

イヌ，ネコおよびフェレットにおける稀少腫瘍  
の病理組織学的並びに免疫組織化学的研究  
：その組織診断と腫瘍細胞の分化について

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

油井 武

獣医病理学教室

指導教員 教授 谷山弘行

2015 年度

## 凡例

AB	alcian blue
ABC	avidin – biotinylated enzyme complex
ACTH	adenocorticotropic hormone
AEC	3 – amino – 9 – ethylcarbazole
AFP	alfa – 1 – fetopotein
AP	alkaline phosphatase
APUD	amine precursor uptake and decarboxylation system
CC	cholangiocarcinoma
CGA	chromogranin A
CI	colloidal iron
CK	cytokeratin
CKs	cytokeratin subtype
DAB	diaminobenzidine
D – PAS	periodic – schiff diastase
EMA	epithelial membrane antigen
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HD – AB	alcian blue – hyaluronidase
HE	hematoxylin and eosin
HID – AB	high iron diamine – alcian blue
MC	mayer's mucicarmin
MUC	mucin core protein
MUCs	mucin core protein subtype
NEC	neuroendocrine carcinoma
NF	neurofilament

NSE	neuron – specific enolase
PAS	periodic acid – schiff
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PGP	protein gene product
RT – PCR	reverse transcription – PCR
SSTR	somatostatin receptor
SSTRs	somatostatin receptor subtype
SYN	synaptophysin
TB	truidin blue
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
wdNET	well – differentiated neuroendocrine tumor
WHO	world health organization

## 目次

緒論	1
第1章 イヌとネコの肝臓の神経内分泌腫瘍に関する組織学的, 組織化学的並びに免疫組織化学的検討	5
1-1 序文	6
1-2 材料と方法	8
1-2-1 症例	
1-2-2 組織学的および組織化学的検索	
1-2-3 免疫組織化学的検索	
1-3 結果	12
1-3-1 肉眼的所見	
1-3-2 組織学的および組織化学的所見	
1-3-3 免疫組織化学的所見	
1-4 考察	19
1-5 小括	25
第2章 イヌの胆管癌における神経内分泌成分発現の検討	26
2-1 序文	27
2-2 材料と方法	28
2-2-1 症例	
2-2-2 組織学的および組織化学的検索	
2-2-3 免疫組織化学的検索	
(1) CC の評価	
(2) 神経内分泌成分の検出	
(3) E-カドヘリン抗原と Ki67 抗原の検出	
2-3 結果	32
2-3-1 6 症例の CC の診断	
2-3-2 CC の神経内分泌成分の検出	

2-3-3	CC と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍	
2-3-4	CC の E-カドヘリン抗原と Ki67 抗原の検出	
2-4	考察	45
2-5	小括	48
第 3 章	フェレットの脊索腫に関する組織学的, 組織化学的並びに 免疫組織化学的検索	49
3-1	序文	50
3-2	材料と方法	52
3-2-1	症例	
3-2-2	組織学的検索	
3-2-3	組織化学的検索	
3-2-4	免疫組織化学的検索	
3-3	結果	60
3-3-1	組織学的所見	
3-3-2	組織化学的所見	
3-3-3	免疫組織化学的所見	
3-4	考察	71
3-5	小括	79
	総括	81
	謝辞	85
	引用文献	86

## 緒論

病理学とは、病気の原因となる発生機序の解明、病気の診断を目的とする学問とされ、特に、動物の腫瘍における原因や進展メカニズムを病理学的に解明することは、腫瘍の診断や治療に欠かすことのできない基礎研究として、重要な位置を占めると考えられる。

ヒトや動物の腫瘍に関する世界保健機構 (world health organization: WHO) の分類は、病理組織学的分類と生物学的性状を組み合わせた基本原則を担うため、腫瘍の母組織 (母細胞) の特定とその腫瘍病変の組織学的特性を明らかにすることが腫瘍診断に必要不可欠であり、その分析能力に高い信頼性が求められている。腫瘍の病理学的診断は、組織学的分類と病期分類に大きく区分される。その中で、腫瘍組織に発生する良性と悪性の腫瘍細胞の形態学的特徴は異なるため、それぞれ腫瘍発生組織ごとに診断的指標が作成され、これに基づき診断・分類がなされている。近年、腫瘍関連抗原あるいは腫瘍特異抗原に対する抗体を用いた免疫組織化学的手法が開発され、細胞を構築する蛋白質や糖蛋白質などの抗原に対する特異抗体を作製することによって、組織上での抗原抗体反応により、その抗原の局在・分布を明らかにすることが可能となった [105]。免疫組織化学的手法により、腫瘍細胞の細部にわたる形態学的特性や細胞機能までも分析が可能となり、これらの情報を組み合わせることによって、腫瘍の病理学的分類および病理診断の正確性が飛躍的に向上した。現在、ヒトおよび動物の WHO 腫瘍分類に免疫組織化学的診断方法が大きく活用されている。この免疫組織化学的診断技術の向上によって、発生数の少ないいわゆる稀少腫瘍の診断も可能となり、その性状もより詳細に明らかにされるようになった。動物の腫瘍診断において、その病変の組織学的特性を明らかにすることは不可欠であるが、従来の病理組織学的検索による腫瘍の形態学的診断のみではその腫瘍組織ならびに腫瘍細胞の特性の解明に限界があることも事実である。本研究では、腫瘍解明が不十分であると考えられる3つの稀少腫瘍に関して、組織学的検索に組織化学的および免疫組織化学的検索を加え、発生学的に腫瘍の母細胞と腫瘍の分化の検索、比較病理学的に腫瘍の特性を詳細に検索することとした。本研究の取り組み方法に基づいた腫瘍検索は、今後、様々な腫瘍の本態の解明に役立ち、新たな腫瘍診断に寄与できるか検討した。

発生学的に、分化系統樹からみた体性幹細胞の分化能に関して、多能性幹細胞は、3胚葉系のいずれの細胞にも分化しうる能力を備えた細胞である [177]。多能性幹細胞は成人生体の約 1%を占め、全身の組織に生涯存在し、骨格筋、皮膚、骨髄に主に存在する細胞

である [134, 176, 177]. 次に, 多能性幹細胞から発生した胚葉系列幹細胞は, 神経堤細胞にみられるように, amine precursor uptake and decarboxylation (APUD) 系細胞, 甲状腺濾胞 C 細胞, 副腎髄質クロム細胞などの内分泌系細胞, 神経細胞, 骨などに分化できる能力を備えた細胞である. 胚葉系列幹細胞は, 組織特異性のある前駆細胞に分化する [134, 177]. この前駆細胞においても, 特定の細胞に分化しうる能力だけではなく, 骨-軟骨-脂肪前駆細胞 [127]にみられるように, 多分化能を有した前駆細胞も認められる. ヒトと動物の胎生期の多能性幹細胞または胚葉系列幹細胞に属した母細胞を起源とした腫瘍のうち, 卵巣線維腫は胎生期生殖索および間質に由来する性索間質性腫瘍, 胎生期の光受容体細胞由来の腫瘍に網膜芽細胞腫, 神経堤の交感神経原細胞由来の神経芽細胞腫, 腎芽細胞由来の腎芽腫のほか, 脊索腫, 頭蓋咽頭腫, ラトケ嚢腫, 胚細胞性腫瘍, 後頭蓋窩腫瘍・類上皮腫, 過誤腫, 肝芽腫などの腫瘍が知られている. 本研究は, 胚葉系列幹細胞に属し, 脊索遺残組織を母組織とする脊索腫, 神経堤の神経堤細胞から分化した前駆細胞に属した肝臓の神経内分泌細胞を母組織とする高分化の神経内分泌腫瘍 (well-differentiated neuroendocrine tumor: wdNET) において, 組織学的, 組織化学的および免疫組織化学的に, これらの稀少腫瘍の特性解明をし, 新たな腫瘍診断に寄与することを目的に研究を実施した.

第 1 章では, 肝臓原発の wdNET を検索した. wdNET は, 神経堤細胞から分化した神経内分泌細胞を由来とする腫瘍である. イヌ 4 症例とネコ 1 症例の肝臓の wdNET の腫瘍病変を組織学的, 組織化学的および神経内分泌マーカーをはじめとした各種抗体を用いた免疫組織化学的検索を実施した. ヒトの肝臓原発の wdNET の組織形態学的特徴は, 均一の好酸性の小型の腫瘍細胞であり, 組織化学的に好銀性反応, 非嗜銀性反応を示す前腸由来の腫瘍である. さらに, ヒトの肝臓の神経内分泌細胞由来とされる神経内分泌腫瘍は, 肝臓に転移した神経内分泌腫瘍と異なり, 腫瘍細胞からアミンやペプチドホルモンが検出されることは稀であり, 臨床的にカルチノイド症候群は認めにくい. 症例の腫瘍組織を様々なアミンやペプチドホルモン抗体を用いて免疫組織化学的に検索した. さらに, ヒトの神経内分泌腫瘍の診断にソマトスタチン受容体 (somatostatin receptor: SSTR) 抗体が活用されており, 本章の症例にも免疫組織化学的に SSTR 抗体に対して, 有効性が確かめられるか検討を加えた. 本章では, 臨床的および病理学的検索によって, 肝臓原発の wdNET を証明した.

第 2 章では, 胆管癌 (cholangiocarcinoma : CC) の腫瘍細胞の神経内分泌分化に関する検

索を実施した。イヌ 6 症例の肝臓の腫瘍は、組織学的および免疫組織化学的に CC と診断された。さらに、腫瘍細胞の神経内分泌成分の検出と分化との関連を組織化学的および免疫組織化学的に検索した。組織化学的にグリメリウス染色により、6 症例の腫瘍細胞の神経内分泌顆粒の検出を試みたほか、クロモグラニン A (chromogranin A: CGA) 抗体、神経特異エノラーゼ (neuron-specific enolase: NSE) 抗体およびシナプトフィジン (synaptophysin: SYN) 抗体を用いた免疫組織化学的検索により、CC の腫瘍細胞の神経内分泌分化との関連を検討した。これらの病理学的検索により、amphicrine 腫瘍の特性を有したヒトの mix adenoneuroendocrine carcinoma との関連を検討した。

第 3 章では、フェレットの脊索腫における脊索由来の未分化腫瘍について、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に検索した。脊索腫の腫瘍細胞は、胚葉系列幹細胞に属した脊索由来の未分化な腫瘍である。脊索腫は、粘液を多量に産生することを特徴とする腫瘍であることから、腫瘍の粘液の特性を明らかにした。上皮性および間葉性の両特性を有した腫瘍細胞に蓄積された粘液と細胞外基質の粘液性状を組織化学的ならびにムチンコア蛋白 (mucin core protein: MUC) の検出を目的に免疫組織化学的に評価を加えた。ヒトの脊索腫における粘液の組成は、酸性ムコ多糖類や中性粘液など一部の粘液成分が検出されているに過ぎない。本章は、組織化学的および免疫組織化学的に、腫瘍細胞が産生する粘液成分の詳細を明らかにした。免疫組織化学的に、E-カドヘリン抗体、サイトケラチン サブタイプ (cytokeratin subtype: CKs) 抗体および MUC サブタイプ (mucin core protein subtype: MUCs) 抗体を用いて、腫瘍細胞の細胞骨格と上皮性粘液の産生との関連を検討した。さらに、腫瘍細胞は、T 遺伝子によってコード化された蛋白である brachyury 遺伝子を保有し、遺残脊索組織をターゲットにした brachyury 抗体は、サイトケラチン (cytokeratin: CK) AE1/AE3 抗体、ビメンチン抗体、S-100 蛋白抗体、NSE 抗体および上皮膜抗原 (epithelial membrane antigen: EMA) 抗体と同様に、フェレットの脊索腫の類症鑑別に有効であるか検討を加えた。

本研究において、腫瘍の本態の解明と新たな腫瘍診断に寄与することを目的とし、腫瘍解明が不十分と考えられた 3 つの稀少腫瘍をそれぞれ 3 章に分けて検討した。第 1 章に肝臓原発の wdNET の証明、第 2 章に CC の神経内分泌分化の証明、第 3 章に脊索腫の未分化腫瘍の特性解明の 3 つの章に関して、発生学的に腫瘍の母細胞と腫瘍細胞の分化の検索、腫瘍の特性を比較病理学的に検討した。本研究の取り組み方法が、腫瘍の本態の解明による新たな腫瘍診断に寄与した事実を総括において評価し、今後の取り組むべき課題と方向



性に関して検討を加えた.

## 第1章

イヌとネコの肝臓の神経内分泌腫瘍に関する組織学的,  
組織化学的並びに免疫組織化学的検討

## 1-1. 序文

脊椎動物の初期発生において、表皮外胚葉と神経板の境界部に神経堤細胞と呼称される胚葉系列幹細胞に属した細胞集団が形成される。神経堤細胞は上皮-間充織転換（脱上皮化）した後に胎児組織間を遊走し、その後、APUD系細胞、甲状腺濾胞C細胞、副腎髄質クロム細胞、骨、神経細胞などの組織特異的前駆細胞に分化し、多様な組織形成に寄与している [135]。これらの前駆細胞のうち、神経内分泌細胞（kulchitsky細胞）は、神経内分泌腫瘍の由来細胞として知られている [99]。肝臓における神経内分泌腫瘍の由来細胞と考えられる神経内分泌細胞の存在は、ヒトとラットで確かめられているが [137, 138]、ラットを除く動物に関する報告はなく、その存在は明らかにされていない。動物のWHO腫瘍分類に従うと、肝臓と胆嚢の神経内分泌腫瘍は、カルチノイド、神経内分泌腫瘍、神経内分泌癌（neuroendocrine carcinoma: NEC）を同一のカテゴリーに定義されている [40]。一方、ヒトの消化器系の神経内分泌腫瘍またはNECは、neuroendocrine tumor G1（carcinoid（well-differentiated endocrine tumor））、neuroendocrine tumor G2（well-differentiated endocrine carcinoma）、neuroendocrine carcinoma（large cell or small cell type（poorly differentiated endocrine carcinoma））、mixed adenoneuroendocrine carcinoma、hyperplastic and preneoplastic lesion）に細分類されている [10]。wdNETは、ヒトにおいてカルチノイドとも呼ばれ、低分化の神経内分泌腫瘍は、NECと呼称されている [10]。肝臓の神経内分泌腫瘍の報告に関して、イヌとネコは、1981年と1992年にPatnaikらによって、初めて報告され [116, 119]、その報告例は極めて稀であるとともに [30, 116, 119, 121]、肝臓原発を証明した報告はみられない。一方、ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍は、1971年にPrimackらによって、はじめて報告され [128]、現在では、一般的に報告されている [1, 5, 6, 25, 28, 29, 31, 50, 52, 60, 71, 85, 111, 125, 129, 130, 143, 148, 164, 175]。

本章は、イヌ4症例とネコ1症例に関して、開腹時、肝臓実質に境界明瞭な白色結節病変を認めた。組織学的に、結節病変は、肝臓実質に均一な好酸性小型の腫瘍細胞が集塊状に増殖した。神経内分泌腫瘍を診断する目的でグリメリウス染色のほか、神経内分泌マーカーを用いた免疫組織化学的検索によって、腫瘍細胞に神経内分泌顆粒が検出された。神経内分泌腫瘍の原発臓器を特定する目的でアミンやペプチドホルモンに関連した各種抗体を用いた免疫組織化学的検索を実施した。肝臓癌との類症鑑別において、CCの診断にCK7抗体、CK19抗体およびCK20抗体、肝細胞癌の診断に癌胎児性蛋白（ $\alpha$ -1-fetoprotein: AFP）

抗体と hepatocyte 抗体を用いた免疫組織化学的検索を実施した。著者は、イヌ 4 症例とネコ 1 症例における肝臓原発の wdNET を診断する目的で、臨床的、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に検索した。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 症例

イヌ 4 症例 (症例 No.1-4) とネコ 1 症例 (症例 No.5) の肝臓の腫瘍病変を検索した。5 症例の年齢と性別は、8 歳から 12 歳で平均 10 歳、オス 4 症例、メス 1 症例であった (表 1)。5 症例に共通して、食欲不振、嘔吐および体重減少が認められ、全身麻酔下で開腹手術を実施した結果、肝臓実質に境界明瞭な米粒大から小豆大の白色結節病変を認めた。肝臓を除くその他の臓器に肉眼病変は認められなかった。なお、対照として 8 歳、オスのビーグル犬種 1 症例の正常の肝臓を供試した。

### 1-2-2. 組織学的および組織化学的検索

開腹手術により摘出した 5 症例の肝臓腫瘍部の組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬後、常法に従い、パラフィン包埋し、4-6  $\mu\text{m}$  に薄切した。その後、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin: HE) 染色を実施した。組織切片は、組織化学的にグリメリウス染色、フォンタナ・マッソン染色を実施し、200 倍、10 視野の光学顕微鏡観察下において腫瘍細胞に、染色反応なし：-、染色反応あり：+として評価した。

### 1-2-3. 免疫組織化学的検索

各症例の肝臓の腫瘍病変を切り出した組織切片を用いてアビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotinylated enzyme complex: ABC) 法 (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) による免疫組織化学的検索を実施した。脱パラフィン切片は、室温 10 分間、3% 過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシターゼを除去した。水洗後、ブロックエース (Ds pharma Biomedical, Osaka, Japan) を用いて、非特異反応を除去した。1 次抗体は、4°C、16 時間、ビオチン化 2 次抗体は室温 30 分間反応させた。さらに、アビジン・ペルオキシターゼ複合体 (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) を用いて室温 30 分間反応させた。切片は、0.05% 3,3'-ジアミノベンチジン加 PBS (diaminobenzidine: DAB, Dojindo, Kumamoto, Japan) に過酸化水素濃度が 0.005% になるように加えた発色液に室温 10 分間浸漬して発色反応させ、可視化させた。その後、切片は、マイヤーヘマトキシリン染色で対比染色した。陰性対照は、各種 1 次抗体を除き同一の方法で処理した。さらに、ソマトスタチン受容体サブタイプ (somatostatin receptor subtype: SSTRs) のうちのマウス抗 SSTR1-3, 5 血清を用いた免疫組織化学的検索は、アルカリフ

オスファターゼ法 (alkaline phosphatase: AP) (Histofine simple stain AP; Nichirei, Japan) により実施した。1次抗体は、4℃、16時間、2次抗体は室温30分間反応させた。ビオチン化2次抗体は室温30分間反応させた。さらに、発色は parma red (Diagnostic Biosystems, U.S.A.) を用いて室温10分間反応させた。使用した1次抗体の詳細は、表2に示した。

表 1. 5 症例の概要

症 例	種 種	品 種	性 別	年 齢
No.1	イヌ	Shiba	オス	8
No.2	イヌ	Golden retriever	オス	10
No.3	イヌ	Shiba	メス	12
No.4	イヌ	Siberian husky	オス	11
No.5	ネコ	mix	オス	不明

表 2. 免疫組織化学的検査に使用した 1 次抗体

1次抗体	宿主動物	クローン	希釈	不活化処理	製造元
CGA	Rabbit		1:1	MW <sup>a</sup>	Nichirei, Tokyo, Japan
SYN	Mouse	MAB329	1:1000	MW <sup>a</sup>	Chemicon International, U.S.A.
NSE	Mouse	BBS/NC/VI-H14	1:50	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
ACTH	Mouse	02A3	1:50	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
Calcitonin	Rabbit		1:300	MW <sup>b</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
Glucagon	Rabbit		1:1	MW <sup>b</sup>	Nichirei, Tokyo, Japan
Insulin	Rabbit		1:1	MW <sup>a</sup>	Nichirei, Tokyo, Japan
Serotonin	Rabbit		1:1	MW <sup>a</sup>	Nichirei, Tokyo, Japan
VIP	Rabbit		1:2000	MW <sup>a</sup>	Chemicon International, U.S.A.
GFAP	Rabbit		1:500	PK	Dako, Glostrup, Denmark
NF	Mouse	2F11	1:100	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
S-100 protein	Rabbit		1:200	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
AFP	Rabbit		1:100	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
Hepatocyte	Mouse	OCH1E5	1:30	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
CK7	Mouse	OV-TL 12/30	1:50	PK	Dako, Glostrup, Denmark
CK19	Mouse	BA17	1:100	MW <sup>a</sup>	Thermo Fisher Scientific, U.S.A.
CK20	Mouse	Ks20.8	1:50	PK	Dako, Glostrup, Denmark
Leu 7	Mouse	HNK-1	1:100	MW <sup>a</sup>	Becton, Dickinson, U.S.A.
PGP9.5	Rabbit		1:5000	MW <sup>a</sup>	UltraClone Ltd, Wellow, U.K.
Ki67	Mouse	MIB-1	1:100	MW <sup>a</sup>	Dako, Glostrup, Denmark
SSTR1	Mouse	ss-840	1:400	MW <sup>b</sup>	Gramsch Laboratories, Germany
SSTR2	Mouse	ss-850	1:400	MW <sup>b</sup>	Gramsch Laboratories, Germany
SSTR3	Mouse	ss-880	1:400	MW <sup>b</sup>	Gramsch Laboratories, Germany
SSTR5	Mouse	ss-890	1:400	MW <sup>b</sup>	Gramsch Laboratories, Germany

ACTH : adenocorticotrophic hormone, AFP : alfa-1-fetoprotein, CGA : chromograninA, CK : cytokeratin, GFAP : Glial fibrillary acidic protein, NF : neurofilament, NSE : neuron-specific enolase, PGP : protein gene product, SSTR : somatostatin, SYN : synaptophysin, VIP : vasoactive intestinal polypeptide, MW : microwave 法, PK : protein kinase 処理 (室温, 20 分間), a : 10 mM citrate buffer solution (pH 6.0) を用いた microwave 法. (121 ° C, 15 分間), b : 50 mM Tris buffer solution (pH 8.0)を用いた microwave 法. (121 ° C, 15 分間)



### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 肉眼的所見

5 症例の肝臓実質に直径 0.5-1.0cm 大の境界明瞭な白色結節病変がみられた。症例 No.2 と症例 No.4 の左葉に直径 1.0cm 大の大型の結節病変が 1 カ所認められた (表 3)。いずれの症例も結節周囲に被膜はみられなかった。腫瘍切除時、肝臓を除く諸臓器に肉眼病変は認められなかった。

#### 1-3-2. 組織学的および組織化学的所見

5 症例の組織学的および組織化学的所見を表 3 に示した。5 症例とも、結節内に集塊状に増殖した腫瘍組織が、肝臓実質に取り囲まれ、境界明瞭にみられた。増殖した腫瘍組織は線維性結合組織で分画され、管状、肺泡状、索状、胞巣状、腺状、ロゼット状およびリボン状の配列パターンを示した (図 1)。腫瘍組織に小血管が少数認められた。腫瘍は、均一の小型の腫瘍細胞で構成された。腫瘍細胞は非染色性または好酸性の細胞質をもつ円形から卵円形の均一の小型の細胞から成り、細胞質の中央に円形または卵円形の核を認めた。5 症例の腫瘍細胞の核分裂像は稀であった。核は核小体不明瞭、核/細胞質比が高く、斑状や顆粒状のクロマチンを認めた。いずれの症例の腫瘍細胞もグリメリウス染色によって、明瞭な銀親和性の褐色顆粒が細胞質に認められたが (図 2)、フォンタナ・マッソン染色に反応を示さなかった。

#### 1-3-3. 免疫組織化学的所見

免疫組織化学的検索結果を表 4 に示した。5 症例の腫瘍細胞は、神経内分泌腫瘍の診断に用いられるウサギ抗 CGA 血清、マウス抗 SYN 血清およびマウス抗 NSE 血清に対して陽性反応を示した (図 3)。アミンとペプチドホルモンのマーカーであるマウス抗副腎皮質ホルモン (adrenocorticotropic hormone: ACTH) 血清、ウサギ抗カルシトニン血清、ウサギ抗グルカゴン血清、ウサギ抗インスリン血清、ウサギ抗セロトニン血清、ウサギ抗血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal polypeptide: VIP) 血清に対して、5 症例の腫瘍細胞に反応を示さなかった。全症例の腫瘍細胞は神経系マーカーであるウサギ抗グリア細胞線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) 血清、マウス抗神経細線維 (neurofilament: NF) 血清に対して反応を示さなかったが、症例 No.1, 3 の腫瘍細胞は、ウサギ抗 S-100 蛋白血清に対して陽性反応を示した。肝細胞または肝細胞癌のマーカーで

あるウサギ抗 AFP 血清とマウス抗 hepatocyte 血清に対して、5 症例の腫瘍細胞に反応を示さなかった。マウス抗 CK7 血清, マウス抗 CK19 血清およびマウス抗 CK20 血清に対して、5 症例の腫瘍細胞に反応を示さなかった。その他、5 症例の腫瘍細胞は、マウス抗 Leu7 血清およびウサギ抗 Protein Gene Product (PGP) 9.5 血清に対して反応を示さなかった。なお、マウス抗 Ki67 血清に対して、いずれの症例も 1,000 腫瘍細胞数当たり、陽性反応を示した腫瘍細胞は、80 腫瘍細胞数未満であった。ウサギ抗 CGA 血清に対する免疫組織化学的検索により、正常イヌの胆嚢壁に極少数の細胞（胆嚢上皮細胞間および胆嚢の粘膜固有層）に陽性反応を示したが、肝門部付近の肝管と実質、肝外胆管および各葉の実質に反応を示す細胞は認められなかった。マウス抗 SSTR2 血清を用いた免疫組織化学的検索に対して、症例 No.1-5 の腫瘍細胞膜に近接して明瞭な陽性反応を示した。5 症例の腫瘍細胞は、マウス抗 SSTR1 血清, マウス抗 SSTR3 血清およびマウス抗 SSTR5 血清に対して、反応を示さなかった。

表 3. 5 症例の肝臓腫瘍の肉眼的および組織診断

分類	症 例				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
肉眼的所見					
左葉		直径1.0cm (1)	直径0.5 cm (多発性)	直径1.0cm (1)	直径0.5 cm (多発性)
右葉					直径0.5 cm (多発性)
方形葉					
全葉	直径0.5cm (2) <sup>2)</sup>	直径0.5-1.0cm (多発性)		直径0.5 cm (多発性)	
組織学的所見					
増殖パターン					
管状	++	+	+	+	+
肺胞状	+	+	+++	++	+
索状	-	+++	++	+++	-
胞巢状	+	-	+	-	-
腺状	+++	-	-	+	+
ロゼット状	+	+	-	-	+++
リボン状	+	+	-	+	+
円形または卵円形	++	+++	+++	+++	+++
好酸性	++	++	++	++	++
核/細胞質比：高	++	++	++	+++	++
核	-	-	-	+	-
大小不同	+++	+++	+++	±	+++
円形または卵円形	-	-	-	+	-
多形態	-	-	-	+	-
核分裂像	+	+	+	+	+
クロマチン顆粒	++	++	++	++	++
核膜明瞭	+++	+	+++	++	+++
核小体不明瞭	-	-	-	-	+
核小体明瞭	-	-	-	-	-
浸潤 <sup>1)</sup>	+++	+++	+++	+++	+++
境界明瞭	-	-	-	-	-
壊死	-	-	-	-	-
出血	+	+	+	+	+
結節の線維性隔壁	+	+	+	+	+
血管新生	+	+	+	+	+
転移病変					
その他					
組織化学的所見 <sup>3)</sup>					
Grimelius染色	+	+	+	+	+
Fontana - Masson染色	-	-	-	-	-

組織所見 -：著変なし， +：軽度， ++：中等度， +++：重度

1) 血管またはリンパ管内浸潤， 被膜外浸潤， 2) ( )：結節数， 3) -：未検出， +：検出

表 4. 5 症例の免疫組織化学的検査の結果

1次抗体	症 例				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
CGA	+	+	+	+	+
SYN	+	+	+	+	+
NSE	+	+	+	+	+
ACTH	-	-	-	-	-
Calcitonin	-	-	-	-	-
Glucagon	-	-	-	-	-
Insulin	-	-	-	-	-
Serotonin	-	-	-	-	-
VIP	-	-	-	-	-
GFAP	-	-	-	-	-
NF	-	-	-	-	-
S-100 protein	+	-	+	-	-
AFP	-	-	-	-	-
Hepatocyte	-	-	-	-	-
CK7	-	-	-	-	-
CK19	-	-	-	-	-
CK20	-	-	-	-	-
Leu7	-	-	-	-	-
PGP9.5	-	-	-	-	-
Ki67 <sup>1)</sup>	+	+	+	+	+
SSTR1	-	-	-	-	-
SSTR2	+	+	+	+	+
SSTR3	-	-	-	-	-
SSTR5	-	-	-	-	-

+ : 陽性反応, - : 陰性反応

1) + : 1,000 腫瘍細胞あたり, 80 腫瘍細胞数未満

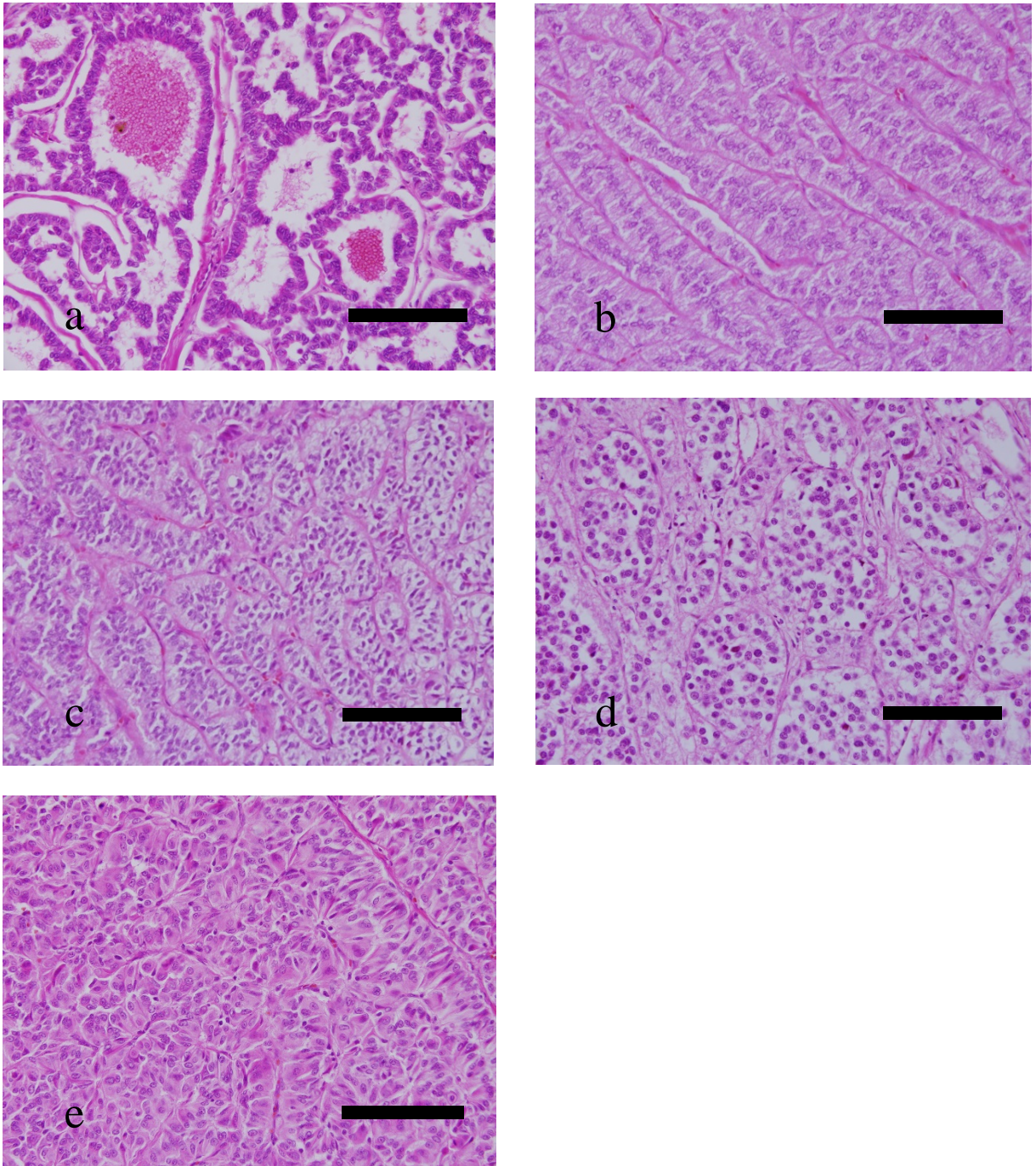


図1 a: 管状に増殖する症例 No.1 の腫瘍細胞, b: 索状に増殖する症例 No.2 の腫瘍細胞, c: 肺泡状に増殖する症例 No.3 の腫瘍細胞, d: 胞巣状に増殖する症例 No.4 の腫瘍細胞, e: ロゼット状に増殖する症例 No.5 の腫瘍細胞. HE 染色, Bar=100  $\mu$  m.

