

Fluorescence *in situ* hybridization 法および restriction fragment length polymorphism 法を併用した 網膜芽細胞腫の遺伝子診断

羽藤 晋¹⁾, 井上 真¹⁾, 石川 薫¹⁾, 野田 航介¹⁾, 谷野 富彦¹⁾
真島 行彦¹⁾, 小崎健次郎²⁾, 小口 芳久¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾慶應義塾大学医学部小児科学教室

要 約

目的: 片眼性網膜芽細胞腫において retinoblastoma (RB) 遺伝子の germ line 変異を否定することは, 遺伝や二次癌発症の可能性を知る上で重要である。今回, 検査会社が提供している遺伝子解析でそれが可能かを試みた。

方法: 対象は, 慶應義塾大学病院で眼球摘出を行った網膜芽細胞腫 5 例で, 摘出眼球から腫瘍細胞と末梢血からリンパ球を抽出し, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法と restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法で遺伝子解析を行った。

結果: 片眼性 3 例中 1 例で, 腫瘍細胞の RB 遺伝子が FISH 法で 0 コピー, RFLP 法でシグナルが消失し

非遺伝性と診断できた。別の 1 例では RFLP 法で RB 遺伝子のシグナルが 50% 以下で非遺伝性の可能性もあったが, FISH 法で RB 遺伝子が多コピーみられ, 判定不能であった。その他の 1 例では異常を検出できず, 両眼性の 2 例でも体遺伝子の異常が検出できなかった。

結論: FISH 法, RFLP 法の組み合わせにより一部の症例で非遺伝性網膜芽細胞腫と診断できた。(日眼会誌 108: 482-488, 2004)

キーワード: 網膜芽細胞腫, 遺伝子診断, 染色体, RB 遺伝子

Genetic Diagnosis of Retinoblastoma by a Combination of Fluorescence *In Situ* Hybridization and Restriction Fragment Length Polymorphism

Shin Hato¹⁾, Makoto Inoue¹⁾, Kaoru Ishikawa¹⁾, Kosuke Noda¹⁾, Tomihiko Tanino¹⁾
Yukihiko Mashima¹⁾, Kenjiro Kosaki²⁾ and Yoshihisa Oguchi¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

²⁾Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine

Abstract

Purpose: It is important to exclude germ line mutation in cases of unilateral retinoblastoma (RB) to estimate hereditary or possible secondary cancer. We investigated whether genetic diagnosis is feasible in a health check screening program.

Methods: Five patients with RB had surgery for enucleation in Keio University Hospital. Tumor cells from enucleated eyes and lymphocytes representing systemic cells were collected and analyzed genetically by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results: One out of three unilateral RB cases could be diagnosed as non-hereditary by the finding of no copies of the RB gene in the tumor cells using the FISH method and no signal in the RFLP

method. A decrease of signal in tumor cells to less than 50% in the RFLP method was observed in another case of unilateral RB that seemed to be non-hereditary, but the case ultimately could not be diagnosed as non-hereditary because polycopies were found in the FISH method. No abnormality in tumor cells could be found in another unilateral case or in systemic cells of two bilateral cases.

Conclusion: A combination of FISH and RFLP methods can be used to diagnose some cases of RB as non-hereditary.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108: 482-488, 2004)

Key words: Retinoblastoma, Genetic diagnosis, Chromosome, RB gene

別刷請求先: 160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 羽藤 晋
(平成 15 年 11 月 10 日受付, 平成 16 年 2 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Shin Hato, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received November 10, 2003 and accepted in revised form February 27, 2004)

I 緒 言

網膜芽細胞腫は出生児の 16,000~20,000 人に 1 人が発生する小児悪性四大疾患の一つである¹⁾²⁾。両眼性の症例は全体の約 25~30% を占め、その全例が遺伝性 (germ line mutation) である^{1)~3)}。一方、片眼性の症例は残りの 70~75% を占め、さらに片眼性の 15~20% が遺伝性、80~85% が非遺伝性とされている。遺伝性の症例では常染色体優性遺伝を示し、浸透率は 90% と高率である²⁾。

