

## 腹腔内の多発性結節性腫瘤を特徴とする牛の 骨外性骨肉腫の1例

須藤亜寿佳<sup>1), 2)</sup> 岩田竜治<sup>2)</sup> 君付和範<sup>2)</sup>

ブンシロー・ハッサデン<sup>2)</sup> 朴 天鎬<sup>2)†</sup>

1) 山形県庄内食肉衛生検査所 (〒999-7762 東田川郡庄内町家根合字中荒田21-7)

2) 北里大学獣医学部獣医病理学研究室 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)

(2013年7月18日受付・2014年2月14日受理)

### 要 約

臨床的に腸間膜脂肪壊死と診断された黒毛和種牛(16歳8カ月齢, 雌)がと畜場に搬入された。解体時, 肝臓, 脾臓の漿膜面, 大網, 横隔膜, 腹壁及び肺実質に骨様の硬組織形成を伴う多数の白色腫瘤が観察された。肉眼的に既存の骨組織に腫瘤形成は認められなかった。病理組織学的には, いずれの腫瘤も類骨性骨梁及び骨芽細胞様の腫瘍細胞から構成されていた。腫瘍細胞の異型性は低く, 核分裂像もまれであったが, 肺への転移が認められた。免疫組織化学的には, 腫瘍細胞はosteopontin, ケラタン硫酸, S-100及びvimentinに陽性を示した。以上の結果から, 本症例は牛で比較的報告の少ない骨外性骨肉腫と診断された。——キーワード: 腹腔, 骨外性骨肉腫, 黒毛和種牛。

-----日獣会誌 67, 665~669 (2014)

骨外性骨肉腫は骨以外の組織または臓器から発生するまれな悪性間葉系腫瘍である [1]。人では悪性軟部腫瘍の約1~2% [2], 骨肉腫の中では約4%を占める [3]。中高齢において比較的発生頻度が高く [4, 5], 大腿, 臀部及び肩部などの四肢が好発部位である [4, 6]。これに対して, 実験動物及び小動物では, 内臓臓器での発生が多く, これまでに高齢のラット [7], 兎 [8], 猫 [9] 及び犬 [10] などで報告されている。反芻動物では, 16歳の山羊の胸郭 [11], 5歳の牛の頸部 [12] で各1例報告されている。今回, 腹壁及び腹腔臓器の漿膜面に大小の結節性腫瘤の形成を特徴とするきわめてまれな骨外性骨肉腫の症例に遭遇したので, その概要を報告する。

### 材料及び方法

**症例及び肉眼所見:** 症例は黒毛和種(16歳8カ月齢, 雌)である。食欲不振のため臨床獣医師の診察を受け, 腸間膜脂肪壊死症と診断された。妊娠牛であったため, 出産まで対症療法で経過観察を行ったが, 出産後も一般状態が好転せず, 廃用認定を受け当所所管のと畜場に搬入された。搬入時の生体検査では, 削瘦及び腹囲膨満が

認められた。解体後の肉眼検査では, 右最後肋骨後位の腹壁に15×15cm大の最大腫瘤が観察された。腫瘤と肋骨との間に連続性は認められなかった。また, 肝臓, 脾臓, 第三胃の漿膜面, 大網及び横隔膜の尾側面に大小さまざまな白色結節が多数観察された。胸腔では, 肺の漿膜下実質に5×5cm大に及ぶ白色腫瘤が3カ所で観察された。いずれの腫瘤も骨様に硬く検査刀では切開が困難であった。頭部, 四肢, 脊椎, 肋骨及び胸椎など既存の骨組織に腫瘤は存在しなかった。腫瘤の発生部位と増殖形態から悪性中皮腫の可能性を考慮し病理検索を実施した。病理検索材料として, 一般諸臓器(肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 横隔膜, 腹膜, 第三胃, 副腎及び腸間膜), 腹腔腫瘤及び肺に形成された腫瘤を用いた。

**病理組織学的検索:** すべての検索材料を10%中性緩衝ホルマリン(武藤化学株, 東京)に固定し, 定法に従ってパラフィン包埋切片を作製した。腫瘤については, ホルマリン固定後に5%ギ酸溶液(関東化学株, 東京)で脱灰後, ヘマトキシリン・エオジン(以下, HE)染色を実施した。次に, 連続パラフィン切片を用いて特殊染色と免疫染色を実施した。特殊染色として, マッソン・トリクローム染色, 過ヨウ素酸シッフ反応(以下, PAS

