

Stereology による膀胱腫瘍細胞平均核容積の 臨床的意義について

—grade, stage, 予後との関連—

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

福澤 重樹, 橋村 孝幸, 堀井 泰樹, 吉田 修

市立静岡病院泌尿器科 (科長: 佐々木美晴)

佐々木 美 晴

京都大学医学部附属病院病理部 (部長: 杉山武敏教授)

山 邊 博 彦

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE STEREOLOGICAL ESTIMATION OF MEAN NUCLEAR VOLUME IN HUMAN BLADDER CARCINOMA

—RELATION TO TUMOR GRADE, STAGE AND PROGNOSIS—

Shigeki Fukuzawa, Takayuki Hashimura,

Yasuki Horii and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Miharu Sasaki

From the Department of Urology, Shizuoka City Hospital

Hirohiko Yamabe

From the Laboratory of Anatomic Pathology, Kyoto University Hospital

Quantitative analysis of the malignant potential in cancer cells is a method currently under discussion. Recently the stereological estimation of cancer cells has been utilized in making an objective and quantitative pathological diagnosis.

In this study, we estimated the mean nuclear volume (MNV) of untreated bladder carcinomas in 128 patients by stereological methods and attempted to quantitatively analyze the malignant potential of the carcinoma.

The MNV was significantly enlarged as the tumor advanced in grade and stage. MNV was largest in grade 3 tumors ($340.2 \pm 100.1 \mu\text{m}^3$) followed by grade 2 tumors ($206.2 \pm 90.6 \mu\text{m}^3$) ($P < 0.01$), and grade 1 tumors ($130.6 \pm 46.7 \mu\text{m}^3$) ($P < 0.01$). MNV was larger in pT1 tumors ($278.2 \pm 126.9 \mu\text{m}^3$) than in pTa tumors ($156.9 \pm 60.5 \mu\text{m}^3$) ($P < 0.01$). MNV was also larger in invasive tumors (T2, T3 and T4: $318.2 \pm 104.0 \mu\text{m}^3$) than in superficial tumors (Ta and T1: $203.5 \pm 109.2 \mu\text{m}^3$) ($P < 0.01$).

Patients were then divided into two subgroups, one with large nuclei ($\text{MNV} \geq 197.3 \mu\text{m}^3$), and the other with small nuclei ($\text{MNV} < 197.3 \mu\text{m}^3$). Survival and disease-free rates in patients with small nuclei (5-year survival rate: 92.9%, 5-year disease-free rate: 24.4%) were significantly better than in patients with large nuclei (5-year survival rate: 58.0%, 5-year disease-free rate: 12.5%).

For patients with grade 2 tumors, those with small nuclei had a good survival rate (5-year survival rate: 95.5%), similar to that of patients with grade 1 tumors (5-year survival rate: 95.0%). Patients with large nuclei had a worse survival rate (5-year survival rate: 52.9%) similar to that of patients with grade 3 tumors (5-year survival rate: 57.6%). These findings suggested that the malignant potential of human bladder carcinomas could be quantitatively analyzed by the

measurement of MNV.

(Acta Urol. Jpn. 38: 25-29, 1992)

Key words: Bladder carcinoma, Mean nuclear volume, Stereology, Quantitative analysis

結 言

癌の診断、腫瘍細胞の異型度を考えるときわれわれは、核の大きさ、形状、配列、極性、分裂像、クロマチン、核細胞質比、等のいくつかの要因を「数量」ではなく「形態」として認識し、その組み合わせを総合的に判断するという複雑な作業を無意識的に行っている。多くの「形態」の組み合わせであるがゆえに主観が入りやすく、細胞異型度の定義は難しく再現性、客観性にも問題がある^{1,2)}。

最近、腫瘍細胞の「形態」を数量的に計測し病理診断の客観化、腫瘍細胞悪性度の定量化を試みている報告³⁾が散見されるが一般的な方法はまだない。

金属学、粉体工学^{4,5)}の分野では、多孔体および粒子を含んだ金属の断面において、その粒子の径、断面積等の二次元情報を計測することにより金属内に含まれる粒子の体積分率、個数、大きさ、表面積等の三次元的な情報を推定する学問 (stereology) がある。

1985年 Gundersen ら⁶⁾は stereology の理論を用いて細胞の平均核容積 (mean nuclear volume = MNV) の計測が可能であることを報告した。また Nielsen ら^{7,8)}、佐々木ら⁹⁾は、膀胱腫瘍細胞では MNV が大きいほど腫瘍悪性度も高く、患者予後も不良であることを示唆した。

