

は必須条件ではない。従って cambium layer が全く確認できない場合は ERMS NOS と判定して良い。Cambium layer は横紋筋分化 myogenesis を示す未分化細胞の正常上皮下高密度の増殖巣 condensation of primitive cells と定義され、その下には疎な領域 hypocellular zone を認める。このクライテリアの採用により生検検体や浸潤部位の検体でも診断が可能である。

膀胱では inflammatory myofibroblastic tumor/pseudosarcomatous myofibroblastic proliferations、外部生殖器では pseudosarcomatous fibroepithelial polyp との鑑別が必要となるが、特に前者はぶどう状型と誤らないことが治療上極めて重要である。

b. 紡錘細胞型 Spindle cell ERMS

ERMS の 1 亜型で、横紋筋肉腫の 3% を占める。傍精巣に好発し（少なくとも 1/3 は傍精巣原発）、ときに頭頸部に発生する。傍精巣発生の 5 年生存率は 88% で傍精巣や眼窩発症例は superior prognosis とされるが、これ以外の部位発症例は intermediate prognosis を示し、ERMS NOS に匹敵する。

黄褐色調の硬い腫瘍で、組織学的には横紋筋への分化を示す長紡錘形細胞が種々の程度に膠原線維の増生を伴い不規則な fascicular or storiform pattern を示して増殖する像を特徴とする。2009 年 CAP Protocol 分類では spindle cell ERMS 領域の占拠率が明確となり、80% 以上を占める際に spindle cell ERMS と診断する。Spindle cell ERMS の領域が 20% 未満の mixed ERMS NOS and spindle cell ERMS は CAP Protocol 分類では ERMS NOS に分類される。細胞密度が高く平滑筋肉腫様、線維肉腫様の像を呈するもの（collagen-poor form）と間質の増生が強く悪性線維性組織球腫に類似の像を示すもの（collagen-rich form）がある。

Leiomyosarcoma、fibrosarcoma、malignant fibrous histiocytoma、leiomyoma、nodular fasciitis など紡錘形細胞から成る軟部腫瘍の鑑別に留意すべきで、MRFs 免疫染色が鑑別の一助となる。

c. 胎児型（非特異群）ERMS NOS (not otherwise specified)

最も頻度の高い組織型（約 50%）とされ、5 歳未満に好発する。あらゆる部位に発生するが頭頸部や泌尿生殖器に多い。IRSG の 5 年生存率は 66% と報告される。

腫瘍断面は境界不明瞭で灰白色から黄褐色調を示す。基本的な組織像は類円形、短紡錘形、星芒状腫瘍細胞の myxoid stroma を背景とした細胞密度の異なる増殖性病変（loose and cellular pattern）として認識される。疎な領域は未分化間葉系組織に類似し、密な領域は比較的血管周囲性に認める。細胞には種々の程度の myogenesis が観察されるが、免疫染色でも未分化細胞に myogenesis が確認できないことがある。高分化領域では好酸性の細胞質を示す ribbon-, or strap-shaped cells, tadpole cells と称される多彩な腫瘍細胞や多核巨細胞が出現し、細胞質に横紋 cross-striations が観察される。しかし、cross-striations が確認される例は半数未満である。ERMS NOS や botryoid ERMS では血管線維性隔壁 fibrovascular septa を伴わない microcystic/microglandular pattern が観察される例があるが、これを ARMS の組織像と誤らないことが重要である。また、未分化細胞の充実性増殖を示す ERMS NOS は ARMS solid alveolar variant に類似の像を示すことから注意を要する。

Well-differentiated ERMS と fetal rhabdomyoma との鑑別に際して、高細胞密度、核分裂像の増加 (>15/50HPF)、異型核の出現などは前者の特徴と判断するが、鑑別が困難な症例が存在する。

d. 胞巣型（非特異群と充実亜型）ARMS NOS or solid variant

5 歳以上に発生し、年長児や若年成人に多い。四肢や体幹に好発するが、鼻腔、副鼻腔、頭頸部など ERMS の好発部位にも頻度が高い。横紋筋肉腫の約 30% を占めるとされるが JRSG Study では、ARMS NOS & solid が 41% と多く ERMS NOS の 43% に匹敵し、従来の報告に比較し増加している。発見時に転移を示すなど病期が進行していることも多く、IRSG での 5 年生存率は 54% とされる。

新鮮な灰褐色調の肉眼像を示す。組織学的には未分化円形細胞が fibrovascular septa に沿う列状配列

palisading と内側の cleft-like space から成る classic cystic pattern の認識が診断上最重視する ARMS のクライテリアであり、その腫瘍内占拠率は問われない(any classic cystic pattern)。類円形核周囲に好酸性細胞質が縁取り、ERMS にみられる myogenesis を示す多彩な腫瘍細胞に乏しい。すなわち、より未分化な細胞形態と any classic cystic pattern が ARMS のクライテリアである。Ribbon-, or strap-shaped cells, tadpole cells など多彩な細胞型と cross-striations は欠くことが多いが、ERMS と鑑別が必要な著しい横紋筋分化を伴う ARMS があり、ARMS with marked cytodifferentiation の存在を認識しておくことが必要である。

Solid variant はより単一の未分化円形細胞が充実性シート状に増殖し cleft-like space や細かな fibrovascular septa を欠いている。Fibrovascular septa に沿う列状配列 palisading が唯一診断の手掛かりとなるが、ない場合や starry sky 像を示す際には Ewing sarcoma family of tumors, desmoplastic small round cell tumor, poorly differentiated monomorphic synovial sarcoma, malignant lymphoma (Burkitt lymphoma, lymphoblastic lymphoma), round cell liposarcoma, INI1-negative undifferentiated sarcoma などと鑑別が必要である。採取量が限定される生検材料での solid variant の診断には慎重を要する。

Classic cystic pattern や solid pattern を示す胞巣構造の確認には鍍銀染色が有効である。典型的な ARMS では好銀線維が胞巣を囲み、個々の細胞間に線維が密に絡み合う像に乏しい。密に絡み合う像の出現は胎児型群、あるいは混合カテゴリーの存在を考慮すべきである。

