

ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープの 細胞学的特徴と多核巨細胞の診断的意義

井上紗季 酒井洋樹[†] 米丸加余子 柳井徳磨

岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

(2013年9月30日受付・2013年11月1日受理)

要 約

ミニチュア・ダックスフンド (M. ダックス) の炎症性結直腸ポリープ (ICRP) の細胞学的診断に有用な指標を確立するために, M. ダックスのICRP16例 (ICRP群) と, 正常な腸, 炎症性腸疾患及び腫瘍性疾患の計53例 (non-ICRP群) のスタンプ標本を細胞学的に評価した. ICRP群の組織標本では粘液塊, 骨化生及び多核巨細胞が存在し, 12例 (75.0%) の細胞診標本にも多核巨細胞がみられ, non-ICRP群の1例 (1.9%) と比較し有意に多く ($P < 0.05$), ICRPの組織診断に対する細胞診での多核巨細胞の検出の感度及び特異度, 陽性的中率及び陰性的中率はそれぞれ, 75.0%, 98.2%, 92.3%及び93.2%であった. 以上より, M. ダックスのICRPの細胞学的診断には多核巨細胞の検出が有用であることが示唆された.

—キーワード: 細胞診, 炎症性結直腸ポリープ, ミニチュア・ダックスフンド, 多核巨細胞.

----- 日獣会誌 67, 193~198 (2014)

炎症性結直腸ポリープ (Inflammatory colorectal polyp: ICRP) は, 近年ミニチュア・ダックスフンド (M. ダックス) に好発する結直腸疾患であり, 本疾患では結腸及び直腸に, 単発性または多発性の大小のポリープが形成され, 臨床症状として血便やしづりが現れる [1]. ポリープ状病変として, 腫瘍性病変との鑑別が必要であり, さらに本疾患の治療として, 外科手術のみならず, 免疫抑制療法などの内科的治療が功を奏する場合やアルゴンプラズマレーザーによる焼烙なども報告されているため, 治療方針を画策する上でもICRPの確定診断は重要となる [1, 2].

現在, 本疾患の確定診断は組織学的検査により行われており, 簡便かつ迅速な細胞診を活用した検査診断法は報告されていない. 本研究では, M. ダックスに好発するICRPの細胞学的特徴の評価を行い, 特にICRPの細胞診標本に多核巨細胞がみられることに着目し, その診断的意義を検討した.

材料及び方法

2007年1月~2013年3月の間に, 岐阜大学獣医病理学教室に病理検査のために提出された犬の小腸及び大腸

の粘膜生検の症例を用いた. 症例はICRP群とnon-ICRP群の2群に分類した. ICRP群は, 15頭のM. ダックスから得られた結直腸ICRP16例, non-ICRP群としては, 48頭の犬から得られた12例の著変のない犬の小腸または大腸, 15例の腫瘍 (8例の腺癌を含む9例の悪性上皮性腫瘍及び6例のリンパ腫), 26例の慢性腸炎の計53例を用いた. 48頭の犬の品種は, M. ダックス7例, ラブラドル・レトリバー3例, ウェルッシュ・コーギー3例, 柴犬2例, ジャック・ラッセル・テリア2例, ジャーマン・シェパード2例, フレンチ・ブルドッグ2例と, シェットランド・シープドッグ, ボーダーコリー, ミニチュア・シュナウザー, アイリッシュ・セター, パピヨン, フラットコートド・レトリバー, ワイマラナー, パグ, ベルジアン・タービュレン, シー・ズー, バーニーズ・マウンテン・ドッグ, ポメラニアン, ダルメシアン, ボストン・テリア, トイ・プードル各1例ずつ, 雑種12例であった.

