

図 1 LI後BK前眼部写真(A)と、障害された内皮細胞(B)

角膜内皮障害の報告としては1984年Pollackら⁸⁾による報告(LI後8年)が最初のものである。近年、島崎ら⁹⁾はわが国におけるBKの原因の23.4%はLI後であると報告しており、LI後BKが角膜移植原因疾患として非常に多いことが明らかとなった。

また、Ang¹⁰⁾らはイギリス(0%)やシンガポール(1.8%)に比べて日本においてその頻度が非常に高いことを報告しており、LI後BKは諸外国においては発生頻度が少ないにもかかわらず日本人に多いことも注目すべき特徴のひとつである。その原因のひとつとして、日本人を含む黄色人種では欧米人に比べて虹彩色素が多くかつ虹彩自体も厚いため、切開に必要な総エネルギー量がより多くなることがあげられている。しかし、同条件でLIを施行してもBKを発症する場合としない場合が存在すること、急性緑内障発作を起こしていない狭隅角眼(原発閉塞隅角症)に対する予防的LIでも発症することがあるなど、単純な要因ではなく複合要因が関与している可能性がある。

また、これらの報告の問題点は、いずれも最終的帰結である角膜移植の原因としての検討であるため、かならずしもLIがその主原因とは限らない点も注意が必要である。すなわち、原発閉塞隅角緑内障の隅角閉塞機序には、LIによって解除される瞳孔ブロック以外にもプラトー虹彩、水晶体ブロック、毛様体ブロックなどの機序が存在しており、LI施行後にも残存隅角閉塞機序により眼圧コ

ントロールが不能となる場合もある。このような場合に他の機序によって角膜内皮障害が進行したとしても、移植原因分類では“LIが原因となったBK”と分類されてしまう可能性がある。つまりLI後BKとされているもののなかには、他の要因によって角膜内皮障害が進行しているにもかかわらず、施行した痕跡の残っているLIが原因とされている可能性も否定できない。

LI後BKの特徴

東原らの検討¹¹⁾によると、LI施行からBK発症までの平均期間は6年10カ月(1年5カ月～10年1カ月)とばらつきが大きかった。また、角膜内皮障害には上方型、下方型、全体型の3種類があり、それぞれの頻度は13.2%、14.3%、72.5%と、上方型と下方型はおおよそ同率であった。上方型・下方型は進行すると最終的に全体型へ移行すると考えられるので、初期BKの障害パターンは上方型と下方型に二分されるのではないかと考えられる。すなわち、LI後BKの約半数はLI施行部である上方からではなく、LI施行部から遠く離れた下方からBKが発症しているといえる。

LI後BKの発症機序

このようなLI後BKの発症機序としては種々の仮説が提起されている。従来から広く信じられてきた説は、極端な浅前房で周辺部虹彩と角膜内皮面間の距離が著しく短い場合、あるいは角膜浮

腫が十分取れる前にレーザーを施行した場合などに発生すると考えられる、レーザー照射による角膜内皮への直接的間接的損傷である。この説では、レーザー虹彩切開術後早期に認められる照射部位近傍の角膜浮腫や内皮障害を説明することは可能であるが、晩発性に照射部位から遠く離れた下方角膜からBKをきたす症例が約半数存在すること、およびかならずしも過剰照射ではない予防的LI後においてもBKが存在することが説明できない。

LI時の総照射エネルギー量が発症に影響を及ぼしていることは明らかであるが、その他の機序として以下に示すように、血液房水柵破綻説¹¹⁾、房水ジェット噴流説¹²⁾、角膜内皮創傷治癒説¹³⁾、マクロファージ説¹⁴⁾など諸説が提起されている。

1. 血液房水柵破綻説¹¹⁾

LI後BKに対する角膜移植の際には、通常よりも高度のフィブリン反応を呈すること、ならびにLI後BK症例の前眼部螢光造影結果から、LI後には虹彩血管の透過性が亢進し、血液房水柵の破綻から、持続的にサイトカインなどの生理活性物質が漏出・滞留して角膜内皮に接しつづけることで内皮が障害されるとする説である。

2. 房水ジェット噴流説¹²⁾

LIによって後房から前房へ向かうバイパス路が形成されるため、房水がジェット流のように前房内に噴出し、角膜内皮細胞に衝突して剝離脱落が発生するとする説。しかし、本説のみでは下方から生じてくるLI後BKを説明できない。また、房水循環動態の変化として縮瞳時の前房方向への噴出と散瞳時の後房方向への吸入が存在することから、いったん前房に流入した新鮮な後房水がすぐに引き戻され、房水のターンオーバー不全をきたして前房内の慢性的な低酸素低栄養状態を引き起こしている可能性も示唆されている。

3. 角膜内皮創傷治癒説¹³⁾

角膜内皮面に向かってLI部から噴出された房水は角膜内皮面に、圧力と剪断応力という2種類の力を生み出す。LI後に角膜内皮細胞が持続的に減少していく患者においては、角膜内皮細胞とデスメ膜の接着不良という問題が隠れているのではないかとする説である。

4. マクロファージ説¹⁴⁾

レーザー照射によってデスメ膜や内皮細胞が熱変性を受けるとともに、焼灼された虹彩色素が角膜内皮面に付着するため、マクロファージがこれらを異物と認識して貪食、炎症性サイトカインを産生して角膜内皮細胞を障害するとする説。焼灼虹彩色素の付着がきっかけとなってマクロファージの浸潤が起るため、どの部位の角膜内皮細胞であっても障害される可能性がある。

おわりに

このように多数の仮説が提起されているにもかかわらず、現在のところ単一の仮説で病態のすべてを説明することができないことから、LI後BK発症にはおそらく複数のメカニズムが関与しているであろうとする複合要因説が主流となっている。したがって、アルゴンレーザーを用いたLIのみならず、角膜内皮に対する影響が少ないとされるNd-YAGレーザーを使用した場合や、虹彩に切開を加えないレーザー隅角形成術、レーザー線維柱帯形成術などでもBKを発症する可能性があり、これらのレーザー治療の際にも十分な注意が必要であると考えられる。

文献

- 1) Beckman, H. and Suger, H. S.: Laser iridectomy therapy of glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, **90**: 453-455, 1973.
- 2) Mandelkorn, R. M. et al.: Short exposure times in argon laser iridotomy. *Ophthalmic Surg.*, **12**: 805-809, 1981.
- 3) 宇根ひろ子, 崎元 剛: 原発閉塞隅角緑内障に対するレーザー虹彩切開術. *日本眼科紀要*, **33**: 2001-2005, 1982.
- 4) 山本哲也・他: 短時間照射法(short-burn technique)によるレーザー虹彩切開. *眼科臨床医報*, **77**: 164-167, 1983.
- 5) Satala, K.: Corneal endothelial cell density after an attack of acute glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, **57**: 1004-1013, 1980.
- 6) Olsen, T.: The endothelial cell damage in acute glaucoma corneal thickness response to intraocular pressure. *Acta Ophthalmol.*, **58**: 257-266, 1980.
- 7) Bigar, F. and Wiltmer, R.: Corneal endothelial changes in primary acute angle-closure glaucoma. *Ophthalmology*, **89**: 596-599, 1982.
- 8) Pollack, I. P.: Current concepts in laser iridotomy. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **24**: 153-180, 1984.
- 9) Shimazaki, J. et al.: National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea*, **26**: 274-278, 2007.

- 10) Ang, L. P. et al. : Argon laser iridotomy-induced bullous keratopathy a growing problem in Japan. *Br J. Ophthalmol.*, 91 : 1613-1615, 2007.
- 11) 東原尚代 : レーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の病態—血液・房水柵破綻説. *あたらしい眼科*, 24 : 871-878, 2007.
- 12) 山本康明 : レーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の病態—房水ジェット噴流説. *あたらしい眼科*, 24 : 879-883, 2007.
- 13) 加治優一・他 : レーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の発症機序—角膜内皮創傷治癒説. *あたらしい眼科*, 24 : 891-895, 2007.
- 14) 山上 聡・他 : レーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の発症機序—マクロファージ説. *あたらしい眼科*, 24 : 885-890, 2007.

* * *

トラベクトミー： 術中手技のポイントとバリエーション

狩野 廉*1 森 和彦*2 中村 誠*3 大鳥安正*4

線維柱帯切除術（レクトミー）は、強膜に房水流出路を作り、眼内の房水を結膜下に流出させる眼圧下降手術だが、細かい手技は施設ごとあるいは術者ごとにバリエーションが非常に多い。これらのバリエーションは、どのような濾過胞を作り、どのように術後管理をしていくかという術者それぞれのコンセプトに沿って築かれたものである。われわれ関西緑内障道場の4名の術式も細部ではそれぞれ少しずつ異なる部分があるが、本稿ではレクトミーの各ステップを分担し、術中手技のポイントを述べる。

なだらかに曲げたトップ針（鈍針）を用いて Tenon 囊下から筋円錐内（球後）へ麻酔薬（2%キシロカイン[®]、Eなし）を2~3ml 注入する。制御糸は6-0 オルソ糸を輪部角膜に通糸する。

狩野：麻酔は放射状結膜切開後、結膜弁作製予定部の Tenon 囊下に鈍針で少量注入し、結膜弁作製後に球後方向へ十分量を注入する。牽引糸は7-0 シルク糸を輪部角膜に通糸する。

I 麻酔と制御糸 (中村 誠)

線維柱帯切除術（レクトミー）は「結膜＝命」である。かつ、術中キョロキョロ動かれるのは危険である。だから上方にも下方にも麻酔を効かせたい。そのために、筆者は27G 鋭針で結膜を切らずに下耳側と上鼻側の円蓋部から Tenon 囊内麻酔をする。進行期症例が多いので、球後血管収縮による視神経障害が起きないように、エピネフリン非添加である。制御糸は角膜輪部に掛けている。

マイレクトミー：私のこだわり

大鳥：牽引糸は7-0 シルク糸を輪部角膜に通糸する。麻酔は放射状結膜切開後、結膜弁作製予定部および後方に広がるように Tenon 囊下に鈍針で少量注入し、マイトマイシンC (MMC) 洗浄後に Tenon 囊下麻酔を少量追加する。