ERMS に ARMS の像が局在する mixed ERMS and ARMS は混合カテゴリーの一つとして取り扱われ、ARMS に区分されてきたが、2009 年 CAP Protocol 分類では、ARMS の像が 50%を超えるものを ARMS の mixed ERMS and ARMS に、50%以下の例は ERMS に分類される（混合カテゴリーの項参照）。

e. 未分化肉腫 Undifferentiated sarcoma

US は非横紋筋系小円形細胞軟部肉腫 non-rhabdomyosarcomatous small cell soft tissue sarcoma と定義され、歴史的、便宜的な組織型として用いられているが、論議も多い。一般には横紋筋肉腫に類似の形態を示すが横紋筋への分化を証明出来ない腫瘍群と理解され [2]、IRSG に登録された腫瘍の 3%を占める。歴史的に RMS に類似の治療効果を示してきたことが分類の一型として取り扱われた理由の一つとされ、近年のプロトコル治療でも予後は不良で改善をみていない。現在では COG non-rhabdomyosarcomatous soft tissue regimen により治療されており、今後、基本分類から除外されていくと思われる。この中から現在まで RMS solid alveolar variant, desmoplastic small round-cell tumor, extrarenal malignant rhabdoid tumor, INI1-negative undifferentiated sarcoma などに再分類され、多くは独立した疾患概念として確立されてきている。

真の未分化肉腫は未熟な円形から短紡錘形細胞の密なシート状増殖からなり、壊死像や炎症像は不明瞭で血管結合織隔壁の介在をみる。一般に形質発現を欠き vimentin のみが陽性で、US の診断には免疫組織学的、超微形態学的、細胞遺伝学的・分子生物学的に他の腫瘍を除外することが求められる。

f. 混合カテゴリー Mixed category (histology)

上述の 5 つの基本組織型の 2 型以上が複合するもので、Newton は胞巣型の約 10%に embryonal pattern や solid area の混在が認められると報告している[2]。Mixed ERMS and ARMS が約 80%を占めるが、他に mixed ERMS NOS and spindle cell ERMS, mixed botryoid ERMS and ARMS NOS などが認められる。Mixed ERMS and ARMS は双方の像に加えて、横紋筋特異的な形質の発現に乏しい未分化細胞の密な増殖巣が出現することも特徴の一つである。

2009 年 CAP Protocol 分類では spindle cell ERMS は spindle cell ERMS の領域が 80%以上に限定され、20%未満の mixed ERMS NOS and spindle cell ERMS は ERMS NOS に区分される。Mixed ERMS and ARMS は ICR 分類や WHO 分類では全て ARMS に分類されたが、2009 年 CAP Protocol 分類では ARMS の領域が 50%を超えるものを ARMS に区分し、50%以下は ERMS NOS と診断する。これは mixed ERMS and

ARMS の大部分が *PAX-FKHR* fusion negative で fusion negative ARMS の gene expression profile や予後が ERMS にほぼ同じとの報告が大きく関わると思われる。しかし、微小検体では ARMS の占拠率の判断は困難なことが多く、*PAX-FKHR* キメラ遺伝子陽性例を ERMS と誤判定する危険がある。遺伝子診断が不可能な際には、診断クライテリアを厳格に守り、免疫組織所見を加え総合的に診断することが不可欠である。

g. 退形成 Anaplasia, diffuse or focal

小児では成人と異なり多形性を示す RMS でも 5 つの基本組織型のいずれかの形態が認められることから、成人を対象とした多形型横紋筋肉腫 pleomorphic rhabdomyosarcoma を基本的な組織型から除外し、退形成としてその生物学的特徴を捉えようとしてきた。定義は NWTS における腎芽腫の anaplasia の基準に準じている。1) 通常、周囲の腫瘍細胞の核の 3 倍以上の大型、分葉状の濃染核、2) 明確な異型核分裂、特に多極性分裂 を示す。単一（少数かごく散在性にのみ出現し周囲に anaplasia のないもの）に認めるものを focal (Group I)、集簇性、連続して広範囲に分布するものを diffuse (Group II)としている。

Qualmann は anaplasia (focal or diffuse) 群で embryonal histology の中間リスク群のみで 5 年生存率に差異 (anaplasia(-):68%, anaplasia(+): 82%) があり、この群の予後予測因子として重要であることを報告しているが[10]、anaplasia は単独の予後因子とは証明されず、最近の治療プロトコールでも anaplasia を層別化の対象とはしていない。WHO 分類では ERMS anaplastic variant と分類されるが、IRSG/STS 基本分類や 2009 年 CAP protocol 分類から除かれている。しかし、予後予測の認知、層別化臨床試験研究の立案にとって anaplasia は重要な因子で、存在の有無と grade (diffuse or focal)を診断名に付記することが求められる。

h. RMS NOS と Sarcoma NOS

小児では標本採取量が限定され十分でないことも多く、また、挫滅の強い組織が提出されることがあり、各組織型の特徴が見出せない際にはこれらの診断名が適用される。

RMS NOS の診断は RMS 各組織型の特徴を認知できない際に免疫学的特徴の確認 (desmin, myogenin/myf4, myoD1 の蛋白発現)により採用される。2009 年 CAP Protocol 分類では rhabdomyosarcoma, subtype indeterminate がこの項目に相当する。プロトコール研究の厳格性を保ち、また、研究不適格症例の治療法を選択する上で重要な意義を持っている。

3. 特異な組織形態を示す横紋筋肉腫 RMS with specific histologic pattern

独特の細胞像や間質の変化に特徴付けられる横紋筋肉腫で、形態像に着目した疾患概念である。

ラブドイド横紋筋肉腫 RMS with rhabdoid features、硬化性横紋筋肉腫 sclerosing RMS、淡明細胞性横紋筋肉腫 clear cell RMS、富脂肪性横紋筋肉腫 lipid-rich RMS が挙げられる。CAP Protocol 分類ではラブドイド横紋筋肉腫と硬化性横紋筋肉腫を取り上げている。

ラブドイド横紋筋肉腫はラブドイド細胞に富む横紋筋肉腫で、胎児型像や胞巣型像を示すと報告された[6]。特異な形態と免疫組織学的特徴 (vimentin, desmin 陽性封入体) から命名された。Extrarenal rhabdoid tumor, proximal-type epithelioid sarcoma, leiomyosarcoma with rhabdoid features などに帰属する可能性もあり、鑑別診断には myogenin や myoD1、INI-1/BAF47 免疫染色が有効である。

