

イヌの骨原発骨肉腫の組織多様性に関する
細胞骨格（中間径フィラメント）の
免疫組織化学的評価法ならびに
組織学的悪性度における予後的意義の検討

長峯 栄路

イヌの骨原発骨肉腫の組織多様性に関する
細胞骨格（中間径フィラメント）の
免疫組織化学的評価法ならびに
組織学的悪性度における予後的意義の検討

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

長峯栄路

獣医病理学教室
指導教員 教授 谷山弘行

2014 年度

目次

凡例

緒言	1
第1章 イヌの頭部および四肢骨原発骨肉腫における組織型分類	
1-1 序文	7
1-2 材料と方法	
1-2-1 供試材料	9
1-2-2 組織型分類	9
1-2-3 統計学的分析法	9
1-3 結果	
1-3-1 臨床データ	10
1-3-2 組織型分類	12
1-3-3 統計学的分析結果	15
1-4 考察	24
1-5 小括	31
第2章 イヌの頭部および四肢骨原発骨肉腫における細胞骨格（中間径フィラメント）の免疫組織化学的評価	
2-1 序文	33
2-2 材料と方法	
2-2-1 供試材料	35
2-2-2 免疫組織化学的検索	35
2-2-3 統計学的分析法	36
2-3 結果	
2-3-1 免疫組織化学的所見	37

2-3-2	統計学的分析結果	39
2-4	考察	51
2-5	小括	59
第3章 イヌの頭部および四肢骨原発骨肉腫における組織学的悪性度評価法の 予後的意義		
3-1	序文	61
3-2	材料と方法	
3-2-1	供試材料	63
3-2-2	組織学的悪性度評価法	63
3-2-3	統計学的分析法	64
3-3	結果	
3-3-1	生存データ	65
3-3-2	組織学的悪性度結果	65
3-3-3	統計学的分析結果	66
3-4	考察	76
3-5	小括	80
	総括	81
	謝辞	85
	引用文献	86

凡例

ABC	avidin - biotinylated peroxidase complex
ALP	アルカリフォスファターゼ
α -SMA	α -smooth muscle actin
Cb	軟骨芽細胞型
CK	cytokeratin
CS	軟骨肉腫
DAB	0.05%3,3 - diaminobenzidine in PBS, 0.01%H ₂ O ₂
EMT	上皮間葉転換
Ep	上皮型
Fb	線維芽細胞型
FS	線維肉腫
Gc	巨細胞型
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HE	ヘマトキシリン・エオシン
HS	血管肉腫
IHC	免疫組織化学
MET	間葉上皮転換
My	粘液型
NF	neurofilament
Ob	骨芽細胞型
OS	骨肉腫
OSA	四肢骨原発骨肉腫
OSH	頭部骨原発骨肉腫
PBS	カルシウム、マグネシウム不含 0.01M リン酸緩衝食塩水

Pd	未分化型
PNET	原始神經外胚葉腫瘍
Rc	円形細胞型
Te	血管拡張型
WHO	世界保健機関

緒言

骨肉腫 (OS) はイヌの骨原発骨腫瘍において最も発生頻度が高い悪性腫瘍であり、悪性骨腫瘍の約 80%を占める[12-14, 24, 66, 76, 80, 92]. イヌの骨原発 OS の多くは中齢～高齢で発生し中央値は 7.5～8 歳であるが、2 歳以下の若齢犬にもまれに認められる[24, 66, 80, 92, 121]. ボクサー, グレート・デーン, セント・バーナード, ジャーマン・シェパード, アイリッシュ・セッター, ゴールデン・レトリバーなどの大型犬あるいは超大型犬に多く発生し、特に体重および体高の増加が重要な発生要因の一つであることが知られている[11-13, 24, 28, 66, 75, 100, 114, 119, 121, 122, 129]. イヌの四肢骨原発骨肉腫 (OSA) において、雄の発生率は雌よりも多いという報告があるが[13, 24, 75, 121], 頭部骨原発骨肉腫 (OSH) を含めた性差に関する報告はなされていない.

イヌの骨原発 OS は、日常生活で最も負荷を受ける四肢、特に前肢の長骨に好発し、骨折治癒部位や内固定装置に関連して発生し [76, 119, 122], 骨梗塞を伴って生じることも報告されている[29, 66, 96, 119]. また OS は骨髓腔から発生し、外方へ浸潤しながら皮質骨を破壊して骨膜を損傷すると考えられており、頭部や脊椎、肋骨などの体軸骨格においても発生が認められる[13, 24, 42, 80, 121]. 生物学的動態はヒトの骨原発 OS と類似しており、強い局所浸潤による激しい疼痛、腫脹や病的骨折などを伴う[10, 13, 66]. また血行性の肺転移病変が高頻度に認められ、他臓器への遠隔転移もまれに発生し、脊椎や肋骨、長骨、骨盤、胸骨などへの骨転移が報告されている[24, 66, 76]. またイヌの骨原発 OS のわずか 5%にリンパ節転移が認められたという報告があるが、OS がリンパ節転移を伴うことはまれである[44]. さらに OSH や OSA の原発骨の違いによる予後の相違が報告されているが[36, 42, 70, 121], 現在までに OSH と OSA の組織学的形態に関して比較検討した報告はない.

イヌの骨原発 OS は強い組織多様性を伴う悪性腫瘍であり、腫瘍性骨芽細胞による類骨あるいは骨組織の形成の有無が組織学的な診断基準とされている

[66, 109, 119, 121]. 動物の世界保健機関 (WHO) 分類において, OS は組織学的形態および基質の種類や量から, 骨芽細胞型 (Osteoblastic ; Ob), 軟骨芽細胞型 (Chondroblastic ; Cb), 線維芽細胞型 (Fibroblastic ; Fb), 血管拡張型 (Telangiectatic ; Te), 未分化型 (Poorly differentiated ; Pd), 巨細胞型 (Giant cell type ; Gc) の 6 種類の組織型に区分され, これら複数の組織型は同一腫瘍組織内に混在して認められることが多い[66, 109, 121] (表 1). ヒトの骨原発 OS は, イヌと同様に多彩な組織学的形態を示し, WHO 分類により通常型, Te, 小細胞型, 骨内低悪性度型に区分され[51, 85, 98], 通常型はさらに Ob, Cb, Fb, 上皮型 (Epithelioid ; Ep) などの 8 種類の組織型に細区分されている[98] (表 2).

一般的に, 腫瘍細胞の多くは発生母組織の形態学的特徴を保持しており, その分化傾向を同定することにより, 確定診断することが可能となる. 細胞骨格は, 細胞を内部から構造的に支持することで細胞形態を特徴づけており, 様々な細胞骨格に対する一次抗体を用いた免疫組織化学 (IHC) による検索は, 腫瘍診断において有用なツールであり, 腫瘍組織における細胞骨格の局在を明らかにすることは, 腫瘍の発生母組織の起源を知る手掛かりとなる[33, 87]. イヌの骨原発 OS と同様に組織多様性を示すヒトの骨原発 OS において, 中間径フィラメントの発現性に関する IHC の研究が報告されている[39].

組織学的悪性度分類は, イヌの様々な腫瘍の生物学的性状を予測するツールとして利用されており, イヌの骨原発 OS においても予後との関連性が報告されており[30], 75%以上の OS は核異型性, 核分裂像, 壊死所見が強く観察され, 予後は悪い[56, 76].

組織学的形態に基づいた細胞骨格に関する IHC の特徴を把握することは, イヌの骨原発 OS のように強い組織多様性を示す腫瘍の形態学的な分類を行う上でも重要である. しかしながら, 現在までにイヌの骨原発 OS の組織学的な多様性に基づいた細胞骨格の発現性を IHC で評価した研究は報告されていない. またイヌの骨原発 OS は軟骨肉腫 (CS), 線維肉腫 (FS), 血管肉腫 (HS) な

どの他の骨原発腫瘍や反応性骨病変との鑑別が困難である場合が多く [24, 66, 76], 詳細な組織学的検索および IHC による検索を行うことは, 的確な腫瘍診断を行う上で重要であると考えられる. 本研究では, イヌの骨原発 OS の組織多様性を把握するための基礎的研究のため, 発生部位別に組織学的検索および IHC による検索を行った. また, OS の組織多様性や発生部位と予後との関連性を明らかにするため, 以下の項目について検索を行った.

まず第 1 章では, イヌの OSH および OSA に関して, その組織多様性を把握し, 組織学的形態をもとに組織型分類を実施し, OSH と OSA の組織学的形態を比較した.

第 2 章では, イヌの OSH および OSA に関して, 腫瘍診断で汎用されている細胞骨格に対する各種一次抗体を用いて, 第 1 章で検索した各組織型における IHC の特徴を明らかにし, OSH と OSA における細胞骨格の発現性を比較した.

第 3 章では, イヌの OSH および OSA に関して, 組織学的悪性度の指標となる組織学的形態と生存データの関連性を評価し, 組織学的悪性度評価法ならびに組織型分類法の予後因子としての有用性を検討するとともに, OSH および OSA の生存データを比較した.

以上の研究を通して, イヌの骨原発 OS における組織多様性に関連する細胞骨格の IHC の特徴を把握し, 発生部位による違いを明らかにするとともに, 組織学的分類法の予後的意義について考察した.

表 1. WHO による動物の骨腫瘍の組織学的分類 (抜粋) [109]

I . BENIGN TUMORS

- A. Osteoma
- B. Ossifying fibroma
- C. Myxoma of the jaw
- D. Osteochondroma
- E. Feline osteochondromatosis
- F. Chondroma
- G. Hemangioma

II . MALIGNANT TUMORS

- A. Central
 - 1. Osteosarcoma
 - a. Poorly differentiated
 - b. Osteoblastic
 - nonproductive
 - productive
 - c. Chondroblastic
 - d. Fibroblastic
 - e. Telangiectatic
 - f. Giant cell type
 - 2. Chondrosarcoma
 - 3. Fibrosarcoma
 - 4. Hemangiosarcoma
 - 5. Giant cell tumor of bone
 - 6. Multilobular tumor of bone

表 2. WHO によるヒトの骨腫瘍の組織学的分類 (抜粋) [51, 85, 98]

I . Osteogenic tumors

- A. Osteoma
- B. Osteoid osteoma
- C. Osteblastoma
- D. Low-grade central osteosarcoma
- E. Conventional osteosarcoma
 - 1. Osteoblastic
 - 2. Chondroblastic
 - 3. Fibroblastic
 - 4. Giant cell rich
 - 5. Osteblastoma-like
 - 6. Epithelioid
 - 7. Clear cell
 - 8. Chodroblastoma-like
- F. Telangiectatic osteosarcoma
- G. Small cell osteosarcoma
- H. Parosteal osteosarcoma
- I. Periosteal osteosarcoma
- J. High-grade surface osteosarcoma

第 1 章

イヌの頭部および四肢骨原発骨肉腫における 組織型分類

1-1 序文

イヌの骨原発 OS は，骨原発腫瘍の中で最も発生頻度が高い悪性腫瘍で，約 75% は最も負荷を受ける四肢の長骨に発生し，発生率は体軸骨格の OS の 3～4 倍である [13, 24, 42, 66, 80, 119, 121]. また OSA は長骨の骨幹端部に発生し，後肢より前肢に 2 倍多く発生が認められ [24, 58, 66, 119, 121]，前肢では上腕骨近位，尺骨遠位，橈骨遠位が，後肢では大腿骨遠位，脛骨近位，脛骨遠位が好発部位である [13, 24, 58, 66, 76, 80, 121]. 一方，イヌの骨原発 OS の 20～25% は体軸骨格に発生し，その中の約 50% は頭部骨組織，残りの 50% は肋骨や脊椎，骨盤骨などを原発骨として発生する [13, 21, 38, 61, 63, 100]. OSH は下顎骨で最も発生が多く，上顎骨，頭蓋骨，鼻腔内，副鼻腔内での発生が散発的に報告されている [24, 42, 76, 121].

イヌの骨原発 OS の年齢の中央値は 8 才（範囲：8 ヶ月～13 才）であるが，超大型犬はより若齢で罹患する傾向にある [76, 100]. 性別と発生率との関連性は報告されていないが，去勢あるいは避妊されたイヌは無処置のイヌに比べて発症のリスクが 2 倍になるという報告がある [13, 75, 100, 111]. またセント・バーナードの遺伝性の OS の発生が報告されており，アイリッシュ・ウルフハウンド，セント・バーナード，グレート・デーンにおいても高い発症リスクが確認されている [76, 100, 119].

イヌの骨原発 OS の組織学的な診断基準は，腫瘍性骨芽細胞による類骨あるいは骨組織の形成の有無とされているが [66, 109, 119, 121]，その組織学的形態は多様性に富んでいる．動物の WHO 分類において，イヌの骨原発 OS は組織学的形態や基質の種類あるいは量から，Ob, Cb, Fb, Te, Pd, Gc の 6 つの組織型に区分され，同一腫瘍組織内に複数の組織型が混在して認められることが多い [66, 109, 121]. 時にこれらの組織型は他の骨原発腫瘍と類似した組織学的形態を示し，わずかな生検材料では CS や FS, HS などとの鑑別が困難であるため，組織診断の際には注意が必要である [24, 66, 76].

発生学的に頭部骨組織は中胚葉由来の四肢骨組織とは異なる外胚葉神経堤細胞由来であり、OSHとOSAは発生学的な起源が異なっている[20]。また、臨床的にOSHとOSAの生物学的動態が異なるという報告がいくつかなされている[36, 42, 70, 121]。本章では、発生学的由来の違いと組織学的形態の関連性を検討するために、イヌのOSH84症例およびOSA141症例について、その組織多様性を把握し組織型分類を行い、OSHとOSAの間で組織学的形態を比較して、発生部位によるイヌの骨原発OSの組織学的形態の違いを明らかにした。

1-2 材料と方法

1-2-1 供試材料

材料には，酪農学園大学獣医学部獣医病理学教室において病理解剖学的検索によって得られた腫瘍組織ならびに病理組織診断のため本学獣医病理学教室あるいは病理組織検査所へ送付された腫瘍組織，OSH84例およびOSA141例，計225例の組織を10%ホルマリン緩衝液で固定，アルコール脱水後パラフィン包埋した．また標本に骨組織を含む場合，10%蟻酸を用いて脱灰した．さらに，4 μ mで薄切し，ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色を施した．

1-2-2 組織型分類

動物のWHO分類に基づいて，腫瘍組織をOb，Cb，Fb，Te，Pd，Gcの6つの組織型に分類した．WHO分類の組織型にあてはまらない組織学的形態を示すものを，新たに粘液型（Myxoid；My），円形細胞型（Round cell；Rc），上皮型（Epithelioid；Ep）として3つの組織型に分類した．さらに，腫瘍組織が単一の組織型で構成されているものを単純型，同一腫瘍組織内に複数の組織型が混在するものを複合型として区分した．

1-2-3 統計学的分析法

本研究では，OSHおよびOSAの各組織型の割合に有意な差があるか，マン・ホイットニー検定を用いて統計学的に分析した．P値が目的とする危険率0.05%以下のとき，帰無仮説は棄却した．

1-3 結果

1-3-1 臨床データ

本研究の症例において、平均年齢は OSH で 10.5 才（範囲，1～18 才），OSA で 9.4 才（範囲，1～17 才）であった。性別は，OSHA で雄：雌が 1：1（雄 42：雌 42），OSA で雄：雌が 1：1（雄 72：雌 69）となり性差は認められなかった。36 種類の犬種が確認され，OSHA は雑種（30 症例），ラブラドール・レトリバー（11 症例），ゴールデン・レトリバー（10 症例）で多く発生し，OSA も同様に雑種（32 症例），ゴールデン・レトリバー（31 症例），ラブラドール・レトリバー（15 症例）で多く認められた（表 3）。また発生部位において，OSHA は下顎骨（38 症例），上顎骨（11 症例）で多く発生し，OSA は上腕骨（30 症例），大腿骨（26 症例），肩甲骨（12 症例）で多く認められた（表 4）。

表 3. イヌの OSH および OSA の犬種

犬種	OSHA	OSA
雑種	30	32
ラブラドール・レトリバー	11	15
ゴールデン・レトリバー	10	31
シーザー	5	2
シベリアン・ハスキー	4	1
フラットコート・レトリバー	3	2
パグ	3	1
柴犬	2	4
ウェルシュ・コーギー	2	3
シェットランド・シープ・ドッグ	2	2
ヨーキー	2	1

パピオン	2	1
北海道犬	2	0
マルチーズ	2	0
プードル	1	0
ポメラニアン	1	0
ビーグル	1	0
ベルジアンター・ビュレン	1	0
ボストン・テリア	1	0
トイ・プードル	1	0
エアデール・テリア	1	0
秋田犬	0	10
グレート・ピレネーズ	0	8
ボルゾイ	0	6
ミニチュア・シュナウザー	0	4
バーニーズ	0	3
セント・バーナード	0	2
ポインター	0	2
アラスカン・マラミュート	0	1
イングリッシュ・ポインター	0	1
ブルドッグ	0	1
四国犬	0	1
チワワ	0	1
カフカス	0	1
ジャーマン・シェパード	0	1
アイリッシュ・セッター	0	1

表 4. イヌの OSH および OSA の発生部位

OSH (n=84)	OSA (n=141)				
	前肢 (n=87)		後肢 (n=54)		
上顎骨	11	肩甲骨	12	大腿骨	26
下顎骨	38	上腕骨	30	脛骨	5
鼻骨	3	尺骨	4	腓骨	1
頬骨	2	橈骨	10	足根骨	2
不明	30	手根骨	3	指骨	1
		指骨	6	不明	19
		不明	22		

1-3-2 組織型分類

OSH および OSA において、動物の WHO 分類に含まれる Ob, Cb, Fb, Te, Pd, Gc の 6 種類の組織型が観察された。また OSH において、My, Rc, Ep の 3 種類の組織型が、OSA においては My, Rc の 2 種類の組織型が新たに観察された。組織型の割合において、Ob が最も高頻度に認められ、続いて Cb, Fb, Te が多く観察された (表 5)。また OSH の 44% (37/84), OSA の 49% (69/141) の腫瘍組織は単一の組織型で構成される単純型に区分され、OSH の 56% (47/84), OSA の 51% (72/141) の腫瘍組織は複数の組織型が同一腫瘍組織内に混在する複合型に区分された。すべての Gc は他の組織型、特に Ob に混在して観察された。OSH および OSA で観察された各組織型の組織学的形態は類似していた (表 6)。

骨芽細胞型 (Ob)

多角形～紡錘形で多形性を示す腫瘍性骨芽細胞が、シート状に増殖していた。腫瘍細胞は核小体明瞭な類円形核、比較的広い好酸性細胞質を有していた。核分裂像が観察された (高倍率で 3～5 個)。腫瘍細胞間に類骨の産生あるいは幼

若骨梁の形成が観察された。類骨の量は様々で石灰沈着を伴っていた（図 1）。

軟骨芽細胞型（Cb）

Ob に類似した多角形～紡錘形で多形性を示す腫瘍細胞が、シート状に増殖していた。腫瘍細胞は核小体明瞭あるいはクロマチンに濃染する類円形核，好酸性細胞質を有していた。核分裂像が観察された（高倍率で 3～5 個）。腫瘍細胞による軟骨基質の産生および成熟した軟骨組織の形成が観察された（図 2）。

線維芽細胞型（Fb）

短紡錘形～長紡錘形の腫瘍細胞は，核小体明瞭な楕円形～紡錘形核を有し，束状あるいは波状に不規則に交錯しながら増殖していた。核分裂像が散見された（高倍率で 1～3 個）。類骨の産生あるいは骨梁の形成はほとんど観察されず，腫瘍細胞間に種々の量の膠原線維が観察された（図 3）。

血管拡張型（Te）

Ob に類似した類円形～多角形の腫瘍細胞で内張りされた血液成分を含む大小の嚢胞の形成が，多数観察された。腫瘍細胞は核小体明瞭な類円形核を有し，核分裂像が散見された（高倍率で 1～3 個）。嚢胞周囲において，腫瘍細胞による石灰化を伴った類骨の産生が観察された。嚢胞内腔に剥離した腫瘍細胞が孤立性に遊離していた（図 4）。

未分化型（Pd）

紡錘形～多角形で強い多形性を示す腫瘍細胞が，密に配列しながらシート状に増殖していた。腫瘍細胞は複数の明瞭な核小体を有する大小不整核あるいはクロマチンに濃染する異型性核，好酸性細胞質を有していた。核分裂像が多数観察された（高倍率で 5～7 個）。腫瘍細胞間の一部でわずかな類骨の産生が観察された（図 5）。

巨細胞型 (Gc)

数～十数個の核を有する多核巨細胞の集簇巣が散在性に観察された。Gcは主にObの腫瘍組織に混在して認められ、多核巨細胞の出現領域は腫瘍性骨組織の形成領域と関連性はなかった。多核巨細胞の核に明瞭な核小体などの異型性は認められなかった(図6)。

粘液型 (My)

紡錘形の腫瘍細胞は、クロマチンに濃染する楕円形～紡錘形核、好酸性細胞質を有しており、粗に間隔をあげながらランダムに配列していた。核分裂像はほとんど観察されなかった。腫瘍細胞間に豊富な粘液産生を伴っていた。腫瘍間質に毛細血管の新生が観察された(図7)。

円形細胞型 (Rc)

小型円形の腫瘍細胞は、核小体明瞭あるいはクロマチンに濃染する類円形核、狭小な好塩基性細胞質を有し、シート状に配列していた。核分裂像はほとんど観察されなかった。腫瘍細胞間にレース状の類骨の産生が観察された(図8)。

上皮型 (Ep)

類円形～多角形で上皮細胞様形態を示す腫瘍細胞は、核小体明瞭な大型円形核、好酸性豊富な細胞質を有し、シート状あるいは敷石状に配列していた。核分裂像が散見された(高倍率で1～3個)。腫瘍細胞間に石灰沈着を伴ったわずかな類骨の産生が観察された(図9)。

複合型

複合型の腫瘍組織の主体はObによって構成され、その腫瘍組織内に異なる組織学的形態を示す他の組織型が混在していた。最も多く観察されたのは、Ob

+Cb, Ob+Fb, Ob+Te の複合型で, Ob+Cb の複合型では, 類似した細胞形態を示す腫瘍細胞が骨組織あるいは軟骨組織を形成していた (図 10). Ob+Fb の複合型では, Ob の腫瘍性骨芽細胞の紡錘形細胞への移行像が認められた (図 11, 14, 15). Ob+Te では, Ob と同様の細胞形態を示す腫瘍細胞による血液成分を含んだ大小の囊胞形成が観察された (図 12, 14). Ob+My の複合型では, Fb と同様に両組織型の移行像が観察され, 豊富な粘液産生を伴っていた (図 13). また Cb+My の複合型では, My の粘液産生に連続して軟骨組織の形成を伴う Cb の腫瘍組織の増殖が観察された. Ob+Ep の複合型では, 両組織型の境界は不明瞭で, Ep における類骨の産生はほとんど観察されなかった. Pd および Rc の腫瘍組織は, 他の組織型と混在することは少なかった. Gc は単一で腫瘍組織を構成することではなく, 常に他の組織型, 特に Ob に混在して散在性に観察された. 複合型では 2 種類から多いものでは 4 種類の組織型が混在しており, 各組織型の腫瘍組織は連続して増殖していた.

1-3-3 統計学的分析結果

本研究において, Ep は OSH のみで観察され, Ep 以外の組織型の割合は, OSH と OSA の間で有意な差は認められなかった ($P > 0.05\%$).

表 5. イヌの OSH および OSA の組織型の割合 (%)

組織型	OSH	OSA
Ob	77 (65/84)	79 (112/141)
Cb	24 (20/84)	19 (27/141)
Fb	29 (24/84)	24 (34/141)
Te	25 (21/84)	25 (35/141)
Pd	12 (10/84)	11 (15/141)
Gc	25 (21/84)	13 (18/141)
My	7 (6/84)	4 (5/141)
Rc	8 (7/84)	7 (10/141)
Ep	6 (5/84)	0 (0/141)

表 6. イヌの OSH および OSA の組織型分類

組織型	OSH (n=84)	OSA (n=141)
Ob	22	51
Cb	1	1
Fb	1	3
Te	2	3
Pd	3	3
My	1	1
Rc	6	7
Ep	1	0
Ob + Cb	7	11
複合型 Ob + Fb	7	13
Ob + Te	7	15

Ob + Pd	1	1
Cb + Fb	0	1
Cb + Pd	0	1
Fb + Te	0	1
Te + Pd	2	7
Ob + Cb + Fb	6	6
Ob + Cb + Te	2	3
Ob + Cb + Ep	1	0
Ob + Cb + My	0	2
Ob + Fb + Te	1	3
Ob + Fb + Pd	1	2
Ob + Fb + My	1	0
複合型 Ob + Fb + Rc	0	1
Ob + Fb + Ep	1	0
Ob + Te + My	1	0
Ob + Te + Rc	1	1
Ob + Te + Ep	2	0
Cb + Fb + My	1	1
Fb + Te + Pd	2	0
Fb + Te + Rc	0	1
Ob + Cb + Fb + Te	1	1
Ob + Cb + Fb + My	1	0
Ob + Fb + Pd + My	1	1
<hr/>		
Gc	21	18
<hr/>		

Gc はすべて他の組織型に混在して観察されたため、別の項目として記載した。

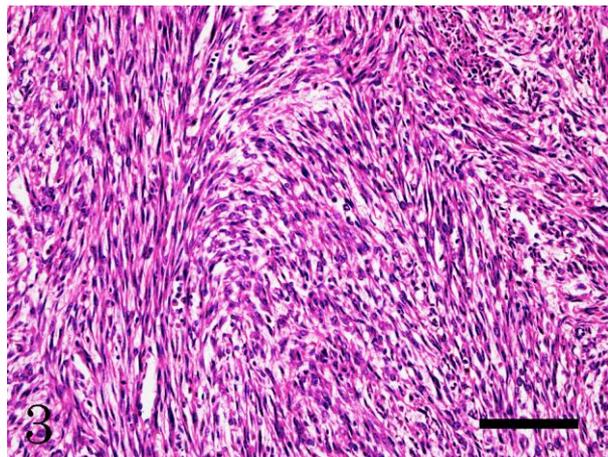
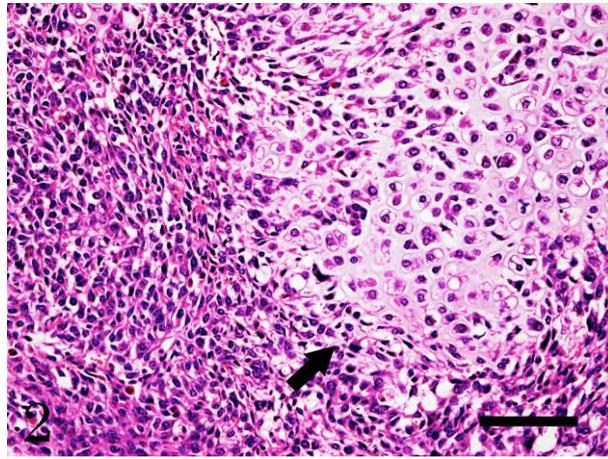
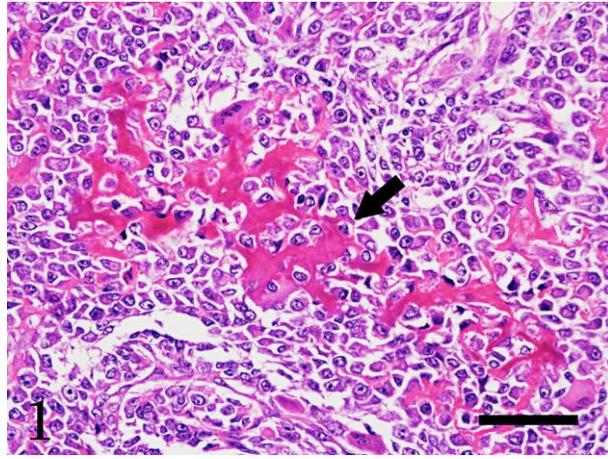


図 1 : Ob の HE 染色．腫瘍細胞間に石灰沈着を伴う類骨の産生（矢印）が観察される． Bar=100 μ m.

