

縦隔型T細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の1例

山崎裕毅^{1)†} 川畑貴裕²⁾ 澤 真理子³⁾ 頼 昱璋¹⁾
 矢吹 映³⁾ 三浦直樹¹⁾

- 1) 鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)
 2) 鹿児島県 開業 (川畑動物病院: 〒899-4346 霧島市国分府中町10-41)
 3) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

(2015年8月5日受付・2016年4月7日受理)

要 約

胸水と呼吸困難を主訴に10カ月齢、未避妊雌のミニチュアダックスが鹿児島大学附属動物病院を受診した。CT検査より、造影増強された前縦隔の腫瘍性病変と肝腫大が描出された。その後の細針生検とクロナリティー検査から肝浸潤を呈した縦隔型T細胞性リンパ腫と診断した。本疾患に対して多剤併用療法(UW-25)を試みたが、治療効果が得られなかった。そこで、腫瘍検体を定量性PCRによる遺伝子解析に供したところ、多剤耐性因子(ABCB1とABCG2)及び血管新生因子受容体(VEGFR2とPDGFR α)の遺伝子発現量が高値を示したため、VEGFR2とPDGFR α を治療標的因子と判断し、リン酸トセラニブとCCNUによる救済療法を開始した。その結果、腫瘍縮小がみられ、一般状態も良好に維持できたが、初診から36日目に呼吸困難を呈し、自宅で斃死した。死後の剖検より、T細胞性リンパ腫が確定された。——キーワード: 若齢犬, リンパ腫, リン酸トセラニブ。

-----日獣会誌 69, 333~338 (2016)

犬リンパ腫はリンパ球のクローン性増殖疾患であり、造血系悪性腫瘍の約90%を占める。発生部位により、おもに多中心型、消化器型、縦隔型、皮膚型に分類され、さらに、細胞表現型からB細胞性とT細胞性に大別される。これらの分類は生物学的挙動や病態進行に関連し、化学療法の治療成績に大きく反映する[1, 2]。リンパ腫は中高齢犬(6~12歳)に多く発生するが、若齢犬での発生はまれであり[3]、1歳未満における縦隔型リンパ腫の報告はない。若齢犬のリンパ腫は高齢犬と比較して抗癌剤抵抗性を示すことが多く[3, 4]、また、縦隔型リンパ腫では、その多くがT細胞に由来するため、予後が悪い[1, 2]。本研究では、多剤耐性を示した10カ月齢の縦隔型T細胞性リンパ腫の犬1例に対し、リン酸トセラニブとロムスチン(CCNU)の併用療法を試みたので、その概要を報告する。

成 績

症例は10カ月齢、体重3.4kg、未避妊雌のミニチュアダックスフンドである。呼吸困難と胸腔内の腫瘍性疾患が疑われ、鹿児島大学附属動物病院を受診した。体

表リンパ節はいずれも正常であったが、血液検査では再生性貧血やスクリーニング検査の異常値がみられた(表1)。単純X線検査や超音波検査では胸水を伴った短径15.3mmの前縦隔腫瘍が描出されたため(図1a, b)、胸水抜去後にCT検査(16列マルチスライスCT: Asteion, 東芝メディカルシステムズ(株), 栃木)を実施した。撮影条件は管電圧120kV、管電流50kA、撮影スライス厚1mmに設定し、血管造影剤(オイパロミン, 富士製薬工業(株), 東京)を1.5ml/kg(2ml/sec)で投与した。イソフルラン(株)プロミクロス, 東京)で全身麻酔を維持し、血管造影CT撮影を行ったところ、造影増強された前縦隔腫瘍と肝腫大が描出された(図1c)。胸水は漏出性であり、診断上有用な情報は得られなかったが、前縦隔腫瘍と肝臓の細針生検から未分化な異型リンパ球が検出されたため(図2a)、多重蛍光抗体染色及びリンパ球遺伝子再構成解析(株)ケーナインラボ, 東京)を実施した。多重蛍光抗体染色ではCD79 α 陰性、CD3陽性の大型T細胞が認められた。リンパ球遺伝子再構成解析では、T細胞レセプター γ 鎖であるTCR-A及びTCR-Bの泳動でクローナルなバンドが検出され

