

平成17-19年度

厚生労働省精神・神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー治療の
エビデンス構築に関する臨床研究

論文集

主任研究者 川井 充

Clinical Research Providing Evidence
in Treatment of Muscular Dystrophy

Mitsuru Kawai M.D.
(Higashisaitama National Hospital)

2005-2007

平成20年3月

まえがき

「筋ジストロフィー治療のエビデンス構築に関する臨床研究」班は筋ジストロフィー患者の診療にあたる臨床医が中心になって構成されている研究班です。現在可能な技術を用いて目の前にいる患者にすぐに役に立つような科学的倫理的な研究を行うことを理念として、3年間研究を進めてきました。「心筋障害の治療」、「筋強直性ジストロフィー」、「遺伝子検査」、「摂食、嚥下、消化管、栄養」、「評価法の開発」の5つを研究班の柱となるテーマとして設定いたしました。はじめの3つは前身の「筋ジストロフィーの治療と医学的管理に関する臨床研究」班のテーマをそのまま引き継ぎました。「摂食、嚥下、消化管、栄養」は新しいテーマです。また「評価法の開発」は前の研究班でQOL評価尺度を開発したことの延長で、臨床試験などで効果判定のための評価尺度が求められることを念頭において設定したものです。3年間の研究成果を論文の形でみなさまにおとどけ致しますが、本当に目の前の患者に役に立つ内ようであるかは皆様の評価を待ちたいと思います。

3年前に前の研究班の論文集のまえがきで、「原因にもとづく筋ジストロフィーの治療はまだ大分先のことになると思われる」と書きました。最近の治療研究の進歩はめざましく、おそらく数年以内に筋ジストロフィーの分子機構にもとづく治療が患者に対して実施されることになるでしょう。しかしその治療法が標準的な治療として一般的になる前の段階で、有効性と安全性が科学的倫理的に試されなければなりません。そして、この役割は私たちが担わなければなりません。筋ジストロフィーの診療を担当する臨床医は発展途上の領域のバイオニアとして、いつでもこの役割を担うことができるように、最先端の臨床研究を行う専門家になるべく準備を進めております。この論文集をそのための一里塚としてご覧いただければ幸いです。

2008年3月

厚生労働省精神・神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー治療のエビデンス構築に関する臨床研究

主任研究者

川井 充

目次

遺伝子検査

An improved method for Southern DNA and Northern RNA blotting using a Mupid®-2 Mini-Gel electrophoresis unit	1
Hirokazu Furuya, Takeshi Yamada, Koji Ikezoe, Yasumasa Ohyagi, Yasuyuki Fukumaki, Naoki Fujii	
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法により発端者が死亡していても Duchenne 型筋ジストロフィー保因者診断が可能だった女性例	4
高橋 俊明, 田中 洋康, 吉岡 勝, 今野 秀彦, 小野寺 宏	
Multiplex 半定量 PCR/PCR - SSCP 法によるジストロフィン遺伝子診断	6
加藤るみ子, 津久井伸枝, 川井 充	
Windows プログラム「RISCALW」による Duchenne 型筋ジストロフィー carrier risk の推測	9
石川 幸辰, 青柳 智幸, 石川 悠加	
長良医療センターにおける筋ジストロフィー患者の遺伝子変異の同定	12
松山善次郎, 安田 邦彦, 水津 博	

摂食嚥下消化管栄養

Duchenne 型筋ジストロフィーにおける PEG 造設の適応とタイミング	14
高橋 俊明, 田中 洋康, 今野 秀彦, 吉岡 勝, 小野寺 宏	
筋ジストロフィーにおいて, NPPV 導入後に PEG をおこなう方法について	16
會田 泉, 中島 孝, 伊藤 博明	
Duchenne 型筋ジストロフィー患者の嚥下機能の客観的評価—嚥下造影による検討—	18
野崎 園子, 馬木 良文, 杉下 周平, 多田羅勝義, 足立 克人, 神野 進	
筋ジストロフィー症の消化管合併症の研究—胃電図を脳波計で記録する方法論の検討—	23
諏訪園修吾, 末原 雅人	
福山型筋ジストロフィー (FCMD) に合併する胃食道逆流 (GER) について	26
大澤真木子, 佐々木香織, 世川 修, 斎藤加代子, 中山 尚子, 塩田 陸記	
土方 希, 平野 嘉子, 田上 孝治, 伊藤 康, 今井 薫, 舟塚 真	
デュシェンヌ型筋ジストロフィー症 (DMD) における外肛門括約筋の組織像	28
— DMD の排便障害に対する外科的治療—	
高橋 俊明, 今野 秀彦, 田中 洋康, 吉岡 勝, 小野寺 宏	

