

## 膀胱腫瘍の診断におけるフローサイトメトリーの応用

近畿大学医学部泌尿器科学教室（主任：栗田 孝教授）

松 浦 健

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO THE  
DIAGNOSIS OF BLADDER CARCINOMA

Takeshi MATSUURA

*From the Department of Urology, Kinki University School of Medicine**(Director: Prof. T. Kurita)*

DNA histograms obtained by flow cytometry (FCM) in patients with bladder tumor were analyzed. DNA histogram pattern and calculated proliferation index (PI) can be used to evaluate the presence or the absence of tumor cells and this technique can be applied to the automated cytology in patients with bladder tumor. Furthermore flow cytometry is considered to provide us with useful information about the malignant potential of the tumor as well as the effect of the treatment. In the follow-up examination, our results suggest that flow cytometry may be a valuable addition to the routine urological examination in the conservatively treated patients with superficial bladder tumors.

**Key words:** Flow cytometry, Bladder tumor

## 緒 言

癌細胞は核 DNA 量の増加していることが知られ、一種の腫瘍マーカーとして利用されている。一方、フローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) は個々の細胞の核 DNA 量を短時間で測定し、ある細胞集団の DNA 分布をヒストグラムとして表示できる。通常、体細胞の染色体は2倍体で FCM により 2C の位置に単一のピークを持つ DNA ヒストグラムが得られるが、腫瘍細胞では核 DNA 量の増加にともない、種々のパターンを持つ DNA ヒストグラムが得られる。この点に注目して、膀胱腫瘍の診断への FCM の応用につき検討したので報告する。

## 対象および方法

1979年2月から1983年4月までに近畿大学医学部附属病院で入院治療した膀胱腫瘍症例57例に FCM による検査を行なった。対照は泌尿器科的良性疾患11例とした。内視鏡施行時に生理食塩水でパンピングを行ない、この洗浄液を検体とした。検体処理法、測定法

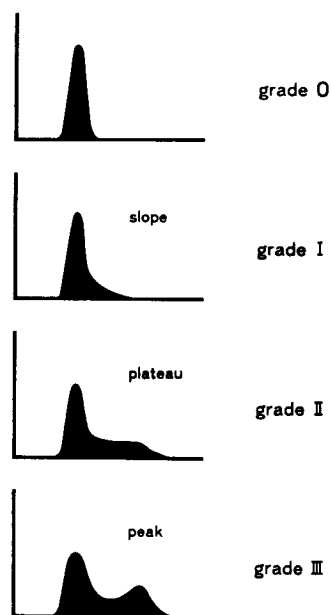


Fig. 1. Grading of DNA histogram

は既報の如く行ない<sup>1,2)</sup>, propidium iodide (PI) 染色液 (50 mg/l) で DNA 染色し, フローサイトメーター (Cytofluofrograf 4800A, 一部は FACS IV) で DNA ヒストグラムを得た. DNA ヒストグラムの解析はパターン分類 (Fig. 1), proliferation index (PI; 全細胞に占める 2 倍体以外の細胞の割合), 幹細胞系列 (stem cell line) の数, 分布から行ない, 細

胞診の自動化への応用の可能性を検討するとともに, 腫瘍の組織学的悪性度, 浸潤度と比較し, 腫瘍の生物学的活性の予測への応用についても検討した.

さらに, 膀胱腫瘍の治療効果判定, 経過観察への応用, 再発の予測について検討した.

Table 1. Comparison of the results of flow cytometry with cytology.

Diagnosis of Bladder Cancer by Cytological Examination				
Specimen	No. Exams	Cytology		
		+	±	-
Bladder cancer	76	46	12	18
Post TUR-Bt	13	0	6	7
Benign disease	11	1	6	4

Diagnosis of Bladder Cancer by FCM

Specimen	No. Exams	FCM	
		positive	negative
Bladder cancer	76	71	5
Post TUR-Bt	13	3	10
Benign disease	11	0	11

Table 2. Comparison of the results of FCM grade with pathological diagnosis.