† 連絡責任者: 朴 天鎬(北里大学獣医学部獣医病理学研究室)

〒034-8628 十和田市東23番町35-1 ☎0176-24-9433 FAX 0176-23-8160  
E-mail: baku@vmas.kitasato-u.ac.jp

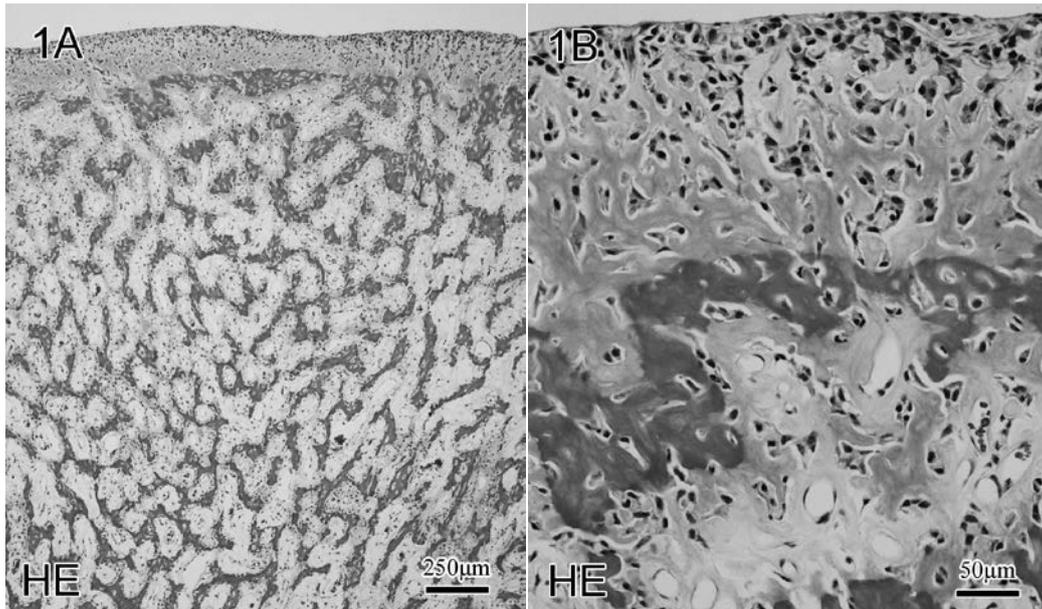


図1 脾臓の漿膜面腫瘍

1A: 多方向性に分岐する骨梁が多数認められる (HE 染色 Bar=250 μm).

1B: 骨梁間には多数の腫瘍細胞, 結合組織の増生及び小径血管が観察される (HE 染色 Bar=50 μm)

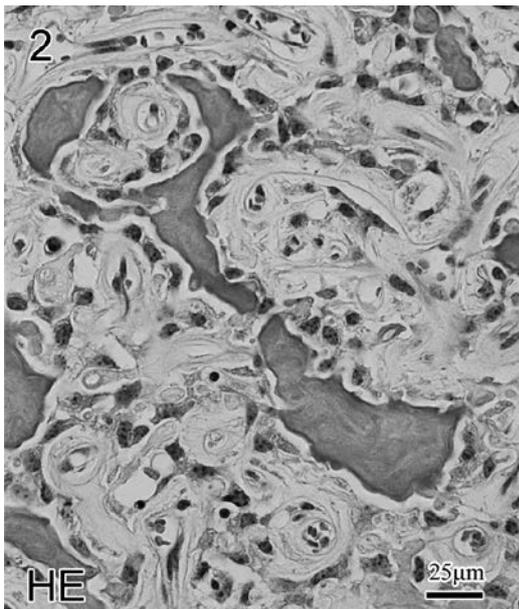


図2 肺転移腫瘍. 骨梁の周囲には星芒状や三角形を呈する腫瘍細胞が多数観察される.  
(HE 染色 Bar=25 μm)

