いわゆる非機能性下垂体腺腫における α subunit 陽性細胞について

山上 達人・橋本 信夫・小島 正行・半田 肇・武内 重二*

α Subunit Positive Cases in so-called Non-functioning Pituitary Adenomas

Tatsuhito YAMAGAMI, Nobuo HASHIMOTO, Masayuki KOJIMA, Hajime HANDA and Juji TAKEUCHI*

Department of Neurosurgery, Kyoto University, Kyoto; *Department of Neurosurgery, Fukui Red Cross Hospital, Fukui

Abstract

Operative specimens of 73 pituitary adenoma cases (25 cases of prolactinoma, 24 cases of acromegaly, 21 cases of non-functioning adenoma, and 3 cases of gonadotropin secreting adenoma) were examined immunohistochemically for luteinizing hormone (LH) β subunit, follicle stimulating hormone (FSH) α subunit, FSH β subunit, and thyroid stimulating hormone (TSH) by using the peroxidase antiperoxidase method.

Four cases of prolactinoma were positive for the FSH α subunit. Nineteen cases of acromegaly were positive for the FSH α subunit. These cases were also positive for the FSH β and/or LH β subunit. In gonadotropin secreting adenoma all 3 were positive for both FSH α and β subunits. Eleven cases of non-functioning adenoma were positive for the FSH α subunit. Six of 11 (3 male and 3 female) were positive only for FSH α subunit. A high serum human chorionic gonadotropin α subunit value was recognized in 1 case of these 6.

In an endocrinological study of non-functioning adenoma cases of positive FSH α subunit low response of TSH to TSH-releasing hormone loading and low response of LH to LH-releasing hormone (LH-RH) loading were found. However, this abnormal response was not statistically significant. In FSH response to LH-RH loading 1 case had delayed response and 7 cases had low response. This abnormal FSH response to LH-RH was statistically significant in 9 FSH α subunit positive cases.

These data indicate that there are α subunit secreting pituitary adenomas in the group which has been diagnosed as "non-functioning adenoma".

Key words: pituitary adenoma, immunohistochemistry, alpha subunit, non-functioning adenoma, glycoprotein hormone

I はじめに

内分泌学, 特に鋭敏な radioimmunoassay および免疫組織化学の発展により, 下垂体腺腫はホルモン産生能に基づいて分類されるようになった。下垂体ホルモンの過剰分泌

により prolactin 産生腺腫 (prolactinoma), GH 産生腺腫 (acromegaly), ACTH 産生腺腫 (Cushing 病) が診断され, まれなものとして gonadotropin 産生腺腫, TSH 産生腺腫がある。しかし, いわゆる non-functioning adenoma (以下 nf) は依然として wastebasket の疾患である。なぜなら, 特

京都大学脳神経外科 *福井赤十字病院脳神経外科

Address reprint requests to: T. Yamagami, M.D., Department of Neurosurgery, Kyoto University, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606.

受稿 1984年6月14日 受理 1984年11月20日

に男性の nf のなかにはいくらかの gonadotropin 産生腺腫などが含まれている可能性があるからである。したがって、いわゆる nf とされている一群についての本態を内分泌学的により詳細に検討する必要があると思われる。

我々は、1980年11月より1984年4月の間に76例の下垂体腺腫に対して経蝶形骨手術による腺腫摘出術を施行した。内訳は prolactinoma 26 例, acromegaly 24 例, gonadotropin 産生腺腫 3 例, Cushing 病 2 例, nf 21 例である。ここで我々の言う nf とは、術前の内分泌学的検査により hyperfunction の認められないものを指す。これらの標本を用いて免疫組織化学的検討を行い、糖蛋白ホルモン (LH, FSH, TSH) の α および β subunit を中心に腺腫細胞の陽性の有無を調べたところ、かなりの頻度で α , β subunit 陽性細胞が認められたので、その意義について考察を加える。

