

201024239A

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

小眼球による視覚障害の原因を特定するための  
疫学調査と診断・治療基準の創成

平成22年度 総括・分担報告書

平成23年(2011年)3月

研究代表者 仁科 幸子  
(国立成育医療研究センター眼科医員)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

小眼球による視覚障害の原因を特定するための  
疫学調査と診断・治療基準の創成

(課題番号H22-難治-一般-184)

平成22年度 総括・分担報告書

平成23年(2011年)3月

研究代表者 仁科 幸子  
(国立成育医療研究センター眼科医員)

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- 小眼球による視覚障害の原因を特定するための疫学調査と診断・治療基準の創成  
仁科 幸子 国立成育医療研究センター 眼科 1

### II. 分担研究報告書

1. 小眼球症に関する全国調査、義眼の実態調査、小眼球症の形態・機能及び画像評価  
仁科 幸子 国立成育医療研究センター 眼科 6  
東 範行 国立成育医療研究センター 眼科  
小林 百合 国立成育医療研究センター 眼科
2. 小眼球の原因究明：網羅的な遺伝子解析に向けた取り組み  
近藤 寛之 産業医科大学 眼科学教室 13
3. 小眼球症の原因遺伝子の変異解析  
堀田 喜裕 浜松医科大学 眼科学講座 15  
細野 克博 浜松医科大学 眼科学講座
4. 小眼球症例の CT 画像による眼窩内の形態評価に関する研究  
西田 保裕 滋賀医科大学医学部 眼科 18
5. 安全な小眼球症の白内障手術治療の開発に関する研究  
黒坂 大次郎 岩手医科大学 眼科学講座 20

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 22

### IV. 研究成果の刊行物、別刷 27

## 小眼球による視覚障害の原因を特定するための疫学調査と診断・治療基準の創成

研究代表者 仁科 幸子 国立成育医療研究センター眼科医員

研究要旨：小眼球（症）患者の実態に関する全国疫学調査の結果を解析し、臨床上の問題点と課題を抽出すること。これを基盤として、小眼球症の原因究明のための研究、病因・病態及び保有視機能の早期診断法、小眼球症・合併異常・眼窩の発育に関する画像評価法、小眼球症・合併異常に対する治療法の研究を実施し、よりよい診断・治療基準の作成に結びつけることを目的とした。本研究の成果として、1) 小眼球症の実態に関する全国調査の結果を解析し、臨床上の問題点を抽出した。さらに小眼球症の整容治療に導入する義眼の実態調査を実施した。2) 小眼球症の原因究明のため、網羅的な遺伝子解析の方法 (MLPA) を応用し有用性を検討した。3) 小眼球症の発症機序を研究するため、トランスジェニックマウス (TgM) を作製し、*Sox2*、*Pax3*、*Sox10* など小眼球に関わる遺伝子の解析に有用な松果体由来不死化細胞株 G2P-7 細胞を樹立した。4) 保有視機能の早期診断法を開発するために、光干渉断層計 (OCT)、網膜電図 (ERG)、黄斑局所網膜電図 (M-ERG) を用いた形態・機能評価を実施した。5) 小眼球症の眼球、眼窩骨、眼球付属器などの画像評価のために、眼窩 CT 撮影の最適条件と、その後の画像再構成の最適条件を検討した。6) 片眼の重度小眼球に対する整容治療基準を作成するために、眼窩の発育異常につき眼窩 CT を用いて評価した。7) 小眼球症の白内障手術では、閉塞隅角緑内障や脈絡膜欠損(コロボーマ)を伴い、チン小帯の脆弱例が多い。前房内の安定性を高め、眼内圧を抑えた状態での安全な手術法の開発のため基礎データを収集した。

### 研究分担者

近藤 寛之 産業医科大学眼科学教室  
准教授  
堀田 喜裕 浜松医科大学眼科学講座  
教授  
西田 保裕 滋賀医科大学医学部眼科  
准教授、病院教授  
黒坂 大次郎 岩手医科大学眼科学講座  
教授

### A. 研究目的

小眼球（症）は小児期より生涯にわたり重篤な視力障害を起こす疾患で、全身疾患に伴う例のみならず、単独の眼疾患であっても、生活面で長期に支障をきたす。小眼球に関する調査研究は欧米でもきわめて少ないが、その頻度は出生数 10 万人に 10～19 人と推測され、我が国においても同等と考えられる希少な疾患である。小眼球症には眼球全体が小さいもの以外に、角膜、水晶体、網膜硝子体などの異常を合併するものも多く、その程度はさまざまである。一部で原因遺伝子が発見されているものもあるが、多くは原因が十分に明らかにされていない。また視覚障害の効果的な治療法も確立していない。

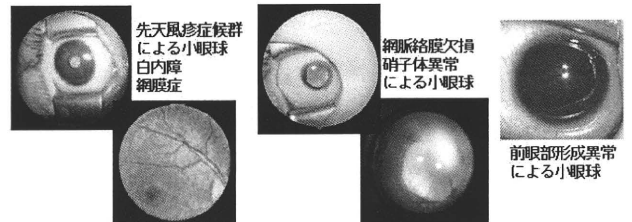
小眼球症は原因や病態を早期に明らかにし、適切な治療や訓練を行えば、保有視機能の発達が期待できるものもある。一方、視力が望めない場合は早期からリハビリ（ロービジョンケア）を開始し社会参画を促す必要がある。しかし乳幼児期には眼科検診が行われないため、十分な診察が受けられず、適切な対応が得られていないものが多い。

### 小眼球症

- ・様々な全身、眼異常に合併
- ・病因は様々、発症機序不明
- ・推定1万人に1人
- ・重篤な視覚障害をきたす
- ・診断・治療基準、治療法は確立していない



極小眼球



平成 21 年度には、本研究の基盤として、小眼球症に関する全国疫学調査を実施し、本邦の患者の実態を把握した。本年度の研究目的は、全国調

査の結果を解析し、臨床上的問題点と課題を抽出すること。これを基盤として、小眼球症の原因究明のための研究、病因・病態及び保有視機能の早期診断法、小眼球症・合併異常・眼窩の発育に関する画像評価法、小眼球症・合併異常に対する治療法の実施し、よりよい診断・治療基準の作成に結びつけることである。

## B. 研究方法

### 1) 小眼球に関する全国調査・義眼の実態調査

平成21年度に全国調査を行った小眼球患者の実態（患側、性別、年齢、家族歴と遺伝形式、眼所見、手術治療、全身異常、視力、眼鏡・補助具および義眼の使用）について解析した。

追加調査として、全国の主要な義眼店に対し、過去3年間（2008～2010年）に作成・調整した小眼球症に対する義眼の実態について書面にて調査した。対象は先天のおよび二次的な小眼球とし、症例、患側、性別、新規作成時の年齢、再作成時の年齢、調整回数、調整期間、義眼装着における問題例、費用について、例・眼数を調査した。

### 2) 小眼球症の原因究明：網羅的な遺伝子解析

DNAプローブを用いた遺伝子欠失診断法

(MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification) を小眼球症の遺伝子に応用するため、専用のオリゴプローブを設計し、MLPAを立ち上げ、小眼球症の原因遺伝子の検索とプローブの設計を行った。MLPAが小眼球症の遺伝子解析に応用可能であるか、その有用性を検討した。

### 3) 小眼球症の原因遺伝子の変異解析

小眼球症の原因遺伝子の変異解析と発生機序の解明を目的とするため、視細胞特異的遺伝子プロモーターとSV40 *LargeT* 抗原遺伝子を用い、視器の発生に関わる種々の遺伝子を発現する視細胞由来不死化細胞株の樹立を試みた。

### 4) 小眼球症の形態・機能評価

保有視機能の早期診断のため、小眼球症13例21眼に対し、光干渉断層計 (OCT)、網膜電図 (ERG)、黄斑局所網膜電図 (M-ERG) による新しい形態・機能検査を実施し検討を加えた。

### 5) CT画像による眼窩内の形態評価

小眼球症例の眼球、眼窩組織、眼窩骨の二次元および三次元的形態評価を行うためのヘリカルCT撮影の最適条件（スライス厚、ピッチ幅）と、その後の画像再構成の最適条件（スライス厚）を検討した。正常成人1名を被検者として、眼窩CTを条件別に撮影した。装置はヘリカルCTスキャナーであるPHILIPS社製 Brilliance 64を用いた。

