ボディアン（Bodian）染色の代用としての免疫染色

浜松医科大学腫瘍病理学講座
五十嵐久喜、椙村春彦

はじめに

中枢神経組織の代表的な染色法の一つであるボディアン（Bodian）染色は，軸索，樹状突起やアルツハイマー病等の神経原線維変化を明瞭に染色する。嗜銀姓が強い線維構造を持つという特性を利用したプロテイン銀（Silver Protein，Albumose silver）による鍍銀法であるが[1)]，その試薬の品質や調整の煩雑さから施設間での染色性に差異が見られるなど，技術的難易度の高い染色である。

一方，免疫染色の普及と抗体の特異性向上にともない，ボディアン染色の代用として，神経細胞の中間径フィラメント（intermediate filaments）であるニューロフィラメント（Neurofilament：NF）に対する抗 NF 抗体および，微小管（microtubule）に結合したタウ（Tau）蛋白に対する抗タウ蛋白抗体での免疫染色が増加傾向にある。

中間径フィラメントは，最も安定した細胞骨格の構造であり，両端に頭部と尾部を持ち，中心に α ヘリックスのある共通の単量体を有している。NF は，この尾部の領域が質量ごとに NF-L（68kDa），NF-M（160kDa），NF-H（200kDa） の 3 つのサブタイプに細分化されており，それらは本来，神経細胞の細胞体や軸索，樹状突起に認められることから，神経芽腫や神経内分泌系腫瘍などの神経細胞由来腫瘍の鑑別診断を目的とした場合に多用される[2)]。

また，タウ蛋白は微小管と結合した重合と安定化に関連する 55～60kDa のタンパク質で，神経軸索内に多く発現していることが知られている[3)]。アルツハイマー病などにおいて過剰にリン酸化したタウが神経原線維変化（NFT：neurofibrillary tangle）として蓄積している。

さて，上記の抗体を用いた免疫染色であるが，時として通常のプロトコールでは満足のいかない結果になることがある。NF 免疫染色は，末梢神経の軸索が明瞭に染まる反面，中枢神経の脳組織切片においては不明瞭な染色結果になることがある（図 1）。また，タウ蛋白の免疫染色で特異性の低い染色性を経験している技師も多いのではないかと思う。組織切片の大きさや厚さによっては，発色の濃淡による染色ムラも顕著で再現性もあるとは言い難い。大割脳切片ともなればなおさらである。

ここでは，脳組織切片におけるボディアン染色の代用を目的とした抗 NF 抗体，抗タウ蛋白抗体での免疫染色について述べる。

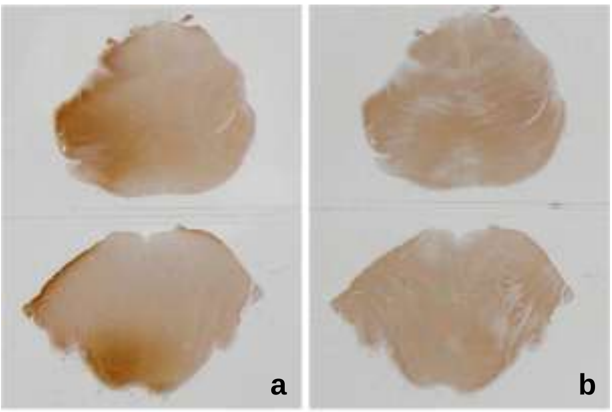

図 1. NF 免疫染色（染色スライドマクロ画像）
a：通常プロトコール（一次抗体：常温 30～60 分間，ポリマー試薬：常温 30 分間反応）
b：一次抗体およびポリマー試薬：37℃，1 時間反応
a は染色ムラが目立ち不鮮明であるのに対し，b は染色ムラも無く明瞭に染まっている．場合によっては，左のような染色像を呈することがある．

