

時間は 52 分から 88 時間 25 分にわたり、平均 13 時間 10 分±6 時間 36 分であったが、高齢者であるためほとんど死後 1 時間以内に 4°C の冷蔵庫内に保管され、死後変化が軽い点の特徴である。

2.3. 方法

2.3.1. 副腎の病理学的検索の方法

10%緩衝ホルマリン固定後、両側の副腎最大断面をパラフィン包埋し、3 μm あるいは 6 μm 厚の切片を作成した。脱パラフィン後、hematoxylin & eosin (H&E) 染色と後述する免疫組織学的染色を施行した。

2.3.2. 中枢神経系の評価

パーキンソン症状や認知症の有無等の臨床的評価や中枢神経系の病理評価は前述した高齢者ブレインバンクプロトコールに従って行った。全例において中枢神経系レヴィー小体ステージを評価するとともに、神経原線維変化や老人斑、嗜銀顆粒等の神経変性型老化関連病理に関してもステージ分類を行った。

2.3.3. 免疫組織化学

副腎切片は Ventana 20NX autostainer (Ventana, Tucson, AZ)を用いて免疫染色を行った。副腎の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、H&E 染色と、抗コビキチン抗体 (polyclonal, DAKO, Glostrup, Denmark) を適宜併用した。また、交感神経のマーカーとしては tyrosine hydroxylase (TH) に対する抗体 (抗 TH 抗体, monoclonal, Calbiochem-Novabiochem Corporation, Darmstadt, Germany) を、軸索の同定にはリン酸化ニューロフィラメントに対する抗体 (SMI31, monoclonal, Sternberger Immunochemicals, Bethesda, Maryland, U.S.A.) を採用した。

2.3.4. 統計方法

各群間の比較は 2 検定あるいは Fisher 直接法により行った。p<0.05 を有意と判定した。

2.4. 結果

2.4.1. 対象症例の臨床症状

対象症例 783 例中 710 例において Clinical dementia rating (CDR) の評価が可能であり、それぞれの症例数は、CDR 0 : 265 例、CDR 0.5 : 111 例、CDR 1 : 144 例、CDR 2 : 66

例そして CDR 3 : 124 例であった。

2.4.2. 中枢神経系におけるレヴィー小体関連病理の評価

対象症例 783 例中、中枢神経系にレヴィー小体関連病理を認めた症例は 206 例であり、26.3%を占めた。この 206 例のうち、パーキンソン症状、認知症の両方あるいはどちらかの臨床症状を有する症例は 123 例 (59.7%) であり、そのうちレヴィー小体関連病理がこの両者あるいはいずれかの臨床症状の原因と判断された例は 56 例であった。4 例にレヴィー小体関連病理によると判断できるパーキンソン症状、24 例にレヴィー小体関連病理によると判断される認知症のみを認め、28 例にレヴィー小体関連病理が原因と思われるパーキンソン症状及び認知症を認めた。認知症を伴う症例のうち、レヴィー小体を伴う認知症とその他の神経変性疾患の合併は 12 例あり、その内訳は移行型を満たす DLB (DLBT) とアルツハイマー病 (Alzheimer's disease、以下 AD) の合併が 2 例、DLBT と嗜銀顆粒性疾患 (Argyrophilic grain disease、以下 AGD) の合併が 3 例、新皮質型を満たす DLB (DLBN) と AD の合併が 5 例、DLBN と進行性核上性麻痺の合併が 1 例、DLBN と diffuse neurofibrillary tangles with calcification の合併が 1 例であった。レヴィー小体は認めるが、認知症とは関連するレベルでないと判断された例は、他の変性型認知症や、血管障害型認知症を伴っていた。また、Lewy 小体は認めるが、パーキンソン症状を説明できるレベルではないと判断された症例は、パーキンソン症状を呈する他の変性疾患、血管障害性パーキンソン症候群と診断してよいレベルの病変、あるいは説明できる病理がなく、薬剤性と判断せざるを得ない症例よりなっている。

