日本婦人乳癌組織の estrogen receptor について

東京医科歯科大学産婦人科学教室

(指導者: 斉藤 幹教授)

志 田 多 果 夫

Estrogen receptors in Japanese female breast cancer tissue

Takao SHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical and
Dental University, School of Medicine.

(Director: Prof. Motoi Saito)

There is a great difference in breast cancer incidence between Japanese and American women. Jensen et al have determined estrogen receptors on American female breast cancer cytosols mainly by the method of sucrose density gradients. In the present paper, estrogen receptors in forty-eight Japanese female breast cancer cytosols from forty-four patients were determined by the sucrose density gradients, and the results were compared to those by Jensen et al. The influence of age, endocrine circumstances, pathological and hereditary conditions on the occurrence of estrogen receptors was also described.

1. In the present study, the occurrence of estrogen receptors was positive in 27%. Jensen reported a 46% occurrence. The incidence of breast cancer is lower in Japan than in the United States. This lower incidence can not be explained by the lower percentage of estrogen receptor positive cases.

2. More estrogen receptors were present in postmenopausal women than in premenopausal women, in papillotubular carcinomas than in scirrhus carcinomas, and in artificial feeding than in breast or mixed feeding.

Endocrine therapy may be choosen for Clinical use, according to estrogen receptors determination. Endocrine therapy is effective in positive cases.

はじめに

19世紀後半に Schinzinger²⁹⁾ が始めて乳癌と卵巣の関連性を予測し、卵巣摘除が乳癌の治療に有効であることを示唆して以来、種々のホルモン療法が乳癌患者に応用されてきた。また同時に乳癌の発生に及ぼすホルモンの影響についても、多くの動物実験がおこなわれてきた^{16) 25) 30) 31)}。それらの結果より、乳癌とホルモンとの間にはある種の密接な関係があることは明白であるが不明な点も多い。

現在乳癌の estrogen に対する依存性を estrogen receptor の検索により推測し、その結果を臨床に応

用しようとする試みがおこなわれている^{6) 17) 19) 36)}. Estrogen receptor の検索方法としては、蔗糖濃度勾配遠心法³³⁾ (sucrose density gradient ultracentrifugation, 以下 DG と略す), dextran coated charcoal 法¹⁵⁾, filter assay 法²⁸⁾, agargel electrophoresis 法³⁴⁾, chromatography 法²⁴⁾, incubation 法¹⁰⁾ などが利用されている。

Jensen⁴⁾ らは米国婦人の乳癌組織中の estrogen receptor の有無を DG により検索し、腫瘍組織が receptor を有する患者においてはホルモン療法が有効である率が高く、腫瘍組織が receptor を持たない患者においてはホルモン療法無効例が多いと報告している。著者は Jensen らと同一実験方法および実験条件を用い、日本婦人乳癌組織中の estrogen receptor の有無を検索し、Jensen らが報告した米国婦人乳癌における成績との比較を試みた。すなわち本邦婦人の乳癌組織が estrogen receptor を含有する頻度を求め、米国婦人乳癌組織のその頻度とを比較した。さらに日米両国婦人の乳癌発生率と、estrogen receptor との間の関連性の有無について検討した。なお本論文での estrogen receptor の有無とは DG などにより receptor が検出されたか否かを意味する。

次に患者年齢、初潮年齢、月経、病理組織像、転移の有無、遺伝関係、授乳方法などと estrogen receptor の出現率との関連について検討を加えた。

さらに乳癌組織中の estrogen receptor の存在がホルモン療法の適応を選定するにあたり実際に価値があるか否かについても論じてみた。

実験材料および方法

1) 使用試薬

2, 4, 6, 7-tritiated-17 β -estradiol (specific activity 99 Ci/mmol, NEN), saccharose (density gradient grade, Nakarai), CN-55, 945-27³⁾ ([1-(2-[p-(α -[p-methoxyphenyl]- β -nitrostyryl) phenoxy] ethyl) pyrimidine, monocrate], Park Davis), tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck), dithiothreitol²¹⁾ (Sigma), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Nakarai), potassium chloride (Nakarai), hydrochloric acid (Nakarai), toluene (Uenokagaku), Triton X-100 (BDH), 2, 5-diphenyloxazole (PPO, Eastman), 2, 2'-p-phenylenebis-(5-phenyloxazole) (POPOP, Eastman).

