

## トピックス

表 1. 糖原病の病型

病型	欠損酵素	遺伝子	Enzyme ID	酵素診断可能組織	病型
糖原病 Ia型	Glucose-6-phosphase	<i>G6PC</i>	3.1.3.9	肝臓	肝型
糖原病 Ib型	G-6-P transporter	<i>SLC37A4</i>	—	肝臓 (凍結不可)	肝型
糖原病 II型	Acid $\alpha$ -glucosidase	<i>GAA</i>	3.2.1.20	リンパ球, 線維芽細胞, 筋	肝筋型
糖原病 III型	Debranching enzyme	<i>AGL</i>	2.4.1.25,3.2.1.33	筋, 肝臓, 白血球, 赤血球	肝型, 肝筋型
糖原病 IV型	Branching enzyme	<i>GBE1</i>	2.4.1.18	赤血球, 肝臓	肝型, 肝筋型
糖原病 V型*	Muscle phosphorylase	<i>PYGM</i>	2.4.1.1	筋	筋型
糖原病 VI型	Liver phosphorylase	<i>PYGL</i>	2.4.1.1	肝	肝型
糖原病 VII型*	Phosphofruktokinase (PFK)	<i>PFKM</i>	2.7.1.11	筋, 赤血球?	筋型
糖原病 VIII型*	Phosphorylase kinase (PBK)	<i>PHKB</i>	2.7.1.38	筋	筋型
糖原病 IX型*	Phosphoglycerate kinase	<i>PGK1</i>	2.7.2.3	赤血球, 白血球, 筋	筋型, 溶血
糖原病 X型*	Phosphoglycerate mutase (PGLM)	<i>PGAM2</i>	5.4.2.1,3.1.3.13,5.4.2.4	筋	筋型
糖原病 XI型*	Lactate dehydrogenase-A (LDH)	<i>LDHA</i>	1.1.1.27	筋, 血清 (電気泳動パターン)	筋型
糖原病 XII型	Aldolase-A	<i>ALDOA</i>	4.1.2.13	赤血球, 筋	筋型, 溶血
糖原病 XIII型*	$\beta$ -enolase	<i>ENO3</i>	4.2.1.11	筋	筋型

(\* : 横紋筋融解症をおこしうる病型)

臓器に発現しているかに対応して、欠損が及ぼす臨床像は多様である。しかし、グリコーゲン分解に関わる酵素は主に肝臓と筋肉に発現しているため、肝腫大を来す肝型と筋症状を来す筋型、両症状を併せ持つ肝筋型に大きく分類する事が多い。現在糖原病は14種類の病型が報告され、その中で11種類が筋型糖原病に分類されている<sup>1)</sup>(表1)(図1)。また糖原病の病型頻度は、精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに関連する疾患の病態解明と治療法の開発に関する研究：清水輝夫班長」(以下清水班)の援助を得て、我が国における筋型糖原病の実態について全国調査を行った結果、筋型糖原病の病型頻度についてはII型(Pompe病)、III型(Forbes-Cori病)、V型(McArdle病)の3病型で全体の約70%を占めている<sup>2)</sup>。

糖原病の理解には症例が示す臨床症状と、生化学的病態を関連づけて理解するとわかりやす

い(表2)。つまり生体におけるグリコーゲンの分解には2つの生理的役割があり、一つは生体にグルコースを供給する事ともう一つはATP(adenosine triphosphate)を供給する事である。前者は肝臓で、後者は骨格筋(心筋も?)で行われる。筋細胞では主に筋収縮のエネルギーを産生することが目的であり、筋型糖原病では解糖過程の障害により、筋収縮に見合うATP供給ができなくなることで筋細胞の崩壊が起こる。一方症状から見ると、筋型糖原病は臨床的に固定性の筋力低下(fixed weakness)を示す群と、運動不耐(exercise intolerance)を示す2つの群に分けることができる(図2)。これを病理的な観点から見ると、筋力低下を示す群では一般的に筋細胞に著明なグリコーゲンの蓄積を認め(glycogen accumulation)、運動不耐型ではグリコーゲンの蓄積は軽度かあまり明瞭でない場合が多い<sup>3)</sup>。

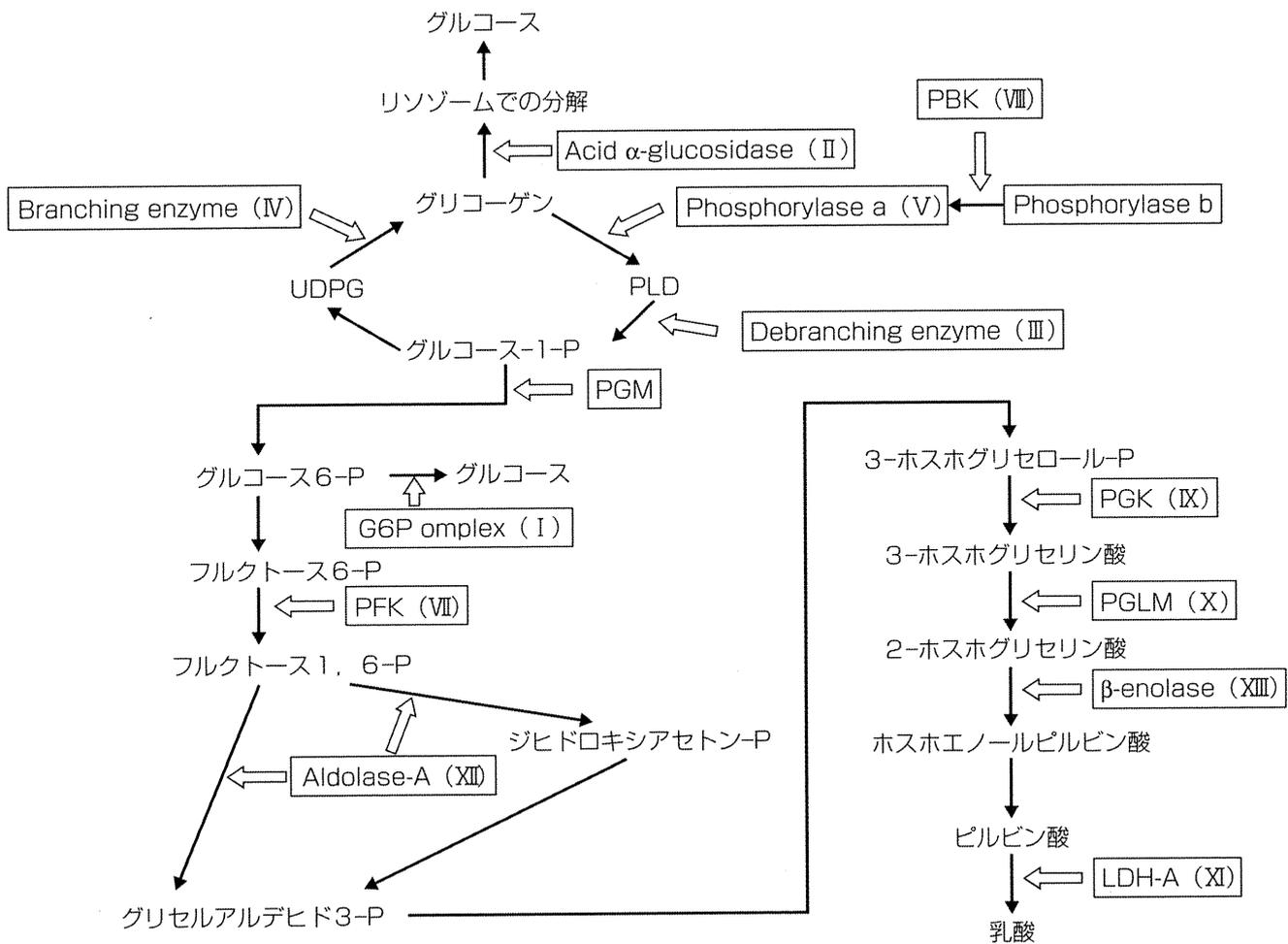


図 1. 解糖経路 (図内の略語は表 1 を参考)

表 2. 糖原病の病態

	病態	症状
エネルギー供給障害型 (energy supply-shortage)	・ ATP産生低下 ・ グリコーゲン蓄積は軽度	筋：筋痛, 筋硬直, 筋力低下 心筋：心筋症 中枢神経：けいれん, 精神遅滞
グルコース供給障害型 (glucose supply-shortage)	・ グルコース供給低下 ・ グリコーゲン蓄積著明	低血糖, 臓器腫大, 筋細胞破壊, 筋力低下, 心筋障害, 前核細胞障害, 末梢神経障害

運動不耐型の筋型糖原病では筋収縮の際のエネルギー産生 (ATP) 不全により筋細胞の崩壊が起こり, 横紋筋融解症が発症する。症状としては運動不耐, 労作時筋痛, 筋硬直などを示し, 筋細胞崩壊により, 筋細胞内のミオグロビン, 細胞内タンパク, 電解質などが血流へ漏出する

状態である。表 3 に筋型糖原病以外の横紋筋融解症を引き起こす主な原因疾患を列挙するが, その中で再発性である場合は基礎疾患として代謝性のものが考えやすい<sup>4)</sup>。なお, 横紋筋融解症の際に代謝性疾患が疑われる場合には筋生検が考慮される場合があるが, 筋生検を行う時期に

