

膀胱移行上皮癌の組織学的異型度と 増殖能との関係

新潟大学医学部泌尿器科学教室（主任：佐藤昭太郎教授）

谷川俊貴

Relationship Between Histological Grading and Proliferative
Activity in Transitional Cell Carcinomas
of the Urinary Bladder

Toshiki TANIKAWA

*Department of Urology, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shootaro SATO)*

For the purpose of establishing a quantitative pathologic diagnosis of transitional cell carcinoma in the urinary bladder, the author conducted research work on relationships between histological grading and cell-proliferative activity. The author examined twenty lesions of seventeen cases with transitional cell carcinoma and employed mitotic figures, bromodeoxyuridine (BrdU) labelling index, proliferating cell nuclear antigen, c-erbB-2 oncogene products and argyrophilic nucleolar organizer region associated protein. As a result, BrdU labelling index was most closely related to the histological grading. Therefore, it is expected that the counting of BrdU labelling index gives effectively more detailed information for the estimation of prognosis.

Key words: Transitional cell carcinoma, Histological grading, Proliferative activity
膀胱移行上皮癌, 増殖能, 組織学的異型度

要 旨

膀胱移行上皮癌における病理診断の計量化をめざして、組織学的異型度と細胞増殖能との関係を調べた。増殖能の指標には核分裂像、bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み率、proliferating cell nuclear antigen 陽性率、c-erbB-2 癌遺伝子産物発現および argyrophilic nucleolar organizer region associated protein を用いて検

索した。その結果、BrdU 取り込み率が最もよく異型度と相関した。したがって、BrdU 取り込み率の測定が予後の推測にあたって更に詳細な情報を与えてくれるものと考えられる。

緒 言

膀胱移行上皮癌における組織学的異型度の判定は、予後の推測や治療法の決定に際し重要な役割を果たしてい

Reprint requests to: Toshiki TANIKAWA,
Department of Urology, Niigata University
School of Medicine, Asahimachi-dori 1,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部泌尿器科学教室
谷川俊貴

る。しかしながら、熟練した病理医の間ではその判定に大差はないとはいうものの、従来の異型度の判定基準¹⁾²⁾は客観性に欠けることは否めず、判定の実地に困難を感じることも少なくない。

一方、旧来からある核分裂像の計測という方法に加え、細胞増殖能を組織学的手法によって識別する方法が近年幾つか開発されてきた。これらの方法は、異型度と増殖能を直接対比でき、かつ数量的取り扱いが可能であるという利点がある。現在比較的良く用いられている細胞増殖能の検査方法には次のようなものがある。

1. 核分裂像の計測
2. 細胞増殖抗原の免疫染色
 - 1) Bromodeoxyuridine (以下 BrdU)
 - 2) Proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA)
 - 3) DNA-polymerase α
 - 4) Ki-67
 - 5) 癌遺伝子産物
3. 好銀性核小体形成体関連蛋白

(Argyrophilic nucleolar organizer region associated protein, 以下 AgNOR)

上記によって得られる増殖能の指標は必ずしも同じものを指しているわけではない。悪性度と異型度との関係が大筋においてはほぼ確立されている膀胱移行上皮癌³⁾⁴⁾においては有用な増殖能のマーカーは異型度と密に関連していることが予想される。従来の異型度判定に加え、数量化された客観的基準を補足するとすればどのようなものが適当か、細胞増殖能マーカーのうち、パラフィン包埋切片を用いることのできる核分裂像、BrdU、PCNA、c-erbB-2 癌遺伝子産物、AgNOR について検討してみたので、その結果と使用にあたっての問題点について述べたい。

研究材料と方法

新潟大学医学部泌尿器科学教室において、膀胱全摘術を行った膀胱移行上皮癌17例を材料とし、その中の組織学的異型度1 (grade 1, 以下 G1) の部分5領域, 異型度2 (grade 2, 以下 G2) の部分6領域, 異型度3 (grade 3, 以下 G3) の部分9領域について検討した(表1)。異型度の判定は膀胱癌取扱規約¹⁾にのっとり、著者および複数の認定病理医によって行われた。なお、これらの症例は術前に化学療法や放射線治療は行われていない。

