

プロラクチン産生腺腫におけるプロラクチンの局在
について：
光顕酸素抗体法及び電顕対応切片による検索

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: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9060

プロラクチン産生腺腫における プロラクチンの局在について

— 光顕酵素抗体法及び電顕対応切片による検索 —

金沢大学大学院医学研究科脳神経外科学講座 (主任: 山本信二郎教授)

黒 田 英 一

(昭和58年2月15日受付)

臨床的に高プロラクチン (PRL) 血症を呈し、光顕酵素抗体法により腫瘍組織内に PRL 陽性細胞が証明された 17 例の下垂体腺腫について、その細胞内 PRL 陽性部位の特徴を通常電顕所見、並びに一部の症例においては酵素抗体法による光顕と対応する電顕切片により検索した。パラフィン切片による酵素抗体法及び通常電顕所見より、対象は A 型 (14 例)、B 型 (2 例)、及び C 型 (1 例) の 3 つの型に分類された。このうち A 型 5 例、B 型 1 例、C 型 1 例の 7 例についてエポソ光顕電顕対応切片による検索を行った。A 型では腺腫の大部分が PRL 陽性細胞より成り、細胞内 PRL は核の近傍に小塊状に認められた。この型の腺腫は電顕上、少数の小型分泌顆粒が分布する細胞より成り、ゴルジ装置と粗面小胞体の発達及び分泌顆粒の腺腫細胞間腔への異常分泌像を示した。A 型の対応切片による検索では、核近傍の PRL 陽性部位は電顕像では核の周辺にゴルジ装置、及びそれに近接する複数の分泌顆粒及び一部の粗面小胞体に対応した。これに対し細胞の辺縁に疎に分布する分泌顆粒は光顕上 PRL 陽性を示さなかった。B 型腺腫では少数の PRL 陽性細胞が散在して認められ、この細胞では PRL は細胞質全体に一樣な分布を示した。電顕検索で、細胞は多数の分泌顆粒を有するが、このもののエポソ切片上では PRL 陰性であった。C 型腺腫では約半数の腺腫細胞において細胞質全体に粗大顆粒状の強陽性 PRL が認められ、残りの細胞には PRL が乏しいか全く認められなかった。電顕上、腺腫は直径が 1μ にも達する大型分泌顆粒を多数有する細胞と、小型顆粒を少数有する細胞より成り、対応切片による検索では陽性 PRL は前者の大型顆粒に極めてよく一致した。以上の事実より、多くの PRL 産生腺腫において光顕上認められる細胞内 PRL は、微細構造上、核近傍のゴルジ装置を中心とした部位に対応し、場合によっては極めて大きな分泌顆粒にも対応する事が示された。

Key words prolactin, pituitary adenoma, immunoenzyme method, electron microscopy

1954 年 Forbes ら¹⁾は無月経と乳汁漏出を伴う下垂体腺腫 8 例を報告し、症状は腺腫によるプロラクチン (prolactin, 以下 PRL と略) の過剰な産生分泌による可能性を示唆した。その後 radioimmunoassay (以下 RIA と略) による内分泌検査法の開発、CT スキャンを初めとする放射線診断学の発達による腫瘍局在診断の進歩、及び顕微鏡使用などによる手術手技の向上により微小腺腫を含め腺腫の手術症例は飛躍的に増加した。高 PRL 血症を伴う下垂体腺腫が多数例報告されるに及

んで PRL 産生下垂体腺腫 (prolactinoma, 以下 PRLoma と略) は一つの clinical entity として確立した^{2)~5)}。

下垂体腺腫の組織診断法として従来の色素親和性に基づく染色法は、腺腫の産生するホルモンの多様性に対応できない⁶⁾⁷⁾。PRLoma の組織診断は主に酵素抗体法と電顕的観察により行われ、PRL producing adenoma⁸⁾⁹⁾、PRL secreting adenoma⁶⁾、prolactinoma¹⁰⁾など種々の名称が付されている。Nakane ら

Localization of Prolactin in Prolactin Secreting Pituitary Adenomas by Immunoenzyme Method, Including Electron Microscopic-Immunohistochemical Correlation on Epon Sections. Eiichi Kuroda, Department of Neurosurgery (Director: Prof. S. Yamamoto), School of Medicine, Kanazawa University.

により開発された immunoenzyme method, いわゆる酵素抗体法¹¹⁾¹²⁾は細胞内物質をその免疫学的特異性と酵素特異性を利用して証明する染色法であり, 細胞内ホルモンの特異的検出を可能ならしめた. 酵素抗体法による PRLoma の研究は, 主にパラフィン切片を利用した光顕酵素抗体法のみならず, 微細構造上の局在を直接観察する電顕酵素抗体法が可能である. 従来の酵素抗体法を用いた PRLoma の研究はその多くが光顕によるもので, 腺腫細胞内に PRL を証明する機能的診断法として満足すべき結果が得られているが^{7)8)13)~17)}, 微細構造における PRL の局在に関しては, 同じ腺腫の他の電顕材料の微細構造との対比により間接的に推測しているにすぎない⁷⁾¹⁶⁾. これに対して電顕酵素抗体法は主としてラットの正常下垂体細胞について行われ¹²⁾¹⁸⁾¹⁹⁾, ヒト PRLoma についての PRL の局在観察は Osamura ら²⁰⁾の報告が成されている. 酵素抗体法を行う場合エボン包埋材料では固定による抗原性の消失, 包埋材料による非特異的反応などの問題が挙げられてきた. しかし一方グルタルアルデヒド, オスミウム固定及びエボン包埋の過程でも PRL の抗原性は保た

れ, エボン切片を利用した免疫組織化学が報告されている²¹⁾²²⁾. Paiz ら²³⁾はヒト下垂体組織のエボン材料を利用して各種色素好性細胞の光顕所見と電顕所見との直接対応を行ってエボン対応切片法の有用性を示し, 更に Osamura ら²⁴⁾はこの直接対応が可能なエボン切片上の酵素抗体法の有用性を示唆した. 著者は臨床的並びに光顕パラフィン切片上の酵素抗体法により PRLoma である事が証明された下垂体腺腫について, エボン包埋材料による光顕と電顕との直接対応切片を作製し, 光顕上の PRL 陽性部位が微細構造上どの部位に対応するかと比較検討を行った. またパラフィン切片における酵素抗体法 PRL 染色による PRLoma の PRL 陽性部位の特徴及び PRLoma の微細構造の特徴についても併せて検討を加えた.

対象および方法

RIA による血清 PRL の測定が開始された 1977 年以後 1982 年 8 月までに, 金沢大学脳神経外科及びその関連病院で手術された下垂体腺腫のうち, 高 PRL 血症を呈し, 且光顕パラフィン切片における酵素抗体法によ

Table 1.

Case	age & sex	symptom	tumor size	s-PRL	Bromocriptine	H-E	Immunostain	EM.
1.	27 F	Am V	L	>200	(-)	C	A	S
2.	30 F	Am V	L	5580	(-)	C	A	S
3.	22 F	Om V	L	2550	(-)	C	A	S
4.	28 F	Am V	L	>200	(-)	C	A	S
5.	24 M	V	L	4300	(-)	C	A	S
6.	29 M	V Im	L	6500	(-)	C	A	S
7.	36 M	V	L	300	(+)	C	A	S
8.	24 F	Am G	S	1200	(+)	C	A	S
9.	26 F	Am G	S	900	(-)	C	A	S
10.	25 F	Am G	S	220	(+)	C	A	S
11.	38 F	Am G	S	3470	(-)	C	A	S
12.	31 F	Am G	M	120	(-)	C	A	S
13.	31 F	Am G	M	90	(+)	C	A	S
14.	27 F	Am G	M	100	(-)	C	A	S
15.	31 F	Am G	M	120	(-)	E	B	D
16.	38 F	Am G	M	120	(-)	C&E	B	D
17.	54 M	V	L	2300	(-)	C&E	C	D&S

Table 1. Clinical and pathological data of 17 cases. Symptoms: Am, amenorrhea; Om, oligomenorrhea; G, galactorrhea; V, visual disturbance; Im, impotence. Tumor size: L, large adenoma; S, small adenoma; M, microadenoma. H-E stain: C, chromophobe; E, eosinophilic. Immunostain (for PRL): The letters of A, B, and C mean the types of immunostain. EM (electron microscopic findings): D, densely granulated adenoma; S, sparsely granulated adenoma. Bromocriptine: (+), Cases treated with bromocriptine; (-), Cases treated without bromocriptine.