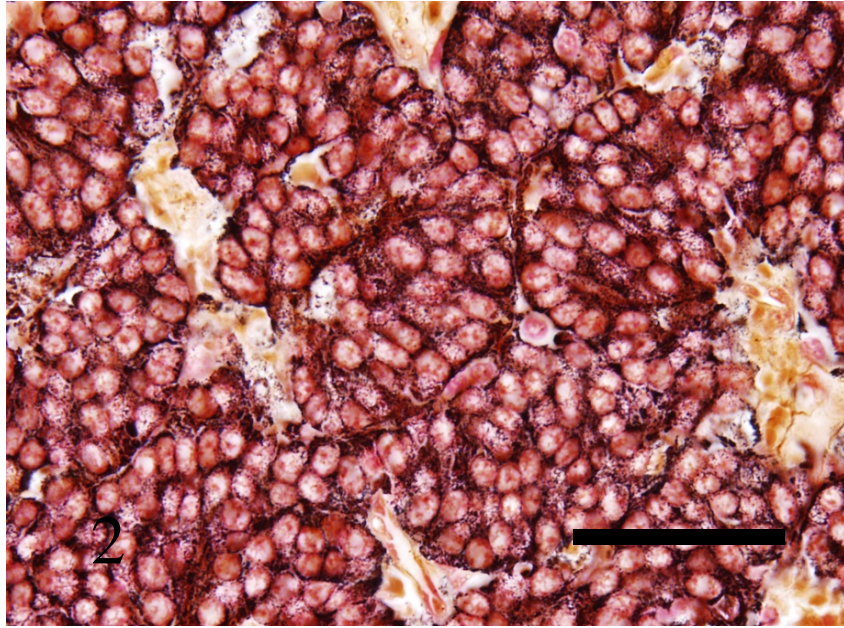
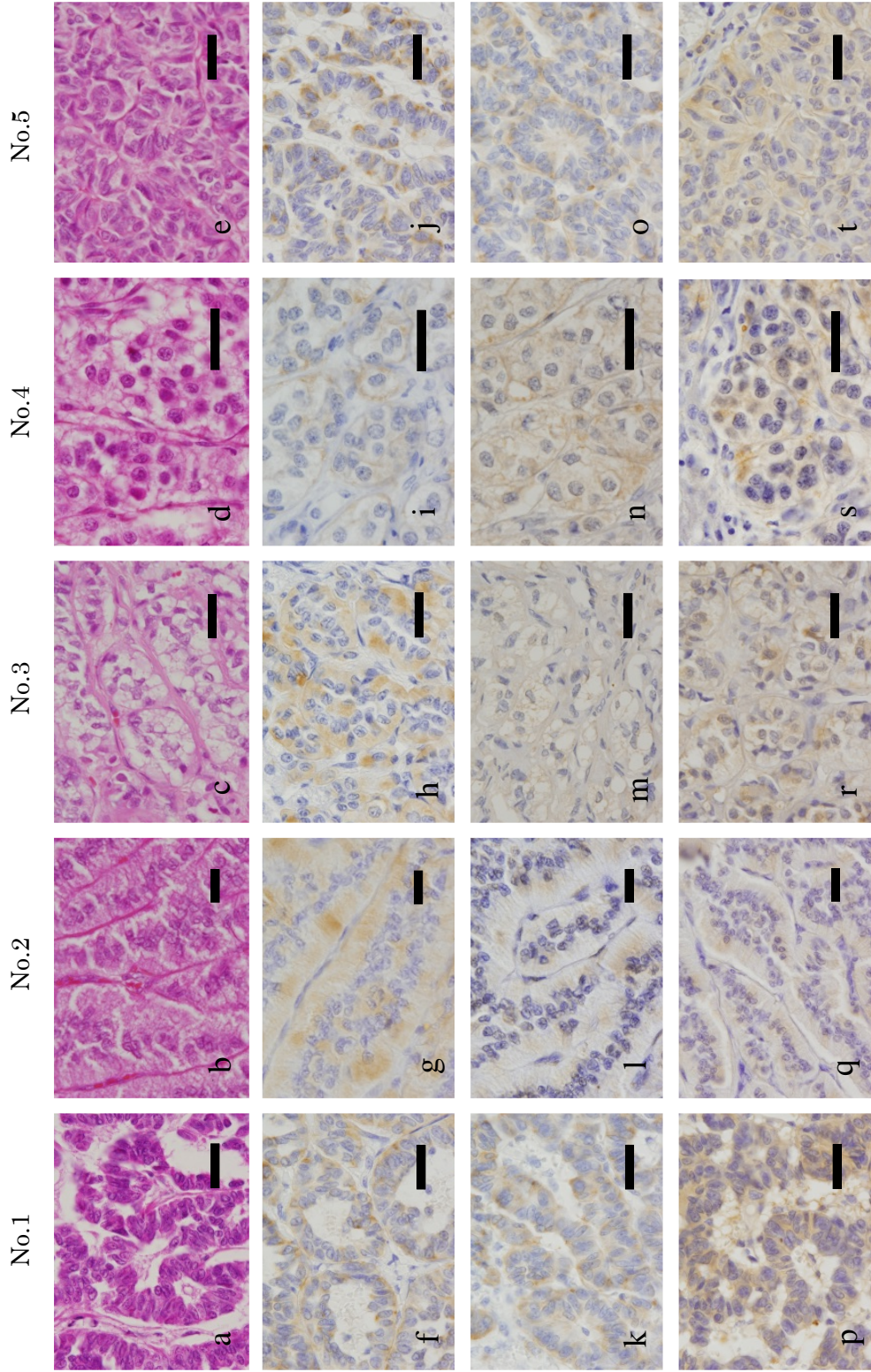


図 2：グリメリウス染色によって，症例 No.2 の腫瘍細胞質に銀親和性の顆粒が認められる． Bar=125  $\mu$  m.



H E C G A N S E S Y N

図3：全症例の肝臓の神経内分泌腫瘍の顕微鏡観察。増殖した腫瘍細胞は、管状、索状、肺胞状、胞巣状およびロゼット状の配列パターンを示す (a-e)。HE 染色, Bar=250  $\mu$  m. 全症例の肝臓の腫瘍細胞質は, CGA 抗体 (f-j), NSE 抗体 (k-o) および SYN 抗体 (p-t) に陽性反応を示す。免疫組織化学的検査, Bar=25  $\mu$  m.

#### 1-4. 考察

組織学的に、ヒトと動物の wdNET を定型の神経内分泌腫瘍、低分化の神経内分泌腫瘍を非定形の神経内分泌腫瘍と一般的に呼称される。wdNET は、均一的好酸性卵円形の小型の腫瘍細胞が集塊状に形成され、これらの腫瘍細胞塊と正常組織との境界は明瞭であり [5, 30, 116, 119, 175]、特有な配列構造を形成する。一方、低分化の神経内分泌腫瘍は、弱好酸性の細胞質、核小体不鮮明、大小不同の多形核、多数の核分裂像を示し、腫瘍細胞の多くは、瀰漫性に大結節状またはシート状に増殖・配列するとされる [56, 57, 58, 59, 125]。本章の 5 症例の腫瘍細胞は、索状、管状等様々な配列構造を認め、低分化を疑う大結節状またはシート状の配列構造はみられなかった。5 症例の腫瘍は、悪性腫瘍を疑う退形成、核分裂像、核の大小不同は認められず、ヒトの肝臓原発の wdNET の組織学的所見と一致した [29, 41, 71, 125, 164]。

ヒトの Ki67 標識率を指標とした神経内分泌腫瘍の悪性度のグレード分類に従うと [10]、Ki67 抗原検出率が 20%以上の腫瘍は、低分化の神経内分泌腫瘍に分類される。本章の症例における Ki67 抗体に対して陽性反応を示す腫瘍細胞は、1,000 腫瘍細胞数当たり 80 腫瘍細胞数未満 (8%検出率未満) であったことから、本章の 5 症例は、ヒトの wdNET に相当した。組織化学的に、神経内分泌腫瘍は、グリメリウス染色による好銀性反応とフォンタナ・マッソン染色による嗜銀性反応を示す神経内分泌顆粒を検出することにより、前腸由来(呼吸器、胸腺、胃、十二指腸、肝臓、膵臓等)、中腸由来(小腸、盲腸等) および後腸由来(結腸、直腸等) に発生学的に分類することが可能である [84, 97, 98]。組織化学的に、前腸由来の肝臓原発の神経内分泌腫瘍は、好銀性を示し、嗜銀性を示さない [5]。本章の 5 症例の腫瘍細胞は、グリメリウス染色により好銀性反応を示し、フォンタナ・マッソン染色により、嗜銀性反応は示さなかったことから、いずれの症例の腫瘍細胞も前腸由来であり、肝臓原発の神経内分泌腫瘍の診断の一助となった。ヒトと動物の肝臓の神経内分泌腫瘍の免疫組織化学的診断は、一般的に CGA 抗体、SYN 抗体などの神経内分泌マーカーを用いた神経内分泌成分の検出と NSE 抗体を使用し [5, 6, 25, 28, 29, 52, 60, 71, 85, 94, 107, 111, 121, 125, 129, 164, 175]、本章の 5 症例もヒトと動物の神経内分泌腫瘍の報告例と一致し、免疫組織化学的に神経内分泌腫瘍と診断された。以上により、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に、本章のいずれの症例も神経内分泌腫瘍と診断された。

ヒトの肝臓の神経内分泌腫瘍において、肝臓原発または肝臓への転移との鑑別方法とし



て、臨床症状のほか、外科的開腹時に各臓器の腫瘍病変を肉眼的に確認することが重要であると指摘されている [6, 143]. 肝臓原発の神経内分泌腫瘍は左葉と右葉に腫瘍結節を形成する傾向にあるとされる [1, 5, 29, 71, 129, 164]. 本章のいずれの症例も主に、肝臓の左葉と右葉に腫瘍結節を認め、開腹時、肝臓以外の臓器に腫瘍結節はみあたらなかった. ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍は、肝臓に多中心性の腫瘍病変を形成する報告がみられ [129], 開腹時、肉眼的に肝臓実質に多発性の結節病変が認められている [6, 29, 60, 129, 164]. イヌとネコの肝臓の神経内分泌腫瘍も肝臓実質に様々なサイズの結節が形成された報告が多くみられている [116, 119, 121]. 本章のいずれの症例も肝臓のみに明瞭な大小の複数の結節病変がみられ、ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍の報告例と一致した. ヒトと動物の肝臓に転移した神経内分泌腫瘍の原発臓器は、主に消化管（回腸，盲腸，直腸）と呼吸器系（気管，肺）に認められる [54, 84, 89, 96, 149, 168]. 消化管の神経内分泌腫瘍の腫瘍結節の大きさと転移に関して、主に、直径約 2cm 以上の腫瘍結節は、悪性度の高い腫瘍で高率に肝臓へ転移するとされる. さらに、肝臓原発の神経内分泌腫瘍と比較して、肝臓に転移した神経内分泌腫瘍の腫瘍結節の中心部は壊死性病変を形成する傾向にもある [2, 33, 54, 89, 152, 154, 172]. このことから、肝臓に転移した消化管の神経内分泌腫瘍は肉眼で確認できる程度の大きさの腫瘍結節を形成し、壊死性病変も認められると推察される. 本章のいずれの症例も肝臓以外の臓器に腫瘍結節はみられず、肝臓の腫瘍結節に壊死性病変や出血性病変もみられなかった. 肉眼的に、本章の症例は、ヒトの肝臓原発と動物の肝臓の神経内分泌腫瘍の報告例と一致した.

イヌとネコの肝臓の wdNET の組織学的特徴は、境界明瞭な好酸性均一の小型の腫瘍細胞塊で構成されており、円形または卵円形の過色素性の核を保有し、細胞質に好酸性の顆粒を含む卵円形から紡錘形の腫瘍細胞から成るとしている [41, 116, 119]. 一方、これらの報告は、ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍の報告と同一であった [5, 6, 29, 60]. 肝臓に転移した消化管の神経内分泌腫瘍は、低分化の傾向にあり [149], 肝臓原発の神経内分泌腫瘍と比較して、壊死や出血のほか、血管内浸潤やリンパ行性の浸潤を認める. その腫瘍細胞は、大小不同、細胞形態の不整、腫瘍細胞間の境界不明瞭、核形の不整、核分裂像の増加傾向にあるとされる [152]. 本章のすべての症例にこれらの組織病変は認められなかった. イヌとネコの肝臓の神経内分泌腫瘍の腫瘍細胞は、巢状、索状、ロゼット状などの配列パターンを示すことが多い [30, 116, 119, 121]. ヒトの肝臓原発とされる神経内分泌腫瘍もイヌとネコの報告と同様の組織病変を形成した報告が多い [5, 6, 29, 50, 52, 71, 94, 111,

125, 164, 175]. 一方, ヒトの低分化の神経内分泌腫瘍の腫瘍細胞は, このような配列構造はつくらず, 瀰漫性に大結節状またはシート状に増殖した配列構造をつくる傾向にあるとされる [56, 57, 58, 59, 125]. 本章も症例ごとに配列パターンは異なったが, 動物やヒトの肝臓の wdNET にみられるような特異的な配列構造を形成した. 本章の症例は, ヒトと動物で過去に報告された wdNET と組織学的にも一致した.

ヒト, イヌおよびネコの神経内分泌腫瘍は, 消化管と呼吸器に発生しやすく [2, 16, 51, 54, 63, 89, 96, 97, 98, 139, 158, 168, 172], 肝臓の神経内分泌腫瘍は, これらの臓器からの転移によることが多い [2, 33, 54, 89, 154, 172]. 免疫組織化学的に, ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍と動物の肝臓の神経内分泌腫瘍は, 他臓器由来の神経内分泌腫瘍と同様に CGA 抗体, SYN 抗体, NSE 抗体を用いて診断されている [5, 6, 28, 29, 30, 85, 125, 148, 175]. 動物の肝臓の神経内分泌腫瘍に関する報告は少数みられたが [30, 116, 119, 121], 肝臓の転移との関連を免疫組織化学的に証明した報告はみられない. ヒトの神経内分泌腫瘍の腫瘍細胞から分泌されるアミンやペプチドホルモンは, 由来細胞ごとに検出される成分が異なる. このため, 原発臓器を特定するため, 神経内分泌腫瘍から分泌される ACTH, カルシトニン, インスリン, SSTR などのアミンやペプチドホルモン物質を免疫組織化学的に検出することは有効とされている [175]. 一方, 肝臓原発の神経内分泌腫瘍は, アミンやペプチドホルモンは検出されにくい [6, 50, 125, 175]. さらに, 消化管から肝臓に転移した神経内分泌腫瘍にカルチノイド症候群を臨床的に認める [73]. 稀にヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍は, ガストリンを分泌するゾリンジャー・エリソン症候群 [130], ACTH を分泌するクッシング症候群 [148]などの報告もみられるが, 肝臓原発の神経内分泌腫瘍の診断は, 臨床症状を含めて転移との関連を推定することも可能である. 本章において, いずれの症例も免疫組織化学的にアミンやペプチドホルモンは検出されず, カルチノイド症候群を疑う臨床症状は認められなかった. ヒトの肝臓に転移した中腸由来の神経内分泌腫瘍は, 血清中のセロトニンおよび 5-ハイドロキシインドール酢酸の上昇がみられるとされるが [172], 本章のいずれの症例もセロトニンは検出されず, 肝臓原発の神経内分泌腫瘍であると考えられた.

肝臓原発の神経内分泌腫瘍は, 肝細胞癌や胆管癌と類似した組織像を形成するケースもみられる. 組織学的検査のみに依存すると診断を誤るケースがある. 免疫組織化学的検査を実施するまで, 肝細胞癌や胆管癌と組織学的に診断されたヒトの報告があるため, 注意する必要がある [28, 50, 52, 71, 85]. 5 症例の腫瘍は, 免疫組織化学的に神経内分泌マーカー

ーを用いた wdNET の診断のほかにも, hepatocyte 抗体, AFP 抗体, CKs 抗体を用いた免疫組織化学的検索は, 肝臓癌との類症鑑別に重要であると考えられた.

SSTR は, 多臓器に存在する神経内分泌細胞から分泌される酸性ポリペプチドホルモンである. SSTR の生物学的機能は, 特定の細胞膜蛋白レセプターに作用することによって, 細胞の増殖や分化, 中枢神経系の機能調整, 内分泌腺や外分泌腺の刺激分泌調整など様々な機能をもつことで知られている [20]. 腫瘍の SSTRs 抗原の検出方法は, 逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription-PCR: RT-PCR) 法 [18, 95, 115], in situ ハイブリダイゼーション法 [66, 133], ウェスタンブロッティング法 [72], 免疫組織化学的検査法 [66, 72, 110, 115, 166] など主に検討されている. SSTRs 抗原に関連した報告はヒトで多く, 特に, 内分泌系および非内分泌系腫瘍の診断や研究に広く利用されている [18, 20, 72, 95, 110, 115, 126, 133]. このうち, SSTR2 は, 血管内皮細胞の増殖を抑制することによって, 腫瘍細胞の増殖抑制効果をもつため, 治療にも応用されている [20, 96, 110]. SSTRs は, SSTR1-5 の 5 つのサブタイプに分類され, 特に, SSTR2 はヒトの神経内分泌腫瘍に対して特異性が高く, 免疫組織化学的検査法のほか, シンチグラフィ, RT-PCR 法によっても SSTR2 の明瞭な検出が神経内分泌腫瘍に認められている [18, 20, 66, 95]. 特に, 免疫組織化学的に SSTR2 抗原の検出をスコア化した神経内分泌腫瘍の診断方法がヒトでみられる [166]. SSTR2 抗体は, 免疫組織化学的にヒトの神経内分泌腫瘍の腫瘍細胞の細胞膜や細胞質に特異的に反応することから, 神経内分泌腫瘍の診断に有効であると報告されている [66, 95, 110, 166]. SSTR1-5 に関する動物の神経内分泌腫瘍の免疫組織化学的診断に関する報告はみられない. 本章の症例は, SSTR2 抗体に対して腫瘍細胞に陽性反応が認められ, SSTR2 抗体が肝臓の神経内分泌腫瘍に特異的に反応したことが明らかにされた. さらに, 免疫組織化学的にヒトの神経内分泌腫瘍に対して SSTR1 抗体, SSTR3 抗体および SSTR5 抗体による診断の有効性も確かめられていることから [18, 72, 95, 110, 133, 166], 本章のイヌの肝臓原発の神経内分泌腫瘍に対して, SSTR1 抗体, SSTR3 抗体および SSTR5 抗体の有効性を評価した. その結果, 本章の腫瘍細胞に SSTR2 抗原は検出されたが, その他の SSTRs 抗原は検出されず, ヒトの報告例と差を認めた. その理由に, 抗体の特異性も考えられた. 症例の性別, 年齢, 原発臓器, 腫瘍細胞の異型性によって, SSTRs 抗原の検出に差が認められた報告もみられることから [95, 115, 166], 動物の神経内分泌腫瘍の SSTRs 抗原の検出の評価に対して慎重に検討する必要があると考えられた.

ヒトとラットの正常肝臓, ヒトの肝臓の慢性炎症病変や化生病変に神経内分泌細胞の存

在が報告されている [138]. イヌとネコの正常肝臓に神経内分泌細胞の存在は明らかにされていない. 主に, イヌとネコの胆管と胆嚢 [100, 118, 170]やヒトの肝外胆管や胆嚢 [9, 14, 26, 37, 61, 86, 106, 109, 141, 178]を原発臓器とした神経内分泌腫瘍の発生が多くみられることから, 正常イヌの肝門部付近の肝臓実質, 肝管, 肝外胆管および胆嚢を中心に神経内分泌細胞の検出を試みたところ, 胆嚢壁に少数の神経内分泌細胞の存在が確かめられた. しかし, 対照症例の正常肝臓実質に神経内分泌細胞の存在は確かめられず, イヌの肝臓の神経内分泌細胞の存在は明らかにされなかった. ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍の由来に関する仮説は, (1) 肝臓実質に膵臓組織が混在する説 [12], (2) 胆管が神経内分泌細胞に分化する説 [4], (3) 肝細胞などの内胚葉の細胞が神経内分泌細胞に分化する説 [19, 131], (4) 肝臓癌と胆管癌の腫瘍細胞が神経内分泌細胞または神経内分泌腫瘍に分化する説 [39, 174], (5) 肝幹細胞由来とする説 [8, 137]が報告されている. (1) に関して, 組織学的に, 肝臓実質に膵臓組織はみられず, 免疫組織化学的にインスリン抗原は検出されなかったため, (1) の可能性は低いと考えられた. (2) に関して, 免疫組織化学的に胆管由来の神経内分泌腫瘍は, 各種アミンやペプチドホルモン抗体に反応を示さず [86], 胆管または胆管癌は, CK7 抗体, CK18 抗体, CK19 抗体および CK20 抗体に対して陽性反応を示す [27, 79, 88]. 5 症例の腫瘍細胞は, これらの抗体に対して陽性反応は示さず, 胆管由来の神経内分泌腫瘍の可能性は低いと考えられた. (3) に関して, 消化管における内胚葉由来の上皮関連細胞は, 内分泌系と関連した細胞に分化しうることが報告されている [19, 131]. 肝細胞は内胚葉由来の細胞であるため, 肝細胞が神経内分泌腫瘍に分化した可能性も考えられたが, 免疫組織化学的に, hepatocyte 抗体および AFP 抗体に対して, 5 症例の腫瘍細胞に反応はみられず, 本章の 5 症例は肝細胞由来の神経内分泌腫瘍の可能性は低いと考えられた. (4) に関して, ヒトの肝細胞癌 [174]と胆管癌 [4, 39]の神経内分泌分化の報告はみられる. 動物では, ネコの胆管癌と神経内分泌腫瘍の分化を考察した報告がみられ [118], イヌの鼻腔腺癌と肛門嚢腺癌の神経内分泌分化した報告がみられている [108]. 免疫組織化学的に, 5 症例の腫瘍細胞は, CK7 抗体, CK19 抗体, CK20 抗体, AFP 抗体および hepatocyte 抗体に対して反応は示さず, 胆管および肝細胞由来の腫瘍細胞が神経内分泌分化した可能性は低いと考えられた. さらに, CKs 抗体を用いたことは, イヌで発生が多くみられる胆嚢癌との鑑別にも有効とされた. (5) に関して, 肝幹細胞は, 神経内分泌細胞に分化しうる多分化能をもつ細胞であることや [137, 163], 肝幹細胞が悪性形質転換によって, 肝細胞癌と神経内分泌成分を含んだ神経内分泌腫瘍に分化する可能性も考えられた.

ヒトの肝臓に転移した消化管の神経内分泌腫瘍と比較して肝臓原発の神経内分泌腫瘍は、予後が比較的良好であるとされ、外科的切除後の再発例は低く、生存率が高まるとされる [33, 60, 69, 143, 154]. 肝臓原発の神経内分泌腫瘍と比較して、肝臓転移の神経内分泌腫瘍は、低分化の腫瘍である可能性が高いことから、生存率は低下したと考えられた. 一方、イヌとネコの肝臓の神経内分泌腫瘍に関して、多臓器転移を起こし外科的切除が困難な死亡後の報告はみられたが [30], 外科的切除後の生存率を纏めた報告はみられなかった. 本章の 5 症例の予後に関しても不明とされた.

ヒトと動物の神経内分泌腫瘍は、一般的に、腫瘍の特性を生かした組織学的、組織化学的および免疫組織化学的手法を用いて診断される. 腫瘍診断において、原発臓器を特定することは、臨床上、必要不可欠な要素である. イヌとネコの肝臓の神経内分泌腫瘍に関する報告は、少数みられたが、肝臓原発と診断された報告はみられなかった. 本章の症例の肉眼的、組織学的および免疫組織化学的検索結果とヒト、イヌおよびネコの報告例を勘案した結果 [30, 116, 119, 121, 175], 全症例とも肝臓原発の wdNET と診断された.

