

ウィルソン病の治療効果判定—難治症例の病態解明
**Evaluation of the therapeutic effect of a patient with intractable
 hepatitis associated with Wilson disease by the high resolution X-ray
 fluorescence mapping of trace elements**

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 School of Medicine Department of Pathology, ^bJASRI/Spring-8

ウィルソン病は肝の銅トランスポーター異常を示す遺伝性疾患であり、早期発見して薬物療法を行うとほぼ正常と変わらない日常生活が可能である。私たちは高解像度蛍光X線分析による肝臓の銅蓄積を測定することによりウィルソン病を早期に確実に診断できるシステムを構築した。しかしながら、実際に治療を開始した後、臨床徴候や検査所見から治療効果を判定し薬剤の投与量を加減することは経験豊富な臨床医にとっても極めて難しい。治療がほぼ一生という長期間にわたることから、治療効果を的確に把握する方法を確立し、薬剤の選択や服薬コンプライアンスの改善などの対策が大切である。今回、難治症例について、治療開始前と治療後4年間にわたり肝機能がなかなか正常化しない肝組織を比較観察する機会を得た。高解像度蛍光X線分析は治療効果を定量的客観的に評価する指標として有用である。

We have established that application of microbeam X-ray fluorescence analysis (μ XRF) on pathological tissue sections is useful to diagnose early phase of Wilson disease. We experienced a case of Wilson disease who responded not well to the administration of the chelating drug. After four-year treatment, his clinical symptoms were improved but his abnormal liver function has been continued. Histological observation of needle biopsy specimens revealed that activity of hepatitis is well reduced. However, tissue copper imaging and calculation of copper content in this case (before and after treatment) clarified that copper content in the affected tissue was decreased after treatment but still remained at relatively high level. We conclude that copper removal in this case is not sufficient and should be continued until its value decreased to that of a well-recovered case or comparable to that of normal cases. Thus, the μ XRF combined with pathological observation is very helpful to objectively evaluate therapeutic effect of drug treatment.

研究目的： ウィルソン病は数少ない治療可能な遺伝性疾患であるが、診断は必ずしも容易ではない。肝組織銅含有量が正常の5倍以上、遺伝子変異1検出の二項目は最新のウィルソン病診断基準でも高い点数を与えられている。しかしながら、両者とも現実的にはいくつかの問題点がある。組織銅測定については、正確な組織銅含有量の測定のためには多くの組織が必要で生体への侵襲性の高い開腹・腹腔鏡による肝の wedge resection が求められる。また、世界的には乾燥重量当たりの銅含有量が基準となっているが、本邦では侵襲性の低い needle biopsy を行い、湿重量当たりの銅含有量を測定している施設が多い。私どもの最近の実験的検討によると組織試料を採取後すぐ重量測定しチューブにいれ凍結した湿重量値と測定施設に送付したのちの湿重

量値を比較した所、同一条件でしっかりシーリングして凍結送付した試料でも20%から40%の重量の減少が生じること、また、その減少は試料毎のバラツキが大きいことが示唆された。乾燥重量（灰化）を測定し乾燥重量当たりの銅含有量を算出すると、最初の湿重量換算値で約3倍から4倍の値となった。理論的に考えても脈管内や間質の血液成分を含まない乾燥重量当たりの含有量が、肝臓の組織（細胞）内の量をよく反映すると考えられる。私たちのこれまでの SPring-8 での蛍光X線分析でも、門脈域の脈管や間質ではなく、肝実質細胞が存在する肝小葉の測定が肝傷害や病勢の判定に重要であるという印象と一致する。遺伝子変異については、新規の変異が検索症例に見つかった場合、集団における多型と病因変異の区別ができない。これは多く

の多型情報が外国のデータベースに依存しており日本人・東洋人の正常集団を含まないことにも起因している。実際、我々の10年前の本邦症例の検索でも欧米人に見つかっていない新規変異が9種類あった。それらは、後の本邦、韓国、中国での東洋人症例の解析で多く見出された。さらに、新しい変異もかなり多く見つかっており(文献1,2および未発表データ)、日本人集団におけるATP7B多型が明らかにされる必要がある。

本研究は上記の実践診断上の問題点を解決するだけでなく、これまで不可能であった除銅効果の評価できる可能性を秘めているため、治療後の経過観察を極めて慎重に行った症例について、本実験課題を施行した。治療効果が肝臓の銅蓄積量や分布パターンと相関するか否かについて検討することを目的とする。

