Macroprolactinoma における hPRL の Heterogeneity の検討

虎の門病院・冲中記念成人病研究所

小児科¹⁾・脳神経外科²⁾・内分泌学科³⁾

田 中 敏 章¹⁾, 相 羽 正²⁾, 紫 芝 良 昌³⁾

The Heterogeneity of Serum hPRL in a Patient with a Giant Prolactinoma

Toshiaki TANAKA¹⁾, Tadashi AIBA²⁾ and Yoshimasa SHISHIBA³⁾

Department of Pediatrics¹⁾, Neurosurgery²⁾ and Endocrinology³⁾,

Toranomon Hospital, Okinaka Memorial Institute for Medical Research,
Akasaka, Tokyo, Japan

The heterogeneity of hPRL in the serum of a patient with a giant prolactinoma (hPRL 27 μ g/ml) was studied employing gel chromatography, RIA and lymphoma cell bioassay. After gel filtration of serum sample on Sephadex G-100 (superfine) column, a few hPRL peaks were detected by RIA. Rechromatography of the second peak, which eluted between the void volume and the small third peak, revealed four hPRL peaks designated big-big hPRL, medium-big hPRL, big hPRL and little hPRL, with BA/RIA ratio 1.3 ~ 2.6, 0.8 ~ 1.2, 0.3 ~ 0.7 and 0.7 ~ 1.5, respectively. The molecular weight of medium-big hPRL was estimated as 80K ~ 90K daltons. Most of big-big, medium-big and big hPRL were converted to little hPRL after mercaptoethanol treatment. These data suggest that most of big-big, medium-big and big hPRL are aggregates of little hPRL.

結 言

ヒトプロラクチン (hPRL) は、血清・羊水・下垂体腫瘍抽出液中に、分子量の異なる3つの形が存在することが知られている^{1)~4) 6) 7) 10) 13)}。分子量が22,000 daltonの little hPRL, little hPRL が disulfide 結合により dimer を形成していると考えられる big hPRL¹⁾, および Sephadex カラムによるゲル濾過で void volume に溶出される big-big hPRL である。これらの heterogeneous hPRL の生物学的活性は、radioreceptor assay (RRA) を用いて検討されており、big hPRL と big-big hPRL は、little hPRL に比較して生物学的活性/免疫学的活性比 (BA/RIA ratio) が低いことが報告されている^{4) 6)}。

Heterogeneous hPRL が、実際にその大きさのものが分泌されて生体内に存在しているかどうかの議論は、未だ結論がでていない。また、それらの性状や生物学的活性の検討は、血中濃度が低いうえに、感度の良い bioassay がなかったため困難であった。しかし、我々の確立した Nb₂ lymphoma

cell bioassay¹⁴⁾は、radioimmunoassay (RIA)と同じぐらい感度がよく、heterogeneityの検討にも最適である。今回、巨大なprolactinomaにより、血中hPRLが著高を示した患者血清を用いて、hPRLのheterogeneityを、Nb₂ lymphoma cell bioassayとRIAとで検討した。

症 例

32歳、既婚の男性。会社員。昭和56年9月に、視野の異常を主訴に来院した。7歳の男児と、5歳と7ヵ月の2人の女兒があり、頭痛・目まい・乳汁分泌・性欲の減退・女性化乳房・易疲労などの訴えはなかった。神経学的には、左上肢の筋力低下および左同名半盲が認められた。頭部CTスキャンで、下垂体より視床下部右基底核に広がる5×5×4 cmの頭蓋内腫瘍が認められた。

内分泌学的検査では、血清hPRLの基礎値が27,000 ng/mlと異常高値を示した。その他の下垂体ホルモンの基礎値は正常で、刺激試験では、insulin tolerance test (ITT) およびarginine tolerance test (ATT)における成長ホルモン(hGH)の反応は低下していた。甲状腺機能は正常であった。右前頭部開頭による腫瘍の部分切除、および術後照射を行なったが、症状の改善はみられなかった。腫瘍はchromophobe adenomaで、酵素免疫法¹²⁾でhPRLが陽性に染まった。

