

表 1.3. 使用した一次抗体 (その2) : 抗タウ抗体

抗体	クローン	エピトープ (2N4R)	Source	免疫動物	希釈倍率	抗原賦活化法
MC1	Monoclonal	7-9, 312-342 アミノ酸配列 Conformation	Dr. Peter Davies	Mouse	1:100	target retrieval solution+蟻酸
AT8	Monoclonal	Phosphorylated Ser202/ Thr205	Innogenetics, Temse, Belgium	Mouse	1:1000	不要
RD3	Monoclonal	209-224 アミノ酸配列 (ON3R)	Upstate, Lake Placid, NY	Mouse	1:4000	target retrieval solution+蟻酸
RD4	Monoclonal	275-291, アミノ酸配 列	Upstate, Lake Placid, NY	Mouse	1:100	microwave +蟻酸
ET3	Monoclonal	274-283, アミノ酸配 列	Dr. Peter Davies	Mouse	1:50	target retrieval solution+蟻酸
PHF1	Monoclonal	Phosphorylated Ser396/Ser404	Dr. Peter Davies	Mouse	1:1000	target retrieval solution+蟻酸
AP422	Polyclonal	Phosphorylated Ser422	Dr. Peter Davies	Rabbit	1:500	microwave
HT7	Monoclonal	159-163 アミノ酸配列	Innogenetics, Temse, Belgium	Mouse	1:1000	Immunoblot
T46	Monoclonal	404-441 アミノ酸配列	Zymed, South San Francisco, CA	Mouse	1:1000	Immunoblot
抗 4R タウ抗血清	Polyclonal	272-277 アミノ酸配列	Dr. Hiroshi Mori	Rabbit	1:10000	microwave

表 1.4. (参考) Preliminary NINDS-PSP 病理診断基準 [2]

- 1) H&E 染色, 鍍銀染色(Gallyas, Bodian)、抗タウ抗体・抗ユビキチン抗体免疫染色で評価
 2) 必須所見 (下表) : 神経原線維変化の分布(Typical, Atypical)。

部位	Typical PSP	Atypical PSP	脳炎後 パーキンソニズム	アルツハイマー病
淡蒼球・視床下核	+++	+ / +++	++	- / +
黒質	+++	+ / +++	++	- / +
橋被蓋	++ / +++	+	+	- / +
動眼神経核	+ / +++	+	- / +	-
線条体	+ / +++	+	+	- / +
橋核	+ / +++	+	+	- / +
延髄・歯状核	+ / +++	+	- / +	-
海馬・嗅内野	- / +	- / +++	+ / +++	+++
前頭前野・中心前回	+	- / +-	+ / +++	+++
他の連合野	- / +	- / +	+	++ / +++

Gradingはx250(対物x25, 接眼x10)で評価:-, 無しあるいは僅か; +, 低密度(1,2個の神経原線維変化(NFT)あるいはニューロピルストレスド(NT)); ++, 高密度(2-5個のNFTあるいはNT); +++, 非常に高密度(6個以上のNFTあるいはNT)

- 3) 支持所見 : アストロサイト原線維変化(Tuft-shaped astrocyte, thorny astrocyte)を認める。
 4) 合併病理の有無 : 他疾患の診断基準を満たさず場合 Combined PSP に分類。

図 1.1. (参考) 合併病理の診断基準

A) アルツハイマー病診断基準：
ADCかつ認知症を伴う場合アルツハイマー病と診断する [60]

アルツハイマー型老年性変化による分類

Braak		神経原線維変化ステージ						
		0	I	II	III	IV	V	VI
老人斑	0	MSC (49.9%)			NFTC (8.0%)			
	A							
	B	PSC (21.9%)			ADC (20.1%)			
	C							

MSC:微小変化群; NFTC:神経原線維変化優位群;
PSC:老人斑優位群; ADC:アルツハイマー型変化群;

B) PD/DLB の臨床病理診断基準：

B-1) 高齢者ブレインバンクレビー小体ステージ III 以上を PD/DLB と診断[52, 61]

高齢者ブレインバンク レビー小体ステージ

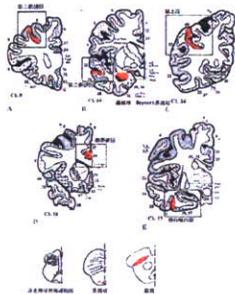
stage	黒質脱色素	レビー小体関連病理の有無			LB score	認知症症状		臨床病理診断
		黒質	辺縁系・新皮質	IML				
0	-	-	-	-	0			
0.5	-	+/-	+/-	+/-	0			
I	-	+/-	+/-	+/-	0-10			偶発性LBD
II	+	+	+/-	+/-	0-10			発症前LBD
III	+	+	+	+	0-10	-	+	認知症のないVPD
IV	+	+	+	+	3-6	+	+/-	PDDT/DLBT
V	+	+	+	+	7-10	+	+/-	PDDN/DLBN

B-2) Lewy score [45] を一部利用

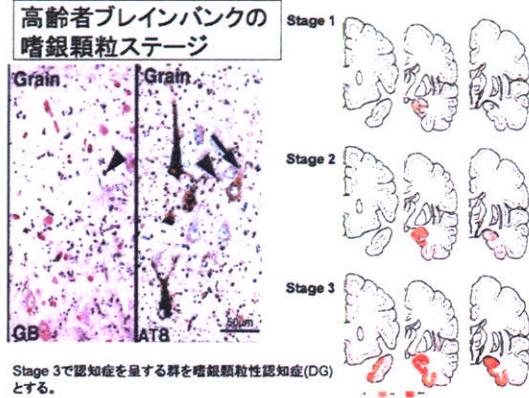
第一回DLBコンセンサスガイドラインのLewy score

DLBコンセンサスガイドライン検索推奨部位
移行嗅内野
前帯状回
第二前頭回
第二側頭回
縁上回
それぞれの場所でLewy小体の数を数える。
1-5個 → 1点
6個以上 → 2点
5箇所を合計しLewy scoreを算出。

Score0-2点: 脳幹型 (Brain stem; B)
Score3-6点: 移行型 (Transitional; T)
Score7-10点: 新皮質型 (Neocortical; N)



C) 嗜銀顆粒性認知症の診断基準[62, 63]：



D) 神経原線維変化優位型認知症の診断基準[82, 83]：

神経原線維変化優位型認知症(NFTD)の診断基準(要約)

