

マゴイに自然発症した横紋筋肉腫の病理組織学的 および免疫組織化学的研究

安本信哉[†], 大村拓也, 中村和也, 近藤昌和

Histopathological and Immunohistochemical Studies of Spontaneous Rhabdomyosarcoma in Common Carp *Cyprinus carpio*

Shinya Yasumoto[†], Takuya Omura, Kazuya Nakamura and Masakazu Kondo

Abstract : We examined in detail the pathological features of common carp *Cyprinus carpio* with spontaneous neoplastic lesions in the lateral muscle. Diseased fish had exophthalmos and dorsal enlargement along with a large oval tumor. Histopathologically, this tumor was mainly composed of parenchyma accompanied with central necrosis, and most of the tumor was covered with thin membrane containing collagenous fibers. However, this membrane was not observed at the deep area of the tumor where the tumor cells invaded into the muscular tissue. In the parenchyma, three types of cells were observed: Some rhabdomyoblast and multinucleated giant cells among the numerous PAS-positive tumor cells. Dissimilarity between the tumor and primary tissue suggest that the tumor is undifferentiated neoplasm. The tumor cell show positive reaction to vimentin but not to other antigens such as anti-Myogenin, anti-MyoD1 and so on. These findings indicate the tumor is rhabdomyosarcoma.

Key words : carp, *Cyprinus carpio*, tumor, rhabdomyosarcoma, histopathology

緒言

魚類における腫瘍は一般的に発生頻度が低いため、食用魚では問題となることは少ないが、ニシキゴイなどの観賞魚では、1尾あたりの価値が高いため、腫瘍の発生は大きな経済的損失となる^{1,2)}。魚類においても様々なタイプの腫瘍が知られており^{3,5)}、腫瘍細胞の由来組織や分化度によって分類される。ニシキゴイでは横紋筋腫、赤色細胞腫、乳頭腫、卵巣腫瘍や生殖腺未分化癌などの腫瘍が報告されているものの^{1,2,6,8)}、卵巣腫瘍と生殖腺未分化癌を除いて^{9,10)}、目視による所見や一般的な病理組織学的特徴しか明らかになっていない。

近年、K-ras遺伝子を人為的に変異させたゼブラフィッシュ *Danio rerio* を作出して様々な癌を発症させることが可能となり、癌研究のモデル動物としての活用が期待されて

いる¹¹⁾。本研究ではマゴイの躯幹部に自然発症した腫瘍の病理組織学的および免疫組織化学の特徴を報告する。

材料および方法

供試魚

2014年5月に水産大学校の屋外飼育施設において雌雄各1尾のマゴイを用いて乾導法により人工授精を行い、孵化した仔魚を飼育した。孵化仔魚にはミジンコ *Daphnia pulex* を初期餌量として与え、ついで市販の配合飼料（林兼産業）を給餌した。孵化後2ヶ月目に取り上げた個体（395尾）のうち、衰弱し躯幹部に腫瘍を形成した1個体（全長10.0 cm, 体重19.0 g）を供試した。なお、対照として、全長15.0 cm, 体重38.2 gのマゴイ健常魚を用いた。

外見および剖検所見

キナルジン麻酔液 (2-メチルキノリン10 gを1 Lのエタノールに溶解させたもの) を飼育水1 Lに対して2 mL加えて病魚を麻酔し, 外見症状を観察したのち, 解剖用剪刀で開腹・開頭し, 腫瘍および内臓諸器官の肉眼観察を行った。解剖後は解剖用剪刀で脊椎を切断して安楽死させた。

細菌分離

ブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地, サイトファガ寒天培地および1%小川培地を用いて, 病魚の腫瘍, 腎臓, 脾臓および肝臓からの細菌分離を行った。

病理組織学的観察

病魚の腫瘍およびその周辺部ならびに内臓諸器官をブアン液で固定をした。エタノール系列で脱水後, キシレンで透徹してパラフィン包埋した。定法に従って厚さ2または4 μm のパラフィン切片を作製し, hematoxylin eosin染色 (HE), azan染色 (Az), May-Grünwald-Giemsa染色 (MGG) およびperiodic acid-Schiff染色 (PAS)を適宜施して光学顕微鏡で観察した。

