

《ノート》

Neuron Specific Enolase (NSE) 測定用 RIA キット「SD-8570」 に関する基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluations of Neuron Specific Enolase Radioimmunoassay Kit "SD-8570"

久保 嘉彦* 前田 知穂** 小原 秀一** 小川 恭弘**
山本 洋一** 森田 莊二郎** 沢田 章弘** 吉田 祥二**

Yoshihiko KUBO, Tomoho MAEDA, Shuichi OHARA, Yasuhiro OGAWA,
Yoichi YAMAMOTO, Sojiro MORITA, Akihiro SAWADA
and Shoji YOSHIDA

Department of Radiology, Kochi Medical School

I. はじめに

Neuron Specific Enolase (NSE) は、1965 年 Moore らにより哺乳動物の神経組織中に特異的で種属非特異性の蛋白として発見され、ことに、中枢神経組織に高濃度で分布し脳の可溶性蛋白の 1% 以上を占め、中でも神経細胞と軸索突起に局在しグリア細胞にはほとんど存在しないといわれている^{2,3)}。

NSE は正常ヒト血清中ではごく微量しか存在しないが、中枢神経組織の破壊や神経内分泌細胞由来の腫瘍特に神経芽細胞腫および Oat cell タイプの肺小細胞型未分化癌などでは、これらの組織より NSE が逸脱し血中に増加するため臨床経過をモニターするマーカーとしての有用性が見いだされてきた⁴⁻⁶⁾。

今回われわれは、二抗体法による血清、組織ホモジネート、および体液中の NSE 測定用キット

SD-8570 (シオノギ製薬) の治験をする機会を得、基礎的ならびに臨床的検討を行ったのでその結果を報告する。

II. 測定原理

本法は ¹²⁵I-標識 NSE をトレーサーとした二抗体法による Radioimmunoassay である。

¹²⁵I-標識 NSE と検体中の NSE を一定量の特異抗体に対して競合反応させた後、第二抗体を球状粒子のアガロースに共有結合させたデカンテーション用試薬を添加し、結合 NSE と遊離 NSE の分離を行う。したがって NSE 濃度と抗体に結合した放射活性は逆相関関係にある。

III. 試薬および調製

本キットは 100 回分 (二重測定で 40 検体と 1 本の標準曲線に使用できる) であり、下記の 4 種類の試薬から構成されている。

1) 標準 NSE (凍結乾燥品)..... 7 バイアル

[0, 2, 5, 10, 30, 100, 200 ng/ml 各 1 バイアル]

調製: 0 ng/ml のバイアルに精製水 2 ml を加える。他の 6 種類の濃度のバイアルにはおのおの

Key words: Neuron specific enolase, Lung cancer, Neuroblastoma.

* 高知医科大学附属病院放射線部

** 同 放射線科

受付: 60年 7 月 3 日

最終稿受付: 60年12月21日

別刷請求先: 高知県南国市岡豊小蓮 (☎ 781-51)

高知医科大学附属病院放射線部

久保 嘉彦

0.5 ml 加える (淡黄色).

2) NSE 抗血清 (凍結乾燥品)…… 1 バイアル

調製: バイアルに精製水 5.5 ml を加える (濃黄色).

3) ^{125}I -標識 NSE (凍結乾燥品)…… 1 バイアル

調製: バイアルに精製水 5.5 ml を加える (濃青色 0.8 μCi 以下).

4) 第二抗体 (溶液)…… 1 バイアル

[アガロースが沈殿しているため, 使用前によく混合する]

調製: 調製不要 (白濁色).

IV. 操作法

本キットの操作法の概略を Fig. 1 に示す. 測定はすべて二重測定を最低の原則とし, 放射能計測はオートウェルガンマシステム ARC-600 (Aloka) を用い, すべて 3 分間で測定した. 標準曲線の作成および NSE 濃度の読み取りは, パーソナルコンピュータ AS-100 (Canon) を用いた. なお近似式は最もフィット率が良かった log Alokacurve を用い, 結合率は $B/B_0(\%)$ で表示した.

