

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 I 編 穿刺吸引材料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

乳癌のホルモン・レセプター, 特にエストロゲン・レセプター (estrogen receptor: 以下 ER) の測定はラジオレセプター・アッセイ, 例えばデキストラン・チャコール吸着法 (dextran-coated charcoal method; 以下 DCC 法) などが一般的である。しかしこれらの測定法はかなりの検体量と設備が必要であり, しかも組織をホモジェナイズして測定するために, 個々の細胞についての検討は不可能であった。

そこで著者は, 少量の検体で迅速かつ術前に ER 測定が細胞レベルで可能な方法として, 穿刺吸引材料を用いた蛍光標識エストラジオール (17β -estradiol-6 carboxymethyloxime-bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate; 以下 E_2 -BSA-FITC) による ER の測定 (以下 FITC-ER 法) を行った。本研究において(1)ヒト乳癌細胞株 ZR75-1 を用いた基礎的検討と, (2) FITC-ER 法による ER の半定量的測定法を開発し, それと従来 DCC 法による ER 結果との比較を中心とした臨床的検討から以下の結果を得た。

1) FITC-ER 法において, 細胞質内の ER を測定するための E_2 -BSA-FITC の至適反応条件は, pH 7.2-7.4 で 4°C 60-120分, または室温 (21°C) 30分であった。

2) E_2 -BSA-FITC を用いた FITC-ER 法は, ジエチルステルベストール (DES) または非蛍光標識 17β - E_2 -6CMO-BSA の添加により蛍光強度の著明な抑制を認め, E_2 -BSA-FITC の ER に対する特異的な結合性が認められた。

3) 臨床症例では, 特に蛍光強度が DCC 法による ER の対数値に対して正の相関を示した。しかし染色陽性率と DCC 法の ER 値には明らかな相関はなく, 染色陽性率はむしろ同一組織内での ER の不均一性 (heterogeneity) を反映したものと考えられた。

4) 線形回帰分析を行った結果, DCC 法の ER 値は主として FITC-ER 法における蛍光強度の強さによって説明されることが判明した。また FITC-ER 法による ER 推定値と DCC 法の ER 値の一致率は 88.4% と良好であった。

5) 本法は, 術前でも注射針により穿刺吸引して得た少量の検体量で検討できるため, 特に再発乳癌や小腫瘍型乳癌においても容易に ER 測定が可能である。また個々の症例の蛍光強度あるいは染色陽性率の両面から, それぞれのパラメーターを別個に検討できるため, 更なる的確な乳癌の治療効果予測の可能性が示唆された。

Key words: Estrogen receptor, Breast cancer, Aspiration biopsy cytology, Fluorocytochemical assay, Linear regression analysis

(estrogen receptor: 以下 ER) を測定する事は重要である^{11, 22)}。

一般に ER の測定は、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) を使ったデキストラン・チャコール吸着法 (以下 DCC 法) や蔗糖密度勾配法などが行われている。これらの測定法によれば、乳癌全体では内分泌療法の有効率は30-40%と言われ^{11, 22, 28)}、特に ER が陽性の場合には、内分泌療法が約50-60%に有効とされている¹²⁾。しかし逆に ER が陰性であっても、その10%前後に内分泌療法が奏効しており²²⁾、必ずしも ER の陽陰性の判定が的確な治療効果の予測には到っていない。更にこれらの方法ではホモジェナイズした組織を使用するため、多少とも非癌成分の混入が避けられず、またその検体量も 0.5-1.0 g 以上と比較的多量を要する³⁴⁾。

そこで著者は ER の測定をより迅速かつ簡単で、しかも個々の細胞レベルで測定可能とするために、蛍光標識エストラジオールを用いた ER 測定法 (以下 FITC-ER 法) を行った。本研究では穿刺吸引細胞診 (Aspiration biopsy cytology; 以下 A. B. C.) で得られた材料および、ヒト乳癌より樹立された ER 陽性の細胞株 ZR75-1⁴⁾ を用い、主として(1)FITC-ER 法における E_2 -BSA-FITC の ER に対する特異性および親和性、(2)穿刺吸引材料を用いた FITC-ER 法による ER 測定の試みとその信頼性; (3)DCC 法と FITC-ER 法それぞれの利点および問題点、の3点について検討した。

研究対象・方法

I. 研究対象

A. 乳癌細胞株

本研究の基礎実験に用いたヒト乳癌培養細胞株は、すでに報告されているように⁴⁾、 E_2 依存性 ER 陽性の ZR75-1 (大日本製薬ラボラトリープロダクツ部; 原 ATCC 株 No. CRL-1500) を用いた。RPMI-1640 (GIBCO 社) に10%のウシ胎児血清 (FCS; Flow 社) を加えた培地により、37°C, 5% CO_2 培養器で培養した。培地の交換は3-4日ごとに行った。なお培地内のホルモンの影響を除外するため、測定前日より無血清培地とした。

B. 穿刺吸引材料

昭和59年9月から昭和62年9月までの3年間に当教室において治療を行った乳癌症例のうち、DCC 法により ER を測定した症例で、更に術前に A. B. C. を行った原発性乳癌64例、再発乳癌5例の計69例を対象

とした。

A. B. C. の方法および成績についてはすでに報告している⁴⁾ので、その詳細については参考文献(14)を参照されたい¹⁴⁾。今回施行した A. B. C. による検体採取方法の概要は、ピストル型シリンジ (Comeco 社) に装着した23ゲージ (0.5×60 mm) の細い注射針にて穿刺吸引して得た細胞で塗抹標本を作成し、その内一枚はメイグリュンワルト・ギムザ染色による通常の細胞診用とした。他の一枚を本研究用として、液体窒素又はディープ・フリーザーで急速凍結して保存し、原則として2週間以内に FITC-ER 法を行った。

II. 研究方法

A. 試薬及び測定装置

本研究に使用した蛍光標識エストラジオールには、 17β - E_2 -6CMO-BSA-FITC (Zeus 社) を用いた。各種競合的阻害剤は 17β - E_2 -6CMO-BSA (Makor 社)、タモキシフェン (tamoxifen citrate; 以下 TAM, ICI ファーマ社)、ジエチルスチルベストロール (DES)、プロゲステロン、テストステロンは Sigma 社のものを用いた。その他の試薬は全て Sigma 社または和光純薬より購入した。

蛍光顕微鏡は、OPTIPHOT™ (M-35S, Nikon 社) を使用し、励起フィルター BV (410-485 nm)、吸収フィルター (515 nm) で鏡検した。

