

## 正常およびウィルソン病肝組織内元素の定量的評価—高解像度組織 元素イメージングによる解析

### Analysis of the elemental content and distribution in normal and patients with Wilson disease with high-resolution tissue element imaging by microbeam X-ray fluorescence analysis

松浦晃洋、杵渕 幸、寺田靖子

Akihiro Matsuura, Miyuki Kinebuchi, Yasuko Terada

藤田保健衛生大学医学部第2病理、高輝度光科学研究センター

Fujita Health University School of Medicine Department of Pathology, JASRI/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診断できるシステムを構築した。しかしながら、銅蓄積過剰と判断するには、銅代謝異常のない健常人対照における微量元素の含有量と分布を規格化した XRF での測定値における基準値を決定する必要がある。本課題では対照症例のイメージングを行い領域ごとの基準値（平均値）を決定した。診断や治療開始後の経過観察の目安となると期待される。

We have established a method of microbeam X-ray fluorescence analysis (microXRF) on pathological tissue sections that was useful to diagnose early phase of Wilson disease. However, tissue copper imaging and calculation of copper content in healthy controls need to be determined to evaluate whether copper accumulation occurred or not. We here defined normalized units as controls from 40 specimens from 15 individuals for microXRF analysis. Thus, the TEI (microXRF combined with histological observation) is helpful to evaluate the regional content of trace elements.

**研究目的：** ウィルソン病は早期発見・早期治療開始により比較的良好な生命予後が得られるが、一方では、完全な治療法は現在のところは肝移植しかなく、長年にわたる罹患期間のため多くの症例において日常生活の質は必ずしも良くない。様々な病型・病態があるため診断や経過観察も容易ではない。例えば、薬剤投与で神経症状が悪化する症例、銅が排出される過程で腎機能不全を起こす症例、劇症型で急性肝不全を起こし救命困難な症例、自覚症状はないが肝硬変が進行して腹水など慢性の肝不全を呈して来院する例などがある。最近、キレート剤による銅の生体からの除去（除銅 copper removal）ではなく亜鉛薬により銅の吸収を抑えるというマイルドな新しい治療方法が提唱され、本邦でも亜鉛薬の導入が試みられようとしている。しかしながら、除銅を最初にしっかりすべきであるという意見も多くあり、客観的な薬剤の効果判定基準が必要である。私たちは銅代謝の中心臓器でウィルソン病において最初に傷害されると考えられている肝組織の銅の蓄積を正確に判定することを目的として、症例蓄積研究を行っ

ている。本課題では、正常との境界を設定することを主な目的として実験を行った。

**利用方法と結果：** 銅代謝に異常のない（健常人肝移植ドナー、剖検例）肝組織標本を用いて、高感度・高解像度の元素マッピングを行い画像化した。ウィルソン病症例ではかなり早期でも明白な銅シグナルが検出され、病期により特有の組織内分布を示すのに対し、対照例では銅はごく少量のカウントが検出されるものの、イメージングにて画像化を試みても明瞭な組織分布パターンを示さなかった（Fig. 1）。ウィルソン病では実質（肝細胞を含む小葉および偽小葉）に銅が多く間質（門脈域や線維性隔壁）に少ないパターンを示す（Fig. 2）。すなわち WD では場所・病変所見ごとのバリエーションがある。よって、主に肝実質に注目して定量を行った。銅はきわめて少量であるが Mn よりは多く存在し、規格化して基準値を設定中である。図3にその一部を示す。正常肝臓では銅は少ないが他の臓器（腎臓・消化管・神経組織など）よりはシグナルが多い。また、個体差が少ないことも

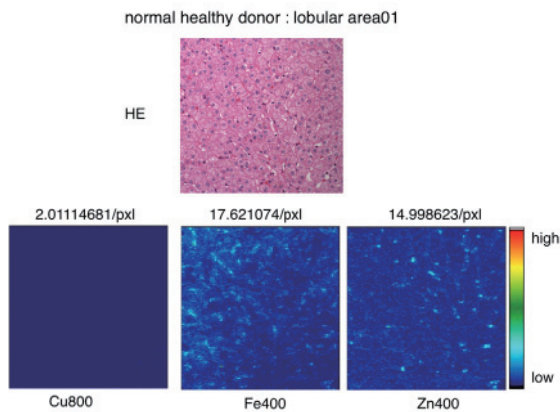


Fig. 1 Elemental image of normal liver.