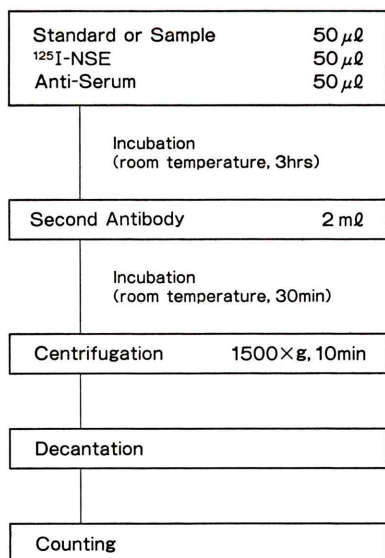


Fig. 1 Assay procedure of SD-8570.

V. 検討方法および結果

1. 標準曲線

2 種類のロットを使用して, 2 か月間にわたり 15 回の測定を行って, 測定間による標準曲線の変動を検討した. 結果を Fig. 2 に示す.

各濃度における $B/B_0(\%)$ \pm 標準偏差を求めたところ, 良好な再現性を示した. 形状も安定した曲線が得られロット間, 測定間の C.V. は 1.0~2.2% であった.

2. 反応時間

他の測定条件は操作法 (cf. Fig. 1) に従い測定し, 第一反応時間だけを 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24 時間と変化させて, 第一反応時間による影響を検討した. 結果を Fig. 3 に示す. 破線は高, 中, 低濃度のプール血清である.

0.5 時間から 3 時間までは NSE と特異抗体との競合反応が不十分なため結合率は低値を示した. この傾向は低濃度で顕著に表われる. 高濃度では ^{125}I -標識 NSE と抗体の結合率が少ないため低濃度に比べると目立たないが, 同様に競合反応は不十分である. 8 時間以降では, 0 濃度の結合率が

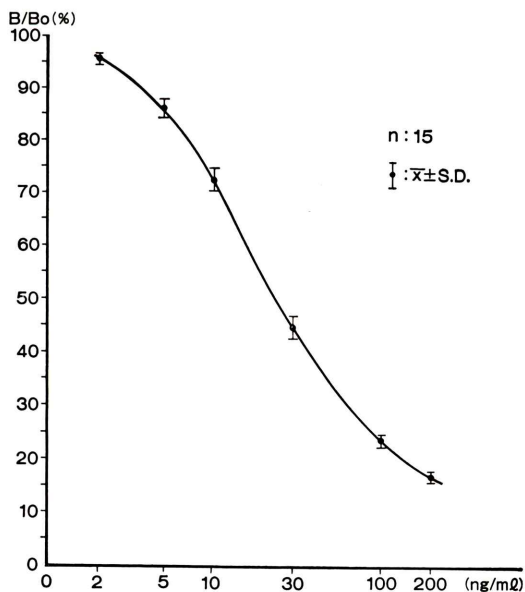


Fig. 2 Variation of standard curve (Interassay).

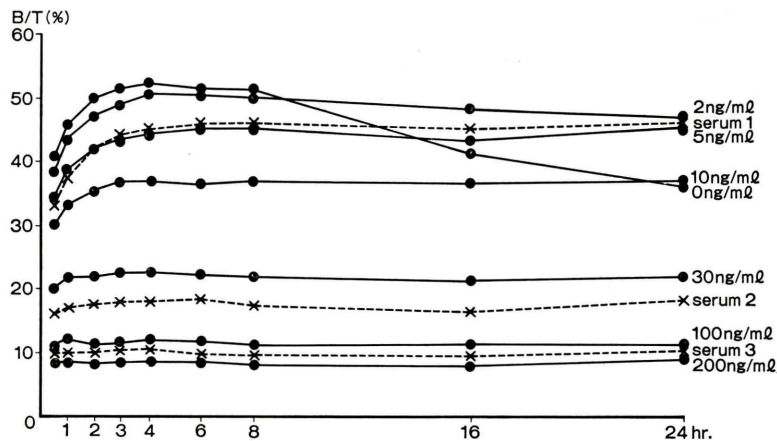


Fig. 3 1st. incubation time.

