長期継代ヒト下垂体腺腫細胞に対するブロモクリプチンの影響－光顕及び電顕的観察－

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 兜, 正則 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7978

長期継代ヒト下垂体腺腫細胞に対するブロモクリプチンの影響
－光顕及び電顕的観察－

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山本信二郎教授）
兜　正　則

（昭和62年10月15日受付）

株化された長期継代ヒトプロラクチン（prolactin, PRL）産生下垂体腺腫細胞：18-54, SF細胞（SF細胞）を用いて，ブロモクリプチン（bromocriptine）のこの細胞に対する効果を検索した．SF細胞をブロモクリプチン1 μg/ml, 10 μg/mlの濃度で添加した培地でそれぞれ24時間，3日，7日間培養した群と非添加群につき光顕，電顕および酵素抗体法で観察した．SF細胞は光顕上多角形をなし，敷石状に増殖する上皮様細胞で，超微構造上ゴルジ装置，ミトコンドリア，粗面小胞体や遊離リボゾーム等の細胞内小器管が発達しており，ホルモン分泌顆粒は認められなかった．酵素抗体法ではPRL染色陽性部位は細胞質内にびまん性に存在していた．ブロモクリプチン1 μg/ml添加群では形態学的に殆ど変化が認められなかった．ブロモクリプチン10 μg/ml添加群では，光顕上3日後より多数の空胞を有する細胞がみられ，電顕上粗面小胞体の内腔拡大と，それが融合したと思われる空胞が多数出現した．又，ミトコンドリアには数の減少と大きさの縮小がみられ，その基質の電子密度は高くなった．更に1週間後には，細胞質や核の濃縮，ミトコンドリアの萎縮ないし膨化がみられ，大多数の細胞は変性死滅した．対照実験として正常胎児マウスグリア細胞をブロモクリプチン10 μg/mlの濃度で添加した培地で培養したが1週間後でも形態学的に変化がみられなかった．以上の結果よりSF細胞はPRL産生下垂体腺腫細胞ではあるが，分泌顆粒を持たない細胞であり，ブロモクリプチンはdose and time dependentにSF細胞に対して殺細胞作用があることが示唆された．

Key words pituitary adenoma, cell culture, bromocriptine, fine structure, cytocidal effect

麦角アルカロイドの誘導体でドーパミン作動薬のブロモクリプチン（bromocriptine, 化学名2-Bromo-α-ergocryptine）[1]は末端肥大症やプロラクチン（prolactin, PRL）産生下垂体腺腫の治療薬として現在広く用いられている．ブロモクリプチンは血中PRL値や成長ホルモン（growth hormone, GH）値を低下させる[2)~4)]他，下垂体腺腫を縮小あるいは消失させる効果も報告されている[5)~19)]．しかしこの薬剤が腫瘍を縮小させる機序に関して，生化学的[20)~23)]あるいは形態学的[17)19)24)~26)]に研究されてはいるが，その本態は未だ解明されていない．

本研究では，Wycheら[27)]によって末端肥大症患者より摘出された下垂体腺腫細胞からクローン化された長期継代培養細胞18-54, SF細胞（SF細胞）を用い，この細胞のブロモクリプチンによる形態学的変化を光顕，電顕および酵素抗体法により観察し，この薬剤の下垂体腺腫に対する腫瘍縮小効果を検索した．

材料および方法

SF細胞を用いて実験を行なった．細胞は37°C 5％ CO_2培養器を利用し，培地として無血清Coon's modified Ham's F12 medium（Coon's medium, KC Biological Inc., Kansas, USA）を用い，Lab-Tek chamber/slide（三光純薬，東京）内で単層培養を行なった．1×10^5 cells/mlに調整した細胞は培養2～3日でconfluentになり，この時点で培地をブロモ

Abbreviations: DAB, 3-3'diaminobenzine tetrahydrochloride; GH, growth hormone; PRL, prolactin; 18-54, SF細胞, SF細胞.

クリプチン（2-Bromo-α-ergocryptine mesylate, Sandoz 薬品，Basel, Switzerland）1 μg/ml, 10 μg/ml 各々を添加した培地に置き換えて培養した．各々24時間後，3日後，7日後に位相差顕微鏡，電子顕微鏡でブロモクリプチン非添加群と対比し観察した．更にブロモクリプチン 10 μg/ml 添加培地で7日間培養した群につき，再び非添加培地に置き換えて培養を続け，その結果を位相差顕微鏡にて経時的に観察した．又，ブロモクリプチン非添加群，10 μg/ml 添加群について3日後に固定し，PRL に対する酵素抗体法による染色を行ない，光顕および電顕観察を行なった．対照実験として，胎児マウスグリア細胞を用い，上述の方法を試みた．

ブロモクリプチンの溶解には，100%エチルアルコール 1 ml に対しブロモクリプチン 20 mg，更に同量の酒石酸（和光純薬，大阪）を加えて良く攪拌し，培養液にて希釈して用いた[28]．ブロモクリプチン非添加群として同濃度アルコール酒石酸入り培地中で培養した細胞を用いた．

電顕検索には Lab-Tek chamber の培地を捨て，4°C 0.1 M のカコジル酸緩衝液（pH 7.4）にて2～3回洗浄後，カコジル酸緩衝2%グルタルアルデヒド，2%パラホルムアルデヒド混合液（pH 7.4）で前固定を4°Cで1時間行なった．前固定後，これを 0.2 M シュクロース入りカコジル酸緩衝液（pH 7.4）に4°Cで1時間浸漬後，カコジル酸緩衝2%四酸化オスミニウム液（pH 7.4）にて4°Cで1時間後固定した．エタノール系列（40% 5分，60% 5分，80% 5分，90% 5分，95% 5分，100%10分2回）で脱水した後，酸化プロピレンを通さず，予め脱気しておいたエポンアラルダイド入りビームカプセルを，アルコールが乾燥しないうちに，スライドグラス上に単層培養された標本上に倒立させ，そのまま 80°C の恒温器内にて24時間重合させた．室温にもどした後，スライドグラスよりエポンブロックを剝がす為，ガスバーナーにてスライドグラス裏面より数秒間加熱した．これによってスライドグラスに接していたエポンブロックの水平面に培養細胞がとりこまれる．LKB 8800 ウルトラミクロトームを用いて，エポンブロックの水平面に平行に超薄切片を作製した．電子染色は，2%酢酸ウラニール水溶液とクエン酸鉛液[29]による2重染色を行ない，日立 H-600 型透過型電子顕微鏡にて観察した．

組織内 PRL に対する酵素抗体法には，培養細胞をスライドグラスに付着させたまま Zamboni 固定液[30]にて4°Cで4時間固定後，0.01 M リン酸緩衝生理食塩水（pH 7.2）にて充分洗浄した．次いで非特異的結合を防ぐため，室温にて正常ヤギ血清と30分間反応させ，次に抗体の細胞内透過性を亢進させるため 0.05% サポニンを加えた[31)32)] 抗ヒト PRL・ウサギ血清（1：300倍希釈，DAKO 社，California, USA）に室温で2時間反応させた．リン酸緩衝液で30分洗浄し，0.05% サポニン添加ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ・ヤギ血清 F（ab'）$_2$（1：100倍希釈，Cappel 社，Pennsylvania, USA）に室温で2時間反応させた．リン酸緩衝液で30分洗浄した後，0.1 M カコジル酸緩衝1%グルタルアルデヒド（pH 7.4）にて4°Cで20分間固定し，0.2 M シュクロース添加カコジル酸緩衝液中に一晩置いた．予め 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride（DAB）溶液（DAB 20 mg/100 ml トリス緩衝液）で30分反応させた後，0.005% H_2O_2 添加 DAB 溶液に5分間反応させた．光顕用には，この後，蒸留水でよく洗浄し，エタノール系列で脱水した後，型の如く封入した．電顕用にはカコジル酸緩衝1%四酸化オスミニウムにて4°Cで，1時間後固定を行ない，前記と同様に包埋した．超薄切片には，ウラニールと鉛による染色を行なう事なくそのまま観察した．なお1次抗体の対照として非感作ウサギ血清を用いた．

培養液中の PRL 値を radioimmunoassay 法にて培養前の培地と，SF 細胞をブロモクリプチン非添加および 10 μg/ml 添加して1週間培養した後の培地につき測定した．

成　　績

I．光顕所見（位相差顕微鏡）

ブロモクリプチン非添加群では，単層を成す多角形上皮様細胞が隙間無く敷石状に配列していた（図1A）．培養初期には細胞の大きさは揃っていて，空胞を有する細胞は殆ど認められなかった．経時的に見た場合，培養24時間後，3日後，7日後では，単層のまま細胞が増殖する為細胞の配列は次第に稠密になるが，個々の細胞には大小不同以外に形態学的に殆ど変化は認められなかった．

ブロモクリプチン 1 μg/ml 添加群では，非添加群と比較して増殖がやや遅い以外は特に差は認められなかった．10 μg/ml 添加群では，非添加群と比較して24時間後では殆ど差は認められなかったが，3日後には細胞の増殖は認められず，多数の空胞細胞の出現や浮遊した細胞がみられた．空胞細胞は細胞質内に種々の大きさの空胞を有し，細胞の形はやや丸みを帯びていた．7日後には，細胞の空胞化，変性破壊，浮遊が著明で，変性の認められない細胞は極く僅かであった（図1B）．変性浮遊した細胞を除去した後，残った細胞（図2A）を正常の培養液に置き換えて培養を続ける

と，速度は遅いが再び増殖を始めるが，10日後でもなおconfluenceを示さなかった（図2B）.

