

《ノート》

Neuron Specific Enolase (NSE) 測定用 Radioimmunoassay キットの検討

Evaluation of Neuron Specific Enolase (NSE) Radioimmunoassay Kit

小堀加智夫* 高野 政明* 阿部 清美* 田中 直子*
佐藤かづ未* 丸山 雄三* 野口 雅裕** 金子稜威雄**
佐々木康人** 辻野大二郎***

Kachio KOZAKAI*, Masaaki TAKANO*, Kiyomi ABE*, Naoko TANAKA*,
Kazumi SATO*, Yuzo MARUYAMA*, Masahiro NOGUCHI**, Itsuo KANEKO**,
Yasuhito SASAKI** and Daijiro TSUJINO***

*Central Radio Nuclear Medicine Laboratory, Toho University School of Medicine

**Department of Radiology, Toho University School of Medicine

***The Third Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine

I. はじめに

Enolase は分子量約10万の解糖系酵素である。この酵素は3種のサブユニット α , β , γ から成る二量体構造をなし、 $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ の Isozyme が確認がされている。このうち γ サブユニットをもつ $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$ 型の Enolase は主に神経細胞や軸索突起に存在するので Neuron Specific Enolase (NSE) と呼ばれる。NSE は神経組織および発生学的に神経組織と類似する神経内分泌細胞に存在するが、赤血球、血小板、血清中などにも微量に分布している¹⁾。

今日までに血清中 NSE 測定法として Marangos らの RIA²⁾, 石黒, 加藤ら³⁾ の EIA 法が報

告されている。これらの臨床的検討から、中枢神経組織の破壊や、神経内分泌細胞由来の腫瘍 (APUDoma³⁾), またこれと似た生化学的性格を持つ肺小細胞癌⁴⁾ で血清中の NSE 濃度が上昇することが知られ、新しい腫瘍マーカーとして注目されている。

今回、われわれは栄研 ICL 社で開発された NSE (γ -エノラーゼ) 栄研キットを使用する機会を得たので、一連の基礎的検討および臨床的応用を行ったので報告する。

II. 測定方法と対象

本キットは B.F 分離を二抗体法により行う。抗血清は牛の脳より得た NSE で家兎を免疫し作製した。NSE 濃度は $\gamma\gamma$ 型の Enolase で表示される。

測定操作は次のとおりである。標準 NSE 溶液および検体 50 μ l, ¹²⁵I-NSE 溶液 200 μ l, 抗 NSE 血清溶液 200 μ l を混和後、25°C で 20 時間イン

Key words: Neuron Specific Enolase, Tumor marker, Radioimmunoassay.

* 東邦大学医学部中放核医学検査室

** 同 放射線科

*** 聖マリアンナ医科大学第三内科

受付: 60年8月26日

最終稿受付: 60年10月3日

別刷請求先: 大田区大森西 6-11-1 (☎ 143)

東邦大学医学部中放核医学検査室

小堀 加智夫

キュベートする(第1反応)。

第二抗体溶液 200 μ l を加え 25°C で30分間インキュベートする(第2反応)。2,000 g で30分間冷却遠心し、上清を吸引除去し沈渣の放射能を測定する。

測定の対象は、正常対照51例(男22例, 女29例, 年齢20~56歳), 良性疾患48例, 癌疾患228例の合計 327 例である。

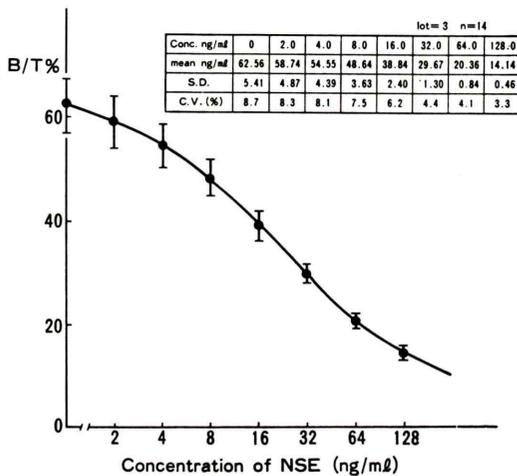


Fig. 1 Standard curve.

