

尿路上皮癌診断における蛍光尿細胞診の有用性

山道 岳¹, 中田 渡¹, 吉村 明洋¹
 辻村 剛¹, 辻本 裕一¹, 任 幹夫¹
 三村 明弘², 三輪 秀明³, 辻畑 正雄¹
¹労働者健康安全機構大阪労災病院泌尿器科
²労働者健康安全機構大阪労災病院中央検査部
³労働者健康安全機構大阪労災病院病理診断科

USEFULNESS OF FLUORESCENT URINE CYTOLOGY
IN THE DIAGNOSIS OF UROTHELIAL CARCINOMA

Gaku YAMAMICHI¹, Wataru NAKATA¹, Akihiro YOSHIMURA¹,
 Go TSUJIMURA¹, Yuichi TSUJIMOTO¹, Mikio NIN¹,
 Akihiro MIMURA², Hideaki MIWA³ and Masao TSUJIHATA¹

¹The Department of Urology, Osaka Rosai Hospital

²The Department of Laboratory Medicine, Osaka Rosai Hospital

³The Department of Diagnostic Pathology, Osaka Rosai Hospital

Five-aminolevulinic acid, an amino acid that is metabolized in the cytoplasm to become protoporphyrin IX, is used in photodynamic diagnosis in various carcinomas because it accumulates in higher concentrations in tumor tissue than in normal tissue. 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescent urine cytology is more sensitive than conventional urine cytology only in low grade urothelial carcinoma (UC), but it showed a tendency for higher sensitivity in high grade UC. To increase the number of patients and reconsider our previous findings, we compared the sensitivity and specificity of preoperative urine cytology and fluorescent urine cytology in 343 patients diagnosed as having UCs pathologically (215 bladder cancers, 128 upper tract UCs) and 197 non-cancer patients at Osaka Rosai Hospital from March 2013 to December 2019. The sensitivities of fluorescent urine cytology and conventional urine cytology were 81.1% and 63.3% ($p < 0.001$), respectively, and specificities were 92.9% and 93.9% ($p = 0.84$), respectively. The sensitivity of fluorescent urine cytology was superior to that of conventional urine cytology in both low grade UC (76.8% vs 41.1%, $p < 0.001$) and high grade UC (83.1% vs 74.0%, $p = 0.023$).

(Hinyokika Kyo 66 : 377-381, 2020 DOI: 10.14989/ActaUrolJap_66_11_377)

Key words : 5-Aminolevulinic acid, Urine cytology, Urothelial carcinoma, Sensitivity, Specificity

緒 言

本邦における膀胱癌は過去15年間で罹患率が1.4倍、死亡率が2.2倍と増加している¹⁾。しかし、日常臨床における膀胱癌の診断方法は15年前と変わらず膀胱鏡検査と尿細胞診検査が主流である。一方、2019年に更新された本邦の膀胱癌診療ガイドラインでは、膀胱鏡検査において白色光より検出率を向上させる技術として5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) を用いた光力学的診断の有用性が記載されている¹⁾。同様にEAUのガイドラインでも尿細胞診陽性例や上皮内癌 (carcinoma in situ, CIS) が疑われる高リスク非乳頭状病変例では光力学的診断を利用した膀胱生検が強く推奨されている²⁾。ヘム生合成の前駆体で、5-ALAの代謝産物であるプロトポルフィリンIXは正常細胞よりも癌細胞に多く蓄積する特徴と、青色

励起光で観察すると蛍光発赤する特徴があり脳外科分野³⁾や皮膚科分野⁴⁾では5-ALAが日常臨床で利用されている。泌尿器科の分野でも2017年12月に経尿道的膀胱腫瘍切除術 (transurethral resection of bladder tumor, TURBT) 前のアラグリオ®内服が承認され微小病変やCIS病変の識別性が向上するなど⁵⁾、光力学的診断はさらなる発展が期待される分野である。

