

内因性エストロゲンおよび、Tamoxifen 下のエストロゲンレセプター測定に対する Hydroxylapatite 法の評価

一本杉 聡

内因性エストロゲン, tamoxifen の存在下でエストロゲンレセプター (ER) の実態を検討する目的として, ER の全結合部位 (占拠型+非占拠型) の検出を試みた. exchange assay は hydroxylapatite (HAP) 法と dextran coated charcoal (DCC) 法の両者で行い, また, enzyme immunoassay (EIA) 法における検討も加えた.

1. ラット子宮サイトソルに 1nM 非標識 17 β -estradiol を添加すると, 占拠型 ER 検出率は HAP 法で 96.3%, DCC 法で 75.5% を示したが, 10 μ M 非標識 17 β -estradiol を添加すると, 各々 48.3% と 6.0% であった.

2. 100 nM 非標識 tamoxifen を添加すると, 占拠型 ER 検出率は HAP 法で 100%, DCC 法で 80.1% を示したが, 10 μ M 非標識 tamoxifen の添加では, 各々 62.5% と 6.3% を示した.

3. EIA 法では添加の種類, 濃度による影響はなく, 100% の占拠型 ER 検出率を示した.

以上より, HAP 法が DCC 法と比較して良好な占拠 ER 検出率を示すことが明らかであった. HAP 法と EIA 法との比較においては, 後者は ER の抗原基を検出する点で, ホルモンレセプターの結合機能を必ずしも反映していないため, 今後も注意深く慎重に検討されるべきと思われる.

(昭和63年2月25日採用)

Evaluation of the Hydroxylapatite Method for the Estrogen Receptor Assay Effect of Endogenous Estrogen and Tamoxifen

Satoshi Ipponsugi

The concentration of occupied and unoccupied estrogen receptor (ER) sites in rat uterine cytosol was measured in the presence of 17 β -estradiol or tamoxifen. Exchange assays were performed by hydroxylapatite (HAP) and dextran coated charcoal (DCC) methods. The ER values measured by the HAP and DCC methods were then compared and the detection rate of occupied ER was evaluated. The data of ER concentration measured by the enzyme immunoassay (EIA) were shown.

1. When 1nM 17 β -estradiol was added to rat uterine cytosol, the detection rate of occupied ER by the HAP method was shown to be 96.3% and that by

the DCC method was 75.5%. In the presence of an additional 10 μ M of 17 β -estradiol, they were 78.3% and 6.0%, respectively.

2. When 100 nM tamoxifen was added, the detection rate of occupied ER by the HAP method was shown to be 100% and that by the DCC method was 80.1%. In the presence of an additional 10 μ M of tamoxifen, they were 62.5% and 6.3%, respectively.

3. The detection rate of occupied ER by the EIA method was shown to be 100% without and with the addition of various concentrations of 17 β -estradiol or tamoxifen.

Consequently, the HAP method clearly showed a higher detection rate of occupied ER than the DCC method. Following comparison of the HAP method with the EIA method, no conclusion could be presently made as to which method is better, since the two methods employ different theories in the detection of ER. (Accepted on February 25, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 14(3): 347-358, 1988

Key Words ① **Estrogen Receptor (ER)** ② **Exchange assay**
③ **Hydroxylapatite (HAP) method**

はじめに

現在乳癌の内分泌療法効果の指標として用いられているエストロゲンレセプター (ER) は極めて重要であるが、一般に行われている radio-receptor assay による ER 測定法で検出されるのは、内因性エストロゲンに結合されていない非占拠型 ER のみであり、ER の全結合部位 (占拠型+非占拠型) の値は測定できない。また抗エストロゲン治療すなわち tamoxifen 投与下においても同様である。このような環境下における治療上の ER の意義を検討する必要がある。そこで今回占拠型 ER が測定可能とされる hydroxylapatite (HAP) 法の評価について、dextran coated charcoal (DCC) 法および enzyme immunoassay (EIA) 法をも用い、比較検討を行った。

材料および方法

1) 組織

クロロホルム麻酔下に摘出した 20~30 週齢の Wistar 系ラット子宮と、ヒト乳癌組織を用いた。これらの組織は摘出後、結合組織を除去しサイトゾル作製用バッファーで血液を洗浄除去した後、直ちに液体窒素で凍結し、 -70°C

で凍結保存した。

2) サイトゾル作製

操作は、氷冷下 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行われ、ラット子宮サイトゾル作製は一度に 10~15 匹分の検体を使用した。凍結保存された検体を液体窒素存在下に粉碎し、検体 1g 当たり 4 ml の TEDG 緩衝液 (10 mM Tris HCl, 1.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% (v/v) glycerol pH 7.4) を加えて、Polytron PT 10 ホモジナイザーによりホモジナイズした。このときダイヤルは 6 にセットし 10 秒間のホモジナイズを 10 秒間隔で 3 回行った。ついで $800\times g$ で 15 分間の遠沈を行い上清を回収して、これを $105000\times g$ で 60 分間遠沈し、この上清をサイトゾルとした (Fig. 1)。

3) hydroxylapatite 法

hydroxylapatite (Bio-Rad 社 DNA Grade Bio-Gel HTP) を TP 緩衝液 (50 mM Tris HCl, 10 mM KH_2PO_4 , pH 7.2) で 3 回洗浄して、hydroxylapatite と TP 緩衝液の比を 0.7 に調整し、HTP 懸濁液とした。¹⁾ サイトゾル 200 μ l に HTP 懸濁液 250 μ l を加えて 4°C 30 分間反応させ (10 分間隔で静かに攪拌)、 $800\times g$ で 2 分間遠沈し、レセプター蛋白が吸