免疫組織化学染色

パラフィン切片を脱パラフィン後, 10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0; SIGMA) または0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 9.5) に浸漬してマイクロウェーブ (700W, 5分間, 3回) で抗原賦活処理を行った。室温にて3%過酸化水素で10分間処理し, 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4; PBS) で5分間洗浄した。洗浄後, 必要に応じてbovine serum albuminを1%添加したPBS (pH 7.4; 以下, 希釈液と称す) を用いて1:50の割合で希釈して免疫染色を行った。抗体として, 抗サイトケラチンAE1/AE3抗体 (以下, 抗サイトケラチン抗体と称す) および抗Vimentin抗体 (ともにDakoCytomation), 抗p53抗体, 抗PCNA抗体, 抗Myogenin抗体, 抗MyoD1抗体および抗Desmin抗体 (いずれもSanta Cruz Biotechnology) を用いた。コントロール抗体にはNegative control Mouse IgG1 (DakoCytomation) を使用した。各希釈抗体を異なる切片上に200 μL ずつ載せ, 室温で2時間静置した。PBSで5分間洗浄して, 希釈液で希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス抗体 (Merck Millipore; 希釈率1:200) 溶液200 μL を, それぞれの切片上に載せて, 室温で45分間反応させた。PBSで5分間洗浄後, スライド上の余分な液体を拭き取り, 3,3'-Diamino-

benzidine (Tablets, SIGMA-ALDRICH) 溶液をスライドに200 μL 上載せし, 5分後に蒸留水で洗浄して反応を終了させた。対比染色として, マイヤーのヘマトキシリンで1分間染色し, 光学顕微鏡で観察した。

結 果

外見および解剖所見

病魚の躯幹部右側上部は卵円形の腫瘍 (2.0 cm \times 1.6 cm) により大きく膨隆していた (Fig. 1)。腫瘍表面は上皮が伸展し, 鱗が存在する部位と存在しない部位があった。鱗を欠く部位は乳白色を呈していた。また, 病魚は眼球が突出していた。解剖して観察したところ, 腫瘍は皮下に形成され筋肉層内に埋没していたが, 腫瘍と筋肉組織との境界は明瞭であった。また, 腫瘍の中心は液状化 (灰白色) していた。内臓諸器官に異常は見られなかった。なお, 病魚から細菌は分離されなかった。



Fig. 1. Diseased fish shows the exophthalmos and dorsal enlargement along with a large oval tumor. Bar = 2 cm.

病理組織学的観察

本腫瘍は皮下から筋肉内にかけて見られ, 中心壊死をともなっていた。実質には腫瘍細胞が充実性に増殖しており, 内部に血管構造もみられた (Fig. 2A)。腫瘍と接する皮膚では, 真皮や皮下脂肪織が消失するとともに上皮層が展延していた (Fig. 2B)。腫瘍の深部を除いて, 腫瘍と周辺組織との境界は明瞭であった。また, 腫瘍に接する上皮組織と筋肉組織の間には膠原線維を含む薄膜が存在した (Fig. 2C)。腫瘍深部では膠原線維性の薄膜は認められず, 筋肉組織に多数の腫瘍細胞が浸潤していた (Fig. 2D)。浸潤部の筋肉細胞は委縮または核の肥大化をともなって壊死崩壊し, 多核巨細胞の集簇がみられた (Fig. 2D)。腫瘍の

中心壊死部では、多核巨細胞や多数の壊死した腫瘍細胞が観察された(Fig. 2E)。

腫瘍細胞は細胞異型や核異型を示し、類円形(長径7-14 μm)で細胞に占める細胞質の割合が小さく、膨化した核

を有しており、細胞質がPAS陽性であった(Figs. 3A & 3B)。腫瘍はいずれの組織とも類似しておらず、未分化であった。腫瘍内では、腫瘍細胞以外に横紋筋芽様細胞と多核巨細胞が観察された。横紋筋芽様細胞は偏在した核を有

