

イヌの甲状腺原発腫瘍に関する
病理組織学的診断と
免疫組織化学的評価

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

河村芳朗

獣医病理学教室

指導教員 教授 谷山弘行

2015 年度

目次

目次

凡例

諸言

第 I 章 イヌの正常甲状腺組織に認められる充実性細胞集塊における組織学的 ならびに免疫組織化学的検索

1. 序文

2. 材料と方法

2-1. 材料の採取

2-2. 組織学的検索

2-3. 免疫組織化学的検索

3. 結果

3-1. 組織学的検索

3-2. 免疫組織化学的検索

3-2-1. Thyroglobulin ならびに Calcitonin の免疫組織学的発現

3-2-2. 細胞外基質の免疫組織化学的発現

3-2-3. 中間径フィラメントの免疫組織化学的発現

3-2-4. E-cadherin の免疫組織化学的発現

3-4-5. 細胞増殖活性

4. 考察

第Ⅱ章 イヌの甲状腺濾胞上皮細胞癌組織における病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索

1. 序文

2. 材料と方法

2-1. 材料の採取

2-2. 病理組織学的検索

2-3. 免疫組織化学的検索

2-4. 半定量的検索および統計処理

3. 結果

3-1. 病理組織学的検索

3-2. 免疫組織化学的検索

3-2-1. 細胞外基質の免疫組織化学的発現

3-2-2. 微小血管密度

3-2-3. Thyroglobulin の免疫組織化学的発現

3-2-4. 中間径フィラメントの免疫組織化学的発現

3-2-5. E-cadherin の免疫組織化学的発現

3-2-6. 腫瘍細胞増殖活性

3-2-7. GLUT-1 の免疫組織化学的発現

4. 考察

第Ⅲ章 イヌの甲状腺 C 細胞癌組織における病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索

1. 序文

2. 材料と方法

2-1. 材料の採取

2-2. 病理組織学的検索

2-3. 免疫組織化学的検索

2-4. 半定量的検索および統計処理

3. 結果

3-1. 病理組織学的検索

3-2. 免疫組織化学的検索

3-2-1. 細胞外基質の免疫組織化学的発現

3-2-2. 微小血管密度

3-2-3. Calcitonin の免疫組織化学的発現

3-2-4. 中間径フィラメントの免疫組織化学的発現

3-2-5. E-cadherin の免疫組織化学的発現

3-2-6. 腫瘍細胞増殖活性

3-2-7. GLUT-1 の免疫組織化学的発現

4. 考察

総括

謝辞

引用文献

凡例

TG	Thyroglobulin
CT	Calcitonin
FC	Follicular cell carcinoma
WDTC	Well-differentiated thyroid carcinoma
FTC	Follicular thyroid carcinoma
CTC	Compact thyroid carcinoma
FCTC	Follicular-compact carcinoma
PDTC	Poorly-differentiated thyroid carcinoma
UDTC	Undifferentiated thyroid carcinoma
CC	C-cell carcinoma
ECMs	Extra cellular matrixes
E-cad	E-cadherin
GLUT-1	Glucose transporter 1
WHO	World Health Organization
HE	Hematoxylin and eosin stain
PAMS	Periodic acid-methenamine-silver stain

諸言

イヌの甲状腺原発腫瘍は腫瘍全体の内 1.2－3.8%に認められ、その 88%が悪性腫瘍であると報告されている[16, 35, 40]。甲状腺原発腫瘍はサイログロブリンを産生する濾胞上皮細胞由来腫瘍とカルシトニンを産生する C 細胞由来腫瘍に大別される。WHO 分類において濾胞上皮細胞腫瘍は濾胞上皮細胞腫と濾胞上皮細胞癌；FC に分類され、さらに後者は高分化型；WDTC（濾胞型；FTC，充実型；CTC，濾胞充実型；FCTC および乳頭型；PTC），低分化型；PDTC および未分化型；UDTC に細分類され、C 細胞腫瘍は良性の C 細胞腫と悪性の C 細胞癌に分類される[6]。

英国の腫瘍学者 Willis, R.A.は腫瘍の定義を “a neoplasm is an abnormal mass of tissue, the growth of which exceeds and is uncoordinated with that of the normal tissue, and persists in the same excessive manner after cessation of the stimuli which evoked the change” と定義し、これが永く受け入れられてきた。この定義では腫瘍組織を一つの塊と捉え、腫瘍実質を構成する細胞だけでなく腫瘍間質を構成する細胞も含めてそこに存在する全ての細胞を総括して “腫瘍” と見なすという概念が含まれていると考えられる。

現在に至るまで、腫瘍に対する学問、研究、治療などの対象のほとんどは腫瘍実質細胞をターゲットにしたものであり、多くの優れた成果を成し遂げてきたことは事実である。しかしながら近年になり腫瘍間質の細胞の重要性が再認識され始めた。腫瘍組織を構成する腫瘍実質細胞以外の構成要素を腫瘍微小環境（tumor microenvironment）と呼び、細胞外基質（extra cellular matrixes；ECMs）や腫瘍微小循環（tumor microvessels），腫瘍関連（筋）線維芽細胞（tumor-associated myofibroblasts），腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage）などの組織学的レベルのものからそれに関わ

る成長因子，増殖因子，サイトカインなど分子生物学的レベルのものまでがその範疇とされ始め，研究や治療薬のターゲットとして様々な知見が得られてきている[20, 25, 26, 37, 46].

古典的に，病理腫瘍組織学は腫瘍実質細胞の特性を基盤とし発展してきた．そのため，腫瘍の組織分類や悪性度の評価を行う際には腫瘍実質細胞の分化度，異型性，核分裂像などに重点を置いた知見が多く存在する．しかしながら，近年の風潮を踏まえると腫瘍間質に関する新たな観点を病理組織学的に検討しこれまでの知見と照らし合わせることは腫瘍組織を理解する上で非常に重要な前進に繋がることであると考えられる．

そこで本研究ではイヌの甲状腺原発腫瘍において，腫瘍間質に主眼を置いた新たな組織学的分類法を提案することを目的とし，その基礎的な病理組織学的ならびに免疫組織化学的研究を行った．

まず第Ⅰ章ではイヌの正常甲状腺組織において認められる充実性細胞集塊の特徴を把握するために，ECMsと実質細胞に関して組織学的ならびに免疫組織化学的検索を行った．第Ⅱ章イヌの甲状腺原発濾胞上皮細胞癌において，その病理組織学的分類に基づきその腫瘍間質を構成するECMsの成分ならびに微小循環の分布・密度を明らかにし，その分類と腫瘍実質細胞の関連性を評価するために，分化度の指標としてThyroglobulin (TG)の発現，細胞骨格を構成する中間径フィラメントの特徴，細胞接着因子であるE-cadherin (E-cad)の発現，腫瘍細胞増殖活性ならびにグルコース輸送体であるGlucose transporter 1

(GLUT-1)の発現に関して免疫組織化学的検索を行った．さらに第Ⅲ章ではイヌの甲状腺原発C細胞癌における腫瘍間質の分布パターンの違いによる病理組織学的分類を行い，その分類と腫瘍実質細胞の関連性を評価するために，分化度の指標としてCalcitonin (CT)の発現，細胞骨格を構成する中間径フィラメ

ントの特徴，細胞接着因子である E-cad の発現，腫瘍細胞増殖活性ならびに GLUT-1 の発現に関して免疫組織化学的検索を行った．

最終的に，これらのことを総合的に踏まえた上で総括では本研究において提案したイヌの甲状腺原発腫瘍の組織学的分類法の整合性ならびに有用性に関して検討を行った．

第 I 章 イヌの正常甲状腺組織に認められる充実性細胞集塊における 組織学的ならびに免疫組織化学的検索

1. 序文

甲状腺実質細胞はサイログロブリンを産生する甲状腺濾胞上皮細胞とカルシトニンを産生する甲状腺 C 細胞から構成される。発生学的に甲状腺濾胞上皮細胞は咽頭正中に形成される甲状腺原基に由来し、甲状腺 C 細胞は鰓後体に移動した神経堤細胞に由来することが知られている[9, 19]。イヌの正常甲状腺組織には成熟した濾胞間に、形態学的特徴の異なる数種類の細胞群から構成される充実性細胞集塊が高頻度に認められることが知られている。Kameda らによってこの細胞集塊は超微形態学的ならびに免疫組織化学的検索から未熟な濾胞上皮細胞、C 細胞および未分化細胞から構成されていることが明らかにされ、C-cell complexes と名付けられた [17]。さらに Leblanc らは C-cell complexes を構成する実質細胞に関する更なる免疫組織化学的検索を報告した[22]が、それ以降 C-cell complexes に関する新たな報告は為されていない。

ECMs は細胞外に存在する高分子構造体であり、基底膜を構成し細胞の足場となること、細胞増殖や細胞移動を調節することなど、多岐にわたる役割を果たすことが知られている[15, 38]。甲状腺組織における ECMs の研究はヒト[3, 41]やラット[23]など限られており、イヌの甲状腺組織における研究は報告されていない。

そこで本章ではイヌの正常甲状腺組織に認められた充実性細胞集塊の新たな知見を集積するために ECMs に焦点を当てて検索を行い、実質細胞の産生ホルモン、中間径フィラメント、細胞接着因子ならびに細胞増殖活性を免疫組織化学的に評価し、その関連を検討した。

2. 材料と方法

種々の理由で病理解剖に供され、組織学的に著変を認めない甲状腺組織 29 例（新生仔犬：3 例，1 歳未満の若齢犬：4 例，3 歳以上の成犬：22 例）の 10%中性緩衝ホルマリン固定ならびに 4%パラフォルムアルデヒド固定パラフィン包埋標本を用いた．斃死個体以外はペントバルビタールナトリウムの静脈内過剰投与により安楽死処置が施された（表 1）．

得られたパラフィン包埋組織は 3 μ m の厚さに薄切し病理組織学的検索に HE 染色ならびに PAMS を用いた．IHC には Avidin-Biotin Complex（ABC）法を用いた．一次抗体には，甲状腺実質細胞のホルモン産生能を検索する目的で，ウサギ抗ヒト TG ポリクローナル抗体ならびにウサギ抗ヒト CT ポリクローナル抗体を用いた．ECMs の構成成分を検索する目的で，ウサギ抗ラット Laminin ポリクローナル抗体，ウサギ抗ヒト Collagen IV ポリクローナル抗体ならびにウサギ抗ヒト Fibronectin ポリクローナル抗体を用いた．また，中間径フィラメントの検索を行うため，上皮系マーカーとしてマウス抗ヒト pan-Cytokeratin（pan-CK）モノクローナル抗体ならびに間葉系マーカーとしてマウス抗ヒト Vimentin（Vim）モノクローナル抗体を用いた．さらに細胞接着因子の検索を行うため，マウス抗ヒト E-cad モノクローナル抗体を，細胞増殖の指標としてマウス抗ヒト Ki-67（MIB-1）モノクローナル抗体を用いた．用いた一次抗体の詳細および反応条件は表 2 に記した．組織切片を脱パラフィン後，抗原賦活化処置を行い，内因性ペルオキシダーゼ除去のために 3%過酸化水素水溶液に 15 分浸漬した．十分に水洗後，非特異反応を抑える目的で Block Ace（Sumitomo Dainippon Pharma Co. Ltd., Hokkaido, Japan）に 37°C，30 分間反応させた後，各一次抗体を反応させた．PBS で洗浄後，二次抗体を室温で 30 分間反応させた．二次抗体にはビオチン標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体および

ビオチン標識抗ラビット IgG ヤギポリクローナル抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A) を用いた。PBS で洗浄後, VECTASTAIN ABC Elite Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A) を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後, 0.005%過酸化水素含有 3, 3-diaminobenzidine (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan) 水溶液にて発色させた。水洗後, ヘマトキシリンで核染色を行った。陰性対照には一次抗体を含まない反応液を使用した。

3. 結果

3-1. 組織学的検索

本研究において成犬の 68.2% (15/22) の検体において充実性細胞集塊が見られ, そのうち 60% (9/15) の検体において両側性に認められた。新生仔犬ならびに若齢犬では認められなかった (表 1), 充実性細胞集塊の認められた検体は雄 10 例, 雌 4 例ならびに不明 1 例であった。

組織学的検索では, 充実性細胞集塊は①淡明で大型の核を持ち, 淡好酸性の細胞質を有する細胞, ②濃染する小型核を持ち, 細胞質内に微小濾胞を有する細胞ならびに③濃染する小型核を持ち, 細胞質がほとんど認められない細胞から構成されていた (図 1A)。PAMS では細胞間に網目状に分布する基底膜状物質が認められた (図 1B)。新生仔犬における甲状腺組織では核分裂像が散見される未熟な濾胞上皮細胞が微小な濾胞構造を形成し, その濾胞上皮細胞間ならび濾胞周囲に核分裂像が散見される淡明核細胞が認められた。若齢犬ならびに成犬の充実性細胞集塊を形成しない領域では濾胞上皮細胞が成熟した濾胞構造を構成し, 濾胞上皮細胞間ならびにその周囲に淡明核細胞が認められた。

3-2. 免疫組織化学的検索

3-2-1. TG ならびに CT の免疫組織化学的発現

充実性細胞集塊を構成する細胞において、①は抗 CT 抗体に陽性を示し、②の細胞質内微小濾胞は抗 TG 抗体に陽性を示した。③の細胞はいずれの抗体も陽性を示さなかった（図 2A および B）。

新生仔犬、若齢犬ならびに成犬の充実性細胞集塊を形成しない領域では濾胞内腔に抗 TG 抗体が陽性を示し、濾胞上皮細胞間や周囲に集塊を成す淡明核細胞が抗 CT 抗体に陽性を示した。

3-2-2. ECMs の免疫組織化学的発現

充実性細胞集塊において抗 Laminin 抗体ならびに抗 Collagen IV 抗体は細胞間に網目状に分布する基底膜状物質が陽性を示し、抗 Laminin 抗体陽性領域は抗 Collagen IV 抗体陽性領域と比較して広範囲であった（図 3A および B）。

新生仔犬、若齢犬ならびに成犬の充実性細胞集塊を形成しない領域では濾胞上皮細胞ならびに淡明核細胞直下の基底膜に抗 Laminin 抗体および抗 Collagen IV 抗体が陽性を示し、抗 Laminin 抗体陽性領域と抗 Collagen IV 抗体陽性領域に差は認められなかった。

抗 Fibronectin 抗体は充実性細胞集塊内、濾胞間ならびに淡明核細胞集塊内に認められた毛細血管毛細血管内腔ならびに血管基底膜に陽性を示した（図 3C）。

3-2-3. 中間径フィラメントの免疫組織化学的発現

充実性細胞集塊において抗 pan-CK 抗体は①の細胞に弱陽性を示し、②の細胞ならびに周囲の成熟濾胞を形成する細胞に強陽性を示した（図 4A）。抗 Vim 抗体は②ならびに③の細胞に陽性を示した（図 4B）。

新生仔犬、若齢犬ならびに成犬の充実性細胞集塊を形成しない領域では抗 pan-CK 抗体は成熟濾胞を形成する細胞に強陽性を示し、淡明核細胞に弱陽性を示した（図 5A）。いずれの細胞も抗 Vim 抗体に陽性を示さなかった（図 5B）。

3-2-4. E-cad の免疫組織化学的発現

充実性細胞集塊において抗 E-cad 抗体は①ならびに②の細胞膜状に明瞭な陽性を示し、③の細胞では不整な陽性像が認められた（図 6A）。

新生仔犬、若齢犬ならびに成犬の充実性細胞集塊を形成しない領域では全ての細胞の細胞膜上に明瞭な陽性像を認めた（図 6B）。

3-2-5. 細胞増殖活性

若齢犬および充実性細胞集塊を含む成犬では抗 Ki-67 抗体に陽性を認める実質細胞は極めて僅かであった。一方、新生仔犬では濾胞上皮細胞ならびに淡明核細胞において多数の陽性細胞を認めた（図 7A および B）。

4. 考察

本研究から、イヌの正常組織に認められる ECMs の分布や構成割合が実質細胞の組織学的構造と関連することが示唆された。ヒトの甲状腺組織における ECMs に関する報告では、濾胞上皮細胞の基底膜成分として Laminin や Collagen IV が知られており、それらが濾胞上皮細胞の分化や増殖を調節している可能性が示唆されている[12]。イヌの甲状腺組織において認められた充実性細胞集塊内に認められた未熟な濾胞上皮細胞直下における Laminin の集積が高度であったことから、イヌの甲状腺濾胞上皮細胞の分化に Laminin が関与している可能性が示唆された。新生仔犬の甲状腺組織における濾胞上皮細胞も形態学

的には未熟な構造を取っているが、成犬の甲状腺組織において認められた充実性細胞集塊内に認められた未熟な濾胞上皮細胞とは基底膜の分布や成分構成が異なっており、それらの組織構築は異なることが明らかになった。C 細胞に関してはその細胞形態や CT の発現から分化度を推察することは困難であったため、ECMs 成分と分化度の関連性は明らかにされなかった。

本研究でイヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊は、①C 細胞と②未熟な濾胞上皮細胞ならびに③未分化細胞が混在しており、組織形態学的ならびに細胞形態学的に Kameda らの提唱した C-cell complexes と一致した[18]。また、免疫組織化学的に C-cell complexes 内に認められる未熟な濾胞上皮細胞は CK と Vim を共発現するという特徴も一致した[18]。しかしながら、Kameda らは C-cell complexes 胎齢 39 日から認められることを報告しており[17]、本研究において新生仔犬ならびに若齢犬の甲状腺組織には認められなかった点に関しては個体差や犬種を考慮する必要があると考えられ、検体数や犬種数を増やして更なる検討が必要であると考えられた。

中間径フィラメントは細胞骨格を形成する上で非常に重要な役割を担っており、特に多くの上皮系細胞の発生段階で認められる上皮-間葉移行

(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) や間葉-上皮移行 (Mesenchymal – Epithelial Transition: MET) は細胞の分化や移動に大きく関与している。また、細胞接着因子である E-cad の減弱・消失は EMT の指標として知られている[5, 8, 13]。免疫組織化学的に、成犬の甲状腺組織に認められた充実性細胞集塊に認められた C 細胞は上皮系マーカーを発現していること、未熟な濾胞上皮細胞は EMT の移行像であること、さらに未分化細胞は間葉系マーカーを発現していることが示唆された。一方、新生仔犬の甲状腺濾胞上皮細胞は形態学的に未熟な構造を示すものの、間葉系マーカーの発現を認めることが出来ず、イヌ

の甲状腺濾胞上皮細胞の発生は一元的ではないことが考えられた。また，本研究ではイヌの甲状腺 C 細胞における間葉系マーカーの発現は認められず，細胞発生の初期から上皮細胞としての特性を有する可能性が示唆された。

ECMs は細胞の分化だけでなく細胞増殖も調節することが知られている。本研究において認められた充実性細胞集塊はその組織構築から細胞増殖活性が高い細胞群であると予想されたが，休止期以外の全ての細胞分裂周期で発現することが知られている Ki-67[32]の発現は僅かに認められるのみであった。一方，新生仔犬の甲状腺組織では細胞増殖活性の高い細胞が多く認められた。このことからイヌの甲状腺組織において ECMs，特に基底膜の主な構成成分である Laminin や Collagen IV と実質細胞の増殖活性との関連性は低いと考えられた。

本研究から，ECMs の分布や構成割合がイヌの甲状腺実質細胞，特に濾胞上皮細胞の分化に関与することが示唆された。Kameda らはイヌの C-cell complexes は鰓後体の遺残と考えられ，そこに存在する未分化細胞が C 細胞だけでなく濾胞上皮細胞の発生母地となり得る可能性を示唆している[17, 18]が，未だその確実な証拠は得られていない。今回得られた知見は C-cell complexes の更なる研究に役立つと共に，甲状腺腫瘍の腫瘍発生の観点からも重要であると考えられた。

表 1. 検体の犬種、年齢、性別、臨床診断名および充実性細胞集塊の有無

No.	犬種	年齢	性別	診断名	充実性 細胞集塊
					L/R
1	N.D	1D	♀	生後直死	—/—
2	N.D	1D	♂	口蓋裂による安楽死	—/—
3	N.D	2D	♂	生後直死	—/—
4	ビーグル	9M	♂	Normal	—/—
5	ビーグル	9M	♀	Normal	—/—
6	ビーグル	10M	♂	Normal	—/—
7	ビーグル	10M	♀	Normal	—/—
8	ビーグル	7Y	♂	Normal	—/+
9	ビーグル	7Y	♂	Normal	+/+
10	ビーグル	7Y	♂	Normal	—/—
11	ビーグル	8Y	♂	Normal	—/—
12	ビーグル	9Y	♀	椎間板ヘルニアによる 安楽死	+/+
13	ビーグル	9Y	♂	Normal	+/+
14	ビーグル	9Y	♀	Normal	+/+
15	ビーグル	10Y	♂	Normal	—/+
16	ビーグル	11Y	♂	Normal	+/+
17	ビーグル	11Y	♀	Normal	+/+
18	ビーグル	ND	♀	Normal	—/—
19	ビーグル	ND	♀	Normal	+/+
20	ビーグル	ND	N.D	Normal	—/+
21	ビーグル	ND	N.D	Normal	—/—
22	ビーグル	ND	♂	Normal	—/+
23	イタリアン・ グレーハウンド	3Y	♂	肺動脈狭窄症/急死	+/+
24	ラブラドル・レトリバー	6Y	♂	扁平上皮癌の肺転移 による安楽死	—/—
25	ゴールデン・レトリバー	14Y	♂	頸動脈小体腫瘍 による安楽死	—/—
26	ラブラドル・レトリバー	11Y	♂C	肺肉腫の拡大による 安楽死	—/+

27	ラブラドル・レトリバー	14Y	♂C	悪性黒色腫の全身転移 による死亡	—/—
28	Mix (チワワ×シー・ズー)	9Y	♂	肉芽腫性髄膜炎 による安楽死	+/+
29	ウェルシュ・コーギー・ ペンブローク	9Y	♂C	下垂体腺腫による安楽死	+/—

ND: Not dated, D: day(s), M: months, Y: years

表 2. 本研究に用いた一次抗体の詳細

Antibody	Antibody type (clone)	Dilution	Antigen retrieval	Source
Thyroglobulin	Rabbit poly	1 in 4000	No	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Calcitonin	Rabbit poly	1 in 600	Microwaving	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Laminin	Rabbit poly	1 in 100	Protease ^a	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, U.S.A.
Fibronectin	Rabbit poly	1 in 400	Protease ^a	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Collagen type IV	Rabbit poly	1 in 100	Protease ^a	Abcam plc, Tokyo, Japan
α -smooth muscle actin (α -SMA)	Mouse mono (1A4)	1 in 100	Microwaving	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Ki-67	Mouse mono (MIB-1)	1 in 50	Autocraving	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
CD31	Mouse mono (JC70)	Prediluted	Proteinase K ^b	Monosan, Uden, Netherlands
E-cadherin	Mouse mono (4A2C7)	1 in 100	Autocraving	Invitrogen Ltd, CA, U.S.A.
Pan-cytokeratin	Mouse mono (AE1/AE3)	Prediluted	Microwaving	Nichirei, Tokyo, Japan
Vimentin	Mouse mono (V9)	1 in 100	Microwaving	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
GLUT-1	Rabbit poly	1 in 100	Microwaving	Abcam, Cambridge, United States, United States

^aNichirei, Tokyo, Japan, ^bDako Denmark A/S, Glostrup, Denmark

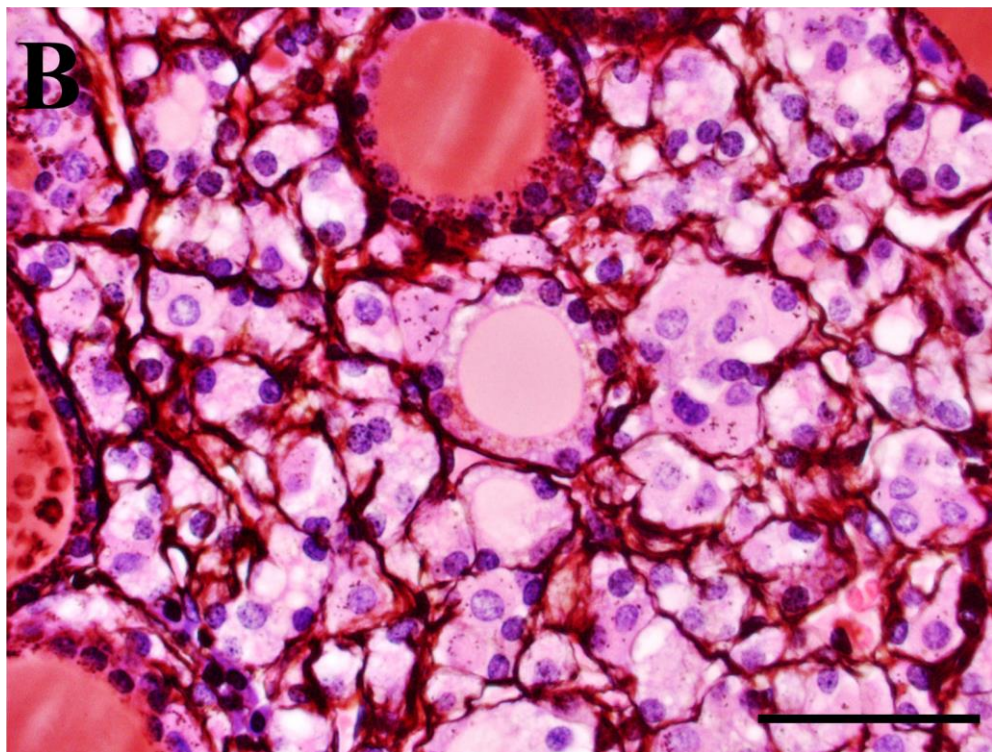
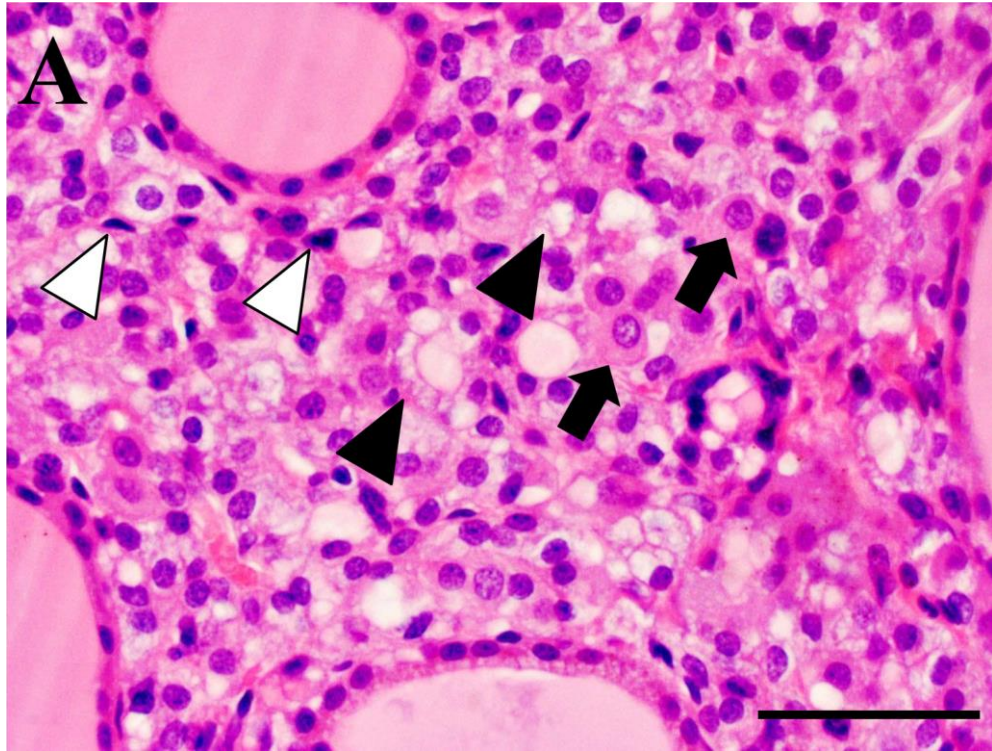


図 1. イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊

A. ①淡明で大型の核を持ち，淡好酸性の細胞質を有する細胞（黒矢印），②濃染する小型核を持ち，細胞質内に微小濾胞を有する細胞（黒矢頭）ならびに③濃染する小型核を持ち，細胞質がほとんど認められない細胞（白矢頭）から構成される．HE. Bar = 50 μ m. B. 細胞間に網目状に分布する基底膜状物質に陽性を示す．PAMS. Bar = 50 μ m.