2) 使用器具

55 PA 日立分離用超遠心機, swing rotor RPS 50 (Hitachi), 遠心機用 butylate tube (1.3 $\times$ 5.0 cm, Hitachi), Potter type glass homogenizer, liquid scintillation spectrometer (Tri Carb Model 3385, Packard), Autopulverizer (Thermovac).

3) 実験対象

44人の乳癌手術患者より腫瘍組織を48例切除し検索した。48例中、原発巣は41例で転移巣は7例である。すべて組織学的に癌を確認した症例である。

4) 実験方法

摘出した乳癌標本から直ちに腫瘍部分を約 1 gm 切除し氷をつめた断熱容器中に入れ、出来るだけすみやかに低温室まで運搬する。低温室内で腫瘍組織を 400~600 mg の小片に分割し、-20℃のストッカー中に保存する。次に以下の操作を行うがこれらはすべて4℃の低温室中で実施する。

① 上清の作製

i) ストッカーよりとりだした 400~600 mg の乳癌組織を液体窒素で凍結し、Autopulverizer を用いて粉碎する。

ii) その粉末を homogenizer にうつし、組織重量の4倍量の 0.01 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4), 0.0005 M dithiothreitol を加え、氷中にてホモジナイズする。本操作中の温度上昇を防ぐため、10秒ホモジナイズした後50秒の休みをおき、これを3回くり返す。

iii) ホモジナイズしたものを、冷却した遠心機用 butylate tube にうつし 130,580 $\times$ g, 4℃で30分間遠

沈し、最上部の脂肪層を除いた後、上清と沈渣とに分離する。このようにして作製した上清部を実験に使用する。

② estradiol-receptor complex の生成

i) 冷却した2本の小試験管を用意し、その1本に 0.01 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4), 0.0005 M dithiothreitol を 0.1 ml, 他の1本に anti-estrogen 剤である CN-55, 945-27 10^{-6} M 0.1 ml を入れた後、同一腫瘍の上清を各々の小試験管に 0.3 ml ずつ添加しよく攪拌する。0℃10分間 incubation した後それぞれに 2.5×10^{-9} M 2,4,6,7-tritiated- 17β -estradiol (E*-2 と略す) 溶液を 0.1 ml ずつ加え混和する。

ii) 遠心機用 tube に、0.01 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4), 0.001 M EDTA, 0.01 M KCl を溶媒とした5~20%蔗糖濃度勾配溶液 4.8 ml を2本作製する。上述 i) で2本の小試験管に作製した溶液より各々 0.2 ml をとり、それぞれの蔗糖濃度勾配溶液上に静かに重層し、130,580×g, 4℃で15時間遠沈する。

③ 測定

超遠心終了後 tube を fractionator に収容し、底部に静かに針を刺して小孔を作り、滴下溶液3滴を1 fraction としてバイアルに直接採取する。各々のバイアルに toluene 1,500 ml, Triton X-100 500 ml, PPO 8 gm, POPOP 100 mg, H₂O 80 ml よりなる scintillation 液 10 ml を加え liquid scintillation spectrometer で各 fraction の放射能を測定する。

成 績

1) 判定基準

測定されたデータより各 fraction の DPM (disintegration per minute) を求め、それが全体の DPM にしめる百分率を計算した。縦軸にその百分率を、横軸に fraction number をとり、グラフ上に各計算値を打点し曲線を作製した。この際同一症例について anti-estrogen 剤 CN-55, 945-27 を添加した場合と、添加しない場合との曲線を同一グラフ上に描き、両者の比較により検体中の estrogen receptor の有無を判定した。Estrogen receptor 陽性例、陰性例および境界例の代表症例を Fig. 1 に示した。

Fig. 1. Typical sedimentation patterns of E*-2 receptor complexes in sucrose density gradients from human breast cancer cytosols. Dotted lines show the absence of anti-estrogen CN-55, 945-27 in cytosols. Solid lines show the presence of anti-estrogen in cytosols. A: Positive case. Eight S complex disappears in the presence of anti-estrogen. B: Negative case. No complex appears in the presence or absence of anti-estrogen. C: Borderline case. Slight 8 S elevation disappears in the presence of anti-estrogen.

