

## B. 研究方法

疾患感受性遺伝子のスクリーニング法として全ゲノムを対象としたMSマッピング法を用いる。MSとはゲノム上に散在する数塩基単位の反復配列のことで、その反復回数に多型性（個人差）が存在することが知られている。すなわち、患者群と対照群で各MSマーカーにおける対立遺伝子分布を比較することにより、疾患感受性遺伝子の存在する位置を正確にマッピングすることが可能である。すでに我々は全ゲノムを網羅する多型性豊富なMSマーカー約3万個の収集を完了している。したがって、これらのMSマーカーを用いて、全染色体をゲノムワイドにスクリーニングする。

横浜市立大学、岐阜大学、神戸大学、山梨大学、山口大学、広島大学、熊本大学、東京大学、北海道大学等の医療機関にて厳密なクライテリア（表1）のもとにNTGと診断された患者を対象に、末梢から20mlを採血する。DNA抽出キット（QIAamp DNA Blood Maxi Kit）を用いてゲノムDNAを精製し、MSスクリーニングに用いる。DNA濃度を定量し、各個人のDNA量が均一になるように100~200サンプルを混合・調整してpooled DNAを作成する。pooled DNAを鋳型として23,465個のMSマーカーについてPCRを行う。PCR産物をキャピラリー式蛍光自動シークエンサー（ABI PRISM 3730 DNA Analyzer）で電気泳動し、波形解析後、MSの対立遺伝子分布を決定する。マーカー毎に患者群と健常群の対立遺伝子分布を統計学的に解析し、疾患遺伝子と関連する陽性マーカーを決定する。

本MSマッピングでは、偽陽性を防ぐために3段階（1次~3次pooled DNA）の解析（pooled DNAスクリーニング）を行い、

独立した3集団のすべてにおいて、患者群と健常群の比較で有意差を認めたMSマーカーのみを本病と関連する陽性MSマーカーとする。得られた陽性MSマーカーについて、pooled DNAに使用した全検体を用いた個別タイピング（individual DNAタイピング）による陽性の確認を行い、真の陽性MSマーカーを決定し、疾患感受性領域を絞り込む。

### （倫理面への配慮）

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

## C. 研究結果

本病の疾患感受性遺伝子スクリーニングに必要な患者数は500人程度と推察され、それを目標としている。現在までに総計204の患者サンプルを収集した。総サンプル数は目標数に達していないが、204サンプルの情報を反映するように138サンプルを選択し、一次スクリーニング用pooled DNAを作成した。対照群は患者群と性比を合わせた健常者138人を用いた。これら両群のpooled DNAを用い、22本の常染色体およびX、Yの性染色体に設定した23,465個すべてのMSマーカーについて1次スクリーニングを行った。その結果、約98.5%の23,114個のMSマーカーの波形解析を完了し、約13.5%の3,125個

のMSマーカーがP値0.05未満の陽性を示した(表2、図2)。

#### D. 考察

MSはSNP (single nucleotide polymorphism : 1塩基多型) に比べ遺伝的多型性が豊富で、連鎖不平衡を示す距離もSNPに比べ長い為、より効率的な疾患遺伝子マッピングが可能である。ヒトの全ゲノム塩基配列は3.1 GB (31億塩基対) であり、すでに我々は100 kb (MSの連鎖不平衡の距離) 毎に全ゲノムをカバーする多型性豊富なMSマーカー約3万個 (3.1 GB÷100 kb=3.1万個) の収集を完了している。したがって、まずMSマッピングを用いて効率的にNTG感受性遺伝子の候補領域を100 kb以内まで絞り込み、次にその絞り込まれた領域内でSNP解析を行い、NTGの感受性遺伝子およびNTG特異的な遺伝変異の同定を進めていく予定である。

今回、全染色体を網羅する 23,465 個すべての MS マーカーについて 1 次 pooled DNA スクリーニングが終了し、P 値 0.05 で判定して陽性 MS マーカーは約 13.5% の 3,125 個であった。この中には偽陽性のマーカーが多く含まれていると考えられる。今後、偽陽性のマーカーを除外するため、一次スクリーニングと異なる別の集団 (2 次、3 次 pooled DNA) を用い、一次スクリーニングで陽性を示した 3,125 個のマーカーに対してスクリーニングを行い、陽性 MS マーカーを絞り込む予定である。

#### E. 結論

患者検体の収集は順調に進行している。今回、22 本の常染色体および X、Y の性染色体で一次 MS スクリーニングが終了し、陽性率は約 13.5% であった。今後、二次ス

クリーニングおよび三次スクリーニングを進め、候補遺伝領域を絞り込むことで、多因子疾患である NTG の疾患感受性遺伝子を明らかにしていきたい。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

- 1) Mizuki N, Watanabe Y, Miyamoto M, Iijima Y, **Itoh N**, Nishida T, Iwata S, Endo Y, Itoh D: Flumoxed sodium and levofloxacin concentrations in aqueous humor. *Ocular Immunol Inflamm* 13(2-3): 229-234, 2005.
- 2) Yamaki K, Takiyama N, **Itho N**, Mizuki N, Maehara S, Wakaiki S, Hayakawa K, Kotani T: Experimentally induced Vogt-Koyanagi-Harada disease in two Akita dogs. *Exp Eye Res* 80(2): 273-280, 2005.

#### J. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

1. 名称: 摂食障害の検査用マーカー遺伝子  
発明者: 猪子英俊、白澤専二  
出願日: 2006年7月25日  
出願人: 東海大学  
国内出願番号: 2006-201944
2. 名称: 高血圧症の検査用マーカー遺伝子  
発明者: 猪子英俊、水木信久、岡晃、梅村敏、三木哲郎  
出願日: 2005年9月14日  
出願人: 東海大学、横浜市立大学、愛媛大学  
国内出願番号: 2005-267657