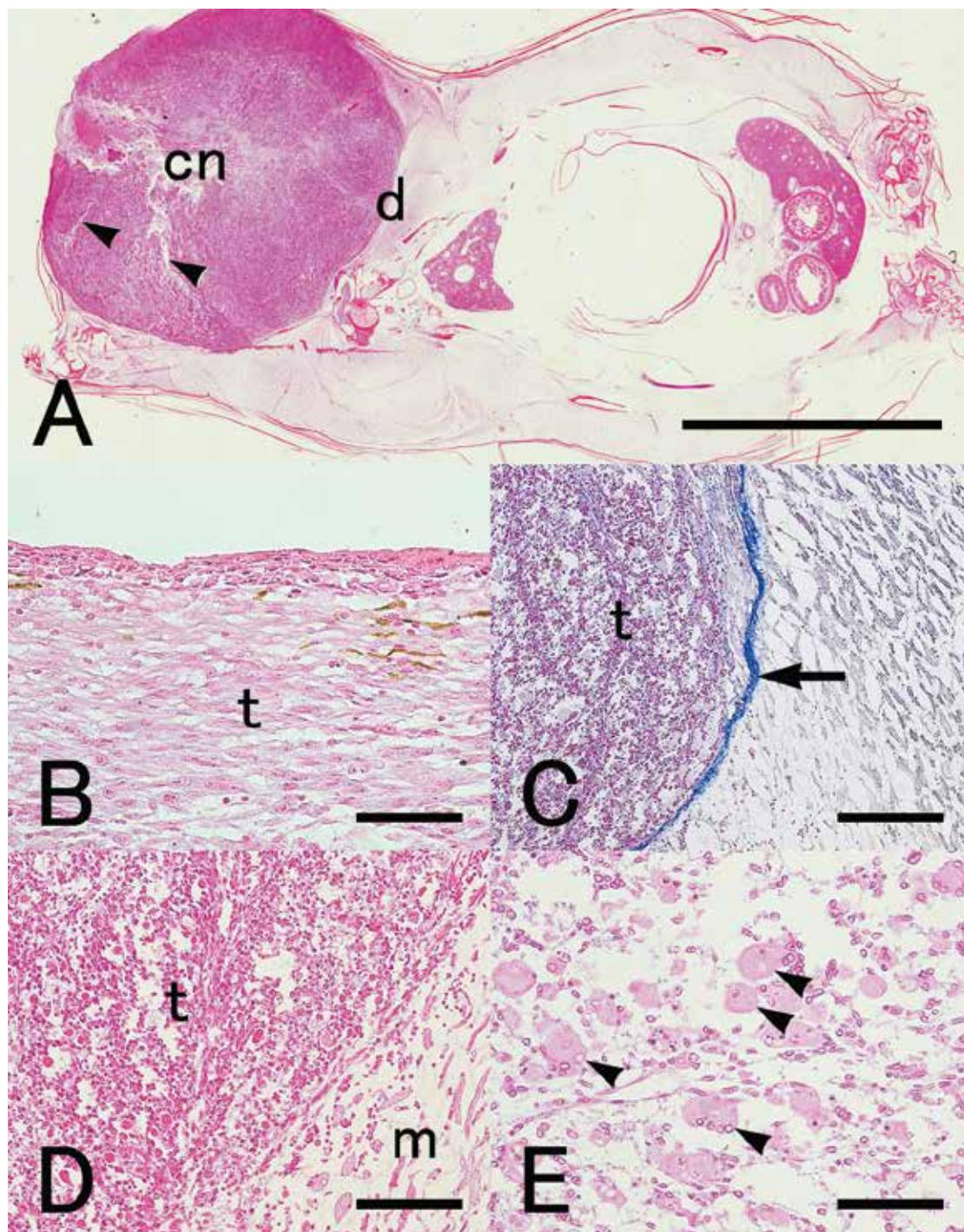


Fig. 2. Light microscopic images of the tumor. A: The macro image of the tumor. The tumor, where blood vessels (arrowheads) are observed, is mainly composed of parenchyma accompanied with central necrosis (cn) (HE; bar = 1 cm). B: The skin, which is touching the tumor (t), is stretched by tumor enlargement and the dermis and subcutaneous adipose tissue had disappeared (HE; bar = 50 μm). C: Most of the tumor (t) is covered with thin collagen fiber membrane (arrow) (Az; bar = 200 μm). D: At the deep area (d in A) of the tumor (t), there is no collagenous membrane, and tumor cells had invaded into the muscular tissue (m) (HE; bar = 100 μm). E: Many necrotized tumor cells and multinucleated giant cell (arrowheads) are observed in central necrosis area (HE; bar = 50 μm).

