

高解像度蛍光X線マッピングによるウィルソン病の早期診断 Early diagnosis of Wilson disease by a third-generation synchrotron-based high-resolution X-ray fluorescence mapping

松浦晃洋^a、杵渕 幸^a、寺田靖子^b

Akihiro Matsuura^a, Miyuki Kinebuchi^a, Yasuko Terada^b

^a藤田保健衛生大学医学部第2病理 ^b高輝度光科学研究センター

^aFujita Health University, ^bJASRI/SPring-8

ウィルソン病は比較的頻度の高い遺伝疾患で早期発見してキレート剤投与を的確に行うとほぼ正常人と変わらない日常生活が可能である。しかし、症状が多彩で見過ごされる例も多く、小児例の5-7%は劇症型でキレート剤は無効ないし症状を悪化させる。発症前に遺伝子診断したとしても、実際にいつどのような病型で発症するかは不明である。経過観察のより正確な指標が必要である。高解像度蛍光X線マッピングにより肝臓への銅の沈着を高感度に、元素特異性をもって検出し、細胞組織学的構築と合わせることにより、早期確定診断を行った。早期症例の中でも明確な違いを見出した。

Wilson disease (WD) is an inherited disorder of copper metabolism resulted in abnormal copper accumulation in the liver followed by that in cornea and basal ganglia. Because of wide variety of symptoms and signs, clinical diagnosis of WD has been known to be difficult. Moreover, due to low sensitivity of histochemical copper staining, pathological diagnosis of WD with tissue specimens has been difficult. We are now able to detect copper content and its two-dimensional distribution in biopsy specimens from the patients with mild hepatic presentation and presymptomatic patients by high-resolution (nano-scale) X-ray fluorescence mapping. Our study reveals previously undescribed early topographic change of copper and other biologically important metallic elements.

ウィルソン病、組織、早期診断、蛍光X線マッピング

背景と研究目的：1912年に Kinneir Wilson が肝硬変を伴う家族性進行性レンズ核変性症を報告してから間もなく100年が経過する。その後本症は Wilson 病あるいは肝レンズ核変性症 (hepato-lenticular degeneration) と呼称されるようになった。1960年以前に発病した人はほとんど全て数週から数年で亡くなったので、有病率の低い極めて希な病気とされていた。当初、大脳基底核障害の神経症状が主体で、肝病変が付随すると考えられたが、その後、銅の蓄積が肝臓に生じるのが一義的な原因であること、血清セルロプラスミンの低下が診断の指標になることが明らかにされた。1956年に経口キレート剤が導入され、救命・治療・発症の抑制に画期的な効果が得られ、薬物で治療可能な最初の肝疾患となった。原因遺伝子が1993年に発見され、生体における銅代謝の細胞・分子レベルの解明が進行中である。患者家族の遺伝子変異検索により発症前診断が可能となり、有病率がかなり高いことが判ってきた。早期の治療開始より

良好な生命予後が期待できる。一方、本症は病状発現の多様性のため診断に至るまでかなりの時間を要する例もあること、小児期に約5-7%の患児が劇症肝炎型で発症し、銅キレート薬の治療効果が期待に反し一時憎悪をみたりするなどの難問に遭遇することが多くある。肝組織の銅蓄積量が1つの指標となる。生検組織の一部から組織切片を作成し、一部は原子吸光法により銅含量測定される。銅含量が極めて高い場合でも銅組織化学染色陰性の場合が早期症例にある。破壊的測定のため含量に疑問あっても試料はなく再確認はできない。特に、家族歴のない症例の場合、ウィルソン病を疑って組織生検をしても病理組織学的確定診断は不可能でした。生体への侵襲の強さに比べ、得られる情報が少なく、1970年代の記載を越えるような新しい知見が得られず、生検自体を行わない傾向があり、発症・進展形式の本質的な病理学的解明と分子生物学的知見の間に大きな隔りがある。本研究ではこれまでの通常の方法では診断不可能

