上皮小体機能亢進症における組織型と細胞活性の関連性について

近畿大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 栗田 孝教授)

高 田 昌 彦

THE RELATIONSHIP BETWEEN MORPHOLOGY AND CELL ACTIVITY IN HYPERPARATHYROIDISM

Masahiko Takada

Department of Urology, Kinki University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi Kurita)

The relationship between tissue morphology and cellular activity in hyperparathyroidism was investigated by 2-color flowcytometry and an immunohistochemical technique using anti-parathyroid hormone (PTH) antibody. A total of 21 cases were employed, which included 8 cases of primary hyperparathyroidism (PHPT) and 13 cases of secondary hyperparathyroidism (SHPT). The results of 2-color flowcytometry on DNA ploidy pattern revealed that all the 8 PHPT cases were diploids. In SHPT, however, there were 9 diploids (69.2%), 2 tetraploids (15.4%) and 2 aneuploids (15.4%). Electron microscopic studies were performed on the diploid 2c and 4c peak cells, which were obtained by individually sorting the cells from each cycle. As a result, these cells were found to possess well developed rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. These cells in general showed weak immunostaining. Furthermore, numerous secretory granules were found in the cells obtained from abnormal peak of aneuploid when compared to diploid cells. In tetraploids and aneuploids, the darkly stained cells and glandular cells showed intense immunostaining. These cells contained numerous secretory granules and they were thought to possess high cellular activity.

Key words: hyperparathyroidism, flowcytometry, immunostain

要旨: 上皮小体機能亢進症における組織形態と細胞活性との関係を, 抗上皮小体ホルモン (PTH) 抗体を用いた免疫組織化学的手法と, 2-color flowcytometry で検討した。対象は, 原発性上皮小体機能亢進症 (PHPT) 8 例, 二次性上皮小体機能亢進症 (SHPT) 13 例の計 21 例である。2-color flowcytometry における DNA ploidy pattern の結果は, PHPT ではすべて diploid を示したのに対し, SHPT では diploid が 9 例 (69.2%), tetraploid が 2 例 (15.4%), aneuploid が 2 例 (15.4%) みられた。各々の細胞周期の細胞を個別に抽出 (ソーティング) した diploid の 2c, 4c ピークの細胞の電子顕微鏡所見は, 粗面小胞体の増加とゴルジ野の拡大がみられ, 免疫染色では全体の細胞の染色度は一様に淡かった。また, aneuploid の異常ピークの細胞は, diploid の細胞に比べて分泌顆粒が多数みられた。一方, tetraploid と aneuploid の免疫染色所見は, 濃く染まる細胞がみられた。これらの細胞は, 分泌顆粒を多量に有し, 細胞活性が高いものと考えられた。以上の 2 つの手法を用いた結果から, 上皮小体の組織型と細胞活性との間には, 強い関連があると推察された。

キーワード: 上皮小体機能亢進症, フローサイトメトリー, 免疫染色

上皮小体機能亢進症には原発性上皮小体機能亢進症 (primary hyperparathyroidism, PHPT) と二次性上皮小体機能亢進症 (secondary hyperparathyroidism, SHPT) が存在するが, これらは多くの点で異なっている。たとえば大半の PHPT は 1 腺のみ腫大するの

に対し, SHPT では 4 腺すべてが腫大していることが多い。組織学的には PHPT は腺腫のことが多いのに対し, SHPT では過形成がほとんどである。臨床症状をみても, PHPT では初期には無症状のことが多く, 経過と共に尿路結石や胃潰瘍をきたすが, SHPT の主

症状である骨症状まで進行することは稀である。これらのことから、PHPTと、SHPTは、腫大した上皮小体の外観上は同様にみえても、異なる細胞活性と微細構造を持っているものと考えられる。PHPTとSHPTの鑑別診断は基礎疾患の有無など、臨床経過からされ、組織学的な診断は困難である¹⁾²⁾。