Fig. 1 (A)の如く陽性例では 8 S の位置に細胞質 receptor と結合した E*-2 が peak として認められた⁸⁾¹⁴⁾⁸⁵⁾. この peak は anti-estrogen 剤 CN-55, 945-27 の添加により消失した. Receptor と結合しない E*-2 は蔗糖濃度勾配溶液上部に残存し, fraction number の後半すなわち図の右側で高い放射能の値を示している. Fig. 1 (B)の如く陰性例では 8 S の位置になんらの peak を認めず, CN-55, 945-27 の添加によっても曲線に変化はあらわれなかった. CN-55, 945-27 の添加により曲線上に多少の差は生じるが明確な peak を示さないものは, 陽性, 陰性の判定が困難であり, したがって境界例とした (Fig. 1 (C)).

Fig. 2. Sedimentation patterns of E*-2 estrogen binding components in sucrose density gradients from human breast cancer cytosol and serum from woman. A : Dotted and solid lines show 4.6 S complexes from human breast cancer cytosol in the absence and presence of anti-estrogen CN-55, 945-27. B : Dotted and solid lines show 4.6 S complexes from human serum in the absence and presence of anti-estrogen. It is postulated that 4.6 S complexes which appear in A are originated from serum components of cytosol. Inhibitor (anti-estrogen) shows no effect.

なお Fig. 2 (A)に示す如く 4.6 S の位置に peak を示し, CN-55, 945-27 の添加により影響を受けない例があった. これは標本組織中に含まれていた血液中の蛋白と E*-2 とが結合したものと考えられる¹³⁾⁸⁵⁾. Fig. 2 (B)では, 人血清中には estrogen と結合し 4.6 S に peak を示す蛋白が存在し, これは CN-55, 945-27 の添加により影響を受けないことを示した.

グラフ上より estrogen receptor の有無を判定すると並行して, Lowry 法¹⁸⁾により検体上清中の蛋白質量を測定した. これより上清中の蛋白あたり結合する estradiol の量を求め, グラフよりえられた結果と比較検討した. Fig. 1 (A)の如く明らかな peak を示す陽性例では, 上清中の蛋白あたり結合する estradiol の量は 60 fmoles/mg protein 以上のことが多かった. 結合能が 30~50 fmoles/mg protein 程度の例では, 上清反応に明確な peak は認められなかったが, CN-55, 945-27 の添加によりグラフ上で明白な差が認められた. これらは陽性に算入した. 境界例と判定した 2 例では結合能は低く, 17 fmoles/mg protein と 23 fmoles/mg protein であった. 陰性例では 10 fmoles/mg protein 以下が多かった.

2) 結 果

44例のうち estrogen receptor 陽性例は12例 (27%), 陰性例は30例 (68%), 境界例は2例 (5%) であった。

陽性例, 陰性例, 境界例について, 手術時年齢, 初潮年齢, 月経, 授乳様式, 遺伝, 病理組織像などとの関係を Table 1 に示した。

Table 1. The presence of estrogen receptors, related with age, endocrine circumstances, and with pathological and hereditary conditions.

