

精巣腫瘍のフェリチン免疫染色法による検討

日本赤十字社医療センター泌尿器科 (部長: 小島弘敬)

高井 計弘, 小島 弘敬, 久米 春喜

日本赤十字社医療センター病理 (部長: 武村民子)

吉村 正博, 北川 昌伸, 武村 民子

東京大学医学部附属病院分院泌尿器科 (主任: 村橋 勲助教授)

森山 信男, 村橋 勲

東京大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 阿曾佳郎教授)

阿曾 佳郎

ANALYSIS OF FERRITIN IMMUNOSTAINING IN TESTICULAR TUMOR

Kazuhiro Takai, Hiroyuki Kojima and Haruki Kume

From the Department of Urology, Japanese Red Cross Medical Center

Masahiro Yoshimura, Masanobu Kitagawa and Tamiko Takemura

From the Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

Nobuo Moriyama and Isao Murahashi

From the Department of Urology, Branch Hospital, Faculty of Medicine, the University of Tokyo

Yoshio Aso

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, the University of Tokyo

Localization of ferritin in testicular tumors was studied by the immunohistochemical method and the usefulness of ferritin was evaluated compared with the clinical course. Seven cases of seminoma and 9 cases of non-seminoma were used for the study. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were stained by the avidin-biotin complex method. Commercial rabbit anti-human ferritin polyclonal antibody in 1/100 dilution was allowed to react at room temperature for one hour. In normal testicular tissues, the epithelium in germinal cells was not stained for ferritin. In seminomas, some tumor nests were stained for ferritin. Interstitial cells, especially histiocytes, were also stained for ferritin. In stained tumor cells, cytoplasm was stained uniformly. Necrotic cells were not stained. The same findings were obtained in non-seminomas. In metastatic lesions and tumor thrombi in the vessels, some tumor cells were stained as intensely as in the origin. A case was calculated positive if more than 5% of the tumor cells in the specimen were stained. The positive rate in ferritin immunostaining was significantly higher than that of human chorionic gonadotropin (β -HCG), α -fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA) immunostaining with the same materials. The specimens from cases with abnormally high serum ferritin level, were stained more intensely than those from cases with normal serum ferritin level. The result suggests that ferritin might be a useful tumor marker in some of testicular tumors.

(Acta Urol. Jpn. 37: 362-68, 1991)

Key words: Testicular tumor, Ferritin, Immunostaining

緒 言

われわれは精巣腫瘍において、フェリチンが有用な腫瘍マーカーとなりうるかを検討するために、その血

清値について検討した¹⁾。その結果、治療前の血清フェリチンの陽性率は、 β -HCG, LDH の陽性率よりは低値だが、AFP と同じ陽性率を示した¹⁾。またその推移をみると、一部の症例では有用なマーカーにな

りうる可能性が示唆された。

従って今回免疫組織染色法により、フェリチンの組織内局在を検討し、精巣腫瘍におけるフェリチン測定の意義を考察した。

対象および方法

(1) 対象

Seminoma 7例, non-seminoma 9例について検討した (Table 1). seminoma (S) の2例では, syncytiotrophoblastic giant cells (以下 STGC) を確認した. non-seminoma では, embryonal carcinoma (E)+teratocarcinoma (T)+choriocarcinoma

Table 1. Clinicopathological findings of 16 cases

Case	Age	Side	Histology	Stage
1. M.K.	36	右	S	I
2. F.T.	24	右	S	I
3. Y.H.	39	右	S	II
4. M.N.	46	右	S	II
5. T.A.	42	右	S	II
6. H.S.	38	右	S, STGC	III
7. S.H.	36	右	S, STGC	III
8. A.N.	36	右	E, T, S	I
9. K.E.	24	左	E, T, S, C	I
10. K.U.	31	左	E, T, S	I
11. M.M.	26	右	E, T	I
12. J.H.	26	左	E, C	II
13. H.H.	27	右	IT	II
14. H.M.	27	左	E, S	III
15. Y.Y.	32	左	E, C, T	III
16. I.K.	18	右	E	III

S: Seminoma

STGC: Syncytiotrophoblastic giant cells

E: Embryonal carcinoma

T: Teratocarcinoma

IT: Immature teratocarcinoma

C: Choriocarcinoma

(C)+S が1例, E+T+S が2例, E+C+T が1例, E+T が1例, E+C が1例, E+S が1例, E単独が1例, immature teratomas が1例であった。

