

老人斑, Alzheimer 神経原線維変化, Pick 嗜銀球の超高倍率走査電顕的観察

岡山大学医学部神経精神医学教室 (指導: 大月三郎教授)

久 山 圭 介

(平成3年9月4日受稿)

Key words : Senile Plaque, Alzheimer's neurofibrillary changes, Pick body, scanning electron microscopy

緒 言

Alzheimer 病, Alzheimer 型老人痴呆, Pick 病の原因はいずれも未だ不明であり, 病理形態学的にはいくつかの脳の老年変化が注目されており, それらの変化の電顕的, 免疫組織化学的, 生化学的, その他の研究が盛んである. 電顕的には透過型電顕による観察は多数あるが, 走査型による観察はごく少数である. これは従来より一般に行なわれている走査電顕法が, 少数のごく小さい構造物を見つけ出すのが困難なこと, 偶然とらえてもせいぜい1万倍程度で透過型に匹敵する超微形態の観察が困難なこと, 構造物によってはその構造物であることの同定も困難なことなどによるものと思われる. しかし, Alzheimer 神経原線維変化を構成する細線維の超微形態など, 長年その立体構造が議論の対象になりながら, 透過型による二次元像の報告のみが続き, 立体構造についてはあくまで仮説の領域を出ないものもある. 本研究では, 非常に小さい数の限られた構造物でも確実に見つけ出して観察でき, しかも, その構成成分の超微細形態が明示できるように標本作製法を工夫し, 老年変化の走査電顕観察を行なった. 改良した走査電顕法により, 従来の走査電顕で報告された脳老年変化の像より, はるかに微細な構造の像が得られた. また, 透過型と同等か, それ以上の超高倍率観察も可能となり, 透過型の二次元像のみでは判断不能であった線維成分等の, 立体構造の像を得た. ここにその結果を報告す

るとともに, 走査電顕法の改良点について述べる.

対象と方法

対象は, Alzheimer 病2例, Alzheimer 型老人痴呆7例, Pick 病2例の解剖脳である.

方法1: 脳のホルマリンあるいはグルタル固定標本から作った5~10 μ パラフィン切片で, キシレン中にて脱パラフィン処理を行なう. 透徹後, hematoxylin-eosin 染色を行い, グリセリン封入を行い, 光顕標本を作製する. 光学顕微鏡による観察を行ない, 観察すべき病変を写真撮影する. その後, 燐酸 buffer 中でカバー・ガラスをはがし, スライド・ガラスに付着したまま切片を十分 buffer で洗浄し, グリセリンを完全に洗い落とす. これよりすべてスライド・ガラスに付着した状態で切片を処理する. つぎに切片を, 37°C の trypsin 25mg/ml 燐酸 buffer 溶液中に1時間おく (この過程はしばしば省略した). これを再び燐酸 buffer 中で十分洗い, 1% Os 燐酸 buffer 溶液中で2時間前固定を行なった後, 田中らの Os 浸軟法¹⁾に従い0.1% Os 燐酸 buffer 溶液中に室温にて3~6日間おく. その後, 1% Os 燐酸 buffer 溶液中で2時間後固定を行ない, 十分に水洗を行なう. 試料は最後に村上のタンニン酸・オスミウム法²⁾にて導電染色を行なう.

タンニン酸処理は0.5%タンニン酸で, 約1時間処理する. 十分な水洗を行なった後 (5~6時間以上), 2% Os で6時間処理する. 再び3

日間以上の水洗を行なった後、エタノール系列で脱水し、セロテープ・クロロフォルム溶解液で処理した試料台に試料を付着させる。そして、定法通り臨界点乾燥法を行なう。

こうして製作した SEM 標本に観察直前に10 Å ないし 5 Å の白金蒸着を行ない、走査電顕で観察する。観察は日立 S-900, HFS-2, JSMU-3 で行い、光顕写真を見ながら光顕で観察したのと同一の病変を観察する。

方法2: 0.1% Os 磷酸 buffer 溶液によるオスミウム浸軟処理までの過程は、方法1と同様に行なう。その後タンニン酸による処理をせず、直接2% Os 溶液で固定する。以後はまた、水洗、エタノール系列による脱水、以下、方法1と同様の処理をして SEM 標本を作製して、走査電顕で観察する。

主に方法1で観察を行なったが、個々の線維構造物の観察を目的とする場合は方法2を用いた。

結 果

1. 老 人 斑

大脳皮質の老人斑は典型斑、原始老人斑、緻密斑の3型を区別しながら観察した。

A. 典型斑 走査電顕弱拡大では、直径80~100 μm の老人斑の中央に光顕像の amyloid core の部分に一致して、径20~40 μm の凹凸がある類円形の高密度の構造物があった。その周囲の crown に相当する部分には、長さ10 μm 前後の棍棒状か不整形で、core よりもさらに密度が高い構造物が長軸を斑の中央に向けて環状に並んでいた。core のまわりには大小間隙を認め、core の突出した部分が crown の間に伸びる場合もあった。crown の外側の老人斑が周囲と接する部分には、幅10 μm ぐらいの低倍率ではやや密度が高く均質に見える帯が見られる場合が多かった (Fig. 1-B)。

強拡大では、core は径30~300 nm の棒状構造物 (ときにリボン状) が放射状に密集しており、個々の棒状構造物は枝別れ、癒合、屈曲しながら周囲へ伸び、core 全体としては珊瑚状に見えた (Fig. 1-D)。この棒状構造物は、中央では非常に高密度で無構造のように見え、周辺

部ではやや疎でシダの葉状に枝別れしているのがよく見えた。crown は、径5 μm 程度までの高密度の異常神経突起や神経膠細胞の突起、毛細血管などであり、これらが core をとり巻いており、ときには core の中に突入していた (Fig. 1-C)。斑の周辺部の、低倍で均質無構造のように見えた帯状の部分には、径50~100 nm の紐状構造物、これに多数の100~300 nm の大小不整形顆粒が付着した数珠状構造物が不規則に走り、網状を呈していた (Fig. 2-A, B)。

B. 緻密斑 H. E. 光顕標本で、典型斑のアミロイドの core のみから成るような老人斑を選び観察した。走査電顕の弱拡大では、径30 μm 程度の類円形ないし不整形で高密度の core のみから成り、周囲には典型斑のような、網状構造や不整形高密度構造物は認められなかった (Fig. 3)。強拡大では core は典型斑の core と同様の、放射状配列した棒状構造物からなる珊瑚状構造であり、棒状構造物の径は50~300 nm 程度であった。これが周囲組織と直接接していた。周囲との境界は凹凸が多かったが、斑の部分は周囲より明瞭に区別された。

C. 原始老人斑 H. E. 光顕標本では、周囲組織に比べわずかにエオジンに濃く染まる類円形の斑状部分として認められた。その中には amyloid core はなく、膠細胞の核や毛細管が少数認められるのみではほぼ無構造のように見えた。走査電顕の観察でも、弱拡大では、斑の部分は周囲より高密度の境界不明瞭な部分として認められた。斑の内部は径80~120 nm の不整形粒子が数珠状に連なった物が不規則に走り、枝別れ、癒合、絡み合った網状構造が組織の間隙をほぼ均一に埋めていた (Fig. 4)。これは典型斑の周辺部に帯状に認めた構造と非常に類似し、それよりもやや密度が低い場合が多かった。周囲との境界ははなはだ不明瞭な場合が多かった。

典型斑 core と緻密斑はほぼ同じような構造だった。直径30~300 nm の凹凸の多い棒状構造物が認められ、この棒状構造物の径は症例によって30~150 nm 程度の細いものが多い場合と1,000~2,000 nm 程度の非常に太いものが多い場合があり、かなり差がみられた。しかし、同一の症例内においてそれほど大きな差はなかった。

