

尿路上皮癌における Multi-colour fluorescence *in situ* hybridization を用いた診断の検討

—尿細胞診との比較—

大西 哲郎¹, 市川 智彦², 五十嵐辰男³

¹聖隷佐倉市民病院泌尿器科, ²千葉大学医学部泌尿器科

³千葉大学フロンティアメディカル工学研究開発センター

STUDY ON THE DIAGNOSIS OF UROTHELIAL CANCER USING MULTI-COLOUR FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH) —COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN FISH AND CYTOLOGY—

Tetsuro ONISHI¹, Tomohiko ICHIKAWA² and Tatsuo IGARASHI³

¹The Department of Urology, Seirei Citizen Hospital

²The Department of Urology, School of Medicine, Chiba University

³Section for Medical Robotics and Surgical Device Creation,
Research Center for Frontier Medical Engineering, Chiba University

To determine the diagnostic merit or demerit of genetic procedures using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for detecting both new and recurrent urothelial cancer, we analyzed the specimens from 81 out-patients with asymptomatic haematuria, aged over 40, in comparison with urine cytology. Of 10 with atypical cytology, 6 showed positive for FISH, and of these, 4 manifested urothelial cancer. FISH showed higher sensitivity in low/intermediate grade cases compared with cytology (FISH; 66.7% vs cytology; 11.1%). Of 15 primary bladder cancer, 4 showed recurrence, and all of these cases showed a positive FISH reaction, but only 1 in cytology. The sensitivity, specificity and accuracy of FISH tests were 81.2, 72.3 and 74.1%, respectively, and these of cytology were 37.5, 98.5 and 86.4% respectively. The FISH test was superior to cytology for sensitivity, but specificity and accuracy were inferior. The FISH tests could be a potent procedure for detecting urothelial cancer in cases of low/intermediate grade, atypical cytology and surveillance setting.

(Hinyokika Kyo 54 : 253-256, 2008)

Key words : Urothelial cancer, FISH, Diagnosis

緒 言

尿路上皮癌の診断および経過観察には、現在も尿細胞診が重要な検査法として繁用されている。しかし、尿細胞診は検者の熟達度によって大きな差を生じ、そのため施設間でのバラツキが大きく、加えて検出感度も十分ではない^{1, 2)}。

このような臨床的背景をふまえ、個々の症例の生物学的特性を基盤とした検査法もすでに臨床応用されており、本邦においては核蛋白を基盤としたマーカー (NMP-22, BTA)^{3, 4)} が繁用されている。加えて分子細胞遺伝子の解析も欧米においては臨床応用がすすんでいる⁵⁾。

今回、尿中に剥離尿路上皮細胞として存在する細胞の遺伝子変異を、蛍光染色した4遺伝子 probe を用いる multi-colour fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を用い⁵⁾、同時に検査した尿細胞診を比較対照に、FISH を用いた尿路上皮癌の診断および経過観

察における有用性/問題点を検討した。

対象および方法

1) 対象 : 2006年4月より2007年3月末までの期間に無症候性血尿を主訴に来院した40歳以上の患者の内、informed consent (院内倫理基準に基づく) の得られた90名を最初のscreening対象とした。男性 (44名)、女性 (46名)、42~86歳 (平均56歳) であった。また、尿路上皮癌として診断された15例に経過観察 (術後3カ月に1回尿細胞診、FISH および膀胱鏡検査施行) として計22回 FISH 検査を施行した。

2) 方法 : 自然排尿にて採取した尿を検体とした。対照には同時に採取した尿細胞診の結果を用いた。

まず顕鏡上悪性と疑わしい細胞 (大型核、不規則核、不均一 DAPI) を選択し、少なくとも25個以上の細胞にこれら異常が認められた際に FISH 検査法を行った⁵⁾。

