

精上皮腫における胎盤性アルカリフォスファターゼの免疫組織化学的染色

東海大学医学部泌尿器科学教室（主任：河村信夫教授）

白 水 幹
星 野 英 章
勝 岡 洋 治

東海大学医学部病理学教室（主任：渡辺慶一教授）

長 村 義 之

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF PLACENTAL ALKALINE PHOSPHATASE IN SEMINOMA

Miki SHIRAMIZU, Hideaki HOSHINO and Yoji KATSUOKA

From the Department of Urology, Tokai University School of Medicine

(Director: Prof. N. Kawamura)

Yoshiyuki OSAMURA

From the Department of Pathology, Tokai University School of Medicine

(Director: Prof. K. Watanabe)

Indirect immunoperoxidase staining was carried out on seminomatous tumors of testes (22 specimens) using anti-placental alkaline phosphatase antibody to search for the usefulness of placental alkaline phosphatase as a tumor marker. All of the seminomas showed positive staining mainly on the cell surface. However, the normal testes and non-seminomas showed negative staining. Of interest, normal tissues outside the tumor mass showed positive staining. This phenomenon is considered to be suggestive of carcinoma *in situ*.

Immunohistochemical study of placental alkaline phosphatase on the seminomas is a useful method for histopathological diagnosis and may be useful for understanding the pathogenesis of the tumor.

Key words: Testicular tumor, Seminoma, Placental alkaline phosphatase, Immunohistochemical staining, Tumor marker

緒 言

睾丸腫瘍における腫瘍マーカーとして AFP や HCG は非精上皮腫睾丸腫瘍の治療効果判定あるいは経過観察の重要な指標である¹⁾ことは周知の事実である。しかし、胚細胞由来の睾丸腫瘍の約40%を占める精上皮腫において血中 HCG の上昇を認めるのは約10%にすぎない²⁾。また、AFP は精上皮腫には存在しないと考えられ、AFP の高値を認めた場合には他の腫瘍成分の混在を考慮しなければならず、精上皮腫

独自の腫瘍マーカーは発見されていないのが現状である。近年になり、種々の悪性腫瘍において胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) の存在が指摘され³⁾、睾丸腫瘍において検討された成績では非精上皮腫に比し、精上皮腫において血中 PLAP レベルが高くなっていることが報告され⁴⁾、精上皮腫の特異的腫瘍マーカーとしての役割が期待されるようになった。

われわれは、正常睾丸組織および非精上皮腫組織を対照とし、精上皮腫における PLAP の存在とその局在の確認のために抗 PLAP 抗体を用いた免疫組織化



Fig. 1. PLAP staining of normal testicular tissue is negative ($\times 100$).

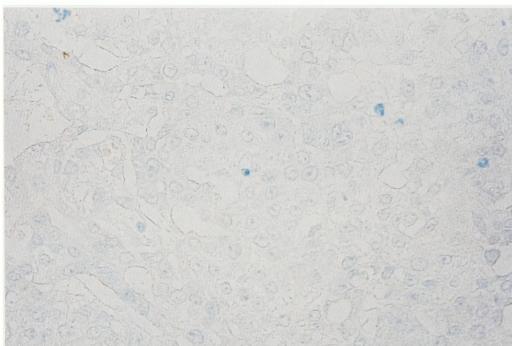


Fig. 2. PLAP staining of embryonal carcinoma tissue is negative ($\times 100$).

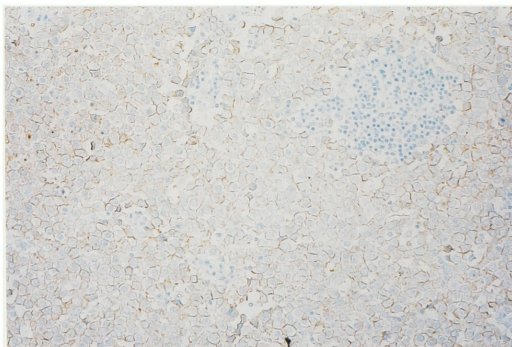


Fig. 3-A

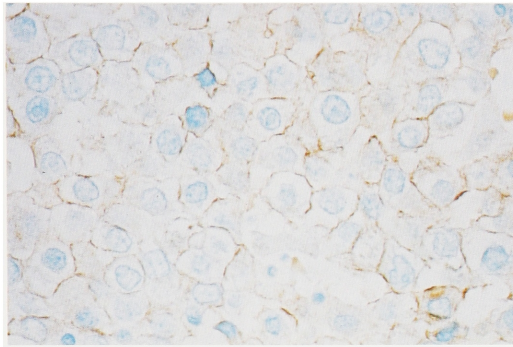


Fig. 3-B

Fig. 3. PLAP staining of seminomatous tissue is positive on the cell surface, in contrast lymphocytes do not yield positive staining (A: $\times 50$, B: $\times 200$).

