

# 筋生検法

独立行政法人国立病院機構東埼玉病院

川井 充

神経筋疾患の検査法には、CT等の画像診断、筋電図、筋生検・神経生検等の病理学的検査があるが、生検は侵襲的検査であるゆえに、最終的な検査と位置付けられる。筋生検はかなり専門的な検査であるので、すべての神経内科医が自分で(あるいは自施設で)これを完結することはまず不可能である。しかしそれでは筋生検はすべて筋疾患の診断を専門とする施設に依頼するのがよいかというと、現実問題としてこれも無理な話である。なぜなら、専門施設は数が限られ、また多くの場合患者は移動が困難だからである。神経専門医としてできなければならないこと、できることが望ましいこと、専門家にまかせればよいこときちんとわかっていることが第一歩である。

筋生検の適応の判断、筋生検部位の決定、筋生検手術、採取した組織の処理の4つは神経内科専門医としては最低限自分で実施できることが求められる。連続切片の作成と基本的な染色は自施設で実施できることが望ましいが、これを習得するにはかなりの経験が必要である。ここでいう基本的な染色法はヘマトキシリン・エオジン染色、ゴモリ・トリクローム染色、NADH テトラゾリウム還元酵素染色の3つである。特殊な組織化学染色や免疫染色などを行って、まれな疾患を診断することは専門家にまかせてもかまわない。

## 1 適応の判断

筋生検を実施する前に丁寧な病歴聴取と診察により、いかなる疾患が疑われるかの的をしぼる必要がある。筋生検は筋電図などの電気生理学的検査と比べて侵襲性が高く、検索箇所も1か所に限られ、何度も実施することはできない。神経原性か筋原性かの判断は、両者が混在する特殊な場合を除いてほとんど筋電図で十分である。筋線維の壊死再生過程が活発か、脱神経が急速に進んであるかなどの情報も筋電図で得ることができる。筋生検でなければ情報が得られないのは1)炎症細胞浸潤や線維化などの間質の変化、2)筋原線維の変性やグリコーゲンなどの物質の蓄積、ネマリン小体などの特異的構造物の存在など筋線維そのものの構造的変化、3)ジスト

ロフィン染色など免疫組織化学的手法で証明される物質の欠損、4)筋材料を用いた遺伝子検査などである。

筋生検によって診断の確定が期待できるものを表1にまとめる。

表1 筋生検によって診断確定が期待できる疾患

炎症性筋疾患	皮膚筋炎 多発筋炎 封入体筋炎 サルコイドミオパチー 血管炎
免疫染色	筋蛋白の欠損ないし発現の異常 ジストロフィン サルコグリカン エメリン ジスフェルリン メロシン など
特異的構造物	ネマリン 中心核 コア
酵素化学	糖原病Ⅱ型 CCO 完全欠損
筋線維型の異常	先天性筋線維型不均等症
遺伝子解析	Kearns-Sayre 症候群

近年多くの遺伝性ミオパチーの原因遺伝子が明らかになってきた。疾患の頻度を考慮に入れると、9割以上の遺伝性ミオパチーは理論的には遺伝子を調べることによって診断可能である。しかし、原因遺伝子が解明されていることと、検査として遺伝子を調べることができることは同じではない。診断のための遺伝子検査が保険診療の対象となっているデュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの限られた疾患をのぞいて、診断サービスとして遺伝子検査を引き受ける検査室は限られており、単にその疾患の可能性があるというだけで、検査を依頼することは現実には無理がある。そのような場合、まず筋生検を実施して診断をしぼったあと、遺伝子検査を依頼するということが行われている。また進行性外眼筋麻痺/Kearns-Sayre 症候群のように遺伝子検査は筋生検材料を用いることが望ましい場合もある。

遺伝子検査の普及の度合いによって、遺伝子検査を先に行うかまず筋生検を行うかが異なるので、現在のめやすを表2にまとめる。これは遺伝子検査の普及によって今後変わってくる可能性がある。

表2 筋生検・遺伝子検査どちらを先に行うか

---

### 1 筋生検で診断する

ジスフェルリン異常症 エメリン異常症

サルコグリカン異常症 メロシン異常症

Kearns-Sayre 症候群

### 2 遺伝子検査を先に行うが筋生検が必要となることも多い

ジストロフィン異常症

### 3 遺伝子検査で診断する 筋生検は副次的な目的で行う

筋強直性ジストロフィー

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー

眼咽頭型筋ジストロフィー MELAS MERRF

---

## 2 筋生検部位の選択

筋肉は全身にある。しかし、診断に寄与する病変は限られた場所にしかないことがある。病変が強すぎると診断に役立たないことがある。どこから採取するかについて事前に十分検討しなければならない。これに関しては小児科と神経内科では診療する疾患の種類とその経過の長さの違いから基本的な考え方に多少の違いがあるようである(表3)。

