

ISSN 1343-9480

MBPT

理学療法の 医学的基礎

Volume 5. No 2. January
2002

理学療法の医学的基礎研究会雑誌

The Society for the Study of Medical Basis of Physical Therapy

MBPT

総 説

動物実験の基礎知識

古川敏紀*

近代の動物実験はフランスのクロードベルナルの「実験医学序説」に始まると言われ、彼がこの本を著述する40年以上前に自宅地下室で実験を開始したことは、近代医学と動物実験を含む実証科学が切っても切り離せない関係にあることを物語っていると思われる。一方、今日言われるところの動物愛護や動物福祉

とは異なるけれども、同時期に動物愛護の最初の動きが見られることにも注意をしなければならない(表1)。

我が国においても敗戦後、大学を中心として動物実験が再開されると同じ時期から動物愛護の動きが見られることから、動物実験と動物愛護(福祉)は相互に長い歴史を持つことが理解される(表2)。一方、戦後の復興とともに公害や環境悪化の問題もクローズアップされ、今日の動物実験廃止運動がこれらの運動と結びつきつつあることに研究者が無関心であったことが今日の相互の乖離を来している。

このような背景を考えながら今日の動物実験が抱える問題と将来像について、

- 1) 動物愛護(福祉)の問題
- 2) 獣医実験動物専門医制度

表1. 近代における動物実験と動物愛護

| | | |
|-------|-----|---|
| 1825年 | (仏) | ベルナル、自宅の地下室で実験開始 |
| 1832年 | (英) | Warburton Anatomy Act、Game (Scotland) Act |
| 1835年 | (英) | The Magna Charters of dumb animals |
| 1848年 | (英) | Hares Act |
| 1860年 | (英) | Game Licenses Act、 |
| 1865年 | (仏) | ベルナル『実験医学序説』 |
| 1876年 | (英) | The Cruelty to Animals Act |
| 1877年 | (米) | American Humane Association 設立 |
| 1880年 | (英) | Ground Game Act |
| 1883年 | (仏) | 動物実験反対連盟発足 |
| 1892年 | (英) | Hares Preservation Act [野兎] |
| 1906年 | (英) | Dogs Act、Ground Game (Amendment) Act |
| 1911年 | (英) | The Protection of Animals Act 1911 |
| 1912年 | (英) | Protection of Animals Act (Scotland) |
| 1925年 | (英) | The Performing Animals (Regulations) Act |
| 1933年 | (英) | Protection of Animals (Cruelty to Dogs) Act |
| 1934年 | (英) | Protection of Animals Act |
| 1937年 | (英) | Cinematograph Films (Animals) Act |

表2. 動物および環境問題に関連の法整備について

| | |
|-------|------------------------------------|
| 1946年 | 日本国憲法公布 |
| 1947年 | (財) 奈良の鹿愛護会設立 |
| 1950年 | 狂犬病予防法 |
| 1967年 | 公害対策基本法 |
| 1972年 | 自然環境保全法 |
| 1973年 | 動物の保護及び管理に関する法律 |
| 1980年 | 老岐のイルカ騒動 |
| 1983年 | 「鹿害」訴訟、自然環境保全審議会、野生生物部会等設置 |
| 1992年 | 種の保存法、白神山地世界遺産指定 |
| 1993年 | 環境基本法、希少野生生物種保存法、第五回ラムサール条約締約国会議 |
| 1998年 | 『[報告] 日本における「自然の権利」運動』、自然環境保全審議会答申 |
| 1999年 | 動物の保護及び管理に関する法律の一部を改正する法律制定 |

*広島大学医学部附属動物実験施設

(〒734-0037 広島市南区霞1-2-3)

Toshinori FURUKAWA, PhD, DVM, Dip JCLAM
 Research Facilities for Laboratory Animal
 Science, Hiroshima University School of Medicine

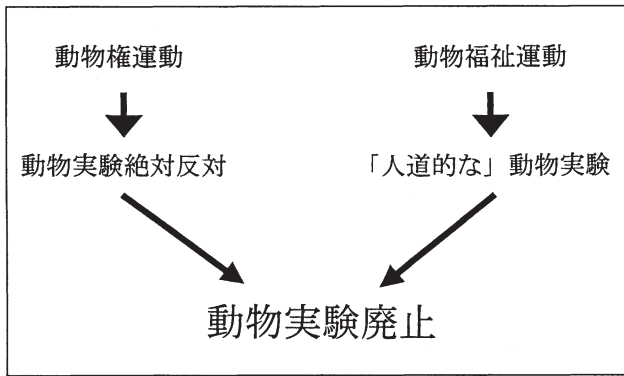


図1. 動物実験反対グループ

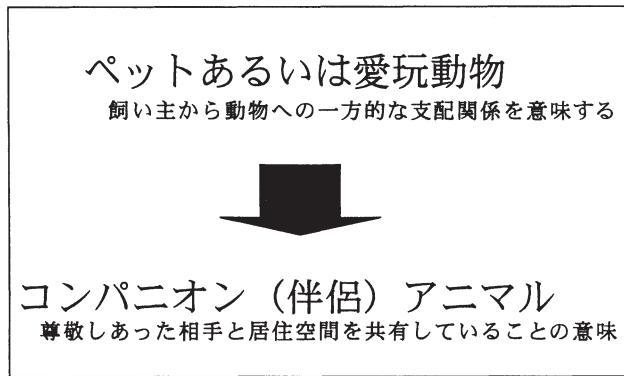


図2. 感情変化

- 3) 環境保護
- 4) 行政改革および大学改革
などを概説したい。

1) 動物愛護（福祉）の問題

動物実験を行う研究者は特異な例を除けば動物虐待を意図しているわけではなく、真理の探究のために全力を尽くしていると思われる。したがってその姿に悪意を見いだすことは出来ないが、その姿が周囲にどのような写っているかという視点に欠けていることが動物実験反対の火種を作っているのかもしれない。また戦後長い間経済の回復に全力が注がれ、人々の健康と安全のために尽くす医学関係者の姿は多くの国民の共感を得ると同時にその支持を得ていた。しかしながら、国民の多くが自分たちは中流に達したとする一定の生活レベルに到達したと同時に、これ以上のレベル向上が大きく望めないことが次第に明らかになってきた。さらに公害や薬害、また環境悪化とどのレベルで折り合いをつけるかという困難な問題が持ち上がり、これ以上の生活向上は要らないという人々と動物が可哀想という感情が結びつくようになってきた。また一般に言われる動物実験反対という運動にも違いがあることに注意が必要であり(図1)さらには動物に対する感情の変化についても注意を払わなければならない(図2)。

そこで今日では動物実験を行う際の基礎知識として、個々の研究者は各自が行っている動物実験が周囲の人

表3. 諸外国における動物実験の規制（実験者、実験施設、実験計画等の許認可に関する比較）

| 国名 | 法律制定 最新改正 | 対象動物 | 実験者の 資格認定 | 施設の認定 | 計画書の承認 | 罰則 | 査察立入検査 | 実質責任者 | 動物実験 委員会 |
|------|--------------|----------------------|--------------|-------|-------------------------------|----|--|---------|----------------|
| イギリス | 1876 1986 | 生きている 脊椎動物 | 内務大臣 | 内務大臣 | 内務大臣 | - | 内務省査察官 | 国 | 国家委員会 |
| ドイツ | 1972 1998 | 脊椎動物 | 州政府 | 州政府 | 州政府 3カ月を越えても決定しない場合は自動的に承認 | - | 州政府 | 州政府 | 州の委員会 |
| フランス | 1968 1987 | 生きている 脊椎動物 | 農業大臣 | 農業大臣 | 農業大臣 | - | 農業大臣より任命された職員 | | 国家委員会 |
| オランダ | 1977 1997 | 生きている脊椎動物と生きている無脊椎動物 | 福祉大臣 | 福祉大臣 | 研究機関の動物実験委員会 有効期限の規定なし | - | Animal Experimentation DepartmentのVeterinary Public Health Inspector | 研究機関実験者 | 施設の委員会と国家中央委員会 |
| アメリカ | 1966 1985 | 全温血動物 げっ歯類、鳥類を除く | なし | 農務省長官 | 研究機関の動物実験委員会 | - | 農務省査察官 | 研究機関長 | 研究機関の委員会 |
| 日本 | 1973 1999 | は虫類以上 | なし | なし | 研究機関の動物実験委員会 | - | なし | 実験者 | 研究機関の委員会 |

表4. 動物関連の法令・基準等

-
- 基本法規
 - ◆ 狂犬病予防法 昭和25年・1950年
 - ◆ 自然環境保全法 昭和47年・1972年
 - ◆ 動物の保護及び管理に関する法律 昭和48年・1973年
 - ◆ 動物の保護及び管理に関する法律施行令 昭和50年・1975年
 - ◆ 絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律 平成4年・1992年
 - ◆ 動物の愛護及び管理に関する法律 平成11年・1999年
 - 基準・指針
 - ◆ 犬及びねこの飼養及び保管に関する基準 昭和50年・1975年
 - ◆ 展示動物等の飼養及び保管に関する基準 昭和51年・1976年
 - ◆ 実験動物の飼養及び保管等に関する基準 昭和55年・1980年
 - ◆ 産業動物の飼養及び保管に関する基準 昭和62年・1987年
 - ◆ 動物の処分方法に関する指針 平成7年・1995年
 - その他の関連法令 (関連部分のみ抜粋)
 - ◆ 民法 明治29年
 - ◆ 遺失物法 明治32年
 - ◆ 刑法 明治40年
 - ◆ 軽犯罪法 昭和23年
 - ◆ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律 昭和45年
 - 関連省令
 - ◆ 動物用医薬品の使用の規制に関する省令 昭和55年
-

にどのような姿として写っているかということ、普段に考えながら研究を継続しなけりばならなくなった。言葉を変えれば「聖域」は無くなったといえる。

さらに研究の成果としての論文が国内にとどまらず国外に多く報告されるようになってくるとともに、諸外国での動物実験規制をあらかじめ調べることも重要になってきている。いわゆる「国際化」もしくはInternational Harmonizationと言われるものである。表3に主な国における動物実験への規制を掲げた。ここで注意しなければならないのは先進国においても未だ動物実験を廃止しているところは一つ国もないということである。動物実験反対論者の多くが先進諸外国ではすでに動物実験が行われていないかのような発言をしていることに対して、研究者は反論を繰り返してゆくべきである。どの国においても国益の問題を考慮せずに実験や研究に規制を設けているところはなく、スイスのように国民投票を実施して動物実験の有無を問うた国でも廃止には至っていない。

しかしそれでは諸外国と我が国のどこが違っているのだろうか。それは動物実験についての規制がより明確に存在しているのか否かという点だけであると思われる。よく我が国には動物愛護の歴史が無いという意見を耳にするがそんなことはなく、歴史的にも我が国には古くから生命を尊ぶ事実は存在する。しかし近

年の指針や法律など(表4)の中身については何が規制され、何が倫理的に問題なのかという点で、「玉虫色」であり具体例に乏しいことが動物実験の推進、反対の両者にとって拡大解釈の余地を広げすぎているといえる。この例として我が国では「動物の保護および管理に関する法律」が1973年に成立しているが、スウェーデンでは1998年によく「The Animal welfare Act」が成立している事実からも、このような法律の整備が遅れているわけではないことが理解される。しかし両者の内容を比べるとその内容が大きく異なっていることが明確である。すなわち前者が「管理」的な面を前面に打ち出していることに対して、後者では「福祉」を述べているからである。すなわち形の問題ではなく、実質としての中身が重要であり、我が国においてはこれらの検討が早急になされなければならないと考える。

このため実際に研究を行う当事者にとってははなはだ都合の悪い面が多々見られることになる。苦痛の除去や倫理的な判断について「個人」の判断を重視する我が国に対して、国のレベルであろうと研究機関ごとのレベルであろうと組織を重視する先進諸外国との間に大きな違いを生み出し、このことが投稿論文の受理を拒否されるという事態を多く招く根拠となっていると思われる。つまり苦痛除去の鎮静剤投与や麻酔に

において、苦痛の程度を研究者個々に判断させ責任を持たせる我が国のやり方に対して、諸外国では国のレベルで苦痛を分類し、もしくは機関ごとに苦痛を規定しているところが、個人戦闘を重視する我が国と集団戦闘を重視する諸外国の違いとは言えないであろうか。