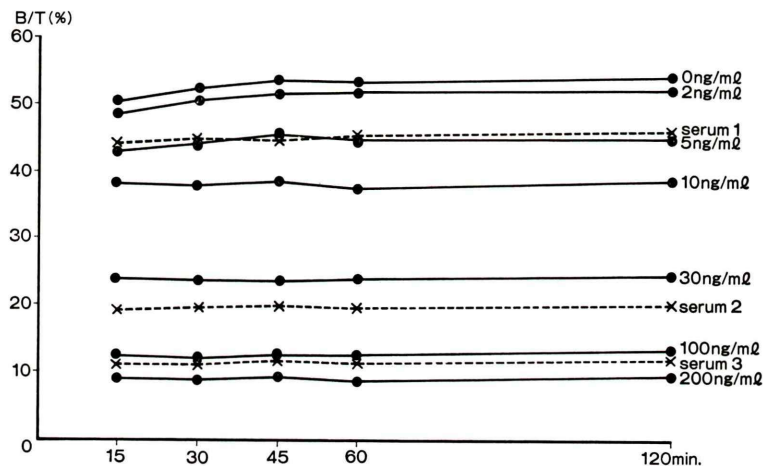


Fig. 4 2nd. incubation time.

時間とともに極端な低下を示した。これより第一反応時間は、3～8時間を厳守する必要がある。

第二反応時間も同様の方法で15, 30, 45, 60, 120分について検討した。結果を Fig. 4 に示す。

30分間の反応時間で競合反応は平衡状態に達し、120分まではほぼ直線となった。30分以下では低濃度で若干の結合率の低下が見られたが、3種類のプール血清の結合率も同じ比率で低下するため測定結果には影響なかった。

3. 反応温度

他の測定条件は操作法 (cf. Fig. 1) に従い測定し、反応温度だけを 0°C (氷水中), 5°C (冷蔵庫),

15°C, 25°C (インキュベーター), 35°C, 45°C (恒温水槽) に設定し、反応温度による影響を検討した。結果を Fig. 5 に示す。破線は高, 中, 低濃度のプール血清である。

15°C～35°C では、結合率が安定しほぼ直線となった。15°C 以下, また 35°C 以上の反応温度では、低濃度で結合率の低下が見られた。しかし3種類のプール血清の結合率も同様に低下するため測定結果には影響なかった。

4. 再現性

濃度の異なる3種類のプール血清を用いて同時再現性と日差再現性の検討を行った。

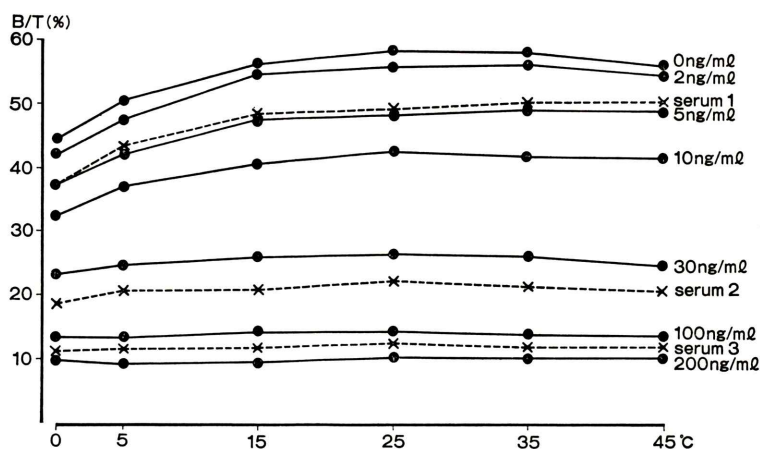


Fig. 5 Incubation temperature.

Table 1 Intra- and Inter-assay variation

| Intraassay | | | |
|--------------|---------|---------|---------|
| | serum 1 | serum 2 | serum 3 |
| mean (ng/ml) | 6.87 | 42.62 | 111.70 |
| S.D. (ng/ml) | 0.36 | 0.92 | 5.37 |
| C.V. (%) | 5.21 | 2.15 | 4.81 |
| Interassay | | | |
| | serum 1 | serum 2 | serum 3 |
| mean (ng/ml) | 4.85 | 43.79 | 125.81 |
| S.D. (ng/ml) | 0.46 | 2.35 | 9.03 |
| C.V. (%) | 9.60 | 5.36 | 7.18 |