トピックス

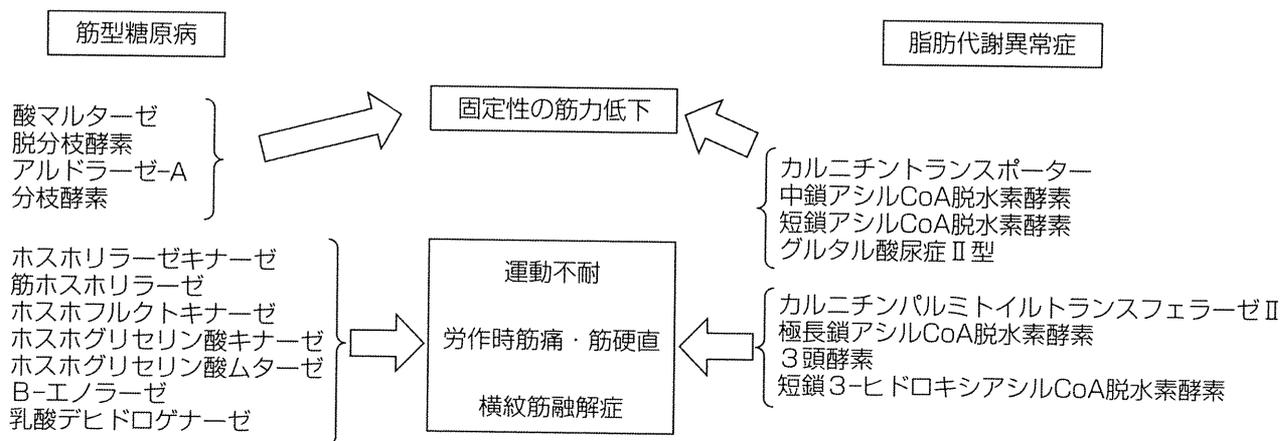


図2. 代謝性ミオパチーの臨床症状と疾患：臨床症状から見た原因疾患

表3. 横紋筋融解症の原因

	主な原因疾患
外傷	Crush syndrome
運動（非生理的）	けいれん重積，過度な運動負荷
筋虚血	動脈閉塞，意識障害などの四肢のimmobilizationによる圧迫など
代謝性（遺伝性）	糖原病，脂肪代謝異常症，ミトコンドリア病，プリン体代謝異常
感染	インフルエンザA・B，EBウイルス，AIDS，レジオネラ，黄色ブドウ球菌，クロストリジウム
体温異常	悪性高熱，熱中症，低体温，悪性症候群
酸塩基平衡異常・電解質異常	電解質異常，アシドーシス
薬剤性	高脂血症治療薬（fibrates, statins）
特発性	

については発症後数カ月程度間を置いた方がよい。急性期では検査結果に信頼性に欠けるからである。筆者も経験したが、急性期に筋生検を行って意外と筋組織が正常所見であったりする事もある。

2) 横紋筋融解症と腎障害 (図3)

横紋筋融解症の原因は多様であるが(表3)、現象として定義すると、横紋筋融解症は“rapid and massive”な筋細胞崩壊が起こる事と定義される<sup>5)</sup>。筋細胞の崩壊に伴って筋細胞内の種々の蛋白、酵素（ミオグロビン、クレアチンホスホキナーゼ(CK)、乳酸脱水素酵素(LDH)、AST (aspartate aminotransferase)、ALT (alanine aminotransferase)、アルドラーゼ)が逸脱し血

中に流出する。時に播種性血管内凝固(DIC)や多臓器不全、呼吸筋力低下による呼吸障害に進展することもある。横紋筋融解症の自覚症状としては、四肢の脱力、腫脹、しびれ、痛みなどの筋障害、さらに筋肉から流出したミオグロビンによる赤褐色尿などがある。検査所見では血清CK、ミオグロビン、AST、ALT、LDHなどの筋逸脱酵素の上昇が特徴的である。また高カリウム血症、高リン血症、低カルシウム血症も見られる。赤褐色尿がみられるが尿所見では鮮血が強陽性にもかかわらず沈渣で赤血球が優位に認められないことが特徴である<sup>6)</sup>。

外傷性、非外傷性を問わず、横紋筋融解症による最も深刻な合併症は、ミオグロビン尿に起

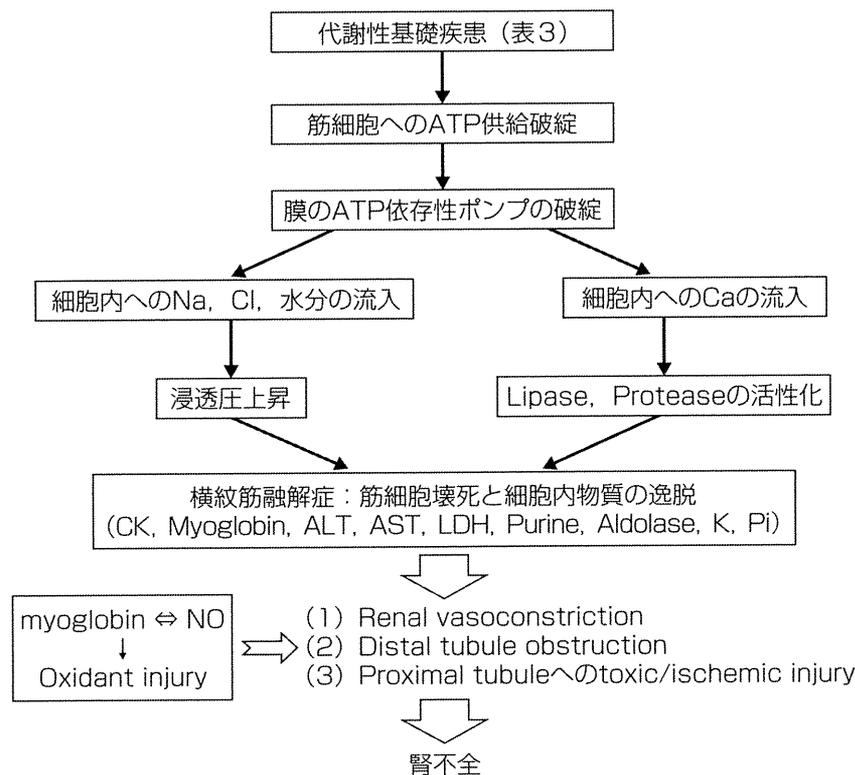


図 3. 先天代謝異常に起因する横紋筋融解症と腎障害の機序

因する急性腎障害であり、生命に危機を及ぼすこともある。横紋筋融解症の合併症として急性腎障害が発生することは珍しくはなく、米国における報告では急性腎障害の約7~10%が横紋筋融解症によるとされている。また横紋筋融解症では約40%に急性の腎障害を来すと報告されている。

腎障害を合併しない横紋筋融解症の予後は比較的良く、腎障害が伴った例でも急性期を乗り切れば腎機能は回復する。横紋筋融解症に伴う腎障害に深くかかわるミオグロビンは、分子量17,800のヘム蛋白で、糸球体で濾過されエンドサイトーシスで尿細管の上皮細胞に入り代謝される。筋細胞の急激で大量の壊死がおこることによりオーバーフローしたミオグロビンが、腎の域値である0.5~1.5 mg/dlを超えると尿中に排泄され、いわゆる褐色尿を呈する。ミオグロビンによる腎障害の起序は十分解明されていないが、図3に示すように(a)腎血管の収縮による虚血、

(b)近位尿細管の虚血、および直接の作用、(c)尿細管内に生ずるミオグロビン円柱による遠位尿細管の閉塞等が関わっていると思われる。腎血管の虚血に関してはミオグロビンによるNO(一酸化窒素)のキレート作用が腎血管収縮を増強しているといわれている<sup>7)</sup>。

### 3) 横紋筋融解症にみられる高尿酸血症

横紋筋融解症では高尿酸血症がみられる。これは筋細胞崩壊により流出したプリン体が肝臓で尿酸に変換されることによるとされ、尿酸産生の過剰により引き起こされる。しかしそれに加えて腎による尿酸の排泄障害も原因の一つとされている。腎不全のない例では血清尿酸は $5.6 \pm 0.8$  mg/dlであるのに対し、腎不全を呈した例では優位に高く、 $10.2 \pm 0.8$  mg/dlであり、横紋筋融解症にみられる高尿酸血症が腎機能の障害にも由来していることを示唆している<sup>8)</sup>。

## トピックス

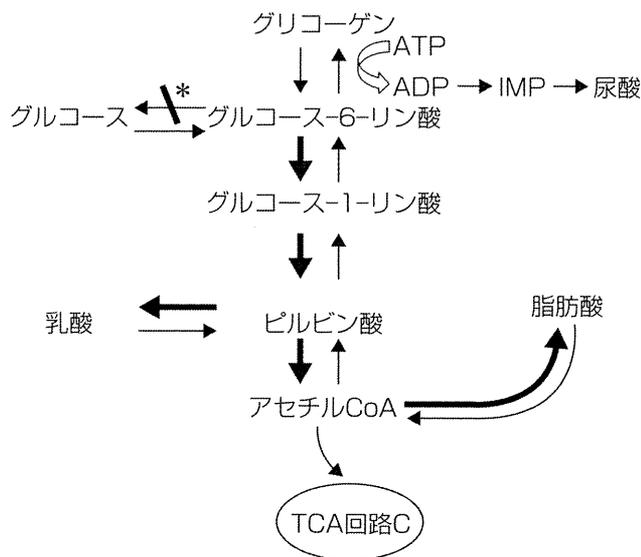


図4. 糖原病1型における代謝病態

\* : 酵素 (glucose-6-phosphatase) 障害部位

## 2. 肝型糖原病1型 (von Gierke病) と腎障害 (図4)

糖原病1型は常染色体劣性遺伝形式で, glucose-6-phosphatase (G6Pase) complexの先天的な欠損による。病型としてtype 1a, type 1bに分類される。1aではG6Paseの欠損であるのに対し, 1bでは基質をG6Paseの活性部位へ転送するためのtransporterの異常である。本症ではglucose-6-phosphateからグルコースへの転換ができないため, 糖新生, 解糖のいずれの方向からもグルコース産生が障害されることから, 糖原病の中では低血糖症状は強い。

症状は低血糖症状 (特に食事摂取の間隔が開いた場合など), 肝腫大, 腎へのグリコーゲン蓄積のため腎腫大も見られる。成長障害 (低身長), 人形様顔貌 (丸い輪郭の顔で, 特に頬部に脂肪沈着があり膨隆するため), 鼻出血なども見られる。知的には低血糖症状の発症頻度・程度などにもよるが, 通常は正常である。1b型では好中球減少を伴い, 易感染性が見られる。グルコース産生障害による低血糖のため, 二次的に起こ

る代謝異常のためさまざまな合併症が多く, 長期予後の観点からいえば糖原病の中では重症といえる。血液生化学的には, 二次的な代謝の異常の結果としてG6Pの蓄積により解糖が亢進するために続発する高乳酸血症, 大量のアセチルCoA産生に由来する高脂血症, 肝でのリン酸低下によりAMP (adenosine monophosphate) deaminaseの抑制が解除され, ADP分解亢進と腎での排泄低下も重なることによる高尿酸血症を呈する<sup>9)</sup>。

糖原病I型における腎合併症の起序は十分判明していないが, 自然歴をみると糸球体でのろ過亢進がみられ, 微小アルブミン尿が比較的早期から見られ始め, その後次第にタンパク尿, 高血圧, 腎不全へと進行してゆく。微小アルブミン尿は20歳以上では95%にみられ, ACE (angiotensin converting enzyme) 阻害薬などが使用される。また高脂血症に起因する局所でのfree radical産生と腎血管収縮による虚血性の変化も腎障害の原因ではないかとされている。腎生検の病理では巣状糸球体硬化と間質の線維化を示す。これらの腎合併症は, 食事療法などの血糖維持の治療がうまく行われ, 二次的な代謝異常を改善することで腎合併症の軽減になるとされているが<sup>10)</sup>, 日本ではそのような研究はなく, 実態は不明である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示 : 本論文発表内容に関連して特に申告なし

## 文 献

- 1) 杉江秀夫, 杉江陽子 : 代謝性筋疾患. 臨床検査 46 : 479-486, 2002.
- 2) 福田冬季子, 他 : 筋型糖原病の全国調査および浜松市発達医療総合センターにおける筋型糖原病診断症例の比較検討. 臨床神経 43 : 243-248, 2003.
- 3) DiMauro S, Lamperti C : Muscle glycogenoses. Muscle Nerve 24 : 984-999, 2001.
- 4) Berardo A, et al : A diagnostic algorithm for metabolic myopathies. Curr Neurol Neurosci Rep 10 : 118-126, 2010.
- 5) Bagley WH, et al : Rhabdomyolysis. Intern Emerg Med 2 : 210-218, 2007.