する紡錘形の細胞（長径6-12 μm ）で、細胞質は好酸性を示し、横紋様構造が観察された (Fig. 3A)。この細胞は実質内に散在したが、中心壊死部では認められなかった。多核巨細胞は類円形または不定形の巨大な細胞（長径28-45 μm ）であり、核は1細胞あたり2-15個観察された。核は類円形で核膜と核小体がヘマトキシリンに濃染した (Fig.

3C)。細胞質はHE染色で淡赤色、MGG染色では淡青色を呈した。多核巨細胞は腫瘍内に散在的に存在していたが、とくに中心壊死部および腫瘍と筋肉との境界付近で多く観察された。中心壊死部で観察される多核巨細胞では、しばしば横紋様構造が観察された (Fig. 3D)。

内臓諸器官においては、腫瘍の転移や異常はみられな

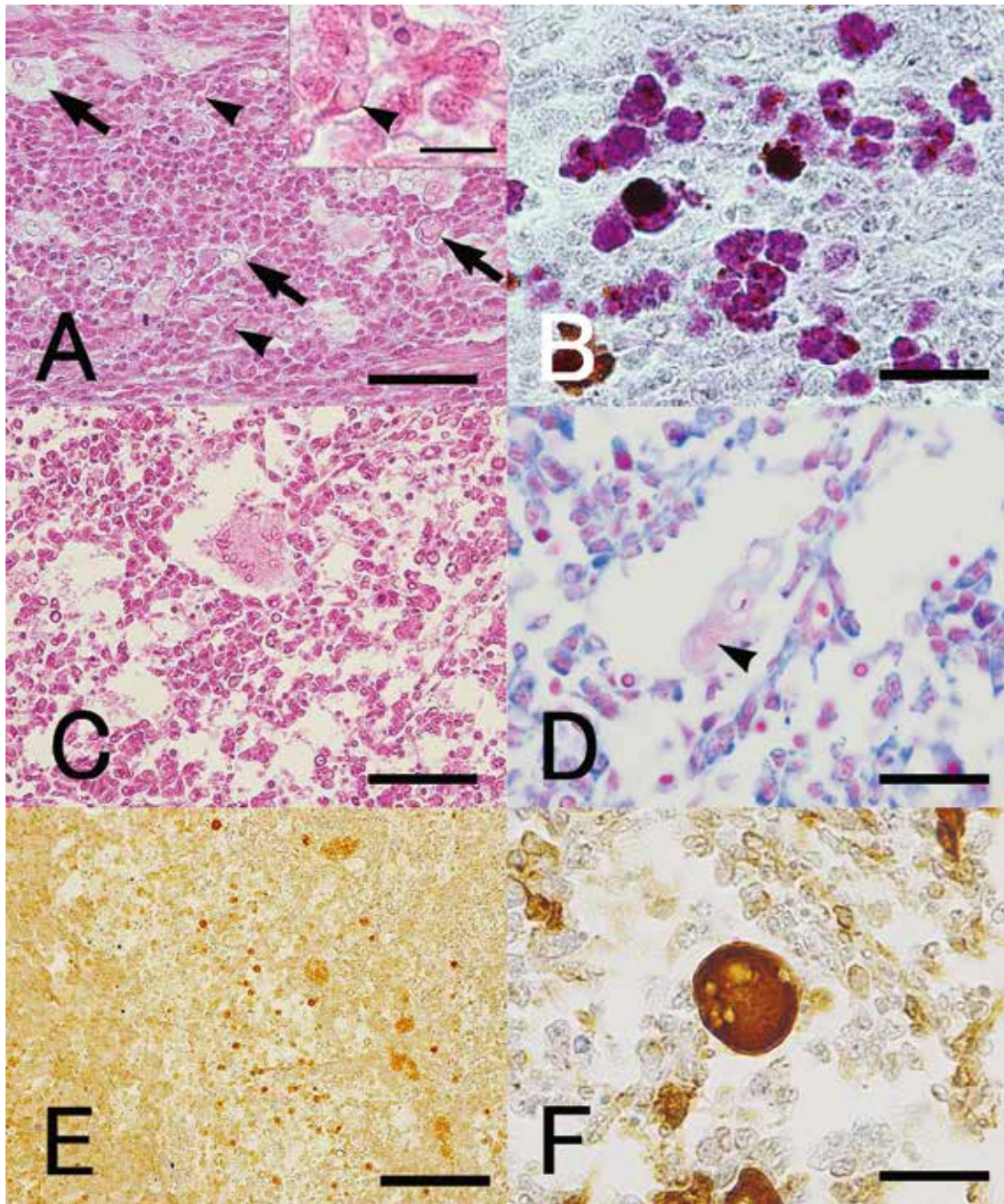


Fig. 3. Light microscopic images of tumor cells. A: In parenchyma, tumor cells had propagated solidly and some rhabdomyoblast (arrowhead) and multinucleated giant cell (MGC) (arrows) are observed. The tumor cells are oval shape and the nuclei are stained strongly with hematoxylin (HE; bar = 50 μm). Inset: details of the rhabdomyoblast (arrowhead). The cytoplasm is stained strongly with eosin (HE; bar = 10 μm). B: Many tumor cells are PAS-positive (PAS; bar = 25 μm). C: The MGC is oval or amorphous in shape and often observed in the central necrosis area (HE; bar = 50 μm). D: The stripe structures (arrowhead) in cytoplasm of MGC (MGG; bar = 10 μm). E: Vimentin-positive tumor cells under epitope retrieval conditions (bar = 100 μm). F: Cytokeratin AE1/AE3-positive MGC under epitope retrieval conditions (bar = 50 μm).

