

### 認知症の神経病理学 各論

## Braak 分類

Braak staging

村山繁雄<sup>1</sup> 齊藤祐子<sup>2</sup>

**Key words** : アミロイドβタンパク, タウ, 老人斑, 神経原線維変化, αシヌクレイン

### はじめに

Braak 夫妻は、元々は解剖学者であるが、独フランクフルト市連続剖検例より特定の部位を研究用途で受け取り、彼が改良した Gallyas-Braak (GB) 法で神経原線維変化 (NFT) を、またその染色過程が一部異なる Campbell-Switzer (CS) 法を用いることで老人斑 (SP) を検索した。用いた方法は 100 μm の厚切り浮遊切片の染色であり、解剖学的層構造の同定に用いていた方法で、病理学で普通用いるパラフィン切片ではなく、我が国では再現不能である。本人の言によると、アルツハイマー型神経原線維変化 (ADNFT)、SP のステージ分類にはおよそ 6,500 例を検討のうえ、厳密に全部位が満足のいくかたちで検討できた 85 例を用いたとして、Braak の NFT、SP のステージ分類を提唱した<sup>1)</sup>。

アルツハイマー病 (AD) に関しては、CERAD 基準<sup>2)</sup>が米国では用いられており、Bielschowsky 鍍銀染色、あるいは thioflavin S 蛍光染色で neuritic plaque を数える方法であるが、上記のような実証的エビデンスがなく、Bradley Hyman 博士と Suzanne Mirra 博士が決めたという以上の根拠をもたない。Bielschowsky 鍍銀染色は簡便だが、技師間の差、施設間差、検者間差が大きく、ごみが多いこと、高温多湿の我が国

ではしばしば退色することで、標準検査とするには問題が多い。また、thioflavin S 蛍光染色は、メイヨークリニックジャクソンビルの Dennis Dickson 博士が標準染色法に採用しているが、蛍光顕微鏡が必要で、教育的伝達が難しく、かつ標本に永続性はない。

現在 US-ADNI2 病理コアで用いられている、Khachaturian 分類<sup>3)</sup>は、びまん性であろうが古典的であろうが、ともかく SP が一定密度あり認知症があれば AD と病理診断するもので、レビー小体型認知症 (DLB) の中で小阪憲司博士の提唱するいわゆる SP を伴う common form や、びまん性 SP を伴う嗜銀顆粒性認知症 (AGD) もすべて AD と診断される。これについては、AD 診断を広くすることで症例数を多くし、重要性を強調することで研究費獲得の材料にしようとする米国特有の戦略がうかがえる。

これに対し Braak 分類は、連続性である老化性変化を、バイアスのかからない連続剖検例の横断研究から、縦断的变化を読み取ろうとした点で、新しいアプローチである。またいわゆる欧州流の、正確な事実を記載し、真実を追究したいという姿勢が基本となっている点に共感もてる。

ただ、Braak の方法論に対しては、同一人の連続変化をみているのではなく、横並びにした

<sup>1</sup>Shigeo Murayama: Brain Bank for Aging Research, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク <sup>2</sup>Yuko Saito: Department of Pathology and Laboratory Medicine, National Center for Neurology and Psychiatry 国立精神・神経医療研究センター 臨床検査部

多数例からの類推にすぎないとの批判もある。現在 SP の進展に関しては、アミロイドアンギオパチーとの分離はできないながら、アミロイド PET ( $^{11}\text{C}$ -Pittsburgh Compound B (PIB)) で経時変化を追求できるようになった。アミロイド PET リガンドはすべて、上記 thioflavin S の誘導体である。認知症例の経時変化を観察すると、陰性であった患者が陽転することはしばしば観察される。これらは恐らく DLB か、高齢者タウオパチー(主に AGD と NFT 優位型老年期認知症よりなる)と考えられる。ADNFT に関しては、現在開発中の tau probe による PET が成功すれば、回答が得られる可能性はある。ただその場合も、死後脳を用いた病理学的検索による確認が必須である点は、言うまでもない。

## 1. Braak 分類

前述したように、Braak 夫妻は、ヒト脳を用いた解剖学的研究の過程で、ADNFT の進展が、解剖学的構造と極めてよく関連することに気づいた。彼らは Gallyas 染色を改良した GB 法を、100  $\mu\text{m}$  厚切り切片の浮遊標本に適用した。GB 法は、染色の濃さの調整に途中検鏡を必要とするため、パラフィン切片に適用した方法では、現在でも日・独の技師以外、染色は困難である。しかし熟練した技師が行えば、再現性は極めて高い。Braak 夫妻は当初はこの方法を、解剖学的構造の部位の同定、例えば古皮質、旧皮質、新皮質の境界の同定に用いていた。しかし、これら老化構造物の進展パターンが一定の傾向をもち、ステージ分類を当てはめることが可能であり、更に、ADNFT においては、進展ステージと認知障害が、非常によく相関することに気づいた(図 1-a~c)。

一方 SP に関しては、GB 法のわずかな変法である CS 法を用い、やはり進展分類を構築し、SP ステージと認知機能との関連はないと結論した(図 1-d~f)。彼らの用いた CS 法は、アミロイド  $\beta$  タンパク ( $A\beta$ ) 免疫染色と極めてよく一致しており、 $A\beta$  の蓄積と認知機能は相関しないという、これまでいわれてきた事実の再確認となっている。これは、CERAD 基準が neu-

ritic plaque を基準としており、実際はタウ病変を基準としていることと、混同しないよう注意が必要である。

## 2. 高齢者ブレインバンク (Brain Bank for Aging Research: BBAR) 連続剖検例への Braak 分類の適用

GB 法は、パラフィン包埋切片にも応用可能である点は Braak らにより確認されている。著者らは、多数例の検討によるエビデンスに基づいていること、我が国の神経病理専門技師であればまず問題なく染色できることより、BBAR では GB 法を基準染色に採用した。

一方我が国では山口晴保博士が、病理で普通に用いられているメセナミン銀染色から重クロム酸カリウムによる前処置を省くことで、SP を特異度・感度ともに極めてよく染色する、改良メセナミン銀染色(modified methenamine silver: MMS)法<sup>4)</sup>を開発しておられ、CS 法よりはるかに簡便であるため、BBAR ではこちらを採用した。 $A\beta$  免疫染色での確認を必ず行っているが、染色むらが特に血管周囲に生じやすいこと、血管アミロイドは検出不可能であることを除いては、一般病理でも容易に施行可能で、ghost tangle がよく染色される点で、GB 法とも相補性を有する。

BBAR 蓄積例中、凍結組織より DNA が採取されている連続剖検例で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、GB 法と MMS 法で、ADNFT と SP の Braak 分類を施した結果を示す(表 1)。検者 2 人が独立して rating を行い、その結果を最終決定者が確認する方法を、すべてで踏襲した。この結果より以下の点が明らかとなった。