硬化性横紋筋肉腫は骨肉腫、軟骨肉腫、血管肉腫、硬化性類上皮線維肉腫との鑑別に注意を喚起する上で重要である。組織学的特徴は sclerosing hyaline matrix と microalveolar/pseudovascular architecture である。現在、小児、成人ともに desmin, myogenin の低陽性率と myoD1 の高陽性率を示し、*PAX-FKHR* fusion-negative の症例が大多数を占め、ERMS と類似の形質を示す群と推測されている [7]。

淡明細胞性横紋筋肉腫は細胞質内に glycogen が豊富で[8]で、富脂肪性横紋筋肉腫は脂肪滴を持っている[9]。それぞれ、ESFT や脂肪肉腫との鑑別に注意が必要である。

4. 免疫組織化学的特徴

a. Myogenic regulatory factors (MRFs) の活用と非筋系マーカーの発現

横紋筋分化 myogenesis の転写制御ネットワークを形成する *MRFs/MyoD family* と呼ばれる遺伝子群の中で *myoD1/myf3, myf-5* が間葉性多能性細胞の筋芽細胞への「決定と維持」に、*myogenin/myf4, MRF4/myf6* はさらに筋管や筋線維への「分化」に関わり、筋特異的遺伝子の転写を活性化し筋特異蛋白の発現を促すとされている。現在、例外的のもの (desmoid, myofibromatosis, infantile fibrosarcoma, synovial sarcoma) を除いて MRFs 蛋白の核への発現は骨格筋系腫瘍に特異的なマーカーとされる[11]。COG, STS では desmin, myoD1, myogenin/myf4 の発現を診断上最重視している。ARMS では陽性率が通常 50%以上で 80% を越えるものも多く、myogenin 陽性率が 80%を越える ARMS や ERMS は予後不良と報告される[12]。一方、ERMS では 10%以下が症例の過半数を占めるが[10,13]、ERMS NOS でも 6%が 80%を越えると報告される[13]。稀な sclerosing RMS では myoD1, myogenin の発現に乖離がみられ、myogenin の陽性率は 10%以下とされる[7]。

RMS では MRFs や他の筋系マーカー (desmin, MSA, sarcomeric actin, α -SMA, myoglobin) に加えて神経系 (NSE, CD57, S100)、上皮系 (CK, EMA) などの多彩な形質を示す症例がある。その他、CD99 は 14% に細胞膜や細胞質に発現し、細胞膜に陽性を示すものは低分化細胞と推測される。p53 は腫瘍細胞の退形成に相関して発現を認める[3]。また、 α -SMA や S100 は例外的な発現ではなく、正常骨格筋細胞の発生段階の形質発現を反映したものと理解される。

b. TFAP2 β , HMGA2 免疫染色による組織型の鑑別

COG から TFAP2 β , HMGA2 免疫染色が ERMS, fusion-negative ARMS, fusion-positive ARMS を区別する上で有用との報告がなされた[14]。Gene expression analysis に基づき選択された遺伝子蛋白で ERMS では全例 TFAP2 β (-)HMGA2 (+)を示し、fusion-negative ARMS では TFAP2 β (-) HMGA2 (+)の頻度が高く、一方 fusion-positive ARMS では TFAP2 β (+) HMGA2 (-)の頻度が高いと報告された。

PAX-FKHR キメラ遺伝子解析を行った JRSG の 100 例を超える検討では、ERMS 群の核発現パターンは COG と多少異なる結果で TFAP2 β (-)HMGA2 (+)の 3 例を除き全例が TFAP2 β (+)HMGA2 (+)を示した。一方、ARMS 群では 80%が TFAP2 β (+) HMGA2 (-)で、特に fusion-positive ARMS は 92%と高率で有意の差 ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) を示した。HMGA2 核発現 (-)群では PAX/FKHR fusion -positive の的中率が 90%、核発現 (+)群では PAX/FKHR fusion-negative の的中率が 96%を示し、HMGA2 染色は PAX/FKHR status を予測する能力を持つ信頼性の高い免疫染色であることが証明された。HMGA2 免疫染色は ERMS と ARMS の鑑別、特に fusion-positive ARMS の診断補助として極めて有用と理解される。

5. 小円形細胞腫瘍、ならびに筋系分化を示す腫瘍群の鑑別診断

横紋筋肉腫と鑑別が必要な固形腫瘍は 2 つに大別される。発生部位や細胞学的特徴 (小型、細胞質に乏しい、裸核状) の類似性を示す小円形細胞腫瘍 (SRCT: small round cell tumor) と骨格筋への分化を認める一群の腫瘍 (表 5) で、特に ARMS と SRCT の鑑別が重要である。免疫染色や遺伝子診断が最も威力を発揮するが、特に myogenesis に関連するマーカーが発現し polyphenotypic differentiation を示す SRCT では鑑別に慎重を要する[15]。中でも腫瘍細胞に MRFs 蛋白の発現が報告される Ewing sarcoma family of tumors, malignant ectomesenchymoma, pleuropulmonary blastoma, mesenchymal chondrosarcoma の鑑別には留意する必要がある。

表5 横紋筋への分化を示す腫瘍と構成組織系

横紋筋など多様な形質を示す小円形細胞腫瘍 (小児・青年)
<ul style="list-style-type: none"> 横紋筋肉腫 ユースング肉腫ファミリー腫瘍: 神経外胚葉、横紋筋、グリア、上皮 Polyphenotypic/biphenotypic sarcoma: 神経外胚葉、横紋筋 外胚葉間葉腫: 神経芽細胞、横紋筋 胸膜肺芽腫: 間葉、横紋筋、軟骨 間葉性軟骨肉腫: 間葉、横紋筋、軟骨 NF1関連悪性神経鞘腫: 末梢神経、横紋筋 (Triton腫瘍)、上皮
胎児性腫瘍 (小児)
<ul style="list-style-type: none"> Wilms腫瘍 肝芽腫 髄筋芽腫
他の肉腫 (成人)
<ul style="list-style-type: none"> 悪性神経鞘腫: 末梢神経、横紋筋 (Triton腫瘍)、上皮 脂肪肉腫 (脱分化型、粘液型/円形細胞型): 脂肪、横紋筋 胚細胞腫瘍: 胚細胞腫成分、横紋筋
癌肉腫 (成人)