網膜芽細胞腫は悪性腫瘍性病変の中で最も早く癌化のメカニズムが解明された疾患であり、それぞれの 13 番染色体長腕 q14.2 に存在する網膜芽細胞腫遺伝子 (RB 遺伝子) に両アレルとも異常が生じることで発症する¹⁾。Knudson ら⁴⁾によって提唱されたこの概念は Two-hit 説と呼ばれ、RB 遺伝子は正常細胞が癌化に至るプロセスを抑制する癌抑制遺伝子であることが判明し、その構造も解明されている^{5)~9)}。遺伝性の症例では、体細胞の RB 遺伝子において、1 個のアレルがすでに異常 (germ line mutation で、すでに 1 ヒットされている) で、出生後網膜芽細胞におけるもう 1 つのアレルに異常が生じれば (さらに 1 ヒット) 腫瘍化する。一方、非遺伝性の症例では、網膜芽細胞における RB 遺伝子の両アレルにおいて、胎生期か出生後にそれぞれに異常を生じる (2 ヒットされる) 必要がある⁴⁾¹⁰⁾。遺伝性の症例では、すべての体細胞にある RB 遺伝子の片方のアレルに異常が存在するため、非遺伝性の症例に比べて発症年齢が低い傾向にあり、二次癌の発生率も高率となる¹⁾²⁾。

網膜芽細胞腫症例に遺伝子診断を行うことは、遺伝性であれば 10~20% とされる二次癌の発症を予測する点や両親が第二子、第三子をもうける際の統計的には数% とされる網膜芽細胞腫の発症率を予測する上で重要である^{1)11)~13)}。また、将来的に本人が子供をもうける際など、遺伝性が否定できれば将来にわたっても患者や家族の精神的な負担を軽減できる。遺伝子診断の問題点として、RB 遺伝子がエキソン 27 まで存在する 200 kbp の大きな遺伝子であり、点変異のある場所が局限せず、いわゆるホットスポットを持たないことが挙げられる^{14)~16)}。そこで、点変異を含めた遺伝子全解析を行おうとすると、それには時間と労力を要するため、現在で

も広く行われてはいない²⁾¹⁷⁾。近年、臨床検査会社への検査依頼により幾つかの疾患において遺伝子解析が行われるようになってきた。今回、臨床検査会社が提供している fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法¹⁸⁾と restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法を併用して、眼球摘出を行った網膜芽細胞腫症例から採取した腫瘍細胞と、体細胞として末梢血液中リンパ球とをそれぞれを比較した遺伝子解析を行い、片眼性の網膜芽細胞腫症例において、遺伝性の有無が判定できるか試みたので報告する。

II 対象および方法

対象は、慶應義塾大学病院眼科で 2001 年から 2003 年に眼球摘出を行った網膜芽細胞腫症例 5 例である (表 1)。この 5 例のうち、片眼性の網膜芽細胞腫は 3 例、両眼性は 2 例であり、両眼性の 2 例は初診時では片眼性であり、眼球摘出後に僚眼にも発症した症例であった。両親からインフォームド・コンセントを得て、摘出眼球から腫瘍細胞および末梢血からリンパ球を抽出し、それぞれで FISH 法と RFLP 法を用いて遺伝子解析を行った。FISH 法とは患者の体細胞 (分裂中期核リンパ球) および腫瘍細胞 (間期核) に対し、低張処理とカルノア固定を行いエアドライ法でスライド標本化した後、蛍光で標識した DNA probe をハイブリダイズさせ、RB 遺伝子の欠損を調べる方法である。DNA probe は 440 kbp の長さをもつ RB 1-DNA probe (LSI 13 SGDNA probe, Vysis 社, イリノイ州, 米国) を用いた。対比用に No 13 染色体認識用 probe (wcp 13: 赤色) および 21 番染色体 q 22.13-q 22.2 領域を認識するコントロール probe (赤色) を使用した。RFLP 法とは腫瘍細胞と体細胞からそれぞれ同量の DNA を制限酵素で切断し、目的とする領域にハイブリダイズする標識した cDNA probe (今回は RB 遺伝子 cDNA エキソン 9-27 領域を認識) を Southern blot 法で解析する方法である。まず、採取細胞を proteinase K で処理後、フェノールを用いて DNA を抽出した。DNA (5 μ g) を、それぞれ制限酵素 (EcoRI, BamHI, Hind III) で切断した。そこに RB 遺伝子のエキソン 9-27 にハイブリダイズする³²P で標識した cDNA probe (3.8 kbp) を Southern hybridization させた。この方法では遺伝子の欠失が起きていればシグナル強度が減弱す