筋強直性ジストロフィー

Myotonic dystrophy type 2 in Japan: ancestral origin distinct from Caucasian families	30
Tsukasa Saito, Yoshinobu Amakusa, Takashi Kimura, Osamu Yahara	
Hitoshi Aizawa, Yoshio Ikeda, John W. Day	
Laura P. W. Ranum, Kinji Ohno, Tohru Matsumura	
筋強直性ジストロフィー患者における不整脈診療の経験	33
下山 良二	
筋緊張性ジストロフィーを合併した心房中隔欠損症・僧帽弁閉鎖不全症の手術例	36
岩崎 美佳, 柘岡 歩, 許 俊鋭, 朝野 晴彦, 加藤木利行	
Peripheral Neuropathy in Myotonic Dystrophy	39
: Electrophysiological and Pathological Study	
T Makino, M Higaki, C Watanabe	
塩酸メトホルミンによる筋強直性ジストロフィーのインスリン抵抗性に対する介入効果	42
高田 博仁, 小山 慶信, 今 清覚, 松村 剛, 本吉 慶史, 久留 聡, 木村 隆, 川井 充	
正常耐糖能筋強直性ジストロフィー患者における塩酸メトホルミンの長期投与効果	44
斉田 和子, 塩屋 敬一, 岸 雅彦, 隈本 健司, 比嘉 利信	

筋強直性ジストロフィー患者の唾液中免疫グロブリン量の検討	47
高橋 俊明, 佐々木俊明	
筋強直性ジストロフィーにおける神経原線維変化の新しい好発部位	49
高橋 俊明, 今野 秀彦, 吉岡 勝, 田中 洋康, 小野寺 宏	
筋強直性ジストロフィーにおける摂食前後での胃電図および心拍揺らぎの同時計測	53
小林 顕, 鎌形 博文, 猪又 八郎, 小林 道雄, 阿部 エリカ, 間宮 繁夫, 井上 浩	
筋強直性ジストロフィーにおける唾液腺の病理組織学的検討	58
高橋 俊明, 今野 秀彦, 佐々木俊明, 大隅 悦子, 吉岡 勝, 大村 清	
筋強直性ジストロフィーの低酸素血症と高炭酸ガス血症における呼吸困難感	60
鈴木 幹也, 川井 充, 大矢 寧	

心筋障害

筋ジストロフィー患者では高率に抗 β 1アドレナリン受容体抗体が存在する	65
松村 剛, 吉尾 卓, 山本 啓二, 齊藤 利雄, 藤村 晴俊, 神野 進	
心不全と β 受容体抗体-難治性心不全に対する免疫吸着療法-	71
池田 宇一, 笠井 宏樹, 伊澤 淳, 小山 潤, 高橋 将文, 樋口 誠, 高 昌星	
Beta-Blocker Therapy for Cardiac Dysfunction in Patients with Muscular Dystrophy	
Running title:Beta-Blocker in Muscular Dystrophy	74
Hidemki Kajimoto, Keiko Ishigaki, Kenichi Okumura, Hirofumi Tomimatsu Makoto Nakazawa, Kayoko Saito, Makiko Oosawa, Toshio Nakanishi	
Duchenne型筋ジストロフィー心筋障害に対する β 遮断薬多施設協同研究	79
松村 剛	
慢性心不全患者に対するcarvedilolとbisoprololの併用療法の意義	84
安村 良男	
Cardiac Involvement inFukuyama-type Congenital Muscular Dystrophy	
Running title:Fukuyama-type Congenital Muscular Dystrophy	86
Toshio Nakanishi, Masako Sakaiuchi, Yoshio Kaneda, Hirofumi Tomimatsu Kayoko Saito, Makoto Nakazawa, Makiko Oosawa	
Cardiac troponin I for accurate evaluation of cardiac status in myopathic patients	91
Tsuyoshi MATSUMURA, Toshio SAITO, Harutoshi FUJIMURA, Susumu SHINNO	
Duchenne型/Becker型筋ジストロフィーにおける脳性ナトリウム利尿ペプチドの 年齢による変化とジストロフィン遺伝子異常の関連	97
竹島泰弘, 八木麻理子, 西山敦史, 親里嘉展, 起塚庸, 張竹君, Hoai Thu Thi Tran, 松尾雅文	
Duchenne型筋ジストロフィーの心不全の予後	99
田村 拓久, 重山 俊喜, 鈴木 幹也, 宮武 聡子, 田邊 肇, 葛目 大輔 望月 仁志, 尾方 克久, 川井 充	
Duchenne型進行性筋ジストロフィーに合併する早期心筋障害の評価:組織ドプラ法による検討	104
尾形 仁子	
細胞移植による心臓疾患への再生療法 骨髄間葉系細胞移植・骨格筋芽細胞移植・骨髄単核球細胞	109
五條 理志, 許 俊鋭	
Importance of Luxury Flow for Critically Ill Patients Receiving Left Ventricular Assist System	116
Motonobu Nishimura, Takashi Nishimura, Masayuki Ishikawa, Ayumu Masuoka Nobuyuki Okamura, Keiko Abe, Takahiro Matsuoka, Mika Iwazaki Kazuhiro Imanaka, Haruhiko Asano, Shunei Kyo	
Cardiac Resurrection following Bone Marrow -derived Mononuclear Cell Transplantation during Left Ventricular Assist Device Support	121
Satoshi Gojo, Shunei Kyo, Shigeyuki Nishimura, Nobuyuki Komiyama, Nobutaka Kawai Masami Bessho, Hiroshige Sato, Toshihisa Asakura1, Motonobu Nishimura, Kenji Ikebuchi	