森：鼻上側を向いてもらい、可能な限り輪部から離れた耳下側円蓋部の結膜と Tenon 囊を有鉤鑷子で把持、スプリング剪刀にて小さく切開し、眼球壁に沿うように

II 結膜切開 (狩野 廉)

1. 結膜切開のポイントとバリエーション

結膜切開ひとつ取っても、切開部位、Tenon 囊の処理、結膜下剝離範囲など、さまざまなバリエーションが挙げられる（表1）。レクトミーの術中操作のなかでも結膜操作は術後濾過胞の形成や形状に大きく影響する。当院では血管に富んだ diffuse に広がる濾過胞形成をめざし、結膜切開は円蓋部基底で行う。輪部結膜は角膜側に残さずすべて有効に利用し、必要最小限の縫合で術後炎症と異物感の軽減を図るため、切開ラインをなるべく

表1 結膜切開のバリエーション

切開部位	輪部基底結膜弁 (= 円蓋部結膜切開)
	円蓋部基底結膜弁 (= 輪部結膜切開)
	輪部結膜を角膜側に少し残す/輪部結膜はすべて結膜弁とする 放射状結膜切開をする/しない
Tenon 囊の処理	余分な Tenon 囊を切除する Tenon 囊を極力残す
結膜下剝離の範囲	なるべく奥まで剝離する 剝離範囲は必要最小限にする

*1 Kiyoshi Kano : 大阪厚生年金病院眼科 *2 Kazuhiko Mori : 京都府立医科大学大学院視覚機能再生外科学 *3 Makoto Nakamura : 神戸大学大学院医学研究科外科系講座眼科学分野 *4 Yasumasa Otori : 大阪医療センター眼科 (別刷請求先) 大鳥安正 : 〒540-0006 大阪市中央区法円坂 2-1-14 大阪医療センター眼科

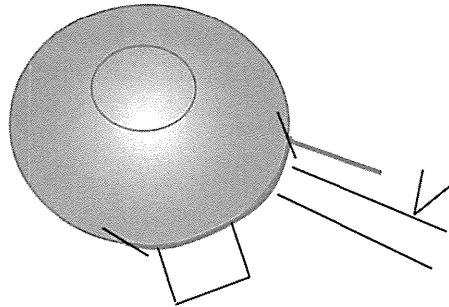
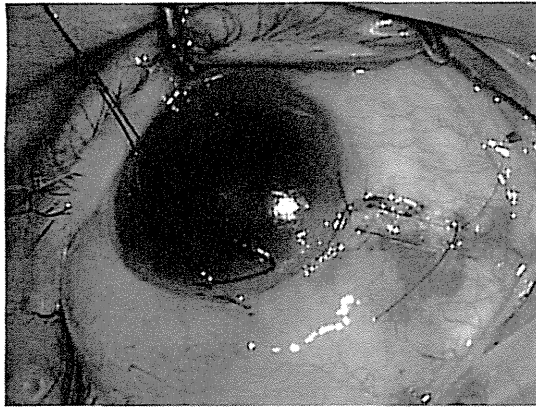


図1 結膜弁のデザイン

結膜弁を作製する前に、強膜弁作製位置と結膜縫合糸の設置位置をイメージしてから、結膜の切開位置を決める。筆者は輪部両端の角結膜埋没縫合と放射状切開部の block suture で結膜を留めるため、強膜弁と放射状切開部の間にある程度距離を取るように位置決めをしている。

平滑にする。Tenon 嚢は縫合時にクッションとなって房水漏出を防止するとともに、菲薄化した無血管濾過胞を生じにくいよう、輪部結膜から極力はずさないようにする。結膜下の剝離は、なるべく広い範囲にマイトマイシンCを塗布できるよう十分に行う。結膜に裂孔が生じると致命傷になりかねないため、結膜切開時に裂孔を生じないように十分注意するとともに、術終了時に房水漏出がないことを必ず確認する。

2. 結膜切開の実際

1) 結膜弁のデザイン

結膜弁を作製する前に、強膜弁作製位置と結膜縫合糸の設置位置をイメージしてから、結膜の切開位置を決める(図1)。筆者は放射状切開部を輪部と円蓋部に通糸した9-0ナイロン糸で押さえ込むように留める block suture を設置する。放射状切開部位が強膜弁に近すぎると、縫合のときに苦勞するため、切開位置は側方よりにする。また眼球は牽引により回旋するので、角膜に通

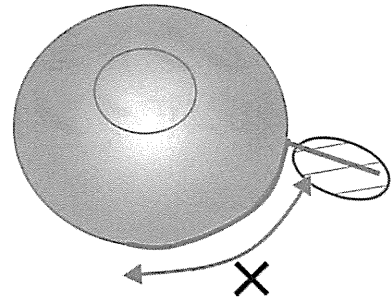


図2 結膜を把持する部位

輪部結膜は最も大切な部分なので、仮に把持するなら無鈎の縫合鑷子や Hoskin 鑷子を用いるが、一番良いのはなるべく把持しないことである。術中操作では放射状切開部の結膜、できれば Tenon 嚢を把持する。

糸する牽引糸で12時をマーキングしておくとうわかりやすい。

2) 放射状切開と Tenon 嚢下麻酔

9時半(1時方向に強膜弁を作製するときは2時半)の結膜に放射状切開を行い、濾過胞作製予定部の Tenon 嚢下に局所麻酔薬を鈍針で注入する。麻酔と同時に結膜下癒着の有無と範囲を確認できる。また、Tenon 嚢の薄い症例でも麻酔薬により以後の操作で Tenon 嚢を把持しやすくなる。

3) 結膜の把持(図2)

輪部結膜は最も大切な部分であり、挫滅や裂孔形成により房水漏出の原因となるので、絶対に有鈎鑷子では把持しない。仮に把持するなら無鈎の縫合鑷子や Hoskin 鑷子を用いるが、一番良いのはなるべく把持しないことである。術中操作では放射状切開部の結膜か、できれば裏打ちされている Tenon 嚢を把持する。多少挫滅してもこの部位は最終的に block suture で押さええるため、術後房水漏出のリスクは低い。

4) 輪部結膜の切開

輪部結膜下の Tenon 嚢の付着部位は結膜の付着部位よりも後方にあり、12時に近いほどギャップがより大きくなる。Tenon 嚢をなるべく結膜裏面からはずさないため、輪部結膜を切開する前に Tenon 嚢を強膜から切離しておく。まず Tenon 嚢下を鈍的に剝離し(図3-a)、Tenon 嚢と強膜を分離する。次に輪部結膜裏側の Tenon 嚢付着部を強膜から切離(図3-b)した後に輪部結膜を切開する(図3-c)。同様の操作を繰り返し、輪部まで Tenon 嚢に裏打ちされた結膜弁を作製する(図

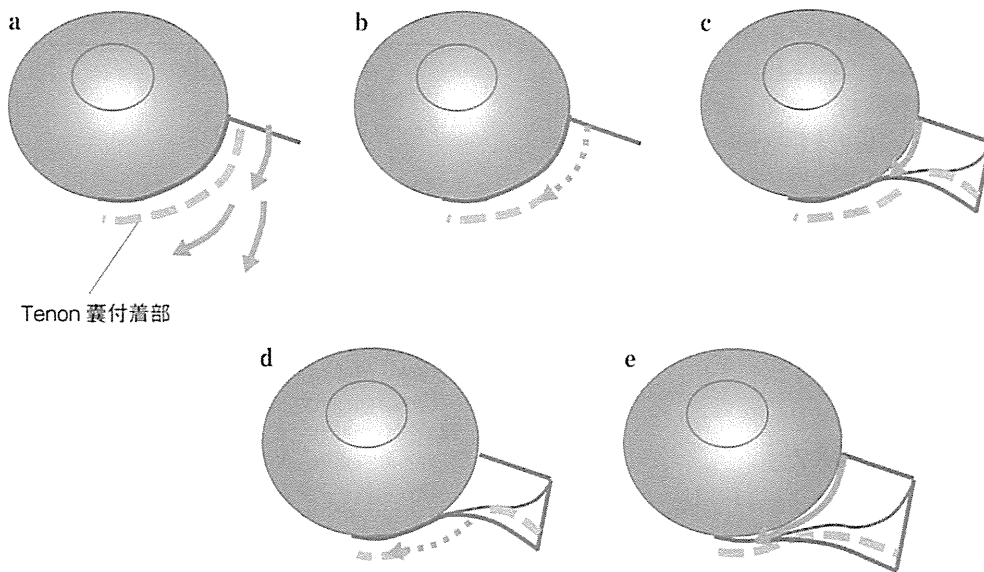


図3 輪部結膜の切開

Tenon 嚢をなるべく結膜裏面からはずさないため、Tenon 嚢を強膜から切離した後に輪部結膜を切開する。

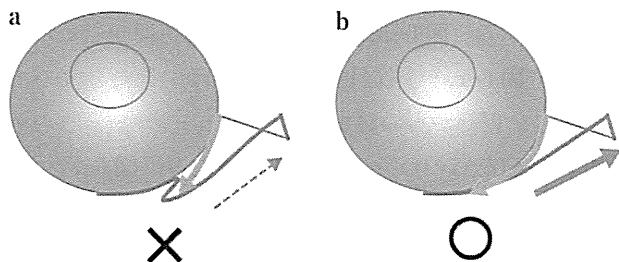


図4 結膜切開は十分テンションをかけて

切開時に結膜がたるんでいると、切開線のずれや裂孔形成を生じやすいため、放射状切開部の結膜をしっかりと引っ張り、切開部に十分なテンションをかけながら切開する。

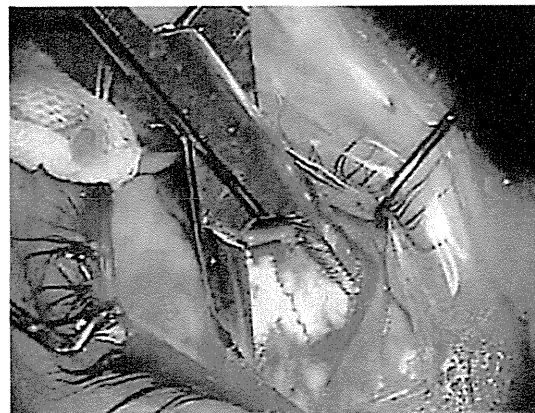


図5 Tenon 嚢剥離

しっかりと強膜を露出し、鈍的に行う。

3-d, e).