(1) 老年性変化は連続性であり、加齢の影響を受ける。

(2) Braak SP ステージ 0 か A で、NFT ステージ V 以上(isocortical stage)に至る症例は、極めてまれである。

アルツハイマー型老年性変化が年齢の影響を受けるのは当然といえば当然である。しかし、老化研究においては、疾患研究の常道である、

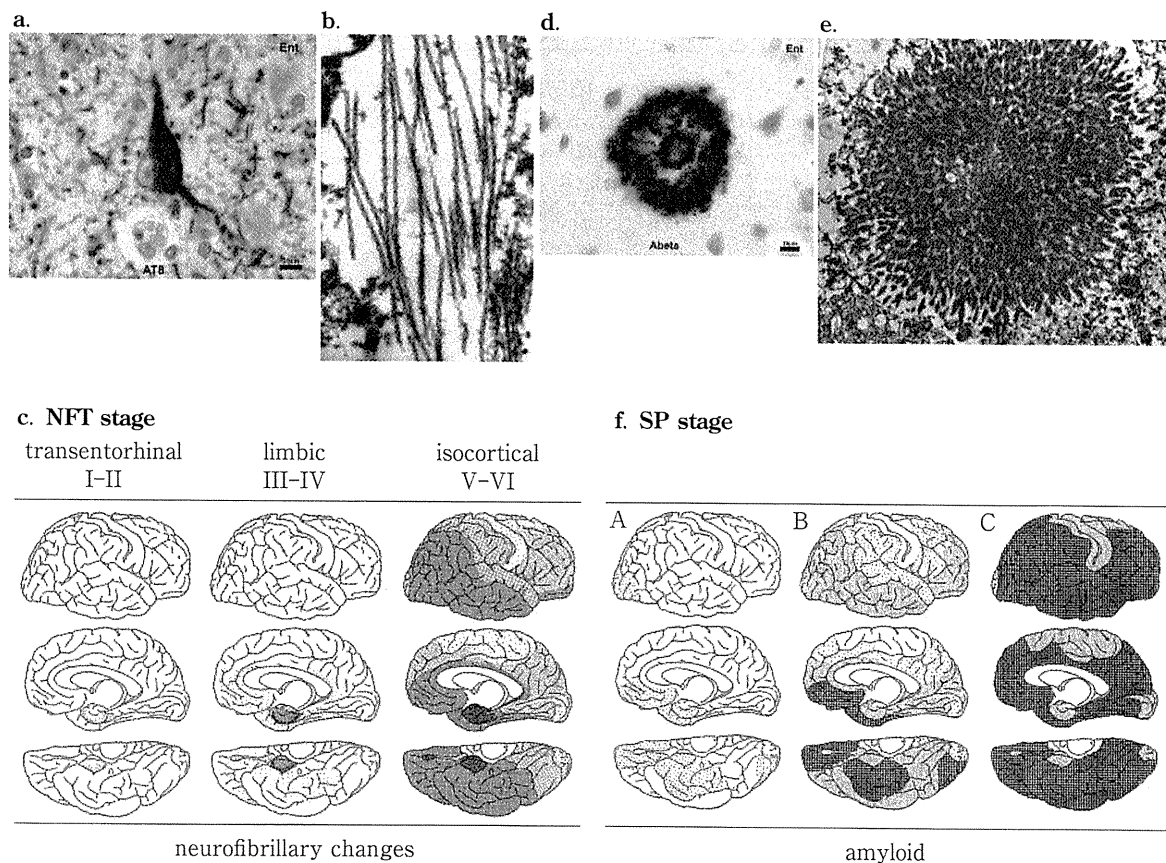


図1 Braakのアルツハイマー型老年変化ステージ分類(文献<sup>1)</sup>より改変, 高齢者ブレインバンクホームページ[[www.mci.gr.jp/BrainBank/](http://www.mci.gr.jp/BrainBank/)]より引用)

- a. AT8免疫染色によるアルツハイマー型神経原線維変化(ADNFT). 線維状構造の同定に加え, Gallyas-Braak (GB)法による確認が, 基礎研究においては要求される.
- b. ADNFTの構成成分であるpaired helical filament. ADNFTの厳密な同定には必須とされる.
- c. ADNFTの, GB法による進展ステージ分類. 嗅内野(transentorhinal)ステージでは認知機能には影響はなく, 辺縁系(limbic)ステージで認知機能障害を示しはじめ, 新皮質(isocortical)ステージで認知症を呈するとされた.
- d. 抗アミロイドβタンパク(Aβ)抗体免疫染色における, 古典的の老人斑(SP). Braakらは本論文ではCampbell-Switzer(CS)法を用いているが, 脳実質内アミロイドの検出では極めてよく一致すると記載されている. 著者らはより簡便で同様に一致度の高い, 改良メセナミン銀染色(MMS)法を用いている.
- e. SPの電顕像. アミロイド線維により構成されている.
- f. SPのステージであるが, アミロイドの進展分類としてはこの分類しか存在しない. CERAD基準は, あくまでneuritic plaqueの, 数による分類であり, 実証性をもたない点が問題である.

疾患群とコントロール群の比較で検討する方法論が, 必ずしも適用できないことを示している.

これまでADは, 進行性の認知機能障害で, 記憶障害のドメインを含む2つ以上の皮質症状をもち, 日常生活が障害され, 他の疾患が除外できることを診断基準としてきた(図2-a). 著者らの検討では, Braak NFTステージIV以上, SPステージCで, 特異度・感度が最も高くなるので, この基準を採用している<sup>5)</sup>.

しかし, 2010年度米国で新診断基準が提唱された. これまでのADは, Alzheimer dementia (ADD)と再定義された. また, 何らかの認知機能障害を有し, バイオマーカーがADを支持する症例は, prodromal Alzheimer disease (pAD)とされた. これは, 従来の軽度認知障害(mild cognitive impairment: MCI)からバイオマーカーにより分離するかたちをとっている. 一方研究基準ではあるが, SPが蓄積し, ADに進展す

表 1 高齢者ブレインバンク DNA リソース (1,890 cases)

SP \ NFT	0	I	II	III	IV	V	VI	計
0	34 66.3	314 75.8	102 81.8	46 85.6	12 85.4	1 81.0	0 —	509 77.5
A	16 75.5	350 78.0	149 83.6	74 86.2	23 88.6	1 99.0	0 —	613 80.6
B	8 76.1	169 79.9	91 82.8	70 85.6	23 91.2	2 82.0	1 94.0	364 82.4
C	3 76.0	50 79.4	51 83.0	80 84.5	80 86.6	100 86.4	40 83.9	404 84.4
計	61 70.5	883 77.7	393 82.9	270 85.4	138 87.6	104 86.4	41 84.1	1,890 80.9

上段が症例数, 下段が平均年齢. Braak の神経原線維変化(NFT)と老人斑(SP)のステージ分類を全例に施しており, これら連続性変化を研究対象にすることが可能である. この中で, アルツハイマー病と病理形態学的に診断しているのは, Braak NFTステージIV以上, SPステージCであり, 全剖検例に占める割合は, 220/1,890=11.6%である.

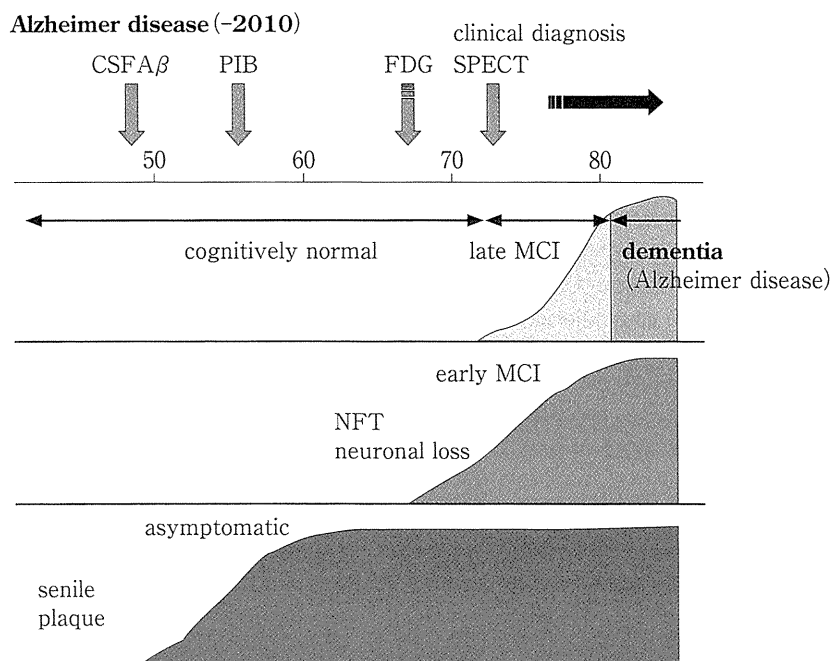


図 2-a 従来のアルツハイマー病の概念(井原康夫原因図より改変, 高齢者ブレインバンクホームページ[[www.mci.gr.jp/BrainBank/](http://www.mci.gr.jp/BrainBank/)]より引用)  
 老人斑がたまりはじめ, 神経原線維変化(NFT)の蓄積が開始すると, 神経細胞脱落をきたし, 一定の期間を経ると, 認知症を発症する. 髄液(CSF)のアミロイドβタンパク(Aβ)の低下が最も早期の指標となりうる. 米国 ADNI 研究で示された. またアミロイド PET(現在<sup>11</sup>C 標識 Pittsburgh Compound B (PIB)が国際標準)が最も簡便なバイオマーカーと位置づけられている. 糖代謝 PET(FDG)は, 認知機能の低下のごく初期をとらえうると考えられており, これが early MCI(mild cognitive impairment)の時期と考えられる. 何らかの認知障害が臨床でつかまる時期は late MCI と考えられる.

