

尿路上皮癌患者の尿中剝離細胞における 17 番染色体数および *HER-2* 遺伝子数異常の臨床的意義

井上 高光¹⁾・佐藤 一成¹⁾・飯沼 昌宏¹⁾・土谷 順彦¹⁾
羽瀧 友則¹⁾・加藤 哲郎^{1,*}

¹⁾秋田大学医学部生殖発達医学講座泌尿器科学分野

*現：秋田県総合保健センター

(平成 15 年 12 月 26 日受付, 平成 16 年 1 月 13 日掲載決定)

Clinical Significance of Chromosome 17 and *HER-2* Numerical Alterations in Urine-Exfoliated Cells in Patients with Urothelial Carcinoma

Takamitsu Inoue¹⁾, Kazunari Sato¹⁾, Masahiro Iinuma¹⁾, Norihiko Tsuchiya¹⁾,
Tomonori Habuchi¹⁾ and Tetsuro Kato^{1,*}

¹⁾*Division of Urology, Department of Reproductive and Developmental Medicine,
Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan*

*Present address : *Akita Prefectural Center of Health Care*

Abstract: This study was conducted to elucidate the clinical significance of the alterations of *HER-2* gene (*HER-2*) and chromosome 17 centromere in urine-exfoliated cells by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in 103 patients with urothelial transitional cell carcinoma. The additional increase of *HER-2* (AI-*HER2*), gain of chromosome 17 (G-17), and AI-*HER2* with G-17 (AI-*HER2*+G-17) in the urine-exfoliated cells were examined by FISH using DNA probes for *HER-2* and chromosome 17 centromere. AI-*HER2*, AI-*HER2*+G-17, and G-17 were found in 13 (12.6%), 10 (9.7%), and 36 (35.0%) patients, respectively. The positive rate of the FISH (AI-*HER2*, AI-*HER2*+G-17, or G-17) was higher than that of cytology in total cases (57.3% vs. 45.6%, $p < 0.001$), in low-stage (pTa-1) tumors (44.3% vs. 27.9%, $p = 0.003$), and in cases without CIS (42.0% vs. 31.9%, $p < 0.001$). AI-*HER2* was significantly more frequent in tumors with two or more recurrences (25.9% vs. 7.9%, $p = 0.037$). AI-*HER2*+G-17 was more frequent in cases with primary CIS than without CIS (26.7% vs. 3.0%, $p = 0.008$). Numerical alterations of *HER-2* and the chromosome 17 centromere in the urine-exfoliated cells detected by FISH may reflect the malignant potential of urothelial carcinoma and could be used as markers for the recurrence and the presence of primary CIS.

Key words: FISH, *HER-2*, cytology

緒 言

尿路上皮癌の診断や経過観察には膀胱鏡や尿管鏡, 尿細胞診がまず行われる。内視鏡は隆起性病変の診断ではもっとも信頼できるが, Carcinoma *in situ* (CIS) では診断が難しく, 侵襲的であるという欠点がある。尿

細胞診は非侵襲的であるが, 各施設の細胞診断士の技量に負うところが大きく, 悪性度の低い症例では陽性率が低いことが指摘されている¹⁾。また尿細胞診の補助として, 膀胱上皮基底膜抗原である Bladder tumor antigen (BTA) や核内蛋白質である Nuclear matrix protein 22 (NMP22) の検出といった, 尿を使った

さまざまな診断法が開発されているが、悪性度の低い症例では尿細胞診に比べて感度や特異度はむしろ低い²⁾。

癌遺伝子 *HER-2* (*HER-2*) は 17 番染色体 q21 に存在し、チロシンキナーゼ活性を持ち、細胞増殖や分化を制御するヒト上皮細胞増殖因子受容体 p185^{*HER-2*} をコードしている³⁾。胃癌⁴⁾ や卵巣癌、乳癌⁵⁾ といったさまざまな癌で *HER-2* の増幅や *HER-2* 遺伝子産物の過剰発現と癌の悪性化や予後との相関が報告されている。尿路上皮癌でも組織免疫染色⁶⁾ やサザンブロットィング法^{7,8)}、polymerase chain reaction 法 (PCR)^{9,10)} や fluorescence in situ hybridization 法 (FISH)^{11,12)} が行われ、本遺伝子やその転写翻訳と癌の進達度や悪性度、予後との有意な相関が報告されている。