5) 結膜切開時の注意

切開時に結膜がたるんでいると、切開線のずれや裂孔形成を生じやすい (図 4-a)。放射状切開部の結膜をしっかりと引っ張り、切開部に十分なテンションをかけながら切開する (図 4-b)。結膜を最大限に利用し、輪部接着不良や房水漏出を防止するため、結膜と Tenon 嚢は最も輪部ぎりぎりの角膜寄りの付着部で切開する。

6) Tenon 嚢下の剥離

円蓋部方向に向かって Tenon 嚢下を鈍的に剥離する。Tenon 嚢が円蓋部に引き込まれないよう、輪部の Tenon 嚢をしっかりと把持しながら剥離する。最後に上耳 (鼻) 側球後方向に Tenon 嚢下麻酔を追加する。

マイレクトミー：私のこだわり

大鳥：結膜を千原氏結膜鑷子で把持し、Tenon 嚢をできる限り結膜側に残すように結膜を切開する。円蓋部の Tenon 嚢は、剪刀で鈍的に剥離した後、新しい MQA を結膜下に入れて MMC スポンジを入れるスペースを後方まで十分確保する。

森：濾過胞壁となる結膜には絶対に穴をあけないように有鉤鑷子ではなくソープ鑷子で把持する。鑷子で持っただけで裂けそうに薄い場合には OSA (はんだや) で押さえながらゴルフメスで剥離する。結膜切開は 2 時もしくは 10 時方向の子午線切開と輪部切開。特に輪部付近に糊しろとなる結膜を残さず、Tenon 嚢も強膜に残

さないようにする。赤道部を超えた奥までソーブ鑷子2本を用いて鈍的に剝離し、強膜をしっかりと露出する。

中村：Tenon 嚢間剝離とならないように、しっかりと強膜を露出させる。薄皮が1枚残るような感じで、線維膜が強膜に残っているとちのち癒着癍痕化しやすい印象がある。Tenon 嚢の剝離は強膜を傷つけて、無用の出血を起こさないように、モスキートを用いて鈍的に行っている(図5)。

III 強膜弁作製・縫合 (森 和彦)

1. 緑内障手術の基本的考え方

緑内障手術、なかでもレクトミーは一見、単純で簡単そうに見えるが、熟練した術者にとっても実はむずかしくて奥が深い手術である。その理由としては、隅角形状、角膜/強膜厚、角膜曲率、結膜癍痕の程度など、術眼の要因が症例ごとに異なるのみならず、強膜弁の厚み、線維柱帯切除部位の大きさや縫合糸のかけ方など、術者に依存する要因も多く存在し、これらが手術効果に大きく影響するからである。例えば強膜弁の作製にあたっては、強膜の厚み自体が症例ごとに異なるだけでなく、乾燥状態によってその厚みが時々刻々と変化するため、慣れるまでは一定の厚みの強膜弁を作製することですら、なかなか困難である。したがってレクトミーの手術結果を安定させ、予測可能な手術にするためには、各ステップの手技における1つ1つのパートの動作を確実に行うことで可能な限り術者側の変動要因を減少させ、かつ各パートのバランスを取るという高度に再現性の高い手術を行う必要がある。

2. 強膜弁処理に関するバリエーション

強膜弁処理に関しては表2に示すようなバリエーションが存在する。すなわち強膜弁の形状/大きさ/深さのバリエーション、切開方法のバリエーション、マイトマイシンC処理に関するバリエーション、および強膜弁縫合のバリエーションである。筆者は3×3mmの四角の二重強膜弁(半層および5分の4層)をダイヤモンドメスとゴルフメスを用いて作製。マイトマイシンC(MMC)処理は一重強膜弁作製後に強膜弁下/周囲/後方に0.04% MMCをMQA スポンジに染み込ませて、3もしくは5分留置。ボトルに繋いだ生理食塩水300mlで洗浄。縫合は10-0ナイロン角針を用いて強膜弁の

表2 強膜弁処理のバリエーション

形状・大きさ・深さのバリエーション
三角/四角/五角形
3×3/3.5×3.5/4×4mm
一重/二重
半層/1/3層/2/3層/4/5層
切開方法のバリエーション
ダイヤモンドメス/フェザーメス/ゴルフメス
MMC処理
When: 一重強膜弁作製後/二重強膜弁作製後
Where: 強膜弁下/周囲/後方
How: MQA/スポンゼル/デリコット/ベンシーツ
How long: 3分/4分/5分、洗い方
縫合のバリエーション
針・糸の種類: 丸針/角針、10-0ナイロン/9-0シルク
縫合糸数/テンション/順序

エッジとその間に計5針縫合している。強膜弁の処理に関するポイントを図6に示す。二重強膜弁は両サイドへの漏出を極力減らし、可能な限り後方へ房水を導くことを目的としており(図6-a)、両サイドの創部はしっかりと縫合する(図6-b)、強膜弁の垂直切開が斜めであったり(図6-c)、1枚目の強膜弁が薄すぎたりすると(図6-d)、創部からの房水漏出をきたしやすい。また強膜弁縫合の左右のバランスが悪かったり(図6-e)、薄い強膜弁を有鉤鑷子で貫通したり強膜を貫いた縫合糸を置いたりしても(図6-f)、過剰濾過の原因となる。

3. 強膜弁作製(図7)

止血はピンポイント型ジアテルミーを用い、フットスイッチで強弱を調節しながら血管を狙って行う(図7-a)。強膜弁は厚みが2分の1層の浅層強膜弁(図7-b, c)と、5分の4層の深層強膜弁(図7-d)からなる二重強膜弁としている。その目的は、1) 深層強膜弁を切除することによってトンネルを作製し後方に房水を導く、2) 癒着によりニードリングが必要となった場合でも中抜きしてあることでエッジの癒着さえ外せばよい、3) ロトミーと同様にSchlemm管を露出させる(図7-d)ので術式が共通化するために安定化する、ことである。強膜弁作製におけるポイントは、よく切れるメスを用いて強膜に対して垂直でエッジの立ったしっかりとした縁取り切開を行うことと、均一な深さの層間剝離による十分な厚みの表層強膜弁を作製することである。また強膜弁を貫通した創部からの房水漏出をきたさないためにも、強膜弁を把持する際には有鉤鑷子による損傷を防ぐように

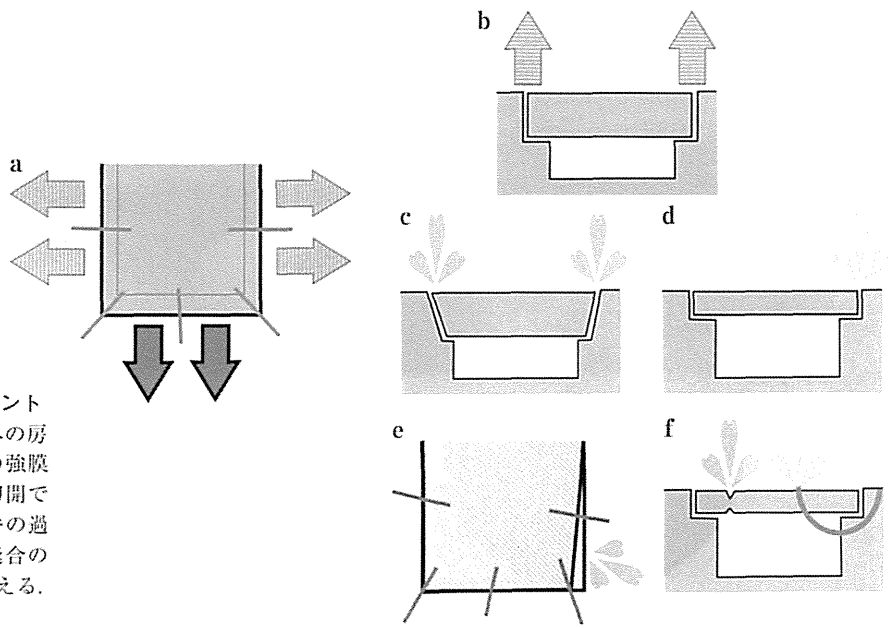


図6 強膜弁の処理に関するポイント
 a: 強膜トンネルを介した後方への房水導出. b: しっかりした厚みの強膜弁と垂直切開. c: 斜めの強膜切開では漏出しやすい. d: 薄い強膜弁の過剰過剰になりやすい. e: 強膜縫合の左右バランスが悪いと漏出が増える. f: 薄い強膜弁では貫通に注意.

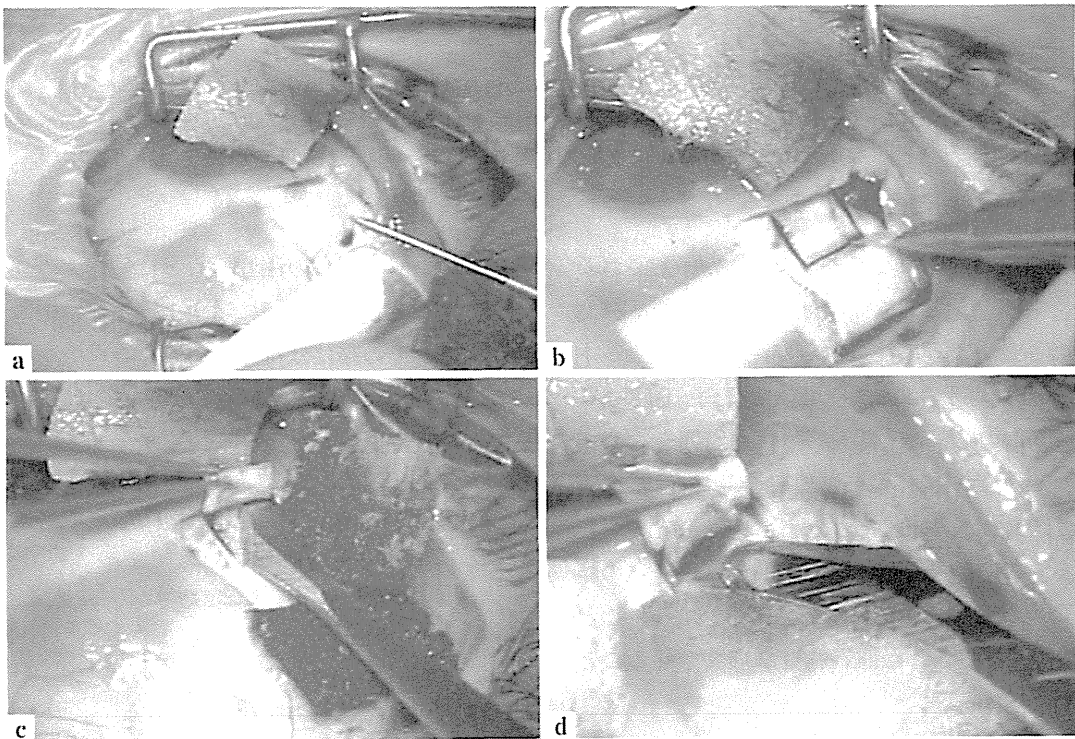


図7 強膜弁作製手順

a: ピンポイントジアテルミーによる止血. b: ダイヤモンドメスによる半層強膜切開. c: 1枚目強膜弁の作製. d: 2枚目強膜弁作製時の Schlemm 管露出.

