

Stereology による膀胱癌の平均核容積の測定

—Point Sampled Intercepts による測定—

市立静岡病院泌尿器科 (科長: 佐々木美晴)

佐々木美晴, 金子 嘉志

STEREOLOGICAL ESTIMATION OF MEAN NUCLEAR
VOLUME IN BLADDER CANCER

—MEASUREMENT BY POINT SAMPLED INTERCEPTS—

Miharu Sasaki and Yoshiyuki Kaneko

From the Department of Urology, Shizuoka City Hospital

To obtain objective information about bladder cancer, we measured the mean nuclear volume of bladder cancer cells by using the "Point Sampled Intercepts" method, which was published by Gundersen et al. Thirty one cases of bladder cancer were selected and divided into 2 groups: group A; no recurrence over 3 years after initial TUR (12 cases), group B; cystectomy or cancer death (19 cases). Estimated mean nuclear volume was significantly smaller in group A than in group B. It is suggested that estimation of the mean nuclear volume by this stereological method may provide objective information for predicting the prognosis of patients with bladder cancers. Further studies in additional patients are required to substantiate the predictive potential of this method.

(Acta Urol. Jpn. 36: 909-913, 1990)

Key words: Bladder cancer, Mean nuclear volume, Stereology, Point sampled intercepts

緒 言

Stereology とは、簡単に言えば、ある物体とその切片との関連について研究する一種の数学である。その応用分野は医学、生物学、冶金学、鉱物学などの広範囲にわたる¹⁾。しかし、泌尿器科の分野ではほとんど知られていない。最近、Gundersen らは stereology を臨床に応用する方法を報告し、その有用性を証明した^{2,3)}。今回、われわれは彼らの報告した方法のひとつである point sampled intercepts による測定を用いて、膀胱癌細胞の平均核容積 (mean nuclear volume; MNV) の測定を試みたのでその方法を紹介し結果を報告する。

方 法

Point sampled intercepts による計測法: 顕微鏡に Fig. 1 のような机上に投影できる projector を付け、point をつけた test system (Fig. 2) の上に組織像を投影する。標本は通常の組織検査に用いる HE 染色をほどこした物を使用する。100 倍の油浸対

物レンズを用い、投影された像の倍率は 1600 倍とした。Fig. 3 は実際の測定方法を図示したものである。point に重なった核のみを計測することとし、point が核の辺縁に接する場合は point の左下 1/4 が完全に核に含まれる場合のみ計測する。point の間隔は測定する核の最大径より長くすることが条件であり、われわれは間隔を 2 cm とした。point を通る線 AB が核の辺縁を横切る点を CD とした時、CD 間の長さ (l_0) を測定する。計測する細胞の数は 50~100 個で充分であり⁴⁾、一標本につき 3 視野以上計測することが必要である。 l_0^3 の平均を $\overline{l_0^3}$ とすると、平均容積 ($\overline{V_V}$) はつぎのような式で求められることが stereology で証明されている⁴⁾。

$$\overline{V_V} = (\pi/3) \times \overline{l_0^3}$$

実際の計測には、能率を上げるために Gundersen らが考案した ruler を使用した (Fig. 4)⁵⁾。この ruler を使用すると、実際の長さ CD を測定する代わりに、それぞれの長さ CD を 15 のクラスに分類することになる。n 個のクラスに区分した ruler において、あるクラス z の上限の長さを表す一般式は