昭和57年6月に、頭痛と左下肢筋力低下による歩行障害のため再入院した。その時の内分泌検査の結果を表1に示した。ITTでのhGHは低反応を示した。血清テストステロンは134 ng/dlと低値だが、LH-RHテストは正常と考えられた。Bromocriptine 5 mg/dayの投与が開始され、2週間後には血清hPRLは、7,600 ng/dlまで下がり、CTスキャン上でも腫瘍は約2分の1に縮少がみられた。筋力低下と、左同名半盲も著明な改善がみられ、6ヵ月後には、血中hPRLは32 ng/mlまで低下した。

材 料 と 方 法

精製hPRL (hPRL-Friesen, 80-3-20) および抗血清は、マニトバ大学Friesen研究室より提供をうけた。精製hPRLを、RIAのtracerとstandard、およびbioassayのstandardに用いた。RIAは二抗体法を用い⁵⁾、hPRLのヨード化には、ラクトペルオキシダーゼ法を用いた。

Bioassayは、すでに述べた方法¹⁴⁾¹⁵⁾にて行なった。Stationary phaseを得るために、bioassayの約24時間前に、Nb₂ lymphoma cellを1%ウシ胎児血清加Fischer培養液(GIBCO)に移して培養する。Assay開始時に、培養液を10%ウマ血清加Fischer培養液に代え、 $1-2 \times 10^5$ cells/mlの細胞濃度で1.5 mlずつ培養皿(NUNC マルチウェルディッシュ)に分注する。標準hPRLまたは検体50 μ lおよび、抗hGH抗体(100倍稀釈)25 μ lを培養皿に加え、72時間炭酸ガス培養器中で培養した後、細胞数をCoulter Counter(東亜医用)で計測した。

治療開始前血清(-20℃ 6ヵ月保存)0.5 mlをSephadex G-100(superfine)カラム(1.5×90 cm)にかけ、0.1%のbovine serum albumin(BSA)を加えた0.01 M phosphate buffered saline (PBS)で溶出し、0.6 mlずつチューブに分取し、RIAおよびbioassayに供した。カラムのキャリブレーションには、blue dextran, cytochrome C, ¹²⁵I-hPRL およびNa¹²⁵Iが用いられた。10数本のチューブ内容をまとめて濃縮する時は、Mini-Con (Amicon)を用い、同じカラムまたは、Sephadex G-100カラム(1×30 cm)で再ゲル濾過した。メルカプトエタノール処理は、0.5%(v/v)の濃度で4℃24時間行なった。

精製hPRLを、0.1% BSA PBSに溶かし、-20℃で2年間保存したものを、同様に1.5×90 cmのSephadex G-100(superfine)カラムでゲル濾過し、各チューブをRIAで測定した。

Table 1. Hormonal studies.

Stimulation test	Hormone	0	30	60	90	120 (min)
LH-RH test	LH (mIU/ml)	6.7	35.3	31.1	22.5	25.9
	FSH (mIU/ml)	3.9	9.4	10.2	9.9	10.0
TRH test	TSH (μ U/ml)	1.25	19.3	19.4	13.2	10.6
	PRL (μ g/ml)	31.2	40.7	39.4	27.8	31.4
ITT	GH (ng/ml)	1.2	0.8	0.6	0.7	1.5
	Cortisol (μ g/dl)	13	12	14	11	15

Fig. 1. Sephadex G-100 (superfine) gel filtration pattern of 0.5 ml of serum from a patient with a giant prolactinoma. Lower panel shows hPRL concentration by RIA and upper panel shows BA/RIA ratio.