- 6) Cervwllin G, et al: Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. Clin Chem Lab Med 48: 749-756, 2010.
  - 7) Bosch X, et al: Rhabdomyolysis and acute kidney injury. N Engl J Med 361: 62-72, 2009.
  - 8) 大野岩男: 横紋筋融解症と尿酸産生異常. 高尿酸血症と痛風 17: 141-146, 2009.
  - 9) Moses SW: Historical highlights and unsolved problems in glycogen storage disease type 1. Eur J Pediatr 161: S2-S9, 2002.
  - 10) Martens DHJ, et al: Renal function in glycogen storage disease type 1, natural course, and renopreservative effects of ACE inhibition. Clin J Am Soc Nephrol 4: 1741-1746, 2009.
-

## 筋病理の基本

西野 一三\*

要旨：筋病理は、筋疾患診断において中心的な役割を果たしている。検体採取・固定・運搬の際、人工産物が入りやすい。ヘマトキシリン・エオジン染色は、構築の変化、筋線維大小不同に加えて、壊死・再生線維、内鞘線維化、リンパ球浸潤などを評価する。ゴモリ・トリクローム変法はタンパク質凝集体などの異常構造物の同定にもちいる。NADH-TR染色は、筋原線維間網を描出するため、筋原線維の乱れを評価するのに適している。ミオシンAT-Paseは、筋線維タイプの評価にもちいる。タイプ1線維の選択的萎縮は筋原性変化を、筋線維タイプ群化は神経再支配を反映する。すべての染色での所見を総合して、筋原性か神経原性変化かを判定する。

(臨床神経 2011;51:669-676)

Key words：筋病理, 筋生検, 組織化学

## はじめに

分子生物学が発展した現代においても、依然として筋病理学は、筋疾患の診断で中心的役割を果たしている。事実、大半の筋疾患は筋病理学的所見に基づいて分類・定義されている。とくに、先天性ミオパチーでは、病名そのものが組織学に基づくものであり、筋病理診断なしには診断を付けることができない。

## 筋生検と固定

## 1. 筋生検部位の選択と検体の大きさ

徒手筋力テスト4レベルの筋を生検することが望ましい。とくに選択的な筋障害をみとめる疾患では、筋生検前に筋CTやMRIで筋障害の程度を評価し、生検部位を決定することが望ましい。上腕二頭筋が大腿直筋が中程度に障害されているならば、これらの筋から筋生検をおこなうのが良い。これらの筋では、タイプ1, 2A, 2Bの三種類の筋線維がモザイクをなして1/3ずつ存在することが確立しているため、筋線維タイプの分布異常を評価できるからである。筋炎のばあいには、病変が局所的にしか存在しないことが多いので、あらかじめMRIを撮影し、所見のある部位を狙って筋生検をおこなうべきである。

筋生検の手法について、本稿では詳しく触れないが、外科医任せにしていると、しばしば病理標本として使い物にならない検体となってしまうことに注意が必要である。これは、採取した検体その後どのように処理・観察されるか知らないために、採取部位を糸で縛ったり、電気メスを使用したり、強

く筋線維を引っ張ったりしてしまうことにより生じるものである。経験を持った神経内科医が自ら筋生検をおこなうか、責任を持って、検体取り扱いに関する正しい知識を外科医に伝えるかする必要はある(誤解の無いようにいうと、正しい知識を持った外科医が採取した検体は、とても素晴らしい)。

採取する検体の大きさは、成人では、鉛筆の太さ程度で、長さ1~1.5cm程度を目処にする。代謝性筋疾患などがうたがわれ、生化学検査に多量の検体を要することが予想されるばあいには、大きめの検体を採取するか複数の検体を採取する。小さすぎる検体では、切片内に病変がふくまれる確率が低くなり、診断確度が低下する。

## 2. 筋生検検体の固定

検体の固定には、ホルマリン固定、新鮮凍結固定、グルタルアルデヒド固定などがあるが、特別な理由がないかぎりホルマリン固定をおこなう必要はない。筋病理学では、凍結検体をもちいた各種の組織化学染色が発達しており(Table 1)、新鮮凍結固定がもっとも重要である。詳しくは成書を参照していただきたいが<sup>1)</sup>、ここでは要点のみを記載する。

凍結固定には、採取した検体をトラガカントゴムを盛りつけたコルク片の上に垂直に立てる。この検体を、コルク片ごと液体窒素で間接的に凝固点(-160℃)まで冷却させたイソペンタン中で、1分間以上検体を攪拌しながら固定する。完了後すぐにドライアイス上に検体を載せる。イソペンタンや液体窒素が入手できないばあい、ドライアイスで冷却したアセトンで代用することも可能である。ただしこのばあいの固定温度は-79℃となる。固定に失敗したり凍結後に融解したりすると、人工産物が生成され、評価がいちじるしく困難になる。基本的に、一般病院の病理部門ではホルマリン固定検体を対象にしており、筋生検検体の凍結固定はおこなえないと考え

\*Corresponding author: 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部 [〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1]  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部  
(受付日: 2011年6月29日)

**Table 1** Routine histochemical stainings at National Center of Neurology and Psychiatry.

1. ヘマトキシリン・エオジン染色 (hematoxylin and eosin ; H&E)
2. ゴモリ・トリクローム変法 (modified Gomori trichrome)
3. NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR)
4. コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase ; SDH)
5. チトクローム c 酸化酵素 (cytochrome c oxidase ; COX)
6. Oil red O (ORO)
7. 酸フォスファターゼ (acid phosphatase ; ACP)
8. アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase ; ALP)
9. 非特異的エステラーゼ (nonspecific esterase ; NSE)
10. アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase ; AChE)
11. Periodic acid Schiff (PAS)
12. Congo red
13. Myoadenylate deaminase (AMP deaminase)
14. Menadione-linked $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (MAG)
15. フォスフォフルクトキナーゼ (phosphofructokinase ; PFK)
16. フォスフォリラーゼ (phosphorylase)
17. Myosin ATPase (ルーチン) pH 10.3
18. Myosin ATPase (ルーチン) pH 10.4
19. Myosin ATPase (ルーチン) pH 10.5
20. Myosin ATPase (ルーチン) pH 10.6
21. Myosin ATPase (ルーチン) pH 10.7
22. Myosin ATPase (ルーチン) pH 10.8
23. Myosin ATPase (pH 4.7)
24. Myosin ATPase (pH 4.6)
25. Myosin ATPase (pH 4.5)
26. Myosin ATPase (pH 4.4)
27. Myosin ATPase (pH 4.3)
28. Myosin ATPase (pH 4.2)
29. Myosin ATPase (pH 4.1)

た方が良い。そのため、神経内科医は、原則的に自ら凍結固定をおこなうか、病理部門に正しい知識と技術を伝える責任がある。

グルタルアルデヒド固定は電顕観察用に必要である。依然として病態不明の筋疾患や過去に報告のない疾患も少なく、そのようなばあいには、電顕的観察が求められる。是非、電顕用に検体の一部をグルタルアルデヒド固定しておきたい。

### 筋病理報告書の記載の仕方

われわれは、Microscopic findings, Pathological diagnosis, Comments の3項目に分けて筋病理報告書を記載している。Microscopic findings の項目では、個々の染色標本について、順次所見を記載する。Pathological diagnosis では、すべての所見を踏まえて、筋原性変化なのか神経原性変化なのかを記載し、重要な所見を要約して箇条書きにする。Comments では、疾患特異的変化の有無を踏まえて、可能性の高い疾患や除外すべき疾患について議論し、更におこなうべき検査があればそれを記載するようにしている。

**Table 2** Pathological evaluation on hamatoxylin and eosin staining.

1. 全体の構築の変化
2. 筋線維大小不同
3. 筋線維の壊死・再生
4. 核の変化
5. 細胞浸潤
6. 内鞘線維化
7. その他の構造的変化

### 染色標本の読み方

凍結固定標本に対して、多くの組織化学染色法が開発されているが(Table 1)、もっとも重要なのは、ヘマトキシリン・エオジン染色、ゴモリ・トリクローム変法、NADH-テトラゾリウム還元酵素の3種類であるといわれる。本稿では、これら3つの染色と筋線維タイプを染め分けるミオシン ATPase 染色に焦点を当てて解説する。

#### 1. ヘマトキシリン・エオジン染色

基本的な構造変化をみるための染色である(Table 2)。正常筋線維は、横断面で見ると多角形で筋核は周辺部に存在する。成人のばあい、筋線維径は60~80 $\mu$ mである。通常、100 $\mu$ mを超えると肥大線維と判定される。筋線維の大小不同はもっとも基本的な病情報の一つである。筋線維の直径を測定し、最小径から最大径までの分布や平均を記載する。原則として、障害の程度が強ければ筋線維大小不同もいちじるしくなる。ただし、先天性疾患では筋線維すべてが小径であったり、筋線維径が小径線維と大径線維の二峰性に分布したりすることもある。また進行期には、肥大線維のみがみとめられることもある。

筋線維は数十本単位でまとまって存在しており、このまとまりを筋束と呼ぶ。筋束と筋束の間は周鞘(perimysium)、筋束内の筋線維と筋線維の間は内鞘(endomysium)と呼ばれる。筋腱接合部や末梢神経進入部を除けば、内鞘には線維組織をみとめない。したがって、内鞘に線維組織が存在するならば、それは線維化をきたしていることを確実に意味している。そのため、線維化の有無を記載する際、敢えて「内鞘線維化(endomysial fibrosis)」という言葉をもちることが多い。

皮膚筋炎の際には、しばしば萎縮線維が筋束周辺部にまとまって存在しているのが観察される。これは per fascicular atrophy (Fig. 1) と呼ばれ、診断的所見である。