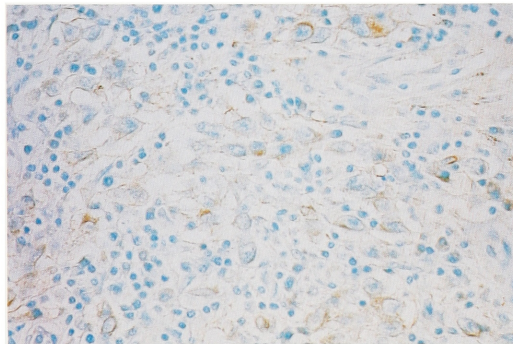


Fig. 4. PLAP staining of seminomatous tissue is positive in the cytoplasm of the tumor cell ($\times 100$).

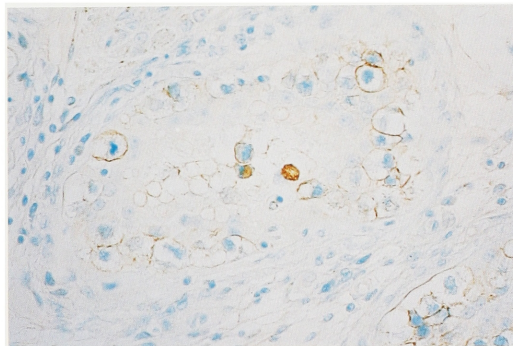


Fig. 5. PLAP staining of normal seminiferous tubules outside the tumor mass is positive mainly on the cell surface and occasionally in the cytoplasm ($\times 100$).

学的手法により形態学的観察を行ない精上皮腫における PLAP の意義を検討した。

材料および方法

正常睪丸組織および睪丸腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン切片を使用した。正常睪丸組織は前立腺癌の治療を目的とした除睪術により得られたもの3例、剖検時に得られたもの1例の合計4例であり、すべて病理組織学的に腫瘍病変のないことを確認した。睪丸腫瘍は精上皮腫22例、胎児性癌2例、精上皮腫と胎児性癌の混合腫瘍3例である。組織染色は通常の H-E 染色と抗 PLAP 抗体による酵素抗体法染色（間接法）を行なった。酵素抗体法染色は渡辺・中根ら⁵⁾の方法に準じた。すなわち脱パラフィン後、一次抗体として抗ヒト胎盤性アルカリフォスファターゼ家兎抗体（ミドリ十字社）を、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗家兎 IgG 山羊抗体を用い、これらを組織に反応させ DAB 溶液で発色させたのち、メチルグリーン核染色後光顕レベルで観察した。

結 果

1) 正常睪丸組織

正常睪丸組織の4例についてはいずれも PLAP は染色されなかった (Fig. 1)。

2) 胎児性癌組織

胎児性癌組織単独の2例についても、PLAP は染色されなかった (Fig. 2)。

3) 精上皮腫組織

精上皮腫組織単独の22例については全例において PLAP が染色され、22例中20例では細胞膜に、2例では細胞質にその局在がみられた。また、腫瘍細胞の浸潤のない周囲残存正常組織と思われる精細管内胚細胞に PLAP が染色されるものがみられた (Fig. 3~5)。

4) 精上皮腫と胎児性癌の混合腫瘍

混合腫瘍の3例では全例においてその精上皮腫成分は PLAP が染色され、胎児性癌成分は染色されなかった。染色された精上皮腫成分では2例において細胞膜に、1例において細胞質に局在がみられた。

以上の結果を Table 1 に示す。

考 察

PLAP は耐熱性であること、L-phenylalanine により阻害されること、およびその免疫学的特性により通常のアルカリフォスファターゼと区別される³⁾。1968年に Fishman ら⁶⁾が肺癌患者から PLAP に酷似したアルカリフォスファターゼを腫瘍関連抗原としてみいだして以来、種々の悪性腫瘍において PLAP の存在が指摘され³⁾、睪丸腫瘍においても Wahren ら⁴⁾が、非精上皮腫に比し精上皮腫において血清 PLAP レベルが高いことを報告した。

組織化学的検索では Uchida ら⁷⁾が精上皮腫の約90%に PLAP の存在を認め、その大部分が細胞膜に局在を示すと報告している。この点については他の諸家の報告^{8,9,10)}も同様であり、今回得られた結果でも細胞膜に PLAP の局在がみられた。アルカリフォスファターゼは膜結合糖蛋白である¹¹⁾ことから、PLAP が細胞膜に存在することは当然の結果と考えられるが、興味あることはわれわれの観察で精上皮腫では22例中2例で、混合腫瘍では3例中1例の精上皮腫成分で細胞質に局在を認めたことである。これがどのような意味を有するのかは明らかでないが、卵巣腫瘍において PLAP がミトコンドリアにみられたとの電顕レベルでの報告¹²⁾もあり、この究明には電顕酵素抗体法などを用いた検討が必要である。