しかしこれまでの報告は凍結組織^{7,12)} やパラフィン包埋組織^{6,9-11)} の薄切標本を検体としたものであり、尿中剝離細胞を用いた検討は行われていない。尿中剝離細胞は容易に入手可能な検体であり、細胞個々の *HER-2* コピー数の異常を評価するためには有利な検体と考えられる。そこで *HER-2* 遺伝子数の臨床上の意義を評価するため、本研究は尿路上皮癌患者から採取した尿中剝離細胞中の *HER-2* 遺伝子数と 17 番染色体の数の異常を FISH 法を用いて検出し、尿細胞診と比較した。

対象と方法

対象：秋田大学医学部附属病院および関連病院で 1999 年から 2002 年までに尿路上皮に発生した移行上皮癌と病理学的に診断された 103 例を対象とした。103 例の臨床データを Table に示した (Table 1)。膀胱癌は 91 例、腎盂尿管癌は 12 例であり、初発症例は 60 例で再発症例は 43 例であった。CIS のある 31 例のうち、隆起性病変を伴わない primary CIS (pTis) は 15 例であり、隆起性腫瘍に随伴性の concomitant CIS は 16 例であった。98 例は手術を、5 例は膀胱ランダム生検のみを施行した。悪性度診断は 103 例全例に行った。深達度診断は 100 例に行ったが、残りの 3 例は不十分な標本であったため評価から除外した。悪性度、深達度診断は WHO の診断基準に基づく日本泌尿器科学会の膀胱癌および腎盂尿管癌の取り扱い規約に則って行った^{13,14)}。本論文では G1-2 を low-grade また G3 を high-grade、pTa-1 を low-stage また pT2-4 を

Table 1 患者背景

患者背景	患者数 (%)
平均年齢	72.20 ± 10.62
性別	
男性	74 (71.8)
女性	29 (28.2)
癌の部位	
上部尿路	12 (11.7)
膀胱	91 (88.3)
手術	
経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-Bt)	63 (61.2)
膀胱全摘術	19 (18.4)
腎尿管全摘術±膀胱摘出術	14 (13.6)
膀胱部分切除術±尿管部分切除術	2 (1.9)
生検のみ (手術なし)	5 (4.8)
深達度	
pTis	15 (14.8)
pTa-1	61 (59.2)
pT2-4	24 (26.7)
悪性度	
G1	14 (13.6)
G2	34 (33.0)
G3	55 (53.4)
上皮内癌 (CIS)	
あり	31 (30.1)
原発性 CIS	15 (14.6)
随伴性 CIS	16 (15.5)
なし	72 (69.9)
再発	
初発 (0)	60 (58.3)
1 回再発 (1)	16 (15.5)
2 回以上再発 (≥2)	27 (26.2)

high-stage と記載した。本研究は秋田大学の倫理委員会の承認を得ており、全例で本人の同意書を得ている。

FISH 用の尿処理：手術前に 20-100 ml の自然排泄尿を採取し、2 つの試験管に分け、一方は FISH 用、他方は尿細胞診用とした。採尿 3 時間以内に尿中剝離細胞を 3,000 回転で 10 分間遠心分離した。得られた細胞沈殿を燐酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、メタノール 3 対酢酸 1 のカルノア液に浮遊させ、再遠心して約 300 μ l のカルノア液に再懸濁した。これを 12 穴スライド (Shandon Inc. Pittsburgh, USA) に約 30 μ l 滴下し 1 晩乾燥させた。

Table 2 泌尿生殖器の非悪性疾患患者の尿中剝離細胞 100 個における *HER-2* と CEP 17 のシグナル数

Probe	Copy No. [mean \pm 3SD (range)]				
	0	1	2	3	4 or more
<i>HER-2</i>	0.00 \pm 0.00 (0-0)	0.55 \pm 3.87 (0-4)	199.36 \pm 3.84 (196-200)	0.09 \pm 0.91 (0-1)	0.00 \pm 0.00 (0-0)
CEP17	0.00 \pm 0.00 (0-0)	0.64 \pm 4.50 (0-5)	199.18 \pm 4.62 (195-200)	0.18 \pm 1.22 (0-1)	0.00 \pm 0.00 (0-0)

