

遺伝性銅代謝疾患の組織における銅沈着の定量的空間的検出
Direct *in situ* demonstration of copper accumulation in the tissues of patients with inherited metabolic disorders by microbeam X-ray fluorescence analysis

松浦晃洋、杵渕 幸、溝口良順

Akihiro Matsuura, Miyuki Kinebuchi, Yoshikazu Mizoguchi

藤田保健衛生大学医学部第2病理

Fujita Health University School of Medicine Department of Pathology

アブストラクト

遺伝性銅代謝疾患(ウイルソン病)肝障害には特異的病理所見はなく、ウイルス性や薬剤性肝障害を除外し、銅過剰が他の方法で確定され、肝傷害所見があればウイルソン病肝障害病変とするという補助的診断の域をでなかった。原子吸光法では少量の生検材料では不成功もあり、組織化学的な銅検出方法は極めて検出感度が低かった。BL37XUによるマイクロビーム蛍光X線マッピングを用いて、罹患組織の銅の蓄積を特異的かつ空間的に直接観察した。ウイルソン病肝障害を病理確定診断する道を開いた。

Abstract

Histopathological diagnosis of Wilsonian hepatitis has not been decisive because the histological findings are non-specific and can be seen in any other liver diseases such as viral, drug-induced hepatitis and liver cirrhosis. Therefore, without family history and keen clinical examination the cases were sometimes regarded as chronic liver failure with unknown etiology and were not properly treated. We here demonstrate the microbeam X-ray fluorescence analysis is very sensitive and specific means to unequivocally detect copper deposition in the affected tissues. The method would provide a powerful tool for monitoring the status of liver damage in patients with Wilson disease.

背景：肝臓は生体代謝の中心となる臓器であり、消化管から吸収された様々な物質の異化、同化、解毒を司る。組織における含量が一定なことから12種類の金属が生体にとって必須であると推測されているが、その真の意義は不明で、多くは特殊な環境で生存する細菌がいること、生物が過剰摂取した場合の毒性が農薬や公害などの事例で注目されてきたに過ぎなかった。一方、ヒトにおける遺伝性重金属代謝性疾患として、銅、鉄、亜鉛の異常が知られていたが、発症機構解明の端緒は原因遺伝子の発見を待つ必要があった。ウイル

ソン病とメンケス病に代表される遺伝性銅代謝異常は1993年新たに見つけられた類似した銅のトランスポーター遺伝子の変異による。遺伝子変異の種類や頻度について情報が蓄積されつつある。銅の細胞外輸送の障害により、特定の細胞、組織に銅が蓄積する。ウイルソン病では肝細胞から胆汁中および血清セロプラスミンへの移送障害により肝細胞内に蓄積し、細胞内に捕捉しきれず漏れ出た銅が全身の銅過剰を引き起こし、中枢神経や角膜などに沈着、組織傷害を引き起こす。

これまでの組織化学的な銅の検出方法は

特異性と検出感度が低く、原子吸光法で組織抽出液中に銅の蓄積が顕著でも細胞や組織内の銅沈着が証明できないことが極めて多く、陽性シグナルの出にくい難易度の高い染色法として汎用されるには至っていない。本研究では、凍結組織切片によるわず Sn やカドミウム Cd の検出に実績のある SPring-8 ビームライン BL37XU を利用して、ウィルソン病患者肝臓組織切片の銅の蓄積を特異的かつ高感度で二次元マッピングによる検出を試みた。

