

201128250A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

オカルト黄斑ジストロフィーの  
効果的診断法の確立および病態の解明

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 角田 和繁

平成 24 年 (2012) 5 月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

オカルト黄斑ジストロフィーの  
効果的診断法の確立および病態の解明

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 角田 和繁

平成 24 年 (2012) 5 月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

オカルト黄斑ジストロフィーの効果的診断法の確立および病態の解明  
角田 和繁

## II. 分担研究報告書

1. オカルト黄斑ジストロフィーの黄斑部錐体細胞機能評価のための視細胞変性モデルにおける錐体 ERG の a 波の起源に関する研究  
近藤 峰生
2. オカルト黄斑症（三宅病）臨床的特徴の検索  
篠田 啓
3. 遺伝性網膜疾患の症例収拾，遺伝子解析および原因遺伝子の探索  
國吉 一樹
4. オカルト黄斑ジストロフィーの遺伝子解析  
町田 繁樹

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

オカルト黄斑ジストロフィーの効果的診断法の確立および病態の解明

研究代表者 角田和繁 東京医療センター臨床研究センター視覚生理学研究室長

研究要旨：オカルト黄斑ジストロフィーは家族性の黄斑変性症であり、いまだに全ての臨床病態および病理学的・分子遺伝学的な原因は明らかにされていない。このため多くの眼科施設では正確な診断に至らず、誤った治療を受ける例が非常に多く、大きな問題となっている。さらに、当疾患には家族性タイプから弧発例タイプまで幾つかの亜型があり、本疾患の正確な病態の解明の必要性が強く求められている。国際的にも疾患概念に対する統一の見解が得られていないのが現状である。

我々は平成22年度までに大家系における疾患調査を行い、優性遺伝型オカルト黄斑ジストロフィーの原因が視細胞の構造タンパク *RP11* の異常によるものであることを世界で初めて解明した。これにより、オカルト黄斑ジストロフィーが視細胞の構造異常を原因とする疾患であることが明らかになった。さらに、これまでに議論のあった本疾患の詳細な病態、長期経過等も明らかになった。

平成23年度には国内専門家による多施設共同研究を行い、家族性、弧発例を含めたオカルト黄斑ジストロフィーの症例を多数集め、臨床型と遺伝子変異との関係を比較検討した。その結果、臨床的にオカルト黄斑ジストロフィーと診断された症例中、遺伝子変異を有する例はほぼ半数程度であること。遺伝子変異を有する症例は、光干渉断層計（OCT）により視細胞外節のみならず視細胞内節がとくに早期から障害されるという形態学的特徴がみられること。遺伝子変異を有しない症例のなかには、*RP11* 遺伝子変異を持つ症例と形態学的に明らかに異なるものが含まれていることが明らかになった。このことは、オカルト黄斑ジストロフィーの原因として、*RP11* 遺伝子以外の関与を強く示唆するものである。

またオカルト黄斑ジストロフィーの症例の詳細な検討に加えて、分担研究者の近藤は網膜電図における錐体反応成分の分析をトランスジェニックウサギを用いて詳細に検討し、また篠田は黄斑部局所網膜電図の計測に影響を与える Stiles-Crawford 効果についてサルを用いて検討を行い、いずれも重要な知見が得られた。

今後、他の原因遺伝子の探索、*RP11* 遺伝子の詳細な機能解析を行うとともに、本疾患の全体像を明らかにすることでその診断がより一般的かつ正確に行われることを目指す。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

近藤峰生	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座眼科学 教授
篠田 啓	帝京大学医学部眼科学講座 准教授
国吉一樹	近畿大学医学部眼科学教室 講師
町田繁樹	岩手医科大学眼科学講座 准教授

A. 研究目的

オカルト黄斑ジストロフィーは家族性の黄斑変性症であり、いまだに全ての臨床病態および病理学的・分子遺伝学的な原因は明らかにされていない。このため多くの眼科施設では正確な診断に至らず、誤った治療を受ける例が非常に多く、大きな問題となっている。さらに、当疾患には家族性タイプから弧発例タイプまで幾つかの亜型があり、本疾患の正確な病態の解明の必要性が強く求められている。国際的にも疾患概念に対する統一の見解が得られていないのが現状である。

我々は平成22年度までに大家系における疾患調査を行い、優性遺伝型オカルト黄斑ジストロフィーの原因が視細胞の構造タンパク *RP11* の

異常によるものであることを世界で初めて解明した。これにより、オカルト黄斑ジストロフィーが視細胞の構造異常を原因とする疾患であることが明らかになったが、すべての症例について同様の遺伝子変異が見つかったわけではない。また、弧発例症例を含めた本疾患の詳細な病態、長期経過等についても明らかでない部分が多かった。

平成23年度には全国多施設の網膜ジストロフィー専門医によって本疾患の詳細な臨床的特徴を調べ、かつ遺伝子解析を行うことで、遺伝子変異と臨床的特徴との比較を行った。また、*RP11* 変異以外の疾患原因を探るべく、変異を有しない患者に対してさらなる家系調査を行った。

## B. 研究方法

本研究の構成は (A) 臨床病態調査、および (B) 原因遺伝子検索からなる。

(A) 臨床病態調査にあたっては主任・分担研究者5施設、および研究協力者3施設間で研究協力体制の構築を行った。症例の発症の経過を詳しく調べる他に、健常者を含めた定期的な眼科ルーチン検査（視力、視野検査等）、電気生理学的検査（全視野網膜電図、局所網膜電図）、画像診断（蛍光眼底造影、光干渉断層計）などを行い、眼科検査の面から疾患の完全な病態把握を行い、また確定診断に必要な効率の良い検査方法の選別、診断基準の作製を目指した（担当：研究分担者近藤、篠田、国吉、町田）。また、研究協力者として愛知医科大学眼科・三宅養三、新潟大学眼科・畑瀬哲尚、名古屋大学・上野真治と共同研究を行い、より多くの家系、症例を対象とした精度の高い解析を行うこととした。