画像解析装置は、モデル CIA-102™ (Olympus 社) を用いた。

B. 研究方法

1. FITC-ER 法の基礎的検討

FITC-ER 法の簡単な手順を Fig. 1 に示した。ヒト乳癌細胞株 ZR75-1 は、培養フラスコから 10 mM のトリス塩酸緩衝液に 0.15 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) および 0.5 mM のジチオスライトール (DTT) を加えた混合液を用いて細胞浮遊液を作成した。 E_2 -BSA-FITC に対する膜の透過性を高めるために、塗抹標本を一旦急速凍結した上ですみやかに溶解した。なお検体スライドの保存は原則として2週間以内とした。検体の固定は95%の冷エタノールで行った。固定洗浄後、各検体の内因性のステロイドを除去するために2%のウシ血清アルブミン (BSA) を含む 0.15 M のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を滴下し、更に PBS (10%グリセロールおよび 0.5 mM の DTT 含有) で段階希釈した 20 μ l の E_2 -BSA-FITC を滴下し、湿潤箱内で反応させた。

a. E_2 -BSA-FITC の ER に対する親和性

まず本法で E_2 -BSA-FITC の ER に対する親和性を検討するために、加える E_2 -BSA-FITC を最終濃

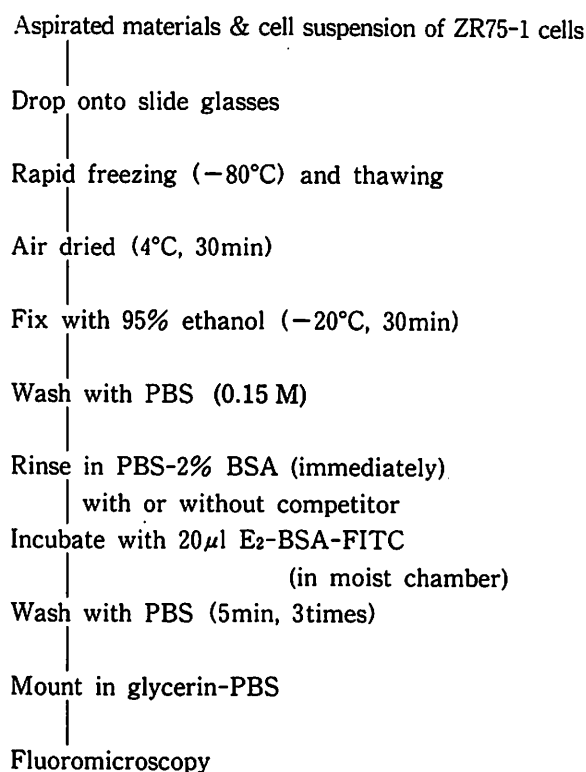


Fig. 1. Brief procedure of FITC-ER method

度が $1 \times 10^{-5} \text{M}$ から $1 \times 10^{-9} \text{M}$ までの 5 段階に希釈した。

b. E_2 -BSA-FITC の至適反応条件

E_2 -BSA-FITC の至適反応条件を決定し、また ER の局在 (localization) および ER の核への移行 (translocation) を検討する目的で、反応温度、pH、時間についてそれぞれ検討した。温度は 4°C 、室温 (21°C)、 37°C の 3 段階、pH は 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8、時間は 15分、30分、60分、120分、180分の 5 段階とした。

c. E_2 -BSA-FITC の ER に対する特異性

E_2 -BSA-FITC の ER に対する特異性を検討するための競合的結合阻害試験 (competitive binding test) に使用したジエチルstilbestロール (DES)、タモキシフェン (TAM)、プロゲステロン、テストステロンは純エタノールで溶解後、エタノール濃度が 1.0% 以下になるように調製し、 E_2 -BSA-FITC 反応前の 30分間投与した。

2. 乳癌臨床例の穿刺吸引材料を用いた FITC-ER 法の検討

Stage I-IV および再発乳癌を含む 69 例を対象とした。その主な手順は Fig. 1 と同様に行った。

a. FITC-ER 法による各因子測定

(1) 染色陽性率

まず蛍光顕微鏡により 200-400 倍で癌細胞を 100-200 個数え、細胞質内または核内に蛍光顆粒を認めた場合はこれを ER 陽性細胞とし、その陽性細胞の割合でもって染色陽性率 (positive staining rate; %) を測定した。

(2) 蛍光強度

蛍光強度 (fluorescent intensity) は数視野における平均的蛍光強度として、蛍光を発しない場合を陰性 (negative; -)、僅かに認める場合を弱陽性 (weak; ±)、中等度と認められるものを中等度陽性 (moderate; +)、非常に強く染まる場合を強陽性 (strong; ++) とした。また各群を統計的処理ができるようにするため (-) を 0, (±) を 1, (+) を 2, (++) を 3 と数値化した。

(3) 吸引細胞量

穿刺吸引して得られた検体の細胞量 (aspirated cell volume) は 100 倍視野にて鏡検し、1-2 個の細胞集塊 (cell clusters) を認める場合を poor (0)、10 個以上の多数を認める場合を rich (2)、その中間を moderate (1) とした。更に吸引細胞量と実際の組織内癌細胞密度 (cellularity; %) との相関性を調べた。即ちヘマトキシリン・エオジン染色またはアザン・マロリー染色を行った組織スライドを、画像解析装置により 200 倍率下、1 視野面積当たりの間質に対する癌組織の占める割合を測定し、数視野の平均値をもってその組織全体の癌細胞密度とした。この癌細胞密度と穿刺吸引して得られた細胞量との相関性について検討した。

なお蛍光強度および吸引細胞量の各クラス別の DCC 法 ER 値が正規分布をとらないために箱型図 (Box plot)⁴²⁾ で表示した。即ち各 box 内はヒンジ散布度を表し、この中に各クラスごとの全データの約 50% が含まれる。また各 box 内の横線がクラスごとの中央値である。

b. DCC 法による ER 測定

DCC 法による ER の測定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。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にて凍結し、 16α - ^{125}I - E_2 を使ったラジオレセプター・アッセイ¹⁰⁾ により、それぞれの細胞質分画から Scatchard 分析によって ER の最大結合部位数 (Bmax) および解離定数 (Kd) を求めた。その基準値は、Bmax が 5.0 fmol/mg 蛋白以上で Kd が $1.9 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下を陽性とした。

c. 乳癌の臨床病期分類

乳癌の臨床病期 (Stage) 分類は乳癌取り扱い規約²⁹⁾ に準じた。

d. FITC-ER 法の線形回帰分析による DCC 法の ER 値の推定

FITC-ER 法の各種測定値から, DCC 法による ER 値を推定する (以下この推定値を estimated-ER と略す) ために, 推定誤差を ϵ とし, また穿刺吸引材料を用いた FITC-ER 法の各種説明因子として染色陽性率, 蛍光強度および吸引細胞量の3種を考えて, 以下の線形回帰式⁴³⁾を作成した。

Log (DCC 法による ER 値)

$$= \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{21} x_{21} + \beta_{22} x_{22} + \beta_{23} x_{23} + \beta_{31} x_{31} + \beta_{32} x_{32} + \epsilon$$

[$\beta_0 - \beta_{32}$ は未知の回帰係数, その内 β_0 は定数項である。また x_1 は染色陽性率(%), $x_{21} - x_{23}$ および $x_{31} - x_{32}$ は蛍光強度および吸引細胞量の各クラスレベルのダミー変数 0 又は 1, 例えば x_{21} の値は蛍光強度が(土)以上の時 1, それ未満のとき 0 を, また x_{31} の値は吸引細胞量が moderate 以上の時 1, それ未満の時 0 とした。] なお実際の分析は Rousseeuw の提唱した Least median of squares regression³⁹⁾ に基づいて開発されたコンピューター・ソフトウェア「PROGRESS」を用いて, 重み付き最小 2 乗法により行った。

成 績

I. ヒト乳癌細胞株 ZR75-1 を用いた FITC-ER 法の基礎的検討

A. E₂-BSA-FITC の ER に対する親和性

Photo. 1 および 2 に, E₂-BSA-FITC をそれぞれ 1×10^{-6} M および 1×10^{-8} M 加えた時の蛍光像を示した (4°C, 60分)。Photo. 1 では, 細胞質を中心に強く染まった蛍光顆粒を認める。Photo. 2 では, Photo. 1 と比べて個々の細胞が淡く染まっているが, 染色陽性率は変化していない。なお 1×10^{-9} M ではほとんど染まらなかった。従って FITC-ER 法では少なくとも 1×10^{-8} M 以上の濃度が必要であった。