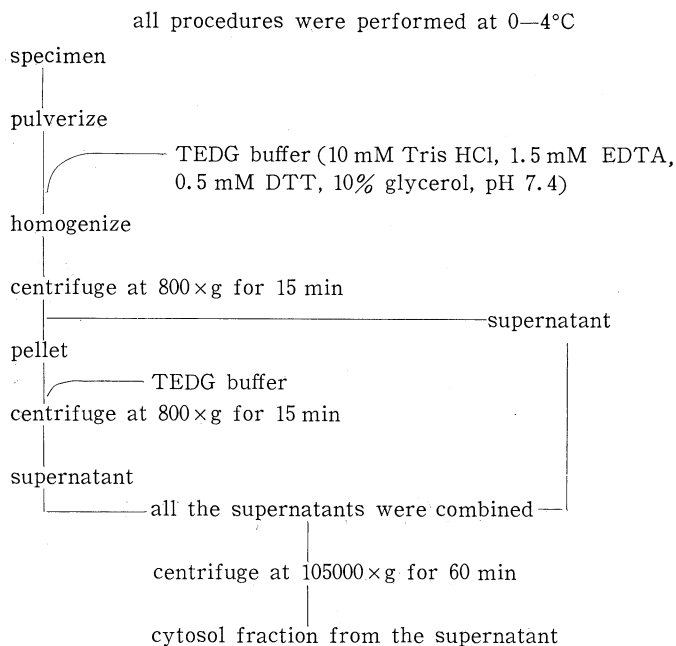


Fig. 1. Cytosol preparation

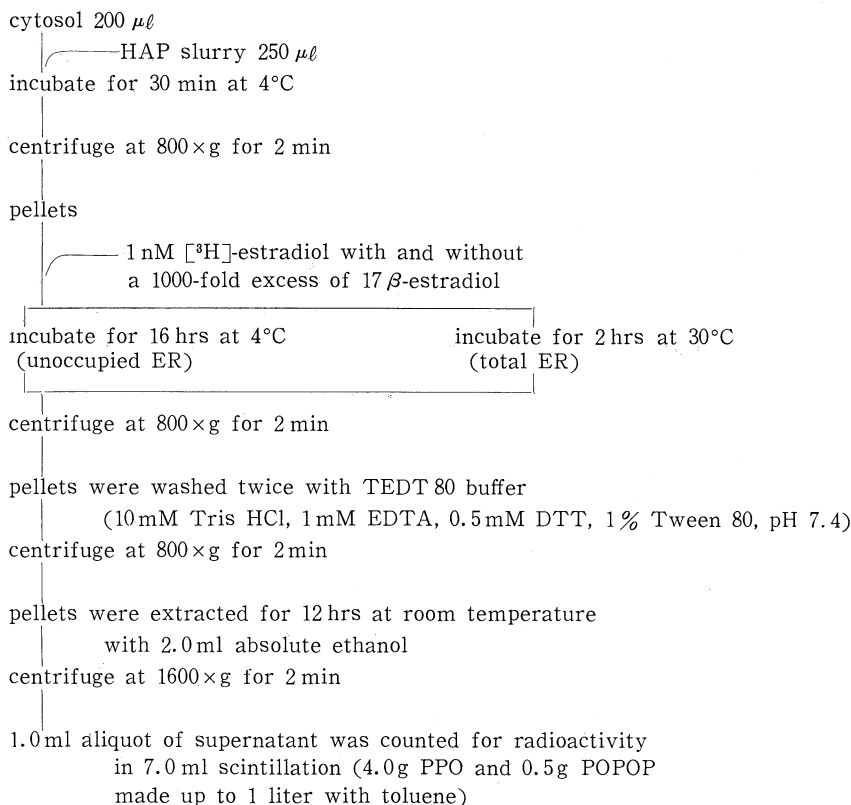


Fig. 2. HAP method

着された HTP ペレットを回収した。ついでこのペレットに最終濃度 1 nM [2, 4, 6, 7, 16, 17-³H]-estradiol ([³H]-estradiol) (168 Ci/mmol: Ammersham 社) を加え ER に対する全結合量を求めた。また, 1 nM [³H]-estradiol と 1000 nM 非標識 17β-estradiol (Sigma 社) を加えて非特異的結合量を求めた。なお, **Figure 2** に示すように非占拠型 ER の測定は 4°C 16 時間, ER の全結合部位 (占拠型+非占拠型) の測定は 30°C 2 時間の反応条件下で行った。反応終了後, HTP ペレットを TEDT 80 緩衝液 (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% Tween 80 pH 7.4) で 2 回洗浄した後, エタノール

2 ml で、抽出反応を室温下で12時間以上行った。ついでこの上清 1 ml を回収し、トルエン系シンチレーター 7 ml を加え、この放射活性を測定した (Fig. 2)。

4) dextran coated charcoal 法

サイトゾル 200 μ l に最終濃度 1 nM [3 H]-estradiol を加え、全結合量の評価を行った。また、1 nM [3 H]-estradiol と 100 nM 非標識 17β -estradiol を加えて非特異的結合量の評価