## 1-5. 小括

ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍の報告は非常に稀である。一方、肝臓原発と診断された動物の神経内分泌腫瘍の報告はみあたらない。脊椎動物の胎生期において、神経堤に存在する胚葉系幹細胞である神経堤細胞は、APUD系細胞、甲状腺濾胞C細胞、副腎髄質クロム細胞、骨、神経細胞など組織特異的性をもった前駆細胞に分化する。このうち、神経内分泌細胞は、神経内分泌腫瘍の由来細胞として知られている。本章では、イヌ4症例とネコ1症例の肝臓の神経内分泌腫瘍の原発臓器の検索に関して、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的手法を用いて検討した。

肉眼的に、イヌ4症例とネコ1症例の肝臓実質に境界明瞭な直径0.5-1.0cm大の複数の白色結節病変を認めた。その他の臓器に肉眼病変は認められなかった。組織学的に、本章の腫瘍は、ヒトの肝臓原発のwdNETとイヌとネコの肝臓のwdNETに特徴的な組織病変を形成した。全症例とも腫瘍細胞は、非染色性または好酸性の細胞質内の中央に円形から楕円形の核をもった均一の小型の腫瘍細胞から成り、核はクロマチンが明瞭であり、核分裂像は稀であった。腫瘍組織は、管状、肺泡状、索状、胞巣状、腺状、ロゼット状およびリボン状の配列パターンを示し、被膜外浸潤や脈管内浸潤は認められなかった。組織化学的に、グリメリウス染色およびフォンタナ・マッソン染色によって、腫瘍細胞に前腸由来の銀親和性の神経内分泌顆粒が認められた。さらに、全症例の腫瘍細胞に神経内分泌マーカー（CGA抗体およびSYN抗体）とNSE抗体に陽性反応を示した。一方、アミンとペプチドホルモンのマーカー（ACTH抗体、カルシトニン抗体、グルカゴン抗体、インスリン抗体、セロトニン抗体およびVIP抗体）に対して陽性反応を示さなかった。神経系のマーカー（GFAP抗体およびNF抗体）に対して陽性反応は示さなかった。さらに、2症例の腫瘍細胞に対してS-100蛋白抗体に陽性反応を示した。類症鑑別として、肝細胞癌と胆管癌を検出するマーカーであるAFP抗体、hepatocyte抗体、CK7抗体、CK19抗体およびCK20抗体に対して、腫瘍細胞に反応を示さなかった。このため、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的検索によって、全症例の肝臓の腫瘍は、肝臓原発のwdNETと考えられた。

本章は、複数のイヌとネコを用いた肝臓原発のwdNETと診断された最初の報告である。

## 第2章

イヌの胆管癌における神経内分泌成分発現の検討

## 2-1. 序文

一般的に、神経内分泌腫瘍の由来細胞は、神経内分泌細胞と考えられ [99]、神経内分泌細胞は様々な臓器に存在する [87, 177]。このうち、ヒト、イヌおよびネコの神経内分泌腫瘍は、消化管や呼吸器を原発臓器とする報告が多い [2, 16, 51, 54, 63, 84, 89, 96, 97, 98, 139, 149, 158, 168, 172]。一方、ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍とイヌ、ネコの肝臓の神経内分泌腫瘍の報告は、稀である [1, 5, 6, 25, 28, 29, 30, 50, 52, 60, 71, 85, 107, 111, 116, 119, 121, 125, 129, 130, 143, 148, 164, 175]。肝臓原発の神経内分泌腫瘍の母細胞である肝臓における神経内分泌細胞の存在は、ヒトとラットの正常肝臓で明らかにされているが [137, 138]、イヌをはじめその他の動物では明らかにされていない。

ヒトの消化管などの上皮性腫瘍に神経内分泌成分を含んだ腫瘍の報告がみられる [39, 46, 68, 76, 140, 147, 165]。ヒトの消化管の神経内分泌腫瘍のWHO組織分類において [10, 76]、mixed adenoneuroendocrine carcinoma は、上皮性腫瘍の特性を保持しながら、免疫組織化学的に神経内分泌成分が検出される腫瘍である。動物において、ラットの大腸癌、イヌの鼻腔腺癌や肛門囊腺癌が神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化した報告も極めて少数みられる [19, 108, 159]。近年、ヒトのCCにおいて、免疫組織化学的に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出され [39]、CCの腫瘍細胞が神経内分泌細胞に分化したとする報告がみられている [39]。このうち、上皮性腫瘍細胞が神経内分泌分化することによって、両性質をもった mixed adenoneuroendocrine carcinoma と診断された報告もみられる [39]。動物に関して、ネコのCCと神経内分泌腫瘍の混合腫瘍に関する報告はみられるが [118]、動物におけるCCの mixed adenoneuroendocrine carcinoma との関連は明らかにされていない。

本章は、イヌのCC6症例の腫瘍細胞における神経内分泌成分の検出と分化との関連を検討した。CCは、CK7抗体、CK19抗体、CK20抗体およびNSE抗体を用いて免疫組織化学的に診断した。さらに、CGA抗体とSYN抗体を用いて免疫組織化学的にCCの腫瘍細胞の神経内分泌成分を検出した。組織化学的にグリメリウス染色によって、腫瘍細胞の神経内分泌顆粒を検出した。さらに、Ki67抗体とE-カドヘリン抗体を用いた免疫組織化学的検索により、神経内分泌分化との関連を検討した。



## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 症例

イヌの CC6 症例の詳細は、表 5 に記載した。犬種は、Labrador retriever 2 症例、Golden retriever 1 症例、Yorkshire terrier 1 症例および交雑種 2 症例であった。性別は、メス 5 症例とオス 1 症例であった。年齢は、4 歳から 13 歳で平均 11 歳であった。なお、ビーグル犬種のオス 8 歳の 1 症例を陰性対照に用いた。

### 2-2-2. 組織学的および組織化学的検索

CC6 症例の組織標本は、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬後、パラフィン包埋した。パラフィンブロックを 4-6  $\mu\text{m}$  に薄切した組織切片を作成後、HE 染色とグリメリウス染色により、組織学的および組織化学的に検索した。なお、陰性対照の正常肝臓のほか、陽性対照にイヌ 1 症例の肝臓の神経内分泌腫瘍の組織切片を用いた。

### 2-2-3. 免疫組織化学的検索

#### (1) CC の評価

CC6 症例の組織切片を用いて、ポリマー法による免疫組織化学的検索を実施した。脱パラフィン切片は、室温 10 分間、3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシターゼを除去した。水洗後、ブロックエース (Ds pharma Biomedical, Osaka, Japan) を用いて、非特異反応を除去した。賦活化処理は、121°C、10 分間、マイクロウェーブ処理または室温 20 分間、プロテインキナーゼにより処理した。1 次抗体は、4°C、16 時間反応させ、2 次抗体には、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Japan) を使用し、室温 30 分間反応させた。アミノエチルカルバゾール (3-amino-9-ethylcarbazole: AEC) (Nichirei, Japan) を用いて発色させた後、対比染色にマイヤーヘマトキシリン染色液を用いた。各抗血清は、適切な希釈方法で実施し、使用した 1 次抗体の詳細は、表 6 に示した。1 次抗体の免疫組織化学的検索結果の評価に関して、AFP 抗体と hepatocyte 抗体に対して陽性反応を示した腫瘍細胞は、肝細胞由来とし、CK7 抗体、CK19 抗体および CK20 抗体に対して陽性反応を示した腫瘍細胞は、胆管細胞由来として評価した。染色強度は、陰性反応：-、弱陽性から中等度陽性反応：+、強度陽性反応：++を指標とした。

#### (2) 神経内分泌成分の検出

CC6 症例と対照の組織切片を用いて、腫瘍細胞の神経内分泌成分を検出した。これらの

パラフィン切片は、(1) と同一の方法による免疫組織化学的検索を実施した。1 次抗体は、神経内分泌成分を検出するウサギ抗 CGA 血清およびマウス抗 SYN 血清を用いた。切片は、90°C、15 分間、マイクロウェーブ処理により賦活化処理した。各抗血清は適切な希釈方法で実施し、使用した 1 次抗体は、表 6 に示した。切片は、マイヤーヘマトキシリン染色液により対比染色をした。神経内分泌成分を含んだ腫瘍細胞の染色性の評価は、標本を 200 倍、20 視野で観察し、陰性反応：－，弱陽性から中等度陽性反応：＋，強度陽性反応：++ を指標とした。

### (3) E-カドヘリン抗原と Ki67 抗原の検出

CC6 症例の組織切片を用いて、腫瘍細胞の増殖と分化との関連を検討した。1 次抗体は、マウス抗 E-カドヘリン血清とマウス抗 Ki67 血清を用いた。組織切片は、(1) と同一の方法による免疫組織化学的検索を実施した。各抗血清は適切な希釈方法で実施し、使用した 1 次抗体は、表 6 に示した。切片は、マイヤーヘマトキシリン染色液で対比染色を実施した。免疫組織化学的評価に関して、6 症例の組織切片をマウス抗 Ki67 血清に反応させ、1,000 腫瘍細胞数当たり陽性反応の腫瘍細胞数をカウントした。マウス抗 E-カドヘリン血清に対する反応の評価は、200 倍、20 視野で観察し、未検出：－，1-50%以下の検出：＋，51-80%以下の検出：++，81%以上の検出：+++を指標とした。なお、陰性および陽性対照は、陰性対照の 1 次抗体を除き処理した以外に、(1) から (3) と同一の方法により免疫組織化学的検索を実施した。

表 5. 胆管癌 6 症例の概要

症例	年齢	性別	犬種	神経内分泌成分
No.1	10	オス	Labrador retriever	+(集塊状)
No.2	13	メス	Labrador retriever	+(集塊状)
No.3	13	メス	Golden retriever	+(集塊状)
No.4	4	メス	Yorkshire terrier	+(弧在性)
No.5	11	メス	Mixed	—
No.6	12	メス	Mixed	—

表 6. 免疫組織化学的検査に用いた 1 次抗体

1次抗体	宿主動物	クローン	希釈	賦活化	製造元
AFP	Rabbit		1:100	MW	Dako, Glostrup, Denmark
CGA	Rabbit		1:1	MW	Nichirei, Tokyo, Japan
CK7	Mouse	OV-TL 12/30	1:10	PK	Dakopatts, Glostrup, Denmark
CK19	Mouse	BA16	1:50	MW	Thermo Fisher Scientific, U.S.A.
CK20	Mouse	Ks20.8	1:10	MW	Dakopatts, Glostrup, Denmark
E-cadherin	Mouse	4A2C7	1:100	MW	Invitrogen Corp, U.K.
Hepatocyte	Mouse	OCH1E5	1:30	MW	Dakopatts, Glostrup, Denmark
Ki67	Mouse	MIB-1	1:100	MW	Dakopatts, Glostrup, Denmark
NSE	Mouse	BBS/NC/VI-H14	1:50	MW	Dakopatts, Glostrup, Denmark
SYN	Mouse	MAB329	1:3,000	MW	Chemicon international, U.S.A.

AFP : alpha-1-fetoprotein, CGA : chromogranin A, CK : cytokeratin, NSE : neuron-specific enolase, SYN : synaptophysin,

PK : protein kinase 処理 (室温, 20 分間)

MW : 10mM citrate buffer (pH6.0) を用いた microwave 法 (121°C , 15 分間)

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 6 症例の CC の診断

6 症例は、組織学的に、立方状、円柱状および扁平状の細胞形態を示し、腺状、管状および乳頭状の配列パターンを形成した (図 4). 腫瘍細胞の多くは、淡好酸性の細胞質を有した. 腫瘍細胞核は、大小不同、円形または楕円形で核形の不整を認めた. 免疫組織化学的に、6 症例の腫瘍細胞は、マウス抗 CK7 血清、マウス抗 CK19 血清およびマウス抗 CK20 血清に対して陽性反応を示した (表 7) (図 5-7). 一方、ウサギ抗 AFP 血清とマウス抗 hepatocyte 血清に対して腫瘍細胞に反応を示さなかった (表 7). 組織学的および免疫組織化学的に 6 症例は CC と診断された.

### 2-3-2. CC の神経内分泌成分の検出

CC4 症例の腫瘍細胞はウサギ抗 CGA 血清に対して陽性反応を示した. 症例 No.4 の腫瘍細胞は、CGA 抗体に対して、孤在性に陽性反応を示した (図 8). 症例 No.1-3 の CC3 症例の腫瘍細胞は、集塊状に陽性反応を示し (表 7, 8) (図 9-12), グリメリウス染色によって、腫瘍細胞に好銀性顆粒を検出した (図 13). なお、マウス抗 SYN 血清に対して症例 No.1-4 の CC4 症例の腫瘍細胞に陽性反応を示した (表 7).

### 2-3-3. CC と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍

CGA 抗体に対して集塊状に陽性反応を示した症例 No.1-3 の CC3 症例の腫瘍細胞は、CC 病変に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が遷移性に増殖しながら、腫瘍細胞塊を形成した (図 9, 10). これらの 3 症例の腫瘍細胞は、グリメリウス染色によって、好銀性の顆粒を検出した (図 13). この CC3 症例の腫瘍細胞は、NSE 抗体に対しても陽性反応を示した (表 7) (図 14-16). CC3 症例は、CC と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍病変を形成した.

### 2-3-4. CC の E-カドヘリン抗原と Ki67 抗原の検出

CC6 症例の Ki67 抗原の検出に関して、神経内分泌成分が集塊状に検出された CC3 症例の腫瘍細胞うち、2 症例は 1,000 腫瘍細胞数あたり 200 腫瘍細胞数以上に陽性反応を示した (表 8). 一方、E-カドヘリン抗原の検出に関して、CC6 症例とも E-カドヘリン抗原は軽度に検出された (表 8, 9).

表 7. CC6 症例の組織化学的および免疫組織化学的検査の結果

症 例	CGA	SYN	NSE	CK7	CK19	CK20	AFP	Hepatocyte	Argyrophil reaction
No.1	++	+	+	+	++	+	-	-	+
No.2	++	+	+	+	++	++	-	-	+
No.3	++	+	+	+	++	+	-	-	+
No.4	+	+	-	+	++	+	-	-	NT
No.5-6	-	-	-	+	++	+	-	-	NT

- : 陰性反応, + : 弱陽性から中等度陽性反応, ++ : 強度陽性反応

NT : 未検査

表 8. 胆管癌 6 症例の神経内分泌成分, Ki67 抗原, E-cadherin 抗原の検出の比較

症 例	神経内分泌成分の検出 (スコアと反応強度) <sup>1)</sup>	Ki67 <sup>2)</sup>	E-cadherin <sup>3)</sup>
No.1	>50 (++) <sup>4)</sup>	210	+
No.2	>50 (++) <sup>4)</sup>	355	+
No.3	>50 (++) <sup>4)</sup>	NT	NT
No.4	5(+) <sup>5)</sup>	33	+
No.5		23	+
No.6		56	+

NT (not tested) : 未検査

- 1) 神経内分泌成分 (CGA 抗原検出) 検出スコア 200 倍の 20 視野数  
検出反応強度 - : 陰性反応, + : 弱陽性から中等度陽性反応, ++ : 強度陽性反応
- 2) Ki67 抗原検出スコア 200 倍の 20 視野, 1,000 腫瘍細胞数当たり, Ki67 抗体に陽性反応を示した腫瘍細胞数
- 3) E-cadherin 抗原検出スコア 200 倍の 20 視野数, - : 未検出, + : 1-50%検出, ++ : 51-80%検出, +++ : 81%以上検出
- 4) 腫瘍細胞は集塊状に検出
- 5) 腫瘍細胞は孤在性に検出

表 9. 胆管癌の腫瘍細胞の神経内分泌成分の発現, 腫瘍細胞の増殖・分化との関連

分類	症例数	E-cadherin抗原検出	Ki67スコア
CC病変のみ	2	+	40
CC病変と神経内分泌成分検出 (+)	1	+	33
CC病変と神経内分泌成分検出 (++)	3	+	277

CC : cholangiocarcinoma

E-cadherin 抗原検出スコア 200 倍の 20 視野数, - : 未検出, + : 1-50%検出, ++ : 51-80%検出, +++ : 81%以上検出

Ki67 抗原検出スコア 200 倍の 20 視野, 1,000 細胞数当たりの Ki67 抗体に陽性反応を示した腫瘍細胞数の平均値



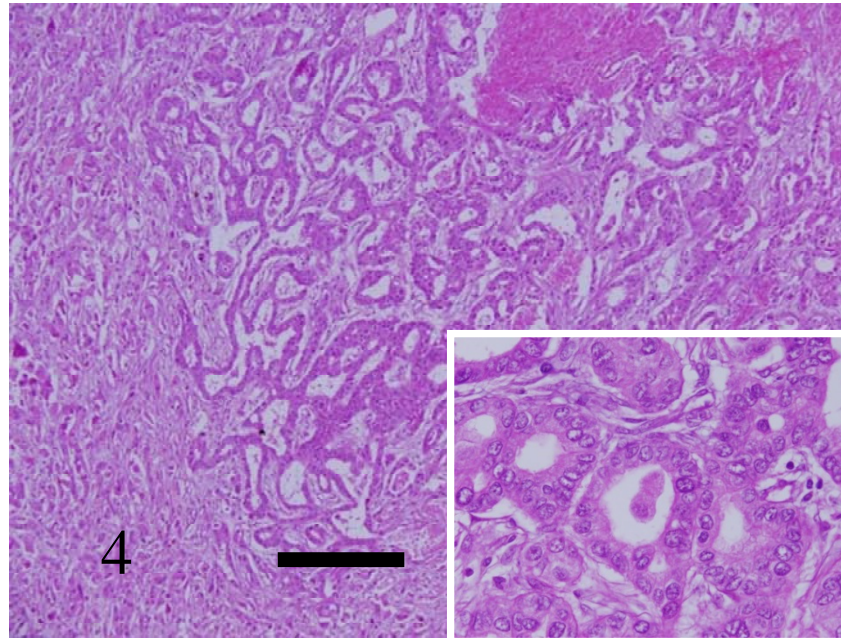


図4：核/細胞質比が高く，立方状，円柱状および扁平状のCCの腫瘍細胞は，腺状または管状に増殖して認められる．（症例 No.1）HE 染色，Bar=250  $\mu$  m.

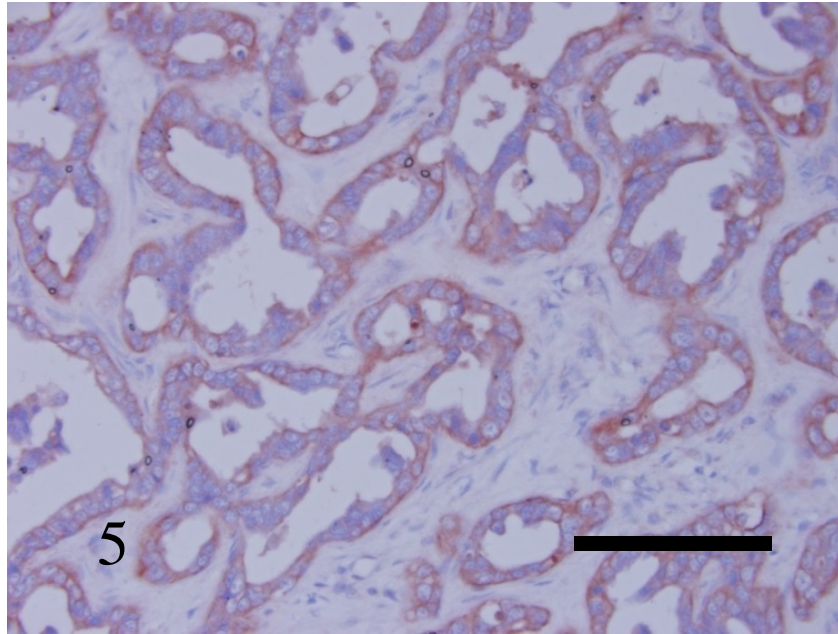


図 5 : 症例 No.1 の腫瘍細胞は, CK7 抗体に対して, 中等度の陽性反応を示す. 免疫組織化学的検査, Bar = 100  $\mu$  m.

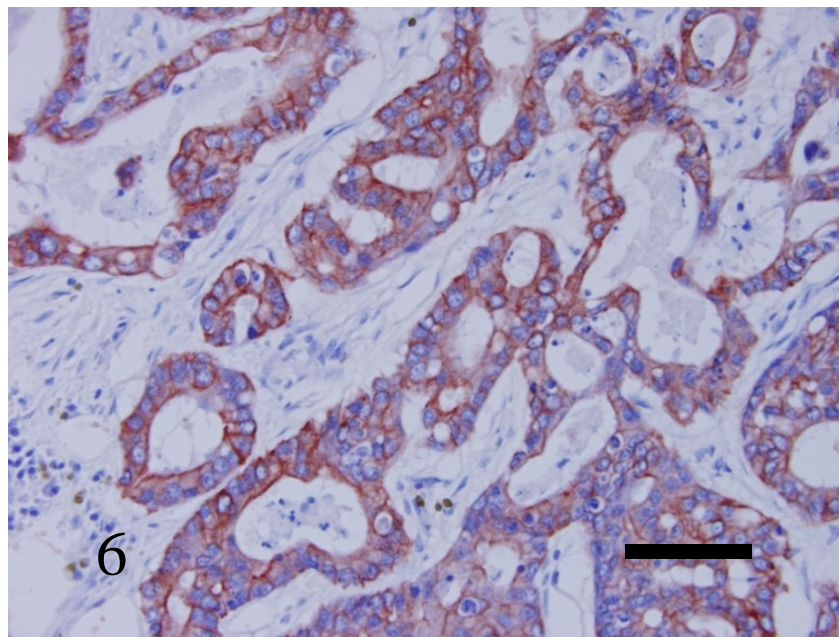


図 6 : 症例 No.1 の腫瘍細胞は, CK19 抗体に対して, 強度陽性反応を示す. 免疫組織化学的検査, Bar = 50  $\mu$  m.

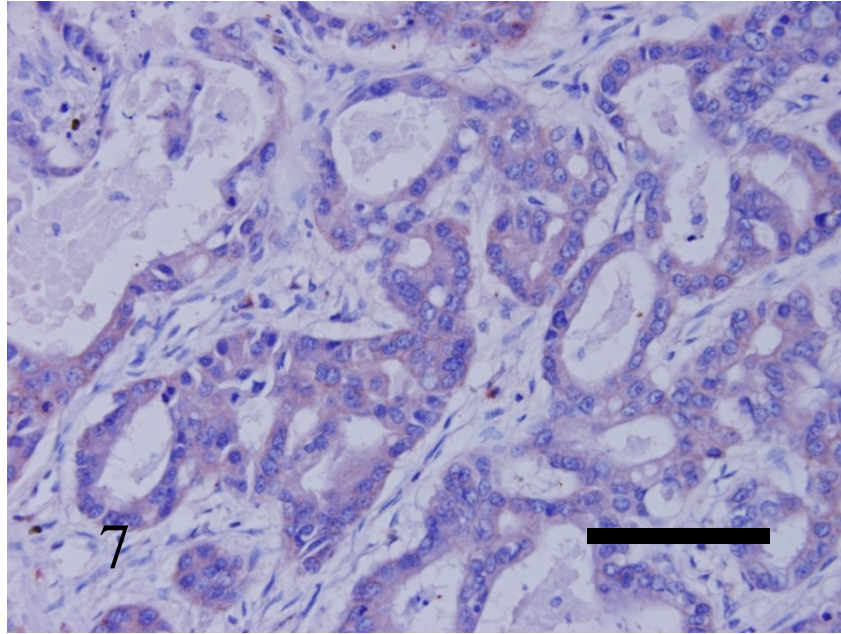


図 7 : 症例 No.1 の腫瘍細胞は, CK20 抗体に対して弱陽性反応を示す. 免疫組織化学的検査, Bar=100  $\mu$  m.

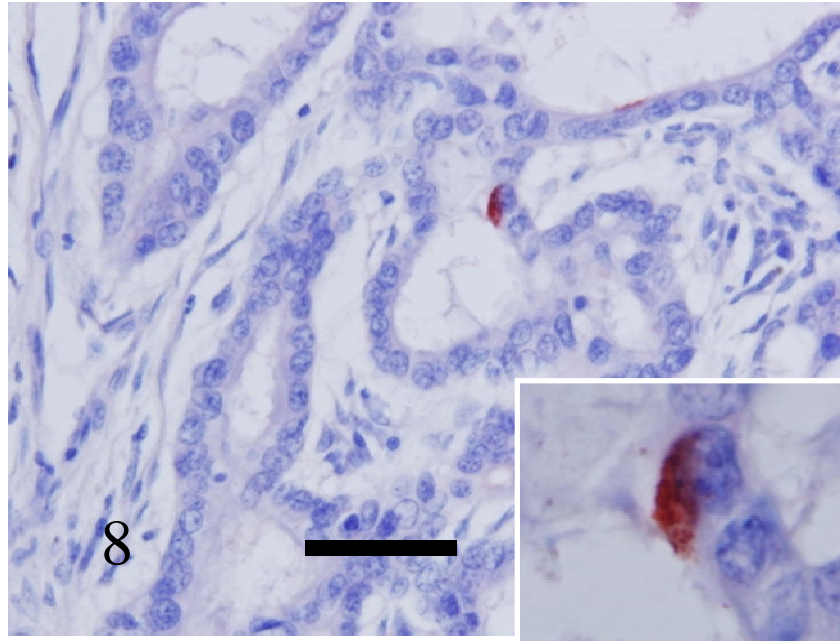


図 8 : 症例 No.4 の腫瘍細胞は, CGA 抗体に対して, 弧在性の神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出される. 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m.

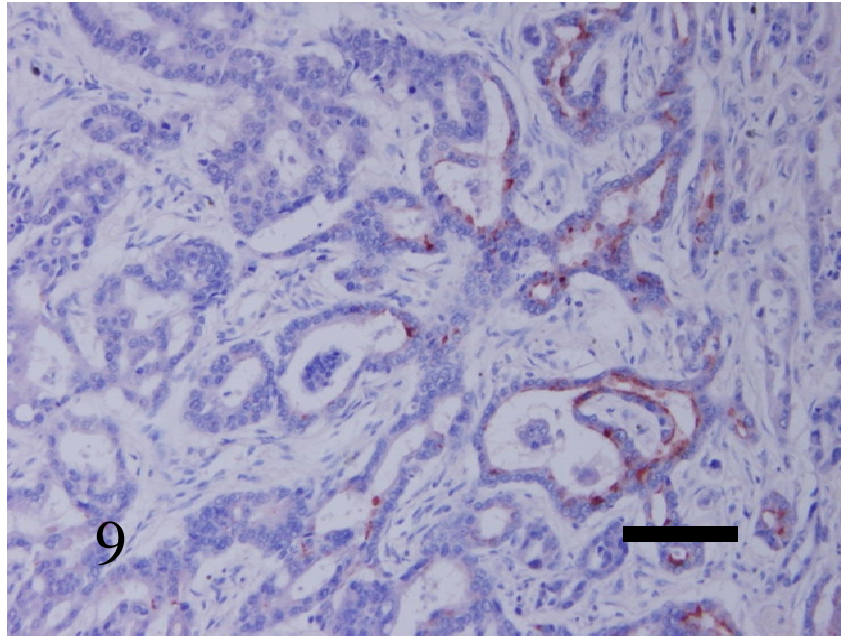


図9：CGA抗体を用いた免疫組織化学的検査により，神経内分泌成分を含んだ腫瘍細胞がCC病変に遷移性に増殖してみられる．（症例 No.1）免疫組織化学的検査，Bar=100  $\mu$  m.

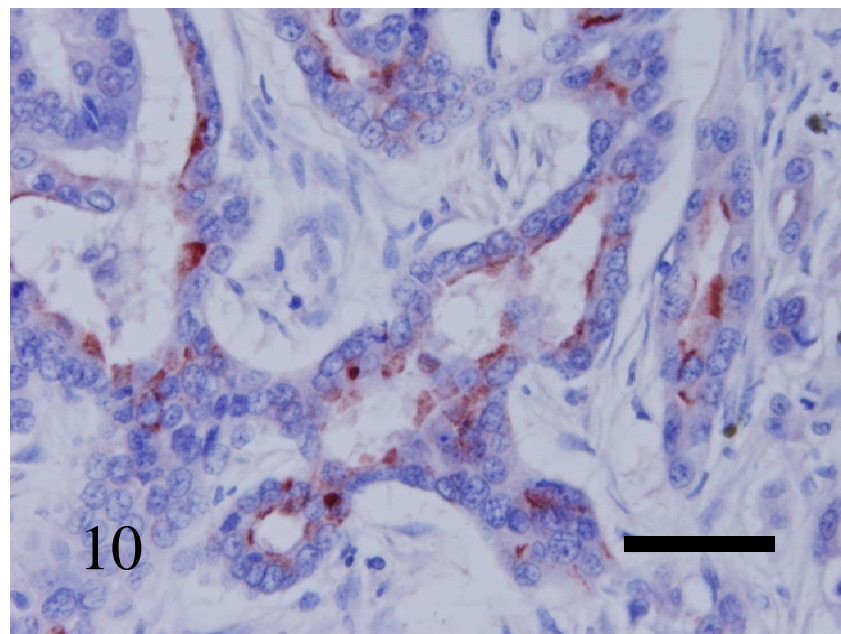


図10：図9の拡大．CGA抗体を用いた免疫組織化学的検査により，腫瘍細胞質にドット状の神経内分泌顆粒が多数検出されてみられる．免疫組織化学的検査，Bar=50  $\mu$  m.

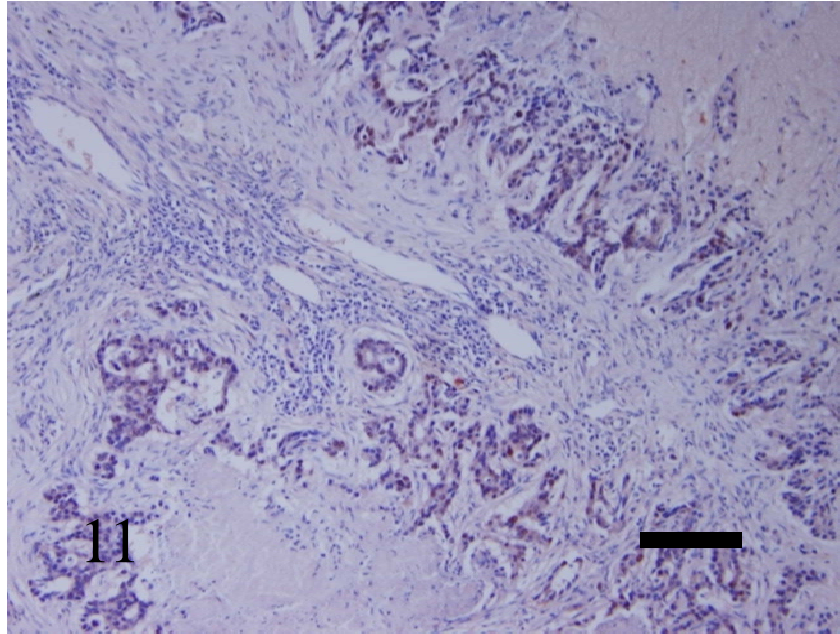


図 11 : 細胞質に乏しく扁平状の腫瘍細胞は, CGA 抗体による免疫組織化学的検査によって, 集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出してみられる.  
(症例 No.3) Bar=125  $\mu$  m.

