

伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための
新規検査法の開発

山口大学大学院連合獣医学研究科

古澤 悠

2022年3月

6) 図および表	55
総括	64
謝辞	67
参考文献	68

総 緒

細胞とは生物の最も基本的な構成単位であり、1665年に Robert Hooke が顕微鏡でコルクの切片を観察し小さな部屋を多数観察したことが最初の発見であるとされているが、細胞を疾病の診断に応用するという細胞診断学の歴史は 20 世紀初頭に Geroge N. Papanicolau が膾炙スミア中の悪性細胞を報告したことから始まっている[16, 28]。Papanicolau の活躍により子宮頸癌診断法としての細胞診の有用性が認識され、今ではその取り扱う学術内容は、婦人科領域に留まらず呼吸器や乳腺、消化器、泌尿器などのはば広い領域で応用されている。

そして、従来の医学領域では、細胞診の役割は主として病変の有無の判定や異常がある場合には病名の推定を行う補助診断としての位置づけであったが、近年の細胞診断学の進歩は目覚ましく、今日ではある種の疾患では細胞診による診断が組織診と同等の診断的価値を与えられるようになり、特に腫瘍診断において細胞診は必要不可欠な検査手法となっている。獣医学領域においても細胞診は、簡便かつ非侵襲的に実施できることから重要な診断ツールとして利用されている。しかし、医学領域と比べるとその診断精度は決して高いものとはいえず、細胞診で腫瘍の確定診断を得ることは難しいのが現状である。

細胞診は主として採取した細胞の形態に関する顕微鏡的所見により、病変の有無の判定

や異常がある場合には病名の推定を行うものであり、医学領域ではパパニコロウ染色、獣医学領域ではギムザ染色での細胞形態の観察が主流である。医学領域と獣医学領域の間に使用されている染色法は異なるが、細胞形態の観察という点では大きな違いはない。では、診断精度の違いはどこにあるのかというと、医学領域では細胞の形態学的特徴に加えて、細胞の免疫学的特徴を検出する免疫細胞化学や腺癌細胞の検出に有用なアルシアンブルー染色や Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色の重染色法などの特殊染色を併用している点が一因として挙げられる。免疫細胞化学での具体例を挙げると、手術中では悪性腫瘍か良性腫瘍か、あるいは原発巣の推定など組織発生的診断により手術方針を決定するために利用される。例えば、肺腫瘍が肺原発性の腺癌か転移性の腺癌かを評価するために、サイトケラチン 7 およびサイトケラチン 20 の免疫細胞化学を施すことで原発巣の推定が行われている [54]。また、胸腔貯留液に対してカルレチニンやサイトケラチン 5/6、ウィルムス腫瘍遺伝子 1 (wilms tumor 1; WT1)、癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen; CEA)、上皮関連抗原 (epithelial related antigen; MOC-31) などの免疫細胞化学が悪性中皮細胞、癌細胞、反応性中皮細胞を鑑別するために用いられている [17]。さらに治療選択を行う場合にも免疫細胞化学は有用であり、非小細胞性肺癌を例に挙げると、分子標的薬の選択に関わるマーカーであるヒト上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) や未分化リンパ腫リン酸

化酵素 (anaplastic lymphoma kinase; ALK) などの特定の分子を免疫細胞化学で検出することで、より非侵襲的に効果的な治療法を提案することができる[18]。

一方、獣医学領域の細胞診では、免疫細胞化学やその他の特殊染色を併用した診断手法は十分に普及していない。近年、伴侶動物の獣医療は大きく発展しており、特に腫瘍性疾患における治療の高度化が進んでいる。獣医療の高度化のためには診断技術の進歩が必須であり、組織診の検体と比べると比較的採取しやすく、意識下の動物で非侵襲的に検査が行える細胞診は今後より重要な臨床検査になっていくと考えられる。

そこで本研究では、伴侶動物における細胞診の高度化に向けた新規検査法の開発を行った。第 1 章では、細胞増殖能の客観的評価を可能にする AgNOR (Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions) 染色を伴侶動物の細胞診において臨床応用するために、リンパ増殖性疾患と診断されたイヌとネコから得た細胞診標本に対して、AgNOR 染色後にメイ・グリュンワルド染色液を用いた対比染色を施すことによって、細胞形態の観察ができないという従来の AgNOR 染色のデメリットを補うことができる新規染色法を開発した。

第 2 章では、悪性上皮系腫瘍の浸潤・転移の過程で上皮系腫瘍細胞が間葉系の形質を獲得する現象である上皮間葉転換を 1 枚の細胞診塗沫標本で検出することができる多重蛍光抗体法を確立した。上皮系腫瘍と診断されたイヌとネコから得た細胞診塗沫標本に、上皮間葉

転換マーカーである E-カドヘリンおよびビメンチンを検出する多重蛍光抗体法を施すこと
によって細胞診検体における上皮間葉転換の検出を可能にした。

第1章

AgNOR染色のイヌとネコの細胞診への応用

緒言

Nucleolar organizer regions (核小体形成領域 ; NOR) は、核内のリボソーム RNA を転写する DNA ループに存在し、細胞の増殖能に関連する核小体の形成やタンパク合成に深く関与している。好銀性 NOR (AgNOR) 染色は、NOR を検出する方法であり、リボソーム RNA をコードする DNA に随伴する特殊な好銀性タンパクに銀が沈着結合することで、核内に brown あるいは black dot (AgNOR スポット) として染色される[8, 29, 35]。病理組織学的分野において、AgNOR 染色は細胞増殖を予測できることから腫瘍の良性悪性の判定や各種腫瘍の生物学的悪性度の判定に用いられている[4]。AgNOR 染色は、細胞学的塗抹標本にも適用されており、ヒト[9, 19, 32, 48]およびイヌ[1, 20, 21, 51, 52]において腫瘍性疾患の予後を予測するための有用な指標となる可能性が示唆されている。しかし、伴侶動物の細胞診においては、腫瘍細胞と炎症細胞などの非腫瘍細胞が混在して塗抹標本上に存在するため、AgNOR 染色単独では細胞形態の類似した腫瘍細胞と非腫瘍細胞との鑑別が困難であり、AgNOR 染色の結果を正確に解釈することが非常に難しい。したがって、獣医学領域で AgNOR 染色を利用するためには、AgNOR スポットを明瞭に検出でき、かつ細胞形態を保持できる簡単で実用的な新規の AgNOR 染色法が必要である。本研究では、AgNOR 染色と

ロマノフスキー染色を組み合わせた新規の対比染色法を確立し、イヌとネコから採取した臨床サンプルに対して様々な設定で検討を行った。

材料および方法

本実験は鹿児島大学の動物実験指針に従い実施された（認証番号 KVH190001）。

1-1. サンプル

鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院で、リンパ増殖性疾患と診断されたイヌ（n = 17）およびネコ（n = 13）の組織あるいは貯留液（胸腔貯留液および腹腔貯留液）から細胞診標本（塗抹標本）を作製した。採取された標本はすべて細胞診あるいは病理組織学的においてリンパ増殖性疾患と診断された。リンパ増殖性疾患の内訳は、反応性過形成（n=4）、多中心型リンパ腫（n=14）、縦隔型リンパ腫（n=6）、消化器型リンパ腫（n=5）、前立腺リンパ腫（n=1）である（Table 1）。

細胞診標本は作製後すぐに風乾し、使用するまで-30°Cにて未固定のまま凍結保存した。

1-2. 試薬

試薬は、2%ゼラチン 1%蟻酸水溶液（蒸留水 100ml にゼラチンを 2g 加温溶解し、蟻酸 1ml を混和する）および 50%硝酸銀水溶液（硝酸銀 50g に蒸留水を加え全量を 100ml とする）

の混合液を染色液として使用した。

1-3. 固定液の決定

アセトン（1分間；4℃）、10%中性緩衝ホルマリン（10%NBF）（5分間；室温）、95%エタノール（5分間；室温）およびメタノール（1分間、5分間、10分間；室温）の4種類の固定液について検討を行った。メタノールについては、3パターンの固定時間（1分間、5分間、10分間）で検討を行った。これらの条件の検討には以下に示す従来法[5]のAgNOR染色法のプロトコルに従って行った。

- 1) ドライヤーにより風乾（冷風）
- 2) 固定
- 3) 蒸留水で洗浄
- 4) AgNOR 溶液による染色：使用直前に 2%ゼラチン 1%蟻酸水溶液と 50%硝酸銀水溶液を 1:2 の割合で混和する。
- 5) インキュベーション（30分間、室温、暗所）
- 6) 水洗
- 7) 乾燥

8) 封入

9) 観察

1-4. 対比染色法のプロトコルの確立

最適な固定液の選定後、メイ・グリュンワルド単染色 (Merck, Darmstadt, Germany)、ギムザ単染色 (Merck)、二重染色 (メイ・グリュンワルド-ギムザ染色) を用いた対比染色法の確立を試みた。メイ・グリュンワルド染色液は、1/150 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.4) で 2 倍に希釈して、ギムザ染色液は、同様の緩衝液で 10 倍に希釈して使用した。メイ・グリュンワルド染色およびギムザ染色の染色時間は、1 分間、3 分間、5 分間、10 分間に設定した。また、一部のサンプルではメイ・グリュンワルド染色液だけではなく、ライト染色液 (Muto Pure Chemicals、東京、日本)、異なる製造元のギムザ染色液 (Muto Pure Chemicals) を使用した。二重染色では、細胞診標本をメイ・グリュンワルド染色液で 3 分間染色し、続いてギムザ染色液で 10~20 分間染色した。この対比染色は、AgNOR 染色の前後に実施した。

1-5. サンプルの保存期間による染色性の評価

最適な対比染色法を確立した後、-30°Cにて凍結保存した細胞診標本および二重染色後に

封入し室温で長期保存した細胞診標本での染色性の評価を行った。凍結保存した細胞診標本については、冷凍庫から取り出した後に冷風で完全に風乾し、1-4 で確立した対比染色法を用いて染色を施した。これらの細胞診標本の保存期間は、1 ヶ月から 1 年、2 年、3 年間であった。ロマノフスキー染色後に封入し室温保存した細胞診標本については、キシレンを用いてカバーガラスを取り除いた後、メタノールを用いて脱色してから、AgNOR 染色を用いた対比染色法を施した。これらの細胞診標本の保存期間は、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年、3 年、5 年、10 年間であった。

結果

固定液の選定

4 種類の固定液（アセトン、10%NBF、95%エタノール、メタノール）について検討を行った。その結果、全ての固定液において明瞭な AgNOR スポットを観察することができた。

4 種類の固定液の間で AgNOR スポットの染色性における顕著な違いは認められなかった

(Fig. 1)。また、メタノール固定においては、様々な固定時間（1分、5分、10分）を検討したが、1分間という最短の固定時間であっても、明瞭な AgNOR スポットを確認することが可能であった (Fig. 2)。この結果は、イヌおよびネコの全てのサンプルで同様の所見を得ることができた。

各染色液の組み合わせと反応時間の決定

最適な対比染色法プロトコルの確立は、メタノール固定した塗抹標本を用いて検討した。最も良好な染色性を示した対比染色法は、AgNOR 染色後にメイ・グリュンワルド染色液による短時間の染色であった (Table 2)。1分から3分間の染色によって細胞形態を良好に観察することが可能であり、核内に明確な AgNOR スポットを認めることができた (Fig. 3A)。

メイ・グリーンワルド染色を5分間および10分間と長く染色した場合には、核が濃く染色され過ぎてしまうため、AgNORスポットの観察が困難であった (Fig. 3B)。一部のサンプルでメイ・グリーンワルド染色の代わりとしてライト染色を使用した場合には、1分間の染色でも核が比較的暗く染色されてしまい、AgNORスポットの観察が困難であった (Fig. 4)。

AgNOR染色後にギムザ染色を施した場合には、1分間と3分間の短い染色時間にもかかわらず、核内のAgNORスポットは不明瞭に観察された (Fig. 3C)。これは、異なる製造元のギムザ染色液 (Muto Pure Chemicals) を使用した場合も同様の結果が得られた (Fig. 5)。

AgNOR染色後に二重染色を施した場合にも、核内が暗く染色されてしまい、明瞭なAgNORスポットの観察はできなかった (Fig. 3D)。メイ・グリーンワルド染色、ギムザ染色、二重染色をそれぞれAgNOR染色の前に施した場合、細胞質の染色性が非常に弱くなってしまい、細胞形態を特定することは困難であった。これらの結果は、調査を行ったサンプル全てにおいて同様の結果が得られ、イヌとネコの違いは認められなかった。上記の結果から、AgNOR染色後にメイ・グリーンワルド染色を短時間施す染色法が最適な対比染色法であると考えられた。

サンプルの保存期間による染色性の評価

-30°Cにて凍結保存した塗抹標本は全ての保存期間（1 ヶ月～3 年間）において明瞭な AgNOR スポットを観察することができた（Fig. 6）。また、二重染色後に封入し室温にて保存をしていたサンプルについては、1 年以内の保存期間であったサンプルでは、AgNOR スポットの観察が可能であったが、1 年を超える保存期間であったサンプルでは AgNOR スポットは確認することができなかった（Figs. 6 & 7）。

考察

AgNOR 染色は、医学領域において 1980 年以降に主に Crocker らにより腫瘍の良性悪性の鑑別においてその有効性が報告され[5]、細胞診には 1989 年に Derenzini らによって体腔貯留液中の腺癌細胞、組織球、中皮細胞の鑑別を目的に応用された[6]。獣医学領域においても、1990 年以降から肥満細胞腫やリンパ腫に対する予後指標として細胞診標本における AgNOR 染色の有用性がいくつか報告されている[21, 51]。

医学領域では、AgNOR 染色が細胞形態の観察に不向きであることは特に言及されていない。それは、医学領域では、獣医学領域とは異なり、炎症細胞が混在しない標本で主に利用されているため問題になっていない可能性が考えられた。細胞診において、腫瘍細胞と炎症細胞の鑑別は重要課題であるが、本研究で開発した対比染色法はそれらの鑑別ができないという AgNOR 染色の欠点を補うことができる染色法であると考えられた。