B) 原因遺伝子検索については、電気生理学的検査を用いて確定診断された罹患者および健常者より採血を行った。検体は東京医療センター分子細胞生物学研究室に運ばれ、すでに明らかになっている45および960のアミノ酸置換を調べ、異常が無い場合には全長のダイレクトシーケンスによって遺伝子変異を探索した（担当：研究分担者岩田）。

## C. 研究結果

1) 昨年度に *AJHG* 誌に報告したのち、新たに取得されたオカルト黄斑ジストロフィー患者および血縁者の血液検体は、東京医療センターにおいて22例、名古屋大学において8例、近畿大学において3例、帝京大学において2例、岩手医科大学において2例、合計で37例であった。このうち弧発例と思われる症例が20例含まれてい

た。これまでに25例について *RP11* 遺伝子の解析が終了したが、そのうち変異が見られたのは5例であった。昨年度までにおこなった大家系を含む調査と合わせると、弧発例を含むオカルト黄斑ジストロフィー患者49例のうち、27例において45および960のアミノ酸置換が認められた。

2) オカルト黄斑ジストロフィーと臨床的特徴の異同が問題となる、「眼底所見の正常な錐体ジストロフィー」についても、東京医療センターより5例、名古屋大より1例、近畿大より2例検体採取を行い、*RP11* 変異の検索を行った。このところ、同遺伝子に変異は確認されていない。

3) 東京医療センターにおいて新たにオカルト黄斑ジストロフィーと診断された三宅病家系、8家系中3家系、5名には変異が見られなかった。そのうち優性遺伝と思われる1家系では、2名とも緑内障による視野欠損を併発していたが、緑内障とオカルト黄斑ジストロフィーとの関連は不明であった。

また、同じく優性遺伝と思われる別の1家系では、家系内に定型的網膜色素変性が発症していた。この家系、および *RP11* 変異の見られない小家系において、網膜色素変性との関連を検索すべく *RPI* 遺伝子および、*RDS*, *RHO*, *PRPF31*, *IMPDH1*, *PRPF8*, *CRX* を含む16の遺伝子において、過去に報告のある383の変異をスクリーニングしたところ、いずれの症例でも変異は認められなかった。

4) 東京医療センターにおいて、弧発例のオカルト黄斑ジストロフィー患者における網膜構造の詳細な調査を、*OCT* を用いて行った。弧発例の三宅病9症例全例において、*RP11* 変異は見つからなかった。フリードメイン *OCT* を用いて網膜構造を調べたところ、5症例においては、*RP11* 変異のある症例に特異的な所見である、「黄斑部における *COST* ラインの消失」および「中心窩付近における *IS/OS* ラインの不明瞭化」が見られた。しかし4症例においては、*RP11* 変異のある症例とは異なる *OCT* 所見、すなわち「*IS/OS* ラインが中心窩においても明瞭に観察される」、あるいは、「*IS/OS* ラインおよび *COST* ラインの異常が、中心窩付近のごく狭い領域に限局的に存在する」が見られた。これらの症例を症状経過や電気生理学検査によって変異を有する症例と区別することは不可能であった。これらの所見はオカルト黄斑ジストロフィーのなかには、*RP11* 変異とは全く異なる機序によって生じている例が含まれることを示唆している。

#### D. 考察

多施設の共同研究により、オカルト黄斑ジストロフィー家系から49例の臨床的調査および血液サンプルの採取を行うことができた。DNAダイレクトシーケンスより、そのうち27例において45および960のアミノ酸置換を確認することができた。さらにOCTを用いた画像解析により、変異を持つ症例に特徴的な構造変化が見られることが明らかになり、その特徴は視細胞内節および外節に発現する本遺伝子の性質を裏付けていた。同時に変異を持たない症例のなかにはRP1L1変異とは全く異なる機序により網膜機能障害を来している症例が含まれることが明らかになり、オカルト黄斑ジストロフィーが、複数の異なる病態を含んだ疾患群であることが推察された (Tsunoda et al, *Retina*, 2012)。

RP1L1変異以外の遺伝子検索においては今のところ疾患原因の候補は見つかっておらず、次年度以降はさらに多数の家系調査を行い、また、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析によって新たな原因を探索する予定である。

またオカルト黄斑ジストロフィーの症例の詳細な検討に加えて、分担研究者の近藤は網膜電図における錐体反応成分の分析をトランスジェニックウサギを用いて詳細に検討し、また篠田は黄斑部局所網膜電図の計測に影響を与えるStiles-Crawford効果についてサルを用いて検討を行い、いずれも重要な知見が得られた。

#### E. 結論

多施設共同研究による多数症例の臨床的調査および遺伝子検査により、これまでに分からなかったオカルト黄斑ジストロフィーの性質、病態がより鮮明になった。今後、他の原因遺伝子の解明、RP1L1遺伝子の詳細な機能解析を引き続き行うとともに、本疾患の全体像を明らかにすることでその診断がより一般的かつ正確に行われることを目指したい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Miyake Y. Fundus Autofluorescence in Autosomal Dominant Occult Macular Dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 129(5): 579-602, 2011
- 2) Tsunoda K, Fujinami K, Miyake Y. Selective

abnormality of the cone outer segment tip line in acute zonal occult outer retinopathy as observed by Fourier domain optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 129(8): 1099-1101, 2011