表3に見られるように国のレベルで動物実験を一元管理しようとする国(イギリス)と、研究機関の責任で動物実験を管理しようとする国(アメリカなど)に分かれているけれども、研究者個々の判断に任せている国は他に無い。いくつかの通達や指針によれば後者を研究機関ごとに作りなさいというように読めるが、しかし法律上の規制が無いために研究機関ごとにばらばらな体制をとらざるを得ないことが、攻撃を受けた場合の脆さと弱さを象徴していると言えるであろう。

事実、栄養学の研究者にとって苦痛の程度を専門的に知ったうえでなければ動物実験が行い得ないとすれば、研究を行う前にかなりの時間と経験を積み重ねる必要がある。しかしながら臨床での麻酔経験が豊富な研究者がこの苦痛の程度について明確に規定を行ってくれば、栄養学の研究者はこの規定にしたがって素早く研究を進めることが可能となる。一方、栄養学の研究者は実験中の動物が必要とする栄養管理面について麻酔の専門家よりはさらに良いアドバイスをすることが出来るのではないだろうか？このように研究者同士が集団で研究活動を守るための活動を始めることが「研究」を守ることに繋がると思われる。

2) 獣医実験動物専門医制度

我が国の「動物の保護および管理に関する法律」によれば、動物実験を行うところでは「管理者」を置かなければならないこととされている。またこの管理者には多くの獣医師がその職に就いているが、管理者としての獣医師に求められるものが明確ではないことが次に問題となる。

ここで表3の制度について再度述べてみたい。英国では動物実験は国レベルで管理されているために動物実験を行いたい研究者は動物実験が行える施設、つまり内務大臣の認可を受けている施設で実験を行うこととなる。またあらかじめ動物実験を行うための個人的なライセンスも得ておかなければならないし、実験計画書についても国の承認を得る必要がある。非常に明快で分かりやすい仕組みではあるが、これを行うためには国のレベルでの大きな組織が必要で、事実、認可や承認を得るまでに時間がかかりすぎるのが指摘されている。次にアメリカでの例を挙げたい。アメリカでは動物実験を行う施設は国のレベルでの承認が必要である。これを行う組織はアメリカ農商務省(USDA)内

にあるAPHIS(Animal and Plant Health Inspection Service)という組織である。しかし英国とは異なり、個人的に国レベルのライセンスを取得する必要もないし、実験計画書についての国レベルでの承認も必要ではない。個人のライセンスや計画書についての責任を持つのは研究機関ということになっている。つまり施設への国からの承認を除けば、あとは各研究機関が責任を持つという方法である。この各研究機関における組織がIACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)と呼ばれるもので、先に紹介したAPHISは抜き打ちの査察を毎年数多くの施設に対して行うが、この場合、各研究機関側で対応するのはこのIACUCである。もし問題が見いだされたときにはAPHISはIACUCに対して改善を要求することになる。したがってIACUCのメンバーは国内の規制や法律のみならず、各学会が出してる勧告や苦痛の除去、さらにはいろいろなガイドラインや最近の動向などについてもよく知っていることが必要となる。このためIACUCのチーフには動物実験施設の「管理者」がその任に当たっていることが多く、獣医師がその主要な位置を占めている。彼らは普段の努力の一環として施設のレベルの向上に努めるとともに研究者や職員への教育についても大変熱心である。この実験動物領域における獣医師(ACLAM)は専門家(Diploma)として高度なレベルでの知識と技術を求められている。

一方、我が国の法律に従えば、管理者が必ずしも獣医師である必要はない。にもかかわらず多くの獣医師が管理者として採用されているのは何故であろうか。言い方を換えれば医学領域の人から見た実験動物に携わる管理者としての獣医師に求められる姿はどのようなものでしょうか？

独善的でひねくれた物の見方で恐縮だが、動物のことを専門にしている、その獣医学的知識を獣医師という国家資格で保証されていて、なおかつ動物実験反対に対して防波堤になりえる人材として獣医師が求められているとは言えないであろうか。また施設の光熱水費を代表とする金銭的な管理や人事管理、予算作成、決算報告、新規動物の開発や導入、さらには実験動物や動物実験に関する教育・研究なども期待されている。

このような期待される管理者像と実際の職務内容との間に齟齬はないのであろうか。

多くの獣医師はそれぞれが学生時代に学んだ獣医学教育において「実験動物学」はほとんど学んでいないと感じている。事実「実験動物学」が獣医学教育ないし国家試験において採用されたのは最近のことである。

また一方で施設教官の集まりの中では「我々は事務

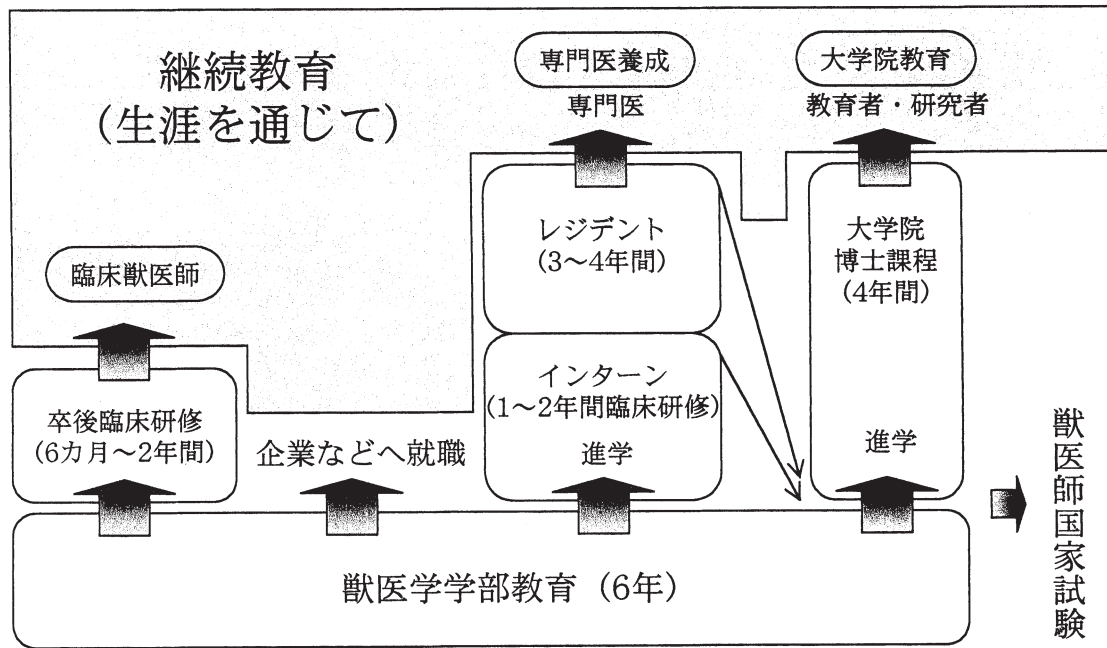


図3. 卒後臨床研修・継続教育・専門医養成教育の位置づけ

屋さんではない。なぜ我々が電気代などのエネルギー費や施設の修理費のことまで仕事にしなければならないのか？獣医らしい仕事は全く出来ない。これではあとに続く若手は出てこない」等々、将来像を描けないという声も多く聞かれる。

このように求められる姿と実際の業務との間に差があることは明確である。

しかしながら、「このままではいけない。もっと自分たちのアイデンティティを明確にしよう。動物実験施設における獣医師の役割を明確にせずには要求にズルズル従うばかりで、結果として国際的な実験動物界においても発言できない獣医師になってしまったのは我々の責任だ」という反省意見も出てきた。この点にたつて、日本獣医学会の中に日本獣医実験動物専門医制度が発足した。すでに50名を越えるCharter Diplomateが認定され、今年度末には第1回の試験が始まることになっている。この制度はアメリカにおける獣医実験動物専門医を参考に作られており、実験動物領域における獣医師のあり方を問い直す物となっている。

日本獣医師会においても生涯研修事業の一環(図3)として獣医専門医制度が発足しており、獣医実験動物専門医はこの中に含まれていることから、これから育ってくる若い獣医にとって明確な目標を示しえるものとなり、医学における獣医師の必要性について、今よりももう少しは「何故管理者が必要なのか、何故獣医師が必要とされるのか」という問いに答えを出せるのではないかと考えられている。もちろん先に述べたように管理者が獣医師でなければならないという法律

は存在しないが、たとえ獣医師でなくとも動物実験施設の「管理者」の役割について再考すべき時期に来ていると考えられる。

3) 環境保護

人間が便利で快適な生活をするために、もしくは産業が発展するとともに環境の悪化が次第に明らかとなっている。動物実験に直接結びつかない所でも種々の規制が始まっており、廃棄物関連だけでも表5に示したように多くの関連法令が存在する。研究者個々人がこれらの規制のどこが自分の研究のどこに抵触するのかを知ることは大変な努力を要する。特に若い研究

表5. 廃棄物関係法令

- ・下水道法 (昭和33年)
- ・大気汚染防止法 (昭和43年)
- ・騒音規制法 (昭和43年)
- ・廃棄物の処理及び清掃に関する法律 (昭和45年)
- ・水質汚濁防止法 (昭和45年)
- ・悪臭防止法 (昭和46年)
- ・瀬戸内海環境保全特別措置法 (昭和48年)
- ・環境基本法 (平成5年)
- ・容器包装に係る分別収集及び再商品化の促進等に関する法律 (平成7年)
- ・環境影響評価法 (平成9年)
- ・特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律 (平成11年)
- ・ダイオキシン類対策特別措置法 (平成11年)
- ・循環型社会形成推進基本法 (平成12年)

表6. 廃棄物における4R

| | |
|---------|---------|
| Refuse | (なくす) |
| Reduce | (減らす) |
| Reuse | (再利用する) |
| Recycle | (再生する) |

者にとってこれらのすべてを知らなければ実験を始められないということになれば研究スタートはますます遅れるばかりである。しかしながら経験の量を問わず、研究者のちょっとした不注意が研究者個人のみならず研究機関全体の研究活動に影響を与ええるという組織に対する責任には自覚が必要であろう。我が国ではややもすれば学生や若い大学院生などの責任を余り社会が求めないという風潮があるが、研究機関を外部から見たときには不始末の原因を作った研究者が若いか否かでは問題でなく、組織に責任が問われ、場合によっては組織の研究活動の命にとどめを刺すかもしれないということについては厳しく教育することが安全で実りある研究活動の第一歩であるという心得を各所で教育することが必要である。廃棄物について言えば表6に掲げた廃棄物における4Rを掲げてもらいたい。

4) 行政改革および大学改革

ここでは日本学術会議の「生命科学の進展と社会的合意の形成特別委員会」が取り上げた提言の中から「教育・研究における動物の取り扱い」を紹介したい(表7)。なぜなら我が国における今後の動物実験のあ

り方について明確な方針がすでに打ち出されており、方向性が明らかであるからである。少々長い引用であるが、

「生命科学研究の遂行に動物実験が不可欠であるとしても、その取り扱いについては、研究者およびこれを支援する関係機関は協力して万全を期する必要がある。日本学術会議はすでに1980年「動物実験ガイドラインの策定について」を勧告した。これに基づいて1987年、文部省は「大学等における動物実験について(通知)」を定めて全国の大学等に送付し、さらに、日本霊長類学会、日本実験動物学会、日本生理学会などもそれぞれ動物実験に関する指針を制定している。指針に盛り込まれている内容を遵守して、動物取り扱いの実務にそれを確実に反映させるには、なお以下の方策が必要であろう。

(1) 生命倫理教育の拡充

生きた動物を利用した理科教育が減少し、動物との共同生活を営む機会にも恵まれない児童・生徒に対して、動物愛護、生命尊重という思いやり豊かな感性をはぐくむことは、極めて困難な情勢になっている。初等中等教育においては、生活科、理科、社会科などの教科および道徳や特別活動等の枠組の中で、機会ある毎に新しい生命倫理教育を行うことが不可欠である。生物学・医学の教育・研究に携わる大学等においては、生命倫理教育の一環として動物実験倫理の教育を行うことを義務づける必要がある。その際、実験に動物を用いることの必要性とその意義、動物に接する態度、実験中及び実験終了後の動物の処理についての注意などについて講述することが望まれる。これに関連して、将来に向けて生命倫理教育の担当者を養成することも必要