PHPTにおいて、血清カルシウム (Ca) 値や上皮小体ホルモン (Parathyroid hormone, PTH) 値に日差変動がみられる。このことは腺腫と言えども細胞活性やPTH分泌能にも日差変動があるものと推察される。さらに、一般的には上皮小体の大きさとその臨床症状とは相関しているが、小さい上皮小体でも多彩な症状をきたす症例もみられ、このような症例に接していると、いかなる状態の上皮小体が強い細胞活性を持ち、臨床症状を呈するのか興味を持たれる。

最近2-color flowcytometryが開発され、広く生物学に用いられている。これは、従来のflowcytometry (FCM)で調べることができる細胞周期だけでなく、細胞内でのチミジンの取り込み量の違いから、その細胞活性が解析でき、おのおの細胞周期ごとの細胞を抽出できるソーティングも可能となり、腫瘍などの研究に利用されている^{3)~5)}。

上皮小体の形態についての報告¹⁾²⁾⁶⁾⁷⁾やFCMについての報告⁸⁾⁹⁾は散見されるが、この両者の関係を調べた報告はみられない。そこで今回、上皮小体機能亢進症における組織形態と細胞活性との関係を、抗PTH抗体を用いた免疫組織化学的手法と、2-color flowcytometryで検討したので報告する。

対象および方法

対象は1988年5月から1990年8月までに手術したPHPT 8例(男性3例, 女性5例, 平均45.3歳), SHPT 13例(男性5例, 女性8例, 平均49.3歳)の計21例である。PHPTはすべて結石型で、1腺のみの腫大であった。SHPTでは全例4腺の腫大を認め、3腺と最も小さい腺の1/2を摘除する上皮小体亜全摘術を施行した。そのうち最大の1腺を検体に用いた。また、平均透析期間は9年間(7~18年)であり、Ca製剤とビタミンDは全員内服していた。病理組織的にはPHPTでは1例のみ主細胞過形成で、残りは腺腫であったが、SHPTでは全例主細胞過形成であった。

1. 2-color flowcytometryの検討

摘出した上皮小体を直ちに1mm³大に細切し、0.05%コラゲナーゼ加培養液にて細胞分散した。遠沈(1,000rpm 5分間, 以下同じ)して上清を捨て、培養

液内に濃度が10 μ Mとなるようbromodeoxyuridine (BrdU, Sigma製)を添加し、37 $^{\circ}$ C, 95%O₂, 5%CO₂の恒温器内で30分間培養した。BrdUを培養液で洗浄除去し、濃度が0.05%となるようにコラゲナーゼを加えて細胞分散を行い、遠沈して上清を捨て、2~3mlの70%冷エタノールで細胞を30分間以上固定した。遠沈後、RNA除去とDNA変性処理のために3M-HClで30分間室温にてインキュベーションし、中和のために遠沈を繰り返してリン酸緩衝液(phosphate buffered saline, pH 7.4, PBS)で4回洗浄した。遠沈後 fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 BrdU 抗体20 μ l (Becton-Dickinson)を加え、30分間インキュベーションした。5mlの0.5%Tween 20加PBSを加えて2回遠沈し、PBSで50 μ g/mlに調製したpropidium iodideを1~2ml加え、30分以上静置して、直前に37 μ m ナイロンメッシュを通して10,000個の細胞をFCM解析(Becton Dickinson社製FACScan, FACStar)した。なお、励起波長は488nm, FL1(縦軸)の蛍光波長は530nm, FL2(横軸)の蛍光波長は575nmで、両者ともBand Passフィルターを使用した。以上の操作は室温で施行した。

2. 微細構造の検討

cell sorterにて細胞をG 0, 1期, G 2M期の細胞, aneuploidピークの細胞を個別に抽出し(sorting), 個々の抽出液を遠沈後2%グルタルアルデヒドで30分以上固定した。PBSで洗浄し、2%オスミウムで4 $^{\circ}$ C, 90分間固定のうえ、50, 70, 90, 100, 100, 100%エタノールでそれぞれ10~15分間脱水した。プロピレンオキシドで置換し、3時間浸透させ、エポキシ樹脂に包埋し、60 $^{\circ}$ Cにて1日以上重合のうえ超薄切して電子顕微鏡にて観察した。