り細胞内 PRL が証明された 17 例を本研究の対象とした。他の 2 例では入院時高 PRL 血症 (20,900 及び 800 ng/ml) が認められ臨床的に PRLoma と診断された症例であったが、光顕酵素抗体法により腺腫組織内に陽性 PRL が証明できなかったために本研究の対象より除外した。この 2 例はともに手術直前まで bromocriptine (2-bromo- α -ergocryptine) が投与された症例であった。また高 PRL 血症を伴う腺腫であっても、同時に高 GH (成長ホルモン) 血症が認められる症例も本研究の対象より除外した。研究の対象として症例の性別は男性 4 例、女性 13 例であった (表 1)。年齢は 22~54 歳 (平均 30.6 歳)、男性群では 24~54 歳 (平均 35.8 歳)、女性群では 22~38 歳 (平均 29.1 歳) であった。臨床症状の上では、無月経または過少月経を 12 例に、乳汁漏出を女性例のみ 8 例に認め、その他視力視野障害は 8 例、陰萎は 1 例に認められた。血清 PRL 値は 90~6,500 ng/ml を示し、初期の 2 例 (case 1, 4) は 200 ng/ml 以上を示したが詳細な測定は行われなかった。腺腫の大きさの定義に関しては、鞍上伸展を伴うものを large adenoma (8 例)、鞍内に限局するが直径が 10 mm を越えるものを small adenoma (4 例)、及び鞍内に限局し直径が 10 mm 以下のものを microadenoma (5 例) とした。bromocriptine は 17 例中 4 例に投与され、うち 1 例 (case 7) では手術直前まで投与が行われたのに対し、他の 3 例 (case 8, 10, 13) では手術の 3 か月以上前に投与が中止された。

摘出腫瘍の一部を直ちに 10% 中性ホルマリンで固定しパラフィン包埋し、それより連続する 3 枚の 5 μ 切片を作製した。このものを卵白アルブミンを塗布したスライドガラスに貼付した。脱パラフィン後、非特異的反応を阻止するために 10% 過酸化水素水を 20 分²⁵⁾、正常ヤギ血清を 45~60 分反応させ²⁶⁾、Nakane ら¹¹⁾ による酵素抗体法を用いて PRL 染色を行った。一次抗体として Anti-ovine PRL rabbit serum²⁷⁾²⁸⁾ (日本生理活性物質研究所—東京)、二次抗体として Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat serum (Cappel 社) を用い、各々 30~45 分反応させた。呈色反応として 0.005% 過酸化水素を加えた 3,3'-diaminobenzidine 溶液²⁹⁾ を用いた。各段階の洗滌には 0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.2 (phosphate buffered saline 以下 PBS と略) を用いた。最後に核染色としてヘマトキシリンを作用させた。上記操作を連続切片①に行うと同時にコントロールとして一次抗体に代えて切片②には正常ウサギ血清、切片③には PBS を作用させ、非特異的染色の有無を検討した。また剖検時に得られた正常下垂体組織をコントロールとしてこの操作の特異性も併せて検討した。同じ腺腫材料より得られたパラフィン切片

に対しヘマトキシリン-エオジン染色 (以下 H-E 染色と記載) を行った。

電顕材料は手術時新鮮材料をグルタルアルデヒド前固定、オスミウム後固定の後にエポン-アララグイト包埋したブロックより LKB 8800 ミクロトームにて薄切した。超薄切片を電顕用に用い、それに連続する 3 枚の 1 μ 切片を作製しスライドガラスに貼布し、脱エポン³⁰⁾を行った後に前述の操作で酵素抗体法を行った。光顕パラフィン切片の場合と同様に、切片①に対して PRL 染色を行い、切片②および③はコントロールとした。超薄切片は酢酸ウラニール、鉛による二重染色を施行後、日立 H-600 型透過型電子顕微鏡にて観察し、PRL 染色を施行した 1 μ エポン切片の対応部位との比較検討を行った。

成 績

1. パラフィン包埋切片の光顕的観察

酵素抗体法による PRL 染色では細胞内 PRL は微細顆粒状ではなく、むしろ泡沫状に染色され、その特徴により A, B, C, 3 つの型に分けられた。A 型は 14 例 (case 1~14) に認められ (表 1)、細胞により可成の染色性の差はあるが、腺腫細胞の大部分が PRL 陽性細胞によって占められるものである。陽性 PRL は細胞質の一極に偏在し、核に接するかある程度の pale zone を介して小塊状乃至三日月状に染色された (図 1 a)。術前に bromocriptine が投与された 4 例の中の 1 例 (case 7) では PRL の染色性が低かったが、他の 3 例には認むべき染色性の差はなかった。腺腫の大きさについては、large adenoma が 7 例、small adenoma が 4 例、microadenoma が 3 例であった。腺腫が大きい程血清 PRL 値が高い傾向を示したが、血清 PRL 値と細胞の陽性 PRL の所見には相関が認められなかった。H-E 染色では全例が嫌色素性腺腫であった (図 1 b)。2 例 (case 9, 12) では calcospherite が認められ、特に 1 例 (case 9) では層状構造を呈する巨大な calcospherite が腺腫細胞を圧排している像が観察された。

β 型の 2 例 (case 15, 16) では腺腫細胞の極めて少数が陽性 PRL を示した。陽性 PRL 細胞は特に集団を作らずに散在し、細胞内 PRL は A 型と異なり細胞質全体に分布していた (図 2 a)。2 例はともに microadenoma であった。H-E 染色では 1 例は好酸性腺腫 (case 15, 図 2 b)、他の 1 例は混合性腺腫 (好酸性と嫌色素性) (case 16) であった。

C 型は 1 例のみに認められた (case 17)。腺腫を構成する細胞の約半数に細胞質全体に粗大顆粒状の強陽性 PRL が認められたのに対し、他の細胞では PRL は全く認めないか、あっても極く弱い陽性であった (図 3 a)。

この例は large adenoma であった。H-E 染色では約半数の細胞ではその細胞質全体にび慢性の好酸性粗大顆粒を認めたのに対し、残る細胞は嫌色素性細胞であった。好酸性細胞は明らかな集団を形成する事なく分布していた (図 3b)。

2. 電顕的観察

A 型の腺腫はいずれも腺腫細胞は多角形を示し密接して存在した (図 4)。核一胞体比は比較的大きく、核は不整形で核の彎入も認められた。時には核の中心に明瞭な核小体が認められ、核内クロマチンはび漫性に分布していた。細胞質内には分泌顆粒が散在するが、核周辺のゴルジ装置に近接した部位で比較的集中して存在した。分泌顆粒の形状は円形、楕円形、棍棒状、勾玉状で明瞭な限界膜を有するものが多かった。顆粒はその大きさから直径が $300\text{ m}\mu$ 以下の小型円形顆粒と、これより大きな概ね $500\sim 800\text{ m}\mu$ の不整形顆粒に分けられた。細胞外にも分泌顆粒が所々認められ、顆粒が腺腫細胞の毛細管腔側ではなく隣接する細胞境界部にみられる異常顆粒分泌像 (misplaced exocytosis) として観察された。腺腫細胞の大多数のものは少数の分泌顆粒を有する、いわゆる sparsely granulated cell であった。1例 (case 4) では上述の sparsely granulated cell に混じって、多数の分泌顆粒を有する細胞が散在しているのが認められ、その顆粒は円形で直径が $500\text{ m}\mu$ 以上の比較的大きなものが多かった (図 5)。細胞内小器官は豊富で、ゴルジ装置、粗面小胞体、ミトコンドリアが良好な発達を示した。ミトコンドリアは内腔が拡張し円形を呈するものや cristae の配列異常を示すものが認められた (図 6)。また大脂肪顆粒や cilia も時に認められた。酵素抗体法上 PRL の染色性の低下が認められた 1例 (case 7) では、微細構造上粗面小胞体の内腔の拡張が認められた (図 7)。

B 型の腺腫の 2 例はいずれも、円形の核を有し直径が $300\sim 800\text{ m}\mu$ の多数の分泌顆粒を有する細胞より成っていた (図 8)。細胞質内にはゴルジ装置、粗面小胞体、ミトコンドリアなどが豊富であった。

C 型の腺腫では細胞質内に直径が 1μ を越える大型分泌顆粒や集簇した顆粒を有する細胞が多数認められ、前述の A 型の腺腫で示した sparsely granulated cell も少数認められた (図 9)。またある細胞では分泌顆粒は大きな空胞の中に集簇して存在する場合もあった (図 10)。大型分泌顆粒は、不整形で均一な高い電子密度を示すものと、電子密度が不均一な微細顆粒が多数集簇した様に見えるものより成っていた (図 11)。一方細胞質内には極めて豊富な粗面小胞体とゴルジ装置が認められた。粗面小胞体は内腔の拡張したものが多数認められた (図 9, 11)。

3. 光顕電顕対応切片の観察

エボン切片における酵素抗体法では background stain として視野全体が淡褐色を呈し、染色性もパラフィン切片におけるものよりも弱い欠点はあるが、検索に十分耐え得るものであった。エボン切片上 A 型の腺腫において観察される、細胞質の一極または核の近傍の小塊状の PRL 陽性部位は、電顕所見では多くの場合、ゴルジ装置と複数の小型分泌顆粒及び一部の粗面小胞体のみられる部位に対応した (図 12)。エボン切片上の PRL 陽性部位に対応して認められる分泌顆粒は、ゴルジ装置の近傍で比較的密に存在する小型分泌顆粒である場合 (図 12, 13) と、直径が 1μ を越える巨大顆粒である場合 (図 13b, 矢印) とが観察された。ゴルジ装置が PRL 陽性部位に対応する場合、その近縁に分泌顆粒を伴う場合が多かった (図 13b 二重矢印)。また PRL 陽性部位に対応して発達した粗面小胞体が認められ、上述の分泌顆粒及びゴルジ装置に乏しい場合も認められた (図 12b 矢印)。一方内腔の拡張した粗面小胞体は PRL 陽性を示す事はなかった (図 13b 三重矢印)。

