症 例

脳脊髄液中に腫瘍細胞を認めた下垂体腺癌 の1症例

——免疫細胞化学，免疫電子顕微鏡的検索——

大阪がん予防検診センター検査部¹⁾，大阪府立成人病センター内科²⁾

甲斐 美咲¹⁾ 布引 治¹⁾ 鳥居 貴代¹⁾ 野田 定¹⁾
岸上 義彦²⁾

今回，脳脊髄液中に腫瘍細胞を認めた下垂体腺癌の1例を経験したので報告する。患者は48歳女性で，CT上鞍上槽に加え左前頭葉に伸展する腫瘍を確認し，最終的には左後頭葉，脳幹部，両側小脳橋角部および脊髄にも転移がみられた。

細胞像：脳脊髄液（CSF）中の腫瘍細胞は大小不同著明な類円形細胞が，散在性およびシート状に認められた。少数ではあるが広い細胞質に多くの空胞がみられる大型の多核巨細胞も散見された。

免疫細胞化学所見：CSF中の腫瘍細胞を用いてGH，ACTHおよびProlactin反応を行った結果，腫瘍細胞の細胞質には著明なGH陽性の褐色陽性顆粒を認めた。ACTHおよびPRL反応は陰性であった。

免疫電子顕微鏡所見：CSF中の腫瘍細胞を用いてProtein A-gold法を用いたGH反応を行った結果，腫瘍細胞の細胞質には多数のミトコンドリアと電子密度の高い直径約200 nmの分泌顆粒が認められた。GH反応陽性のgold顆粒は円形分泌顆粒のみに一致して陽性所見を認めたことより，この腫瘍細胞は周囲のGHを取り込んだものではなく，腫瘍細胞自身がGHを産生していることが証明された。

Key words : Pituitary carcinoma——Cerebrospinal fluid——Immunohistochemistry——Immunoelectron microscopy——Case report

I. はじめに

A case of pituitary adenocarcinoma in which tumor cells were detected in cerebrospinal fluid: Immunocytochemical and immunoelectron microscopic studies

Misaki KAI¹⁾, Osamu NUNOBIKI¹⁾, C.T., C.M.I.A.C., Kiyo TORII¹⁾, M.D., Sadamu NODA¹⁾, M.D., F.I.A.C., Yoshihiro KISHIGAMI²⁾, M.D., M.I.A.C.

¹⁾Department of Cytology and Pathology, Osaka Cancer Prevention and Detection Center

²⁾Department of Internal Medicine, The Center for Adult Disease, Osaka

論文別刷請求先 ☎ 534 大阪市城東区森ノ宮1の6の107
大阪がん予防検診センター検査部 野田 定

平成6年3月18日受付

平成6年7月1日受理

下垂体腺腫は頭蓋内腫瘍の約10%を占める良性腫瘍であるが，きわめてまれに遠隔転移を伴う悪性化例が認められる¹⁻³⁾。今回われわれは，当初良性と思われた下垂体腺腫が，左前頭葉，脳脊髄液，その他に転移をきたした症例を経験した。脳脊髄液（CSF）中の腫瘍細胞を用いて，由来を明らかにする目的でgrowth hormone (GH)，ACTHおよびprolactin (PRL)の免疫細胞化学的検索を行った。さらに細胞内局在の同定のため免疫電子顕微鏡的検索を行ったの