B. E₂-BSA-FITC の至適反応条件

FITC-ER 法の pH を 7.2 とし, 各々の温度と反応時間における染色陽性全細胞 (total ER positive cells; ER_t) に対して, 細胞質内に染色顆粒を有する細胞 (cytoplasmic ER positive cells; ER_c) の比, 即ち ER_c/ER_t を求め Fig. 2 に示した。37°C では早期より核内染色を認め, 時間の経過に伴って ER_c/ER_t 比が低くなっている。それに対し 4°C では 60分-120分 で, 室温 (21°C) では 30分 で ER_c の占める割合が最高となった (Photo. 3 および 4)。

次に反応時間を 60分 と一定にして温度と pH を変

え, それぞれの ER_c/ER_t 比を求めたところ, 4°C および室温 (21°C) において pH 7.2-7.4 で最高となった (Fig. 3)。よって細胞質内の ER を検討するためには pH 7.2 または 7.4 で, 4°C 60分-120分または室温 30分が最も良いものと考えられた。また pH, 温度, 時間の変化により ER の核内移行が認められた。

C. E₂-BSA-FITC の ER に対する特異性

FITC-ER 法の ER に対する特異性について, 各々の阻害剤による競合的結合阻害試験により検討をした。17 β -E₂-6CMO-BSA の濃度を, E₂-BSA-FITC の 100 倍量として反応前 30 分間加えた時の蛍光像を Photo. 5 に示した。染色陽性率には殆ど関係なく, 均一に蛍光強度の著明な抑制を認めた。この事はまた同じ濃度の DES および TAM にも見られた。一方プロゲステロンを 1×10^{-6} M 加えた時の蛍光像を Photo. 6 に示した。その染色陽性率, 蛍光強度ともに殆ど変化が見られなかった。テストステロンでも同様であり, E₂-BSA-FITC の ER に対する特異的結合性が証明された。

以上の基礎的検討の結果, FITC-ER 法による ER 測定はその特異性において妥当であり, また使用する E₂-BSA-FITC 濃度は 1×10^{-8} M 以上が必要であるが, その至適反応条件は pH 7.2-7.4, 4°C 60-120分または室温 30分が適当であることがわかった。そこで以下の A. B. C. を用いた臨床的検討には反応条件を一定にするため, E₂-BSA-FITC の最終濃度を 1×10^{-8} M とし pH 7.2, 室温 30分で行った。

II. 乳癌臨床例の穿刺吸引材料を用いた FITC-ER 法の検討

A. FITC-ER 法の各因子と DCC 法の比較

Stage I-IV 原発および再発乳癌の計 69 例について検討した。Photo. 7 および Photo. 8 に DCC 法による ER(+) および ER(-) 症例を示す。Photo. 7 ではほとんどの細胞が細胞質を中心によく染色されているが, 一部に染まっていない細胞も見られた。一方 Photo. 8 では, ほとんどの細胞が染色陰性であった。

1. FITC-ER 法の染色陽性率

FITC-ER 法の染色陽性率と, DCC 法の ER 値との関係を Fig. 4 に示した。なお DCC 法による ER 値 (Bmax) が 1.0 fmol/mg 蛋白以下は 1.0 fmol/mg 蛋白とした。染色陽性率と ER 値の相関性は弱いが, 染色陽性率の基準値を 10% とした場合, DCC 法との陽陰性の判定結果による一致率は, 81.2% (56/69) と良好であった。

2. FITC-ER 法の蛍光強度

FITC-ER 法における蛍光強度と DCC 法の ER 結

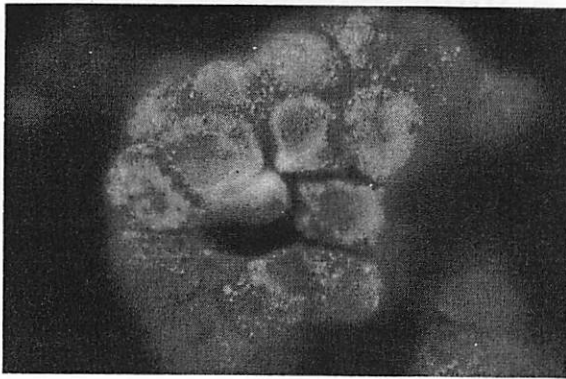


Photo. 1. ZR75-1 cells treated with 1×10^{-6} M E_2 -BSA-FITC for 60 min at 4°C . Note higher cytoplasmic uptake of fluorescence-conjugated E_2 and weakly stained nuclei ($640\times$).



Photo. 2. ZR75-1 cells treated with 1×10^{-8} M E_2 -BSA-FITC for 60 min at 4°C . Note fluorescent intensity is weaker compared to that with higher concentrations of E_2 -BSA-FITC (Photo. 1), while positive staining rate remains the same ($640\times$).

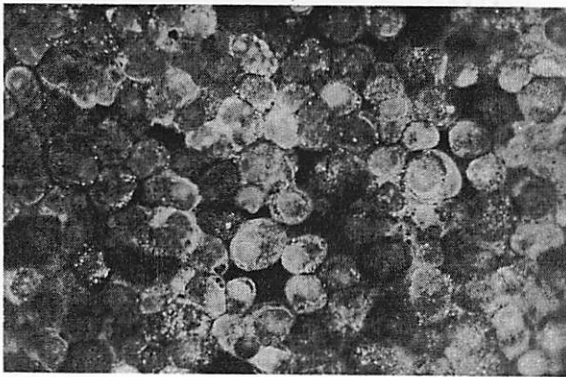


Photo. 3. ZR75-1 cells were incubated with E_2 -BSA-FITC for 60 min at 4°C prior to fixation. Note dense staining in cytoplasm, while nuclei are poorly stained ($160\times$).

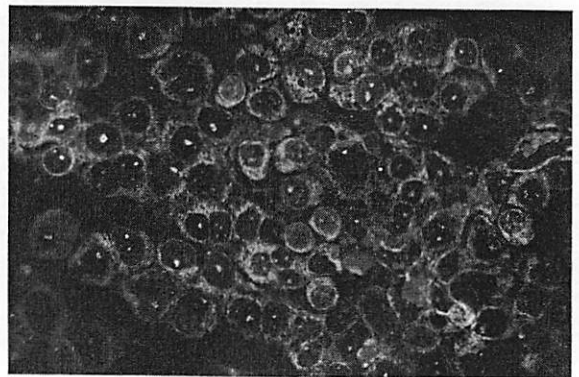


Photo. 4. ZR75-1 cells were incubated with E_2 -BSA-FITC for 120 min at 37°C prior to fixation. Note nuclear compartments are densely stained while cytoplasm is almost negative ($160\times$).

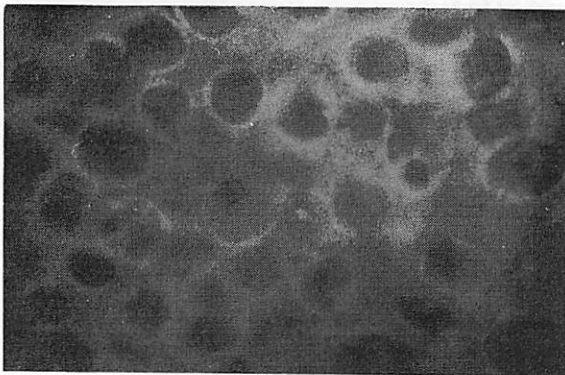


Photo. 5. Competitive binding test; ZR75-1 cells were preincubated with 100-fold concentration of 17β - E_2 -6CMO-BSA followed by E_2 -BSA-FITC treatment. Fluorescent intensity is greatly diminished and few fluorescent granules are present, but number of positively stained cells remains the same ($320\times$).