B 型の腺腫においてエボン切片上で酵素抗体法を試みたが、腺腫内に PRL 陽性細胞は証明されなかった。

C 型の 1 例ではエボン切片上の粗大顆粒状の陽性 PRL は、電顕所見では大型分泌顆粒に極めてよく一致した (図 14)。一方極く少数の小型分泌顆粒のみを有する sparsely granulated cell では全く PRL 陽性を認めないか、極く弱い PRL 陽性を示した。

考 察

寺本¹⁷⁾は高 PRL 血症を伴う下垂体腺腫 37 例に光顕酵素抗体法を行い、細胞内 PRL の特徴から 2 型に分類した。第 1 型では腺腫構成細胞の 90% 以上が PRL 陽性で、それらは核の近傍に偏在する小塊状 PRL を有した。これに対し第 2 型では PRL 陽性細胞は極めて少なく、しかもこの細胞では細胞質全体に均一な PRL の分布を示した。本研究では酵素抗体法による検索から 17 例の PRLoma を A, B, 及び C の 3 つの型に分類したが、この分類法は微細構造的にも適当なものであった。A 型のもものは 14 例であり、寺本の第 1 型に相当するものと思われる。この型の腺腫は microadenoma から鞍上伸展を示す large adenoma までの種々の大きさの腺腫より成り、腺腫細胞の大部分は PRL 陽性細胞より成るため、血清 PRL 値は腫瘍の大きさに比例して $80\sim 6,500\text{ ng/ml}$ と幅広い分布を示した。この型の 14 例はいずれも、光顕酵素抗体法による染色態度は一定し、その特徴は細胞質の一極に偏在する三日月状、または核近傍に小塊状に認められる陽性 PRL である。

PRLomaの光顕酵素抗体法の特徴として、“PRL arranged in streaks, adjacent to the nucleus or to the cell membrane”⁸⁾、“juxtannuclear distribution”¹⁴⁾、“perinuclear mass”²⁰⁾などの記載があるが、これらは概そ本研究のA型にみられる細胞質内の三日月状または小塊状の陽性PRLに相当するものと思われる。血清PRL値は直径10mm以下のmicroadenomaでは80~120ng/mlであり、腺腫が大きいく程その値が高く最高で6,500ng/mlであった事実は、A型の腺腫は概ね一様なPRLの産生分泌能をもつ細胞より成る腺腫である事を示唆する。

B型の腺腫の2例はいずれもmicroadenomaであり血清PRL値はともに120ng/mlを示し、血清PRL値と腺腫の大きさの点ではA型の場合と同様であるが、光顕酵素抗体法の特徴は全く異なっていた。この型の腺腫ではPRL陽性細胞の数は陰性の細胞のそれに比して著しく少なく、しかもPRL陽性細胞ではPRLは細胞質全体にびまん性に分布していた。この特徴をもつ腺腫について寺本¹⁷⁾は腺腫の鞍上伸展をみ、視床下部の障害を主張したが、本研究における2例はいずれもmicroadenomaであり、視床下部の機械的障害があったとは考えられない。Martinezら¹⁵⁾は25例のPRLomaのうち3例に本研究のB型と同様の所見を認め、酵素抗体法の結果と血清PRL値の間に矛盾のある事を指摘している。

C型腺腫の1例では概そ半数の腺腫細胞内に、細胞質全体に分布する多数の粗大顆粒状の強陽性PRLを認め、残りの腺腫細胞では細胞質の一部に弱いPRL陽性を示すか全くPRL陰性であった。血清PRL値は2,300ng/mlで、腫瘍の大きさととの相関関係はA型の場合と同様であった。

手術の前にbromocriptineを投与したPRLomaの症例では、光顕酵素抗体法上のPRL陽性部位の染色性が低下すると言われている^{31,37)}。本研究においても臨床的にはPRLomaと診断されながら、長期間bromocriptineを投与した直後に手術された3例のうち2例は、ほとんどPRLに対する染色性が失われており、本研究の対象より除かざるを得なかった。しかし残る1例と、手術の3カ月前まで本剤が投与された3例ではPRLの染色性が保たれており本研究の対象に含められた。従ってbromocriptineは全てのPRLomaにおいてPRLの染色性を抑制するとは限らず、また抑制しても本剤の投与を中止するとその染色性は回復すると言える。

微細構造上A型の腺腫はいずれも共通する特徴を有していた。核の不整と彎入を多く認め、細胞内小器官ではゴルジ装置の増加と粗面小胞体の発達、及びミト

コンドリアの増大とcristaeの異常が観察された。また特徴的な少数の分泌顆粒と、その異常分泌像であるmisplaced exocytosis³²⁾が多数認められた。Horvathら³³⁾及びLandolt¹⁰⁾は微細構造の特徴、特にその分泌顆粒の多寡によりPRLomaをdensely granulated typeとsparsely granulated typeの二種に分類した。前者は多数の分泌顆粒を有する腺腫細胞より成り正常下垂体のPRL細胞に比較的類似した微細構造をもつ。これに対し後者はその特徴として少数の分泌顆粒とmisplaced exocytosis、及び発達したゴルジ装置と粗面小胞体などが挙げられ、ホルモンの産生分泌がより高い状態を示すものである^{6)8)~10)34)}。A型の腺腫は極めて高いPRL産生分泌能をもつsparsely granulated PRLomaと考えられた。

エボン包埋材料による光顕と電顕との対応検索より、光顕酵素抗体法上核近傍の小塊状PRL陽性部位を示したA型腺腫では、主なPRLの局在は核近傍のゴルジ装置及びその周辺に分布する複数の分泌顆粒であるが、一部の粗面小胞体にもPRLの局在が認められた。A型の腺腫細胞のPRL陽性部位に対応してみられる分泌顆粒は、ほとんどが小型の分泌顆粒で核の周辺に比較的密に分布するものであったが、稀には直径が1 μ を越える巨大な分泌顆粒であった。これに対し小型の分泌顆粒が細胞質の辺縁に疎に分布する場合にはPRL陰性であった。この事実は分泌顆粒の間でPRLの抗原性に差があるためではなく、むしろ小型分泌顆粒が疎に分布する場合には光顕的検出の限界に達し得ないものと考えられる。Osamuraら²⁰⁾は電顕酵素抗体法を用い、ヒトPRLomaの腺腫細胞内で、核近傍のゴルジ装置、粗面小胞体及び複数の分泌顆粒にPRLの局在を直接的に証明したが、これは本研究におけるA型の腺腫の所見に一致する。

B型の腺腫は好酸性顆粒に富む細胞が多数を占めるにもかかわらず、光顕酵素抗体法ではPRL陽性細胞が極めて少数に限られた。エボン切片ではPRL陽性細胞が証明されず、電顕所見は直径が300~800 μ mの分泌顆粒を多数有する腺腫細胞より成り、densely granulated adenomaに属するものであった。この型の腺腫ではPRL陽性細胞が少ないために、上述の電顕上のdensely granulated cellはPRL細胞以外のものである可能性を否定できない。

C型の1例ではA型の腺腫細胞に類似するsparsely granulated cellから、細胞質全体に大型の分泌顆粒を有するdensely granulated cellまで多彩な存在様式を示し、両者の間に移行型と考えられる細胞が認められた。C型の腺腫は酵素抗体法上PRL強陽性の細胞と、PRLに乏しいか全くPRLを認めない細胞より構成され

るが、エボン対応切片による検索より、微細構造の上で前者は大型の分泌顆粒が密に分布する densely granulated cell に属し、後者は顆粒に乏しく sparsely-granulated cell に属した。この腺腫における PRL の局在は、主に大型の分泌顆粒そのものである。微細構造により分類される sparsely granulated PRLoma と densely granulated PRLoma は、互いに独立した腫瘍型であるのか、または同一の腫瘍型の異なる時相、即ちホルモンの分泌期と貯留期を示すものであるのかについては確立した見解をみていない³⁴⁾。C 型腺腫における PRL に乏しい細胞は微細構造上 A 型の腺腫細胞に類似し、むしろ著明な分泌活動を示す細胞と考えられる。清水ら⁹⁾は bromocriptine を投与した PRLoma の電顕像で分泌顆粒の集簇像が見られた事を報告し、これが本剤による顆粒放出抑制作用によると推定している。しかし本研究の C 型腺腫では bromocriptine は投与されなかった。PRL 陽性細胞については分泌期にある sparsely granulated cell が、顆粒の放出抑制を来す何らかの機序により、顆粒の集簇像を示しながら貯留期にある大型顆粒を多数有する細胞へと移行した可能性を否定し得ない。殊にこの場合顆粒の集簇化によっても顆粒の抗原性は失なわれない事がエボン切片による検索により確認された。

PRL 細胞におけるホルモンの合成と分泌に関する知見は、主としてラットの下垂体組織の研究より得られている。通常電顕の検索により Farquhar³⁵⁾は粗面小胞体内腔で合成されたホルモンがゴルジ装置へと移動し、ここより遊離する際に限界膜を有する分泌顆粒となると主張した。Kawarai ら¹⁸⁾は電顕酵素抗体法を用いてラット下垂体細胞の分泌顆粒とゴルジ装置及び一部の粗面小胞体の内腔に PRL の局在を証明した。一方 estrogen を投与したラット下垂体では PRL 細胞の増殖を来し、形態学的にはその投与期間の差により densely granulated adenoma 或いは sparsely granulated adenoma に類似した腫瘍を生ずる事が言われている³⁶⁾³⁷⁾。電顕酵素抗体法により Parsons ら²²⁾はこれらのラット腫瘍細胞の分泌顆粒に、また Osamura ら³⁸⁾は核近傍のゴルジ装置と一部の粗面小胞体に PRL の局在を証明した。

