

図1. DLB症例 (75yo, M) の経過

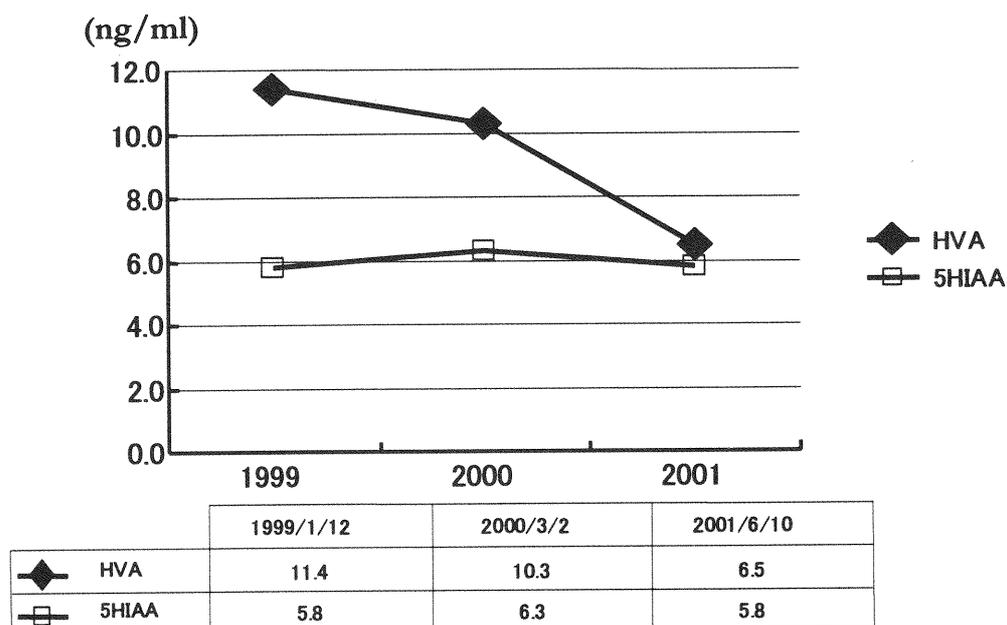


図2. Pick病症例 (73yo, M) の経過

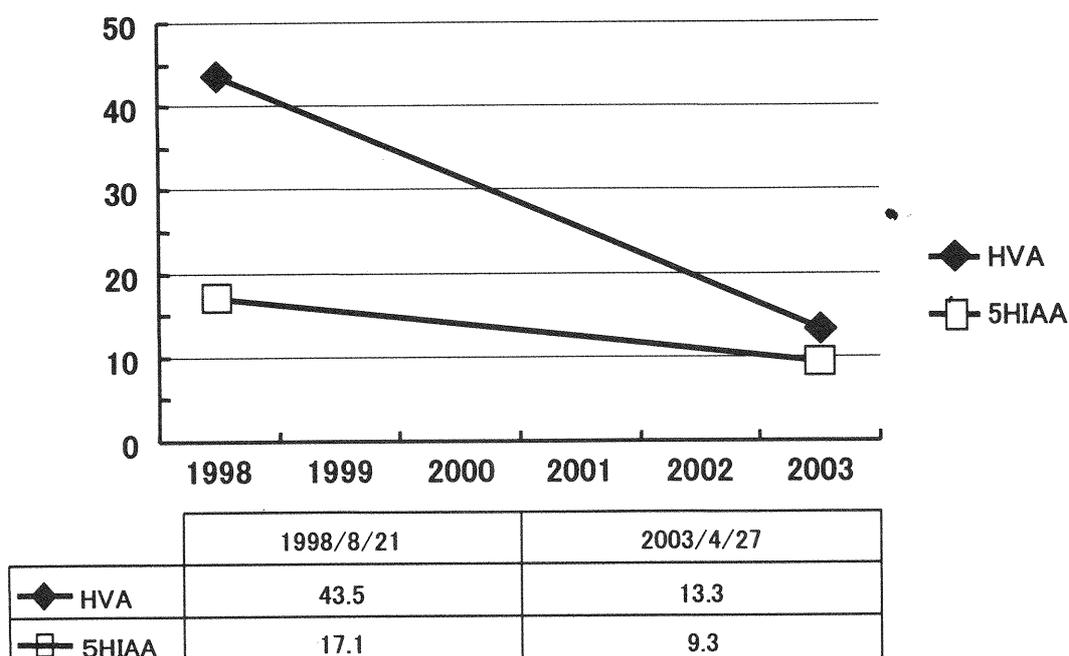


表1: 各疾患におけるCSF HVA, 5HIAA (ng/ml)

| | n | HVA | 5HIAA |
|--------|---|-----------------|----------------|
| AD | 4 | 19.6±6.4 | 14.1±5.7 |
| PD | 1 | 6.3 | 2.9 |
| DLB | 6 | 11.2±4.8 | 7.3±4.2 |
| PSP | 3 | 20.5±11.8 | 19.2±5.5 |
| CBD | 1 | 29.0 | 15.9 |
| DG | 2 | 27.2±18.2 | 22.6±18.2 |
| MND | 4 | 30.6±14.5 | 30.7±16.0 |
| SCD | 1 | 24.7 | 14.9 |
| Pick | 1 | 43.5 | 17.1 |
| Others | 2 | 21.0±2.3 | 21.0±4.8 |

図3. 各疾患におけるCSF HVA (ng/ml)