後述する BrdU 取り込み率を調べるために、膀胱全

表1 研究材料の内訳

症例	年齢	性	発育様式	異型度	深達度	Ly	V	N
1	53	M	PNT	G1	pTa	0	-	0
2	65	M	PNT	G1	pTa	0	-	0
3	67	M	PNT	G1	pTa	0	-	0
4	63	M	PNT	G1>2	pTa	0	-	0
5	61	M	PNT	G2>1	pT1b	0	-	0
6	57	M	PIT	G2	pT1b	0	-	0
7	72	M	PIT	G2	pT1b	0	-	0
8	61	F	PIT	G2	pT3b	0	-	0
9	72	F	NNT	G3>2	pT1	0	-	0
10	63	M	NNT	G3	pTis	0	-	0
11	74	M	NNT	G3	pT1	0	-	0
12	70	M	NIT	G3	pT1	0	-	0
13	72	M	NIT	G3	pT2	0	+	0
14	67	F	NIT	G3	pT3b	2	-	2
15	79	M	NIT	G3	pT4	2	-	2
16	60	M	NIT	G3	pT4	2	-	2
17	75	M	NIT	G3	pT4	2	+	0

摘術前に BrdU 500 mg を生理食塩水 50 ml に溶解し、これを膀胱内に2時間注入しておいた。BrdU の検索は70%アルコール固定パラフィン包埋切片を用いたが、他はすべて10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片で検索した。

(1) 核分裂像

ヘマトキシリン・エオジン標本を用い400倍視野下で細胞1,000個に対する核分裂数を算定した。

(2) BrdU 取り込み率

BrdU 免疫染色は抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (Becton Dickinson, USA) を用い、ストレプトアビジン・ビオチン (Streptavidin-Biotin: 以下 SAB) 法にて行った。取り込み率は細胞500個に対する BrdU 陽性染色細胞数を数えた。

(3) PCNA

抗 PCNA マウスモノクローナル抗体 (Nobocastra, England) を用い、SAB 法にて免疫染色を行い、腫瘍細胞500個に対する PCNA 陽性細胞の比率を求めた。