これに対しヒト PRLoma における酵素抗体法は電顕酵素抗体法を用いた Osamura ら²⁰⁾の報告を除き、光顕レベルでの単なる PRL 陽性細胞の検出にとどまり^{8)13)~15)17)}、その特徴的な PRL 陽性部位に関しては、わずかに Kovacs ら⁷⁾及び寺本ら¹⁶⁾が通常電顕所見との対比から、発達したゴルジ装置及び Nebenkern 状の粗面小胞体に相当すると推測しているに過ぎない。本研究では我々が電顕観察用に以前よりルーチンに作製し

てきたエボン包埋材料を利用して光顕と電顕の直接対応切片を作製し、光顕上の PRL 陽性部位と電顕所見との対応を可能ならしめた。エボン 1 μ 切片上での酵素抗体法では、前述した様に光顕観察に由来する解像力の限界があり、個々の細胞内小器官内の PRL の局在観察は不可能であるが、PRL の局在する部位の検索には十分耐え得るものであった。従来より PRLoma の細胞内 PRL として特徴的とされてきた核近傍の小塊状 PRL は、微細構造との対応により、ゴルジ装置を中心とした部位に相当する事が証明された。この部位には粗面小胞体より移動してゴルジ装置内に集中するホルモン様物質が存在すると同時に、ここより遊離し細胞膜へと向かう分泌顆粒が比較的多く存在する。従ってこの部位は腺腫細胞内において最もホルモンの局在の高い部位と考えられ、この事は本研究の酵素抗体法ならびに対応電顕検索により証明された。また C 型腺腫においては、光顕観察の可能な大きさに及ぶ大型顆粒が存在し、電顕上の分布と酵素抗体法による PRL 陽性部位とが極めてよく一致し、大型顆粒そのものに PRL が局在する事が証明された。

結 論

1. 高 PRL 血症を呈する 17 例の下垂体腺腫について、光顕酵素抗体法による PRL 染色並びに通常電顕観察を行った。うち 7 例でエボン対応切片を検索し、光顕上の PRL 陽性部位と微細構造の直接的対応を行った。

2. 14 例の腺腫 (A 型) では、腫瘍は大部分 PRL 陽性細胞から構成された。細胞内 PRL は核近傍に小塊状に認められ、腫瘍の電顕像は少数の分泌顆粒を有する細胞より成る sparsely granulated adenoma であった。エボン切片による検索より、核近傍の陽性 PRL は電顕像で核近傍のゴルジ装置、分泌顆粒、及び一部の粗面小胞体に対応し、この部位の高いホルモンの局在が証明された。

3. 2 例の腺腫 (B 型) では、PRL 陽性細胞は腫瘍の極く一部に過ぎず、かかる細胞には PRL は細胞質全体に一樣に分布して認められた。電顕的には densely granulated adenoma であった。

4. 1 例 (C 型) では約半数の腺腫細胞に細胞質全体に粗大顆粒状の PRL が認められ、これに対し残る細胞では細胞質の一部に弱い陽性 PRL を示すか PRL 陰性であった。電顕像では大型の分泌顆粒を多数有する densely granulated cell と、小型分泌顆粒を少数有する sparsely granulated cell が混在し、両者の移行型と考えられる細胞も少数存在した。エボン対応切片による検索より、光顕上の粗大顆粒状 PRL は densely

granulated cell の大型分泌顆粒に極めてよく一致し、PRL に乏しいかこれを欠く細胞は sparsely granulated cell として認められた。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師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った久保田紀彦講師をはじめ教室員の皆様に深く感謝致します。更に本研究の材料提供に御協力いただきました石川県立中央病院、国立金沢病院、福井県立病院および福井済生会病院の脳外科の諸先生に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Forbes, A.P., Henneman, P.H., Griswolt, G. C. & Albright, F.: A syndrome characterized by galactorrhea, amenorrhea and low urinary FSH. Comparison with acromegaly and normal lactation. *J. Clin. Endocrinol.*, **14**, 265-271 (1954).
- 2) Friesen, H. & Hwang, P.: Human prolactin, *Ann. Rev. Med.*, **24**, 251-270 (1973).
- 3) Malarkey, W.B. & Johnson, J.C.: Pituitary tumors and hyperprolactinemia. *Arch. Intern. Med.*, **136**, 40-44 (1976).
- 4) Boyar, R.M., Kaplan, S. & Weitzman, E.D.: Pituitary microadenomas and hyperprolactinemia. A cause of unexplained secondary amenorrhea. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 263-265 (1976).
- 5) Carter, J.N., Tyson, J.E., Tolis, G., Van Vliet, S., Faiman, C. & Friesen, H.G.: Prolactin-secreting tumors and hypogonadism in 22 men. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 847-852 (1978).
- 6) Robert, F. & Hardy, J.: Prolactin-secreting adenomas: A light and electron microscopical study. *Arch. Pathol.*, **99**, 625-633 (1975).
- 7) Kovacs, K., Corenblum, B., Sirek, A.M.T., Penz, G. & Ezrin, C.: Localization of prolactin in chromophobe pituitary adenomas: Study of human necropsy material by immunoperoxidase technique. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 250-258 (1976).
- 8) Kovacs, K.: Morphology of prolactin producing adenomas. *Clin. Endocrinol.*, **6** (Suppl), 71s-77s (1977).
- 9) 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).
- 10) Landolt, A.M.: Progress in pituitary adenoma biology. Result of research and clinical applications. p 1-49. In Krayenbühl (ed.), *Advances and technical standards in neurosurgery*, Vol. 5, Springer-Verlag, Wien, New York, 1978.
- 11) Nakane, P.K. & Pierce, G.B.: Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 929-931 (1966).
- 12) Nakane, P.K.: Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 9-20 (1970).
- 13) 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**, 577-585 (1974).
- 14) Halmi, N.S.: Immunostaining of growth hormone and prolactin in paraffin-embedded and stored or previously stained materials. *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 486-495 (1978).
- 15) Martinez, A.J., Lee, A., Moossy, J. & Maroon, J.C.: Pituitary adenomas: Clinicopathological and immunohistochemical study. *Ann. Neurol.*, **7**, 24-36 (1980).
- 16) 寺本明・松谷雅生・平川公義・佐野圭司・長村義之・渡辺慶一: 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—。 *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **18**, Part 2, 209-214 (1978).
- 17) 寺本明: ホルモン産生下垂体腺腫の免疫組織化学的検討。 *脳神経*, **32**, 1163-1174 (1980).
- 18) Kawarai, Y. & Nakane, P.K.: Localization of tissue antigens on the ultrathin sections with peroxidase-labeled antibody method. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 161-166 (1970).
- 19) Moriarty, G.C.: Adenohypophysis: Ultrastructural cytochemistry. A review. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 855-894 (1973).
- 20) Osamura, R.Y., Watanabe, K., Teramoto, A., Hirakawa, K., Kawano, N. & Morii, S.: Male prolactin secreting pituitary adenomas in humans studied by peroxidase-labeled antibody method. *Acta Endocrinol.*, **88**, 643-653 (1978).
- 21) Nakane, P.K.: Application of peroxidase-labeled antibodies to the intracellular localization of hormones. *Acta Endocrinol.* [suppl] (Kbh), **153**, 190-204 (1971).
- 22) Parsons, J.A. & Erlandsen, S.L.: Ultra-