Werdnig-Hoffmann 病とも呼ばれる脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy) 1型(SMA1)など、先天性の神経原性疾患では、しばしば筋束ごとすべての筋線維が萎縮しており、大群集萎縮(large group atrophy) (Fig. 2) と呼ばれる。この疾患で見られる萎縮線維は丸みを帯びているのが特徴である。一方、筋萎縮性側索硬化症などの後天的神経原性疾患では、萎縮線維が角張っており、しばしば小角化線維と呼ばれる。ただ

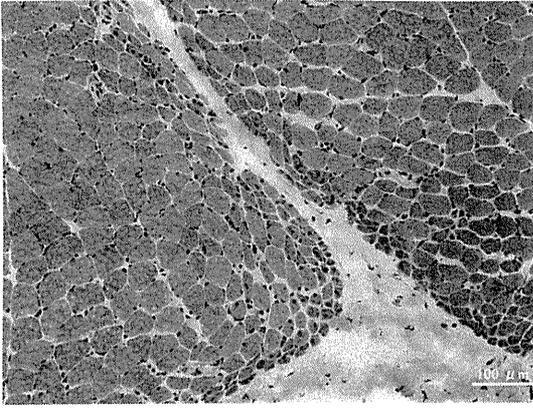


Fig. 1 Perifascicular atrophy. Muscle from a 7-year-old boy with juvenile dermatomyositis shows atrophic fibers clustered in perifascicular area. This is a diagnostic finding of dermatomyositis. (hematoxylin and eosin)

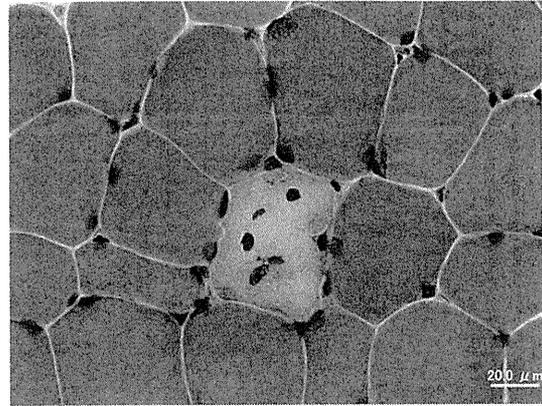


Fig. 3 Necrotic fiber. Muscle from a 36-year-old woman with dysferlinopathy shows a necrotic fiber with pinkish cytoplasm that reflects liquefaction of the cytoplasm immediately after necrosis. Macrophages are also observed. (Hematoxylin and Eosin)

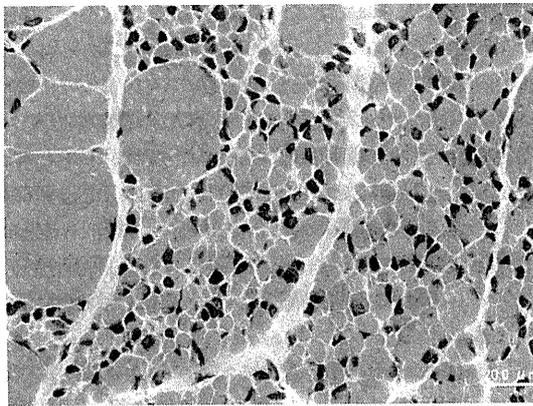


Fig. 2 Large group atrophy. Muscle from a 2-year-old girl with spinal muscular atrophy 1 (or Werdnig-Hoffmann disease) shows fascicles solely composed of round atrophic fibers. (Hematoxylin and eosin)

し、これらの小角化線維は、神経原性疾患においては脱神経筋線維を反映しているものと考えられるが、小角化する原因は様々であり、小角化線維がすなわち神経原性変化を意味するわけではない。神経再支配を受けた後、さらに脱神経がおこると、その末梢神経の支配領域の筋線維が数本から数十本単位でまとまって小角化する。これを小群集萎縮 (small group atrophy) という。程度がいちじるしく、筋束全体が萎縮するようなばあいもあり、このようなばあいには大群集萎縮と呼ばれる。いずれも脱神経を反映する重要な所見である。

筋線維壊死・再生変化は、筋ジストロフィーにおけるもっとも重要な所見である。われわれは、たとえ所見がなくとも、筋線維壊死・再生変化が無かったと記載するようにしている。筋線維は壊死すると、筋線維細胞質が溶解して薄いピンク色になり、内部にマクロファージが侵入する (Fig. 3)。これと平行して、筋衛星細胞から分裂した筋芽細胞が壊死線維内で分化して更に融合し、筋線維を再生する。再生線維は盛んにタ

ンパク質を合成しているために、核が大きく、核小体がめだつ。さらには、核や細胞質にタンパク質合成装置であるリボソームが充満しているために好塩基性に青みがかって染色される。再生線維では、筋核は筋線維内部にあるが (内在核と呼ぶ)、再生が完了するころ筋線維周辺部へと移動する。

筋ジストロフィーは、壊死・再生をくりかえす疾患であるため、一つの切片内で壊死から再生完了までの様々なフェーズが観察される。一方、発作性ミオグロビン尿症などにより、一時期に一斉に壊死をおこした筋では、筋生検の時期に応じて壊死または再生の一定のフェーズの像しか観察されないことが多い。また、デュシェンヌ型など筋鞘膜脆弱性を病態とする筋ジストロフィーでは、数本単位で壊死・再生線維がまとまって存在していることが多い。

内在核は再生線維で見られることは述べたが、再生以外にも筋核が内在するばあいがある。たとえば、先天性ミオパチーの一つである中心核ミオパチーでは、大半の筋線維で筋線維中心部に筋核が存在している (Fig. 4)。したがって、内在核といわず、とくに中心核という言葉が使用される。また、筋強直性ジストロフィーではしばしば多数の内在核をみとめる。

炎症細胞浸潤は炎症性筋疾患の重要な所見である。周鞘内の血管周囲のリンパ球浸潤をみとめることが多いが、軽度のものとは非特異的にみとめられることがある。多発筋炎や封入体ミオパチーでは、内鞘へのリンパ球浸潤が特徴的で、非壊死性線維をかこむようにして存在し、時には筋線維内部へも侵入しているのが確認される。これらのリンパ球は CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞であることがわかっている。サルコイドミオパチーでは、周鞘や内鞘に類上皮細胞と Langhans 巨細胞からなる非乾酪性肉芽腫をみとめる。周辺部にはリンパ球をともしなう。

時に筋線維内に空胞をみとめることがある。Pompe 病では、内部に好塩基性で不定型な物質をふくんだ比較的大きな空胞がみとめられる。この空胞はグリコーゲンや細胞質分解

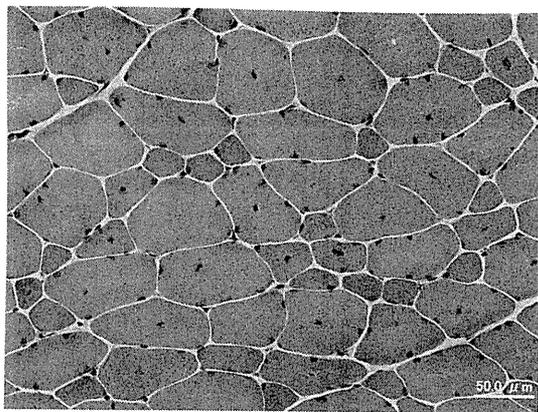


Fig. 4 Centronuclear myopathy. This 15-year-old boy has centrally-placed nuclei in almost all fibers. A dominant mutation in dynamin 2 gene was later confirmed. (Hematoxylin and Eosin)

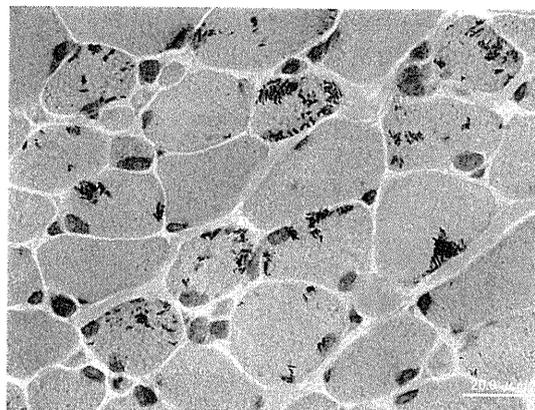


Fig. 5 Nemaline bodies. This 3-year-old girl has nemaline bodies in scattered fibers. Based on this finding, this patient was diagnosed as nemaline myopathy. (modified Gomori trichrome)

Table 3 Structures detectable on modified Gomori trichrome.

赤～赤紫色
1. ネマリン小体
2. 細胞質小体 (cytoplasmic body)
3. tubular aggregates
4. 縁取り空胞 (rimmed vacuole)
5. 赤色ぼろ線維 (ragged red fiber)
6. 末梢神経髄鞘
緑色
1. spheroid body
2. 線維組織

産物が蓄積した自己食空胞であり、酸フォスファターゼ染色で濃染する。脂質蓄積性ミオパチーでは、脂肪滴の増加を反映して筋線維内に小空胞をみる。糖尿病のうち、脱分枝鎖酵素欠損症などでは筋鞘膜直下を中心に比較的大型の空胞がみられる。内部にはグリコーゲンが蓄積している。その他にも異常があれば記載する。たとえば、炎症性ミオパチーではしばしば血管壁が肥厚している。また、結節性動脈周囲炎では血管壁のフィブリノイド壊死をみとめる。

## 2. ゴモリ・トリクローム変法

ゴモリ・トリクローム変法 (modified Gomori trichrome : mGT) は、基本的に特殊な構造物を染め出すための染色方法である (Table 3)。ネマリン小体はネマリンミオパチーで観察される (Fig. 5)。電顕的には、Z線と同様の電子密度ならびに構造を有している。ネマリンミオパチーは通常先天性ミオパチーに分類される遺伝性疾患であるが、成人発症型ネマリンミオパチーと呼ばれる一群は、免疫異常などを背景として二次的にネマリン小体を形成する疾患と考えられており、区別して考える必要がある。

mGT では、細胞内小器官のミトコンドリアやライソゾームが赤染する。そのため、自己食空胞の集塊である縁取り空胞の縁の部分は赤～赤紫色に染色される。縁の部分は細かな赤