FISH 法 : 尿路上皮癌と最も関連性を有する染色体

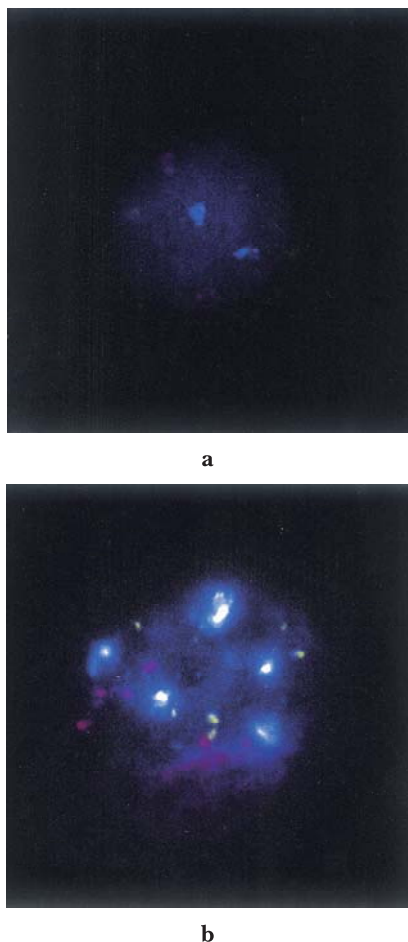


Fig. 1. a: Normal cell with multi-colour fluorescence in situ hybridization (FISH) depicting probes for chromosome 3 (red), 7 (green), 17 (blue) and 9p21 (gold). b: Positive FISH test showing abnormal numbers of chromosomes 3, 7 and 17 and homozygous loss of 9p21 in patients with bladder cancer.

3, 7, 17番⁶⁾のセントロメアプロブ (CEP3, CEP7, CEP17) および特異的染色体領域 9p21 (p16^{INK4a} and p15^{INK4b} gene: 9p21) から構成される mixed probe による multi-colour FISH (UroVysionTM Multi-colour FISH: VYSIS) を用いた。染色体 3 番は赤、染色体 7 番は緑、染色体 17 番は青、染色体 9p21 は金にラベルされている (Figs. 1a, 1b)。

染色は、前処置として 2XSSC 溶液で 37°C 10 分反応させた後、0.5 mg/ml ペプシン (pH 2.0) で 37°C で 13 分処理後、1%ホルムアルデヒドで再固定、pH 7.4 リン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄後アルコール脱水し乾燥した。

次に、標本上にプローブ混合液 3 マイクロを添加し、カバーガラスをかけ、73°C、2 分間加熱した。Hybridization は 37°C にて孵卵器内で一晩おいた。

次に、洗浄のため 0.4XSSC/0.3% NP-40 で 73°C 2 分間処理後、2XSSC/0.1% NP-40 にて反応させた。対比染色は DAPI II (Vysis) で施行し、最後にカバー

ガラスで覆った。

検鏡に際しては X100 倍油浸対物レンズを用い、蛍光顕微鏡にて標本を観察した。染色体 3, 7, 17 番に関しては、4 個以上の細胞に 2 種類以上の signal 増加 (3 dots 以上) で陽性と判断し、一方 9p21 変異の解析は、(CEP9 と 9p21 の two colour FISH) 12 個以上の細胞に欠失が認められた際陽性と判断した⁵⁾。

これら FISH 検査施行時、事前に検者に細胞診結果を知らせることはしなかった。また、細胞診の診断には、Papanicolaou 染色にて、陽性、疑陽性 (atypical) および陰性を診断した⁷⁾。

3) 尿路上皮癌の診断法：対象症例全例何らかの画像診断および膀胱鏡検査にて評価した。すなわち、画像診断法として IVP (造影 CT 後単純撮影 35 例を含む) を 61 例に行い (IVP と CT 併用が 30 例、IVP と MRI/MR-U 併用が 21 例、造影検査を行わなかった 39 例はすべて MRI/MR-U による検査を施行した。また IVP 施行 61 例は上下腹部超音波検査を併せて施行した (膀胱鏡未施行例は全例施行)。また膀胱鏡検査は対象症例中 39 例に施行した。さらに画像および膀胱鏡検査にて強く尿路上皮癌が疑われた例はすべて観血的療法にて組織学的診断を行った。

結 果

90 例に対し、合計 112 回 FISH 検査を試行した (初回 screening が 90 回、経過観察に 22 回施行)。初回 screening 90 例中、31 例 (34%) 陽性、50 例 (56%) 陰性であった。残り 9 例 (10%) は FISH 判定保留であり、したがって初回 screening では 81 例が検討対象である。FISH 陽性症例中、28 例は染色体 3, 7, 17 番の 3 dots 以上の polysomy であり、残り 3 例は 9p21 遺伝子の deletion であった。

1) FISH と細胞診の一致率：FISH と細胞診いずれも陽性であった例は 6 例 (7.4%)、いずれも陰性であった例は 50 例 (61.7%) であり、細胞診と FISH の一致率は 69.1% であった。残り 25 例 (30.9%) は FISH 陽性で細胞診陰性/疑陽性であった。FISH 陰性で細胞診陽性の例はなかった。

2) 細胞診陽性、疑陽性、陰性症例の解析：細胞診陽性例は 6 例 (7.4%) で、これら例はすべて FISH 陽性であり、内訳は初発膀胱癌 5 例、初発腎盂癌 1 例であった。また、細胞診陽性で尿路上皮癌がみられなかった例が 1 例存在した。

