

# Cell immunoblot assay による Prolactin-secreting adenoma における Bromocriptine 負荷試験の有用性の評価

東京慈恵会医科大学脳神経外科学講座

大 橋 元 一 郎

(受付 平成 15 年 2 月 28 日)

## USEFULNESS OF THE BROMOCRIPTINE LOADING TEST IN PROLACTIN-SECRETING ADENOMA AS DETERMINED WITH CELL IMMUNOBLOT ASSAY

Genichiro OHHASHI

*Department of Neurosurgery, The Jikei University School of Medicine*

Dopamine agonists are the treatment of first choice for prolactin-secreting adenoma, but some 10% of adenomas are drug-resistant. Because such resistance is difficult to diagnose before treatment, long-term administration is often needed to determine whether treatment will be effective. Additionally, the method and duration of follow-up differs among institutions. To obtain basic data for the differential diagnosis of bromocriptine-resistant adenoma and to establish a therapeutic policy before starting treatment, I perform a bromocriptine-loading test. I hypothesized that prolactin-secreting adenomas contain in various ratios both cells highly responsive to bromocriptine and cells poorly responsive; this heterogeneity may make the bromocriptine-loading test useful. To test this hypothesis, I used the cell immunoblot assay to examine the effects of bromocriptine at the cellular level in surgical specimens of adenoma tissue. Results of the bromocriptine loading test before the start of treatment were strongly correlated with the results of cell immunoblot assay. These results suggest that the preoperative bromocriptine-loading test can be used to predict the effectiveness of bromocriptine against adenoma.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2003; 118: 243-8)

Key words: prolactin-secreting adenoma, bromocriptine, cell immunoblot assay, bromocriptine-loading test

### I. 緒 言

Prolactin-secreting adenoma (PRLoma) に対する Bromocriptine (BC) を始めとする dopamine agonist の効果の程度には、個体差があることはよく知られている<sup>1)2)</sup>。とくに BC に抵抗性を示す腺腫が約 8~15% に認められ、薬物療法を行う上で問題となる<sup>3)-6)</sup>。こうした個体差は、腺腫を構成する細胞に BC に対する反応性の良い細胞と、悪い細胞がさまざまな程度に混在している

のではないかと推測されている<sup>7)8)</sup>。

この推測を、術前の BC に対する反応性と、手術により採取された腫瘍細胞の BC に対する反応性を cell immunoblot assay (CIBA) を用いて比較検討することにより証明する。

### II. 対象と方法

症例は 6 例、全例女性で、乳汁分泌と無月経を主訴とするものが 4 例、無月経のみを主訴とするものが 2 例であった。PRLoma の診断は、厚生省

特定疾患「間脳下垂体機能障害」調査研究班による1990年のPRLoma診断基準に従い、さらに摘出標本の免疫染色により診断した。年齢は15歳から35歳、平均25.7歳、5例が未婚者、1例が既婚者であった。手術に至った経過は、2例が薬物療法で症状の改善が認められなかったBC抵抗性腺腫(case 5, 6)、3例がBCの副作用による薬物療法脱落症例(case 1, 2, 4)、1例は本人の治療選択上の希望であった(case 3)。腺腫は4例が10ミリ以下のmicroadenomaで、2例は最大径がそれぞれ18mm(case 1)、12mm(case 2)であったが海綿静脈洞浸潤は画像上認められなかった。

術前のProlactin (PRL)の基礎値はIRMA法を用いて測定し82~366 ng/ml、平均223.33±112.73 (average±SD) ng/ml、PRL以外の内分泌学的異常は認められなかった。TRH負荷試験は全例に行い、すべてにPRL値の軽度上昇を認めた。

全例に、治療開始前にBC負荷試験を行った。BC負荷試験は、早朝起床時のPRL値を測定した後、朝食摂取30分後にパーロゲル2.5 mgを内服してもらい、60分後、120分後、180分後、240分後、300分後、360分後と、24時間後のPRL値を測定した。PRL基礎値でBC内服後の最低値を除き抑制率を百分率化した。