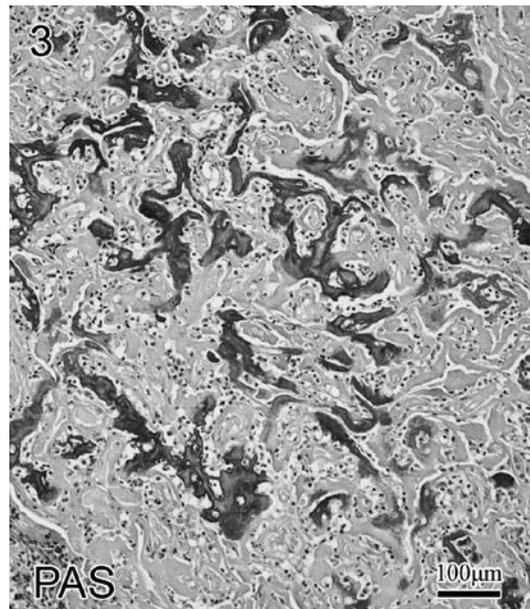


図3 肺転移腫瘍. 骨梁の中心部はPAS強陽性を示すが, 辺縁部は弱陽性である.  
(PAS 反応染色 Bar=100 μm)

反応) 及びアルシアンブルー染色を行った.

**免疫組織化学的検索:** 一次抗体として, osteopontin, ケラタン硫酸, S-100, mesothelial cell, calretinin, cytokeratin 5/6 (以下, CK 5/6), cytokeratin AE1/AE3 (以下, CK AE1/AE3),  $\alpha$ -smooth muscle actin (以下, SMA), vimentin, desmin, adipophilin を使用した. 薄切切片を脱パラフィン後, 必要に応じて抗原賦活化を行った. その後, 3% もしくは 0.3% 過酸化水

素加メタノールにより内因性ペルオキシダーゼの除去を行った. 陽性反応の可視化には 3-3'-diaminobenzidine 溶液 (株ニチレイ, 東京) を用い, 最後にヘマトキシリンで対比染色を行った. なお, 一次抗体名, 会社名, 染色条件については表にまとめた.

#### 成 績

**病理組織学:** いずれの腫瘍も同様な構成成分であっ

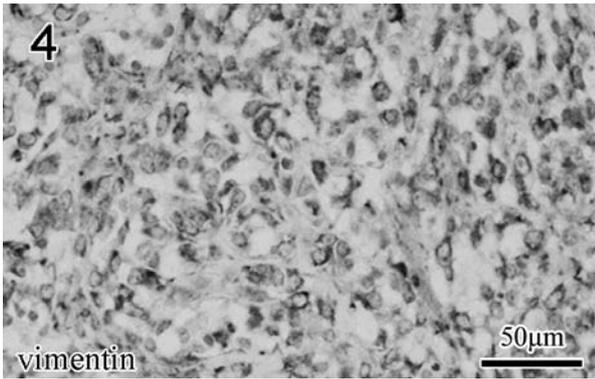


図4 肺転移腫瘍. ほとんどの腫瘍細胞が vimentin に陽性を示す. (免疫染色 Bar=50 μm)

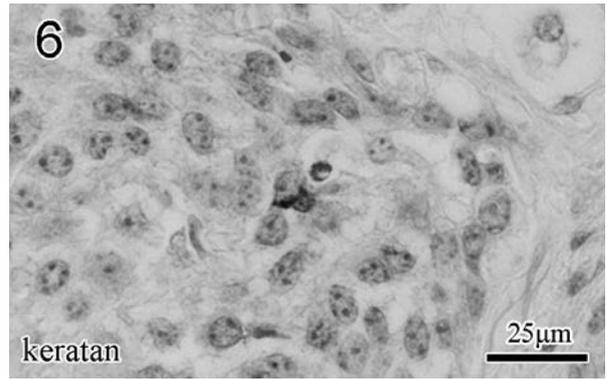


図6 肺転移腫瘍. 腫瘍細胞の一部の細胞質がケラタン硫酸に陽性を示す. (免疫染色 Bar=25 μm)

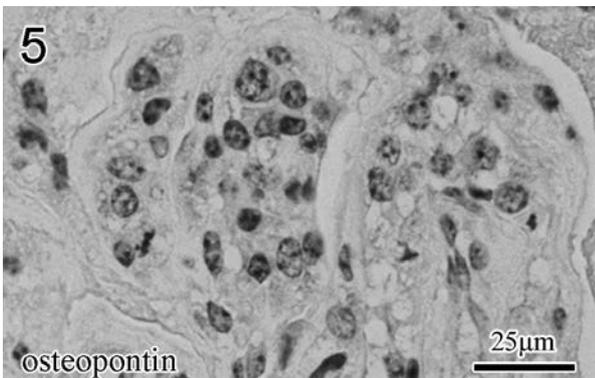


図5 肺転移腫瘍. 腫瘍細胞の細胞質が osteopontin に陽性を示す. (免疫染色 Bar=25 μm)