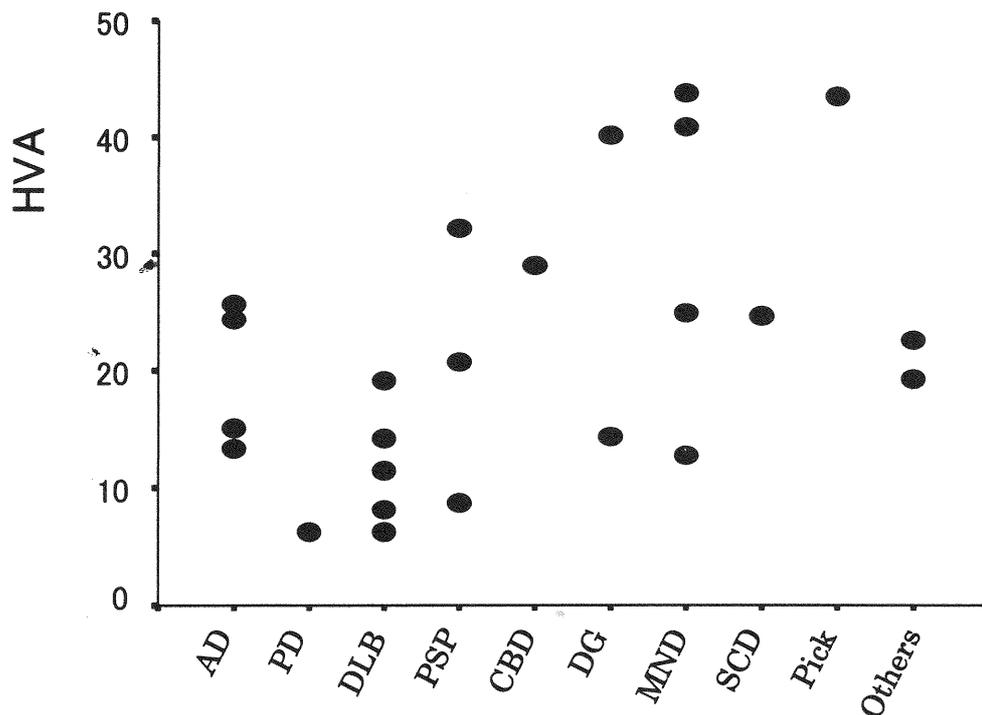


図4. 各疾患におけるCSF 5HIAA (ng/ml)