注意する必要がある.

4. マイトマイシン C (MMC) 処理

MMC が前房内へ入らないようにするために、MMC 処理は一重強膜弁作製後、二重強膜弁作製前に行う。ス

ポンジは MQA を切って作製するが、ちぎれにくい一定の大きさと同厚みを維持して作製し、0.04% MMC を染み込ませた後に円蓋部後方、強膜弁周囲、ならびに強膜弁を挟むように留置する (図 8-a)。時間は基本 3 分、再

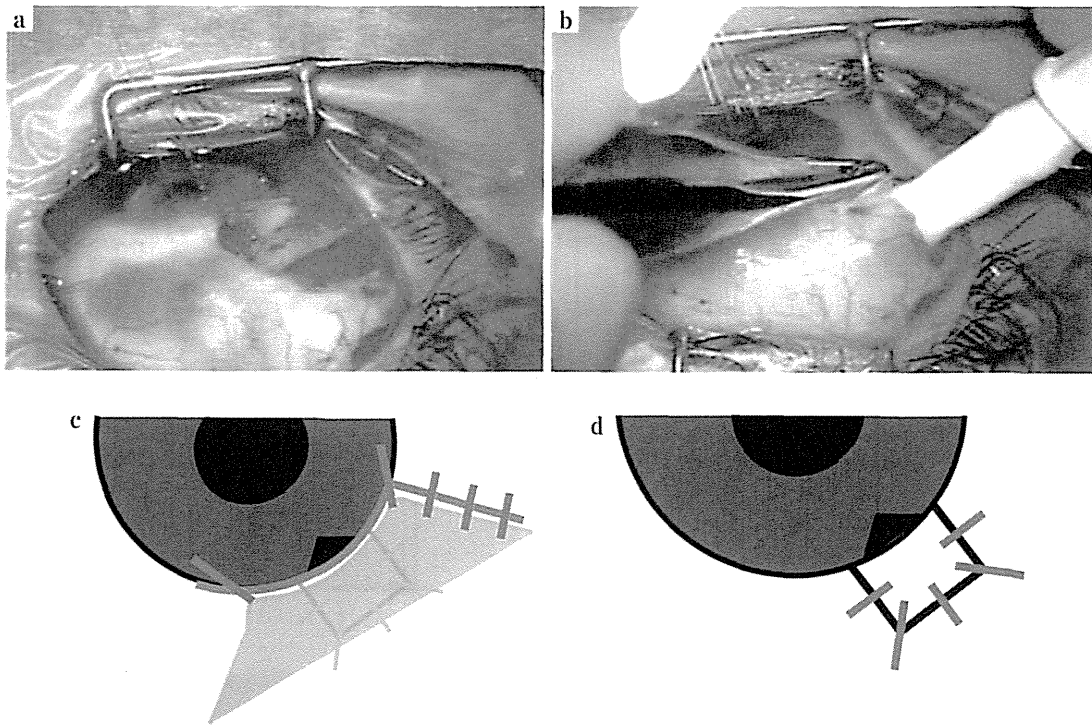


図8 MMC処理～強膜弁縫合手順

a: ちぎれない程度のしっかりした大きさのスポンジを使用. b: 輸液セットを用いた生食での洗浄. Tenon 嚢をしっかりと膨らませる. c: 膨らませた Tenon 嚢を輪部結膜とともに縫着. d: 強膜弁の縫合.

手術例や血管新生緑内障などのような癒着が予想される例では5分. スポンジを置く際にはその個数を必ず確認し, 破片を残さないように注意する. 洗浄は輸液セットに接続した生理食塩水300mlを用いて行い(図8-b), 結膜上, Tenon 嚢内および嚢下, 強膜弁周囲を含めて十分に洗浄, 合わせて後に輪部結膜縫合時に Tenon 嚢を輪部まで引き寄せられるように十分に Tenon 嚢を膨らませておく. このときに膨らませた Tenon 嚢を後の結膜縫合時に結膜とともに輪部に縫着する(図8-c)ことで Tenon 嚢に裏打ちされた濾過胞壁を形成させることができる.

5. 強膜弁縫合

10-0 ナイロン角針(アルコン 10-0 ナイロン, CU-5)を用い, 強膜弁のエッジとその間を通常は計5針縫合している(図8-d). 強膜弁縫合におけるポイントは, 左右のバランスを重視し(図6-e), 針穴からの房水漏出を予防するために有鉤鑷子で把持する際に鉤の部分で貫通させないように気をつけるとともに, 縫合時の針が強膜弁全層を貫かないようにも注意する(図6-f).

このように細心の注意のもとに施行するレクトミーであるが, 時として以下に示すような症例に巡り会うことがある. その際には持てる力, 全身全霊を傾けて対処するしか方策はない.

レクトミー哀歌

東海の小島の磯の白砂に

われ泣き濡れて蟹とたわむる

石川啄木

強膜のフラ(ッ)ブのそばの大穴に

われ泣き濡れて糸とたわむる

はたらけどはたらけど

猶わが生活 楽にならざり

ちっと 手を見る

石川啄木

繕えど繕えど

なお水漏れは 止まらざりけり

ちっと 目を見る



図9 マイトマイシン (MMC) 塗布

MMCはベンシーツ[®]に染みこませる。しっかり奥まで挿入する。

マイレクトミー：私のこだわり

大鳥：強膜弁の厚さ、硬さには個人差があり、常に強膜半層切開をイメージして、四角形の一重強膜弁を作製している。MMC スポンジはひも付きの Delicot[®] を使用し、結膜下への迷入を予防している。強膜縫合は、10-0 ナイロン糸ヘラ針 (マニー社 #1404) で4糸縫合するが、後方の縫合は輪部側の縫合よりも弱めにしている。

中村：MMCはベンシーツ[®]に染み込ませて塗布する (図9)。ベンシーツ[®]は糸付きなので、抜去が容易であり、教え間違いやとり忘れも防ぐことができる優れたものである。強膜弁の縫合では後方へ房水を導きたいので、両サイドは強めに縫合し、flapの角は若干弱めに縫合する。房水の漏れ具合で、flapの底辺上にもう1糸、追加することがある。糸はエチロン[®] カアルコン[®]の角針を使用している。

狩野：術後低眼圧の原因となるので1枚目のフラップが薄くならないよう十分留意する。横方向からの房水流出がないように強膜縫合する。縫合時フラップは薄く横方向にすくい、フラップを突き抜けないよう注意する。

IV 強膜 Second flap と周辺虹彩切除 — (中村 誠)

1. Second flap と周辺虹彩切除のポイント

レクトミーは「結膜=命」であり、一定の緊張感を維持し続けないといけない手術である。強膜弁の作製は二重弁の場合は、Second flapを十分に深く、かつ十分前方まで作製するのがコツである。毛様体を傷つけないために、実際は「線維柱帯」ではなく「角膜内層切除」のつもりで強角膜片切除する。周辺虹彩はまず半幅を切開

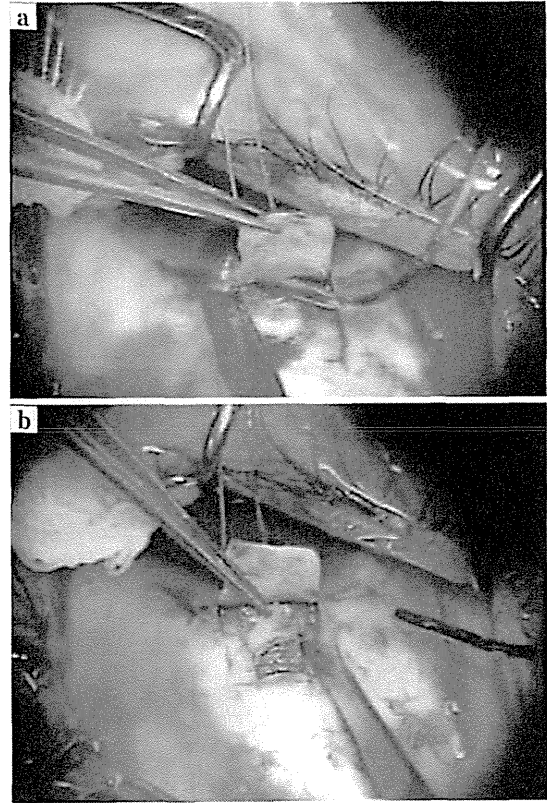


図10 強膜弁作製

a：強膜の半層で、角膜内まで進入する。b：Second flapは毛様体が透けて見える程度まで深く、横幅はFirst flapより一回り狭く。

して房水漏出を確認してから、残る半分を切除することがポイントである。

2. Second flap と周辺虹彩切除の実際

1) 強膜弁作製と Second flap 切除

強膜弁は二重弁を原則としている。First flapは強膜の厚みの約半層で、白内障手術のときと同じ程度まで、角膜内に進入する (図10-a)。切開線はダイヤモンドメスで、flapの剥離はグリスハーバー[®]のゴルフ刀で行っている。Second flapは縦長に、十分深く作製する。深さはuveaが露出するぎりぎり手前まで、線維柱帯切開術のflapの厚みと同じ程度としている (図10-b)。ただし、横幅は少し狭くして、First flapがぴったりと強膜切開底と密着できるようにして、flapの側壁から房水が漏れにくくしている。