Histological grade*	DNA histogram grade			
	0	I	II	III
G1	2	1	1	1
G2	2	3	14	3
G3	1	2	5	8

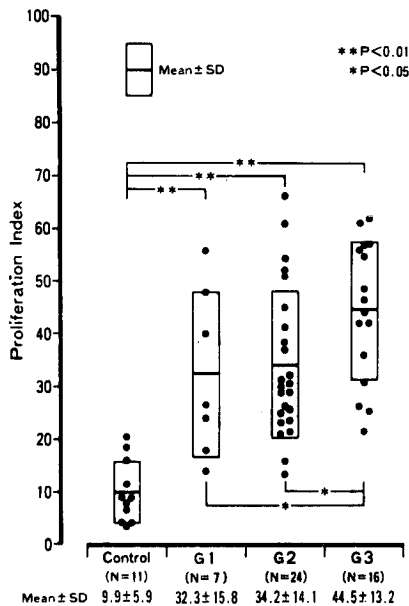
\*UICC

Histological Stage and FCM Grade

Histological stage*	DNA histogram grade			
	0	I	II	III
pT1	3	5	11	4
pT2	1		3	3
pT3	1		3	6
pT4				3

\*UICC

Histological Grade and Proliferation Index



Histological Stage and Proliferation Index

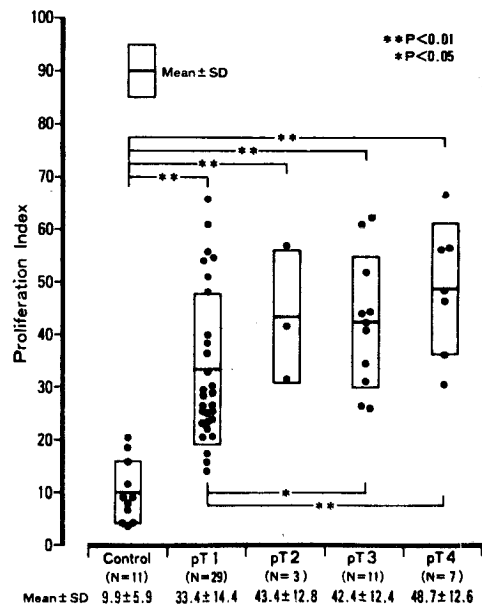


Fig. 2. Comparison of proliferation index with pathological diagnosis.

結 果

1. DNA ヒストグラムパターンによる検討

FCM により膀胱腫瘍症例 76 検体中 71 検体 (93.4%) に異常が認められ、同時に施行した細胞診では陽性 46 検体 (60.5%), 疑陽性 12 検体 (15.8%), 陰性 18 検体 (23.7%) であった (Table 1).

また、FCM grade を腫瘍の組織学的悪性度、浸潤度 (UICC 分類) と比較すると、組織学的悪性度が高いほど FCM grade も高く、浸潤度でも pT1 以外は FCM grade と相関する傾向が認められた (Table 2).

2. Proliferation index (PI) による検討

PI を組織学的悪性度、浸潤度と比較すると、膀胱腫瘍症例は対照群より明らかに高値を示し、grade 1,2 と 3, stage 1 と 3,4 には有意差が認められた。また対照群の PI の平均+2 SD の 21.7% を正常上限とすると、腫瘍の存在診断は 88.0% の正診率であった (Fig. 2).

また、腫瘍の生物学的悪性度が高いと考えられる多発例、上皮内癌および進行癌症例で比較的高い PI 値を示した (Fig. 3).

3. 幹細胞系列の検討

幹細胞系列の分布はフローサイトメーターの精度の問題で DNA index としては検討できなかったが、悪性度別には grade 2,3 で grade 1 より異数倍数体の割合が多く認められた。浸潤度も high stage では 3 倍体領域以上に幹細胞系列が多くなる傾向が認められた (Fig. 4).