- 神経原線維変化(細胞内):3R+4R タウ
重度:(移行)嗅内野、海馬傍回、海馬
症例の10%のみ出現:歯状回顆粒細胞
例外的:新皮質
- 細胞外神経原線維変化:3Rタウ
顕出:海馬(CA1)、海馬傍回、海馬支脚、扁桃核
殆ど認めない:新皮質
- プレタングル:4Rタウ
(移行)嗅内野、海馬傍回、海馬支脚、扁桃核
実質殆ど認めない:新皮質
- Braak 神経原線維変化ステージ: Stage IVまで
- アミロイド老人斑:実質上殆ど認めない
- 変性突起を伴う老人斑:実質上認めない
- 脳血管アミロイドアンギオパシー:稀

E) 脳血管性認知症の診断基準[64]：

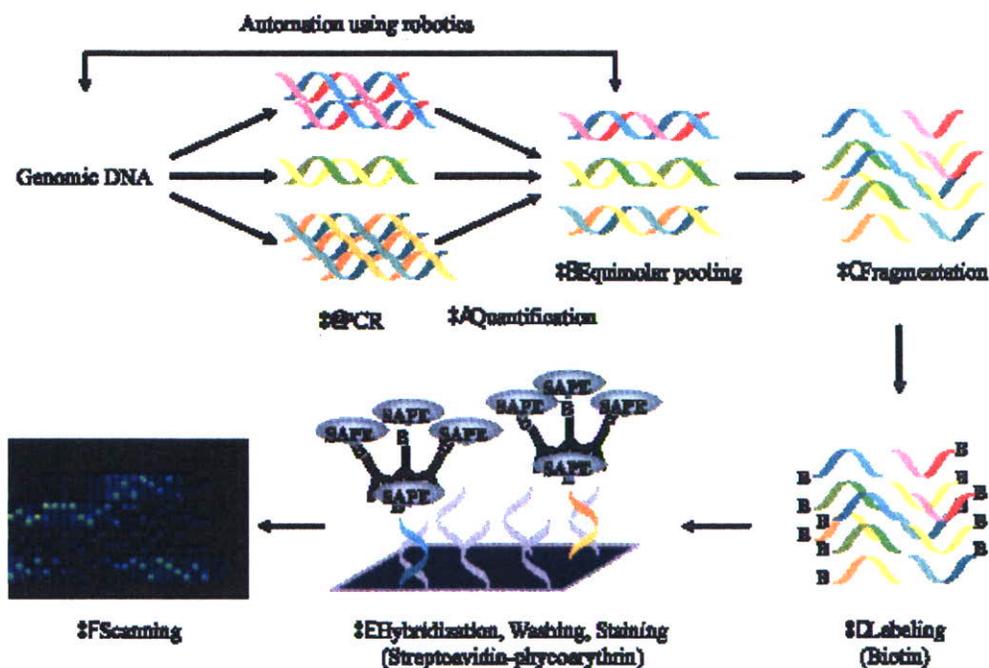
NINDS-AIRENによる
血管性認知症の診断基準(要点)

- (1) 記憶と2つ以上の認知機能障害(見当識、注意、言語、視空間機能など)と、脳卒中の身体障害のみには還元できない日常生活障害
- (2) 脳血管障害の存在。脳血管障害に矛盾しない局所神経学的徴候の存在。かつ画像診断(CT, MRI)により、基底核領域・白質病変だけでなく、多発性の大血管梗塞や単発でも重要部位の梗塞の存在(戦略拠点破壊型脳梗塞)
- (3) 上記の(1)と(2)の関連が以下の1つ以上により証明または推論される
 - (a) 脳卒中の見られた3ヶ月以内に認知症が発症
 - (b) 認知機能の突然の障害あるいは動揺性の経過

表 1.5. DNA microarray “TKYAD01”の概要

略語	遺伝子	疾患	疾患との関係	タイリングされた遺伝子
<i>APP</i>	amyloid precursor protein	AD	Causative	promoter (400bp), exon
<i>PSEN1</i>	presenilin 1	AD	Causative	promoter (130bp), exon
<i>APOE</i>	apolipoprotein E	AD	Susceptibility	SNP
<i>MME</i>	Neprilysin	AD	Related	promoter (800bp), exon
<i>BDNF</i>	brain-derived neurotrophic factor	AD	Related	SNP
<i>CHT1</i>	high affinity choline transporter	AD	Related	SNP
<i>MAPT</i>	microtubule-associated protein tau	FTD	Causative	promoter (500bp), exon, intron
<i>PRNP</i>	prion protein	CJD	Causative	exon
<i>SPG1</i>	L1 cell adhesion molecule	FSP	Causative	exon
<i>PLP1</i>	proteolipid protein 1	FSP	Causative	exon
<i>ABCD2</i>	ATP-binding cassette, subfamily D, member 2	ALD	Related	exon
<i>SNCB</i>	synuclein, beta	PD	Related	promoter (700bp), exon

図 1.2. DNA microarray を用いた DNA 配列決定法



(1) PCR による増幅、(2) 定量、(3) 等モルのプーリング、(4) 断片化、(5) ラベリング、(6) ハイブリダイゼーション、染色、(7) 洗浄とスキャン

表 1.6. PCR に使用した Primer

Forward primer		Reverse primer	
Name (MAPT-F1)	Sequence	Name (MAPT-R1)	Sequence
Ex1	5'-AGTGCTGAGATCACAGGCGTGAG-3'	Ex1	5'-GTCTGGCCATTATCTCACTGCTTGAG-3'
Ex2-3	5'-GCACATCACCTGTGTCCTCATCTG-3'	Ex2-3	5'-CACCAAGGCATCGAGCTACTCAC-3'
Ex4A	5'-GCCTCTTCAAACCAGAGGAGTTGAG-3'	Ex4A	5'-GTCACCTACTACTCATTGGCCTTCGG-3'
Ex4	5'-TGCTTAGACACAGCCTCCACAACC-3'	Ex4	5'-TAGACATTCATTCTCAACTCCCAGGC-3'
Ex5	5'-GACTGCACCTTCCTTAGATAGCCTCC-3'	Ex5	5'-GCAGTTTATGCAGTGAGAAGATGGC-3'
Ex6-7	5'-GAGATTGCACCACTGCAGTCCAG-3'	Ex6-7	5'-GTAAACTGCAAGCTGCTGACCAGC-3'
Ex8	5'-TCTTACCTGCTCTTCGGTGGCTG-3'	Ex8	5'-TTCGGACTGCTCCATCTCAGG-3'
Ex9	5'-CGTCTGCTGTAGCTGCGCTTC-3'	Ex9	5'-ACACAGCCCTGCCATCTCTGTC-3'
Ex10	5'-TCTGCCAAGTCCGAAAGTGGAG-3'	Ex10	5'-CTGGGCATGAGTGAAGGAGAC-3'
Ex11	5'-ACTAGGATGTGCTCCTCATGGCAG-3'	Ex11	5'-GTCTCAATCTCTGACCTCATGATCC-3'
Ex12	5'-GTCTCTACTTGAACCACTTGCTTGG-3'	Ex12	5'-GCCAGTCAACACAGAAGCCTCTG-3'
Ex13-14	5'-GAGATTGTGCCACCGCACTCTAG-3'	Ex13-14	5'-CACCTAGGGTCACAGCTGAGCAG-3'
Ex-1	5'-ACTGGTCAGTTTCAGGCTGAGGTG-3'	Ex-1	5'-CGAATCTGGTGGTGAAGACCCTC-3'
Saitohin	5'-AGACTGCCATCCAGGATCTCCTC-3'	Saitohin	5'-GCTGTGACTGTGTCCTCTGCCAC-3'