本章ではまず標本の固定法から検討した。結果として AgNOR 染色は本章で使用した全ての固定液で染色が可能であった。検討を行った固定法のうち、メタノール固定は、獣医学領域の細胞診標本において最も一般的に用いられている固定液であることから、メタノール固定が伴侶動物における AgNOR 染色では最適な固定法であると考えられた。また、アセト

ン固定はヒトのリンパ節細胞診において有用性が報告されている[37]。さらに獣医学領域においてもサイトケラチンおよびビメンチンに対する免疫細胞化学を行う場合、アセトン液が最適な固定剤であることが報告されている[40]。加えて、イヌの非上皮系腫瘍についてアセトン固定標本からビメンチン、S-100 タンパクおよびメラニン-A の検出をした報告もある[15, 30]。また、10%NBF は、組織標本で一般的に用いられる固定液であるが、イヌおよびネコの CD 抗原に対する免疫細胞化学において最適な固定剤であることが分かっている[25, 42]。このように AgNOR 染色は免疫細胞化学で用いられる固定液でも染色が可能であることが本章で判明した。さらに、免疫細胞化学に使用した細胞診標本はギムザ染色など他の染色に再利用できることは既に判明している[39]。よって、本章で確立した対比染色法は、免疫細胞化学と併用することで、例えば、T 細胞性リンパ球マーカーである CD3 や B 細胞性リンパ球マーカーである CD20、腫瘍細胞の由来を特定するサイトケラチンおよびビメンチンなど特定の分子の発現と AgNOR スポットを 1 枚の標本で同時に検出できる可能性があり、今後本法を用いた多様な解析に利用できるポテンシャルを持っている。95%エタノールは医学領域における細胞診において一般的な固定液であるが[24, 44]、免疫染色における有用性は低いとされる[53]。よって、AgNOR 染色と免疫細胞化学を併用する場合には 95%エタノールの有用性は期待できないが、医学領域で一般的な細胞診染色として用いられているパ

パニコロウ染色は 95%エタノール固定を使用する。パパニコロウ染色は、細胞の分化度の評価や核の微細形態の観察などにおいてイヌとネコの細胞診においても有用性が高い染色であることが報告されており[41]、本法は今後パパニコロウ染色との併用も期待できる。

メイ・グリュンワルド染色は、中性色素（Methylene blue eosin）を主体として構成されており、一般的に細胞質および細胞質顆粒の良好な染色が得られるが核染色が困難であるため単独で染色に使用されることはない。しかし、本章では、この特性により核内の AgNOR スポットの染色性を妨げることなく、細胞形態を明瞭に観察することが可能であった。ライト染色は、メイ・グリュンワルド染色と同様に細胞の核染色よりも細胞質、顆粒をよく染める性質がある。しかし、本章ではライト染色はメイ・グリュンワルド染色と比較すると細胞質および核が暗く染色され、明瞭な AgNOR スポットの観察が困難であった。メイ・グリュンワルド染色液は 1902 年にドイツ、ミュンヘンの May と Grünwald によりメチレンブルーとエオジンのアルコール溶液の混合液として発表されておりロマノフスキー効果は有していないため[26]、通常ギムザ染色と併せた二重染色法として使用され、単染色として使用されることはない。一方で、ライト染色は 1902 年にアメリカ、ボストンの Wright により重炭酸ソーダを加えたメチレンブルーとエオジンのアルコール溶液の混合液として発表されており、多染性メチレンブルーが多く含まれ、ロマノフスキー効果を有しているため[55]、単

剤でも使用される。ライト染色液はギムザ染色液ほどではないがロマノフスキー効果を持つため核が染色されてしまうので AgNOR スポットの観察に不適合であったと考えられる。

また、ギムザ染色液はアズール II エオシンとアズール II がグリセリン/メタノール液に溶解されている。核の DNA は化学的官能基であるリン酸基を有するため塩基性色素のアズールブルーでその染色性が高まり、ギムザ液はメイ・グリュンワルド染色とライト染色と比較してその絶対量が多いため核の染色性が良いとされるため[12]、本章での対比染色液には適さなかった。以上のことから、メイ・グリュンワルド染色は AgNOR 染色に最も適した対比染色であると考えられる。ただし、メイ・グリュンワルド染色後に AgNOR 染色を施すと、細胞診標本は AgNOR 染色により脱色されてしまうため、AgNOR 染色の後にメイ・グリュンワルド染色を施す必要があると考えられた。

-30°Cにて凍結保存した塗抹標本について、少なくとも 3 年以内の保存期間であれば AgNOR 染色が可能であることが分かった。これは、本章で確立した対比染色法が、AgNOR スポットの数と腫瘍性疾患の予後との関連性をさらに明らかにするためのレトロスペクティブ解析にも利用できる可能性を示唆する。本章で用いた方法を導入することにより、今後 AgNOR 染色の伴侶動物における腫瘍細胞診への応用価値が高まると考えられた。

小括

AgNOR 染色とは、核内に存在する核小体形成領域を特異的に染色する方法であり、良悪性腫瘍の判定や悪性度・予後の推定などに有用性が知られている。AgNOR 染色が細胞診標本でも染色可能であることは既に報告されているが、獣医学領域において臨床応用するにあたり AgNOR 染色単独では腫瘍細胞と炎症細胞を判別することが困難であるため、ロマノフスキー染色を併用した二重染色が必要である。そこで、本章では AgNOR 染色を臨床応用するために対比染色法、最適な固定法および保存標本への応用の検討を行った。

細胞診あるいは病理組織検査でリンパ増殖性疾患と診断されたイヌ (n=17) およびネコ (n=13) から得たリンパ節、腫瘍、胸水および腹水から細胞診標本を作成した。本章では、サンプル採取後に速やかに乾燥させた未固定の標本、未固定で凍結保存した標本 (-30°C)、既にメイ・グリュンワルド-ギムザ染色を施され室温で封入保存した標本を使用した。凍結保存の期間は、1 ヶ月～3 年間である。また、封入保存の期間は、1 ヶ月～10 年間である。最適な固定法の選出には、10%ホルマリン液、アセトン液、95%エタノール液、メタノール液を用いた。また、メタノール液については固定時間についても検討した。対比染色法の確立は、サンプルを固定後に、メイ・グリュンワルド-ギムザ染色、メイグリュンワルド単染

色、ライト単染色、ギムザ単染色をそれぞれ AgNOR 染色の前後に施した。メイ・グリュンワルド染色およびギムザ染色については、染色時間についても検討した。確立した対比染色法を用いて、凍結保存標本および封入後保存標本の染色性について検討した。

結果として、全ての固定液で AgNOR スポットは検出可能であり、メタノール液は全ての時間で検出可能だった。AgNOR スポットおよび細胞形態の観察に最も適した対比染色法は、AgNOR 染色後にメイ・グリュンワルド染色を 1~3 分施したプロトコルであった。その他の対比染色法では核が濃く染色され過ぎてしまい明瞭な AgNOR スポットの観察が困難であった。凍結保存した標本については、全ての保存期間で染色可能であった。封入保存標本については、1 年間以内の保存標本は染色可能であった。

以上の結果から、AgNOR 染色には獣医学領域で最も一般的に用いられているメタノールが最適な固定剤であり、細胞質を染色するメイ・グリュンワルド染色液を AgNOR 染色後に施す対比染色法が最良であると考えられた。さらに、本法は凍結保存した標本や封入保存した標本であっても応用可能であることが明らかになった。細胞診において、腫瘍の良性悪性の判定や悪性度・予後の推定などに有用かは更なる検証が必要であるが、本章の結果により、AgNOR 染色の細胞診への応用価値が高まると考えられた。

図および表

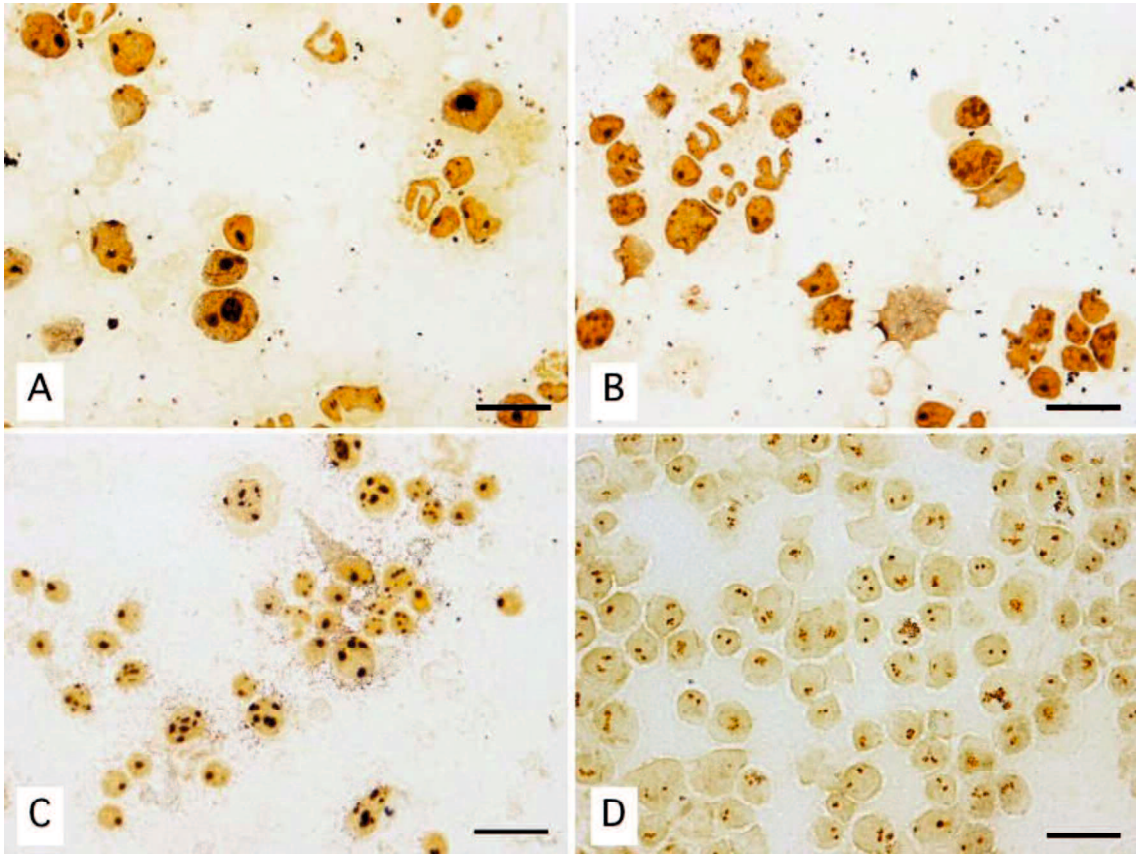


Fig. 1. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining for the smear fixed with acetone (A), 10% NBF (B), 95% ethanol (C) and methanol (D). A and B: smear from a reactive hyperplastic lymph node of a dog. C: smear from a neoplastic lymph node (lymphoma) of a dog. D: smear from the pleural effusion (lymphoma) of a cat. Bars: 15 μ m.

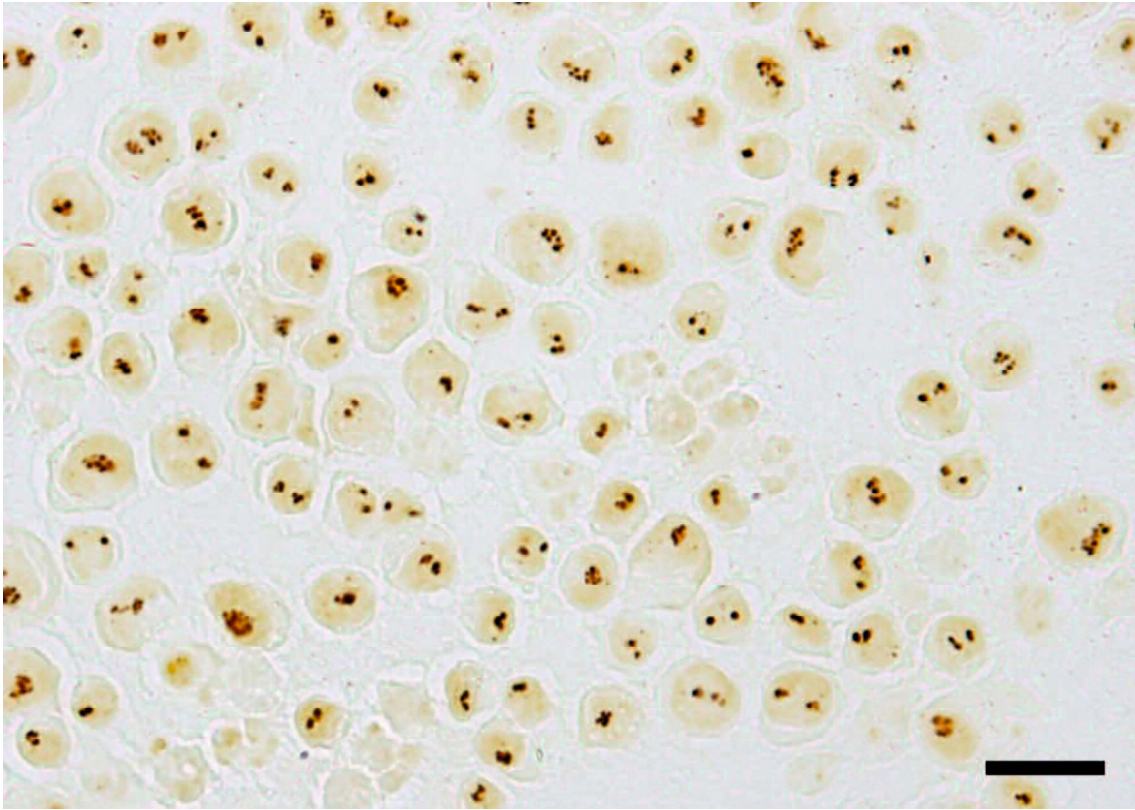


Fig. 2. AgNOR staining for the smear fixed with 100% methanol for 1 min. The smear was prepared from the pleural effusion of a cat with mediastinal lymphoma. Bar: 15 μ m.