	Positive	Negative	Borderline	Total
Number of cases	12(27%)	30(68%)	2(5%)	44
Average age	52.1 (37—69)	49.8 (29—72)	38.5 (38—39)	
Average age of menarche	15.3 (11—20)	14.8 (12—18)	15.5 (15—16)	
Menstruation				
{Premenopause	4(17%)	18(75%)	2(8%)	24
{Postmenopause	8(40%)	12(60%)	0	20
Feeding method*				
{Breast feeding	5(29%)	11(65%)	1(6%)	17
{Mixed feeding	3(25%)	9(75%)	0	12
{Artificial feeding	2(67%)	1(33%)	0	3
Pathological classification				
{Papillotubular carcinomas	0	3(100%)	0	3
{Medullary tubular carcinomas	6(46%)	6(46%)	1(8%)	13
{Scirrhou carcinomas	3(17%)	15(83%)	0	18
Metastases				
{With metastases	7(35%)	13(65%)	0	20
{Without metastases	3(19%)	12(75%)	1(6%)	16
Hereditary conditions**				
{Positive	3(19%)	12(75%)	1(6%)	16
{Negative	9(32%)	18(64%)	1(4%)	28

* Multipara who experienced two or three kinds of feedings were included in mixed feeding group.

** Hereditary conditions concerning all kinds of malignant tumors were investigated on patients' parents, brothers, sisters, grandparents, uncles and aunts.

3) 米国婦人乳癌における成績

Jensen⁴⁾らが主に DG を用いて著者とほぼ同一方法により検索した乳癌組織中の estrogen receptor の

Table 2. Occurrence of estrogen receptors in American female breast cancers*.
(From Jensen, E.V. et al, Cancer Chemother. Rep. 58: 111, 1974)

	Total	Positive	Borderline	Negative	Mixed**
Primary tumors	251	116(46%)	21(8%)	114(46%)	
{Without metastases	206	94(45%)	16(8%)	96(47%)	
{With metastases	45	22(49%)	5(11%)	18(40%)	
Metastatic tumors	142	53(37%)	9(7%)	77(54%)	3(2%)
Average age	61 (30~85)		54 (28~86)		

* Presence of receptor determined by estradiol uptake in tumor slices and/or sedimentation peak on sucrose gradient centrifugation of cytosol treated with tritiated estradiol in the presence and absence of a specific binding inhibitor.

** Patients from whom both positive and negative specimens were obtained.

Table 3. Occurrence of estrogen receptors in Japanese female breast cancers*.

	Total	Positive	Borderline	Negative
Primary tumors	41	9(22%)	2(5%)	30(73%)
{Without metastases	11	3(27%)	1(9%)	7(64%)
{With metastases	17	4(24%)	0	13(76%)
Metastatic tumors	7	3(43%)		4(57%)
Average age	52 (37~69)		50 (29~72)	

* Presence of receptor determined by sedimentation peak on sucrose gradient centrifugation of cytosol treated with tritiated estradiol in the presence and absence of a specific binding inhibitor.

出現頻度、転移の有無との関係および転移巣における estrogen receptor の頻度に関する成績を Table 2 に示した。なお参考のため著者の DG による成績を同一分類様式に従って区分したものを Table 3 に示した。

4) 結果の検討

Jensen らによると 米国婦人乳癌における estrogen receptor 陽性頻度は、原発巣で46%であり、陽性対陰性の比はほぼ1対1である。著者の本邦婦人における原発巣での成績では陽性は米国婦人の約1/2の22%であり、陽性対陰性の比はほぼ1対3である。

転移巣における陽性率は、米国婦人では37%、本邦婦人では43%である。すなわち米国婦人では原発巣における陽性率の方が転移巣よりやや高率であるが、本邦婦人では逆に転移巣の方が陽性率が高い。しかし一般的には、原発巣と転移巣とは同一患者においては同じ反応を示し、このことは Jensen らも確認している。ただ原発巣と転移巣での receptor 出現頻度が異なることは、両者間において receptor 存在の逆転がありうるのかもしれない。また Jensen らの報告によると Table 2 に mixed として示された症例の如く、同一患者における転移巣がその部位により receptor を含有したりあるいは欠いたりすることがあることも示されている。腫瘍の蔓延、すなわち転移を有するか否かということは、本質的には receptor の陽性率と無関係と考えられる。これらのことは Table 2 から明らかであるが、著者の結果でも同じ傾向が認められた。