出願人: 東海大学、横浜市立大学、愛媛  
大学

国内出願番号: 2005-267657

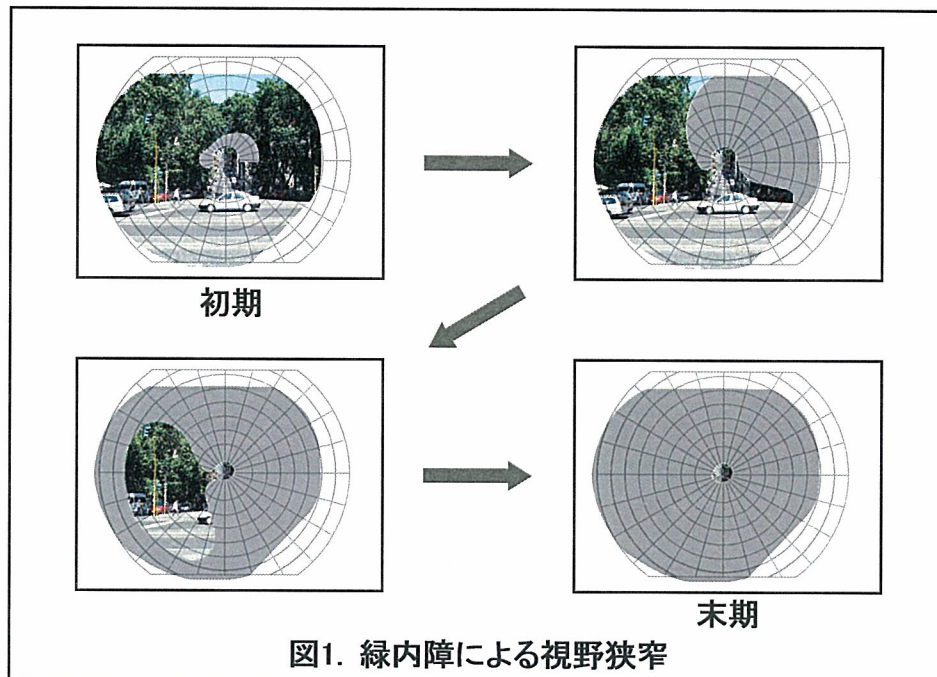


表1. 本研究で採用した正常眼圧緑内障の診断基準

A. Inclusion criteria

1. 眼圧が常に21mmHg以下で、正常外観の隅角所見を有し、少なくとも1眼に緑内障性視神経乳頭変化とそれに対応する視野変化をもつ。
2. 隅角・乳頭所見の評価判定は、各施設の緑内障外来で眼科専門医が行う。
3. 視野評価判定はHumphrey静的視野測定にて、Anderson & Patellaの基準に準じる。すなわち、pattern deviationプロットにおいて、 $P < 5\%$ の感度低下を示す検査点が、最周辺以外の3つ以上の隣接する検査点に存在し、かつ、うち1点が $P < 1\%$ の感度低下を示すとき、緑内障性視野欠損と判断する。ただし、加齢変化による網膜神経節細胞傷害の影響を少なくする目的で、診断時50才まではいかなるstageの視野変化でもよいが、50才以上55才未満であればmean deviationが $-10\text{dB}$ より不良なもの、55才以上60才未満であれば同 $-15\text{dB}$ より不良なものとする。

B. Exclusion criteria

1. 緑内障様視神経乳頭変化を惹起し得る局所的・全身的な疾患を有するものは除外。
2. エントリー時20才未満ないし診断時60才以上。
3. 屈折異常が等価球面で $-8\text{D}$ を超えるもの。

表 2. 正常眼圧緑内障の 1 次スクリーニング結果

	実験数	解析数 (%)	陽性数 (%)	実験数	解析数 (%)	陽性数 (%)	
chr.01	1,895	1,872 (98.8)	243 (13.0)	chr.13	806	794 (98.5)	123 (15.5)
chr.02	2,053	2,014 (98.1)	249 (12.4)	chr.14	709	699 (98.6)	124 (17.7)
chr.03	1,650	1,601 (97.0)	152 (9.5)	chr.15	610	599 (98.2)	91 (15.2)
chr.04	1,554	1,531 (98.5)	215 (14.0)	chr.16	631	623 (98.7)	106 (17.0)
chr.05	1,500	1,486 (99.1)	195 (13.1)	chr.17	626	615 (98.2)	93 (15.1)
chr.06	1,369	1,351 (98.7)	204 (15.1)	chr.18	649	630 (97.1)	94 (14.9)
chr.07	1,370	1,356 (99.0)	206 (15.2)	chr.19	454	450 (99.1)	55 (12.2)
chr.08	1,103	1,090 (98.8)	159 (14.6)	chr.20	501	500 (99.8)	66 (13.2)
chr.09	956	947 (99.1)	138 (14.6)	chr.21	296	293 (99.0)	52 (17.7)
chr.10	1,097	1,083 (98.7)	136 (12.6)	chr.22	251	248 (98.8)	40 (16.1)
chr.11	1,076	1,048 (97.4)	135 (12.9)	chr.X	1,105	1,093 (98.9)	100 (9.1)
chr.12	1,128	1,117 (99.0)	148 (13.2)	chr.Y	76	74 (97.4)	1 (1.3)
				total	23,465	23,114 (98.5)	3,125 (13.5)

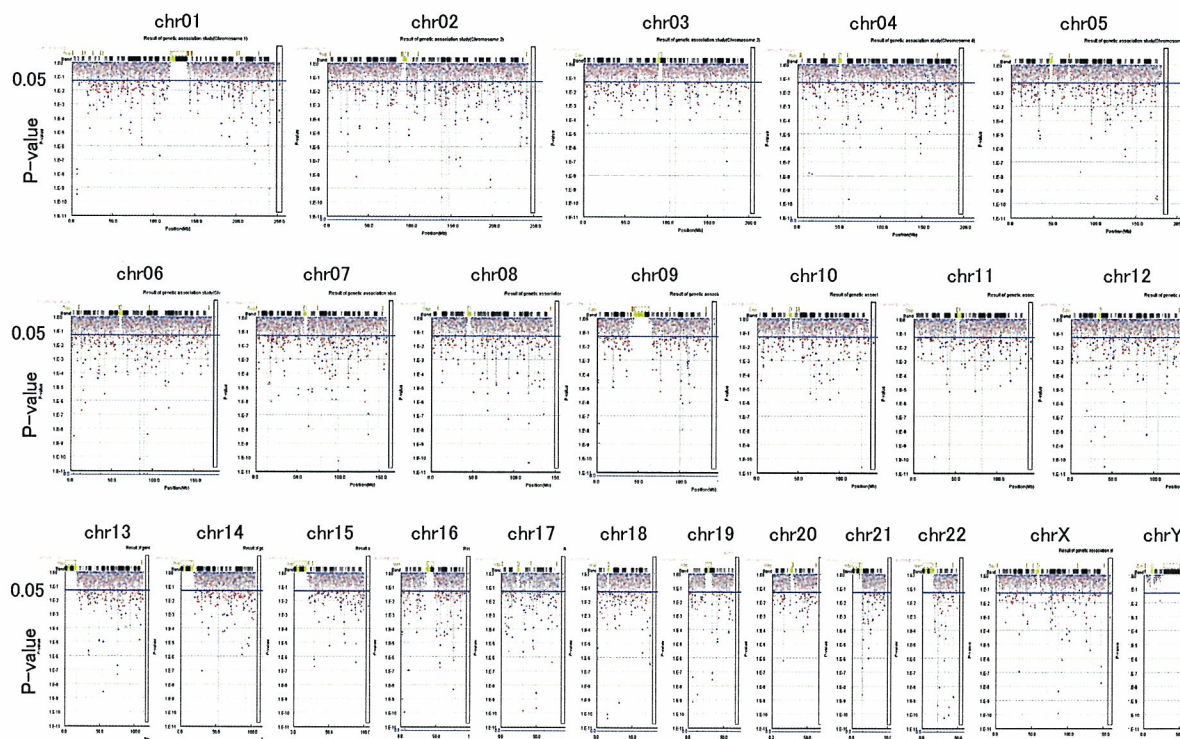


図2. 1次スクリーニングで得られた陽性マイクロサテライトマーカーの染色体上分布.

横軸は染色体上のマイクロサテライトマーカーの位置を示す. 縦軸は患者群と健常群でのマイクロサテライトの対立遺伝子分布の有意差検定の値(P値)を示している. 太い横線がP値0.05を示し、それより下がP値0.05未満である. マイクロサテライトマーカーを黒丸で示した.