図 2 : Cb の HE 染色．腫瘍細胞による軟骨組織の形成（矢印）が観察される． Bar=100 μ m.

図 3 : Fb の HE 染色．紡錘形腫瘍細胞が不規則に交錯しながら束状に配列している． Bar=100 μ m.

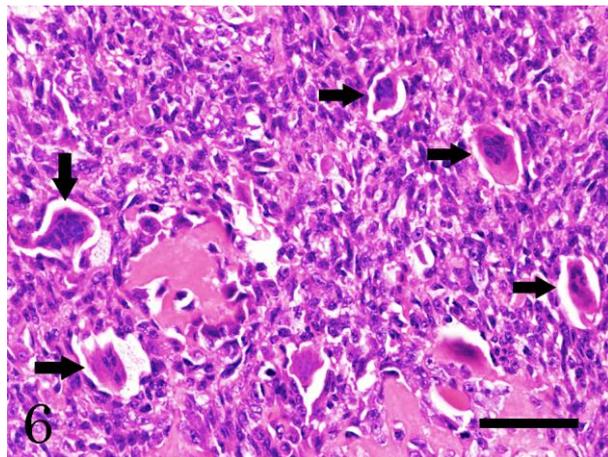
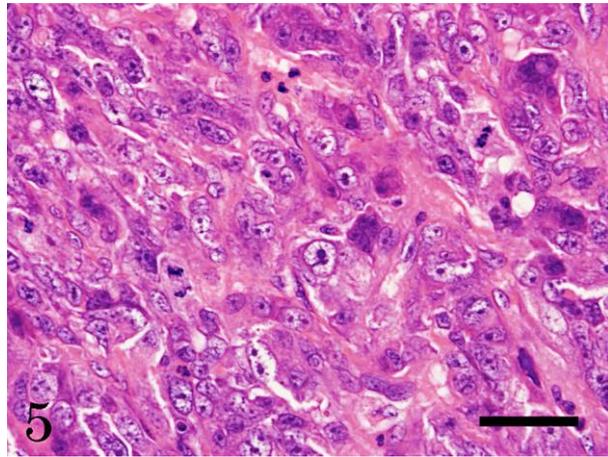
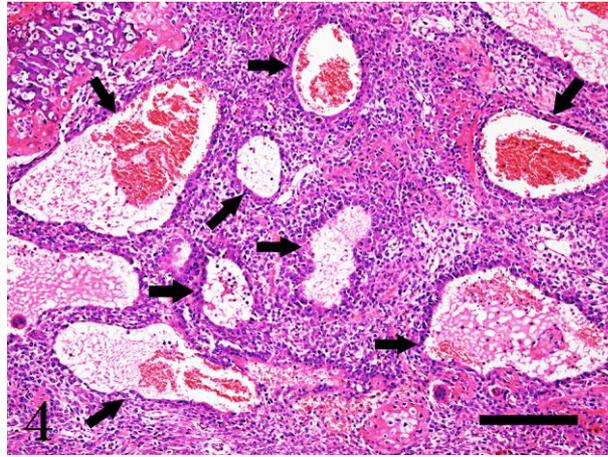


図 4 : Te の HE 染色．腫瘍細胞に内張りされた血液成分を含む多数の嚢胞（矢印）が観察される． Bar=200 μ m.

図 5 : Pd の HE 染色．強い異型性を示す核小体明瞭な大型不整核を有する腫瘍細胞がシート状に配列している． Bar=50 μ m.

図 6 : Gc の HE 染色．数～十数個の核を有する多核巨細胞（矢印）の集簇巣が観察される． Bar=100 μ m.

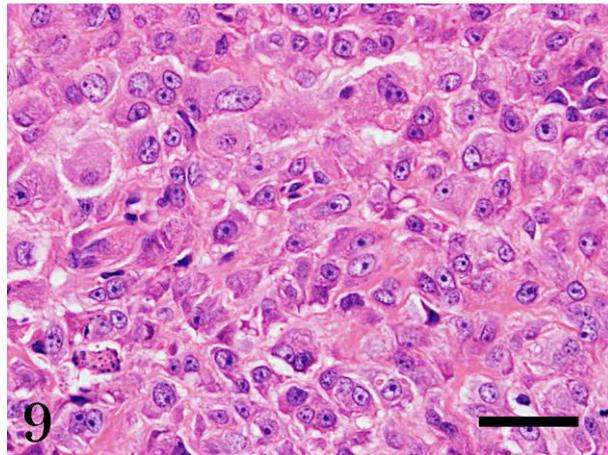
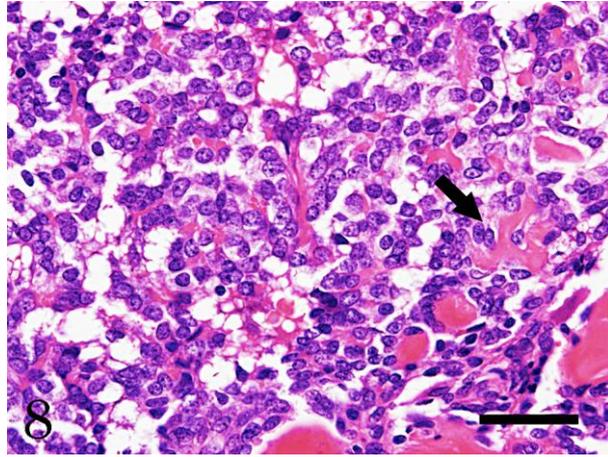
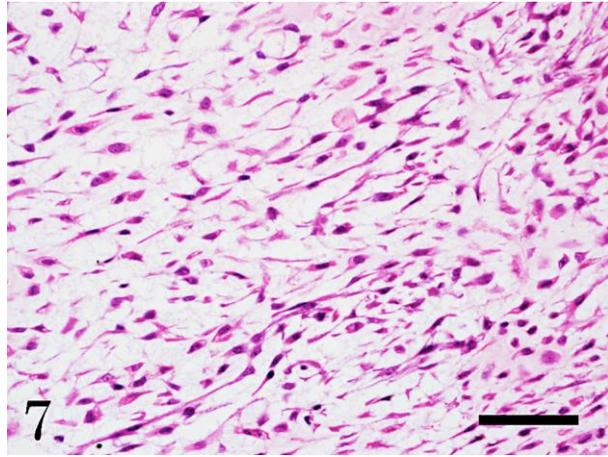


図 7 : My の HE 染色. 紡錘形の腫瘍細胞が粗に間隔をあけてランダムに配列し, 粘液の産生を伴っている. Bar=100 μ m.

図 8 : Rc の HE 染色. 小型円形腫瘍細胞がシート状に配列し, レース状の類骨の産生 (矢印) が観察される. Bar=100 μ m.

図 9 : Ep の HE 染色. 上皮細胞様腫瘍細胞がシート状あるいは敷石状に配列している. Bar=100 μ m.

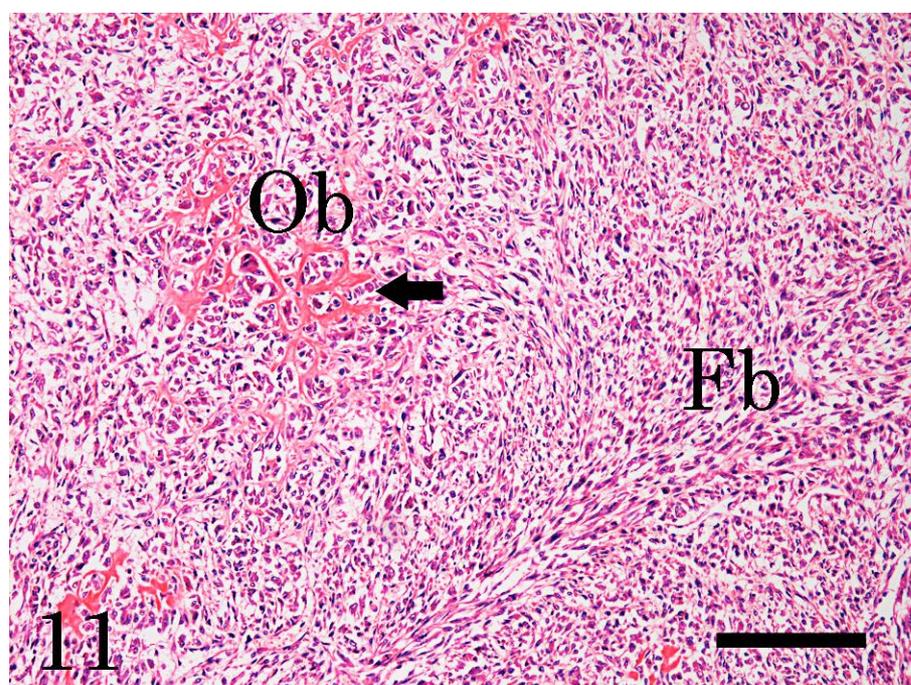
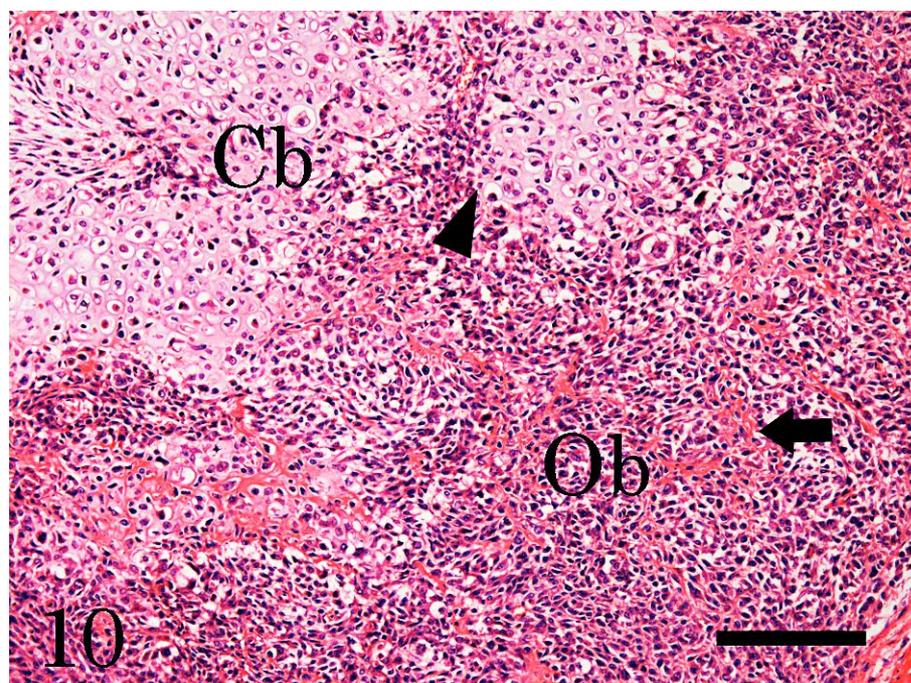


図 10 : Ob + Cb の複合型の HE 染色. 多角形～紡錘形の腫瘍細胞による類骨の産生 (矢印) および軟骨組織の形成 (矢頭) が観察される. Bar=200 μ m.

図 11 : Ob + Fb の複合型の HE 染色. 腫瘍性骨芽細胞による類骨の産生 (矢印) および紡錘形細胞への移行像が観察される. Bar=200 μ m.

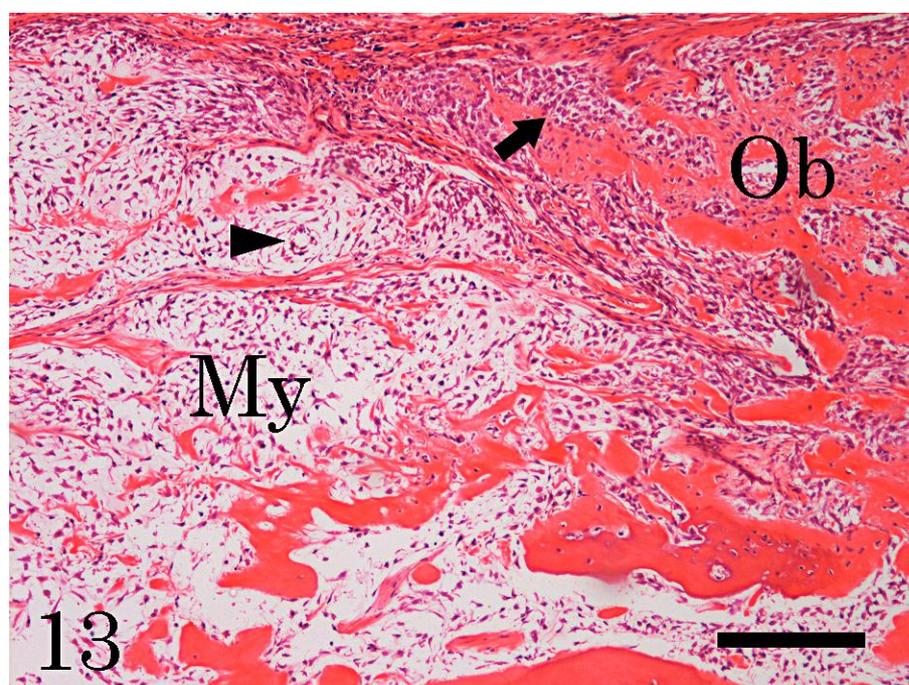
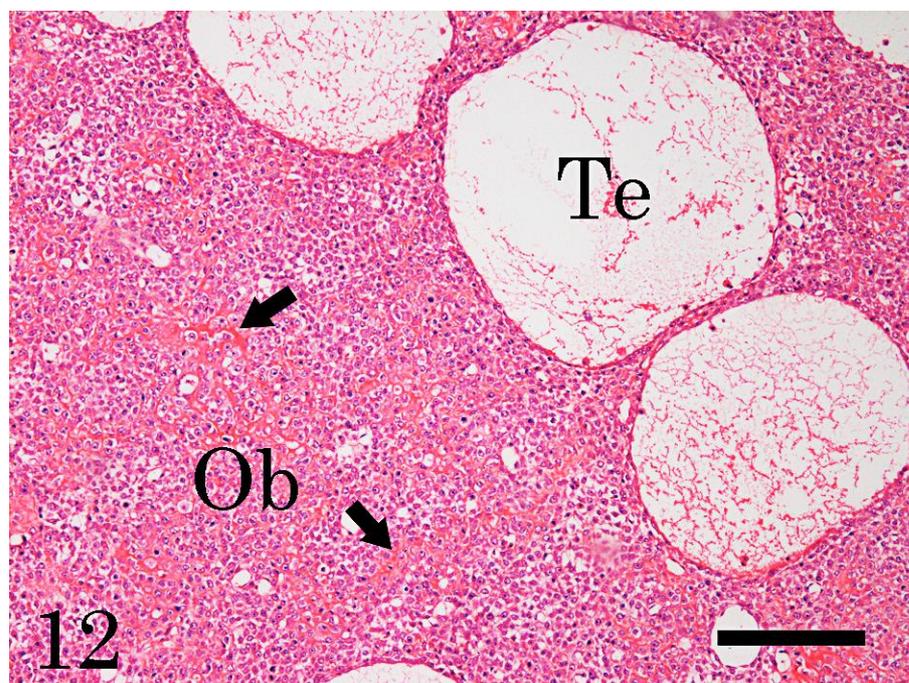


図 12: Ob+Te の複合型の HE 染色. 腫瘍性骨芽細胞による類骨の産生 (矢印) と囊胞の形成が観察される. Bar=200 μ m.

図 13: Ob+My の複合型の HE 染色. 腫瘍性骨芽細胞による骨梁の形成 (矢印) および紡錘形細胞への移行像が観察され, 粘液産生 (矢頭) を伴っている. Bar=200 μ m.

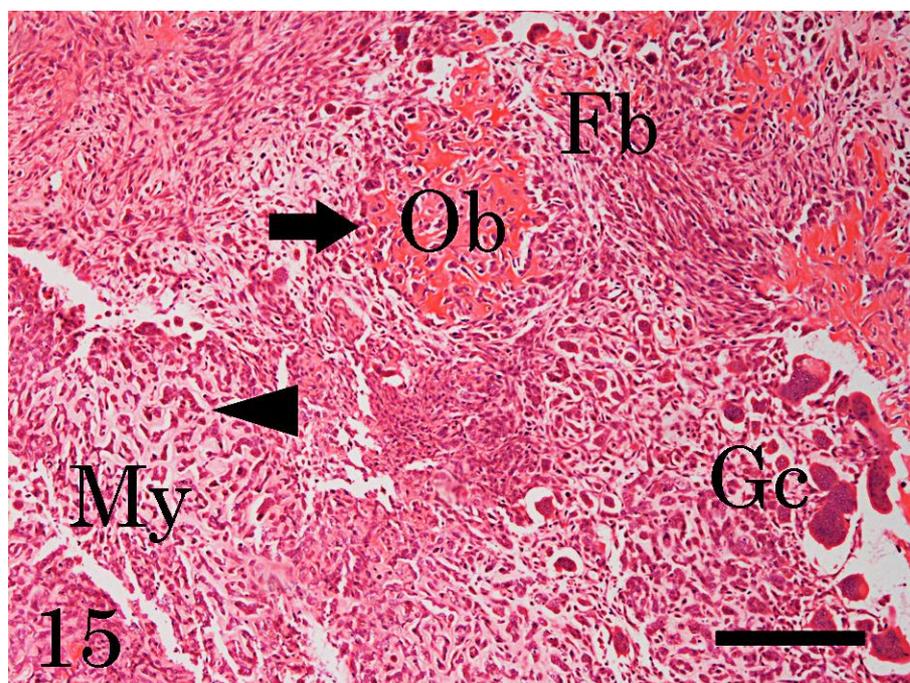
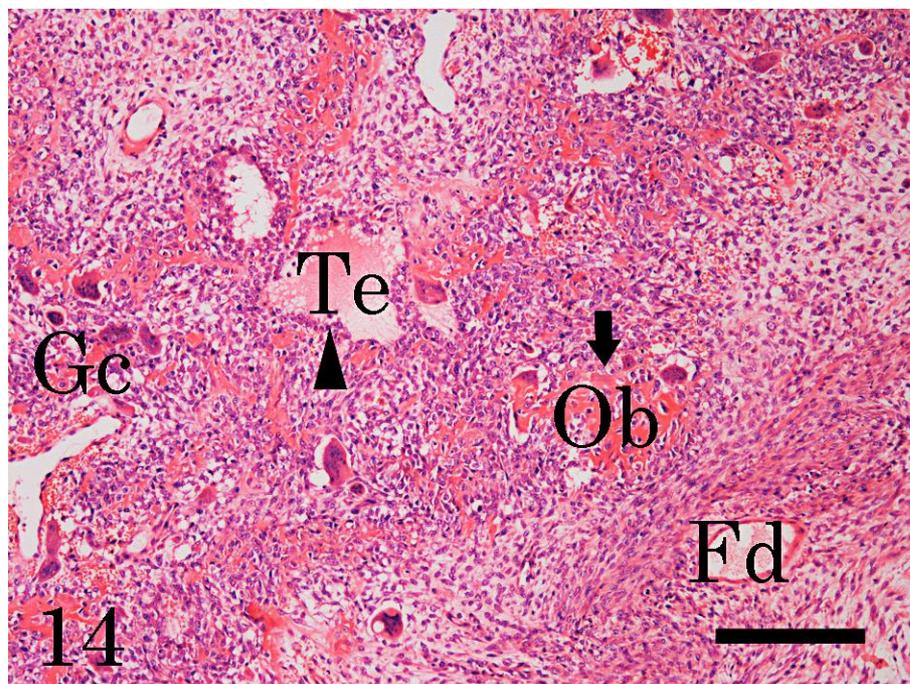


図 14: Ob + Fb + Te + Gc の複合型の HE 染色. 腫瘍性骨芽細胞の類骨の産生 (矢印), 囊胞の形成 (矢頭), 紡錘形細胞への移行像が観察される. Bar=200 μ m.

図 15: Ob + Fb + My + Gc の複合型の HE 染色. 腫瘍性骨芽細胞による類骨の産生 (矢印) および紡錘形細胞への移行像が観察され, 粘液産生 (矢頭) を伴っている. Bar=200 μ m.

1-4 考察

臨床データにおいて、年齢、性別、犬種の種類は OSH と OSA の間で明らかな違いは認められず、過去の研究と類似する結果となった[13, 36, 56, 61, 70, 75, 119, 121]. イヌの骨原発 OS の発生部位において、OSH : OSA が 1 : 1.68 (84 : 141 症例) で、過去の報告と比較して OSH での発生頻度が高い結果となり[13, 24, 42, 121], OSH は下顎骨での発生が最も多く、上顎骨の 3 倍以上となった. OSA の発生部位については、前肢 : 後肢の比が 1.61 : 1 (87 : 54 症例) であり、過去の報告と比較して後肢での発生頻度が高く[24, 58, 121], 肩甲骨, 上腕骨, 大腿骨での発生が多く認められ、尺骨や橈骨における発生は少ない結果となった[13, 24, 42, 56, 58, 66, 75, 76, 80, 121]. 本研究において、発生部位の不明な症例も多く含んでおり、イヌの骨原発 OS の正確な局在を示していない可能性はあるが、OSH の下顎骨および OSA の肩甲骨における高い発生率は新たな知見になりうると考えられた.

OSH と OSA の間において、Ep 以外の各組織型の割合に有意な違いは認められず、各組織型の組織学的形態は類似していた. Ep の腫瘍組織は、OSH のみで認められ、OSA では観察されなかった. 発生学的に、頭部骨組織は外胚葉神経堤細胞由来であり、中胚葉由来の四肢骨組織とは起源が異なっている[20]. 神経堤細胞は、発生初期の神経管形成期に神経板の神経堤組織から上皮間葉転換 (EMT) により上皮から間葉に脱上皮化し、胚内の様々な部位に遊走し、頭部骨軟骨組織の他、末梢神経、シュワン細胞、メラノサイト、副腎髄質細胞、角膜や虹彩などさまざまな細胞種に分化する[20, 63]. Ep が OSH のみで認められたことには、OSH の母組織である頭部骨組織の発生学的な起源が上皮性の神経堤細胞であることが関与していると考えられた.

今回、イヌの骨原発 OS において認められた WHO 分類で区分されている 6 種類の組織型の組織学的形態は、教科書的な記載と類似していた[109, 121].

Ob は最も頻繁に観察され、Ob の単純型は他の単純型や複合型に比べて有意

に多く認められた。この結果はイヌの骨原発 OS の診断基準である腫瘍性骨芽細胞による類骨および骨組織の形成の有無に起因するものであり [109, 121], Ob はイヌの骨原発 OS の基本的かつ典型的な組織学的形態であると考えられた。また、動物の WHO 分類 (表 1) において, Ob は腫瘍性骨基質の量に応じて非産生性および産生性に細分類されており, 非産生性 Ob は類骨の産生および骨組織の形成を欠くものとして記載されている [109, 121]。しかしながら, 本研究における Ob の類骨および骨組織の量は症例により様々であったが, 腫瘍細胞による類骨や骨組織の形成が認められないものは本研究材料から除外した。非産生性および産生性 Ob という細分類は, イヌの骨原発 OS の診断基準と矛盾するものであり, 区分する必要はないものと考えられた。

正常な骨端板軟骨において, 骨の前駆体として軟骨の原型が利用される軟骨内骨化により骨が長管骨の長軸方向へ形成され, その過程で骨芽細胞から軟骨細胞が分化することが知られている [99]。本研究において, Cb は Ob に混在して認められることが多く, Cb の細胞形態は Ob のものと酷似していた。このことから, Ob および Cb の腫瘍細胞は系統的に近縁な細胞であり, 両者の複合型は骨および軟骨組織両方の形成能を有する腫瘍細胞で構成されていると考えられた。また Cb は骨原発 CS との鑑別が困難となる場合が多い [109, 121]。CS においても骨組織の形成が認められるが, これは腫瘍性軟骨組織に連続する軟骨内骨化によるもので, CS の腫瘍細胞による骨組織の形成は認められない [121]。両者の鑑別診断において, 腫瘍細胞による類骨産生および骨組織形成の所見を正確に見極めることが重要であると考えられた。

Fb は Ob に連続して認められることが多く, 両者の増殖境界は不明瞭で組織学的形態の移行像が観察された。また Fb 領域では類骨の産生や骨組織の形成はほとんど観察されず, 紡錘形細胞間に様々な量の膠原線維の産生を伴っていた。以上の所見から, Fb は Ob の腫瘍細胞が紡錘形細胞に形態を変化させたものであると考えられた。また Fb は骨原発 FS と鑑別されなければならないが, 骨原発 FS は OS と同様に骨髄の間葉系幹細胞由来で, その組織学的形態は酷

似している[121]. Fb を FS と区別する上で重要なことは、腫瘍性骨芽細胞による骨組織形成所見を確認し、Fb への組織学的形態の移行像を検索することであると考えられた.

