

Stereology による非腫瘍部分膀胱粘膜の平均核容積の測定

—Vertical Section による計測—

市立静岡病院泌尿器科 (科長: 佐々木美晴)

佐々木美晴, 中村英二郎, 金子 嘉志*

ESTIMATION OF NUCLEAR VOLUME OF NONTUMOROUS
BLADDER MUCOSA IN PATIENTS WITH BLADDER TUMOR

—MEASUREMENT BY VERTICAL SECTION—

Miharu Sasaki, Eijiro Nakamura and Yoshiyuki Kaneko

From the Department of Urology, Shizuoka City Hospital

The mean nuclear volume (MNV) of non-tumorous bladder mucosa in 27 patients with a bladder tumor was estimated by using a new stereological method, "vertical section". Eighty four specimens were obtained by punch biopsy from preselected sites of urinary bladder. Thirteen specimens (10 patients) out of 84 were histologically diagnosed as carcinoma in situ (CIS). Bladder mucosa of 24 patients with various benign diseases were also measured as normal controls. The MNV of the normal control group was $127.1 \pm 19.6 \mu\text{m}^3$ (mean \pm standard error) and that of the specimens diagnosed with CIS was $279.6 \pm 69.0 \mu\text{m}^3$. There was no overlap between the two groups. Out of 71 specimens diagnosed as having no malignancy, 30 (42.3%) exhibited significantly increased MNV. Estimation of the MNV of non-tumorous bladder mucosa may be useful for standardization of CIS. Further studies are needed to investigate the role of the increased MNV in histologically normal mucosa in the course of a bladder tumor.

(Acta Urol. Jpn. 37: 679-684, 1991)

Key words: Bladder tumor, Non-tumorous mucosa, Mean nuclear volume, Stereology, Vertical section

緒 言

膀胱癌において非腫瘍部分の変化が再発との関係において注目され¹⁾, carcinoma in situ (CIS) あるいは dysplasia, atypia などの概念が提唱されている。しかし、それらの定義は確定されたとは言えず、より客観的な方法による定義づけが必要である²⁾。一方、癌組織を数量化する試みが以前よりなされているが、いまだ一般的な方法はない。われわれはすでに、stereology を応用した計測法による膀胱癌の平均核容積 (mean nuclear volume; MNV) の測定法につき報告し、予後不良の群において MNV が有意に増大していることを証明し、膀胱癌において MNV の測定が悪性度の客観的指標となることを示した³⁾。本法は高価な装置を必要とせず、測定も簡単で、日常の臨床検査として用いる有用な方法である。しか

し、前回報告した方法は細胞の配列に方向性のない標本 (random section) にも適応できる方法で、すべての膀胱癌組織に適応できるものではない。たとえば、正常膀胱粘膜は基底膜より垂直方向に向かう細胞配列を示すため、前回報告した方法で測定するのは理論的に間違いである。そこで今回は、point sampled intercepts 法のうち、方向性のある組織のため工夫された vertical section 法について述べ、膀胱粘膜の変化を数量化する目的で非腫瘍部分粘膜の MNV を計測したのでその結果につき報告する。

方 法

Gundersen らが報告した point sampled intercepts 法⁴⁾のうち、方向性のある組織に対して考案された vertical section 法にて計測した⁵⁾。光学顕微鏡を用いて組織像を机上に投影し、特別に工夫された ruler を用いて計測する点では、random section における計測と同じである。Vertical section では

* 現: 京都大学

intercept 測定の方法を決めるために orientating frame と test probe を使用する。Orientating frame は Fig. 1 に示したように1から97まで目盛りがついてある。Test probe は透明なフィルムに印刷してあり、orientating frame と重ねることにより intercept 測定の方法を決めることができる (Fig. 1)。まず、orientating frame の水平軸を投影された組織像の基底膜にあわせ、垂直軸が核の長軸に平行になるように orientating frame を置く。つぎに、乱数表から2桁の数字 R ($1 \leq R \leq 97$) を選び、それを最初の視野の intercept 測定の方法とし、orientating frame 上の目盛りに合わせて test probe を重ねる (Fig. 2)。つぎの視野に移る時は、 R に任意の数 m