病理学的検索, 病期分類は, 辜丸腫瘍取扱規程に従った²⁾。

(2) 方法

組織化学的検討は, ホルマリン固定のパラフィンブロックを用い, Avidin-Biotin Complex 法 (以下 ABC 法) で染色した (Table 2)³⁾。一次抗体として, フェリチンは, 抗ヒト肝フェリチンポリクローナル抗体 (ラビット血清: DAKO 社) を使用した。同時に免疫組織染色を行った AFP は, 抗ヒト AFP ポリクローナル抗体 (ラビット血清: DAKO 社), CEA は抗ヒト CEA ポリクローナル抗体 (ラビット血清: DAKO 社), β -HCG は, 抗ヒト β -HCG モノクローナル抗体 (マウス血清: DAKO 社) を使用した。各抗体は, それぞれ100倍, 室温で1時間反応させた。

症例全体の判定は, 便宜上切片中で陽性に染まる細胞の比率が, 全体の5%未満のものを陰性 (-), 5~24%のものを弱陽性 (+), 25~49%のものを中等度陽性 (++) , 50%以上のものを強陽性 (+++) 症例とした。

有意差の検定は Fisher の直接確率計算法によった。

結 果

1) 各マーカーの組織内局在

正常精巣組織では精細管上皮は陰性であった (Fig. 1-1). seminoma では腫瘍巣にフェリチン陽性の腫瘍細胞が散在性に認められた (Fig. 1-2). フェリチンは間質の細胞, とくに histiocyte に多く染まっていた。腫瘍細胞では胞体内に均一に染色していた。陽性細胞は散在性であるが, HE 標本と対応して検討した所, ほとんどがいわゆる viable cell や若干変性した

Table 2. The procedure of Avidin-Biotin-Complex method

1. Deparaffinization of 5 μ m sections from 10% formalin fixed paraffin embedded specimen
2. Block of intrinsic peroxidase activity with 0.3% hydrogen peroxide solution (at room temperature. 30 min)
3. Block of non-specific binding site with normal goat serum (at room temperature. 20 min)
4. Incubation with primary antibody (at room temperature. 1 hour)
5. Incubation with secondary antibody (at room temperature. 30 min)
6. Incubation with avidin-biotin complex (at room temperature. 30 min)
7. Incubation with a diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (at room temperature. 5-10 min)
8. Counter staining with hematoxylin
9. Dehydration and mount

細胞であり, 壊死細胞は染まっていなかった (Fig. 1-3). non-seminoma もほぼ同様の所見であった. 転移巣ならびに血管内に見られた tumor thrombus も原発巣と同じく腫瘍細胞体が陽性であった. しかし, 原発巣に比べて腫瘍塊全体が強く染まった (Fig. 1-4). 出血巣ならびに壊死巣は陰性であった (Fig.

1-5).

β -HCG の免疫染色法では, seminoma 例では STGC 部, non-seminoma 例では, choriocarcinoma, embryonal carcinoma で陽性であった (Fig. 2). 腫瘍部分で陽性細胞が散在性に, かつ巣状に認められた. 腫瘍細胞の胞体内にびまん性に顆粒状の染色

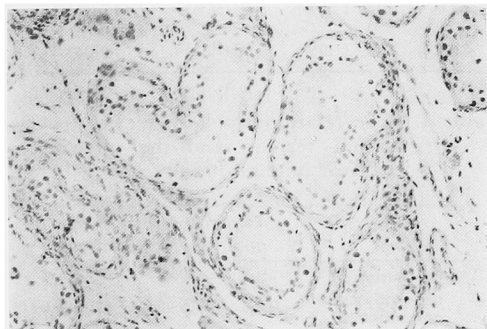


Fig. 1-1. A case of normal testicular tissues stained for ferritin. H.E. $\times 100$. Normal seminiferous tubules are stained negative.

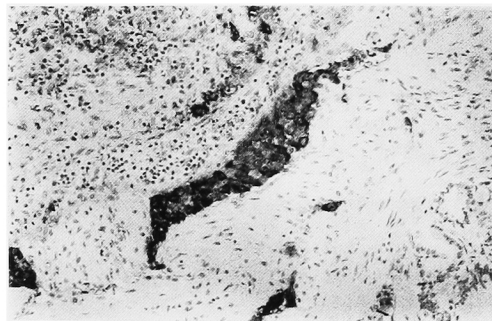


Fig. 1-4. A case of tumor thrombi in the vessels stained for ferritin. Tumor cells are stained as intensely as the original tumor.