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

DNAチップによる正常眼圧緑内障感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

分担研究者 西出忠之 横浜市立大学医学部眼科学 助手

研究要旨 緑内障は遺伝的多型のある多くの危険因子（疾患感受性遺伝子）が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられている。現在、緑内障の疾患感受性遺伝子としてMIOC遺伝子、OPA1遺伝子、OPTN遺伝子などが報告されているが、いずれの遺伝子も緑内障患者の数%にしか見られず、日本人においてはほとんど相関を示さない。すなわち、現時点では緑内障感受性遺伝子の有力な候補遺伝子は同定されていない。本研究では日本人に多い正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子を同定するために、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて疾患感受性遺伝子の全ゲノム網羅的な解析を行っている。

A. 研究目的

緑内障とは正常視機能を維持できる健常眼圧以上の眼圧上昇のために、視神経に傷害を来す進行性の難治性疾患である。放置すると視野狭窄が進行し、失明することのある疾患で、本邦の失明原因の第2位を占めている。緑内障全体では40歳以上の罹患率は5.78%であり、全国の潜在患者総数は200万人以上ともいわれる。緑内障には色々な病型があるが、なかでも眼圧が正常範囲にあるにも関わらず視神経傷害、視野狭窄が進行してしまう正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）は特に日本人に多く、その頻度は40歳以上の約4%と考えられている（2002年多治見スタディ）。NTGは眼圧が正常範囲にあるため、眼圧検査では発見することが困難であり、健康診断や通常の眼科検査では見落とされがちである。また、一度傷ついた視神経は回復することがないため、NTGにおいては早期発見・早期治療が大変大切であるが、NTGは徐々

に進行するため自覚症状に乏しく、本人も気づかないうちに視神経傷害（視野狭窄）が進行していることも少なくない。

NTGは多くの遺伝要因が多数重なることにより発症の危険度が増大する多因子疾患であると考えられている。NTGの疾患感受性遺伝子を同定し、それをもとに迅速遺伝子診断キットを開発することで、NTGの早期発見については早期診断に繋がることが期待される。現在までにNTGを含む緑内障の疾患感受性遺伝子としてMYOC遺伝子、OPA1遺伝子やOPTN遺伝子などが報告されているが、いずれも緑内障患者の数%にしか見られず、日本人においてはほとんど相関を示さない。したがって、私達はNTGの疾患感受性遺伝子を同定するため、Affymetrix社の500k Gene Chipを用いて、50万以上のSNPをハイスループットに一度に解析を行うことで、全ゲノムを網羅的にスクリーニングしている。本稿ではその中間報告をする。

B. 研究方法



①疾患感受性遺伝子のスクリーニング法としてAffymetrix社Gene ChipのHuman Mapping 500k Array set (図1) を用いたSNP解析を行った。Gene ChipのMapping 500k Array setは2枚の高密度オリゴヌクレオチドアレイ(250k Array)からなり、各アレイは平均25万SNPをジェノタイピングすることが可能である。Mapping 500k setの全てのSNPは厳密なスクリーニングと評価実験を受けている。1度の実験で50万以上のSNPのジェノタイピングを行えることから、全ゲノムの網羅的な解析ツールとして有用である。

横浜市立大学附属病院眼科ほか共同研究医療機関において年齢、眼圧、屈折異常など厳密なクライテリアを満たしたNTG患者サンプルを収集した。QIAamp DNA Blood Maxi Kitを用いてDNAを抽出した。DNAチップの解析方法はAffymetrix社のプロトコールの準拠して行った(図2)。まず、PicoGreen定量キット(PicoGreen ds DNA Quantification Reagent and Kit 200-2000 assay)を用いてDNA濃度を定量し、各サンプルのDNA濃度が250/50 $\mu$ lになるように調製した。その後、全ゲノムを制限酵素で切断し、4塩基の特異的突出末端を認識するアダプターをライゲーションした。アダプターを付加したDNA断片をPCRで増幅し、フラグメント化して標識した後、Mapping 250k Arrayにハイブリダイゼーションさせた。蛍光で染色し、レーザースキャナーで各プローブの蛍光強度から各SNPの対立遺伝子をDirect Model (DM) Algorithm (DMアルゴリズム)

(図3) を用いて解析を行った。得られた結果からSNPごとに患者群と健常群の対立遺伝子分布を統計学的に解析し、疾患と関連する遺伝子の決定を行う。実験精度とコンタミネーションの評価はmodified partitioning

aroundmethods (MPAM) algorithm (MPAMアルゴリズム)(図4)にて行った。

②50万SNP (500 k DNAチップ)解析用のデータベースを作成する。SNP解析のソフトにはHaploviewを使用する予定である。Gene Chipの解析ソフトであるGTTYPEのアウトプットファイルを解析するためには、必要なフォーマットにデータを変換する必要があるが、全てのSNPデータが1行に出力されてしまうため、500 kアレイでは1検体につき、1行50万列のデータとなる。染色体ごとに分けても膨大な数になり、染色体レベルよりさらに詳細な設定はできないため、大規模なデータベース化が必要になる。しかし、データが膨大であり、従来のデータベースでは扱えないサイズになる。そこで、今回の実験に際し、ゲノムワイドな大規模SNPタイピングデータに対して患者と健常者の関連解析を行うことを目的とし、データ登録・管理・統計解析・検索・抽出が可能な新しいSNP解析用のデータベースを構築・導入する。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

## C. 研究結果

①現在までに収集された正常眼圧緑内障患者サンプル204検体のうち、146検体においてAffymetrix社Gene Chip 500kアレイを用いての解析を終了した。Gene Chipのデータは解析ソフトで

あるGTYPEを用いてDMアルゴリズムによって解析したところ、Mapping 500k Array setの SNPの call rate（解析が適切に行われたSNPの割合）はNsp Iのアレイ（24万SNP解析）で平均94.00%、Sty Iのアレイ（26万SNP解析）で平均96.13%であった（図5）。各アレイにおいてSNP call rateが94%以上、両アレイ平均で95%以上の良好な精度を示した。

MPAMアルゴリズムによる評価で、MCR（MPAM Call Rate）はNsp Iのアレイでは91.75%、Sty Iのアレイでは94.18%であり、MDR（MPAM Detection Rate）は Nsp Iのアレイでは97.51%、Sty Iのアレイでは98.92%であった（図5）。

また、本相関解析における対照群である健康者検体のSNPタイピングデータは東京大学の福永先生の研究室で実験されたGene Chip 500kのデータを使用させて頂き、患者群と対照群の相関解析を行う予定である。

②統計学的解析に用いるデータベースは従来のデータベースを大規模SNPタイピングに使用できるように改変・作成している。当研究室で現在SNP解析に使用しているデータベースはTaqman<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay用であり、統計計算とHardy-Weinberg検定が可能なものである。現在稼働中のデータベース管理システムに準じ、(i)Gene Chip 250kおよび500kのSNPタイピング出力ファイル（Textファイル）をデータベース入力用ファイルとしてデータ入力できること、(ii)GTYPEで使用されているSNP IDとrs番号・位置情報・近傍の遺伝子情報・人種別既知アレル情報（Hapmap）との対応が管理できること、(iii)Haploview他、各種解析ソフトの入力用テキストフォーマットを任意に指定して出力ファイルとして得られることなど、新しい機能を付加し、登録デ