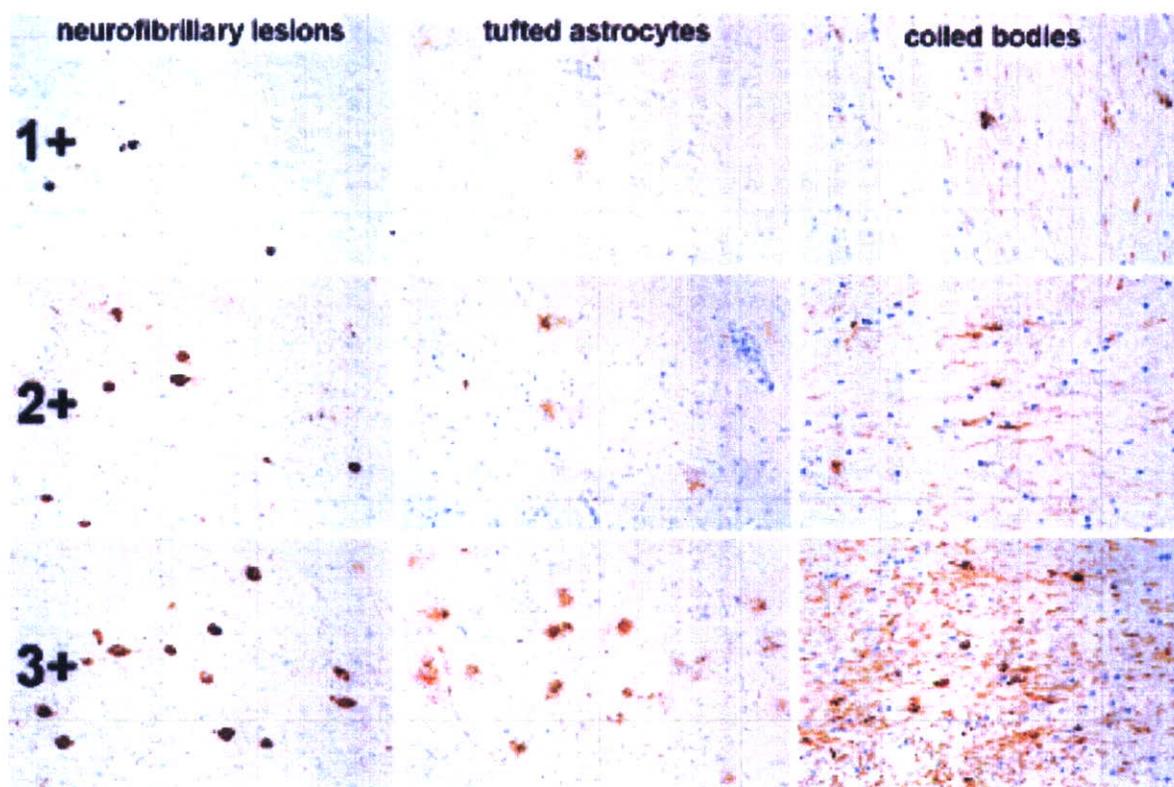


図 1.3. (参考) 米国 PSP ブレインバンクで用いられている PSP のタウ沈着に対するステージング [66]

抗リン酸化タウ抗体(CP13, Ser202/Thr205, monoclonal)免疫染色を用いて、0(none), 1(mild), 2(moderate), 3(severe)の 4 段階で評価している。ほぼ同じ抗リン酸化タウ抗体(AT8, Ser202/Thr205)免疫染色を用いて Grading を行った。

表 1.7. Clinical Dementia Rating (CDR)

障害					
	障害なし 0	疑わしい 0.5	軽度 1	中等度 2	高度 3
記憶	障害なし、あるいは時々軽度の物忘れ	軽度の物忘れが常に存在する。出来事を部分的に思い出す。“良性”健忘	中等度の記憶障害。障害は最近の出来事について、より著しい。日々の活動を妨げる	重度の記憶障害。十分に学習したことのみに保持される。新しいことは急速に忘れる。	重度の記憶障害。断片的なことのみ保持される。
見当識	十分に見当識がある。	軽度の時間的前後関係の障害を除き、十分に見当識がある。	中等度の時間的前後関係の障害。他の場所で地理的見当識障害があるかもしれない。	重度の時間的前後関係の障害。時間的見当識はたいていの場合障害され、地理的見当識もしばしば障害される。	人物への見当識のみ保たれている。
判断力と問題解決	日常の問題を解決し、仕事上および金銭上の問題を十分処理できる。過去の美談と比較しても、遜色のない的確な判断力	問題解決、類似性および相違性において軽度の障害。	問題解決、類似性および相違性において中等度の障害。社会的判断力はたいていの場合、保持されている。	問題解決、類似性および相違性において重度の障害。社会的判断力はたいていの場合、障害されている。	判断したり、問題を解決したりすることができない。
地域社会の業務	仕事、買い物、ボランティア、社会集団において、通常のレベルで自立して(介助なしで)機能を果たせる。	左記の活動における軽度の障害。	左記の活動のいくつかに、まだ従事しているかもしれないが、自立して機能を果たすことができない。通り一遍の査定だと正常そうに見える。	家庭外において、自立して機能を果たせる様子には見えない。	家庭外において、自立して機能を果たせる様子には見えない。
家庭生活と趣味	家庭生活、趣味、知的関心が十分に保持されている。	家庭生活、趣味、知的関心は軽度に障害されている。	家庭における軽度だが確実な障害。より困難な家事の放棄。より複雑な趣味や関心の放棄。促すことが必要	単純な家事だけが保持されている。非常に限られた興味が不十分に保持されている。	家庭において意義のある機能を果たせない。
日常生活の介護	自分の面倒は自分で十分見ることができ。			着衣、衛生、所持品の保管などに介助が必要	日常生活の介護において多くの介助が必要。頻繁に失禁がある。