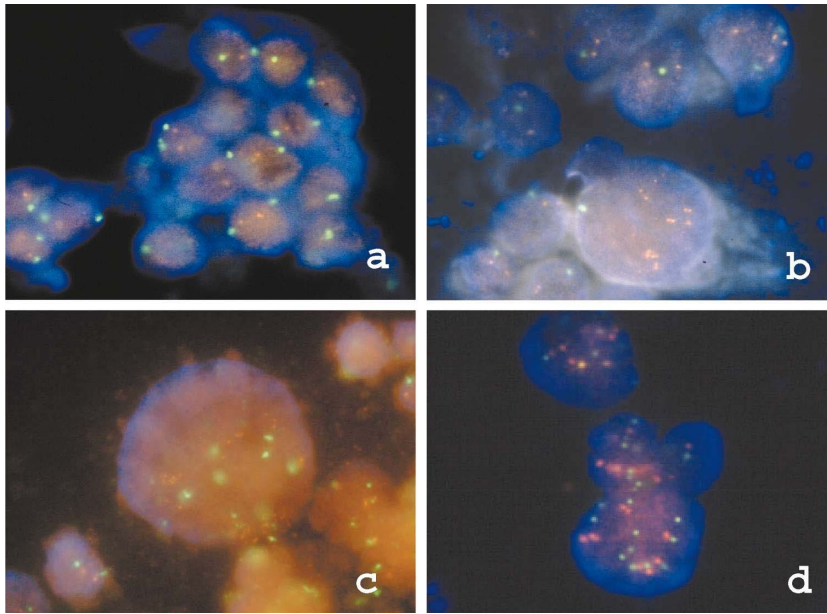


Fig. 1 a: 正常 FISH. Orange (*HER-2*) シグナルと Green (CEP17) シグナルが 2 個ずつ観察される.
 b: additional increase of the *HER-2* (AI-*HER2*). Orange (*HER-2*) シグナルが 12 個と Green (CEP17) シグナルが 2 個観察され, *HER-2*/CEP17 比 \geq 2.0 である.
 c: additional increase of the *HER-2* および gain of chromosome 17 (AI-*HER2*+G-17). Orange (*HER-2*) シグナルが 20 個と Green (CEP17) シグナルが 10 個観察され, *HER-2*/CEP17 比 \geq 2.0 であると同時に, CEP17 シグナル数 \geq 3 である.
 d: gain of chromosome 17 (G-17). Orange (*HER-2*) シグナルが 6 個と Green (CEP17) シグナルが 10 個観察され, CEP17 シグナル数 \geq 3 であるが, *HER-2*/CEP17 比 $<$ 2.0 である.

FISH 用の DNA プローブ: *HER-2* のコピー数と 17 番染色体の数を評価するため, 17q11.2-q12 (LSI *HER-2*/neu SpectrumOrange, Vysis Inc., IL, USA) および 17p11.1-q11.1, locus D17Z1 (Chromosome Enumeration Probe 17 (CEP17) SpectrumGreen, Vysis) の 2 色の DNA probe を使用した.

尿中剝離細胞の FISH: 12 穴スライド上の尿中剝離細胞を順次 2 \times saline/sodium citrate (SSC) に 37°C で 10 分, 0.05% ペプシンに 37°C で 13 分, PBS に 10 分, 1% ホルムアルデヒドに 5 分, PBS に 10 分 インキュベートした. 尿中剝離細胞の乗ったスライド

をエタノールで脱水し乾燥させた後, 73°C の 2 \times SSC/70% ホルムアミドで 5 分間熱変性させ, 再びエタノールで脱水し乾燥させた. 細胞上に熱変性させた 3 μ l の FISH probe mixture (probe mixture 1: hybridization buffer 7: water 2) を乗せ, 37°C の湿潤箱で一晩ハイブリダイズさせた. 0.4% SSC/0.3% NP-40 (Vysis Inc.) に 73°C で 2 分間, 2 \times SSC/0.1% NP-40 で 1 分間洗浄した後, 3 μ l の 4, 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) で核染色を行い, 検鏡した.