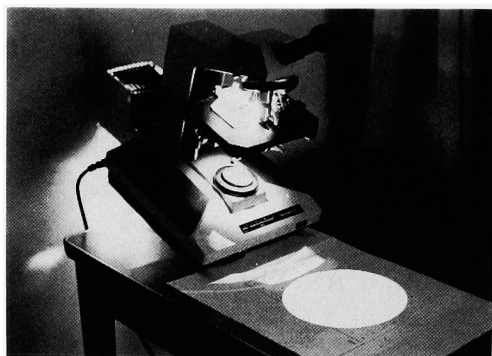


Fig. 1. Microscope equipped with a projection attachment

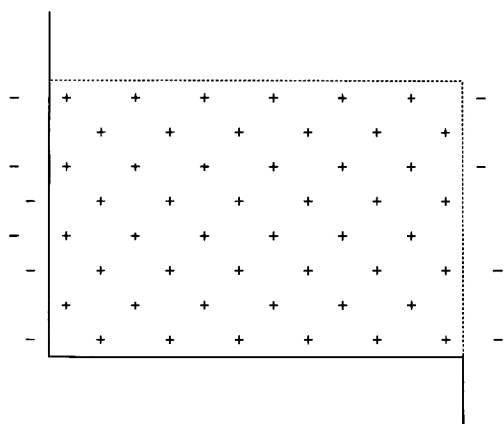


Fig. 2. Test system with a set of regularly spaced points

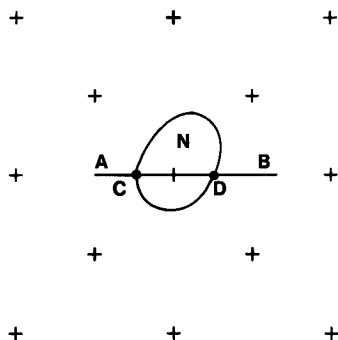


Fig. 3. Schematic drawing of a nucleus (N) and a point sampled intercept. For estimating the mean nuclear volume, one measures the length CD. See text for further details

$$(\text{Upper limit length})^3 = \frac{(Ln)^3}{10^{n/n-1}} \cdot (10^{z/n-1} - 1)$$

である。ここで Ln は ruler の全長を示し、 z は

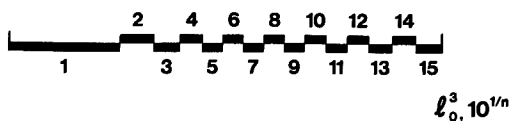


Fig. 4. Ruler for classifying point sampled intercepts

Table 1. Patient profile

		Age range	Sex M:F	Pathological grade		
				G1	G2	G3
Group	A	38-73	10:2	8	4	0
Group	B	44-77	13:6	0	12	7

ruler 上の目盛りを示す。ruler は写真技術を用いれば任意の大きさに簡単に複製でき、われわれは $n=15$, $Ln=25\text{ mm}$ の ruler を使用した。この ruler を使用した場合の $\bar{l}_0^3$ の算出法に関しては Brøndgaard らの論文⁵⁾を参照していただきたい。

対 象

当科で治療した膀胱癌患者のうちつぎの2つの条件に当てはまる患者31人を対象とした。(1)初発後3年以上再発のない患者 (group A: 12例), (2)膀胱全摘例または癌死例 (group B: 19例)。group Bのうち複数回組織検査がなされた症例は、最後に得られた組織を測定した。年齢は38歳から77歳、性別は男性24例女性7例であり、全例移行上皮癌であった。膀胱癌取り扱い規約による組織学的異型度分類では grade 1; 8例, grade 2; 16例, grade 3; 7例であった。各 group における年齢、性別、異型度分類は Table 1に示した。なお検定には student's T-test を用いた。

結 果

1標本につき4~6視野、57~91個の細胞核を計測し、計測に必要とした時間は、1標本当たり約20分であった。各群の MNV の平均はそれぞれ group A: $167.9 \pm 76.0 \mu\text{m}^3$, group B: $419.5 \pm 171.2 \mu\text{m}^3$ であり、両群間に有意差を認めた ($P < 0.01$) (Fig. 5)。つぎに、grade 別に MNV を検討してみたところ、各 grade の平均値はそれぞれ, grade 1 $151.7 \pm 43.9 \mu\text{m}^3$, grade 2: $349.4 \pm 161.6 \mu\text{m}^3$, grade 3: $454.7 \pm 217.7 \mu\text{m}^3$ であった。grade 1 と grade 2 の間には有意差を認めた ($P < 0.01$) が, grade 2 と grade 3 との間には有意差がなかった (Fig. 6)。grade

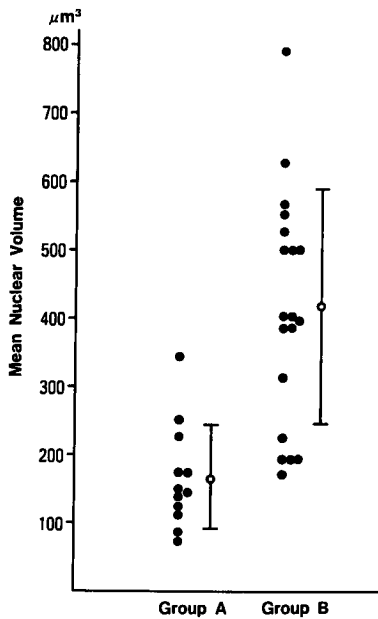


Fig. 5. The relationship between the mean nuclear volume and the prognosis of patients with bladder cancer. Group A: no recurrence over 3 years after initial TUR. Group B: cystectomy or cancer death. There is significant difference in the mean nuclear volume between 2 groups ($P < 0.01$). Open circles with bars indicate means $\pm$ standard deviation.