幹細胞系列の数は high grade で 2 つ以上存在する症例が多くなる傾向があり、浸潤度では明らかな傾向は認めないが stage 3,4 で幹細胞系列が 3 つ存在する症例が認められた (Fig. 5).

4. 治療効果判定、経過観察への応用

TUR-Bt 前後に採取した検体で PI を比較すると、姑息的 TUR-Bt 後には高値を示す症例が多いが、根治的 TUR-Bt 後には 1 例以外で PI は低下し正常値になった (Fig. 6).

FCM で経過観察した 3 例を Fig. 7 に示す。症例 1 は PI で経過観察し、腫瘍存在時に PI は高く、有効な治療により正常値へ低下した。症例 2 は根治的 TUR-Bt 後も PI が高値を示し、DNA ヒストグラムでも異数倍数体のピークを認めた。細胞診、内視鏡でも異常は認めなかったが、1 年後に腫瘍が再発した。症例 3 の DNA ヒストグラムは生検検体によるが、術前放射線照射に反応して FCM grade は低下

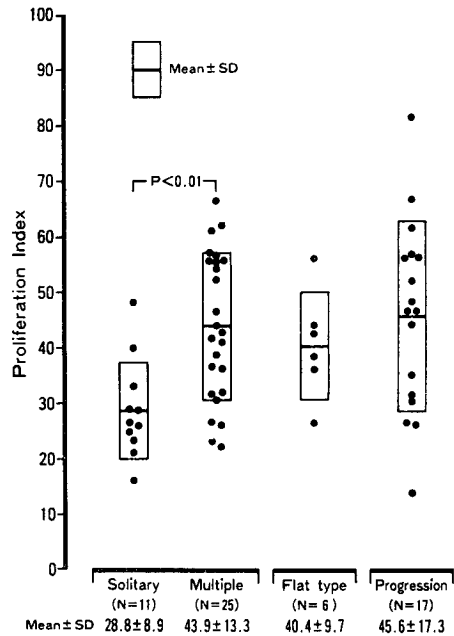


Fig. 3. Proliferation index for various state of tumor.

した。

5. FCM による TUR-Bt 後の再発予測

FCM により腫瘍の再発を予測できないかどうかを、初回治療前の検体で検討した。FCM grade を非再発例、再発例で比較すると、明らかな差異を認めないが、再発例で FCM grade II,III がやや多かった (Table 3). PI には有意差を認めなかった (Fig. 8). 幹細胞系列の分布は非再発例、再発例で明らかな差異は認められないが、幹細胞系列が 2 つ以上あったのは非再発例中 1 例のみであったのに対し、再発例の半数に複数の幹細胞系列を認めた (Table 4).

考 察

FCM は細胞浮遊液を層流の原理を応用したフローシステム内に流し、レーザー光を照射して各種パラメーターを測定する。測定の高速度、定量性、高精度が特徴で、ある集団の特性を短時間のうちに定量的かつ正確に把握することができる。応用分野も腫瘍学、免疫学など多岐にわたり、当教室でも核 DNA 量をパラメーターとして、膀胱腫瘍の剝離細胞診への応用について検討を重ねてきた<sup>1-3)</sup>。今回は症例を増やし、腫瘍の生物学的活性についても検討を加えた。