認知機能の損失によって生じた以前の通常レベルからの衰退だけに得点を与える。認知機能以外の要因(身体的な障害、等)によって生じた障害に得点は与えない。

表 1.8. 高齢者ブレインバンクで PSP 病理を有する 71 例における臨床症候の出現頻度

		高齢者ブレインバンク									
分類	PSP 病理を持つ全例	Pure PSP 全体				Pure PSP				Combined PSP	
		Pure PSP 全体		Pure Typical PSP		Pure Atypical PSP		Pure Atypical PSP		Combined PSP	
症例数	71 例 (M 42, F29)	39 例(M 27, F12)		19 例(M 13, F 6)		20 例(M14, F6)		32 例(M 15, F 17)			
発症時年齢	73.4±8.2 歳(56-95, 66 例)	72.2±7.4 歳(56-88)		67.9±6.3 歳(56-84)		76.2±6.2 歳(62-88) ^a		76.8±9.8 歳(61-95) ^b			
剖検時年齢	81.3±8.7 歳 (64-101)	78.9±7.7 歳(64-94)		75.7±6.8 歳(64-90)		82.4±7.1 歳(70-94)		84.2±9.1 歳(68-101)			
		<3yrs(%)	Total(%)	<3yrs(%)	Total(%)	<3yrs(%)	Total(%)	<3yrs(%)	Total(%)	<3yrs(%)	Total(%)
歩行障害	59	74	82	79	89	70	75	41	59		
易転倒性	37	49	67	63	74	35	60	22	34		
無動	39	51	62	58	68	45	55	25	38		
筋強剛	32	41	59	42	58	40	60	22	38		
振戦	18	23	31	26	42	20	20	13	13		
頸部ジストニア	18	23	33	26	37	20	30	13	6		
抗パ薬無効	20		23		26		20		16		

抗バ薬有効	31*	41*	53*	30*	19*
垂直性眼球運動制限	18	38	53	25	13
構音障害	28	62	63	60	44
嚥下障害	15	41	47	35	44
錐体路徴候	4	15	21	10	16
小脳失調	6	10	20	20	
認知症	52	69	74	65	84
その他の精神症状	38	41	53	30	34
前頭葉徴候	10	18	26	10	16
幻視	11****	13	11	15	9

＜3yrs 発症後3年以内に出現した症状、Total: 全経過で一度でも出現した症状、^a 1例で発症時不明、^b 4例で発症時不明

* 抗バ薬の有効性は全例で一過性、** 12例が下方視制限あり、*** 1例は脳梗塞による Wemicke 失語で評価不能、**** 2例が薬剤性の幻視、

^e p<0.05 (ANOVA)

表 1.9. 剖検確認を持つ PSP 既報告における臨床症候の出現頻度表 饗場ら[89]の図を改変

診断基準	NINDS[2]		原著[11]		Jellinger らの基準[90]		
	Litvan ら(1996)[79]	Vermly ら(1996)[73]	De Bruin & Lees (1994)[74]	Collins ら(1995)[75]	葛原ら(1989)*[76]	長友(1992)[77]	天野ら(1993)[78]
著者							
分類	Pure Typical PSP		臨床病理典型例	PD 合併は除外	合併含む		
症例数	24 例 (M 15, F 9)	21 例 (M 15, F 6)	90 例*(M 51, F 34)	12 例 (M 9, F 3)	11 例 (M 7, F 4)	10 例 (M 8, F 2)	12 例 (M 11, F 1)
発症時年齢	63 歳 (45-73)	62±7 歳 (43-70)	62 歳*(47-78)	66.2±8.5 歳 (48-7)	68.5±5.6 歳 (59-77)	60.9±7.9 歳 (51-76)	59.3±6.6 歳 (51-69)
剖検時年齢	69.6 歳	記載無し	67 歳(51-86)	71.3±7.9 歳 (54-82)	74.0±5.2 歳 (60-85)	65.1±6.6 歳 (57-78)	65.9±5.5 歳 (57-76)
	初診% [†]	終診% [‡]	全経過%	全経過%	全経過%	全経過%	全経過%
歩行障害	96	100	71	72°			
易転倒性	83	100	61	100			
無動	88°	96°	67	100°	100	80	
筋強剛	63	83°	58	100°	82	60	83
振戦	21	13	17	18°	19		
頸部ジストニア	21°	46	48		36	80	100
抗バ薬無効	39	73		70°			
垂直性眼球運動制限	79	87°	69	100°	73	80	100
構音障害	75°	100	67	100°	73		
嚥下障害	16		57	55°	73		
偽性球麻痺				36°		100	100
錐体路徴候	21	38	34	72°	36		
小脳失調			7	9°	9		30
認知症		17(81)		63°	91	100	100
前頭葉徴候	54	79°	38				

*: 1 例のデータ欠如, °: 2 例のデータ欠如, †: 3 例のデータ欠如, ‡: 5 例のデータ欠如, §: 13 例のデータ欠如, ¶: 14 例のデータ欠如,

* 高齢者ブレインバンク例, † 平均発症 3.7 年, ‡ 剖検前の最後の受診, § 初診後平均 2.2 年,

表 1.11. Combined PSP における合併病理の内訳 (重複あり)

合併病理	Combined PSP		
	計	Combined Typical PSP	Combined Atypical PSP
	N=32	N=22	N=10(%)
嗜銀顆粒性認知症	12	8	4
アルツハイマー病	8	7	1
認知症を伴うパーキンソン病/ レビー小体型認知症	9	7	2
脳血管性認知症	7	3	4
(上記うち Binswanger 病	2	2)	
神経原線維変化優位型認知症	5	1	4

表 1.12. Pure PSP の病理分類とタウ沈着の Grading

	Typical Pathology (N=20)	Atypical Pathology (N=19)
部位	平均±SD	平均±SD
淡蒼球	2.88±0.33	2.75±0.45
視床下核	3.00±0.00	2.79±0.43
黒質	3.00±0.00	2.88±0.34
橋被蓋	2.83±0.39	2.67±0.49
動眼神経核	1.90±0.64	1.44±0.73*
線条体	1.47±0.62	1.50±0.73
橋核	2.42±0.67	1.94±0.87
延髄(ION)	2.21±0.63	2.00±0.73
齒状核	2.35±0.61	2.12±0.89
小脳白質	1.62±0.72	1.25±1.78
嗅内野	1.89±0.81	1.89±0.76
前頭前野	1.17±0.58	1.54±0.88
中心前回	1.78±1.08	2.00±1.16
他の連合野	0.93±0.92	0.88±0.86

* p<0.05 (Mann-Whitney U 検定, 正確検定)