ータや解析結果の検索・ソート・抽出表示が可能なデータベースを現在作成中である。

#### D. 考察

SNP(single nucleotide polymorphism : 1 塩基多型)は1個の塩基が他の塩基に置き換わっている違い（多型）である。ヒトの全ゲノム中には300万から1000万ものSNPが存在することが示唆され、近年では疾患とSNPとの関連性が注目されている。すなわち、患者群と対照群で各SNPにおける対立遺伝子頻度を比較することによって、全ゲノムを対象とした網羅的な疾患感受性遺伝子の探索が可能である。Gene Chip Mapping 500k Array setは、全てのSNPで厳密なスクリーニングおよび評価実験を経て3つの人種集団におけるゲノム全体の連鎖不均衡解析に基づいてアレイ上にプロットされている。SNP間の物理的距離の中央値は2.5kb、平均距離は5.8kbであり、ヒトの全ゲノムの85%で10kb以内に1つのSNPを含んでいることになる。これらのSNPの平均ヘテロ接合度は0.29である。

今回、私達は、NTG患者146検体において、この高精度のDNAチップを用いて、全ゲノムに散在する50万個のSNPを網羅的に解析した。DMアルゴリズムにおけるSNPのcall rateは各アレイで94%以上、両アレイ全体で95%以上と良好な結果が得られた。また、実験精度やサンプルのコンタミネーションを評価するMPAMアルゴリズムでは、MCRは各アレイともに91%以上であった。MCRはMPAMによってSNP callがついた割合を示すため、本実験の精度は高く、信頼できる結果と考えられた。また、MPAMアルゴリズムによるMDRの評価では、各アレイともに97%以上であった。MDRはMPAMによってスポットが検出できた割合を示し、MCRが低く、MDRも低いと実験手技のミスを示し、MCRが低く、MDRが高い



とサンプルのコンタミネーションを示す(図4)。今回、MCR も高く、MDR も高かったため、本実験の解析精度は高く、実験手技のミスやサンプルのコンタミネーションもないと考えられた。

本 DNA チップでは、各検体で 50 万 SNP の情報が得られるため、情報量は膨大である。GTYPE で使用されている各 SNP の ID と DNA データバンクの rs 番号を対応させなくてはならない。また、SNP の位置情報、近傍の遺伝子情報、人種別既知アレル情報 (Hapmap) などとも対応させて管理しなくてはならない。その上で、Haploview 他、各種解析ソフトの入力用テキストフォーマットを任意に指定して出力ファイルとして得られる必要がある。しかし、DNA チップの製造元の affymetrix 社ではそのようなデータベースは作成しておらず、個々の研究者に任されている。したがって、私達は Applied Biosystems 社と連携して、独自の 50 万 SNP 解析用のデータベースの構築を行っており、今年度中には完成する予定である。

健常者のデータに関しては、コスト面から考えて、今回他の施設から提供を受けることにした。NTG 検体数が目標 (300 検体) に達した際に、健常者のデータとあわせて、統計学的な相関解析を行い、NTG の疾患感受性遺伝子を同定

していきたい。

#### E. 結論

今回、NTG 患者 146 検体において Affymetrix 社の高精度の DNA チップ、GeneChip® mapping 500k を用いて、全ゲノムを網羅的に解析し、良好な結果が得られた。今後、更に検体数を増やしてタイピングを行っていく予定である。また、データベースが

完成次第、対照群と患者群の相関解析を行い、多因子疾患と考えられる NTG の有力な疾患感受性遺伝子を同定していきたい。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

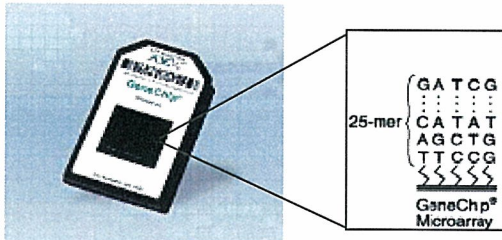
- 1) 西出忠之、加藤陽子、水木信久：水晶体温存硝子体手術における術後水晶体調節力. 臨床眼科 60(9) :1633-1635, 2006