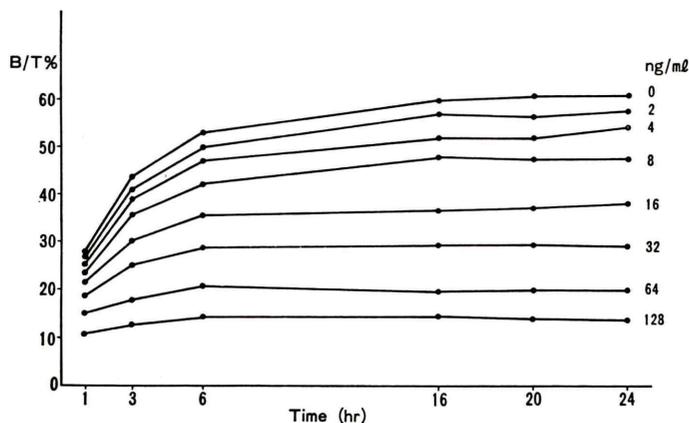


Fig. 2 Effect of the first incubation time.

III. 結果

1. キットの基礎的検討

(1) 標準曲線

3 Lot, 14回測定で得られた標準曲線の各標準濃度における B/T%の平均値 \pm 1標準偏差(mean \pm 1 S.D.)を示す(Fig. 1). 各標準濃度の変動係数(C.V.)は3.3~8.7%と毎回安定した標準曲線が得られた。

(2) インキュベーション時間

第1インキュベーション時間の検討では、インキュベーション温度 25°C, 第2インキュベーション時間を30分と一定にし、第1インキュベーション時間を1~24時間の6段階に変化させ各標準濃度の結合率を検討した(Fig. 2). インキュベーション1~6時間では、B/T%はまだ上昇傾向にあり16時間以後プラトーに達した。

第2インキュベーション時間の検討では、インキュベーション温度 25°C, 第1インキュベーション時間を20時間と一定にし、第2インキュベーション時間を15, 30, 60分と変化させ各標準濃度の結合率を検討したが、B/T%に明らかな変化は見られなかった。

(3) インキュベーション温度

第1インキュベーション時間を20時間, 第2イ

ンキュベーション時間を30分と一定にしインキュベーション温度を4°C, 25°C, 37°Cと変化させ、各標準濃度の結合率を検討した (Fig. 3).

4°C と 25°C では高濃度域で結合率の差は見ら

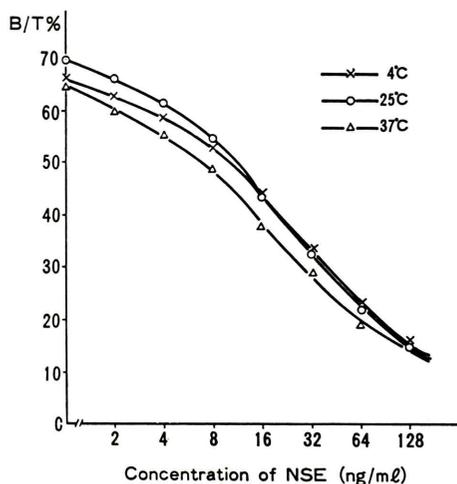


Fig. 3 Effect of incubation temperature.

Table 1 Reproducibility

Intra-assay variance				n=10
No.	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)	
I	7.53	0.25	3.3	
II	34.40	0.77	2.2	
III	78.72	2.76	3.5	
Inter-assay variance				n=10
No.	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)	
I	7.04	0.34	4.8	
II	33.04	1.18	3.6	
III	78.48	4.52	5.8	

れないが, 25°C はより急峻な曲線が得られた。また 37°C は全濃度で結合が低下した。

(4) 精度と再現性

低・中・高濃度血清について1キットでおのおの10本ずつ測定した測定内誤差は, C.V. 2.2~3.5%であった。次に同血清を10キットで10回の二重測定した測定間誤差は C.V. 3.6~5.8%と良好であった (Table 1).