結 果

血清 (hPRL 27 μ g/ml RIA, 26.6 μ g/ml bioassay) の Sephadex G-100 (superfine) カラムによるゲル濾過における hPRL 活性を図 1 に示した。下段は RIA によるプロフィール, 上段は BA/RIA ratio を示してある。2 つの大きなピークが, void volume と 125 I-hPRL に一致してみられ, 125 I-hPRL に一致するピークの前にも小さなピークが認められる。プロフィールを, void volume を含むチューブ No. 40-50 を Group A, 125 I-hPRL を含むピークチューブ No. 76-97 を Group D, その前の小さなピークを含むチューブ No. 64-75 を Group C, チューブ No. 51-64 を Group B の 4 つの Group に分けた。Group A, B, C, D の BA/RIA ratio は, それぞれ 1.0-1.6, 0.5-1.5, 0.4-0.9, 0.8-1.5 であった。

Fig. 2. Distribution of hPRL after gel filtration of pool B (from Fig. 1). Upper panel shows the BA/RIA ratio.

Fig. 3. Rechromatography of big hPRL (tube 62-75 in Fig. 2) with (○-----○) or without (●—●) mercaptoethanol treatment. Upper panel shows BA/RIA ratio.

Group B (チューブ No. 50-64) を Amicon で濃縮し, 同じカラムで再濾過したところ, 図 2 に示すような 4 つのピークが認められた。各ピークを void volume 側より, big-big hPRL, medium-big hPRL, big hPRL, little hPRL と呼び, BA/RIA ratio は, それぞれ 1.3-2.6, 0.8-1.2, 0.3-0.7, 0.7-1.5 であった。カラムのキャリブレーションより分子量を推定すると, big hPRL は, little hPRL の約 2 倍で, 40,000-50,000 dalton, medium-big hPRL は, big hPRL の約 2 倍で 80,000-90,000 dalton と考えられた。

Fig. 4a Rechromatography of big-big hPRL (tube 43-50 in Fig. 2) on Sephadex G-100 column (1X 30 cm) with (○-----○) or without (●————●) mercaptoethanol treatment.

Fig. 4b Rechromatography of medium-big hPRL (tube 51-60 in Fig. 2) on Sephadex G-100 column (1X 30 cm) with (○-----○) or without (●————●) mercaptoethanol treatment.

図2のbig-big, medium-big, big hPRLの各ピークを再び集め濃縮し、メルカプトエタノール処理の前後で、再ゲル濾過した結果を図3・4に示した。Big hPRL (図3)は、メルカプトエタノール処理なしでも1部little hPRLに移行し、処理後は大部分がlittle hPRLに転換されているが、BA/RIA ratioには差がない。Big-big, medium-big hPRL (図4(a)(b))も、メルカプトエタノール処理で、大部分がlittle hPRLに移行した。

精製hPRLを2年間 -20°C で保存した後にSephadex G-100 (superfine) カラム ($1.5 \times 90 \text{ cm}$) にかけた時の、RIAによるプロフィールを図5に示す。4つのピークが認められている。

Fig. 5. Sephadex G 100 (superfine) gel filtration pattern of purified hPRL stored for two years at -20°C by RIA.

考 按

Macroprolactinomaで、hPRL血中濃度の著しく高い患者血清を、ゲル濾過をくり返すことによって、従来からいわれていたbig-big, big, little hPRLに加えて、big-bigとbig hPRLの中間の分子量のmedium-big hPRLの存在が明らかになった。今まで報告がみられていないのは、濃度が非常に低いため、1回だけのゲル濾過では、現われないと考えられた。今回、我々の扱った例はhPRL 27,000 ng/mlと著しく高く、1回だけのゲル濾過ではやはりmedium-big hPRLのピークははっきりしなかったが、濃縮と再ゲル濾過によってはっきりしたピークとして認められた。分子量は、カラムキャリブレーションから推定すると、80K-90K daltonで、メルカプトエタノール処理によりlittle hPRLに変化することより、little hPRLのaggregateでtetramerと考えられた。