一方、膀胱癌の新規尿中バイオマーカーとして本邦では2019年1月に遺伝子検査キットであるUroVysion®が保険承認され感度69~87%、特異度89~96%と報告されている¹⁾。しかしUroVysion®は再発性膀胱癌の補助診断としてしか利用できず検査費用も高額である⁶⁾。われわれは先行研究で、5-ALAを用いた蛍光尿細胞診検査が従来の尿細胞診検査と比べて安価でありながら、低異型度の尿路上皮癌の検出に有用であることを報告した⁶⁾。しかし高異型度腫瘍に

対しては有用な傾向を示すのみであった ($p=0.17$).
そこで今回、高異型度尿路上皮癌においても蛍光尿細胞診が有意差をもって感度が高いか症例数を増やして再検討した。

対象と方法

2013年3月から2019年12月までに大阪労災病院で診断した膀胱癌215例、腎盂尿管癌128例、非担癌197例の計540例を対象とし、術前に採取した尿を用いて従来の尿細胞診と蛍光尿細胞診の感度と特異度を後ろ向きに検討した。膀胱癌はTURBTもしくは経尿道的膀胱生検術で、腎盂尿管癌は腎尿管摘除術でそれぞれ病理学的に尿路上皮癌と診断した症例を担癌群とし、非担癌群は泌尿器科悪性腫瘍の既往がなく良性疾患で入院となった症例とした。

尿検体は全例で入院中に採取し、泌尿器科的な処置が行われる前に自排尿で150 ml以上採取されたもののみを検討した。尿検体は採取後1時間以内に従来の尿細胞診用と蛍光尿細胞診用と半分ずつに分けて蛍光尿細胞診検査は以下の手順で行った^{6,7)}。まず1,500回転/分で尿を5分間遠心分離し、沈渣に最小必須培地 (minimum essential medium, MEM 11095080, GibcoTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を2 ml 加えて細胞浮遊液とした。これに5-ALA (5-Aminolevulinic Acid Hydrochloride, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を1.2 mMになるように添加し、遮光の孵卵器内において37°Cで2時間培養した。これを再度1,500回転/分で5分間遠心分離し、沈渣を励起用の400~440nm bandpass filter と吸収用の610 nm longpass filter 装填の蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE Ni, 株式会社ニコン, 東京, 日本) を用いて観察し、

蛍光発赤している上皮細胞が存在しているかを診断した。蛍光尿細胞診を観察する際の蛍光顕微鏡の輝度やコントラストなどの設定は推奨通りの初期設定で行った (1.3 Mp, CCD Mode 1)。また観察時の注意点として、photobleaching 現象を回避するため青色光の照射時間ができるだけ5分以内になるように発赤細胞の撮影を行い、発赤の強弱の判定は撮影した画像で行った。

従来の尿細胞診も蛍光尿細胞診も1人の経験豊富な病理医が判定し、尿細胞診はclass 1~3を陰性、class 4, 5を陽性とした。蛍光尿細胞診は強く発赤しているもののみを陽性としてそれ以外は陰性とした^{6,8)} (Fig. 1)。蛍光顕微鏡で撮影した画像は後でまとめて評価することによって、従来の尿細胞診の判定によるバイアスがかからないようにした。患者背景として、年齢、性別、原疾患、pT stage、腫瘍異型度を検討し、それぞれにおける従来の尿細胞診と蛍光尿細胞診の感度と特異度を比較した。統計学的分析はJMP version 14.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を使用し統計学的解析はWilcoxon 検定、 χ^2 乗検定で行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。この研究は大阪労災病院倫理委員会の承認を受けている (承認番号31-110)。

結 果

担癌群と非担癌群の患者背景を Table 1 に示す。担癌群は非担癌群に比べて高齢 ($p < 0.001$) で男女比は同様であった ($p = 0.91$)。膀胱癌215例の内、初発は105例で再発が110例であった。非担癌群197例の内訳は前立腺肥大症140例、尿路結石症28例、尿路感染症22例、腎盂尿管移行部狭窄症3例、放射線性膀胱炎2例、陰嚢水腫1例、膀胱内反性乳頭種1例であっ