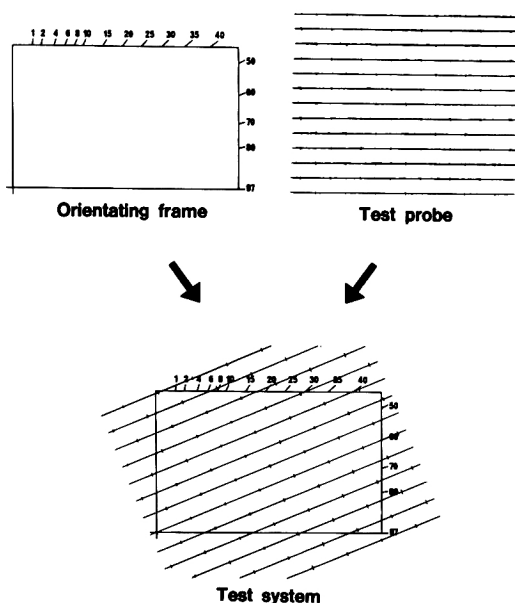


Fig. 1. Schematic drawing of the orientating frame and the test system.

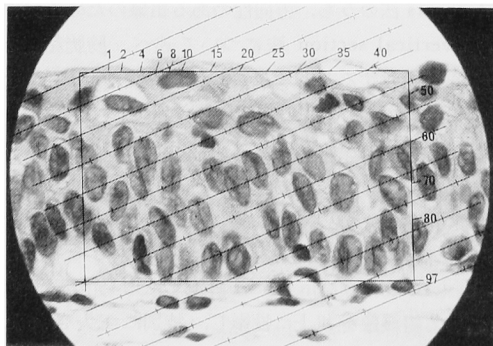
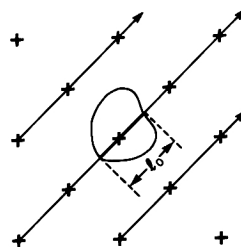


Fig. 2. The uroepithel projected on the orientating frame with the test system.

($1 \leq m \leq 97/2$) を加えて、つぎの intercept 測定の方法とする。われわれは、 m の値として Nielsen⁶⁾ と同様 37 を用いた。もし $R+m$ が 97 を越えた場合は 97 を引く。Intercept 測定の方法が決まれば、test point が重なった核について Intercept の長さを計測する。intercept の長さを l_0 とすると平均容積 \bar{V}_v は以下の式で表される (Fig. 3)⁴⁾。



$$\text{mean volume}(\bar{V}_v) = \frac{\pi}{3} l_0^3$$

Fig. 3. Schematic drawing of a nucleus and a point sampled intercept. For estimating the mean nuclear volume, one measures the length l_0 .

$$\bar{V}_v = (\pi/3) \times l_0^3$$

実際の計測には、Brændgaard らが報告した特殊な Ruler を使用した⁷⁾。Test point の間隔は 2 cm とし、ruler は全長 25 mm のものを使用した。また、投影像の倍率は正確に 1,600 倍とした。Vertical section 法の理論的背景については、Baddeley らの論文を参照していただきたい⁵⁾。

対 象

当科で治療した膀胱癌患者 27 名を対象とし、腫瘍部分および punch biopsy で得られた非腫瘍部分粘膜の平均核容積を計測した。対象症例の年齢は 30~78 歳 (平均 56.7 歳)、男性 23 例、女性 4 例である。27 例中 17 例は初発時の標本を計測し、10 例は再発時の標本を計測した。そのうち 3 例は膀胱内注入療法を受けていたが、治療終了後最低 4 週間以上の期間をおいた時点での標本を計測した。放射線療法後の標本は含まれていない。組織型はすべて移行上皮癌であり、組織学的診断は膀胱癌取り扱い規約に従った。非腫瘍部分生検で得られた 84 標本のうち、CIS と診断された部分は 13 標本 (10 例) であり、10 例中 9 例は腫瘍に随伴する CIS である。なお、腫瘍部分の組織は random section として測定した。生検部位は原則として、左右尿管口付近、三角部、左右側壁、後壁、頸部としたが、生検予定部位に腫瘍がある場合は組織採取していない。し

たがって、生検部位のほとんどは腫瘍部分より少なくとも約2 cm 以上離れた部位である。採取した組織は直ちに20% buffered formaldehyde で固定し、Hematoxylin-Eosin 染色した4 μm の厚さの切片を作成した。また、control として、前立腺肥大症の手術時に患者の同意をえて採取した膀胱粘膜、および膀胱腫瘍を疑って生検を施行したが悪性所見が認められなかった症例の膀胱粘膜を計測した。いずれも punch biopsy で採取された組織であり、全例他臓器にも癌を有しない症例である。年齢は37~84歳(平均68.3歳)、男性23人、女性1人である。有意差検定には student's T-test を用いた。

