

Table The number of muscle biopsy (1979-2011)

Year	Needle biopsy sample	Open biopsy sample	Sample from Other institutions	Autopsy sample	subtotal
1979	6	11	0	0	17
80	12	19	0	1	32
81	32	11	0	3	46
82	20	17	0	8	45
83	34	24	2	4	64
84	49	3	1	3	56
85	56	10	0	2	68
86	43	30	0	2	75
87	44	31	1	4	80
88	43	12	0	3	58
89	23	19	1	3	46
90	18	25	0	0	43
91	11	18	0	8	37
92	8	11	0	0	19
93	4	12	0	2	18
94	15	16	2	4	37
95	5	22	2	3	32
96	12	20	0	2	34
97	5	19	0	4	28
98	8	16	0	2	26
99	4	15	1	5	25
2000	7	10	0	2	19
01	2	7	0	1	10
02	2	11	0	1	14
03	1	10	1	1	13
04	0	12	0	2	14
05	1	13	0	0	14
06	0	5	0	1	6
07	1	4	1	1	7
08	0	3	0	1	4
09	0	4	3	1	8
10	0	1	0	2	3
11	0	6	1	2	9
Total	466	447	16	78	1,007

京女子医科大学小児科学教室において、現在まで約30年にわたり筋生検が施行されたが、筋病理の目的、頻度、術式は、時代を反映して変化した。

技術者として、筋病理標本作製、解析に長く携わった30年を振り返り、施行された筋生検に基づく診断、および研究を考察する。

1. 東京女子医科大学小児科30年間の筋生検の実績

Table, Figureは1979年から2011年までの33年間の全筋生検数、剖検数を年代別に示したものである。開放筋生検数は466件、針筋生検数は447件、他施設で生検を行われ、病理解析の依頼のみの件数は16件、剖検数は78件であった。検体は、電子顕微鏡検体以外は凍結保存とし、組織化学的検査用、免疫組織化学検査用、生化学的検査用に分けて

保存された。筋のホルマリン固定、パラフィン包埋処理は一般的病理検索では有用であるが、筋炎の浸潤細胞の検索などの特殊な場合を除き、凍結検体以上の情報はなため一般的に行われず、また小児からの検体採取量は限りがあるため、当科では行っていない。下記に述べるように、生検の頻度、術式は時代を反映して変遷した。

2. 1980年代：酵素組織化学染色と針筋生検

1980年代は、積極的に開放筋生検(open biopsy)を施行していた。得られた生検筋標本から凍結切片を作製し、酵素組織化学染色による病理検索を行った。染色法はヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin and eosin: HE), Gomoriトリクローム変法(modified Gomori trichrome: mGT), periodic acid Schiff(PAS), コハク酸脱水素酵素(succinate dehy-

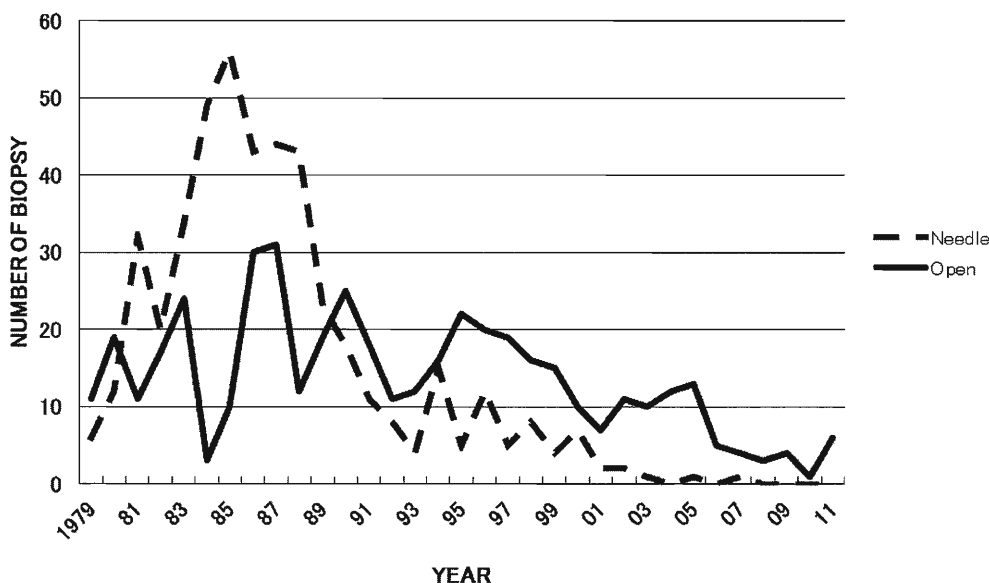


Figure The number of muscle biopsy

The solid line indicates the trend in the performance of open biopsy, and the dotted line indicates that of needle biopsy. The number of needle biopsies performed peaked in 1985. Since 2004, only open biopsy, but no needle biopsy is performed.