783 例の中中枢神経系レヴィー小体ステージは以下のようになる。ステージ 0 : 577 例、ステージ 0.5 : 36 例、ステージ I : 85 例、ステージ II : 29 例、ステージ III : 4 例、ステージ IV : 27 例、ステージ V : 25 例である。ステージ I の 85 例を型別にすると、IB : 41 例、IT : 35 例、IA : 9 例となり、ステージ II では II B : 5 例、II T : 19 例、II N : 2 例そして II A : 3 例である。

2.4.3. 副腎におけるレヴィー小体関連病理の評価

1) 副腎に認められるレヴィー小体関連病理

783 例中 87 例 (11.1%) において副腎に psyn 陽性所見を認めた。psyn 陽性となるレヴィー小体関連病理の副腎における出現部位としては以下の 4 箇所が同定された。

1. 副腎髄質内神経節細胞 (図 2-1)
2. 副腎皮質の間質を通る神経束 (図 2-2)
3. 副腎被膜脂肪組織内神経節 (図 2-3)
4. 副腎被膜脂肪組織内神経束 (図 2-4)

副腎被膜脂肪組織内神経節細胞及び、副腎髄質神経節細胞はいずれも、交感神経のマーカーとして知られる抗 TH 抗体陽性となり、交感神経節細胞であると推測される (図 2-3-4)。

副腎被膜脂肪組織内神経節では Lewy neurites のほか、H&E 染色のみでも確認できるレヴィー小体を多数認めたが、レヴィー小体の形成されている部位は神経細胞内よりも周囲の突起内に多く見られ、交感神経節において報告されているレヴィー小体の特徴と一致していた。副腎髄質の神経節細胞においても同様であり、神経節細胞内よりも周囲の突起にレヴィー小体関連病理を認める傾向にある[17]。神経節細胞以外の副腎髄質細胞内にレヴィー小体は認めなかった。副腎被膜脂肪組織内神経束には psyn 陽性となる点状・線状の陽性所見が散見され、少数ではあるが腫大突起として H&E 染色で認識可能なものもある。大部分を占める前者の陽性部位では抗リン酸化ニューロフィラメント抗体である SMI31 の染色性の低下は見られないが、腫大突起部位では、辺縁部には SMI31 陽性所見を認めたが中心部では染色性の低下を認めた[40, 41]。副腎髄質や副腎被膜脂肪組織内神経節・神経束と比較すると出現頻度は少ないが、副腎皮質にも、細胞索間に線状、部分的に類円形を呈する psyn 陽性所見を認めた。

副腎に psyn 陽性所見を認めた 87 例について、psyn 陽性所見出現部位を検討すると、表 2-1 のようになる。出現部位の 1、2 を副腎実質内、3、4 を副腎実質外として比較を行うと、実質内陽性は 87 例中 60 例（69.0%）で、実質外陽性は 87 例中 86 例（98.8%）とほぼ全例であった。

2) 副腎に出現する psyn 陽性レヴィー小体関連病理の形態

副腎に出現する psyn 陽性所見の形態としては、免疫組織化学的所見と H&E 染色における性質によって、2 パターンに分けられる。すなわち、1. 免疫組織化学的に psyn 所見を認め、H&E 染色においてもレヴィー小体や pale body を確認できる。2. 免疫組織化学的に psyn 陽性所見を認めるが、H&E 染色においては確認できない。レヴィー小体関連病理を認める 87 例中、37 例がパターン 1 であり、50 例がパターン 2 であった。

3) 中枢神経系レヴィー小体ステージと副腎 psyn 陽性レヴィー小体関連病理の比較

各中枢神経系レヴィー小体ステージにおける副腎 psyn 陽性所見の出現頻度を表 2-2 に示す。認知症の有無に関わらず、PD は全例副腎に psyn 陽性所見を認めた。中枢神経系にレヴィー小体関連病理を認めないステージ 0 の 1 例、極少数の Lewy neurites や dots を認めるステージ 0.5 の 1 例において、副腎に psyn 陽性所見をみた。ステージ 0 の症例では、中枢神経系にレヴィー小体関連病理は認めなかったが、交感神経節には少数の Lewy neurites を認め、副腎には被膜脂肪組織内の神経節や神経束に Lewy neurites、副腎髄質の神経節細胞周囲に Lewy neurites を認めた。ステージ 0.5 の症例は、迷走神経背側運動核に極少数の Lewy neurites や dots を認めるのみであり、交感神経節にはより多くの Lewy neurites、副腎には髄質にレヴィー小体の出現を認め、中枢神経系よりも末梢神経系に勾配を持つ病変分布を示した。