かったが、筋肉は広範囲で壊死や混濁などの浮腫性病変を示していた。

免疫組織化学的観察

腫瘍細胞と横紋筋芽様細胞の細胞質は、抗Vimentin抗体陽性であった(Fig. 3E)。多核巨細胞は、細胞質が抗サイトケラチン抗体に強陽性であったが(Fig. 3F)、いずれの細胞もその他の抗体では陰性であった。なお、抗Myogenin抗体、抗MyoD1抗体および抗Desmin抗体は正常筋肉組織においても陰性であった。

考 察

マゴイ躯幹部で自然発症した腫瘍（以下、本腫瘍と称す）は、病理組織学的観察の結果、実質部に富んだ中心壊死をともなう卵円形の腫瘍であることが明らかとなった。本腫瘍は肉眼的に辺縁組織との境界は明瞭であり、病理組織学的にも大部分が膠原繊維の薄膜によって取り囲まれていた。しかし、腫瘍深部の一部では膠原繊維の薄膜がみられず、境界は不明瞭で筋肉への浸潤もみられたが、内臓諸器官への転移は観察されなかった。また、腫瘍内には血管構造が観察されたことから、血管新生をともなう腫瘍と考えられる。腫瘍の大部分を占める実質では、PAS陽性かつ異型性の強い未分化な腫瘍細胞が充実性に増殖していた。横紋筋を原発組織とし、本腫瘍に酷似する腫瘍として、横紋筋腫と横紋筋肉腫が挙げられる^{18,19)}。前者は良性腫瘍であり、腫瘍細胞は横紋筋細胞に類似した特徴を持つ。後者は悪性腫瘍であり、腫瘍細胞は横紋筋細胞と類似しない未分化な特徴を有する。保科（1952）はキンギョ *Carassius auratus*において、横紋筋細胞の異型的な増殖により形成された腫瘍を横紋筋腫として報告している⁶⁾。しかし、本腫瘍細胞は横紋筋細胞との類似性はなく、分化の方向性も明らかでないことから、横紋筋腫ではなく横紋筋肉腫であると考えられた。ヒトの横紋筋肉腫組織内では横紋筋芽細胞や多核巨細胞が観察される^{12,13)}、本腫瘍においてもこれら細胞と類似した細胞が観察された。Storer et al. (2013) は人為的にK-ras遺伝子を変異させたゼブラフィッシュで発生した横紋筋肉腫の病理組織を報告しており¹⁴⁾、中心壊死は伴わないものの、腫瘍細胞や横紋筋芽細胞の特徴は本腫瘍と類似している。