対照実験として，胎児マウスグリア細胞をブロモクリプチン10 μg/mlを添加した培地及び添加していない培地にて7日間培養し観察したが，両者に差異は認められなかった.

II．電顕所見

ブロモクリプチン非添加群では，培養24時間後，3日後，7日後の細胞の間で超微構造的な差は認められなかった．細胞は多角形で，細胞間は発達したjunctional complex（主に接着帯Zonula adherens様装置）で結合され，細胞の辺縁にmicrovilliを有するものが認められた（図3）．核は多形性で辺縁は不整，所々に陥凹が認められ，核小体の発達した細胞もみられた（図3, 4）．細胞質内には遊離リボゾーム，ミトコンドリア，ゴルジ装置，粗面小胞体の発達が良好であった．粗面小胞体は一般に細胞質全体に分布して認められるが，層状に並んだものもあった（図4）．ライソゾームは少数認められた．又，tonofilament様の細胞内細線維を認める細胞もみられた．細胞内空胞がみられる場合，その数はわずかで大きさも小さく，径1.0 μm前後であった．ホルモン分泌顆粒と思われる顆粒は全く認められなかった.

ブロモクリプチン1 μg/ml添加群では，1週間後でも非添加群と比較して超微構造的に著変を認めなかった．10 μg/ml添加群では，24時間後に粗面小胞体の内腔の軽度拡大が認められた（図5）．投与3日後では，粗面小胞体の内腔は更に拡大し（図6），楕円形あるいは円形の大小様々な空胞化を呈し，次第に表面のRNA顆粒の脱落がみられ，多数の空胞は互いに融合し，細胞質が網目状にぬけている細胞もみられた（図7）．空胞の内腔には無定形な物質が少量認められた．遊離リボゾームは減少し，ミトコンドリアは空胞間の狭い細胞質内に散在し，大きさは対照群に比して小さく，その基質の電子密度は高くなっていた．細胞によっては少数の0.1 μm前後の円形小顆粒が出現したが，これらの顆粒に限界膜は認められなかった．細胞の突起やmicrovilliは殆ど消失していた．Junctional

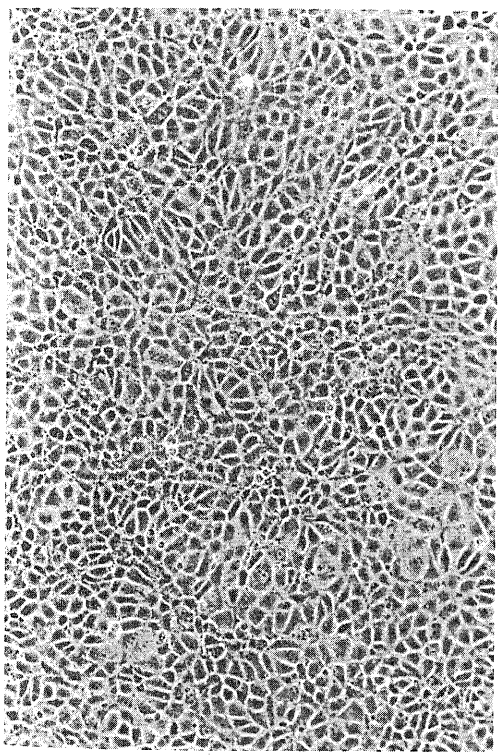

Fig. 1A. Phase contrast micrograph of untreated SF cells for 7 days cultivation. Confluent polygonal cells are shown. (×150).

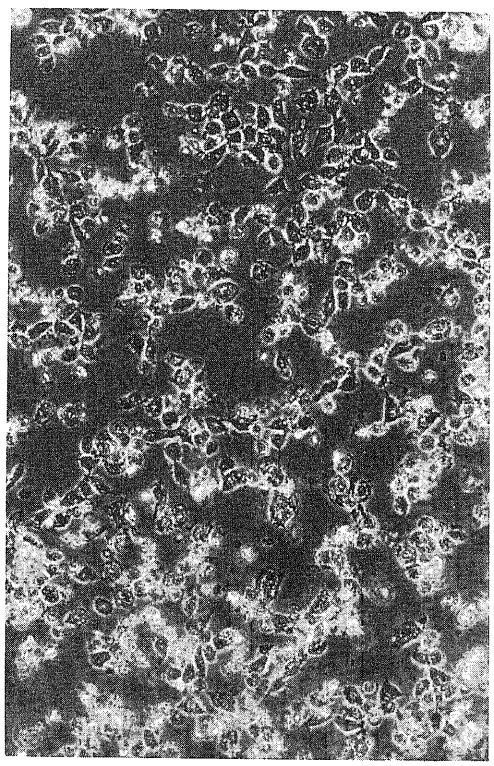

Fig. 1B. Phase contrast micrograph of SF cells treated with 10μg/ml of bromocriptine for 7 days. A large number of cells are markedly degenerated. (×150).

complex は所々保たれていた．核及び核小体には著変は認められなかった．添加7日後では，変性した細胞が多く，核および細胞質は萎縮し，その電子密度は高くなり，ミトコンドリアは萎縮あるいは膨化し，無構造化していた（図8）．更に，細胞質，核ともに破壊死滅した細胞も多数認められた（図8矢印）．

Ⅲ．酵素抗体法所見

PRL に対する酵素抗体法を行なった．光顕レベルでは，ブロモクリプチン非添加群においても 10 μg/ml 添加群の3日後においても PRL 陽性細胞は全体の約30%であった．染まり方は，細胞質全体に染まり核は染まらず（図9），染色の強さは両者に差を認めなかった．

電顕酵素抗体法では，ブロモクリプチン非添加群の染色陽性部位は細胞質内であり遊離リボゾーム様にびまん性に存在していた（図10）．ミトコンドリア，核はもとより粗面小胞体内腔，ゴルジ装置内は陰性であった．ブロモクリプチン 10 μg/ml 添加群の3日後の細胞の染色のされ方は非添加群のそれとほぼ同じであったが，ブロモクリプチン添加により形成された細胞内空胞は陰性であった．対照として正常ウサギ血清を用いて行なった酵素抗体法では PRL 染色は陰性であった．

PRL 値は，培養前培地内は測定可能値以下であり，培養1週間後では1～2 ng/ml であった．ブロモクリプチン 10 μg/ml を添加したものでは，PRL は培養1週間で，0.5 ng/ml 以下であった．

以上の実験中，培地の pH は 7.2～7.4 の範囲内であり，又浸透圧も 300 mOsm/l 前後で大きな変化は認められなかった．

考　　察

Ⅰ．18-54, SF 細胞について

Wyche ら[27]により末端肥大症患者の下垂体腺腫から分離クローン化された SF 細胞は，既に数年間数百代以上継代培養され続けている．この細胞は長期培養にもかかわらず，PRL と増殖因子（growth factor）が産生放出されている事が知られている[33]．本実験においても，SF 細胞は PRL 分泌細胞である事を，培養液中ホルモン測定および酵素抗体法にて確認した．

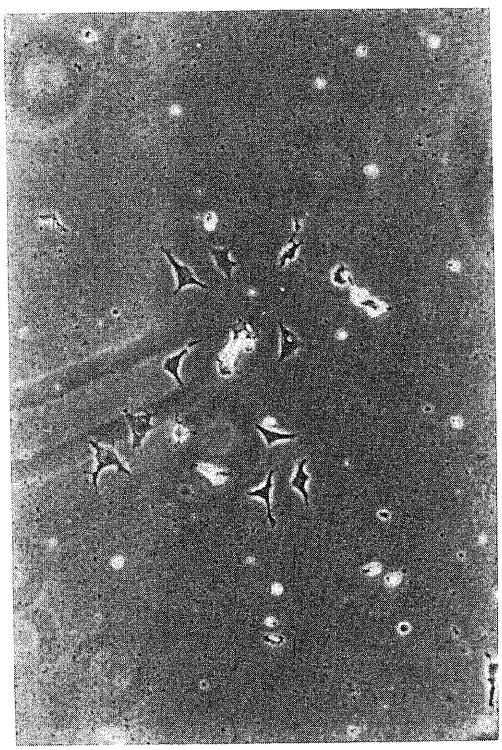

Fig. 2A. Phase contrast micrograph of remaining SF cells treated with 10μg/ml of bromocriptine for 7 days. A few aliving SF cells are seen. (×150).