ステージ I・II において、それぞれ亜型別に副腎の psyn 陽性率を計算すると以下のよう

になる。ステージ I に関しては、IB:41 例中 6 例 (14.6%)、IT:35 例中 8 例 (22.9%)、IA:9 例中 0 例 (0%)。ステージ II に関しては、IIB:5 例中 4 例 (80%)、IIT:19 例中 14 例 (73.7%)、IIN:2 例中 2 例 (100%) そしてIIA:3 例中 0 例である (表 2-3)。すなわち扁桃核亜型では副腎に psyn 陽性所見を認める症例はなかった。扁桃核亜型におけるその他の神経変性型老化関連病理の詳細を表 2-4 に示す。扁桃核亜型 12 例中 9 例に AD の合併、2 例に AGD、残りの 1 例には神経原線維変化優位型認知症と AGD の合併を認め、12 例全てに他の神経変性型老化関連病理の合併を認めた。ステージ II では、脳幹型で副腎に psyn 陽性所見を認めない 1 例に神経原線維変化優位型認知症の病理を、また移行型において psyn 陽性所見を認めない 5 例に関しても、4 例にアルツハイマー型老年性変化の合併を認めた。ステージ II の症例中、副腎に psyn 陽性所見を認める 20 例に関しては、アルツハイマー型老年性変化を合併した症例は 1 例、AGD を合併した症例は 3 例であった (表 2-5)。

さらに、ステージIV・Vにおいて、副腎に psyn 陽性所見を認めない症例 5 例について検討を行った。臨床的にこれらの症例はいずれも認知症が初発症状であるとともにパーキンソン症状の記載を欠いており、DLB と分類された。神経病理学的には、5 例中 4 例に、老人斑 Braak ステージ C、神経原線維変化ステージ III 以上のアルツハイマー型老年性変化を合併しており、1 例にはステージ III の広がりを示す AGD を合併していた。詳細を表 2-6 に示す。

DLB 症例で、副腎に psyn 陽性所見をみる群においても同様に、他の神経変性型老化関連病理の合併を検索した。該当症例 33 例中、8 例に Braak ステージ III 以上の神経原線維変化及びステージ C の老人斑を認め、3 例にステージ III の広がりを示す AGD を認めた。副腎 psyn 陰性例と同様に、これらの症例は全て認知症が初発症状であったが、経過中パーキンソン症状を認める症例が 2 例存在した。

4) 他の老年性変化と副腎の psyn 陽性率の関係

中枢神経系にレヴィー小体関連病変を認める症例において、神経原線維変化のステージと副腎の psyn 陽性率の比較を行った。各神経原線維変化の Braak ステージにおける副腎 psyn 陽性率は以下のとおりである。Braak ステージ 0:3 例中 0 例 (0%)、ステージ I:81 例中 38 例 (46.9%)、ステージ II:41 例中 19 例 (46.3%)、ステージ III:30 例中 18 例 (60%)、ステージ IV:16 例中 4 例 (25%)、ステージ V:18 例中 2 例 (11.1%)、ステージ VI:17 例中 5 例 (29.4%)。ステージ III 以下では、40%以上の陽性率が見られるのに対し、ステージ IV 以上では全て 30%以下と陽性率が下がる (表 2-7(1))。

これに対し老人斑のステージと副腎 psyn 陽性率を比較すると、ステージ 0:42 例中 22 例 (52.4%)、ステージ A:57 例中 22 例 (38.6%)、ステージ B:52 例中 22 例 (42.3%)、ステージ C:55 例中 20 例 (36.4%) となり、副腎 psyn 陽性率は老人斑ステージ間であまり差がみられない (表 2-7(2))。