手術により得られた腺腫組織は、直ちに培養液に入れ、冷却保存した後1時間以内に実験に使用した。また、得られた組織は10%ホルマリンに12時間固定し、パラフィン包埋した。ブロックを4 μmに薄切し、PAP法を用いて免疫染色した。使用した一次抗体は抗ヒトPRL (DAKO L1837 U.S.A., 1:200)で、発色にはDABを使用した。また、正常下垂体組織の混入がないことを確認するために、GH (DAKO L1814)、ACTH (DAKO L1801)、LH (DAKO L1827)、FSH (DAKO L1810)、TSH (DAKO L1847)に対する免疫染色を行った。患者には術前に腺腫組織を用いた研究を行うことを説明し、同意を得ている。以下にCIBAの詳細を記す。

#### Cell Immunoblot Assay (CIBA)

手術により採取した組織を有田らの方法<sup>910)</sup>に準じて、0.4% コラゲナーゼと0.005% DNAaseで処理して、単一細胞浮遊液( $2 \times 10^5$  cells/ml)を作

成した。細胞プロット用チャンバーは、スライドガラスの上に転写膜(Immobilon, Millipore, Bedford, MA)を載せ、この転写膜の両側に18×24 mmのカバーガラスを、さらにこの上に24×60 mmのカバーガラスを載せて作成した。

単一細胞浮遊液を細胞プロット用チャンバーの中に、毛細管現象を利用して100 μl注入し、37°C、5% CO<sub>2</sub>下で1時間培養したものをコントロール群、細胞浮遊液の状態と同様の環境において30分間培養した後、10<sup>-5</sup> MのBC (bromocriptine methylate: Sigma Chemical Co., St. Louis. MO)を加えた溶液を加え、チャンバー内でさらに30分間追加培養したものを、BC treat群とした。

培養後、転写膜を10%BSAに2時間反応させブロッキングの操作を行った。つぎに、抗体に12時間反応させてから、ABC法により免疫染色し、免疫陽性のプロット数を測定した。プロット数は転写膜に8ミリ四方の枠を描いて、この中のプロット数を顕微鏡下に数えた。一定面積あたりのプロット数と同面積あたりの細胞数を計測し、分泌細胞率を計算した。BCが個々のPRL分泌細胞に及ぼした効果は、BC treat群のプロット数をControl群のプロット数で除して百分率で表した。抗体はPRL (DAKO, A569, ×15,000)を用いた。

### III. 結 果

本研究で用いた症例ならびにBC負荷試験およびCIBAによる結果をTable 1に示す。

ホルマリン固定標本の免疫染色では、全例でPRL分泌細胞が陽性となった。全分泌細胞に占める割合は全例で80%以上であった。また、他の下垂体ホルモンに対する免疫染色は、Case 4および6でGH分泌細胞が陽性、全例でLH、FSH分泌細胞が陽性になったが、全ホルモン分泌細胞群のうちの10%以下であった。また、ACTH、TSHはすべて陰性であった。

CIBAでは、Control群全例で免疫陽性細胞が認められた。プロットの大きさに大小不同が見られたが、プロットの濃度には差は見られなかった。BC treat群では、Control群に比べ明らかに免疫陽性細胞の割合が低下した (Fig. 1a, 1b)。また、

Table 1. Serum prolactin value, results of percent suppression by Bromocriptine loading test and percent suppression of prolactin-secreting cell for cell immunoblot assay, and presenting symptoms in six patients is shown.