得られた粘膜生検材料は, 挫滅しないように清浄なスライドグラスに載せ, 注射針を用いて数回転がしながらスタンプ標本を作製した. また, 直腸引き抜き術などで, 正常粘膜も含めて採取された組織では, 病変部に割

[†] 連絡責任者: 酒井洋樹 (岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学研究室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2957 E-mail: shiroki@gifu-u.ac.jp

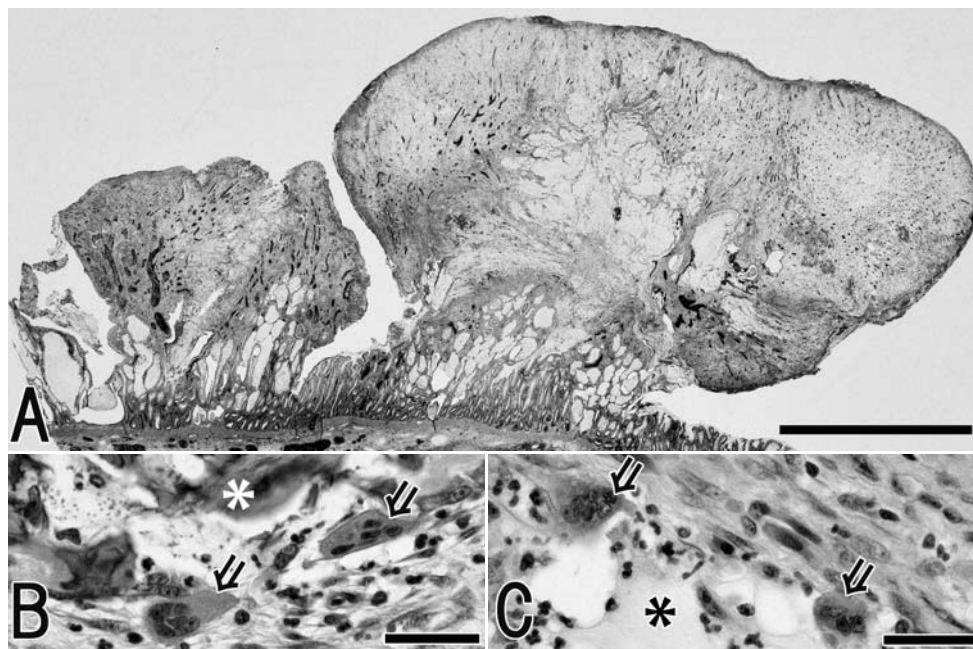


図1 ICRPの組織像 (HE染色)

- A : ICRPのルーベ拡大像. 大小2つのポリープが認められる. いずれのポリープも粘膜面上に茸状に覆いかぶさるように形成される. (Bar = 3mm)
- B : 骨化生巣. 骨形成 (*) 部の近傍に破骨細胞様多核巨細胞が散在する (矢印). (Bar = 30 μ m)
- C : 粘液 (*) に接するように多核巨細胞が散在する. 好中球等の炎症細胞も散在する. (Bar = 30 μ m)

を入れ、断面をスライドガラスにスタンプした。スタンプ標本は風乾後、ヘマカラー (Merck KGaA, ダルムシュタット, ドイツ) にて染色、観察した。また、スタンプ後の生検組織は10%中性ホルマリン液にて固定し、定法に従いパラフィンに包埋し、4 μ mに薄切したものにHE染色を施し、組織標本作製した。

組織学的検査は光学顕微鏡にて行い、多核巨細胞あるいは骨化生の有無を評価した。

細胞学的検査は光学顕微鏡にて行った。評価項目は、スライド標本1枚当たりの多核巨細胞の数、炎症細胞100個当たりに占めるマクロファージ、好中球及びリンパ球の割合、粘膜上皮塊及び粘液塊の出現程度を評価した。粘液塊及び粘膜上皮塊の出現程度に関しては、半定量的に4段階で評価した (- : なし, + : 少量, ++ : 中等量, +++ : 多量)。

統計解析: ICRP群とnon-ICRP群の細胞診標本上の多核巨細胞の数、マクロファージ、好中球及びリンパ球の割合に対してはマン・ホイットニーのU検定を用いた。また、2群間の粘膜上皮塊及び粘液塊の出現程度の比較には、 χ^2 乗検定を用いた。P<0.05のとき、有意差ありと判断した。