- structural immunocytochemical localization of prolactin in rat anterior pituitary by use of the unlabelled antibody enzyme method. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 340-351 (1974).
- 23) **Paiz, C. & Hennigar, G.R.**: Electron microscopy and histochemical correlation of human anterior pituitary cells. *Am. J. Pathol.*, **59**, 43-73 (1970).
- 24) **Osamura, R.Y., Akatsuka, A. & Watanabe, K.**: Localization of anterior pituitary hormones on epon sections by peroxidase-labeled antibody method—light and electron microscopic observation. *Acta Histochem. Cytochem.*, **11**, 399-407 (1978).
- 25) **Moriarty, G.C. & Halmi, N.S.**: Electron microscopic study of the adrenocorticotropin-producing cell with the use of unlabelled antibody and the soluble peroxidase-antiperoxidase complex. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**, 590-603 (1972).
- 26) **Sternburger, L.A.**: Immunocytochemistry, 2nd ed., q 118-122, John Wiley & Sons Inc., New York, 1979.
- 27) **Nicoll, C.S. & Bryant, G.D.**: Prolactin and carcinogenesis, p 28-38, A.R. Boyns & K. Griffiths (ed.), Alpha Omega Alpha, Cardiff, 1972.
- 28) **Pasteels, J.L., Gausset, P., Dauguy, A., Ectors, F., Nicoll, C.S. & Varavudhi, P.**: Morphology of the lactotropes and somatotropes of man and rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **34**, 959-967 (1972).
- 29) **Graham, R.C. Jr. & Karnovsky, M.J.**: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291-302 (1966).
- 30) **Imai, Y., Sue, A. & Yamaguchi, A.**: A removing method of the resin from epoxy-embedded sections for light microscopy. *J. Electron Microscopy*, **7**, 84-85 (1968).
- 31) **Rengachary, S.S., Tomita, T., Jefferies, B. F. & Watanabe, I.**: Structural changes in human pituitary tumor after bromocriptine therapy. *Neurosurg.*, **10**, 242-251 (1982).
- 32) **Horvath, E. & Kovacs, K.**: Ultrastructural classification of pituitary adenomas. *Can. J. Neurol. Sci.*, **3**, 9-21 (1976).
- 33) **Horvath, E. & Kovacs, K.**: Misplaced exocytosis. Distinct ultrastructural feature in some pituitary adenomas. *Arch. Pathol.*, **97**, 221-224 (1974).
- 34) **Kovacs, K., Horvath, E. & Ezrin, C.**: Pituitary adenomas. *Pathol. Ann.*, **12**, 341-382 (1977).
- 35) **Farquhar, M.G.**: Processing of the anterior pituitary glands, p 79-122. In H. Heller & K. Lederis (ed.), *Subcellular organization and function in endocrine tissues*, Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
- 36) **Landolt, A.M.**: Ultrastructure of human sella tumors: Correlations of clinical findings and morphology. *Acta Neurochir. (Wien) [Suppl]*, **22**, 1-167 (1975).
- 37) 寺本明・高倉公朋・久保俊朗・福嶋孝徳・長村義之: Bromocriptine 投与に伴う prolactinoma の病理学的変化—臨床的および実験的検討—. 133-144 頁. 第 2 回下垂体ワークショップ講演会録 (佐野圭司監修), 1981.
- 38) **Osamura, R.Y., Izumi, S., Komatsu, N., Yoshimura, S., Murakoshi, M. & Watanabe, K.**: Ultrastructural localization of anterior pituitary hormones (prolactin, ACTH, LH) in the stimulated rat pituitaries. *Acta Histochem. Cytochem.* **12**, 558 (1979).

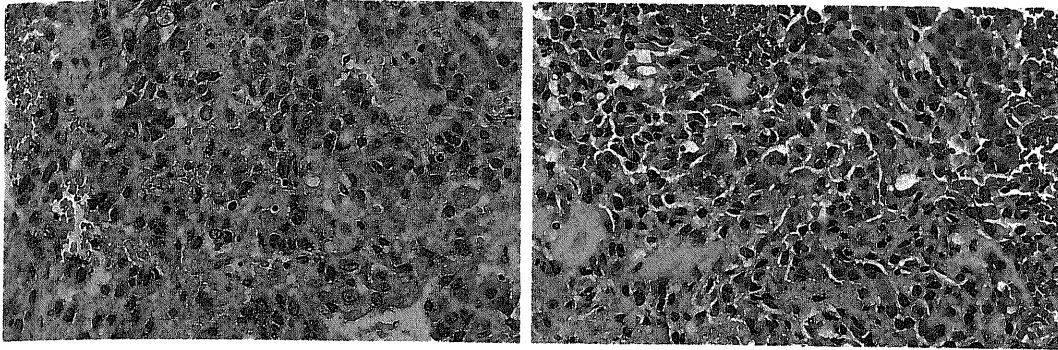
Localization of Prolactin in Prolactin Secreting Pituitary Adenomas by Immunoenzyme Method, Including Electron Microscopic- Immunohistochemical Correlation with Epon Sections
Eiichi Kuroda, Department of Neurosurgery (Director: Prof. S. Yamamoto), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., 92, 252–268 (1983)

Key words: prolactin, pituitary adenoma, immunoenzyme method, electron microscopy.

Abstract

Seventeen cases of pituitary adenomas with hyperprolactinemia were studied by Nakane's immunoenzyme method and by electron microscopy in an attempt at the localization of prolactin (PRL). Furthermore, seven of them were studied by the use of thick-thin epon serial sections in order to correlate immunoreactive PRL at the light microscopic level with the fine structure. All the seventeen cases were divided into three types according to the immunostaining pattern for PRL on light microscopy and electron microscopic findings. In fourteen cases (type A), immunoreactive PRL was present as a perinuclear mass in most of the tumor cells. Electron microscopic observation revealed that all of the adenomas of type A were composed of sparsely granulated cells. These cells contained a few secretory granules with occasional "misplaced exocytosis", well developed Golgi apparatus, and numerous rough-surfaced endoplasmic reticula (RER). Epon serial sections were obtained from five cases of type A, and the perinuclear immunoreactive PRL was localized in the Golgi apparatus, a few secretory granules, and some of RER near the nucleus. In two cases (type B), a small number of the tumor cells have immunoreactive PRL throughout the cytoplasm. Both of them were composed of densely granulated cells by electron microscopy, but few PRL cells were present on these epon sections. In one case (type C), about half of the tumor cells had coarsely granular PRL throughout the cytoplasm, whereas others had a little, if any. By electron microscopy the adenoma was composed of two kind of cells. Some cells contained many large secretory granules more than 1μ in diameter throughout the cytoplasm, and the others had a few small secretory granules. Studies of epon serial section revealed that immunoreactive PRL was completely localized at the fine structure of large secretory granules in the densely granulated cells in this case. These results suggest that immunoreactive PRL demonstrated in many cases of prolactinomas on light microscopy can be localized in the region of Golgi apparatus and its surroundings and that in rare cases extremely large granules may be seen as an immunoreactive PRL by light microscopy.

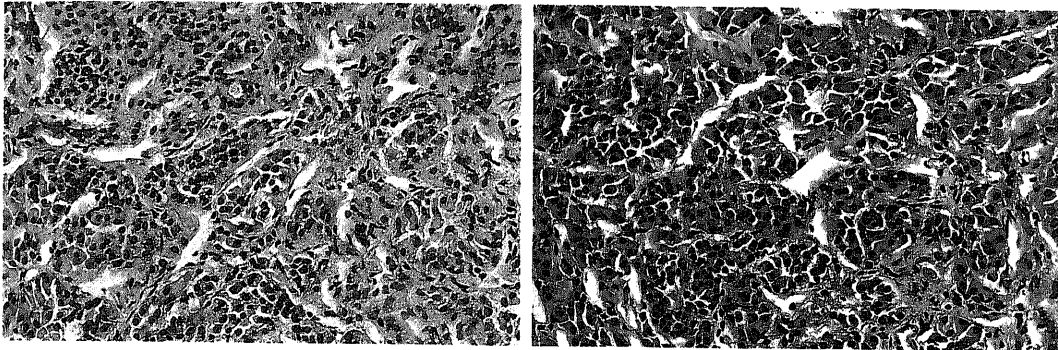
Fig. 1-3. Photomicroscopic appearances of three types of prolactinomas. a: Immunoperoxidase stain for PRL. b: Hematoxylin and eosin (H-E) stain.



(a)

(b)

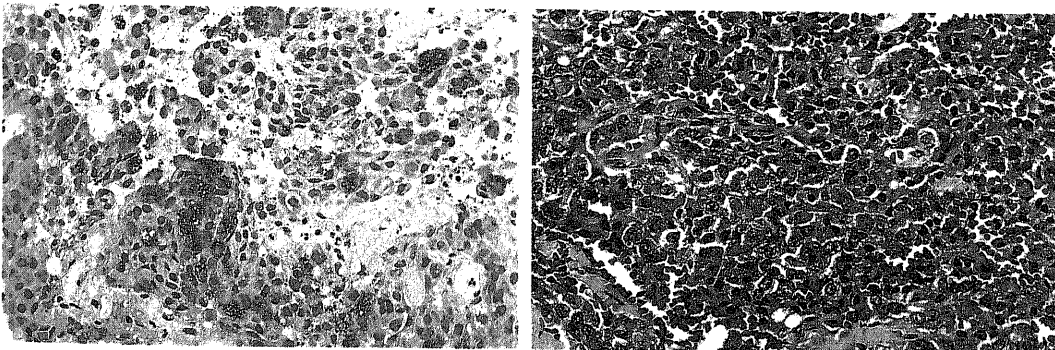
Fig. 1. Case 4 (type A). Great majority of the chromophobic tumor cells show the dark deposits for PRL. ($\times 180$).



(a)

(b)

Fig. 2. Case 15 (type B). A few of the eosinophilic tumor cells show the dark deposits for PRL in the entire cytoplasm. ($\times 180$).



(a)

(b)

Fig. 3. Case 17 (type C). About half of the tumor cell cytoplasm is intensely stained for PRL which appears like coarse granules. ($\times 180$).