表7. 教育・研究における動物の取り扱い —倫理的及び実務的問題点と提言—

生命科学の進展と社会的合意の形成特別委員会 (日本学術会議)

I V . 動物実験遂行上の問題点と提言

生命科学研究の遂行に動物実験が不可欠であるとしても、その取り扱いについては、研究者およびこれを支援する関係機関は協力して万全を期する必要がある。日本学術会議はすでに1980年「動物実験ガイドラインの策定について」を勧告した。これに基づいて1987年、文部省は「大学等における動物実験について(通知)」を定めて全国の大学等に送付し、さらに、日本霊長類学会、日本実験動物学会、日本生理学会などもそれぞれ動物実験に関する指針を制定している。指針に盛り込まれている内容を遵守して、動物取り扱いの実務にそれを確実に反映させるには、なお以下の方策が必要であろう。

- (1) 生命倫理教育の拡充
- (2) 動物実験委員会の強化
- (3) 実験動物施設の整備

V . まとめ

本委員会は、現段階においては、対象とする動物の生命を尊重しつつ国際的に許容される限度内で行われる動物実験は正当なものであるという結論に達した。国際的にも、1996年7月、ICSU(国際学術連合)が同じ主旨の「研究および教育における動物使用方針に関する声明」を発表している。本委員会のまとめた見解と提言が、動物実験の必要性についての社会的合意の形成と研究者自身の倫理性の高揚に役立つことを期待する。

である。

(2) 動物実験委員会の強化

1987年、文部省から全国の大学等に送られた指針「大学等における動物実験について(通知)」に応じてつくられた「動物実験委員会」はその組織、運営においてすでに相当な実績を上げてはいるが、なお、いくつかの点について改正を行って委員会を一層強化する必要があると思われる。委員会の構成、任務、権限について以下のように提言したい。

構成： 委員会には、動物実験を行う部局のほか、動物実験を行わない部局(主に人文社会系)からも相当数の委員を参加させて、幅広い意見を求めるとともに大学(機関)全体の動物実験の適正な遂行に責任を持つ組織とする。

任務： 動物実験を行うには、先ず、実験の目的と必要性、使用する動物の種類と数、使用方法、とくに、実験動物が被ると予測される苦痛の程度とその軽減方法、使用後の処置等を明記した計画書について、委員会の審査を徹底させる。その結果を科研費の申請に反映させることも考えられる。また、動物実験の妥当性と必要性に関する広報活動も重要な任務である。

権限： 動物実験を行う施設を査察し、実験計画を審査するとともに、必要に応じて実験の状況を調査し、妥当性を欠く実験に対しては中止を含めた改善処置を指示することができる。多くの生物・医学系の学術雑誌への投稿に際しては実験動物の倫理的取り扱いが行われた旨を記載することが求められているが、必要に応じて証明書を発行するなどの対応をする。

(3) 実験動物施設の整備

倫理性にも配慮した適切な動物実験を進めるためには、動物実験の飼育管理に必要な施設、およびその運営に要する人員、設備、事業費等についてなお一層の配慮をする必要がある。近年、ヒト疾患および生命機能研究のモデルとしての利用が著しく増大している遺伝子導入動物についても同様な措置が必要である。また、脳科学の今後の発展を支える霊長類については、研究遂行に支障を来さぬよう計画的に確保する方策を講ずべきである。

(4) まとめ

本委員会は、現段階においては、対象とする動物の生命を尊重しつつ国際的に許容される限度内で行われる動物実験は正当なものであるという結論に達した。国際的にも、1996年7月、ICSU(国際学術連合)が同じ主旨の「研究お

表8. 動物実験における3R

| |
|---|
| •Reduction in the number of animals sacrificed 供試動物数の削減 |
| •Refinement of techniques that cause suffering 苦痛の軽減 |
| •Replacement of living animals by simulation or cell culture 動物を用いない方法 |

よび教育における動物使用方針に関する声明」を発表している。本委員会のまとめた見解と提言が、動物実験の必要性についての社会的合意の形成と研究者自身の倫理性の高揚に役立つことを期待する。」

以上のようにすでに我が国の動物実験の今後の進め方については明確に示されていることから動物実験を行う各研究機関は早急にこれらを実行、もしくは実行しえる組織作り着手することが「研究環境」を保持しえる第一歩となりえるものと思われる。

以上動物実験の基礎知識として今日我々が求められているところの幾つかの問題について概説した。しかしながらこれらの問題をすべてクリアーできたとしても動物実験は結果として多くの動物に苦痛を与え、死をもたらしものであることには間違いが無い。だとすれば研究者を始めとする多くの動物実験に携わるものに求められるものは生命倫理に対する支点であろう。ここが強固でなければ動物実験を行うべきではなく、そのためにも生命倫理に対する教育はもっとも重要視されるべき問題である。最後に動物実験における3Rを掲げておきたい(表8)。動物実験を行う場にあっては是非この3原則に則しているかという観点にたって研究を行うことが「動物実験環境」を守る第一歩であると思われるからである。

本稿の執筆に当たり秋田大学附属動物実験施設、楼猫(<http://www.animalrights.jp/>)を参考にさせていただきました。松田先生および長尾亜紀さんに厚く御礼申し上げます。

ミニレビュー

片側大脳皮質障害後の運動および脳機能の回復メカニズム

一原里江¹⁾, 村上新治²⁾, 藤戸 裕³⁾

キーワード: 障害・学習・回復・脳・therapy

【緒言】

リハビリテーション場面における訓練効果判定として、訓練前後の行動や運動の変化を測定することが多い。しかし、中枢神経障害後における機能回復は、自然に回復していく面と訓練によって回復していく面との両側面があり、一概に訓練効果と言えない場合が多い。また、ヒトでは侵襲を伴うコントロールスタディーが不可能なため、訓練による行動や運動の変化と脳機能の変化及びこれらの変化の関連性について明らかにされていない^{1), 2)}。しかし、近年、神経生理学の進歩により、中枢神経の可塑性を背景に、動物モデルで訓練前後の効果判定を行ない、有効とされる訓練要素について言及されるようになってきた。片側大脳皮質障害などの中枢神経障害後の回復過程には、運動学習訓練が有効であることを、行動の回復と共に健常側大脳半球でのシナプス数の増加という脳の組織学的変化から証明する研究が数多く報告されている³⁻⁸⁾。行動の変化という現象面を、脳内で起っている変化と照らし合わせることで「回復」「変化」がどのような意味を持つのか、またそれに有効な影響を与える因子を明らかにすることで、臨床場面で観察される現象に対する指針を提供したい。

【損傷部周辺皮質での機能代償と対側（健常側）半球での変化についての文献レビュー】

上田⁹⁾は中枢神経障害における機能回復のメカニズムの一つに機能再構築(functional reorganization)があるとしている。脳の一部の損傷後、残存した脳部位が動的な機能の再組織化や再編成を行うとするもので、そのタイプを、1) 損傷部周辺皮質での機能代償、2) 対側半球への機能転換に分類している。前者は、脳の局所的な障害では、ある機能をもつ脳細胞は完全に失われることはないため、関係する相当数の細胞が周辺に残っており、訓練を通じた機能再編により回復が可能であるとしている。後者は、大脳両半球間で互いに運動を代償し合う能力があることを想定したものである。前者の例としてCastroら¹⁰⁾は、一次運動野を切除したラットで、切除範囲の尾側に前肢領野が出現したことを大脳皮質の微小電気刺激の実験から示した。再構造化された領域と動作遂行には関連があったとしている。サルにおいてNudoら¹¹⁾は運動野を障害後、手の巧緻動作トレーニングを行うと、障害を与えた周辺の支配領域のマップが変化したことを示した。Jenkinsら¹²⁾もサルの示指支配領域の再構築に関して同様の見解を示している。一方、後者は、障害部位の機能が対側半球対応部位へ機能転換するという見解に加え Jones ら^{3, 13)} や Kleim ら⁴⁾ は、前肢麻痺モデルラットの作り方の詳細な検討から始め、運動学習が健常側大脳半球で、脳の可塑的变化が起きる可能性を示唆した。成熟ラットで運動野障害後、運動学習を含む複雑な訓練をした群ではそうでない群よりも、健常側半球でのシナプス数が増加したことや軸索が成長していたことを組織学的に、形態変化として明示した。それによって、therapyとしての行動、運動は適応的な

- 1) 札幌医科大学大学院保健医療学研究科
(〒060-8556 札幌市中央区南3条西17丁目)
Satoe ICHIHARA, MSc, OTR
Sapporo Medical University Graduate School of
Health Sciences
 - 2) 札幌医科大学保健医療学部作業療法学科
Shinji MURAKAMI, MD
 - 3) 札幌医科大学医学部生理学第二講座
Yutaka FUJITO, PhD
- (受付日 2001年8月6日/受理日2001年10月25日)

神経の可塑性を高める可能性があることを論じた。さらに、早期からの強制的な肢の使用は害があったとした Schallertら¹⁴⁾の研究と比較して異なる点は、四肢、軀幹を自然に (naturally) 使った運動を行ったことであり、可塑的变化は自発的な学習 (active learning) と結びついている可能性を提示している¹³⁾。また、同様の条件にて運動野障害後、複雑な運動学習の後には健常側大脳半球の運動野の厚さが増加していたこと⁵⁾、樹状突起の増加がみられること⁶⁾、小脳プルキンエ細胞のシナプス数が増加すること^{7, 8)}などが1990年代に盛んに報告されている。ここでは、組織学的方法を用いて健常側(非障害側)にて障害後の回復過程に伴った変化が起こることを証明している。さらにそれはマニピュレーションすなわちtherapyの内容によって変化があることを示唆している。

【仮説と検証】

我々の仮説は上記のいずれにも共通する部分はあるが、障害後の脳の回復過程は、ある部分の機能代償がある特定の部分が行うのではなく、脳の多様な部位の機能再構築、再編成によって機能代償が起こるのではないかと想定し実験を進めた。それはJonesら⁹⁾の研究にて、健常側大脳半球のシナプス数や密度は訓練内容によって変化があったという報告があったためである。そこでその第一歩として、成熟ラットの片側大脳皮質に障害を与え、運動再学習課題を含む訓練を行った。健常側大脳半球で微小電気刺激を実施し、前肢が反応する領域の比較から、訓練が健常側大脳半球に与える影響を検討した。その実験を以下に示す。

【方法】

1. 対象

雄Wistar系無傷ラット(4-5ヶ月齢, 350-400g) 18匹である。ラットは2匹ずつ透明な飼育ケージにて、明暗12時間サイクルの動物実験施設内ラット室で飼育し、水は自由に、餌は1日1回必要量を与えた。これらのラットを無作為に障害を与えた後、熟練を要する複雑な訓練 (skilled訓練, 後述) をする群 (n=3, L-skilled群), 障害を与えた後単純な訓練 (simple訓練, 後述) をする群 (n=3, L-simple群), 障害を与えた後訓練をしない群 (n=3, L-non-training群), sham-operation (手術手順は障害を与えた群と同様だが、障害形成は行わない) を行ない skilled訓練をする群 (n=3, S-skilled群), sham-operation を行ない simple訓練をする群 (n=3, S-simple群), sham-operation を行ない訓練をしない群 (n=3, S-non-training群) の6群に分けた。

2. 訓練方法

全てのラットは手術前に5日間、はしごと平行棒上の走行を設定する skilled訓練を施行した (図1A)。これはJonesら⁹⁾が示した課題の一部であり、巧みな動作と多くの反射, 感覚情報, バランス保持プログラムが必要な複雑な課題とされている^{7, 15)}。skilled群は、術後28日間, 1日1時間, 前述したskilled訓練を行なった。simple群は、単純な繰り返し動作として平面上の走行を設定し, 28日間, 1日1時間行なった (図1B)。non-training群は、訓練を施行せず, 飼育ケージ内で28日間過ごさせた。

3. 非対称性の評価

障害を与えることで生じた運動障害によって姿勢保持時に非対称性が観察された。この非対称性の回復を定量化するために、床上10 cmに固定されたえさ箱内の餌を獲る動作を設定し、餌を獲る際、餌箱の縁にラットの四肢が、両前肢で接地した回数、健肢が接地してから患肢が接地するまでに要した時間を計測した。これを全群において、手術の前日と手術後(4, 6, 8, 12, 16, 20, 28日目)に測定した (図2)。