6. 遺伝子異常と発癌のメカニズム

a. *PAX3/7-FKHR* キメラ (融合) 遺伝子と 11p15 の異常 (表 6)

Solid variant を含む ARMS には特異な *PAX3/7-FKHR* (*FKHR* は *FOXO1A* と呼ばれる) のキメラ遺伝子 chimeric gene の発現がよく知られ、ARMS の 80-85% に検出される。さらにまれな *PAX3-AFX* 融合 (*AFX* は *FOXO4*, *MLLT7* と呼ばれる)、*PAX3-NCOA1* 融合 (*NCOA1* は *SRC-1* と呼ばれる)、*PAX3-NCOA2* 融合も報告される [16-18]。Parham による COG の解析結果では ARMS で *PAX3-FKHR*-positive、*PAX7-FKHR*-positive、*PAX3/7-FKHR* fusion-negative はそれぞれ 55%、20%、25% を占める [19]。通常の解析に比較して検出感度の高い方法ではキメラ遺伝子の発現は陰性群の 1/4 に確認されると報告があり [16]、これを考慮しても ARMS の 20-25% はキメラ遺伝子が陰性と推測される。JRSG Study では ARMS NOS, solid variant の 84% に *PAX3/7-FKHR* のキメラ遺伝子が検出され (*PAX3-FKHR*-positive、*PAX7-FKHR*-positive、*PAX3/7-FKHR* fusion-negative はそれぞれ 66%、18%、16%)、ARMS において欧米と共通の遺伝子異常を基盤とする発癌メカニズムが明確になった。

表6 横紋筋肉腫の主な遺伝子異常

<ul style="list-style-type: none"> キメラ遺伝子 (ARMS、ごく稀にERMS) <ul style="list-style-type: none"> ARMS: <i>PAX3-FKHR</i> (<i>FOXO1A</i>); t(2;13)(q35;q14) <i>PAX7-FKHR</i> (<i>FOXO1A</i>); t(1;13)(p36;q14) <i>PAX3-AFX</i> (<i>FOXO4</i>, <i>MLLT7</i>); t(2;X)(q35;q13) <i>PAX3-NCOA1</i> (<i>SRC-1</i>) type I, type II; t(2;2)(q35;p23) <i>PAX3-NCOA2</i>; t(2;8)(q35;q13) ERMS: <i>PAX3-NCOA2</i>; t(2;8)(q35;q13) 	
<ul style="list-style-type: none"> 11p15 LOI/UPD, LOH <ul style="list-style-type: none"> ERMS (LOIはARMSにもある) <i>MYCN</i> amplification (low or high copy) <ul style="list-style-type: none"> Low: ERMS & ARMS High: ERMS < ARMS (ARMSではDNAとRNAに相関) その他: <ul style="list-style-type: none"> <i>FKHR</i> amplification 	
<i>PAX3</i> : paired box 3 <i>FKHR</i> : forkhead in human rhabdomyosarcoma <i>AFX</i> : acute-lymphocytic-leukaemia-1 fused gene from chromosome X <i>FOXO1</i> : forkhead box O1 LOI: loss of imprinting LOH: loss of allelic heterozygosity	<i>PAX7</i> : paired box 7 <i>NCOA</i> : nuclear receptor coactivator UPD: uniparental disomy

一方、ERMS では最近、*PAX3-NCOA2* 融合が報告されている [18]。この type の融合例は mixed ERMS and ARMS 例である可能性を完全に否定できないが、検鏡した本邦の *PAX3-NCOA2* positive RMS 例は ERMS

NOS の像であった。*PAX3-NCOA2* positive ARMS との発癌メカニズムの違いは不明である。また、ERMS では 11p15 の loss of allelic heterozygosity (LOH)や uniparental disomy (UPD)あるいは loss of imprinting (LOI) が知られる。LOH/UPD や LOI による 11p15.5 の IGF2 遺伝子の発現の違いや増加が発生原因の一つと理解されているが、LOI は ARMS にも観察されることから ERMS 発症の key メカニズムの解析が必要である。

b. Fusion-negative alveolar rhabdomyosarcoma と mixed alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma
近年、fusion-negative ARMS について新たな遺伝子解析結果が報告されている。Fusion-negative ARMS は fusion-positive ARMS に比較し予後良好で予後曲線は ERMS に匹敵し、gene expression profile は ERMS に近似することが示された[14, 20-22]。さらに、mixed ARMS and ERMS は aggressive embryonal clone の増殖と推測され [4]、一部を除いて *PAX-FKHR* fusion は検出されず、gene expression profile は ERMS に近似している[23]。従って、fusion-negative ARMS と mixed ARMS and ERMS は共通した genotype を有する可能性が推測され、新たな層別化の対象としてこの 2 群の臨床病態的、組織学的、遺伝子学的特徴、予後など生物学的態度の解析が進み整理され、ERMS と同一の risk 群とした臨床研究の進展が期待される。今後、phenotype, genotype, prognosis を反映した新たな分類が提案されていく方向にある。

c. MYCN 増幅

2q21 に位置する *MYCN* 増幅は ARMS に特異的で予後不良因子の一つと報告された [24]。最近、*MYCN* の低コピー増幅は ARMS, ERMS とともにみられるが、高コピー増幅はやや ARMS に多いと報告される。ARMS のみで、*MYCN* 増幅 (DNA) と *MYCN* 発現 (RNA) に相関を認め、*MYCN* 増幅や発現例は予後不良とされている[25]。

d. 家族性腫瘍症候群 familial cancer syndrome を背景とした RMS の発生

家族性腫瘍症候群を背景とした RMS の発生は Li-Fraumeni 症候群、Beckwith-Wiedemann 症候群、Gorlin 症候群、neurofibromatosis 1 (NF1), pleuropulmonary blastoma syndrome などが知られる。前 4 者ではそれぞれ *p53* 遺伝子の constitutional mutation、11p15 の imprinting 異常や *PAX3*, *myoD1* の methylation の異常、*PTC* 遺伝子変異、*NF1* 遺伝子変異が関与しているとされるが、腫瘍発生のメカニズムは明確になっていない。診断後 2 年以内に腫瘍発生の risk が特に男児で高いとされる。IRS-IV Study によると RMS における NF1 は 0.5%と報告される[26]。NF1 における RMS が malignant Triton tumor の variant とみなす意見もあり、双方の関連は必ずしも明確ではない。

