表在性膀胱癌の増殖速度と Bromodeoxyuridine (BrdU) および Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 標識率との関係

筑波大学臨床医学系泌尿器科 (主任: 赤座英之教授)

*茨城西南医療センター病院泌尿器科

太田 智則 赤座 英之 服部 一紀* 内田 克紀

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ESTIMATED TUMOR GROWTH SPEED AND INDICES OF BROMODEOXYURIDINE (BrdU) INCORPORATION AND THE PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA) EXPRESSION IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER

Tomonori Ota, Hideyuki Akaza, Kazunori Hattori* and Katsunori Uchida

Department of Urology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

(Director: H. Akaza)

*Department of Urology, Ibaraki Seinan Medical Center Hospital

(Background) We previously reported that the average tumor growth speed estimated from clinical findings may be useful as a prognostic factor to determine the stage progression in superficial bladder cancer. Here, we examined the relationship between the dynamic estimation based on the average tumor growth speed and the static estimation based on the biological proliferative activity determined from bromodeoxyuridine (BrdU) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) indices in superficial bladder cancer.

(Methods) The subjects were 11 patients with recurrent superficial bladder cancer. The tumor growth speed was calculated by dividing all tumor volume at a certain recurrence episode by the duration until the recurrence. And then, the average tumor growth speed was determined individually by calculating mean tumor growth speed for all recurrence episodes. BrdU and PCNA indices were investigated by immunohistochemical staining.

(Results) There was a significant correlation between the average tumor growth speed and indices of PCNA and BrdU were statistically (Spearman's rank correlation test; between the average tumor growth speed and PCNA index: $\rho=0.85$, $p<0.01$; between the average tumor growth speed and BrdU index: $\rho=0.71$, $p<0.05$; between BrdU index and PCNA index: $\rho=0.77$, $p<0.05$). The average tumor growth speed which was calculated based on clinical findings reflected the biological proliferative activities such as BrdU and PCNA indices. Furthermore, the values of all indices were higher in the invasive than in the non-invasive cases.

(Conclusion) These findings suggest that the average tumor growth speed as the dynamic estimation is an important prognostic factor to determine stage progression in superficial bladder cancer.

Key words: bladder cancer, bromodeoxyuridine (BrdU), proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

要旨: (背景・目的) 以前我々は, 表在性膀胱癌において, 臨床所見より求めた造腫瘍能の動的評価法が
癌進展予測の指標となりうることを報告した。今回, さらにこの動的評価法 (全経過の腫瘍増殖速度)

と生物学的増殖能の指標である BrdU・PCNA 標識率といった静的評価法との相関関係につき検討した。

(方法) 約9年間に経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行した表在性膀胱癌 (Ta, T1) のうち、経過観察中再発を認め、全経過の腫瘍増殖速度の算出可能 (紹介患者の場合前医での臨床記録も含め、腫瘍数やすべての腫瘍の大きさ、治療経過など初発時からの臨床記録が整備されてる) であり、かつ Bromodeoxyuridine (BrdU) または Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 標識率が測定されている11例を対象とし、retrospective に検討した。全経過の腫瘍増殖速度は、個々の症例ごとに求めた各再発間の腫瘍増殖速度 (ある発症時の全ての腫瘍量を再発間隔で除したもの) の平均値 (平均腫瘍増殖速度) とした。求めた全経過の腫瘍増殖速度と BrdU 標識率、PCNA 標識率間で相関性を検討した。

(結果) 全経過の腫瘍増殖速度と PCNA 標識率、BrdU 標識率との間で有意な相関を認め (Spearman's rank correlation test; 全経過の腫瘍増殖速度と PCNA 標識率間: $\rho=0.85$, $p<0.01$, 全経過の腫瘍増殖速度と BrdU 標識率間: $\rho=0.71$, $p<0.05$, PCNA・BrdU 標識率間: $\rho=0.77$, $p<0.05$)。臨床所見より求めた全経過の腫瘍増殖速度は、BrdU 標識率、PCNA 標識率といった生物学的増殖能を反映していた。さらに、浸潤を示した症例は示さなかった症例に比べ、全経過の腫瘍増殖速度も含め全ての指標で高値を示す傾向を認めた。