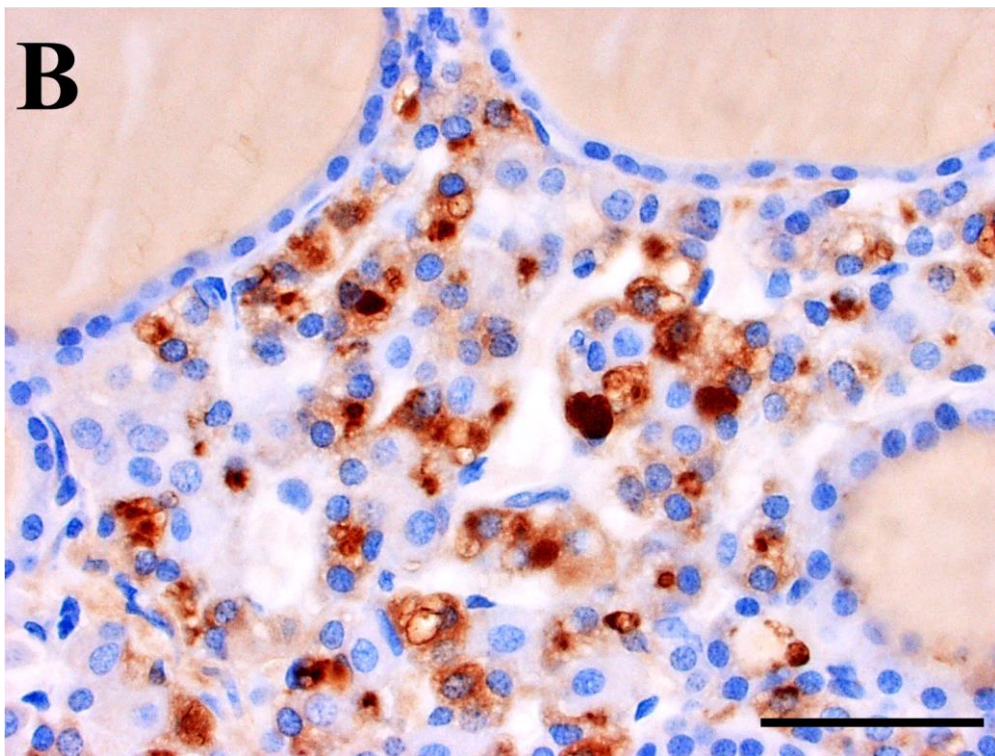
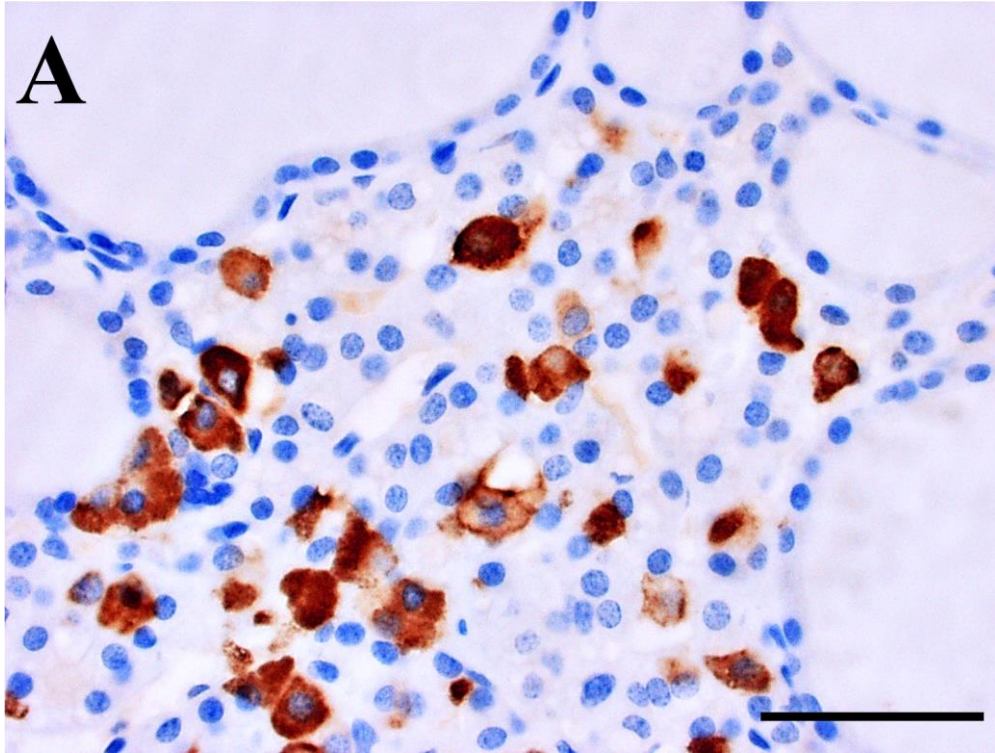


図 2. イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊

A. 淡明核を持つ細胞が抗 CT 抗体に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

B. 細胞質内微小濾胞が抗 TG 抗体に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

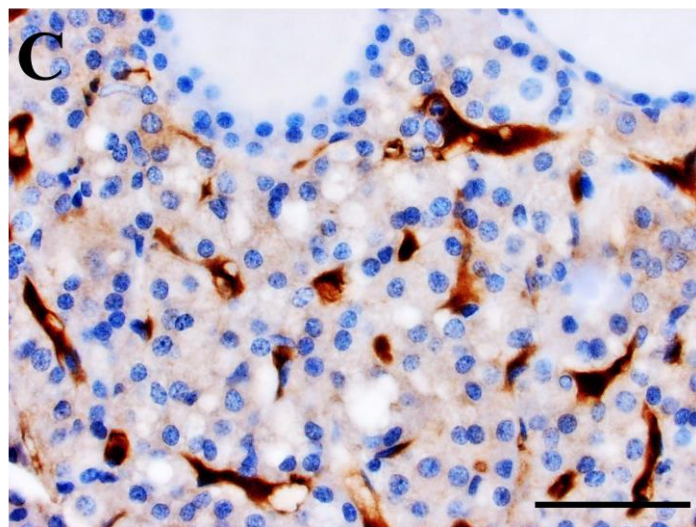
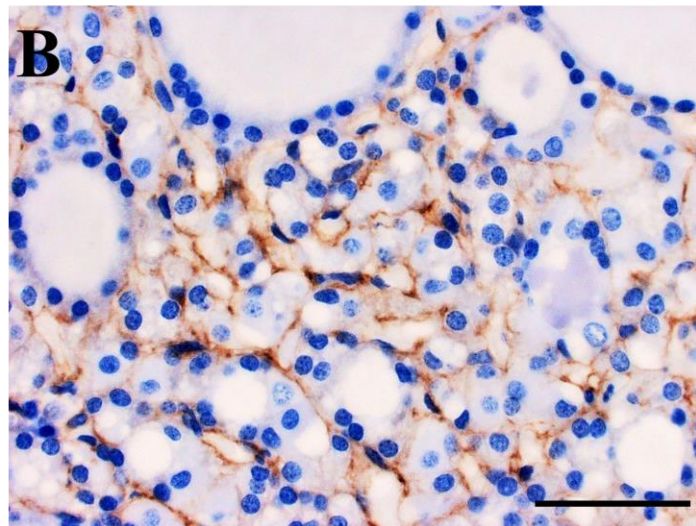
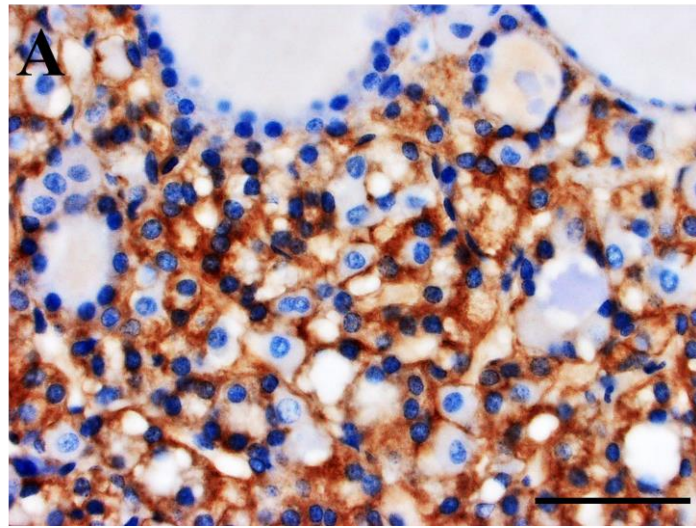


図 3. イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊

網目状に分布する基底膜状物質は抗 Laminin 抗体 (A) ならびに抗 Collagen IV 抗体 (B) に陽性を示す, 抗 Fibronectin 抗体 (C) は毛細血管毛細血管内腔ならびに血管基底膜に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

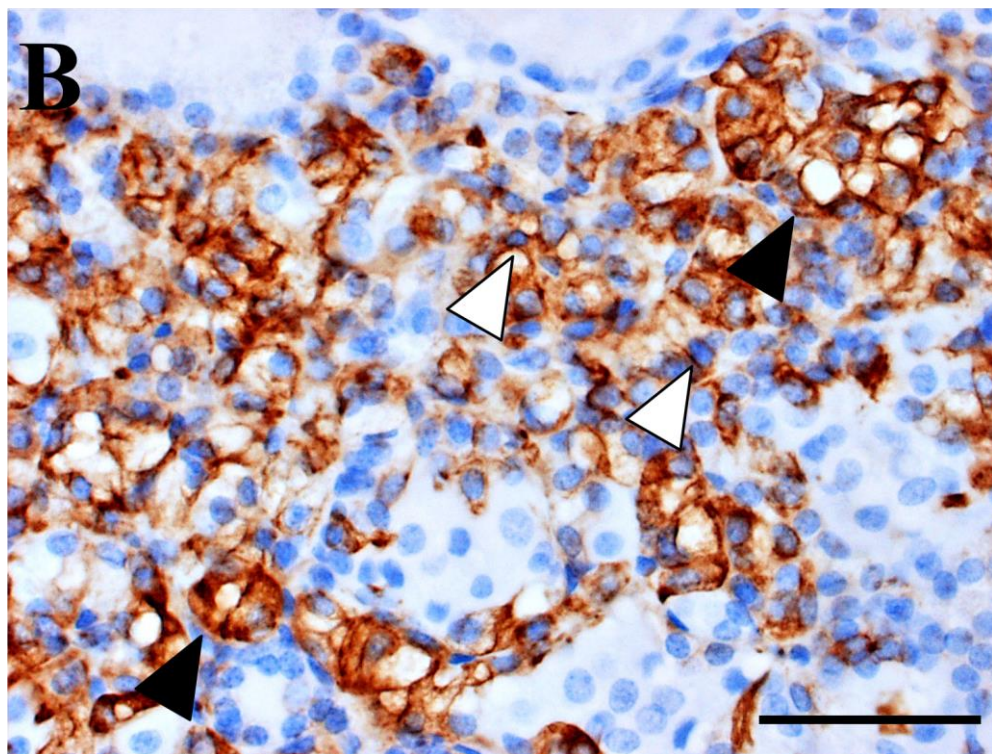
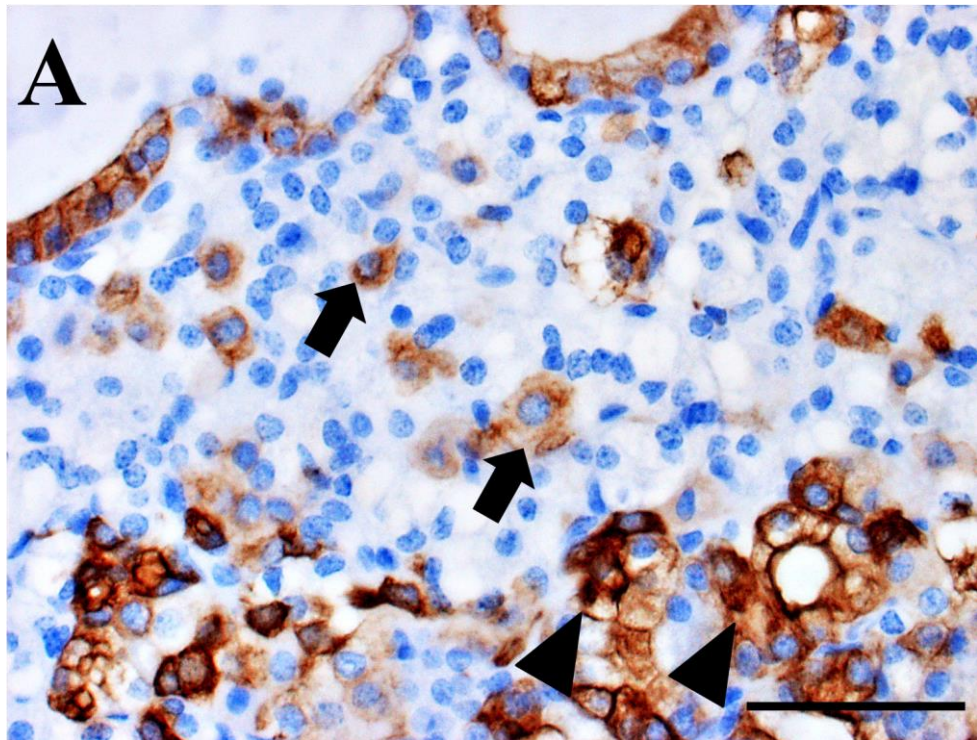


図 4A および B. イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊

抗 pan-CK 抗体は淡明核細胞に弱陽性（黒矢印）を，未熟濾胞上皮細胞ならびに周囲の成熟濾胞を形成する細胞に強陽性を示す（黒矢頭）．抗 Vim 抗体は未熟濾胞上皮細胞（黒矢頭）ならびに未分化細胞に陽性を示す（白矢頭）．IHC.

Bar = 50 μ m.

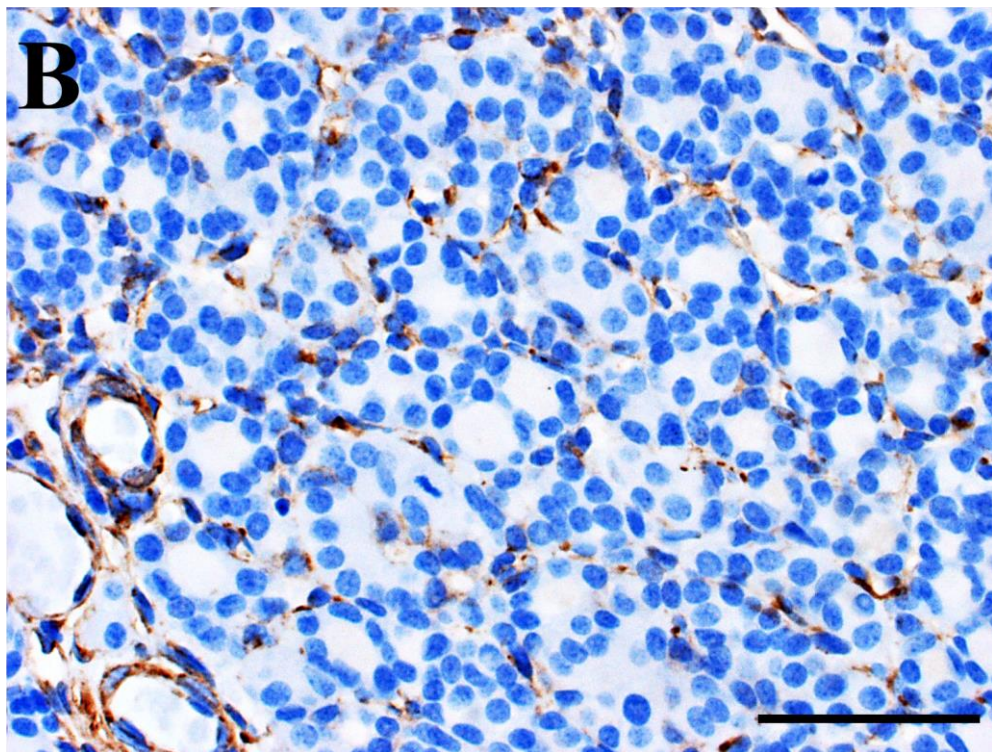
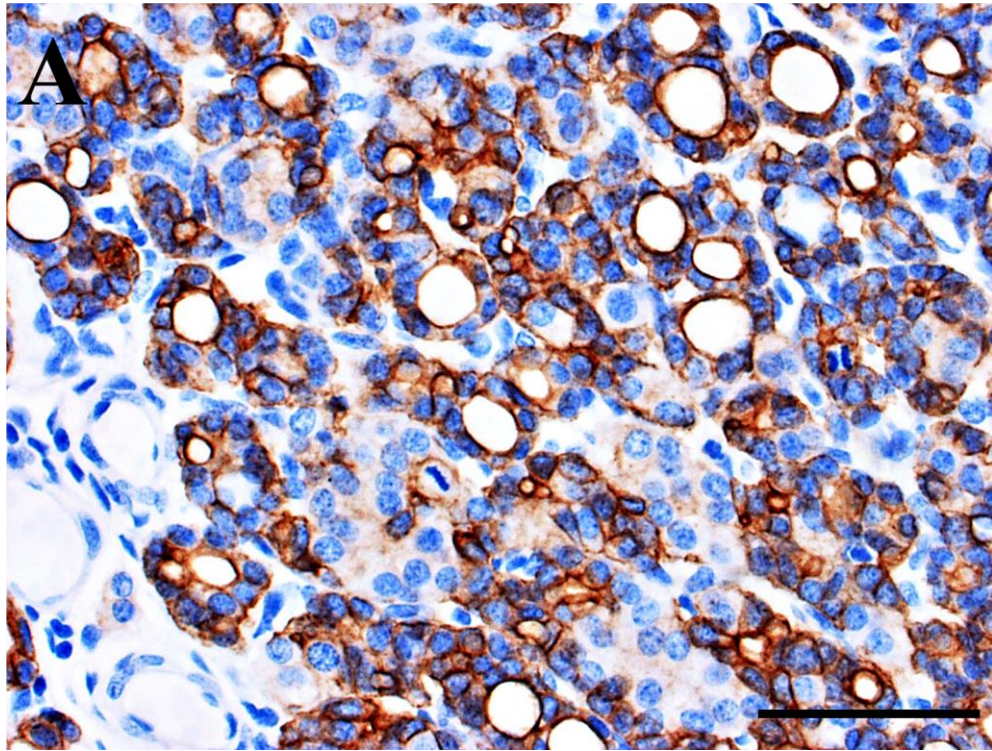


図 5. 新生仔犬の甲状腺組織

抗 pan-CK 抗体は成熟濾胞を形成する細胞に強陽性を，淡明核細胞に弱陽性を示す (A)．抗 Vim 抗体に陽性を示す実質細胞は認められない (B)．IHC．

Bar = 50 μ m．

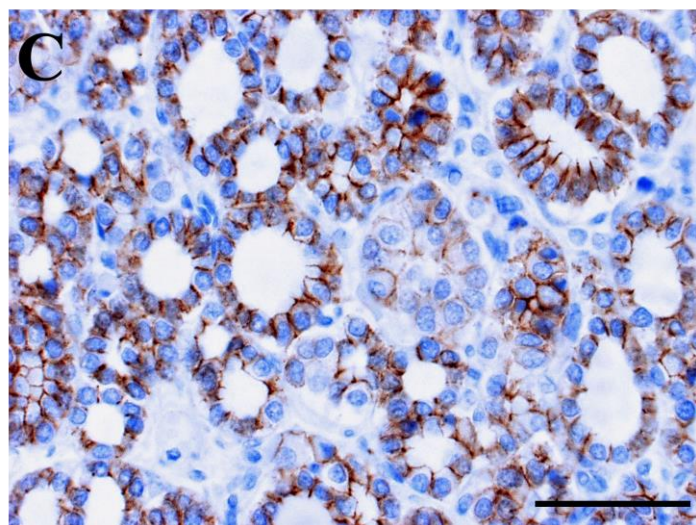
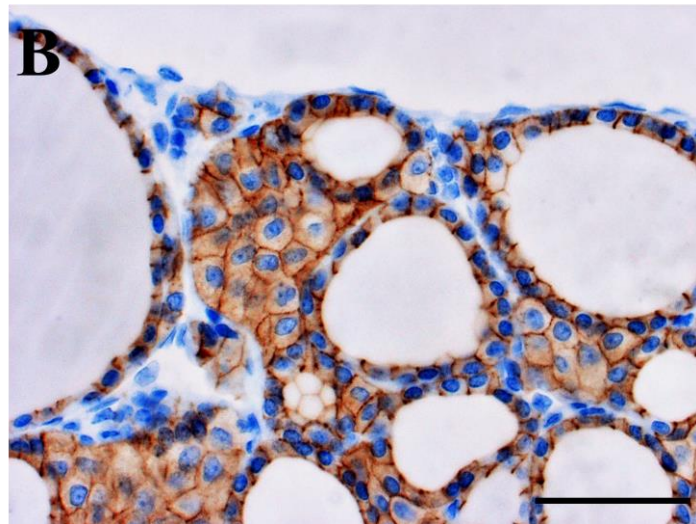
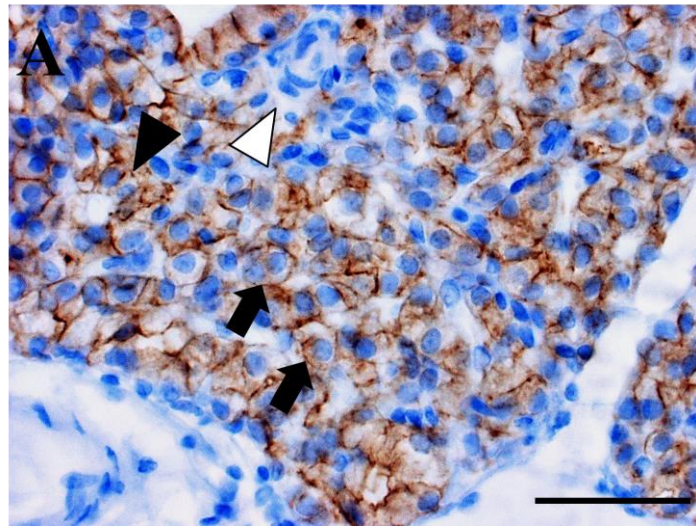


図 6. イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊 (A)、若齢犬 (B) ならびに新生仔犬 (C) の甲状腺組織

抗 E-cad 抗体は淡明核細胞 (黒矢印) ならびに未熟濾胞上皮細胞 (黒矢頭) の細胞膜状に明瞭な陽性を示し, 未分化細胞では不整な陽性像が認める (白矢頭). 若齢犬ならびに新生仔犬では全ての細胞の細胞膜上に明瞭な陽性像を認めた.

IHC. Bar = 50 μ m.

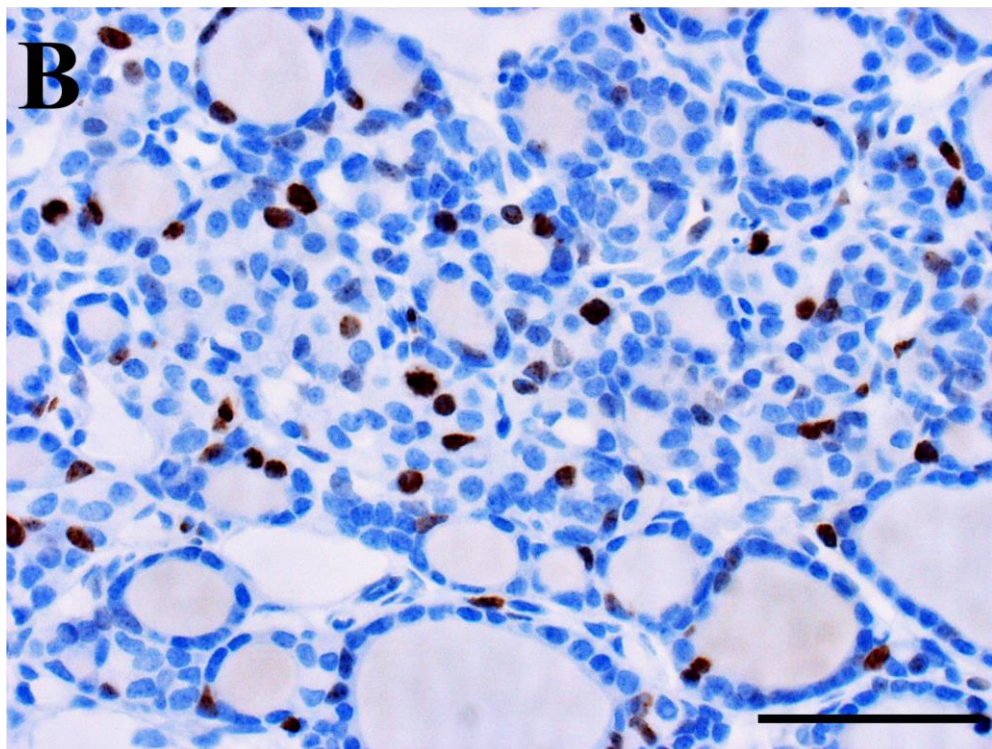
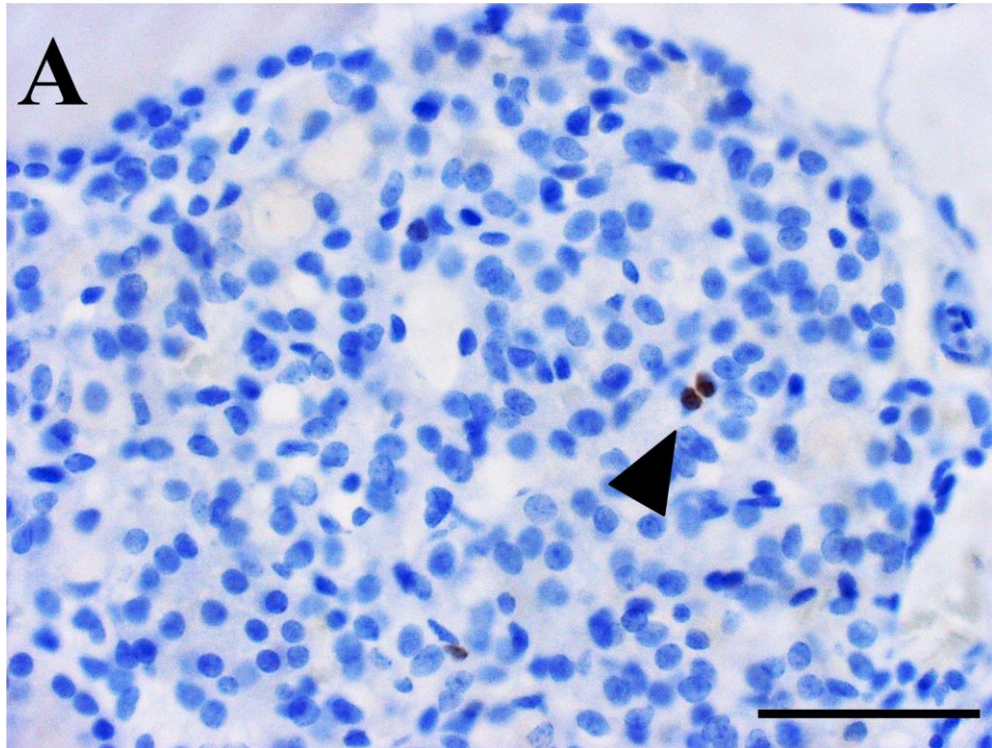


図 7. イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊 (A) ならびに新生仔犬の甲状腺組織 (B)

イヌの正常甲状腺に認められた充実性細胞集塊 (A) では抗 Ki-67 抗体に陽性を認める実質細胞は極めて僅か (黒矢頭) であり, 新生仔犬では濾胞上皮細胞ならびに淡明核細胞において多数の陽性細胞を認める. IHC. Bar = 50 μ m.