II 対象および方法

対象としたのは、適切な腺腫標本が得られた prolactinoma 25 例, acromegaly 24 例, nf 21 例, gonadotropin 産生腺腫 3 例の計 73 例である。術中の新鮮な標本を 10%ホルマリン, 10%緩衝ホルマリン, Bouin 固定液, Zamboni 固定液のいずれかで固定したのち、後二者の場合には十分水洗後、0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) にて一晩洗滌し、通常の光顕用のパラフィン包埋を行った。切片は 4 μ m のものを用い、脱パラフィン後、peroxidase anti-peroxidase 法により免疫組織化学的染色を行った。TSH の抗血清は DAKO 社のキットを用いた。また、National Institute of Arthritis Metabolism & Digestive Diseases の Dr. Parlow より入手した FSH α subunit, LH β subunit および FSH β subunit の抗血清を 0.01 M PBS (pH 7.2) にて 200 倍希釈して用いた。核は hematoxylin にて弱染色した。対照としては、0.01 M PBS (pH 7.2) にて 2% に希釈した正常ウサギ血清を用いた。

結果の判定基準は以下の通りである。免疫組織化学的に陽性な細胞間にも intensity の差があり、弱く曖昧に反応した例や一標本中で数個の細胞しか反応しなかった場合には陰性とした。また、腺腫周囲に正常下垂体細胞を含む場合もあるので、腺腫細胞と判断される部分のみを検討の対象とした。特に nf 21 例に関しては、内分泌的機能を評価するため TSH, LH, FSH の刺激試験に対する反応を検討した。すなわち、TRH に対する TSH の正常反応 (最高値 10 μ U/ml 以上), LH-RH に対する LH の正常反応 (最高値 40~100 mIU/ml) および FSH の正常反応 (最高値 10~50 mIU/ml) 以外に、無反応、低反応、遅延反応、過剰反応の判定を行った²⁰⁾。

III 結 果

正常ウサギ血清を用いた対照例での免疫組織化学的染色はすべて陰性であった。nf では 21 例中 11 例 (52%) に FSH α subunit が陽性であり、このうち FSH α subunit のみ陽性となったものは 6 例 (男性 3 例, 女性 3 例) であった (Table 1)。 α subunit は細胞質全体に均一に染色されたが、この α subunit 陽性細胞は腺腫中に散在性に存在するものから腺腫細胞の大半を占めるものまでさまざまであった (Fig. 1)。血管に近い部分に α subunit 陽性細胞が多いということとはなかった。Acromegaly では 24 例中 19 例 (79%) に FSH α subunit 陽性であったが、この場合には FSH β あるいは LH β subunit も同時に陽性であった (Table 2)。 α subunit 陽性細胞は、nf の例と同様に細胞質全体に均一に染色された。Prolactinoma では 25 例中 4 例 (16%) に FSH α subunit が陽性であり、この場合も FSH β subunit の同時陽性を伴っていた (Table 3)。Gonadotropin 産生腺腫では 3 例全例が FSH の α , β subunit ともに陽性であった (Table 4)。

nf 21 例を内分泌学的に、特に糖蛋白ホルモンに対する負荷試験で調べてみたところ、まず TRH test における

Table 1 Non-functioning adenomas

Case	LH β	TSH	FSH β	FSH α
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
11	—	—	—	+
12	—	—	—	+
13	—	—	—	+
14	—	—	—	+
15	—	—	—	+
16	—	—	—	+
17	—	+	—	+
18	+	—	+	+
19	—	+	+	+
20	—	+	+	+
21	+	+	+	+

LH indicates luteinizing hormone; TSH, thyroid stimulating hormone; FSH, follicle stimulating hormone.

Fig. 1 Non-functioning adenomas. A: Clusters of follicle stimulating hormone (FSH) α subunit positive cells are found in the adenoma. The cytoplasm are stained reddish brown. B: FSH α subunit positive cells are distributed more sparsely in this case. Counter-stain hematoxylin, $\times 400$.