1）ボディアン染色と免疫染色

日常的に頻用されるボディアン染色は，大きく二つの目的に応じて染色されることが多い。

軸索・樹状突起の観察

脱髄疾患の一つである多発性硬化症（multiple sclerosis : MS）における脱髄部位での軸索の相対的な残存，また，脳梗塞や多系統萎縮症（multiple system atrophy : MSA）での軸索の崩壊などを確認する。抗 NF モノクローナル抗体（2F11/ニチレイバイオサイエンス）は，ヒト NF の 70kDa および 200kDa のタンパク質と反応することがわかっており，神経内分泌組織および内分泌組織に由来する腫瘍の鑑別や軸索を明瞭に染める。

神経原線維変化等の観察

アルツハイマー（Alzheimer's disease : AD）でのアルツハイマー型神経原線維変化（neurofibrillary tangle : NFT）や，進行性核上性麻痺，大脳皮質基底核変性症，加齢性変化での神経原線維変化や老人斑を確認する。抗タウ蛋白抗体は，抗リン酸化タウ抗体（AT-8）が世界標準となってはいるが，比較的入手が容易なタウ因子・ウサギポリクローナル抗体でもアルツハイマー神経原線維を構成する Paired Helical Filament（PHF）と反応する。

2）染色方法

染色プロトコールを表 1 に示す。

NF 免疫染色の場合，熱処理などの抗原賦活化処理は必ずしも行う必要はないが，処理した方が染色性は格段によくなり，軸索の走行が容易に観察できる [4]。

37℃での抗体反応であるが，NF およびタウ蛋白共に，傾斜・乾燥防止のため，組織上をラップ（ラップを幅 24mm でカットし適度な長さに切って，ペーパータオル等に挟んで保存しておく）で覆い行うとよい。さらに，湿潤箱よりもホットプレート上の方が安定性がある。

大割脳組織切片（12×16cm 大のスライドガラス）の場合は，抗原賦活化処理は必須でタッパウェア等に入れ行うとよい。試薬（過酸化水素水，抗体，ポリマー試薬）は，約 1mL を滴下混和する。また，一次抗体反応は 37℃オーバーナイトで行う方がよいので，ラップ周囲をペーパーボンドでシールする（図 2）。注意点として，DAB 溶液は 3～4mL を切片上に一気に流し，反応時間は長めとする。

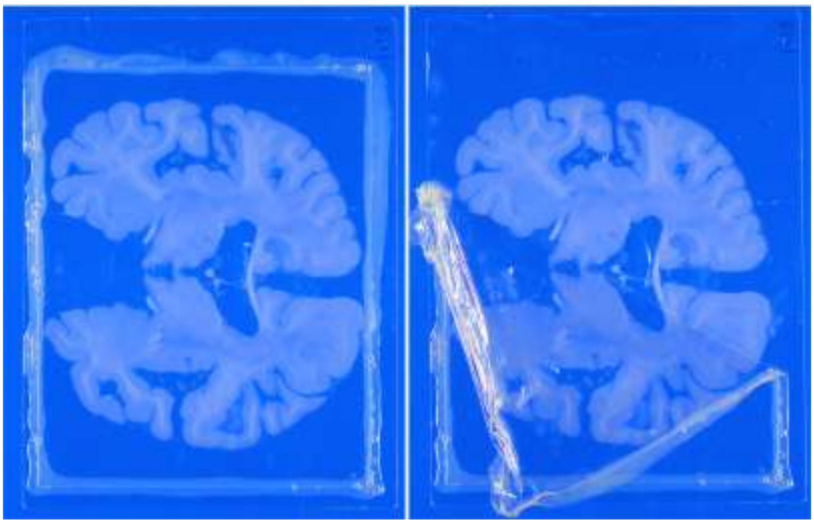

図 2. 大割脳組織切片を用いた免疫染色
一次抗体反応時は，ラップ周囲をペーパーボンドでシールして，37℃で一晩反応させる．
反応後，乾燥したペーパーボンドも緩衝液等で濡らすことで容易に剥がすことができる．