紫色の顆粒で構成されており、電顕で観察すると、この顆粒1個が自己食空胞ないしはその類縁構造物であるミエリン様小体 (myeloid body) 1個を反映している。ヘマトキシリン・エオジン染色では紫色に染まる。縁取り空胞の空隙は、多数の自己食空胞が光顕標本作製段階でスライドガラスから剥がれてしまうためにできた人工産物であり、電子顕微鏡的観察ではこのような空隙はみとめられない。縁取り空胞は幅広い筋疾患で観察されるが、とくに封入体筋炎、眼咽頭筋ジストロフィー、多くの遠位型ミオパチーなどで診断的所見となっている。

赤色ぼろ線維 (ragged red fiber : RRF) は、筋線維内のミトコンドリア増加を反映して、筋線維全体が赤色に染色されたものである。mGT でもちいられている色素の特性から、赤色が強い部分はひび割れてくる。そのため、赤色ぼろ線維との名がついた。ミトコンドリアはとくに筋線維周辺部で増加するため、比較的早期の RRF では筋鞘膜直下に赤色の顆粒が増加したようにみえる。RRF はミトコンドリア脳筋症の診断的所見であるが、加齢変化でも生じるため、高齢者では正常でもみとめられることに注意が必要である。

Cytoplasmic body は、デスミンやミオチリンなど、Z線やその周辺の構造タンパク質を中心としたタンパク質の凝集体であり、筋原線維性ミオパチー (myofibrillar myopathy) で特徴的にみとめられる。ただし、筋原線維性ミオパチー以外でもみとめられることがあるので注意が必要である。次に述べる NADH-TR 染色では抜けてみえる。やや緑色に染色されるタンパク質凝集体は spheroid body と呼ばれることがある。

Tubular aggregates は、電子顕微鏡的には筋小胞体由来と考えられる管状構造が規則正しく集まった構造物である。ゴモリ・トリクローム変法で赤染し、NADH-TR 染色で濃染する。タイプ 2B 線維にのみ出現する。周期性四肢麻痺でみられることが多いが、tubular aggregates の出現を特徴とするまれな進行性家族性ミオパチーの報告もある<sup>2)</sup>。

その他、mGT は、末梢神経の髄鞘を赤く染めるので、筋内

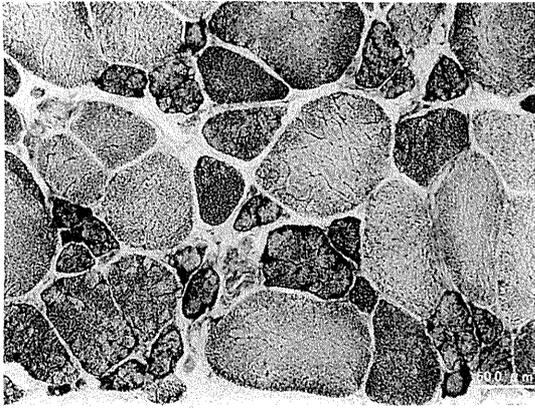


Fig. 6 Lobulated fibers. Atrophic type 1 fibers (darkly stained fibers) have disorganized intermyofibrillar network, showing lobulated appearance. Lobulated fibers are typically seen in the advanced stages of limb girdle muscular dystrophy 2A. Indeed, a homozygous mutation was identified in calpain 3 gene in this 57-year-old man. (NADH-tetrazolium reductase)

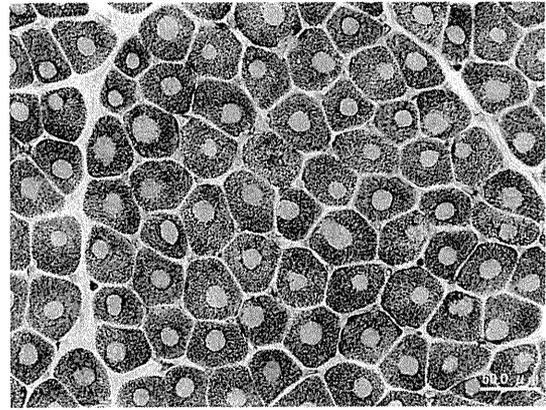


Fig. 7 Central cores. Virtually all fibers have well-demarcated and centrally-placed cores. Note that all fibers are in the same color, suggesting all fiber types are the same. In typical central core disease, almost all fibers are type 1, just as this patient. RYR1 gene mutation was later confirmed in this 8-year-old girl. (NADH-tetrazolium reductase)

神経束内の有髄神経の評価に有用である。ただし、光顕レベルでは、有髄神経が保たれているか脱落しているかを評価できるだけで有り、軸索変性が脱髄なのかは判断できないことに注意が必要である。

### 3. NADH-テトラゾリウム還元酵素

NADH-テトラゾリウム還元酵素 (NADH-tetrazolium reductase : NADH-TR) は、NADH 存在下で nitro blue tetrazolium (NBT) を還元して青色に発色させる酵素組織化学染色である。NADH を補酵素とする各種脱水素酵素の活性を反映する。筋線維内では、筋小胞体、ミトコンドリア、ライゾソームが主に染色される。ミトコンドリアはタイプ1線維に多いことから、タイプ1線維はタイプ2線維よりも濃染する。したがって、次に述べるミオシン ATPase 標本がないばあいには、簡易の筋線維タイプ分別を NADH-TR でおこなうことが可能である。筋小胞体は、筋原線維の周囲を一本一本取り巻いて分布しているため、NADH-TR 染色では筋線維内に筋原線維と筋原線維の間隙を結ぶ網状の構造が染め出される。これを筋原線維間網 (intermyofibrillar network) と呼ぶ。筋原線維間網の配列の乱れをみることで、間接的に筋原線維の配列の乱れを評価することができる。そのため、NADH-TR は、主に筋原線維の配列の乱れを評価するのにもちいられる。

筋原線維間網の異常として代表的なものとして、分葉線維 (lobulated fiber)、虫食い線維 (moth-eaten fiber)、コア (core)、マルチミニコア (multiminicore)、target/targetoid 線維、peripheral halo などがある。

分葉線維は、calpain 3 遺伝子変異を原因とする肢帯型筋ジストロフィー 2A 型の進行期に典型的にみとめられる (Fig. 6)<sup>3)</sup>。ただし、他の肢帯型筋ジストロフィーやベッカー型筋ジストロフィーなどでもみとめられることがあるので、注意が必要である<sup>4)</sup>。虫食い線維は疾患特異性が乏しく、内分泌異常や中毒性ミオパチーなどをふくむ幅広い筋原性疾患で出現す

る。また筋炎の傍炎症部でもしばしばみとめられる。

コアは、典型的にはセントラルコア病でみとめられる (Fig. 7)。コア部分はミトコンドリアや筋小胞体を欠いているため染色されないが、筋原線維自体は存在する。ただし、Z 線が乱れている。典型的なセントラルコア病では、RYR1 遺伝子の C 端コード領域に変異部位がある<sup>5)</sup>。マルチミニコアはマルチミニコア病でみられるが、虫食い線維との鑑別が難しいばあいもある。

Target/targetoid はコアと似ているものの、縦断面でみれば、コアが典型的には筋線維全長にわたりみとめられるのに対して、target/targetoid 構造の長さは様々で、全長にわたることはない。ただし、本質的には同じ構造変化であると考えられる研究者もいる。中心部にはしばしば spheroid body をみとめる。基本的に疾患特異性はないが、多数みとめられるばあいには神経原性変化を反映していることが多い。

X 連鎖性ミオチューブラーミオパチーでは、ほぼすべての筋線維が小径で丸みを帯びている。NADH-TR では筋線維中心部の染色性が増加する一方で、周辺部が抜けてみえる。これを peripheral halo と呼ぶ (Fig. 8)。先天性筋強直性ジストロフィーの一部の例でも同様の所見を呈することがあるので、注意が必要である。

### 4. ミオシン ATPase

筋線維のタイプ分別のための染色である。各筋線維タイプのみオシン ATPase が活性を持つための至適 pH がことなることを利用して、一定の pH 下で前処理をしてから活性染色をおこなうことで各筋線維タイプを染め分ける。正常ヒト骨格筋では、タイプ1、タイプ2A、タイプ2B の3つの筋線維タイプがあり、約1/3ずつモザイクを成して分布している。病的筋では、これに加えて未熟性を反映したタイプ2C線維が出現する。アルカリ側 pH (pH 10.6 付近) の前処理では、タイプ1線維のみオシン ATPase 活性が失われ、タイプ2線維の

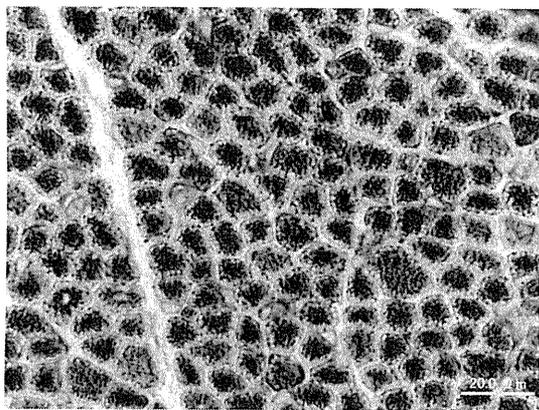


Fig. 8 Peripheral halo. All fibers are round in shape and small in size. In addition, enzyme activity is high in the center while it is scanty in the periphery of muscle fibers. This is a diagnostic finding of myotubular myopathy. The diagnosis of X-linked myotubular myopathy was later confirmed in this 3-month-old boy by *MTM1* gene analysis. (NADH-tetrazolium reductase)

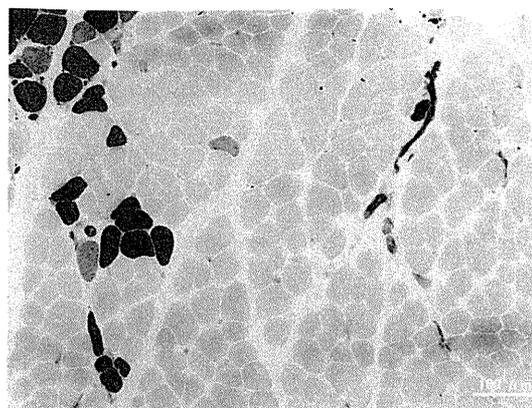


Fig. 9 Fiber type grouping. Mosaic pattern is lost and type 1 fibers (white color) are clustered. Note that there are a few type 2C fibers that are stained in intermediate color. Fiber type grouping reflects reinnervating process. This 1-year-old girl has arthrogryposis multiplex congenital of neurogenic origin. (myosin ATPase with preincubation at pH 10.6)

み染色される。一方、酸性側 (pH 4.2 付近) では逆に、タイプ 1 線維のみが染色される。pH を 4.2 付近より少し上げると、pH 4.6 付近でタイプ 2B のみ中間色で染色されるようになる。タイプ 2C 線維は、どの pH で前処理しても活性が残る。このような染色性の差をみることで、各筋線維タイプを分別することができる。

