

## 蛍光標識法による乳癌細胞のエストロゲン受容体測定

### 第Ⅱ編 フローサイトメトリーを用いたエストロゲン受容体測定に関する研究

片 岡 健

広島大学医学部外科学第二講座 (指導: 土肥雪彦教授)

受付 昭和 62 年 11 月 10 日

乳癌組織および穿刺吸引材料より作製した単離細胞浮遊液を用いて、フローサイトメトリー (flow cytometry) によるエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) の測定 (以下 FCM 法と略す) が可能かどうか検討した。蛍光標識エストロゲンには、 $17\beta$ -estradiol-6carboxymethyl-oxime-bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate (以下  $E_2$ -BSA-FITC) を使用し、(1) ヒト細胞株による基礎的実験と、(2) 乳癌組織および穿刺吸引材料から作製した単離細胞浮遊液を用いてのデキストラン・チャコール吸着法 (dextran-coated charcoal method; DCC 法) との比較を中心とした臨床的検討により、以下の結果を得た。

1) ER 陽性のヒト乳癌細胞株 ZR75-1 と、ER 陰性のヒト肺癌細胞株 LK-2 を用いた実験において、ER 陽性細胞株 ZR75-1 では  $E_2$ -BSA-FITC の濃度が  $1 \times 10^{-9}$  M から  $1 \times 10^{-8}$  M の範囲内で、特異的結合を示す蛍光強度の濃度依存性上昇を示したが、ER 陰性細胞株 LK-2 では濃度依存性を認めず低値のままであった。従って本試験における  $E_2$ -BSA-FITC の最小濃度は  $1 \times 10^{-8}$  M が適当と思われた。

2) ER 陽性のヒト乳癌細胞株 ZR75-1 および YMB-1 を用いた競合的結合阻害試験において、 $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する結合が抗エストロゲン剤および合成エストロゲン剤により 80-90% 阻害されたが、他のホルモン剤では阻害の程度が弱かった。このことから  $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する特異性は高いものと考えられた。

3) 乳癌組織材料において ER 陽性乳癌と ER 陰性乳癌では、FCM 法による平均蛍光強度 (mean fluorescent intensity; MFI) のうち、 $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する真の全結合を示す平均蛍光強度 ( $MFI_T$ ) は、ER 陽性群で有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。また ER 陰性群の  $MFI_T$  の  $\text{mean} + 2SD$  を基準値とすると、DCC 法の ER 判定結果との一致率は 80% (20/25) であった。

4) 競合的阻害剤を加えた時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) のヒストグラムから基準値 (97.5%点) を測定し、それから求めた FCM 法による染色陽性細胞率 (%gated) は、ER 陽性群で有意に高かった ( $p < 0.01$ ) が、DCC 法による ER 値との間には相関がなかった。

5)  $E_2$ -BSA-FITC を単独に反応させた時の平均蛍光強度 ( $MFI_P$ ) と、ジエチルスチルベストロールニリン酸 (DES-DP) で阻害した時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) のそれぞれから自家蛍光強度を差し引いた値の比を蛍光結合比 (fluorescent binding ratio; FBR) とした。FBR は DCC 法による ER 陽性群で有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。ER 陰性群の FBR の  $M + 2SD$  を基準値とすると、DCC 法 ER 結果との一致率は 88% (22/25) であった。また FBR の対数値は、DCC 法による ER の対数値と非常によく相関した ( $p < 0.001$ )。

6) 穿刺吸引材料でも FCM 法による ER の陽陰性の判定が可能であった。

以上より FCM 法はその結果が客観的かつ定量的であり、しかも従来の DCC 法と異なり、蛍光強度と染色陽性率の両面から細胞レベルで検討できるため、臨床的に有用な方法となり得るものと

考えられる。

**Key words** : Breast cancer, Estrogen receptor, Flow cytometry, Aspiration biopsy cytology

従来より乳癌のエストロゲン受容体 (estrogen receptor; 以下 ER) 測定は、ラジオアイソトープで標識したエストラジオール ( $E_2$ ) またはジエチルスチルベストロール (DES) を用いたデキストラン・チャコール吸着法 (dextran-coated charcoal; 以下 DCC 法)<sup>16)</sup> または蔗糖密度勾配法 (sucrose density gradient; 以下 SDG 法)<sup>17)</sup> などの生化学的測定法が一般的である。しかしこれらの方法によるデータは、非癌成分などの混入した組織材料から得られた平均値である。また同一癌組織内での ER の量的あるいは質的な相違、即ち ER の不均一性 (heterogeneity<sup>3)</sup>) に関する検討は不可能であった。一方形態学的測定法<sup>4, 14, 17, 21, 23, 27)</sup> は迅速かつ少量の検体で個々の細胞を観察できることから、ER 測定にも応用されてきたが、特に蛍光強度の客観的な判定は難しく、定量性に欠けるという欠点があった。

そこでそれらの欠点を補うために、乳癌組織および穿刺吸引材料より作製した単離細胞浮遊液を用いて、フローサイトメトリーによる ER の測定 (以下 FCM 法) を行い、細胞レベルで ER の定量的測定が可能かどうかについて検討した。

## 研究対象・方法

### I. 研究対象

#### A. 乳癌組織および穿刺吸引材料

昭和62年1月より昭和62年9月までに当教室および関連病院にて摘出された乳癌組織25例と、術前に穿刺吸引細胞診 (Aspiration Biopsy Cytology; 以下 A. B. C. と略す)<sup>13)</sup> を行った12例を対象とした。いずれの検体もフローサイトメトリーによる ER 測定 (FCM 法) の比較検討を行うために、その対照として術後デキストラン・チャコール吸着法 (DCC 法) により ER 値の測定を行った。

生検時または術中摘出された乳癌組織は、速やかに冷却した生理的食塩水で洗浄後、以下後述する測定方法に従った。ただし他院で摘出された検体は、4°C の無血清培地 HB-102<sup>TM</sup> (Hana 社) に入れて運搬した。

#### B. 細胞株

基礎的実験に使用した細胞株は、 $E_2$  依存性 ER 陽性のヒト乳癌細胞株 ZR75-1<sup>6)</sup> (大日本製薬ラポラトリープロダクツ部; 原 ATCC 株 No. CRL-1500) お

よび当教室の山根が樹立した  $E_2$  依存性 ER 陽性ヒト乳癌細胞株 YMB-1<sup>34)</sup> と、対象として当教室の吉岡が樹立した ER 陰性ヒト肺癌細胞株 LK-2 (未発表) である。いずれも、RPMI-1640 培地 (GIBCO 社) に 10% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS; Flow社) を加え、培養器 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度) 内で培養した。

### II. 試薬及び測定装置

本研究で用いた蛍光標識エストラジオールは、17 $\beta$ -estradiol-6carboxymethylxime-bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate (FLUORO-CEPT<sup>TM</sup>, Zeus 社; 以下  $E_2$ -BSA-FITC) を使用した。なお Lot No. は一定とした。

競争的結合阻害試験 (competitive binding test) に用いた薬剤の内、17 $\beta$ -estradiol-6carboxymethylxime-bovine serum albumin (以下  $E_2$ -6CMO-BSA) は Makor 社、タモキシフェン (tamoxifen citrate; TAM) および四水酸化タモキシフェン (4hydroxy-tamoxifen; 4OH-TAM) は ICI ファーマ社、ジエチルスチルベストロールニリン酸 (DES-DP) は杏林製薬より、それぞれ譲与された。17 $\beta$ -エストラジオール (17 $\beta$ - $E_2$ )、ジエチルスチルベストロール (DES)、プロゲステロン、テストステロンおよびヒドロコルチゾン は Sigma 社のものを用いた。

トリプシン (0.25%) は半井化学、コラゲナーゼ (type II)、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I)、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) は Sigma 社、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水 (Dulbecco's PBS; pH 7.4, 0.15 M, Ca<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> free) は日本化学のものを用いた。

フローサイトメトリーは FACS-Analyzer (Becton Dickinson 社、水銀アークランプ使用) を、蛍光顕微鏡は OPTIPHOT<sup>TM</sup> (M-35S; Nikon 社) を用いた。

### III. 研究方法

#### A. 単離細胞浮遊液の作製方法

摘出後に冷生理的食塩水にて洗浄した乳癌組織は、脂肪組織や壊死および出血部分を可及的に除去し、約 1 mm<sup>3</sup> 程度に細切した (Fig. 1)。細切した組織および穿刺吸引材料を 0.2% コラゲナーゼ (type II) + 0.1% トリプシン + 0.02% デオキシリボヌクレアーゼ I の酵素処理液内で、37°C, 30-60分間細胞分散を行った。

また FCM 法に用いた各種細胞株はそれぞれ対数増殖期の細胞を使用し、更に培地内のホルモンの影響

Materials

Disperse cells with 0.2% collagenase, 0.1% trypsin and 0.02% DNase (37°C, 30–60min)