† 連絡責任者: 山崎裕毅 (鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院)

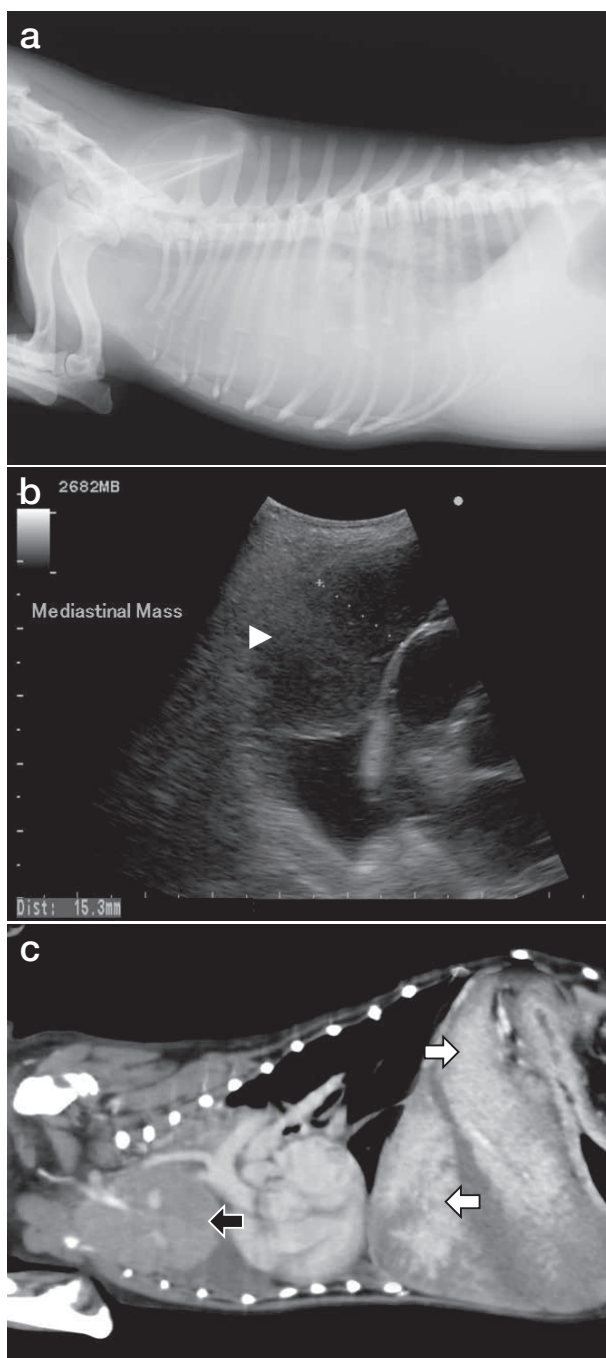


図 1 初診時の画像検査所見

- a: 胸部 X 線検査 (R ラテラル像)
- b: 胸部超音波検査. 前縦隔腫瘤 (矢頭)
- c: 造影 CT 所見 (矢状断面像). 造影増強された前縦隔腫瘤 (黒矢印) と肝腫大 (白矢印)

た. 免疫グロブリン H 鎖である IgH-A ではブロードなバンドが検出されたが, その他の IgH-B と IgH-C では PCR 産物は増幅されなかったため, B リンパ球のクローナリティーは否定的であり, T リンパ球のモノクローナルな増殖疾患が疑われた (図 2b). 以上より, 肝浸潤を呈した縦隔型 T 細胞性リンパ腫と診断した.

