

# 脳組織における Gallyas-Braak 染色法の検討

静岡赤十字病院 検査部

河原崎 由紀子 八木 弥八 大塚 証一  
後 藤 務 田 島 敬 夫

**要旨：**今回我々は、脳神経変性疾患における、神経線維変化の形態学的検索について特異性が高いとされる、Gallyas-Braak 染色法 (G-B 法) の検討を行った。材料は、剖検例におけるアルツハイマー型老人性痴呆、脳梗塞、進行性核上性麻痺等 36 例を使用した。方法は、本法並びに G-B 法および羽賀らの改良法を用い、染色性の度合、背景の過染性、染色時間について検討を行った。結果、本法の染色性は良好で、背景は過染性がなくコントラストに優れ、安定した染色法であった。又、手技については染色時間が短縮され、アルツハイマー病を含む神経変性疾患の病理学的診断に有用な染色法であると思われる。

**Key words :** Gallyas-Braak 鍍銀染色法, 神経線維, アルツハイマー病

## I. 緒 言

脳神経病変の中で、アルツハイマーを含む脳神経変性疾患の病理組織学的検索には、従来から Bodian, Bielschowsky などの鍍銀染色が用いられている。近年、異常蛋白の沈着を伴う変性疾患には、Methenamine 銀法や Gallyas-Braak 法 (G-B 法) が有用な染色法とされ、特に G-B 法は、神経原線維変化 (neurofibrillary tangle), 老人斑の変性神経突起, neuropil thread に特異性が高く、一般に用いられつつある。この G-B 法は、硝酸ランタン溶液で媒染することにより、アルカリヨウ化銀による好銀性を高めるとされ、また酸化還元剤を加えた改良 G-B 法では、更に鮮明な染色結果が得られると報告されている。しかし、これらの方法は、媒染時間が費やされる点、手技がやや複雑などの問題点が見られる。そこで、今回我々は、より短時間で染色を行うために手技として、硝酸ランタン溶液に於ける媒染の必要性の有無を検討した結果について報告する。

## II. 材料並びに方法

1. 材料：剖検例におけるアルツハイマー型老人性痴呆、脳梗塞、進行性核上性麻痺の 36 例について、海馬回を中心に、通常のパラフィン包埋後、6  $\mu$ にて薄切したものを使用。

2. 各染色法の比較

Gallyas 原法は、過ヨウ素酸による酸化、アルカ

リヨウ化銀、還元液の染色過程からなる<sup>1)</sup>。一方、Braak らは、硝酸ランタン液を媒染剤として用い、アルカリヨウ化銀、還元液、塩化金酸とした染色過程を報告している<sup>2)</sup>。さらに近年、羽賀らは、過マンガン酸カリによる酸化還元処理、硝酸ランタンによる媒染、鍍銀という過程の改良法を報告している<sup>3)</sup>。今回、我々の検討した染色法は (本法)、この羽賀らの改良法 (改良 G-B 法) に硝酸ランタン処理を省いた方法、即ち、過マンガン酸カリによる酸化還元法と鍍銀染色、という過程の手技を用いた (表 1)。

3. 検索方法：本法及び G-B 法、羽賀らの改良 G-B 法を用い、それぞれ 1) 染色性の度合、2) 背景の過染性 3) 染色時間について比較検討を行った。

## III. 結 果

1. 本法と改良 G-B 法に於いての染色度合は、両者共、背景に非特異的染色 (過染性) を生じることなく、神経原線維変化, neuropil thread などの異常構造物が明瞭に染め出されていた。又、この両者の染色性には明らかな違いは見られなかった。しかし染色時間は、本法は約 1 時間で染色され、一方の改良 G-B 法は約 2 時間が費やされ、即ち、本法はより短時間で良い染色結果を得ることが可能であった。

2. 原法の G-B 法は、染色手技において、時として

染色性にムラが見られ、且つ背景に過染性が認められる為、異常構造物の検索がやや困難であった(表2, 図1~4).

表1 染色方法の比較

	酸化	還元(漂白)	媒染	鍍銀	還元	鍍金
Gallyas 原法	過ヨウ素酸			アルカリ ヨウ化銀	還元液	
G-B 法			硝酸 ランタン	アルカリ ヨウ化銀	還元液	塩化金
改良 G-B 法	過マンガン 酸カリ	シュウ酸	硝酸 ランタン	アルカリ ヨウ化銀	還元液	塩化金
本法	過マンガン 酸カリ	シュウ酸		アルカリ ヨウ化銀	還元液	塩化金

表2 各染色法の評価

A:優 B:良 C:可

	染色性	背景の過染性	時間
本法	A	A	A
改良 G-B 法	A	A	C
G-B 法	B~C	C	B

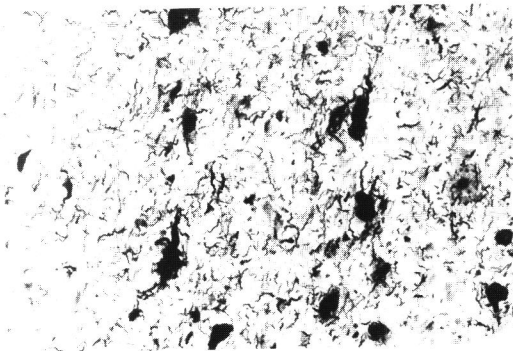


図1 本法 (×200)