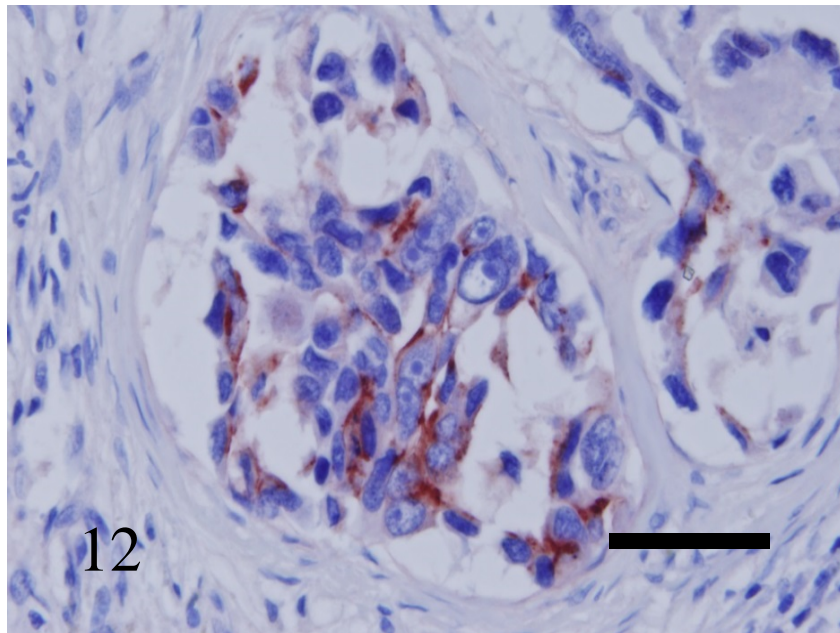


図 12 : 図 11 の拡大. Bar=50  $\mu$  m.

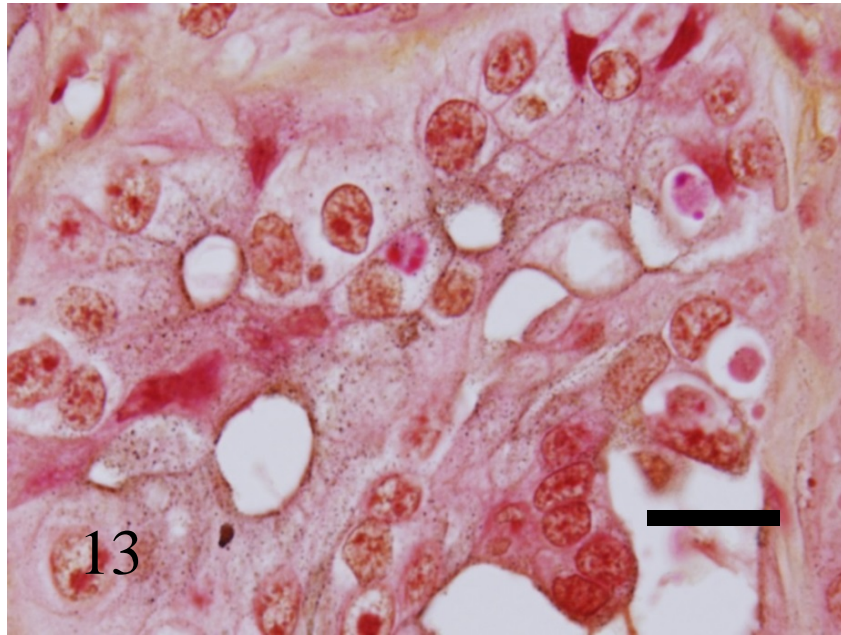


図 13 : グリメリウス染色により, 症例 No.3 の腫瘍細胞に  
黒色顆状の好銀性反応を認める. Bar = 25  $\mu$  m.

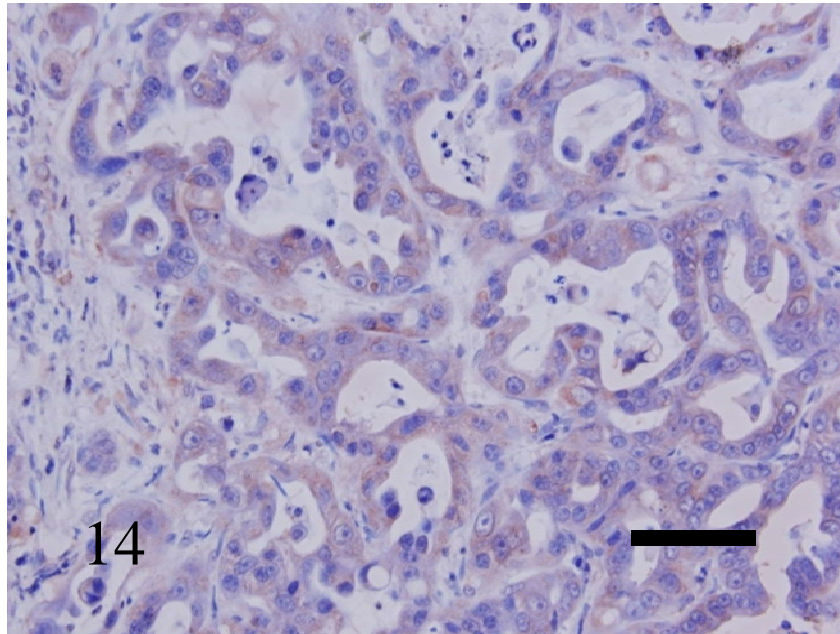


図 14 : SYN 抗体を用いた免疫組織化学的検査により, CC の腫瘍細胞に中等度の陽性反応を示す. (症例 No.3) Bar=75  $\mu$  m.

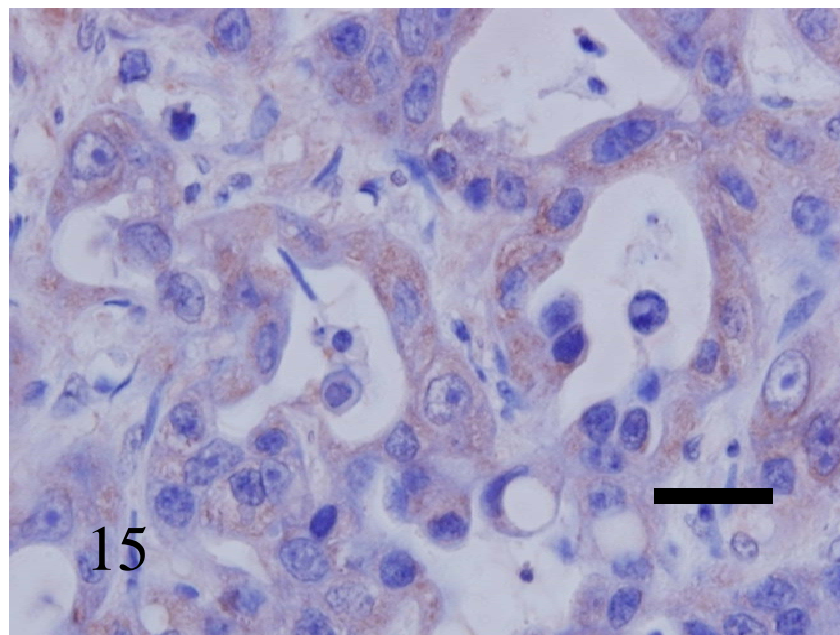


図 15 : 図 14 の強拡大. Bar=25  $\mu$  m.



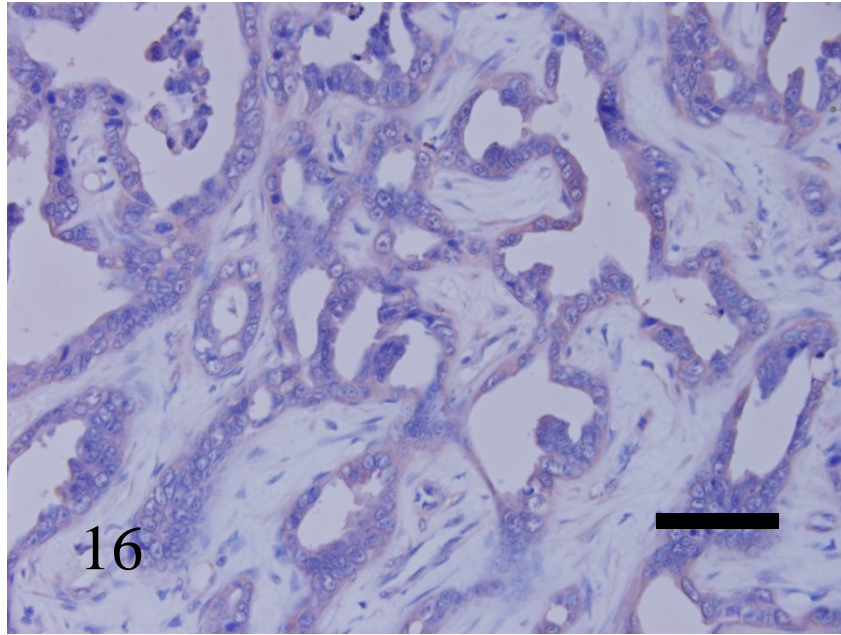


図 16 : CC の腫瘍細胞は，NSE 抗体に対して陽性反応を示す．（症例 No.1）免疫組織化学的検査，Bar = 75  $\mu$  m.

## 2-4. 考察

近年、ヒトと動物の神経内分泌腫瘍と非神経内分泌腫瘍の複合腫瘍に関する報告がみられる [19, 39, 46, 68, 76, 108, 118, 147, 165]. ヒトの消化管の mix adenoneuroendocrine carcinoma は多数報告されている [68, 76, 147]. ヒトの CC と神経内分泌腫瘍の複合腫瘍の報告例のうち、CC の腫瘍細胞が神経内分泌成分を含む腫瘍細胞へ分化したことを報告している [39]. 特に、mix adenoneuroendocrine carcinoma と診断された報告が、肝内胆道系腫瘍にもみられている [39]. 動物では、ネコの CC と NEC の混合腫瘍が報告されている [118]. 動物において、上皮性腫瘍が神経内分泌細胞へ分化した報告は、ラットの大腸癌 [19] とイヌの鼻腔腺癌や肛門囊腺癌で極めて少数報告されている [108, 159]. 動物の CC に関して、mix adenoneuroendocrine carcinoma を考察したネコの報告が 1 例みられたが [118], 腫瘍細胞の mix adenoneuroendocrine carcinoma との関連を証明した動物の報告はみられない.

CGA 抗体は、腺癌の腫瘍細胞の神経内分泌分化を検出するマーカーとして報告されている [39, 46, 76, 108, 118, 140, 145, 147, 165]. このうち、特に、神経内分泌分化した CC の腫瘍細胞は、CGA 抗体に対して陽性反応を示す [39, 46, 118]. 本章の CC に関して、立方状または円柱状の腫瘍細胞が管状に増殖した腫瘍病変よりも扁平状または不定形状の腫瘍細胞が集塊状、線状、管状に増殖した腫瘍病変により、CGA 抗体に対して陽性反応を示した。従って、形態学的に低分化の腫瘍細胞は、より神経内分泌成分が検出される傾向にあった。SYN 抗体と NSE 抗体も CGA 抗体と同様に腫瘍細胞に陽性反応を示した。CGA 抗体のほか、SYN 抗体、NSE 抗体、S-100 蛋白抗体を用いた免疫組織化学的検索は、イヌとネコの神経内分泌腫瘍の診断に有効な抗体であると報告されている [108, 117, 118, 120, 122]. 従って、CGA 抗体、NSE 抗体、SYN 抗体を用いた免疫組織化学的検索は、本章の CC の症例の神経内分泌分化との関連を証明する重要な抗体と考えられた。

本章の CC6 症例の腫瘍細胞は、CK7 抗体、CK19 抗体および CK20 抗体に対して陽性反応を示し、胆管上皮細胞由来の CC と診断された。このうち、CC3 症例は、集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出されるとともに、グリメリウス染色によって、この腫瘍細胞塊の腫瘍細胞に好銀性顆粒が重度に検出された。免疫組織化学的に、神経内分泌成分を含む腫瘍細胞塊と CC 病変との境界域において、遷移性に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が増殖した腫瘍組織像を認めた。従って、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に、CC の腫瘍細胞は、神経内分泌成分を含む腫瘍細胞の分化に伴って、神経内分泌腫瘍

と複合した腫瘍を形成したと考えられた。このような腫瘍病変の形成は、ヒトの肝胆道系腫瘍のうちの mix adenoneuroendocrine carcinoma と診断した Harada らの報告と一致し [39]、動物の CC の症例において、神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化しながら、神経内分泌腫瘍の形成を証明した動物での最初の報告となった。

肝臓原発の神経内分泌腫瘍の母細胞とされる神経内分泌細胞の存在は、ヒトとラットで報告されている [137, 138]。しかし、第 1 章において、イヌの正常の肝臓実質に神経内分泌細胞の存在は確かめられなかった。このため、肝臓の神経内分泌腫瘍の母細胞の存在は明らかにされなかった。一方、本章の CC4 症例は、孤在性または集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出された。多くの CC の症例に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出されていることから、CC の腫瘍細胞が神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化したと考えられた。ヒトの神経内分泌腫瘍と非神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍に関して、組織学的にいくつかのカテゴリーに分類することができる [57, 147, 165]。(1) 非神経内分泌腫瘍に神経内分泌細胞が混在するケース、(2) 神経内分泌腫瘍内に非神経内分泌腫瘍が混在するケース、(3) 両腫瘍が等しく混在するケース、(4) 同一腫瘍細胞に神経内分泌成分および非神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が混在した 4 つのケースに分類した報告がある。(1) から (3) の両腫瘍が混在したケースを composite 腫瘍、(4) を amphicrine 腫瘍と呼称される。Amphicrine 腫瘍の分類の定義に従うと、同一腫瘍細胞に上皮性腫瘍成分と神経内分泌成分の両要素を含む腫瘍細胞とされることから [147]、本章は、これらの分類のうちの composite 腫瘍の (1) と amphicrine 腫瘍の分類に相当した。集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出された CC3 症例は、CC の腫瘍細胞が神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化・増殖した結果、CC と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍を形成したと考えられた。ヒトの上皮性腫瘍と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍に関して、La Rosa らは、上皮性腫瘍と神経内分泌腫瘍の両腫瘍が 30%以上共存した場合を、複合腫瘍として報告している [76]。このうち、集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出された CC3 症例は、CC 病変に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞を 30%以上共存したため、CC と神経内分泌腫瘍の複合腫瘍に相当したと考えられた。

Ki67 抗体は、細胞周期の G1 後期、S 期、G2 期および M 期に存在し、休止期の細胞に存在しない細胞増殖能を検出する有効な抗体である [35]。特に、ヒトの Ki67 抗原標識率を指標とした神経内分泌腫瘍の悪性度のグレード分類は、神経内分泌腫瘍の診断に重要な役割を果たしている [10]。神経内分泌腫瘍の腫瘍細胞と正常細胞の Ki67 抗原の検出率の

差は低い [81]. 一方, 上皮性腫瘍と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍は, 上皮性腫瘍と比較して Ki67 抗原の検出が高くなるとされる [39]. さらに, Ki67 抗原の検出を指標にした腫瘍細胞増殖能の低い上皮性腫瘍に対して, 増殖能の高い上皮性腫瘍の腫瘍細胞に, 神経内分泌成分がより検出されている [10]. 本章の 5 症例の 1,000 腫瘍細胞数あたり, 23–355 腫瘍細胞数に神経内分泌成分が検出された. このうち, 集塊状に神経内分泌成分が検出された CC2 症例は, 200 腫瘍細胞数以上に神経内分泌成分が検出され, 他の症例と比較して多数の腫瘍細胞に Ki67 抗原が検出された. 従って, 細胞増殖能が高く, 未分化な腫瘍細胞ほど, 神経内分泌成分の検出は高まり, CC の腫瘍細胞が, 神経内分泌成分を含んだ腫瘍細胞に分化すると考えられた.

E-カドヘリン抗体は主に, 上皮細胞の細胞間接着に関与するマーカーとして知られる [160]. E-カドヘリン抗体は, 上皮性腫瘍の進行度, 浸潤・転移の指標となる重要な抗体であり [113, 160], 未分化で悪性度の高い腫瘍細胞ほど細胞間の接着因子は少なく [81, 113], 浸潤や転移の可能性が高まるとされる. E-カドヘリン抗原の検出に関して, 本章のいずれの症例の腫瘍細胞も E-カドヘリン抗原は軽度に検出された. このため, 細胞接着能の低い未分化な腫瘍細胞に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出される傾向にあった. 従って, 腫瘍細胞増殖能が高く, 細胞接着因子の少ない未分化な CC の腫瘍細胞は, 神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化する傾向にあると考えられた.

非神経内分泌腫瘍の神経内分泌分化した症例の臨床経過に関して, 予後の評価は得られないとする報告がある [93, 159]. 一方, 免疫組織学的に, 神経内分泌分化の評価を重要視する意見もある [144]. いずれにしても, 腫瘍結節のサイズや転移の有無, 腫瘍の適切な切除, 切除後の再発に対して予後に影響を及ぼすと報告されていることを臨床的に評価することが重要であると考えられる [159]. 一方, 本章の症例において, CGA 抗原, Ki67 抗原および E-カドヘリン抗原の検出により, 腫瘍細胞の増殖能と接着因子, 神経内分泌分化との間に関連がみられた. 本章の症例において, 未分化な腫瘍細胞ほど神経内分泌細胞に分化したと考えられたが, 臨床経過と予後との関連は, 今後, 症例数を増やして検討する必要があると考えられた.

## 2-5. 小括

近年、ヒトの消化管の上皮性腫瘍が神経内分泌分化することにより、上皮性腫瘍と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍を形成した報告がみられる。マウスやイヌの上皮性腫瘍細胞が神経内分泌細胞に分化したことも極めて稀に報告されている。ネコの CC と神経内分泌腫瘍の複合腫瘍に関する報告はみられるが、動物における CC の腫瘍細胞が、神経内分泌分化した報告はみられない。

本章において、イヌの CC の神経内分泌分化を検討した。本章の 6 症例は、CC に特徴的な組織病変を形成した。腫瘍細胞は、管状、線状、集塊状に増殖した。増殖した腫瘍細胞の多くは、淡好酸性の細胞質を有した。腫瘍細胞核は、大小不同、円形または楕円形、核形の不整を認めた。CC6 症例の腫瘍細胞は、胆管由来の CK7 抗原、CK19 抗原および CK20 抗原を検出した。一方、肝細胞由来の AFP 抗原と hepatocyte 抗原は検出されなかった。よって、6 症例の腫瘍は CC と診断された。一方、このうち、集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出された CC3 症例の腫瘍細胞は、CGA 抗原、SYN 抗原および NSE 抗原が検出された。免疫組織化学的に、CC 病変に遷移性に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が集塊状に増殖した組織像を認めた。組織化学的にもグリメリウス染色によって、この腫瘍細胞塊の腫瘍細胞に好銀性の内分泌顆粒が重度に検出された。従って、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に、集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が検出された CC3 症例の腫瘍細胞は、amphicrine 腫瘍の特性を有したヒトの mix adenoneuroendocrine carcinoma に相当した。さらに、Ki67 抗原と E-カドヘリン抗原の検出により、集塊状に神経内分泌成分が検出された CC3 症例のうち 2 症例の腫瘍細胞は、腫瘍細胞の増殖能が高く、細胞接着因子の少ない未分化な腫瘍細胞であった。CC の腫瘍細胞が神経内分泌分化した結果、CC と神経内分泌腫瘍の複合腫瘍を形成した最初の報告となった。CC 病変に孤在性に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞が認められた症例は、腫瘍細胞が神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に孤在性に分化したと考えられた。

### 第3章

フェレットの脊索腫に関する組織学的,  
組織化学的並びに免疫組織化学的検索

### 3-1. 序文

脊索は、胎生期に原条頭側の細胞増殖により形成され、神経管の腹側に現れる。さらに、ラトケ囊から尾部に縦走した脊索は中胚葉組織で包囲された後、次第に消失する。脊索腫は、生体の脊椎椎間板髄核内など異所性の遺残脊索組織より発生する [32, 65, 70]。発生学的に、遺残脊索組織は、分化系統樹からみると胚葉系列幹細胞に属し、様々な細胞に分化する能力を備える未分化な細胞である [177]。脊索腫は、ヒト [11, 43, 48, 75, 104, 112, 124, 146]、ラット [153]、ミンク [38]、イヌ [36]、ネコ [13]、フェレット [3, 24, 45, 83, 101, 150, 171]などで報告されている。フェレットの脊索腫は、飼育頭数の増加と相まって、一般的なものと認識されているが報告例は少ない。ヒトの脊索腫は、後頭・蝶形骨癒合部（斜台部）と仙骨・尾骨部に好発する [42]。一方、フェレットの脊索腫は、尾部に多く [3, 24, 45, 101, 150]、稀に頸部に発生した報告もみられる [171]。そのほかに、末梢型の脊索腫の傍脊索腫も稀に報告されている [146]。ヒトと動物の脊索腫は、局所的に徐々に増殖し、転移の報告もみられている [70]。組織学的に、腫瘍細胞は、細胞質内に大小の空胞と豊富な粘液成分を含んだ泡沫状に腫大した淡空胞細胞（*physaliphorous cells*）と呼称される腫瘍細胞が認められる [36, 70, 101]。組織学的に、脊索腫の腫瘍細胞は、特徴的な形態を示すことから、診断の目安となるが [13, 48, 78, 112, 124, 156]、免疫組織化学的検索も含めて一般的に診断される [13, 24, 36, 45, 48, 112, 124, 153, 156]。脊索は、発生母地である胎生期脊索組織が外胚葉と中胚葉に由来することに関連して [65]、免疫組織化学的に腫瘍細胞は、CK 抗原とビメンチン抗原が共発現することが確かめられている [13, 24, 36, 101, 171]。脊索腫の腫瘍細胞の細胞骨格の特性を評価するため、CKs 抗体を用いた免疫組織化学的検索は、ヒトに関して報告されている [43, 48, 104, 112, 146]。一方、動物に関して、CK 抗体を用いた脊索腫の診断はみられるが [13, 24, 36, 45, 101, 153, 171]、細胞骨格の特性に関する報告はみられない。フェレットにおける骨腫瘍に関する報告は、脊索腫のほかに骨腫 [62, 82, 83]、骨肉腫 [83, 169]、軟骨腫 [82, 83]、軟骨肉腫 [44, 83]、横紋筋肉腫 [142]がある。特に、脊索腫と軟骨肉腫は、尾部に発生が多く、脊索腫との類症鑑別が必要と考えられる。さらに、ヒトの脊索腫の9%に悪性度の高い腫瘍もみられることから [90]、組織学および免疫組織化学的検索は脊索腫の診断に重要と考えられる。

脊索腫は、腫瘍細胞と腫瘍細胞周囲の間質に多量の粘液の蓄積が認められることが特徴である。組織学的に、腫瘍細胞に粘液が過剰に蓄積され、超微形態学的にオルガネラの拡

張などによって、細胞質に泡沫状の変性を起こすことが知られている [92, 102]. 従来、粘液は細胞外からの作用に対して細胞保護や乾燥防止、潤滑等の役割に関与していると考えられてきた. しかし、近年、上皮系悪性腫瘍が、ムチンコア蛋白 (Mucin core protein : MUC) の検出に異常を起こすことがヒトで知られている [7, 22, 80]. MUC subtype (MUCs) 抗体を用いた動物の免疫組織化学的検索に関する報告は極めて少ない. 現在までにヒトと動物の脊索腫の MUC 抗原の検出の報告はない. さらに、組織化学的検索による粘液組成の検出は、ヒトで少数報告されているが [123, 124, 156], フェレットをはじめ動物の報告は極めて少ない [3, 38]. 組織化学的および免疫組織化学的検索による粘液組成を明らかにすることによって、脊索腫の腫瘍細胞にどのような特性を有しているか検討した.

Brachyury 抗原は、主に、脊索の発達を調節する中胚葉の形成に関与する T 遺伝子によってコード化された蛋白である [21, 67, 114, 173]. 正常成人組織では発現しないとされるが、脊索腫において、胎生期遺残脊索組織を特異的に検出する brachyury 抗原が活性化されていることから、ヒトの脊索腫の診断に極めて有効であるとされ [167], 他の骨腫瘍の類症鑑別のほか、脊索腫の悪性度の指標になることから [32, 167], 動物の脊索腫の診断に有効であると考えられた.

本章は、6 症例のフェレットの尾部に形成された腫瘤を組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に脊索腫と診断した. 新たに CKs 抗体および brachyury 抗体, MUCs 抗体を加え、脊索腫の胎生期の遺残脊索組織由来の腫瘍細胞の特性を解明した.



## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 症例

6 症例 (症例 No.1-6) のフェレットの尾部に発生した腫瘍を外科的に切除後, 切除された組織材料を組織学的, 組織化学的および免疫組織化学的に検索した. 6 症例の年齢は, 3 歳から 5 歳で平均 3.6 歳, 性別は, オス 3 症例とメス 3 症例であった (表 10).

### 3-2-2. 組織学的検索

6 症例の腫瘍を 10% 中性緩衝ホルマリン水溶液に浸漬した. 脱灰後, エチルアルコールで脱水, パラフィン包埋し, 厚さ 4-6 $\mu$ m に薄切した. 薄切後, HE 染色を施し, 組織学的に検索した. 腫瘍細胞質に小泡沫状の空胞が密集した小型の腫瘍細胞を small cell size の腫瘍細胞とし, 腫瘍細胞質に小泡沫状から大型の空胞が混在した中型の腫瘍細胞を medium cell size の腫瘍細胞とし, 大型の空胞が 1-3 個程度含まれ, 細胞質辺縁に三日月状の核をもつ大型の腫瘍細胞を large cell size の腫瘍細胞とし, 3 分類した (図 17 a-c). 3 分類した腫瘍細胞を 1,000 腫瘍細胞数カウントし, 症例ごとに検出率を算出した.

### 3-2-3. 組織化学的検索

腫瘍細胞と間質に含まれる粘液成分の検出のための組織化学的検索方法を表 11 に示した. 上皮性粘液の検索に, 過ヨウ素酸シッフ (Periodic acid-Schiff: PAS) 反応とジアスターゼ消化試験後の PAS (Periodic acid-Schiff diastase: D-PAS) 反応により, 糖蛋白, グリコーゲンを検出した. さらに, マイヤーのムチカルミン (Mayer's mucicarmin: MC) 染色により, 上皮性粘液と中性ムコ多糖類を検出した. 間葉性粘液の検索法として, アルシアンプルー (Alcian blue: AB) 染色 pH2.5 によって, 酸性糖蛋白と酸性ムコ多糖類を検出した. コロイド鉄 (Colloidal iron: CI) 染色によって, 酸性糖蛋白と酸性ムコ多糖類を検出した. 高鉄ジアミン-AB (High iron diamine-AB: HID-AB) 染色 pH2.5 によって, 酸性糖蛋白と酸性ムコ多糖類を検出した. AB 染色 pH1.0 によって, 酸性糖蛋白を検出した. トルイジンブルー (Truidin blue: TB) 染色 pH2.5 によって, 酸性ムコ多糖類を検出した. さらに, ヒアルロニターゼ消化試験後の AB (Alcian blue-hyaluronidase: HD-AB) 染色 pH2.5 によって, ヒアルロン酸を検出した. 組織化学的検索結果は, 症例ごとに small cell size または medium cell size の腫瘍細胞を 1,000 個カウントし, 検出率を算出した. 未検出: -, 1-30% 以下の検出: +, 31-60% 以下の検出: ++, 61% 以上の検出: +++ とし, 半定量的に評価し

た.