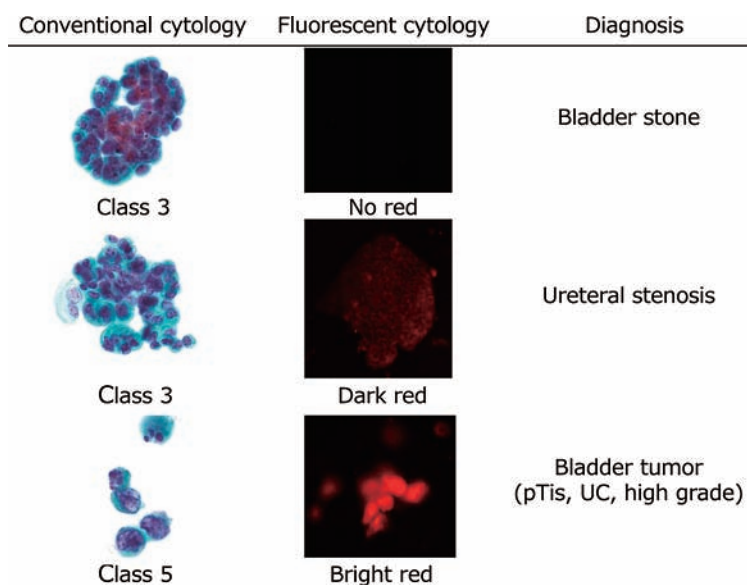


Fig. 1. Photographic comparison between conventional urine cytology and 5-ALA-induced fluorescent urine cytology ($\times 40$).

Table 1. Patient characteristics

Characteristic	UC (n = 343)	Control (n = 197)	P-value
Age, yrs	75 (45-90)	72 (27-90)	<0.001
Sex, M : F	267 : 76	152 : 45	0.91
Diagnosis			
BT	215	—	
UTUC	128		
BPH		140	
Urinary stone		28	
Infection		22	
Other		7	
pT stage			
≤pT1	229		
≥pT2	114		
Tumor grade			
Low grade	112		
High grade	231		

UC: urothelial carcinoma. BT: bladder tumor. UTUC: upper tract urothelial carcinoma. BPH: benign prostatic hyperplasia. 5-ALA: 5-aminolevulinic acid.

Table 2. Sensitivity and specificity of conventional urine cytology and 5-ALA-induced fluorescent urine cytology

	Cancer	Conventional	5-ALA	P-value
Sensitivity	All UC	63.3% (217/343)	81.1% (278/343)	<0.001
	BT	62.8% (135/215)	77.2% (166/215)	0.002
	UTUC	64.1% (82/128)	87.5% (112/128)	<0.001
Specificity	All UC	93.9% (185/197)	92.9% (183/197)	0.84

UC: urothelial carcinoma. BT: bladder tumor. UTUC: upper tract urothelial carcinoma. BPH: benign prostatic hyperplasia. 5-ALA: 5-aminolevulinic acid.

た。

尿路上皮癌に対する蛍光尿細胞診と従来の尿細胞診の感度は81.1%と63.3% (p<0.001) で蛍光尿細胞診が有意に優れていた。特異度はそれぞれ92.9%と93.9% (p=0.84) で同等に高かった (Table 2)。蛍光尿細胞診での偽陽性は14例であり内訳は尿路感染症7例, 尿路結石症4例, 前立腺肥大症2例, 膀胱内反性乳頭種1例であった。従来の尿細胞診での偽陽性は12例であり内訳は尿路感染症5例, 前立腺肥大症4例, 尿路結石症2例, 放射線性膀胱炎1例であった。偽陽性と判断した症例はいずれも, 経尿道的膀胱生検術と両側腎盂尿採取術と造影CTを行っており, いずれの検査でも尿路上皮癌所見を認めなかったもので, さらに3カ月ごとに尿細胞診を再検査して1年以内に尿細胞診の陰性化を確認している。

サブグループ解析の結果を Table 3 に示す。蛍光尿細胞診は, 年齢, 性別, 癌種, pT stage, 腫瘍異型度

Table 3. Sensitivity of conventional urine cytology and 5-ALA-induced fluorescent urine cytology for UC in the subgroup analysis

