

|                           |
|---------------------------|
| Acta Neuropathologica     |
| © Springer-Verlag 2005    |
| 10.1007/s00401-005-0988-6 |

## Regular Paper

# Silver staining profiles distinguish Pick bodies from neurofibrillary tangles of Alzheimer type: comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods

Toshiki Uchihara<sup>1</sup> , Kuniaki Tsuchiya<sup>2,3</sup>, Ayako Nakamura<sup>1</sup> and Haruhiko Akiyama<sup>3</sup>

- (1) Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashi-dai, Fuchu, 183-8526 Tokyo, Japan
- (2) Department of Laboratory Medicine and Pathology, Tokyo Metropolitan, Matsuzawa Hospital, 2-1-1 Kamikitazawa, Setagaya-ku, 156-8585 Tokyo, Japan
- (3) Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, 156-0057 Tokyo, Japan

 **Toshiki Uchihara**  
Email: uchihara@tmin.ac.jp  
Phone: +81-42-3253881 ext 4712  
Fax: +81-42-3218678

Received: 29 November 2004 Revised: 13 January 2005 Accepted: 13 January 2005 Published online: 10 March 2005

**Abstract** Silver staining profiles of Pick bodies (PBs) and their relation to tau-like immunoreactivity were examined on hippocampal sections and compared with those of neurofibrillary tangles of Alzheimer type (NFTs). Pairs of mirror sections were double-fluorolabeled with an anti-paired helical filament tau (AT8) antibody and thiazin red (TR), a fluorochrome that identifies fibrillary structures such as NFTs. One of the paired sections was subsequently stained using the Gallyas method (GAL), and the other using the Campbell-Switzer method (CS). By comparison of the same microscopic field on fluorolabeled sections and on both silver-stained paired sections, four different profiles of each structure could be distinguished: AT8 immunoreactivity, affinity to TR, argyrophilia with GAL or CS staining. PBs, containing mainly three-repeat (3R) tau, were positive for CS but not for GAL and its affinity to TR was, at most, weak. This selective affinity of PBs to CS is in sharp contrast with tau-positive structures of corticobasal degeneration/progressive supranuclear palsy, which are positive for GAL but not for CS, as we reported previously. This contrast is explainable if the argyrophilia with CS is related to deposits containing 3R tau, while that with GAL is linked to those containing four-repeat (4R) tau. Indeed, NFTs, containing both 3R and 4R tau, are positive for both CS and GAL, as expected. Taken together, differences in molecular composition of tau protein in these deposits are linked to their argyrophilic properties that are dependent on the staining method. Although explanations for these

empirical differences are not yet available, awareness of this clear distinction is potentially of diagnostic and pathological relevance.

**Keywords** Argyrophilia - Campbell-Switzer - Diagnosis - Gallyas - Repeat tau

---

## Introduction

Degenerative tauopathies are characterized by tau-positive deposits, and some of them are considered to be diagnostic hallmarks for some clinicopathological entities. Tauopathies are currently classified according to the difference in their molecular species [three-repeat (3R) or four-repeat (4R)] of pathologically phosphorylated tau [26]. Disease-specific definition of tau-positive deposits, however, is still a challenge because differentiation based on their immunohistochemical profiles are so far not very successful in spite of this biochemical difference [5, 6, 10, 19, 38]. Because of the lack of reliable routine histological staining that discriminates these molecular species of tau, combination of biochemical analyses and tau immunostaining is considered the current standard to delineate tau pathology.

Initial observations on these deposits, now known to contain tau protein, were based on silver staining methods. These methods are still widely used for diagnosis of these tauopathies and Alzheimer's disease (AD) [1, 2, 7, 9, 12, 14, 15, 22, 36]. Further modifications of silver staining methods have been reported [3, 4, 17, 27] that claim an improved sensitivity with lower background and easier standardization of the procedure. Because the Gallyas method (GAL) [12] and its modification [4] are highly successful in visualizing innumerable lesions, it may appear that the differences between silver staining methods are based on their difference in sensitivity. Indeed, various silver staining methods have been demonstrated to have a different sensitivity in detecting AD-related deposits [8, 11, 18, 23, 33, 34, 35, 37].

In our previous study [32], we found that tau-positive lesions in corticobasal degeneration (CBD)/progressive supranuclear palsy (PSP) were positive for GAL but negative for the Campbell-Switzer method (CS) [7, 25], another sensitive silver staining method that labels neurofibrillary tangles of AD (NFTs). Because both GAL and CS label equivalent number of NFTs, this discrepancy between CS and GAL observed in CBD/PSP may represent a feature unique to CBD/PSP. This implies that differences in silver staining methods are related not only to their sensitivities but also to the characteristics of each tau deposit. This prompted us to examine argyrophilic features of another type of tau-positive inclusions, Pick bodies (PBs), that contain predominantly 3R tau. Although little is known about how these argyrophilic properties are formed [13, 16], "argyrophilia" is now found to be dependent not only on the sensitivity of each staining procedure but also on the disease process, and, therefore, is of potential importance in histological distinction of tauopathies. Moreover, this difference in argyrophilic property may possibly represent a different architecture or molecular composition of the deposits.

---

## Materials and methods

Four cases of PB disease (PBD) and four cases of AD were enrolled in this study. Pathological diagnosis of AD was based on the published criteria [21]. Demographic data on

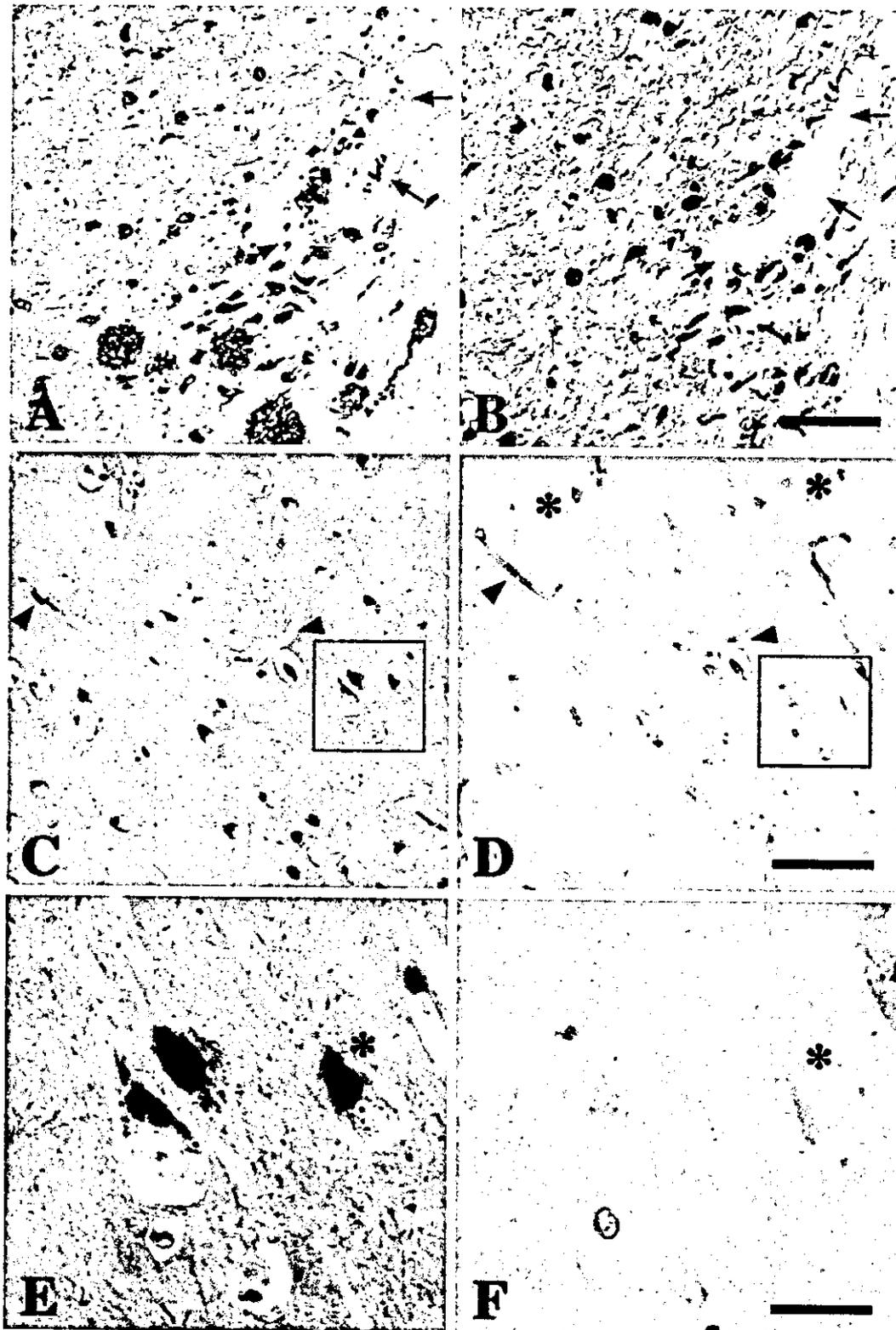
these cases are shown in Table 1. Brains were fixed in formalin and embedded in paraffin. Serial hippocampal sections were stained either with GAL [4, 12] or CS [3, 7] and the corresponding argyrophilic structures were compared. Mirror section pairs (4  $\mu$ m thick) from the hippocampus were subjected to subsequent studies to identify possible relation between argyrophilia and tau-like immunoreactivity, as reported previously [32]. Pairs of mirror sections were first incubated at 4°C for 2 days with an anti-paired helical filament tau antibody (AT8, 1:10,000, Zwijndrecht, Belgium [20]) and the target epitope was visualized with an anti-mouse IgG conjugated with Alexa 488 (1:500, Molecular Probe, Eugene, OR). Sections were then incubated with thiazin red (TR, 1:30,000, Wako, Tokyo, Japan) for 15 min. After being observed under a confocal microscope (Leica TSC/SP, Heidelberg, Germany), one of the section pair was stained with GAL and the other with CS to compare argyrophilic properties of each AT8- or TR-positive structure. Identification of the same microscopic field on the fluorescence images (AT8 and TR) and on the corresponding silver-stained (GAL and CS) pair-wise images allowed us to compare staining profiles of each structure based on four different properties; AT8 immunoreactivity, affinity to TR, argyrophilia with GAL and that with CS.