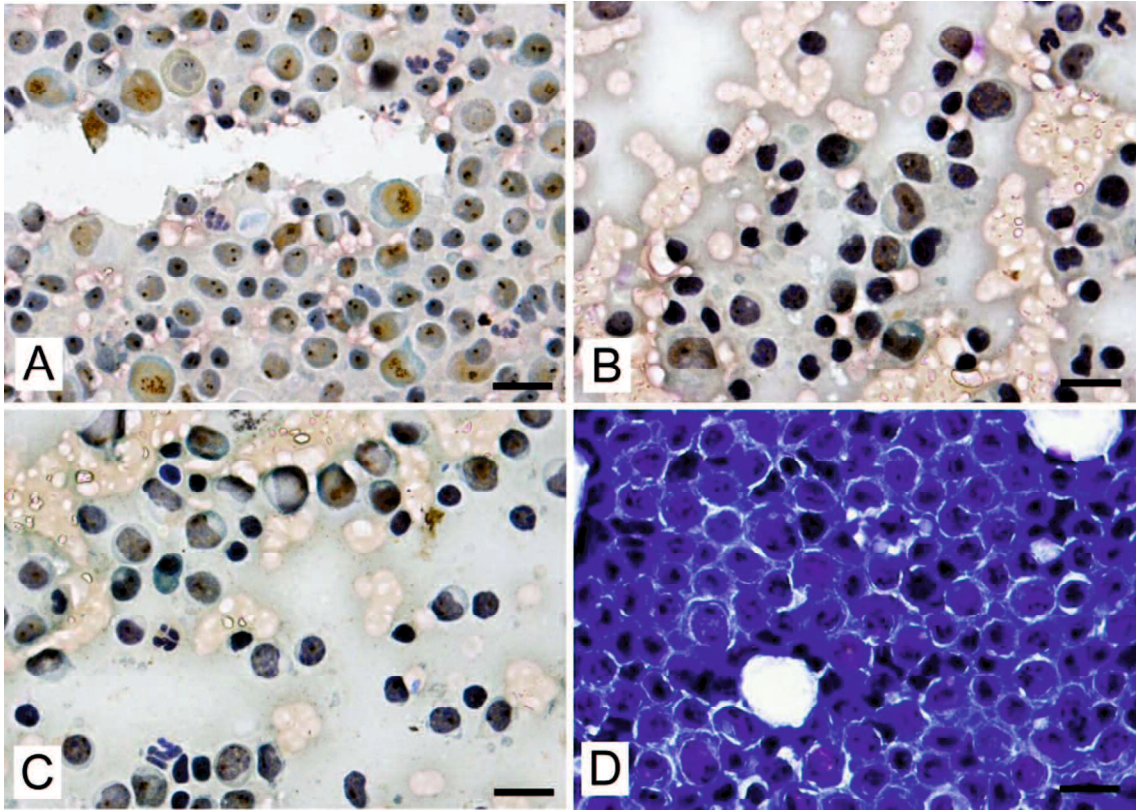


Fig. 3. Findings of the different counterstaining methods after AgNOR staining. May–Grünwald staining for 3 (A) and 5 min (B), Giemsa staining for 1 min (C), and May–Grünwald–Giemsa staining in the standard manner (D). A–C: smears from a reactive hyperplastic lymph node of a cat. D: smear from a neoplastic lymph node (lymphoma) of a dog. Bars: 15 μ m.

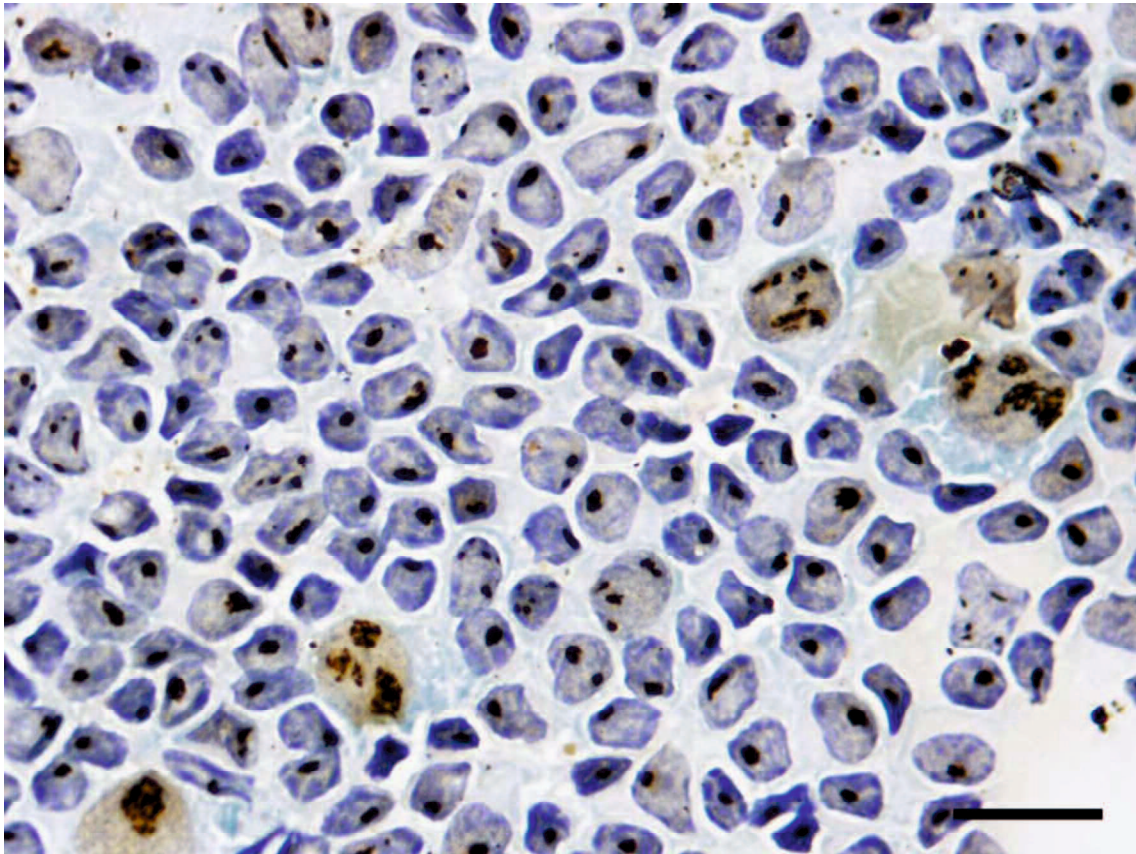


Fig. 4. Findings of the counterstaining methods after AgNOR staining. Wright staining for 1 min in the standard manner. Smears from a reactive hyperplastic lymph node of a dog. Bar: 15 μ m.

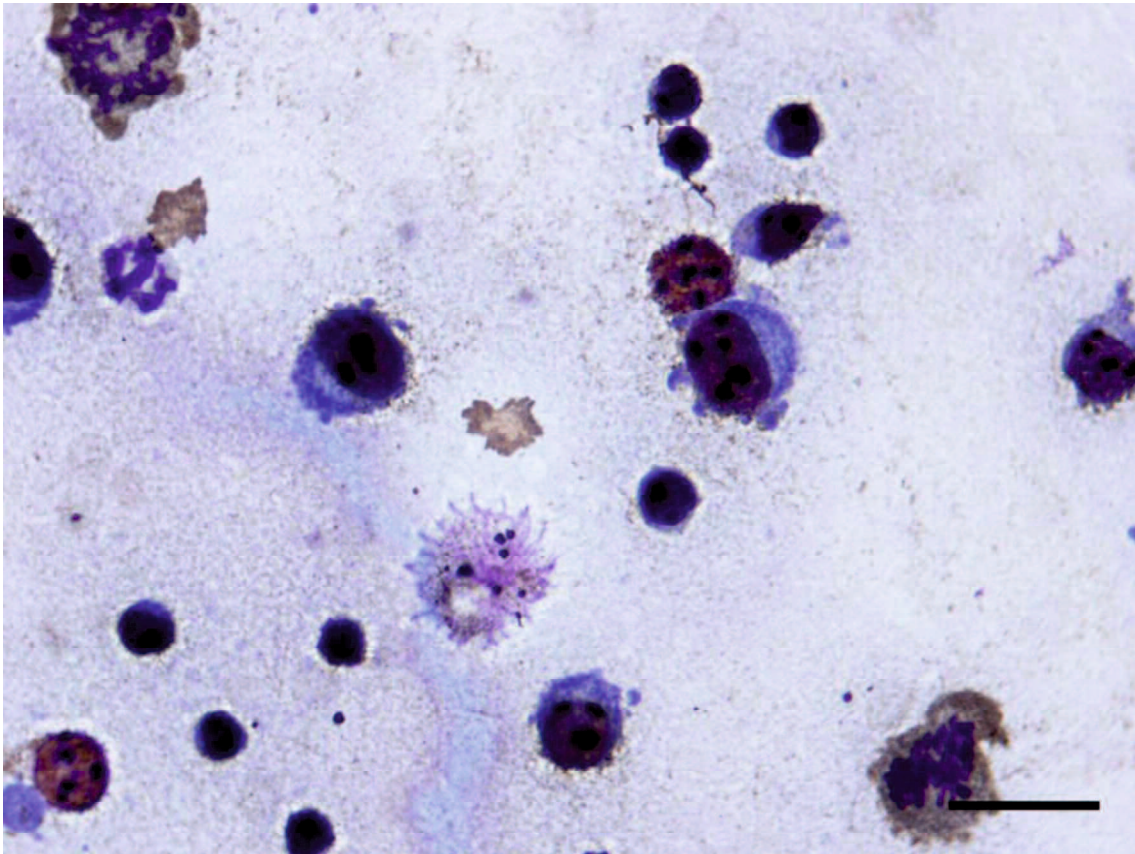


Fig. 5. Findings of the counterstaining methods after AgNOR staining. Giemsa staining from different manufacturers for 1 min in the standard manner. Smears from a neoplastic lymph node (lymphoma) of a dog. Bar: 15 μ m.

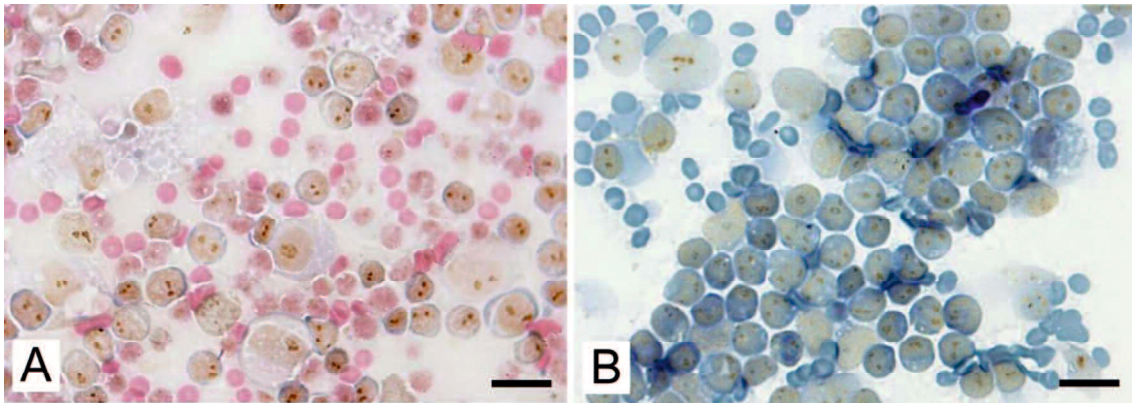


Fig. 6. Findings of the established AgNOR staining applied for long-term preservation samples. A: smear from the pleural effusion of a cat with mediastinal lymphoma that was directly stocked in the freezer (-30 °C) for 3 years after air-drying. B: smear from a reactive hyperplastic lymph node of a cat that was stained with the May–Grünwald–Giemsa stain and stocked in a dark box at room temperature for 1 year. Bars: 15 µm.

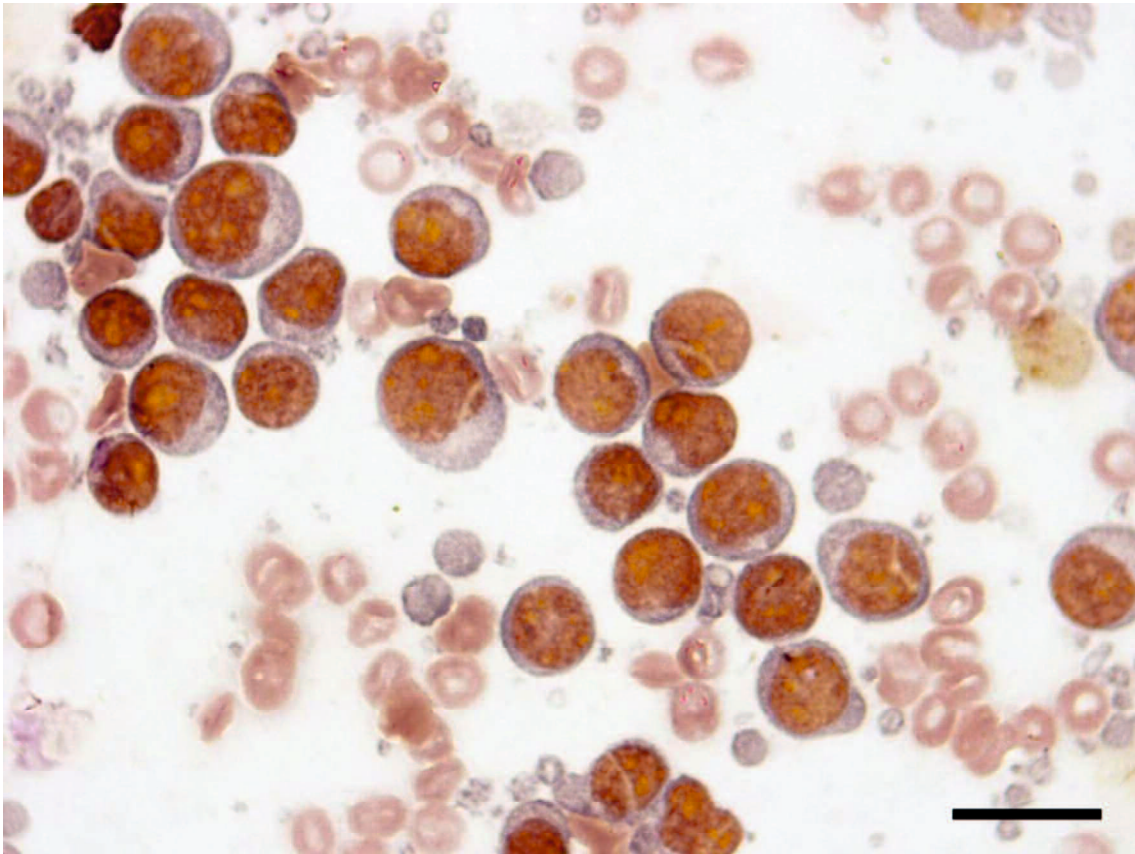


Fig. 7. Findings of the established AgNOR staining applied for long-term preservation samples.

smear from a reactive hyperplastic lymph node of a dog that was stained with the May-Grünwald-

Giemsa stain and stocked in a dark box at room temperature for 3 years. Bar: 15 μ m.