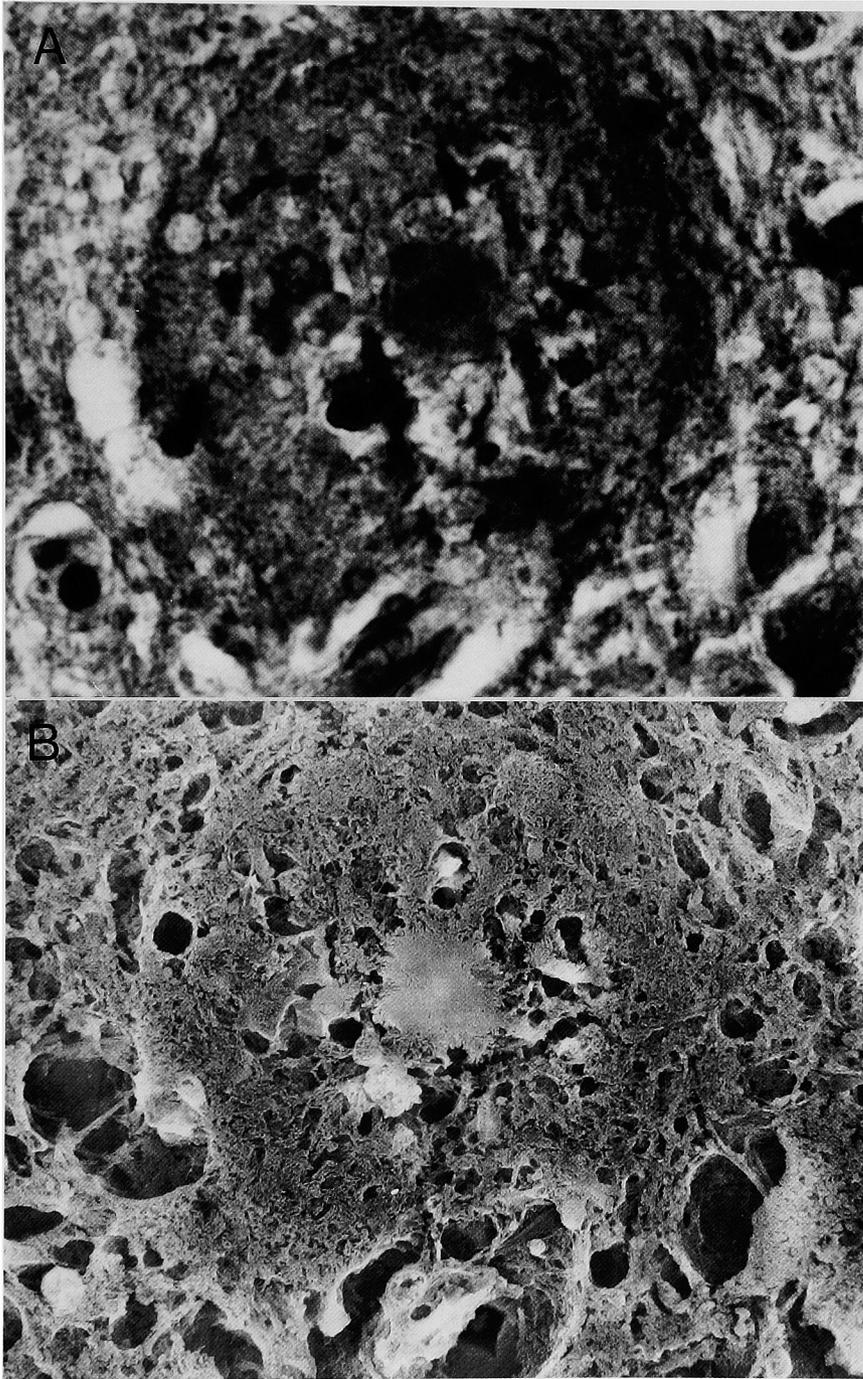


Fig. 1 A : 典型斑光顕像. (HE 染色 $\times 1,250$)
B : その走査電顕像. ($\times 1,250$)

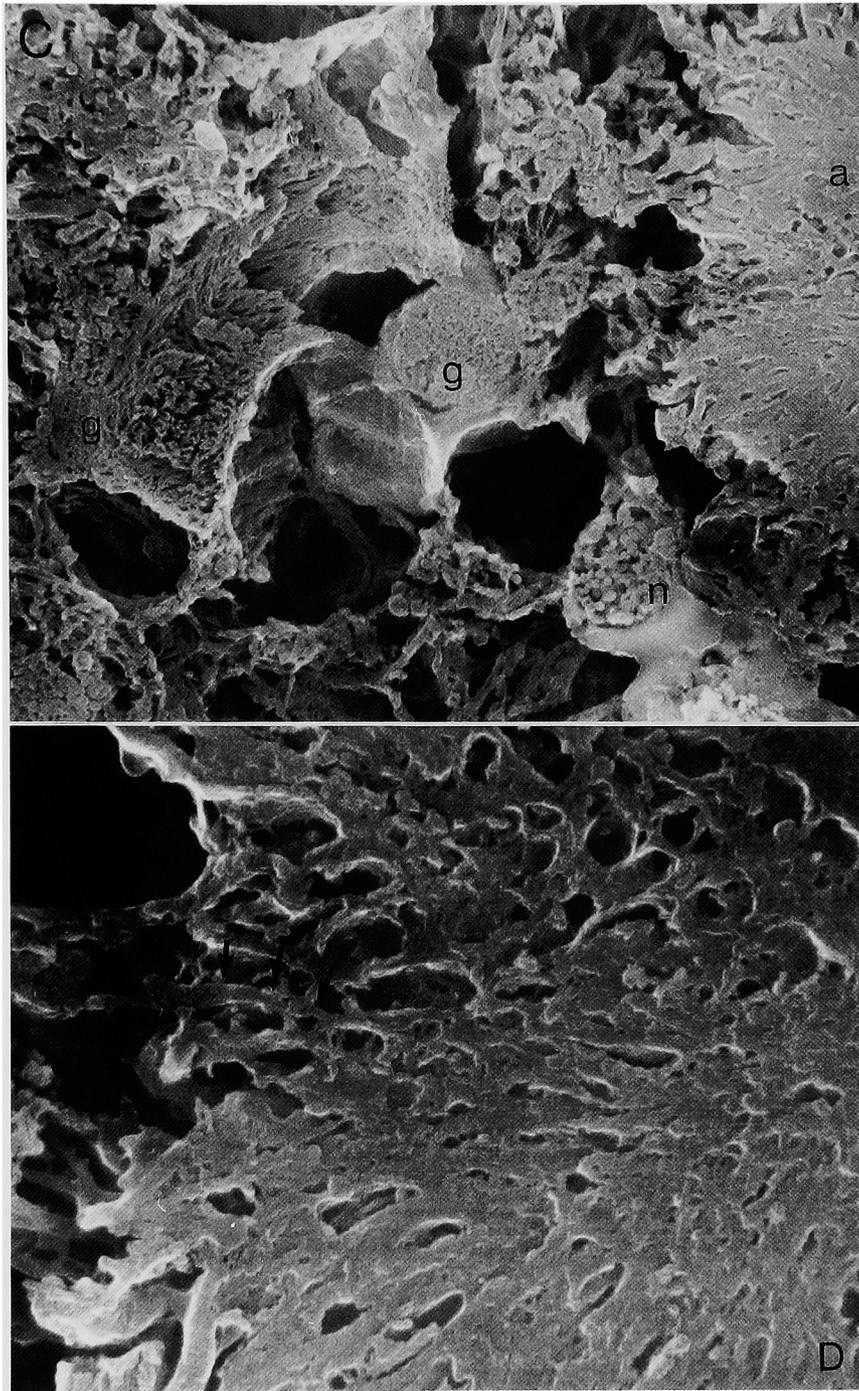


Fig. 1 C : Bの一部拡大像. 異常神経突起, 膠細胞の突起, 毛細管などが core をとり囲む. a はアミロイド core. n は神経突起. g は神経膠細胞の突起. ($\times 6,250$)
 D : アミロイド core をさらに拡大. 棒状構造物 (矢印) が放射状配列しているのが末梢ほど明瞭に認められる. ($\times 18,800$)