第Ⅱ章 イヌの甲状腺濾胞上皮細胞癌組織における 病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索

1. 序文

イヌの甲状腺原発腫瘍の内、TG 産生細胞である濾胞上皮細胞由来の腫瘍は WHO 分類において濾胞上皮細胞腺腫 (follicular cell adenomas) と濾胞上皮細胞癌 (follicular cell carcinomas ; FC) に分類され、さらに後者は高分化型 ; WDTC (濾胞型 ; FTC, 充実型 ; CTC, 濾胞充実型 ; FCTC および乳頭型 ; PTC), 低分化型 ; PDTC (島状型 ; ITC) および未分化型 ; UDTc に細分類される。イヌの FC に関する詳細な組織学的検索は行われておらず, その組織学的分類と組織学的分化度の整合性を検討することが重要であると考えられる。

第Ⅰ章においてイヌの甲状腺濾胞上皮細胞の分化に ECMs が関与している可能性が示唆され, イヌの甲状腺濾胞上皮細胞癌の各組織型における ECMs の違いが腫瘍細胞の分化度に関連していることが予想される。また、腫瘍組織内における微小血管新生は腫瘍細胞の生存や伸展に重要な役割を担っており, 微小血管密度は種々の腫瘍の悪性度と相関するとの報告もある[24, 45]。微小血管新生は様々な因子によって調節されるが ECMs もその一因となっていることが知られている[44]。

そこで本章ではイヌの甲状腺 FC の組織学的分類における ECMs の分布ならびに構成成分と微小血管密度を比較し, さらに各組織型における腫瘍細胞自体の分化度, 中間径フィラメント, 細胞接着因子, 細胞増殖活性ならびに主要なグルコース輸送体である glucose transporter 1 (GLUT-1) [36]の発現に関して免疫組織化学的に評価し, その関連性を検討した。

2. 材料と方法

2-1. 材料ならびに病理組織学的・免疫組織学的検索

本学付属動物病院にて切除され、獣医病理学教室にて FC と診断された 22 症例（4%パラフォルムアルデヒド固定）および外部病理検査施設にて FC と診断された 46 症例（10%中性ホルマリン固定）、計 68 症例のパラフィン包埋標本を用いた。得られたパラフィン包埋組織は 3 μ m の厚さに薄切し、病理組織学的検索に HE 染色ならびに PAMS を用いた。IHC には Avidin-Biotin Complex

(ABC) 法を用いた。一次抗体には、ホルモン産生能を検索する目的で、ウサギ抗ヒト TG ポリクローナル抗体を用いた。ECMs の構成成分を検索する目的で、ウサギ抗ラット Laminin ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト Collagen IV ポリクローナル抗体ならびにウサギ抗ヒト Fibronectin ポリクローナル抗体を用いた。また、微細な血管内皮細胞を検出するため、マウス抗ヒト CD31 モノクローナル抗体を用いた。中間径フィラメントの検索を行うため、上皮系マーカーとしてマウス抗ヒト pan-CK モノクローナル抗体ならびに間葉系マーカーとしてマウス抗ヒト Vim モノクローナル抗体を用いた。さらに細胞接着因子の検索を行うためマウス抗ヒト E-cad モノクローナル抗体を、細胞増殖の指標としてマウス抗ヒト Ki-67 (MIB-1) モノクローナル抗体を、グルコース取り込み能の指標としてマウス抗ヒト GLUT-1 モノクローナル抗体を用いた。用いた一次抗体の詳細および反応条件は表 2 に記した。組織切片を脱パラフィン後、抗原賦活化処置を行い、内因性ペルオキシダーゼ除去のために 3%過酸化水素水溶液に 15 分浸漬した。十分に水洗後、非特異反応を抑える目的で Block Ace

(Sumitomo Dainippon Pharma Co. Ltd., Hokkaido, Japan) に 37°C, 30 分間反応させた後、各一次抗体を反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体を室温で 30 分間反応させた。二次抗体にはビオチン標識抗マウス IgG ヤギポリクローナ

ル抗体およびビオチン標識抗ラビット IgG ヤギポリクローナル抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A) を用いた。PBS で洗浄後, VECTASTAIN ABC Elite Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A) を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後, 0.005%過酸化水素含有 3, 3-diaminobenzidine (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan) 水溶液にて発色させた。水洗後, ヘマトキシリンで核染色を行った。陰性対照には一次抗体を含まない反応液を使用した。

2-2. 半定量的検索ならびに統計解析

ECMs は同一組織内に認められる毛細血管基底膜の陽性像と比較し 0=陰性, 1=毛細血管基底膜より弱い陽性像, 2=毛細血管基底膜と同等の陽性像および 3=陽性物質の集積とし, スコア化を行った。TG, pan-CK ならびに Vim および GLUT-1 はその陽性細胞率からスコア化を 1=0~5%, 2=6~50%ならびに 3=51~100%とした。Ki-67 index は Ki-67 陽性細胞の割合 (%) を算出した。検索した組織切片中で Nikon optiphot compound brightfield microscope (Nikon, Tokyo, Japan) の 40 倍視野において最も Ki-67 index ならびに微小血管密度が多い部位を 5 視野選出 (いわゆる Hot Spot 法[45]) し, その 5 視野の平均を, 微小血管密度に関しては 200 倍視野 (0.139 mm²/field)、Ki-67 index に関しては 400 倍視野で観察した後, Sony colour digital camera DXC-S500 (Sony, Tokyo, Japan)で画像を描出, 用事にて計数し平均を求めた。これらのスコア, Ki-67 index および微小血管密度を各組織型ごとに評価し, 有意差検定にはノンパラメトリック検定 (Kruskal-Wallis test) および多重比較検定 (Steel-Dwass test) を行った。さらに, TG は濾胞構造内腔側に陽性を認める Luminal 型 (L 型), 細胞質にび漫性の陽性を認める Cytoplasmic 型 (C 型) ならびに細胞質内の微

小濾胞内に陽性を認める Microfollicular 型 (M 型) の発現パターンに分類した. E-cad の発現パターンは, 細胞質に発現を認める Cytoplasmic 型 (C 型), 微小濾胞構造の内腔側のみに発現を認める Rosette 型 (R 型) ならびに腫瘍細胞における発現の低下を認める Decrease (D 型) に分類した. 発現パターンの評価は各組織型ごとにそれぞれが認められる割合を算出し, Tukey 法による多重比較検定を行った. *P* 値が 5% 以下の場合を有意差有り と判定した.

3. 結果

3-1. 病理組織学的検索

イヌの FC68 症例はその組織学的構造から WHO 分類に基づき FTC20 症例, CTC30 症例, PDTC13 症例および UDTTC5 症例に分類された. FTC と分類された症例にはさらに 3 つのバリエーションが認められ, ①立方形的上皮細胞から構成される小濾胞構造がび慢性に認められる組織型, ②核の異型性に富む好酸性細胞質を有する腫瘍細胞が, 不規則な拡張を示す濾胞構造を形成する組織型ならびに③立方から扁平な上皮細胞によって拡張した濾胞構造が構成され, 一部に内腔側に乳頭状増殖を認める組織型に細分類された (図 8A-C). PAMS ではいずれも濾胞構造の基底側に陽性を認めたが, ③の組織型で認められる乳頭状構造部では PAMS で褐色に染色される細線維状物質を認めた (図 8D). CTC と分類された症例は主に核の異型性に乏しい腫瘍細胞の充実性増殖が認められ, 細胞質内に微小濾胞を有する腫瘍細胞や濾胞構造を構成する腫瘍細胞集塊を認める領域も認められた (図 9A). PAMS では腫瘍細胞集塊を胞巣状に取り囲む PAMS の陽性像を認める症例や腫瘍細胞間に密に PAMS の陽性像を認める症例など, 様々なバリエーションを認めた (図 9B). PDTC と分類された症例は淡明な細胞質を有する腫瘍細胞の充実性増殖を認め, 腫瘍細胞集塊が線維性結合

組織ならびに微小血管により島状に区画される特徴的な配列を認めた (図 10A). PAMS では腫瘍細胞集塊を胞巣状に取り囲む PAMS の陽性像を認める領域では周囲に明瞭な血管内皮細胞を認めた (図 10B). UDTC と診断された症例は腫瘍性濾胞上皮細胞の充実性増殖を基本的な増殖形態とし、顕著な異型核と豊富な細胞質を有する腫瘍細胞の出現を特徴とした (図 11A). また顕著な核異型に加え紡錘形細胞の増殖を特徴とする 1 症例を認めた. 5 症例に PDTC に特徴的な腫瘍細胞の島状構造を伴う領域が認められた. 腫瘍細胞間に網目状に好酸性硝子様物質の沈着を伴う症例が 2 症例認められ同物質は PAMS で陽性を示した (図 11B).

3-2. 免疫組織化学的ならびに半定量的検索

3-2-1. ECMs の免疫組織化学的発現

FTC では基底部に抗 Laminin, Collagen IV および Fibronectin 抗体陽性の膜状物で腫瘍間質結合織と接しており、抗 Laminin 抗体は一部の腫瘍細胞の細胞質に陽性を示した (図 12A-C). CTC では腫瘍細胞間を網目状に区画するように抗 Laminin, Collagen IV および Fibronectin 抗体の陽性像を認めた (図 13). PDTC は島状の腫瘍細胞集塊を取り囲むように、腫瘍細胞集塊内部では顆粒状～網状の不規則な抗 Laminin および Fibronectin 抗体の陽性像を認めた. 抗 Collagen IV 抗体は血管内皮細胞の基底膜には陽性を示したが、一部の島状腫瘍細胞集塊の周辺領域において弱い陽性像が認められた (図 14). UDTC で認められた腫瘍細胞間に網目状に沈着した好酸性硝子様物質は抗 Fibronectin 抗体に陽性を示し、抗 Laminin 抗体に陽性を示す粗大顆粒状物質の沈着を認め、Collagen IV 抗体に対する陽性像は認められなかった (図 15). Laminin スコアの平均±標準偏差は、FTC で 1.85 ± 0.37 , CTC で 2.03 ± 0.18 ,

PDTC で 2.08 ± 0.76 および UDTC で 2.40 ± 0.71 であり、各組織型における有意な差は認められなかった (図 16A). Collagen IV スコアの平均±標準偏差は、FTC で 1.90 ± 0.31 , CTC で 1.67 ± 0.55 , PDTC で 0.77 ± 0.83 および PDTC で 0.02 ± 0.45 であり、FTC-PDTC 間 ($P=.0003$), FTC-UDTC 間 ($P=.0005$), CTC-PDTC 間 ($P=.0067$) および CTC-UDTC 間 ($P=.0056$) で有意な差が認められた (図 16B). Fibronectin スコア平均±標準偏差は、FTC で 1.50 ± 0.51 , CTC で 1.90 ± 0.04 , PDTC で 1.92 ± 0.76 および UDTC で 2.40 ± 1.34 であり、FTC-UDTC 間で有意な差 ($P=.0024$) が認められた (図 16C).

3-2-2. 微小血管密度

抗 CD31 抗体は腫瘍細胞集塊間に分布する微小血管ならびに腫瘍組織を構成する線維性結合組織内に分布する細動脈、細静脈の血管内皮細胞に陽性を示した (図 17A). 微小血管密度の平均±標準偏差は、FTC で 33.8 ± 14.5 , CTC で 49.2 ± 28.3 , PDTC で 32.3 ± 10.6 および UDTC で 37.0 ± 17.4 であり、各組織型における有意な差は認められなかった (図 17B).

3-2-3. TG の免疫組織化学的発現

TG スコアの平均±標準偏差は、FTC で 2.85 ± 0.08 , CTC で 2.6 ± 0.11 , PDTC で 2.39 ± 0.65 ならびに UDTC で 1.4 ± 0.55 であり、UDTC と FTC および CTC の間に有意な差 ($P=.001$ および $P=.01$) を認めた. 発現パターン割合として、L 型は FTC の 95% ならびに CTC の 6.7% に認められ、FTC とその他の組織型の間に有意な差 (いずれも $P<.0001$) が認められた. C 型は FTC の 30%, CTC の 66.7%, PDTC の 69.2% ならびに UDTC の 80% に認められ、FTC とその他の組織型の間に有意な差 (vs. CTC: $P=.001$, vs. PDTC: $P=.001$ およ

び vs. UDTC: $P=.004$) が認められた. M 型 (図 21A) は FTC の 20%, CTC の 90%, PDTC の 76.7%ならびに UDTC の 40%に認めら, CTC-FTC 間 ($P<.0001$), CTC-UDTC 間 ($P=.003$) ならびに PDTC-FTC 間 ($P=.0006$) に有意な差が認められた (図 18).

3-2-4. 中間径フィラメントの免疫組織化学的発現

CK スコアの平均±標準偏差は, FTC で 2.65 ± 0.17 , CTC で 2.4 ± 0.14 , PDTC で 2.23 ± 0.30 ならびに UDTC で 0.6 ± 0.25 であり, UDTC と他の組織型の間 に有意な差 (vs. FTC: $P=.002$, vs. CTC: $P=.003$ および vs. PDTC: $P=.05$) を認めた (図 19A および B).

Vim スコアは FTC で 0.1 ± 0.1 , CTC で 1.53 ± 0.20 , PDTC で 0.39 ± 0.27 ならびに UDTC で 2.2 ± 0.2 であり, CTC-FTC 間 ($P<.0001$), CTC-PDTC 間 ($P=.006$), UDTC-FTC 間 ($P=.0001$) および UDTC-PDTC 間 ($P=.001$) に有意な差を認めた (図 20A および B).

3-2-5. E-cad の免疫組織化学的発現

全ての症例で腫瘍細胞間に陽性像を認めた. C 型 は FTC の 15%, CTC の 13.3%, PDTC の 23.1%ならびに UDTC の 60%で認められ, UDTC-FTC 間 ($P=.016$) ならびに UDTC-CTC 間 ($P=.035$) で有意な差が認められた. R 型は FTC では認められず, CTC の 13.3%, PDTC の 53%および UDTC の 60%で認められ, PDTC-FTC 間 ($P=.0002$) ならびに PDTC-CTC 間 ($P=.005$) に有意な差が認められた, D 型は FTC では認められず, CTC の 23.3%, PDTC の 61.5%ならびに UDTC の 100%に認められ, FTC とその他の組織型 (vs. CTC: $P=.001$, vs. PDTC および vs. UDTC: $P<.0001$) との間, CTC-PDTC 間 ($P=.008$)

ならびに CTC-UDTC 間 ($P=.0004$) に有意な差が認められた (図 20).

3-2.6. 腫瘍細胞増殖活性

Ki-67 index (%) の平均±標準偏差は, FTC で 7.0 ± 2.6 , CTC で 10.0 ± 6.8 , PDTC で 18.7 ± 8.3 ならびに UDTC で 15.3 ± 6.2 であり, PDTC-FTC 間 ($P=.0001$), PDTC-CTC 間 ($P=.006$) および UDTC-FTC 間 ($P=.003$) に有意な差が認められた (図 21A および B).

3-2-7. GLUT-1 の免疫組織化学的発現

抗 GLUT-1 抗体の陽性像は細胞膜上に限局して認められた. GLUT-1 スコアの平均±標準偏差は, FTC で 1.05 ± 0.61 , CTC で 0.51 ± 0.71 , PDTC で 1.54 ± 0.52 ならびに UDTC で 1.40 ± 0.89 であり, PDTC-CTC 間に有意な差 ($P=.003$) が認められた (図 22A および B).

4. 考察

本研究ではイヌの甲状腺 FC における既存の WHO 分類に基づき組織型分類を行い, その腫瘍間質の分布や構成成分の詳細な検索を行った. まず, FTC と診断される組織型で認められた病理組織学的バリエーションは腫瘍間質構造ならびに成熟した濾胞構造を構成するという点で同一組織型の亜型として考えることが妥当であると考えられた. イヌの甲状腺 FC において CTC が最も頻繁に認められる組織型であることが知られており, 本研究でも同様の結果となった[6]. 腫瘍細胞間に認められる ECMs の網目状配列は, 第 I 章で認められたイヌの甲状腺組織に認められる充実性細胞集塊 (C-cell complexes) 内に存在する明瞭な濾胞構造を構成しない未熟な濾胞上皮細胞の充実性配列部位と類似していた.

このことから CTC に認められる腫瘍細胞の充実性配列はイヌの FC において FTC よりもやや分化度が低いことを示唆する所見であると考えられたが, WHO classification in domestic animals に記載のある濾胞充実型

(follicular-compact thyroid carcinoma) と区別することに対しての組織学的意義を見出せなかった. ヒトの甲状腺 FC において, PDTC は高分化型 FC よりも予後の悪い組織型であることが 1983 年に提唱され, 2004 年に WHO classification に採用された組織型である[29, 42]. WHO of domestic animals でも 2008 年に PDTC が特徴的な組織学的構造を有しており, 高分化型 FC と比較して予後の悪い組織型であるとの記載は認めるがその分化度の定義や発生率を含め詳細は未だに不明確である. 本研究において PDTC と診断された症例は FC 全体の 19.1%であり, ヒトにおける発生率 (1%~10%) [43]よりも若干高い結果となった. また, PAMS において島状腫瘍細胞集塊は高頻度に微小血管基底膜に取り囲まれていることが明らかとなり, 腫瘍細胞の脈管浸潤が高頻度に生じていることが示唆されたが, 本研究において遠隔転移率に関するデータを収集できなかったため, 今後の課題であると考えられた. UDTC と分類された 2/5 症例に認められた高度な基底膜様物質の網目状沈着は ECMs 異常産生を示す所見と考えられ, UDTC に特徴的な組織構造の一つであることが示唆された. また, 腫瘍微小血管密度は各組織型間で有意な差が認められずイヌの甲状腺 FC において新生微小血管の分布は組織構築に大きく寄与しないことが考えられた.

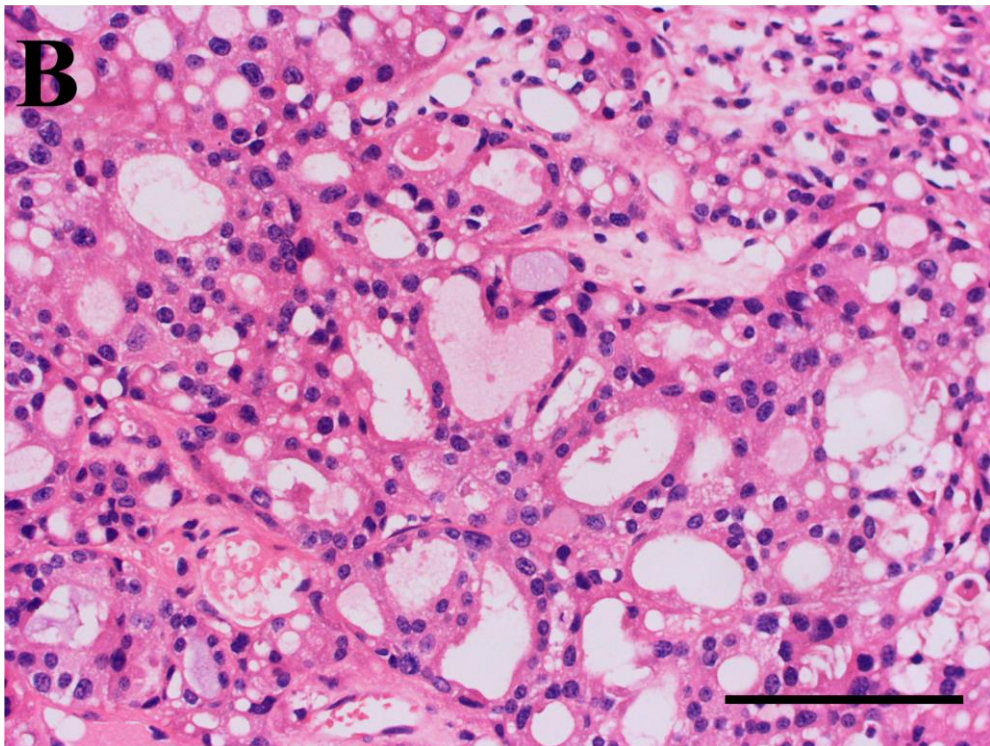
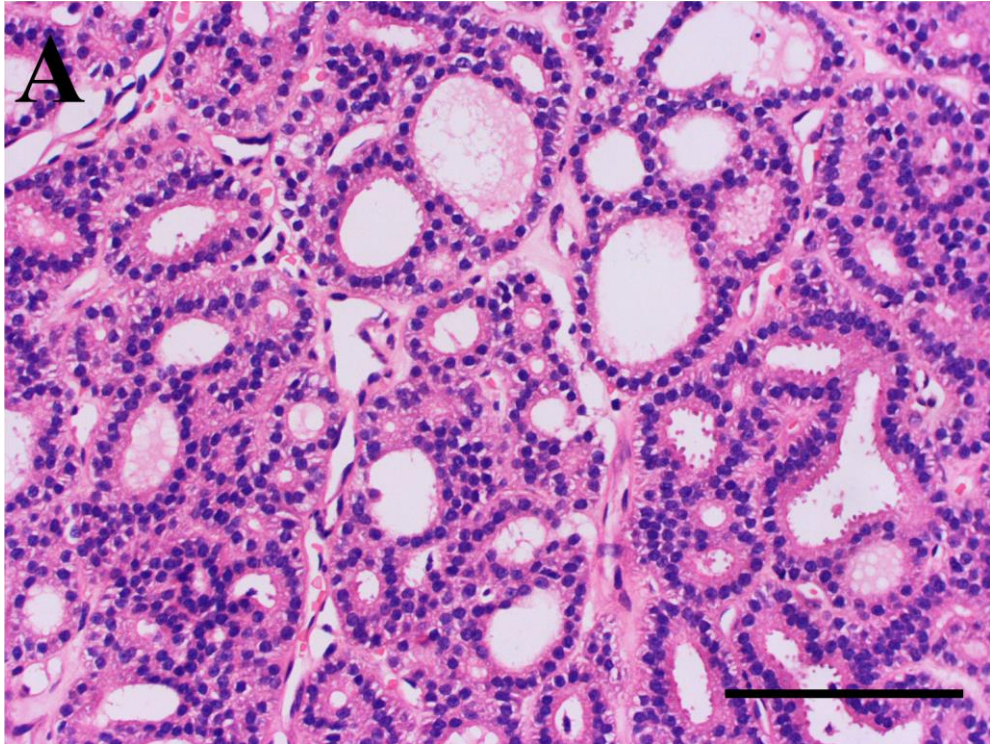
本研究では ECMs の分布ならびに構成成分の違いが各組織型の組織構造ならびに腫瘍細胞の分化度や細胞活性と関連性があることが示唆された. 第 I 章において, イヌの甲状腺濾胞上皮細胞の基底膜には Fibronectin の発現がみとめられず, 甲状腺 FC には全症例の ECMs に発現が認められたことに加え, 最も細

胞分化度が低いと考えられている UDTC の ECMs において高度な Fibronectin の集積が認められたことから、Fibronectin がイヌの甲状腺 FC の発癌機構に大きく関与していることが示唆され、ヒトやラットの甲状腺 FC における過去の報告と類似性が認められた[23, 39]. 当初、第 I 章の結果から Laminin が細胞の分化度と関与する可能性を予想したが、本研究の結果ではイヌの甲状腺 FC の分化度における Laminin の発現の有意な関連性は認められず、腫瘍性甲状腺濾胞上皮細胞の分化度には Collagen IV が大きく関与している可能性が示唆された。特に腫瘍細胞の充実性増殖が CTC と PDTC に共通する所見であることに加え、甲状腺濾胞上皮細胞の分化マーカーである TG の発現に有意な差が認められないことから、それらはしばしば混同されるが、Collagen IV の発現には有意な差があり、鑑別診断を行う上で有効な知見となる可能性が示唆された。また本研究から、PDTC は高い細胞増殖活性と GLUT-1 の発現能を有する腫瘍細胞群から構成されていることが明らかになった。これらの特徴は腫瘍細胞自体の分化度とは相関がなく、ECMs によって調節されている可能性が示唆された。これらのことを踏まえて、イヌの甲状腺 FC における PDTC の診断意義の重要性が高まることが期待される。

上皮 - 間葉移行 (EMT) は上皮細胞が上皮としての特性を消失し、間葉細胞の特性を獲得することであり、悪性上皮性腫瘍細胞における浸潤性や転移能獲得の重要なメカニズムの一つと考えられている[27, 28]. 一般に蛋白質レベルでは上皮細胞における CK 発現の低下と vimentin 発現の上昇、cadherin 分子を始めとした細胞接着因子の発現低下などが特徴とされており、ヒト・イヌを含め様々な哺乳類における種々の悪性上皮系腫瘍細胞で低分化腫瘍細胞あるいは高悪性度の指標とされている[2, 7, 28]. しかしながら、ヒトの甲状腺 FC ならびに非腫瘍性甲状腺組織において CK と vimentin を共発現する甲状腺濾胞上皮細胞

胞が認められることから、甲状腺 FC における EMT の悪性度の指標として有用性には疑問が生じるという報告がある[3, 41]. また、第 I 章ならびに過去の報告[18]から、イヌの正常甲状腺組織に認められる充実性細胞集塊 (C-cell complexes) 内に存在する濾胞上皮細胞は TG と vimentin を発現しており、本研究における CTC はこの特性を有する腫瘍細胞から構成される組織型であると考えられた. 一方、PDTC における腫瘍細胞の中間径フィラメントの発現動態は上皮としての特性を有しており、一般的な概念では CTC の腫瘍細胞よりも高分化な腫瘍細胞であると考えられた. しかしながら、腫瘍細胞における E-cad の発現パターンは UDTC を構成する腫瘍細胞との類似性が認められ、イヌの甲状腺 FC においても EMT を細胞分化度の指標とすることが困難であることが示唆された.

本研究から、イヌの甲状腺 FC において細胞分化マーカーや EMT の有無から腫瘍細胞自体の分化度ならびに細胞機能を推察することが困難であることが示唆された. このことの一因として、イヌの甲状腺濾胞上皮細胞が EMT という概念から逸脱した性質を有することやその組織発生の複雑さが考えられる. これらのことを考慮すると、イヌの甲状腺 FC における腫瘍細胞に対する腫瘍間質、特に ECMs の重要性を踏まえた上で組織学的分類を行う際には、腫瘍細胞学的な観点よりも腫瘍組織学的観点が重要であることが示唆された.



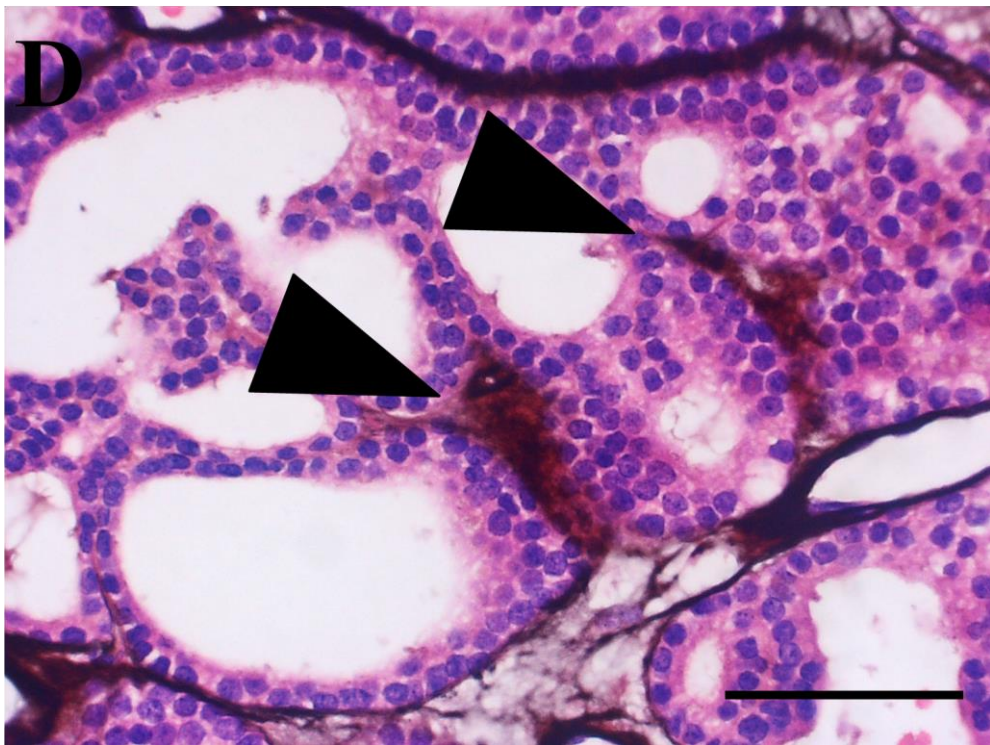
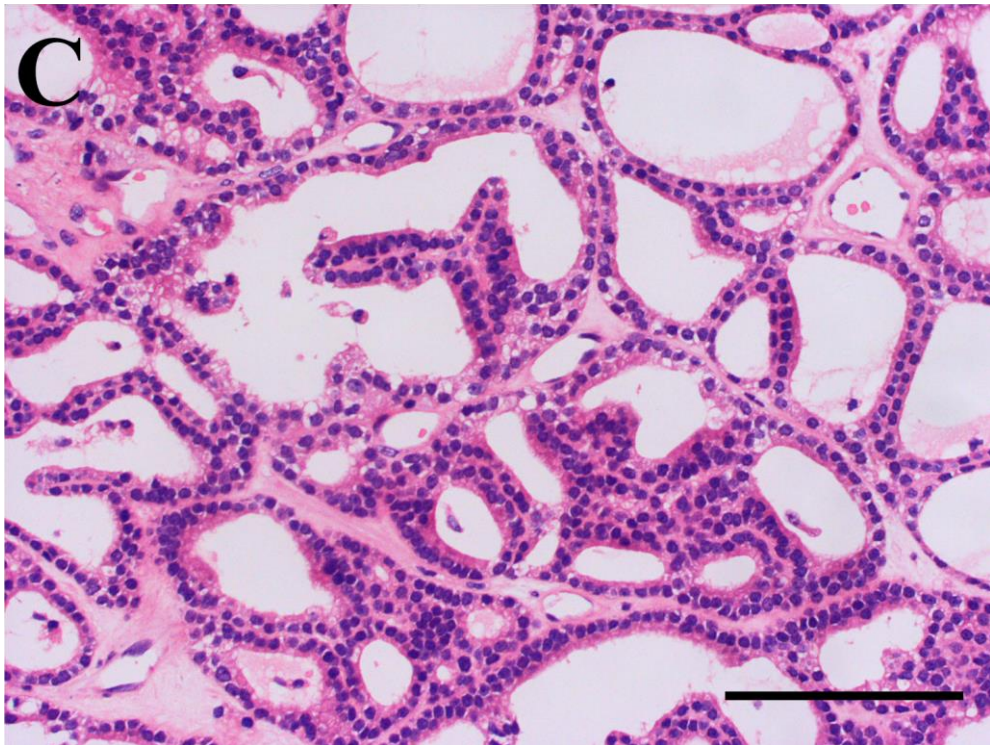


図 8. イヌの FTC

A. 立方形の腫瘍細胞から構成される小濾胞構造がび漫性に認められる．HE.

Bar = 100 μ m.

B. 核の異型性に富み，好酸性細胞質を有する腫瘍細胞が不規則な濾胞構造を形成する．HE. Bar = 100 μ m.

C. 立方～扁平な上皮細胞によって拡張した濾胞構造が構成され，一部に内腔側に乳頭状増殖を認める．HE. Bar = 100 μ m.

D. 乳頭状構造部では褐色に染色される細線維状物質を認める．PAMS/HE.

Bar = 50 μ m.