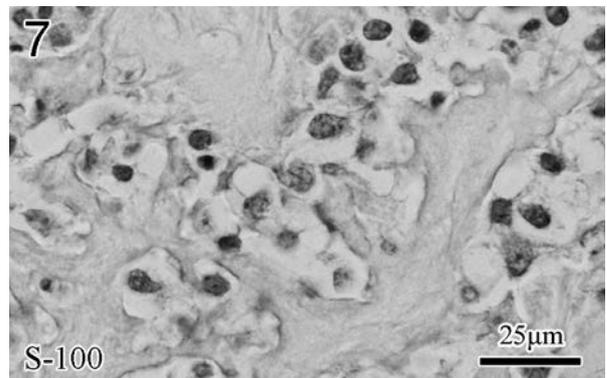


図7 肺転移腫瘍. 腫瘍細胞の核と細胞質が S-100 に陽性を示す. (免疫染色 Bar=25 μm)

た. 腫瘍の中心部はおおむね類骨組織が占め, 辺縁部では骨芽細胞様の紡錘形細胞と骨基質から構成されていた. 類骨組織は多方向性に大小の分岐状の骨梁を形成し(図1A), 骨梁間には小径血管や線維性結合組織が増生していた(図1B). 時折, 石灰化した骨組織も観察された. 腫瘍細胞の核は大小不同, 卵円形から紡錘形であったが, 核分裂像はまれにしか観察されなかった. 腫瘍細胞の細胞質は広く, 星芒状, 三角形(図2)を呈していたが, 網目状や空胞状の細胞質を有する細胞も混在していた. 破骨細胞は観察されなかった. 肝臓, 脾臓, 第三胃に形成された腫瘍は漿膜面から臓器を圧迫しながら増殖していたが, 肝臓では一部の腫瘍細胞が漿膜を超えて実質内に浸潤増殖していた. この部位では, 結合組織や細胆管が反応性に増生していた. 肺では腫瘍細胞の占める割合が高く, 多くの腫瘍細胞が血管や気管支内に浸潤増殖していた. その他の諸臓器において腫瘍細胞は観察されなかった. なお, 腸間膜脂肪組織の一部に石灰化を伴う脂肪壊死巣が観察されたが, 腫瘍性変化は認められなかった.

特殊染色では, 一部の腫瘍細胞及び類骨組織がPAS反応に陽性を示した(図3). マッソン・トリクローム染色では, 腫瘍中心部の骨基質が強陽性(濃い青)を示

し, 辺縁部では弱陽性(薄い青)であった. アルシアンブルー染色では, 骨基質及び間質の一部が陽性を示したが, 腫瘍細胞は陰性であった.

**免疫組織化学:** 腫瘍細胞は vimentin (図4), osteopontin (図5), ケラタン硫酸(図6), S-100 (図7), calretinin に陽性を示した. Vimentin はおおむねすべての腫瘍細胞が強陽性を示した. Osteopontin 及びケラタン硫酸は腫瘍細胞の細胞質及び類骨領域の両方が陽性を示した. S-100 は腫瘍細胞の核と細胞質がともに陽性であった. Calretinin は一部の腫瘍細胞のみが陽性(約10%以下)を示した. 一方, CK 5/6, CK AE1/AE3, mesothelial cell, SMA, adipophilin, desmin はすべて陰性であった. 免疫組織化学的検索結果は, 表にまとめた.

## 考 察

本症例では, 既存の骨組織に腫瘍が認められず, 腹壁及び腹腔内に多数の結節性腫瘍を形成していた. 腫瘍の形成部位と増殖形態から悪性中皮腫を疑って精査したが, 腫瘍細胞の細胞形態と構成成分は中皮腫とは明らかに異なっていた. 免疫染色の結果も一部の腫瘍細胞が calretinin に陽性であったことを除けば, すべて骨肉

