

ヒト正常脳及び脳腫瘍組織におけるS-100 蛋白の局在に関する免疫組織化学的研究

岡山大学脳神経外科学教室（指導：西本 詮教授）

大 西 林 吉

（昭和58年11月4日受稿）

Key words : S-100 蛋白, ヒト正常脳,
ヒト脳腫瘍, 免疫組織化学

序 言

近年の蛋白質化学の急速な発展により、神経組織には、種々の神経組織特異蛋白が存在することが明らかになりつつある。

1965年 Moore らは²³⁾、牛脳蛋白可溶分画より、肝には存在せず、中性領域では 100%飽和硫酸にも可溶性である蛋白質を発見し、S-100蛋白と命名した。S-100蛋白の生物学的機能は、未だに解明されていないが、哺乳類、鳥類、爬虫類など広く脊椎動物の神経組織に分布していることが知られている¹⁴⁾。一方、免疫組織化学的研究から、S-100蛋白は、中枢神経系では主にグリア細胞に存在し⁹⁾、末梢神経系では主にシュワン細胞に存在することが明らかとなっている³⁴⁾。

従来、ヒト脳腫瘍の病理組織診断に際して数多くの特殊染色法が用いられているが、これらの染色法のみでは腫瘍の組織発生由来及び性格を十分に理解することは難しく、新たな診断方法の出現が待たれていた。しかし、近年、酵素免疫組織化学的検索方法の進歩に伴い、ヒト脳腫瘍においても腫瘍組織中の各種組織特異抗原等の局在を明らかにすることが、有用な診断方法の一つとして定着しつつある。

S-100蛋白は、現在神経外胚葉由来の細胞の指標として最も広く用いられている蛋白の一つである。しかし、ヒト正常脳及び脳腫瘍組織におけるS-100蛋白の局在に関する報告は少なく十分な検索がなされているとは言い難い。今回、著者は、ヒト正常脳及び脳腫瘍におけるS-100

蛋白の局在を光顕並びに電顕レベルで酵素免疫組織化学的に検索し、本蛋白が脳腫瘍の免疫組織化学的診断に有用であることを確認したので文献的考察を加えて報告する。

材料及び検索方法

(1)対象

ヒト正常脳組織は、神経系疾患以外で死亡した剖検材料（2例）並びに、深在性脳腫瘍患者で内減圧術を目的として施行された前頭葉又は小脳半球外側切除術手術材料（5例）より得た。ヒト脳腫瘍組織は、1979—1982年の約3年間に岡山大学脳神経外科学教室で経験した229例の脳腫瘍症例に対する開頭術時の生検材料より得た、その組織別内訳は表1に示す通りである。

表1. 検索したヒト脳腫瘍症例の組織別内訳

組織型	検索例数
良性星状膠腫	25
多形性膠芽腫	45
希突起膠腫	5
脳室上衣腫	15
脈絡叢乳頭腫	4
髄芽腫	14
神経鞘腫	25
血管芽腫	13
髄膜腫	58
奇形腫	5
転移性脳腫瘍	20
計	229

(2)S-100蛋白の分離精製

S-100蛋白の分離精製は、Herschman¹⁰⁾の方

表2 酵素抗体法の概略

A 光顕的検索 (PAP 法)

切片	6 μ ホルマリン固定パラフィン切片		
1)	正常ヤギ血清 (1:5)	10分	室温
2)	抗 S-100 蛋白血清 (1:1000)	一晚	4°C
3)	抗家兎 IgG ヤギ血清 (Dako, デンマーク 1:80)	30分	室温
4)	PAP complex (Dako, デンマーク 1:100)	30分	室温
5)	0.005% H ₂ O ₂ 加 DAB 溶液*	10分	室温
6)	脱水後包埋し鏡檢		

B 電顕的検索 (直接酵素抗体法)

切片	8 μ McLean's PLP 固定凍結切片		
1)	peroxidase 標識 抗 S-100 蛋白 IgG Fab'	一晚	4°C
2)	2.5% glutaraldehyde にて後固定	30分	4°C
3)	DAB 溶液*	15分	室温
4)	0.005% H ₂ O ₂ 加 DAB 溶液*	10分	室温
5)	1% オスミウム酸溶液で 後固定	30分	室温
6)	Epon に包埋後, 超薄切片を作成し, 日立 H-700 にて観察		

* DAB 溶液 20mg 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride/100ml 0.05M Tris-HCl buffer

法に従って行なった。即ち、屠殺場より得て -80°C に保存しておいたウシ脳を、ワーリングブレンダー (HITACHI) にてホモジェナイズし、15,000×g、45分間遠沈 (HITACHI, 20PR-520) した。この上清を硫酸により 100% 飽和 (pH 7.2) させたのち、15,000×g、30分間遠沈した。次に上清を酢酸で pH 4.0 に調製した後、15,000×g、60分間遠沈した。得られた沈渣を磷酸緩衝液 (0.1M, pH 7.0) に再溶解し、DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia, スウェーデン) を用いて、0.2M ~ 0.5M NaCl linear gradient で溶出し、0.3M 前後で溶出される分画を採取した。この分画を飽和硫酸溶液中で一晩透析した後、15,000×g、30分間遠沈し、析出した蛋白を採取した。この蛋白を Sephadex G-200 (Pharmacia, スウ

ェーデン) カラムクロマトグラフィー (溶出液、0.1M 磷酸緩衝液, pH 7.0) により精製し、S-100 蛋白を得た。なおすべての操作は、摂氏 4°C で行なった。

(3) 抗 S-100 蛋白血清の作製

Plescia ら²⁹⁾の方法に準じて作製した。まず、S-100 蛋白 1 mg, methylated bovine serum albumin (Me-BSA, Sigma 米国) 1 mg 及び生理食塩水 1 ml を混合し、室温で約 30 分間振盪した。この混合液に同量の Freund's complete adjuvant (GIBCO, 米国) を加えてエマルジョンを作製した。このエマルジョンを 1 週毎に 4 回ニュージーランド白色家兎 (雄, 体重約 2 kg) の皮下に接種した。さらに、最終接種日より 10 週後に S-100 蛋白 1 mg, Me-BSA 1 mg 及び生食 1 ml の混合液を静注し、その 1 週間後に採血し、抗血清を得た。

(3) 免疫組織化学的検索

光顕的検索は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた Sternberger の Peroxidase antiperoxidase (PAP) 法³⁵⁾により行なった。免疫電顕的検索では、McLean²²⁾の PLP 固定凍結切片を用いた直接酵素抗体法により行なった。

i) 組織の固定及び切片の作製

光顕的検索では、組織は採取後直ちに 10% 中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋した。このブロックより 6 μ の連続切片を作製した。免疫電顕的検索では、組織を採取後、2 ~ 3 mm 厚の小片に細切し、McLean の PLP 固定液で 4°C、4 時間浸漬固定した。次に、このブロックを 10% 蔗糖加 0.1M 磷酸緩衝食塩水 (PBS) で一晩洗浄した後、15% 及び 20% 蔗糖加 PBS で 4°C、4 時間づつ洗浄した。次にこのブロックを OCT compound (Lab-Tec 米国) に包埋した後フレオンガスで凍結し、クリオスタット (サクラ CM-41) で 8 μ の凍結切片を作製した。

ii) PAP 法

切片は脱パラフィン後、内在性ペルオキシダーゼ活性を不活性化する目的で、0.5% 過酸化水素加メタノールを室温、30分反応させた。次に切片を PBS で洗浄後、表 2-A に示す手順に従い S-100 蛋白の局在を検索した。なお対照血清

として、正常家兎血清及び抗ヒト IgG 家兎血清を用いた。

iii) 免疫電顕的検索

Nakane の方法²⁸⁾に従い、ペルオキシダーゼ標識抗 S-100 蛋白 IgG Fab' を作製した。即ち、抗 S-100 蛋白家兎血清を用いて、1/3飽和硫酸塩析 (pH 7.0, 4°C) を行ない IgG 分画を採取した。この IgG 30mg に対し、ペプシン (Worthington, 米国) を 0.3mg 加え、16時間消化 (pH 4.0, 37°C) し (Fab')₂ を作成した。この (Fab')₂ 溶液に 0.01 M β-メルカプトエタノール (Sigma, 米国) を 30分反応させ PBS で一晩透析後、Sephadex G-100 (Pharmarcia, スウェーデン) カラムクロマトグラフィーにて精製し、Fab' を得た。この Fab' 5 mg を 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) にて一晩透析した。一方、ペルオキシダーゼ 4 mg (Sigma type VI, 米国) に 0.1M NaIO₄ を加え、室温で 20分間反応させたのち、1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) にて一晩透析した。次に Fab' にペルオキシダーゼを室温 2 時間反応させ、標識抗体を作製した。標識抗体の精製は、Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー (溶出液 PBS) により行なった。この標識抗体を用いて、表 2-B に示す手順に従って電顕標本を作製した。このブロックより、超薄切片を作製し、重金属による電子染色をすることなく日立 H-700 型電子顕微鏡で観察した。なお、対照としてペルオキシダーゼ標識正常家兎 Fab' を用いた。光学顕微鏡的観察における写真撮影は、ニコン AFM-B 型写真撮影装置を用いて、ヘマトキシリンによる核染色を行なうことなく撮影した。

結 果

1. 家兎抗血清の特異性の検定

今回作製した抗ウシ S-100 蛋白血清は、Ouchterlony の免疫拡散法にて、ラット脳ホモジネートに対し一本の沈降線を形成した。またこの沈降線は、Moore 教授 (ワシントン大学, セントルイス, 米国) より供与された抗血清が形成する沈降線と交叉することなく連続していた (図 1)。