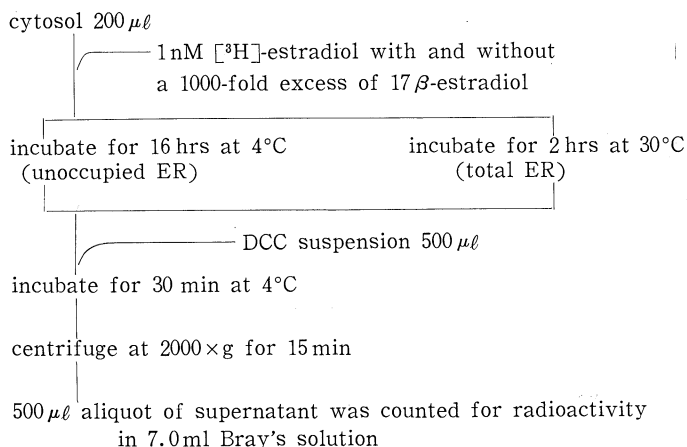


Fig. 3. DCC method

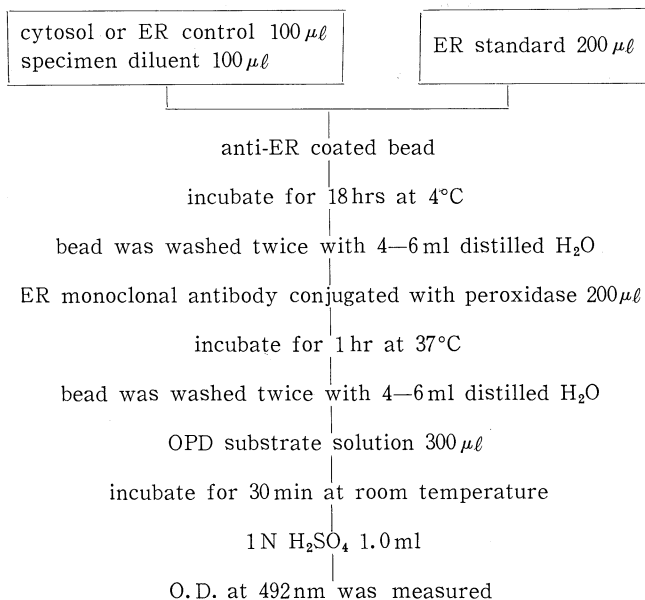


Fig. 4. EIA method

を行った。なお、Figure 3 に示すように非占拠型 ER の測定は 4°C 16時間、全結合部位(占拠型+非占拠型)の測定は 30°C 1時間の反応条件下で行った。反応終了後のサイトゾルに 500 μ l dextran coated charcoal 液 (0.25 % charcoal, 0.025 % dextran in 10 mM Tris HCl, pH 8.0) を加え、静かに攪拌して 4°C 30分間静置した。ついで 1600 \times g 15分間遠沈を行い、上清 500 μ l を回収して Bray のジオキサン系シンチレーター 7 ml を加え、この放射活性を測定した (Fig. 3)。

5) enzyme immunoassay 法
ダイナボット社製 ER-EIA キットを用いて ER 測定を行った。これに用いたサイトゾルは、HAP 法および DCC 法と同じ TEDG 緩衝液で作製されたものを用いた。測定は duplicate で行い、事前に高い ER 値が予測される場合は、あらかじめ TEDG 緩衝液で希釈を行った。その他は Figure 4 に示したキットの方法に準じて行った。

6) 蛋白定量

蛋白定量は、280 nm と 260 nm の紫外光吸収域を用いた吸光度で行い、²⁾ 蛋白濃度をおよそ 1.0 mg/ml から 2.0 mg/ml に調整した後、coomassie brilliant blue G-250 を利用した Bio-Rad 社製 Protein Standard Assay Kit を用い、標準蛋白として bovine serum albumin を用いて行った。

結 果

- 1) ER 測定手技における至適反応条件の設定
1. hydroxylapatite 法
HAP 法の反応時間が ER 値に

及ぼす影響を検討するため、温度条件 4°C と 30°C において、反応時間を 1・2・4・8・16・32・64 時間に設定し、各々の条件下での ER 測定値を比較検討した。

HAP 法において 4°C 条件下では、2 時間で ER 値はほぼ平衡に達し、64 時間まで安定であった。一方、30°C 条件下では 4°C 条件下より ER 値は高く、1 時間で既に結合部位数は平衡に達し 8 時間まで安定した結果が得られた (Fig. 5)。

また、最終濃度 1 mg/ml に調整された bovine serum albumin 添加 TEDG 緩衝液 200 μ l をサイトゾルの代わりに用いて、非特異的結合蛋白が ER 測定時に及ぼす影響を検討したが、20 nM [³H]-estradiol 添加時の放射活性は 12.84 dpm と低値を示し、ほとんど影響は認められなかった。

2. DCC 法

DCC 法の反応時間が ER 値に及ぼす影響を検討するため、温度条件 4°C と 30°C において、反応時間を 1・2・4・8・16・32・64 時間に設定し、各々の条件下での ER 測定値を比較した。

ER 値は 4°C 条件下では 2 時間の反応時間でほぼ平衡に達し、32 時間まで安定していた。一方、30°C 条件下では 1 時間で結合部位数は最高値に達するが、以後時間の経過とともに急激に低下する傾向を認め ER 測定は不可能であった (Fig. 5)。

また、HAP 法と同様に最終濃度 1 mg/ml に調整された bovine serum albumin 添加 TEDG 緩衝液 200 μ l をサイトゾルの代わりに用いて、非特異的結合蛋白が ER 測定時に及ぼす影響を検討し、20 nM [³H]-estradiol 添加時の放射活性は 164.91 dpm を示し、HAP 法に比べやや増大傾向を認めた。

2) hydroxylapatite 法と DCC 法における ER 測定値の比較

ヒト乳癌組織とラット子宮を各々 20 検体および 41 検体、合計 61 検体の ER 測定を HAP 法と

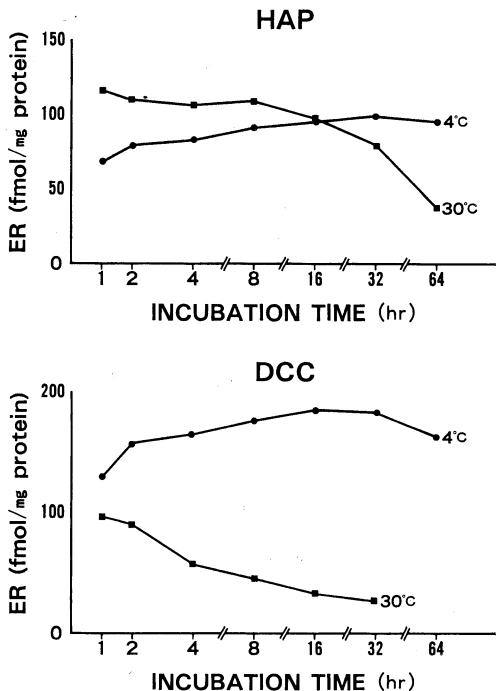


Fig. 5. Effect of incubation time on ER concentration. ER assays were carried out by HAP and DCC methods at 4°C (●) and 30°C (■) from cytosol of rat uterus. All assays were performed 4-point binding methods by scatchard analysis. Each point is the mean of triplicate determination.