同時再現性は、高、中、低濃度のプール血清をおのおの20重測定を行いその変動を、日差再現性は2種類のロットを使用し、2か月にわたり12回の測定を行いその間の変動を検討した。その結果をTable 1に示す。

同時再現性の変動係数(C.V.)は低濃度(6.9 ng/ml)で5.2%, 中濃度(42.6 ng/ml)で2.2%, 高濃度(111.7 ng/ml)で4.8%であった。日差再現性は低濃度(4.9 ng/ml)で9.6%, 中濃度(43.8 ng/ml)で5.4%, 高濃度(125.8 ng/ml)で7.2%であった。同時再現性、日差再現性ともに良好な結果であり、ロット間、測定間の大きな変動は認められなかった。

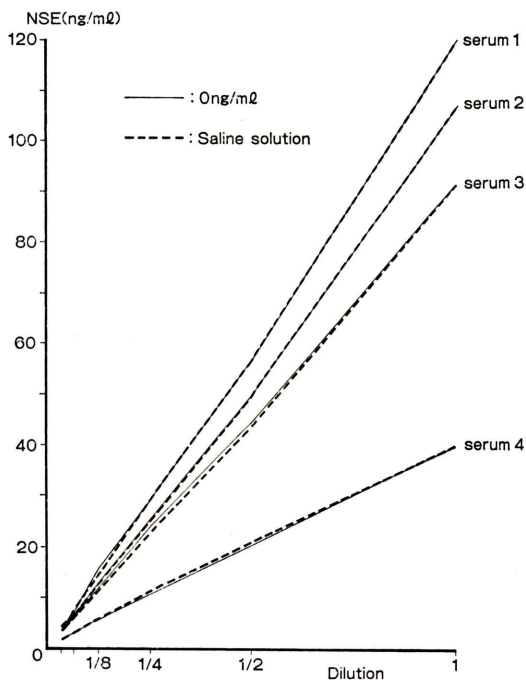


Fig. 6 Dilution test.

5. 希釈試験

高濃度の4種類の患者検体を、0 ng/mlの標準NSEと生理食塩水を希釈溶媒として、2倍から32倍まで倍数希釈を行い希釈精度を検討した。結果をFig. 6に示す。

いずれの検体も希釈溶媒による影響はなく、原

Table 2 Recovery test

| Sample (ng/ml) | Added (ng/ml) | | | | | Recovery (%) |
|-------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-----------------|
| | 5 | 10 | 30 | 100 | 200 | |
| serum 1 (3.78) | 106.0 | 98.3 | 99.8 | 98.7 | 108.4 | 102.24 |
| serum 2 (3.31) | 94.0 | 100.3 | 101.0 | 100.0 | 103.0 | 99.66 |
| serum 3 (5.68) | 90.5 | 98.5 | 96.7 | 96.5 | 98.4 | 96.12 |
| serum 4 (12.69) | 96.5 | 102.8 | 105.1 | 114.4 | 111.8 | 106.12 |
| serum 5 (13.24) | 99.5 | 110.0 | 94.1 | 113.7 | 101.4 | 103.74 |
| Mean | 101.58% | | | | | |

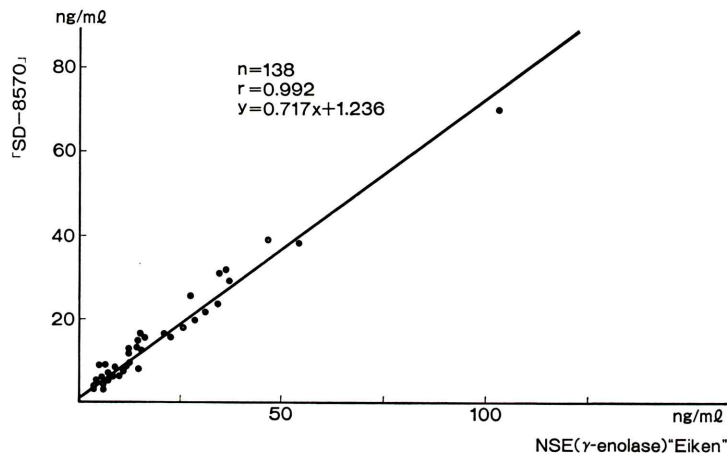


Fig. 7 Correlation between NSE values measured by SD-8570 and NSE (γ-enolase) "Eiken".