2. ヒト正常脳組織における S-100 蛋白の局在

ヒト正常大脳では、S-100 蛋白陽性反応は、主に星状膠細胞の細胞質、核、細胞突起に認められた。しかし、神経細胞では陽性反応は認められなかった。脳表では、外グリア限界膜に強い S-100 蛋白陽性反応が認められ、限界膜直下の星状膠細胞がこの膜に向かって細胞突起を伸ばしているのが観察された (図 2-a)。白質では、繊維性星状膠細胞のみならず、希突起膠細胞にも陽性反応が認められた。脳室上衣細胞にも S-100 蛋白陽性反応が認められたが、この細胞層に存在するタニサイトにも強い S-100 蛋白陽性反応が認められた (図 2-b)。脈絡叢上皮細胞にも S-100 蛋白陽性反応が認められた (図 2-c)。

小脳では、プルキンエ細胞層に存在するバークマングリア細胞に強い S-100 蛋白陽性反応が認められた。一方、プルキンエ細胞には陽性反応は認められなかった (図 2-d)。分子層では、バークマングリア細胞より脳表に向かって伸展した細胞突起に陽性反応が認められた。顆粒細胞層では、小型の星状膠細胞にのみ S-100 蛋白陽性反応が認められた (図 2-d)。免疫電顕的にヒト大脳皮質を観察すると、S-100 蛋白の局在を示す電子密度の高い陽性反応は星状膠細胞に強く認められた。星状膠細胞では、陽性反応は核質及び細胞質にびまん性に存在していた。核内では、核小体を除く核質全体に陽性反応が認められた (図 3-a)。

細胞質においては、ミトコンドリア内、粗面小胞体腔内には陽性反応は認められなかったが、細胞膜、粗面小胞体形質側及びミトコンドリア外膜には、S-100 蛋白陽性反応が認められた (図 3-b)。又、外核膜形質側にも所々に陽性反応が認められた。

細胞突起では、グリアフィラメントが存在する部位ではフィラメントに一致して S-100 蛋白陽性反応が認められた (図 3-c)。一方、脳内毛細血管周辺の星状膠細胞の血管足突起にも S-100 蛋白陽性反応が存在していた (図 3-d)。シナプス領域では、星状膠細胞の細胞突起内にも S-100 蛋白陽性反応が認められ、シナプス後膜では S-100 蛋白陽性反応は認められなかった (図 3-e)。

3. 各種ヒト脳腫瘍組織における S-100 蛋白の

局在

星状膠腫

25例を検索したが、星状膠腫では、全例において腫瘍細胞に S-100 蛋白性反応が認められた。陽性反応は、腫瘍細胞の細胞質、核、細胞突起に認められた (図 4-a)。その程度は、各種瘍細胞間で比較的均一であった。小脳星状膠腫では、長い突起を持った紡錘状の腫瘍細胞に S-100 蛋白陽性反応が認められた (図 4-b)。

多形性膠芽腫

検索した45例すべての組織において、S-100 蛋白陽性反応を認めた。膠芽腫細胞の S-100 蛋白陽性反応は星状膠腫に比べて弱く、各種瘍細胞間で染色性に著しい差異を認めた (図 5-a)。又、病理組織学的悪性度が場す程、陰性細胞が増加する傾向にあった。腫瘍組織辺縁部には、細胞突起に富んだ S-100 蛋白強陽性細胞が散在していたが、これらは、その形態から腫瘍組織に取りこまれた正常星状膠細胞であると考えられた (図 5-b)。

免疫電顕的に膠芽腫の細胞を観察すると、S-100 蛋白陽性反応は、核及び細胞質にびまん性に存在していた。核質における S-100 蛋白陽性反応は、正常星状膠細胞に比べて著しく弱かったが、核小体周辺では、比較的強い陽性反応が認められた (図 6-a)。又、検索した10例中の1例では、核質内に強い陽性反応の凝集を認めた (図 6-b)。細胞質における S-100 蛋白陽性反応は弱いが、その分布は基本的には正常星状膠細胞とほぼ同じであり、細胞質にびまん性に存在しており、一部は、グリアフィラメント、細胞膜、粗面小胞体形質側及びミトコンドリア外膜に一致して存在していた。

希突起膠腫

5例の希突起膠腫を検索したが、この中3例は種々の程度に星状膠細胞様細胞の混入が認められるいわゆる混合型希突起膠腫と考えられた。検索したすべての組織の腫瘍細胞に S-100 蛋白陽性反応が認められたが、希突起膠腫細胞の細胞質における S-100 蛋白陽性反応の程度は核に比較して弱かった (図 7-a)。一方、混合型希突起膠腫では星状膠細胞に強い S-100 蛋白陽性反応を認め、組織構築細胞の把握が容易で

あった (図 7-b)。

脳室上衣腫

検索した14例すべての症例において、S-100 蛋白陽性反応を認めたが、陽性所見は症例により著しく異なっていた。S-100 蛋白陽性反応は各種瘍細胞に比較的均一に認められる症例が多かったが (図 8-a)、血管周囲偽ロゼットの構成が著明な症例では、血管周囲の腫瘍細胞に S-100 蛋白強陽性反応を認めた (図 8-b)。又、繊維性基質の豊富な症例では、混在する星状膠細胞に強陽性反応が認められた。しかし1例では、ごく少数の腫瘍細胞にのみ S-100 蛋白陽性反応を認めた。

脈絡叢乳頭腫

検索した4症例では、すべての症例で腫瘍細胞に S-100 蛋白陽性反応を認めた (図 9)。陽性反応は、主として細胞質に存在していた症例 (2例) と細胞質及び核に存在していた症例 (2例) に分類された。

神経鞘腫

検索した25例の神経鞘腫における S-100 蛋白陽性反応は極めて強く、各種瘍細胞間で均一であった。陽性反応は、細胞質、核、細胞突起に認められた (図 10)。

髄芽腫

検索した14例中、5例の腫瘍組織中に S-100 蛋白陽性細胞が認められた。陽性細胞の多くは良く発達した細胞突起を有しており、又、腫瘍深部では組織中の血管周辺に多く存在していることなどより、その形態及び分布から腫瘍組織内に取り込まれた星状膠細胞と考えられた (図 11)。

髄膜腫

58例中19例の組織中に S-100 蛋白陽性細胞の存在を認めた。陽性例は、陽性細胞の分布様式から、びまん型 (5例)、限局型 (7例)、散在型 (7例) に分類された。陽性反応は、腫瘍細胞の細胞質に主として認められた。S-100 蛋白陽性例と腫瘍の組織型及び占拠部位との明らかな関連性を認めることはできなかった (図 12-a, b, c)。

小脳血管芽腫

検索した13例のすべてに、強い S-100 蛋白陽

表 3. ヒト脳腫瘍における S-100 蛋白の免疫組織化学的検索結果

験織型	検索例数	S-100 蛋白陽性例数	(%)
良性星状膠腫	25	25	100
多形性膠芽腫	45	45	100
希突起膠腫	5	5	100
脳室上衣腫	15	15	100
脈絡叢乳頭腫	4	4	100
髄芽腫	14	0	0
神経鞘腫	25	25	100
血管芽腫	13	10	77
髄膜腫	58	19	35
奇形腫	5	5	100
転移性脳腫瘍	20	0	0
計	229		

性反応を呈する細胞の存在を認めた。これらの陽性細胞は、腫瘍組織辺縁部に多く、その形態と分布から腫瘍組織内に取り込まれた星状膠細胞と思われた。一方、10例において種々の血管腔の間質に存在する胞沫状の胞体を有するいわゆる間質細胞に、S-100 蛋白陽性反応が認められた(図13)。S-100 蛋白陽性間質細胞の存在と、腫瘍周辺のグリオーシスの程度、囊胞の存在の有無及び腫瘍占拠部位との関連を認めることはできなかった。

奇形腫

3例の頭蓋内奇形腫を検索したが、S-100 蛋白陽性反応は、形態学的に神経系を模倣している部分では、星状膠細胞、脳室上皮細胞、脈絡叢上皮細胞及びシュワン細胞への分化を示す腫瘍細胞に S-100 蛋白陽性反応が認められた(図14-a)。その他、軟骨細胞及びメラニン産生細胞への分化を示す腫瘍細胞に S-100 蛋白陽性反応が認められた(図14-b)。

転移性脳腫瘍

20例を検索したが、いずれの症例でも腫瘍細胞に S-100 蛋白陽性反応は認められなかった。

表 3 は、今回の検索成績を示している。S-100 蛋白陽性反応は、良性星状膠腫、多形性膠芽腫、希突起膠腫、脳室上衣腫、神経鞘腫及び奇形腫の全例に、又髄膜腫、小脳血管芽腫の一部の症例に認められた。

考 察

磯辺ら¹³⁻¹⁵⁾によると、S-100 蛋白は分子量約 2 万の酸性蛋白であり、S-100 a 及び S-100 b などのサブタイプがある。S-100 a, b は、それぞれ $\alpha\beta$, $\beta\beta$ のサブユニット構造を有する 2 量体である。 α 鎖及び β 鎖は、カルモデュリンやトロポニン C と類似の EF-hand 型 Ca^{+} 結合部位を有しており、S-100 a 及び S-100 b は、1 分子あたり 2 個の Ca^{+} イオンを結合する。このように S-100 蛋白の物理化学的特性の解明が進んでいるにもかかわらず、その生物学的役割は未だによく解っていない。しかし、S-100 蛋白が、神経系の発生と分化に深く関与していることを示唆する数多くの実験結果が、これまでに報告されている。ラット脳では、S-100 蛋白の出現時期は、神経細胞が活動を開始する時期にほぼ一致している⁹⁾。一方、培養ラットグリオーマ細胞(C-6)では、細胞が対数増殖期から静止期に移行する時期に一致して、S-100 蛋白合成が増加し¹⁸⁾、さらに培養 C-6 細胞に dibutyryl cyclic AMP を用いて形態学的分化を誘導すると、細胞 1 個あたりの S-100 蛋白量が増加することが知られている⁵⁾。Hydén ら¹²⁾は、S-100 蛋白抗体をラット脳室内に注入すると、学習が阻害されることから、S-100 蛋白が学習に関係した蛋白であると考えた。