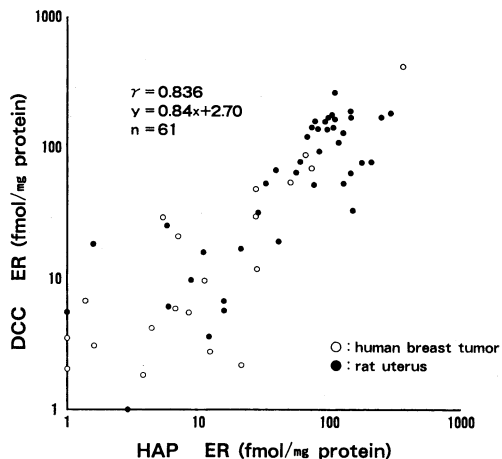


Fig. 6. Comparison of HAP and DCC method for ER concentration in cytosol. Specimens are rat uterus (●) and human breast tumors (○). All assays were performed 4-point binding methods by scatchard analysis that were incubated for 16 hrs at 4°C. The correlation coefficient is 0.836. Both axes are log scale.

DCC法により4°C 16時間の条件下で行い、両測定法によるER測定値の結果を比較検討した。

Figure 6に示すように両測定法間の相関係数は $r=0.836$ (危険率 $p<0.001$) で、良好な相関を示した。

- 3) EIA法とhydroxylapatite法およびEIA法とDCC法によるER測定値の比較
ヒト乳癌組織とラット子宮を各々35検体お

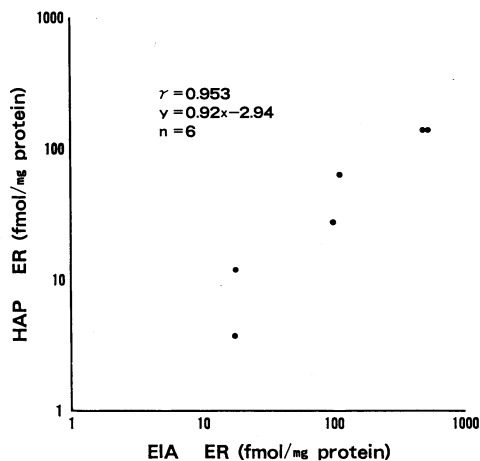


Fig. 7. Comparison of HAP and EIA method for ER concentration in cytosol. Specimens are rat uterus and human breast tumors. The correlation coefficient is 0.953. Both axes are log scale.

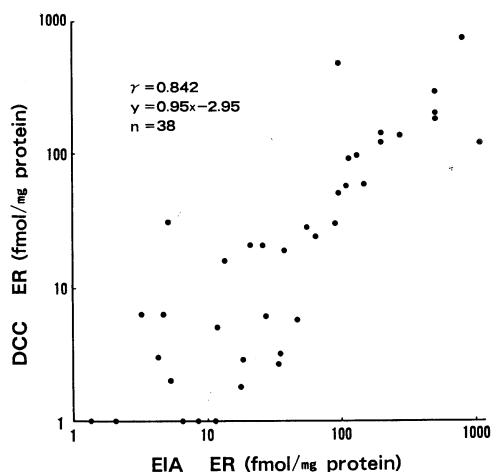


Fig. 8. Comparison of EIA and DCC method for ER concentration in cytosol. Specimen is the same as that of **Fig. 7**. The correlation coefficient is 0.842. Both axes are log scale.

よび3検体、合計38検体のER測定をEIA法とDCC法により4°C 16時間の条件下で行い、両測定法によるER測定値の結果を比較検討した。このうち6検体はHAP法も加えて、EIA法とHAP法によるER測定値の比較を行った。EIA法における基礎実験として、ヒト乳癌組織4検体においてサイトゾル作製時に、EIAキットにしたがったTEMo緩衝液(10 mM Tris HCl, 1.5 mM EDTA, 5.0 mM Na_2Mo_4)と、従来当施設で用いてきたTEDG緩衝液によるものと2種類のサイトゾルを作製、両者間のER測定値の比較を行った。結果を**Figures 7, 8**に示すが、各々両測定間の相関係数はEIA法とHAP法の間で $r=0.953$ (危険率 $p<0.001$)、EIA法とDCC法の間で $r=0.842$ (危険率 $p<0.001$)であり、ともに良好な相関を示した。

EIA法において、TEMo緩衝液とTEDG緩衝液による各サイトゾルでのER測定値を比較した結果は**Figure 9**に示すように $r=0.992$ (危険率 $p<0.001$)と良好な相関を示した。

- 4) exchange assayの至適インキュベーション条件の検討

ERの全結合部位(占拠型+非占拠型)の検出が可能なexchange assayの至適インキュ

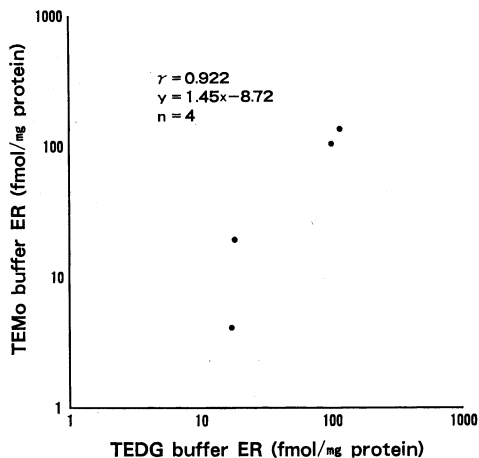


Fig. 9. Comparison of ER concentration of cytosol preparation by EIA. One of the cytosol was prepared with TEDG buffer, and the other that with TEMo buffer. The correlation coefficient is 0.922. Both axes are log scale.

バージョン温度を検討するため HAP 法を用いて, 時間条件を 2・4・8・16 時間, 温度条件を 4・10・30・37°C と設定, 各々の条件下での ER 測定値を比較した. ER 値は **Figure 10** に示すように, 30°C の高温条件下においては 8 時間まで安定しており, 4°C 条件下と比較して高値を示し, ER 測定に適した温度と考えられた. 一方, 37°C 条件下では ER 値の低下が著しく, 測定条件としては適さなかった.