Table 1. Clinical sample diagnosed as lymphoproliferative disease through histopathology and/or cytology

Case	Samle/speies	Histopathological and/or cytological doagnosis
1	Mandibular lymph node FNB/dog	Reactive hyperplasia
2	Mandibular lymph node FNB/dog	Reactive hyperplasia
3	Mandibular lymph node FNB/dog	Reactive hyperplasia
4	Superficial cervical lymph node FNB/dog	Lymphoma
5	Superficial cervical lymph node FNB/dog	Lymphoma
6	Superficial cervical lymph node FNB/dog	Lymphoma
7	Superficial cervical lymph node FNB/dog	Lymphoma
8	Superficial cervical lymph node FNB/dog	Lymphoma
9	Popliteal lymph node FNB/dog	Lymphoma
10	Popliteal lymph node FNB/dog	Lymphoma
11	Popliteal lymph node FNB/dog	Lymphoma
12	Popliteal lymph node FNB/dog	Lymphoma
13	Popliteal lymph node FNB/dog	Lymphoma
14	Popliteal lymph node FNB/dog	Lymphoma
15	Prostate mass FNB/dog	Lymphoma
16	Acites/dog	Lymphoma
17	Pleural effusion/dog	Lymphoma
1	Mandibular lymph node FNB/cat	Reactive hyperplasia
2	Superficial cervical lymph node FNB/cat	Reactive hyperplasia
3	Superficial cervical lymph node FNB/cat	Lymphoma
4	Superficial cervical lymph node FNB/cat	Lymphoma
5	Jejunal mass FNB/cat	Lymphoma
6	Jejunal mass FNB/cat	Lymphoma
7	Jejunal mass FNB/cat	Lymphoma
8	Colonic mass FNB/cat	Lymphoma
9	Pleural effusion/cat	Lymphoma
10	Pleural effusion/cat	Lymphoma
11	Pleural effusion/cat	Lymphoma
12	Pleural effusion/cat	Lymphoma
13	Pleural effusion/cat	Lymphoma

FNB indicates fine-needle biopsy.

Table 2. Protocol for the established AgNOR staining method

1	Air-drying	Thoroughly
2	Fixation with 100% methanol	1 min
3	Staining with a fresh AgNOR solution	30 min
4	Washing with distilled water	in brief
5	Counterstaining with the May–Grünwald stain	1–3 min
6	Washing with distilled water	in brief
7	Air-drying	
8	Application of a coverslip	

第2章

イヌとネコにおける免疫細胞化学を用いた
細胞診検体での上皮間葉転換の検出

緒 言

癌の悪性化の最大の要因である浸潤・転移のメカニズムには、上皮間葉転換が重要な役割を果たしていると考えられている[23]。上皮間葉転換とは、上皮系細胞が間葉系の形質を獲得する現象であり、細胞間接着分子である E-カドヘリン、サイトケラチン、 β カテニン、デスモグレインの喪失により、腫瘍細胞の運動能および浸潤能が促進する[2, 13, 43, 49, 58]。さらに、上皮系細胞の特性を失う一方で、間葉系細胞の中間系フィラメントであるビメンチン、N-カドヘリン、 α -平滑筋アクチンが発現する[38, 58]。医学領域では、上皮間葉転換の発現は、乳癌や扁平上皮癌などの様々な上皮系悪性腫瘍における浸潤・転移に関連していると報告されている [31, 56]。獣医学領域においても、イヌの前立腺癌および乳癌の転移の過程で上皮間葉転換が発現することが示唆されている[10, 33]。また、イヌおよびネコの口腔扁平上皮癌において上皮間葉転換の発現が腫瘍の攻撃的な挙動に関連することが報告されている[14, 27]。

近年、イヌおよびネコの高齢化に伴い悪性腫瘍の発生は増加している。高齢動物は全身麻酔や試験開腹など侵襲的な検査に伴うリスクが高いため、より非侵襲的な検査が求められる。

細胞診は、生体から採取した細胞材料から標本を作製して行う顕微鏡検査であり、簡便かつ

非侵襲的であるため獣医学臨床でも重要な診断ツールとして注目されている。しかし、細胞診は、ある程度の腫瘍の種類や悪性度は予測できても、腫瘍の浸潤・転移を予測することは困難である。免疫細胞化学は、高度な細胞診において有用な診断ツールであり、免疫細胞化学を利用することで非侵襲に腫瘍の浸潤・転移を予測できる可能性がある。本研究では、免疫細胞化学を用いて一般的な乾燥塗抹標本からイヌとネコの上皮系腫瘍における上皮間葉転換（E-カドヘリンの喪失およびビメンチンの発現）を検出する多重蛍光抗体法を確立し、その結果を標準的な免疫組織化学から得られた結果と比較検討した。

材料および方法

本実験は鹿児島大学の動物実験指針に従い実施された（認証番号 KVH190001）。

1-1. サンプル

鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院で外科的に摘出されたイヌ (n=22) およびネコ (n=9) の上皮系腫瘍組織から乾燥塗抹標本を作製した。標本作製後の組織はすべてホルマリンで固定されてから病理組織学的診断に供された。塗抹標本は作製後にすぐに風乾し、使用するまで -30°C にて未固定のまま凍結保存した。細胞診と病理組織学的診断は相互の診断に影響がないように別々に実施された。悪性上皮系腫瘍と診断した全ての症例に対しては初診時に TNM 病期分類を実施し、所属リンパ節を含む他の臓器への転移を評価した。また、全血球計算 (Complete Blood Count; CBC) および C 反応タンパク (C-reacted protein; CRP) を含む血液生化学検査は、全ての症例に対して行った。

本研究に使用したサンプルの選択基準は以下に示す通りである。

- 1) 病理組織学的検査において上皮系腫瘍と診断されている。
- 2) 病理組織学的検査において腫瘍の悪性度が明確に決定されている。

- 3) 細胞診による診断が病理組織学的診断と一致している。
- 4) 良質な細胞形態を有し、かつ多数の上皮系腫瘍細胞を含む塗抹標本である。

サンプルの除外基準は以下に示す通りである。

- 1) 病理組織学的検査において非上皮系腫瘍と診断されている。
- 2) 病理組織学的検査において腫瘍の悪性度を明確にできていない。
- 3) 細胞診による診断が病理組織学的診断と一致していない。
- 4) 複数の種類の腫瘍細胞が病理組織学および細胞診断学的に検出されている。
- 5) 明らかな炎症、壊死および線維化が病理組織学および細胞診断学的に検出されている。
- 6) 細胞形態が不良、かつ細胞数の乏しい塗抹標本。

これらの基準に基づいてサンプルはランダムに選択され、以下に示す分析に用いた。本研究に用いた上皮系腫瘍サンプルの内訳を Table 1 に示した。イヌにおいては、乳腺管状乳頭状癌 (n=2)、乳腺良性混合腫瘍 (n=2)、乳腺混合腺腫 (n=1)、乳腺腺腫 (n=1)、乳腺脂質産生癌 (n=1)、歯肉扁平上皮癌 (n=2)、扁桃扁平上皮癌 (n=1)、直腸腺癌 (n=3)、甲状腺濾胞腺腫 (n=1)、甲状腺癌 (n=1)、肛門周囲腺腫 (n=2)、肛門嚢腺癌 (n=1)、肝細胞癌 (n=1)、毛包上皮腫 (n=1)、膀胱移行上皮癌 (n=1)、肺腺扁平上皮癌 (n=1) である (Table 1)。ネコにおいては、乳腺管状乳頭状癌 (n=4)、歯肉扁平上皮癌 (n=2)、眼瞼扁平上皮癌 (n=1)、未

分化癌 (n=1)、直腸腺癌 (n=1) である。

1-2. 試薬

免疫細胞化学 (immunocytochemistry; ICC) は、細胞診標本においては蛍光標識二次抗体を用いた多重蛍光抗体法 (multiple fluorescent immunocytochemistry; MFICC) により行った。一次抗体には、抗ヒト E-カドヘリン・マウスモノクローナル抗体 (clone 36, diluted at 1:100; BD Biosciences, NJ, USA) および抗ヒトビメンチン・ウサギモノクローナル抗体 (clone SP20, diluted at 1:200; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) を使用した。二次抗体には、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 血清 (diluted at 1:500, Life Technologies, Paisley, UK) および Alexa Fluor 594 標識ロバ抗ウサギ IgG (H+L) 血清 (diluted at 1:500, Life Technologies) を使用した。抗体は、0.25%カゼインを含む 10mM PBS により希釈した。0.25%カゼイン/PBS 溶液はブロッキング液としても使用した。核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Dojinkagaku, Tokyo, Japan) を使用した。陰性コントロール試験には、一次抗体の代わりに正常マウス IgG (Sant Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) と正常ラビット IgG (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) をそれぞれ使用した。免疫染色を施した細胞診標本は蛍光顕微鏡 (BX-53; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

組織標本を用いた免疫組織化学（immunohistochemistry; IHC）においては、一次抗体は細胞診標本の抗体と同じものを使用した。二次抗体には、ペルオキシダーゼ標識ユニバーサル抗体（anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG, ready to use; Simple Stain MAX PO, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan）を使用した。一次抗体は、0.25%カゼインを含む 10mM PBS により希釈した。0.25%カゼイン/PBS 溶液はブロッキング液としても使用した。発色には DAB（DAB-buffer tablet; Merck, Darmstadt, Germany）を使用した。核染色にはマイヤーのヘマトキシリン液を使用した。陰性コントロール試験には、一次抗体の代わりに正常マウス IgG（Sant Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA）と正常ラビット IgG（Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA）をそれぞれ使用した。

1-3. 多重蛍光抗体法（Table 2）

細胞診標本を用いた MFICC のプロトコルは以下の通りである。

- 1) ドライヤーによる風乾（冷風）
- 2) アセトン固定（4°C、1 分間）
- 3) PBS で洗浄（洗浄ボトルによる直接噴射、10 秒間）
- 4) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング（室温、5-10 分間）

- 5) 一次抗体の混合液でインキュベート：抗 E-カドヘリン抗体（100 倍）と抗ビメンチン抗体（200 倍）を 0.25%カゼイン/PBS で混合希釈（37°C、10 分間）
- 6) PBS で洗浄（約 10 秒）
- 7) 二次抗体と DAPI の混合液でインキュベート：抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体および DAPI を各々 500 倍で 0.25%カゼイン/PBS で混合希釈（37°C、遮光、15 分間）
- 8) PBS で洗浄（約 10 秒）
- 9) 封入（Fuluoro Mount Plus, Diagnostic Biosystems, Delhi, India）

1-4. 免疫組織化学

組織標本に用いた IHC のプロトコルは以下の通りである。

- 1) 脱パラフィンおよび再水和
- 2) マイクロウェーブによる抗原賦活化処理：抗原賦活化液には 10mM クエン酸緩衝液（pH6.0）を用いた。マイクロウェーブ照射（750W）には家庭用電子レンジ（NE-5350F; National, Osaka, Japan）を使用した。予加熱 5 分間で緩衝液を沸騰させ、スライドグラスを投入してマイクロウェーブ照射を 10 分間行った。照射後は、室温で 20 分間静置した。

- 3) 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化（室温、30 分間）
- 4) PBS で洗浄（5 分間×3 回）
- 5) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング（室温、60 分間）
- 6) 一次抗体でインキュベート（4°C、over night）：抗 E-カドヘリン抗体は 100 倍希釈、抗
ビメンチン抗体は 200 倍希釈
- 7) PBS で洗浄（5 分間×3 回）
- 8) 0.25%カゼイン/PBS でブロッキング（室温、60 分間）
- 9) 二次抗体でインキュベート（室温、30 分間）
- 10) PBS で洗浄（5 分間×3 回）
- 11) DAB による発色（1ml につき 3 μ l の 3%過酸化水素水を混和、室温、5 分間）
- 12) 冷却蒸留水による反応停止
- 13) マイヤーのヘマトキシリン液で核染色
- 14) 水洗
- 15) アルコール系列で脱水
- 16) キシレンで透徹
- 17) 封入

1-5. 多重蛍光抗体法の評価と解析

本研究では、上皮系腫瘍細胞における E-カドヘリンの減弱およびビメンチンの発現を上皮間葉転換と定義した。細胞診標本での E-カドヘリンの減弱は、同じスライド上の腫瘍細胞と比較することで評価した。ビメンチンの発現については、同じスライド内の非悪性間葉系細胞を陽性コントロール細胞として使用した。スライドに非悪性間葉系細胞が観察されなかった場合には、同じスライド上に存在するマクロファージを陽性コントロール細胞として使用した。これらの内部陽性コントロール細胞に加えて、免疫反応陽性シグナルは、同じ組織から採取した陰性コントロール標本との比較によって決定した。また、MFICC および IHC における染色結果を比較した。さらに、MFICC および IHC の染色結果の一致性、感度および特異度を算出した。加えて、細胞診標本での上皮間葉転換の発現と転移との関連性をフィッシャーの正確確率検定により統計学的に評価した。統計学的解析には、PASW software (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA)を使用した。