#### 3-2-4. 免疫組織化学的検索

6 症例の組織切片は、ABC 法により免疫組織化学的検索を実施した。脱パラフィン切片は、室温 15 分間、3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシターゼを除去した。水洗後、ブロックエース (Ds pharma Biomedical, Osaka, Japan) を用いて非特異反応を除去した。使用した 1 次抗体は、4°C、16 時間反応させ、ビオチン化 2 次抗体は室温 30 分間反応させた。その後、アビジン・ペルオキシターゼ複合体 (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) を用いて室温 30 分間反応させた。切片は、DAB (Kumamoto, Japan) に室温 10 分間浸漬して発色反応させ、可視化させた。発色後、対比染色にマイヤーヘマトキシリン染色液を用いた。陰性対照は、1 次抗体を除き同一の方法で処理した。各 1 次抗体のうち、高分子量の CKs 抗体 (マウス抗 CK9 血清, マウス抗 CK13 血清およびマウス抗 CK14 血清) と低分子量の CKs 抗体 (マウス抗 CK7 血清, マウス抗 CK18 血清, マウス抗 CK19 血清およびマウス抗 CK20 血清) を用いた免疫組織化学的検索において、形態学的に 3 分類した腫瘍細胞ごとに検出率を算出した。腫瘍細胞の MUC 抗原を検出する目的でマウス抗 MUC1 血清, マウス抗 MUC2 血清およびマウス抗 MUC5AC 血清を用いた免疫組織化学的検索を実施した (表 12)。MUCs 抗体に対する陽性対照は、フェレットの正常の胃と結腸の組織切片を用いた。さらに、細胞の接着因子と増殖因子検出のため、マウス抗増殖細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen: PCNA) 血清, マウス抗 E-カドヘリン血清を用いた。使用した 1 次抗体の詳細は表 12 に示した。免疫組織化学的検索結果は、1,000 個の腫瘍細胞に対して、陰性反応: -, 1-30%以下の陽性反応: +, 31-60%以下の陽性反応: ++, 61%以上の陽性反応: +++とし、半定量的に評価した。

表 10. 6 症例のフエレット

症 例	年 齢	性 別	腫瘍部
No.1	3	オス	尾
No.2	4	メス	尾
No.3	不明	メス	尾
No.4	3	メス	尾
No.5	3	オス	尾
No.6	5	オス	尾

表 11. 腫瘍細胞と基質に含まれた粘液物質の検出方法

染色法	検出物質
PAS反応	糖蛋白 (中性粘液, 酸性糖蛋白 (スルホムチン, シアロムチン)), グリコーゲン
D-PAS	グリコーゲン
AB pH2.5	酸性糖蛋白 (シアロムチン, スルホムチン) 酸性ムコ多糖類 (ヒアルロン酸, コンドロイチン, ヘパリン, ケラタン, デルマトタン)
AB pH1.0	酸性糖蛋白 (スルホムチン)
HD-AB pH2.5	酸性ムコ多糖類 (ヒアルロン酸)
CI pH2.5	酸性糖蛋白 (シアロムチン), 酸性ムコ多糖類 (ヒアルロン酸, コンドロイチン, ケラタン, デルマトタン)
HID-AB pH2.5	酸性糖蛋白 (スルホムチン), 酸性ムコ多糖類
MC	上皮性粘液, 中性ムコ多糖類
TB pH2.5	酸性ムコ多糖類 (コンドロイチン, ムコイチン)

染色法	症 例					
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
PAS反応	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D-PAS	+	+	++	+	+	++
AB pH2.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AB pH1.0	+	+	+	+	+	+
HD-AB pH2.5	++	++	++	++	++	++
CI pH2.5	+	+	+	+	+	+
HID-AB pH2.5	-	-	-	-	-	-
MC	+++	++	++	++	++	+++
TB pH2.5	-	-	-	-	-	-

腫瘍細胞に対する反応　－：未検出，＋：1－30％検出，++：31－60％検出，+++：61％以上検出

PAS：Periodic acid－Schiff diastase

D－PAS：Periodic acid－Schiff diastase

AB：Alcian blue

HD－AB：Alcian blue－hyaluronidase

CI：Colloidal iron

HID－AB：High iron diamine－Alcian blue

MC：Mayer's mucicarmino

TB：Truidin blue

表 12. 本症例の免疫組織化学的診断に使用した 1 次抗体

1次抗体	クローン	希 釈	賦活化処理	製造元
Brachyury	D-10	1:100	Ca	Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.
CK AE1/AE3	AE1/AE3	1:1	PK	Nichirei, Tokyo, Japan
CK7	VO-TL-12/30	1:50	PK	Dakopatts, Glostrup, Denmark
CK9	ks9.7	1:10	Cm	Progen, German
CK13	Ks13.1	1:10	Cm	Dakopatts, Glostrup, Denmark
CK14	LL002	1:20	Cm	Biomed, U.S.A.
CK18	RGE53	1:50	Cm	Progen, German
CK 19	BA17	1:1	Cm	Thermo Fisher Scientific, U.S.A.
CK20	Ks20.8	1:50	PK	Dakopatts, Glostrup, Denmark
E-cadherin	4A2C7	1:100	Cm	Invitrogen, U.S.A.
EMA	E29	1:50	Cm	Dakopatts, Glostrup, Denmark
MUC1	Ma695	1:100	Cm	Novocastra, U.K.
MUC2	Ccp58	1:100	Cm	Novocastra, U.K.
MUC5AC	CLH2	1:100	Cm	Novocastra, U.K.
NSE	BBS/NC/VI-H14	1:100	Cm	Dakopatts, Glostrup, Denmark
PCNA	PC10	1:100	Ca	Dakopatts, Glostrup, Denmark
S-100 protein		1:1000	Cm	Dakopatts, Glostrup, Denmark
Vimentin	V9	1:100	Cm	Dakopatts, Glostrup, Denmark

CK : cytokeratin  
EMA : epithelial membrane antigen  
NSE : neuron — specific enolase  
PCNA : proliferating cell nuclear antigen  
MUC : mucin core protein  
Cm : citrate buffer PH6.0 を用いた microwave 法(121°C, 15 分間)  
Ca : citrate buffer PH6.0 を用いた Autoclave 法(121°C, 15 分間)  
PK : protein kinase 処理(室温, 20 分間)

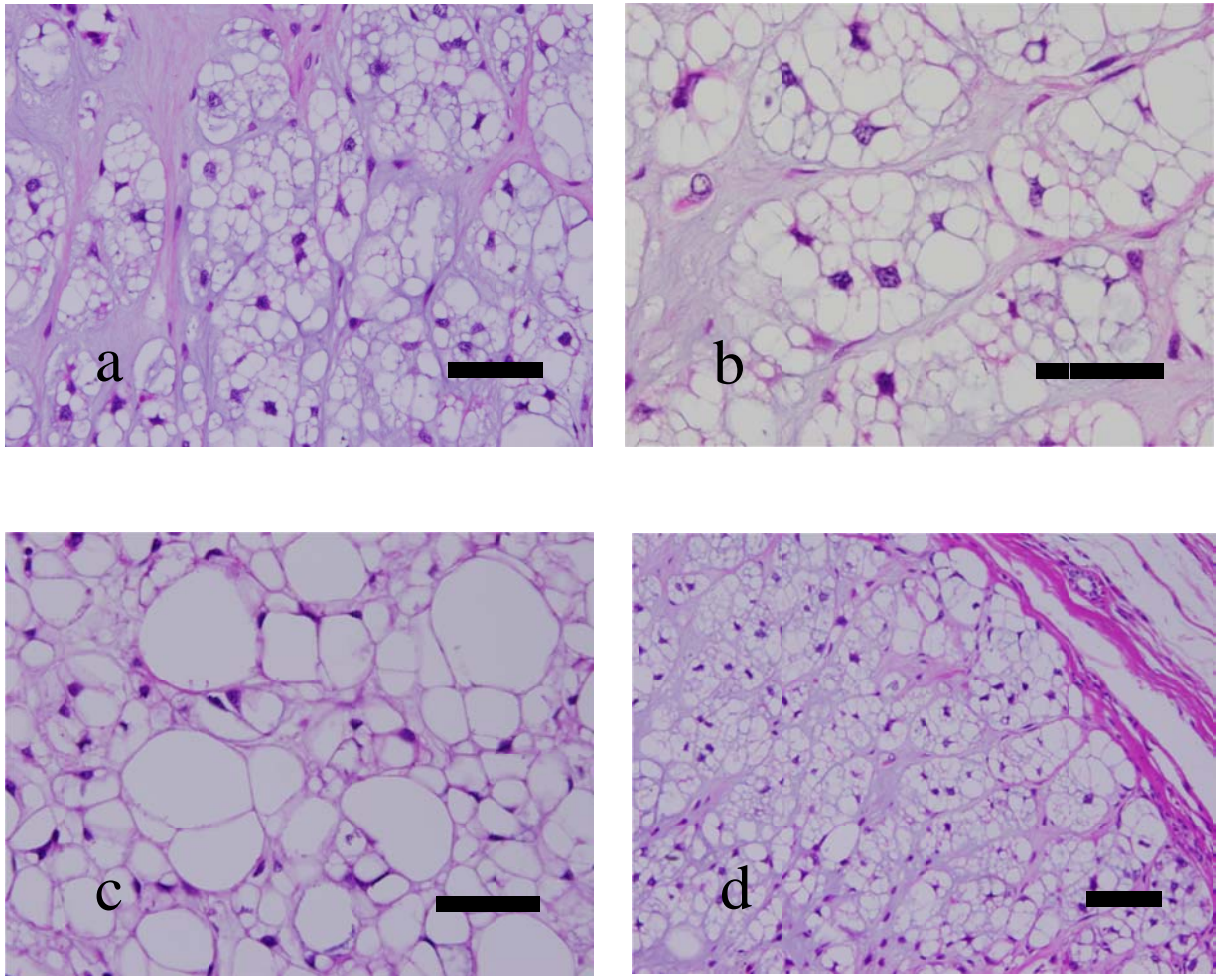


図 17 a: 腫瘍細胞質に小泡沫状構造物が密集した小型の small cell size の腫瘍細胞.  
 (症例 No.2) HE 染色, Bar=50  $\mu$  m. b: 腫瘍細胞質に様々な大きさの泡沫状の空胞をもった medium cell size の腫瘍細胞. (症例 No.1) HE 染色, Bar=50  $\mu$  m. c: 細胞質全体が空胞をもち, 核が細胞質の辺縁に偏在した large cell size の腫瘍細胞. (症例 No.1) HE 染色, Bar=75  $\mu$  m. d: 大小の空胞をもった類円形の腫瘍細胞は, 均質無構造の好酸性細胞外基質の中に敷石状充実性に配列して認められる. (症例 No.1) HE 染色, Bar=100  $\mu$  m.



### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 組織学的所見

全症例とも尾部の腫瘤に腫瘍の増殖が認められた。6 症例の脊索腫に共通して、増殖した腫瘍細胞塊は、薄い結合組織によって、小葉状に区画してみられた。腫瘍細胞は、均質無構造の好酸性の細胞外粘液間質に索状または敷石状充実性に配列して認められた (図 17 d)。腫瘍細胞は細胞質に大小の空胞をもった類円形の細胞から成り、淡好酸性または好酸性であった。全症例とも核分裂像は稀であった。一部の腫瘍組織に軟骨や骨組織の形成が認められたが、異型性や悪性腫瘍を疑う類骨の形成はみられなかった。腫瘍細胞は、形態学的に 3 つに分類することができた。①微細泡沫状の淡好酸性または好酸性の細胞質を持ち、核が細胞質の中央に位置する小型の腫瘍細胞 (small cell size の腫瘍細胞)、②大小複数の空胞を含む染色性の乏しい細胞質と核が細胞質の辺縁に位置した中型の腫瘍細胞 (medium cell size の腫瘍細胞)、③細胞質に 1 ないし 3 つの大型の空胞を含み、細胞質の辺縁に圧排された三日月状の核を持った大型の腫瘍細胞 (large cell size の腫瘍細胞) に分類された (図 17 a-c)。6 症例とも 3 分類した腫瘍細胞は、腫瘍病変に混在してみられた。Small cell size と medium cell size の両腫瘍細胞核は、大小不同で多形態にみられた。Small cell size の腫瘍細胞は 43-62%、medium cell size の腫瘍細胞は、32-48%、large cell size の腫瘍細胞は 4-16% 検出され、症例ごとに検出率の差を認めた (表 13)。Large cell size は、small cell size や medium cell size の腫瘍細胞と比較して低検出率であった。

#### 3-3-2. 組織化学的所見

上皮性粘液の検出に関して、PAS 反応により、腫瘍細胞は、赤染または淡赤染し、糖蛋白とグリコーゲン顆粒が検出された (図 18 a)。腫瘍細胞は D-PAS 反応によって、腫瘍細胞にグリコーゲン顆粒の消失が認められた。腫瘍細胞に含まれたグリコーゲン顆粒は、腫瘍細胞が大きくなるにつれて、消失する傾向にあった (図 18 b)。MC 染色によって、腫瘍細胞は赤染し、上皮性の粘液を検出した (図 18 c)。間葉性粘液の検出に関して、AB 染色 pH1.0 および AB 染色 pH2.5 により、腫瘍細胞は淡青染または青染し、酸性糖蛋白と酸性ムコ多糖類を検出した (図 18 d, e)。HD-AB 染色 pH2.5 は、AB 染色 pH2.5 と比較して腫瘍細胞に染色性の低下を認めたことから、腫瘍細胞にヒアルロン酸を検出した (図 18 f)。CI 染色によって、腫瘍細胞は明瞭に青染し、酸性糖蛋白のほか、酸性ムコ多糖類を検出した (図 18 g)。一方、HID-AB 染色 pH2.5 により、腫瘍細胞は染色されなかった (図 18 h)。

さらに、TB 染色 pH2.5 により、腫瘍細胞は染色されなかった (図 18 i)。いずれの染色方法によっても腫瘍細胞質の空胞は染色されなかった。大型の空胞を持った large cell size の腫瘍細胞は、空胞の少ない small cell size の腫瘍細胞と比較して、染色性は極めて低下した。腫瘍組織の間質の粘液の染色性に関して、PAS 反応に淡赤染したが、グリコーゲン顆粒は検出されなかった (図 18 a)。MC 染色に淡赤染し、上皮性の粘液を検出した (図 18 c)。AB 染色 pH1.0 および AB 染色 pH2.5 に青染し (図 18 j, k)、HD-AB 染色 pH2.5 に淡青染したことから、間質に酸性糖蛋白、酸性ムコ多糖類のほか、ヒアルロン酸の検出が確かめられた (図 18 f)。間質は、CI 染色に明瞭に青染した (図 18 g)。TB 染色 pH2.5 と HID-AB 染色 pH2.5 によって、間質に染色性は認められなかった (図 18 h, i)。一方、尾椎の軟骨組織、骨組織の軟骨細胞、骨化生した組織は、HID-AB 染色 pH2.5 に青黒染し、TB 染色 pH2.5 によって、メタクロマジーを示した (図 18 l, m)。組織化学的検索結果を表 11 に示した。

### 3-3-3. 免疫組織化学的所見

マウス抗 CK AE1/AE3 血清、マウス抗 CK18 血清、マウス抗 CK19 血清、マウス抗 CK20 血清およびマウス抗ビメンチン血清に対して 6 症例の腫瘍細胞に陽性反応を示した (図 19 a-e)。しかし、マウス抗 CK7 血清、マウス抗 CK9 血清、マウス抗 CK13 血清およびマウス抗 CK14 血清に対して、6 症例の腫瘍細胞に反応を示さなかった (図 19 f-i)。6 症例の small cell size および medium cell size の腫瘍細胞は、マウス抗 CK AE1/AE3 血清に対して強陽性反応を示した。さらに、マウス抗 CK AE1/AE3 血清とマウス抗ビメンチン血清による 2 重染色により、両染性の腫瘍細胞が多数検出された (図 19 j)。マウス抗 NSE 血清とマウス抗 EMA 血清に対して 6 症例の腫瘍細胞に陽性反応を示した (図 19 k, l)。ウサギ抗 S-100 蛋白血清は、6 症例の腫瘍細胞に中等度から強度の陽性反応を示した (図 19 m)。いずれの抗血清に対しても腫瘍細胞が大きくなるに従い、反応性の低下を認めた。マウス抗 PCNA 血清に対して、少数の small cell size の腫瘍細胞核に陽性反応を示した (図 19 n)。マウス抗 MUC1 血清およびマウス抗 MUC2 血清に対して、腫瘍細胞に反応を示さなかったが、マウス抗 MUC5AC 血清に対して、腫瘍細胞膜や細胞質に陽性反応を示した (図 19 o)。正常フェレットを用いた免疫組織化学的検索により、マウス抗 MUC1 血清に対して胃表面上皮細胞と結腸の腺上皮細胞に陽性反応を示し、マウス抗 MUC2 血清に対して結腸の腺上皮細胞と胃表面上皮細胞に陽性反応を示した。マウス抗 MUC5AC 血清に対して胃表面上

皮細胞に陽性反応を示した。多くの腫瘍細胞核はマウス抗 **brachyury** 血清に対して強陽性反応を示した (図 19 p)。マウス抗 E-カドヘリン血清に対して、全症例とも腫瘍細胞膜に反応を示さなかった。いずれの症例の腫瘍細胞の空胞も全抗血清に対して反応を示さなかった。免疫組織化学的検索結果を表 14 に示した。

表 13. 形態学的に分類した腫瘍細胞 1,000 個当たりの検出率

症 例	腫瘍細胞		
	Small cell size	Medium cell size	Large cell size
No.1	59	41	ND
No.2	43	48	9
No.3	56	34	10
No.4	58	35	7
No.5	62	34	4
No.6	52	32	16

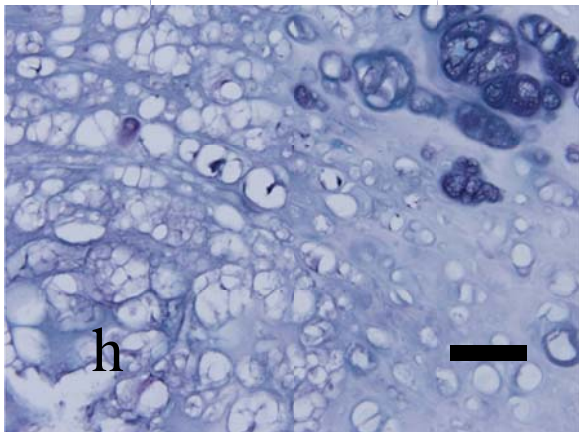
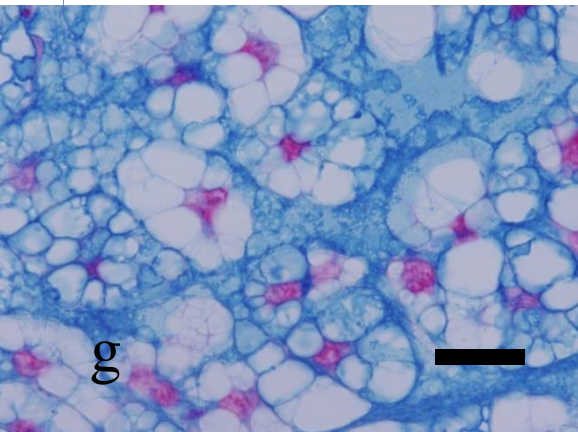
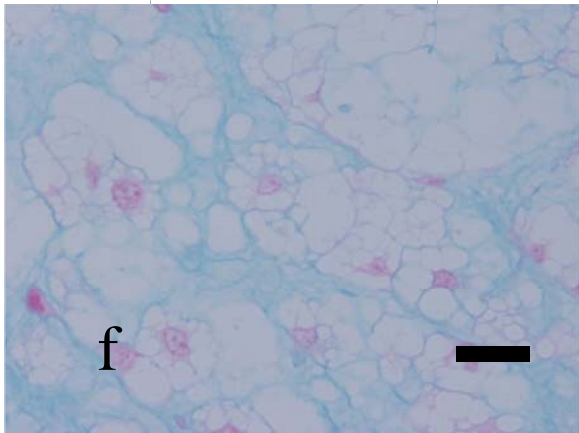
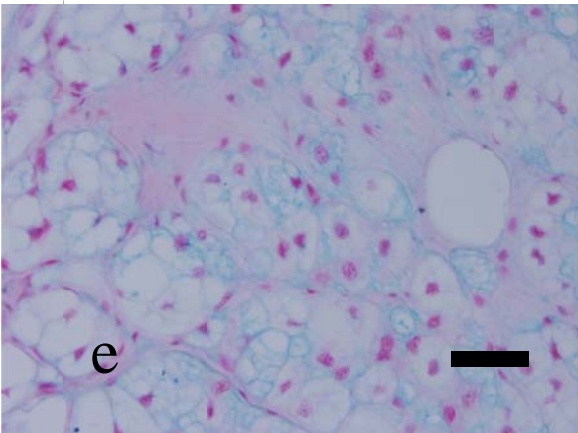
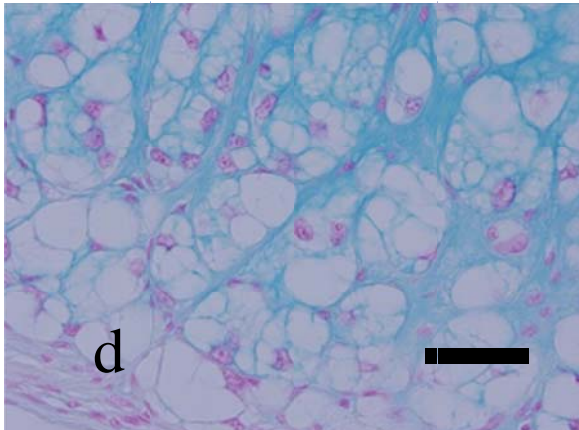
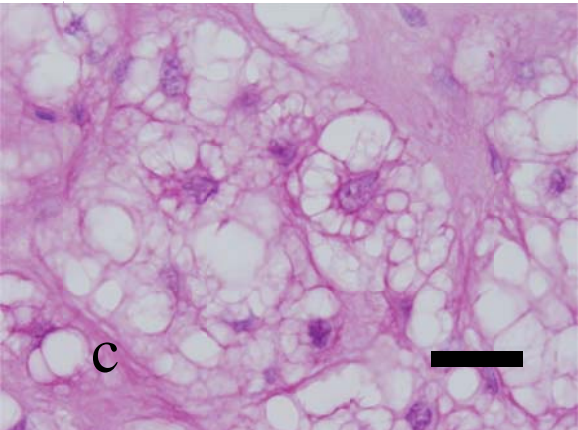
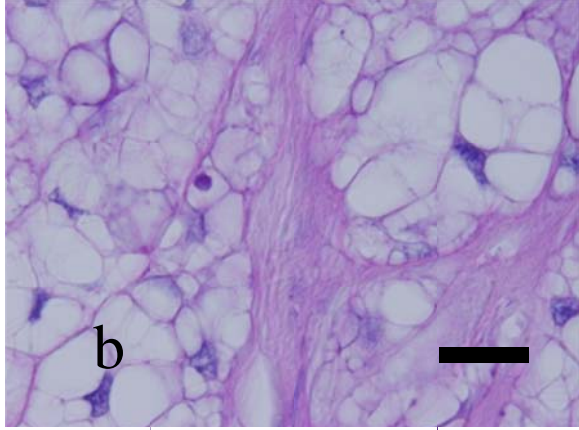
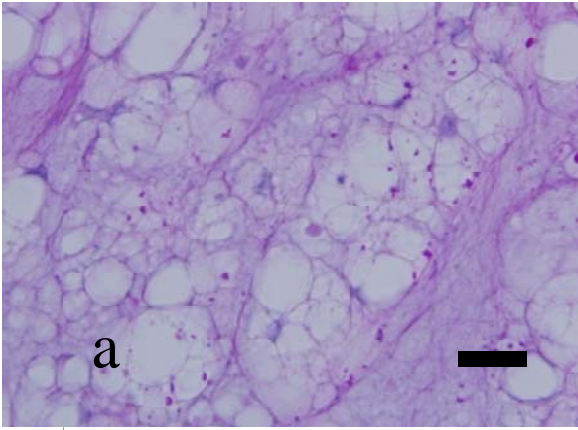
ND: 未検出

表 14. 腫瘍細胞 1,000 個当たりの免疫組織化学的検出結果

症 例	腫瘍細胞	1次抗体												
		CK AE1/AE3	CK7	CK9	CK13	CK14	CK18	CK19	CK20	MUC1	MUC2	MUC5AC		
No. 1	Small cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	
	Medium cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	
No. 2	Small cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	
	Medium cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	
No. 3	Small cell size	+++	-	-	-	-	++	+++	+++	-	-	-	++	
	Medium cell size	+++	-	-	-	-	++	+++	+++	-	-	-	++	
No. 4	Small cell size	+++	-	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+	
	Medium cell size	+++	-	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+	
No. 5	Small cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	
	Medium cell size	+++	-	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+	
No. 6	Small cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	++	
	Medium cell size	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+	

症 例	腫瘍細胞	1次抗体							
		Vimentin	EMA	NSE	S-100 protein	E-cadherin	PCNA	Brachyury	
No. 1	Small cell size	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	
	Medium cell size	+++	+++	++	+++	-	+	+++	
No. 2	Small cell size	+++	++	+++	+++	-	+	+++	
	Medium cell size	+++	++	++	+++	-	+	+++	
No. 3	Small cell size	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	
	Medium cell size	+++	++	+++	+++	-	+	+++	
No. 4	Small cell size	+++	++	+++	+++	-	++	+++	
	Medium cell size	++	+	+++	++	-	+	+++	
No. 5	Small cell size	+++	+++	++	++	-	+	+++	
	Medium cell size	+++	+	++	+++	-	+	+++	
No. 6	Small cell size	+++	++	++	+++	-	+	+++	
	Medium cell size	+++	++	++	+++	-	+	+++	