尿細胞診: 検体の尿はパパニコロウ法で染色し, 秋田大学附属病院の細胞診断士および病理医が 5 段階の

評価を行った。Class V を尿細胞診陽性とした。

パラフィン包埋薄切標本の FISH: 腫瘍部のパラフィンブロックから 5 μ m 厚の連続薄切標本を作成した。最初の標本スライドはヘマトキシリン・エオジンで染色し、次の標本スライドに対し脱パラフィンおよび脱水をおこなった。次に 10 mM (pH 6.0) のクエン酸に入れ、10 分間マイクロウェーブで加熱した後、37°C 0.4% のペプシンに 13 分間インキュベートした。3 μ l の FISH probe mixture と共に 80°C 2 分、50°C 30 分、37°C で一晚、湿潤箱内でハイブリダイズさせた。1.5 M urea/0.1 \times SCC を 45°C で 10 分間洗浄し、3 μ l の DAPI で核染色し、検鏡した。

FISH シグナルの解析: FISH のシグナルは Texas Red, FITC, および DAPI のフィルター付き顕微鏡 Olympus BX10 (Olympus Inc., Tokyo) で観察し、デ

ジタルカメラ (DXM1200, Nikon Inc., Tokyo) で撮影した。

尿路に異常を認めない 11 例の泌尿器科患者において、100 個の尿中剝離細胞の *HER-2* と CEP 17 のシグナルを数えて正常コントロールとした。Table 2 に示した正常コントロール値から、4 個かそれ以上の尿中剝離細胞に 3 個かそれ以上の同色のシグナルを認めた場合をシグナル数の異常とし、FISH 陽性と定義した (Table 2)。尿中剝離細胞において、細胞診断学的に核の腫大や核異型のある核を可能な限り多く、最高 100 個まで数えた。

尿中剝離細胞中の FISH シグナルを、次に示す条件で 17 番染色体の増加 (G-17)、*HER-2* 付加的増加 (AI-*HER2*)、および G-17 に伴う AI-*HER2* (AI-*HER2*+G-17) の 3 型に分類し定義した。(1) AI-

Table 3 尿細胞診および尿中剝離細胞 FISH 所見と病理学的パラメータの相関

病理学的パラメータ	<i>n</i>	AI- <i>HER2</i> [‡] (%)	AI- <i>HER2</i> +G-17 [¶] (%)	G-17 [†] (%)	FISH positive (%)	Cytology (%)	<i>p</i> value (FISH positive vs. cytology)
全体	103	13 (12.6)	10 (9.7)	36 (35.0)	59 (57.3)	47 (45.6)	<0.001
悪性度							
G1	14	3 (21.4)	0 (0.0)	1 (7.1)	4 (28.6)	0 (0.0)	0.027 (G1-2)
G2	34	5 (14.7)	1 (2.9)	6 (17.6)	12 (35.3)	11 (32.3)	
G3	55	5 (9.1)	9 (16.4)	29 (52.7)	43 (78.2)	36 (65.5)	
<i>p</i> value (G1-2 vs. G3)		0.373	0.018	<0.001	<0.001	<0.001	0.015
深達度*							
pTa-1	61	9 (14.8)	2 (3.3)	16 (30.3)	27 (44.3)	17 (27.9)	0.003
pT2-4	24	3 (12.5)	3 (12.5)	12 (50.0)	18 (75.0)	17 (70.8)	0.235
<i>p</i> value (pTa-1 vs. pT2-4)		>0.999	0.285	0.044	0.016	<0.001	
上皮内癌 (CIS)*							
あり	31	4 (12.9)	7 (22.6)	17 (54.8)	28 (90.3)	24 (77.4)	0.550
Primary CIS	15	1 (6.7)	4 (26.7)	7 (46.7)	12 (80.0)	12 (80.0)	>0.999
Concomitant CIS	16	3 (18.8)	3 (18.8)	10 (62.5)	16 (100.0)	12 (75.0)	0.515
なし	69	9 (13.0)	2 (3.0)	18 (26.1)	29 (42.0)	22 (31.9)	<0.001
<i>p</i> value (primary CIS vs. CIS(-))		>0.999	0.008	0.129	0.010	<0.001	
再発回数							
初発 (0)	60	5 (8.3)	5 (8.3)	26 (43.3)	36 (60.0)	33 (55.0)	0.002
1 回再発 (1)	16	1 (6.3)	1 (6.3)	5 (31.3)	7 (43.8)	5 (31.2)	0.106
2 回以上再発 (≥ 2)	27	7 (25.9)	4 (14.8)	5 (18.5)	16 (59.3)	9 (33.3)	0.003
<i>p</i> value (0-1 vs. ≥ 2)		0.037	0.285	0.059	0.826	0.178	