Te は、比較的まれなイヌの骨原発 OS で、腫瘍性骨芽細胞による血液成分を含んだ多数の嚢胞形成を特徴とし、嚢胞を内張りするのは血管内皮細胞ではなく腫瘍細胞である[109, 121]. 嚢胞を形成する腫瘍細胞は、血管内皮細胞の特異的マーカーである factorVIII を発現し[121], 超微形態学的検索により血管内皮細胞の特徴である飲食胞, 強い細胞間接着が確認されており[97], Te の嚢胞構造は腫瘍細胞が形成する血管構造であると考えられている[97, 121]. 本研究で観察された嚢胞を内張りする腫瘍細胞の細胞形態は、嚢胞周囲の中隔で類骨や幼若骨梁を形成する Ob の腫瘍細胞と類似していたことから、血管内皮細胞の性格を有する Ob の腫瘍細胞が血管構造を形成していると考えられた. また Te は骨原発 HS との鑑別が困難であり、腫瘍細胞による類骨産生あるいは骨組織形成の有無が両者の鑑別点とされている[5, 121]. HS は血管内皮への分化を示す腫瘍細胞で構成されており、腫瘍細胞は紡錘形～多角形で多形性を示し、形成される脈管構造は細かい網目状で不完全である[121]. 一方、本研究で認められた Te の腫瘍細胞は、Ob に類似した類円形～多角形で、血液成分を含む大型で明瞭な嚢胞構造を形成し、HS の不明瞭な血管構造とは異なっていた. このような組織学的形態の違いから、Te と HS の鑑別診断が可能であると考えられた.

Pd は、骨髄間質の細網細胞に類似した小型細胞や大型で強い多形性を示す未分化な腫瘍細胞の増殖が特徴であり、少なくともわずかな類骨の産生や骨梁の形成を伴う組織型である[109, 121]. 本研究で認められた Pd は、大型不整形で複数の核小体明瞭な大型異型性核を有する腫瘍細胞で構成され、類骨の産生はわずかに認められる程度であった. また細網細胞に類似した小型細胞の増殖は認められなかった. 異型性が強く特徴的な組織学的形態が認められなかったことから、Pd はわずかな骨組織形成能を伴いながら、他の組織型への分化能を

獲得することなく、骨髄細胞が腫瘍化したものであると考えられた。

Gc は、イヌの骨原発 OS の腫瘍組織内に多核巨細胞の集簇巣が多数認められる組織型として、下位分類されている[109, 121]。この多核巨細胞の由来は、腫瘍性骨芽細胞が融合した巨細胞であるとするものや破骨細胞由来であるとするものまで諸説様々で、詳細な解明は未だされていない[90, 121]。本研究で認められた Gc の多核巨細胞は、腫瘍性骨組織の形成部位と関連なく散在性に出現し、他の組織型、特に Ob に混在して多く認められた。また破骨細胞様で、数～十数個の核に明らかな異型性は認められなかった。破骨細胞は単球系の造血性幹細胞由来であり、様々なサイトカインやシグナルにより分化成熟し、骨組織の吸収や修復、リモデリングに関わっている[99]。本研究で認められた多核巨細胞の形態から、Gc の多核巨細胞は腫瘍性骨芽細胞由来ではなく、破骨細胞由来であると思われたが、その出現機序や理由は不明であった。また、Gc の多核巨細胞の核に明らかな異型性は認められず、Gc が OS の腫瘍細胞の特徴的な組織学的形態を表す組織型であるとは言いがたいため、他の組織型と並列して下位分類されるべきではないと考えられた。さらに、Gc は骨巨細胞腫瘍との鑑別が問題となる[109, 121]。骨巨細胞腫瘍はイヌやネコで発生するまれな腫瘍であり、破骨細胞に類似した多核巨細胞の増殖が主体で、多核巨細胞の核と類似した核を有する単核細胞の増殖を伴い、腫瘍細胞による類骨の産生や骨組織の形成は認められない[109, 121]。両者の鑑別点は、多核巨細胞の増殖様式、単核細胞の核の形態、腫瘍性骨組織の形成の有無とされている[109, 121]。本研究の Gc において、多核巨細胞の出現領域は限局性であり、積極的な増殖所見や明らかな異型性は認められず、周囲の OS の腫瘍細胞は明らかな悪性所見を示す異型性核を有していた。これらの組織学的形態から、Gc と骨巨細胞腫瘍を区別するのは比較的容易であると考えられた。

イヌの骨原発 OS において、WHO 分類で区分されている 6 種類の組織型に加えて、My, Rc, Ep の 3 種類の新たな組織型が認められた。これらの組織型は、それぞれ腫瘍組織を特徴づける組織学的形態を示していた。

ヒトの骨原発 OS において、粘液産生は Cb に伴って認められることが報告されている[98]. 本研究で観察された My は Cb に連続して認められる以外にも, Ob, あるいは Fb の腫瘍組織に連続して認められるか, 単独で腫瘍組織の主体を構成していた. これらの所見から, My は Cb の組織所見の一つではなく, イヌの骨原発 OS を特徴づける一つの組織型であり, Ob や Cb, Fb が組織学的形態を変化させたものであると考えられた. また My の組織学的形態は, 粘液肉腫あるいは筋上皮細胞腫に類似しているが, 腫瘍性骨組織の形成の有無から, 両者は鑑別可能であると考えられた.

Rc の腫瘍組織は, レース状の類骨産生を伴う小型円形腫瘍細胞のシート状増殖で構成され, 他の組織型とは明らかに異なる組織学的形態を示していた. また, Rc の多くは他の組織型と複合することなく, 単独で腫瘍組織を構成していた. ヒトの WHO 分類において, 本研究で認められた Rc と類似した組織学的形態を示す小細胞型 OS が区分されており, その組織学的形態は通常型 OS とは異なっている[51]. またイヌの尺骨における小細胞型の骨原性 OS の発生が報告されており, その組織学的形態は Rc のものと類似していた[32]. 以上のことから, Rc はイヌにおいてもヒトと同様に, 他の組織型と並んで分類されるべき組織型であると考えられた. またヒトの骨組織において, 小細胞型 OS と類似した円形核を有する小型細胞のシート状増殖を特徴とする Ewing 肉腫がしばしば発生し, OS との鑑別が困難な場合がある[22]. Ewing 肉腫は神経外胚葉由来の腫瘍で[16, 50], 神経由来の性質の特に強いものは原始神経外胚葉腫瘍 (primitive neuroectodermal tumour, PNET) と呼ばれている[16]. イヌにおける PNET の発生はまれで, 頭部骨組織を原発として散発的に認められる程度であり, 小型円形細胞のシート状増殖に加えて, 偽ロゼット状配列, IHC 染色, 超微形態学的所見から確定診断されている[23, 53]. 本研究の Rc において, 典型的な偽ロゼット状配列は認められなかったこと, OSH のみではなく OSA でも認められたこと, 類骨基質の産生を伴っていたことから, Rc の発生には OSH の起源である神経外胚葉は関与しておらず, 組織学的に PNET との鑑別

は可能であると考えられた。

OSH で認められた Ep において、多角形で豊富な胞体を有する上皮様腫瘍細胞がシート状に配列し、腫瘍組織の主体を成していた。医学領域では、上皮様形態を示す骨原発 OS の報告は数多くなされており、腫瘍性骨組織形成を伴う上皮様腫瘍細胞による胞巣状、管状構造が確認されている[17, 33, 54, 60, 82, 84, 95]。またヒトの通常型 OS の下部分類として、Ep が区分されている[98]。本研究で認められた Ep において、腫瘍細胞による典型的な胞巣構造や管状構造の形成は認められなかったが、OS の腫瘍性骨芽細胞の細胞形態とは明らかに異なる上皮様腫瘍細胞のシート状増殖が観察された。イヌの上皮様形態を示す骨原発 OS は報告されていないが、Ep はイヌの骨原発 OS の新たな組織学的形態として認識されるべき組織型であると考えられた。

本研究において、イヌの骨原発 OS は非常に強い組織多様性を示す腫瘍細胞により構成され、全体の 54%は複合型に分類された。過去の研究において、Hammer らは Ob が 64%、複合型が 16%[36]、Kruse らは Ob が 74%、複合型が 6%であった報告しており[61]、本研究の複合型の割合は過去の研究における複合型の割合よりも明らかに多い結果となった。最も多く認められた複合型の組み合わせは、Ob + Cb, Ob + Fb, Ob + Te で、Ob の腫瘍組織と Cb, Fb, Te それぞれの腫瘍組織は連続して増殖しており、Ob がそれぞれの組織型へ組織学的形態を変化させたものと考えられた。また My および Ep は、Ob や他の組織型に混在して観察され、組織学的形態の移行像も認められた。一方、Rc の多くは他の組織型と複合せずに、単一で腫瘍組織を構成していた。これらの所見から、My および Ep は、Cb などと同じように Ob の組織学的形態変化による表現型であると考えられ、Rc は発生段階から独自の組織学的形態を示す組織型であると考えられた。

イヌの骨原発 OS は、典型的かつ基本的な組織型である Ob から Cb, Fb, Te などの様々な表現型へ形態を変化させることにより、多様な組織学的形態を示していることが明らかになった。イヌの骨原発 OS の腫瘍細胞は、骨髄の多能

性間葉系幹細胞に由来しており[109, 121], 多能性間葉系幹細胞は骨芽細胞の他に軟骨細胞, 脂肪細胞, 筋細胞などの様々な間葉系細胞に分化する能力を有している. 本研究結果から, イヌの骨原発 OS の組織多様性には, OS が骨髄の間葉系幹細胞由来であることが関与していると考えられた. また新たに観察された 3 種類の組織型はいずれも腫瘍組織を特徴づける組織学的形態を示し, WHO 分類の 6 種類の組織型に加えて区分されるべき組織型であると考えられた. さらに, イヌの骨原発 OS は, その組織多様性が強いがゆえに, 骨原発の CS, FS, HS などとの鑑別診断が困難な場合が多い[121]. しかしながら, OS のそれぞれの組織型の組織学的形態を十分に理解し, 詳細に検索することにより, より正確な鑑別診断が可能であると思われた.

1-5 小括

イヌの骨原発 OS において，組織多様性を把握し，組織学的形態に基づいて組織型分類を行い，OSH と OSA の組織学的形態を比較した．イヌの骨原発 OS において，動物の WHO 分類で区分されている 6 種類の組織型に加えて，新たに My, Rc, Ep の 3 種類の組織型が観察された．OS は非常に強い組織多様性を示す腫瘍細胞により構成され，半数以上の症例で同一腫瘍組織内に複数の組織型が観察された．また OSH と OSA の間で，Ep 以外の各組織型の割合に有意な違いは認められず，各組織型の組織学的形態も類似していた．

本研究において，新たに認められた組織型は，それぞれの腫瘍組織を特徴づける組織学的形態を示しており，すでに区分されている 6 種類の組織型に並んで分類されるべき組織型であると考えられた．またイヌの骨原発 OS の基本的な組織型である Ob から様々な組織型へ形態を変化させることにより，発生部位に関わりなく多彩な組織学的形態を示すことが明らかになった．さらにイヌの骨原発 OS の組織多様性は，OS の由来が骨髄の間葉系幹細胞であることが関与していると考えられた．

第 2 章

イヌの頭部および四肢骨原発骨肉腫における
細胞骨格（中間径フィラメント）の免疫組織化学的評価

2-1 序文

細胞骨格は、微小管、中間径フィラメント、アクチンフィラメントで構成され、細胞内で複雑な網目状構造を形成し、細胞形態を保持していると考えられており、その中でも中間径フィラメントは特定の細胞種に特異的な蛋白質で構成されている[49, 68]. 中間径フィラメントには *cytokeratin (CK)*, *vimentin*, *desmin*, *glial fibrillary acidic protein (GFAP)*, *neurofilament (NF)* などがあり、中間径フィラメントに対する一次抗体を用いた IHC 染色は、有用な腫瘍診断ツールの一つとして広く利用されている[33, 87].

ヒトの骨原発 OS はイヌの骨原発 OS と同様に多彩な組織学的形態を示し、骨腫瘍の WHO 分類において、通常型, Te, 小細胞型, 骨内低悪性度型に分類され[51, 85, 98], 通常型はさらに, Ob, Cb, Fb, Gc, 骨芽細胞腫様, Ep, 淡明細胞型, 軟骨芽細胞様の 8 種類の組織型に区分されている (表 2) [98]. ヒトの骨原発 OS において, *osteocalcin*, *osteonectin* などの OS 特異抗体を用いた IHC 染色による腫瘍診断に関する研究が報告されており[98], 組織多様性における α -smooth muscle actin (α -SMA), CK, *vimentin*, *desmin*, GFAP などの一次抗体を用いた IHC 染色による細胞骨格の発現性に関する研究もなされている[38].

イヌの骨原発 OS はヒトと同様に高率に肺転移を伴う予後不良の悪性腫瘍であり, 最近では予後診断マーカーとして *p53*, *β -catenin*, *surviving*, *heat shock protein*, *epidermal growth factor receptor*, *COX-2* などの一次抗体を用いた IHC 染色に関する研究が数多くなされている[7, 71, 72, 102, 105-107, 112]. しかしながら, イヌの骨原発 OS の組織多様性に関する IHC の研究はなされておらず, 組織型分類に基づいた細胞骨格の発現性に関する研究は報告されていない.

本章では, イヌの OSH60 例および OSA60 症について, 中間径フィラメントである上皮系マーカーの CK, 間葉系マーカーの *vimentin*, 筋系マーカーの

desmin, 神経系マーカーの GFAP および NF, アクチンフィラメントである平滑筋マーカーの α -SMA に対する一次抗体を用いて, それぞれの組織型における細胞骨格の発現性を評価し, 組織学的形態とこれら細胞骨格の発現の関連性について検討するとともに, OSH と OSA で細胞骨格の発現性を比較した.

2-2 材料と方法

2-2-1 供試材料

材料採取には、酪農学園大学獣医学部獣医病理学教室において病理解剖学的検索を行った腫瘍組織ならびに病理組織診断のため本学獣医病理学教室あるいは病理組織検査所へ送付された腫瘍組織、120頭のイヌから得られた OSH60 例および OSA60 例のパラフィン包埋標本を用いた。

2-2-2 免疫組織化学的検索

本研究では、OSH84 例および OSA141 例、それぞれの中から 60 例を選択し、アビジン（卵白塩基性蛋白）とビオチン（ビタミン H）の間に特異的に形成される結合反応を利用した酵素抗体法（avidin-biotinylated peroxidase complex method, ABC）による IHC 酵素抗体法を行った。一次抗体およびそれぞれの前処置は表 7 に示す。脱パラフィン後、前処置を行ったのちに内因性ペルオキシダーゼ阻害のために 0.3% H_2O_2 加メタノールに 10 分間浸漬した。十分に水洗後、Block Ace（大日本製薬、大阪）中で非特異反応除去を行った。すべての標本は一次抗体をマウント後 4℃で 16 時間反応させ、反応終了後は PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、ビオチン化二次抗体と室温で 30 分間反応させた。再び PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、アビジン-ペルオキシダーゼ複合体（Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratorise, CA, USA）と室温で 30 分間反応させた。最後に 0.05% 3,3 ジアミノベンチジン加 PBS (DAB) に過酸化水素濃度が 0.01% になるように加えた発色溶液に 10 分間浸漬して免疫反応を可視化させた。発色後、マイヤーのヘマトキシリンにて核染したのち、アルコール系列で脱水し、キシレンにて透徹操作を行い、キシレン系封入剤（MGK-S, 松浪硝子工業株式会社、大阪）を用いて封入して光学顕微鏡で観察した。IHC 染色の結果は全ての腫瘍細胞が陰性を示す場合を-, 1~25%の腫瘍細胞が陽性を示した場合を+, 26~50%の腫瘍細胞が陽性を示した場合を++, 51%以上の腫瘍細胞が陽性を示

した場合を+++とし、半定量的に評価した。

表 7. 本章で用いた一次抗体

抗体名	種類	希釈倍率	前処置	製造元
CK	mAb	Ready to use	MW	Nichirei, Tokyo, Japan
Vimentin	mAb	1:100	MW	Dako, Glostrup, Denmark
α -SMA	mAb	1:100	MW	Dako, Glostrup, Denmark
Desmin	mAb	1:40	MW	Progen, Heidelberg, Denmark
GFAP	pAb	1:1000	None	Dako, Glostrup, Denmark
NF	mAb	1:100	MW	Dako, Glostrup, Denmark

MW=マイクロウェーブ.

2-2-3 統計学的分析法

本研究では、OSH および OSA の各細胞骨格の発現性の間に関連性があるかを、スピアマンの順位相関係数検定を用いて統計学的に分析した。また各組織型の間で細胞骨格の発現性に有意差があるかを、クラスカル・ワーリス検定あるいはマン・ホイットニー検定を用いて統計学的に分析した。さらに、OSH と OSA の間で各細胞骨格の発現性に有意な差があるかを、マン・ホイットニー検定を用いて統計学的に分析した。P 値が目的とする危険率 0.05% 以下のとき、帰無仮説は棄却した。

2-3 結果

2-3-1 免疫組織化学的所見

骨芽細胞型 (Ob)

OSHにおいて、Obはすべて vimentin に陽性を示し、Obの27%がCKに、71%が α -SMAに、15%がGFAPに、7%がNFに陽性を示した。OSAにおいて、Obはすべて vimentin に陽性を示し、Obの18%がCKに、57%が α -SMAに、4%が desmin に、25%がGFAPに、18%がNFに陽性を示した。またOb全体で、25%が vimentin のみに陽性を示し、24%が vimentin + α -SMA に、7%が vimentin + CK に、9%が vimentin + α -SMA + CK に、2%が vimentin + α -SMA + GFAP + CK に共陽性を示し、全体の30%以上が vimentin を含めた3~4種の細胞骨格の共陽性を示した(表8)(図16-21)。

軟骨芽細胞型 (Cb)

OSHにおいて、Cbはすべて vimentin に陽性を示し、Cbの33%が α -SMAに、20%がGFAPに、7%がNFに陽性を示した。OSAにおいて、Cbはすべて vimentin に陽性を示し、Cbの19%がCKに、20%が α -SMAに、40%がGFAPに、27%がNFに陽性を示した。またCb全体で、53%が vimentin のみに陽性を示し、17%が vimentin + α -SMA に、17%が vimentin + GFAP、7%が vimentin + α -SMA + GFAP + CK に共陽性を示した(表8)(図22-27)。

線維芽細胞型 (Fb)

OSHにおいて、Fbはすべて vimentin に陽性を示し、Fbの20%がCKに、85%が α -SMAに、5%が desmin に、20%がGFAPに陽性を示した。OSAにおいて、Fbはすべて vimentin に陽性を示し、Fbの11%がCKに、68%が α -SMAに、5%がGFAPに、11%がNFに陽性を示した。またFb全体で、13%が

vimentin のみに陽性を示し、64%が vimentin + α -SMA に、8%が vimentin + α -SMA + GFAP + CK に、3%が vimentin + α -SMA + desmin に共陽性を示した (表 8) (図 28-33).

血管拡張型 (Te)

OSH において、Te はすべて vimentin に陽性を示し、Te の 13%が CK に、94%が α -SMA に、6%が desmin に、12%が GFAP、6%が NF に陽性を示した。OSA において、Te はすべて vimentin に陽性を示し、Te の 7%が CK に、80%が α -SMA に、7%が desmin に、20%が GFAP に、7%が NF に陽性を示した。また Te 全体で、6%が vimentin のみに陽性を示し、68%が vimentin + α -SMA に、6%が vimentin + α -SMA + GFAP + desmin に、3%が vimentin + α -SMA + desmin に共陽性を示した (表 8) (図 34-39).

未分化型 (Pd)

OSH において、Pd はすべて vimentin に陽性を示し、Pd の 14%が CK に、43%が α -SMA に、28%が GFAP に陽性を示した。OSA において、Pd はすべて vimentin に陽性を示し、Pd の 55%が α -SMA に、9%が desmin に、9%が GFAP に、9%が NF に陽性を示した。また Pd 全体で、33%が vimentin のみに陽性を示し、39%が vimentin + α -SMA に、6%が vimentin + α -SMA + GFAP に、6%が vimentin + α -SMA + NF に、6%が vimentin + α -SMA + desmin に共陽性を示した (表 8) (図 40-45).

巨細胞型 (Gc)

OSH において、Gc はすべて vimentin に陽性を示し、Gc の 21%が α -SMA に陽性を示した。OSA において、Gc はすべて vimentin に陽性を示し、他の細胞骨格には陰性を示した。また Gc 全体で、78%が vimentin のみに陽性を示し、22%が vimentin + α -SMA に共陽性を示した (表 8) (図 46-51).

粘液型 (My)

OSHにおいて、Myはすべて vimentin に陽性を示し、Myの84%が α -SMAに、17%が desmin に陽性を示した。OSAにおいて、Myはすべて vimentin に陽性を示し、Myの77%が α -SMAに、67%がGFAPに陽性を示した。またMy全体で22%が vimentin のみに陽性を示し、45%が vimentin+ α -SMAに、22%が vimentin+ α -SMA+GFAPに、11%が vimentin+ α -SMA+desminに共陽性を示した(表8)(図52-57)。

円形細胞型 (Rc)

OSHにおいて、Rcはすべて vimentin に陽性を示し、Rcの17%が α -SMAに、17%が desmin に、34%がGFAPに陽性を示した。OSAにおいて、Rcはすべて vimentin に陽性を示し、Rcの13%がCKに、50%が α -SMAに、13%がGFAPに、13%がNFに陽性を示した。またRc全体で、43%が vimentin のみに陽性を示し、29%が vimentin+ α -SMAに、7%が vimentin+ α -SMA+CKに共陽性を示した(表8)(図58-63)。

上皮型 (Ep)

OSHにおいて、Epはすべて vimentin に陽性を示し、Epの60%がCKに、80%が α -SMAに陽性を示した。またEp全体で、20%が vimentin+CKに、40%が vimentin+ α -SMA+CKに、40%が vimentin+ α -SMAに共陽性を示した(表8)(図64-69)。

2-3-2 統計学的分析結果

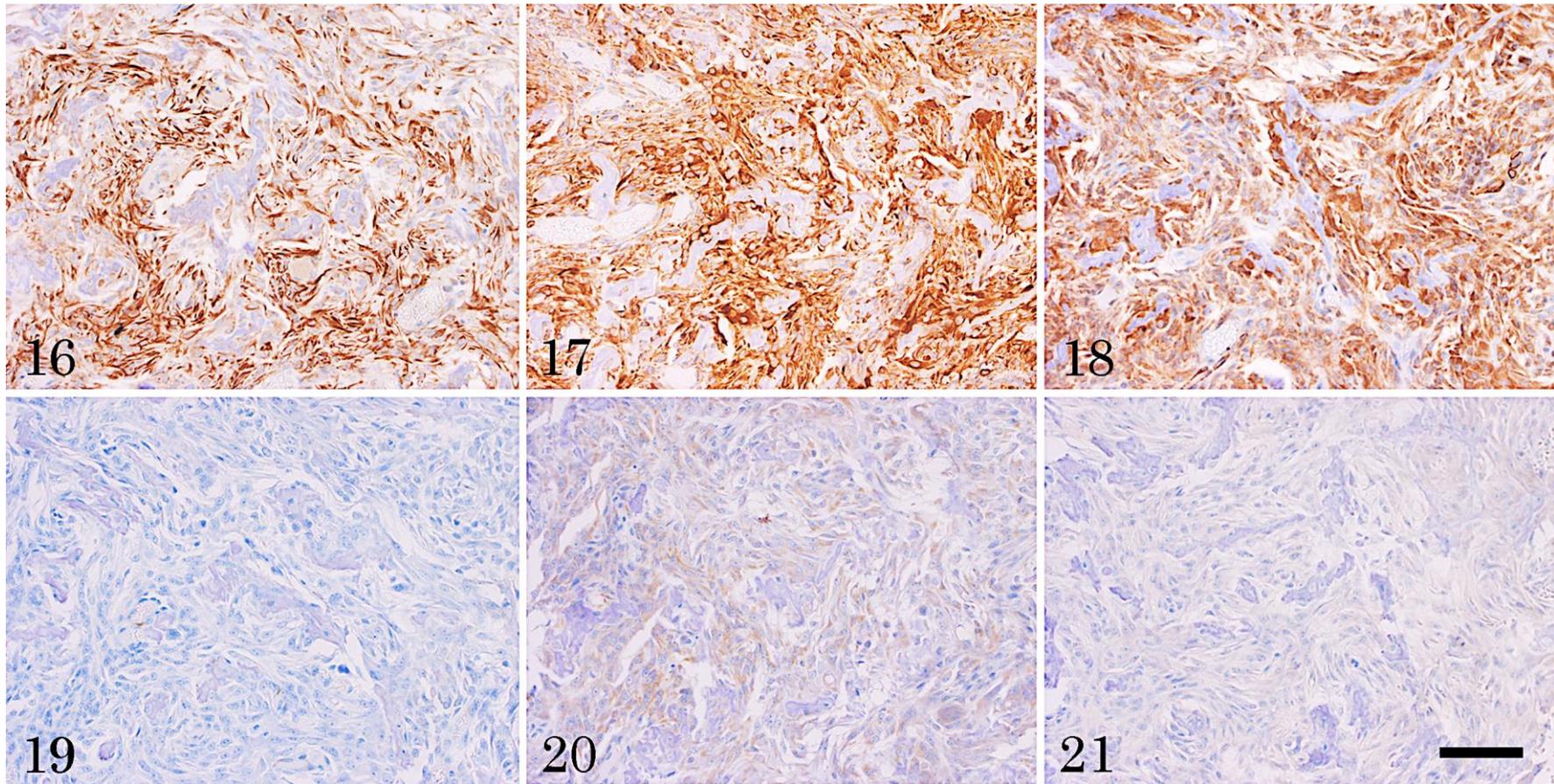
CKの発現性において、ObおよびEpが他の組織型に比べて有意に強い発現性を示した($P < 0.05$)。 α -SMAの発現性において、FbおよびTeが他の組織型に比べて有意に強い発現性を示した($P < 0.05$)。他の細胞骨格において、各

組織型の間で有意な発現性の違いは認められなかった ($P > 0.05$). また GFAP と NF の発現に有意な正の相関性が認められた ($P < 0.05$). さらに OSH の α -SMA は OSA よりも有意に強い発現性を示し ($P < 0.05$), α -SMA 以外の細胞骨格の発現は OSH と OSA の間で有意な差は認められなかった ($P > 0.05$).

