

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461534

研究課題名(和文)放射光X線による微量元素異常疾患の高精度イメージング診断

研究課題名(英文)Precise diagnostic trace elemental imaging by synchrotron-generated X ray

研究代表者

松浦 晃洋(MATSUURA, Akihiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70157238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射光X線を用いて組織切片上の微量元素の蛍光X線シグナルを正確に検出解析できるように、試料作成・光学素子・検出装置・解析条件・運転モードによる標準化法を樹立した。ウィルソン病、メンケス病、ヘモクロマトーシスなどの疾患組織切片で明瞭な銅、鉄、亜鉛などの同時描画を行う事が可能となった。微量元素異常疾患を組織学的に精密診断するとともに、治療効果判定、組織細胞内局在と病理所見の比較検討を行うことが可能となった。非遺伝性のありふれた疾患の背景に元素異常の存在する場合、その解析が可能となった。元素病理学と言うべき新しい分野のドアが開かれた。

研究成果の概要(英文)：Inherited metabolic disorders of trace elements are rare, but difficult to diagnose clinically as well as pathologically. We tried to incorporate synchrotron-generated brilliant X-ray to pathological examination and successfully detected trace elements in tissue sections; such as copper, iron and zinc. We also achieved to simultaneously create two-dimensional elemental maps. These elemental disorders, that have been impossible to capture pathological study, are now readily diagnosing by synchrotron X-ray fluorescence analysis. Now, we open the door to elemental pathology. The diagnosis and pathogenesis of abnormality in trace elements can be analyzed with a new aspect.

研究分野：医歯薬学

キーワード：微量元素異常 イメージング 遺伝病 銅 ウィルソン病 メンケス病 ヘモクロマトーシス 放射光X線 組織元素

1. 研究開始当初の背景

ウィルソン病は Kinnier Wilson が百年前に神経精神症状に肝硬変を伴う重篤な疾患として報告した。臓器特異的な銅の蓄積が根本にあり、銅のキレート剤治療によって良好な生命予後が期待できるようになった。本疾患は銅輸送トランスポーターATP7B分子の異常による。ATP7B ゲノム遺伝子の変異により、常染色体劣性遺伝形式をとる。遺伝性疾患として日本人に比較的多い。このため、遺伝子検査に期待が寄せられた。しかし、ウィルソン病の診断基準を満たしていても遺伝子変異が検出されない。あるいは、遺伝子変異の解析結果から臨床病型が決められない。さらに、病期ステージも決められない。など遺伝子検査からの診療解決には無理があった。

肝臓の銅含有量を生化学的に定量することはできる。原子吸光法から進化した誘導結合プラズマ ICP 発光分析など微小な肝生検組織から高精度の銅の定量ができるように測定機器の進歩があった。しかし、生化学的手法では銅の組織の二次元蓄積分布を測定できない。

電子顕微鏡を用いた電子線プローブ微小分析 EPMA は観察領域が極小である。

研究開始当初は銅の組織蓄積を解析する適切な手法はなかった。

2. 研究の目的

日本のシンクロトロン放射光施設は世界最高レベルにある。シンクロトロン放射光を用いて新次元で、銅代謝異常ウィルソン病の診断と病態を解明することを目的とする。

①微小領域の元素特異的蛍光 X 線を検出し、組織元素を高感度で定量的に画像化する。②社会的な要請への対応：症状が軽い小児ウィルソン病(早期・発症前)を確実に補足する。③肝臓の針生検の微量試料に適用可能とし、低侵襲性で、かつ、信頼性の高い診断法を樹立する。④治療の開始と治療効果判定、病型と元素局在、発症機序や病態に新しい視点を導入する。

ウィルソン病を疑う際には、生化学的定量的目的以外でも、病変の活動性 activity、進行度 stage を判定するため、生検が行われる。これらの残余組織検体を用いて組織の銅を特異的かつ高感度に位置情報(組織の二次元座標上の各点を網羅する)と量の情報(二次元座標上の各点に対応する銅の定量)から組織診断を構築する。この事で侵襲性をあげずに診断精度を向上させることが可能である。遺伝子診断の正確度をあげることと併せて、これまで困難であった発症前および早期にウィルソン病を高精度に診断できるシステムを構築する。