- 3) Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura M, Oguchi Y, Miyake Y. Oguchi's Disease with Unusual Findings Associated with a Heterozygous Mutation in SAG Gene. *Arch Ophthalmol*. 129(10): 1375-1376, 2011

- 4) Chai Y, Yamazaki H, Fujinami K, Tsunoda K, Yamamoto S. Case of acute zonal occult outer retinopathy with abnormal pattern visual evoked potentials. *Clin Ophthalmol*. 5: 1235-1241, 2011

- 5) Tsunoda K, Watanabe K, Akiyama K, Usui T and Noda T. Highly reflective foveal region in optical coherence tomography in eyes with vitreomacular traction or epiretinal membrane. *Ophthalmology*. 119(3): March 2012, 581-587

- 6) Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, and Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in family with mutation of RP1L1 gene. *Retina*. 2012 Mar 29. Epub

##### 2. 学会発表

- 1) Tsunoda K, Hatase T, Usui T, Fujinami K, Miyake Y. Optical Coherent Tomography (OCT) Findings In Occult Macular Dystrophy (OMD) With RP1L1 Mutation. ARVO annual meeting 2011. Fort Lauderdale, Florida. 2011.5.2

- 2) Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Tsuji S, Usui T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Iwata T. Dominant Mutations In RP1L1 Are Responsible For Occult Macular Dystrophy. ARVO annual meeting 2011. Fort Lauderdale, Florida. 2011.5.5

- 3) Shinoda K, Ozeki N, Ohde H, Matsumoto CS, Inoue M, Tsunoda K, Inomata K, Kimura I, Mizota A. Transcorneal electrical stimulation on eyes with no light perception. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 49th Symposium. Quebec City, Canada. 2011.9.19

- 4) Tsunoda K, Suzuki W, Hanazono G, Tanifuji M. Invited Lecture 「Photoreceptor Activities Detected by Functional Optical Coherence Tomography (fOCT) in

the Macaque Retina」. The First Asia and Pacific Rim Symposium on Optical Coherence Tomography. Taipei, Taiwan. 2011.11.12

5) Tsunoda K. Symposium 「Genetics and retinal dystrophy」 「RP1L1 gene mutations in Occult Macular Dystrophy (Miyake's Disease)」. The 2nd JSCEV- KSCEV Joint Meeting, Seoul, South Korea. 2011. 11.19

6) 赤堀正和, 角田和繁, 三宅養三, 福田陽子, 石浦浩之, 辻省次, 白井知聡, 畑瀬哲尚, 中村誠, 大出尚郎, 板橋剛, 岡本はる, 岩田岳. オカルト黄斑ジストロフィー (Occult Macular Dystrophy) の原因遺伝子解明. 第 115 回日本眼科学会総会. 東京. 2011.5.13

7) 角田和繁. シンポジウム「OCT は既存の検査機器を超えたか?」「OCT vs 網膜電図 (OCT による黄斑ジストロフィーの診断)」. 第 47 回日本眼科学学会総会. 東京. 2011.9.4

8) 中村奈津子, 角田和繁, 田中宏樹, 福島梨紗, 窪野裕久, 藤波芳, 篠田啓, 富田香, 三宅養三. 杆体反応の増強をともなう錐体ジストロフィー姉弟例の OCT 所見. 第 65 回日本臨床眼科学会. 東

京. 2011.10.7

9) 渡辺健, 角田和繁, 秋山邦彦, 白井知聡, 野田徹. 中心窩網膜牽引において光干渉断層計(OCT)で観察される視細胞層の円形高輝度領域. 第 65 回日本臨床眼科学会. 東京. 2011.10.9

10) 角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) -最新の知見-. 第 15 回近畿眼科先進医療研究会. 大阪. 2011.6.10

11) 角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) -最新の知見-. 第 9 回信濃町網膜研究会. 東京. 2011.7.1

#### 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



## Ⅱ. 分担研究報告書

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

オカルト黄斑ジストロフィーの黄斑部錐体細胞機能評価のための  
視細胞変性モデルにおける錐体 ERG の a 波の起源に関する研究

研究分担者 近藤峰生 三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座眼科学 教授

研究要旨：オカルト黄斑ジストロフィーの黄斑部における錐体機能を他覚的に研究するには、黄斑部から記録した局所錐体 ERG の a 波を解析することが必要になる。これまでに、サルを用いた実験において、錐体 ERG の a 波の中には錐体視細胞以外に OFF 型双極細胞由来の成分が含まれていると報告されている (Bush & Sieving, 1994; Robson et al. 2004)。しかしながら、これらの結果は全て正常なサルにおける結果であり、視細胞が徐々に変性していくジストロフィーの網膜において錐体 ERG の a 波中にどの程度錐体視細胞の関与があるのかは知られていない。これは、オカルト黄斑ジストロフィーの黄斑部局所 ERG を解析する際に重要な問題である。そこで今回我々は、ロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ウサギにシナプス遮断薬を作用させて、視細胞変性モデルの網膜における錐体 ERG の a 波の起源を研究した。その結果、錐体 ERG の a 波に占める視細胞成分の割合は、生後 4 か月の野生型では 50-70%あるのに対し、Tg ウサギでは 30-50%しかなかった。今回の結果から網膜ジストロフィーの錐体 ERG a 波の解釈には十分な注意が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

オカルト黄斑ジストロフィーの黄斑部における錐体機能を他覚的に研究するには、黄斑部から記録した局所錐体 ERG の a 波を解析することが必要になる。これまでの霊長類を用いた研究によって、錐体 ERG の a 波の中には錐体視細胞以外に OFF 型双極細胞由来の成分が含まれていることが報告されている (Bush & Sieving 1994; Robson et al. 2004)。しかしながら、視細胞が徐々に変性していく、いわゆるジストロフィーの網膜において、両者の関与がどのように変化するかは知られていない。そこで今回我々は、我々が作製した網膜変性ウサギであるロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ウサギを用いてこれを研究した。