今回われわれは、Gundersen の方法を用いて膀胱腫瘍細胞の MNV を計測し grade, stage および腫瘍の再発、患者予後との関係を調べ MNV による膀胱腫瘍悪性度の定量的解析を試みたので報告する。

対象および方法

1979年1月から1985年12月までの7年間に京大病院泌尿器科に入院した初発の膀胱移行上皮癌症例のうち、観察期間が3年間以上である128例を対象とした。性別は男106例、女22例、年齢は33歳から88歳で平均年齢は64.5歳であった。組織学的異型度は grade 1 30例、grade 2 52例、grade 3 46例であり、組織学的深達度は pTis 3例、pTa 56例、pT1 35例、pT2 11例、pT3 20例、pT4 3例であった。病理学的所見は膀胱癌取扱い規約¹⁰⁾に準じた。

標本は治療開始前の cold biopsy あるいは初回の TUR にてえられた組織を10%ホルマリン溶液で固

定、パラフィン包埋したものを4 μ mの厚さに薄切し H.E. 染色をほどこし使用した。

核の大きさの計測には、投影用 projector を取り付けた光学顕微鏡 (BHS, Olympus) を傾斜固定し、100倍油浸対物レンズを用いて組織標本を point をつけた図形情報計測装置 Digitizer KW-3300 (Graphtec corporation, Japan) の計測面に正確に1,850倍に拡大投影した。投影像で point に当たる腫瘍細胞核のみを選択し、その point を通りあらかじめ定められた方向に平行な切線の長さ l_0 をボタンカーソル (Graphtec corporation, Japan) を用いて計測した。計測視野は組織標本中、最も悪性度の高い部位を選び1標本につき5から8視野、70個から80個の細胞核を計測し l_0 の3乗の平均値 $\bar{l}_0^3$ より $\frac{\pi}{3} \bar{l}_0^3$ の計算式で MNV を算出した。この計算式でえられた平均容積は、実際の平均容積に近似することがいわれている^{11,12)}。

コンピュータは PC-9801 nv (NEC) を使用し、Digitizer 入力および MNV 計算のプログラムは TURBO C ++ (BORLAND) により作成した。

各群の MNV の有意差検定には t 検定を用い、生存期間の差の検定には一般化ワイルコクソン検定を用いた。

結 果

1) MNV の分布と平均

128例の膀胱腫瘍 MNV は、61.9 μ m³ から 567.3 μ m³ までの間に分布し平均は236.7 μ m³ であった (Fig. 1)。

2) 組織学的異型度・深達度と MNV の関係

grade 別にみると MNV の平均値は grade 1 130.6 $\pm$ 46.7 μ m³, grade 2 206.2 $\pm$ 90.6 μ m³, grade 3 340.2 $\pm$ 100.1 μ m³ であり、各群の MNV の間に有意差を認めた (P<0.01) (Fig. 2A)。

stage 別にみると pT1 の MNV (278.2 $\pm$ 126.9 μ m³) は pTa の MNV (156.9 $\pm$ 60.5 μ m³) と比較して有意に大きかった (P<0.01)。pT1, pT2, pT3, pT4 各群の MNV の間に有意差は認めなかったが pT2 以上の浸潤性膀胱腫瘍 (318.2 $\pm$ 104.0 μ m³) は、pTa, pT1 の表在性膀胱腫瘍 (203.5 $\pm$ 109.2 μ m³) に比較して MNV が有意に大きかった (P<0.01)。

(Fig. 2B).

3) 生存率・再発率と MNV の関係

線形判別関数の計算¹³⁾によりえられた grade 1 と grade 3 の MNV の判別点は $197.3 \mu\text{m}^3$ であった. すなわち MNV の値により grade 1 と grade 3 を分類する場合, $197.3 \mu\text{m}^3$ という値を判別点とすると誤判別率が最も低い (13.2%) と計算された.

観察期間が5年以上の92例を MNV の大きさに, $197.3 \mu\text{m}^3$ 以上50例, $197.3 \mu\text{m}^3$ 未満42例の2群に分類し, 生存率 (Fig. 3A) を比較した. また観察期間が5年以上の症例のうち, 初回治療時に膀胱全摘を施行した症例と手術不能であった症例を除いた69例を対象として腫瘍の非再発率 (Fig. 3B) を MNV の大きさに比較した. 起算日は初回治療日とし, 最終予後確認日を1991年2月19日として再発および転帰を確認した.