表3 小児科と神経内科の立場の違い

---

小児科	神経内科
病気の経過が短い	病気の経過が長いこともまれでない
病気はひとつ	病気はひとつとは限らない
病変はどこでも同じ	病変は場所によって異なる
筋はどこにもある	筋は残っていないところもある
筋電図はむずかしい	筋電図はきちんとやれば信頼できる

---

その結果として小児科では以下の理由で一般的に上腕二頭筋から組織を採取することが多い。まず上腕は皮下脂肪が少なく容易に筋に到達できるので生検手技が簡単である。歩いて帰れるのも利点である。標本の中に神経筋結合部や筋紡錘、末梢神経が含まれることが多い。筋線維タイプが一定(1型、2A型、2B型がそれぞれ3分の1)であるので、所見の判断がしやすい。また、腱組織が少ないので標本の見栄えがよい。

一方、神経内科の場合はもう少し複雑である。ていねいに診察して適度の筋力低下と筋萎縮のある部分を選ぶ。症状は強すぎても弱すぎてもいけない。筋電図で所見のあるところを選ぶ。しかし過去の筋生検部位、最近筋電図を行った場所は避ける。画像診断が有用である。CTで脂肪化や萎縮の強いところは避け、筋炎を疑うならさらにMRIで炎症のあるところを選ぶとよい。脊椎症、外傷、糖尿病、飲酒の影響も考慮する。目的とする疾患で所見がでにくい筋があるので注意する。筋生検の経験のない部位は避けたほうがよい。当然ながら、小さくて機能障害を残す可能性がある筋は採取できない。

### 3 筋生検手術の実際

#### 1) 事前の説明と同意取得

現在疑われている病名と病態、筋生検の目的(何がわかることが期待されるか)、生検組織を用いて遺伝子検査を実施する可能性、代替可能なほかの検査、筋生検手術の手順、手術後の注意、危険性について説明し、文書で同意を得る。検体を他の施設に送る場合、検体を研究のために保存する場合はそれについての同意が必要である。

#### 2) 麻酔

小児は全身麻酔、成人は局所麻酔で行う。神経筋疾患の患者は悪性高体温症をきたす危険性が一般患者より高いといわれる。とくにリアノジン受容体の異常によるセントラルコア病では危険性が高い。全身麻酔でもスクサメトニウム(サクシン)やハロタン(フローセン)などの悪性高体温症を惹起する可能性が指摘されている薬剤は避け、静脈麻酔薬であるプロポフォールを使用することが推奨される。呼吸機能に障害のある患者では手術後抜管しにくい状態が生ずる危険性があるのでできるだけ局所麻酔で実施する。局所麻酔薬は筋の壊死をひきおこすことが知られており、皮内お

よび皮下の投与のみにとどめ、決して筋膜より下に投与してはならない。エピネフリンの入った局所麻酔薬を用いると出血が少ないが、心筋障害を合併する患者では不整脈を誘発する可能性があるので要注意である。