Case	Age (yr)	PRL value (ng/ml)	Suppression by Bromocriptine loading test (%)	PRL-secreting cell in all secretary cell by CIBA (%)	Symptoms
1	24	360	9.44	35.80	amenorrhea
2	35	284	29.93	40.50	amenorrhea galactorrhea
3	20	82	19.38	35.00	amenorrhea
4	15	166	14.26	33.60	amenorrhea galactorrhea
5	26	82	64.63	70.73	amenorrhea galactorrhea
6	34	366	69.40	82.31	amenorrhea galactorrhea

PRL: prolactin

CIBA: cell immunoblot assay

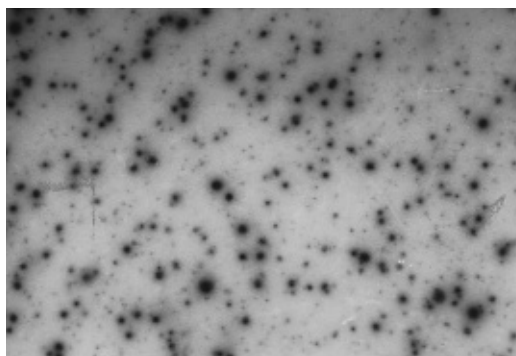


Fig. 1a.

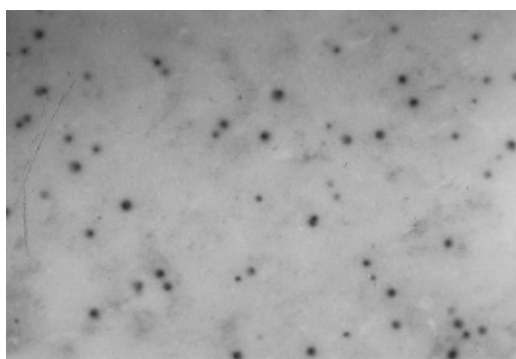


Fig. 1b.

Fig. 1. Results of cell immunoblot assay in Case 3. Panel 1a shows the blot pattern for the control group; panel 1b shows the blot pattern obtained with the load of  $10^{-5}$  M bromocriptine.

Control 群に比べ、プロットの大きさが不均一で、濃淡にも差が見られた。細胞数の計測にあたり、BC 負荷後も PRL を分泌している細胞の数は、プロットの大きさや濃度にかかわらずすべてを含めた。

6 例全例で、術前の BC 負荷によるプロラクチン値の減少率より (*in vivo*)、CIBA における BC 負荷による PRL 分泌細胞減少率 (*in vitro*) の方が低い傾向が見られた。しかし、両者の間には高い相関関係が認められた (Pearson's test=0.97, R-square=0.9528) (Fig. 2)。

#### IV. 考 察

現在プロラクチノーマに対する治療の主流は手術療法から薬物療法へと移行しており、数カ月薬物療法を行った結果、治療成績が不良であったものに対して他の薬物を用いるか手術を行うことが多い<sup>11)12)</sup>。しかし、抵抗性腺腫に対し漫然と薬物治療が継続されている可能性もある。無意味な長期の BC 投与によりかえってその後の手術を困難にしている症例も存在していると思われる<sup>13)14)</sup>。

BC 抵抗性腺腫の原因として、dopaminergic regulatory mechanism の欠損があげられている<sup>14)</sup>。とくに D2 receptor level に問題があると推測されており、大型の腺腫に特徴的で、海綿静脈洞浸潤を呈しているものが多いとされてきた<sup>8)16)17)</sup>。また、この事実は mRNA を用いた Rat