MNV が $197.3 \mu\text{m}^3$ 未満の症例 (5年生存率: 92.9%, 5年非再発率: 24.4%) は, $197.3 \mu\text{m}^3$ 以上の症例 (5年生存率: 58.0%, 5年非再発率: 12.5%) に比較して生存率および非再発率が有意に高かった ($P < 0.01$).

4) MNV による grade 2 症例のサブグループ化

Fig. 4A は観察期間が5年以上の92例の grade 別生存率を示す. このうち grade 2 の39例を, MNV の大きさに $197.3 \mu\text{m}^3$ 以上17例, $197.3 \mu\text{m}^3$ 未満22

例の2群に分類して示したものが Fig. 4B である.

grade 2 で MNV が $197.3 \mu\text{m}^3$ 未満の症例の生存曲線 (5年生存率: 95.5%) は, grade 1 の生存曲線 (5年生存率: 95.0%) にほぼ一致し, grade 2 で MNV が $197.3 \mu\text{m}^3$ 以上の症例の生存曲線 (5年生存率: 52.9%) は, grade 3 (5年生存率: 57.6%) のものによく一致した.

考 察

最近のテクノロジーの発展とともに医学の分野では, フローサイトメトリーに代表されるように細胞内物質の定量が可能となり, 新しい知見が多く報告されている. また腫瘍細胞の「形態」も再現可能な方法で

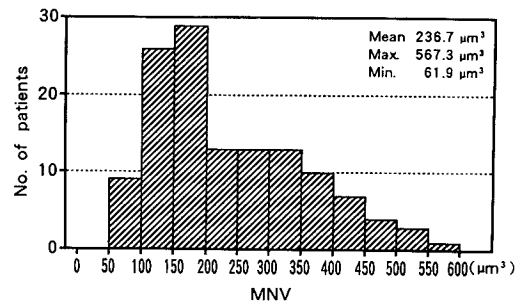


Fig. 1. Distribution of mean nuclear volume in patients with bladder carcinoma

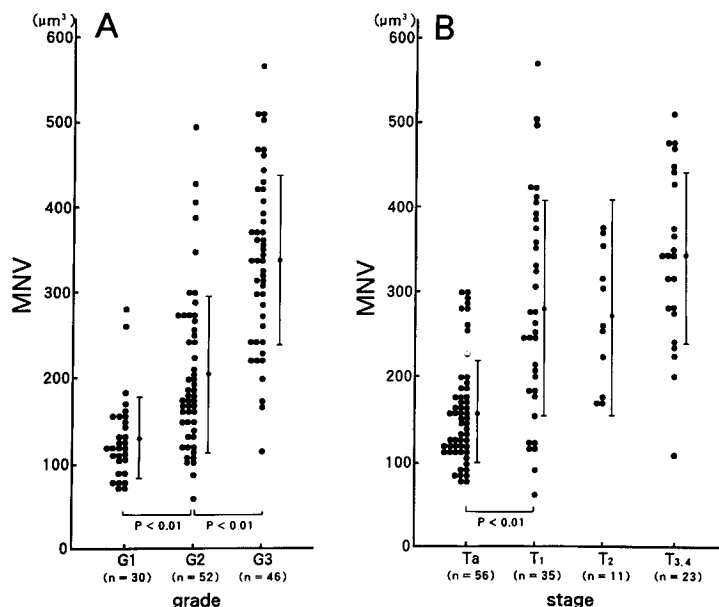


Fig. 2. The relationship between mean nuclear volume and pathological grade (A), and pathological stage (B) of the bladder carcinoma.

数量化し、数学的に解析する試み³⁾がいくつか報告されている。

腫瘍細胞の「形態」を数量化し解析する試みは、1976年 Fulker ら¹⁴⁾が腫瘍細胞の平均核面積を数量化して報告したのが最初であり、その後も Ooms ら¹⁵⁾、Nielsen ら^{7,8)}、Helander ら¹⁶⁾、Blomjous ら¹⁷⁾、Lipponen ら^{18,19)}、Hanai ら²⁰⁾が、細胞の平均核容積、平均核面積、核分裂像、核細胞質比を定量的に解析し報告した。