7. 病理診断のための検体の取り扱い

病理診断には HE 染色、鍍銀染色、desmin, MRFs, HMGA2 などの免疫染色の各標本、FISH 法には凍結標本あるいはスタンプ標本、*PAX-FKHR* など遺伝子解析のため OCT コンパウンド包埋、snap freeze した凍結検体の作製・保存は必須である。中央病理診断では FISH 法による遺伝子増幅の検査や DNA ploidy 検査を行うため新鮮生組織検体の提出が必要となることがある。極小検体や挫滅検体ではコンセンサス診断が決定できないことがあり、診断に必要な検体採取には臨床医の理解・協力、相互信頼が不可欠である。

II. 臨床分類 (Group 分類と modified TNM 分類) とリスク分類への対応

悪性腫瘍の国際的な臨床分類は TNM 分類に代表され、本邦の各腫瘍取り扱い規約でも TNM 分類が採用されている。しかし、横紋筋肉腫では、独自の術後 Group 分類 (IRS Postsurgical Clinical Grouping System) が推奨され、原発部位、腫瘍大きさ、転移の有無に基づく術前の modified TNM 分類が採用され、これにリスク組織分類 (Histology) を加え、この組み合わせにより、予後を予測し、適切なプロトコール治療を選択する上で重要な治療前リスク分類が決定されてきた。IRSG-V Study における治療前リ

スク分類は3者の組み合わせにより低リスク群 (A, B)、中間リスク群 (A, B)、高リスク群の大きく3者に分けられ、プロトコール治療が施行されてきた[27]。Histology は embryonal histology と alveolar histology の2型で、前者には botryoid ERM、spindle cell ERMS、ERMS NOS の3組織型、後者には ARMS NOS or solid variant、US の各2組織型が該当している。従って、小児横紋筋肉腫の層別化治療には迅速かつ的確なコンセンサス病理診断と治療前リスク分類が求められ、病理診断書に組織型に加えて付記事項 category とリスク組織分類 risk group assignment (Histology)を記載することが望ましい。その詳細については JRSRG 治療プロトコールや最新の Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Rhabdomyosarcoma (<http://www.cap.org>) を参照されたい。

おわりに

小児横紋筋肉腫の形態病理、分子病理について新たな知見を加え解説した。今後、phenotype, genotype, prognosis を反映した新たな分類が提案されていくと思われる。診断のポイントはコンセンサス病理診断のクライテリアを厳格に守ることにあることを強調したい。

文献

1. Parham DM, Barr FG: Embryonal rhabdomyosarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma. In Fletcher DM, Unni KK, Mertens F (ed): WHO Classification Tumours, Pathology and Genetics. Tumors of Soft Tissue and Bone. IARC Press, Lyon 2002, p146-152
2. Newton WA Jr, Gehan EA, Webber BL, et al: Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification -An Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. Cancer, 76:1073-85,1995
3. Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA, et al: Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: update for pathologists. Pediatr Dev Pathol, 1:550-611,1998
4. Parham DM, Ellison DA: Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. Arch Pathol Lab Med 130:1454-65, 2006
5. 北條洋、箱崎 道之、橋本 優子：小児固形腫瘍の病理(3) 骨軟部腫瘍・悪性リンパ腫。病理と臨床、26:945-959, 2008
6. Kodet R, Newton WA Jr, Hamoudi AB, et al. Rhabdomyosarcomas with intermediate-filament inclusions and features of rhabdoid tumors. Light microscopic and immunohistochemical study. Am J Surg Pathol ,15:257-67,1991
7. Chiles MC, Parham DM, Qualman SJ, et al: Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. Sclerosing rhabdomyosarcomas in children and adolescents: a clinicopathologic review of 13 cases from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group and Children's Oncology Group. Pediatr Dev Pathol, 7:583-94, 2004
8. Boman F, Champigneulle J, Schmitt C, et al: Clear cell rhabdomyosarcoma. Pediatr Pathol Lab Med, 16:951-9, 1996
9. Zuppan CW, Mierau GW, Weeks DA; Lipid-rich rhabdomyosarcoma -a potential source of diagnostic confusion. Ultrastruct Pathol, 15:353-9, 1991
10. Qualman S, Lynch J, Bridge J, et al: Prevalence and clinical impact of anaplasia in childhood rhabdomyosarcoma : a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. Cancer, 113:3242-7,2008

11. Cessna MH, Zhou H, Perkins SL, et al: Are myogenin and myoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma? A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics. *Am J Surg Pathol*, 25:1150-7, 2001
12. Heerema-McKenney A, Wijnaendts LC, Pulliam JF, et al: Diffuse myogenin expression by immunohistochemistry is an independent marker of poor survival in pediatric rhabdomyosarcoma: a tissue microarray study of 71 primary tumors including correlation with molecular phenotype. *Am J Surg Pathol*, 32:1513-22, 2008.
13. Dias P, Chen B, Dilday B, et al: Strong immunostaining for myogenin in rhabdomyosarcoma is significantly associated with tumors of the alveolar subclass. *Am J Pathol*, 156:399-408, 2000
14. Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, et al: Molecular classification of rhabdomyosarcoma -genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol*, 174:550-64, 2009
15. 北條洋、箱崎道之：小児疾患の病理と病態 小児腫瘍における免疫染色の有用性. *小児外科* 38:567-575, 2006
16. Barr FG, Qualman SJ, Macris MH, et al: Genetic heterogeneity in the alveolar rhabdomyosarcoma subset without typical gene fusions. *Cancer Res*, 62:4704-10, 2002
17. Wachtel M, Dettling M, Koscielniak E, et al: Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res*, 64:5539-45, 2004
18. Sumegi J, Streblov R, Frayer RW, et al. Recurrent t(2;2) and t(2;8) translocations in rhabdomyosarcoma without the canonical PAX-FOXO1 fuse PAX3 to members of the nuclear receptor transcriptional coactivator family. *Genes Chromosomes Cancer*, 49:224-36, 2010
19. Parham DM, Qualman SJ, Teot L, et al: Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Surg Pathol*, 31:895-901, 2007
20. Barr FG, Smith LM, Lynch JC, et al: Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-III trial: a report from the Children's Oncology Group. *J Mol Diagn*, 8:202-8, 2006
21. Davicioni E, Finckenstein FG, Shahbazian V, et al: Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*, 66:6936-46, 2006
22. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, et al: Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 28:2151-8, 2010
23. Nishio J, Althof PA, Bailey JM, et al: Use of a novel FISH assay on paraffin-embedded tissues as an adjunct to diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Lab Invest*, 86:547-56, 2006
24. Hachitanda Y, Toyoshima S, Akazawa K, et al: N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization: its correlation with histologic features. *Mod Pathol*, 11:1222-7, 1998
25. Williamson D, Lu YJ, Gordon T, et al: Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype. *J Clin Oncol* 23:880-8, 2005