実験：BL37XUの X 線顕微鏡システムを用いて、マイクロビーム X 線をプローブとして、試料そのものを非破壊的に 2 次元的に広範囲にわたって蛍光 X 線分析 (microbeam X-ray fluorescence analysis: mbXRF) を行った。今回の実験では単色化された放射光を 2 枚の Kirkpatrick-Baez (KB) mirror によって集光し、X 線ビームサイズを約 1 ミクロン近くまで絞り込んだ。pixel size は 2 (V) × 1(H) μm^2 平方ミクロンの領域を、exposure time 0.5sec/pixel で照射し、試料から放射される蛍光 X 線を SDD 検出器にて検出した。試料によって多少異なるが、原則として XY 方向約 300 ミクロン四方をスキャンし、設定した金属種チャンネルごとの 2 次元マップを作成した。非破壊的な手法であることから、スキャン後の試料を通常の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色 (post-mbXRF HE staining 法と呼ぶ) して、照射測定部位の病理所見と銅の蓄積を直接比較した。組織は固定後、パラフィン包埋ブロックとし、厚さ 2 ミクロンの薄切切片を PET 膜上に採取し、3 センチ角四方を試料ホルダーに固定した。照射観察部位を連続切片の HE 染色標本と合わせつつ、測定ハッチ内の試料ホルダーと連動したコンピュータ制御の positioning microscopy の落射画像をもとに観察に適した位置を選んだ (Fig. 1)。ヒト材料を用いる研究であり、藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理審査委員会の承認を得て、患者様およびご家族のインフォームドコンセントに基づいて採取された試料についてのみ研究に用いた。

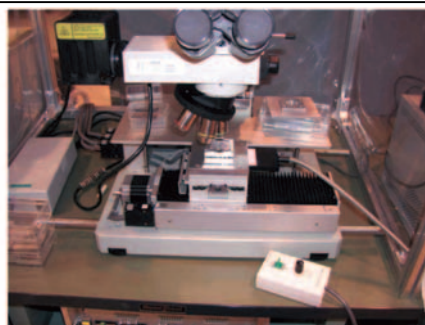


Fig. 1 Positioning microscopy in the BL37XU.

照射測定位置決め顕微鏡はハッチ内の試料ホルダーとコンピュータ制御で連動し位置指定。

結果と考察：症例はクームス陰性の溶血性貧血発作と肝不全で発症し、意識障害が出現し、劇症肝炎と診断された。血液透析により症状の緩解がみられず、母児間の生体肝移植にて、救命・寛解した。移植直前に、眼科受診にて Kaiser-Fleisher 角膜輪の存在と低セルロプラスミン血症からウィルソン病の劇症肝炎型と推定された。肝臓組織片を原子吸光法にて測定し、銅と鉄の蓄積が判明した。一方、病理組織学的には、肝硬変に強い炎症と壊死が加わった所見がみられ、ウィルソン病に伴う劇症肝炎に矛盾しない像であった。しかしながら、ロダニン法、ルペアン法といった銅の組織化学的染色では陽性像が得られず、これまでの報告同様、ウィルソン病肝障害は他のウイルス性肝障害や薬剤性肝障害と区別し難いとせざるを得なかった。本症例について、BL37XU において mbXRF を行った結果、銅のチャンネルに大量のシグナルが得られた (Fig. 2 A)。一方、鉄のチャンネルにも大量のシグナルが得られた (Fig. 2 B)。鉄と銅の局在は多くは一致しておらず、溶血により放出されたヘム鉄の網内系での捕捉とセルロプラスミン低下によるフェロキシダーゼ活性の低下による鉄代謝の障害による沈着と考えられた。

Post-mbXRF HE staining 法により、銅のシグナルは肝硬変の偽小葉に含まれる空胞変性を起こした肝細胞質内と細胞膜 (細胞境界面) に一致して観察された (Fig. 3)。

Fig. 2 Two-dimensional mapping by mbXRF analysis. マイクロビーム蛍光X線分析による銅 Cu と鉄 Fe の2次元マッピング。