結 果

1) Control 群の MNV について

Control 群の MNV は平均 $127.1 \pm 19.6 \mu\text{m}^3$ であった。統計学的にほぼ正規分布を示し、正常範囲(95%信頼区間)は $87.9 \sim 166.3 \mu\text{m}^3$ と考えられた。

2) 腫瘍部分の MNV について

腫瘍部分の MNV と腫瘍の grade との関係は Fig. 4 に示す通りである。Grade 1 と grade 2 との間で MNV に有意差が認められたが、grade 2 と grade 3 との間には有意差は認められなかった。

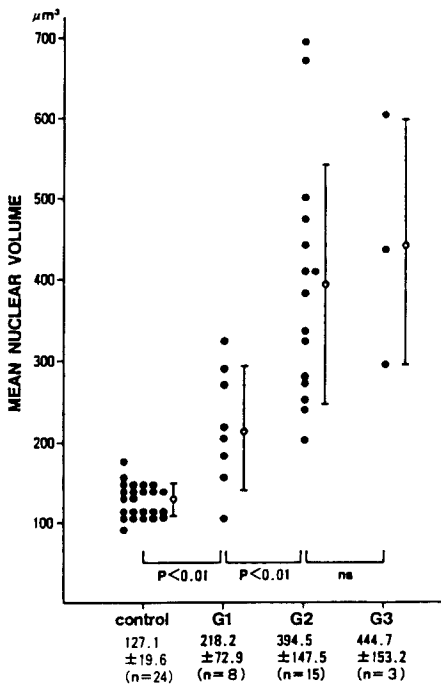


Fig. 4. Relationship between the mean nuclear volume and the histological grade in patients with bladder tumor.

MNV と stage との関係では、pTa と pT1 との間で MNV に有意差が認められたが、pT1 と pT2 以上の群の間には有意差は認められなかった (Fig. 5)。

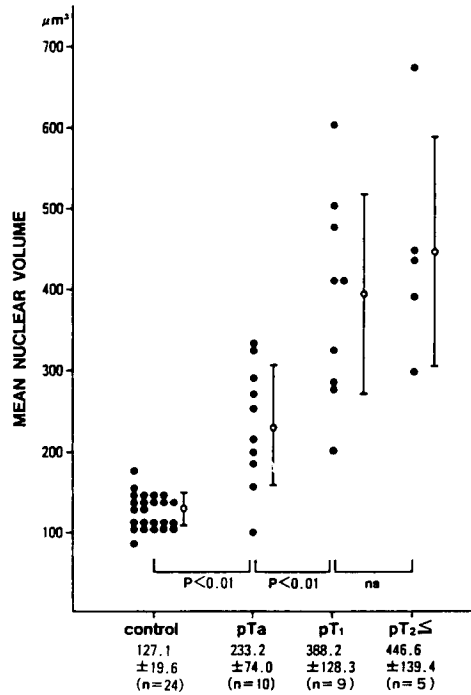


Fig. 5. Relationship between the mean nuclear volume and the histological stage in patients with bladder tumor.

3) 非腫瘍部分の MNV について

非腫瘍部分の84標本全体の MNV の分布を Fig. 6

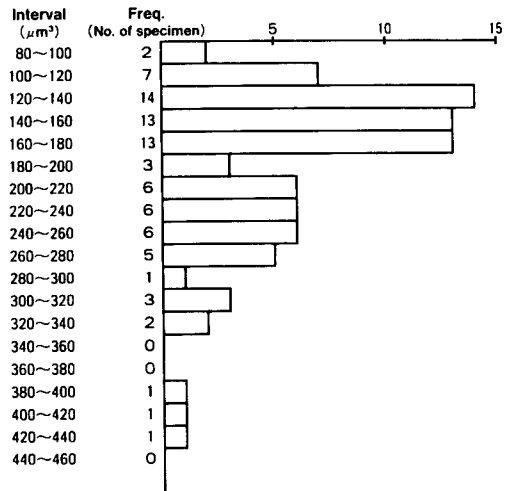


Fig. 6. Distribution of the mean nuclear volume of non-tumorous mucosa in patients with bladder tumor.