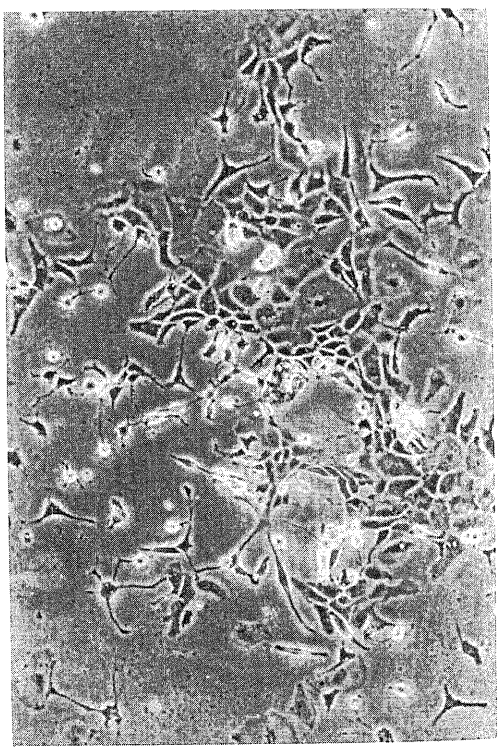

Fig. 2B. Phase contrast micrograph of restoring SF cells from those illustrated in Fig. 2A. after changing the bromocriptine-containing medium into the drug-free one for 10 days. (×150).

Demura ら[34]や Peillon ら[35]は末端肥大症患者より摘出した下垂体腺腫細胞の培養実験を行ない，培地内の GH 値は漸次低下し，PRL 値は症例によって上昇するものがあり，PRL 分泌の期間は GH 分泌のそれより長い事を指摘した．

Wyche が SF 細胞を株化した際，GH が測定され得たのは初めの 3 ヵ月のみであり[27]，これに対して PRL は継続的にその値を維持し続けている．SF 細胞の様に数年間もの長期に渡ってホルモン分泌が確認されているクローン化されたヒト下垂体腺腫細胞の例は我々の知る限り見当たらない．

SF 細胞の超微構造はゴルジ装置，粗面小胞体，遊離リボゾーム等の細胞内小器管が発達していることより，盛んな蛋白合成と活発な細胞活動を思わせた．更に最も特徴的な点は，ホルモン分泌細胞であるのにもかかわらず分泌顆粒を持たない事である．

下垂体培養細胞の細胞内分泌顆粒の消失ないし減少に関して従来の報告を見ると 2 通りの考え方ができる．即ち．1 つはホルモン産生機能低下に伴う顆粒の減少・消失[36)~38)]であり，もう 1 つはホルモン産生能亢進に伴う顆粒の減少・消失[39)40)]である．

Peillon ら[36]は末端肥大症患者より摘出した somatotrophic adenoma の organ culture において，約 1 ヵ月の培養で GH 分泌の低下とともに分泌顆粒の減少を認めた．これに対し，石川[40]はラット胎児のラトケ嚢上皮細胞より下垂体ホルモン産生能を持つ株細胞を樹立し，これらの細胞は多量のホルモンを分泌するにもかかわらず，分泌顆粒が無いことを観察した．更にこの細胞にホルモン分泌抑制物質を添加し，細胞内に分泌顆粒の出現をみた．これはホルモン分泌亢進時には顆粒を経ないホルモン分泌の様式があることを示唆するものである．

SF 細胞の場合，培養液中に PRL は分泌されていることが確認されたが，その値は 1 ～ 2 ng/ml の程度で

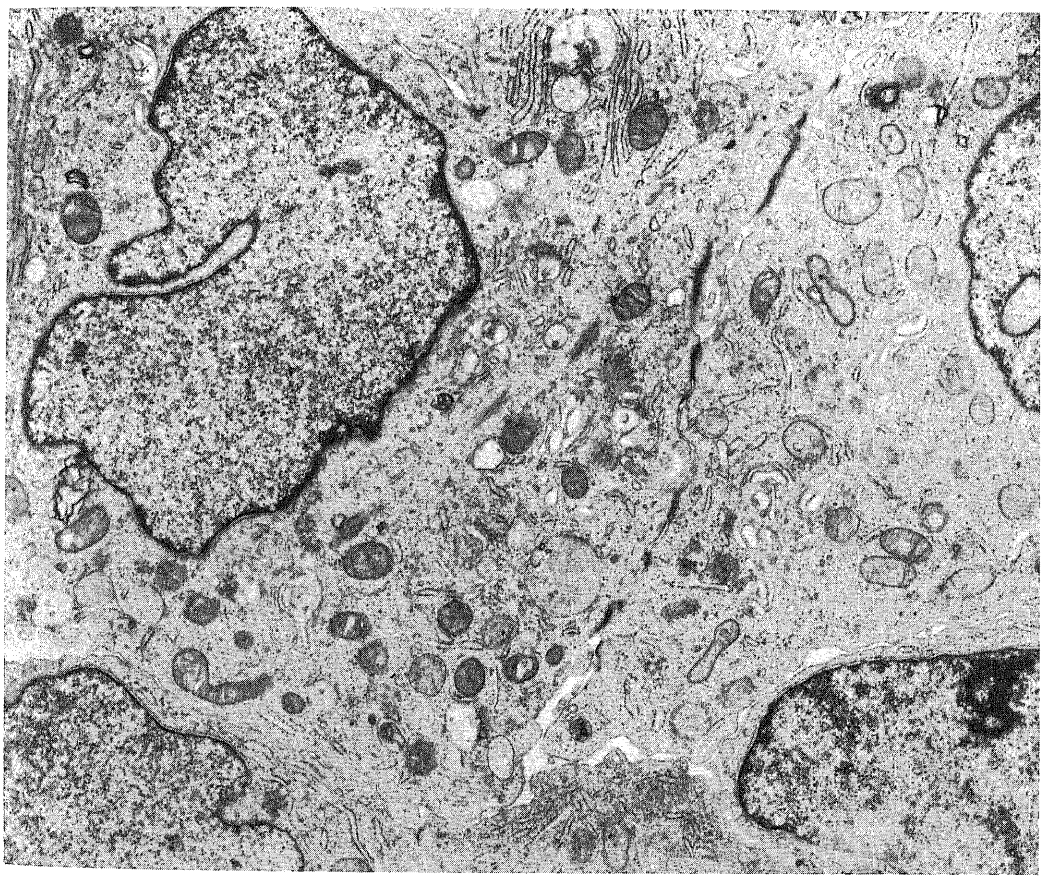

Fig. 3. Electron micrograph of untreated SF cells for 7 days cultivation. Junctional complex and microvilli are seen. The nuclei show pleomorphic outline. (×9600).