(結論) 臨床上の観察データから算出した動的評価法である全経過の腫瘍増殖速度が、生物学的予後推定因子であり静的評価法である BrdU、PCNA 標準率と有意な相関を示したことより、腫瘍増殖速度は生物学的指標を反映し、腫瘍の進展性を示す指標になりうる可能性があるものと思われた。

キーワード: 膀胱癌, bromodeoxyuridine (BrdU), proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

緒 言

表在性膀胱癌において、膀胱保存療法後の腔内再発予防と約10%¹⁾²⁾に認められる進行癌への進展予測が非常に重要な課題である。

一般に担癌患者の予後推定には受診時の進行度や組織学的悪性度が用いられる。ところが表在性膀胱癌は再発を繰り返すことが少なくなく、またその経過中に TUR-Bt ら膀胱内注入療法といった様々な修飾を受け、さらに時間的空間的多発性という特徴を有する。このような特徴を考慮すると、表在性膀胱癌において、ある一時点におけるある腫瘍の評価に加え全経過および膀胱全体の造腫瘍能も考慮する必要があると考え、我々は表在性膀胱癌の膀胱全体 (即ち一全体) の造腫瘍能を再発例を対象に臨床上の観察データより全経過の腫瘍増殖速度を求め、進展性を予測できる可能性があることをすでに報告した³⁾。しかし、このような動的評価 (全経過の腫瘍増殖速度) と従来から用いられている静的評価 (AgNOR・BrdU・PCNA・Ki-67標識率や DNA パターンなど)^{4)~14)}との関係は明らかではない。そこで、今回は臨床上の観察データから求めた全経過の腫瘍増殖速度 (動的評価) と、ある一時点の腫瘍の生物学的増殖能の指標である BrdU・PCNA 標識率 (静的評価) との相関性を検索し、全経過の腫瘍増殖速度の有用性につき検討した。

対象と方法

筑波大学泌尿器科にて約9年間に経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行した表在性膀胱癌 (Ta, T1) のうち、経過観察中再発を認め、全経過の腫瘍増殖速度の算出可能 (紹介患者の場合、前医での臨床記録も含め腫瘍数やすべての腫瘍の大きさ、治療経過など初発時からの臨床記録が整備されてるもの) であり、かつ Bromodeoxyuridine (BrdU) または Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 標識率が測定されている11例を対象とし、retrospective に検討した。対象症例の平均年齢は67.4歳 (35~83歳)、観察期間は平均55ヵ月 (13~100ヵ月)、女性は1例のみであった。内視鏡所見、病理組織学的所見は膀胱癌取扱い規約¹⁵⁾に従った。

膀胱全体の造腫瘍能の評価法は、前回の検討と同様に³⁾、ある再発時点で膀胱内総ての腫瘍の最大径の合計を前回術後から再発までの期間で除し、膀胱全体 (即ち1全体) である再発間の腫瘍増殖速度とした。さらに各症例ごとに再発間の腫瘍増殖速度の平均を求め全経過の腫瘍増殖速度 (平均腫瘍増殖速度) とした。腫瘍径の計測には、経腹的超音波、または経尿道的膀胱腫瘍切除術中に経尿道的超音波、切除鏡ループを用いた。なお腫瘍の容量を求めるにあたり腫瘍最大径を代用したのは、retrospective な検討であるため様々な形態を加味した容量を求めることは困難であったため

ある。術後の follow-up は 3 カ月ごとの膀胱鏡検査を原則とした。なお、再発時腫瘍が筋層浸潤を示した場合を進展あり (progression) とした。