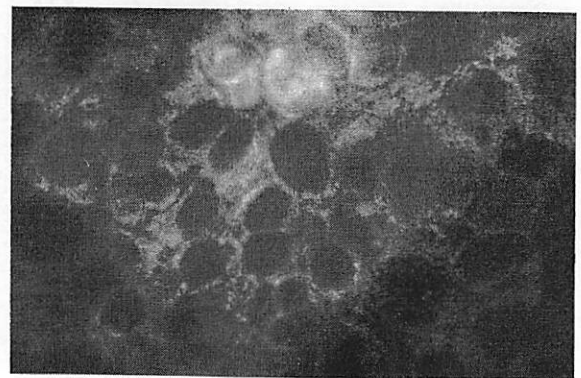


Photo. 6. Competitive binding test; ZR75-1 cells were preincubated with 100-fold concentration of progesterone followed by E_2 -BSA-FITC treatment. Note fluorescent intensity and positive rate are not affected by progesterone ($320\times$).

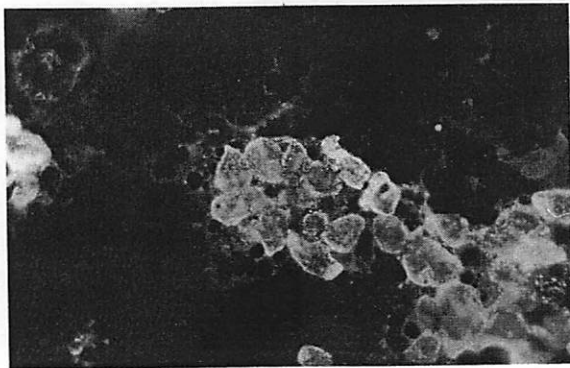


Photo. 7. Aspirated ER(+) breast cancer cells. Most of the cells show strong cytoplasmic fluorescence, though some cells do not (160×).

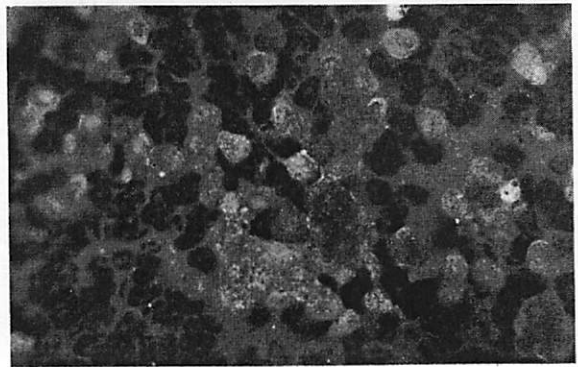


Photo. 8. Aspirated ER(-) breast cancer cells. Note fluorescent intensity is very low compared to that for ER(+) cells shown in Photo. 7 (160×).

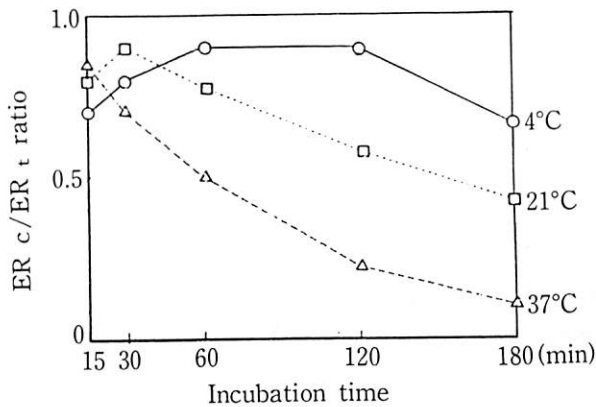


Fig. 2. Effect of temperature and incubation time on the translocation of ER from cytoplasm to nucleus prior to fixation; ZR75-1 cells were incubated with E₂-BSA-FITC under different conditions at pH 7.2. Ordinate represents the frequency of cells showing fluorescence in cytoplasm (ER_c) among total number of cells with stained cytoplasm or nucleus (ER_t).

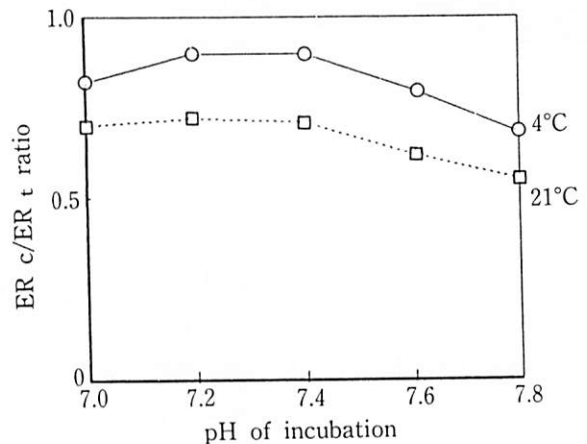


Fig. 3. Effect of pH and temperature on the translocation of ER from cytoplasm to nucleus. Prior to fixation, ZR75-1 cells were incubated for 60 min under different conditions. The ordinate is the same as in Fig. 2.

果との関係を Fig. 5 に示した。箱型図 (Box plot) で表示した蛍光強度の各クラス別 ER 値の中央値は、それぞれ 2.9;5.4;22.4;49.4 fmol/mg 蛋白と順次増加し、正の相関を認めた。

3. FITC-ER 法の吸引細胞量

次に穿刺吸引して得た吸引細胞量と、画像解析によって得た組織の癌細胞密度との関係を見た (Fig. 6)。各吸引細胞量別の癌細胞密度の中央値はそれぞれ 26.2 ; 37.4 ; 46.5%と漸次増加し、正の相関が見られた。従って吸引細胞量は各症例の癌細胞密度を反映していると思われるので、吸引細胞量と DCC 法の ER

値との関係を Fig. 7 に示した。それによると各群の ER 値の中央値は、それぞれ 14.4;12.0;30.5 fmol/mg 蛋白と、cell rich 群でやや高いものの明らかな傾向は認めなかった。

B. 乳癌臨床病期別による DCC 法 ER 値と FITC-ER 法各因子の測定結果

各症例に関して、臨床病期別に DCC 法の ER 値 (Bmax) および FITC-ER 法の染色陽性率、蛍光強度、吸引細胞量それぞれの mean±SD を求めた。なお ER 値はその対数を取り加算して得た値の mean±SD であり、蛍光強度および吸引細胞量は、それぞれのク

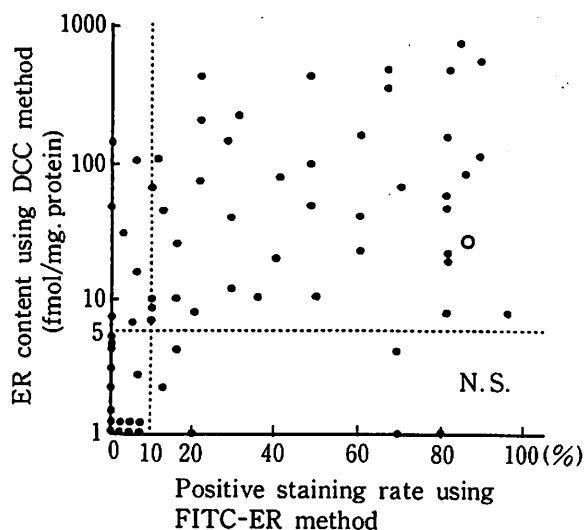


Fig. 4. Relationship between ER content using DCC method and positive staining rate using FITC-ER method. ○ ZR75-1 cells