従来、S-100 蛋白は中枢神経系以外では、主にシュワン細胞に存在するとされてきた³⁴⁾。しかし、最近、S-100 蛋白は、副腎及び下垂体のサテライト細胞^{25,34)}、メラノサイト^{6,27)}、軟骨細胞³³⁾、皮膚 Langerhans 細胞及びリンパ節の interdigitating reticulum cell²⁶⁾ にも存在することが明らかになっている。これらの S-100 蛋白陽性細胞は発生学的に、神経外胚葉或は一部の間葉系由来の細胞に大別される⁴⁰⁾。このことから、S-100 蛋白は、神経外胚葉或は一部の間葉系由来の細胞のマーカーとなり得ると考えられる。

中枢神経系における S-100 蛋白の局在に関する諸家の報告によると、S-100 蛋白が主として星状膠細胞に存在するという点では一致している。しかし、神経細胞における S-100 蛋白の存在の有無については、未だ議論のあるところで

ある。Hydénら¹¹⁾によると、家兎ダイテルス核には、S-100 蛋白が存在する。又、Haglidら⁸⁾は、ラットのシナプス後膜における S-100 蛋白の存在を報告している。しかし、Matusら²¹⁾及び Cocchia²⁾は、神経細胞における S-100 蛋白の存在に否定的である。また、グリア細胞における S-100 蛋白の局在も諸家の報告により異なっている。山口⁴¹⁾によると、S-100 蛋白は、ラット脳では星状膠細胞、希突起膠細胞、及び脳室上皮細胞に存在している。しかし、Ludwinら¹⁹⁾及び Cocchiaら²⁾は、希突起膠細胞と脳室上皮細胞には S-100 蛋白は存在しないと報告している。このような検索結果の相異の理由については、(1)S-100 蛋白は、水溶性蛋白であるため、迅速な組織固定を行わないと組織内では拡散が起り得る。(2)使用した抗体の特異性に差があるなどが考えられる。

ヒト脳組織における S-100 蛋白の検索結果では、脈絡叢上皮細胞にも S-100 蛋白が存在することが明らかになった。この事実は、S-100 蛋白が、脈絡叢上皮細胞でヒト個有の何らかの機能に関与している可能性を示唆しているものと思われる。電子顕微鏡的に S-100 蛋白の局在を観察すると、正常アストログリアでは、S-100 蛋白は、核及び細胞質にびまん性に存在しており、一部は、細胞膜、ミトコンドリア外膜、外核膜などの膜構造物に一致して存在していた。後者は、Ruscaら³¹⁾の言う膜結合性 S-100 蛋白分画に相当するものと考えられる。星状膠細胞の核質に分布する S-100 蛋白は Ca⁺ 依存性に核内機構の調節に関与している可能性を推測させる³⁷⁾。一方、毛細血管周囲の星状膠細胞の血管足に分布する S-100 蛋白の機能について、田淵らは³⁸⁾、脳血液関門を介しての能動輸送に関与しているものと考えている。事実、Calissanoら¹⁾は、S-100 蛋白が Ca⁺ 依存性に膜を介しての輸送機構に関与していることを示唆する実験結果を報告している。

ヒト脳腫瘍における S-100 蛋白の局在については、Haglid⁷⁾ら及び山口⁴¹⁾が蛍光抗体法による免疫組織化学的検索結果を報告しているのみであり、未だに十分な検索がなされているとは言いがたい。彼等の報告によると、S-100 蛋白は、

星状膠腫、多形性膠芽腫、海綿芽腫、神経鞘腫に存在する。一方、PAP 法による著者の検索では、希突起膠腫、脳室上衣腫、血管芽腫及び髄膜腫にも S-100 蛋白が存在することが明らかとなった。これは、PAP 法は、蛍光抗体法に比較して、抗原の検出感度が極めて高いためであると考えられる。

星状膠腫及び多形性膠芽腫についての検索では、病理組織学的悪性度が増すに従い S-100 蛋白陽性反応は弱くなり、しかも各細胞間での差が著明になる傾向にあった。この結果は、当教室の守屋ら²⁴⁾による S-100 蛋白の定量結果とも良く一致している。田淵ら³⁹⁾は、星状膠腫及び多形性膠芽腫組織における S-100 蛋白の局在を免疫組織化学的に明らかにすることは、腫瘍の病理組織学的悪性度を診断する上で有用な指標の一つとなり得るものと考えている。

免疫電顕的には、多形性膠芽腫細胞における S-100 蛋白の細胞内局在は、正常星状膠細胞と基本的に異ならず、主として核質及び細胞質にびまん性に存在していた。しかし、核内では、核小体周辺に比較的強い凝集を認め、さらに 1 例では、核内で凝集した陽性反応が認められるなど、正常細胞の分布と相異を認めた。このことは、S-100 蛋白が多形性膠芽腫においてもまた Ca⁺ 依存性に何らかの核内機構調節に関与している可能性を示唆するものとする。

脳室上衣腫における S-100 蛋白陽性反応の程度は、検索症例において著しく異なっていたが、当教室の守屋ら²⁴⁾も、定量的検索結果で同様の傾向を認めている。ところで星状膠細胞に特異的に存在するとされ、グリアフィラメントの構成蛋白の一つであるとみなされている Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) は、正常脳室上衣細胞では陰性であるが、反応性に増殖した脳室上衣細胞や脳室上衣細胞腫では陽性になることが知られている³⁰⁾。S-100 蛋白の一部は、グリアフィラメントに関連して存在していることから、S-100 蛋白量も又 GFAP と同様に、細胞環境に応じて著しく変化するものと考えられる。

髄芽腫は、未分化な腫瘍細胞から構成されているが、一部の腫瘍細胞は、神経芽細胞や膠芽

細胞への分化を示し得ることは既に知られている。万納寺ら²⁰⁾は、髄芽腫における GFAP の局在を免疫組織化学的に検索し、一部の腫瘍細胞に GFAP が存在することを報告している。しかし、我々の検索した症例では、S-100 蛋白陽性細胞は腫瘍周辺部に多く、腫瘍深部では、栄養血管に沿って存在していた。このことから、これらの S-100 蛋白陽性細胞は、腫瘍組織に取り込まれた星状膠細胞であろうと考えられる。

髄膜腫では、58例中19例で S-100 蛋白陽性細胞の存在を認めた。一方、同一症例について GFAP の局在を検索したが、陽性細胞は全く認められなかった。このことから髄膜腫組織中の S-100 蛋白陽性細胞は、星状膠細胞とは考え難い。S-100 蛋白陽性細胞の由来については現在のところ明かではないが、脳軟膜はその発生過程において、神経堤由来と言われていることから、神経堤由来の腫瘍細胞である可能性も考えられる。

血管芽腫は、3種類の細胞、即ち、血管内皮細胞、血管周囲細胞、間質細胞から構成されている。これらの構成細胞の中、間質細胞の由来については、従来議論がなされているが、未だに定説はない。Kepes¹⁷⁾は、一部の間質細胞に GFAP 陽性反応を認め、間質細胞の一部は、星状膠細胞であると結論した。一方、Deckら³⁾も同様の所見を得たが、彼等は、GFAP 陽性細胞が、反応性グリオシスが著明な部位に多いことから、間質細胞外 GFAP を貪食したものと考えた。我々は、10例の血管芽腫中の間質細胞に S-100 蛋白陽性反応を認めたが、陽性反応の分布は、腫瘍内囊胞の有無とか反応性グリオシスとの関連性は認められなかった。このことから、著者は、間質細胞が S-100 蛋白を産生したものと考える。ところで、Russellら³²⁾は、肉眼的に血管芽腫がしばしば脳軟膜と連続していることから、脳軟膜由来の腫瘍であると考えている。

近年、ヒトグリア系腫瘍の診断では、S-100 蛋白とともに、GFAP の局在を免疫組織化学的に検索することが広く行なわれつつある。GFAP は、Engら⁴⁾によると、星状膠腫、多形性膠芽腫に主として存在しており、星状膠細胞由来の

腫瘍の診断に極めて有用である。一方、S-100 蛋白は、星状膠腫、多形性膠芽腫のみならず、希突起膠腫、脳室上衣腫、脈絡叢乳頭腫、及び神経鞘腫に陽性であることから、S-100 蛋白は、グリア細胞のマーカーとしては GFAP に勝っている。しかし、髄膜腫及び血管芽腫の一部にも陽性であることから、ヒトグリア系脳腫瘍の診断においては、GFAP 及び S-100 蛋白の両者を同時に免疫組織化学的に検索することが大切であると言える。