DNA ヒストグラムを grade 分類、あるいは定量化するために PI を算出して検討し、同時に施行した細胞診の成績と比較した結果をまとめたのが Table

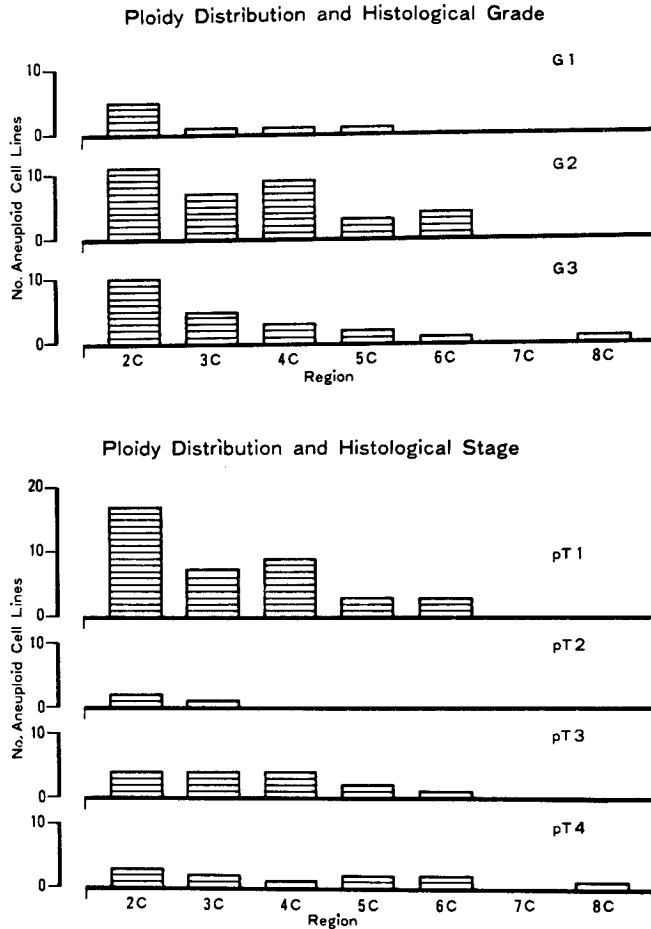


Fig. 4. Comparison of ploidy distribution with pathological diagnosis.

5である。FCMは細胞診より正診率が高く、偽陽性、偽陰性はむしろ少なかった。Collsteら<sup>4)</sup>(1980)も診断基準を決めて膀胱洗浄液のDNAヒストグラムから膀胱腫瘍の87.0%が診断可能であったと、われわれのPIによる診断率と同様の成績を報告し、本法の有用性を強調している。さらに本法は細胞診と異なり、結果判定に習熟を要しないため、腫瘍の存在診断に関しては有用な検査法で、現在までの諸成績から直ちに細胞診の自動化へ応用可能であると考えられた。

以上の結論に加え、FCM grade, PIを腫瘍の組織学的悪性度、浸潤度と比較すると、high grade, high stageほどFCM grade, PIも高くなる傾向を示し、細胞診以上の情報が得られるものと考えられた。さらにDNAヒストグラムを解析すると、幹細胞系列の数や分布も腫瘍の悪性度、浸潤度と相関傾向を示し、再発例の半数に複数の幹細胞系列を認めたことから、予後推測も含めた腫瘍の生物学的活性もFCMで予測

可能と思われた。これはFCMに最も期待されている点で、膀胱腫瘍の治療方針を決定するに際し有用な情報を提供し得るものと思われる。Gustafsonら<sup>5)</sup>(1980)も20例の膀胱腫瘍をFCMで検討し、2つ以上の異数倍性細胞系列をもつ7例は全例2年以内に再発し、進行例ではFCMより算出した増殖率(S期細胞の割合)は高く、異数倍性細胞の占める割合も多くなると報告している。Farsundら<sup>6)</sup>(1983)も腫瘍と周辺部粘膜の生検検体から得たDNAヒストグラムを検討し、異数倍性細胞を持ち、S<sub>2</sub>期細胞の多い腫瘍が高率に周辺部位へ浸潤すると述べている。S期細胞の割合も、生物学的活性を示す良い指標になり得ると思われるが、通常のDNAヒストグラムからのS期細胞数測定は異数倍性細胞が存在する場合はコンピュータ解析が困難になることが多い。しかし、最近では放射線増感剤として臨床使用されているbromodeoxyuridine (BrdU)とこれに対する