Second flapを十分深く作製すると、Schlemm管の外壁は一緒に剥がれ、Descemet膜より表層の角膜まで連続して剥離される。ここまで進んだら、次にSecond flap

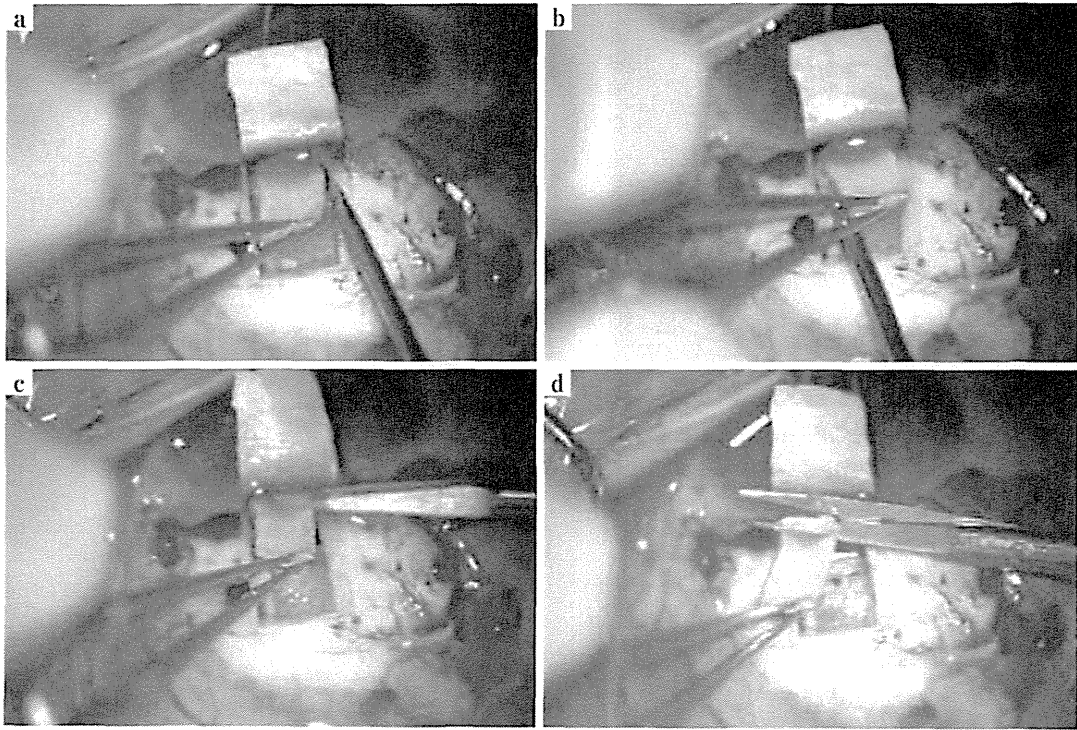


図 11 Second flap 切除

縦. 縦 (a, b) にまず穿孔し, 前方をバナス剪刀で切開して (c, d), 一塊として切除.

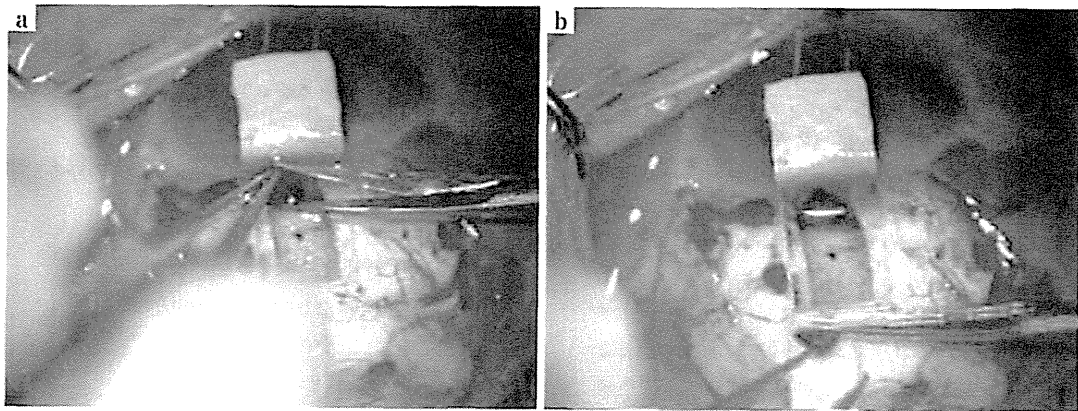


図 12 周辺虹彩切除と強膜・結膜縫合

a: まず半幅切除し, 房水の漏出を確かめる. b: 残る半幅を切除する.

の切除を行う。筆者のやり方は、Second flap の側壁の両サイドで、Schlemm 管より前方の残余組織を V-lance で穿孔して (図-11a, b)、最前線をバナス剪刀で切開する (図 11-c, d) という方法である。線維柱帯の位置に、内皮網の組織が薄い膜状に残るので、これを鑷子でピーリングすると、周辺虹彩が嵌頓してくる。

2) 周辺虹彩切除

周辺虹彩は、前方へ折り返し、まず全幅のうち半分ま

で切開し、房水が流出するのを確認のうえ、残り半分を切除する (図 12)。一気に全幅を切除すると虹彩前葉組織のみの切除となり、後葉を残す羽目になる。またあまり虹彩を引き出しすぎると、特に眼内レンズ眼では前部硝子体膜を傷つけて硝子体が嵌頓して厄介なことになる。

一連の動作で、肝に銘じておくことがある。それは、本術式は「線維柱帯切除術」とよばれているものの、実際には、それより前方の角膜側組織を半層切除するとい

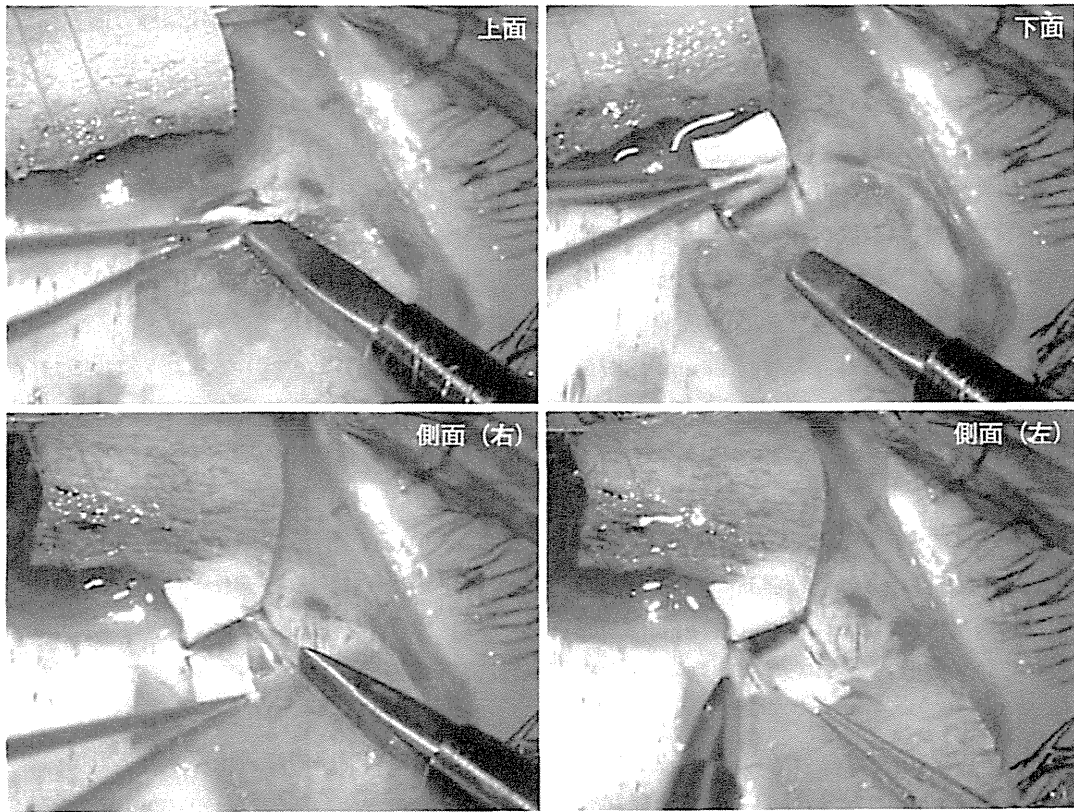


図 13 線維柱帯切除手順 (深層強膜弁ごと)

深層強膜弁の上面、下面、側面 (右)、側面 (左) の順に切開し、引き出しを引き抜くように切除。

う意識を持つことと、毛様体を傷つけないということである。毛様体を傷つけると大出血を起こすからである。線維柱帯の高さで強膜ブロックを切除すると、かなり前方の虹彩を掴みにいかなければならず、それを怠ると毛様体を傷つけてしまう。また、創傷治癒の観点からも、増殖能のない角膜内皮側を切除するほうが濾過効果の長期維持を期待できる。これらの理由で、線維柱帯より前方で強角膜組織片を切除するのである。

マイレクトミー：私のこだわり

大鳥：強膜窓作製は、新しい15°メスで縦-縦-横-横の順番で行っている。手前の部分は剪刀を使用し、線維柱帯よりも角膜寄り切除している。周辺虹彩切除は2段階で行い、確実に虹彩後葉まで切れていることを確認するようにしている。

森：二重強膜弁作製法は中村先生とほぼ同じ。線維柱帯切除は2枚目強膜弁ごと行う。すなわち、2枚目強膜弁作製後、1枚目と2枚目の強膜弁間の輪部角膜で前房に到達 (図 13 上面)、さらに2枚目強膜弁下の露出させ

たSchlemm管部分で線維柱帯を切開して前房に達する (図 13 下面) ことで、2枚目強膜弁の上下を切った形とする。次いで2枚目強膜弁の両サイドの垂直切開を延長する (図 13 側面右、左) 形で、あたかも引き出しを引き抜くように2枚目強膜弁ごと線維柱帯を含んだ強角膜片を切除する。虹彩切除は根部を切らないように注意。虹彩切除後の出血に対してはできる限りボスマン加BSSによる止血を試み、ジアテルミーによる凝固止血は組織の収縮を伴い炎症を惹起すると考えられるため、可能な限り避ける。