Japanese multicenter clinical evaluation of the HeartMate® VE left ventricular assist system	123
Ryozo Omoto, Shunei Kyo, Motonobu Nishimura, Hikaru Matsuda Goro Matsumiya, Soichiro Kitamura, Takeshi Nakatani, Shinichi Takamoto Koichi Tabayashi, Ryohei Yozu, Minoru Ono	
LVAS 装着術周術期における PDE III 阻害薬の有効性に関する検討	130
西村 隆, 今中 和人, 朝倉 利久, 石川 雅透, 阿部 馨子, 栢岡 歩 三浦 純男, 岩崎 美佳, 加藤木利行, 許 俊鋭	
筋ジストロフィーに合併した心不全に対する外科手術のかかわり	132
磯村 正, 星野 丈二, 深田 靖久, 古川 貢之, 井上 有方	
特発性拡張型心筋症の外科治療 補助人工心臓の現状と筋ジストロフィーへの適応	135
心筋線維の走行に沿った病理標本による筋ジストロフィー症心筋の病理学的検索	140
佐野 壽昭, 市原 賢真, 香川 典子, 王 路, 和田美智子, 足立 克仁	
評価法	
Duchenne 型筋ジストロフィーの骨格筋 CT 所見の経年的変化	143
久留 聡, 酒井 素子, 田中 信彦, 小長谷正明	
筋ジストロフィー患者の骨格筋肉量測定	146
中山 貴博, 大倉 正嗣, 塩川 隆, 佐藤 等, 久留 聡, 本吉 慶史, 川井 充	
筋ジストロフィー症例の安静時代謝量	151
後藤 公文, 福留 隆泰, 近藤 誉之, 松尾 秀徳	
筋ジストロフィー患者の筋力測定の方法について	153
大矢 寧	
筋音図法 (Mechanomyography) を用いた筋疾患の病態および評価に関する検討	157
園田 至人, 内田 裕一, 丸田 恭子, 有里 敬代, 福永 秀敏, 有村 公良, Arlene Ng	
筋ジストロフィー症患者における運動誘発電位の検討	160
杉本精一郎, 齊田 和子, 岸 雅彦, 塩屋 敬一, 比嘉 利信	
持続高 CK 血症患者の血清 ALT(GPT) 高値, AST/ALT 比低下	161
大矢 寧, 青木 吉嗣, 小牧 宏文, 有馬 邦正	
脈波伝播速度による Duchenne 型筋ジストロフィーの末梢循環動態	165
上山 秀嗣, 今村 重洋, 西田 泰斗, 山口喜久雄, 箕田 修治	
生存関数のモデル比較	167
菊池 泰樹, 野間口謙太郎, 安楽 和夫	
Scoliosis Surgery for patients with Duchenne muscular dystrophy and Severe Pulmonary Dysfunction	172
Masashi Takaso, Toshiyuki Nakazawa, Takayuki Imura, Tetsuya Watanabe, Wataru Saitou, Dai Iwase, Ryousuke Shintani, Noriko Hirakawa, Naonobu Takahira, Moritoshi Itoman, Hideshige Moriya, Yoshinori Nakata, Masatoshi Inoue, Kazuhisa Takahashi, Masashi Yamazaki, Tsutomu Akazawa, Sumio Hoka, Toshiyuki Okutomi, Ryou Osawa, Kousuke Mizuno	
筋原性疾患に伴う脊柱変形に対しては下位腰椎までの後方インストゥルメンテーションと固定で十分である	177
高相 晶士, 糸満 盛憲, 中澤 俊之, 井村 貴之, 渡辺 哲哉, 新谷りょう介 齊藤 亘, 高平 尚伸, 外 寿美男, 奥富 俊之, 守屋 秀繁, 高橋 和久 山崎 正志, 中田 好則, 井上 雅俊, 赤沢 努, 南 昌平, 小谷 俊明	