drogenase : SDH), nicotinamid adenine dehydrogenase-tetrazolumriductase (NADH), フォスホリラーゼ (phosphorilase : Phr), adenosine triphosphatase (ATPase) を行っていた⁶⁾. 1983年に Oil Red O (Oil-R-O), Alkaline phosphatase (Alp), Acid phosphatase (acid) 染色が追加され, 1986年にはミトコンドリア診断に非常に有用な Cytochrome C Oxidase (COX) 染色が可能となった. さらにアルカリ性 (pH9.4) のみであった ATPase 染色が, 1990年には酸性 (pH4.2, 4.3, 4.5, 4.6) の染色が追加となった.

これに加え, ミトコンドリア異常や, 封入体などの細胞内変性物の微細構造を評価する目的で必要に応じて電子顕微鏡検索を加えた. 女子医大総合研究所・電子顕微鏡室に於いて透過型電子顕微鏡が3台設置・稼働しており, 電子顕微鏡検索はこの場を使用して行われた. また, 末梢神経障害を疑う例には神経生検を, Lafora 病, 神経セロイドリポフスチン症などの変性疾患においては, 汗腺周囲の末梢神経の蓄積物検索目的で皮膚生検も行われ, 採取された検体は, 同様に電子顕微鏡にて微細構造, 蓄積物の解析を行った. 同時期より, 患児への侵襲が少なく, 当日に帰宅でき, 心身共に負担の軽減できるメリットをもつ針筋生検 (needle biopsy) による筋生検が多用されるようになった. 針生検は, 外来にて局所麻酔下により施行するため, 理解が得られる年齢で

あり, かつ全身状態が安定している場合に選択された. 局所麻酔はキシロカインを用い, 針は Needle 針 (Tru-cut, Travenol 社) を使用した.

臨床所見と併せて, 筋病理解析により多くの筋疾患の診断がついたが, この時点では DMD の確定診断, 肢帯型筋ジストロフィー (limb-girdle muscular dystrophy : LGMD) および先天性筋ジストロフィー (congenital muscular dystrophy : CMD) の分類を確定することはできなかった.

3. 1990年代: 免疫組織化学染色法

1987年に Kunkel らがジストロフィン遺伝子産物としてのジストロフィン蛋白を同定し³⁾, その後荒畑により, 画期的な免疫組織化学染色の有用性が示された⁸⁾⁹⁾. 1986年にジストロフィン遺伝子は同定されていたが, 79エクソンからなる巨大な遺伝子であり, 遺伝子診断を行うことは容易ではなく, 実際的ではなかった. 1995年に当科でも免疫組織化学染色が導入され¹⁰⁾¹¹⁾, Dystrophin-1, 2, 3 (Dys-1, 2, 3), Dystrophin-like protein (DRP), α -Sarcoglycan (α -SG), Merosin, Spectein の染色が, さらに1996年には β -Sarcoglycan (β -SG), γ -Sarcoglycan (γ -SG), δ -Sarcoglycan (δ -SG), Collagen IV, Collagen V, Desmin の染色が可能となった. いままで筋ジストロフィー, または臨床所見により DMD の疑いと診断されていた例にジストロフィン蛋白欠損または著明減少を証明することにより, 実質的な確定診断が

可能となった。LGMDのうち、 α -サルコグリカン (α -Sarcoglycan) 欠損による α -サルコグリカノパチー (LGMD2D) は DMD と臨床的に類似した経過をたどるが、DMD と比較して心筋症が少ないという特徴を有する¹²⁾。LGMD2D は頻度の高い疾患ではなく、DMD として臨床診断されていた例もあったが、免疫組織化学染色により 2 例が診断された。これらの鑑別が可能になったことは、心筋症発症の予測、管理の点から、臨床的に大きな意味をもつ。メロシン (ラミニン $\alpha 2$) 欠損による CMD は欧米では最も多いタイプの CMD であるが、本邦での頻度は少ない。FCMD と異なり、知的障害を伴わないこと、頭部 MRI で特徴的な白質病変を示すことから臨床的には診断可能であるが¹²⁾、筋病理にてメロシンの完全欠損を示すことで確定診断が可能となる¹²⁾。免疫組織化学染色が可能となるまえは、乳児期より症状を示す CMD を、臨床的に知的障害を伴う福山型と非福山型とに単純に分類していたが、免疫組織化学染色により、非福山型でもメロシン陽性、メロシン陰性という分類がなされるようになった。