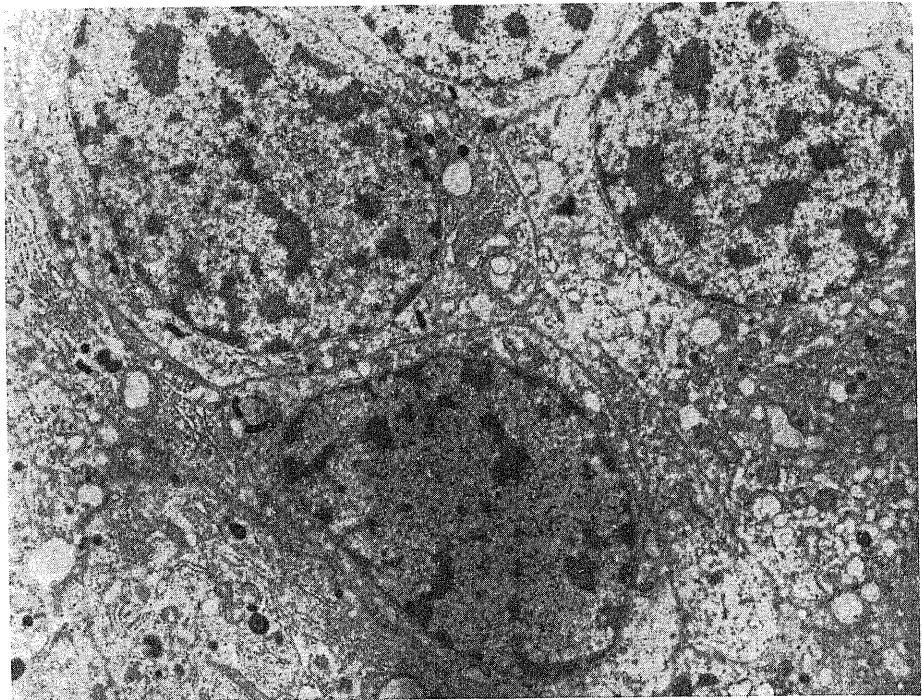


Fig. 4. Electron micrograph of sparsely granulated adenoma cells exhibiting occasional pleomorphic secretory granules and misplaced exocytosis. (case 11) ($\times 8300$).

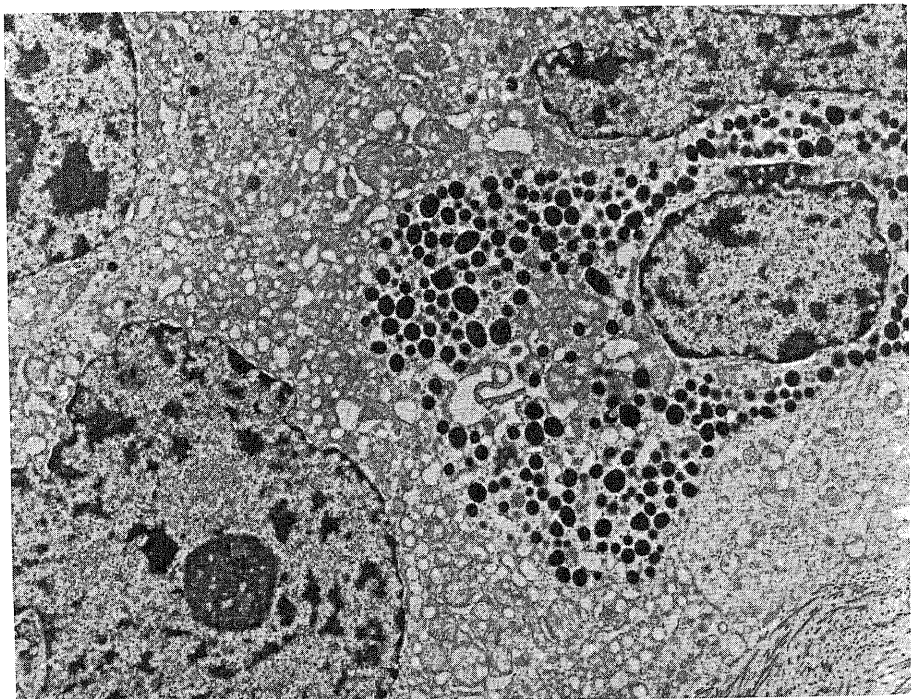


Fig. 5. Electron micrograph of sparsely granulated adenoma with occasional densely granulated cell. (case 4) ($\times 5500$).

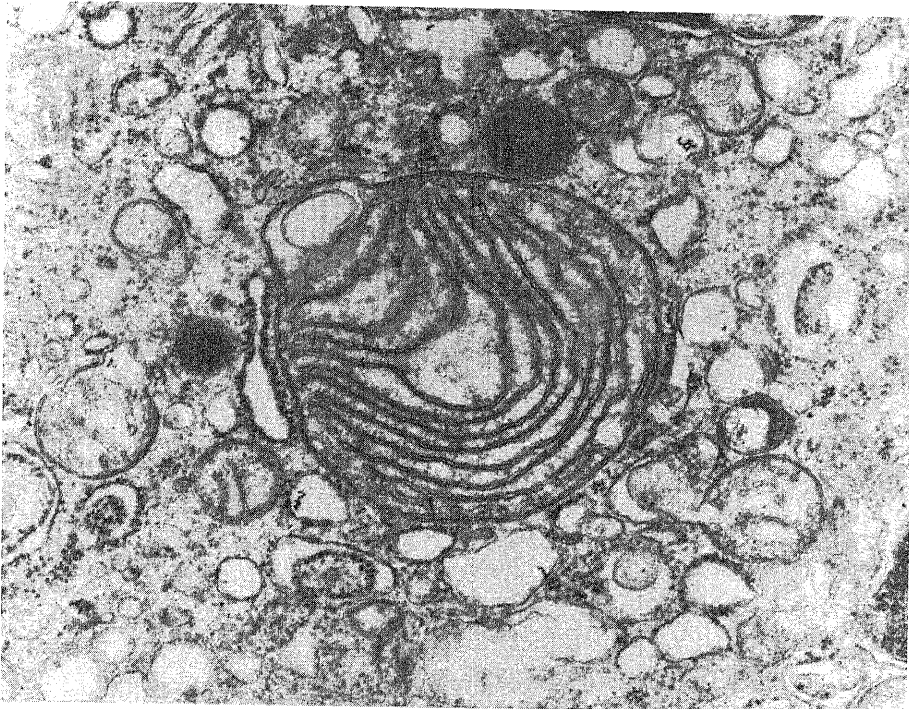


Fig. 6. High magnification of extremely large mitochondria with abnormal cristae. (case 4) ($\times 30000$).

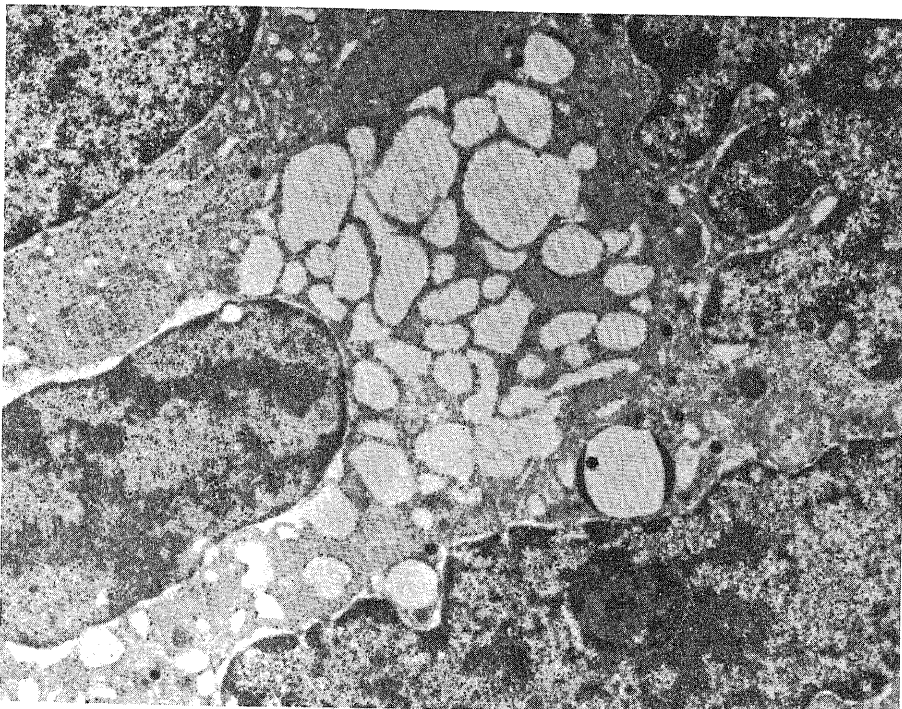


Fig. 7. Tumor cell in the center shows extreme dilatation of rough-surfaced endoplasmic reticula. (case 7) ($\times 11000$).