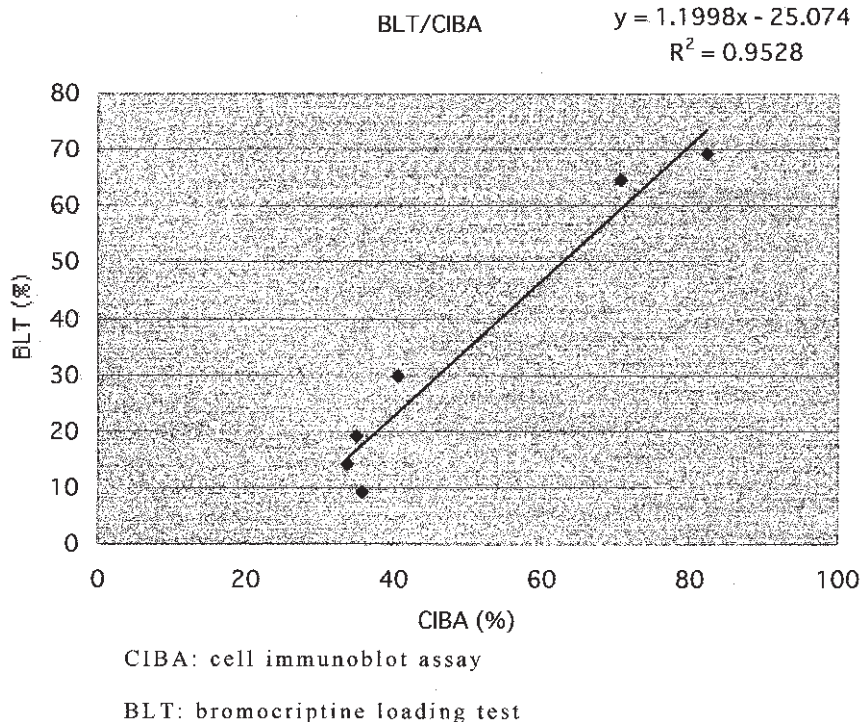


Fig. 2. The correlation of percent suppression of prolactin-secreting cell between bromocriptine loading test and cell immunoblot assay in each case. An approximation curve is given on the graph. A high correlation of  $y = 1.1998x - 25.074$  ( $RR = 0.9528$ ) was found.

の実験でも証明されている<sup>18)</sup>。こうした、D2 receptor が欠損した細胞群が BC に対し抵抗性を示していると考えられている。しかし、実際の PRLoma から得られた組織を用いて細胞レベルでの反応性を調べた報告例は少ない<sup>19)20)</sup>。

従来 BC に対する腫瘍の感受性については 1 回投与の負荷試験で予測がある程度可能であるという報告<sup>21)</sup>と不可能であるとする報告がある<sup>4)7)22)</sup>。しかし、こうした抵抗性腫瘍にはさまざまな比率で BC 反応性成分と抵抗性成分が存在しているのではないかと考えられている。こうした推測を考慮すると、治療開始前の BC 負荷試験は、間接的に腺腫を形成する細胞群の、反応性の良い細胞群と、反応性の不良である細胞群の比率を反映するはずである。

我々は以前に行った研究において、薬物治療開始前の負荷試験の結果は、その後の治療効果を充分反映しており、重要であると指摘してきた<sup>23)24)</sup>。今回治療開始前の BC 負荷試験の結果により、その後の治療成績の予測がある程度可能であること

を証明する手段として、cell immunoblot assay を用いた。

Cell immunoblot assay は 1987 年 Kendall と Hymer により考案された手法で、ホルモン分泌組織の単一細胞浮遊液を、転写膜上で培養し、細胞から分泌され転写膜に吸着したホルモンを免疫染色することで様々なホルモン分泌動態を視覚化することが可能となる<sup>25)</sup>。培養の過程において、ホルモン分泌細胞に様々な薬剤や成長因子を加えることにより、単一細胞レベルでの反応性が観察される。有田や小嶋らは、この手法に改良を加え、同一細胞から分泌される多種類のホルモンについても測定が可能となった<sup>10)26)27)</sup>。ただし、CIBA は通常の免疫染色に比べ、ホルモン産生細胞の検出精度が高く、PRLoma の場合、GH 産生細胞との混合性腺腫が検出されることがある。この場合、CIBA に用いた腺腫細胞に正常下垂体組織の混入した可能性が否定できないが、同時に測定した ACTH や TSH 産生細胞が検出されなければその可能性はないものと考えられる。今回の検討に