**Table 1** Demographic data of the cases (*PBD* Pick body disease, *AD* Alzheimer's disease)

| Pathological diagnosis | Brain weight (g) | Age at death (years) | Duration (years) | Gender |
|------------------------|------------------|----------------------|------------------|--------|
| PBD                    | 1,090            | 56                   | 1.5              | M      |
| PBD                    | 1,080            | 64                   | 5                | F      |
| PBD                    | 1,120            | 67                   | 10               | M      |
| PBD                    | 890              | 83                   | ?                | F      |
| AD                     | 755              | 62                   | 15               | F      |
| AD                     | 1,250            | 65                   | 5                | M      |
| AD                     | 1,070            | 66                   | 10               | M      |
| AD                     | 780              | 72                   | 15               | F      |

## Results

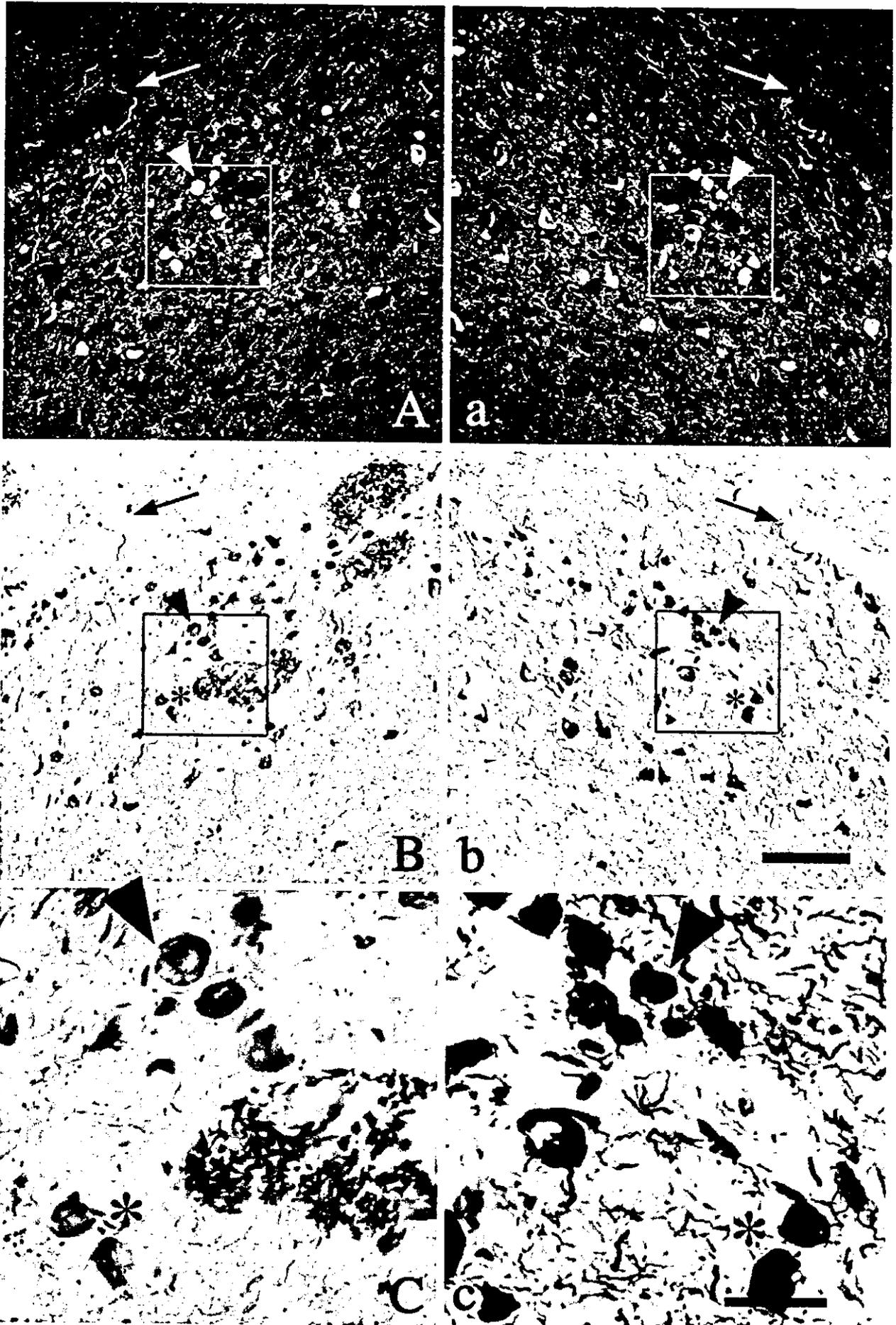
On hippocampal sections from AD brains, CS visualized NFTs and neuropil threads (NTs) as well as innumerable senile plaques (SPs) (Fig. 1A). On the neighboring section, GAL also visualized NTFs to an equivalent extent and a larger number of NTs (Fig. 1B), while SPs stained with GAL were limited to those with neuritic reactions. On hippocampal sections from PBD, CS clearly visualized PBs (Fig. 1C, E). In contrast, argyrophilia by GAL (Fig. 1D, F) was nearly absent or, if detectable, very weak (asterisks in Fig. 1D).



**Fig. 1** Discrepant argyrophilia in PBs. **A, B** AD; **C–F** PB disease. Serial sections from pyramidal layer of hippocampus. **A, C, E** CS; **B, D, F** GAL. NFTs in AD brain exhibit argyrophilia after staining with CS (**A**) and with GAL (**B**) methods. PBs similarly exhibit argyrophilia after staining with CS (**C, E**) but their argyrophilia after staining with GAL is, at most, weak (*asterisks* in **D, F**). *Arrows* in **A** and **B** and *arrowheads* in **C** and **D** indicate the same blood vessels. **E, F** Higher magnification of squared area in **C** and **D**, respectively. *Asterisks* in **E** and **F** indicate the same neuron harboring a PB (PB Pick body, AD Alzheimer's disease, CS Campbell-Switzer stain, GAL Gallyas-Braak stain, NFT neurofibrillary tangle). Bars **A–D** 100  $\mu\text{m}$ , **E, F** 25  $\mu\text{m}$