表 8. 各組織型における細胞骨格の陽性率 (%)

組織型	OSH						OSA					
	CK	vimentin	α -SMA	desmin	GFAP	NF	CK	vimentin	α -SMA	desmin	GFAP	NF
Ob	27	100	71	0	15	7	18	100	57	4	25	18
Cb	0	100	33	0	20	7	19	100	20	0	40	27
Fb	20	100	85	5	20	0	11	100	68	0	5	11
Te	13	100	94	6	12	6	7	100	80	7	20	7
Pd	14	100	43	0	28	0	0	100	55	9	9	9
Gc	0	100	21	0	0	0	0	100	0	0	0	0
My	0	100	84	17	0	0	0	100	77	0	67	0
Rc	0	100	17	17	34	0	13	100	50	0	13	13
Ep	60	100	80	0	0	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a=該当なし.

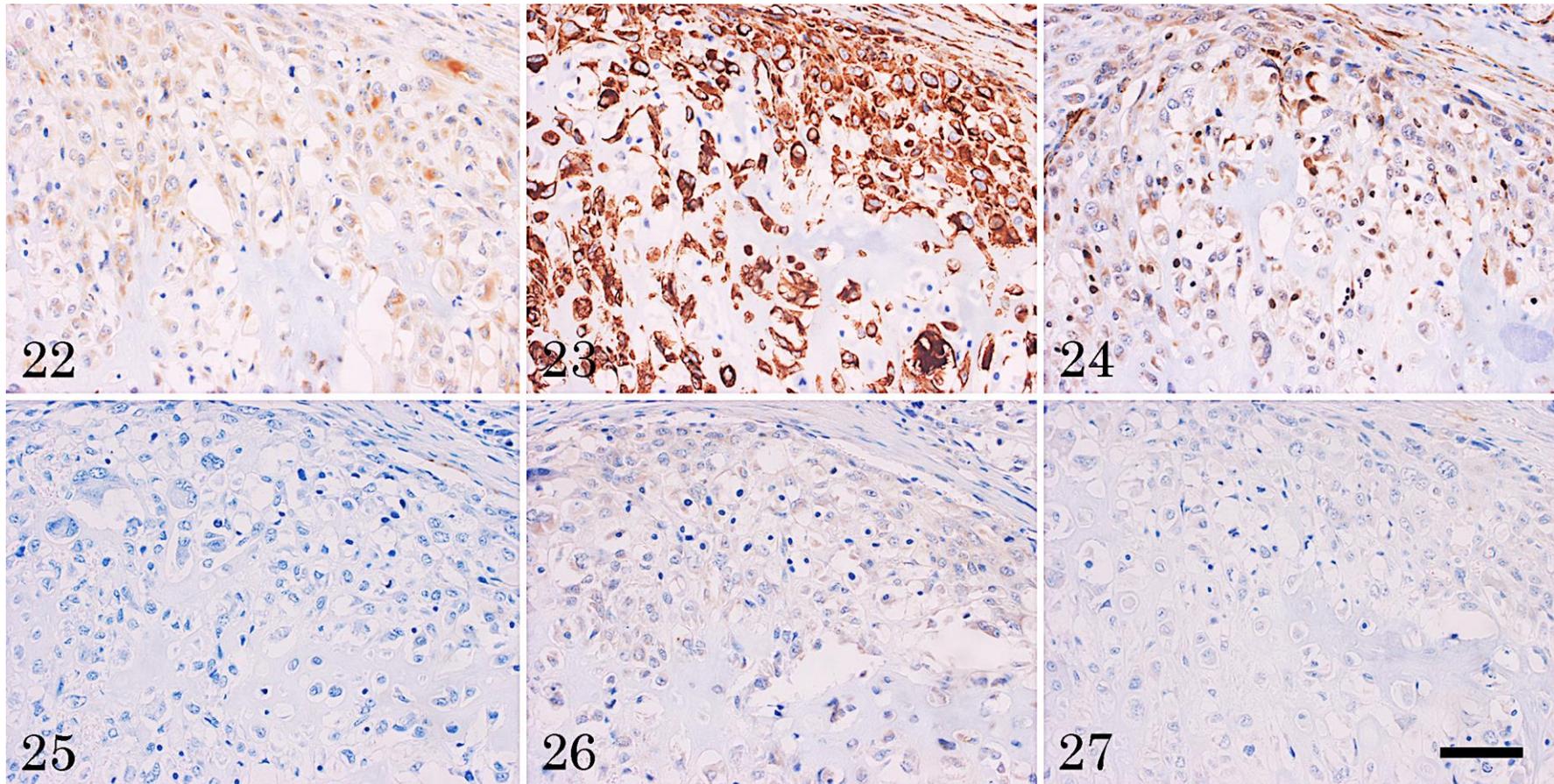


Ob における IHC 染色結果.

図 16 : CK. 図 17 : vimentin. 図 18 : α -SMA. 図 19 : desmin. 図 20 : GFAP. 図 21 : NF.

CK, vimentin, α -SMA, GFAP に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

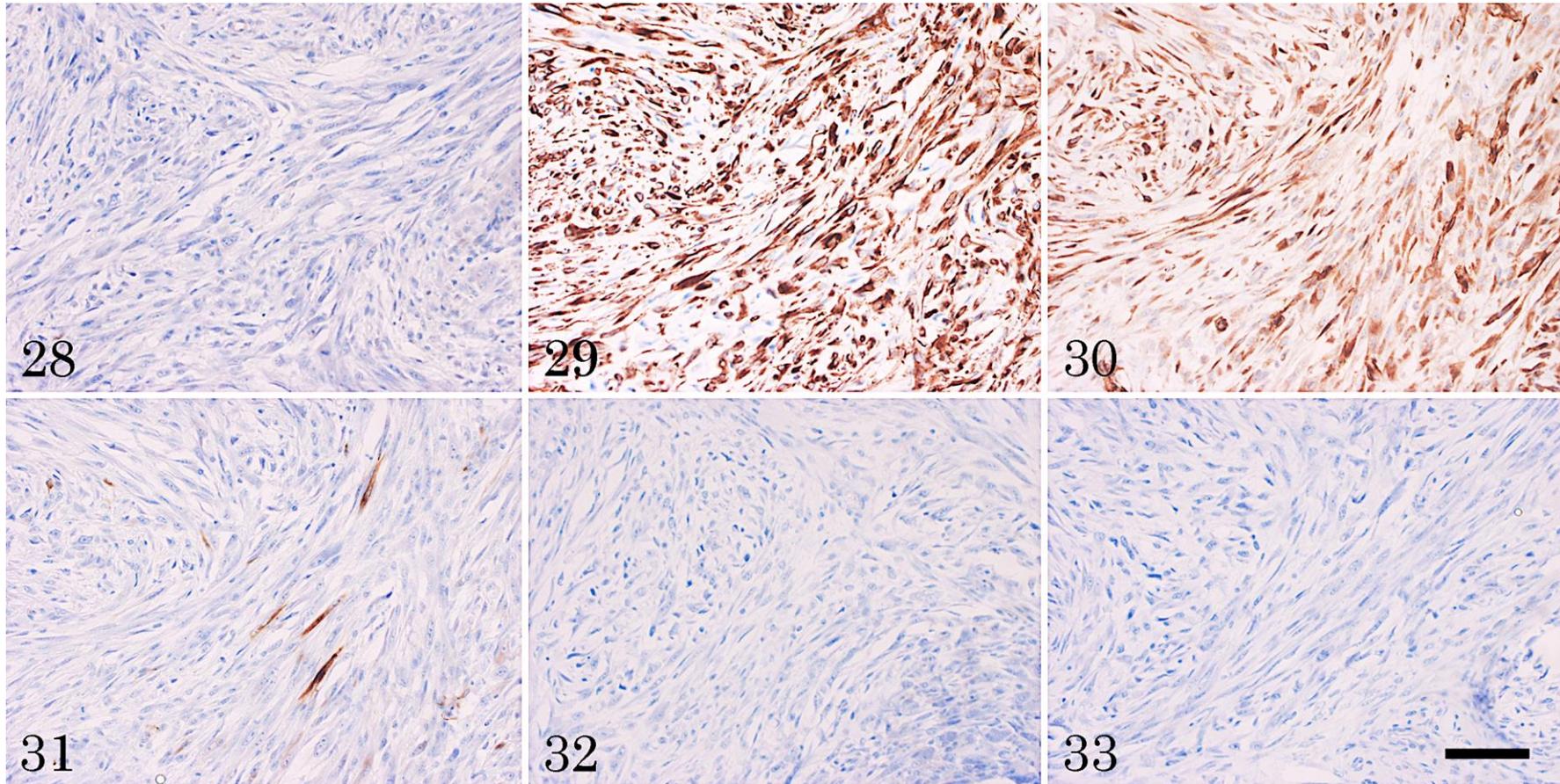


Cbにおける IHC 染色結果.

図 22 : CK. 図 23 : vimentin. 図 24 : α -SMA. 図 25 : desmin. 図 26 : GFAP. 図 27 : NF.

CK, vimentin, α -SMA, GFAP に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

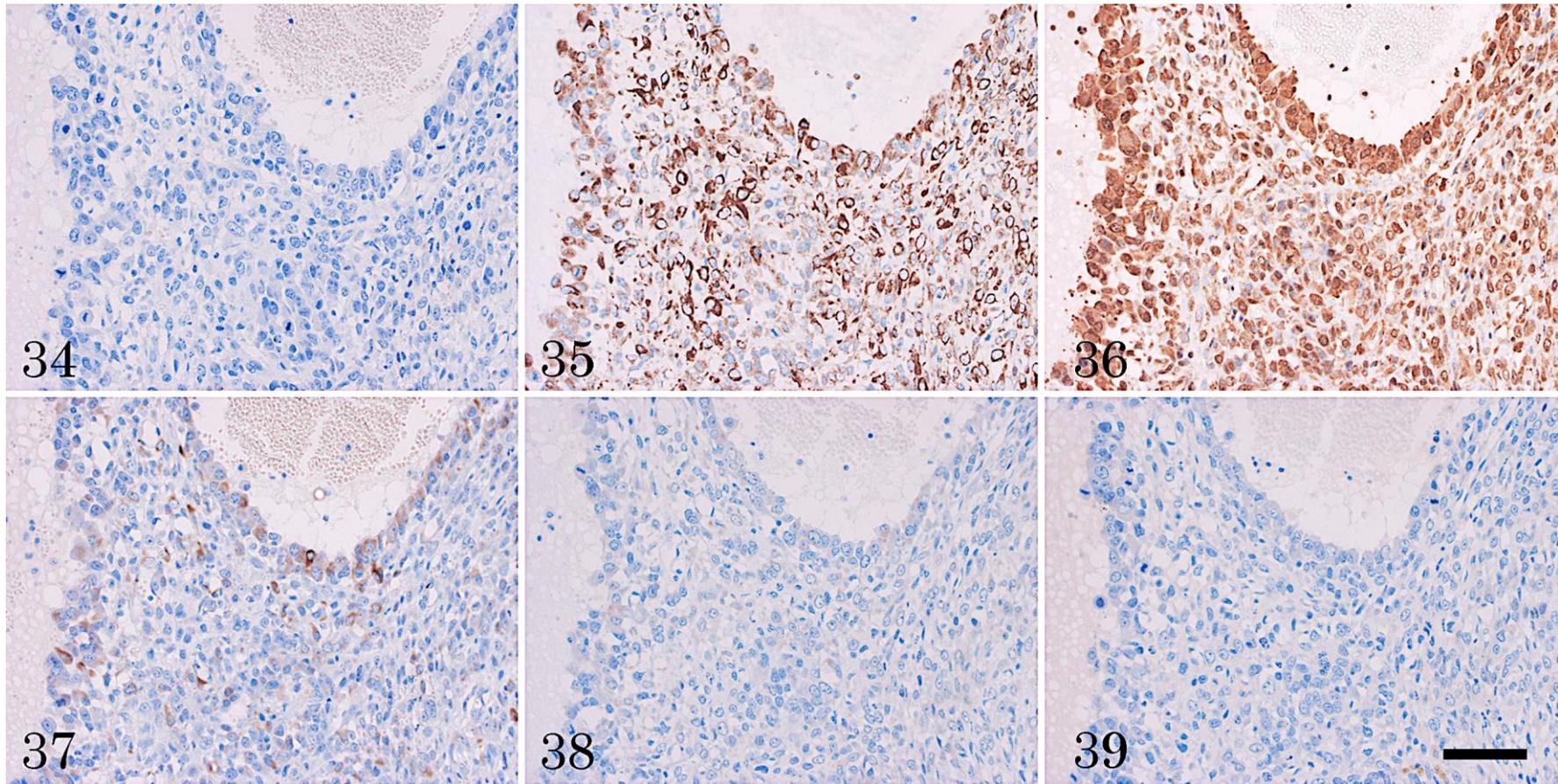


Fb における IHC 染色結果.

図 28 : CK. 図 29 : vimentin. 図 30 : α -SMA. 図 31 : desmin. 図 32 : GFAP. 図 33 : NF.

vimentin, α -SMA, desmin に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

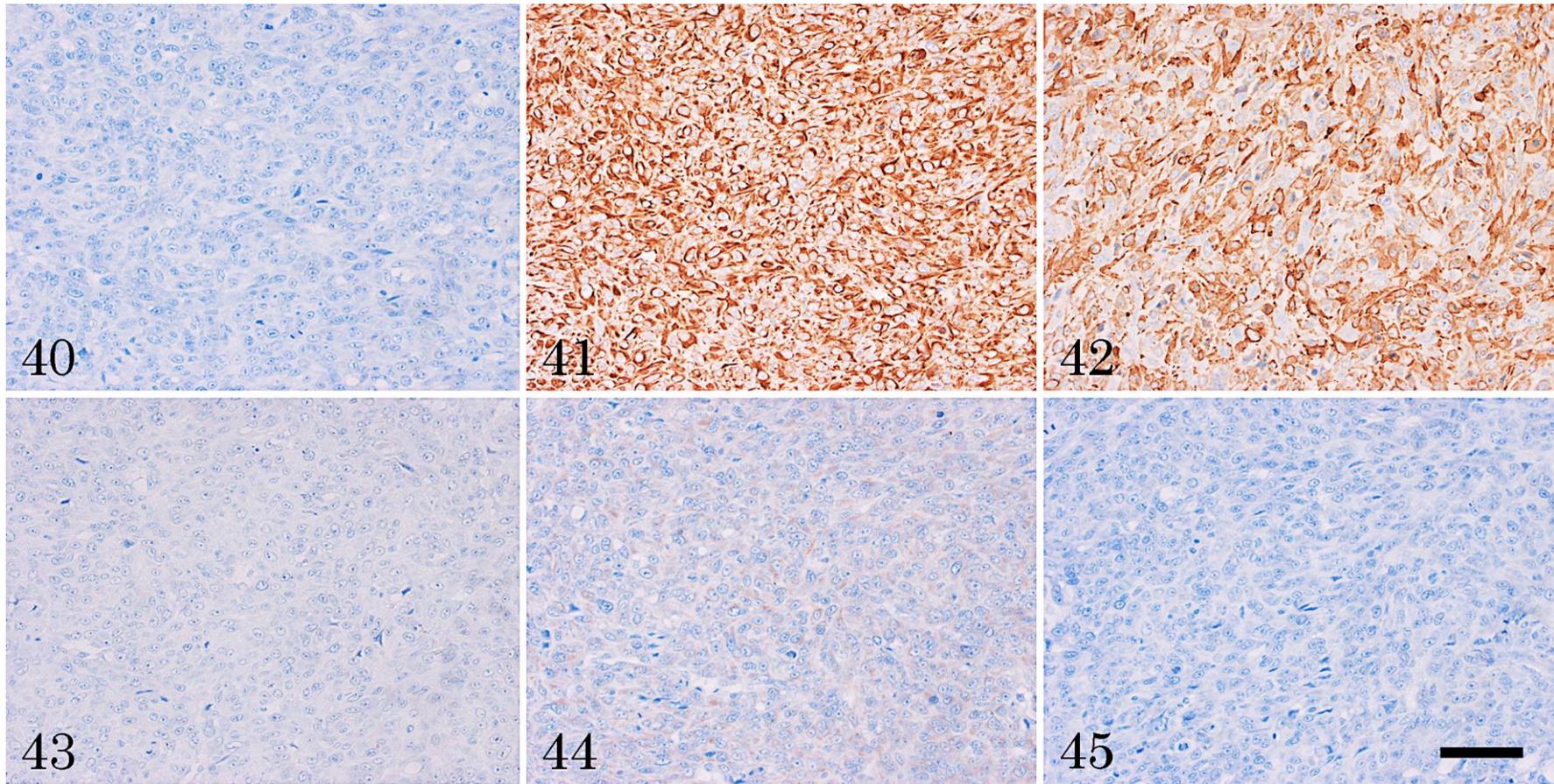


Teにおける IHC 染色結果.

図 34 : CK. 図 35 : vimentin. 図 36 : α -SMA. 図 37 : desmin. 図 38 : GFAP. 図 39 : NF.

vimentin, α -SMA, desmin, GFAP に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

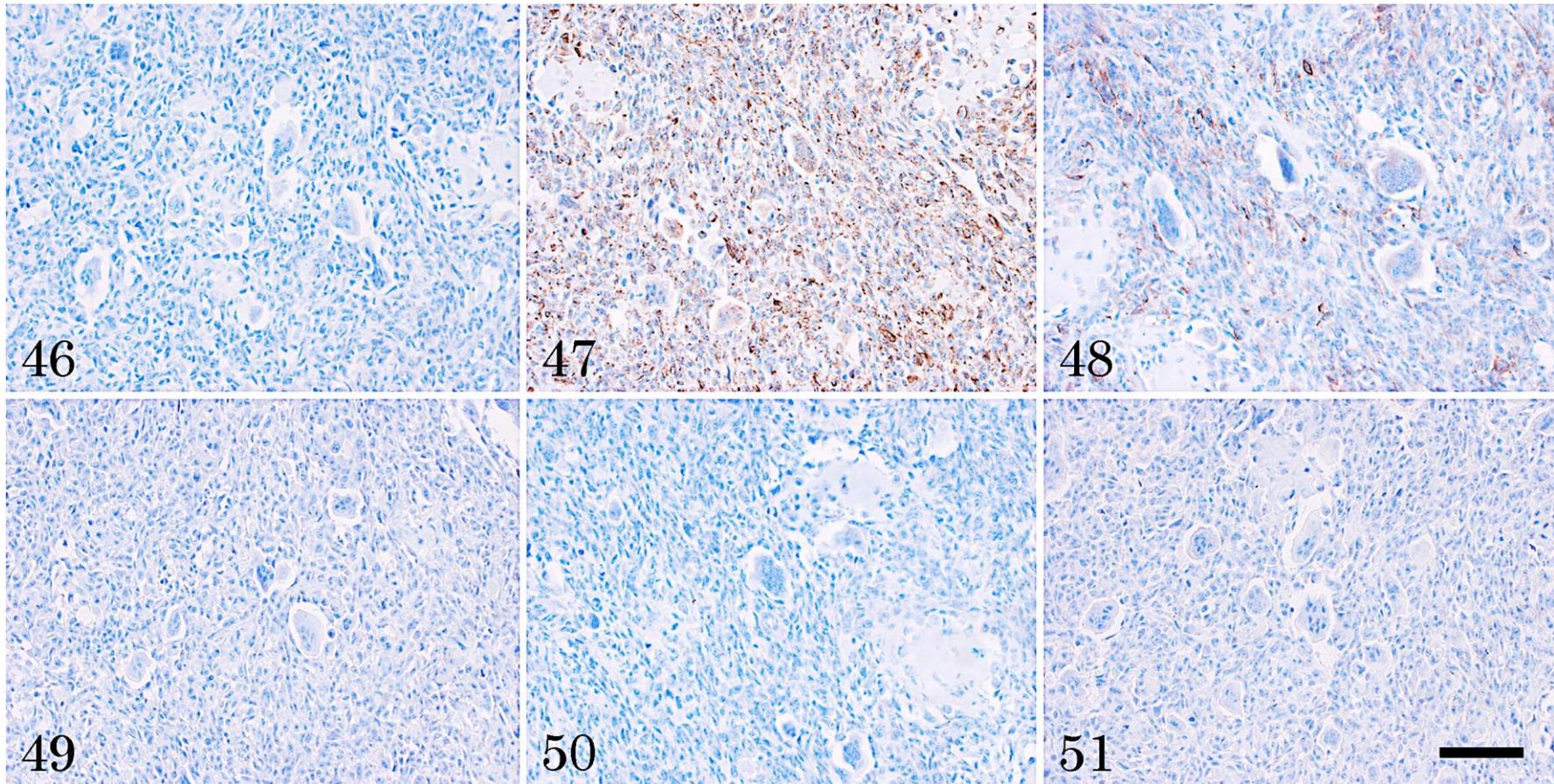


Pdにおける IHC 染色結果.

図 40 : CK. 図 41 : vimentin. 図 42 : α -SMA. 図 43 : desmin. 図 44 : GFAP. 図 45 : NF.

vimentin, α -SMA, GFAP に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

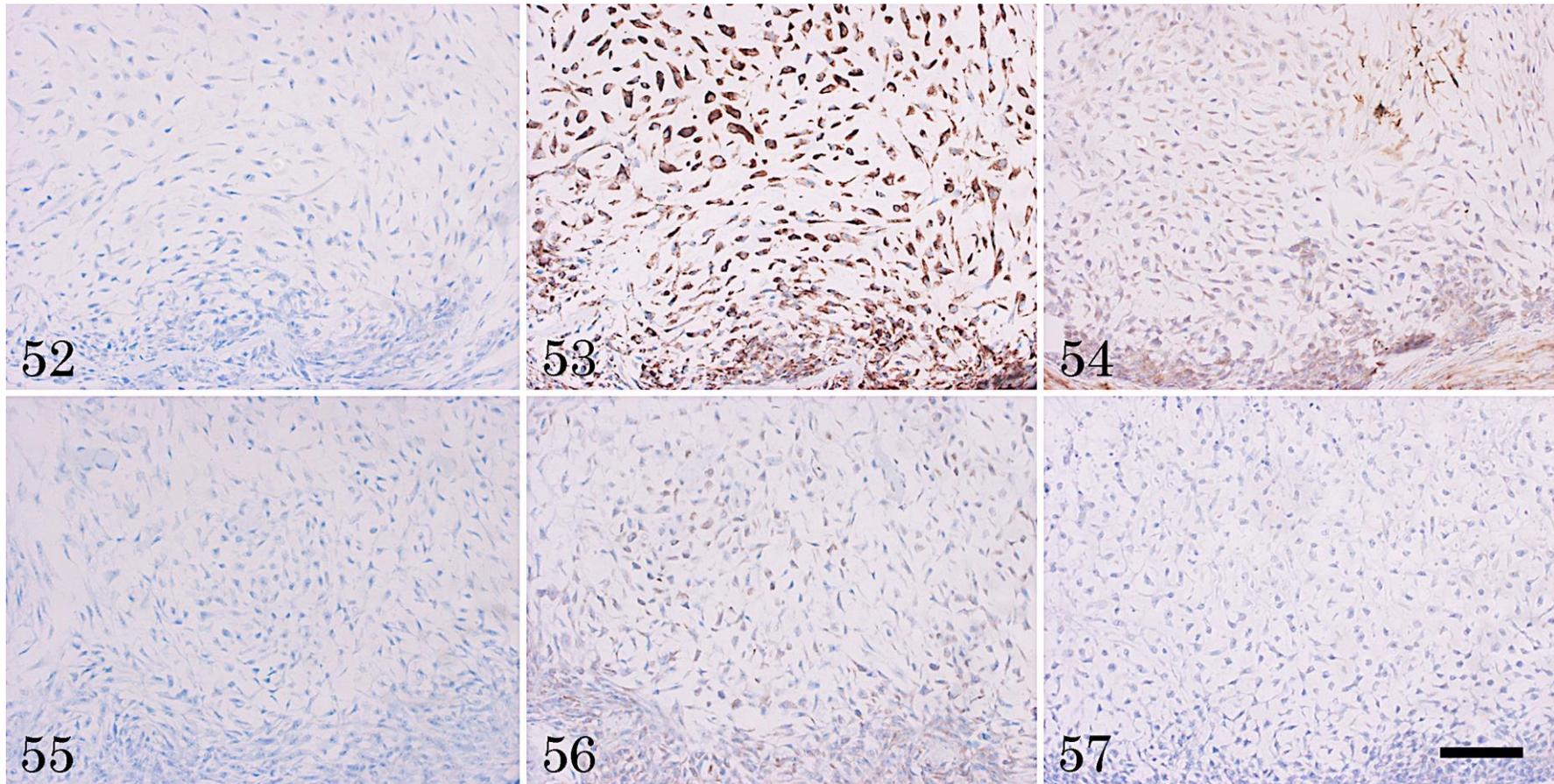


Gcにおける IHC 染色結果.