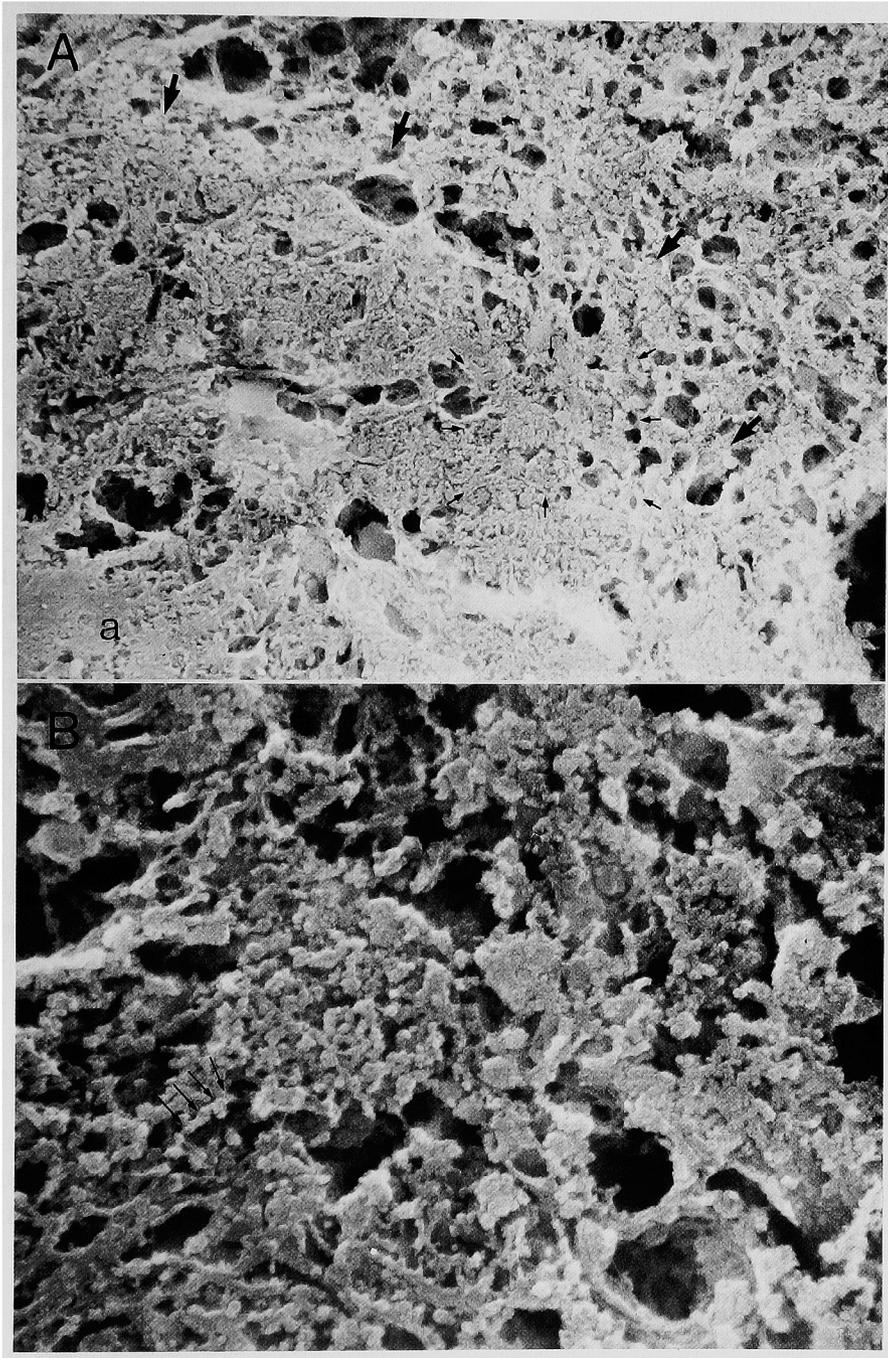


Fig. 2 A : 典型斑周辺部の走査電顕像. a はアミロイド core. 大矢印より内側が老人斑. 周辺部には細かい網状構造を認める. (×2,500)
 B : 典型斑周囲の帯状の網状構造. A の小矢印で囲った部分の強拡大. (×12,500)

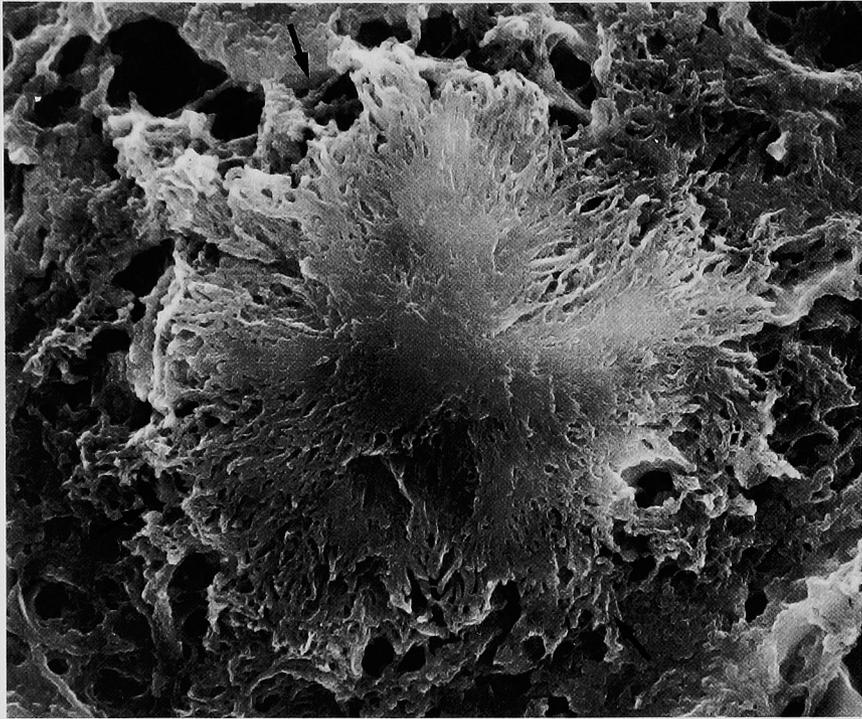


Fig. 3 緻密斑. 矢印の内側が老人斑. アミロイド core のみからなる. 棒状構造物が放射状配列している. ($\times 3,750$)

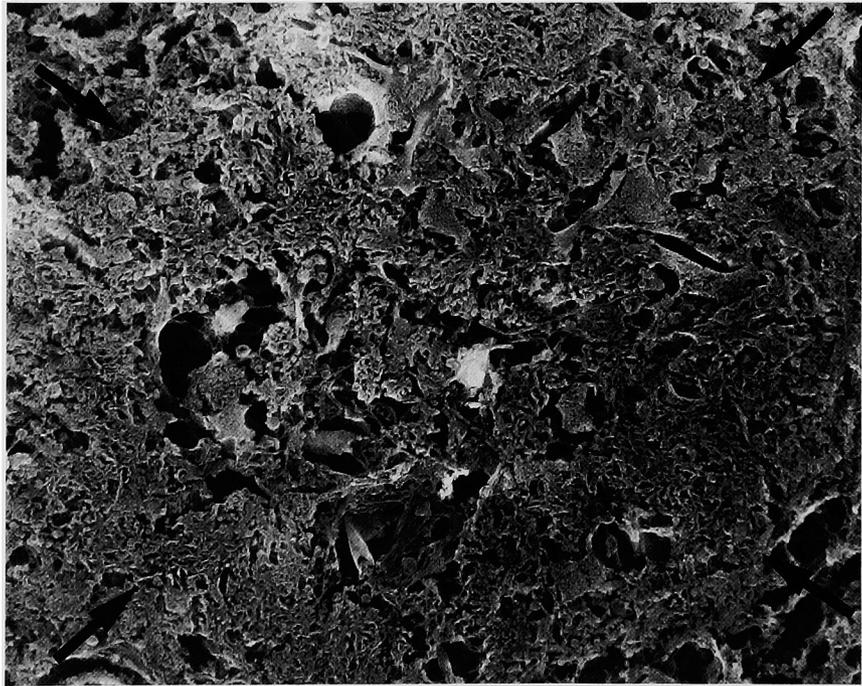


Fig. 4 原始老人斑. 矢印の内側が老人斑. ($\times 2,500$)

これらの老人斑をさらに30万倍～60万倍の超高倍率で観察した。amyloid coreの棒状構造物は、径15 nm 前後の表面に凹凸が多く数珠状の外観を呈する線維が、屈曲、癒着しながら全体として同一方向に配列し、非常に密に集合して形成されたものであった (Fig. 5-A, B)。典型斑周辺部の帯状均質部や原始老人斑の内部の網状構造の中に、周囲の数珠状構造物に比べわずかに暗い部分が散在性に認められ、超高倍率で観察すると、amyloid coreの棒状構造物に見られたのと同じような、径15 nm 前後で凹凸と屈曲の多い数珠状の線維を認めた (Fig. 6-A, B)。すなわち、網状構造の内部に少数で蛇行したり、癒着し合ったりして走行するものや、多数同一方向に集合して配列し、かなり大きな紐状または波打った膜状構造物を形成するものもあった。

2. Alzheimer 神経原線維変化

走査電顕で観察すると、光顕像での Alzheimer 神経原線維変化の走行と一致して、線維状構造物の束が走っていた。

A. 炎型 (flamed shape) 弱拡大では細い線維が密に集合した径3～10 μm 程度の束が、神経細胞内で核の近くに現われて、神経突起の方に向かってまっすぐに、またはなだらかな曲線を描いて伸びていた (Fig. 7)。束の周辺には細胞質を認めても、束の内部にはほぼ一様に径25 nm 程度の平行な細線維が認められ、他の細胞内小器官はほとんど認められなかった。原線維変化の多くは光顕で認められたのと同じ形態の束が見られたが、光顕で明瞭な flame 型が見られても走査電顕では細線維の束がごく一部しか見られない場合もあった。

B. 球状型 (globose shaped) globose 型神経原線維変化は、光顕像は細胞質の大部分を渦巻き状線維が占め、核を細胞の片隅に押しやっているので見られるが、弱拡大走査電顕像でも光顕に一致して、細い線維の束が渦巻いて平行に走るのが見られた (Fig. 8)。線維の間には、やはり他の細胞内小器官はほとんど見られなかった。

原線維変化の走査電顕像でときに、弱拡大では細線維には見えず、径1 μm 以上の粗大な紐

状の構造物が平行に走るように見える場合もあった。しかし、こういうものも、倍率を3万倍程度の高倍率まで上げると、粗大紐状構造物は、それぞれが細線維の密集した束であることがわかった (Fig. 9-A, B)。

強拡大では flame 型も globose 型も、細線維の径はほとんどが25～30 nm 程度であり、その密度は flame 型の方がやや高いものが多かった。細線維の多くはくびれの部分と太い部分が交互に見られ、10万倍程度の倍率にすると多数の数珠状線維が平行に並んで走っている像が認められた (Fig. 10) (Fig. 11)。さらに30～60万倍の超高倍率に拡大すると、個々の線維は70～80 nm 程度のほぼ規則正しい周期で径25 nm 程度の太い部分と径15 nm 程度のくびれた部分が認められた (Fig. 12)。このような細線維を、超高倍率でその三次元形態を観察すると、70～80 nm の周期で180°ずつ回転しながら走っているようであり、その回転方向は、左回り回転であるものをよく認めたが、右回り回転のものは確認できなかった (Fig. 13-A～C)。線維に側鎖のような構造は認めなかった。