米国婦人乳癌においてもまた本邦婦人乳癌においても、estrogen receptor 陽性例において平均年齢が高い。Table 1 の月経との関係からも明らかな通り、閉経後乳癌組織の方が receptor 陽性率が高い^{15), 35)}。すなわち高年齢者の乳癌組織に estrogen receptor の出現が多いと言えよう。また病理組織学的には、髄様腺管癌において陽性率が高かった。しかし病理所見と estrogen receptor との関連については否定的な報告もある。注目されることは授乳方法と receptor との関係で、人工栄養を用いた婦人でその陽性率が高い。

実験成績を χ^2 検定により推計学的に処理した。その結果では、米国婦人乳癌原発巣の estrogen receptor 陽性率は、0.05%以下の危険率で、日本婦人乳癌組織の陽性率より高い。しかし月経、病理組織像、授乳方法などと receptor 陽性率との間には有意差は認められない。Fisher の直接確率計算によると、危険率 10.7%で閉経後乳癌組織の方が閉経前に比べ陽性率が高く、13.0%の危険率で乳頭腺管癌と髄様腺管癌との合計群の方が硬癌より receptor 陽性率が高い。より多くの症例について検討を加えればもっとはっきりした結論がひきだせるであろう。

考 案

Lacassagne¹⁶⁾ の報告以来、乳癌の発生・発育と receptor との間には密接な関係があると考えられてきている。Estrogen の標的組織、たとえば子宮⁸⁾、乳腺^{24), 27)}、下垂体^{5), 11), 26)}、腔³²⁾などに estrogen receptor が存在することが最近明らかにされ、estrogen 作用の mechanism の一端が説明されている^{2), 12), 22), 23)}。乳癌組織中の estrogen receptor を測定することは、したがって乳癌と estrogen との関係を追求する上で極めて興味ある問題であろう。

乳癌組織中の *estrogen receptor* 測定は実地臨床面での応用の可能性も考えられる。乳癌の治療法としてのホルモン療法は有望ではあるが根治手術および放射線療法のように確立された治療法とはいいがたく、またその効果についても疑問がないわけではない。厳密な意味において、*estrogen receptor* を有するものは *estrogen* 依存性であるとは断定できないが、一般には同じものと考えてよいであろう。したがって乳癌組織の *estrogen* 結合能を調べ、これが高い場合には体内のあらゆる *estrogen* 産生源を除去することが合理的と思われる。実際的にも乳癌組織中の *estrogen receptor* の検索成績より、卵巣摘除、副腎摘除、下垂体摘除などを行い治療面での好結果を報告しているものもある⁴⁾⁶⁾。Leung¹⁷⁾らが乳癌患者に外科的ホルモン療法を施した結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より明らかな如く腫瘍組織が *estrogen receptor* 陽性の患者に対し外科的ホルモン療法、すなわち *estrogen* 産生器官(卵巣および副腎)の摘除はかなり有効であり、*receptor* 陰性の患者に対しては無効のことが多い。Fig. 3 の *mixed estrogen receptor value*

Fig. 3. Response of patients to endocrine ablation grouped by positive, mixed, and negative *estrogen receptor* values. CR, complete response; PR, partial response; NC, no change; P, progression. (From Leung, B.S., Krippaehne, W.W. and Fletcher, W.S. Surg. Gynecol. & Obstet., 139: 525, 1974)

とは、Jensen らが用いたのと同義語である。

病理組織学的考察を加味すると、一般に硬癌は髄様腺管癌や乳頭腺管癌よりも臨床的に予後が不良である。すなわち悪性度が高いとされている。また Ackerman & del Regato¹¹⁾は乳癌を Table 4 の如く分類し、未分化細胞より構成される腫瘍は分化した細胞腫瘍よりも悪性度が高いとしている。Estrogen receptor

Table 4. Modified Törnberg's classification of mammary carcinoma. (From Ackerman, L.V., Regato, J.A., Cancer: Diagnosis, Treatment and Prognosis. 4th ed. 1970, 837, C.V. Mosby Company, St. Louis)

