

《ノート》

16 α - ^{125}I -Estradiol を用いるヒト乳癌の細胞質 エストロゲン・レセプターの測定

Measurement of Cytosol Estrogen Receptor in Human Breast
Cancer Using 16 α - ^{125}I -estradiol

飯田 泰啓* 徳田 康孝* 新井 圭輔* 笠木 寛治*
小西 淳二* 児玉 宏** 鳥塚 菁爾*

Yasuhiro IIDA*, Yasutaka TOKUDA*, Keisuke ARAI*, Kanji KASAGI*,
Junji KONISHI*, Hiroshi KODAMA** and Kanji TORIZUKA*

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine
**Kodama Clinic, Kyoto, Japan

I. はじめに

ヒト乳癌組織のエストロゲン受容体(ER)の存在は Jensen¹⁾ らによって初めて報告され、臨床的にはその存在の有無が治療方針の選定や予後の判定、とりわけ再発進行乳癌に対するホルモン療法の効果の予測に有用であることが知られている^{2~5)}。

従来より ER の測定にはトレーサーとして ^3H -estradiol-17 β (^3H -E₂) が用いられ、Dextran Coated Charcoal (DCC) 法による radioreceptor assay (RRA) が行われている。しかし、 ^3H -E₂ は比放射能が高くないこと、 β 線放出核種であり測定に液体シンチレーターを用いなければならず、廃棄物の処理が煩雑である等の問題があり、臨床的には重要であるにもかかわらず、ER 測定の普及が遅れる原因となっていた。

近年、 ^{125}I で標識された 16 α - ^{125}I -estradiol-17 β (^{125}I -E₂) の合成法が開発され^{6,7)}、これを用いた ER の RRA キットが開発されるに至った⁸⁾。今回、われわれは、この ^{125}I -E₂ をトレーサーとする ER の RRA キットを試用する機会を得たので、その有用性についての検討成績を報告する。

II. 対象および方法

1. 対象

昭和60年7月より61年5月までに児玉クリニックで手術を実施した症例のうち乳癌組織が採取できた64症例を対象とした。採取した組織はただちに-80°Cで凍結し、使用まで保存した。

2. キットの内容

1) 16 α - ^{125}I -エストラジオール液 (1 fmol=4,884 dpm)

A 液 (1,600 fmol/ml)

B 液 (800 fmol/ml)

C 液 (400 fmol/ml)

D 液 (200 fmol/ml)

E 液 (100 fmol/ml)

Key words: Human breast cancer, Estrogen receptor, ^{125}I -estradiol.

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 乳癌クリニック児玉外科

受付: 61年8月21日

最終稿受付: 61年11月26日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町54 (番606)

京都大学医学部放射線核医学科

飯田泰啓

- 2) デキストラン・チャコール液
(DCC 液) (60 ml, 1 バイアル)
- 3) 緩衝液 (60 ml, 1 バイアル)
- 4) ジエチルスチルベスチロール
(DES 液) (1.5 ml, 1 バイアル)

3. 測定原理

測定原理はラジオ・レセプター・アッセイである。既知の 5 種類の濃度の ^{125}I -E₂ と別に調整したヒト乳癌細胞のサイトゾル分画との結合より、DES 液存在下での非特異的結合を差し引いた値を特異的結合として Scatchard plot を行い結合部位数、結合親和性を求める。

4. 測定操作

測定操作は大別して次のようになる。

1) 検体の調整—サイトゾルの調整

採取した 0.5 g 程度のヒト乳癌組織より脂肪組織を除去した後、5 倍量の緩衝液を加えてポリトロン® を用いて 4°C にて 10 秒間ずつ 30 秒間隔で 3 回ホモジナイズした。これを 4°C で 105,000 × g, 1 時間遠心分離して、上清のサイトゾル分画を得た。

2) サイトゾルの蛋白濃度の測定

サイトゾルの蛋白濃度は結晶ウシ血清アルブミン (Sigma 社製) を標準として Lowry 法⁹⁾ を用いて測定し、レセプター・アッセイに際しては、緩衝液で蛋白濃度が 3~4 mg/ml になるように調整した。