TSH の反応では、FSH α subunit が陰性であった10例のうち無反応が1例、低反応が3例、正常反応が6例であり、FSH α subunit が陽性であった11例中低反応が7例、正常反応が4例であった。次に LH-RH test における LH の反応では、FSH α subunit が陰性であった7例のうち低反応が4例、正常反応が3例であり、FSH α subunit が陽性であった9例中7例が低反応、2例が正常反応であった。また LH-RH test における FSH の反応では、FSH α subunit が陰性であった7例のうち1例が低反応、6例が正常反応であり、FSH α subunit が陽性であった9例中7例が低反応、1例が遅延反応、1例が正常反応であった。すなわち、FSH の反応異常が FSH α subunit 陽性例で有意に高かった ($P < 0.005$, Table 5)。

なお、nf 4例と prolactinoma 1例で血清 HCG の α subunit を測定したところ、nf の FSH α subunit 陽性の1例 (男性) に血清 α subunit の高値が認められた (Table 6)。

IV 考 察

従来より nf には電顕にて分泌顆粒の存在が指摘され、これらが何を意味するのかは議論されるところであった。

正常下垂体より分泌されるホルモンにはペプチドホルモンと糖蛋白ホルモンとがあり、糖蛋白ホルモンには LH, FSH, TSH があるが、これらはそれぞれ α , β の2つの subunit より成り立っている。それぞれの α subunit は免疫学的には identical であり、 β subunit が特異的な性質を現わす。 α subunit は HCG の α subunit とも同一と考えられている^{1,3,6,10,11,15}。しかし、腫瘍では不均衡な subunit の生合成による増加の可能性も指摘されている^{19,25}。

Kourides ら⁸)は60例の下垂体腺腫を検討し、その5例に血中 α subunit の異常な高値を認め、これらの症例では LH-RH や TRH の投与による α subunit の増加があまりみられず、腫瘍よりの α subunit 分泌にはある程度の自律性があると指摘した。これら5例は両耳側性半盲を伴い、鞍上部伸展を示していた。一方、Peterson ら¹⁴)は LH と α subunit を分泌する下垂体腺腫を報告し、さらに Ridgway ら¹⁷)は純粋の α subunit 産生腫瘍という概念を強調した。下垂体以外でも異所性に α subunit を産生する腫瘍が胃の癌様腫や乳癌で報告されている^{18,26}) が、Weintraub ら²⁷)は異所性の α subunit と正常ヒト糖蛋白の α subunit とは異なるとの発表を行っている。また、Parsons ら¹³)はウシの

Table 2 Acromegaly

Case	LH β	TSH	FSH β	FSH α
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	—
6	—	—	+	+
7	—	—	+	+
8	—	—	+	+
9	—	—	+	+
10	—	—	+	+
11	—	—	+	+
12	—	—	+	+
13	—	—	+	+
14	—	—	+	+
15	—	+	+	+
16	—	+	+	+
17	—	+	+	+
18	+	—	+	+
19	+	—	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	+
24	+	+	+	+

LH α subunit と free α -like material との構造の違いを述べている。Klibanski ら⁷⁾は Ridgway ら¹⁷⁾の報告を含む 6 例を純粹の α subunit 産生下垂体腫瘍としてまとめ、これらは臨牀的には視野障害を生ずるほどの鞍上部伸展を伴った大きな腺腫で、下垂体機能低下症がみられ、6 例中 5 例は男性であったとしている。我々の α subunit 陽性の nf 11 例中、男性は 7 例であった。なお、最近 Ridgway ら¹⁶⁾は α subunit のみを分泌するマウス下垂体腫瘍モデルを開発しており、興味を持たれる。

免疫組織化学的に α subunit 陽性細胞を証明した報告は、現在までに Walker²⁶⁾、長村ら¹²⁾、Klibanski ら⁷⁾によるものがある。長村ら¹²⁾は nf における α subunit 産生能力を指摘し、nf の 1/3 にその可能性があることを示唆している。Surmont ら²³⁾は連続切片による染色法を用い、LH、FSH および α subunit は同じ細胞に認められると述べている。これらの免疫組織化学的な結果の解釈には、慎重な比較検討が必要であることは言うまでもない。