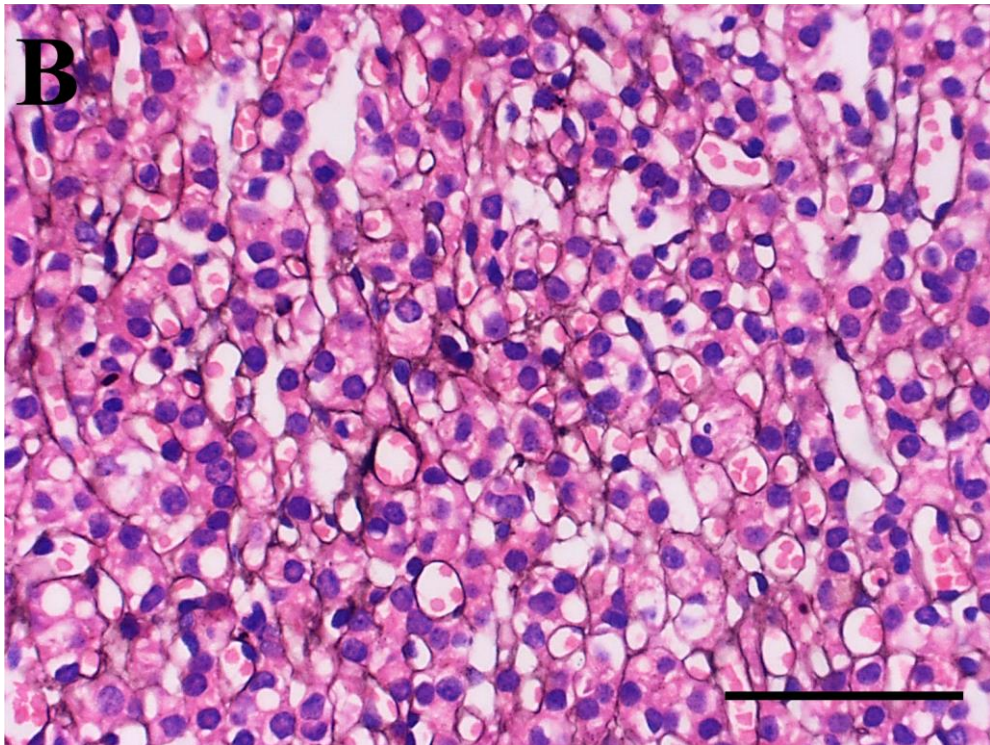
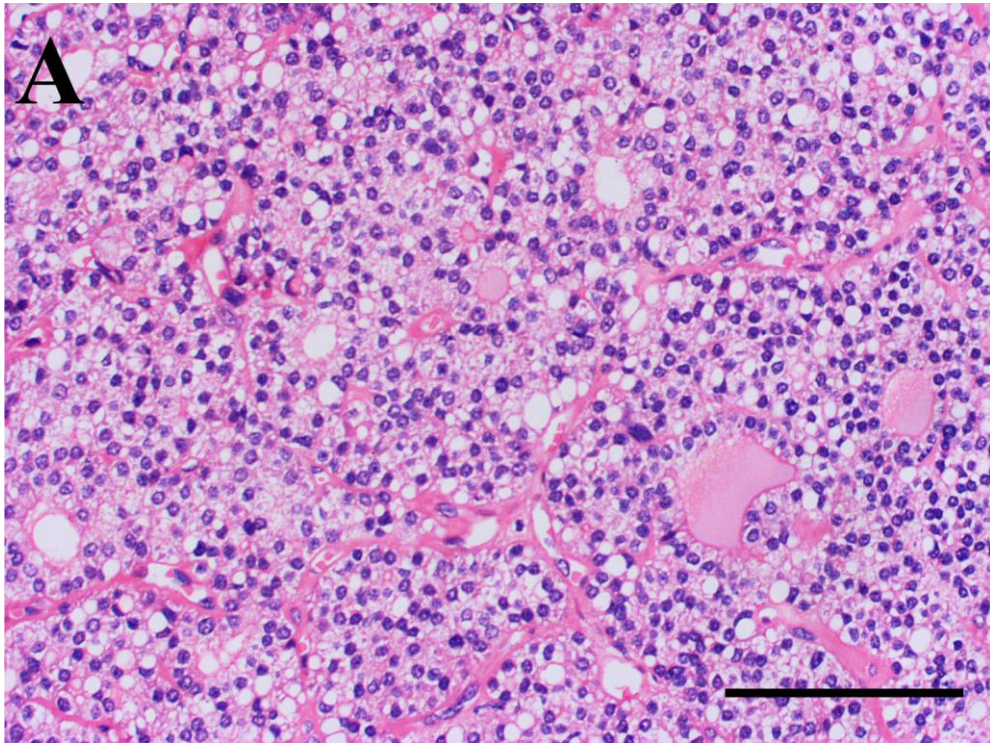


図 9. イヌの CTC

A. 核の異型性に乏しい腫瘍細胞が充実性に増殖し，細胞質内に微小濾胞を有する腫瘍細胞や濾胞構造を認める．HE. Bar = 100 μ m.

B. 腫瘍細胞間に細網線維を認める．PAMS/HE. Bar = 50 μ m.

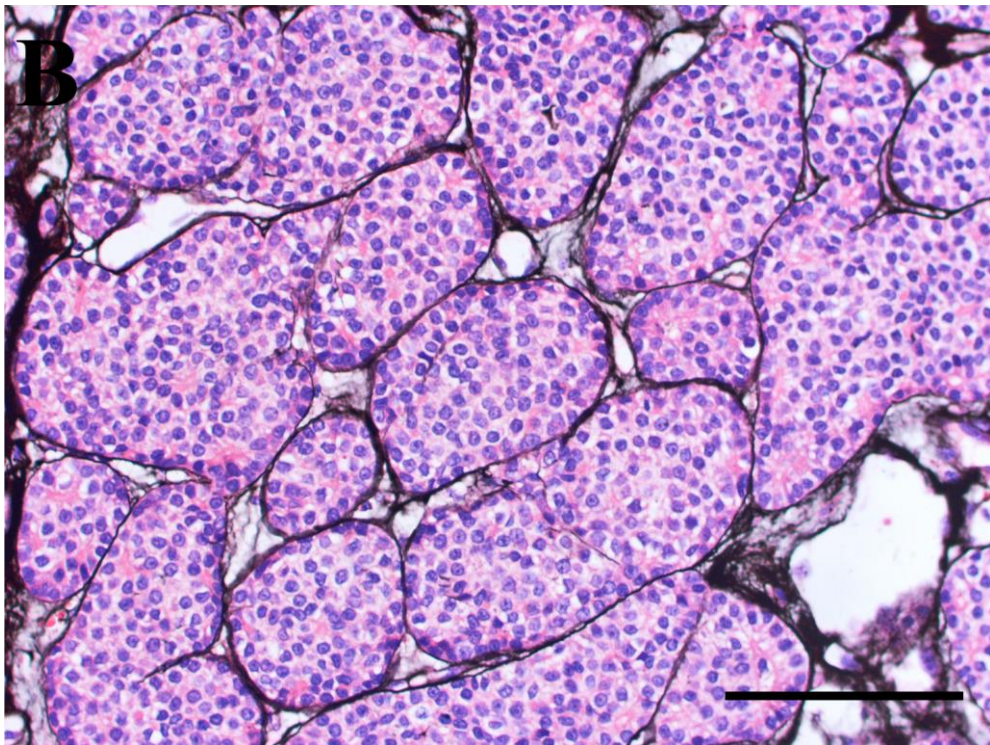
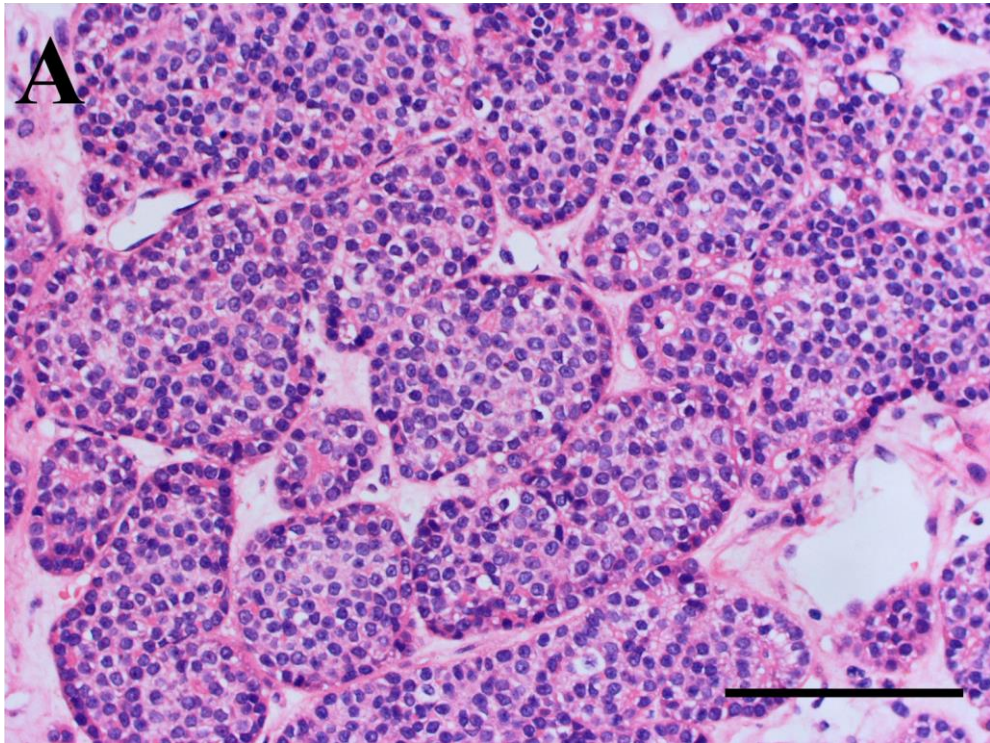


図 10. イヌの PDTC

- A. 腫瘍細胞の充実性増殖を認め、腫瘍細胞集塊が線維性結合組織ならびに微小血管により島状に区画される。HE. Bar = 100 μ m.
- B. 腫瘍細胞集塊を基底膜が胞巣状に取り囲む。PAMS/HE. Bar = 100 μ m.

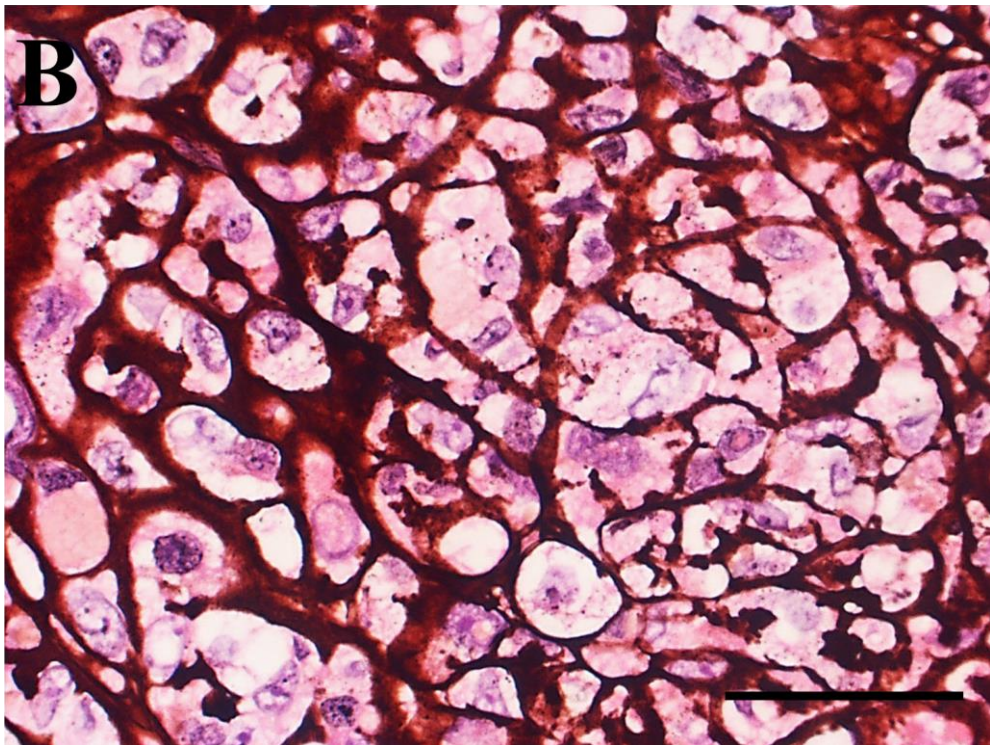
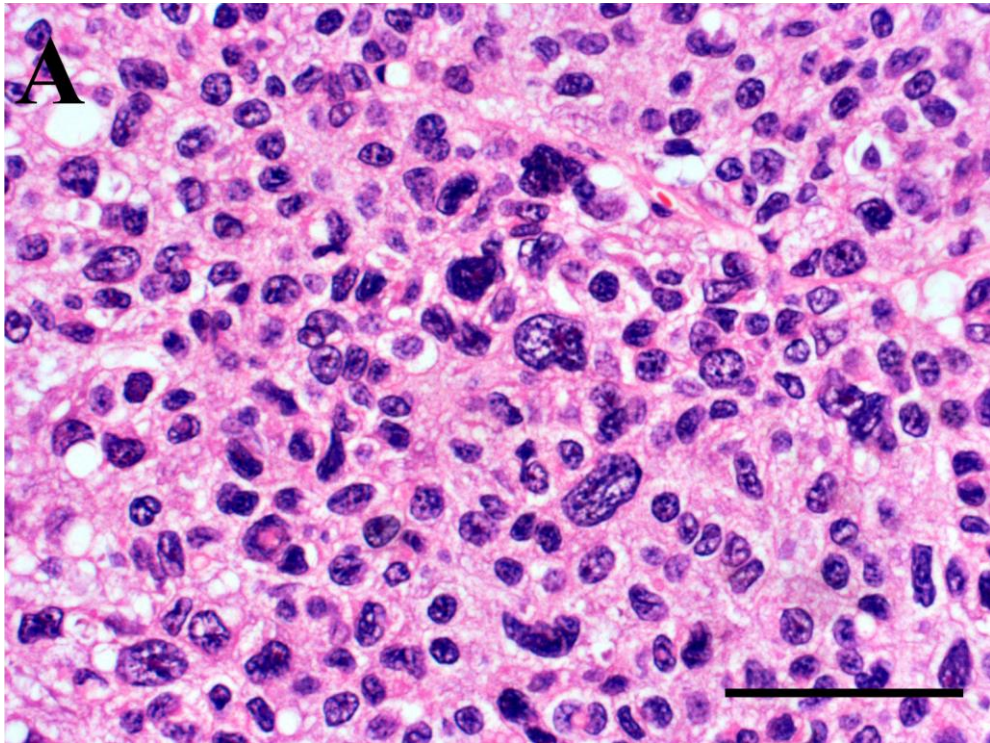


図 11. イヌの UDTc

A. 顕著な異型核と豊富な細胞質を有する腫瘍細胞を認める. HE. Bar = 50 μ m.

B. 腫瘍細胞間に網目状に基底膜様物質の沈着を認める. PAMS/HE.

Bar = 50 μ m.

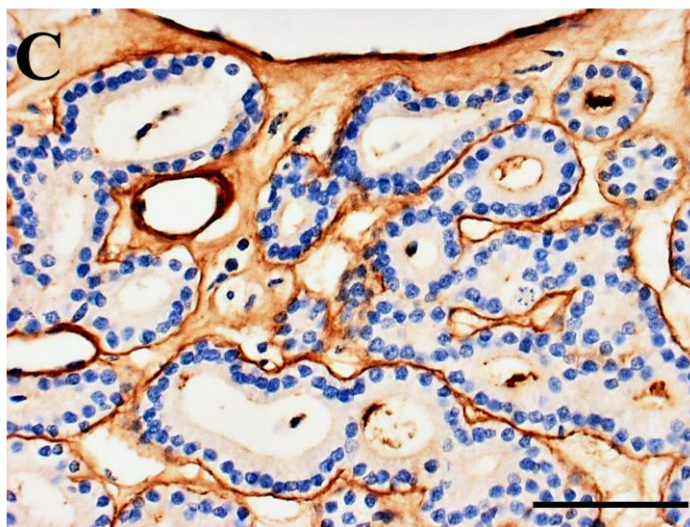
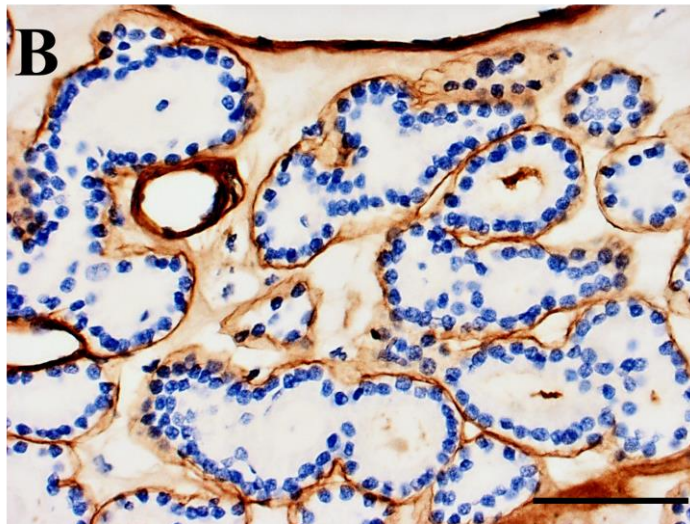
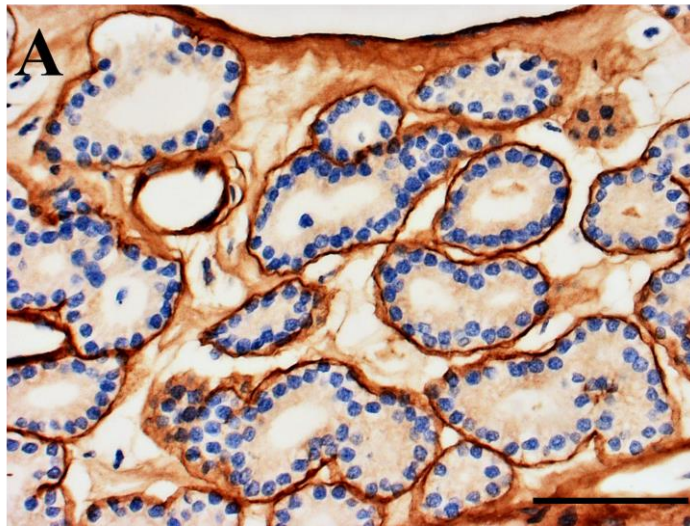


図 12. イヌの FTC

腫瘍細胞の基底部に抗 Laminin (A), Collagen IV (B) および Fibronectin (C)

抗体陽性の膜状物を認める. IHC. Bar = 50 μ m.

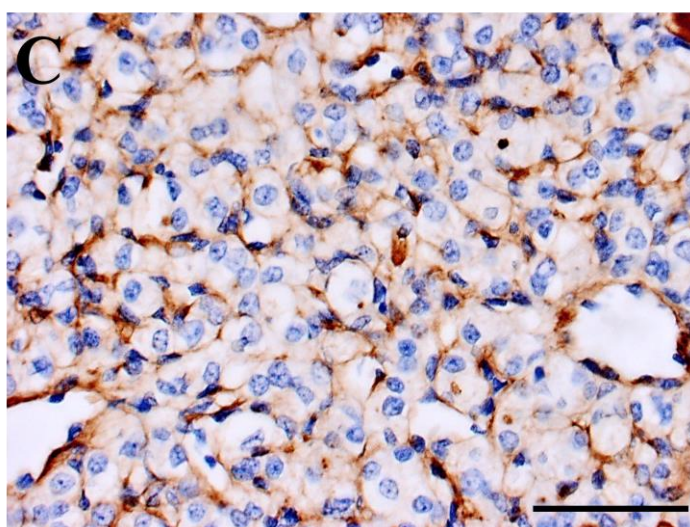
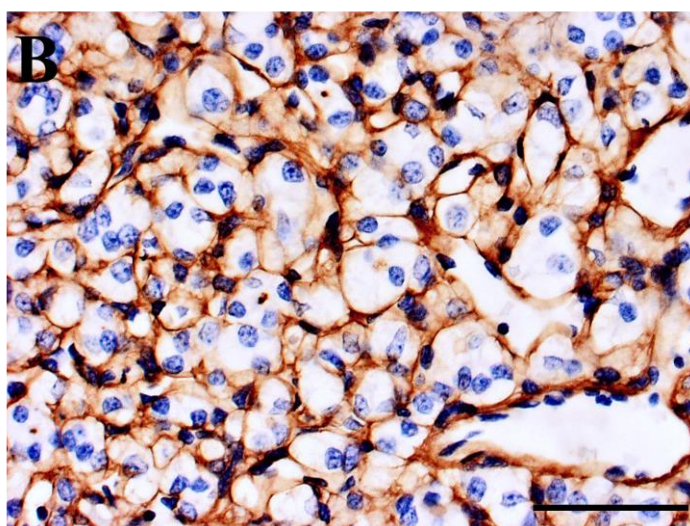
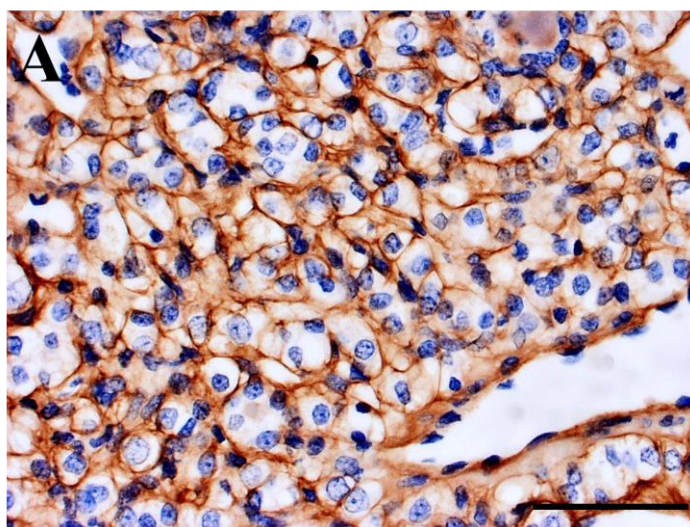


図 13. イヌの CTC

腫瘍細胞間を網目状に区画するように抗 Laminin (A), Collagen IV (B) および Fibronectin (C) 抗体陽性線維状物を認める. IHC. Bar = 50 μ m.

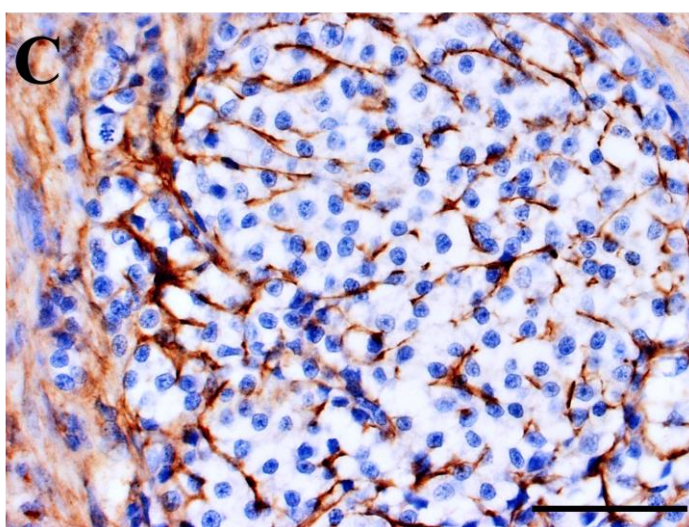
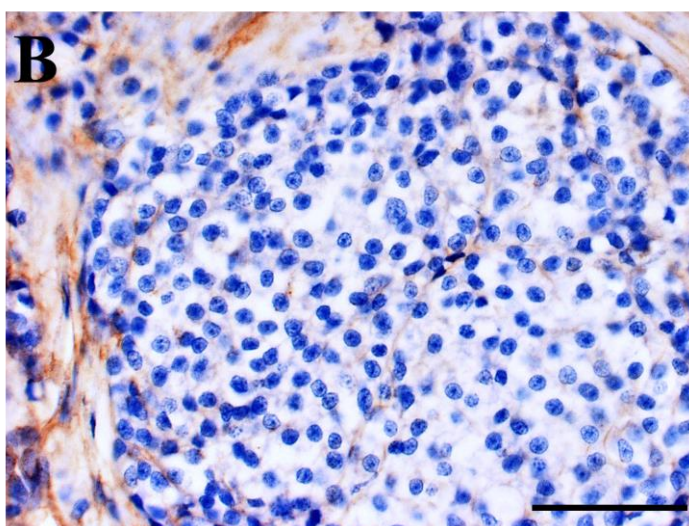
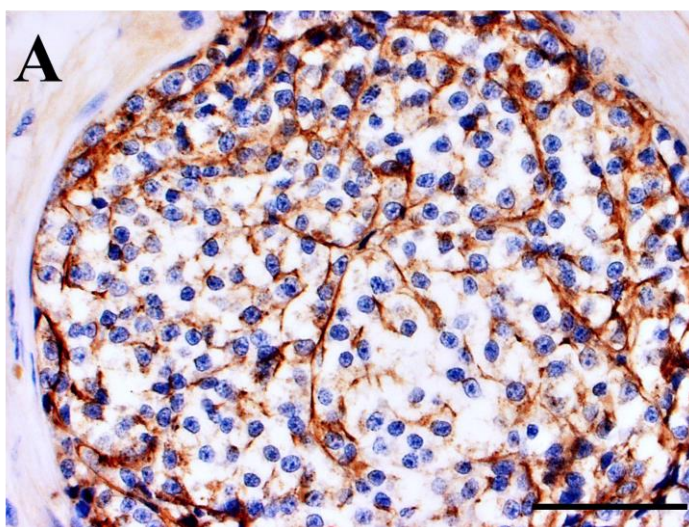


図 14. イヌの PDTC

腫瘍細胞集塊内部では網状の抗 Laminin (A) および Fibronectin (C) 抗体の陽性像を認め、抗 Collgen IV (B) 抗体の陽性像は一部消失する. IHC.

Bar = 100 μ m.

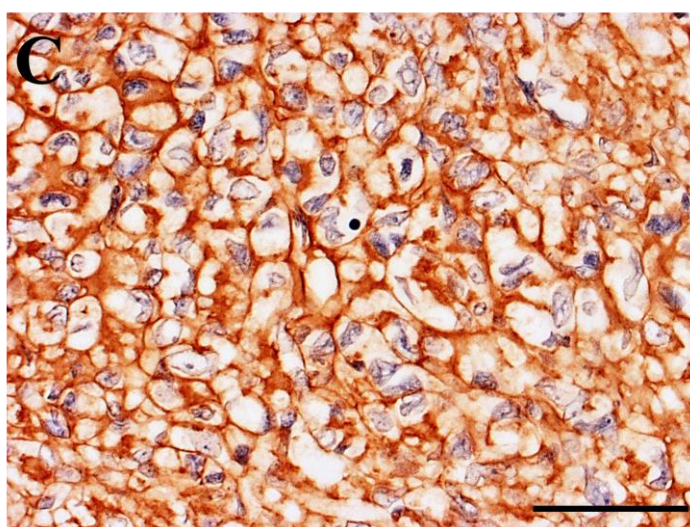
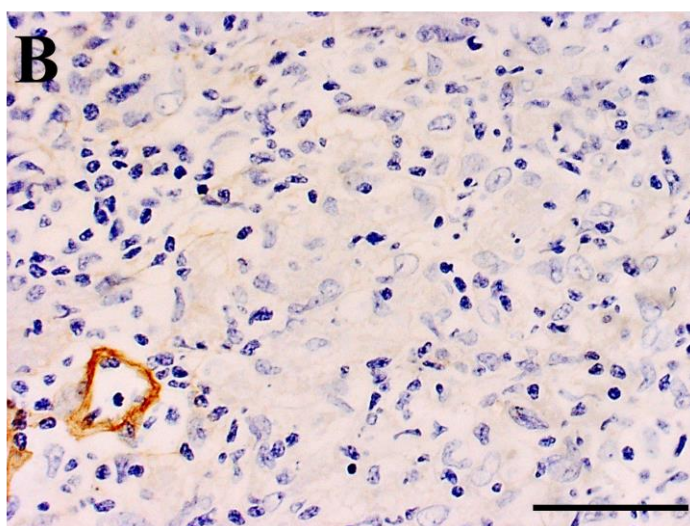
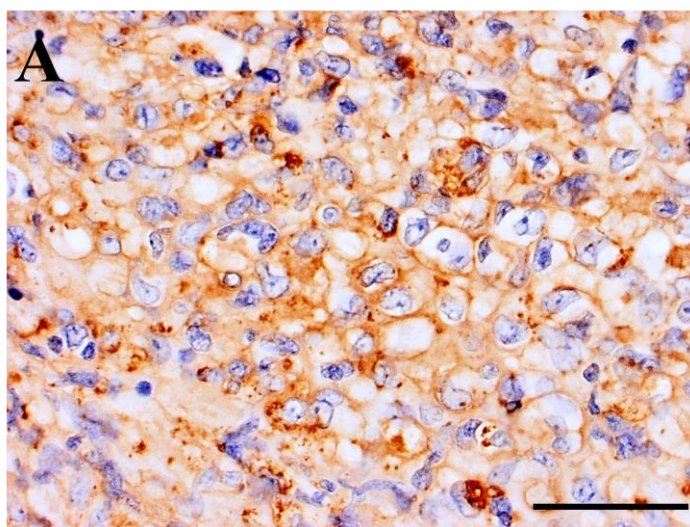


図 15. イヌの UDTc

腫瘍細胞間に網目状に沈着した好酸性硝子様物質は、抗 Laminin 抗体に陽性を示す粗大顆粒状物質の沈着を認め (A), 抗 Fibronectin 抗体に陽性を示すが (C), Collagen IV 抗体に陽性を示さない (B). IHC. Bar = 50 μ m.