タイプ 1 線維はいわゆる赤筋であり、ミトコンドリア内での脂肪酸の  $\beta$  酸化による ATP 合成を主なエネルギー源としている。ゆっくりと収縮することから生理学的には遅筋と呼ばれ、姿勢保持に働く抗重力筋は主にタイプ 1 線維である。一方、タイプ 2A および 2B 線維はいわゆる白筋であり、解糖系によるグリコーゲン分解を主なエネルギー源としている。速い収縮をすることから生理学的には速筋と呼ばれる。

タイプ 2C 線維は未熟な筋線維である。正常ではほとんどみられない (1% 以下)。筋線維タイプは脊髄前角細胞が決定している。胎生期、筋線維が形成される過程で筋芽細胞が融合してできる筋管細胞はすべてタイプ 2C 線維であり、神経支配を受けてはじめて筋線維タイプが決定する。したがって、標本内にタイプ 2C 線維をみとめたばあいには、神経支配を受けない未熟な筋線維の可能性を考える。具体的には、1) 筋分化遅延、2) 再生線維 (筋再生は発生の過程をくりかえす)、3) 脱神経のいずれかである。たとえば、先天性筋強直性ジストロフィーでは筋分化が遅れており、出生後も多数のタイプ 2C 線維をみとめる。筋ジストロフィーなどでみられる再生線維は、基本的にすべてタイプ 2C である。また、脱神経を受けた線維は、神経再支配を受けるまでは一旦タイプ 2C 線維となる。

タイプ 1 線維の選択的な萎縮がみられるばあいは、ほぼまちがいがなく筋原性疾患である。とくに、ネマリンミオパチーなどの先天性ミオパチーでは、大部分の例でタイプ 1 線維萎縮をみとめる。タイプ 1 線維が 55% 以上を占めるときは、タイ

プ 1 線維優位と呼ぶが、先天性ミオパチーでは、タイプ 1 線維萎縮に加えて、しばしばタイプ 1 線維優位とタイプ 2B 線維欠損をとまなっている。先天性ミオパチーのうち、タイプ 1 線維萎縮をみとめるもののネマリン小体や中心核などの他の先天性ミオパチーの疾患特徴的所見を欠くばあいは、先天性筋線維タイプ不均等症 (congenital fiber type disproportion : CFTD) と呼ばれる。タイプ 1 線維萎縮は、先天性ミオパチー以外にも筋強直性ジストロフィーやベッカー型筋ジストロフィーなど、幅広い筋原性疾患にみとめられる。

一方、タイプ 2 線維萎縮 (とくにタイプ 2B 線維萎縮) は疾患特異性が低く、廃用性萎縮、低栄養、中枢神経障害、ステロイドミオパチーなどでみとめられる。

神経原性疾患があり、脱神経がおこると一旦タイプ 2C 線維になることは述べた。脱神経がおこると、神経連絡が保たれている軸索から sprouting がおこり、脱神経筋は神経再支配をうける。この際、神経再支配を受けた筋線維のタイプは再支配をおこなった脊髄前角細胞によって規定される。本来、正常では、ことなる前角細胞によって神経支配を受けたタイプのことなる筋線維がモザイク状に入り交じって分布している。ところが、神経再支配がおこると、近接する筋線維が同一の前角細胞によって支配されるようになり、モザイクパターンが崩れて同一の筋線維タイプがまとまって存在するようになる。これを筋線維タイプ群化 (fiber type grouping) という (Fig. 9)。

##### 5. その他の染色

PAS はグリコーゲンを、oil red O は中性脂肪を染色するため、それぞれ、糖原病と脂質蓄積性ミオパチーの診断に有用である。酸フォスファターゼはライソゾーム酵素であり、ライソゾーム活性が高い貪食細胞などが染色される。アルカリフォスファターゼは、正常では小血管壁にのみ活性をみとめる。筋再生の一時期に発現するため、もし活性を持つ筋線維があれば

ば、それは再生線維である。また、多発筋炎や皮膚筋炎の22%に、周鞘でのアルカリフォスファターゼ活性亢進をみとめる<sup>6)</sup>。Menadione-linked  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenaseは還元小体の同定にもちいる。アセチルコリンエステラーゼ(AChE)は神経筋接合部を染色する。ある種の先天性筋無力症候群では筋鞘膜に全周性に発現をみとめる。Danon病などの自己貪食空胞性ミオパチーでは、筋線維内の空胞の膜にジストロフィンなどの筋鞘膜タンパク質とともにAChEが発現している。このような空胞はautophagic vacuoles with unique sarcolemmal features (AVSF)と呼ぶ<sup>7)</sup>。

コハク酸脱水素酵素(succinate dehydrogenase : SDH)とチトクロームc酸化酵素(cytochrome c oxidase : COX)は、ともにミトコンドリア呼吸鎖酵素である。MELASのばあいには、筋内血管壁でのミトコンドリア増加を反映してSDHで血管が濃染する。これをstrongly SDH-reactive blood vessel (SSV)と呼ぶ<sup>8)</sup>。ミトコンドリア脳筋症のばあいに、ミトコンドリアDNA変異体の比率が高い筋線維ではCOX活性が欠損するものの、ミトコンドリアDNA変異体の比率の低い筋線維では活性が保たれる。これをCOX部分欠損(focal COX deficiency)という。糖尿病であるMcArdle病や垂井病はそれぞれ筋フォスホリラーゼ、フォスホフルクトキナーゼで染色性が低下することで診断がつく。

### おわりに

筋病理学は伝統的に、病理学者ではなく、臨床医が育ててきた学問である。それだけに、筋病理は臨床神経学の一部として、臨床医が基本的知識を持つべき分野である。加えて、筋生検標本には検体採取・固定・搬送の過程で人工産物が入りやすく、筋病理診断の成否の半分は、臨床医の検体の取り扱い方に掛かっているとみえる。筋病理診断における臨床神経内科医の役割はきわめて大きいことを強調しておきた

い。

謝辞：本稿作成に協力をいただいた米国衛生研究所のMay Christine V. Malicdan博士、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部の梶野幸子医師、佐藤孝俊医師、三橋里美医師、米川貴博医師に感謝いたします。

### 文 献

- 1) 埜中征哉. 臨床のための筋病理. 第4版. 東京: 日本医事新報社; 2011.
- 2) Cameron CH, Allen IV, Patterson V, et al. Dominantly inherited tubular aggregate myopathy. *J Pathol* 1992;168:397-403.
- 3) Gallardo E, Saenz A, Illa I. Limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Handb Clin Neurol* 2011;101:97-110.
- 4) Figarella-Branger D, El-Dassouki M, Saenz A, et al. Myopathy with lobulated muscle fibers: evidence for heterogeneous etiology and clinical presentation. *Neuromuscul Disord* 2002;12:4-12.
- 5) Wu S, Ibarra MC, Malicdan MC, et al. Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* 2006;129:1470-1480.
- 6) Cros D, Pearson C, Verity MA. Polymyositis-dermatomyositis: diagnostic and prognostic significance of muscle alkaline phosphatase. *Am J Pathol* 1980;101:159-176.
- 7) Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003;3:64-69.
- 8) Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, et al. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 1991;29:601-605.

**特 集** 神経・筋疾患の新規治療

## 縁取り空胞を伴う遠位型 ミオパチーの病態と治療戦略\*

● 西野一三\*\* / May Christine V. Malicdan\*\* / 野口 悟\*\*

**Key Words** : DMRV/hIBM, rimmed vacuole, *GNE*, sialic acid, ManNAc

### はじめに

大部分の筋疾患は近位筋優位の筋障害をきたす。しかし、筋疾患の中にも例外的に遠位筋優位の筋障害をきたすものがあり、遠位型ミオパチーと総称される。世界的には少なくとも14種類の遠位型ミオパチーが報告されているが、本邦で診断が確立している遠位型ミオパチーは、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV)、三好型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチー (oculopharyngodistal myopathy : OPDM) の3種類のみである。

縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) は、1981年に埜中らにより国際的に初めて報告された疾患であり、諸外国ではしばしば、埜中ミオパチー (Nonaka myopathy) と呼ばれている<sup>1)~3)</sup>。またこの疾患は、1984年にイスラエルのArgovらにより rimmed vacuole myopathy sparing the quadriceps あるいは quadriceps sparing myopathy (QSM) として報告され<sup>4)</sup>、その後、主に欧米で遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy :

hIBM) と呼ばれている疾患<sup>5)</sup>と同一疾患である<sup>6)</sup>。ただし、炎症性筋疾患である封入体筋炎 (inclusion body myositis : IBM) と同じ略語が用いられて混乱しやすいことから hIBM という病名に批判的な考え方も多い。本邦では歴史的に DMRV の病名が用いられている。

### 臨床と筋病理所見

本邦の患者の大部分は孤発例である。一般に発症年齢は15歳から40歳で、男女ともに侵される<sup>1)~3)</sup>。前脛骨筋が好んで侵され、スリッパが脱げやすい、あるいは段差でつまずきやすいなどの垂れ足の症状で異常に気づくことが多い。頸部屈筋群、傍脊柱筋、大腿後面の膝屈筋群も侵されやすいが、比較的後期まで大腿四頭筋が保たれる。筋力低下と筋萎縮は進行し、発症から平均12年で歩行不能となる。ただし、遺伝子診断が可能となってからは患者によりかなり進行速度に差があることがわかってきている。正確な患者数を知ることは困難であるが、われわれが行っている筋病理診断サービスでの検体数からの推計では150~400人程度と考えられる。すでにこれまでにわれわれの施設だけでも150名以上の患者が遺伝子診断で確認されていることから、おそらく本邦には200名を越える患者が存在するものと考えられる。現在までにさまざまな

\* Pathophysiology and therapeutic strategy of distal myopathy with rimmed vacuoles.