(4) c-erbB-2 癌遺伝子産物

抗 c-erbB-2 癌遺伝子産物ウサギポリクローナル抗体 (ニチレイ, 東京) を用い SAB 法にて行った。

(5) AgNOR

AgNOR 染色は、Derenzini の方法⁵⁾ によって行い、その評価は3次元画像解析装置 (ライズ, 東京) を用い、

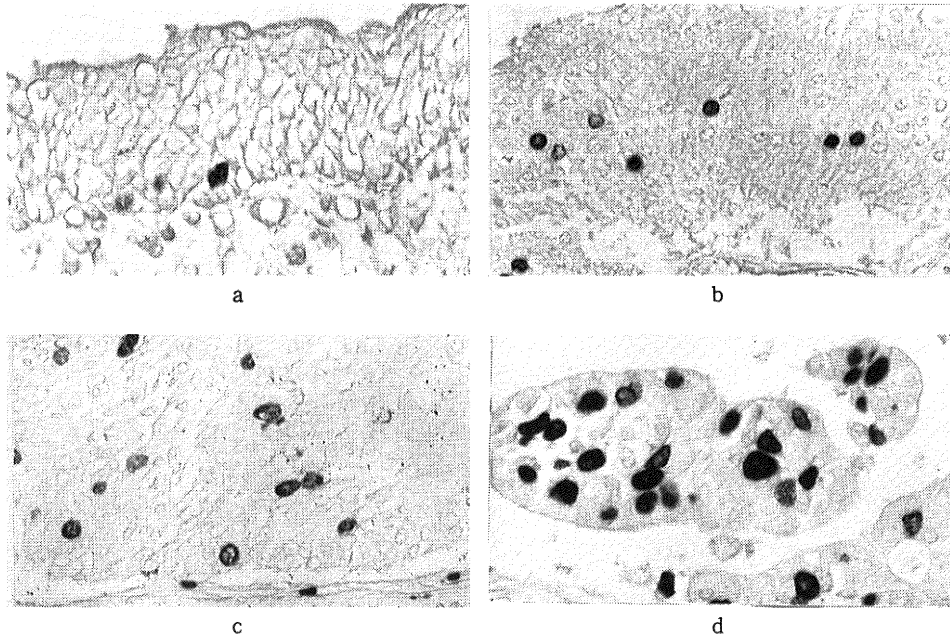


図1 BrdU 取り込み細胞

a: 正常移行上皮, b: TCC, G1, c: TCC, G2, d: TCC, G3 (ヘマトキシリン後染色, $\times 360$)

油浸1,000倍下において腫瘍細胞100個のAgNORの数と総面積を計算した。

上記(1)~(3), (5)は陽性像の多い部分を選んで数カ所計測し, その中の最高値を各症例の代表値とした。

統計学的な検討は, 上記(1)~(3), (5)にはWilcoxonの順位検定, (4)には χ^2 検定を用い, 危険率5%で有意差とした。

結 果

1) 核分裂像

核分裂像は, 正常移行上皮部ではほとんど認められず, G1: 0.17%, G2: 0.21%, G3: 0.58%となり, 異型度とともに増加する傾向はあったが有意差は得られなかった。

2) BrdU 取り込み率

正常移行上皮部では, BrdU 取り込み細胞は基底部に認められ(図1-a), その取り込み細胞の比率は0.1%以下であった。G1では, 概ね基底層から中間層までに認められた(図1-b), 取り込み率の平均は5.6%であった。G2では取り込み細胞はさらに表層までにも見られるようになり(図1-c), 取り込み率は13.5%であった。

一方, G3では取り込み細胞の分布に一定の傾向はなく(図1-d), 取り込み率の平均は21.7%であった。正常移行上皮部と移行上皮癌との間および移行上皮癌の各異型度間に有意差を認めた(図2)。

3) PCNA

正常移行上皮部でのPCNA検出率は1%以下で, 移行上皮癌G1では11.4%, G2: 28.3%, G3: 49.6%であった(図3, 4)。PCNA検出率は異型度とともに増加し, 各異型度群間で有意差があったが, 同一異型度群内でもかなりのばらつきが見られた。

4) c-erbB-2 癌遺伝子産物

正常部とG1とはc-erbB-2癌遺伝子産物は全く検出されず, G2では粘膜部5領域中1領域, 浸潤部5領域中2領域に, G3では粘膜部5領域中3領域, 浸潤部8領域中6領域に陽性であった(表2, 図5)。粘膜内領域とG1とG3間に有意差を認めたが, 他の群間に有意差は見られなかった。

5) AgNOR

正常移行上皮の平均AgNOR数は2.03で, G1, G2, G3ではそれぞれ平均3.17, 3.03, 4.86であった。同一症例の正常部はAgNOR数と腫瘍部のAgNOR数

