

Morphologic Examination of Copper Granules in Hepatocytes of Various Hepatobiliary Diseases with Emphasis on their Pathologic and Diagnostic Significance

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7916

各種の肝・胆道系疾患における肝細胞内銅顆粒に関する研究

— その病的および診断学的意義を中心に —

金沢大学医学部第二病理学講座 (主任: 太田五六教授)

宮 村 肇

(昭和62年1月6日受付)

各種の肝・胆道系疾患 721 例の肝をパラジメチルアミノベンチリデンロダニン銅検出法 (ロダニン銅検出法) で染色し, 肝細胞内に沈着する銅顆粒を検索した。なお, ロダニン銅検出法陽性の銅顆粒の沈着程度は, 肝組織内銅量を良く反映した。銅顆粒が主に肝小葉や再生結節の辺縁部の肝細胞の核周囲に染まるものと, 肝細胞の毛細胆管周囲に染まるものがあった。Wilson 病の 1 例では核周囲性のものと毛細胆管周囲性のものが混在し, 他の銅顆粒陽性例はすべて核周囲性のものであった。銅顆粒陽性例を, 以下の 4 群に分類できた。1. 原発性胆汁性肝硬変, 原発性硬化性胆管炎, Alagille 症候群では, 銅顆粒沈着は高率で (胆道系疾患高率群), 病期の進行した例で高度であった。2. 肝外閉塞性黄疸 (ほとんどが急性例) では低率かつ軽度であった (胆道系疾患低率群)。3. 肝硬変, 慢性活動性肝炎, アルコール性肝線維症では低率かつ軽度であった (肝疾患低率群)。いずれも小葉改築の進行した例にみられた。4. Wilson 病の 1 例では, 中等度の沈着がみられた。胆道系疾患高率群では, 黄疸陽性例全例に中等度～高度の銅顆粒がみられ, 無黄疸例でも半数以上の例に銅顆粒がみられた。一方, 胆道系疾患低率群では, 黄疸例の一部にのみ銅顆粒がみられた。肝疾患低率群では, 黄疸の有無と銅顆粒沈着の間に関連性はなかった。これらの所見より, 胆汁うっ滞, その持続期間, 胆管系の障害部位とその程度, 肝線維化, 肝細胞障害が複合的に銅顆粒沈着に関連すると思われる。以上より, 各種肝・胆道系疾患で, 種々の頻度で銅顆粒が検出され, その出現状態と病的意義に差があり, 肝生検診断に有用と考えられた。

Key words 肝細胞内銅顆粒, 胆汁うっ滞, 肝生検, 銅代謝

銅は生理的に体内に存在する必須微量元素の 1 つであり, 主として十二指腸から吸収され, 比較的急速に肝に取り込まれ, ceruloplasmin や cytochrome oxidase などの銅結合蛋白に利用される。そして, そのほとんどが胆汁中に排泄される¹²⁾。肝は銅代謝の中心的臓器であり, 銅の先天性代謝異常の Wilson 病で肝障害がみられ, また, 種々の肝・胆道系疾患においても銅代謝異常が出現し, 特に原発性胆汁性肝硬変 (PBC) で大量の銅が肝組織内に沈着することが知られている¹¹⁻¹²⁾。とくに近年, Sipponen⁷⁾, Nakanuma⁸⁾により, 肝細胞内で銅がメタロチオネインと結合し, この銅結合性蛋白質が Shikata¹³⁾のオルセイン染色で染まることが明らかとなり, また肝組織内銅量が原子

吸光法により比較的容易に定量出来る様になって, 肝組織内の銅沈着の機序と意義が注目されている¹¹⁻¹²⁾。しかし, 多くの報告は PBC や Wilson 病などの 2, 3 の肝・胆道系疾患に限られている。

そこで今回, 著者は, 日常しばしば経験する各種の肝・胆道系疾患を対象とし, 肝細胞内に銅が組織化学的にどの程度, どの様に染まるかを知り, 肝・胆道系疾患における銅代謝の異常の一端を知ろうと試み, さらに銅の沈着像が肝の病理形態診断に有用かどうかを検討した。従来, 肝組織内の銅の染色方法として, 岡本らのパラジメチルアミノベンチリデンロダニン銅検出法 (ロダニン銅検出法), ルベアン銅検出法, Timm 銅検出法などが知られている¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。ルベアン銅検出

Abbreviations: CAH, chronic active hepatitis; CPH, chronic persistent hepatitis; HBsAg, hepatitis B surface antigen; m.±S.D., mean±standard deviation; PBC, primary biliary cirrhosis; PSC, primary sclerosing cholangitis

法は特異性は高いが、検出感度がかなり低い。また、Timm 銅検出法は、検出感度は非常に高いが、銅以外の金属、例えば鉄や亜鉛なども可染される¹⁰⁾¹⁴⁾。そこで、今回の研究では、ある程度の染色感度と特異性のあるロダニン銅検出法を用いた。さらに、肝組織内銅量を原子吸光法により化学的に定量し⁴⁾¹⁶⁾、また銅結合蛋白を染めるオルセイン染色、および X 線微量分析法³⁾¹⁷⁾も同時に行い、肝細胞に沈着する銅の病的意義の検討を行った。

対象および方法

昭和 58 年 1 月から昭和 61 年 9 月までに、金沢大学医学部第二病理学教室に診断目的に送られて来た肝生検 557 例（針生検肝 552 例と外科的生検肝あるいは部分的外科切除肝 5 例）および金沢大学医学部中検病理、福井県立病院、黒部市民病院の最近の一部の生検肝 164 例（針生検肝 77 例と外科的生検肝あるいは部分的外科切除肝 87 例）を対象とした。なお、一部の症例では重複して肝生検が行われた。生後 6 ヶ月以内の新生児の肝細胞内には、生理的に銅顆粒が染色され、銅顆粒沈着の病的解釈が困難とされているので²⁾⁹⁾、本研究ではいずれも 5 才以上の小児及び成人例を対象とした。いずれも 10%中性ホルマリン固定後パラフィン包埋されたものであり、5 μ 切片を作製し、ルーチンの HE 染色、アザン・マロリー染色、ゴモリの鍍銀染色の他に、後述のオルセイン染色と銅染色を行った。肝生検の病理形態学的診断は、臨床所見および生化学的所見を考慮して行った。慢性肝炎は国際分類¹⁾³⁾に従い、慢性活動性肝炎 (CAH) と慢性持続性肝炎 (CPH) に二分し、CAH はさらに Scheuer¹⁾⁹⁾に従い門脈域相互あるいは門脈域と中心静脈とを結ぶ隔壁の無い軽度群と種々の程度にこれらの隔壁を示す中等度～高度群とした。アルコール性肝障害は文部省科学研究費総合研究班 (班長 武内重五郎教授)²⁾⁰⁾に従い、脂肪肝、アルコール性肝炎、アルコール性肝線維症、アルコール性肝硬変とした。アルコール肝線維症をさらに隔壁形成のない軽度群と種々の程度の隔壁形成や不完全な結節形成を示す中等度～高度群に二分した。なお、アルコール性脂肪肝は他の原因による脂肪肝に含め検討した。PBC の病期は、太田ら²⁾¹⁾に従い、無線維化期、線維化期、肝硬変期とした。原発性硬化性胆管炎 (PSC) の病期に関しても、PBC のそれに従い無線維化期、線維化期、肝硬変期とした。肝外閉塞性黄疸は、黄疸の持続期間が一カ月未満のものと、一カ月以上のものに二分した。オルセイン染色は Shikata らの変法¹⁾³⁾に従った。つまり、5 μ のパラフィン切片を型の如く脱パラシ、0.3%過マンガン酸液で前処理 (30 秒～1 分) し、