Characteristic	Conventional	5-ALA	p Value
Age <76 yrs	64.9% (120/185)	79.5% (147/185)	0.003
Age ≥76 yrs	61.4% (97/158)	82.9% (131/158)	<0.001
Male	66.3% (177/267)	82.4% (220/267)	<0.001
Female	52.6% (40/76)	76.3% (58/76)	0.004
BT	62.8% (135/215)	77.2% (166/215)	0.002
UTUC	64.1% (82/128)	87.5% (112/128)	<0.001
≤pT1	61.1% (140/229)	81.2% (186/229)	<0.001
≥pT2	67.5% (77/114)	80.7% (92/114)	0.034
Low grade	41.1% (46/112)	76.8% (86/112)	<0.001
High grade	74.0% (171/231)	83.1% (192/231)	0.023

UC: urothelial carcinoma. BT: bladder tumor. UTUC: upper tract urothelial carcinoma. BPH: benign prostatic hyperplasia. 5-ALA: 5-aminolevulinic acid.

に関わらず従来の尿細胞診よりも感度が優れていた。

考 察

5-ALA はミトコンドリア内におけるヘム合成過程で生成される天然のアミノ酸で, その代謝経路の最終段階でプロトポルフィリンⅨに2価鉄が挿入されてヘムとなる。このプロトポルフィリンⅨこそが光活性を有しており青色の可視光 (375~445 nm) で励起されると赤色光 (600~670 nm) を発する。癌細胞内ではポルフィリン代謝関連酵素の活性異常やミトコンドリア膜に発生しているトランスポーターの発現異常により, プロトポルフィリンⅨが正常細胞よりも過剰集積するため^{9,10)} 様々な癌腫で 5-ALA は光力学的診断に利用されている。特に尿路上皮癌細胞は正常上皮細胞よりも9~16倍もプロトポルフィリンⅨが集積するため¹¹⁾ 光力学的診断が利用しやすい癌種である。1996年に世界で最初に膀胱癌に対する 5-ALA を用いた光力学的診断の有用性が報告され, 3%濃度の 5-ALA 溶液を膀胱癌患者の膀胱内に注入して青色光を用いた膀胱鏡で観察すると白色光での観察よりも膀胱癌の検出感度が高かった (96.9% vs 72.7%, p<0.001)¹²⁾。その後, 5-ALA を TURBT 術前に経口摂取し術中に青色光で観察する事で白色光のみと比べて, 膀胱 CIS の検出感度が上昇し膀胱癌の無再発生存期間の延長が報告されている¹³⁾。

今回われわれが用いた蛍光尿細胞診の作成方法は, 藤本らの方法¹⁴⁾を参考に市中病院でも行えるように

われわれが改変したものである⁶⁻⁸⁾。すなわち CO₂ インキュベーターではなく遮光の孵卵器を用いて 5-ALA の培養を行ったが、過去の報告と遜色ない結果が得られた。一方、膀胱癌に対する 5-ALA を用いた蛍光尿細胞診は低異型度癌においてのみ従来の尿細胞診より感度が優れているという報告しかない^{6,15)}。これは従来の尿細胞診の感度が低異型度癌においては特に低いためだと考えられる。しかしわれわれの予後に影響する尿路上皮癌は低異型度癌より高異型度癌であり^{16,17)}、今回の検討では高異型度癌においても蛍光尿細胞診の感度が従来の尿細胞診よりも優れていることを示すことができた。過去の報告では、高異型度尿路上皮癌の症例数が32例¹⁵⁾や113例⁶⁾と少なかったが、今回の検討では231例と多かったので統計学的な差が生じたと考えられる。