さらに、ICRP群とnon-ICRP群の全症例をもとに、細胞診での多核巨細胞の有無と組織学的にICRPと診断されたか否かで、感度、特異度、陽性的中率及び陰性的

中率を算出した。

成 績

組織学的にICRPは、粘膜固有層に好中球、マクロファージ及びリンパ球などの炎症細胞の高度な浸潤を伴う肉芽組織の増生が主体で、粘膜面に覆いかぶさるように茸状の病変が形成されていた (図1A)。病変の腸管内腔面の粘膜上皮はほとんど消失していたが、一部では再生像を認めた。肉芽組織内には粘液が大小の塊状に認められ、一部の粘液塊の辺縁には萎縮し、扁平化した粘膜上皮細胞がわずかに残存していた。正常な粘膜面に近い箇所では、拡張した腸陰窩がみられた。ICRP群の16例中8例では病変内に骨芽細胞が明瞭に観察される骨化生を認め、骨周囲では破骨細胞様の多核巨細胞が少数認められた (図1B)。骨化生は比較的大型のICRPで認められる傾向があった。また、骨とは離れた位置、あるいは骨化生のみられない3例においても多核巨細胞は確認され、これらの多核巨細胞は、間質に逸脱した粘液の辺縁部あるいは内部に存在していた (図1C)。non-ICRP群の組織標本では、多核巨細胞は認められなかった。

細胞診標本では粘液塊、粘膜上皮細胞塊、多核巨細胞、マクロファージ及びその他の炎症細胞がさまざまな程度に観察された (図2)。多核巨細胞は、3から十数個の均一な大きさの核を有する多核の大型細胞で、核は細胞中