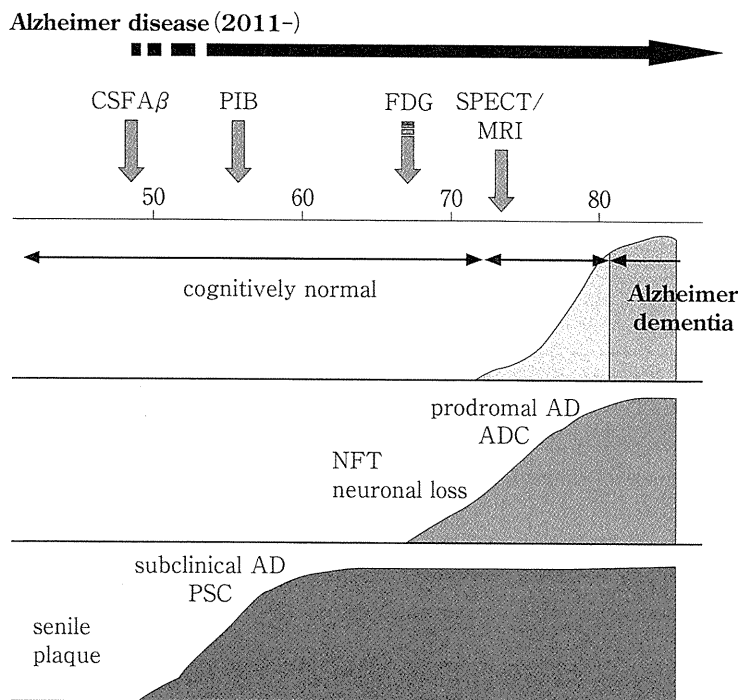


図 2-b アルツハイマー病新診断基準(高齢者ブレインバンク  
ホームページ[www.mci.gr.jp/BrainBank/]より引用)

従来のアルツハイマー病(AD)は、アルツハイマー認知症(Alzheimer dementia)とされ、何らかの認知機能障害を呈し、バイオマーカーがADを支持するものを、prodromal ADと定義する。一方老人斑の蓄積だけであっても、将来ADに進行する群を、subclinical AD(sAD)と定義する。現在のUS-ADNI2の主たる目的にsAD群の同定基準の選定があげられている。

ることが決定づけられている症例群は、subclinical Alzheimer disease(sAD)と定義された(図 2-b)。

これは、Aβ軽減のための、γ、βセクレターゼ阻害剤、Aβ能動・受動ワクチン療法が、すべて無効であることが明らかとなったことについて、ADDの段階では既に遅すぎるとの反省が生まれたことによる。アミロイドが蓄積した後、タウの沈着が誘導されるという、Aβ cascading 仮説に基づき、タウの沈着が起き始めた段階ではタウの除去が有効であるとの観点で、現在AD治療はタウにシフトしており、その場合pADが治療対象となる。一方、Aβ除去は、ADの進展予防にむしろ有用で、sADを的確に診断し、介入することが重要であろうと提言されている。

この新診断基準にあてはまるよう、著者らの症例群を、ADNFTステージII/III、SPステージ

A/Bをカットオフ値として分類した(表 2)。アルツハイマー病変化(Alzheimer disease change: ADC)がpADに、SP優位老年性変化(plaque dominant senile change: PSC)がsADにほぼ該当すると考えられる。PSCは、Dicksonらはpathological agingと呼称している。

著者らの検討は、Aβ cascading 仮説を支持するものである。ただし、辺縁系までの沈着は、Aβ蓄積とは相関せず<sup>6)</sup>、むしろ加齢が大きな影響を与える。ADNFTステージIII以上、SPステージA以下を、神経原線維変化優位型老年性変化(neurofibrillary tangle-predominant senile change: NFTC)と分類したが、これらの症例群は、記憶障害以外のドメインは侵されず、記憶障害型MCIのレベルにとどまり、90歳以上の高齢になり全身症状が加わるか、脳血管障害を併発しないかぎり、認知症レベルには至らない。

SPがA以下で、ADNFTがV以上の症例は、

表 2 新しいアルツハイマー病診断基準に沿った, Braak  
ステージ分類に基づく老年性変化のカテゴリー

		NFT stage					
		0	I	II	III	IV	V
SP stage	0	MSC			NFTC		
	A	(49.9 %)			(8.0 %)		
	B	PSC			ADC		
	C	(21.9 %)			(20.1 %)		

カットオフを老人斑(SP)ステージA/B, 神経原線維変化(NFT)ステージII/IIIに定めると, 理解が容易になる. アルツハイマー病変化(ADC)は prodromal Alzheimer disease(AD)にはほぼ合致することが予想される. 一方, SP 優位老年性変化(plaque dominant senile change)は Dickson らは病的老化と呼んでおり, subclinical AD と合致することが予想される.

MSC: minimal senile change, NFTC: NFT-prodominant senile change, PSC: plaque-dominant senile change, ADC: Alzheimer disease change.

PSC=subclinical AD, ADC=prodromal AD.

石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化症(diffuse neurofibrillary tangle with calcification)か, 広範脳梗塞を伴い, 同側に NFT の新皮質までの進展を伴った, いずれも特殊例である. ただ, Braak の NFT 分類単独では, 少数ながらタウの沈着を主体とする, AD とは明らかに異なる症例が迷入してくるので, 著者らは SP ステージも AD 病変のカテゴリー分類には加えている.

### 3. AT8 免疫染色を用いた Braak ステージ

GB 法は技師の能力に依存するため, Braak は現時点で ADNFT を最も鋭敏に検出できる, 抗リン酸化タウ抗体(AT8, Innogenetics 社)免疫染色を用いたステージ分類を新たに提唱した. 前方・後方海馬と第一側頭回, 視覚領・視覚連合野でステージ分類をする方法で, 移行嗅内野ステージ(I), 嗅内野ステージ(II), 海馬ステージ(III)は変わらないが, 第一側頭回まで進展していれば IV, 視覚連合野にあれば V, 視覚領にあれば VI とするものである. また, 細胞質内 NFT のみを評価対象とし, neuropil thread や, びまん性陽性である pretangle は除外することを原則とする. この染色は, より厳密性を欠くかたちで, BrainNet Europe で Alafuzoff らにより標準化されている<sup>7)</sup>.

BBAR では, Braak の論文に基づき, GB 法に

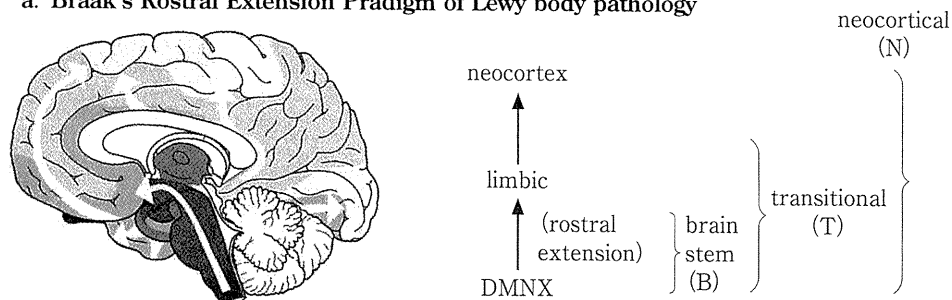
よるステージ分類との対比を行った. 全般に AT8 ステージ分類の方が, GB ステージ分類より高くなる傾向が明らかにある. しかし国際標準化のためには, 特に英・米の技術者が染色できない GB 法は, 説得力を保てない. ただ, ADNFT と pretangle の区別, neuropil thread は評価対象としないという点が, 技師間の差, 施設間差, 検者間差を生む可能性はある. BBAR では全例 Braak の GB ステージと AT8 ステージで評価することで, 基礎データ提供の努力を継続している.

### 4. レビー小体病理の Braak ステージ

Braak は同様の手法をレビー小体病理に適用することで, 有名な脳幹上行仮説を提唱した(図 3-a)<sup>8)</sup>. 100 μm 厚浮遊切片を用い, 抗 α シヌクレイン抗体免疫染色で行ったが, AD 変化への適用と異なり, 2 つの大きな問題点を有する.

(1) 連続剖検例より認知症例を除外したとしており, バイアスのかかった集団の検索結果である. これは上記の ADNFT, SP の全連続剖検例を用いた結果と異なる. この結果, AD だけでなく, DLB でパーキンソン症状が臨床的に記載されていなかった群を除外する結果を招いている.

a. Braak's Rostral Extension Paradigm of Lewy body pathology



b. Olfactory-Amygdala Extension of Lewy body pathology

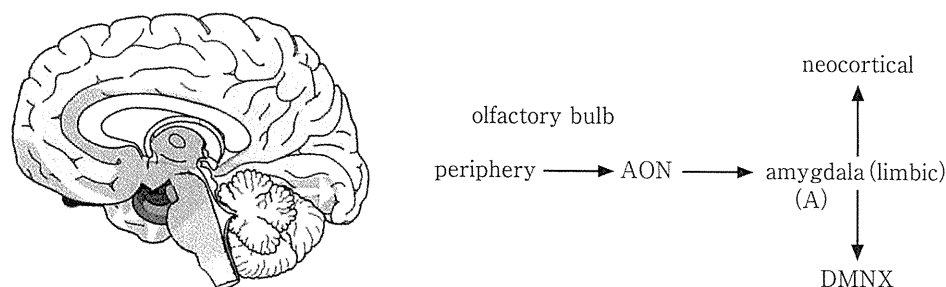


図3 レビー小体の進展形式(高齢者ブレインバンクホームページ[www.mci.gr.jp/BrainBank/]より引用)

a. Braakの有名な脳幹上行仮説. b. 著者らは高齢者連続剖検例を用い、嗅球・扁桃核進展経路が独立して存在することを明らかにした<sup>9)</sup>.