1-6. 多重蛍光抗体法の後のギムザ染色

蛍光顕微鏡による観察後の細胞診標本は、PBS に浸漬してカバーガラスを外して封入剤を洗浄した後にギムザ染色（メイ・グリュンワルド-ギムザ染色）を施した。

結 果

IHC を施した組織標本上では上皮間葉転換を示した場合、上皮系腫瘍細胞は、E-カドヘリンに対して低い膜性免疫反応性を示し、ビメンチンに対して明確な陽性シグナルを示す。本章では、IHC を施した組織標本上で腫瘍細胞における E-カドヘリンへの免疫反応の減弱およびビメンチンに対する陽性シグナルの発現を認めた場合には上皮間葉転換を発現していると判断した。

MFICC を施した細胞診標本上では、通常上皮系細胞は上皮系マーカーである E-カドヘリンに対して陽性を示すため緑色蛍光の細胞が観察できる。一方で、上皮系細胞が上皮間葉転換を発現した場合には、細胞診標本上では E-カドヘリンは減弱し間葉系マーカーであるビメンチンに陽性を示すため赤色蛍光の腫瘍細胞が観察できる。本章では、細胞診標本上で上皮系腫瘍細胞が E-カドヘリンに対して陽性つまり緑色蛍光の細胞のみ観察された場合には上皮間葉転換を起こしていないと判断した。標本上で、上皮系腫瘍細胞において E-カドヘリンの減弱およびビメンチンの発現つまり赤色蛍光の細胞が観察された場合には上皮間葉転換を発現していると判断した。

31 症例、全ての症例において、MFICC および IHC の両方で E-カドヘリンおよびビメン

チンの免疫シグナルの強度は十分であり、非特異反応やバックグラウンドもほとんど認められなかった。また、IHC および MFICC 標本における免疫染色の結果、その一致性および症例の転移の有無を Table 1 にまとめた。

IHC の結果では、31 例中 16 例 (51.6%) で E-カドヘリンの減弱およびビメンチンの発現を特徴とする上皮間葉転換が観察された (Figs. 1&2)。上皮間葉転換を示した症例のうち、イヌは 8 症例であった。これは、イヌの全症例の 36.4% (8/22) が上皮間葉転換を示したことを意味する。また、ネコにおいて 8 症例が上皮間葉転換に陽性を示した。これは、ネコの全症例の 88.9% (8/9) が上皮間葉転換を示したことを意味する。イヌの扁桃扁平上皮癌の症例では、IHC 標本上において上皮系腫瘍細胞は、E-カドヘリンに対して低い膜性免疫反応性を示し、さらにビメンチンに対しては明確な陽性シグナルを示した (Fig. 1A&B)。また、MFICC 標本においても赤色のビメンチン陽性を示す腫瘍細胞が多数観察され、緑色の E-カドヘリン陽性を示す腫瘍細胞はほとんど認められなかった (Fig. 1C)。ネコの乳腺管状乳頭状癌の症例でも同様に IHC 標本において、腫瘍細胞における E-カドヘリンの減弱およびビメンチンの強発現が観察された。MFICC 標本においても赤色発光したビメンチンに陽性の腫瘍細胞が主体であり、緑色発光した E-カドヘリン陽性の腫瘍細胞はほとんど認められなかった (Fig. 2C)。

上皮間葉転換を示さなかった症例では、IHC および MFICC の両方で腫瘍細胞は E-カドヘリンに対して明瞭な陽性の免疫反応性を示したが、ビメンチンに対しては陰性の免疫反応性を示した。イヌの乳腺混合良性腫瘍の症例では、IHC 標本では E-カドヘリンのみ明確な陽性シグナルを確認できた (Fig. 3A&B)。これは MFICC 標本においても同様の所見を呈し、E-カドヘリン陽性の緑色蛍光した腫瘍細胞が多数観察され、ビメンチン陽性の腫瘍細胞は認められなかった (Fig. 3C)。

イヌの 3 症例 (乳腺管状乳頭状癌、甲状腺濾胞腺腫、肺腺扁平上皮癌) において、MFICC の結果は、IHC の結果と一致しなかった (Table 1) (Fig. 4)。いずれの症例も IHC 標本においては、E-カドヘリンに対して低い膜性免疫反応性を示し、ビメンチンに対しては明確な陽性シグナルを示していたため上皮間葉転換の発現と判定した。しかし、MFICC 標本上においては、E-カドヘリン陽性の緑色蛍光した腫瘍細胞のみ観察され、ビメンチンの発現を示す赤色発光の腫瘍細胞は認められなかった。ネコでは、全ての症例において IHC および MFICC の結果の一致が認められた。

上皮間葉転換を検出するための MFICC の感度および特異度は、MFICC の結果を IHC の結果と比較することによって統計的に計算した。MFICC を用いた上皮間葉転換の検出の感度を解析したところ、全症例においては 81.2%、イヌにおいては 62.5%、ネコにおいては

100%の感度だった。また、MFICC を用いた上皮間葉転換の検出の特異度を解析したところ、全症例、イヌ、ネコにおける特異度はいずれも 100%だった。一方、細胞診標本での上皮間葉転換の発現と転移との関連性をフィッシャーの正確確率検定により統計学的に評価したところ、全症例、イヌ、ネコにおける転移と上皮間葉転換の間にはいずれも有意差は認められなかった (Table 3)。

MFICC を行った後の細胞診標本にギムザ染色を施した。その結果、通常のギムザ染色標本と比較するとやや核が濃縮される傾向が認められるものの、細胞形態の観察に十分な染色性を得ることができた (Fig. 5)。

考 察

本章では、E-カドヘリンとビメンチンに対する MFICC を開発し、イヌとネコの上皮系腫瘍から採取した細胞診標本を用いて上皮間葉転換の発現を評価した。その結果、イヌおよびネコの上皮系腫瘍細胞における上皮間葉転換を 31 症例中 28 例で評価できることを示した。

しかし、イヌの 3 症例（乳腺管状乳頭状癌、甲状腺濾胞腺腫、肺腺扁平上皮癌）においては IHC における結果と一致せず、MFICC では上皮間葉転換の検出ができなかった。これらの症例では、IHC では、E-カドヘリンの減弱およびビメンチンの陽性シグナルを観察することができたが、MFICC では腫瘍細胞は E-カドヘリンに対してのみ陽性シグナルを示して、ビメンチンに対する免疫シグナルを検出することができなかった。細胞診塗抹標本で観察できる細胞の数は、通常、病理組織学的標本における細胞数と比較すると非常に少なく、腫瘍組織の全ての変化を細胞診塗抹標本に反映されているとは限らない。IHC では、これら 3 症例は腫瘍細胞において散在したビメンチンの発現を示しており、評価できる細胞の量が MFICC 標本におけるビメンチンの検出に影響を与えた可能性があると考えられた。

良性上皮系腫瘍と診断されたイヌの 2 症例（乳腺腺腫、甲状腺濾胞腺腫）においても上皮間葉転換の発現が認められた。上皮間葉転換は、炎症、線維症、創傷治癒などの悪性腫瘍と

関連しない組織病変でも発現すると報告されており[50]、本章ではこれらの病変を伴うサンプルは分析から除外していた。さらに、CBCの白血球数およびCRPの血漿中濃度は正常範囲内であったため、これら2症例では全身性炎症による上皮間葉転換の発現の可能性は低いと考えられた。近年、上皮間葉転換は、単純に細胞の形態や移動能に影響を与えるだけでなく、上皮間葉転換活性化転写因子によって良性腫瘍から悪性へと形質転換が誘導されることも示唆されているため[3]、本章での良性腫瘍における上皮間葉転換についても悪性腫瘍への転化に関連した発現である可能性が考えられた。

ネコでは、IHCで上皮間葉転換を示した全症例で、MFICCにおいても同様に上皮間葉転換を検出することができた。上皮間葉転換の発現はイヌよりもネコにおいて多く認められているが、これは症例数が少ないことと腫瘍の種類の違いが原因である可能性がある。すなわち、ネコでは調査に用いた全9症例のうち4症例が悪性乳腺腫瘍、3症例が扁平上皮癌（2症例が口腔発生、1症例が耳介発生）であり、浸潤・転移を生じ易く臨床的挙動が悪いとされる腫瘍が調査した症例の7割以上を占めている。これらの悪性腫瘍と上皮間葉転換について十分な検討がなされている訳ではないが、上皮間葉転換が癌の浸潤・転移の固形癌固有のプロセスであると考えると浸潤・転移を一般的に起こしやすい腫瘍については、上皮間葉転換も同時に発現しやすい傾向を持っている可能性があり、本章で検索したネコの症例に

においては、そのような症例が多く調査に含まれたことが可能性として考えられる。転移が認められたにも関わらず、上皮間葉転換が IHC と MFICC いずれにおいても観察されなかった症例が 1 例（腸腺癌）認められたが、上皮間葉転換の発現は腫瘍の種類によって異なる可能性があるため今後症例を蓄積して更なる検討を行う必要があると考えた。

本章で行った統計解析では、イヌおよびネコのいずれも上皮間葉転換と転移の間に密接な関連があることは示されなかった。一般的には、上皮間葉転換は悪性腫瘍性組織における分子病理学的イベントと考えられているが[23]、前述したように上皮系腫瘍における上皮間葉転換は良性腫瘍から悪性腫瘍への移行などの他の分子病理学的イベントである可能性も考えられる。本章では、上皮系腫瘍という広い分類で解析を行い、腫瘍の種類ごとの症例数は少ない例数であったことを考慮すると、一概に上皮間葉転換と転移は関係ないと述べることはできない。上皮間葉転換の発現は動物腫や腫瘍の種類によって異なる可能性があるため、今後腫瘍ごとに症例を集積しプロスペクティブな解析を行うことで再検討したい。

本章では、免疫細胞化学を用いて細胞診標本における上皮間葉転換の検出を行った。免疫細胞化学は、抗体を用いて細胞内の抗原を検出する方法であり、酵素あるいは蛍光物質を標識した二次抗体を使用することで、対象となる標的の局在を視覚化することができる[39, 40, 42]。本研究では、蛍光物質を使用した蛍光抗体法を用いて上皮間葉転換の発現を視覚化し

た。酵素を使用した酵素抗体法では、特別な装置なしで対象となる標的を視覚化できることが利点であるが、細胞診標本における上皮間葉転換の評価にはいくつかの制限があると考えられる。それは、まず上皮系腫瘍細胞における E-カドヘリンの減弱とビメンチンの発現が上皮間葉転換の特徴として定義されているが[34]、酵素抗体法では通常 1 枚のスライドで 1 つの抗原しか検出できないため、E-カドヘリンとビメンチンの染色、およびギムザ染色の一般的な所見を観察するには少なくとも 3 枚のスライドが必要となる。さらに、従来の酵素抗体法では通常、免疫反応はジアミノベンジジンとの反応によって暗褐色の陽性シグナルとして着色されるため細胞形態の判別が難しく、さらに陽性シグナルを示した細胞が真に腫瘍細胞であるのかの判断が難しい。以上のことから酵素抗体法で上皮間葉転換を評価することは困難であると考えられた。一方、これらの酵素抗体法による免疫細胞化学のデメリットは、多重蛍光抗体法によって払拭することができる。多重蛍光抗体法では、異なる動物種で作成した一次抗体を組み合わせることによって複数のマーカーを同時に検出することができる。1 枚の細胞診塗抹標本で 2 つの抗原の同時検出を可能にした MFICC は、獣医学領域において Sawa ら (Sawa et al. 2015, Sawa et al. 2018) によって T 細胞性リンパ球マーカーである CD3 と B 細胞性リンパ球マーカーである CD79 の鑑別[42]および上皮系あるいは間葉系腫瘍細胞の由来の特定のためにサイトケラチンとビメンチン[40]を検出する手法が

試みられており、MFICC の感度と特異性は酵素抗体法よりも優れていたと報告されている [40]。また、蛍光抗体法も酵素抗体法と同様に細胞形態の観察は不得意であるが、本法の利点として MFICC 後のロマノフスキー染色も可能であり、免疫染色後に対象の細胞形態を再確認することが可能である。例えば、免疫染色でビメンチン陽性細胞が観察されてもそれが腫瘍細胞なのかマクロファージなのかを鑑別することはできない。このような場合、同一の標本に免疫染色とギムザ染色を施すことができればより確実な診断が可能になる。理想的なのはギムザ染色の後に免疫染色を施すことであるが、それは酵素抗体法、多重蛍光抗体法のいずれにおいても不可能であったと報告されている [40]。しかしながら、本章において MFICC の後にギムザ染色を施すと、やや染色の質は低下するものの一般的な細胞形態の観察には十分なギムザ染色標本作製することが可能であることが判明した。これは、Sawa ら (Sawa et al. 2018) によって、サイトケラチンおよびビメンチンを用いた MFICC においても同様に、染色可能であったことが報告されており [40]、MFICC 後のギムザ染色は抗体を選ばず可能であると考えられる。これは MFICC の特筆すべき利点の一つである。特に腫瘍細胞と炎症細胞が混在する標本、腫瘍細胞の脱落が少ない標本、あるいは複数種類の腫瘍細胞が混在する標本では免疫染色後に行うギムザ染色により腫瘍細胞の鑑別に重要な判断材料が得られると考えられる。