3. Pick 嗜銀球

光顕では Pick 球は通常、神経細胞の先端突起と核との間に位置し、核とはほぼ同大で、H. E 染色で均一な弱塩基性を示す類円形の封入体として認められた。Pick 球の周りには細胞質は少量認められるのみであった。封入体と周囲の境界は、光顕では明瞭であった。走査電顕による観察では、7,000倍程度までの低倍率では、Pick 球は限界膜を欠くが、周囲の細胞質と明瞭に区別される比較的密な類円形の網状構造物として認められた。網状構造物の所々には、径1～2 μm の小孔や、細胞内小器官と思われるものが散在していた (Fig. 14A)。倍率を上げると、Pick 球は縦横に錯綜する細線維が1辺100～200 nm 程度の三角、四角などの網眼をなす網状構造物であり、これらの線維の表面には多数の顆粒が付着するのが基本構造であった。その間に少数のリポフスチンや、ミトコンドリアと思われる細胞内小器官、あるいは小空胞などが散在していた。線維の走行は、それぞれの線維が立体的に不規則に走り、癒合し合うことはほとんどな

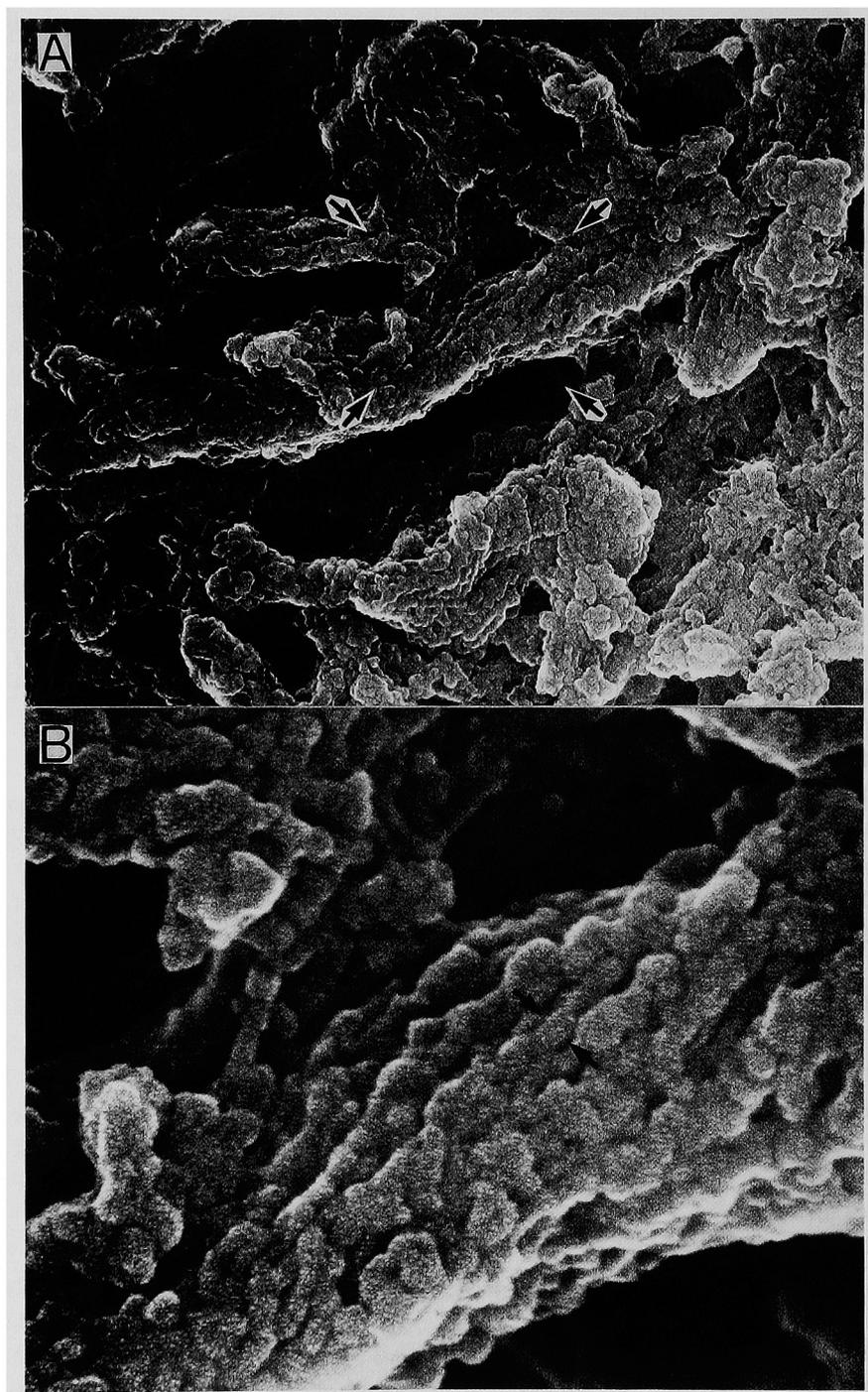


Fig. 5 老人斑のアミロイド core の強拡大像。(典型斑)
A : 棒状構造物の表面に微細な顆粒状物質が見える。(×61,000)
B : Aの矢印で囲った部分の拡大。径15 nm 程度の凹凸屈曲の多い線維(矢印)が集合し癒合して、棒状構造物を形成している。(×285,000)

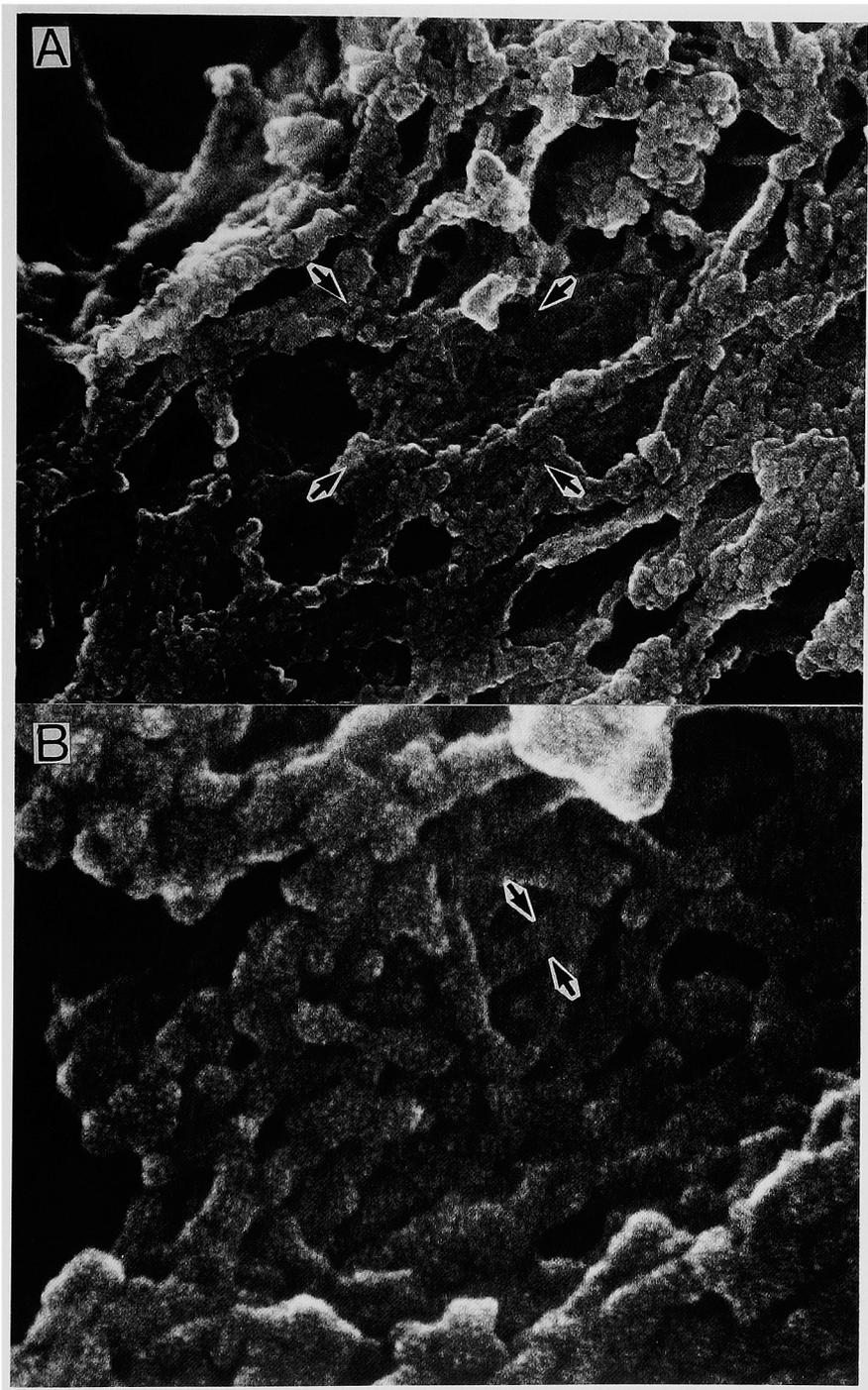


Fig. 6 原始老人斑内部の網状構造の間隙にみられた小さな膜状、ないし紐状構造物。
A : 10万倍前後に拡大すると表面に多数の顆粒状のもの見られる。(×93,000)
B : Aの矢印で囲った部分の拡大。数珠状の線維(矢印)が集合している。(×400,000)