点に収斂する良好な直線性を示した。

6. 最小検出感度

2.0 ng/ml の標準液を 0 ng/ml の標準液で倍数希釈を行い、1.0, 0.5, 0.25 ng/ml の各濃度を 8 重測定を行った。有意差検定の結果、5% の危険率で最小検出感度は 1.0 ng/ml であり、十分な検出感度を有していた。

7. 回収試験

濃度の異なる 5 種類の検体に 5, 10, 30, 100, 200 ng/ml の標準 NSE を添加し (検体量 : 標準液 = 9 : 1) 回収試験を検討した。回収率は下記の式により求め、その結果を Table 2 に示す。

平均回収率は、それぞれ 102.2%, 99.7%, 96.1%, 106.1%, 103.7% であり、総平均回収率は 101.6% であった。

$$\text{回収率} = \frac{\text{添加試料濃度} - \text{基礎濃度}}{\text{添加濃度}} \times 100(\%)$$

8. 相 関

当院放射線科、耳鼻科、外科、内科を受診した患者のうち 196 例を抜粋し、他の腫瘍マーカーとの相関を検討した。CEA, AFP, SCC, CA 19-9 とはなんら相関関係は認められなかったが、重複して高値を示す例が時に認められた。E 社製の NSE 測定用キットとの相関は $r=0.99$ と良好な相関関係を示している (Fig. 7)。

9. 溶血の影響

健常者 3 例の検体を -30°C の冷凍庫にて 16 時間放置し、人工的に溶血させ血清中のヘモグロビン値と NSE 値の関係について検討を行った (Fig. 8)。

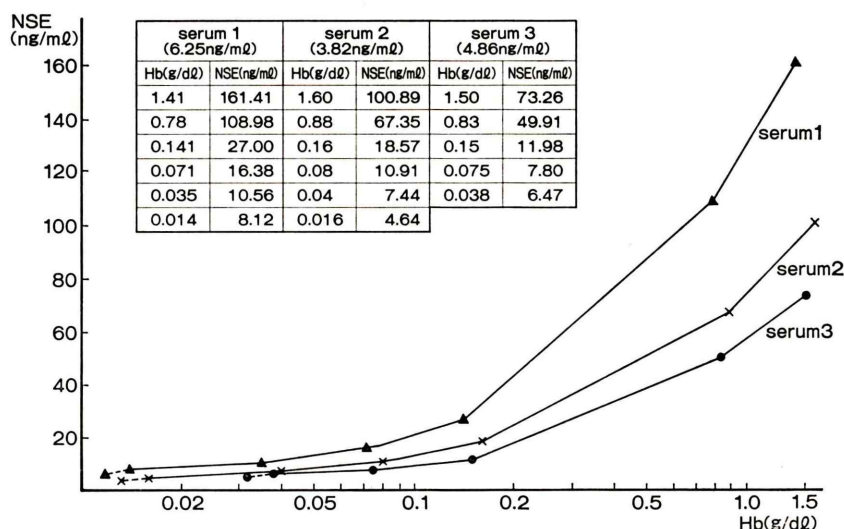


Fig. 8 Effect of hemolysis.

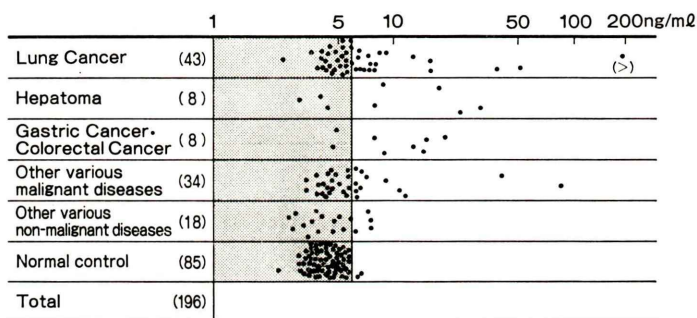


Fig. 9 Serum NSE values in various diseases.

