Flow Cytometry による膀胱癌の核 DNA 量解析

—膀胱癌における DNA heterogeneity の検討—

北海道大学泌尿器科 (主任: 小柳知彦)

豊田 健一 永森 聡¹⁾ 柏木 明²⁾
野々村克也 小柳 知彦

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE DNA CONTENT OF THE URINARY BLADDER CANCERS

—Study on the DNA Heterogeneity in Bladder Cancers—

Ken-ichi Toyota, Satoshi Nagamori, Akira Kashiwagi,
Katsuya Nonomura and Tomohiko Koyanagi

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan
(Director: Prof. T. Toyonagi)

Purpose: To evaluate the clinical relevance between the DNA ploidy and histopathology, and the incidence of the DNA heterogeneity in patients with bladder cancers.

Methods: Flow cytometry (FCM) was used to study the DNA ploidy in 63 patients who underwent total cystectomy. The DNA ploidy and DNA index were analyzed by FCM in total 328 paraffin embedded samples (5.2 samples per case on the average).

Results: The DNA ploidy of 52 bladder cancers, that had coexisted after total cystectomy, showed that 24 cases, 46% were DNA aneuploid and 18 cases, 35% had DNA heterogeneity. The DNA ploidy of 11 cases that were eradicated after cystectomy was all DNA diploid. There were significantly good correlation among DNA ploidy pattern and intravesical involvement (lymph-duct involvement and venous involvement), but were not among the DNA ploidy pattern and tumor grade and stage. With regard to the evaluation of two vertical divided samples of tumors, DNA aneuploid had been not always recognized in the deeper sample, therefore, we did not determine that there was good correlation between the DNA ploidy and the tumor invasion.

Conclusion: These data suggest that although the incidence of DNA heterogeneity in bladder cancers (35%) is thought to be relatively small, the DNA ploidy will be able to the important prognosticating factor in bladder cancers.

Key words: flow cytometry, bladder cancers, DNA heterogeneity

要旨: 目的; 膀胱癌症例において, DNA ploidy と病理組織学的因子, 腫瘍浸潤および予後との関係, また, DNA heterogeneity を探るため検討した。方法; Flow cytometry (FCM) を用いて, 根治的膀胱全摘除術を施行した膀胱癌63症例の核 DNA 量を解析し, DI 値 (DNA index) にて評価した。結果; 1) DNA aneuploid (以下 aneuploid) の出現率は膀胱全摘後, 腫瘍が存在した52例中24例 (46%) であり, DNA heterogeneity を示したのは18例 (35%) であった。また, 術前照射後に全摘し, 腫瘍が存在しなかった11例は, 全例 DNA diploid (以下 diploid) であった。2) DNA ploidy と Grade および Stage との間に明かな関係はないが, high Grade, high Stage 例に aneuploid の出現率が高かった。また, 壁内侵襲 (ly, v) では, 陽性例で有意に aneuploid が多かった ($p < 0.01$, $p < 0.02$)。3) 腫瘍の粘膜側と漿膜側の検討から, 必ずしも筋層 (深部) 部分に aneuploid を認めず, DNA ploidy と腫瘍浸潤との間には明確な関係を示すことはできなかった。結論; 膀胱癌における DNA heterogeneity の出現頻度は比

較的少ないが、DNA ploidy は、膀胱癌において、重要な予後規定因子となりうることを示唆している。

キーワード：フローサイトメリー、膀胱癌、核 DNA 量の多様性

緒 言

Flow cytometry (以下 FCM) を用いた腫瘍細胞の核 DNA 量解析は、今や腫瘍の病理組織学的所見とは異なる新たな客観的な評価法と成りつつあり、種々の腫瘍において検討が行われている。われわれも既に、腎細胞癌¹⁾や精巣腫瘍²⁾における核 DNA 量解析を行い、腫瘍の客観的な臨床的悪性度の評価や核 DNA 量における多様性 (DNA heterogeneity) の評価などに有用であることを報告してきた。また、膀胱癌においては³⁾、術前照射し、膀胱全摘術を施行された膀胱移行上皮癌症例の照射前の DNA ploidy と照射前後の DNA ploidy 変化が、治療効果および予後を予測する上で、有用であることを報告してきた。