### B. 研究方法

4・5か月齢の野生型とTgの白色家兎合計20匹を対象とした。家兎の硝子体内にCNQX、続いてAPBを注入することによって、OFF型双極細胞とON型双極細胞の活動をそれぞれ遮断し、その後で錐体ERGのa波の振幅を計測した。

ERGは、10分間の明順応後にGanzfeldドーム内で全視野刺激で記録を行った。最強刺激を2.2 log cd·s/m<sup>2</sup>として、neutral density filterで0.5 log単位で刺激を変化させてERGを記録した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部動物実験委員会の

承認を得て行った。動物実験においてはARVOの動物実験規約に基づいて動物の苦痛が最小限となるように気をつけた。

### C. 研究結果

図1に、生後4か月と1年の正常ウサギ (WT) と Tgウサギから記録した錐体ERGの代表波形を示す。WTと比較すると、Tgでは錐体ERGのa波振幅は明らかに小さく、また1年ではさらに小さくなった。これは、Tgウサギがロドプシン遺伝子に異常を有していることにより、視細胞が進行性に変性していることによると考えられた。

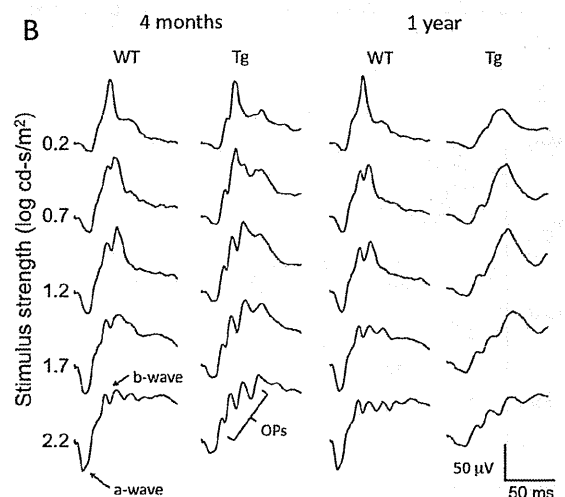


図1. 生後4か月と1年の正常ウサギ (WT) と Tgウサギから記録した錐体 ERG の代表波形

次に、WT と Tg における a 波の振幅に占める視細胞成分の割合 (%) を図 2 にプロットした。WT では、錐体 ERG の a 波に占める錐体視細胞成分の割合は 50-70%程度であったが、Tg ウサギではこれが 30-50%と低くなっていることがわかった。WT と Tg におけるこの%の違いは統計学的に有意であった。

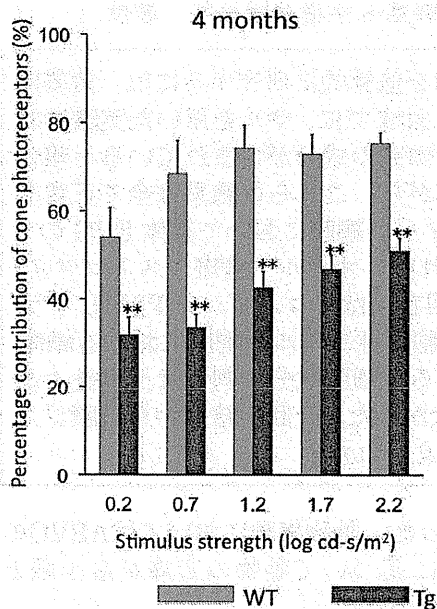


図 2. 野生型 (WT) と RP ウサギ (Tg) の錐体 ERG a 波に占める錐体視細胞成分の割合

これまでの結果により、Tg では a 波に含まれる視細胞以降の成分の割合が高くなっていることがわかったが、この理由として、(1) 錐体視細胞が変性しているにもかかわらず網膜内層の細胞は保たれている、(2) 視細胞の変性に伴って視細胞以降の成分に二次的変化が生じて視細胞以降の成分の電気反応が増大した、の 2 つの理由が考えられた。

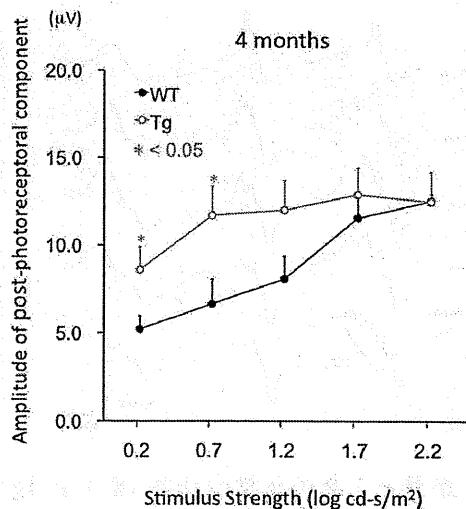


図 3. 野生型 (WT) と RP ウサギ (Tg) 視細胞以降の成分の振幅の絶対値をプロットした

このうち 2 つめの可能性がないかを検討する目的で、視細胞以降の成分の振幅の絶対値をプロットした (図 3)。その結果、特に弱い光刺激に対しては、WT よりも Tg の方が視細胞以降の成分の振幅が大きくなっていることがわかった。以上の結果により、(1) と (2) の両方の理由により、Tg ウサギの錐体 ERG の a 波では視細胞以降の成分の割合が増えていることがわかった。