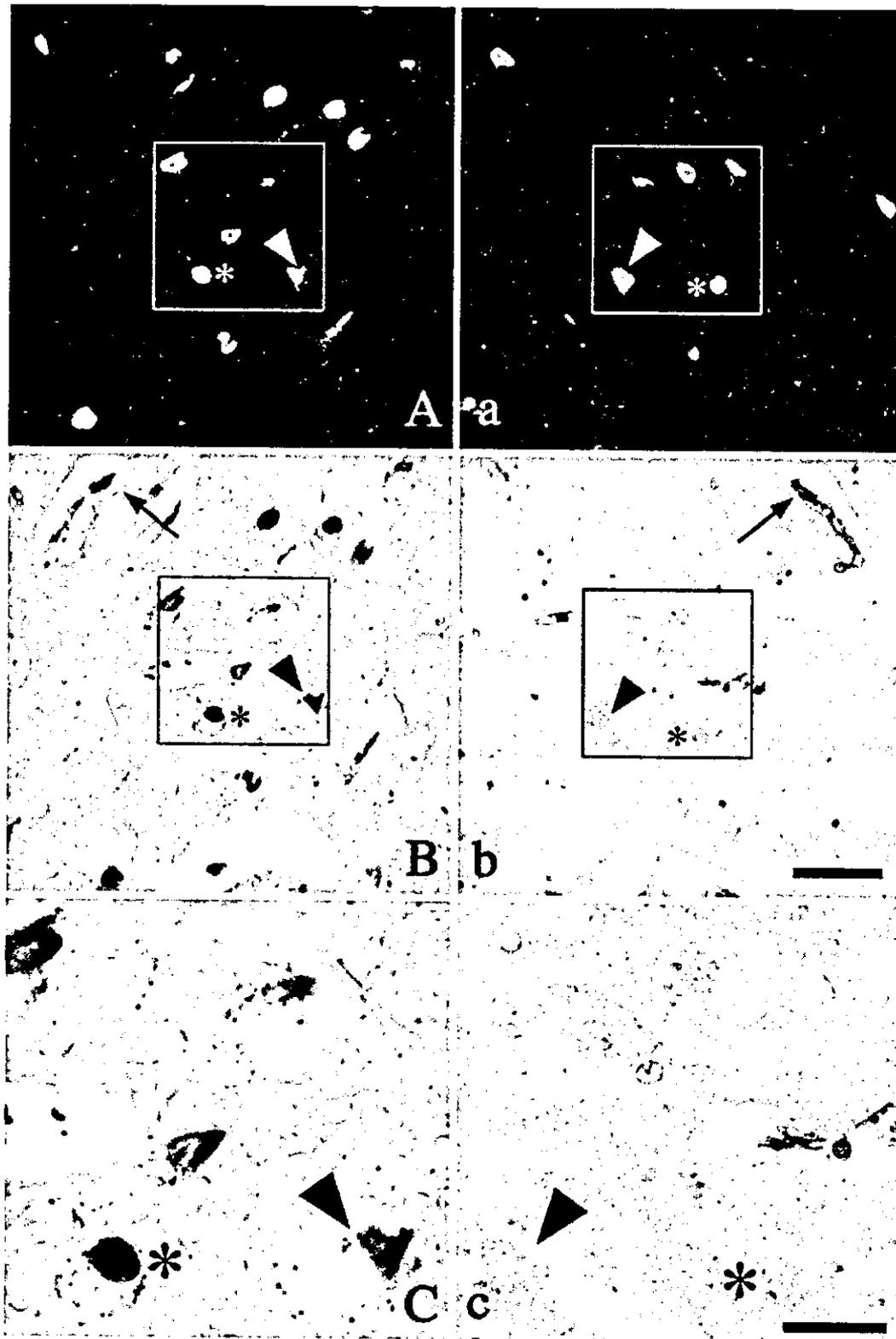
---

This contrast was further confirmed on mirror section pairs. Fluorolabeling of a mirror section pair from AD brains with AT8 and TR visualized NFTs and NTs (Fig. 2A, a) that were clearly stained with TR (red) or both TR and AT8 (yellow, Fig. 2A, a, arrowhead), dependent on their evolutionary stage [29]. One of the section pair was subsequently stained with CS (Fig. 2B, C), and the other with GAL (Fig. 2b, c). Each of the CS-positive structures was identifiable on the corresponding mirror section stained with GAL, and vice versa. These structures positive for both CS and GAL (asterisks and arrowheads in Fig. 2B, b, C, c) were also positive for TR or for both TR and AT8 (asterisks and arrowheads in Fig. 2A, a). Another section pair from PBD brains, initially fluorolabeled (Fig. 3A, a) and subsequently silver-stained either with CS (Fig. 3B, C) or GAL (Fig. 3b, c), demonstrated that each of AT8-positive PBs (asterisks and arrowheads in Fig. 3A, a) was stained with CS (Fig. 3B, C, asterisk and arrowhead). GAL, however, failed to label these PBs (Fig. 3b, c). Affinity of TR to these PBs was less evident (Fig. 3A, a) compared with that of NFTs (Fig. 2A, a).



**Fig. 2** NFTs exhibit equivalent argyrophilia with either silver staining method. Mirror section pair from pyramidal layer of hippocampus of AD brain initially fluorolabeled (**A, a**) with anti-PHF tau (AT8, *green*) and thiazin red (TR, *red*) and subsequently silver-stained with CS (**B**) or GAL (**b**). AT8-positive neurons are also stained with TR to yield *yellow color*, indicating that they are composed of rigid fibrillary structure. Fibrillary structures stained as *red* are extraneuronal NFTs that lost immunoreactivity to AT8. Both AT8-positive NFTs (*yellow*) and AT8-negative NFTs (*red*) exhibit argyrophilia with either CS or GAL method. **C, c** Higher magnification of the area indicated in **B, b**, respectively. *Arrows* (**A, B, a, b**) indicate the same blood vessel. *Arrowheads and asterisks* (**A–C, a–c**) indicate corresponding NFTs. *Bars* **A, B, a, b** 100  $\mu\text{m}$ ; **C, c** 30  $\mu\text{m}$

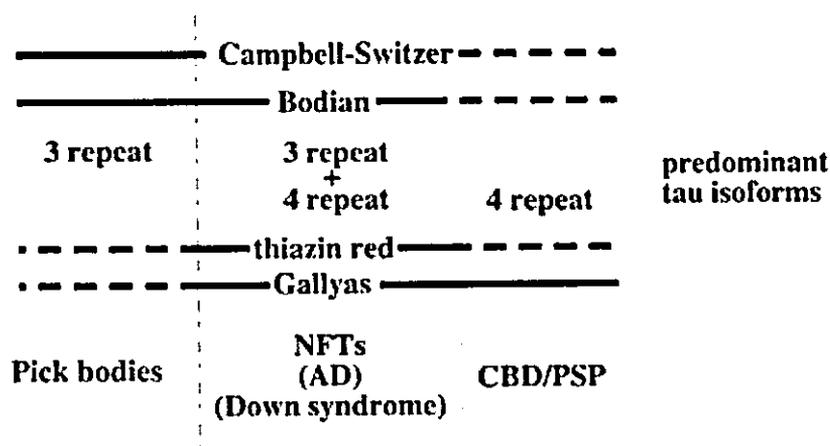
---



**Fig. 3** Argyrophilia of PBs is dependent on the silver staining method. Mirror section pair from pyramidal layer of hippocampus of PBD brain initially fluorolabeled (**A, a**) with AT8 (*green*) and TR (*red*) and subsequently silver-stained with CS (**B**) or GAL (**b**). AT8-positive neurons are not stained with TR, indicating that they are composed of less fibrillary structure. **C, c** Higher magnification of the area indicated in **B** and **b**, respectively. *Arrows* (**B, b**) indicate the same blood vessel. *Arrowheads* and *asterisks* (**A–C, a–c**) indicate corresponding PBs (PBD Pick body disease). *Bars* **A, B, a, b** 100  $\mu$ m; **C, c** 30  $\mu$ m

## Discussion

A number of methods of silver staining have been developed to delineate pathological lesions related to neurodegeneration [1, 2, 7, 9, 12, 14, 15, 22, 36]. Although some of them are highly useful in diagnosis and research, their utility is based merely on empirical relevance because little is known about the mechanism of how argyrophilic properties are engendered [13, 16, 17, 25]. For AD-related lesions, the number (quantity) of visualized lesions is dependent on the silver staining method used [8, 11, 18, 23, 33, 34, 35, 37]. This gives an impression that the sensitivity for visualizing AD-related lesions is dependent on the silver staining method. Our previous study [32], however, demonstrated that tau-positive lesions in CBD/PSP lacked argyrophilia when they were stained with CS, while they were clearly visualized with GAL. This contrast indicates that each staining method exhibits argyrophilia in disease-dependent manner. In other words, possible difference between silver staining methods is related not only to their sensitivity to detect lesions (quantitative difference) but also to their ability to distinguish lesions in disease-dependent manner (qualitative difference). In the present study, we expanded this approach to PBD, and found that the argyrophilia of PBs was detectable with CS but not with GAL. This staining profile was absolutely complimentary to that observed for tau-positive-lesions in CBD/PSP, which exhibit argyrophilia with GAL but not with CS. Although we have no direct explanation for this empirical distinction, one hypothesis is that argyrophilia with CS is related to tau deposits composed of the 3R species, as we observed in PBD, whereas that with GAL is linked to tau deposits mainly composed of the 4R counterpart, as reported in PSP/CBD [32]. NFTs of Alzheimer type, containing both the 3R and 4R species, exhibit argyrophilia with either CS or GAL (Fig. 4).



**Fig. 4** Argyrophilic properties of tau-positive deposits are dependent on staining methods and on tau isoforms. Diseases are classified according to their predominant tau isoforms. *Solid lines* indicate positive argyrophilia and *interrupted lines* indicate negative argyrophilia (CBD/PSP corticobasal degeneration/progressive supranuclear palsy)

Despite this sharp contrast, the staining procedures for GAL and CS are quite similar. Alkaline silver iodide is used after pretreatment with lanthanum nitrate for GAL [4], while

pyridine-silver is the initial step for CS [7]. Because subsequent visualization of silver particles is essentially the same for GAL and CS, this difference of initial silver reagents (alkaline silver iodide versus pyridine-silver) is one of the major factors responsible for this contrast. However, we do not yet know whether this distinction is based directly on the difference in tau isoforms or related to more complex composition after tau deposition. Another difference between PBs and NFTs depends on their affinity to TR, a fluorochrome that labels fibrillary structures such as NFTs [30] or Lewy bodies [24]. This difference possibly represents a different density of fibrillary structures or qualitative difference in fibrillary composition, as demonstrated previously [29, 30]. The lack of GAL staining, with abundant CS staining, in PBs may be related to this difference. A mixture of 3R and 4R tau, as seen in NFTs, may lead to a more solid organization of fibrils recognized as NFTs [29], also identified clearly with TR. In contrast, deposition of 3R tau not accompanied by its 4R counterpart is organized into different, probably less fibrillary, structures that escape detection with TR or GAL. Our previous study demonstrated that PBs, composed predominantly of the 3R isoform of tau, are preferentially stained with Bodian method (BOD) but not with GAL [31]. Conversely, tau-positive structures in CBD are scarcely argyrophilic with BOD [28]. These data are compatible with the hypothesis that tau deposits, composed of 3R tau, exhibit selective argyrophilia with BOD and CS.