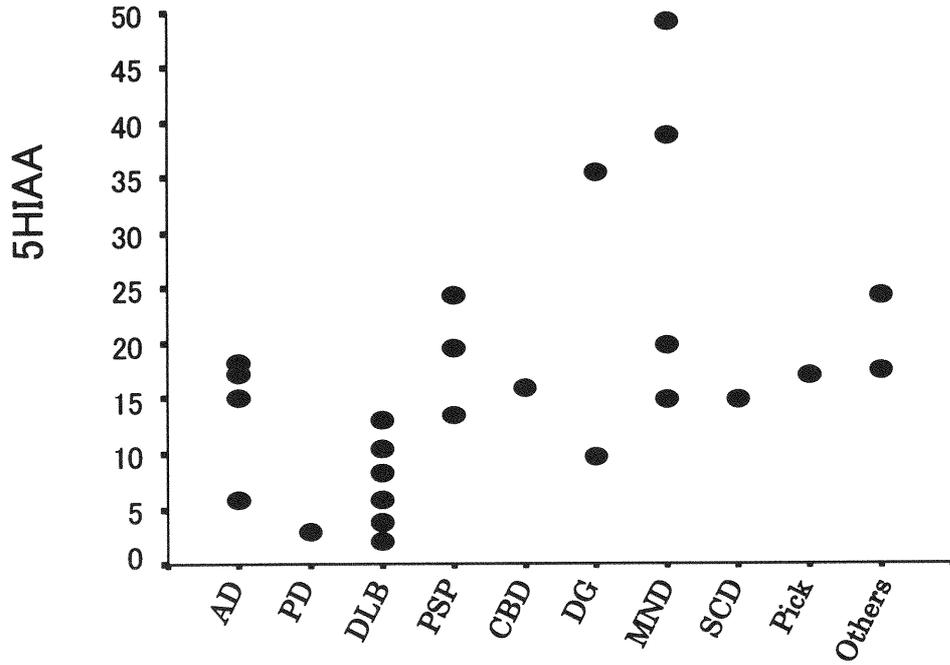


図5. CSF 5HIAA

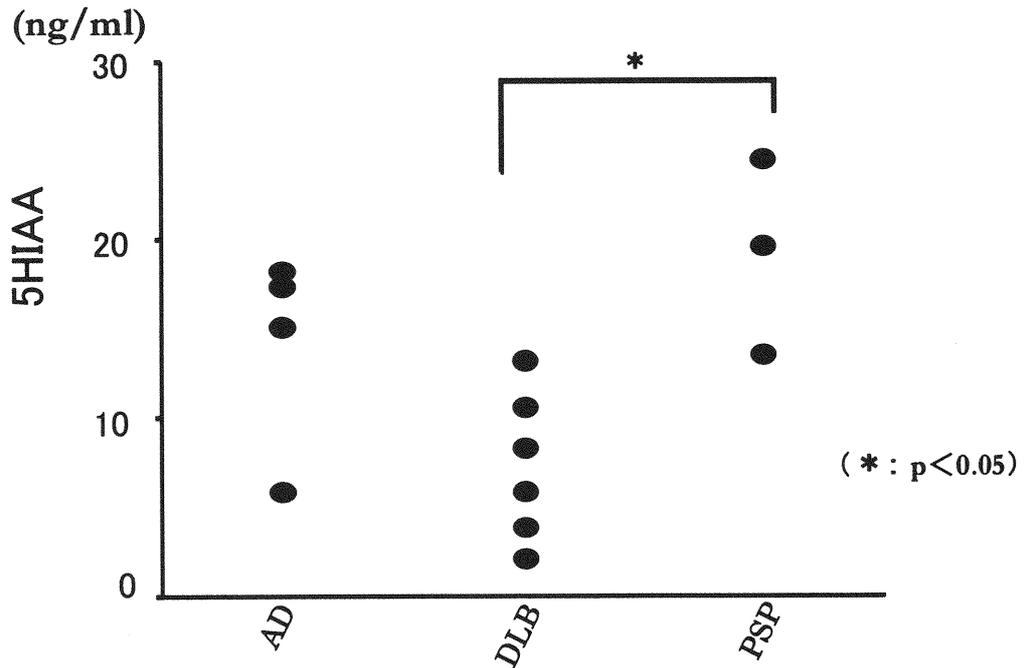


図6. 臨床例各疾患における脳脊髄液HVA

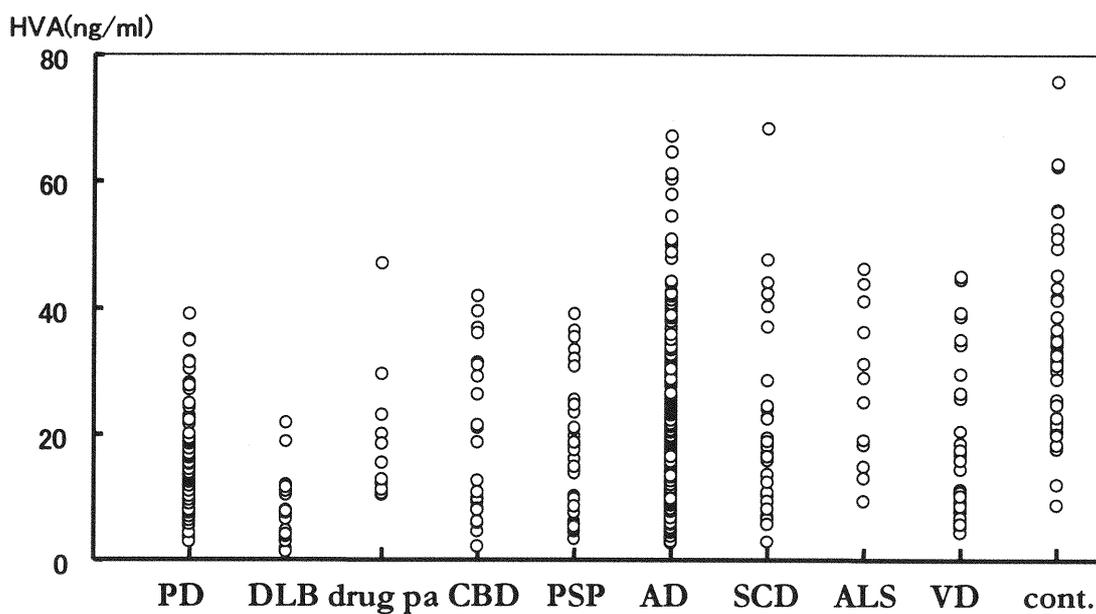


図7. 臨床例各疾患における脳脊髄液5HIAA

5HIAA
(ng/ml)

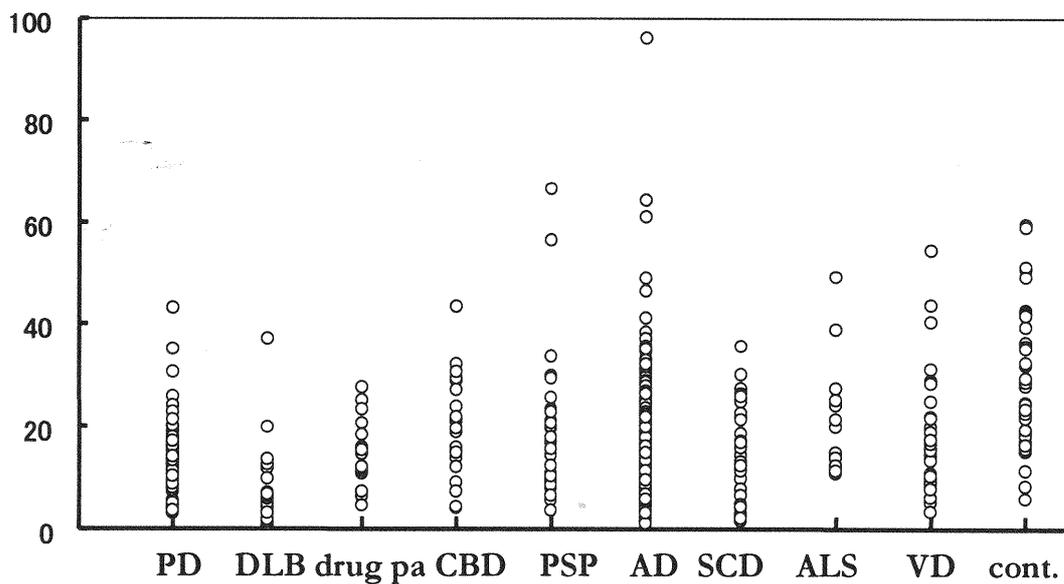


表2. 臨床例各疾患におけるHVA・5HIAA

| | n | HVA ng/ml | 5HIAA ng/ml |
|---------|-----|--------------|--------------|
| PD | 76 | 15.8±8.1 ** | 12.5±7.2 ** |
| DLB | 22 | 8.0±5.2 ** | 8.1±7.9 ** |
| drug pa | 17 | 18.9±12.1 * | 14.9±6.5 ** |
| CBD | 22 | 20.0±12.9 * | 19.4±9.8 |
| PSP | 37 | 17.2±10.7 ** | 19.1±12.8 * |
| AD | 215 | 22.1±13.3 ** | 17.6±11.5 ** |
| SCD | 31 | 21.2±14.9 * | 16.3±9.3 ** |
| ALS | 13 | 27.7±12.3 | 22.8±11.3 |
| VD | 31 | 18.5±12.5 ** | 17.3±12.2 ** |
| cont. | 38 | 35.2±15.0 | 30.6±13.9 |

(ANOVA, * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$)

全身疾患としてのレヴィー小体病概念確立のための臨床病理学的研究

分担研究者： 齊藤 祐子（東京都老人医療センター・剖検病理科）

研究協力者：○池村 雅子（東京都老人総合研究所・高齢者ブレインバンク）

仙石 鍊平（同上）

主任研究員： 村山 繁雄（同上）

研究要旨

高齢者ブレインバンク蓄積例を用い、パーキンソン病（PD）/ 認知症を伴う PD（PDD）/ Lewy 小体型認知症（DLB）の末梢自律神経病理を、中枢神経系病理との関連で検索し、以下の新知見を得た。1. PD/PDD/DLB では皮膚に分布する神経に、抗リン酸化 α シヌクレイン抗体免疫染色陽性 Lewy 小体関連病理が広がる。2. PD/PDD/DLB 発症過程では極初期段階を除いて、副腎に高率に Lewy 小体関連病理が出現し、交感神経節出現率とほぼ一致する。3. 神経原線維変化、老人斑、嗜銀顆粒等の変性型老化関連病理は、Lewy 小体関連病理の分布を中枢神経系に偏位させる傾向をもつ。4. 末梢自律神経系において、Lewy 小体関連病理は、交感神経節、副腎、皮膚の出現頻度勾配を認める。5. 末梢自律神経系が Lewy 小体関連病理の初発部位となりえ、また末梢優位の Lewy 小体関連病理の広がりを示す群が存在する。本研究により、PD/PDD/DLB が、その発症過程を含め、全身疾患であることが、病理学的にはじめて示された。

A. 研究目的

パーキンソン病（PD）は、老化関連中枢神経系変性疾患の中で、末梢自律神経系を障害する唯一の疾患である。この末梢自律神経病変は、生命予後に直結するにもかかわらず、系統的検索はあまり行われていない。最近 ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィが PD/ 認知症を伴う PD（PD with dementia: PDD）/ Lewy 小体型認知症（DLB）の診断に有用であることが本邦を中心に報告され、PD の末梢自律神経病理に関心が集まっている。

我々は、高齢者ブレインバンクの連続剖検例を、パワー神経病理学的手法で網

羅的に検索することで、末梢自律神経病理と中枢神経病理の関連の解明を試みた。

B. 研究方法

対象：

高齢者ブレインバンク登録例を対象とした。中枢神経系については DNA が保存されている全例と現在蓄積されている症例（剖検後 49 日をデッドラインとして）について、高感度鍍銀染色と、各種免疫染色により、老化性変性疾患関連変化のステージ分類と、画像と対応させた脳血管障害病への評価を完了した。