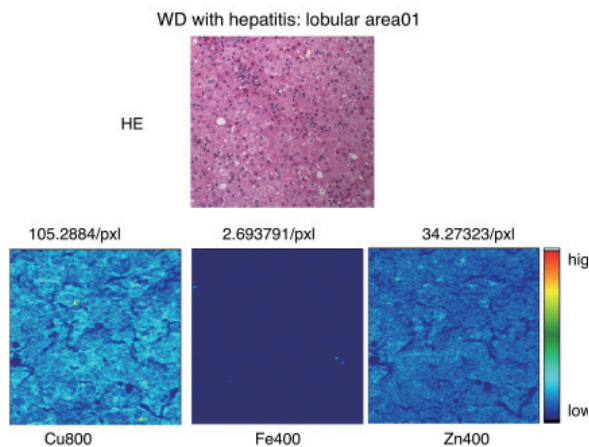


Fig. 2 Elemental image of WD liver with hepatitis.

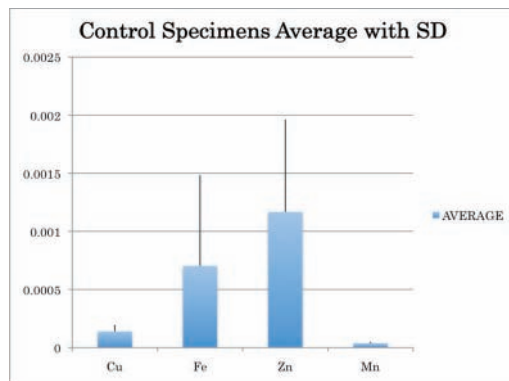


Fig.3 Elemental content in normal livers (expressed as normalized units). Note that variation of Cu content is much less than that of Fe and Zn.

特徴である。一方、鉄や亜鉛は銅よりも平均量が多いが個体差が大きい。鉄は明確な男女差がある。小葉の銅含量は薬剤が著効した例では相当下がるが、正常対照レベルまでには下がっていなかった。

**考察：** 正常肝で銅がうまく描画できないのは、銅が微量元素であり比較的均等に分布しているためと考えられた。現在の設定では曝

露時間を増やしても組織と対応のあるイメージ作成は困難であると考えられた。逆に、組織構築がわかるほど明確なイメージが描出できるウィルソン病はきわめて特殊な銅過剰の病態であることが再認識された。本課題（引き続いて行っている課題の蓄積である）により、正常銅代謝機能を有するヒトの間で銅の含量が比較的一定して均等な分布を示すのに対して、鉄や亜鉛は小葉内に比較的均一に分布するが、個体差・性差が存在するとの印象が得られた。年齢差については情報が不十分なので、今後症例を蓄積して確実な情報を得る所存である。薬剤効果判定の基盤確立に大いに役立つものである。また、銅以外の元素；鉄、亜鉛、マンガン、カルシウム、イオウ、クロミウムなども測定しておりそれらが一定の評価基準となるか否かについて、より詳細な検討が必要である。発症したウィルソン病では病型や測定組織部位により銅の分布や含量は大きく異なっている。未発症例や発症前症例、軽症例、変異を片方にだけ持つ症例（キャリア）の区別が付くかどうかなどについて詳細な解析を行っている。さらには、その他の銅蓄積を来す疾患との違いについても今後の検討が必要である。

## 文献

- 1) Ohya K, Abo W, Matsuura A et al., *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., *Mol Biol Cell* **19**:2444-2456, 2008
- 4) 松浦晃洋、杵渕 幸 他, 第97回日本病理学会総会 一般口演 肝胆膵6、金沢 5月15日—17日、2008 (日病誌 97:255、2008)
- 5) Kitazawa J et al., *Pediatrics International*. **46**:726-9, 2004
- 6) 北澤淳一、松浦晃洋 他, 第12回ウィルソン病研究会 口演、東京 5月10日、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, 第98回日本病理学会総会 一般口演 肝胆膵5、京都 5月1日—3日、2009 (日病誌 98:248、2009)
- 8) 松浦晃洋、杵渕 幸、溝口良順 他, 第13回ウィルソン病研究会 口演、東京 5月9日、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., Submitted.