26. Sung L, Anderson JR, Arndt C, et al: Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma study IV. *J Pediatr*,144:666-8, 2004
27. Qualman SJ, Bowen J, Parham DM,et al: Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists: Protocol for the examination of specimens from patients (children and young adults) with rhabdomyosarcoma. *Arch Pathol Lab Med*, 127:1290-7, 2003

Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の病理組織診断

石田 剛

国立国際医療センター国府台病院臨床検査部

はじめに

1921年にEwingは、”diffuse endothelioma of bone”の名称で骨に発生する小円形細胞腫瘍を報告した。その後、この腫瘍は血管内皮由来ではないとされ、組織起源が不明なことからEwing肉腫(Ewing sarcoma)と呼ばれるようになった。Ewing肉腫は小児や若年者の骨、ときに軟部組織に好発する小円形細胞肉腫である。一方、Ewing肉腫に類似した特徴を有する小円形細胞腫瘍がEwing肉腫とは別の腫瘍として、原始神経外胚葉性腫瘍(primitive neuroectodermal tumor; PNET)、神経上皮腫(neuroepithelioma)、あるいはAskin腫瘍などの名称で報告された。従来、これらの腫瘍とEwing肉腫との異同が議論されていたが、これらの腫瘍にt(11;22)(q24;q12)などの共通の染色体転座とこの染色体転座に由来する*EWS-FLI1*などの共通の融合遺伝子の発現を有することが明らかとなり、同一範疇の腫瘍と考えられるようになった。最近では、Ewing肉腫ファミリー腫瘍(Ewing sarcoma family of tumors: ESFT)という名称でこれらの腫瘍を包括し、単一の疾患として扱われるようになった。

1. 病理診断

ESFTの病理診断も基本的には、他の小児腫瘍の病理診断と異なることはない。ESFTは治療として化学療法や放射線療法が外科的療法に先立って施行されることがほとんどであるので、生検標本で診断を行うことを原則とする。ESFTは小円形細胞腫瘍であり、小児のいわゆるsmall round blue cell tumorの1つであり、他のsmall round blue cell tumorを鑑別しなくてはならない。したがって、HE標本だけではなく、免疫染色が診断のためには必須である。また、後述する遺伝子診断を合わせて行なえば、より正確な診断をすることができる。

2. 生検検体の取扱い

1) 他の腫瘍の検体の取扱いと基本的には同様である。以下にESFTの検体として注意すべき点を簡単に列記する。

2) ESFTの診断にはキメラ遺伝子を検出するための検索が非常に参考となる。したがって、キメラ遺伝子検索のための検体を確保しておくことが望ましい。RT-PCR法での

キメラ遺伝子の検索は、ホルマリン固定パラフィン切片でも可能ではあるが、新鮮凍結検体で行う方が、検出率がよく、また結果の信頼性も高い。また、キメラ遺伝子の亜型や新たなキメラ遺伝子の検索にも応用ができるので、新鮮未固定の腫瘍組織を凍結保存しておくことが望ましい。染色体分析でも、特異的な染色体転座を確認できるが、技術的に難しいことと時間がかかることから日常診断には応用しにくい。一方、FISH 法による染色体転座の検出は、腫瘍の捺印標本やパラフィン切片からも可能であり、これも日常の補助診断に取り入れつつある。

3) 骨発生の ESFT の場合、検体に骨組織が含まれていることがある。脱灰操作を必要とする骨組織が含まれるときには、骨組織を腫瘍部組織と選り分け、別々の標本にすると、腫瘍が脱灰による artifact をまぬがれ、また、標本作製時間の短縮にもつながる。

4) 手術検体では、治療効果判定のために、壊死率を算出する。そのため、腫瘍の最大断面すべてを標本とする必要がある。

3. 病理組織学的特徴

ESFT の典型的な組織像は、以下のごとくである。すなわち、比較的均一な小円形細胞から成る腫瘍細胞の単調なびまん性シート状増殖である。その核クロマチンは繊細で、核小体は目立たない。細胞境界は不明瞭で、fibrillary な細胞質を持ち、背景に基質は乏しい。また、細胞質にグリコーゲンを認めることが多く、Homer Wright 型ロゼットを認めることもある (表 1)。

通常の ESFT よりも大型の細胞から成るものは、large cell Ewing sarcoma (あるいは atypical Ewing sarcoma) と呼ばれる。稀な所見として紡錘形細胞の出現や細胞境界明瞭な淡明な細胞の出現がある。化学療法後では、変性のために著しい大小不同を示すことが稀にある。

4. 免疫組織化学的特徴

免疫染色では、CD99 (MIC2) が腫瘍細胞の膜にびまん性に陽性となる。この所見は ESFT に非常に特徴的であるが、特異的ではないことに注意しなくてはならない。ESFT 以外の小円形細胞腫瘍でも CD99 が陽性となることが知られているからである。したがって、診断にあたっては ESFT 以外の腫瘍で特異的に陽性となるマーカー (ESFT にとっては negative marker) を同時に染色し、これらが陰性であることを確認しなくてはならない (図 1)。

CD99 は ESFT のほぼ全例で陽性となる。逆にいえば、CD99 が陰性の場合、ESFT の診断はきわめて慎重に行わなければならない。必要があれば、キメラ遺伝子の発現を確認