Wash with PBS

Filtrate with 100 $\mu$ m nylon mesh

Fix cells with 70% ethanol (-20°C, 30min)

Wash with PBS

Divide into aliquots

Add PBS-2% BSA

Incubate with E<sub>2</sub>-BSA-FITC (4°C, 2hr)  
(with or without competitor)

Wash with PBS-0.2% BSA

Filtrate with 50 $\mu$ m nylon mesh

Supply to FACS-Analyzer (Mercury arc lamp)

Fig. 1. Brief procedure of FCM method

を除くために、本研究施行前日より無血清培地で培養した。細胞分散法は、組織および穿刺吸引材料と同様の酵素処理を行った。

酵素処理法により得られた単離細胞浮遊液は、1500 rpm, 10分間遠心し、上清を捨てその沈渣を、Dulbecco's PBS にて十分洗浄した。細胞固定まで時間を要す場合には 1 mg/ml のトリプシンインヒビターを加えた。

細胞膜の透過性を高めるためと ER 保存のため、液体窒素およびディープ・フリーザーで急速凍結し、使用前にすみやかに溶解した。細胞浮遊液はよく攪拌した後、100 $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過し、70% エタノールで -20°C, 30分間固定した。

### B. FCM 法の染色および測定方法

固定した単離細胞は再度 Dulbecco's PBS で洗浄後、 $1 \times 10^6$  cells/ml に調整し、各々 3本の試験管 (マイクロテストチューブ -S<sup>TM</sup>; 日本商事) に 200 $\mu$ l ずつ分注した。次に同量の PBS-BSA (2%) を加えた後、内 2本には各実験に適する濃度に希釈した E<sub>2</sub>-BSA-FITC を 50 $\mu$ l ずつ加え、このうち 1本には各種競合的阻害剤をそれぞれ 50 $\mu$ l ずつ添加した。残りの 1本はそれぞれの自家蛍光を見るために、E<sub>2</sub>

-BSA-FITC および各阻害剤を両方とも加えなかった。いずれも全量が 1 ml になるように Dulbecco's PBS にて調整し、時々攪拌しながら 4°C, 2時間反応させた。

反応後再度遠心洗浄し、50 $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過して FACS-Analyzer で測定した。FACS-Analyzer (水銀アークランプを使用) は、測定前に標準蛍光ラテックス粒子 (Fluoresbrite<sup>TM</sup>, Polysciences 社) により光軸を補正した (CV は 5% 以下)。また蛍光粒子の位置が常に一定になるように蛍光検出器のゲインを決めた。また赤血球や細胞破砕物などの混入による測定結果への影響を避けるために、細胞の内部構造を反映する側方散乱光 (90°散乱光) および細胞の大きさを反映する前方散乱光 (0°散乱光; 即ち cell volume) によって腫瘍細胞と考えられる領域の設定 (gated analysis) を行った<sup>31)</sup>。また臨床症例では各細胞株で設定した gate の位置を参考とした。

測定は各々 10,000個の細胞を計測し、一次元ヒストグラムに表示した。ただし A. B. C. で穿刺吸引して得られた細胞量が少ない場合には、可能な数だけ測定した。主な計測値は平均蛍光強度 (以下 MFI) および分散係数 (以下 CV; %) とした。即ち E<sub>2</sub>-BSA-FITC のみでインキュベートした時の平均蛍光強度を MFI<sub>F</sub>, それに競合的阻害剤を添加してインキュベートした時の平均蛍光強度を MFI<sub>C</sub>, どちらも加えなかった時の自家蛍光強度を MFI<sub>A</sub> とした。また E<sub>2</sub>-BSA-FITC 単独でインキュベートした時の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) から自家蛍光強度 (MFI<sub>A</sub>) を差し引いた値を E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する真の全結合を意味する平均蛍光強度 (true total binding MFI; MFI<sub>T</sub>) とし、競合的阻害剤を添加した時の平均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>) から自家蛍光強度 (MFI<sub>A</sub>) を差し引いた値を非特異的結合を意味する平均蛍光強度 (MFI<sub>N</sub>), 真の全結合を意味する平均蛍光強度 (MFI<sub>T</sub>) から非特異的結合を意味する平均蛍光強度 (MFI<sub>N</sub>) を差し引いた値を特異的結合を意味する平均蛍光強度 (MFI<sub>S</sub>) とした。その他の略号は Table 1 に示した計算式に基づいて算出したが、それぞれの詳細については関連箇所において適時説明を加えることとする。

### C. FCM 法の基礎的検討

#### 1. E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する親和性の検討

E<sub>2</sub>-BSA-FITC の親和性を検討するため、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する濃度依存性について検討した。E<sub>2</sub>-BSA-FITC の最終濃度を  $1 \times 10^{-7}$  M から  $1 \times 10^{-9}$  M までの 5段階となるよう Dulbecco's

Table 1. Abbreviations

Abbreviation	Glossary
<u>MFI</u>	: Mean fluorescent intensity
<u>MFI<sub>F</sub></u>	: MFI incubated with E <sub>2</sub> -BSA-FITC only
<u>MFI<sub>C</sub></u>	: MFI incubated with E <sub>2</sub> -BSA-FITC plus each competitor
<u>MFI<sub>A</sub></u>	: MFI incubated without E <sub>2</sub> -BSA-FITC (autofluorescence)
	$MFI_T = MFI_F - MFI_A$ ; (true total binding MFI)
	$MFI_N = MFI_C - MFI_A$ ; (non-specific binding MFI)
	$MFI_S = MFI_T - MFI_N = MFI_F - MFI_C$ ; (specific binding MFI)
<u>Inhibitor rate (%)</u>	$= (MFI_S / MFI_T) \times 100$
<u>FBR</u>	: fluorescent binding ratio FBR = $MFI_T / MFI_N$
<u>CV (%)</u>	: Coefficient of variation
<u>%gated</u>	: %gated positive staining cells
	$\%gated = \frac{\left\{ \begin{array}{l} \text{Number of cells with fluorescent intensity} \\ \text{greater than the cut off value* of } MFI_C \end{array} \right\}}{\text{Total cell number of } MFI_F \text{ histogram}} \times 100$

\* Cut off value was defined as the 97.5% point value of fluorescent intensity in MFI<sub>C</sub> histogram.

PBS (10%グリセロールおよび 0.5 mM のジチオスライトール含有) で希釈して使用した。また特異的結合を調べるための対象には、E<sub>2</sub>-BSA-FITC 各濃度の100倍量のジエチルスチルベストロールニリン酸 (DES-DP) をそれぞれに添加した。

## 2. E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する特異性の検討

E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する特異性を検討するために、競争的結合阻害試験 (competitive binding test) を行った。即ち E<sub>2</sub>-BSA-FITC の濃度を一定 ( $1 \times 10^{-8}$  M) にし、各種の阻害剤を純エタノールにより  $1 \times 10^{-4}$  M から  $1 \times 10^{-9}$  M までの6段階に希釈 (但し、エタノールの最終濃度は1%以下とし、水溶性の DES-DP および E<sub>2</sub>-6CMO-BSA は Dulbecco's PBS にて希釈) して、インキュベーションの30分前に添加した。

また E<sub>2</sub>-BSA-FITC の100倍量 ( $1 \times 10^{-6}$  M) の競争的阻害剤それぞれの阻害率 (inhibition rate) は、蛍光強度のヒストグラムから得られた MFI 値より Table 1 の計算式に代入して求めた。即ち E<sub>2</sub>-BSA-FITC 単独にインキュベートした時の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) から DES-DP を添加した時の平均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>) を差し引いた値 (MFI<sub>S</sub>) を、E<sub>2</sub>-BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) から自家蛍光強度 (MFI<sub>A</sub>) を差し引いた値 (MFI<sub>T</sub>) で割って求めた。

## D. DCC 法による ER 測定

FCM 法と比較検討した DCC 法は、ほぼ確立した測定法であるため、大塚アッセイ研究所に依頼した。即ち術中摘出した 0.5-1.0 g 以上の組織ブロックを液体窒素で凍結し、<sup>125</sup>I-estradiol を使ったラジオレセプター・アッセイにより、それぞれの細胞質分画から Scatchard 分析を用いて ER の最大結合部位数 (Bmax) および解離定数 (Kd) を求めた。DCC 法による ER の陽陰性の判定のための基準値は、解離定数 (Kd) が  $1.9 \times 10^{-9}$  M 以下で、最大結合部位数 (Bmax) が 5.0 fmol/mg 蛋白以上を陽性とした。

## E. 統計学的検討

また各々の統計学的検定は、student t-test および  $\chi^2$ -test により行った。

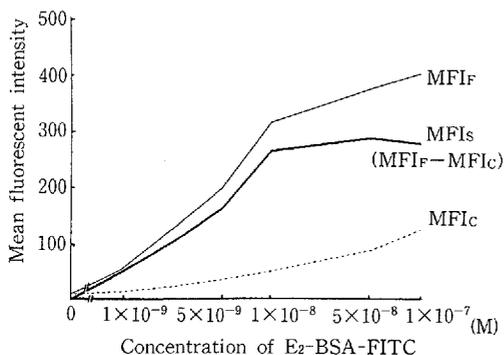
## 成 績

### I. 細胞株を使った基礎的検討

#### A. E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する親和性の検討

E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する親和性を濃度依存性から検討した。ER 陽性 E<sub>2</sub> 依存性のヒト乳癌細胞株である ZR75-1 を用いて、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の各濃度で反応させた時の結果を濃度依存性曲線として Fig. 2 に示した。なお競争的阻害剤として使った DES-DP は、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の各100倍量を添加した。

E<sub>2</sub>-BSA-FITC のみでインキュベートした場合の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) および DES-DP 添加時の平均



**Fig. 2.** Dose response curve for the binding of  $E_2$ -BSA-FITC to ZR75-1 cells.  $MFI_C$  was determined with  $E_2$ -BSA-FITC plus DES-DP at 100-fold concentration as a competitor. Specific binding ( $MFI_S$ ) was calculated as  $MFI_F$  minus  $MFI_C$ .