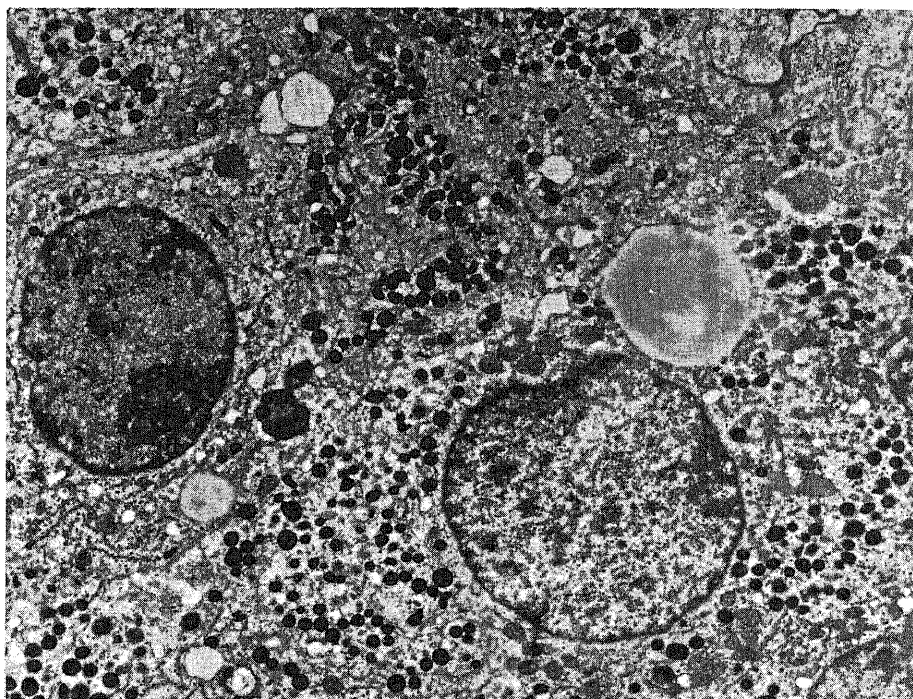


Fig. 8. Electron micrograph of densely granulated adenoma cells. (case 16) ($\times 6000$)

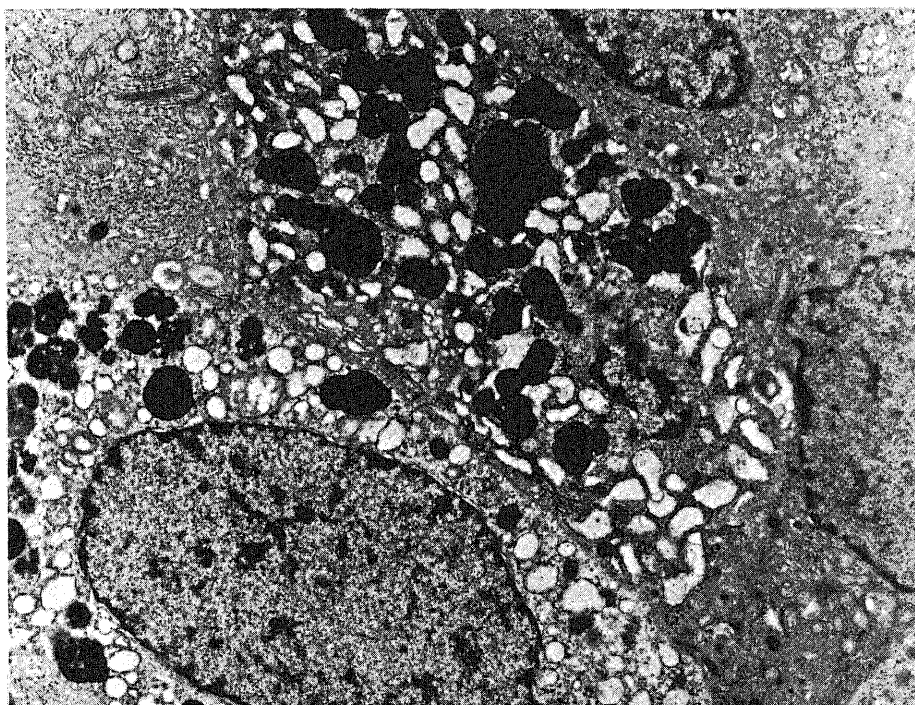


Fig. 9. Two tumor cells in the center contain large and extremely electron-dense granules in their whole cytoplasm, whereas others show the characteristic appearance of sparsely granulated tumor cells. (case 17) ($\times 7500$).

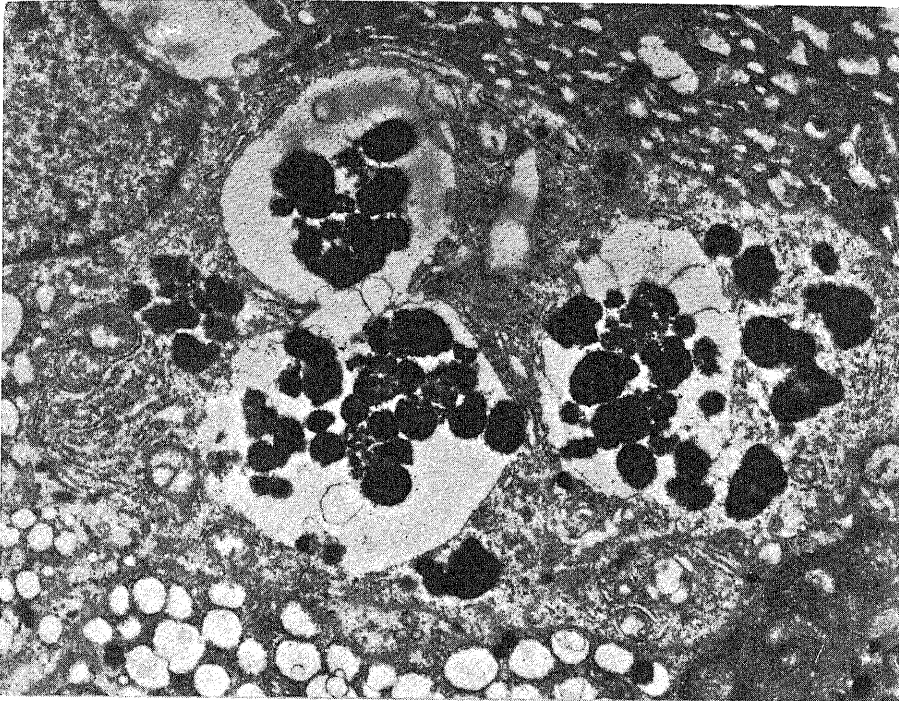


Fig. 10. Some of the large granules are present together in large cavities of cytoplasm. (case 17) ($\times 8500$).

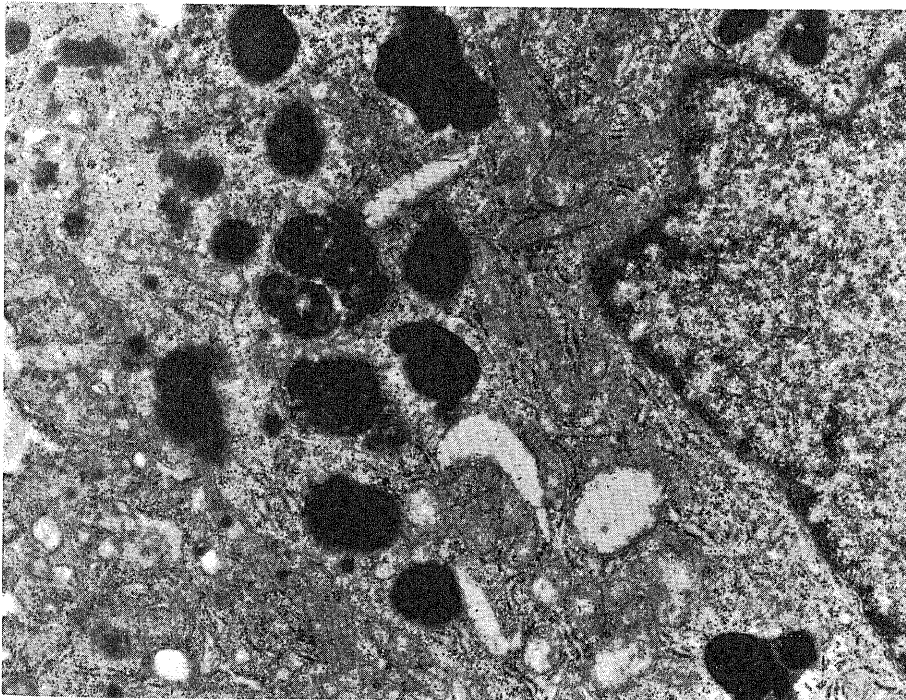


Fig. 11. High magnification views of the large granules seen in case 17. Some of them appear clusters of smaller granules. ($\times 15000$).

Fig. 12-14. Thick-thin section correlation for light and electron microscopy (LM & EM).
a: Immunoperoxidase stain for PRL. (Epon-embedded $1\ \mu$ section) b: Electron micrograph taken from the corresponding ultrathin section adjacent to section a.