副腎については 1999 年 10 月～2006 年 3 月に当施設で剖検が行われ、中枢神

経系・副腎ともに検索可能な 783 例（男性 455 例、女性 328 例）を対象とした。対象症例の死亡時平均年齢は 80.7 ± 8.8 歳（48 歳～104 歳）であった。

皮膚については、2003 年 3 月から 2006 年 3 月までの 279 例（男性 167 例、女性 112 例）については、上腕の皮膚をパラフォルム固定、腹部皮膚を 10% 中性ホルマリンに固定し評価した。これらの症例は、全て副腎も検索した。

さらに、腹部皮膚については通常検索部位に含まれているので、1995 年 1 月から 2006 年 3 月までに当施設で行われた連続開頭剖検例 1594 例中、中枢神経系に Lewy 小体を認め、黒質の変性を伴う症例 142 例（男性 72 例、女性 70 例）に関して検討を加えた。対象症例の死亡時平均年齢は 83.7 ± 7.6 歳（48 歳～100 歳）Lewy 小体が中枢に存在する対象症例の死亡時平均年齢は 80.8 ± 8.6 歳（52 歳～104 歳）であった。剖検開始までの死後時間は 52 分から 88 時間 25 分にわたり、平均 12 時間 59 分であった。

交感神経節に関しては、当施設連続開頭剖検例、154 例（男性 88 例、女性 66 例、2004 年 4 月～2006 年 3 月）を対象とした。対象症例の死亡時平均年齢は 80.8 ± 8.6 歳（52～100 歳）である。全ての症例で、副腎、前腕・腹部皮膚が検索された。

方法：

Ventana 20NX autostainer (Ventana, Tucson, AZ) を用いて免疫染色を行った。レヴィー小体関連病理の評価には、以下の三種の抗体を用いた：抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (psyn) (psyn#64 monoclonal and Pser129 polyclonal)、抗 α シヌクレイン抗体 (LB509, monoclonal)。レヴィー小体の確認には、Hematoxylin and Eosin 染色と、抗ユビキ

チン抗体 (polyclonal, DAKO, Glostrup, Denmark) 免疫染色を適宜併用した。また、交感神経のマーカーとしては抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (monoclonal, Calbiochem-Novabiochem Corporation, Darmstadt, Germany) を、軸索の同定には抗リン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI31, monoclonal, Sternberger Immunochemicals, Bethesda, Maryland, U.S.A.) を採用した。

C. 研究結果

副腎の Lewy 小体の頻度は、中枢神経系の Lewy 小体の密度にほぼ匹敵するが、中枢神経系に Lewy 小体のない 2 例で副腎に Lewy 小体を認め、初期出現においては、必ずしも相関しない結果を得た。

また、PD/PDD では全例に、副腎で Lewy 小体を認めた。DLB においては、AD や tauopathy の合併病変が軽い症例では副腎は全例陽性であったが、重複病変が強い症例の 1/3 で副腎は陰性であり、かつこれらの症例にはパーキンソン症状の記載はなかった。

皮膚では皮膚真皮・皮下組織内神経束に、psyn 抗体陽性所見を認めた。中枢に陽性構造のない例、突起内陽性所見のみ認める例、Lewy 小体はあるが黒質の退色がない例では、皮膚に陽性所見はなかった。陽性所見は、Lewy 小体を伴い黒質変性はあるが、臨床記載がない 14 例中 3 例 (21.4%)、認知症のないパーキンソン病 (PD) 4 例中 4 例 (100%)、PDD 15 例中 11 例 (73.3%)、DLB 28 例中 14 例 (50%) に認めた。

交感神経節・副腎・皮膚の全てが検索された例では、Lewy 小体の出現頻度が最も高いのが交感神経節であるが、一例の例外を除き、Lewy 小体を伴う黒質変性を伴う症例は、パーキンソン症状や認知症の記載の有無にかかわらず、副腎にも陽

性所見を伴っていた。例外の一例は、DLB 新皮質型であるが、高度の Alzheimer 病変を合併しており、交感神経節のみに Lewy 小体を認め、副腎には認めなかった。また皮膚陽性例は全て副腎陽性であった。さらに、交感神経節に Lewy 小体を認めるが、中枢神経系に認めない例が 6 例存在し、これらは末梢優位の分布をとる症例と判断された。

D. 考察

本研究で、以下の 4 つの新知見を得た。

1. PD/ PDD/ DLB では高率に、皮膚に分布する末梢自律神経に、抗 psyn 抗体免疫染色陽性 Lewy 小体関連病理が広がる。皮膚に Lewy 小体関連病理を認める場合、中枢には Lewy 小体に関連黒質変性が存在する。このことは、部位と症例を的確に選べば、皮膚生検で、PD/ PDD/ DLB の診断がつくことを意味する。
2. PD/ PDD/ DLB 発症過程では、極初期段階を除いて、副腎に高率に Lewy 小体関連病理が出現し、交感神経節出現率とほぼ一致する。このことは、副腎を用いることで、自律神経病理の検索が可能であることを意味し、今後の検索の可能性を広げる重要な知見と考える。
3. 神経原線維変化、老人斑、嗜銀顆粒等の変性型老化関連病理が存在すると、Lewy 小体関連病理の分布が中枢神経系優位となる傾向を示す。老化において、重複病変の頻度は極め高いことを考慮した時、臨床上参考となる知見と考えられる。
4. 末梢自律神経系において、Lewy 小体関連病理は、交感神経節、副腎、皮膚の出現頻度勾配を認める。また、末梢自律神経系が Lewy 小体関連病理の初発部位となりえ、かつ末梢優位の Lewy 小体関連病理の広がりを示す群が存在する。これは、Lewy 小体関連進行性自律神経不全

症の前駆状態の存在を支持する知見である。

E. 結論

高齢者一般コホートにおいて、Lewy 小体関連病変は、病初期においては独立して、また進行期においては中枢神経系病変と相関して、末梢自律神経系を障害する点に、今後留意する必要がある。

[文献]

1. Saito, Y., et al., Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. 63(7): p. 742-9.
2. Saito, Y., et al., Severe involvement of ambient gyrus in dementia with grains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002. 61(9): p. 789-96

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, Mizusawa H, Murayama S: Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lesy body disease. *J Neuropath Exp Neurol* in press
2. 池村雅子：全身疾患としてのレヴィー小体病概念確立のための臨床病理学的研究。平成 19 年度東京大学大学院医学系研究科過程博士論文（この後に添付）