2.4.4. 臨床症状と副腎病理の関連

臨床症状と副腎 psyn 陽性所見の有無との関係を表 2-8 に示す。

対象 783 例の中で自律神経症状として明かな起立性低血圧の記載を認める症例は 6 例あり、このうち 5 例が LBD であった。5 例の内訳は PD 1 例、PDDT 1 例、PDDN 1 例、DLBT 2 例である。これらの症例は全て、副腎に psyn 陽性所見を伴っていた。

中枢神経系レヴィー小体ステージ 0 と 0.5 の症例で、副腎に明らかに psyn 陽性所見を認めた 2 例には、起立性低血圧の記載はみられなかったが、うち 1 例に失神の既往があった。

2.5. 考察

本研究により以下の点が明らかとなった。

1. 認知症の有無には関わらず、PD では副腎に psyn 陽性所見が必発である。
2. 扁桃核垂型では、副腎に psyn 陽性所見は見られない。
3. DLB のうち、副腎に psyn 陽性所見を認めない症例は、アルツハイマー型老年性変化あるいは嗜銀顆粒性認知症の病理を合併している。
4. 中枢神経系のレヴィー小体関連病理が非常に軽微であるか、全く認めないにも関わらず、副腎に psyn 陽性所見を認める症例が存在する。

以上より、psyn を用いた副腎の免疫組織科学的検索は、LBD における末梢自律神経系の病理学的評価に有用であることが示された。

副腎では、髄質内神経節細胞及び、副腎周囲交感神経節に、レヴィー小体が認められる事は既に報告されている[16, 20, 42]。免疫染色を用いる事により、副腎周囲の無髄線維束や、皮質内無髄線維にも、psyn 陽性所見が出現することが確認された。

既報告によると、副腎の相同器官とされる交感神経節で、PD、DLB 症例において、ほぼ 100%にレヴィー小体関連病理が認められるとされている[17]のに対し、副腎でのレヴィー小体関連病理の出現率は約 30%とされ[20]、LBD の末梢自律神経系の病理評価に副腎が有用であるとは言えない結果であった。しかし、本研究では psyn を用いた免疫組織化学的検索を行う事によって、psyn 陽性レヴィー小体関連病理の検出感度があがっただけでなく、パラグングリオン系に属し、発生上副腎と同じ意味を持つとされる、副腎周囲の交感神経節並びに神経線維が評価可能となった結果、PD では 100%、中枢神経系で、レヴィー小体による変性を伴うが臨床症状が見られなかった発症前 LBD においても、69%と高頻度に psyn 陽性レヴィー小体関連病理を検出する事が出来た。副腎は剖検時に通常必ず採取され組織学的に評価される臓器であり、一般剖検手技でも LBD の末梢自律神経系の病理評価が可能だけでなく、蓄積例において、副腎のパラフィンブロックを用いた後方視的研究が可能なる事を示している。

副腎はしばしば悪性腫瘍の転移、感染あるいは自己融解による影響で、組織学的検索が

困難となる事がある。しかし、本研究では副腎実質が腫瘍により占められている症例や、最大死後時間 62 時間 13 分の症例においても、レヴィー小体をはじめとする psyn 陽性レヴィー小体関連病理を認める事できた。これは、副腎周囲脂肪組織に認められる神経束や神経節に高頻度にレヴィー小体関連病変を認めるため、副腎の自己融解で、陽性率が影響を受けない事と関係していると考えられる。我々は東京大学人体病理学教室の伝統にならい、副腎周囲の脂肪織を出来る限りはがし、副腎重量を正確に測ることをルーチンとしてきた。それでも、psyn 陽性レヴィー小体関連病理が、これだけ高率に検出できた。一方、この副腎周囲脂肪織を温存し、パラガングリオン、交感神経節及び交感神経線維を評価している施設では、副腎周囲脂肪織内にこれら構造物は 100%検出されるとのことで(川端健二博士、明石市民病院病理部、2006 年 7 月、私信)、psyn 陽性レヴィー小体関連病理の検出はより容易であることが予想される。副腎周囲の後腹膜パラガングリオン系は、副腎と同じ発生意義を有し、小児期には血圧調整において、副腎より優位と考えられている[43]。本研究において、副腎周囲に存在し、副腎髄質と同じ役割を果たすパラガングリオン系が、副腎の標本で同時に評価できること、それが psyn 陽性レヴィー小体関連病理の評価に極めて有用であり、死後変化を受けにくいことが示された点が、重要と思われる。