上皮間葉転換は、医学領域では癌細胞の浸潤・転移に関与しており、腫瘍内の上皮間葉転換の有無が予後因子や治療抵抗性と関連していることが報告されている[45, 47]。上皮間葉転換を標的とした治療も着目されており、上皮間葉転換の誘導を阻害して細胞の上皮性を維持することが癌治療につながると考えられている。例えば、肺癌においては上皮間葉転換を抑制することで癌の悪性を減弱させ治療抵抗性を克服できる可能性も報告されている[11, 22]。獣医学領域では、医学領域と比較すると上皮間葉転換についてまだ十分には解析されていないが、イヌの前立腺癌および乳癌の転移との関連性や[10, 33]、イヌとネコの口腔扁平上皮癌において腫瘍の臨床的挙動への関連性が報告されている[14, 27]。また、イヌの乳腺腫瘍において *in vitro* ではあるが抗マラリア薬として知られるジヒドロアルテミシニンが上皮間葉転換関連遺伝子の発現を調節して癌細胞の遊走・浸潤を抑制したとの報告もある[7]。本章では、上皮間葉転換と癌の転移に明らかな統計学的関連性を見いだすことはできなかったが、上皮間葉転換の発現は動物種や腫瘍の種類によって異なる可能性があるため本研究のみで上皮間葉転換と腫瘍の浸潤・転移との関連性を判断するのは難しいと考えられた。上記に記載したように、上皮間葉転換は獣医学領域においても癌の浸潤・転移との関連性が示唆されているため、今後がん治療における新たなターゲットになり得ると考えられる。また、癌細胞の周辺には、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast; CAF)

や癌関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM)、血管細胞などの様々な細胞が存在して、癌が育つための癌微小環境を形成している。上皮間葉転換には癌微小環境における CAF や TAM、トランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β ; TGF- β) や線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factors; FGFs)、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) などといった様々な因子が関与するとされている[36, 45, 46, 57]。今後上皮間葉転換の発現に加えてこれらの癌周囲微小環境の解析を同時に行うことで伴侶動物の腫瘍性疾患における新規の診断および治療法の開発につながる可能性が期待できる。

結論として、本章で確立した MFICC によって一般的な乾燥塗抹標本から上皮間葉転換を検出できることが実証された。本法は上皮間葉転換の検出に高い感度と特異度を示した。一方、上皮間葉転換の出現と悪性上皮系腫瘍における関連性を示すことはできなかった。転移性あるいは浸潤性マーカーとしての上皮間葉転換の重要性は腫瘍の種類あるいは動物種によって異なる可能性が考えられた。本章では症例数に限りがあったが今後さらなる症例の集積を行い、腫瘍の種類および動物種ごとの検証を行うべきだろう。また、本章で確立した MFICC は、イヌとネコの悪性上皮系腫瘍性疾患における上皮間葉転換の臨床的および診断的重要性を調査するためのプロスペクティブ研究にも有用であると考えられる。今後、細胞診をより高度な診断法と発展させていくために、本法がイヌとネコの悪性上皮系腫瘍にお

ける浸潤・転移に対する非侵襲的なマーカーとして広く活用されることを期待したい。

小 括

上皮系細胞が間葉系の形質を獲得する現象である上皮間葉転換は、上皮系悪性腫瘍の浸潤および転移の過程において重要な役割を果たすと考えられている。伴侶動物において細胞診は腫瘍性疾患における重要な診断ツールのひとつであるが、細胞診では腫瘍の良性悪性のある程度予測できても腫瘍の浸潤・転移の予測をすることは困難である。本研究では、免疫細胞化学（immunocytochemistry; ICC）を用いて一般的な細胞診塗抹標本から上皮間葉転換を検出するための多重蛍光抗体法（multiple fluorescent ICC; MFICC）の開発を行い、組織標本における免疫組織化学（immunohistochemistry; IHC）の結果と比較・検討を行った。

鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院で、外科的に摘出されたイヌ（n = 22）およびネコ（n = 9）から得た上皮系腫瘍組織より細胞診標本を作製した。採取した塗抹標本は速やかに風乾し、使用するまでは-30°Cで凍結保存した。標本作製後の腫瘍組織は速やかに病理組織学的検査に供された。本研究では、上皮間葉転換の上皮系マーカーとして E-カドヘリン、間葉系マーカーとしてビメンチンを検出のターゲットとした。マウスモノクローナル抗 E-カドヘリンおよびウサギモノクローナル抗ビメンチン抗体を使用して ICC および IHC を行った。ICC は MFICC を用いた。IHC は標準的な方法で行った。結果として、IHC では、症

例の 51.6% (イヌでは 8/22、ネコでは 8/9) が上皮間葉転換を示した。FICC はイヌでは組織標本で上皮間葉転換を認めた症例の 62.5% (5/8) で上皮間葉転換を検出できた。ネコでは、MFICC は症例の 100% (8/8) で上皮間葉転換を検出できた。組織標本と比較して細胞診標本における上皮間葉転換の検出は高い感度、特異度を示した。一方、細胞診標本での上皮間葉転換の発現と転移との関連性をフィッシャーの正確確率検定により統計学的に評価したが有意な関連性は認められなかった。

結論として、本章では一枚の細胞診塗抹標本から上皮間葉転換を検出できる MFICC を開発することができた。上皮間葉転換と転移の間に明らかな統計学的関連性は認められなかったが、この点については腫瘍の種類や動物種の違いによって今後更なる解析が必要になると考えられた。細胞診標本によって上皮間葉転換を検出できる本法の臨床的な実用性および有用性は高いと考えられ、イヌとネコの悪性上皮系腫瘍疾患における臨床的挙動を予測する強力な診断ツールとして活用できることを期待したい。

図および表

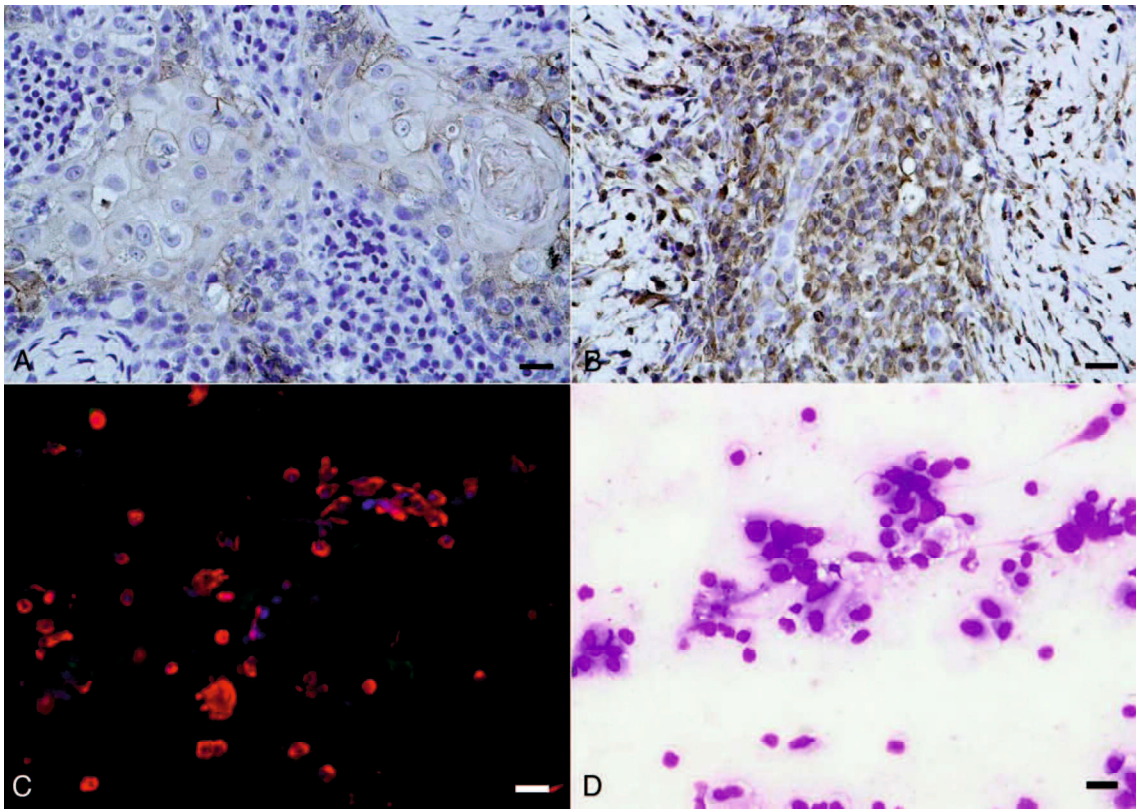


Fig. 1. Detection of the E-cadherin and vimentin in a squamous cell carcinoma of the tonsil from a dog. (A) Detection of E-cadherin by immunohistochemistry (IHC). (B) Detection of vimentin by IHC. (C) Simultaneous detection of E-cadherin (green signals) and vimentin (red signals) by multiple fluorescent immunocytochemistry (MFICC). (D) A standard Giemsa stain. Attenuation of the signals for E-cadherin and the distinct positive staining for vimentin in the tumor cells are observed in both IHC and MFICC. In IHC panels: Diaminobenzidine chromogen, hematoxylin counterstain. In MFICC panels: E-cadherin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bars = 20 μ m.

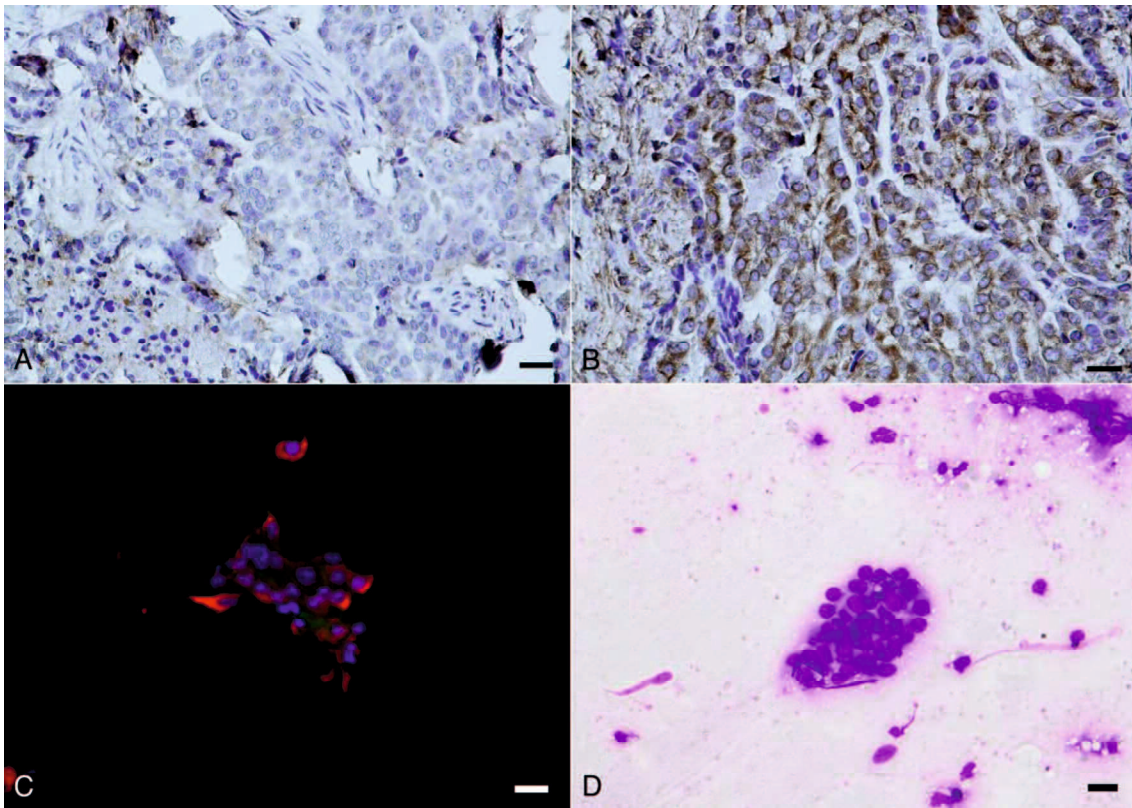


Fig. 2. Detection of E-cadherin and vimentin in tubulopapillary carcinoma of a mammary gland from a cat. **(A)** Detection of E-cadherin by IHC. **(B)** Detection of vimentin by IHC. **(C)** Simultaneous detection of E-cadherin (green signals) and vimentin (red signals) by MFICC. **(D)** A standard Giemsa stain. Attenuation of the signals for E-cadherin and the positive signals for vimentin in the tumor cells are observed in both IHC and MFICC. In IHC panels: Diaminobenzidine chromogen, hematoxylin counterstain. In MFICC panels: E-cadherin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue.

Bars = 20 µm.

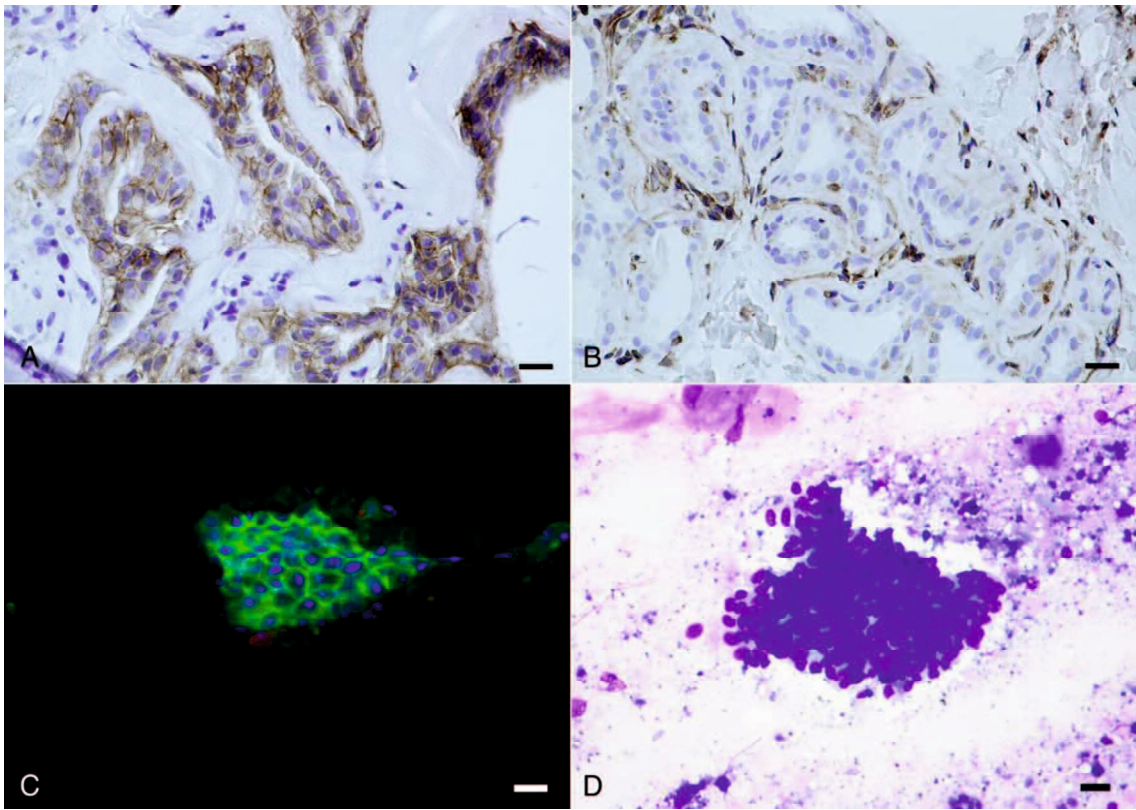


Fig. 3. Detection of E-cadherin and vimentin in benign mixed tumor of a mammary gland from a dog.