図 46 : CK. 図 47 : vimentin. 図 48 : α -SMA. 図 49 : desmin. 図 50 : GFAP. 図 51 : NF.

vimentin, α -SMA に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

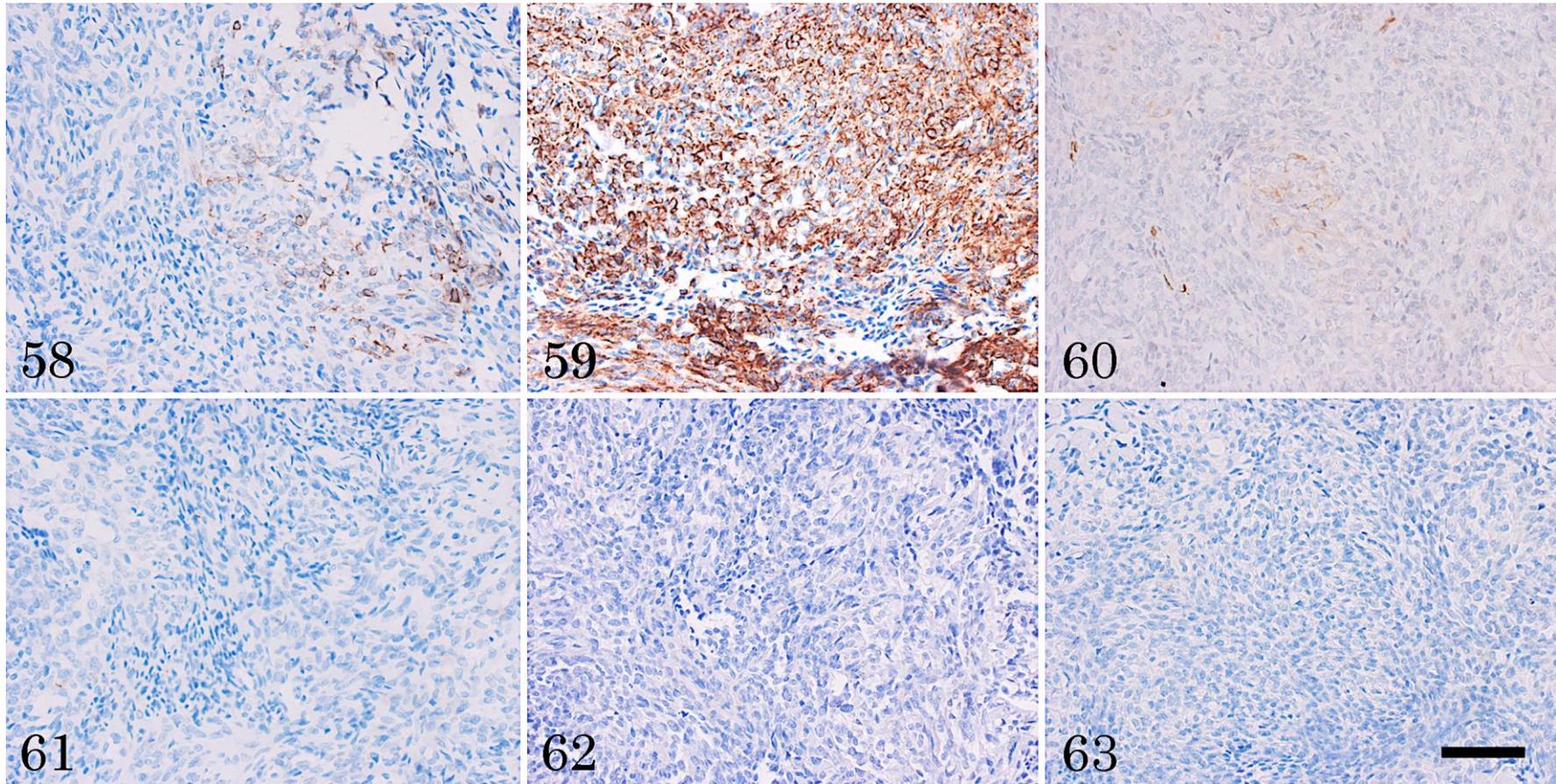


My における IHC 染色結果.

図 52 : CK. 図 53 : vimentin. 図 54 : α -SMA. 図 55 : desmin. 図 56 : GFAP. 図 57 : NF.

vimentin, α -SMA, GFAP に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

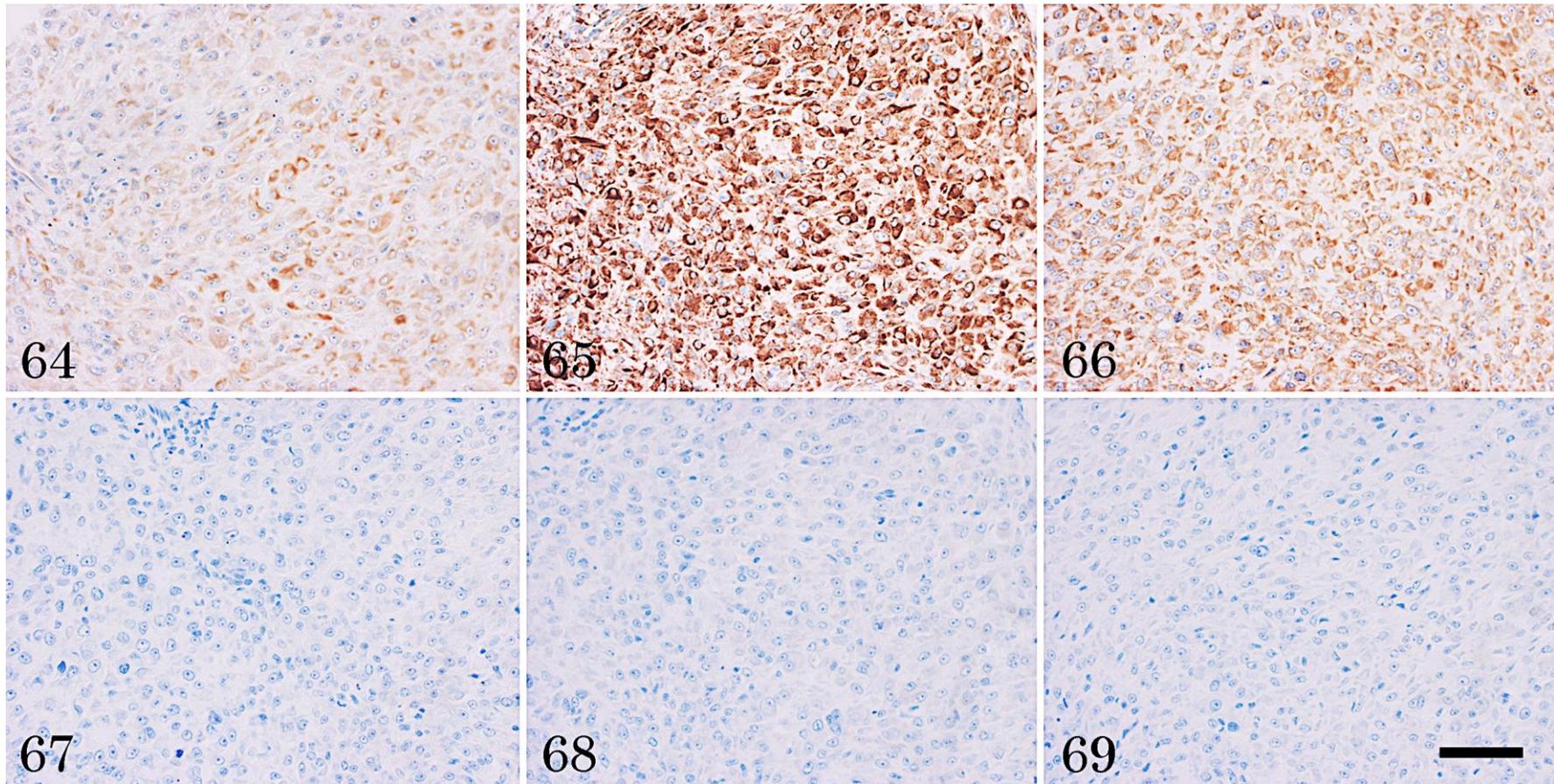


Re における IHC 染色結果.

図 58 : CK. 図 59 : vimentin. 図 60 : α -SMA. 図 61 : desmin. 図 62 : GFAP. 図 63 : NF.

CK, vimentin, α -SMA に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.



Ep における IHC 染色結果.

図 64 : CK. 図 65 : vimentin. 図 66 : α -SMA. 図 67 : desmin. 図 68 : GFAP. 図 69 : NF.

CK, vimentin, α -SMA に陽性像が観察される.

ABC 法, Bar=100 μ m.

2-4 考察

細胞骨格は、その名のとおり細胞の骨格を内部から構造的に支持しながら細胞形態を保持しており、主な構成要素は微小管、中間径フィラメント、アクチンフィラメントの3つの線維構造である[49, 68]。細胞骨格はほぼすべての細胞に存在し、細胞種によって構成する細胞骨格の種類は異なっている[49, 68]。この特徴を利用して、細胞骨格はIHC染色による腫瘍細胞の性質や由来を特定するための有用なマーカーとして広く用いられている[33, 87]。本研究において、イヌの骨原発OSは様々な細胞骨格を発現し、その組織学的形態に一致するあるいは一致しないCK, vimentin, α -SMA, desmin, GFAP および NF の細胞骨格を保持していた。細胞骨格は細胞の形態を決定づけていると考えられているが、必ずしも発現している細胞骨格がOSの腫瘍細胞の細胞形態を決定しているわけではないことが明らかになった。また複数の細胞骨格の共発現を示す腫瘍細胞が多数認められた。腫瘍組織内における腫瘍細胞の組織異質性は以前から知られており、腫瘍組織は異なる表現型を有する様々な腫瘍細胞から構成されている[26]。より多くの細胞骨格を発現している腫瘍細胞は、より多様な組織学的形態を示す能力を有し、その組織多様性に基づく細胞骨格の発現の多様性は、骨髄組織由来であるイヌの骨原発OSの腫瘍異質性に起因していると考えられた。

Vimentin の発現はすべての組織型のすべての腫瘍細胞に認められ、多くの腫瘍細胞は vimentin と他の細胞骨格の共発現を示した。Vimentin は骨軟骨細胞、線維芽細胞、横紋筋細胞、平滑筋細胞、神経細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞など多様な間葉細胞に分布する中間径フィラメントで、発生過程において胚葉起源に限らず分化度の低い細胞に広く分布しており、特定の組織においてCK, desmin, GFAP, NF と同時に重複して発現することが知られている[46, 65, 88, 116, 123]。本研究において、多様な組織学的形態を示すイヌの骨原発OSは骨髄の間葉系幹細胞由来であるため、常に vimentin を発現し、同時に他の

細胞骨格を共発現することにより、多様な組織学的形態を示すようになったのではないかと考えられた。

CKの発現はOb, Cb, Fb, Te, Pd, Rcなどの様々な組織学的形態を示す腫瘍細胞に認められ、特に多くのObおよびEpの腫瘍細胞で多く観察された。またCK陽性腫瘍細胞は、すべてvimentinの共発現を示した。これらの結果から、イヌの骨原発OSのCKを発現する腫瘍細胞は多彩な組織学的形態を示し、上皮および間葉系両方の細胞骨格を保持していることが明らかになった。CKは分化成熟した上皮細胞に分布する中間径フィラメントで、約20種のサブタイプが知られている[93]。イヌの骨原発OSは骨髄の間葉系幹細胞由来であり[109, 121]、OSの腫瘍細胞のCKの発現機序にはEMTとは逆の現象である間葉上皮転換(MET)が関与している可能性が考えられた。EMTとは上皮細胞が細胞極性や細胞接着性を失い、間葉細胞の性質を獲得する現象で、発生過程の器官形成において重要な現象である[47]。また癌の浸潤転移においてもEMTが深く関わっており、SnailやTwistなどの様々な転写因子の活性化により、上皮細胞のCKや細胞接着因子であるE-cadherinの発現が減少し、間葉系マーカーであるvimentinやN-cadherinの発現が増加することにより、腫瘍細胞が遊走能や浸潤能を獲得することが知られている[47]。逆に、METは間葉細胞が上皮様の表現型を獲得する現象で、肉腫の予後診断マーカーおよび治療標的因子として重要であるとされ、腫瘍の増殖や浸潤転移を抑制することが報告されている[35, 78, 131]。Vimentinは発生初期から間葉細胞以外の細胞でも発現が認められるため、OSの腫瘍細胞がMETによりCKの発現を示してもなお、vimentinの発現の低下が認められなかったのではないかと考えられた。しかしながら、METにおけるCKやvimentinの発現性の変化については詳細な検索は行われておらず、転写因子や他のEMTマーカーによるさらなる検討が必要であると考えられた。

CKの発現を示すヒトの骨原発OSは数多く報告されており、上皮様形態を示すOSだけではなく、ObやCb, Fbなどの肉腫様形態を示す腫瘍細胞にも

CK の発現が確認されている[37, 36, 39, 54, 60, 83, 84], 近年, CK の発現を示すヒトの骨軟部肉腫の報告が増えており, 組織学的形態と合わせて 3 群に区分されている[39]. 第 1 群は肉腫様の組織学的形態を示す腫瘍細胞が CK の発現を示す腫瘍で, OS や平滑筋肉腫, 悪性線維性組織球腫で報告されている[15, 37, 44, 69, 79, 94, 117]. 第 2 群は, 胞巣構造あるいは管状構造を形成する上皮様形態を示す腫瘍細胞が CK の発現を示す腫瘍で, 類上皮性 OS や類上皮性平滑筋肉腫などが報告されている[79, 94, 117, 133]. 第 3 群は肉腫成分と上皮成分が混在する腫瘍で, 滑膜肉腫などが含まれている[73, 86]. 第 2 群や第 3 群の腫瘍では, 発現している CK が腫瘍細胞の上皮様形態に関わっており, それが組織診断名の決め手となっている. 一方, 第 1 群の肉腫様腫瘍細胞の CK の発現は, 腫瘍化に関連したランダムな異常分化の結果であるとされ, 臨床病理学的意義は少ないと考えられている[57]. 本研究においても, イヌの骨原発 OS の肉腫様および上皮様形態を示す腫瘍細胞の両方に CK の発現が認められた. 肉腫様細胞における CK の発現の機序は詳細に解明されていないが, この現象を理解することは腫瘍診断学において極めて重要であり, 正確な組織診断を決定するためには IHC 染色の所見に振り回されることなく, 腫瘍の組織学的形態を正確に把握することが重要であると考えられた. 本研究は, CK の発現および上皮様形態を示すイヌの骨原発 OS に関する初めての報告である.

α -SMA 陽性細胞は, すべての組織型で多数観察され, 特に Fb および Te で多く認められた. また OSH は OSA よりも有意に強い α -SMA の発現を示した. α -SMA 陽性細胞の主体は紡錘形で線維芽細胞様の形態を示していた. α -SMA は一般的に平滑筋細胞が有するアクチンフィラメントで, 他に筋線維芽細胞や筋上皮細胞にも分布し, これら紡錘形細胞への分化を示す腫瘍の鑑別診断に有用なマーカーとして IHC 染色に広く利用されている[67]. ヒトの骨原発 OS において, 様々な組織学的形態を示す OS が α -SMA の発現を示したという報告がいくつかなされている[38, 40, 130]. 本研究において, Ob や Te などの骨芽細胞様腫瘍細胞, Rc の円形腫瘍細胞, Ep の上皮様腫瘍細胞にも α -SMA の発現

が観察されたが、Fb などの紡錘形腫瘍細胞における発現が有意に多く認められた。このことから、 α -SMA の発現を示す腫瘍細胞は平滑筋や筋線維芽細胞、筋上皮細胞の性質を有しており、Fb の紡錘形腫瘍細胞は、 α -SMA を保持している腫瘍性骨芽細胞が形態を変化させたものであると推察された。また OSH の方が OSA よりも有意に強い α -SMA の発現性を示した理由は不明であるが、OS の発生部位の違いがその要因の一つであることが示唆された。

Ob, Fb, Te, Pd, My, Rc の少数の腫瘍細胞に desmin の発現が認められ、その組織学的形態はさまざまであった。Desemin は、筋系細胞が有する中間径フィラメントで、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、筋線維芽細胞などに分布し、横紋筋肉腫や一部の平滑筋肉腫などの鑑別診断に有用であり、特異性の高い筋原性マーカーである [87]。Desmin の発現を示す骨原発 OS は、ヒトおよびイヌでいくつか報告されているが [38, 40, 45, 130]、その組織学的形態と desmin の発現の関連性についての評価は行われていない。本研究において、desmin の発現を示す腫瘍細胞は骨芽細胞様～円形細胞様あるいは紡錘形で、一定した細胞形態は認められなかった。Desmin の発現が認められるヒトやイヌの横紋筋肉腫は、紡錘形～円形などの多形性を示す細胞形態を示し、多様な組織学的形態を示す腫瘍であり [41, 91]、その組織多様性を特徴づけているのが desmin であるならば、desmin は多彩な細胞形態を形成する能力を有する中間径フィラメントであると考えられる。これらのことから、本研究における desmin の発現を示した腫瘍細胞の組織学的形態には、多様な細胞形態を形成する desmin の特性が関与しているのではないかと考えられた。

GFAP の発現は、Ob, Cb, Fb, Te, Pd, My, Rc で観察され、その組織学的形態に特定の所見は認められなかったが、OSA の Cb および My の軟骨や粘液を産生する腫瘍細胞に多くの GFAP の発現が観察された。GFAP は、星状膠細胞や上皮細胞、末梢神経、シュワン細胞などの神経系組織に分布する中間径フィラメントで、それらへの分化を示す星状膠細胞腫や上皮腫、膠芽腫などで発現が認められる [87]。Kasantikul らは、成熟骨細胞あるいは軟骨細胞が GFAP

に類似した細胞骨格を有していることを明らかにした[52]。またヒトの OS への分化を示す神経膠肉腫の骨芽細胞様腫瘍細胞における GFAP の発現や[2, 3], ヒトの OS の Ob および Cb における GFAP の発現が確認され, GFAP の発現と骨軟骨組織への分化の関連性が報告されている[103]。さらに, ヒトの軟骨粘液腫や粘液を産生する筋上皮細胞腫瘍においても GFAP の発現が確認されている[55, 115]。本研究結果から, GFAP の発現は, イヌの骨原発 OS の細胞形態には関与せず, 腫瘍性軟骨組織やそれに連続する粘液産生に関連していると考えられ, GFAP を保持している他の組織型の腫瘍細胞も同様の性質を有していることが示唆された。

NF 陽性細胞は, Ob, Cb, Fb, Te, Pd, Rc の腫瘍組織内で散在性に少数認められた。NF は, 成熟した神経細胞, 神経内分泌細胞に分布する中間径フィラメントであり, 中枢神経系腫瘍, 末梢神経系腫瘍の鑑別診断に用いられる[87]。現在までに, ヒトおよびイヌの骨原発 OS における NF の発現性について検討した研究は報告されていない。本研究において, NF を発現する腫瘍細胞には, 明らかな神経細胞への分化を示す組織学的形態は認められず, 神経系細胞の性質を有しているとは言いがたいが, イヌの骨原発 OS における NF の発現性は認知すべき新たな知見であると考えられた。またイヌの OSH は OSA とは異なる外胚葉神経堤細胞由来であるが[20], 両者で NF の発現性に違いが認められなかった。NF はより分化した神経細胞において発現が認められる中間径フィラメントであり, NF の発現がイヌの骨原発 OS の発生部位の違いに関与していないことが明らかになった。

Ob において, vimentin, α -SMA, GFAP, CK, NF, desmin の中で 3~4 種の複数の細胞骨格を発現している腫瘍細胞が 30%以上を占めており, 多様な細胞骨格の発現を示していた。また vimentin+ α -SMA の共発現を示す Ob の腫瘍細胞が多く認められ, これらの腫瘍細胞は平滑筋細胞や筋線維芽細胞の性質を有し, Fb のような紡錘形細胞に組織学的形態を変化させる素質を有していると考えられた。さらに vimentin+CK あるいは vimentin+ α -SMA+CK の共

発現を示す Ob の腫瘍細胞も多く認められ、それぞれ上皮細胞あるいは筋上皮細胞の性質を有し、Ep や My のような組織学的形態を示す性質を有していると考えられた。これらのことから、Ob はイヌの骨原発 OS の基本的かつ典型的な組織学的形態であり、多様な細胞骨格を発現することにより、他の組織型へ組織学的形態を変化させているのではないかと考えられた。

Cb において、vimentin+ α -SMA, vimentin+GFAP, vimentin+ α -SMA+GFAP に共発現を示す腫瘍細胞がしばしば認められた。Cb は骨芽細胞様腫瘍細胞による軟骨組織の形成を特徴とし、Ob, Fb あるいは My に連続して増殖していた。GFAP の発現は Cb における軟骨組織の形成に、 α -SMA の発現は Cb に連続して増殖する Fb や My への形態学的変化に関連するものであると考えられた。

Fb は紡錘形腫瘍細胞の線維肉腫様増殖を特徴とし、Fb の腫瘍細胞の 60%以上は vimentin+ α -SMA の共発現を示し、Ob と Fb の組織学的形態の移行部位においても α -SMA の発現が認められた。これらのことから、Fb は Ob が組織学的形態を変化させたものであり、その細胞形態の保持には α -SMA が関与していると考えられた。また vimentin+ α -SMA+desmin や vimentin+ α -SMA+CK に共発現を示す Fb の紡錘形腫瘍細胞も散見され、これらは筋線維芽細胞、筋上皮細胞あるいは平滑筋細胞の性質を有している腫瘍細胞であると考えられた。

Te は骨芽細胞様腫瘍細胞による血液成分を含んだ大小の嚢胞形成を特徴とし、Te の 70%近くの腫瘍細胞は vimentin+ α -SMA の共発現を示し、興味深いことに、嚢胞を内張りしている腫瘍細胞により強い α -SMA の発現が認められた。Te の腫瘍細胞は血管内皮細胞の特徴を有していると考えられており [97, 121], 骨髄の間葉系幹細胞由来の血管内皮前駆細胞が平滑筋細胞への分化能を有し、 α -SMA の発現を示すことが確認されている [48]。これらのことから、Te は平滑筋細胞への分化を示す血管内皮細胞の性質を有する腫瘍細胞で構成され、血管様嚢胞構造を形成していると考えられた。また、 α -SMA を発現する Ob の

腫瘍細胞は、Fbの紡錘形細胞への細胞形態の変化だけではなく、Teの嚢胞を形成する能力を有していると考えられた。今後、イヌの骨原発OSのTeにおける血管内皮細胞の性質を確かめるために、血管内皮マーカーによるIHC染色、電顕による超微形態学的検索など、さらなる検討が必要であると考えられた。

Pdは強い異型性核を有する大型で多形性を示す腫瘍細胞で構成され、Pdの腫瘍細胞は、vimentin+ α -SMA, vimentin+ α -SMA+GFAP, vimentin+ α -SMA+NF, vimentin+ α -SMA+desminなどのように、vimentinと α -SMAの共発現を中心として、複数の細胞骨格の発現を示した。これらの結果から、強い多形性あるいは異型性を示すPdは、必ずしも未分化な腫瘍細胞ではなく、様々な細胞種への分化能を有する腫瘍細胞で構成されているのではないかと考えられた。

Gcにおいて、すべての多核巨細胞はvimentinの発現を示し、一部で α -SMAの発現が観察された。多核巨細胞は、核に明らかな異型性は認められず、破骨細胞由来であると推察されたが、破骨細胞は単球系の造血性幹細胞由来であり、通常 α -SMAの発現は示さない[99]。今回認められた多核巨細胞の由来をさらに検討するためには、CD68やHLA-DRなどの単球系マーカーを用いたIHC染色による検索が必要であると考えられた。

Myの腫瘍細胞の60%以上はvimentin+ α -SMAあるいはvimentin+ α -SMA+GFAPの共発現を示した。またMyの粘液産生に連続して軟骨組織を形成するCbの腫瘍細胞においても、 α -SMAおよびGFAPの発現が認められた。このIHC染色の所見は組織学的形態と矛盾せず、Myの腫瘍細胞は粘液産生を伴う筋線維芽細胞や軟骨芽細胞への分化を伴っていると考えられた。

Rcでは、vimentin+ α -SMAあるいはvimentin+ α -SMA+CKの共発現を示す腫瘍細胞がしばしば認められた。Rcと類似した組織学的形態を示すヒトのsmall cell OSにおいても、 α -SMAの発現が報告されている[51]。Rcの α -SMAやCKの発現は、組織学的形態と一致するものではないが、イヌの骨原発OSにおいて新たな組織型の認知すべきIHC所見の一つであると考えられた。また、

Rc と類似する組織学的形態を示す PNET では NF の発現が認められ、CD99 や内分泌系マーカーであるシナプトフィジンやクロモグラニン A など PNET の鑑別に必要であるとされている[23, 53]. 本研究の Rc では、NF の発現はほとんど認められず、ロゼット状配列などの構造も観察されなかったことから、PNET との鑑別は可能であった. さらに、OSH の Rc の一部で α -SMA + desmin の共発現を示す腫瘍細胞が観察され、平滑筋あるいは骨格筋への分化を示唆する IHC 所見が認められた. Rc の細胞形態は、ヒトやイヌの横紋筋肉腫の組織型の一つである胞巣型横紋筋肉腫に類似しているが、胞巣型横紋筋肉腫ではシート状に増殖する円形細胞を区画する線維性血管が存在する[77, 91, 110]. この組織所見と腫瘍性類骨の有無、IHC 染色による myogenin などの骨格筋マーカーの発現性が、Rc と胞巣型横紋筋肉腫との鑑別点に挙げられる.