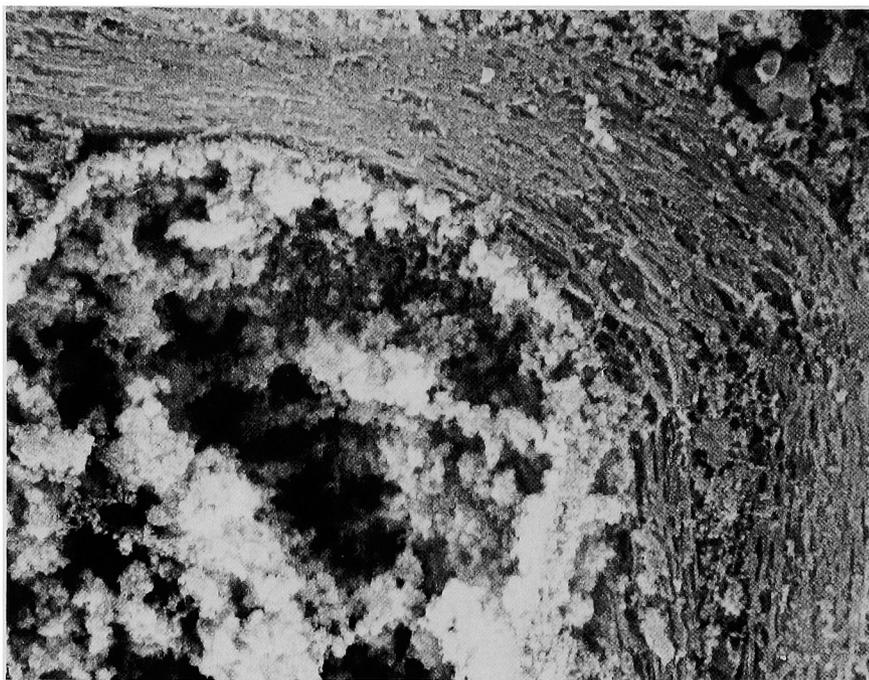


Fig. 7 flame 型 Alzheimer 神経原線維変化. ($\times 8,750$)

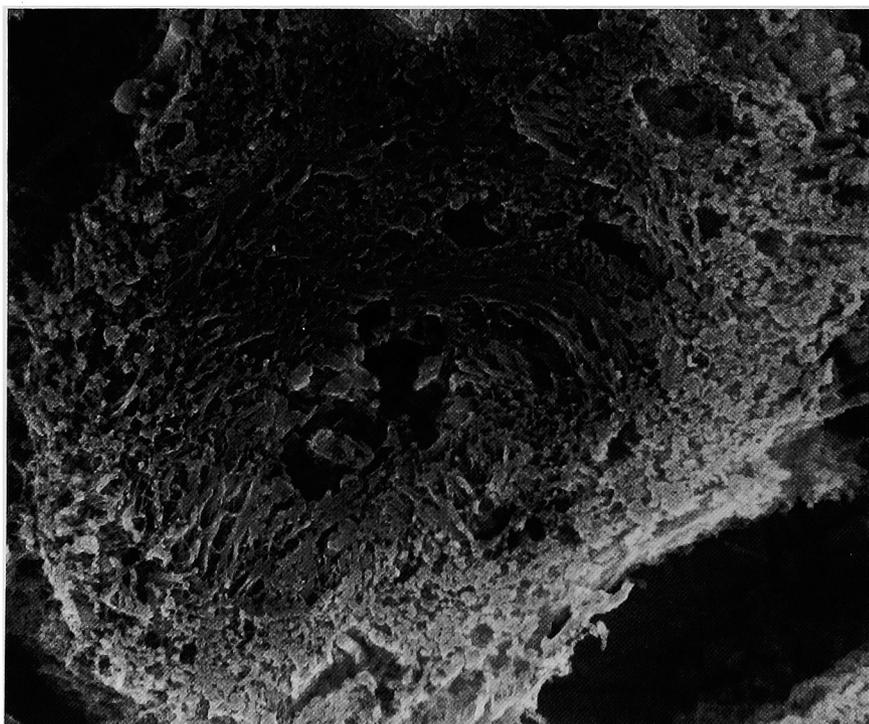


Fig. 8 globose 型 Alzheimer 神経原線維変化. ($\times 6,500$)

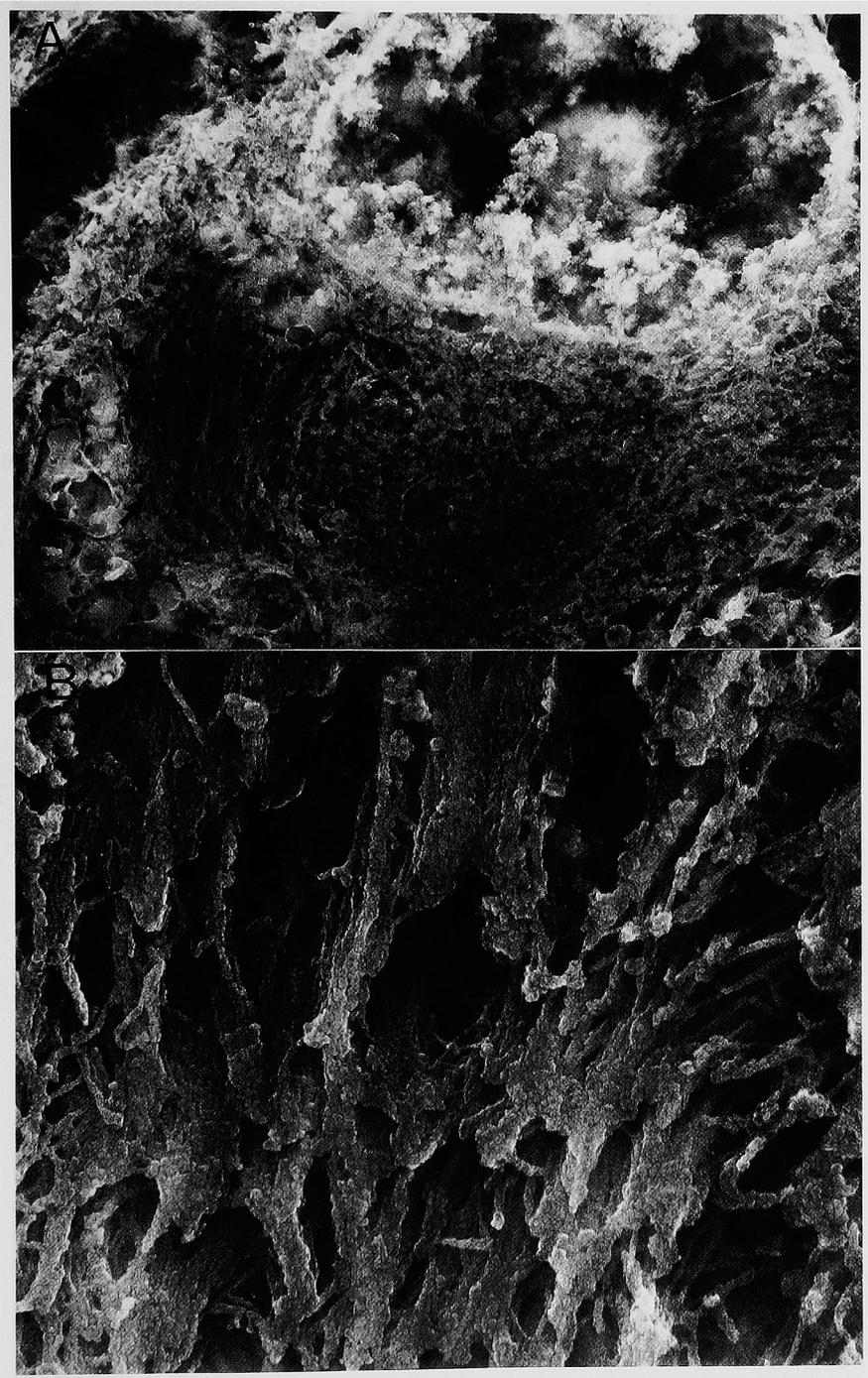


Fig. 9 A : 低倍率では, 粗大な平行に走る紐状構造物からなる神経原線維変化を認める (globose shaped).
 (×7,080)
 B : Aの矢印で囲った部分の拡大. 紐状構造物は細線維が集合してできていることがわかる. (×42,000)