*深達度および CIS の有無に関する統計学的解析は 100 例で行った。

[‡]: Additional increase of *HER-2* gene

[¶]: Additional increase of *HER-2* gene with gain of chromosome 17

[†]: Gain of chromosome 17

HER2: 少なくとも4つの細胞核において *HER-2*/CEP17 比 ≥ 2.0 かつ CEP17 シグナルが2個の場合 (Fig. 1b), (2) AI-HER2+G-17: 少なくとも4つの細胞核において *HER-2*/CEP17 比 ≥ 2.0 かつ CEP17 シグナルが3個かそれ以上の場合 (Fig. 1c), (3) G-17: 少なくとも4つの細胞核において *HER-2*/CEP17 比 < 2.0 かつ CEP17 シグナルが3個かそれ以上の場合 (Fig. 1d). AI-HER2 は *HER-2* の増幅を含むと想定される。

パラフィン組織標本の FISH の評価では、3個かそれ以上の同色のシグナルが病理学的に癌細胞と認められる細胞全体の10%以上の核に認められる場合、FISH positive とした。

統計: Fisher's exact test を AI-HER2, G-17, AI-HER2+G-17, および FISH 陽性と、病理学的所見, 再発回数, および尿細胞診所見との相関は、Fisher's exact test で検定し、 p 値 < 0.05 で統計学的に有意とした。

結 果

103 例全例について、尿中剝離細胞の FISH と細胞診を行った。検体毎の平均の測定可能細胞数は 50.0 個 (8-100) であった。AI-HER2, AI-HER2+G-17 および G-17 において、平均の *HER2*/CEP17 比はそれぞれ 2.47, 1.69, および 0.99 であり、平均の1細胞毎の平均 *HER-2* シグナル数は 5.40, 6.92 および 3.70 であった。AI-HER2, AI-HER2+G-17 および G-17 の各臨床病理学的パラメータとの対比を Table 3 に示した (Table 3)。

FISH 陽性 (AI-HER2, AI-HER2+G-17, または G-17) は 103 例中 59 例 (57.3%) であった。陽性率は high-grade 症例 (78.2% for G3 vs. 31.2% for G1-2, $p < 0.001$), high-stage 症例 (75.0% vs. 44.3%, $p = 0.016$), および primary CIS のある例 (80.0% for primary CIS vs. 42.0% for tumors without CIS, $p < 0.010$) で有意に高かった。尿細胞診と比較すると、FISH 陽性率は有意に高く (57.3% vs. 45.6%, $p < 0.001$)、階層化しても FISH 陽性率は high-grade および low-grade 両方とも有意に高く (33.3% vs. 22.9%, $p = 0.027$ for low-grade tumors, and 78.2% vs. 65.5%, $p = 0.015$ for high-grade tumors), また low-stage の症例 (44.3% vs. 27.9%, $p = 0.003$) および、CIS のない症例 (42.0% vs. 31.9%, $p < 0.001$) でも有意に高かった。

AI-HER2, AI-HER2+G-17 および G-17 は尿検体 103 例中それぞれ 13 例 (12.6%), 10 例 (9.7%), および 36 例 (35.0%) で検出された。AI-HER2 は初発例に比べ、再発例で多く検出される傾向にあり (18.6% vs. 8.3%, $p = 0.145$), 初発例+1 回再発例に比べ、2 回かそれ以上の再発例で有意に頻度が高かった (25.9% vs. 7.9%, $p = 0.037$)。AI-HER2 と grade や stage との相関はなかった。AI-HER2+G-17 は low-grade に比べて high-grade で (16.4% vs. 2.1%, $p = 0.018$) また、CIS のない例に比べて primary CIS のある例で (26.7% vs. 3.0%, $p = 0.008$) 有意に頻度が高かったが、stage や再発回数とは相関がなかった。G-17 は low-grade に比べて high-grade で (52.7% vs. 14.6%, $p < 0.001$), low-stage に比べて high-stage で (50.0% vs. 30.3%, $p = 0.044$) 有意に頻度が高かったが、CIS の有無に関しては相関がなかった。