表 免疫組織化学的検索に用いた一次抗体名, 免疫動物, 会社名, 反応条件及び染色結果

一次抗体名* <sup>1</sup>	免疫動物	クローン	会社名	希釈倍率	抗原賦活法* <sup>2</sup>	染色結果* <sup>3</sup>
Vimentin	Mouse	V9	ニチレイ	希釈済み	MW, 170W, 15分	+++ / +
Osteopontin	Rabbit		Thermo	50倍	MW, 170W, 15分	++ / ++
ケラタン硫酸	Mouse	5D4	生化学工業	100倍	実施せず	++ / ++
S-100	Mouse	4C4.9	ニチレイ	希釈済み	実施せず	++ / -
Calretinin	Rabbit	DC8	Zymed	希釈済み	AC, 121°C, 10分	+ / -
Mesothelial cell	Mouse	HBME-1	DAKO	希釈済み	実施せず	- / -
CK 5/6	Mouse	D5/16 B4	DAKO	希釈済み	AC, 121°C, 10分	- / -
CK AE1/AE3	Mouse	AE1/AE3	DAKO	希釈済み	AC, 121°C, 10分	- / -
SMA	Mouse	1A4	DAKO	1,000倍	実施せず	- / -
Desmin	Mouse	D33	DAKO	希釈済み	実施せず	- / -
Adipophilin	Mouse	GP40	Progen	25倍	MW, 170W, 10分	- / -

\* 1 : CK : cytokeratin, SMA :  $\alpha$ -smooth muscle actin

\* 2 : AC : autoclave, MW : microwave

\* 3 : 腫瘍細胞 / 類骨組織, +++ : びまん性 (50%以上), ++ : 中等度 (30%~50%), + : 軽度 (10%以下), - : 陰性

腫を裏付けるものであった。また、類骨組織の一部がPAS反応に陽性を示し、マッソン・トリクローム染色では類骨組織のおおむね全域が弱陽性から強陽性であった。このことから、本腫瘍の腫瘍細胞は通常の骨芽細胞と同様に糖原や膠原線維などの骨基質を細胞外に分泌し、これらの分泌物の堆積が骨様の硬組織の形成に深く関与した可能性が示唆された。

骨原性骨肉腫を除く間葉系腫瘍の中に石灰化や骨軟骨形成を伴う腫瘍として、中皮腫 [13]、脂肪腫 [14] 及び脂肪肉腫 [15] 等が報告されている。しかし、これらの腫瘍にみられる骨組織は腫瘍全体の一部であり、何らかの要因によって腫瘍細胞が骨組織へ化生したものと考えられている。本症例では類骨組織が腫瘍の主要な構成要素であり、検索したすべての結節において類骨が含まれていた。さらに、類骨組織及び腫瘍細胞が骨組織のマーカー (osteopontin, ケラタン硫酸, S-100 及び vimentin) に陽性を示したことから、骨肉腫であると判断された。

骨原性骨肉腫と同様に、骨外性骨肉腫においても線維芽細胞型、骨芽細胞型、軟骨芽細胞型、巨細胞型 (破骨細胞型) 等の亜型が報告されている [1, 10]。牛では軟骨芽細胞型の骨外性骨肉腫が1例報告 [12] されている。本症例では、腫瘍の大半が骨芽細胞と類骨組織から構成されており、線維芽細胞、破骨細胞及び軟骨組織への分化形態は示さなかった。したがって、本症例は骨芽細胞型の骨外性骨肉腫に該当すると判断された。

本症例の腫瘍の原発巣については、多発性の腫瘍を形成していたため、特定には至らなかった。しかし、右腹壁の腫瘍が最も大きく、その他の部位では小結節状を呈していたことから、右腹壁が原発巣であった可能性が示唆された。また、肺では腫瘍細胞の増殖が実質内の血管や気管支腔に主座していたが、その他の胸腔内臓器や組織において腫瘍巣は観察されなかった。このことから肺