精上皮腫組織において PLAP が高率に検出されることは諸家の報告の一致するところであるが、いっぽう非精上皮腫においては必ずしも一定の結果を得ていない。今回の観察では胎児性癌で PLAP は全く染色

Table 1. PLAP 染色の陽性率と局在部位

組織型	PLAP 染色陽性例/検討例数 (%)	PLAP 染色の局在	
		細胞膜 (%)	細胞質 (%)
正 常 睪 丸	0/ 4 (0)		
精 上 皮 腫	22/22 (100)	20/22 (91)	2/22 (9)
非精上皮腫			
胎児性癌	0/ 2 (0)		
混合腫瘍	精上皮腫成分	3/ 3 (100)	2/ 3 (67)
	胎児性癌成分	0/ 3 (0)	1/ 3 (33)

されず、Uchida ら⁷⁾も同様の報告をしている。胎児性癌にも染色を観察している報告^{8,9,10)}もあり、他の奇形癌、絨毛癌などについても文献上その結果はまちまちである^{7,10,13)}。この相反する成績については isozyme との交叉反応の可能性や、用いられる抗体の純度（モノクローナル抗体かどうか）により説明される検討課題である。

今回の結果でさらに興味あることは、正常睾丸組織では PLAP は染色されないが、精上皮腫症例において腫瘍細胞の浸潤のない周囲残存睾丸組織の胚細胞に染色がみられたことである。同様の現象は諸家の報告^{9,10)}にもみられ、いずれもこれらを浸潤前癌 carcinoma in situ の状態ととらえている。これら PLAP 染色を示す細胞を carcinoma in situ として考えると、精上皮腫の腫瘍発生過程において正常細胞→carcinoma in situ→精上皮腫という図式を想定することができる¹⁵⁾。

最近になり、正常の睾丸組織中に微量の PLAP 様アルカリフォスファターゼとも呼ぶべき酵素の存在することが明らかにされ¹⁶⁾、これは酵素阻害作用¹⁶⁾およびモノクローナル抗体に対する反応性¹⁷⁾より PLAP variant と考えられて睾丸胎盤性アルカリフォスファターゼ様アルカリフォスファターゼ (testicular PLAP-like AP) として睾丸特有のものとされている¹⁷⁾。Jeppson ら¹⁸⁾は腫瘍組織中の PLAP を測定し、その酵素阻害および抗原特異性のパターンより精上皮腫中の PLAP は正常睾丸組織にある PLAP-like AP と同様のものであるとした。これらの事実および正常細胞→carcinoma in situ→精上皮腫という仮説に立脚すると、腫瘍細胞で PLAP が染色されるのは腫瘍細胞がなにか新しい特質を得たというよりは、むしろ細胞に含まれる酵素量の差によるものであり、酵素量の少ない正常細胞では、組織の固定、洗浄その他の過程において、PLAP の免疫反応性の低下および絶対量の減少などにより染色が認められず、酵素量の多い腫瘍細胞では染色が認められるものと考えられる。

PLAP の血中レベルでの測定も種々検討され、RIA¹⁹⁾や ELISA²⁰⁾が用いられているが、いずれでも PLAP の上昇している例では、その臨床経過と血中 PLAP の値がよく相関する結果となっている。血中 PLAP の陽性率は報告者によりさまざまであるが^{11, 20)}、モノクローナル抗体²¹⁾を用いた immunolocalization of enzyme activity (ILEA) assay では陽性率は88~100%と報告され²²⁾、かなり感度の高いものとなっているが、喫煙者では false positive が

みられるという。

以上述べてきたごとく睾丸腫瘍とくに精上皮腫と PLAP のあいだには密接な関係がみられ、PLAP は腫瘍マーカーとして有用なものと思われる。また、精上皮腫における PLAP 染色は病理組織学的診断および腫瘍発生とその分化過程の解明に重要な情報を提供するものと考えられる。

結 語

正常睾丸組織および精上皮腫と非精上皮腫を含む睾丸腫瘍組織の PLAP 染色を行ない以下の結果を得た。

1. 正常睾丸組織および胎児性癌組織では PLAP は染色されなかった。
2. 精上皮腫では PLAP の染色を認め、主に細胞膜に、一部細胞質に局在がみられた。
3. 精上皮腫において腫瘍細胞の浸潤のない正常精細管内胚細胞と思われる細胞にも染色を認め、carcinoma in situ の存在が推測された。