パラフィン組織標本における FISH は 45 例で評価可能であった。陽性か陰性のみで分類し尿中剝離細胞とパラフィン組織標本の FISH を比較したところ、45 例中 36 例 (80.0%) で一致した結果を得た。一致しなかった 9 例中、G1-2 で pTa-1 が 5 例、G3 で pTa-1 が 3 例、G3 で pT4 が 1 例であった。一致しなかった 9 例中 7 例 (77.8%) は尿中剝離細胞では陽性で、パラフィン包埋標本では陰性であった。

考 察

尿中剝離細胞とパラフィン組織標本の FISH 所見を対比すると、80% (36/45) の症例で一致していた。このことは検討対象とした尿中剝離細胞が確かに腫瘍から由来しており、尿中剝離細胞を利用した FISH 法は確かに尿路上皮癌の性質を反映し、再現性が高いことを示している。一致しなかった 9 例中 8 例は low-stage (pTa-1) の症例であった。またこれら 9 例中 7 例は尿中剝離細胞では陽性であったものがパラフィン包埋標本では陰性であったもので、これは尿中剝離細胞を使った FISH の感度がより高いことを示すと考えられる。これらの low-stage の腫瘍では腫瘍組織量が少ないことや、腫瘍細胞が剥がれ落ちにくいこと、細胞集塊ごとの遺伝子異常の多様性¹⁵⁾ などが影響して尿中剝離細胞と組織標本の FISH の結果が一致しなかったものと考えられる。

我々は尿路上皮癌細胞の遺伝子マーカーとして尿路上皮癌の発癌での関与が報告されている *HER-2* を

選択した^{7,9,10}、Sauter ら¹¹) は 141 例の膀胱癌パラフィン包埋組織標本の FISH で *HER-2* “amplification” ($HER-2/CEP17 \text{ ratio} > 2.0$) が 7%, “borderline result” ($1.5 < HER-2/CEP17 \text{ ratio} < 2.0$) が 8.5% に検出されたと報告している。また、Ohta ら¹²) は 29 例での膀胱癌の凍結組織を FISH で評価し、*HER-2* “amplification” ($HER-2/CEP17 \text{ ratio} > 2.0$) が 3.4%, “relative increase” ($1.5 < HER-2/CEP17 \text{ ratio} < 2.0$) が 41.4% を報告している。しかし、尿中剝離細胞で *HER-2* と 17 番染色体を評価した報告はない。本研究では、*HER-2* 付加的増加 (the additional increase of *HER-2*) が 22.3% (23/103) で検出された。FISH シグナルの評価基準がそれぞれの報告で異なるが、本研究で示された尿中剝離細胞での *HER-2* 増幅の頻度は組織標本を使った他報告よりも若干高い結果となった^{11,12})。

AI-HER2, G-17, ならびに AI-HER2+G-17 による分類は、それぞれ *HER-2* 遺伝子のコピー数が単独に増加した状態、17 番染色体が数を増している状態、ならびに 17 番染色体が数を増すとともにそれ以上に *HER-2* 遺伝子のコピー数が増加している状態に対応している。*HER-2* 遺伝子が尿路上皮癌の発生と進行に関与するならば AI-HER2 と AI-HER2+G-17 をもつ症例にその特徴が現れると考えられる。本研究では、AI-HER2 は初発症例に対し再発症例で頻度が高い傾向にあり、2 回以上再発すると有意にその頻度が高かった。特に、Grade 1 腫瘍の再発は稀とされるが、AI-HER2 の検出された Grade 1 の 3 例すべて 2 回以上の再発例であったことは興味もたれる。いっぽう、AI-HER2+G-17 は CIS のない症例に比較して、primary CIS のある症例で有意に頻度が高かった。CIS は浸潤癌に進展しやすく遺伝子異常の蓄積も認められている¹⁵)。AI-HER2+G-17 は CIS に起こりやすい遺伝子変化であり、これが見いだされた場合は CIS の存在を示唆するといえる。このように FISH による尿中剝離細胞での *HER-2* の検出は腫瘍細胞の生物学的態様の違いを区別するのに有用であり、再発や進展の予測を容易にする可能性があると考えられる。

近年、3, 7, 9p, 17 番染色体数を multi-color FISH 法で検出する UroVysion が、尿細胞診を凌ぐ感度、特異度および悪性度、深達度と相関すると報告されている¹⁷)。本研究は 17 番染色体数の評価を含み、G-17 は悪性度、深達度との相関が認められたが、全体の陽性率は UroVysion を凌ぐものではなかった。しかし

