

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659503

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Copper imaging of Wilson disease by synchrotron radiation 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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000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蛍光X線をエネルギー分散スペクトロメトリーで解析できるように、試料作成・光学集光素子・放射光の条件、検出機器・解析条件などを様々な角度で検討した。対照肝では銅シグナルが低いのに、ウィルソン病肝に極めて高い銅シグナルを検出できた。生化学的な定量と蛍光X線強度に相関がみられた。銅染色が完全陰性で、生化学的に大量の銅が検出された小児早期WD肝炎症例について、銅局在の画像化(銅イメージング)に成功した。ウィルソン病の早期高精度診断をサポートするまったく新しい原理に基づく銅元素のイメージング技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Wilson disease is an inherited disorder of copper overload that results in severe liver failure and neurological defects if untreated. Although effective treatments are available to prevent or reverse many manifestations, the diagnosis is often overlooked because of diverse symptoms and inevitable difficulties in laboratory tests; the failure of detecting disease-causing mutations in ATP7B genotyping and the failure or questionable biochemical tissue copper content using small needle biopsied specimens. To improve the diagnostic ability, we established a new element mapping technique by introducing a synchrotron-generated X-ray fluorescence into the pathological examination. The copper was readily detected in the tissue sections of WD livers which were negative for copper stainings. The sensitive and high-resolution copper visualization technique would provide a new tool for confirmative diagnosis and an insight into pathogenesis of tissue injury by copper.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：放射光 銅 組織 病理診断 発症機序 遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

Kinnier Wilson が百年前に報告したウィルソン病は神経精神症状に肝硬変を伴う致死性の重篤な疾患であった。キレート剤治療が奏功し良好な生命予後が期待できるようになった。遺伝性疾患としては日本人に比較的多い。最近、早期軽症例に遭遇することが増えてきており診断に苦慮することも少なくない。診断確定には肝臓の銅を原子吸光法や誘導結合プラズマ ICP 発光分析などの生化学的手法で測定しバルクな元素含有量を高感度で得ることができる。かなり専門的な機器で操作が難しくどこでも容易にできる訳ではない。一方、生検にて十分量が採取されなければ正確な測定が難しいが肝楔状切除は侵襲性が高く回避されがちである。針生検では量が少なく測定不能・疑問値となることが多い。試料は測定過程で灰化・燃焼され消失するため再検査できない。さらに、位置情報は全くえられない。組織切片を用いた銅染色は位置情報は得られるものの検出感度が著しく低く、リソソーム細胞小器官に局限して存在する場合しかほぼ検出できない。電子顕微鏡を用いた電子線プローブ微小分析 EPMA も感度が低く、特殊かつ複雑な試料作成が必要で、限られた領域しか観察できず、ごく一部にしか存在しないリソソーム銅を搜索するのは全く現実的とは言えなかった。

遺伝子検査に大きな期待寄せられたが、実際には臨床的に明らかな WD 症例であっても変異が検出されないことがあり、他の疾患を必ずしも否定できない。確定診断できないウィルソン病がかなりある。確実な診断法の開発が喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

日本が世界最高レベルにあるシンクロトロン放射光を銅代謝異常ウィルソン病の診断と病態解明に応用することを目的とする。

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。症状が軽い小児ウィルソン病(早期・発症前)を確実に捕捉する。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。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、生検が行われることが多い。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と量の情報を持って検出できれば、侵襲性をあげずに組織診断が可能となる。遺伝子診断の正確度をあげることに併せて、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。

銅代謝の異常のない組織とその極端な異常を比較することでウィルソン病という古

い病気に新しい解析手段と疾病発症機構へ新しい視点を提供する。最終的には、放射光科学と医学の融合し、放射光病理学という新しい学際領域の創設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

高輝度の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。第三代放射光は検出感度が高いので、薄切片でもシグナルが検出できると予想した。実際に用いるには試料作成方法(固定の有無、凍結、固定の種類、処理過程、包埋材、切片作成、支持膜)、X 線ビーム条件(エネルギー、焦点絞り法)、試料台(ビームとの角度、スキヤン法)、検出機器(種類 SSD, SDD, 検出条件、距離)、画像化(pixel size, detection area 条件、データ収集と抽出、スペクトル解析、画像作成プログラムの開発)について検討を加え、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解析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、通常より長い範囲を繰返し配列を読んでゲノム情報を得る。