本症例はプレドニゾロンによる治療効果が認められな

表 1 初診時の血液学検査及び生化学検査

項目	測定値	参考基準値*
WBC (μ l)	31500	6000~17000
Seg (μ l)	25200	—
Lym (μ l)	2520	—
Mon (μ l)	3780	—
RBC ($\times 10^4 \mu$ l)	285	550~850
PCV (%)	20	37.0~55.0
PLT ($\times 10^4 \mu$ l)	42	20~50
TP (g/dl)	5.8	5.0~7.2
Alb (g/dl)	2.6	2.6~4.0
ALP (U/L)	923	38~165
ALT (U/L)	36	22~84
BUN (mg/dl)	23	9.2~29.2
CRE (mg/dl)	0.5	0.4~1.4
Ca (mg/dl)	9.6	8.8~11.9
LDH (U/L)	348	35~187
CRP (mg/dl)	4.8	0~0.7

*poch-100iV, 富士ドライケム 7000V 及び Laser CRP-2 の犬参考基準値範囲 (各製造会社における基準値範囲シート)

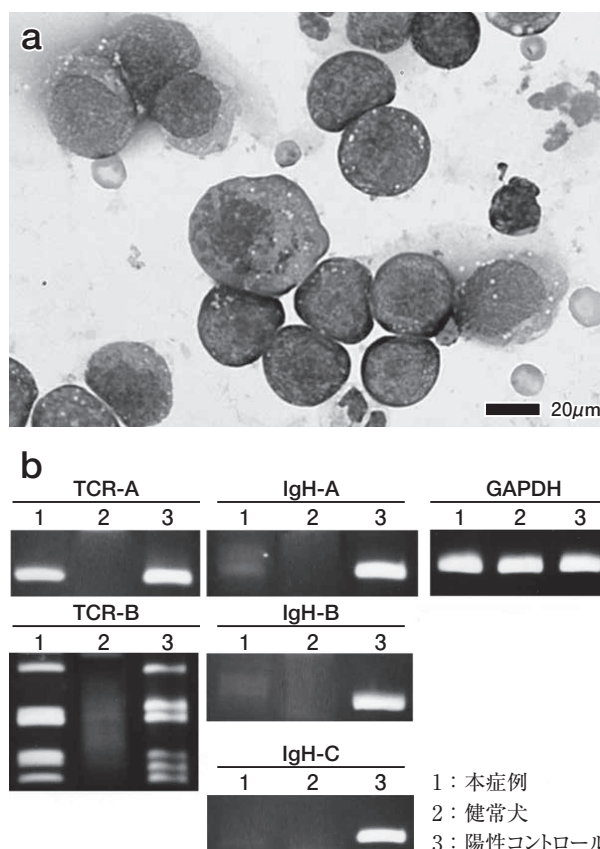


図 2 前縦隔腫瘤の検査所見

- a: 前縦隔腫瘤の細胞診 (ギムザ染色)
- b: リンパ球遺伝子再構成解析 (電気泳動像)

かったため, 本剤を除いた多剤併用療法 (UW-25) を計画した. 輸血後, 第 2 病日に L アスパラギナーゼ (ロイナーゼ 5000, 協和発酵キリン(株), 東京, 400 IU/kg, SC), 第 5 病日にピンクリスチン (オンコピン, 日本化

表2 プライマー一覧

遺伝子名	増幅産物 (bp)	塩基配列	Genbank No
HPRT	192	Forward 5'-TGCTCGAGATGTGATGAAGG-3' Reverse 5'-TCCCCTGTTGACTGGTCATT-3'	NM001003357
ABCB1	195	Forward 5'-CTATGCCAAAGCCAAAGTATC-3' Reverse 5'-GAGGGCTGTAGCTGTCAATC-3'	NM001003215
ABCG2	100	Forward 5'-GGTATCCATAGCAACTCTCCTCA-3' Reverse 5'-GCAAAGCCGCATAACCAT-3'	NM001048021
VEGFR2	103	Forward 5'-TGTCATCCTTACCAACCCATT-3' Reverse 5'-CGGAGAGATCAGGGATTCTCA-3'	NM001048024
PDGFR α	113	Forward 5'-TTCCCTTGGCGGCACAC-3' Reverse 5'-GTCAGGCTTGGCCATCCG-3'	AY525124