図1 剖検時の転移性腫瘍。左前頭葉下部，左後頭葉，脳幹小脳橋角部および脊髄全長にわたり転移性腫瘍が認められた

で，CSF中の細胞像と合わせて報告する。

II. 症 例

患 者：48歳，女性

主 訴：左眼の視野欠損と両眼の視力低下，進行性の末端肥大症

既往歴：特記すべきことなし

現病歴：昭和63年11月，左眼の視野欠損と両眼の視力低下，視野視力障害および進行性の末端肥大を主訴として某病院に入院。血中GH値の上昇（140 ng/ml）がみられ，CT上鞍上槽に第3脳室を圧迫し，左前頭葉に伸展する腫瘍を確認したため，11月24日下垂体腫瘍摘出術を施行した。術後，外来にて経過観察していたが，7ヵ月後鞍上槽より左前頭葉に進展する残存腫瘍の増大を認めたため，左前頭側頭開頭術の施行に続き， ^{60}Co による放射線照射（全量5960 rad）が行われた。平成2年8月頃より，手指のしびれ感，尿失禁を訴えるようになり，血中GH値39.4 ng/ml，CT上脳幹部，左後頭部，両側小脳橋角部の多発性の腫瘍病変を認めたため入院。脳脊髄液のGH値は20090 ng/ml，細胞診では異常細胞を認め，血中GH値の上昇に加え，CT上腫瘍の進行性増大がみられ平成2年11月14日死亡した。剖検では，左前頭葉下部への直接進展を伴った母子頭大の下垂体腫瘍とともに，左後頭葉，脳幹部，両側小脳橋角部に母子頭大

から超母子頭大の孤立性腫瘍を認めた。また脊髄全長にわたり，多数の転移性小結節がみられた（図1）。

III. 材料および方法

CSFおよび手術時に得られた組織を用いて光顕的，免疫細胞化学的，免疫電子顕微鏡（免疫電顕）的検索を行った。Papanicolaou (Pap)，Giemsa (G) および Hematoxylin Eosin (H-E) 染色は通常の方法を用いた。

免疫細胞組織化学的検索は Avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法⁴⁾を用いた。GH (DAKO, 1:400)，ACTH (DAKO, 1:300) および PRL (DAKO, 1:300) の各一次抗体を反応後，二次抗体以下は Bio Genex 社製の StrAviGen B-SA を用いて 3-3'Diaminobenzidine (DAB) にて発色させた。

免疫電子顕微鏡（免疫電顕）的検索は Postembedding (Protein A-gold) 法⁵⁾を用いた。CSF中の腫瘍細胞について Zamboni 固定，エタノール脱水を行い，LR-White (London Resin Co, Ltd) にて包埋後，超薄切片を作製した。免疫反応は，1% 卵白アルブミン加 PBS で洗浄後，GH 抗体（1:400）を2時間反応させ，PBS にて洗浄後 Protein A-gold (EY 社製，金粒子直径のサイズ15 nm) 液にて60分反応させた。蒸留水にて洗浄後，通常の電子染色である酢酸ウラニール鉛染色を加え日立 H-700 にて電顕観察を行った。

IV. 結 果

細胞所見：CSF中の腫瘍細胞は大小不同著明な類円形細胞が，散在性およびシート状に認められた。細胞質は泡沫状でライトグリーンに淡染し，大小の空胞を認めた。核は類縁系で増量した粗顆粒状クロマチンと著明な核小体が一部の細胞で認められた（写真1，2）。少数ではあるが広い細胞質に多くの空胞がみられる大型の多核巨細胞も散見された（写真3）。

組織所見：腫瘍細胞は円形および多形性で，核分裂像を伴う腫瘍細胞の瀰漫性増殖が認められる。細胞質に好酸性顆粒が認められ，核は類縁形で粗顆粒状クロマチンと一部の細胞には大型の核小体も認められた（写真4）。また広い細胞質を有する多核巨細胞も散見され，好酸性の下垂体腺癌と診断された。

写真 1 CSF 中の腫瘍細胞。大小不同著明な類円形細胞がシート状に認められた (Pap.×40)

写真 3 CSF 中の腫瘍細胞。広い細胞質に多数の空胞がみられる多核巨細胞も散見された (Pap.×40)

写真 5 CSF 中の腫瘍細胞における GH の免疫細胞化学。細胞質には著明な GH 陽性の褐色陽性顆粒を認めた (GH×40)