狩野：強膜窓作製ではまず角膜側の横方向を切開し、次に線維柱帯の中央の高さで横切開したうえで両側の縦切開を手前から切り上げるように行う。同時手術など角膜側の切開がしにくいときは剪刀やパンチを利用する。虹彩切除はつまんだ虹彩を角膜側かつ9時側に倒して12時側を半分切開し、次に角膜側かつ12時側に倒して9時側の残りを切開、切除する。

V 結膜縫合 (大島安正)

1. 結膜縫合のポイントとバリエーション

レクトミーは、房水を結膜下に導く代表的な濾過手術である。房水が結膜から眼外に漏出すると、濾過機能が低下して、レクトミーは不成功に終わるので、一連の術式の最後の手技である結膜縫合は、慎重に行わねばならない。房水漏出をきたさないために、Tenon 嚢を裏打ちさせることを心がける。高齢者では、Tenon 嚢が後退していることが多く、結膜が非常に薄いので、Tenon 嚢の存在をあらかじめ確かめておくことが重要である。

レクトミーの結膜切開法には、輪部基底結膜弁(円蓋部結膜切開)と円蓋部基底結膜弁(輪部結膜切開)の2種類がある。筆者も以前は、輪部基底結膜弁を作製していたが、近年は初回手術では、ほぼ全症例に円蓋部基底結膜弁を作製している。それぞれの方法について、手技のコツを紹介する。

1) 輪部基底結膜弁の場合

結膜、Tenon 嚢、Tenon 嚢、結膜の順番で巾着縫合を端々縫合と連続縫合で行うとよい。結膜縫合には、通常、10-0 ナイロン丸針糸(マニー社製、#1459)を使用する。結膜縫合では、ヘラ針を使用すると結膜に穴があきやすいことから、丸針を使用することが基本であるが、Tenon 嚢が十分にあれば、ヘラ針で縫合しても問題ないことも多い。強膜弁から離れているので、比較的安心して縫合が行える。結膜を Tenon 嚢で裏打ちしながら縫合することがポイントである。濾過量が多いときには、縫合糸の間隔が大きいくところから房水が漏れやすいので、手術の最後に前房形成をしたときに、結膜からの房水漏出の有無をしっかりと確認し、房水漏出があれば、端々縫合を追加する。

2) 円蓋部基底結膜弁の場合

輪部基底結膜弁の場合と異なり、強膜弁に近いところを縫合するので、結膜に細心の注意を払って縫合を行うことが重要である。

まず、最初に輪部寄りの結膜を2カ所しっかりと縫合することが重要である(wing suture)。結膜をしっかりと引きのばして強角膜に縫合すると、輪部結膜の切開範囲が少なければ、これだけで結膜縫合を終えることも可能であるが、術後管理をするうえで、眼球マッサージを

することを考えると、輪部に接線方向で縫合を置いておくほうが安心である。

輪部の接線方向の縫合法としては、半返し縫合、Weiss 縫合、輪部 block suture などがあるが、筆者は輪部 block suture を好んで行っている。以下に詳細な方法を記述する。

(1) L 字結膜切開の角を 10-0 ナイロンヘラ針糸(マニー社製、#1404)で縫合し、結膜と強角膜をしっかりと縫合し、組織がずれないようにしておく(図 14-a)、ヘラ針のほうが結紮部分を埋没しやすい。

(2) 輪部結膜切開の端に 10-0 ナイロン丸針糸(マニー社製、#1459)を通糸して、結膜と強角膜を縫合して、wing suture を行う(図 14-b)。結膜下の組織が強角膜に接するようにするとそれぞれの組織が接着しやすい。

(3) 10-0 ナイロン丸針糸を切らずに L 字結膜切開の輪部寄りの強膜に逆手で通糸して、輪部 block suture を行う(図 14-c)。眼圧が低下していると、糸が縮まりすぎるので、前房内に人工房水を入れて、眼圧をある程度上げてから結紮部分を(2)で通糸した部分に寄せて、糸をしめこむ。

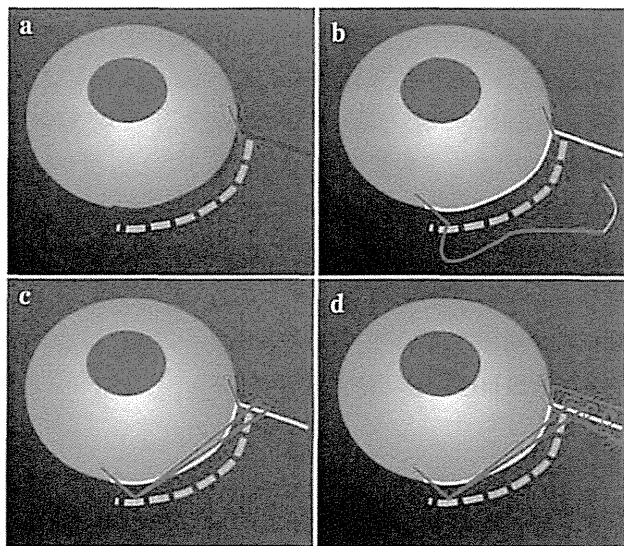


図 14 結膜縫合の手順(円蓋部結膜切開の場合)

- a: L 字切開部分の結膜を輪部強角膜に縫合する。
b: 反対側の結膜を輪部強角膜に縫合して、結膜を引き伸ばす感じて輪部結膜に wing suture をおく。
c: b. で縫合した糸を切らずに、L 字切開の角膜寄りの強膜に逆手で通糸し、b. で縫合した糸と結紮して、輪部に block suture をおく。
d: L 字切開から放射状に block suture をおくと同時に連続縫合で結膜縫合を行う。

(4) L字切開部分は、Tenon 嚢が十分に厚ければ、放射状におく block suture のみでよいが、通常は結膜、Tenon 嚢、結膜の順番でランニング縫合を行う (図 14-d)。結膜下に Tenon 嚢が少なく結膜の伸展性が悪い場合には、結膜、強膜、結膜の順番でランニング縫合を行い、強膜と結膜をしっかりと縫合し、進展性のある下方の結膜を上方に移動させておく。

2. 結膜縫合でのトラブルシューティング

1) ボタンホールの対処法

濾過胞再建術の結膜癒着剝離のときなど、結膜と強膜との癒着が強い場合には結膜に大きなボタン状の穴 (ボタンホール) が空きやすい。結膜欠損面積が小さい場合には、結膜のみを縫合すればよいが、ボタンホールが空いてしまった場合には、Tenon 嚢を一部切除して、欠損した結膜部分に裏打ちして、結膜縫合を行うことで、房水漏出を予防できる。

2) 高齢者のレクトミーで結膜が非常に薄い場合の対処法

高齢者では、Tenon 嚢が本来の外科的輪部よりも後方に移動していることが多く、手術中に結膜が裂けてしまうこともあり、結膜のみで縫合を行うと房水漏出を抑えることができないことがある。このような場合には、後方に移動している Tenon 嚢を前方に引き出して、輪部付近に縫い合わせておくとよい (図 15)。結膜が裂けてしまった場合には、結膜と結膜を縫合するよりも、

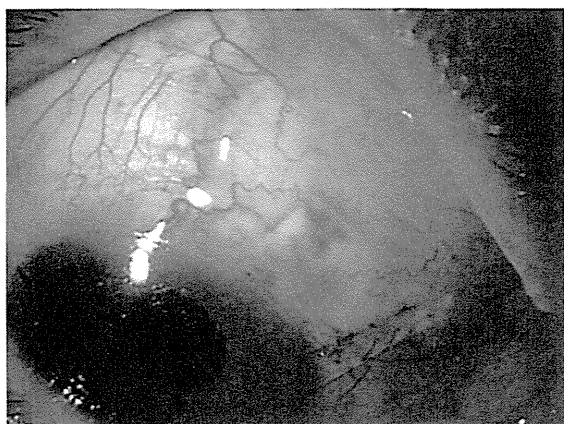


図 15 88 歳、女性のトラベクレクトミー術後 2 週間の濾過胞 (右眼)

高齢者では、輪部結膜付近の Tenon 嚢がほとんどなく後方に後退していることが多い (耳側)。Tenon 嚢を後方から輪部寄りに引き出して、強膜に縫合しておくことで、術中に結膜が裂けたとしても Tenon 嚢があると、結膜からの房水漏出を予防できる (鼻側)。

Tenon 嚢と結膜を縫合するようになるとよい。Tenon 嚢があると結膜上皮は数日で必ず被覆してくる。端々縫合で房水漏出が止まらないときは、block suture の要領で周りから組織を寄せて創を閉じるとよい。

おわりに

緑内障患者の高齢化に伴い、視機能を維持するために、高齢者であってもレクトミーを選択せざるをえない状況が今後増加するものと予想される。高齢者では、結膜が非常に薄いことが多く、結膜からの房水漏出をきたしやすい。結膜からの房水漏出が持続すると、結果として、レクトミーが不成功に終わる。結膜切開の時点から Tenon 嚢の状態を十分に把握しておき、術中のトラブルに対処できるように心がけておくことが大切である。

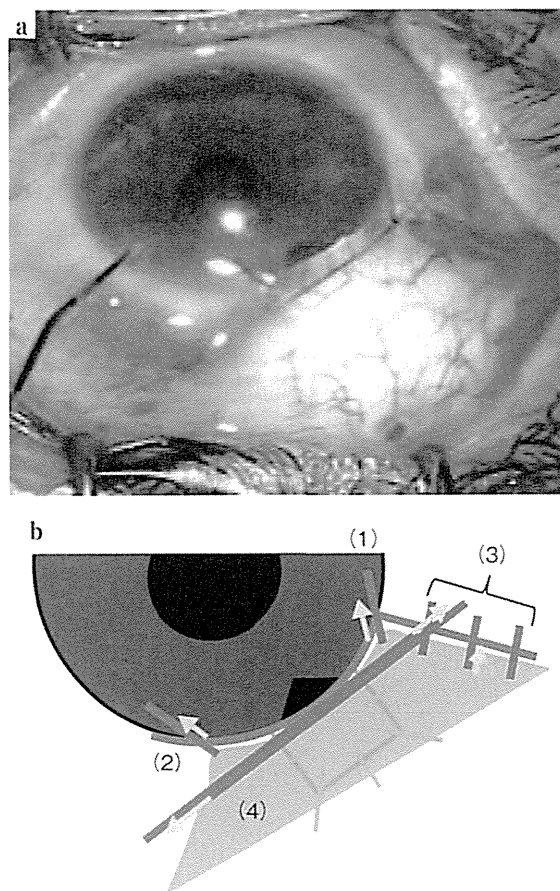


図 16 結膜縫合手順

a: 手術終了時所見。b: 10-0 ナイロン角針を用い、(1)、(2)、(3)、(4) の順に縫合。(4) は結膜上から強膜をすくったマットレススーチャーで、2 カ所の刺入点と刺出点が一直線上にのって、輪部結膜を押しえ込むように設置。