神経原線維変化, neuropil threadが明瞭に染め分けられている。

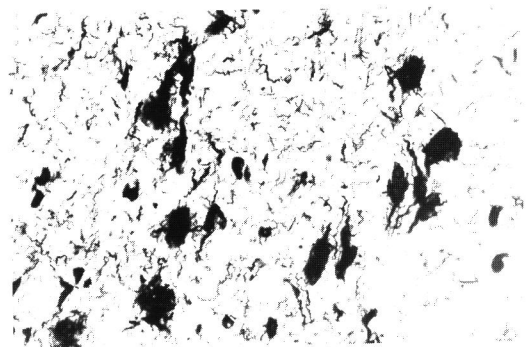


図2 改良 G-B 法 (×200)

神経原線維変化, neuropil threadが十分観察される。

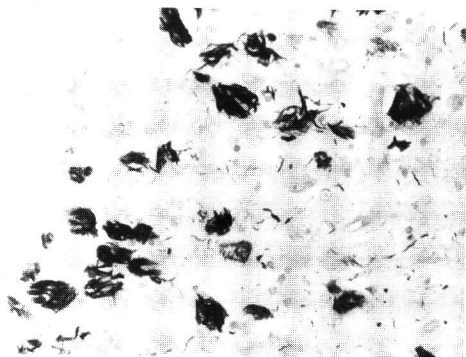


図3 本法 (×200)  
背景が抑えられ、コントラストに優れている。

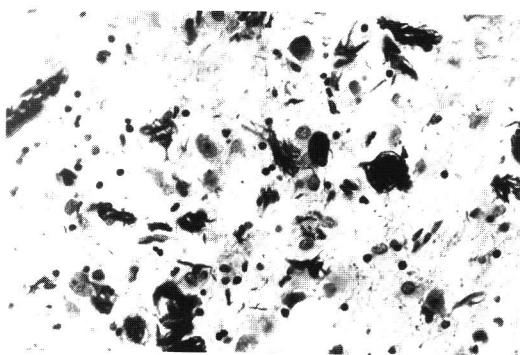


図4 G-B法 (×200)  
背景の非特異的染色により、コントラストに劣っている。

#### IV. 考 察

1971年 Gallyas によって、アルツハイマー病の神経原線維変化の染色法として、Gallyas 染色法は考案された<sup>1)</sup>。この染色法は、ヨウ化銀がアルカリ条件下で変性した原線維に結合、ついで、還元剤により結合したヨウ化銀からヨウ素原子が外れ銀粒子となる。更にこの銀粒子が現像されて可視化されるという原理である。これらの粒子は神経細胞体および神経突起内の細管状構造物に特異的に付着しており、この細管状構造は、周期性のくびれをもつねじれ細管 (paired helical filament) に相当するものと、直径約 15 nm の真直ぐな直細管 (straight tubule) に相当するものが見られるとされている<sup>4,5)</sup>。これらは、過剰なリン酸化を受けた、微小管関連蛋白の一

つであるタウ蛋白が主要成分とされている。神経原線維変化をはじめ G-B 法で染色される対象は、抗タウ抗体による免疫組織化学染色で検出される異常蛋白にほぼ一致すると報告されている<sup>6,7)</sup>。

これらを光顕的に観察する Gallyas 染色法は、アルカリヨウ化銀液の反応前に過ヨウ素酸による前処理を行い、これにより背景の非特異的染色を抑えようとしている。その後 Braak らによって考案された G-B 法では、前処理を硝酸ランタンで行うことにより、更に非特異的染色を有効に抑えようとしている<sup>2)</sup>。しかし実際、我々の検討から両染色法は、目的の構造を十分に染色し得ないうちに、背景の非特異的染色が目立ってしまい、満足な染色を得られないという結果であった。一方羽賀らが提唱している改良 G-B 法は、過マンガン酸カリとシュウ酸による前処理で、非特異的染色をほぼ完全に抑えることが可能である。これは、過マンガン酸は強力な酸化剤で、組織内の銀イオンと反応するアミノ基 (NH<sub>2</sub>) やメルカプト基 (SH) などの官能基を切り離す。もちろん背景だけでなく、線維構造の構成蛋白の官能基も切り離されるが、比較的アミノ基などの官能基を多く含むばかりではなく、線維構造自体が相対的に酸化剤の影響を受けにくい可能性もあり、これらが相まって背景との染色態度に違いがあらわれてくると思われる。しかしこの方法は、過マンガン酸カリ処理後、更に硝酸ランタン溶液を使用している<sup>3,6)</sup>。今回我々の経験から、過マンガン酸カリ単独による酸化還元処理で十分背景が抑えられ、コントラストに優れ、硝酸ランタン処理は省略可能と思われた。その結果として、時間の短縮、手技の簡易化につながった。