Ep の腫瘍細胞の 60% が vimentin + CK あるいは vimentin + α -SMA + CK の共発現を示し、40% は CK の発現は示さなかった. ヒトの骨原発 OS において、CK の発現を伴うあるいは伴わない上皮様形態を示す OS は数多く報告されている[17, 38, 39, 54, 60, 82-84, 95]. 本研究結果から、Ep の腫瘍細胞の上皮様形態には CK の発現が関連していることが示唆されたが、CK の発現を示さない Ep の組織学的形態の発生機序は不明であった.

本研究により、細胞骨格はイヌの骨原発 OS の腫瘍細胞の細胞形態を特徴づけるだけでなく、軟骨や粘液などの基質産生や血管様構造などの特徴的な組織構造の形成にも関与し、多くの細胞骨格を発現している腫瘍細胞は多様な組織学的形態を示し、その組織多様性は骨髄の間葉系幹細胞由来であるイヌの骨原発 OS の腫瘍異質性に起因するものであると結論付けられた.

2-5 小括

イヌの骨原発 OS において、細胞骨格に対する一次抗体を用いて IHC 染色を実施し、各組織型における細胞骨格の発現性を明らかにし、OSH と OSA における細胞骨格の発現性を比較した。OS は、CK, vimentin, α -SMA, desmin, GFAP および NF の細胞骨格に一致するあるいは一致しない組織学的形態を示し、複数の細胞骨格を保持している腫瘍細胞はより多彩な組織学的形態を示していた。また α -SMA において、OSH が OSA よりも有意に強い発現性を示した。

本研究は、上皮様形態あるいは CK の発現を示すイヌの骨原発 OS に関する初めての報告である。また、多くの細胞骨格を発現している腫瘍細胞は多様な組織学的形態を示し、その組織多様性は骨髄の間葉系幹細胞由来であるイヌの骨原発 OS の腫瘍異質性に起因し、イヌの骨原発 OS は上皮細胞や筋線維芽細胞、平滑筋細胞、神経細胞などの様々な間葉細胞の性質を有する腫瘍細胞で構成されていると考えられた。

第 3 章

イヌの頭部および四肢骨原発骨肉腫における
組織学的悪性度評価法の予後的意義

3-1 序文

イヌの骨原発 OS は，悪性度の高い生物学的動態を示し，骨溶解および骨増生を伴う局所浸潤，高率な肺への転移病変が認められ，断脚や切断術のみでの生存率は 10%以下である[11, 24, 66, 75, 76, 111, 113, 114, 119]. また椎骨や肋骨，長骨などへの骨転移がまれに認められる[111]. 現在では，局所療法としての断脚術，補助的全身療法としての化学療法，再発防止や疼痛緩和療法としての放射線療法を組み合わせる治療法が一般的である[24, 66, 76]. OS の多くは中齢から高齢犬に発生するが，年齢分布は幅が広く幼若犬から高齢犬まで発生が認められる[43, 56, 61, 70, 101, 111, 113]. また OS は大型犬あるいは超大型犬であるボクサー，グレート・デーン，ジャーマン・シェパード，アイリッシュ・セッター，ゴールデン・レトリバー，ラブラドル・レトリバーなどで発生し，特に体重や体高の増加が発生要因となり[76, 100, 119, 122, 127]，体重が 20kg 以上の大型～超大型犬の罹患率が高く，多くの文献のイヌの骨原発 OS の平均体重は 29kg～40.5kg の間であった[1, 34, 43, 56, 61, 108, 122, 127].

イヌの骨原発 OS において，臨床的および組織学的に有用性のある予後因子が多数報告されており，年齢，体重，犬種，発生部位，血清アルカリフォスファターゼ（ALP）値，肺転移病変の有無，サージカルマージンの完全性，化学療法の有無，組織型分類と生存期間や無病期間との関連性が示されている[6, 21, 24, 25, 31, 34, 36, 42, 61, 70, 75, 76, 80, 100, 111, 127]. また中齢のイヌが幼若あるいは高齢のイヌに比べて，良好な予後を示したという報告がなされている[111]. さらに発生部位において，頭部を含む体軸骨格の OS が OSA よりも良好な予後を示すという報告がいくつかなされている[36, 42, 70, 121]. 組織型分類の臨床的意義は少ないと考えられているが，予後診断における組織型分類の有用性については文献により解釈が異なっており，さらなる詳細な検索が求められている[36, 56, 61, 70, 75, 76, 113].

組織学的悪性度評価法は腫瘍の予後診断や治療方針を決定する上で有用なツ

ールであり、イヌの乳腺腫瘍[64]、滑膜肉腫[125]、HS[81]、膀胱の移行上皮癌[126]、扁平上皮癌[18]、肺癌[72]、軟部組織肉腫[62]、皮膚および眼球の黒色腫[8, 9, 128]、肥満細胞腫[8, 89]、リンパ腫[19, 118]などにおいて、組織学的悪性度と予後との関連性が報告されている。またイヌの骨原発 OS においても、核異型性、核分裂像の数、壊死程度、腫瘍基質の程度、腫瘍細胞密度を評価対象とする組織学的悪性度評価法および脈管侵入像の有無と生存期間や肺への転移率の関連性が報告されている[56, 61, 70, 76, 101, 113]。さらにイヌの OSH および OSA において、発生部位による組織学的悪性度の違いが報告されているが、生存期間を含めた両者の予後の比較はなされていない[70]。通常、腫瘍は異質な腫瘍細胞で構成されており、領域により腫瘍細胞の組織学的悪性度が異なることがある[30]。そのため腫瘍組織の組織学的悪性度を評価する際には、最も悪性度が高いと考えられる領域を選択し評価することが重要である[30]。

本章では、生存データの追跡が可能であったイヌの骨原発 OS について、体重、血清 ALP 値、サージカルマージン、化学療法の有無、組織型の予後因子としての有用性を評価した。また発生部位による生存データの違いを検討するため、OSH と OSA の間で、体重、血清 ALP 値、肺転移率、生存期間を比較した。さらに、組織学的悪性度の予後因子としての有用性を評価するため、組織学的悪性度および脈管侵入像の有無と生存期間および肺転移率の関連性を評価し、組織学的悪性度を OSH と OSA で比較した。

3-2 材料と方法

3-2-1 供試材料

材料採取には，酪農学園大学獣医学部獣医病理学教室において病理解剖学的検索を行った個体ならびに病理組織診断のため本学付属動物病院から獣医病理学教室へ送付された症例の中で，年齢，体重，犬種，発生部位，血清 ALP 値，サージカルマージン，化学療法の有無，生存期間および転移病変の有無などの生存データが得られたイヌの OSH12 例および OSA13 例を用いた。

3-2-2 組織学的悪性度評価法

腫瘍組織の最も悪性度が高い領域において，5 種類の評価基準の組織学的形態である核異型性，核分裂像，壊死程度，腫瘍基質の程度，腫瘍細胞密度を 4 段階にスコア化し（表 9），それぞれの組織学的スコアから総合悪性度スコアを評価した。また評価した総合悪性度スコアを Grade I（3-9），Grade II（10-16），Grade III（17-21）の 3 段階に分類した（表 10）。さらに腫瘍細胞の脈管侵入像の有無を評価した。

表 9. 組織学的悪性度評価法（組織学的スコア）

組織学的形態	0	1	2	3	4
核異型性	なし	軽度	中程度	著しい	-
核分裂像（×400, 10 視野）	-	1-10 個	11-20 個	21-30 個	30 個<
壊死程度	なし	<15%	15-50%	50%<	-
腫瘍基質の程度	-	> 50%	25-50%	< 25%	0%
腫瘍細胞密度	-	< 25%	25-50%	50-75%	75-100%

表 10. 組織学的悪性度評価法（総合悪性度スコア）

総合悪性度スコア	Grade
3-9	I
10-16	II
17-21	III

3-2-3 統計学的分析法

生存データにおいて、OSH と OSA の間で、体重、血清 ALP 値、生存期間、肺転移率の差を Student の t 検定、Kaplan Meier 法、ログランク検定、マン・ホイットニー検定を用いて解析した。また年齢、体重、血清 ALP 値、サージカルマージンの完全性および化学療法の有無と生存期間および肺転移率の関連性を X^2 独立性の検定、フィッシャーの直接確率計算法、Kaplan Meier 法あるいはログランク検定を用いて解析した。組織型分類において、各組織型の生存期間および肺転移率の差を Kaplan Meier 法、ログランク検定、マン・ホイットニー検定を用いて解析した。組織学的悪性度において、OSH と OSA の間で、各組織学的スコアおよび総合悪性度スコアの差を Student の t 検定を用いて解析し、各組織学的スコアおよび総合悪性度スコアと生存期間および肺転移率の関連性を Kaplan Meier 法、ログランク検定あるいは Student の t 検定を用いて解析した。腫瘍細胞の脈管侵入像の有無と生存期間、肺転移率、組織学的悪性度の関連性を Kaplan Meier 法、ログランク検定、Student の t 検定、 X^2 独立性の検定を用いて解析した。P 値が目的とする危険率 0.05% 以下のとき、帰無仮説は棄却した。

3-3 結果

3-3-1 生存データ

OSH および OSA において、体重の平均は 20.95kg (範囲, 3.1~60.5kg), 血清 ALP 値の平均は 666.84IU (範囲, 53~4911IU) であった。切除生検のみが実施された OSH1 症例および OSA2 症例で、サージカルマージンが不完全であった。また OSH4 症例および OSA3 症例で、カルボプラチンによる化学療法が実施された。OSH2 症例および OSA10 症例で肺への転移病変が、OSH4 症例で椎骨、脛骨、肋骨などへの骨転移が認められた。生存期間の中央値は、OSH が 525 日 (範囲, 117~1486 日), OSA が 238 日 (範囲, 40~446 日) であった。組織型分類は、Ob を含む複合型が大部分を占め、OSH と OSA の間で各組織型の割合に明らかな差は認められなかった (表 11, 12)。

3-3-2 組織学的悪性度結果

OSH において、Grade I では、多角形~紡錘形の骨芽細胞への分化を示す腫瘍細胞が増殖し、石灰沈着を伴う豊富な類骨の産生および骨組織の形成を伴っていた。核分裂像はほとんど観察されないか散見される程度で、核の異型性は軽度であった (図 70-72)。OSH および OSA において、Grade II では、核小体明瞭で異型性を示す核を有する腫瘍細胞間に、石灰沈着を伴う類骨の産生を伴っていた。腫瘍細胞は密にシート状に増殖し、腫瘍組織中心部において広範囲な壊死所見が観察された (図 73-78)。OSA において、Grade III では、複数の核小体明瞭で異型性を示す大小不整核を有する腫瘍細胞がランダムに配列しながらシート状に増殖し、わずかな類骨の産生が認められた。腫瘍組織の広範囲な壊死所見を認め、多数の核分裂像が観察された (表 13, 14) (図 79-81)。OSA の 3 症例において、腫瘍細胞塊の脈管侵入像が観察され (図 76, 80)、OSH には認められなかった。

3-3-3 統計学的分析結果

生存データにおいて、OSH と OSA の間で、体重および血清 ALP 値に有意な差は認められず ($P > 0.05$)、生存期間は OSA が OSH よりも有意に短く、生存率は OSA が OSH よりも有意に低い結果となった ($P < 0.05$) (図 82)。肺転移率は OSA が OSH よりも有意に高くなった ($P < 0.05$)。体重、血清 ALP 値、サージカルマージンの完全性および化学療法の有無と生存期間および肺転移率の間に有意な関連性は認められなかった ($P > 0.05$)。各組織型と生存期間および肺転移率の間に有意な関連性は認められなかった ($P > 0.05$)。組織学的悪性度において、OSH と OSA の間で、総合悪性度スコア、核異型性、壊死程度および腫瘍基質の程度は、OSA が OSH よりも有意に高くなった ($P < 0.05$)。生存期間と総合悪性度スコア、核異型性、壊死程度および腫瘍基質の程度の間に関連性が認められた ($P < 0.05$)。また肺転移率と総合悪性度スコア、核異型性および壊死程度に有意な関連性が認められた ($P < 0.05$)。生存期間、肺転移率および組織学的悪性度と脈管侵入像の有無の間に有意な関連性が認められた ($P < 0.05$)。

表 11. OSH の生存データ, 組織型, 組織学的悪性度

No.	犬種	部位	体重	ALP	手術	化学療法	転移	ST	組織型	TG	IV
1	GR	上顎骨	26.3	90	上顎切除	実施せず	なし	1208	Ob + Cb	13	-
2	LR	下顎骨	38.5	399	下顎切除	カルボプラチン	肺, 脛骨	509	Ob + Pd	12	-
3	シーズー	下顎骨	6.5	162	下顎切除	実施せず	なし	541	Ob + Fb + Te	8	-
4	TP	頬骨	4	359	頬骨切除	実施せず	なし	1486*	Ob + Fb + Pd	5	-
5	LR	上顎骨	24.2	421	上顎切除	カルボプラチン	なし	1099*	Ep	7	-
6	北海道犬	下顎骨	14.8	208	下顎切除	実施せず	腸骨, 椎骨	171	Ob + Fb	13	-
7	マルチーズ	頬骨	5	4911	頬骨切除	実施せず	なし	118	Ob + Cb + Fb	9	-
8	コーギー	下顎骨	14.4	100	下顎切除	カルボプラチン	肺	780	Ob + Cb + Fb	7	-
9	雑種	下顎骨	10	772	下顎切除	カルボプラチン	肋骨, 椎骨	698*	Ob + Fb	10	-
10	AT	下顎骨	24	416	下顎切除	実施せず	椎骨	290	Ob + Fb	11	-
11	パグ	上顎骨	6.8	347	上顎切除	カルボプラチン	なし	368*	Ob + My	5	-
12	シーズー	上顎骨	5.4	2471	切除生検	実施せず	なし	117	Ob	12	-

GR=ゴールデン・レトリバー ; LR=ラブラドール・レトリバー ; TP=トイ・プードル ; AT=エアデールテリア ;

ST=生存期間 ; *=生存中 ; TG : 総合悪性度スコア ; IV=脈管侵入像.

表 12. OSA の生存データ, 組織型, 組織学的悪性度

No.	犬種	部位	体重	ALP	手術	化学療法	転移	ST	組織型	TG	IV
1	雑種	上腕骨	20	409	切除生検	実施せず	なし	229	Ob + Cb	8	-
2	カフカス	橈骨	60.5	150	前肢断脚	実施せず	なし	104	Ob + Cb	14	-
3	秋田犬	肩甲骨	30.4	53	前肢断脚	実施せず	肺	40	Te + Pd	17	+
4	GS	上腕骨	43	63	前肢断脚	実施せず	肺	466	Ob + Fb	14	-
5	LR	上腕骨	42.2	482	前肢断脚	実施せず	肺	238	Ob + Fb + Pd	12	-
6	GP	脛骨	51.5	158	切除生検	実施せず	肺	365	Ob + Cb + Fb	10	-
7	雑種	脛骨	3.1	161	後肢断脚	実施せず	肺	134	Ob + Fb	15	-
8	SS	橈骨	14.6	327	後肢断脚	実施せず	なし	366	Ob + Cb + Fb	14	-
9	LR	前肢指骨	30.3	88	後肢断脚	実施せず	肺	261	Ob + Cb	16	+
10	シーズー	大腿骨	5.02	1492	後肢断脚	カルボプラチン	肺	442	Ob + My	10	-
11	雑種	大腿骨	17.1	385	後肢断脚	実施せず	肺	82	Ob + Cb + Fb	14	+
12	雑種	肩甲骨	7.6	407	肩甲骨切除	カルボプラチン	肺	459	Pd	13	-
13	コーギー	大腿骨	19.1	1840	後肢断脚	カルボプラチン	肺	41	Ob + Pd	13	-

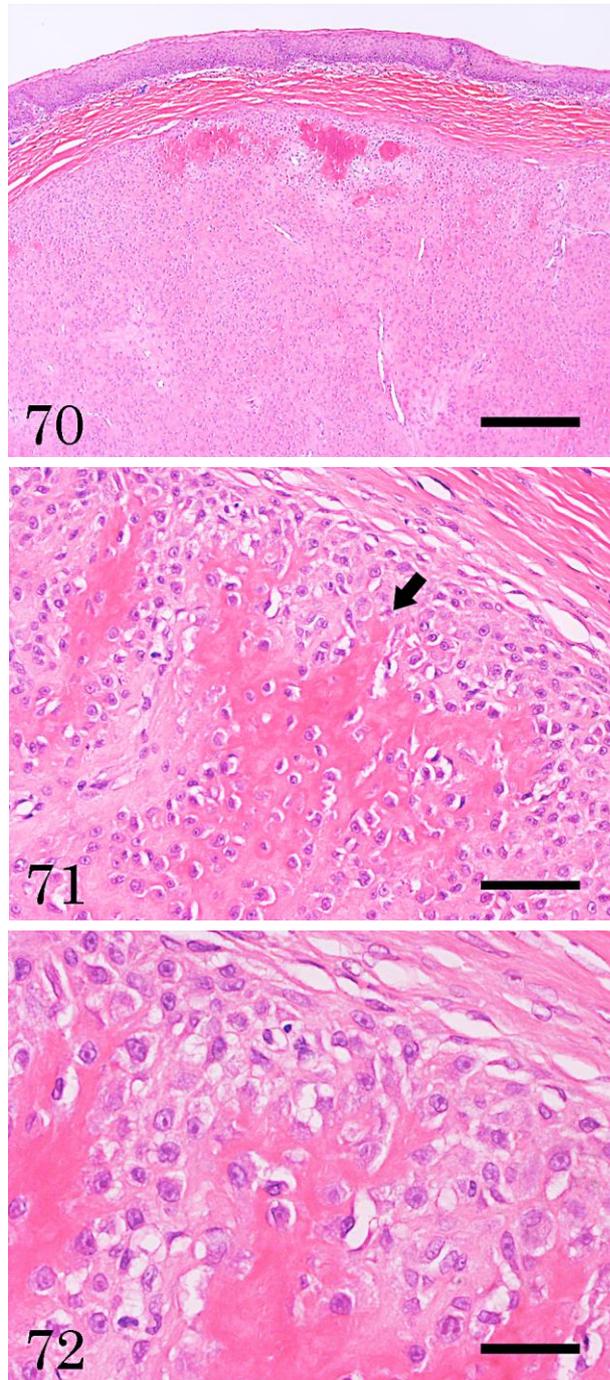
GS=ジャーマン・シェパード ; LR=ラブラドール・レトリバー ; GP=グレート・ピレネーズ ; SS=シェットランド・シープドック ; ST=生存期間 ; TG=総合悪性度スコア ; IV=脈管侵入像.

表 13. 組織学的悪性度結果（組織学的スコア）

	スコア	OSH (n=12)	OSA (n=13)
核異型性	0	0	0
	1	7	1
	2	4	8
	3	1	4
核分裂像	1	3	1
	2	6	3
	3	0	5
	4	3	4
壊死程度	0	2	0
	1	4	2
	2	6	4
	3	0	7
腫瘍基質の程度	1	6	0
	2	2	6
	3	4	7
	4	0	0
腫瘍細胞密度	1	1	0
	2	6	2
	3	4	7
	4	1	4

表 14. 組織学的悪性度結果（総合悪性度スコア）

Grade	OSH (n=12)	OSA (n=13)
I (3-9)	6	1
II (10-16)	6	11
III (17-21)	0	1



OSH, No. 11, Ob+My の複合型, Grade I の HE 染色.

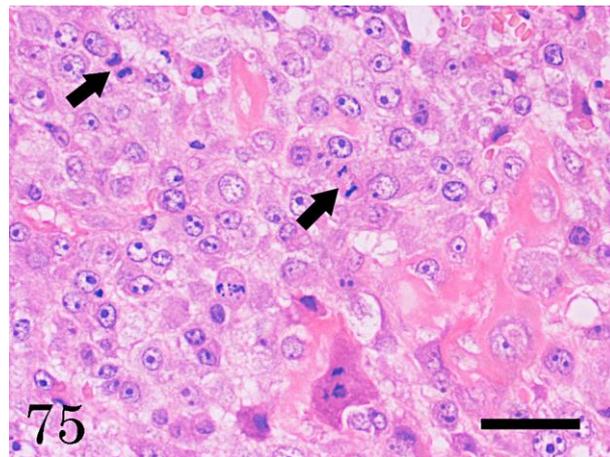
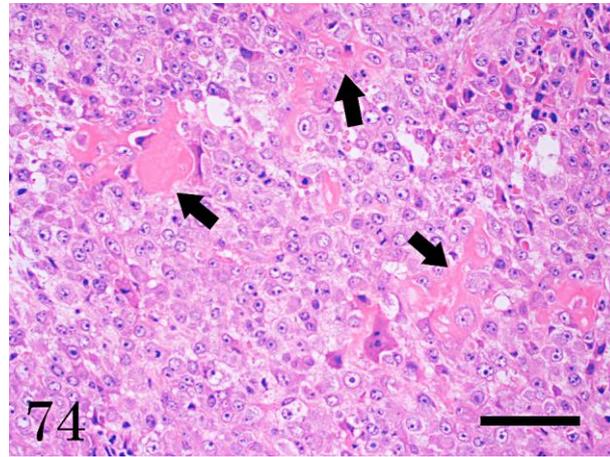
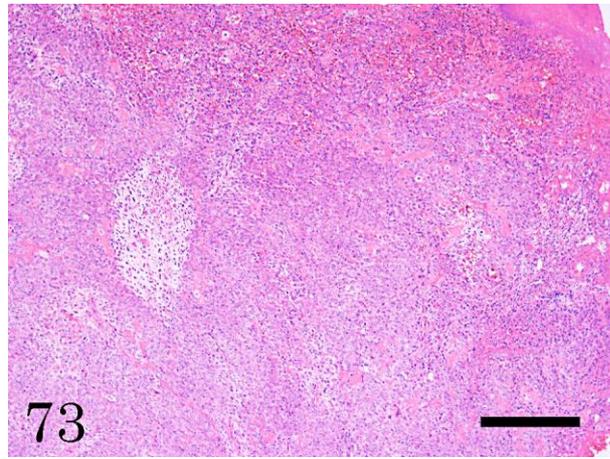
図 70 : 弱拡大の HE 染色. Bar=500 μ m. 粘膜下における腫瘍性骨組織.

図 71 : 中拡大の HE 染色. Bar=100 μ m. 腫瘍細胞による成熟骨梁形成 (矢印).

図 72 : 強拡大の HE 染色. Bar=50 μ m. 骨芽細胞への分化を示す腫瘍細胞.

核異型性スコア : 1, 核分裂像スコア : 1, 壊死程度スコア : 0

腫瘍基質スコア : 1, 腫瘍細胞密度スコア : 2, 総合悪性度スコア : 5.



OSH, No. 2, Ob+Pd の複合型, Grade II の HE 染色.

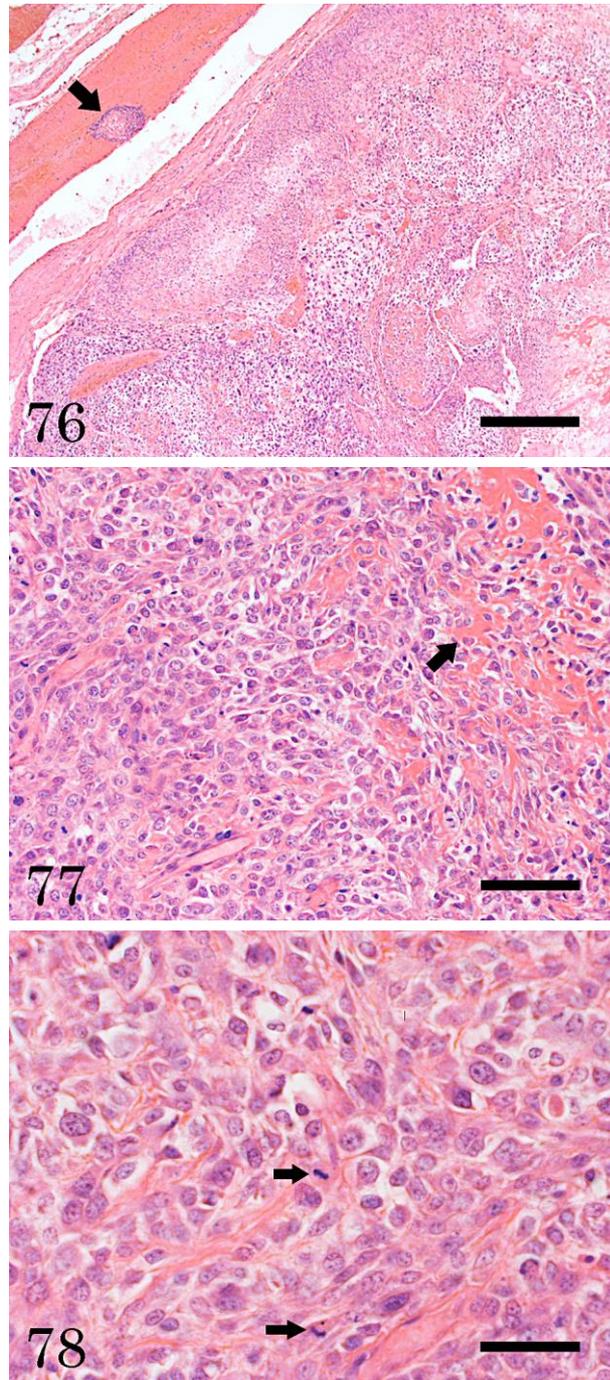
図 73 : 弱拡大の HE 染色. Bar=500 μ m. 腫瘍細胞のシート状増殖.

図 74 : 中拡大の HE 染色. Bar=100 μ m. 腫瘍性類骨 (矢印) の産生.

図 75 : 強拡大の HE 染色. Bar=50 μ m. 核分裂像 (矢印) が散見される.

核異型性スコア : 2, 核分裂像スコア : 4, 壊死程度スコア : 2

腫瘍基質スコア : 2, 腫瘍細胞密度スコア : 2, 総合悪性度スコア : 12.



OSA, No. 11, Ob + Cb + Fb, Grade II の HE 染色.