高い値ではない．しかし，PRL に対する光顕酵素抗体法による染色では多数の陽性細胞が認められた．更に電顕酵素抗体法による観察で細胞質内にびまん性に PRL の局在を認めた．これらの結果より，SF 細胞では，ホルモン分泌顆粒によらない PRL 貯留様式があり，また分泌顆粒によらない細胞内 PRL 貯留は必ずしも，分泌亢進を示すものではないことが明らかとなった．

SF 細胞における PRL の局在については，電顕酵素抗体法による観察では，粗面小胞体内腔およびゴルジ装置内は陰性であり，主に細胞質内がびまん性に陽性となった．本実験では，サポニン処理によって細胞内に抗 PRL 抗体などが浸透し易い様に処理しており，粗面小胞体内腔やゴルジ装置内までは抗体が浸透しなかった可能性は少ない．したがって，PRL の局在が粗面小胞体やゴルジ装置内ではなく，遊離リボゾームの多い細胞質内にびまん性にあるとすれば，遊離リボゾームからの PRL 分泌の可能性も推定される[41]．

II．ブロモクリプチンの作用について

1968 年 Flückiger ら[1]ははじめてブロモクリプチンがラットの乳汁分泌を抑制する事実を報告した．1972 年 Besser ら[2]はブロモクリプチンが高 PRL 血症患者の血中 PRL 濃度を低下させ，乳汁分泌を改善する事を報告した．更に 1974 年 Liuzzi ら[3]は末端肥大症患者の血中 GH をも減少させる事を報告した．以来ブロモクリプチンは，PRL 産生下垂体腺腫（prolactinoma）や末端肥大症の治療薬として広く用いられる様になった．その作用部位に関しては，ラット及びヒト胎児下垂体やラット下垂体腺腫の培養細胞に，ブロモクリプチンを直接添加する実験から，この物質は下垂体細胞に直接作用することが明らかにされた[42][43]．

ブロモクリプチンには GH 及び PRL 分泌抑制作用の他に下垂体腺腫縮小の作用があることが知られている．1975 年 Corenblum ら[5]は prolactinoma の患者で，又 1977 年 Wass ら[6]は末端肥大症患者にブロモクリプチンを投与して視野障害が改善されたことを報告した．1979 年 McGregor ら[10]は X 線 CT と metrizamide cisternography の方法によりブロモクリプチン

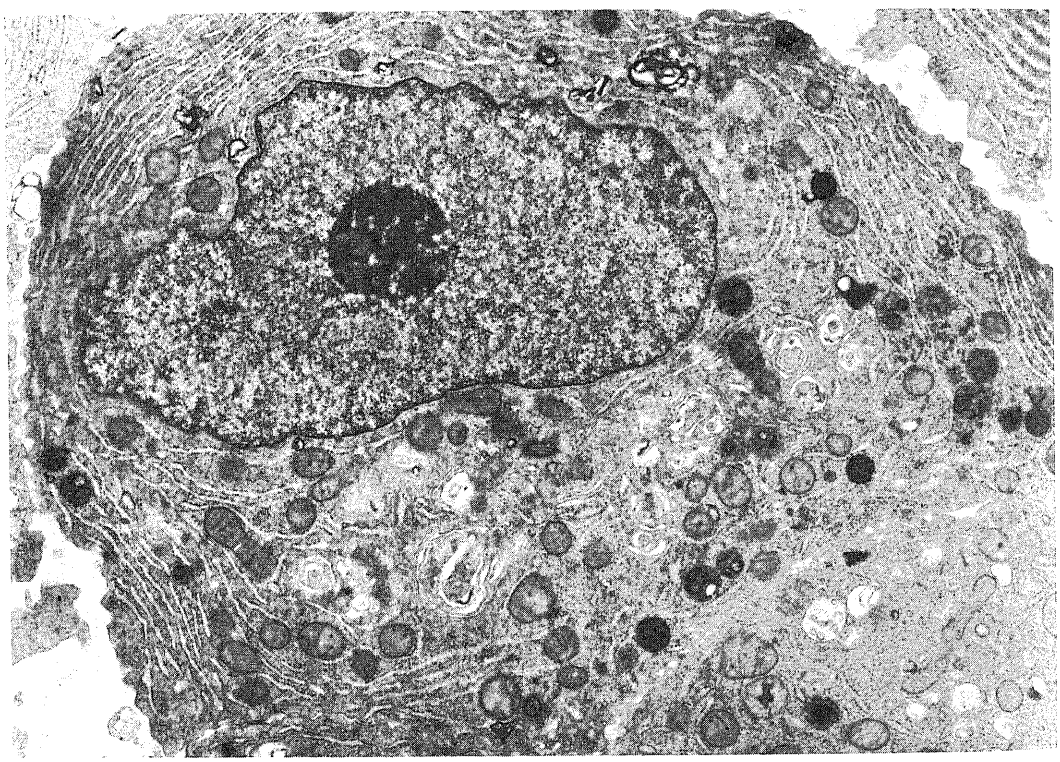

Fig. 4. Electron micrograph of untreated SF cells for 7 days cultivation. Numerous free ribosomes and many mitochondria are found throughout the cytoplasm. The rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex are well developed, whereas no secretory granules can be observed. Lysosomes are also seen. (×9800).

投与がprolactinomaを消失させることを認めた．以来ブロモクリプチン投与後下垂体腺腫の縮小ないし消失した多数の症例がX線CTで示された[12)~19)]．

腫瘍縮小の原因として，細胞容積の縮小又は腫瘍細胞の死滅が考えられる．寺本ら[26)]やRengacharyら[17)]はブロモクリプチン投与後のprolactinoma摘出標本で細胞内小器官（ゴルジ装置，粗面小胞体など），細胞質の退縮を電顕により観察したが，死滅した細胞は認めないとのべた．又，臨床上もブロモクリプチン投与中止後再び血中PRL値の上昇や腫瘍の増大を認めることも多く，ブロモクリプチンは従来cytostatic effectを有すると考えられてきた．しかし，一方，清水ら[24)]は，術前にブロモクリプチンを投与されたヒト下垂体腺腫の摘出標本で電顕にて細胞の変性・壊死のある症例を報告した．この中では，核・核小体は保たれているが，分泌顆粒は極く少量で，細胞膜，ゴルジ装置，粗面小胞体は認めがたいまでに変性し，空胞が多数認められた．Genら[19)]はブロモクリプチン投与後X線CT上著明に縮小したlarge prolactinomaの1例の摘出標本で，散在する多数の変性・死滅した細胞群を光顕及び電顕により観察した．この様にin vivoではブロモクリプチンのcytocidal effectを示唆する報告もみられる．さらにin vitroでは，Annikoら[25)]はヒトprolactinoma細胞を培養し，ブロモクリプチン添加後細胞が変性・死滅する現象を光顕で観察した．しかし一般にヒト下垂体腺腫細胞の継代培養は難しく十分な実験系が得られないのが現状である[44)]．

本実験においてはSF細胞をブロモクリプチン10 μg/ml添加で1週間培養した結果SF細胞の増殖は次第に抑制され，更に細胞の変性が進み大部分の細胞が死滅した．この結果はブロモクリプチンの下垂体腺腫縮小効果を裏付けるものであり，腺腫細胞を変性させるのみならず死滅させる効果（cytocidal effect）もあることを示す．

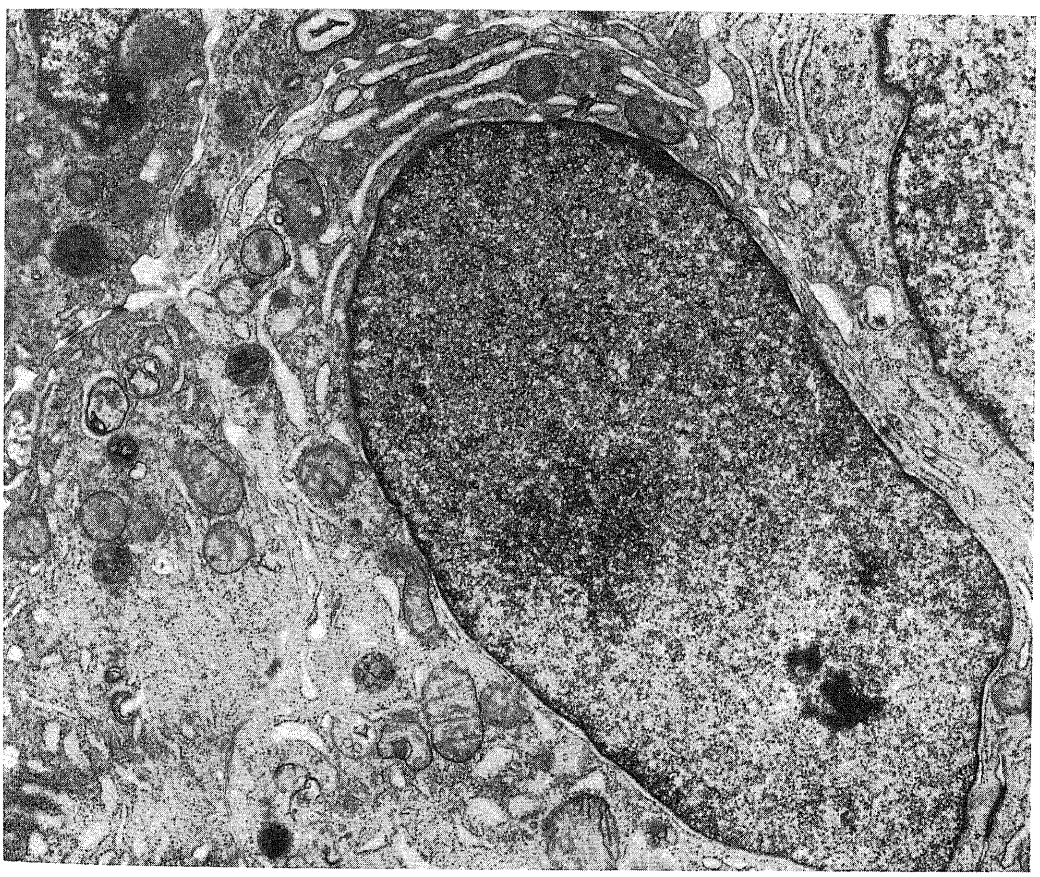

Fig. 5. Electron micrograph of SF cells treated with 10μg/ml of bromocriptine for 24 hrs. The cisternal spaces of the RER are slightly dilated. (×12700).