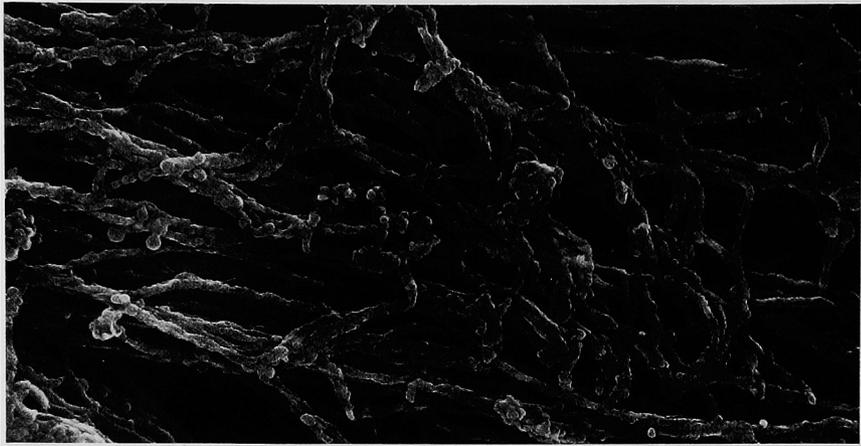


Fig. 10 倍率を上げると Alzheimer 神経原線維変化は数珠状の細線維が認められる。(×67,000)

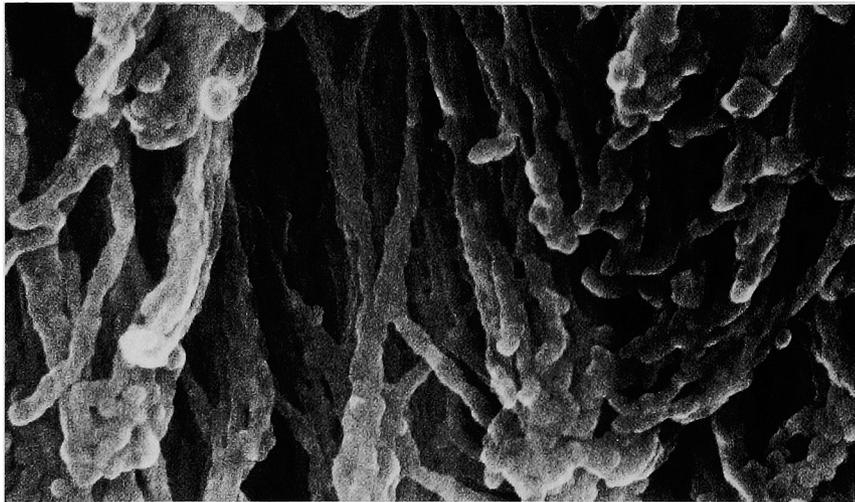


Fig. 11 Alzheimer 神経原線維変化の数珠状細線維。(×142,000)



Fig. 12 細線維に周期的なくびれ (矢印) があり, 周期は70~80 nm 程度である。(×283,000)



Fig. 13 Alzheimer 神経原線維変化は、ときどき70~80 nm 進むごとに立体的に左回りに180°回転するように見える。

A : ($\times 212,000$) B : ($\times 573,000$)

C : ($\times 435,000$)

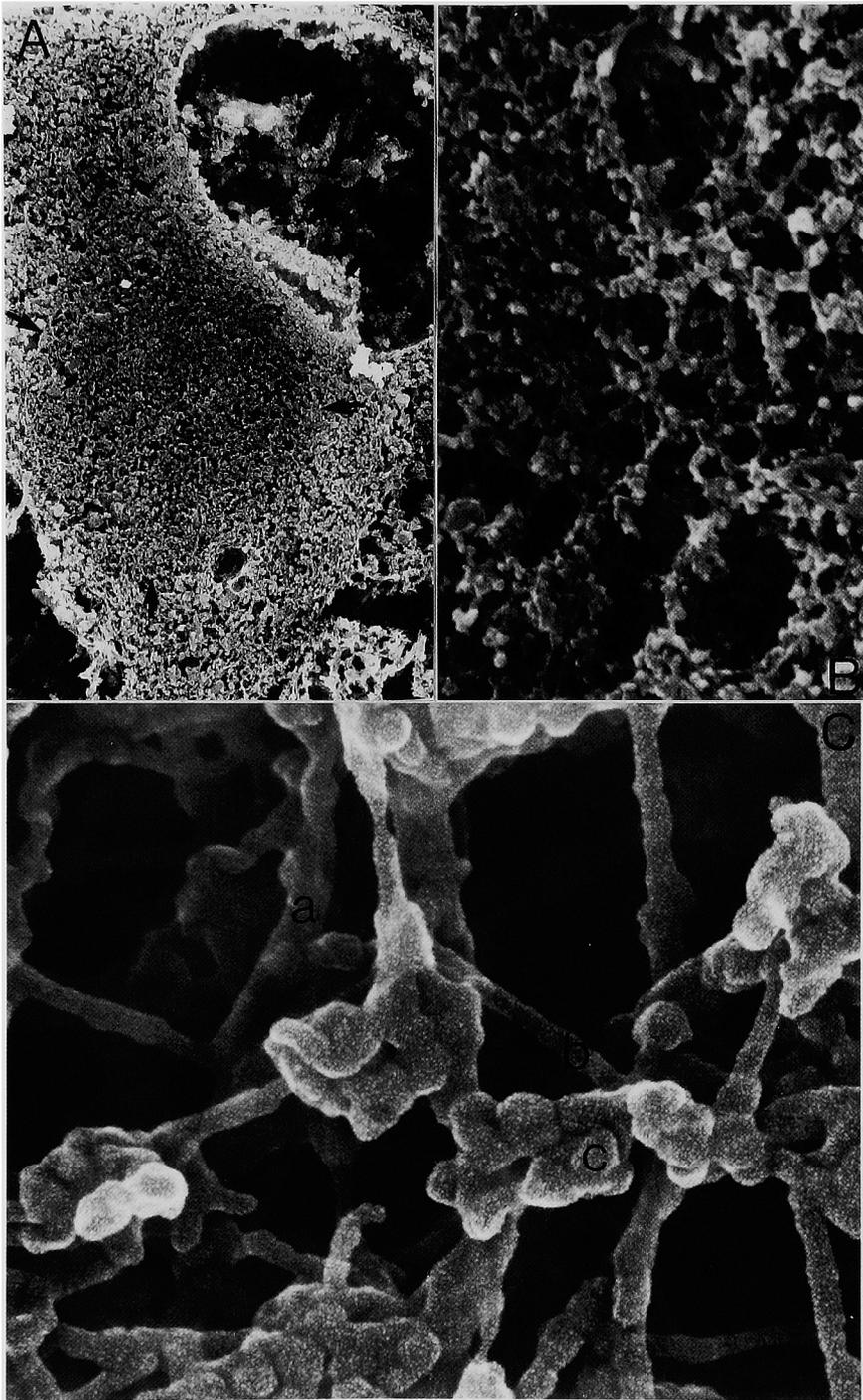


Fig. 14 Pick 嗜銀球

A : 矢印の内部が Pick 嗜銀球 ($\times 4,000$)

B : Pick 嗜銀球内部 ($\times 25,000$).

C : 太い線維(a), 細い線維(b), これらに付着する顆粒(c)を認めた. ($\times 270,000$)

かった (Fig. 14 B)。周辺部では線維が周囲との境界に沿って走る傾向がいくぶん見られた。倍率をさらに上げると、細線維は径が15 nm 程度の細いものと20~30 nm 程度の太いものが認められた (Fig. 14 C)。細い線維の方が太い線維よりいくぶん多かった。個々の細線維の形状は、付着する顆粒のため長い距離にわたって観察することは困難だったが、径15 nm 程度の細い線維は、まっすぐに走り付着物質も少ないために比較的観察が容易であり、表面は平滑であった。径が20~30 nm 程度のやや太い線維は、蛇行、屈曲することが多く、表面に多数の顆粒物質を付着させていて観察がいろいろ困難だった。太い線維の中には、ところどころに径が15~30 nm の範囲でなだらかに変化しているものがあった。それらはくびれの間隔は相当に長く、必ずしも一定の周期ではないように見えた。顆粒は長径30 nm、短径20 nm 程度の卵円形のものも多く、これが単独で、あるいは10個程度がかたままって細線維に付着していた。観察した2症例で太い線維と細い線維の割合、線維とそれに付着する顆粒の量の割合がいくぶん異なっていたものの、構成成分はほぼ一致していた。

考 察

1. 老人斑

老人斑の走査電顕による観察は少数なされている。Miyakawaら³⁾は痴呆老人脳のアミロイド・アンギオパチーを来した毛細血管の周囲と老人斑に、対照にはない solid substances を認め、老人斑とアミロイド・アンギオパチーを有する毛細血管に密接な関係が見られたとした。村田⁴⁾は典型斑と原始老人斑を観察し、典型斑に放射状に走る径100~200 nm の棒状構造物から成る core を認めている。しかし、いずれも5,000倍以下の観察であり高倍率の観察はなされておらず、特に原始老人斑においては微細な観察はされていない。