3) レセプター・アッセイ

蛋白濃度調整済みのサイトゾルを 1.0 ml ずつ 2 本に分け、一方をサンプル用サイトゾルとしてこれには 100 μl の緩衝液を、他方をプランク用サイトゾルとして、これには 100 μl の DES 液を加えた。おののより 50 μl を取り、 ^{125}I -E₂ の A~E 液各 50 μl を加えて混和後、4°C にて 18 時間反応させた。各チューブにデキストラン・チャコール液 500 μl を加えて攪拌後、4°C, 20 分間静置し、4°C にて 3,000 rpm, 20 分間の遠心分離を行い、その上清の放射能を計数効率既知の γ -カウンターで計測した。計測はすべて二重測定で行い、その平均値を用いて Scatchard plot を行い結合部

位数 (ER 値)、結合親和定数 (K_d 値) を求めた。

特異的結合量 B cpm は結合カウントより DES 液存在下でのカウント、すなわち非特異的結合カウントを差し引いて求めた。遊離量 F cpm は total カウントより B cpm を減じて求めた。またアッセイに用いた ^{125}I -E₂ の比放射能が 4,884 dpm/fmol であることより次の計算式より B cpm を fmol/mg 単位に換算した。

$$B \text{ fmol/ml} = \frac{B \text{ cpm}}{4,884 \times E \times d \times 0.1}$$

ただし、

E: 使用測定機の計数効率 (%) × 1/100

d: 計測日の減衰係数

以上のようにして求めた B fmol/ml と B/F をグラフにプロットし、最小二乗法で直線に回帰した Scatchard plot を得た。X 切片が ER 値 (fmol/ml) であり、最終蛋白濃度 (mg/ml) で除した値を蛋白当たりの ER 値 (fmol/mg) とした。また X 切片を B_{max} (fmol/ml), Y 切片を (B/F)_{max} とすると K_d 値は次式より求められた。

$$K_d = B_{\max} \times \frac{1}{(B/F)_{\max}} \times 10^3 \text{ fmol/l}$$

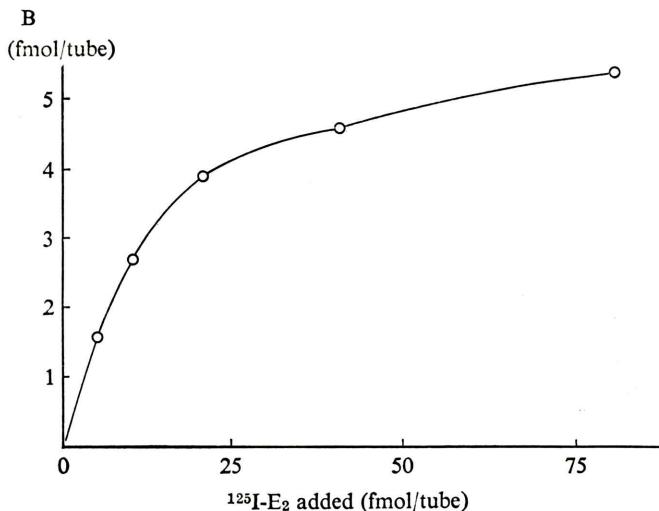
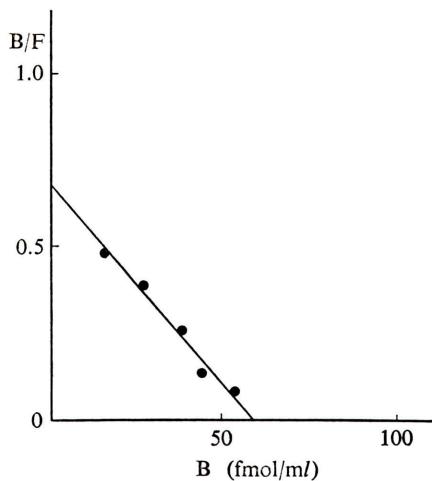
本レセプター・アッセイ・キットでは非特異的結合を求めるために DES 液が用いられているが、非標識 E₂ を用いて非特異的結合を求めて同じ結果が得られた。

4) ^{3}H -Estradiol-17 β を用いる ER の測定法

^{3}H -E₂ をトレーサーとする ER の RRA は、Estradiol-[2, 4, 6, 7- ^{3}H (N)], (NET-317, New England Nuclear 社, MA, 米国) をトレーサーとして用いた。非特異的結合は 500 倍量の非標識 E₂ の添加での ^{3}H -E₂ のサイトゾルへの結合とし、McGuire ら²⁾ の DCC 法にしたがって測定した。このアッセイ法では、ER 値が 100 fmol/mg 付近の検体でのアッセイ間変動係数は 16.4% であった。

III. 実験内容

レセプター・アッセイ系に及ぼすサイトゾル分画の蛋白濃度の影響、検体組織の保存の影響、同

Fig. 1 The binding curve of ^{125}I -estradiol to cytosol.Fig. 2 Scatchard plot of ^{125}I -estradiol binding to the cytosol.