通常の H・E 染色での範例では、神経原線維変化が青染性を帯びている程度で、言うまでもなく異常構造物を十分把握することが出来ないことを一言付記しておく (図 5)。

最近では、老人性変化の病理診断基準として、Methenamine 銀法と G-B 染色によるブラック分類が用いられるという報告もある<sup>4)</sup>。アルツハイマー病において、痴呆の程度と神経原線維変化の数および老人斑の数との間には、相関性があるといわれている<sup>8,9)</sup>。また、アルツハイマー病とは明らかに異なる病変を有しながら痴呆を伴う神経変性疾患 (進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症など) もあり、G-B 染色は、これら神経変性疾患の重要な診断学的手段であると思われる。

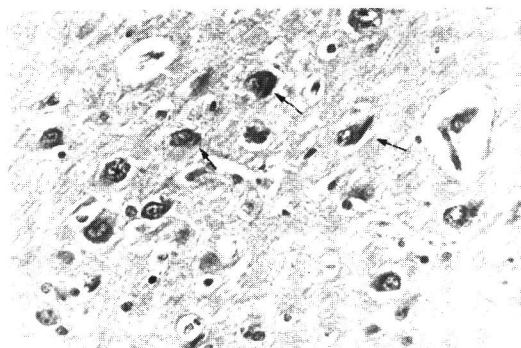


図5 アルツハイマー病のH・E染色(×200)  
神経原線維変化は青染調を帯びている(矢印)  
が、H・E染色からは線維は十分把握できない。

## V. 結 語

今回我々は、脳神経変性疾患における神経線維変化の形態学的検索について、特異性が高いとされるG-B染色法について検討を行った。本法は、神経原線維変化、変性神経突起、neuropil threadに特異性が高く、またグリア関連異常構造物の検出も可能であり、再現性もよく、安定した染色法であった。さらに、従来法に比べ、染色時間の短縮が可能となり、脳神経変性疾患の病理学的診断補助となる染色法と思われる。

本論文の要旨は第41回中部医学検査学会(2002年10月、富山市)で発表した。

## 文 献

- 1) Gallyas F. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1971; 19(1): 1-8.
- 2) Braak H, Braak E, Ohm T, et al. Silver impregnation of Alzheimer's neurofibrillary changes counterstained for basophilic material and lipofuscin pigment. *Stain Technol* 1988; 63(4): 197-200.
- 3) 羽賀千恵, 池田研二. ガリアス・ブランク法とメセナミン銀法. *臨床検査* 1997; 41(11): 1545-1548.
- 4) 池田研二, 羽賀千恵, 小阪憲司. ガリアス電顕法によるアルツハイマー病脳の神経原線維変化の観察, とくに neuropil thread について. *Dementia* 1991; 5: 344-350.
- 5) 藤澤浩四郎. 痴呆. 現代病理学大系 23(B) 神経疾患II(飯島宗一編集). 東京: 中山書店; 1993. P.249-279.
- 6) 内原俊記, 近藤ひろみ, 池田研二. 最近の神経系染色法について(神経原線維変化と老人斑). *病理と臨* 1994; 12(2): 163-168.
- 7) 広川禎之, 羽賀千恵, 秋山治彦ほか. 痴呆症の病態像および病理学的検査法. *医学検査* 2002; 51(1): 13-17.
- 8) 中里洋一. 大脳皮質に主な病変が現れる疾患. 標準病理学(町並陸生, 泰 順一編集). 東京: 医学書院; 1997. p.625-627.
- 9) 小柳新策. 神経細胞の病理学的変化. 現代病理学大系 23(A) 神経疾患I(飯島宗一編集). 東京: 中山書店; 1985. P.3-52.

# A study of Gallyas-Braak Stain Method for Brain Tissues

Yukiko Kawaharasaki, Yahachi Yagi, Shouichi Ohtsuka,  
Tutomu Goto, Norio Tajima

Department of Pathological Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

**Abstract :** We studied the Gallyas-Braak stain method (G-B method) said to be highly specific to the morphological changes of nerve fibers in degenerative neurofibrillary diseases. The materials used were 36 autopsied cases of various neurofibrillary diseases including Alzheimer type senile dementia, brain infarction and progressive supranuclear palsy. Our modified method, G-B method and Haga method were studied as to the degree of stainability, excessive staining of the background and staining time. Our modified method was found to be a stable stain method, showing a good stainability, clear background and excellent contrast. Additionally, because of the staining time being shortened, our modified method seems to be useful for pathological diagnosis of senile degenerative neurofibrillary diseases including Alzheimer disease.

**key words :** Gallyas-Braak silver stain, nerve fiber, Alzheimer's disease



---

連絡先：河原崎由紀子；静岡赤十字病院 検査部

〒420-0853 静岡市追手町8-2 TEL (054)254-4311 内線 (2411)