

【3】アルツハイマー型痴呆例のアポトーシスについて

はじめに

老年期の痴呆をきたす代表的神経疾患にアルツハイマー型痴呆(AD)が知られている。ADの臨床病態生理学的研究並びに病理組織学的研究は歴史的にも、量的にも、膨大であるが、なお不明点が多い。その1つにADにおける神経細胞死がどのような機序で起こるかが挙げられる^{(1)・(8)}。ADの脳では、特徴的な形態学的所見として、神経細胞内における神経原線維変化、神経網における老人斑が知られ、やがては神経細胞は消失・脱落し、神経機能低下すなわち痴呆をきたすと説明されてきた。しかし、神経細胞死については、最近、アポトーシスの関与が示唆されている。^{(1)・(2)・(5)}。本研究では、AD脳において、形態学的にアポトーシス細胞を標識するTUNEL法^{4・6・7)}、およびAD脳から抽出したDNAを電気泳動し、ラダー形成をみることにより、DNAがヌクレオソーム単位で切断されているかどうか⁽³⁾を検討することを目的とした。

材料と方法

症例は臨床的及び病理組織学的にアルツハイマー型老年痴呆を診断された80才女性を用いた。

TUNEL法は、神経原線維変化および老人斑が高頻度に出現している側頭葉のAmmon角を中心に、脱パラフィンした切片をプロテイナーズKで処理し、ジゴキシキゲニン標識ヌクレオチドをターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ(TdT)によりDNAの3'-OH末端に付加させ、これにHRP標識抗ジゴキシキゲニン抗体を反応させ、DABで発色した。陽性コントロールとして、ラット腸管および胸線を用いた。

DNAは、剖検時に凍結保存した側頭葉皮質をホモジナイズし、核酸抽出剤(Sepa Gene, 三光純薬KK)を用いて抽出した。OD₂₆₀測定後、EcoR1あるいはHiND処理し、2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウム・ブロマイド処理によりUVで観察した。陽性コントロールとして、ラット脾臓を用い同様に処理した。

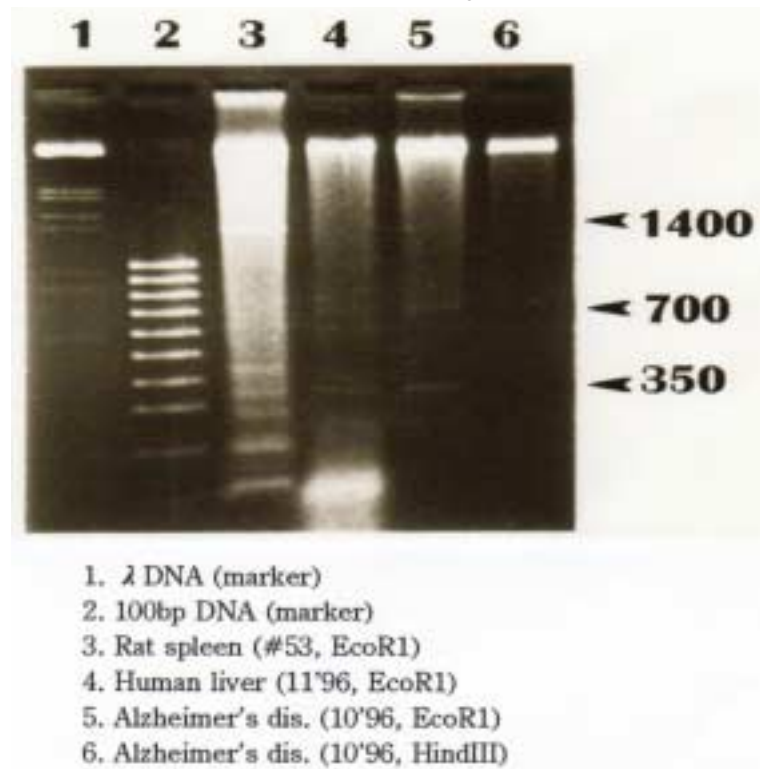
結 果

組織学的には、Ammon角のCA1領域を中心に多数の老人斑および神経原線維変化が出現し、神経細胞の減少、および反応性アストロサイトの増加が認められ、これはアルツハイマー型老年痴呆に相当していた。こうした変化を示す部位を観察しても、核濃縮像あるいは分葉構造のアポトーシス小体は認められなかった。

TUNEL法においては、対照群では腸絨毛先端部および胸腺胚中心に陽性細胞が出現しているのに対し、本例のAmmon角には陽性を示す細胞は出現していなかった。

抽出DNAの電気泳動では、図に示すごとく、ラット脾臓ではおよそ180bpとその整数倍のDNAラダーを認めるが、本例ではおよそ350、700および1400bpでのラダーを認めた。(図12)

図 12 Alzheimer's disease : genomic DNA



考察

アルツハイマー病(AD)の神経細胞死には最近アポトーシスに依るとする考え方⁽⁵⁾と壊死あるいは特殊な programmed cell death によるとする考え方⁽²⁾がある。これらはいずれも TUNEL 法と神経細胞、およびグリア細胞に対する酵素抗体法を用いて AD 症例の Ammon 角の染色性について評価している。いずれにおいても神経細胞には TUNEL 陽性反応が指摘されているが、通常の染色ではアポトーシスの光顕的特徴を示す形態学的所見は認められなかったとしている。

われわれの検討では、AD 症例に光顕的にも TUNEL 法においてもアポトーシスを示唆する所見は得られなかったが、DNA の電気泳動で非典型的ラダーが証明された。この結果は、少なくとも DNA が壊死によって起こる不規則な切断(この結果、DNA の電気泳動ではスメア-状となる)ではなく、規則的にヌクレオソーム単位で切断されている可能性を示している。しかし、これがなぜ 350bp の倍数になるかについては不明である。

一方、TUNEL 法によっても形態的にアポトーシスを示す形態が認められないことについて、不明の点も多いが、少なくとも可能性として、実験的アポトーシスを誘導する経過を観察した研究では、数時間から数日以内にこの変化を認めるとしており⁽³⁾、AD 脳における病態の進行が 1 年から数年に及ぶという事実との間に、進行の時間的相違は考慮しなければならない。このことは通常の programmed cell death⁽³⁾で起こる death gene の誘導が個々の細胞において長時間を要する意味であるのか、1 個の細胞は短時間で消失しても、次の細胞に変化をきたすまでに長時間を要するのか、今後の課題と考えられる。いずれにせよ、DNA に断片かが起きていることから、非定型的なアポトーシスの考え方⁽²⁾を現時点で考慮すべきと思われた。

文 献

1. 川原正博、黒田洋一郎：Alzheimer アミロイド神経毒性とアポトーシス 医学のあゆみ 176：647-649,1996
2. Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM: Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* 89: 35-41, 1995
3. 三浦正幸：アポトーシスの分子機構 医学のあゆみ 178：707-711, 1996
4. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung P, Toyka KV, Lassmann H: Differentiation Between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 71: 219-225, 1994
5. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE: Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease . *Exp Neurol* 133: 225-230, 1995
6. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH: A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labeling of fragmentation DNA. *J Histochemi Cytochemi* 41: 7-12, 1993
7. 安田政実、堤 寛：TUNEL 法 アポトーシスの組織化学同定法 医学のあゆみ 173：658-659, 1995
8. 柳沢勝彦、井原康夫：アルツハイマー病における神経細胞死 *Dementia* 9: 376-383, 1995