においても Case 4 および 6 で, GH 産生細胞が検出されたが, 全分泌細胞の 10% 以下であり, ACTH, TSH 産生細胞が陰性であったことから, 純粋な腺腫組織であったと考えられる。

今回の検討の結果では, 術前に行われた BC 負荷試験の結果と, 実際に手術により得られた腺腫組織の細胞に対する BC の効果には高い相関関係が認められた (Pearson's test=0.97, R-square=0.9528)。CIBA による PRL 分泌細胞の減少率が, BC 負荷試験による PRL 値の抑制率に対して少ない傾向があったが, これは BC 投与下での培養時間の不足, 単一細胞作成中や培養中に溶解あるいは消失する細胞の存在, PRL 産生細胞数と PRL 値とが必ずしも一致しないなどの因子が考えられた。また, 手術により摘出されてから, 培養操作に入る間に 60 分ほどの遅延があるために, 分泌細胞の活動性が低下した可能性も否定できない。

単一細胞レベルでの, プロモクリプチンに対する反応性の違いが, 治療前に施行した BC 負荷試験とよく相関していることから, PRLoma の薬剤に対する反応は, これを形成する細胞群の中に, 反応良好な成分と反応不良な成分が様々な割合で混在していると思われた。

我々が以前から指摘しているように, 治療施行前の BC 負荷試験の結果から, 治療開始数カ月後の PRL 値の正常化や腫瘍縮小率をある程度予測可能であるとの説は, 今回の細胞レベルでの検討においても充分正当化された。今後は PRLoma 症例において, 治療開始前の BC 負荷試験の結果が, 治療方針決定の際の指針として必須であると考えられた。

## 結 語

PRLoma の単一細胞レベルにおける, BC 反応性を検討した。

CIBA による BC に対する反応性は, 治療開始前の BC 負荷試験の結果と相関関係にあることが証明された。

治療開始前の BC 負荷試験の結果は, 薬物療法による治療効果を予測するに当たって, 重要な指針になると考えられた。

稿を終えるにあたり, 御指導を賜った脳神経外科学講座阿部俊昭教授および神尾正巳講師に感謝の意を捧げる。また, 研究にあたり御援助, 御協力を頂いた第三病院脳神経外科, 坂井春男教授, 中島真人講師に感謝する。

## 文 献

- 1) Thorner MO, Schran HF, Evance WS, Rogol AD, Morris JL, MacLeod RM. A broad spectrum of prolactin suppression by bromocriptine in hyperprolactinemic women: a study of serum prolactin and bromocriptine levels after acute and chronic administration of bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 1026-33.
- 2) 佐藤秀一. プロラクチン産生下垂体腺腫におけるプロラクチン分泌特性. *日内分泌会誌* 1987; 63: 947-60.
- 3) 寺本 明, 高倉公朋. プロモクリプチン療法の長期治療成績. *ホルモンと臨* 1987; 35: 113.
- 4) 寺本 明. プロラクチノーマの治療. *産婦の世界* 1993; 45: 399-405.
- 5) Breidahl HD, Toppliss DJ, Pike JW. Failure of bromocriptine to maintain reduction in size of a macroprolactinoma. *Br Med J* 1983; 287: 451-2.
- 6) Martin NA, Hales M, Wilson CB. Cerebellar metastasis from a prolactinoma during treatment with bromocriptine. *J Neurosurg* 1981; 55: 615-9.
- 7) 寺本 明, 福島孝徳, 高倉公朋. プロラクチン産生腺腫に対するプロモクリプチン療法の根治性. 第 4 回下垂体腫瘍ワークショップ講演会録 1984: 247-52.
- 8) 寺本 明, 高倉公朋. Prolactin 産生腺腫に対する長期 Bromocriptine 療法: Bromocriptine 抵抗例の検討を中心に. 高倉公朋 監修. 第 5 回下垂体腫瘍 Workshop 講演集 1987. p 121-5.
- 9) Arita J. Analysis of the secretion from single cells by cell immunoblot assay. *Endocr J* 1993; 40: 1-15.
- 10) Arita J, Kojima Y, Kimura F. Identification by sequential cell immunoblot assay of a subpopulation of rat dopamine-unresponsive lactotrophs. *Endocrinology* 1991; 128: 1887-94.
- 11) Molitch ME. Disorder of prolactin secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30: 585-610.
- 12) Molitch ME, Thorner MO, Wilson C. Thera-