SF細胞においては，ブロモクリプチン添加後初期には粗面小胞体内腔が次第に拡大融合して空胞状となり，粗面小胞体の膜表面に付着しているリボゾーム顆粒が消失した．高木[45]は空胞変性を3型に分類している．I型はRNA顆粒の脱落を伴う粗面小胞体内腔の拡大によるもの，II型は細胞内コロイドの変化などによる水分の局所的集合によるもの，第III型はライソゾーム的性格を有するものである．本実験で認められたブロモクリプチンによりSF細胞に出現した空胞状変性はI型に相当し，代謝障害と関連があると思われる．本実験で認められる広範な細胞内粗面小胞体の変化は蛋白合成阻害を示唆する[46]．しかしこの変化は蛋白合成阻害のみならず細胞膜成分の障害等[45]でも二次的に出現し，ブロモクリプチンが一次的に粗面小胞体での蛋白合成を阻害するのか，これらの変化は二次的なものなのかを決定するには至らなかった．久保ら[47]もエストロジェン誘発ラット下垂体腺腫にブロモクリプチンを投与後電顕観察を行ない，粗面小胞体が拡大，膨化していたと述べている．

現在のところ，腫瘍縮小をもたらすブロモクリプチンの細胞内における作用機序は不明である．ひとつには核小体でのmessenger RNA複写を抑制するとの報告があり[48]，これが二次的に粗面小胞体に影響を及ぼす可能性はあるが，本実験では核小体に明瞭な変化は認められなかった．さらに，いわゆる'intracellular negative feed back mechanism'の考え方もある．Daviesら[20]やLloydら[21]は，エストロジェンで誘発されたラットの下垂体細胞のDNA合成や核分裂活動はブロモクリプチンで抑制され，同時にラット血中PRL値が低下し細胞内PRL濃度が上昇していた事実を報告し，これは細胞内に貯留したPRLの為negative feed backによるものと主張した．しかし，ヒト下垂体腺腫のflow cytometryによるDNA量分布の分析では，分裂前期および分裂期に相当する腫瘍細胞は少

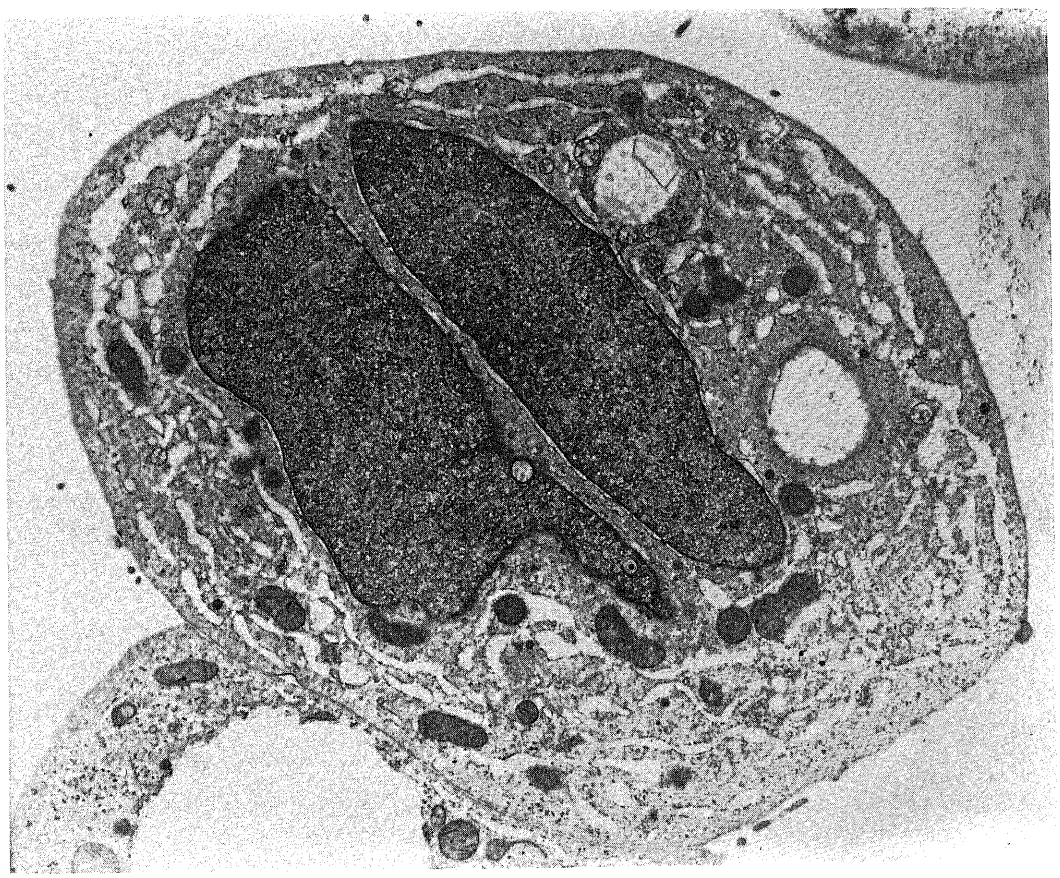

Fig. 6. Electron micrograph of SF cells treated with 10μg/ml of bromocriptine for 3 days. The cisternal spaces of the RER are dilated in varying degrees. (×8100).

なく[26)49)]，又，ブロモクリプチン投与後数日間でprolactinomaの縮小した症例もあり[13)]，更にnon-functioning pituitary adenomaがブロモクリプチンにより縮小したとの報告も散見される[50)~52)]事実より，単にintracellular negative feed back mechanismによるDNA合成および核分裂活動の抑制のみでは腫瘍の縮小ないし消失を充分には説明できない．本実験においては，初期には核の変化は少なく，むしろ腺腫細胞の細胞質レベルで蛋白合成阻害などの代謝障害をおこす機序を裏付けるものであった．

ブロモクリプチン1 μg/ml添加群では増殖の遅延が軽度認められる以外形態学上の変化はみられず，10 μg/ml添加にて経時的に細胞が変性・死滅するのを認めた事より，ブロモクリプチンの作用はin vitroにおいてdose- and time-dependentであると推測される．又，対照実験として胎児マウスグリア細胞にブロモクリプチン10 μg/ml添加して培養したが形態学的変化は認めなかった事より，これらの作用はブロモクリプチン大量投与による非特異的中毒作用とは考えられず[53)]，下垂体腺腫細胞（SF細胞）に特異的な作用と考えられた．しかし本実験においてブロモクリプチン10 μg/ml添加培地で7日間耐え，生き残った細胞は正常培養液に換えることにより再び増殖を始めることが認められた．株化された細胞にさえブロモクリプチンに抵抗性のあるものがあり，この事実は臨床上この薬剤投与を中止後再び腫瘍の増大を認める症例[6)11)]の基礎的裏付けと言える．すなわち一旦消失した様に見える下垂体腺腫が，実は一部resistant cellsとして残存し，ブロモクリプチン投与中止後にホルモン分泌活動を再開したり，増殖したりして再発するものと推測される．

結　　論

ヒト下垂体腺腫細胞よりクローン化された長期継代培養細胞18-54，SF細胞を用い，その超微形態学的特

Fig. 7. Electron micrograph of SF cells treated with 10μg/ml of bromocriptine for 3 days. The ribosomes alongside enlarged cisternae of the RER fall off. dilated cisternae presumably fuse into each other and form large vacuoles containing amorphous substance. Mitochondria decrease in number and size, and their matrices increase the electron density. (×7700).