1.5%修酸で脱色後、オルセイン溶液 (70%アルコール溶液 100 ml + 0.2 g のオルセイン + 濃塩酸 0.8 ml) に 2 時間反応させ、70%アルコールで分別し、脱水、封入し、鏡検した。そして、肝細胞内の境界の鋭利な濃く染まる黒褐色～赤褐色の顆粒物を陽性とし、今回の検索対象とした。銅染色としてロダニン銅検出法¹⁾⁴⁾を用いた。つまり、5 μ のパラフィン切片を型の如く脱パラシ、新調した染色液 (7%酢酸ナトリウム 100 ml + パラジメチルアミノベンチリデンロダニン 飽和アルコール液 3 ml) に 36°C で 24 時間～48 時間反応させた。その後、蒸留水で水洗後、ヘマトキシリンで核染色し、脱水、封入を行って鏡検し、赤褐色～赤紫色に染まる顆粒物を銅陽性とした。なお、同染色法では、銅以外の水銀、銀、パラジウム、金、白金等の金属化合物も陽性反応を示すが、蒸留水 100 ml + パラジメチルアミノベンチリデンロダニン飽和アルコール溶液 5 ml + 1N 硝酸 3 ml + 3%過酸化水素 5 ml の染色液では、銅は反応せず、その他の上述の金属は反応する¹⁾⁴⁾。そこで、化学定量的およびロダニン銅検出法で大量の銅を認めた PBC 3 例と Wilson 病の 1 例を上記対照反応液内で反応させたが、陰性であり、ロダニン銅検出法で反応する物質を銅と判断した。なお、肝細胞がびまん性に淡く赤褐色に染まる症例が、PBC、PSC、Wilson 病でしばしば見られたが、いずれも銅顆粒沈着高度例であり、媒染の可能性もあり、今回の研究では陽性とはしなかった。銅染色とオルセイン染色の陽性対照として PBC 剖検肝 (後述の化学的定量により 1331 μ g/g dry liver の銅量を示す。なお、正常値は 22.9～52.1 μ g/g dry liver) の肝切片を用いた。また、銅顆粒とオルセイン陽性顆粒の沈着程度を、以下の如く半定量的に表現した。すなわち、全く染まらないものを陰性、肝小葉あるいは再生結節の辺縁部の一部の肝細胞に陽性顆粒を認めるものを軽度、肝小葉あるいは再生結節の辺縁部のほとんどの肝細胞に陽性顆粒を認めるものを高度とし、その中間のものを中等度とした。

組織化学的に中等度～高度の銅顆粒の沈着が見られた PBC 6 例では、肝生検採取時に、肝組織片の一部を冷 2.5%グルタルアルデヒド内で細切し、同固定液で 1～2 時間固定。冷オスミウム酸で後固定し、型の如く脱水し、酸化プロピレン置換後、EPON812 に包埋した。トリミング後、LKB-4800 で超薄切片を作製し、クエン酸鉛および酢酸ウラニールの二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (JEM 100B) で観察した。さらに、これらの 6 症例を用い、X 線微量分析法で二次 X 線の分析を行った。すなわち、EPON 包埋ブロックより 0.5 μ 切片を作製し、金メッシュに載せ、Hitachi

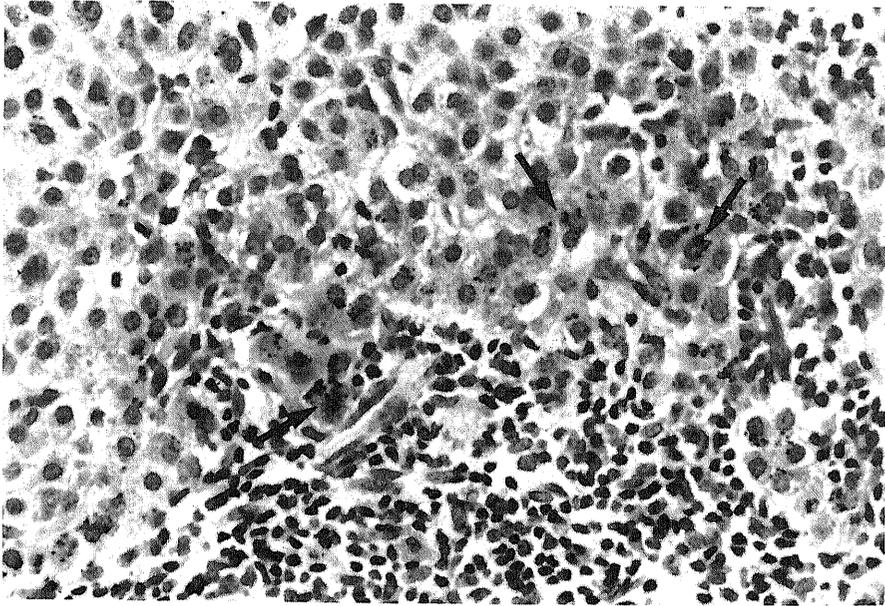


Fig. 1. Copper granules (arrows) are seen in the hepatocytes of the periportal area. These granules are gathered around the nucleus. Primary biliary cirrhosis (fibrotic stage). Rhodanine stain, $\times 160$.

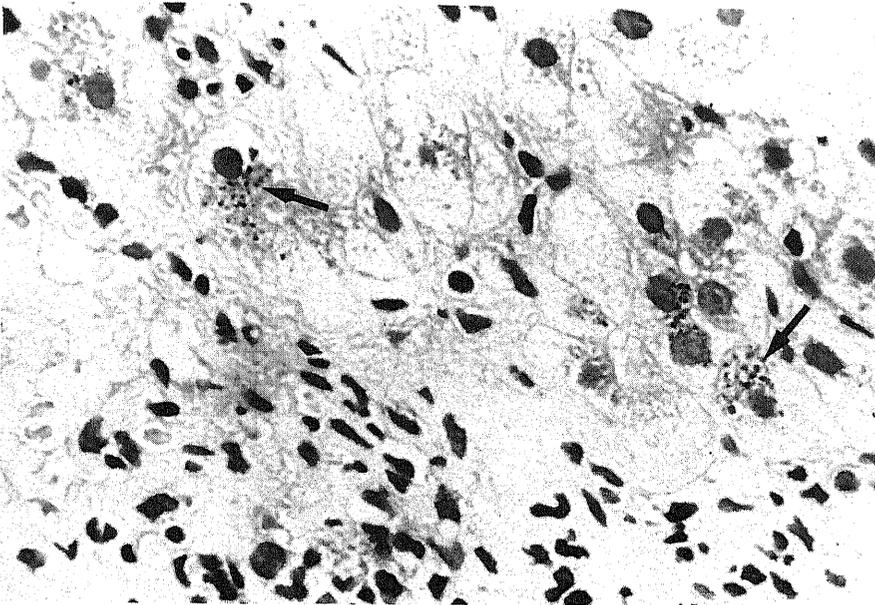


Fig. 2. Copper granules (arrows) are seen in the cytoplasm, especially around the nucleus, of the hepatocytes in the periportal area. Liver cirrhosis (alcoholic). Rhodanine stain, $\times 325$.