表 1 症例の内訳

症例	患眼	発症年齢	発育形式	TNM 分類	Reese-Ellsworth 分類
1	片眼 (左)	2 年 3 か月	endophytum	T3bN0M0	Va
2	片眼 (右)	2 年 1 か月	exophytum	T3bN0M0	Vb
3	片眼 (左)	6 か月	exophytum	T3bN0M0	Va
4	両眼	2 か月	endophytum	T3bN0M0	Va
5	両眼	1 歳 9 か月	endophytum	T3bN0M0	Vb

TNM: tumor-node-metastasis

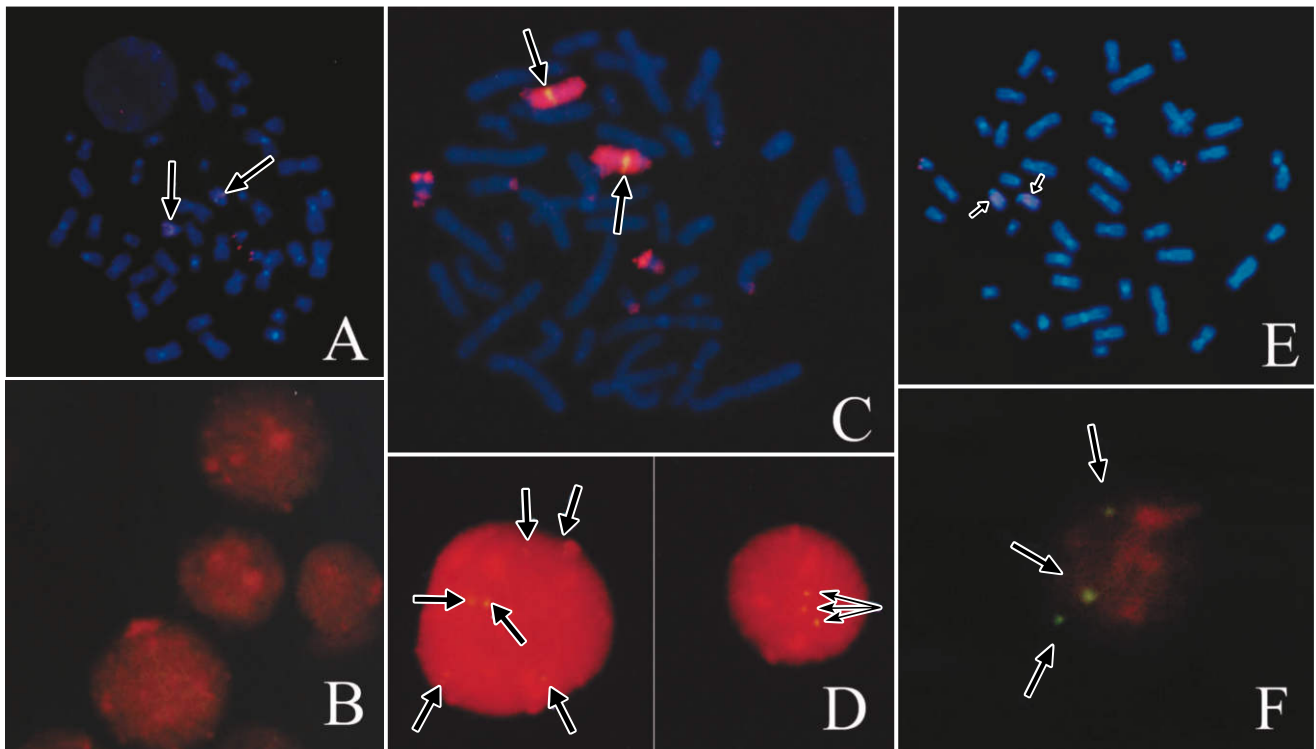


図 1 13 番染色体の fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法の結果。

A: 症例 1 のリンパ球. 体細胞には橙色に発色する網膜芽細胞腫 (RB) 遺伝子が 2 コピーみられる (白矢印).
 B: 症例 1 の腫瘍細胞. 腫瘍細胞には RB 遺伝子が 0 コピーである. C: 症例 2 のリンパ球. 体細胞に RB 遺伝子が 2 コピーみられる (白矢印). D: 症例 2 の腫瘍細胞. 左写真では RB 遺伝子が 6 コピー (白矢印), 右細胞では 3 コピー (白矢印) みられ, 多コピーを呈していた. E: 症例 3 でのリンパ球. 体細胞に RB 遺伝子が 2 コピーみられる (白矢印). F: 症例 3 の腫瘍細胞. RB 遺伝子が 3 コピー (白矢印) みられる.