4. 大脳微小電気刺激の方法と障害モデルラットの作成

Ketamine (100 mg/Kg; im), Xylazine (0.5-1.0 mg; im) の麻醉下で、右頭蓋骨をbregmaに対して1 mm尾方, 3 mm頭方, 正中に対して2-4 mm外側方の範囲を除去し、体性感覚運動野を直視下に、硬膜を切開反転し大脳皮質を露出した。大脳皮質はシリコンオイルで保護した。大脳微小電気刺激に用いた電極はタングステン線で先端以外は絶縁塗料で被覆されている (1-3 M Ω)。電気刺激には1 Hzのトレインパルス波 (パルス幅200 μ sec, 矩形波, 300 Hz, 10発) を用い、皮質下1.2-1.5 mmの深さで刺激した。刺激は0.5 mm間隔で行った。刺激による反応部位の同定には、筋肉の観察と触診¹⁶⁻¹⁸⁾及び誘発筋電図による方法^{19, 20)}を用いた。得られた結果は脳地図上に

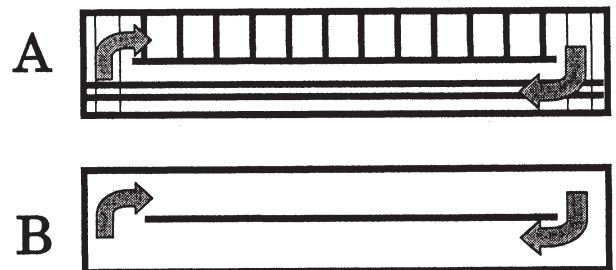


図1. ラットの訓練内容。

A, B はともに訓練ケージを上方からみた図である。A は複雑な訓練としてのはしごと、平行棒課題を含んだもので床上10 cmに高架されている。B は単純な訓練である平面上の走行課題である。

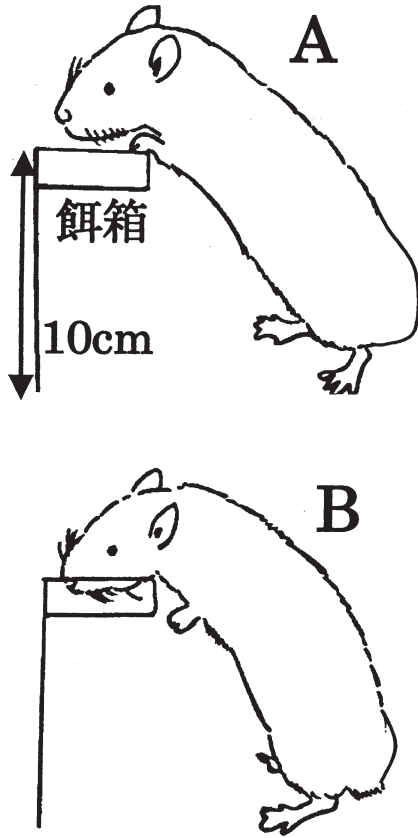


図2. 前肢非対称性の観察.

餌箱は床上10 cmに固定されている。Aは障害を与えていないラットや回復期のラットに見られる両前肢接地。Bは障害受傷後に見られた健肢のみの片側前肢接地で、患肢が餌箱から離れていた状態である。経過とともに、患肢の接地に遅延は認められるが、Bの状態からAのような両前肢接地へと変化した。

プロットした。

障害モデルラットは、大脳皮質微小電気刺激を用いて確認した右半球運動野前肢領域に、直径0.2 mmの被覆していない按摩針電極を用い、1 mAのプラス電流、硬膜下1.5 mmの深さに1カ所につき20秒、計約2分の電氣的障害を与え作成した。28日間の訓練終了後、健常側(左半球)にて再び微小電気刺激を実施し、前肢が反応する領域の広さ、閾値を障害を与える前と比較した。

5. 組織学的方法

28日間の訓練を終え全ての測定終了後、10 %

Folmalin, 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4, 33 - 37 °C)にて灌流固定を行ない、前頭断にて、厚さ100 μ mで組織切片を作成した後Cresyl violet染色を行った。skilled群, simple群, non-training群で障害された各々の範囲を検討した。

【結果】

1. 組織学的結果

図3に障害を与えたラットの脳の切片標本模式図を示した。障害範囲の断定は皮質層構造(特にV層)の乱れ、炎症性細胞の有無から判断した(図3A)。障害範囲はbregmaに対して1 mm尾側 - 3 mm吻側, 3 - 5 mm外側方であり、特に0.2 - 1.2 mm吻側の範囲では障害の程度が大きかった。これらの範囲から主に運動野, 前肢の感覚野が障害を受けていると判断され、前肢を支配するとされている運動野と感覚野の重複領域には障害が与えられていたといえる。L-skilled, L-simple, L-non-training群間において、障害範囲、程度に著明な差は認められなかった(図3B)。

2. 前肢の運動回復

図4に餌獲り動作時、餌箱に健肢が接地してから患肢が接地するまでに要した時間の平均値を示した。L-

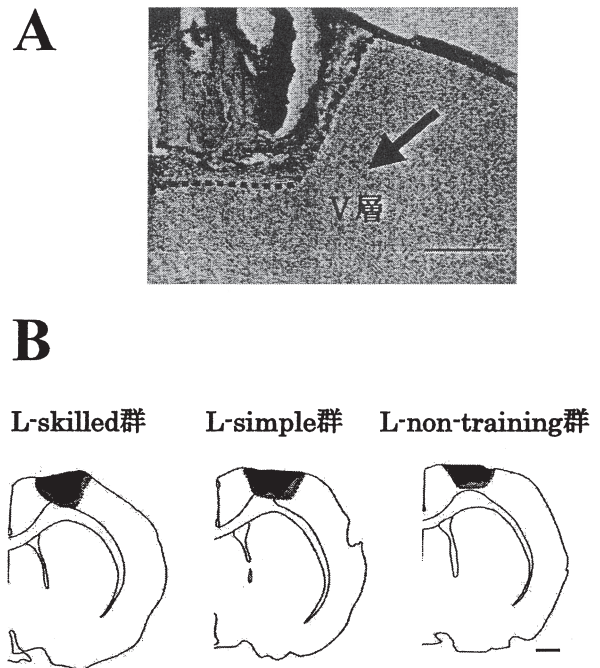


図3. 条件群間における障害範囲.

Aは厚さ100 μ m, Cresyl violet染色した組織切片である。点線より左上方の領域を障害範囲と判定した。矢印は運動野のV層を示す。スケールは0.5 mmを示す。Bはbregmaから吻側に1.2 mm地点の切片である。黒色部分は層構造の断絶、壊死細胞が観察された部位で、灰色部分では層構造の乱れが観察された。黒, 灰色部分を障害範囲と断定した。スケールは1 mmを示す。

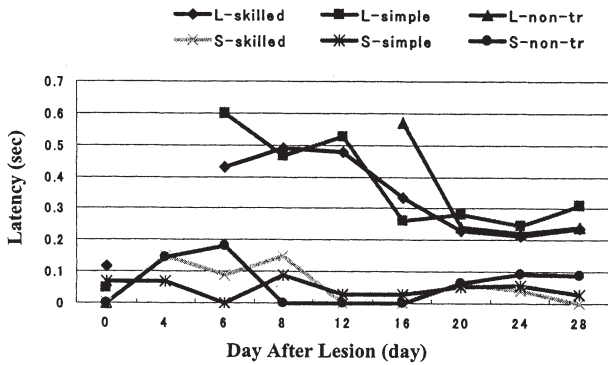


図4. 患肢の運動回復.

縦軸に各群の餌箱に健肢が接地してから患肢が接地するまでに要した時間の平均値, 横軸に術後の経過日数を示す. L-skilledは障害を与え skilled 訓練をした群, L-simpleは障害を与え simple 訓練をした群, L-non-trは障害を与えた後訓練しなかった群. S-はSham群を表す. 4日目は障害を与えた全群で両前肢にて接地することはなかったためプロットがされていない (図2B参照). L-non-training群は, 16日までで両前肢で接地することがなかったため4-16日間でプロットされていない.

skilled群とL-simple群が12日目までは, 0.4秒以上費やしていたのに対し, 16日目からはその約1/2の時間に短縮された. L-non-training群では, 20日以降に減少が見られた. 日数の経過と共に安定した両前肢の接地, 接地までの着実な時間短縮が認められたのはL-skilled群, L-simple群であった. 一方 L-non-training群では, 両前肢での接地は3群の中で最も日数を要した.

3. 大脳微小電気刺激

図5はラットの大脳皮質を背側から見た図で, 0.5 mm 間隔に微小電気刺激した結果である. 20 μ A以下でも反応があった場所を黒, 20-40 μ Aは灰色, 40 μ A以上の電流を要した場所を白で示した. また, ひげ, 首, 下肢などの前肢以外の部位が反応した場所については印で示されていない. 図の右が障害を与える前の結果を示し, 図の左は障害を与え, 28日間訓練したのちの左側, すなわち健常側大脳半球におけるマッピングの結果である. 障害を与えた後, L-simple群や, 訓練をしなかった群よりも, L-skilled群にて, より低い電流値で反応しており, その範囲も拡大が認められた. 全てのラットで同様な傾向を示していた.

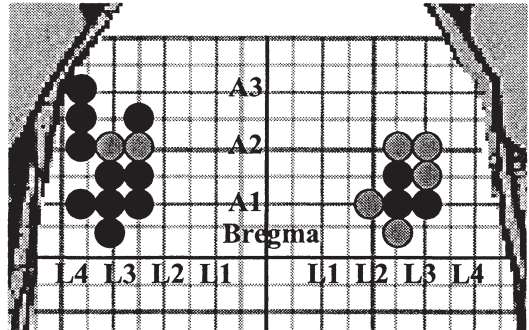
【システムとしての脳と therapy】

本実験から, 行動面の非対称的な回復には顕著な差は認められなかったが, 脳内の変化の指標として用いた大脳微小電気刺激に対してはL-skilled群が最も低い電流値で, 広範囲に反応していることがわかった. Jonesら³⁾は, 一定時間内で壁への両前肢の接地回数

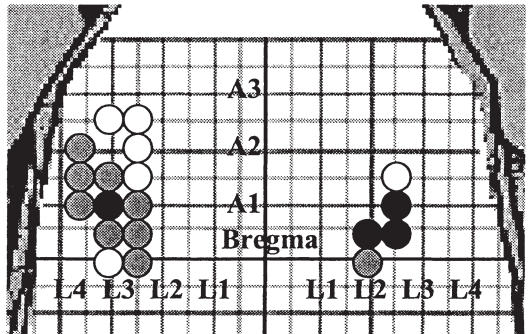
A. L-Skilled訓練群

障害+28日間訓練後,
健常側半球

障害前



B. L-Simple訓練群



C. L-non-training群

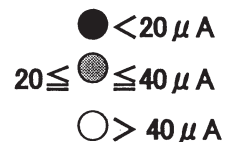
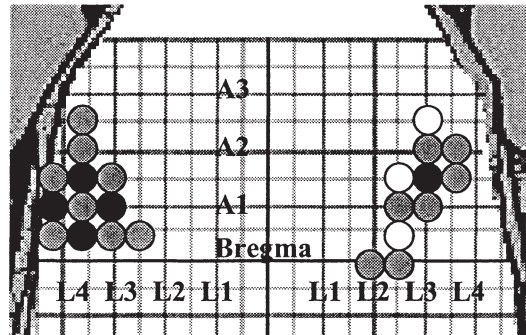


図5. 障害を与えたラットにおける大脳微小電気刺激による前肢反応部位.

ラットの脳を背側から見た図で0.5 mm 間隔にて升目が区切られている. 右が障害を与える前, 左は障害を与え, 28日間訓練した後, 健常側大脳半球で計測した結果を示す. 黒印は20 μ A以下, 灰色印は20-40 μ A, 白印は40 μ A以上の電流で前肢が反応したことを示す. A1は基点としたbregmaより1 mm 吻側, L1は1 mm 外側方を示す.