結 論

ヒト正常脳及び脳腫瘍組織について、神経組織特異蛋白の一つである S-100 蛋白の局在を光顕並びに電顕レベルで免疫組織化学的に検索した。その結果、ヒト正常脳では、S-100 蛋白は、主として星状膠細胞に存在していたが、希突起膠細胞、脳室上衣細胞及び脈絡叢上皮細胞においても細胞質及び時に核質に存在していた。ヒト脳腫瘍では、星状膠腫、多形性膠芽腫、希突起膠腫、脳室上衣腫、脈絡叢乳頭腫、神経鞘腫、奇形腫の全例に、更に髄膜腫、血管芽腫の一部の症例においても腫瘍細胞の細胞質に S-100 蛋白陽性反応が認められた。星状膠腫、多形性膠芽腫では、組織学的悪性度が増すほど、S-100 蛋白陽性反応の程度は弱く、しかも各腫瘍細胞間の反応の程度に差が認められる傾向にあった。一方、転移性脳腫瘍では S-100 蛋白陽性反応は認められなかった。こうしたことから、ヒト脳腫瘍における S-100 蛋白の局在を免疫組織化学的に明らかにすることは、脳腫瘍の病理組織学的診断に際して一つの有用な方法であると考える。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師西本詮教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に御指導、御助言を頂きました当教室の田淵和雄講師はじめ、諸先生、諸氏諸嬢に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第39回日本癌学会及び第23回日本神経病理学会にて発表した。

文 献

1. Calissano, P. and Bangham, A.D.: Effect of two brain specific proteins (S-100 and 14-3-2) on cation diffusion across artificial lipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 504—509, 1971.
2. Cocchia, D.: Immunochemical localization of S-100 antigen in the brain of adult rat, *Cell Tissue Res.* **214**, 529—549, 1981.
3. Deck, J.H.N. and Rubinstein, L.J.: Glial fibrillary acidic protein in stromal cells of some capillary hemangioblastomas: Significance and possible implications for an immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **54**, 173—181, 1981.
4. Eng, L.F. and Rubinstein, L.J.: Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J. Histochem. Cytochem.* **26**, 513—522, 1978.
5. 古田知久: 培養グリオーマ細胞の形態学的分化に伴う DNA とヒストグラム並びに S-100 蛋白質の経時的変化に関する研究. 岡山医学会誌, **94**, 1113—1125, 1982.
6. Gaynor, R., Irie, R., Morton, D. and Hershman, H.R.: S-100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* **286**, 400—401, 1980.
7. Haglid, K.G., Carlson, C.A., and Stavrou, D. An immunological study of human brain tumors concerning the brain specific proteins S-100 and 14-3-2. *Acta Neuropathol. (Berl)* **24**, 187—196, 1973.
8. Haglid, K.G., Hambergen, A., Hansson, H. A., Hydén, H., Presson, L. and Rönback, L.: S-100 protein in synapses of the central nervous system. *Nature* **251**, 532—534, 1974.
9. Hershmann, H.R., Leuine, L. and DeVellis, J.: Appearance of a brain specific antigen (S-100 protein) in the developing rat brain. *J. Neurochem.* **17**, 247—251, 1971.
10. Hershmann: 私信
11. Hydén, H. and McEwen, B.: A glial protein specific for the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**, 354—358, 1966.
12. Hydén, H. and Lange, P.W.: S-100 Brain Protein: Correlation with Behavior. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **67**, 1959—1966, 1970.
13. Isobe, T. and Okuyama, T.: The aminoacid sequence of S-100 protein (PAP 1-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **89**, 379—388, 1978.
14. 磯辺俊明, 石岡憲昭, 奥山典生: 脳のタンパク質—Calmodulin と S-100 タンパク質—. 神経進歩, **24**, 983—1007, 1980.
15. Isobe, T. and Okuyama, T.: The aminoacid sequence of the α subunit in bovine S-100 protein. *Eur. J. Biochem.* **116**, 79—86, 1981.
16. Kawamura, J., Garcia, J.H. and Kamijo, J.: Cerebellar hemangioblastoma: Histogenesis of stromal cells. *Cancer* **31**, 1528—1540, 1973.
17. Kepes, J.J., Rengachary, S.S. and Lee, S.H.: Astrocytes in hemangioblastomas of the central nervous system and their relationship to stromal cells. *Acta Neuropathol. (Berl)* **47**, 99—104, 1979.
18. Labourdette, G., Mahony, J.B., Brown, I.R. and Marks, A.: Regulation of synthesis of a brain specific protein in monolayer cultures of clonal rat glia cells. *Eur. J. Biochem.* **81**, 595—597, 1977.
19. Ludwin, S.K., Kosek, J.C. and Eng, L.F.: The topographical distributions of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: An immunohistochemical study using horseradish peroxidase labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.* **165**, 197—208, 1976.
20. Mannoji, H., Takeshita, I., Fukui, M., Ohita, M. and Kitamura, K.: Glial fibrillary acidic protein in medulloblastoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **55**, 63—69, 1981,

21. Matus, A. and Mughal, S.: Immunohistochemical localization of S-100 protein in brain. *Nature* **258**, 746—748, 1975.
22. McLean, I.W. and Nakane, P.K.: Periodate lysine-paraformaldehyde fixative; a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. and Cytochem.* **22**, 1077—1083, 1974.
23. Moore, B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Commun.* **19**, 739—745, 1965.
24. 守屋芳夫, 古田知久, 坪井雅弘, 田淵和雄, 西本 詮: ヒト脳腫瘍と S-100 蛋白質. *神経化学*, **17**, 265—268, 1978.
25. Nakajima, T., Yamaguchi, H. and Takahashi, K.: S-100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res.* **191**, 523—531, 1980.
26. Nakajima, T., Watanabe, S., Sato, Y., Shimosato, Y., Motoi, M. and Lennirt, K.: S-100 protein in Langerhans cells, interdigitating reticulum cells and histiocytosis X cells. *Gann* **73**, 429—432, 1982.
27. Nakajima, T., Watanabe, S., Sato, Y., Kameya, T., Simosato, Y. and Ishihara, K.: Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer* **50**, 912—918, 1982.
28. Nakane, P.K.: Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **254**, 203—211, 1975.
29. Plescia, O.J., Braun, T.O. and Palczuk, N.C.: Production of antibodies to denaturated deoxyribonucleic acid (DNA). *Biochemistry* **52**, 279—285, 1964.
30. Roessmann, U., Velasco, M.E., Sindely, S.D. and Gambetti, D.: Glial fibrillary acidic protein (G.F.A.P) in ependymal cells during development. An immunohistochemical study. *Brain Res.* **200**, 13—21, 1980.
31. Rusca, G., Calissano, P. and Alemda, S.: Identification of membrane bound fraction of the S-100 protein. *Brain Res.* **49**, 223—227, 1972.
32. Russel, D.S. and Rubinstein, L.J.: *Pathology of tumours of the nervous system*. 4th edition, Edward Arnold, London, pp.116—129, 1977.
33. Steffansson, K., Wollmann, R.L., Moore, B.W. and Arnasson, B.G.W.: S-100 protein in human chondrocytes. *Nature* **295**, 63—64, 1982.
34. Steffansson, K., Wollmann, R.L. and Moore, B.W.: Distribution of S-100 protein outside the central nervous system. *Brain Res.* **234**, 309—317, 1982.
35. Sternberger, L.A., Handy, P.H. Cuculis, J.J. and Meyer, H.G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry, preparation and properties of soluble antigenantibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification in spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 315—333, 1970.
36. Tabuchi, K. and Kirsch, W.M.: Immunocytochemical localization of S-100 protein in neurons and glia of hamster cerebellum. *Brain Res.* **92**, 175—180, 1975.
37. Tabuchi, K., Nishimoto, A. and Kirsch, W.M.: Immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in cultured rat glioma cells. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **52**, 159—162, 1978.
38. Tabuchi, K., Kirsch, W.M. and Nakane, P.K.: The fine structural localization of S-100 protein in rodent cerebellum. *J. Neurol. Sci.* **28**, 65—76, 1976.
39. Tabuchi, K., Moriya, Y., Ohnishi, R. and Nishimoto, A.: S-100 protein in human tumors. Qualitative and Quantitative studies. *Acta Neurochirurgica* **65**, 239—251, 1982.
40. Takahashi, Y., Fujita, T., Masuda, T. and Iwanaga, T.: S-100 protein-immunoreactive cells in the

lymphnode and spleen of the rat. *Arch, Histol, Jpn.* 45, 393—397, 1982.

41. 山口晴保, 神経特異蛋白 S-100 蛋白, GFA 蛋白のラット神経組織, ヒト脳腫瘍組織内局在に関する免疫組織化学的研究. *脳と神経*, 32, 1055—1064, 1980.

付 図 説 明

図 1 Ouchterlony の免疫拡散法による抗 S-100 蛋白家兔血清の特異性の検定

図 2 ヒト正常脳における S-100 蛋白の局在

a. 大脳灰白質×200

S-100 蛋白陽性反応は, 主に星状膠細胞に認められる。

b. 脳室上衣細胞層×200

S-100 蛋白陽性反応は, 脳室上衣細胞及び上衣細胞層下の星状膠細胞に認められる。上衣細胞層のタニサイト(矢印)には強陽性反応が認められる。

c. 脈絡叢上皮細胞×200

d. 小脳×200

プルキンエ細胞(P)層のバークマングリア細胞に強 S-100 蛋白陽性反応が認められる。

図 3 ヒト正常星状膠細胞における S-100 蛋白の酵素免疫電顕的局在

a. S-100 蛋白陽性反応は, 核質(N)及び細胞質にびまん性に存在している。核小体(n)には陽性反応は認められない。

b. 細胞質では, ミトコンドリア及び粗面小胞体腔内には, S-100 蛋白陽性反応は認められない(m: ミトコンドリア, er: 粗面小胞体)。

c. 細胞突起では, S-100 蛋白陽性反応の一部はグリアフィラメントに一致して認められる。外核膜にも所々に S-100 蛋白陽性反応が認められる(矢印)。

d. 星状膠細胞の血管足にも S-100 蛋白陽性反応が認められる(c: 血管腔)

e. シナプス(S)領域では, 星状膠細胞の細胞突起にのみ S-100 蛋白陽性反応が認められる。シナプス後膜には陽性反応は認められない。

図 4 良性星状膠腫

a. S-100 蛋白染色×200

b. 小脳星状膠腫 S-100 蛋白染色×200

図 5 多形性膠芽腫

a. S-100 蛋白染色×200

b. S-100 蛋白染色(腫瘍辺縁部)×200

図 6 多形性膠芽腫細胞における S-100 蛋白の酵素免疫電顕的局在証明

a. 弱い S-100 蛋白陽性反応は細胞質及び核質にびまん性に分布しており, その分布は基本的には正常星状膠細胞と異なる。しかし, 核小体周辺には比較的強い陽性反応(矢印)が認められる。

b. 1 例においては, 核質内に陽性反応の強い凝集(矢印)を認めた。

図 7 希突起膠腫

a. S-100 蛋白染色

b. 混合型希突起膠腫 S-100 蛋白染色

図 8 脳室上衣腫

a. S-100 蛋白染色×200

b. S-100 蛋白染色×200

図 9 脈絡叢乳頭腫

S-100 蛋白染色×200

図10 神経鞘腫

S-100 蛋白染色×200

図11 髓芽腫

S-100 蛋白染色×200

図12 髓膜腫

- a. S-100 蛋白染色 (びまん型)×209
- b. S-100 蛋白染色 (限局型)×200
- c. S-100 蛋白染色 (散在型)×200

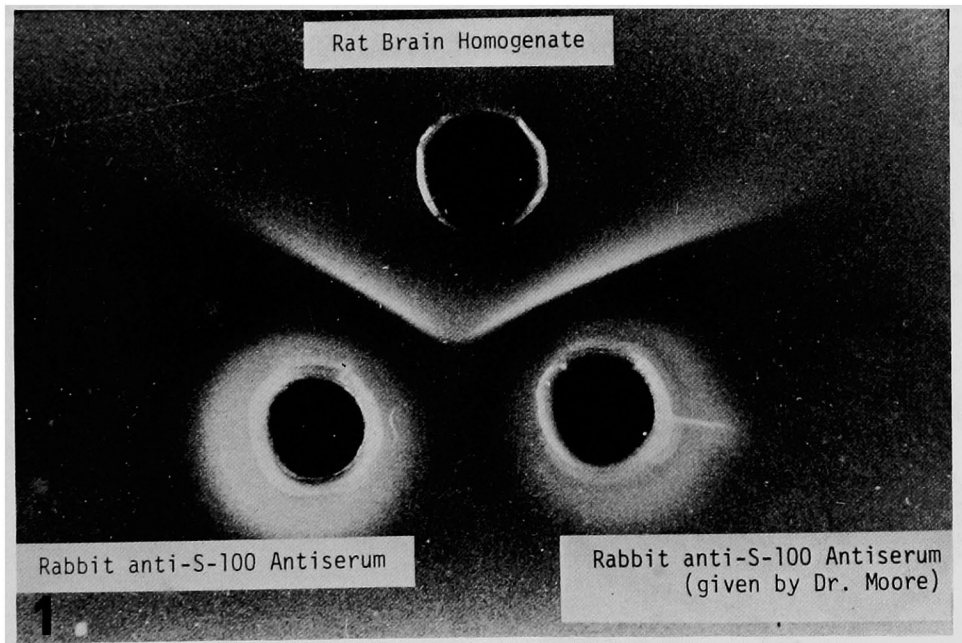
図13 小脳血管芽腫

S-100 蛋白染色×200

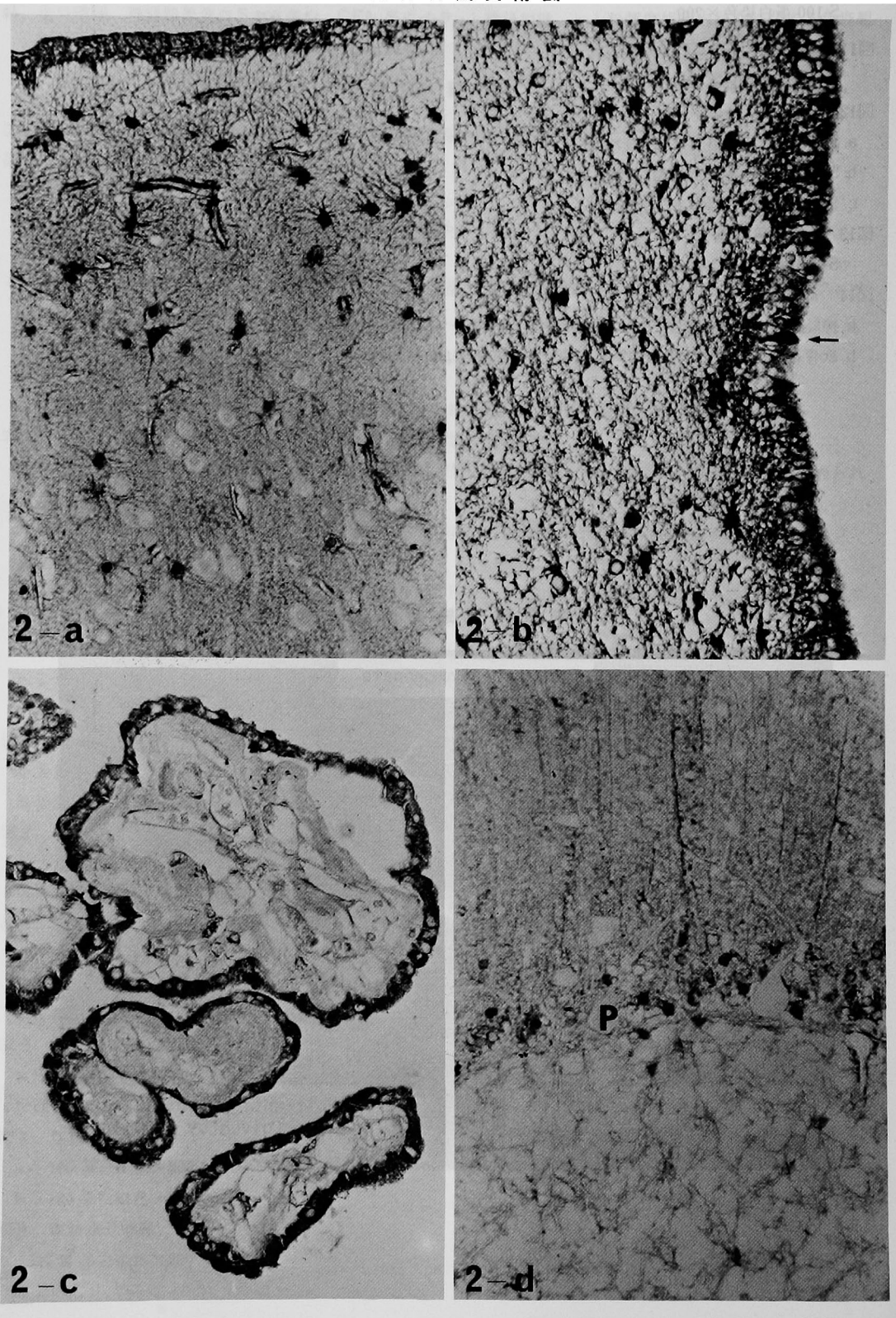
図14 奇型腫

- a. 神経組織への分化を呈していると考えられる部分 (S-100 蛋白染色)×200
- b. 軟骨細胞への分化を呈している部分 (S-100 蛋白染色)×200

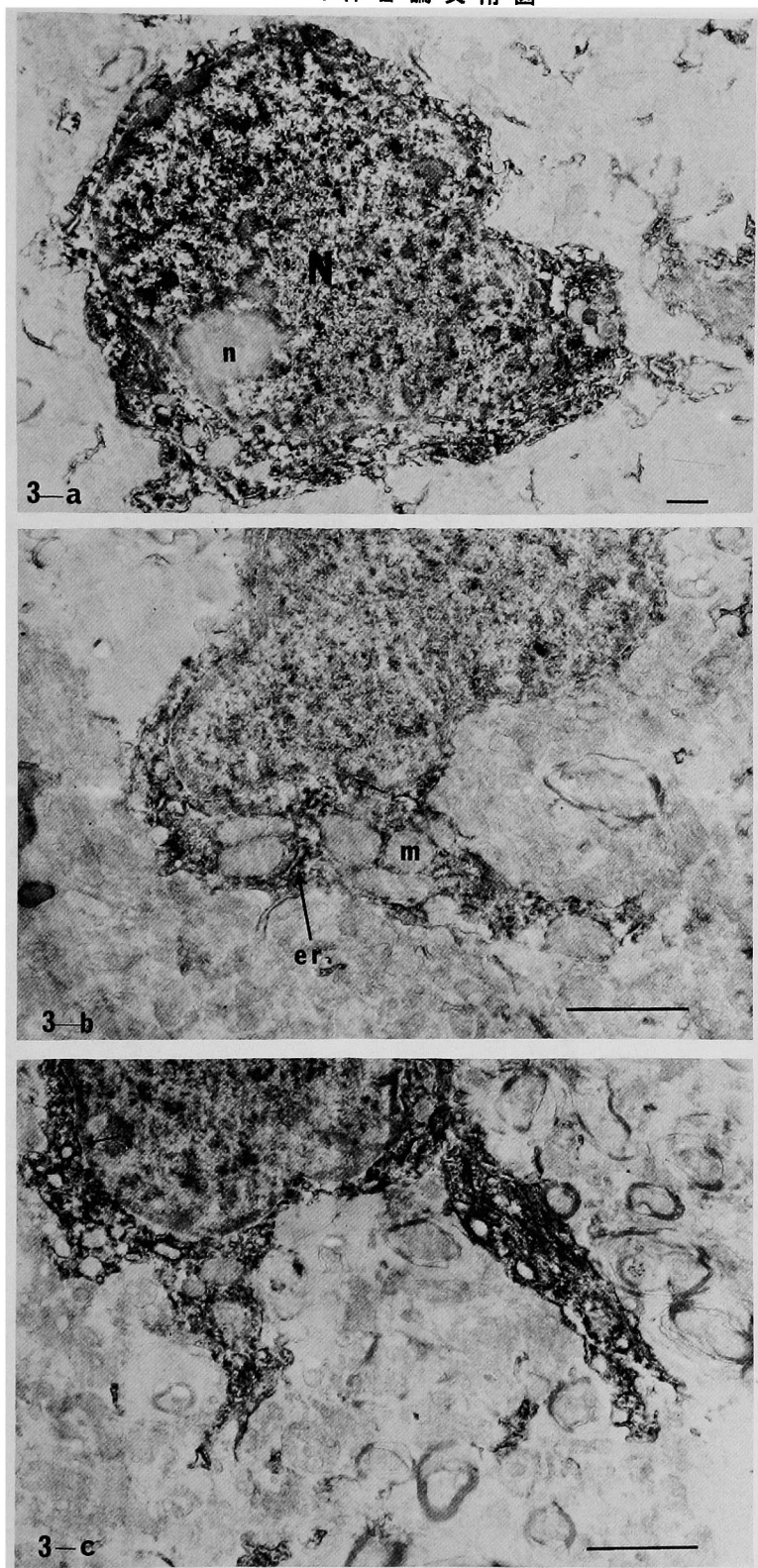
大西林吉論文附図

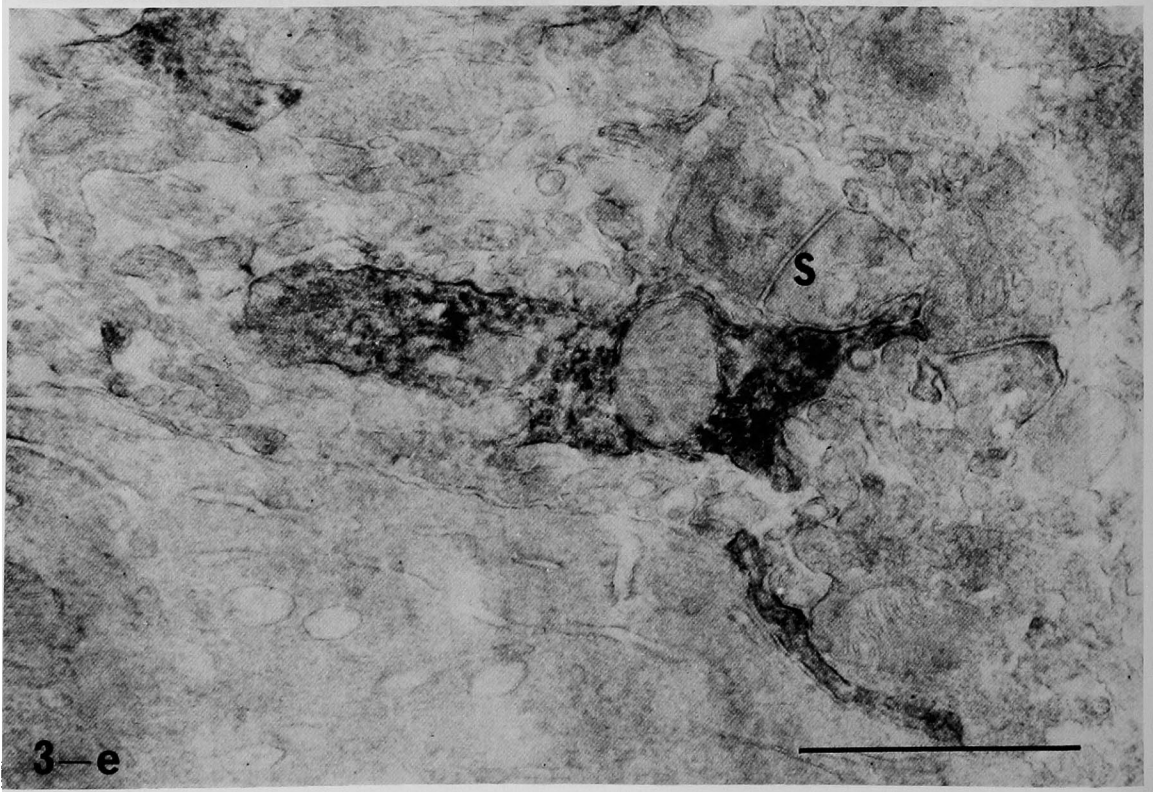
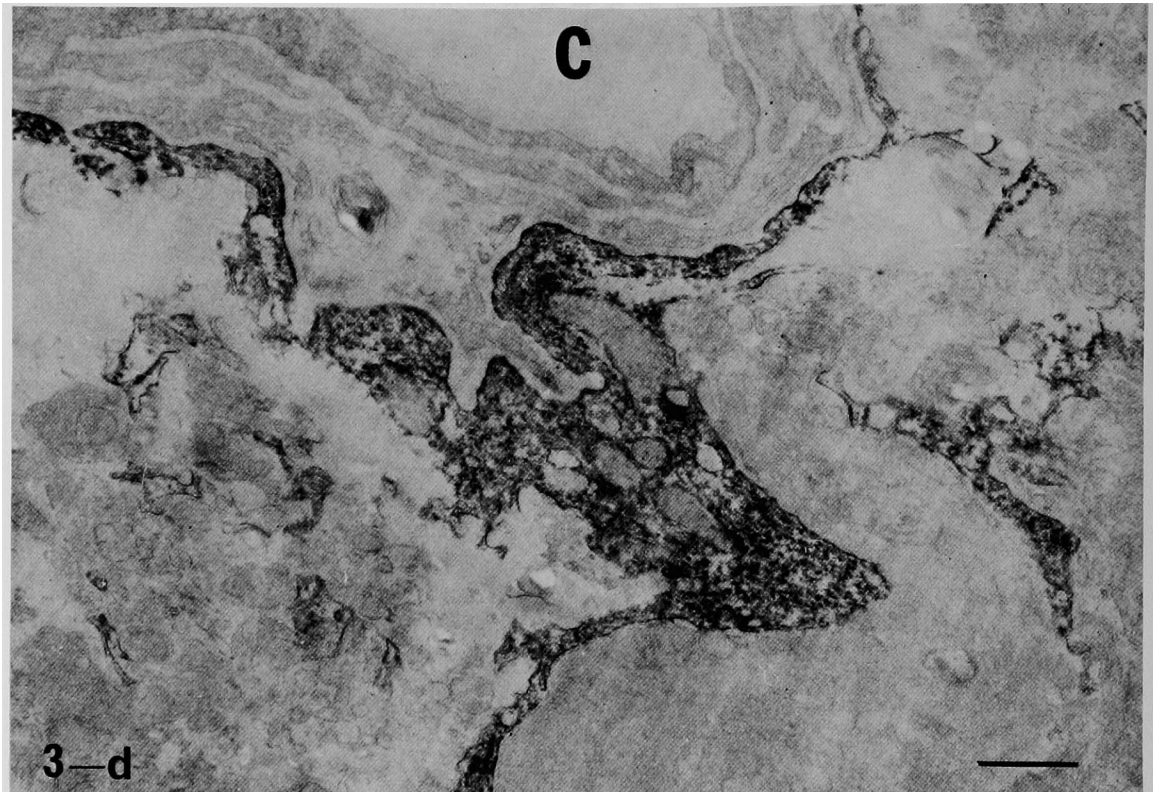


大 西 林 吉 論 文 附 圖

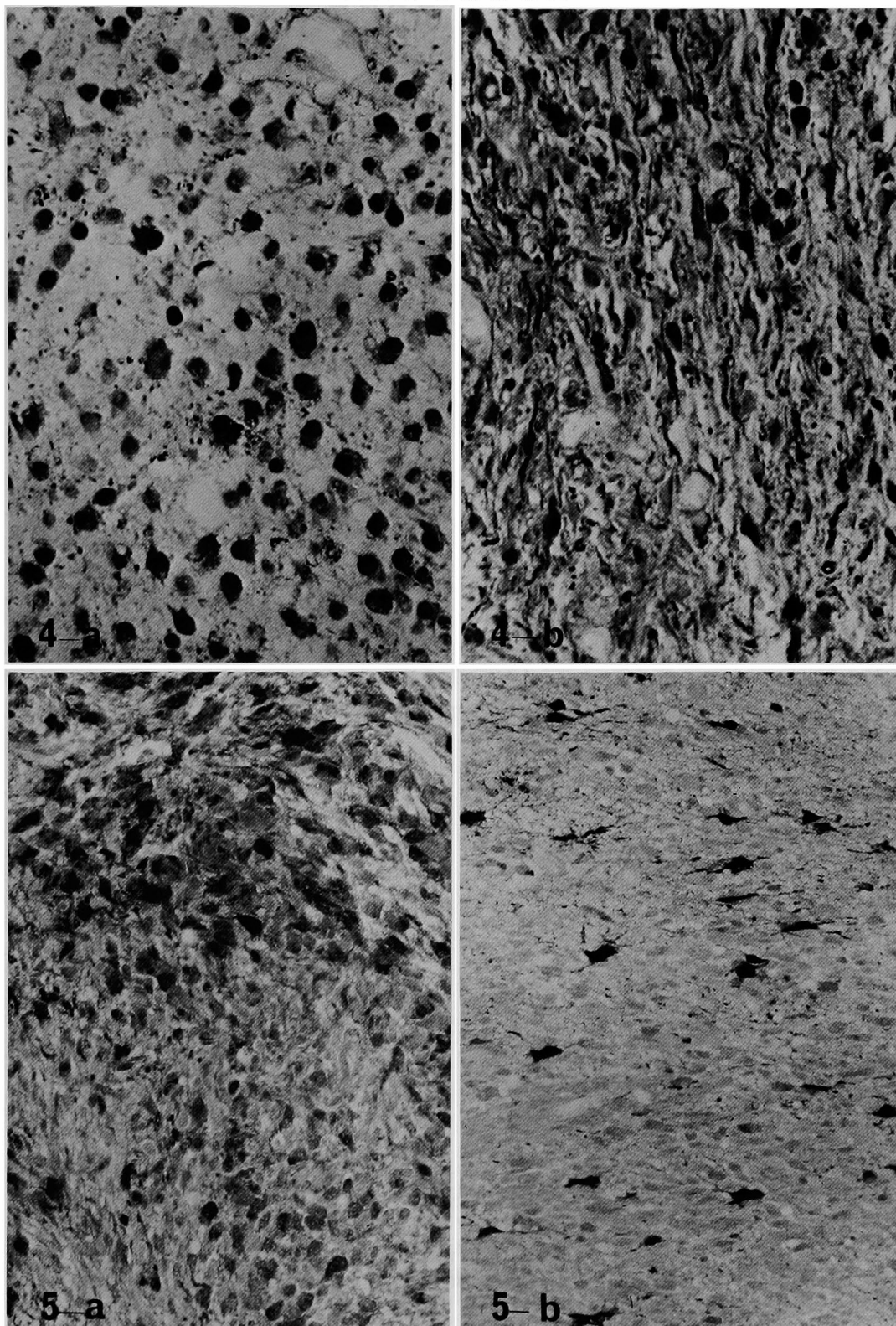


大西 林 吉 論 文 附 図

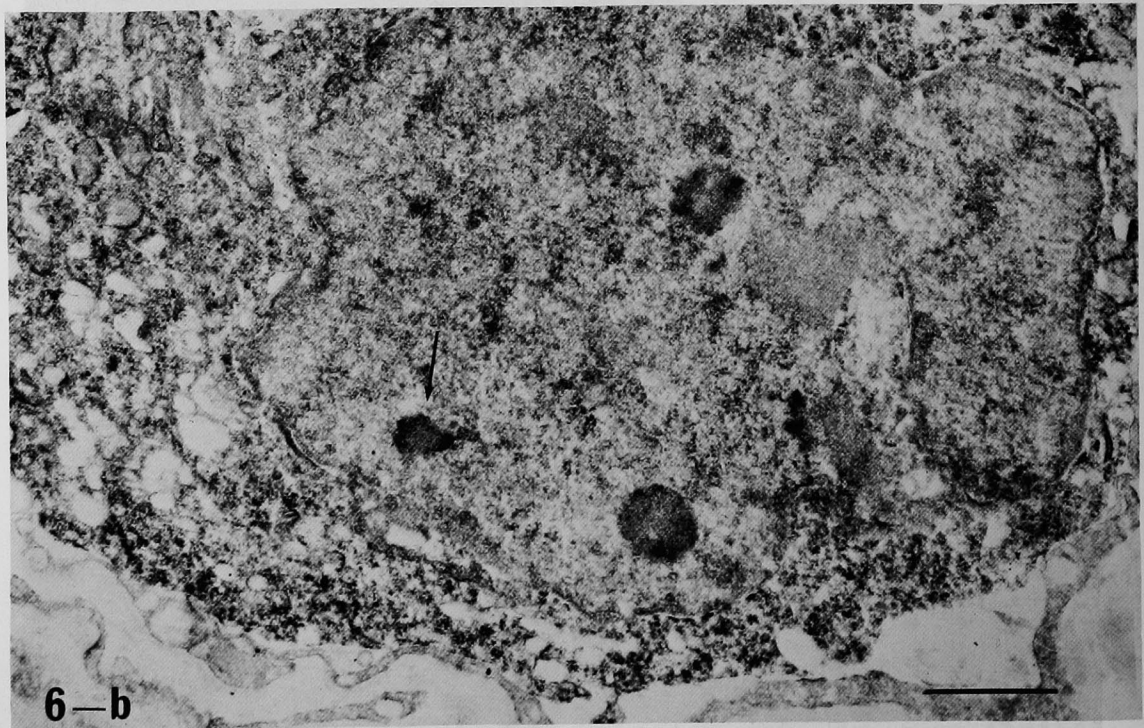
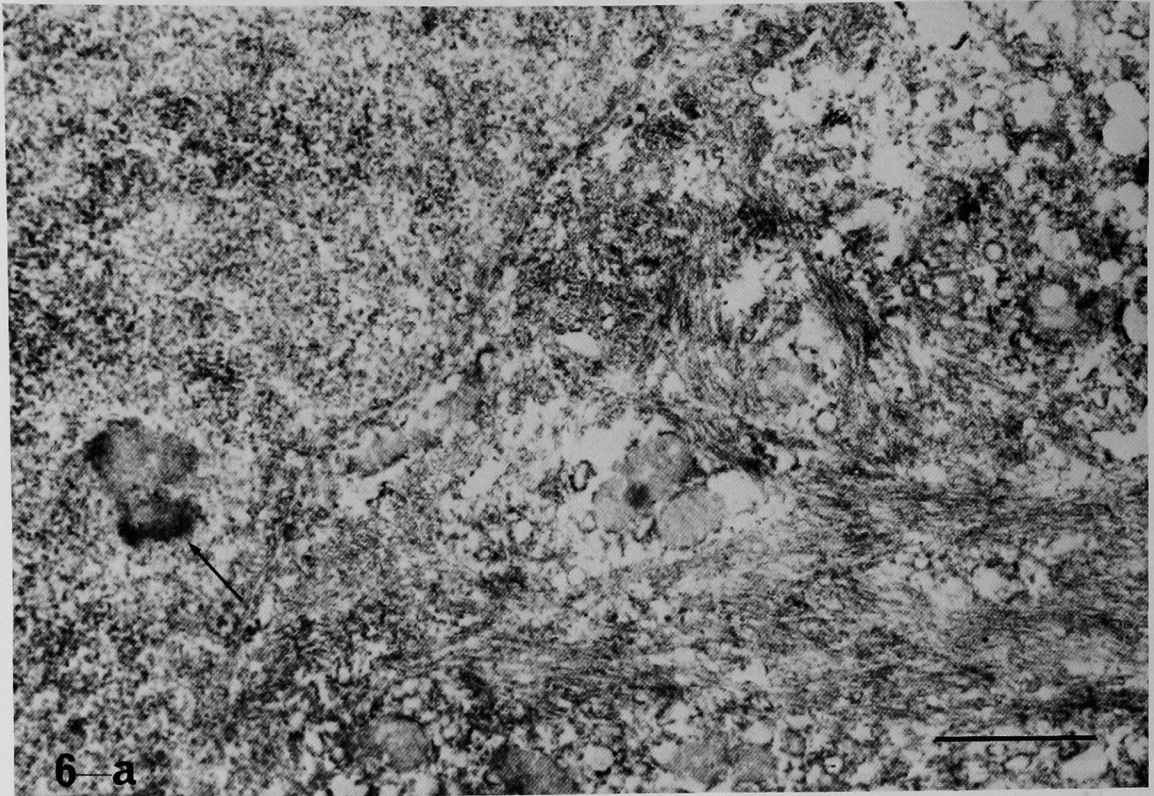




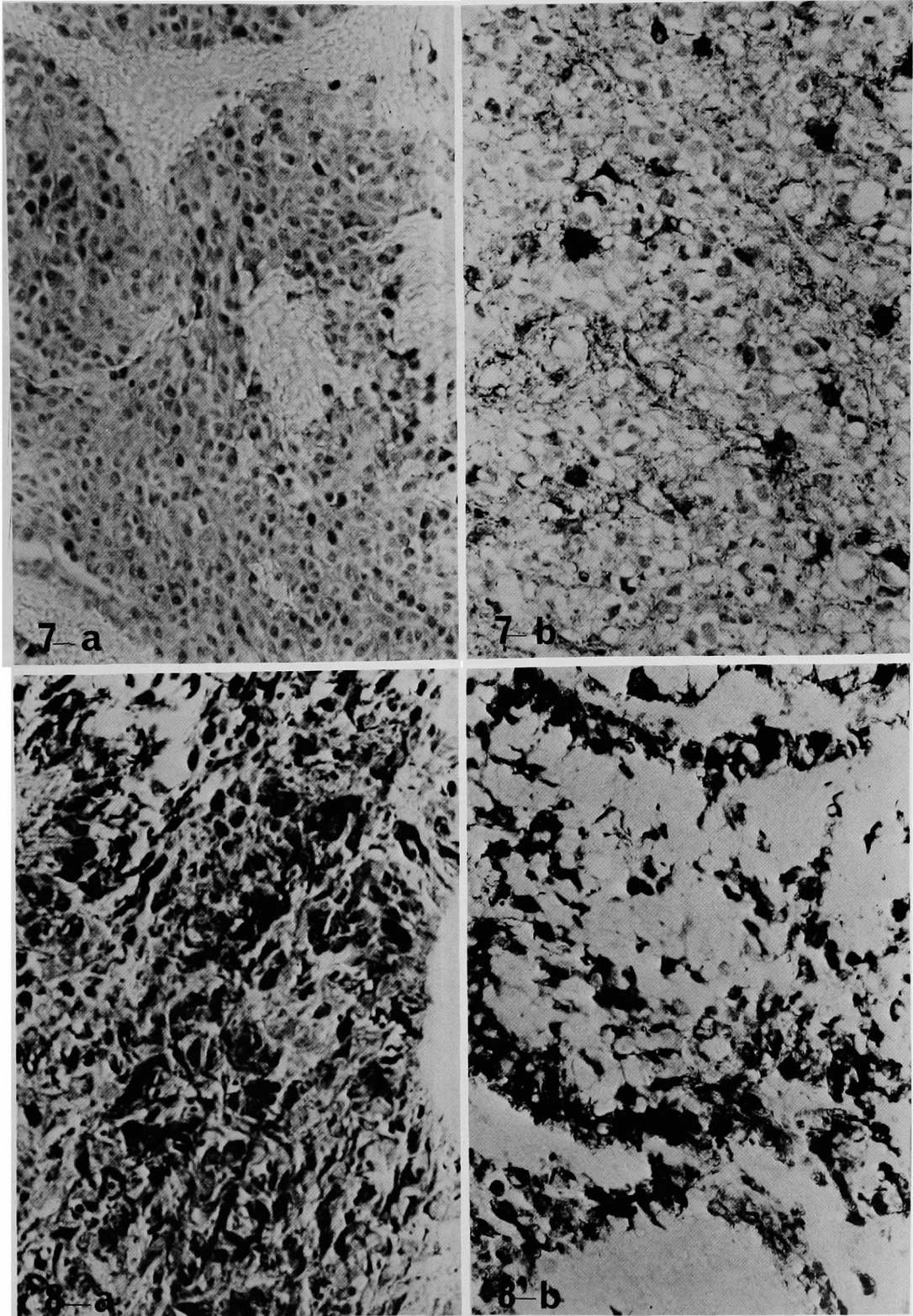
大西 林 吉 論 文 附 図

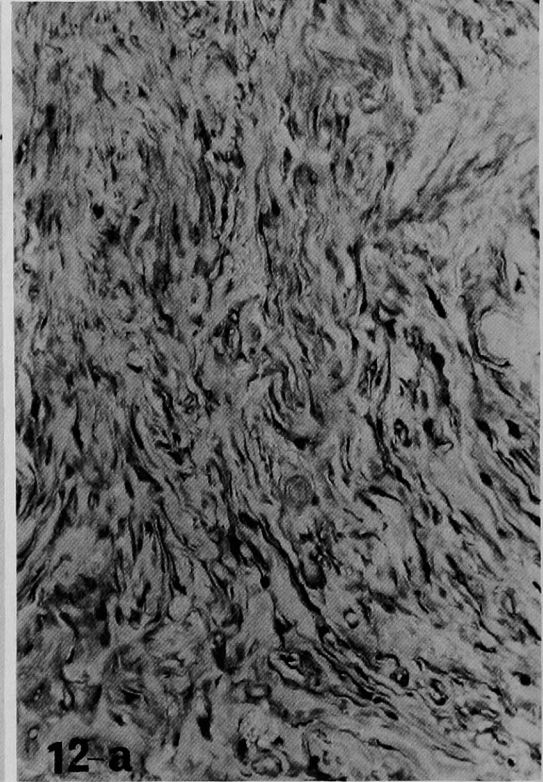
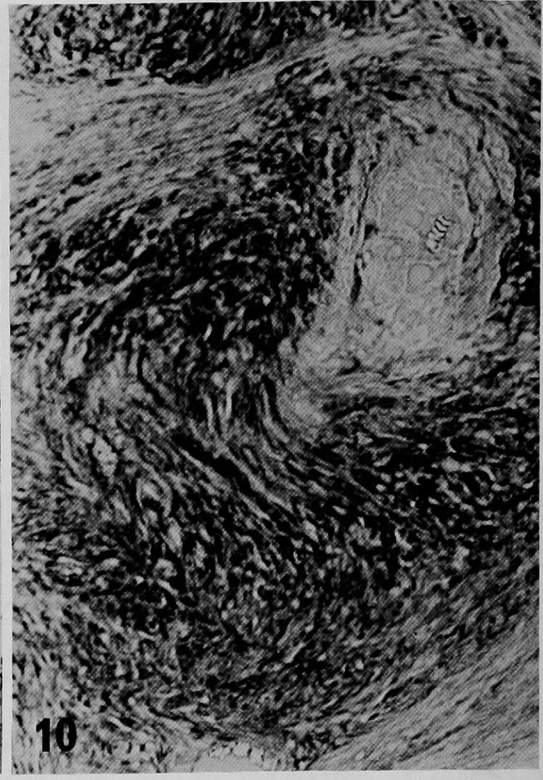


大 西 林 吉 論 文 附 圖

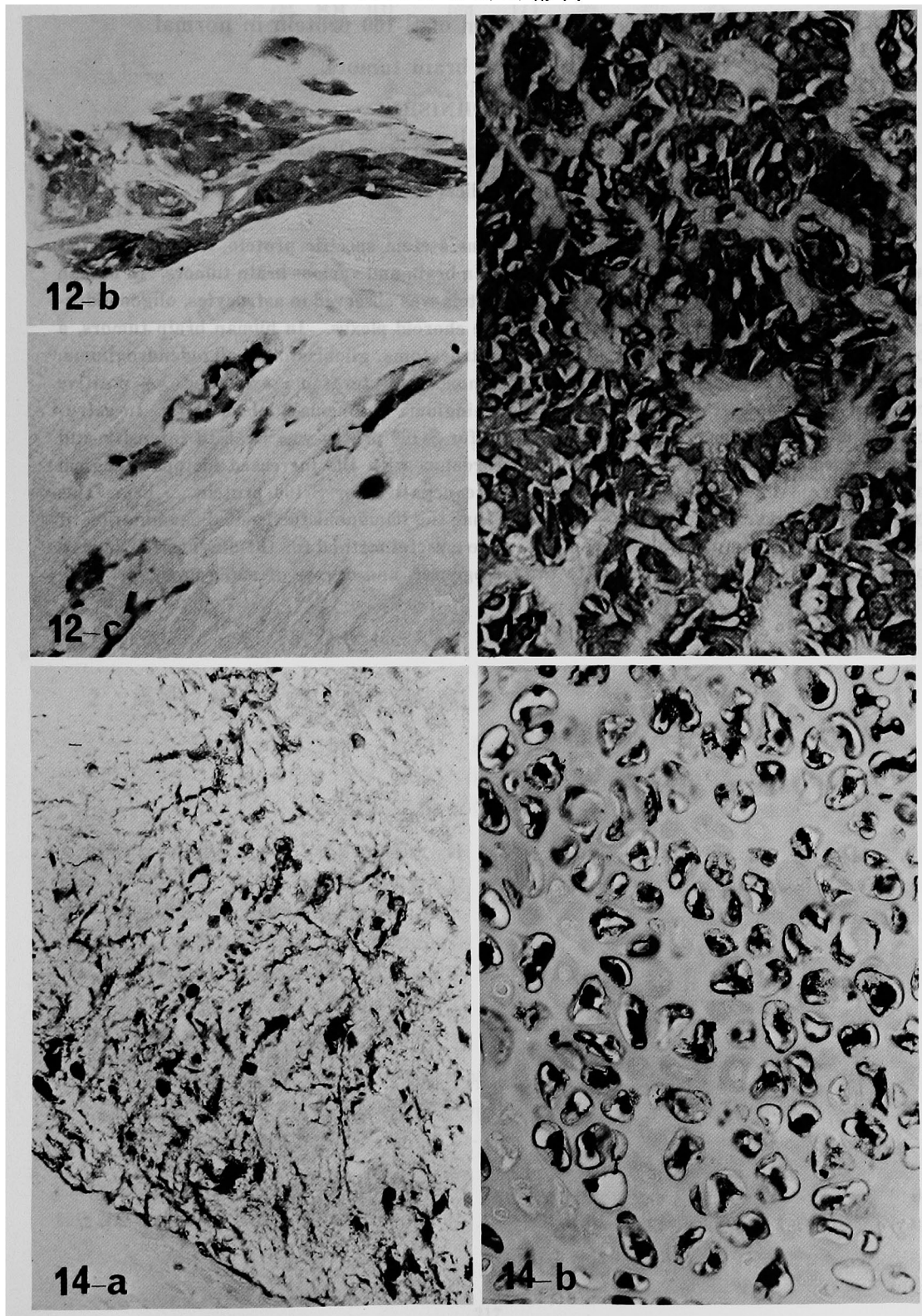


大西 林 吉 論 文 附 図





大西 林 吉 論文 附 図



**Immunohistochemical localization of S-100 protein in normal
human brain and brain tumors.**

Rinkichi OHNISHI

Department of Neurological Surgery, Okayama

University Medical School

The localization of S-100 protein, a nervous system specific protein, was studied immunohistochemically in sections of normal human brain and various brain tumors. In human brain, the specific positive reaction for S-100 protein was observed in astrocytes, oligodendrocytes, ependymal cells and epithelial cells of the choroid plexus. In human brain tumors, a positive reaction was observed in all cases of astrocytoma, glioblastoma, oligodendroglioma, ependymoma, choroidplexus papilloma, neurinoma and teratoma examined. A positive reaction was also observed in some cases of meningioma and hemangioblastoma. In astrocytoma and glioblastoma, the positive reaction for S-100 proten was weak in intensity and heterogeneous throughout the section in accordance with the increased histopathological malignancy. All metastatic brain tumors were negative for S-100 protein. From this immunohistochemical evidence it is concluded that the immunohistochemical examination of S-100 protein in human brain tumors may become a useful method for the diagnosis of human brain tumors, especially in relation to the histogenesis and degree of malignancy.