る. また, 制限酵素の認識部位内に点突然変異があれば, バンドの出現パターンに変化がみられる可能性がある. FISH 法はエスアールエルに, RFLP 法は三菱化学ビーシーエルにそれぞれ依託した.

III 結 果

症例の内訳は表 1 のごとくである. 眼球摘出を行った時期は生後 2 か月~2 歳 3 か月で, 男児 4 例, 女児 1 例であり, 摘出眼の Reese-Ellsworth 分類は Va が 2 眼, Vb が 3 眼であった. 手術時に明らかな全身転移がみられた症例はなく, tumor-node-metastasis (TNM) 分類は全例 T3bN0M0 であった.

症例 1 における FISH 法の結果は, 体細胞の体遺伝子に RB 遺伝子が 2 コピーであったのに対し (図 1 A), 腫瘍組織での RB 遺伝子は 0 コピーであった (図 1 B). RFLP 法では血液からの体細胞が正常対照と差がなかったのに対し, 腫瘍組織ではバンドが欠失していた (図 2). 腫瘍細胞では RB 遺伝子が欠失し, 体細胞では欠失していないので非遺伝性の典型例と考えられる.

症例 2 の腫瘍組織では, RFLP 法ではバンドの出現パターンは同じであるが, シグナルが 50% 以下であった (図 3). 体細胞のバンドは正常対照と同じであり, シ

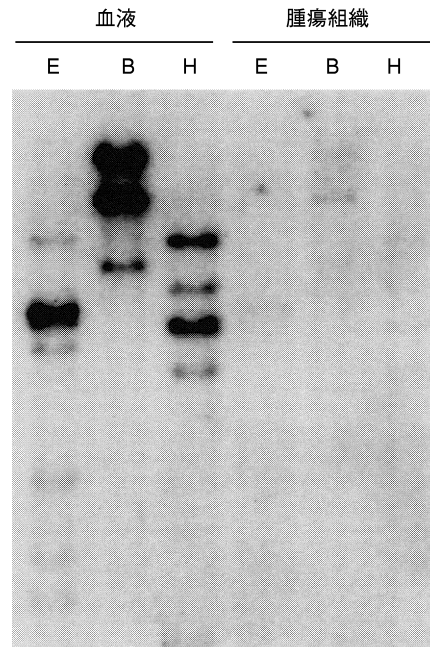


図 2 サザンブロット法による restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法の結果 (症例 1).

血液中のリンパ球からは RB 遺伝子フラグメントのシグナルがみられるが, 腫瘍細胞ではシグナルが欠失している. E: EcoRI, B: BamHI, H: Hind III

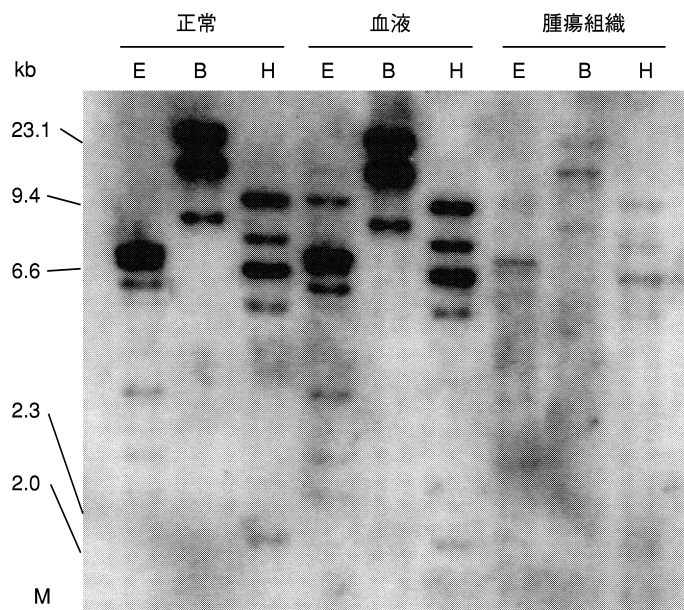


図 3 サザンブロット法による RFLP 法の結果(症例 2).

