

《ノート》

Radioimmunoassay による Neuron Specific Enolase (NSE) 測定の基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Studies of Measurement of Neuron-Specific Enolase (NSE) by Radioimmunoassay

米田 正弘* 奈野 謙次* 田中 博志* 戸谷 有二*
大磯ユタカ* 山内 一征* 高槻 健介* 富田 明夫*
加藤 兼房**

Masahiro YONEDA*, Kenji MOKUNO*, Hiroshi TANANA*, Yuji TOTANI*,
Yutaka OISO*, Kazuyuki YAMAUCHI*, Kensuke TAKATSUKI*,
Akio TOMITA* and Kanefusa KATO**

*First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine

**Department of Biochemistry, Institute for Developmental Research,
Aichi Prefectural Colony

I. はじめに

エノラーゼは、分子量約9万の可溶性蛋白質で、解糖系酵素である。この酵素は、3種のサブユニット α , β および γ から成る二量体構造をもち^{1,2)}, α サブユニットをもつエノラーゼは全ての組織に広く分布し、 β サブユニットをもつエノラーゼは横紋筋組織と心筋に局在³⁾している。一方、 γ サブユニットをもつエノラーゼ ($\gamma\gamma$ と $\alpha\gamma$) は、神経組織に特異的に存在し⁴⁾, Neuron-Specific Enolase (NSE) と呼ばれている。

血清 NSE の測定法に関して、1979年 Marangos らが RIA⁴⁾ を、また1983年に Kato らが、Human NSE EIA を開発⁵⁾している。血清 NSE は、小児

腫瘍⁶⁾, 各種神経疾患⁷⁾, 肺癌⁸⁾ および APUD 系腫瘍^{9,10)}において高値を示すことが知られ、その測定は臨床的に有用であると報告されている¹¹⁾。

今回、われわれは栄研イムノケミカル研究所の開発した、NSE RIA キットを使用する機会を得たので、その基礎的検討ならびに、褐色細胞腫をはじめとする副腎腫瘍マーカーとなり得るかについて、臨床的検討を試みたので報告する。

II. 方法および検討

1. キットの内容および調整

1) ¹²⁵I-NSE (溶液): ヒト $\gamma\gamma$ エノラーゼを ¹²⁵I で標識したもので、精製水 8 ml を加えて混和する。

2) NSE 抗血清 (凍結乾燥品): 家兎をヒト $\gamma\gamma$ エノラーゼで免疫して得た抗体で、精製水 10 ml を加えて溶解する。

3) 標準 NSE (ヒト $\gamma\gamma$ エノラーゼ, 溶液): 調整不要。

Key words: Neuron Specific enolase, Radioimmunoassay, Adrenal tumor, Pheochromocytoma.

* 名古屋大学医学部第一内科

** 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部門

受付: 59年12月14日

最終稿受付: 60年2月27日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町 65 (☎ 466)

名古屋大学医学部第一内科

米田 正弘

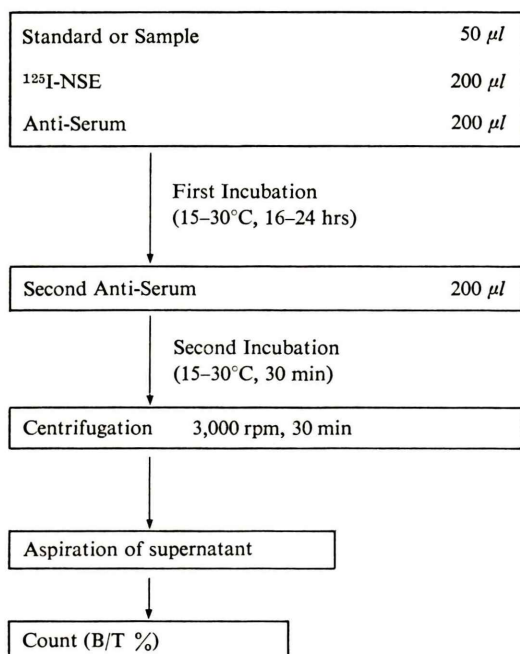


Fig. 1 Procedure for measurement of NSE.

