酵素抗体法による下垂体腺腫の免疫組織化学的観察

—Hyperprolactinemia を伴う症例について—

寺本 明・松谷 雅生・平川 公義
佐野 圭司・長村 義之*・渡辺 慶一*

Immunohistochemical Observations of the Pituitary Adenomas with the Use of Enzyme Labeled Antibody Method

—On the Cases with Hyperprolactinemia—

AKIRA TERAMOTO, MASAO MATSUTANI, KIMIYOSHI HIRAKAWA,
KEIJI SANO, R. YOSHIYUKI OSAMURA* and KEIICHI WATANABE*

Department of Neurosurgery, University of Tokyo

**Department of Pathology, Tokai University*

Summary

Fifteen pituitary adenomas with hyperprolactinemia obtained at surgery were studied by an indirect immunoperoxidase technique for the demonstration of prolactin. (Anti-human prolactin was supplied by NIAMDD.) The immunoreactive prolactin was revealed in the cytoplasm of the tumor cells in 13 cases, which were classified into two types according to the population of prolactin cells and the intracytoplasmic localization of immunoreactive prolactin.

Type I——8 cases——

The adenomas of this type consisted of numerous prolactin cells, which accounted for more than 90% of the tumor cells. These were strongly suggested to be the primary prolactin producing adenomas. Immunoreactive prolactin was characteristically found in the form of 'Nebenkern' in the cytoplasm of these adenoma cells, while it distributed evenly throughout the cytoplasm in normal prolactin cells. This finding suggested discrepancy of the hormone syntheses between normal and neoplastic prolactin cells. Clinically, serum prolactin levels were over 1,000 ng/ml, and the tumor sizes were variable from intrasellar types to larger ones showing remarkable suprasellar extensions.

Type II——5 cases——

The proportion of prolactin cells was only 10 ~ 30% of the tumor cells, which also contained growth hormone and/or luteinizing hormone in two cases. These adenomas, consisting of prolactin cells and some other cell types, might be considered to show the 'chimera' like proliferation. In contrast with Type I, intracytoplasmic immunoreactive prolactin was detected unevenly in each prolactin cells. Clinically, serum prolactin levels were about 100 ng/ml, and all the tumors of this type showed moderate or marked suprasellar extensions. From this viewpoint, the interruption of prolactin inhibiting factor (PIF) might play some role to activate prolactin cells of these adenomas. Since the immunohistochemical findings well reflected the serum prolactin levels in most cases, it might be considered that the origin of hyperprolactinemia can be attributed to the tumor itself.

Key words: pituitary adenoma, hyperprolactinemia, prolactin, enzyme labeled antibody method, immunohistochemistry

東京大学脳神経外科

*東海大学病理

〔連絡先: 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1, 東京大学脳神経外科, 寺本 明〕

1978年2月16日 受稿

I はじめに

近年, hyperprolactinemia を伴う下垂体腺腫がかなり高頻度に報告されており, いわゆる chromophobe adenoma においては, その1/3以上がこの範疇に属するものと考えられている²²⁾. それに伴い, 血中 prolactin (PRL)値測定の有用性が, 診断, 治療, 予後の各面から重要視され, 数多くの研究がなされている³⁾⁵⁾⁹⁾¹⁵⁾²⁰⁾²¹⁾.

一方, 下垂体腺腫における hyperprolactinemia の病態に関しては, 従来一次的な腫瘍分泌による場合, および視床下部障害に伴う PIF (prolactin inhibiting factor) 遮断による場合とが考えられていた. また, 後者においては, PRL を分泌する主体が腫瘍自体か, 残存下垂体組織か, またはその両者かという問題が存在する. しかし, このような各病態を臨床例に関して考察した報告はきわめて少なく, 通常, PRL分泌腫瘍とのみ称している場合が多い.

我々は, hyperprolactinemia を呈した下垂体腺腫の症例について, 酵素抗体法による, 腫瘍内 immuno-reactive PRLの免疫組織化学的観察を行い, 臨床像と比較検討し, その病態に関して若干の知見を得たので報告する.