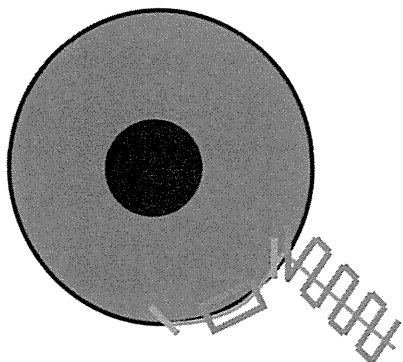


図 17 結膜縫合

まず輪部切開断端に1糸ずつ端々縫合(緑線)。次に切開線中央部にマットレス縫合。最後に放射状切開部を連続マットレス縫合する(赤線)。

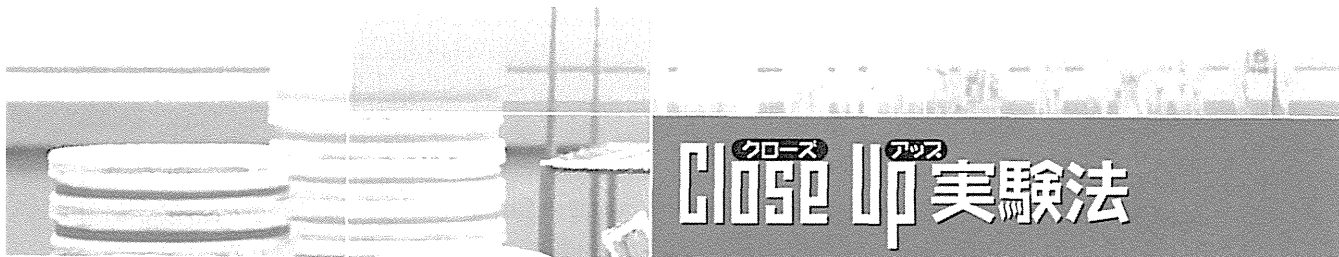
マイレクトミー：私のこだわり

森：通常、再手術例であっても円蓋部基底結膜弁によるレクトミーを基本としているため、結膜はすべて輪部縫合である(図16-a)。縫合糸は強膜弁を縫合したものと同一10-0ナイロン角針(アルコン10-0ナイロン、CU-5)を用いる。輪部縫合は「ハの字」型にテンションをかけながら、結膜、Tenon 嚢をすくい、角膜まで通糸したうえで、結紮部を埋没する(図16-bの(1)、(2))。いずれも通糸はフリーの結膜を先に通した後に固定部分に通す(図16-bの矢印)。輪部に縫着する Tenon

嚢は、MMC 洗浄時に十分に生理食塩水で膨らませて拡張した部分を後方から持ってくる。次いで子午線方向の結膜切開部を結膜-Tenon 嚢-強膜-Tenon 嚢-結膜と通糸してleakのないように縫合する(図16-bの(3))。最後に輪部には通糸部分が一直線になるような水平ブロック縫合を結膜上から強膜をすくう形でマットレススーチャーとして置く(図16-bの(4))。

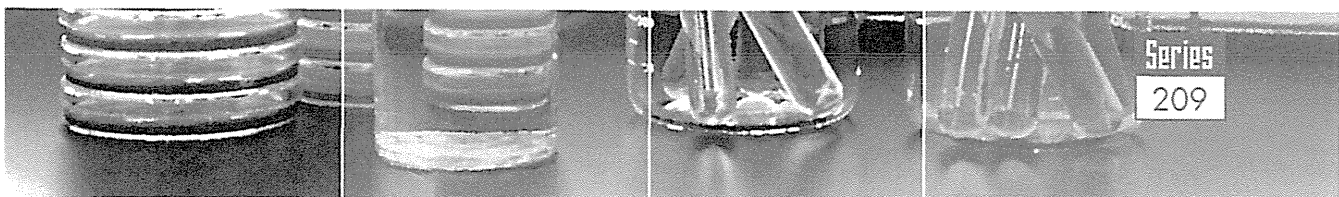
中村：レクトミーは「結膜=命」である。ボタンホールを作らないために、糸は丸針(マニー[®])ナイロン糸を使用している。輪部切開縁の両端に「結膜-角膜」となるよう、結膜側から通糸して、しっかり角膜組織をすくって端々縫合する。ついで、輪部切開縁の中央部の結膜-角膜間にマットレス縫合を置く。最後に結膜放射状切開部を連続マットレス縫合する。円蓋部側から開始し、輪部に近づくにつれ、結膜と Tenon 嚢が薄くなってくるので、多くの場合、強膜にも通糸していく。最後にやはり結膜側から角膜へすくって結紮する(図17)。

狩野：輪部縫合はヘラ針の10-0ナイロン糸を、block sutureはヘラ針9-0ナイロン糸を用いている。縫合時に結膜通糸部にテンションがかかると通糸孔が拡大し、房水漏出の原因となることがあるので、まず角膜に通糸して持針器で持ち直したうえで結膜に通糸している。block sutureは結膜上からブラインドで通糸するが、Tenon 嚢が厚く通糸しにくいときは結膜切開して直視下に強膜をすくう。



大規模シーケンサー解析用 ヒトゲノム標的配列濃縮法

中野正和, 田代 啓



はじめに

大規模シーケンサーの登場により、そのデータ産生量やカバー率の高さからヒトを含めたあらゆる生物種のゲノムを解析するにあたり、既存の概念を超越するさまざまな新発見がもたらされている。ゲノム医学の分野では、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) マーカーによるゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study : GWAS) で同定された数々の疾患に関連する染色体領域を精査する手段として精力的に用いられはじめている。GWASで同定されたマーカー SNP それ自体や同一連鎖不平衡ブロック上の SNP には疾患の直接的要因となるような強い影響力がないのに、そもそも大多数の SNP が近傍に遺伝子が存在しないいわゆる “gene desert (遺伝子砂漠)” 領域由来で、ごく一部の疾患を除いて疾患の発症機序に結びつく生化学的な手掛かりが得られていないからである¹⁾²⁾。しかし、遺伝子砂漠領域には少なくとも統計学的に疾患に関連付けられる SNP が存在する以上、遺伝子の発現を遠隔調節している何らかの分子機構が存在する可能性が高い。同定された SNP が未

知の調節配列上にあるのかもしれない。あるいは、DNA チップの感度では捉えきれない rare variant が何らかの役割を果たしているかもしれない。欧米諸国では、GWAS レースでは明かされなかった疾患の “missing heritability” を大規模シーケンサーによって力づくで暴こうとしている³⁾。

しかし、大規模シーケンサーといえどもヒト全ゲノムのシーケンズデータを多検体から取得することは検体処理能力およびコストの面から依然難しい。そこで、シーケンサーに供する試料の前処理として、研究者が興味のある領域あるいは特定の構成成分 (例えば遺伝子のエクソン) をゲノムから特異的かつ効率的に捕獲する技術 (標的配列濃縮法) が開発されている。現在までに開発されている標的配列濃縮法は、ハイブリダイゼーション、MIP (molecular inversion probe)、PCR に基づく方法に大別される。ハイブリダイゼーションに基づく方法では、標的配列に相補な DNA プローブをアレイ上で合成し、アレイ上⁴⁾ またはアレイから遊離させた溶液中において⁵⁾⁶⁾ 断片化ゲノム DNA とハイブリダイゼーションすることにより、ゲノムの広範な領域や大量の構成成分を一度に濃縮す

Enrichment of sequence targets from human genome for the follow-up studies of GWAS using next-generation sequencers

Masakazu Nakano/Kei Tashiro : Department of Genomic Medical Sciences, Kyoto Prefectural University of Medicine (京都府立医科大学ゲノム医学部門) E-mail : manakano@koto.kpu-m.ac.jp

ることが可能である（ロシュ・ニンブルジェン社やアジレント・テクノロジー社がキット化している）。同様に、多数の標的配列を一度に濃縮できる方法としてMIPに基づく方法⁷⁾があり、この方法は標的配列の上流と下流に相補な配列を含むDNA分子を用いて標的配列を環状に捕獲して増幅する方法である。しかし、両方法ともにゲノムに相当量存在するくり返し配列を含む標的や相同性の高い遺伝子ファミリーを構成する遺伝子群を特異的に濃縮することは原理的に困難である。さらに、標的配列ごとのハイブリダイゼーション効率に差があることから、取得できるシークエンスデータの深さ（カバー率）に数十～10,000倍におよぶバイアスが生じてしまう弱点がある。一方PCRに基づく方法は、領域を数百bpの断片に分けて増幅する通常のPCRや10 kb前後の大きな断片に分けて増幅するlong-range PCRにより標的配列を特異的に増幅する方法である。この方法は、シークエンスデータのカバー率の高さや均質性において定評があるものの、個々の反応を1ウェルずつ行う必要があり、容易にスケールアップできない点に課題がある。

本稿では、PCRの利点を保持したまま一度に多数の標的を濃縮できる新しい標的配列濃縮法として、先進的なマイクロ流路系を開発したRDT (RainDance Technologies) 社 (<http://www.raindancetechnologies.com/>) の技術を紹介する。本法は、異なる標的配列に対するPCRを1ウェルの中で一粒一粒のマイクロ液滴中で独立に行うことにより、何千という標的配列を増