な症例について蛍光X線マッピングにより早期確定診断への応用の可能性を探り、また、ナノスケール測定により、未解明の微細な変化を検出しようとする意欲的な試みである。

方法及び結果：肝機能が異常ないが遺伝子解析により疾患変異遺伝子を両方の染色体に保有する症例1、および肝機能異常が現れてすぐの症例2、症例3について、肝生検を行い、一部は原子吸光法による銅の定量を行い、一部は凍結切片を作成し、残りは通常のホルマリン固定標本を作製し測定した。症例1の組織像はほぼ正常であり、症例2は中等度、症例3は軽症の肝炎の所見であった。対照とした銅代謝機能に異常のない試料ではほとんど銅のチャンネルにシグナルが得られない (Fig. 1) のに比して、症例1では照射野の全体に比較的均一な弱いシグナルが検出され、画像化して連続切片のHE像と比較したところ、肝小葉内の一部の肝細胞の細胞質に弱いびまん性の分布を示した。一方、症例2は門脈域にリンパ球浸潤と軽度の線維化、肝小葉内に single cell necrosis が見られ、組織学的に chronic active hepatitis の所見である。照射野を数カ所選んで検出したところ、肝小葉内では中心静脈付近にやや強いが小葉全体にほぼ同程度のシグナルが得られた (Fig 2)。門脈域には弱いシグナルしか得られない。症例3の早期軽症例をナノスケール解像度で観察したところ、細胞質内で一部顆粒状に強くシグナルの得られる所があった (Fig 3)。

考察：銅含量が正常の5倍あればウィルソン病の診断をサポートするとされてきた。今回症例の原子吸光法による銅の定量では症例1は正常の3倍程度で、症例2は20倍程度と極めて高い銅が検出された。後者は測定エラーを疑ったが、破壊的測定で再検索できなかった。このような疑問症例について、残存する組織観察用の組織切片を蛍光X線分析することにより、銅の肝細胞内蓄積を確実に検出できた。定量のため罹患者にとって侵襲性の高い組織生検を無用に繰り返す必要がなく、また、銅組織化学染色陰性のウィルソン病症例全てにおいて確実に高感度に銅を検出できた。これまでの結果、発症前・早期症例では、銅の蓄積が肝臓小葉内の一部の肝細胞に始まり、比較的均等に広がってゆくこと、また蓄積量と肝細胞傷害の程度に一定の関連があり、症例を増やして統計学的有意差を検討する予定である。今回、設定したナノスケール高解像度での解析をさらに進めることにより、早期病変の起こる部位、劇症化の際の銅分布の変

化を知り、また微細構造の解析と合わせ病態予測や治療薬のコンプライアンスを的確に判断するのに役立てることが期待できる。

文献：1) Kinebuchi M, Matsuura A et al.: Contribution of Valpha24Vbeta11 natural killer T cells in Wilsonian hepatitis. Clin Exp Immunol **139**:144-151, (2005).

2) Matsuura A, Kinebuchi M, Terada Y: Early diagnosis of Wilson disease by a third-generation synchrotron-based high-resolution X-ray fluorescence mapping. manuscript in preparation.

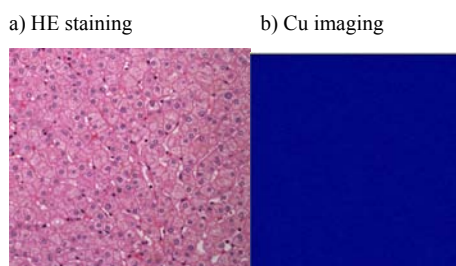


Fig 1 Copper imaging of normal healthy liver.

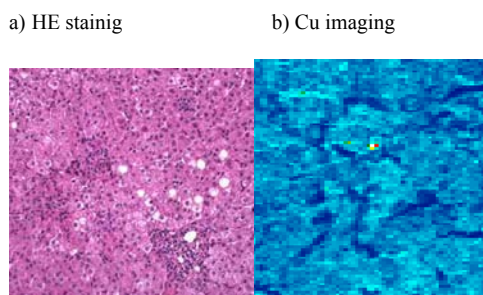


Fig 2 Copper imaging of WD hepatitis (moderate). HE staining section reveals histological findings consistent with chronic active hepatitis. Copper imaging revealed massive diffuse copper deposition in hepatocytes.

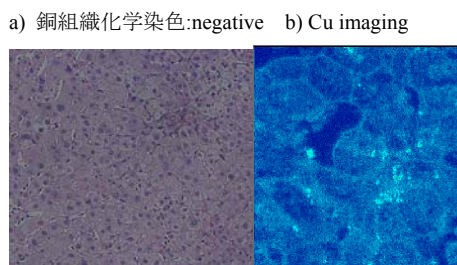


Fig 3 Nano-scale fine mapping of WD hepatitis (mild). Diffuse faint cytoplasmic signals with several strong fine granular signals were observed.