### 3) 筋生検査の手順

筋生検の手順を図1に示す。

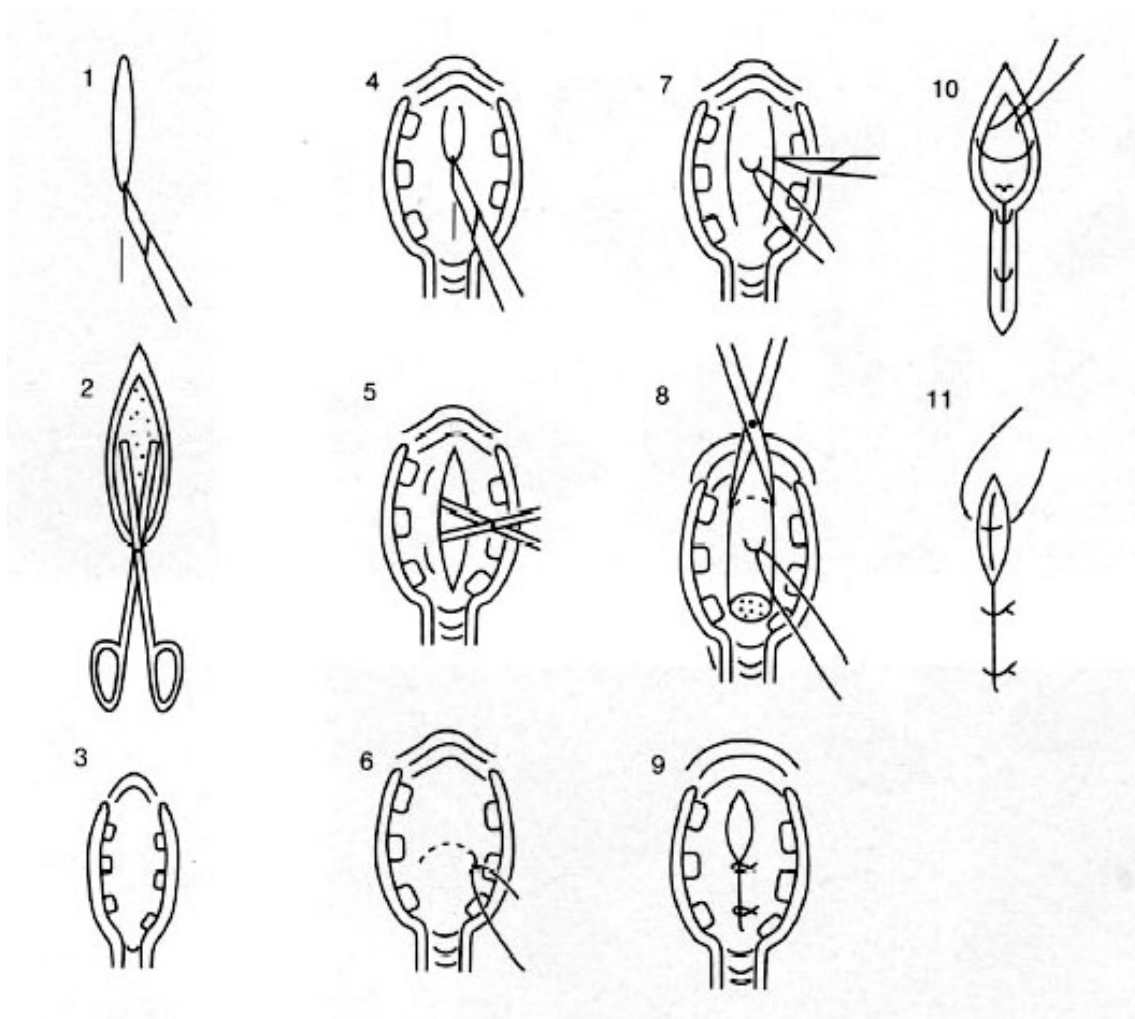


図1 筋生検の手順 説明は本文参照

1 皮膚切開の前にその部位の筋が収縮するか肉眼で確認する。確実に収縮がある部分から採取することが原則である。切開部位はあらかじめマーキングする。3 cm程度の切開をおく。

2 鉗子を用いて皮下組織を鈍的に開き、筋膜に到達する。このとき血管や神経が現れることがある。たまた無視できない血管や皮神経に遭遇することがあるが、血管は切斷するときは結紮し、皮神経はできるだけ温存する。

- 3 開創鉤を引く助手がいなるときは、図のように開創器をかけて視野を広くとるようにする。
- 4 筋膜を切開する。メスを使ってもよいしハサミを用いてもよい。メスを使うときは皮膚を傷つけないように注意する。
- 5 鉗子で筋膜の裏を剥離する。
- 6 再度鉤または開創器をかけなおし、筋の表面をできるだけ広く露出する。
- 7 筋線維の走行と直角に糸をかける。筋を切離するときに採取する組織を持つためであり、かるく結んでよいが決してつよくしぼるように結んではいけない。
- 8 採取する筋組織の側面と裏を尖剪かメスなどで筋線維の走行方向に切り、必要な量の筋束を確保する。まがりペアンを裏に通してこれを開くと長い距離にわたって採取すべき筋組織が浮き上がってくる。ここから筋の採取までの手順は麻酔なしで行わなければならないので、局所麻酔の場合はできるだけ短時間で行う。筋組織を採取する。採取する組織が大きいときは、上端と下端を少しずつ交互に切っていくと切除する筋組織が収縮せず、切りやすい。筋組織採取後は創を圧迫し止血されていることを十分に確認する。
- 9 デキソンなどの吸収糸を使って筋膜を縫合する。通常 3 針程度。
- 10 抜糸後の創の離開を防ぐ目的で吸収糸を用い真皮縫合を行うことがある。結び目が下にくるように糸を通すことに注意する。
- 11 ナイロン糸を用いて皮膚を縫合する。最後に縫合面をきちんとあわせ、消毒して終了。

#### 4 採取した筋組織の処理

採取した筋の処理まで少し時間があるときは、乾燥しないようにスピッツなどに入れてふたをして密閉する。絶対に生理食塩水などにつけてはいけない。スピッツの底に生理食塩水でぬらしたガーゼを置くのはよいが、十分しぼって水がしみだしてこないように注意する。水滴が検体につくのは好ましくない。

採取した筋組織の処理を行う上で知っておく重要なことは次の 3 つである。

第 1 に筋生検では最も重要な情報は凍結ブロックから得られる。組織化学と免疫組織化学による情報が大きいからである。第 2 に横断面(筋線維の方向に垂直な面)の切片を作らなければならない。横断面でないと筋線維径が測定できないからで