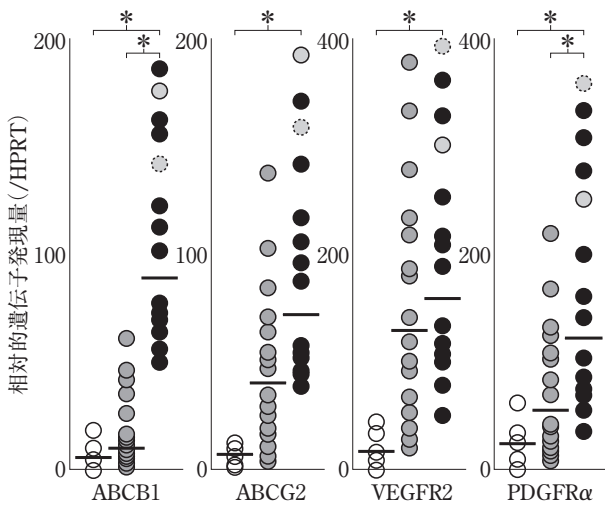


図3 本症例の原発巣と肝転移巣における標的遺伝子発現量
 ○ 正常リンパ節 (n=5)
 ● 薬剤感受性リンパ腫 (n=16)
 ● 多剤耐性リンパ腫 (n=12)
 本症例 (○原発巣 ●肝浸潤巣)
 — 中央値 *P<0.05

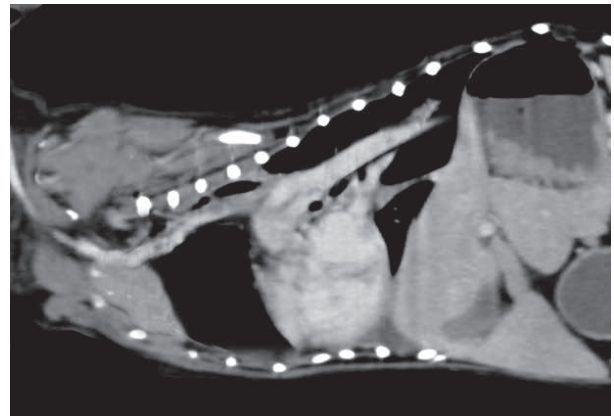


図4 第33病日の造影CT所見 (矢状断面像)

薬(株, 東京, 0.5 mg/m², iv), 第12病日にシクロフォスファミド (エンドキサン, 塩野義製薬(株, 大阪, 200 mg/m², iv) を投与したが, いずれも治療効果は得られなかった. そこで, 有効性の高い救済療法を選択するために, 前縦隔と肝臓の腫瘍検体を定量性 PCR 法による遺伝子解析に供した.

RNA 抽出 試薬 (mirVanaTM miRNA Isolation Kit, ambion, U.S.A.) を用い, 腫瘍検体から RNA を抽出した. 2013~2015 年に本学附属動物病院を受診した未治療の犬リンパ腫 (薬剤感受性リンパ腫) 16 例を陰性対照とし, これらの 16 例で多剤併用療法後に耐性を示した 12 例を陽性対照として, これらの検体からも同様に RNA を抽出した. さらに, 正常犬 (ビーグル, n=5, 未避妊雌, 1 歳) のリンパ節を参考試料として用いた. RNA Nano Kit と Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用い, 抽出 RNA

の分解度と完全性を客観的に評価した. RNA 濃度測定は分光光度計 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, U.S.A.) を用い, RNA 濃度が適正範囲内であることを確認した. cDNA 合成試薬 (ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, 東洋紡(株, 大阪) とサーマルサイクラー (T100TM thermal cycler, BIO-RAD, U.S.A.) を用いて, 37°C, 60 分間で逆転写を行い, cDNA を合成した. 治療標的因子として ABC トランスポーター (ABCB1 と ABCG2), 血小板由来成長因子受容体 (PDGFR α) 及び血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2) の CDNA を増幅する各プライマーを作製し (表 2), 内部標準には Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) 遺伝子を用いて相対的遺伝子発現量を測定した. リアルタイム PCR は Applied Biosystems StepOnePlusTM (CA, U.S.A.) と SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, タカラバイオ(株, 滋賀) を用い, 95°C で 20 秒間加熱した後, 95°C で 3 秒間及び 60°C で 20 秒間を 40 サイクル繰り返して, 相対定量解析 (2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 解析) を行った. PCR 増幅産物の特異性は融解曲線分析で確認し, 統計処理は SPSS, version 12.0.1 (IL, U.S.A.) を用いたマン・ホイットニーの U 検定を実施し, P<0.05 を有意差ありとした.