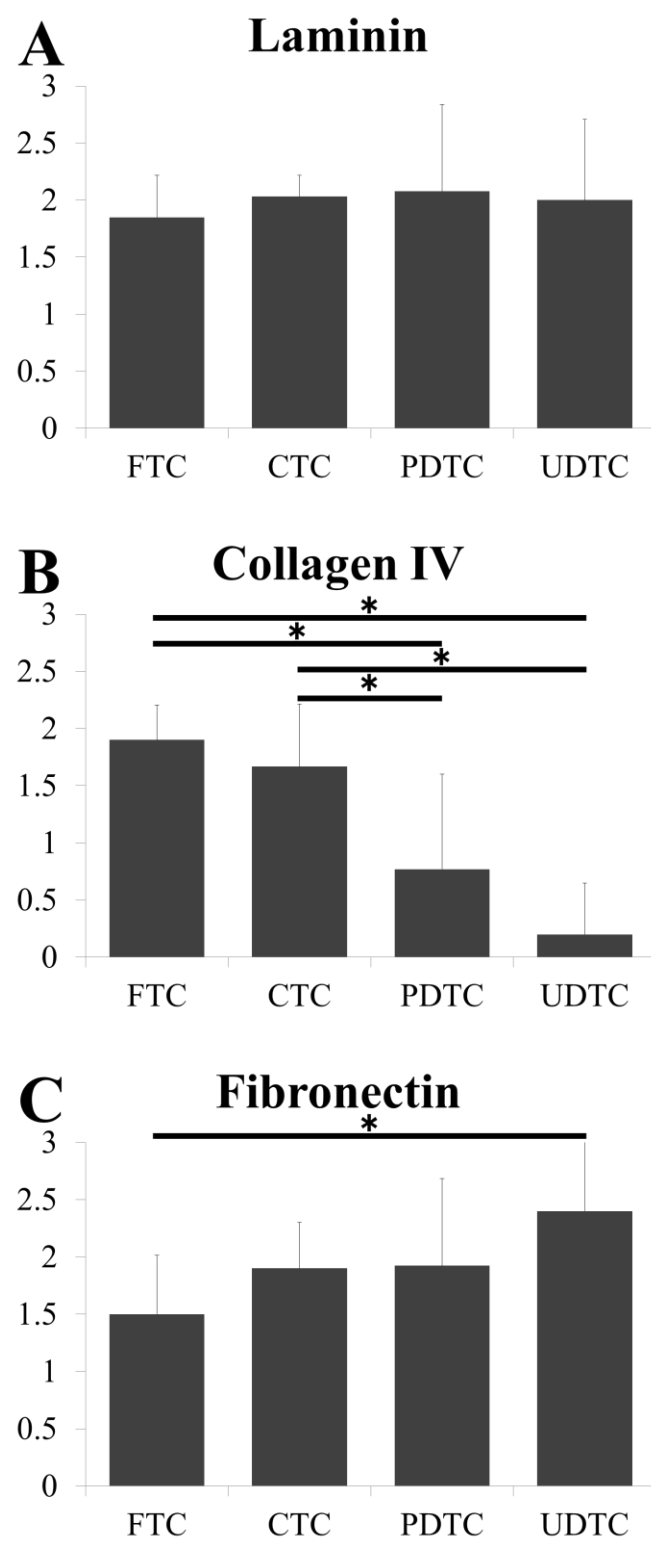


図 16. ECMs の発現スコア

A : Laminin, B : Collagen IV および C : Fibronectin. (* $P<0.05$)

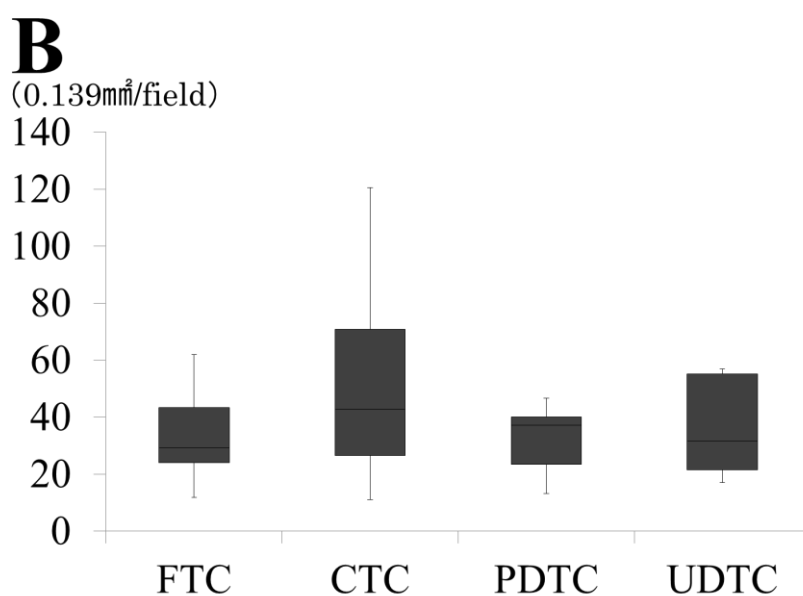
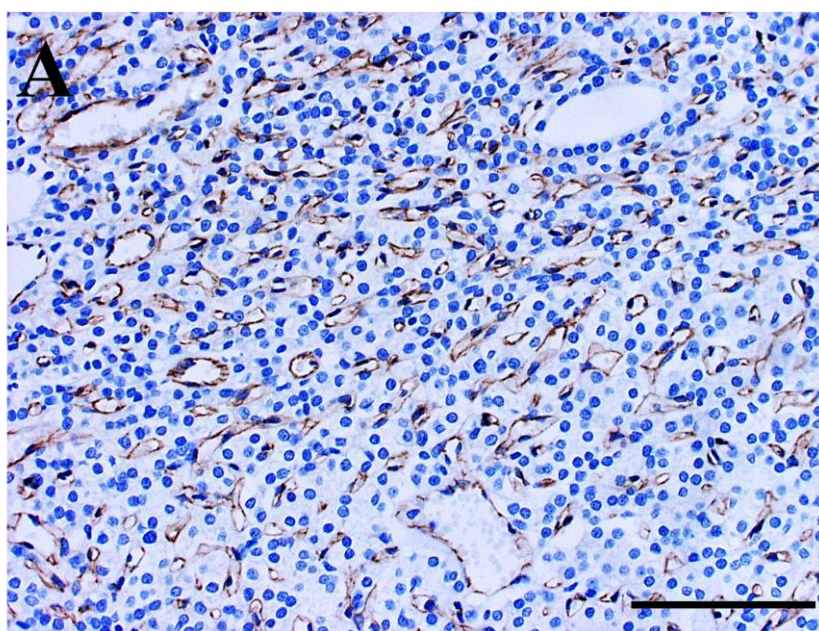


図 17. イヌの甲状腺 FC における微小血管

A. 抗 CD31 抗体は血管内皮細胞に陽性を示す. IHC. Bar = 100μm.

B. 各組織型における微小血管密度の Box plots 図. 各 Box は四分位範囲を, Box 内の線は中央値を表す. 中央線の下端と上端はそれぞれ最小値と最大値を示す.

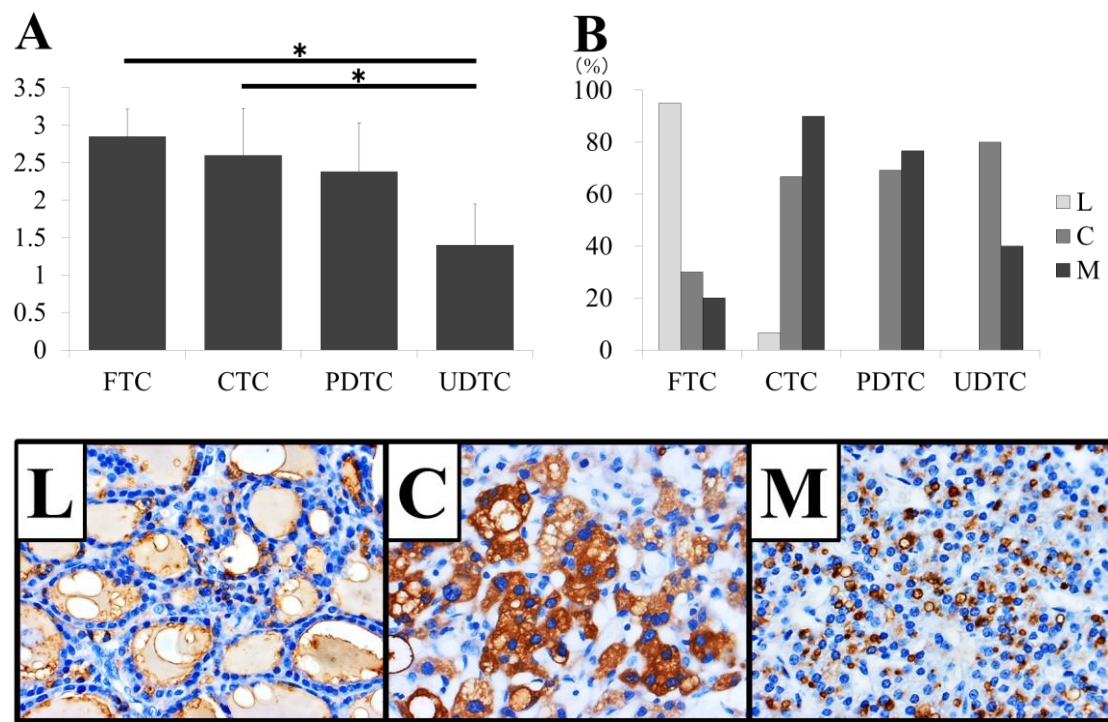


図 18. TG スコアならびに TG 発現パターン

A. TG 発現スコアの各組織型における平均値+標準偏差を示す. (* $P<0.05$)

B. TG 発現パターンの各組織型における割合を示す.

L 型：発現パターンには濾胞構造内腔側に陽性を示す.

C 型：細胞質にび漫性の陽性を示す.

M 型：細胞質内の微小濾胞内に陽性を示す.

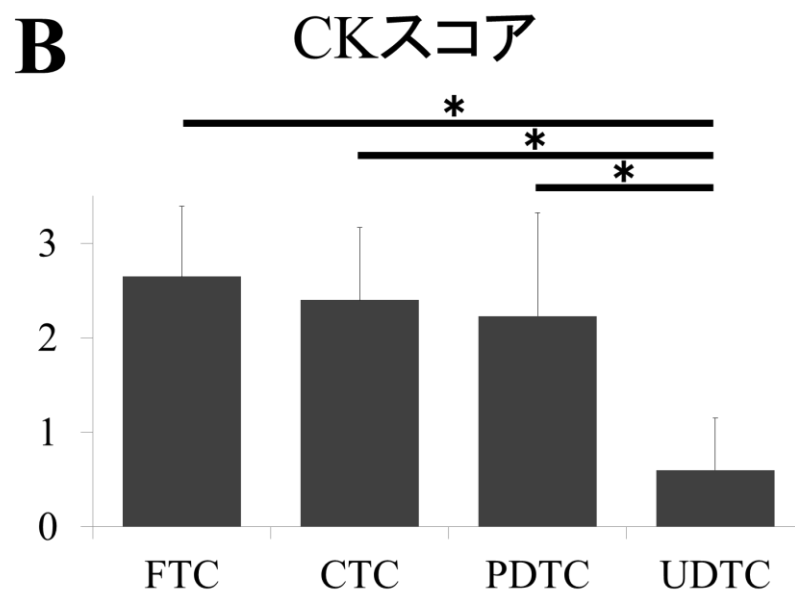
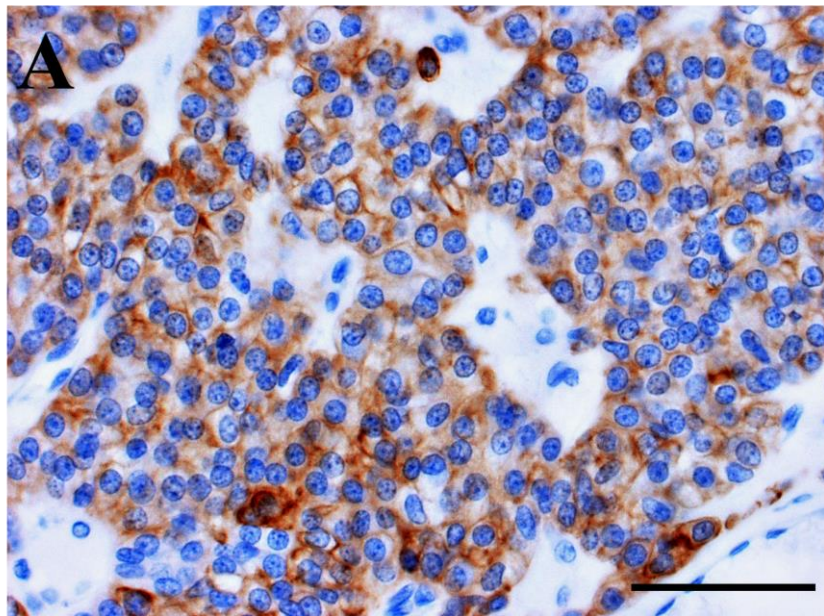


図 19. イヌの甲状腺 FC における CK の発現

A. 抗 pan-CK 抗体は腫瘍細胞に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

B. CK 発現スコアの各組織型における平均値+標準偏差を示す. (* $P<0.05$)

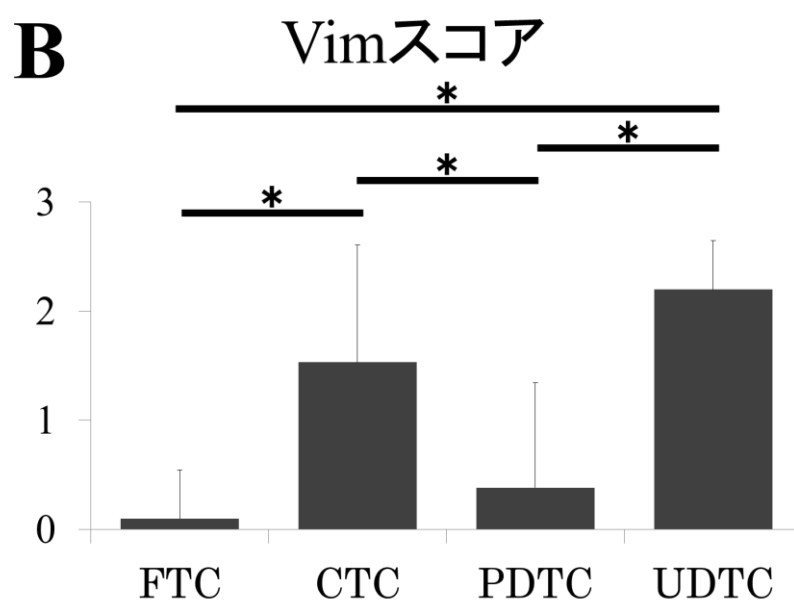
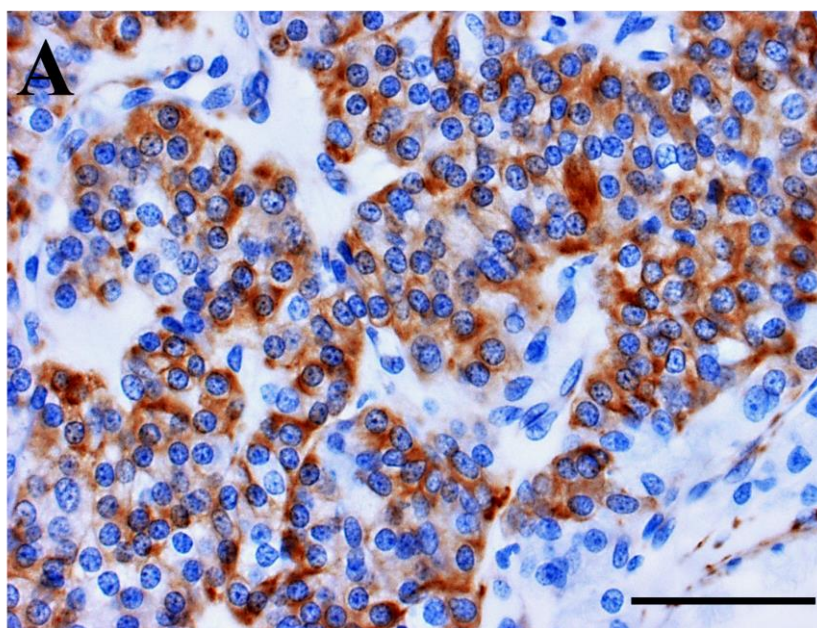


図 20. イヌの甲状腺 FC における Vim の発現

A. 抗 Vim 抗体は腫瘍細胞に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

B. Vim 発現スコアの各組織型における平均値+標準偏差を示す. (* $P<0.05$)

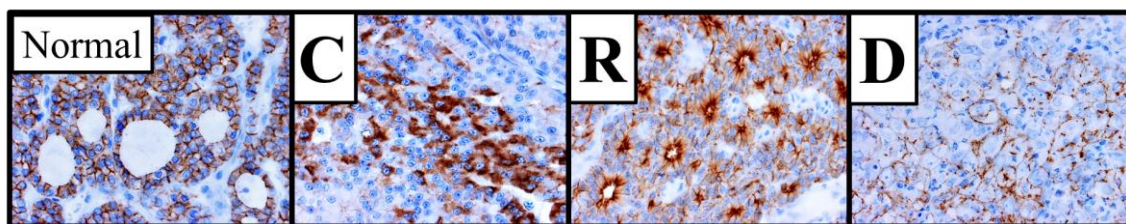
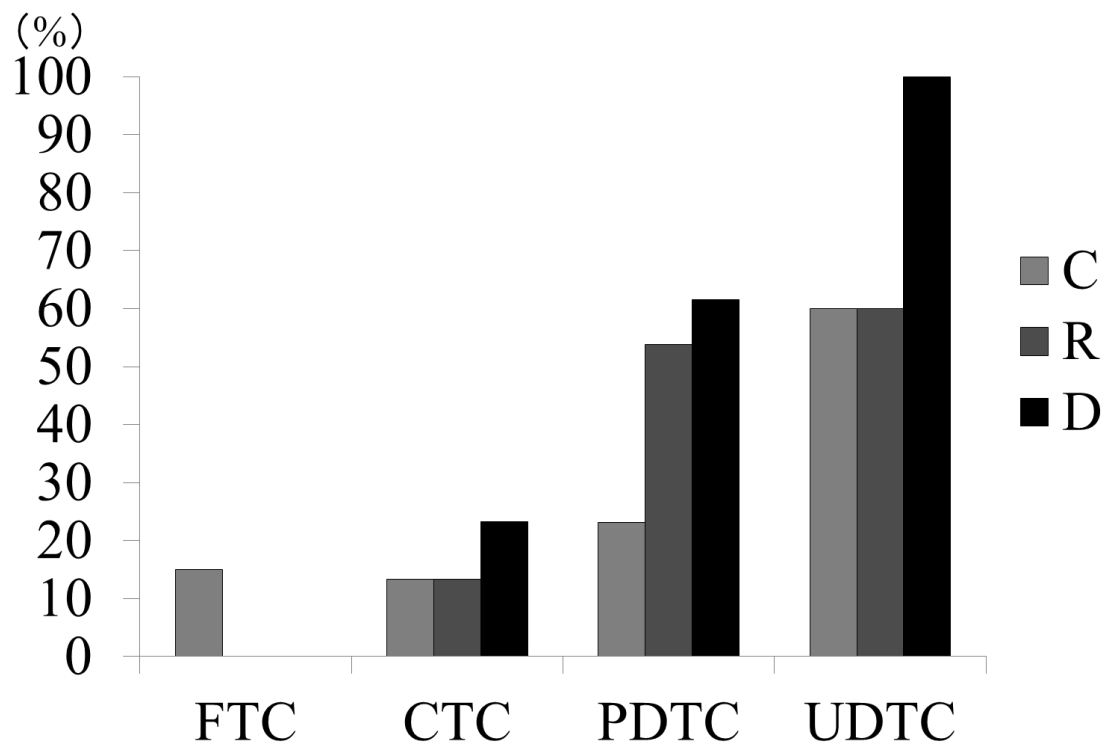


図 20. イヌの甲状腺 FC における E-cadherin の発現パターン

E-cad 発現パターンの各組織型における割合を示す.

C 型：細胞質内に陽性を示す.

R 型：微小濾胞構造の内腔側のみに発現を認める.

D 型：腫瘍細胞における発現の低下を認める.

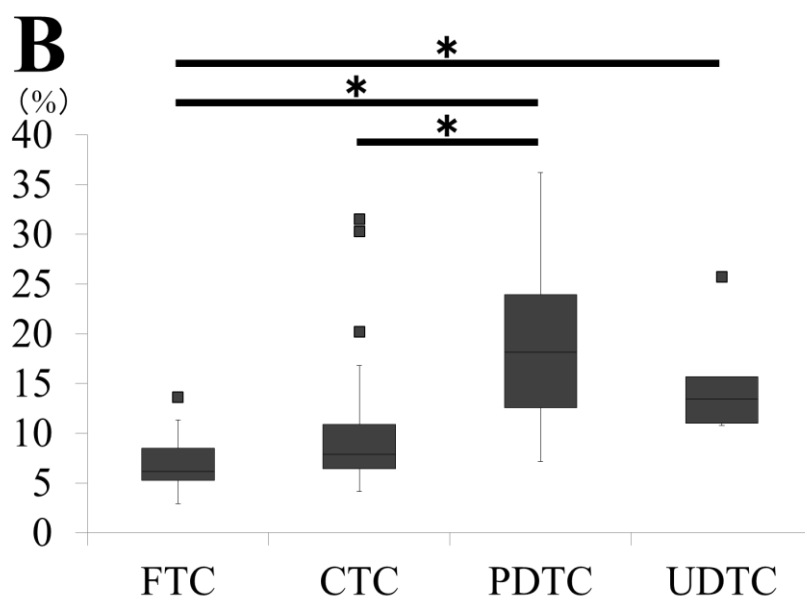
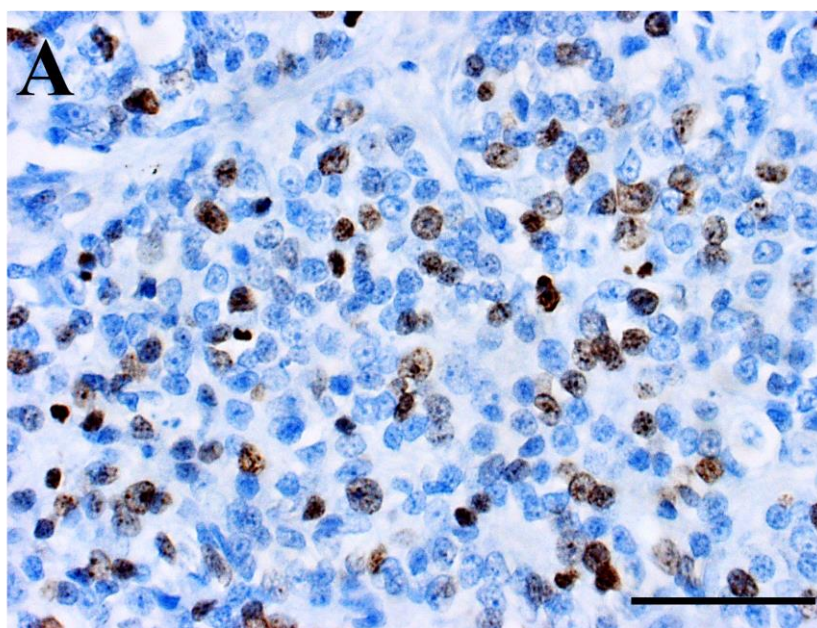


図 21. イヌの甲状腺 FC における腫瘍細胞増殖活性

A. 抗 Ki-67 抗体は増殖細胞の核に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

B. 各組織型における Ki-67 index の Box plots 図. 各 Box は四分位範囲を, Box 内の線は中央値を表す. 中央線の下端と上端はそれぞれ最小値と最大値を示す.

■は外れ値を表す. (* $P < 0.05$)

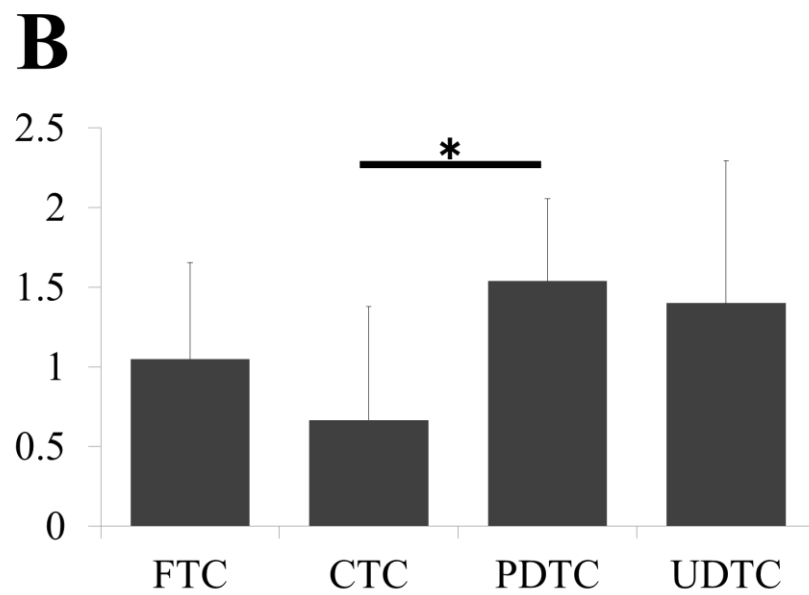
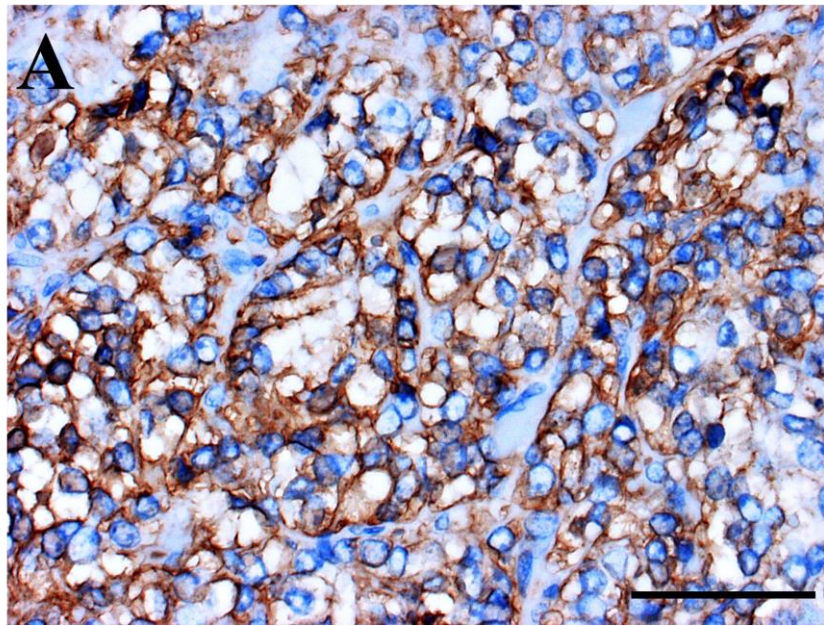


図 22. イヌの甲状腺 FC における GLUT-1 の発現

A. 抗 GLUT-1 抗体は腫瘍細胞の細胞膜上に陽性を示す. IHC. Bar = 50 μ m.

B. GLUT-1 発現スコアの各組織型における平均値+標準偏差を示す.

(* P <0.05)

第Ⅲ章

イヌの甲状腺 C 細胞癌組織における 病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索

1. 序文

イヌの甲状腺 C 細胞癌 (C-cell carcinomas; CC) は CT 産生細胞である甲状腺 C 細胞由来の悪性腫瘍である[14, 30]. 過去の報告において, 同一腫瘍組織内にいくつかの組織学的ならびに細胞学的バリエーションを認めることが知られているが, その腫瘍細胞活性との関連性は未だ不明である[31]. また, ヒトの甲状腺 CC を含め, 甲状腺 CC には組織学的分類が存在しない. 一般的に腫瘍細胞活性は腫瘍細胞自体の分化度や異型性から推測されるが, 甲状腺 C 細胞は細胞形態が単純であるため, その観点から腫瘍細胞活性を推察することはイヌの CC において困難である. この問題を解決するためには新たな観点の必要性が考えられる. 近年, 腫瘍間質と腫瘍実質細胞の密接な関連性が明らかになっていることから, 本研究では腫瘍間質型の違いが腫瘍細胞活性に関与しているか否かに着目した.

そこで本章ではイヌの甲状腺 CC の腫瘍間質における ECMs の分布ならびに構成成分と微小血管密度を比較し, さらに各組織型における腫瘍細胞自体の分化度, 中間径フィラメント, 細胞接着因子ならびに細胞増殖活性を免疫組織化学的に評価し, その関連性を検討した.