扁桃核に強調されたレヴィー小体関連病理は、AD やダウン症候群、その他のタウノパチーでの出現が報告されている[44-47]が、本症例でみられた扁桃核亜型 LBD においても全例に扁桃核に神経原線維変化や老人斑、あるいは嗜銀顆粒病変を高度に認め、いわゆる二次性シヌクレイノパチーであると考えられた。扁桃核亜型では全例副腎に psyn 陽性所見は見られず、レヴィー小体の分布が二次性シヌクレイノパチーでは中枢優位となる事が明瞭となった。一方発症前 LBD では副腎の psyn 陽性率が 69%と非常に高いが、副腎 psyn 陰性例中、扁桃核亜型以外でも、1 例を除き、中等度以上のアルツハイマー型老年性変化及び、高度の神経原線維変化優位型タウオパチーを全例に認め、レヴィー小体の分布に、レヴィー小体関連病理以外の神経変性型老化関連病理が影響を及ぼしていることが示唆された。

さらにこの傾向は、中枢神経系レヴィー小体ステージの高い症例においても同様である。本研究の全例において、交感神経節前線維の評価のために、中枢神経系レヴィー小体関連病理の検索部位として、Braak のステージには含まれていない脊髄も検索しているが[32]、脊髄にはレヴィー小体関連病理を認める中枢神経系レヴィー小体ステージⅣ・Ⅴの症例で、副腎には psyn 陽性所見を認めない症例の存在が明らかとなった。これらの症例は全て、病理学的に AD あるいは嗜銀顆粒性認知症の診断基準を同時に満たす。しかしながら、同様に AD や嗜銀顆粒性認知症を合併するステージⅣ・Ⅴの症例で、副腎に psyn 陽性レヴィー小体関連病理を認める症例もほぼ同数存在する。これは単に中枢神経系と比較して副腎がレヴィー小体関連病理の好発部位ではないという感度の問題だけかもしれないが、LBD には中枢神経系優位の分布を示す群と、末梢神経系優位の分布を示す群が存在していることを示唆している可能性がある。

レヴィー小体関連病理以外の神経変性型老化関連病理と副腎 psyn 陽性率との関係をみる

ために、中枢神経系レヴィー小体ステージ 0 を除いた症例で、神経原線維変化及び老人斑ステージと副腎 psyn 陽性率の比較を行ったところ、老人斑ステージとの間には関連を指摘する事は出来なかったが、神経原線維変化では、ステージの高いIV~VIでは、それより早期のステージと比較すると陽性率が低くなった。AD や AG が合併した扁桃核亜型や DLB・PDD で副腎 psyn 陽性率が低い事と一致する。AD に合併する二次性シヌクレイノパチーの発症メカニズム解明のため神経原線維変化や老人斑とシヌクレイン蓄積との関連に関しては複数の研究がなされている。AD 合併例の扁桃核では、同じ神経細胞内にタウと α シヌクレインが共存する事[48, 49]や、タウと α シヌクレインを共発現させると線維形成を促進する事[50]など、タウとシヌクレインの関連を示唆する報告や、DLB における皮質型レヴィー小体の数は老人斑の数に相関するという老人斑との関連を示唆する報告[33, 51]があり、AD 病変のどちらがシヌクレイン蓄積の出現や分布に影響を与えているか一定の見解は得られていない。しかしいずれにせよ、中枢神経系にレヴィー小体関連 α シヌクレイン病変が生じた際に、おそらく α シヌクレイン蓄積の広がるスピードは全ての症例である程度一定であり、中枢神経系にシヌクレイン蓄積を促進するタウや老人斑がある事で、中枢神経系内に広がるスピードが速くなり、末梢自律神経系は相対的に広がりが軽度となる可能性が考えられる。