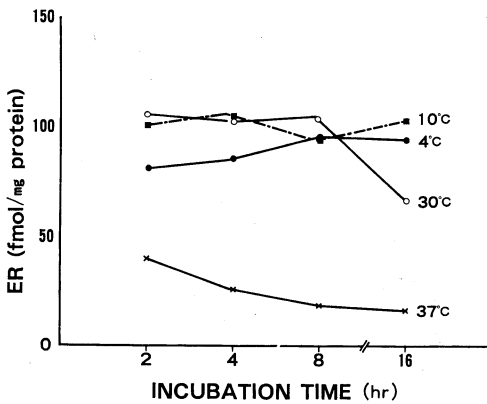


Fig. 10. Effect of incubation temperature on ER concentration. ER assays were carried out by HAP method at 4°C (●), 10°C (■), 30°C (○) and 37°C (×). All assays were performed 3-point binding methods by scatchard analysis.

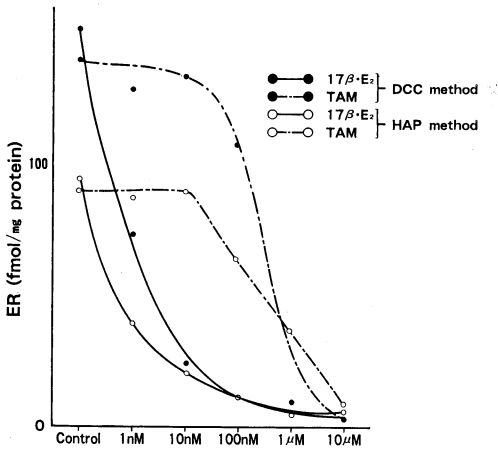


Fig. 11. Comparison of ER values in the presence of 17β-E₂ or TAM (17β-E₂: 17β-estradiol, TAM: tamoxifen)

5) 17β-estradiol および tamoxifen 添加によるサイトゾル ER 値の変化

ラット子宮サイトゾルに, 1 nM から 10 μM までの各種濃度の非標識 17β-estradiol を添加し, 1 時間静置した後 DCC 処理 (0.25% charcoal と 0.025% dextran を加え, 攪拌し氷冷下 30 分間静置した後, 1600×g 15 分間遠沈の上清を回収) を行った. このサイトゾルを 1 nM [³H]-estradiol で HAP 法・DCC 法により 4°C 16 時間条件下で ER を測定した. tamoxifen (ICI ファーマ提供) においても同

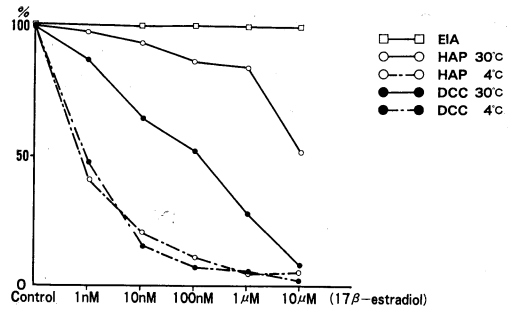


Fig. 12. Comparison of various methods for the detection rate of occupied ER. Assays were performed by HAP (○), DCC (●), and EIA (□) method from rat uterine cytosol in the presence of 1 nM–10 μM 17β-estradiol. On HAP and DCC methods by single-saturating-dose assay, incubation were performed for 16 hrs at 4°C and for 2 hrs at 30°C, in order to evaluate of unoccupied and total ER.

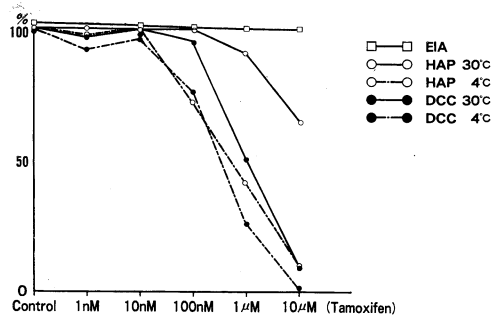


Fig. 13. Comparison of various methods for the detection rate of occupied ER. Otherwise the procedure is the same as that of **Fig. 12**, except added tamoxifen instead of 17β-estradiol.

様の検討を行った。ER 測定値は、非標識 17β -estradiol の添加を増量するにしたがい連続的に低下し、 $[^3\text{H}]$ -estradiol と同量の 1nM 非標識 17β -estradiol の添加では ER 値は 50% の低下を示した。また、1 μM (1000 倍量) 非標識 17β -estradiol の添加では低下はほぼ平衡に達した。一方、tamoxifen では 10 nM (10 倍量) では ER 値の変化は極めて軽度で、100 nM (100 倍量) 以上の tamoxifen 添加で次第に著明となり、10 μM (10000 倍量) ではほぼ平衡に達する低下が得られた (Fig. 11)。

6) 17β -estradiol および tamoxifen 添加時における ER の全結合部位 (占拠型 + 非占拠型) の検出の試み

非標識 17β -estradiol および tamoxifen を前述の方法で処理したサイトゾルで、30°C 条件下の exchange assay を行い、ER を測定した。このとき HAP 法は反応時間を 2 時間、DCC 法は 1 時間と設定した。また同時に EIA 法による検討も加え、各測定法による検出結果を Figures 12, 13 および Table 1 に示した。非標識 17β -estradiol の添加を増量するにしたがい、HAP 法・DCC 法ともに 4°C 条件下では前述のごとく ER 値は連続的に低下したが、HAP 法 30°C 条件下による exchange assay では $[^3\text{H}]$ -estradiol の 1000 倍量の 1 μM 非標識 17β -estradiol の添加では、非添加群の 83.8% まで ER 値の検出が可能であった。しかし、10 μM 存在下 (10000 倍量) 非標識 17β -estradiol の添加では 51.6% の検出にとどまった。一方、DCC 法 30°C 条

件下による exchange assay では、Figure 12 に示すように HAP 法に比べて急激な低下が認められた。

EIA 法では 17β -estradiol の添加に影響されることなく、良好な検出結果を示した。

tamoxifen における同様の検討では、添加濃度を増量するにしたがい HAP 法・DCC 法ともに 4°C 条件下で結果 5) で述べたように、 $[^3\text{H}]$ -estradiol の 100 倍量の 100 nM tamoxifen の添加により ER 値の低下を示すが、30°C 条件下による exchange assay では HAP 法・DCC

Table 1. Concentration of cytosol ER in rat uterus and detection rate of total ER in the presence of 17β -estradiol or tamoxifen.