我々の検討では、nf 21 例中 11 例に FSH α subunit が陽性であり、血清 HCG α subunit を測定しえた nf の 4 例中 1 例は血清 α subunit も高値であった。内分泌学的には

Table 3 Prolactinomas

Case	LH β	TSH	FSH β	FSH α
1	—	—	—	—
2	—	—	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	—	—
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
11	—	—	—	—
12	—	—	—	—
13	—	—	—	—
14	—	—	—	—
15	—	—	—	—
16	—	—	—	—
17	—	—	—	—
18	—	—	—	—
19	—	—	—	—
20	—	—	+	—
21	—	+	+	—
22	—	—	+	+
23	—	—	+	+
24	—	+	+	+
25	+	—	+	+

Table 4 Gonadotropin secreting adenomas

Case	LH β	TSH	FSH β	FSH α
1	—	—	+	+
2	—	—	+	+
3	+	+	+	+

FSH α subunit 陽性例において LH-RH test で FSH が低反応を示した。厳密には Kourides ら⁸⁾、Klibanski ら⁷⁾のように α subunit に対する TRH test、LH-RH test を施行する必要があるが、我々はまだ routine に α subunit に対する負荷試験を施行していない。正常人では TRH test において α subunit は二相性の増加を示し²⁾、Klibanski ら⁷⁾の報告でも 6 例中 2 例では α subunit が増加した。また、正常人では LH-RH test でも α subunit は増加する²²⁾と言われている。

Acromegaly でも FSH α subunit 陽性例は多かったが、この際には必ず FSH β 、LH β subunit あるいは TSH の陽性を伴っていた。Acromegaly では multihormonal activi-

Table 5 Response to loading tests in cases of non-functioning adenomas

Case	TRH test	LH-RH test	
	TSH	LH	FSH
1	low	normal	normal
2	normal	normal	normal
3	normal		
4	normal		
5	low		
6	no	low	low
7	normal	low	normal
8	normal	normal	normal
9	low	low	normal
10	normal	low	normal
11	normal	low	low
12	low	low	low
13	low	low	low
14	low	low	low
15	normal	low	normal
16	normal	low	delayed
17	normal	normal	low
18	low	normal	low
19	low	low	low
20	low		
21	low		

Cases 11-21 were FSH α subunit positive. TRH indicates TSH-releasing hormone; LH-RH, LH-releasing hormone.

ty^{4,21,24})が指摘されており、FSH β subunit 陽性例が多いため FSH α subunit も高い陽性率を示したと思われる。また、prolactinoma でも同様の傾向であり、gonadotropin 産生腺腫でも FSH α subunit 陽性例で FSH β あるいは LH β subunit の同時陽性を伴っていた。

注意しなければならないことは、甲状腺機能低下症、腎不全の患者、閉経後の婦人では α subunit が高値となる^{5,7)}ことである。我々の血清 HCG α subunit が高値を呈した男性の nf 例では、甲状腺機能低下症、腎機能障害は認められなかった。また、Macfarlane ら⁹⁾によれば放射線治療により血清 α subunit 値は低下するとされ、我々の比較的古い症例のなかには放射線治療後に採取された標本もあり、本来 α subunit 高値であった例が含まれていた可能性もある。

我々の nf 21 例中免疫組織化学的に 11 例が FSH α subunit 陽性(そのうち 6 例では FSH α subunit のみ陽性)、1 例では血清 HCG α subunit も高値であったという結果より、免疫組織化学的な反応と血清中の高値との相関について言及することは困難であり、この 21 例のなかに α