この新しい解析手法は進行性銅蓄積症であるウィルソン病の有用な診断法である。さらに放射光科学の帝京する物理量を

用いて、放射光科学と医学を融合した放射光病理学という新しい学際領域の総説に寄与することを大きな目標とする。

3. 研究の方法

(1) 放射光蛍光 X 線分析の病理標本解析への応用

高輝度マイクロビーム放射光 X 線をウィルソン病および対照組織切片に照射し、内殻電子の放出に伴って生じる蛍光 X 線をエネルギー分散検出器(XEDS)で検出する。試料作成方法(固定、凍結、処理過程、切片作成)、X線ビーム条件、試料台とビームの角度、試料台のスキャン法、検出機器(SSD, SDD, 検出条件、距離)、画像化(pixel, detection, analysis, 画像解析用プログラム開発 9 について検討し、至適条件を決定する。

(2) ATP7B 遺伝子解析

新規症例および変異を行っていない症例について、5'プロモーターから 21 個のエクソン、スプライシング近傍配列についてゲノム情報を得る。家族例など多数例のゲノム解析は簡易に次世代シーケンサーを用いる。

(3) 生化学的定量と組織染色

試料の症例数と量に対して適切に、原子吸光法、ICP 発光分析を選択し、測定用試料作成の元素濃度に与える影響を検討した。試料となる組織の連続切片のエオジン&ヘマトキシリン染色や銅染色などと、放射光イメージングと比較する。

4. 研究成果

放射光を病気の診断と病態解明に応用することを目的とし、必要な技術開発およびその疾患解析を行う。比較的多い遺伝性銅代謝異常ウィルソン病は特に幼児・小児期の早期発見と早期治療開始が予後・生活の質の向上・病状の進展の防止に役立つことが知られているため、銅を元素測定のための対照としてシステムを構築した。

(1) 組織切片内銅の高感度検出

ビームラインの基本構造は蓄積リングから発生させた入射光を monochromator で単色化し、さらに KB ミラーやゾーンプレートなどの光学素子を用いて試料測定ポイントにおけるビームサイズを絞り込んだ。入射 X 線のエネルギーは銅の検出に適した条件を選択した。焦点を絞りやすい光学素子により、X 線は試料照射点において数~数十ミクロンとし、目的により変更する。照射時間は蛍光 X 線を検出する際に明白な強弱が得られかつ全体の測定時間を短くするため、バックグラウンド部位における蛍光 X 線 photon counts (光子数)を 0~5 とした。シグナルが得られる領域で 100~50000 程度が得られた。生化学的に大量の銅が検出された症例を陽性対照 w1 とし、陰性対照として特に肝機能異常がみられなかった症例や肝移植ドナー(ATP7B 変異保因者をのぞく)を用いた。生化学的な銅の測定を施行できた肝疾患がな

い症例では、20ug/g dry weight を越えることはなかった。米国や欧州のウィルソン病診療指針では正常は 50 ug/g 以内で 5 倍以上 (250 ug/g 以上) がウィルソン病判定の基準とされている。胆汁うっ滞をきたした肝臓でも 70ug/g を越えることはなかった。上記設定条件で測定すると正常対照ではきわめて少ないが一定量の銅シグナルが様々な測定ポイントにあり、一カ所でスペクトルをとると低いピークがみられる。ウィルソン病 w1 ではきわめて強い急峻な銅ピークが得られた。

(2) 画像化システムの確立

ピクセル毎のデータを抽出し、元素毎に光子数を算出し二次元座標上に描出した。Image J や IGORpro を基盤として部分的に新しいコードをいくつかつないだ。計測絶対値と画像の対応が双方向に検証可能であることに注意を払った。

(3) 銅イメージング

これまで 80 例の明らかなウィルソン病肝を測定した。典型例では肝実質の強い銅シグナルを確認した。門脈行きや間質の銅シグナルは、肝実質と比較すると総体的に低い。ウィルソン病ではない症例群として代表的にはウイルス性肝炎、ウイルス性肝硬変、自己免疫性肝炎を測定した結果は、銅シグナルが弱い。以前までの標準的な病理の組織診断法である銅染色を同じ試料の連続切片に施した結果、進行したウィルソン病肝硬変期で銅陽性となる症例はあるが、ウィルソン病肝炎期では銅陽性症例はなかった。