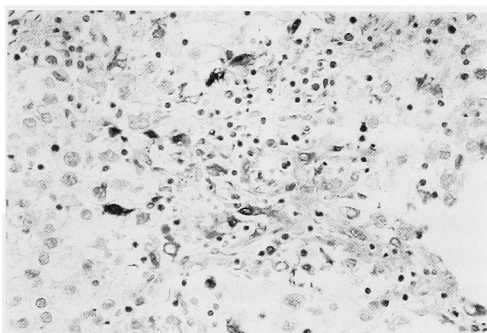


Fig. 1-2. A case of seminomas stained for ferritin. $\times 100$. The case is stained positive and judged as medium intensity. Interstitial cells, especially histiocytes, are also stained for ferritin.

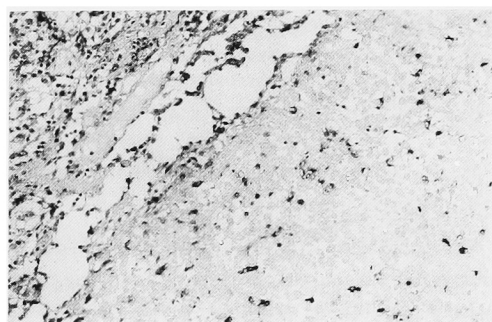


Fig. 1-5. A case of the bleeding site. No cells are stained for ferritin in bleeding or necrotic sites.

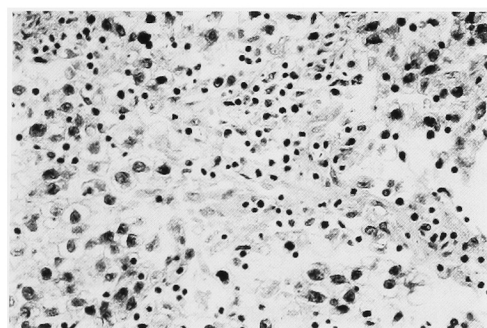


Fig. 1-3. Areas corresponded with areas of Fig. 1-2. H.E. $\times 100$.

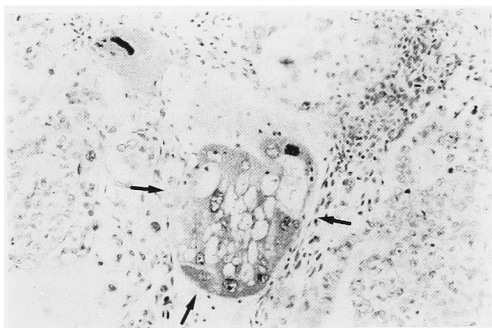


Fig. 2. A case of non-seminomas stained for β -HCG. $\times 200$. Arrow shows the positive cells.

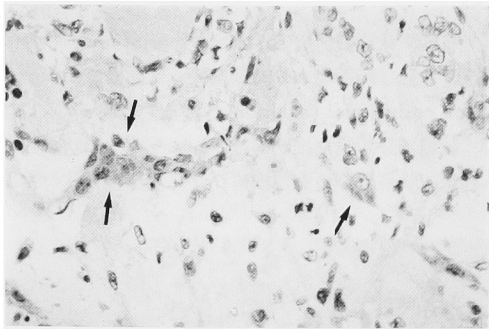


Fig. 3. A case of non-seminomas stained for AFP. Arrow shows the positive cells.

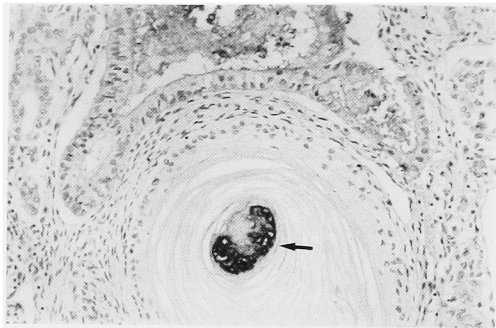


Fig. 4. A case of non-seminomas stained for CEA. $\times 200$. Arrow shows the positive cells.