陽性対照と陰性対照の標的遺伝子発現量を評価基準と

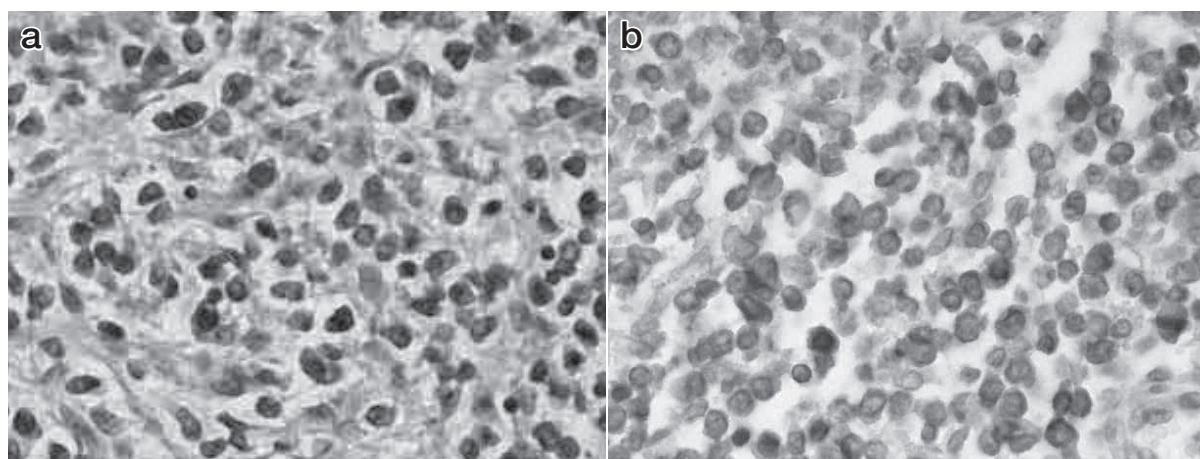


図5 剖検による前縦隔の病理組織学的所見 (×400) a: HE染色 b: CD3免疫染色

してそれぞれ比較解析を行った。本症例の ABCB1 遺伝子発現量 (原発巣 176, 肝浸潤巣 142) は, 陽性対照の ABCB1 遺伝子発現量中央値 (86) より高く, ABCG2 遺伝子発現量 (原発巣 188, 肝浸潤巣 156) も陽性対照中央値 (72) より上昇していた (図3)。VEGFR2 遺伝子発現量 (原発巣 298, 肝浸潤巣 396) は, 陽性対照中央値 (148) を上回り, PDGFR α 遺伝子発現量 (原発巣 240, 肝浸潤巣 360) も, 陽性対照中央値 (106) の 2 倍以上を示した (図3)。以上の解析結果から, VEGFR と PDGFR が有効な治療標的因子であると判断し, 第 19 病日よりリン酸トセラニブ (パラディア, ゴエティス・ジャパン(株), 東京, 2.4 mg/kg, PO, EOD) を投与した。投与後, 軽度の下痢がみられたが第 24 病日から腹部膨満が徐々に改善してきた。さらに, 第 26 病日より CCNU (CeeNU: Bristol-Myers, Squibb, N.Z., 50 mg/m², PO, 3 週間ごと) を併用したところ, 第 30 病日から呼吸器障害が改善し, 一般状態も良好に維持できた。第 33 病日に無麻酔 CT 検査により治療効果を判定したところ, 前縦隔腫瘍と肝浸潤巣の縮小が認められ (図4), 血液検査も正常値を示した。しかし, 第 36 病日に呼吸困難を呈し, 自宅で斃死した。死後の剖検では, 前縦隔から CD3 陽性の大型円型細胞がび漫性に認められた (図5)。肝臓では腫大や腫瘤形成は認められないが, 類洞内や小葉間の一部で CD3 陽性の大型 T 細胞の浸潤が確認された。以上の所見より肝転移を呈した T 細胞性リンパ腫が確定されたが, 直接的死因は特定できなかった。

考 察

多剤併用療法を実施した 1 歳未満の犬リンパ腫は消化管型と肝臓型の 2 例のみで, 縦隔型リンパ腫の報告はない [3, 4]。これらの 2 例はいずれも治療成績が悪く生存期間は 3 カ月未満である [3, 4]。縦隔型リンパ腫の多くは T 細胞性であり, B 細胞性と比較して治療成績