		Control	17β -estradiol				
			1 nM	10 nM	100 nM	1 μM	10 μM
HAP	4°C	94.62	38.87* (41.1)**	19.70 (20.8)	10.95 (11.6)	4.75 (5.0)	6.08 (6.4)
	30°C	87.78	85.89 (97.8)	81.68 (93.1)	75.95 (86.5)	73.56 (83.8)	45.30 (51.6)
DCC	4°C	152.32	72.66 (47.7)	24.27 (15.9)	11.63 (7.6)	9.29 (6.1)	3.50 (2.3)
	30°C	123.51	107.70 (87.2)	80.04 (64.8)	64.84 (52.5)	34.95 (28.3)	10.13 (8.2)
EIA		530.28		565.52 (100.0)	510.16 (96.2)	529.40 (99.8)	530.44 (100.0)
		Control	Tamoxifen				
			1 nM	10 nM	100 nM	1 μM	10 μM
HAP	4°C	89.86	87.43 (97.3)	90.86 (100.0)	64.67 (72.0)	36.69 (40.8)	9.28 (10.3)
	30°C	96.29	108.71 (100.0)	108.83 (100.0)	100.16 (100.0)	89.78 (93.2)	63.94 (66.4)
DCC	4°C	140.00	128.66 (91.9)	134.84 (96.3)	107.59 (76.9)	37.02 (26.4)	3.81 (2.7)
	30°C	119.50	115.08 (96.3)	127.05 (100.0)	114.05 (95.4)	61.24 (51.3)	10.49 (8.8)
EIA		430.12		452.20 (100.0)	412.36 (100.0)	507.00 (100.0)	517.56 (100.0)

* ER values (fmol/mg protein)

** Detection rate of total ER (%)

Rat uterine cytosol was made in TEDG buffer.

Unoccupied ER concentration was measured by single saturating-dose assay employing HAP and DCC methods for 16 hrs at 4°C. Total ER concentration was measured for 2 hrs at 30°C. EIA was performed according to the method described in the legend to Fig. 4.

法ともにそれぞれ 100%と 95.4%の検出が得られ、良好な結果を示した。1 μM (1000 倍量) tamoxifen の添加では DCC 法では 51.3%まで低下を示すのに対し、HAP 法では 93.2%の検出が可能であった。また、10 μM (10000 倍量) tamoxifen の添加では HAP 法で 66.4%を示すのに対し、DCC 法で 8.8%とその検出率は極めて低値であった。

EIA 法では tamoxifen の添加に影響されることなく、良好な ER 値の検出結果を示した。

考 察

従来の非占拠型 ER 陽性の抗エストロゲン療法の有効率は、50~60%であるのに反し、陰性においては 5~10%で、ほぼ内分泌療法無効の予測が可能である。ER 陽性で効果の得られない 40%において、一般に腫瘍細胞の多様性 (ER 陽性、陰性細胞の混在)、エストロゲン作用の postreceptor process の欠損などが考えられている。一方、ER 陰性で効果の得られる 10%においては、ER が温度不安定な蛋白であるため様々な温度変化によって影響されること、内因性ホルモンにより ER 結合部位を占拠されていることなどが考えられている。事実、内因性エストロゲンの影響下にある閉経前、閉経後の乳癌における ER の陽性率は、米国においては 59%と 79%で閉経後に ER 陽性率が高いとされている。³⁾ このように内因性エストロゲン関与、tamoxifen 投与中の ER の変動などの諸性状を解析することが必要である。

HAP 法に用いるリン酸カルシウム塩 hydroxylapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$) は、一般に蛋白質、核酸およびその他の高分子物質の分離、精製、定量分析に有用な担体として用いられており、熱安定性で、pH 耐性とされている。

今回検討を行った 30°C 条件下における exchange assay による ER 測定において、DCC 法では ER 値の減衰が著しく測定法として適さないが、HAP 法では 8 時間まで反応を行っても、4°C 条件下より高い、安定した ER 値が得

られた。

ER 蛋白は温度に不安定であるため、サイトゾルを高温条件に長時間曝すと ER の減衰をもたらすが、今回の実験成績から hydroxylapatite に吸着された ER は 30°C 以下の条件下、熱安定性を有すると考えられる。ただし生理的温度として 37°C 条件下を検討すると、その安定性は急激に低下した。また hydroxylapatite への、非特異的な [^3H]-estradiol の吸着はほとんど認められなかった。以上より、HAP 法は従来の報告にみられるように exchange assay に適した方法であると思われる。^{4), 5)}

HAP 法と DCC 法による ER 測定値を比較すると、HAP 法においてやや低値となる傾向が認められた。これについては HAP 法がホルモンレセプターの 8S component を主に検出しているのに対し、DCC 法では 8S・4S component を検出しているとする報告があり、⁶⁾ また、high affinity・low capacity の Type A と low affinity・high capacity の Type B の 2 種類の ER が存在し、HAP 法では Type A を検出しているとする報告もある。⁷⁾ いずれにしても、ER 値の差は測定法の違いによるものと考えられるが、結果 2) に示したように両方法の相関性は高く、かつ内因性エストロゲンの影響下でも ER の検出が可能であることより、HAP 法は DCC 法に優る測定法であろう。

我が国における正常の非妊娠婦人の血中の estradiol は卵胞期で 20~40 pg/ml、排卵期で 150~400 pg/ml、黄体期で 100~300 pg/ml であり、⁸⁾ およそ 1~10 nM の範囲にあると考えられる。一方、Maass ら⁹⁾ は、血中 estradiol が 300 pg/ml 以上では ER 陽性例はなかったと述べており、理論上 1 nM の内因性エストロゲンが存在すると ER は偽陰性となる可能性がある。

1973年 Katzenellenbogen ら¹⁰⁾ は、exchange assay 法を考案し、ラット子宮サイトゾル中の ER が一部内因性エストロゲンに占拠されていることを示し、Sakai ら¹¹⁾ はヒト乳癌において、サイトゾル中の ER が内因性エストロゲン