に示す。統計学的には、非腫瘍部分の MNV は右すそ広がり分布を示すが、単峰性と考えられた。非腫瘍部分の組織のうち、移行上皮癌と診断された部分(10例, 13標本)の MNV は平均 $279.6 \pm 69.0 \mu\text{m}^3$ であり、control 群より有意に大きく、overlap もなかった (Fig. 7)。組織学的に悪性所見なしと診断された部分(25例, 71標本)の MNV は平均 $174.9 \pm 60.2 \mu\text{m}^3$ であり、control 群との間に有意差を認めた (Fig. 8)。また、71標本中30標本(42.3%)が正常範囲を越えており、症例単位で検討すると、組織学的

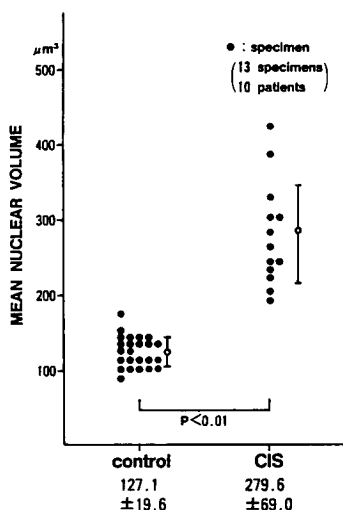


Fig. 7. The mean nuclear volume of carcinoma in situ.

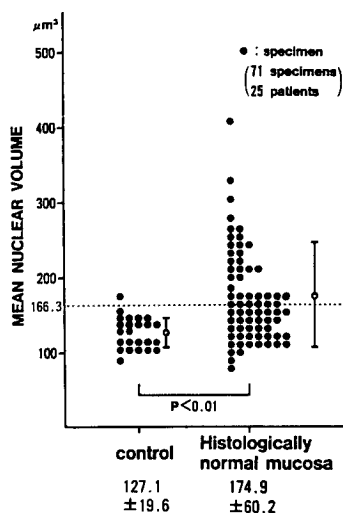


Fig. 8. The mean nuclear volume of the non-tumorous mucosa which are histologically diagnosed as normal in patients with bladder tumor.

には、正常と診断されたにもかかわらず、MNv の異常値を示した部分が25例中17例(68%)に認められた。CIS と診断された部位を含めると、27例中20例(74.1%)において、非腫瘍部分粘膜の MNv が異常値を示していた。非腫瘍部分におけるその他の随伴病変、たとえば dysplasia あるいは炎症所見などの有無については検討しなかった。手術標本にて確認した pT2 以上の invasive tumor についてみると、6例中5例は非腫瘍部分粘膜の MNv の異常値を示した。また、非腫瘍部分の MNv がすべて正常値を示した7例のうち、わずか1例のみが invasive tumor であった。

考 察

膀胱癌において、MNv が予後と非常に良い相関を示すことが、Nielsen らによって初めて報告された⁸⁾。その後彼らはさらに詳細な検討を加えているが⁹⁾、この検査法を追試した報告は見あたらない。われわれが初めて追試に成功し、彼らと同様の結果を得たことはすでに報告した³⁾。今回の症例でも、grade の増加につれて MNv が増大することが確認され、さらに stage ともよい相関を示すことが示された。膀胱癌の stage と grade はその予後を判定する上で非常に重要な要素である、その両者と相関する MNv は膀胱癌の悪性度を表す客観的な指標として非常に有用である。

一方今回の報告の目的は、極性のある組織における測定法を紹介し、それを利用して非腫瘍部分の変化を数量化することにある。Stereology において vertical section とは、ある一定の方向性をもつ組織において、すべての切片がある軸 (vertical axis) に平行に配列しており、しかも切片は vertical axis を中心にして isotropic であるような標本を意味する。今回検討した膀胱移行上皮は基底膜から垂直方向に向かう極性を示し、この方向を vertical axis とみなせば、それと平行に切られた切片は vertical section と見なすことができる。この方法は悪性黒色腫にも応用され、MNv が予後を予知する上で重要な要素であることが証明されている¹⁰⁾。

今回得られた結果には、注目すべきことが3点ある。ひとつは、control 群の MNv の平均が Nielsen の計測結果とほとんど同じであるという点である。Nielsen は 10% formaldehyde で固定し、われわれは 20% のものを使用したにもかかわらず、control 群の MNv は Nielsen の報告⁵⁾では $133 \mu\text{m}^3$ 、われわれの結果は $127.1 \mu\text{m}^3$ とほとんど差がない。このこ

とは、核容積が固定液の濃度差による影響をほとんど受けないことを示す以外に、この測定法が非常に優れた再現性を持つことを証明する点で重要である。今回われわれが control として用いた症例の多くは尿路感染を有し完全な正常者とは言えない。しかし、Nielsen の検討では尿路感染症症例の MNV は正常者よりやや大きい傾向を示しており、非腫瘍症例の上限を決める場合、尿路感染症を含めた症例で検討するのは意味がある。

