

遺伝性銅代謝疾患組織を用いた銅沈着の定量的空間的検出
**Quantitative and topographic detection of copper deposition in the
tissues of inherited disorders of copper metabolism**

松浦 晃洋、杵渕 幸

Akihiro Matsuura, Miyuki Kinebuchi

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（ウィルソン病）肝障害には特異的病理所見はなく、銅過剰が原子吸光法など他の方法で確定され、肝傷害所見があればウィルソン病肝障害病変とされてきた。しかしながら、破壊的手法では再現性の確認ができない。組織化学的な銅検出方法は極めて検出感度が低い。遺伝子変異解析も約15%が陰性である。マイクロビーム蛍光X線マッピングを用いて、組織切片銅を特異的、高感度に測定する条件設定を行った。ウィルソン病診断へのシンクロトロン応用に新局面が開かれた。

Abstract

Diagnosis of Wilson disease is difficult. Copper content measured by atomic absorption spectroscopy is most reliable technique. However, the method is destructive and re-examination is impossible especially for the needle biopsy specimens. Histochemical copper staining is often negative. We here demonstrate the microbeam X-ray fluorescence analysis is very sensitive and specific means to unequivocally detect copper deposition in the affected tissues. This way of application would open a new era of the third-generation synchrotron radiation facility for practical application to clinical medicine.

背景と研究目的:

ウィルソン病は銅の肝細胞から胆汁への分泌障害により、過剰の銅蓄積が肝障害を起し、さらに肝臓より漏出した銅が肝外組織（大脳基底核・角膜・腎臓など）に障害を引き起こす。稀とはいえ遺伝性疾患としては比較的頻度が高く、Wilsonの報告後約一世紀の間に症例が蓄積し、様々な病型の存在と病態の解析が進んでいる。受診時の障害臓器により、肝脳両方が侵される肝脳型、いずれかが侵される脳型、肝型がある。脳型は一次的に脳神経系のみが障害を受けるのではなく、肝障害が軽微な場合肝臓の代償機能が高いため気づかれず、より障害が顕れやすい神経精神症状で受診したもので、入院して肝機能検査・銅代謝に関わる精査をすれば全例に肝病変が存在

する。ウィルソン病は軽度の場合、キレート剤などの薬剤療法によってほぼ一生の間完治しうる可能性が高く、早期診断・早期治療が疾病の転帰に大きく影響する疾患である。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多く、信頼性の高い方法ではない。原子吸光法は破壊的で測定により試料が喪失するので、予測と違うデータがでて再現性を確認することが困難である。最近導入された遺伝子変異解析は臨床的に明らかなウィルソン病症例の約15%が陰性となる。変異検出の範囲の問題、より本質的には、変異と多型の判定が疾患に見出された登録と合わない限り難しいためである。いずれ

の検索手段も単一の手法では診断できない。本研究では、化学分析に実績のあるビームライン 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 2 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マイクロビーム蛍光 X 線分析 (microbeam X-ray fluorescence analysis: mXRF) 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。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光学顕微鏡の落射画像をもとに観察に適した位置を選んだ。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。

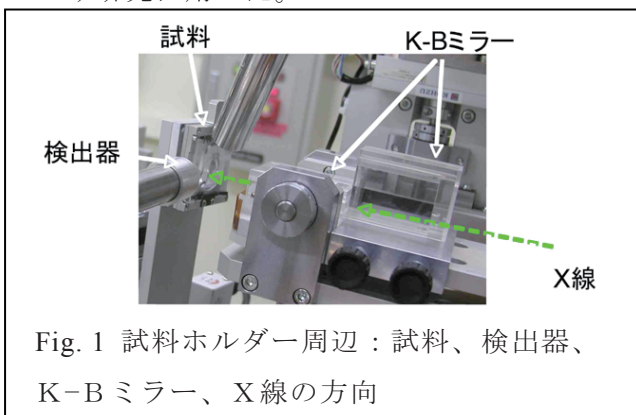
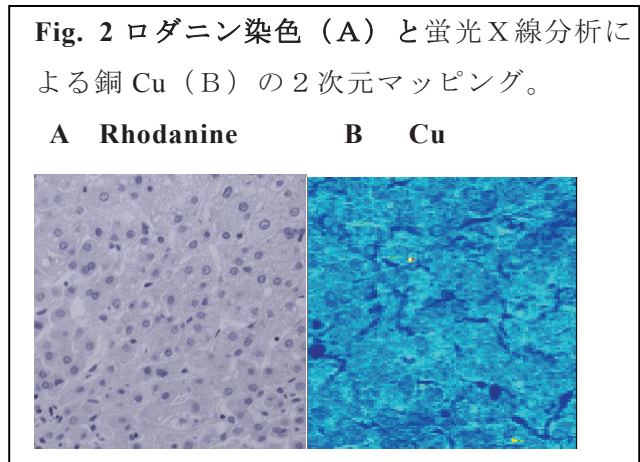


Fig. 1 試料ホルダー周辺：試料、検出器、K-B ミラー、X 線の方向

結果と考察：

症例は軽症肝機能障害と診断された。低セルロプラスミン血症からウィルソン病性肝炎と推定された。肝臓組織片を原子吸光法にて測定し銅の蓄積が判明した。一方、病理組織学的には、門脈域に軽度のリンパ球浸潤と小葉内肝細胞壊死が見られ、慢性肝炎の組織所見であった。

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なかった (Fig. 2A)、他のウイルス性肝障害や薬剤性肝障害と区別し難い。本症例について、BL37XU において mXRF 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. 2B)。



対照的に、銅代謝に異常を認めない組織切片には銅のシグナルが極めて低い。mXRF 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。

今後の課題：

ウィルソン病遺伝子変異は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。mXRF により、罹患臓器・組織の病変局所銅の蓄積を特異的、高感度で行うことにより、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、ウィルソン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。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。

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