#### K. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

# 〔図1〕 DNAチップ (GeneChip® Mapping 500K)

1検体につき2アレイで50万SNPを1種類のプライマーでジェノタイピングが可能



1.28cm四方に650万のプローブセルが含まれる

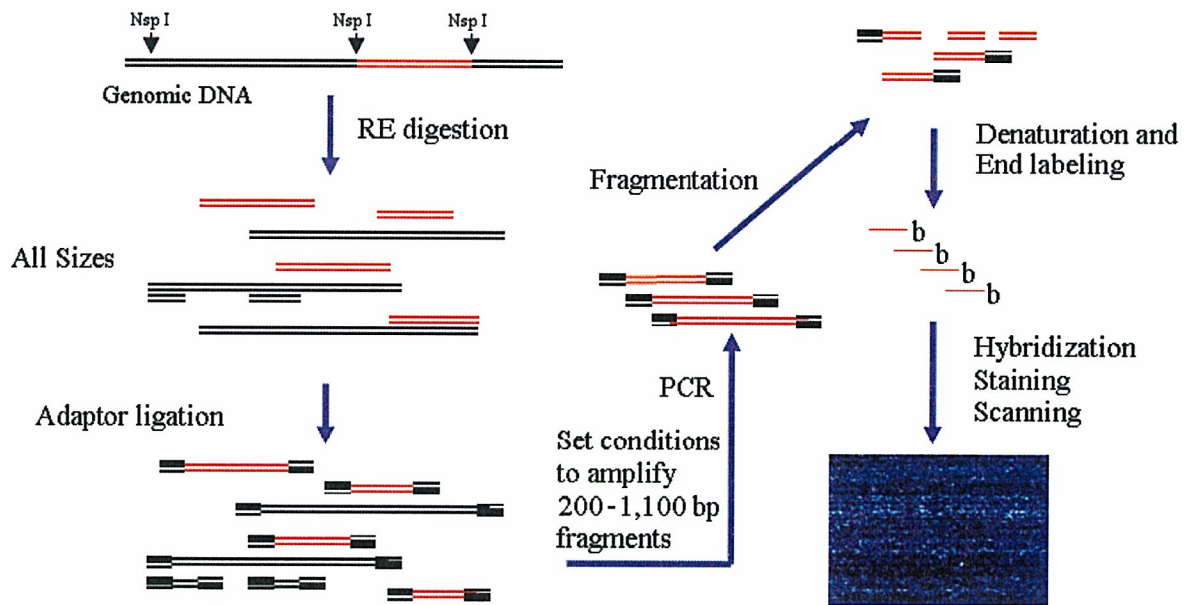
SNPあたり4組または10組のプローブセル

それぞれ各アレルのパーフェクトマッチ プローブとミスマッチプローブの4種類

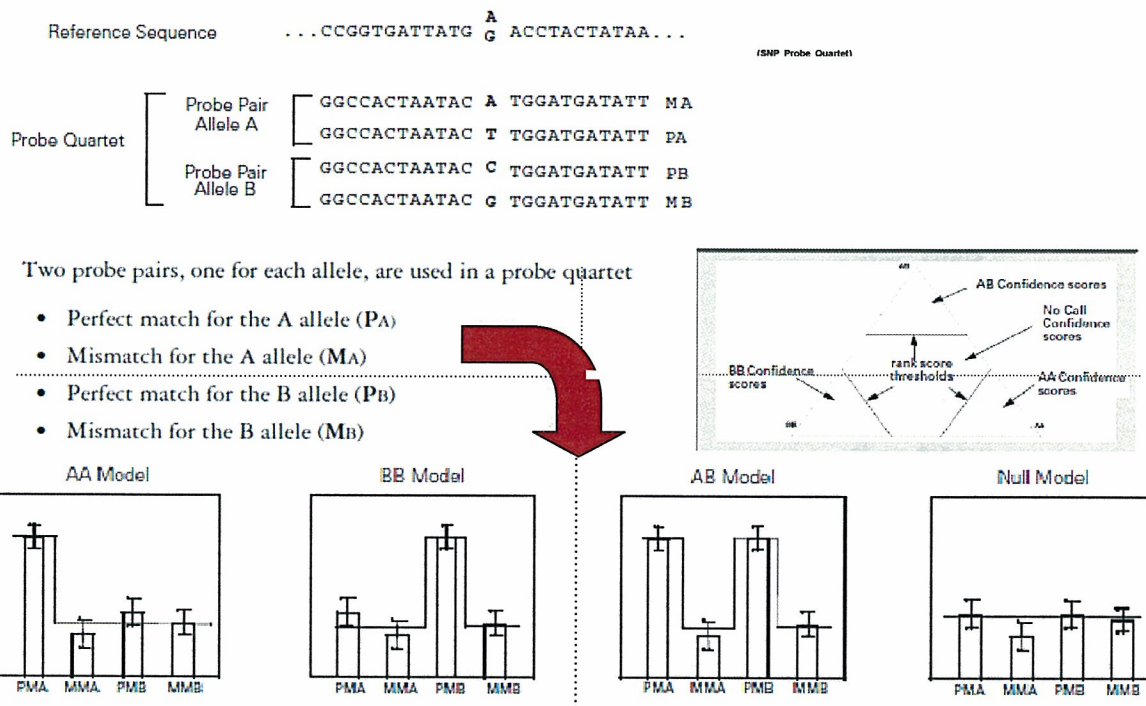


1SNPあたり24または40種類のプローブで検出される

## 〔図2〕 DNAチップ解析のプロセス

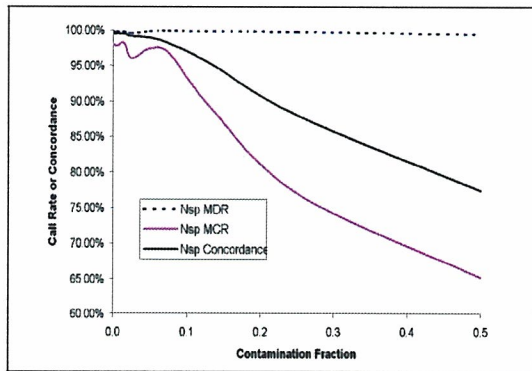


### 〔図3〕 DM (Dynamic Model) Algorithm



各プローブのパーフェクトマッチとミスマッチの蛍光強度の波形よりホモ・ヘテロの判

### 〔図4〕 MPAM (modified partitioning around methods) algorithm → 実験精度およびコンタミネーションの評価



MPAM (modified partitioning around methods) algorithmによって得られた

- MCR(MPAM Call Rate)
- MDR(MPAM Detection Rate)

が実験の精度やサンプルのコンタミの



**MCR(MPAM Call Rate)**

→MPAMによってSNP callがついた割合

**MDR(MPAM Detection Rate)**

→MPAMによってスポットが検出できた割合

MCR(SNP callがつく割合)が低い場合

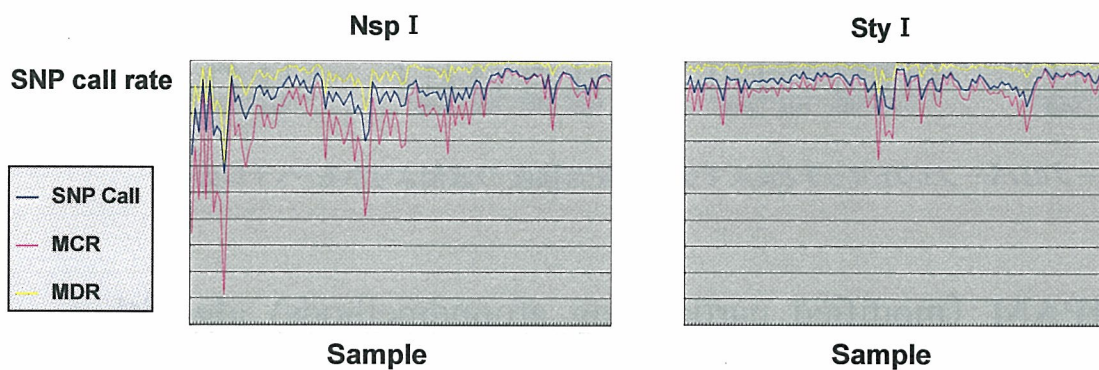
•MDRも低い → 実験手技的ミス

〔図5〕 全ゲノム網羅的なDNAチップ

解析におけるSNP call, MCR, MD

R

General results from the 500K	Nsp I	Sty I
<b>SNP chip (%)</b>		
SNP call	94.00	96.13
MCR	91.75	94.18
MDR	97.51	98.92
<b>Genotype</b>		
AA call	39.84	39.44
AB call	22.33	23.00
BB call	37.83	37.56



## NTGクライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

分担研究者 遠藤要子 横浜市立大学医学部眼科学 助手

研究要旨 正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）は多因子疾患であり、その発症にはさまざまな要因が関与している。したがって、NTGの疾患感受性遺伝子スクリーニングにおいて、統計学的検出感度を上げるためには、NTGをより純粋な単一疾患に絞り込む必要がある。そのために、まず本研究プロジェクトでは通常のNTG診断基準（クライテリア）よりもさらに厳格なクライテリアを作成して検体収集を行った。現在、この厳しいクライテリアを満たした204検体を全国の共同施設より収集した。また、マイクロサテライトおよびSNPの解析精度を高めるためには精製度の高い完全長ゲノムDNAが必要であり、ゲノムの断片化を抑制するために採血から抽出までの保存・輸送方法を検討した。その結果、採血後4℃であれば10日までゲノムDNAの断片化はほとんど起こらず、採血後速やかに-20℃で凍結した場合にはゲノムDNAの断片化は完全に抑制されることが分かった。さらに、抽出したDNA100-150検体をそれぞれを均一の濃度で混合するpooled DNA法のプロセスを再検討し、検体間の濃度誤差が極めて少ない新しいpooled DNA調整法を確立した。

### A. 研究目的

#### 正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）

は眼圧が正常範囲にあるにも関わらず、視神経が進行性に傷害される疾患である。NTGの発症にはさまざまな要因が関与していることが唆されているが、異なった要因により発症する疾患を、表現型（視神経障害とそれに対応した視野狭窄）が同じということで、同一のNTGという単一疾患で括することは本病の病態解明を困難にしているといえる。相関解析では疾患群、健常群それぞれ400を超える検体が必要となる。また、疾患感受性遺伝子スクリーニングにおける統計学的検出感度を高めるためには、疾患をより純粋な単一疾患に絞り込む必要がある。そこで、本研究では、日本緑内障学会・データ解析委員会の助力を得て、まず通常のNTG診断基準（クライテリ

ア）よりもさらに厳格なNTGの診断基準を作成した。

ゲノム解析では解析の精度を高めるために質の高いゲノムDNAが必要となる。DNAとしての純度が高いことも重要であるが、DNA総量あたりに占める断片化していない完全長DNAの割合が高いことも重要である。DNAが断片化されないためには採血後各施設で速やかにDNA抽出を行うことが理想であるが、全施設に設備と技術を導入することは予算的にも技術的にも困難である。週に数件の採血に対して、その都度少数の検体からDNA抽出を行うことは非効率である。また、本研究ではハイスループット化のために各検体のDNA濃度を均一にして混合したpooled DNAを用いているが、個々の検体からすべて同程度に高精度のDNAを再現性を維持して抽出するためには、一施設でまとめて行うこ