一キット内および異なるキット間の再現性に関し検討するとともに、 ^3H -E₂をトレーサーとした従来のアッセイ法との比較を行った。

IV. 結 果

1. 結合曲線および Scatchard plot

ヒト乳癌組織より得たサイトゾル分画への ^{125}I -E₂の結合曲線の代表例とその Scatchard plot

を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。 ^{125}I -E₂のエストロゲン・レセプターへの結合は飽和曲線を示した。その Scatchard plot は直線性を示し単一の結合部位であると思われた。横軸との交点より結合部位数すなわち ER 値は 34.4 fmol/mg, その勾配の逆数より K_d 値は $0.86 \times 10^{-10}\text{M}$ と算出された。

2. サイトゾル分画の蛋白量の影響

サイトゾル分画を緩衝液で希釈して各種濃度のサイトゾルを作成し、それらを用いて RRA を行った時の ER 値、 K_d 値を Fig. 3 に示した。ER 値は 3.0~7.4 mg/ml の間で、 K_d 値は 3.0~5.6 mg/ml の間で有意の変化を認めなかった。しかし、3.0 mg/ml より少なくなると ER 値、 K_d 値の測定値が低下し、また K_d 値では蛋白濃度が 5.6 mg/ml を、ER 値は 7.4 mg/ml を超えると、これらの値を過大に見積る結果となると考えられた。

3. ヒト乳癌組織の保存の影響

手術時に採取した 3 種類の乳癌組織を約 0.5 g ずつの標本に分け、それぞれ 4°C, -20°C および -80°C で 0~7 日間保存して ER 値に及ぼす影響を検討した。Fig. 4 に示したように -20°C および -80°C で保存した場合には ER 値に変化が認められなかったが、4°C で保存した場合には 1~3 日間でその活性が急速に低下した。

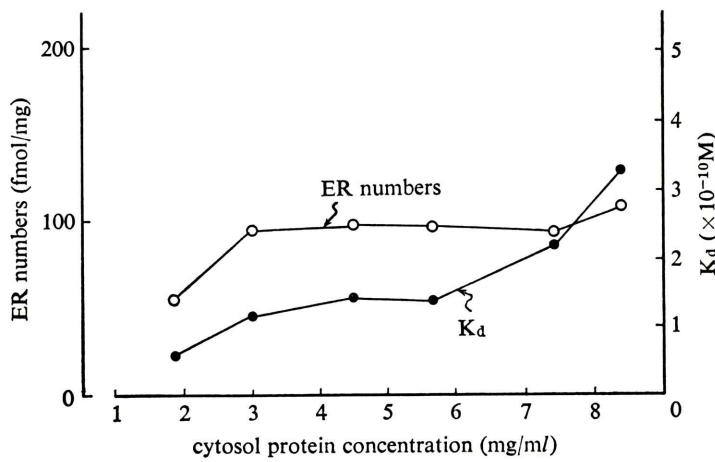


Fig. 3 Effect of the cytosol concentration on estrogen receptor number and K_d value.

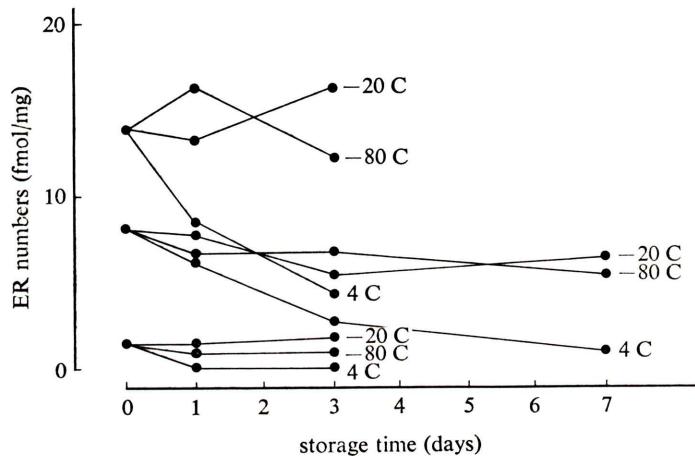


Fig. 4 Effect of the storage of human breast cancer tissue on estrogen receptor number.