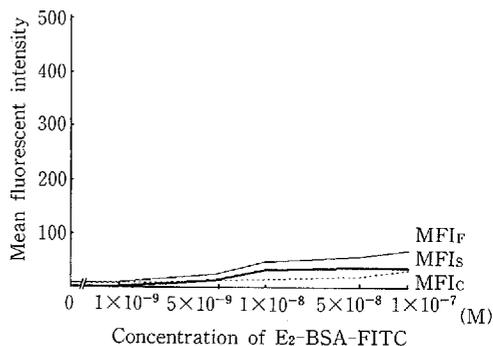
蛍光強度 ( $MFI_C$ ) は、 $E_2$ -BSA-FITC 濃度が高くなるとともに増大した。一方  $E_2$ -BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ ) から DES-DP 添加時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) を差し引いた値は、 $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する特異的結合 (specific binding) を示す平均蛍光強度 ( $MFI_S$ ) であるが、この特異的結合を意味する平均蛍光強度 ( $MFI_S$ ) は、 $E_2$ -BSA-FITC の濃度が  $1 \times 10^{-9}$  M から  $1 \times 10^{-8}$  M までは急激に増加し、以降はわずかしき増加しなかった。

一方 ER 陰性のヒト肺癌細胞株である LK-2 の濃度依存性曲線は Fig. 3 の如く  $E_2$ -BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ ) も DES-DP 添加時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) もその上昇はごく軽度で、しかも両者の差は非常に小さかった。従って、特異的結合を意味する平均蛍光強度 ( $MFI_S$ ) の上昇率もごくわずかで、明らかなピークは見られなかった。

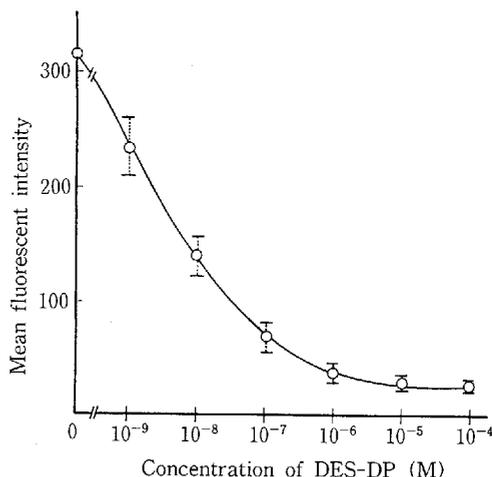
即ち  $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する特異的結合を示す平均蛍光強度 ( $MFI_S$ ) は、 $1 \times 10^{-9}$  M から  $1 \times 10^{-8}$  M の濃度において、濃度に依存して上昇を示すことが判った。以上のことより、ER に対する親和性を考慮した  $E_2$ -BSA-FITC の最小濃度は、 $1 \times 10^{-8}$  M が適当であることがわかった。

#### B. $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する特異性の検討

ER 陽性  $E_2$  依存性の細胞株 ZR75-1 および YMB-1 を用いて、 $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する特異性を検討するために各阻害剤による競合的結合阻害試験を行った。各阻害剤は反応開始前30分間加えた。



**Fig. 3.** Dose response curve for the binding of  $E_2$ -BSA-FITC to LK-2 cells (ER-negative). See Fig. 2 legend for details.



**Fig. 4.** Results for competitive binding test; ZR75-1 cells were incubated with  $1 \times 10^{-8}$  M  $E_2$ -BSA-FITC plus varying concentrations of DES-DP. Bars represent are standard deviation from the mean.

Fig. 4 に、細胞株 ZR75-1 を用いて  $E_2$ -BSA-FITC の  $1 \times 10^{-8}$  M に対し各濃度の DES-DP を加えた時の競合的結合阻害試験の結果をグラフに示した。90%以上の阻害を認める DES-DP の最小濃度は  $E_2$ -BSA-FITC の100倍量に当たる  $1 \times 10^{-6}$  M であった。

ER 陽性の乳癌細胞株 ZR75-1 および YMB-1 を用いた時の各種阻害剤における競合的結合阻害試験の結果をまとめたものが Table 2 である。 $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する特異的結合を阻害する

**Table 2.** Summary of competitive binding test using ZR75-1 cells and YMB-1 cells with E<sub>2</sub>-BSA-FITC plus a competitor at 100-fold concentration

Competitors	Inhibition rate*(%)
Estrogen analogues	
17β-estradiol (17β-E <sub>2</sub> )	81.3± 3.1
E <sub>2</sub> -6CMO-BSA	89.4± 6.4
Tamoxifen citrate (TAM)	80.8± 7.2
Diethylstilbestrol (DES)	88.0± 2.9
DES-diphosphate (DES-DP)	90.3± 2.4
4-hydroxy tamoxifen (4OH-TAM)	89.2± 4.9
Non-estrogen analogues	
Progesterone	37.2±20.3
Testosterone	15.8±11.4
Hydrocortisone	7.9± 5.3

$$*:\text{Inhibition rate}(\%) = \frac{\text{MFI}_F - \text{MFI}_C}{\text{MFI}_F - \text{MFI}_A} \times 100$$

Values represent Mean±SD

各種阻害剤のそれぞれの阻害率 (inhibition rate) は、真の全結合を意味する平均蛍光強度 (MFI<sub>T</sub>) に対する特異的結合を示す平均蛍光強度 (MFI<sub>S</sub>) の割合  $\{(MFI_S \div MFI_T) \times 100\}$  とした。各阻害剤の阻害率を比較すると、17β-E<sub>2</sub>, TAM, DES をはじめとしたエストロゲン剤、抗エストロゲン剤または合成エストロゲン剤では、80-90%程度の阻害を認めるのに対して、プロゲステロン、テストステロン、ヒドロコルチゾンでは軽度の阻害効果しか認めなかった。これらの結果から、FCM 法によって検出される E<sub>2</sub>-BSA-FITC の結合が ER を介する特異性の高い結合である事がわかった。

そこで以後の FCM 法の検討には 1×10<sup>-8</sup> M の E<sub>2</sub>-BSA-FITC を、また競合的阻害剤としては E<sub>2</sub>-BSA-FITC の100倍量に相当する 1×10<sup>-6</sup> M の DES-DP を使用することにした。

### C. 各細胞株の FCM 法による測定結果

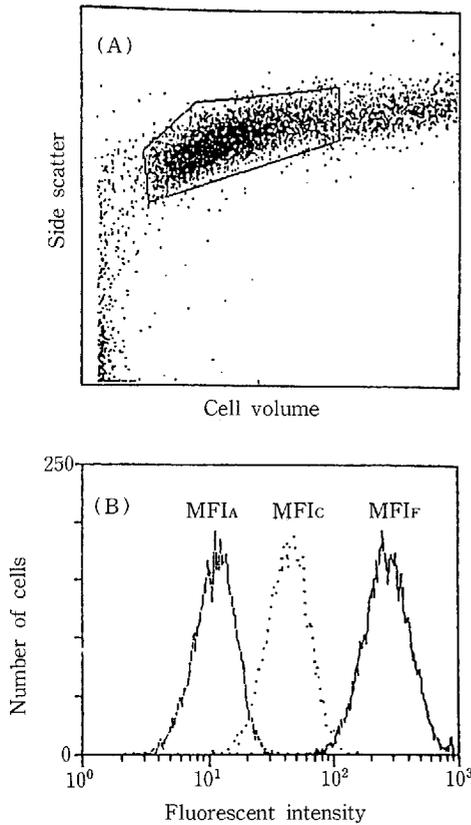
Photo. 1 に細胞株 ZR75-1 の単離細胞浮遊液を用いた蛍光像を示した。E<sub>2</sub>-BSA-FITC の濃度は 1×10<sup>-8</sup> M で、細胞質内を中心に明らかな蛍光顆粒を認める。