3. 免疫染色の検討

ホルマリン固定後パラフィン包埋し、8 μ mに薄切した標本を十分に覆うように1%過酸化水素メタノール液を滴下、室温にて30分インキュベーションし、PBSで洗浄、20倍希釈正常ヤギ血清を滴下、室温にて30分インキュベーション、PBSで洗浄し、IBL製抗ヒトPTHウサギ抗体、あるいは陰性コントロールとして20倍希釈正常ウサギ血清を滴下、4 $^{\circ}$ Cで12~18時間インキュベーションし、PBSで洗浄、抗ウサギIgGヤギ抗体を滴下、室温で40分間インキュベーションし、PBSで洗浄後、peroxidase-anti-peroxidaseを滴下し、室温で30分インキュベーション、過酸化水素含有0.01M PBS加3-3'ジアミノベンチジン(0.2mg/ml)

を滴下，室温で10～20分インキュベーションし，PBSで洗浄，さらにヘマトキシリンにて対比染色を施し，脱水，封入して検鏡した。

結 果

1. 2-color flowcytometry の検討

図1 2-color flowcytometry 上，単一の G0G1ピークを示す diploid pattern.

図2 2-color flowcytometry 上，2c に G0G1ピークを有し，4c ピークが総細胞中20%以上であり，かつ tetraploid の G0G1ピークに一致する tetraploid G2, M ピークを認める tetraploid pattern.

2-color flowcytometry で得られたデータを解析する際，単一の G0G1ピークを示すものを diploid(図1)とし，tetraploid(図2)は2c に G0G1ピークを有し，4c ピークが総細胞中20%以上であり，かつ tetraploid の G0G1ピークに一致する tetraploid G2, M ピークを認めるものとし，それ以外のものは aneuploid(図3)とした。

DNA ploidy pattern の結果は，PHPT では，1例の主細胞過形成症例を含め，8例すべて diploidを示したのに対し，SHPT では diploid が9例(69.2%)，tertaploid が2例(15.4%)，aneuploid が2例(15.4%)みられた。DNA ploidy pattern と年齢，男女差，透析期間，摘出腺の総重量，血清 PTH 値，血清カルシウム値との間には関係はみられなかった。ただし，血清アルカリフォスファターゼ(Alp)値の平均±標準偏差(IU/L)は，diploid 280 ± 88 に対し，tetraploid は563，809，aneuploid は680，456といずれも高値であった。SHPT のなかで病的骨折の既往がある症例は，5例であったが，このうち2例は tetraploid，2例は aneuploid を示した。

2. 微細構造の検討

diploid の2c および4c ピークのみを sorting して抽出した上皮小体細胞の電子顕微鏡所見では，両者とも粗面小胞体の増加，ゴルジ野の拡大がみられた(図4)。aneuploid の正常の2c，4c ピークの細胞は diploid の

図3 2-color flowcytometry 上，diploid でも tetraploid でもない aneuploid pattern.

図4 diploidの2c ピーク細胞の電子顕微鏡所見。粗面小胞体(白矢印)、ゴルジ装置(黒矢印)がみられる(×6,000)

図5 aneuploidの異常ピーク細胞の電子顕微鏡所見。多量の分泌顆粒がみられる。小顆粒はグリコーゲン顆粒(×9,900)

は、分泌顆粒が多数みられた(図5)。

3. 免疫染色の検討

PHPTとSHPTの所見は、diploidの上皮小体では、全例、細胞質を中心に細胞全体が一様に淡く染まっていた(図6-I)。この所見はPHPT(8例)とSHPT(9例)とで差異はなかった。tetraploid(2例)の上皮小体においては、腺構造の細胞が特に濃く染まった部分がみられた(図6-II)。aneuploid(2例)の上皮小体では、濃く染まる細胞が散在して認められた(図6-III)。また、陰性コントロールを図6-IVに示した。