膀胱癌患者に対する光力学的診断の方法として、5-ALA を経口摂取する方法と経尿道的に膀胱内に投与方法と今回われわれが用いた体外で培養する方法とがあるが、われわれの用いた体外法なら患者への侵襲がまったくないという利点がある。なお、今回の検討で調節した 5-ALA の濃度は 1.2 mM であるが、プロトポルフィリンⅨが最も蛍光発赤するためのアミノレブリン酸の至適濃度が 1~2 mM の範囲であるという報告に合致している¹⁸⁾。

光力学的診断では特に偽陽性が問題となるため、今回の検討では蛍光が弱発赤のものはすべて陰性としたが、14例の偽陽性と65例の偽陰性を認めた。偽陽性の原因は炎症や扁平上皮化生や異形成や過形成や前癌病変と考えられており¹⁹⁾、今回の検討でも偽陽性の 50% (7例/14例) は炎症性疾患であった。偽陰性の原因に関しては、photobleaching 現象で蛍光発赤が弱まっていた細胞を陰性と診断した可能性や、採取した尿検体は1時間以内に遠心分離を行うようにしていたが、それでも癌細胞内のミトコンドリアが経時的に失活し 5-ALA が代謝されず偽陰性となっていた可能性がある⁶⁾。

膀胱癌と腎盂尿管癌に対する尿細胞診の感度はそれぞれシステマティックレビューで55%²⁰⁾、40%²¹⁾であり、特に低異型度癌の場合はさらに感度が下がる。そのため新規尿中バイオマーカーの検討が多くなされており、膀胱癌における感度と特異度はそれぞれ NMP22 で71%と73%、CK18-8 で60%と87%、BTA で48%と92%、UroVysion で67%と72%である^{22,23)}。しかし感度と特異度以外に検査時間や費用の点からも、本邦の日常臨床においては尿細胞診以外の尿中バイオマーカーが利用されないのが現状である。その点でも蛍光尿細胞診は安価かつ簡便で日常臨床に有用な検査と考えられる⁶⁾。

今回の検討の limitation の1つ目は単施設の後ろ向

きの検討であることだ。2つ目は、フォローアップの期間が短く、偽陽性という診断を1度の白色光下の膀胱生検術と造影 CT による上部尿路評価と腎盂尿細胞診と尿細胞診の陰性化で行ったが、もっと長期的に判断すべきかもしれない点である。3つ目は、蛍光診断が観察者の主観によるもので定量化できていない点である。しかしプロトポルフィリンⅨは photobleaching 現象という、ひとたび退色してしまうと2度と発赤しなくなる特徴を有する。これは青色光照射に伴い励起に必要な活性酸素種が生成されなくなり赤色発光が速やかに退色する現象である。このため蛍光発赤の観察時は可及的迅速に対応しなければならないという点から厳密な定量化は難しい²⁴⁾。分光スペクトル解析法でプロトポルフィリンⅨの蛍光ピーク値を測定したり²⁵⁾ 発赤画像の赤色光と青色光との比を測定したり²⁶⁾ と発赤の定量化を試みる報告は散見されるが統一化された方法はない。今後は本手法による蛍光尿細胞診検査が他施設でも同様に有用であるかを検討していきたい。

結 語

尿路上皮癌に対する 5-アミノレブリン酸を用いた蛍光尿細胞診は従来の尿細胞診と比べて、腫瘍異型度に関わらず感度が高く特異度も同等に高かった。

文 献

- 1) 膀胱癌診療ガイドライン, 2019年版, 医学図書出版, 東京, 2019
- 2) Babjuk M, Burger M, Comperat E, et al.: Non-muscle invasive bladder cancer. 5. Diagnosis. 5.14. Summary of evidence and guidelines for transurethral resection of the bladder, biopsies and pathology report. EAU Guideline, 2019
- 3) 脳腫瘍診療ガイドライン, 2016年版, 金原出版, 東京, 2016
- 4) 中村泰大, 浅井 純, 井垣 浩, ほか: 皮膚悪性腫瘍ガイドライン第3版, メラノーマ診療ガイドライン2019. 日皮会誌 **129**: 1759-1843, 2019
- 5) Inoue K: 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int J Urol* **24**: 97-101, 2017
- 6) Yamamichi G, Nakata W, Tani M, et al.: High diagnostic efficacy of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescent urine cytology for urothelial carcinoma. *Int J Clin Oncol* **24**: 1075-1080, 2019
- 7) 三村明弘, 岡部美由紀, 小倉啓介, ほか: 腎盂・尿管カテーテル尿細胞診における 5-アミノレブリン酸蛍光染色法の有用性. *日臨細胞会誌* **55**: 302-307, 2016
- 8) Yamamichi G, Nakata W, Yoshimura A, et al.: High performance of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescent selective upper tract urinary cytology. *Int J*