を認めた。核は染まらなかった。不整で多核の腫瘍細胞ほど、染色度が強かった。

AFP 免疫染色法では, seminoma 例は全例陰性で, embryonal carcinoma, immature teratomas 例で陽性であった (Fig. 3)。腫瘍部で陽性細胞は散在性に染まっていた。腫瘍細胞の胞体内に、びまん性に顆粒状の染色を認めた。核は染まらず、また細胞膜も染まらなかった。

CEA 免疫染色法では, seminoma 例は全例陰性で, embryonal carcinoma, choriocarcinoma, immature teratoma で陽性であった (Fig. 4)。全体的に、 β -HCG, AFP 染色よりもびまん性に腫瘍部は染まっていた。腫瘍細胞の胞体内がびまん性に染色された。核全体は染まらなかったが、核膜の一部に染色が認められた。細胞膜にも染色を認めた。

2) 陽性症例の検討

規準により組織の染色態度が (+) 以上の症例を陽性症例としてまとめた (Table 3)。フェリチンは seminoma の7例全例が陽性で、フェリチンの陽性症例は、 β -HCG, AFP, CEA の陽性症例よりも有意に高値であった ($p < 0.01$)。 β -HCG は, seminoma

Table 3. Cases with the positive immunostaining among 16 cases

	Seminoma	Non-Seminoma	Total
Ferritin	7/7 (100%)	8/9 (89%)	15/16 (94%)
β -HCG	1/7 (14%)	4/9 (44%)	5/16 (31%)
AFP	0/7 (0%)	5/9 (56%)	5/16 (31%)
CEA	0/7 (0%)	7/9 (78%)	7/16 (44%)

Table 4. The relationship between the level of serum ferritin and the intensity of ferritin immunostaining

	Ferritin immunostaining	
	positive*	positive**
Serum ferritin elevated beyond normal limit	0/7 (0%)	7/7 (100%)
within normal limit	5/9 (56%)	4/9 (44%)

* specimen stained less than (+)

** specimen stained more than (++)

の7例中1例が陽性であり、これは STGC を証明できた症例であった。AFP, CEA は seminoma では全例陰性であった。non-seminoma ではフェリチン、 β -HCG, AFP, CEA の陽性症例に有意の差はなかった。全体ではフェリチンの陽性症例 (94%) は、 β -HCG, AFP の陽性症例 (31%) および CEA の陽性症例 (44%) よりも有意に高かった ($P < 0.01$)。

つぎに前報の血清値の検討結果より、フェリチンの血清値陽性例、血清値正常例別の組織染色度との相関をみた (Table 4)。血清フェリチン陽性群7例のうち、組織染色が中等度陽性 (++) 以上を示した例は100%であった。一方、血清フェリチン正常群9例のうち、組織染色が中等度陽性以上示したものは4例 (44%) であり、この2群の間には有意の差が認められた ($P < 0.05$)。

考 察

フェリチンは、分子量40~45万の水溶性鉄貯蔵蛋白であり、主に肝、骨髄、脾、胎盤などに分布する⁴⁾。細胞質内の free polysome 上で合成され、lysosome 中で分解される。細胞質内のフェリチン量は鉄投与により増加し、鉄欠乏状態で減少するという。

Jacobsen らの報告によると、免疫組織学的にフェリチンは多くの腫瘍細胞胞体に、荒くて粗な顆粒様反応物として認められ、seminoma の93%に、non-seminoma の90%に証明されたという⁵⁾。細胞別では

embryonal carcinoma のすべてのタイプの上皮細胞が陽性に染色され、yolk sac tumor では、内胚葉性細胞や細網細胞、肝小葉に似た上皮構造などが強く染まる⁵⁾。teratoma では、種々のタイプの上皮が陽性を示し、syncytiotrophoblastlike cell の microvillous surface にも陽性反応がよくみられた⁵⁾。正常の生殖細胞や精細管ではフェリチン陰性であった⁵⁾。

精巣腫瘍に随伴した carcinoma in situ (以下 CIS) のフェリチン免疫染色の検討では、CIS の83.3～84.2%がフェリチン陽性であり、精巣腫瘍の早期診断に有用とも報告されている^{6,7)}。

Cohen らも、23例のセミノーマ全例で、肝、心筋フェリチンの両抗体とも細胞質に局在を認めた⁷⁾。肝および心筋フェリチン抗体による免疫染色法でそれぞれ74%、52%が強陽性であり、その半数がびまん性分布を示したと報告している⁷⁾。