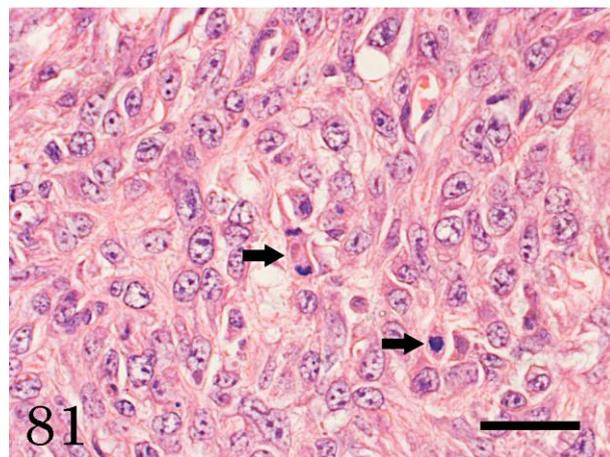
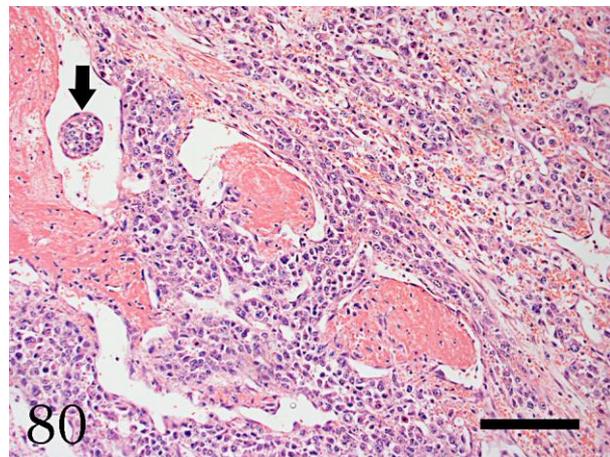
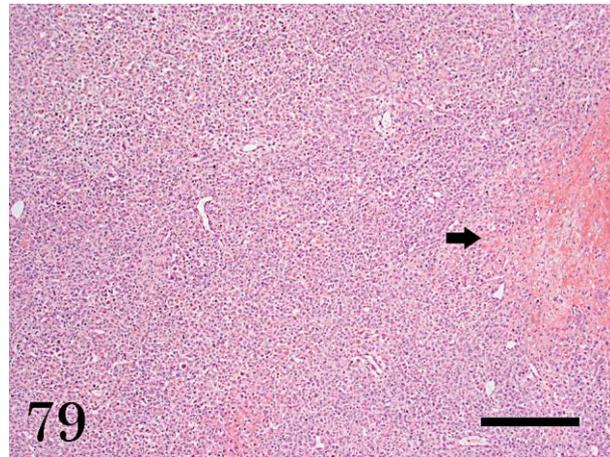
図 76 : 弱拡大の HE 染色. Bar=500 μ m. 腫瘍細胞塊の脈管侵入 (矢印).

図 77 : 中拡大の HE 染色. Bar=100 μ m. 腫瘍性類骨の産生 (矢印).

図 78 : 強拡大の HE 染色. Bar=50 μ m. 核分裂像 (矢印) が散見される.

核異型性スコア : 3, 核分裂像スコア : 3, 壊死程度スコア : 2

腫瘍基質スコア : 3, 腫瘍細胞密度スコア : 3, 総合悪性度スコア : 14.



OSA, No. 3, Tel+Pd, GradeⅢの HE 染色.

図 79 : 弱拡大の HE 染色. Bar=500 μ m. 腫瘍組織の壊死巣 (矢印).

図 80 : 中拡大の HE 染色. Bar=100 μ m. 腫瘍細胞塊 (矢印) の脈管内侵入.

図 81 : 強拡大の HE 染色. Bar=50 μ m. 核分裂像 (矢印) が散見される.

核異型性スコア : 3, 核分裂像スコア : 4, 壊死程度スコア : 3

腫瘍基質スコア : 3, 腫瘍細胞密度スコア : 4, 総合悪性度スコア : 17.

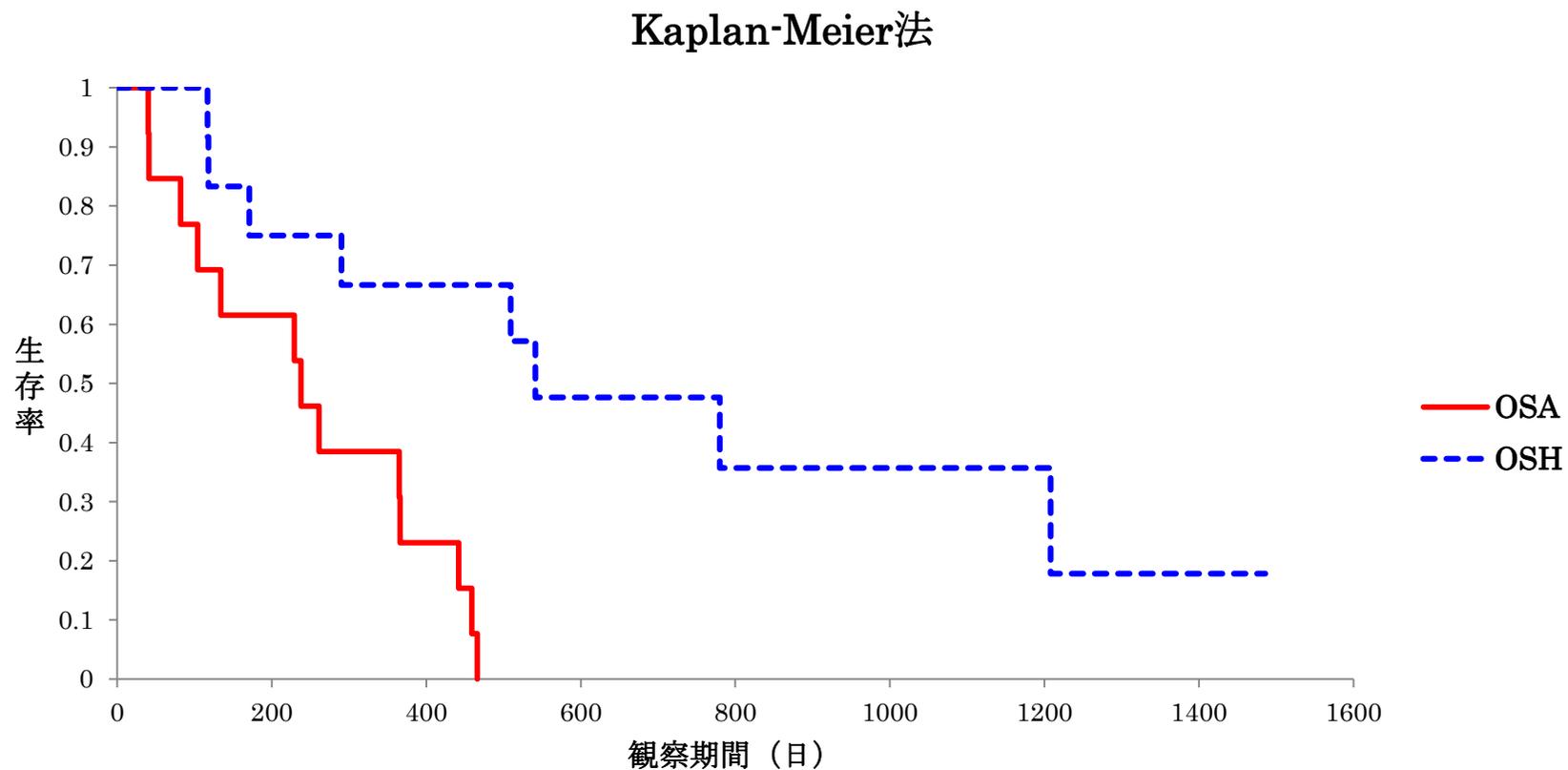


図 82 : ログランク検定によるイヌの OSH および OSA の生存曲線.

生存率は OSA が OSH よりも有意に短くなった ($P < 0.05$).

3-4 考察

今回、イヌの骨原発 OS は発生部位の違いにより腫瘍の生物学的動態が異なることが、臨床的および組織学的に明らかになった。

イヌの OSH は OSA よりも有意に生存期間が長く、肺転移率が低い結果となり、OSH が OSA よりも良好な予後を示すことが明らかになった。過去の研究では、イヌの体軸骨格の OS が OSA よりも予後は良好であり、特に下顎骨を含む頭蓋骨における OS はより良好な生物学的動態を示すことが報告されている [24, 27, 36, 42, 59, 70, 76, 113, 121]。これらの報告は本研究結果を支持するものである。

組織学的悪性度法において、総合悪性度スコア、核異型性、壊死程度および腫瘍基質の程度のスコアは、OSA が OSH よりも有意に高くなった。この結果は OSH が OSA よりも長い生存期間、低い肺転移率を示し、良好な予後を示したという本研究の生存データの解析結果を裏付けるものであり、イヌの骨原発 OS の腫瘍細胞の核異型性、壊死程度、腫瘍基質の程度の組織学的形態の違いが、OSH と OSA の悪性度の違いに関与していると考えられた。また OSH および OSA において、総合悪性度スコア、核異型性、壊死程度および腫瘍基質の程度のスコアと生存期間の間に有意な関連性が認められ、総合悪性度スコア、核異型性および壊死程度と肺転移率のスコアに有意な関連性が認められた。過去のイヌの骨原発 OS の組織学的悪性度に関する研究において、Kirpensteijn らや Saam らは、総合悪性度スコアおよび核分裂像が生存期間に関与し、核異型性、壊死程度、腫瘍基質の程度、腫瘍細胞密度には予後因子としての有用性はなかったと報告している [56, 101]。また Loukopoulos らは、核分裂像および壊死程度が予後診断に有用であり、総合悪性度が高くなるに従い肺転移率が高くなると結論付けている [70]。さらに、Straw らは、組織学的悪性度が高くなるに従い予後は悪化し、組織学的悪性度と生存期間には有意な関連性があると報告している [113]。一方、Kruse らは、いずれの組織学的スコアおよび総合悪

性度スコアも生存期間との関連性はなく、予後診断価値はないと報告している[61]。本研究において、総合悪性度スコアおよび壊死程度が生存期間に関連しているのは、過去の研究と一致しており、組織学的悪性度評価法はイヌの骨原発 OS の予後を診断する上で有用なツールであることが明らかになった。また核異型性について、OS の大部分の腫瘍細胞は異型性核を有しているため、核異型性に予後因子としての有用性はないと報告されているが[70]、本研究における OS の腫瘍細胞において、核小体の特徴、核の大小不同や不整性などの異型性は症例により異なっており、核異型性も有用な組織学的予後診断マーカーになりえると思われた。さらに腫瘍基質の程度について、類骨産生や腫瘍性骨梁形成などが少ない症例ほど生存期間が短い結果となり、腫瘍細胞の骨芽細胞への分化度が予後に関連していると考えられた。また組織学的悪性度が高いほど肺転移率も高くなり、核異型性および壊死程度が腫瘍組織の肺への転移に関与していることが明らかになった。

腫瘍細胞の脈管侵入像は、全症例の 12% (3/25) で観察され、肺転移が認められた OSA のみで認められた。また脈管侵入像が認められた症例は認められなかった症例よりも、有意に生存期間が短く、肺転移率および組織学的悪性度が高くなった。イヌの骨原発 OS は高頻度に肺転移病変が認められる悪性腫瘍で、過去の研究では約 70% の症例で腫瘍細胞の脈管侵入像が観察されたという報告があるが[56, 75]、別の研究では脈管内侵入像は 13% の症例のみで認められたと報告されている[101]。文献により脈管侵入像の頻度に大きな差があり、今回の研究結果を含めたさらなるデータの蓄積が必要ではあるが、脈管侵入像が認められた症例がすべて肺転移を伴い、生存期間の短縮が認められたことから、脈管侵入像が核異型性や壊死程度と同様に有用な予後診断マーカーのひとつであると考えられた。

イヌの OSH および OSA において、各組織型と生存期間および肺転移率の間に関連性は認められなかった。過去の研究では、イヌの骨原発 OS の Fb が比較的良好な予後を示し、Te は肺転移率が高く悪性の生物学的動態を示すという

報告がなされている[36, 75]. 一方, 最近の研究では, 本研究と同様に腫瘍の組織型は生存期間や肺転移率に関連せず, 有用な予後因子とはならないことが報告されている[56, 61]. しかしながら, 第一章で明らかにされたように, イヌの骨原発 OS は多様な組織学的形態を示し, 腫瘍組織は複数の組織型で構成されているため, 予後因子としての組織型分類をより正確に評価するためには, 新しい組織型や複合型を含めた新たな組織型分類法の開発が必要であると考えられた.

イヌの OSH および OSA において, 体重および血清 ALP 値と生存期間に有意な関連性は認めず, OSH と OSA の間でも体重および血清 ALP 値に有意な差は認められなかった. 体重は OS の予後因子として知られており, 体重の増加や体高の増加は重要な予後因子であることが報告されている[36, 76, 100, 127]. ALP は骨, 肝臓, 小腸や胎盤などに多く含まれる酵素であり, これらの臓器に障害が生じると血液中に漏出する[132]. 血清 ALP 値は, イヌの OSA の生存率と関連性があり, 正常よりも高い血清 ALP 値を示すイヌは正常値を示すイヌよりも予後が悪く, 患者の予後診断や治療法を決定する上で有用な予後因子であることが報告されている[30, 34, 43, 56, 76, 80, 124]. しかしながら, 体軸骨格の OS における血清 ALP 値と予後の関連性について検索した研究は報告されていない. 本研究では, 体重および血清 ALP 活性の予後因子としての有用性は示されず, OSH と OSA の予後の違いにこれらの項目は関連していないことが示唆された.

イヌの OSH および OSA において, サージカルマージンおよび化学療法の有無と生存期間および肺転移率の間に関連性は認められなかった. サージカルマージンの評価については, 局所再発率および生存率の予測因子としての有用性が報告されている[36]. OS の断脚術は緩和療法であり, 痛みを改善することにより安楽死を遅らせ, 生存期間を延長させる[24, 76]. 化学療法は, 主な死亡原因である肺転移に対する補助的全身療法であり, シスプラチン, カルボプラチン, ドキソルビシンを用いた化学療法と外科手術を組み合わせることで, 明らかな

生存率の改善が報告されている[1, 4, 24, 66, 76, 80, 101, 104, 108, 113, 120]. またカルボプラチン, ドキソルビシンを用いた単一製剤による治療は, シスプラチンと同程度の効果が期待できる[24, 66, 76, 80]. 本研究において, サージカルマージンおよび化学療法が予後に反影されなかった理由として, 症例数が限られていたこと, 治療開始時の肺転移の有無に関わらず症例を評価したことなどが考えられた.

イヌの OSH は OSA よりも良好な予後を示すことが明らかになり, イヌの骨原発 OS において予後診断価値が高いとされる組織学的悪性度評価法により裏付けされる結果となった. 特に核異型性, 壊死程度, 腫瘍基質の程度, 脈管侵入像は予後と強く関連しており, 肺転移を予測する上でも重要な組織学的形態であると考えられた.

3-5 小活

イヌの骨原発 OS において、体重、血清 ALP 値、サージカルマージン、化学療法の有無、組織型の予後因子としての有用性を評価し、OSH と OSA の間で、体重、血清 ALP 値、生存期間、肺転移率を比較した。さらに組織学的悪性度評価法の予後診断マーカーとしての有用性を評価し、OSH と OSA で比較した。体重、血清 ALP 値、サージカルマージン、化学療法の有無および組織型と生存期間に有意な関連性は認められず、OSH と OSA の間でも体重および血清 ALP 値に有意な差は認められなかった。またイヌの OSA は OSH よりも有意に生存期間が短く、肺転移率が高い結果となった。組織学的悪性度は、生存期間および肺転移率に関連性があり、OSA が OSH よりも有意に高くなった。また腫瘍細胞の脈管侵入像が、肺転移が認められた OSA のみで観察された。

本研究により、OSH が OSA よりも良好な生物学的動態を示すことが明らかになり、体重、血清 ALP 活性、サージカルマージン、化学療法および組織型の予後因子としての有用性は示されなかった。また組織学的悪性度評価法がイヌの骨原発 OS の有用な予後診断ツールであることが明らかになり、核異型性、壊死程度、腫瘍基質の程度、脈管侵入像の組織学的形態が OSH と OSA の予後の違いに関与していることが示唆された。

総括

近年、獣医療の進歩にともない伴侶動物の寿命は伸び、ヒトと同様に腫瘍がイヌおよびネコの主要な死因の一つとなっており、獣医療においても腫瘍に対する高度医療が望まれるようになってきた。その中で、獣医病理学は臨床医に正確な診断情報を提供し、適切な治療を可能にすることで、腫瘍管理においてきわめて重要な役割を果たしている。また様々な腫瘍で組織型や組織学的悪性度による生物学的動態の違いが示されており[8, 9, 18, 19, 62, 64, 81, 89, 118, 125, 128]、詳細な組織型分類と正確な組織学的悪性度の分類体系の構築が求められている。

イヌの骨原発 OS は骨原発腫瘍において最も発生頻度が高く、組織学的形態や産生される基質に基づいて、組織学的に 6 種類の組織型に下位分類されている[109, 121]。組織型分類や組織学的悪性度と予後との関連性が報告されているが[36, 56, 61, 70, 75, 76, 101, 113]、イヌの骨原発 OS は組織多様性が非常に強く、組織学的形態による生物学的動態の違いは十分に把握されていない。また特定の細胞種に特異的に存在する蛋白質である細胞骨格を IHC 染色により検索することは、多彩な組織学的形態を示すイヌの骨原発 OS の組織多様性を把握する上で、非常に重要かつ有用なツールであると考えられる。

本研究では、イヌの骨原発 OS の組織学的形態を発生部位別に詳細に観察し、予後との関連性を評価するとともに、組織多様性における細胞骨格の発現性を明らかにした。

1) イヌの骨原発 OS における組織学的および免疫組織化学的多様性

近年の分子生物学的技術を含む病理学の進歩にもかかわらず、現在でも光学顕微鏡による組織評価が最も重要な腫瘍の診断ツールである。イヌの骨原発 OS においても、その組織学的および IHC の特徴を把握することは、腫瘍診断学的に必要不可欠である。

第一章におけるイヌの骨原発 OS の組織学的検索により、OS が非常に強い組織多様性を示す腫瘍細胞により構成されること、大部分の腫瘍組織が複数の組織型を含む複合型に分類されること、区分されていない新たな組織型を示す腫瘍組織が存在すること、OSH と OSA の間で Ep 以外の各組織型の割合に有意な差が認められないことが明らかになった。イヌの骨原発 OS は強い組織多様性を示し複数の組織型が同一腫瘍組織内に混在することは知られているが [36, 56, 61, 121], 本研究の複合型の割合は過去の研究における割合よりも明らかに多い結果となった。本研究結果から、イヌの骨原発 OS の基本的な組織型である Ob から Cb, Fb, Te などの様々な組織型へ形態を変化させることで、多様な組織学的形態を示し、その組織多様性には OS の由来が骨髄間葉系幹細胞であることが関連していると考えられた。また WHO 分類で区分されている 6 種類の組織型に加えて、My, Rc, Ep の 3 種類の組織型が観察された。これらの組織型は、ヒトの WHO 分類で区分されている小細胞型や Ep の組織学的形態と類似しており [51, 98], 各腫瘍組織を特徴付ける組織学的形態を示しており、イヌの骨原発 OS においても追加分類されるべき組織型であると考えられた。さらに Ep が OSH のみで認められたことには、OSH の母組織である頭部骨組織の発生学的な起源が上皮性の神経堤細胞であることが関与していると考えられた。

第二章のイヌの骨原発 OS の細胞骨格の発現性の検索では、OS がその組織学的形態に一致するあるいは一致しない CK, vimentin, α -SMA, desmin, GFAP および NF の細胞骨格を保持していることが明らかになった。CK の発現は様々な組織型の腫瘍細胞で確認され、特に Ep の腫瘍細胞で多く観察された。また CK 陽性細胞は全て vimentin の共発現を示し、上皮および間葉系両方の細胞骨格を保持していることが明らかになった。 α -SMA, desmin, GFAP および NF の発現も多様な組織型の腫瘍細胞で確認され、組織学的形態に必ずしも一致しなかった。これら細胞骨格の発現の多様性は、イヌの骨原発 OS の組織多様性に関連した腫瘍異質性に起因していると考えられた。また OSH の

方が OSA よりも有意に強い α -SMA の発現性を示す結果となり、OS の発生部位の違いがその要因の一つであることが示唆された。ヒトの骨原発 OS における CK の発現を伴う上皮様 OS の報告はいくつか成されているが[17, 38, 39, 54, 60, 82, 83, 84, 95]、イヌにおいて、本研究が CK の発現および上皮様形態を示す骨原発 OS に関する初めての報告である。

2) 組織学的悪性度評価法の予後的意義

イヌの一部の腫瘍では、組織学的悪性度からその生物学的動態の予測が可能であり、イヌの骨原発 OS においてもいくつかの組織学的形態を評価する組織学的悪性度と生存期間との関連性が報告されている[56, 70, 101, 113]。第三章のイヌの骨原発 OS の組織学的悪性度評価において、組織学的悪性度と生存期間および肺転移率の間に有意な関連性が認められ、特に核異型性、壊死程度、腫瘍基質の程度および脈管侵入像の組織学的形態が予後に関連していた。本研究結果は過去の報告と一致しており、組織学的悪性度評価法はイヌの骨原発 OS の予後を診断する上で有用なツールであり、核異型性、壊死程度、腫瘍基質の程度、脈管侵入像は特に重要な組織学的形態であると考えられた。

イヌの OSH は OSA よりも有意に生存期間が長く、肺転移率が低い結果となり、OSH がより良好な予後を示すことが明らかになった。過去の研究においても、イヌの体軸骨格の OS が OSA よりも予後は良好であり、特に下顎骨を含む OSH はより良好な予後を示すことが報告されており[24, 27, 36, 42, 59, 70, 76, 113, 121]、これらの報告は本研究結果を支持するものである。また組織学的悪性度において、OSA が OSH よりも有意に高くなった。この結果は OSH が OSA よりも良好な予後を示すという本研究の生存データを裏付けするものであり、腫瘍組織の組織学的形態が OSH と OSA の予後の違いに関与し、発生部位により OS の生物学的動態が異なることが、臨床的および組織学的に明らかになった。

イヌの OSH および OSA において、各組織型と生存期間および肺転移率の間

に関連性は認められず，腫瘍の臨床的な生物学的動態は組織多様性に関与しないことが示唆された．過去の研究では，組織型の違いによる生物学的動態は様々で，予後診断ツールとしての組織型分類法は十分に確立されていない[36, 56, 61, 75]．イヌの骨原発 OS の予後因子としての組織型分類をより正確に評価するためには，さらなるデータの蓄積と新しい組織型や複合型を含む新たな組織型分類の開発が必要であると考えられた．

謝辞

本研究の遂行にあたり，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感謝いたします．また数多くの検体を提供してくださった PATHO LABO 大町哲夫博士，伴侶動物医療学教室 廉澤 剛教授，遠藤能史講師，統計学的解析に関するご助言を賜りました獣医疫学教室 蒔田浩平准教授，学位論文作成にあたり貴重なアドバイスを頂きました伴侶動物医療学教室 中出哲也教授に深謝いたします．最後に，大学院生活で多くのご協力をいただいた坂口佳菜子博士，溝奥尋子博士，河村芳朗獣医師，近藤佑美獣医師，佐野悠人獣医師，遠藤ちひろ獣医師，獣医病理学教室内外の諸氏に心よりお礼を申し上げます．

引用文献

1. Bacon, N. J., Ehrhart, N. P. Dernell, W. S., Lafferty, M. and Withrow, S. J. 2008. Use of alternating administration of carboplatin and doxorubicin in dogs with microscopic metastases after amputation for appendicular osteosarcoma: 50 cases (1999-2006). J Am Vet Med Assoc. **232**(10):1504-1510.
2. Barres, V., Cerasoli, S., Morigi, F., Cremonini A. M., Volpini, M. and Tuccari, G. 2006. Gliosarcoma with features of osteoblastic osteosarcoma: a review. Arch Pathol Lab Med. **130**:1208-1211.
3. Barut, F., Kandemir, N.O., Ozdamar, S.O., Gul, S., Bektas, S., Gun, B. D. and Bahadir B. 2009. Gliosarcoma with chondroblastic osteosarcomatous differentiation: report of two case with clinicopathologic and immunohistochemical features. Turk Neurosurg. **19**(4):417-422.
4. Berg, J., Weinstein, M. J., Schelling, S. H. and Rand, W. M. 1992. Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb-sparing surgery: 22 cases (1987-1990). J Am Vet Med Assoc. **200**(12):2005-2008.
5. Bingel, S. A., Brodey, R. S., Allen, H. L., Riser, W. H. 1974. Haemangiosarcoma of bone in the dog. J Small Anim Pract. **15**(5):303-322.

6. Boerman, I., Selvarajah, G. T., Nielen, M. and Kirpensteijn, J. 2012. Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma - a meta-analysis. BMC Vet Res. **8**:56.
7. Bongiovanni, L., Mazzocchetti, F., Malatesta, D. Romanucci, M., Ciccarelli, A., Buracco, P., De Maria, R., Palmieri, C., Martano, M., Morello, E., Maniscalco, L. and Della, S. 2012. Immunohistochemical investigation of cell cycle and apoptosis regulators (survivin, β -catenin, p53, caspase 3) in canine appendicular osteosarcoma. BMC Vet Res. **8**:78.
8. Bostock, D. E. 1973. The prognosis following surgical removal of mastocytoma in dogs. J Small Anim Pract. **14**(1):27-41.
9. Bostock, D. E. 1979. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. Vet Pathol. **16**(1):32-40.
10. Brodey, R. S. 1979. The use of naturally occurring cancer in domestic animals for research into human cancer: general considerations and a review of canine skeletal osteosarcoma. Yale J Biol Med. **52**(4):345-361.
11. Brodey, R. S. and Abt, D. A. 1976. Results of surgical treatment in 65 dogs with osteosarcoma. J Am Vet Med Assoc. **168**(11):1032-1035.
12. Brodey, R. S., McGrath, J. T. and Reynolds, H. 1959. A clinical and radiological study of canine bone neoplasms: part I. J Am Vet Med Assoc. **134**(2):53-71.