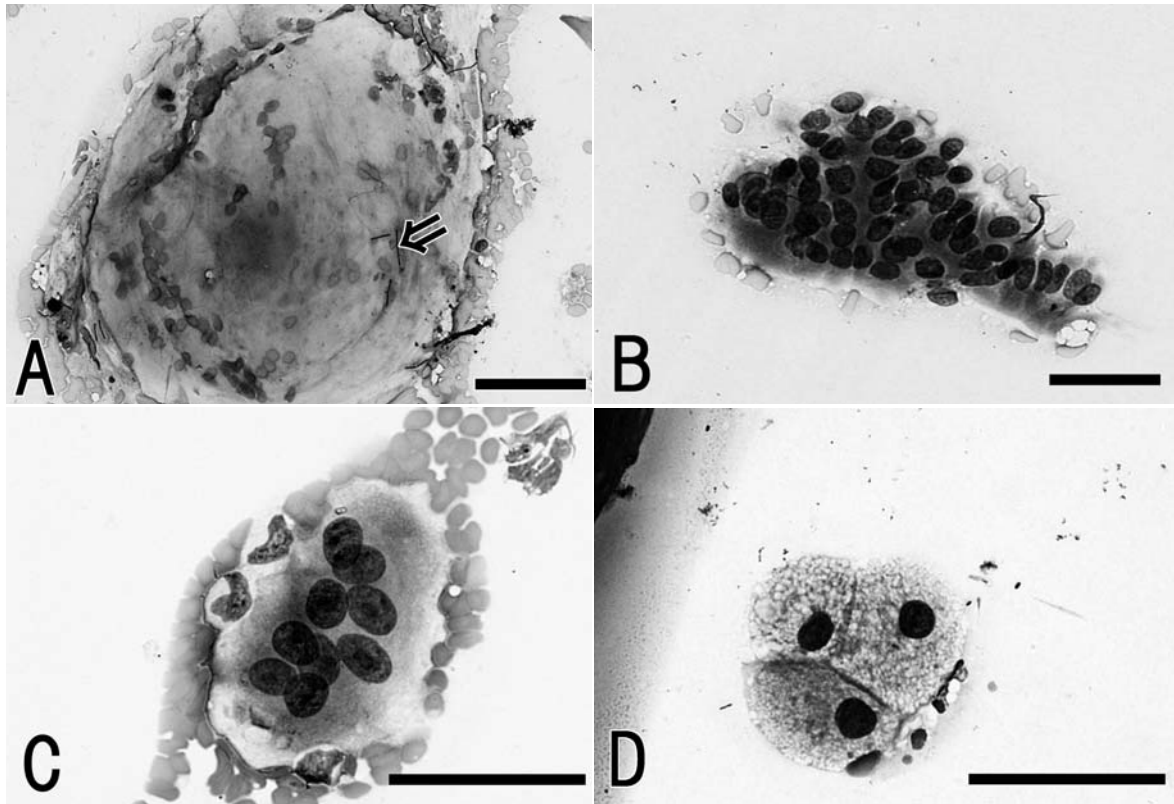


図2 ICRPの細胞像（ヘマカラー染色）（Bar = 50 μ m）

- A：粘液塊。粘液が塊状に存在する。細菌（矢印）を混じるものもみられる。
- B：粘膜上皮細胞塊。卵円形から長円形の核と多角形から長方形の細胞質を有し、互いに密着した集塊をなす。
- C：多核巨細胞。明瞭な核小体を一つ有する卵円形から長円形の核と、豊富で好塩基性の細胞質を有する大型の細胞であり、孤在性に認められる。
- D：マクロファージ。円形の核と泡沫状で豊富な細胞質を有する。数個単位で小集塊をなすものもみられる。

中央に密在し、核内には明瞭な核小体を一つ有し、細胞質は好塩基性で豊富であり、細胞質内に赤色不定形の細顆粒を少数認めた（図2C）。一部の多核巨細胞には細胞質に空胞を含むものもみられた。ICRP群の細胞診標本の16例中12例（75.0%）で多核巨細胞が認められた。non-ICRP群で多核巨細胞が認められたのは、53例中1例（1.9%）のみであった。さらにスライド標本1枚当たりの多核巨細胞数の平均は、ICRP群では9.2個（ ± 12.0 標準偏差（SD））、non-ICRP群では、0.004（ ± 0.027 SD）で、ICRP群はnon-ICRP群と比較して、多核巨細胞は有意に多かった（ $P < 0.05$ ）。ICRP群では、16例中11例で細胞診標本と組織標本の両方に多核巨細胞が認められ、5例ではいずれにも多核巨細胞がみられなかった。1例では、細胞診標本のみで多核巨細胞が認められた。ICRPの組織診断に対する細胞診における多核巨細胞の検出の感度、特異度、陽性的中率及び陰性的中率はそれぞれ、75.0%、98.1%、92.3%及び92.8%であった（表1）。

non-ICRP群のうち、細胞診標本上に多核巨細胞のみられた1例は、ランブル鞭毛虫の寄生を伴う慢性十二指

表1 各群における細胞診標本上における多核巨細胞の有無

多核巨細胞	ICRP群	non-ICRP群	合計
+	12	1	13
-	4	52	56
合計	16	53	69

腸炎であったが、組織標本上では粘膜固有層にリンパ球や形質細胞の浸潤がみられたものの、多核巨細胞はみられなかった。細胞診標本でランブル鞭毛虫がみられた別の1症例では、細胞診標本と組織標本のいずれにおいても多核巨細胞はみられなかった。さらに、悪性上皮性腫瘍の細胞診標本ではしばしば多核細胞が認められたものの、これらの細胞の核の数は2、3個程度で、核の大小不同がみられた。またこれらの腫瘍細胞は好塩基性の増加した細胞質を有し、核/細胞質比が上昇した細胞異型性を有する腫瘍細胞であり、上記の多核巨細胞とは明らかに区別される形態を示した。