また、生化学検索が行われるようになり、ミトコンドリアの呼吸鎖酵素解析、糖原病の原因酵素活性、生検筋のグリコーゲン量測定が追加され、代謝性疾患の診断の精度が改善した。同時に生化学検索には一定量 (100~200mg) 必要とされ、針生検では事実上対応が難しい状況となり、開放生検が主体となった。生検数の年代別推移では、針生検数は 1985 年をピークに激減し、2004 年以後は開放生検のみとなったことを示している (Table, Figure)。

4. 2000 年：筋疾患分類の拡大と遺伝子解析

2000 年に β -Dystroglycan (β -DG), merosin80, Desmin, Emerin, LaminA/C, LamininA1, LamininB1, LamininB2 の免疫組織化学染色が追加された。この中で、特に重要な染色は、Emery-Dreifuss 筋ジストロフィー (Emery-Dreifuss muscular dystrophy: EDMD) に関連する、Emerin, LaminA/C で、特に前者は X 染色体劣性遺伝形式の EDMD で欠損し、確定診断に有用である¹²⁾。Ullrich CMD は遠位関節の過伸展と近位関節拘縮を特徴とし、本邦では FCMD に次いで頻度が高い CMD であるが、筋線維基底膜に結合しているコラーゲン VI (Collagen VI) の欠損により発症する。これらの原因遺伝子が 2001 年に同定され¹³⁾、病態が解明されると共に疾患概念が認識され、鑑別診断の一つとして考慮されるようになった。Collagen VI の染色は、全欠損、部分

欠損のパターンがあり、全欠損の場合は診断が容易であるが、部分欠損では判断に難しく、遺伝子診断は 3 種の原因遺伝子の解析が必要となるため実際的ではない。当科では 3 例疑い症例があったが、完全欠損でなかったため確定には至らなかった。このように、以前は非福山型先天性筋ジストロフィー、または LGMD として、まとめて診断されていた例が、筋疾患分類の拡大と共に、新たに診断可能となったことが、2000 年以後、特記すべき点である。

また、各疾患の遺伝子同定による病因解明が進み、診断の主流が遺伝子解析となったことも、この時代の特徴である。FCMD は 1990 年代にはマイクロサテライトマーカーによる連鎖解析が主体であったが、1998 年に戸田らが原因遺伝子フクチン遺伝子を同定して以後⁹⁾、フクチン遺伝子における 3kb の創始者挿入異変を解析することで確定診断が可能となった。2006 年以後は、筋ジストロフィーの遺伝子解析が保険適用となり、FCMD のフクチン遺伝子の PCR 検査、DMD の MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) が商業化され、筋生検を行う必要性が激減した (Table, Figure)。Pompe 病のように、生検筋検体を必要とせず、乾燥ろ紙血により、容易に酵素活性測定を行う技術が発展したことも筋生検数が減少したことに影響している。

家族が侵襲的な筋生検は好まず、可能な限り、遺伝子解析で診断を行う流れとなり、一時は、筋生検はほとんど行われなくなった。しかし、遺伝子解析が進むにつれ、臨床型と遺伝子型の不一致や、2 種の遺伝子にダブルトラブル (double trouble) 症例の報告が増え、遺伝子解析のみでの病態説明は限界を迎えた。2012 年現在では、再び筋病理の重要性が再評価されたこと、また治療を前提とした評価として筋生検の重要性が増し、筋生検数は増加傾向にある。

おわりに

以上、30 年間に施行した筋病理標本作成、解析の流れを振り返った。現在では 18 種類以上の酵素組織化学染色、21 種類の抗体による免疫組織化学染色を行い、診断に役立てている。このシステムの確立途中には、パラフィン標本に対する免疫組織化学染色、マイクロウェーブ使用による免疫組織化学染色、凍結切片による抗原抗体反応を施行後、樹脂包埋を行い超薄切片を作製する Pre-embedding 法による電顕的免疫組織化学法でも施行検討したが¹⁴⁾、いずれも良好な結果は得られず、最も安定した結果を得られることから、現在施行している免疫組織化学染色