Table 6 Serum human chorionic gonadotropin (HCG) α subunit

Non-functioning adenomas			
FSH α (+)	Case 11	female	0.19 ng/ml
	Case 19	male	0.68 ng/ml
	Case 20	female	0.78 ng/ml
FSH α (-)	Case 7	male	0.30 ng/ml
Prolactinoma			
FSH α (-)	Case 11	female	0.19 ng/ml
Normal value of HCG α :			
Male			<0.35 $\pm$ 0.18 ng/ml
Female	Follicular phase		<0.44 $\pm$ 0.19 ng/ml
	Luteal phase		<0.31 $\pm$ 0.24 ng/ml
	Menstrual phase		<0.94 $\pm$ 0.86 ng/ml

subunit 産生腺腫が存在したとは結論できないが、従来いわゆる nf とされてきたもののなかにはかなりの頻度で α subunit 産生腺腫が存在する可能性がある。腫瘍組織中の免疫組織化学的な陽性反応が必ずしも生物学的な活性に結びつかないことが免疫組織化学における問題点であるが、多くの症例で頻回かつ systemic に α subunit を検討すれば明らかとなろう。 α subunit 産生腺腫では血清 α subunit 値が治療効果判定の marker として使用できるという報告がある⁷⁾ので、さらに確認していく必要がある。今後、内分泌学的・免疫組織化学的検討を駆使することにより、いわゆる nf のなかに α subunit 産生腺腫が多数発見されるようになってくると思われる。したがって、下垂体腺腫の分類にも一つの新しい一群を設ける必要があり、またその臨床的意義についてさらに検討が必要である。それは、下垂体腺腫の本態解明の一助となりうると思われる。

V 結 語

1. 73 例の下垂体腺腫を免疫組織化学的に検討したところ、non-functioning adenoma 21 例中 11 例に FSH α subunit が陽性で、そのうち 6 例(29%)では FSH α subunit のみ陽性であった。また、FSH α subunit 陽性の 1 例には血清 HCG α subunit の高値を認めた。

2. FSH α subunit 陽性例の内分泌負荷試験では、LH-RH test で FSH の反応異常(主に低反応)がみられた。

3. Acromegaly でも FSH α subunit の陽性率は高かったが、この場合には β subunit も陽性であった。Prolactinoma, gonadotropin 産生腺腫でも FSH α subunit が単独に陽性となることはなかった。