Table 1 Reproducibility

Sample	Intra-assay				Inter-assay			
	A		B		C		D	
	ER ¹⁾	$K_d^{2)}$	ER	K_d	ER	K_d	ER	K_d
26.2	0.77	104.7	1.60	12.7	0.40	56.8	0.84	
28.8	1.10	106.7	1.71	15.3	0.85	91.5	1.87	
26.2	0.86	84.7	1.72	15.0	0.63	53.9	1.29	
26.6	1.03	91.3	1.80	20.7	1.40	131.3	1.99	
26.6	1.00	116.0	2.23	6.3	0.40	71.0	1.01	
mean	26.9	0.95	100.7	1.81	14.0	0.74	80.9	1.40
S.D.	1.1	0.13	12.6	0.24	5.2	0.42	31.9	0.51
C.V. (%)	4.1	14.1	12.5	13.5	37.2	56.5	39.4	36.5

¹⁾ fmol/mg

²⁾ $\times 10^{-10} M$

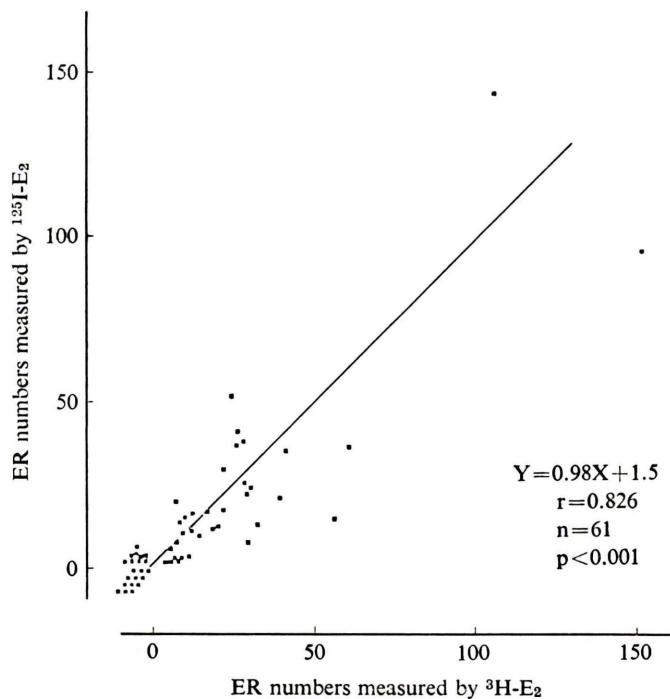


Fig. 5 Correlation between estrogen receptor number measured by radioreceptor assay using 125 I-estradiol and 3 H-estradiol.

4. 再現性

再現性の検討として、ER 濃度が低値および高値の 2 つの乳癌組織より作成したサイトゾル分画を用い、それぞれ 5 回のアッセイを行った。Table 1 に示したようにアッセイ内変動係数は ER 値で 4.1 および 12.5%, K_d 値で 14.1 および 13.5% と良好な成績であった。アッセイ間変動係数は検体を -80°C で保存して全て異なる 125 I-E₂ ロットのキットで測定して比較した。変動係数に検体の保存の影響も加味されているものの、その変動係数は ER 値で 37.2 および 39.4% であり、 K_d 値で 56.5 および 36.5% であった。

5. 3 H-E₂ を用いるアッセイ法との相関

ヒト乳癌組織 61 例から得られた同一検体を二分割して、一方は 125 I-E₂ を用いる、他方は 3 H-E₂ を用いる DCC 法によりそれぞれ測定した結果を Fig. 5 に示した。両者の結合部位数についての相関をみると $r=0.826$ と両者の間に有意の正相関が認められた ($p<0.001$)。