2-1. 材料ならびに病理組織学的・免疫組織学的検索

本学付属動物病院にて切除され獣医病理学教室にて CC と診断された 5 症例（4%パラフォルムアルデヒド固定）および外部病理検査施設にて CC と診断された 16 症例（10%中性ホルマリン固定）、計 21 症例のパラフィン包埋標本を用いた。得られたパラフィン包埋組織は 3 μ m の厚さに薄切し、病理組織学的検索に HE 染色ならびに PAMS を用いた。IHC には Avidin-Biotin Complex (ABC) 法を用いた。一次抗体には、ホルモン産生能を検索する目的で、ウサギ抗ヒト CT ポリクローナル抗体を用いた。ECMs の構成成分を検索する目的で、ウサギ抗ラット Laminin ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト Collagen IV ポリクローナル抗体ならびにウサギ抗ヒト Fibronectin ポリクローナル抗体を用いた。また、腫瘍間質細胞を検出するためにマウス抗ヒト α -smooth muscle actin (α -SMA) モノクローナル抗体を、微細な血管内皮細胞を検出するためマウス抗ヒト CD31 モノクローナル抗体を用いた。中間径フィラメントの検索を行うため、上皮系マーカーとしてマウス抗ヒト pan-CK モノクローナル抗体ならびに間葉系マーカーとしてマウス抗ヒト Vim モノクローナル抗体を用いた。さらに細胞接着因子の検索を行うためマウス抗ヒト E-cad モノクローナル抗体を、細胞増殖の指標としてマウス抗ヒト Ki-67 (MIB-1) モノクローナル抗体を、グルコース取り込み能の指標としてマウス抗ヒト GLUT-1 モノクローナル抗体を用いた。用いた一次抗体の詳細および反応条件は表 2 に記した。組織切片を脱パラフィン後、抗原賦活化処置を行い、内因性ペルオキシダーゼ除去のために 3%過酸化水素水溶液に 15 分浸漬した。十分に水洗後、非特異反応を抑える目的で Block Ace (Sumitomo Dainippon Pharma Co. Ltd., Hokkaido, Japan) に 37°C, 30 分間反応させた後、各一次抗体を反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体を室温で 30 分間反応させた。二次抗体にはビオチン標識抗マウス IgG ヤギポリクローナ

ル抗体およびビオチン標識抗ラビット IgG ヤギポリクローナル抗体 (Vector Laboratories Inc.. Burlingame, U.S.A) を用いた。PBS で洗浄後, VECTASTAIN ABC Elite Kit (Vector Laboratories Inc.. Burlingame, U.S.A) を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、0.005%過酸化水素含有 3, 3-diaminobenzidine (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan) 水溶液にて発色させた。水洗後、ヘマトキシリンで核染色を行った。陰性対照には一次抗体を含まない反応液を使用した。

2-2. 半定量的検索ならびに統計解析

CT, pan-CK ならびに Vim および GLUT-1 はその陽性細胞率からスコア化を $1=0-5\%$, $2=6-50\%$ ならびに $3=51-100\%$ とした。Ki-67 index は Ki-67 陽性細胞の割合 (%) を算出した。検索した組織切片中で Nikon optiphot compound brightfield microscope (Nikon, Tokyo, Japan) の 40 倍視野において最も Ki-67 index ならびに微小血管密度が多い部位を 5 視野選出 (いわゆる Hot Spot 法 [45]) し, その 5 視野の平均を, 微小血管密度に関しては 200 倍視野 ($0.139\text{ mm}^2/\text{field}$), Ki-67 index に関しては 400 倍視野で観察した後, Sony colour digital camera DXC-S500 (Sony, Tokyo, Japan) で画像を描出し, 用事にて計数し平均を求めた。これらのスコア, Ki-67 index および微小血管密度を各組織型ごとに評価し, 有意差検定にはノンパラメトリック検定 (Kruskal-Wallis test) および多重比較検定 (Steel-Dwass test) を行った。

3. 結果

3-1. 病理組織学的検索

イヌの甲状腺 CC には、その腫瘍間質の分布に大きく 3 型の種類が認められた。網状 (reticular; R) 型では腫瘍細胞が充実性増殖を示し、腫瘍細胞間に微小血管を豊富に認めた (図 23A)。PAMS では腫瘍細胞を一つないし数個単位で網状に取り囲む細網線維を認めた (図 23B)。胞巣 (nest; N) 型では微小血管ならびに紡錘形細胞を含む線維性結合組織が数十個単位の腫瘍細胞集塊を取り囲んでいた (図 24A および B)。索状 (trabecular; T) 型では膠原線維に富み微小血管を含む束状の線維性結合組織により数十個単位の腫瘍細胞集塊が束状に区画されていた (図 25A および B)。これらは同一切片内に混在して認められ、その組み合わせから 21 症例の CC は、①R 型と N 型の間質型が混在する R/N バリエーション 7 症例、②N 型の間質型のみで構成される simple N バリエーション 7 症例ならびに③T 型と N 型の間質型が混在する T/N バリエーション 7 症例に分類された。以降に行った統計学的検索はこの組織バリエーションごとに比較を行った。

積極的な被膜浸潤を示す症例は R/N バリエーション 2 症例に認められた。比較的大きな血管への浸潤像は 5 症例 (R/N2 症例, simple N2 症例ならびに T/N1 症例) に認められ、微小血管への浸潤像は全ての症例に認められた。10 視野当たり 5 個以上の核分裂像を認める症例は 13 症例 (R/N3 症例, simple N4 症例ならびに T/N6 症例) であった。

3-2. 免疫組織化学的検索

3-2-1. ECMs ならびに α -SMA の免疫組織化学的発現

R 型では PAMS 陽性部位に一致して腫瘍細胞を一つないし数個単位で網状に取り囲む細網線維および腫瘍細胞間の間質細胞に抗 Laminin、Collagen IV ならびに Fibronectin 抗体の陽性像を認めた (図 26A-C). 腫瘍細胞間に抗 α -SMA 抗体に陽性を示す樹状の細胞質突起を有する細胞が散在性に認められた (図 29A). N 型では胞巣状腫瘍細胞集塊を取り囲むように抗 Laminin, Collagen IV ならびに Fibronectin 抗体の陽性像を認め (図 27A-C), 同部位に単層から数層の抗 α -SMA 抗体に陽性を示す紡錘形細胞を認めた (図 29B). T 型では腫瘍細胞集塊間に存在する成熟した膠原線維束に抗 Laminin, Collagen IV ならびに Fibronectin 抗体の陽性像を認め (図 28A-C), 同部位に抗 α -SMA 抗体に陽性を示す紡錘形細胞の束状配列を認めた (図 29C).

3-2-2. 微小血管密度

抗 CD31 抗体は腫瘍細胞集塊間に分布する微小血管ならびに腫瘍組織を構成する線維性結合組織内に分布する細動脈, 細静脈の血管内皮細胞に陽性を示した. R 型では多数の抗 CD31 抗体陽性細胞が腫瘍細胞集塊内に散在性に認められ, その分布は抗 α -SMA 抗体に陽性を示す間質細胞の分布と類似していた (図 30A および B). N 型では抗 CD31 抗体陽性細胞が腫瘍細胞集塊を全周性に取り囲み, その分布は抗 α -SMA 抗体に陽性を示す間質細胞の分布と一致していた (図 31A および B). T 型では抗 CD31 抗体陽性細胞が成熟した膠原線維に分岐に乏しい血管を構成し, その分布は抗 α -SMA 抗体に陽性を示す間質細胞の分布と一致していた (図 32A および B). 微小血管密度の平均 \pm 標準偏差は, R/N バリエーションで 38.3 ± 11.4 , simple N バリエーションで 27.4 ± 12.4 ならびに

T/N バリエーションで 19.8 ± 7.6 であり, R/N バリエーションと T/N バリエーションの間に有意な差 ($P=0.028$) が認められた (図 33).

3-2-3. Calcitonin の免疫組織化学的発現

抗 CT 抗体は腫瘍細胞の細胞質に顆粒状に陽性を示した. CT スコアの平均±標準偏差は, R/N バリエーションで 2.14 ± 0.38 , simple N バリエーションで 2.43 ± 0.20 および T/N バリエーションで 2.43 ± 0.20 であり, 各バリエーションで間に有意な差は認められなかった (図 34).

3-2-4. 中間径フィラメントの免疫組織化学的発現

抗 pan-CK 抗体は全ての症例で腫瘍細胞に陽性を示した. CK スコアの平均±標準偏差は, R/N バリエーションで 3.00 ± 0.00 , simple N バリエーションで 3.00 ± 0.00 および T/N バリエーションで 2.43 ± 0.98 であり, 各バリエーションで間に有意な差は認められなかった (図 35).

抗 Vim 抗体に陽性を示す細胞は認められなかった.

3-2-5. E-cadherin の免疫組織化学的発現

全ての症例で腫瘍細胞間に陽性像が認められ, 発現異常を示唆する所見は得られなかった.

3-2-6. 腫瘍細胞増殖活性

Ki-67 index (%) の平均±標準偏差は、R/N バリエーションで 15.6 ± 2.3 , simple N バリエーションで 7.3 ± 4.2 および T/N バリエーションで 8.9 ± 3.8 であり、R/N バリエーションと他の組織型との間に有意な差(vs. simple N: $P=0.007$ および vs. T/N : $P=0.03$) が認められた (図 36A および B).

3-2-7. GLUT-1 の免疫組織化学的発現

抗 GLUT-1 抗体の陽性像は細胞膜上に限局して認められた. GLUT-1 スコアの平均±標準偏差は、R/N バリエーションで 1.29 ± 0.95 , simple N バリエーションで 0.43 ± 0.79 および T/N バリエーションで 1.00 ± 1.00 であり、各バリエーションで間に有意な差は認められなかった (図 37A および B).

4. 考察

本研究からイヌの甲状腺 CC における腫瘍間質の詳細な構成とそれらのバリエーションが明らかになった. ヒトならびにイヌの甲状腺 CC における過去において組織学的多様性は確認されているが、それらと腫瘍細胞活性に関する知見は明らかにされていない[31, 34]. 本研究において、腫瘍細胞の増殖様式や核分裂像ならびに腫瘍細胞における CT 発現や中間径フィラメントの発現と各組織バリエーションとの関連性は認められなかった. 一般的に腫瘍の組織学的分類は腫瘍実質細胞の異型性や分化度ならびに細胞形態に基づいて行われるが、甲状腺 C 細胞においてそれらとの関連性が低いことが考えられた. そのため、本研究でイヌの甲状腺 CC の組織学的分類を行う上で新たな観点を提案した.

R 型間質には非常に豊富な微小血管が認められることが明らかになったが、その繊細さから HE 染色では判別が困難であった. そのため PAMS が病理組織

学的検索において非常に有効な手段であった。樹状の細胞質突起を持つ α -SMA 陽性間質細胞の分布が微小血管と密接に関わっており、この所見から血管周皮細胞と考えられる[26]この α -SMA 陽性間質細胞が R 型間質の血管新生に大きく関与することが示唆された。N 型間質は本研究において最も頻繁に認められた間質型であり、過去のイヌの甲状腺 CC における報告内で言及されている『typical type (古典的組織型)』と類似性が認められた[31]。R 型間質を有する症例の全てで N 型間質の混在が認められたことから、腫瘍細胞間に微小血管が侵入するかどうかそれらの間質型を規定することが予想された。N 型間質においても α -SMA 陽性間質細胞の分布が微小血管と密接に関わっており、R 型間質と同様にこの間質細胞が血管新生に大きく関与していることが示唆された。T 型間質は成熟した膠原線維から構成される腫瘍間質を特徴としており、N 型間質との混在が認められた。N 型間質に認められる α -SMA 陽性間質細胞と比較すると形態学的に筋線維芽細胞が想定され、さらに顕著な血管新生を伴っていないことから腫瘍間質における線維増生 (desmoplastic reaction) が N 型間質から T 型間質への移行に関与していることが示唆された。また、いずれの間質型においても α -SMA 陽性間質細胞は ECMs 構成成分である Laminin, Collagen IV ならびに Fibronectin を発現していることから、この α -SMA 陽性間質細胞がイヌの甲状腺 CC における間質型の構成を決定する大きな要因である可能性が考えられた。

本研究からイヌの甲状腺 CC における腫瘍間質バリエーションと細胞増殖活性との関連性が明らかになった。一般的に腫瘍細胞の核分裂像は腫瘍細胞増殖の指標と考えられるが、イヌの甲状腺 CC ではそれらを検出することが困難であった。Ki-67 は細胞分裂周期の全ての段階で発現することが知られている。その点を考慮すると、イヌの甲状腺 CC における腫瘍細胞の多くは有糸分裂期ではなく間期の段階にいたることが予想され、本研究における間質型バリエーションに

基づく分類は腫瘍細胞増殖活性の指標になり得ることが考えられた。R 型間質を有する症例で腫瘍細胞増殖活性が有意に高いことから、イヌの甲状腺 CC において α -SMA 陽性間質細胞の特徴が腫瘍細胞活性に関与する可能性も示唆された。

GLUT-1 はイヌの乳腺腫瘍、悪性黒色ならびに組織球肉腫など腫様々な腫瘍で発現していることが報告されている [1, 11, 38]。本研究では R/N 型や T/N 型の腫瘍間質を持つ腫瘍細胞が simple N 型の間質を持つ腫瘍細胞に比べて GLUT-1 の発現が高い傾向にあり、GLUT-1 の発現が腫瘍間質の環境を反映することが示唆された。GLUT-1 は主要なグルコース輸送体であり、腫瘍細胞が低栄養状態に抵抗するために重要な役割を果たしていると考えられている[36]。

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) は低酸素感受性蛋白質であり、GLUT-1 や血管新生促進因子である vascular endothelial growth factors (VEGFs) の発現も調節することが知られている[36]。イヌの甲状腺 CC において検索した全ての症例に VEGF の高発現が認められたとの報告があり[4]、GLUT-1 も同様の発現傾向にあることが予想されたが、本研究では症例ごと、あるいは同一症例でも領域ごとにその発現に差が認められた。このことから、イヌの甲状腺 CC における GLUT-1 の発現は VEGF とは異なるメカニズムで調節されている可能性が示唆された。

本研究から、イヌの甲状腺 CC の腫瘍間質には 3 種類の型があり、その組み合わせにより 3 種類の間質バリエーションが存在することが明らかになった。さらにその間質バリエーションによって腫瘍細胞増殖活性や腫瘍細胞の GLUT-1 の発現に差が認められ、これらは腫瘍実質細胞自体の特徴からは推察が困難であることが示唆された。以上のことから、イヌの甲状腺 CC における腫瘍間質の違いによる組織型分類が新たな分類法となる可能性が考えられた。

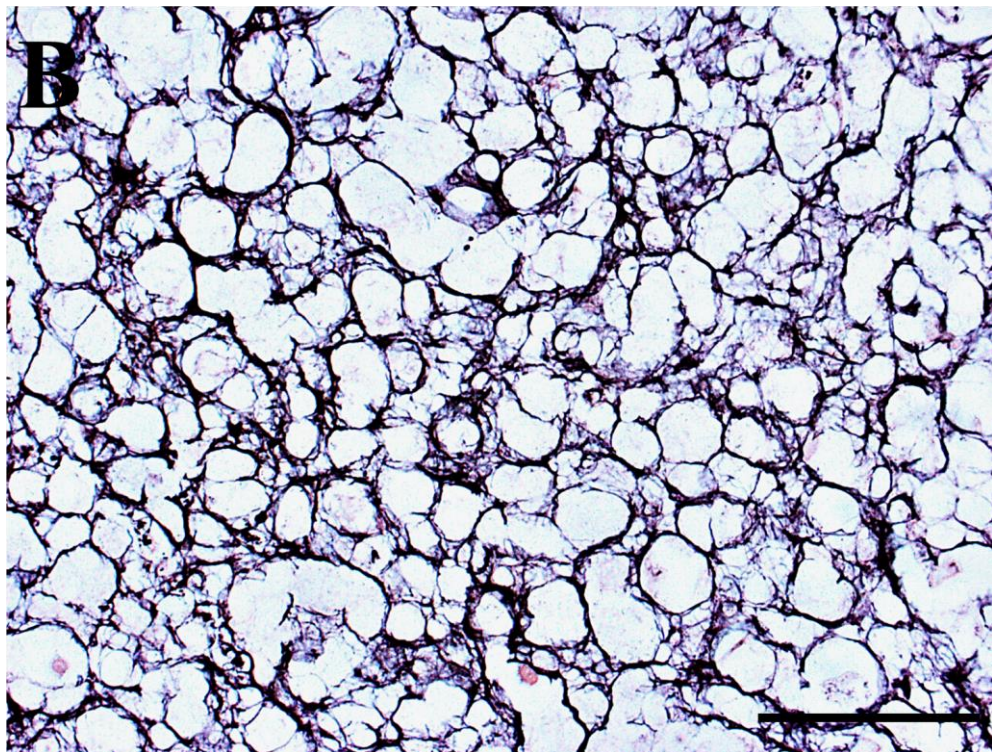
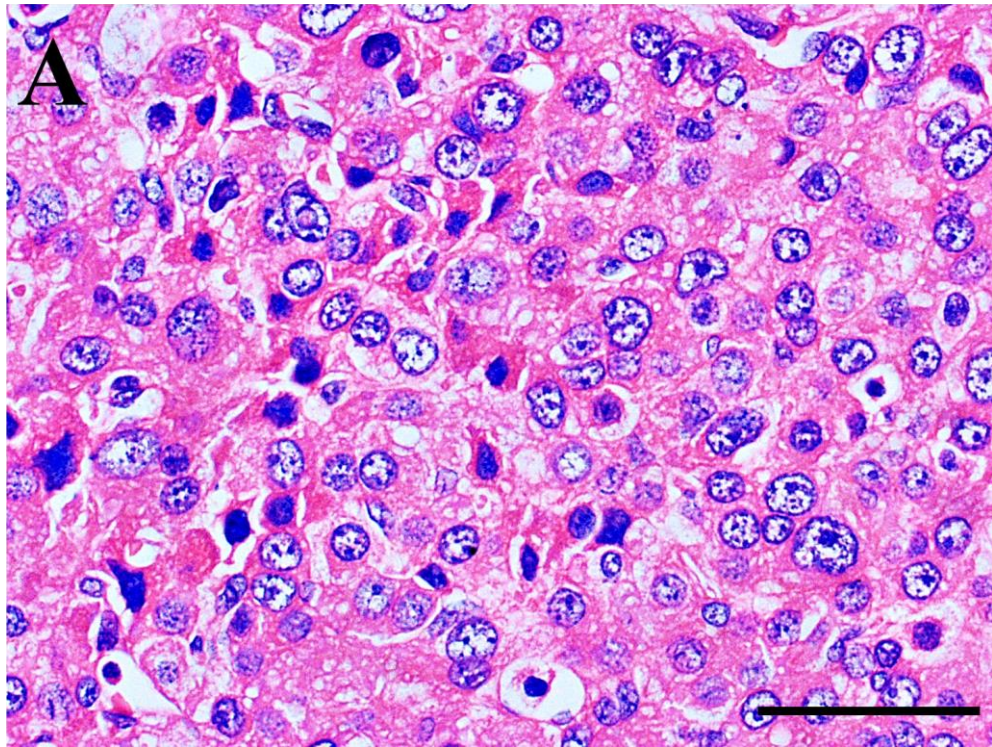


図 23. イヌの甲状腺 CC における R 型間質

A. 腫瘍細胞が充実性増殖を示し, 腫瘍細胞間に微小血管を豊富に認める. HE.

Bar=50 μ m.

B. 腫瘍細胞を一つないし数個単位で網状に取り囲む細網線維を認める. PAMS.

Bar=50 μ m.

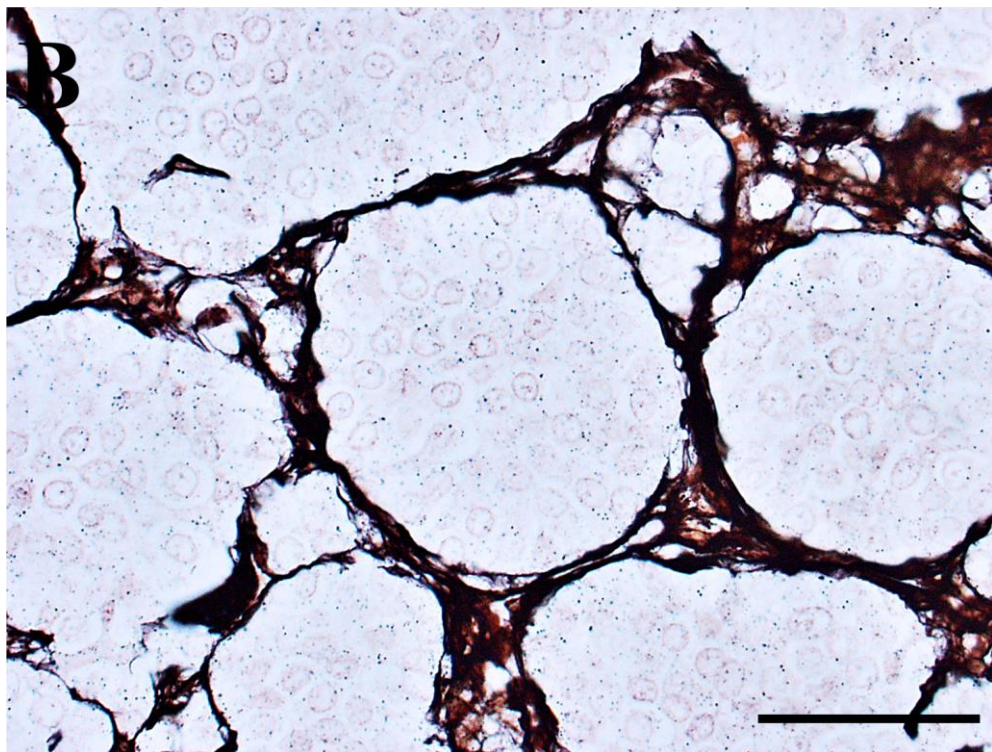
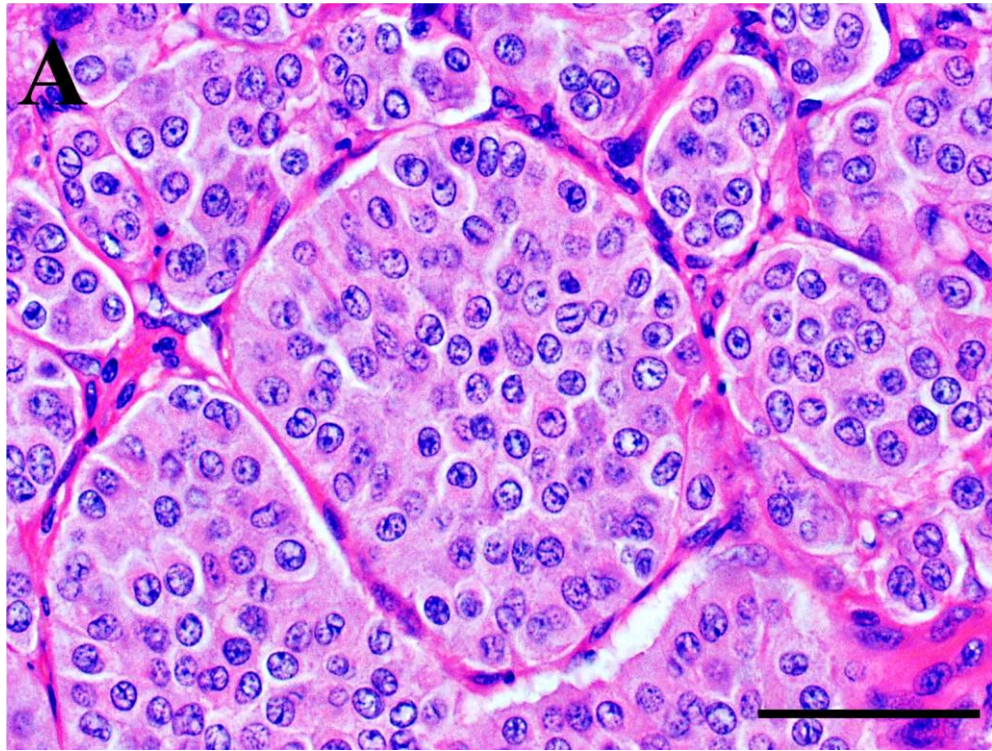


図 24. イヌの甲状腺 CC における N 型間質

A. 線維性結合組織により胞巣状に区画された腫瘍細胞集塊を認める. HE.

Bar=50 μ m.

B. 膠原線維が腫瘍細胞集塊を胞巣状に取り囲む. PAMS. Bar=50 μ m.

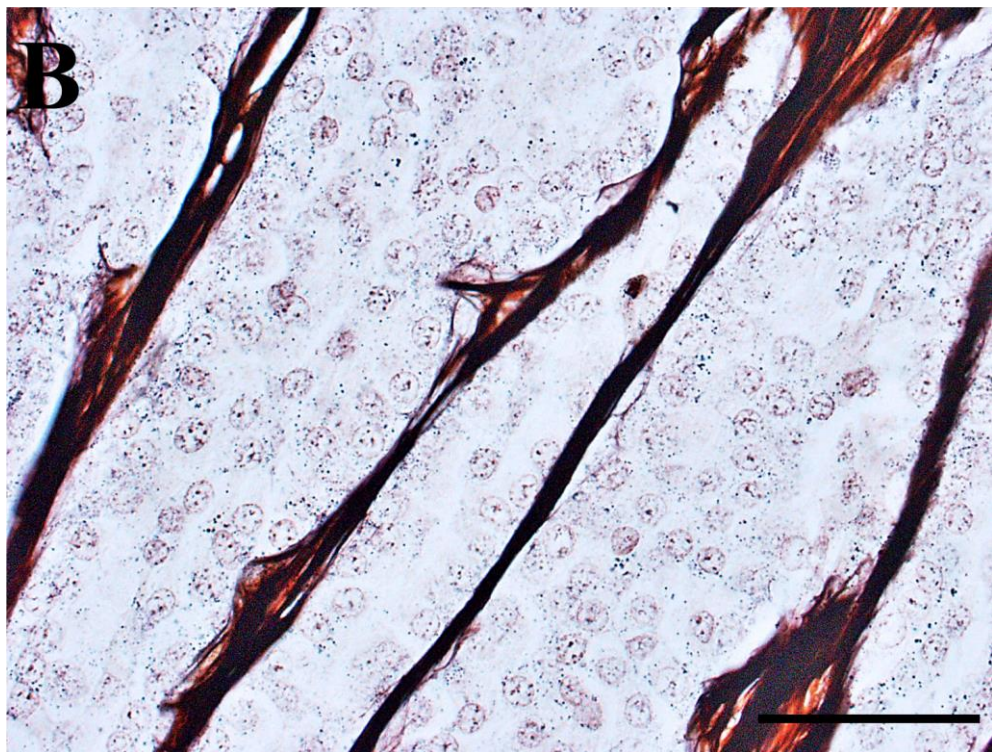
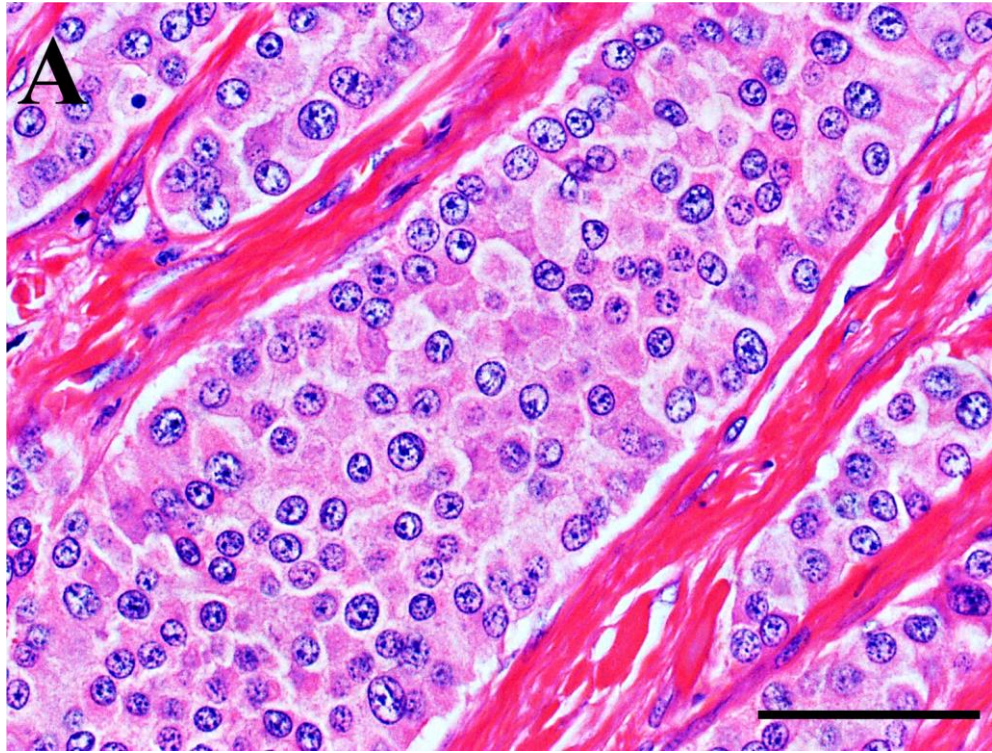


図 26. イヌの甲状腺 CC における T 型間質

A. 微小血管を含む束状の線維性結合組織により索状に区画された腫瘍細胞集塊を認める. HE. Bar=50 μ m.

B. 膠原線維に富む束状の線維性結合組織を認める. PAMS. Bar=50 μ m.

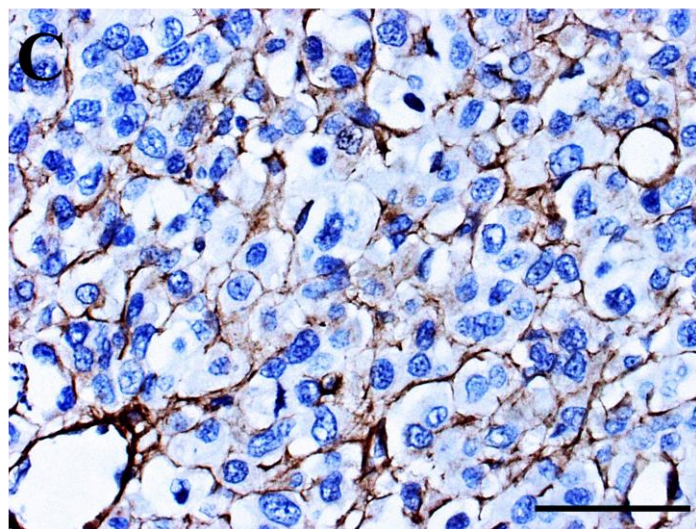
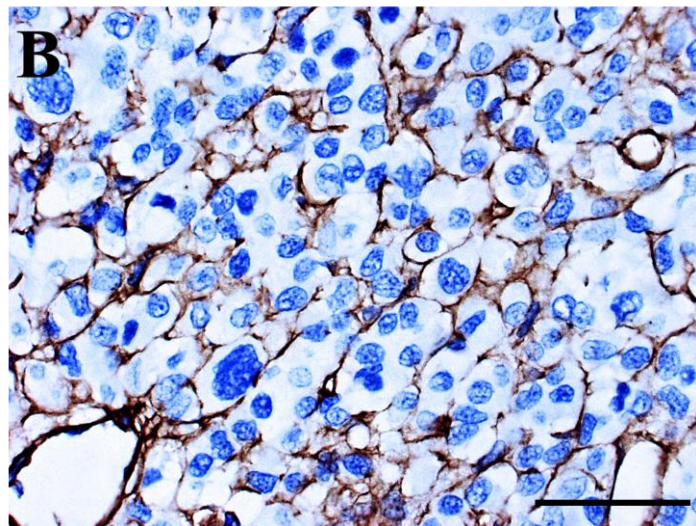
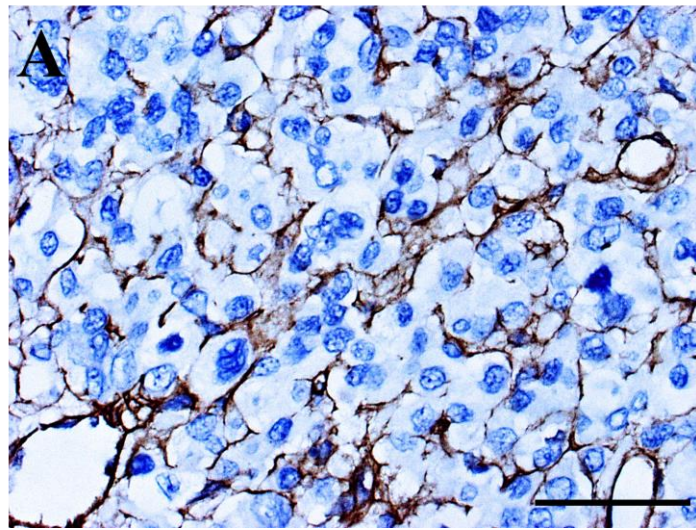


図 27. イヌの甲状腺 CC における R 型間質

腫瘍細胞間に認められる細網線維ならびに間質細胞は抗 Laminin (A), Collagen IV (B) ならびに Fibronectin (C) 抗体に陽性を示す. IHC. Bar=50 μ m.