が定着した。しかし、今後もより情報が安定して得られる方法を検討していく予定である。

筋生検の頻度や術式は時代と共に変遷したが、一旦はほとんどなされなくなった針筋生検や開放筋生検が再び重要性を増した点は非常に興味深い。当初は侵襲性の軽い針生検が好まれ、その後、確実に情報を得るためには中途半端な情報しか得られないという判断で、針筋生検は激減し、開放筋生検のみとなった。一方で現在、DMDに対する遺伝子治療の効果判定には繰り返しの筋生検が必要となるため、針生検の有用性が再び見直されつつある。当科においても、針生検の方法を廃れさせず、今後も伝えていく必要がある。同様に、一時は遺伝子解析が主流となり、筋病理の時代は終わったとも言われていたが、遺伝子解析が進むことにより、一層臨床型と遺伝子型の関係は一對一の単純なものではなく、より複雑な多因子の影響を受け、臨床型が決定することが分かってきており、臨床症状と筋病理の基本に立ち返った研究の価値が見直されるようになった。いずれは、非侵襲的な検査が主流となることが望まれるが、確実な臨床診断とさらには治療効果判定に有効な診断システムの確立のために、今後、筋病理検索を更に進歩、発展させることを目標にしたい。

結 語

東京女子医科大学小児科における筋病理の30年間を振り返った。分子生物学の進歩により、多くの筋疾患の病態解明がなされ、それと共に筋生検施行による筋病理検索も発展し、多くの情報をもたらした。より早く正確な検索結果と病態解明が治療法へと一歩でも前進することを今後期待する。

筆頭著者に開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 埜中征哉：1. 筋病理組織標本の作り方 2. 筋病理組織標本の読み方。「臨床のための筋病理」, pp4-231, 日本医事新報社, 東京 (2011)
- 2) Dubowitz V, Sewry CA: Chapter 2 Histological and histochemical stains and Reactions. Chapter 6 Im-

- munohistochemistry. In *Muscle Biopsy* (Victor D ed), pp21-245, Elsevier Limited, London (2007)
- 3) Kunkel LM, Hejtmanic JF, Caskey CT et al: Analysis in DNA from Patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **322** (6074): 73-77, 1986
- 4) Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M et al: An ancient retrotransposon insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* **394** (6691): 388-392, 1998
- 5) Rudnik-Schoneborn S, Weis J, Kress W et al: Becker's muscular Dystrophy aggravating facioscapulohumeral muscular dystrophy-Doubletrouble as an explanation for an atypical phenotype. *Neuromuscul Disord* **18** (11): 881-885, 2008
- 6) 平井圭一, 馬屋原宏: Cytochrome oxidase, Alkaline phosphatase, Acid phosphatase. 「新酵素組織化学」(武内忠男・小川和朗編), pp125-311, 朝倉書店, 東京 (1980)
- 7) 水平敏和: 脱水・包埋法, 超薄切片法, 透過型電子顕微鏡の操作. 「電子顕微鏡操作マニュアル」(水平敏和編), pp39-134, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1989)
- 8) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T et al: Immunostaining of skeletal and cardiac Muscle surface membrane with antibody against Duchenne-muscular dystrophy Peptide. *Nature* **333** (617): 861-863, 1988
- 9) 小沢瑛二郎: DMD 筋の免疫学的手法による研究. 「ジストロフィン」, pp166-178, 学会出版センター, 東京 (1992)
- 10) 木村 宏, 相見良成: 免疫組織化学/固定および組織の取り扱いについて. 「組織細胞化学 1999」(日本組織細胞化学会編), pp16-21, 学際企画社, 東京 (1999)
- 11) 笹野公伸, 伊達文子: 免疫組織化学/方法論. 「組織細胞化学 1999」(日本組織細胞科学会編), pp22-28, 学際企画社, 東京 (1999)
- 12) Engel AG, Hirschhorn R, Huie ML: Acid maltase deficiency. In *Myology*. Vol.2, 3rd edn (Engel AG, Franzini-Armstrong C eds), pp 1559 - 1580, McGrawHill, New York (2004)
- 13) Camacho VO, Bertini E, Zhang RZ et al: Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations incollagen type VI. *Oroc Natl Acad Sci USA* **98** (13): 7516-7521, 2001
- 14) 名倉 宏, 大谷明夫, 小野克彦: 免疫電顕 pre-embeddin 法の医学生物学への応用. 「組織細胞化学 1999」(日本組織細胞科学会編), pp29-37, 学際企画, 東京 (1999)