(3) 生化学的定量と組織染色

試料が十分得られた場合には、原子吸光 AAS や ICP 発光分析を行い、測定用試料作成の元素濃度に与える影響を検討した。組織切片の銅染色を行い、銅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、銅を元素測定の対象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剖検症例および肝移植ドナー(ATP7B 変異保因者でない)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 50ug/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が、胆汁うっ滞を来した肝臓でも 70 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極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見られた。一方、ウィルソン病 w1 では極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て、元素毎に画像を作成した。Image J および IGOpro を用いてプログラムを作成した。共局在を可視化するため、Zeiss 社のソフトを用いた。実際には、光子数の絶対値そのものよりむしろピクセルで構成される組織や細胞構築で隣接する構造との差があると濃淡が付くためとカウント数そのものが必ずしも高くなくとも画像化は十分に行えるとの感触を得た。画像化に向けた測定至適条件が得られたと考える。また、病期で肝細胞内の銅の分布が変化することがあるとの感触を得たので、今後、症例を重ねて病型や遺伝子型との関係を検討する。組織においてシグナルのある部位を探してから詳細にみることで効率的に測定できる。測定部位の選定は経験が必要である。

(3) 銅イメージング

これまで 9 例の明らかなウィルソン病肝を測定した。肝実質に強い銅シグナルが存在した。門脈域・間質のシグナルは相対的には低いが非ウィルソン病症例(ウイルス性肝炎・肝硬変、自己免疫肝炎)はシグナルが弱くほぼ意味のある像が病臥できないのと比べると、かなり強いシグナルがある。肝硬変例においても例外なく銅シグナルが得られた。銅染色では進行した肝硬変期になって探してようやく分かる程度の少ない顆粒がみられのみで、肝炎期では全く検出できなかった。放射光 X 線を用いた銅イメージングが銅蓄積を証明する有力な診断根拠を提供する。陰性例が 1 例もなかったのは特記すべきである。

(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。かなり気をつけても約 15% の症例の片方ないし両方のアレルに病原変異が見つからなかった。本研究が開始してからの期間でも 13 例中 2 例で変異が確定できなかった。

(5) 統合確定診断の試み

特に、小児科領域の WD は症状が無いがごく軽度で、風邪や肺炎で入院した際に、偶然肝機能障害がみつきり、それが遷延しウイルス

や薬剤などの原因がないことからようやく疑い、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)にて、精査を依頼される例がほとんどである。この場合、生化学的定量に十分な量を採取するため肝楔状生検を行うことは本人、両親、主治医も躊躇しがちである。遺伝子変異が片方のアレルにしかない発症前症例について、針生検を行った。微量のため生化学的解析はできなかったが、組織学的検索と合わせて微小領域の蛍光 X 線分析を行った。対照 7 例の平均的シグナル強度と比較して約 20 倍のシグナルがあり、保因者ではなくウィルソン病患者と診断して早期に治療を開始した。放射光 X 線をうまく用いると早期診断に役立つ。また、両方のアレルに変異の検出されない原因不明の慢性肝不全で肝硬変を伴う症例では硬変結節に銅が多く検出された。ウィルソン病ないし WD 以外の銅代謝異常症と考えている。蛋白・RNA・DNA の解析が進行中である。

以上から、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効率よく至適条件の設定ができた。検出感度は施設によってやや異なるが測定設定や試料条件を改良しどちらでも測定自体は可能となった。解像度・検出範囲が異なるので目的に応じた使い分けが重要である。微小領域に局在する銅の量が極めて少ないことが判明した。通常の鉍物測定に使う標準試料では全く参考にならない。ヒト試料測定時に得られる光子カウント数を与える濃度の目安がついたので、絶対値測定のため、多数のための標準試料を作成中である。

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ヒトゲノム・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 6 件)

松浦晃洋：臨床研究と倫理委員会-リハビリテーション医学領域研究の倫理的留意点
リハビリテーション医学 印刷中 査読無

Matsuura A, Kinebuchi A: Refinement of synchrotron X-ray fluorescence procedure for measurement of trace elements in human liver. PF Activity Report in press. 査読有

Matsuura A, Kinebuchi M, Terada Y: Ultra high-resolution imaging of copper accumulation by the nanobeam X-ray fluorescence. SPring-8 experiment summary report support project 2013 (成果公開優先利用課題実験報告書 2013A1010, Spring-8 online-access 2013) 査読有