Big-big, medium-big, big hPRLとも、メルカプトエタノール処理により大部分がlittle hPRLに変換されることより、同様にlittle hPRLのaggregateと考えられる。Big hPRLはdimer, medium-big hPRLはtetramerとすると、big-big hPRLも同様に2の倍数体と考えられ、8以上の分子のaggregateで、それも1つの分子量のものではなく、多くの大分子hPRL aggregateの集したものと思われる。

これらの heterogeneous hPRL が、実際に生体内に分泌されているか否かは、いまだ明らかではない。Big-big hPRL は、正常の下垂体細胞培養や prolactinoma 組織ホモジネートにはあまり検出されない⁷⁾¹³⁾ ため、Whittaker ら¹⁷⁾ は、血清中に、little hPRL を aggregate させるような因子の存在を推測している。実際に、 $[^{125}\text{I}]$ PRL を血清に混ぜてゲル濾過すると、big-big PRL の radioactivity がみられることを、Fang と Refetoff³⁾ が報告している。しかし、我々は 0.1% BSA PBS に解かして -20℃ に保存しておいた精製 hPRL をゲル濾過すると、big-big, medium-big, big と little の 4 つの heterogeneous hPRL のピークを確認しており、保存の状態や期間も大きな要素ではないかと考えている。Pensky ら⁹⁾ も血清の凍結・溶解をくり返すと、大分子 hPRL の割合がふえると述べている。また、我々は¹⁶⁾、acromegaly において、腫瘍ホモジネートや腫瘍細胞培養液には、big-big hGH はほとんど認められないが血清の保存期間が長いほど big-big hGH の割合が多くなることを報告した¹⁶⁾。これらのデータは、実際に大分子 hPRL が下垂体から分泌されるよりも、血液中または保存などにより little hPRL が aggregate してできることを示唆している。

Big-big hPRL は、我々の bioassay 系では、BA/RIA ratio が 1 より有意に大きい。これは、Farkouh ら⁷⁾ が、big-big hPRL は、RRA において little hPRL の 15% の活性しか示さないという報告と異なっている。この違いは、用いた bioassay system の差によるものかもしれない。RRA は、 ^{125}I -hPRL の膜レセプターへの結合しかみていないのに対し、lymphoma cell bioassay は、hPRL の PRL レセプターへの結合¹¹⁾ を最初のステップとし、その後の一連の反応の結果としての細胞増殖を指標とした bioassay である。最初のレセプターへの結合の差なのか、ポスト・レセプターの反応の差なのかを、現在 Nb₂ cell を用いた RRA および receptor modulation assay を確立させて、検討中である。また、little hPRL の aggregate と考えられる big-big hPRL が、72 時間の培養の間に little form に転換して生物学的活性を表わす可能性も考えられる。しかし、他の medium-big, big hPRL も同様に aggregate と考えられ、同様の機序が働いているとすれば、BA/RIA ratio が 1 より大きくなってもよいが、実際は medium-big hPRL は little とほぼ同じ、big hPRL は little の約 2 分の 1 の BA/RIA ratio を示している。メルカプトエタノール処理により、同じように解離する disulfide 結合でも、dimer の場合の結合と、それ以上 aggregate する場合の結合は、結合の様式が異なっているのかもしれない。

生物学的活性を比較する時、我々は、免疫学的活性は一定で変化しないと仮定して BA/RIA ratio を用いて比較している。しかし Lorensen ら⁸⁾ は、disulfide 結合したホルモン重合体は、免疫学的活性が低下すると述べており、heterogeneous hPRL の免疫学的活性も変化するとすると、BA/RIA ratio で生物学的活性を比較することが不可能になり、真の生物学的活性の比較のためのバロメーターは、更に検討が必要であると思われる。