細胞診疑陽性例は 10 例 (12.3%) でこの内 FISH 陽性は 6 例であった。この内 3 例が初発膀胱癌、1 例が初発膀胱癌と腎盂癌が混在していた。

細胞診陰性例は 64 例 (71.1%) で、この内 FISH 陽性例が 18 例 (28.1%) みられ、この内 2 例に初発膀胱癌が認められた。

FISH および細胞診いずれも陰性であった50例の内3例初発膀胱癌が認められたが、いずれの例もきわめて微少な病変であった。

3) Grade と疾患感受性: low/intermediate grade 症例 (grade 1+2) は9例であった。FISH にて診断された例は6例 (66.7%) で、細胞診では1例 (11.1%) のみ診断可能であった。一方, high grade 例 (grade 3) は7例認められ、FISH にて全例 (100%) 診断可能であったが、細胞診では5例 (71.4%) が診断可能であった。

4) 経過観察例の診断: 15例の初発膀胱癌の術後経過観察中に4例再発が認められた。これら4例はすべて FISH 陽性 (100%) であったが、細胞診では1例のみ陽性 (25%) であった。

5) FISH および細胞診を用いての尿路上皮癌の疾患感受性、疾患特異性、正診率: FISH を用いた解析結果、腫瘍と診断可能であった13例はすべて3, 7, 17番遺伝子の異常 (polysomy) であり、9p21 遺伝子の異常 (deletion) 例は認められなかった。FISH での感受性は、13/16 (81.2%), 特異性は、47/65 (72.3%), 正診率は、60/81 (74.1%) であった。一方、細胞診のそれは感受性が6/16 (37.5%), 特異性が64/65 (98.5%), 正診率が70/81 (86.4%) であった。また、false-positive 例は、FISH で18/31 (58%), 細胞診のそれは1/7 (14.2%) であった。

考 察

顕微鏡的および肉眼的血尿を主訴に来院した患者の内、特に喫煙などの risk factor を有する患者に対する、膀胱癌を中心とした尿路上皮癌の検索や、これら悪性腫瘍の経過観察において尿細胞診が多く用いられてきた。しかし、尿細胞診の膀胱癌に対する感受性は12.2%から76%と報告により大きなバラツキがある^{3,8)}。

今回、すでに FDA (Food and Drug Administration) の認可に基づき米国において臨床応用されている FISH を用いた尿路上皮癌の screening や術後の経過観察における有用性と問題点を、尿細胞診を対照に比較検討した。今回検討した4遺伝子の異常は、尿路上皮癌との関連性が強く認められた遺伝子集団であり^{6,9)}、これら遺伝子の mixed probe を用いた解析は、尿路上皮癌の診断に有用である可能性を秘めている¹⁰⁾。

尿細胞診と FISH 判定の一致率をみると、われわれの結果は69.1%であり、過去の同様な検討結果⁵⁾である78%に比較してやや低い結果であった。この差異の生じた原因は、われわれの結果が細胞診陰性 (疑陽性も含む) および FISH いずれも陰性であった例が過去の報告⁵⁾に比較して約10%低いこと、およびわれわれ

の FISH 陽性率が過去の報告⁵⁾に比較して約10%高いことなどがあげられる。また、われわれの尿採取法はすべて自然排尿であったが、Laudadio ら⁵⁾の尿 sample には自然排尿に加えて膀胱洗浄尿が混在しており、この尿採取法の差異や、Laudadio ら⁵⁾の検討症例に膀胱刺激例が含まれるなど、われわれの対象 (無症候性血尿症例のみ) との間に母集団の差が存在した可能性がある。

尿路上皮癌を疑って検査を進める際、尿細胞診の結果が疑陽性と判定されることがしばしばある。今回の解析結果でも10例 (12.3%) がその様な例であった。これら症例の内6例で FISH 陽性となり、その内4例に尿路上皮癌が認められた。尿細胞診での疑陽性症例は臨牀的に他に悪性を疑わせる所見がなければ経過観察や尿細胞診再検になる場合が多い。過去の同様な検討から、尿細胞診疑陽性症例の内46%に FISH 陽性例が認められ、この内20%に悪性腫瘍が認められている⁵⁾。われわれの検討でも、また過去の報告⁵⁾からも、今後尿細胞診疑陽性例での FISH を用いた追加検査により診断率の向上が示唆された。

細胞診は low grade 症例での検出率が低いことが知られている⁷⁾。同様の結果がわれわれの検討でも得られている。一方、FISH での grade 別解析から low grade 症例での検出率向上が報告されており^{5,10)}、われわれの解析結果ともほぼ一致している。したがって、尿細胞診の弱点である low grade 症例の診断率向上に FISH は有用である可能性が示唆された。