正常対照と血液中のリンパ球では RB 遺伝子フラグメントのシグナルに差がみられないが、腫瘍細胞では 50%以下のシグナルの減弱がみられる。バンドの出現パターンに差はみられない。

グナルも同等であった。しかし、FISH 法の結果は体細胞では異常がないが(図 1 C)、腫瘍細胞では RB 遺伝子のコピー数が 3~6 コピーと多コピーあり(図 1 D)、癌化による遺伝子の不安定性に伴い RB 遺伝子領域が増幅していた。

症例 3 では、腫瘍組織、体細胞、正常対照で差がなかった。腫瘍細胞は両アレルとも異常であるので、それぞれのアレルとも RFLP 法ではとらえられない点突然変異か小さな欠失があり、今回の制限酵素による切断では異常部位が特定できなかった(図 4)。

症例 4 は両眼性の症例であり、体細胞の RB 遺伝子において 1 個のアレルに異常がある germ line mutation と考えられる。この例では FISH 法と RFLP 法とも異常を検出できず、RB 遺伝子の大きな欠失ではないため、腫瘍細胞では両アレルとも点突然変異か小さな欠失が存在すると考えられるが、腫瘍組織の異常も体細胞の異常も検出できなかった。症例 5 でも RFLP 法ではすべて正常パターン、正常シグナル強度であった。FISH 法では 3 コピーがみられ、癌化による遺伝子の不安定性に伴い多コピーを示していた(図 1 F)。症例 4 と同じく体細胞の RB 遺伝子における 1 個のアレルに点突然変異があると考えられるが、体細胞の異常を検出できなかった(図 1 E)。

5 症例をまとめると、片眼性 3 例のうち非遺伝性と診断できたのは 1 例(症例 1)のみであった(表 2)。1 例(症例 2)は RFLP 法でシグナル減弱がみられたにもかかわらず、FISH 法と組み合わせて考えると判定不能と結論づけられた。遺伝性と推定される両眼性の 2 例では、体

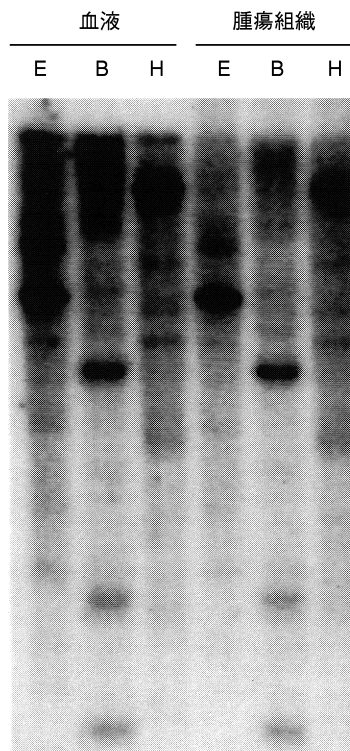


図 4 サザンブロット法による RFLP 法の結果(症例 3).

血液中のリンパ球と腫瘍細胞では RB 遺伝子フラグメントのシグナルに差がみられない。

細胞の異常は検出できなかった。

IV 考 按

網膜芽細胞腫は代表的な小児眼内悪性腫瘍であり、そ

表 2 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法と restriction fragment length polymorphism (RFLP)法での結果のまとめ

症例	患眼	血液		腫瘍組織	
		FISH	RFLP	FISH	RFLP
1	片眼(左)	2 copy (100%)	正常シグナル	0 copy (95.3%)	シグナル欠失
2	片眼(右)	2 copy (100%)	正常シグナル	3~6 copy (85.9%)	シグナル減弱
3	片眼(左)	2 copy (100%)	正常シグナル	2 copy (99.1%)	正常シグナル
4	両眼	2 copy (100%)	正常シグナル	2 copy (89.4%)	正常シグナル
5	両眼	2 copy (100%)	正常シグナル	3 copy (77.0%)	正常シグナル