細胞診標本上の炎症細胞100個当たりのマクロファージ、好中球及びリンパ球の割合（%）の平均は、それぞれ

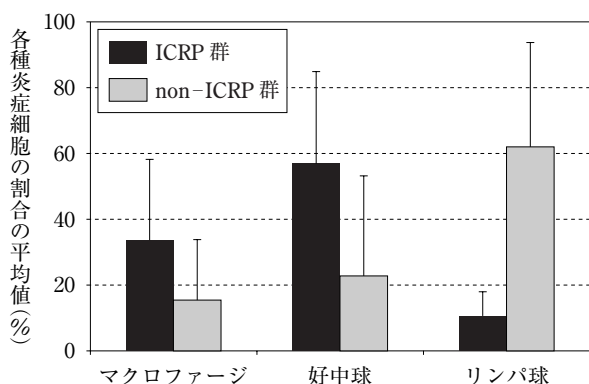


図3 炎症細胞 100 個当たりの各種炎症細胞の割合の平均値の比較

マクロファージ、好中球及びリンパ球のいずれの炎症細胞においても有意差を認める ($P < 0.05$)。

バーは標準偏差を示す。

れ、ICRP 群で 33.7% ($\pm 24.5SD$)、56.9% ($\pm 28.0SD$) 及び 10.6% ($\pm 7.3SD$)、non-ICRP 群で、15.4% ($\pm 18.3SD$)、22.8% ($\pm 30.4SD$) 及び 62.0% ($\pm 31.7SD$) であった (図3)。いずれにおいても有意差が認められ (いずれも $P < 0.05$)、ICRP 群は non-ICRP 群と比較して、マクロファージ及び好中球が有意に多く、逆にリンパ球は有意に少なかった。

また、粘膜上皮塊の出現程度は、non-ICRP 群に比較して、ICRP 群では有意に少なく ($P < 0.05$)、粘液塊は ICRP 群で多い傾向があったものの、有意差は認められなかった (表2)。

考 察

動物の腸管のポリープは腺腫性、乳頭状、過誤腫性、炎症性ポリープ及び若年性ポリープ症に分類される [3]。これらのうち炎症性ポリープは粘膜固有層におけるさまざまな炎症細胞の浸潤を伴う肉芽組織からなるポリープ状病変とされる [3]。しかしこの WHO 分類には、過去の M. ダックスの ICRP の報告 [1] や今回の研究の多くの ICRP 群の症例でみられた粘液塊や骨化生についての記載はみられず、M. ダックスの ICRP は WHO 分類での炎症性ポリープの範疇にはあるものの、特殊な組織型と考えられる。M. ダックスの ICRP は、人における Cap polyposis との肉眼的、組織学的共通点が指摘されている [1]。Cap polyposis の原因として粘膜脱と結腸運動機能不全の関連などがあげられるものの、これらの疾患が背景にない症例もあり [4]、その関与については完全には明らかになっていない。近年、M. ダックスの ICRP について、インターロイキン (IL) - 17、IL-10 及びインターフェロン γ などの CD4+ 細胞サイトカイン関連遺伝子発現の亢進が病理発生に関わる可能性が示唆されているが [5]、初期の病変形成メカニズムなどいまだ

表2 細胞診標本における粘膜上皮細胞塊及び粘液塊の出現程度

	粘膜上皮細胞塊		粘液塊	
	ICRP 群	non-ICRP 群	ICRP 群	non-ICRP 群
-	2	2	0	1
+	14	15	6	31
++	0	24	3	7
+++	0	12	7	14
合計	16	53	16	53