とが最適と考えられる。したがって、本研究プロジェクトでは全検体を当教室（横浜市立大学医学部眼科学教室）に集約してDNAを抽出することにし、そのための輸送、保存方法を検討した。

Pooled DNAの調整について、これまでの従来法では各検体の濃度を測定し、その濃度に基づいて各検体の混合する容量（ボリューム）を決定していたため、誤差が大きく出てしまう危険性があった。今回、あらかじめ各検体の濃度を一定に揃えてから各検体から等量を取り混合するという新しい方法（濃度均一化後のpooled DNA調整法）を検討した。

## B. 研究方法

4月開催の日本眼科学会、および10月開催の日本臨床眼科学会で会合を開催し、本研究で対象とするNTGの診断基準を検討した。検体収集開始後も、随時診断基準を見直す機会を作った。各患者はスコアシートにより詳細な情報が管理されているため、クライテリアの見直しの際に除外される検体も生じる。検討は随時継続し、NTGクライテリアの確立と検体の収集を実施した。

高品質ゲノムDNAを確保するシステムの開発に関しては以下の方法で検証を行った。ACD (acid citrate dextrose) 管で採血された血液は採血管ごと室温、4℃でそれぞれ1から10日間静置後、DNAを抽出、電気泳動でDNAの断片化を確認した。また採血された全血を採血管のまま-20℃で凍結、10日後DNAを抽出、DNAの断片化を電気泳動で確認した（図1）。

Pooled DNAの調整について、これまでの従来法では、1つの検体について、濃度が違うサンプルを3回濃度測定して、その平均値をその検体の濃度として等量のDNAが含まれるように、各検体から異なる体積（容量：ボリューム）を取り混合していた（図2）。これではマイクロピペットの体積を合わせる手間がかかり、また、異なる体積を取ることに

よるボリューム誤差のばらつきが大きくなってしまいうという危険性があった（ピペットの種類、また同じピペットでもセットするボリュームによって誤差の範囲が変化するため）。今回、最初に各検体の濃度を測定し、それを基に各検体を希釈し濃度を一定に揃えてから、各検体から等量を取り混合する濃度均一化後のpooled DNA調整法（図3）を試行し、従来法と比較した。

## （倫理面への配慮）

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報 は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

## C. 研究結果

### 1. NTG クライテリアの確立と検体の収集

当初の案を下地に、下記NTG診断基準を定め、204検体の収集を行った（表1）。

- ①眼圧が常に21mmHg以下で、正常外観の隅角所見を有し、少なくとも1眼に緑内障性視神経乳頭変化とそれに対応する視野変化をもつ。
- ②視野評価判定はHumphrey静的視野測定にて、Anderson & Patellaの基準に準じP<5%の感度低下を示す検査点が、最周辺以外の3つ以上の隣接する検査点に存在し、かつ、うち1点がP<1%の感度低下を示す。
- ③診断時50才まではいかなるstageの視野変化でもよいが、50才以上55才未満であればmean deviationが-10dBより不良なもの。
- ④除外基準：(i)緑内障様視神経乳頭変化を惹起し得る局所的・全身的な疾患を有するもの、



(ii) エントリー時20歳未満ないし診断時60才以上。

(iii) 屈折異常が等価球面で-8Dを超えるもの。

これらの厳しい診断基準を満たすNTG検体を全国から収集し、現在までに204検体を収集している(表2)。

## 2. 高品質ゲノムDNAを確保するシステムの確立

室温で静置されていた血液から抽出されたDNAでは静置日数の増加に比例したゲノムDNAの断片化がみられた。また、4°Cで静置されていた血液から抽出されたDNAでは同様の断片化は10日間を経過してもほとんどみられず、本実験系に影響を与えることはないと考えられた(図4)。また一方、-20°Cで静置されていた血液から抽出されたDNAでは全くDNAの断片化がみられなかった(図5)。

## 3. Pooled DNAの新しい調整法(濃度均一化後のpooled DNA調整法)

従来の方法によるpooled DNA調整法と今回新しく試みた濃度均一化後のpooled DNA調整法を比較した結果を図6に示す。従来法では最大で約9倍の濃度差があった検体が、今回の新しい方法により±7%以内に収まった。

## D. 考察

NTGは多因子疾患であり、その発症にはさまざまな要因が関与していることが示唆されている。しかし、異なった要因により発症する疾患を、表現型(視神経障害とそれに対応した視野狭窄)が同じということで、同一のNTGという単一疾患で括ることは本病の病態解明を困難にしているといえる。日本緑内障学会「緑内障診療ガイドライン」によるとNTGは「原発開放隅角緑内障(広義)のうち、眼圧が常に統計学的に決定された正常値に留まるサブタイプ」と定義されている。しかし、このガイドラインではNTGは病因(発症要因)の異なる多くの疾患

を包括的に含んでいる総称としての疾患名である可能性がある。したがって、私達はこの中でも特に遺伝的要因が強く関与しているNTGのみを抽出してその疾患感受性遺伝子を同定することを目的とした。そのために、このような通常のNTGの診断基準よりも数段厳しい診断基準を課して、NTGをより純粋な単一疾患に絞り込む努力をした。すなわち、私達が本研究で用いている検体は、老化による影響を除いた早期発症型、早期重症型の遺伝的要因の強いNTGであり、ガイドラインで診断されるNTGの一部分である。しかし、疾患感受性遺伝子スクリーニングにおける統計学的検出感度を高めるためには、疾患をより純粋な単一疾患に絞り込む必要があり、このような厳しいクライテリアを課したNTG検体のみを用いた。現在このクライテリアを満たすNTG検体を全国から204検体収集している。今後、診断基準を緩めることなく、検体収集ネットワークに参画されている各大学を中心に、サテライトの収集施設の増加を検討して、さらに検体数を増やしていきたい。

また、今回のDNAの断片化の実験では4°Cでは10日間保存してもDNAの断片化はほとんど問題にならず、-20°Cでは全くDNAの断片化は起こらなかった。したがって、これらの結果を踏まえた検体保存、輸送システムを構築した。すなわち、各施設において、月曜日から金曜日までに採血した検体は、4°Cに保存し、その週の金曜日にまとめてクール宅急便(4°C)にて横浜市大眼科学教室に輸送し、翌週の月曜日朝に到着することにした。このシステムでは前の週の月曜日～金曜日に採血した検体が翌週の月曜日には当教室のラボに到着することになり、一番遅くとも4°Cで1週間の保存期間である。このため、DNAの断片化はほとんど起こらず、本研究の遺伝子スクリーニングに影響を及ぼすことはないと考えられた。この収集システムの構築で、再現性を維持して質の高いDNAを抽出することが可能になったことに加え、各施設で抽出するために生じる労