#### D. 考察

正常サルを用いたこれまでの研究では、強い光刺激を用いれば、錐体 ERG の a 波に占める錐体視細胞成分の割合は 70-80%に達すると考えられていた。しかし、今回の結果から RP モデルウサギでは最強の刺激を用いても、錐体 ERG の a 波に占める錐体視細胞成分の割合は 50%以下であることがわかった。さらに、刺激の強さが中等度であると、錐体 ERG の a 波に占める視細胞の割合は 30%であり、70%近くは視細胞以降の成分であることがわかった。これにより、錐体視細胞が徐々に変性する疾患 (例えばオカルト黄斑ジストロフィー) では、黄斑部局所 ERG の解釈に注意が必要であることがわかった。つまり、黄斑部局所 ERG の a 波振幅がわずかに認められたとしても、その大部分は視細胞以降の成分 (OFF 型双極細胞あるいは水平細胞) であって、視細胞機能が十分に保たれていることを示していないということになる。

#### E. 結論

視細胞が徐々に変性していく網膜 (例えば網膜色素変性) においては、錐体 ERG の a 波は錐体視細胞よりも OFF 型双極細胞の関与が大きくなる。これまで錐体 ERG の a 波を残存錐体視細胞の機能評価として使ってきた研究では、結果が過大評価されていた可能性がある。

#### 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

1) Terui T, Kondo M, et al. Changes in areas of capillary nonperfusion after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with branch retinal vein occlusion. *Retina*. 2011;31:1068-1074.

2) Yasuda S, Kondo M, et al. Rebound of macular edema after intravitreal bevacizumab therapy in eyes with macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina*. 2011;31:1075-1082.

3) Sanuki R, Onishi A, et al. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci*. 2011; 14: 1125-1134.

4) Kondo M, Sanuki R, et al. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLoS One*. 2011;6:e19911.

5) Yasuda S, Kachi S, et al. Significant correlation between electroretinogram parameters and ocular vascular endothelial growth factor concentration in central retinal vein occlusion eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:5737-5742.

6) Hirota R, Kondo M, et al. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:1467-1472.

## 2. 学会発表

1) Kondo M, Sanuki R, et al. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar

cell dysfunction. Annual Meeting of the Association for Research in Vision & Ophthalmology. Fort Lauderdale. May 6. 2011.

2) Kondo M, Hirota R, et al. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in Rhodopsin P347L Transgenic Rabbits. International Society for Electrophysiology of Vision. Quebec. June 11, 2012.

## 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

## 参考文献

1. Bush RA, Sieving PA. A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:635-645.

2. Jamison JA, et al. Characterization of the rod photoresponse isolated from the dark-adapted primate ERG. *Vis Neurosci*. 2001;18:445-455.

3. Robson JG, et al. Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *J Physiol*. 2004;547:509-530.

オカルト黄斑症（三宅病）臨床的特徴の検索

研究分担者 篠田啓 帝京大学医学部眼科学講座 准教授

研究要旨：他覚的な黄斑局所機能評価に用いられる黄斑局所網膜電図において Stiles-Crawford 効果 (SCE)の有無を検討した。細隙灯顕微鏡型黄斑局所網膜電図記録装置を用いてニホンザルの黄斑局所網膜電図を記録した。刺激光の角度を変化させた際の反応の振幅を指標として解析検討を行ったところ、aおよびb波は角度が増すとともに振幅は有意に低下したがd波においては有意な変化は見られなかった。a波やb波においてはSCEが見られたがd波では見られなかった。

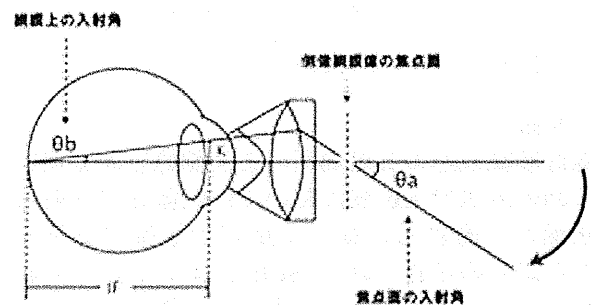
A. 研究目的

オカルト黄斑症（三宅病）は遺伝性黄斑ジストロフィーに分類される両眼性網膜疾患で、進行性の視力低下と、中心網膜感度低下を認めるものの、検眼鏡所見、蛍光眼底所見、および全視野網膜電図(electroretinogram:ERG)で異常を示さないという特徴を有するためにオカルトという病名がつけられた疾患である。診断には、視力視野障害が黄斑部網膜の局所的な異常に基づくものであることを確認することが重要であり、これには黄斑局所 ERG(focal macular ERG ないしは multifocal ERG)が必須である。眼には「視細胞の指向性により瞳孔の周辺を通った光は、中心部を通った光よりも強度が弱くなり、暗く感じられる効果：スタイルズ-クロフォード効果, Stiles-Crawford effect, 以下 SCE」が知られているが、三宅病をはじめとする種々の黄斑疾患において SCE が正常に保たれているか否かについては未知である。今回、細隙灯顕微鏡型の黄斑局所 ERG 装置を用いて電気生理学的に SCE が検出可能か否か検討した。

B. 研究方法

ニホンザル3匹に対して、全身麻酔下で黄斑局所 ERG を記録した。刺激光の角度を±11.7度と変化させた(図1)際の反応について、その波形成分である a, b, d 波の振幅を測定し、刺激角度との関係を解析した。また、種々の波長光による影響を調べるために、白色の他に、赤( $\lambda_{max} = 644$  nm, half-amplitude bandwidth 634 ~ 655 nm), 黄 ( $\lambda_{max} = 590$  nm, half-amplitude bandwidth 585 ~ 596 nm), 緑 ( $\lambda_{max} = 523$  nm, half-amplitude bandwidth 512 ~ 545 nm), 青 ( $\lambda_{max} = 470$  nm, half-amplitude bandwidth 460 ~ 482 nm) の LED による刺激を行った。