II 対 象

東京大学脳神経外科において, 1972年6月から, 1977年9月までに手術を施行した下垂体腺腫は84例であり, その21例(25%)に hyperprolactinemia (basal level 30 ng/ml 以上)を認めた. なお Forbes-Albright 症候群は4例であった. 以上の症例中, 手術時摘出した材料が十分な腫瘍組織を含んでおり, しかも保存性の良好なもの

Table 1 Summary of clinical data in reported 15 cases*

No.	Subject	Age	Sex	Size of sella mm.	Suprasellar mass	Serum PRL ng/ml
1	S.K.	26	F	16×13	M	113
2	K.S.	40	F	14×9	L	135
3	T.F.	26	F	18×13	S	5600
4	B.N.	65	F	19×14	L	>1000
5	N.K.	42	M	21×16	M	>1300
6	S.Y.	36	M	21×21	M	5980
7	K.W.	39	M	19×15	—	1475
8	N.K.	45	M	18×14	M	1183
9	F.N.	24	F	18×11	M	100
10	K.R.	27	M	25×18	L	8240
11	T.E.	34	F	22×15	M	62
12	Y.T.	22	F	20×14	S	2000
13	M.K.	37	F	12×11	L	84
14	N.N.	51	M	32×17	M	13800
15	N.M.	25	F	18×11	—	763

* All cases were chromophobe adenomas.

◁ S=Small, M=Moderate, L=Large

15例を本研究の対象とした (Table 1).

症例は, 22~65才までの男子6例, 女子9例である. 腫瘍は, intrasellar type から著明な suprasellar extension を示すものまでを含み, 血中 PRL 値は 62 ng/ml から 13,800 ng/ml に及んだ. 従来組織学的診断は全例 chromophobe adenoma である.

III 方 法

Nakane による酵素抗体法間接法を用い⁶⁾¹⁴⁾, PRL, growth hormone (GH), luteinizing hormone (LH) に関し, 免疫組織化学的染色を行った. 以下, PRLに例をとる (Fig. 1). 10%ホルマリンまたは Bouin 固定後, パラフィン包埋された腫瘍組織の切片を作製し, 脱パラフィンを行う. 一次抗体として抗ヒト PRL ウサギ血清 (NIAMDD 提供) を, 二次抗体として peroxidase をラベルした抗「ウサギγグロブリン」ヒツジ血清を作用させた後, 3,3'-diaminobenzidine と H₂O₂ による発色反応 (Graham & Karnovsky⁴⁾)を用いた.

なお, Control test としては一次抗体を正常ウサギ血清で置換して上記操作を行い, 非特異的染色, すなわち background staining を検討した.

腫瘍切片の染色時, 剖検により得られた正常下垂体組織をも同時に染色を行い, 一次抗体の力価, 特異性を確認するとともに, 全体の操作を通じてこの technical error の指標とした.

最後に, counter staining として methyl green による核染色を施し, 脱水, 封入した.

IV 結 果

Immuno-reactive PRL は, 15例中13例に証明され, 主として腫瘍構成細胞における PRL 細胞の占める割合に Pieces of tumor tissue were fixed in 10% formalin or Bouin's solution and embedded in paraffin.

↓※
Deparaffinize and hydrate.
↓※
Apply rabbit anti-human prolactin (NIAMDD).
Control: normal rabbit serum.
↓※
Apply peroxidase-labeled sheep anti-rabbit γ-globulin.
↓※
Incubate in 3,3'-Diaminobenzidine + H₂O₂.
↓※
Dehydrate and mount.
※ Wash in PBS.

Fig. 1 Indirect peroxidase-labeled antibody method (by P. K. Nakane)

より症例は大きく2型に分類されるとともに、細胞質内 PRL 分布様式にも若干の相異が認められた (Table 2).

〔第Ⅰ型〕 8 例 (Fig. 2, 3)

PRL 細胞が腫瘍構成細胞の90%以上を占める. 腫瘍細胞内 immuno-reactive PRL は核に接して、核よりやや小

型の塊状をなして存在しており、この分布様式は第Ⅰ型のすべての PRL 細胞に共通した所見である. しばしば核は偏在し、その対側の細胞質の大部分に、いわゆる “Nebenkern” 状の immuno-reactive PRL が証明される.

一方、GH および LH に関しては全例 negativeであった.

細胞構築は一例を除いてすべて diffuse type を示した.

〔第Ⅱ型〕 5 例 (Fig. 4, 5)

PRL 細胞は腫瘍構成細胞の一部であり、10~30%程度である. 腫瘍細胞内 immuno-reactive PRL の分布は、基本的には前述した第Ⅰ型と同様 “Nebenkern” 状に証明される. しかし、immuno-reactive PRL は量的に第Ⅰ型がほぼ均一であるのに反し、第Ⅱ型では比較的不揃いであって、きわめてわずかしき証明されない細胞から、細胞質全体に認められるものまで様々である. また、不規則な cup-shape を示す PRL 細胞も散見される.