抗リン酸化タウ抗体(AT8)免疫染色の Grading の比較では、Atypical PSP では動眼神経核のタウ沈着が有意に低く、その他脳幹・基底核でも低い傾向にあった。しかし、中心前回・前頭前野ではむしろ高い傾向にあった。

第二章．進行性核上性麻痺における認知症と背景病理の位置づけ

I. 進行性核上性麻痺における認知症のリン酸化タウ沈着 Grading による検討

1. はじめに

PSP において認知症は主要症状のひとつである[11, 91]が、これまで発表されてきた臨床的研究診断基準において、必須項目には Parkinsonism[92, 93]および眼球運動障害[1]といった運動障害が中心で、認知症は米国神経疾患・脳卒中研究所(以下 NINDS)臨床診断基準においての支持的所見のひとつ[1]で、「神経疾患の予防・診断・治療に関する臨床研究班」の診断基準案[94]において、副症候の一つとされているのみであり診断においては必須ではない。

第一章で、進行性核上性麻痺(以下 PSP)の病理を持つ症例の臨床診断を後方視的に検討したところ、PSP には高頻度に認知症を伴い、他の変性疾患の合併によりその頻度が高くなることがわかった。Pure PSP の中で限ってもやはり高頻度に認知機能障害は存在していた。Pure PSP の中でも Atypical PSP は Typical PSP と比べてタウ沈着が、脳幹が軽度であるのに皮質では高い傾向にあったため、皮質病変が認知症の責任病巣であるかを検討するため、認知症の有無で病理学的な比較を行った。

2. 対象

第一章で述べた高齢者ブレインバンクより抽出した Pure PSP (Typical, Atypical を含む) 39 例(剖検時平均 78.9±7.68 歳、男性 27 例、女性 12 例、56～88 歳)。

3. 方法

(1) 臨床病歴の評価

評価法については前章に詳述した。認知症(D)は CDR1 以上を基に判定し(表 1.5)、その有無によって D+, D-群に分類し検討した。

(2) 病理学的評価：Pure PSP におけるタウ沈着の半定量的評価

Pure PSP39 例に対して、NINDS 神経病理診断基準における神経原線維変化評価部位に小脳白質を加え、それらを含む 6μm 厚パラフィン包埋切片を作成し、抗リン酸化タウ抗体(AT8)免疫染色を行い、前章で記載した Grading [66]にて半定量的に評価した(図 1.2)。D+群と D-群について、各部位の Grading を比較し、Mann-Whitney U-test ($p<0.05$,

正確検定)にて有意差を検定した。

(3) 皮質のタウ沈着 Grading と神経心理検査(MMSE)

生前神経心理検査として MMSE が実施されていた 7 例について、MMSE の点数と皮質のタウ沈着 Grading の関係を検討し Kruskal-Wallis 検定($p < 0.05$, 正確検定)で有意差を検定した。

(4) Braak 神経原線維変化ステージと認知症の関係

Braak らが、認知症のあった 3 例と無かった 3 例の計 6 例の剖検例の検討から、神経原線維変化が嗅内野から辺縁系に広がると認知症を発症すると報告しているため[95]、Pure PSP39 例について、認知症の有無と Braak 神経原線維変化の関係を検討し、D+群と D-群の staging を比較し Mann-Whitney U-test($p < 0.05$, 正確検定)で検定した。

4. 結果

(1) Pure PSP におけるタウ沈着の半定量的評価 (表 2.1.1.)

Pure PSP39 例について行ったタウ沈着の半定量的評価を D+, D-群で比較した結果、D+群で中心前回に有意差をもって Grading が高く、前頭前野の Grading が高い傾向にあった。

(2) 皮質のタウ沈着 Grading と MMSE スコア(図 2.1.1.)

MMSE から死亡までの期間は平均 2.5 年(9 ヶ月から 5 年)であった。少数例であり、統計学的有意差は認めなかったが、皮質のタウ沈着が高い症例ほど MMSE スコアが低い傾向が示唆された。

(3) Braak NFT stage と認知症との関連 (図 2.1.2.)

神経原線維変化が辺縁系に広がっている Braak Stage III の症例でも、認知症の D+群(赤)と D-群(青)の両方が存在した。また、D+群と D-群の間に Braak stage の有意差は認められず、アルツハイマー型の神経原線維変化は AD や NFTD の診断基準を満たさない範囲では、認知症に関与している可能性は低いと考えられた。

5. 考察

PSP における認知症は、PSP 自体の本質的な病理によって引き起こされる可能性があると考え、PSP 病理診断基準切り出し推奨部位の抗タウ抗体免疫染色を行いタウ沈着の分布を半定量的に評価し、D+群と D-群で比較した。その結果、中心前回を中心とする前頭葉皮質のタウ病変が D+群で有意に高度であり、責任病巣である可能性が

考えられた。皮質病変が認知症例で高度であることは、Bigio ら[96]が D+群 7 例と D-群 4 例で検討し報告しているが、今回はより多数例の検討で、それに加えて中心前回から前頭前野の重要性を新たに指摘した。

また、Braak らのアルツハイマー神経原線維変化ステージと認知症の関連は見出せず、Braak らの報告[95]とは異なる結果となったが、後の報告では否定的な見解であり[78, 97]、本研究もそれを裏付ける結果を示した。

以上より、認知症に関連して、Braak ステージよりも中心前回のタウ沈着 Grading の方が高かったため、中心前回のタウ病理が PSP に内在する病変であるか次項にて分子病理学的に検討した。

表 2.1.1. Pure PSP の臨床分類とタウ沈着の Grading

	D+	D-
	26 例 (M 19, F 7)	13 例 (M 8, F 5)
剖検時年齢	79.1±7.3 歳(64-94)	78.6±8.7 歳(64-94)
部位	平均±SD	平均±SD
淡蒼球	2.86±0.35	2.73±0.47
視床下核	2.90±0.30	2.90±0.32
黒質	2.96±0.20	2.90±0.32
橋被蓋	2.76±0.44	2.67±0.50
動眼神経核	1.69±0.14	1.70±0.21
線条体	1.48±0.15	1.50±0.20
橋核	2.29±0.72	1.78±.97
延髄(ION)	2.12±0.61	2.09±0.83
歯状核	2.36±0.66	2.00±0.89
小脳白質	1.55±0.76	1.48±1.29
海馬	1.71±0.91	1.33±0.75
嗅内野	1.83±0.82	2.00±0.76
前頭前野	1.45±0.83	1.00±0.00
中心前回	2.14±1.04*	1.35±1.11
他の連合野	1.05±0.95	0.67±1.67

* p<0.05 (Mann-Whitney U 検定, 正確検定)