表 1. 染色プロトコール

Neurofilament (NF)	タウ白蛋
6〜8μm に薄切された切片を脱パラフィン	6〜8μm に薄切された切片を脱パラフィン
TE（pH9），96℃，30 分間（省略可）	
PBS 洗浄	PBS 洗浄
3%過酸化水素水，5 分間	3%過酸化水素水，5 分間
PBS 洗浄	PBS 洗浄
*抗 NF 抗体，37℃，60 分間〜一晩	抗タウ蛋白抗体，37℃，30 分間
PBS 洗浄	PBS 洗浄
**ポリマー試薬，37℃，60 分間	**ポリマー試薬，37℃，30 分間
PBS 洗浄	PBS 洗浄
DAB 発色	DAB 発色

*抗ニューロフィラメント モノクローナル抗体（2F11/ニチレイバイオサイエンス）
**ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI)
※試薬を滴下混和し，傾斜・乾燥による不均一防止のため組織より一回り大きいラップで覆い，ホットプレート（伸展板，ハイブリダイザー等）上で 37℃反応.

各種染色結果を示す（図 3〜8）。

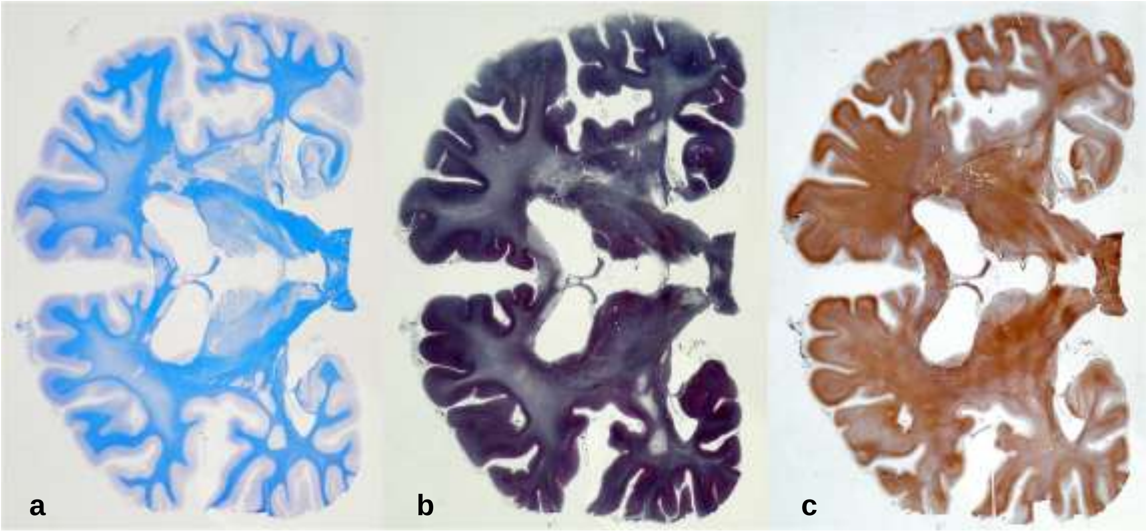

図 3. 多発性硬化症における大割脳組織切片のマクロ画像：大脳前額断面
a：Kluver-Barrera 染色，b：Bodian 染色，c：NF 免疫染色

Kluver-Barrera 染色で認められるいくつもの境界の明らかな脱髄巣が，NF 免疫染色では Bodian 染色以上に軸索の残存が確認できる．広範囲に病変を確認する場合，ルーペ像は有用である．