Fig. 5 から Fig. 7 は、各細胞株に 1×10<sup>-8</sup> M の E<sub>2</sub>-BSA-FITC を加えた時と、更に競合的阻害剤である DES-DP を 1×10<sup>-6</sup> M 加えた時の FCM パターン (対数表示) を示す。Fig. 5 は乳癌細胞株 ZR75-1 (DCC 法による ER 値は 37.0 fmol/mg 蛋



**Photo. 1.** Fluoromicroscopic photograph of mono-dispersed ZR75-1 cells treated with 1×10<sup>-8</sup> M E<sub>2</sub>-BSA-FITC (640×)

白) の gated analysis および蛍光強度のヒストグラムである。それぞれの平均蛍光強度 (MFI) を検討してみると、E<sub>2</sub>-BSA-FITC 単独でインキュベートした時の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) は298.5、それに DES-DP を加えてインキュベートした時の平均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>) は46.8、自家蛍光 (autofluorescence) 即ち E<sub>2</sub>-BSA-FITC および DES-DP 共に加えなかった時の平均蛍光強度 (MFI<sub>A</sub>) は9.8であった。分散係数 (CV) は48.8%であった。Fig. 6 は乳癌細胞株 YMB-1 (ER;5.9 fmol/mg 蛋白) における同様の検討である。MFI<sub>F</sub>, MFI<sub>C</sub>, MFI<sub>A</sub> および CV は、それぞれ99.1, 22.6, 5.9および54.4%であった。一方

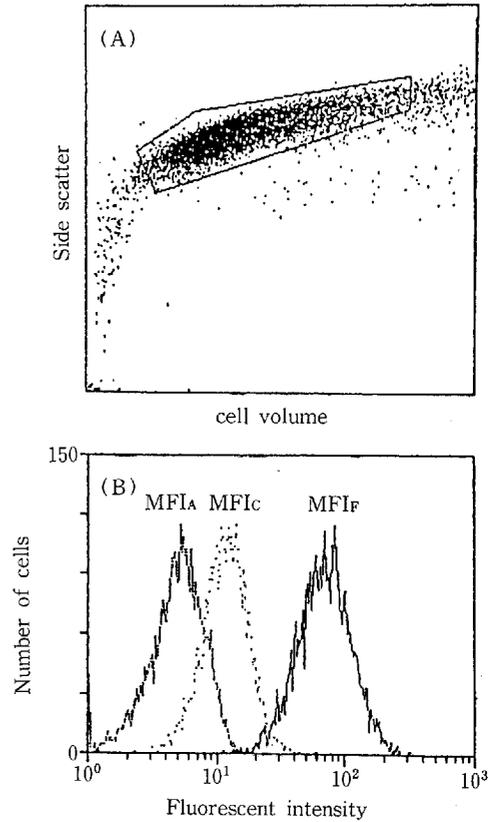


**Fig. 5.** (A) Gated analysis; ZR75-1 cells (ER-positive) were gated by cell volume (forward scatter) and side (90°) scatter. (B) Fluorescent intensity histogram; The cells gated in (A) were analyzed after incubation either with  $E_2$ -BSA-FITC only ( $MFI_F$ ;—), with  $E_2$ -BSA-FITC plus DES-DP at a 100-fold concentration ( $MFI_C$ ;···) or without  $E_2$ -BSA-FITC ( $MFI_A$ ;---).  $MFI_F$  298.5;  $MFI_C$  46.8;  $MFI_A$  9.8; CV 48.8%.

DCC 法で ER 陰性の肺癌細胞株 LK-2 (ER は 1.0 fmol/mg 蛋白以下) ではそれぞれ 30.4, 20.6, 6.7 および 50.4% であった (Fig. 7)。特に  $E_2$ -BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ ) は, ER 陽性細胞株の ZR75-1 で 298.5 および YMB-1 で 99.1 と ER(-) 株の LK-2 の 30.4 より明らかに高く, また DES-DP による阻害の程度 ( $MFI_F \rightarrow MFI_C$ ) も ZR75-1 および YMB-1 で明らかに大きかった。

## II. 乳癌組織材料を用いた FCM 法の臨床的検討

臨床症例における FCM 法の結果について, DCC

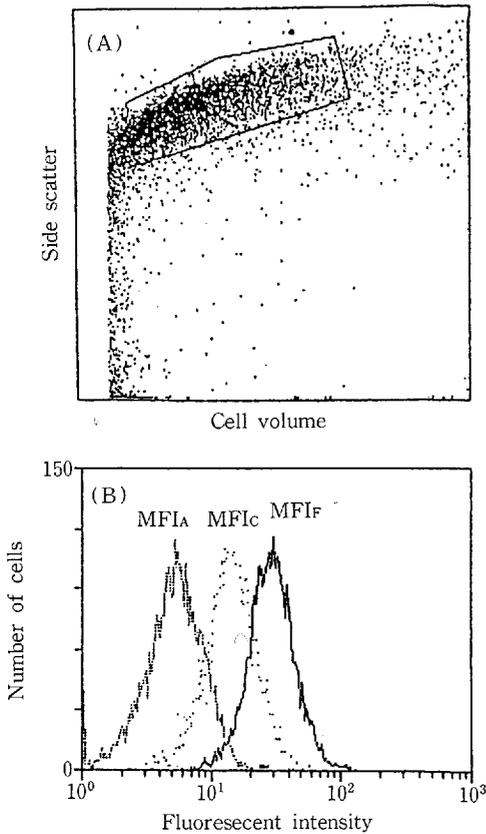


**Fig. 6.** Gated analysis (A) and fluorescent intensity histogram (B) of YMB-1 cells (ER-positive).  $MFI_F$  99.1;  $MFI_C$  22.6;  $MFI_A$  5.9; CV 54.4%

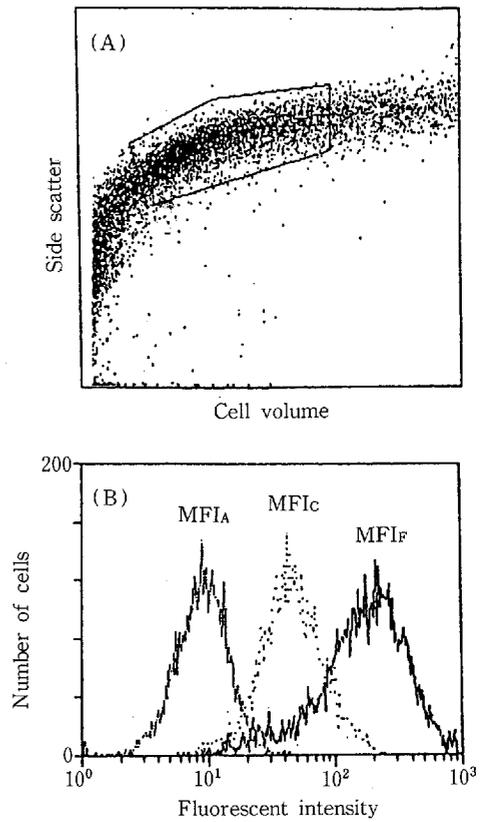
法と対比して検討した。

### A. DCC 法の ER 結果と FCM パターンの比較

Fig. 8 および 9 に, ER(+) および ER(-) 症例の gated analysis と蛍光強度のヒストグラムを示した。Fig. 8 は 39 才女性で DCC 法によって測定した ER (Bmax) 値は 80.8 fmol/mg 蛋白であった。 $E_2$ -BSA-FITC 単独にインキュベートした時の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ )、DES-DP を加えた時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ )、自家蛍光強度 ( $MFI_A$ ) および分散係数 (CV) はそれぞれ 260.3, 74.4, 9.8 および 128.1% であった。Fig. 9 は 55 才女性で ER 値は 1.2 fmol/mg 蛋白であった。 $MFI_F$ ,  $MFI_C$ ,  $MFI_A$  および CV はそれぞれ 25.9, 19.8, 8.1 および 91.1% であり, ER(+) 例でいずれも高値を示したが, 特に  $E_2$ -BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ ) と DES-DP を加えた時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) の差は ER(+) 例で明らかに大



**Fig. 7.** Gated analysis (A) and fluorescent intensity histogram (B) of LK-2 cells (ER-negative).  
 MFI<sub>F</sub> 30.4; MFI<sub>C</sub> 20.6; MFI<sub>A</sub> 6.7;  
 CV 50.4%

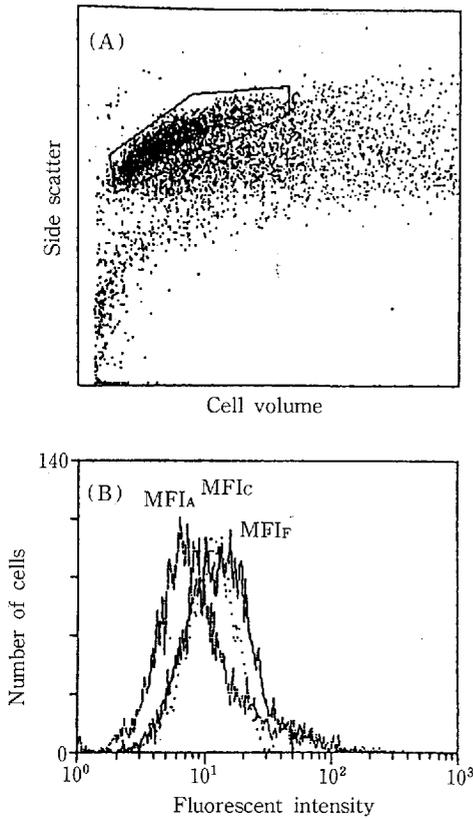


**Fig. 8.** Gated analysis (A) and fluorescent intensity histogram (B) of ER(+) breast cancer cells from biopsied material. Note the high MFI<sub>F</sub> and its strong reduction with DES-DP (MFI<sub>C</sub>). CV value is larger than that observed in cell lines.  
 MFI<sub>F</sub> 260.3; MFI<sub>C</sub> 74.4; MFI<sub>A</sub> 9.8;  
 CV 128.1%

**Table 3.** Biopsied material; Comparison of results obtained by FCM method between ER positive and negative groups classified by DCC method. Values represent mean ± standard deviation.