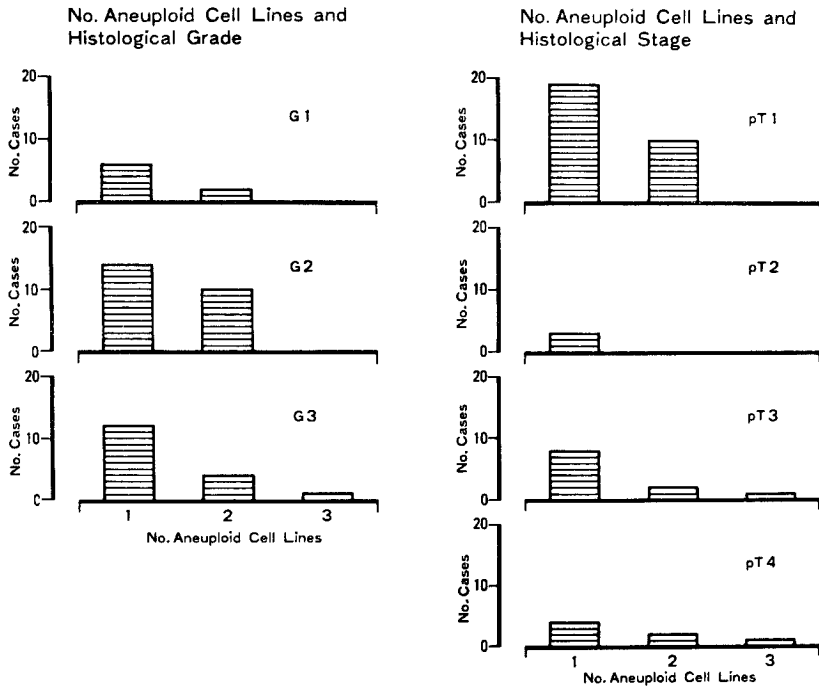


Fig. 5. Comparison of the number of aneuploid cell lines with pathological diagnosis.

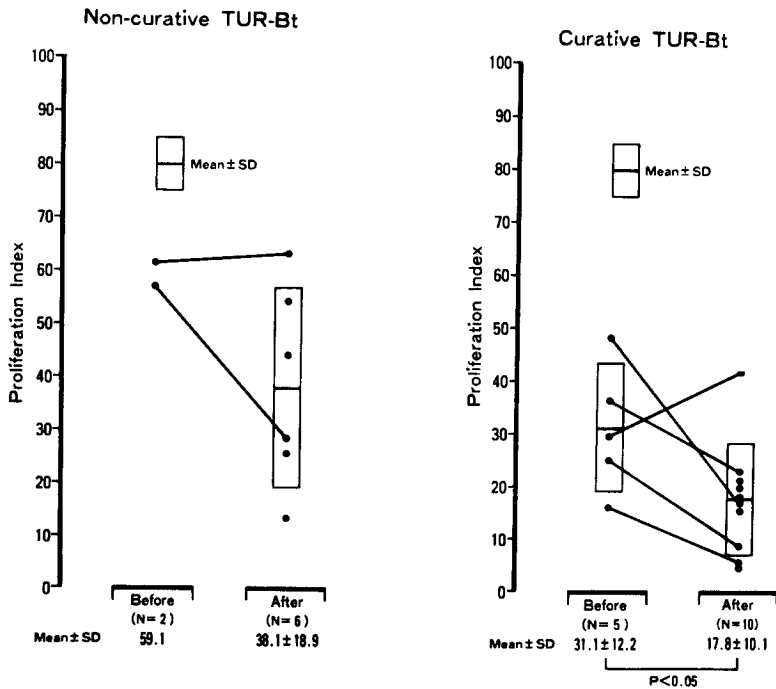
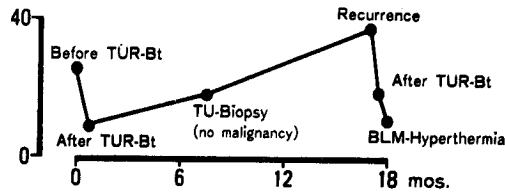
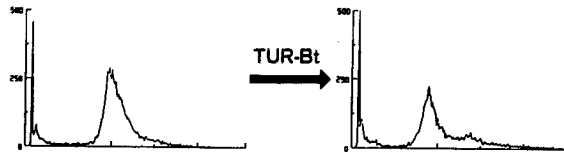


Fig. 6. Evaluation of the radicality of TUR-Bt.