が低く, 呼吸器や循環器障害などの重篤な症状を引き起こすため, 他の発生部位と比較して予後が悪い [1, 2]。CCNU は ABCB1 や ABCG2 による多剤耐性機構の影響を受けにくいとため, 救済療法として選択される [5]。しかし, 奏功期間中央値が 2 カ月程度であるため, 長期寛解が期待できない [5]。したがって, 本症例では CCNU との併用効果が期待できる新規薬剤を必要としたため, 効果予測として遺伝子解析を実施した。造血器腫瘍の一部では VEGFR や PDGFR などの受容型チロシンキナーゼが異常に活性化しているため, 血管内皮細胞の遊走と増殖が無秩序に促進し, 腫瘍形成や薬剤耐性が高まる [6-8]。本結果でも PDGFR α 遺伝子と ABCB1 遺伝子の発現量が薬剤感受性群と比較して薬剤耐性群で有意に上昇していたことから, PDGFR α がリンパ腫の治療抵抗性を助長させている可能性が示唆された [7, 8]。さらに, 一部のチロシンキナーゼ阻害剤は薬剤耐性機構を弱めることから [9, 10], 本疾患に対するリン酸トセラニブの有効性を予測した。本遺伝子解析を治療標的の効果予測法として確立するために, 治療成績と遺伝子発現量を比較検討していく必要がある。

リン酸トセラニブは c-kit, VEGFR や PDGFR などを標的とするマルチキナーゼ阻害剤であり, c-kit 変異を持つ肥満細胞腫や VEGFR 及び PDGFR の発現機能と関連している肛門嚢腺癌や甲状腺癌への有効性が示唆されている [11]。また, 犬の T 細胞性リンパ腫でも VEGFR や PDGFR の高発現が確認されている [7, 8]。ある研究では, T 細胞性皮膚型リンパ腫に対して, リン酸トセラニブと同様のマルチキナーゼ阻害剤であるマシチニブを投与したところ, 奏効率 70%, 奏功期間中央値 85 日を示した [12]。本症例では, リン酸トセラニブ開始から 5 日後に腹部膨満が改善したことから, 著明な血管新生を伴う肝浸潤巣を優先的に抑制した可能性が高い。さらに, リン酸トセラニブ開始から 1 週間後に CCNU を併用し, 呼吸状態が改善されたことから,

CCNU作用機序が縦隔原発巣の縮小効果を助長させたかもしれない。リン酸トセラニブの受容体阻害とCCNUのDNA複製阻止による増強効果が確立されれば、予後の改善が期待できる。

リン酸トセラニブとCCNUの併用療法における第I相試験では至適用量や安全性が検討されている [13]。CCNUは好中球減少や肝毒性が著明に認められるが、消化器毒性が少ないためリン酸トセラニブの副作用と重複する可能性が低く、交差耐性も生じない [13]。本症例でも、副作用による投与中止や投与間隔延長の必要性はなく、一時的な症状緩和と腫瘍縮小がみられたが、長期的生存は得られなかった。

リン酸トセラニブとCCNU併用療法は本症例に対し、一定の腫瘍縮小効果を示した。多剤耐性リンパ腫に対するリン酸トセラニブの有用性が確立されれば、さらなる併用効果が期待できる。そのため、併用療法と副作用を考慮した投与量と投与間隔の検討が必要である。