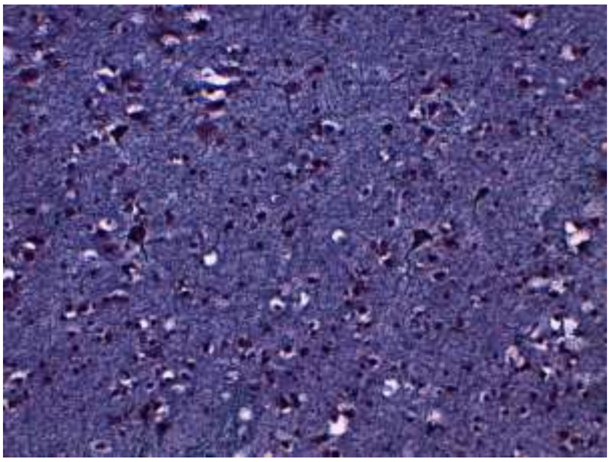

図 4. Bodian 染色：アルツハイマー病，海馬
アルツハイマー神経原線維変化が確認できる．

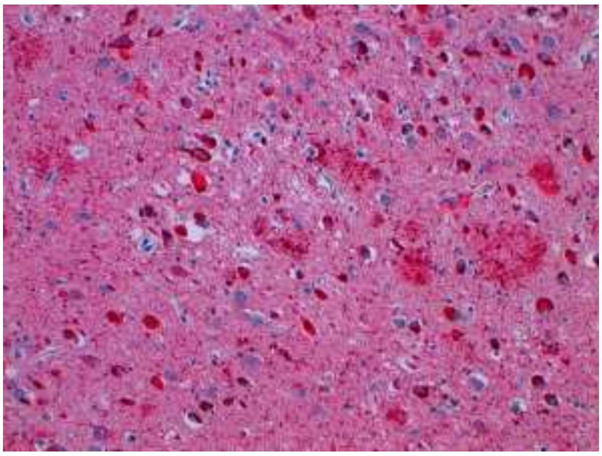

図 5. タウ蛋白免疫染色：
アルツハイマー型認知症，海馬
アルツハイマー神経原線維変化，老人斑が確認できる.
ヒストファイン シンプルステイン AP (MULTI)
ファーストレッドⅡ基質キット（ニチレイバイオサイエンス）使用

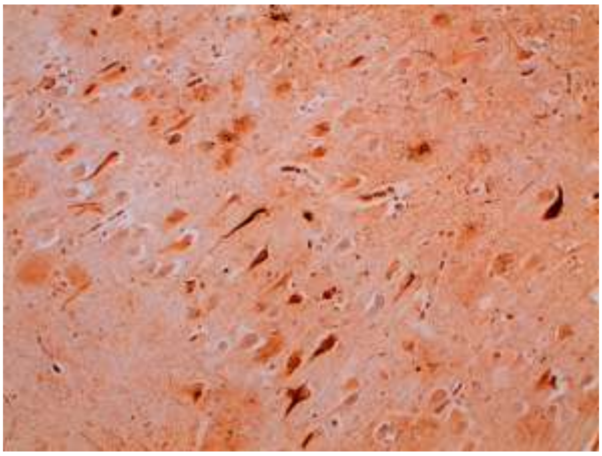

図 6. Bielshowsky 染色：
アルツハイマー型認知症，海馬
アルツハイマー神経原線維変化，老人斑が確認できる.