口頭発表

1. Fumimura Y, Saito Y, Ikemura M, Arai T, Sawabe M, Kanemaru K, Mizusawa H,

Murayama S: Adrenal gland is useful for evaluating the pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lewy body disease. the 47th Annual Meeting of Japanese Society of Neuropathology, Okayama, May 2006. Neuropathology; 2006: 26: A57

2. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Hatsuta H, Sakiyama Y, Arai T, Sawabe M, Iwatsubo T, Fukayama M, Murayama S: Dermal alpha-synucleinopathy in Lewy body disease. Neuropathology 2006; 26: A57

3. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Fumimura Y, Arai T, Sawabe M, Ito G, Iwatsubo T, Fukuyama M, Murayama S: Lewy Body-related alpha-synucleinopathy involves cutaneous nerves in human aging process. the 16th International Congress of Neuropathology, San Francisco, Sep. 2006. Brain Pathology 2006; 16 Sup. 1: S57

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

参考文献：池村雅子博士 東京大学学位論文

全身疾患としてのレヴィー小体病概念確立のための
臨床病理学的研究

池村 雅子

題名：全身疾患としてのレヴィー小体病概念確立のための、臨床病理学的研究

| | |
|--|----|
| 目次 | 1 |
| 略語 | 2 |
| 序章 | 3 |
| 第一章 中枢神経系の評価－東京都高齢者ブレインバンクプロトコール | 6 |
| 第二章 副腎を用いたレヴィー小体病の末梢自律神経病理の検討 | 10 |
| 第三章 皮膚を用いたレヴィー小体病の末梢自律神経病理の検討 | 19 |
| 第四章 交感神経節を用いたレヴィー小体病の末梢自律神経病理の検討 ～皮膚・副腎・交感神経節におけるレヴィー小体関連病理の比較～ | 28 |
| まとめ | 33 |
| 表及び図 | 35 |
| 参考文献 | 57 |
| 謝辞 | 63 |

略語

AD : Alzheimer's disease、アルツハイマー病

ADL : Activities of Daily Living

AGD : Argyrophilic grain disease、嗜銀顆粒性疾患

CBD : corticobasal degeneration、大脳皮質基底核変性症

CDR : clinical dementia rating

DLB : dementia with Lewy bodies、レヴィー小体型認知症

DLBD : diffuse Lewy body disease、びまん性レヴィー小体病

DLBT : DLB, transitional form

DLBN : DLB, neocortical form

H&E : hematoxylin & eosin

KB : Klüver-Barrera

LBD : Lewy body disease、レヴィー小体病

MIBG : [¹²³I]meta-iodobenzylguanidine

MSA : multiple system atrophy、多系統萎縮症

NFT : neurofibrillary tangle

NFTD : neurofibrillary tangle predominant form of dementia

NPD : neuropathological diagnosis

PD : Parkinson's disease、パーキンソン病

PDD : Parkinson's disease with dementia、認知症を伴うパーキンソン病

PDDT : PDD, transitional form

PDDN : PDD, neocortical form

PSP : progressive supranuclear palsy、進行性核上性麻痺

psyn : anti-phosphorylated α -synuclein antibody

TH : tyrosine hydroxylase

序章

レヴィー小体病 (Lewy body disease、以下 LBD) とは、病理学的にレヴィー小体の出現を認める状態の総称であり、疾患としてはパーキンソン病 (Parkinson's disease、以下 PD)、認知症を伴う PD (PD with dementia、以下 PDD)、レヴィー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies、以下 DLB)、レヴィー小体を伴う進行性自律神経不全症 (Lewy body-related progressive autonomic failure) を含む。レヴィー小体とは、光学顕微鏡的に hematoxylin & eosin (H&E) 染色で好酸性を示す神経細胞内の円形構造物であり、免疫組織化学的にニューロフィラメントやユビキチンに対する抗体で陽性となるほか、近年主要構成成分は α シヌクレインである事が判明した[1, 2]。PD において α シヌクレインが注目されたのは、 α シヌクレインが家族性 PD である PARK1 の責任遺伝子である事が明らかとなった事にはじまり[3]、 α シヌクレインの過剰産生自体が PD の原因となりうる事[4]、レヴィー小体の主要成分である事が示されたから、現在 PD の発症に大きく関与する分子として多くの研究がなされている。 α シヌクレインは 140 のアミノ酸からなり、正常脳のシナプス前末端に存在する可溶性蛋白であるが、何らかの原因によりコンフォメーション異常を生じ、不溶性となる事が神経細胞変性やレヴィー小体形成につながると考えられている。正常マウス脳の α シヌクレインは数%のみがリン酸化されており、さらに死後すぐに脱リン酸化されるのに対し、LBD の脳に蓄積した α シヌクレインは 129 番 Serin 位で特異的にリン酸化している事が発見され[5]、このリン酸化が α シヌクレイン凝集性の変化に何らかの原因があると示唆されている。このように PD 発症メカニズムとして、 α シヌクレイン凝集性の変化のほか、これら処理する蛋白分解に重要な役割を果たすユビキチン-プロテアソーム系の異常の関与も示唆されている[6]。

α シヌクレインはレヴィー小体の構成成分である事が判明した他、多系統萎縮症 (multiple system atrophy、以下 MSA) で見られるグリア細胞あるいは神経細胞内の封入体も抗 α シヌクレイン抗体で強陽性となる事が判明し、 α シヌクレインの異常蓄積を原因とする疾患概念として α シヌクレイノパチーが提唱された。 α シヌクレイノパチーは、LBD や MSA を含む一次性 α シヌクレイノパチーと、タウオパチーやアルツハイマー病 (Alzheimer's disease、以下 AD) に合併する二次性 α シヌクレイノパチーに分類される。二次性 α シヌクレイノパチーは扁桃核に強調されたレヴィー小体関連病理を示すと認識されている。本研究では一次性・二次性 α シヌクレイノパチーを含めた LBD における末梢神経系レヴィー小体関連病理を検索した。はじめに LBD の歴史的背景及び末梢自律神経系検索の重要性につき言及する。

PD は安静時振戦、無動、筋固縮、姿勢反射障害を四大症候とする緩徐進行性神経変性疾患であり、1817 年、James Parkinson により臨床像の詳細な記載がなされた事に始まり、その後 Charcot により PD と名付けられた。神経病理学的検討については 1912 年にドイツ人である Lewy がレヴィー小体を発見した事に始まる。その後、1919 年 Tretiakoff により PD では黒質の変性が病態に深く関与している事が指摘された。