- Type I: Non metastasizing (not invasive)
 - 1 Intraductal (comedo) carcinoma without stromal invasion
- Type II: Rarely metastasizing (always invasive)
 - 1 Pure extracellular mucinous or colloid carcinomas
 - 2 Medullary carcinomas with lymphocytic infiltration
 - 3 Well-differentiated carcinomas (include papillary carcinomas)
- Type III: Moderately metastasizing (always invasive)
 - 1 Adenocarcinoma
 - 2 Intraductal carcinoma with stromal invasion
- Type IV: Highly metastasizing (always invasive)
 - 1 Undifferentiated carcinoma

を有する乳腺腫瘍は分化の程度が高く、receptor の少ない腫瘍は分化の程度が低いと仮定すれば、estrogen receptor を有する腫瘍の方が悪性度が低いともいえよう。前述した如く著者の検索成績では、髄様腺管癌と乳頭腺管癌との合計群の方が硬癌より receptor 陽性率が高かった。閉経後婦人の乳癌において receptor 陽性率が高い理由は不明である。閉経後には内因性 estrogen の著明な減少がみられるが、receptor の存在を estrogen 分泌低下と関連づけて考えるよりは、腫瘍自体の本質的性状によるものと考えの方が合理的であろう⁷⁾。

本論文においてとくに問題とした一つの点は、米国および本邦婦人乳癌の estrogen receptor 頻度の比較である。著者はしたがって出来る限り Jensen らと同一実験条件および実験方法を用いた。しかし実際にはその設備、器具、試薬の性状などに差があり、両者の検索成績が完全に合致するであろうかという点で全く疑問がないわけではない。この疑問を解消するために同一検体を Jensen およびわれわれの研究室でそれぞれ測定してみたが、その結果からではこの問題は否定してよいと考える。

日米両国婦人乳癌発生率には大きな差が存在する。日本および米国における乳腺悪性腫瘍による死亡率を Fig. 4 に示す²⁰⁾。また既述した如く estrogen receptor 陽性率にも明白な差が存在する。この両者の関連性について結論を下すにたる資料をわれわれは未だ保有していない。

実験手技上の問題として、堅固な癌組織がどの程度ホモジナイズされているかということ、および検体組織の保存期間が挙げられる。ホモジナイズに関しては、使用したすべての上清の蛋白質量をLowry

Fig. 4. Trends in age-adjusted death rates for malignant neoplasm of breast (female), 1950-1951 to 1962-1963. (From McDivitt, R.W., Stewart, F.W. and Berg, J.W., Tumors of the Breast, 1968, 11, AFIP Washington D.C.)

Fig. 5. Influence of storage days at -20°C on sedimentation patterns of E^*-2 receptor complexes in sucrose density gradients from human breast cancer cytosols. Thick line : 24 days storage. Thin line : 41 days storage. There shows little influence.

法により求め確認をおこなった。全例とも5.9~10.9 mg/ml の範囲内であり, 7.2 mg/ml の例でも著名な peak (receptor 結合 E*-2)を認めた。したがって estrogen receptor の検索に必要なホモジナイズは充分できていると考えられた。

保存期間に関しては, receptor 陽性例でもっとも長期間, 腫瘍のままで-20°Cのストッカー中に保存したのは28日間であった。腫瘍を24日間ストッカー中に保存し, receptor 検索後その上清をさらに17日間(合計41日間)ストッカーに保存し, 再びreceptor を検索した例を Fig. 5 に示した。すなわち41日間保存後でも明らかな peak が認められ結合能は 67 fmoles/mg protein であった。同一標本の24日間保存後の結合能は 82 fmoles/mg protein で, estrogen 結合能がとくに低下している傾向はみられなかった。したがって estrogen receptor の DG による検索には, -20°Cのストッカー中で約1カ月保存した標本も充分使用できると思われる。しかし境界例ではその間に receptor が消失する可能性もあり, なるべく新鮮な腫瘍を使用するのが望ましいことはいうまでもない。