結 語

血中 hPRL 27,000 ng/ml の macroprolactinoma 患者の保存血清を Sephadex G-100 (superfine) カラムでゲル濾過した。Void volume の後の小さなピークを濃縮し、再ゲル濾過すると、4 つの明らかなピーク (big-big hPRL, medium-big hPRL, big hPRL, little hPRL) が認められ、BA/RIA ratio は、それぞれ 1.3-2.6, 0.8-1.2, 0.3-0.7, 0.7-1.5 であった。大分子の hPRL は、メルカプトエタノール処理で大部分が little hPRL に変換されることより、little hPRL の aggregate と考えられた。Medium-big hPRL の分子量は 80 K-90 K dalton と推定され、tetramer と考えられた。

本論文の要旨は、第7回アジア太平洋州内分泌学会(1982東京)および第55回日本内分泌学会秋季大会(1982京都)において発表した。本研究は、文部省科学研究費、冲中記念成人病研究所および成長科学協会研究助成金によった。

文 献

- 1) Benveniste, R., Helman, J.D., Orth, D.N., McKenna, T.J., Nicholson, W.E. and Rabinowitz, D.: Circulation big human prolactin: conversion to small human prolactin by reduction of disulfide bonds. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 883–886, 1979.
- 2) Fang, V.S. and Kim, M.H.: Study on maternal, fetal and amniotic fluid human prolactin at term. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 41: 1030–1034, 1975.
- 3) Fang, V.S. and Refetoff, S.: Heterogeneous human prolactin from a giant pituitary tumor in a patient with panhypopituitarism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 780–787, 1978.
- 4) Farkouh, N.H., Packer, M.G. and Frantz, A.G.: Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high prolactin in basal state and reduction after thyrotropin releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 1026–1032, 1979.
- 5) Friesen, H.G. and Carr, D.: A assay of growth hormone, 349–366, Ed., by H.N. Antoniades, *Hormones in human blood*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London, 1976.
- 6) Garnier, P.E., Aubert, M.L., Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M.: Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: decreased affinity of “big” prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 1273–1281, 1978.
- 7) Guyda, H.: Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: immunoassay and radioreceptor assay correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 41: 953–967, 1975.
- 8) Lorensen, M.Y., Robson, D.L. and Jacobs, L.S.: Detectability of pituitary PRL and GH by immunoassay is increased by thiols and suppressed by divalent cations. *Endocrinology*, 112: 1880–1882, 1983.
- 9) Pensky, J., Murray, R.M.L., Mozattarian, G. and Pearson, O.H.: Prolactin and carcinogenesis, 24–36, Eds., by Boyns, A.R. and Griffiths, K., *Alpha Omega Publishing*, Cardiff, Wales, U.K., 1972.
- 10) Rogol, A.D. and Robsen, S.W.: Prolactin of apparent large molecular size: the major immunoreactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38: 714–717, 1974.
- 11) Shiu, R.P.C., Tanaka, T., Friesen, H.G., Elsholtz, H.P., Gout, P.W., Beer, C.T. and Noble, R.L.: Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology*, 113: 159–165, 1983.
- 12) Sternberg, L.A. and Cuculis, J.J.: Method for enzymatic intensification of the immunocytochemical reaction without use of labelled antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 190–198, 1967.
- 13) Suh, H.K. and Frantz, A.G.: Heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 928–935, 1975.
- 14) Tanaka, T., Shui, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.N. and Friesen, H.G.: A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 1058–1063, 1980.
- 15) 田中敏章, 中山 恵, 林

河宏, 吉原昭次, 立花克彦, 前坂機江, 諏訪誠三: Lymphoma cell を用いた bioassay による小児における hGH の生物学的活性の検討。ホルモンと臨床, 31: 577-581, 1983.

16) Tanaka, T., Aiba, T. and Shishiba, Y.: Discrepancy between immunoactivity and bioactivity of big-big and big human growth hormones in acromegaly. Endocrinol. Japon., 31: 141-148, 1984.

17) Whittaker, P.G., Wilcox, T. and Lind, T.: Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53: 863-866, 1981.

(受付日: 59. 3. 1)