KeveX 7000 (加速電圧 75 keV) で二次 X 線を検出した³⁾¹⁷⁾。

PBC 44 例, 肝外閉塞性黄疸 2 例, Wilson 病 1 例では, 肝生検時の一部の肝組織を, 対照として正常成人剖検肝 6 例の肝組織を用い, 以下の如く肝組織内銅量の定量を行った⁴⁾¹⁶⁾。採取した肝組織をデシケータ内で乾燥させ, 乾燥肝重量を求めたのち, 乾燥肝を硝酸・過塩素酸 (4 : 1) 混合液中で溶解させた。これを脱イオン化した蒸留水で 200 ml にメスアップし, これを試量とした。銅定量方法として, 銅標準液 1 mg/ml (関東化学 KK 製) を, 1N-HCl で 2.5, 5.0, 7.5 μ g/ml に希釈し, 添加用銅標準液とした。試量より, 4 本の試験管にそれぞれ 2.0 ml ずつ分取し, その分取液に 2.5, 5.0, 7.5 μ g/ml の銅標準液を 100 μ l ずつ添加し, この混合液を原子吸光分光光度計 (Instrumentation Laboratory 社製, IL-251 型) にかけて, それぞれの吸光度を波長 324.7 nm で測定した。各液の吸光度と単位試量当たりの銅添加量を方眼紙にプロットし, 試料中の銅添加量を読み取った。なお, 銅の測定はメディカルサイエンス特殊分析室 (東京都) の協力を得て行った。

推計学的処理は, χ^2 検定および Spearman の順位相関係数で行い, 危険率が 0.05 以下をもって有意差あり

と判断した。

成 績

I. 肝細胞内の銅顆粒沈着

ロダニン銅検出法で陽性に染まる銅顆粒の染色パターンには, 次の 2 種類がみられた。第一のものは, 核周囲性に数個から多数の微細ないし粗剛な顆粒として見られ, 主に肝小葉や再生結節辺縁部に見られた (I 型) (図 1, 2)。細胆管様に変化した肝細胞や食細胞にも同様の銅顆粒がわずかに認められた。その他の細胞は陰性であった。電顕的には, 大きさ 0.5~3 μ の電子密度の高い円形~楕円形~不整形の二次ライソゾームとして見られ (図 3), 明らかな限界膜を持つものもあった。X 線微少部分分析法で, このライソゾームを分析すると, 図 4 a に示す如く, 銅の特異的二次 X 線である $K\alpha$ 線 (8.074 keV) が検出され, 硫黄の特異的二次 X 線の $K\alpha$ 線 (2.307 keV) も同時に検出された。しかし, これらの二次 X 線の高さは, 顆粒により, また同じ顆粒でも部位によって異なり, 硫黄は検出されるが銅が殆ど検出されないものもあった (図 4 b)。なお, 銅と硫黄の特異的二次 X 線の他に, オスミウム, 金, マグネシウム, クロールの二次 X 線も同時に検出された。

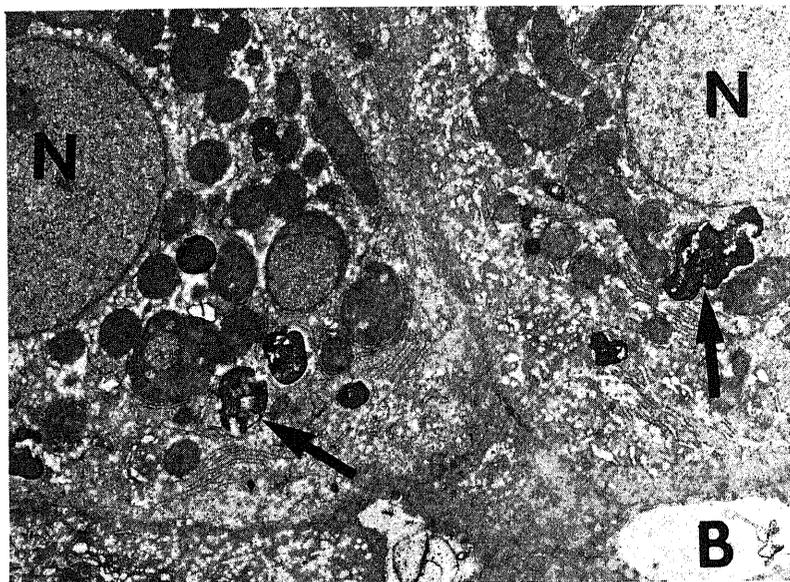


Fig. 3. Secondary lysosomes (arrows) with a variable shape and electron density are seen in the cytoplasm of hepatocytes. N: Nucleus of hepatocytes, B: bile canaliculus. Primary biliary cirrhosis. Uranyl-acetate and lead citrate double stain, $\times 5,000$.

他の一つは、主に毛細胆管周囲の細胞質内に微細顆粒状に見られるものであり (II型) (図5, 6), 小葉辺縁部に強い傾向があった。なお, II型に関しては、電顕的観察やX線微少部分分析法による二次X線の分析は行っていない。

検索した721例中89例に肝細胞内銅顆粒が陽性であった。Wilson病の1例 (組織学的に、小葉改築傾向をともなったCAHの像, 26才男性) でのみ, I+II型の染色パターン (図6, 7) であったが、他の88例は、すべてI型のみ染色パターンを示した。

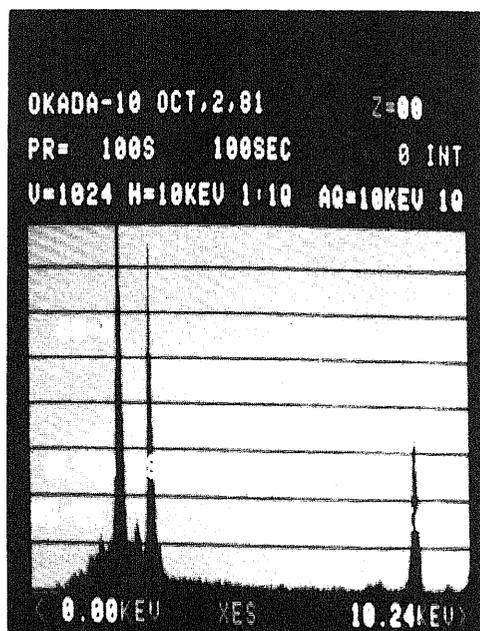
銅染色陽性を示した疾患を胆道系疾患群 (表1-A) と非胆道系疾患群 (表1-B) に分け、その陽性率と陽性程度を検索した。胆道系疾患群では、PBC, PSC, Alagille症候群でそれぞれ、60.3%, 75%, 100%と高率に銅顆粒が見られた (胆道系疾患高率群)。とくに、PBCとPSCでは、いずれも病期の進展した症例で陽性率が高く、中等度以上の症例が多く見られた。病期の進展していない無線維化期では、陽性率が低く (23.1%), 全例軽度例であった。なお、Alagille症候群の2例は、いずれも線維性隔壁形成の目立つ前肝硬変

状態の肝であった。一方、肝外閉塞性黄疸では、銅沈着率は12%と低率であり (胆道系疾患低率群)、黄疸持続期間が1カ月未満では5.9%であり、1カ月以上では8例中2例 (黄疸持続期間が3カ月と3年半で、肝の線維化がかなり進展していた) に見られ、黄疸期間のやや長い症例で陽性率が高かった。高度沈着例は見られなかった。なお、原因を明らかにし得なかった胆道障害を伴った肝線維症でも4例中2例に銅顆粒の沈着が見られた。

次に非胆道系疾患で銅顆粒を認めた疾患を表1-Bに示す。肝硬変, CAH, アルコール性肝線維症, 薬剤性胆汁うっ滞で、それぞれ19.4%, 11.7%, 7%, 18.2%と低率に銅顆粒の沈着があり、殆どは軽度例であった。わずかに肝硬変の1例とアルコール性肝線維症の1例で中等度の沈着が見られた。なお、銅顆粒沈着を示した薬剤性胆汁うっ滞の2例は、いずれも小葉間胆管の消失と壊死所見を認めた。これらの内で、症例数の多い肝硬変, CAH, アルコール性肝線維症を、肝疾患低率群として一括し、以下の検索に用いた。一方、Wilson病では、銅顆粒が中等度に陽性であり、肝小葉毎に全



(a)



(b)

Fig. 4. Display of characteristic X-ray images in electron dense granules (lysosomes) in the hepatocyte of a patient with primary biliary cirrhosis. AL-KA: $K\alpha$ ray of aluminium, OS-M: M ray of osmium, S-KA: $K\alpha$ ray of sulphur, CL-KA: $K\alpha$ ray of chlorine, CA-KA: $K\alpha$ ray of calcium, CU-KA: $K\alpha$ ray of copper, OS-LA: $L\alpha$ ray of osmium, Au: gold. Fig. 4-A shows a considerable level of CU-KA, but Fig. 4-B discloses a negligible peak of CU-KA.