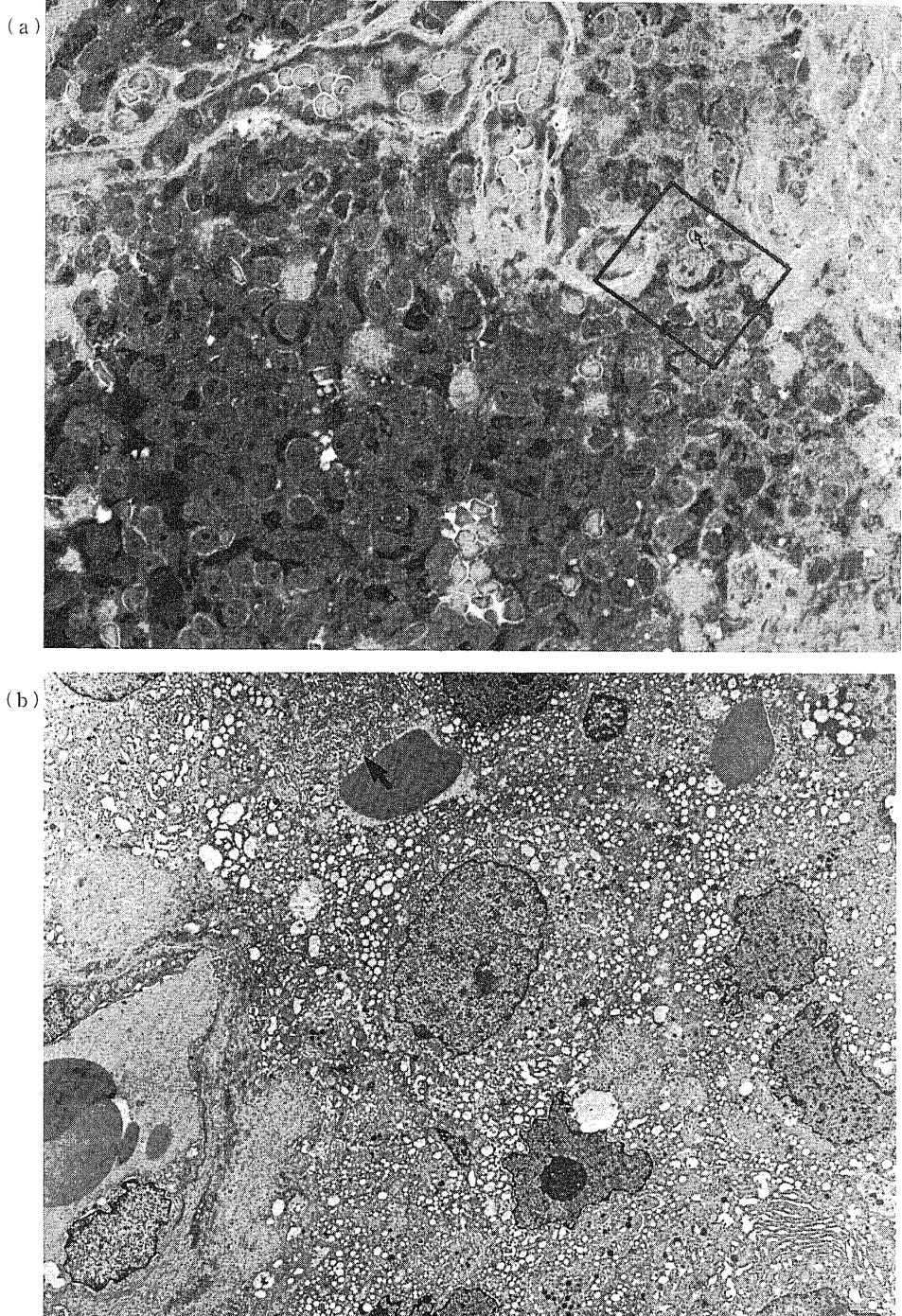
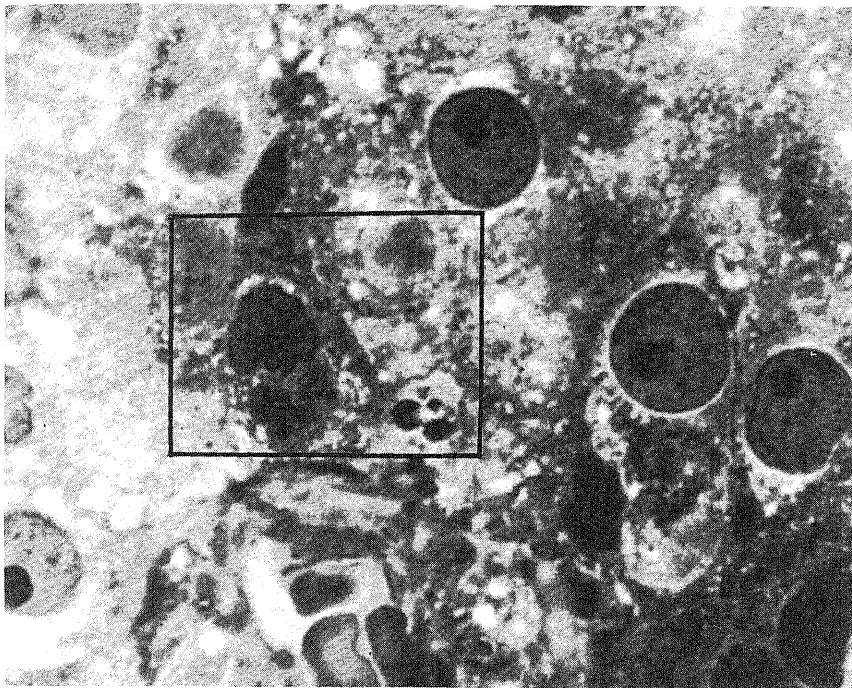


Fig. 12. Case 2 (type A). Immunoreactive PRL on the light microscopy (LM) corresponds mainly to the aggregates of a few secretory granules complexed with Golgi apparatus. An area of extremely developed RER shows immunoreactivity to PRL. (↑) (LM $\times 420$, EM $\times 2400$).

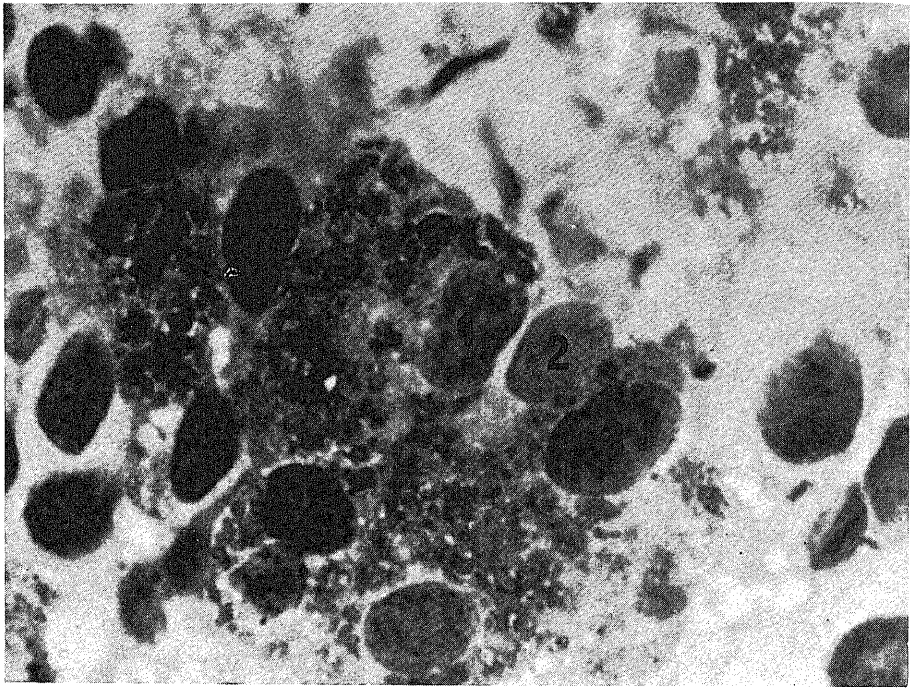


(a)

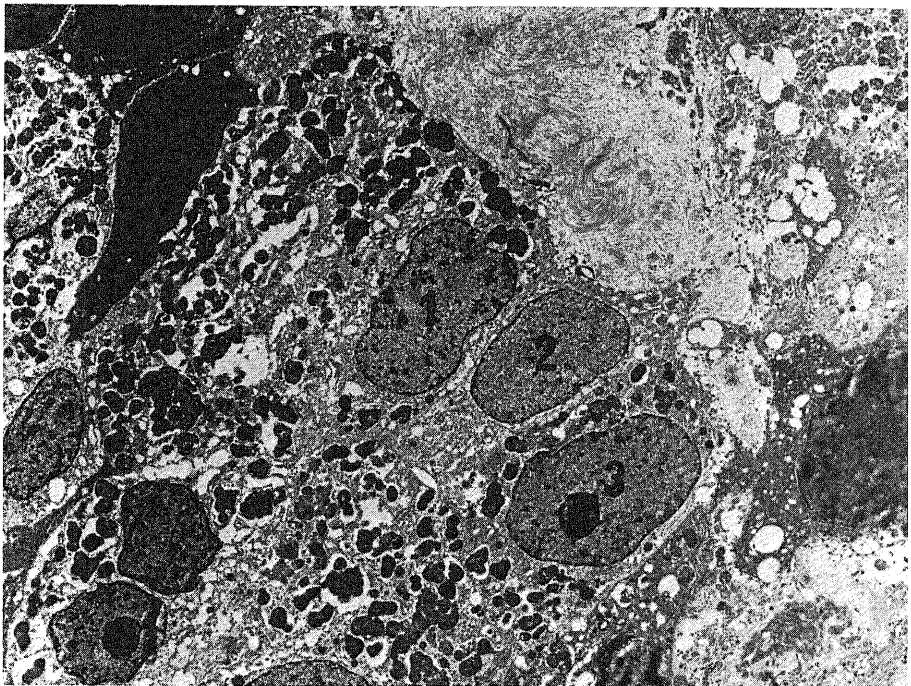


(b)

Fig. 13. Case 9 (type A). Some of the large secretory granules (\uparrow) and a perinuclear aggregate of a few granules in the Golgi area ($\uparrow\uparrow$) shows immunoreactivity to PRL. Immunoreactive PRL can't be found on the RER with dilated cistern ($\uparrow\uparrow\uparrow$). (LM $\times 2000$, EM $\times 5600$).



(a)



(b)

Fig. 14. Case 17 (type C). Very large granules (and clusters of granules) densely distributed throughout tumor cell cytoplasm show the same distribution with immunoreactive PRL. (LM $\times 2000$, EM $\times 2700$)