Matsuura A, Kinebuchi M, Terada Y:

Copper imaging by microbeam X-ray fluorescence analysis for diagnosis of presymptomatic Wilson disease. SPring-8 experiment summary report support project 2012 (成果公開優先利用課題実験報告書 2012B1002, Spring-8 online-access 2013) 査読有

Matsuura A, Kinebuchi M, Terada Y: Trace elements in the livers of Wilson disease with acute hepatic failure: Spring-8 Research report of nanotechnology support project 2011 (重点ナノテクノロジー支援課題 成果報告書 2011B1715, Spring-8 online-access 2012) 査読有

松浦 晃洋: 倫理委員会に関する諸問題: G「迅速審査」メデカルエシックス 44 医学系大学倫理委員会連絡会議編、p75-81, 2012 査読無

[学会発表](計 10 件)

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会学術集会 医療倫理・安全研修講演、名古屋 6 月 7 日、2014

松浦晃洋、杵淵 幸: ウィルソン病の高精度診断 第 18 回ウィルソン病研究会 特別講演、東京 5 月 17 日、2014 (第 18 回ウィルソン病研究会誌 p11 2014)

小林千夏、高曽根健、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 歳男性の一例 第 18 回ウィルソン病研究会 口演、東京 5 月 17 日、2014(第 18 回ウィルソン病研究会誌 p5 2014)

松浦晃洋、杵淵 幸、乾あやの、藤澤知雄、北澤淳一: 幼児発症前ウィルソン病: 統合診断の重要性 第 17 回ウィルソン病研究会 口演、東京 5 月 18 日、2013 (第 17 回ウィルソン病研究会誌 p2 2013)

松浦晃洋、杵淵 幸、鎌田義正: 発症前ウィルソン病: 遺伝子変異・生化学的解析と放射光 X 線による統合診断 第 102 回日本病理学会学術集会 口演、札幌 6 月 7 日、2013 (第 102 回日病誌 p110 2013)

松浦晃洋、杵淵 幸: 微量元素と健康-放射光による組織元素イメージングの確立と遺伝病への応用、シンポジウム講演、Spring-8 ヘルスケア研究会(第 13 回)大阪、大阪大学銀杏会館、12 月 4 日、2012 (Spring-8 ヘルスケア研究会第 13 回報告書、Spring-8 online-access)

Matsuura A, Kinebuchi M: Early diagnosis of pediatric patients with Wilson disease by synchrotron copper imaging, UVSOR STXM Users Meeting, oral presentation. Okazaki, NIMS Okazaki Conference Center June 4, 2012

杵淵 幸、松浦晃洋、乾あやの、藤澤知雄: ウィルソン病銅過剰症の組織評価-針生検による迅速診断を試みた 1 例 第 16 回ウィルソン病研究会 口演、東京 5 月 12 日、

2012 (第 16 回ウィルソン病研究会誌 p15 2012)

松浦晃洋、杵淵 幸: 第 3 世代放射光による組織元素イメージング-遺伝病解析への応用 シンポジウム講演、SPring-8 安全安心のための分析評価研究会(第 6 回) 私たちの体の安全安心のための分析評価 東京、東京理科大学森戸会館、4 月 28 日、2012 (Spring-8 安全安心評価研究会第 6 回報告書、Spring-8 online-access)

松浦晃洋: 倫理委員会に関する諸問題: 迅速審査 招待講演、第 44 回医学系大学倫理委員会連絡会議 岡山、岡山大学、2 月 3 日、2012

[図書](計 4 件)

松浦晃洋、杵淵 幸: 病理診断 Wilson 病診療ガイドライン 2014 印刷中

杵淵 幸、松浦晃洋: 胸腺の腫瘍 器官病理学 改訂第 14 版 笠原正典・石倉浩・佐藤昇志編 南山堂 p304-314, 2013

杵淵 幸: 縦隔 器官病理学 改訂第 14 版 笠原正典・石倉浩・佐藤昇志編 南山堂 p390-398, 2013

松浦晃洋: 多臓器機能不全症候群 器官病理学 改訂第 14 版 笠原正典・石倉浩・佐藤昇志編 南山堂 p975-985, 2013

[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

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