考 察

今回、2-color flowcytometryで得られた細胞活性と形態との関係を検討した。その結果、PHPTの8例ではすべてdiploidであったのに対し、SHPTではtetraploid、aneuploidがそれぞれ2例(15.4%)みられた。また、これら3種類のDNA ploidy patternは、免疫染色では異なった形態を示した。また、2-color flowcytometryで、正常の2c、4cおよびその他の異常ピークをsortingして電子顕微鏡で観察したところ、2c、4cピークの細胞は粗面小胞体の増加やゴルジ野の拡大などがみられた。図4は、粗面小胞体の数、ゴルジ装置の広さから、involting phase¹⁰⁾に相当するものと考えられるが、ほとんどの細胞はresting phaseではないactive phaseであった。異常ピークの細胞においては分泌顆粒が多数認められたことから、packaging~secreting phase¹⁰⁾に相当するものと考えられた。免疫染色で染色されるものは分泌顆粒であったことから¹¹⁾、tetraploid、aneuploidでみられた濃染細胞は、分泌顆粒を多量に持っており、active phaseの中でもpackaging~secreting phaseにあり、その細胞活性は高く、sortingされたaneuploidの異常ピークの細胞は、免疫染色では濃染される細胞に相当すると考えられた。

tetraploidの異常ピークは、その細胞数が少数であったため電子顕微鏡で観察するには至らなかったが、やはり、腺構造の細胞が濃染されていることから、aneuploidと同様、分泌顆粒を多量に持った細胞であることが推察される。

FCM上、tetraploid、aneuploidを示した症例は、すべて病的骨折の既往を持っていたが、diploid症例では17例中1例しか病的骨折はなかった。病的骨折と上皮小体細胞の細胞活性を直接結びつけることはできないが、病的骨折の原因はPTHによる骨吸収によると思われるので、tetraploidやaneuploidを持つ上皮小体

ものと同様の所見であった。一方、aneuploidの正常の2c、4cピーク以外のピークを抽出した上皮小体細胞で

図6 I : 全体の細胞が淡く染まる型(×350). II : 腺構造の細胞が濃く染まる型(×350). III : 濃く染まる細胞が散在する型(×350). IV : 陰性コントロール(×350).

6-I

6-II

6-III

6-IV

細胞の影響と考えられた。

血清 Alp 値に diploid と tetraploid および aneuploid との間で差がみられたことは、病的骨折後の影響とも思われるが、PTH の直接作用の可能性も考えられる。

今回の上皮小体の検討と同様に、他の内分泌臓器でも病理学的に良性疾患に tetraploid や aneuploid がみられることがある¹²⁾¹³⁾。また、癌でない上皮小体機能亢進症でも、FCM 上 tetraploid や aneuploid を示すことがあるとの報告もみられる⁸⁾⁹⁾。しかし、今回の検討では、diploid, tetraploid, aneuploid の間において、PTH, カルシウム, リンなどの検査成績や臨床症状に差異はなく、Alp 値と病的骨折においてのみ差異がみられた。

同じ主細胞過形成でも DNA ploidy pattern が異なる原因は興味を持たれる。しかし、男女差、年齢、透析期間、上皮小体の総腺重量、基礎疾患などにおいては差異はなかった。

今回の検討で、従来の FCM にかわって 2-color flow-cytometry を用いたのは、細胞周期の違いによる細胞を sorting することによって各々の細胞群を電子顕微鏡で観察する目的であったからである。ただ、tetraploid の異常ピークの細胞は観察できなかった。これは、sorting 後、電子顕微鏡の試料作成の過程で、遠沈などの操作を繰り返すことによって細胞数が減少し、観察するに不十分であったためである。

今回、免疫組織化学的手法と 2-color flowcytometry を用いて、上皮小体の組織型と細胞活性との関連を調べたところ、強い相関のあることが推察された。