Surgical correction of coronal and sagittal alignment

for large spinal deformity secondary to Duchenne muscular dystrophy 182

Masashi Takaso, Moritoshi Itoman, Tetsuya Watanabe, Toshiyuki Nakazawa, Takayuki Imura
Dai Iwase, Wataru Saito, Mitsutoshi Moriya, Gennyō Miyajima, Ryosuke Shintani, Maonobu Takahira,
Hideshige Moriya, Kazuhisa Takahashi, Yoshinori Nakata, Masashi Yamazaki, Masatoshi Inoue,
Seiji Ohtori, Tsutomu Akazawa, Sumio Hoka, Toshiyuki Okutomi, Ryou Osawa, Kousuke Mizuno

中枢神経

Duchenne 型筋ジストロフィーの中枢神経症状についての研究 白石 一浩, 名取千枝子 188

Becker 型筋ジストロフィー患者 (含剖検例) の症状発現 - 中枢神経系を中心として - 191

足立 克仁, 斎藤 美穂, 柏木 節子, 川井 尚臣, 乾 俊夫, 橋口 修二
馬木 良文, 野崎 園子, 香川 典子, 佐野 壽昭

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に合併した脳血管障害の 2 例 松村 隆介, 木村 隆二 194

Duchenne 型筋ジストロフィー高年齢者における脳萎縮について 197

本家 一也, 大野 一郎, 石山 千春, 高筒 秀一

症例と臨床病態

A case of dysferlinopathy presenting choreic movements 200

Toshiaki Takahashi, Masashi Aoki, Takashi Imai, Masaru Yoshioka, Hidehiko Konno
Syuichi Higano, Yoshiaki Onodera, Hiroshi Saito, Itaru Kimura, and Yasuto Itoyama

A Unique Case of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva

With an ACR1 Mutation, G356D, Other Than the Common Mutation (R206H) 202

Hirokazu Furuya, Koji Ikezoe, Lixiang Wang, Yasumasa Ohyagi, Kyoko Motomura, Naoki Fujii
Jun-ichi Kira and Yasuyuki Fukumaki

Duchenne 型筋ジストロフィー女性保因者における症状発現 - 骨格筋, 心筋と中枢神経系 - 足立 克仁 205

カンデサルタンシレキセチル (プロプレス®) により貧血を来した 2 症例 210

土屋 一郎, 石原 傳幸, 横山 照夫, 小濱るり子

高度の精神発達遅滞を呈した Becker 型筋ジストロフィーの 4 兄弟例 212

二村直伸, 河本邦彦, 高橋桂一, 舟川 格, 陣内研二

人工呼吸器使用中の筋ジストロフィー患者で生じた急性呼吸不全の検討 216

後藤 勝政, 石川 知子, 佐藤紀美子, 島崎 里恵

日本人のジスフェルリン遺伝子変異の確定した肢帯型筋ジストロフィーの

遺伝子変異の特徴と臨床経過および治療的介入の検証 219

高橋 俊明, 青木 正志, 小野寺好明, 鈴木 直輝, 豎山 真規, 早坂 美保
佐藤 仁美, 相場 瞳, 阿部 恵美, 伊藤真理子, 松村 剛
久留 聡, 吉岡 勝, 今野 秀彦, 小野寺 宏, 糸山 泰人

福山型先天性筋ジストロフィーの小児・若年者における眼所見 223

篠崎 和美, 大澤真木子, 梶本美智子, 白濱 久美, 堀 貞夫, 斎藤加代子, 佐々木香織, 柳澤 暁子

その他

筋ジストロフィー患者のためのインターフェース技術 井上 浩, 猪又 八郎, 小林 顕 228

在宅の神経・筋疾患をもつ者の自己実現と医療ニーズ - 当事者からの聞き取り調査を通して - 233

貝谷 久宣, 貝谷 嘉洋, 福沢 利夫, 河端 静子, 松繁 卓哉, 斎藤 省

An improved method for Southern DNA and Northern RNA blotting using a Mupid®-2 Mini-Gel electrophoresis unit

Hirokazu Furuya ¹⁾, Takeshi Yamada ²⁾, Koji Ikezoe ¹⁾, Yasumasa Ohyagi ³⁾,
Yasuyuki Fukumaki ⁴⁾, Naoki Fujii ¹⁾