ある。また連続切片に対して様々な染色をほどこすことによって、1本1本の筋線維の所見を様々な染色法を対比しながら観察できるようでなければならないからである。第3にパラフィン包埋標本、電顕用標本も有用である。なぜなら間質病変の観察にはパラフィン包埋標本が優れており、筋線維内の特異的構造を詳細に観察するには電顕が不可欠であるからである。生検を行った直後に検体を適切に処理することなしに、あとから標本を作ることは絶対に不可能である。

凍結、ホルマリン固定、電顕用固定の3通りの処理を行うために、検体を3つに分割する。検体が得られたらはじめに筋束の方向性を確認し、全体をどのように分割するかをよく考える。通常凍結ブロックに主要な部分をあてる。筋組織の採取時に糸をかけた部分は分割時まで糸を残し、この部分が標本にならないように気をつける。

#### 1) 凍結ブロック

剃刀で断端の形を整えた後、小さなコルクの台の上にトラガカントゴム、あるいは凍結組織切片作製用包埋剤(ティシュー・テック O.C.T.コンパウンド)を用いて筋組織を垂直に立てる。凍結組織切片作製用包埋剤を用いるときはあくまでも「のり」として使い、決してこれに材料を包埋してはいけない。ここで筋束の方向が垂直になっていないと、切片を作ったときに横断面にならない。台の部分を大きな鑷子ではさみ倒さないように液体窒素で冷やしたイソペンタンの中に急速に入れて凍結する。検体は冷却したイソペンタンの中に入れて直後から20秒ほどイソペンタンの中で激しく震盪する。決して組織を直接液体窒素に入れて凍結してはならない。組織の表面に気泡が生じ、熱の伝達を妨げるために、組織がゆっくり凍ることになり、大きな氷の結晶ができて標本の観察が著しく妨げられる。同様にディープフリーザーにおいて徐々に凍結させてはならない。

なお、イソペンタンは容器ごと液体窒素の中に入れ、容器の内壁に白く凍結するまでかきまぜながら冷却する。イソペンタンが凍り始めたということは、イソペンタンがその凝固点である $-160^{\circ}\text{C}$ まで冷却され、さらにかきまわすことで過冷却状態になっていることが期待される。液体窒素の温度は $-196^{\circ}\text{C}$ であるので、イソペンタンを液体窒素のなかに入れ続ければすべて凍結して液体相がなくなり、病理材料を凍結することはできなくなる。イソペンタンはふたのある容器の中に入れるものを用いるとそのまま冷凍庫の中で保存できる。あらかじめ $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存してあると、液体窒素の消費量を少なくすることができる。

イソペンタンと液体窒素がないときはドライアイスで冷却したアセトンを用いることができる。アセトンの中にドライアスを割ったものを入れる。アセトンの凝固点は $-95^{\circ}\text{C}$ で、ドライアスの昇華点は $-79^{\circ}\text{C}$ であるので、ドライアイスは十分冷えると $-79^{\circ}\text{C}$ まで冷える。決してアセトンが凍結することはない。十分冷却されたかどうかは気泡の出方が少なくなったかどうかで判断する。

凍結した筋は乾燥を防ぐためにキャップ付きのビンかシールのできるプラスチックの袋に入れてディープフリーザーで保存する。一度凍らせた筋は決して融かしてはならない。他施設に標本作製以後の過程を依頼する場合は移送の必要があるが、発泡スチロールの箱を用いて小さく割った十分な量のドライアスを入れ、検体のビンあるいは袋を密着、埋没させた状態で発送する。到着の予定を事前に打ち合わせ、到着後に検体が放置されることのないようにしなければならない。

凍結されたブロックからクリオスタットを用いて  $10\mu\text{m}$ の厚さの切片を作成する。ヘマトキシリン・エオジン染色、ゴモリ・トリクローム染色、NADH-テトラゾリウム還元酵素染色の3つの染色は自施設で行い所見を判断できることが望ましい。筋疾患の病理診断を専門的に行っている国立精神・神経センター神経研究所で実施している染色法のリストを表4に示す。

**表4 国立精神・神経センターで行っている染色法**

---

HE	alkaline phosphatase
modified Gomori trichrome	phosphofructokinase
NADH-TR	acetyl choline esterase
ATPase	nonspecific esterase
PAS	phosphorylase
Cytochrome c oxidase	myoadenylate deaminase
succinate dehydrogenase	menadione-linked $\alpha$ -glycerophosphate
acid phosphatase	dehydrogenase
oil red O	immunocytochemistry