特記すべきは、ウィルソン病の肝組織を放射光 X 線診断した場合に、陰性症例がなく、有力な診断法である根拠が示された。

(4) 遺伝子変異解析

本邦においても、部位や種類の異なる多彩な変異が存在する。解析方法を検討しなおしても、約 15% の症例が片方ないし両方のアリルに病原変異が見つからなかった。

(5) 統合確定診断の試み

特に、小児科領域のウィルソン病は症状が無いかごく軽度で、風邪や肺炎で入院した際に、偶然肝機能障害が見つかり、持続性の肝機能障害に対してウイルスや薬剤などの原因検索を実施した後に、ウィルソン病を疑って銅関連検査(セルロプラスミン低値、血清銅低値、尿中銅増加)を実施して、はじめて病理に精査が依頼される。肝における銅含有量を生化学的に定量し増加を確認する場合には量的および測定部位による偏倚による偽陰性を避けるためには肝喫状切除術が必要であるが、患児への侵襲性を考えると肝生検を行うのが限度である。現在、臨床と連携して肝生検試料を放射光 X 線解析し、発症前ウィルソン病の診断が可能となっている。

日本国内の代表的な放射光施設のビームラインを用いることにより至適条件の設定ができた。検出感度を含めて施設ごと

に至適条件は異なるが、試料の放射光 X 線測定は可能である。現状は、解像度・検出範囲が異なるので目的に応じた使い分けをしている。肝生検組織に局在する銅の量は、通常の放射光 X 線の対象となる標準試料に対してとても少ない。ヒト試料測定時に得られる光子数から、銅の定量値を算出する。

尚、本研究は藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理審査委員会およびゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て行われている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 22 件)

1. Matsuura A, Kinebuchi M. Medical application of synchrotron radiation: high precision diagnosis of diseases due to specific elements abnormality. KEK Synchrotron radiation CDR ver3, 2017. [Epub ahead of print] 査読有
2. 柁淵 幸, 松浦晃洋. Menkes 病のヒスチジン銅による標準治療の限界はどこにあるか(中間報告). ウィルソン病研究会誌 2017. [Epub ahead of print] 査読無
3. Matsuura A, Kinebuchi M. Diagnostic copper imaging of Wilson disease by synchrotron radiation X-ray fluorescence technique. 日本病理学会誌 106: 2D3, 2017. 査読有
4. Kinebuchi M, Matsuura A, Kiyono T, Nomura Y, Kimura S. Diagnostic copper imaging of Menkes disease by synchrotron radiation-generated X-ray fluorescence analysis. Scientific Reports 6: 33247, 2016. doi: 10.1038/srep33247. 査読有
5. Matsuura A, Kinebuchi M. Wilson disease in Japan: current status and challenge to copper detection by synchrotron X-ray. 日本病理学会誌 105: 348, 2016. 査読有
6. Matsuura A, Kinebuchi M. Current status of Wilson disease in Japan: challenges toward precise diagnosis by synchrotron generated-X-ray. Photon Factory Activity Report 2015B: #32, 2016. 査読有
7. 柁淵 幸, 松浦晃洋, 近藤まや. 腫瘍関連肉芽腫症の Function の樹立による診断法の開発. 日本皮膚科学会雑誌 126: 953, 2016. 査読有
8. Matsuura A, Kinebuchi M. Diagnostic copper imaging of pathology examination by synchrotron-generated X-ray: basic principal and application to Wilson