横紋筋肉腫は固形腫瘍の一種であり、上皮系と間葉系（非上皮系）の腫瘍に大別され、この判別には抗サイトケラチン抗体と抗Vimentin抗体が用いられる^{15,16)}。本腫瘍の腫瘍

細胞は非上皮性細胞マーカーである抗Vimentin抗体で陽性となり、間葉系腫瘍であるヒトの横紋筋肉腫と同様の染色性を示した。p53遺伝子は細胞増殖を抑制するタンパク質の遺伝子であり、抗p53抗体は細胞核内の変異したp53遺伝子が作り出すタンパク質を検出する。悪性度の強い腫瘍細胞では、この遺伝子の変異が高頻度で見られる。また、抗PCNA抗体は細胞のDNA合成期に発現するタンパク質（Proliferating Cell Nuclear Antigen）を検出することから、細胞周期の速い細胞の核に反応する。これら2種の抗体はともに悪性度の強い腫瘍細胞に反応することから、癌（悪性腫瘍）のマーカーとして用いられる。ヒトの横紋筋肉腫ではおよそ50%で抗p53抗体が陽性となる¹⁷⁾、本腫瘍は抗p53抗体陰性であった。さらに、抗PCNA抗体についても陰性であり、病理組織観察により転移もみられなかったことから、悪性度は低いと考えられる。しかし、本腫瘍は横紋筋肉腫のマーカーとして用いられる抗Myogenin抗体、抗MyoD1抗体、抗Desmin抗体に陰性であった。ヒトの場合、これら抗体を用いた染色の陽性対照には正常ヒト骨格筋組織が用いられる^{18,19)}、コイの正常筋肉組織は陰性であった。一方、Storer et al. (2013) はK-ras遺伝子変異ゼブラフィッシュの横紋筋肉腫や正常組織は抗Myogenin抗体、抗MyoD1抗体、抗Desmin抗体に陽性であると報告している¹²⁾。腫瘍マーカーなどの抗体は本来ヒト用に作出されたものであることから、魚種によって染色性が異なることも考えられる。

腫瘍内にみられた多核巨細胞は類円形または不定形で、腫瘍内やその周囲に散在していた。宮崎、江草（1973）はアユ*Plecoglossus altivelis*の真菌性肉芽腫症でみられた多核巨細胞を、肉芽腫形成により誘導された異物巨細胞（複数のマクロファージなどの食細胞により形成された合胞体）と報告している²⁰⁾。また、中務（1972）もヒブナ（キンギョ）の腺腫内で多核巨細胞を観察しているが、この細胞は合胞体ではなく腫瘍細胞の一つと考えている²¹⁾。ヒトの横紋筋肉腫でみられる多核巨細胞は腫瘍由来の細胞と言われている¹²⁾、本研究の多核巨細胞は、腫瘍細胞や筋肉組織と全く異なる免疫組織化学染色性を示した。このことから、腫瘍性の細胞ではなく、異物巨細胞とみなすべきである。本研究の多核巨細胞が異物巨細胞であるとすれば、細胞質にみられた横紋様構造は貪食された腫瘍細胞や横紋筋芽様細胞と推察できる。しかしながら、ヒトにおいて一般的な貪食細胞や異物巨細胞は抗サイトケラチン抗体陰性である²²⁾、本研究でみられた多核巨細胞は強陽性であった。この理由については、不明である。

腫瘍以外の組織においては、筋肉に広範囲の浮腫性病変がみられた。魚類においては、腫瘍の進行により低タンパク血症に陥って浮腫症状や眼球突出を示すことが知られている⁹⁾。本症例においても腫瘍は巨大かつ病魚は衰弱していたことから、同様の理由により浮腫性病変や眼球突出がみられたと推察する。また、腫瘍と接する皮膚組織の展延は、腫瘍巨大化による物理的な圧迫によるものと考えられる。