---

## 2)ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック



診断はほとんど凍結ブロックを用いて行われるが、脂肪組織の多い材料の場合、血管炎、アミロイド沈着など間質の変化が重要な場合はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックからの情報が重要になる。通常緩衝ホルマリン液で数時間固定する。脱水包埋まで時間があるときは緩衝液で固定液を置換し、冷所に保管する。日常的にはヘマトキシリン・エオジン染色とマソン・トリクローム染色で観察を行っている。

### 3) 電子顕微鏡のための固定

採取時の損傷が少ない部位から剃刀で小片を切りだし、濾紙あるいはスライドガラスのすりガラスの部分に形を整えてはりつける。20分くらいそのまま放置し、全体が変色し硬くなったら取り出して剃刀で細切する。このあとオスミウムで後固定したとき、筋束の方向が確認しにくくなるので、細切にあたっては方向性が判断しやすいように心がけるとよい。

## 最後に：安全で役に立つ筋生検を行うために

筋生検には生検針を使う針生検という方法もあるが、多くの場合局所麻酔薬を用いて開放筋生検として実施される。血管や神経などがあれば直視下で確認することができるし、出血があればすぐに止めることができるので、いろいろな生検の中では安全な部類に属すると考えられる。しかし、絶対に事故や失敗が発生しないとは断言できない。

### 1) 安全な筋生検を行うために

筋生検の手技そのものは難しいものではなく、外来小手術として対応可能なものである。以前は大学病院でも外来で実施しているところがあった。しかし、診察を十分に行い、事前に筋電図や画像検査を実施した上で適応を検討し、生検部位を選択しなければならないし、術後の安静も必要で、感染などの危険をできるだけ避ける必要がある。したがって、現在は神経・筋疾患の精査の一環として入院中に手術室で実施することが一般的である。

筋生検で起こりうる事故と失敗には以下のようなものがある。

## 1 筋生検手術と直接関係

麻酔 全身麻酔の事故 局所麻酔薬によるショック

感染

出血

神経損傷 正中神経損傷

皮神経切断による感覚障害

手術創の離開

## 2 筋生検から有益な情報が得られない

事前の検討が不十分

不適切な検体の取り扱い

小児は全身麻酔下で実施することが多いので麻酔科医の協力が必要である。局麻薬のショックや感染の危険に関しては他の小手術と同様である。出血は筋採取後に十分止血を確認すること、術後1週間は手術部位の安静をとらせることが大切である。手術創の離開は真皮縫合を併用することで防ぐことができる。皮膚を切開したあとはメスを使わず、ペアンなどで鈍的に剥離することを心がければ、皮神経を傷つける頻度は少なくなる。正中神経の損傷は上腕二頭筋生検の事故として知られている。生検部位が内側によらないように注意することが大切である。手術中な術野以外は布でおおうことになるので、手術室にはいる前に生検部位をマークしておくのもよい方法である。

### 2)役に立つ情報が得られるために

筋生検手術に直接関係する事故は経験豊富な術者であればほとんどおこらないとあってよい。実際のところ、これよりもはるかに頻度が高い失敗は、筋生検を行ったが何ら有益な情報が得られなかったというものである。患者に痛い思いをさせたのに有益な情報が得られず、傷だけが残るわけで、できるだけこのようなことを避けるように最善をつくす必要がある。

とどこおりなく筋生検を実施したのに有益な情報が得られないことがしばしばある。その中には筋生検を行う目的が十分に検討されていない場合が多く含まれる。

筋生検に何を求めるかは重大な問題である。筋の病理診断を受ける側の立場にたとえと依頼する先生方の意図を以下のように分類できるように思う。

1)特定の疾患が疑われるので筋生検で最終的な診断をつけてほしい

- 2) 診断の確定の上で根拠となる情報を提供してほしい
- 3) 今後の経過を判断する情報を提供してほしい
- 4) 学問的興味に答えてほしい
- 5) 見当がつかないがやれば何かがわかるのではないか

臨床経過、神経学的所見、血液検査、筋電図など臨床生理学検査などを十分検討し、事前に筋生検がどのような質問に答えるのを目的とするのかはっきりさせることがとても大切である。臨床情報が乏しくても筋病理から診断がつく場合もあるが、できるだけこのようなことは避けるように心がける必要がある。