今回のわれわれの計測でも膀胱腫瘍 MNV は、grade, stage および患者予後と高い相関があり膀胱腫瘍の悪性度を定量的に示すことのできる指標になりうると思われた。またわれわれは、臨床上前後良好な症例と予後不良な症例が混在している grade 2 に着目し、grade 2 の症例を MNV の大きさによって $197.3 \mu\text{m}^3$ 以上、 $197.3 \mu\text{m}^3$ 未満の2群に分類し患者の予後を検討してみた。結果は grade 2, $\text{MNV} \geq 197.3 \mu\text{m}^3$ 症例の生存曲線は grade 3 の生存曲線と一致し、grade 2, $\text{MNV} < 197.3 \mu\text{m}^3$ 症例の生存曲線は grade 1 のものとよく一致した。Blomjous ら¹⁷⁾は grade 2 の症例を平均核面積の大小によって2群に分類し患者の予後を検討している。それによると grade 2 で平均核面積の大きな症例の生存曲線は grade 3 の生存曲線と一致し、grade 2 で平均核面積の小さな症例の生存曲線は grade 1 のものとよく一致したと報告している。今まで予後の予測が困難であった grade 2 症例を定量的に分類することは临床上、非常に有意義であると思われた。

今回われわれが平均核容積を計測した方法は1989年 Nielsen ら⁸⁾が報告した方法と基本的には同じであるが、Nielsen らは腫瘍組織標本の計測部位を無作為に選択しているのに対して、われわれは悪性度の高い部位がよりその腫瘍の性質を表わしていると考え、計測部位を悪性度の高いところとした。また計測時間を短縮するために図形情報計測装置 Digitizer KW-3300 (Graphtec corporation, Japan) を使用した。

われわれの計測では膀胱腫瘍の MNV は $62 \mu\text{m}^3 \sim 567 \mu\text{m}^3$ の間に分布していたが、Nielsen ら⁷⁾は $124 \mu\text{m}^3 \sim 3,149 \mu\text{m}^3$ 、Helander ら¹⁶⁾は $107 \mu\text{m}^3 \sim 1,367 \mu\text{m}^3$ 、佐々木ら⁹⁾は約 $80 \mu\text{m}^3 \sim 800 \mu\text{m}^3$ と報告している。この値の差が計測方法の違いによるものか、標本の固定方法の違いによるものか、あるいは別の原因によるものか、を明らかにしなければ多施設で計測した MNV の客観的な比較は不可能であり定量的評価の意義が半減される。多施設間で計測した MNV の比較は現在検討中である。

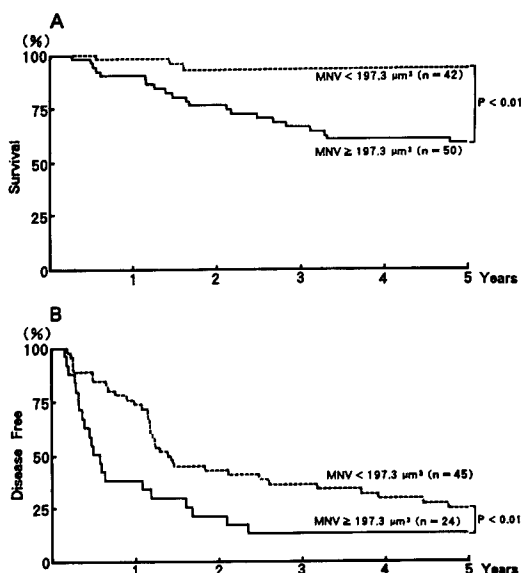


Fig. 3. Survival (A) and disease-free (B) rates for bladder carcinoma patients with small ($\text{MNV} < 197.3 \mu\text{m}^3$) and large ($\text{MNV} \geq 197.3 \mu\text{m}^3$) mean nuclear volumes.

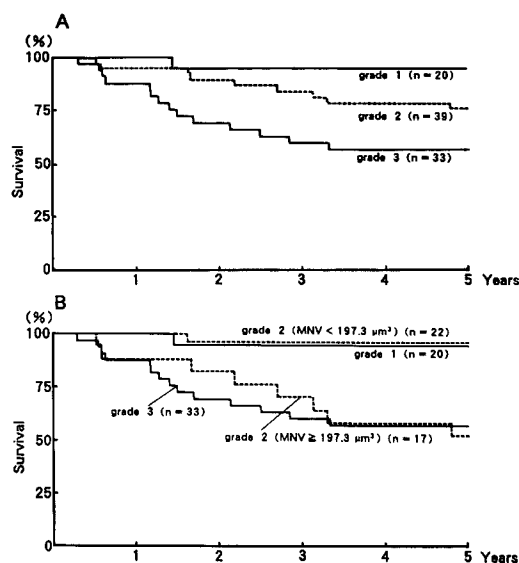


Fig. 4. Survival rate for patients with various tumor grades (A). Patients with grade 2 tumors is divided into two subgroups based on mean nuclear volume (B).