本研究において注目すべきもう一つの点は、中枢神経系にレヴィー小体関連病理を認めない症例あるいは非常に軽微な症例においても副腎に psyn 陽性所見を認める一群の存在が示された事である。Braak らは認知症を伴わない PD の病理変化は迷走神経背側運動核の Lewy neurites から始まり、徐々に脳幹を上行して、辺縁系、新皮質系に広がると報告している[32]。しかし、本研究で明らかとなった 2 例は、1 例は中枢神経系に全く陽性所見はなく、交感神経節に軽度、副腎に中等度、もう 1 例は迷走神経背側運動核に少数のレヴィー小体関連病理を認めるのみでその他の脳幹部にレヴィー小体関連病理は見られず、脊髄には軽度、交感神経節さらに副腎と、末梢に行くほどレヴィー小体関連病理の病変が優位となる傾向を示した。これらは中枢神経系のみでの病理学的評価では抽出できない群であり、末梢自律神経系、特に副腎の検索が重要である事が示された。

LBD において副腎に psyn 陽性レヴィー小体関連病理を高頻度に認める事は明らかとなったが、これらの副腎病変と臨床症状との対応に問題が残る。最近 PD や DLB では、MIBG 心筋シンチグラフィーで高率に心臓の MIBG 集積が低下し、他のパーキンソン症状を呈する疾患との鑑別が有用であることが報告されている[14, 15]。画像所見に対応する病理像として、左室前壁心外膜内に存在する神経束における、抗 TH 抗体や抗リン酸化ニューロフィラメント抗体の染色性の低下が示されている[52]。副腎では、副腎被膜脂肪組織内の神経束、神経節、副腎髄質内の神経節細胞、いずれの部位においても抗 TH 抗体免疫染色性の低下は見られず、また抗リン酸化ニューロフィラメント抗体を用いた染色においても軸索の変性は明らかではなかった。副腎 MIBG シンチグラフィーの用途は主として腫瘍診断であり、副腎の小ささや、交感神経線維の減少が心臓ほど目立たない点からも、取込み低下

を指摘する事は困難であると考えられる。しかし、PDにおける副腎の機能を検討した少数の論文の中に、PD例の副腎に含まれるTHやcatecholamineの量は、正常コントロールと比較して減少しておりPDでは副腎機能の低下を認めるとの報告もみられ[53, 54]、免疫染色において差を指摘するのは困難な程度に障害されている可能性はあるだろう。臨床症状との対応として、LBDにおいて起立性低血圧が認められた5例全てに、副腎にレヴィー小体関連病理の出現を認めたが、逆に副腎にレヴィー小体関連病理を認める大多数例において、起立性低血圧は見られず、交感神経節や中枢自律神経系など、多因子が関わって症状となる可能性がある。副腎病理に対応する生前の検査としては、副腎と直接関連してはいないが、起立試験前後におけるアドレナリン値の変動が最も有用である可能性があり、今後検討していく予定である。

以上、psynを用いた副腎の免疫組織化学的検索は、PDで全例副腎が陽性となるだけでなく、他の老年性変化に合併する扁桃核亜型LBDの鑑別、末梢神経系優位の広がりを示す一群の検出を含め、LBDの末梢自律神経病理評価に有用であることが、本研究で明らかとなった。

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

3.1. はじめに

第二章では、剖検検索必須部位であり交感神経節と相同臓器である副腎に注目し、副腎がレヴィー小体病 (Lewy body disease、以下 LBD) の末梢自律神経系の病理学的検討に有用である事を示した。病理学的な有用性は確認されたが、前述したように副腎における MIBG シンチグラフィーの有用性は乏しいと予想される事や、副腎が生検部位として適していない事等から、副腎の病理学的変化を、生前診断に応用する事は難しいと考えられる。今回の検討により明らかとなった、LBD では末梢自律神経系に高率に病変が広がっている事を応用し、生前にアプローチが可能な末梢自律神経系として、皮膚に着眼した。パーキンソン病 (Parkinson's disease、以下 PD) に伴う自律神経症状としては、前述したように嚥下障害、便秘などの消化管運動障害、尿失禁などの膀胱障害、起立性低血圧、心血管系障害などの循環障害が知られている。これらの自律神経症状に対応する病理学的所見としては、視床下部や迷走神経背運動核などの中枢神経系の病変だけでなく、それぞれ症状に対応した病変が報告されている。つまり消化管運動障害に対しては、食道主体にマイスネル神経叢やアウエルバッハ神経叢におけるレヴィー小体の出現[19, 21, 55]、膀胱障害に関しては膀胱壁神経節内のレヴィー小体の出現[18, 42]、起立性低血圧としては本研究においても検索している交感神経節や副腎髄質におけるレヴィー小体の出現[16]、そして心血管系障害においては心臓外膜内の神経束に認められるレヴィー小体関連病理である[18, 52]。