2 番目に、CIS 群の MNV は明らかに増大しており、control 群との overlap がまったくなかったことも注目すべき結果である。CIS 自体ある程度認められた病変であるとしても厳密に定義されているとは言いがたく、まして dysplasia あるいは atypia といわれる変化は定義が客観性に乏しく、一般的に受け入れられた概念とはいえない²⁾。今回の結果は、MNV が少なくとも CIS を定義する上で客観的な指標となることを示唆するものである。

3 番目に、組織学的に正常と診断された部位に、MNV が増大した部分が発見されたことも興味深い。今回検討した症例はほとんど再発あるいは膀胱全摘例で、症例に偏りがあった可能性はあるとしても、全症例の68%にこのような部位が発見されたことは無視できない。つまり、MNV を CIS の指標として用いることを考えた場合、false positive が非常に多くなることが問題となる。しかし、非腫瘍部分における MNV の増大が、組織診断の如何に関わらず膀胱腫瘍の再発あるいは進行と関係があるとなれば、この検査法は非常に有用な検査法となる。今回の検討では invasive tumor において異常値の出現頻度が高く、正常値を示した症例のほとんどが non-invasive であるという傾向が認められたが、非腫瘍部分における核容積の増大が臨床上的ような性格を持つのか、今回の症例だけでは結論を下すことはできない。再発との関係など今後検討すべき問題である。

今回の検討で、stereology による MNV の計測が、膀胱腫瘍の腫瘍部分だけでなく非腫瘍部分の数量化にも有用であることが示唆された。MNV を悪性度の指標として用いれば、多施設間の共同研究あるいは成績の比較を、客観的なデータのもとで行うことができる。そのためには MNV をもとにした grading system を確立するとともに、施設間あるいは計測者間の再現性についてさらに厳密な検討が必要である。この点に関して、現在デンマーク、オーフス大学との間で共同研究が進行中である。

結 語

前回われわれは、Stereology による測定法の一つである Random section における測定を試み、平均核容積が悪性度の客観的指標となることを示した。今回の検討で、CIS 群は control 群の約2倍の核容積を示し、正常粘膜と明らかに区別できた。本法は非腫瘍部分の変化を客観的に表す方法として有用である。組織学的に正常と診断された粘膜にも核容積が増大した部分が認められ、この部分の膀胱腫瘍における意義についてさらに検討する必要がある。

Acknowledgements. We wish to thank Dr. F. B. Sørensen, Aarhus University for his helpful advice and thoughtful guidance.

文 献

- 1) Wolf H, Olsen PR, Fischer A, et al.: Urothelial atypia concomitant with primary bladder tumor. *Scand J Nephrol* **21**: 33-38, 1987
- 2) Dean PJ and Murphy WM: Carcinoma in situ and dysplasia of the bladder urothelium. *World J Urol* **5**: 103-107, 1987
- 3) 佐々木美晴, 金子嘉志 STEREOLOGY による膀胱癌の平均核容積の測定—POINT SAMPLED INTERCEPTS による測定—. *泌尿紀要* **36**: 909-913, 1990
- 4) Gundersen HJG and Jensen EB: Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J Microsc* **138**: 127-142, 1985
- 5) Baddeley AJ, Gundersen HJG and Cruz-Orive LM: Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* **142**: 259-276, 1986
- 6) Nielsen K: Stereological estimates of nuclear volume in normal mucosa and carcinoma in situ of the human urinary bladder. *Virchows Arch (Cell Pathol)*, **55**: 233-236, 1988
- 7) Brændgaard H and Gundersen HJG: The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Meth* **18**: 39-78, 1986
- 8) Nielsen K, Colstrup H, Nilsson T, et al.: Stereological estimates of nuclear volume correlated with histopathological grading and prognosis of bladder tumour. *Virchows Arch (Cell Pathol)*. **52**: 41-54, 1986
- 9) Nielsen K, Petersen SE and Ørntoft T: A comparison between stereological estimates of mean nuclear volume and DNA flow cytometry in bladder tumors. *Acta Pathol*

- Microbiol Immunol Scand **97**: 949-956, 1989
- 10) Sørensen FB: Objective histopathologic grading of cutaneous malignant melanomas by stereologic estimation of nuclear volume:

Prediction of survival and disease free period.
Cancer **63**: 1784-1798, 1989

(Received on August 8, 1990)
(Accepted on November 27, 1990)