(2) 免疫染色を用いている点で、レビー小体病理を正確にとらえているかどうか不明である。本来100 $\mu$ m厚切片ではH. E. 染色が不可能であるため、レビー小体の本来の定義であるH. E. 染色による確認は一切行えない。また、著者らがリン酸化 $\alpha$ シヌクレイン抗体をBraak博士の要望に応えお送りしたが、判断できないとの回答であった。これは、リン酸化抗体は感度・特異度とも高いこと、しかし検体の固定に大きく影響を受けることが、採用できない理由と考えられる。

この2つの方法論的問題に加え、著者らが指摘した嗅球・扁桃核進展経路が存在すること(図3-b)<sup>9)</sup>、ADNFT、SPと異なり、レビー小体の場合は末梢神経系に出現するため、中枢神経系のステージ分類だけでは全体が評価できないことが問題となる(図4)。

現在著者らの非難を受けて、Braakらはdual

hit hypothesisを提唱している<sup>10)</sup>。病因(恐らくウイルス)が、口から入り、嗅粘膜より嗅球、口蓋扁桃・消化管より舌咽・迷走神経を通り延髄に至る2経路で、中枢神経系に到達している。これについては、末梢を含めた網羅的検討をBBARでは継続しているが、彼らの仮説をサポートするデータは得られていない。

おわりに

Braakのアルツハイマー病理ステージ分類について述べ、認知症診療とのかかわりを述べた。バイアスのかからない多数例を検索し、老化を連続性変化で、閾値を超えたときに症状が出現すること、技師間の差、施設間差、検者間差の生じにくい進展分類を採用したことが、オリジナルである。一方、レビー小体病理ステージは、更なる検討が必要である。

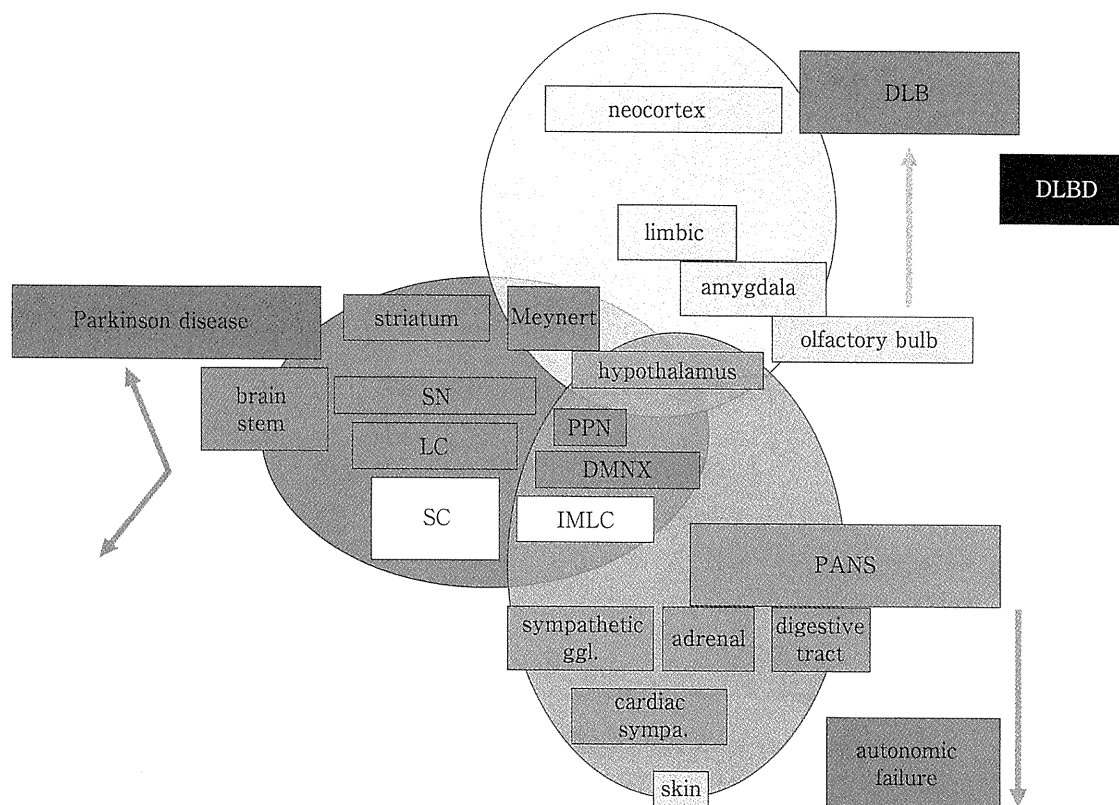


図4 レビー小体病(高齢者ブレインバンクホームページ[www.mci.gr.jp/BrainBank/]より引用)

レビー小体病は全身疾患である。アルツハイマー病とは異なり、末梢自律神経系にも出現する。多系統萎縮症のように、病変の主座により、病型が異なるが、オーバーラップが当然存在し、高齢者においては、病変は一般的に、どの症状で初発しようと既に広範であるとの理解が必要である。

## ■ 文 献

- 1) Braak H, Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259, 1991.
- 2) Mirra SS: The CERAD neuropathology protocol and consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease: a commentary. *Neurobiol Aging* 18: S91-94, 1997.
- 3) Khachaturian ZS: Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 42: 1097-1105, 1985.
- 4) Yamaguchi H, et al: Distinctive, rapid, and easy labeling of diffuse plaques in the Alzheimer brains by a new methenamine silver stain. *Acta Neuropathol* 79: 569-572, 1990.
- 5) Murayama S, Saito Y: Neuropathological diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Neuropathology* 24: 254-260, 2004.
- 6) Katsuno T, et al: Independent accumulations of tau and amyloid beta-protein in the human entorhinal cortex. *Neurology* 64: 687-692, 2005.
- 7) Alafuzoff I, et al: Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol* 18: 484-496, 2008.
- 8) Braak H, et al: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197-211, 2003.
- 9) Sengoku R, et al: Incidence and extent of Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging human olfactory bulb. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 1072-1083, 2008.
- 10) Hawkes CH, et al: Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 599-614, 2007.



綜合臨牀 第60巻第9号  
(平成23年9月1日発行 別刷)

# 認知症の病理学

*Neuropathology of dementia*

村山 繁雄 齊藤 祐子  
*MURAYAMA Shigeo SAITO Yuko*

永 井 書 店

## 認知症の病理学

*Neuropathology of dementia*

特集


村山 繁雄 齊藤 祐子\*

MURAYAMA Shigeo SAITO Yuko

認知症

Key words タウ 迂回回 記憶障害型軽度認知障害 前頭側頭型認知症  
機能画像

認知症の病理学は多岐にわたるため、われわれが現在最も注目している嗜銀顆粒性認知症について述べる。嗜銀顆粒 (AG) は Gallyas-Braak (GB) 鍍銀染色で、高齢者に高頻度に認められ、アルツハイマー型神経原線維変化 (ADNFT) とともに neuropil thread (NT) と異なる構造として発見された<sup>1)</sup>。AG 以外に認知症の原因が認められない群を、嗜銀顆粒性認知症 (AGD) と呼称し、高齢者連続剖検例においては、アルツハイマー病に次ぐ頻度を占める<sup>2)</sup>。その後タウパチーとして再定義され<sup>3)</sup>、4 リピートタウから形成されることが明らかとなった<sup>4)</sup>。本稿では、認知症、運動障害の臨床的縦断研究後、極力剖検を得、臨床情報と病理所見の統合を行う、高齢者ブレインバンクプロジェクトよりの AGD の知見を述べ、連続的变化を示す認知症病理への、臨床・画像・病理の統合的アプローチを紹介する。