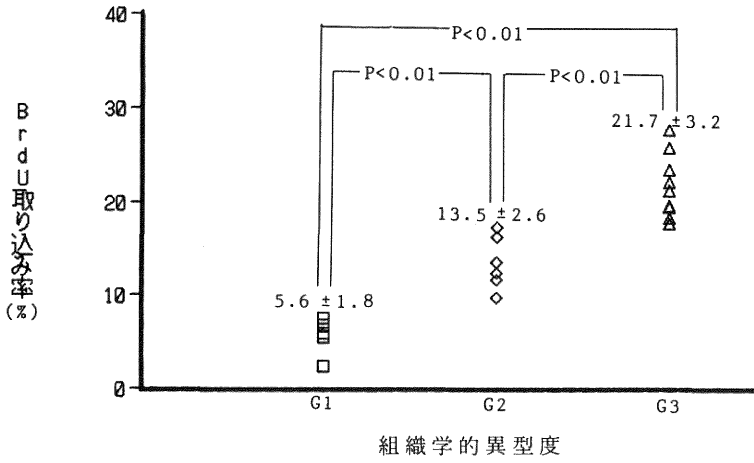


図 2 BrdU 取り込み率と組織学的異型度

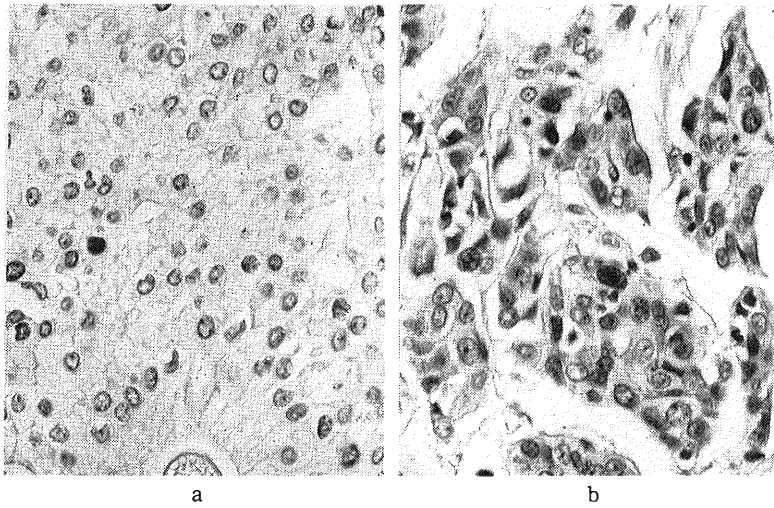


図 3 PCNA 取り込み細胞

a: TCC, G1, b: TCC, G3 (ヘマトキシリン後染色, ×450)

表 2 c-erbB-2 遺伝子産物の発現部位

	粘膜領域数	陽性数(%)	浸潤領域数	陽性数(%)
G1	5	0 (0)	0	—
G2	5	1 (20) *	4	2 (50)
G3	5	3 (60)	8	6 (75)

* : p < 0.05

表 3 AgNOR の数と面積

	AgNOR 数	正常部との比	AgNOR 面積(μm ²)
正常部	2.03 ± 0.19		2.51 ± 0.22
G1	3.17 ± 0.11 **	1.46 ± 0.11	6.32 ± 0.23 **
G2	3.03 ± 0.28	1.66 ± 0.07 *	7.23 ± 0.55 *
G3	4.86 ± 0.37 **	2.31 ± 0.15 **	9.84 ± 0.70 **