Case 1 A.K. 72 F



Case 2 T.T. 69 M



Case 3 E.S. 56 F

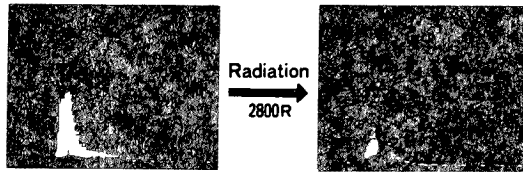


Fig. 7. Presentation of three cases studied by flow cytometry.

Table 3. FCM grade and tumor recurrence.

Cases	No. cases	FCM grade			
		0	I	II	III
No recurrence	6	■ ■ ■ ■			■ ■ ■ ■
Recurrence	14	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■

単クローン抗体を重いて二重蛍光染色し、DNA 分布と同時に S 期細胞数を直接測定できる方法が開発応用されている<sup>7)</sup>。本法を臨床応用するためには、さらに検討を要するが、BrdU を用いた生長解析法は大いに期待されている。

FCM は膀胱保存的治療後に、経過観察や治療効果判定にも利用され<sup>8,9)</sup>、今回の検討でも有用性を確認した。特に TUR-Bt の根治性判定へ応用可能と思われる興味ある成績が得られた。PI で検討した結果、根治的 TUR-Bt 後は 1 例を除き正常値になった。術後異常値を示した症例は 1 年後に再発し、DNA ヒストグラムから、2 つの幹細胞系列を持っていたもの

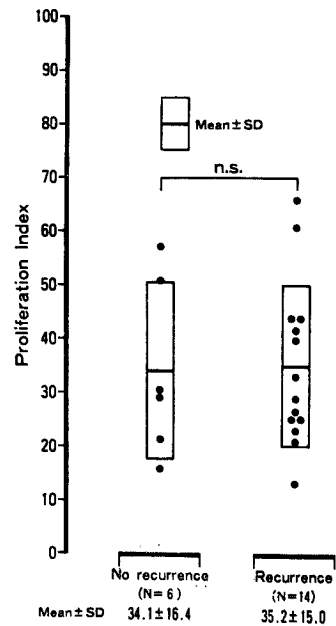


Fig. 8. Proliferation index and tumor recurrence.

Table 4. Stem cell line and tumor recurrence.

Cases	No. Cases	No. stem cell lines		
		1	2	3
No recurrence	6	■ ■ ■ ■	■	
Recurrence	14	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■

Cases	Region				
	2C	3C	4C	5C	6C
No recurrence	■ ■ ■ ■	■	■ ■		■
Recurrence	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■	■

Table 5. Diagnostic value of flow cytometry and cytology.

	FCM		Cytology
	Grade	PI	
Accurate diagnosis	93.4 %	88.0 %	60.5 %
False negative	6.6	12.0	23.7
False positive	0	0	15.8

と考えられた。また、膀胱腫瘍の治療後、定期的にFCMで観察することにより、腫瘍再発の確定診断の補助、さらに再発の早期発見にも応用可能と考えられた。

FCMは現時点でも膀胱腫瘍の細胞診への応用のみでなく、予後推測も含めた腫瘍の生物学的活性の判定、治療効果の判定、経過観察への応用が可能であると考えられる。さらに、FCMにより腫瘍細胞のRNA測定<sup>10)</sup>や染色体分析<sup>11)</sup>を行なう試みもなされ、FCMを用いた種々の検査法は今後ますます発展することが予想され、膀胱腫瘍の診断や生物学的活性の判定もより正確に行なえるものと思われる。