 神経病理所見

AG は neuropil に出現する、GB 染色で確認されるコンマ状あるいは紡錘状の形態をとる構造物である (図 1)。存在の確認には、抗リン酸化タウ抗体 (AT8 は国際標準) 免疫染色の感度が高いが、抗 4R タウ抗体 (市販抗体は RD4 のみ)、3R タウ抗体 (RD3) 免疫染色の特異度が高い。また腫大神経細胞、bush like astrocyte、oligodendroglial coiled body 等、4R タウ陽性構造を伴う。

AG の出現頻度は高齢者ブレインバンク (平均

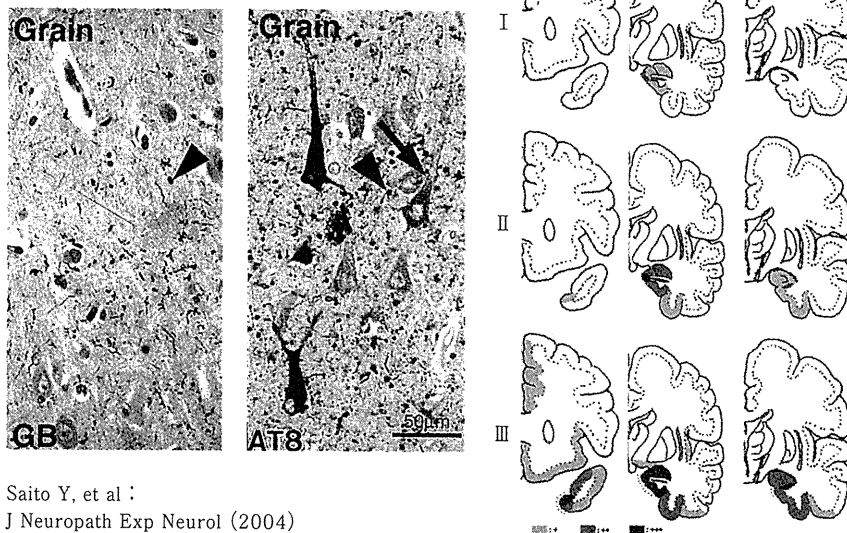
年齢およそ 80 歳) のほぼ 2/3 で、60 代から出現を認め、頻度、程度ともに、年齢とともに増加傾向を示す。また変性型老化性変化として、65 歳以上では、ほぼ 100% である ADNFT、80% 近い老人斑 (SP) に次ぎ、第 3 位を占める。

われわれは、AG の進展分類を提唱しており (齊藤分類<sup>5)</sup>)、ヨーロッパ神経病理学会で承認されている<sup>6)</sup>。すなわち、迂回回ステージ (Stage I)、側頭葉ステージ (Stage II)、前頭葉ステージ (Stage III) で、Stage III で認知機能障害を高率に呈する<sup>5)</sup>。また、剖検時軽度認知障害に対応すると考えられる CDR 0.5 の症例では、AGD の頻度が最も高い<sup>7)</sup>。

AG の進展レベルと老人斑の進展レベルとの相

東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク \* 国立精神・神経医療研究センター臨床検査部

Staging of Argyrophilic  
Grains (BBAR)



Saito Y, et al :  
J Neuropath Exp Neurol (2004)

図1 嗜銀顆粒性認知症進展ステージ分類

左：Gallyas Braak 染色での嗜銀顆粒(矢尻).  
中央：AT8免疫染色による嗜銀顆粒(矢尻)と pretangle(矢印).  
右：嗜銀顆粒性認知症進展ステージ分類. I：迂回回ステージ, II：側頭葉ステージ, III：前頭葉ステージに分類され, ステージIIIが認知障害と関連する(高齢者ブレインバンクホームページ <http://www.mci.gr.jp/BrainBank> より引用).  
(Approved by European Society of Neuropathology as the Staging Standard in 2010)

関はなく<sup>5)</sup>, びまん性老人斑が多い点で, AD とは区別される. また, 神経原線維変化優位型変化を伴うことが多い.

AG の進展に伴い, 最好発部位である迂回回の萎縮が特徴となる(図2)<sup>8)</sup>. また, AG は同じ4R タウオパチーである皮質基底核変性症と同様, 高率に左右差を伴う<sup>9)</sup>.

**病理から臨床への還元**

高齢者ブレインバンクでの検討では, 臨床症状としては, 記憶障害が前景に立つ点で AD との鑑別が難しいが, 易怒性, 性格変化等の, 前頭側頭型認知症(FTD)様の症状を軽いながら伴うことが一般的である<sup>9)</sup>. また進行が緩徐である点は, AD とは明らかに異なる. 一方, 精神科でフォローされている例では, FTD 症状が前景に立つ場合が多いことが報告されており<sup>10)</sup>, 疾患のスペクトラムと考えられる.

画像上は, 病理学的に確認される迂回回の左右

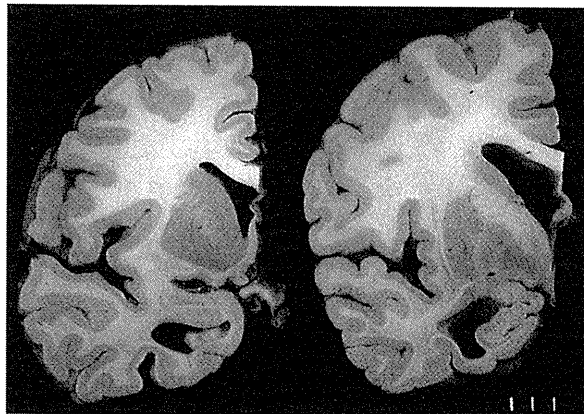


図2 嗜銀顆粒性認知症の肉眼像

(静岡てんかん神経医療研究センター小尾智一博士提供)  
迂回回の著明な萎縮と, 側脳室下角の拡大が特徴的である. 本例は診断困難認知症とされており, われわれが再検索し, 嗜銀顆粒性認知症と診断した症例である.

差を持った萎縮を反映し, 形態・機能統計画像(図3)で, 左右差を持った側頭葉内側面の萎縮・代謝血流低下が診断上有用である<sup>9)</sup>. われわれは MRI VSRAD と ECD SPECT eZis 3.0, <sup>18</sup>F-FDG PET を用いているが, 機能画像がより鋭敏である. また VSRAD の旧版は, 迂回回病変を強く反映するため, MMSE の割に VSRAD の Z score

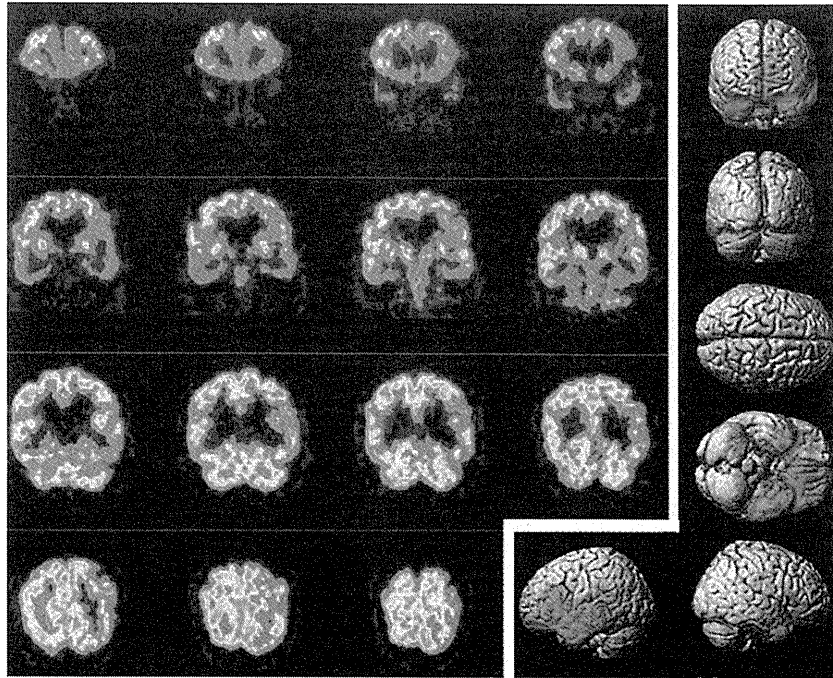


図3 嗜銀顆粒性認知症(剖検確定例)の、FDG PET 画像

左が原画像。右がSPM処理統計画像( $p < 0.01$ で代謝低下部位を赤で表示)。左側頭葉内側面前方の代謝低下が、統計画像でより明瞭に認められる。(石井賢二博士提供、高齢者ブレインバンクホームページ <http://www.mci.gr.jp/BrainBank>より引用)。