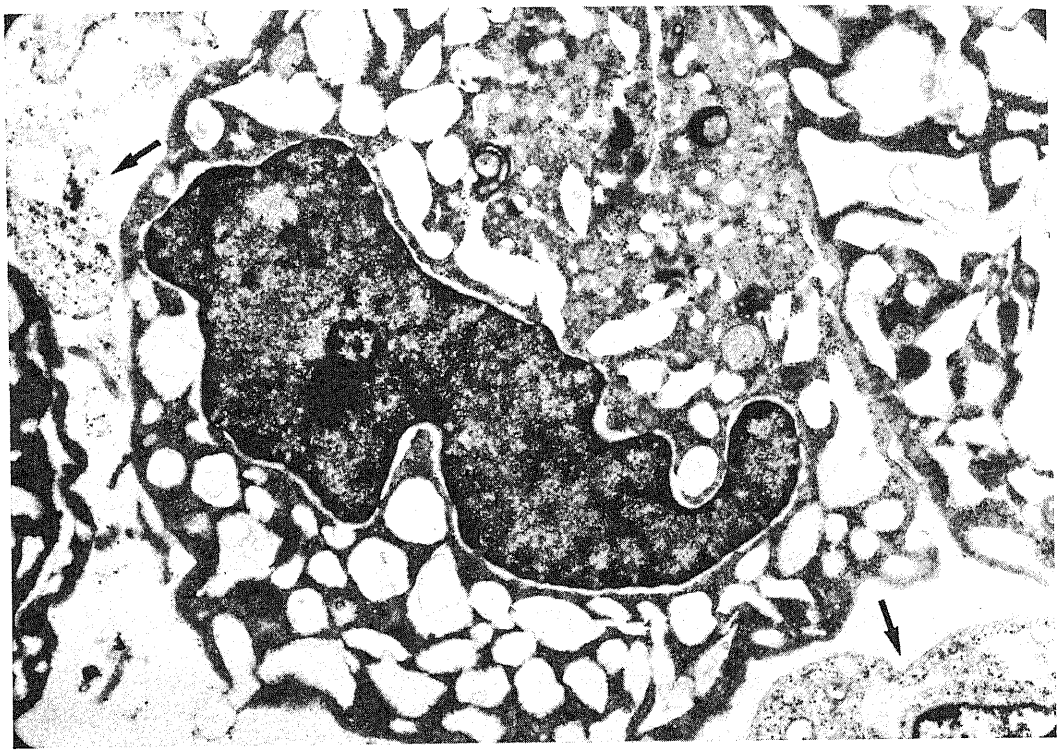

Fig. 8. Electron micrograph of SF cells treated with 10μg/ml of bromocriptine for 7 days. Vacuoles originated from the cisternae of the RER form a net-work and occupy a large part of the cytoplasm. The matrix of cytoplasm shows increased the electron density. The nucleus demonstrates pyknotic feature. Destroyed cells (arrows) are seen. (×10800).

徴を検索すると同時に，ブロモクリプチンによる細胞の形態学的変化を観察し，その作用機序について考察した．

1．18-54, SF細胞はゴルジ装置，粗面小胞体，ミトコンドリア，遊離リボゾームがよく発達し，又 microvilli や junctional complex を有していた．最も特徴的な点は分泌顆粒が認められないことであった．

2．ブロモクリプチン1μg/ml 添加群では，1週間後の観察でも形態学的な著変は認められなかった．

3．ブロモクリプチン10μg/ml 添加群では，経時的に粗面小胞体内腔の拡大および RNA 顆粒の脱落が認められ，次第に多数の空胞形成が認められた．遊離リボゾームも減少し，ミトコンドリアは萎縮あるいは膨化した．1週間後では核にも pyknotic change を認め，細胞は変性・死滅した．

4．一部 resistant cells と思われる細胞が存在し，これらではブロモクリプチンを除いた培地中で再び増殖が認められた．

5．対照実験として正常胎児マウスグリア細胞を用いてブロモクリプチン10μg/ml 添加後1週間の観察を行なったが，形態学的に変化を認めなかった．

以上の如く，18-54, SF細胞は PRL 産生細胞であるにもかかわらず分泌顆粒を持たない細胞であり，ブロモクリプチンは dose- and time-dependent にこの細胞に対して cytocidal effect（殺細胞作用）を示した．この in vitro の実験より，ブロモクリプチンが感受性のある下垂体腺腫細胞に対し殺細胞作用を有し，腫瘍を縮小ないし消失させうる可能性が推定された．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わりました恩師金沢大学医学部脳神経外科山本信二郎教授に深甚の謝意を表します．また，本研究の遂行にあたり常に適切な御指導と御教示を賜わった福井医科大学脳神経外科久保田紀彦助教授に深く感謝致します．さらに18-54, SF細胞を提供下さいました金沢医科大学内分泌内科細島弘行講師に厚くお礼申し上げます．

本研究の要旨は，第24回日本神経病理学会総会（1983年5月，名古屋）および第43回日本脳神経外科学会総会（1984年10月，千葉）において発表した．

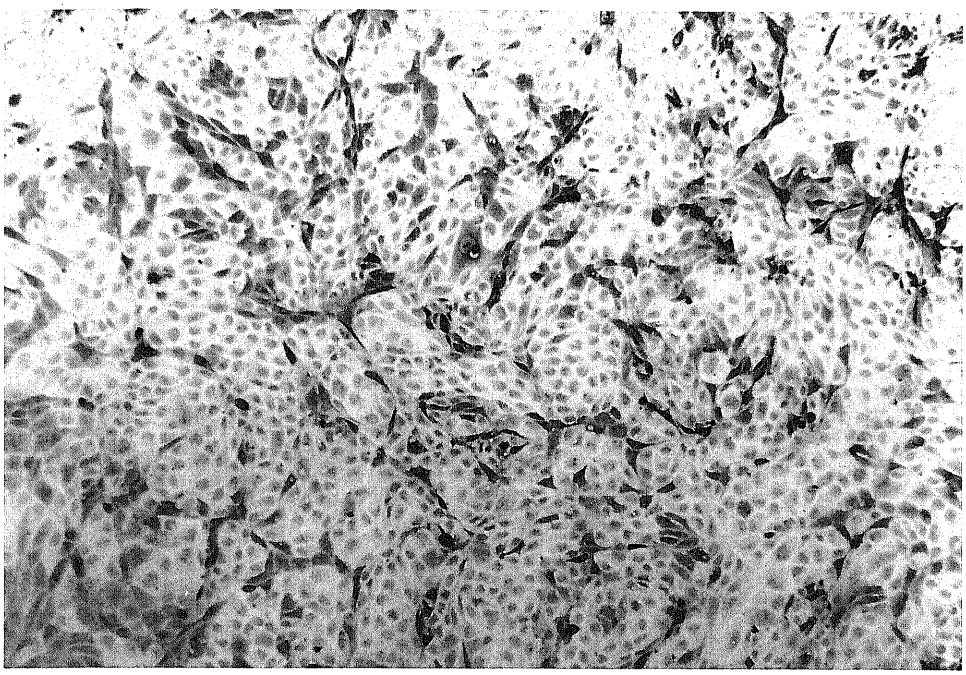

Fig. 9. Light micrograph of immunoperoxidase staining for prolactin (PRL) of untreated SF cells. PRL is demonstrated throughout the cytoplasm in many SF cells. (Counterstain with hematoxylin, ×190).

文　　献

1) **Flückiger, E. & Wagner, H. R.**: 2-Br-α-Ergokryptine: Beeinflussung von Fertitität und Laktation bei der Ratte. Experientia (Basel), **24**, 1130-1131 (1968).

2) **Besser, G. M., Parke, L., Edwards, C. R. W., Forsyth, I. A. & McNeilly, A. S.**: Galactorrhoea: Successful treatment with reduction of plasma prolactin levels by bromergocriptine. Br. Med. J., **3**, 669-672 (1972).

3) **Liuzzi, A., Chiodini, P. G., Botalla, L., Cremascoli, G., Müller, E. E. & Silvestrini, F.**: Decreased plasma growth hormone (GH) levels in acromegalics following CB-154 (2-Br-α-ergocryptine) administration. J. Clin. Endocrinol. Metab., **38**, 910-912 (1974).

4) **Camanni, F., Massara, F., Belforte, L. & Molignatti, G. M.**: Changes in plasma growth hormone (GH) levels normal and acromegalic subjects following administration of 2-Br-α-ergocryptine. J. Clin. Endocrinol. Metab., **40**, 363-366 (1975).