を計測し、複雑な運動をした群と単純な運動をした群にて著明な差はなかったと我々と同様の見解を示し、ダイナミックな変化は患肢よりも健肢に認められたことも報告している^{3, 13)}。すなわち訓練は患肢の非対称性を回復することにのみ寄与していたのではなく、健肢さらには健常側大脳半球に多大な影響を与えていたことが示唆された。この部分を論じるためには、患肢の回復のみを計測することでは不十分で、健肢の機能向上さらには後肢、躯幹を含めた体全体や行動の質の変化についても評価していく必要があったと考える。しかし、電気生理学的所見からは、健常側大脳半球における大脳微小電気刺激でL-skilled群が他の群と比べて最も敏感な反応を示していた。前述したように組織学的にはJonesら³⁾が複雑な課題を行ったラットにて、健常側の大脳半球でのシナプス数の増加を報告している。よって運動学習を含む訓練は、非障害側も含む脳全体の可塑的变化に影響を与えることを支持する。運動学習のいかなる側面が有効であるのかについては今後の検討課題であると考えているが、Jonesら^{3, 13)}が可塑的メカニズムは四肢、躯幹を自然に(naturally)使うこと、自発的な学習(active learning)と結びついている可能性を提示していることから、単なる障害部位だけの訓練や自発性の伴わない強制的な運動は有効ではないことが推測される。これらは、障害後の回復過程では、部分的な脳の変化により、機能が代償されるわけではなく、システムとして脳の機能を再編成しているという仮説²¹⁾を支持するものと考えられる。ゆえに、therapy場面では、障害の回復のためにその障害された部分のみに注目するのではなく、システムとして相互作用している脳機能を想定した取り組みが必要であることを示唆している。

【動物実験の可能性】

ヒトでは脳への直接侵襲を伴う実験が不可能であることから、臨床場面で評価できる能力、行動の変化の背景で脳内の起こっている現象を直接評価することは困難である^{1, 2)}。しかし、それらを追うことは、訓練効果を脳の変化という客観的事実から証明し、さらにそれらを基礎として適応的回復を高める手技、環境を考えていく手がかりになると考えられる。therapyによる変化を追う手段として、脳機能を直接測ることを想定した場合、動物実験は有効と考えられる。また、ヒトでは、患者が持つ様々な障害は、多種多様で誰一人として他者と同じではないと考えられ、厳密なコントロールスタディーは困難であるといえる^{1, 2)}。純粹に訓練そのものの効果を提示することを目的とした場

合、対象の限定や障害領域の確認が可能な動物実験は有効であるといえる。さらに、動物では回復のタイムコースが比較的短く、短期間で一連の流れを追うことが出来るという点も有効であるといえる。しかし、これらの利点は裏を返せばヒトとは違う面である。ゆえに動物実験による知識の臨床場面への応用にあたっては、十分に注意して行う必要があると考える。

【終わりに】

現段階での実験は症例数も少なく、麻酔深度や皮質の状態を良好に保つなどの実験手法の精密化、訓練課題の設定において追求すべき点が多々ある。また、変化に対する考察も推測の域を出ていない。これらの点を再考した上で、今後は仮説の裏付け、検討を詳細に進めていきたいと考えている。

【文献】

- 1) 正門由久, 千野直一: 神経機能障害の評価と再建プラン—リハビリテーション医学の立場から—。神経進歩 40 (5): 795 - 804, 1996
- 2) 千野直一, 木村彰男: 脳血管障害のリハビリテーション。Annual Review 神経 7: 151-159, 1992
- 3) Jones TA, Chu CJ, Grande LA, Gregory AD: Motor skill training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. J Neuroscience 19 (22): 10153-10163, 1999
- 4) Kleim JA, Lussnig E, Schwarz ER, Comery TA, Greenough WT: Synaptogenesis and FOS expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. J Neuroscience 16 (14): 4529-4535, 1996
- 5) Anderson BJ, Eckburg PB, Relucio KI, Greenough WT: Thickness of the motor cortex increase following 28 days of exercise or motor skill training. Soc Neuroscience Abstr 18: 346, 1992
- 6) Greenough WT, Larson JR, Withers GS: Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motor-sensory forelimb cortex. Behav Neural Biol 44: 301-314, 1985
- 7) Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Greenough WT: Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. Proc Natl

- Acad Sci USA 87:5568-5572, 1990
- 8) Kelim JA, Ballard D, Vji K, Greenough WT: The persistence of experience dependent morphological plasticity in the cerebellar cortex of the rat. Soc Neurosci Abstr 21:444 1995
- 9) 上田敏:中枢神経障害における機能回復のメカニズム. リハビリテーション基礎医学, 上田敏, 千野直一, 大川嗣雄(編), 医学書院, p. 163-179, 2000
- 10) Castro-Alamancos MA, Borrell J: Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent area of cortex. Neuroscience 68 (3):793-805, 1995
- 11) Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW: Neural substrates for the effect of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. Science 272: 1791-1794, 1996
- 12) Jenkins WM, Merzenich MM: Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. Pro Brain Res 71:249-266, 1987
- 13) Jones TA, Hawrylak N, Klintsova AY, Greenough WT: Brain damage, behavior, rehabilitation, recovery, and brain plasticity. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 4:231-237, 1998
- 14) Schallert T, Kozlowski DA, Humm JL, Cocke RR: Use-dependent structural events in recovery of function. Adv Neurol 73:229-238, 1997
- 15) Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT: Exercise and the brain: Angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. J cereb blood Flow Metab 12:110-119, 1992
- 16) Castro-Alamancos MA, Borrell J: Reversal of paw preference after ablation of the preferred forelimb primary motor cortex representation of the rat depends on the size of the forelimb representation. Neuroscience 52 (3):637-644, 1993
- 17) Donoghue JP, Wise SP: The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. J Comp Neurol 212:76-88, 1982
- 18) Donoghue JP, Sanes JN: Organization of adult motor cortex representation patterns following neonatal forelimb nerve injury in rats. J Neuroscience 8: 3221-3232, 1988
- 19) 今井富裕: Biocytinによるラットの皮質脊髄路の順行性標識法-WGA-HRP法との比較- 札幌医学雑誌 61(4):257-266, 1992
- 20) 今井富裕: 実験的脊髄傷害後のラット後肢運動機能回復の神経機序. 札幌医学雑誌 62(2):99-111, 1993
- 21) Ichihara S, Murakami S, Fujito Y, Matsuyama K, Aoki M: Motor learning and neurological effect of skilled training after unilateral sensory-motor cortical lesion in rat. Soc Neurosci Abstr 27:1423, 2001

The mechanism of behavioral and brain recovery after unilateral cortical lesion in rats.

Satoe ICHIHARA, MSc, OTR¹⁾, Shinji MURAKAMI, MD²⁾, Yutaka FUJITO, PhD³⁾

Sapporo Medical University Graduate School of Health Sciences¹⁾, Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Sapporo Medical University²⁾, Department of Physiology, School of Medicine, Sapporo Medical University³⁾

Abstract: To assess the effect of behavioral manipulation as therapy on the new neural network after brain damage, we studied the effect of skilled training on neurophysiological change in the intact cortex after unilateral damage to the forelimb sensorimotor cortex. Eighteen male Wistar rats (4-5 months) were assigned to 6 groups: (1) rats receiving unilateral forelimb sensorimotor cortex lesion (FSMC lesion) and postoperative training on the skilled task (L-skilled), (2) rats with unilateral FSMC lesion receiving simple repetitive task (L-simple), (3) rats with unilateral FSMC lesion receiving no task (L-non-training), (4) sham-operated rats receiving skilled task, (5) sham-operated rats receiving simple task, (6) sham-operated rats with no task. Rats were anesthetized with halothane and followed with Ketamine HCl and electrical lesion was added at FSMC where was confirmed by electrical microstimulation (less than 20 μ A). After chronic operations, rats were trained according to each task. Recovery of motor behavior was tested by the symmetry in the use of the forelimbs for upright postural support. Recovery from the asymmetrical use in the forelimbs indicated the recovery period was faster in the L-skilled and L-simple than L-non-training groups. Microstimulation mapping showed forelimb area was expanded in intact cortex of the L-skilled group especially. These findings suggested that therapeutic effect as behavioral manipulation makes neurophysiological change in whole brain, evening the intact side, after unilateral cortical lesion.

Key Word : lesion, learning, recovery, whole brain, therapy

ミニレビュー

X-linked myotubular myopathyにおける遺伝子変異のスクリーニングと遺伝子解析

内田英二¹⁾ 小塚直樹²⁾ 菊地 真¹⁾ 武田秀勝²⁾ 仙石泰仁²⁾ 舘 延忠²⁾

キーワード: X-linked myotubular myopathy (XLMTM)・MTM1 遺伝子・遺伝子変異スクリーニング
塩基配列決定

1. はじめに

遺伝子変異による遺伝性疾患は、正常なDNAの塩基配列に何らかの変異(欠失, 挿入, 一塩基置換, 重複, 三塩基反復など)が起こり、最終的に蛋白の発現に影響を及ぼすことで発症する¹⁾。

遺伝性筋疾患である先天性ミオパチーのうち、常染色体劣性および優性遺伝 myotubular myopathy は発症時期が遅いが、X染色体劣性遺伝形式をとる X-linked myotubular myopathy (以下 XLMTM) は発症時期が早く、出生直後あるいは乳幼児期より発症する^{2, 3)}。XLMTMの臨床症状としては、重症な筋緊張低下、筋萎縮および筋力低下などが出生直後から全身に観察される floppy infant であり、著明な呼吸機能不全を呈することからレスピレータ管理を余儀なくされる予後不良の疾患である。

XLMTMの責任遺伝子である myotubularin (以下 MTM1) 遺伝子は1996年にLaporteらによって同定され、遺伝子座はX染色体長腕部(Xq28)に位置する。15個のエクソンが2.4 kb (1 kbは1000塩基対)の

mRNAから転写され、603個のアミノ酸から構成されているMTM1タンパク質が翻訳されることがクローニングにより解明された^{4, 5)}。

2. X-linked myotubular myopathyの概要

2. 1. 筋生検による骨格筋組織の所見

Hematoxylin and eosin (H-E) 染色では、中心核を有し胎児期myotubeに類似した大小不同の未熟な筋線維が20-50%観察されている。またNADH-tetrazolium reductase (NADH-TR) 染色では、中心部と比較し周辺部において酵素活性が低下する所見である sarcoplasmic halo を認め、他の先天性ミオパチーと同様にtype 1線維の数量的優位と小径を示している。しかしながら筋の基本構築の乱れはみられず壊死および再生の所見は認められない。生直後の正常筋、XLMTM患児筋、先天性筋緊張性ジストロフィー(DM)筋における筋構成蛋白である myosin heavy chain (MHC) のアイソフォーム分布について各アイソフォームに対する抗体で解析すると、生直後の正常筋ではslow MHC (type 1), fast MHC (type 2), fetal MHC (type 2C) の3種類に染め分けられ、またXLMTM患児筋における中心核を有する筋線維についても正常筋と同様である。DMにみられる中心核線維はfast MHCの特徴を示し同時にfetal MHCの特徴を示す。このように同じ中心核線維を特徴とするXLMTM患児筋とDM筋では異なり、DM筋では未熟筋が特徴であるが、XLMTM患児筋では筋の未熟性はなく正常筋と同程度に分化していることが特徴である^{6, 7)}。しかしながら、臨床的には著明な筋力および筋緊張低下を示す以外、いずれの筋構造蛋白の異常がこのような所見をもたらすかについては不明である。

1) 札幌医科大学大学院保健医療学研究科
(〒060-0061 札幌市中央区南3条西17丁目)

Eiji UCHIDA, MA, Shin KIKUCHI, RPT
Graduate School of Health Sciences, Sapporo
Medical University

2) 札幌医科大学保健医療学部

Naoki KOZUKA, RPT, PhD, Hidekatsu TAKEDA, PhD,
Yasuhito SENGOKU, OTR, MA, Nobutada TACHI, MD,
PhD

School of Health Sciences, Sapporo Medical
University

(受付日 2001年7月23日/受理日2001年10月25日)

2. 2. MTM1 遺伝子およびmyotubularin

MTM1遺伝子は筋細胞中で散在性かつ特異的に発現し、15個のエクソンを有する。またゲノムDNAではXq28に存在し、100 kbの長さを有し、その20 kb下流には相同性の高いMTMR1遺伝子が同定されている⁸。⁹ MTM1遺伝子がコードする蛋白であるmyotubularinは⁵、tyrosine phosphatase (PTP)のactive siteを含んでいる点で一致している以外は、他のPTPとの相同性はみられないと報告されている。myotubularinの酵素活性については不明な点が多いが、いくつかのミスセンス変異のある症例においてPTPの活性部位が障害を受けていることが確認されている。また最近の知見からmyotubularinはserine phosphataseとPTPの両者に対する脱リン酸を行うことができることから、新しいdual specificity phosphatase (DSP) familyであると考えられている¹⁰。