初期にはPDの臨床像として運動障害に焦点があてられ、知的機能は障害されないと考えられていたが、CharcotによりPDでも認知症がみられる事が報告され、現在ではAD、血管性認知症とともに認知症をきたす代表的疾患であると認識されている。当初PDに合併した認知症の多くは、ADの合併によるものであるという報告がみられたが、小阪らにより、レヴィー小体が脳皮質に広汎に広がる症例が報告され、びまん性レヴィー小体病(diffuse Lewy body disease、以下DLBD)が提唱された[7]。小阪らはPDとDLBDを、レヴィー小体病というスペクトラムの中でとらえ、レヴィー小体の分布により、脳幹型、移行型、瀟慢型に分類した。その後、しばしばDLBDにはADの病理が合併する事から、レヴィー小体型老年痴呆(senile dementia of Lewy body type、以下SDLT) [8]や、レヴィー小体型アルツハイマー病(Lewy body variant of Alzheimer's disease、以下LBV) [9]などの名称が提唱されるようになり、混乱が生じるようになった。これらの混乱を收拾するため、1995年に第1回DLB国際診断基準会議が開かれ、DLBD、SDLT、LBVを含めた包括的疾患概念としてDLBの名称が提唱されるとともに、臨床及び病理診断基準が報告された[10]。2003年9月には第3回DLB国際診断基準会議が開催され、診断基準の改訂版が示された[11]。1996年に制定されたDLBの病理学的診断基準は、前帯状回、第二前頭回、第二側頭回、移行嗅内野、縁上回をH&E染色と抗ユビキチン抗体免疫染色で評価、決められた範囲内でレヴィー小体の数を数え、レヴィー小体スコアを算出し、脳幹型、移行型、新皮質型に分類するものであった。2005年に出版された改訂基準では、抗 α シヌクレイン抗体免疫染色を用い、上記部位に加え、迷走神経背側運動核、青斑核、黒質、扁桃核、Meynert基底核を検索し、染色の強さを半定量的に評価し、脳幹型、移行型、新皮質型に分類するとされているが、先の分類との不一致を示すなど問題が多く、改訂基準がどこまで普及するかは、現時点では不明である。

LBDの重要な臨床症状として、運動障害、知能障害のほかに、自律神経障害があげられる。LBDにおける自律神経障害としては、便秘、排尿障害、起立性低血圧、発汗障害等が知られている[12]。これらの自律神経症状は、患者のquality of lifeにとって非常に重要なものであるだけでなく、直接生命予後に影響する。そのため、自律神経症状を、発症早期より正しい認識のもとで治療計画に組み入れ、経過観察することが重要である。しかし、DLBに関する神経病理学的興味は脳だけに集中しており、また、これらの診断基準の作成において重要な役割を果たした脳バンクは、脳しか扱っていないのが原則である。第1回、第3回DLB国際診断基準会議の検索推奨部位には、末梢神経系はおろか、交感神経節前線維の代表とされる脊髄中間外側核すら含まれていないのが現状である。

近年、 $[^{123}\text{I}]$ meta-iodobenzylguanidine (MIBG) 心筋シンチグラフィーにおいて、心筋へのMIBG集積低下がPDやDLBでは早期から見られ、他のパーキンソン症状や認知症をきたす疾患との鑑別に有用である事が報告された事により、末梢自律神経系の病理に注目が集まっている[13-15]。これまでもかなり古くから、PDでは交感神経節に高率にレヴィー小体を認める事[16-18]や、消化管のマイスネルやアウエルバッハ神経叢[19-21]、副腎髓

質[16, 18]、骨盤神経叢[18]にレヴィー小体を認める事は報告されてきた。しかし、どれも少数例の検討であり、中枢神経系におけるレヴィー小体の広がりとの比較が乏しく、末梢自律神経系におけるレヴィー小体関連病理の系統的な検討は行われていない。これは末梢自律神経系におけるレヴィー小体関連病理が、H&E染色で認識困難なものが多いことも一因となっていると考えられる。しかし前述したように、レヴィー小体の主要構成成分が129番 Serin 位でリン酸化された α シヌクレインである事が発見され[5]、リン酸化 α シヌクレインに対する抗体を用いる事によって、レヴィー小体関連病理の検出感度・特異度が著しく上昇した[22]。この結果、レヴィー小体に至る神経細胞の形態学的変化や神経突起の変化、及び中枢神経系のレヴィー小体関連病理の分布に関し、多くの新しい知見がもたらされた。この手法は、末梢自律神経系にも活用できるはずである。しかし、一般的な神経病理学的検索スタイルからは、交感神経節前線維の評価は、脊髄採取の機会が乏しいため不十分であり、剖検時検索が必要な交感神経節後線維に至っては評価不能である。また、本邦では疾患を持つ脳しか開頭しない事が一般的であり、老化におけるレヴィー小体関連病理の位置づけの検討も困難である。

本研究は、東京都老人医療センターにおいて、剖検例の開頭許可を出来る限り全例で得る努力をし、脊髄を全例で採取し、全身剖検を神経病理部も担当してきた伝統により、可能となった。これにより、一般高齢者をほぼ代表する連続剖検例での、脳・脊髄・末梢自律神経系を抗リン酸化 α シヌクレイン抗体免疫染色で検索し、全身におけるレヴィー小体形成と疾患に至るプロセスの検討を行った。

本研究では、学位の4年間で取り組んだ順に章別に記載した。第一章では、最初から取り組んだ中枢神経系の神経病理学的評価方法について記載した。これは第二章から第四章全ての検索に関わるものである。第二章では、交感神経節相同器官とされ、通常剖検時に検索される臓器である副腎に注目して、副腎がLBDにおける末梢自律神経系の病理学的評価部位として有用であるかを、連続剖検例を用いて検討した。第三章では、末梢自律神経が分布する部位のうち、生前検索可能である皮膚に注目して、皮膚におけるレヴィー小体関連病理を、抗リン酸化 α シヌクレイン抗体を用いた免疫組織化学的手法により検討した。この章は本研究の中心テーマであり、前方視的に連続剖検例を用いた検討と、後方視的にLBDを抽出した検討を示す。第四章では、自律神経系の代表格とされ、LBDでは古くよりレヴィー小体の出現する部位として知られている交感神経節のレヴィー小体関連病理を、連続剖検例において検討し、中枢神経系におけるレヴィー小体関連病理との比較を行うとともに、第二章、第三章で検討した副腎、皮膚の結果を統合して、全身の末梢自律神経系へのレヴィー小体関連病理の広がりを検討した。