腫瘍細胞の検出 - : 未検出, + : 30%以下検出, ++ : 30-60%以下検出, +++ : 61%以上検出



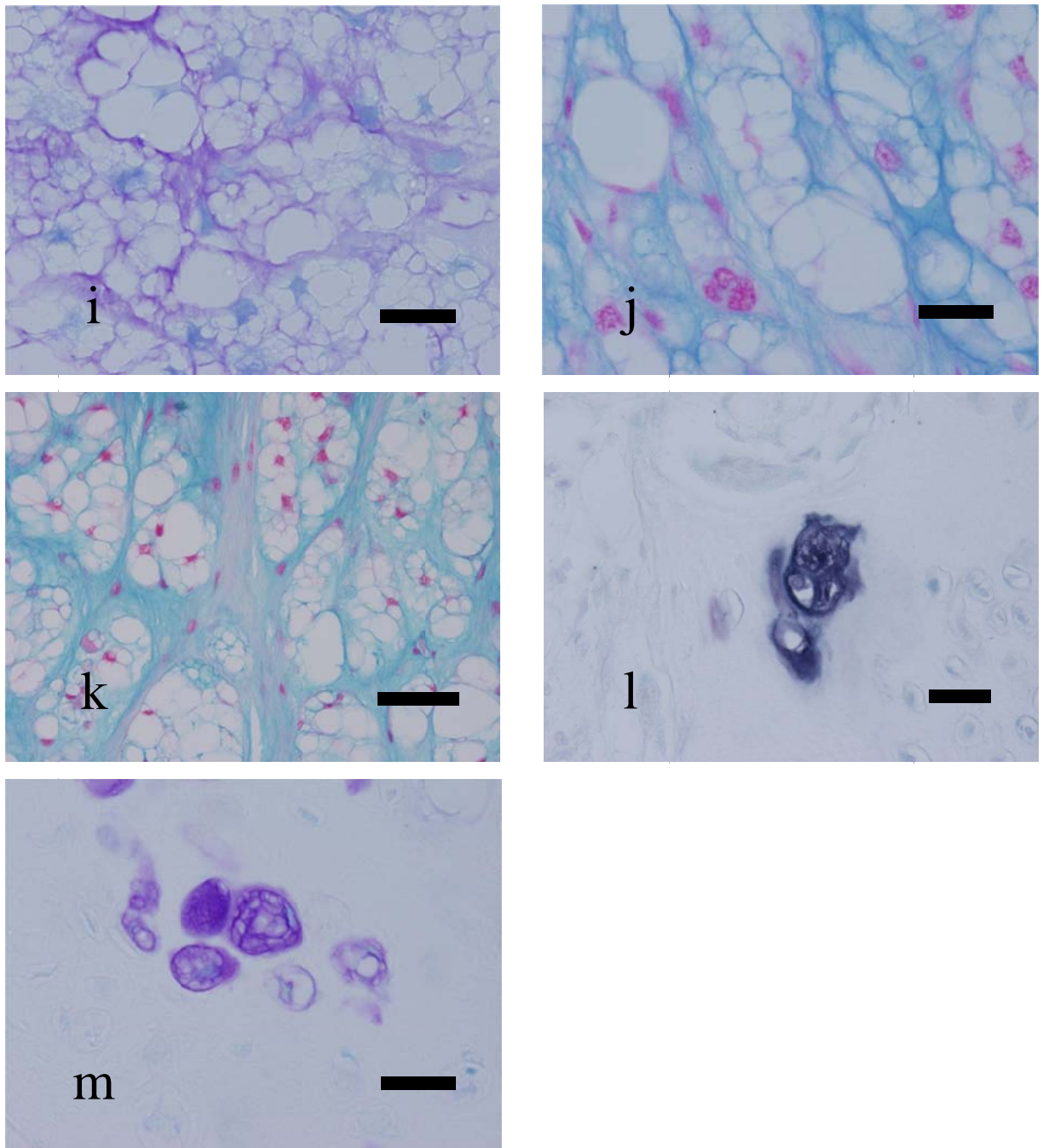
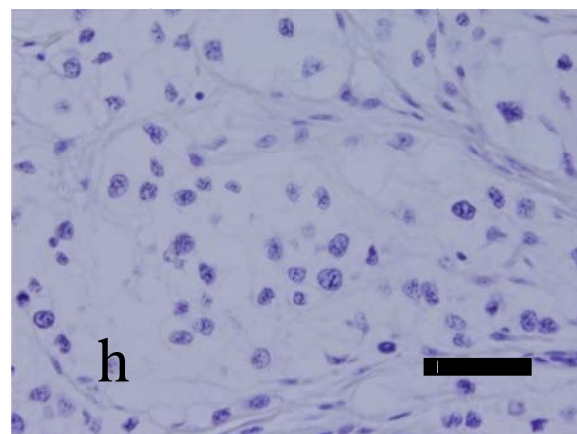
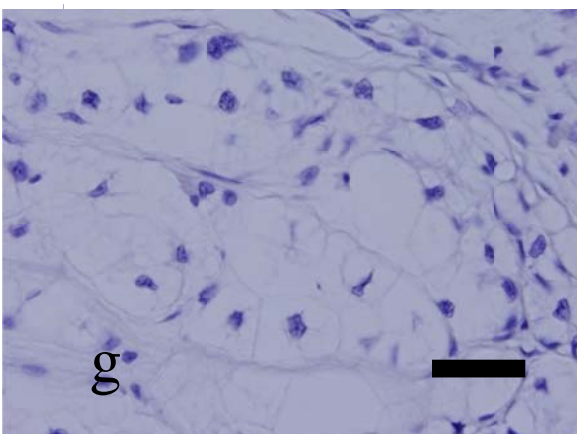
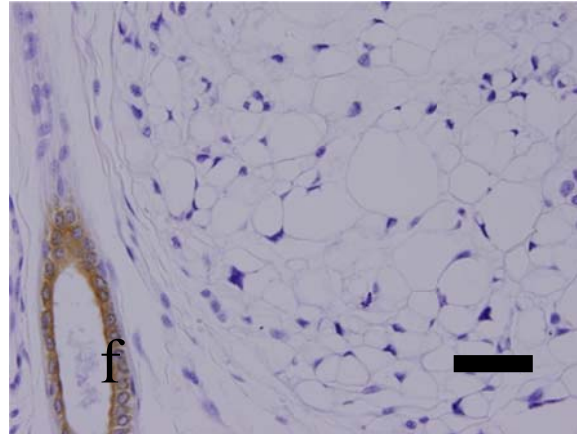
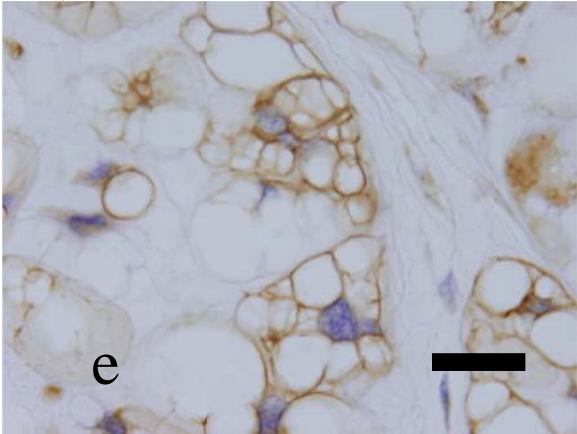
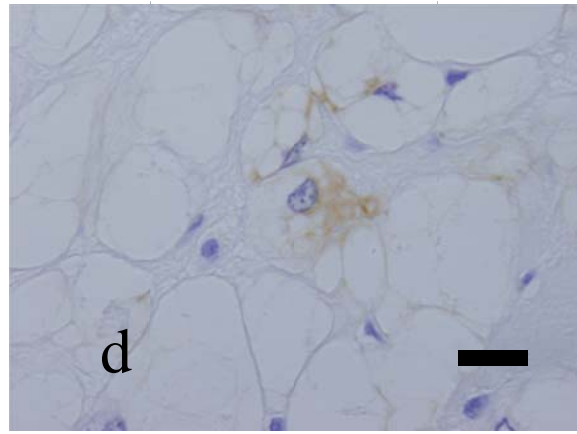
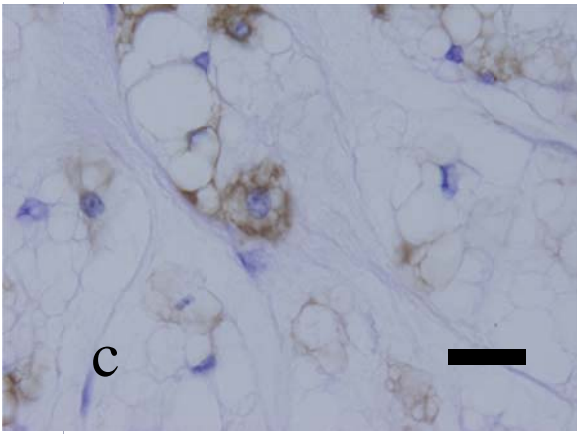
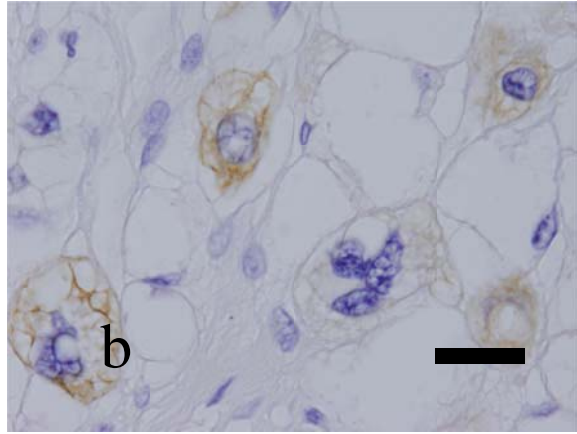
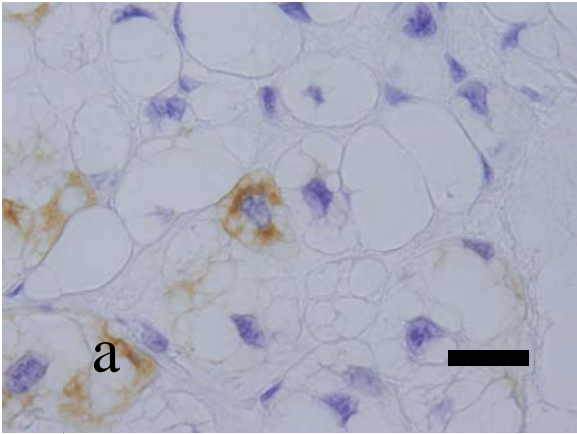


図 18 a : 腫瘍細胞質内は, PAS 反応に淡赤染するとともにグリコーゲン顆粒も検出される。(症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. b : 腫瘍細胞質内は, D-PAS 反応に淡赤染。(症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. c : 腫瘍細胞は, MC 染色に淡赤染。(症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. d : AB 染色 pH2.5 によって, 腫瘍細胞と間質に酸性粘液が検出される。(症例 No.1) Bar=50  $\mu$  m. e : AB 染色 pH1.0 によって, 腫瘍細胞に酸性糖蛋白が検出される。(症例 No.1) Bar=50  $\mu$  m. f : HD-AB 染色 pH2.5 により, AB 染色 pH2.5 と比較して腫瘍細胞と間質の染色性が低下。(症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. g : 腫瘍細胞と周囲の基質は, CI 染色によって, 明瞭に

青染. (症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. h : HID-AB 染色 pH2.5 により, 軟骨基質の軟骨細胞に黒染したが, 腫瘍細胞に染色性は認められない. (症例 No.1) Bar=50  $\mu$  m. i : TB 染色 pH2.5 によって, 基質に青紫染色した酸性ムコ多糖類が検出されたが, 腫瘍細胞に染色性は認められない. (症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. j : AB 染色 pH2.5 により, 腫瘍細胞間の間質に青染. (症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. k : AB 染色 pH1.0 により, 腫瘍細胞間の間質に青染. (症例 No.1) Bar=50  $\mu$  m. l : 腫瘍組織に形成された軟骨細胞が HID-AB 染色 pH2.5 により, 青黒染. (症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m. m : 腫瘍組織に形成された軟骨細胞は TB 染色 pH2.5 によって, メタクロマジーを示す. (症例 No.1) Bar=25  $\mu$  m.





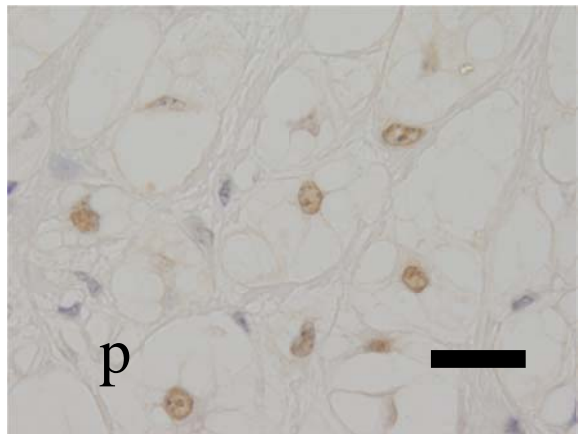
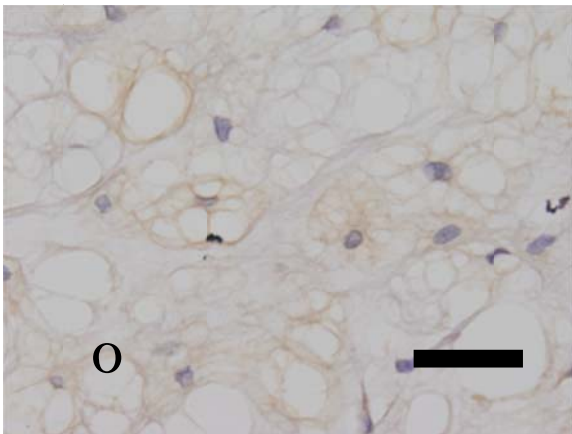
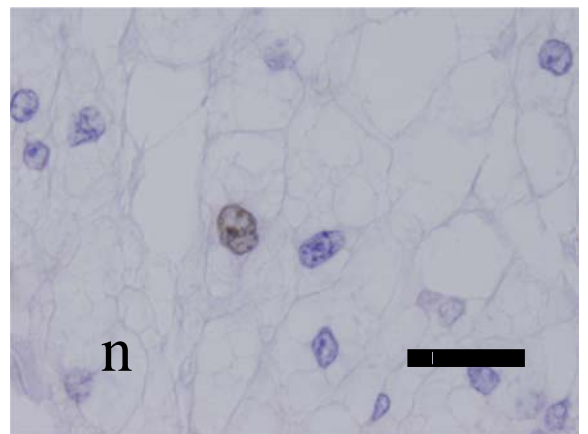
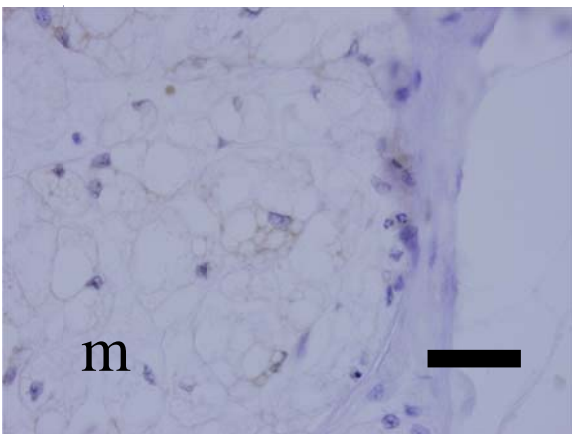
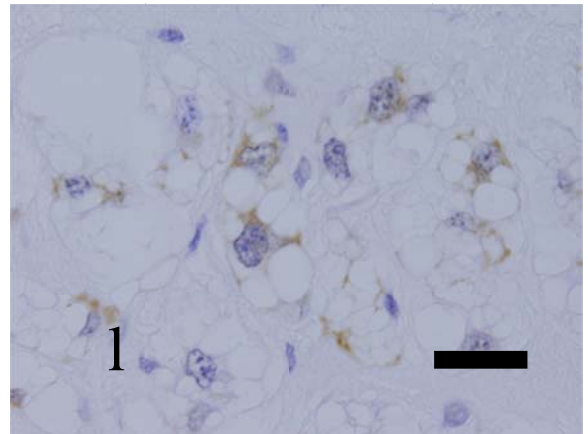
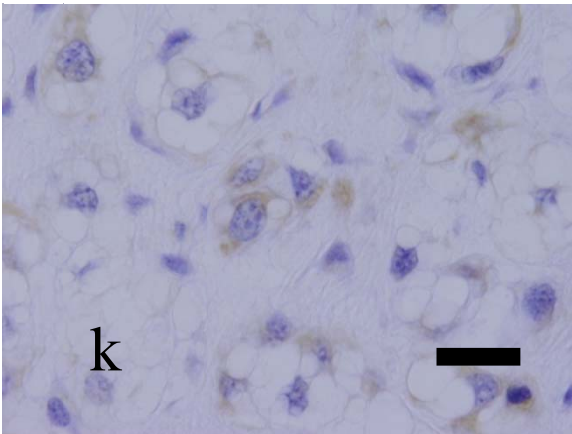
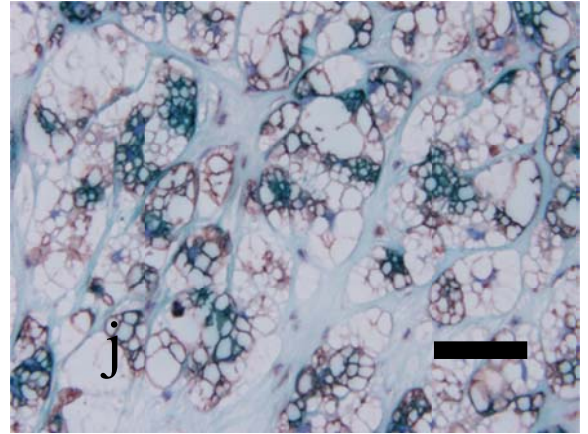
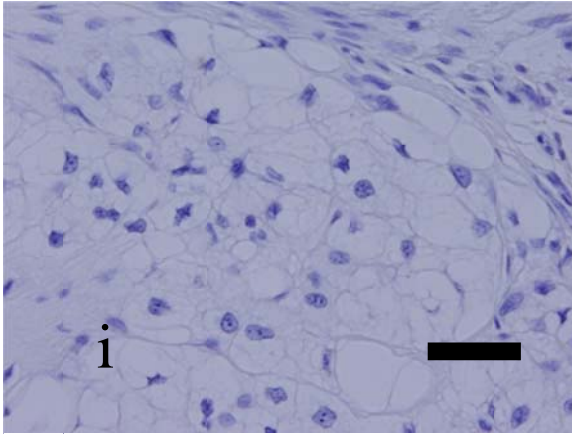


図 19 a : 腫瘍細胞は CK AE1/AE3 抗体に対しての陽性反応を示す。(症例 No.3) 免疫組織化学的検査, Bar=25  $\mu$  m. b : 腫瘍細胞は CK18 抗体に対して中等度の陽性反応を示す。(症例 No.2) 免疫組織化学的検査, Bar=25  $\mu$  m. c : 腫瘍細胞は CK19 抗体に強陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=25  $\mu$  m. d : 腫瘍細胞は CK20 抗体に対して中等度から重度の陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=25  $\mu$  m. e : 多くの腫瘍細胞は vimentin 抗体に対して重度の陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=25  $\mu$  m. f : 腫瘍細胞は CK7 抗体に対して陰性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. g : 腫瘍細胞に対して CK9 抗体に対して陰性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. h : 腫瘍細胞は CK13 抗体に対して陰性反応を示す。(症例 No.1). 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. i : 腫瘍細胞は CK14 抗体に対して陰性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. j : 腫瘍細胞は CK AE1/AE3 抗体 (赤染) と vimentin 抗体 (緑染) に対して両染色性の反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. k : 腫瘍細胞は EMA 抗体に対して陽性反応を示す。(症例 No.6) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. l : 腫瘍細胞は NSE 抗体に対して陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. m : 腫瘍細胞は S-100 protein 抗体に対して中等度から重度の陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. n : PCNA 抗原を検出した腫瘍細胞の多くは, small cell size の腫瘍細胞である。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=30  $\mu$  m. o : MUC5AC 抗体に対して腫瘍細胞質と腫瘍細胞膜に陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=50  $\mu$  m. p : Brachyury 抗体に対して多数の腫瘍細胞核に陽性反応を示す。(症例 No.1) 免疫組織化学的検査, Bar=30  $\mu$  m.

### 3-4. 考察

雌雄別の脊索腫の発生割合は、フェレットで2:1 [24]と報告されているが、本章の6症例に性差はみられなかった。

脊索腫は、特徴的な組織病変が認められ、大小不同の類円形の腫瘍細胞が、索状または敷石状充実性に配列してみられる。特に、腫瘍細胞質に大小の空胞と豊富な粘液成分を含む泡沫状に腫大した *physaliphorous cells* と呼称される腫瘍細胞が認められる [36, 70, 101]。核は多形態で核分裂は稀であるとされる [24]。特に、腫瘍細胞質に大型の空胞をもった腫瘍細胞核は、細胞質辺縁に三日月状に圧排するように認められる。全症例のフェレットの尾部の組織病変はこれまで報告されたフェレットの脊索腫と一致した [3, 24, 45, 101]。ヒトや動物の脊索腫は緩慢な増殖を示し、浸潤や転移もみられる [70, 101, 153, 171]。一方、フェレットの脊索腫の多くは、尾部に発生し [3, 24]、良性腫瘍の発生報告が多い [45]。本章の症例の脊索腫の腫瘍細胞は明瞭な核分裂像や周囲組織への浸潤像もみられず、転移もみられなかったことから、良性の脊索腫と診断され、組織学的にヒトの *classic chordoma* に相当し [32, 124]、*chondroid chordoma* や *dedifferentiated chordoma* の組織像とは異なった [91, 124, 136]。頭頸部や仙尾部に発生したヒトの脊索腫は、稀に悪性腫瘍となり、発育は緩慢であるが、再発や転移を起こすことがある [32, 34]。一方、フェレットの脊索腫は稀に頸部に発生するが [171]、一般的に尾部に発生が多く報告されている。このため、肉眼的に、腫瘍を早期に発見できることから、早い段階で外科的切除が可能と考えられた。そのため、フェレットの脊索腫はヒトと異なり、診断、治療および予後は良好であると考えられた。

ヒトの脊索腫は組織学的に3つのタイプ；*classic chordoma*, *chondroid chordoma*, *dedifferentiated chordoma* に分類される [32]。免疫組織化学的に *chondroid chordoma* の軟骨成分は *brachyury* 抗原と *CKs* 抗原を検出し、*dedifferentiated chordoma* の腫瘍細胞は、*brachyury* 抗原、*CKs* 抗原、*EMA* 抗原および *S-100* 蛋白抗原は検出されないことから、これらの抗体を用いた脊索腫の診断が活用されている [32, 91, 136, 167]。本章のフェレットの脊索腫の腫瘍細胞は、*classic chordoma* の組織像と一致し、*CKs* 抗体、ビメンチン抗体、*S-100* 蛋白抗体、*NSE* 抗体、*EMA* 抗体および *brachyury* 抗体に対して、腫瘍細胞に陽性反応を示したことから [32, 124]、組織学的および免疫組織化学的に良性の脊索腫と診断された。

本章の脊索腫において、形態学的に3分類された腫瘍細胞の保有率は症例ごとに異なっ

た。このうち、small cell size の腫瘍細胞に PCNA 抗原が多数検出された。このため、small cell size の腫瘍細胞が、粘液を過剰に産生しながら、small cell size から large cell size に形態学的に変化したと考えられた。その理由に、粘液を過剰産生する腫瘍細胞の形態学的特徴として、オルガネラの拡張によって、細胞質に泡沫状の変性を起こし、超微形態学的に泡沫状の小型の腫瘍細胞の細胞質に含まれる小胞体などのオルガネラの空胞化や膨化が進行した結果、組織学的に水腫性に変性した大型の空胞をもった腫瘍細胞に変化すると考えられた [92, 102]。脊索腫の腫瘍細胞の増殖過程は、泡沫状の小型の腫瘍細胞が、大型の空胞を含んだ腫大した腫瘍細胞に変性すると考えられた。このことから、small cell size の腫瘍細胞が、増殖・腫大しながら large cell size の腫瘍細胞に形態的に変化したと考えられた。

全症例の腫瘍細胞は、免疫組織化学的に CK AE1/AE3 抗体に対して陽性反応を示したことから軟骨肉腫との関連は否定された [151]。一方、脊索腫は他の骨腫瘍と比較して紡錘形細胞の増殖がみられるが、多くは非腫瘍性であると報告されている [103]。稀に、脊索腫は、悪性紡錘形細胞腫瘍 [49]や悪性線維性組織球腫 [17, 53]を伴うことが報告されている。本章の 6 症例の腫瘍組織に増殖した紡錘形細胞はビメンチン抗体に陽性反応を示したが、CK AE1/AE3 抗体と S-100 蛋白抗体に陰性反応を示したことから、悪性線維性組織球腫との関連は否定された [53]。さらに、悪性紡錘形細胞腫瘍は CKs 抗体と S-100 蛋白抗体に対して陽性反応を示しにくいことから [49]、悪性紡錘形細胞腫瘍との関連も否定された。免疫組織化学的に脊索腫との鑑別診断を表 15 に示した。

ヒトおよび動物の脊索腫は、腫瘍細胞と間質に豊富な粘液を認める。ヒトと動物の脊索腫における粘液の組成に関する組織化学的報告は極めて少ない [3, 4, 13, 38]。表 11 に示した組織化学的検索により、本章の症例において、PAS 反応と MC 染色により、腫瘍細胞に中性ムコ多糖類や糖蛋白などの上皮性の粘液が検出された。PAS 反応と D-PAS 反応により、腫瘍細胞に中性ムコ多糖類や糖蛋白が豊富に含まれていると考えられ、これは、脊索腫の腫瘍細胞の粘液の特性と考えられた。AB 染色 pH2.5 によって、腫瘍細胞に酸性粘液が検出された報告もみられ [38]、本章の 6 症例も AB 染色 pH2.5, AB 染色 pH1.0 および HD-AB 染色 pH2.5 により、6 症例の腫瘍細胞に酸性糖蛋白と酸性ムコ多糖類が検出された。本章の症例は、組織化学的検索によって、酸性粘液に含まれる多くの粘液成分（スルホムチン、シアロムチン、コンドロイチン、ヒアルロン酸、ムコイチン）が検出されたことが示唆された。腫瘍細胞は、CI 染色によって、酸性ムコ多糖類のうちのコンドロイチン、ヘパリン、ケラタンおよびデルマトランが含まれたことが示唆された。幼弱な組織や腫瘍細

胞から検出される酸性ムコ多糖類の役割は、上皮性腫瘍細胞の増殖や浸潤に重要な働きがあるとされている [23]. 本章の脊索腫においても酸性ムコ多糖類が検出され、脊索腫は、幼弱な細胞つまり未分化な腫瘍細胞であると考えられた。組織化学的に間質は酸性ムコ多糖類を多く含む粘液で多くはコンドロイチン硫酸などを含む間葉性のムコ多糖類であり [13, 38], 報告例と一致した。腫瘍細胞と周囲の間質は、PAS 反応と MC 染色に赤染した。間質は、腫瘍細胞と同様の糖蛋白と中性ムコ多糖類が含まれていたことから、腫瘍細胞で産生された上皮性粘液は、間質に分泌されたことが明らかとなった。このことから、多くの腫瘍細胞は、上皮系および間葉系の両成分の中間径フィラメント構成タンパク質を含みながら、上皮性と間葉性の両染色性の粘液成分を間質に分泌したことが明らかとなった。

フェレット、イヌ、ネコ、ラットおよびヒトの脊索腫の免疫組織化学的検索の報告に関して、CKAE1/AE3 抗体、ビメンチン抗体、S-100 蛋白抗体、NSE 抗体および EMA 抗体を用いることによって、脊索腫を診断している [11, 13, 24, 36, 45, 75, 101, 153]. このうち、フェレットの脊索腫においてもヒトや動物の報告と同様に、CK AE1/AE3 抗体、ビメンチン抗体、S-100 蛋白抗体および NSE 抗体を用いて診断されている [24, 101, 150, 171]. イヌ、ネコ、フェレット、ラットおよびヒトの脊索腫の報告 [11, 13, 24, 36, 45, 75, 101, 103, 150, 153, 171]のうち、腫瘍細胞に対して、CK AE1/AE3 抗体 9/10 例（陽性症例数/総症例数）、ビメンチン抗体 7/7 例、S-100 蛋白抗体 8/8 例、NSE 抗体 5/6 例および EMA 抗体 1/1 例に陽性反応を示した。一方、フェレットの脊索腫の腫瘍細胞において、CK AE1/AE3 抗体 4/4 例、ビメンチン抗体 4/4 例、S-100 蛋白抗体 2/2 例および NSE 抗体 3/3 例で陽性反応を示した（表 15） [24, 101, 150, 171]. 本章の脊索腫に関して、6 症例の腫瘍細胞は、CK AE1/AE3 抗体、CK18 抗体、CK19 抗体、CK20 抗体、ビメンチン抗体、NSE 抗体および S-100 蛋白抗体に対して陽性反応を示した。これらの免疫組織化学的検索はこれまで報告されたヒト、フェレットを含む動物の脊索腫の報告例とほぼ一致した。各種抗体に対する動物の脊索腫の特徴として、NSE 抗原は、フェレットとラットの腫瘍細胞に検出されている [24, 153, 171]. S-100 蛋白抗原は、フェレット、イヌ、ネコおよびラットの腫瘍細胞に検出されている [13, 24, 36, 45, 153, 171]. 脊索腫における S-100 蛋白抗体と NSE 抗体による検出は、腫瘍組織におけるコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸を含むグリコサミノグリカンの蓄積と関連していることが示唆されている [13, 64, 124]. 本章においても、これらの免疫組織化学的所見はこれまで報告されたヒトの脊索腫の報告と一致した。

本章のいずれの症例の腫瘍細胞もマウス抗 CKs 抗原とマウス抗ビメンチン抗原が検出

され、上皮系と間葉系の腫瘍細胞が混在してみられた。上皮系または間葉系成分を含む腫瘍細胞の分布に規則性はみられず、両成分を含んだ腫瘍細胞が、腫瘍組織内で一様に増殖した。ヒトと動物の脊索腫の腫瘍細胞は、上皮系マーカーにより検出される上皮系細胞と間葉系マーカーにより検出される間葉系細胞の両特性を有する [13, 24, 36, 43, 101, 171]。このことは胎生期脊索組織が外胚葉と中胚葉に由来することに関連していると考えられているため [65, 155]、腫瘍細胞は、脊索遺残組織由来の多分化能をもった腫瘍細胞であると考えられた。

CKs 抗原は、上皮細胞の細胞骨格を形成する中間径フィラメント構成タンパク質の一つで、分子量の違いによって、約 20 種のサブタイプに分類されている。特に、CKs 抗原は、低分子量 CKs (40–60kD ; CK7, CK8, CK17–20) 抗原と高分子量 CKs (48–67kD ; CK1–6, CK9–16) 抗原に分類され、主に、高分子量の CKs 抗原は、角化扁平上皮細胞、低分子量の CKs 抗原は、腺上皮細胞に分類される。腫瘍細胞の細胞骨格の特性は、ヒトに関して報告され [43, 48, 104, 112, 146]、CK AE1/AE3 抗原は 39/39 (陽性反応の症例数/総症例数) [48, 112]、CK7 抗原は 11/58 [43, 48, 104, 112, 146]、CK13 抗原は 0/3 [43]、CK18 抗原は 12/17 [43, 104]、CK19 抗原は 52/52 [43, 104, 112]、CK20 抗原は 7/55 [48, 104, 112, 146] 検出されている (表 16)。一方、動物の脊索腫の CKs 抗原の検索に関して、Herron らは [45]、低分子量の CK を検出しているが、各 CK 抗体の検出による腫瘍細胞のもつ細胞骨格の特性については検討されていない。従って、本章において、低分子量の CKs 抗体 (CK7 抗体, CK18 抗体, CK19 抗体, CK20 抗体) と高分子量の CKs 抗体 (CK9 抗体, CK13 抗体, CK14 抗体) を用いた免疫組織化学的検索により、腫瘍細胞は低分子量 CKs 抗体 (CK18 抗体, CK19 抗体, CK20 抗体) に陽性反応を示したが、高分子量の CKs 抗体 (CK9 抗体, CK13 抗体, CK14 抗体) に反応を示さなかった。CK18 抗原, CK19 抗原および CK20 抗原は主に消化管などの腺上皮細胞や粘膜上皮細胞に発現する CKs 抗原であり、本章の腫瘍細胞は腺上皮細胞への分化能を有している可能性を示唆した (表 16)。さらに、CKs 抗体のうち、CK18 抗体を用いた免疫組織化学的検索により、脊索腫の腫瘍細胞は、正常の脊索細胞よりも特異性が高いとされる [104]。CK18 抗体に対して本章の脊索腫の腫瘍細胞に強陽性反応が認められたことから、フェレットの脊索腫の診断に重要な抗体であると考えられた。

ムチンは、化学的にポリペプチドに多数のオリゴ糖が O グリコシド結合した分子量 40 万以上の糖蛋白である [22, 55]。ムチンは細胞の粗面小胞体で合成され、粗面小胞体で合成されたコア蛋白にゴルジ体 cis 部において一連の特異的糖転移酵素が連続的に働くこと

によって、母核糖鎖、骨格糖鎖・修飾末端糖鎖が段階的に結合 (glycosylation) した MUC を形成する。MUC 抗原は上皮細胞と上皮性腫瘍細胞に発現する糖蛋白であり、構造的特徴としてコア蛋白に同じアミノ酸配列の繰り返し構造から成るタンデムリピートを有し、タンデムリピートの違いにより、MUC 抗原は分類されている。MUC 抗原は、分子構造により、2つのグループに分かれ、MUC1 抗原、MUC3 抗原、MUC4 抗原は膜結合型、MUC2 抗原と MUC5AC 抗原は分泌型である。このうち、ヒトの生体における MUC1 抗原、MUC2 抗原および MUC5AC 抗原の検出は、一般的なものとして認識されている。ヒトと動物の MUC1 抗原は上皮細胞の細胞膜上に発現する膜結合型粘液コア蛋白であり、主に、気管、肺、膵臓、消化管の上皮細胞から検出される [47, 74, 80]。ヒトと動物の MUC2 抗原は、主に、消化管の粘膜上皮の細胞質と細胞膜上に検出される [15, 80, 162]。MUC5AC 抗原は、主にヒトと動物の胃粘膜と胆嚢粘膜の上皮細胞から検出される [74, 80, 132, 162]。ヒトの上皮性悪性腫瘍のムチンの検出パターンに関して、MUC1 抗体、MUC2 抗体および MUC5AC 抗体を用いた免疫組織化学的検索による腫瘍細胞の特性に関して多数の報告がある [77]。特に、MUC1 抗体は、ヒトの様々な臓器の上皮系腫瘍細胞に高発現し [22, 77]、MUC1 抗原に存在する糖鎖が腫瘍の浸潤や増殖に重要な役割を果たすと報告されている [157]。MUC2 抗体は、主に消化器系の上皮系腫瘍の診断 [22, 77]、MUC5AC 抗体は、主に膵臓、子宮頸管、胃腸系の腫瘍の診断に利用される [77]。本章の脊索腫の腫瘍細胞にも MUC5AC 抗原が検出されたことから、ヒトの腺上皮細胞や腺癌と同様のタイプの MUC を産生したと考えられた。しかし、いずれの症例の腫瘍細胞も MUC1 抗原と MUC2 抗原は検出されず、さらに、腫瘍細胞に E-カドヘリン抗原も検出されなかったことから、ムチンを分泌する上皮細胞への分化には至らなかったものと考えられた。

Brachyury 抗原は T 遺伝子によってコード化された蛋白であり、中胚葉の形成に関与する 20 以上の遺伝子が存在する T-box 遺伝子複合体の転写因子である [67, 114]。Brachyury 抗原は、主に脊索の発達を調整していると考えられ、カエル [21]、ゼブラフィッシュ [173]、マウス [67]において良く研究されている。本章においてもヒトと同様に、brachyury 抗体が脊索腫の診断に有効とされた。6 症例のフェレットの腫瘍細胞核に brachyury 抗原が検出されたことは、動物の脊索腫の診断に有効な抗体であると考えられた。ヒトと動物の脊索腫に軟骨と骨成分が存在し [24, 45, 161]、ヒトの脊索腫にしばしば共存する軟骨組織や骨組織に brachyury 抗原は検出されない [167]。本章の症例の腫瘍に軟骨または骨状に化生した成分も含まれ、報告例と一致した。さらに、軟骨腫や軟骨肉腫のような非脊索由来の腫瘍



も brachyury 抗原を検出しない [167]. 本章においても軟骨や骨成分に brachyury 抗原は検出されなかった. 本章の腫瘍組織に軟骨および骨組織が共存したが, フェレットやイヌの脊索腫にしばしば認められる化生に起因した病変と考えられた [24, 45, 36]. このため, 軟骨化生した脊索腫の骨のほか, 軟骨腫, 軟骨肉腫などの腫瘍と脊索腫の鑑別診断に brachyury 抗体を用いることは脊索腫を診断するうえで極めて有効な抗体と考えられた.