ER status (DCC method)	No.	FCM method			
		MFI <sub>T</sub> *	FBR*	CV (%)*	%gated*
ER(-)	10	90.5 ± 31.5	1.4 ± 0.3	104.3 ± 64.1	25.0 ± 21.3
ER(+)	15	201.5 ± 149.2	2.9 ± 1.4	122.5 ± 54.0	53.3 ± 24.4
Significance		p < 0.05	p < 0.01	N. S.	p < 0.01

\*: For abbreviations, see Table 1.



**Fig. 9.** Gated analysis (A) and fluorescent intensity histogram (B) of ER(-) breast cancer cells from biopsied material. Note the low  $MFI_F$  and little reduction with DES-DP ( $MFI_C$ ).  
 $MFI_F$  25.9;  $MFI_C$  19.8;  $MFI_A$  8.1;  
 CV 91.1%

きかった。一方分散係数 (CV) は、前述の各細胞株と比較してかなり高かった。これは主として細胞株が形態的に均一 (homogeneous) な細胞であるのに対して、臨床例から得られた乳癌組織材料では色々と形状の異なる細胞が混在していることによるものと思われる。

#### B. DCC 法による ER 判定結果と FCM 法による各種測定値の比較

現在までに乳癌組織材料を用いて FCM 法を施行した症例は、1 例の再発乳癌を含む 25 例である。DCC 法による ER(+) 群 15 例と ER(-) 群 10 例について FCM 法で測定した各パラメーターの結果を Table 3 に示した。ここで、Table 3 に示したパラメーターの内、FBR と %gated について説明してみる。

**蛍光結合比 (FBR) :**  $E_2$ -BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ ) と、競合的阻害剤である DES-DP を加えた時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) のそれぞれから自家蛍光強度 ( $MFI_A$ ) を引いた値の比、即ち  $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する真的全結合を示す平均蛍光強度 ( $MFI_T$ ) と非特異的結合を示す平均蛍光強度 ( $MFI_N$ ) の割合 ( $MFI_T/MFI_N$ ) を蛍光結合比 (fluorescent binding ratio; FBR) とした。

**染色陽性細胞率 (%gated) :** また各症例の自家蛍光強度 ( $MFI_A$ ) および非特異的結合を示す平均蛍光強度 ( $MFI_N$ ) を排除して特異的に蛍光を発する癌細胞の出現率を算出するために、まず競合的阻害剤 DES-DP を加えた時の平均蛍光強度 ( $MFI_C$ ) のヒストグラムより 97.5% 点を基準値として測定した。次に  $E_2$ -BSA-FITC 単独にインキュベートした時の平均蛍光強度 ( $MFI_F$ ) において、基準値以上の蛍光強度を示す細胞を蛍光強度ヒストグラム上でマーカーを設定する

**Table 4.** Coincidence between  $MFI_T$ <sup>a)</sup> obtained by FCM method and ER status using DCC method

ER status (DCC method)	No.	$MFI_T$ value	
		< 153.5	≥ 153.5
ER(-)	10	7*	3 (3/10) <sup>b</sup>
ER(+)	15	2	13* (13/15) <sup>c</sup>

a) : For abbreviations, see Table 1.

\*: Coincidence is 80% (20/25).

b - c : Significant difference between b and c

( $p < 0.05$ ;  $\chi^2 = 6.08$ )

**Table 5.** Coincidence between FBR<sup>a)</sup> obtained FCM method and ER status using DCC method

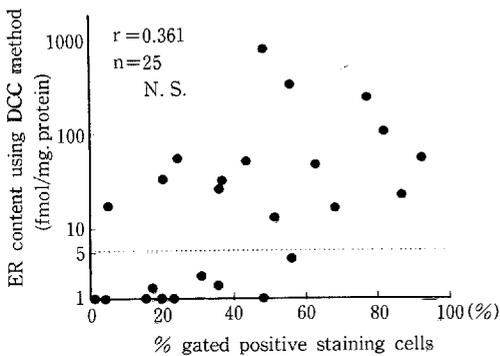
ER status (DCC method)	No.	FBR value	
		<2.0	≥2.0
ER(-)	10	10**	0 (0/10) <sup>b</sup>
ER(+)	15	3	12** (12/15) <sup>c</sup>

a) :For abbreviations, see Table 1.

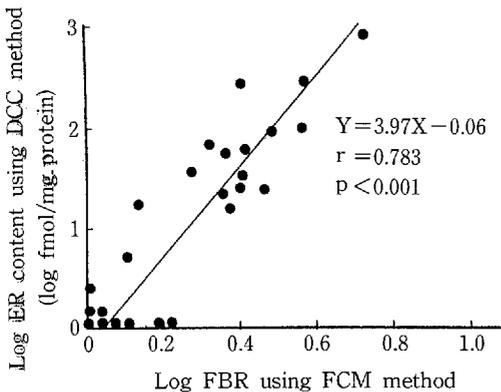
\*\* :Coincidence is 88% (22/25).

b-c :Significant difference between b and c

( $p < 0.01; \chi^2 = 12.35$ )



**Fig. 10.** Relationship between ER content using DCC method and %gated positive staining cells using FCM method.



**Fig. 11.** Relationship between log ER content using DCC method and log FBR using FCM method.

事によって自動的に求め、これを FCM 法における特異的な染色陽性細胞率 (%gated positive staining cells; %gated) とした。

Table 3 で示すように、ER(+) 群では ER(-) 群と比べ全結合の平均蛍光強度 (MFI<sub>T</sub>)、蛍光結合比 (FBR) および染色陽性細胞率 (%gated) は共に高く、特に MFI<sub>T</sub> で 5%、FBR および %gated では 1% 以下の危険率で有意の差を認めた。しかし分散係数 (CV) は ER(+) 群と ER(-) 群間で有意差を認めなかった。

**C. FCM 法と DCC 法との一致率の検討**

次に FCM 法により ER 陽陰性判定を行う基準値を決めた。即ち Table 3 より真の全結合を示す平均蛍光強度 (MFI<sub>T</sub>) および蛍光結合比 (FBR) それぞれについて ER(-) 群の mean+2SD を求め、MFI<sub>T</sub> では 153.5 および FBR では 2.0 をそれぞれの ER 陽陰性判定に対する基準値とした。Table 4 および 5 に示す如く DCC 法と FCM 法の一致率は、MFI<sub>T</sub> で 80% (20/25,  $p < 0.05$ ), FBR で 88% (22/25,  $p < 0.01$ ) と良好であった。よって FCM 法の MFI<sub>T</sub> および FBR を測定するだけでも、DCC 法による ER 陽陰性の判定をある程度推定可能であることがわかった。

**D. FCM 法と DCC 法の相関性の検討**

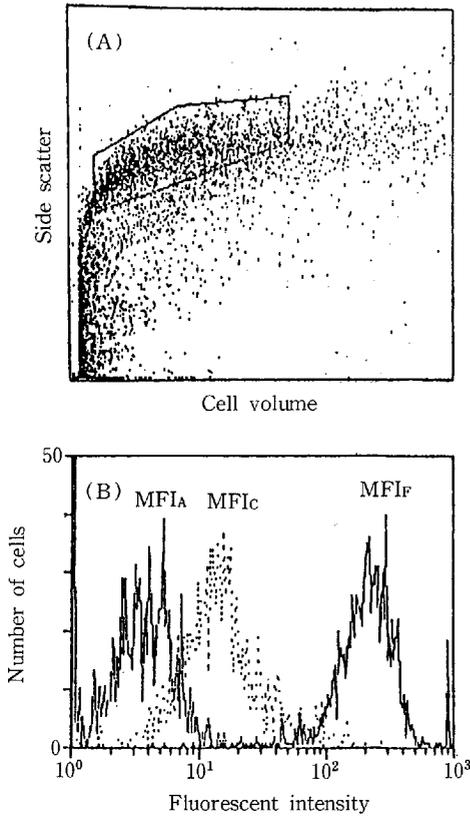
1. %gated と DCC 法の ER 値

FCM 法において定義した染色陽性細胞率 (%gated) と DCC 法の ER 値との相関性について検討したのが Fig. 10 である。しかし DCC 法の ER 値と FCM 法の染色陽性細胞率には相関を認めなかった。