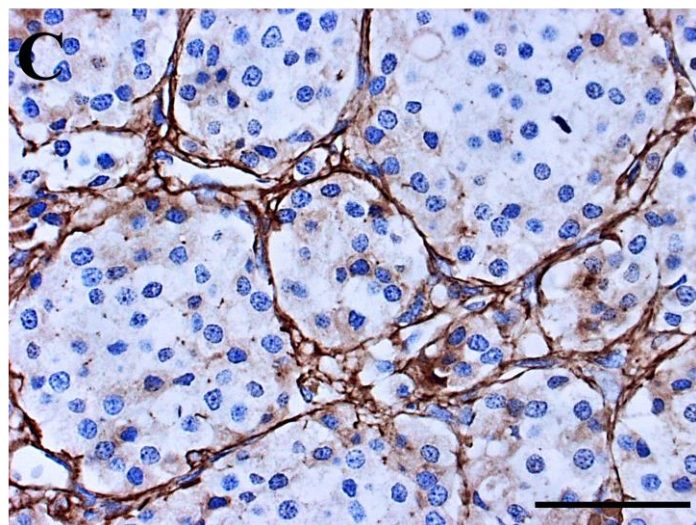
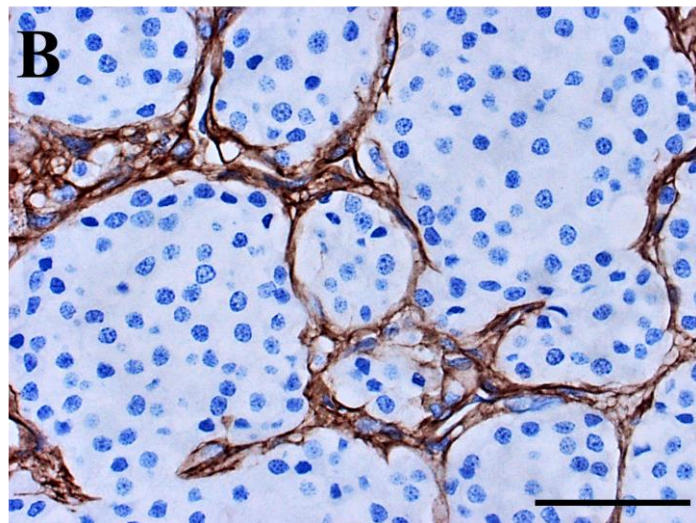
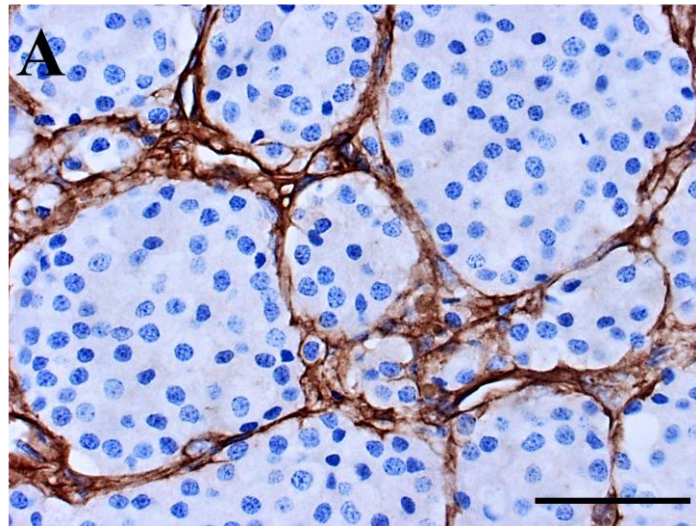


図 27. イヌの甲状腺 CC における N 型間質
腫瘍細胞集塊を胞巣状に取り囲む膠原線維ならびに間質細胞は抗 Laminin (A),
Collagen IV (B) ならびに Fibronectin (C) 抗体に陽性を示す. IHC.
Bar=50 μ m.

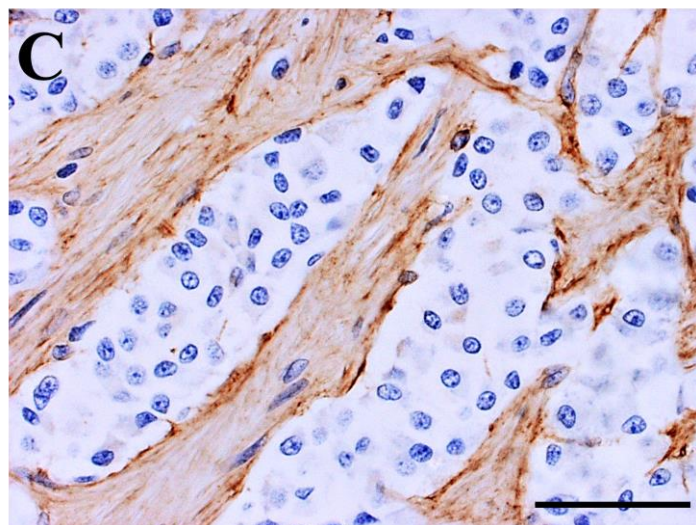
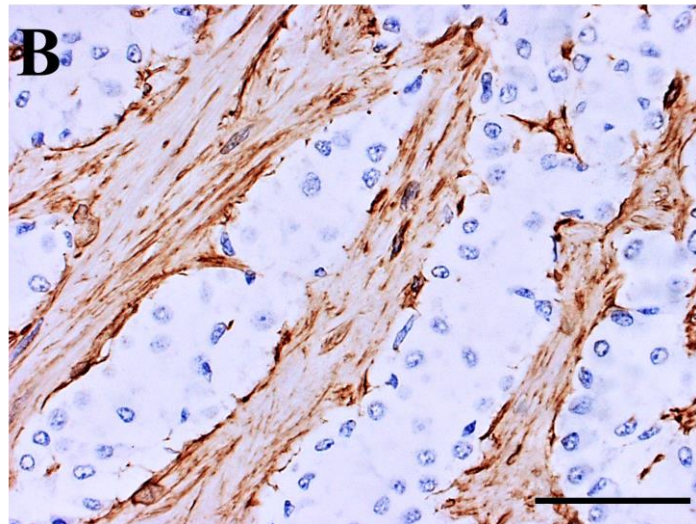
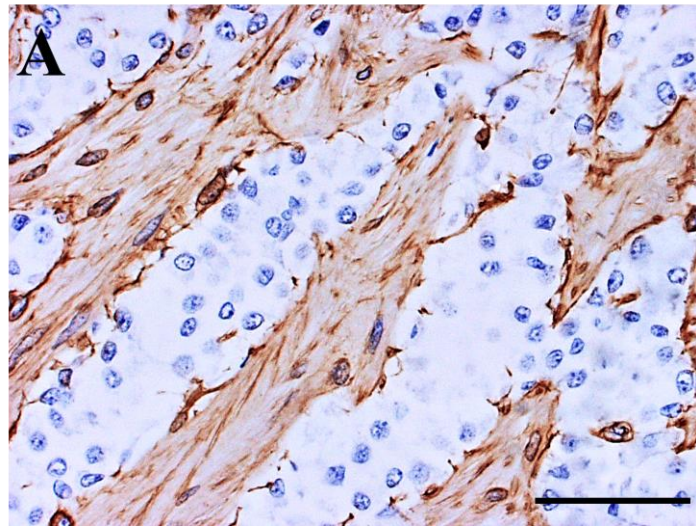


図 27. イヌの甲状腺 CC における T 型間質

腫瘍細胞集塊間に認められる膠原線維束ならびに間質細胞は抗 Laminin (A), Collagen IV (B) ならびに Fibronectin (C) 抗体に陽性を示す. IHC.

Bar=50 μ m.

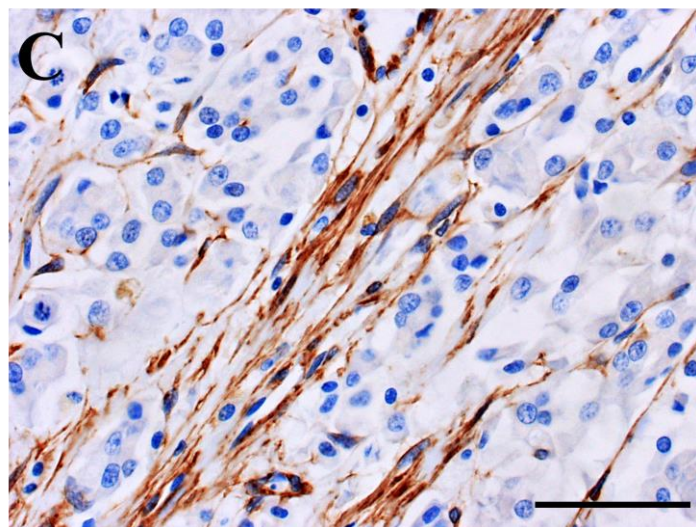
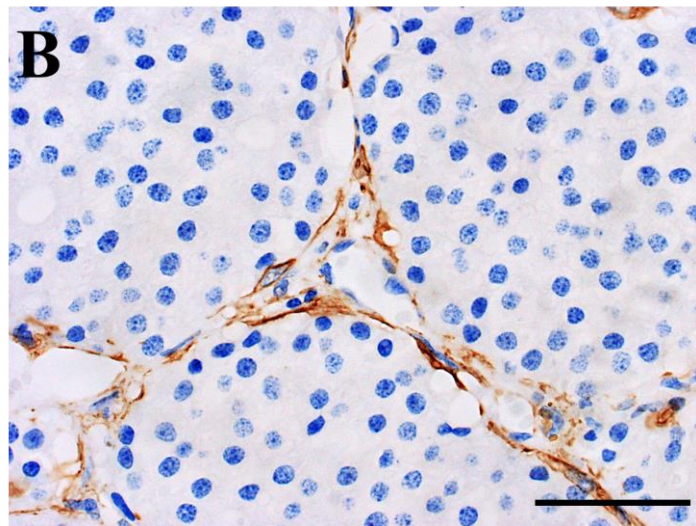
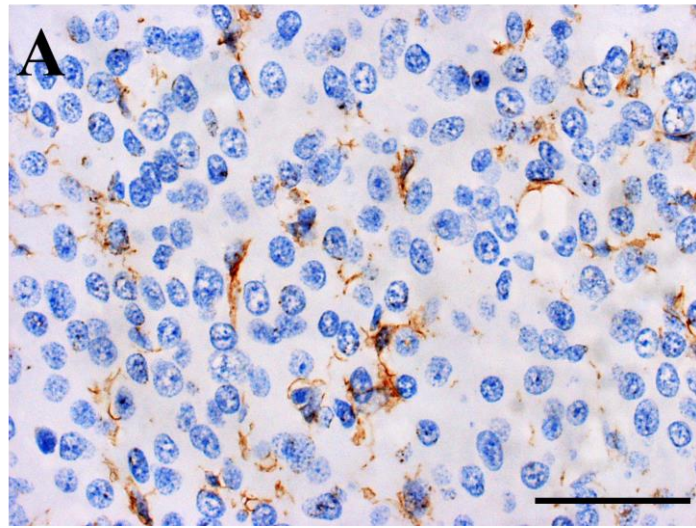


図 29. イヌの甲状腺 CC における抗 α -SMA 抗体陽性間質細胞

A. R 型間質に認められる抗 α -SMA 抗体陽性間質細胞は樹状の細胞質突起を有する. IHC. Bar=50 μ m.

B. N 型間質に認められる抗 α -SMA 抗体陽性間質細胞は紡錘形を示し, 単層から数層の細胞層を形成する. IHC. Bar=50 μ m.

C. T 型間質に認められる抗 α -SMA 抗体陽性間質細胞は紡錘形を示し, 束状配列を形成する. IHC. Bar=50 μ m.

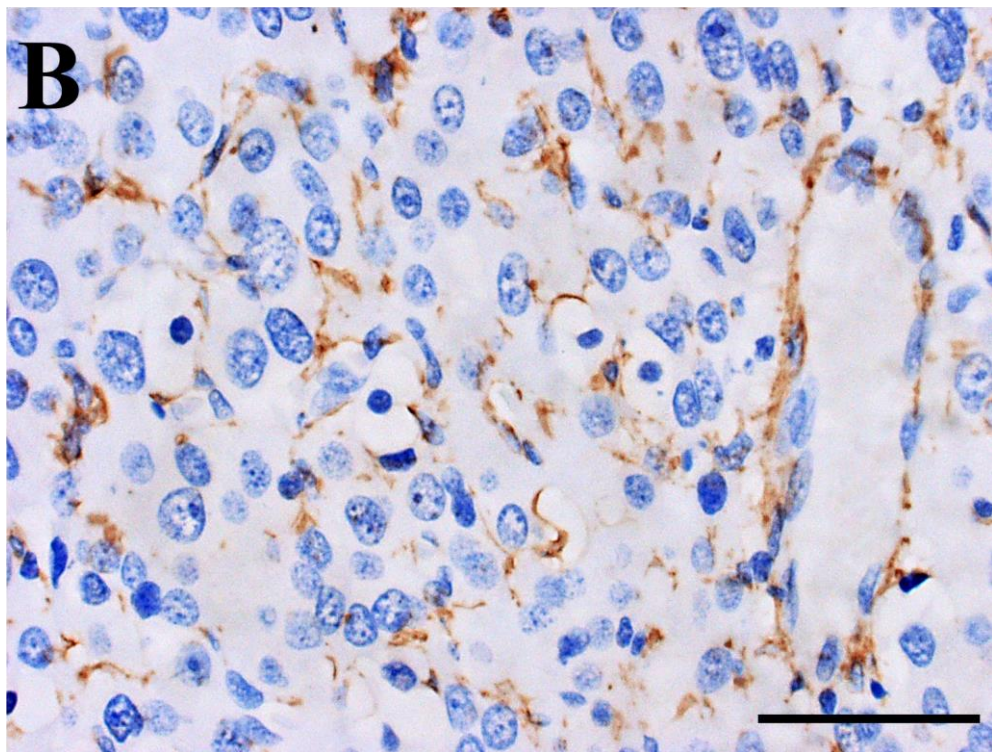
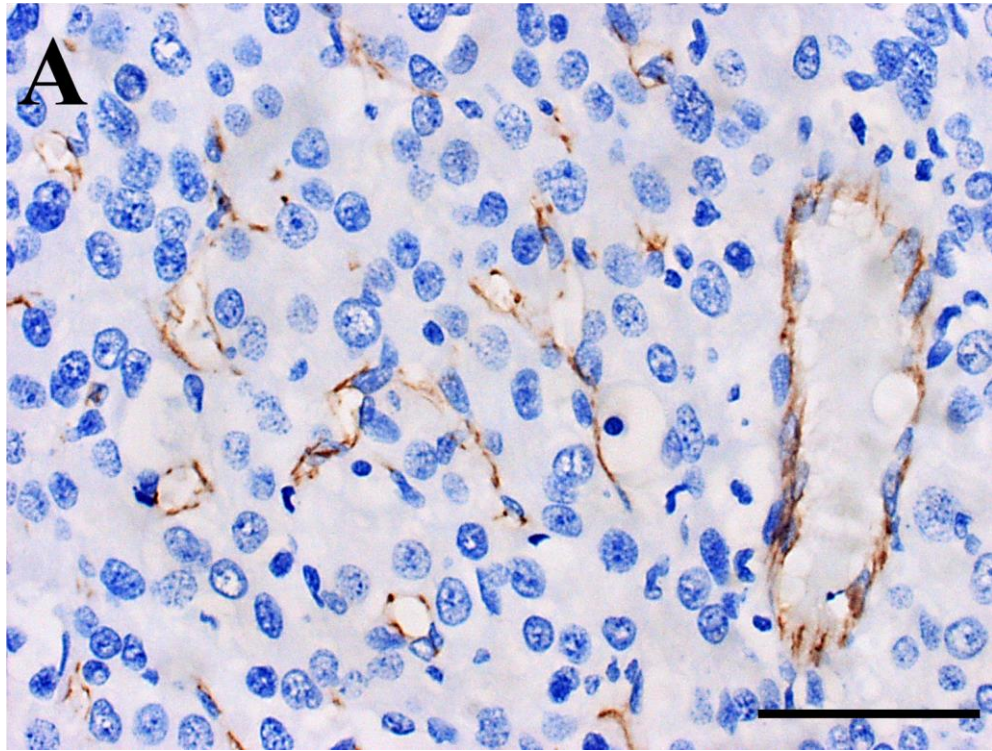


図 30. イヌの甲状腺 CC における R 型間質

抗 CD31 抗体陽性血管内皮細胞は腫瘍細胞間に散在性に認められ (A), その分布は抗 α -SMA 抗体陽性間質細胞と一致する (B). IHC. Bar=50 μ m.

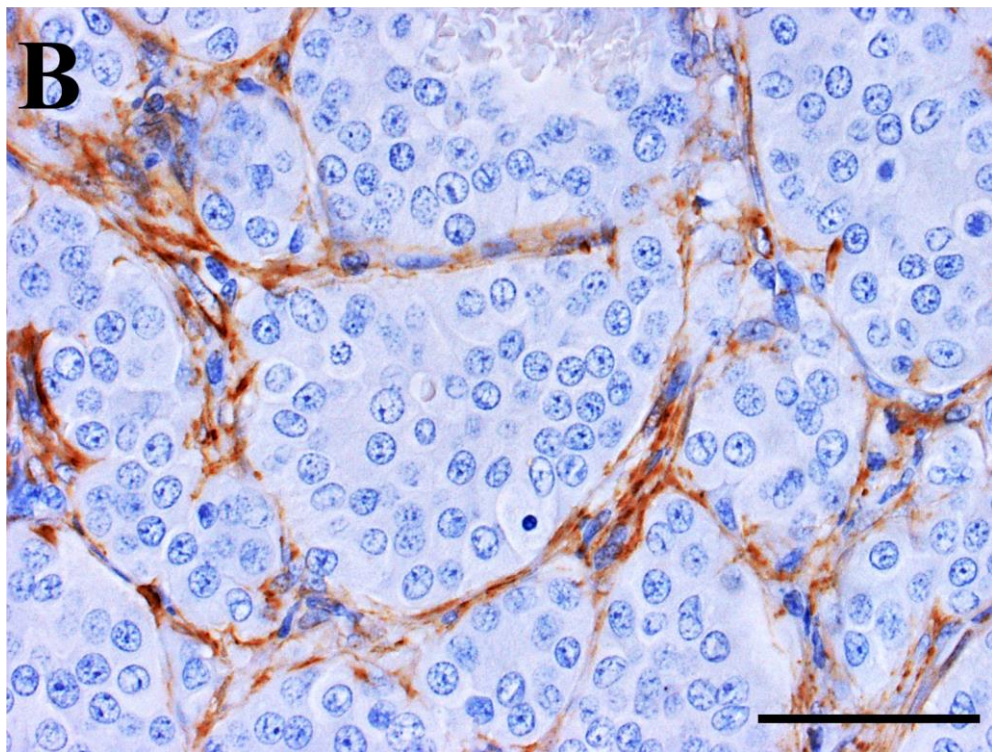
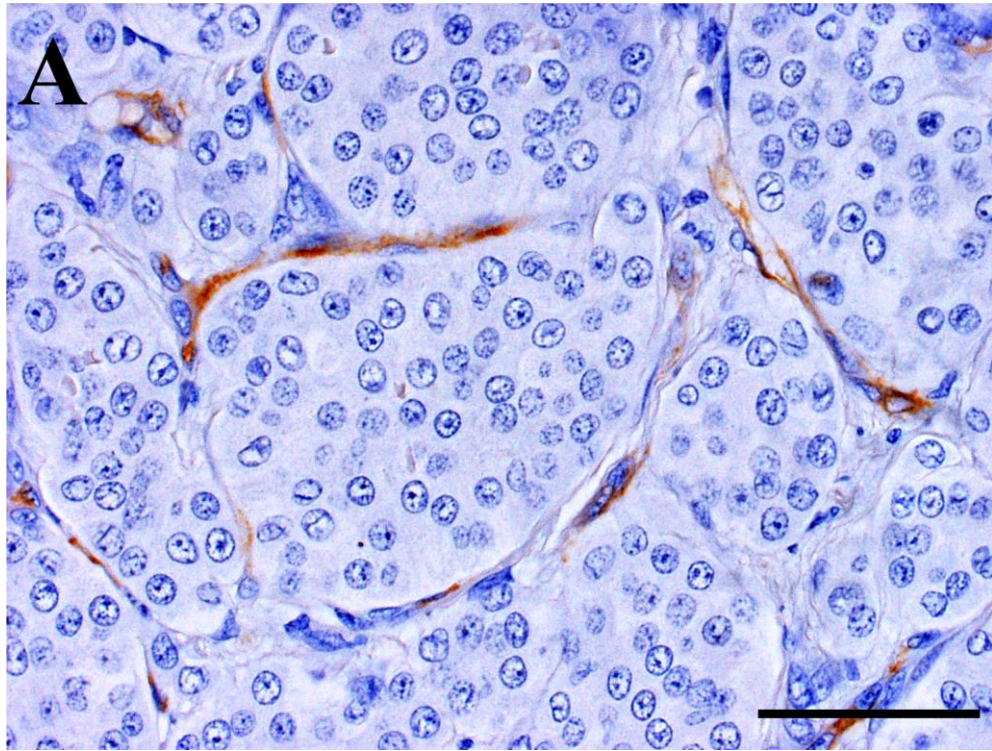


図 31. イヌの甲状腺 CC における N 型間質

抗 CD31 抗体陽性血管内皮細胞は腫瘍細胞集塊を取り囲み (A), その分布は抗 α -SMA 抗体陽性間質細胞と一致する (B). IHC. Bar=50 μ m.

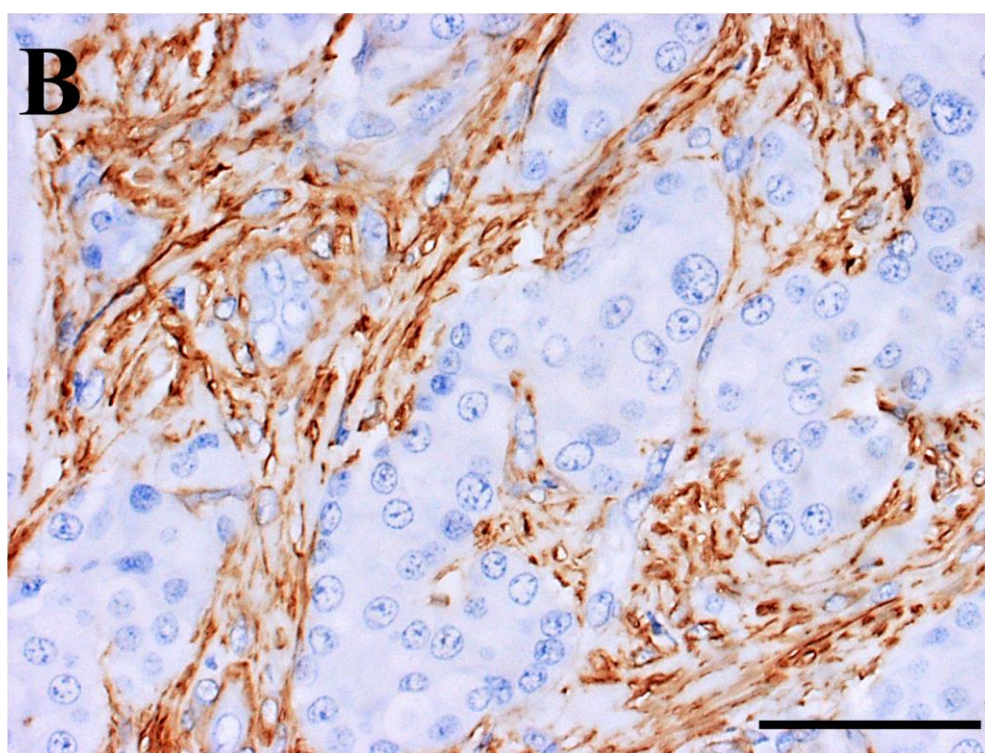
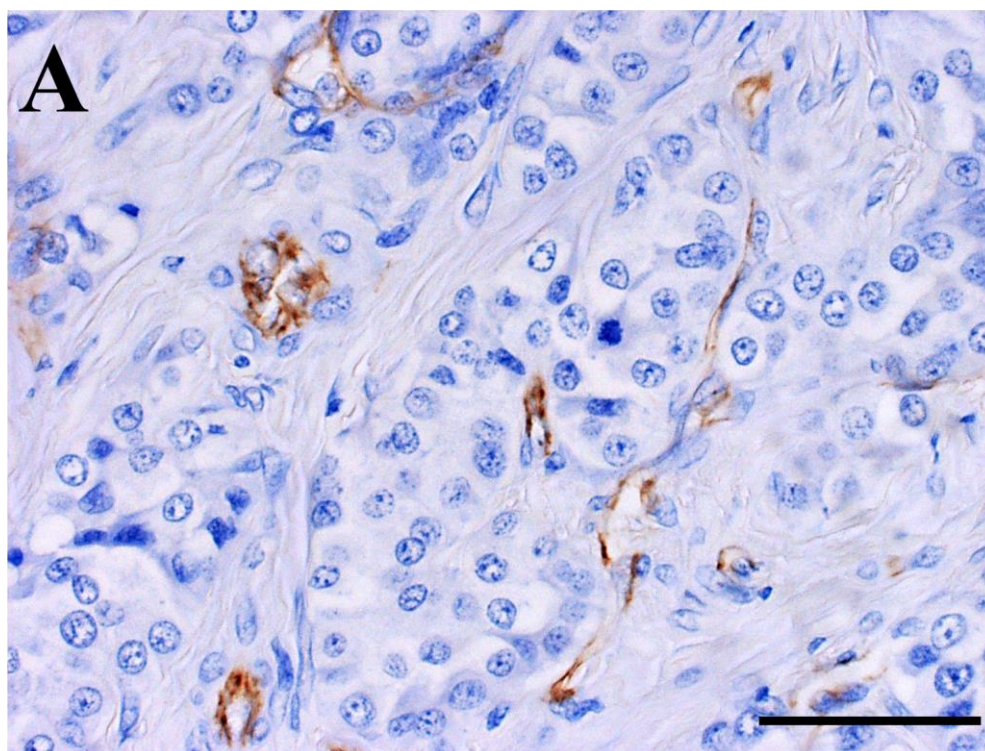


図 32. イヌの甲状腺 CC における T 型間質

抗 CD31 抗体陽性血管内皮細胞が，抗 α -SMA 抗体に陽性を示す間質細胞 (B)

を含む成熟した膠原線維束内に分岐に乏しい血管を構成する (A)．IHC．

Bar=50 μ m．

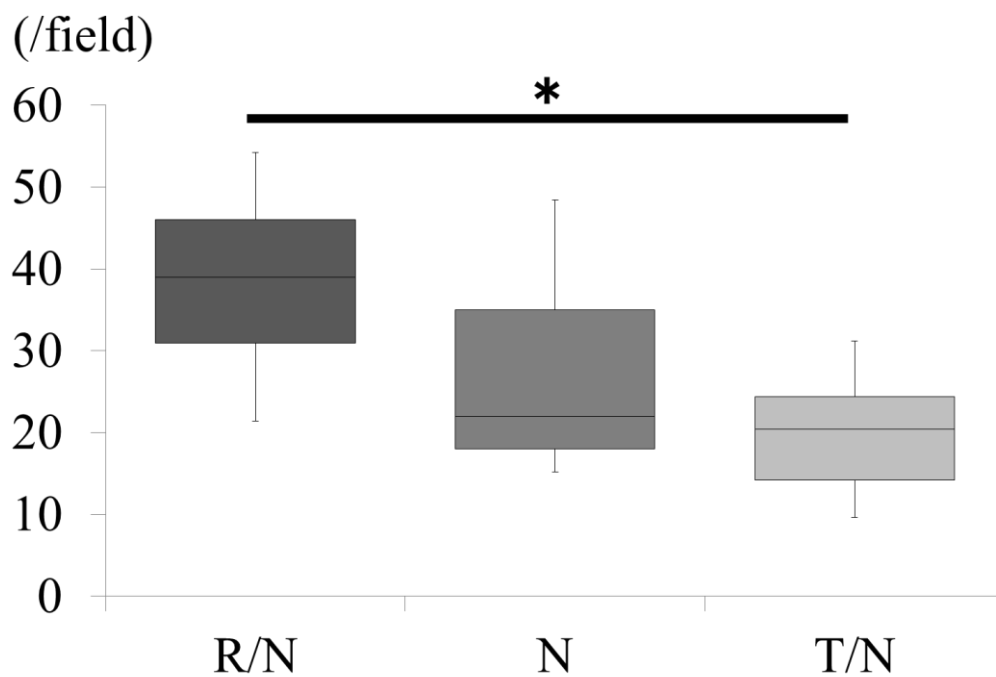


図 33. イヌの甲状腺 CC における微小血管密度

各間質バリエーションにおける微小血管密度の Box plots 図. 各 Box は四分位範囲を, Box 内の線は中央値を表す. 中央線の下端と上端はそれぞれ最小値と最大値を示す. (* $P < 0.05$)