最近、Miyakawaら⁵⁾は quick freezing method で作製した Down 症候群の脳の replica 標本で、毛細管壁から外へ放散するアミロイド細線維を透過型電顕の超高倍率で観察し、その超微形態を報告した。彼らによると、アミロイ

ド細線維は中空を有し、球状の units が並んで構成された rods として認められたという。同時に彼らは Alzheimer 病脳の通常の組織電顕標本では、数珠状を呈するアミロイド線維の像を得ている。病変の透過像でなく、切断面の表面形態を replica に取り観察したものであり、走査電顕で得られる立体像に通じる面があって興味深い。

今回の観察では、光顕であらかじめ老人斑を選定した上で、走査電顕標本を作製観察しているため、典型斑、緻密斑、原始老人斑を確実に識別でき、さらに、本法では100,000倍以上の観察が可能であり、各型の老人斑のより細部を観察し、アミロイド線維も観察することができた。

典型斑の弱拡大による観察では、アミロイドの core の多くは放射状に走る棒状構造物より成り、村田⁴⁾の観察と同様であった。計測値の違いは標本作製過程、蒸着の厚さなど人工的变化によるものであろう。しかし、アミロイド細線維は従来より透過型電顕で観察され報告されているように、その径は10 nm かそれ以下で、束を成して走り、典型斑の中央で密集して大きな塊となり、周辺部では放射状ないし手指状を成すという。走査電顕で見られたアミロイド core の棒状構造物は、一本一本のアミロイド線維でなく、アミロイド線維の集合した束と考えられ、線維同志が非常に強く癒合し合っているものと思われた。

著者はアミロイド・アンギオパチーや drusige Entartung も観察し⁶⁾、内部で放射状配列し、ときにうねりつつ、密に平行に走るアミロイド線維を走査電顕で観察した。これらの病変に比べ老人斑の core のアミロイド線維はさらに密に集合しており、10万倍以下の倍率では観察できなかった。s-900を用いて30万倍以上の倍率で観察することにより、ようやく core を構成している棒状構造物がアミロイド線維が密集してできていることを確認できた。著者が得た所見では、アミロイド線維に相当すると思われる構造物は、数珠状の外観を呈し、この点は Miyakawa らが透過型で組織標本を観察して得た所見に一致していた。しかし、線維は屈曲癒合が多いうえ、蒸着物質以外にもかなりの人工変化物質が

覆っているようであり、個々の線維が識別しにくい部分が多かった。老人斑の core の棒状構造物を構成するアミロイド線維はアミロイドアンギオパチーや drusige Entartung に見られたそれに比べ⁶⁾蛇行屈曲がずっと多いように見えた。Miyakawa らが replica で見た中空を有し球状 units が並んで構成される rods 構造は確認できなかった。線維径は約15 nm で、透過型電顕でのアミロイド線維の径7~10 nm よりかなり太い値を示した。これはさらに今後観察し追究されるべき点であろう。

典型斑周辺部や原始老人斑の網状構造の中にも、core の棒状構造物を構成する数珠状線維と同様の径15 nm 前後で凹凸屈曲の多い数珠状線維を認めた。これは網状構造の部分のどこにもあるのではなく、低倍では網状構造内部に散在する周囲よりわずかに暗く見え形状は周囲とほとんど変わらない紐状、膜状の部分を超高倍率で検索していくうちに、これらが数珠状線維の集合であることが見いだされたもので、中等倍率では全くわからなかった。数珠状線維の形状はアミロイド core を構成する物に一致しており、著者は老人斑のアミロイド線維はアミロイド core とその周囲にのみ存在するのではなく、典型斑周辺部や原始老人斑全体にもこのような形で存在する可能性を考えている。

2. Alzheimer 神経原線維変化

同じ構造物を観察しているのであるから、光顕像と走査電顕像は一对一の対応なすものと考えられる。しかし、原線維変化が光顕像とかなり異なる形で走査電顕で認められることがあった。大きな原線維変化の一部のみが観察されたり、時には光顕で見られた構造物が走査電顕像には該当する部位にまったく認められない場合もあった。これは走査電顕が標本の表面を観察するという走査電顕法の限界に由来するものであろう。走査電顕標本は厚さ10 μ 以下の非常に薄い試料を用いたが、神経細胞封入体のような小さな構造物の観察には10 μ の厚さが問題となり、光顕像では試料を光線が透過して試料内部の原線維変化の全体像がとらえられるのに対し、走査電顕二次電子像では、その原線維変化のうちセンサー側の試料の表面とその方向に面した

内部の部分しか促えられず、切片深部の部分は見えないことによるものと思われる。

flame 型原線維変化で、光顕像に一致して走査電顕では細線維の束ではなく、粗大な紐状構造物を認める場合もあるが、超高倍率走査電顕法により、これも細線維が非常に密に集合したものとわかった。

このような細線維を数多く、20万倍~60万倍の超高倍率に拡大しその三次元形態を観察したが、2本の細い線維状構造物が向い合いよじれあって1本の細線維を構成する、いわゆる paired herical filaments の像は認められなかった。ただ、細線維が立体的になだらかに twist する事によってくびれができている twisted tubules の像は、ときどき見られた。さらに注意して観察すると、立体的に twisted tubules が twist するのは左回り回転のようであった。

PHFの立体的超微形態は、長年の電顕的研究にもかかわらず、なお確定はしていない。今までもごく少数の Alzheimer 神経原線維変化の走査電顕的観察報告はあり⁴⁾、また、Ohtsuboら⁷⁾は etching と replica の方法で神経原線維変化を透過型で観察し2本の細線維からなる反時計方向に回転する PHF を報告している。今回の研究では Alzheimer 神経原線維変化のそのものの立体構造を直接、数十万倍の超高倍率で観察したが、今回の観察で回転方向が左回りのように見えた点は Ohtsubo らの報告に一致していたものの、2本の細線維から形成されているようには見えなかった。従来の透過型による報告⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾と、特に超高倍率の観察報告¹²⁾と比較してみると、Wisniewsky らの言う8本の互いに連結した subunits すなわち proto-filaments から成る PHF の像は今回確認できなかった。本研究はあくまで線維を外表面から見たものであり、線維内部を観察する透過型の観察像とは一致し難い要素がある。しかし、外表の形態として twisted tubules を認めたことは意義があると思われる。

3. Pick 嗜銀球

Pick 球の透過型電顕観察報告は数多くあり¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、Takauchi ら¹⁶⁾は封入体は不規則に配列した線維状構造物とその間に散在する細胞内

小器官から成り、線維状構造物には、径10~14 nmのまっすぐで表面の滑らかな filaments, 径15~22 nmの表面の滑らかな tubules, neurofilaments 2本から成り130~160 nmごとに交差し最大径、最小径を成す PHF の3種類がみられた、としている。典型的な Pick 球の電顕像の報告のほか、小柳ら¹⁷⁾の線維構造物が特異な幾何学的配列を示す Pick 球電顕像の報告があり、また、Munotz-Garcia ら¹⁸⁾のいわゆる“generalized variants”における、全長を顆粒状、羽毛状物質が覆いぐびれがない細線維で形成された嗜銀球の電顕像報告もある。

今回の Pick 嗜銀球の超微形態の走査電顕による観察でも、従来より報告されている透過型による観察所見とほぼ一致していた。Pick 嗜銀球は限界膜を欠く類円形の部分であり、走査電顕で見られた径15 nmの線維、径20~30 nmの線維は、それぞれ透過型で径13 nm程度で報告されている太い線維に相当するものと思われる。走査電顕で認められた線維に付着する長径30 nm、短径20 nmの卵円形の顆粒物質は、透過型で認められるリボゾームに一致すると考えられる。しかし、周期的な径の変化を示す PHF¹⁹⁾は観察されなかった。これについては、今後さらに走査電顕による検索がなされることを期待したい。

光顕では Pick 嗜銀球の中にしばしば Alzheimer 神経原線維変化の globose 型と区別しがたい場合がある。しかし、両者は透過型電顕で観察すれば容易に区別される。走査電顕でも両者の区別は容易であった。構成線維成分の太さは類似していたが、線維の走行はまったく異なっていた。Pick 球は不規則な走行で癒合しないのに対し、globose 型は渦巻きながら平行に走り、隣接する線維は癒合し多数集合する傾向が強かった。両者は低倍で区別できたが、個々の線維については、Pick 球が径の細い線維の割合が多いのに対し、globose 型は、それより径の太いものがほとんどであった。そして、Pick 嗜銀球に見られた径がなだらかに変化する太い線維は、Alzheimer 神経原線維変化に認めた数珠状の PHF とは明らかに異なっていた。