く陰性のものと高度に陽性のものとが混在していた(図5)。なお、原因不明の肝線維症2例中1例で軽度の銅顆粒の沈着が見られた。

なお、表2に示した各種の肝・胆道系疾患総計362例

では銅顆粒は全く染色されなかった。

つぎに、銅顆粒の沈着と黄疸(身体所見上、黄疸を認めたもの、あるいは血中ビリルビンが2 mg/dl以上のも)との関連性を検討した。

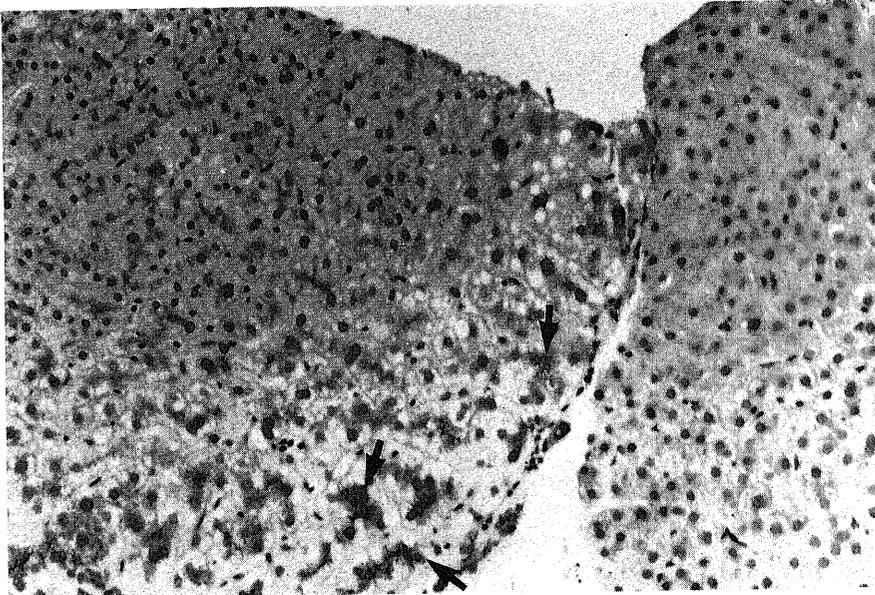


Fig. 5. Copper granules (arrows) are seen in the left hepatic lobule, but absent in the right one. Wilson disease. Rhodanine stain, $\times 80$.

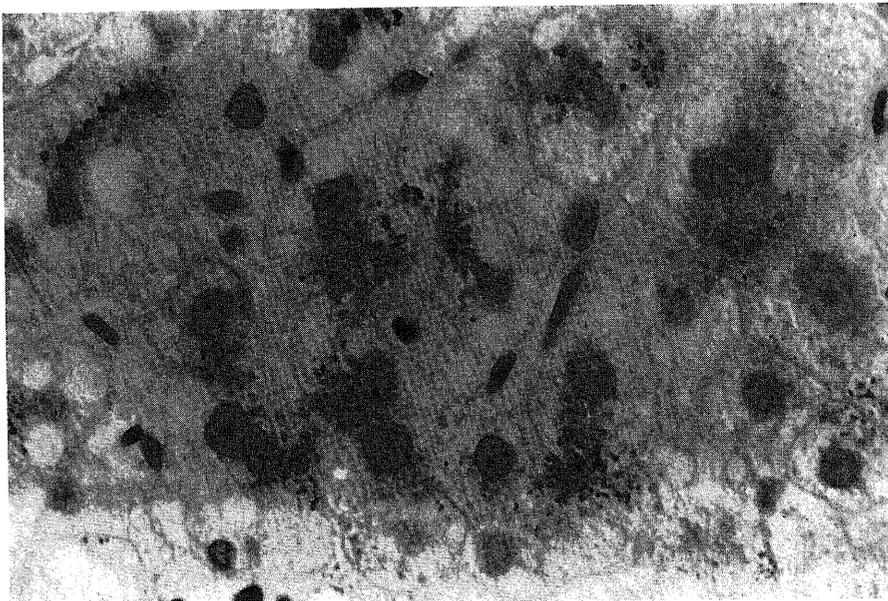


Fig. 6. Copper granules are gathered around bile canaliculi. Wilson disease. Rhodanine stain, $\times 325$.

先ず、胆道系疾患高率群では、表3の左側に示す如く、黄疸陽性例全例で銅顆粒の沈着があり、その殆どが中等度以上の沈着を示した。さらに、無黄疸例でも、その半数の症例で銅顆粒の沈着がみられ、多くは軽度例であった。一方、胆道系疾患低率群では、銅顆粒沈着は黄疸陽性例の極く少数例にみられた。肝疾患低率群では、銅顆粒沈着は無黄疸例で10.2%、黄疸例で17.4%であり、有意差はなかった。なお、中等度の沈着を示したWilson病では、黄疸は認められなかった。

銅顆粒沈着と肝組織内の胆汁栓形成との関連性を表4に示す。胆道系疾患高率群では、胆汁栓陽性例でいずれも中等度以上の銅顆粒の沈着がみられ、胆汁栓陰性群でも73例中40例(54.8%)に種々の程度の銅顆粒の沈着がみられた。胆道系疾患低率群では、胆汁栓陽性の一部の症例にのみ銅顆粒を認めた。一方、肝疾患低率群では胆汁栓形成と銅顆粒沈着との間に関連性は認められなかった。

II. 肝細胞内の銅顆粒沈着と肝組織内銅量

正常成人剖検肝6例の肝組織内銅量は、40.1, 40.8, 33.5, 30.4, 50.9, 30.4 $\mu\text{g/g}$ dry liver (m. \pm S.D. は、 37.5 ± 7.25)であった。そこで、正常肝のm. \pm 2S.D. ($22.9 \sim 52.1 \mu\text{g/g}$ dry liver)を正常範囲とした。肝組織内銅量と肝細胞内銅顆粒の沈着程度との関連性を図8に示した。肝細胞内銅顆粒陰性例(19例)では $91.5 \pm 45.5 \mu\text{g/g}$ dry liver、軽度陽性例(9例)

$141.7 \pm 80.1 \mu\text{g/g}$ dry liver、中等度陽性例(13例) $259 \pm 88.0 \mu\text{g/g}$ dry liver、高度陽性例(6例) $1033 \pm 635 \mu\text{g/g}$ dry liverであった。Spearmanの順位相関係数は $\rho = 0.9964$ で銅顆粒沈着程度と肝組織内銅量との間に正の関連性がみられた($p < 0.01$) (図8)。なお、Wilson病の1例は $134 \mu\text{g/g}$ dry liverであった。

III. 肝細胞内銅顆粒とオルセイン陽性顆粒との関連性

オルセイン染色で、銅顆粒と同一の染色態度を示す陽性顆粒が、肝小葉および再生結節の辺縁部の肝細胞の核周囲に見られた(I型)(図9, 10)。また、Wilson病の1例では、このI型の染色パターンに加え、銅顆粒のII型に相当する毛細胆管周囲性のオルセイン陽性顆粒もみられたが(図11)、その染色性はI型に較べやや淡く、境界はやや鈍であり、やや小型のものが多かった。表5左側に示す如く、銅顆粒陽性疾患において、銅顆粒の沈着程度とオルセイン陽性顆粒の沈着程度とは殆どの症例で一致した。銅染色陽性例は、全例オルセイン陽性顆粒がみられたが、銅顆粒陰性でオルセイン顆粒陽性例が少数例みられた。また、銅顆粒の沈着程度に較べ、オルセイン陽性顆粒の沈着の多い症例が少数みられた。一方、銅顆粒陰性疾患においては、362中僅か5例に極く軽度のオルセイン陽性顆粒がみられた(表5, 右側)。この顆粒状の陽性物質の他にも、封入体様のオルセイン陽性物質(HBs抗原)や肝小葉内