(A) Detection of E-cadherin by IHC. (B) Detection of vimentin by IHC. (C) Simultaneous detection of E-cadherin (green signals) and vimentin (red signals) by MFICC. (D) A standard Giemsa stain.

Epithelial tumor cells show positive signals for E-cadherin and negative signals for vimentin, and mesenchymal cells show positive signals for E-cadherin and negative signals for vimentin. These findings are similar in both IHC and MFICC. In IHC panels: Diaminobenzidine chromogen, hematoxylin counterstain. In MFICC panels: E-cadherin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue. Bars = 20 μ m.

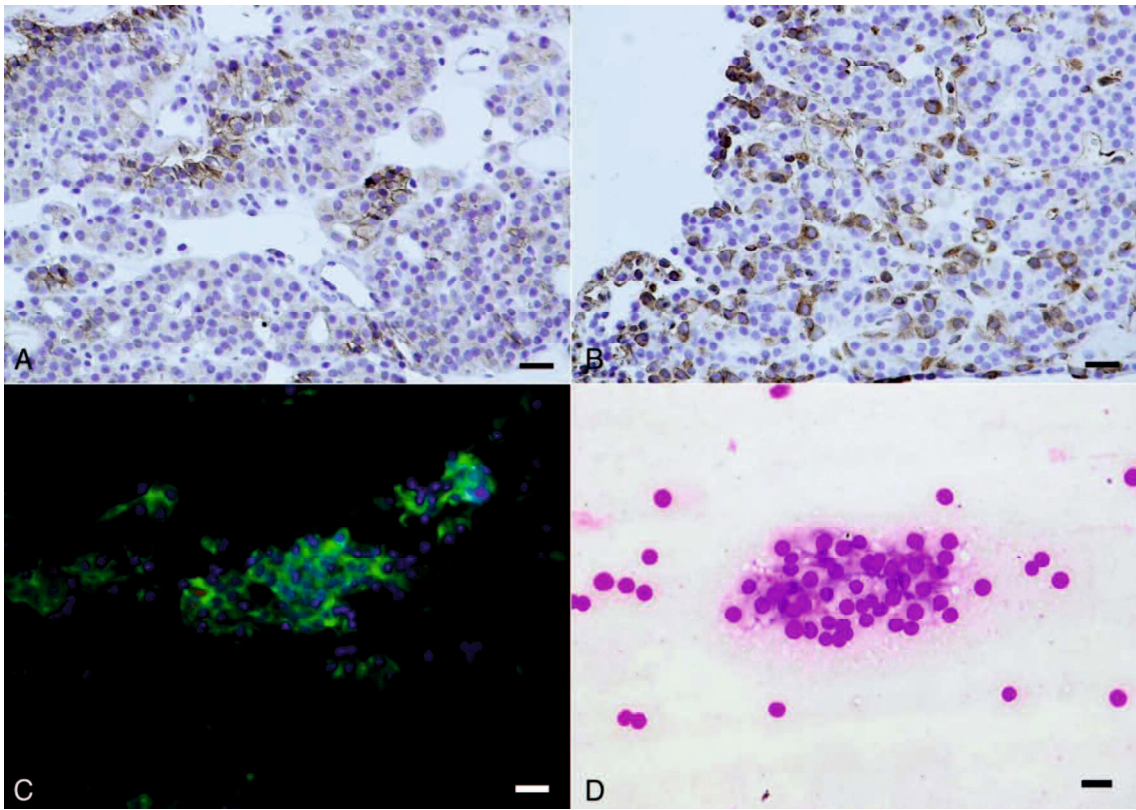


Fig. 4. Detection of E-cadherin and vimentin in follicular adenoma of the thyroid gland from a dog.

(A) Detection of E-cadherin by IHC. (B) Detection of vimentin by IHC. (C) Simultaneous detection of E-cadherin (green signals) and vimentin (red signals) by MFICC. (D) A standard Giemsa stain.

Attenuation of the signals for E-cadherin in the tumor cells are observed in both IHC and MFICC. In the detection of the vimentin, positive signals are sporadically observed in the tumor cells in IHC, but no signals are observed in MFICC. In IHC panels: Diaminobenzidine chromogen, hematoxylin counterstain. In MFICC panels: E-cadherin-Alexa 488, green; vimentin-Alexa 594, red; DAPI, blue.

Bars = 20 μ m.

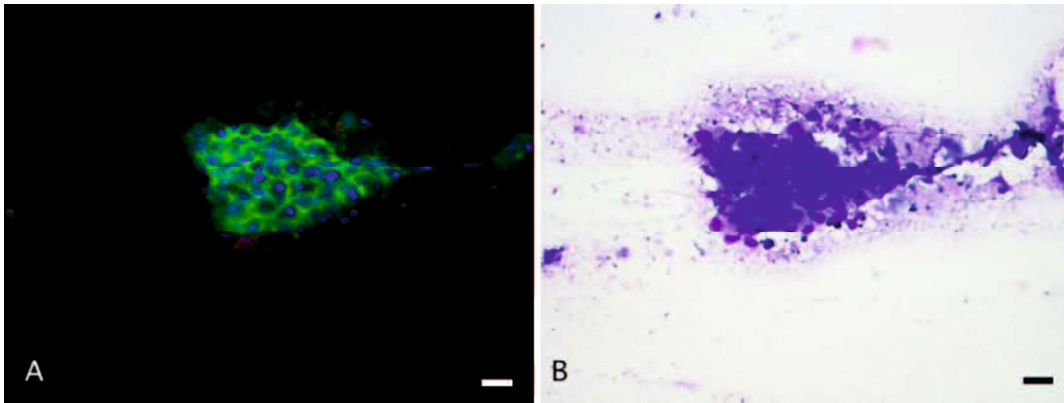


Fig. 5. Benign mixed tumor of a mammary gland from a dog (Fig. 4C). (A) Simultaneous detection of E-cadherin (green signals) and vimentin (red signals) by MFICC. (B) A standard Giemsa stain after MFICC. Bars = 20 μm .

Table 1. Findings of the all cases examined by IHC and MFICC.

Sites/speies	Histopathological diagnosis	IHC		FICC		Agreement	Metastasis
		E-cad	Vim	E-cad	Vim		
Mammary gland/dog	Tubulopapillary carcinoma	At	Posi	non-At	Nega	×	non-Me
Mammary gland/dog	Tubulopapillary carcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Mammary gland/dog	Benign mixed tumor	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Mammary gland/dog	Benign mixed tumor	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Mammary gland/dog	Complex adenoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Mammary gland/dog	Simple adenoma	At	Posi	At	Posi	○	non-Me
Mammary gland/dog	Lipid-rich carcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Gingiva/dog	Squamous cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	non-Me
Gingiva/dog	Squamous cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Tonsil/dog	Squamous cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Rectum/dog	Adenocarcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Rectum/dog	Adenocarcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Rectum/dog	Adenocarcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Thyroid gland/dog	Follicular adenoma	At	Posi	non-At	Nega	×	non-Me
Thyroid gland/dog	Follicular carcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Perianal/dog	Perianal gland adenoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Perianal/dog	Perianal gland adenoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Perianal/dog	Anal sac adenocarcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	Me
Liver/dog	Hepatocellular carcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Trunk/dog	Trichoepithelioma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	non-Me
Bladder/dog	Transitional cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	non-Me
Lung/dog	Adenosquamous carcinoma	At	Posi	At	Nega	×	Me
Mammary gland/cat	Tubulopapillary carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Mammary gland/cat	Tubulopapillary carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Mammary gland/cat	Tubulopapillary carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Mammary gland/cat	Tubulopapillary carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Gingiva/cat	Squamous cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	non-Me
Gingiva/cat	Squamous cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Eyelid/cat	Squamous cell carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	non-Me
Perineum/cat	Undifferentiated carcinoma	At	Posi	At	Posi	○	Me
Rectum/cat	Adenocarcinoma	non-At	Nega	non-At	Nega	○	Me

E-cad: E-cadherin, Vim: vimentin, At: attenuation of the E-cadherin, Posi: positive signals, Nega: negative signals, Ag: agreement, Me: metastasis

Table 2. Procedure of MFICC

- 1 Air-drying with cold air
 - 2 Fixation with cold acetone for 1 min
 - 3 Washing with PBS for 10 sec with direct stream from a bottle
 - 4 Blocking with 0.25% casein/PBS for 5-10 min at room temperature
 - 5 Incubation with primary antibodies for 15 min at 37°C
 - 6 Washing with PBS for 10 sec with direct stream from a bottle
 - 7 Incubation with secondary antibodies and DAPI for 15 min at 37°C
 - 8 Washing with PBS for 10 sec with direct stream from a bottle
 - 9 Coverslip with mounting medium
-

Table 3. Relationships between EMT and metastasis in the malignant cases.

IHC				MEICC			
Dogs & cats	EMT	Non-EMT	Total	Dogs & cats	EMT	Non-EMT	Total
Metastasis	9	2	11	Metastasis	8	3	11
Non-metastasis	5	7	12	Non-metastasis	4	7	11
Total	14	9	23	Total	13	10	22
Fisher's exact test NS				Fisher's exact test NS			
Dogs	EMT	Non-EMT	Total	Dogs	EMT	Non-EMT	Total
Metastasis	3	1	4	Metastasis	2	2	4
Non-metastasis	3	7	10	Non-metastasis	2	8	10
Total	6	8	14	Total	4	10	14
Fisher's exact test NS				Fisher's exact test NS			
Cats	EMT	Non-EMT	Total	Cats	EMT	Non-EMT	Total
Metastasis	6	1	7	Metastasis	6	1	7
Non-metastasis	2	0	2	Non-metastasis	2	0	2
Total	8	1	9	Total	8	1	9
Fisher's exact test NS				Fisher's exact test NS			

EMT: epithelial-methenchymal transision determined by attenuation of E-cadherin and expression of vimentin, NS: not significant ($P < 0.05$)

総括

細胞診は、獣医学領域において簡便かつ非侵襲的に行うことができることから、重要な診断ツールのひとつである。近年、伴侶動物の高齢化に伴い腫瘍性疾患の発症が増加しているが高齢動物は全身麻酔や試験開腹などの侵襲的な検査に対してリスクを伴う。非侵襲的に行うことができる細胞診は腫瘍性疾患のスクリーニング検査として欠くことのできない臨床検査であり、今後その需要はますます高まると考えられる。獣医学領域の細胞診は一般的に乾燥塗抹標本のロマノフスキー染色（ライト・ギムザ染色あるいはメイ・グリュンワルド-ギムザ染色あるいは簡易ギムザ染色）を用いた細胞形態の観察が主流である。臨床の現場で日常的に行われている検査法であるが、正しい診断ができるまでにはある程度の経験が必要であり、その診断はしばしば主観的になりやすい。また、細胞診はある程度の腫瘍の良悪性の判定はできても細胞の由来や浸潤・転移の予測は困難である。非侵襲的な検査法で病気の確定診断を求めることは獣医療の高度化のために必要であり、実用的な診断手法の開発は必須である。獣医学領域において非侵襲的検査として必要不可欠な診断ツールである細胞診の診断精度をより向上するためには、客観的な評価および腫瘍性疾患の予後予測が可能な検査法の確立が必要である。そこで本研究では、伴侶動物における細胞診の診断精

度向上のための新規検査法の開発を行った。

第 1 章では、腫瘍の良性悪性の判定や予後予測に有用な Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) 染色について、イヌとネコの細胞診に応用するために様々な設定で検討を行った。第 2 章では、イヌとネコの上皮系腫瘍における上皮間葉転換の発現を一般的な乾燥塗抹標本から検出するための多重蛍光抗体法 (multiple fluorescent immunocytochemistry ; MFICC) を開発し、その臨床応用性を検討した。

第 1 章では、乾燥塗抹標本での有用性が報告されている AgNOR 染色を伴侶動物の細胞診に応用するために、ロマノフスキー染色を併用した対比染色法、最適な固定法および長期保存標本への応用の検討を行った。その結果、AgNOR 染色後にメイ・グリュンワルド染色を短時間施す対比染色法が最も AgNOR スポットおよび細胞形態を明瞭に観察できた。また、本研究で使用した全ての固定液で AgNOR 染色が可能であることが判明した。さらに、未固定の凍結保存標本であれば少なくとも 3 年間は AgNOR 染色の染色性が維持されることが分かった。本法は、固定液を選ばないことより免疫細胞化学との併用が可能であり、さらには長期保存標本への染色が可能であることからレトロスペクティブ解析への利用も可能である。本研究は、伴侶動物の細胞診における腫瘍性疾患の臨床的挙動を予測するための診断ツールとなることが期待される。

第2章では、悪性上皮系腫瘍の浸潤・転移に重要な役割を果たす上皮間葉転換を伴侶動物で用いられる一般的な乾燥塗抹標本において検出する MFICC を開発した。上皮間葉転換とは、上皮系細胞が間葉系の形質を獲得する現象である。本研究では、上皮間葉転換の上皮系マーカーとして E-カドヘリン、間葉系マーカーとしてビメンチンを検出のターゲットとした。結果として、1枚の細胞診標本上で上皮間葉転換を検出できる診断法を確立することができた。本法を臨床症例に適用し、免疫組織化学との比較や転移との関連性を解析した結果、本法は上皮間葉転換の検出に高い感度と特異度を示した。一方、転移との明らかな関連性は認められなかったが、上皮間葉転換は腫瘍の種類や動物種によって発現が異なる可能性があるため、今後さらなる症例の集積を行い、本法が細胞診で腫瘍の浸潤・転移を予測できる強力な診断ツールとして活用できることを期待したい。