の発癌を担う RB 遺伝子は代表的な癌抑制遺伝子である。細胞分裂は転写因子 E2F が mRNA の転写開始部位に作用することによって開始される¹⁰⁾¹¹⁾¹⁹⁾。RB 蛋白はその E2F と結合し、E2F を転写開始部位から遠ざけ、転写を開始させず細胞分裂を抑制している。RB 蛋白をコードしている RB 遺伝子は細胞周期を止め、静止期に保つのに重要な役割を果たしている¹⁵⁾²⁰⁾。網膜芽細胞腫では、RB 遺伝子の両アレルともに欠失、または遺伝子内に点突然変異を生じることによって正常な RB 蛋白が産生されなくなる。そのため、細胞の分裂周期の制御ができなくなり、細胞増殖が無制限に生じて腫瘍化すると考えられている³⁾⁷⁾。しかし、RB 遺伝子の両アレルをノックアウトしたマウスは神経系細胞と赤血球分化に異常を来し、貧血により胎生 15 日までに死亡するという報告や、ヒト RB 遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニックマウスでは小人症がみられるとする報告があり、RB 遺伝子は発生の段階では細胞分化やアポトーシスに関与していると考えられている²¹⁾。

近年、網膜芽細胞腫の症例に対してさまざまな遺伝子診断の試みがなされてきている。Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法や PCR-heteroduplex analysis (PCR-HA) 法などの PCR 法を用いた変異検出検査で、その異常箇所はある程度同定可能である²¹⁾⁶⁾。しかし、見つかった腫瘍細胞での点突然変異が RB 遺伝子の不活化を起こすために十分であるかは遺伝子配列の解明のみでは不十分で、常に体細胞遺伝子との比較が必要である。今回得られた結果について体細胞と比較して考案を加える。

症例 1 は遺伝子検査で非遺伝性であると推定された症例である。この症例での FISH 法と RFLP 法の結果は腫瘍組織で RB 遺伝子が両アレルとも欠失していることを示し(図 5)、体細胞において、どちらかの遺伝子にさらに点突然変異も併発していることは確率的に極めて低いため、体細胞の遺伝子では正常 RB 遺伝子を持ち、網膜芽細胞で 2 ヒットされることで癌化したと推定され、非遺伝性と考えてよいと思われる。この症例では FISH 法と RFLP 法の結果が一致していた。

RB 遺伝子は大きな欠失や点突然変異の異常を来すと同時に、腫瘍化することで遺伝子の不安定化を生じ、

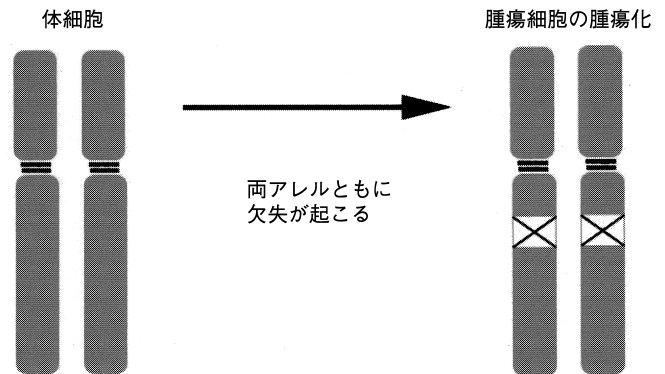


図 5 RB 遺伝子異常の模式図(症例 1)。

FISH 法と RFLP 法の結果が一致し、腫瘍細胞の RB 遺伝子は欠失していた。点突然変異を合併していることは確率的に考えにくいいため、この症例は非遺伝性と考えられる。

