

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目；FISH (FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION)を用いた膀胱癌の非侵襲的検出および再発の予測

指導教官；北村唯一教授

外科学専攻

氏名；石渡 進

膀胱癌を検出するためには、膀胱鏡検査と尿細胞診が一般的に用いられているが、膀胱鏡は侵襲的な検査であり、尿細胞診は specificity は良好であるが、sensitivity は充分ではない。また、BTA テストや NMP22 などの新しい検査の sensitivity や specificity はいまだ充分ではない。

一方、最近の Fluorescence in situ hybridization (FISH) における進歩により、膀胱癌の細胞遺伝学的変異の研究が可能になった。FISH 法は蛍光標識された一本鎖 DNA プローブと染色体 DNA を相補性のある部位で hybridize させ、その部位を蛍光顕微鏡下で検出する方法である。第 9 染色体の欠失は、移行上皮癌の 60%以上に認められ、また、第 17 染色体の欠失と第 7、第 8 染色体の増加は、膀胱癌に特異的な変化であることが明らかにされた。これらの染色体変異を膀胱癌検出の腫瘍マーカーとする研究が、膀胱洗浄液検体を用いて行われている。一方、自然排尿を用いた FISH 法は、膀胱癌を非侵襲的に検出できる可能性を有する方法であるが、これまで十分な検討が行われていない。

今回、膀胱癌切除標本および尿中剥離細胞における FISH 法の有用性を検討し、自然尿を用いた FISH 法が膀胱癌の検出を非侵襲的に行えるか、さらに、同法が膀胱癌の再発を予測しうるかを検討した。

①；尿中剥離細胞を用いた FISH 法による解析の予備実験として、膀胱癌に特異的な染色体数異常を明らかにし、染色体数異常検出の cut-off 値を設定するために、健常例 7 例(男性 5 例、女性 2 例、平均 54.8 歳)から得られた正常膀胱切除標本並びに膀胱癌 25 例(男性 22 例、女性 3 例、平均 70.5 歳)か

ら得られた腫瘍切除標本において FISH 法を施行した。重なりがなく、形態保存良好な核 200 個における第 7, 8, 9, 17 染色体セントロメアのシグナル数を落射型蛍光顕微鏡（オリンパス社、東京）によって計測した。その結果、健常群において染色体欠失あるいは増加を示した細胞比率(%) + 2SD（標準偏差）は 20%未満であったことから、染色体数異常検出の cut-off 値を 20%と設定し、少なくとも 1 つの染色体におけるセントロメアシグナルの欠失や増加を 40 個（20%）以上の核で認められた場合、FISH 陽性とした。膀胱癌症例においては、一般に FISH 陽性の症例は 20%の cut-off 値を明らかに上回るものが多く、その判定は妥当であると考えられた。FISH による膀胱癌検出頻度は、第 7 染色体 39%、第 8 染色体 18%、第 9 染色体 58%、第 17 染色体 45%、全体で 64%であった。染色体数異常の頻度が高い第 9, 第 17 染色体を合わせた検出頻度は 25 例中 15 例（60%）であり、第 7, 第 8 染色体数異常を合わせた検出頻度（32%）と比較すると有意に検出頻度が高かった（ $p=0.041$ ）。

②；自然尿中剥離細胞を検体として用いた FISH 法の膀胱癌の非侵襲的検出法としての有用性を検討するために、手術前の膀胱癌症例 44 例（男性 38 例、女性 6 例、平均 69.2 歳）と泌尿器科的悪性腫瘍を有さない症例 20 例（男性 13 例、女性 7 例、平均 63.4 歳）において FISH 法を行った。自然尿 50ml を採取し、遠沈後、0.75%KCl で 10 分間低張処理した。カルノア液にて固定後、スライドガラス上に滴下し、 -20°C にて解析まで冷凍保存した。1 つの検体スライド上での同時に 2 つの染色体解析が可能のため、膀胱癌切除標本を用いた予備実験にて、染色体数異常を高頻度に検出した第 9, 第 17 染色体のセントロメアプローブを用いて前述のように、FISH 法を行なった。また、同症例において、尿細胞診と BTA テスト（米国 Bard 社）を行い、FISH の結果と比較検討した。hybridization 不良な 3 例を除いた膀胱癌症例 41 例において、染色体の欠失は概して、grade, stage の低い症例に認められたのに対して、染色体の増加は grade, stage の高い症例に多く認められた。第 9 染色体の膀胱癌検出頻度は 75%であり、第 17 染色体の膀胱癌検出頻度 51%よりも有意に高かった（ $p=0.037$ ）。FISH による膀胱癌検出感度は 85%であり、BTA テスト 64%、尿細胞診 32%よりも有意に高かった（それぞれ $p=0.026$, $p<0.0001$ ）。FISH、BTA テスト、尿細胞診の specificity は、それぞれ 95%, 80%, 100%であった。

FISH は BTA や尿細胞診に比べて、Tis や grade, stage の低い腫瘍において検出感度が高いという特徴を有しており、specificity は尿細胞診と同等であった。

③；膀胱癌の再発予測マーカーとしての FISH 法の有用性を検討するために、膀胱癌症例 33 例(男性 27 例、女性 6 例、平均 66.0 歳)より経尿道的膀胱腫瘍切除術 1 か月後に得た尿検体において FISH 法を行った。症例は全例、3 か月毎に膀胱鏡検査と尿細胞診にて経過観察された。腫瘍切除後の FISH の結果は、33 例中 21 例 (63.6%)で FISH 陽性であった。観察期間中 (3 - 30 か月、平均 15.5 か月)に、膀胱癌の再発は 13 例において確認され (39.4 %)、全例 FISH 陽性であった。FISH 陰性の 12 例は全例再発しなかった。第 9 染色体変異を有する症例は、第 9 染色体変異を有さない症例よりも膀胱癌を再発しやすい傾向を認めた ($p=0.080$)が統計学的有意差を生じなかった。一方、第 17 染色体変異を有する症例は、第 17 染色体変異を有さない症例よりも有意に膀胱癌の再発率が高かった ($p<0.0001$)。各パラメーターの再発予測における PPV (Positive predictive value)・ NPV (Negative predictive value) を検討したところ、PPV, NPV とともに良好な膀胱癌の再発予測マーカーは、第 17 染色体の染色体変異 (PPV 91.7%, NPV 90.5%)であった。

まとめ

今回の研究において、自然尿を検体として用いた FISH 法により非侵襲的に膀胱癌を検出し、再発を予測することが可能であるかを検討した。予備実験の結果に従って、第 9, 第 17 染色体セントロメアプローブを用いて自然尿中剥離細胞における FISH を行い、尿細胞診、BTA テストと比較して、FISH 法は sensitivity は有意に優れ、specificity は尿細胞診と同等であるという結果が得られた。さらに、FISH 法は膀胱癌切除後症例において膀胱癌の再発を予測できる可能性が示唆された。