さて、膀胱癌は多発したり、同所性又は異所性に再発し易く、組織学的異型度も混在する場合が多く、多彩な特徴があるが、核 DNA 量においても、DNA heterogeneity が存在するのかどうか、さらに、膀胱という管腔臓器である点を考慮し、腫瘍の筋層への浸潤と核 DNA 量との関係があるのか否かも、興味が持たれる。

本研究では、膀胱全摘除術で得られた膀胱癌の全摘標本のパラフィン包埋標本を用いて核 DNA 量を測定、解析し、膀胱癌の病理組織学的因子と DNA ploidy との関係、膀胱癌の持つ DNA heterogeneity について、また、腫瘍浸潤と DNA ploidy との関係を明確にするため、検討を行った。

対象および方法

対象：1978年1月から1988年12月までの11年間に当科で膀胱全摘された症例のうち、評価可能であった63例の全摘標本263検体（1例より3～10検体、平均4.0検体）のパラフィン包埋組織を対象とした。対象63例の手術時年齢は40～78歳、平均61.0歳、男女比は3.85：1で、術前治療については、63例中無治療全摘群13例、化学療法群7例、放射線治療群43例であった。治療の内訳は後述する。組織型の内訳は移行上皮癌が54例、移行上皮癌を主体とする混在癌が9例であった。

標本採取部位は原則として、最も高い異型度か最も深い深達度の箇所を含む、数カ所を選択し、腫瘍の広がり（水平方向）による、DNA heterogeneity を評価した。また、浸潤の深さ（垂直方向）による、DNA heterogeneity 評価のため、pT3a 以上で、粘膜側と漿

膜側におおよそ2分割しても、十分評価検体が存在すると、HE (hematoxylin-eosine stain) 標本で確認された18例、36検体（1症例より1～3検体）に対し、粘膜側、漿膜側おのおのについても同様に解析を行った。

方法：それぞれの症例の HE 病理組織標本を膀胱癌取扱い規約⁴⁾に従って再検討し、標本内の腫瘍細胞、炎症細胞や間質細胞の存在を確認し、FCM 解析に適当かどうか、さらに粘膜側、漿膜側に2分割する検体に関しては双方に充分評価可能な腫瘍細胞が存在することを HE 標本で確認した上で、それぞれの対応する組織ブロックより50 μ m で薄切し、既報の方法⁵⁾と同様の処理をおこない核懸濁液を作成、FCM 分析に供した。すなわち Hedley らの方法⁶⁾に準じ、キシレンで脱パラフィンの後、100%・80%・60%・40%エタノールで漸次親水化、次いで0.5%ペプシン液で37°C、60分インキュベートし、核懸濁液を作成、引き続き Vindelov らの方法⁷⁾に準じ、RNase で処理後、propidium iodide にて核 DNA 染色し、Coulter 社製 EPICS-C を用い、FCM 分析した。

測定条件は平均核流速を毎秒200～300個、1回の測定カウント数は10,000～20,000個とし、得られた DNA histogram を附属の PARA-I program にて解析した。

DNA ploidy の判定：DNA diploid (以下 diploid) は膀胱癌組織中にその存在を確認した diploid の炎症細胞や間質細胞を internal diploid standard として使用し、その histogram の first peak を diploid の G0/G1peak とし、それに対応する G2+Mpeak を持つものとした⁸⁾。そして、その histogram の first peak (diploid の G0/G1peak) を DNA histogram 上、50 channel にくるよう調節した。DNA aneuploid (以下 aneuploid) は diploid の G0/G1peak と G2+Mpeak 以外の第3 peak を持ち、かつ channel number が diploid peak と少なくとも10%以上異なる場合に aneuploid と判定した⁵⁾⁸⁾。tetraploid region の細胞 peak に関しては、4C 細胞が全測定細胞数の10%以上である場合に aneuploid と判定した³⁾⁹⁾。また、DNA index (以下 DI 値) は腫瘍細胞の G0/G1peak の channel 数を diploid 細胞の G0/G1peak の channel 数で除した相対的指数である。定義により、diploid peak の DI 値は