する。NSE は陽性となるが特異性には乏しいので診断的価値はあまり高くない。neurofilament や synaptophysin などの神経系マーカーは ESFT で陽性となることがあり、ESFT の神経組織への分化を示しているが、その陽性率は高くはない。vimentin は ESFT の多くで陽性となるが、特異性は全くない。S-100 蛋白も陽性となることがあるが、神経、脂肪、軟骨、メラノサイトなどその他多数の腫瘍で陽性となるので、結果の判断は組織像と合わせて行う。cytokeratin は上皮系マーカーであるが、ESFT でも 10-20% の症例で陽性となる。筋原性腫瘍のマーカーである desmin, muscle specific actin (HHF-35), myogenin は ESFT では陰性であり、これらが陽性であれば横紋筋肉腫などを考える。各種リンパ球や血液細胞のマーカーも ESFT は陰性であり、これらが陽性となれば血液・リンパ球系腫瘍を考える。免疫染色のパネルでは、CD45, CD20, CD79a, CD3 に加え、必ず TdT を行う。これは、リンパ芽球性リンパ腫が CD99 陽性、TdT 陽性で、他のリンパ球マーカーが陰性であることがあるからである。成人の悪性リンパ腫の鑑別ではリンパ芽球性リンパ腫が少ないこともあり TdT を染色しないことも多いため、TdT を行わないとリンパ芽球性リンパ腫が見逃される危険がある。このような点を踏まえ、ESFT の鑑別を考えたスクリーニング用の免疫染色パネルを表 2 に示す。

5. 分子・細胞遺伝学的特徴

Ewing 肉腫ファミリー腫瘍は、特異的な染色体転座とそれに伴うキメラ遺伝子を有する。これを検出することが病理診断の補助となるので、近年日常診断に応用されつつある。しかし、このような遺伝子診断が実際に行える施設はまだ限られているのが現状である。また、キメラ遺伝子の検索には、原則として腫瘍組織の新鮮凍結検体を用いるので、遺伝子診断用の検体を保存しておく必要がある。表 3 に ESFT に認められる染色体転座とキメラ遺伝子を示す。このうち、キメラ遺伝子 *EWS-FLI1* が 80%以上を占め、*EWS-ERG* が約 15%を占める。その他のキメラ遺伝子が見られることは稀である。

文献

- 1) Meis-Kindblom JM, Stenman G, Kindblom LG: Differential diagnosis of small round cell tumors. *Semin Diagn Pathol* 13:213-241, 1996
- 2) 牛込新一郎：小円形細胞腫瘍。取り扱い規約に沿った腫瘍鑑別診断アトラス軟部。文光堂，東京，pp151-164，1993

- 3) Ewing J: Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc 21:17-24, 1921
- 4) Angervall L, Enzinger FM: Extraskkeletal neoplasm resembling Ewing' s sarcoma. Cancer 36: 240-251, 1975
- 5) Stout AP: Tumor of the ulnar nerve. Proc NY Pathol Soc 18:2-12, 1918
- 6) Askin FB, Rosai J, Sibley RK, et al.: Malignant small cell tumor of thoracopulmonary region in childhood. a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. Cancer 43:2438-2451, 1979
- 7) Delattre O, Zucman J, Melot T, et al.: The Ewing family of tumors. a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N Engl J Med 331:294-299, 1994
- 8) Folpe AL, Goldblum, JR, Rubin BP, et al. : Morphologic and immunophenotypic diversity of in Ewing family tumors: a study of 66 geneticlly confirmed cases. Am J Surg Pathol 29:1025-1033, 2005
- 9) 大喜多肇, 秦順一: Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の臨床病理. 病理と臨床 27:151-155, 2009
- 10) 石田剛, 大喜多肇, 長谷川匡, 他: Ewing 肉腫の病理診断上の問題点. 日整会誌 84:1126-1131, 2010

表 1. Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の組織学的所見

典型的所見	Diffuse monotonous proliferation Uniform small round tumor cells Uniform round nuclei containing fine chromatin Inconspicuous nucleoli Fibrillary cytoplasm Indistinct cytoplasmic membrane No ground substance Cytoplasmic glycogen (PAS stain(+))
時に見られる所見	Homer Wright rosettes Large tumor cell
稀に見られる所見	Spindle cell Clear cytoplasm with distinct cell membrane