結 語

FCMの膀胱腫瘍の診断への応用について検討し、剝離細胞診への応用は十分可能であると考えられた。さらに、腫瘍の生物学的活性もある程度推測可能で、臨床的に有用性は高いものと思われた。また、膀胱腫瘍の治療効果判定、膀胱保存的治療後の経過観察にも利用可能と考えられる結果を得た。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた本教室栗田孝教授に深謝致します。

文 献

- 1) 秋山隆弘・永井信夫・松浦 健・井口正典・八竹直・栗田 孝：尿路悪性腫瘍における Flow cytometry の応用，第1報 DNA histogramによる膀胱腫瘍の剝離細胞診の試み。日泌尿会誌 72：178～184，1981
- 2) Akiyama T, Matsuura T, Yachiku S and Kurita T：Detection of bladder cancer by flow cytometry. Proceedings of the XIX Congress de la Societe Internationale d'Urologie：129～132，1982
- 3) 松浦 健・辻橋宏典・神田英憲・秋山隆弘・栗田孝：尿路悪性腫瘍における Flow cytometry の応用。第3報 DNA ヒストグラム定量化による膀胱腫瘍剝離細胞診の試みおよび治療効果判定、経過観察への応用。日泌尿会誌 76：89～95，1985
- 4) Collste LG, Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless TK, Sogani, P, Grabstald H, Whitmore WF Jr and Melamed MR：Flow cytometry in bladder cancer detection and evaluation using acridine orange metachromatic nucleic acid staining of irrigation cytology specimens. J Urol 123：478～485，1980
- 5) Gustafson H, Tribukait B and Esposti PL：The prognostic value of DNA analysis in primary carcinoma in situ of the urinary bladder. Scand. J Urol Nephrol 16：141～146，1982
- 6) Farsund T, Hoestmark JG and Laerum OD：Relation between flow cytometric DNA distribution and pathology in human bladder cancer. Cancer 54：1771～1777，1984
- 7) 星野孝夫・長島 正：抗 BrdU 単一クローン抗体を用いた成長解析。関西フローサイトメトリー研究会機関誌 3：4～9，1985
- 8) Klein FA, Whitmore WF Jr, Herr HW and Melamed MR：Flow cytometric followup of patients with low stage bladder tumors. J Urol 128：88～92，1982
- 9) Farsund T, Laerum OD, Hostmark J and Jordfald G：Local chemotherapeutic effects in bladder cancer demonstrated by selective

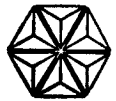
sampling and flow cytometry. J Urol 131 : 22~32, 1984

- 10) Klein FA, Melamed MR, Whitmore WF Jr, Herr HW, Sogani PG and Darzynkiewicz Z : Characterization of bladder papilloma by two-parameter DNA-RNA flow cytometry. Cancer Res 42: 1094~1097, 1982

- 11) Wijkström H, Granberg-Öhman I and Tribukait B Chromosomal and DNA patterns in transitional cell bladder carcinoma. A comparative cytogenetic and flow-cytofluorometric DNA study. Cancer 53 : 1718~1723, 1984

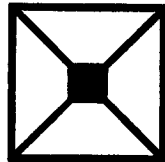
(1986年3月11日受付)

# ブリストルのCisplatin



## 新しいタイプの抗悪性腫瘍剤

# BRIPLATIN®



抗悪性腫瘍剤



**ブリプラチン**  
 (一般名 シスプラチン)

■健保適用

### 【効能又は効果】

下記疾患の自覚的ならびに他覚的症狀の寛解。  
睾丸腫瘍、膀胱癌、腎盂・尿管腫瘍、前立腺癌、卵巣癌。

●用法・用量、使用上の注意等は添付説明書をご参照ください。



発売元  
ブリストル・マイヤーズ株式会社

医薬品事業部・バイオケミカル事業部・クレイロール事業部  
東京都港区赤坂7-1-16 電話03(403)3211(代表)