Through these studies, we became aware that each method of silver staining exhibits preferential affinity to tau-positive deposits in an isoform-dependent manner (Fig. 4). Although this correlation is empirical at present, and molecular mechanism to explain how argyrophilic properties specific for disease or tau isoform are engendered still remains to be elucidated, awareness of these differences will help in clearly recognizing and diagnosing specific pathological cascades, which are probably distinct from each other.

**Acknowledgements** This work was supported in part by grants from the Ministry of Health and Welfare, Japan (Longevity Science H-14-005) and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (grant in aid for scientific research B15300118) to T.U.

---

## References

1. Bodian D (1936) A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat Res* 65:89
2. Bolle L, Maurer B, Janzer RC (1992) A modified Hortega-Globus stain is superior to Bielschowsky and Bodian stains for demonstrating neuritic plaques. *Biotech Histochem* 67:82-87  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
3. Braak E, Braak H (1999) Silver staining method for demonstrating Lewy bodies in Parkinson's disease and argyrophilic oligodendrocytes in multiple system atrophy. *J Neurosci Methods* 87:111-115
4. Braak H, Braak E, Ohm TG, Bohl J (1988) Silver impregnation of Alzheimer's neurofibrillary changes counterstained for basophilic material and lipofuscin pigment. *Stain Technol* 63:197-200  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
5. Buée-Scherrer V, Hof PR, Buée L, Leveugle B, Vermersch P, Perl DP, Olanow CW, Delacourte

A (1996) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 91:351-359

[SpringerLink](#)

[PubMed](#)

6. Bussi re T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin M-L, Perl DP, Bu e L, Delacourte A (1999) Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol* 97:221-230  
[SpringerLink](#) [PubMed](#)
7. Campbell SK, Switzer RC, Martin TL (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. *Soc Neurosci Abstr* 13:67
8. Connolly AAP, Anderton BA, Esiri MM (1987) A comparative study of a silver stain and monoclonal antibody reactions on Alzheimer's neurofibrillary tangles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50:1221-1224  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
9. Cross RB (1982) Demonstration of neurofibrillary tangles in paraffin sections: a quick and simple method using a modification of Palmgren's method. *Med Lab Sci* 39:67-69  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
10. De Silva R, Lashley T, Gibb G, Hanger D, Hope A, Reid A, Bandopadhyay R, Utton M, Strand C, Jowett T, Khan N, Anderton B, Wood N, Holton J, Revesz T, Lee A (2003) Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29:288-302
11. Duyckaerts C, Brion JP, Hauw JJ, Flament-Durand J (1987) Quantitative assessment of the density of neurofibrillary tangles and senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. Comparison of immunocytochemistry with a specific antibody and Bodian's protargol method. *Acta Neuropathol (Berl)* 73:167-170
12. Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Scient Hung* 19:1-8
13. Gambetti P, Autilio-Gambetti L, Papasozomenos SC (1981) Bodian's silver method stains neurofilament polypeptides. *Science* 213:1521-1522  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
14. Hicks SP (1946) A rapid pyridine silver stain for nervous tissue and reticular fibers. *J Lab Clin Med* 31:1375-1377
15. Hirano A, Zimmerman HM (1962) Silver impregnation of nerve cells and fibers in celloidin sections. A simple impregnation technique. *Arch Neurol* 6:114-122  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
16. Iqbal K, Braak E, Braak H, Zaidi T, Grundke-Iqbal I (1991) A silver impregnation method for labeling both Alzheimer paired helical filaments and their polypeptides separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Neurobiol Aging* 12:357-361  
[cross\\_ref](#) [ChemPort](#) [PubMed](#)
17. Kondoh H, Matsushita M, Kosaka K, Miyazaki N (1993) Staining senile plaques using Bodian's

method modified with methenamine. *Biotech Histochem* 68:113-116

[ChemPort](#) [PubMed](#)

18. Lamy C, Duyckaerts C, Delaère P, Payan C, Fermanian J, Poulain V, Hauw JJ (1989) Comparison of seven staining methods for senile plaques and neurofibrillary tangles in a prospective series of 15 elderly patients. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15:563-578
19. Mailliot C, Sergeant N, Bussièrè T, Caillet-Boudin M-L, Delacourte A, Buée L (1998) Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett* 433:201-204  
[crossref](#) [ChemPort](#) [PubMed](#)
20. Mercken M, Vandermeern M, Lübke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, Martin J-J, Gheuens J (1992) Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol* 84:265-272  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
21. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Hughes JP, Belle G van, Berg L (1991) The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:479-486
22. Reusche E (1991) Silver staining of senile plaques and neurofibrillary tangles in paraffin sections. A simple and effective method. *Pathol Res Pract* 187:1045-1049  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
23. Rosenwald A, Reusche E, Ogomori K, Teichert H-M (1993) Comparison of silver staining and immunohistology for the detection of neurofibrillary tangles and extracellular cerebral amyloid in paraffin sections. *Acta Neuropathol* 86:182-186  
[SpringerLink](#) [PubMed](#)
24. Sakamoto M, Uchihara T, Hayashi M, Nakamura A, Kikuchi E, Mizutani T, Mizusawa H, Hirai S (2002) Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp Neurol* 177:88-94
25. Switzer RC 3rd (1993) Silver staining methods: their role in detecting neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 679:341-348
26. Tolnay M, Probst A (1999) Tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:171-187
27. Uchihara T, Kondo H, Ikeda K, Kosaka K (1995) Alzheimer-type pathology in melanin-bleached sections of substantia nigra. *J Neurol* 252:485-489
28. Uchihara T, Mizusawa H, Tsuchiya K, Kondo H, Oda T, Ikeda K (1998) Discrepancy between tau immunoreactivity and argyrophilia by the Bodian method in neocortical neurons of corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol* 96:553-557  
[SpringerLink](#) [ChemPort](#) [PubMed](#)
29. Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O (2001) Evolution from pretangle neurons to neurofibrillary tangles monitored by thiazin red combined with Gallyas method and double immunofluorescence. *Acta Neuropathol* 101:535-539  
[ChemPort](#) [PubMed](#)

30. Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O, Ikeda K, Tsuchiya K (2001) Different conformation of neuronal tau deposits distinguished by double immunofluorescence with AT8 and thiazin red combined with Gallyas method. *Acta Neuropathol* 102:462–466  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
31. Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K (2003) Pick body disease and Pick syndrome. *Neuropathology* 23:318–326  
[crossref](#) [PubMed](#)
32. Uchihara T, Shibuya K, Nakamura A, Yagishita S (in press) Silver stains distinguish tau-positive structures in corticobasal degeneration/progressive supranuclear palsy and in Alzheimer's disease: Comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods. *Acta Neuropathol*
33. Vallet PG, Guntern R, Hof PR, Golaz J, Delacourte A, Robakis NK, Bouras C (1992) A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 83:170–178  
[SpringerLink](#) [ChemPort](#) [PubMed](#)
34. Wilcock GK, Matthews SM, Moss T (1990) Comparison of three silver stains for demonstrating neurofibrillary tangles and neuritic plaques in brain tissue stored for long periods. *Acta Neuropathol* 79:566–568  
[SpringerLink](#) [ChemPort](#) [PubMed](#)
35. Wisniewski HM, Wen GY, Kim KS (1989) Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol* 78:22–27  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
36. Yamaguchi H, Haga C, Hirai S, Nakazato Y, Kosaka K (1990) Distinctive, rapid, and easy labeling of diffuse plaques in the Alzheimer brain by a new methenamine silver stain. *Acta Neuropathol* 79:569–572  
[SpringerLink](#) [ChemPort](#) [PubMed](#)
37. Yamamoto T, Hirano A (1986) A comparative study of modified Bielshowsky, Bodian and Thioflavin S stains on Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12:3–9  
[ChemPort](#) [PubMed](#)
38. Yen SH, Horoupian DS, Terry RD (1983) Immunocytochemical comparison of neurofibrillary tangles in senile dementia of Alzheimer type, progressive supranuclear palsy, and postencephalitic Parkinsonism. *Ann Neurol* 13:172–175  
[ChemPort](#) [PubMed](#)