Abstract

An improved method for Southern DNA and Northern RNA blotting using the Mupid®-2 Mini-Gel System is described. We get sharp and clear bands in Southern and Northern blotting after only 30 minutes' short gel electrophoresis instead of the several hours large gel electrophoresis of conventional methods. The high electrical voltage with a pulse-like current of the Mupid®-2 Mini-Gel System also allows reduction of the amount of formaldehyde, a harmful reagent, from the gel running buffer in RNA blotting. This minor modification of DNA and RNA blotting technique enables us to perform the complete experimental procedure more quickly economically in less space, than conventional Southern and Northern blotting, as well as using an extremely small amount of formaldehyde in RNA blotting.

Key Words:Mupid®-2 system, Northern blotting, Southern blotting, formaldehyde, pulse-like electrical current

Polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used laboratory technique in molecular biology, and the recent progress in direct PCR-based genome sequencing and quantitative RT-PCR technology, has largely eliminated traditional gene analysis methods, including Southern DNA and Northern RNA blotting.

On the other hand, a difference in amplification speed has become apparent between the genomic regions or genes that are easy to amplify with PCR and those that are hard to amplify. The latter include candidate areas for triplet repeat diseases with expansions that are longer than 0.25 to 6.0 kb, such as segments with simple 'CTG' triplet repeats (MIM 160900; myotonic dystrophy type 1 (DM1) [1]), decreased repeats with 10-kb *EcoRI* fragments (MIM 158900; FSH-type muscular dystrophy) [2], 'ATTCT' repeat expansions ranging from 920 to 4,140 repeats (MIM603516; spinocerebellar atrophy 10 (SCA10)) [3]), and expanded 'CCTG' repeats ranging from 75 to approximately 11,000 repeats (MIM 602668; myotonic dystrophy type 2 (DM2)) [4], all of which are beyond the capacity of Taq polymerase in PCR reaction. Furthermore, expansion of a tandem repeat of a dodecamer ('CCC-CGCCCCGCG') in the 5-prime untranslated region of the cystatin B gene (MIM 601145; CSTB) may alter the complex secondary structure of a single strand of DNA in gene transcription, resulting

in failure of PCR amplification in Unverricht-Lundborg disease (MIM 254800; ULD) [5]. Thus, for the molecular diagnosis of these neuromuscular disorders, common PCR technology is useless. On the other hand, Northern blotting is still a popular method for analysis of gene expressions in which the splicing pattern is unclear. In such cases, conventional DNA and RNA blotting methods, which are time-consuming and costly, are applied for the diagnosis or analysis of gene expression.

The Mupid®-2 Mini-Gel Electrophoresis Unit (Advance Co., Ltd.) (13.0cm ¥ 18.0cm ¥ 5.0cm in height) is a mini-gel gene analysis system commonly used for preliminary gene analysis or small-scale DNA analysis. Unlike other gel analysis system, it uses a semi-direct pulse-like current instead of the usual power unit, and has a very small gel system (6.0cm ¥ 5.5cm, 6 lanes) combined with the power supply in one unit [6, 7].

Here we describe a minor modification of DNA and RNA gel electrophoresis using the Mupid®-2 Mini-Gel System that enables us to improve quantification even in a small gel format and to reduce analysis time while decreasing the amount of harmful formaldehyde necessary in RNA gel electrophoresis.

Southern blotting

Genomic DNA is obtained from human blood samples. Genomic DNA (10 µg) is digested with the restriction enzyme and precipitated with ethanol, and the concentration is quantified by means of a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Tech). Then 7.5 µg of the DNA is electrophoresed in an agarose gel, using the usual TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA (pH 8.0)) [8, 9], in the larger lane of the Mupid®-2 Mini-Gel System and running the gel at 100V for 30-40 minutes until the bromphenol blue dye has migrated to the appropriate position. We change the TAE buffer in the middle of the electrophoresis if the gel is run more than 30 minutes to avoid raising the temperature of the buffer. The

1) Department of Neurology, Neuro-Muscular Center, National Omuta Hospital, Fukuoka 837-0911, Japan

2) Department of Neurology, Aso Iizuka Hospital, Fukuoka 820-8505, Japan

3) Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

4) Division of Disease Genes, Research Center for Genetic Information, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University and CREST, JST, Fukuoka 812-8582, Japan

*Address correspondence to: H. Furuya, MD & PhD, Department of Neurology, Neuro-Muscular Center, National Omuta Hospital, Fukuoka 837-0911, Japan.

TEL: +81-944-58-1122. Fax: +81-942-53-7053. E-mail: furuya@omuta.hosp.go.jp