1.00であり、aneuploid peak の DI 値は1.10以上となる。症例の DI 値は各検体の DI 値の median をその症例の DI 値として代表させたが、同一腫瘍の検体間で DI 値の差が0.2以上異なる peak が検出された場合、異なる cell clone と考え、clonal heterogeneity を論じる場合の基準とした¹¹⁰⁾。

術前治療について：それぞれの治療の内訳は、化学療法が CAP 4 例(1コース：2例, 2コース：2例), M-VAC 3 例(2コース：2例, 5コース：1例)であり、放射線治療では、リニアク照射であり、照射線量は20Gy：8例, 40Gy：33例, 60Gy：2例であった。

手術は原則として根治的膀胱全摘術を施行し、統計学的処理に関しては、有意差検定に χ^2 検定を用いた。転帰は、膀胱全摘除術の手術日を起点とし、1991年5月現在で算定した。

結 果

263検体で評価可能であり、変異係数 (CV: coefficient of variation) はほとんど 2～8%であった。

63症例の Grade, Stage を表 1 に示した。pT0の11例は全て、術前照射症例で、病理組織学的にも tumor free であった。pT0症例の DNA ploidy 解析は、11例全例 diploid であった。

腫瘍の存在した52例について腫瘍の Grade と DNA ploidy との関係を表 2 に示した。Grade (G) 1は3例全例 diploid であったが、G2は46%, G3は50%が aneuploid であった。腫瘍が存在した52例中24例、46%に aneuploid を認めた。

表 1 全摘標本の Grade と Stage

	pT0	pTa	pT1	pT2	pT3a	pT3b	pT4	Total
—	11	—	—	—	—	—	—	11
G1	—	1	1	0	1	0	0	3
G2	—	0	3	5	2	0	3	13
G3	—	0	2	5	15	10	4	36
	11	1	6	10	18	10	7	63

表 2 Grade と DNA ploidy

	G1	G2	G3	Total
D*	3	7	18	28
A	0	6(46%)	18(50%)	24(46%)
	3	13	36	52

*; D: DNA diploid, A: DNA aneuploid

腫瘍の Stage と DNA ploidy との関係(表 3)では、pT1以上で aneuploid を認め、特に pT3b 以上で高率に認めたが、Grade, Stage とともに DNA ploidy とは有意な関係はなかった。

次に、壁リンパ管内侵襲 (ly) と DNA ploidy との関係(表 4)を見ると、それぞれの aneuploid の出現率は ly0で22%, ly1で55%, ly2では72%と深層に侵襲するほど、有意に高率に出現していた ($p<0.01$)。壁静脈内侵襲 (v) との関係(表 5)についても v (—) に比較して、v (+) で aneuploid が有意に高率に出現していた ($p<0.02$)。

表 6 に DNA aneuploid 24例をまとめた。24例中6例は1種類の aneuploid cell clone のみで (DI 値の差が0.2以内(症例 1～6)), 12例は aneuploid と diploid との混在型 (症例 7～18), 他の 6 例 (症例19～24) は2種類の aneuploid cell clone を持つ3群に分けられた。結局、術前治療を考慮しない場合には、63例中18例、29%, 腫瘍が存在した52例中18例、35%に核 DNA 量における heterogeneity を認めた (水平方向の heterogeneity)。術前治療法別に、DNA ploidy と DNA heterogeneity の出現頻度を検討してみた (表 7)。無治療群及び化学療法群は、43%～54%と高率に

表 3 Stage と DNA ploidy

	pTa	pT1	pT2	pT3a	pT3b	pT4	Total
D	1	4	7	12	2	2	28
A	0	2(33%)	3(30%)	6(33%)	8(80%)	5(71%)	24(46%)
	1	6	10	18	10	7	52