5) **Corenblum, B., Webster, B. R., Mortimer, C. B. & Ezrin, C.**: Possible antitumor effect of 2-bromo-ergocryptine (CB-154, Sandoz) in 2 patients with large prolactin secreting pituitary adenomas. Clin. Res., **23**, 614A (1975).

6) **Wass, J. A. H., Thorner, M. O., Morris, D. V., Rees, L. H., Masson, A. S., Jones, A. E. & Besser, G. M.**: Long-term treatment of acromegaly with bromocriptine. Br. Med. J., **1**, 875-878 (1977).

7) **Corenblum, B.**: Bromocriptine in pituitary tumors. Lancet, **2**, 786 (1978).

8) **Landolt, A. M., Wüthrich, R. & Fellmann, H.**: Regression of pituitary prolactinoma after treatment with bromocriptine. Lancet, **1**, 1082-1083 (1979).

9) **Wass, J. A. H., Moult, P. J. A., Thorner, M. O., Dacie, J. E., Charlesworth, M., Jones, A. E. & Besser, G. M.**: Reduction of pituitary tumor size in patients with prolactinomas and acromegaly treated with bromocriptine with or without radiotherapy. Lancet, **2**, 66-69 (1979).

10) **McGregor, A. M., Scanlon, M. F., Hall, K., Cook, D. B. & Hall, R.**: Reduction in size of a pituitary tumor by bromocriptine therapy. N. Engl. J. Med., **300**, 291-293 (1979).

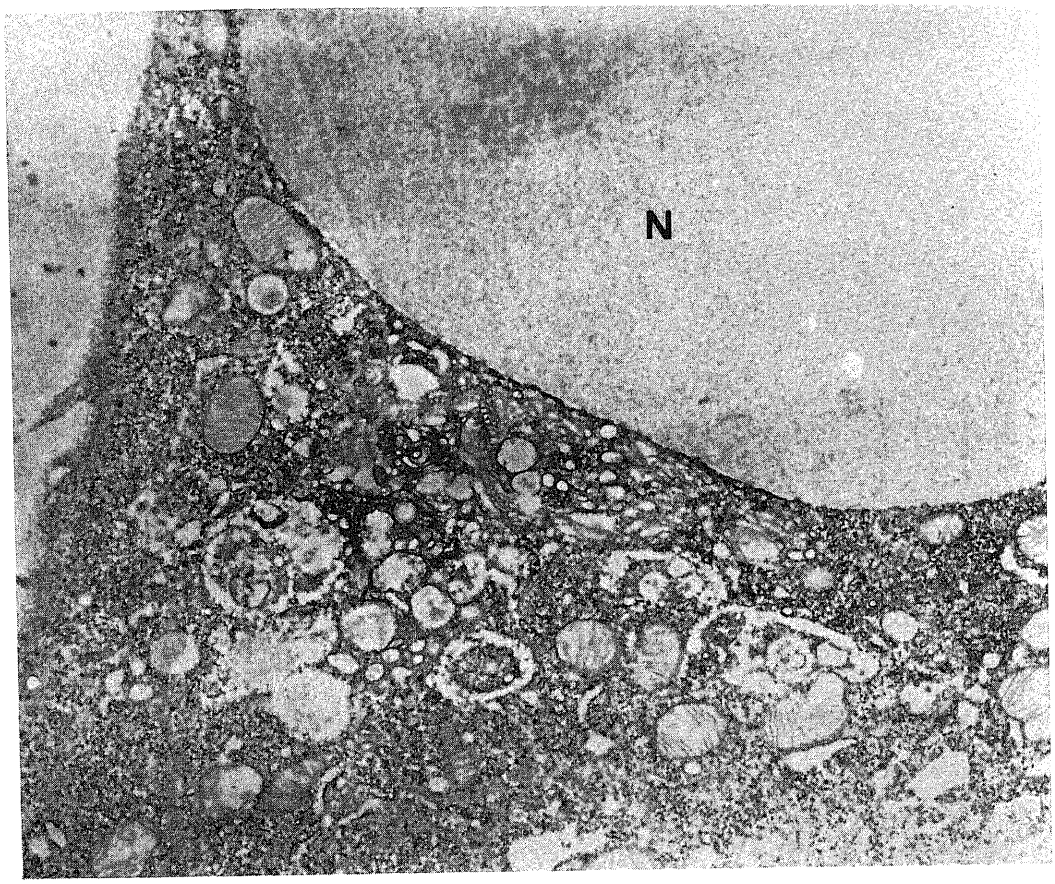

Fig. 10. Immunoelectron micrograph of untreated SF cell. Immunoreactive products for PRL are confined to the matrix of the cytoplasm and the outer surface of the cisternae of RER, whereas the inside of cisternae of RER and Golgi complex are unstained. (Without uranyl lead stain, ×9500) N, nucleus.

11) **George, S. R., Burrow, G. N., Zinman, B. & Ezrin, C.**: Regression of pituitary tumors: A possible effect of bromergocryptine. Am. J. Med., **66**, 697-702 (1979).

12) **McGregor, A. M., Scanlon, M. F. & Hall, K.**: Effects of bromocriptine on pituitary tumor size. Br. Med. J., **2**, 700-703 (1979).

13) **Thorner, M. O., Martin, W. H., Rogol, A. D., Morris, J. L., Perryman, R. L., Conway, B. P., Howards, S. S., Wolfman, M. G. & MacLeod, R. M.**: Rapid regression of pituitary prolactinomas during bromocriptine treatment. J. Clin. Endocrinol. Metab., **51**, 438-445 (1980).

14) **小林士郎, 志村俊郎, 中沢省三**: CT scan 上腫瘍陰影の消失した Forbes-Albright 症候群の1例. 脳外, **8**, 463-467 (1980).

15) **宗光博文, 松田昌之, 平井 収, 川村純一郎, 松林公蔵, 福山秀直**: Bromocriptine 投与による prolactin 産生下垂体腫瘍の消失. 脳外, **8**, 981-986 (1980).

16) **Matsumura, S., Mori, S. & Uozumi, T.**: Size reduction of a large prolactinoma by bromocriptine treatment. Report of a case. Neurol. Med. Chir. (Tokyo), **21**, 127-130 (1981).

17) **Rengachary, S. S., Tomita, T., Jefferies, B. F. & Watanabe, I.**: Structural changes in human pituitary tumor after bromocriptine therapy. Neurosurgery, **10**, 242-251 (1982).

18) **Bonneville, J. F., Poulignot, D., Cattin, F., Couturier, M., Mollet, E. & Dietemann, J. L.**: Computed tomographic demonstration of the effect of bromocriptine on pituitary adenoma size. Radio-

logy, **143**, 451-455 (1982).

19) **Gen, M., Uozumi, T., Shinohara, S., Naito, M., Ito, A. Mori, S. & Kajiwara, H.**: Does bromocriptine have a cytocidal effect on prolactinoma cells? Report of a case. Neurol. Med. Chir. (Tokyo), **23**, 61-65 (1983).

20) **Davies, C., Jacobi, J., Lloyd, H. M. & Meares, J. D.**: DNA synthesis and the secretion of prolactin and growth hormone by the pituitary gland of the male rat: Effect of diethylstilboestrol and 2-bromo-α-ergocryptine methanesulphonate. J. Endocrinol., **61**, 411-417 (1974).

21) **Lloyd, H. M., Meares, J. D. & Jacobi, J.**: Effect of oestrogen and bromocriptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. Nature, **255**, 497-498 (1975).

22) **Kalbermann, L. E., Machiavelli, G. A., De Nicala, A. F., Werssenberg, L. S. & Burdman, J. A.**: Synthesis of DNA in oestrogen induced pituitary tumors in rats: Effect of bromocriptine. J. Endocrinol., **87**, 221-224 (1980).

23) **Prysor-Jones, R. A. & Jenkins, J. S.**: Effect of bromocriptine on DNA synthesis, growth and hormone secretion of spontaneous pituitry tumors in the rat. J. Endocrinol., **88**, 463-469 (1981).

24) **清水庸夫, 木村良一, 田村　勝, 武田文和**: ヒトプロラクチン産生下垂体腺腫の電顕像. Neurol. Med. Chir. (Tokyo), **21**, 1219-1228 (1981).

25) **Anniko, M., Werner, S. & Wersäll, J.**: Bromocriptine induced change in hormone secretion and cell morphology in growth hormone and prolactin producing pituitary adenomas. Acta Otolaryngol. (Stockh), **91**, 343-355 (1981).