13. Brodey, R. S. and Riser, W. H. 1969. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. Clin Orthop Relat Res. **62**:54-64.
14. Brodey, R. S., Sauer, R. M. and Medwy, W. 1963. Canine bone neoplasms. J Am Vet Med Assoc. **143**:471-495.
15. Brown, D. C., Theaker, J. M., Banks, P. M., Gatter, K. C. and Mason, D. Y. 1987. Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumours. Histopathology. **11**(5):477-486.
16. Carlei, F., Polak, J. M., Ceccame, A., Marangos, P. J., Dahl, D., Cocchia, D., Michetti, F., Lezoche, E. and Speranza, V. 1984. Neuronal and glial markers in tumours of neuroblastic origin. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. **404**(3):313-324.
17. Carlos-Bregni, R., Contreras, E., Hiraki, K. R., Vargas, P. A., Leon, J.E. and de Almeida, O.P. 2008. Epithelioid osteosarcoma of the mandible: a rare case with unusual immunoprofile. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **105**:47-52.
18. Carpenter, L., Withrow, S. and Powers, B. 1993. Squamous cell carcinoma of the tongue in 10 dogs. J Am Anim Hosp Assoc. **29**:17-24.
19. Carter, R. F., Vail, V. E. and Lumsden, J. H. 1986. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. Can J

Vet Res. **50**(2):154-164.

20. Chai, Y. and Maxson, R. E. Jr. 2006. Recent advances in craniofacial morphogenesis. Dev Dyn. **235**(9):2353-2375.
21. Cohen, D., Reif, J.S., Brodey, R. S. and Keiser, H. 1974. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. Cancer Res. **34**(11):2859-2868.
22. De Alava, E., Lessnick, S. L. and Sorensen, P. H. 2013. Ewing sarcoma. pp. 306-309. *In*: WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. (Fletcher, C. D. M., Bridge, J. A., Hogendoorn, P. C. W. and Mertens, F. eds.) IARC Press. Lyon, France.
23. De Cock, H. E., Busch, M. D., Fry, M. M., Bollen, A. W. and Higgins, R. J. 2004. A peripheral primitive neuroectodermal tumor with generalized bone metastases in a puppy. Vet Pathol. **41**(4):437-441.
24. Dernell, W. S., Ehrhart, N. P., Straw, R. C. and Vail, D. M. 2010. 骨格系の腫瘍 pp. 556-598. 小動物臨床腫瘍学の実際. (加藤元監訳), 文永堂, 東京.
25. Dernell, W. S., Straw, R. C., Cooper, M. F., Powers, B. E., LaRue, S. M. and Withrow, S. J. 1998. Multilobular osteochondrosarcoma in 39 dogs: 1979-1993. J Am Anim Hosp Assoc. **34**(1):11-18.
26. Dexter, D. L., Kowaiski, H. M., Blazar, B. A., Fligiell, Z., Vogel, R. and

- Heppner, G. H. 1978. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. Cancer Res. **38**(10):3174-3181.
27. Dickerson, M. E., Page, R. L., LaDue, T. A., Hauck, M. L., Thrall, D. E., Stebbins, M. E. and Price, G. S. 2001. Retrospective analysis of axial skeleton osteosarcoma in 22 large-breed dogs. J Vet Intern Med. **15**(2):120-124.
28. Dorfman, S. K., Hurvitz, A. I. and Patnaik, A. K. 1977. Primary and secondary bone tumours in the dog. J Small Anim Pract. **18**(5):313-326.
29. Dubielzig, R. R., Biery, D. N. and Brodey, R. S. 1981. Bone sarcomas associated with multifocal medullary bone infarction in dogs. J Am Vet Med Assoc. **179**(1):64-68.
30. Ehrhart, E. J. and Powers, B. E. 2010. 腫瘍の病理学. pp. 57-71. 小動物臨床腫瘍学の実際. (加藤元監訳), 文永堂, 東京.
31. Ehrhart, N., Dernell, W. S., Hoffmann, W. E., Weigel, R. M., Powers, B. E. and Withrow, S. J. 1998. Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). J Am Vet Med Assoc. **213**(7):1002-1006.
32. Frazier, K., Herron, A. J., Dee, J., Ghandur-Mnymneh, L. and Altman, N. H. 1991. Development of small-cell osteogenic sarcoma after ulnar ostectomy in a dog. J Am Vet Med Assoc. **198**(3):432-434.

33. Gabbiani, G., Kapanci, Y., Barazzone, P. and Franke, W. W. 1981. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. Am J Pathol. **104**(3):206-216.
34. Garzotto, C. K., Berg, J., Hoffmann, W. E. and Rand, W. M. 2000. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. J Vet Intern Med. **14**(6):587-592.
35. Guo, F., Parker Kerrigan, B. C., Yang, D., Hu, L., Shmulevich, I., Sood, A. K., Xue, F. and Zhang, W. 2014. Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions. J Hematol Oncol. **7**:19.
36. Hammer, A. S., Weeren, F. R., Weisbrode, S. E. and Padgett, S. L. 1995. Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. J Am Anim Hosp Assoc. **31**(4):321-326.
37. Hasegawa, T., Hirose, T., Kudo, E., Hizawa, K., Usui, M. and Ishi, S. 1991. Immunophenotypic heterogeneity in osteosarcomas. Hum Pathol. **22**(6):583-590.
38. Hasegawa, T., Hirose, T., Seki, K., Hizawa, K., Ishii, S. and Wakabayashi, J. 1997. Histological and immunohistochemical diversities, and proliferative activity and grading in osteosarcomas. Cancer Detect Prev. **21**(3):280-287.

39. Hasegawa, T., Shibata, T., Hirose, T., Seki, K. and Hizawa, K. 1993. Osteosarcoma with epithelioid features. An immunohistochemical study. Arch Pathol Lab Med. **117**:295-298.
40. Hemingway, F., Kashima, T. G., Mahendra, G., Dhongre, A., Hogendoorn, P. C., Mertens, F. and Athanasou, N. A. 2012. Smooth muscle actin expression in primary bone tumors. Virchows Arch. **460**:525-534.
41. Hendrick, M. J., Mahaffey, E. A., Moore, E. A., Vos, J. and Walder, E. J. 1998. Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals. Second series, vol 2. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D. C.
42. Heyman, S. J., Diefenderfer, D. L., Goldschmidt, M. H. and Newton, C. D. 1992. Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). Vet Surg. **21**(4):304-310.
43. Hillers, K. R., Dernell, W. S., Lafferty, M. H., Withrow, S. J. and Lana, S. E. 2005. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003). J Am Vet Med Assoc. **226**(8):1364-1367.
44. Hirose, T., Kudo, E., Hasegawa, T., Abe, J. and Hizawa, K. 1989. Expression of intermediate filaments in malignant fibrous histiocytomas. Hum Pathol. **20**(9):871-877.

45. Hoenerhoff, M. J., Kiupel, M., Rosenstein, D. and Pool, R. R. 2004. Multipotential osteosarcoma with various mesenchymal differentiations in a young dog. Vet Pathol. **41**:264-268.
46. Holthofer, H., Miettinen, A., Lehto, V. P., Lehtonen, E. and Virtanen, I. 1984. Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. Lab Invest. **50**(5):552-9.
47. Hugo, Honor., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williamms, E. D. and Thompson, E. W. 2007. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol. **213**(2):374-383.
48. Imamura, H., Ohta, T., Tsunetoshi, K., Doi, K., Nozaki, K., Takagi, Y. and Kikuta, K. 2010. Transdifferentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into the smooth muscle cell lineage mediated by transforming growth factor-beta1. Atherosclerosis. **211**(1):114-121.
49. Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. J Cell Biol. **38**(3):538-555.
50. Jaffe, R., Santamaria, M., Yunis, E. J., Tannery, N. H., Agostini, R. M. Jr., Medina, J. and Goodman, M. 1984. The neuroectodermal tumor of

bone. Am J Surg Pathol. **8**(12):885-898.

51. Kalil, R. K. and Squire, J. 2013. Small cell osteosarcoma. pp. 291. *In:* WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. (Fletcher, C. D. M., Bridge, J. A., Hogendoorn, P. C. W. and Mertens, F. eds.) IARC Press. Lyon, France.
52. Kasantikul, V. and Shuangshoti, S. 1989. Positivity to glial fibrillary acidic protein in bone, cartilage, and chordoma. J Surg Oncol. **41**:22-26.
53. Katayama, K. I., Kuroki, K., Uchida, K., Nakayama, H., Sakai, M., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sasaki, N. and Doi, K. 2001. A case of canine primitive neuroectodermal tumor (PNET). J Vet Med Sci. **63**(1):103-105.
54. Kaveri, H., Rekha, K. and Punnya, V. A. 2009. Epithelioid osteosarcoma of the maxilla: report of an unusual case. Br J Oral Maxillofac Surg. **47**:143-145.
55. Khamechian, T., Alizargar, J. and Mazoochi, T. 2014. Reporting a rare case of pleomorphic adenoma of the breast. Case Rep Med. 387183.
56. Kirpensteijn, J., Kik, M., Rutteman, G. R. and Teske, E. 2002. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. Vet Pathol. **39**(2):240-246.
57. Knapp, A. C. and Franke, W. W. 1989. Spontaneous losses of control of

- cytokeratin gene expression in transformed, non-epithelial human cells occurring at different levels of regulation. Cell. **59**(1):67-79.
58. Knecht, C. D. and Priester, W. A. 1978. Musculoskeletal tumors in dogs. J Am Vet Med Assoc. **172**(1):72-74.
59. Kosovsky, J. K., Matthiesen, D. T., Marretta, S. M. and Patnaik, A. K. 1991. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. Vet Surg. **20**(6):397-401.
60. Kramer, K., Hicks, D. G., Palis, J., Rosier, R. N., Oppenheimer, J., Fallon, M. D. and Cohen, H. J. 1993. Epithelioid osteosarcoma of bone. Immunocytochemical evidence suggesting divergent epithelial and mesenchymal differentiation in a primary osseous neoplasm. Cancer. **71**(10):2977-2982.
61. Kruse, M. A., Holmes, E. S., Balko, J. A., Fernandez, S., Brown, D. C. and Goldschmidt, M. H. 2012. Evaluation of clinical and histopathologic prognostic factors for survival in canine osteosarcoma of the extracranial flat and irregular bones. Vet Pathol. **50**(4):704-708.
62. Kuntz, C. A., Dernell, W. E., Powers, B. E. Devitt, C., Straw, R. C. and Withrow, S. J. 1997. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). J Am Vet Med Assoc. **211**(9):1147-1157.
63. Kuriyama, S. and Robert, Mayor. 2008. Molecular analysis of neural

- crest migration. Philos trans R Soc Lond B Biol Sci.
363(1495):1349-1362.
64. Kurzman, I. D. and Gilbertson, S. R. 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. Sumin Vet Med Surg (Small Anim). 1:25-32.
65. Lane, E. B., Hogan, B. L., Kurkinen, M. and Garrels, J. I. 1983. Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. Nature. **303**(5919):701-704.
66. LaRue, S. M. and Withrow, S. J. 1995. 骨格系の腫瘍. pp. 240-258. 小動物の臨床腫瘍学. (加藤元, 大島慧監訳), 文永堂, 東京.
67. Lazard, D., Sastre, X., Frid, M. G., Glukhova, M. A., Thiery, J. P. and Koteliansky, V. E. 1993. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. **90**(3):999-1003.
68. Lazarides, E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature. **283**(5744):249-256.
69. Litzky, L. A. and Brooks, J. J. 1990. Aberrant expression of cytokeratin in malignant fibrous histiocytoma and spindle cell tumors. Lab Invest. **62**:58A.
70. Loukopoulos, P. and Robinson, W.F. 2007. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. J Comp Pathol. **136**(1):65-73.

71. Loukopoulos, P., Thornton, J. R. and Robinson, W. F. 2003. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. Vet Pathol. **40**:237-248.
72. McNiel, E. A. Ogilvie, G. K., Powers, B. E., Hutchison, J. M., Salman, M. J. and Withrow, S. J. 1997. Evaluation of prognostic factors for dogs with primary lung tumors: 67 cases (1985-1992). J Am Vet Med Assoc. **211**(11):1422-1427.
73. Miettinen, M. 1991. Keratin subsets in spindle cell sarcomas. Keratins are widespread but synovial sarcoma contains a distinctive keratin polypeptide pattern and desmoplakins. Am J Pathol. **138**(2):505-513.
74. Millanta, F., Asproni, P., Cancedda, S., Vignoli, M., Bacci, B. and Poli, A. 2012. Immunohistochemical expression of COX-2, mPGES and EP2 receptor in normal and reactive canine bone and in canine osteosarcoma. J Comp Pathol. **147**:153-160.
75. Misdrop, W. and Hart, A. A. 1979. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. J Natl Cancer Inst. **62**(3):537-545.
76. Moore, A. S. and Ogilvie, G. K. 2008. 骨の腫瘍. pp. 530-553. 犬の腫瘍. (桃井康行監訳), interzoo, 東京.
77. Murakami, M., Sakai, H., Asakura, A., Hoshino, Y., Mori, t., Yamai, T., Maruo, K. and Masegi, T. 2010. Cytologic, histologic, and

- immunohistochemical features of maxillofacial alveolar rhabdomyosarcoma in a juvenile dog. Vet Clin Pathol. **39**(1):113-118.
78. Niinaka, Y., Harada, K., Fujimuro, M., Oda, M., Haga, A., Hosoki, M., Uzawa, N., Arai, N., Yamaguchi, S., Yamashiro, M. and Raz, A. 2010. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. Cancer Res. **70**(22):9483-9493.
79. Norton, A. J., Thomas, J. A. and Isaacson, P. G. 1987. Cytokeratin-specific monoclonal antibodies are reactive with tumours of smooth muscle derivation. An immunocytochemical and biochemical study using antibodies to intermediate filament cytoskeletal proteins. Histopathology. **11**(5):487-499.
80. Ogilvie, G. K. 2007. 骨の腫瘍. pp. 164-172. 獣医腫瘍学シークレット. (松原哲舟監修), NEW LLL PUBLISHER, 大阪.
81. Ogilvie, G. K., Powers, B. E., Mallinckrodt, C. H. and Withrow, S. J. 1996. Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. J Vet Intern Med. **10**(6):379-384.
82. Okada, K., Hasegawa, T. and Yokoyama, R. 2001. Rosette-forming epithelioid osteosarcoma: a histologic subtype with highly aggressive clinical behavior. Hum Pathol. **32**(7):726-733.
83. Okada, K., Hasegawa, T., Yokoyama, R., Beppu, Y. and Itoi, E. 2003.

Osteosarcoma with cytokeratin expression: a clinicopathological study of six cases with an emphasis on differential diagnosis from metastatic cancer. J Clin Pathol. **56**:742-746.

84. Okada, K., Hasegawa, T., Yokoyama, R., Beppu, Y. and Itoi, E. 2003. Prognostic relevance of rosette-like features in osteosarcoma. J Clin Pathol. **56**:831-834.
85. Oliveira, A. M., Okada, K. and Squire, J. 2013. Telangiectatic osteosarcoma. pp. 289-290. *In*: WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. (Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, eds.) IARC Press. Lyon, France.
86. Ordonez, N. G., Mahfouz, S. M. and Mackay, B. 1990. Synovial sarcoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. Hum Pathol. **21**(7):733-749.
87. Osborn, M. and Weber, K. 1983. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. Lab Invest. **48**(4):372-394.
88. Pachter, J. S. and Liem, R. K. H. 1984. The differential appearance of neurofilament triplet polypeptides in the developing rat optic nerve. Dev Biol. **103**(1):200-210.
89. Patnaik, A. K., Ehler, W. J. and MacEwen, E. G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Vat

Pathol. 21(5):469-474.

90. Palmer, N. 1992. Diseases of bones. pp. 133-136. *In: Pathology of domestic animals, 4th ed., vol. 1.* (Jubb KVF, Kennedy PC, and Palmer N ed) Academic Press, San Diego, CA.
91. Parham, D. M. and Barr, F. G. 2013. Skeletal-muscle tumours. pp. 123-135. *In: WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed.* (Fletcher, C. D. M., Bridge, J. A., Hogendoorn, P. C. W. and Mertens, F. eds.) IARC Press. Lyon, France.
92. Priester, W. A. and McKay, F. W. 1980. The occurrence of tumors in domestic animals. Natl Cancer Inst Monogr. 54:1-210.
93. Quinlan, R. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., Achtstatter, T., Moll, R., Jorcano, J. L., Magin, T. M. and Franke, W. W. 1985. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. Ann N Y Acad Sci. 455:282-306.
94. Ramaekers, F. C., Pruszynski, M. and Smedts, F. 1988. Cytokeratin in smooth muscle cells and smooth muscle tumours. Histopathology. 12(5):558-561.
95. Rinaggio, J., Kewitt, G. F. and McGuff, H. S. 2007. Epithelioid osteosarcoma presenting as a rapidly expanding maxillary mass. Head Neck. 29:705-709.

96. Riser, W. H., Brodey, R. S. and Biery, D. N. 1972. Bone infarctions associated with malignant bone tumors in dogs. J Am Vet Med Assoc. **160(4):**414-421.
97. Roessner, A., Hobik, H. P., Immenkamp, M. and Grundmann, E. 1979. Ultrastructure of telangiectatic osteosarcomas. J Cancer Res Clin Oncol. **95(2):**197-207.
98. Rosenberg, A. E., Cleton-Jansen, A-M., de Pinieux, G., Deyrup, A. T., Hauben, E. and Squire, J. 2013. Conventional osteosarcoma. pp. 282-288. *In*: WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. (Fletcher, C. D. M., Bridge, J. A., Hogendoorn, P. C. W. and Mertens, F. eds.) IARC Press. Lyon, France.
99. Ross, M. H and Pawlina, W. 2010. 骨組織. pp. 202-237. Ross 組織学. (内山安男, 相磯貞和監訳), 南江堂, 東京.
100. Ru, G., Terracini, B. and Glickman, L. T. 1998. Host related risk factors for canine osteosarcoma. Vet J. **156(1):**31-39.
101. Saam, D. E., Liptak, J.M., Stalker, M. J. and Chun, R. 2011. Predictors of outcome in dogs treated with adjuvant carboplatin for appendicular osteosarcoma: 65 cases (1996-2006). J Am Vet Med Assoc. **238(2):**195-206.
102. Sagartz, J. E., Bodley, W. L., Gamblin, R. M., Couto, C. G., Tierney, L. A. and Capen, C. C. 1996. p53 tumor suppressor protein

- overexpression in osteogenic tumors of dogs. Vet Pathol. **33(2)**:213-221.
103. Santos, G. C., Carvalho, K. C., Falzoni, R., Simoes, A. C., Rocha, R. M., Lopes, A., Vassallo, J, Reis, L. F., Soares, F. A. and da Cunha, I. W. 2009. Glial fibrillary acidic protein in tumor types with cartilaginous differentiation. Mod Pathol. **22**:1321-1327.
104. Selmic, L. E., Burton, J. H., Thamm, D. H., Withrow, S. J. and Lana, S. E. 2014. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. J Vet Intern Med. **28(2)**:554-563.
105. Selvarajah, G. T., Bonestroo, F. A., Kirpensteijn, J., Kik, M. J., van der Zee, R., van Eden, W., Timmermans-Sprang, E. P., Slob, A. and Mol, J. A. 2013. Heat shock protein expression analysis in canine osteosarcoma reveals HSP60 as a potentially relevant therapeutic target. Cell Stress Chaperones. **18**:607-622.
106. Selvarajah, G. T., Verheije, M. H., Kik, M., Slob, A., Rottier, P. J., Mol, J. A. and Kirpensteijn, J. 2012. Expression of epidermal growth factor receptor in canine osteosarcoma: association with clinicopathological parameters and prognosis. Vet J. **193**:412-419.
107. Shoeneman, J. K., Ehrhart, E. J. 3rd., Eickhoff, J. C., Charles, J. B., Powers, B. E. and Thamm, D. H. 2012. Expression and function of survivin in canine osteosarcoma. Cancer Res. **72(1)**:249-259.

108. Simcock, J. O., Withers, S.S. Prpich, C. Y., Kuntz, C. A. and Rutland, B. E. 2012. Evaluation of a single subcutaneous infusion of carboplatin as adjuvant chemotherapy for dogs with osteosarcoma: 17 cases (2006-2010). J Am Vet Med Assoc. **241(5)**:608-614.
109. Slayter, M. V., Boosinger, T. R., Pool, R. R., Dammrich, K., Misdrop, W. and Larsen, S. 1994. Histological Classification of Bone and Joint Tumors of Domestic Animals. Second series, vol 1. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D. C.
110. Snyder, L. A. and Michael, H. 2011. Alveolar rhabdomyosarcoma in a juvenile Labrador Labrador retriever: case report and literature review. J Am Anim Hosp Assoc. **47(6)**:443-446.
111. Spodnick, G. J., Berg, J., Rand, W. M., Schelling, S. H., Couto, G., Harvey, H. J. Henderson R. A., MacEwen, G., Mauldin, N. and McCaw, D. L. 1992. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). J Am Vet Med Assoc. **200**:995-999.
112. Stein, T. J., Holmes, K. E., Muthuswamy, A., Thompson, V. and Huelsmeyer, M. K. 2011. Characterization of β -catenin expression in canine osteosarcoma. Vet Comp Oncol. **9(1)**:65-73.
113. Straw, R. C. and Withrow, S. J. 1996. Limb-sparing surgery versus amputation for dogs with bone tumors. Vet Clin North Am Small Anim Pract. **26(1)**:135-143.

114. Straw, R. C., Withrow, S. J., Richter, S. L., Powers, B. E., Klein, M. K., Postorino, N. C., LaRue, S. M., Ogilvie, G. K., Vail, D. M. and Morrison, W. B. 1991. Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. J Vet Intern Med. **5**(4):205-210.
115. Tsai, S. Y., Chang, K. C., Tsai, H. W. and D D S YT. 2012. Ectomesenchymal chondromyxoid tumor of tongue. Indian J Pathol Microbiol. **55**(4):519-520.
116. Tapscott, S. J., Bennett, G. S., Toyama, Y., Kleinbart, F. and Holtzer, H. 1981. Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. Dev Biol. **86**(1):40-54.
117. Tauchi, K., Tsutsumi, Y., Yoshimura, S. and Watanabe, K. 1990. Immunohistochemical and immunoblotting detection of cytokeratin in smooth muscle tumors. Acta Pathol Jpn. **40**(8):574-580.
118. Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G. R., Kurzman, I. D., Moore, P. F. and MacEwen, E. G. 1994. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. J Am Vet Med Assoc. **205**(12):1722-1728.
119. Theilen, G. H. and Madewell, B. R. 1985. 骨格の腫瘍. pp. 315-316. 獣医臨床腫瘍学. (竹内啓監訳), 学窓社, 東京.
120. Thompson, J. P. and Fugent, M. J. 1992. Evaluation of survival times after limb amputation, with and without subsequent

- administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). J Am Vet Med Assoc. **200(4):**531-533.
121. Thompson, K. G. and Pool, R. R. 2002. Tumors of bones. pp. 245-317. *In: Tumors in Domestic Animals*, 4th ed. (Mueten DJ ed.) Iowa State Press, Iowa.
122. Tjalma, R. A. 1966. Canine bone sarcoma: estimation of relative risk as a function of body size.
123. Tokuyasu, K. T., Maher, P. A. and Singer, S. J. 1984. Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. I. Immunofluorescence study. J Cell Biol. **98(6):**1961-1972.
124. Vail, D. M., Kurzman, I. D., Glawe, P. C., O'Brien, M. G., Chun, R., Garrett, L. D., Obradovich, J. E., Fred, R. M. 3rd., Khanna, C., Colbern, G. T. and Working, P. K. 2002. STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. Cancer Chemother Pharmacol. **50(2):**131-136.
125. Vail, D. M., Powers, B. E., Getzy, D. M., Morrison, W. B., McEntee, M. C., O'Keefe, D. A., Norris, A. M. and Withrow, S. J. 1994. Evaluation of prognostic factors for dogs with synovial sarcoma: 36 cases (1986-1991). J Am Vet Med Assoc. **205(9):**1300-1307.
126. Vail, V. E., Norris, A., Jacobs, R. M., Laing, E., Withrow, S., Macy, D.,

- Tomlinson, J., McCaw, D., Ogilvie, G. K. and Pidgeon, G. 1995. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumor progression and survival. J Comp Pathol. **113**(2):113-130.
127. White, R. A. S. 1991. Mandibulectomy and maxillectomy in the dog: long term survival in 100 cases. J Small Anim Pract. **32**:69-74.
128. Wilcock, B. P. and Peiffer, R. L. Jr. 1986. Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs. Vet Pathol. **23**(4):418-424.
129. Wolke, R. E. and Nielsen, S. W. 1966. Site incidence of canine osteosarcoma. J Small Anim Pract. **7**(7):489-492.
130. Yamamura, H., Yoshikawa, H., Tatsuta, M., Akedo, H. and Takahashi, K. 1998. Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. Int J Cancer. **79**:245-250.
131. Yang, J., Du, X., Wang, G., Sun, Y., Chen, K., Zhu, X., Lazar, A. J., Hunt, K. K., Pollock, R. E. and Zhang, W. 2014. Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas. Eur J Cancer. **50**(3):593-601.
132. Yong, J. M. 1967. Origins of serum alkaline phosphatase. J Clin Pathol. **20**(4):647-653.
133. Yoshida, H., Yumoto, T., Adachi, H., Minamizaki, T., Maeda, N. and Furuse, K. 1989. Osteosarcoma with prominent epithelioid features.

Acta Pathol Jpn. **39**(7):439-445.