(Mean ± SD), * : P < 0.05, ** : P < 0.01

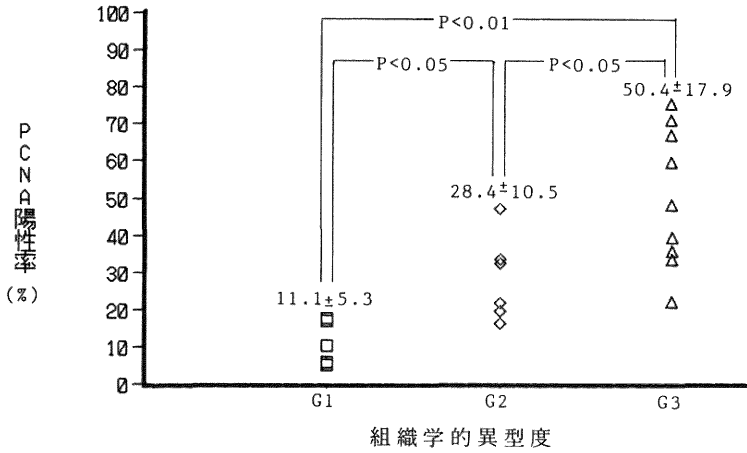


図4 PCNA 陽性率と組織学的異型度

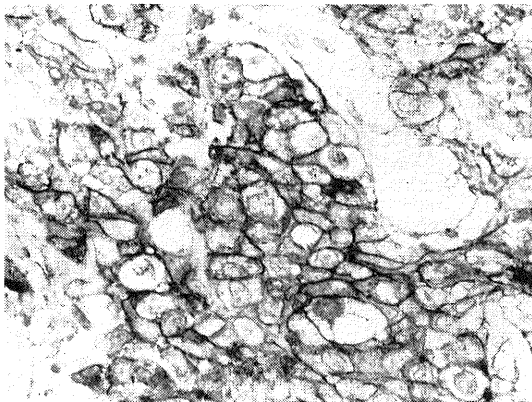


図5 c-erbB-2 遺伝子産物の免疫染色
強陽性像は浸潤部に見られることが多い。
(ヘマトキシリン後染色, ×450)

との比では G1, G2, G3 でそれぞれ平均 1.46, 1.66, 2.31 で、各異型度間に有意差を認めた。また、正常移行上皮の平均 AgNOR 総免疫は $2.51 \mu\text{m}^2$ で、移行上皮癌 G1, G2, G3 ではそれぞれ 6.32, 7.23, $9.84 \mu\text{m}^2$ で、各異型度間に有意差を認めた (表 3, 図 6)。

考 察

腫瘍の予後を推察するとともに治療方針を決定するための指標として、組織型、組織学的異型度、発育様式、深達度等の病理形態学的所見がこれまで多くの臓器でも頻用されてきた。膀胱移行上皮癌においても異型度と悪性度とがよく相関することは諸家によって確かめられ

ている³⁾⁴⁾。しかしながら、異型度診断はどうしても主観的要素が入ることを否めず、客観的診断基準もいまだ確立されているとは言い難い。このことは治療の個別化をめざして、prospective に研究を推進させようとする際大きな問題となる。そこで著者は、比較的数量化しやすい細胞増殖能から悪性度を見てみることにし、有用な増殖能の指標を選ぶべく、異型度と増殖能との関係を検討することにした。

まず従来より増殖能の指標として用いられてきた核分裂像について検討してみた結果は異型度が高まるとともに核分裂数も増加する傾向を認めたが、有意差が認められるほどではなかった。非上皮性腫瘍においては核分裂像の多寡が悪性度の判定に用いられている⁶⁾が、上皮性の腫瘍である膀胱移行上皮癌においては層形成の問題、乳頭状か非乳頭状かの問題もあることから、単に数だけ、特に一定視野内での数だけで判断することは困難と思われる。また、固定までに時間がかかると核分裂像は減少してしまう⁷⁾。核分裂像の計測という古典的方法においてさえ厳密な条件の設定が必要である。

近年、核分裂数計測のほか組織切片において細胞の増殖動態を調べる方法が幾つか開発されてきた。BrdU は、合成の thymidine analogue で、in vivo あるいは in vitro で投与すると S 期細胞の DNA に選択的に取り込まれる。Gratzner⁸⁾ により抗 BrdU モノクローナル抗体が開発され免疫染色により容易に S 期細胞が検出されるようになった⁹⁾。BrdU 取り込み率と予後との関係は脳腫瘍において最もよく明らかにされ¹⁰⁾、膀胱癌においても異型度とよく相関していることが示されて