が高い特徴を有する。

髄液バイオマーカーは、剖検確定診断例の検討からは、タウ、リン酸化タウがわずかに高値をとる場合がある。A $\beta$ 値は原則として正常であるが、A $\beta$ 沈着と相関し低下する場合がある。

バイオマーカーとして最も有用なのは、 $^{11}\text{C}$ -PIB (Pittsburgh Compound B) PETである。多くの症例で陰性となるが、一部A $\beta$ 沈着と相関し、陽性となる場合もある。しかし、最も多く蓄積する例でも、ADとはパターンが明らかに異なる。

治療について、塩酸ドネペジルは原則として不応であり、高齢者が多いため、鑑別診断なき投与は、錐体外路症状による、歩行障害、転倒を誘発する危険がある。

新皮質連合野が比較的保たれることを反映し、遂行機能障害は軽い。したがって、記憶障害と性

格異常を適切に管理すれば、ADLが長く保たれる点はADとは異なる。

## まとめ

AGDは、神経病理学的に高齢者変性型認知症ではADに次ぐ頻度であるが、臨床症状からは、ADとの鑑別が困難である。髄液バイオマーカー、構造・機能画像を用いることで、今後見逃さない配慮が必要である。

認知症の病理学で最も重要な点は、進行していく病態を評価するには、連続性を持ったコホートのデータを持つことが必要である点である。さらに、臨床・画像・病理連関の重要性を強調し、結びとしたい。

## 文 献

- 1) Braak H, Braak E : Argyrophilic grains : characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without Alzheimer changes. *NeurosciLetters* 76 : 124-127, 1987.
- 2) Braak H, Braak E : Argyrophilic grain disease : frequency of occurrence in different age categor-

- ies and neuropathological diagnostic criteria. *Journal Neural Transm* 105 : 801-819, 1998.
- 3) Tolnay M, et al : Argyrophilic grain disease : widespread hyperphosphorylation of tau protein in limbic neurons. *Acta Neuropath* 93 : 477-484, 1997.
  - 4) Togo T, et al : Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy. *J Neuropath Exp Neurol* 61 : 547-556, 2002.
  - 5) Saito Y, et al : Staging of argyrophilic grains : an age-associated tauopathy. *J Neuropath Exp Neurol* 63 : 911-918, 2004.
  - 6) Kovacs GG, Budka H : Current concepts of neuropathological diagnostics in practice : neurodegenerative diseases. *Clin Neuropath* 29 : 271-288, 2010.
  - 7) Saito Y, Murayama S : Neuropathology of mild cognitive impairment. *Neuropathology* 27 : 578-584, 2007.
  - 8) Saito Y, et al : Severe involvement of ambient gyrus in dementia with grains. *J Neuropath Exp Neurol* 61 : 789-796, 2002.
  - 9) Adachi T, et al : Neuropathological asymmetry in argyrophilic grain disease. *J Neuropath Exp Neurol* 69 : 737-744, 2010.
  - 10) Togo T, et al : Clinical features of argyrophilic grain disease : a retrospective survey of cases with neuropsychiatric symptoms. *Am J Geriatr Psy* 13 : 1083-1091, 2005.

第2部 病理診断医になじみのある疾患関連分子  
診断編  
Tau

村山繁雄 齊藤祐子

病理と臨床【臨時増刊号】・別刷

2011 vol. 29

東京／文光堂／本郷

## I. 鍍銀染色

現在主流の免疫染色は、後述するように、抗体の購入が必要で、固定法の影響を受けるため、一般病院の病理検査室で行うことには制約があるが、鍍銀染色はその影響が少ない。ただし、施設ごと、技師ごとの差異が大きい点で、標準化においては問題となる<sup>1)</sup>。

Bielschowsky 鍍銀染色は簡便であるため、CERAD (Consortium to Establish Registry for Alzheimer Disease)<sup>2)</sup>では標準染色に指定されている。この染色で Alzheimer により、原線維変化、老人斑(図1)に加え、Pick 球が記載されたが、染色が不安定であること、高温多湿の本邦では経年変化により退色・変色が起きることが問題で、本邦では積極的には採用されていない。ただ簡便である点が利点である。

Bodian 染色は、リン酸化ニューロフィラメントに強い親和性があることが示されているが、神経原線維変化の染色性は弱い。しかし 3R タウパチーである

Pick 球は最もよく染色される(図2)。

Gallyas-Braak 鍍銀染色による検討は(図2, 3)、染色されているものがタウの蓄積とは限らず、 $\alpha$ -シヌクレイン沈着である多系統萎縮症のグリア内封入体 glial cytoplasmic inclusion も陽性に染色されること、アルツハイマー原線維(ADNFT)でも ghost tangle は原法では染色されないこと、3R タウパチーである Pick 球は染色されない点(図2)に注意が必要であるが有用である。

最近、原法では必須の硝酸ランタンが要らず、短時間で済む簡易法が開発された(表1)<sup>3)</sup>ので、参考に供する。

なお、pretangle の用語は、もともとは Bodian 染色陰性、Bielschowsky 染色陽性の神経原線維変化に与えられた名称であるが、現在研究者領域では、後述するタウ免疫染色陽性、Gallyas-Braak 染色陰性のものが呼ばれており、超微形態的に、線維形成をしていない状態を指す用語となっている。

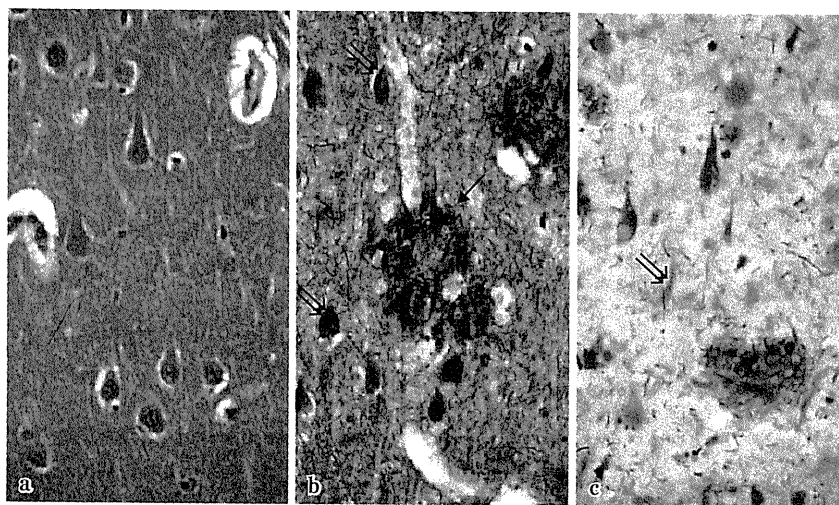


図1 Bielschowsky 鍍銀染色 a. 正常. b. アルツハイマー病活動期. 老人斑(矢印)と神経原線維変化(二重矢). c. アルツハイマー病晩期. Ghost tangle (二重矢).

\*<sup>1</sup> 東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク

\*<sup>2</sup> 国立精神・神経医療研究センター病院臨床検査部

図2 Pick球

a: HE染色ではやや塩基好性の細胞質内封入体として観察される。b: Bodian染色では核と隣接した円形、腎臓形等さまざまな形態をとる。c: AT8染色ではBodian染色より感度が高く認識される。d: Gallyas-Braak染色では染色性が極めて淡く、見落とす危険性がある点に注意が必要である。