2. 3. MTM1 遺伝子変異と臨床症状との関連

XLMTM発症の一因として、myotubularin中のPTP (Protein tyrosine phosphatase) ドメインあるいはSID (set interaction domain) の損傷によるmyotubularinのphosphatase活性低下が考えられている¹¹。また、15個あるエクソンのうち、エクソン11はPTPドメインをコードする領域、エクソン12はSIDをコードする領域であることが判明している。Laporteら¹¹は、198症例中に同定された133変異について、変異形式はミスセンス、ナンセンス、小さな挿入と欠失、大きな欠失、スプライス部位変異などすべてのタイプが確認されたと報告している。変異はすべてのエクソンで起こり、3, 4, 8, 9, 11, 12に多く、このことからXLMTMに関連する遺伝子異常のhot spotがこの領域に存在すると考えられる。

ミスセンス変異は198例中55例であり、エクソン8, 9, 11, 12, 13に多く認められ、PTPドメインやSIDに関連するエクソン11, 12に生じたミスセンス変異14症例の臨床症状は重度である。Laporteら¹¹は、これらのミスセンス変異がmyotubularinに与える影響をヒトMTM1遺伝子と相同性の高いマウスMTM1遺伝子、ショウジョウバエMTMH1遺伝子、ヒトMTMR1遺伝子と比較した結果、いずれもmyotubularinに損傷を生じさせるとしている。したがって、PTPドメインやSIDはmyotubularinにおいて機能的に重要であることが示された。また、それ以外のエクソンで生じた場合の臨床症状は軽度—中等度であり、比較的長期の生存例も報告されている。また抗myotubularin抗体を用いた免疫沈降法での解析で、PTPドメインおよび

SID以外の領域にミスセンス変異を持つ症例のうち、重度なものはmyotubularinがほとんど検出されないのに対し、軽症例では少量のmyotubularinが検出されることからPTPドメインやSID以外の領域でのミスセンス変異によるXLMTMは、MTM1遺伝子の発現低下によるものと考えられる。このことからPTPドメインおよびSIDのMTM1遺伝子の機能における重要性が示唆されている。

ナンセンス変異はエクソン6以外の2-14に40例、1塩基から12塩基程度の欠失、あるいは挿入がエクソン4-14にかけて50例報告されており、特にエクソン4におけるcDNA141-144 (AGAA)の欠失の頻度が高い。いずれの場合も臨床症状は重度であり、生命予後も不良である。ナンセンス変異あるいはフレームシフトによって下流のアミノ酸が停止コドンに変化する可能性のある欠失および挿入では、遺伝子の発現自体に異常をもたらしていることが予想される。

その他の変異タイプとして、大きな欠失はエクソン単位(1個から全て)の欠失が15例報告され、ナンセンス変異と同様にmyotubularinは作られていない。また、残りの38例はイントロンおよびプロモーター領域での遺伝子異常であり¹²⁻¹⁴、臨床症状はやはり重度である。スプライス部位変異はイントロン3, 8, 11に多く、その中で特にイントロン11に頻度が高い。cDNA1261のAがGに置換した例のように、イントロンおよびプロモーター領域に変異が発生した場合、新しいスプライス部位が作られることにより、変異したmyotubularinが生成されていることが予想され、正常なスプライシングの阻害により、遺伝子発現低下や消失が引き起こされることを考慮する必要がある。本邦ではエクソン11のミスセンス変異(cDNAの1205G-T)、エクソン11のナンセンス変異(cDNAの1261C-T)、エクソン11のフレームシフト変異(cDNAの1131と1132にGGAT挿入)、エクソン13のフレームシフト変異(cDNAの1433からTCTT欠失)、イントロン11のスプライス部位変異(cDNAの1261の10A-G)がNishinoら¹⁵と渡辺ら¹⁶により報告されている。最近、MTM1遺伝子およびその下流20 kbに位置するMTMR1遺伝子を含んだ225 kb領域のゲノムDNAが解明された。このMTMR1遺伝子はMTM1遺伝子と相同性が高いため、XLMTMとの関係が注目されている⁸。また、いくつかのXLMTM症例に幽門狭窄症、球状赤血球症、胆石、腎結石、肝障害等の合併が報告され、myotubularinは単に筋細胞のみならず種々の臓器に関係していることが示唆されている¹⁷。これらの関連を明確にするためには、今後の症例検討の蓄積が重要

な課題と考える。また母親が保因者となる遺伝形式のため、出生前診断を視野に入れた迅速かつ正確な遺伝子診断は重要であると考え。

3. 遺伝子診断の手順

臨床的には、生直後から著明な全身の筋緊張と呼吸不全を呈し、レスピレータ管理になる先天性筋緊張性ジストロフィー (congenital DM), 脊髄性筋萎縮症 I 型 (SMA I), 予後不良の先天性ミオパチーである nemaline myopathy が類似した症状を示す。特に多くの先天性ミオパチーから XLMTM を鑑別するためには筋生検は必要な検査である。

XLMTM の遺伝子診断を行うために、末梢血白血球より抽出した DNA から 15 個あるエクソンについて特異的プライマー (Table 1) を用いて polymerase chain reaction 法 (以下 PCR) によって増幅する (Table 2)

^{9,18)}。また筋組織があれば、RT-PCR 法によりエクソンを増幅し、heteroduplex 解析または single-strand conformation polymorphism (SSCP) 解析を用いて変異のスクリーニングをし、異常なバンドが認められた場合、該当するエクソンの塩基配列を決定する¹³⁻¹⁴⁾。

3. 1. XLMTM 遺伝子解析プロトコール

我々は本疾患の遺伝子変異スクリーニングを、heteroduplex 解析および SSCP 解析の 2 種類の方法で実施している¹⁹⁾。

heteroduplex 解析の原理は図 1 に示す。heteroduplex 解析は PCR により増幅した正常 DNA と患者 DNA を混合し、熱変性によりそれぞれを一本鎖 DNA とした後、正常 DNA と患者 DNA の二本鎖をつくる。患者 DNA に異常がある場合、正常な DNA 断片 (以下、アレル) と異常アレルがアニーリングし、正常+正常、正常+異常、

Table 1. Primers set for each exon of MTM1 gene

| | Exon | Forward | Reverse |
|-------|------|-------------------------------|------------------------------|
| XLMTM | 1 | 5'-GGCGCCCAGTCCAACCTTC-3' | 5'-CCAAGGAGTCCCAACCTTC-3' |
| | 2 | 5'-AGAACCCTGTAAAGTAGTACC-3' | 5'-TAGGCCAGCCCCAAAATGAC-3' |
| | 3 | 5'-AACAGTGTGTAATGTAAACGTC-3' | 5'-AGACTTCTCCTCAAGTTATGC-3' |
| | 4 | 5'-AGTGCCATTTGTTGTGTATC-3' | 5'-TGACCCACAGTCAATCTTGC-3' |
| | 5 | 5'-TAATTATACTGACACAAATACTG-3' | 5'-TCCACATTAATTGTCTACTATC-3' |
| | 6 | 5'-TTGAAGACTGAACTGTCATAC-3' | 5'-AACCTTCCCACGCTGAGG-3' |
| | 7 | 5'-AGATGTACTATAATAGTAGAC-3' | 5'-AGGTTTCATCACATACCAGAC-3' |
| | 8 | 5'-TCCAGAGATGAGGTCAAGC-3' | 5'-GGTGCTCTTCAAGAGAAACG-3' |
| | 9 | 5'-TTGATAGCTTAAACTTTCTGAC-3' | 5'-TCCAGCACATCATTAAGTCC-3' |
| | 10 | 5'-CTGATTGTTTGTATTTTCATG-3' | 5'-TATATACACAAATATTTTCAC-3' |
| | 11 | 5'-AACTCCCTACTGACTCACG-3' | 5'-AATCCTGAATGGTAGTGATCT-3' |
| | 12 | 5'-ATGCTTTCTCAGTTTTGTACC-3' | 5'-TAAACAATGAGTTGAATGTA-3' |
| | 13 | 5'-TTATAAAGTTTCAGTCCCAG-3' | 5'-TTTGGCAAGCCTAATGTATC-3' |
| | 14 | 5'-TTTTACTTAGGCTCTCCAC-3' | 5'-CTATCTTTTAACAGTGCTAC-3' |
| | 15 | 5'-AGTGTAACCAAGTCTCTGG-3' | 5'-AAATGAAAGTCAGCTATCGC-3' |

Table 2. PCR condition of MTM1 gene

| | Time / duration / temperature |
|-------|---|
| XLMTM | [95°C-2min.] × 1 cycle → [95°C-15sec./52°C-15sec./72°C-45sec.] × 28 cycle → [72°C-7min.] × 1 cycle |

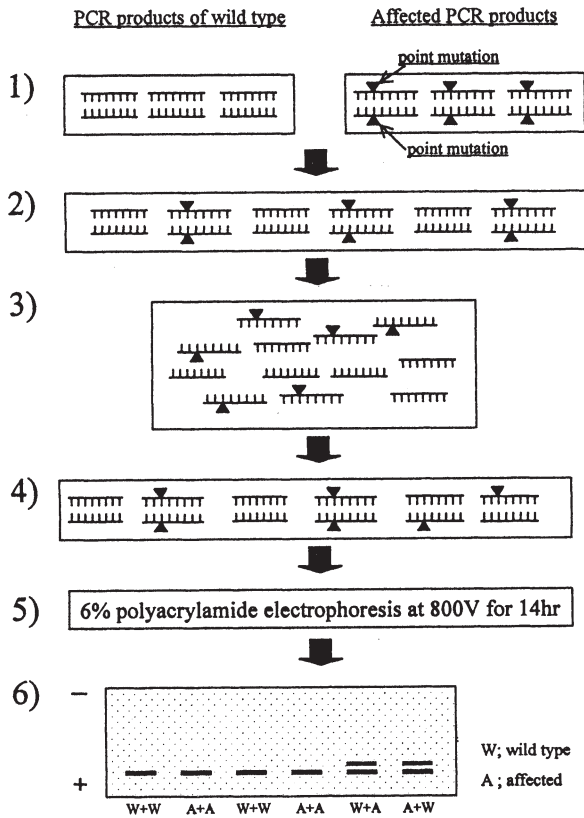


Fig. 1 Principle of heteroduplex analysis. 1) PCR for target DNA. 2) Mixed control and mutant DNA. 3) Denaturing at 95°C for 3 min. 4) Annealing at 37°C for 60 min. 5) Electrophoresis in 6% polyacrylamide gel at 800V for 12-14 hr at room temperature. 6) Staining in ethidium bromide.

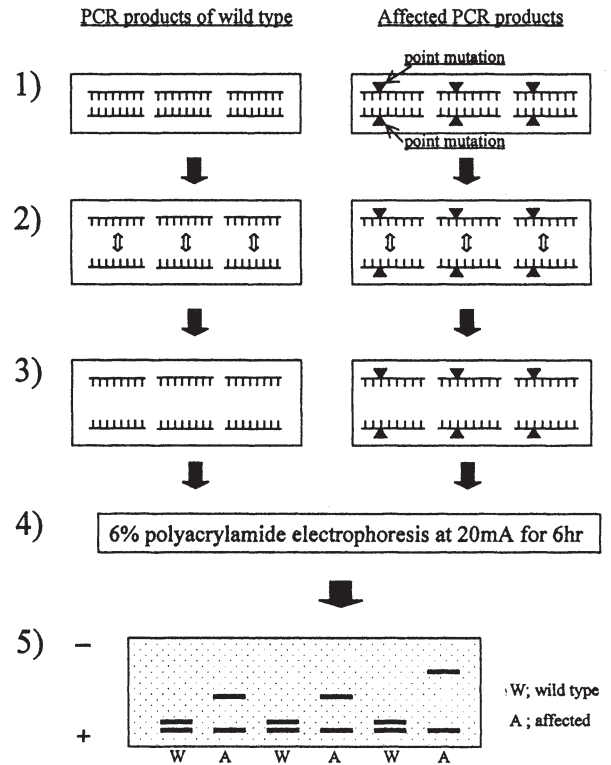


Fig. 2 Principle of single-strand conformation polymorphism analysis. 1) PCR for target DNA. 2) Denaturing at 100°C for 10 min. 3) Quickly on-ice for 10 min. 4) Electrophoresis in 6% polyacrylamide gel at 20mA for 6 hr in a cold (4°C) room. 5) Silver staining.