- Urol **27** : 213–218, 2020
- 9) Schoenfeld N, Epstein O, Lahav M, et al. : The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett* **43** : 43–48, 1988
 - 10) Hagiya Y, Fukuhara H, Matsumoto K, et al. : Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **10** : 288–295, 2013
 - 11) Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, et al. : Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol* **62** : 887–895, 1995
 - 12) Kriegmair M, Baumgartner R, Knüchel R, et al. : Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* **155** : 105–109, 1996
 - 13) Inoue K, Fukuhara H, Shimamoto T, et al. : Comparison between intravesical and oral administration of 5-aminolevulinic acid in the clinical benefit of photodynamic diagnosis for nonmuscle invasive bladder cancer. *Cancer* **118** : 1062–1074, 2012
 - 14) 藤本清秀, 松村善昭, 三宅牧人, ほか : 膀胱癌における 5-aminolevulinic acid を用いた蛍光膀胱鏡下経尿道的膀胱腫瘍切除術および尿中剥離細胞に対する光学的診断. *日レーザー医学会誌* **30** : 399–404, 2010
 - 15) Miyake M, Nakai Y, Anai S, et al. : Diagnostic approach for cancer cells in urine sediments by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic detection in bladder cancer. *Cancer Sci* **105** : 616–622, 2014
 - 16) Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. : Bladder cancer : epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* **66** : 4–34, 2005
 - 17) Margulis V, Shariat SF, Matin SF, et al. : Outcomes of radical nephroureterectomy : a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer* **15** : 1224–1233, 2009
 - 18) Kiesslich T, Helander L, Illig R, et al. : Real-time analysis of endogenous protoporphyrin IX fluorescence from δ -aminolevulinic acid and its derivatives reveals distinct time- and dose-dependent characteristics in vitro. *J Biomed Opt* **19** : 085007, 2014
 - 19) Matsuyama H: Could basic research shed light on false positivity in photodynamic diagnosis? *Int J Urol* **19** : 695–696, 2012
 - 20) Glas AS, Roos D, Deutekom M, et al. : Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer : a systematic review. *J Urol* **169** : 1975–1982, 2003
 - 21) Jin H, Lin T, Hao J, et al. : A comprehensive comparison of fluorescence in situ hybridization and cytology for the detection of upper urinary tract urothelial carcinoma : a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **97** : e13859, 2018
 - 22) van Rhijn BW, van der Poel HG and van der Kwast TH: Urine markers for bladder cancer surveillance : a systematic review. *Eur Urol* **47** : 736–748, 2005
 - 23) Lavery HJ, Zaharieva B, McFaddin A, et al. : A prospective comparison of UroVysion FISH and urine cytology in bladder cancer detection. *BMC Cancer* **17** : 247, 2017
 - 24) Matsuda F, Ikeda N, Kajimoto Y, et al. : Neurosurgical microscopic solid laser-based light inhibits photobleaching during fluorescence-guided brain tumor removal with 5-aminolevulinic acid. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **20** : 120–124, 2017
 - 25) Nakai Y, Ozawa T, Mizuno F, et al. : Spectrophotometric photodynamic detection involving extracorporeal treatment with hexaminolevulinate for bladder cancer cells in voided urine. *J Cancer Res Clin Oncol* **143** : 2309–2316, 2017
 - 26) Zaak D, Frimberger D, Stepp H, et al. : Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. *J Urol* **166** : 1665–1668, 2001

(Received on February 19, 2020)

(Accepted on July 8, 2020)