によって0~29.4%占拠されていることを報告している。

今回検討した exchange assay では、1nM 非標識 17 β -estradiol 添加により HAP 法では、control の41.1%まで低下した ER を97.8%まで検出可能であった。一方、DCC 法でも、47.7%まで低下した ER を87.2%まで検出可能であった。つまり、占拠型 ER 検出率でみると1nM 非標識 17 β -estradiol 添加により HAP 法では96.3%、DCC 法では75.5%を検出し得たことになる (Table 2)。非標識 17 β -estradiol の添加濃度が増すにしたがい占拠型 ER 検出率は低下し、10 μ M (10000 倍量) 17 β -estradiol の添加では HAP 法・DCC 法でそれぞれ48.3%と6.0%まで低下する傾向を認め、HAP 法は DCC 法に比較して、良好な占拠型 ER 検出率を示した。

一方、内分泌療法において最もよく使用されている非ステロイド系抗エストロゲン剤である tamoxifen の ER 結合能は、和田ら¹²⁾の報告によると0.2~10.0%であり、エストロゲンと競合結合するためにはエストロゲンの約10~100倍の tamoxifen 濃度を要するとされ、斉藤ら¹³⁾は ER との結合を50%低下させるためにはエストロゲンの250倍の tamoxifen 濃度が必要であると報告している。Figure 11 に著者の成績を示したが、1nM [³H]-estradiol に対して ER 値を50%低下させるには約500倍の tamoxifen 濃度であった。

tamoxifen 添加における検討では、1nM [³H]-estradiol に対し10倍量にあたる10nM tamoxifen 添加までは、4 $^{\circ}$ C 条件下において HAP 法・DCC 法ともに control に近い100%の全結合量の検出が可能であった。100nM (100倍量) tamoxifen 添加時には、exchange assay により HAP 法では72.0%まで低下した ER を100%検出しており、DCC 法では76.9%

Table 2. Detection rate of occupied ER in the presence of 17 β -estradiol or tamoxifen

		HAP			DCC		
		A	B	C	A	B	C
17 β -estradiol	1nM	41.1	97.8	96.3	47.7	87.2	75.5
	10nM	20.8	93.1	91.3	15.9	64.8	58.2
	100nM	11.6	86.5	84.7	7.6	52.5	48.6
	1 μ M	5.0	83.8	83.0	6.1	28.3	23.6
	10 μ M	6.4	51.6	48.3	2.3	8.2	6.0
Tamoxifen	1nM	97.3	100.0	100.0	91.9	96.3	54.3
	10nM	100.0	100.0	100.0	96.3	100.0	100.0
	100nM	72.0	100.0	100.0	76.9	95.4	80.1
	1 μ M	40.8	93.2	88.5	26.4	51.3	33.8
	10 μ M	10.3	66.4	62.5	2.7	8.8	6.3

A: Detection rate of total ER at 4 $^{\circ}$ C (%)

B: Detection rate of total ER at 30 $^{\circ}$ C (%)

C: Detection rate of occupied ER (%)

$$C = \frac{B-A}{100-A}$$

まで低下した ER を95.4%まで検出可能であった。つまり、占拠型 ER 検出率は100nM (100倍量) tamoxifen 添加時には HAP 法では100%、DCC 法では80.1%であり、10 μ M (10000倍量) tamoxifen 添加時にはそれぞれ62.5%と6.3%を示し、HAP 法は DCC 法に比較して良好な占拠型 ER 検出率を示した (Table 2)。

和田ら¹²⁾の報告によると tamoxifen の血中濃度は、20mg 初回投与で代謝物も含めて、6時間目に27.2ng/mlを示すが、これは閉経前婦人の排卵期の血中エストラジオールの正常値150~400pg/mlの100倍以上である。また、tamoxifen の血中濃度は2週目で152ng/ml、4週目で210ng/ml、6週目で244ng/mlとさらに高濃度を示す。一方、腫瘍組織内の tamoxifen 濃度については5~110ng/mg protein とする報告があり、¹⁴⁾ 腫瘍組織内における内因性エストロゲンの約10⁴倍以上であると報告されている。つまり、ER は高濃度の tamoxifen により十分占拠されていると考えられる。この時の腫瘍組織サイトゾル内の蛋白濃度を仮に2mg/ml とすると、19~415nM の組織内 tamoxifen 濃度と考えられる。この範囲では、

著者の検討した HAP 法による exchange assay で良好な占拠型 ER 検出率を得るものと考えられる。

1980年 Greenら¹⁵⁾により作製された MCF-7 細胞の細胞質分画中の ER に対するモノクローナル抗体を用いたダイナボット社製 ER-EIA キットは、ポリスチレンビーズに固相化されたヒト ER 抗体と、ペルオキシダーゼで標識されたラット ER 抗体を用いた固相サンドイッチ法による酵素抗体法である。この EIA 法と従来の [³H]-estradiol を用いた radioreceptor assay との良好な相関性は、多くの諸家の報告により認められるところであるが、^{16)~19)} 今回の検討でも HAP 法・DCC 法の両方法において良好な結果が確認された。

また、TEMo 緩衝液と TEDG 緩衝液を用いて作製したサイトゾルの ER 値には差がみられず、従来の [³H]-estradiol による radioreceptor assay で使用してきた TEDG 緩衝液サイトゾルが EIA 法にも利用できると考えられる。

EIA 法では 17 β -estradiol および tamoxifen による占拠型 ER の検出が理論上可能であり、**Figures 12, 13** で良好な成績を示した。本法は放射能物質を使用せず、測定法も簡便である利点をもっているが、ER 蛋白の抗原基を検出する点において、ホルモンレセプターの結合機能を必ずしも反映していないと思われる。

ER のモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色においては、細胞の核内のみが染まることより、King, W. J. ら²⁰⁾ は ER は本来核内のみ存在し、radioreceptor assay で細胞質分画に認められる ER は抽出過程に非占拠型 ER が核内から漏れ出たための人工産物であるという説を提唱した。Welshons ら²¹⁾ は、ER 陽性