表 15. 本症例と引用文献の免疫組織化学的検査結果の比較

症例と診断名	種	症例と引用文献	1次抗体				
			CK AE1/AE3	Vimentin	S-100 protein	EMA	NSE
Physiferous cells	フェレット	症例(No.1-6)	+	+	+	+	+
Infiltrative spindle cells	フェレット	症例(No.1-6)	-	+	-	-	NT
Chordoma	フェレット	[24]	+	+	+	NT	+
	フェレット	[150]	+	+	NT	NT	+
	フェレット	[101]	+	+	NT	NT	NT
	フェレット	[171]	+	+	+	NT	+
	イヌ	[36]	+	+	+	NT	-
	ネコ	[13]	+	+	+	NT	NT
	ラット	[153]	+	NT	+	NT	+
	ラット	[153]	-	NT	+	NT	+
	ヒト	[11]	+	NT	+	NT	NT
	ヒト	[75]	+	+	+	+	NT
Chondrosarcoma	ヒト	[151]	-	+	+	NT	NT
	ヒト	[49]	+	+	+	+	NT
Spindle cell type malignant tumor	ヒト	[17]	NT	+	+	-	NT
Malignant fibrous histiocyoma	ヒト	[53]	-	+	-	NT	NT

NT : 未検査

表 16. 本症例とヒトの脊索腫の報告例における CKs 抗原の免疫組織化学的検出結果の比較

1次抗体	引用文献							症例	
	[104]	[146]	[43]	[136]	[112]	[48]	合計	検出率(%)	合計
CK AE1/AE3			12/12	26/26	1/1	39/39	100	6/6	100
CK7	1/14	1/5	0/3	9/35	0/1	11/58	19	0/6	0
CK13			0/3			0/3	0	0/6	0
CK18	9/14		3/3			12/17	70	6/6	100
CK19	14/14		3/3	35/35		52/52	100	6/6	100
CK20	0/14	0/5		7/35	0/1	7/55	13	6/6	100

陽性症例数/総症例数

NT: not test

### 3-5. 小括

ヒトならびに動物の脊索腫は、胎生期の脊椎椎間板髄核内の遺残脊索組織や異所性脊索組織より発生すると考えられている。組織化学的および免疫組織化学的手法による脊索腫の腫瘍細胞の解析はヒトのほか、一部の動物で報告されているが、腫瘍細胞の特性は、ヒトと動物では、明らかにされていない。今回、著者は、フェレットの脊索腫の腫瘍細胞の特性を明らかにするため、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に検索した。

脊索腫は、特徴的な組織病変が認められ、好酸性または淡好酸性の間質に大小不同の類円形の腫瘍細胞が、索状または敷石状充実性に配列してみられた。特に、腫瘍細胞質内に大小の空胞と豊富な粘液成分を含んだ泡沫状に腫大した *physaliphorous cells* と呼称される腫瘍細胞が認められた。腫瘍細胞の転移や浸潤はみられなかった。本章のフェレットの脊索腫の腫瘍細胞は、ヒトの *classic chordoma* の組織像と一致し、CKs 抗体, ビメンチン抗体, S-100 蛋白抗体, EMA 抗体および *brachyury* 抗体に対して、陽性反応を示したことから、本章の症例は、組織学的および免疫組織化学的に良性の脊索腫と診断された。ヒトおよび動物の脊索腫は、腫瘍細胞と間質に豊富な粘液を認める。ヒトと動物の脊索腫における粘液組成に関する組織化学的報告は極めて少ない。組織化学的および免疫組織化学的に腫瘍細胞の粘液成分を検出した結果、腫瘍細胞には、中性粘液、糖蛋白およびグリコーゲンが豊富に含まれた上皮性粘液の特性を有していた。さらに、酸性糖蛋白や酸性ムコ多糖類が検出され、酸性ムコ多糖類のうち、コンドロイチン、ヒアルロン酸、ムコイチン、ヘパリン、ケラタンおよびデルマトタンが含まれたことが示唆された。MUCs 抗原は、主に、ヒトの腺上皮細胞と腺癌に発現する。本章における脊索腫に MUC5AC 抗原が特異的に検出され、ヒトの腺上皮細胞や腺癌と同様の MUC 抗原を産生したと考えられた。本章のいずれの症例も低分子量の CKs 抗原 (CK18 抗原, CK19 抗原, CK20 抗原), ビメンチン抗原および MUC5AC 抗原が検出され、上皮系と間葉系の両特性をもつ腫瘍細胞であることが明らかにされた。特に、低分子量の CKs 抗原を検出した腫瘍細胞は、腺上皮細胞の特性を有していた。しかし、E-カドヘリン抗原は検出されず、腫瘍細胞は上皮細胞の分化に至らなかったと考えられた。従って、腫瘍細胞は遺残脊索組織由来の多分化能を有した腫瘍細胞であると考えられた。脊索腫は、胎生期の遺残脊索組織由来の腫瘍細胞であるため、本章の腫瘍細胞にもヒトと同様に *brachyury* 抗体に対して特異的に反応し、フェレットの脊索腫の病理学的診断に対して有効に活用できる抗体であった。特に、この抗体は、骨化生、

軟骨腫，軟骨肉腫，悪性紡錘形腫瘍，悪性線維性組織球腫との類症鑑別にも活用できた。

本章は，胎生期の遺残脊索組織由来の腫瘍の特性を解明することによって，より脊索腫の診断に貢献できた。

## 総括

ヒトと動物の腫瘍に関する WHO 腫瘍分類に基づく腫瘍の診断は、数々の相似と相違を含むため、その病変の組織学的特性を明らかにすることは必要不可欠である。そのため、ヒトと動物のこれまでの研究報告を勘案しながら発生学および比較病理学的に検討を加え、腫瘍の本態を解明し、新たな腫瘍診断に貢献した。本研究では、腫瘍の特性の解明が不十分と考えられた稀少腫瘍に関して、第1章にイヌとネコの肝臓原発の wdNET の証明、第2章にイヌの CC の神経内分泌分化の証明、第3章にフェレットの脊索腫の未分化腫瘍の特性解明に関する本研究の取り組み方法によって、腫瘍の本態の解明と新たな腫瘍診断に寄与した事実を評価し、今後の取り組むべき課題と方向性について評価を加えた。

腫瘍診断を実施するうえで、これまでに報告されたヒトと動物に関する研究と比較病理学的にどのような点において相似と相違が成り立つか検討し、腫瘍病変の本態を明らかにすることができた。第1章において、ヒトと動物の神経内分泌腫瘍は、一般的に、腫瘍の特性を生かした組織学的、組織化学的および免疫組織化学的手法を用いて診断されている。腫瘍診断において、原発臓器を特定することは、臨床上、必要不可欠な要素であると考えられる。ヒトの肝臓原発の神経内分泌腫瘍は非常に稀である一方、動物において検討された報告はみられない。本章は、臨床的、肉眼的、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的にヒトの肝臓原発の wdNET に相当し、本章の症例は、wdNET と診断することが可能であった。本章は、臨床的にカルチノイド症候群はみられず、組織学的に多中心性の腫瘍病変を形成した。さらに、組織化学的に、前腸由来のヒトの肝臓原発の wdNET に相当した。免疫組織化学的に、肝臓の神経内分泌腫瘍の多くは、他臓器からの転移による。そのため、ヒトと同様に、アミンやペプチドホルモンに関連した抗体を用いた免疫組織化学的検索によって、イヌとネコの肝臓原発の神経内分泌腫瘍を診断することができた。本章のイヌの正常肝臓に、wdNET の母細胞とされる神経内分泌細胞の存在は明らかにされなかったが、肝臓原発の wdNET と診断することが可能であった。第2章において、近年、ヒトの消化器系の上皮性腫瘍は、神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化する報告がみられる。本章の胆管由来の CC6 症例のうち、CC4 症例は、組織学的、組織化学的および免疫組織化学的に amphicrine 腫瘍の特性を有したヒトの mix adenoneuroendocrine carcinoma に相当した。CC の腫瘍細胞の神経内分泌分化によって、CC と神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍を形成した動物で最初の報告となった。第3章において、脊索腫の腫瘍細胞は、組織学的に、細胞

質内に大小の空胞と豊富な粘液成分を含んだ泡沫状に腫大した *physaliphorous cells* と呼称される腫瘍細胞が認められ、免疫組織化学的に CK AE1/AE3 抗原、ビメンチン抗原、S-100 蛋白抗原、NSE 抗原および EMA 抗原が検出され、ヒトの *classic chordoma* に相当し、良性の脊索腫と診断することができた。

本研究において、腫瘍の特性が明らかされ、腫瘍の本態の解明に結びつく新たな知見を得ることができた。第2章の CC6 症例の腫瘍細胞に神経内分泌成分が検出され、CC の腫瘍細胞は、高率に神経内分泌成分を含んだ腫瘍細胞に分化し、神経内分泌腫瘍と複合した腫瘍を形成した。腫瘍の増殖や分化の指標となる E-カドヘリン抗原と Ki67 抗原の検出と神経内分泌分化との関連を検討することができた。細胞増殖能が高く、細胞接着性の低い低分化な腫瘍細胞ほど神経内分泌分化したと考えられた。第3章において、CKs 抗体を用いた免疫組織化学的検索により、腫瘍細胞に低分子量の CKs 抗原が特異的に検出され、腺上皮細胞の特性を有した腫瘍細胞に分化したことが明らかにされた。ヒトと動物の脊索腫の腫瘍細胞の粘液は、酸性ムコ多糖類や中性粘液など一部の粘液成分が検出されているに過ぎない。組織化学的および免疫組織化学的に腫瘍細胞の粘液成分を検出した結果、腫瘍細胞には、中性ムコ多糖類、糖蛋白およびグリコゲンが豊富に含まれた上皮性粘液の特性を有した。さらに、酸性糖蛋白や酸性ムコ多糖類が検出され、酸性ムコ多糖類のうち、コンドロイチン、ヒアルロン酸、ムコイチン、ヘパリン、ケラタンおよびデルマタンが検出されたと考えられた。さらに、MUCs は、主に、ヒトの腺上皮細胞と腺癌に発現する。本章における脊索腫に MUC5AC 抗原が特異的に検出されており、ヒトの腺上皮細胞や腺癌と同様の MUC を産生したと考えられた。しかし、腫瘍細胞に E-カドヘリン抗原は検出されず、上皮細胞への分化に至らなかったと考えられた。

発生学的に、分化系統樹からみた分化能と本章の腫瘍における病理学的診断の意義との関連に関して検討することができた。胚葉系列幹細胞から分化した前駆細胞は、一般的に特定の組織への分化が運命づけられた組織特異性のある細胞である。第1章に関して、肝臓原発の *wdNET* の由来細胞とされる神経内分泌細胞は、分化系統樹からみて組織特異性の高い前駆細胞と考えられる。多臓器に分布する神経内分泌細胞から検出される各種アミンやペプチドホルモンは、組織特異性が高く、これらの成分を検出することによって、原発臓器を推定することが可能である。一方、肝臓原発の神経内分泌腫瘍は、これらの内分泌系成分が検出されにくいことで知られる。これらの腫瘍細胞の特性を利用した結果、免疫組織化学的に、本章の肝臓の神経内分泌腫瘍にアミンとペプチドホルモンは検出されな

かった。従って、腫瘍の母細胞は、組織特異性をもつ前駆細胞に位置づけられた肝臓の神経内分泌細胞と考えられた。一方、一部の前駆細胞においても卵巣間質腫瘍や軟骨一骨一脂肪前駆細胞のように分化する細胞もみられる。第2章において、CCの腫瘍細胞は、孤在性または集塊状に神経内分泌成分を含む腫瘍細胞に分化したことが明らかにされた。特に、CCの腫瘍細胞は、神経内分泌成分を含む腫瘍細胞の分化に伴って、CCと神経内分泌腫瘍の複合した腫瘍病変を形成した。従って、組織特異性の高い前駆細胞が、腫瘍化することによって、神経内分泌成分を含む腫瘍に分化したことが免疫組織化学的に明らかにされた。第3章では、胚葉系列幹細胞に属した多分化能をもつ脊索由来の腫瘍細胞の特性を明らかにした。本章における脊索腫の腫瘍細胞は、胚葉系列幹細胞に属しながら、低分子量のCK抗原を保有した腺上皮細胞の特性を有し、上皮性粘液を産生する外胚葉の特性を有したほか、ビメンチン抗原を保有し、間葉性粘液を産生する中胚葉の特徴を有した多分化能を有した腫瘍細胞であることが明らかにされた。

本章の腫瘍の特性を解明するにあたって、新たな抗体を活用することにより、腫瘍診断における類症鑑別に有効であった。第1章において、ヒトの神経内分泌腫瘍の診断にSSTRs抗体が活用されていることから、本章の肝臓の神経内分泌腫瘍においてもSSTR2抗体に対して特異的な反応を示した。SSTR2抗体を用いた免疫組織化学的検索は動物の神経内分泌腫瘍の診断にも有効であった。第3章において、brachyury抗原は、T遺伝子によってコード化された蛋白で脊索に特異的に反応することがヒトで知られている。脊索腫は、胎生期の遺残脊索組織由来の腫瘍細胞からなり、本章の腫瘍細胞もヒトと同様にbrachyury抗体に特異的に反応し、フェレットの脊索腫の病理学的診断に有効に活用できる抗体であることが確かめられた。低分子量のCKs抗原を検出した腺上皮細胞の特性を有した脊索腫の腫瘍細胞は、MUC抗原を産生した。免疫組織化学的に、第1章において、神経内分泌腫瘍の原発臓器の推定、CCとの類症鑑別、第3章において、骨化生、軟骨腫、軟骨肉腫、悪性紡錘形腫瘍、悪性線維性組織球腫との類症鑑別が可能であった。

本研究のまとめから考えられる今後取り組むべき課題や方向性に関して4つの項目に分けて検討した。1つ目に、発生学的に、腫瘍の母細胞や分化能の検索、腫瘍の特性を解明することは、新たな腫瘍診断に貢献できると考えられた。2つ目に、ヒトと動物の病理診断的位置づけを考慮しながら、これまでのヒトと動物の病理学的研究との間で、どのような点において相似と相違が成り立つか明確にし、体系づけて纏めながら研究をすることが獣医病理学の研究を進めるうえで重要な役割を担った。3つ目に、腫瘍の母細胞の検索や



腫瘍特性の解明は、類症鑑別に重要であるとともに腫瘍診断の正確性を担うことができると考えられた。4 つ目に、本研究の取り組み方法に基づく腫瘍検索は、様々な腫瘍特性の本態の解明に役立つと考えられた。以上により、本研究は、今後の獣医腫瘍病理学の研究に重要な役割を担う指針になると考えられた。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました酪農学園大学獣医学群 獣医学類 獣医病理学ユニット 谷山弘行教授に深謝致します。また、懇切丁寧な御校閲を賜りました酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 画像診断学ユニット 中出哲也教授、伴侶動物外科学Ⅱユニット 廉澤剛教授に深謝致します。

本研究を進めるにあたり、貴重な検体を提供してくださいました PATHO LABO 大町哲夫博士に深謝致します。本研究に際して、多大な御助言・御協力を頂きました酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医病理学ユニット 松田一哉准教授、獣医免疫学ユニット 岡本実准教授、獣医病理ユニット並びに獣医免疫学ユニット 平山和子獣医学博士、院生、学部生の皆様に深く感謝いたします。

本学研究に携わる橋渡しとなり、扉を開いてくださいました農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 病態研究室 芝原友幸先生、元動物衛生研究所 久保正法先生、大阪大学 獣医環境科学分野 感染症制御学講座 獣医国際防疫学教室 松林誠准教授に深く感謝いたします。

最後に、終始、大学院での研究生活を御支援頂きました油井香織獣医師に心から深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Abdel, Wahab, M., Fathy, O., Elghwalby, N., Sultan, A., Mostafa, M., El-Baz, M., Elsaadany, M., Elshobary, M. and Ezzat, F. 2006. Primary hepatic carcinoid tumor: one Egyptian center experience. Hepatogastroenterology **53**: 33–38.
2. Albers, T. M., Alroy, J., Mc Donnell, J. J. and Moore, A. S. 1998. A poorly differentiated gastric carcinoid in a dog. J. Vet. Diagn. Invest. **10**: 116–118.
3. Allison, N. and Rakich, P. 1988. Chordoma in two ferrets. J. Comp. Pathol. **98**: 371–374.
4. Alpert, L. I., Zak, F. G., Werthamer, S. and Bochetto, J. F. 1974. Cholangiocarcinoma: a clinicopathologic study of five cases with ultrastructural observations. Hum. Pathol. **5**: 709–728.
5. Andreola, S., Lombardi, L., Audisio, R. A., Mazzaferro, V., Koukouras, D., Doci, R., Gennari, L., Makowka, L., Starzl, T. E. and van Thiel, D. H. 1990. A clinicopathologic study of primary hepatic carcinoid tumors. Cancer **65**: 1211–1218.
6. Asakawa, T., Tomioka, T., Abe, K., Yamaguchi, T., Tsunoda, T. and Kanematsu, T. 1999. Primary hepatic carcinoid tumor. J. Gastroenterol. **34**: 123–127.
7. Baldus, S. E. and Hanisch, F. G. 2000. Biochemistry and pathological importance of mucin associated antigens in gastrointestinal neoplasia. Adv. Cancer Res. **79**: 201–248.
8. Barsky, S. H., Linnoila, I., Triche, T. J. and Costa, J. 1984. Hepatocellular carcinoma with carcinoid features. Hum. Pathol. **15**: 892–894.
9. Bhalla, P., Powle, V., Shah, R. C. and Jagannath, P. 2012. Neuroendocrine tumor of common hepatic duct. Indian J. Gastroenterol. **31**: 144–146.
10. Komminoth, P., Rindi, G., Arnoid, R., Albores Saavedra, J., Capella, C., Solcia, E., Klimstra, D. S. and Kloppel, G. 2010. Neuroendocrine neoplasms of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. pp. 274–276 In WHO classification of tumors of the Digestive System. (Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H. and Theise, N. D. eds). International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon.

11. Bozbuğa, M., Turan, Süslü, H., Güler, I., Bilgi, B. and Bayindir, C. 2007. Removal of clival chordoma in an adolescent thorough combined pterional transsylvian and anterior temporal approach. Turk. Neurosurg. **17**: 55–59.
12. Busard, J. M. and Walters, W. 1950. Heterotopic pancreatic tissue: reports of a case presenting symptoms of ulcer and review of the recent literature. Arch. Surg. **60**: 674–682.
13. Carminato, A., Marchioro, W., Melchiotti, E., Vascellari, M. and Mutinelli, F. 2008. A case of coccygeal chondroid chordoma in a cat: morphological and immunohistochemical features. J. Vet. Diagn. Invest. **20**: 679–681.
14. Chamberlain, R. S. and Blumgart, L. H. 1999. Carcinoid tumors of the extrahepatic bile duct. A rare cause of malignant biliary obstruction. Cancer **86**: 1959–1965.
15. Chang, S. K., Dohrman, A. F., Basbaum, C. B., Ho, S. B., Tsuda, T., Toribara, N. W., Gum, J. R. and Kim, Y. S. 1994. Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. Gastroenterology **107**: 28–36.
16. Choi, U. S., Alleman, A. R., Choi, J. H., Kim, H. W. and Youn, H. J. 2008. Lee CW. Cytologic and immunohistochemical characterization of a lung carcinoid in a dog. Vet. Clin. Pathol. **37**: 249–252.
17. Choi, Y. J. and Kim, T. S. 1994. Malignant fibrous histiocytoma in chordoma. Yonsei Medical Journal **35**: 239–243.
18. Corleto, V. D., Falconi, M., Panzuto, F., Milione, M., De Luca, O., Perri, P., Cannizzaro, R., Bordi, C., Pederzoli, P., Scarpa, A. and Delle, Fave, G. 2009. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 are associated with better survival in well-differentiated endocrine carcinomas. Neuroendocrinology **89**: 223–230.
19. Cox, W. F. and Jr, Pierce, G. B. 1982. The endodermal origin of the endocrine cells of an adenocarcinoma of the colon of the rat. Cancer **50**: 1530–1538.
20. De Martino, M. C., Hofland, L. J. and Lamberts, S. W. 2010. Somatostatin and somatostatin receptors: from basic concepts to clinical applications. Prog. Brain Res. **182**: 255–280.

21. del Pino, E. M. 1996. The expression of Brachyury (T) during gastrulation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. Dev. Biol. **177**: 64–72.
22. Devine, P. L. and McKenzie, I. F. 1992. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. Bioessays **14**: 619–625.
23. Dietrich, C. P., Sampaio, L. O., Toledo, O. M. S. and Cassaro, C. M. F. 1977. Cell recognition and adhesiveness a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. Biochem. Biophys Res. Commun. **75**: 329–336.
24. Dunn, D. G., Harris, R. K., Meis, J. M. and Sweet, D. E. 1991. A histomorphologic and immunohistochemical study of chordoma in twenty ferrets (*Mustela putorius furo*). Vet. Pathol. **28**: 467–473.
25. Dvořáčková, J., Mačák, J., Fakhouri, F., Horáček, J. and Plášek, J. 2012. Primary hepatic neuroendocrine carcinoma. Cesk. Patol. **48**: 49–52.
26. El Rassi, Z. S., Mohsine, R. M., Berger, F., Thierry, P. and Partensky, C. C. 2004. Endocrine tumors of the extrahepatic bile ducts. Pathological and clinical aspects, surgical management and outcome. Hepatogastroenterology **51**: 1295–1300.
27. Espinosa, de, los, Monteros, A., Fernández, A., Millán, M. Y., Rodríguez, F., Herráez, P. and Martín, de, las, Mulas, J. 1999. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. Vet. Pathol. **36**: 179–190.
28. Fenoglio, L. M., Severini, S., Ferrigno, D., Gollè, G., Serraino, C., Bracco, C., Castagna, E., Brignone, C., Pomerio, F., Migliore, E., David, E. and Salizzoni, M. 2009. Primary hepatic carcinoid: a case report and literature review. World J. Gastroenterol. **15**: 2418–2422.
29. Fenwick, S. W., Wyatt, J. I., Toogood, G. J. and Lodge, J. P. 2004. Hepatic resection and transplantation for primary carcinoid tumors of the liver. Ann. Surg. **239**: 210–219.
30. Ferreira-Neves, P., Lezmi, S., Lejeune, T., Rakotovo, F., Dally, C., Fontaine, J. J., Bernex, F. and Cordonnier, N. 2008. Immunohistochemical characterization of a hepatic neuroendocrine carcinoma in a cat. J. Vet. Diagn. Invest. **20**: 110–114.
31. Ferrero, A., Gallino, C., D'Aloisio, G., Gandini, G. and Garavoglia, M. 1999. Primary neuroendocrine carcinoma of the liver: difficult diagnosis of a rare

- neoplasm. Acta. Chir. Belg. **99**: 299–302.
32. Flanagan, A. M. and Yamabuchi, T. 2013. Chordoma. pp. 328–329. In: WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, 4th ed. (Christopher, D. M., Fletcher, Julia A., Bridge, Pancras C.W. Hogendoorn. and Fredrik, Mertens. eds.). International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon.
  33. Frilling, A., Sotiropoulos, G. C., Li, J., Kornasiewicz, O. and Plöckinger, U. 2010. Multimodal management of neuroendocrine liver metastases. HPB. (Oxford) **12**: 361–379.
  34. Gay, E., Sekhar, L. N., Rubinstein, E., Wright, D. C., Sen, C., Janecka, I. P. and Snyderman, C. H. 1995. Chordomas and chondrosarcomas of the cranial base: results and follow-up of 60 patients. Neurosurgery **36**: 887–897.
  35. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. and Stein, H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J. Immunol. **133**: 1710–1715.
  36. Gruber, A., Kneissl, S., Vidoni, B. and Url, A. 2008. Cervical spinal chordoma with chondromatous component in a dog. Vet. Pathol. **45**: 650–653.
  37. Gusani, N. J., Marsh, J. W., Nalesnik, M. A., Tublin, M. E. and Gamblin, T. C. 2008. Carcinoid of the extra-hepatic bile duct: a case report with long-term follow-up and review of literature. Am. Surg. **74**: 87–90.
  38. Hadlow, W. J. 1984. Vertebral chordoma in two ranch mink. Vet. Pathol. **21**: 533–536.
  39. Harada, K., Sato, Y., Ikeda, H., Maylee, H., Igarashi, S., Okamura, A., Mastuda, S. and Nakamura, Y. 2012. Clinicopathologic study of mixed adenoneuroendocrine carcinomas of hepatobiliary organs. Virchows Arch. **460**: 281–289.
  40. Head, K. W., Cullen, J. M., Dubielzig, R. R., Else, R. W., Misdorp, W., Patnaik, A. K., Tateyama, S. and van der, Gaag, I. 2003. Histologic Classification of the Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals. 2nd. pp 119–120. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.
  41. Head, K. W., Else, R. W. and Dubielzig, R. R. 2002. Tumors of the alimentary

- tract. In: Tumor in domestic animals, ed. Meuten, D. J., 4th ed., pp. 401–481. Iowa State Press, Ames, I. A.
42. Heffelfinger, M. J., Dahlin, D. C., MacCarty, C. S. and Beabout, J. W. 1973. Chordomas and cartilaginous tumors at the skull base. Cancer **32**: 410–420.
  43. Heikinheimo, K., Persson, S., Kindblom, L. G., Morgan, P. R. and Virtanen, I. 1991. Expression of different cytokeratin subclasses in human chordoma. J. Pathol. **164**: 145–150.
  44. Hendrick, M. J. and Goldschmidt, M. H. 1987. Chondrosarcoma of the tail of ferrets (*Mustela putorius furo*). Vet. Pathol. **24**: 272–273.
  45. Herron, A. J., Brunnert, S. R., Ching, S. V., Dillberger, J. E. and Altman, N. H. 1990. Immunohistochemical and morphologic features of chordomas in ferrets (*Mustela putorius furo*). Vet. Pathol. **27**: 284–286.
  46. Hidaka, H., Kuwao, S., Kokubu, S., Yanagimoto, K., Satomichi, A., Takada, M., Nakazawa, T. and Saigenji, K. 2000. Mixed carcinoid-adenocarcinoma of the liver. Intern. Med. **39**: 910–913.
  47. Ho, S. B., Niehans, G. A., Lyftogt, C., Yan, P. S., Cherwitz, D. L., Gum, E. T., Dahiya, R. and Kim, Y. S. 1993. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res. **53**: 641–651.
  48. Horn, K. D., Fowler, J. C., Carrau, R., Barnes, E. L. and Rao, U. N. 2001. Cytokeratin immunophenotyping of an unusual cervical vertebral chordoma with extensive chondroid foci and perilaryngeal recurrence: a case report with review of the literature. Am. J. Otolaryngol. **22**: 428–434.
  49. Hruban, R. H., Traganos, F., Reuter, V. E. and Huvos, A. G. 1990. Chordomas with malignant spindle cell components. A DNA flow cytometric and immunohistochemical study with histogenetic implications. Am. J. Pathol. **137**: 435–447.
  50. Hsueh, C., Tan, X. D. and Gonzalez-Crussi, F. 1993. Primary hepatic neuroendocrine carcinoma in a child. Morphologic, immunocytochemical, and molecular biologic studies. Cancer **71**: 2660–2665.
  51. Huang, C. C., Collins, B. T., Flint, A. and Michael, C. W. 2013. Pulmonary