BrdU・PCNA 標識率は以下のようにして求めた。BrdU (Rudibud®, 武田薬品) 500mg を経尿道的膀胱腫瘍切除術の 2～3 時間前に電解質液 200ml に溶解し、約 30 分で点滴静注した。採取した検体は 70% エタノールでただちに固定し、24 時間以上冷蔵庫に保存したのちパラフィン包埋した。固定時間は約 1 日から 7 日であったが概ね 3 日以内であった。このように作成したアルコール固定パラフィン包埋ブロックを用いて 4 μ m の薄切切片を作成し、抗 BrdU 抗体、抗 PCNA 抗体を用いた酵素抗体法で免疫染色 (Avidin Biotin Complex 法) を行った。判定は腫瘍細胞が最もよく染色された部位を選び、400 倍の鏡視下で 5～10 視野について、1 視野約 100～300 個、計約 1,000 個の細胞を数えた。数えた全細胞に対する標識細胞の割合を百分率 (%) で表し、平均の標識率を求めた。なお、PCNA in situ 検査については最近倫理的問題が提起されているが、ここで検討された症例はすべて 1991 年以前に施行された retrospective study である。また、これらの検査にあたり全患者に informed consent を得たうえで行った。

以上のようにして求めた全経過の腫瘍増殖速度と BrdU・PCNA 標識率との相関関係を検討した。統計解析は Stat View 4.5J® を使用した。

結 果

1. 追跡過程で浸潤癌へ進展性を示したのは 3 例であった。

2. 各測定値の分布を示す (図 1)。進展性を示した症例は、各測定項目のいずれにおいても高値を示していた。対象症例数が少なくあくまで参考値であるが、浸潤癌への進展を認めた群も認めなかった群で比較したところ全ての指標において進展例で有意に高値を示した (Mann-Whitney's U test: $p < 0.05$)。

3. 相関性の検討結果

BrdU 標識率と PCNA 標識率間の順位相関係数は $\rho = 0.77$ で有意な相関性を示した (図 2: $n = 11$, Spearman's rank correlation test, $p = 0.015$)。全経過の腫瘍増殖速度と PCNA 標識率間の順位相関係数も $\rho = 0.85$ で有意な相関性を示した (図 3: $n = 11$, Spearman's rank correlation test, $p = 0.0075$)。同様に BrdU 標識率と全経過の腫瘍増殖速度の間でも $\rho = 0.71$ (図 4: $n = 11$, Spearman's rank correlation

図 1 各測定値の分布。全経過の腫瘍増殖速度、BrdU 標識率、PCNA 標識率の分布を示す。●は経過観察中に浸潤癌へ進展を示した症例で、いずれも高値を示している。

図 2 BrdU 標識率と PCNA 標識率間の散布図。BrdU 標識率と PCNA 標識率間の順位相関係数は $\rho = 0.77$ (Spearman's rank correlation test: $p < 0.05$) と有意な相関を認めた。浸潤癌へ進展した症例 (●) は、右上に分布している。

test, $p = 0.025$) と有意な相関関係を認め、全ての指標間で有意な相関を認めた。また、経過中に進展性を示した 3 例は、全経過の腫瘍増殖速度、BrdU 標識率、PCNA 標識率のいずれも高値を示し、図 2～4 の右上

図3 PCNA 標識率と全経過の腫瘍増殖速度間の散布図。PCNA 標識率と全経過の腫瘍増殖速度間の順位相関係数は $\rho=0.85$ (Spearman's rank correlation test: $p<0.01$) と有意な相関を認めた。浸潤癌へ進展した症例 (●), 右上に分布している。

図4 BrdU 標識率と全経過の腫瘍増殖速度間の散布図。BrdU 標識率と全経過の腫瘍増殖速度間の順位相関係数は $\rho=0.71$ (Spearman's rank correlation test: $p<0.05$) と有意な相関を認めた。浸潤癌へ進展した症例 (●) は、右上に分布している。