異常+異常の3種の二本鎖DNAが異なる移動度を示し、その変異を検出することができる²⁰⁻²³。またSSCP解析(図2)はPCRにより増幅したアレルを熱変性して一本鎖DNAとした後、電気泳動によって分離し、塩基配列変化による泳動度の変化を解析する方法である。配列変化の検出感度は温度、泳動ゲルの構成内容などの泳動条件によって大きく変わるとされている²³⁻²⁶。また、最近の傾向として放射性同位元素を使わない方法が一般的になり安全性の点でも有効性が評価されている^{20, 23, 27}。これらの方法はいずれも検出感度の高さ、変異検出までの迅速性、特別な装置を必要としないコストの低さや簡便性という長所がある^{20-23, 25}。

3. 1. 1. heteroduplex 解析

heteroduplex解析の実験手順をFig. 1に示す。解析には、患者PCR産物および正常対照PCR産物を用い

る。正常対照PCR産物 5 μ l と患者PCR産物 5 μ l を混合し、同様に正常対照PCR産物 5 μ l と control とする別個体の正常 PCR産物 5 μ l を混合する。混合後、95°Cで3分加熱して熱変性し、それぞれを1本鎖DNAとした後、37°Cで60分以上静置したものを泳動用サンプルとする。泳動用ゲルはMDEゲル溶液 (BioWhittaker Molecular Applications 社製) 40.0 ml, 10 \times TBE (トリス・ホウ酸・EDTA緩衝液) 4.8 ml に滅菌水を 40.2 ml 加え、攪拌後、10%過酸化アンモニウム (APS) 水溶液 320 μ l, N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 32 μ l をさらに加え、泳動板 (50.0 cm \times 17.0 cm \times 0.9 mm) に注入し固化させる。泳動用サンプルは作成した5 μ l に、ローディングバッファーを1 μ l 加え、ゲルに投入する。電気泳動は800 Vで14時間、室温にて行い、泳動終了後、エチジウムブロミド処理を施し、紫

外線照射下で泳動変異の有無を確認する。

3. 1. 2. SSCP 解析

SSCP解析の実験手順をFig. 2に示す。解析に用いる泳動用サンプルは、患者PCR産物および対照とする正常対照PCR産物を各々 1.0 μ l, ローディングバッファーを 15 μ l 混合し, 100 $^{\circ}$ Cで10分加熱して熱変性し, 一本鎖DNAとし氷上で10分冷却する。泳動用ゲルはMDEゲル溶液4.0 ml, 10 \times TBE 1.0 mlに滅菌水を5.0 ml加え, 攪拌後, 10% APS水溶液 50 μ l, TEMED 10 μ lをさらに加え, 泳動板(9.0 cm \times 8.4 cm \times 1.0 mm)に注入し固化させる。電気泳動は泳動用サンプル(15 μ l)をゲルに投入し, 4 $^{\circ}$ Cに固定した低温室内で, 20 mAで6時間行い, 終了後, 室温で銀染色処理を施す。銀染色処理は, 最初に25% グルタルアルデヒド/滅菌水(2:3)溶液に30分浸潤した後, 滅菌水による洗浄(10分間を6回)を行う。次に1N NaOH/アンモニア水/20% 硝酸銀溶液/滅菌水(5:1:1:93)溶液に15分浸潤した後, 再度, 滅菌水で洗浄(1分間を2回)し, 1% クエン酸/ホルムアルデヒド/滅菌水(10:1:200)溶液に5分程度浸潤し, 変異アレルの状態を確認する。

3. 1. 3. サブクローニング

XLMTMの場合, 点突然変異に加え, 数塩基程度の欠失や挿入あるいはエクソン単位の欠失が予想されるので, サブクローニング後に得られるプラスミドDNAを鋳型とする直接塩基配列決定を行うため, TA Cloning kit (Invitrogen Corp.)を用い, サブクローニングを実施する²⁸⁾。

3. 1. 4. 塩基配列決定

塩基配列決定にはDNAシーケンサーSQ5500E(日立電子エンジニアリング(株)製)を用いている。hetero-duplex解析およびSSCP解析により泳動変異が検出された患者の該当エクソンのPCR産物を精製し, プライマーや酵素を除去した後, サブクローニングを実施する。サブクローニングにより得られたプラスミドDNA 500 ngを鋳型とし, 末端に蛍光標識されたM13 forwardプライマーを用いて, Thermo Sequenase Core Sequencing kit(日立計測機器サービス, 東京)によるシーケンス反応をDNA Thermal Cycler PJ480により行う。反応温度条件は[95 $^{\circ}$ C-5分] \times 1サイクル \rightarrow [95 $^{\circ}$ C-30秒/60 $^{\circ}$ C-30秒] \times 25サイクル \rightarrow [4 $^{\circ}$ C]である。5 μ lのシーケンス反応産物に90%ホルムアミドローディングダイ3 μ lを加えた混合液を20分間真空吸引する。泳動用ゲルは,

Long Rangerゲル溶液(BioWhittaker Molecular Applications社製)7.2 ml, 尿素22.0 gおよび滅菌水を30 ml加え, 攪拌溶解後, AG501-X8 Resinを2.4 g加えた混合液を完成させる。さらに室温で約30分攪拌後, フィルターユニットを用いて10 \times TBE 7.2 mlおよび混合液を続けて吸引濾過する。この溶液を5分程度攪拌後, 10% APS水溶液およびTEMEDを加え固化させる。

泳動は12時間実施し, fluorogramによりゲルに出現した配列状況を確認し, コンピュータ処理により塩基配列を決定する²⁹⁾。

4. XLMTM 遺伝子解析の自験例

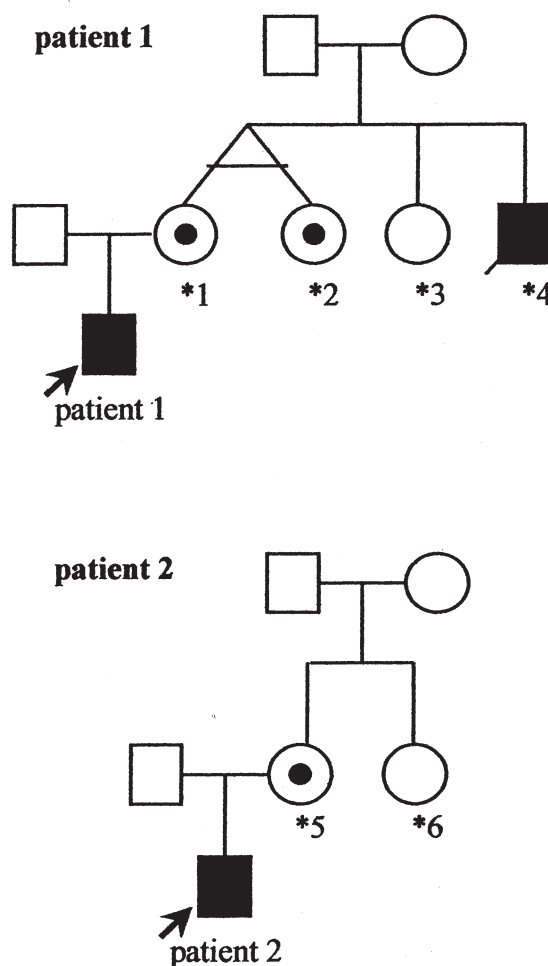


Fig. 3

Pedigree of patients in XLMTM.

*1,2: Mother and aunt were carrier as XLMTM. *3: Another aunt was normal. *4: He was dead at neonatal term and suspected XLMTM. *5: Mother was carrier as XLMTM. *6: His aunt was normal.

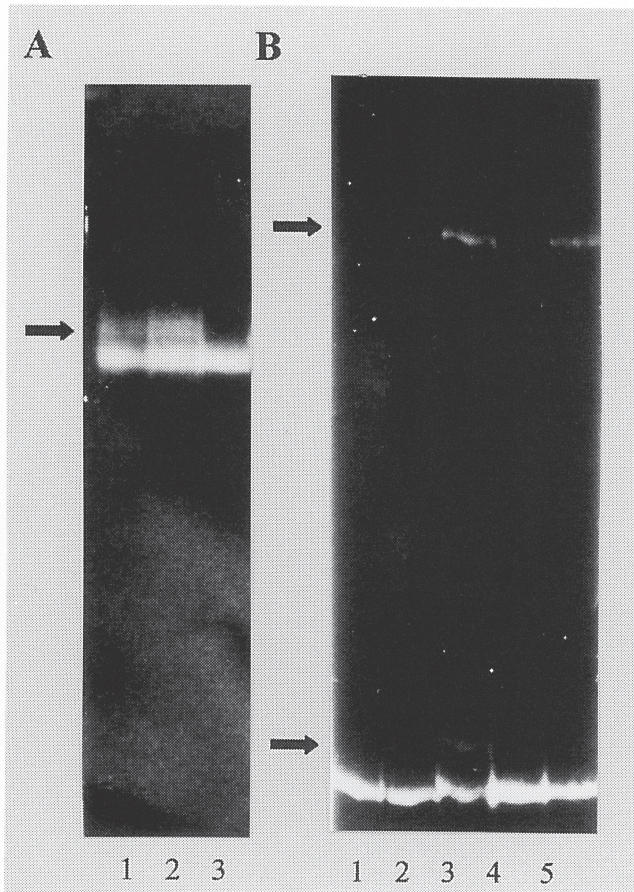


Fig. 4

The results of HD in exon 3 (A) and exon 4 (B) of MTM1 gene in controls and XLMTM patients. A; A heteroduplex band is demonstrated in patient 1 (lane 1, arrowed) and his mother (lane 2). Lane 3 is his father. B; Two heteroduplex bands are demonstrated in patient 2 (lane 3, arrowed) and his mother (lane 5). Other lanes are unaffected normal controls (lane 4 is his father).

今回我々は、臨床診断および筋生検により重症型 myotubular myopathy と診断された男児 2 症例 (Fig. 3) に対して MTM1 遺伝子の解析を行い、その結果、遺伝子変異を同定した。

4. 1. 対象

臨床診断の結果、重症の XLMTM と診断された男児 2 名の DNA を、また対照として疾患のない健常者の正常 DNA を用いた。なお、血液サンプルの使用については、書面および口頭説明によるインフォームドコンセントで同意を得た。

4. 2. スクリーニングの結果

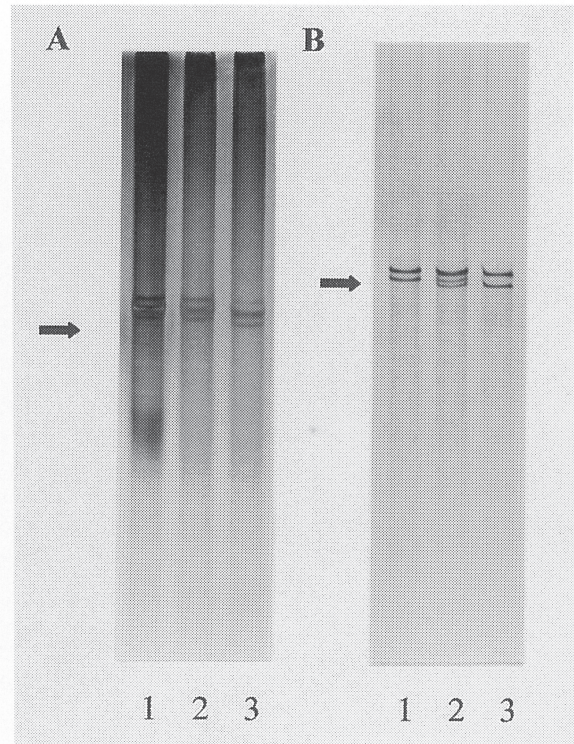


Fig. 5

The results of SSCP in exon 3 (A) and exon 4 (B) of MTM1 gene in controls and XLMTM patients. A; A mutant band is demonstrated in patient 1 (lane 3, arrowed). Other lanes are unaffected normal controls. B; A mutant band is demonstrated in patient 2 (lane 3, arrowed) and his mother (lane 2). Lane 1 is his father.