### 6) 小眼球症の眼窩の画像評価

重症小眼球に伴う眼窩の発育異常について画像評価するため、片眼性小眼球15例に対し眼窩CT

を撮影した。研究5) をもとに最適条件を設定し、骨条件画像から眼窩体積、軟部条件画像から眼球体積を計測した。

### 7) 安全な小眼球症の白内障手術治療の開発

眼内圧の変動の少ない術式を開発すべく基礎データを収集した。PEA装置はアルコン社のインフィニティ<sup>®</sup>、45°Kelman型ミニフレアチップ、ウルTRASリーブを使用した。ボトル高60, 75, 90, 100cmによる灌流量(ml/分)の測定、切開幅2.4mm, 3.0mmによるBSSの創口やサイドポートからのリーク量の測定、吸引 (15ml/分, 30ml/分, 45ml/分) をかけた状態でのリーク量の測定を行った。

## C. 研究結果および考察

### 1) 小眼球に関する全国調査・義眼の実態調査

全国調査によって総計454施設から総数851症例1254眼の調査結果を得て、これを解析した。

過去2年間に医療機関を受診した小眼球患者の患側は両眼性、片眼性とも同等の比率であり、年齢は0～9歳が50%を占め、視覚の発達途上の小児期における診断・治療・管理・訓練（リハビリ）の重要性が示された。また視覚障害や併発症の問題に対し、継続した管理が必要とされている。

遺伝的背景や病因は解明されていないものが多く今後の課題である。

眼所見として、真性小眼球26%、無・極小眼球14%など眼球全体の異常に加えコロボーマ19%、網膜硝子体形成異常18%など後眼部異常を伴う例が多かった。併発症として白内障34%、緑内障13%、網膜剥離7%の頻度が高かった。今後さらに後眼部の形態・機能解析を進めることが課題である。

手術治療を要した例は総数の21%と高率で、白内障手術が多い。手術法と予後を解析しよりよい治療・管理基準を作成することが課題である。

全身異常の合併は31%と高率で、重複障害児（者）に対する治療・管理・リハビリの体制をつくることも必要である。

視力は、約30%が0.1以上と推定された。有効な治療・ロービジョンケアの早期導入と併発症の管理によって保有視機能を十分活用できる例が比較的多いと考えられる。

一方、片眼の重度小眼球に対しては、重度視覚障害を早期に診断し、眼球・眼窩発育不全を画像評価して義眼を導入する整容治療基準を作成することが有益と考えられた。

義眼の実態調査を実施し、全国の主要義眼店6店から過去3年間に作成・調整した義眼総数468例の調査結果を得た。

新規作成は0歳が多く、3歳以降に再作成を要することが示された。特に乳児期に義眼の導入を要

する先天性の重度小眼球では、小児の著しい成長によって早期に義眼の調整や再作成が必要になると考えられる。

小眼球に対する義眼の装着は、整容治療であるとともに眼窩・顔面骨の正常な発育を促す役割を担っている。発達途上の小児においては、重症小眼球に対する義眼の装着は不可欠であり、適切な時期を逃すと不可逆的な眼窩・顔面骨の変形をきたすおそれがある。

小児に義眼を導入する際には、受け入れる患児（とくに3歳以降）に抵抗が強いことが問題となっていた。調整に長期間を要することあり、患児と家族の抱える負担に対し、適切な指導・ケアを行う必要がある。

#### 2) 小眼球症の原因究明：網羅的な遺伝子解析

小眼球症の原因となる8遺伝子 (*BMP4*, *CHX10*, *CRYBA4*, *OTX2*, *RAX*, *SIX2*, *SIX6*, *GDF6*) 27エクソンに設計を試み、20 (74%) は設計可能であった。

MLPAは小眼球症遺伝子の網羅的なスクリーニングとして有用な方法となりうる。

#### 3) 小眼球症の原因遺伝子の変異解析

ヒト錐体特異的*GMAT2*プロモーターと、SV40 *LargeT*を用い、トランスジェニックマウス (TgM) を作製した。継代培養して株化細胞 (G2P-7) の樹立に成功した。同細胞では、*Sox2*, *Pax3*, *Sox10* 遺伝子等、小眼球やWaardenburg症候群に関わる遺伝子の発現を認めた。松果体由来不死化細胞株 G2P-7細胞は、小眼球に関わる遺伝子の発現研究に有用な可能性がある。

#### 4) 小眼球症の形態・機能評価

小眼球症13例21眼にOCT、ERG、M-ERGによる新しい形態・機能検査を実施した。

OCTによる形態評価によって21眼中19眼 (90%) と高率に異常が検出された。黄斑部中心窩陥凹の形態から保有視機能がある程度評価することが可能と考えられる。

全視野ERGによる機能評価は14眼に実施し、軽度の小眼球症では、錐体・杆体細胞の機能が保たれていることが示された。

M-ERGによる機能評価によって17眼中9眼

(53%) に明らかな異常を認めた。OCT所見と比較すると、黄斑部の形態に異常があっても視機能を保有する可能性が示唆される。

#### 5) CT画像による眼窩内の形態評価

CT撮影の条件は、スライス厚0.67 mm, 1.0 mmとも眼球、外眼筋、視神経などの眼窩組織が描出され、各ピッチ幅による撮影時間は0.27 mmで12.7秒、0.48 mmで7.1秒、0.70 mmで5.1秒であった。また、再構成画像の条件は、多数のスライスで眼窩組織が描出されたスライス厚1.0 mmではsignal/noise比 (S/N比) の低い画像となった。

CT撮影条件としてピッチ幅0.48mm、スライス厚0.67mmが適切である。再構成画像の条件として、スライス厚1.0mmの画像ではpartial volume effectが少ないため、外眼筋に代表される微小な眼窩内組織が多数の連続スライスに亘って描出されるが、薄切スライスのためにS/N比が低く、眼窩組織の計測には支障をきたすことが予想される。一方、スライス厚5.0mmの画像では、partial volume effectが大きいいため、詳細な形態評価は困難である。S/N比とpartial volume effectを考慮すると、再構成画像のスライス厚は2.0-3.0mmが適切と考えた。

#### 6) 小眼球症の眼窩の画像評価

片眼性の小眼球の小児15例に対し、眼窩CTによる画像評価を実施した。

患側と健側を比較すると、患側の眼球容積の比率が小さいほど骨眼窩容積、眼窩容積の比率も小さくなり、眼窩横径の差も大きい傾向にある。したがって小眼球の重症度に伴った眼窩組織・眼窩骨の形態的な発育異常が起こることが示された。計測値より検討すると、眼球容積が健眼の80%以下の小眼球では、眼窩組織・眼窩骨とも健側の約90%以下の発育不全をきたす。眼窩横径に2mm以上の差を生じる。50%以下の小眼球では、約80%以下の眼窩発育不全をきたすと考えられた。

#### 7) 安全な小眼球症の白内障手術治療の開発

USスリーブからの単位時間当たりの平均灌流量はボトルの高さに比例して増加した。創口とサイドポートからのリーク量を測定した結果、切開幅2.4mmではボトル高60cm~100cmのいずれの設定でも平均0.09ml/分で漏れはほとんどなかったが、切開幅2.75mmと3.0mmではボトルを高くする程リーク量は増加した。また、同じ切開幅・ボトル高でも吸引流量が少ない程リーク量は多かった。

切開創に適応したUSスリーブとチップを選択して創口からのBSSの漏れを減らすこと、サイドポートの使用を最小限にすることによって、効率的に前房の安定性が得られる可能性が考えられた。

#### D. 結論

小眼球 (症) に関する全国調査の結果を解析し、早期診断と有効な治療・ロービジョンケアの導入によって保有視機能を十分活用できる例が比較的多いこと、片眼の重度小眼球には義眼を導入する整容治療基準を作成することが有益であること、視機能を生涯にわたり保持するためには併発症の治療基準・手術法の開発、長期的な管理プロトコルを作成する必要があることが示された。

小眼球に対する義眼の実態調査を行った結果、

小児期に義眼を新規作成する際には、頻回・長期間の調整を要することが示された。また3歳以降になると装着困難例がみられた。患児・家族の負担を軽減するために、最適な導入時期・方法及び支援を検討することが課題である。

小眼球の原因究明のため、MLPAは小眼球症遺伝子の網羅的なスクリーニングとして有用な方法となりうる。

小眼球症の発症機序を研究するため、*Sox2*、*Pax3*、*Sox10*など小眼球に関わる遺伝子の解析に有用な松果体由来不死化細胞株G2P-7細胞を樹立した。