26) **寺本　明, 高倉公朋, 福島孝徳, 長村義之**: Bromocriptine 投与に伴う prolactine 産生下垂体腺腫の病理学的変化. 脳外, **10**, 619-627 (1982).

27) **Wyche, J. H. & Noteboom, W. D.**: Growth regulation of cultured human pituitary cells by steroidal and non-steroidal compounds in defined medium. Endocrinology, **104**, 1765-1773 (1979).

28) **Adams, E. F., Brajkovich, I. E. & Mashiter, K.**: Growth hormone and prolactin secretion by dispersed cell cultures of a normal human pituitary: Effects of thyrotrophin releasing hormone, theophylline, somatostatine, and 2-bromo-α-ergocryptine. Acta Endocrinologica, **98**, 345-351 (1981).

29) **佐藤泰山**: 超薄切片用鉛染色法の一改良法. J. Electron Micro. (Tokyo), **17**, 158-159 (1968).

30) **Zamboni, L. & De Martino, C.**: Buffered picric acidformaldehyde: A new, rapid fixative for electron microscpry. J. Cell Biology, **35**, 148A (1967).

31) **Bohn, W.**: A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopical immunoperoxidase studies. J. Histochem. Cytochem., **26**, 293-297 (1978).

32) **Tougard, C., Picart, R. & Tixier-Vidal, A.**: Electron microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture. Am. J. Anat., **158**, 471-490 (1980).

33) **西川克三, 長尾嘉信, 山田幸生**: ガン細胞と増殖因子. 組織培養, **8**, 39-45 (1982).

34) **Demura, R., Kubo, O., Odagiri, E., Nomura, K., Yamaguchi, H., Wakabayashi, I., Demura, H. & Schizume, K.**: Growth hormone and prolactin in tissue culture of pituitary adenoma. Endocrinol. Japan, **24**, 259-264 (1977).

35) **Peillon, F., Cesselin, F., Garnier, P. E., Brandi, A. M., Donnadieu, M., Hermite, M. L. & Dubois, M. P.**: Prolactin secretion and synthesis in short- and long-term organ culture of pituitary tumor from acromegalic patients. Acta Endocrinologica, **87**, 701-715 (1978).

36) **Peillon, F., Gourmelen, M., Donnadieu, M., Brandi, A. M., Sevaux, D. & Pham Huu Trung, M. T.**: Organ culture of human somatotrophic pituitary adenomas: Ultrastructure and growth hormone production. Acta Endocrinologica, **79**, 217-219 (1975).

37) **Yoshida, J., Kageyama, N., Seo, H. & Kanzaki, M.**: Growth hormone and prolactin secretion of pituitary adenoma. Neurol. Med. Chir. (Tokyo), **15**, 13-21 (1975).

38) **清水庸夫, 田村　勝, 藤井　卓, 三隅修三, 武田文和**: ヒト下垂体腺腫の超微形態：腺腫によるホルモン産生と分泌顆粒との相関. 脳外, **7**, 441-453 (1979).

39) **Osamura, R. Y., Izumi, S., Komatsu, N., Yoshimura, S., Murakoshi, M. & Watanabe, K.**: Ultrastructural localization of anterior hormones (prolactin, ACTH, LH) in the stimulated and suppressed rat pituitaries. Acta Histochem. Cytochem., **12**, 558 (1979).

40) **石川　博**: 培養法による下垂体前葉細胞の分化様式－ホルモン産生株細胞の特徴－. 組織培養, **8**, 85-

90 (1982).

41) 石川 博：下垂体細胞の形態と機能．内科，28, 17-29 (1971).

42) **Pastells, J. L., Danguy, A., Frérotte, M. & Ectore, F.**: Inhibition de la sécrétion de prolactine par l'ergocornine et la 2-Br-α-ergocryptine: action directe sur l'hypophyse en culture. Ann. Endocrinol. (Paris), **32**, 188-192 (1971).

43) **Gautvik, K. M., Hoyt, R. F. & Tashjian, A. H. Jr.**: Effects of colchicine and 2-Br-α-ergocryptine-methanesulfonate (CB-154) on the release of prolactin and growth hormone by functional pituitary tumor cells in culture. J. Cell Physiol., **82**, 401-410 (1973).

44) 吉田達生，早川 徹，森信太郎，生塩之敬，中川秀光，最上平太郎，中川陽造：下垂体 PRL 産生腫瘍および GH 産生腫瘍の初代組織培養．脳外，**11**, 1149-1155 (1983).

45) 高木文一：細胞障害の超微形態学．日病理会誌，**53**, 17-52 (1964).

46) **Longnecker, D. S., Shinozuka, H. & Farber, E.**: Molecular pathology of in vivo inhibition of protein synthesis: Electron microscopy of rat pancreatic acinar cells in puromycin induces necrosis. Amer. J. Path., **52**, 891-915 (1968).

47) 久保長生，田鹿安彦，神谷増三，井上憲夫，氷室博，本阿弥妙子，出村黎子，喜多村孝一：ヒト prolactinoma の bromocriptine 療法およびラット prolactinoma の bromocriptine の効果の形態学的観察．第3回下垂体腫瘍 Workshop 講演会録（景山直樹監修），105-116 頁，1982.

48) **Mauer, R. A.**: Dopaminergic inhibition of prolactin synthesis and prolactin messenger RNA accumulation in cultured pituitary cells. J. Biol. Chem., **255**, 8092-8097 (1980).

49) 河本圭司，西山直志，池田 裕，河本悌夫，松村浩，平野朝雄，**Herz, F. & Wolley, R. C.**: Flow cytometry による脳腫瘍の生長解析－Part 2：ヒト良性脳腫瘍－．脳外，**9**, 1017-1022 (1981).

50) **Johnston, D. G., McGregor, A., Ross, W. M. & Hall, R.**: Bromocriptine therapy for "nonfunctioning" pituitary tumors. Am. J. Med., **71**, 1059-1061 (1981).

51) **Spark, R. F., Baker, R., Biefang, D. C. & Bergland, R.**: Bromocriptine reduces pituitary tumor size and hypersecretion: Requiem for pituitary surgery? JAMA, **247**, 311-316 (1982).

52) **Wollesen, F., Andersen, T. & Karle, A.**: Size reduction of extrasellar pituitary tumors during bromocriptine treatment: Quantitation of effect on different types of tumors. Ann. Intern. Med., **96**, 281-286 (1982).

53) **Marrs, R. P., Kletzky, O. A. & Schecter, J.**: In vitro effect of bromocriptine on human pituitary cells. Fertil. Steril., **36**, 430 (1981).

Effect of Bromocriptine on Cultured Human Pituitary Adenoma Cells (18-54,SF cells)－Light and Electron Microscopical Studies－

Masanori Kabuto, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med. Soc., **96**, 885－899 (1987)

Key words: pituitary adenoma, cell culture, bromocriptine, fine structure, cytocidal effect

Abstract

This study was undertaken to investigate the effect of bromocriptine on morphological features of clonal strain derived from human pituitary adenoma: 18-54, SF cells (SF cells). The cells were cultured in serum-free medium containing bromocriptine at concentrations of 1 and 10 μg/ml. After 24 hours, 3 days, and 7 days of cultivation, the cells were observed under both phase-contrast microscopy and transmission electron microscopy. Immunocytochemical staining for prolactin (PRL) was also performed. The phase-contrast microscopic study disclosed that untreated SF cells had angular or polygonal shapes in confluent monolayer. Ultrastructurally they were characterized by the presence of numerous free ribosomes, many mitochondria, well developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex, and by the lack of secretory granules in the cell. Immunoreactive products for PRL were observed throughout the cytoplasm. These cells showed little change after the administration of 1 μg/ml of bromocriptine all through the study. On the other hand, the cisternal spaces of the RER were dilated to varying degrees, and many vacuoles originating from the RER cisternae were observed in the cytoplasm 3 days after the administration of 10 μg/ml of bromocriptine. Mitochondria decreased in number and size, and the electron density of their matrices increased at this stage. Seven days after the administration of 10 μg/ml of bromocriptine, electron microscopy disclosed the following; pyknosis of nuclei, atrophy or swelling of mitochondria, increased cytoplasmic electron density, and severe degeneration in a large number of cells. No degenerative changes were observed in fetal mouse glial cells when 10 μg/ml of bromocriptine was administered (control group). These results suggest that SF cells have no secretory granules in spite of PRL producing pituitary adenoma cells and that bromocriptine has a cytocidal effect on SF cells in dose- and time-related phenomenon.