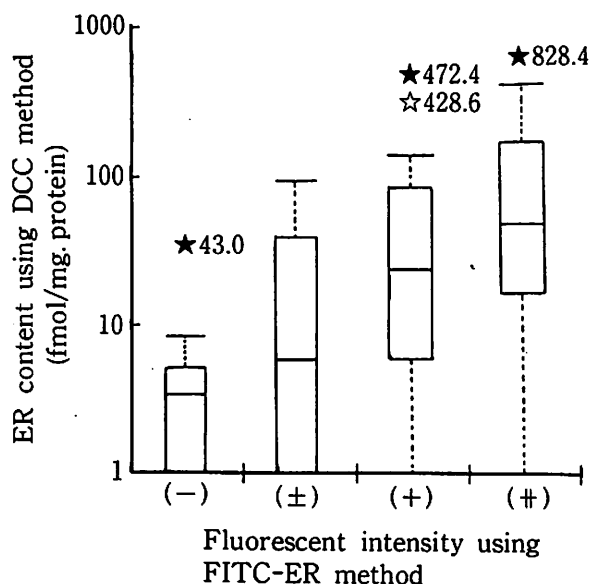


Fig. 5. Box plot; Relationship between ER content by DCC method and fluorescent intensity using FITC-ER method. ☆ outside value, ★ extreme value

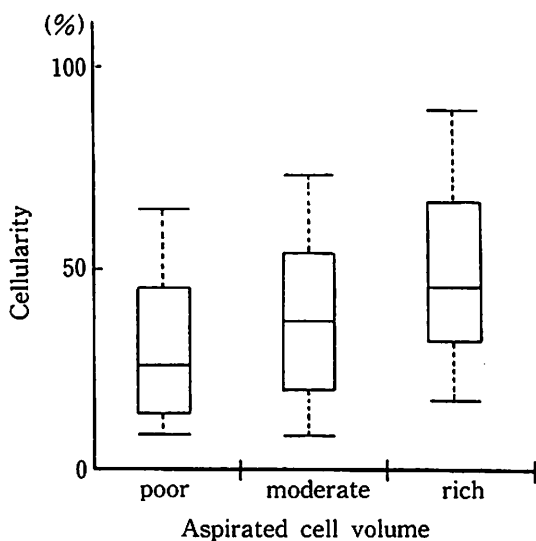


Fig. 6. Box plot; Relationship between cellularity as determined by color image analyzer (model CIA-102) and aspirated cell volume.

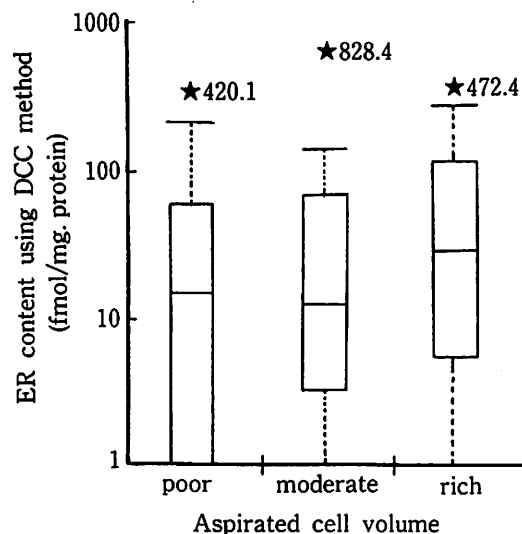


Fig. 7. Box plot; Relationship between ER content using DCC method and aspirated cell volume. ★ extreme value

ラス別スコア 0-3 および 0-2 より求めた (Table 1)。蛍光強度は、Stage の進行度が増すごとに減少し、Stage IV+再発症例群では他の各群との間において 5% 以下の危険率で有意の差を認めた。一方 DCC 法 ER 値と染色陽性率は、Stage IV+再発例で低くなっているものの、各群間に有意差を認めなかった。

C. 閉経状況別による DCC 法 ER 値と FITC-ER 法各因子の測定結果

閉経の有無による各値の変化を Table 2 に示した。いずれも閉経後の症例群で高くなっているが、特に蛍光強度および吸引細胞量で有意差を認めた ($p < 0.05$)。なお年齢別および組織型別には、各群ともに有意差を

Table 1. Comparison of results by DCC and FITC-ER methods for different clinical stages

Stage ^{a)}	No.	ER content (fmol/mg. p.)	Fluorescent ^{b)} intensity	Positive rate (%)	Aspirated cell ^{b)} volume
I	12	30.9±45.0	2.3±1.1**	34.2±25.1	1.0±0.4
II	35	45.5±72.1	2.0±1.2*	34.6±21.8	1.2±0.6
III	14	14.1±26.8	1.8±0.9*	35.1±30.2	0.9±0.6
IV+Rec. ^{c)}	8	13.2±34.8	1.0±0.7	27.4±24.2	1.1±0.5

a) : According to *The General Clinical and Pathological Record of Mammary Cancer*²⁹⁾

b) : Class score±standard deviation

c) : Rec.=recurrent breast cancer patients

*, **: Significant difference from Stage IV+Rec.

at *p<0.05, **p<0.01

Table 2. Comparison of the results by DCC and FITC-ER methods for the menopausal status

Menopause* status	No.	ER content (fmol/mg. p.)	Fluorescent intensity	Positive rate (%)	Aspirated cell volume
Premeno.	31	19.4±17.0	1.8±0.9 ^{a)}	30.8±24.3	0.9±0.6 ^{b)}
Postmeno.	37	33.2±41.8	2.4±1.0 ^{a)}	36.7±32.7	1.3±0.8 ^{b)}

*: One male breast cancer patient is excluded

a), b) : Significant difference (p<0.05)

Table 3. Estimated Regression Coefficients based on the Reweighted Least Squares method⁴⁰⁾

Variable*	Coefficient	Standard error	T-value
PR (x ₁)	-0.005	0.012	-0.432
INT. 1 (x ₂₁)	1.415	0.883	1.603
INT. 2 (x ₂₂)	1.855	0.860	2.159
INT. 3 (x ₂₃)	0.917	0.726	1.262
CELL 1 (x ₃₁)	1.079	0.773	1.396
CELL 2 (x ₃₂)	-0.255	0.520	-0.490
CONSTANT (β ₀)	-0.375	0.638	-0.587

n=69 (d. f.=62) R²=0.487 s=1.775

*: PR: positive staining rate (%), INT.: fluorescent intensity, CELL: aspirated cell volume

$$x_{21} = \begin{cases} 1; \text{INT.} \geq (\pm) \\ 0; \text{INT.} = (-) \end{cases} \quad x_{22} = \begin{cases} 1; \text{INT.} \geq (+) \\ 0; \text{INT.} \leq (+) \end{cases} \quad x_{23} = \begin{cases} 1; \text{INT.} = (\#) \\ 0; \text{INT.} < (\#) \end{cases}$$

$$x_{31} = \begin{cases} 1; \text{CELL} \geq \text{moderate} \\ 0; \text{CELL} = \text{poor} \end{cases} \quad x_{32} = \begin{cases} 1; \text{CELL} = \text{rich} \\ 0; \text{CELL} < \text{rich} \end{cases}$$

認めなかった。

D. FITC-ER 法の線形回帰分析による DCC 法 ER 値の推定 (estimated-ER)

線形回帰分析を用いた各症例の DCC 法による ER

の対数値と, FITC-ER 法において判定した染色陽性率, 蛍光強度, 吸引細胞量から重み付き最小 2 乗法によって推定した各因子の回帰係数をまとめたのが Table 3 であり, 回帰式より得られた DCC 法の ER