第一章 中枢神経系の評価 - 東京都高齢者ブレインバンクプロトコール -

1.1. 臨床症状の評価

東京都老人医療センターにおいて剖検が施行された全例において、二人の神経内科専門医が、病歴（含 Mini-Mental State Examination (MMSE)、改訂長谷川式簡易知能スケール、手段的日常生活動作、Instrumental ADL）[23-26]、主治医との協議、許可の得られる場合は介護者のインタビューを通じ、Clinical dementia rating (CDR)を決定し[27]、認知機能の評価を行った。また病歴より生前におけるパーキンソン症状の有無を抽出した。

1.2. 神経病理学的評価

1.2.1. 剖検時 —固定前の処理—

全開頭剖検例に神経病理医が立会い、臨床医からの情報や神経放射線画像をもとに、脳の凍結部位を検討。脳は写真撮影後、脳重量測定や出血・梗塞など血管性病変の有無、萎縮、動脈硬化の程度等を含め外表観察を行い、原則として非優位半球、病変が外表的に認められる場合は非病変側を凍結側として最終的に決定した。凍結側の脳は7mm厚冠状断、脳幹は約5mm厚水平断、小脳は7mm厚矢状断の断面を作成。断面の肉眼的観察、写真撮影を行った後、凍結側より組織学検索を行うルーチン部位として前頭葉、側頭極、頭頂間溝を含む頭頂葉、後頭葉、後方海馬、扁桃核、歯状核を含む小脳、中脳、嗅球を採取、その他病変部位を適宜追加採取した。これらを4%パラフォルムアルデヒドに48時間固定し、パラフィン包埋後、6 μ m切片を通常染色に加え、後述する特殊染色や免疫組織化学染色を施行し病理組織学的に評価を行った。

1.2.2. 固定後

凍結側の反対側は20%中性緩衝ホルマリンに7~13日固定後、神経内科、リハビリテーション科医と神経病理との合同ブレインカッティングカンファランスを施行した。固定後の半脳も原則として凍結側と同様に断面を作成した。肉眼的に黒質の脱色素の有無を含め断面を観察後、レヴィー小体型認知症（dementia with Lewy bodies、以下DLB）診断基準会議の推奨部位(図1)[10, 11]を含めた代表的部位の切り出しを行った。ルーチンの切り出し部位を表1に示す。パラフィン包埋後、6 μ m切片を作成し、通常染色に加え後述する特殊染色や免疫組織化学染色を施行し病理組織学的評価を行った。

1.2.3. 染色

1) 通常染色として全切片にhematoxylin & eosin (以下H & E)染色とKlüver-Barrera(以下KB)染色を施行した。

2) 特殊染色

神経変性型老化関連病理の評価のため代表的部位に鍍銀染色である改良 methenamine 銀染色[28]、Gallyas-Braak 染色[29]、Bielschowsky 染色、アミロイド沈着評価目的に Congo-red 染色、そして血管病理の評価目的に elastica Masson trichrome 染色を行った。

3) 免疫組織化学染色

パラフィン包埋ブロックを 6 μ m 厚に薄切し、シランコーティングガラスの上のせ、脱パラフィン後、Ventana 20NX autostainer (Ventana, Tucson, AZ)を用いて免疫染色を行った[30, 31]。中枢神経系のレヴィー小体関連病理の評価には以下の抗体を用いた。抗リン酸化 α シヌクレイン抗体(psyn) (psyn#64 monoclonal and PSer129 polyclonal)[5, 22]、抗 α シヌクレイン抗体(LB509, monoclonal, Jakes, 1996)、抗コピキチン抗体(polyclonal, DAKO, Glostrup, Denmark)。レヴィー小体関連病理以外の神経変性型老化関連病理の評価のため以下の抗体を用いた。抗リン酸化タウ抗体 (AT8, monoclonal, Innogenetics, Temse, Belgium)、抗アミロイド β 抗体 (β 11-28, 12B2, monoclonal, IBL, Maebashi, Japan)、抗 glial fibrillary acidic protein 抗体(GFAP, polyclonal, DAKO, Glostrup, Denmark)、抗 HLA-DR 抗体 (CD68, monoclonal, DAKO, Glostrup, Denmark)である。各々の抗体の希釈倍率及び抗原賦活法については表 2 に示す。

1.2.4. 組織学的評価方法

1) レヴィー小体関連病理の評価

レヴィー小体病 (Lewy body disease、以下 LBD) の病理学的変化は、単純に正常所見と病的所見に 2 分割できるものではなく、ある程度予測可能な分布に従いながら、徐々に広がるとともに、病変程度を増していくものである。つまり、臨床症状を呈していない症例にもレヴィー小体関連病理を認める事があり、この病変がある閾値を超えた場合にのみ、臨床的に症状を示すようになる。我々は、この加齢に伴う異常蛋白の蓄積は連続的プロセスであり、一定の閾値を越えた時に臨床症状を呈するという、変性型認知症診断基準の原則に配慮して、レヴィー小体関連病理の評価を行った。また、レヴィー小体関連病理はパーキンソン病 (Parkinson's disease、以下 PD) や DLB、レヴィー小体を伴う進行性自律神経不全症のような一次性シヌクレイノパチーに含まれるものの他、タウオパチーやアルツハイマー病 (Alzheimer's disease、以下 AD) に伴う二次性シヌクレイノパチーがあり、これらを包括的に評価した。

これまでに報告されている代表的なレヴィー小体関連病理の評価法としては Braak らによる PD の進展ステージ[32]と、DLB 国際診断基準会議に基づくレヴィー小体スコアによる評価法の二つがあげられる[11]。Braak らの進展ステージは、PD と、認知症を除外した一般連続剖検例を用いて提唱されたものである。進展ステージは発症前の評価を行う点では適しているが、一次性シヌクレイノパチーである LBD の病理とは異なり、扁桃核に強調