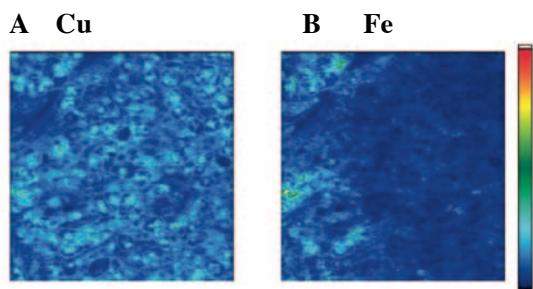
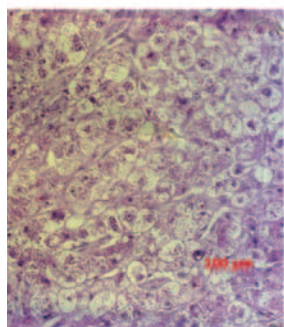


Fig. 3 Post-mbXRF HE staining

同一切片を mbXRF 解析後、HE 染色

Fig. 2 A と比較すると銅の抜けた部分は小葉間の毛細血管と脂肪変性した肝細胞であることがわかる。350(V)×400(H) μm^2 をスキャンした。



銅代謝に異常を認めない組織切片には全く銅のシグナルは検出されない。mbXRFによる2次元マップは病理組織標本において、過剰の銅を原子特異的に、位置情報とともに得られることを示すことが出来た。本症例はATP7B遺伝子変異の解析により、R778LとA874Vの変異遺伝子をそれぞれ母方と父方から受け継いだ複合ヘテロ接合体として発症したことを確認している。

今後の課題：私たちはWilson病遺伝子変異の研究データを収集・解析しているが、変異が多岐にわたることから病型と遺伝子型の関連はあまりうまく説明できていない。現在は症状やセルロプラスミン、血清銅や尿中銅を測定することにより病勢を推定している。 μ -XRFにより、罹患臓器・組織の病変局所で (*in situ*) 銅の蓄積を特異的かつ定量的、高感度で行うことにより、治療効果の判定や病態の変動を局所に蓄積した

銅を指標として行うことで、より直接的に判定することができる。特に、生検で得た微小標本に応用することにより、家族歴や典型的症状(肝硬変、錐体外路症状、Kaiser-Fleisher 角膜輪)のない軽症や慢性の肝障害例の中に、Wilson病や他の重金属代謝異常疾患を見出すことが可能になると期待される。理論的には、二次性の金属代謝異常の検出、鑑別にも有用と考えられる。本解析により、銅代謝異常を遺伝子解析の結果を待たずに生検組織材料を用いて、病理組織学的に確定診断する可能性を示した。

本システムが改良されると広範囲観察し、軽度病変と高度病変の成立機序の違いに迫ることができ、細胞小器官レベルでの銅の分布の違いや動きの観察が可能となれば、より詳しく遺伝子型や病型との対応を検討できる。正常を含め、軽症例や治療奏効例など様々な症例を観察し、また、一定領域のデータを定量することにより、明らかな過剰性疾患と健常者におけるゆらぎの範囲を決めることが急務である。

文献：

- (1) Kitazawa J, Kaizuka M, Kasai M, Noda Y, Takahashi Y, Terui K, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M, Kamata Y, Endo T, Nomachi S, Saikai T, Mizoguchi Y, Kinebuchi M, Ito E, Matsuura A. *Pediatr Int.* 46:726-729, 2004
- (2) Kinebuchi M, Matsuura A, Ohya K, Abo W, Kitazawa J. *Clin Exp Immunol.* 139:144-151, 2005
- (3) Ohya K, Abo W, Tamaki H, Sugawara C, Endo T, Nomachi S, Fukushi M, Kinebuchi M, Matsuura A. *Eur J Pediatr* 161:124-126, 2002
- (4) Yamaguchi A, Matsuura A, Arashima S, Kikuchi Y, Kikuchi K. *Hum Mutat. Suppl* 1:S320-322, 1998
- (5) Hayakawa S, Tohno S, Takagawa K, Hamamoto A, Nishida Y, Suzuki M, Sato Y, Hirokawa T. *Anal Sci.* 17S, i115-117, 2001