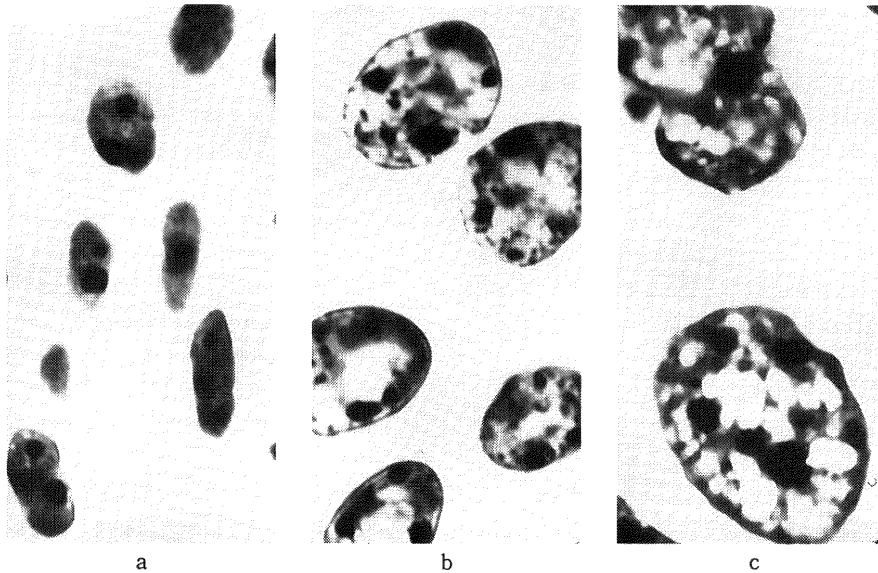


図 6 AgNOR 染色

a: 正常移行上皮, b: TCC, G2, c: TCC, G3 (×1,350)

いる¹¹⁾¹²⁾。著者の検索では、非腫瘍部と移行上皮癌部および移行上皮癌の各異型度間で明瞭な差をみとめた。さらにこの方法の良い点は、染色の陽性・陰性がはっきりしているため BrdU の取込みの有無の判定が容易なことである。一方、BrdU の人体投与に対する安全性が初期より問題となっていたが、著者らの考案した膀胱内投与方法¹³⁾は、動物実験で他臓器への BrdU の取り込みが全くないこと、使用者の追跡調査により異常を全く認めていないことからその安全性は確かなものとする。

PCNA は、DNA ポリメラーゼ δ のホロ酵素の一部を構成する蛋白¹⁴⁾で、G1 後期から S 期にかけて合成される¹⁵⁾。ホルマリン固定パラフィン切片でも検出できるようになったため¹⁶⁾、DNA polymerase α と同様の増殖能の指標として期待されるようになった。今のところ膀胱移行上皮癌について十分に検討した報告はまだみない。著者の成績では、非腫瘍部と移行上皮癌部及び移行上皮癌の各異型度間で有意の差を認めた。しかし、同一異型度群内でもかなりのばらつきがあり、特に G3 においてそれは著しかった。また、PCNA は薄切した切片を熱伸展板に長時間おくと抗原性が低下すると報告され、著者もその事実を確かめた。したがって、今後 PCNA を用いるためには、染色までの至適条件等をさらに細部まで検討してみる必要がある。

c-erbB-2 は、erbB と cross hybridization によってヒトゲノム上に見いだされた遺伝子¹⁷⁾で、cDNA の塩基配列から EGF レセプターと極めて類似した蛋白をコードしていると推測されている¹⁸⁾。c-erbB-2 の増幅が乳癌においては転移や予後との間に密接な関係があることが示され¹⁹⁾、その遺伝子産物の発現は膀胱癌においても悪性度との関連を示唆する報告がなされている²⁰⁾。今回の検討では、異型度が高く、浸潤部であるほど c-erbB-2 遺伝子産物が検出される傾向はあったものの、これに該当しない例も見られ、これのみで膀胱移行上皮癌の悪性度を総括的に論ずることは困難と思われる。しかし、個々の症例については、c-erbB-2 遺伝子産物の発現と癌の浸潤との間に関連があるように思われた。