- disease. Proceedings of International Copper Research Meeting. 10: 34, 2016. 査読有
9. 杵渕 幸, 松浦晃洋. ヒト肝臓の銅蓄積は肝細胞傷害を引き起こすか? ウィルソン病研究会誌 20: 11, 2016. 査読無
 10. 田中一成、姜 貞憲、大森優子、田中伸哉、松浦晃洋, 杵渕 幸. 脳死移植待機中に心原死が疑われた Wilson 病の 1 剖検例. ウィルソン病研究会誌 20: 7, 2016. 査読無
 11. Matsuura A, Kinebuchi M. Challenge to detecting copper in human livers: with special reference to the first clinical practice guideline for the diagnosis and management of Wilson disease in Japan. Journal of Trace Elements in Medicine & Biology 32S: 25, 2015. 査読有
 12. 松浦晃洋, 杵渕 幸. 放射光 X 線によるウィルソン病の高精度イメージング診断. 日本病理学会誌 104: 200, 2015. 査読有
 13. Matsuura A, Kinebuchi M. Detector setting of X-ray fluorescence analysis for histological specimens. Photon Factory Activity Report. 32B: 30 2015. 査読有
 14. Kinebuchi M, Matsuura A. Calcium-overloaded sympathetic preganglionic neurons in a case of severe sepsis with anorexia nervosa. Acute Medicine & Surgery 2: 169-175, 2015. Doi : 10.1002/ams2.100 査読有
 15. Matsuura A, Kinebuchi M. Ultra high-resolution imaging of copper accumulation by the nanobeam X-ray fluorescence. SPring-8/SACLA Research Report, 2015. 査読有
 16. Matsuura A, Kinebuchi M. Ultra high-resolution imaging of copper accumulation by the nanobeam X-ray fluorescence. Proceedings of X-ray Imaging Optics 13: 25, 2015. 査読有
 17. 松浦晃洋, 杵渕 幸. ウィルソン病の病理診断. 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 29: 63-119, 2015. 査読有
 18. Matsuura A, Kinebuchi M. Synchrotron X-ray fluorescence microscopy of biological specimens: Basic instrument arrangement and a trial measurement. Photon Factory Activity Report 31: 309 2014. 査読有
 19. Matsuura A, Kinebuchi M. New age pathologists with the synchrotron: How to apply the synchrotron-based X-ray fluorescence analysis to pathological diagnosis. J Nanomed Nanotechnol 5: 121, 2014. 査読有
 20. 松浦晃洋 臨床研究と倫理的留意点 リハビリテーション医学 51:634-639, 2014. 査読有
 21. Matsuura A, Kinebuchi M. Refinement of X-ray fluorescence analysis of biological specimens. Photon Factory Activity Report 31: 315, 2014. 査読有
 22. Matsuura A, Kinebuchi M, Terada Y. Ultra high-resolution imaging of copper accumulation by nanobeam X-ray fluorescence. SPring-8 experiment summary report support project 2013 PartB: #31, 2014. 査読有
- (学会発表) (計 20 件)
1. Matsuura A, Kinebuchi M. Precise diagnosis of presymptomatic Wilson disease by integrating synchrotron X-ray. 16th International Symposium of Trace Elements in Man and Animals. Saint Petersburg, Russia. 2017 年 6 月 26-29 日
 2. Kinebuchi M, Matsuura A. Clinical evaluation of copper-histidine treatment for a genetic disease caused by a copper-transporter deficiency using synchrotron radiation-generated X-ray fluorescence. 24th International Conference of Optics. 東京大学本郷地区 東京 2017 年 8 月 21-25 日
 3. Matsuura A, Kinebuchi M. Diagnostic copper imaging of Wilson disease by synchrotron radiation X-ray fluorescence technique. 106th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology. 京王プラザホテル 東京 2017 年 4 月 27-29 日
 4. Kinebuchi M, Matsuura A. Menkes 病のヒスチジン銅による標準治療の限界はどこにあるか(中間報告). 第 21 回ウィルソン病研究会 東京 東邦大学 2017 年 5 月 20 日
 5. Matsuura A, Kinebuchi M. Diagnostic copper imaging of pathology examination by synchrotron-generated X-ray: basic principal and application to Wilson disease. 10th International Copper Research Meeting. Sorrento, Italy 2016 年 9 月 25-30 日
 6. Matsuura A, Kinebuchi M. Wilson disease in Japan: current status and challenge to copper detection by synchrotron X-ray. 105th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology 仙台国際センター 仙台 2016 年 5 月 1 日
 7. Matsuura A, Kinebuchi M. ヒト肝臓