# 原発性進行性失語

内原 俊記

## ■ はじめに

大脳皮質の機能が部位によって異なることが臨床的に確認されるようになったのは、失語という症状と病変部位の関係が脳血管障害の例を中心に集積されたことによる部分が多い。大脳皮質の変性がこのような部位に強調されておれば、対応する失語という症状も変性過程のなかで分離されてとらえられることが想定できる。実際、痴呆性疾患の代表の一つである Pick 病の最初の報告では、失語に類する症状から全般的な痴呆へ進展する過程が記載されており、失語に対応する病変として、左側頭葉の限局性萎縮があると推論されている<sup>1)</sup>。脳血管障害では孤立した非進行性の病変があり、失語症状と病変の対応は比較的容易だが、変性過程では、1) 病変の境界が不明瞭で程度や範囲が進行性に拡大すること、2) 反対側や大脳白質、大脳以外の部位(基底核、脳幹等)にも病変が伴う場合が多い点で脳血管障害とは異なり、純粋な失語症状の抽出が困難な場合も多い。特に大脳皮質を中心とする変性過程では、知的機能、認知機能の低下が臨床像の前景にたつ時期が早く訪れる場合が多く、失語があっても解析が十分にできない場合がある。

## Primary progressive aphasia の診断基準要約 (Mesulam<sup>2)</sup>より)

1. word finding, 物品呼称, word-comprehension の障害がゆっくりと始まり、進行する。
2. 言語以外の日常生活は、発症後少なくとも2年間は保たれる。
3. 発症前の言語機能が正常である。
4. 無為、抑制解除、近時記憶障害、視空間認知障害、感覚-運動障害などが、発症後少なくとも2年間はみられない。
5. この間、失計算、観念運動失行、軽度の構成障害や保続を伴う場合がある。
6. その後これらの症状が出現しても、言語の障害が経過を通じてもっとも目立ち、進行も早い。
7. 脳血管障害、脳腫瘍等、画像で確認できる原因疾患がない。

## Mesulam らの提唱と用語上の混乱

変性過程に伴う失語に類する症状を変性性失語 aphasia dégénérative<sup>3)</sup>と総称するという考え方があるが、一定の臨床・病理像に対応するものではない。Mesulam は進行性失語を呈する6例が、1) 知的機能の低下が長期にわたりみられず、失語があっても自律した日常生活が保たれ、2) 左 Sylvius 裂周囲の萎縮という特徴をもち、これまでの疾患概念では説明し難い一群として“slowly progressive aphasia without generalized dementia”という臨床概念を提唱した<sup>3)</sup>。その後 primary progressive aphasia (PPA) という呼び方が提唱され、臨床的な診断基準も示されている(表)<sup>4)</sup>。現在提唱されている frontotemporal lobar degeneration の分類<sup>5)</sup>では、言語の障害として progressive non-fluent aphasia (PNA) と semantic dementia (SD) があげられている。PNA は non-fluent aphasia を特徴とし、発語量が少なく、語想起に時間がかかり、時に努力性発話、失文法が見られるなど、運動性失語の要素が目立つと考えられ、言語領域の中で前方よりの病変に伴う障害と想定される。一方、SD は言語の意味理解の障害を中心とした fluent type の失語で、発語や文法の障害がめだたず、復唱も保たれる等の特徴があり、側頭葉を中心としたより後方の障害と類型化されている。上記にあげた PPA の診断基準 (Mesulam) は、失語の型に関する定義に乏しく、広い範囲の進行性失語をふくみ得るが、PPA は non-fluent aphasia のみをさすとする研究者もあり、注意を要する。しかし運動性失語の要素が少ない SD でも、変性に伴う場合は non-fluent の場合もあり、fluency の程度のみで明解な失語の区分ができるとは限らない。実際、変性を基礎におこる進行性失語として報告された例のなかには、あらゆる失語の

うちはら としき 東京都神経科学総合研究所/神経病理学研究部  
門副参事研究員

A) 62歳発症, transcortical motor aphasia (non-fluent type) に軽度の人格変化を伴い, 65歳で死亡した臨床診断 Pick 病例の剖検脳肉眼所見(脳重1200g), 前頭葉に萎縮があり, 前頭弁蓋部(\*)に萎縮が目立つ。

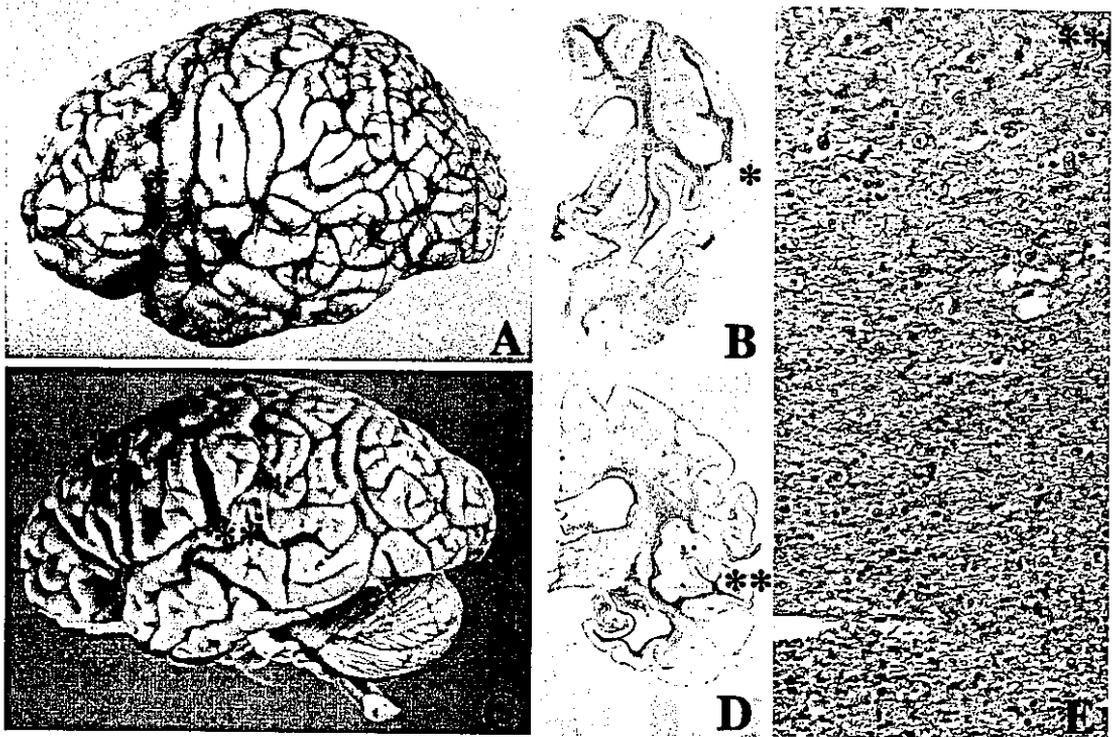
B) 同部の前額断 Holzer 染色. 弁蓋部(\*)を含む前頭葉白質に線維性グリオシスを認める。(Mimura ら<sup>10)</sup>より改変)

C) 58歳, 言語の理解困難で発症, 感覚性失語と行動異常に筋固縮を伴い68歳で死亡した臨床診断 Pick 病例の剖検脳肉眼所見(脳重1115g), 上側頭回(\*\*)に萎縮が目立つ。

D) 同部の前額断 Holzer 染色. 萎縮した上側頭回(\*\*)に強調される線維性グリオシスを認める。

E) 同部の Gallyas 染色. Gallyas 陽性の glial lesions が白質にも広汎に認められる。

(Ikeda ら<sup>11)</sup>より改変)



失語を伴い, 臨床的に Pick 病と診断された2例  
病理診断はいずれも corticobasal degeneration だが, 大脳の病変分布に違いがある。

型が含まれるという<sup>9)</sup>。

### 大脳皮質病変の病理学的多様性

一方, 大脳皮質変性病変の形態や分布に関する病理学的知見は, Mesulam の発表以後大幅に進展したといえる。従来, 脳幹の疾患と考えられた進行性核上性麻痺 progressive supranuclear palsy (PSP) にも運動野を中心とする大脳皮質病変があり<sup>7)</sup>, 大脳皮質基底核変性症 corticobasal degeneration (CBD) では, さらに変化に富んだ大脳皮質病変分布が確認されるようになった<sup>9)</sup>。Pick 病では, 側頭葉前方下面に強調される左右差のある高度な萎縮が歴史的に特徴的とされてきたが, 嗜銀球を有する Pick 小体病 Pick body disease (PBD) に限っても, 大脳皮質病変はこの範疇におさまらないことが明らかにされている<sup>9)</sup>。また, 運動ニューロン疾患に伴う痴呆としてとらえられる疾患は, ユビキチン陽性の封入体が海馬歯状回や側頭葉に見られるが, 大脳皮質の変性は当初提唱された範囲を越える場合もあることが知られており, それぞれの疾患で進行性失語を呈した剖検例の報告がある<sup>10-13)</sup>。振り返れば, Mesulam が slowly progressive aphasia without generalized

dementia を提唱した当時想定した各疾患の臨床・病理像は典型的なものに限定されており, その後これを逸脱する例が既存の病理学的概念の中で見出されてきたということもできる。Hodges ら<sup>14)</sup>が prospective に検討した fronto-temporal dementia (FTD) 61 例の剖検例中, non-fluent aphasia と分類された例は 8 例で, 内 6 例は PBD だが, SD と分類された例は 9 例で, PBD は 3 例と少なく, 運動ニューロン疾患に伴う痴呆が 4 例であったという。この研究はアルツハイマー病 (AD) を除外した群を対象にしたにもかかわらず, amnesia や SD で発症した例が意外に多い。FTD の痴呆や失語の臨床的特徴を, 記憶障害が少なくとも初期には目立たない点で AD とは異なるものとしてきたこれまでの考え方<sup>9)</sup>に変更を迫る可能性がある。また semantic memory の障害は AD にもみられるが, episode 記憶や視空間認知の障害を伴わない点で AD とは異なる一群を SD として区別する立場があり, さらに詳細な臨床像と病理所見の対比が望まれる。