最後に筋病理診断を困難にする要因には以下のようなものがある。

### 1) 採取時の問題

不適切な生検部位 筋線維がない

病変が高度すぎて判断できない

採取量があまりにも少ない

採取した組織内に出血

結合組織が多すぎる 筋膜や腱が多量に含まれている

### 2) 凍結時の問題

乾燥

水や生理食塩水に浸した

冷やすための氷により部分的に凍結

凍結がおそい

筋線維の方向がわからなくなった

凍結の間に倒れた

術中に組織にかけた糸がそのまま残っている

### 3) 凍結後の問題

解凍された

紛失

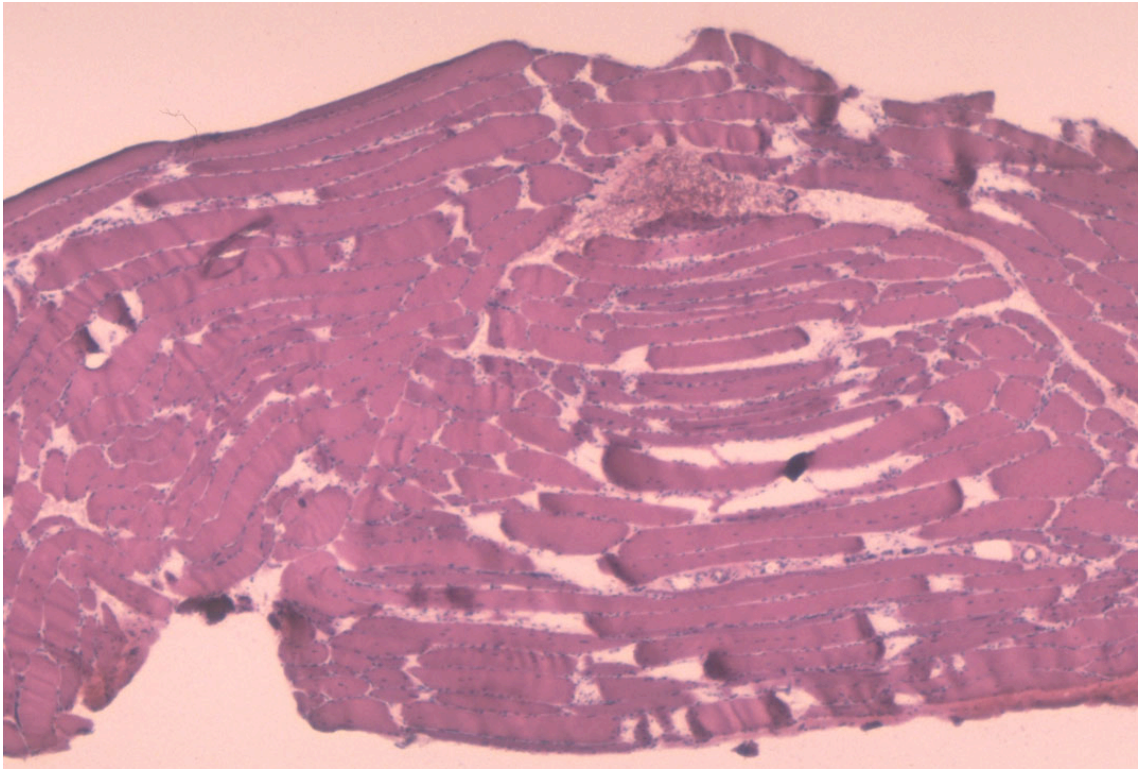


図2 横断面の切片がえられていない標本

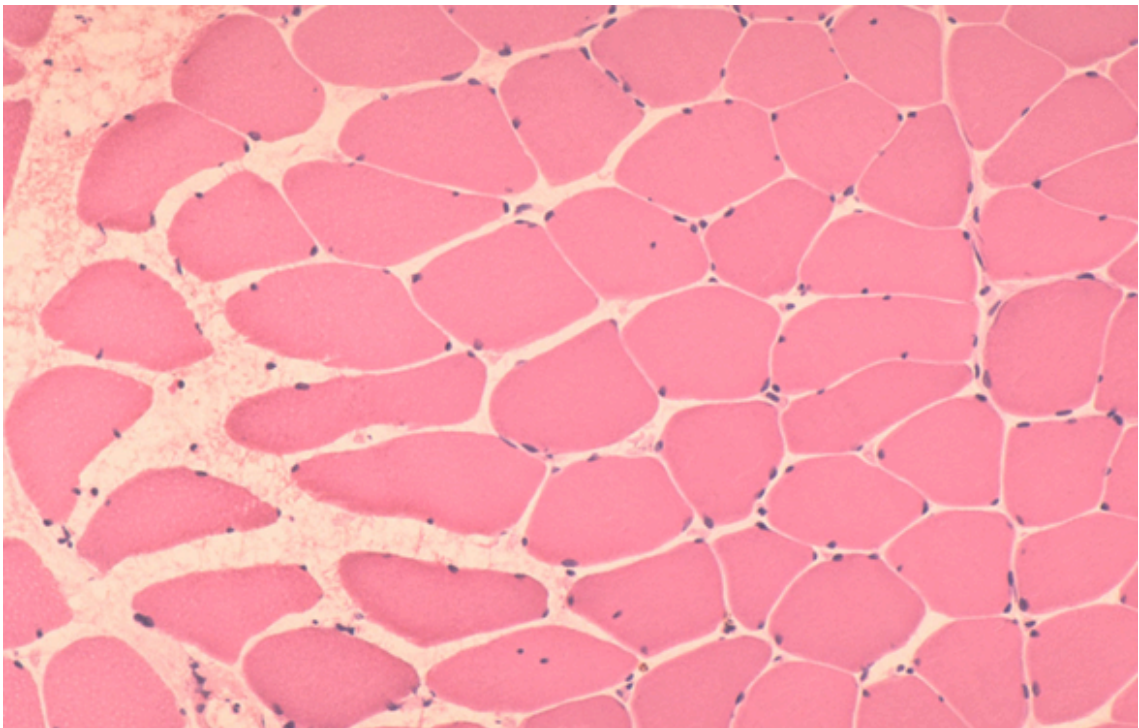


図3 採取時の出血により筋線維間が開大した標本



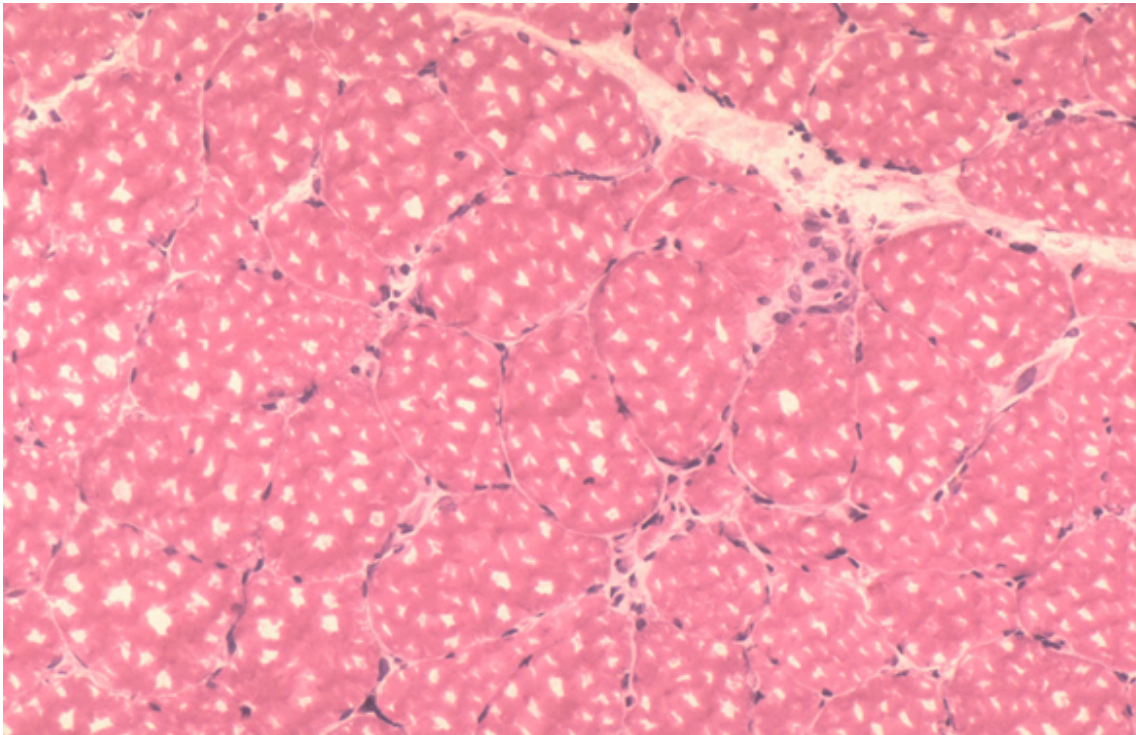