にみられた結節は転移病巣として理解された。

本症例は牛における骨外性骨肉腫の2例目の報告例である。本腫瘍の発生疫学や増殖形態などについては不明であり、さらに症例を増やす必要があると思われる。

## 引用文献

- [1] Weiss SW, Goldblum JR : Extraskelatal osteosarcoma. In: Soft Tissue Tumors, Enzinger and Weiss's, 4th ed, 1405-1414, Mosby, St. Louis (2001)
- [2] Sordillo PP, Hajdu SI, Magill GB, Golbey RB : Extraosseous osteogenic sarcoma. A review of 48 patients, Cancer, 51, 727-734 (1983)
- [3] Christopher DM, Fletcher K, Krishnan U, Fredrik M : Extraskelatal osteosarcoma, WHO classification of tumor of soft tissue and bone, 182-183, IARC Press, Lyon, Washington (2002)
- [4] Lee JS, Fetsch JF, Wasdhal DA, Lee BP, Pritchard DJ, Nascimento AG : A review of 40 patients with extraskelatal osteosarcoma, Cancer, 76, 2253-2259 (1995)
- [5] McCarter MD, Lewis JJ, Antonescu CR, Brennan MF : Extraskelatal osteosarcoma: analysis of outcome of a rare neoplasm, Sarcoma, 4, 119-123 (2000)
- [6] Chung EB, Enzinger FM : Extraskelatal osteosarcoma, Cancer, 60, 1132-1142 (1987)
- [7] Okazaki S, Ando R, Matsushima K, Hoshiya T, Tamura K : Spontaneous extraskelatal osteosarcoma in the stomach of an aged F344 rat, J Toxicol Pathol, 23, 157-159 (2010)
- [8] Renfrew H, Rest JR, Holden AR : Extraskelatal fibroblastic osteosarcoma in a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), J Small Anim Pract, 42, 456-458 (2001)
- [9] Dhaliwal RS, Johnson TO, Kitchell BE : Primary extraskelatal hepatic osteosarcoma in a cat, J Am Vet Med Assoc, 222, 340-342 (2003)
- [10] Patnaik AK : Canine extraskelatal osteosarcoma and chondrosarcoma: a clinicopathologic study of 14 cases, Vet Pathol, 27, 46-55 (1990)

- [11] Braun U, Schwarzwald CC, Forster E, Becker-Birck M, Borel N, Ohlerth S : Extraskelatal osteosarcoma of the thorax in a goat: case report, *BMC Vet Res*, 7, 55 (2011)
- [12] Braun U, Sydler T, Irmer M, Gautschi A, Kamber R, Gerspach C, Puorger M : Ultrasonographic findings in a cow with extraskelatal chondroblastic osteosarcoma of the neck region, *Schweiz Arch Tierheilkd*, 152, 379-383 (2010)
- [13] Demirag F, Unsal E, Tastepe I : Biphasic malignant mesothelioma cases with osseous differentiation and long survival: a review of the literature, *Lung Cancer*, 57, 233-236 (2007)
- [14] Saksobhavit N, Jaovisidha S, Sirikulchayanonta V, Nartthanarung A : Parosteal ossifying lipoma of the fibula: a case report with contrast-enhanced MR study and a review of the literature, *Singapore Med J*, 553, 172-175 (2012)
- [15] Okuda I, Ubara Y, Okuda C, Fujii T, Suwabe T, Koku-bo T, Nakajima Y, Hashimoto M : A large calcified retroperitoneal mass in a patient with chronic renal failure: liposarcoma with ossification, *Clin Exp Nephrol*, 14, 185-189 (2010)

---

### A Case of Bovine Extraskelatal Osteosarcoma Characterized by Multiple Nodular Mass in the Abdominal Cavity

Asuka SUTO<sup>1),2)</sup>, Ryuji IWATA<sup>2)</sup>, Kazunori KIMITSUKI<sup>2)</sup>, Hassadin BOONSRIROJ<sup>2)</sup> and Chun-Ho PARK<sup>2)†</sup>

1) *Shounai Meat Inspection Center, Yamagata, Japan, 21-7 Nakaarata, Kaneai, Shounai-machi, Higashitagawa-gun, 999-7762, Japan*

2) *Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Kitasato University, 35-1 Higashi 23 ban-cho, Towada, 034-8628, Japan*

#### SUMMARY

Japanese black cattle (16-years-old and an 8-month-old female), which was clinically diagnosed with mesenteric fat necrosis, was presented to the meat inspection center. At dismantling, multiple white nodules were found on the serosal surface of the liver, spleen, omentum, diaphragm, abdominal wall and lungs. Grossly, nodular lesions were not observed in the pre-existing bone tissue. Histopathologically, all of the tumors were composed of osteoid trabecula and osteoblastic tumor cells. Tumor cells showed low cell atypia and occasional mitotic figures, but there was metastasis in the lungs. Immunohistochemically, tumor cells showed positive reaction to osteopontin, keratin sulfate, S-100 and vimentin. Based on these findings, the present case was diagnosed as extraskelatal osteosarcoma which is relatively rarely reported in cattle.

— Key words : Abdominal cavity, extraskelatal osteosarcoma, Japanese black cattle.

† *Correspondence to : Chun-Ho PARK (Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Kitasato University)*

*35-1 Higashi 23 Ban-cho, Towada, 034-8628, Japan*

*TEL 0176-24-9433 FAX 0176-23-8160 E-mail : baku@vmas.kitasato-u.ac.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 665 ~ 669 (2014)*