4. 2. 1. heteroduplex 解析による検出

XLMTM 患者の heteroduplex 解析の結果を Fig. 4A-4B に示した。Fig. 4A は患者 1 の MTM1 遺伝子エクソン 3 について、Fig. 4B には患者 2 の MTM1 遺伝子エクソン 4 についての解析結果である。患者 1 (lane 1) および患者 1 の母 (lane 2) は矢印で示したところにヘテロデュプレクスバンドが確認された (lane 3 は正常)。同様に患者 2 (lane 3) および患者 2 の母 (lane 5) には 2 本のヘテロデュプレクスバンドが確認された。

4. 2. 2. SSCP による検出

XLMTM 患者についての SSCP の結果を Fig. 5A-5B に示した。患者 1 (Fig. 5A, lane 3) では正常 (lane 1 および 2) と比較し、移動度が異なるバンドが観察された。患者 2 (Fig. 5B, lane 3) では、正常である患者 2 の父 (lane 1) と比較し、移動度の異なるバン

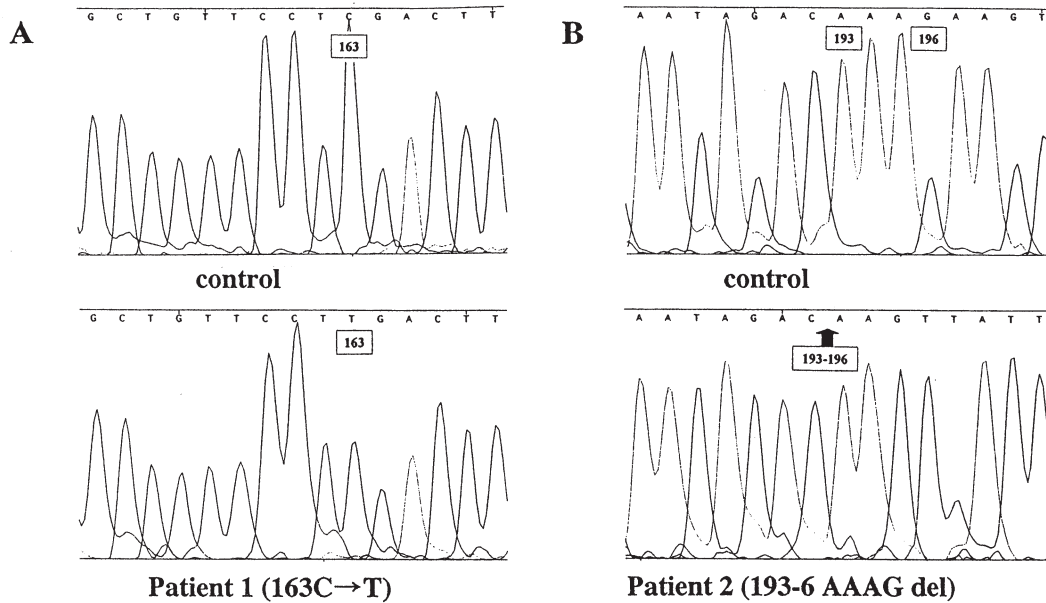


Fig. 6 The results of the sequence analysis in exon 3 (A) and exon 4 (B) of MTM1 gene in controls and XLTM patients. A; In patient 1, a nonsense mutation corresponding to C163→T is demonstrated in exon 3. B; In patient 2, 4 bp deletion in frameshift mutation and distal terminal codon after amino acid 25 in exon 4.

ドが1本観察された。また保因者と推察される患者2の母 (lane 2) では患者2の変異バンドと同じ位置に新たなバンドが確認された。

4. 3. 塩基配列決定

サブクローニングにより得られたプラスミドDNAを用いた塩基配列決定のついでの結果はFig. 6Aおよび6Bに示した。患者1 (Fig. 6A) については、塩基193から196にかけての4塩基(AAAG)欠失を認めた (Fig. 6A)。この欠失によりフレームシフト変異を生じ、下流25番目のアミノ酸が停止コドンに置換していた。母親はこの欠失遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合体を有する保因者と診断された。

また患者2では塩基163CがTに置換しており、このためCGAがコードするアルギニンが停止コドン (TGA) になり、ナンセンス変異となっていた (Fig. 6B)。母親とその一卵性である双子の姉は同一の変異遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合体を有する保因者と診断された。

【文 献】

- 1) 服巻保幸: 遺伝子変異. 医科遺伝学 (改訂第2版). 松田一郎監修. 東京, 南江堂, pp. 185-197, 1999
- 2) Joseph M, Pai GS, Holden KR, Herman GE: X-

linked myotubular myopathy: clinical observations in ten additional cases. *Am J Med Genet* 59:168-173, 1995

- 3) Wallgren-Pettersson C, Clarke A, Samson F, Fardeau M, Dubowitz V, Moser H, Grimm T, Barohn RJ, Barth PG: The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X-linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies. *J Med Genet* 32:673-679, 1995
- 4) Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, Klauck SM, Poustka A, Dahl N: A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nature Genet* 13:175-182, 1996
- 5) Laporte J, Blondeau F, Bui-Bello A, Tentler D, Kretz C, Dahl N, Mandel JL: Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatases gene family yeast to human. *Hum Mol Genet* 7:1703-1712, 1998
- 6) Sawchak JA, Sher JH, Norman MG, Kura RW, Shafiq SA: Centronuclear myopathy

- heterogeneity: distinction of clinical types by myosin isoform patterns. *Neurology* 41:135-140, 1991
- 7) Soussi-Yanicostas N, Chevallay M, Laurent-Winter C, Tome FMS, Fardeau M, Butler-Browne GS: Distinct contractile protein profile in congenital myotonic dystrophy and X-linked myotubular myopathy. *Neuromusc Disord* 1:103-111, 1991
 - 8) Kioschis P, Wiemann S, Heiss NS, Francis F, Götz C, Poustka A, Taudien S, Platzer M, Wiehe T, Beckmann G, Weber J, Nordsiek G, Rosenthal A: Genomic organization of a 225-kb region in Xq28 containing the gene for X-linked myotubular myopathy (MTM1) and a related gene (MTMR1). *Genomics* 54:256-266, 1998
 - 9) Laporte J, Guiraud-Chanmeil C, Tanner SM, Blondeau F, Hu LJ, Vicaire S, Liechti-Gallati S, Mandel JL: Genomic organization of the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. *Eur J Hum Genet* 6:325-330, 1998
 - 10) Cui X, De Vivo I, Slany R, Miyamoto A, Firestein R, Cleary ML: Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nature Genet* 18:331-337, 1998
 - 11) Laporte J, Biancalana V, Tanner SM, Kress W, Schneider V, Wallgren-Pettersson C, Herger F, Bui-Bello A, Blondeau F, Liechti-Gallati S, Mandel JL: MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum Mutat* 15:393-409, 2000
 - 12) de Gouyon BM, Zhao W, Laporte J, Mandel JL, Metzenberg A, Herman GE: Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum Mol Genet* 6:1499-1504, 1997
 - 13) Tanner SM, Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Liechti-Gallati S: Confirmation of prenatal diagnosis results of X-linked recessive myotubular myopathy by mutational screening, and description of three new mutations in the MTM1 gene. *Hum Mutat* 11:62-68, 1998
 - 14) Tanner SM, Schneider V, Thomas NS, Clarke A, Lazarou L, Liechti-Gallati S: Characterization of 34 novel and six known MTM1 gene mutations in 47 unrelated X-linked myotubular myopathy patients. *Neuromusc. Disord.* 9: 41-49, 1999
 - 15) Nishino I, Minami N, Kobayashi O, Ikezawa M, Goto Y, Arahata K, Nonaka I: MTM1 gene mutations in Japanese patients with the severe infantile form of myotubular myopathy. *Neuromusc Disord* 8:453-458, 1998
 - 16) 渡辺達也, 渡辺真史, 斉藤徹, 東谷暁子, 田中総一郎, 西野一三, 埜中征哉: 遺伝子異常を明らかにし得た重症型ミオチューブラーミオパチーの1例. *脳と発達* 30: 523-527, 1998
 - 17) Herman GE, Finegold M, Zhao W, de Gouyon BM, Metzenberg A: Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. *J Pediatr* 134: 206-214, 1999
 - 18) Laporte J, Guiraud-Chanmeil C, Vincent MC, Mandel JL, Liechti-Gallati S, Wallgren-Pettersson C, Dahl N, Kress W, Bolhuis PA, Fardeau M, Samson F, Bertini E: Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. *Hum Mol Genet* 6:1505-1511, 1997
 - 19) 内田英二, 舘延忠, 小塚直樹, 小田中芳子, 仙石泰仁, 武田秀勝: 遺伝性神経筋疾患の遺伝子変異スクリーニングにおけるheteroduplex解析およびsingle-strand conformation polymorphism解析の有効性. *札幌医科大学保健医療学部紀要* 4:69-76, 2001
 - 20) Glavac D, Dean M: Application of heteroduplex analysis for mutation detection in disease genes. *Hum Mutat* 6: 281-287, 1995
 - 21) Grompe M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet* 5: 111-117, 1993
 - 22) Lessa EP, Applebaum G: Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol Ecol* 2: 119-129, 1993
 - 23) Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE: Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for

- gel-based mutation detection. Electrophoresis 20: 1177-1185, 1999
- 24) Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M: Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. Hum Mol Genet 3: 801-807, 1994
- 25) 田平知子, 林健志: PCR, PCR-SSCP法. 新訂新遺伝子工学ハンドブック改訂第3版. 村松正實, 山本雅 (編). 東京, 羊土社, pp74-77, 1999
- 26) Wikman FP, Katballe N, Christensen M, Laurberg S, Orntoft TF: Efficient mutation detection in mismatch repair genes using a combination of single-strand conformational polymorphism and heteroduplex analysis at a controlled temperature. Genet Testing 4: 15-21, 2000
- 27) Pogue R, West S, Bushby K: Multiplex SSCP and heteroduplex analysis with Southern hybridization for large-scale mutation detection. Genomics 54: 1-4, 1998
- 28) 小塚直樹, 舘延忠: 遺伝性ニューロパチー (Charcot-Marie-Tooth病) の遺伝子解析-P0遺伝子を中心に-. 札幌医学雑誌 67:39-49, 1998
- 29) 小塚直樹, 舘延忠, 内田英二, 武田秀勝, 仙石泰仁, 小田中芳子: X連鎖性劣性遺伝を示した myotubular myopathy の遺伝子解析. 札幌医科大学保健医療学部紀要 4:61-68, 2001

Molecular analysis of X-linked myotubular myopathy

Eiji UCHIDA, M.A. ¹⁾, Naoki KOZUKA, R.P.T., Ph.D. ²⁾, Shin KIKUCHI, R.P.T. ¹⁾
Hidekatsu TAKEDA, Ph.D. ²⁾, Yasuhito SENGOKU, O.T.R., M.A. ²⁾ Nobutada TACHI,
M.D., Ph.D. ²⁾

1) Graduate School of Health Sciences, Sapporo Medical University

2) School of Health Sciences, Sapporo Medical University

Abstract: X-linked myotubular myopathy (XLMTM) is a congenital myopathy characterized by severe hypotonia and muscle weakness, and respiratory insufficiency after birth. Surviving patients have prolonged ventilator dependence and severely delayed motor milestones. Myotubularin, which is encoded by MTM1 gene, is a new family of putative tyrosine phosphatase and appears to be ubiquitously expressed, with a 3.9 kb transcript detected in all adult and fetal tissues studied. The mutations in XLMTM are occurred in all exons, and the types of them are various. These mutations caused a development of an inactivation of the putative enzymatic activity of myotubularin. We present clinical and molecular analysis of two patients with XLMTM in which we identified mutations of the MTM1 gene. In one patient, an AAAG deletion was identified at the position of nucleotide 193 in coding exon 4. These 4 bp deletions caused a shift of the reading frame and created a stop codon (frameshift mutation). His mother had both normal and mutant alleles heterozygously as a XLMTM carrier. In another patient, a C to T substitution of nucleotide 163, leading Arg 55 to stop codon (nonsense mutation) was identified. His mother, who was an identical twin, had both normal and mutant alleles heterozygously as a XLMTM carrier.

Key word: X-linked myotubular myopathy (XLMTM) • MTM1 gene • Screening of mutation • Sequencing