結 語

上皮小体機能亢進症における組織形態と細胞活性との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 2-color flowcytometry による上皮小体の DNA ploidy pattern は、PHPT ではすべて diploid であったが、SHPT では diploid が 9 例(69.2%)、tetraploid が 2 例(15.4%)、aneuploid が 2 例(15.4%)みられた。

2. aneuploid の異常ピークを sorting した細胞の電顕所見では、diploid の細胞に比べて分泌顆粒が多数みられた。

3. 免疫染色の結果は、diploid の上皮小体では細胞の染色度は一様に淡かったが、aneuploid, tetraploid の上皮小体では濃染される細胞がみられた。

4. これらの濃染細胞は、PTH の分泌顆粒を多量に

有し、高い細胞活性を持つものと考えられた。

本研究は文部省科学研究費一般研究 C(No. 62480344)および奨励研究 A (No. 02771035) による援助を受けた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師栗田孝教授に深謝いたします。さらに直接本実験を御指導くださいました郡健二郎講師に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第78回日本泌尿器科学会総会、第1回日本尿路結石症研究会において発表した。

文 献

- 1) Roth, S.I.: Recent advances in parathyroid gland pathology. *Am. J. Med.*, 50, 612—622, 1971.
- 2) Lawrence, D.A.S.: A histological comparison of adenomatous and hyperplastic parathyroid glands. *J. Clin. Path.*, 23, 626—632, 1978.
- 3) Horan, P.K. and Wheelless, L.L.: Quantitative single cell analysis and sorting. *Science*, 198, 149—157, 1977.
- 4) 北條一夫, 遠藤 仁, 古閑千寿子, 蓮村 哲, 酒井文徳: Cell sorter (flow cytometer)を利用した Kupffer 細胞の単離とその特性. *肝臓*, 23, 864—872, 1982.
- 5) Durand, R.E.: Use of a cell sorter for assays of cell clonogenicity. *Cancer Res.*, 46, 2775—2778, 1986.
- 6) Szakacs, J.E. and Bryant, M.: Ultrastructure of parathyroid adenomas. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 10, 13—25, 1980.
- 7) Oka T., Yoshioka, T., Shrestha, G.R., Koide, T., Sonoda, T., Hosokawa, S., Onoe, K. and Sakurai, M.: Immunohistochemical study of nodular hyperplastic parathyroid glands in patients with secondary hyperparathyroidism. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat.*, 413, 53—60, 1988.
- 8) 小松 誠, 菅谷 昭, 小林 信や, 増田裕行, 高橋昭三, 清水忠博, 飯田 太, 村松 昭: 原発性上皮小体機能亢進症における細胞核 DNA Ploidy Pattern の検討. *内分泌外科*, 7, 65—69, 1990.
- 9) Obara, T., Fujimoto, Y., Kanaji, Y., Okamoto, T., Hirayama, A., Ito, Y. and Kodama, T.: Flow cytometric DNA analysis of parathyroid tumors —Implication of aneuploidy for pathologic and biologic classification—. *Cancer*, 66, 1555—1562, 1990.
- 10) Shannon, W.A. Jr. and Roth, S.I.: An ultrastructural study of acid phosphatase activity in normal, adenomatous and hyperplastic (chief cell type) human parathyroid glands. *Am. J. Pathol.*, 77, 493—506, 1974.
- 11) 高田昌彦: 上皮小体機能亢進症の組織分類と微細構造について. *日泌尿会誌*, 投稿中

- 12) 元村祐三：フローサイトメトリーによる甲状腺腫瘍内 DNA 含量の測定—腫瘍の生物学的悪性度判定の試み—。日外会誌，89，1066—1074，1988。
- 13) 中井秀郎，橘 政昭，馬場志郎，出口修宏，実川正

道，畠 亮，田崎 寛：正常副腎および副腎腫瘍組織の flow cytometric DNA-histogram による分析。日泌尿会誌，80，11—16，1989。

(1992年 8 月 3 日受理，特別掲載)