力と予算を大幅に削減することができた。

Pooled DNAの調整法では、今回、あらかじめ濃度を均一化してから、各検体を等量混合する新しい方法を試行した。この新しい方法では、各検体の濃度を正確に測定後、それに基づいて各検体を希釈し、あらかじめ各検体の濃度を一定に揃えてから（濃度均一化後）、各検体から同体積（等量）のサンプルを取り混合する。濃度を揃えるときも、ピペットの目盛りを固定して、その組み合わせで濃度が均一になるような組み合わせを選んだ。大した改善ではないように思えるが、DNA量を均一化するために、異なった濃度の検体から異なった体積（容量）を取って混合する従来のpooled DNA調整法よりも遥かに濃度誤差のばらつきの少ない優れた結果が得られた。この方法により、検体間の濃度誤差が極めて少ない新しいpooled DNA調整法を確立でき、遺伝子スクリーニングの精度がかなり上昇することが期待される。現在、この新しい方法で調整したpooled DNAを用いてNTGのマイクロサテライトスクリーニングを施行しており、以前より綺麗な波形が得られている。現に私達は本pooled DNA調整法を用いたNTGの第一次MS（マイクロサテライト）スクリーニングを終了しており、陽性率は13.5%と良好であった。

## E. 結論

NTGのクライテリアを厳しく定め、NTGを疾患として純粋な単一疾患に絞り込む努力をした。このことにより、遺伝子スクリーニングの統計学的検出感度が上昇することが期待される。また、全国規模で行われている検体の保存、輸送の条件を設定し、質の高い検体収集ネットワークを構築した。また、濃度均一化後の新しいPooled DNA調整法を確立し、遺伝子スクリーニングの精度を向上した。

## F. 健康危機情報（総括研究報告書に記載）

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mizuki N, Watanabe Y, Miyamoto M, Iijima Y, Itoh N, Nishida T, Iwata S, Endo Y, Itoh D. Flumoxed sodium and levofloxacin concentrations in aqueous humor. *Ocular Immunol Inflamm* 2005;13:229-234.
- 2) 遠藤要子. 正常眼圧緑内障患者の眼圧日内変動と血圧の関係. *横浜医学* 2005;56:161-165.
- 3) 遠藤要子, 伊藤典彦, 杉田美由紀, 門之園一明, 水木信久, 奥沢幸雄. ニプラジロール点眼による傍中心窩毛細血管血流速度の増加. 第7回オプサルモニューロプロテクション研究会会誌 2004:33-38.
- 4) 門之園一明, 遠藤要子. フルオレセイン眼底造影法、SLO-Rodenstock. *NEWMOOK 眼科*第7巻 眼循環 2004: 140-144.
- 5) 樋口亮太郎, 遠藤要子, 岩田慎子, 杉田美由紀, 水木信久. 眼虚血症候群による血管新生緑内障の検討. *臨床眼科* 2004;58:1457-1461.
- 6) 岩田慎子, 遠藤要子, 齊藤秀典, 栗田正幸, 杉田美由紀, 磯部裕, 岡田和四郎, 北村紀子, 益原奈美, 椎野めぐみ, 堀まどか, 水木信久. 正常眼圧緑内障に対するラタノプロストの眼圧下降効果. *あたらしい眼科* 2003;20:709-711.

### 2. 学会発表

- 1) 遠藤要子, 伊藤典彦, 小熊亜弥, 木村綾子, 伊藤亜紀子, 柴木尚子, 門之園一明, 杉田美由紀, 水木信久: カリジノゲナーゼ内服による傍中心窩毛細血管血流速度の変化. 第110回日本眼科学会 2006.4 大阪
- 2) 遠藤要子, 伊藤典彦, 神尾美香子, 永野葵, 柴木尚子, 飯島康仁, 伊藤竜太, 小熊亜弥, 佐々木英, 後藤さや香, 門之園一明, 杉田美由紀, 水木信久: ラタノプロスト点眼による傍中心窩毛細血管血流速度の変化. 第60回臨床眼科学会 2006.10 京都
- 3) 柞山健一, 竹内聡, 三上武則, 遠藤要子, 伊藤典彦, 石原麻美, 中村聡, 林清文, 水木信久, 矢吹和朗, 佐藤真美, 野村英一, 栗田正幸: 若年で発症し5年の間隔をあけ撩眼に発症したと考えられた単純

ヘルペスウイルスによる急性網膜壊死. 第60回臨床眼科学会 2006.10 京都

- 4) 翁長正樹, 蓮見由紀子, 永野葵, 三上武則, 竹内聡, 西出忠之, 遠藤要子, 飯島康仁, 伊藤典彦, 石原麻美, 中村聡, 林清文, 水木信久: 若年発症の帯状疱疹ウイルスによる急性網膜壊死. 第60回臨床眼科学会 2006.10 京都
- 5) 永野葵, 遠藤要子, 柴木尚子, 加藤陽子, 水木信久, 杉田美由紀, 栗田正幸, 堀まどか, 樋口遼太郎, 呉竹容子, 磯部和美, 益原奈美: 未治療緑内障例へのラタノプロスト投与の長期成績. 第60回臨床眼科学会 2006.10 京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表1. 本研究で採用した正常眼圧緑内障の診断基準

---

A. Inclusion criteria

1. 眼圧が常に21mmHg以下で、正常外観の隅角所見を有し、少なくとも1眼に緑内障性視神経乳頭変化とそれに対応する視野変化をもつ。
2. 隅角・乳頭所見の評価判定は、各施設の緑内障外来で眼科専門医が行う。
3. 視野評価判定はHumphrey静的視野測定にて、Anderson & Patellaの基準に準じる。すなわち、pattern deviationプロットにおいて、 $P < 5\%$ の感度低下を示す検査点が、最周辺以外の3つ以上の隣接する検査点に存在し、かつ、うち1点が $P < 1\%$ の感度低下を示すとき、緑内障性視野欠損と判断する。ただし、加齢変化による網膜神経節細胞傷害の影響を少なくする目的で、診断時50才まではいかなるstageの視野変化でもよいが、50才以上55才未満であればmean deviationが $-10\text{dB}$ より不良なもの、55才以上60才未満であれば同 $-15\text{dB}$ より不良なものとする。

B. Exclusion criteria

1. 緑内障様視神経乳頭変化を惹起し得る局所的・全身的な疾患を有するものは除外。
  2. エントリー時20才未満ないし診断時60才以上。
  3. 屈折異常が等価球面で $-8\text{D}$ を超えるもの。
-