- peutic controversy : management of prolactinomas. *J Endocrinol Metab* 1997 ; 82 : 996-1000.
- 13) Landolt AM, Osterwalder V. Perivascular fibrosis in prolactinomas: is it increased by bromocriptine? *J Clin Endocrinol Metab* 1984 ; 58 : 1179-83.
  - 14) Brue T, Pellegrini I, Priou A, Morange I, Jaquet P. Prolactinomas and resistance to dopamine agonist. *Horm Res* 1992 ; 38 : 84-9.
  - 15) Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynek CP, et al. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 ; 69 : 500-9.
  - 16) Bression D, Brandi AM, Martres MP, Nousebaum A, Cesselin F, Racadot J, et al. Dopaminergic receptors in human prolactin-secreting adenomas: a quantitative study. *J Clin Endocrinol Metab* 1980 ; 51 : 1037-43.
  - 17) de Herder WW, Reijs AEM, Kwekkeboom DJ, Hofland LJ, Nobels FRE, Oei HY, et al. *In vivo* imaging of pituitary tumours using a radiolabelled dopamine D2 receptor radioligand. *Clin Endocrinol* 1996 ; 45 : 755-67.
  - 18) Caccavelli L, Morange-Ramos I, Kordon C, Jaquet P, Enjalbert A. Alteration of *Gα*subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. *J Neuroendocr* 1996 ; 8 : 737-46.
  - 19) Burdman JA, Guerra LN, Calabrese MT, Basso A. Bromocriptine and the expression of c-myc and c-fos in human prolactinomas. *Neurol Res* 2001 ; 23 : 721-3.
  - 20) Delgrange E, Crabbe J, Donckier J. Late development of resistance to bromocriptine in a patient with macroprolactinoma. *Horm Res* 1998 ; 49 : 250-3.
  - 21) Grossman A, Wass JAH, Besser M. The rapid diagnosis of sensitivity or resistance to dopamine agonists with depot bromocriptine. *Acta Endocrinol* 1987 ; 116 : 275-81.
  - 22) Ciccarelli E, Camanni F. Diagnosis and drug therapy of prolactinoma. *Drug* 1996 ; 51 : 954-65.
  - 23) 大橋元一郎, 清水 純, 神尾正巳, 阿部俊昭. プロラクチノーマの薬物療法における長期予後とプロモクリプチン負荷試験について. *ホルモンと臨* 1999 ; '99 (臨増) : 36-9.
  - 24) 神尾正巳, 大橋元一郎, 清水 純, 阿部俊昭. プロラクチノーマに対する薬物療法の評価. *日内分泌会誌* 2002 ; 78 (Suppl) : 34-7.
  - 25) Kendall ME, Hymer WC. Cell blotting: a new approach to quantify hormone secretion from individual rat pituitary cells. *Endocrinology* 1987 ; 116 : 2260-2.
  - 26) Kojima Y, Suzuki S, Yamamura K, Kawasaki T, Yamamoto I. Identification of somatotrophs, mammosomatotrophs, and mammotrophs by sandwich cell immunoblot assay in GH-secreting adenomas and prolactinomas: Correlation between the proportions of hormone secreting cells and tumor size. *Endocr J* 2000 ; 47 : 143-55.
  - 27) Kojima Y, Suzuki S, Yamamura K, Ohhashi G, Yamamoto I. Comparison of ACTH secretion in Cushing's adenoma and clinically silent corticotroph adenoma by cell immunoblot assay. *Endocr J* 2002 ; 49 : 285-92.