不明な点は多い。病理発生の解明には今後のさらなる研究が必要と考えられる。

細胞診標本上の多核巨細胞の形態は破骨細胞あるいは異物型巨細胞に類似したものであった [6, 7]。組織標本内における、これらの多核巨細胞に相当する細胞は骨化生巣において骨に密着して存在したり、間質に逸脱した粘液内あるいはその近傍に認められたりしたことから、破骨細胞あるいは異物巨細胞であると考えられた。人の消化管の癌における間質の骨形成には、腫瘍細胞における骨形成タンパク質の産生が関与するとされる [8]。一方で良性腫瘍や結腸ポリープでの骨形成はまれで、骨形成のみられた 10 例の人の良性結直腸ポリープ及び腺腫において、3 例が炎症性ポリープであり、腫瘍性変化でなくても持続的な炎症が骨形成刺激となることが示唆されている [8]。動物の消化管の上皮性腫瘍、ポリープ状病変においては、猫の小腸腺癌で間質での骨または軟骨形成が比較的多いとされる一方で、検索のかぎりでは犬の消化管上皮性腫瘍やポリープにおける骨形成の記載はない [3, 9, 10]。今回調べた M. ダックスの ICRP は、骨化生を起ししやすい特異な疾患と考えられ、人の炎症性ポリープでの骨形成経過を加味すると、同様な持続的な炎症刺激が骨化生を惹起している可能性が高い。

細胞学的な多核巨細胞の検出は、ICRP の診断に対し高い感度、特異度、陽性的中率及び陰性的中率を示した。感度に関しては特異度に比較してやや低い値を示したが、この原因としては、組織標本内で多核巨細胞は比較的限局して認められるため、スタンプされる部位によっては、多核巨細胞が得られない可能性が考えられた。したがって、細胞診標本作製の際に、採材組織の複数の面をスタンプし、多核巨細胞の検出率を高めることで感度の上昇が期待できるであろう。

non-ICRP 群のうち、細胞診標本で多核巨細胞が検出された 1 例はランブル鞭毛虫の出現を伴う慢性十二指腸炎であった。この細胞診標本上には、多核巨細胞とともに多数のランブル鞭毛虫が塗抹されていた。したがって、多核巨細胞が検出された場合であっても背景に他の病変の存在が疑われる場合は診断に注意が必要である。また、悪性上皮性腫瘍では、細胞診標本上に多核化した

腫瘍細胞がみられる場合があり、多核巨細胞との鑑別が必要である。しかし、これらの腫瘍細胞は細胞異型性の点からICRPでみられる多核巨細胞とは形態的に異なる。さらに、腫瘍の場合、多核化した細胞の他に、細胞異型を伴う細胞塊が塗抹されるため塗抹標本上の細胞像全体としてICRPとの鑑別は可能である。したがって、多核巨細胞とともに病原体や異型細胞がみられないことも重要と考えられる。

今回の研究では、ICRP群ではnon-ICRP群に比較して好中球やマクロファージが有意に多かった。組織像をもとに考えると、これはICRPでは腫瘍表面を被覆する上皮細胞の剝離による炎症や粘液の逸脱による異物反応などが原因と思われる。一方でnon-ICRP群ではICRP群と比較して、細胞診標本上のリンパ球の割合が有意に多かった。これは、全例のICRP群の採材部位が大腸に由来するのに対し、non-ICRP群では元来小型リンパ球が比較的多く存在する小腸の標本も含まれており、このためスタンプ標本にも小型リンパ球が多く観察されたものと考えられ、ICRPでリンパ球が真に少ないか否かについては、現段階では結論づけることはできなかった。

塗抹標本上の粘膜上皮細胞塊の出現程度はICRP群の方が有意に少なかったが、これは組織学的に腫瘍の表面の粘膜上皮細胞の剝離や陰窩内における粘液の高度な貯留による粘膜上皮の萎縮によるものと考えられた。一方で組織学的に病変内には粘液塊が多くみられたにもかかわらず、塗抹標本上では、粘液塊の出現頻度はICRP群とnon-ICRP群の間に有意差はみられなかったが、もともと消化管粘膜表面には粘液が多量に付着しているため、これらの粘液が標本上に塗抹されたことに起因する可能性が考えられた。

以上の結果から、M. ダックスの結直腸腫瘍状病変の細胞診標本において、多核巨細胞の検出はICRPの診断に有用であると考えられた。また、その他のICRPの細胞学的特徴としては粘膜上皮細胞塊が乏しく、好中球やマクロファージが多い点があげられた。しかし、粘膜上皮細胞塊の出現程度や好中球やマクロファージの数は定量的な指標である点から、多核巨細胞の有無を観察することが、より簡便で、特異性の高い指標と考えられた。