### 同一疾患内での失語病型の多様性

病理学的診断が同じでも大脳皮質病変分布は変化に富む

ことが、PBDやCBDで明らかにされている。しかし、大脳皮質の病変分布が疾患によりある傾向をもっていけば、失語に関連する臨床像から病理像を類推できる可能性も期待される。図に示す2例の臨床診断はPick病、病理診断はいずれも典型的なCBDである。一方はnon-fluentのtranscortical motor aphasiaを呈し、前頭弁蓋を中心とした病変がある(図A, B)<sup>10)</sup>。他方は言語理解の障害からsensory aphasiaに至った例で、側頭葉前方に萎縮が強く(図C, D)、失語病型もそれに応じて異なる<sup>11)</sup>。こうしてみると、進行性失語の病型から類推できるのは大脳皮質病変の分布に限られ、その根底にある病理診断を類推させる特徴を抽出するのはいまのところ困難に見える。しかし、独特の運動障害(CBD with aphasia)、運動ニューロン疾患の合併(motor neuron disease with aphasia)、人格や接触性の変化(Pick病: frontal lobe dementia with aphasia)など、失語以外の要素(PPA-plus syndrome)は病理像をも示唆する鑑別診断に役立つ場合がある<sup>9)</sup>。

## 大脳白質病変の関与

白質に注目してproton magnetic resonance spectroscopy(1H-MRS)を行うと、N-acetylaspartate値がPPA例ではADに比して有意に低下しており、特に左半球白質

での低下がより目立つという<sup>15)</sup>。この画像所見は、同部の軸索の病変がより強いことを反映しているとされる。確かにPBDやCBDでは大脳皮質病変に加えて、大脳白質にも広汎な病変がみられる場合があり(図E)、PPAの失語の成り立ちや病理像との関連を考える上で今後留意すべき点と思われる。

## ■ むすび

変性過程に伴う進行性失語が、ある時期比較的独立して臨床的に顕在化する場合に想定される病理学的背景は一部明らかにされつつあるが、病変の質と分布を規定している要素が何かという因子を同定するには至っていない。臨床像と病理像の関連を踏まえた上で病態を考えることが第一歩であるが、臨床像、病理像ともにheterogeneousな対象をどのようにとらえていくか、今後に残された問題である。

謝辞：本稿をまとめるにあたり、都立松沢病院 土谷邦秋先生、東京都精神医学総合研究所 池田研二先生、秋山治彦先生、昭和大学精神科 三村 将先生、都立神経病院 水谷俊雄先生、東京都神経科学総合研究所 林 雅晴先生に貴重な資料を検索させていただく機会を与えていただきました。深謝致します。

## 文 献

- 1) Pick A. Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. Prager Med Wochenschr. 1892; 17: 165-7.
- 2) Assal G, Favre C, Regli F. Aphasie dégénérative. Rev Neurol. 1985; 141: 245-7.
- 3) Mesulam M-M. Slowly progressive aphasia without generalized dementia. Ann Neurol. 1982; 11: 592-8.
- 4) Mesulam M-M. Primary progressive aphasia. Ann Neurol. 2001; 49: 425-32.
- 5) Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration—A consensus on clinical diagnostic criteria. Neurology. 1998; 51: 1546-54.
- 6) 櫻井靖久. 緩徐進行性失語. 老年精神医学雑誌. 1996; 7: 854-61.
- 7) Hauw J-J, Vernet M, Delaère P, et al. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. Neurosci Lett. 1990; 119: 182-6.
- 8) Tsuchiya K, Ikeda K, Uchihara T, et al. Distribution of cerebral cortical lesions in corticobasal degeneration: a clinicopathological study of five autopsy cases in Japan. Acta Neuropathol. 1997; 94: 416-24.
- 9) Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K. Pick body disease and Pick syndrome. Neuropathology. 2003; 23: 318-26.
- 10) Mimura M, Oda T, Tsuchiya K, et al. Corticobasal degeneration presenting with nonfluent primary progressive aphasia: a clinicopathological study. J Neurol Sci. 2001; 183: 19-26.
- 11) Ikeda K, Akiyama H, Iritani S, et al. Corticobasal degeneration with primary progressive aphasia and accentuated cortical lesion in superior temporal gyrus: case report and review. Acta Neuropathol. 1996; 92: 534-9.
- 12) Tsuchiya K, Ozawa E, Fukushima J, et al. Rapidly progressive aphasia and motor neuron disease: a clinical, radiological, and pathological study of an autopsy case with circumscribed lobar atrophy. Acta Neuropathol. 2000; 99: 81-7.
- 13) Li F, Iseki E, Kato M, et al. An autopsy case of Alzheimer's disease presenting with primary progressive aphasia: a clinicopathological and immunohistochemical study. Neuropathology. 2000; 20: 239-45.
- 14) Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, et al. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. Ann Neurol. 2004; 56: 399-406.
- 15) Catani, M, Piccirilli M, Cherubini A, et al. Axonal injury within language network in primary progressive aphasia. Ann Neurol. 2003; 53: 242-7.

## 特集 神経病理：最前線

### 封入体の神経病理

#### —蛋白沈着の疾患特徴的様式と萎縮・変性との関係—\*

内原俊記\*\*

神経疾患の形態的特徴は、蛋白の病的沈着・封入体形成と神経細胞の萎縮・変性の2つの側面に集約される。いくつかの遺伝子異常がこの両者を惹起することが知られているが、それぞれの過程や両者の関係は必ずしも明らかでない。封入体の構成蛋白の沈着過程をタウ蛋白を例に、変性における封入体の位置づけをCAGリピート病の核内封入体(NI)を例に示す。またこれらの検索に用いた多重染色法、三次元立体構築法、銀染色についても概観する。リン酸化に伴ってタウ蛋白が凝集する変性性タウオパチーとは異なり、リン酸化によらない conformational change に伴い、線維構造を欠くタウの沈着が起こり得ることを、脳梗塞と glial cytoplasmic inclusion を例に示した。タウエピトープの conformation は物理化学的環境により可逆的に変化し、この違いは疾患の種類や病変形成の時期に対応する異なる沈着様式を反映している可能性を示唆する。延長したポリグルタミン蛋白の発現は、NI形成と細胞変性の両者を惹起するが、NIを有する神経細胞の核断面積は有さないものに比して有意に大きいことが、CAGリピート病剖検脳では共通した特徴であることを示した。蛋白の病的沈着・封入体形成過程と細胞萎縮・変性過程は密接に関連しているが、必ずしも正の相関を持つとは限らない。両者をいったん独立したものとして解析した上で、その関係を改めて見直すことで、ヒト脳で起こっている病態を把握することができる。

キーワード：萎縮・変性・細胞死, conformation, 三重染色, 三次元再構成

#### はじめに

神経変性疾患は、進行性の神経細胞萎縮ひいては細胞死を共通の特徴とする原因・病態未解明の部分が未だに多い疾患群である。各疾患を区別する形態的特徴は、(1) 神経細胞萎縮・細胞死の時間・空間的パターン、(2) これと関連(時に独立)してみられる、病的沈着物や封入体の形成、に大まかに分けることができる。

神経変性の機序を、apoptosis 等の定型的な細胞障害パターンに還元した上で治療戦略を探る試みは研究の大きな潮流だが、異なる神経疾患にみられる細胞萎縮・細胞死の過程にかなりの共通部分があるのか、む

しろ疾患特異的部分が大部分を占めるのかは不明の部分が多い。これに対し、各種封入体の形成は疾患特異的と考えられる部分がより多く、診断上の形態的指標とされている場合も多い<sup>49)</sup>が、細胞萎縮や変性とどのように関係しているかは必ずしも明らかでない。

本稿ではまず、タウ蛋白沈着の形態的側面を例に、病態との関連についてまとめる。その後、脊髄小脳変性症にみられる核内封入体を例にあげ、形態観察の技術的問題点も併せて考えてみたい。

2004年2月3日受稿

\* Disease-specific patterns of protein deposition and their relation to neurodegeneration.