\*\* Ichizo NISHINO, M.D., Ph.D., May Christine V. MALICDAN, M.D., Ph.D. & Satoru NOGUCHI, M.D., Ph.D.: 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部〔〒187-8502 東京都小平市東町4-1-1〕; Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

国と地域から患者が見出されているが、現状では、本邦での患者数が世界最多と考えられる。

筋病理ではしばしば小角化した萎縮線維を認めるとともに縁取り空胞(rimmed vacuole)が観察される<sup>1)~3)</sup>。縁取り空胞を電子顕微鏡で観察すると、自己貪食空胞あるいはその類縁構造物であるミエリン様小体(myeloid body)が集塊をなしている<sup>1)~3)</sup>。核内および細胞質の一部には直径15~20nmの管状線維性封入体(tubulofilamentous inclusion)を認める<sup>1)~3)</sup>。縁取り空胞にも管状線維性封入体にも疾患特性はなく、縁取り空胞が出現する疾患ではほぼ例外なく管状線維性封入体が認められることに注意が必要である。

しばしば筋線維内にβ-アミロイドの沈着やリン酸化タウ蛋白質を認め、Alzheimer病類似の変性過程が存在すると考えられている<sup>1)~3)5)</sup>。また、ユビキチン・プロテアソーム系の活性化やアポトーシスの関与を示唆するデータもあり、さまざまな変性のプロセスが知られている。

### 原因遺伝子と遺伝子変異

DMRV/hIBMの原因遺伝子は第9染色体上のGNEである。このGNEはシアル酸生合成経路の律速段階を触媒する酵素UDP-N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ(UDP-GlcNAc 2-epimerase : GNE)と、その次の反応を触媒する酵素N-アセチルマンノサミン・キナーゼの二つの酵素活性をもつ蛋白質をコードしている。患者で見出されるほぼすべての変異がミスセンス変異であり、両アレルにnull変異を有する例は1例も報告されていない。

日本人ではp.V572L変異が一番多く、日本人患者アレルの半数以上を占めている。次に多いのがp.D176V変異で20%程度のアレル頻度である<sup>6)</sup>。ユダヤ人患者では大半の患者がp.M712Tを有している<sup>8)9)</sup>。これ以外にも世界各地から多くの共通変異が見出されてきている。

興味深いことに、GNE遺伝子にホモ接合型の変異を有しながら60歳を過ぎても無症状の健常者も存在する<sup>6)9)</sup>。このことは、GNE変異の存在のみがDMRV/hIBM発症の決定的な因子ではないことを意味している。いい換えるならば、このような因子を見出すことができれば治療法

開発の糸口となる可能性があることを意味している。

### 生化学的異常と分子病態

DMRV患者におけるGNE変異は機能喪失型変異であり、酵素活性が低下している<sup>6)</sup>。そのためシアル酸量が減少し、患者細胞ではシアリル化が減少している<sup>10)</sup>。シアル酸は細胞表面の糖脂質および糖蛋白質上のオリゴ糖の末端に広範に存在しており、細胞表面の保護や細胞の相互認識など多彩かつ重要な役割を担っていると考えられているが、依然としてどのようにしてシアル酸の低下がミオパチーをきたすかは不明である。

興味深いことに、GNE代謝産物であるN-アセチルマンノサミン(ManNAc)や最終産物(シアル酸)であるN-アセチルノイラミン酸(NeuAc)を患者培養細胞に投与すると、線維芽細胞、骨格筋細胞のいずれにおいても正常レベルまで細胞内シアル酸量が回復する<sup>11)</sup>。このことは、もし低シアリル化がミオパチーの原因であるならば、すでに*in vitro*で治療できていることを意味している。

### モデルマウス

GNE遺伝子のノックアウトマウス*Gne*<sup>-/-</sup>は胎生致死である<sup>12)</sup>。このことは、シアル酸生合成が哺乳類の発生にとって必須であることを意味している。事実、DMRV/hIBM患者で見出される変異はほぼすべてミスセンス変異であり、null変異のホモ接合体は見出されていない。

米国NIHのグループはユダヤ人患者に認められるp.M712T変異を有するノックインマウスの作製を行った。しかし、ホモ接合型マウスは重篤な腎障害を呈し、ほぼすべてが生後72時間以内に死亡した<sup>13)</sup>。妊娠母胎にManNAcを投与したところ12匹が誕生したが、9匹が12日までに死亡した。いずれのマウスにおいても筋障害を認めなかった。

われわれのグループは、まずGNEトランスジェニックマウス(hGNED176V-Tg)を作製した。このマウスは日本人患者で2番目に多いp.D176V変異を有するヒトGNEを高発現するものである<sup>14)</sup>。このhGNED176V-Tgマウスと*Gne*<sup>-/-</sup>のヘテロ接

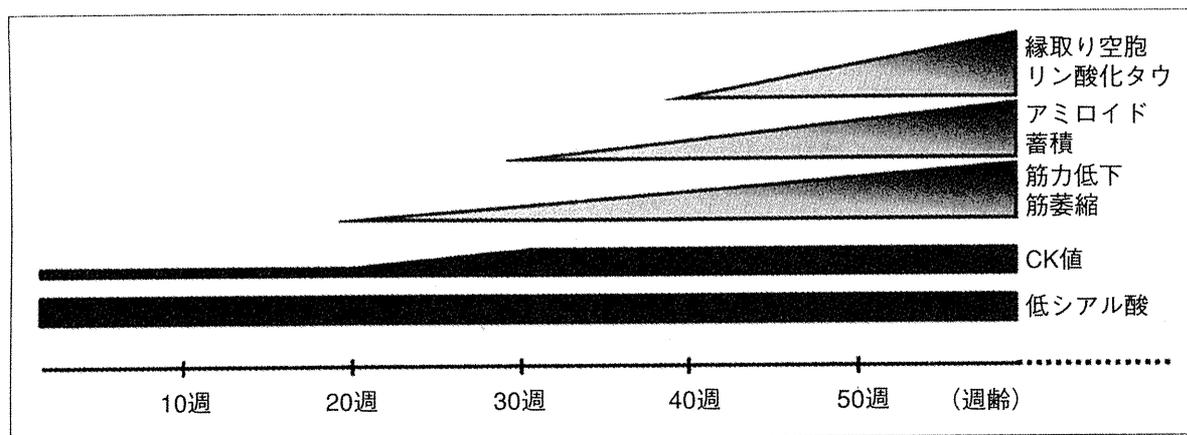


図1 DMRVモデルマウス

われわれの作製したモデルマウスは、20週過ぎから筋力低下と筋萎縮を、30週過ぎからβ-アミロイド沈着、40週過ぎから縁取り空胞やリン酸化タウを認める。さらに、血中CKが軽度上昇するとともに各種臓器でシアル酸が低下しており、臨床的・病理学的・生化学的にDMRV/HIBMを良好に再現している。

合体マウス ( $Gne^{-/+}$ ) を掛け合わせて、内在性のマウス  $Gne$  を欠き p.D176V 変異を有するヒト  $GNE$  のみを発現する DMRV マウス ( $Gne^{-/-}$  hGNED176V-Tg) を作製した<sup>14)</sup>。この DMRV マウスは生下時にはとくに異常を認めなかったものの、20週齢以降より筋力低下と筋萎縮を、さらにその結果として運動能力の低下を示した<sup>15)</sup>。また、CK 値も軽度に上昇した。30週齢からは骨格筋内β-アミロイド沈着、40週齢以降から縁取り空胞、リン酸化タウを認めるとともに、筋萎縮と筋力低下はさらに進行した。シアル酸は血中ならびに脳を除くすべての組織で著しく減少していた。つまり、このマウスは臨床的・病理学的・生化学的にヒト DMRV を良好に再現していたのである<sup>14)~16)</sup> (図 1)。

### モデルマウスを用いた治療研究

まず DMRV マウスに対して、離乳時から ManNAc を 3 種類の投与量 (低用量 20mg/kg/day, 中用量 200mg/kg/day, 高用量 2,000mg/kg/day) で飲水に混ぜ、連続投与した。その結果、いずれの用量においても、50週齢を越えても運動能力低下、筋萎縮、筋力低下、縁取り空胞形成、β-アミロイド沈着、リン酸化タウ、高CK血症などの所見をいずれも認めず、ほぼ完全に DMRV 発症を抑制できた<sup>17)</sup>。そこで次に、NeuAc ならびにシアリル乳糖を低用量 20mg/kg/day で飲水投与した。その結果、NeuAc、シアリル乳糖においても同様に、ほぼ完全に DMRV を抑制することに成功

した<sup>17)</sup>。ManNAc、NeuAc、シアリル乳糖の 3 種類の化合物間で有効性の違いはみられなかった。骨格筋内のシアル酸は正常の 70% 程度にまで回復していた。また、これら 3 種類の化合物の長期投与において肝機能と腎機能への毒性は認めなかった。これらの結果は、低シアル酸状態が確かにミオパチーの原因となっていること、外部から  $GNE$  代謝産物を投与することでミオパチーを予防できることを示している<sup>17)</sup>。今後は当然、この結果をヒトで試す必要、すなわち、臨床試験を行う必要がある。

### 低シアル酸とミオパチー

われわれはモデルマウスでの実験で、シアル酸代謝物投与により骨格筋のシアル酸レベルを上昇させることでミオパチー症状を抑制できることを示した<sup>17)</sup>。このことは、ミオパチー発症における体シアル酸状態の重要性を示している。それでは、低シアル酸状態がなぜミオパチーをきたすのであろうか。β-アミロイド蛋白質の分解にかかわる膜金属ペプチダーゼのネプリライシンにおいては、そのシアリル化がペプチダーゼ活性に必要なことから、脱シアリル化によりβ-アミロイド沈着をきたすと考える研究者もいる<sup>18)</sup>。依然として、病態が十分に解明されたとはいえないが、少なくとも、低シアル酸状態こそが DMRV におけるミオパチー症状発症の原因であることは間違いなく、DMRV はいわば先天的なシアル酸欠乏症であるといえる。

## これから進むべき道

基礎研究レベルではすでにシアル酸の有効性を示すことができた。シアル酸欠乏症であるDMRVにシアル酸を補充することはきわめて理にかなった治療法である。加えて、シアル酸は日常的に食事から摂取しているものであり本質的に毒性が高いとは考えられない。したがって早急に、ヒトにおけるシアル酸自体の有効性検証、すなわち治験の開始が求められている。しかし、DMRVのような希少疾病の治療薬開発は、仮に治験に成功したとしてもその費用を回収するためのマーケットが小さく、製薬会社にとってはきわめてリスクの高いプロジェクトである。そのため、希少疾病の治療薬開発に乗り出そうとする製薬企業は皆無に近いのが現状である。このような現状を克服しようと、遠位型ミオパチー患者会(<http://enigata.com>)が立ち上がり、署名活動など活発な活動を繰り広げている。今後は、患者、製薬会社、医師、研究者、国が一体となって開発を進めていくことが求められる。

基礎研究レベルでは、よりシアル酸増加効果の高い薬剤、あるいはシアル酸血中濃度の維持効果の高い治療法開発を目指していく必要がある。これは、マウスにおいてシアル酸投与を行っても、シアル酸量が増加するが完全に正常化できているわけではないこと、また、比較的速やかに尿中に排泄されてしまうことが明らかになっているからである。したがって、ヒトでも同様によりシアル酸増加効果は限定的である可能性があり、とくに患者では、モデルマウスよりも進行した状態で投与を受け始めることを考えると、よりシアル酸増強効果の高い薬剤が今後必要とされる可能性がある。