OCT、ERG、M-ERGによる新しい形態・機能検査は、さまざまな小眼球症の病態・保有視機能の早期診断に有用と考えられた。

CTでの画像検査により、小児の小眼球症例でも、眼球、眼窩組織、眼窩骨の画像による形態評価が可能と考える。眼窩CT撮影と画像再構成の最適条件を設定した。

眼窩CTによる画像解析を実施したところ、重症の小眼球に伴う眼窩組織・眼窩骨の発育不全を評価し、整容治療基準を導入するために有用と考えられた。

小眼球症の白内障に対し、前房内の安定性を高め、眼内圧を抑えた状態での安全な手術法の開発のため基礎データを収集した。術者は切開創に適應したUSスリーブとチップを選択して創口からのBSSの漏れを減らすこと、サイドポートの使用を最小限にすることによって、効率的に前房の安定性が得られる可能性が考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk factors for recurrent fibrovascular proliferation in aggressive posterior retinopathy of prematurity after early vitreous surgery. *Am J Ophthalmol*, 150: 10-15, 2010
2. Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, Azuma N. Endogenous candida chorioretinitis in a healthy infant. *Jpn J Ophthalmol*, 54: 629-631, 2010
3. Fujinami K, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Choroidal neovascularization in child following laser pointer-induced macular injury. *Jpn J Ophthalmol*, 54: 631-633, 2010
4. Shoji K, Ito N, Ito Y, Inoue N, Adachi S, Fujimaru T, Nakamura T, Nishina S, Azuma N, Saitoh A. Is a 6-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J Pediatr*, 157: 331-333, 2010
5. Wu J, Kubota J, Hirayama J, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajiho H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of murine embryonic stem cells by activating MEF2C-dependent BMP2 transcription. *Stem Cells Dev*, 19: 1723-1734
6. Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A*, 155: 409-414, 2011
7. Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. *Transaction book of XIth ISA meeting*, 2011 in press
8. Tanaka M, Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, Azuma N. Nishida's procedure combined with medial rectus recession for large-angle esotropia in Duane syndrome. *Jpn J Ophthalmol*, 2011 in press
9. Kobayashi Y, Yokoi T, Yokoi T, Hiraoka H, Nishina S, Azuma N. Fluorescein staining of the vitreous during vitrectomy for retinopathy of prematurity. *Retina*, 2011 in press
10. 伊藤一清水里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東 範行. 液晶視力表システムチャート SC-2000 によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. *眼科臨床紀要* 3: 70-73, 2010
11. 仁科幸子、横井匡、横井多恵、小林百合、野田英一郎、東範行. 乳幼児眼疾患の発見・受診経路と初診時期. *眼科臨床紀要* 3: 172-177, 2010
12. 仁科幸子. 視神経無形成. *眼科* 52: 205-209, 2010
13. 伊藤一清水里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東範行. 国立成育医療センターにおける小児ロービジョンケアの特徴. *眼科臨床紀要* 3: 346-352, 2010
14. 田中三知子、仁科幸子. 小児の眼筋麻痺. *あたらしい眼科* 27: 909-915, 2010
15. 福島梨沙、重安千花、水野嘉信、横井 匡、中川温子、仁科幸子、東範行、山田昌和. セントラルデルモイドの1例. *臨眼* 64: 1337-1340, 2010
16. Kondo H, Saito K, et al: A case of Fukuyama congenital muscular dystrophy associated with negative electroretinograms. *Jpn J Ophthalmol* 2010;54:622-624.

17. Poulter JA, Ali M, et al: Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Hum Genet* 2010;86:248-253.
18. 小山田剛、近藤寛之、林英之、内尾英一：成人と小児における増殖硝子体網膜症の手術成績. *臨眼*;64:543-546
19. Kondo H, Kusaka S, Yoshinaga A Uchio E, et al: Mutations in TSPAN12 gene in Japanese patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*, in press.
20. Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Kondo, H, et al: Quercetin induces the expression of peroxiredoxin 3 and 5 through Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
21. Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Bin H Kondo H, et al: Transcriptional regulation of activating transcription factor 4 (ATF4) under oxidative stress in retinal pigment epithelial ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
22. Ohtsubo M, Sato M, Hikoya A, Hosono K, Minoshima S, Hotta Y. A Japanese Case of X-linked Ocular Albinism Associated with *GPR143* Gene Mutation. *Jpn.J. Ophthalmol.* 54(6), 624-626, 2010.
23. Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Takizawa Y, Hosono K, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. *J. Hum. Genet.* 55(12), 796-800, 2010.
24. Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Hair roots as an mRNA source for mutation analysis of Usher syndrome-causing genes. *J Hum Genet.* 55(10):701-703, 2010.
25. Sawada M, Sato M, Hikoya A, Wang C, Mihoshima S, Azuma N, Hotta Y. A case of aniridia with unilateral Peters anomaly. *J. AAPOS.* in press, 2011.
26. 西川亜希子, 西田保裕, 村木早苗, 柿木雅志, 大路正人：外傷性下直筋断裂に用いた水平筋全幅移動術. *眼科臨床紀要* 3 (2) : 145-148, 2010
27. 西田保裕：複視の画像診断. *あたらしい眼科* 27 (7) : 869-874, 2010
28. 西田保裕：固定名斜視のMRIによる評価について教えてください. *あたらしい眼科* 27 (臨時増刊号) : 249-251, 2010
29. 西田保裕：外転神経麻痺に対する眼筋移動術. *眼科* 52 (13) : 1877-1882, 2010
30. 鎌田有紀、木澤純也、黒坂 大次郎. 水晶体乳化吸引術における創口およびサイドポート

からの灌流液の漏れの影響. *IOL&RS*(印刷中)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

小眼球症に関する全国調査、義眼の実態調査、小眼球症の形態・機能及び画像評価

研究分担者 仁科 幸子 国立成育医療研究センター眼科医員  
研究協力者 東 範行 国立成育医療研究センター眼科医長  
小林 百合 国立成育医療研究センター眼科医員

研究要旨：1) 平成21年度に実施した小眼球症の実態に関する全国疫学調査の結果を解析し、臨床上の問題点を抽出して国内外へ公表した。2) さらに小眼球症の整容治療に導入する義眼の実態を把握するために、全国の主要義眼店に対し、書面にて調査を実施した。3) さまざまな小眼球症において、保有視機能の早期診断法を開発するために、小眼球用コンタクトレンズ・電極を作成し、光干渉断層計（OCT）、網膜電図（ERG）、黄斑局所網膜電図（M-ERG）を用いた形態・機能評価を実施した。4) 片眼の重度小眼球に対する整容治療基準を作成するために、さまざまな小眼球に伴う眼窩組織・眼窩骨の形態的発育異常につき眼窩CTを用いて評価した。

A. 研究目的

- 1) 平成21年度に実施した小眼球（症）患者の疫学、臨床像、視覚障害の実態に関する全国調査の結果を解析すること。
- 2) さらに追加調査として、小眼球症に対する義眼（整容治療）の実態調査を実施し、臨床上の問題点と課題を抽出すること。
- 3) 保有視機能の早期診断法を開発するために、新しい形態・機能評価法について研究し、有効な治療・ロービジョンケアの導入基準・方法を検討すること。
- 4) 重度小眼球に対する整容治療基準を作成するために、小眼球に伴う眼窩組織・眼窩骨の形態的発育異常について眼窩CTを用いて画像評価を行うこと。

B. 研究方法

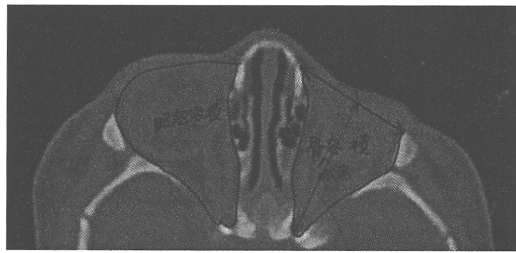
- 1) 平成21年度に日本眼科学会専門医制度研修施設他1151病院に対し、2008.1.～2009.12. に診療した小眼球患者の実態（小眼球症例、手術症例、患側、性別、年齢、家族歴と遺伝形式、眼所見、手術治療、全身異常、視力、眼鏡・補助具および義眼の使用）について、書面にて例・眼数を調査した。その結果を解析した。
- 2) 追加調査として、本年度に全国の主要な義眼店に対し、過去3年間（2008～2010年）に作成・調整した小眼球症に対する義眼の実態について書面にて調査した。対象は先天的な小眼球および二次的な小眼球（重症未熟児網膜症・網膜剥離等による眼球萎縮）とし、過去3年間の症例、患側、性別、新規作成時の年齢、再作成時の年齢、調整

回数、調整期間、義眼装着における問題例、費用について、例・眼数を調査した。

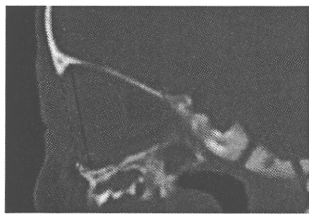
3) 保有視機能の早期診断のため、さまざまな小眼球症13例21眼に対し、全身麻酔下または外来にて通常の眼科検査と同時に光干渉断層計（OCT）、網膜電図（ERG）、黄斑局所網膜電図（M-ERG）による形態・機能検査を実施し、検討を加えた。形態検査はOCT（RS-3000, NIDEK）及び手持ち式OCT（iVue, Optovue）を用い、必要に応じて小眼球用に作成したコンタクトレンズを装着して施行した。機能検査は、まず白色LED電極（EW-202, メイヨー）刺激による全視野ERG（ニューロパック, MEB-2200, 日本光電）を用い、未熟児・乳児・小眼球用に作成した電極のうち適合する形状サイズを選んで装着し、ICSEVプロトコールに準じて実施した。次に黄斑局所ERG（ER-80, Kowa）を用い、刺激光サイズ15度、発光時間100msec, 10msecとして検査を実施した。