細胞であるラット下垂体腫瘍 GH₃ 細胞を cytochalasin-B で細胞質と核に分離した実験において、ER が細胞質分画へ人工的に抽出される可能性を報告した。しかし、King, R. J. B. ら^{22), 23)} は、ヒト子宮筋層より部分精製した ER に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的実験において、核でなく細胞質のみに ER が染色され、さらに生化学的方法による結果とよく相関することを報告した。これらの結果の不一致が ER の抗原決定基の多様性に由来するものなのか、今後も検討を必要とするとともに、ER 測定法においても従来の radioreceptor assay と EIA 法において、内分泌療法の効果との相関性を今後も注意深く慎重に検討されるべきと思われる。

今回の検討で、ER の結合能をみる radioreceptor assay で exchange assay を行い、HAP 法が DCC 法と比較して良好な ER 値を示すことが明らかであった。また、exchange assay を HAP 法で行うことにより、生理的濃度の内因性エストロゲンや、tamoxifen の存在下でも、占拠型 ER を含めた ER の全結合部位の検出が可能であると考えられた。同時に EIA 法において、ER の抗原基により検出された ER 値もあわせて検討することで、より正確な内分泌療法の効果の予測が可能になると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を頂いた川崎医科大学内分泌外科 妹尾亘明教授に深甚の感謝の意を表します。また、同時に直接御指導頂いた同内分泌外科 園尾博司講師に謹んで深謝致します。

文 献

- 1) William, S. D. and Gorski, J.: Equilibrium binding of estradiol by uterine cell suspensions and whole uteri in vitro. *Biochemistry* 13: 5537-5542, 1974
- 2) Layne, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3: 447-454, 1957
- 3) Matsumoto, K., Ochi, H., Nomura, Y., Takatani, O., Izuo, M., Okamoto, R. and Sugano, H.: *Hormone, receptor, and breast cancer.* ed. by McGuire, W. L. New York, Raven Press. 1978,

pp. 43—58

- 4) Garola, R. E. and McGuire, W. L.: An improved assay for nuclear estrogen receptor in experimental and human breast cancer. *Cancer Res.* 37 : 3333—3337, 1977
- 5) Garola, R. E. and McGuire, W. L.: A hydroxylapatite micromethod for measuring estrogen receptor in human breast cancer. *Cancer Res.* 38 : 2216—2220, 1978
- 6) Powell, B., Garola, R. E., Chamness, G.C. and McGuire, W.L.: Measurement of progesterone receptor in human breast cancer biopsies. *Cancer Res.* 39 : 1678—1682, 1979
- 7) Erdos, T., Best-Belpomme, M. and Bessada, R.: A rapid assay for binding estradiol to uterine receptor (s). *Anal. Biochem.* 37 : 244—252, 1970
- 8) 金井 泉: 臨床検査法提要. 第29版. 東京, 金原出版. 1983, pp. 654—666
- 9) Maass, H., Engel, B. and Trams, G.: Steroid hormone receptors in human breast cancer and the clinical significance. *J. Steroid Biochem.* 6 : 743—749, 1975
- 10) Katzenellenbogen, J.A., Johnson, H.J. and Carlson, K.E.: Studies on the uterine, cytoplasmic estrogen binding protein. Thermal stability and ligand dissociation rate. An assay of empty and filled sites by exchange. *Biochemistry* 12 : 4092—4099, 1973
- 11) Sakai, F. and Saez, S.: Existence of receptor bound to endogenous estradiol in breast cancer of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 27 : 99—110, 1976
- 12) 和田富雄, 小山博記, 寺沢敏夫, 本郷英太郎: Tamoxifen の血中動態—ヒトにおける tamoxifen ならびに主代謝物質の血中濃度とその推移—. *薬理と治療* 8 : 415—422, 1980
- 13) 斉藤一史, 片岡 誠, 小林俊三, 飛岡紀彦, 左久間修三, 永井良治: 17β -エストラジオールのエストロゲンレセプター結合に及ぼす抗エストロゲン剤 (tamoxifen) の阻害作用. *薬理と治療* 7 : 2305—2310, 1979
- 14) Daniel, P., Gaskell, S. J., Bishop, H., Campbell, C. and Nicholson, R. I.: Determination of tamoxifen and biologically active metabolites in human breast tumors and plasma. *Eur. J. Cancer Res. clin. Oncol.* 17 : 1183—1189, 1981
- 15) Green, L. G., Nolan, C., Eugler, J. P. and Jensen, E. V.: Monoclonal antibodies to human estrogen receptors. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 77 : 5115—5119, 1980
- 16) 富永 健, 吉田陽子, 北村正次, 林 和雄, 高橋 勇, 神前五郎: 乳癌組織中 estrogen receptor 測定における, モノクローナル抗体を用いた enzyme immuno-assay と dextran coated charcoal 法および sucrose density gradient 法による比較検討. *癌と化療* 12 : 1782—1786, 1985
- 17) 佐藤文三, 松本圭史: レセプターに対するモノクローナル抗体を用いた酵素免疫法によるヒト乳癌のエストロゲンレセプター測定法の基礎的臨床的検討. *ホルモンと臨* 33 : 977—982, 1985
- 18) 小林俊三, 佐本常男, 小林 学, 岩瀬弘敬, 柄松章司, 伊藤由加利, 正岡 昭: ヒト乳癌エストロゲンレセプター測定用モノクローナル EIA キットの基礎的, 臨床的検討. *ホルモンと臨* 33 : 1175—1179, 1985
- 19) 土岐利彦, 及川直弘, 和田裕一, 矢嶋 聡: モノクローナル抗体を用いた ER-EIA キットの基礎的検討. *ホルモンと臨* 34 : 53—56, 1986
- 20) King, W. J. and Greene, G. L.: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in nuclei of target cells. *Nature* 307 : 745—747, 1984
- 21) Welshons, W. V., Lieberman, M. A. and Gorski, J.: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307 : 23, 1984
- 22) Coffey, A. I., Lewis, K. M., Brockas, A. J. and King, R. J. B.: Monoclonal antibodies against component related to soluble estrogen receptor. *Cancer Res.* 45 : 3686—3693, 1985
- 23) King, R. J. B., Coffey, A. I., Gilbert, J., Lewis, K. H., Nash, R., Millis, R., Raju, S. and Taylor, R. W.: Histochemical studies with a monoclonal antibody raised against a partially purified soluble estradiol receptor preparation from human myometrium. *Cancer Res.* 45 : 5728—5333, 1985