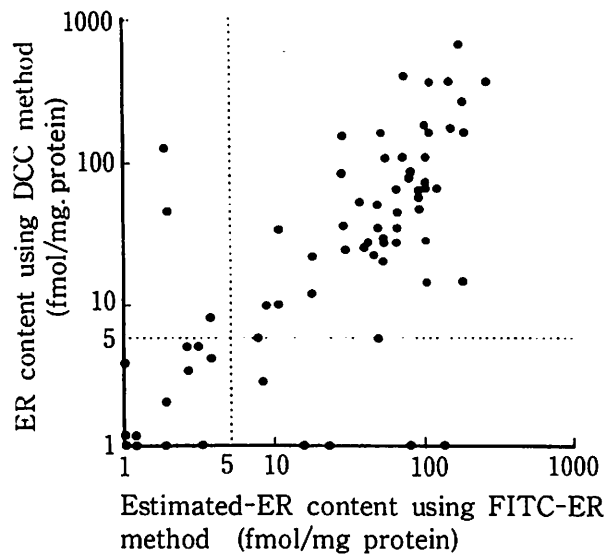


Fig. 8. Relationship between ER content measured by DCC method and estimated by FITC-ER method

に対する推定値が estimated-ER である。また Fig. 8 には, estimated-ER と DCC 法の ER 値をプロットして示した。Table 3 では FITC-ER 法における各説明因子の T 値から, DCC 法の ER 値の推定には蛍光強度, 特に(±)及び(+)の判定に影響されている事が判明した。また推定式の決定係数 (coefficient of determination= R^2) は 0.487 であったが, この推定式の有意性は F-検定により危険率 1% 以下で認められた。しかも DCC 法の ER 値の基準値 5.0 fmol/mg 蛋白に対応する, estimated-ER 値の基準値を 5.0 fmol/mg 蛋白とした場合, DCC 法の ER と estimated-ER の陽陰性判定結果の一致率は 88.4% (61/69) と良好であり, 特に DCC 法の ER に対する estimated-ER の偽陰性(false negative) は, わずか 3 例であった。また FITC-ER 法各因子を線形回帰分析による T 値の結果から検討すると, DCC 法の ER 値を FITC-ER 法で推定する場合, 特に蛍光強度の判定が最も重要であることが明らかとなった。

考 察

乳癌がホルモン依存性 (hormone dependency) の癌である事は, 古くから知られている^{11-13, 22, 28}。特に Jensen ら¹² がエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) の概念を導入してからは, 乳癌組織中の ER を測定することがその治療方針を決定する上で非常に大きな意味を持つようになった。

一方従来より臨床的に頻繁に使われている ER 測定法は, デキストラン・チャコール吸着法 (DCC 法) 又は蔗糖密度勾配法 (SDG 法) などのラジオリセプター・アッセイであった。しかしこれらの測定法によれば ER 陽性の乳癌で 50-60% に内分泌療法が有効である¹² が, ER 陰性例でも約 10% にその有効例が存在し²², まだ十分な治療効果の予測には到っていない。また DCC 法などの生化学的測定法では, 癌組織全体より抽出した細胞質分画又は核分画の蛋白質 mg 当たりの平均的結合部位数を測定するため, 当然ながら非癌成分の混入は避けられない。しかも同一癌組織内でも ER が存在する細胞と存在しない細胞が混在 (ER の heterogeneity^{1, 30}) するが, ラジオリセプター・アッセイでは組織をホモジェナイズする必要があるために, この ER の不均一性を検討する事は非常に困難であった²⁶。また組織のホモジェナイズなどによる損失を考慮して, 0.5-1.0 g 以上とかなりの検体量を必要とした³⁴。しかし早期発見により小腫瘍型の早期乳癌が増える事が予想され¹⁵, また特に治療方針を決定する上で ER の測定が必要とされる局所および遠隔再発の症例から, これだけの検体量を得る事は非常に困難な事も多い。

著者の研究の目的は, このような多量の検体を必要とする従来の ER 測定法に変わって, 迅速かつ極少量の検体量により ER 測定が可能で, しかも ER の不均一性 (heterogeneity) を判定し得る測定法の開発である。

当教室では, 昭和 55 年末より穿刺吸引細胞診 (A. B. C.) を乳癌の診断に導入して以来, 生検する事なく 90% 以上の正診率で乳癌の診断が可能となった¹⁴。そこでこの A. B. C. を診断の目的と同時に ER の測定にも応用した。

組織化学的 ER 測定に関する報告は多数見られる^{3, 8-9, 17, 19, 23, 25, 27, 35}。Mercer ら²³ は, エストラジオール (E_2) に対する抗体を使った E_2 染色により, 間接的に ER の存在を証明している。しかし細胞内に E_2 の存在を確認してもその全てが ER に結合するわけではなく²⁴, 間接的な E_2 染色法には限界がある。Dandliker ら³ は, 1-(N)-fluoresceinyl estrone thiosemicarbazone (17-FE) を使って高親和性の ER を同定する事ができたと報告した。また最近 2, 3 の研究者によって ER に対するモノクローナル抗体が発表された^{8, 9, 17}。特に Greene ら⁸ は, 抗 ER モノクローナル抗体を使った免疫組織化学法による ER についての検討から, 従来より言われた細胞質内 ER は, 核内 ER が測定段階にこぼれ出たものであろう

と報告した。しかし ER が核内に入るメカニズムが明確にされていない現時点において、彼らの仮説は一般的とは言えない。どちらが真実であるかを証明するには、更に基礎的臨床的検討が必要であろう。

一方蛍光標識エストラジオールの1つである E_2 -BSA-FITC を使った測定 (FITC-ER 法) についてもいくつかの報告がある^{19-20, 27, 32)}。Pertschuk ら³²⁾ は、凍結組織切片を使った E_2 -BSA-FITC による FITC-ER 法と DCC 法との一致率が、90%以上であったと報告している。当教室でも、Nishiki ら²⁷⁾ がすでにその有効性について報告している。

以上の種々の問題点を考えた上で、著者は穿刺吸引材料を用いた FITC-ER 法の基礎的臨床的検討を行うこととした。まず最初に E_2 -BSA-FITC の ER に対する親和性および特異性と、FITC-ER 法の反応条件を検討すべく、 E_2 依存性 ER 陽性のヒト乳癌細胞株である ZR75-1⁴⁾ を用いて基礎的検討を行った。

E_2 -BSA-FITC の ER に対する親和性に関しては、細胞質内の蛍光顆粒を確認できる最小濃度が 1×10^{-8} M であった。 E_2 -BSA-FITC を使った他の報告でも 10^{-6} M から 10^{-8} M でインキュベーションを行っている^{20, 32)}。

E_2 -BSA-FITC の各至適反応条件を決定するために、まず pH を一定として温度と反応時間の関係を検討したところ、 4°C では60-120分、室温では30分において細胞質内の蛍光顆粒を認める細胞の出現率がピークとなった。また温度が高く、反応時間が長くなるにつれて細胞質内に蛍光顆粒を認める細胞の数が減り、核内への移行 (ER の translocation^{5, 35)}) が認められた。

次に反応時間を一定にして 4°C および室温における pH の影響を検討したところ、pH 7.2-7.4 において細胞質内の蛍光陽性細胞出現率のピークが認められた。前の結果と併せて至適反応条件は pH 7.2-7.4 で、温度および反応時間が 4°C では60-120分、室温 (21°C) では30分が適当と考えられた。

E_2 -BSA-FITC の ER に対する特異性についてエストロゲン類似の DES, TAM および 17β - E_2 -6CMO-BSA と、エストロゲンとは異なるプロゲステロンおよびテストステロンにより、蛍光顕微鏡下での競合的結合阻害試験を行った。それによると E_2 -BSA-FITC の100倍量の DES や 17β - E_2 -6CMO-BSA などのエストロゲン類似の阻害剤では明らかな蛍光強度の阻害効果を認めたが、染色陽性率に関してはほとんど影響を受けなかった。一方プロゲステロンやテストステロンでは蛍光強度も染色陽性率