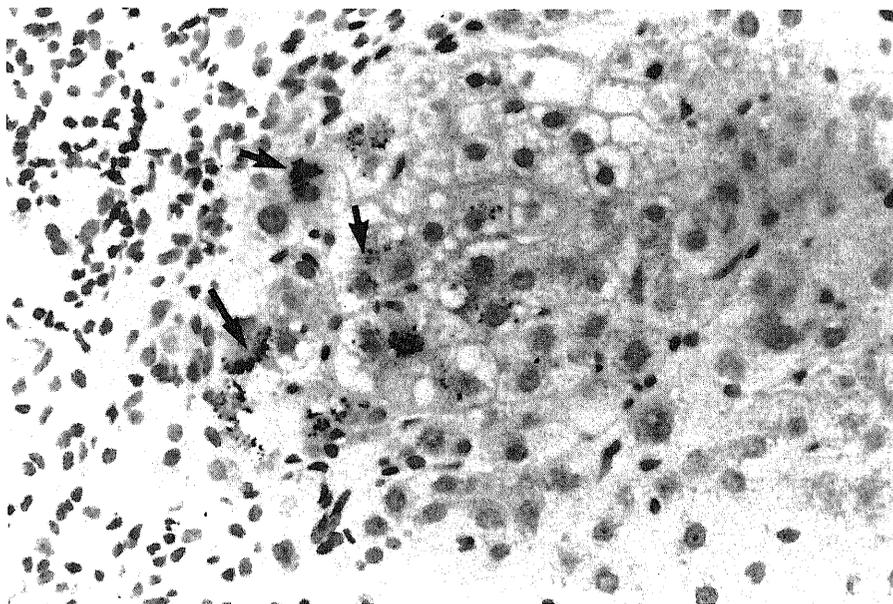


Fig. 7. Copper granules are seen in the perinuclear area (short arrows) and in the pericanalicular area (long arrows) of the periportal hepatocytes. Wilson disease. Rhodanine stain, $\times 160$.

不規則に分布するポフスチン様の陽性顆粒（しばしば、空胞形成がみられ、染色程度が種々）もみられたが、今回の検索対象とはしなかった。

考 察

銅は広く生体内の諸臓器に分布しており、その全含

Table 1-A. Biliary disorders associated with copper granules in liver cells

Liver Disorder	No. of Biopsies	No. of Positive(%)	Quantity of Copper Granules		
			Light	Moderate	Heavy
Primary biliary cirrhosis	78	47(60.3)	19	15	13
Non-fibrotic stage	26	6(23.1)	6	0	0
Fibrotic stage	49	38(77.6)	12	15	11
Cirrhotic stage	3	3(100)	1	0	2
Primary sclerosing cholangitis	8	6(75)	2	3	1
Non-fibrotic stage	1	0(0)	0	0	0
Fibrotic stage	7	6(85.7)	2	3	1
Cirrhotic stage	0				
Extrahepatic cholestasis	25	3(12)	2	1	0
<1 month(duration of jaundice)	17	1(5.9)	1	0	0
≥1 month(")	8	2(25)	1	1	0
Alagille syndrome	2	2(100)	0	0	2
Biliary fibrosis of unknown etiology	4	2(50)	1	0	1

Table 1-B. Non-biliary disorders associated with copper granules in liver cells

Liver disorders	No. of Biopsies	No. of Positive(%)	Quantity of Copper Granules		
			Light	Moderate	Heavy
Liver cirrhosis (non-biliary)	31	6(19.4)	5	1	0
Alcoholic	6	2(33.3)	1	1	0
viral	21	4(19.0)	4	0	0
others	4	0(0)	0	0	0
Chronic active hepatitis	111	13(11.7)	13	0	0
Mild	25	0(0)	0	0	0
Moderate to severe	86	13(15.1)	13	0	0
Alcoholic fibrosis	86	6(7.0)	5	1	0
Mild	50	0(0)	0	0	0
Moderate to severe	36	6(16.7)	5	1	0
Drug-induced cholestasis	11	2(18.2)	1	1	0
Wilson disease	1	1(100)	0	1	0
Hepatic fibrosis of unknown etiology	2	1(50)	1	0	0

有量は100~150 mgで、その約8% (8 mg 前後)が肝に含まれて、その殆ど全てが肝細胞内に存在する。胎児では、生体内の殆どの銅は肝に存在し、肝細胞内でライソゾーム内に局在しており、種々の銅検出法で肝細胞内に銅顆粒が染まってくる。しかし、生育とともに肝内銅量は減少し、生後3~6カ月頃からは成人と同一の分布を示す様になり、肝細胞内に銅顆粒が組織

化学的に染まらなくなる¹²⁾。さて、銅は、肝を中心とした代謝やエネルギー産生に重要であり、また、肝は銅の貯蔵、排泄に加えて、諸種の銅蛋白を生合成する。従って、銅の過剰や欠乏は肝に種々の影響を与え、また各種の肝・胆道系疾患において銅の代謝系に障害が生ずると考えられる¹¹⁻¹²⁾。

そこで、本研究では、主として組織化学的手段によ

Table 2. Conditions not associated with copper granules in liver cells

Liver Disorder	No. of Biopsies
Acute hepatitis	116
Alcoholic hepatitis	8
Chronic persistent hepatitis	35
Granulomatous hepatitis	3
Infectious mononucleosis	1
Fatty liver	28
Anoxic change	4
Chronic venous congestion	2
Idiopathic portal hypertension	8
Constitutional hyperbilirubinemia	3
Hemochromatosis and hemosiderosis	3
Thorotrast deposition	1
Extramedullary hematopoiesis	2
Bone marrow transplantation	3
Mild hepatic fibrosis related to cholecystolithiasis	4
Intrahepatic calculi	13
No remarkable changes	128

Table 3. Correlation between clinical jaundice and degree of copper granules in the conditions with copper granules in liver cells

copper granules	High incidence group(biliary)*		Low incidence group(biliary)**		Low incidence group(nonbiliary)***	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
##	2	14	0	0	0	0
+	9	9	0	1	2	0
+	20	1	0	2	19	4
-	33	0	0	22	184	19
	jaundice		jaundice		jaundice	

*, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis and Alagille syndrome.

** extrahepatic cholestasis.

***, liver cirrhosis, chronic active hepatitis and alcoholic fibrosis.

-, absent; +, light; #, moderate; ##, heavy.
number, number of biopsies.

Table 4. Correlation between bile plug formation and degree of copper granules in the conditions with copper granules in liver cells

copper granules	High incidence group(biliary)*		Low incidence group(biliary)***		Low incidence group(nonbiliary)***	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
卅	4	12	0	0	0	0
卅	15	3	0	1	2	0
+	21	0	0	2	21	2
-	33	0	0	22	177	26

Abbreviations, see Table 3.

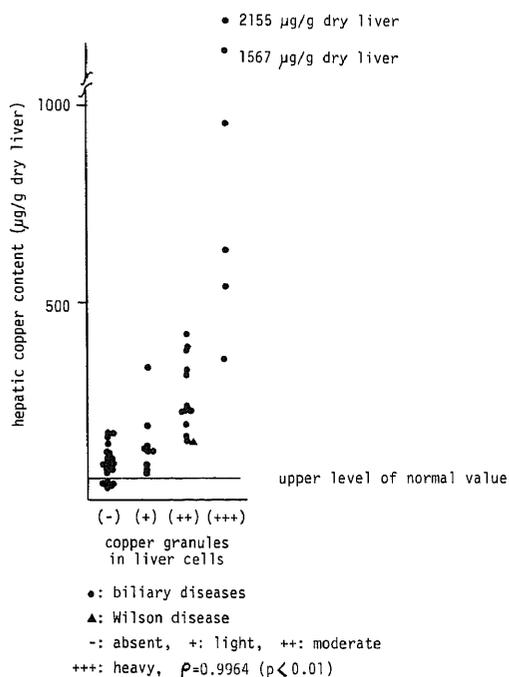


Fig. 8. Correlation between hepatic copper content and degree of copper granules in liver cells.