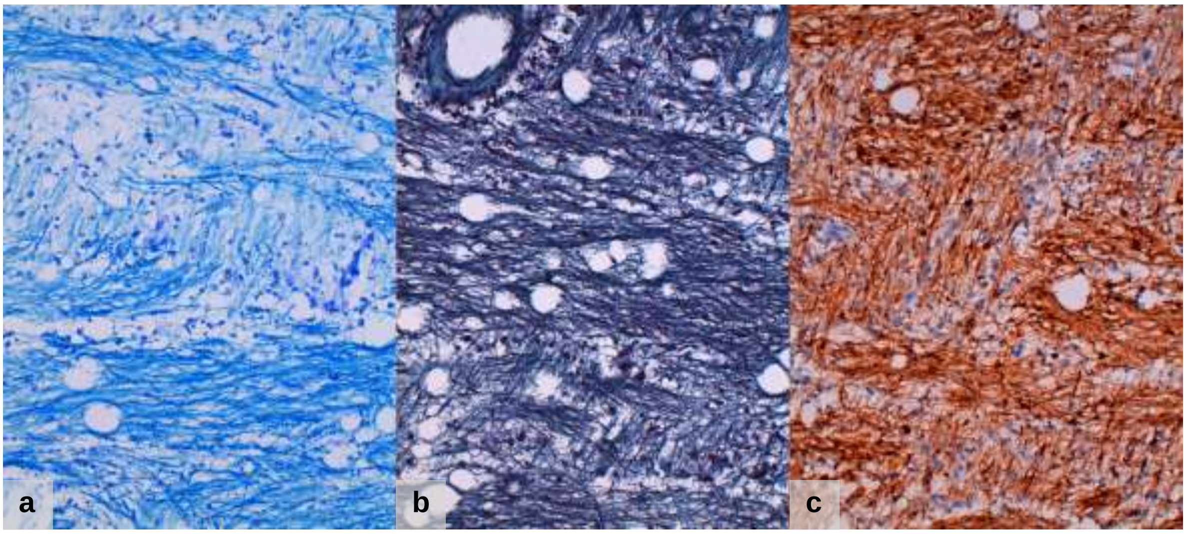

図 7. 多発性硬化症における染色：脳梁
a：Kluver-Barrera 染色，b：Bodian 染色，c：NF 免疫
脱髄部位に残存している軸索が明瞭に確認できる.

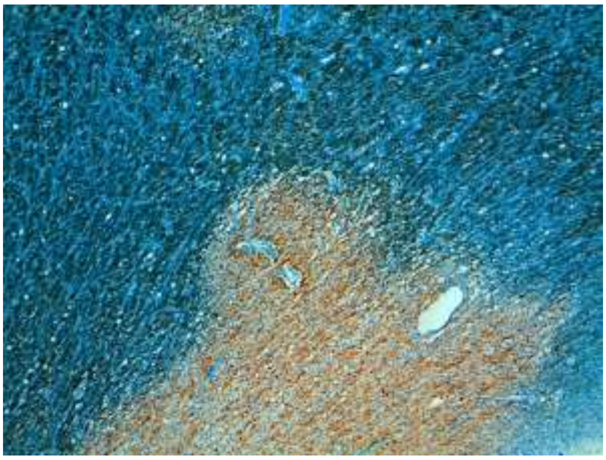

図 8. Kluver-Barrera 染色と NF 免疫染色の重染色
Kluver-Barrera 染色による脱髄部位と残存している軸索が同時に観察できる.

まとめ

一般的に剖検で得られた脳組織は固定時間が長い。また，神経細胞等を観察する際には薄切切片も比較的厚くする必要がある。その結果，免疫染色は通常のプロトコールで均一に染まらないことも少なくない。それは，熱処理などの抗原賦活化処理を行っても同様である。このような脳組織の免疫染色は，抗体反応温度を上げ時間を延長することが技術的要点となる。これらにより，抗体の浸透および反応が向上したと考えられる。

現在，ボディアン染色に用いられるプロテイン銀は原材料の不足から製造中止となってきており，在庫のみでの入手になりつつある。ビルショウスキー（Bielshowsky's silver stain）染色（図6）でも神経原線維変化や老人斑などが染まるが，高濃度の硝酸銀液の使用など問題点もあるとしてそれほど一般化していない。

上記の，あるいはその他の事情でボディアン，ビルショウスキーといった銀を含む化合物を使う染色に種々の問題がある状況下では，抗 NF 抗体，抗タウ蛋白抗体による免疫染色が，近い将来出来なくなるであろうボディアン染色の代用になりうると考える。

参考文献

1) Bodian D.: A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections, Anatomical Record Vol.65, No1 89, 1936

2) Fuchs, E., Weber, K. : Intermediate filaments : structure, dynamics, function, and disease. Annu Rev Biochem 1994, 63 : 345-382

3) Ihara, Y.,Nukina, N.,Miura, R.& Ogawara, M.: Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. J.Biochem.99:1807-1810, 1986.

4) Igarashi,H., H.Sugimura, K.Maruyama, Y.Kitayama, I.Ohta, M.Suzuki, M.Tanaka, Y.Dobashi and I.Kino. : Alteration of immunoreactivity by hydrated autoclaving, microwave treatment, and simple heating of paraffin- embedded tissue sections. APMIS 102 : 295-307, 1994