最後にこの実験指導ならびに御校閲を賜った東京医科歯科大学産婦人科斉藤幹教授, ならびに諸々の御助力をいただいた Chicago 大学 Jensen 教授, 東京医科歯科大学産婦人科岡本良平博士, 川島利哉博士に深謝致します。なお乳癌組織を提供くださった癌研究所の久野敬二郎博士に深く感謝いたします。

- 1) Ackerman, L.V., & del Regato, J.A. : "Cancer" Diagnosis Treatment and Prognosis, C.V. Mosby Company, St. Louis, 1970 p. 837-838.
- 2) Alberga, A., Massol, N., Raymond, J.-P., & Baulien, E.-E. "Estradiol Binding of Exceptionally High Affinity by a Nonhistone Chromatin Protein Fraction", *Biochemistry*, 10, 3835-3843 (1971).
- 3) Callantine, M.R., Humphery, R.R., Lee, S.L., Windsor, B.L., Schottin, N.H., & O'Brien, O.P. "Action of an Estrogen Antagonist on Reproductive Mechanisms in the Rat", *Endocrinology*, 79, 153-167 (1966).
- 4) DeSombre, E.R., Smith, S., Block, G.E., Ferguson, D.J., & Jensen, E.V. "Prediction of Breast Cancer Response to Endocrine Therapy", *Cancer Chemotherapy Rep.*, 58, 111-117 (1974).
- 5) Eisenfeld, A.J., & Axelrod, J. "Effect of Steroid Hormones, Ovariectomy, Estrogen Pretreatment, Sex and Immaturity on the Distribution of ³H-Estradiol", *Endocrinology*, 79, 38-42 (1966).
- 6) Engelsman, E., Persijn, J.P., Korsten, C.B., & Cleton, F.J. "Oestrogen Receptor in Human Breast Cancer Tissue and Response to Endocrine Therapy", *Brit. Med. J.*, 30, 750-752 (1973).
- 7) Feherty, P., Robertson, D.M., Waynforth, H.B., & Kellie, A.E. "Changes in the Concentration of High-Affinity Oestradiol Receptors in Rat Uterine Supernatant Preparations during the Oestrous Cycle, Pseudopregnancy, Pregnancy, Maturation and after Ovariectomy", *Biochem. J.*, 120, 837-844 (1970).
- 8) Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W., & DeSombre, E.R. "A Two Step Mechanism for the Interaction of Estradiol with Rat Uterus", *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 59, 632-638 (1968).
- 9) Jensen, E.V., Block, G.E., Smith, S., Kyser, K., & DeSombre, E.R. "Estrogen Receptors and Breast Cancer Response to Adrenalectomy", *Prediction of Response in Cancer Therapy*, NCI Monograph, 34, 55-70 (1971).
- 10) Johanson, H., Terenius, L., & Thorén, L. "The Binding of Estradiol-17 β to Human Breast Cancers and Other Tissues in Vitro", *Cancer Res.*, 30, 692-698 (1970).
- 11) Kato, J., & Villee, C.A. "Factors Affecting Uptake of Estradiol-6, 7-³H by the Hypophysis and Hypothalamus", *Endocrinology*, 80, 1133-1138 (1967b).
- 12) 加藤順三 : "ホルモンとレセプターの相互作用", 蛋白質, 核酸, 酵素, 18, 618-630 (1973).
- 13) Kawashima, T. "Estrogen Binding Proteins in Uterus and Serum", *Gunma Symposia on Endocrinol.*, 7, 187-202 (1970).
- 14) 川島利哉, 沼田正広 : "エストロゲンの受容体", 代謝, 11, 518-528 (1974).
- 15) Korenman, S.G., & Duker, B.A.