UroVysion では遺伝子の評価ではなく、腫瘍細胞の生物学的態様を特定の遺伝子異常に対応させることは困難と考えられる。本研究では *HER-2* の数の異常が臨床的パラメータと相関し、染色体の評価とは異なる意義を持つことを明らかにすることができた。

結 論

FISH 法を用いて検出した尿中剝離細胞での *HER-2* や 17 番染色体の数の異常は、尿路上皮癌の潜在的悪性度と相関し、再発や CIS の存在のマーカーとして利用できる可能性がある。

謝 辞

パラフィン組織標本の収集にご協力を賜った平鹿総合病院の斎藤昌宏博士ならびに高橋さつき博士に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Maier, U., Simak, R., and Neuhold, N. (1995) The clinical value of urinary cytology: 12 years of experience with 615 patients. *Clin. Pathol.*, **48**, 314-317.
- 2) Boman, H., Hedelin, H., and Holmang, S. (2002) Four bladder tumor markers have a disappointingly low sensitivity for small size and low-grade recurrence. *J. Urol.*, **167**, 80-83.
- 3) Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J., Greene, M.I., et al. (1984) The neu oncogene: an erb-B related gene encoding 185,000-M tumor antigen. *Nature*, **312**, 513-516.
- 4) Yonemura, Y., Ninomiya, I., Ohoyama, S., Kimura, H., Yamaguchi, A., Fushida, S., et al. (1991) Expression of c-erbB2 protein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer*, **67**, 2914-2918.
- 5) Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wang, S.G., Keith, D.E., et al. (1989) Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*,

- 244, 707-712.
- 6) Sato, K., Moriyama, M., Mori, S., Saito, M., Watanuki, T., Terata, K., *et al.* (1992) An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer*, **70**, 2493-2498.
 - 7) Coombs, L.M., Pigott, D.A., Sweeney, E., Proctor, A.J., Eydmann, M.E., Parkinson, C., *et al.* (1991) Amplification and over-expression of c-erbB2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br. J. Cancer*, **63**, 601-608.
 - 8) Habuchi, T., Kinoshita, H., Yamada, H., Kakehi, Y., Ogawa, O., Wu, W.J., *et al.* (1994) Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 1331-1335.
 - 9) Lonn, U., Lonn, S., Friberg, S., Nilsson, B., Silfverswald, C., and Stenkivist, B. (1995) Prognostic Value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1189-1194.
 - 10) Underwood, M., Bartlett, J., Reeves, J., Gardiner, D.S., Scott, R., and Cooke, T. (1995) C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res.* **55**, 2422-2430.
 - 11) Sauter, G., Moch, H., Moore, D., Carroll, P., Kerschmann, R., Chew, K., *et al.* (1993) Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res.*, **53**, 2199-2203.
 - 12) Ohta, J., Miyoshi, Y., Uemura, H., Fujinami, K., Mitaka, K., Hosaka, M., *et al.* (2001) Fluorescence in situ hybridization Evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in Bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, **8**, 2463-2467.
 - 13) The Japanese Urological Association and Japanese Society of Pathology. (2001) General Rules for Clinical and Pathological Studies on Bladder Cancer, 3rd ed. Tokyo, Japan: Kanahara-Shuppan Co.
 - 14) The Japanese Urological Association and Japanese Society of Pathology. (2001) General Rules for Clinical and Pathological Studies on Renal Pelvic and Ureteral Cancer, 2nd ed. Tokyo, Japan: Kanahara-Shuppan Co.
 - 15) Takahashi, K., Habuchi, T., Kakehi, Y., Mitsumori, K., Akao, T., Terachi, T. and Yoshida, O. (1998) Clonal and chronological analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.*, **58**, 5835-5841.
 - 16) Riddle, P.R., Chisholm, G.D., Trott, P.A., and Pugh, R.C.B. (1976) Flat carcinoma in situ of the bladder. *Brit. J. Urol.*, **47**, 829.
 - 17) Halling, K.C., King, W., Sokolova, I.A., Meyer, R.G., Burkhardt, H.M., Halling, A.C., *et al.* (2000) A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J. Urol.*, **164**, 1768-1775.