利用方法と結果： 症例は中等度から高度の肝機能障害を契機にウィルソン病を疑い生検し病理学的に慢性肝炎(活動性A2)の診断がされた症例で、治療開始されたが年余にわたり肝機能指標AST, ALT値の軽度から中等度上昇が持続しキレート剤投与に反応の良好でないとして経過観察されて来た。同意を得て、針生検を行い組織所見と蛍光X線分析解析を照らし合わせて治療効果を評価する機会を得た。治療開始前後の肝組織HE染色標本では、組織学的に肝炎の活動性は低下しており治療効果はかなりあった判定される。しかしながら、高解像度蛍光X線分析にて奏効例と今回の難治例の治療前後を比較したところ、治療後の肝組織での銅含有量の減少率が少ないこと(Fig. 1)、また、肝組織内銅絶対量(規格化値)がまだ高いことが判明した。すなわ

ち難治例では除銅copper removalが十分でないと考えられた。治療に対する臨床的な反応性の違い(奏効と難治)は肝臓内の銅の含量と密接に結びついている可能性が示唆された。また、鉄の増加傾向と分布の変化が観察された。

考察： 侵襲性の比較的軽度な針生検を行い小組織片を蛍光X線分析することにより、薬剤による除銅効果を客観的に評価できた。奏効例、難治例の症例を重ね、経過観察・治療方針への客観的基準を作成できる。薬剤応答性の違いの解明と対策に役立てるべく総合的に検討中である。鉄についても注意して経過観察する必要がある。神経系での銅の蓄積についても解明してゆきたい³⁾。

文献：

- 1) Ohya K, Abo W, Matsuura A et al., Presymptomatic diagnosis of Wilson disease. *Eur J Pediatr* 161:124-126, 2002
- 2) Yamaguchi A, Matsuura A, Arashima S, Kikuchi Y, Kikuchi K. *Hum, Mutat Suppl* 1:S320-322, 1998
- 3) Baudouin SJ, Matsuura A et al.: The signaling adaptor protein CD3zeta is a negative regulator of dendrite development in young neurons. *Mol Biol Cell* 19:2444-2456, 2008
- 4) 松浦晃洋、杵渕 幸 他：遺伝子変異解析と蛍光X線元素分析の応用によるウィルソン病の早期診断 第97回日本病理学会総会一般口演 肝胆膵6、金沢、2008(日病誌97:255、2008)
- 5) Kitazawa J et al.: Hemolytic crisis with fulminant hepatic failure in Wilson disease without consanguinity. *Pediatrics International*. 46:726-9, 2004
- 6) 北澤淳一、松浦晃洋 他：アデノウイルス感染症を契機に発見されたウィルソン病の1例 第12回ウィルソン病研究会 口演、東京、2008(第12回ウィルソン病研究会誌 p11、2008)
- 7) 松浦晃洋、杵渕 幸 他：高解像度蛍光X線分析を用いたWilson病の病理確定診断と病態解明 第98回日本病理学会総会一般口演 肝胆膵5、京都、2009(日病誌98:248、2009)
- 8) 松浦晃洋、杵渕 幸 他：ウィルソン病の病理組織所見—確定診断は可能か? 第13回ウィルソン病研究会 口演、東京、2009(第13回ウィルソン病研究会誌 p13、2009)
- 9) Matsuura A, Kinebuchi M, Terada Y et al.: Element-specific in situ detection of copper by synchrotron radiation X-ray fluorescence microscopy for diagnosis of Wilson disease. in preparation

Effect of treatment on hepatic copper content (expressed as relative decrease)

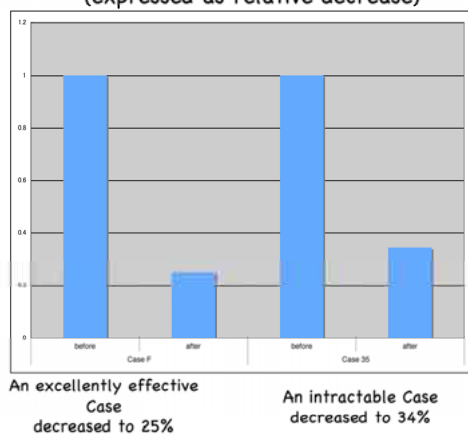


Fig.1 Effect of treatment on hepatic copper content. Comparison of normalized copper units in an excellently effective case with those in an intractable case.