今後 MNV の再現性の問題を検討するとともに、膀胱腫瘍再発時の MNV を計測し再発時の MNV と腫瘍の再発および進展との関係を検討していく予定である。また今回は「形態」の一要因である核の大きさ

による定量的解析を行ったが, 他の形態的要因(核の形状, 配列, etc.)の定量化, およびそれらの組み合わせによる多変量解析の可能性にも取り組む予定である。

結 語

膀胱腫瘍細胞の平均核容積(MNV)を stereology の理論を用いて計測し, 患者予後との関係を検討した。

1. grade, stage の高い症例は腫瘍細胞の MNV が大きかった。
2. MNV の小さな群 ($MNV < 197.3 \mu m^3$) は, 大きな群 ($MNV \geq 197.3 \mu m^3$) と比較して生存率および非再発率が有意に高かった。
3. grade 2 の症例を MNV の大きさによって 2 群に分類すると, MNV が $197.3 \mu m^3$ 未満の症例の生存曲線は, grade 1 の生存曲線にはほぼ一致し, MNV が $197.3 \mu m^3$ 以上の症例の生存曲線は, grade 3 のものによく一致した。
4. MNV は簡便な方法で測定でき, しかも膀胱腫瘍の悪性度を定量的に示すことができる指標になりうると思われた。

実験助手をつとめられた橋本真由美嬢に感謝いたします。

本論文の要旨は, 第 79 回日本泌尿器科学会総会で発表した。

文 献

- 1) Ooms ECM, Anderson WAD, Alons CL, et al.: Analysis of the performance of pathologists in the grading of bladder tumors. *Hum Pathol* **14**: 140-143, 1983
- 2) Robertson AJ, Swanson BJ, Burnett RA, et al.: Observer variability in histopathological reporting of transitional cell carcinoma and epithelial dysplasia in bladders. *J Clin Pathol* **43**: 17-21, 1990
- 3) 岩間憲行, 千場良司, 手塚文明, ほか: 癌細胞の「形」判断の可能性について —形態計量とクラスター解析による客観化—. *Oncologia* **23**: 32-40, 1990
- 4) 石坂昭三: 定量形態学の最近の動向. 粉体工学会誌 **22**: 837-843, 1985
- 5) De Hoff RT: Stereological meaning of the inflection point count. *J Microsc* **121**: 13-19, 1981
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Nielsen K, Ørntoft T and Wolf H: Stereologic estimates of nuclear volume in non-invasive bladder tumors (Ta) correlated with the recurrence pattern. *Cancer* **64**: 2269-2274, 1989
- 9) 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
- 10) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編: 膀胱癌取り扱い規約. 第 1 版, 金原出版, 東京, 1980
- 11) Gundersen HJG and Jensen EB: Particle sizes and their distributions estimated from line- and point-sampled intercepts. Including graphical unfolding. *J Microsc* **131**: 291-310, 1983
- 12) Gundersen HJG: Stereology of arbitrary particles. *J Microsc* **143**: 3-45, 1986
- 13) 市川雅教, 服部芳明, 佐藤俊哉, ほか: 判別分析, 多変量解析ハンドブック, 柳井晴夫, 高木廣文編. 第 1 版, pp. 126-159, 現代数学社, 京都, 1986
- 14) Fulker MJ, Adamthwaite SJ and Anderson CK: Stereological measurements of bladder tumour morphology. *Eur J Cancer* **12**: 575-579, 1976
- 15) Ooms ECM, Essed E, Veldhuizen RW, et al.: The prognostic significance of morphometry in T1 bladder tumours. *Histopathol* **5**: 311-318, 1981
- 16) Helander KG and Tribukait B: Modal DNA values of normal and malignant urothelial cells of the bladder in relation to nuclear size. *Anal Quant Cytol* **10**: 127-133, 1988
- 17) Blomjous CEM, Vos W, Schipper NW, et al.: The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *Hum Pathol* **21**: 409-413, 1990
- 18) Lipponen PK, Kosma VM, Collan Y, et al.: Potential of nuclear morphometry and volume-corrected mitotic index in grading transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* **17**: 333-337, 1990
- 19) Lipponen PK and Eskelinen MJ: Volume-corrected mitotic index and mitotic activity index in transitional cell bladder cancer. *Eur Urol* **18**: 258-262, 1990
- 20) Hanai S, Kishi K and Watanabe S, et al.: Morphometry of bladder cancer cells in tissue sections according to histological grade of malignancy. *Jpn J Clin Oncol* **15**: 671-678, 1985

(Received on August 5, 1991)

(Accepted on September 20, 1991)

(迅速掲載)