4) 重症小眼球に伴う眼窩組織・眼窩骨の形態的発育異常について画像評価するため、片眼性小眼球15例に対し眼窩CTを撮影し検討を加えた。撮影条件は西田の研究をもとに設定し、水平断・冠状断・矢状断の画像を再構成した。骨条件画像から眼窩体積、軟部条件画像から眼球体積を解析した。眼窩の評価として眼窩横径（眼窩幅）、眼窩縦径（眼窩高）、眼窩長（眼窩軸長）を計測、さらに水平断で眼窩・骨眼窩をトレースして最大断面積を計測し、全スライスの全断面積からスライス厚を乗じて眼窩容積・骨眼窩容積を計算した（図1）。眼球体積は、同様に水平断の全スライスの断面積

からスライス厚を乗じて計算した。



(a) 眼窩容積、骨眼窩容積  
眼窩横径、眼窩長



(b) 眼窩縦径

図1. 眼窩の計測法

#### (倫理面への配慮)

実態調査については例・眼数だけの調査とし、個人を特定するデータが一切含まれないように留意した。

形態・機能・画像評価に関しては、臨床上必要性のある患者に対して同意を得て実施したもので、本研究による患者への負担は生じていない。症例の解析にあたっては、個人が特定できないよう配慮して行った。

### C. 研究結果 及び D. 考察

#### 1) 小眼球に関する全国調査

平成21年度に実施した小眼球症に関する全国調査の結果、総計454施設(回答率39.4%)から、総数851症例1254眼の調査結果を得た。患側、性別、年齢、家族歴と遺伝形式、眼所見、手術治療、全身異常、視力、眼鏡・補助具および義眼の使用などの実態を調査した結果を解析し、以下のごとく小眼球症の臨床像と問題点、課題を抽出した。

##### (1) 性別・患側

当該期間に医療機関を受診した小眼球患者に性差はほとんどなく、患側は両眼性、片眼性とも同等の比率であった。真性小眼球や全身疾患に伴う小眼球は両眼性が多く、前眼部異常、コロボーマ、網膜ひだを伴う小眼球においてもしばしば両眼に異常をきたす。このような両眼性の視覚障害例は医療機関への定期的な受診が必須と考えられるが、たとえ片眼性であっても等しく医学的管理を要することが示唆される。

##### (2) 年齢分布

当該期間に医療機関を受診した小眼球患者の

年齢分布は0～9歳が50%を占め、視覚の発達途上の小児期における診断・治療・管理・訓練(リハビリ)の重要性が示された。次いで10歳代の患者の比率が16%と比較的高く、20歳代～70歳代の比率はそれぞれ約4～7%と一定していた。小眼球による視覚障害や併発症の問題に対し、小児期・若年から継続した管理が必要とされている。

##### (3) 家族歴・遺伝

家族歴を7%に認め、うち常染色体優性遺伝が41%であったが不明例も多く、十分な検索がなされていない可能性がある。遺伝的背景や病因診断に関する研究を更に進め、種々の小眼球の病態を解明することが課題である。

##### (4) 眼所見・併発症

真性小眼球26%、無・極小眼球14%など眼球全体の異常に加えコロボーマ19%、網膜硝子体形成異常18%など後眼部異常を伴う例が多い。今後さらに後眼部の形態・機能解析を進めることが、小眼球による視覚障害の早期診断・治療基準の作成に不可欠な課題と考えられる。

併発症として白内障34%、緑内障13%、網膜剥離7%の頻度が高く、いずれも手術治療を要するが難治である。手術法と予後を解析し小児・若年から生涯にわたるよりよい治療・管理基準を作成することが課題である。

##### (5) 手術治療

手術治療を要した例は総数の21%に達した。年齢分布(0～19歳が66%)を考慮すると非常に高率である。その内訳は白内障手術が圧倒的に多いが、緑内障、網膜硝子体手術の比率も高い。前述のように、これらの併発症に対する手術法の開発と標準化は、視機能を生涯にわたり保持するために重要である。

##### (6) 全身所見

全身異常の合併が31%と高率で、特に中枢神経系障害・発達遅延13%の合併が多い。重複障害児(者)に対する治療・管理・リハビリの体制をつくることも必要である。

##### (7) 視力

視力は約30%が0.1以上と推定され、0.02未満は34%である。有効な治療・ロービジョンケアの早期導入と併発症の管理によって保有視機能を十分活用できる例が比較的多いと考えられる。一方、重症片眼例に対しては、よりよい整容治療を早期に開始することも重要な課題である。

##### (8) 眼鏡・補助具・義眼

眼鏡・補助具を使用している例は22%にとどまっていた。低年齢児が多いためとも考えられるが、保有視機能を十分に発達させるため、眼鏡・補助具を積極的に活用し、ロービジョンケアの早期導入を図る必要がある。

義眼の装着は20%であった。片眼の重度小眼球に対しては、重度視覚障害を早期に診断し、更に眼球・眼窩発育不全を早期に画像評価して義眼を導入する整容治療基準を作成することが有益と考えられる。

## 2) 義眼の実態調査

本年度、追加調査として行った小眼球に対する義眼の実態調査で、全国の主要義眼店6店の協力を得て、過去3年間に作成・調整した義眼総数468例の調査結果を得た。内訳はアツザワプロテーゼ東京151例(32%)、カジヤマプロテーゼ148例

(32%)、日本義眼研究所101例(21%)、アツザワプロテーゼ九州36例(8%)、アツザワプロテーゼ横浜28例(6%)、笑瞳4例(1%)であった。

### (1) 患側・性別

患側は両眼性80例(17%)、片眼性388例(83%)と片眼例が圧倒的に多く、性別は女性248例(53%)、男性220例(47%)と同等の比率であった。

### (2) 作成年齢

総数468例のうち新規作成は138例(29%)であった。新規作成例の年齢分布(図2)は0歳:42例、1歳:20例、2歳:28例、3~5歳:32例、6~12歳:19例、13~19歳:10例、20歳以上:12例であった。小眼球症に対する義眼(整容治療)の導入年齢は、0歳が最も多く、2歳までに行われる比率が高い。しかし3歳以降、遅い場合には20歳以降に新規作成される例もみられた。おそらく対象として先天的な小眼球に加え、二次的な小眼球(重症未熟児網膜症・網膜剥離等による眼球萎縮)を含めたためと考えられる。

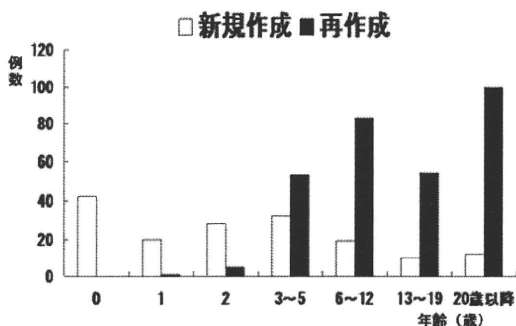


図2. 作成年齢

一方、再作成例の年齢分布(図2)は1歳:1例、2歳:5例、3~5歳:53例、6~12歳:83例、13~19歳:54例、20歳以上:100例であった。早い場合には、3歳以降で再作成を要することが示された。特に乳児期に義眼の導入を要する先天性の重度小眼球では、小児の著しい成長によって早期に頻回に義眼の調整や再作成が必要になると考えられる。

良好な整容治療を実施するためには、乳幼児期から継続した管理と支援が必要である。

### (3) 義眼の調整

新規作成例について、義眼の調整回数(本人用義眼作成までの間に仮義眼を試した回数)、及び調整期間(本人用義眼作成までに要した期間)を調べた結果を図3に示す。調整回数は1回:50眼(26%)、2回:30眼(15%)、3回以上:116眼(59%)であった。調整期間は1ヵ月未満:58眼(32%)、1~3ヵ月:46眼(25%)、4~6ヵ月:67眼(37%)、6ヵ月以上:12眼(6%)であった。小眼球症例ごとの特徴や重症度によって異なると考えられるが、一般に新規作成には3回以上の調整が必要であること、調整期間が約6ヵ月かかる可能性があることが示された。患児・家族の負担を軽減するために、最適な導入時期・方法を検討することが課題である。