いずれの検体も、0.01 g/ml 程度の弱溶血です
でに NSE 値の上昇を認め、さらにヘモグロビン
値の上昇とともに NSE 値も著しい高値を示した。

視覚的に溶血が認められる場合は、その値も
1/4~2 倍近くの上昇が認められるなど NSE 値の
測定に際しては、溶血に十分注意し採血する必要
がある。

VI. 臨床的検討

生化学検査で健常者と判定された当院職員85名
と、放射線科、耳鼻科、外科、内科を受診した患
者のうち肺癌43例、肝癌8例、胃癌ならびに大腸癌
8例、その他の悪性疾患34例、また良性疾患18例

の計 196 例を対象に血中 NSE の測定を行った。
その結果を Fig. 9 に示す。

健常者 85 例の NSE 値は、2.3 ng/ml から 6.7
ng/ml の範囲に分布し、平均 4.3 ± 0.8 ng/ml であ
った。これより当院の正常値の上限は平均値に
2 S.D. を加え、6.0 ng/ml とした。肺癌の平均は
9.5 ng/ml、肝癌では 12.8 ng/ml、胃癌・大腸癌で
は 11.4 ng/ml、また 89.9 ng/ml と高値を示した神
経芽細胞腫の 1 例を除くその他の悪性腫瘍33例の
平均は 6.8 ng/ml であり、良性疾患の平均は 4.4
ng/ml で、いずれの悪性腫瘍例よりも低値を示す
傾向がみられた。また、正常群と各種疾患群との
有意差検定を行うと、肺癌、胃癌ならびに大腸癌、

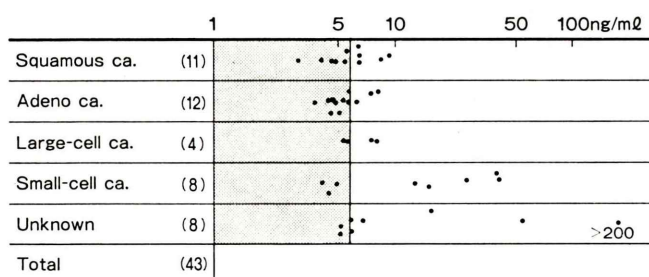


Fig. 10 Serum NSE values in histopathological type of lung cancer.

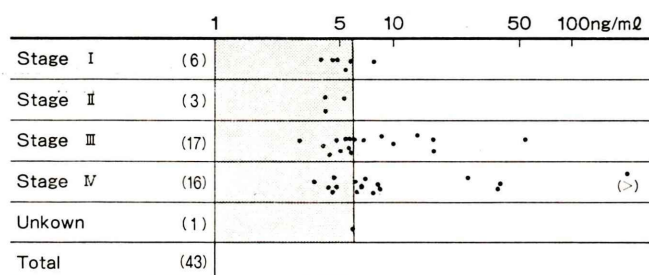


Fig. 11 Serum NSE values in clinical stage of lung cancer.

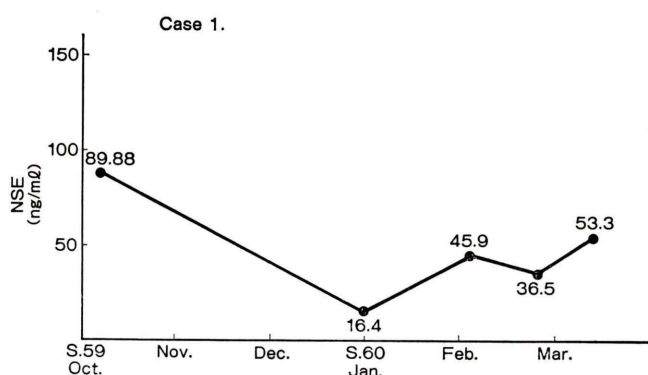


Fig. 12 Case 1.

その他の悪性腫瘍群間では5%の危険率で有意差が認められたが、肝硬変および慢性肝炎群では有意差はなかった。

また、カットオフ値を6.0 ng/mlとし各疾患の陽性率を比較すると、肺癌41.9%、肝癌62.5%、胃癌・大腸癌75.0%、その他の悪性腫瘍38.2%、良性疾患では22.2%であった。肺癌例のみについて組織型別にみると、扁平上皮癌45.5%、大細胞型未分化癌では50.0%、腺癌では12例中3例の