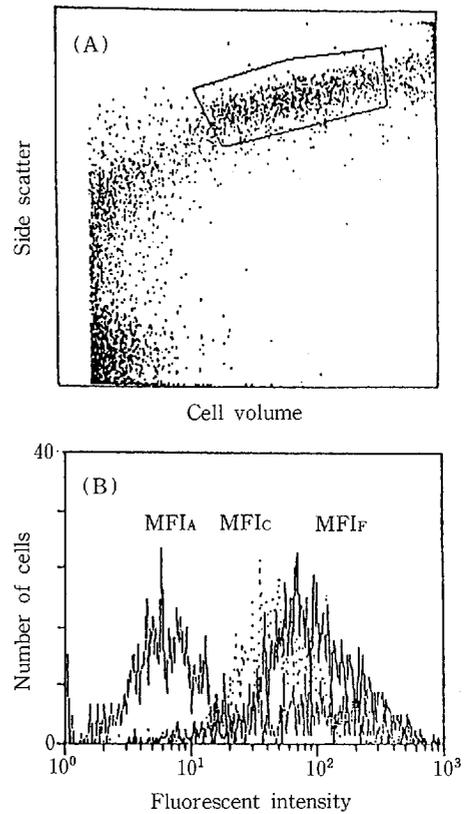
2. FBR と DCC 法の ER 値

次に DCC 法の ER 値を推定するために蛍光結合比 (FBR) の対数値を求めた。Log. FBR は、

$$\begin{aligned} \text{Log. FBR} &= \text{Log. (MFI}_T/\text{MFI}_N) \\ &= \text{Log. MFI}_T - \text{Log. MFI}_N \end{aligned}$$



**Fig. 12.** FCM-gated analysis (A) and fluorescent intensity histogram (B) for aspirated cell material (ER-positive). MFI<sub>F</sub> 213.1; MFI<sub>C</sub> 29.8; MFI<sub>A</sub> 4.4; CV 148.4%



**Fig. 13.** FCM-gated analysis (A) and fluorescent intensity histogram (B) for aspirated cell material (ER-negative). MFI<sub>F</sub> 90.2; MFI<sub>C</sub> 54.0; MFI<sub>A</sub> 6.2; CV 160.3%

であり、特異的結合の程度をある程度反映していると考えられる。蛍光結合比 (FBR) の対数値と DCC 法 ER の対数値をそれぞれの症例について求めた結果が Fig. 11 である。ただし DCC 法による ER 値が 1.0 fmol/mg 蛋白以下の場合には 1.0 fmol/mg 蛋白とおいた。Log. FBR は、DCC 法の ER の対数値と非常に良い相関が得られた ( $p < 0.001$ )。この結果は FCM 法により得られたデータから DCC 法の ER 値を十分に推定し得る可能性がある事を示唆する。

### III. 穿刺吸引材料を用いた FCM 法

#### A. ER 陽陰性別の FCM パターン

Fig. 12 に DCC 法により ER(+) 症例, Fig. 13 に ER(-) 症例の gated analysis と蛍光強度のヒストグラムを示した。ER(+) 例の  $E_2$ -BSA-FITC 単独でインキュベートした場合の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>)、それに DES-DP を加えてインキュベートした時の平

均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>)、自家蛍光強度 (MFI<sub>A</sub>) および分散係数 (CV) は、213.1, 29.8, 4.4および148.4%であり、ER(-) 例ではそれぞれ90.2, 54.0, 6.2および160.3%であった。やはり、ER(+) 例で明らかに  $E_2$ -BSA-FITC 単独にインキュベートした時の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) が高く、DES-DP の阻害率も大きくになっている。

#### B. DCC 法 ER 判定結果と FCM 法の各種測定値

これまで測定し得た A. B. C. 症例は、12例と少ないが、DCC 法による ER 陽性および陰性両群における  $E_2$ -BSA-FITC の ER に対する真的全結合を意味する平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>)、蛍光結合比 (FBR)、分散係数 (CV) および FCM 法の染色陽性細胞率 (%gated) の結果を Table 6 に示した。真的全結合を示す平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) および分散係数 (CV) では共に有意

**Table 6.** Aspirated material; Comparison of results obtained by FCM method between ER positive and negative groups classified by DCC method. Values represent mean±standard deviation.

ER status (DCC method)	No.	FCM method			
		MFI <sub>T</sub> *	FBR*	CV (%)*	%gated*
ER(-)	6	101.6±74.5	1.4±0.2	148.8±79.2	10.1±12.5
ER(+)	6	195.1±117.8	3.3±1.6	143.5±84.1	48.8±33.2
Significance		N. S.	p<0.05	N. S.	p<0.05

\* ; For abbreviations, see Table 1.

差を認めないが、FBR および %gated は ER(+) 群で有意に高かった ( $p<0.05$ )。現在のところ gated analysis により測定可能な細胞の数は平均 1,520 cells (846-3,769 cells) と少なく、FCM 法により DCC 法の ER 値を推定するためには更に改良が必要であろう。

以上の基礎的および臨床的検討の結果から、FCM 法において使用した  $E_2$ -BSA-FITC は ER に対してほぼ特異的に結合し、癌細胞内の ER の検討に使用することが妥当であることが明らかとなった。また FCM 法において測定した各パラメーターの内、 $E_2$ -BSA-FITC 単独に反応させた時の平均蛍光強度 (MFI<sub>P</sub>) と競合的阻害剤である DES-DP を添加した時の平均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>) からそれぞれ自家蛍光強度を差し引いて求めた比、即ち  $MFI_T/MFI_N$  を蛍光結合比 (FBR) としたが、この FBR の対数値は DCC 法の ER の対数値と良く相関し ( $p<0.001$ )、FCM 法による DCC 法の ER 値を推定でき得る可能性が示唆された。

## 考 案

乳癌症例のエストロゲン受容体 (ER) 陽性率は約55-65%との報告が多く<sup>16,24</sup>、特に閉経後の症例や、分化型の乳癌に高率と言われている<sup>11,20</sup>。

これまで ER の測定は、デキストラン・チャコール吸着法 (DCC 法) を中心としたラジオレセプター・アッセイが主流であったが、これらの測定法による ER 陽性例中、実際に内分泌療法が有効であったのは50-60%程度、全乳癌症例では30-40%の有効率<sup>11,24</sup>で期待されたほどには高くない。

一方、組織細胞化学的に ER を確認したり、測定したいくつかの報告<sup>9,14,23,27</sup>もある。例えば Pertschuk ら<sup>27</sup>は、染色陽性率と蛍光強度及び細胞密度を測定して半定量的に ER の測定を試みた。しかしそのような判定の多くは主観的要素が多く、著者が第

I編で述べたように ER 測定と最も関係が深いと思われる蛍光強度を客観的に判定することは難しい。また実際に蛍光顕微鏡を用いて染色陽性率の判定を行う場合、そのボーダーラインで難渋する事が多い<sup>17</sup>のも事実である。その原因として、組織切片の厚さや用いた試薬の同一切片当たりの濃度を一定にする事が難しいことが考えられ、各々の症例を比較検討する場合、測定誤差が大きくならざるを得ない<sup>21</sup>。組織細胞化学的な ER 測定法の有用性に関しては、今後治療効果との関係などから、更に十分の検討が必要と思われる。

そこで著者は、細胞レベルでしかも同一条件下に ER を測定する目的で、フローサイトメトリー (FCM) を応用した ER の測定法 (FCM 法) を試みた。

FCM を使った ER 測定の試み<sup>2,15,26,32</sup>は、現在までごくわずかしかない。1984年に Oxenhandler ら<sup>26</sup>は、1-(N)-fluoresceinyl estrone thiosemicarbazone (17-FE) を用いて ER 陽性の MCF-7<sup>12</sup> および ER 陰性の MDA-231<sup>10</sup> ヒト乳癌細胞株の基礎的検討を行った。彼らは、散乱光および蛍光強度ヒストグラムから細胞一個当たりの平均蛍光強度 (MFI) をコンピューターを使って計算し、17-FE が高親和性の ER に結合すると報告した。しかし彼らの求めた MFI は自家蛍光をほとんど考慮しておらず、また 37°C の高温で反応を行っているなど問題点も多い。Van ら<sup>32</sup>は、N'-fluoresceino-N'-(17 $\beta$ -estradiol)-hemisuccinamide thiourea ( $E_{17}$ -FITC) を使った。やはり 37°C、2時間という高温での反応であり、ER が長時間の高温で不活化される<sup>28</sup>事を考えれば、彼らの使用した反応条件は必ずしも妥当とは言えない。1985年、Benz ら<sup>23</sup>は、著者と同様、 $E_2$ -BSA-FITC を使って、 $E_2$  依存性 ER 陽性のヒト乳癌細胞株 MCF-7 および 47-DN<sup>30</sup> のタモキシフェン投与による DES 反応性について検討した。反応条件は 4°C、2時間であるが自家蛍光をほとんど考慮していない点が問題であ