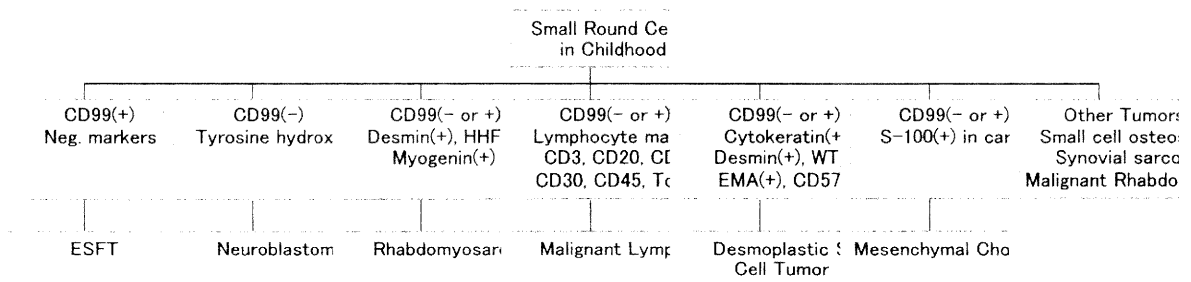


図 1. 主な小児小円形細胞腫瘍の免疫染色による鑑別

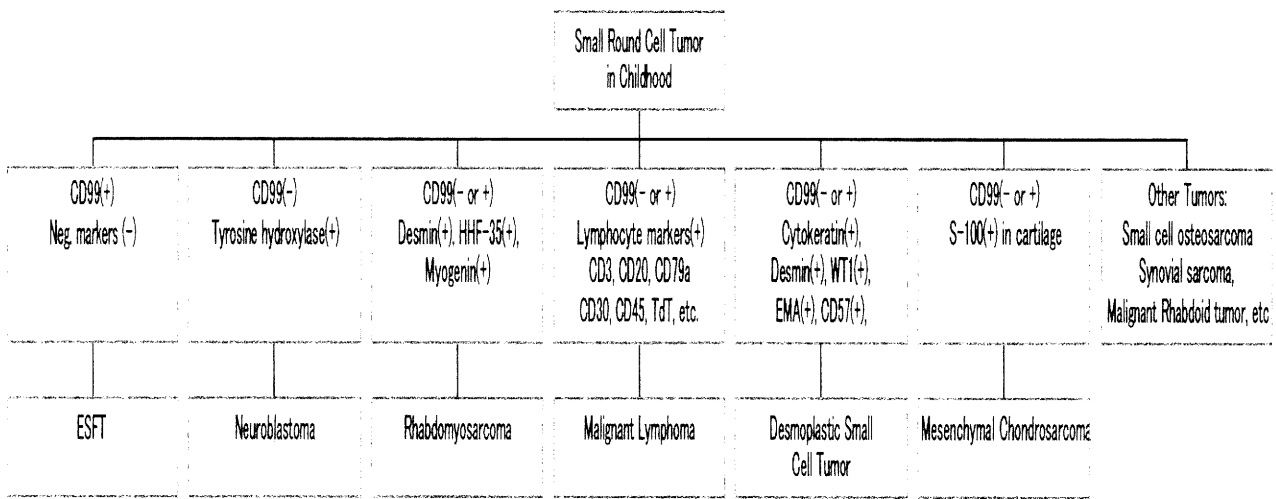
表 2. Ewing 肉腫ファミリー腫瘍診断のための免疫染色マーカー

	一次スクリーニングとして推奨される免疫染色マーカー	より詳細な検討のために必要な免疫染色マーカー
Positive marker	CD99	Synaptophysin, Neurofilament, FLI1
Negative marker	Desmin, HHF-35, CD45, TdT (CD3, CD20, CD79a)	α -SMA, Myogenin, MyoD1, Myf4, Myoglobin, CD3, CD20, CD79a, CD30, CD1a, CD68, CD138, TH, MPO, ALK1, EMA, INI1, HMB-45
Indeterminate markers	Cytokeratin (wide), S-100 protein	Vimentin, cytokeratin (low-MW), NSE, CD34, CD56, CD117, bcl-2, p53

α -SMA: α -smooth muscle actin, TH: Tyrosine hydroxylase, MPO: Myeloperoxidase, EMA: Epithelial membrane antigen

表 3. Ewing 肉腫ファミリー腫瘍に認められる染色体転座とキメラ遺伝子

染色体転座	キメラ遺伝子
t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLI1</i>
t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>
t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETV1</i>
t(17;22)(q12;q12)	<i>EWS-E1AF</i>
t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-FEV</i>
t(16;21)(p11;q12)	<i>FUS-ERG</i>
t(2;16)(q33;p11)	<i>FUS-FEV</i>



分子生物学的診断用の腫瘍組織検体等の取り扱いについて

各種の腫瘍における診断上のポイント、問題点等が述べられてきたが、この冊子に掲載した腫瘍に限らず、形態学的検索や免疫組織学的検索では診断しえない難解な症例があり、それらの腫瘍においては、腫瘍組織（細胞）の DNA や RNA を用いた分子生物学的な診断法が、診断の決め手となることがある。この項では各種の腫瘍性病変に共通する良質な DNA や RNA を採取するための一般的な留意点をまとめたが、個々の腫瘍に特有な検索が必要なものもあるので、それらについては種々の研究グループの指示等を参考にしてほしい。

1. 凍結検体の作成

A) 液体窒素あるいはドライアイス・アセトンを用いる場合

腫瘍組織を 2 ml 程度のチューブに入れ、直ちに液体窒素あるいはドライアイス・アセトンにて凍結し、ディープフリーザー（ -80°C ）に保存する。液体窒素やドライアイス・アセトンがない場合は、直接ディープフリーザーに保存する。これ以降は解凍してはならない。

B) OTC コンパウンドによる場合

1) 5mm～1cm 大の腫瘍組織を凍結標本作成用樹脂性包埋皿あるいはアルミホイルで包み OTC コンパウンド（迅速標本作成時に使われているもので可）を検体より多めに入れる。

2) 検体とコンパウンドの入ったアルミホイル容器を、あらかじめ用意しておいたドライアイス・アセトンあるいは液体窒素内に静置し迅速に凍結する。その際、アルミホイル容器内にアセトン等が入らないように注意する。

3) 完全に凍結したら、アルミホイル容器等をよく振ってアセトン等を飛ばし、ディープフリーザー（ -80°C ）の中で保管する。

2. 分子生物学的(DNA)分析コントロールとしての末梢血あるいは新鮮生組織検体等の処理方法

末梢血は 5～10ml をヘパリン採血し、プラスチックチューブに入れ、十分な保冷剤を入れ 4°C にて送付する。末梢血の代わりに腎腫瘍であれば正常腎組織、肝腫瘍であれば正常肝組織をコントロールとしても良い。その組織片の処理は 1.と同様であるが、腫瘍と正常組織は別のチューブに入れ、それぞれの内容を明記する。

3. 検体の送付方法

凍結腫瘍、凍結されたコントロール組織は充分量のドライアイス（検体到着まで 1 日かかる場合は 2kg、2 日の場合は 3kg）と共に発泡スチロール製のボックスに入れ、凍結した状態（凍結便）で送付する。なお、末梢血は凍結材料と一緒にしないで、別の容器に入れてお送りください。

4. 送付する凍結組織の採取は壊死部を避けて下さい。部位の決定はできれば施設の病理医

により行われるのが望ましい。また、その処理は可及的速やかに遂行する事とし、プロセスに遅れなどの問題があった場合にはその旨を記録し、その情報を送付施設に報告する必要がある。

小児固形腫瘍の診断の手引き

日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

「小児がんに対する標準治療・診断確立のための研究」班

平成 23 年 3 月

編集：石田 剛、中澤温子、北條 洋、堀江 弘

日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会事務局

〒266-0007 千葉市緑区辺田町 579-1

千葉県こども病院検査部病理科内

Tel.043-292-2111

小児固形腫瘍の分子診断の手引き

平成22年3月

(独) 国立成育医療研究センター
小児血液・腫瘍研究部
大喜多 肇