尿路上皮癌、特に low grade/low stage 症例の約50~70%が再発する傾向を有する^{11,12)}。したがって、経過観察における尿細胞診や膀胱鏡検査はきわめて重要となる。今回の検討症例は限られた例であり、さらなる多数例での長期に渡る検討が必要であるが、経過観察例においても FISH は細胞診に比較して優れた感受性を示した⁵⁾。

全症例における、感受性、特異性および正診率をみると、FISH は細胞診に比較して感受性は高いものの (81.2% vs 37.5%), 特異性 (72.3% vs 98.5%) や正診率 (74.1% vs 86.4%) では細胞診に劣る結果であった。この結果の背景には FISH では false-positive が18/31 (58.1%) 認められた一方、細胞診のそれは1/7 (14.3%) ときわめて低い結果であったことがあげられる。Laudadio ら⁵⁾の結果も同様に FISH の特異性 (65%) が細胞診のそれ (90%) に比較して低い結果を示している。したがって、この特異性の低さは FISH の臨床応用に際して大きな問題となる可能性がある。

しかし、FISH の false-positive 症例に関して Halling ら¹¹⁾は大変興味ある報告を行っている。すなわち、11例の false-positive 症例中、3~12カ月の経

過観察を経て7例に組織学的に悪性腫瘍が確認されている。同様に FISH における false-positive 例の経過観察中の尿路上皮悪性腫瘍発生例の報告⁵⁾がある。つまり FISH を用いた尿路上皮癌の診断および経過観察における false-positive 症例に関しては、今後経過観察中に臨床癌として診断される可能性がそうでない症例に比較して高くなる可能性を示唆しているとも考えられる。さらに FISH を用いた検討では、BTA や NMP-22 に比較して尿路感染による false-positive と判定されることがないなどの利点も有している⁹⁾。

今回の検討から、FISH による検索を行う中で、判定保留が10%認められた。過去の同様な検討では判定保留が3.6~5%と報告^{5,9)}されており、われわれの検討結果より低い割合である。FISH による検査は採取した細胞核内の遺伝子変異を蛍光発色でとらえてゆくため、細胞が重なった状態での解析が困難となる。また細胞診同様、ある程度の細胞数が必要となることから微少腫瘍病変での false-negative 症例の存在⁵⁾など、いくつかの解決してゆかなければならない問題があり、今後の課題と考えている。

結 語

今回の検討から、FISH を用いた解析により従来から繁用されてきた尿細胞診にない新たな特性が明らかになってきた。今後、本検査法の利点および欠点を整理することから、尿路上皮癌のより優れた screening や経過観察に応用されるものと思われる。

本研究に際し、株式会社 エスアールエル：羽村ラボラトリー・羽村検査部病理遺伝子検査課の名取恒夫氏および大塚秀幸氏の助言および御協力を頂いた。この場をお借りして深謝する。なお、本論文の骨子は第72回日本泌尿器科学会東部総会において発表した。

文 献

- 1) 高橋 悟：尿路上皮癌の新しい腫瘍マーカー。臨泌 **55**：41-47, 2001
- 2) 中村 博, 石和 久, 古川丈子, ほか：尿路腫瘍スクリーニングにおける細胞診と NMP22 併用の

意義。日臨細胞会誌 **42**：337-341, 2003

- 3) Grossman HB, Soloway M, Katz G, et al.: Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. JAMA **295**: 299-305, 2006
- 4) Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, et al.: Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. Cancer **95**: 61-72, 2002
- 5) Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, et al.: Fluorescence *in situ* hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. BJU Int **96**: 1280-1285, 2005
- 6) Sandberg AA and Berger CS: Review of chromosome studies in urological tumors. II. cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. J Urol **151**: 545-560, 1994
- 7) Wiener HG, Vooijs GP and Hof-Grootenboer B: Accuracy of urinary cytology in the diagnosis of primary and recurrent bladder cancer. Acta Cytol **37**: 163-169, 1993
- 8) Badalament RA, Kimmel M, Gay H, et al.: The sensitivity of flow cytometry compared with conventional cytology in the detection of superficial bladder carcinoma. Cancer **59**: 2078-2085, 1987
- 9) Halling KC, King W, Sokolova IA, et al.: A comparison of cytology and fluorescence *in situ* hybridization for the detection of urothelial carcinoma. J Urol **164**: 1768-1772, 2000
- 10) Sarosdy MF, Kahn PR, Differ MD, et al.: Use of multitarget fluorescence *in situ* hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. J Urol **176**: 44-47, 2006
- 11) Halling KC, King W, Sokolova I, et al.: A comparison of cytology and fluorescence *in situ* hybridization for the detection of urothelial carcinoma. J Urol **164**: 1768-1775, 2000
- 12) Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, et al.: Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. Am J Clin Pathol **116**: 79-86, 2001

(Received on August 20, 2007)
(Accepted on October 24, 2007)