- の銅蓄積は肝細胞傷害を引き起こすか？第 20 回ウィルソン病研究会 東京 東邦大学 2016 年 5 月 7 日
8. 田中一成、姜 貞憲、大森優子、田中伸哉、松浦晃洋、杵淵 幸。脳死移植待機中に心原死が疑われた Wilson 病の 1 剖検例。第 20 回ウィルソン病研究会 東京 東邦大学 2016 年 5 月 7 日
 9. Matsuura A, Kinebuchi M。放射光 X 線によるウィルソン病の高精度イメージング診断。(招待講演) 104th Annual Meeting of the Japanese Society of Pathology 名古屋 国際会議場 2015 年 5 月 2 日
 10. Matsuura A, Kinebuchi M。発症前ウィルソン病 1 家系の高精度診断の試み 第 19 回ウィルソン病研究会 東京 東邦大学 2015 年 5 月 9 日
 11. Matsuura A, Kinebuchi M。Challenge to copper detection in Wilson disease by synchrotron. Symposium Wilson disease. International Society for Trace Element Research in Humans. Dubrovnik, Croatia 2015 年 10 月 18-22 日
 12. Matsuura A, Kinebuchi M。Current status of Wilson disease in Japan: challenges toward precise diagnosis by synchrotron-generated X-ray. The 13th Symposium on X-ray Imaging Optics (招待講演) 名古屋 名古屋大学 Noyori ホール 2015 年 11 月 17-18 日
 13. 小林千夏、杵淵 幸、松浦晃洋、池田修一。進行肝硬変で発症した非典型的 Wilson 病と考えられる 39 才男性例(第 2 報)-遺伝子解析結果を中心に第 19 回ウィルソン病研究会東京 東邦大学 2015 年 5 月 9 日
 14. Matsuura A, Kinebuchi M。発症前ウィルソン病 1 家系の高精度診断の試み 第 19 回ウィルソン病研究会東京 東邦大学 2015 年 5 月 9 日
 15. Matsuura A, Kinebuchi M。Pathology of human elemental disorders: Medical application of synchrotron for dissecting pathogenesis and advanced diagnosis. The 1st SACLA Workshop on Femtosecond Crystallography. Kouto-Plaza, Harima Science Garden City, 兵庫 2015 年 3 月 26 日
 16. 松浦晃洋、杵淵 幸。蛍光 X 線を用いた銅イメージング 平成 26 年度新技術説明会 中部地区医療・バイオ系シーズ発表会 名古屋 吹上ホール 2014 年 12 月 10 日
 17. 松浦晃洋。臨床研究と倫理審査委員会 第 51 回リハビリテーション医学学術集

- 会 医療倫理・安全研修講演 (招待講演) 名古屋 国際会議場 2014 年 6 月 7 日
18. 松浦晃洋、杵淵 幸。ウィルソン病の高精度診断。(招待講演) 第 18 回ウィルソン病研究会 東京 東邦大学 2014 年 5 月 17 日
 19. 高曾根健、小林千夏、杵淵 幸、松浦晃洋、池田修一。肝生検で銅沈着を認めた非代償性肝硬変 39 才男性の一例。第 18 回ウィルソン病研究会 東京 東邦大学 2014 年 5 月 17 日
 20. Matsuura A, Kinebuchi M。New age pathologists with the synchrotron: How to apply the synchrotron-based X-ray fluorescence analysis to pathological diagnosis. Nanotek & Expo 2014 San Francisco, SA, USA. 2014 年 12 月 1-4 日

(図書) (計 1 件)

松浦晃洋、杵淵 幸。ウィルソン病診療ガイドライン 2015 児玉浩子編 診断と治療社 (産業財産権)

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

(その他)

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0091594>

<http://www.fujita-hu.ac.jp/teacher/medicine/ma/m-akihiro/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 晃洋 (MATSUURA, Akihiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70157238

(2)研究分担者

杵淵 幸 (KINEBUCHI, Miyuki)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：30244346

(3)連携研究者 (0)

研究者番号：

(4)研究協力者 (0)