(5) 希釈試験

NSE 濃度 82.6, 20.1, 15.5 ng/ml の臨床検体を用

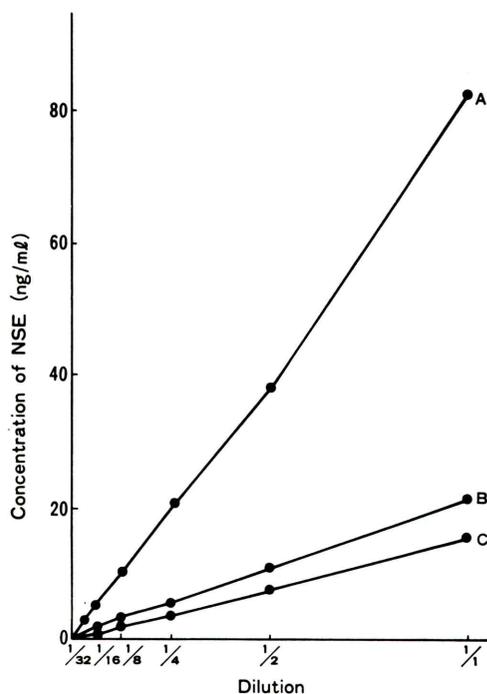


Fig. 4 Dilution test.

Table 2 Recovery test

Sample		Added NSE (ng/ml)								
		0	1	2	4	8	16	32	64	
A	Measured ng/ml	5.78	6.83	8.30	10.10	14.05	21.88	37.93	73.70	
	Recovery %		105.0	126.0	108.0	103.4	100.6	100.5	106.1	M=107.1
B	Measured ng/ml	3.61	4.61	5.39	7.34	11.65	19.58	36.84	72.52	
	Recovery %		100.0	89.0	93.3	100.5	99.8	103.8	107.7	M=99.0
C	Measured ng/ml	26.0	27.0	28.0	29.5	35.0	43.0	59.0	90.0	
	Recovery %		100.0	100.0	87.5	112.5	106.3	103.1	100.0	M=101.3

い、キット添付の 0 濃度溶液で倍々希釈し測定した (Fig. 4)。測定結果は良好な直線性が得られた。

(6) 回収試験

3 種の臨床検体に NSE 標準溶液をおのおのの等量ずつ添加し回収率を求めた (Table 2)。

平均回収率は A 検体で 107.1%、B 検体で

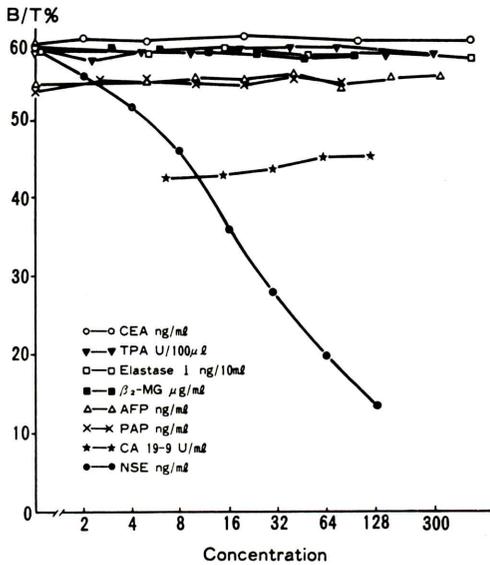


Fig. 5 Cross-reactivity.

99.0%、C 検体で 101.3% と良好な結果であった。

(7) 交叉試験

腫瘍関連物質 CEA (CEA・リアビーズ), TPA (TPAキット第一), Elastase 1 (エラスターゼ 1・リアキット), β_2 -MG (β_2 -マイクロロテストシオノギ), AFP (AFP 栄研), PAP (PAP 栄研), CA 19-9 (セントコア CA 19-9 RIA キット) の各測定用キットの標準溶液を NSE 測定系に添加し、測定したてが明らかな交叉性は認められなかった (Fig. 5)。

(8) CEA, TPA との相関

NSE を測定した同一検体を用い CEA を CEA・リアビーズで、また TPA を TAP キット第一で測定しその相関をみた。NSE (Y) は CEA (X と 135 例の検討で $r=0.507$, $Y=0.181X+5.341$, TPA (X) とは 116 例の検討で $r=0.405$, $Y=0.05X+6.086$ と両者とも統計学的に弱い相関がみられた ($p<0.001$)。