もほとんど阻害を見なかった。以上のことより、 E_2 -BSA-FITC は ER に特異的に結合することがわかった。特に DES は ER との親和性が高く、細胞質内にある sex hormone binding globulin (SHBG) とは結合しないため²⁴⁾、DES によって結合を阻害されたことは E_2 -BSA-FITC の ER に対する特異的結合性を示唆するものである。

E_2 -BSA-FITC の ER に対するこのような親和性および特異性について Rao ら³⁶⁾ は、 17β - E_2 -6CMO に BSA を結合しても、ER に対する親和性および特異性は E_2 と変わらなかったと報告しており、著者の結果もこれを支持するものである。更に E_2 -BSA-FITC の反応温度、pH、時間の変化による ER の核内移行を認めた事は、その多くが ER に特異的に結合する証拠と言える。一般に、ER には Type I と Type II の2種類のレセプターの存在が証明されている^{17, 31)}。しかし Type II の ER は核への移行がない事¹⁷⁾ より、その生化学的意義については未だ明確にされていない。そして Type II の ER は低親和性、高結合部位数であり、もしも E_2 -BSA-FITC が Type I よりも Type II をより強く認識しているのであれば、その殆どは核内への移行を示さずに細胞質内に留まったはずである。

以上より、FITC-ER 法に使用した E_2 -BSA-FITC は type I の ER にほぼ特異的に結合するものと考えられた。そして至適反応条件は pH 7.2-7.4 において、 4°C では60-120分、室温では30分であることが証明されたので、以後の穿刺吸引材料を用いた臨床例ではインキュベーションの条件を pH 7.2、室温30分と一定にして行った。

乳癌症例においては、臨床病期や閉経状況、年齢、組織型別などで ER 陽性率に差が見られる^{16, 18)} との報告がある。著者の検討結果では、臨床病期別に DCC 法の ER 結果にはいずれも有意の差を認めなかった。FITC-ER 法においても、染色陽性率にはそれぞれ有意の差を認めないが、蛍光強度では特に Stage IV または再発症例群と他の各群との間において、 $p < 0.05$ で有意の差を認めた。閉経に関しては閉経後の症例群で有意に強く染色された。この事は、閉経後に内因性のエストロゲンが減少してくる事実¹⁶⁾ から予測できる結果と言えよう。

FITC-ER 法の染色陽性率と DCC 法の ER 値との間には有意の相関はなかったが、染色陽性率10%を基準値とし、それ以上を ER 陽性とする、DCC 法との一致率は81.2% (56/69) とかなり良い成績が得られた。

次に蛍光強度には、その結果に正規分布的な傾向がないため、各クラス間ごとの有意差検定は行わなかったが、蛍光強度と DCC 法の ER 値との間にはかなり強い相関が認められた。

癌細胞密度そのものは、穿刺吸引材料だけでは測定不可能であるが、画像解析装置を使った癌細胞密度の結果と A. B. C. によって得られた吸引細胞量とを比較した結果、癌細胞密度と吸引細胞量は正の相関を認めた。更に硬癌や未分化癌で吸引材料が少ないとする報告^{42, 45)}があり、吸引細胞量は乳癌の悪性度や予後を反映している可能性もあるため、吸引細胞量が各組織の癌細胞密度をある程度反映しているものと考えた。

これまでも穿刺吸引材料による ER 測定について極くわずかの報告^{2, 40)}があるが、例えば Silfverswald⁴⁰⁾は吸引材料を ³H-estradiol で反応させ、isoelectric focusing を使って ER 測定に成功したと報告している。しかし症例も少なく、以後の追試もなされていない。また組織材料を使った半定量的 ER 測定の試みも幾つか報告されてはいる^{9, 33, 37)}が、いずれも適当とは言えない。何故なら、例えば Pertschuk³³⁾は染色陽性率と顕微鏡下に計測した癌細胞密度及び一定のレベル値で染色強度を分け、それぞれを掛け合わせた値を半定量的な ER としている。しかしこれではそれぞれの数値の次元を充分には考慮したのではなく、しかも ER 値の推定に対する寄与の度合いも検討されていない。

そこで著者は DCC 法による ER 値を FITC-ER 法の各説明因子から、それぞれの寄与の度合いを考慮して推定するために、研究方法において示した線形回帰式^{39, 43)}を用いて行った。この回帰式の有意性は、F-検定により危険率 1% 以下で認められた。特にその T 値の結果から、DCC 法の ER 値を推定するには、FITC-ER 法の蛍光強度が最も重要な因子であることが判った。また DCC 法の ER 値 (Bmax) の基準値 5.0 fmol/mg 蛋白に従い、estimated-ER の基準値を 5.0 fmol/mg 蛋白としてそれ以上を ER 陽性とする、DCC 法による ER 値と estimated-ER の一致率は 88.4% (61/69) と非常によい成績が得られた。

以上の如く A. B. C. による穿刺吸引材料を用いた FITC-ER 法は、手術前の症例でも注射針により穿刺吸引して得た極少量のサンプルで ER 測定が可能であり、迅速かつ何回でも測定可能である。従って早期乳癌や他臓器癌の ER 測定や再発乳癌の ER の経時的变化を見る上で、今後更に臨床的に活用されて行くものと考えられる。また個々の症例の蛍光強度あるいは染色陽性率の両面から、それぞれの因子を別個に検

討できるし、特に本法と EGF その他の単クローン抗体などを使った検査法との組み合わせ⁶⁾により、細胞診レベルで更に確実な治療効果や予後の推定が可能となるであろう。

[本論文の要旨の一部は、第85回日本外科学会総会 (1985年4月仙台市)、第86回日本外科学会総会 (1986年4月東京都)、第87回日本外科学会総会 (1987年4月東京都)、14th International Cancer Congress (21-27th, August, 1986, Budapest, Hungary) 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・土肥雪彦教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究に対して直接御指導、御教示を頂きました広島大学医学部第2外科学教室・西亀正之助教授、松山敏哉講師、山根基博士、神田千穂女史、及び原医研誘発癌研究部門・伊藤明弘教授、渡邊教光助教授、放射能影響研究所・秋山實利博士、中村典博士に心より感謝いたします。並びに本研究に御協力、御援助を戴いた第2外科学教室の諸兄にあわせて謝意を表します。

参 考 文 献

1. 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.
2. Curtin, C. T., Pertschuk, L. P. and Mitchell, V. 1981. A fluorescent method of measuring estrogen receptors in cytologic materials. *Am. Soc. Cytol. (Abst.) Acta Cytol.* 25:450.
3. 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.
4. 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.
5. Eriksson, H. A., Hardin, J. W., Markaverich, B., Upchurch, S. and Clark, J. H. 1980. Estrogen binding in the