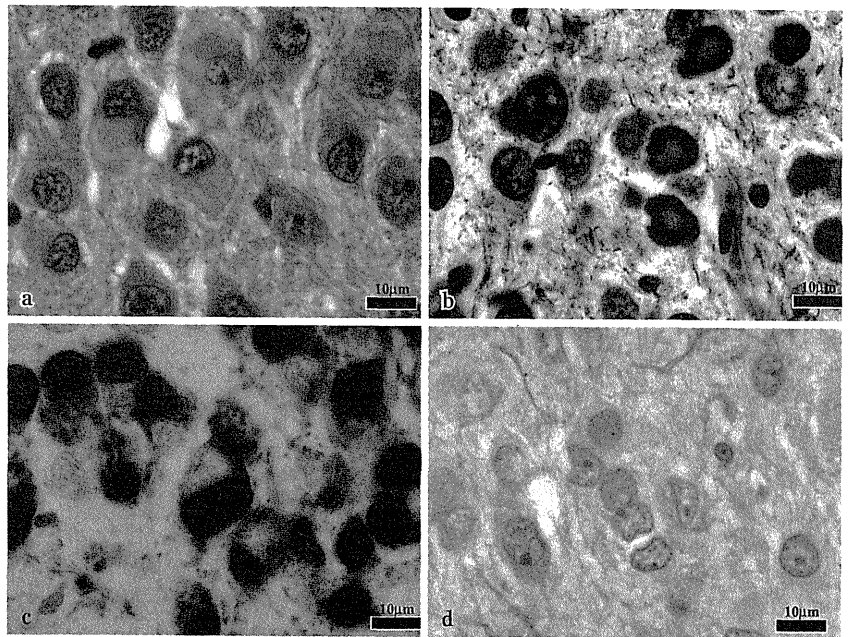
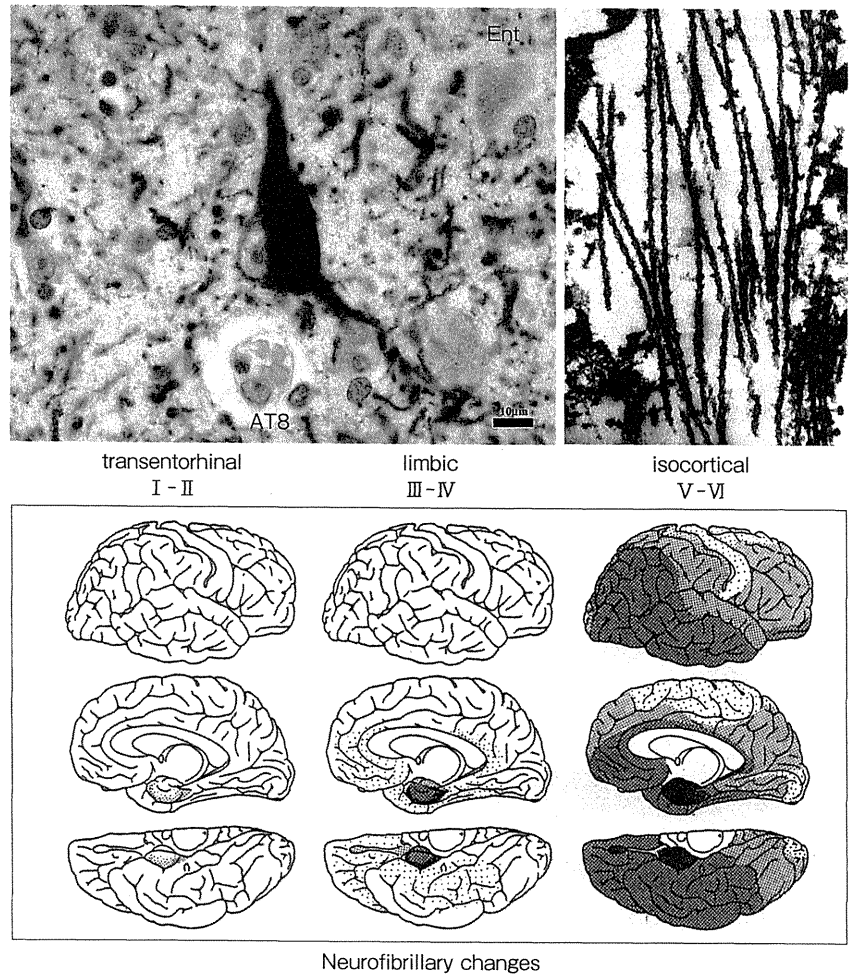


図3 神経原線維変化と Braak 進展ステージ分類 (引用文献5, 一部改変)。認知機能障害とステージ分類が平行して動くことは、多くの所見が支持する。上左は抗リン酸化タウ抗体で染色された神経原線維変化。上右はその電顕像。高齢者ブレインバンクホームページ ([www.mci.gr.jp/BrainBank/](http://www.mci.gr.jp/BrainBank/)) より引用。





## II. 免疫組織化学

現在市販されている抗タウ抗体は、Innogenetics社が販売している AT8 が世界標準となっている。エピトープは Ser 198 と Ser 208 のリン酸化部位を認識しており、ADNFT 形成の初期に、過剰にリン酸化される部位を認識すると考えられている。AT8 はタウオパチーの存在検出感度はきわめて高いが、認識部位が生理的リン酸化部位である点が問題である。生理的リン酸化は、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素で可逆的であるが、ADNFT においては過剰リン酸化により非可逆的になるため、死後変化によってもリン酸化が維持され、描出されると考えられている。しかし、切除後時間が短い外科材料においては、擬陽性が生じる可能性に留意する必要がある。また、胎児においてはリン酸化が強いため、AT8 で微小管に結合したタウが認識されうる点に注意が必要である<sup>4)</sup>。

ADNFT は、多数例の病理学的横断研究により、Braak の進展ステージ分類が採用されている。Gallyas-Braak 染色によるステージ分類<sup>5)</sup>と、AT8 免疫染色<sup>6)</sup>の両者があり、後者はヨーロッパ連合のブレインバンクネットワークでの共通診断所見として採用されている。我々の施設では前者を Braak ステージ、後者を AT8 ステージとして、全症例に両方のステージ分類を施しており、Braak ステージ分類4以上を AD 診断の必須事項としている<sup>7)</sup>。なお、本邦や米国では認知度が低いですが、高齢者タウオパチーとして ADNFT に次ぐ頻度の嗜銀顆粒 (図4) についても、我々は同様の進展ステージ分類を提唱しており<sup>8)</sup>、本年度ヨーロッパ神経病理学会で、標準ステージ分類として採用された<sup>9)</sup>。

タウは先述のように6つのイソフォームからなり、微小管結合部位が3カ所か4カ所かにより、3リピート (3R) タウと4リピート (4R) タウに分類される。3R と4R タウでは、リピート部とC末端ジャンクションに構造的差異が存在することを利用しつくられたのが、3R タウ (RD3)、4R タウ (RD4) アイソフォーム特異抗体である。RD3 と RD4 は交差反応は免疫ブロット上ないとされている<sup>10)</sup>。

AD や一般的な老化に伴う神経原線維変化は両方で認識されるが、RD4 は4リピートタウオパチーである進行性核上性麻痺 (図5)、皮質基底核変性症を特異的に認識する。RD3 は3リピートタウオパチーであるピ

表1 Gallyas-Braak 染色簡易法

(1) 0.3% 過マンガン酸カリウム	10分
(2) 軽く水洗	
(3) 1% 酢酸	1分
(4) 水洗	5分
(5) 蒸留水	
(6) アルカリ性ヨウ化銀	1分
(7) 0.5% 酢酸 (3回)	各1分
(8) developer 液	16~18分
(9) 0.5% 酢酸 (3回)	各1分
(10) 1% 塩化金	5分
(11) 軽く水洗	
(12) 2% チオ硫酸ナトリウム	1分
(13) 水洗	1分
(14) 0.1% ケルンエヒトロート	3分

### 試薬調整

#### ・アルカリ性ヨウ化銀のつくり方 (100 mL)

水酸化ナトリウム 4g, ヨウ化カリ 10g, 蒸留水 50 mL

蒸留水に水酸化ナトリウムを溶かすと熱をもつので冷ますこと。

→この液に1%硝酸銀を1滴ずつ3.5 mL 入れる→蒸留水 50 mL 加える。

#### ・developer のつくり方 (注意参照)

使用時に A 液, B 液等量混和する (各 A 液 B 液は、冷蔵庫保存可)。

A 液: 硝酸銀 2g, 硝酸アンモニウム 2g, ケイタングステン酸 10g, ホルマリン原液 5.1 mL, 蒸留水 1,000 mL

B 液: 5% 無水炭酸ナトリウム

B 液に A 液をゆっくり滴下しながら混和する (分液ロートなどを用いるとよい)。

#### ・1%ゼラチンのつくり方

ゼラチン 1g, 蒸留水 100 mL

少し熱を加えて溶解する (冷蔵保存: ぬるま湯につけて溶解してから developer 液に混入する)。

### 染色上の注意

1. 毎回、陽性対照をたてて染色性のチェックをする。
2. developer の反応は液温が低いと遅く、高いと早くなるので作製後は使用時まで冷蔵庫で保管しておくこと。当センターの検討では、液温が15°C くらいの場合、16~18分で染め上がっている。
3. 作製した反応液は40分以内に使用するのが望ましい (劣化傾向あり)。
4. 染色ムラを防ぐため時々切片を上下動する。
5. developer 100 mL に対して1%ゼラチン1 mL 混ぜることで銀鏡反応や反応速度が緩やかになり、染め上がりが見極めが容易になる。

ック病の Pick 球関連病変を特異的に染色する。

AT8 は固定条件を選ばず染色性が保たれるが、固定期間が長い場合、あるいは虚血性病変の負荷があった場合、特にニューロピルの陽性所見が影響を受ける。賦活法としては、Aβ抗体のようにギ酸処理、オートクレーブ、マイクロウェーブ、湯煎のいずれでも有用性が報告されているが、本来の生理的リン酸化部位の過剰リン酸化が保持されることを認識する抗体であることに留意し、陽性構造物の形態的特徴で、病的か否かの判定を行う必要がある点に、留意が必要であ

図4 嗜銀顆粒とその進展ステージ分類.  
 左: Gallyas-Braak 鍍銀染色での形態(矢尻). 中: AT8免疫染色では, 嗜銀顆粒(矢尻)に加え, pretangle(矢印)の存在が特徴とされる. 右: 嗜銀顆粒のステージ分類. 迂回回よりはじまり(I), 側頭葉を前方・後方に広がり(II), 前頭葉に及ぶ(III). ステージIIIと認知障害がよく相関する(高齢者ブレインバンクホームページより引用 www.mci.gr.jp/BrainBank/).