方に位置している。

考 察

表在性膀胱癌は、再発予防と浸潤癌への進展予測を念頭に、どのように適切な治療を選択するかという臨床上の問題を有する。膀胱癌の再発や進展につき分子

生物学的研究や、遺伝子解析などその本質を追求すべく盛んに研究が行われている。しかし、これらの解析は時間・費用の制約や設備に依存するところも大きく、現時点では多くの施設でこれらの解析を行い治療法を選択するという段階ではなく、臨床の観察データを参考にしなければならない場合が少なくない。そこで我々は、一つの試みとして再発症例を対象に臨床観察データから動的に進展予測を簡便に行うことを目的とし全経過の腫瘍増殖速度を求め、進展性と相関することを報告した³⁾。この全経過の腫瘍増殖速度は、臨床の観察データから簡便に求めた膀胱全体すなわち一個体の全経過を対象とした造腫瘍能の指標で、既存の一時点の一腫瘍を対象とした予後推定因子とは異なった捉え方である。しかし、このような臨床上の観察データから求められた指標は生物学的指標と相関性を保つものでなければならない。そこで細胞の増殖能を反映するものとしてあげられる BrdU 標識率と PCNA 標識率^{6)~10)}と、観察データから求めた全経過の腫瘍増殖速度との相関性を検討した。同時にこの検討は全経過の腫瘍増殖速度が示す動的評価と、BrdU, PCNA 標識率が示すある時点の静的評価との関連性を示すものとも考えることができる。

これまでに AgNOR, PCNA, BrdU, Ki-67 標識率といった増殖能を示す指標の間では、AgNOR と PCNA⁵⁾⁹⁾¹⁶⁾・Ki-67 標識率間¹⁷⁾、BrdU 標識率と Ki-67 標識率間⁶⁾、BrdU・PCNA 標識率間¹⁸⁾で相関すると報告されている。今回の検討においても Waldman¹⁸⁾の報告と同様に BrdU・PCNA 標識率間で有意な相関を示した(図2: $n=11$, $\rho=0.77$, $p=0.015$)。さらに全経過の腫瘍増殖速度は PCNA 標識率(図3: $n=11$, $\rho=0.85$, $p=0.0075$)、BrdU 標識率(図4: $n=11$, $\rho=0.71$, $p=0.025$)の両方で有意な相関を示した。このことは、動的評価と静的評価が相関関係することを示し得たと同時に、全経過の腫瘍増殖速度が生物学的増殖能の一部を反映し腫瘍の進展性を示す指標となりうる可能性を示したものであると思われる。しかも進展を認めた症例は、いずれの指標においても高値を示しており、いずれの指標も進展予測に有用であることを示唆するものと考えられる。事実、対象症例が少ないので参考値ではあるが、各指標ごとに進展例が非進展例と比較してみたところ、進展例で高値を示す傾向が認められた ($p<0.05$)。

近年 BCG をはじめ膀胱内注入療法^{19)~21)}や動注療法²²⁾といった膀胱保存的治療法が各種検討されて良好

な成績をおさめているが、残念ながら再発を繰り返したり浸潤癌へ進展する表在癌の症例を認めることがある。どこまで膀胱内注入療法や動注療法などといった保存的治療法で経過を追えるか、どのタイミングで膀胱全摘除術など侵襲の大きな治療法へ転換するべきかを決定するのは必ずしも容易ではない。今回検討した全経過の腫瘍増殖速度も含め既存の指標の算出・測定方法について解決すべき点が残っているものの³⁾、より多くの情報により予後を推定し適切な治療法へ切り替えることは大変重要なことであり、膀胱全体を対象にし臨床の観察データから簡便に求めた全経過の腫瘍増殖速度も予後推定ならびに治療法選択・転換の決定に寄与するものと思われる。