一方、GH positive 1 例、GH および LH がともに positive 1 例が認められた.

Table 2 Summary of immunohistochemical and morphologic findings

	No.	Subject	Immuno-reactive PRL	GH	LH	Architecture
Type I	5	N.K.	+++	—	—	Diffuse
	6	S.Y.	++	—	—	Diffuse
	7	K.W.	++	—	—	Diffuse
	8	N.K.	++	—	—	Diffuse
	10	K.R.	+++	—	—	Sinusoidal
	12	Y.T.	+++	—	—	Diffuse
	14	N.N.	+++	—	—	Diffuse
	15	N.M.	+++	—	—	Diffuse
Type II	1	S.K.	+	—	—	Sinusoidal
	2	K.S.	+	+	—	Sinusoidal
	9	F.N.	+	—	—	Diffuse
	11	T.E.	+	+	+	Sinusoidal
	13	M.K.	+	—	—	Sinusoidal
Negative	3	T.F.	—	—	—	Diffuse
	4	B.N.	—	—	—	Diffuse

Fig. 2 Micrographs of type I. Top: Case 14 (fixed in 10 per cent neutral formalin). Bottom: Case 15 (fixed in Bouin's solution). The adenomas consist of numerous PRL cells, (immunoperoxidase staining for PRL x approx 400)

Fig. 3 Same cases as in Fig. 2. Immunoreactive PRL is evident in the form of 'Nebenkern' in the cytoplasm of almost all adenoma cells. (immunoperoxidase staining for PRL x approx 1,000)

Fig. 4 Micrograph of type II. Case 11. PRL cells are seen sparsely. (immunoperoxidase staining for PRL $\times$ approx 400)

Fig. 5 Same cases as in Fig. 4. Immunoreactive PRL is detected unevenly in the cytoplasm of each PRL cells. (immunoperoxidase staining for PRL $\times$ approx 1,000)

Fig. 6 Normal anterior pituitary gland. The population of PRL cells is estimated at 20 ~ 30%. (immunoperoxidase staining for PRL $\times$ approx 200)

Fig. 7 Normal anterior pituitary gland. PRL cells are frequently cup-shaped. (immunoperoxidase staining for PRL $\times$ approx 1,000)

細胞構築は、5例中4例が sinusoidal type であった。Immuno-reactive PRLの証明されない症例は2例であり、GH および LH に関しても negative であった。

V 考 察

酵素抗体法は、1966年、Nakane ら¹⁰⁾¹¹⁾ により開発されて以来、免疫組織化学の分野において着実に重要な役割を荷ってきている。そして、酵素抗体法を用いた間脳下垂体系に関する研究も次第にその数を増してはいるものの²⁾⁶⁾⁷⁾²²⁾、いまだ我国では、この方面に関する報告を散見する程度にすぎない。

そこで、まず酵素抗体法を用いて、正常下垂体組織における PRL 細胞の形態学的観察を行い、腫瘍組織におけるそれとの相異を求めた (Fig. 6, 7)。

正常下垂体前葉には、現在5種類のホルモン産生細胞が同定されており¹²⁾、PRL 細胞の population は通常20 ~ 30%とされ、部位により多少その密度を異にするもの

の、GH 細胞について大きな割合を占める¹³⁾。正常PRL細胞は多くの場合、cup-shape をなしており、小型の円形細胞を包含するような形態で存在している。Nakane によるラット下垂体の観察では、PRL 細胞はやはり同様の形態を示しており、LH 細胞をとりまいてると報告されている¹²⁾。細胞内 immuno-reactive PRL は細胞質全体にほぼ均一に顆粒状に証明される。

一方、腫瘍組織、特に第1型における PRL 細胞はその population が90%以上であり、細胞形態は cup-shape を示すものではなく、oval ~ polygonal type が大勢を占める。細胞内 immuno-reactive PRL 分布はきわめて特徴的であり、核に接して核よりやや小さい塊状に証明され、腫瘍細胞すべてに共通する所見である。Immuno-reactive PRL の集族であるこの小塊の様態は、ホルマリン固定例の場合やや蜂巢状となり、Bouin 固定例の場合顆粒状となる傾向がみられるものの、その細胞質内局在

Fig. 8 Correlation between immunohistochemical findings, serum PRL and suprasellar mass.