抗リン酸化タウ抗体(AT8)免疫染色の Grading の比較では、D+群は、D-群に比較して、中心前回の Grading が有意に高く、前頭前野は高い傾向であった。

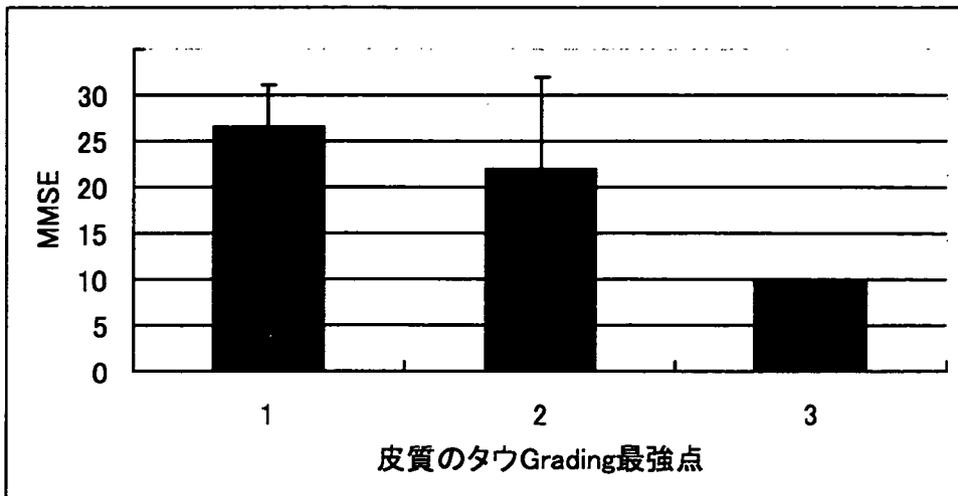


図 2.1.1. 皮質のタウ沈着 Grading と MMSE の関係

MMSE から死亡までの期間は平均 2.5 年(9 ヶ月から 5 年)であった。皮質のタウ沈着が高度になるに従い MMSE スコアが悪くなる傾向が示唆された。

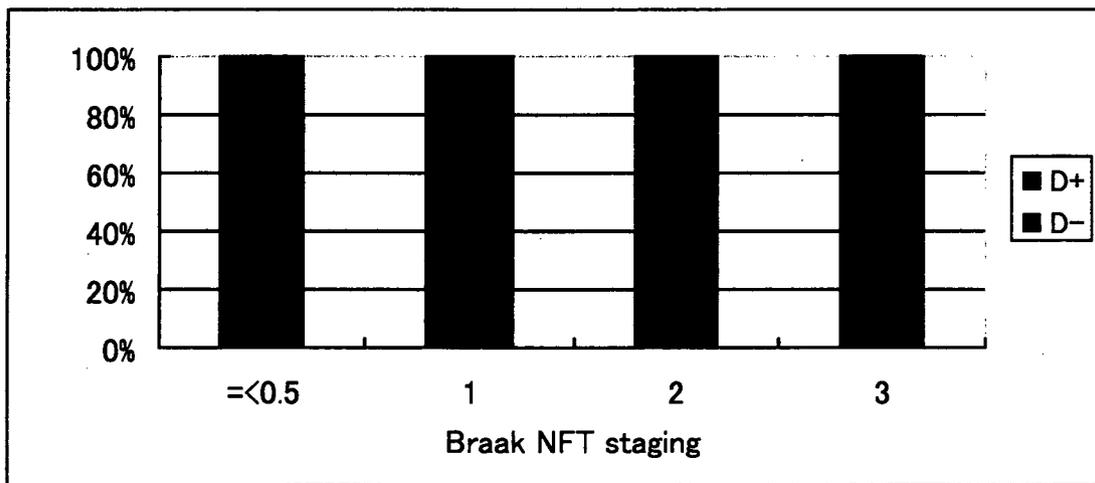


図 2.1.2. Pure PSP における Braak NFT Stage と認知症の関係

既報告[95]で認知症の原因とされている辺縁系の神経原線維変化は、認知症が出現すると考えられていた Braak Stage III (Limbic stage)の症例でも、認知症のある症例(D+,赤)と無い症例(D-,青)の両方が存在し、認知症の原因とは考えにくかった。ただし、この症例群には単独で認知症の原因になりうる神経原線維変化優位型認知症やアルツハイマー病は含まれていない。

II. 進行性核上性麻痺における認知症の責任病巣候補としての中心前回の分子病理：黒質・嗅内野との対比

1. はじめに

前項の結果、進行性核上性麻痺(PSP)における認知機能障害の責任病巣候補として中心前回を中心とする前頭葉新皮質が抽出された。また、責任病巣と考えられていたアルツハイマー神経原線維変化の広がりにはアルツハイマー病(以下 AD)や神経原線維変化優位型認知症の診断基準(NFTD)を満たさない範囲では、認知症と関連しなかった。この点をさらに追求する目的で、タウアイソフォーム特異抗体を用いた分子病理学的検討を行った。

PSP は基本的に 4R タウオパチーと定義づけられているが、部位によって 3R タウの混入が見られているという指摘が生化学的[98, 99]、超微形態的になされている[99, 100]。中脳黒質は、PSP 病理診断基準において必須評価部位であり、かつ、4R タウの沈着が殆どであることが超微形態的に指摘されている。嗅内野は、生化学的に 3R タウの混入が指摘されている部位で、これに前項で抽出された中心前回は加え、中心前回のタウ沈着が PSP に内在する病変であるかタウアイソフォーム特異抗体免疫染色にて検討した。

2. 方法

(1) 対象 (表 2.2.1.)

PSP 群として高齢者ブレインバンク中、黒質・嗅内野の 4%PFA 固定標本のある AD, DLB の合併の無い Pure PSP 8 例を選択(70-91 歳、平均 82.4 ± 6.1 歳、男性 7 例、女性 1 例)。症例 4 では中心前回の 4%パラホルム固定標本が利用可能であり、検索に用いた。比較のため、疾患コントロールとして AD10 例(70-92 歳、平均 83.0 ± 7.50 歳、男性 5 例、女性 5 例)、正常コントロールとして老年性変化の軽度な 10 例(71-92 歳、平均 80.1 ± 7.50 歳、男性 7 例、女性 3 例、Braak らの神経原線維変化ステージ 2 以下で老人斑のステージ A 以下)を年齢、性別ができるだけ一致するように選択し検討した。

PSP 群 8 例については、通常固定法である 20%中性ホルマリン固定標本も用いた。予備的検討から、アイソフォーム特異抗体は固定条件により結果が変動することが示唆されたので、2 種類の固定条件標本を用いた。