4. 走査電顕法について

著者は最初定法どおりのブロック型標本による電顕観察を多数の脳老年病変に対して行なったが、ブロックでは微細な病変を識別し到達することが難しく、他の構造物を目標物と見誤ることも多かった。目標を見いだしてもさほど高倍率での観察もできず、十分な成果が挙げられなかった。これに対して、光顕標本を制作して一度光顕で目標を選定、撮影し、その切片から走査電顕標本を作成観察すれば、光顕写真を参照して確実に目標に到達でき、切片が非常に薄いので蒸着でも帯電し難く、超高倍率での観察も可能となった。また材料も少量ですみ多数の病変が観察できた。ただし、処理過程が多いため、人工的变化が生じる機会が多く、人工的变化除去、軽減のため様々な工夫を必要とした。凍結切片やカーボボックスによる包埋による方法も試みたが、パラフィン標本に劣っていた。パラフィン切片からでも脱パラを充分に行ない、また、田中ら¹⁾の Os 侵軟法を併用することにより、線維の径などが透過型によるそれと近いものになり、病変の真の微細構造にかなり近づくことができたと考える。光顕標本からの標本作製であるための人工的变化は従来考えられていたよりはるかに軽度と思われ、少なくとも本研究の対象とした病変は通常の透過型電顕観察で見られる微細構造が非常によく保たれていた。本研究では白金蒸着は5 Åと非常に薄いもので充分コントラストが得られたが、これが特により大きな倍率でより微細な部分を観察するのに重要な要素であった。なお、染色過程にタンニン酸処理を加えると、10万倍前後の観察では表面に微細な顆粒状付着物が生じ、線維径などが若干増大するよう思われたので、超高倍観察をするときは行なわなかった。

Alzheimer 神経原線維変化の線維の径が走査電顕と透過型電顕でほぼ同じ結果になっているのに対し、老人斑のアミロイド線維と Pick 嗜銀球の細線維では径が走査電顕が透過型の1.5倍程度という結果になった。アミロイド線維と Pick 嗜銀球にはまだかなりの程度の人工的变化があったとも考えられるが、この点は今後追究解決されるべきである。現状では試料作製段階で、

試料が完全に破損してしまうことがあり、また、人工的变化も試料によってはかなり見られることもある。試料作製を何度も行い、良好な結果を得たものを採用したが、アミロイド線維、Pick 嗜銀球などは今後の観察でさらに微細な構造に言及できる像が得られる可能性があり、透過型に一致する径の線維が観察されるかも知れない。

今回の観察でも、やはりある程度の人工変化はあるが、それを念頭において標本作製に種々の工夫をすることにより、走査電顕法で20~60万倍の超高倍率化の超微形態像を得た。さらに人工的变化をなくすよう試料作製法に改良を加え、今後の走査電子顕微鏡の発達とともに、走査電顕法は神経組織の超微形態の研究に欠かせないものになると考えられる。

結 論

走査電顕法を工夫し、老人斑、Alzheimer 神経原線維変化、Pick 嗜銀球を、光顕像と対照しながら走査電顕で低倍率から50万倍程度の超高倍率まで観察を行い、立体的超微形態の像を得た。

(1) 老人斑では、典型斑のアミロイド core が放射状配列する棒状構造物よりなり、棒状構造物は屈曲蛇行する径15 nm 程度の数珠状のアミロイド細線維が密集してできていた。core 周囲に異常神経突起、膠細胞突起、毛細管、その外に帯状に網状構造の部分認められた。緻密斑は典型斑の core のみにほぼ一致する構造で、原始老人斑は全体が典型斑の周辺部網状構造に類似した構造だった。典型斑網状構造部と原始老人

斑にも、core のアミロイド線維に酷似した細線維の集合を認めた。

(2) Alzheimer 神経原線維変化は、炎型は核近くから末梢に向かってまっすぐに、球状型は渦巻いて、平行な細線維の束を認めた。これを構成する PHF は超高倍率では、径25~30 nm で、70~80 nm の周期で180°左回り回転することにより径15 nm 程度のくびれができていた。

(3) Pick 嗜銀球は縦横に錯綜する細線維が網状構造をなし、その中に細胞内小器官、小空胞などが散在していた。細線維は径20~30 nm のやや太い線維と径15 nm の2種類があった。

今後本法を改良し、さらに高性能の機械を用いれば、走査電顕法は神経病理の超微形態に迫る非常に有用な手段になると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました岡山大学医学部神経精神医学教室、大月三郎教授、終始直接御指導頂き、多大な御教示御鞭達頂いた黒田重利助教授に深甚の謝意を表します。また、走査電顕法について重要な御教示を頂いた岡山大学医学部第二解剖学教室、村上宅郎教授に深謝すると共に、電顕操作に御協力頂いた医学部共同実験室の林信夫氏、岸本登氏に御礼申し上げます。最後に、写真作製に御協力を頂いた小橋正博氏、標本作製に御協力頂いた遠部盛子さん、藤原明美さん、佐藤吉子さんに御礼申し上げます。

(本論文の要旨は第25回日本神経病学会、第26回日本神経病理学会、第29回日本神経病理学会に於て発表した。)

文 献

- 1) 田中敬一：高分解能走査電子顕微鏡法。生体の科学 (1983) **34**, 143—149.
- 2) Murakami T: A revised tannin-osmium method for non-coated scanning electron microscope specimens. Arch Histol Jpn (1974) **36**, 189.
- 3) Miyakawa T, Uehara Y: Observations of amyloid angiopathy and senile plaques by scanning electron microscope. Acta Neuropathol (Berl) (1979) **48**, 153—156.
- 4) 村田 章：老年性脳病変の走査電子顕微鏡による検討。精神経誌 (1984) **86**, 1—22.
- 5) Miyakawa T, Katsuragi S, Watanabe K, Shimoji A, Ikeuchi Y: Ultrastructural studies of amyloid fibrils and senile plaques in human brain. Acta Neuropathol (Berl) (1986) **70**, 202—208.
- 6) 久山圭介, 黒田重利, 森岡英五：小脳老人斑, アミロイドアンギオパチーの走査電顕による観察 — 光顕標

- 本より走査電顕標本を作製して(抄). 神経病理学 (1986) 7, 171—172.
- 7) Ohtsubo K, Izumiya N, Shimada H, Tachikawa T, Nakamura H : Three-dimensional structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles of the human brain revealed by the quick-freeze, deep-etch and replica method. *Acta Neuropathol (Berl)* (1990) **79**, 480—485.
 - 8) Kidd M : Paired herical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* (1963) **197**, 192—193.
 - 9) Terry RD : The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J Neuropathol & Exp Neurol* (1963) **22**, 629—642.
 - 10) Hirano A, Dembitzer HM, Kurland LT, Zimmerman HM : The fine structure of some intragan-gionic alterations. *J Neuropathol & Exp Neurol* (1968) **27**, 167—182.
 - 11) Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD : Neurofibrillary tangles of paired herical filaments. *J Neurol Sci* (1976) **27**, 173—181.
 - 12) Wisniewski HM, Wen GY : Substructure of paired herical filaments from Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol (Berl)* (1985) **66**, 173—176.
 - 13) Schochet SSJr, Lampert PW, Lindenberg R : Fine structure of the Pick and Hirano bodies in a case of Pick's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* (1968) **11**, 330—337.
 - 14) Rewcastle NB, Ball MJ : Electron microscopic structure of the "inclusion bodies" in Pick's disease. *Neurology* (1968) **18**, 1205—1213.
 - 15) Wisniewski HM, Coblentz JM, Terry RD : Pick's disease. A clinical and ultrastructural study. *Arch Neurol (Chicago)* (1972) **26**, 97—108.
 - 16) Takauchi S, Hosomi M, Marashigan S, Sato M, Hayashi S, Miyoshi K : An ultrastructural study of Pick's bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* (1984) **64**, 344—348.
 - 17) 小柳新策, 田中政春, 大森 隆, 松下正明, 石井 毅 : ピック病の1剖検例に見られた嗜銀球の超微形態 : 特に管状構造の規則的配列について. *神経進歩* (1979) **23**, 441—451.
 - 18) Munotz-Garcia D, Ludwin SK : Classic and generalized variants o Pick's disease : A clinicopath-ological, ultrastructural, and immunocytochemical comparative study. *Ann Neurol* (1984) **16**, 467—480.

**High-power scanning electron microscopy of senile plaques,
neurofibrillary tangles, and Pick bodies**

Keisuke KUYAMA

**Department of Neuropsychiatry,
Okayama University Medical School,**

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. S. Otsuki)

Senile plaques, neurofibrillary tangles, and Pick bodies were examined by modified scanning electron microscopy from a low-power to an ultra high-power range. The amyloid core of the typical plaques was found to be composed of radially arranged rod-shaped components, which were made up of dense aggregation of meandering moniliform amyloid filaments about 15 nm in diameter. Bands with a mesh-like structure were observed outside the crown around the core. The compact plaques were nearly identical to the core alone of the typical plaques. The primitive plaques as a whole were analogous to the mesh-like structure around the typical plaques, and they both contained aggregates of filaments closely resembling amyloid fibers. In neurofibrillary tangles, the flamed shape stretched straight to the peripheries, the globosed shaped formed vortices, and only bundles of parallel filaments were observed. PHFs that constituted these structures were 25-30 nm in diameter, and many appeared constricted to a diameter of about 15 nm by rotating 180° to the left at a cycle of 70-80 nm. In Pick bodies, filaments were interwoven and formed a mesh-like structure, numerous granules were attached the filaments. Some filaments were large, being 20-30 nm in diameter, others were thin, being about 15 nm in diameter.