り肝細胞内銅の沈着の有無とその程度を、日常しばしば経験する多数の肝・胆道系疾患 721 例を用い検索した。なお、本研究で、ロダニン銅検出法により検出される銅の沈着程度と原子吸光法により化学的に定量した銅量とはよく相関することが明らかになったので、本染色法は、肝内で増加した銅量を反映すると考えられた。

肝細胞内に出現する銅顆粒には、その染色性により大きく 2 種類あることが明らかとなった。一つは、核周囲に出現する銅であり、他の一つは毛細胆管の周囲

に出現するものである。この違いは、銅の沈着機序に関連している可能性がある。さて、前者の銅顆粒は電顕的観察により肝細胞内のライソゾームに相当することが知られており^{31,17)}、今回の研究結果もこれを支持している。肝内に過剰の銅が存在した場合に、これがメタロチオネインの産生を誘導し、銅とメタロチオネインとが結合しライソゾーム内に取り込まれ、隔離され、銅の細胞障害性をなくすると考えられている^{11~14,22)}。メタロチオネインには、スルフィドリル基を持つシステインが豊富に存在し²²⁾、この基がオルセインと反応し^{34,13)}、ライソゾーム内に豊富に存在する銅-メタロチオネイン結合物がオルセイン陽性の顆粒として認められると思われる。一方、毛細胆管周囲性の銅顆粒は、従来より Wilson 病、胎児、先天性の銅代謝異常を示すテリー犬、過剰の銅を投与したラットで^{23)~25)}記載されている。今回の観察では、Wilson 病の 1 例にだけみられた。電顕的観察は今回の研究で行わなかったが、従来の報告では、毛細胆管の周囲のライソゾーム内に銅が存在することが知られている。セルロプラスミンあるいはライソゾームから胆汁への銅の排泄機構の障害等により、このような銅沈着パターンが出現するのかもしれない^{11,2)}。

銅沈着陽性の肝・胆道系疾患を、肝実質内、それに肝細胞内での銅の沈着性により、四群に分類することが可能であった。そして、銅顆粒沈着の機序や意義はそれぞれの群で異なっていると推定された。

第一群は、高率に銅顆粒を認める肝・胆道系疾患である(胆道系疾患高率群)。この群は、PBC、PSC、Alagilie 症候群²⁶⁾よりなり、いずれも小型の胆管系を含む肝内胆管系に閉塞性、破壊性の病変が広汎にあり、胆汁の排泄がかなり障害されている。これらの疾患群では、病変が徐々に進行し、その結果、胆汁うっ滞が長年月にわたるのが特徴であり、このため、肝組織内

に過剰の銅が沈着するものと思われる。しかし、限局性の慢性胆管炎が特徴である肝内結石症²⁷⁾では、銅顆粒は陰性であったので、限局性の胆汁排泄障害だけでは銅沈着が生じないと思われる。さらに、上記三疾患

では、肝硬変へと向かう肝の線維化が同時に進行し、これがさらに胆汁の排泄障害や肝細胞障害を促し、肝内の銅量増加に関与していると思われる。肝細胞の銅顆粒は、PBC、PSC、Alagille 症候群では、黄疸の出現

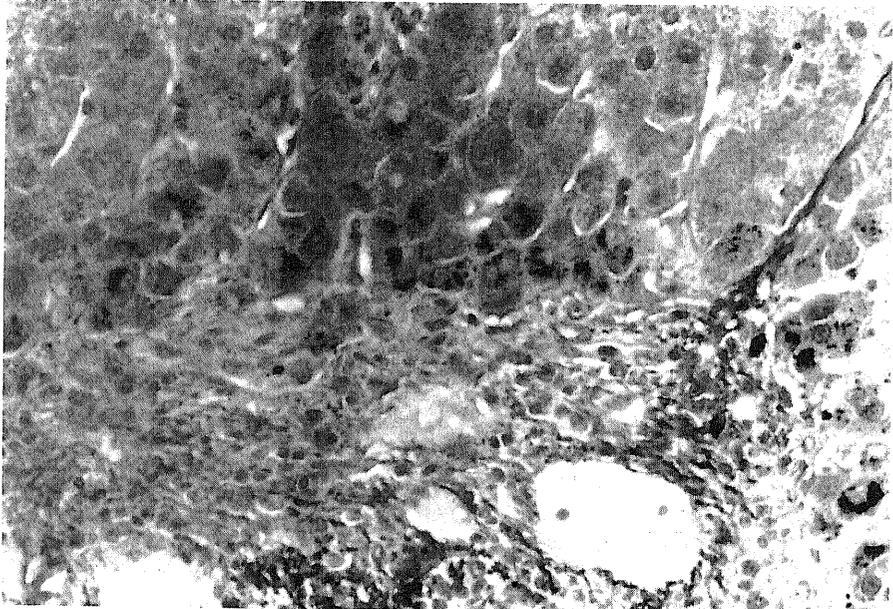


Fig. 9. Orcein positive granules are seen in the perinuclear area of the periportal hepatocytes. Primary biliary cirrhosis. Orcein stain, $\times 160$.

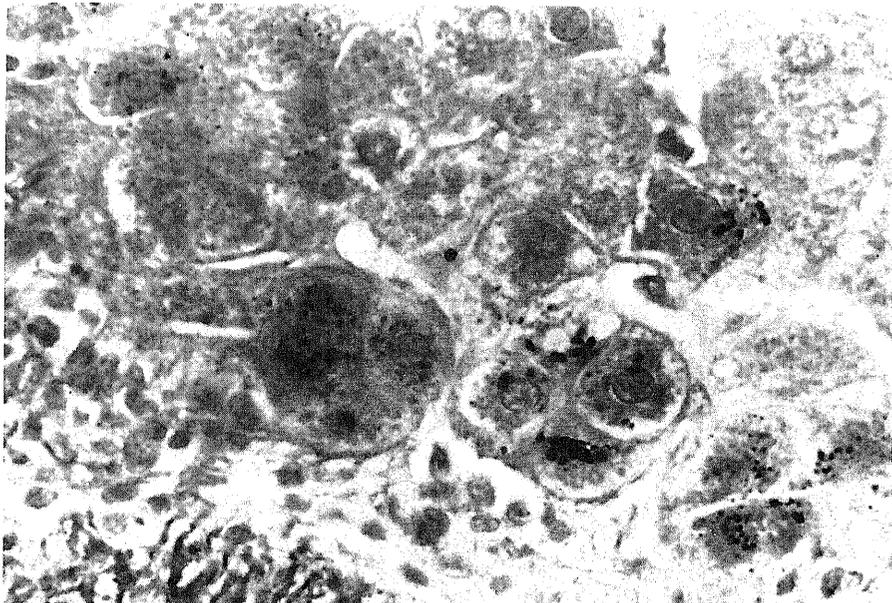


Fig. 10. Perinuclear accumulation of orcein positive granules is evident. Primary biliary cirrhosis. Orcein stain, $\times 325$.

する以前からみられ、また沈着程度が軽度～高度と広い範囲である。特に、中等度以上の沈着は、その他の肝疾患では、極めて稀あり、この所見は他の銅顆粒沈着性の肝・胆道系疾患との鑑別に役立つと思われる。

第二群は肝外閉塞性黄疸である。この群の殆どは黄疸持続期間が2カ月以内であり、銅顆粒沈着の陽性率が極めて低く(胆道系疾患低率群)、銅顆粒の沈着程度が軽い。黄疸が遷延し、肝の線維化が進んだ症例で陽性率がやや高い傾向にあった。この事実は、胆汁流出障害が、銅顆粒沈着の大きな原因であるが、胆汁うっ滞すなわち銅顆粒の沈着ではなく、その他の因子が考えられる。一つの可能性として、胆汁流出障害に伴い

肝内銅量が増加し、メタロチオネインの合成を誘導し、銅と結合しライソゾーム内に隔離、貯蔵されるには、相当の期間が必要なかもしれない、小沢ら⁵⁾も、主に肝内銅量を化学的に定量し、黄疸持続期間や閉塞の程度が、肝内銅量の増加に重要だと述べている。特に、完全閉塞例で黄疸が2カ月以上続いた例で、黄疸期間が短かかったり胆道閉塞が不完全であった例に較べ、肝内銅量の増加が有意に高かったと述べている。また、肝の線維化の進んだ症例に陽性顆粒のみられる率が高いことから、線維化に伴う小型の肝内胆管系の障害も銅沈着の一因子と考えられる。この事実は病理診断上、閉塞性のパターンを示す黄疸陽性例において、肝実質