2. 検体の測定値に及ぼす影響

(1) 溶血

検体の溶血による測定値への影響をみるため、健常者 3 名 (O 型 Hgb 15.3 g/dl, A 型 Hgb 12.8 g/dl, AB 型 Hgb 11.9 g/dl) の赤血球を生理食塩水で十分洗浄後、おのおのの血清に添加し任意の溶血検体を作製し NSE を測定した (Fig. 6)。

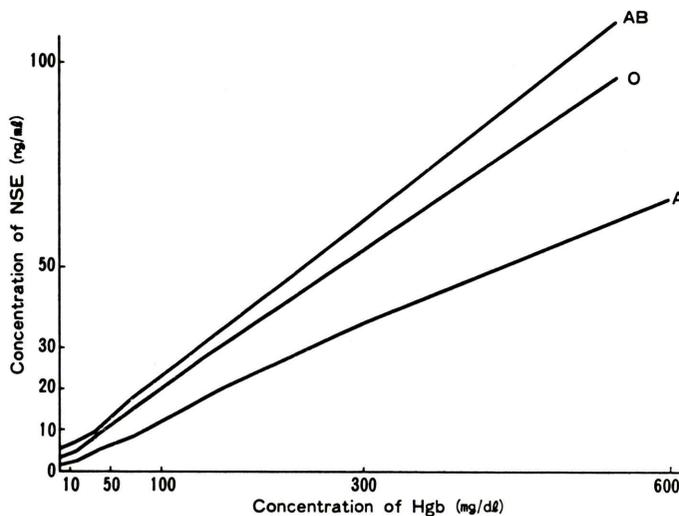


Fig. 6 Effect of hemolysis on serum measurement.

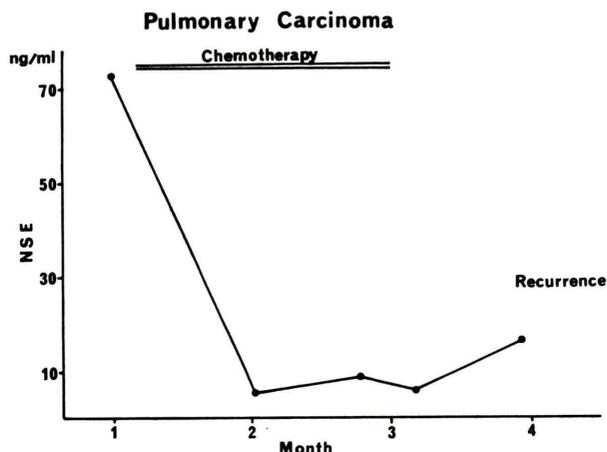


Fig. 9 Serum NSE levels in patient with small cell lung carcinoma responded to therapy.

臨床的検討では腫瘍マーカーとしての特異性を高めるため、任意の Cut off 値として 10 ng/ml を用いた。

癌患者全体で 228 例中 50 例 (21.9%) が陽性であった。癌原発臓器別にみると肺癌 61 例中 24 例 (39.3%) 特に肺小細胞癌 6 例中 5 例 (83.3%)、肝癌 20 例中 1 例 (5%)、大腸癌 33 例中 6 例 (18.2%)、骨腫瘍 2 例中 1 例 (50%)、膵癌 16 例中 2 例 (12.5%)、甲状腺癌 4 例中 2 例 (50%)、乳癌 13 例中 1 例 (7.7%)、食道癌 8 例中 3 例 (37.5%)、胃癌 20 例中 6 例 (30%)、前立腺癌 6 例中 1 例 (16.7%)、その他の癌 22 例中 4 例 (18.2%) が陽性を示し脳腫瘍 5 例、卵巣癌 18 例は陰性例のみであった。20 ng/ml 以上の高値例は、肺小細胞癌などの肺癌およびその他の癌の中で示した神経芽細胞腫の 1 例を除いては、遠隔転移を伴った消化器癌であった。

各種の良性疾患 48 例の NSE 値をみると、肝硬変と肝硬変に肺結核の合併した 2 例 (4.2%) で陽性を示したのみであった。

次に臨床経過を追って血清 NSE を測定できた肺小細胞癌の症例を示した (Fig. 9)。初診時、NSE は 72.3 ng/ml と高値であり、化学療法による寛解後に NSE 値は正常範囲となった。その後、NSE 値の上昇がみられ精査の結果、癌の再発を確認した。