本邦では、欧米に比べて治療薬開発が困難とされる。希少疾病においてはなおさらであろう。実際、本邦でシーズから製薬まで行われた希少疾病薬は皆無に等しい。しかし、希少疾病であるとはいえ、日本は世界最多の患者をかかえると考えられること、また、基礎研究でのシーズ開発が日本において成されたことを考え合わせると、日本において、世界に先駆けて臨床試験から実際の治療薬開発までを行うことは、先進

国である日本の責務であるといっても過言ではない。

## 文 献

- 1) Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, et al. Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 1981 ; 51 : 141-55.
- 2) Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, et al. Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 1998 ; 8 : 333-7.
- 3) Nonaka I. Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 1999 ; 12 : 493-9.
- 4) Argov Z, Yarom R. 'Rimmed vacuole myopathy' sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *J Neurol Sci* 1984 ; 64 : 33-43.
- 5) Askanas V, Engel WK. Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies : current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 1998 ; 10 : 530-42.
- 6) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, et al. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 2002 ; 59 : 1689-93.
- 7) Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, et al. The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 2001 ; 29 : 83-7.
- 8) Eisenberg I, Grabov-Nardini G, Hochner H, et al. Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps. *Hum Mutat* 2003 ; 21 : 99.
- 9) Argov Z, Eisenberg I, Grabov-Nardini G, et al. Hereditary inclusion body myopathy : The middle Eastern genetic cluster. *Neurology* 2003 ; 60 : 1519-23.
- 10) Noguchi S, Keira Y, Murayama K, et al. Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 11402-7.
- 11) Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human

- sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 4228-37.
- 12) Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, et al. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 5267-70.
  - 13) Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, et al. Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 1585-94.
  - 14) Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, et al. A GNE knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 : 2669-82.
  - 15) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I. Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* 2008 ; 35 : 106-15.
  - 16) Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I. Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM : treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* 2008 ; 21 : 596-600.
  - 17) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, et al. Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* 2009 ; 15 : 690-5.
  - 18) Broccolini A, Gidaro T, De Cristofaro R, et al. Hyposialylation of neprilysin possibly affects its expression and enzymatic activity in hereditary inclusion-body myopathy muscle. *J Neurochem* 2008 ; 105 : 971-81.

\* \* \*

特集 神経・筋疾患とオートファジー

# オートファジー関連筋疾患\*

● 圓谷理恵\*\* / 埜中征哉\*\* / 西野一三\*\*

**Key Words** : autophagic vacuolar myopathy, Danon disease, Pompe disease, XMEA, DMRV

## はじめに

Autophagy(自己貪食)とは、細胞質内の蛋白や細胞内小器官を分解する機構である。Autophagyには不要になった蛋白質や細胞内小器官を除去・リサイクルして細胞内の恒常性を保つための恒常的なautophagyと、飢餓などのストレス下で細胞内エネルギーを産出するために誘導されるautophagyがある。

Autophagyの課程を簡略化すると、①まず二重膜構造が分解する蛋白質や細胞内小器官を取り囲みオートファゴソームを形成する、②オートファゴソームがライソソームと融合してオートライソソームになる、③ライソソームに含まれる加水分解酵素により分解されるという3段階からなる。この全課程で作られる各空胞構造を総称して「自己貪食空胞」と呼んでいる。

ライソソームは生体のほぼすべての細胞に存在する細胞内小器官である。膜に包まれた内部にはさまざまな加水分解酵素が含まれ、この酵素が効率よく作用するために至適pH4.5~5.0前後の酸性に保たれている。この加水分解酵素の分解産物は細胞内で利用されたり、exocytosis(開

表1 Autophagic vacuolar myopathyの分類

### <病態に基づく分類>

- ①ライソソームの構造・機能異常
- ②二次的に惹起されたオートファジー

### <骨格筋病理所見による分類>

- ①Pompe病
- ②AVSF関連ミオパチー：Danon病, XMEA
- ③RV関連ミオパチー：DMRV, IBMPFD, ほか

AVSF : autophagic vacuoles with sarcolemmal features, XMEA : X-linked myopathy with excessive autophagy, RV : rimmed vacuoles, DMRV : distal myopathy with rimmed vacuoles, IBMPFD : inclusion body myopathy, Paget's disease of bone and frontotemporal dementia.

口分泌)により細胞外に分泌されたりする。

## 自己貪食空胞性ミオパチー

正常の骨格筋・心筋組織ではライソソームや自己貪食空胞はみられない。しかし、筋線維内に多数の自己貪食空胞を認める一群の筋疾患が存在し、骨格筋病理所見に基づいて自己貪食空胞性ミオパチー (autophagic vacuolar myopathy : 以下, AVM) と総称される<sup>1)</sup>。AVMを病態および形態学的特徴に基づいて分類すると3群に大別される(表1)。

第一にライソソーム内の酵素異常によるPompe病がある。Pompe病では疾患特異的な筋線維全体を占める大きな空胞を認める。

\* Autophagic vacuolar myopathy.

\*\* Rie S. TSUBURAYA, M.D., Ikuya NONAKA, M.D., Ph.D. & Ichizo NISHINO, M.D., Ph.D.: 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部[〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1]; Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

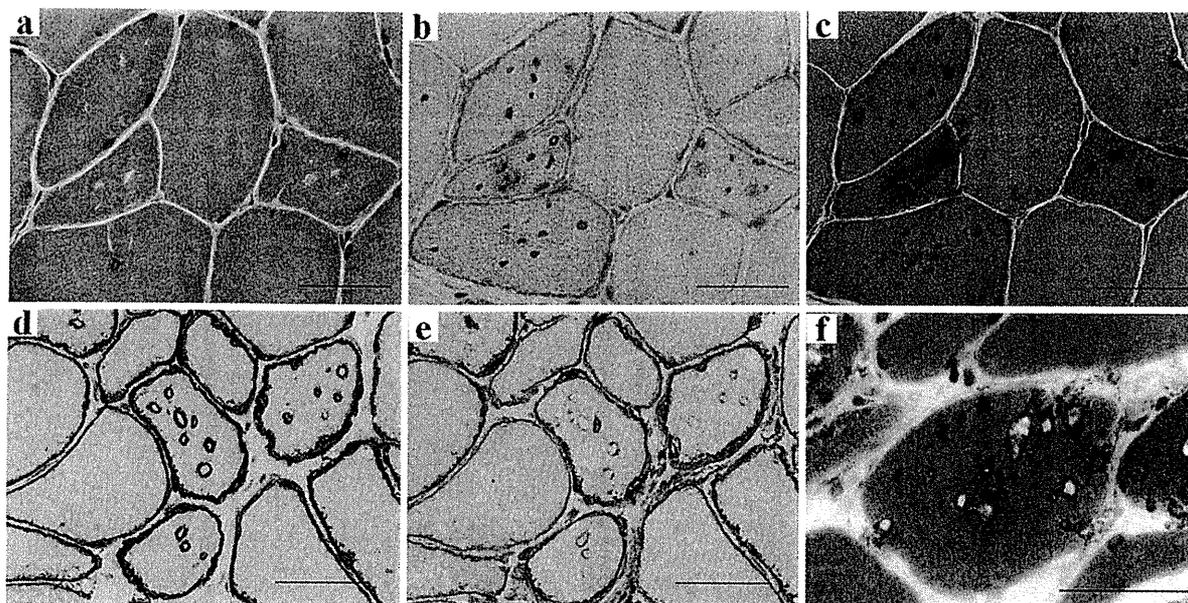


図1 Autophagic vacuoles with sarcolemmal features (AVSF)と縁取り空胞

小空胞(a:mGT)は、AChE染色およびNSE染色(b,c)で陽性に染色される。抗ジストロフィン抗体(d)や抗メロシン抗体(e)による免疫染色で陽性を呈する。縁取り空胞は、mGTで紫色の顆粒状の縁取りをもつ(f)(Bar 50 $\mu$ m)(HE:ヘマトキシリン・エオジン染色, mGT:Gomoriトリクローム変法, AChE:アセチルコリンエステラーゼ染色, NSE:非特異的エステラーゼ染色, ACP:酸フォスファターゼ染色—以下、略語は図2~6にも適用)。

第二にライソゾームの構造・機能異常によるDanon病およびX-linked myopathy with excessive autophagy(XMEA)がある。Autophagic vacuoles with sarcolemmal features(AVSF)と呼ばれる特徴的な空胞が出現し、AVSF関連ミオパチーとも呼ばれる。AVSFは筋線維内の小顆粒または小空胞として認められるが(図1-a)、空胞膜には本来では神経筋接合部にしか認められないはずのアセチルコリンエステラーゼ(AChE)が発現している(図1-b)。AChE活性があることから、AVSFは非特異的エステラーゼ(NSE)染色でも陽性を呈する(図1-c)。AVSFの膜は筋鞘膜の性質を有しており、ジストロフィンやメロシンなどの筋鞘膜構成蛋白を発現している(図1-d, e)。

第三に縁取り空胞(rimmed vacuole)と呼ばれる顆粒状の縁どりのある空胞の出現を特徴とする疾患がある(図1-f)。縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー(distal myopathy with rimmed vacuoles:以下、DMRV), inclusion body myopathy, Paget's disease of bone and frontotemporal dementia(IBMPFD), oculopharyngeal muscular dystrophy(OPMD), desminopathyなどが代表的である。おそらく、縁取り空胞は二次的に惹起

されたオートファゴゾーム・オートライソゾームの蓄積であろうと考えられている。ただし、縁取り空胞自体は他疾患でも非特異的にみられる所見なので注意が必要である。

## Pompe病

### 1. 病態

Pompe病はグリコーゲンをグルコースに加水分解する酵素acid- $\alpha$ -glucosidase(GAA)をコードするGAA遺伝子変異による常染色体劣性遺伝性疾患である。糖原病II型であると同時にライソゾーム病の一つでもある。糖原病の中でPompe病のみがAVMに含まれるのは、他の糖原病の原因酵素が細胞質内に存在するのに対してGAAが唯一ライソゾーム内に存在するからである。GAA欠損により分解ができないグリコーゲンはライソゾーム内に蓄積し、グリコーゲンが充満した自己貪食空胞が増加する。分解されないグリコーゲンが二次的に細胞質内にも蓄積しさらにautophagyが誘導される。筋線維内には自己貪食空胞が蓄積し筋線維障害が進行していく<sup>2)</sup>。

### 2. 臨床症状

発症年齢および症状の重症度は概ね残存酵素