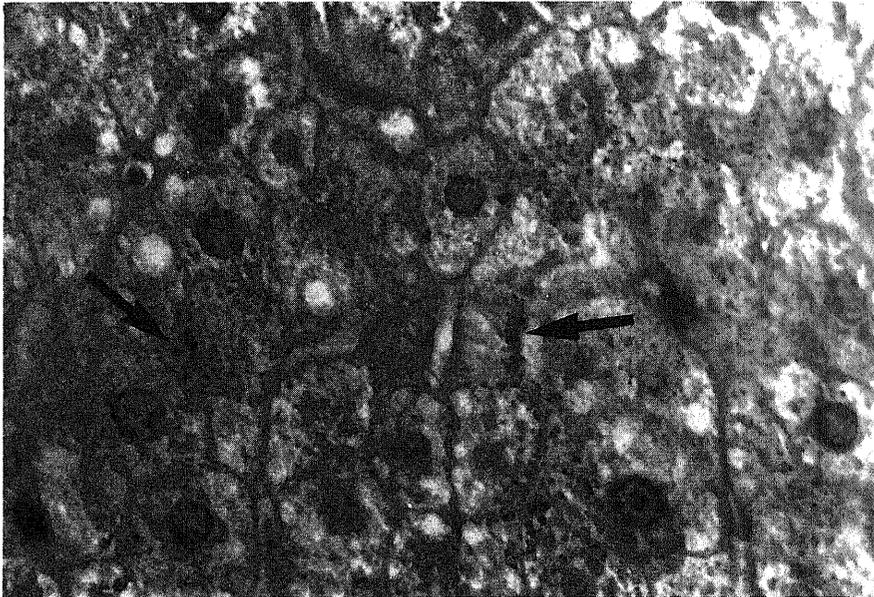


Fig. 11. Orcein positive granules (arrows) are seen in the pericanalicular area of the hepatocytes. Wilson disease. Orcein stain, $\times 325$.

Table 5. Correlation between copper granules and orcein positive granules in liver cells

		Conditions associated with copper granules				Conditions not associated with copper granules			
		-	+	++	###	-	+	++	###
copper granules	##	0	0	0	17	0	0	0	0
	+	0	0	20	3	0	0	0	0
	+	0	47	2	0	0	0	0	0
	-	251	16	3	0	357	5	0	0
		orcein positive granules				orcein positive granules			
		-	+	++	###	-	+	++	###

-, absent; +, light; ++, moderate; ###, heavy.

に大量の銅顆粒がみられた場合は、肝外閉塞性黄疸よりはPBCやPSCの方が考えやすいことを意味している。

第三群は、肝硬変、CAH、アルコール性肝線維症である。この群では、黄疸や胆汁栓の存在と関係なく銅顆粒が出現し、陽性例では、いずれも肝の線維化が進展し、肝小葉の改築傾向があった。八田ら¹⁾によると、肝硬変の肝組織内銅を定量したところ、多数の症例において、その銅量は、正常肝と同じ正規分布するのに対し、36%の症例で高値を示し、その分布は非連続性であったと述べている。今回の検索では、肝硬変の19.4%において肝細胞内に銅顆粒が染まり、八田らの成績より低かった。これは、今回の検索が組織化学を用いたためと思われる。いずれにしても、なぜこれらの慢性の肝疾患の一部の症例にのみ銅が過剰に沈着するのかは不明である。八田らは、肝硬変における肝細胞障害がその原因と述べている。また、Sumithranら⁹⁾は、肝の線維化、肝小葉や肝の構築の乱れがあるとこれらが胆管系の障害を来し胆汁の流れの異常につながり、二次的に銅が沈着するのではないかと述べている。おそらく、両方の因子が作用しているであろう。

第四は、Wilson病である。この先天性銅代謝異常は極めて稀であり²¹⁾、今回は1例しか検索出来なかった。銅顆粒の沈着パターンとして、核周囲性のものと毛細胆管周囲性のものが混在しており、上述の3群の肝・胆道系疾患とは異なっていた。毛細胆管周囲性の銅顆粒沈着がWilson病で見られることは、Uzman, Goldfischerら⁸⁾¹⁰⁾により指摘されており、Wilson病固有の代謝異常に関連して出現するのかもしれない。また同時に核周囲性の銅顆粒の沈着がみられたが、これは肝細胞内における銅沈着としては一般的なので、Wilson病の肝障害進展に関連して二次的に出現する現象なのであろう。なお、早期のWilson病では、細胞質にびまん性に銅が染色されると言われているが¹⁰⁾¹²⁾、今回の研究では明らかにし得なかった。

日常しばしば経験する急性肝炎、CPH、脂肪肝、非特異性の肝病変では、銅顆粒を全く検出できなかった。このことは、肝生検の鑑別診断学上かなり重要と考えられる。例えば、PBCやPSCの無黄疸例、特に病期の進展していない症例やWilson病において、CPHあるいは非特異性肝病変と紛らわしい症例がかなりある¹⁹⁾。このような場合に、銅染色を行い、陽性ならば、PBC、PSC、Wilson病の可能性を考えなければならぬ。また、PBC、PSC、Wilson病で、病期が進展し、CAH、あるいは活動性の肝硬変と紛らわしい症例も日常しばしば経験する。銅染色を行い、銅顆粒が中等度以上に染まってくれば、ウイルス性CAHや非胆汁性

の肝硬変は否定的となる。さらに、慢性肝炎で生検材料が少ない場合でも、銅染色を行い、もし、銅顆粒が染まれば、活動性の肝炎あるいは、すでに肝硬変へ移行していると考えられる。

さて、オルセイン染色はShikataら¹³⁾により、HBs抗原の簡便な染色法として開発され、現在広くルーチン化している。今回の検索より、オルセイン染色で染まる顆粒状陽性物質がロダニン法で染まる銅顆粒と、その部位と頻度と程度で、一部の症例を除き一致していた。さらに、X線微少部分分析法で、同一のライソゾーム内に銅と硫黄（銅結合蛋白であるメタロチオネインのスルフィドリル基由来）の特異的二次X線が検出された。従って、オルセイン染色を銅染色の代用とすることが可能と思われる。ちなみに、ロダニン染色は、染色時間に最短で24時間を必要とするので、迅速な検索には適していない。しかし、オルセイン染色では、銅顆粒以外の物質、例えば、HBs抗原や、種々の形態をボサリボフスチン顆粒も染色性は弱い染まる²⁰⁾。従って、個々の肝生検を観察する時に銅結合蛋白のオルセイン陽性顆粒なのかどうか、判断に迷う症例が少なくない。しかし、今回の検索において、銅顆粒陽性例は全例オルセイン染色で陽性の顆粒が認められたので、オルセイン染色はむしろ銅染色のスクリーニングとして適していると思われた。

結 論

各種の肝・胆道系疾患721例を用い、肝細胞内銅沈着顆粒を検索し、以下の結論を得た。

1. ロダニン法で染まる銅顆粒の沈着程度と化学的に定量した銅量とは良く相関した。
2. 肝細胞内の銅顆粒は、肝小葉や再生結節の辺縁部の肝細胞の核周囲にあるものと、肝細胞の毛細胆管周囲に染まるものの2種類があり、Wilson病の1例では前者+後者で、他の陽性例は全例、前者の染色パターンを示した。
3. 銅沈着陽性例を、胆道系疾患高率群（原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、Alagille症候群）、胆道系疾患低率群（肝外閉塞性黄疸）、肝疾患低率群（肝硬変、慢性活動性肝炎、アルコール性肝線維症）、Wilson病の4群に分類することが可能であった。
4. 胆道系疾患高率群では、黄疸の出現する以前から銅顆粒の沈着がかなりみられ、病期の進展した症例では中等度～高度の銅沈着がみられた。
5. 胆道系疾患低率群では、黄疸陽性例の一部の症例にのみ銅顆粒がみられ、黄疸が遷延し、線維化の進んだ例にやや高率であった。
6. 肝疾患低率群では、いずれも線維化が進展し小