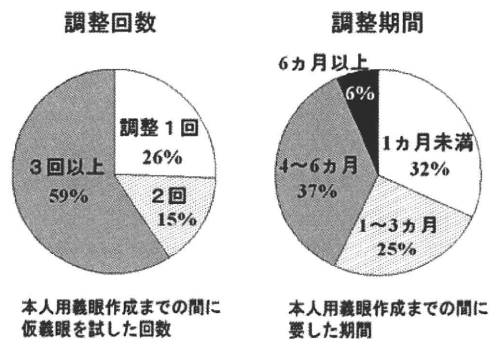


図3. 義眼の調整

### (4) 義眼装着における問題

新規作成例について調査した結果、義眼装着に問題のあったものは、患児が装着を嫌がった:10眼、結膜嚢形成手術を要した:3眼、結膜嚢拡張が不十分:1眼、角結膜障害のため装着困難:1眼であった。無眼球・極小眼球で眼瞼結膜の形成不全を伴う例では義眼の導入が難しいと考えられるが、それよりも小児に義眼を導入する際には、受け入れる患児に抵抗が強いことが問題となっていた。調整に長期間を要することも鑑みて、患児と家族の抱える負担に対し、つねに適切な指導・ケアを行う必要がある。

義眼導入時期(年齢)が遅かったため眼窩・顔面の左右差が出てしまったものは3眼あり、年齢は12歳、2歳であった。また義眼導入時期(年齢)が遅かったため患児が装着を嫌がったと思うものは12眼、年齢は12歳、3歳であり、特に3歳の例が多かった。義眼の新規導入の時期として、3歳以降になると患児の受け入れが困難になることが示唆された。

今回の調査は後ろ向きの調査であったため、義眼の導入時における問題例の抽出が十分にできなかった可能性がある。今後、小児に対するよりよい義眼導入・整容治療のために、義眼店と医療機関が連携を密にして対策を立てる必要があると思われる。

#### (5) 義眼の費用

小眼球に対する義眼の費用に関しては、100%自費: 58%、視覚障害者手帳から費用負担: 42%であった。義眼に関しては、昭和25年から、眼球摘出後の眼窩保護のため装用を必要とする場合のみ保険給付が行われており、現在、眼球摘出を行わない小眼球に対するコンタクト義眼は保険給付の対象外である。

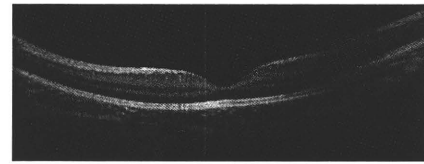
小眼球に対する義眼の装着は、整容治療であるとともに眼窩・顔面骨の正常な発育を促す役割を担っている。発達途上の小児においては、重症小眼球に対する義眼の装着は不可欠であり、適切な時期を逃すと不可逆的な眼窩・顔面骨の変形をきたすおそれがある。しかし義眼の費用は約95000円と高額であり、適切な時期に導入・調整・再作成するには、家族の経済的負担が非常に大きい。この点を鑑みて、小児期には小眼球の義眼に対しても給付が行われることが望まれる。

#### 3) 小眼球症の形態・機能評価

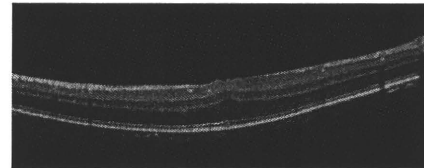
小眼球症の小児12例、成人1例、計13例21眼にOCT、ERG、M-ERGによる形態・機能検査を実施した。年齢は生後5ヵ月～14歳、及び20歳である。性別は男性9例、女性4例、患側は両眼性8例、片眼性5例、内訳は真性小眼球3例6眼、さまざまな眼先天異常に伴う小眼球10例15眼である。眼所見として、先天白内障（術後無水晶体眼）7眼、網脈絡膜コロボーマ6眼、視神経無形成・乳頭異常5眼、無虹彩4眼を認めた。重度の小眼球（極小眼球・無眼球）は検査不能であり含まれていない。

OCTによる形態評価は全21眼に実施可能であり、網膜の形態及び黄斑の中心窩陥凹が正常: 2眼、中心窩陥凹の形態が不完全（図4a）: 4眼、黄斑部網膜の肥厚・ひだ・分離（図4b）: 6眼（すべて真性小眼球）、中心窩陥凹なし: 7眼、黄斑を含む網膜の異形成・萎縮: 2眼であった。黄斑部中心窩陥凹の形態から保有視機能を評価することが可能と考えられるが、今回検討した小眼球症は、比較的軽症例であるにもかかわらず、21眼中19眼（90%）と高率に異常が検出された。

今後さらに、さまざまなタイプの小眼球症における後眼部の形態評価を研究することによって、病態の解明および視機能の早期診断に結びつくと考えられる。



(a) 中心陥凹の形態が不完全



(b) 黄斑部網膜の肥厚

図4. OCT所見

全視野ERGによる機能評価は14眼に実施し、錐体・杆体反応ともに正常6眼、振幅低下7眼、反応微弱1眼であった。一般に軽度の小眼球症では、錐体・杆体細胞の機能がある程度保たれていることが示されたが、反応微弱の1眼は視神経無形成、無虹彩、異所性コロボーマを合併した小眼球であった。症例によっては広汎な網膜機能の低下をきたすと推測される。

M-ERGによる機能評価は17眼に実施可能であった。その結果、正常反応（図5）: 4眼、軽度の振幅低下: 4眼、顕著な振幅低下: 2眼、反応消失: 7眼であった。すなわちM-ERGでは17眼中9眼

（53%）に明らかな異常を認めたこととなる。OCT所見と比較すると、黄斑部の形態に異常があっても視機能を保有する可能性が示唆される。今後さらにM-ERGの刺激条件を検討し、形態評価と合わせて解析し、保有視機能の早期診断に結びつけたい。

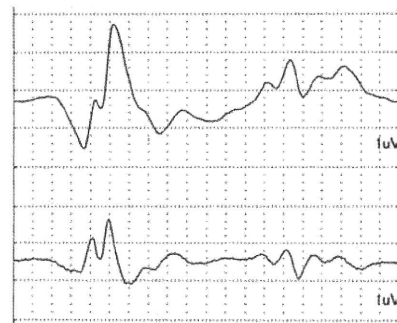


図5. M-ERG 正常例  
（刺激光サイズ15度、発光時間100msec）

#### 4) 小眼球症の眼窩の画像評価

片眼性の小眼球（疑い例を含む）の小児15例に対し、眼窩CTによる画像評価を実施した。性別は男性7例、女性8例、年齢分布は0歳: 8例、1歳: 2例、2、3、4、6、8歳: 各1例で、4歳以上の3例は、す

でにコンタクト義眼を装着している例であった。また0歳のうち2例はすでに拡張器を使用していた。患側（小眼球）の眼所見として極小眼球4眼、第一次硝子体過形成遺残4眼、Peters異常4眼、網脈絡膜コロボーマ2眼、家族性滲出性硝子体網膜症（牽引性網膜剥離）1眼を認めた。患側の角膜径は0～10mm、眼軸長は0～20mmであった。患側の視力は15眼中13眼で光覚(-)と推定され他の2眼は測定困難であった。

3歳以下12例における眼窩計測値を表1に示す。小眼球に伴い眼窩横径、縦径、骨眼窩容積、眼窩容積に差がみられる。

表1. CT画像計測値 (mm, mm<sup>3</sup>)

	患側	健側
眼窩横径	22.0～34.5 平均29.7	26.7～35.5 平均31.4
眼窩長	23.4～40.9 平均32.2	21.8～42.5 平均32.2
眼窩縦径	19.8～35.1 平均28.1	25.2～35.4 平均29.9
骨眼窩容積	5096～16274 平均10235	6741～18165 平均11630
眼窩容積	5614～19039 平均12067	8173～21299 平均13907
眼球容積	868～7557 平均3376	3814～7340 平均5273

次に全15例を対象に、患側と健側の計測値を比較し、健側に対する患側の眼球容積、骨眼窩容積、眼窩容積の比率、眼窩横径の差を求めた(表2)。

表2. 健側に対する比率・差

年齢	眼球	骨眼窩	眼窩	横径
8歳	0.05	0.67	0.64	-2.5
3ヵ月	0.18	0.68	0.62	-3.4
6歳	0.22	0.74	0.68	-4.2
0ヵ月	0.23	0.75	0.69	-4.7
3ヵ月	0.28	0.74	0.70	-3.7
4ヵ月	0.47	0.85	0.82	-2.3
3歳	0.48	0.83	0.82	-1.0
2歳	0.64	0.91	0.92	-1.7
1ヵ月	0.69	0.91	0.86	-2.4
6ヵ月	0.74	0.88	0.87	-0.2
4歳	0.80	0.90	0.87	-3.1
5ヵ月	0.81	0.97	0.99	-0.3
2ヵ月	0.83	0.96	0.95	-1.6
1歳	0.97	0.98	0.98	-0.1
1歳	1.03	0.96	0.97	-0.3