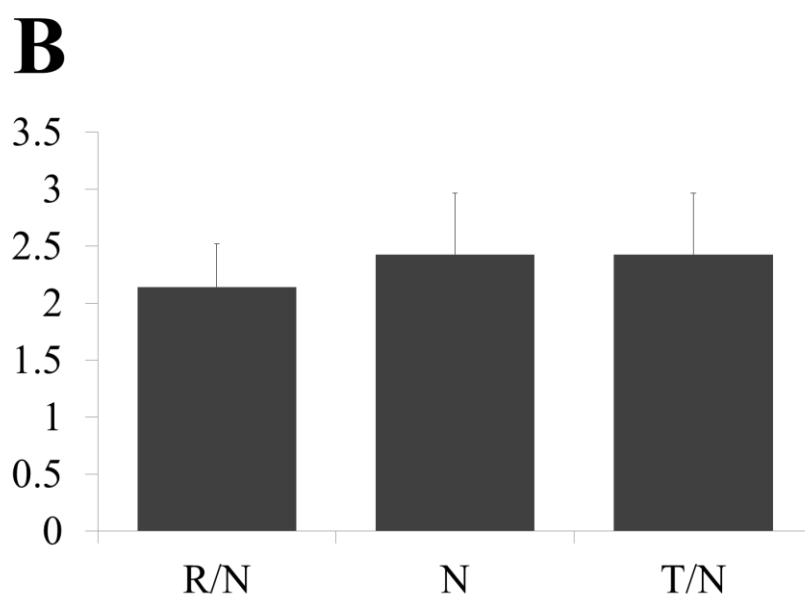
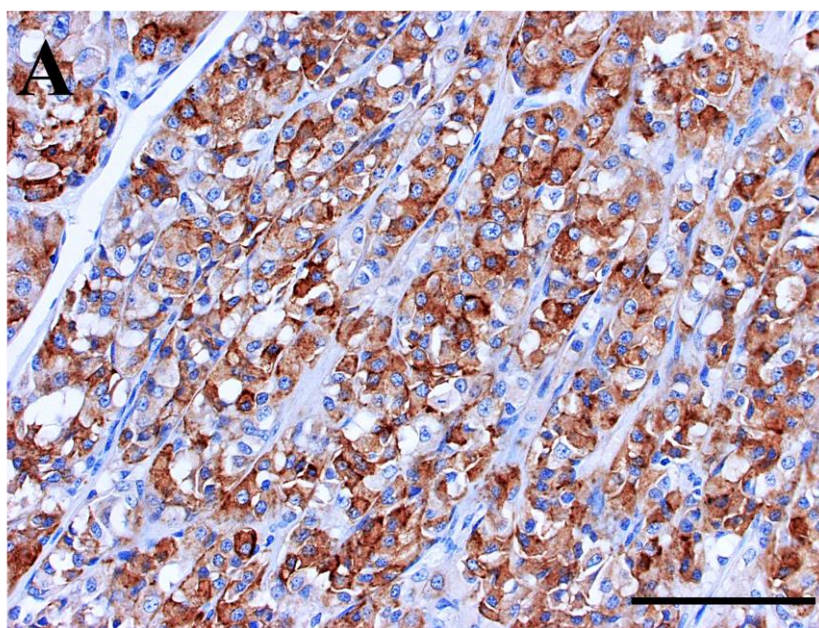


図 34. イヌの甲状腺 CC における CT の免疫組織化学的発現

A. 抗 CT 抗体は細胞質に顆粒状に陽性を示し，高度に発現する．IHC.

Bar=100 μ m.

B. 各間質バリエーションにおける CT スコアの平均値+標準偏差を示す．有意な差は認められない．

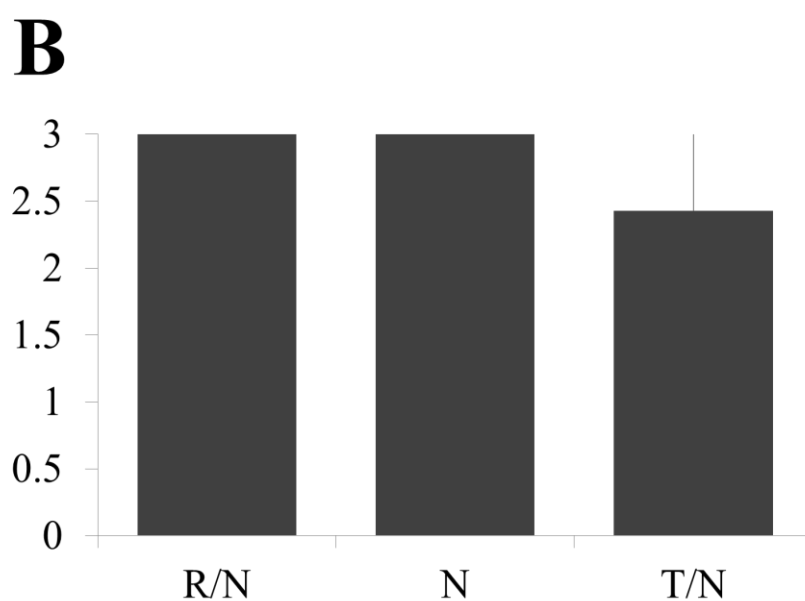
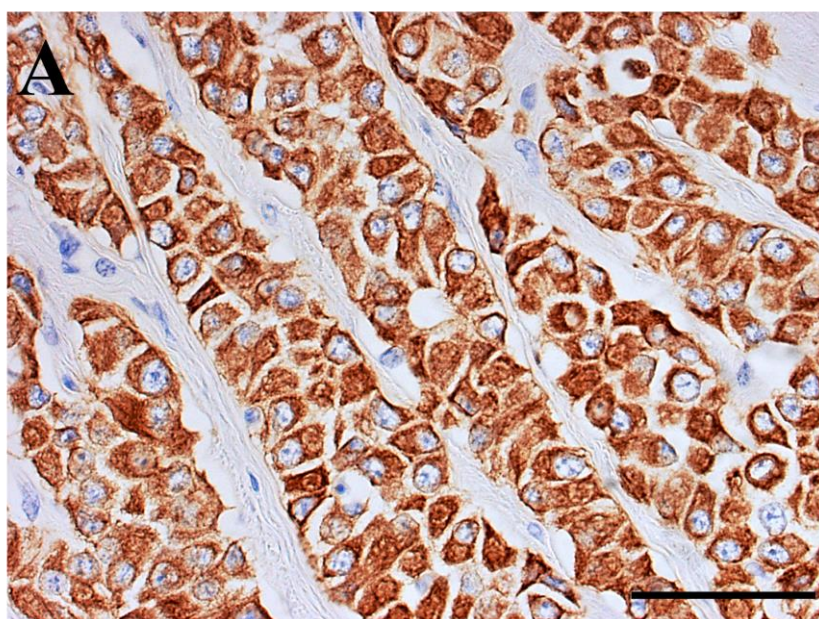


図 35. イヌの甲状腺 CC における CK の免疫組織化学的発現

A. 抗 pan-CK 抗体は細胞質に陽性を示し, 高度に発現する. IHC. Bar=50 μ m.

B. 各間質バリエーションにおける CK スコアの平均値+標準偏差を示す. 有意な差は認められない.

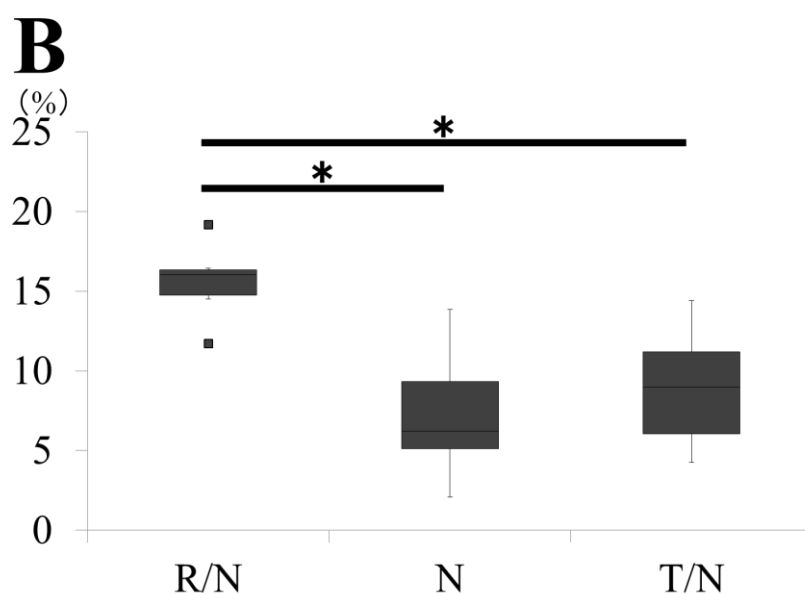
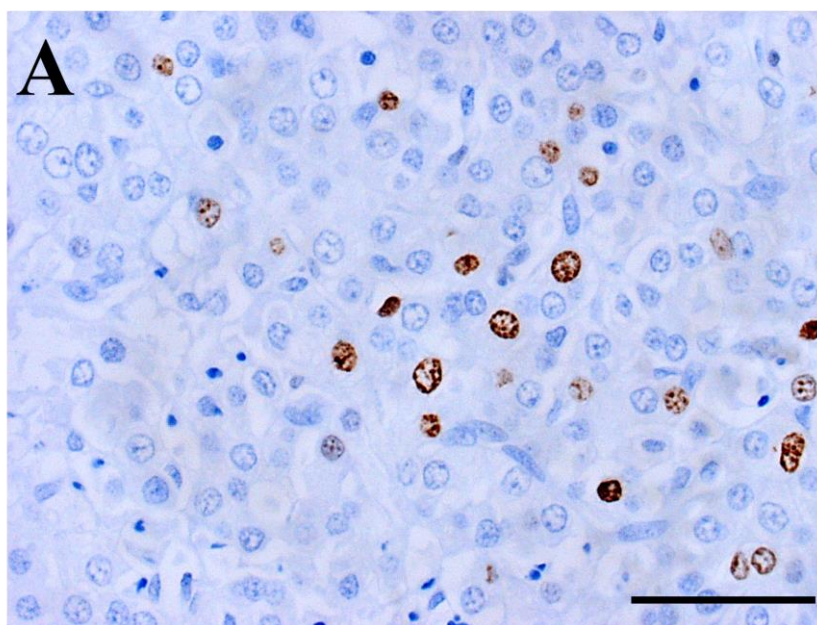


図 36. イヌの甲状腺 CC における腫瘍細胞増殖

A. 抗 Ki-67 抗体は増殖細胞の核に陽性を示す. IHC. Bar = 50μm.

B. 各間質バリエーションにおける Ki-67 index の Box plots 図. 各 Box は四分位範囲を, Box 内の線は中央値を表す. 中央線の下端と上端はそれぞれ最小値と最大値を示す. ■は外れ値を表す. (* $P<0.05$)

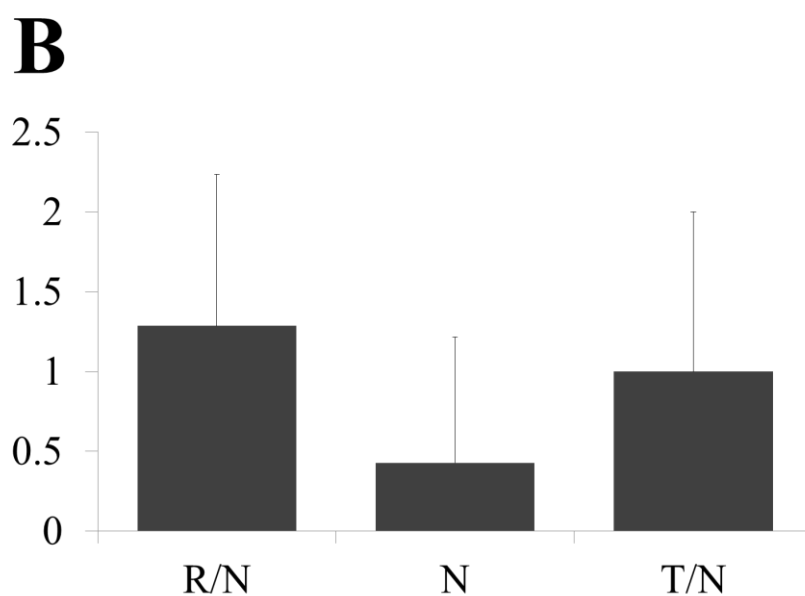
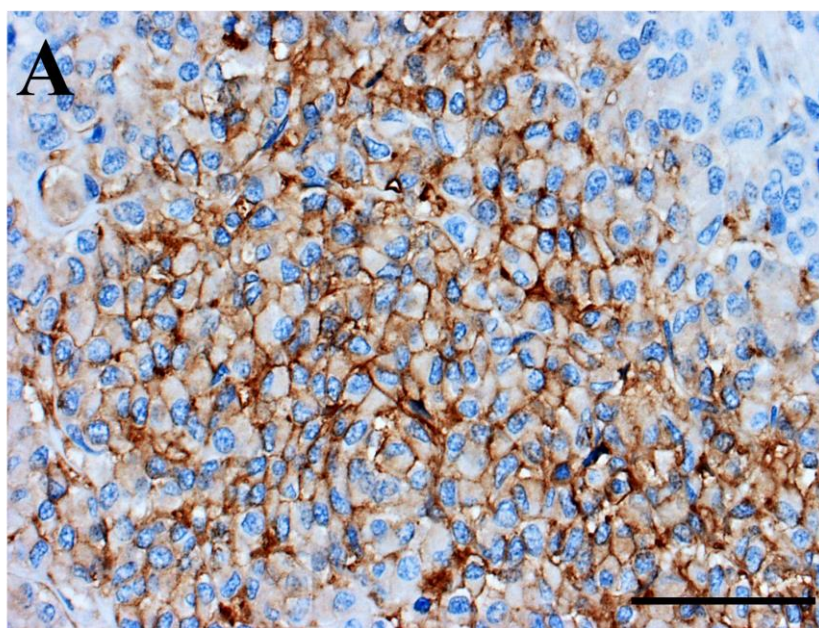


図 36. イヌの甲状腺 CC における GLUT-1 の免疫組織化学的発現

A. 抗 GLUT-1 抗体は腫瘍細胞の細胞膜上に陽性を示す. IHC. Bar=50 μ m.

B. 各間質バリエーションにおける GLUT-1 スコアの平均値+標準偏差を示す.

有意な差は認められないが, simple N 型バリエーションにおける発現は低値を示す傾向が認められる.

総括

WHO classification of domestic animal に基づくと、イヌの甲状腺原発腫瘍はまず腫瘍実質細胞のホルモン産生能から濾胞上皮細胞腫瘍と C 細胞腫瘍に大別され、それぞれ良性腫瘍と悪性腫瘍に分類される。FC はさらに腫瘍実質細胞の分化度によって分類され、CC に関しては明確な組織分類は為されていない。本研究では FC における分類基準となる濾胞上皮細胞としての分化度の概念とその整合性、ならびに CC における組織型分類の必要性を検討した。その基盤として、現在用いられている腫瘍細胞自体の性質による分類法ではなく、近年急速に発展してきた腫瘍微小環境という概念を反映し、新たに腫瘍間質の配列の相違による組織型分類法を提案し、その整合性と有用性に関してイヌの正常甲状腺組織から得られた知見を基に検討した。

第 I 章ではイヌの正常甲状腺組織に認められる充実性細胞集塊における未熟な細胞と ECMs との関連性の検討を行った。充実性細胞集塊には C 細胞と未熟な濾胞上皮細胞ならびに未分化細胞が混在しており、それらの細胞間に網目状の ECMs が存在していることが明らかとなった。ECMs は細胞の分化や増殖を調節することが知られているが、細胞増殖活性は新生仔犬の甲状腺実質細胞と比較して低いことから、充実細胞集塊間に認められた網目状の ECMs、特に Laminin がイヌの甲状腺濾胞上皮細胞の分化に関与していることが示唆されたが、C 細胞に対する関連性はその細胞学的分化度の不明確さから明らかにされなかった。このことから、甲状腺濾胞上皮細胞由来の悪性腫瘍であるイヌの甲状腺 FC では ECMs が腫瘍細胞の分化度に関連することが予想され、第 II 章では ECMs とイヌの甲状腺 FC における実質細胞の分化度、中間径フィラメントならびに細胞接着、腫瘍細胞増殖活性ならびにグルコース取り込み能を担う GLUT-1 の発現動態との関連性を検討した。その結果、イヌの甲状腺 FC では組

組織学的悪性度に ECMs の一種である Collagen IV の発現が関与する可能性が示唆された。腫瘍実質細胞の分化度や一般的に上皮性腫瘍細胞の悪性度の指標となる EMT との相関は認められず、これらはイヌの甲状腺濾胞上皮細胞の発生的特徴によるものであると考えられた。このことから、イヌの甲状腺 FC における ECMs の重要性が示唆された。

一方、C 細胞由来の悪性腫瘍であるイヌの甲状腺 CC において、腫瘍間質の分布の違いが認められたことから、この点に着目して組織学的分類を行った。さらにその分類と実質細胞の分化度、中間径フィラメントならびに細胞接着、腫瘍細胞増殖活性ならびにグルコース取り込み能を担う GLUT-1 の発現動態との関連性を検討した。イヌの甲状腺 CC では ECMs の分布の違いは微小血管の分布と一致しており、さらにそれらは α -SMA 陽性腫瘍間質細胞の形態学的特徴と相関していることが示唆された。腫瘍実質細胞の分化度はいずれの症例も高度であり、また、今回検索を行った症例における EMT は確認されなかった。このことは第 I 章で認められた正常甲状腺組織内に存在する C 細胞にも一致しており、イヌの甲状腺 CC における腫瘍細胞学的アプローチの困難さを示唆するものであった。本研究で提案した腫瘍間質バリエーションによる分類は腫瘍増殖活性や GLUT-1 の発現を反映していることが明らかとなり、その有用性が示唆された。

本研究では腫瘍間質の構造に着目した、イヌの甲状腺原発腫瘍における新たな組織分類法を提案し、その有用性を示した。また、多くのイヌの甲状腺原発腫瘍の病理組織学的ならびに免疫組織化学的知見を構築した。腫瘍微小環境は腫瘍治療学の標的としても注目されており、その成果は分子標的薬などによる血管新生阻害剤などに代表される[10, 33]。本研究の知見を基盤としてイヌの甲状腺原発腫瘍だけに限らず様々な腫瘍組織において、腫瘍病理組織学と

腫瘍微小環境という概念との整合性の更なる検討が期待される.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご指導賜りました酪農学園大学獣医病理学教室 谷山弘行教授，岡本実准教授，松田一哉准教授，Bio LAB 平山和子博士に心より深謝致します．また，数多くの貴重な検体を提供して下さった PATHO LABO 大町哲夫博士，伴侶動物医療部門 廉澤剛教授，遠藤能史講師，学位論文作成にあたり，貴重なアドバイスを頂いた伴侶動物医療部門 中出哲也教授に深謝致します．最後に，大学院生活を送るにあたり多くの御助言，御協力を頂いた伴侶動物医療部門 山下和人教授，ノースラボ 賀川由美子博士，獣医保険看護学類 宮庄拓講師，川迫一史博士，花園究博士，田村純博士，溝奥尋子博士，長峯栄路博士，坂口佳菜子博士，佐野悠人博士，諸先輩方，学友ならびに後輩達に感謝致します．

引用文献

1. Abbondati, E., Del-Pozo, J., Hoather, T. M., Constantino-Casas, F. and Dobson, J. M. 2013. An immunohistochemical study of the expression of the hypoxia markers Glut-1 and Ca-IX in canine sarcomas. *Vet Pathol.* **50**: 1063-1069.
2. Belluco, S., Brisebard, E., Watrelot, D., Pillet, E., Marchal, T., Ponce, F. 2013. Digital squamous cell carcinoma in dogs: epidemiological, histological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol.* **50**: 1078-1082.
3. Buley, I. D., Gatter, K. C., Heryet, A., Mason, D. Y. 1987. Expression of intermediate filament proteins in normal and diseased thyroid glands. *J Clin Pathol.* **40**: 136-142.
4. Campos, M., Ducatelle, R., Kooistra, H. S., Rutteman, G., Duchateau, L., Polis, I. and Daminet, S. 2014. Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma. *J Vet Intern Med.* **28**: 564-570.
5. Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C., Brunton, V. G. 2013. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci.* **126**: 393-401.

6. Capen, C. C. 2002. Tumors of the endocrine glands. pp. 638-664. *In*: Tumors in Domestic Animals. 4th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, USA.
7. Carvalho, M., Guimarães, M. J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C., Queiroga, F. L. 2013. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res Vet Sci*. **95**: 1094-1099.
8. Cervantes-Arias, A., Pang, L. Y., Argyle, D. J. 2013. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. *Vet Comp Oncol*. **11**: 169-184.
9. Dupin, E., Sommer, L. 2012. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol*. **366**: 83-95.
10. Fallahi, P., Ferrari, S. M., Santini, F., Corrado, A., Materazzi, G., Ulisse, S., Miccoli, P., Antonelli, A. 2013. Sorafenib and thyroid cancer. *BioDrugs*. **27**: 615-628.
11. Freeman, A., Hetzel, U., Cripps, P. and Mobasher, A. 2010. Expression of the plasma membrane markers aquaporin 1 (AQP1), glucose transporter 1 (GLUT1) and Na, K-ATPase in canine mammary glands and mammary tumours. *Vet J*. **185**: 90-93.

12. Garbi, C., Wollman, S. H. 1982. Basal lamina formation on thyroid epithelia in separated follicles in suspension culture. *J Cell Biol.* **94**: 489-492.
13. Gruenbaum, Y., Aebi U. 2014. Intermediate filaments: a dynamic network that controls cell mechanics. *F1000Prime Rep.* **6**: 54.
14. Harmelin, A., Nyska, A., Aroch, I., Yakobson, B., Stern, S., Orgad, U. and Waner, T. 1993. Canine medullary thyroid carcinoma with unusual distant metastases. *J Vet Diagn Invest.* **5**: 284-288.
15. Illario, M., Amideo, V., Casamassima, A., Andreucci, M., Matola, T., Miele, C., Rossi, G., Fenzi, G., Vitale, M. 2003. Integrin-dependent cell growth and survival are mediated by different signals in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**: 260-269.
16. Julius M. Liptak. 2007. Canine Thyroid Carcinoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* **22**: 75-81.
17. Kameda, Y., Shigemoto, H., Ikeda, A. Development and cytodifferentiation of C cell complexes in dog fetal thyroids. 1980. An immunohistochemical study using anti-calcitonin, anti-C-thyroglobulin and anti-19S thyroglobulin antisera. *Cell Tissue Res.* **206**: 403-415.

18. Kameda, Y. 1995. Co-expression of vimentin and 19S-thyroglobulin in follicular cells located in the C-cell complex of dog thyroid gland. *J Histochem Cytochem.* **43**: 1097-1106.
19. Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., Iseki, S., Sucov, H. M. 2007. Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development. *J Histochem Cytochem.* **55**: 1075-1088.
20. Kunz-Schughart, L. A., Knuechel, R. 2002. Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histology and Histopathology.* **17**: 599-621.
21. Kunz-Schughart, L. A., Knuechel, R. 2002. Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histology and Histopathology.* **17**: 623-637.
22. Leblanc, B., Paulus, G., Andreu, M., Bonnet, M. C. 1990. Immunocytochemistry of thyroid C-cell complexes in dogs. *Vet Pathol.* **27**: 445-452.

23. Lu, S., Huang, M., Kobayashi, Y., Komiyama, A., Li, X., Katoh, R., Kawaoi, A. 2000. Alterations of basement membrane in di-isopropanolnitrosamine-induced carcinogenesis of the rat thyroid gland: an immunohistochemical study. *Virchows Arch.* **436**: 595-601.
24. Majchrzak, K., Kaspera, W., Szymaś, J., Bobek-Billewicz, B., Hebda, A., Majchrzak, H. 2013. Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas. *Neurol Neurochir Pol.* **47**: 325-331.
25. Mbeunkui, F. and Johann, D. J. Jr. 2009. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* **63**: 571-582.
26. Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K et al., 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *American Journal of Pathology.* **160**: 985-1000.
27. Nakamura, M., Onoda, N., Noda, S., Kashiwagi, S., Aomatsu, N., Kurata, K., Kawajiri, H., Takashima, T., Ishikawa, T., Hirakawa, K. 2004. E-cadherin expression and cell proliferation in the primary tumor and metastatic lymph nodes of papillary thyroid microcarcinoma. *Mol Clin Oncol.* **2**: 226-232.

28. Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S et al., 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research*. **68**: 3645-3654.
29. Patel, K. N., Shaha, A. R. 2014. Poorly differentiated thyroid cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. **22**: 121-126.
30. Patnaik, A. K., Lieberman, P. H., Erlandson, R. A., Acevedo, W. M. and Liu, S. K. 1978. Canine medullary carcinoma of the thyroid. *Vet Pathol*. **15**: 590-599.
31. Patnaik, A. K. and Lieberman, P. H. 1991. Gross, histologic, cytochemical, and immunocytochemical study of medullary thyroid carcinoma in sixteen dogs. *Vet Pathol*. **28**: 223-233.
32. Peña, L. L., Nieto, A. I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., Castaño, M. 1998. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*. **10**: 237-246.
33. Perez, C. A., Arango, B. A., Velez, M., Raez, L. E., Santos, E. S. 2012. Emerging role of multikinase inhibitors for refractory thyroid cancer. *Biologics*. **6**: 257-65.

34. Raïkhlin, N. T., Smirnova, E. A., Satylganov, IZh. 2001. Histological variants of thyroid medullary carcinoma. *Arkh Patol.* **63**: 10-14.
35. Ramos-Vara, J. A., Miller, M. A., Johnson, G. C., Pace, L. W. 2002. Immunohistochemical detection of thyroid transcription factor-1, thyroglobulin, and calcitonin in canine normal, hyperplastic, and neoplastic thyroid gland. *Vet Pathol.* **39**: 480-487.
36. Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D. and Prado-Garcia, H. 2011. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther.* **12**: 939-948.
37. Schor, S. L., Ellis, I. R., Jones, S. J., Baillie, R., Seneviratne, K. et al. 2003. Migration-stimulating factor: a genetically truncated onco-fetal fibronectin isoform expressed by carcinoma and tumor-associated stromal cells. *Cancer Research.* **63**: 8827-8836.
38. Shimoyama, Y., Akihara, Y., Kirat, D., Iwano, H., Hirayama, K., Kagawa, Y., Ohmachi, T., Matsuda, K., Okamoto, M., Kadosawa, T., Yokota, H. and Taniyama, H. 2007. Expression of monocarboxylate transporter 1 in oral and ocular canine melanocytic tumors. *Vet Pathol.* **44**: 449-457.

39. Takano, T., Matsuzuka, F., Liu, G., Miyauchi, A., Yokozawa, T., Kuma, K., Amino, N. 1999. Analysis of splice variants of the fibronectin gene in thyroid carcinomas by reverse transcription-polymerase chain reaction: increased expression of oncofetal fibronectin mRNA in papillary carcinomas is not caused by the alternation in splicing. *J Endocrinol Invest.* **22**: 18-22.
40. Turrel, J. M., McEntee, M. C., Burke, B. P., Page, R. L. 2006. Sodium iodide I 131 treatment of dogs with nonresectable thyroid tumors: 39 cases (1990-2003). *J Am Vet Med Assoc.* **229**: 542-548.
41. Uchida, H., Nakayama, I., Noguchi, S. 1989. An immunohistochemical study of cytokeratin and vimentin in benign and malignant thyroid lesions. *Acta Pathol Jpn.* **39**: 169-175.
42. Volante, M., Landolfi, S., Chiusa, L., Palestini, N., Motta, M., Codegone, A., Torchio, B., Papotti, M. G. 2004. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid with trabecular, insular, and solid patterns: a clinicopathologic study of 183 patients. *Cancer* **100**: 950-957.
43. Volante, M., Papotti, M. 2010. Poorly differentiated thyroid carcinoma: 5 years after the 2004 WHO classification of endocrine tumours. *Endocr Pathol.* **21**: 1-6.

44. Watnick, R. S. 2012. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**: a006676.
45. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. and Folkman, J. 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* **324**: 1-8.
46. Yoshimura, H., Michishita, M., Ohkusu-Tsukada, K., Takahashi, K. 2011. Increased presence of stromal myofibroblasts and tenascin-C with malignant progression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* **48**: 313-321.