\*\* 東京都神経科学総合研究所神経病理学研究部門(〒183-8526 東京都府中市武蔵台2-6) Toshiki UCHIHARA: Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan.

0001-8724/04/ ¥500/論文JCLS

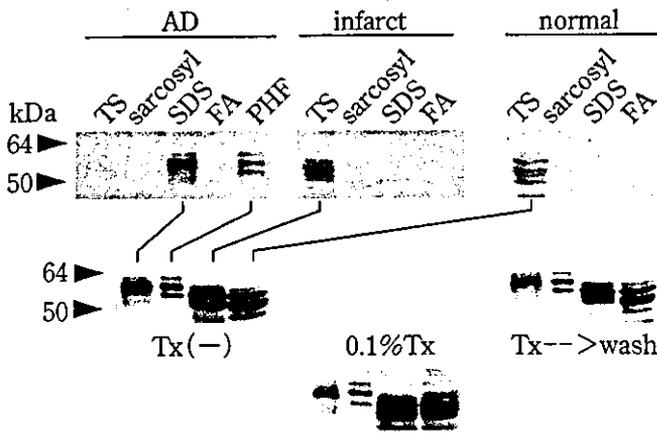


図1 脳梗塞のタウ蛋白はリン酸化を受けず、界面活性剤なしで可溶化される

等量の凍結脳から順に Tris-buffered saline (TS), 1% sarcosyl/TS (sarcosyl), 2% SDS/TS (SDS), 蟻酸 (FA) 可溶性画分を採取し、別に採取した PHF 画分 (PHF) と泳動した。Alzheimer 病脳 (AD) では SDS 可溶性画分に集中する tau2 陽性バンドが、脳梗塞 (infarct) では正常 (normal) と同様 TS 可溶性画分にあり、分子量の増加もない。これらの陽性画分に対する tau2 の反応性は界面活性剤の存在下 (0.1%Tx) で消失するが、界面活性剤暴露後洗浄する (Tx-->wash) と、再び観察される。また他の抗タウ抗体 (pool 2) に対する反応性は界面活性剤存在下 (0.1%Tx) でも保たれている (文献 54 より改変)。

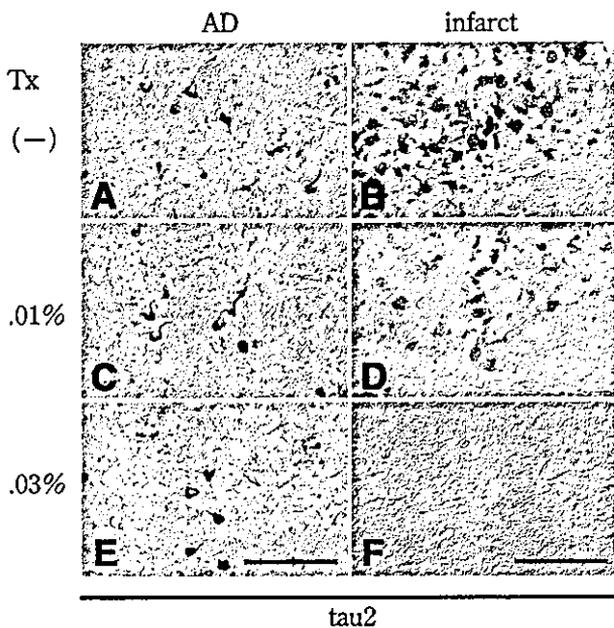


図2 固定標本上の tau2 免疫陽性像は界面活性剤により影響を受ける

Tau2 免疫原性は界面活性剤非存在下 Tx (-) では AD の神経原線維変化 (A), 脳梗塞巣のミクログリア (B) に同様に認められるが、界面活性剤の濃度が上昇するにつれミクログリアの陽性像は次第に減弱し (D), 0.03% の濃度では消失する (F)。同様の濃度では、神経原線維変化の tau2 免疫原性は保持される (C, E) [bar=100 μm (A, C, E), bar=50 μm (B, D, F), 文献 54 より改変]。

### I. タウ蛋白の沈着から封入体形成まで

#### 1. タウ蛋白の沈着と可視化の背景にある病的修飾

アルツハイマー病 (AD) のタウ蛋白は、リン酸化等の病的な修飾を受けて沈着し、神経原線維変化 (NFT) 等の疾患特異的病変を形成するとされ、固定標本の免疫組織化学的検出は容易である<sup>6,17)</sup>。一方、タウ蛋白は

正常脳にも存在し immunoblot で検出可能だが、正常脳の固定標本を用いた免疫組織化学での検出は通常、困難である。正常脳に存在するタウ蛋白は immunoblot 上で Tris-可溶性画分に主に認められ、SDS 可溶性画分に主にみられる AD とはその生化学的性質が異なるが、immunoblot では両者に含まれるタウ蛋白の総量に大きな違いはないように見え、総タウ蛋白の含有量の差だけで免疫組織化学所見の陽性、陰性を説明するのは難しいように思われる (図 1)<sup>54)</sup>。このことは免疫組織化学的にタウエピトープが可視化され得るには、その発現量と抗体への親和性のみでは説明できない要素があることを物語っている<sup>31,40)</sup>。AD 脳のタウ蛋白はリン酸化等の病的修飾を受けて線維化し、これに伴って免疫組織化学的に可視化できるようになるとされている。とすれば正常脳に存在するタウ蛋白が免疫組織化学的に可視化し難いのは、何らかの病的修飾を欠くことと関連している可能性が考えられる。

一方、脳梗塞脳において、神経細胞は Alz50 陽性<sup>61)</sup>、梗塞巣周囲のミクログリアは tau2 陽性<sup>35,62)</sup> となる。脳梗塞巣を immunoblot で検索すると (図 1), タウ陽性バンドは正常脳と同じ Tris 可溶性画分にみられ、その分子量も正常と区別できず AD 脳でのようなリン酸化は受けていない。同様のタウ蛋白の沈着は、multiple system atrophy (MSA) に特徴的とされる glial cytoplasmic inclusion (GCI) にも tau2 抗体を用いて明らかにできる<sup>44)</sup>。

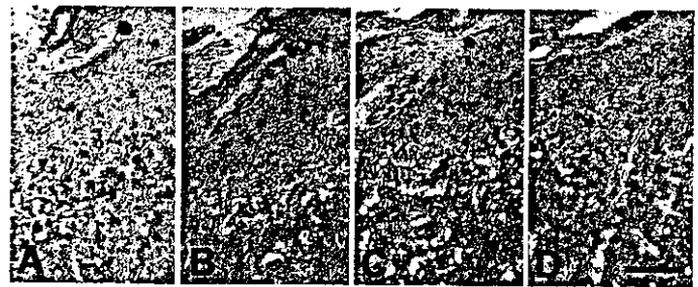
#### 2. Reversible conformational change

それでは脳梗塞脳のミクログリアと GCI に共通してみられる tau2 エピトープの可視化に、どのような過程が関連しているのだろうか。Tau2 抗体を界面活性剤存在下で反応させると、その免疫原性が immunoblot 上では消失してしまうことを見出した (図 1 中段)。固定

切片上で観察すると、これらの glia の tau2 陽性像は同様に界面活性剤存在下で同様に消失するが (図 2D, F), AD の NFT では界面活性剤に抵抗性を示し、一定の濃度までは tau2 陽性像を保持する点で、脳梗塞のミクログリアや GCI とは異なる (図 2C, E)<sup>44,54</sup>。また界面活性剤暴露により、いったん消失した (図 3B) tau2 免疫原性は、暴露後界面活性剤を含まない緩衝液で洗浄すると、再び認められるようになる (図 3C, D)。Tau2 エピトープは、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列では 101 番目の proline 付近にあり、この proline が病的修飾に伴って serine 様の conformation<sup>29)</sup>をとることで、tau2 抗体に対する親和性を著しく増すという<sup>64)</sup>。ヒトで 101 番目の proline は、ウシタウ蛋白では Serine にあたり、ウシのタウ蛋白を抗原として作成された tau2 抗体がこの Serine そのもの、または Serine 様の conformation に強い親和性を有することも理解できる。この変化は AD でタウ蛋白のリン酸化に伴って起こるとされているが、脳梗塞脳<sup>22,54)</sup>や MSA 脳<sup>44)</sup>では、リン酸化に準じる生化学的変化は通常の immunoblot で観察する限り認められないので、タウ蛋白の修飾がリン酸化を介さずに tau2 エピトープの conformation を変化させると推測される。これらリン酸化を伴わないタウ蛋白の沈着は、タウ蛋白からなる線維構造を形成していない点ばかりでなく、他の抗タウ抗体による免疫原性が固定組織標本で見られない点でも共通しており、タウ蛋白沈着後、線維形成に至る前の初期の段階を表している可能性がある (図 4)。

タウ蛋白は、それを対象とした抗体が最も数多く作成されている分子の 1 つである。そのエピトープに対する反応性に基づいて Carmel ら<sup>7)</sup>は、タウ抗体を以下の 3 種類に分類している。