図 4 凍結に時間がかかったため氷の結晶で穴があいた標本

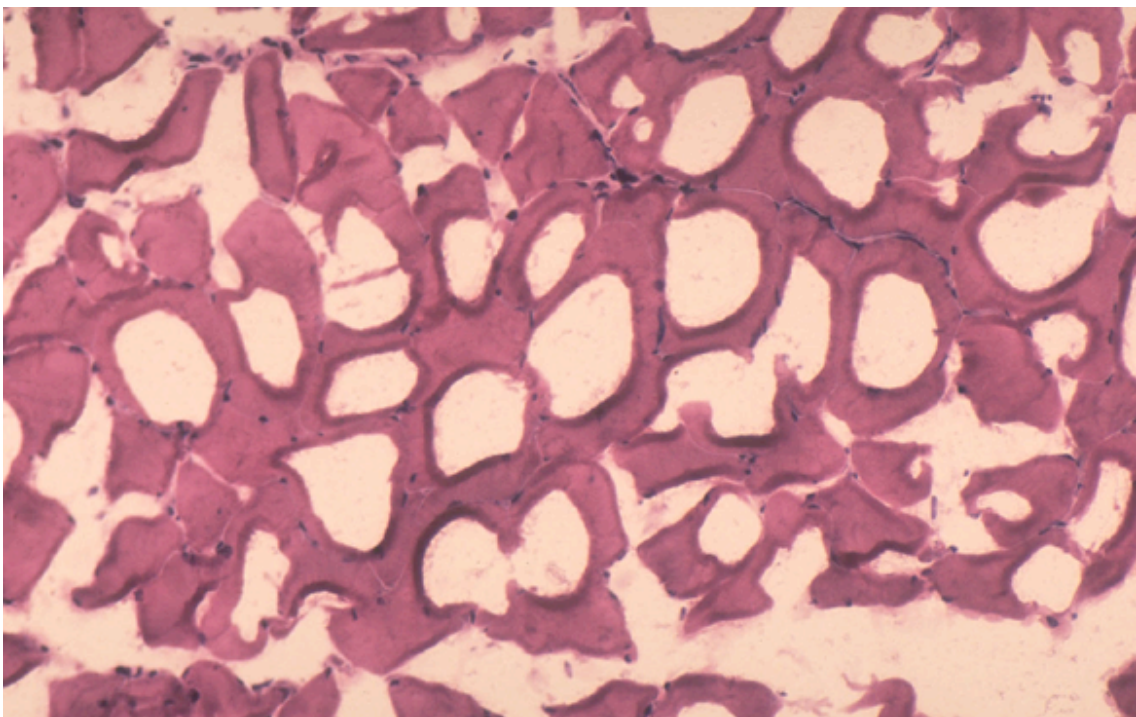
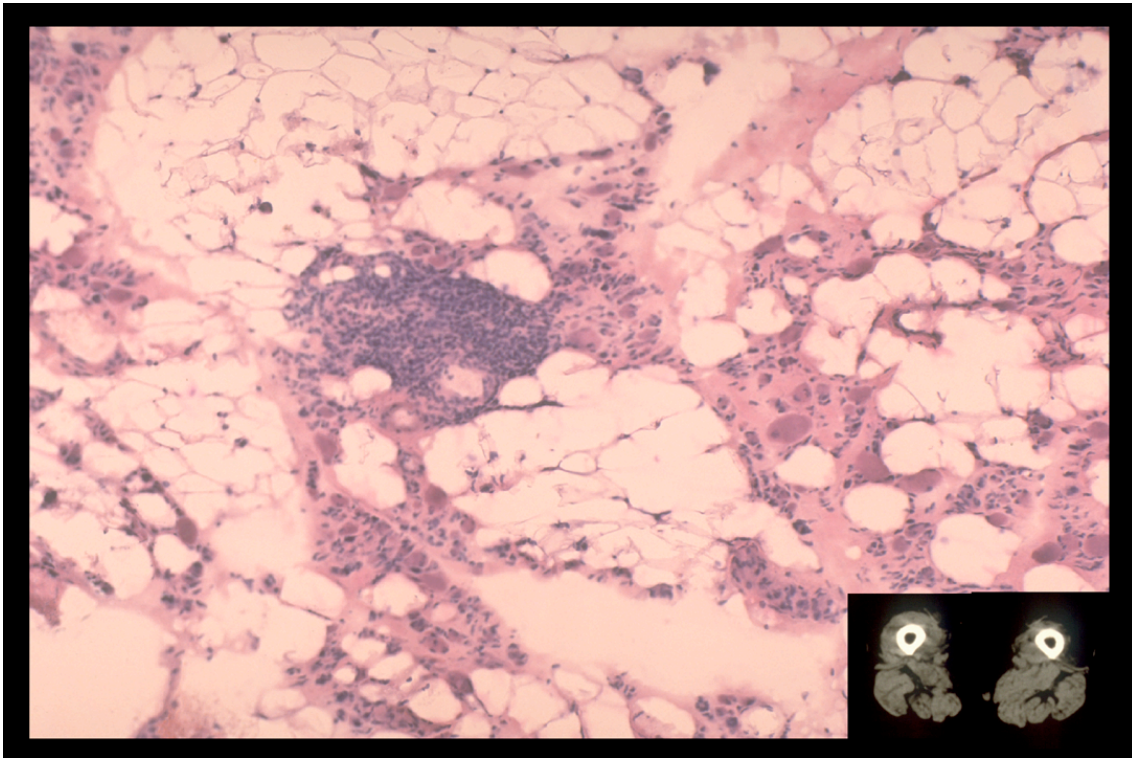


図 5 融解後徐々に凍結した標本



**図6 高度脂肪置換された筋から採取された標本**

右下の CT に示される大腿四頭筋から採取。筋線維がわずかにみられるので、筋組織であることはわかる。炎症細胞浸潤は確認できるが、診断に寄与する所見とはいえない。