されたレヴィー小体関連病理の像を示すと考えられている二次性シヌクレイノパチーとしてのLBDが、認知症を除外しているため含まれていない。本研究の対象である高齢者ブレインバンクは平均年齢80歳と高齢であり、認知症の合併率も高い事から、Braakらによる進展ステージと、本研究対象の傾向は完全には一致しない。一方、第1回DLB国際診断基準会議では、H&E染色あるいは抗ユビキチン抗体染色を用いて前帯状回、移行嗅内野、第二前頭回、第二側頭回、縁上回の5箇所認められるレヴィー小体の数を数え、レヴィー小体が存在し5個以内であれば1点、6個以上であれば2点としてそれぞれのスコアを算出する。5箇所の総計スコアをレヴィー小体スコアとし、レヴィー小体スコア2点以下が脳幹型、3点以上が移行型、7点以上でかつ五箇所の皮質検索部位全てにレヴィー小体が存在する場合、新皮質型に分類する方法である[10]。これはあくまでも、DLBと診断された症例の、皮質病変の広がりや評価する目的のもので、レヴィー小体進展の初期段階の評価には適さず、またレヴィー小体スコアと臨床症状との対応は考慮されていない。これらの理由により、本研究では臨床症状(パーキンソン症状と認知症の有無)、黒質の細胞脱落の有無、DLB国際診断基準会議に基づくレヴィー小体スコアを組み合わせた、高齢者ブレインバンク中枢神経系レヴィー小体ステージ分類に従った[22, 33]。これは、病理変化の程度と分布に、臨床症状との関係を考慮したステージ分類である。すなわち、ステージ0:レヴィー小体関連病理なし。ステージ0.5:抗リン酸化 α シヌクレイン抗体陽性となるLewy neuritesやdotsを認めるが、レヴィー小体なし。ステージI:レヴィー小体の出現をみる、黒質の脱色素なし(偶発性LBD)。ステージII:レヴィー小体の出現と黒質の脱色素を伴うが、単独で症状を発現するレベルに達していないか、達していても臨床の記載がない症例(発症前LBD)。ステージIII:認知症を伴わないPD。ステージIV:認知症を伴い、病理学的にレヴィー小体スコアで移行型の基準を満たす症例。ステージV:認知症を伴い、病理学的にレヴィー小体スコアで新皮質型の基準を満たす症例である。中枢神経系レヴィー小体ステージを表3に示す。

ステージIV・Vに関しては、第1回DLB国際診断基準会議に基づき、認知症で発症するか、パーキンソン症状と認知症との間隔が1年以内の症例をDLB、それ以外を認知症を伴うパーキンソン病(PD with dementia、以下PDD)とした[10]。

またステージ0.5からIIに関しては、レヴィー小体関連病理の中枢神経系における分布を把握するために、脳幹型(B)、移行型(T)、新皮質型(N)に分類するとともに、二次性シヌクレイノパチーの初期病変を区別するため、扁桃核に強調されたレヴィー小体関連病理を示す症例を扁桃核垂型とした。

2) その他の神経変性型老化関連病理の評価

神経原線維変化、老人斑はBraak分類[34]に基づいて評価を行った。つまり老人斑に関しては、ステージ0:なし、ステージA:新皮質に少数出現、ステージB:海馬にも出現、ステージC:新皮質一次野にも出現、の4段階にわけて評価を行い、神経原線維変化に関

してはステージ 0：なし、ステージ I：移行嗅内野にのみ出現、ステージ II：嗅内野にも進展し海馬傍回に多数出現、ステージ III：海馬内に進展、ステージ IV：海馬に多量に出現するが新皮質には少数、ステージ V：新皮質連合野に多数出現、ステージ VI：中心前回など新皮質一次野に多数出現、の 7 段階で評価を行った。AD の病理学的診断は Braak らの神経原線維変化ステージ IV 以上、老人斑ステージ C を満たすものとした[35]。神経原線維変化優位型認知症の病理学的診断は、Braak の老人斑ステージ A 以下で、神経原線維変化ステージ III 以上で、他の認知症を呈する病理を認めない症例を診断した[36]。

嗜銀顆粒は高齢者ブレインバンクの提唱する齊藤らの分類に基づき、ステージ 0：なし、ステージ I：迂回回を含む側頭葉内側面・扁桃核移行部に限局、ステージ II：側頭極から後方海馬に至る側頭葉内側面に進展、ステージ III：中隔、前帯状回、島回に広がり、迂回回の変性を伴う、の 4 段階で評価を行った[37]。嗜銀顆粒性認知症の病理学的診断は、嗜銀顆粒がステージ III 以上か、ステージ II でも他に認知症を呈する病理を認めないことを診断根拠とした。

第二章 副腎を用いたレヴィー小体病の末梢自律神経病理の検討

2.1. 副腎の特異性

副腎は左右の腎臓上極に位置する後腹膜臓器である。副腎は表層の大部分を占める皮質と深部に位置する髄質とに区別される。両者は異なる起源をもち、皮質は胎児期の腹腔後壁を覆う中胚葉細胞から発生するのに対し、髄質は自律神経節細胞と同様に外胚葉である神経堤に由来する。つまり副腎髄質は胎生 7 週頃に神経堤から遊走してきた交感神経系の細胞が皮質原基に進入する事で形成される。これらの細胞が、軸索突起を持たない内分泌型の細胞へと分化した 3 種類のクロム親和細胞によって主に副腎髄質は構成されるが、そのほか、神経節細胞自体も髄質内に見られる。また同じく神経堤に由来し髄質原基と同様でありながら、皮質原基に進入せずに形成された、髄質同等臓器と考えられている傍神経節も副腎周囲に散在している。

副腎の神経は主として、大・小内臓神経由来の交感神経節前線維であり、その他迷走神経由来の副交感神経が混在する。交感神経節前線維は、他の内臓臓器と異なり、腹腔神経節ではシナプスを形成せずに素通りし、直接副腎に入り髄質細胞との間にシナプスを形成する。すなわち、副腎髄質細胞は節後線維系に相当する[38, 39]。

このように副腎髄質は神経堤に由来する事、髄質には神経節細胞が含まれている事、副腎髄質自体が神経節後線維に相当する事等より、副腎は交感神経節と相同の器官とされてきた。これに加え、副腎周囲の脂肪組織内にも副腎と同等のパラガングリオンと共に多数の神経節が含まれている。

パーキンソン病 (Parkinson's disease、以下 PD) において、交感神経節にレヴィー小体を認める事は古くから報告されているが[16]、交感神経節は通常の剖検で採取される事はほとんどなく、レヴィー小体病 (Lewy body disease、以下 LBD) の末梢自律神経系の病理評価を一般に行うのに適している部位とは言えない。これに対し、交感神経節と相同とされる副腎は、剖検時必ず採取され、組織学的に評価される臓器であり、もし副腎が LBD の自律神経病理評価を代表するとすれば、これまでの蓄積例が全て活用できるだけでなく、通常の剖検手技で、LBD の自律神経病理が評価可能ということになる。副腎髄質あるいは周囲の神経節にレヴィー小体を認める報告も認められるが、その詳細な観察や、中枢神経病理との関連など、系統的な検討は見られない[16, 18]。LBD の末梢自律神経系の評価に、副腎が有用であるか否かを明らかにするために、以下の系統的な検討を行った。

2.2. 対象

東京都老人医療センター高齢者連続剖検例中、1999 年 10 月～2006 年 3 月に剖検が行われ、中枢神経系・副腎ともに検索可能な 783 例 (男性 455 例、女性 328 例) を対象とした。対象症例の死亡時平均年齢は 80.7 ± 8.8 歳 (48 歳～104 歳) である。剖検開始までの死後