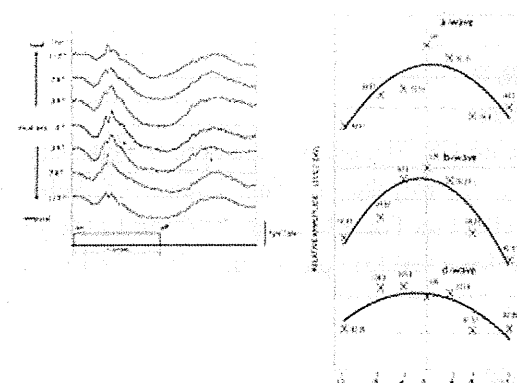
図1 刺激装置の模式図



C. 研究結果

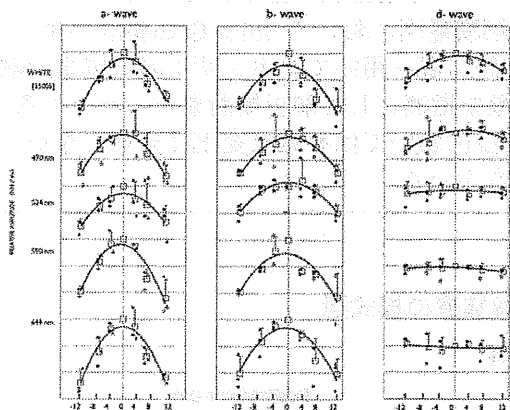
aおよびb波は角度が増すとともに振幅は有意に低下したがd波においては有意な変化は見られなかった。a波やb波においてはSCEが見られたがd波では見られなかった。(図2)

図2 左 刺激光の入射角度を変化させて記録した黄斑局所 ERG 右 横軸に入射角を縦軸に各波形成分(上から a, b, および d 波)の振幅をプロットした。



また、刺激光の波長を変化させた際に得られた黄斑局所 ERG において、刺激光の入射角と各波形成分の振幅の関係は白色光を刺激光に用いた場合と同様の結果であった(図 3)。

図 3 刺激光の波長を変化させた際の、刺激光の入射角と各波形成分の振幅の関係



#### D. 考察

細隙灯顕微鏡型の黄斑局所 ERG 記録装置を用いた今回の方法で a,b 波においては刺激光の入射角が正面から離れるに従って反応の振幅が低下することがしめされこれは SCE によるものと思われた。一方 d 波においては上記反応振幅の低下は有意ではなかったがその理由は不明である。推測の域を出ないが各波形成分の起源の差による可能性が考えられた。また、刺激光の波長を変えても SCE はほぼ不変であった。

#### E. 結論

細隙灯顕微鏡型の黄斑局所 ERG 記録装置を用いた今回の方法で SCE を他覚的に評価することが可能であり、三宅病における黄斑機能評価に応用できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### I. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsumoto CS, Shinoda K, Satofuka S, Nakatsuka K, Mizota A, Miyake Y. The impact of Stiles-Crawford effect on Focal Macular ERGs in Monkeys. *JOV* 2012 Mar 6;12(3). pii: 6. doi: 10.1167/12.3.6. Print 2012.

##### 2. 学会発表

1) Kondo T, Matsumoto CS, Satofuka S, Matsumoto

H, Funada H, Shinoda K, Mizota A. Liquid Crystal Display monitors as a visual stimulator for recording Pattern-reversal Visual Evoked Potentials: Usefulness and limitations. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, (44th; 2011; Fort Lauderdale, Florida). 2011.5.1.-5.5.

2) Matsumoto K, Matsumoto CS, Terauchi N, Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Inomata K, Shinoda K, Noda T, Mizota A, Miyake Y. Transient macular ischemia determined by focal macular electroretinogram. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.

3) Kawai S, Matsumoto CS, Terauchi G, Ohde H, Uchida A, Kawai M, Ozawa Y, Ishida S, Inoue M, Satofuka S, Shinoda K, Mizota A. Acute visual field defect following vitrectomy was determined as optic nerve origin by multifocal ERG and multifocal VEP. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.

4) Shinoda K, Ozeki N, Ohde H, Matsumoto CS, Inoue M, Tsunoda K, Inomata K, Kimura I, Mizota A. Transcorneal electrical stimulation on eyes with no light perception. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.

5) Wakasa R, Kimura I, Matsumoto CS, Terauchi M, Matsumoto H, Imamura Y, Sugahara M, Kondo T, Satofuka S, Shinoda K, Mizota A. Focal retinal response and retinal microstructure in a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.

6) Matsumoto CS, Kondo T, Matsumoto H, Satofuka S, Funada H, Shinoda K, Mizota A: High Frequency 120Hz Liquid Crystal Display monitors as a visual stimulator for recording Pattern-reversal Visual Evoked Potentials. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.

#### J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

4. 特許取得 なし
5. 実用新案登録 なし
6. 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

遺伝性網膜疾患の症例収拾，遺伝子解析および原因遺伝子の探索

研究分担者 國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室 講師

研究要旨：オカルト黄斑変性症（三宅病）と眼底所見が正常な錐体ジストロフィを対象に，その網膜機能解析と遺伝子検索を行った。方法は，遺伝性網膜変性疾患が疑われた症例に，視力検査，眼底検査，蛍光眼底造影検査，網膜電図(ERG)検査，多局所 ERG 検査，暗順応検査，光干渉断層計(OCT)検査を行い，診断した。同意を得たケースに対して採血を行い，その検体は東京医療センターに送付して遺伝子解析を行った。平成 23 年度は 5 例の採血と遺伝子解析を行い，1 例について *RP1L1* 遺伝子の点変異が見つかった。なお，本研究はすべて近畿大学倫理委員会で承認された方法・書式にのっとって行った。