には差異を認めなかった。一般に、酵素抗体法における下垂体組織の固定としてはBouin 固定が賞用されるが、同一症例に対するホルマリン固定と Bouin 固定とを比較すると、後者の方がより fine に immuno-reactive PRL の局在を表現する傾向がみられる。

以上のごとく正常 PRL 細胞と腫瘍における PRL 細胞とは、形態学的相異に加えて、細胞質内 immuno-reactive PRL の局在を異にすることから、両者における PRL 分泌機構の差異を示唆するものと考えられる。従来、functioning adenoma の電子顕微鏡的観察において、ホルモンの局在は直接的には分泌顆粒に、間接的には endoplasmic reticulum や Golgi apparatus などに求められていた¹⁶⁾。今回光学顕微鏡 level で観察された、この "Nebenkern" の fine structure に関して免疫電顕の手法を用いた研究が今後の課題である。

つぎに、PRL 分泌腫瘍における免疫組織化学的観察の結果を臨床像との関連で検討した (Fig. 8)。

第 I 型は 763 ng/ml の 1 例を除きすべて血中 PRL 値 1,000 ng/ml 以上の症例であり、腫瘍組織における PRL 細胞の頻度を反映していると考えられる。腫瘍の発育型は, intrasellar type から著明な suprasellar extension を示すものまでが存在する。TRH に対する血中 PRL 値の反応はほとんど認められなかった。なお、男性例が全例第 I 型に属していることは興味深く、男性における PRL の内分泌学的意義との関連を示唆する。

第 II 型に関しては、すべて血中 PRL 値が 100 ng/ml

前後の症例であり、中等度以上の supra-sellar extension を伴っていた。また、TRH に対する血中 PRL 値の変動は無反応ないし低反応であった。

以上の結果から、第 I 型に属する腫瘍は、元来 PRL を分泌する腫瘍 (primary PRL producing tumor) であることが強く示唆される。第 II 型に関しては、いくつかの病態が考えられる。その 1 つは腫瘍が中等度以上の suprasellar extension を示していることから、視床下部ないし下垂体茎を障害し、prolactin inhibiting factor (PIF) を遮断することにより腫瘍もしくは残存下垂体の PRL 細胞を activate する場合である。第 2 には、第 II 型の一部に GH および LH が positive であることから、PRL 細胞を含む複数の cell type が、いわば "chimera" 的に増殖していることが考えられる。高 PRL 血症の責任病巣を考える時、正常下垂体組織の PRL 分泌能力が問題となる。各種薬剤による刺激効果¹⁷⁾、stalk section¹⁸⁾、craniopharyngioma 等ホルモン非分泌腫瘍による物理的 PIF 遮断効果に基づく高 PRL 血症は通常 200 ng/ml 以内であり、500 ng/ml 以上となることはきわめて稀である^{17,18)}。ゆえに、これ以上の高 PRL 血症は下垂体組織の分泌能力を越えており、腫瘍の autonomic secretion と考えるのが妥当であろう。Immunohistochemical stain にて証明された PRL 細胞の頻度に加えて、前述した理由からも第 I 型における高 PRL 血症の責任病巣は腫瘍に求められよう。一方、第 II 型に関しては血中 PRL 値のみでは判定不可能であるが、immunohistochemical stain にて PRL 細胞が証明されることから、少なくとも腫瘍も責任病巣の役割を荷っているといえよう。

腫瘍組織内 immuno-reactive PRL の negative 例は 2 例であり、いずれも古い症例に属し、その antigenicity の保存性が問題となる。Immunohistochemical stain においては常に固定による antigenicity の喪失が重要な問題であるが、時間の経過とともに変性の要素も考慮しなければならない。それゆえ、positive 例に関してはその形態学的観察をなしうが、negative 例については対象とする抗原が存在しないということと必ずしも等価でない場合があるため、その意義付けはしばしば困難である。ただし、現在までの検索では少なくとも GH や PRL 等 peptide hormone に関しては、数年前のホルマリン固定パラフィンブロックの材料でも比較的良好な結果が得られることが知られている⁷⁾。

VI 結 論

Hyperprolactinemia を呈した下垂体腫瘍 15 例に関し、酵素抗体法を用いて免疫組織化学的観察を行い、臨床像

と比較検討した。

1. Immuno-reactive PRL陽性例は13例であり、PRLの分布形態により大きく2型に分類された。また、腫瘍におけるPRLの細胞内分布はいわゆる“Nebenkern”として存在し、正常PRL細胞のそれと異なっていた。

2. 第Ⅰ型はPRL細胞ほぼ一色の密な増殖形態を示し、primary PRL producing tumorであることを強く示唆する。臨床的には血中PRL値1,000 ng/ml以上を呈し、その発育型には特に傾向を認めない。