D: DNA diploid, A: DNA aneuploid

表 4 壁リンパ管内侵襲 (ly) と DNA ploidy

	ly0	ly1	ly2	Total
D	18	5	5	28
A	5(22%)	6(55%)	13(72%)	24
	23	11	18	52

$p<0.01$

表 5 壁静脈内侵襲 (v) と DNA ploidy

	v (—)	V (+)	Total
D	22	6	28
A	10(31%)	14(70%)	24
	32	20	52

$p<0.02$

表6 DNA aneuploid 症例

症例	G	pT	前治療	DI 値	転帰(月)
1	3	4	/	2.12	9*
2	2	4	C	1.98	9*
3	3	3b	R	1.81	85
4	2	1b	R	1.70	5*
5	3	3b	R	1.40	9*
6	3	2	R	1.71	17*
7	3	3a	/	2.09, 1.00	34*
8	3	3b	/	2.21, 1.00	58*
9	3	3a	/	1.60, 1.00	104
10	3	4	/	1.53, 1.00	40*
11	3	3b	C	2.08, 1.00	17*
12	3	3b	R	2.38, 1.00	3*
13	3	3a	R	2.11, 1.00	4
14	2	2	R	2.22, 1.00	5*
15	3	3a	R	2.08, 1.00	115
16	3	2	R	1.78, 1.00	11*
17	2	2	R	2.17, 1.00	12*
18	3	3b	R	1.41, 1.00	4*
19	3	3a	/	1.32, 1.80	44*
20	3	3b	/	2.11, 2.42	19*
21	3	3a	/	1.84, 2.73	27
22	3	4	C	2.54, 2.87	5*
23	2	4	C	1.20, 1.44	5*
24	3	3b	R	1.84, 2.10	12*

前治療：／；無治療例，R；術前照射例
C；術前化学療法例
転帰＊；癌死例

表7 術前治療別の DNA heterogeneity

術前治療	DNA ploidy		DNA heterogeneity	
	D	A*	有	頻 度
無治療	5	8	7	54%(7/13)
化学療法	3	4	3	43%(4/ 7)
放射線療法	31	12	8	19%(12/43)

D: DNA diploid, A: DNA aneuploid

DNA heterogeneity を認めたが、放射線治療群では、19%と少なかった。

また、18症例36検体を上層：粘膜側，下層：漿膜側の2層に分割して検討したが、18例中8例がdiploid症例で、その16検体の両側ともdiploidであった。さらに、aneuploid 10症例中、4症例8検体において、上下両側のDI値の比較で、前述したように0.2以上の差が認められなかった。他の6症例8検体について分析を加えた(表8)。図1に代表例のhistogramを示した。全層と粘膜、漿膜の二分割での双方で比較検討し

表8 垂直方向の DNA heterogeneity

No.	前治療	症例の DI 値	2分割の 検体の DI 値	上：粘膜側 下：漿膜側
3	R	1.81	1.00 1.81	
5	R	1.40	1.38 1.47	1.00 1.58 1.36 1.00
9	/	1.60, 1.00	1.61 1.59 1.00 1.00	
11	C	2.08, 1.00	1.00 1.00 1.00 2.08	
13	R	2.11, 1.00	2.26 1.00	
22	C	2.54, 2.87	1.00 2.69 1.00 2.87	1.00 2.61

症例 No.と前治療は表6と一致する。
：DNA heterogeneity を持つ検体

たもので、表8中のNo.5である。分割せずに検討したDI値は1.40(3検体のmedian値)で、第2検体を2分割し分析した結果は、粘膜側がdiploidで、漿膜側がDI値1.36のaneuploidであった。

結局18例(36検体)のうち、6症例(8検体)で両側で異なるDNA ploidyを認め、その内訳は、粘膜側がaneuploidで漿膜側がdiploidの検体が3症例(4検体)で、粘膜側がdiploidで漿膜側がaneuploidの検体が3症例(4検体)であった。従って、検討した18例中6例(33%)にいわゆる垂直方向でのheterogeneityを認めた。しかし、術前治療による差異は認められなかった。そして、垂直方向でheterogeneityを認めた6例のうち、4例(67%)は水平方向のheterogeneityも認めた。