以上、本研究では伴侶動物における細胞診の診断精度向上のための新規検査法の開発を目的として、AgNOR 染色および上皮間葉転換を検出する MFICC の開発とその有用性について検討を行った。両法はいずれも腫瘍の悪性度、浸潤・転移など腫瘍性疾患の臨床的挙動を客観的に評価できる非侵襲的で実用性の高い診断ツールになり得ると考えている。本研究は伴侶動物の腫瘍細胞診の高度化に貢献するものであり、今後さらに多くの診断マーカーを用いた非侵襲的かつ腫瘍の診断・治療に有用な細胞診検査法を開発していきたい。

謝辞

本研究の遂行し本稿を終えるにあたり、終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座臨床病理学および附属動物病院 矢吹 映 教授に深く感謝をいたします。また、本研究を遂行するにあたり、多くの御助言を下さいました鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座臨床病理学 大和 修 教授に深謝いたします。鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院 高橋 雅 准教授には多くの御指導を頂き心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くの助言を頂き、助力を惜しまれなかった島 真理子さん、水上圭二郎さんを始めとする鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座臨床病理学研究室の皆様および附属動物病院の皆様に心から感謝いたします。

最後に本研究を支えた多くの動物達に哀悼の意を表し、深く感謝いたします。

参考文献

1. Bauer, N. B., Zervos, D. and Moritz, A. 2007. Argyrophilic Nucleolar Organizing Regions and Ki67 Equally Reflect Proliferation in Fine Needle Aspirates of Normal, Hyperplastic, Inflamed, and Neoplastic Canine Lymph Nodes (n = 101). *J. Vet. Intern. Med.* **21**: 928–935.
2. Berx, G. and van Roy, F. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**: a003129.
3. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. and Weinberg, R. A. 2018. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **18**: 128–134.
4. Caldeira, P. C., Aguiar, M. C. F., Mesquita, R. A. and Carmo, M. A. V. do 2011. Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: comparative study of hMLH1, p53, and AgNOR. *J. Oral Pathol. Med.* **40**: 305–311.
5. Crocker, J. and Nar, P. 1987. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* **151**: 111–118.
6. Derenzini, M., Nardi, F., Farabegoli, F., Ottinetti, A., Roncaroli, F. and Bussolati,

- G. 1989. Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol.* **33**: 491–498.
7. Dong, J., Yang, W., Han, J., Cheng, R., Guo, X. and Li, L. 2019. Effect of dihydroartemisinin on epithelial-to-mesenchymal transition in canine mammary tumour cells. *Res. Vet. Sci.* **124**: 240–247.
8. Elangovan, T., Mani, N. J. and Malathi, N. 2008. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: A quantitative and qualitative assessment. *Indian J. Dent. Res.* **19**: 141.
9. Ferreira, S. J., Machado, M. Â. N., de Lima, A. A. S., Johann, A. C. B. R., Grégio, A. M. T. and Azevedo-Alanis, L. R. 2017. Identification of AgNORs and cytopathological changes in oral lichen planus lesions. *Acta Histochem.* **119**: 32–38.
10. Fonseca-Alves, C. E., Kobayashi, P. E., Rivera-Calderón, L. G. and Laufer-Amorim, R. 2015. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. *Res. Vet. Sci.* **100**: 176–181.

11. Fujiwara, A., Shintani, Y., Funaki, S., Kawamura, T., Kimura, T., Minami, M. and Okumura, M. 2017. Pirfenidone plays a biphasic role in inhibition of epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **106**: 8–16.
12. Giemsa, G. 1904. Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. *Centralblatt f. Bak.* **37**: 308–311.
13. Guarino, M., Rubino, B. and Ballabio, G. 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology (Phila.)*. **39**: 305–318.
14. Harris, K., Gelberg, H. B., Kiupel, M. and Helfand, S. C. 2019. Immunohistochemical Features of Epithelial-Mesenchymal Transition in Feline Oral Squamous Cell Carcinoma. *Vet. Pathol.* **56**: 826–839.
15. Höinghaus, R., Hewicker-Trautwein, M. and Mischke, R. 2008. Immunocytochemical differentiation of canine mesenchymal tumors in cytologic imprint preparations. *Vet. Clin. Pathol.* **37**: 104–111.
16. Hooke, R. 1665. *Micrographia*, Royal Society, London.

17. Husain, A. N., Colby, T. V., Ordóñez, N. G., Allen, T. C., Attanoos, R. L.,
Beasley, M. B., Butnor, K. J., Chirieac, L. R., Churg, A. M., Dacic, S., Galateau-
Sallé, F., Gibbs, A., Gown, A. M., Krausz, T., Litzky, L. A., Marchevsky, A.,
Nicholson, A. G., Roggli, V. L., Sharma, A. K., Travis, W. D., Walts, A. E. and
Wick, M. R. 2018. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant
Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International
Mesothelioma Interest Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**: 89–108.
18. Jain, D., Nambirajan, A., Borczuk, A., Chen, G., Minami, Y., Moreira, A. L.,
Motoi, N., Papotti, M., Rekhtman, N., Russell, P. A., Savic Prince, S., Yatabe, Y.,
Bubendorf, L., and IASLC Pathology Committee 2019. Immunocytochemistry for
predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol.* **127**:
325–339.
19. Jajodia, E., Raphael, V., Shunyu, N. B., Ralte, S., Pala, S. and Jitani, A. K. 2017.
Brush Cytology and AgNOR in the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma.
Acta Cytol. **61**: 62–70.
20. Kiupel, M. and Camus, M. 2019. Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous

Mast Cell Tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **49**: 819–836.

21. Kravis, L. D., Vail, D. M., Kisseberth, W. C., Ogilvie, G. K. and Volk, L. M. 1996. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **209**: 1418–1420.
22. Kusumoto, H., Shintani, Y., Kanzaki, R., Kawamura, T., Funaki, S., Minami, M., Nagatomo, I., Morii, E. and Okumura, M. 2017. Podocalyxin influences malignant potential by controlling epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **108**: 528–535.
23. Larue, L. and Bellacosa, A. 2005. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* **24**: 7443–7454.
24. Maeda, S., Yokoyama, M. and Naito, Z. Rapid Cytological Diagnosis Correlated with Clinical Medicine. *Nihon Ikadaigaku Igakukai Zasshi* **1**: 102–109.
25. Matsumoto, F., Shima-Sawa, M., Furusawa, Y., Yamato, O. and Yabuki, A. 2021. A rapid multiple immunofluorescence method for the simultaneous detection of

- CD20 and CD3 in canine and feline cytological samples. *J. Vet. Med. Sci.* **83**: 832–836.
26. May, R. and Grünwald, L. 1902. Über Blutfärbungen. *Cent. Inn. Med.* **11**: 265–270.
27. Nagamine, E., Hirayama, K., Matsuda, K., Okamoto, M., Ohmachi, T., Uchida, K., Kadosawa, T. and Taniyama, H. 2017. Invasive Front Grading and Epithelial-Mesenchymal Transition in Canine Oral and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Vet. Pathol.* **54**: 783–791.
28. Papaincolaou, G. N. and Traut, H. F. 1944. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. *Am. J. Clin. Pathol.* **14**: 127–127.
29. Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J. J. 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* **18**: 5–14.
30. Przeździecki, R., Czopowicz, M. and Sapieryński, R. 2015. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic

- melanomas in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* **44**: 597–604.
31. Pyo, S. W., Hashimoto, M., Kim, Y. S., Kim, C. H., Lee, S. H., Johnson, K. R., Wheelock, M. J. and Park, J. U. 2007. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* **35**: 1–9.
32. Rao, D. S., Ali, I. M. and Annigeri, R. G. 2017. Evaluation of diagnostic value of AgNOR and PAP in early detection of dysplastic changes in leukoplakia and lichen planus – a preliminary case–control study. *J. Oral Pathol. Med.* **46**: 56–60.
33. Raposo-Ferreira, T. M. M., Brisson, B. K., Durham, A. C., Laufer-Amorim, R., Kristiansen, V., Puré, E., Volk, S. W. and Sorenmo, K. 2018. Characteristics of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Primary and Paired Metastatic Canine Mammary Carcinomas. *Vet. Pathol.* **55**: 622–633.
34. Ribatti, D., Tamma, R. and Annese, T. 2020. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl. Oncol.* **13**: 100773.
35. Rüschoff, J., Plate, K., Bittinger, A. and Thomas, C. 1989. Nucleolar Organizer

Regions (NORs): Basic Concepts and Practical Application in Tumor Pathology.

Pathol. - Res. Pract. **185**: 878–885.

36. Saitoh, M. and Miyazawa, K. 2012. Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *J. Biochem. (Tokyo)*. **151**: 563–571.
37. Salem, A. A., Douglas-Jones, A. G., Sweetland, H. M., Newcombe, R. G. and Mansel, R. E. 2002. Evaluation of axillary lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry. *Br. J. Surg.* **89**: 1386–1389.
38. Satelli, A. and Li, S. 2011. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **68**: 3033–3046.
39. Sawa, M., Inoue, M., Yabuki, A., Kohyama, M., Miyoshi, N., Setoguchi, A. and Yamato, O. 2017. Rapid immunocytochemistry for the detection of cytokeratin and vimentin: assessment of its diagnostic value in neoplastic diseases of dogs. *Vet. Clin. Pathol.* **46**: 172–178.
40. Sawa, M., Yabuki, A., Kohyama, M., Miyoshi, N. and Yamato, O. 2018. Rapid

- multiple immunofluorescent staining for the simultaneous detection of cytokeratin and vimentin in the cytology of canine tumors. *Vet. Clin. Pathol.* **47**: 326–332.
41. Sawa, M., Yabuki, A., Miyoshi, N., Arai, K. and Yamato, O. 2012. Rapid-air-dry papanicolaou stain in canine and feline tumor cytology: a quantitative comparison with the Giemsa stain. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1133–1138.
42. Sawa, M., Yabuki, A., Setoguchi, A. and Yamato, O. 2015. Development and application of multiple immunofluorescence staining for diagnostic cytology of canine and feline lymphoma. *Vet. Clin. Pathol.* **44**: 580–585.
43. Scanlon, C. S., Van Tubergen, E. A., Inglehart, R. C. and D’Silva, N. J. 2013. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res.* **92**: 114–121.
44. Shidham, V. B., Lindholm, P. F., Kajdacsy-Balla, A., Chang, C. C. and Komorowski, R. 2000. Methods of cytologic smear preparation and fixation. Effect on the immunoreactivity of commonly used anticytokeratin antibody AE1/AE3. *Acta Cytol.* **44**: 1015–1022.
45. Shintani, Y., Abulaiti, A., Kimura, T., Funaki, S., Nakagiri, T., Inoue, M.,

- Sawabata, N., Minami, M., Morii, E. and Okumura, M. 2013. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **96**: 425–433.
46. Shintani, Y., Fujiwara, A., Kimura, T., Kawamura, T., Funaki, S., Minami, M. and Okumura, M. 2016. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer.* **11**: 1482–1492.
47. Shintani, Y., Okimura, A., Sato, K., Nakagiri, T., Kadota, Y., Inoue, M., Sawabata, N., Minami, M., Ikeda, N., Kawahara, K., Matsumoto, T., Matsuura, N., Ohta, M. and Okumura, M. 2011. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **92**: 1794–1804; discussion 1804.
48. Srivastava, A. N., Misra, J. S., Singh, U., Khan, M. and Raza, S. 2019. AgNOR Pleomorphic Count as a Tumor Marker in Cervical Carcinogenesis and Feasibility of Its Introduction in Cervical Cancer Screening Programs to Discriminate High-

- Risk Cases of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. *Acta Cytol.* **63**: 371–378.
49. Stemmler, M. P. 2008. Cadherins in development and cancer. *Mol. Biosyst.* **4**: 835–850.
50. Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I. and Tomic-Canic, M. 2016. Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis. *Cell Tissue Res.* **365**: 495–506.
51. Vail, D. M., Kravis, L. D., Kisseberth, W. C., Ogilvie, G. K. and Volk, L. M. 1997. Application of Rapid CD3 Immunophenotype Analysis and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Frequency to Fine Needle Aspirate Specimens From Dogs With Lymphoma. *Vet. Clin. Pathol.* **26**: 66–70.
52. Vajdovich, P., Psáder, R., Tóth, Z. A. and Perge, E. 2004. Use of the Argyrophilic Nucleolar Region Method for Cytologic and Histologic Examination of the Lymph Nodes in Dogs. *Vet. Pathol.* **41**: 338–345.
53. Valli, V., Peters, E., Williams, C., Shipp, L., Barger, A., Chladny, J. and Hoffmann, W. 2009. Optimizing methods in immunocytochemistry: one

- laboratory's experience. *Vet. Clin. Pathol.* **38**: 261–269.
54. Wang, N. P., Zee, S., Zarbo, R. J., Bacchi, C. E. and Gown, A. M. 1995. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas. *Appl. Immunohistochem.* **99**.
55. Wright, J. H. 1902. A Rapid Method for the Differential Staining of Blood Films and Malarial Parasites. *J. Med. Res.* **7**: 138–144.
56. Ym, B., Aa, B. and Sv, S. 2017. [Epithelial cadherins and associated molecules in invasive lobular breast cancer]. *Arkh. Patol.* **79**: 12–18.
57. Yoshimatsu, Y., Wakabayashi, I., Kimuro, S., Takahashi, N., Takahashi, K., Kobayashi, M., Maishi, N., Podyma-Inoue, K. A., Hida, K., Miyazono, K. and Watabe, T. 2020. TNF- α enhances TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- β signal augmentation. *Cancer Sci.* **111**: 2385–2399.
58. Zeisberg, M. and Neilson, E. G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**: 1429–1437.