ろう。

著者はフローサイトメトリーを ER の測定に応用するためには、この各細胞の持つ自家蛍光を考慮した方がよいと考えた。自家蛍光は、細胞を構成している蛋白質やアミノ酸などが適当な励起波長により発する細胞内の自然蛍光<sup>31)</sup> であるため、細胞差によりその蛍光強度が異なる<sup>3)</sup> と言われている。従って E<sub>2</sub>-BSA-FITC 単独のインキュベーションによる平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) も自家蛍光の強さを加味したものであり、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する真の全結合を示す平均蛍光強度 (MFI<sub>T</sub>) は自家蛍光、即ち MFI<sub>A</sub> を差し引いて考えるべきと思われる。

次に FCM を使用するためには、ER を損なわずに単離細胞浮遊液を作製する必要があり、高分子の E<sub>2</sub>-BSA-FITC<sup>3)</sup> により染色するためには、ER が細胞質内又は核内にあるために膜の透過性 (permeability) を高める操作が必要である<sup>2,4)</sup>。著者は、0.2% コラゲナーゼ II、0.1% トリプシン、0.02% デオキシリボスクレアーゼ I の混合酵素処理液で細胞分散を行い、急速凍結融解を行った。それはコラゲナーゼ併用によりトリプシン濃度を減らす目的と、トリプシン処理によって生じる粘液様物質をデオキシリボスクレアーゼ併用によって取り除き<sup>18)</sup>、しかも長時間の反応によって起こる ER の不活化を防ぐためである。著者はこれら 3 種の酵素を併用する事により、30-60 分という比較的短時間に細胞分散を行うことができた。しかも予備実験においては、この酵素処理混合液で処理した組織の DCC 法による ER 値 (Bmax および Kd) と、無処理の組織の DCC 法による ER 値はほとんど変わらなかった。

膜の透過性は急速凍結融解で十分目的は達せられた。また本測定法の平均蛍光強度 (MFI) および分散係数 (CV) の測定誤差が 10% 以下であり再現性も認められた。

ヒト乳癌細胞株である ZR75-1<sup>19)</sup> および YMB-1<sup>34)</sup> と、ヒト肺癌細胞株である LK-2 を用いた基礎的実験で、FCM のヒストグラムより測定した平均蛍光強度 (MFI) を指標にして、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する親和性や特異性を客観的に評価する事が可能となった。即ち、ER 陽性の ZR75-1 および YMB-1 細胞では、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する特異的結合を示す平均蛍光強度 (MFI<sub>S</sub>) が  $1 \times 10^{-9}$  M から  $1 \times 10^{-8}$  M の間で濃度に依存して急激に上昇したが、LK-2 細胞では濃度依存性を認めず MFI<sub>S</sub> が低値のままであった。また競合的結合阻害試験では、エストロゲン類似の 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>-6CMO-BSA、TAM、

4OH-TAM、DES および DES-DP では、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の 100 倍量を添加することにより 80-90% の阻害効果を認めたとのに対して、プロゲステロン、テストステロンおよびヒドロコルチゾンではその阻害効果は低かった。これらの結果は他の報告とほぼ一致するものであった<sup>5,28)</sup>。以上 E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する親和性および特異性の検討により、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する結合がほぼ特異的な結合であり、その親和性の成績から E<sub>2</sub>-BSA-FITC は  $1 \times 10^{-8}$  M の濃度でインキュベートするのが良いことがわかった。

以後の検討で競合的阻害剤として DES-DP を使用した理由<sup>22,29)</sup> は、DES-DP および E<sub>2</sub>-6CMO-BSA が水溶性であるのに対して、それ以外の阻害剤がエタノールなどの有機溶剤に溶解して使用するため、処理段階で酸化されその活性が損なわれる危険性がある<sup>29)</sup> ためである。また DES-DP は水に溶けると速やかに加水分解されて DES に変換する<sup>22)</sup> が、変換した DES は ER に対して特異的であり他のステロイド結合性蛋白 (SHBG 等) には結合しないという利点がある。よって本研究には DES-DP が最も適したものと考えられた。

FCM 法を乳癌症例に応用して検討した報告は、著者の調べた限りではまだない。25 例の乳癌組織より作製した単離細胞浮遊液を用いて FCM 法で検討したが、E<sub>2</sub>-BSA-FITC の ER に対する真の全結合を示す平均蛍光強度 (MFI<sub>T</sub>)、特異的結合を反映した蛍光結合比 (FBR) および DES-DP 添加時の平均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>) から基準値を決め、特異的蛍光強度を有する癌細胞の割合をコンピューターにて得た染色陽性細胞率 (%gated) は、DCC 法による ER の陽陰性結果と非常によく一致した。即ち自家蛍光の影響をできるだけ排除すべく考案した MFI<sub>T</sub>、FBR および %gated は、ER(-) 群と比べて ER(+) 群で有意に高値を示した。特に MFI<sub>T</sub> と FBR の ER 陽陰性判定の基準値をそれぞれ 153.5 と 2.0 として ER 陽陰性を判定すると、DCC 法の ER 陽陰性結果との一致率が両者共に 80% 以上と良好であった。

一方分散係数 (CV) は、DCC 法による ER の陽陰性結果とは全く無関係であった。

乳癌組織より作製した単離細胞浮遊液を用いて FCM 法測定値と DCC 法 ER 値との相関を検討してみた。DES-DP 添加時の平均蛍光強度 (MFI<sub>C</sub>) より基準値 (97.5% 点) を決め、E<sub>2</sub>-BSA-FITC 単独の平均蛍光強度 (MFI<sub>F</sub>) から測定した染色陽性細胞率 (%gated) を、各癌組織内で E<sub>2</sub>-BSA-FITC と特異的

に結合を示す ER 陽性癌細胞の出現率を示す値と考えたが、DCC 法の ER 値とは有意の相関を認めなかった。

一方蛍光結合比 (FBR) の対数値は、DCC 法による ER の対数値と有意の相関を認めた ( $p < 0.001$ )。この事は、 $E_2$ -BSA-FITC の特異的結合を反映する Log-FBR を計測する事により、DCC 法による ER 値の予測が可能である事を示している。

穿刺吸引細胞診 (A. B. C.) を応用した FCM 法は、少量の検体で容易に測定できるため大いに期待されるが、現在までこれに関する研究報告はされていない。著者は穿刺吸引材料を用いた FCM による ER 測定をこれまで12症例について検討したが、蛍光結合比 (FBR) および染色陽性細胞率 (%gated) は DCC 法 ER 陽性群が DCC 法 ER 陰性群に比べて有意に高く、穿刺吸引材料を使った FCM 法による ER の陽陰性の判定が可能と思われた。ただ問題点としては組織材料と比べて測定可能な細胞量が少ないので、測定誤差が大きくなる危険性があることであろう。従って、FCM 法を用い穿刺吸引材料から ER 値を測定するためには A. B. C. 法そのものを工夫するか、或いは少量の検体だけでも測定できる方法を開発する必要がある。

以上著者の検討した FCM 法で使用した  $E_2$ -BSA-FITC は ER に対してほぼ特異的で、測定して得た各平均蛍光強度 (MFI)、蛍光結合比 (FBR) および染色陽性細胞率 (%gated) により細胞レベルで ER 値を測定することが可能であることが示唆された。

FCM の乳癌への応用は、他の研究者では主としてその細胞動態 (cell kinetics) についての検討<sup>19, 25, 33)</sup>が行われているが、ER と DNA との二重染色により更に ER 測定精度が増すものと考えられる。また肝臓癌その他ホルモン・レセプターの関与<sup>7)</sup>が指摘されている腫瘍の A. B. C. を使った ER 測定も可能であり、本法は今後非常に有用な手段となり得ると考える。

[本論文の要旨の一部は、第45回日本癌学会総会 (1986年10月札幌市) において発表した。]

## 謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師・広島大学医学部第2外科学教室・土肥雪彦教授、並びに本研究に対して直接御指導、御教示を賜った広島大学医学部第2外科学教室・西亀正之助教授、山根 基博士、吉岡伸吉郎先生、放射能影響研究所・秋山實利博

士、京泉誠之博士、中村 典博士、河野修典博士、岡光久恵女史、原医研誘発癌研究部門・伊藤明弘教授、広島大学医学部泌尿器科教室・中村浩二博士に深甚なる謝意を表します。更に本研究に御協力、御援助を戴いた関連病院の諸先生方並びに第2外科学教室の諸兄に心より感謝致します。