以上の結果から、マゴイ軀幹部で自然発症した腫瘍は横紋筋肉腫と判断するが、一部の免疫組織化学染色性がヒトの場合と異なっていたことについては今後の検討課題としたい。

文 献

- 1) 山田和雄: 卵巣腫瘍. 畑井喜司雄, 小川和夫 (編), 新魚病図鑑. 緑書房, 東京, 113 (2006)
- 2) Yasumoto S, Koga D, Tanaka K, Kondo M and Takahashi Y: Histopathological and immunohistochemical studies of gonadal undifferentiated carcinoma in common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol*, **50**, 53-59 (2015)
- 3) Schlumberger HG, Lucke B: Tumors of fishes, amphibians, and reptiles. *Cancer Res*, **8**, 657-754 (1948)
- 4) Masahito P, Ishikawa T, Sugano H: Fish tumors and their importance in cancer research. *Jpn J Cancer Res*, **79**, 545-555 (1988)
- 5) Harchbarger JC, Clark JB: Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *Sci Total Env*, **94**, 1-32 (1990)
- 6) 保科利一: 魚類の腫瘍四例に就いて. 魚類学雑誌, **2**, 81-88 (1952)
- 7) Murchelano RA, Edwards RL: An erythrophoroma in ornamental carp, *Cyprinus carpio* L.. *J Fish Dis*, **4**, 265-268 (1981)
- 8) 福田穎穂: ヘルペスウイルス性乳頭腫. 畑井喜司雄, 小川和夫 (編), 新魚病図鑑. 緑書房, 東京, 95 (2006)
- 9) Ishikawa T, Kuwabara N, Takayama S: Spontaneous ovarian tumors in domestic carp (*Cyprinus carpio*): Light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst*, **57**, 579-584 (1976)
- 10) Ishikawa T, Takayama S: Ovarian neoplasia in ornamental hybrid carp (Nishikigoi) in Japan. *Ann of the NY Acade Sci*, **298**, 330-341 (1977)
- 11) Eleanor YC, David ML: Zebrafish models of rhabdomyosarcoma. *Method in Cell Biol*, **105**, 383-402 (2011)
- 12) 森脇昭介, 宇佐美孝子, 山本陽子, 山内政之, 村上和重: 各種多核巨細胞について - 主として細胞診の立場から. 日本臨床細胞学会雑誌, **15**, 83-96 (1976)
- 13) Tandon A, Sethi K, Singh AP: Oral rhabdomyosarcoma: A review. *J Clin Exp Dent*, **4**, 302-308 (2012)
- 14) Storer YN, White MR, Uong A, Price E, Nielsen PG, Langenau MD, Zon IL: Zebrafish rhabdomyosarcoma reflects the developmental stage of oncogene expression during myogenesis. *Development*, **140**, 3040-3050 (2013)
- 15) Cooper D, Schermer A, Sun TT: Biology of disease. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins. Strategies, applications and limitations. *Labor Invest*, **52**, 243-256 (1985)
- 16) Osborn M, Weber K: Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing. *Labor Invest*, **48**, 372-394 (1983)
- 17) Cam H, Griesmann H, Beitzinger M: p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. *Cancer Cell*, **10**, 281-293 (2006)
- 18) Altmannsberger M, Weber K, Droste R, Osborn M: Desmin is a specific marker for rhabdomyosarcomas of human and rat origin. *Am J Pathol*, **118**, 85-95 (1985)
- 19) Cessna MH, Zhou H, Holly MD, Perkins SL, Tripp SR, Layfield L, Daines C, Coffin C: Are myogenin and MyoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma?: A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics. *Am J Surg Pathol*, **25**, 1150-1157 (2001)
- 20) 宮崎照雄, 江草周三: 淡水魚の真菌性肉芽腫症に関する研究 II. アユに流行した真菌性肉芽腫症. 魚病研究, **7**, 125-133 (1973)
- 21) 中務康生: ヒブナの表皮にみられた良性腺腫について. 魚類学雑誌, **19**, 39-40 (1972)
- 22) Moll R, Franke WW, Schiller DI: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11-24 (1982)