本論文の要旨は第33回日本癌治療学会総会にて発表した。

文 献

- Williams, J.L., Hammonds, J.C. and Saunders, N.: T1 bladder tumors. *Brit. J. Urol.*, **49**, 663—668, 1977.
- 垣添忠生, 松本恵一, 蔦巢賢一, 高井計弘: 乳頭状・表在性膀胱癌の発育進展に関する考察. *日泌尿会誌*, **78**, 1065—1070, 1987.
- 太田智則, 赤座英之: 表在性膀胱癌の腫瘍増殖速度に関する一考察. *日泌尿会誌*, **87**, 851—856, 1996.
- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J.J.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem. J.*, **18**, 5—14, 1986.
- 笹野公伸, 宮崎修吉, 伊達文子, 佐藤郁郎: AgNORs—病理組織診断への応用. *病理と臨床*, **9**, 890—893, 1991.
- Limas, C., Bigler, A., Bair, R., Bernhart, P. and Reddy, P.: Proliferative activity of urothelial neoplasms: Comparison of BrdU incorporation, Ki67 expression, and nucleolar organizer regions. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 159—165, 1993.
- 大山 力, 中角尚誉, 佐藤 信, 吉川和行, 星 宣次, 折笠精一, 林 隆則, 光野 聡, 村上房夫, 黒須清一, 千葉隆一, 箱崎半道: Bromodeoxyuridine in vivo labeling による膀胱腫瘍のS期細胞の検討. *日泌尿会誌*, **81**, 524—531, 1990.
- Robbins, B.A., Vega, D., Ogata, K., Tan, E.M. and Nakamura, R.M.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 841—845, 1987.
- Lipponen, P.K. and Eskelinen, M.J.: Cell proliferation of transitional cell bladder tumours determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br. J. Cancer*, **66**, 171—176, 1992.
- Hattori, K., Uchida, K., Akaza, H., Koiso, K., Nemoto, R. and Harada, M.: Proliferating cell nuclear antigen cyclin in human transitional cell carcinoma. *Br. J. Urol.*, **75**, 162—166, 1995.
- Fontana, D., Bellina, M., Gubetta, L., Fasolis, G., Rolle, L., Scoffone, C., Porpiglia, F., Colombo, M., Tarabuzzi, R. and Leonardo, E.: Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J. Urol.*, **148**, 1149—1151, 1992.
- Barlogie, B., Raber, M.N., Schumann, J., Johnson, T.S., Drewinko, B., Swartzendruber, D.E., Göhde, W., Andreeff, M. and Freireich, E.J.: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.*, **43**, 3982—3997, 1983.
- Williams, N.N. and Daly, J.N.: Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **171**, 257—266, 1990.
- Clemons, F.A.S., DeNicola, D.B., Carlton, W.W., Morrison, W.B. and Walker, E.: Flow cytometric DNA ploidy analysis in canine transitional cell carcinoma of urinary bladders. *Vet. Pathol.*, **31**, 207—215, 1994.
- 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2版, 金原出版, 東京, 1993.
- Skopelitou, A., Korkolopoulou, P., Papanicolaou, A., Christodoulou, P., Thomas-Tsagli, E. and Pavlakis, K.: Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Eur. Urol.*, **22**, 235—240, 1992.
- Murray, P.G., Boldy, D.A.R., Crocker, J. and Ayres, J.G.: Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin sections. *J. Pathol.*, **159**, 169—172, 1989.
- Waldman, F.M., Carroll, P.R., Cohen, M.B., Kerschmann, R., Chew, K. and Mayall, B.H.: 5-Bromodeoxyuridine incorporation and PCNA expression as measures of cell proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Mod. Pathol.*, **6**, 20—24, 1993.
- Akaza, H., Koiso, K., Kotake, T., Matsumura,

- Y., Isaka, S., Machida, T., Obata, K., Ohashi, Y., Ohe, H., Ohi, Y., Shimazaki, J., Tashiro, K., Ueda, T., Kagawa, S., Nijima, T. and The Japanese Urological Cancer Research Group for Adriamycin: Long-term results of intravesical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer: Experience of the Japanese Urological Cancer Research Group for Adriamycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **30**, 15–20, 1992.
- 20) Akaza, H.: BCG treatment of existing Ta, T1 tumors or carcinoma in situ of the bladder. *Euro. Urol.*, **27**, 9–12, 1995.
- 21) Akaza, H., Hinotsu, S., Aso, Y., Kakizoe, T. and Koiso, K.: Bacillus Calmette-Guerin treatment of existing papillary bladder cancer and carcinoma in situ of the bladder. Four-year results. The Bladder Cancer BCG Study Group. *Cancer*, **75**, 552–559, 1995.
- 22) 河合弘二, 赤座英之: 尿路性器腫瘍の術前化学療法. *癌と化学療法*, **22**, 1912–1917, 1995.
(1996年11月14日受付, 1997年3月26日受理)
-