4. 以上より、non-functioning adenoma のなかにはかなりの頻度で α subunit 産生腺腫が含まれていると結論された。

本論文の要旨は、第42回日本脳神経外科学会総会(1983年10月、大阪)において発表した。

文 献

- 1) Bahl OP: Chemistry of human chorionic gonadotropin, in Li CH (ed): *Hormonal Proteins and Peptides*, vol 1. New York, Academic, 1973, pp 171-199
- 2) Chan V, Wang C, Yeung RTT: Thyrotropin: α - and β -subunits of thyrotropin, and prolactin responses to four-hour constant infusions of thyrotropin-releasing hormone in normal subjects and patients with pituitary-thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 49: 127-131, 1979
- 3) Fiddes JC, Goodman HM: The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 3-18, 1981
- 4) Fukaya T, Kageyama N, Kuwayama A, Takanohashi M, Yoshida J, Osamura Y: Immunoenzymatic study of pituitary adenomas in acromegalic patients, in Faglia G, Giovannelli MA, MacLeod M (eds): *Pituitary Microadenomas*. London, Academic, 1980, pp 205-210
- 5) Hagen C, Gilby ED, McNeilly AS, Ølgaard K, Bondy PK, Rees H: Comparison of circulating glycoprotein hormones and their subunits in patients with oat cell carcinoma of the lung and uraemic patients on chronic dialysis. *Acta Endocrinol (Kbh)* 83: 26-35, 1976
- 6) 井村裕夫, 中井義勝, 深瀬正晃, 服部正宏, 中尾一和, 隠岐尚吾, 吉見宏樹, 末岡 悟, 松倉 茂, 平田緒喜緒: 機能性腫瘍の問題点 —とくに異所性ホルモン産生腫瘍を中心に—. 蛋・核・酵 23: 641-656, 1978
- 7) Klibanski A, Ridgway EC, Zervas NT: Pure alpha subunit-secreting pituitary tumors. *J Neurosurg* 59: 585-589, 1983
- 8) Kourides IA, Weintraub BD, Rosen SW, Ridgway EC, Kliman B, Maloof F: Secretion of alpha subunit of glycoprotein hormones by pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 43: 97-106, 1976
- 9) Macfarlane IA, Beardwell CG, Shalet SM, Darbyshire PJ, Hayward E, Sutton ML: Glycoprotein hormone α subunit secretion by pituitary adenomas: Influence of external irradiation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 13: 215-222, 1980
- 10) 中井義勝, 中尾一和, 隠岐尚吾, 井村裕夫: 下垂体ホルモン. 医のあゆみ 106: 344-350, 1978
- 11) 奥村 一, 須藤忠満, 沢井政信, 藤沢宗駿, 早川 秀: hCG subunit の分離・精製および生物学的・免疫化学的検討. ホルモンと臨 26: 509-518, 1978
- 12) 長村義之, 渡辺慶一, 寺本 明: ヒト下垂体腺腫における α , β subunit 陽性細胞について —酵素抗体法による種々下垂体ホルモン産生細胞との関連の検討—. 癌の臨 24: 1348-1349, 1978
- 13) Parsons TF, Bloomfield GA, Pierce JG: Purification of an alternate form of the α subunit of the glycoprotein hormones from bovine pituitaries and identifications of its O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 258: 240-244, 1983
- 14) Peterson RE, Kourides IA, Horwith M, Vaughan ED, Saxena BB Jr, Fraser RAR: Luteinizing hormone- and α -subunit-secreting pituitary tumor: Positive feedback of estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 692-698, 1981
- 15) Pierce JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: Structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495, 1981
- 16) Ridgway EC, Kieffer JD, Ross DS, Downing M, Mover H, Chin WW: Mouse pituitary tumor line secreting only the α -subunit of the glycoprotein hormones: Development from a thyrotropic tumor. *Endocrinology* 113: 1587-1591, 1983
- 17) Ridgway EC, Klibanski A, Ladenson PW, Clemmons D, Beitins IZ, McArthur JW, Martorana MA, Zervas NT: Pure alpha-secreting pituitary adenomas. *N Engl J Med* 304: 1254-1259, 1981
- 18) Rosen SW, Weintraub BD: Ectopic production of the isolated alpha subunit of the glycoprotein hormones. *N Engl J Med* 290: 1441-1447, 1974
- 19) Ross DS, Downing MF, Chin WW, Kieffer JD, Ridgway EC: Divergent changes in murine pituitary concentration of free α - and thyrotropin β -subunits in hypothyroidism and after thyroxine administration. *Endocrinology* 112: 187-193, 1983
- 20) 佐藤 修, 堀田晴比古, 中川俊男, 相馬文勝, 蓮沼正博, 土田博美, 田辺純嘉, 小林計理, 井上慶俊: 高プロラクチン血症を呈する下垂体腺腫の内分泌学的考察. 脳と神 33: 1115-1123, 1981
- 21) 白瀧邦雄, 玉木紀彦, 松本 悟: ヒト下垂体腺腫のホルモン免疫組織化学. 日外宝 52: 129-130, 1983
- 22) Snyder PJ, Johnson J, Muzyka R: Abnormal secretion of glycoprotein α -subunit and follicle-stimulating hormone (FSH) β -subunit in men with pituitary adenomas and FSH hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 579-584, 1980
- 23) Surmont DWA, Winslow CLJ, Loizou M, White MC, Adams EF, Mashiter K: Gonadotropin and alpha subunit secretion by human 'functionless' pituitary adenomas in cell culture: Long term effects of luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 19: 325-336, 1983
- 24) 武内重二: 未発表データ
- 25) 土屋寛泰, 大西利夫, 熊原雄一: 内分泌腺腫瘍ホルモンの heterogeneity. 下垂体. 日臨 41: 1238-1246, 1983
- 26) Walker RA: Significance of α -subunit HCG demonstrated in breast carcinomas by immunoperoxidase technique. *J Clin Pathol* 31: 245-249, 1978
- 27) Weintraub BD, Krauth G, Rosen SW, Rabson AS: Differences between purified ectopic and normal alpha subunits of human glycoprotein hormones. *Clinical Research* 22: 352A, 1974

[別刷請求先: 〒606 京都市左京区聖護院川原町54, 京都大学脳神経外科, 山上達人]