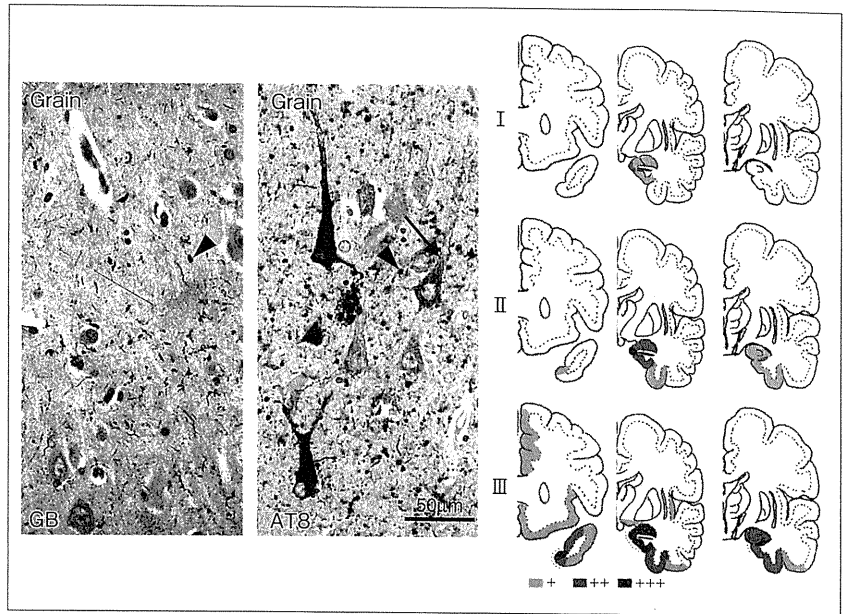
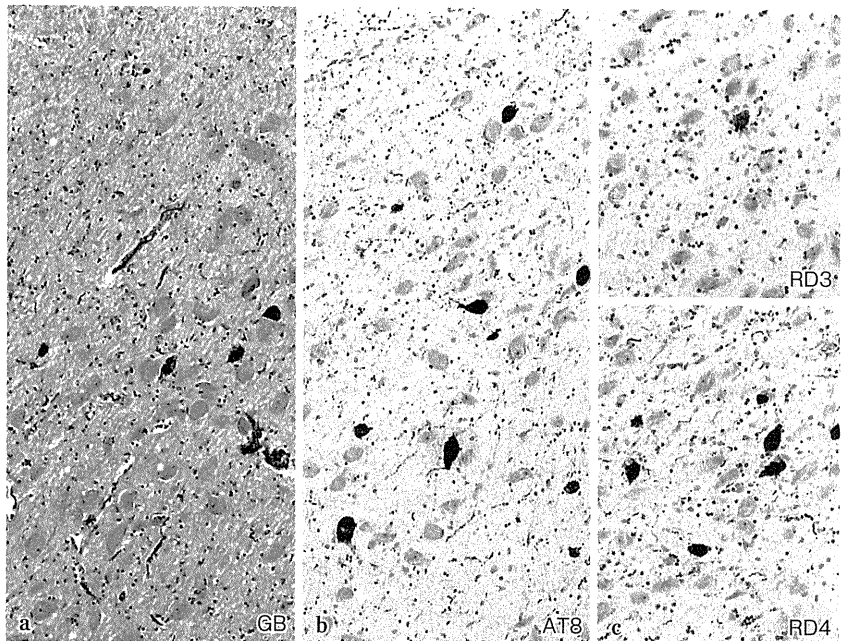


図5 進行性核上性麻痺例のマイネルト基底核病変. Gallyas-Braak 染色(a), AT8免疫染色(b)ではアルツハイマー病における原線維変化との区別が容易ではないが, 抗3リピートアイソフォーム特異抗体(RD3)ではほとんど染色されず(c), 抗4リピート抗体(RD4)でよく染色される点で, 進行性核上性麻痺の神経原線維変化であると判断できる.



る.

一方, RD3はマイクロウェーブ, RD4はギ酸処理とマイクロウェーブの賦活が必要である. RD3, RD4とも, 米国の基準である中性干渉ホルマリン7~13日固定でも一定の陽性所見が得られるが, 剖検時に切り出し, 直接4%パラホルムアルデヒドに入れ, 48時間固定しパラフィン包埋した材料とでは, 感度に明らか

な差がある. 特に, 中性ホルマリンでも固定時間が長い場合, あるいは酸性ホルマリンの場合には陽性率は著しく減じる点に留意が必要である.

免疫染色の方法であるが, 我々は Ventana NX300 システム (avidin streptavidin) を採用している. これは, インキュベーション時間が短く, 切片がきれいであることが最大の理由である. また, SRLが採用して

おり、高齢者ブレインバンクホームページ (www.mci.gr.jp/BrainBank/) 上で公開している、固定液、固定時間、包埋法と切片の厚さ (6  $\mu\text{m}$ ) を統一すれば、外注で我々と同じ染色結果を得ることができる。標準化された免疫組織化学を診断基準とするのが、多施設をまたがるブレインバンクネットワークを構築するうえで基本であることは、ヨーロッパブレインネット、UA-ADNI 研究からも明らかである。

### III. 超微形態

タウオパチーにおいては、特に ADNFYT において、電子顕微鏡像が必須とされてきた。paired helical filament (PHF) (図3) と呼ばれる特徴的形態をとり、進行性核上性麻痺や Pick 病は直細管の形態をとる点で、区別される。タウの同定は、電顕的に確認された PHF 画分で家兎を免疫し、得られた抗体 (抗 PHF 抗体) の解析が突破口となった<sup>11)</sup>。

### まとめ

タウオパチーの診断においては、高感度鍍銀染色と免疫組織化学に、アイソフォーム特異抗体が国際標準となっており、固定条件の調節が基本となる点で、組織病理の根幹と関連する。

### 文 献

- 1) Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al-Sarraj, S. et al. : Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease : a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathology* 2008, 18 : 484-496
- 2) Mirra, S., Heyman, A., Mckeel, D. et al. : The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991, 41 : 479-786
- 3) Kawaguchi, M., Kuninaka, N., Ogawa, M. et al. : Generalization of the modified Gallyas-Braak stain. *Neuropathology* 2010, 30 : 333
- 4) Saito, Y., Motoyoshi, Y., Kashima, T. et al. : Unique tauopathy in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *J Neuropathol Exper Neurol* 2005, 64 : 1118-1126
- 5) Braak, H., Braak, E. : Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991, 82 : 239-259
- 6) Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T. et al. : Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 2006, 112 : 389-404
- 7) Murayama, S., Saito, Y. : Neuropathological diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Neuropathology* 2004, 24 : 254-260
- 8) Saito, Y., Ruberu, N.N., Sawabe, M. et al. : Staging of argyrophilic grains : an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exper Neurol* 2004, 63 : 911-918
- 9) Kovacs, G.G., Budka, H. : Current concepts of neuropathological diagnostics in practice : neurodegenerative diseases. *Clinical Neuropathol* 2010, 29 : 271-288
- 10) Luk, C., Giovannoni, C., Williams, D.R. et al. : Development of a sensitive ELISA for quantification of three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies. *J Neurosci Met* 2009, 180 : 34-42
- 11) Ihara, Y., Abraham, C., Selkoe, D.J. : Antibodies to paired helical filaments in Alzheimer's disease do not recognize normal brain proteins. *Nature* 1983, 304 : 727-730

第2部 病理診断医になじみのある疾患関連分子  
解説編  
Tau

村山繁雄

病理と臨床【臨時増刊号】・別刷

2011 vol. 29

東京／文光堂／本郷