3. 第Ⅱ型はPRL細胞の頻度が低く、その病態に関して若干の考察を加えた。臨床的には血中PRL値100 ng/ml前後であり、中等度以上のsupra-sellar extensionを示した。

4. 高PRL血症の責任病巣は第Ⅰ型では腫瘍に求められ、第Ⅱ型では少なくとも腫瘍もその役割を荷っていると考えられる。

本論文の要旨は、第36回日本脳神経外科学会総会(1977年、大阪)において発表した。

文 献

- 1) CLEMENS, J. A., SMALSTIG, E. B. & SAWYER, B. D.: Antipsychotic drugs stimulate prolactin release. *Psychopharmacologia* (Berl.) 40: 123-127, 1974
- 2) CORENBLUM, K., SIREK, A. M. T., HORVATH, E., et al.: Human mixed somatotrophic and lactotrophic pituitary adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 857-863, 1976
- 3) FRANK, S., JACOB, H. S. & NABRRO, J. D. N.: Proceedings: Studies of prolactin secretion in pituitary disease. *J Endocrinol* 67: 55, 1975
- 4) GRAHAM, R. C. & KARNOVSKY, M. J.: The early stages of absorption of injected horse-radish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291-302, 1966
- 5) HWANG, P., GUYDA, H. & FRIESEN, H.: A radioimmunoassay for human prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1902-1906, 1971
- 6) KOVACS, K., HORVATH, E., CORENBLUM, B., et al.: Pituitary chromophobe adenomas consisting of prolactin cells. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 366: 113-123, 1975
- 7) KOVACS, K., CORENBLUM, B., SIREK, A. M. T. et al.: Localization of prolactin in chromophobe pituitary adenomas: Study of human necropsy material by immunoperoxidase technique. *J Clin Pathol* 29: 250-258, 1976

- 8) 瓦井康之 & NAKANE, P.K.: 酵素抗体法—最近の方法論的進歩を中心として—。蛋白質・核酸・酵素 20: 1007-1013, 1975
- 9) MALARKEY, W. B. & JOHNSON, J. C.: Pituitary tumors and hyperprolactinemia. *Arch Intern Med* 136: 40-44, 1976
- 10) NAKANE, P. K. & PIERCE, G. B.: Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14: 929-931, 1966
- 11) NAKANE, P. K.: Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method. A study on pituitary gland of the rat. *J Histochem Cytochem* 16: 557-560, 1968
- 12) NAKANE, P. K.: Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 18: 9-20, 1970
- 13) NAKANE, P. K.: Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann NY Acad Sci* 254: 203-211, 1975
- 14) 長村義之, 渡辺慶一: 酵素抗体法—原理より内分泌応用まで—。ホルモンと臨床 24: 1074-1087, 1976
- 15) PEREZ-LOPEZ, F. R.: Hypothalamic pituitary disorders expressed by galactorrhea. A dynamic evaluation. *Obstet Gynecol* 46: 621-626, 1975
- 16) ROBERT, F. & HARDY, J.: Prolactin-Secreting adenomas. A light and electron microscopical study. *Arch Pathol* 99: 625-633, 1975
- 17) TOLIS, G., GOLDSTEIN, M. & FRIESEN, H. G.: Functional evaluation of prolactin secretion in patients with hypothalamic-pituitary disorders. *J Clin Invest* 52: 783-788, 1973
- 18) TOLIS, G., SOMMA, M., VAN CAMPENHOUT, J. & FRIESEN, H. G.: Prolactin secretion in sixty-five patients with galactorrhea. *Am J Obstet Gynecol* 118: 91-101, 1974
- 19) TURKINGTON, R. W., UNDERWOOD, L. E. & VAN WYK, J. J.: Elevated serum prolactin levels after pituitary-stalk section in man. *N Eng J Med* 285: 707-710, 1971
- 20) TURKINGTON, R. W.: Secretion of prolactin by patients with pituitary and hypothalamic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 34: 159-164, 1972
- 21) YAMAJI, T., SHIMAMOTO, K., ISHIBASHI, M., et al.: Effect of age and sex on circulating and pituitary prolactin levels in human. *Acta Endocrinol* 83: 711-719, 1976
- 22) ZIMMERMAN, E. A., DEFENDINI, R. & FRANTZ, A. G.: Prolactin and growth hormone in patients with pituitary adenomas. A correlative study of hormone in tumor and plasma by immunoperoxidase technique and radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 577-584, 1974