また Jacobsen らは、HCG と AFP が陰性である non-seminoma 腫瘍患者19例でフェリチンが陽性であり、これらの患者の臨床経過をモニターする上でフェリチンの測定が有用だとしている⁸⁾。

われわれの組織フェリチンの陽性率94%という結果からも、純粋な seminoma においては、おそらくフェリチン以外にこれほど高頻度に免疫組織染色を示すものはない。しかし、non-seminoma においても高い陽性率を示し、精巣腫瘍の各種細胞の型と組織フェリチンの染色性には対応は見られなかった。non-seminoma においては、すでに β -HCG、AFP という特異的な組織染色法があるが、これも seminoma には有用ではない。このためフェリチン組織染色法の利用法としては、たとえば血清フェリチンが治療前に高値を示した転移巣を持つ seminoma において、転移巣の摘除標本で viable cells の残存の有無などを確認するのに有用ではないかと思われる。症例4は、CTで大動脈周囲の一部に軟部組織の残存を認めるものの後腹膜リンパ節摘除標本で、H・E 染色およびフェリチン組織染色で viable cells を認めず、治療後1年10カ月の現在も NED が得られている。以上より組織フェリチンについては、non-seminoma における β -HCG、AFP 組織染色と同等の有用性が、血清フェリチン高値を示す seminoma にも期待できるのではないかと思われる。

前報¹⁾と今回の検討より、フェリチンの組織陽性率94%に比較すると血清陽性率が44%と低値であった理由としては、フェリチンは本来細胞内に存在するものであるが、血清フェリチンの上昇が認められるには、癌組織が血管やリンパ管などを侵襲し、組織フェリチ

ンが細胞から解離されることが必要のためとも思われる。

また今回同時に検討した β -HCG、AFP、CEA については、これらの腫瘍マーカーの組織局在性と組織型の関係は、文献的にはほぼ確定していると思われる⁸⁻¹¹⁾。本検討では、 β -HCG、AFP、CEA の組織局在性については文献と類似の結果が得られた。

以上の結果より、フェリチン免疫染色の精巣腫瘍における反応結果は、specificity は低いものの sensitivity は高く、血清値と併用することにより、特に血清フェリチン高値を示した seminoma の viable cells の残存の有無の組織検索などに有用と思われる。

文 献

- 1) 高井計弘, 小島弘敬, 久米春喜, ほか: 精巣腫瘍における血清フェリチン値の検討. 泌尿紀要 37: 357-362, 1991
- 2) 泌尿器科・病理: 辜丸腫瘍取扱い規約. 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編. 金原出版, 東京, 1984
- 3) Hsu SM, Raine L and Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29: 577-580, 1981
- 4) 渡辺直樹, 新津洋司郎 Ferritin. 医学と薬学 14: 619-627, 1985
- 5) Jacobsen GK and Jacobsen M: Ferritin (FER) in testicular germ cell tumours. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A 91: 177-181, 1983
- 6) Jacobsen GK, Jacobsen M and Clausen PP: Ferritin as a possible marker protein of carcinoma-in-situ of the testis. Lancet 2: 533-534, 1980
- 7) Cohen C, Shulman G and Budgeon LR: Immunohistochemical ferritin in testicular seminoma. Cancer 54: 2190-2194, 1984
- 8) Mostofi FK: Tumor markers and pathology of testicular tumors. Prog Clin Biol Res 153: 69-87, 1984
- 9) 三木恒治: 辜丸腫瘍の腫瘍マーカーの研究—免疫酵素抗体法による AFP, HCG, CEA の腫瘍組織局在について—. 日泌尿会誌 75: 503-523, 1984
- 10) Kurman RJ, Scardino PT, McIntire KR, et al.: Cellular localization of alphafetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using an indirect immunoperoxidase technique. A new approach to classification utilizing tumor markers. Cancer 40: 2136-2151, 1977
- 11) Jacobsen FK and Jacobsen M: Alphafeto-

protein (AFP) and human chorionic gonadotropin (HCG) in testicular germ cell tumours. A prospective immunohistochemical study. *Acta Pathol Microbiol Im-*

munol Scand Sect A 91: 165-176, 1983

(Received on April 23, 1990)
(Accepted on July 20, 1990)