一方皮膚自律神経症状の一つとして知られている発汗障害に関しては、臨床的検討では他の自律神経障害と同様に、中枢及び末梢自律神経系、双方の障害が示唆されているにも関わらず、これに相応する病理の検討はほとんどみられず、皮膚におけるレヴィー小体関連病理の有無に関しての言及もない。臨床的検討の結果を考慮すると皮膚に分布する神経節後線維にレヴィー小体関連病理が出現する可能性が考えられ、もし出現すれば生前病理学的に LBD の確定診断が可能になる。このような利点、可能性をもつ皮膚に注目し検索を行った。

本研究は、前方視的検索と後方視的検索の二つの項目よりなる。前方視的検索では、連続剖検例を用いて、中枢神経系レヴィー小体ステージと皮膚におけるレヴィー小体関連病理出現頻度の比較を行い、後方視的検索では東京都老人医療センターにおいて、これまで剖検時の必須検索部位に指定されていた皮膚切片を利用する事で LBD の症例数を増やし、発症前 PD、PD、認知症を伴う PD (PD with dementia、以下 PDD)、DLB における皮膚のレヴィー小体関連病理出現率をより細かく検討した。

3.2. 対象

3.2.1. 前方視的検索

東京都老人医療センター高齢者連続剖検例中、中枢神経系・皮膚ともに検索可能な 279 例（男性 167 例、女性 112 例、2003 年 3 月から 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 歳～104 歳）である。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。前方視的に検索した 279 例は、すべて第二章の副腎検索対象例に含まれている。神経病理学的検索は第一章に前述した高齢者ブレインバンクプロトコールに基づき行った。

皮膚の検索としては剖検時に上腕部の皮膚及び腹部の皮膚を採取した（東京都老人医療センター(No.156)、東京都老人総合研究所(#22)倫理委員会承認）。上腕部の皮膚は、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、 $6 \mu\text{m}$ 切片を作成。腹部の皮膚は 10%緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋後、 $6 \mu\text{m}$ 切片を作成した。どちらも hematoxylin & eosin (H&E) 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。

3.2.2. 後方視的検索

東京都老人医療センターで 1995 年 1 月から 2006 年 3 月までに行われた連続開頭剖検例 1594 例中、中枢神経系レヴィー小体ステージが II 以上である症例 142 例（男性 72 例、女性 70 例）を抽出した。対象症例の死亡時平均年齢は 83.7 ± 7.6 歳（48 歳～100 歳）である。10%緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋後、 $6 \mu\text{m}$ 厚に薄切した腹部皮膚の切片を H&E 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。

3.3. 方法

3.3.1. 免疫組織化学

皮膚切片は Ventana 20NX autostainer（Ventana, Tucson, AZ）を用いて免疫組織化学染色を行った。皮膚のレヴィー小体関連病理の評価には抗リン酸化 α シヌクレイン抗体（psyn）（psyn#64 monoclonal and PSer129 polyclonal）を用いた。

3.3.2. 二重免疫染色

リン酸化ニューロフィラメントに対する抗体（SMI31, monoclonal, Sternberger Immunochemicals, Bethesda, MA）と psyn（PSer129, polyclonal）を用いて二重染色を施行した。二重免疫染色も Ventana 20NX autostainer を用い、diaminobenzidine (DAB) による発色と、streptavidin-alkaline phosphatase に Ventana Red を用いた発色を 1 回ずつ連続して行った。抗体希釈は Ventana 社製の抗体希釈液を用い、それぞれの希釈倍率は SMI31 1 : 5000、PSer129 1 : 50 である。どちらも抗原賦活化は行わなかった。

3.3.3. 蛍光免疫染色

PSer129 と交感神経のマーカーとなる tyrosine hydroxylase (TH) に対する抗体