引用文献

- [1] Ohmi A, Tsukamoto A, Ohno K, Uchida K, Nishimura R, Fukushima K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H : A retrospective study of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds, *J Vet Med Sci*, 74, 59-64 (2012)
- [2] Tsukamoto A, Ohno K, Irie M, Ohmi A, Maeda S, Nakashima K, Fukushima K, Fujino Y, Uchida K, Tsujimoto H : A case of canine multiple inflammatory colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy and argon plasma coagulation, *J Vet Med Sci*, 74, 503-506 (2012)
- [3] Head KW, Cullen JM, Dubielzig RR, Else RW, Misdorp W, Patnaik AK, Tateyama S, van der Gaag I : *Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals*, 2nd Series vol X, 106-107, Armed Forces Institute of Pathology (2003)
- [4] Papaconstantinou I, Karakatsanis A, Benia X, Polymeneas G, Kostopoulou E : Solitary rectal cap polyp: Case report and review of the literature, *World J Gastrointest Surg*, 4, 157-162 (2012)
- [5] Ohta H, Takada K, Torisu S, Yuki M, Tamura Y, Yokoyama N, Osuga T, Lim SY, Murakami M, Sasaki N, Nakamura K, Yamasaki M, Takiguchi M : Expression of CD4+ T cell cytokine genes in the colorectal mucosa of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds, *Vet Immunol Immunopathol*, 155, 259-263 (2013)
- [6] Fielder SE, Mahaffey EA : *The musculoskeletal system, Diagnostic cytology and hematology of the dogs and cats*, Cowell RL, et al eds, 3rd ed, 210-214, Mosby Elsevier, St. Louis (2008)
- [7] Raskin RE : *General categories of cytologic interpretation, Canine and feline cytology*, Raskin RE, et al eds, 2nd ed, 15-25, Saunders Elsevier, St. Louis (2010)
- [8] Oono Y, Fu KL, Nakamura H, Iriguchi Y, Oda J, Mizutani M, Yamamura A, Kishi D : Bone formation in arectal inflammatory polyp, *World J Gastrointest Endosc*, 2, 104-106 (2010)
- [9] Head KW, Else RW, Dubielzig RR : *Tumors of the alimentary tract, Tumors in domestic animals*, Meuten DJ, ed, 4th ed, 401-482, Iowa State Press, Ames (2002)
- [10] Brown CC, Baker DC, Barker IK : *Alimentary system, Pathology of domestic animals, volume 2*, Maxie MG, ed, 5th ed, 116-127, Saunders Elsevier, St. Louis (2007)

Cytological Features and Significance of Multinucleated Giant Cells
in Inflammatory Colorectal Polyps of Miniature Dachshund

Saki INOUE, Hiroki SAKAI[†], Kayoko YONEMARU and Tokuma YANAI

* Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

For establishment of cytological diagnostic criteria of inflammatory colorectal polyp (ICRP) in miniature dachshunds (*M. dax*), cytological specimens of 16 cases of ICRP of *M. dax* (ICRP group) and 53 cases of a non-ICRP group including normal mucosa, inflammatory diseases and neoplastic diseases were analyzed. In 12 cases of the ICRP group (75.0%), significantly more multinucleated giant cells (MGCs) were detected than those in the non-ICRP group (only one case, 1.9%). Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of cytological detection of MGCs in cytological specimens to diagnose ICRP were 75.0%, 98.2%, 92.3% and 93.2%, respectively. In conclusion, detection of MGCs in colorectal cytology of *M. dax* is useful for cytological diagnosis of ICRP.

— Key words : cytology, inflammatory colorectal polyp, miniature dachshund, multinucleated giant cells.

[†] Correspondence to : Hiroki SAKAI (Laboratory of Veterinary Pathology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan TEL · FAX 058-293-2957 E-mail : shiroki@gifu-u.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 193 ~ 198 (2014)