- neuroendocrine tumors: an entity in search of cytologic criteria. Diagn Cytopathol. **41**: 689–696.
52. Iimuro, Y., Deguchi, Y., Ueda, Y., Tanaka, A., Iwasa, Y., Ishihara, M., Mizuta, K., Yamamoto, Y., Ikai, I., Shimahara, Y. and Yamaoka, Y. 2002. Primary hepatic carcinoid tumor with metachronous lymph node metastasis after long-term follow up. Journal of Gastroenterology and Hepatology **17**: 1119–1124.
  53. Imai, K., Saito, H., Minamiya, Y., Hashimoto, M., Kimura, Y. and Ogawa, J. 2008. Malignant fibrous histiocytoma originating from the thymus. Gen Thorac Cardiovasc Surg. **56**: 606–609.
  54. Imamura, M., Yamauchi, H. and Namiki, T. 1995. Resected case of carcinoid tumor of the liver metastatic from the breast. J. Gastroenterol. **30**: 398–402.
  55. Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Montgomery, C. K., Kjeldsen, T., Takahashi, H. K., Bigbee, W. L. and Kim, Y. S. 1989. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. Cancer Res. **1**: 197–204.
  56. 岩淵三哉, 石原法子, 渡辺英伸. 1984. 胃内分泌癌の組織発生. 癌の臨床. **30**: 435–437.
  57. 岩淵三哉, 佐野尋昭. 1999. 非内分泌臓器に発生する神経内分泌腫瘍 消化管 (肝, 胆管を含む) の内分泌腫瘍. 病理と臨床. **17**: 1253–1262.
  58. Iwafuchi, M., Watanabe, H. and Ishihara, N. 1990. Pathology of carcinoid tumor and endocrine cell carcinoma of the digestive tract: characteristics and histogenesis. Rinsho Shokaki Naika **5**: 1669–1681.
  59. Iwafuchi, M., Watanabe, H. and Noda, Y. 1989. Gastrointestinal carcinoid tumors of Japanese, Incidence and characteristics based on anatomical classification, with special reference to difference between carcinoid tumor and endocrine cell carcinoma. Stomach Intest. **24**: 869–882.
  60. Iwao, M., Nakamuta, M., Enjoji, M., Kubo, H., Fukutomi, T., Tanabe, Y., Nishi, H., Taguchi, K. I., Kotoh, K. and Nawata, H. 2001. Primary hepatic carcinoid tumor: case report and review of 53 cases. Med. Sci. Monit. **7**: 746–750.
  61. Iype, S., Mirza, T. A., Propper, D. J., Bhattacharya, S., Feakins, R. M. and Kocher, H. M. 2009. Neuroendocrine tumours of the gallbladder: three cases and



- a review of the literature. Postgrad Med. J. **85**: 213–218.
62. Jensen, W. A., Myers R. K and Liu, C. H. 1985. Osteoma in a ferret. JAVMA. **187**: 1375–1376.
  63. Jiang, Y., Long, H., Wang, W., Liu, H., Tang, Y. and Zhang, X. 2011. Clinicopathological features and immunoexpression profiles of goblet cell carcinoid and typical carcinoid of the appendix. Pathol. Oncol. Res. **17**: 127–132.
  64. Karabela-Bouropoulou, V., Kontogeorgos, G., Papamichales, G., Milas, C., Roessner, A., Vollmer, E. and Grundmann, E. 1988. S-100 protein and neuron specific enolase (NSE) expression by chordomas in relation to the composition of their stromal mucosubstances. Pathol. Res. Pract. **183**: 256–261.
  65. Keith, L. M. 1988. The developing human. IV ed. pp.53–59. W. B. Saunders Company. West Washington square. Philadelphia.
  66. Kimura, N., Pilichowska, M., Date, F., Kimura, I. and Schindler, M. 1999. Immunohistochemical expression of somatostatin type 2A receptor in neuroendocrine tumors. Clin. Cancer Res. **5**: 3483–3487.
  67. Kispert, A., Koschorz, B. and Herrmann, B. G. 1995. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. EMBO J. **14**: 4763–4772.
  68. Kitajima, T., Kaida, S., Lee, S., Haruta, S., Shinohara, H., Ueno, M., Suyama, K., Oota, Y., Fujii, T. and Udagawa, H. 2013. Mixed adeno(neuro)endocrine carcinoma arising from the ectopic gastric mucosa of the upper thoracic esophagus. World J. Surg. Oncol. **11**: 218.
  69. Knox, C. D., Anderson, C. D., Lamps, L. W., Adkins, R. B. and Pinson, C. W. 2003. Long-term survival after resection for primary hepatic carcinoid tumor. Ann. Surg. Oncol. **10**: 1171–1175.
  70. Koestner, A. and Higgins, R. J. 2002. Chordomas. pp. 728–729. In: Tumors in Domestic Animals, 4th ed. (Donald J. Meuten ed.). Iowa State Press, Iowa.
  71. Krishnamurthy, S. C., Dutta, V., Pai, S. A., Kane, S. V., Jagannath, P., Desouza, L. J., Deshpande, R. and Desai, P. B. 1996. Primary carcinoid tumor of the liver: report of four resected cases including one with gastrin production. J. Surg. Oncol. **62**: 218–221.

72. Kulaksiz, H., Eissele, R., Rössler, D., Schulz, S., Höllt, V., Cetin, Y. and Arnold, R. 2002. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. Gut **50**: 52–60.
73. Kvols, L. K. 1994. Metastatic carcinoid tumors and the malignant carcinoid syndrome. Ann. N. Y. Acad. Sci. **15**: 464–470.
74. Lacunza, E., Bara, J., Segal-Eiras, A. and Croce, M. V. 2009. Expression of conserved mucin domains by epithelial tissues in various mammalian species. Res. Vet. Sci. **86**: 68–77.
75. Larizza, L., Mortini, P. and Riva, P. 2005. Update on the cytogenetics and molecular genetics of chordoma. Hered. Cancer Clin. Pract. **15**: 29–41.
76. La, Rosa, S., Marando, A., Sessa, F. and Capella, C. 2012. Mixed Adenoneuroendocrine Carcinomas (MANECs) of the Gastrointestinal Tract: Cancers (Basel). **4**: 11–30.
77. Lau, S. K., Weiss, L. M. and Chu, P. G. 2004. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study. Am. J. Clin. Pathol. **122**: 61–69.
78. Le Charpentier, Y., Bellefqih, S., Boisnic, S. and Roy-Camille, R. 1988. Chordomas. Ann. Pathol. **8**: 25–32.
79. Lee, M. J., Lee, S., Kim, W. H., Choi, Y. and Yang, M. 2003. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. Mod. Pathol. **16**: 403–410.
80. Lesuffleur, T., Zweibaum, A. and Real, F. X. 1994. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. Crit. Rev. Oncol. Hematol. **17**: 153–180.
81. Li, C. C., Hirowaka, M., Qian, Z. R., Xu, B. and Sano, T. 2002. Expression of E-cadherin, b-catenin, and Ki-67 in goblet cell carcinoids of the appendix: an immunohistochemical study with clinical correlation. Endocr. Pathol. **13**: 47–58.
82. Li, X., Fox, J. G., Erdman, S. and Murphy, J. C. 1996. Spontaneous neoplasms in ferrets (*Mustela putorius furo*): A review of 204 cases (1980-1995). Vet. Pathol. **33**: 590.

83. Li, X. and Fox, J. G. 2000. Neoplastic disease, Fox, J. G. ed. Biology and disease of ferret. 2nd ed. pp.433–435. Williams and Wilkins. Baltimore. Maryland.
84. Lillie, R. D. and Glenner, G. G. 1960. Histochemical reactions in carcinoid tumors of the human gastrointestinal tract. Am. J. Pathol. **36**: 623–651.
85. Lin, C. W., Lai, C. H., Hsu, C. C., Hsu, C. T., Hsieh, P. M., Hung, K. C. and Chen, Y. S. 2009. Primary hepatic carcinoid tumor: a case report and review of the literature. Cases J. **2**: 90.
86. Liqato, S., Furmaga, W., Cartun, R. W., Hull, D. and Tsongalis, G. J. 2005. Primary carcinoid tumor of the common hepatic duct: A rare case with immunohistochemical and molecular findings. Oncol. Rep. **13**: 543–546.
87. Loeffler, A. G. and Hart, M. N. 2015. Endocrine system. pp. 375 – 391. In: Introduction to Human Disease 6th ed: Pathophysiology for Health Professionals. Jones and bartlett learning.
88. Maeda, T., Kajiyama, K., Adachi, E., Takenaka, K., Sugimachi, K. and Tsuneyoshi, M. 1996. The expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in primary and metastatic carcinomas of the liver. Mod. Pathol. **9**: 901–909.
89. Mayo, S. C., de Jong, M. C., Pulitano, C., Clary, B. M., Reddy, S. K., Gamblin, T. C., Celinski, S. A., Kooby, D. A., Staley, C. A., Stokes, J. B., Chu, C. K., Ferrero, A., Schulick, R. D., Choti, M. A., Mentha, G., Strub, J., Bauer, T. W., Adams, R. B., Aldrighetti, L., Capussotti, L. and Pawlik, T. M. 2010. Surgical management of hepatic neuroendocrine tumor metastasis: results from an international multi-institutional analysis. Ann. Surg. Oncol. **17**: 3129–3136.
90. Meis, J. M. 1991. Dedifferentiation in bone and soft tissue tumors. In Rosen, P. P., Fechner, R. E. ed. pp. 37–62. Pathology Annual. Part1. California: Appleton and Lange.
91. Meis, J. M., Raymond, A. K., Evans, H. L., Charles, R. E. and Giraldo, A. A. 1987. Dedifferentiated chordoma. A clinicopathologic and immunohistochemical study of three cases. Am. J. Surg. Pathol. **11**: 516–525.
92. Mikuz, G., Mydla, F. and Gütter W. 1977. Chordoma: ultrastructural,

- biochemical and cytophotometric findings (author's transl). Beitr. Pathol. **161**: 150–165.
93. Miremadi, A., Pinder, S. E., Lee, A. H., Bell, J. A., Paish, E. C., Wencyk, P., Elston, C. W., Nicholson, R. I., Blamey, R. W., Robertson, J. F. and Ellis, I. O. 2002. Neuroendocrine differentiation and prognosis in breast adenocarcinoma. Histopathology **40**: 215–222.
  94. Mizuno, Y., Ohkohchi, N., Fujimori, K., Doi, H., Orii, T., Asakura, T., Kimura, N., Pilichowska, M., Inomata, M. and Satomi, S. 2000. Primary hepatic carcinoid tumor: a case report. Hepatogastroenterology **47**: 528–530.
  95. Mizutani, G., Nakanishi, Y., Watanabe, N., Honma, T., Obana, Y., Seki, T., Ohni, S. and Nemoto, N. 2012. Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry. Acta. Histochem. Cytochem. **45**: 167–176.
  96. Modlin, I. M., Kidd, M., Latich, I., Zikusoka, M. N. and Shapiro, M. D. 2005. Current status of gastrointestinal carcinoids. Gastroenterology **128**: 1717–1751.
  97. Modlin, I. M., Lye, K. D. and Kidd, M. 2003. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. Cancer **97**: 934–959.
  98. Modlin, I. M. and Sandor, A. 1997. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. Cancer **79**: 813–829.
  99. Modlin, I. M., Shapiro, M. D. and Kidd, M. 2004. Siegfried oberndorfer: Origins and perspectives of carcinoid tumors. Human Pathology **35**: 1440–1451.
  100. Morrell, C. N., Volk, M. V. and Mankowski, J. L. 2002. A carcinoid tumor in the gallbladder of a dog. Vet. Pathol. **39**: 756–758.
  101. Munday, J. S., Brown, C. A. and Richey, L. J. 2004. Suspected metastatic coccygeal chordoma in a ferret (*Mustela putorius furo*). J. Vet. Diagn. Invest. **16**: 454–458.
  102. Murad, T. M. and Murthy, M. S. 1970. Ultrastructure of a chordoma. Cancer **25**: 1204–1215.
  103. Naka, T., Boltze, C., Kuester, D., Samii, A., Herold, C., Ostertag, H.,

- Iwamoto, Y., Oda, Y., Tsuneyoshi, M. and Roessner, A. 2005. Intralesional fibrous septum in chordoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 122 lesions. Am. J. Clin. Pathol. **124**: 288–294.
104. Naka, T., Iwamoto, Y., Shinohara, N., Chuman, H., Fukui, M. and Tsuneyoshi, M. 1997. Cytokeratin subtyping in chordomas and the fetal notochord: An immunohistochemical Analysis of Aberrant Expression. Mod. Pathol. **10**: 545–551.
105. Nakane, P. K. and Pierce, G. B. Jr. 1966. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem. Cytochem. **14**: 929–931.
106. Nesi, G., Lombardi, A., Batignani, G., Ficari, F., Rubio, C. A. and Tonelli, F. 2006. Well-differentiated endocrine tumor of the distal common bile duct: a case study and literature review. Virchows Arch. **449**: 104–111.
107. Nikfarjam, M., Muralidharan, V. and Christophi, C. 2004. Primary hepatic carcinoid tumours. HPB. **6**: 13–17.
108. Ninomiya, F., Suzuki, S., Tanaka, H., Hayashi, S., Ozaki, K. and Narama, I. 2008. Nasal and paranasal adenocarcinomas with neuroendocrine differentiation in dogs. Vet. Pathol. **45**: 181–187.
109. Noronha, Y. S. and Raza, A. S. 2010. Well-differentiated neuroendocrine (carcinoid) tumors of the extrahepatic biliary ducts. Arch. Pathol. Lab. Med. **134**: 1075–1079.
110. Oberg, K. E., Reubi, J. C., Kwkkeboom, D. J. and Krenning, E. P. 2010. Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. Gastroenterology **139**: 742–753.
111. Oh, Y. H., Kang, G. H. and Kim, O. J. 1998. Primary hepatic carcinoid tumor with a paranuclear clear zone: a case report. J. Korean Med. Sci. **13**: 317–320.
112. O'Hara, B. J., Paetau, A. and Miettinen, M. 1998. Keratin subsets and monoclonal antibody HBME-1 in chordoma: immunohistochemical differential diagnosis between tumors simulating chordoma. Hum. Pathol. **29**: 119–126.
113. Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T.,

- Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S. and Takeichi M. 1993. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. Cancer Res. **53**: 1696–1701.
114. Packham, E. A. and Brook, J. D. 2003. T-box genes in human disorders. Hum. Mol. Genet. **12**: 37–44.
115. Papotti, M., Bongiovanni, M., Volante, M., Allia, E., Landolfi, S., Helboe, L., Schindler, M., Cole, S. L. and Bussolati, G. 2002. Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. Virchows Arch. **440**: 461–475.
116. Patnaik, A. K. 1992. A morphologic and immunocytochemical study of hepatic neoplasms in cats. Vet. Pathol. **29**: 405–415.
117. Patnaik, A. K., Erlandson, R. A. and Lieberman, P. H. 1990. Esophageal neuroendocrine carcinoma in a cat. Vet. Pathol. **27**: 128–130.
118. Patnaik, A. K., Lieberman, P. H., Erlandson, R. A. and Antonescu, C. 2005. Hepatobiliary Neuroendocrine Carcinoma in Cats: A Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study of 17 Cases. Vet. Pathol. **42**: 331–337.
119. Patnaik, A. K., Lieberman, P. H., Hurvitz, A. I. and Johnson, G. F. 1981. Canine hepatic carcinoids. Vet. Pathol. **18**: 445–453.
120. Patnaik, A. K., Ludwig, L. L. and Erlandson, R. A. 2002. Neuroendocrine carcinoma of the nasopharynx in a dog. Vet. Pathol. **39**: 496–500.
121. Patnaik, A. K., Newman, S. J., Scase, T., Erlandson, R. A., Antonescu, C., Craft, D. and Bergman, P. J. 2005. Canine hepatic neuroendocrine carcinoma: an immunohistochemical and electron microscopic study. Vet. Pathol. **42**: 140–146.
122. Patnaik, A. K., Post G. S. and Erlandson, R. A. 2001. Clinicopathologic and electron microscopic study of a cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in a cat with comparison to human and canine tumors. Vet. Pathol. **38**. 553–556.

123. Pelfrene, A. and Laumonier, R. 1976. Histochemical study of the ground substance in chordoma. Ann. Anat. Pathol (Paris). **21**: 357–364.
124. Persson, S., Kindblom, L. G. and Angervall, L. 1991. Classical and chondroid chordoma. A light-microscopic, histochemical, ultrastructural and immunohistochemical analysis of the various cell types. Pathol. Res. Pract. **187**: 828–838.
125. Pilichowska, M., Kimura, N., Ouchi, A., Lin, H., Mizuno, Y. and Nagura, H. 1999. Primary hepatic carcinoid and neuroendocrine carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study of five cases. Pathol. Int. **49**: 318–324.
126. Pisarek, H., Pawlikowski, M., Kunert-Radek, J. and Radek, M. 2009. Expression of somatostatin receptor subtypes in human pituitary adenomas immunohistochemical studies. Endokrynol Pol. **60**: 240–251.
127. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science **284**: 143–147.
128. Primack, A., Wilson, J., O'Connor, G. T., Engelman, K., Hull, E. and Canellos, G. P. 1971. Hepatocellular carcinoma with the carcinoid syndrome. Cancer **27**: 1182–1189.
129. Quartey, B. 2011. Primary Hepatic Neuroendocrine Tumor: What Do We Know Now?. World J. Oncol. **2**: 209–216.
130. Rascarachi, G., Sierra, M., Hernando, M., Diez, R., Arias, L., Jorquera, F., Vivas, S. and Olcoz, J. L. 2009. Primary liver carcinoid tumour with a Zollinger Ellison syndrome - an unusual diagnosis: a case report. Cases J. **2**: 6346.
131. Rawdon, B. B. and Andrew, A. 1993. Origin and differentiation of gut endocrine cells. Histol. Histopathol. **8**: 567–580.
132. Reis, C. A., David, L., Nielsen, P. A., Clausen, H., Mirgorodskaya, K., Roepstorff, P. and Sobrinho-Simões, M. 1997. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal

- antibody. Int. J. Cancer **20**: 112–121.
133. Reubi, J. C., Schaer, J. C., Waser, B. and Mengod, G. 1994. Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR2, and SSTR3 messenger RNAs in primary human tumors using in situ hybridization. Cancer Res. **54**: 3455–3459.
  134. Romero-Ramos, M., Vourc'h, P., Young, H. E., Lucas, P. A., Wu, Y., Chivatakarn, O., Zaman, R., Dunkelman, N., el-Kalay, M. A. and Chesselet, M. F. 2002. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. J. Neurosci. Res. **69**: 894–907.
  135. Rosai, J. 2011. The origin of neuroendocrine tumors and the neural crest saga. Mod. Pathol. **24**: 53–57.
  136. Rosenberg, A. E., Brown, G. A., Bhan, A. K. and Lee, J. M. 1994. Chondroid chordoma-a variant of chordoma. A morphologic and immunohistochemical study. Am. J. Clin. Pathol. **101**: 36–41.
  137. Roskams, T., Cassiman, D., De, Vos, R. and Libbrecht, L. 2004. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. **280**: 910–923.
  138. Roskams, T., van, den, Oord, J. J., De, Vos, R. and Desmet, V. J. 1990. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. Am. J. Pathol. **137**: 1019–1025.
  139. Rossmeis, J. H. Jr., Forrester, S. D., Robertson, J. L. and Cook, W. T. 2002. Chronic vomiting associated with a gastric carcinoid in a cat. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. **38**: 61–66.
  140. Roy, S., Dhingra, K. K., Gupta, P., Khurana, N., Gupta, B. and Meher, R. 2009. Acinic cell carcinoma with extensive neuroendocrine differentiation: a diagnostic challenge. Head Neck Pathol. **3**: 163–168.
  141. Rugge, M., Sonogo, F., Militello, C., Guido, M. and Ninfo, V. 1992. Primary carcinoid tumor of the cystic and common bile ducts. Am. J. Surg. Pathol. **16**: 802–807.
  142. Sakai, H., Maruyama, M., Hirata, A., Yonemaru, K., Yanai, T. and Masegi, T.



2004. Rhabdomyosarcoma in a ferret (*Mustela putorius furo*). J. Vet. Med. Sci. **66**: 95–96.
143. Sano, K., Kosuge, T., Yamamoto, J., Shimada, K., Takayama, T., Yamasaki, S. and Makuuchi, M. 1999. Primary hepatic carcinoid tumors confirmed with long-term follow-up after resection. Hepatogastroenterology **46**: 2547–2550.
144. Sapino, A., Papotti, M., Righi, L., Cassoni, P., Chiusa, L. and Bussolati, G. 2001. Clinical significance of neuroendocrine carcinoma of the breast. Ann. Oncol. **12**: 115–117.
145. Sapino, A., Righi, L., Cassoni, P., Papotti, M., Pietribiasi, F. and Bussolati, G. 2000. Expression of the neuroendocrine phenotype in carcinomas of the breast. Semin. Diagn. Pathol. **17**: 127–137.
146. Scolyer, R. A., Bonar, S. F., Palmer, A. A., Barr, Wills, Stalley, P., Schatz, J., Schatz, J., Soper, J., Li, L. X. and McCarthy, S. W. 2004. Parachordoma is not distinguishable from axial chordoma using immunohistochemistry. Pathol. Int. **54**: 364–370.
147. Serra, S. and Chetty, R. 2014, Amphicrine (mixed adenoneuroendocrine carcinoma) of the duodenum and coexistent metastatic well differentiated neuroendocrine tumour. Diagnostic Histopathology **7**: 297–300.
148. Shah, N. A., Urusova, I. A., D'Agnolo, A., Colquhoun, S. D., Rosenbloom, B. E., Vener, S. L., Geller, S. A., Younes, M., Lechago, J. and Heaney, A. P. 2007. Primary hepatic carcinoid tumor presenting as Cushing's syndrome. J. Endocrinol. Invest. **30**: 327–333.
149. Shin, Y., Ha, S. Y., Hyeon, J., Lee, B., Lee, J., Jang, K. T., Kim, K. M., Park, Y. S. and Park, C. K. 2015. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors with Liver Metastases in Korea: a Clinicopathological Analysis of 72 Cases in a Single Institute. Cancer Res. Treat. [Epub ahead of print]
150. Shirati, T., Nakano, Y., Higashi, M. and Minami, T. 2000. Tail-tip chordoma in a ferret. Jpn. Vet. Med. Assoc. **53**: 752–754.
151. Shukla, K., Jetly, D., Parikh, B., Shah, B., Patel, N., Mehta, H. and Panchal, H. 2006. Primary chondrosarcoma of lung: case report and review of literature.

- Indian J. Pathol. Microbiol. **49**: 570–573.
152. Solcia, E., Arnold, R. and Capella, C. 2010. Neuroendocrine neoplasms of the stomach. WHO classification of tumours of the Digestive system. pp. 64–68. Lyon: IARC Press.
153. Stefanski, S. A., Elwell, M. R., Mitsumori, K., Yoshitomi, K., Dittrich, K. and Giles, H. D. 1988. Chordomas in Fischer 344 rats. Vet. Pathol. **25**: 42–47.
154. Stinner, B., Kisker, O., Zielke, A. and Rothmund, M. 1996. Surgical management for carcinoid tumors of small bowel, appendix, colon, and rectum. World Journal of Surgery **20**: 183–188.
155. Stosiek, P., Kasper, M. and Karsten, U. 1988. Expression of cytokeratin and vimentin in nucleus pulposus cells. Differentiation **39**: 78–81.
156. Suster, S. and Moran, C. A. 1995. Chordomas of the mediastinum: clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of six cases presenting as posterior mediastinal masses. Hum. Pathol. **26**: 1354–1362.
157. Suwa, T., Hinoda, Y., Makiguchi, Y., Takahashi, T., Itoh, F., Adachi, M., Hareyama, M. and Imai, K. 1998. Increased invasiveness of MUC1 and cDNA-transfected human gastric cancer MKN74 cells. Int. J. Cancer **76**: 377–382.
158. Sykes, G. P. and Cooper, B.J. 1982. Canine intestinal carcinoids. Vet. Pathol. **19**: 120–131.
159. Suzuki, K., Morita, R., Hojo, Y., Nomura, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K. 2013. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine differentiation of canine anal sac glandular tumours. J. Comp. pathol. **149**: 199–207.
160. Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science **251**: 1451–1455.
161. Tarik, T. and Scott, E. K. 2010. Mesenchymal Tumors of the Central Nervous System. pp. 219–234. In: Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach. (Perry, A. and Brat, D. J., eds.), Elsevier, Philadelphia, PA.
162. Terada, T. 2013. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell

- carcinoma of the stomach and colorectum: II. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in normal mucosa and in 42 cases. Int. J. Clin. Exp. Pathol. **6**: 613–621.
163. Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. and Crawford, J. M. 1999. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. Hepatology **30**: 1425–1433.
164. Tohyama, T., Matsui, K. and Kitagawa, K. 2005. Primary hepatic carcinoid tumor with carcinoid syndrome and carcinoid heart disease: a case report of a patient on long-term follow-up. Intern. Med. **44**: 958–962.
165. Ulich, T.R., Kollin, M. and Lewin, K.J. 1988. Composite gastric carcinoma: report of a tumor of the carcinoma-carcinoid spectrum. Arch. Pathol. Lab. Med. **112**: 91–93.
166. Volante, M., Brizzi, M. P., Faggiano, A., La, Rosa, S., Rapa, I., Ferrero, A., Mansueto, G., Righi, L., Garancini, S., Capella, C., De, Rosa, G., Dogliotti, L., Colao, A. and Papotti, M. 2007. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. Mod. Pathol. **20**: 1172–1182.
167. Vujovic, S., Henderson, S., Presneau, N., Odell, E., Jacques, T. S., Tirabosco, R., Boshoff, C. and Flanagan, A. M. 2006. Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. J. Pathol. **209**: 157–165.
168. Weng, Y. J., Wang, S. S., Yang, W. G., Chao, Y., Lai, C. R. and Lee, S. D. 1996. Carcinoid tumors of the gastrointestinal tract in Chinese of Taiwan: an analysis of fifty cases. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). **58**: 254–258.
169. Wilber, J. and Williams, B. H. 1997. Osteosarcoma in two domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). Vet. Pathol. **34**: 487.
170. Willard, M. D., Dunstan, R. W. and Faulkner, J. 1988. Neuroendocrine carcinoma of the gallbladder in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. **192**: 926–928.
171. Williams, B. H., Eighmy, J. J., Berbert, M. H. and Dunn, D. G. 1993. Cervical chordoma in two ferrets (*Mustela putorius furo*). Vet. Pathol. **30**: 204–206.

172. Woodard, P. K., Feldman, J. M., Paine, S. S. and Baker, M. E. 1995. Midgut carcinoid tumors: CT findings and biochemical profiles. J. Comput. Assist. Tomogr. **19**: 400–405.
173. Yabe, T. and Takada, S. 2012. Mesogenin causes embryonic mesoderm progenitors to differentiate during development of zebrafish tail somites. Dev. Biol. **370**: 213–222.
174. Yamaguchi, R., Nakashima, O., Ogata, T., Hanada, K., Kumabe, T. and Kojiro, M. 2004. Hepatocellular carcinoma with an unusual neuroendocrine component. Pathol. Int. **54**: 861–865.
175. Yasoshima, H., Uematsu, K., Sakurai, K., Ueno, Y., Hori, K., Kanazawa, N., Tanaka, T., Yamanaka, N. and Okamoto, E. 1993. Primary hepatic carcinoid tumor. Acta. Pathol. Jpn. **43**: 783–789.
176. Young, H. E., Duplaa, C., Romero-Ramos, M., Chesselet, M. F., Vourc'h, P., Yost, M. J., Ericson, K., Terracio, L., Asahara, T., Masuda, H., Tamura-Ninomiya, S., Detmer, K., Bray, R. A., Steele, T. A., Hixson, D., el-Kalay, M., Tobin, B. W., Russ, R. D., Horst, M. N., Floyd, J. A., Henson, N. L., Hawkins, K. C., Groom, J., Parikh, A., Blake, L., Bland, L. J., Thompson, A. J., Kirincich, A., Moreau, C., Hudson, J., Bowyer, F. P., Lin, T. J. and Black, A. C. Jr. 2004. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. Cell Biochem. Biophys. **40**: 1–80.
177. Young, H. E. and Black, A. C. Jr. 2004. Adult stem cells. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. **276**: 75–102.
178. Zou, Y. P., Li, W. M., Liu, H. R. and Li, N. 2010. Primary carcinoid tumor of the gallbladder: a case report and brief review of the literature. World J. Surg. Oncol. **8**: 12.