以上より、精上皮腫における PLAP 染色は病理組織学的診断および病理発生学的解明に有用な手段と考えられた。

本論文の要旨は第50回日本泌尿器科学会総会東部部会において発表した。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った東海大学医学部泌尿器科学教室河村信夫教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Sidi AA, Chiou RK and Lange PH: Recent reflections on tumor markers. World J Urol 2: 18~25, 1984
- 2) Javadpour N, McIntire KR and Waldmann TA: Human chorionic gonadotropin (HCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in sera and tumour cells of patients with testicular seminomas. A prospective study. Cancer 42: 2768~2772, 1978
- 3) Nathanson L and Fishman WH: New observations on the Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients. Cancer 27: 1388~1397, 1971
- 4) Wahren B, Holmgren PA and Stigbrand T: Placental alkaline phosphatase, alphafetoprotein and carcinoembryonic antigen in testicular tumors. Tissue typing by means of cy-

- tologic smears. *Int J Cancer* 24 : 749~753, 1979
- 5) 渡辺慶一・中根一穂 : 酵素抗体法 改訂版 pp 72~88, 学際企画, 東京, 1985
 - 6) Fishman WH, Inglis NI, Stolbach LL and Krant MS : A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. *Cancer Res* 28 : 150~154, 1968
 - 7) Uchida T, Shinoda T, Miyata H, Shikita T, Iino S, Suzuki H, Oda T, Hirano K and Sugiura M : Immunoperoxidase study of alkaline phosphatase in testicular tumor. *Cancer* 48 : 1455~1462, 1981
 - 8) Paiva J, Damjanov I, Lange PH and Harris H : Immunohistochemical localization of placental-like alkaline phosphatase in testis and germ-cell tumors using monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 111 : 156~165, 1983
 - 9) Beckstead JH : Alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 7 : 341~349, 1983
 - 10) Jacobsen GK and Pederson BN : Placental alkaline phosphatase in testicular germ cell tumors and in carcinoma in situ of the testis. *Acta Pathol Microbil Scand Sect (A)* 92 : 323~329, 1984
 - 11) Fishman WH : Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am J Med* 56 : 617~650, 1974
 - 12) Sasaki M and Fishman WH : Ultrastructural studies on Regan and non-Regan isoenzymes of alkaline phosphatase in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 33 : 3008~3018, 1973
 - 13) Epenetos AA, Travers P, Gatter KC, Oliver RDT, Mayson DY and Bodmer WF : A immunohistological study of testicular germ cell tumours using two different monoclonal antibodies against placental alkaline phosphatase. *Br J Cancer* 49 : 11~15, 1984
 - 14) Skakkebaek NE : Atypical germ cells in the adjacent "normal" tissue of testicular tumors *Acta Pathol Microbil Scand (A)* 83 : 127~130, 1975
 - 15) Skakkebaek NE : Carcinoma *in situ* of the testis: Frequency and relationship to invasive germ cell tumors in infertile men. *Histopathology* 2 : 157~170, 1978
 - 16) Chang CH, Angells D and Fishman WH : Presence of the rare D-variant heatstable, placental-type alkaline phosphatase in normal human testis. *Cancer Res* 40 : 1506~1510, 1980
 - 17) Millán JL and Stigbrand T : Antigenic determinants of human placental and testicular placental-like alkaline phosphatases as mapped by monoclonal antibodies. *Europ J Biochem* 136 : 1~7, 1983
 - 18) Jeppsson A, Wahren B, Anderson EB, Silfverswärd C, Stigbrand T and Millan JL : Eutopic expression of placental-like alkaline phosphatase in testicular tumors. *Int J Cancer* 34 : 757~761, 1984
 - 19) Lange PH, Millan JL, Stigbrand T, Vesella RL, Ruoslahti E and Fishman WH : Placental alkaline phosphatase as a tumor marker for seminoma. *Cancer Res* 42 : 3244~3247, 1982
 - 20) Jeppsson A, Wahren B, Stigbrand T, Edsmyr F and Andersson L : A clinical evaluation of serum placental alkaline phosphatase in seminoma patients. *Br J Urol* 55 : 73~78, 1983
 - 21) Travers P and Bodmer W : Preparation and characterization of monoclonal antibodies against placental alkaline phosphatase and other human trophoblast-associated determinants. *Int J Cancer* 33 : 633~641, 1984
 - 22) Tucker DF, Oliver RDT, Travers P and Bodmer WF : Serum marker potential of alkaline phosphatase-like activity in testicular germ cell tumours evaluated by H17E2 monoclonal antibody assay. *Br J Cancer* 51 : 631~639, 1985
 - 23) Tonik SE, Ortemeyer AE, Shindelman JE and Sussman HH : Elevation of serum placental alkaline phosphatase levels in cigarette smokers. *Int J Cancer* 31 : 51~53, 1983

(1986年8月4日迅速掲載受付)