- rat uterus; Heterogeneity of sites and relation to uterotrophic response. *J. Steroid Biochem.* 12:121-130.
6. Fitzpatrick, S., Brightwell, J., Wittliff, J. L., Barrows, G. H. and Schults, G. S. 1984. Epidermal growth factor binding breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterin receptor levels. *Cancer Res.* 44:3448-3453.
 7. Guazzi, A., Bozzetti, C., Riva, I., Zaffe, D. and Cocconi, G. 1985. Relationship between estrogen receptor concentration and cytomorphometry in breast cancer. *Cancer* 56:1972-1976.
 8. Greene, G. L., Nolan, C., Engler, J. P. and Jensen, E. V. 1980. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:5115-5119.
 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. Hochberg, R. B. 1980. Interaction of 16α -[^{125}I]iodoestradiol with estrogen receptor and other steroid-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:328-332.
 11. Jensen, E. V. 1975. Estrogen receptors in hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res.* 35:3362-3364.
 12. Jensen, E. V. and DeSombre, E. R. 1973. Estrogen-receptor interaction; Estrogenic hormones effect transformation of specific receptor proteins to a biochemically functional form. *Science* 182:126-134.
 13. Johnson, Jr. R. B., Nakamura, R. M. and Libby, R. M. 1975. Simplified scatchard-plot assay for estrogen receptor in human breast tumor. *Clin. Chem.* 21:1725-1730.
 14. 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.
 15. Kataoka, T., Nishiki, M., Yamane, M., Kushiro, J., Fujii, Y., Matsuyama, T. and Dohi, K. 1986. Improved in early detection of breast cancer by combining aspiration biopsy cytology and xeromammography. *Hiroshima J. Med. Sci.* 35:245-251.
 16. King, R. J. B. 1981. Analysis of estradiol and progesteron receptors in early and advanced breast tumors. *Cancer* 46:2818-2821.
 17. King, W. J. and Greene, G. L. 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307:745-747.
 18. Kute, T. E., Muss, H. B., Anderson, D., Crumb, K., Miller, B., Burns, D. and Dube, L. A. 1981. Relationship of steroid receptor, cell kinetics and clinical status in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 41:3524-3529.
 19. Lee, S. H. 1978. Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 70:197-203.
 20. Lee, S. H. 1979. Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer* 44:1-12.
 21. Mason, B. H., Holdaway, I. M., Mullins, P. R., Yee, L. H. and Kay, R. G. 1983. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res.* 43:2985-2990.
 22. McGuire, W. L., Horwitz, K. B., Zava, D. T., Garola, R. E. and Chamness, G. C. 1978. Hormones in breast cancer: Update 1978. *Metabolism.* 27:487-501.
 23. Mercer, W. D., Lippman, M. E., Wahl, T. M., Carlson, C. A., Wahl, D. A., Lezotte, D. and Teague, P. O. 1980. The use of immunocytochemical techniques for the detection of steroid hormones in breast cancer cells. *Cancer* 46:2859-2868.
 24. Murayama, Y., Utsunomiya, J. and Asano, K. 1977. Sex hormone-binding globulin predicts response of breast cancer to hormone therapy. *Lancet* 2:1356.
 25. 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.
 26. van Netten, J. P., Algard, T., Coy, P., Carlyle, S. J., Brigden, M. L., Thornton, K. R., Peter, S. Fraser, T. and To, M. P. 1985. Heterogenous estrogen receptor levels detected via multiple microsamples from individual breast cancers. *Cancer* 56:2019-2024.
 27. Nishiki, M., Amano, K., Yamane, M., Okumichi, T. and Ezaki, H. 1984. Estrogen receptors in human breast cancer detected by the fluorescent estradiol histochemically and dextran coated charcoal techniques. *Jpn. J. Surg.* 14:459-464.
 28. Nomura, Y., Tashiro, H. and Shinozuka, K. 1985. Changes of steroid hormone receptor content by chemotherapy and/or endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 55:

- 546-551.
29. 乳癌研究会(編): 1986. 臨床・病理 乳癌取り扱い規約. 第8版. 金原出版, 東京.
 30. **Osborne, C. K.** 1985. Heterogeneity in hormone receptor status in primary and metastatic breast cancer. *Seminars in Oncology* 12: 317-326.
 31. **Panco, W. B., Watson, C. S. and Clark, J., H.** 1981. The presence of a second, specific estrogen binding site in human breast cancer. *J. Steroid Biochem.* 14:1311-1316.
 32. **Pertschuk, L. P., Gaetjens, E., Carter, A. C., Brigati, D. J., Kim, D. S. and Fealey, T. E.** 1979. An improved histochemical method for detection of estrogen receptors in mammary cancer: Comparison with biochemical assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 71:504-508.
 33. **Pertschuk, L. P., Tobin, E. H. and Carter, A. C.** 1982. Immunohistologic and histochemical methods for detection of steroid binding in breast cancer: A reappraisal. *Breast Cancer Res. Treat.* 1:297-314.
 34. **Petterson, K. S. I., Vanharanta, R. M. and Soderholm, Jr-M.** 1985. Pitfalls in the dextran-coated charcoal assay of estrogen receptors in breast cancer tissue. *J. Steroid Biochem.* 22:39-45.
 35. **Raam, S., Richardson, G. S., Bradley, F., McLaughlin, 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.
 36. **Rao, B. R., Patrick, T. B. and Sweet, F.** 1980. Steroid-albumin conjugate interaction with steroid-binding proteins. *Endocrinology* 106:356-362.
 37. **Rodbard, D., Munson, P. J. and Thakur, A. K.** 1980. Quantitative characterization of hormone receptors. *Cancer* 46:2907-2918.
 38. **Roos, W., Fabbro, D., Kung, W., Costa, S. D. and Eppenberger, U.** 1986. Correlation between hormone dependency and the regulation of epidermal growth factor receptor by tumor promoters in human mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 991-995.
 39. **Rousseeuw, P. J.** 1984. Least median of squares regression. *J. Am. Statistical Assoc.* 871-880.
 40. **Silfversward, C. and Humla, S.** 1980. Estrogen receptor analysis on needle aspirates from human mammary carcinoma. *Acta Cytol.* 24:54-57.
 41. **Takeda, T., Takana, K., Isono, S., Oshiba, M., Yoshida, K., Ishioka, K. and Sato, E.** 1977. Studies on cytologic characteristics of mammary aspiration smears based on histological types. *Acta Cytol.* 21: 424-428.
 42. **Tukey, J. W.** 1977. *Exploratory data analysis.* Addison-Wesley Pub. Co. Inc., USA.
 43. **Weisbergs, S.** 1985. *Applied linear regression.* 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 44. **Zajdela, A., Ghossein, N. A., Pilleron, J. and Ennuyer, A.** 1975. The value of aspiration cytology in the diagnosis of breast cancer; Experience at the Foundation Curie. *Cancer* 35:499-506.

Fluorocytochemical Assay of Estrogen Receptors in Breast Cancer Cells

Part I. Measurement of estrogen receptors using aspiration biopsy cytology

Tsuyoshi KATAOKA

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

Estrogen receptors (ER) were detected on the breast cancer cell line ZR75-1 and on the cells in aspiration biopsies (FITC-ER method) using fluorescence-conjugated estradiol (E_2 -BSA-FITC). A clinical utility study was undertaken comparing the FITC-ER method to the dextran-coated charcoal method (DCC method). The results showed that: 1) Estrogen analogues, DES or E_2 -6CMO-BSA, competitively inhibited the fluorescent intensity in the FITC-ER method; 2) Using the clinical materials, the fluorescent intensity was found to be correlated, among the parameters examined, with the value of log ER content using DCC method. On the other hand, the rate of positive staining was found not to be clearly correlated with log ER content using DCC method, but rather to reflect a heterogeneity of cellular expression of ER; 3) A linear regression analysis between parameters obtained from the FITC-ER method and the log ER content using DCC method revealed that the ER content is mainly related to the degree of fluorescent intensity in the FITC-ER method; 4) This method is capable of measuring ER levels in small samples obtained by aspiration and thus, is considered useful for diagnostic use in recurrent breast cancer and early breast cancer. Since this method can also detect heterogeneity of cellular expression of ER, it may have a possible use in prediction of drug response in breast cancer patients.