眼球容積の比率が小さいほど骨眼窩容積、眼窩容積の比率も小さくなり、眼窩横径の差も大きい傾向にある。したがって、適切な時期に拡張器や義眼を装着した例を含めて検討しても、小眼球の重症度に伴った眼窩組織・眼窩骨の形態的な発育異常が起こることが示された。計測値より検討すると、眼球容積が健側の80%以下の小眼球では、眼窩組織・眼窩骨とも健側の約90%以下の発育不全をきたす。眼窩横径に2mm以上の差を生じる。50%以下の小眼球では、約80%以下の眼窩発育不全をきたすと考えられた(図6)。

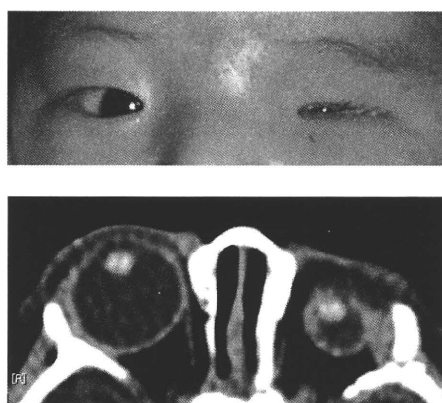


図6. 左極小眼球に伴う眼窩発育不全, 0ヵ月(眼球23%, 骨眼窩75%, 眼窩69%, 横径-4.7mm)

重度小眼球に対しては0歳から拡張器を用いて結膜嚢を徐々に拡大し、早期に義眼を装着して眼窩の発育を促すことが必要と考えられる。また、成長に応じて義眼の調整・再作成を適切に行うことが小児期では重要な課題である。

## E. 結論

小眼球(症)に関する全国調査の結果を解析し、早期診断と有効な治療・ロービジョンケアの導入によって保有視機能を十分活用できる例が比較的多いこと、片眼の重度小眼球には義眼を導入する整容治療基準を作成することが有益であること、視機能を生涯にわたり保持するためには併発症の治療基準・手術法の開発、長期的な管理プロトコルを作成する必要があることが示された。

小眼球に対する義眼の実態調査を行った結果、小児期に義眼を新規作成する際には、頻回・長期間の調整を要することが示された。また3歳以降になると装着困難例がみられた。患児・家族の負担を軽減するために、最適な導入時期・方法及び支援を検討することが課題である。

OCT、ERG、M-ERGによる新しい形態・機能検査は、さまざまな小眼球症の病態・保有視機能の早期診断に有用と考えられた。

眼窩CTによる画像解析は、重症の小眼球に伴う眼窩組織・眼窩骨の発育不全を評価し、整容治療基準を導入するために有用と考えられた。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

31. Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk factors for recurrent fibrovascular proliferation in aggressive posterior retinopathy of prematurity after early vitreous surgery. *Am J Ophthalmol*, 150: 10-15, 2010
  32. Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, Azuma N. Endogenous candida chorioretinitis in a healthy infant. *Jpn J Ophthalmol*, 54: 629-631, 2010
  33. Fujinami K, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Choroidal neovascularization in child following laser pointer-induced macular injury. *Jpn J Ophthalmol*, 54: 631-633, 2010
  34. Shoji K, Ito N, Ito Y, Inoue N, Adachi S, Fujimaru T, Nakamura T, Nishina S, Azuma N, Saitoh A. Is a 6-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J Pediatr*, 157: 331-333, 2010
  35. Wu J, Kubota J, Hirayama J, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajiho H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of murine embryonic stem cells by activating MEF2C-dependent BMP2 transcription. *Stem Cells Dev*, 19: 1723-1734
  36. Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A*, 155: 409-414, 2011
  37. Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. *Transaction book of XIth ISA meeting*, 2011 in press
  38. Tanaka M, Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, Azuma N. Nishida's procedure combined with medial rectus recession for large-angle esotropia in Duane syndrome. *Jpn J Ophthalmol*, 2011 in press
  39. Kobayashi Y, Yokoi T, Yokoi T, Hiraoka H, Nishina S, Azuma N. Fluorescein staining of the vitreous during vitrectomy for retinopathy of prematurity. *Retina*, 2011 in press
  40. 伊藤一清水里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東 範行. 液晶視力表システムチャート SC-2000 によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. *眼科臨床紀要* 3: 70-73, 2010
  41. 仁科幸子、横井匡、横井多恵、小林百合、野田英一郎、東範行. 乳幼児眼疾患の発見・受診経路と初診時期. *眼科臨床紀要* 3: 172-177, 2010
  42. 仁科幸子. 視神経無形成. *眼科* 52: 205-209, 2010
  43. 伊藤一清水里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東範行. 国立成育医療センターにおける小児ロービジョンケアの特徴. *眼科臨床紀要* 3: 346-352, 2010
  44. 田中三知子、仁科幸子. 小児の眼筋麻痺. *あたらしい眼科* 27: 909-915, 2010
  45. 福島梨沙、重安千花、水野嘉信、横井 匡、中川温子、仁科幸子、東範行、山田昌和. セントラルデルモイドの1例. *臨眼* 64: 1337-1340, 2010
2. 学会発表
1. Nishina S. Invited speaker of the Symposium "Challenging pediatric ophthalmology management problems" Assessment and management of microphthalmos. 25<sup>th</sup> APAO Congress – A Joint Meeting of APAO/AAO. Beijing, China, 2010.9
  2. Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. XI meeting of the International Strabismological Association. Istanbul, Turkey, 2010.9
  3. 仁科幸子. 小児ロービジョン患者の視機能評価. 第114回日本眼科学会総会, 名古屋, 2010.4
  4. 仁科幸子. 先天性水晶体偏位の管理. 第114回日本眼科学会総会, 名古屋, 2010.4
  5. 仁科幸子. 未熟児網膜症の診断と治療. 聖マリアンナ医科大学周産期カンファレンス, 2010.4
  6. 仁科幸子. 発達緑内障の早期発見と診断. 第66回日本弱視斜視学会総会・第35回日本小児眼科学会総会合同学会, 東京, 2010.7
  7. 伊藤牧子、田中三知子、横井匡、小林百合、野田英一郎、仁科幸子、東範行. 小児眼底の広範囲な構造と機能の検査. 第66回日本弱視斜視学会総会・第35回日本小児眼科学会総会合同学会, 東京, 2010.7
  8. 田中三知子、伊藤牧子、横井匡、野田英一郎、小林百合、仁科幸子、東範行. 検眼鏡的に異常がない視力不良例に対する網膜電図検査. 第

- 66 回日本弱視斜視学会総会・第 35 回日本小児眼科学会総会合同学会, 東京, 2010.7
9. 初川嘉一、仁科幸子、菅澤淳、木村亜紀子、矢ヶ崎悌司、不二門尚、平野慎也. 外斜視の多施設共同研究 2. 術前眼位と手術効果. 第 66 回日本弱視斜視学会総会・第 35 回日本小児眼科学会総会合同学会, 東京, 2010.7
  10. 仁科幸子. 小児の眼疾患の診方. 茨城県眼科医会講演会, つくば, 2010.8
  11. 仁科幸子. 小眼球の診断と管理. 杏林大学オープンカンファレンス, 2010.10
  12. 伊藤牧子、田中三知子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行. 小児における全身麻酔下での局所網膜電図検査. 第 58 回日本臨床視覚電気生理学会, 盛岡, 2010.10
  13. 田中三知子、伊藤牧子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行. 小児の網膜疾患に対する全身麻酔下での局所と全視野の網膜電図所見. 第 58 回日本臨床視覚電気生理学会, 盛岡, 2010.10
  14. 仁科幸子、黒坂大次郎、西田保裕、近藤寛之、小林百合、東範行. 小眼球症の実態に関する全国調査. 第 64 回日本臨床眼科学会, 神戸, 2010.11
  15. 田中三知子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行. 乳頭周囲ぶどう腫/ 朝顔症候群の黄斑の構造と機能. 第 49 回日本網膜硝子体学会, 大阪, 2010.11
  16. 仁科幸子. 斜視と弱視. 東京都眼科医会卒後研修会, 東京, 2010.11
  17. 仁科幸子. 小児白内障手術の術後管理. 第 34 回日本眼科手術学会, 京都, 2011.1
  18. 仁科幸子. 小児の続発緑内障の治療戦略. 第 34 回日本眼科手術学会, 京都, 2011.1
  19. 小林百合、田中三知子、横井匡、仁科幸子、東範行. 水晶体後方完全脱臼を呈した小児同胞 2 例に対する手術治療. 第 34 回日本眼科手術学会, 京都, 2011.1
  20. 仁科幸子. 小児の眼疾患の診かた. 第 92 回香川県眼科集談会, 高松, 2011.3
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## 小眼球症の原因究明：網羅的な遺伝子解析に向けた取り組み