## 参 考 文 献

1. Aubin, J. E. 1979. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* 27:36-43.
2. Benz, C., Wiznitzer, I. and Lee, S. H. 1985. Flow cytometric analysis of fluorescein-cojugated estradiol ( $E_2$ -BSA-FITC) binding in breast cancer suspensions. *Cytometry* 6:260-267.
3. Clark, J. H., Hardin, J. W., Upchurch, S. and Eriksson, H. 1978. Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 253:7630-7634.
4. Curtin, C. T., Pertschuk, L. P. and Mitchell, V. 1981. A fluorescent method of measuring estrogen receptors in cytologic material. *Am. Soc. Cytol. (Abst) Acta Cytol.* 25:450.
5. Dandliker, W. B., Brawn, R. J., Hsu, M-L., Brawn, P. N., Levin, J., Meyers, C. Y. and Kolb, V. M. 1978. Investigation of hormone-receptor interactions by means of fluorescence labelling. *Cancer Res.* 38:4212-4224.
6. Engel, L. W., Young, N. A., Tralka, T. S., Lippman, M. E., O'Brien, S. J. and Joyce, M. J. 1978. Establishment and characterization of three continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res.* 38:3352-3364.
7. Friedman, M. A., Demanes, D. J. and Hoffman, P. G. 1982. Hepatomas: Hormone receptors and therapy. *Am. J. Med.* 73:362-366.
8. Gaetiens, E. and Pertschuk, L. P. 1980. Synthesis of fluorescent labelled steroid hormone albumin conjugates for the fluorescent detection of hormone receptors. *J. Steroid Biochem.* 13:1001-1003.
9. Hawkins, R. A., Sangster, K. and Krajewski, A. 1986. Histochemical detection of oestrogen receptors in breast carcinoma: A successful technique. *Br. J. Cancer* 53:407-410.
10. Horwitz, K. B., Costlow, M. E. and McGuire, W. L. 1975. A human breast

- cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone and glucocorticoid receptors. *Steroids* 26:785-795.
11. **Jensen, E.V.** 1975. Human breast cancer. 1975. Raven Press, New York.
  12. **Keydar, I., Chen, L., Kardy, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaicik, S. and Brenner, H. J.** 1979. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur. J. Cancer* 15: 659-670.
  13. **Kataoka, T., Nishiki, M., Matsuyama, T., Yamane, M., Kishi, N. and Dohi K.** 1985. Diagnosis of breast lesions by aspiration biopsy cytology. *Jpn. J. Surg.* 15:361-367.
  14. **King, W. J. and Greene, G. L.** 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307: 745-747.
  15. **Kute, T. E., Linville, C. and Barrows, G.** 1983. Cytofluorometric analysis for estrogen receptors using fluorescent estrogen probes. *Cytometry* 4:132-140.
  16. **Leclerq, G., Heuson, J. C., Schoenfeld, R., Mattheiem, W. H. and Tagoni, H. T.** 1973. Estrogen receptors in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* 9:665-673.
  17. **Lee, S. H.** 1980. Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Cancer* 44:1-12.
  18. **Madden, R. E. and Burk, D.** 1961. Production of viable single cell suspensions from solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 27:841-861.
  19. **McDivitt, R. W., Stone, K. R., Craig, R. B. and Meyer, J. S.** 1985. A comparison of human breast cancer cell kinetics measured by flow cytometry and thymidine labelling. *Lab. Invest.* 52:287-291.
  20. **McGuire, W. L., Horwitz, K. B., Pearson, O. H. and Segaloff, A.** 1977. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 39:2934-2947.
  21. **Mercer, W. D., Edwards, D. P., Chamness, G. C. and McGuire, W. L.** 1981. Failure of estradiol immunofluorescence in MCF-7 breast cancer cells to detect estrogen receptors. *Cancer Res.* 41:4644-4652.
  22. **Nakamura, K.** 1986. Bioavailability, distribution and pharmacokinetics of diethylstilbestrol converted from diethylstilbestrol diphosphate in patients with prostatic cancer. *Hiroshima J. Med. Sci.* 35: 325-338.
  23. **Nenci, I., Beccati, M. D., Piffanelli, A. and Lanza, G.** 1976. Detection and dynamic localization of estrogen-receptor complexes in intact target cells by immunofluorescence technique. *J. Steroid Biochem.* 7:505-510.
  24. **Nomura, Y., Kobayashi, S., Takatani, O., Sugano, H., Matsumoto, K. and McGuire, W. L.** 1977. Estrogen receptor and endocrine responsiveness in Japanese versus American breast cancer patients. *Cancer Res.* 37:106-110.
  25. **Olszewski, W., Darzynkiewics, Z., Rosen, P. P., Schwartz, M. K. and Meland, M. R.** 1981. Flow cytometry of breast carcinoma: I. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 48:980-984.
  26. **Oxenhandler, R. W., McCune, R., Subtelney, A. Truelove, C. and Tyrer, H. W.** 1984. Flow cytometric determination of estrogen receptors in intact cells. *Cancer Res.* 44:2516-2523.
  27. **Pertschuk, L. P., Tobin, E. H. and Carter, A. C.** 1982. Immunohistological and histochemical methods for detection of steroid binding in breast cancer: A reappraisal. *Breast Cancer Res. Treat.* 1:297-314.
  28. **Raam, S., Richardson, G. S., Bradley, F., MacLaughlin, D., Sun, L., Frankel, F. and Cohen, J. L.** 1983. Translocation of cytoplasmic estrogen receptors to the nucleus; Immunohistochemical demonstration utilizing rabbit antibodies to estrogen receptors of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 3: 179-199.
  29. **Schneider, M. R., von Angerer, E., Prekajac, J. and Brade, W. P.** 1986. Studies on the mammary tumor-inhibiting effects of diethylstilbestrol and its mono- and diphosphate. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 111: 110-114.
  30. **Soule, H. D., Vasquez, J., Lang, A., Albert, S. and Brennan, M. J.** 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1409-1416.
  31. 天神美夫, 高橋 学, 野村和弘(編) 1984. フローサイトメトリーハンドブック. サイエンスフォーラム, 東京.
  32. **Van, N. T., Raber, M., Barrows, G. H. and Barlogie, B.** 1984. Estrogen receptor analysis by flow cytometry. *Science* 224: 876-879.
  33. **Walker, R. A.** 1986. DNA flow cytometry of human breast carcinomas and its relationship

- to transferrin and epidermal growth factor receptors. *J. Pathol.* 150:37-42.
34. **Yamane, M., Nishiki, M., Kataoka, T., Kishi, N., Amano, K., Nakagawa, K., Okumichi, T., Naito, M., Ito, A. and Ezaki, H.** 1984. Establishment and characterization of new cell line (YMB-1) derived from human breast carcinoma. *Hiroshima J. Med. Sci.* 33:715-720.

## Fluorocytochemical Assay of Estrogen Receptors in Breast Cancer Cells

### Part II. Measurement of estrogen receptors using flow cytometry

Tsuyoshi KATAOKA

The Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine  
(Director: Prof. Kiyohiko DOHI)

Detection of estrogen receptors (ER) was performed for human cancer cell lines and clinical materials using flow cytometry (FCM method). The results showed that: 1) Mean fluorescent intensity (MFI) indicating specific binding of fluorescence-conjugated estrogen ( $E_2$ -BSA-FITC) increased in a dose dependent manner at the range of  $10^{-9}$  to  $10^{-8}$  M in ER positive cell line ZR75-1 while no such dependency was seen for a ER negative cell line LK-2. 2) Competitive inhibition of  $E_2$ -BSA-FITC was observed for antiestrogen and estrogenic drugs but not for other steroids, supporting the specific binding of  $E_2$ -BSA-FITC to ER. 3) True total binding (including specific as well as non-specific binding;  $MFI_T$ ) was significantly higher in ER positive group than in ER negative group ( $p < 0.05$ ) determined by dextran-coated charcoal method (DCC method). Using a cut off value from ER negative group (mean  $MFI_T$  plus 2SD), the coincidence of ER status between  $MFI_T$  and DCC method was 80% (20/25). 4) MFI excluding autofluorescence was examined after incubation with and without an estrogen analogue; DES-DP. The ratio (fluorescent binding ratio; FBR) was found to be significantly higher in ER positive group than in ER negative group ( $p < 0.01$ ). Using a cut off value from the latter group (mean FBR plus 2SD), the coincidence of ER status between FBR and DCC method was 88% (22/25). In order to evaluate ER level quantitatively by the present FCM method, log ER content by DCC method was plotted against log FBR, the latter represents the difference-in MFI excluding autofluorescence with and without DES-DP. The correlation was found to be highly significant ( $p < 0.001$ ). 5) If enough cell numbers were available, the aspirated materials could also be used for determination of ER status by FCM method.