核小体形成体 (Nucleolar organizer region, NOR) は rRNA 遺伝子が存在する DNA 上の部位であり、この周囲を酸性リン酸化蛋白が取り巻く。この蛋白は好銀性を有するため、銀染色により、核小体形成関連蛋白 (argyrophilic nucleolar organizer region associated protein, AgNOR) として検出される²¹⁾。この蛋白は DNA polymerase I による rRNA 遺伝子の転写活性を反映すると考えられることから²²⁾、AgNOR 数は細胞増殖能の指標になり得ると考えられるようになった²³⁾。

膀胱癌においても、腫瘍の異型度と相関し、化学療法有効例では治療により AgNOR 数の減少と分布の変化を認めたと報告が既になされている²⁴⁾。著者の検索では、単に AgNOR 数だけでみていくと G2 では G1 よりむしろ少ない結果になってしまった。しかし、同一検体上の正常部との比でみると、異型度と相関して有意に高くなった。この原因は検討中ではあるが、固定条件特に固定時間が長くなると AgNOR が凝集し数が減少するという現象によることに一因すると考えられる。多施設間での成績の比較の場合、注意すべき要点である。このため、標準製作条件を一定にするか、次善策として同一症例の正常部との比で補正することが必要と考えられる。むしろ、AgNOR の総面積の方が異型度と相関するので、こちらを採用すべきかもしれない。

以上の検討より、予後をよく反映する異型度と最もよく相関する増殖能のマーカーは、BrdU 取り込み率であった。PCNA と AgNOR も良い指標となる可能性があった。これらを比べた場合、BrdU 取り込み率は免疫染色までの前処置がやや複雑で、また使用に際し informed consent を得なければならない。特に後者の理由から適用が限定される。一方、PCNA も AgNOR も染色は簡単ではあるが、標本の作製条件にまだ問題が残る、染色結果の判定も必ずしも容易ではない。私見ではあるが、副作用を全く認めていないことから BrdU 膀胱内注入法による BrdU 取り込み率が増殖能の指標として最も良い情報を与えてくれると考える。それができない場合は、in vitro 標識法²⁵⁾²⁶⁾を代用してもよいであろう。

今後、異型度判定が難しい例について、これら増殖能のマーカーを検索しどのような経過をたどるか十分に追跡調査しなければならない。その成績が出たときにこそ、増殖能の指標が悪性度の指標となるであろう。

結 語

膀胱移行上皮癌において、予後に関係する計量化可能な指標を求めめるために、核分裂数、BrdU 取り込み率、PCNA、c-erbB-2 癌遺伝子産物及び AgNOR について検討してみた結果、BrdU 取り込み率を用いることが最も適当であるという結論を得た。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師佐藤昭太郎教授ならびに渡辺英伸病理学第一教室教授に心から御礼申し上げます。また本研究を直接御指導して下さいました本山悌一病理学第一教

室助教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編：泌尿器科・病理膀胱癌取扱規約。第1版，金原出版，東京，1980。
- 2) **Murphy, W.M.**: Diseases of the urinary bladder, urethra, ureters and renal pelvis. In Murphy, W.M. ed. Urologic pathology (1st ed.), p. 64~102, Saunders, Philadelphia, 1989.
- 3) 守山正胤，加藤哲郎，森 久，阿部良悦，佐藤一成，土田正義，上坂佳敬，綿貫 勤：膀胱移行上皮癌の臨床病理学的検討。日泌尿会誌，78：1940~1949, 1987。
- 4) 黒田昌男，細木 茂，木内利明，三木恒治，清原久和，宇佐美道之，中村麻嵯男，古武敏彦：膀胱腫瘍の臨床統計的観察。日泌尿会誌，78：2098~2107, 1987。
- 5) **Derenzini, M., Romagnoli, T., Mingazzini, P. and Marinozzi, V.**: Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. Virch. Arch. B Cell Pathol., 54: 334~340, 1988.
- 6) **Silverberg, S.G.**: Reproducibility of the mitosis count in the histopathological diagnosis of smooth muscle tumors of the uterus. Hum. Pathol., 7: 451~456, 1976.
- 7) **Donhuijsen, K., Schmidt, U., Hirche, H., van Beuningen, D. and Budach, V.**: Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. Hum. Pathol., 21: 709~714, 1990.
- 8) **Gratzner, H.G.**: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science, 218: 474~475, 1982.
- 9) **Morstyn, G., Hsu, S-M., Kinsella, T., Gratzner, H.G., Russo, A. and Mitchell, J.B.**: Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. J. Clin. Invest., 72: 1844~1850, 1983.
- 10) **Nagashima, T., DeArmond, S.J., Murovic, J. and Hoshino, T.**: Immunocytochemical demonstra-