研究分担者 近藤 寛之 産業医科大学眼科学教室 准教授

研究要旨：小眼球は環境要因とともに、単一または複数の遺伝素因（遺伝子異常）によって生じると考えられている。本症はきわめて多様な疾患群であり、該当するすべての遺伝子を直接検索するのは多大の労力と費用を要して困難である。このため、診断に向けた新しいアプローチが必要である。候補となる遺伝子の網羅的なスクリーニングは有用な方法の一つであり、多方面の検討が必要である。DNAプローブを用いた遺伝子欠失診断法（MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification）は複数の遺伝子の各エクソンを同時に増幅し、エクソン単位の欠失や重複を診断する方法である。この方法を小眼球症の遺伝子に応用するには、専用のオリゴプローブの設計が必要である。MLPAが小眼球症の遺伝子解析に応用可能であるか、その有用性を検討した。

### A. 研究目的

小眼球は環境要因とともに、単一または複数の遺伝素因（遺伝子異常）によって生じると考えられている。本症はきわめて多様な疾患群であり、該当するすべての遺伝子を直接検索するのは多大の労力と費用を要して困難である。このため、診断に向けた新しいアプローチが必要である。候補となる遺伝子の網羅的なスクリーニングは有用な方法の一つであり、多方面の検討が必要である。

DNA プローブを用いた遺伝子欠失診断法（MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification）は複数の遺伝子の各エクソンを同時に増幅し、エクソン単位の欠失や重複を診断する方法である。この方法を小眼球症の遺伝子に応用するには、専用のオリゴプローブの設計が必要である。MLPAが小眼球症の遺伝子解析に応用可能であるか、その有用性を検討した。

### B. 研究方法

①テストサンプルの選定とオリゴプローブの設計：網膜分離症の原因遺伝子（*RS1*）のエクソン4の欠失を有する1家系のDNAサンプルを用いた。*RS1*遺伝子エクソン4およびエクソン3（コントロール）に対してDNAプローブを設計した。設計には、public domain プログラム（MAPD, <http://bioinform.arcan.stonybrook.edu/mlpa2/>）を用いた。

②MLPAの立ち上げ：コントロールとなる遺伝子プローブキット、SALSA MLPA KIT（P200-A1, MRC-Holland）のプローブミックスに新たに設計したプローブを混和し、サンプルDNAとハイブリダイズさせた。蛍光色素で標識したプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、DNAシークエンサー（Prism 310, ABI）で電気泳動した。

③小眼球症の原因遺伝子の検索とプローブの設計：小眼球症の原因遺伝子をデータベースから検索し、遺伝子配列を抽出し、プローブの設計を行った。

遺伝子診断を行った症例は産業医科大学倫理委員会の承認のもと、文書でインフォームドコンセントを得た。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守した。

### C. 研究結果

①オリゴプローブ対として、5' -GGGTTCCCTAAGGGTTGGATGATATAGGGCCCGGGGATTTTTTTCATGTGCTTTT-3' と 5' -AAAAAAAAATAGGCCTCTCTACCAGCGTGGCGAATTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3' を作成した。

②網膜分離症1家系について*RS1*遺伝子エクソン4の欠失を確認した。コントロールの計14種類のプローブはすべて正常のタイピングであった。

③小眼球症の原因となる8遺伝子（*BMP4*, *CHX10*, *CRYBA4*, *OTX2*, *RAX*, *SIX2*, *SIX6*, *GDF6*）27エクソンに設計を試み、20（74%）は設計可能であった。

### D. 考察

既知の小眼球の原因遺伝子の大半は転写因子であり、その発症機序はハプロ不全（発現減少による機能異常）であると考えられる。また、今回検討した遺伝子うち、半数は原因として塩基欠失が報告されており、さらに2つの遺伝子（*CHX10*, *SOX2*）にはエクソン欠失の報告がある。このため、小眼球の原因診断のためにエクソン欠失の有無を診断することの意義は大きいと思われる。

MLPA 法は、1回の電気泳導で多数のエクソンを同時に検査することができる。今回の検討では新たに設計したプローブ (RS1 エクソン 3 と 4) に加えて、キットに含まれる 14 エクソンを同時にタイピングしえた。MLPA は一旦プローブのセットを作成すれば、安定した解析が可能であるだけでなく、少ない労力と費用で解析できる利点がある。

MLPA は小眼球症遺伝子の網羅的なスクリーニングとして有用な方法となりうる。現在のところ、専用のプローブが市販されていないため、プローブの精製にコストがかかること、今回使用したプログラム (MAPD) では設計に制限があるため、今後はこの点を改良する必要がある。

今後は小眼球症の多数例を収集し、小眼球症遺伝子のプローブセットを作成して遺伝子解析を計画する。

#### E. 結論

MLPA を用いた遺伝子のスクリーニングは小眼球症の遺伝子同定に有用な方法となりうる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kondo H, Saito K, et al: A case of Fukuyama congenital muscular dystrophy associated with negative electroretinograms. *Jpn J Ophthalmol* 2010;54:622-624.
- 2) Poulter JA, Ali M, et al: Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Hum Genet* 2010;86:248-253.
- 3) 小山田剛、近藤寛之、林英之、内尾英一：成人と小児における増殖硝子体網膜症の手術成績。 *臨眼*;64:543-546
- 4) Kondo H, Kusaka S, Yoshinaga A, Uchio E, et al: Mutations in TSPAN12 gene in Japanese patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*, in press.
- 5) Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Kondo, H, et al: Quercetin induces the expression of peroxiredoxin 3 and 5 through Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 6) Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Bin H Kondo H, et al: Transcriptional regulation of activating transcription factor 4 (ATF4) under oxidative stress in retinal pigment

epithelial ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.

#### 2. 学会発表

- 1) 近藤寛之ほか：わが国の Stickler 症候群にみられた COL2A1 遺伝子異常とその臨床像 (第 114 回日本眼科学会総会：2009. 4. 16、名古屋)
- 2) 近藤寛之ほか：TSPAN12 遺伝子異常による家族性滲出性硝子体網膜症 (第 64 回日本臨床眼科学会：2009. 11. 12、神戸)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他  
いずれもなし

#### I. 参考文献

- 1) Schouten J, McElgunn C, et al: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucl Acid Res* 2002;30:e57.
- 2) Zhi J: MAPD: a probe design suite for multiplex ligation-dependent probe amplification assays. *BMC Res Notes* 2010;3:137.
- 3) Williamson KA, Hever AM, et al: Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet* 2006;15:1413-22.

## 小眼球症の原因遺伝子の変異解析

研究分担者 堀田 喜裕 浜松医科大学 眼科学講座 教授  
研究協力者 細野 克博 浜松医科大学 眼科学講座 助教

研究要旨：視器の発生に関わる種々の遺伝子の異常によって小眼球症が起こる。小眼球症の発症機序を検討するために、こうした遺伝子を発現する、低分化で視細胞の性質を持つ細胞株の樹立が望まれる。ヒト錐体特異的 *GNAT2* プロモーターと SV40 *LargeT*、視細胞特異的 *RBP3* エンハンサー配列からなるトランスジーンを構築し、トランスジェニックマウス (TgM) を作製した。TgM の一部に松果体由来と考えられる脳の腫瘍を認めた。同腫瘍組織での *LargeT* の発現を免疫染色で確認し、同腫瘍を培養系に移し、継代培養して株化細胞 (G2P-7) の樹立に成功した。同細胞で発現する遺伝子を RT-PCR とマイクロアレイで解析した。同細胞では、*Sox2*、*Pax3*、*Sox10* 遺伝子等、小眼球や Waardenburg 症候群に関わる遺伝子の発現を認めた。松果体由来不死化細胞株 G2P-7 細胞は、小眼球に関わる遺伝子の発現研究に有用な可能性がある。

### A. 研究目的

小眼球症は小児期より生涯にわたり重篤な視力障害を起こす疾患で、全身疾患に伴う例のみならず、単独の眼疾患であっても、生活面で長期に支障をきたす。欧米の研究では頻度は出生数 10 万人に 10~19 人と推測され、我が国においても同等（約 12000 人）と考えられる。小眼球症には眼球全体が小さいもの以外に、角膜、水晶体、網膜硝子体などの異常を合併するものも多く、その程度はさまざまである。一部で原因遺伝子が発見されているものもあるが、多くは原因が明らかにされていない。また視覚障害の効果的な治療法も確立していない。