Table 2 Correlation between estrogen receptor numbers obtained by using 16 α - 125 I- and those obtained by using 3 H-estradiol as a ligand

	125 I-E ₂ Assay	
	<5 ¹⁾	5 \leq
3 H-E ₂ Assay	<5	22 cases
	5 \leq	6

¹⁾ fmol/mg

% correlation = 55/61 = 90.2%

また、結合部位数が 5 fmol/mg 以上を示す検体を ER 陽性の乳癌とすると²⁾、Table 2 に示したように、いずれの測定法においても陽性であったものが 33 例 (54.1%), いずれも陰性であったものが 22 例 (36.1%) であり、不一致例はいずれも ER 値が 5 fmol/mg 限界前後の弱陽性例であった。したがって 125 I-E₂ を用いる測定法と 3 H-E₂ を用いる測定法との結果の一一致率は 55/61 例 (90.2%) と有意であった ($p<0.01$)。

V. 考 察

ホルモンレセプターの検出のためには、比活性の高い標識化合物の合成が不可欠である。Jensen ら¹⁾によって³H-E₂が開発され、これを用いたRRAによる解析により、ERに関する研究が進歩した。

しかし、 γ 線放出核種、例えば¹²⁵Iで標識されたE₂が開発されれば、³H-E₂よりも比放射能が高められ(³Hの比放射能は約29 Ci/mmolであり、³H原子を複数入れてもステロイドの比放射能は最大限約100 Ci/mmolであるが、¹²⁵Iはそれ自身で比放射能が約2,200 Ci/mmol存在する⁷⁾)、より感度の良いレセプター・アッセイが可能となること、測定操作をより簡素化できること、またより安価で迅速にそして一般の臨床検査室に普及している γ -カウンターで測定が可能となるなどの利点がある。

近年、Hochberg ら^{6,7)}により、 16β -Br-E₂とNa¹²⁵Iとのハロゲン置換反応を用いる方法が開発され¹²⁵I-E₂の合成が可能となった。本アッセイ・キットで用いられている¹²⁵I-E₂は、この方法にしたがって合成され、さらに高速液体クロマトグラフィーによって¹²⁵I-E₂を反応混合物から高純度に分離したものであり、それ自身標識E₂に匹敵する生物活性を有することが確かめられている⁸⁾。

¹²⁵I-E₂とヒト乳癌細胞のサイトゾルとの結合は飽和曲線を示し、Scatchard plotでは直線性を示した。この結合様式は³H-E₂を用いた場合と同じ結果であり¹²⁵I-E₂がレセプターとの結合性において³H-E₂と変わらないことを示すものである。

アッセイに及ぼすサイトゾルの蛋白濃度の影響の検討では、3.0～5.6 mg/mlの間でER値およびK_d値の測定値に差を認めず、安定した結果が得られ、キットで規定されている3～4 mg/mlの蛋白量よりもさらに広い範囲でも測定が可能であることが示された。

採取したヒト乳癌組織の保存条件に関する検討

では、採取後-20～-80°Cに7日間保存した後も、ほとんど同一のレセプター量が保たれていた。規定のように採取後5分以内にドライアイスまたは液体窒素で凍結してディープフリーザーで保存することが望ましいが、温度が-20°C以下で凍結保存されておれば、ERの測定は可能であることより、アッセイまでの検体の取り扱いが比較的簡便化できるものと考えられる。

再現性に関しては、ER値のアッセイ内変動係数は4.1および12.5%とラジオイムノアッセイに匹敵する値であった。しかし、アッセイ間変動係数は37.2および39.4%と大きな値を示した。この原因としては、乳癌組織サイトゾルを異なる¹²⁵I-E₂ロットのキットで測定するために、長い場合には約6か月間-80°Cで保存しており、その間のレセプターの変性が避けられなかったこと、またサイトゾル分画に膜分画等の混入が避けられず、その不均一性の存在する可能性があることがあげられる。また方法論的には、RRAによって5つの濃度の¹²⁵I-E₂とサイトゾルとの結合率を求め、その値をさらにScatchard plotで解析してER値を求めるという2段階の算出方法をとっているため、一般的のRRAのように単純に実測値を求める場合よりも変動係数が大きくなると考えられる。