考 察

腫瘍における治療上、腫瘍の病理組織学的所見は治療効果を予測したり、治療手段の選択等にと重要な問題である。そして、腫瘍細胞の病理組織から得られた形態学的な異常は主観的な評価である側面を持つのに対し、客観性と再現性を兼ね備えたFCMによる腫瘍細胞の核DNA量解析は、病理組織学的所見とは別な側面から腫瘍の悪性度や予後などの評価を行ったり、さらには、治療法を選択したりできるような可能性もあり、臨床の現場でも徐々に活用されつつある。

本研究では、膀胱全摘標本の病理組織学的所見とDNA ploidyとの関係、腫瘍浸潤との関係、および膀胱癌のDNA heterogeneityについて検討し、膀胱癌に

図1 DNA histogram の1例 (漿膜側のみ DNA aneuploid を示した症例)
症例 No は表6 参照. 左に, 全層での histogram を示し, 右に, 各々分割した時の histogram を示した. 粘膜側は DNA diploid, 漿膜側は全層標本と同じ DI 値を示す, DNA aneuploid であった.

症例 5: 61歳, 男; 9カ月癌死
TCC, G3, pT3b, ly₁, v(+), pN0, pM0

おける DNA ploidy の有用性について分析し, 考察を加えた.

1) Grade, Stage と DNA ploidy との関係

Grade との関係を見ると, aneuploid の出現率は全摘標本で G2 以上でも 50% 前後と, 比較的低率である. それに対し, 膀胱癌における aneuploid (non-diploid) 腫瘍の出現率について, Tribukait ら¹¹⁾, Chin ら¹²⁾ は, G2 で 30%, G3 で 80%~90%, 他の報告¹³⁾ では G2 で 57%, G3 で 96% と, G2 における aneuploid の出現率に差が認められるが, Grade の上昇とともに高率となっている. 我々の全摘標本の DNA ploidy study で aneuploid の出現率が低率であるという事実は, 術前治療により, 治療前後で DNA ploidy が変化している可能性が考えられる. 既に報告³⁾ しているとおりだが, 放射線治療については, 照射前後で DNA ploidy が aneuploid から diploid へ変化している例が存在し, 放射線治療群が多いことより, aneuploid の出現率が低率である理由の一つと考えられた. Stage との関係では, pT1 以上で aneuploid を認め, 特に pT3b 以上で高率に aneuploid を認めるが, 有意な関係は認められなかった.

2) 壁内侵襲 (ly, v) と DNA ploidy との関係
病理組織学的にも ly, v が陽性を示す場合は, リンパ

節転移及び遠隔転移の出現に結びつき易く, 予後を規定する因子である¹⁴⁾. ly, v とともに陽性例では有意に高率に aneuploid が出現しているが ($p < 0.01$, $p < 0.02$), この事実は aneuploid 腫瘍が転移や浸潤などを起こし易いと言う, malignant potential の高さを証明する事例であろう.

3) DNA heterogeneity および腫瘍浸潤と DNA ploidy との関係

膀胱癌は多中心性発生や腔内再発するなど, 多彩な性格を有し, また, 病理組織学的にも一つの腫瘍中にいくつかの grade を示し, 形態学的にも heterogeneous な細胞集団を有する場合が多い. その事実は, 核 DNA 量にも heterogeneity が存在することを示唆するものであろうか. 膀胱癌での (水平方向の) DNA heterogeneity は 52 例中 18 例, 35% であった. 我々は既に, 術前照射例において, 照射前 aneuploid から, 全摘後 diploid へ変化する事を報告している³⁾ が, 前治療によって修飾されない無治療全摘群では, 症例数は少ないものの, 実に 13 例中 7 例, 54% の高率で DNA heterogeneity が認められており, 従来の膀胱癌の報告 (8%~10.8%)¹¹⁾¹⁵⁾ に比べるとかなり高率であった. また, Vogelstein らは膀胱癌遺伝子を検討し, 多発性腫瘍でも遺伝子としての起源は同じ, すなわち,