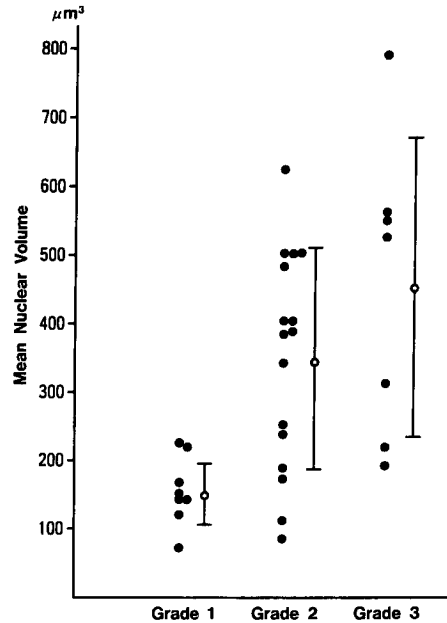


Fig. 6. The relationship between the mean nuclear volume and the pathological grade of bladder cancer. There is significant difference in the mean nuclear volume between grade 1 and grade 2, but not between grade 2 and grade 3. Open circles with bars indicate means $\pm$ standard deviation.

2のうち, group Aに含まれる症例の MNV の平均は, $200.6 \pm 120.8 \mu\text{m}^3$ ($n=4$), group Bに含まれる症例の MNV の平均は $399.1 \pm 144.4 \mu\text{m}^3$ ($n=12$)であり, 両群間に有意差が認められた ($P < 0.05$).

考 察

癌細胞を計測することにより客観的な情報を得ようとする試みは以前よりあるが, 一般的に用いられている方法はない. stereology の理論を応用した計測もその試みのひとつである. stereology の分野には数学者の立場から理論的研究をする分野と, そこから得られた結果を実際に応用する分野がある. 2次元構造(切片)を計測することにより3次元構造(組織)の長さ, 表面積, 体積等を算出することを目的とする stereology は, 常に組織標本を観察する医学の分野では大いに利用する価値がある.

今回われわれが用いた方法は, 1985年 Gundersen らが報告したものである⁶⁾ point sampled intercepts の特徴は手技的に簡単であり高価な装置を必要

としないことにある. 標本の作り方にもほとんど制約が無く通常病理検査に用いる標本が使用しうる. 唯一の制約は腫瘍中の細胞の配列が "isotropic uniform random (IUR)"¹⁾であり, その切片も方向性があるとはならないということがある. papillary tumor の標本は IUR とみなしうるが, 明らかに方向性のある部分は避ける必要がある. 正常移行上皮は方向性のある配列を示すため, 今回報告した方法で計測するのは理論的に間違いである. 一方向に規則正しい配列を示す場合は intercept の方向の選択に多少工夫する必要がある, Gundersen らはその手技についてもすでに報告している²⁾. われわれも方向性のある組織についての検討を始めており, 近く報告する予定である.

一方, 膀胱癌の診断, 治療に組織学的診断は欠かせない検査法である. しかし, 組織学的異型度は必ずしも客観性のある分類とはいえず, 正確に診断を下すことは病理学者にとっても困難である³⁾. したがって, 客観性のある方法により組織学的異型度を表すことは, 膀胱癌の診療において非常に重要な課題である. Nielsen らは, 今回報告した方法を用いて, 膀胱癌細

胞の計測を初めて行いその有用性を報告した⁹⁾。彼らによれば平均核容積は患者の予後、組織学的異型度と非常に良い相関を示し、平均核容積が $300 \mu\text{m}^3$ 以下の場合ほとんど死亡例がなく、 $500 \mu\text{m}^3$ 以上は予後不良であったと報告している。われわれの測定でもほぼ同様の結果が得られたが、grade 2 と grade 3 との間に有意差が無かったのは、異型度の診断自体に問題がある可能性が考えられる⁷⁾。さらに多数例で検討する予定である。

Point sampled intercepts を臨床に応用した報告は膀胱癌に限らず、前立腺癌でも報告されており^{9,10)}、さらに、泌尿器科の分野に留まらず他分野の癌についても計測が試みられている。stereology には今回報告した方法以外にも様々な測定法があり、さらに新しい理論が生まれる可能性もある。今後さらにその有用性につき検討する予定である。

結 語

Stereology の理論を応用した計測法を用いて、膀胱癌細胞の平均核容積を測定した。平均核容積は患者の予後と良好な相関を示した。この測定法は高価な装置を必要とせず手技的にも簡単であり、膀胱癌の治療上有用な検査となる可能性が示唆された。