本研究では、小眼球症の病因解析・早期診断・原因究明のため、小眼球症の原因遺伝子の変異解析と発生機序の解明を目的とする。

本研究を遂行することで、小眼球症の疫学的データを基に、早期診断の画一化を図り、治療やリハビリテーションを早急に適応することが可能となれば、成人まで続く障害を軽減する成果を期待できる。また長期管理プロトコール作成により生涯のQOLが飛躍的に向上する。小児の重症視覚障害に対し、残存視力を向上させ、早期に社会参加を可能とすることは、少子時代の医療、福祉問題の解決に大きく寄与することができ、厚生科学研究として重要な位置を占めると考える。

### B. 研究方法

視器の発生に関わる種々の遺伝子の異常によ

って小眼球症が起こる。小眼球症の発症機序を検討するために、こうした遺伝子を発現する、低分化で視細胞の性質を持つ細胞株の樹立が望まれるが、殆ど報告がない。本研究では視細胞特異的遺伝子プロモーターと SV40 *LargeT* 抗原遺伝子を用いて視細胞由来不死化細胞株の樹立を試みた。

#### 1. 錐体細胞特異的発現を示す遺伝子プロモーターの単離

視細胞の培養系確立を目指して、錐体細胞に特異的発現を示す遺伝子プロモーターの単離と視細胞癌化用プラスミドの構築を行った。ロドプシンなどのプロモーターを用いると、癌化でなく細胞や組織の変性が起きるという報告があるため、錐体に特異的に発現するトランスデュシン $\alpha$ 遺伝子 *GNAT2* のプロモーターをヒトゲノムから単離し、それらの下流に SV40 *Large T* 抗原遺伝子、さらに錐体・杆体の両方で発現するレチノイド結合タンパク *RBP3* 遺伝子のエンハンサー配列を連結して発現ベクター (pGNAT2) を構築した。

#### 2. 視細胞癌化用プラスミドの構築

SV40 *Large T* 抗原遺伝子を pBluescript II SK(+)へクローニングし、その上流に *GNAT2* のプロモーターを、下流に *RBP3* のエンハンサーを連結した。

#### 3. マウス受精卵への微量注入と癌発生の追跡

上記2までで作製したpGNAT2を用いてTgMを作成した。C57BL/6系のマウス受精卵にプラスミドを微量注入して、受胎メスICR系マウスの

子宮に移植し、発育・出産させた。出産後、仔の尾からDNAを抽出し、プラスミドとして注入した塩基配列のDNAが計画どおり保持されている個体をPCR法を用いて確認した。

プラスミドが正しく導入された仔個体を継続して発育させ、その過程を慎重に観察した。特に、形態の異常、活動の活発さ、全身状態に注意を払って、癌の発生に備えた。形態や動きの異常、あるいは明らかな癌の発生を認め、生命の維持が困難と思われる状態になったら、安楽死させて該当組織・器官を摘出して、病理学的観察を行うとともに、細胞培養を試みた。

#### 【倫理面への配慮】

当該研究に関する遺伝子及び組織の収集にあたり、浜松医科大学の組換えDNA実験安全委員会(組換えDNA実験承認番号07-7:平成19年11月)の承認を受けた。実験動物の取扱においては、浜松医科大学の動物実験委員会(動物実験計画承認番号:第2007078号:平成19年8月)の承認を受けた。実験動物は、実験終了後に速やかにかつ痛みのない方法で安楽死処置を行った。本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)、「疫学研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省)及び「動物の愛護及び管理に関する法律」(環境省)を遵守して行った。

### C. 研究結果

TgMの一部に視細胞のアポトーシス様変化と松果体由来と考えられる脳の腫瘍を認めた。*GNAT2*は、他の視細胞発現遺伝子と同様、松果体で発現する可能性が高く、松果体での腫瘍形成は想定されることであった。同腫瘍組織での*LargeT*の発現が免疫染色で確認できた。同腫瘍を培養系に移し、得られた増殖細胞群を240日間継代培養して、株化細胞(G2P-7)を樹立した。G2P-7細胞の倍化時間は26.6時間であった。同細胞で発現する遺伝子をRT-PCRとマイクロアレイで解析したところ、*Gnat2*(錐体特異的)の発現は認められたが、*Gnat1*(杆体特異的)は認められなかった。また、レポーター遺伝子を用いたプロモーター活性測定の結果、*Gnat2*は*Gnat1*より相対的に高値を示した。また、*Rbp3*と松果体特異的*Tph1*(Tryptophan hydroxylase 1)も有意なプロモーター活性を示した。また、G2P-7細胞では、*Sox2*、*Pax3*、*Sox10*遺伝子等、小眼球やWaardenburg症候群に関わる遺伝子の発現を認めた。

### E. 結論

G2P-7細胞は、視細胞や松果体に特異的に発現する一部の遺伝子のプロモーターの駆動が可能であった。松果体由来不死化細胞株G2P-7細胞は、小眼球に関わる遺伝子の発現研究に有用な可能性はある。

現在、倫理委員会の追加承認待ちではあるが、国立成育医療研究センターと共同研究の手続きを進めLeber先天盲等の原因遺伝子の変異解析を行う計画である。

### F. 健康危険情報

該当する危険なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Ohtsubo M, Sato M, Hikoya A, Hosono K, Minoshima S, Hotta Y. A Japanese Case of X-linked Ocular Albinism Associated with *GPR143* Gene Mutation. *Jpn.J. Ophthalmol.* 54(6), 624-626, 2010.

Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Takizawa Y, Hosono K, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. *J. Hum. Genet.* 55(12), 796-800, 2010.

Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Hair roots as an mRNA source for mutation analysis of Usher syndrome-causing genes. *J Hum Genet.* 55(10):701-703, 2010.

Sawada M, Sato M, Hikoya A, Wang C, Mihoshima S, Azuma N, Hotta Y. A case of aniridia with unilateral Peters anomaly. *J. AAPOS.* in press, 2011.

#### 2. 学会発表

Sawada M, Sato M, Hikoya A, Wang C-X, Minoshima S, Azuma N, Hotta Y: A case of aniridia with a unilateral lens malposition. WOC 2010 Berlin (平成22年6月8日)

Minoshima S, Hosono K, Ohishi K, Yamamoto S, Yamaguchi Y, Kudoh J, Shimizu N, Hotta Y: Establishing a mouse cell line from a tumor developed with SV40 Large T antigen driven by a photoreceptor-specific gene promoter. The 10<sup>th</sup> Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium Hamamatsu Meeting Hamamatsu (平成20年9月17日)

Hotta Y, Hosono K, Nojima K, Zhao Y, Toshiba T, Asai T, Kato M, Minoshima S: Clinical features of a Japanese patient with Bothnia dystrophy. ISGEDR 2010 Bengaluru (平成 23 年 1 月 15 日)

Hosono K, Wang C-X, Nakanishi N, Hotta Y, Minoshima S: Fine analysis of the deletion in red/green opsin genes and the upstream locus control region (LCR) found in two Japanese families with blue cone monochromacy (BCM). ISGEDR 2010 Bengaluru (平成 23 年 1 月 16 日)

大坪正史、佐藤美保、彦谷明子、細野克博、蓑島伸生、堀田喜裕: OA1 遺伝子検査にて確定診断できた眼白子症の 1 例. 第 114 回日本眼科学会総会名古屋 (平成 22 年 4 月 15 日)

王春霞、細野克博、川野敏夫、加地秀、中村誠、寺崎浩子、三宅養三、中西伸夫、堀田喜裕、蓑島伸生: 青錐体一色型色覚日本人家系の赤緑遺伝子解析. 第 114 回日本眼科学会総会名古屋 (平成 22 年 4 月 16 日)

蓑島伸生、王春霞、細野克博、川野敏夫、加地秀、中村誠、中西伸夫、寺崎浩子、三宅養三、清水信義、堀田喜裕: 青錐体一色型色覚日本人 2 家系の赤緑オプシン遺伝子変異のゲノム解析. 第 17 回日本遺伝子診療学会津 (平成 22 年 8 月 6 日)

稲垣理佐子、青島明子、浅野麻衣、鷺山愛、藤田由美子、根岸貴志、佐藤美保、堀田喜裕: 浜松医大における視覚障害を持つ乳幼児に対する早期療育相談. 第 11 回日本ロービジョン学会学術総会岡山 (平成 22 年 10 月 22 日)

大坪正史、佐藤美保、彦谷明子、細野克博、蓑島伸生、堀田喜裕: GPR143 遺伝子検査にて確定診断できた眼白子症の 1 例. 日本人類遺伝学会第 55 回大会 さいたま (平成 22 年 10 月 28 日)

野嶋計寿、細野克博、趙洋、彦谷明子、東芝孝彰、佐藤美保、加藤勝、蓑島伸生、堀田喜裕: 日本人の Bothnia ジストロフィも超長時間の暗順応によって ab 波が回復する. 第 64 回日本臨床眼科学会神戸 (平成 22 年 11 月 13 日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし