

イヌの悪性間葉系腫瘍に関する病理学的研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

鈴木 隆

2019

## 目 次

序論	2
第1章 イヌの血管肉腫の病理組織学的検索および治験例	
第1節 イヌの血管肉腫の病理組織学および免疫組織化学的検討	5
第2節 イヌの血管肉腫の分化度における病理組織学および免疫組織化学的所見の関連性に関する検討	26
第3節 イヌの血管肉腫における塩酸ドキソルビシンの治験例	39
第2章 イヌの血管周皮腫の病理組織学的検索	
第1節 イヌの血管周皮腫の病理組織学および免疫組織化学的検索	47
第2節 再発したイヌの血管周皮腫の病理組織学および免疫組織化学的検索	58
第3節 ヒトの古典的血管周皮腫に類似するイヌの間葉系腫瘍の病理学的検索	67
総括	79
謝辞	81
参考文献	82

## 序 論

近年、イヌやネコの腫瘍は発生率が増加しており、診療件数も以前と比較して増えてきている。その理由の一つとして、伴侶動物が長生きするようになっていることである。腫瘍は一般的に高齢動物の病気であることから、高齢になる代償としてよりがんに罹りやすくなる (Withrow *et al.*, 2010)。この寿命の延長の理由はイヌやネコなど伴侶動物に対しての飼育環境が著しく改善され、飼い主より生涯にわたりより良い飼育環境で飼養されているためと考えられている。それに伴い、診療内容でも様々な点で進歩がある。その進歩の裏付けとなるものはヒトにおけるがんの情報のうち、特に治療法が広く獣医領域に紹介されていることが要因と思われる。また、伴侶動物に対するがんの治療に関し、ヒトの治療法を用いて動物の治療成績が向上するだろうという飼主の期待感を背景に、多くの環境が整ってきていることも挙げられる (Withrow *et al.*, 2010)。実際、伴侶動物の健康管理に関する情報の普及や、獣医腫瘍学や獣医臨床腫瘍学の発展により、腫瘍の診療内容が過去と比べ診断率や治癒率の面では著しく向上していると思われる。

現在では伴侶動物に発生した腫瘍が悪性であると診断し、その後は安楽死という事では済まされない事が多く、腫瘍が発生した伴侶動物に対して十分な病態生理学的説明や、病理組織学的説明が必要となる。診療の結果より決定した診断名、そして臨床的な治療および予後との関連性を踏まえて飼主に治療法を説明することにより、がん治療を伴侶動物に受けさせたいという飼主の要望が以前より増してきている。

腫瘍に関しては多くの診断学的アプローチが利用されている。血液学的・血液生化学的診断、臨床病理学および病理組織学的検索は重要である。一方、個々の細胞を検査する細胞診は切除生検や病理組織学的検査ほど情報は得られないが、迅速で安価に診断を確立する手助けとなっている。また、X線診断、CT スキャナー、MRI 等の画像診断はがん患者の日常的な診断や病態の管理に最も重要な役割を果たしている。初期の診断、ステージング、外科および放射線治療計画、そして治療に対する反応など画像診断はあらゆる場面で必要な情報を提供してくれる。これらの情報は種々の治療法の選択肢を飼主に提供でき、飼主が最も望む治療を選択するという飼主本位の治療を確立することができる (Forrest, 2010; Fukuda *et al.*, 2014)。今後も伴侶動物での腫瘍に関する診療内容は診断面から治療面にわたり集学的となり、更により高度になってゆくと考えられる。

より詳細な腫瘍の情報を飼主に提供すべき現状において、病理学的知見は診断・治療・予後を決定する重要な情報である。そこで本研究では、近年、高齢化に伴い遭遇する機会が増加しているイヌの悪性間葉系腫瘍、特に血管肉腫と血管周皮腫に焦点をあてた。血管肉腫は血管内皮細胞への分化を示す骨髄多能性幹細胞由来と考えられている。一方、血管周皮腫は血管周囲で渦巻き状に増殖する由来細胞が未確定な腫瘍である。両者は構築に血管が関わっていることのみ一致した悪性間葉系腫瘍で、臨床上、治療や予後で大きな問題になる。イヌで多発するこれらの腫瘍を組織学および免疫組織化学的手法を用いて、それぞれの腫瘍の病理学的特徴を明らかにするとともに血管肉腫の治験例および

血管周皮腫の病理組織学的分類に関して検討した。

第 1 章では、イヌの血管肉腫の病理組織学的検索として 1) イヌの血管肉腫 43 症例について種々の抗体の有用性を免疫組織化学的に検討した。また、2) イヌの血管肉腫の分化度について病理組織学および免疫組織化学的に検討した。さらに、3) イヌの血管肉腫における塩酸ドキソルビシンの治験例についても検討した。

第 2 章では、イヌの血管周皮腫の病理組織学的検索として 1) 血管周皮腫様構築を示すイヌの皮膚腫瘍 15 症例について病理組織学および免疫組織化学的検索を行った。また、2) イヌの血管周皮腫と診断された同一症例の原発組織と再発組織を病理学的に比較検討した。さらに、3) ヒトの古典的血管周皮腫に類似するイヌの間葉系腫瘍を病理組織学および免疫組織化学的に検索し、イヌの血管周皮腫の分類について考察した。

## 第1章 イヌの血管肉腫の病理組織学的検索および治験例

### 第1節 イヌの血管肉腫の病理組織学および免疫組織化学的検討

#### はじめに

血管肉腫は幹細胞に由来する悪性腫瘍で、造血前駆物質と血管内皮の分化増殖で形成され、血管内皮細胞が元々悪性由来のものと、幹細胞から血管肉腫が突然変異を受け変化するものがある (Valli *et al.*, 2017)。イヌでの発生が一般的に知られており、好発犬種に、ジャーマンシェパード、ゴールドンレトリバーなどがある。また、グレーハウンドなどの短毛種では慢性の日光照射による、血管内皮細胞由来の良性腫瘍（血管腫）の発生が知られているが、その皮膚血管腫の悪性転換による血管肉腫も可能性が示唆されている (Valli *et al.*, 2017)。好発年齢は 9-10 歳で、好発に性別差はない。腫瘍はどこにでも発生するが、特に脾臓、右心房、皮膚等に多く発生する (Goldschmidt and Hendrick, 2002; Prymak *et al.*, 1988; Srebernik and Appleby, 1991)。非常に進行が速く、急速に浸潤、転移する。肉眼的には灰白色から赤黒色を呈し、脾臓では血腫様の結節を形成し、内部は出血・壊死がともなう。そのため血管肉腫が疑われた場合、複数部位から採材し組織学的評価を行うことが重要と考えられている。多中心的発生血管肉腫は、真に多中心的な発生なのか、原発腫瘍の転移なのかは議論が続いている (Sabattini and Bettini, 2008; Waters *et al.*, 1998)。一般に予後は悪く、血管肉腫と診断されたイヌの平均生存値はわずか 6 ヶ月である (Clifford *et al.*, 2000)。

これは血管肉腫が容易に転移すること、腫瘍の破裂による二次的急性内臓出血が原因である。組織学的には、腫瘍細胞は形態的变化に富み、紡錘形から多角形、卵円形を示し、小型から大型の内皮様細胞が一層または多層性に配列して血管腔をつくる。また低分化なものは、腫瘍細胞がシート状の配列を示し、血管腔の形成は不明瞭である。特に低分化なものは、線維肉腫や未分化肉腫など、他の間葉系腫瘍との鑑別が重要となる。血管肉腫の診断では、免疫組織化学染色において抗第Ⅷ因子関連抗体 (von Willebrand Factor, vWF)、抗 CD31 抗体 (PECAM) にたいして陽性反応を示すことが知られているが、多くの血管肉腫の症例で抗体に反応性が無く、また抗 vWF 抗体においてはリンパ管腫または他の肉腫において腫瘍の一部が陽性を示すことが知られている (Hoover *et al.*, 1993; Krump-Konvalinkova *et al.*, 2003; Masuzawa *et al.*, 1999)。

本節ではイヌの血管肉腫 43 症例について、従来 of イヌの血管肉腫の病理組織学的検討に用いられる抗 vWF 抗体、抗 CD31 抗体に加え、新たにイヌの血管肉腫の病理診断への有用性が示唆されている抗 Claudin-5 抗体およびヒトにおいて研究が進められている抗 Endothelin-1 抗体、また細胞増殖マーカーである抗 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 抗体を用いて免疫組織化学的検討を行い、病理組織学および免疫組織化学的にイヌの血管肉腫の特徴づけを行った。

## 材料・方法

1999 年から 2014 年までに血管肉腫と診断されたイヌ 43 症例を用いた。症例の犬種、年齢、性別、体重および採材部位は表 1-1 に示す。

摘出した組織は、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定、その後パラフィン切片を作成し、5-10 $\mu$ m に薄切した。一般染色としてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、特殊染色として渡辺鍍銀法を行った。

さらにデキストランポリマー法 (ENVISION 法) (Dako, Agilent Technologies, Tokyo) による免疫組織化学的検索を行った。使用した一次抗体は、表 1-2 に示す。抗原性の賦活化は、PBS により 10 倍希釈した pH6 または pH9 の Target Retrieval Solution (TRS) 緩衝液 (Dako) にパラフィン包埋切片を浸し、オートクレーブ (121 $^{\circ}$ C、20 分) により行った。0.3%過酸化水素メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った後、10 倍希釈した正常山羊血清にて 30 分間室温でインキュベートすることにより、ブロッキングを行った。その後一次抗体を滴下し、4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。二次抗体には ENVISION<sup>TM</sup>/HRP (Dako) を使用し、滴下後 30 分間室温にてインキュベートした。発色は DAB 発色基質溶液 (Dako) を用いて行い、対比染色にはメイヤー・ヘマトキシリン溶液を使用した。

## 結果

組織学的所見の結果は中心部に腫瘍細胞の増殖がみられ、その周囲には広範な壊死組織が認められた (図 1-1)。また組織の広範囲におよぶ激しい出血が認められた (図 1-2)。紡錘形から多形性を呈した腫瘍細胞は不規則な間隙や網目構造を形成し、増殖していた (図 1-3、1-4)。渡辺鍍銀法ではその間隙や管腔を中心とした、細網線維と膠原線維よりなる不完全な管腔形成が認められた (図



1-5、1-6)。

免疫組織化学的所見の結果は抗 Vimentin 抗体で全ての症例において強い反応性が認められた (図 1-7, 1-8)。抗 vWF 抗体は、8 症例が弱陽性であったが、41 症例で陽性反応が認められた (図 1-9、1-10)。しかし、2 症例は陰性であった。抗 CD31 抗体は、2 症例の弱陽性を含む 7 症例で陽性反応が認められたが (図 1-11、1-12)、36 症例は陰性であった (図 1-13)。抗 Claudin-5 抗体は、1 症例の弱陽性を含め 21 症例が陽性であり (図 1-14、1-15)、22 症例は陰性であった (図 1-16)。抗 Endothelin-1 抗体は 17 症例で陽性反応が認められたが、このうち 10 症例が弱陽性であり (図 1-17、1-18)、26 症例は陰性であった (図 1-19)。抗 PCNA 抗体は全症例で陽性反応が認められた (図 1-20、1-21、1-22)。

以上の免疫反応の結果および反応性の陽性率を表 1-3 および表 1-4 にそれぞれ示す。

## 考察

本研究では、イヌの血管肉腫の病理組織学的解析に用いられる抗 vWF 抗体、抗 CD31 抗体に加え、抗 Claudin-5 抗体および抗 Endothelin-1 抗体、また、細胞増殖マーカーである抗 PCNA 抗体を用いて、血管肉腫と診断された標本において免疫組織化学的検索を行った。

間葉系マーカーである抗 Vimentin 抗体を用いた反応はイヌの血管肉腫の全ての症例にて強い陽性像が認められたことから、全ての症例が間葉系腫瘍であることが確認された。

vWF は、血液凝固および血小板機能において重要な役割を果たしている構成要素の一つである。血管内皮や骨髄巨核球で産生され、血漿中や血管内皮下組織に存在する。本研究結果からは、抗 vWF 抗体を用いた反応はほぼ全ての症例で強い陽性像が認められたことから、病理診断への有用性が担保されたものと考えられる。

CD31 蛋白質は血管内や内皮細胞に存在し、血管肉腫において抗 CD31 抗体による反応で高い陽性率を示すとされている (Valli *et al.*, 2017) が、本研究では強い反応性を示す症例も存在したが陽性率は低いものであった。従来の結果と異なる点については更なる検索が必要と考えられた。

Claudin-5 は血管内皮細胞のタイトジャンクションに関連するタンパクである。今回、抗 Claudin-5 抗体による反応は約半数の症例で陽性が認められたため、病理学的診断の補助的マーカーとして用いることができると考えられた。

Endothelin-1 は血管内皮由来のペプチドであり、ヒトの血管肉腫の診断において研究が進められている (Ferrer *et al.*, 1995)。抗 Endothelin-1 抗体は 43 症例中 17 症例が陽性であったが、陽性反応が他の抗体に比べて弱いうえに、半数以上の症例が弱陽性を示した。また、特異性が低く腫瘍細胞以外での反応も多くみられたため、イヌの血管肉腫の病理学的診断には有用性は低いと考えられた。

## 小括

イヌの血管肉腫 43 症例について、種々の抗体の腫瘍マーカーとしての有用性を免疫組織化学的に検討した。その結果、抗 vWF 抗体は血管内皮由来の腫瘍細

胞の検出に、抗 Claudin-5 抗体は補助的なマーカーとして、更に抗 PCNA 抗体は腫瘍細胞の増殖活性の指標として有用であることが示された。抗 CD31 抗体および抗 Endothelin1 抗体は反応性が不安定で、イヌにおける腫瘍マーカーとしての有用性は低いと考えられた。

表 1-1. 血管肉腫症例の犬種、年齢、性別、体重、採材部位

No	犬種	年齢	性別	体重	臓器
1	雑種	NA	NA	NA	右大腿
2	DB	2.9	♀	NA	肝臓
3	GR	8	♂	29	右心室
4	MS	NA	NA	NA	肝臓,脾臓
5	AM	8.4	♂	49.55	脾臓,腹膜
6	FCR	NA	NA	NA	脾臓,大網
7	SD	13.1	♀	NA	心臓
8	GR	NA	NA	NA	脾臓
9	HU	NA	NA	NA	腹膜
10	SH	NA	NA	NA	脾臓
11	GR	NA	NA	NA	脾臓
12	SZ	8	♀	5.45	右後肢
13	GR	NA	NA	NA	腹膜
14	GR	NA	NA	NA	脾臓
15	DHM	NA	NA	NA	脾臓
16	Mix	NA	NA	NA	腰部皮膚
17	SID	NA	NA	NA	脾臓
18	GR	NA	NA	NA	左指
19	FCR	NA	NA	NA	脾臓
20	AH	NA	NA	NA	会陰
21	BZ	NA	NA	NA	左上腕骨
22	FCR	NA	NA	NA	脾臓
23	GR	11	♀	NA	脾臓
24	NA	5	♂	NA	脾臓
25	FCR	3	♂	NA	脾臓
26	GR	11	♀	NA	脾臓
27	Mix	12	♀	NA	脾臓
28	BZ	10	♂	NA	脾臓
29	DA	10	♀	NA	脾臓
30	SID	9	♂	NA	脾臓
31	GR	9	♂	NA	脾臓
32	DHM	13	♀	NA	脾臓
33	GR	11	♂	NA	脾臓
34	PP	11	♀	NA	脾臓
35	NA	14	♂	NA	脾臓
36	WP	11.2	♂	14.3	脾臓
37	YT	10.9	♂	5.2	脾臓
38	BT	NA	NA	NA	骨盤腔
39	DHM	14	♂	11.34	脾臓
40	PP	NA	NA	NA	脾臓
41	FB	NA	NA	NA	脾臓
42	Mix	8	♂	14	脾臓
43	DHM	NA	NA	NA	脾臓

NA: No Applicable、年齢: 歳.月、性別: 去勢避妊(取消線)、体重: kg

犬種: 雑種(Mix)、ドーベルマン(DB)、ゴールデンレトリバー(GR)、ミニチュアシュナウザー(MS)、アラスカンマラミュート(AM)、フラットコーテッドレトリバー(FCR)、シェットランドシープドック(SD)、シベリアンハスキー(HU)、ジャーマンシェパード(SH)、シーズー(SZ)、ミニチュアアダックス(DHM)、柴犬(SID)、アフガンハウンド(AH)、ボルゾイ(BZ)、ダルメシアン(DA)、パピヨン(PP)、ウェルシュコーギー(WP)、ヨークシャーテリア(YT)、ベルジアンターピュレン(BT)、フレンチブルドック(FB)

表 1-2. 本研究に用いた一次抗体

Antibody	Animal & Clonality	Dilution	Source
Vimentin	Mouse monoclonal	Diluted	Dako
vWF	Mouse monoclonal	1:1500	Dako
CD31	Mouse monoclonal	1:50	Dako
Claudin-5	Mouse monoclonal	1:100	Abcam
Endothelin-1	Mouse monoclonal	1:100	Peptide
PCNA	Mouse monoclonal	1:200	Dako

Nichirei: Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan

Dako: Dako Agilent Technologies Japan, Tokyo, Japan

Peptide: Peptide Institute INC, Osaka, Japan

表 1-3. イヌの血管肉腫 43 症例の免疫染色の結果

No	Vim	vWF	CD	CL	EDN	PCNA
1	+	+	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	+
3	+	+	-	-	-	+
4	+	+	-	-	-	+
5	+	+	-	-	+	+
6	+	+	-	-	-	+
7	+	+	-	-	±	+
8	+	+	-	+	±	+
9	+	+	-	-	±	+
10	+	+	-	+	-	+
11	+	+	-	+	-	+
12	+	+	-	-	-	+
13	+	+	-	-	-	+
14	+	+	-	+	-	+
15	+	±	-	-	-	+
16	+	+	-	-	-	+
17	+	+	-	-	-	+
18	+	+	-	-	+	+
19	+	+	-	+	-	+
20	+	+	-	-	-	+
21	+	±	-	-	-	+
22	+	+	-	-	-	+
23	+	±	±	+	+	+
24	+	+	+	+	-	+
25	+	±	-	-	+	+
26	+	+	+	±	+	+
27	+	+	-	+	-	+
28	+	-	-	+	±	+
29	+	±	+	+	-	+
30	+	+	-	+	-	+
31	+	±	+	+	±	+
32	+	+	-	+	±	+
33	+	+	-	+	-	+
34	+	-	-	+	±	+
35	+	±	-	+	±	+
36	+	+	-	+	-	+
37	+	+	+	-	+	+
38	+	+	±	-	±	+
39	+	+	-	+	-	+
40	+	+	-	+	±	+
41	+	+	-	-	-	+
42	+	+	-	+	+	+
43	+	±	-	-	-	+

Vim:Vimentin、CD:CD31、CL:Claudin-5、EDN:Endothelin-1.

+ : 陽性、± : 弱陽性、- : 陰性.

表 1-4. 免疫反応の比率 (%)

比率	Vim	vWF	CD	CL	EDN	PCNA
+	100	76.7	4.7	46.5	16.2	100
±	0	18.6	4.7	0.23	23.2	0
-	0	2.3	83.7	51.5	61.0	0

イヌ血管肉腫 43 症例における陽性、弱陽性および陰性の割合をパーセントで示した.

Vim: Vimentin、CD: CD31、CL: Claudin-5、EDN: Endothelin-1.

+ : 陽性、± : 弱陽性、- : 陰性.

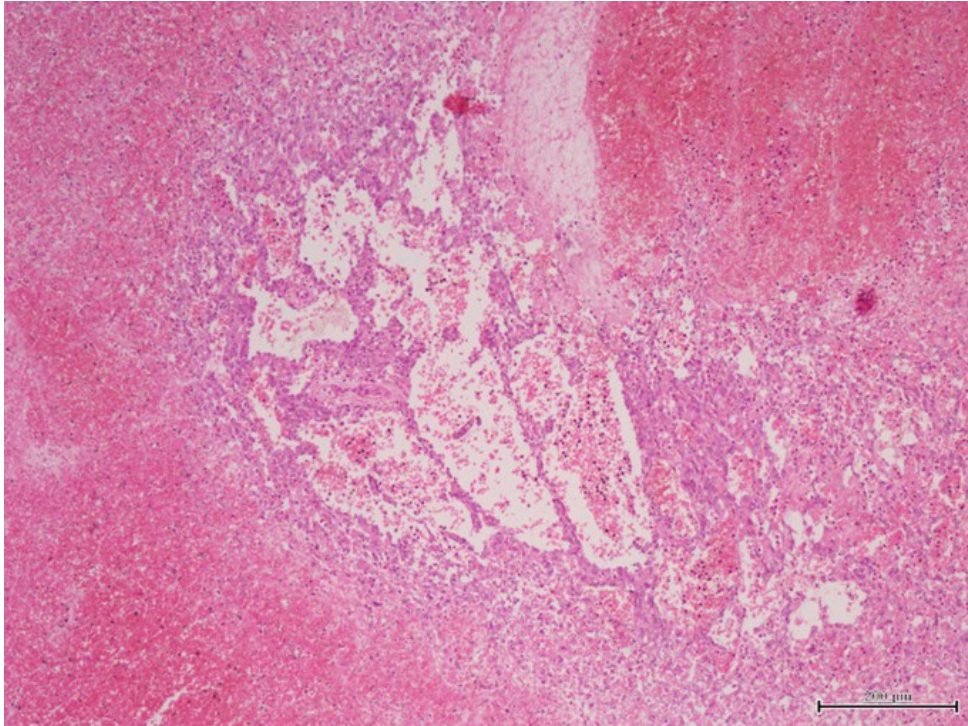


図 1-1. 症例 14 における HE 染色像. 腫瘍細胞の周囲に広範な壊死が認められる. Bar = 200  $\mu$ m

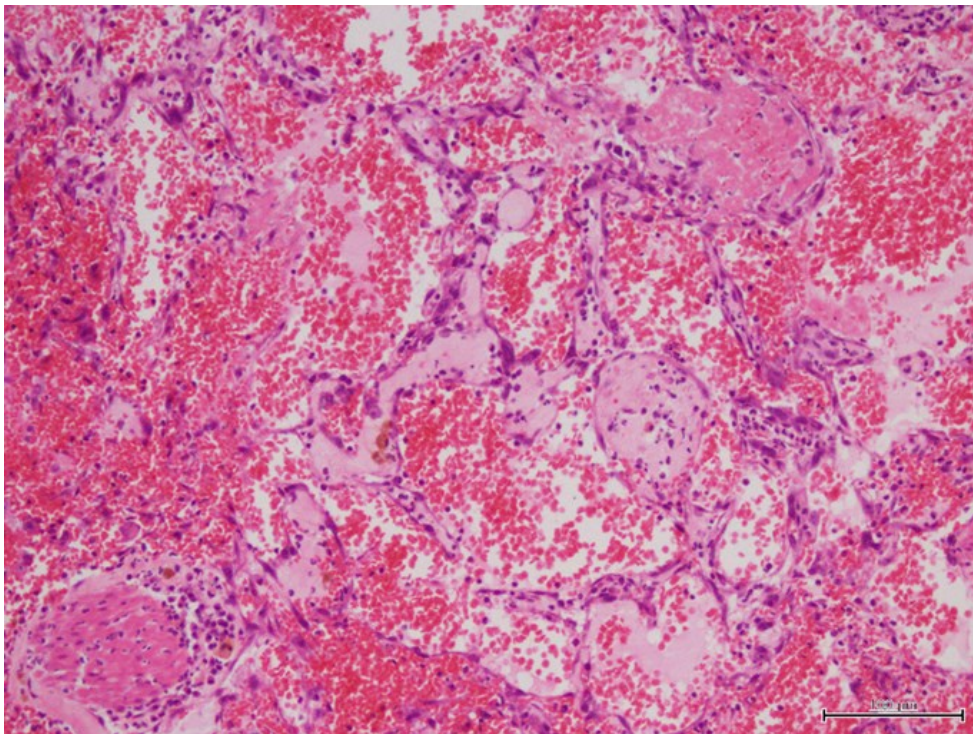


図 1-2. 症例 10 における HE 染色像. 広範囲に激しい出血が認められる. Bar = 100  $\mu$ m



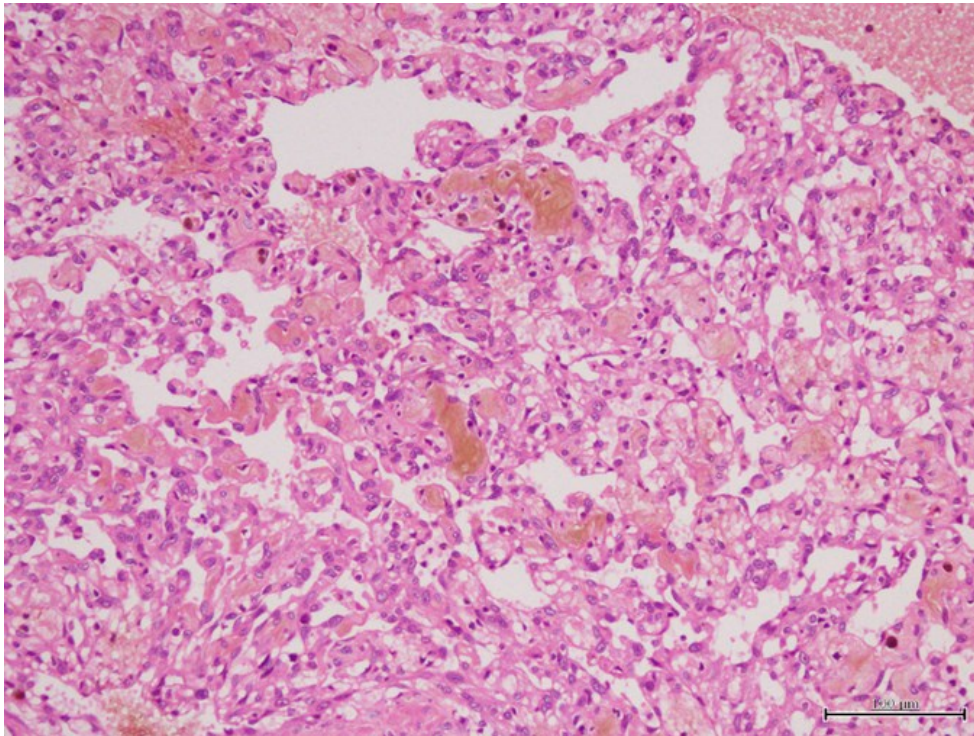


図 1-3. 症例 39 における HE 染色像. 紡錘形の腫瘍細胞に裏打ちされた不規則な間隙が認められる. Bar = 100  $\mu$ m

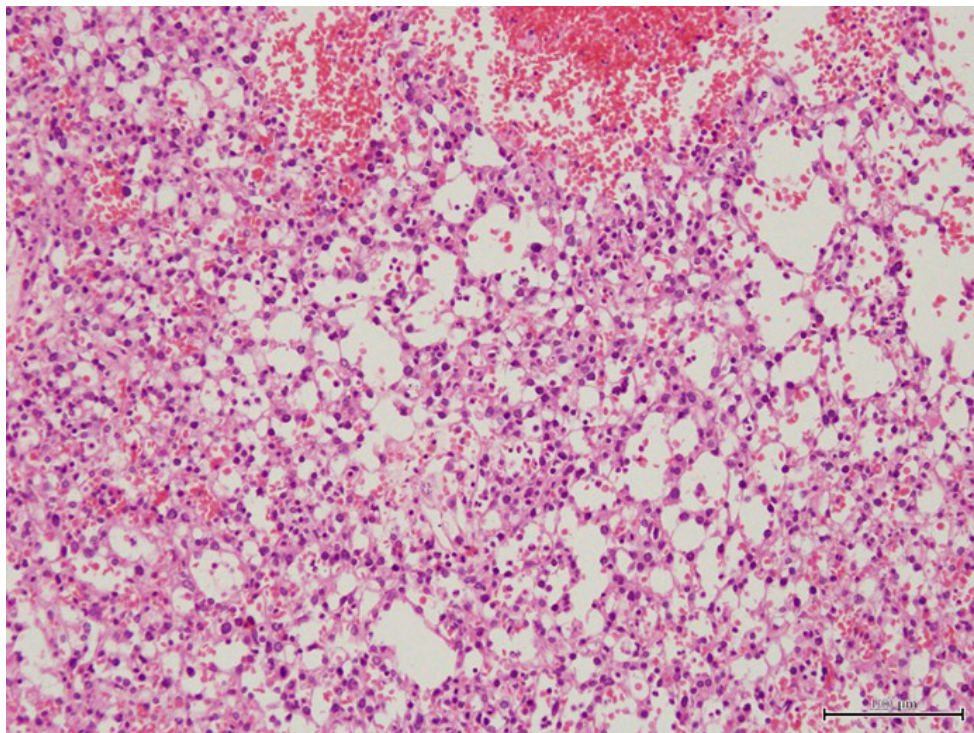


図 1-4. 症例 13 における HE 染色像. 紡錘形から多形性を呈する腫瘍細胞が網目構造を形成している. Bar = 100  $\mu$ m

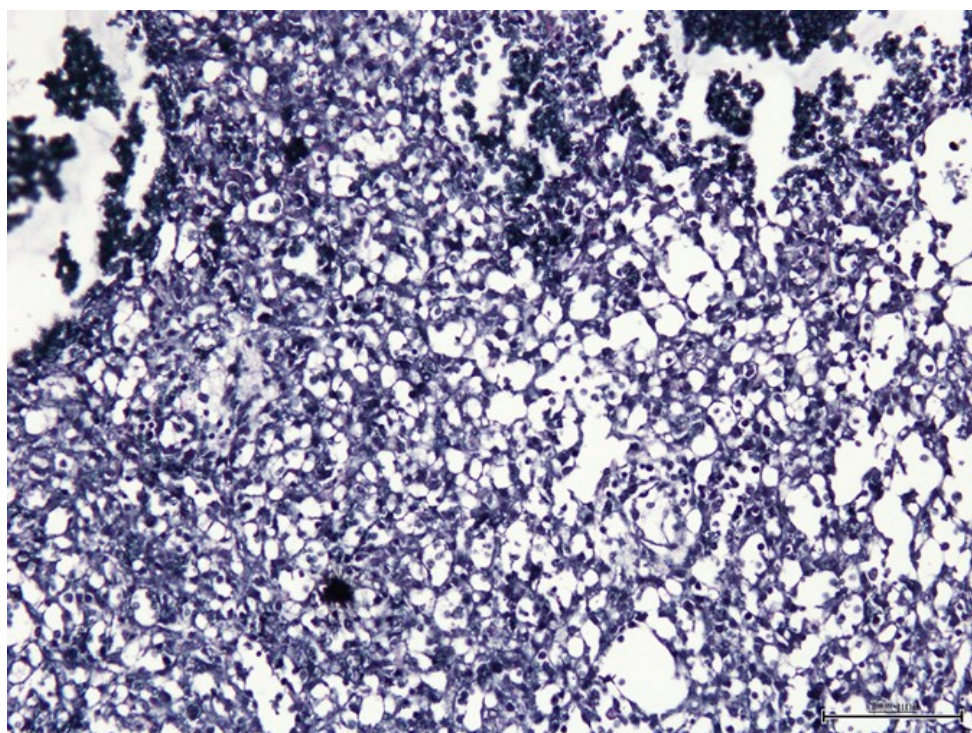


図 1-5. 症例 13 における渡辺鍍銀染色像. 細網線維と膠原線維よりなる不完全な管腔形成が認められる. Bar = 100  $\mu$ m

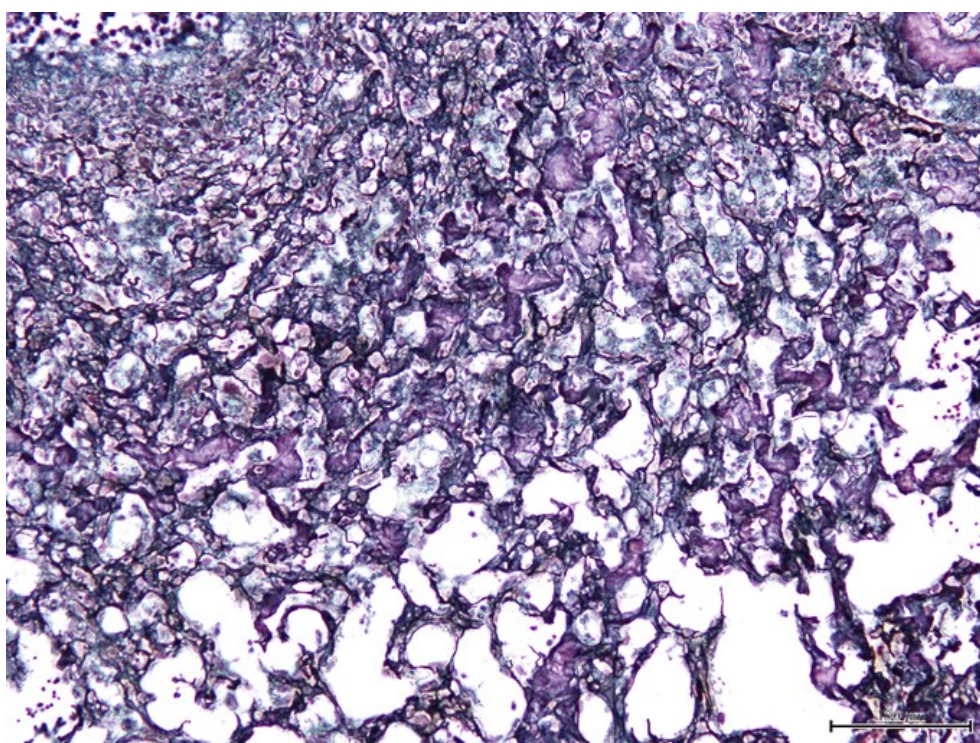


図 1-6. 症例 11 における渡辺鍍銀法染色像. 細網線維と膠原線維よりなる不完全な管腔形成が認められる. Bar = 100  $\mu$ m

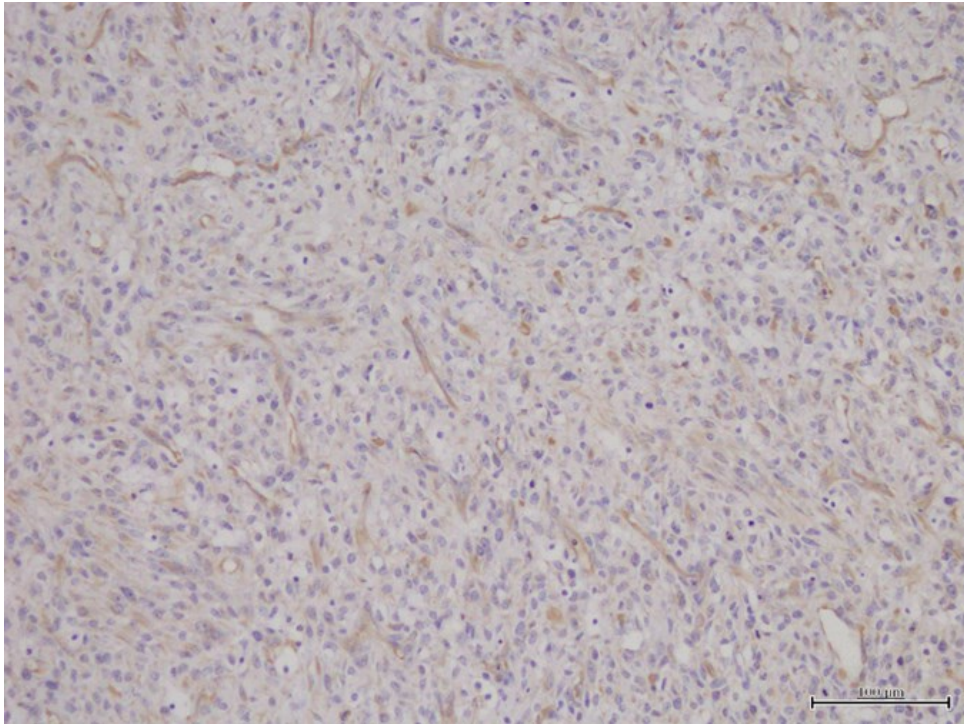


図 1-7. 症例 20 における紡錘形腫瘍細胞の細胞質に認められた抗 Vimentin 抗体陽性像. Bar = 100  $\mu$ m

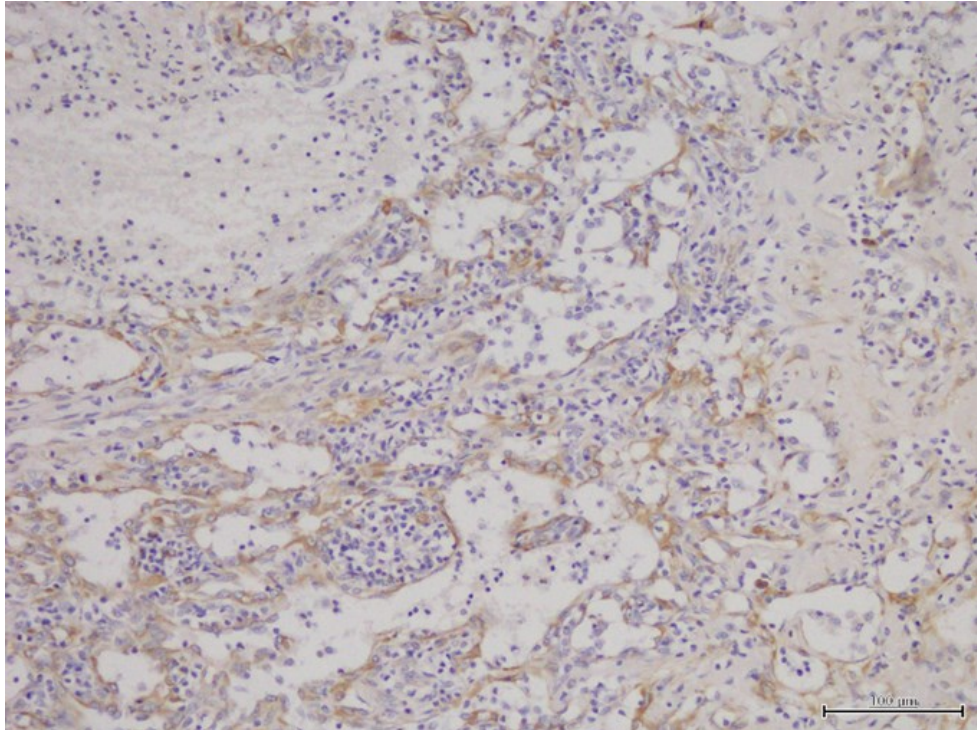


図 1-8. 症例 40 における不完全な管腔を形成する腫瘍細胞に認められた抗 Vimentin 抗体陽性像. Bar = 100  $\mu$ m

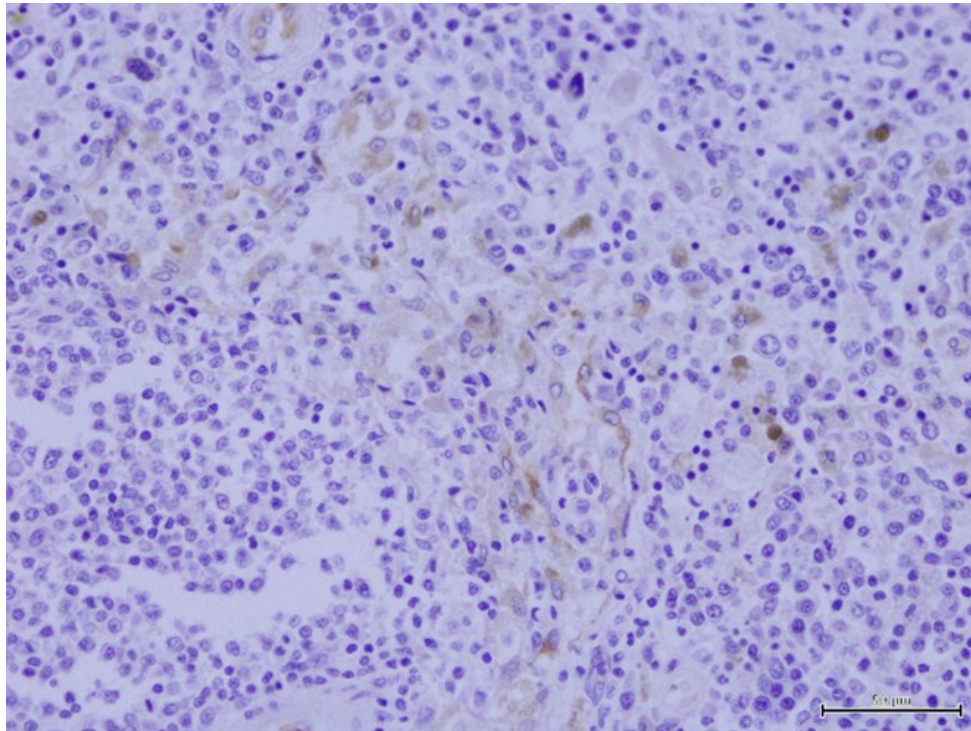


図 1-9. 症例 14 における紡錘形腫瘍細胞の細胞質に認められた抗 vWF 抗体陽性像. Bar = 50 μm

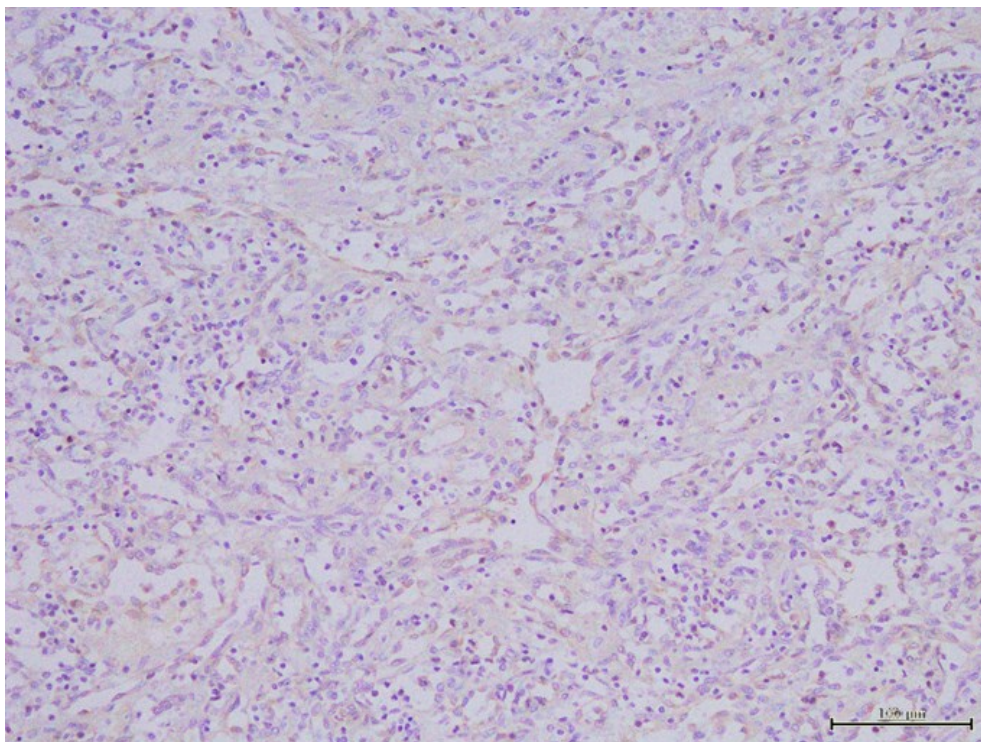


図 1-10. 症例 40 における間隙を形成する腫瘍細胞に認められた抗 vWF 抗体陽性像. Bar = 100 μm

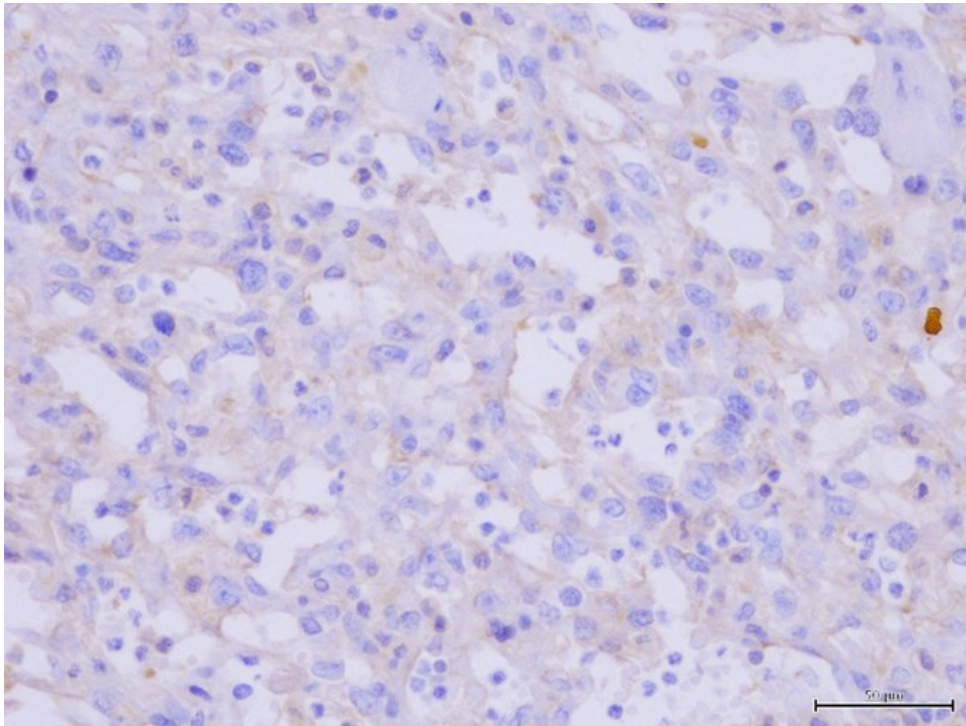


図 1-11. 症例 37 における管腔を形成する腫瘍細胞に認められた抗 CD31 抗体陽性像. Bar = 50  $\mu$ m

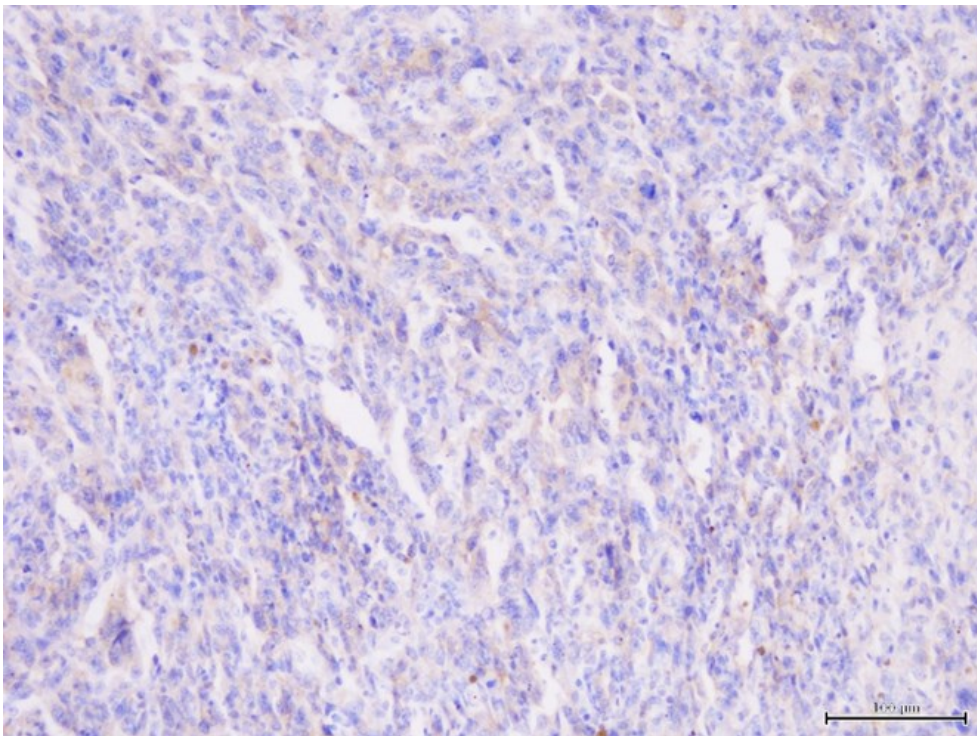


図 1-12. 症例 23 における腫瘍細胞の細胞質に認められた抗 CD31 抗体弱陽性像. Bar = 100  $\mu$ m

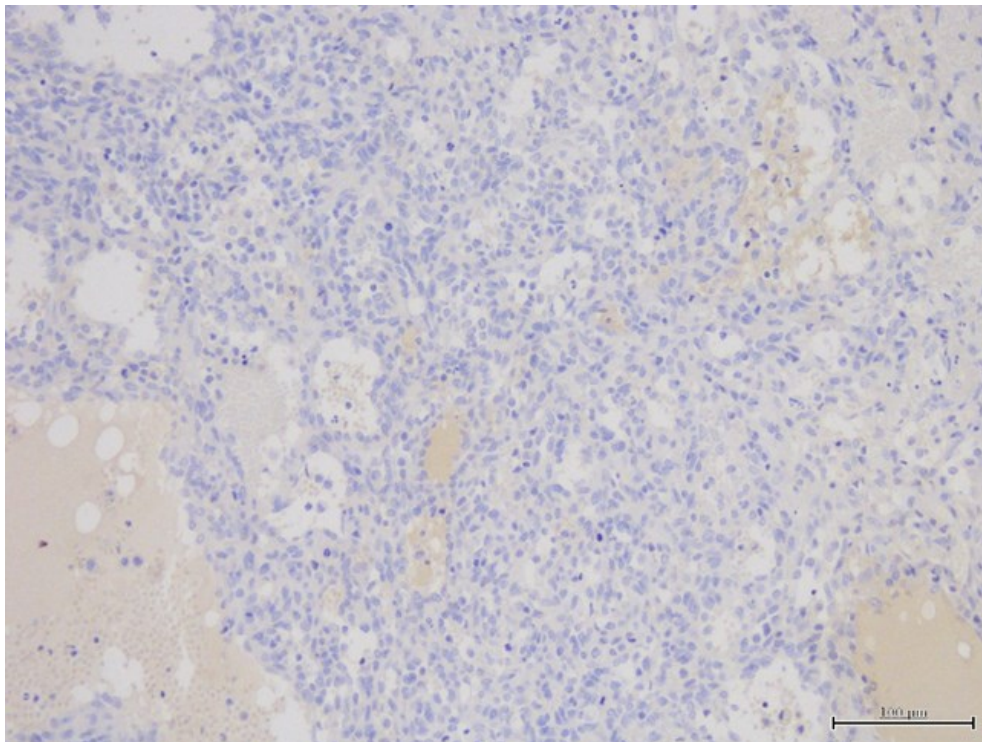


図 1-13. 症例 36 における抗 CD31 抗体陰性像. Bar = 100  $\mu$ m

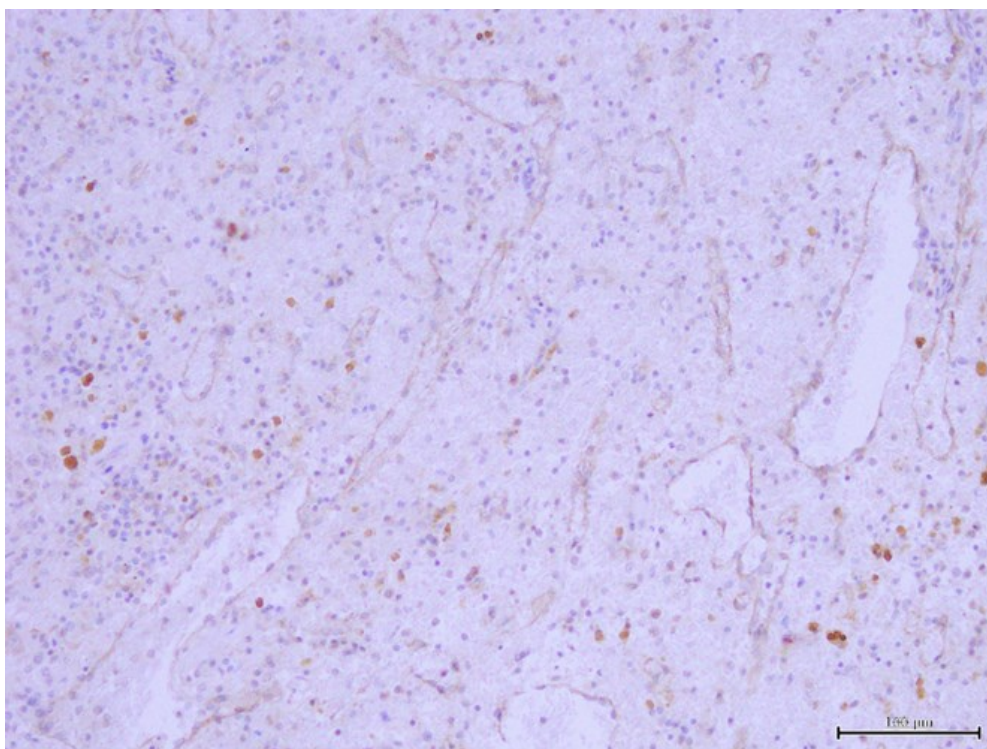


図 1-14. 症例 10 における管腔を形成する腫瘍細胞に認められた抗 Claudin-5 抗体陽性像. Bar = 100  $\mu$ m

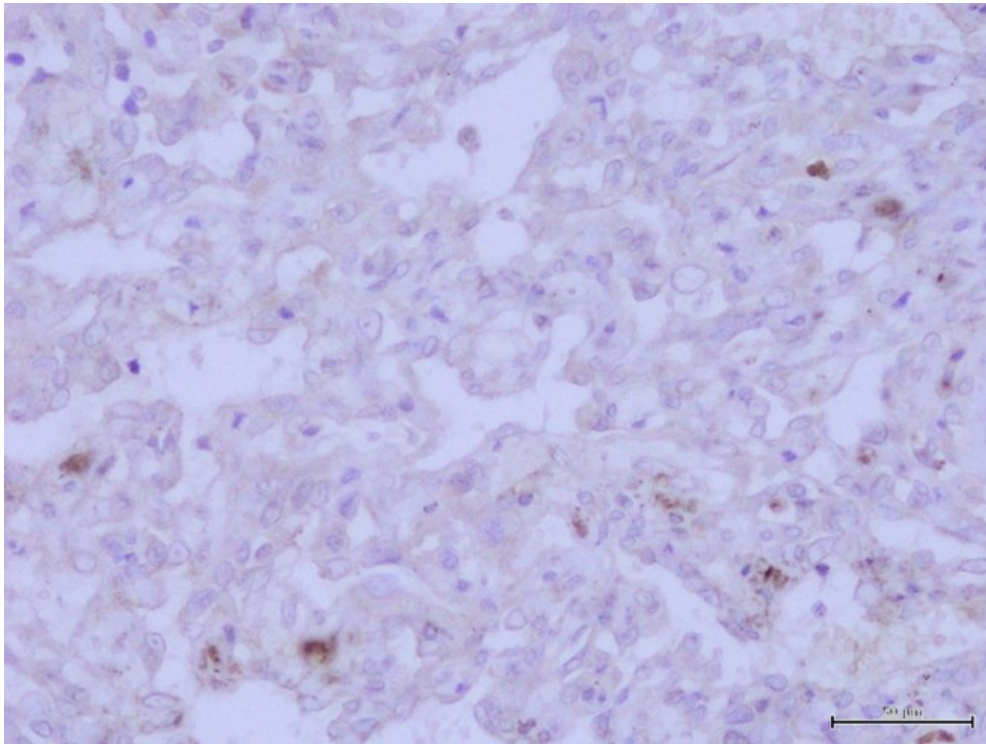


図 1-15. 症例 39 における間隙を形成する腫瘍細胞に認められた抗 Claudin-5 抗体陽性像. Bar = 50  $\mu$ m

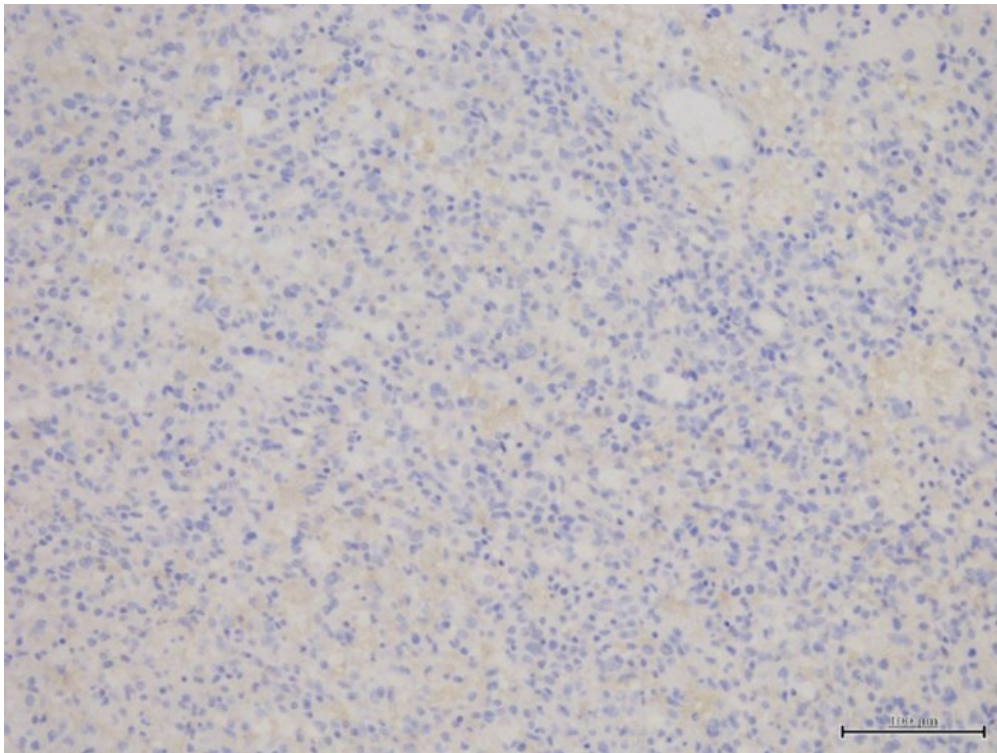


図 1-16. 症例 13 における抗 Claudin-5 抗体陰性像. Bar = 100  $\mu$ m

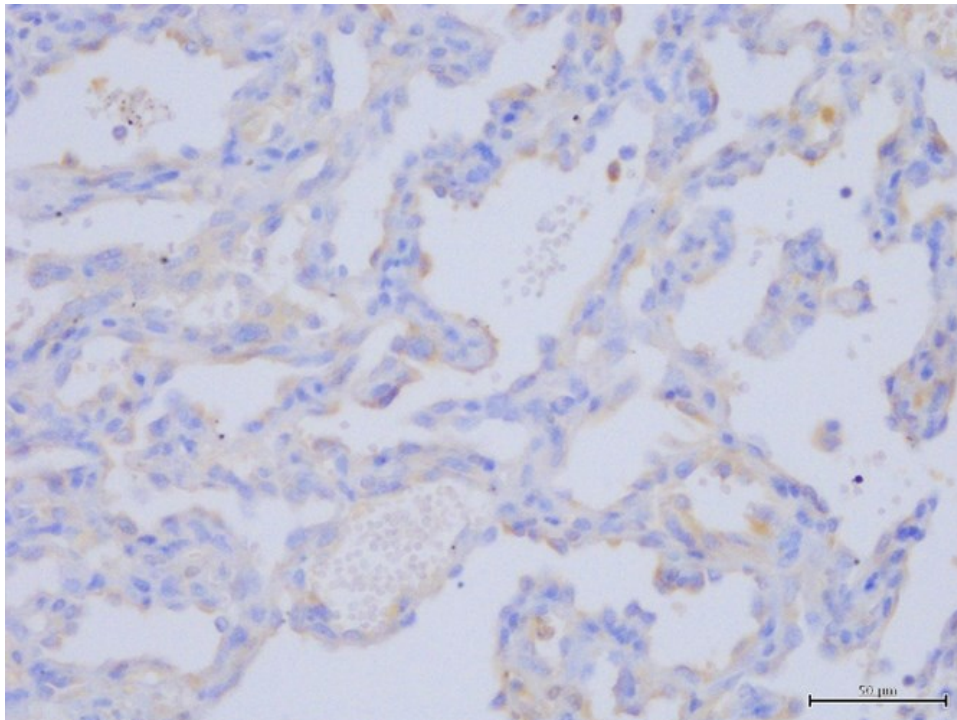


図 1-17. 症例 34 における間隙を形成する腫瘍細胞に認められた抗 Endothelin-1 抗体弱陽性像. Bar = 50  $\mu$ m

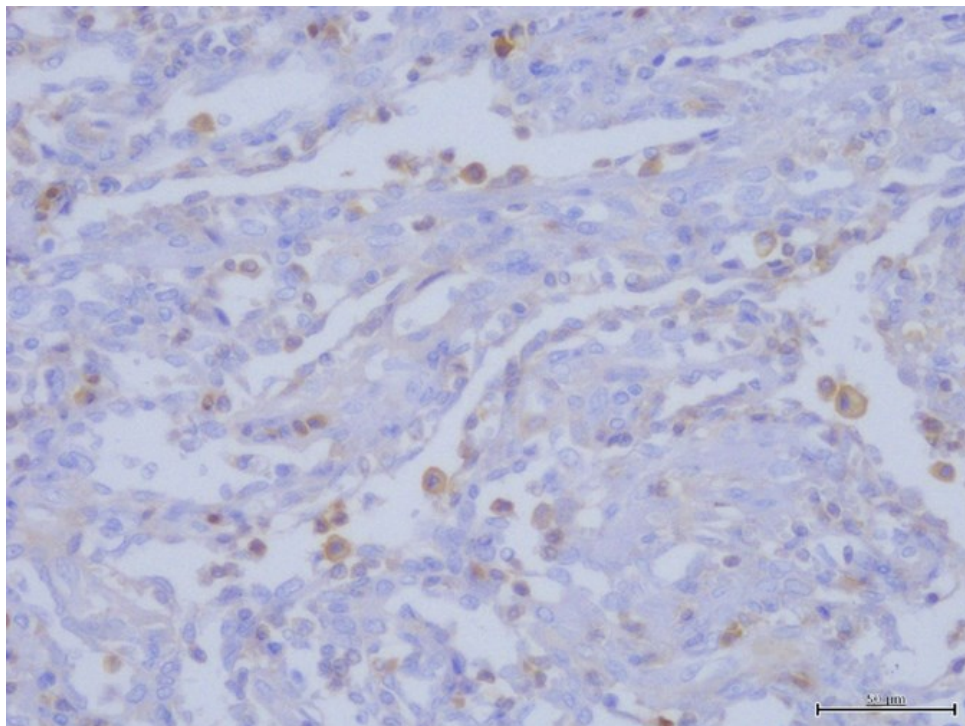


図 1-18. 症例 40 における間隙を形成する腫瘍細胞に認められた抗 Endothelin-1 抗体弱陽性像. 非特異反応が認められる. Bar = 50  $\mu$ m



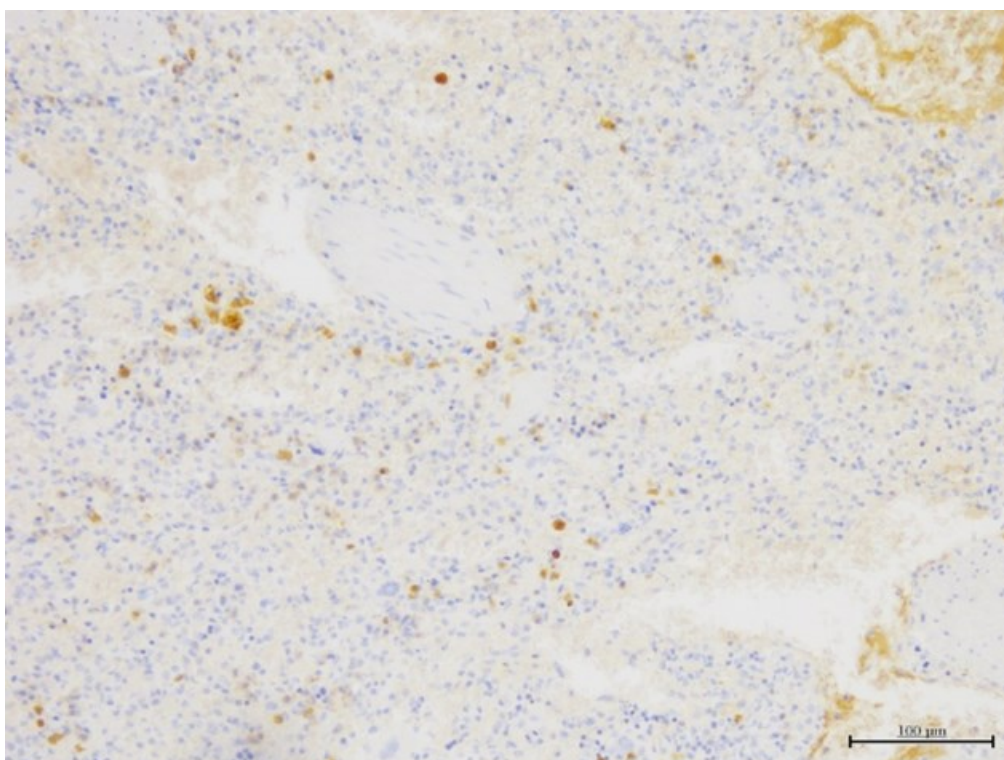


図 1-19. 症例 10 における抗 Endothelin-1 抗体陰性像. Bar = 100  $\mu$ m

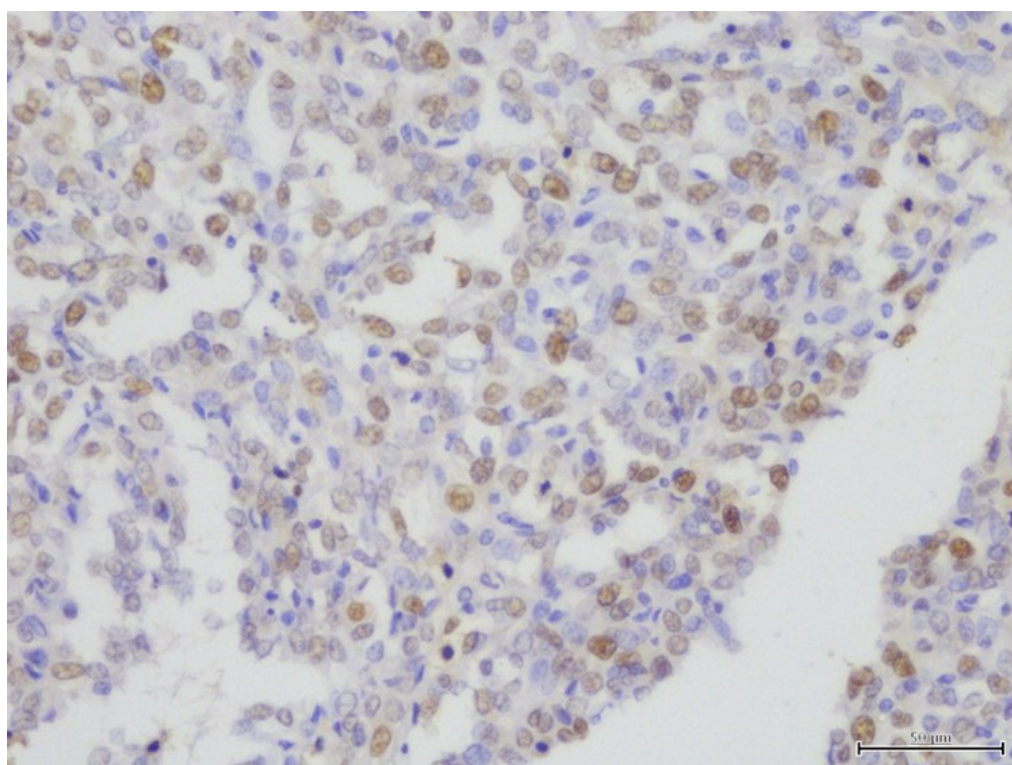


図 1-20. 症例 28 における腫瘍細胞の核に認められた抗 PCNA 抗体陽性像. Bar = 50  $\mu$ m

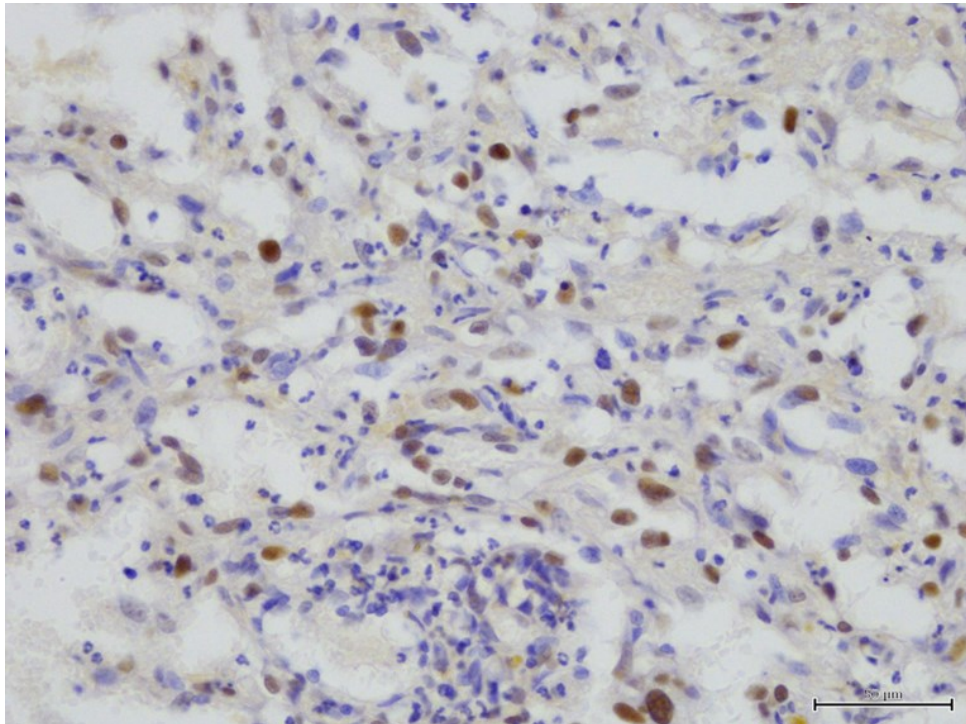


図 1-21. 症例 37 における腫瘍細胞の核に認められた抗 PCNA 抗体陽性像. Bar = 100  $\mu\text{m}$

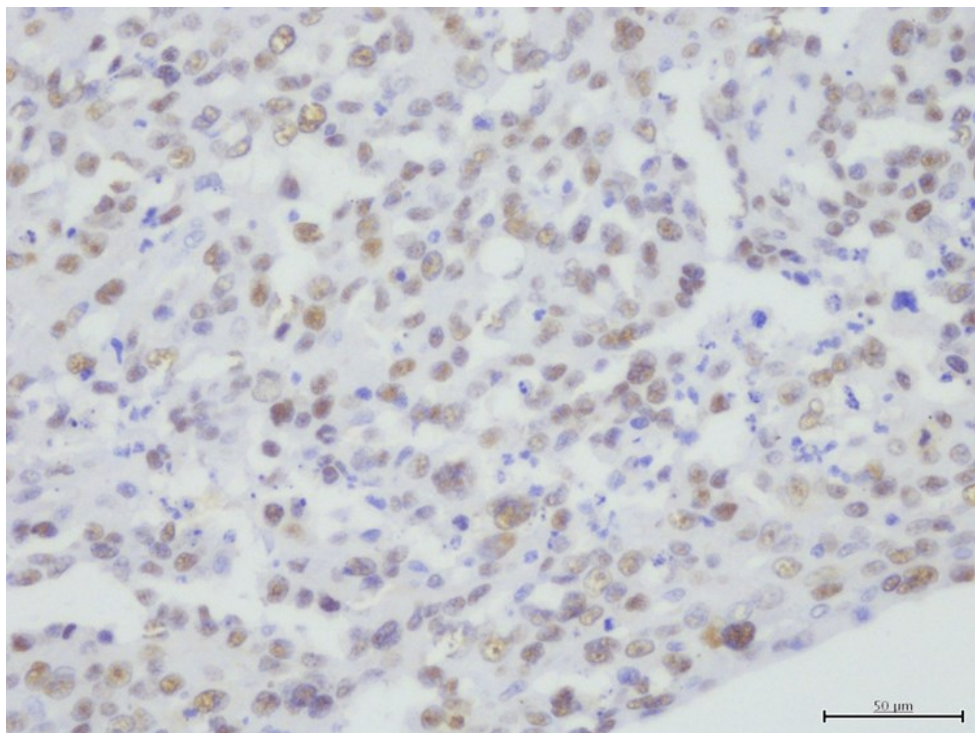


図 1-22. 症例 23 における腫瘍細胞の核に認められた抗 PCNA 抗体陽性像. Bar = 50  $\mu\text{m}$

## 第 2 節 イヌの血管肉腫の分化度における病理組織学的および免疫組織化学的所見の関連性に関する検討

### はじめに

イヌにおいて、血管肉腫は転移性、浸潤性の高い悪性腫瘍として組織学的グレード分類は考慮しないのが一般的である。しかしながら、積極的な対処あるいは治療報告において、予後の変化、すなわち生物学的性状の相違が示唆されている (Valli et al., 2017)。これらを踏まえ本節では、血管肉腫において組織形態学的、免疫組織化学的に差異が認められるか、また、それらに相関性が存在するかについて検索した。血管肉腫と診断された 32 症例を形態学的特徴や腫瘍細胞の増殖、核の異型性を評価し、さらに免疫組織化学的に vWF および CD31 の発現との関連性を検討した。

### 材料・方法

1998 年から 2008 年にかけて本獣医学病理学研究室に送付され、病理学的診断で血管肉腫と診断された 32 症例を用いた。また犬種ではゴールデンレトリバー (11 症例)、雑種 (3 症例)、シェットランドシープドッグ (2/症例)、フラットコーデッドレトリバー (2 症例)、ミニチュア・シュナウザー (2 症例)、1 症例のみのその他の犬種 (12 症例) という内訳であった。年齢は 3 歳～15 歳 (平均は 8.7 歳)、性別は雄 14 症例、雌 17 症例、不明 1 症例 (ただし去勢や避妊の症例も含む) であった。

症例はすべて 10%ホルマリン緩衝液で固定され、パラフィンに包埋後、0.5 $\mu$ m に薄切したものにヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色、渡辺鍍銀法および免疫組織化学染色を行った。

免疫組織化学染色は酵素ポリマー法 (N-Histofine® Simple Stain<sup>TM</sup>、Nichirei) を使い、一次抗体は抗 Vimentin 抗体 (Dako、希釈済)、抗 vWF 抗体 (Dako、1:1500 希釈)、抗 CD31 抗体 (Dako、1:50 希釈) を用いた。切片は、pH9 賦活化液でオートクレーブ 20 分 (ただし、抗 Vimentin 抗体においては pH6 賦活化液を用いた)、前処理後、内因性ペルオキシダーゼの賦活化として 0.3%過酸化水素/メタノールに 20 分 (抗 Vimentin 抗体においては 30 分) 浸し、牛血清でブロッキング 30 分後、4°Cで一晩一次抗体と反応させ、その後 PBS で洗浄を行った。二次抗体のポリマー試薬 30 分の反応後、洗浄し DAB にて発色させた。

血管肉腫の組織標本は HE 染色および渡辺鍍銀法において、組織全体の所見をスコア 1-3 に分類し、1 を高分化型、2 を中程度の分化型、3 を低分化型とした。また、核の所見もスコア 1-3 に分類し、1 を低異型性、2 を中程度異型性、3 を高異型性と分類した (表 2-1)。

免疫組織化学染色では、陽性コントロールに正常な皮膚および陽性確認済血管肉腫を、また、陰性コントロールには肺腺腫を用いた。各マーカーの発現強度の評価は、スコアを 0-3 に分類し、0 は無発現、1 は弱発現、2 は中程度発現、3 は強発現が認められるものと判定した。

## 結果

対象とした 32 症例において、組織学的に組織の所見を総合的にみた分化度では、スコア 1（高分化型）は 12 症例（図 2-1、2-2、2-6）、スコア 2（中程度分化型）は 12 症例（図 2-3）、スコア 3（低分化型）は 8 症例（図 2-4、2-5、2-7）であった。また、核の所見では 1（低異型性）が 12 症例、2（中程度異型性）が 10 症例、3（高異型性）が 10 症例であった。

免疫組織化学染色の結果は、血管肉腫は抗 Vimentin 抗体に全て陽性を示した（図 2-8）。血管肉腫の症例における評価はスコア 0 が 0 症例、スコア 1 が 3 症例、スコア 2 が 20 症例、スコア 3 が 9 症例であった。また、抗 CD31 抗体との反応の陽性または陰性についての評価は、スコア 0 が 17 症例、スコア 1 が 9 症例、スコア 2 が 3 症例、スコア 3 が 3 症例であった（図 2-9、2-10、2-11）。抗 vWF 抗体との反応の陽性または陰性については、スコア 0 が 4 症例、スコア 1 が 9 症例、スコア 2 が 9 症例、スコア 3 が 7 症例、また判定不可が 3 症例であった（図 2-12）。表 2-2 に解析した血管肉腫 32 症例の組織学的グレード分類および核の所見と免疫染色結果をまとめた。

## 考察

イヌの血管系腫瘍における好発年齢は 9 歳齢以上であることが報告されており（Prymak *et al.*, 1988; Srebernik, 1991）、今回の研究による発症年齢の平均値は 8.7 歳（n=32、3-15 歳）とほぼその範囲に含まれていた。また好発犬種としてはジャーマンシェパードやゴールデンレトリバーが知られている（Bettini, 2001; Srebernik, 1991）。本研究結果でもゴールデンレトリバー（11/32）に多く発症が

認められたが、雑種を含む他の犬種では特に大きな好発傾向は認められなかった。性別については明瞭な差はこれまで報告がされていないが、本研究では雄と雌の比率は 14:17 であり、雌がやや多かった。ただし去勢や避妊症例も含むため、性差があるかは不明であった。

組織学的には、HE 染色における組織学的所見の評価は、高分化は 12 症例、中程度の分化は 12 症例、低分化は 8 症例であることから、中程度から低分化である血管肉腫が半分以上を占めることがわかった。すべての症例における組織学形態は構築、核異型ともに低分化な腫瘍が多かったが、明らかな形態学的差異が示された。これらの相違が臨床症状、治療法また予後の腫瘍動向に関連があるか精査が必要である。

免疫組織化学染色の結果として、血管肉腫は抗 Vimentin 抗体にすべて陽性を示した。しかしながら、血管肉腫の症例における評価は、スコア 0 が 0 症例、スコア 1 が 3 症例、スコア 2 が 20 症例、スコア 3 が 9 症例であったことから、腫瘍の分化度と Vimentin の発現強度に明らかな関連性は認められなかった。一方、抗 CD31 抗体の反応性においては差が認められ、評価はスコア 0 が 17 症例、スコア 1 が 9 症例、スコア 2 が 3 症例、スコア 3 が 3 症例であったことから、腫瘍の分化度の高いものほど CD31 の発現は認められず、分化度の低いほど発現が顕著であった。この結果は以前の報告と一致したものであった (Ferrer *et al.*, 1995)。CD31 は PECAM-1 としても知られており、細胞接着分子として機能のほか血小板の活性化と凝集に関与している (DeLisser *et al.*, 1994)。このことより血管肉腫と血栓形成を関連付ける因子の可能性が推察された。抗 vWF 抗体に

においては陽性が高い比率を示し、スコア 0 が 4 症例、スコア 1 が 9 症例、スコア 2 が 9 症例、スコア 3 が 7 症例であり、また判定不可が 3 症例であった。腫瘍マーカーとしての重要性が再確認できたものの、腫瘍の分化度と vWF の発現強度に明らかな関連性は認められなかった。

以上の結果より、血管肉腫の診断として、好発犬種や性別は診断の一助とはなるが、必ずしも特徴的とは言えず、組織学的診断が重要であると考えられた。しかし、免疫組織化学的診断においては、従来腫瘍マーカーとして有用とされている抗 vWF 抗体および抗 CD31 抗体は、限られた条件でのみ有用であり、結果については注意を要すると考えられた。HE 染色の標本において、顕著に血管肉腫の所見が認められた場合には、鍍銀染色による細網線維の観察、および抗 vWF 抗体による免疫組織化学染色は有用である。しかし、低分化な血管肉腫の場合、HE 染色や鍍銀染色標本による診断だけではなく、抗 CD31 抗体による免疫組織化学染色も行うべきである。しかしながら、低分化な血管肉腫であっても、必ずしも抗 CD31 抗体に陽性を示すとは限らず、総合的な診断が不可欠と考えられた。

## 小括

本研究では、イヌの血管肉腫において組織形態学的な差異が存在することを示した。しかしながら、抗 vWF 抗体の反応性と形態との関連性は認められなかった。一方、CD31 の発現では腫瘍分化度において半定量的ではあるが差が認められることが明らかになり、イヌの血管肉腫の生物学的性状を特徴付ける上で

も重要と思われる。



表 2-1. 血管肉腫の組織学的グレード分類、および核の所見

スコア	総合的に見た分化度	核の所見（異型性）
1	高分化な腫瘍。 多数の不規則な血管腔を伴う。	核の変化の程度（大きさと形態）は最少。
2	中分化な腫瘍細胞が腫瘍の少なくとも 50%を占める。また、境界明瞭な血管腔 をつくる。	中程度の大きさと形態の変化。
3	未分化、低分化な腫瘍細胞。 堅固な腫瘍（充実性）。血管形成はわ ずか。	核の大きさや形態の変化は著しい核の大 きさは2倍かそれ以上。形態は腫瘍細胞間 で違いがある。

表 2-2. 血管肉腫 32 症例の組織学的グレード分類および核の所見と免疫染色結果

No.	分化度	核異型	vWF	CD31	No.	分化度	核異型	vWF	CD31
1	3	3	1	3	17	3	3	3	3
2	3	3	2	0	18	1	1	3	0
3	3	3	0	0	19	2	3	2	1
4	1	1	1	0	20	2	3	1	1
5	3	2	0	2	21	1	2	2	0
6	1	1	0	1	22	2	2	2	1
7	3	3	3	3	23	2	2	-	0
8	3	3	1	2	24	1	2	2	0
9	1	1	2	1	25	1	1	2	0
10	2	2	3	1	26	1	1	1	0
11	2	3	2	2	27	1	1	2	0
12	2	1	1	0	28	2	2	-	1
13	1	1	-	1	29	1	1	0	0
14	1	1	1	1	30	1	1	3	0
15	2	2	1	0	31	2	2	3	0
16	3	3	1	0	32	2	2	3	0

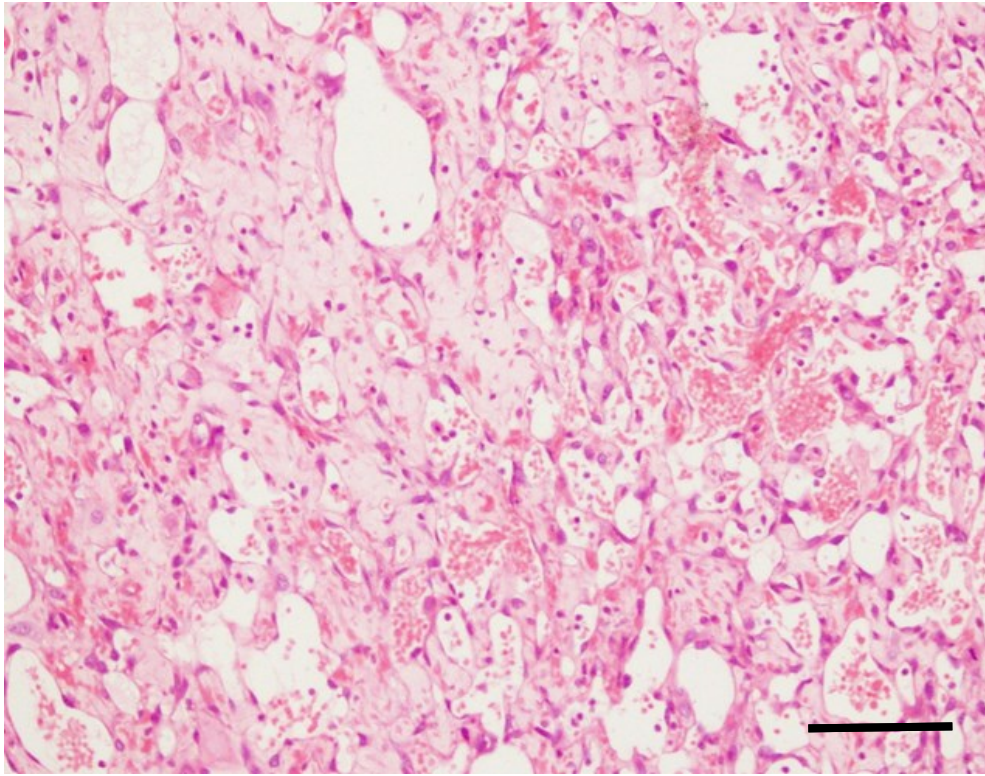


図 2-1. 症例 13 における高分化型の血管肉腫像. 組織学的評価スコア 1. HE 染色. Bar = 200  $\mu$ m

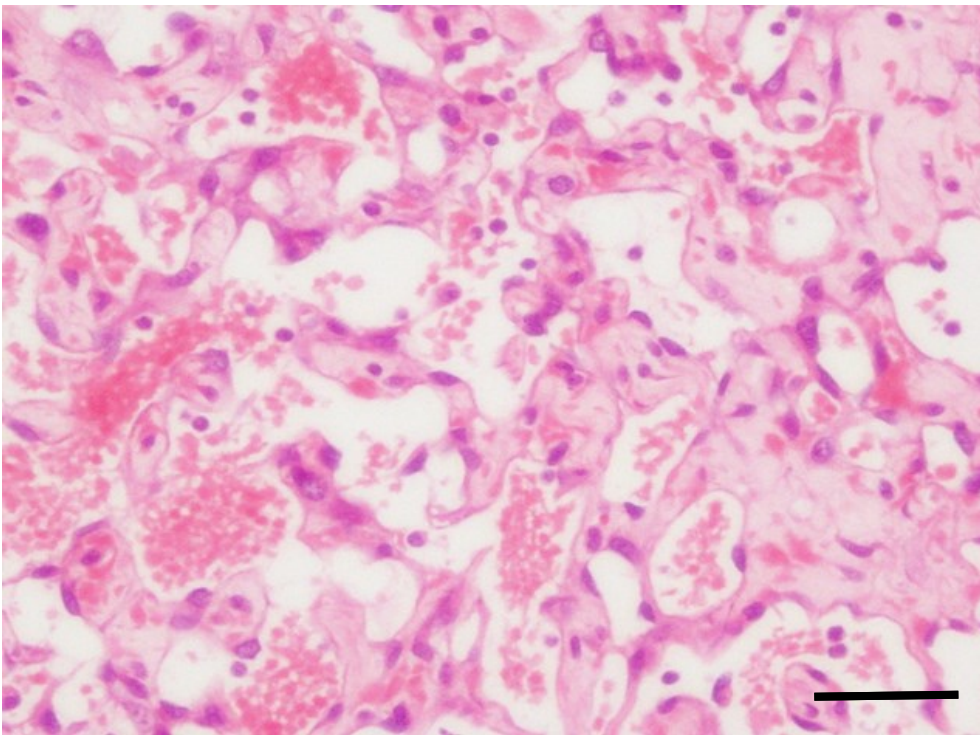


図 2-2. 症例 13 における高分化型の血管肉腫像. HE 染色. Bar = 20  $\mu$ m.

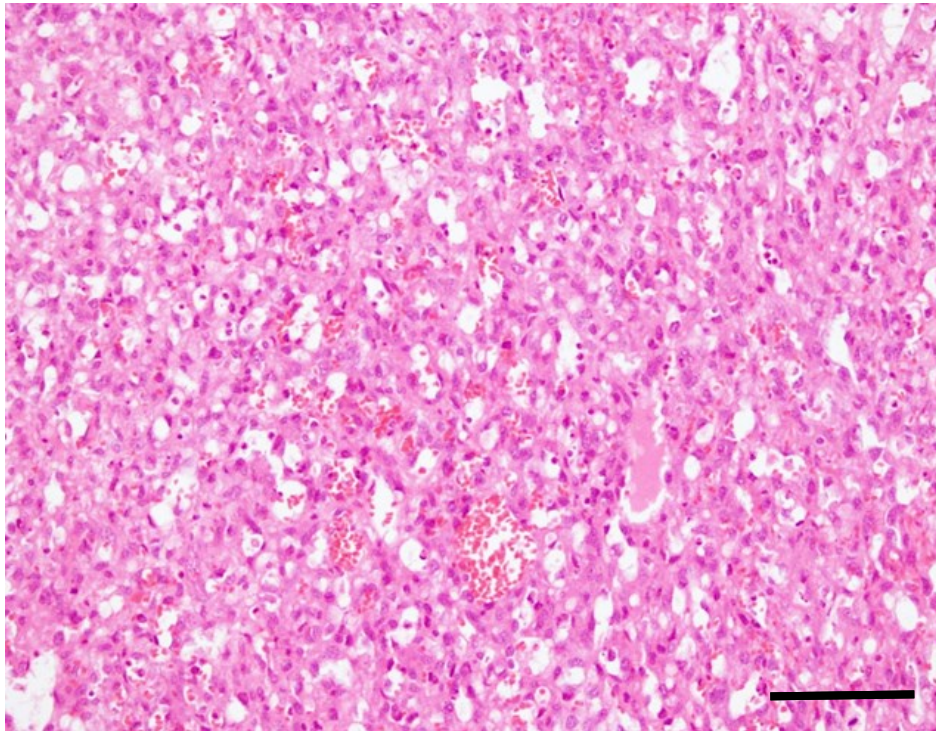


図 2-3. 症例 11 における中程度の分化型血管肉腫像. 組織学的評価スコア 2.  
HE 染色. Bar = 200  $\mu$ m

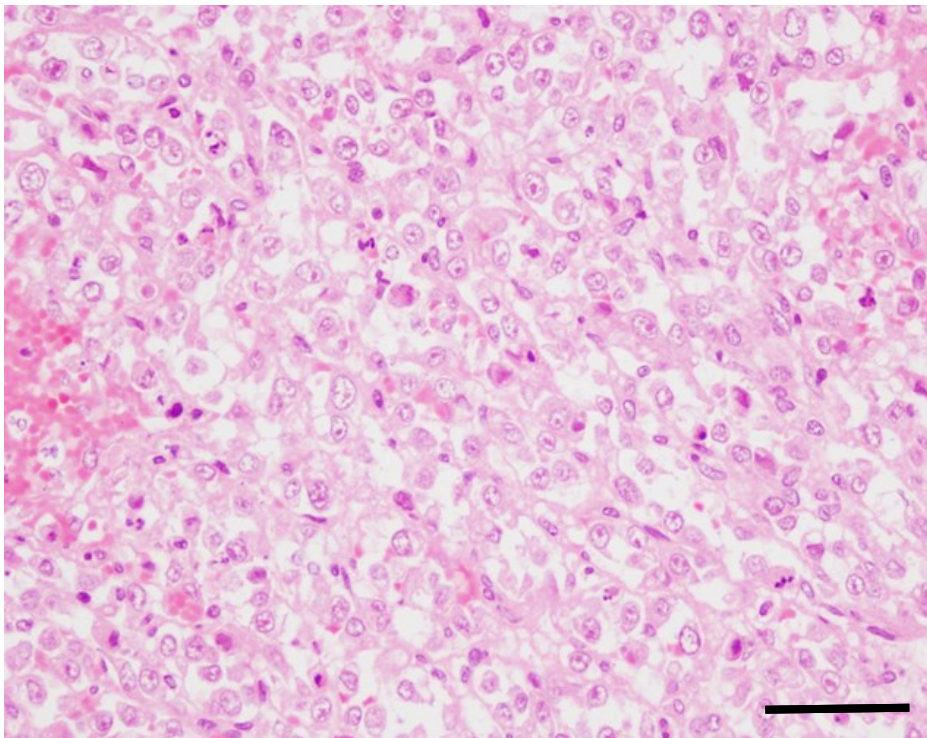


図 2-4. 症例 1 における低分化型血管肉腫像. 腫瘍細胞がシート状で不明瞭な血管構造が認められる. 組織学的評価スコア 3. HE 染色. Bar = 100  $\mu$ m

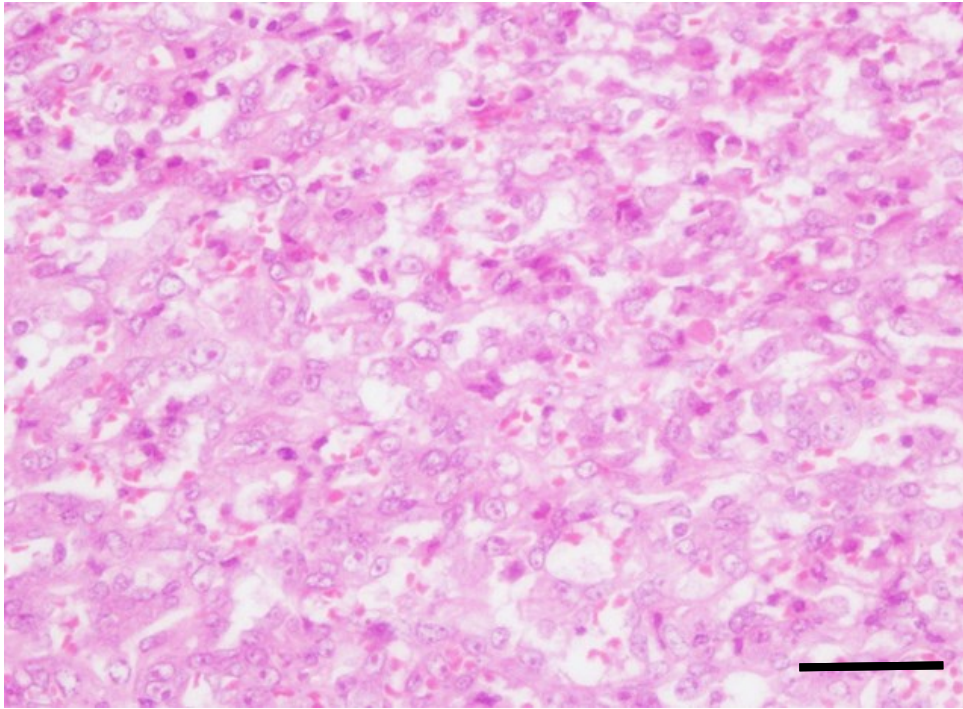


図 2-5. 症例 7 における低分化型血管肉腫像. 多角形の腫瘍細胞がシート状に増殖. 組織学的評価はスコア 3. HE 染色. Bar = 50  $\mu$ m.

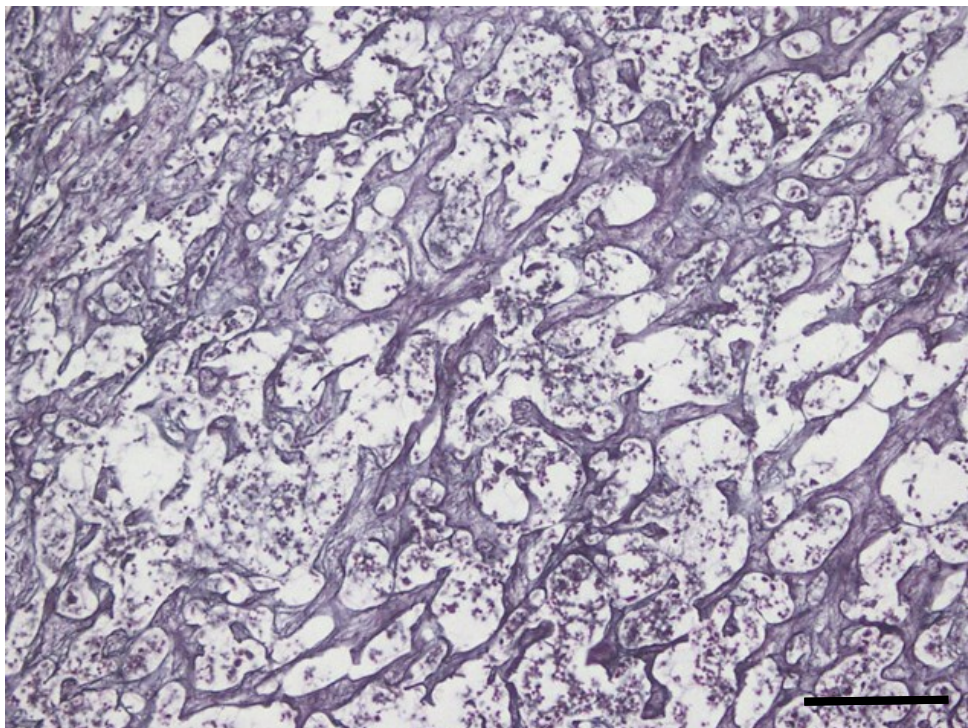


図 2-6. 症例 26 における高分化型血管肉腫像. 基底膜に沿って膠原線維が増殖、チャンネル構造が認められる。組織学的評価はスコア 1. 渡辺鍍銀法. Bar = 100  $\mu$ m

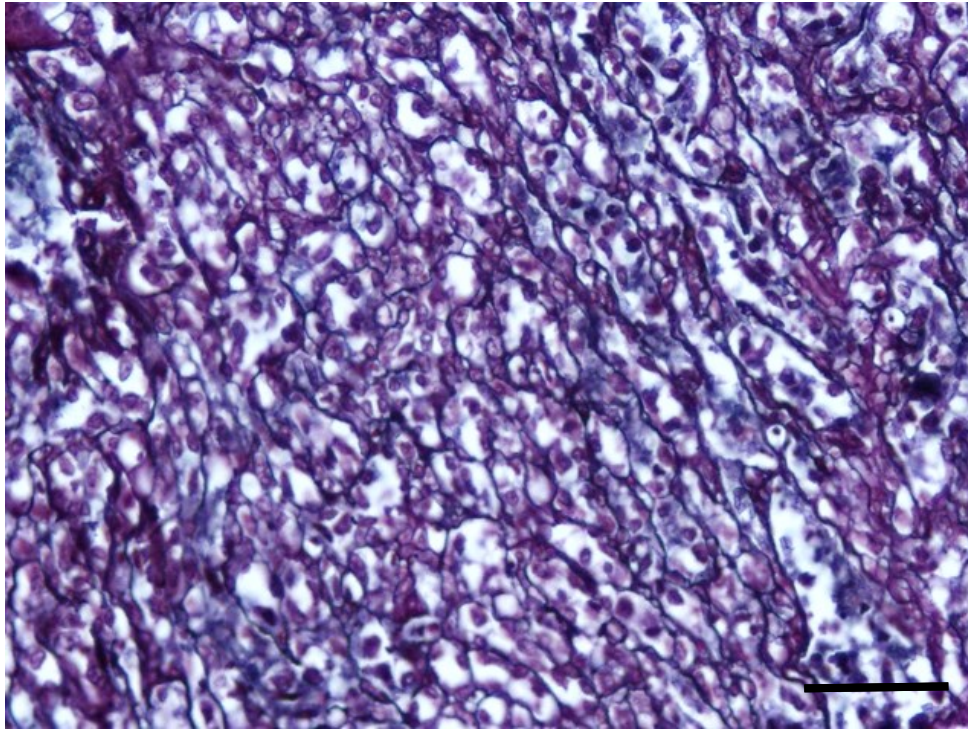


図 2-7. 症例 1 における低分化型血管肉腫像. 好銀線維である細網線維が入り組み、血管構造は不明瞭な網状構造を示す. 組織学的評価はスコア 3. 渡辺鍍銀法. Bar = 50  $\mu$ m

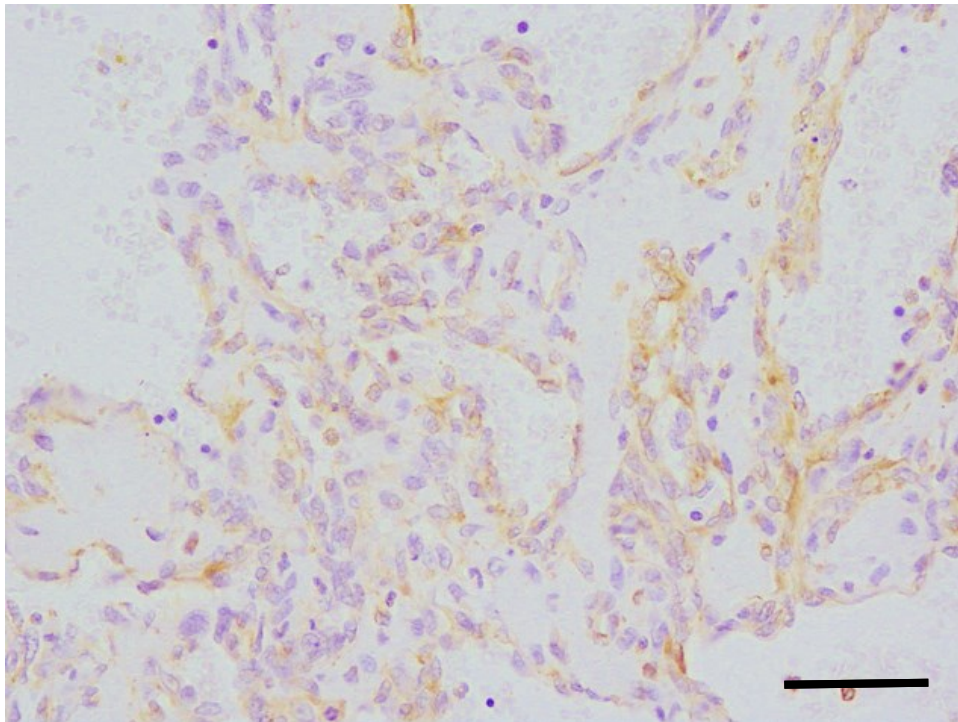


図 2-8. 症例 21 における高分化型血管肉腫像. 細胞質は抗 vimentin 抗体に陽性を示している. 組織学的スコア 1. Bar = 50  $\mu$ m

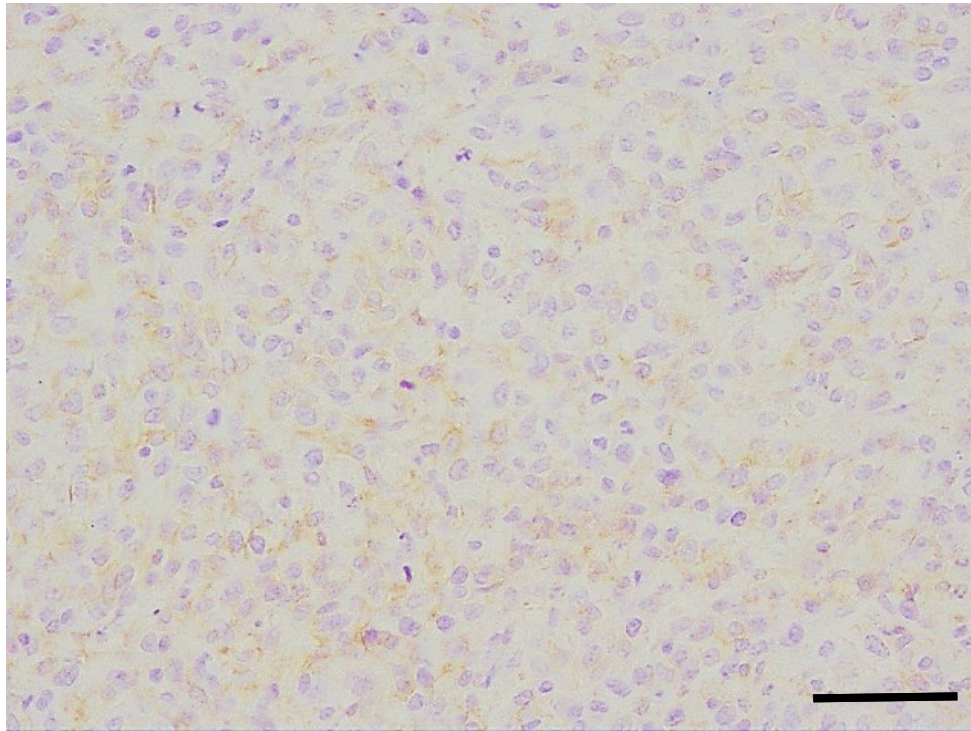


図 2-9. 症例 7 における低分化型血管肉腫像. 腫瘍細胞の表面に CD31 の発現が認められる. 組織学的スコア 3. Bar = 50  $\mu$ m

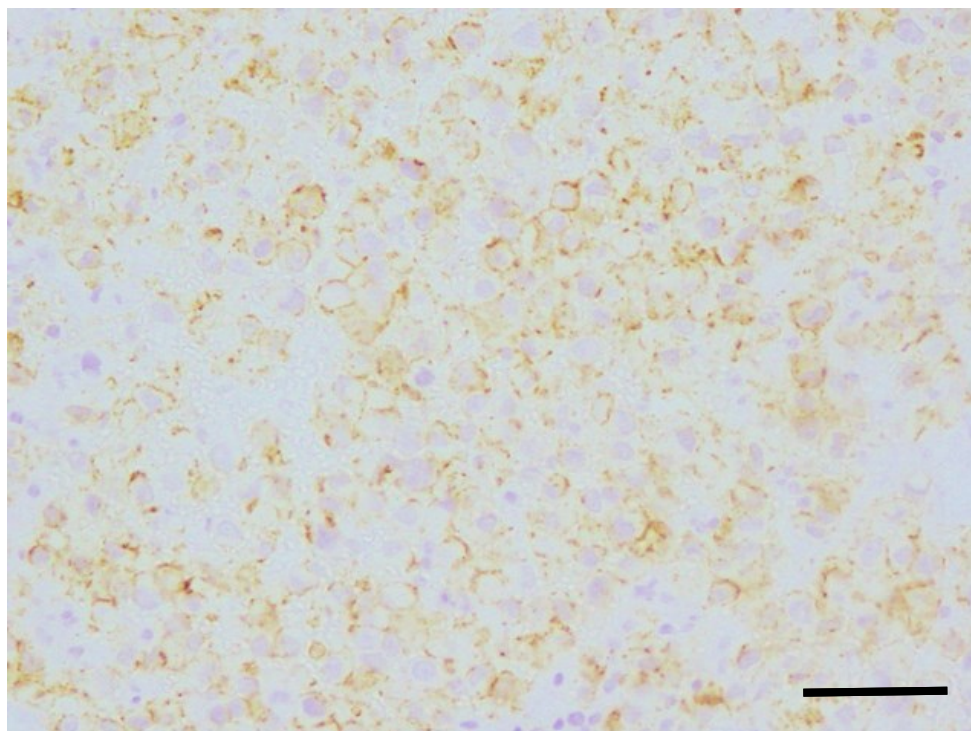


図 2-10. 症例 1 における副腎転移腫瘍像. 腫瘍細胞のシート状発育部分では、細胞表面に CD31 の発現が顕著に認められた. Bar = 50  $\mu$ m

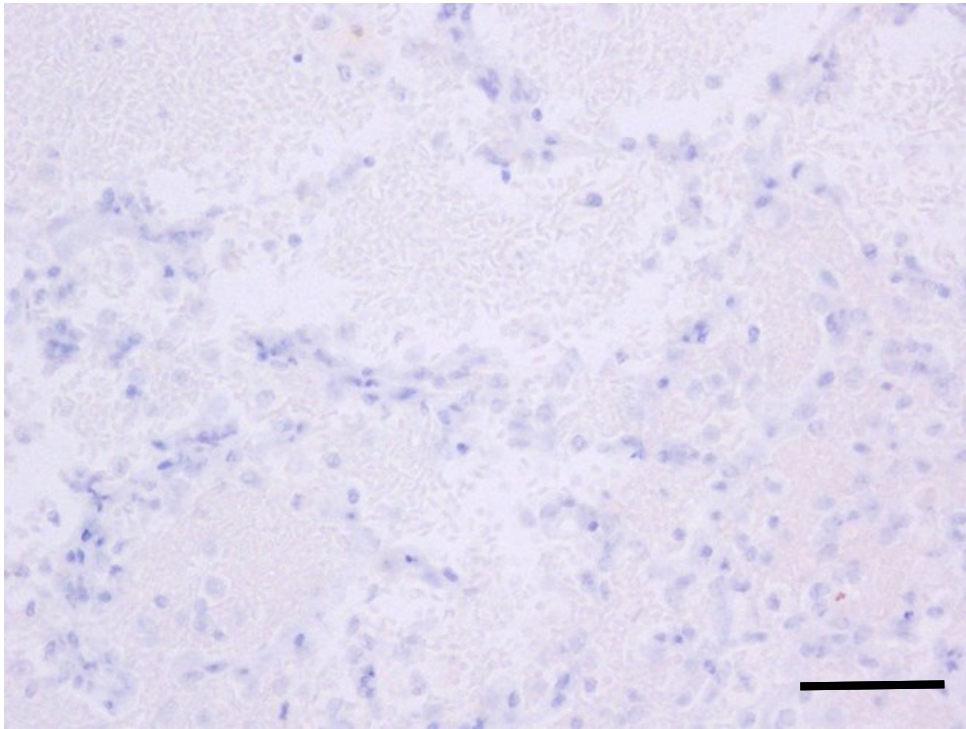


図 2-11. 症例 14 における高分化型血管肉腫像. CD31 の発現は認められない.  
組織学的スコア 1. Bar = 50  $\mu$ m

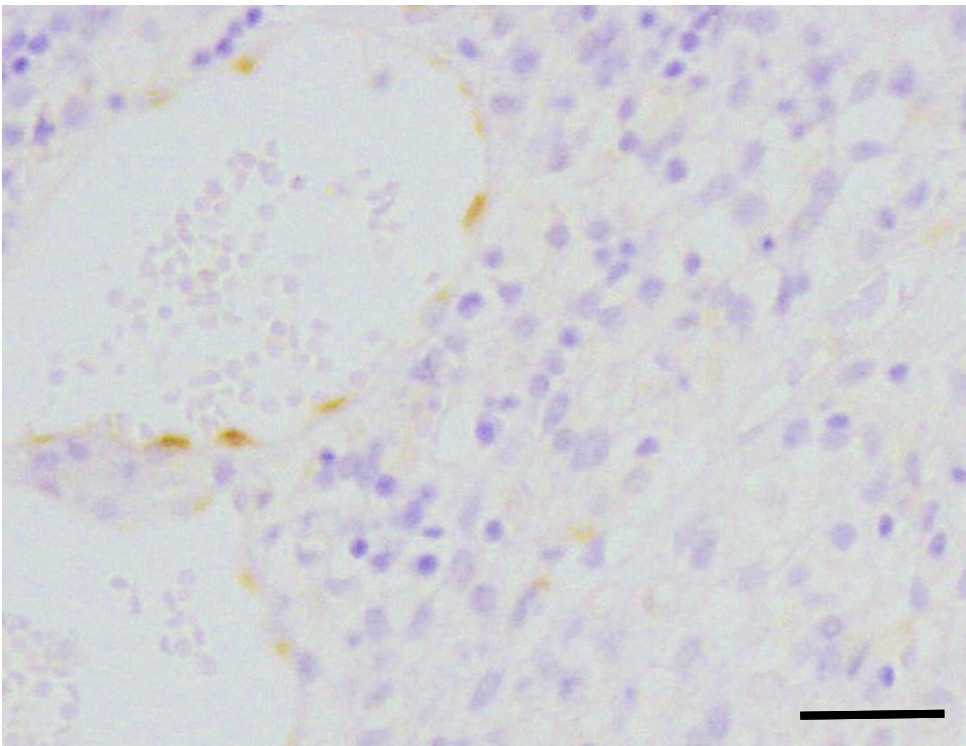


図 2-12. 症例 15 における中程度分化型血管肉腫像. 腫瘍細胞の細胞質は抗 vWF  
抗体に弱陽性を示している. スコア 2. Bar = 20  $\mu$ m

### 第3節 イヌの血管肉腫における塩酸ドキソルビシンの治験例

#### はじめに

血管肉腫はイヌの全腫瘍の約7%を占め、発症年齢は8～10歳で、雄で多く認められる。発症例の多い犬種はジャーマンシェパード、ゴールデンレトリバー、ラブラドルレトリバー、ボクサー、他が挙げられている (Goldschmidt and Hendrick, 2002)。イヌの脾臓に発生する血管肉腫は自壊や転移の有無によりステージ分類がなされている。ステージがⅠからⅢと臨床上的悪性度が高くなり、ステージⅢではVAC（ビンクリスチン・アドリアマイシン・サイクロフォスファミド）を用いた多剤併用化学療法はすべて無効であったとする報告と、それに反して有効性を示唆する報告がなされている (Alvarez *et al.*, 2013)。本節では、ステージ分類を加味した血管肉腫の症例に対し、外科単独処置と外科および化学療法併用を併用した例の生存日数を比較した。

#### 材料・方法

症例は2012年から2014年の間に鈴木犬猫病院に来院し、X線検査と腹部超音波検査により、脾臓の腫瘍を認め脾臓の摘出術を実施した6例（表3-1）であり、摘出した腫瘍は何れも日本大学獣医病理研究室で血管肉腫と診断された。手術後の再発防止のために化学療法を勧め、飼い主から同意が得られなかった3例（症例1, 2, 3）は外科手術単独療法で、同意が得られた3例（症例4, 5, 6）では術後に化学療法を実施した。



化学療法は塩酸ドキソルビシン単独で1mg/kg(体重10kg以下)ないし30mg/kg(体重10kg以上)を3週間ごとに1回投与した。術後の平均生存日数を化学療法の有無で比較した。

症例1:夕方散歩中に虚脱し来院、腹部エコーで腹水および複数の脾臓腫瘍を認めた。脾臓破裂で出血した脾臓を摘出した。腫瘍の大きさは5×5 cmであった(図3-1)。

症例2:超音波検査により脾臓に3個の球形腫瘍を確認し、外科的に切除した。それぞれの腫瘍の直径は5、4、3 cmであった。

症例3:数か月前より運動不耐性、軽度の貧血を認め、エコーにて脾臓に腫瘍を確認した。腫瘍は直径10 cm大であった。

症例4:元気消失で来院、超音波で血様腹水および脾臓の腫瘍を認め、摘出した。腫瘍の大きさは直径5 cm大であった。

症例5:痙攣発作で来院、超音波で脾臓に複数の腫瘍を認め、摘出した。最も大きかった腫瘍の大きさは3 × 2.5 × 2.5 cmであった。

症例6:他院より転院してきた症例で、脾臓に腫瘍が認められた。手術時に肝臓、肺、リンパ節に転移が認められた。脾臓腫瘍の大きさは11 × 7 cmであった。

病理組織学的に全症例とも同様な所見を示した(図3-2、3-3)。紡錘形の腫瘍細胞が網状、束状に増殖しており、不完全な管腔あるいはチャネル構造を形成し、広範囲な出血および壊死が認められた。腫瘍細胞の核は大小不同で類円形から紡錘形、異型度は高く、核分裂像が時折認められた。巨核球が散在し、出

血部位ではヘモジデリン沈着があった。

ステージ分類は、TNM法（Alvarez *et al.*, 2013）に準じた簡便法を採用し、ステージⅠは脾臓に限局していた血管肉腫、ステージⅡは破裂していた血管肉腫、ステージⅢは転移が認められた血管肉腫とした。各症例のステージ分類を表 3-1 に示す。

## 結果

外科手術単独の症例 1、2、3 の生存日数はそれぞれ 97 日、74 日、90 日であった（表 3-1）。外科手術と化学療法の併用療法の症例 4、5、6 はそれぞれ 164 日、291 日、112 日であった。今回の研究では手術のみ実施した血管肉腫の 3 例の生存日数は平均 87 日で、手術後塩酸ドキソルビシンを投与した 3 例は生存日数の平均は 189 日であった。その差は術後化学療法を行った 3 症例が生存日数の点で平均が 102 日間延長していた（表 3-1）。外科療法に化学療法併用の症例 4 では 22.5 mg/5 回、症例 5 では 16 mg/8 回、症例 6 では 28.8 mg/4 回であった。

## 考察

血管肉腫は組織学的形態に基づき血管内皮由来の腫瘍であるとされ、また腫瘍には原発部位と転移部位があるが、分類上多中心性の腫瘍であると呼ばれる例もある。原発部位か転移部位かの区別が判然としないケースがあるが、これは血管肉腫が骨髄細胞中の多能性幹細胞由来であることが起因するとされている（Gorden *et al.*, 2014; Lamerato-Kozickia *et al.*, 2006）。血管肉腫は血管内皮細胞

の特徴を有することから血管肉腫罹患犬の血中抗 Endothelin-1 抗体は高値を示すことが報告されており、血管肉腫の腫瘍マーカーとして期待されている (Sugawara and Ito, 2000)。しかしながら、第1章、第1節の結果として示したように、イヌ血管肉腫の病理診断マーカーとしては検討を要するものと思われる。

今回当院で治療した犬種は、ダックスフンド、パピヨン、ヨークシャテリアなどの小型犬やウェルシュコーギー、中型日本犬雑種等の中型犬であった。また、6頭中5頭が雄犬であった。血管肉腫は雄犬に多い傾向があるとする報告があり (Bingel *et al.*, 1974)、発症に雌雄差が関わるかもしれない。

血管肉腫もステージ分類され脾臓単独の腫瘍が存在するステージⅠ、脾臓の腫瘍が破裂したものがステージⅡで、更に他の臓器 (肝臓や心臓等) にも発生したものがステージⅢである (Alvarez *et al.*, 2013)。このステージ分類を基に化学療法の実施ならびに、抗癌剤投与の抗腫瘍効果に対する判定基準を用いて効果判定をした。以前は効果がないと考えられていた (Hammer *et al.*, 1991; Mullin *et al.*, 2016) ため化学療法実施の報告がなかった。しかしながら、今回の治験例に対し化学療法剤を投与したところ、ステージⅢの症例の方がステージⅠ・Ⅱよりも延命効果が認められた。

今回、イヌの血管肉腫6頭において、外科手術単独の症例3例に比べ外科手術に化学療法を併用した3症例の生存日数が長かった。さらにステージⅢの症例でも、外科手術後に塩酸ドキソルビシンの化学療法を併用した症例において、外科単独症例と比較し、生存日数の延長が認められたことから、ステージが進

んだ症例においても化学療法の有益性が示唆された。本研究は 6 症例での解析であり、統計学的有意差を検討するには至らないが、今後、さらに症例数を増やし、その有効性を検討すべきであると考えられた。

## 小括

イヌの血管肉腫は、病理組織学的な評価や死亡率の点で悪性度が高い腫瘍と言われている。今回の治験例により、生存日数において外科手術と化学療法の併用で延長できることが示唆された。

表 3-1. イヌ血管肉腫術後に対する塩酸ドキソルビシンの効果

症例	犬種	年齢	性別	体重(kg)	Stage	生存日数(日)
1	ウェルシュコーギー	11 歳 6 か月	雄	15.0	II	97
2	ヨークシャテリア	10 歳 2 か月	雄	3.5	I	74
3	雑種	8 歳 6 か月	雄	13.0	II	90
4	ミニチュアダックス	14 歳 10 か月	雄	4.5	III	164
5	パピヨン	13 歳 1 か月	雄	2.0	II	291
6	フレンチブルドック	11 歳 3 か月	雌	7.2	III	112

症例 1, 2, 3 は手術のみ（対照群）、症例 4, 5, 6 は術後に塩酸ドキソルビシンを投与した。生存日数は、ステージ分類に関わらず化学療法併用例が外科療法単独例より生存日数が長かった。



図 3-1. 症例 1 の脾臓腫瘍. 大きさ 5 × 5 cm.

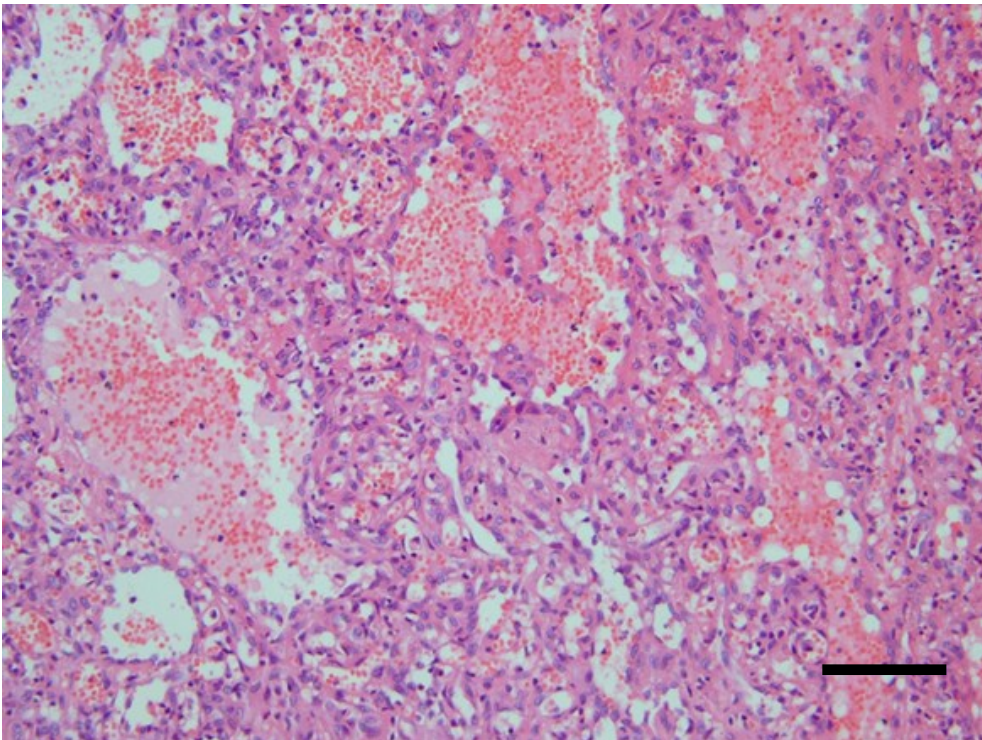


図 3-2. 症例 1 の病理組織像. 多量の血液を含む不完全な血管腔を形成していた.  
Bar = 100  $\mu$ m

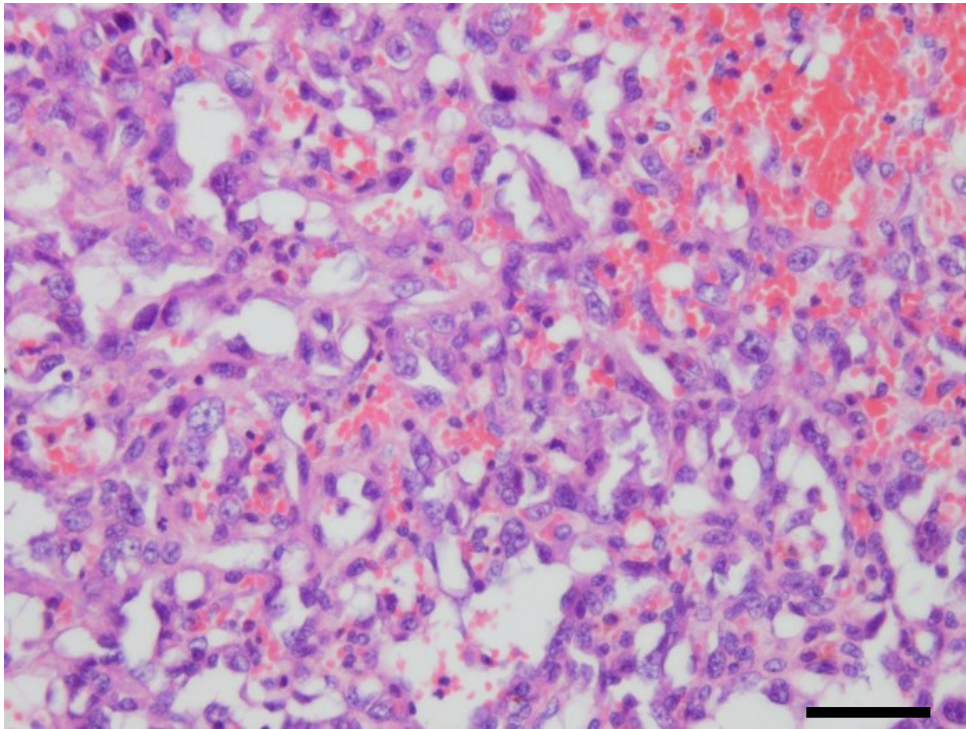


図 3-3. 症例 3 の病理組織像. 紡錘形の腫瘍細胞が管腔を形成しながら増殖していた. Bar = 50  $\mu$ m

## 第2章 イヌの血管周皮腫の病理組織学的検索

### 第1節 イヌの血管周皮腫の病理組織学および免疫組織化学的検索

#### はじめに

イヌの血管周皮腫は血管周皮細胞由来とされているが、組織発生はいまだに明らかにされていない。血管周皮腫は大型犬の成犬から高齢犬に多く認められ、好発部位は四肢の関節部、胸壁と考えられている。腫瘍は孤立性あるいは多小葉性に発達し、真皮の深部および皮下組織に発生し、境界不明瞭である。そのため高頻度に再発するが、転移はまれと考えられている。血管周皮腫の典型的な組織学的特徴は指紋様の増殖パターンで、血管を中心に同心円状に取り囲んだ紡錘形細胞の層から構成される。組織学的パターンには花むしろ型、血管周囲渦状型、類上皮型、混合型などが認められる。時にはこれらのような増殖パターンが認められない場合があり、また神経鞘腫、線維肉腫など他の軟部組織腫瘍でも類似した構築を示すため、鑑別診断が重要になる (Avallone *et al.*, 2007; Mazzei *et al.*, 2002)。

本節はイヌの血管周皮腫を病理組織学および免疫組織学的に特徴づけるため、血管周皮腫様構築を示す間葉系腫瘍で血管周皮腫と組織学的に診断された15症例において、組織学的構築の特徴付けと分類、さらに間葉系マーカーである抗 Vimentin 抗体、筋系マーカーである抗 Calponin 抗体、抗 Desmin 抗体、抗  $\alpha$ SMA 抗体、神経系マーカーである抗 S100 抗体を用いて免疫組織化学的検索を



行った。また血管周皮腫症例における組織学的な特徴、免疫染色によりこれらの症例を Avallone ら (2007) により提案された血管周囲壁腫瘍の分類方法 (表 4-1) を用いて再検索することを目的とした。

## 材料・方法

1996 年から 2013 年までに日本大学獣医病理学研究室において、血管周皮腫と診断された犬 16 症例を用いた。それぞれの症例の犬種、年齢、性別、発症部位は表 4-2 に示した。摘出した組織は、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定、その後パラフィン切片を作成し、5-10  $\mu\text{m}$  に薄切した。一般染色としてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

免疫組織化学的検索は酵素ポリマー法 (N-Histofine<sup>®</sup> Simple Stain<sup>™</sup>, Nichirei) を用いた。一次抗体は間葉系マーカーとして抗 Vimentin 抗体 (Dako、1:100 希釈)、筋系マーカーとして抗 Calponin 抗体 (Nichirei、希釈済)、抗 Desmin 抗体 (Nichirei、希釈済)、抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (Nichirei、希釈済)、また神経系マーカーとして抗 S100 抗体 (Nichirei、希釈済) を用いた。抗原性の賦活化は、PBS により 10 倍希釈した pH 6 または pH 9 の TRS 緩衝液 (Dako) にパラフィン包埋切片を浸し、オートクレーブ (121°C、20 分) 処理により行った。0.3%過酸化水素メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った後、10 倍希釈した正常山羊血清にて 30 分間室温でインキュベートすることにより、ブロッッキングを行った。その後、一次抗体を滴下し、4°Cにて一晩インキュベートした。二次抗体には ENVISION<sup>™</sup>/HRP (Dako) を使用し、滴下後 30 分間室温にてイン

キュベートした。発色は DAB 発色基質溶液 (Dako) を用いて行い、対比染色にはメイヤー・ヘマトキシリン溶液を使用した。

組織学および免疫染色学的分類は表 4-1 の Avallone らのチャートを参考にした。

## 結果

組織学的には症例 1、2、4、5、6、8、10、14 は紡錘形細胞もしくは不整形細胞が花むしろ状に増殖していた (図 4-1、4-2、4-3)。症例 3、9、12、15 は紡錘形細胞が小血管様構造を中心に渦巻き状に増殖していた (図 4-4、4-5、4-6)。症例 7、11、13 紡錘形細胞が花むしろ状および渦巻き状構造が混在していた。

免疫組織化学的にはすべての症例で抗 Vimentin 抗体を用いた反応が陽性、抗 Calponin 抗体、抗 Desmin 抗体、抗  $\alpha$ SMA 抗体および抗 S100 抗体による反応が陰性であった。渦巻き状構築の中心に明らかな小血管が存在する症例では、血管および血管周囲が  $\alpha$ SMA に反応する細胞が認められた (図 4-7)。以上の結果を表 3 に示す。

## 考察

本研究で血管周皮腫は中高齢で、雌に多く、また大型犬に好発する傾向がみられ、これまでの報告 (Avallone *et al.*, 2007; Hendrick, 2017; Mazzei *et al.*, 2002) と大きな相違は認められなかった。好発部位は四肢と考えられているが、本研究では体幹部 67%、四肢 33%と体幹部に多く認められたことより、発生部位に留

意する必要があると考えられた。

組織学的構築は、花むしろ型 53%、血管周囲性渦状型 27%、混合型 20%であった。血管周囲性の渦巻き構築と血管欠如の花むしろは血管周皮腫の形態学的特徴であるが、紡錘形細胞が平滑筋腫や線維腫のような直線的でなく湾曲して走行する形態は一貫した組織像であった。

免疫染色では、間葉系マーカーの発現が陽性で、筋系マーカーと神経系マーカーの発現は陰性であった。これらの結果より、発生部位による腫瘍マーカーの発現性の差異はないと考えられた。15 症例は組織学的に花むしろ型 8 症例、血管周囲渦状型 4 症例、混合型 3 症例に分類されたが、組織学的パターンと腫瘍マーカーの発現性の差異はみられなかった。したがって、発生部位、組織学的パターンおよび腫瘍マーカーの発現性より、血管周皮腫と診断した。

間葉系マーカーである Vimentin の発現が陽性、筋系マーカーおよび神経系マーカーの発現が陰性であったことより、Avallone ら (2007) の報告にある血管線維腫 (Angiofibroma) に相当すると考えられた。この結果により、血管周皮腫様構築を形成する腫瘍は、線維系腫瘍の特徴を示すものが多いことが示された。

## 小括

血管周皮腫様構築を示すイヌの皮膚腫瘍 15 症例について、病理組織学および免疫組織化学的検索を行った。組織学的には花むしろ型が多く、次いで血管周囲性渦状型、混合型であった。免疫組織化学的検索では、筋系マーカーの発現が認められなかったため、血管線維腫 (Angiofibroma) に相当する所見である

と考えられた。

本研究により、血管周皮腫様構築を形成する腫瘍は、線維系腫瘍の特徴を示すものが多いことが示された。

表 4-1. Avallon ら (2007) による血管周囲壁腫瘍の病理学的分類法チャート図。  
 最初に形態学的に束状、渦巻き状、粘液・鹿の角状に分類し、次に免疫組織化学的に血管平滑筋腫、血管周皮筋腫様の筋周皮細胞腫、筋周皮細胞腫、血管線維腫、血管筋線維芽細胞腫そして血管周皮腫に分類される。

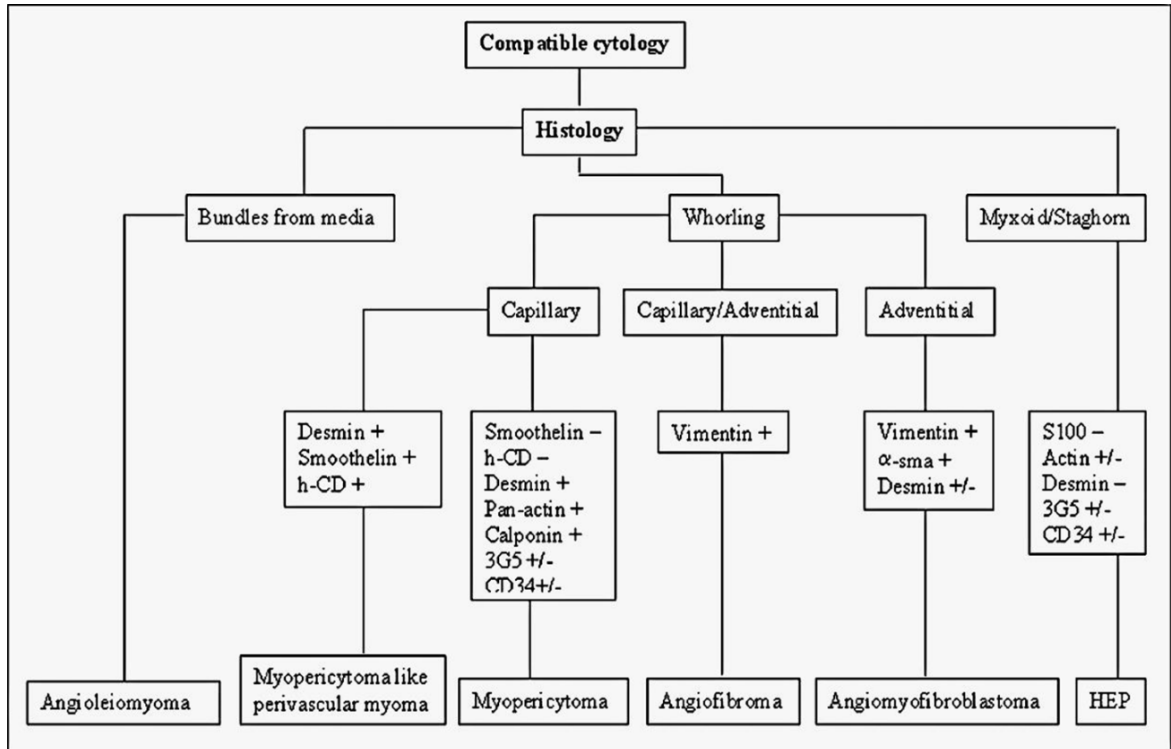


表 4-2. 本研究に使用した症例および腫瘍発生部位

症例	品種	年齢	性別	検索部位
1	不明	9	雌	右側皮膚
2	雑種	不明	雄	左前腕
3	ビーグル	不明	不明	右頸部
4	雑種	13	雄	右腋窩部
5	雑種	4	雌	左前肢外側指球
6	ミニチュア・シュナウザー	8	雄	前胸部皮下
7	雑種	8	雌	右後肢趾間部
8	シベリアン・ハスキー	9	雄	左前肢
9	ゴールデン・レトリバー	10	雌	左腰背部
10	雑種	13	雌	胸部皮膚
11	ゴールデン・レトリバー	9	雄	右後肢
12	ゴールデン・レトリバー	10	雄	左臀部
13	ジャーマン・シェパード	11	雌	左内股部
14	ビーグル	15	雌	臀部
15	雑種	不明	不明	腋窩部

表 3. 組織学的パターンおよび免疫染色結果

症例	組織学的パターン	Vim	CNN	Desmin	$\alpha$ -SMA	S100
1	花むしろ型	+	-	-	-	-
2	花むしろ型	+	-	-	-	-
3	血管周囲性渦状型	+	-	-	-	-
4	花むしろ型	+	-	-	-	-
5	花むしろ型	+	-	-	-	-
6	花むしろ型	+	-	-	-	-
7	混合型	+	-	-	-	-
8	花むしろ型	+	-	-	-	-
9	血管周囲性渦状型	+	-	-	-	-
10	花むしろ型	+	-	-	-	-
11	混合型	+	-	-	-	-
12	血管周囲性渦状型	+	-	-	-	-
13	混合型	+	-	-	-	-
14	花むしろ型	+	-	-	-	-
15	血管周囲性渦状型	+	-	-	-	-

Vim:Vimentin、CMM:Calponin、+ : 陽性、- : 陰性



図 4-1. 血管周皮腫における花むしろ構築の模式図

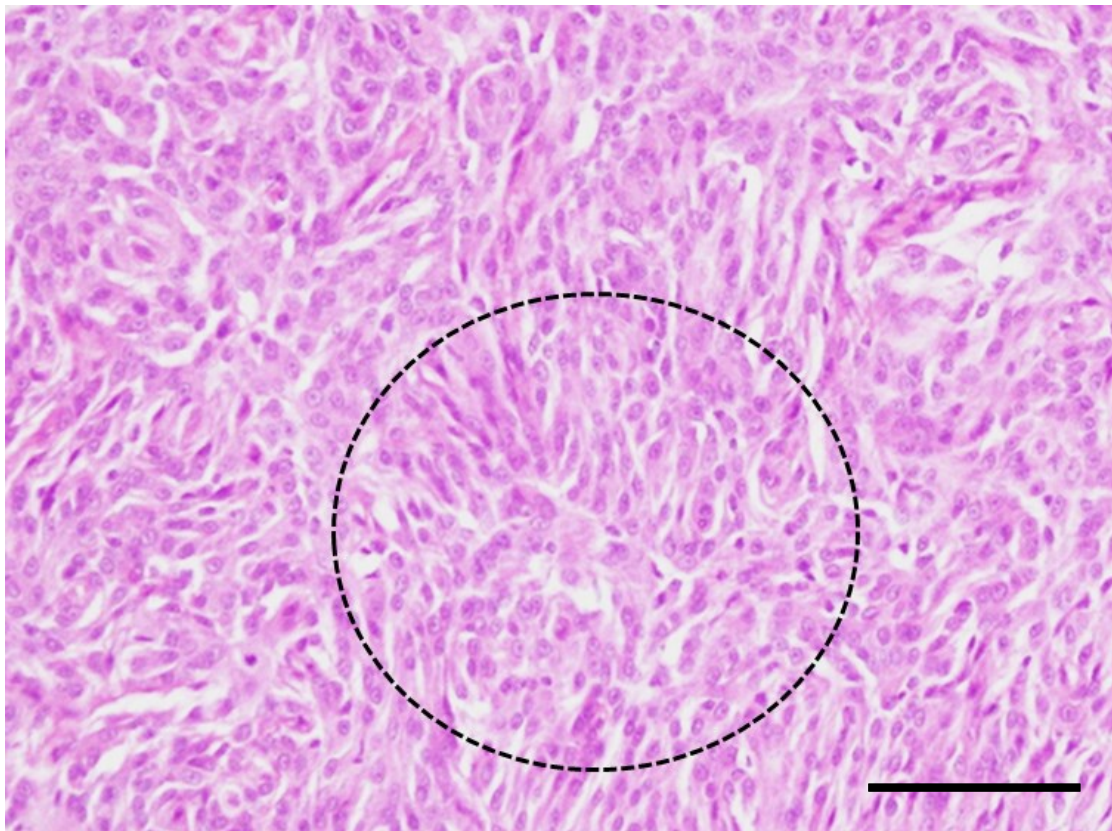


図 4-2. 症例 4 の組織像. 破線部分の紡錘形細胞が不完全な花むしろ状に配列する. Bar = 100  $\mu$ m

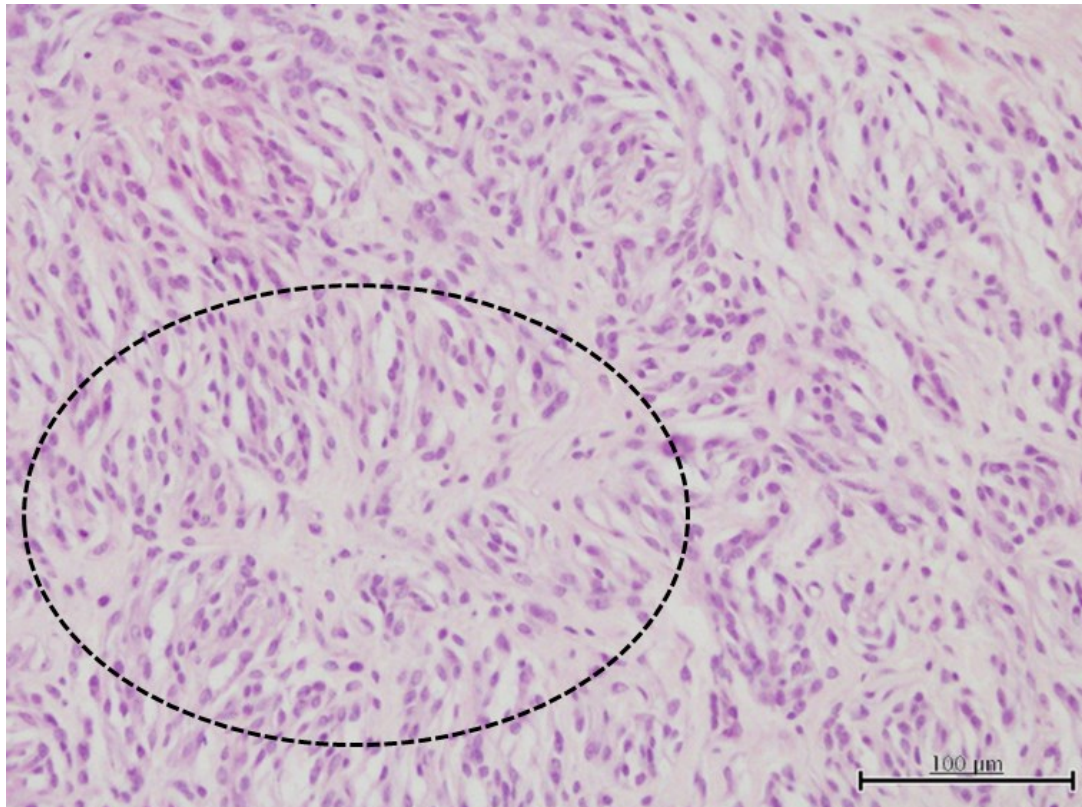


図 4-3. 症例 5 の組織像. 同様に破線部分の紡錘形細胞が不完全な花むしろ状に配列する. Bar = 100 μm



図 4-4. 血管周囲渦巻き状構築の模式図



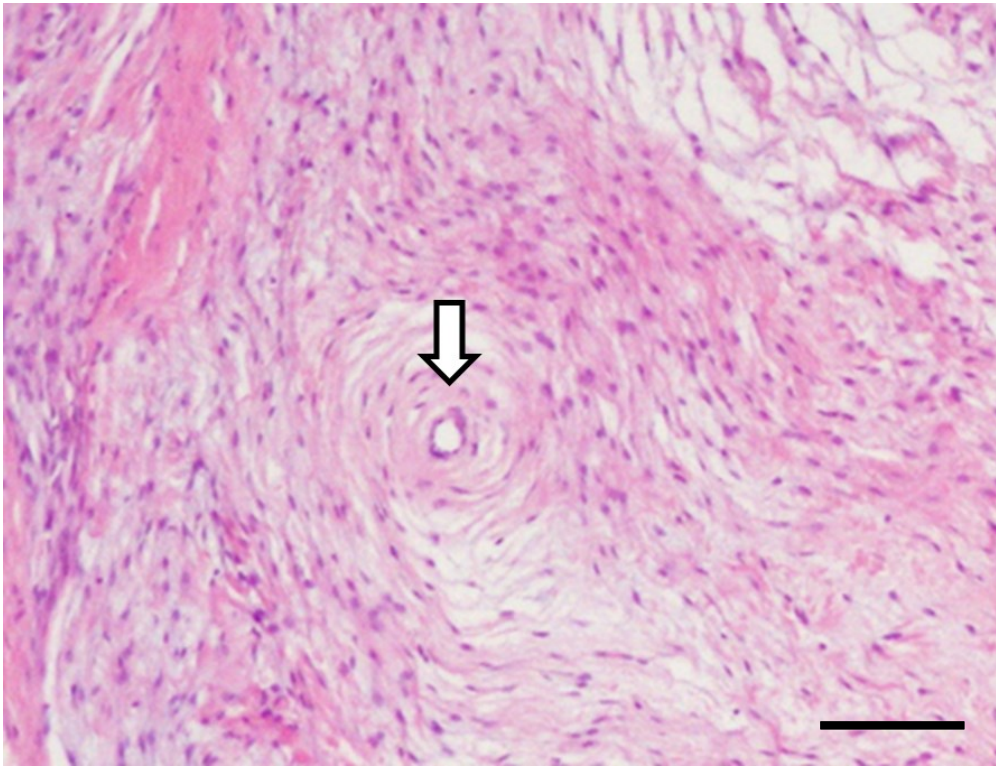


図 4-5. 症例 9 の組織像. 矢印の小血管周囲に紡錘形細胞が渦巻き状に配列する.  
Bar = 100  $\mu$ m

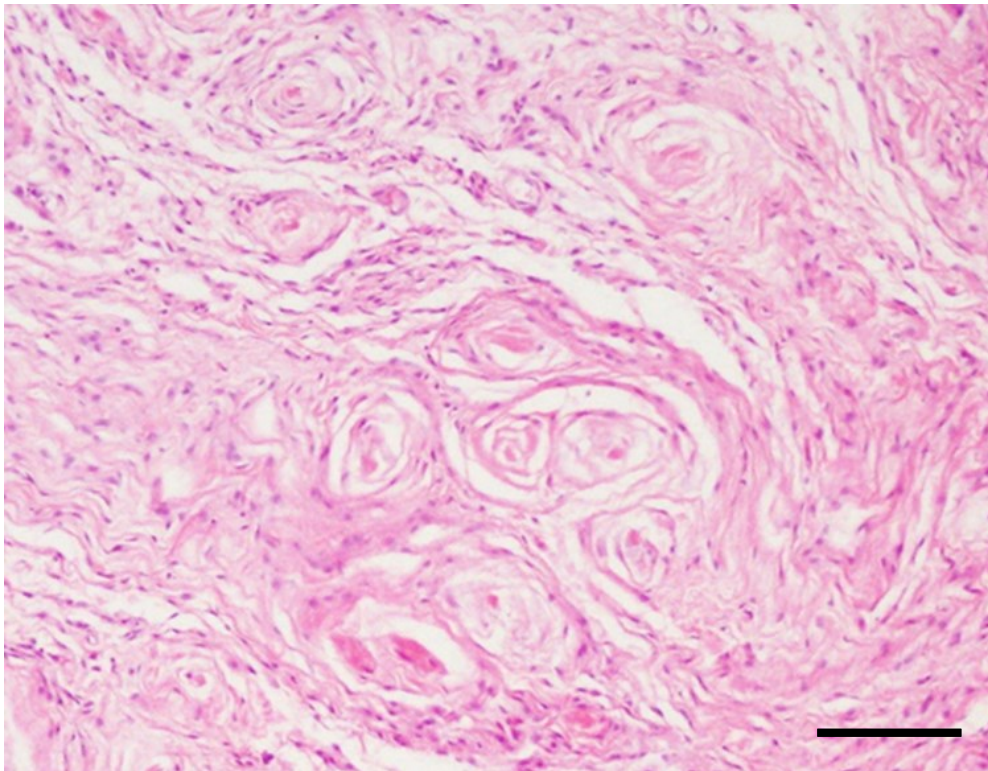


図 4-6. 症例 12 の組織像. 多数の血管周囲渦巻き状構築が存在する. Bar = 100  $\mu$ m

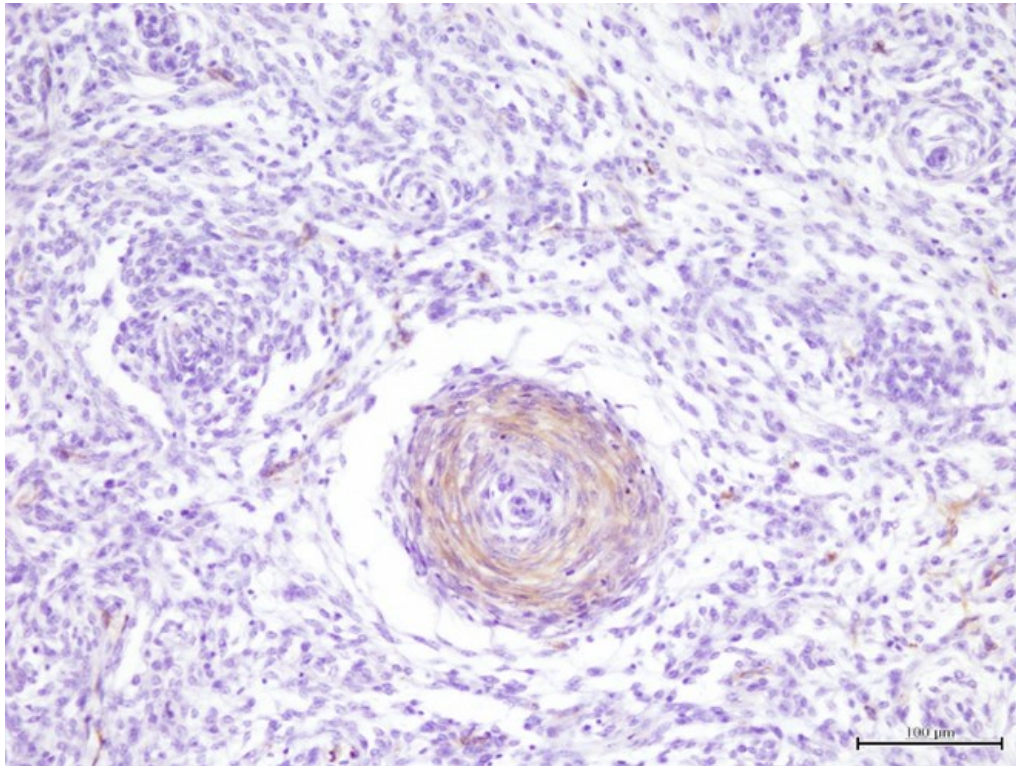


図 4-7. 症例 13 の組織像. 血管周囲の紡錐形細胞の  $\alpha$ -SMA 発現の陽性像. Bar = 100  $\mu$ m

## 第2節 再発したイヌの血管周皮腫の病理組織学的および免疫組織化学的検索

### はじめに

イヌの血管周皮腫は血管系腫瘍の一つであり、血管周皮細胞由来とされているが、病理組織発生はいまだに明らかにされていない。血管周囲渦巻状、花むしろ状、混合型など典型的な増殖パターンを示す場合が多い（Goldshmidt and Shofer, 1992; Medewell *et al.*, 1992）。しかし、時にはこれらのような増殖パターンが認められない場合があり、神経鞘腫、線維肉腫、皮膚線維性組織球腫など他の軟部組織腫瘍で認められる場合もあるため、鑑別が非常に難しいとされている（Pantekoek and Schifer, 1975; Richardson *et al.*, 1983）。血管周皮腫は転移することは稀であるが再発率は高く、繰り返し再発することで、転移能が高まることが示されている。原発腫瘍では細胞の形態不整はあまり見られず分裂活性も低いですが、再発を重ねることで細胞異型性が増加する傾向があると言われている（Hendrick *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1983）。そのため、分裂指数がこの腫瘍の重要な予後の特徴であるとも考えられている。

そこで本節では、同一症例の原発組織と再発組織を比較し、病理組織学的な悪性度の相違、また、免疫組織化学的な反応性の変化に関して比較検討した。

### 材料・方法

1996年から2002年までに日本大学獣医病理学研究室において、同部位において原発および再発腫瘍が血管周皮腫と診断されたイヌ3症例を用いた。検体の

詳細は以下の通りである。

症例 1：ポメラニアン、雄、9 歳齢。2016 年 1 月 26 日原発、右前肢肘関節腫瘍。2001 年 2 月 23 日再発。

症例 2：雑種、雌、8 歳齢。2000 年 10 月 4 日原発、右肘部腫瘍。2002 年 11 月 26 日再発。

症例 3：紀州犬、雌、13 歳齢。1996 年 3 月 19 日原発、左前肢腫瘍。1996 年 4 月 5 日再発。

摘出した組織は、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定、その後パラフィン切片を作成し、5-10  $\mu\text{m}$  に薄切した。一般染色としてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

免疫組織化学的検索は酵素ポリマー法 (N-Histofine® Simple Stain™, Nichirei) を用いた。一次抗体は、間葉系マーカーとして抗 Vimentin 抗体 (Dako、1:100 希釈)、筋系マーカーとして抗 Calponin 抗体 (Nichirei、希釈済)、抗 Desmin 抗体 (Nichirei、希釈済)、抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (Nichirei、希釈済)、また神経系マーカーとして抗 S100 蛋白抗体 (Dako、1:100 希釈) を用いた。抗原性の賦活化は、PBS により 10 倍希釈した pH6 または pH9 の TRS 緩衝液 (Dako) にパラフィン包埋切片を浸し、オートクレーブ (121°C、20 分) 処理により行った。0.3% 過酸化水素メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った後、10 倍希釈した正常山羊血清にて 30 分間室温でインキュベートすることにより、ブロッキングを行った。その後、一次抗体を滴下し、4°Cにて一晩インキュベートした。二次抗体には ENVISION™/HRP (Dako) を使用し、滴下後 30 分間室温に

てインキュベートした。発色は DAB 発色基質溶液 (Dako) を用いて行い、対比染色にはメイヤー・ヘマトキシリン溶液を使用した。

## 結果

組織学的所見では原発腫瘍において 3 症例とも花むしろ状の構築を形成しており (図 5-1、5-2)、症例 1 のみ再発組織で血管周囲渦巻き構築が優勢であった (図 5-3、5-4)。血管構築数は症例 3 においてのみ減数していた (図 5-5、5-6)。細胞密度は症例 3 で増加していた (図 5-5、5-6) が、他の症例では変化が認められなかった。核の異型度と核小体の明瞭化は、症例 1 と 3 において高くなっていた (表 5-1、図 5-2、5-4)。

免疫組織化学的には筋系マーカーの Calponin、Desmin、 $\alpha$ SMA および神経系マーカーの S100 に対する特異抗体には反応性が認められなかった。抗 Vimentin 抗体では症例 2、3 において原発で顕著に認められた反応性が再発では減弱する傾向が認められた (表 5-2、図 5-5、5-6)。

## 考察

血管周皮腫と診断され再発した 3 症例について組織学的検索を行った結果、1 症例のみ原発と再発で組織学的パターンが異なったが、2 症例は同じ花むしろ状を示す所見が得られた。原発の組織像は核が濃縮されクロマチンが濃く、小型で円形から楕円形を示すものが多く、また、血管構築をなしていたが、再発症例は細胞密度の増加、核の大小不同、核小体の大型化が認められ、血管構築数

において 1 症例でのみ減少が見られた。また、複数の核小体をもつ細胞も多く認められ、細胞異型性が増していることが明らかとなった。総合的に、再発症例は細胞密度の上昇、核の大小不同、核小体の大型化、また複数の核小体をもつ細胞、細胞異型性が増加する傾向が認められた。これらの結果は、外科的治療における完全切除の重要性を支持すると考えられた。

免疫組織化学的には血管周皮腫は抗 Vimentin 抗体にのみ陽性を示し、他の診断マーカーの抗体に陰性を示すことで、組織学的に共通点の多い軟部組織球腫との鑑別をすることができるかと報告されている (Hendrick, 2017)。抗 Vimentin 抗体は非上皮系マーカーであり、症例 1 で原発および再発組織共に陽性反応を示し、症例 2、3 では原発組織で陽性、再発組織で弱陽性反応を示した。筋系マーカーである抗 Calponin 抗体、抗 Desmin 抗体、抗  $\alpha$ -SMA 抗体は、3 症例の全てで陰性が認められた。また、神経鞘腫との鑑別に用いられる神経系マーカーの抗 S100 抗体が、3 症例の全てに陰性が認められたことから、3 症例すべてを血管周皮腫に分類することが妥当と考えられた。しかしながら原発および再発両者において、特に顕著な差異は見られなかったため、組織学的所見に比べ、免疫組織化学的所見は悪性度の評価に対し有用性が低いと考えられた。

## 小括

犬の血管周皮腫と診断された同一症例の原発組織と再発組織を病理学的に比較検討した。その結果、免疫組織化学的には特に顕著な差異は認められなかったが、組織学的には細胞密度の増加、核の大小不同、核小体の大型化が認めら

れ、原発組織に比べ、再発組織は核の異型度が高く悪性度が増していた。

表 5-1. 原発および再発腫瘍の組織学的検索の結果

症例／検体	組織学的パターン	血管構築数	細胞密度	核異型度	核小体	
1	原発	花むしろ状	+	+	低異型	+
	再発	血管周囲渦巻き状	+	++	低異型	++
2	原発	花むしろ状	+	++	低異型	+
	再発	花むしろ状	+	++	中異型	+
3	原発	花むしろ状	+++	+	低異型	+
	再発	花むしろ状	+	+	中異型	+++

血管構築数： 1～5+、6～10++、11以上+++  
核小体数： 1～5+、6～10++、11以上+++

表 5-2. 原発および再発腫瘍の免疫組織化学的検索の結果

症例／検体	Vimentin	Desmin	Calponin	α-SMA	S100	
1	原発	++	-	-	-	-
	再発	++	-	-	-	-
2	原発	++	-	-	-	-
	再発	+	-	-	-	-
3	原発	++	-	-	-	-
	再発	+	-	-	-	-

評価：++陽性、+弱陽性、-陰性。



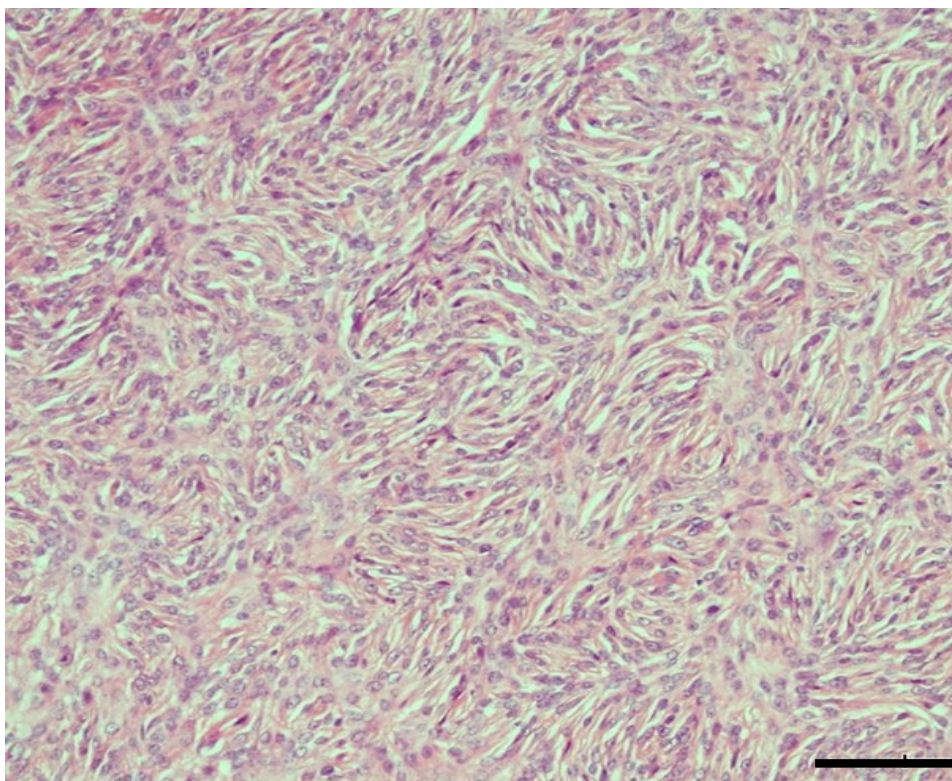


図 5-1. 症例 1 における原発腫瘍の組織像. 紡錘形細胞が花むしる構造を形成しながら増殖している像が確認できる. Bar = 50  $\mu$ m

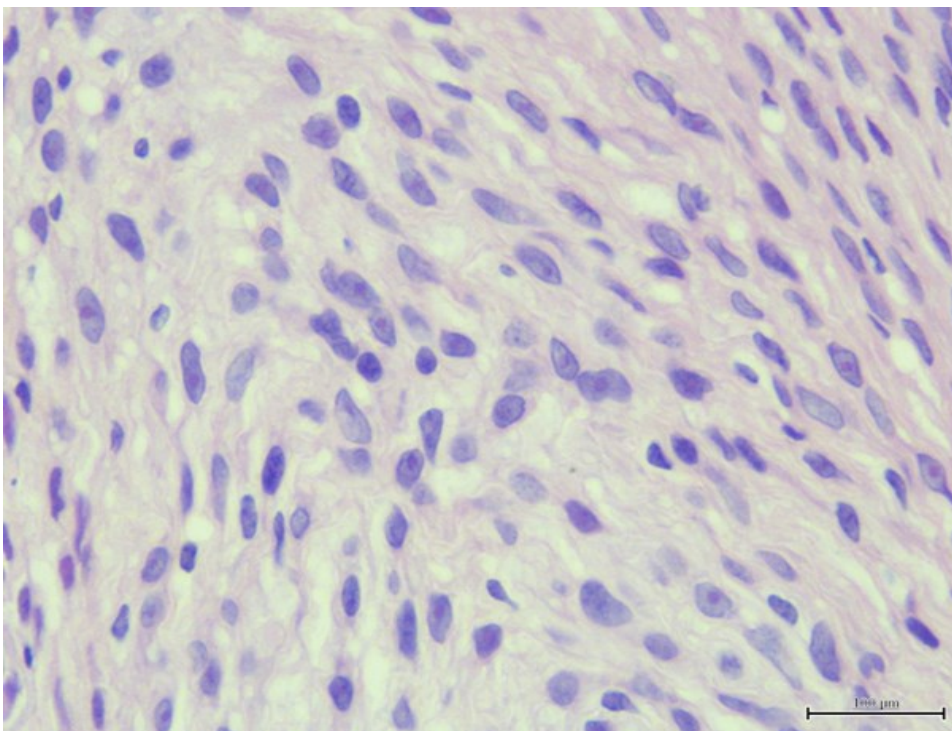


図 5-2. 図 5-1 の高倍率像. 細胞密度は中等度で、核異型は認められない. Bar = 20  $\mu$ m

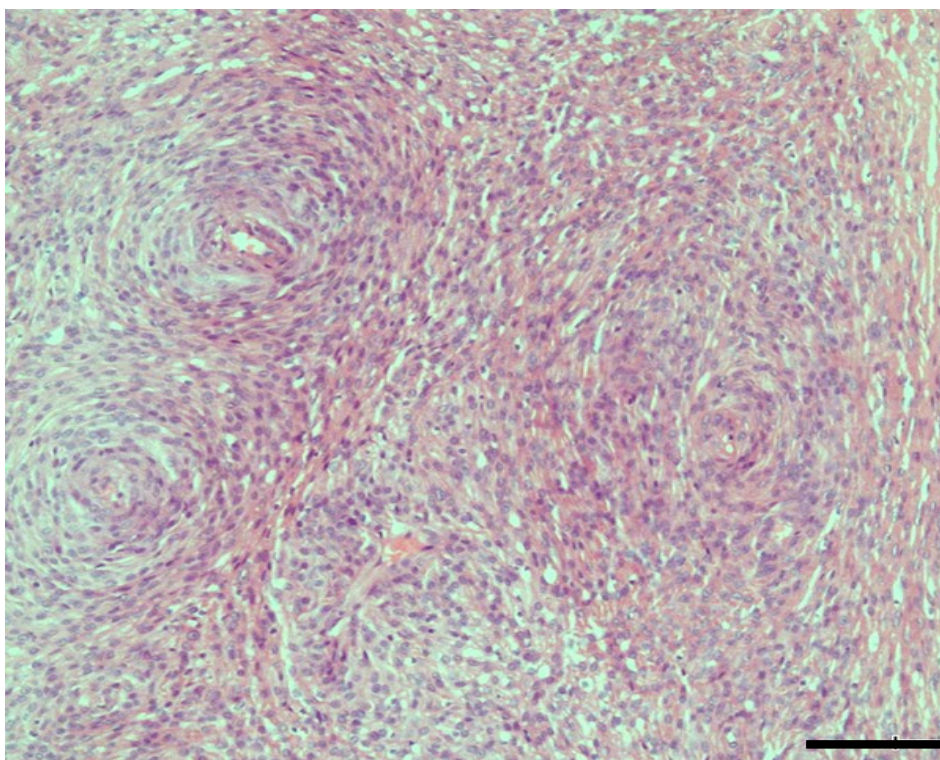


図 5-3. 症例 1 における再発腫瘍の組織像. 紡錘形細胞が小血管様構造を中心に渦巻状構造を示しながら増殖している像が認められる. Bar = 100  $\mu$ m

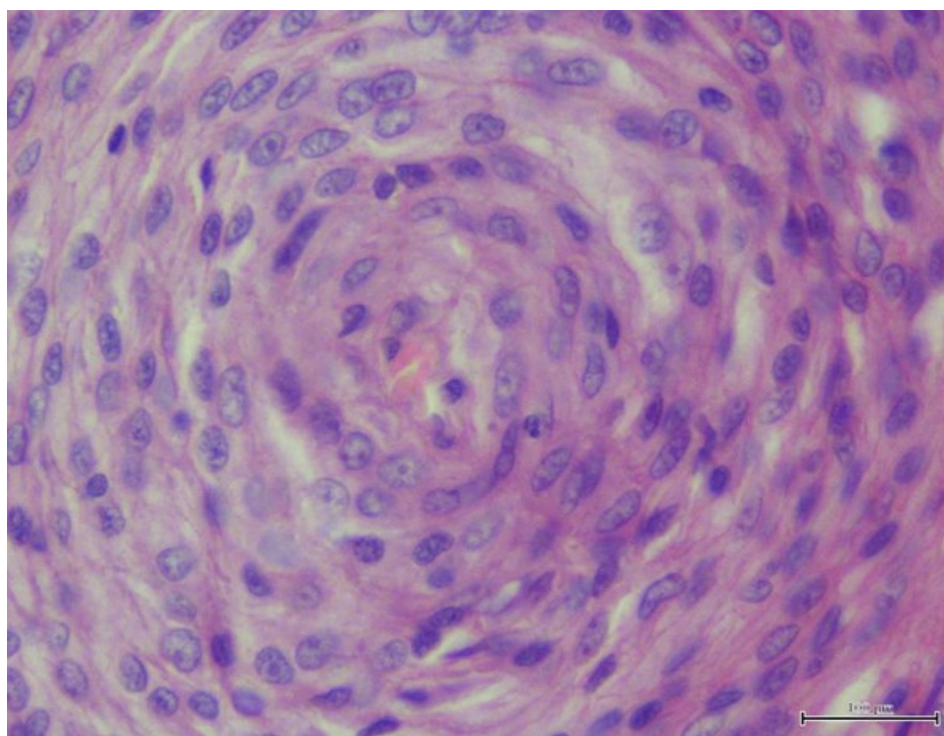


図 5-4. 図 3 の高倍率像. 細胞密度、核異型が高くなっている. Bar = 20  $\mu$ m

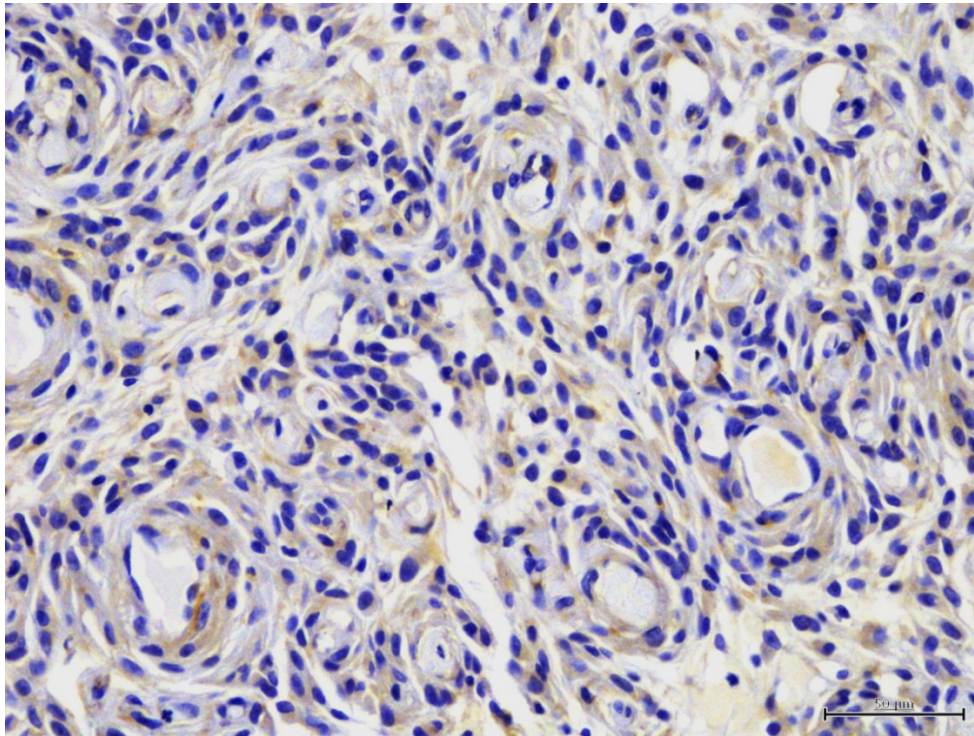


図 5-5. 症例 3 における原発腫瘍の免疫染色像. 抗 Vimentin 抗体に陽性反応が示された. Bar = 50  $\mu$ m

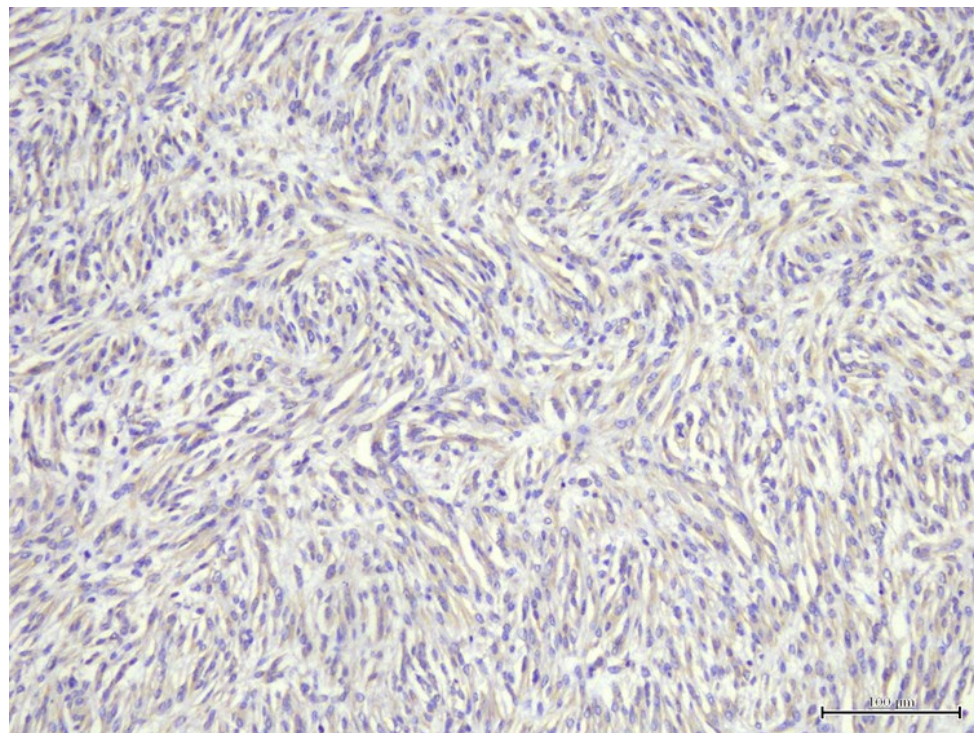


図 5-6. 症例 3 における再発腫瘍の免疫染色像. 抗 Vimentin 抗体の反応性が減弱していた. Bar = 100  $\mu$ m

### 第3節 ヒトの古典的血管周皮腫に類似するイヌの間葉系腫瘍の病理学的検索

#### はじめに

ヒトにおいて、血管周皮腫は1942年 Stout ら (Stout and Murray, 1942) により Staghorn pattern (鹿角状構造) や血管周囲の渦巻き状構造を特徴とする軟部組織の腫瘍として報告された。その構築像から血管周皮腫と命名されたが、長年の研究報告から多くの軟部組織腫瘍が同様の構築像を示すため、免疫組織化学や遺伝学的に再分類が試みられ、現在、血管周皮腫と孤立性線維性腫瘍は共通の遺伝子異常 (NAB2-STAT6 遺伝子融合) を有する一連の腫瘍群という考え方が主流になっている (Gengler & Guillou, 2006)。

獣医領域では、Avallone ら (2007) が組織学および免疫組織化学的特徴をもとに、筋系の血管平滑筋腫、筋周皮細胞腫、線維系の血管線維腫、血管筋線維芽細胞腫そして血管周皮腫に細分類できることを示唆した。このような分類は成書にも記載され、血管周皮腫の項目には同義語として Myopericytoma (筋周皮腫) や Perivascular wall tumor (血管周皮壁腫瘍) と併記されている。しかしながらイヌの血管周皮腫という診断名は存続されており、いまだ分類学的位置付けは不明瞭とされている (Hendrick, 2017)。

本節では、イヌのボーダーコリーにおいて、組織学的所見は Staghorn pattern や胎盤様構造など、ヒトの古典的な血管周皮腫と同様な構築を示す腫瘍についてさらに組織形態学および免疫組織化学的に検索し、獣医領域の既存の血管周皮腫と比較検討した。

## 材料・方法

症例はボーダーコリー、雄、13歳、体重26 kgで左腹側部に直径8.0 cmの腫瘤を確認したが、高齢のため飼い主は切除に消極的だった(図6-1)。しかし、1ヶ月後、腫瘤の急速な腫大により、生活にも支障が出たため、7ヶ月後に外科的に切除した。切除後再発は認められなかった。摘出した腫瘤は28 × 25 × 10 cm可動性で、やや硬結感があり、断面は灰白色充実性であった(図6-1挿入図)。

摘出した組織は、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、パラフィン切片を作成し、5-10 μmに薄切した。一般染色としてヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、特殊染色として渡辺鍍銀法を行った。さらにデキストランポリマー法(ENVISION)法による免疫組織化学的検索を行った。一次抗体は、抗Cytokeratin AE1/3抗体、抗Vimentin抗体、抗Desmin抗体、抗CD34抗体、抗第Ⅷ因子関連抗原(vWF)抗体、抗α-smooth muscle actin(SMA)抗体、抗Calponin抗体、抗Laminin抗体、抗CD117(c-kit)抗体、抗S100抗体を用いた。一次抗体の詳細は表1に示す。抗原性の賦活化は、PBSにより10倍希釈したpH6またはpH9のTRS緩衝液(Dako)にパラフィン包埋切片を浸し、オートクレーブ(121℃、20分)により行った。0.3%過酸化水素メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った後、10倍希釈した正常山羊血清にて30分間室温でインキュベートすることにより、ブロッッキングを行った。その後、一次抗体を滴下し、4℃にて一晩インキュベートした。二次抗体にはENVISION™/HRP(Dako)を使用し、滴下後30分間室温にてインキュベートした。発色はDAB発色基質

溶液 (Dako) を用いて行い、対比染色にはメイヤー・ヘマトキシリン溶液を使用した。10%中性緩衝ホルマリン固定後に常法に従い HE 染色をした。免疫組織化学的検索はデキストランポリマー (ENVISION) 法により行った。

## 結果

組織学的所見は、豊富な膠原線維をともない好酸性の細胞質を持つ紡錘形細胞が豊富な線維性間質をともない疎に増殖していた。線維の走行に規則性は認められないが、胎盤状の構築を示す部位が存在した。血管が裂隙、分岐するように発達し、鹿角状構造を形成していた (図 6-2、6-3)。部位により間質粘液が多量に存在し、粘液腫様に増殖している領域も散在していた。細胞成分が消失し、広範囲に癒痕化が認められた。腫瘍細胞の核は紡錘形、異型性はなく、核分裂像はわずかであった。

免疫組織化学染色では、AE1/3、Desmin、 $\alpha$ -SMA、Calponin 発現は陰性、Vimentin、CD34、CD117 発現は陽性、Laminin、S100 は弱陽性、vWF については血管のみが陽性の反応を示した (表 6-1、図 6-4 ~ 6-10)。

## 考察

獣医領域におけるイヌの血管周皮腫は、紡錘形細胞が血管を中心に同心円状の構築をとる形態学特徴を主体に分類されてきた。Avallone ら (2007) の報告では、組織学的並びに免疫組織化学的特徴をもとに、筋系の血管平滑筋腫、筋周皮細胞腫、線維系の血管線維腫、血管筋線維芽細胞腫そして血管周皮腫に細分

類できることを示唆している。この分類の中で、形態学的に同心円状構築をとる腫瘍、すなわち現在の血管周皮腫を筋系また線維系の間葉系腫瘍と位置付け、ヒトの血管周皮腫と組織学的に一致する腫瘍を、真の血管周皮腫に分類した。この分類を参考にすると、本症例は組織学的特徴から血管周皮腫に診断された。S100 発現の陽性所見は Avallone (2007) の分類に合わせると良性神経鞘腫に分類すべきであるが、形態学的に神経鞘腫と診断することは困難であった。

ヒトにおいて、血管周皮腫は Stout ら (1942) により、Staghorn pattern や血管周囲の渦巻き状構造を特徴とする軟部組織の腫瘍として報告されて以来、その診断名は長く用いられてきた。しかし近年、免疫組織化学や遺伝学的に再分類が試みられ、現在は血管周皮腫と孤立性線維性腫瘍は共通の遺伝子異常 (NAB2-STAT6 遺伝子融合) を有する一連の腫瘍群という考え方が主流になっている。孤立性線維性腫瘍スペクトラムのなかの線維型と細胞型が移行しあうことで複雑な組織像を呈すると考えられ、未分化な多能性幹細胞のマーカである CD34 の発現強度が組織形態に関わることが示されている (C Gengler and L Guillou, 2006; Robinson *et al.*, 2013)。また、孤立性線維性腫瘍群では S100 発現の有無陽性の腫瘍が報告されていることより、S100 発現の有無は分類に影響がないと思われた (Chijiwa *et al.*, 2004)。本症例は形態学的類似性に加え、CD34 反応性も一致しており、ヒトの旧名の血管周皮腫、すなわち孤立性線維性腫瘍の細胞型に分類すべきものと考えられた。したがってイヌ特有の渦巻き状構築を有する血管周皮腫は筋系の特徴を有する Myopericytoma (筋周皮腫) に分類すべきであることが示された。

## 小括

イヌのボーダーコリーにおいて、ヒトの古典的な血管周皮腫と同様な構築を示す腫瘍に遭遇した。組織形態学的および免疫組織化学的に検索し、獣医領域の既存の血管周皮腫と比較検討した結果、獣医領域の Avallone ら (2007) の分類では血管周皮腫に診断されるが、ヒト分類の孤立性線維性腫瘍に分類されるべき腫瘍であることを示した。このような特徴を示す所見は、血管周皮腫の病理学的診断基準を再考する上で重要な症例といえる。



表 6-1. 本研究に用いた一次抗体

Antibody	Animal & Clonality	Dilution	Source
Cytokeratin AE1/3	Mouse monoclonal	Diluted	Nichirei
Vimentin	Mouse monoclonal	Diluted	Nichirei
Desmin	Mouse monoclonal	Diluted	Nichirei
CD34	Mouse monoclonal	Diluted	Nichirei
vWF	Rabbit polyclonal	1:200	Agilent
$\alpha$ -SMA	Mouse monoclonal	1:50	Agilent
Calponin	Mouse monoclonal	1:50	Agilent
Laminin	Rabbit polyclonal	1:25	Agilent
CD117	Rabbit polyclonal	1:400	Agilent
S-100	Mouse monoclonal	Diluted	Agilent

Nichirei: Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan

Agilent: Agilent Technologies Japan, Tokyo, Japan

表 6-2. 免疫染色における本症例とヒトの孤立性線維性腫瘍(古典的血管周皮腫)の比較

一次抗体	本症例	SFT (HEP)
<b>Cytokeratin AE1/3</b>	—	—
<b>Vimentin</b>	+	+
<b>Desmin</b>	—	—
<b>CD34</b>	+	+ (80-90%)
<b>vWF</b>	+(血管のみ)	+(血管のみ)
<b>α-SMA</b>	—	± (部分的に陽性)
<b>Calponin</b>	—	—
<b>Laminin</b>	±	NA
<b>CD117</b>	+	—
<b>S100</b>	±	± (部分的)

+ : 陽性、± : 弱陽性、— : 陰性.



図 6-1. 左脇腹に発達した 28 × 25 × 10 cm 大の腫瘍. 可動性があり、横臥では背側に移動した〈矢印〉. Bar = 10 cm. 挿入図：ホルマリン固定後の剖面. Bar = 1 cm.

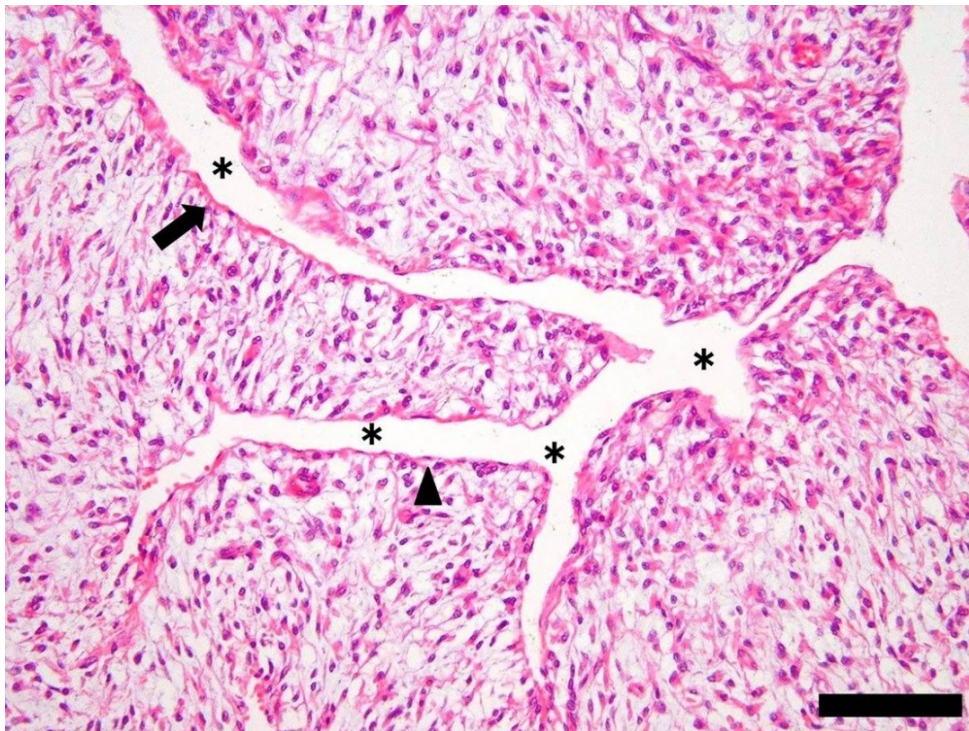


図 6-2. 鹿の角状構築 (\*) を伴い均一に増殖する腫瘍細胞. 細い線維束〈矢印〉と内皮細胞〈矢頭〉で裏打ちされた間隙. Bar = 200 μm.

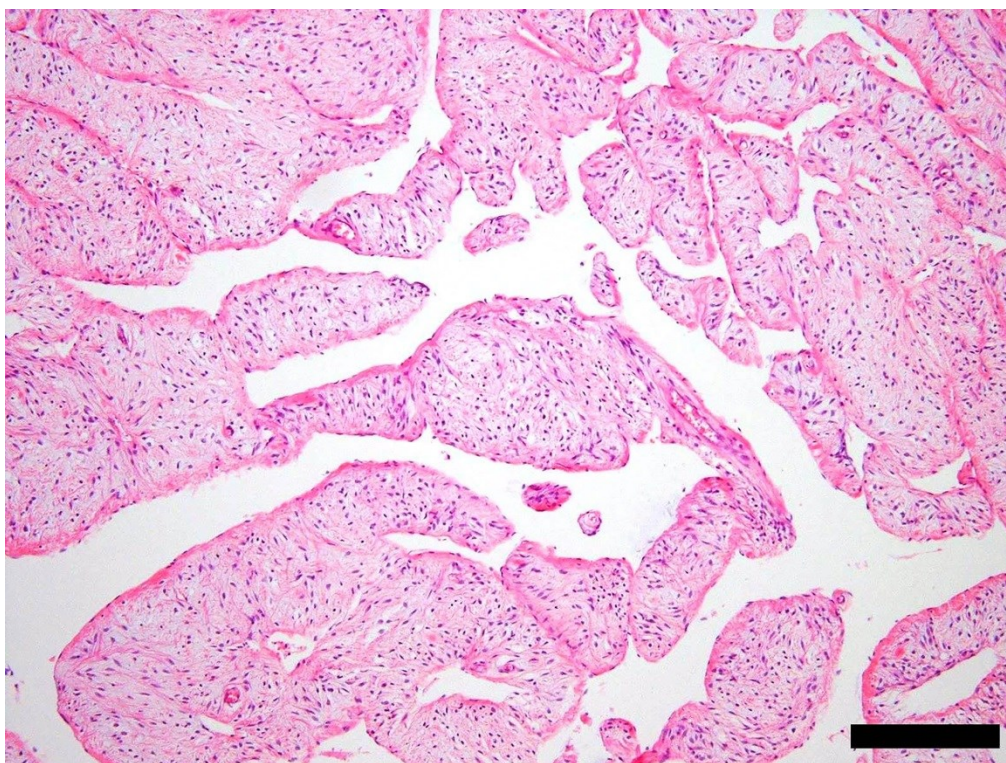


図 6-3. 胎盤様構造を示す腫瘍. Bar = 100  $\mu$ m.

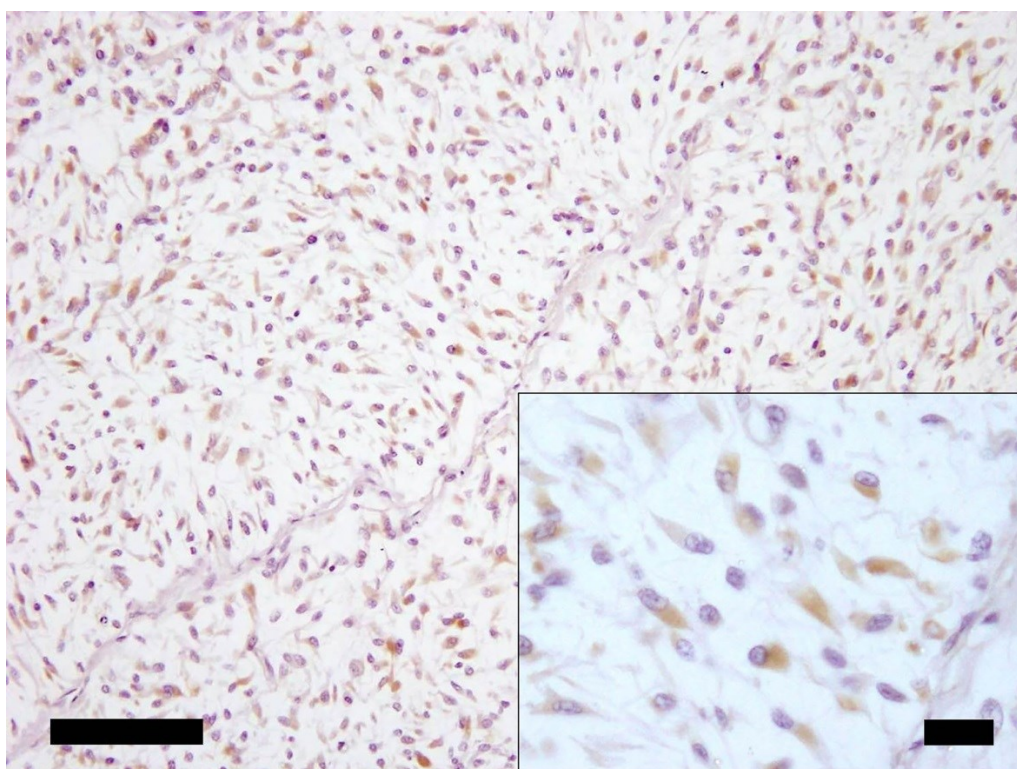


図 6-4. 抗ビメンチン抗体で細胞質が陽性を示した. IHC、Bar = 100  $\mu$ m. 挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu$ m.

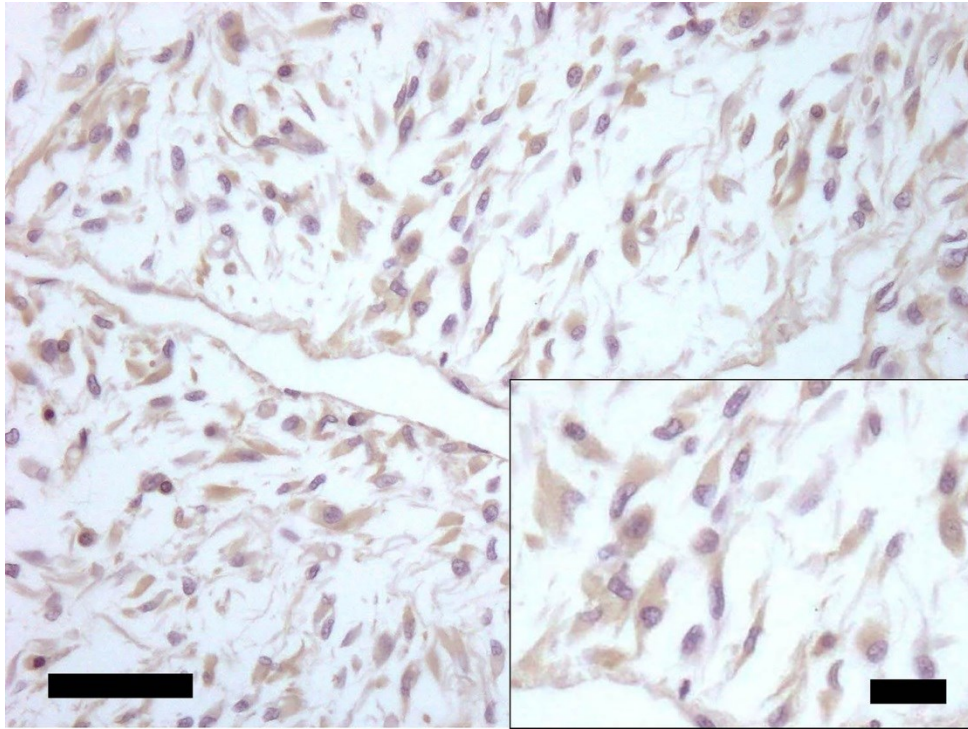


図 6-5. 抗 CD34 抗体で陽性を示す腫瘍細胞. IHC、Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

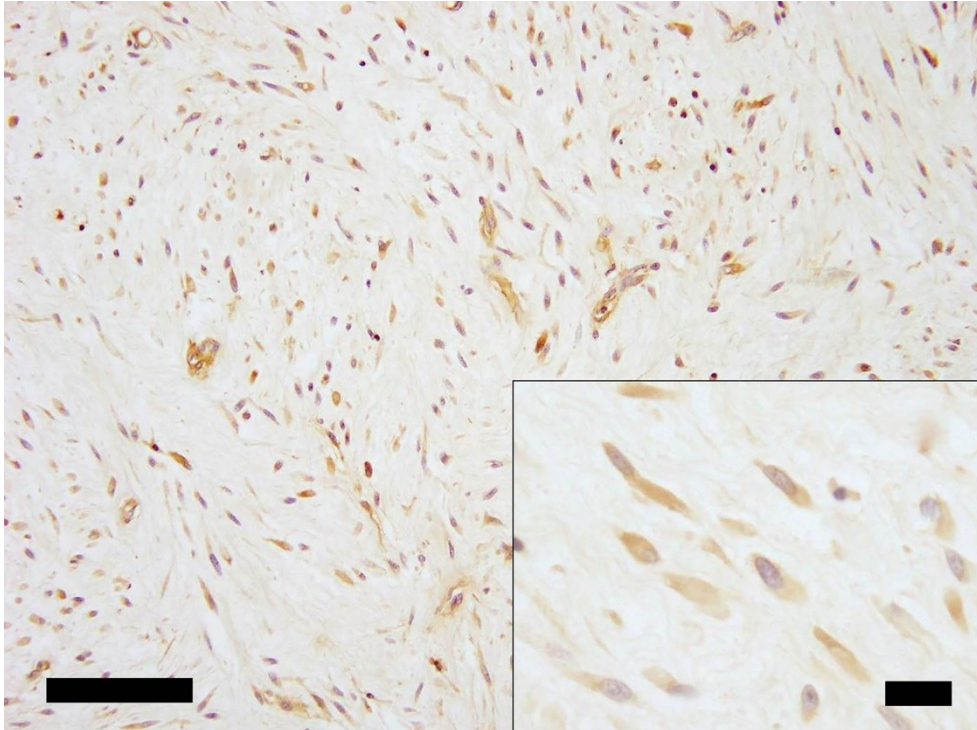


図 6-6. 抗ラミニン抗体で弱陽性を示す腫瘍細胞. IHC、Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

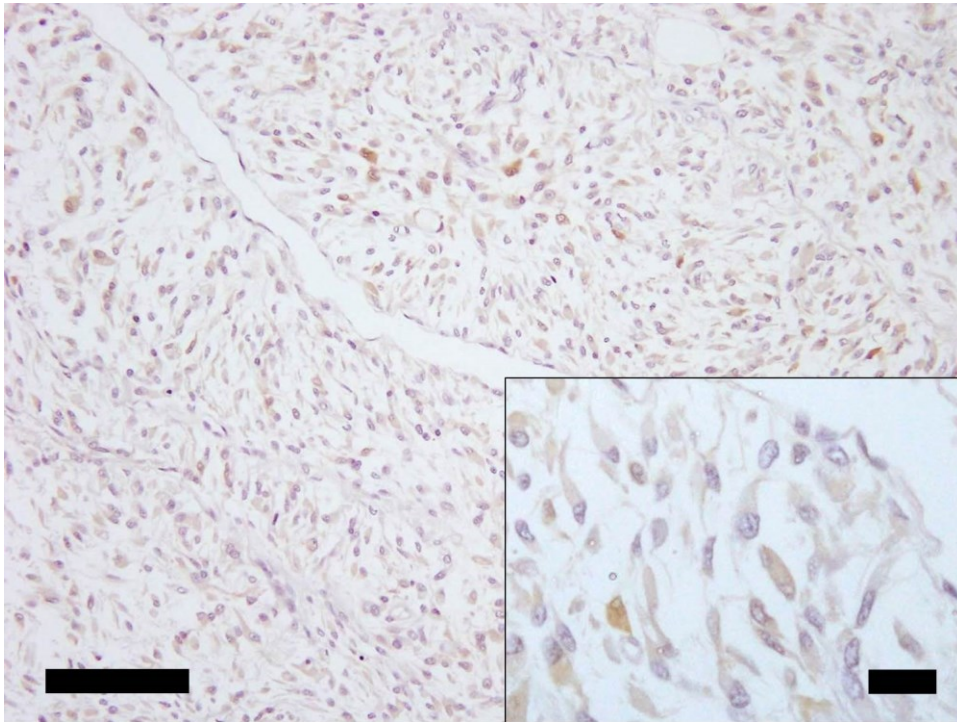


図 6-7. 抗 S-100 蛋白抗体で弱陽性を示す腫瘍細胞. IHC、Bar = 100  $\mu\text{m}$ . 挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

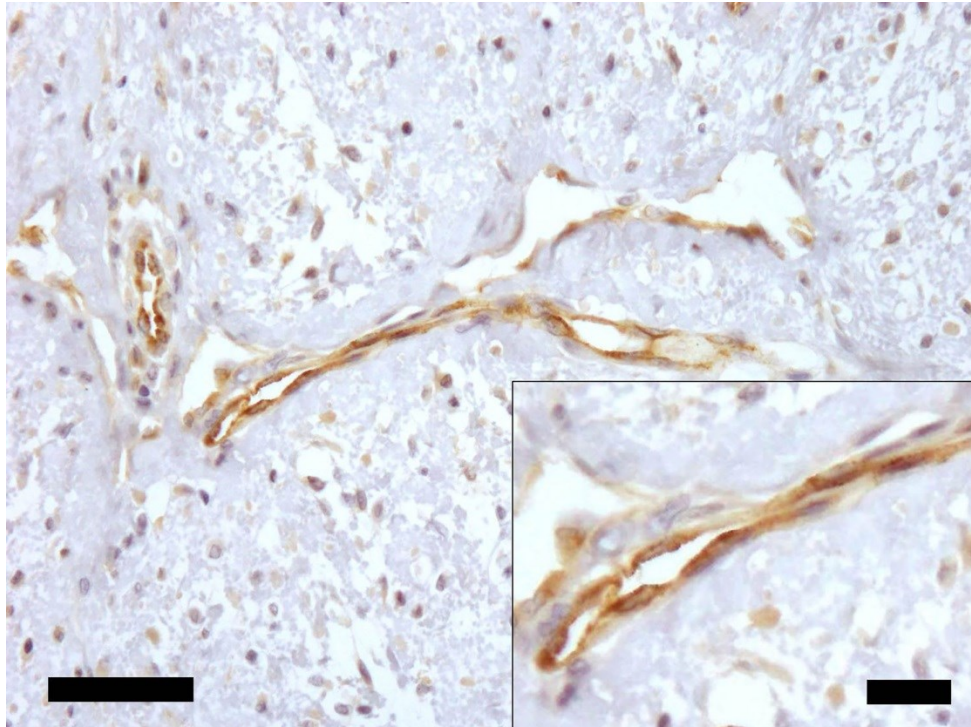


図 6-8. 角の鹿状構築を示す血管内皮細胞が抗 vWF 抗体により陽性を示した. IHC、Bar = 50  $\mu\text{m}$ . 挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

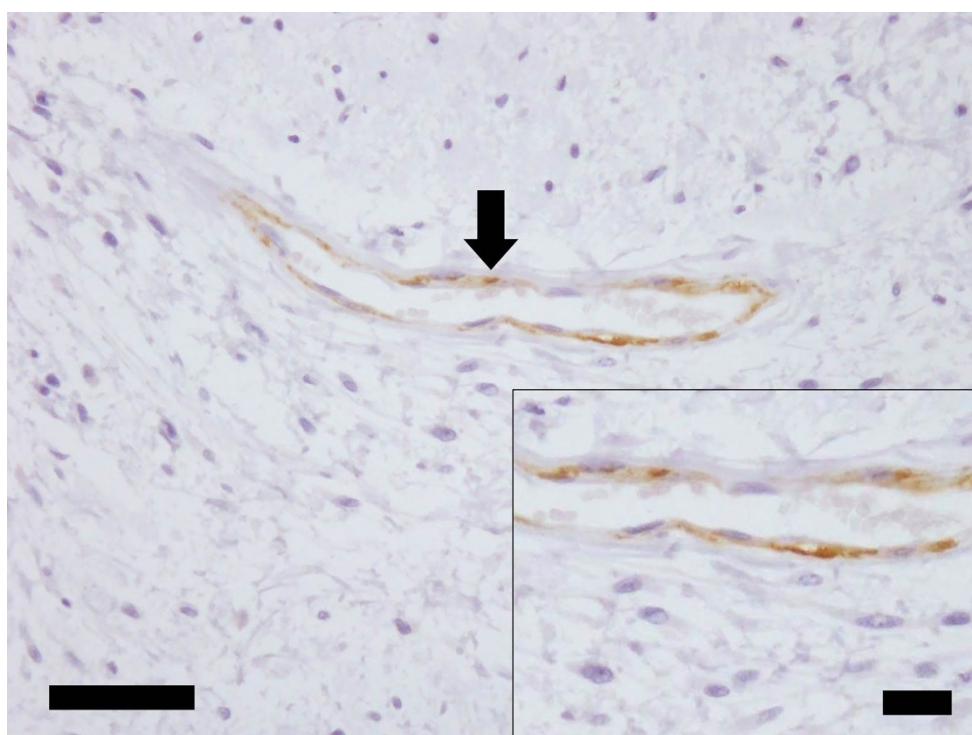


図 6-9. 血管内皮細胞のみ抗  $\alpha$ -SMA 抗体で陽性、紡錘形の腫瘍細胞は陰性. IHC、  
Bar = 50  $\mu$ m. 挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu$ m.

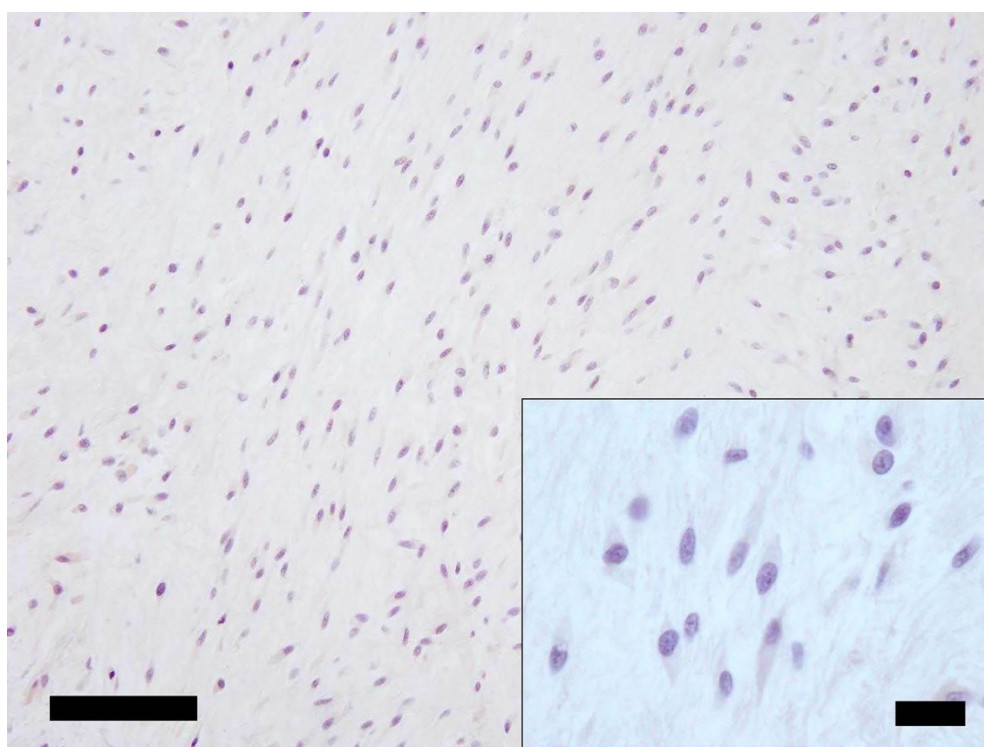


図 6-10. 抗カルポニン抗体では反応性が認められなかった. IHC、Bar = 100  $\mu$ m.  
挿入図：高倍率像. Bar = 20  $\mu$ m.

## 総括

本研究では、小動物臨床でしばしば遭遇する悪性間葉系腫瘍の血管肉腫、血管周皮腫に関して病理組織学的および免疫組織化学的手法を用いて、その特徴を明らかにしたものである。

血管肉腫の章において、第 1 節では抗 vWF 抗体は血管内皮由来の腫瘍細胞の検出に有用であるが、現在推奨されている抗 CD31 抗体は反応性が不安定であること、さらに抗 Claudin-5 抗体も補助的なマーカーとして有用であることが証明された。また抗 PCNA 抗体は全症例で陽性反応を示したことより、増殖活性の指標として有用であることを発見した。第 2 節では血管肉腫において組織形態学的な差異が存在すること、また CD31 の発現性の差を発見し、第 3 節では塩酸ドキシソルビシンの治験例として、化学療法の有益性が示唆された貴重な結果であった。

血管周皮腫の章において、第 1 節では間葉系マーカー、筋系マーカー、神経系マーカーを用いて、総合的に免疫組織化学的解析を行った結果、多くの血管周皮腫が線維系腫瘍の特徴を有することが示された。第 2 節では再発した血管周皮腫を検討し、再発腫瘍は細胞形態学的に悪性度が増加しており、外科的切除におけるマージン部位の設定の重要性を発見した。また免疫組織化学的には発現の差異が認められなかったことより、退形成にともない細胞性状が変化しないことを示した。第 3 節ではヒトの古典的血管周皮腫に類似する貴重な間葉系腫瘍の検索を行い、ヒトの孤立性線維性腫瘍に相当すること、そして既存のイヌの血管周皮腫とは病理組織学的な分類で相違していることを発見した。



本研究で明らかにしたとおり、その組織形態学的特徴、生物学的性状はそれぞれの腫瘍で特異的であり、病理学的特徴・性質を獣医師は十分に理解して対応すべきことが示された。これらの新知見は獣医学領域において診断、治療に大いに寄与するものと考えられる。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始ご指導いただきました本学獣医病理学研究室 佐藤常男元教授、渋谷久教授に深く感謝の意を表します。また、貴重なるご助言を賜りました本学獣医解剖学研究室 五味浩司教授、本学獣医放射線学研究室 中山智宏教授、および本学獣医生化学研究室 杉谷博士教授に厚く御礼申し上げます。最後に、終始ご支援いただいた鈴木犬猫病院のスタッフの皆様、そして精神的にいつも支えてくれた家族に心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- Alvarez FJ, Hosoya K, Lara-Garcia A, Kisseberth W, Couto G. VAC protocol for treatment of dogs with stage III hemangiosarcoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49: 370-377 (2013)
- Avallone G, Helmbold P, Caniatti M, Stefanello D, Nayak RC, Roccabianca P. The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Veterinary Pathology*, 44: 607-620 (2007)
- Bettini G, Mandrioli L, Brunetti B, Marcato PS. Canine splenic pathology: a retrospective study of 109 surgical samples, with special emphasis on fibrohistiocytic nodules. *European Journal of Veterinary Pathology*, 7: 101-109 (2001)
- Bingel SA, Brodey RS, Allen HL, Riser WH. Haemangiosarcoma of bone in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 15: 303-322 (1974)
- Chijiwa K, Uhida K, Tateyama S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Veterinary Pathology*, 41: 307-318 (2004)
- Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14: 479-485 (2000)
- DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology Today*, 15: 490-495 (1994)
- Ferrer L, Fondevila D, Rabanal RM, Vilafranca M. Immunohistochemical assessment of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *Journal of Comparative Pathology*, 112: 319-326 (1995)
- Forrest LJ. Imaging in Oncology, *In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical*

- Oncology, 4th Edit., Vail DM (ed.), Saunders, St. Louis, pp103-116 (2010)
- Fukuda S, Kobayashi T, Robertson ID, Oshima F, Fukazawa E, Nakano Y, Ono S, Donald E. Computed to mographic features of canine nonparenchymal hemangiosarcoma. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 55: 374-379 (2014)
- Gengler C, Guillou L. Solitary fibrous tumour and haemangiopericytoma: evolution of a concept. *Histopathology*, 48: 63-74 (2006)
- Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the skin and soft tissue. *In: Domestic Animals of Tumors*, 4th Edit., Meuton DJ (ed.), Iowa State Press, Iowa, pp99-101 (2002)
- Goldshmidt MH, Shofer FS. Canine hemangiopericytoma: *In: Skin Tumors of the Dog & Cat*. Goldshmidt MH, Shofer FS (eds). Pergamon Press, Tarrytown, NY, pp168-174 (1992)
- Gorden BH, Kim JH, Sarver AL, Frantz AM, Breen M, Lindblad-Toh K, O'Brien TD, Sharkey LC, Modiano JF, Dickerson EB. Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *American Journal of Pathology*, 184: 985-995 (2014)
- Hammer AS, Guillermo Couto C, Filppi J, Getzy D, Shank K. Efficacy and toxicity of VAC chemotherapy (vincristine, doxorubicin, and cyclophosphamide) in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5: 160-166 (1991)
- Hendrick MJ. Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues. *In: Tumors in Domestic Animals*, 5th Edit., Meuten DJ (ed.), Wiley-Blackwell, Hoboken, pp142-175 (2017)

- Hoover ML, Vetvicka V, Hoffpauir JM, Tamburro CH. Human endothelial cell line from an angiosarcoma. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 29A: 199-202 (1993)
- Krump-Konvalinkova V, Kleideiter E, Friedrich U, Klotz U, Kirkpatrick CJ. Tumorigenic conversion of endothelial cells. *Experimental and Molecular Pathology*, 75: 154-159 (2003)
- Lamerato-Kozickia AR, Helm KM, Jubala CM, Cutter GC. Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. *Experimental Hematology*, 34: 870-8 (2006)
- Masuzawa M, Fujimura T, Hamada Y, Fjita Y, Hara H, Nishiyama S, Katsuoka K, Tamauchi H, Sakurai Y. Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISOHAS). *International Journal of Cancer*, 81: 305-308 (1999)
- Mazzei M, Millanta F, Citi S, Lorenzi D, Poli A. Haemangiopericytoma: histological spectrum, immunohistochemical characterization and prognosis, *Veterinary Dermatology*, 13: 15-21 (2002)
- Medewell BR, Griffey SM, Munn RJ. Ultrastructure of canine vasoformative tumors. *Journal of Vascular Research*, 29: 50-5 (1992)
- Mullin CM, Arkans MA, Sammarco CD, Vail DM, Britton BM, Vickery KR, Risbon RE, Lachowicz J, Burgess KE, Manley CA, Clifford CA. Doxorubicin chemotherapy for presumptive cardiac hemangiosarcoma in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14: 171-183 (2016)
- Pantekoek JF, Schifer B. Metastasising canine fibrosarcoma originally diagnosed as haemangiopericytoma. *Journal of Small Animal Practice*, 16: 259-265 (1975)
- Prymak C, McKee LJ, Goldschmidt MH, Glickman LT. Epidemiologic, clinical,

- pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193: 706-712 (1988)
- Richardson RC, Render JA, Rudd RG, Shupe RE, Carlton WW. Metastatic canine hemangiopericytoma. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 182: 705-706 (1983)
- Robinson DR, Wu YM, Kalyana-Sundaram S, Cao X, Lonigro RJ, Sung YS, Chen CL, Zhang L, Wang R, Su F, Iyer MK, Roychowdhury S, Siddiqui J, Pienta KJ, Kunju LP, Talpaz M, Mosquera JM, Singer S, Schuetze SM, Antonescu CR, Chinnaiyan AM. Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nature Genetics*, 45: 180-185 (2013)
- Sabattini S, Bettini G. An immunohistochemical analysis of canine hemangioma and hemangiosarcoma. *Journal of comparative pathology*, 140: 158-68 (2008)
- Srebernik N, Appleby EC. Breed prevalence and sites of haemangioma and hemangiosarcoma in dogs. *Veterinary Record*, 129: 408-409 (1991)
- Stout AP, Murray MR. Hemangiopericytoma: a vascular tumor featuring Zimmermann's pericytes. *Annual Surgery*, 116: 26-33 (1942)
- Sugawara A, Ito S. Endothelin-producing tumor. *Japanese journal of Clinical Medicine*, 58: 550-552 (2000)
- Valli VE, Bienzle D, Meuten DJ, Linder KE. Tumors of the hemolymphatic system. *In: Tumors in Domestic Animals*, 5th Edit., Meuten DJ (ed.), Wiley-Blackwell, Hoboken, pp203-321 (2017)
- Vandevelde M, Higgins R. Neoplasia. *In: Veterinary Neuropathology: Essentials of Theory and Practice*. Oevermann A (ed.), Wiley-Blackwell, Hoboken, pp129-156

(2012)

Waters DJ, Caywood DD, Hayden DW, Klausner JS. Metastatic pattern in dogs with splenic hemangiosarcomas: clinical implications. *Journal of Small Animal Practice*, 29: 805-814 (1998)

Withrow S, Vail D, Page R. Introduction, *In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 4th Edit, Vail D (ed.), Saunders, St. Louis, pp19-21 (2010)