免疫細胞化学所見：CSF における腫瘍細胞の GH 反応は核はメチルグリーンに淡染し、細胞質には著明な GH 陽性の褐色陽性顆粒を認めた (写真 5)。組織における GH 反応の結果、強弱の差はあれ大半の腫

写真 2 CSF 中の腫瘍細胞 (Giemsa×40)

写真 4 腫瘍組織像。細胞質には好酸性顆粒が充満し、核は類縁形で粗顆粒状クロマチンを持つ腫瘍細胞の瀰漫性増殖が認められる (H-E×20)

写真 6 腫瘍組織を用いた GH の免疫組織化学。強弱の差はあれ大半の腫瘍細胞の細胞質に褐色の陽性反応が認められた (GH×20)

瘍細胞の細胞質に褐色の陽性反応が認められた (写真 6)。CSF および組織ともに ACTH および PRL 反応は陰性であった。

免疫電子顕微鏡所見：類円形核が多く、一部は異型

写真 7 CSF 中の腫瘍細胞を用いた免疫電子顕微鏡所見。細胞質には多数のミトコンドリアと電子密度の高い直径約 200 nm の分泌顆粒が多数認められる (×4,000)

写真 8 CSF 中の腫瘍細胞を用いた免疫電子顕微鏡所見。細胞質縁の分泌顆粒に一致して GH 反応陽性の gold 顆粒が多数認められた (×17,000)

性の強い、切れ込みのある核も認められる。細胞質には多数のミトコンドリアがみられ、細胞質縁には大半の細胞で電子密度の高い直径約 200 nm の分泌顆粒が多数存在した (写真 7)。強拡大では細胞質縁の

分泌顆粒上に一致して GH 反応陽性の gold 顆粒が多数認められた (写真 8)。

V. 考 察

下垂体腺腫は従来より好酸性、好塩基性、嫌色素性腺腫に分類されてきたが、この分類法は腺腫の内分泌機能を反映したものではない。現在では、それぞれの腺腫が種々のホルモンを分泌することがわかってきたことより、Kovacs ら⁹⁾による分類が広く用いられている。下垂体腺腫の多くは良性腫瘍であるが、一部は近傍組織に発育浸潤する invasive adenoma や、まれには遠隔転移をおこし、細胞異型が強い前葉腺癌とよばれる症例がある。本例も当初腺腫と考えられたが、最終的には左前頭葉への直接進展とともに、左後頭葉、脳幹部、両側小脳橋角部および脊髄にも転移がみられ、血中、および CSF 中の GH 値の上昇に加え、腫瘍細胞内に免疫細胞化学的に GH が証明されたことより GH 産生性の下垂体腺癌と診断された。

CSF 中の腫瘍細胞は大小不同著明な類円形細胞がシート状にみられ、比較的下垂体腺腫細胞の面影を残しているため、臨床経過を加味すれば従来の形態学的診断のみでもある程度の推測は可能かもしれない。しかし本例では免疫細胞化学的検索により CSF 中の腫瘍細胞の細胞質に GH を証明したことにより、細胞診のみでも腫瘍細胞の由来が明らかとなり確定診断が可能となった。CSF 中の腫瘍細胞の由来を明らかにするにはほかの所見がない場合通常は非常に困難であるが、GH の免疫細胞化学的検索は由来の同定には有効であった。

細胞内にある特定の物質が証明されても、その細胞が産生したものか、周囲の物質を取り込んだものかの判定は光顕レベルの免疫細胞化学のみでは困難である。これらの証明は通常、免疫電顕的検索か *In situ* hybridization 法を用いた mRNA^{7,8)} の検出が必要とされる。今回免疫電顕的検索に用いた Postembedding method (Protein A-gold) は *Staphylococcus aureus* の塩基性膜構成蛋白である Protein A が、IgG の Fc 部分と特異的に結合する性質を利用し、これに金コロイドを標識した方法である。本法は gold 粒子が非常に電子密度が高いため陽性反応の確認が容易なこと、DAB 他の発色操作が不要であることで、内因性酵素による非特異反応の影響はないことに加え、通常の電子染色を加えることができるので、pre embedding 法に比べて細胞の微細構造検索が同時にできる点が特徴である^{4,9)}。CSF 中の腫瘍細胞を用いての電