(2) 免疫プロット

まず、組織への抗体の反応性を見るため、Braak 神経原線維変化ステージ III の PSP1 症例(症例 7)および、AD1 例(症例 15)について、黒質と嗅内野のアイソフォーム特異抗体を

含む抗タウ抗体(図 2.2.1.) 免疫プロットを行った。組織学的評価を行った切片の対面にあたる黒質あるいは嗅内野を含む凍結脳組織を重量体積比で 20 倍希釈 (w/v)した緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.4), 0.8 M NaCl, 1 μ M EGTA, and 10% sucrose, brought to 1% Triton)内で polytron homogenizer でホモジナイズし、37°Cで 30 分加熱した後、35,000rpm (100,000 X g) で 30 分超遠心、沈殿を緩衝液内で 10 倍(w/v)に再懸濁、ホモジナイズした後、1% Sarkosyl (w/v)溶液とし、37°Cで 30 分加熱。30 分超遠心した後、沈殿を再懸濁、ホモジナイズした後、CHAPS 試薬を加える。50,000rpm で 20 分超遠心した後、沈殿を 7M Guanidine を加え sonication を用いて再懸濁する。一晚透析した後、試料を starting material に再懸濁し、10% SDS-PAGE で電気泳動し、Immobilon 膜に転写、そして抗タウ抗体、RD4, RD3, AT8, T46 を各 1000 倍希釈で免疫プロットし、ABC 法で可視化した[65, 101]。試料の一部は *E. Coli* のアルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化し、HT7 で免疫プロットを行った。

(3) 神経病理

ルーチンの神経病理学的検索法、および免疫染色法、神経病理診断については序章で述べた。本研究においてはそれに加え、免疫染色は Ventana NX20 自動免疫染色装置(Tucson, AZ, USA)を用い、抗タウ抗体は、タウアイソフォームの発現を見るため抗 3R タウ抗体 (RD3)、抗 4R タウ抗体(RD4, ET3, 抗 4R タウ抗血清) を、翻訳後修飾の観点から検討するため、抗タウコンホメーション特異抗体(MC1)、認識するリン酸化部位の異なる 3 種類の抗リン酸化タウ抗体(AT8, PHF-1, AP422)を使用した(表 1.3., 図 2.2.1.)。RD3, RD4 はタウオパチーの脳組織と recombinant 6 tau isoform で免疫プロットを行い、特異性を確認、抗 4R 抗血清は、6 tau の dot blot で、3R タウは認識せず 4R タウを認識することを確認した(図 2.2.2.)。黒質はメラニン含有細胞との識別のためアルカリフォスファターゼ赤で発色、嗅内野はジアミノベンチジン(褐色)で発色した。また黒質については、アルカリフォスファターゼ赤とジアミノベンチジン褐色で GFAP と RD4 の二重染色を、アルカリフォスファターゼ赤とアルカリフォスファターゼ青で AT8 と RD4 二重染色を行った。

抗 4R タウ抗体の中で比較するために、ET3, RD4, 抗 4R 抗血清で PSP 黒質の免疫染色を行った(図 2.2.3)。Monoclonal 抗体である ET3 と RD4 では、ほぼ一致した神経細胞体・突起、グリア細胞体に加え、これまでにタウ免疫染色では記載のない繊細な突起が認識され、この繊細な突起の感度は RD4 のほうが優れていたため、RD4 を主に使用した。抗 4R tau 抗血清は、神経細胞体は同程度認識されたが、バックグラウンドが高いため、グリア細胞および繊細な突起の検出感度が劣っていた。こちらは、神経細胞体内の局在をみるための共焦点顕微鏡の検討で使用することとした。

また、タウアイソフォームの沈着と、AD での早期リン酸化部位である Ser202/Thr205 の

リン酸化を比較する観点から、PSP, AD, 正常コントロール全例の黒質、嗅内野についてはこれらを含む 4%パラホルム固定パラフィン包埋切片を用い、これらに加えて AD 病変の出現が少ないことで知られ PSP 固有障害部位と考えられる中心前回、黒質、下オリブ核、橋核、歯状核、視床下核と、AD 病変がよく出現することで知られ PSP と AD の共通障害部位と考えられる嗅内野、青班核、マイネルト基底核を含む切片について、通常固定である中性ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、抗リン酸化タウ抗体(AT8), 抗 4R タウ抗体(RD4), 抗 3R タウ抗体(RD3)を用いて序章に記載したように染色し、半定量的に評価した。抗タウ抗体陽性所見の半定量法については、タウ沈着の Grading を米国 PSP ブレインバンクの 0~3 の Grading(一章図 1.2.) [66]に、第二回 DLB コンセンサスガイドライン [46]で用いられた抗 α シヌクレイン抗体免疫染色のステージングを参考にして、Grade 4 (非常に高度: 高倍率の視野で多数の細胞体と突起が染色される。基質がびまん性に染色される場合も含む, 例: 図 2.2.7.A) を追加して、0-4 の 5 段階の Grading で評価した。簡便のために、神経細胞体内への沈着を neurofibrillary changes (NFT), 神経細胞体外の沈着を Tufted astrocytes (Tuft)と Coiled bodies (CB)のスコアの平均(Tuft & CB)の二つに分けて表現した。Grading の結果は、各症例群・部位・細胞種・抗体毎に平均値を求め、Wilcoxon の符号付順位和検定($p < 0.05$, 正確検定)で有意差を検定した。

共焦点顕微鏡観察のための蛍光二重免疫染色には、黒質を含む切片を 0.1M クエン酸緩衝液内で 30 分間電子レンジ加熱し、抗 4R タウ抗血清(10,000 倍希釈)と AT8(500 倍希釈)で反応させた。前者は抗ウサギ Alexa 546 Fluor™ で、後者は抗マウス IgG Alexa 488 Fluor™ (Molecular Probes, Eugene, OR) で可視化し、共焦点レーザー顕微鏡 (model LSM5 PASCAL, Carl-Zeiss, Jena, Germany)で観察した。

3. 結果

(1) 免疫プロット解析 (図 2.2.4.)