#### A. 研究目的

1991 年に本邦の Miyake らは，眼底や造影検査所見に異常がみられず，黄斑部局所 ERG のみで異常がある症例をはじめて報告し，1996 年に Occult macular dystrophy（オカルト黄斑変性，OMD）と命名された。この疾患は，多局所 ERG 検査の普及によって，当初予想されたよりもその罹患率は高いことが近年明らかとなってきた。

OMD には優性遺伝をしめすもの，劣性遺伝をしめすもの，孤発型などが報告されており，そのうち優性遺伝型 OMD では，2010 年に Akahori らにより *RP1L1* の遺伝子異常が初めて報告され，三宅病と呼ばれるに至っている。

一方，眼底所見が正常な錐体ジストロフィについては過去に数十例の報告がある。過去には *CRX*，*GUCY2D*，*KCNV2*，そして *CNGB3* 遺伝子異常をもつ眼底所見が正常な錐体ジストロフィの報告がある。

本研究の目的は，この OMD と眼底所見が正常な錐体ジストロフィについて，新規遺伝子異常の発見が主たる目的である。またこれらの網膜変性疾患について既知の遺伝子異常を調べることで，その異常の発生率や臨床表現型について解明することがもう一つの目的である。

#### B. 研究方法

まず近畿大学医学部遺伝子倫理委員会に研究内容について書類で申請を行った。

OMD や眼底が正常な錐体ジストロフィの遺伝性網膜変性症が疑われる症例に対して，まず臨床検査を行った。臨床検査は，視力検査，眼圧検査，

眼底検査および眼底写真撮影，フルオレセイン蛍光眼底造影検査，ゴールドマン視野検査，光干渉断層計(OCT)検査，網膜電図(ERG)検査，多局所 ERG 検査であった。ERG 検査はトーマー社製 WLS-20 を用い，国際臨床視覚電気生理学学会による検査プロトコールにしたがって施行した。多局所 ERG 検査は，トーマー社製 Veris Science ver.5.0 を用いて行った。その中で，同意を得たケースに対して採血を行い，東京医療センターで遺伝子解析を行った。なお，遺伝子採血についての説明・同意・方法は，すべて近畿大学倫理委員会に申請し，承認された方法を遵守し，倫理委員会で規定された用紙を使用して施行した。

#### C. 研究結果

本研究の内容は，平成 23 年 1 月に近畿大学医学部遺伝子倫理委員会に申請し，平成 23 年 2 月 2 日に同委員会により承認された。

平成 23 年度に遺伝子採血に同意をいただき，遺伝子検索を行った症例は 5 例であった。うち 3 例は OMD，2 例は眼底所見が正常な錐体ジストロフィであった。OMD 3 例のうち 2 例は同胞（兄弟），そして眼底所見が正常な錐体ジストロフィの 2 例は同胞（兄弟）であった。

5 例のうち，1 例の OMD について，*RP1L1* 遺伝子異常(p.Arg45Trp)が見つかった。

#### D. 考察

今回，遺伝子異常が見つかった OMD は問診する限り孤発例ということであった。OCT 所見は過

去に報告された OMD 症例に類似していた。他の症例は家族歴のあるものだったが、現在までに *RP11* 遺伝子に関しては異常が見つからない。今回遺伝子検索を行った 2 例の眼底所見が正常な錐体ジストロフィについては、兄弟例でかつ 82 歳および 80 歳と高齢で発症は遅く、そして兄のフラッシュ ERG がやや **negative** 型であった。今後は *RP11* 遺伝子以外に *CRX* 遺伝子など他の遺伝子異常についても検索が必要であろう。

また、高齢発症で眼底が正常な錐体ジストロフィについては、OMD のみならず、**peripheral cone dystrophy** の末期などについても鑑別が必要かもしれない。

#### E. 結論

平成 23 年度は、1 例の OMD について *RP11* 遺伝子異常が発見された。平成 24 年度は、さらに症例を増やして検討してゆく計画である。

#### F. 健康危険情報

現在、健康危険情報は無い。

#### K. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Matsumoto C, Shimomura Y. Two siblings of late-onset cone-rod dystrophy with no macular degeneration. *Doc Ophthalmol.* 投稿中。

2) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Nakao A, Takada S, Shimomura Y. A case of bilateral, acquired and acute dysfunction of short-wavelength-sensitive cone systems. *Doc Ophthalmol* 投稿中。

##### 2. 学会発表

1) Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Matsumoto C, Shimomura Y. Two siblings of late-onset cone dystrophy with no macular degeneration. Second joint meeting of KSCEV-JSCEV.

2) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Matsumoto C, Shimomura Y. Relationship between OCT findings and Vision in Patients with Retinitis Pigmentosa. Second joint meeting of KSCEV-JSCEV.

#### L. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 7. 特許取得

なし

##### 8. 実用新案登録

なし

##### 9. その他

なし



## オカルト黄斑ジストロフィーの遺伝子解析

研究分担者 町田繁樹 岩手医科大学眼科学講座 准教授

研究要旨：オカルト黄斑ジストロフィー（OMD）の遺伝子解析を行うため、OMD 症例の臨床データを集積した。明らかな家族歴は無かったが、OMD の臨床所見を呈する 2 症例を検出し、それぞれの遺伝子解析を行った。これらの症例では OMD の既知の遺伝子変異である RP1L1 遺伝子の異常は認められなかった。