RB 遺伝子領域の多コピー化を来すことが知られている¹⁸⁾。しかし、網膜芽細胞腫で多コピー化を来すのは RB 遺伝子領域に限らず、6 番染色体も多コピー化を来すことが知られており、6 番染色体の多コピー化は腫瘍の悪性度に相関があるともいわれている¹⁸⁾。症例 2 のように、腫瘍化による遺伝子の不安定化が生じて RB 領域の複数コピーが生じた場合は、単純に RFLP 法で腫瘍組織でのシグナルが減弱していることが非遺伝性であるという診断にはつながらない。腫瘍組織において、cDNA probe は RB 遺伝子に大きな欠失があるとハイブリダイズできず、点突然変異や数十 bp の小さな欠失がある RB 遺伝子にはハイブリダイズする。大きな欠失を持つ RB 遺伝子と、RFLP 法ではとらえられない点突然変異か小さな欠失がある RB 遺伝子とが、ある割合で複数コピーに増幅されると、全体の DNA 量をそろえた RFLP 法では相対的にシグナルの減弱を起こすことが考えられる(図 6)。この現象は体細胞での点変異の有無、すなわち、遺伝性か非遺伝性かにかかわらず起こり得るため、遺伝性は診断不能となる。RB 領域が複数コピーに増幅しているかどうかは FISH 法を施行してみないと判別できないため、RFLP 法のみを施行しシグナル減弱をみるだけでは遺伝性鑑別の誤診につながる恐れがある。FISH 法を用いた網膜芽細胞腫の遺伝子診断

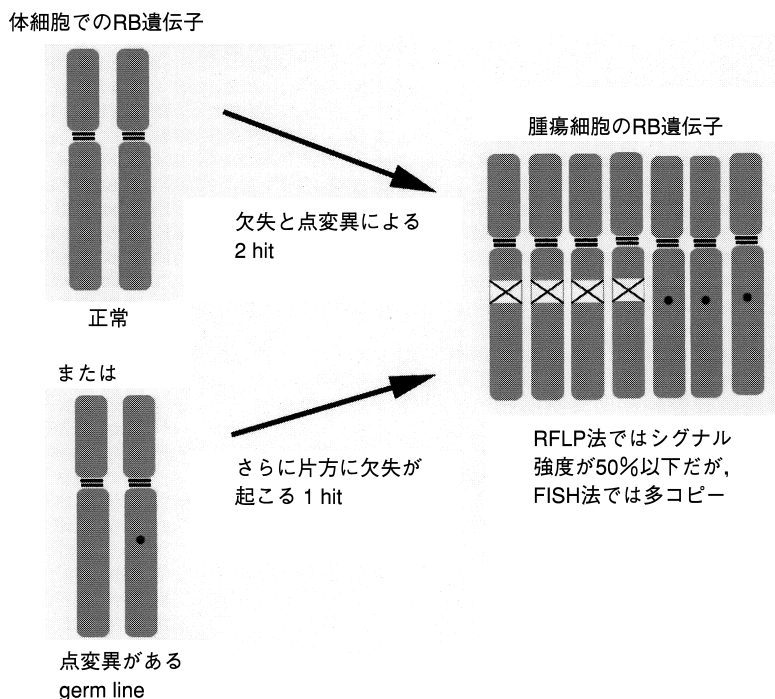


図 6 RB 遺伝子異常の模式図(症例 2)。

腫瘍細胞で RB 遺伝子が欠失したコピーと点突然変異があるコピーが多コピー存在している。すると、体細胞ではもともと正常で RB 遺伝子に欠失と点突然変異が生じた場合と、元々 RFLP 法で異常が検出できない点突然変異があって、さらに欠失が加わった可能性がある。どちらか断定できないため遺伝性とも非遺伝性とも断定できない。

は Damjanovich ら²²⁾によって報告され、またその他の腫瘍に関しても応用されている²³⁾。

FISH 法は RB 遺伝子に大きな欠失がある場合には、その異常を検出することが可能であるが、点変異や小さな欠失は検出できない¹⁸⁾。RFLP 法で用いた制限酵素の切断部位が点突然変異に相当すれば、理論的にはバンド配列の変化として変異を検出可能であるが、それ以外の場所での変異はバンド配列が変化しないので検出できない。以上の結果を踏まえると、網膜芽細胞腫の遺伝子診断を行うに当たっては、FISH 法、RFLP 法それぞれの特徴と検査の限界があることを把握し、判定には双方の検査を組み合わせたことが必要であることが推定された。実際、遺伝性であるはずの症例 4, 5 は、FISH 法でも RFLP 法でも体細胞の異常を検出できなかったので点突然変異または小さな欠失の存在が考えられた。