25.0%であったが、小細胞型未分化癌では8例中5例が陽性で62.5%を示した (Fig. 10)。症例数が少ないとはいえ有意に病理組織型推定の一助となり得ると考えられる。さらに、肺癌臨床病期別血中NSE値をみると、I, II期の症例数は少なく比較し得ぬがIII, IV期群では17例のIII期群の平均値10.2 ng/ml、16例のIV期群の平均値は11.7 ng/mlと進行度に伴ってNSE値の上昇する傾向が示された (Fig. 11)。

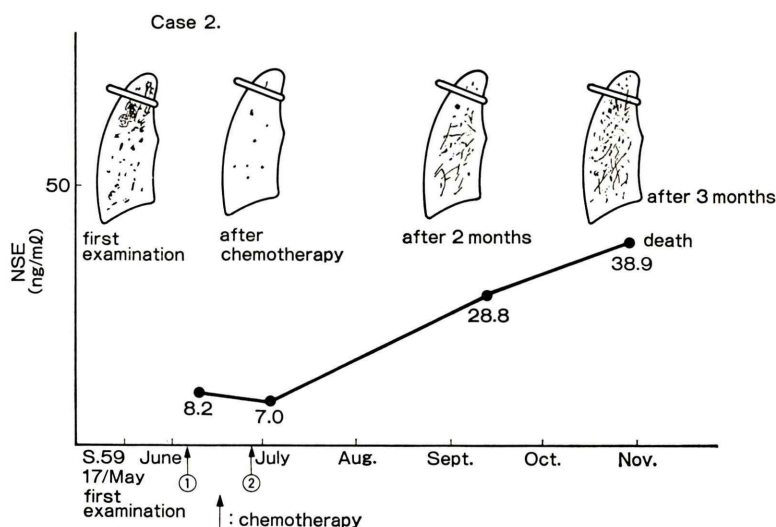


Fig. 13 Case 2.

次に NSE 値が経過観察に有用であった症例を示す。

症例 1. (4 歳女性, 右副腎神経芽細胞腫)

(Fig. 12)

昭和59年10月5日当院入院。発熱および関節痛を訴え, CRP 強陽性, 貧血を認めた。尿中 VMA 79.9 mg/日 (正常値 2~12), HVA 64.7 mg/日 (正常値 1~11) で神経芽細胞腫を疑い CT 施行。右副腎に 6×4 cm の腫瘍ならびに大動脈リンパ節転移像を認めた。10月18日, 直ちに手術および術中照射療法を行い, 術後も化学療法を加えた。VMA, HVA ともに正常値に復し症状改善のため退院。経過観察にて NSE 値の漸次高値への推移を示した。昭和60年3月22日, CT を施行するが所見はなく, 胸骨吸引生検により, 骨髓への転移が認められた。

症例 2. (62歳女性, 肺小細胞型未分化癌)

(Fig. 13)

胸部 X 線像では右上肺野に原発巣と思われる 2×3 cm の腫瘍影あり。両肺野に散布する小粒状影を認め右鎖骨上窩リンパ節の生検より小細胞型未分化癌と診断された。初診時の NSE 値は測定されておらず CEA 3.7 ng/ml であった。6月5日と6月26日に化学療法を施行 (各, ランダ 90 mg,

アドリアマイシン 40 mg, オンコビン 1 mg)。胸部 X 線所見上, 原発巣の腫瘍影は著しく縮小, かつ散布巣もほとんど消失した。当時の NSE 値は, ほぼ正常域となり退院。その後再び咳嗽, 呼吸困難を訴え始め, 胸部 X 線所見上, 両肺野に網状影と散布する粒状影が出現, 漸次増加の傾向を示した。それとともに NSE 値も高値を示し, 11月中旬死亡。

以上, 経過観察の推移に従った NSE 値の変動は, 再発の有無を把握するのに有効な方法と考える。

VII. 考 察

最近開発された NSE は, 細胞質に存在する分子量約 9 万の可溶性タンパク質で, 2-ホスホグリセレートホスホエノールピルビン酸に変換する解糖系の酵素であり, 3 種のサブユニット α , β , γ からなる二量体構造を示す。このうち, 神経細胞, 軸索突起に特異的かつ高濃度で存在する $\alpha\gamma$ (hybrid 型) と $\gamma\gamma$ (homodimer 型) の γ サブユニットを有する分子 NSE がと呼ばれている^{5,7)}。したがって神経内分泌細胞由来の腫瘍のうち, 神経芽細胞腫および, Oat cell type の肺小細胞型未分化癌では, NSE が逸脱して血中に増加すると考