### A. 研究目的

オカルト黄斑ジストロフィー（OMD）の遺伝子解析を行うため、OMD 症例の臨床データを集積し、遺伝子解析を行う。

### B. 研究方法

1. 既往歴：家族歴の調査
2. 眼底所見：詳細な眼底検査を行うとともに、フルオレセイン（FAG）およびインドシアニン赤外蛍光眼底造影（ICGA）を施行する。
3. 網膜電図所見（ERG）：全視野および黄斑局所 ERG を記録し、黄斑部の機能低下を証明する。
4. 静的量的視野：中心暗点の有無を確認する。
5. スペクトラルドメイン光干渉断層計（SD-OCT）：黄斑部の微細構造を評価する。
6. 血液採取：血液サンプルを国立感覚器センターに送り、遺伝子解析を行う。

### C. 研究結果

上記の検査所見から OMD と考えられる症例が 2 例あった。症例 1 は 61 歳の女性で中心暗点を訴え、症状は進行性に徐々に悪化している。視力は両眼（0.8）で、黄斑局所 ERG の振幅が低下、脱分極型を呈していた。静的量的視野検査では中心暗点がみられた。OCT では COST が不鮮明で、ONL が薄くなっていた。症例 2 は 64 歳の男性で、視力は右（0.05）、左（1.0）で両眼に中心暗点がみられた。黄斑局所 ERG の振幅が著明に低下していた。明らかな家族歴は無い。2 症例の血液検体の遺伝子解析では MD の既知の遺伝子変異である RP1L1 遺伝子の異常は認められなかった。

更に、眼底が正常な錐体ジストロフィー（CD）の臨床データの集積に努めた。症例は 40 歳の男性で、錐体 ERG 振幅が著明に低下していたが、眼底所見および蛍光造影所見は正常であった。

OCT では COST が消失し、IS/OS ラインが不鮮明となっていた。血液検体の遺伝子解析中である。

### D. 考察

今回、遺伝子解析を行った OMD の 2 症例は、孤発例と考えられた。これらの症例では、優性遺伝性の OMD の既知の遺伝子異常が認められなかった。従って、孤発例の OMD の発症には、優性遺伝性の OMD とは異なった発症メカニズムが関与している可能性がある。

### E. 結論

OMD の孤発例 2 症例では、既知の遺伝子変異である RP1L1 遺伝子の異常は認められなかった。

### F. 健康危険情報

なし

### M. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Machida S, Tamada K, Nishimura T, Harada T, Kurosaka D. Macular function evaluated by focal macular electroretinogram after reduced fluence photodynamic therapy in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy. Doc Ophthalmol. 2012 Dec 31 (Epub ahead of print).

2) Harada T, Machida S, Fujiwara T, Nishida Y, Kurosaka D. Choroidal findings in idiopathic uveal effusion syndrome. Clin Ophthalmol. 5: 1599-1601, 2011.

3) Nishimura T, Machida S, Yokoyama D, Kondo M, Terasaki H, Kurosaka D. Enhancement of ON-bipolar cell response in rabbits carrying Pro347L rhodopsin

mutation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 59: 7610-7617, 2011.

4) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G and Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. PloS One. 2011, 6(5):e19911. Epub.

5) Machida S, Ohguro H, Suzuki M, Tateda M, Kurosaka D. Melanoma-associated retinopathy associated with intranasal mucosal melanoma. Doc Ophthalmol. 122: 191-197, 2011.

## 2. 学会発表

1) Machida S. Pharmacological dissection of cone ERGs of Pro347Leu rhodopsin transgenic rabbits. Symposium for Korean Society of Clinical Electrophysiology for Vision, Seoul, 2011 (symposium).

2) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Ohguro H, Yamamoto Y, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. ERG and cancer-associated retinopathy. Symposium for Korean Society of Clinical Electrophysiology for Vision, Seoul, 2011 (symposium).

3) Nishimura T, Machida S, Tamada K, Yokoyama D, Kurosaka D. Retinal ganglion cell function after repeated injections of ranibizumab into vitreous of patients with age-related macular degeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, Florida, 2011.

## N. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

10. 特許取得

なし

11. 実用新案登録

なし

12. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Miyake Y	Fundus Autofluorescence in Autosomal Dominant Occult Macular Dystrophy	Arch Ophthalmol	129(5)	579-602	2011
Tsunoda K, Fujinami K, Miyake Y	Selective abnormality of the cone outer segment tip line in acute zonal occult outer retinopathy as observed by Fourier domain optical coherence tomography	Arch Ophthalmol	129(8)	1099-1101	2011
Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura M, Oguchi Y, Miyake Y	Oguchi's Disease with Unusual Findings Associated with a Heterozygous Mutation in SAG Gene	Arch Ophthalmol	129 (10)	1375-1376	2011
Chai Y, Yamazaki H, Fujinami K, Tsunoda K, Yamamoto S	Case of acute zonal occult outer retinopathy with abnormal pattern visual evoked potentials	Clin Ophthalmol	5	1235-1241	2011
Tsunoda K, Watanabe K, Akiyama K, Usui T and Noda T	Highly reflective foveal region in optical coherence tomography in eyes with vitreomacular traction or epiretinal membrane	Ophthalmology	119 (3)	581-587	2012
Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, and Miyake Y	Clinical characteristics of occult macular dystrophy in family with mutation of RP1L1 gene	Retina		Mar 29 Epub	2012
Terui T, Kondo M, et al	Changes in areas of capillary nonperfusion after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with branch retinal vein occlusion.	Retina	31	1068-1074	2011
Yasuda S, Kondo M, et al	Rebound of macular edema after intravitreal bevacizumab therapy in eyes with macular edema secondary to branch retinal vein occlusion	Retina	31	1075-1082	2011
Sanuki R, Onishi A, et al	miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression	Nat Neurosci	14	1125-1134	2011
Kondo M, Sanuki R, et al	Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction	PLoS One	6	e19911	2011