今後、症例の蓄積により腫瘍化のメカニズムがさらに明らかになれば、適切な制限酵素を用いることで RFLP 法での検出率が向上する可能性がある。さらに、DNA チップ化すれば遺伝子診断がより正確に効率的になるかもしれない。将来的な追加検査のため摘出した遺伝子は凍結保存している。検出率などの種々の問題はあがあるが、現時点ではこの FISH 法、RFLP 法を単独に行うのではなく組み合わせる方法が、一般施設でも検査可能な範囲では適切な方法であると考えられる。

本論文の要旨は平成 15 年 7 月の第 41 回日本小児眼科学会

で発表した。

文 献

- 1) 箕田健生：網膜芽細胞腫. 眼腫瘍アトラス. メディカル出版, 東京, 89-136, 1989.
- 2) 戸塚清一：遺伝子診療の時代に向けて. 網膜芽細胞腫の遺伝子診断. 眼科 40 : 283-288, 1998.
- 3) 戸塚清一：網膜芽細胞腫の遺伝. あたらしい眼科 9 : 545-553, 1992.
- 4) Knudson AG Jr, Meadows AT, Nichols WW, Hill R : Chromosomal deletion and retinoblastoma. N Eng J Med 295 : 1120-1123, 1976.
- 5) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al : A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323 : 643-646, 1986.
- 6) Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY : Human retinoblastoma susceptibility gene : Cloning, identification and sequence. Science 235 : 1394-1399, 1987.
- 7) Bookstein R, Lee EY, To H, Young LJ, Sery TW, Hayes RC, et al : Human retinoblastoma susceptibility gene : Genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. Proc Natl Acad Sci USA 85 : 2210-2214, 1988.
- 8) McGee TL, Yandell DW, Drayja TP : Structure

- and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 80 : 119—128, 1989.
- 9) **Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, et al** : Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 5502—5506, 1989.
 - 10) 橋本知子, 外園泰弘 : 腫瘍. RB 遺伝子とその機能. *医学のあゆみ* 174 : 507—511, 1995.
 - 11) 橋本知子, 一井重利, 外園泰弘, 古山順一 : 遺伝子異常と遺伝子診断. 網膜芽細胞腫. *臨床分子生物学*, 782—787, 1994.
 - 12) 堀田喜裕, 足立和孝, 横山利幸, 岩田文乃, 玉城宏一, 藤木厚子, 他 : 網膜芽細胞腫の遺伝子診断の試み. *眼臨* 90 : 366—369, 1996.
 - 13) 箕田健生 : 遺伝相談の実際, 網膜芽細胞腫. 大庭紀雄(編) : 眼科診療プラクティス 16. 眼科診療に役立つ遺伝学. 文光堂, 東京, 172—175, 1995.
 - 14) **Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, et al** : Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene : Their application to genomic counseling. *N Engl J Med* 321 : 1689—1695, 1989.
 - 15) 橋本知子, 高橋 玲 : 網膜芽細胞腫(RB) 遺伝子の構造および機能とその変異. *実験医学* 7 : 1367—1376, 1989.
 - 16) **Zhang Q, Minoda K** : Mutation detection and genetic counseling in retinoblastoma using heteroduplex analysis. *Jpn J Ophthalmol* 39 : 432—437, 1995.
 - 17) 加藤満雄, 戸口田淳也 : 癌抑制遺伝子の機能と変異. 網膜芽細胞腫の遺伝様式と遺伝子診断. *実験医学* 10 : 218—2153, 1992.
 - 18) **Bartova E, Kozubek S, Gajova H, Jirsova P, Zluvova J, Taslerova R, et al** : Cytogenetics and cytology of retinoblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 129 : 89—99, 2003.
 - 19) **Bandara LR, La Thangue NB** : Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351 : 494—497, 1991.
 - 20) 向井志寿夫 : 網膜芽細胞腫. 大庭紀雄(編) : 眼科診療プラクティス 16. 眼科診療に役立つ遺伝学. 文光堂, 東京, 116—120, 1995.
 - 21) **Weinberg RA** : The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81 : 323—330, 1995.
 - 22) **Damjanovich J, Adany R, Berta A, Beck A, Balazs M** : Mutation of the RB1 gene caused unilateral retinoblastoma in early age. *Cancer Genet Cytogenet* 119 : 1—7, 2000.
 - 23) **Murthy SK, DiFrancesco LM, Ogilvie RT, Dementrick DJ** : Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma. *Mod Pathol* 15 : 1241—1250, 2002.
-