引用文献

- [1] Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P, Blavier A, Bonnefont C, Chabanne L, Marchal T, Cadore JL, Goythollot I, Ledieu D, Ghernati I, Magnol JP : Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases, *Vet Pathol*, 39, 92-109 (2002)
- [2] Beaver LM, Strottner G, Klein MK : Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008), *J Am Vet Med Assoc*, 237, 1052-1055 (2010)
- [3] 高島 論, 大場恵典, 渡辺一弘, 児玉篤史, 酒井洋樹, 高木 満, 北川 均 : 消化管近傍リンパ節にT細胞性リンパ腫を発症した若齢犬の1例, *日獣会誌*, 64, 390-393 (2011)
- [4] Chung TH, Lamm C, Choi YC, Lee JW, Yu D, Choi US : A rare case of hepatic T-cell rich B-cell lymphoma (TCRBCL) in a juvenile dog, *J Vet Med Sci*, 76, 1393-1397 (2014)
- [5] Flory AB, Rassnick KM, Al-Sarraf R, Bailey DB, Balkman CE, Kiselow MA, Autio K : Combination of CCNU and DTIC chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs, *J Vet Intern Med*, 22, 164-171 (2008)
- [6] Wolfesberger B, Guija de Arespacohaga A, Willmann M, Gerner W, Miller I, Schwendenwein I, Kleiter M, Egerbacher M, Thalhammer JG, Muellauer L, Skalicky M, Walter I : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma, *J Comp Pathol*, 137, 30-40 (2007)
- [7] Aricò A, Guadagnin E, Ferraresso S, Gelain ME, Iusich S, Rütgen BC : Platelet-derived growth factors and receptors in Canine Lymphoma, *J Comp Pathol*, 151, 322-328 (2014)
- [8] Meng F, Speyer CL, Zhang B, Zhao Y, Chen W, Gorski DH, Miller FR, Wu G : PDGFR α and β play critical roles in mediating Foxq1-driven breast cancer stemness and chemoresistance, *Cancer Res*, 75, 584-593 (2015)
- [9] Shukla S, Robey RW, Bates SE, Ambudkar SV : A small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2, *Drug Metab Dispos*, 37, 359-365 (2009)
- [10] Zandvliet M, Teske E, Chapuis T, Fink-Gremmels J, Schrickx JA : Masitinib reverses doxorubicin resistance in canine lymphoid cells by inhibiting the function of P-glycoprotein, *J Vet Pharmacol Ther*, 36, 583-587 (2013)
- [11] Urie BK, Russell DS, Kisseberth WC, London CA : Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors-alpha and -beta, KIT, and RET in canine apocrine gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma, *BMC Vet Res*, 8, 67 (2012)
- [12] Holtermann N, Kiupel M, Kessler M, Teske E, Betz D, Hirschberger J : Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma, *Vet Comp Oncol*, doi: 10.1111/vco.12157. [Epub ahead of print] PMID: 26364581 (2015)
- [13] Pan X, Tsimbas K, Kurzman ID, Vail DM : Safety evaluation of combination CCNU and continuous tocera-nib phosphate (Palladia[®]) in tumour-bearing dogs: a phase I dose-finding study, *Vet Comp Oncol*, doi: 10.1111/vco.12091. [Epub ahead of print] PMID: 24735385 (2014)

A Rare Case of Mediastinal T-Cell Lymphoma in a Juvenile Dog

Hiroki YAMAZAKI^{1)†}, Takahiro KAWABATA²⁾, Mariko SAWA³⁾, Yu-Chang LAI¹⁾,
Akira YABUKI³⁾ and Naoki MIURA¹⁾

- 1) *Veterinary Teaching Hospital, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*
- 2) *Kawabata Animal Hospital, 10-41 Fuchucho, Kokubu, Kirishima, 899-4346, Japan*
- 3) *Laboratory of Veterinary Clinical Pathology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*

SUMMARY

Mediastinal mass and hepatomegaly were detected by computed tomography in a 10-month-old Miniature Dachshund presenting with dyspnea. The dog was diagnosed as mediastinal T-cell lymphoma with liver invasion by cytological and clonality examination. Multidrug therapy (UW-25) was not effective for the dog. As a second-line therapy, a combination treatment of toceranib phosphate and CCNU was performed based on the expression profiling of multidrug resistance genes and angiogenic genes by qRT-PCR analysis, resulting in an improved condition. However, the dog died from dyspnea at 36 days after first examination. T-cell lymphoma was confirmed by necropsy. — Key words : Juvenile dog, Lymphoma, Toceranib phosphate.

† *Correspondence to : Hiroki YAMAZAKI (Veterinary Teaching Hospital, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)*

1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

TEL · FAX 099-285-8750 E-mail : hyamazaki@vet.kagoshima-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 333 ~ 338 (2016)