葉改築の目立つ症例で銅顆粒がみられ黄疸の有無との間に関連性がなかった。

7. 先天性代謝異常の Wilson 病の 1 例は、慢性活動性肝炎の組織像であり、中等度の沈着がみられ黄疸はみられなかった。

8. 以上より、胆汁うっ滞、その程度と期間、胆管系の障害部位とその程度、肝線維化、肝細胞障害が複合的に銅顆粒沈着に関連すると考えられた。また、各種の肝・胆道系疾患で、種々の程度で銅顆粒が検出され、その出現頻度と病的意義に差があり、銅染色は肝生検の診断に有用と考えられた。

謝 辞

稿を終わるに臨み、終始御懇意なる御指導と御校閲を賜った恩師太田五六教授に深く感謝致します。また、御指導、ご助言を賜りました中沼安二講師ならびに第二病理学教室の諸先生に深謝致します。

文 献

- 1) 八田善夫, 小沢明美, 米山啓一郎, 竹内治男, 小貫 誠: 銅・亜鉛代謝における肝の役割. 肝胆膵, 10, 863-869 (1985).
- 2) Sternlieb, I.: Copper and the liver. Gastroenterol., 78, 1615-1628 (1980).
- 3) Nakanuma, Y., Karino, T. & Ohta, G.: Orcein positive granules in the hepatocytes in chronic intrahepatic cholestasis. Morphological, histochemical and electron X-ray microanalytic examination. Virchow. Archiv. A Pathol. and Histol., 382, 21-30 (1979).
- 4) 中沼安二, 太田五六: 各種肝疾患の肝細胞内に出現する顆粒状オルセイン陽性物質と肝組織内銅量. 日消誌, 75, 1190-1195 (1978).
- 5) 小沢明美, 八田善夫, 松村 剛: ヒト肝組織銅含量に関する研究. 日内会誌, 73, 925-934 (1984).
- 6) Nayak, N. C. & Ramalingaswami, V.: Indian childhood cirrhosis. Clin. Gastroenterol., 4, 333-349 (1975).
- 7) Sipponen, P.: Orcein positive hepatocellular material in long-standing biliary diseases. I. Histochemical characteristics. Scand. J. Gastroenterol., 11, 545-552 (1976).
- 8) Uzman, L. L.: The intrahepatic distribution of copper in relation to the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. Archiv. Pathol., 64, 464-479 (1957).
- 9) Sumithran, E. & Looi, L. M.: Copper-binding protein in liver cells. Hum. Pathol., 16, 677-682 (1985).
- 10) Goldfishcer, S. & Sternlieb, I.: Changes in the distribution of hepatic copper in relation to the progression of Wilson's disease (Hepatolenticular degeneration). Amer. J. Pathol., 53, 883-927 (1968).
- 11) 有馬正高: Wilson 病. 肝胆膵, 7, 15-18 (1983).
- 12) Sternlieb, I., van den Hamer C. J. A., Morell, A. G., Alpert, S., Gregoriadis, G. and Scheiberg, I. H.: Lysosomal defect of hepatic copper excretion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). Gastroenterol., 64, 99-105 (1973).
- 13) Shikata, T., Uzawa, T., Yoshiwara, N., Akatsuka, T., Yamazaki, S.: Staining methods of Australia antigen in paraffin section-detection of cytoplasmic inclusion bodies. Jap. J. Exp. Med., 44, 25-36 (1974).
- 14) 佐野 豊: 組織化学研究法. 第5版, 南山堂, 東京, 1976.
- 15) Timm, F.: Histochemical demonstration of copper in the brain. Histochemie, 2, 332-341 (1961).
- 16) Irons, R. D., Schenk, E. A. & Lee, J. C. K.: Cytochemical methods for copper. Semiquantitative screening procedures for identification of abnormal copper levels in liver. Archiv. Pathol. Lab. Med., 101, 298-301 (1977).
- 17) 渡部忠雄, 永谷 隆: 生物学におけるエネルギー分散型 X 線分光法について (I). 細胞, 6, 53-56 (1974).
- 18) International group: Acute and chronic hepatitis revisited. Lancet, II, 914-919 (1977).
- 19) Scheuer, P. J.: Liver biopsy interpretation. 3rd ed., p.102-132, Bailliere Tindall, London, 1980.
- 20) 武内重五郎, 奥平雅彦, 高田 昭, 太田康幸, 藤沢 冽, 伊藤 進, 辻井 正, 蓮村 靖: わが国におけるアルコール性肝障害の実態—全国集計の成績から—. 日消誌, 76, 2178-2185 (1979).
- 21) 太田五六: Scheuer の Stage 分類とその批判. 肝胆膵, 7, 201-205 (1983).
- 22) 木村正巳: メタロチオネイン. 代謝, 12, 205-217 (1975).
- 23) Evans, J., Newman, S. P. & Sherlock, S.: Observations on copper associated protein in childhood liver disease. Gut, 21, 970-976 (1980).
- 24) Ludwig, J., Owen, C. A., Baram, S. S., McCall, J. T., and Hardy, R. M.: The liver in the inherited copper disease of Bellington Terriers. Lab Invest., 43, 82-87 (1980).

- 25) Lindquist, R. R. : Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. III. The effect of copper on rat liver lysosomes. *Amer. J. Pathol.*, **53**, 903-925 (1968).
- 26) Alagille, D., Odievre, M., Gautier, M., and Dommergues, J. P. : Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformation, retarded physical, mental and sexual development, and cardiac murmur. *J. Pediatr.*, **86**, 63-71 (1975).
- 27) 中沼安二, 寺田 忠, 太田五六 : 肝内結石症の病理. 外科MOOK. 宮崎逸夫編, 第1版, 10-17, 金原出版, 東京, 1982.
- 28) 堀内隆三, 内田俊和, 志方俊夫 : 新しく発見された肝細胞質内封入体“リング体”-その出現の意義-. *肝臓*, **27**, 945-952 (1986).

Morphologic Examination of Copper Granules in Hepatocytes of Various Hepato-biliary Diseases with Emphasis on their Pathologic and Diagnostic Significance Hajime Miyamura, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, **96**, 15—29 (1987)

Key words : copper granules in hepatocytes, cholestasis, liver biopsy, copper metabolism

Abstract

Seven hundred and twenty one liver biopsy specimens showing variable hepatobiliary diseases were stained with rhodanine method for hepatocytic copper granules, which were well correlated with hepatic copper content. Wilson disease showed pericanalicular and perinuclear copper granules in the hepatocytes, while other hepatobiliary diseases revealed perinuclear copper granules in the periportal or periseptal hepatocytes. The copper-positive hepatic diseases were subdivided into 4 groups ; 1. Primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis and Alagille syndrome showed copper granules to much frequency (high incidence group), especially in the fibrotic and cirrhotic stages. 2. Extrahepatic biliary obstruction, being composed mainly of acute phase, showed them to less frequency, and their degree was, when present, mild (low incidence biliary group). 3. Liver cirrhosis, chronic active hepatitis and alcoholic fibrosis showed them to low frequency and to mild degree (low incidence nonbiliary hepatic group). These positive livers had usually an extensive fibrosis and lobular disarray. 4. Wilson disease disclosed moderate deposition of copper granules. Moderate to heavy deposition of copper granules were seen in the high incidence biliary group patients with jaundice, and even about half of the patients without jaundice revealed the hepatocytic copper. Copper granules were found in a minority of the low incidence biliary group patients with jaundice. In the low incidence non-biliary hepatic group, however, there was no correlation between jaundice and copper granules. These findings suggest that cholestasis and its duration, level and degree of intrahepatic biliary injuries, hepatic fibrosis, and hepatocytic damages in variable combinations lead to deposition of copper granules in the hepatocytes. Examination of hepatic copper granules seems valuable for a diagnosis of liver biopsies.