- "Specific Estrogen Binding by the Cytoplasm of Human Breast Carcinoma", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 30, 639-645 (1970).
- 16) Laccassagne, A. "Apparition de la mamelle chez la souris male, soumise a des injections de folliculine", *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 195, 630-632 (1932).
- 17) Leung, B.S., Krippahne, W.W., & Fletcher, W.S. "Prognostic Value of Estrogen Receptor to Endocrine Ablation in Cancer of the Breast", *Surg. Gynecol. & Obstet.*, 139, 525-528 (1974).
- 18) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 19) Maass, H., Engel, B., Hohmeister, H., Lehmann, F., & Trams, G. "Estrogen Receptors in Human Breast Cancer Tissue", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 113, 377-382 (1972).
- 20) McDivitt, R.W., Stewart, F.W., & Berg, J.W. : Tumors of the Breast, AFIP Washington D.C., 1968 p. 11.
- 21) McGuire, W.L., & DeLaGarza, M. "Improved Sensitivity in the Measurement of Estrogen Receptor in Human Breast Cancer", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 37, 986-989 (1973).
- 22) Mohla, S., DeSombre, E.R., & Jensen, E.V. "Tissue-Specific Stimulation of RNA Synthesis by Transformed Estradiol-Receptor Complex", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46, 661-667 (1972).
- 23) Nicolette, J.A., LeMahieu, M.A., & Mueller, G.C. "A Role of Estrogens in the Regulation of RNA Polymerase in Surviving Rat Uteri", *Biochem. Biophys. Acta*, 166, 403-409 (1968).
- 24) Puca, G.A., & Bresciani, F. "Decrease to Complete Loss of Ability to Bind Estradiol by a Soluble Macromolecular Fraction of C3H Mammary Tumors", *Europ. J. Cancer*, 3, 475-479 (1968).
- 25) Rooks, II, W.H. "Anti-Mammary Tumor Activities in Rats and Mice", *Methods Hormone Res.*, 3, 139-184 (1964).
- 26) Roy, S., Mahesh, V.B., & Greenblatt, R.B. "Effects of Clomiphene on the Physiology of Reproduction in the Rat", *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 47, 669-675 (1964).
- 27) Sander, S., & Attramadal, A. "An Autoradiographic Study of Oestradiol Incorporation in the Breast Tissue of Female Rats", *Acta Endocrinol. Copenh.*, 58, 235-242 (1968).
- 28) Santi D.V., Sibley, C.H., Perriard, E.R., Tomkins, G.M., & Baxter, J.D. "A Filter Assay for Steroid Hormone Receptors", *Biochemistry*, 12, 2412-2416 (1973).
- 29) Schinzinger, A. "Über Carcinoma mammae", *Zbl. Chir.*, 16, XVIII Kongress, 55-56 (1889).
- 30) Segaloff, A. "Hormones and Breast Cancer", *Recent Progr. Hormone Res.*, 22, 351-379 (1966).
- 31) Shimkin, M.B., & Wyman, R.S. "Mammary Tumors in Male Mice Implanted with Estrogen-Cholesterol Pellets", *J. Nat. Cancer Inst.*, 7, 71-75 (1946).
- 32) Stone, G.M. The Radioactive Compounds in Various Tissues of the Ovariectomised Mouse Following the Systemic Administration of Tritiated Oestradiol and Oestrone", *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 47, 433-443 (1964).
- 33) Toft, D., & Gorski, J. "A Receptor Molecule for Estrogens : Isolation from the Rat Uterus and Preliminary Characterization", *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 55, 1574-1581 (1966).
- 34) Wagner, R.K. "Characterization and Assay of Steroid Hormone Receptors and Steroid-Binding Serum Proteins by Agarose Electrophoresis at Low Temperature", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353, 1235-1245 (1972).
- 35) Wittliff, J.L., Hilf, R., Brooks, W.F.Jr., Savlov, E.D., Hall, T.C., & Orlando, R.A. "Specific Estrogen-binding Capacity of the Cytoplasmic Receptor in Normal and Neoplastic Breast Tissues of Humans", *Cancer Res.*, 32, 1983-1992 (1971).
- 36) 山本泰久, 岩藤真治, 佐野和人, 井上真, 酒井邦彦: "乳癌の依存性ホルモンと予後との関連性について", *外科治療*, 30, 141-146 (1974).