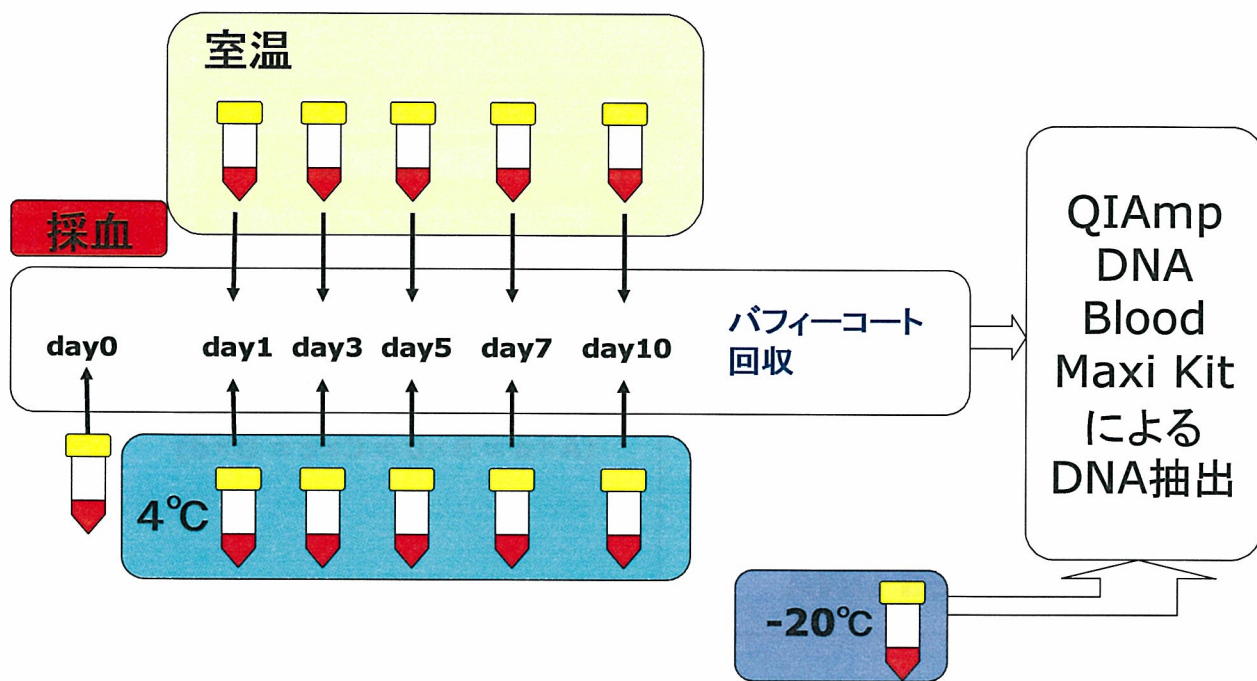


図1 血液中のゲノムDNAの切断時期確認実験

表2 NTG検体収集状況

施設名	検体数
横浜市大	13
神戸大	30
山梨大	54
熊本大	6
山口大	8
岐阜大	75
広島大	6
合計	192

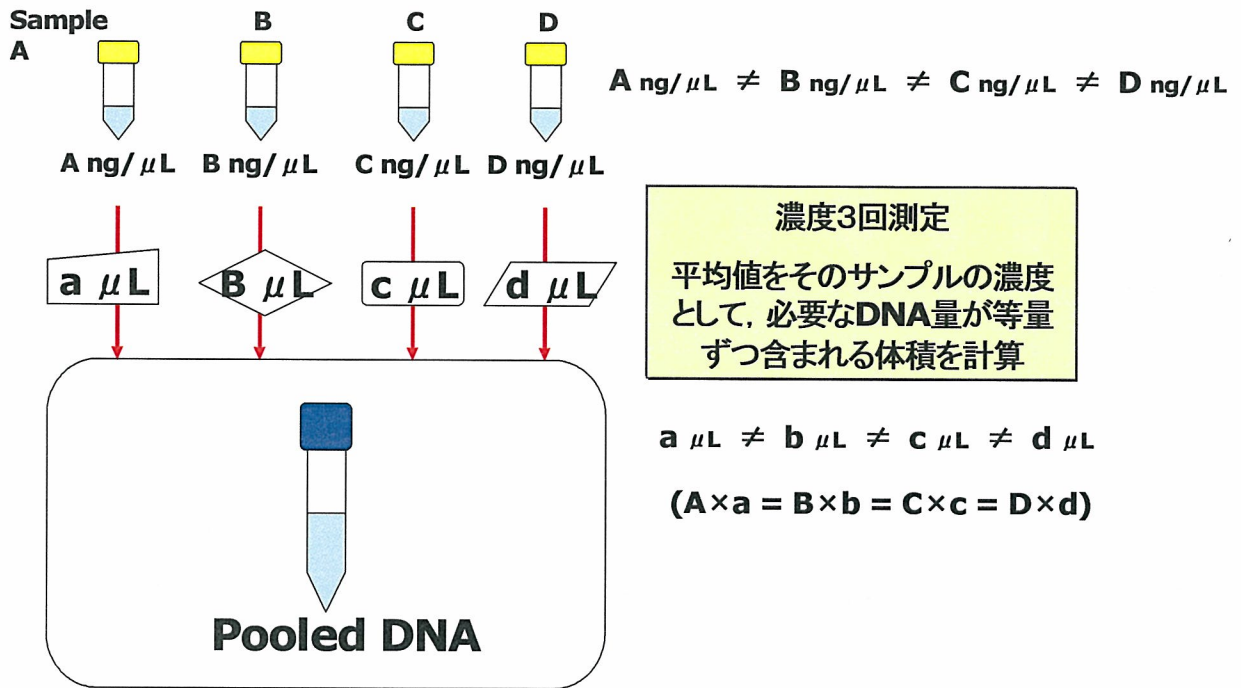


図2 従来のpooled DNA調整法

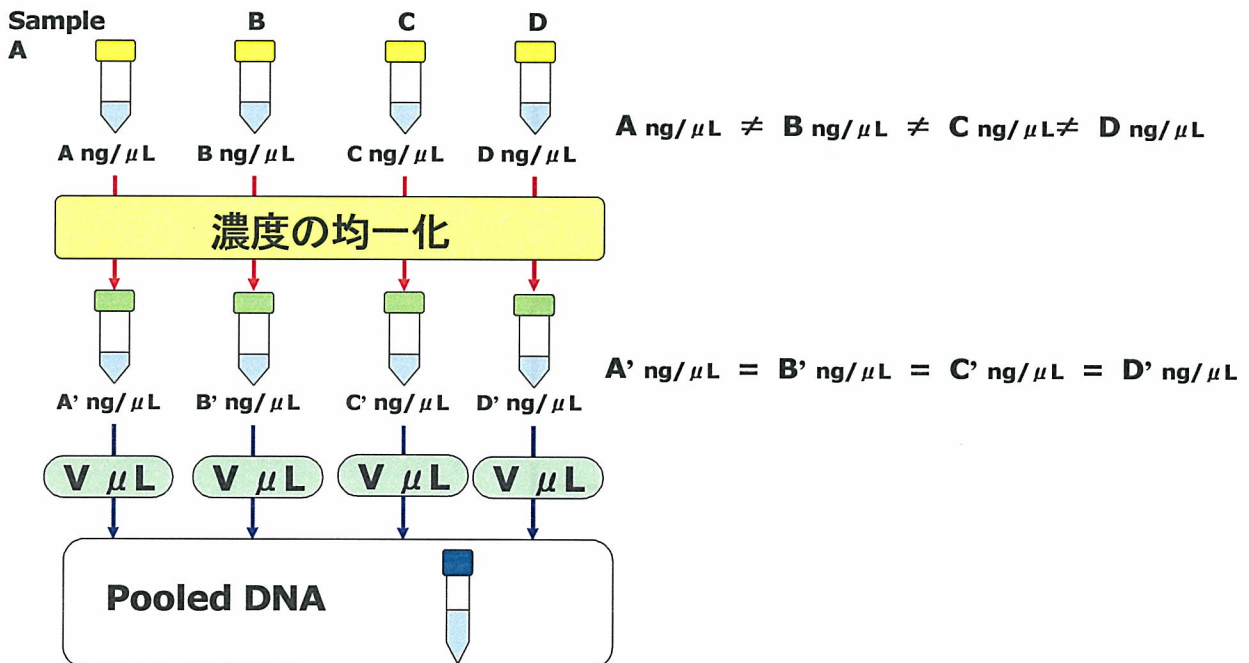


図3 濃度均一化後のpooled DNA調整法