幅効率の差がなく高効率に濃縮することができる画期的な技術である。

● 原理

RDT社が開発したマイクロ流路系では、pL量の液滴を1時間に1,000万粒調製することができ、この液滴に反応溶液を封入することにより一粒一粒が独立したバイオリクター（反応系）になる。標的配列濃縮法では、この技術を2つの場面で応用している（図1）。1つ目は、標的領域に対するForwardとReverseプライマーを等molずつ封入したプライマーセットの液滴を調製するときである（図1A①～③）。その後、全標的に対する液滴を1本のチューブにプールし（図1A④）、プライマーライブラリとして用いる（図1B⑤）。もう1つは、プライマー以外のPCR溶液（テンプレートDNAや酵素等）を封入した液滴を調製し（図1B⑥）、それをプライマーライブラリの液滴一粒一粒と融合させるときである。異なるチャンネルから添加された2種類の成分は、合流した後に電荷を加えることで融合する（図1B⑦）。その結果、一標的に対するプライマーセットとゲノムDNAを含むPCR溶液が粒径の揃った一粒ずつの液滴に独立に封入される。これらの液滴を連続的に回収し（図1B⑧）エマルジョンPCRを行う（図1B⑨）ことによって、一度に多数の標的を特異的かつほぼ均等な増幅効率で濃縮することが可能になる。

準備

● プライマー

プライマーの設計には、Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) 等のウェブツールを用いる。設計の際、プライマー配列上の既知SNPをマスクすることでアレルの配列の違いによる不均衡な増幅 (allelic imbalance) を回避する。同様に、くり返し配列もマスクする^{※1)}。なお、プライマー設計からプライマーライブラリの調製に

※1 大規模シークエンスで生じるカバー率のバイアスは現状では避けられないので、前処理でのバイアスを可能な限り排除することが賢明。

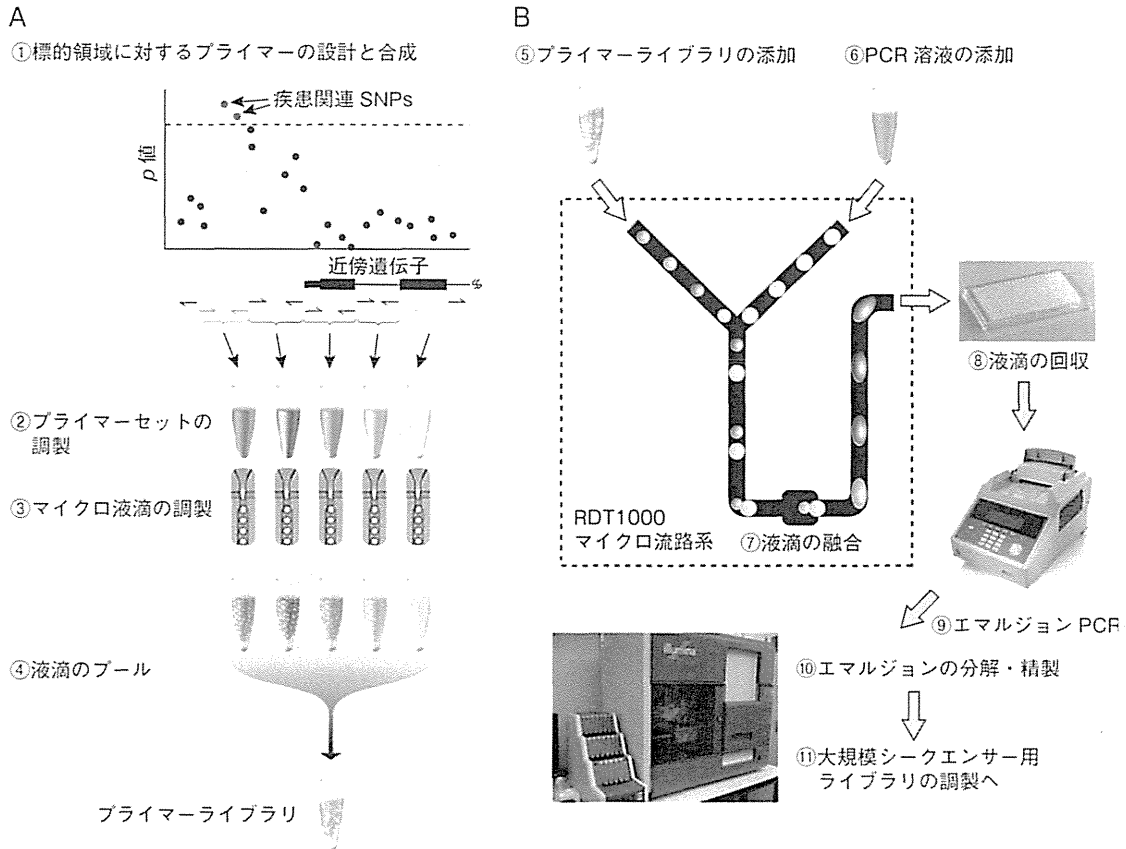


図1 マイクロ流路系を応用した標的配列濃縮法

A) GWASで同定された疾患関連領域をカバーするプライマーを設計し(①)、合成したForwardとReverseプライマーを等molずつ含む溶液を調製する(②)、それぞれのプライマーセットの液滴を調製し(③)、全標的に対する液滴をプールする(④)、「プライマーライブラリ」。B) プライマーを除くPCR溶液(テンプレートDNAや酵素など)とプライマーライブラリをマイクロ流路系に添加し(⑤)、⑥)、電荷をかけることによって両液滴を融合させる(⑦)。その結果、個々の標的を増幅するために必要なPCR溶液の一式が一粒の液滴に封入される。この液滴を連続的に回収し(⑧)、エマルジョンPCRを行う(⑨)、エマルジョンを分解しPCR産物を精製した後に(⑩)、大規模シーケンサー用のライブラリ調製へと移行する(⑪)(図中写真は一部文献8より転載)

至る一連のプロセス(図1A)はRDT社が受託業務として請け負っている。

- ゲノムDNA
- PCR用試薬

Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (ライフテクノロジー ジャパン社)

- ・ 10×High Fidelity Buffer
- ・ 50 μM MgSO₄
- ・ 5U/μL Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Deoxynucleotide Solution Mix (10 mM each, NEB社)

- RDT 1000 Droplet Stabilizer (RDT社)
- DMSO (シグマアルドリッチ社)
- ベタイン溶液 (シグマアルドリッチ社)
- エマルジョンの調製・分解用試薬 (RDT社)
 - RDT 1000 Drive Oil
 - RDT 1000 Carrier Oil
 - RDT 1000 Droplet Destabilizer
- RDT 1000 (RDT社, 図2)
- RDT Chip (RDT社, 図2赤丸囲み)

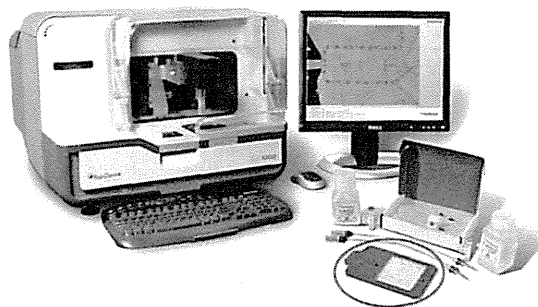


図2 RDT 1000 (RDT社)
 マイクロ流路系での液滴の様子がリアルタイムでモニターできる。赤丸囲みは、マイクロ流路系が搭載されたチップ (RDT 1000 Chip) (写真はDarren R. Link博士より供与)

- MinElute PCR Purification Kit (キアゲン社)
- サーマルサイクラー (ライフテクノロジーズジャパン社・GeneAmp PCR System 9700等)
- Bioanalyzer 2100 (アジレント・テクノロジー社)

プロトコール

1 ゲノムDNAの断片化

Covaris™ (Covaris社), Hydroshear® (Digilab社), Nebulizer (ライフテクノロジーズジャパン社) のいずれかのDNA断片化装置のプロトコールに従って, 2~4 kbのサイズに断片化したゲノムDNAを1.5 μg以上準備する^{※1}。

2 PCR溶液 (プライマーを除く) の調製 (図1 B⑥)

- ① 酵素と室温保存以外の試薬を解凍し, 軽くボルテックスしてス

※1 断片化したDNAの濃度を正確に定量するとともに必ずサイズの分布を確認すること。

ピンダウンした後に氷上に置く^{※2}

②以下の表に従いマスターミックスを調製する

試薬	1 サンプル分 (μL)
10×High Fidelity Buffer	4.7
MgSO ₄	1.3
Deoxynucleotide Solution Mix	1.6
RDT 1000 Droplet Stabilizer	3.6
DMSO	1.8
Betaine	3.6
Platinum Taq DNA Polymerase	0.7
計	17.3

③マスターミックスを軽くボルテックスしてスピンドウン

④PCRチューブに分注

⑤あらかじめ約200 ng/μLに調製した断片化ゲノムDNAを7.7 μL加える

⑥次のステップで使用するまで氷上に置いておく

なお、ゲノムDNAの混入を避けるためにステップ①と②の操作はステップ③以降の操作とは実験室を明確に区別して実施する。

③ RDT 1000 (図2) によるPCR液滴の調製 (図1 B ⑤~⑧)

研究者は、プライマーライブラリ等の試薬、オイル、チューブ、バイアル、チップ等を指定された位置にセットする (後は装置が全工程をフルオートメーションで実施してくれる)。詳細についてはRDT 1000 Operator's Manualを参照されたい。

④ エマルジョンPCR (図1 B ⑨)

①ステップ③から持ち込んだ余分なオイルをピペッティングで極力除く^{※3}

②以下の条件でPCRを行う

温度	時間	サイクル数
94℃	2分	1
94℃	15秒	
54℃	15秒	54
68℃	30秒	
68℃	10分	1
4℃	Hold	-

⑤ エマルジョンの分解とPCR産物の精製 (図1 B ⑩)

① RDT 1000 Droplet Stabilizerを50 μL加える

② 15秒間ボルテックス

③ 高速微量遠心機の最高回転数で5分間室温で遠心

④ 油層と水層の二層に分離するので、チューブの底側の油層を極

※2 RDT 1000 Droplet StabilizerとDMSOは凝固するので氷冷しないこと。

※3 ゲルに試料を添加するためのチップ (Gel Loading Tips) の使用を推奨する。