1) タウ蛋白の部分のアミノ酸一次配列によつての



tau2 in 0%Tx 0.1%Tx 0.1%Tx 1h wash 3h tau2 in 0%Tx

図 3 界面活性剤で消失した tau2 陽性像は洗浄後復元する

脳梗塞巣のミクログリアにみられる tau2 陽性像 (A) は、界面活性剤で preincubate すると消失する (B : 0.1%Tx) が、その後界面活性剤を含まない緩衝液で 1 時間洗浄 (C : 1h) 後、免疫染色すると再び可視化でき、3 時間の洗浄 (D : 3h) ではさらに明瞭になる (Bar=50 μm, 文献 54 より改変)。

み、その親和性が規定されている抗体。

- 2) タウ蛋白のリン酸化によって、その親和性が著しい影響を受ける抗体。
- 3) タウ蛋白の conformation (リン酸化による変化を除く) によって、その親和性が著しい影響を受ける抗体。

面白いことに、脳梗塞や MSA 脳の glia を染色する tau2 や脳梗塞の神経細胞を染色する Alz50 は、いずれも上記の 3 に分類されている。固定した脳標本で免疫組織化学的にタウ陽性像を観察する場合に、用いる抗体が上記にどのような性質を持つかを解釈に含めることが可能になるとと思われる。Josephsen らは、vimentin に対するモノクローナル抗体の 1 つが vimentin と相同性がなく、分子量も異なる amelogenin

図 4 Tau2 エピトープの conformational change

Tau2 抗体が親和性をもつエピトープは 101 番目のプロリン (P101) 付近にあり、AD ではタウ蛋白がリン酸化されるとともに、このアミノ酸が serine 様の conformation をとり、ウシタウ蛋白の相同部分 (Ser101) に類似するとされている。脳梗塞巣固定標本上のタウ蛋白は同様の conformation をとっているが、界面活性剤の存在下 (Tx+) では conformation が変化し、tau2 抗体への親和性を失う。これに対して AD の神経原線維変化では conformation の変化が起こりにくく、界面活性剤の存在下でも tau2 への親和性が保たれる点で異なる。

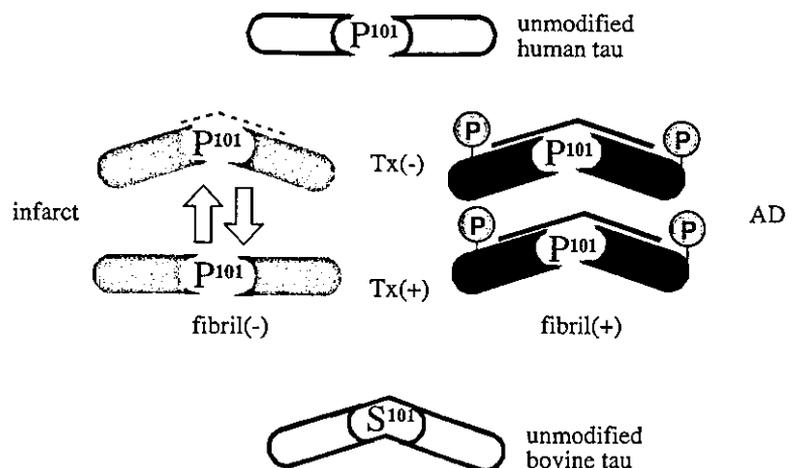
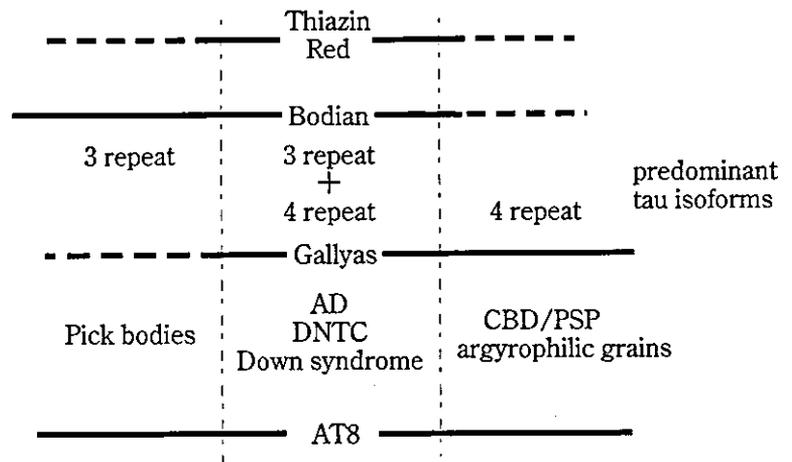


図5 変性性タウオパチーのタウ isoform による分類と染色特性の疾患による違い

4 リピートタウが主に沈着する corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP), argyrophilic grains のタウ陽性構造物は Gallyas 染色により明瞭に染色されるが, Bodian 染色による染色性は乏しい。3 リピートタウが主に沈着するピック小体 (Pick body) は Bodian 染色により明瞭に染色されるが, Gallyas 染色による染色性は逆に乏しい。両方の isoform が沈着する AD, diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC), Down syndrome では両方の染色法により明瞭に染色される。この群は沈着したタウの線維形成傾向が顕著で, これに親和性を持つ蛍光色素 thiazin red に対する親和性も顕著である。



を固定液暴露後に認識することを, 免疫電顕および Western blot で示した<sup>24)</sup>。抗体が認識する限局したエピトープの conformation が, アミノ酸配列の全く異なる 2 つの分子で類似し, 固定液への暴露等によってさらに変化することを示唆している。モノクローナル抗体が限局したエピトープの conformation を認識している場合, その conformation が物理化学的条件によって変化し, 抗体に対する親和性も変化し得るのは tau や vimentin に限らず, conditional epitope と呼ぶ場合がある<sup>65)</sup>。

### 3. 沈着から線維形成へ

免疫組織化学的に可視化されるように修飾されてタウ蛋白は沈着すると考えられるが, その沈着様式は疾患により異なり, 同じ疾患では病期によっても異なる<sup>16)</sup>。疾患特異的なタウエピトープを同定しようとする試みは繰り返して行われてきたが, 単一のエピトープに対する免疫組織化学のみでタウ蛋白の沈着を特徴とする病変を疾患特異的に分類しえると広く認められた方法は, 今のところ確立されていない。病変の構造を観察するために, 以前から蛍光色素 (thioflavin, Congo red, thiazin red) が用いられてきた。蛍光色素の一部は, 形成された  $\beta$ -sheet 構造に基づく線維構造に強い親和性を有し, 線維構造をとる老人斑や NFT を比較的明瞭に可視化することができる<sup>32)</sup>。線維構造に親和性を有する蛍光色素である thiazin red (TR) と抗 PHF タウ抗体 (AT8) を用いた二重染色を行うと, リン酸化タウの沈着と線維形成の関係に疾患ごとの特徴があるかどうかを定量的に観察できる<sup>57-59)</sup>。大脳皮質にみられるリン酸化タウ陽性神経細胞は AD 脳, diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC) の大脳皮質では TR 陽性で明瞭な線維構造をとるが, 大脳皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration: CBD) では TR 陽

性神経細胞は稀で, リン酸化タウの沈着が直ちに NFT 形成に繋がるとは限らないことを示している。Banerjee らは, AD 脳海馬にみられるこのような沈着を pretangle neurons として記載し, NFT 形成の前段階と考えた<sup>3)</sup>。しかし CBD 脳では神経細胞内のタウ沈着が線維形成に至らないまま, とどまっている部分が多いとも解釈でき, 今後両者にみられるタウ蛋白沈着の分子機構の違いを, 線維形成に至るか否かという観点から捉え直すことを通して, タウ蛋白の沈着が NFT 形成に至る過程をヒト脳で明らかにすることが期待される。

### 4. 銀染色からみたタウ陽性沈着物の特徴

神経免疫組織化学は, 対象とするエピトープを限定することによってその特異性を確保しているが, 対象エピトープのみに病変を代表させ, それ以外の要素をいったん全て無視する方法論ということもできる。一方, 銀染色は病変の最初の記述の際, 抛り所とされた歴史的スタンダードであり, 病理診断を進める上でも限られたエピトープの陽性像のみを抛り所とせざるを得ない免疫組織化学とは, 異なる利点もあることを忘れるべきではない<sup>2)</sup>。銀染色による陽性像は一般に「嗜銀性」という言葉でひとくくりにされることが多いが, その染色機序について解明されている部分は限られている<sup>15,21)</sup>。たとえば NFT を観察するのに頻用される Gallyas 染色<sup>14,21)</sup>は, Bodian 染色<sup>15)</sup>に比して一見より多くの病変を描出しているように見え, 嗜銀性構造物を捉える感度がより高いという印象を与えることが多い<sup>28)</sup>。しかし, リン酸化タウを含むピック小体 (Pick body: PB) は逆に Bodian 染色で良好に染色され, Gallyas 染色には染色されにくい<sup>49)</sup>。とすると両染色の違いは感度の差にとどまらず, 対象とする構造物の性質をある程度反映していると考えられることができる。図