¹²⁵I-E₂を用いる本法と従来より用いられている³H-E₂をトレーサーとする方法とを比較した結果では両者の間にr=0.826と有意の正相関があった。McGuire ら²⁾はERの5 fmol/mgをcut off値として、ER陽性ではホルモン療法に40～60%反応するが、ER陰性では10%程度の有効率としている。これにしたがいレセプター数5 fmol/mg以上を陽性とした場合の両法による陽性、陰性の一致率は90.2%ときわめて良好であり、¹²⁵I-E₂を用いた場合にも³H-E₂をトレーサーとする場合と同様、ERを正しく測定できていると考えられた。

近年monoclonal抗体の作成手技の進歩にともない、エストロゲン・レセプターに対するmonoclonal抗体を用いたimmunoradiometric assayが

開発されようとしている¹⁰。しかし、monoclonal 抗体の認識する抗原部位の特異性や感度の問題があり、必ずしもレセプター活性を示すものでないなど、さらに研究が必要とされる。その点、¹²⁵I-E₂ をトレーサーとする RRA は生物学的なレセプター結合部位を直接に求める方法であり、レセプター活性そのものを反映するものである。

これらの成績より臨床的に ¹²⁵I-E₂ を用いる DCC 法は簡便であり、従来より用いられている ³H-E₂ をトレーサーとする方法との互換性にも富み、ヒト乳癌の ER 測定法として ³H-E₂ をトレーサーとする方法に取ってかわり得るものと思われる。

VI. 結 論

¹²⁵I-E₂ をトレーサーとするヒト乳癌の ER を測定する RRA キットの検討を行った。

- 1) ¹²⁵I-E₂ とヒト乳癌のサイトゾルとの結合は飽和曲線を示し、一相性の Scatchard plot が得られた。
- 2) アッセイに用いるサイトゾルの蛋白量が、3.0～5.6 mg/ml の範囲で同様の結果が得られ、-20～-80°C の保存で 7 日間はレセプター活性が保たれていた。再現性においても良好な結果が得られた。
- 3) 従来用いられている ³H-E₂ をトレーサーとする方法との間に $r=0.826$ と有意の正相関が得られ ($p<0.001$)、両者の一致率は 90.2% であった。

以上、本キットは ³H-E₂ をトレーサーとする方法よりも簡便であり、液体シンチレーターを用いない点、一般臨床検査室においても容易に実施できる有用なキットであることが示された。

稿を終わるにあたり、本キットを提供して頂きました大塚製薬株・大塚アッセイ研究所に深謝致します。

文 献

- 1) Jensen EV, Jacobson HJ: Basic guide to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* **18**: 387-414, 1962
- 2) McGuire WL, Carbone PP, Sears ME, et al: Estrogen receptors in human breast cancer: An overview. *Estrogen Receptors in Human Breast Cancer*, ed, McGuire WL, Carbone PP, Vollmer EP, pp. 1-7, Raven Press, New York, 1975
- 3) Matsumoto K, Nomura Y, Sugano H, et al: Progesterone and estrogen receptors in Japanese breast cancer. In: *Hormones, Receptors, and Breast Cancer*, ed, McGuire WL, pp. 43-58, Raven Press, New York, 1978
- 4) Waseda N, Kato Y, Imura H, et al: Prognostic value of estrogen and prolactin receptor analysis in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res (Gann)* **76**: 517-523, 1985
- 5) 泉 雄勝: 乳癌と Estrogen Receptor: その臨床的意義とそれをめぐる諸問題. *癌の臨床* **29**: 755-764, 1983
- 6) Hochberg RB: Iodine-125-labeled estradiol: a gamma-emitting analog of estradiol that binds to the estrogen receptor. *Science* **205**: 1138-1140, 1979
- 7) Hochberg RB, Rosner W: Interaction of 16 α -[¹²⁵I] iodo-estradiol with estrogen receptor and other steroid-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 328-332, 1980
- 8) 富永 健、北村正次、斎藤妙子、他: 16 α -¹²⁵I-estradiol を用いた乳癌の cytoplasmic estrogen receptor の測定. *癌と化学療法* **8**: 1558-1564, 1981
- 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 10) Coffer AI, Spiller GH, Lewis KM, et al: Immuno-radiometric studies with monoclonal antibody against a component related to human estrogen receptor. *Cancer Res* **45**: 3694-3698, 1985