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

文 献

- 1) Weibel ER: Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry. Edited by Weibel ER. Vol. 1, ppl-100, Academic Press, London, 1979
- 2) Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A and West MJ: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **96**: 379-394, 1988
- 3) Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evance SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A and West MJ: The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **96**: 857-881, 1988

- 4) Gundersen HJG and Jensen EB: Particle size and their distributions estimated from line and point-sampled intercepts. Including graphical unfolding. *J Microsc* **131**: 291-310, 1983
- 5) Brændgaard H and Gundersen HJG: The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods* **18**: 39-78, 1986
- 6) Gundersen DJG 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) Ooms ECM, Anderson WAD, Alons CL, Boon ME and Veldhuizen RW: Analysis of the performance of pathologists in the grading of bladder tumors. *Hum Pathol* **14**: 140-143, 1983
- 8) Mielsen K, Colstrup H, Nilsson T and Gundersen HJG: Stereological estimates of nuclear volume correlated with histopathological grading and prognosis of bladder tumour. *Virchows Arch (Cell Pathol)* **52**: 41-54, 1986
- 9) Jørgensen PE, Berild GH, Bruun E, Weis N, Nielsen K and Gundersen HJG: Stereological estimates of nuclear volume correlated with clinical stage and progression of prostatic cancer: clinical aspects. *Scand J Urol Nephrol Suppl* **110**: 131-135, 1988
- 10) Nielsen K, Berild GH, Bruun E, Jørgensen PE and Wies N: Stereological estimation of mean nuclear volume in prostatic cancer, the reproducibility and the possible value of estimations on repeated biopsies in the course of disease. *J Microsc* **154**: 63-69, 1989
(Received on November 9, 1989)
(Accepted on January 30, 1990)

Editorial Comment

Stereology の technique は biology でも多くの例で用いられ、また 1 断面のみの sampling で簡単に行える利点がある。標本は 3 方向に isotropic direction である方向が望ましく、そのために mean particle volume V_v 計算の計数には $(3/4)\pi$ より $(1/3)\pi$ が用いられるとされている。

Nielsen らの報告では first bladder papilloma MNV と 10 年間の予後の間に高い相関があることを述べており、膀胱癌の最初の生検の結果でその malignant potential を予知できるという意味で興味ある仕事である。

しかし, 著者らは group B のうち複数回組織検査した場合, なぜ最終の組織標本を用いたのであろうか. retrospective study であっても group B の症例についても最初の組織標本の analysis に意味があるので, ことに膀胱全摘までに受けた種々の治療の影響が入ってくるのでその悪性度に問題があり, また本法は膀胱癌の malignant potential の予知に応用することを目的としているので, 初回の組織標本の悪性度の高い群と低い群と比較して group B についても治療前の生検組織や初回の組織標本, または膀胱全摘前に化学療法または放射線療法などが施行されていない組織標本について検討されるべきと考える.

奈良医科大学泌尿器科学講座

岡 島 英五郎

Author's Reply

平均容積を求める数式についてつぎの点を強調しておきたい. 一見この式は球の体積を求める式に似ているが, 確率論を基礎にして証明されたものであり, これを理解するためには stereology の基礎知識と十分な数学的知識が必要である. また, ここで言う平均容積とは正確に言えば, volume weighted mean volume のことであり, つぎのような数式で表され, 一般に用いられる平均とは定義が違う.

$$\bar{V}_V = \frac{\sum_{i=1}^N V_i^2}{\sum_{i=1}^N V_i}$$

(N: number of particles)

複数回検査した症例は19例中4例のみである. したがって初回検査時の標本をもちいても group A と group B の間に有意差が出る (group A: $167.9 \pm 76.0 \mu\text{m}^3$, group B: $379.7 \pm 184.4 \mu\text{m}^3$ $P < 0.01$). しかし, そこから初回検査で予後を知れるとの結論を出すのは無理である. したがって今回は予後不良群と良好群との間で核容積に有意差があるか否かを検討するにとどめ, 他の16例と統一する意味で invasive になった時点である最終回の組織を用いた. Nealsen の報告でも死亡例の60%が最初からすでに invasive であることが表から読み取れ, 初回検査すなわち最終回である可能性が推測される. 厳密な意味で predictive value を検討するとすれば, 初回検査時 non-invasive なグループで検討する必要がある. Editor のご指摘の通り, 彼らの報告はこの検査法が非常に有用な方法である可能性を示唆している. しかし, 彼らのグループ以外にこの方法を用いた報告はなく, 今回われわれが初めて追試に成功し同様の結果を得たことは, この方法の再現性を証明した点で意味がある.