mono-clonal であるという報告¹⁶⁾をしており、多中心性発生は、元は一つの癌細胞から発生し、膀胱腔内に播種した、腫瘍の進展の結果と考えられると述べている。つまり、膀胱癌に核 DNA 量上の heterogeneity が存在するということは、発癌時の変化ではなく、腫瘍の進展過程上に生じてくる変化であり、腫瘍が分裂、増殖を繰り返している内に核 DNA 量に差が生じてくると考えられる。当教室の斉藤¹⁷⁾は、BBN 投与のマウスにおける膀胱癌の発癌と核 DNA 量の関係について検討し、発癌の過程は、diploid で発癌し、次第に progression しながら、aneuploid cell clone が出現し、悪性度も増しながら、aneuploid の出現率も増加していくという結論を得ており、この考えを支持するものであると思われる。従って、検索検体数を増やして検討すれば、さらに DNA heterogeneity の出現頻度は高まる可能性も有ると思われた。

また、膀胱は管腔臓器であり、膀胱癌は移行上皮より発生し、内腔や筋層に進展、浸潤していく訳であるが、その腫瘍の垂直方向での DNA heterogeneity について考えてみたい。前述したように aneuploid の出現が発癌後の変化であるとするならば、浸潤癌でも粘膜側で diploid で発癌したものが、浸潤に伴って、少なくとも、漿膜側では aneuploid に変化していくと考えることができる。従って、垂直方向の DNA heterogeneity では、そのパターンとして、粘膜側→漿膜側の順に、D (DNA diploid) → D, A (DNA aneuploid) → A, D → A の場合が考えられるが、実際は、2 症例で A → D の場合が存在し、従って、分割した検体の DNA ploidy の結果からは発癌の過程での DNA ploidy 変化と癌の浸潤性変化を説明可能な一定の傾向は認められなかった。この点は、管腔臓器である大腸癌で検討した Quirke ら¹⁸⁾も、腫瘍の表層と深部の垂直方向での ploidy には一定の傾向は認められなかったとし、我々と一致する結果であった。

以上、FCM を用い、膀胱癌の核 DNA 量の持つ意義を種々の観点から検討してきたが、aneuploid の持つ生物学的悪性度を、膀胱癌においても、非常に良く表現していると思われた。今後は、DNA ploidy 解析が積極的に臨床応用されるよう、さらなる検討が必要であると考えられた。

結 語

膀胱癌全摘症例において、FCM を用いて全摘標本の核 DNA 量を解析し、DNA ploidy と病理組織学的因子、腫瘍浸潤との関係、また、膀胱癌の DNA hetero-

geneity について検討した。

1) DNA aneuploid は腫瘍が存在した 52 例中 24 例 (46%) に認め、DNA heterogeneity を示したのは 18 例 (35%) であった。術前治療別には、無治療で 54% と高率で、化学療法で 43%、放射線治療で 19% であった。

2) Grade 2 以上の症例にのみ DNA aneuploid を認め、pT3b 以上の high stage 症例で、高率に DNA aneuploid を認めたが、DNA ploidy と有意な関係はなかった。また、壁内侵襲 (ly, v) では、陽性例で有意に DNA aneuploid が多かった ($p < 0.01$, $p < 0.02$)。