IV. 考 察

本キットは、Enolase の γ -サブユニットに対する特異抗体を利用した $\gamma\gamma$ 型と $\alpha\gamma$ 型の NSE が測定される。NSE は種属特異性はなく⁵⁾、抗体作製に使用する NSE の種類による影響はないといわれる。本キットは牛の脳より得られた NSE によるヒト NSE 測定系である。

インキュベーション時間および温度を変化させ検討した結果、キット指示で問題はなかった。

測定における Within Assay Error は C.V. 2.2~3.5%、Between Assay Error は C.V. 3.6~5.8% であり、良い精度と再現性を示した。また希釈試験、回収試験の結果も良好であった。腫瘍関連物質 CEA, TPA Elastase-1, β_2 -MG, AFP, PAP, CA 19-9 と交叉性はなかった。他の測定値の CEA ($r=0.507$)、TPA ($r=0.405$) とは弱い相関が見られた。

NSE は赤血球中¹⁾に存在することから、溶血検体で血清中の NSE 値は高値となる。それゆえ、溶血の程度による血清 NSE 値の上昇を検討したが、Hgb 35 mg/dl とごく僅かな溶血で NSE 測定値に上昇が見られた。実際の臨床ではしばしば軽度の溶血検体が提出される。著明な肉眼的溶血の除外は問題ないが、ごく軽度の溶血では血清の脂質やビリルビン等による混濁があればチェックは

困難となる。したがって簡便な溶血の検査法、たとえば適度な感度をもつテストテープ法などが必要であろう。

検体の血清分離までの時間の検討では、放置時間の長くなるほど NSE は上昇した。これらのことから、採血に際しての注意と速やかな血清分離が必要である。

また検体の凍結融解の繰り返しによる NSE 値への影響は見られなかった。生体内の NSE の多くは中枢神経細胞に存在する。また発生学的に類似する神経内分泌細胞 (APUD 細胞) にも NSE が存在し、これより発生する APUDoma の腫瘍マーカーになると報告³⁾されている。さらにこの腫瘍と似た生化学的性格を持つといわれる Oat Cell タイプの肺小細胞癌でも血清 NSE の上昇が報告⁴⁾されている。われわれの検討でも肺小細胞癌で 83.3% の血清 NSE 値の上昇がみられ、また臨床経過観察例でも病態とよく一致した変動がみられたことなどから肺小細胞癌の有用な腫瘍マーカーと考えられる。他の組織型の肺癌や遠隔転移のみられた消化器癌等で NSE 高値の症例がみられたが、その意義は判然とせず、今後の症例をふやしての検討が必要である。

V. おわりに

一連の検討の結果、測定操作はキット指示に従

い、精度、感度、再現性とも良好で、日常の検査法として満足する結果を得た。

しかし NSE 測定値は、僅かな溶血に影響される点、十分注意する必要がある。

臨床的には、肺小細胞癌で高いレベルの分布が見られ、また臨床経過例も病態と一致し、これらの診断および臨床経過をモニターする腫瘍マーカーとして十分期待される。

文 献

- 1) Brown KW: Kynoch, PAM, Thompson RJ: Immunoreactive nervous system specific enolase (14-3-2 Protein) in human serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* **101**: 257-264, 1980
- 2) Marangos PJ, Schmechel D, Parma AM, et al: Measurement of neuron-specific (NSE) and non neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue. *J Neurochem* **33**: 319-329, 1979
- 3) Ishiguro Y, Kato K, Shimizu A, et al: High levels of immunoreactive nervous system-specific enolase in sera of patients with neuroblastoma. *Clin Chim Acta* **121**: 173-180, 1982
- 4) Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC, et al: Serum neuron-specific enolase: A marker for disease extent and response to therapy of small cell lung cancer. *Lancet* **1**: 583-585, 1982
- 5) Grasso A, Roda G, Hogné Angeletti RA, et al: Preparation and Properties of the brain specific Protein 14-3-2. *Brain Res* **121**: 497-507, 1977