顕的検索では、腫瘍細胞の細胞質には多数のミトコンドリアが存在し、細胞質周辺には直径約 200 nm の分泌顆粒が多数存在することがわかった。さらに Protein A-gold 法を用いた GH の免疫電顕の結果、腫瘍細胞内の GH は細胞質周辺の円形分泌顆粒のみに一致して陽性所見を認めた。これにより光顕で細胞質全体が陽性にみえても、腫瘍細胞内の GH は分泌顆粒のみに存在しており、この腫瘍細胞は周囲の GH を取り込んだものではなく腫瘍細胞自身が GH を産生していることが証明された。

稿を終えるにあたり英文抄録のご校閲を頂きました Schneider, P.H. 先生に深謝致します。

Summary

A case of pituitary adenocarcinoma in which tumor cells were detected in the cerebrospinal fluid (CSF) is described. A 48-year-old woman was diagnosed by CT as having a tumor spreading over not only the suprasellar superior cisterna but the left frontal lobe as well. The tumor was eventually determined to have metastasized into the left occipital lobe, brain stem, cerebellopontile angles bilaterally, and spinal cord.

Cell features : Tumor cells in the CSF varied greatly in size and were roundish in shape. They were sporadic or formed sheets, although a few large multinucleate giant cells with many vacuoles in their extensive cytoplasm were also observed sporadically.

Immunocytochemical findings : The GH, ACTH and prolactin (PRL) reactions were performed using tumor cells in the CSF. Dark-brown granules predominantly positive for GH were observed in the tumor cell cytoplasm, whereas testing was negative for ACTH and PRL.

Immunoelectron-microscopic findings : The GH reaction was performed on tumor cells in the CSF by the protein-A gold method. A large number of mitochondria and secretory granules with high electron density measuring about 200 nm in diameter were observed in the cytoplasm of the tumor cells. The fact that GH-positive gold granules were always observed in association with round secretory granules proved that the tumor cells produced GH themselves, and had not trapped GH from their surroundings.

文 献

- 1) Stewart, P.M., et al.: Growth hormone secreting pituitary carcinoma: a case report and literature review (see comments) Clin. Endocrinol. Oxf., 8; 37(2): 189~194, 1992.
 - 2) Alienza, D.M., et al.: Prolactin producing pituitary carcinoma with pulmonary metastases. Cancer. 10-1, 68(7): 1605~1610, 1991.
 - 3) Mountcastle, R.B., et al.: Pituitary adenocarcinoma in an acromegalic patient: response to bromocriptine and pituitary carcinoma. Am. J. Med. Sci., 8; 298(2): 109~118, 1989.
 - 4) Hsu, S.M., et al.: Use of avidine-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29: 577~580, 1981.
 - 5) 片岡秀夫: 染色法のすべて (免疫電子顕微鏡染色—Pre-embedding 法および Post-embedding 法) pp. 189~193, 医歯薬出版, 東京, 1988.
 - 6) Kovacs, K., et al.: Tumors of the Pituitary Gland. AFIP, Washington, D.C., 1986.
 - 7) Morely, D.J., et al.: In situ localization of amylase mRNA and protein: an investigation of amylase gene activity in normal human parotid gland. J. Histochem. Cytochem., 35: 9~14, 1987.
 - 8) Binder, M., et al.: In situ hybridization at the electron microscope level: Localization of transcripts on ultrathin sections of lowicryl K 4 M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A gold complexes. J. Cell. Biol., 102: 1646~1653, 1986.
 - 9) Bassetti, M., et al.: Morphological studies on mixed growth hormone (GH) -and prolactin (PRL) -secreting human pituitary adenomas. Coexistence of GH and PRL in the same secretory granule. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 1093~1100, 1986.
-