3) 腫瘍の粘膜側と漿膜側の検討から、DNA ploidy と腫瘍浸潤との間に、明確な関係は認められなかった。

本論文の要旨は第 55 回日本泌尿器科学会東部総会 (松本)、第 49 回日本癌学会総会 (札幌) 他において発表した。

文 献

- 1) 永森 聡: Flow cytometry による腎細胞癌の Heterogeneity の検討. 日泌尿会誌, 81, 593—600, 1990.
- 2) 柏木 明, 永森 聡, 野々村克也, 豊田健一, 小柳知彦, 野島孝之, 井上和秋: Flow Cytometry による成人胚細胞性腫瘍の核 DNA 量の検討. 日泌尿会誌, 83, 1062—1070, 1992.
- 3) 豊田健一, 永森 聡, 柏木 明, 野々村克也, 富樫正樹, 小柳知彦, 野島孝之, 井上和秋: 膀胱腫瘍術前照射全摘症例の核 DNA 量解析—照射前の DNA ploidy と照射前後の DNA ploidy 変化と治療効果及び予後との関係—. 日泌尿会誌, 83, 2050—2057, 1992.
- 4) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 泌尿器科・病理. 膀胱癌取り扱い規約, 第 1 版, 金原出版, 東京, 1980.
- 5) 永森 聡, 坂下茂夫, 小柳知彦, 井上和秋: Flow cytometry による腎癌パラフィン包埋組織の核 DNA 解析. 日泌尿会誌, 79, 1355—1363, 1988.
- 6) Hedley, D.W., Friedlander, M.L., Taylor, I.W., Rugg, C.A. and Musgrove, E.A.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J. Histochem. Cytochem., 31, 1333—1335, 1983.
- 7) Vindeløv, L.L., Christensen, I.J. and Nissen, N. I.: A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometry DNA analysis. Cytometry, 3, 323—327, 1983.
- 8) Coon, J.S., Schwartz, D., Summers, J.L., Miller A.W. III. and Weinstein, R.S.: Flow cytometric analysis of deparaffinized nuclei in urinary bladder carcinoma—Comparison with

- cytogenetic analysis—*Cancer*, **57**, 1594—1601, 1986.
- 9) Blute, M.L., Tsushima, K., Terry, G.M., Therneau, T.M. and Lieber, M.M.: Transitional cell carcinoma of renal pelvis: Nuclear deoxyribonucleic acid ploidy studied by flow cytometry. *J. Urol.*, **140**, 944—949, 1988.
 - 10) Kallioniemi, O.P.: Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as staining material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. *Cytometry*, **9**, 164—169, 1988.
 - 11) Tribukait, B., Gustafson, H. and Esposti, P.L.: The significance of ploidy and biological evaluation of bladder tumors: A study of 100 untreated cases. *Br. J. Urol.*, **54**, 130—135, 1982.
 - 12) Chin, J.L., Huben, R.P., Nava, E., Rustum, Y.M., Greco, J.M., Pontes, J.E. and Frankfurt, O.S.: Flow cytometric analysis of DNA content in human bladder tumors and irrigation fluids. *Cancer*, **56**, 1677—1681, 1985.
 - 13) Norming, U., Nyman, C.R. and Tribukait, B.: Comparative flow cytometric deoxy ribonucleic acid studies on exophytic tumor and random mucosal biopsies in untreated carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, **142**, 1442—1447, 1989.
 - 14) 豊田健一, 金川匡一, 柏木 明, 永森 聡, 関 利盛, 後藤敏明, 野々村克也, 富樫正樹, 小柳知彦, 南谷正水, 丸 彰夫: 膀胱全摘症例の臨床的検討—予後規定因子と補助療法の意義について—. *日泌尿会誌*, **81**, 757, 1990.
 - 15) 吉川和行, 栃木達夫, 星 宣次, 折笠精一, 今井克忠: Flow Cytometry による膀胱腫瘍の研究. 第2報. Flow cytometric DNA analysis による膀胱腫瘍の予後と腔内再発の解析. *日泌尿会誌*, **78**, 227—231, 1987.
 - 16) Sidransky, D., Frost, P., Eschenbach, A.V., Oyasu, R., Preisinger, A.C. and Vogelstein, B.: Clonal origin of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.*, **326**, 737—740, 1992.
 - 17) 斉藤文志郎: N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 誘発マウス膀胱癌に関する研究—形態学的変化と核 DNA 量変化との関係について—. *日泌尿会誌*, **82**, 1206—1210, 1991.
 - 18) Quirke, P., Dyson, J.E.D., Dixon, M.F., Bird, C. C. and Joslin, C.A.F.: Heterogeneity of colorectal adenocarcinoma evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br. J. Cancer*, **51**, 99—106, 1985.

(1994年11月24日受付, 1995年3月27日受理)