PSP 嗅内野のプロットでは、3 本の太いバンドが AT8, T46 で確認され、RD3, RD4 でそのうちの 2 本ずつが認識された。スメアの反応は RD4 よりも AT8 で強かった。黒質では、2 本の太いバンドが RD4, AT8, T46 で確認され、RD3 では認識されなかった。矢印は PSP に特異的と報告されている [102]37kDa のタウの低分子 C 末フラグメントであり、これは RD4, AT8, T46 で認識され、黒質に強く嗅内野には弱かった。脱リン酸化後の HT7 によるプロットでは、嗅内野は 6 つのタウアイソフォームを示す 6 本のバンドが、黒質は 4 リピート(R) タウを示す 2 本の太いバンドと 1 本の微かなバンドが確認された。

AD の嗅内野では、AT8 は 3 本の太いバンドに加え、スメアも強く認識していた。RD4

はそのうち2本を認識しているが、バンド・スメアともに反応が弱かった。黒質も同様だが、反応は全体的にわずかであった。

この結果から、PSP 固有病理は RD4 が AT8 よりも多くの構造を認識し、RD3 では認識されないパターンを呈することが疑われ、RD4 の染色性が有用と考えられた。この染色性の違いについて、翻訳後修飾の違いが疑われたので、抗体を増やして免疫組織学的に比較を行った。

(2) 黒質、嗅内野の特殊固定標本によるタウアイソフォーム特異抗体、AT8 陽性所見の半定量分析(図 2.2.5.)

黒質では、PSP の neurofibrillary changes (以下 NFT)、tufted astrocytes and coiled bodies (以下 Tuft&CB)は共に RD4 の染色性が AT8 のそれを上回っており、AD, Control の NFT はその反対の傾向を示した。また、PSP の NFT, Tuft &CB は共に RD4 陽性、RD3 殆ど陰性で、AD, Control は RD3、RD4 共に陽性であった(図 2.2.5.A)。この結果から、AT8 と RD4 の神経細胞体外の neuropil の染色性の違いが AD と PSP において認められ、特に RD4 の染色性の違いが大きかった。

嗅内野では、PSP、AD、Control の NFT はいずれも AT8 が最も高く、RD3、RD4 は同程度であった。ただし、PSP の Tuft & CB は RD4 が AT8 のそれを上回った。また、PSP, AD, Control いずれも NFT は RD3、RD4 共に陽性で、Tuft & CB は RD4 陽性、RD3 陰性であった。(図 2.2.6.B.)

(3) 黒質、嗅内野における種々の抗タウ抗体免疫染色(図 2.2.6., 2.2.7.)

PSP 黒質(図 2.2.6.)では、RD4 によって、繊細な突起が多数認識され、加えて NFT/PT, NT, Tuft, CB を認めた。この繊細な突起は C 末側のリン酸化部位への抗体である PHF1, AP422 が RD4 について多数認識し、N 末側のリン酸化部位への抗体である AT8 では少数で、RD3, MC1 では認識されなかった。Tuft, CB も同様の染色性であった。NFT/PT, NT は PHF-1, AP422, RD4, AT8, MC1 の順に多く認識された。

PSP 嗅内野(図 2.2.7.)では、NFT/PT, NT が殆どで AT8 が最も広い範囲を染色し、ついで PHF1, AP422, RD3, RD4, MC1 の順で認識した。しかし、Tuft, CB は黒質と同じく RD4, PHF-1, AP422 で多く、AT8 は検出に劣っていた。繊細な突起も症例によって少数、RD4 で認識された。細胞外神経原線維変化(extracellular Neurofibrillary Tangle, 以下 eNFT)は、RD3, PHF-1, AP422 で認識された。AD の嗅内野では、NFT/PT, NT はほぼ同様の染色パターンを示し、Tuft, CB は認めなかった。

その他の所見の詳細について記載する。PSP 黒質では、神経原線維変化(以下 NFT)/プレ

タングル(以下 PT)、ニューロピルスレッド(以下 NT)、グリア原線維変化(以下 GFT)、嗜銀顆粒(以下 AG)、が抗タウ抗体抗体で認識された。AG は高齢者ブレインバンクステージ 2 以上の 3 例で検出され、RD4、AT8 陽性、RD3 陰性だった。AD 黒質では、NFT/PT、NT、GFT、AG を抗タウ抗体で認めた。NFT/PT、NT は AT8 に最もよく認識され、RD3、RD4 ではより少数であった。GFT は 2 例で認め、RD4、AT8 陽性、RD3 陰性だった。AG は AD の 3 例で認めた。コントロール黒質では、少数の NFT/PT、NT を AT8 で認め、RD3、RD4 ではわずかだった。PSP 嗅内野では、NFT/PT、NT、GFT、細胞外神経原線維変化(eNFT)、AG、老人斑の変性突起が抗タウ抗体で認識された。NFT/PT、NT、老人斑の変性突起は、RD4、RD3、AT8 陽性で、AT8、が最も多くを認識し、RD3 や RD4 でより少数であった。RD3 陽性所見は Braak ステージにほぼ一致していた。GFT は RD4、AT8 陽性、RD3 陰性で、RD4 で強調されるが、AT8 では背景がびまん性に染色され分かりにくくなっていた。eNFT は RD3 陽性、RD4、AT8 陰性であった。AG は RD4、AT8 陽性で、RD3 にわずかに陽性であった。AD 嗅内野でも同様であったが、NFT/PT、NT について RD3 の染色性が RD4 に勝っていた。コントロールの嗅内野では、少数の NFT/PT、NT が抗タウ抗体で認識された。老人斑と eNFT は 1 例で認識された。これらの構造物の染色性は、PSP 嗅内野や AD の場合と同じパターンであった。

(4) 進行性核状性麻痺の固有障害部位と、アルツハイマー型神経原線維変化との共通病変部位の観点からの検討 (図 2.2.8.)

各部位の RD3 陽性 NFT の Grading は、中心前回、橋核、視床下核、歯状核では 0 であった。黒質、視床下核では、RD3 陽性 NFT の Grading は 0.5 前後であった。嗅内野、青斑核、マイネルト基底核では RD3 陽性 NFT の Grading は 1 を越えていた。これら Grading が 0 の部位は、Grading 1 以上の部位と RD3 NFT Grading に有意差を認め、前者は PSP 固有病変部位と考えられた。これら AT8、RD3、RD4 の 3 種の抗体の染色パターンから PSP 固有病変とアルツハイマー神経原線維変化様の病変に分類できると考えられた。Tuft & CB について抗体間で比較すると、RD4 の染色性が AT8 を上回る傾向が検索した全ての部位で見られたが、ホルマリン固定標本では固定期間によって染色性がぶれる傾向があり、有意差は歯状核の Tuft & CB にのみ認めた。

(5) 中心前回のタウアイソフォーム特異抗体、AT8 に対する染色性(図 2.2.9)

中心前回に沈着するタウは黒質と同様の染色パターンを示し、PSP 固有病変と考えられた。RD4 では NFT/PT、NT、Tuft、CB に加えて多数の繊細な突起を認識していた。AT8 では NFT/PT、NT、Tuft、CB を認めるが、繊細な突起の数は RD4 に比較し少なかった。RD3 は陰