えられている。今回われわれは、新しく開発された NSE 測定用キット SD-8570 (シオノギ製薬) を入手する機会を得たので、基礎的検討および臨床的検討を行った。

1) 基礎的検討

標準曲線に関しては、2 か月間にわたり 15 回測定を行ったが、各濃度の変動係数は 1.0~2.2% の範囲内となり、形状も安定した曲線が得られロット間ならびに測定間による影響は認められなかった。反応時間に関しては、第一反応時間は 3~8 時間とし、一定時間を厳守する必要がある。第二反応時間は 30 分で反応がプラトーに達するため時間による影響はないと思われる。反応温度については、15~35°C までほぼ直線となり安定した反応を示した。再現性に関しては、同時再現性での変動係数は、6.9 ng/ml で 5.2%, 42.6 ng/ml で 2.2%, 111.7 ng/ml で 4.8% であった。また日差再現性では、4.9 ng/ml で 9.6%, 43.8 ng/ml で 5.4%, 125.8 ng/ml で 7.2% と、いずれも満足のいく結果でありロット間、測定間による影響は認められなかった。希釈試験においては生理食塩水と 0 ng/ml の標準 NSE を溶媒として検討を行ったが、両者ともに原点に収斂する良好な直線性を示す結果が得られた。最小検出感度は 1.0 ng/ml と考える。また、各検体の回収率は 102.2%, 99.7%, 96.1%, 106.1%, 103.7% で、総平均回収率は 101.6% となり、測定値の正確度も良好であった。

2) 臨床的検討

神経芽細胞腫の 1 例で、術前の NSE 値は 89.9 ng/ml と異常な高値を示したが、術後はおおむね正常値に復した例や、肺小細胞型未分化癌 7 例のうち 5 例が陽性 (陽性率 71.4%) を示すなど、他の病理組織型の肺癌と異なり高い陽性率を示した。これらの成績は有吉らの報告⁴⁾とおおむね一致する。一方、肺癌の病期の進行に一致する NSE 値の変動は得られなかったが、症例もいまだ少なく結論を出すには至っていない。しかし肺癌の治療

経過とともに NSE 値の変動を示す症例を経験しており、CEA 値とともに NSE 値の変動は悪性腫瘍の臨床状態の把握の上できわめて重要であろう。ことに小細胞型未分化癌は放射線治療や化学療法によく反映するだけに、再発の有無を含め病状の把握に有用と考える。

VIII. ま と め

二抗体法による NSE 測定用キット SD-8570 (シオノギ製薬) について基礎的検討ならびに臨床的検討を行い以下の結論を得た。

- 1) 操作法が簡便、かつ反応時間が短い。
- 2) 測定精度、感度にすぐれている。
- 3) 悪性腫瘍、とりわけ神経芽細胞腫や肺小細胞型未分化癌の診断、経過観察に有用である。

文 献

- 1) Moore BM, McGregor D: Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem* **240**: 1647-1653, 1965
- 2) Marangos PJ, Schmechel D, Parama 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) Zeltzer PM, Marangos PJ, Parama AM, et al: Raised neuron-specific enolase in serum of children with metastatic neuroblastoma. *Lancet* **361**-363, 1983
- 4) 有吉 寛, 加藤兼房, 石黒士雄, 他: Neuron-specific enolase (NSE). 癌と化学療法 **10**: 1744-1753, 1983
- 5) 米田正弘, 李野謙次, 田中博志, 他: Radioimmunoassay による Neuron Specific Enolase (NSE) 測定の基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **22**: 545-548, 1985
- 6) 前田知穂, 久保嘉彦, 片岡みどり, 他: NSE (γ -エノラーゼ) に関する基礎的ならびに臨床的検討. ホルモンと臨床 **33**: 403-408, 1985
- 7) Shimizu A, Suzuki F, Kato K: Characterization of $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ and human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases ($\alpha\gamma$, $\beta\gamma$, and $\alpha\beta$) from homodimeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta* **748**: 278-284, 1983