- tion of S-phase cells by anti-bromodeoxy-uridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol.*, **67**: 155~159, 1985.
- 11) **Nemoto, R., Uchida, K., Hattori, K., Shimizu, T., Nishijima, Y., Saito, S., Koiso, K. and Harada, M.**: S phase fraction of human bladder tumor measured in situ with bromodeoxyuridine labeling. *J. Urol.*, **139**: 286~289, 1988.
 - 12) 大山 力, 中角尚誉, 佐藤 信, 吉川和行, 星 宣次, 折笠精一: Bromodeoxyuridine in vivo labeling による膀胱腫瘍のS期細胞の検討. *日泌尿会誌*, **81**: 524~531, 1990.
 - 13) 谷川俊貴, 富田善彦, 笹川 亨, 西山 勉, 佐藤昭太郎: Bromodeoxyuridine 膀胱注入による正常移行上皮および移行上皮癌への取り込みについて. *日癌治会誌*, **24**: 233, 1989.
 - 14) **Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G. and Daune, K.M.**: An auxillary protein for DNA polymerase- δ from fetal calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **261**: 12310~12316, 1986.
 - 15) **Bravo, R. and Macdonald Bravo, H.**: Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but its syntesis depend on DNA replication. *EMBO. J.*, **4**: 655~661, 1985.
 - 16) **Robbins, B.A., de la Vega, D., Ogata, K., Tan, E.M. and Nakamura, R.M.**: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**: 841~845, 1987.
 - 17) **Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.**: A v-erbB-related proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6497~6501, 1985.
 - 18) **Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. and Toyoshima, K.**: Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature (Lond.)*, **319**: 230, 1986.
 - 19) **Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullich, A. and McGuire, W.L.**: Human breast cancer: corelation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**: 177, 1987.
 - 20) **Moriyama, M., Akiyama, T., Yamamoto, T., Kawamoto, T., Kato, T., Sato, K., Watanuki, T., Hikage, T., Katsuta, N. and Mori, S.**: Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J. Urol.*, **145**: 423~427, 1991.
 - 21) **Hernandez-Verdun, D.**: The nucleolar organizer regions (collective review). *Biol. Cell*, **49**: 191~202, 1983.
 - 22) **Dimova, R.N.**: Electron microscopic ocalization of silver staining NOR-proteins in rat nucleoli upon D-galactosamine block of transcription. *Eur. J. Cell Biol.*, **28**: 272~277, 1982.
 - 23) **Derenzini, M., Pession, A., Farabegoli, F., Badiali, M. and Dehan, P.**: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuro-blastoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, **134**: 925~932, 1989.
 - 24) 竹内敏視: 膀胱腫瘍における核小体形成体の研究. *日泌尿会誌*, **81**: 1711~1719, 1990.
 - 25) **Sasaki, K., Takahashi, M., Ogino, T. and Yasui, H.**: In vitro estimation of cell kinetic parameters in human urinary bladder cancers. *Gann*, **72**: 795~797, 1981.
 - 26) 辻橋宏典, 松田久雄, 秋山隆弘, 栗田 孝, 上島成也: 抗 Bromodeoxyuridine モノクローナル抗体を用いた膀胱腫瘍S期細胞の免疫組織学的検討. *日泌尿会誌*, **79**: 423~427, 1988.

(平成3年9月25日受付)