0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ng/ml

4) 第二抗体 (凍結乾燥品): 精製水 10 ml を加えて溶解する。

2. 測定操作 (Fig. 1)

1) 試験管に, 0~128 ng/ml の標準 NSE 溶液または被検血清を 50 μ l ずつ入れる。

2) 各試験管に, 125 I-NSE 溶液 200 μ l および NSE 抗血清溶液 200 μ l ずつ添加し, 混和後 15~30°C にて 16~24 時間静置する。また, 別の試験管に 125 I-NSE 溶液 200 μ l を入れ, total count 用とする。

3) total count 用試験管以外のすべての試験管に, 第二抗体溶液 200 μ l を加え, 混和後 15~30°C にて 30 分間静置する。

4) 3,000 rpm で 30 分間冷却遠心し, アスピレーターを用いて上清を除去し, 沈殿物の放射能を計測し, 次式より Bound を算出する。

$$B\% = \frac{\text{各試験管のカウント数}}{\text{total count}} \times 100$$

Table 1 Recovery

Patient Serum (ng/ml)	Added (ng/ml)	Calculated value (ng/ml)	Measured value (ng/ml)	Recovery (%)
3.1	+ 4	7.1	6.8	96
	+ 8	11.1	10.5	95
	+16	19.1	17.0	89
	+32	35.1	33.5	95
13.2	+ 4	17.2	18.5	108
	+ 8	21.2	23.1	109
	+12	25.2	29.7	102
	+32	45.2	43.0	95

(mean: 98.5)

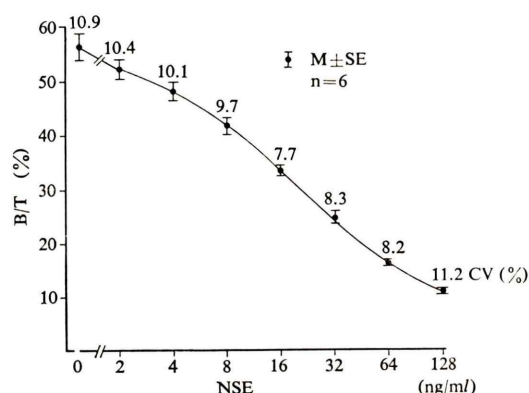


Fig. 2 Standard curve.

5) 標準曲線を作製し, 未知検体中の NSE 濃度を読みとる。

3. 基礎的検討

1) 抗体の特異性

本測定法に用いられている NSE 抗血清の特異性をみるため, ヒト $\alpha\alpha$ -enolase, $\beta\beta$ -enolase および $\alpha\gamma$ -enolase との交差免疫性を検討した。この抗体は, $\alpha\alpha$ -enolase および $\beta\beta$ -enolase とは, 100 ng/ml まで交差性を認めなかったが, $\alpha\gamma$ -enolase とは, 平均 36.9% (理論値 50%) の交差性を認めた。

2) 標準曲線

標準 NSE 溶液 50 μ l を用いて作製した標準曲線は, Fig. 2 のごとくである。標準 NSE 0~128 ng/ml の各濃度における 6 回の assay において,

変動係数は 7.7~11.2% であり, 良好な曲線が得られた。

3) 回収率

2 種類の異なる血清を用いて, 既知濃度の NSE を加え, 回収率を検討した (Table 1)。回収率は 89~109%, 平均 98.5% と良好な回収率を得た。

4) 希釈試験

Table 2 Intra- and Inter-assay variation

Sample	Intra-assay variation (n=10)		Inter-assay variation (n=4)	
	M±SD (ng/ml)	CV (%)	M±SD (ng/ml)	CV (%)
A	5.4±0.26	4.9	5.8±0.47	8.2
B	2.5±0.25	10.0	2.9±0.27	9.3
C	27.8±1.79	6.4	30.6±3.1	10.2

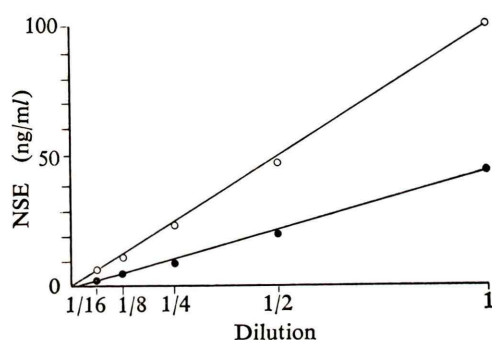


Fig. 3 Dilution tests.

濃度の異なる 2 種類の患者血清を, 添付の 0 ng/ml 濃度の標準 NSE 溶液で, 1/2~1/16 に希釈して得た測定値は, Fig. 3 のごとく, 原点に向かう直線上にプロットできた。

5) 再現性

異なる 3 種類のヒト血清を用いて, 同一キットおよび異なるキット間における測定値の再現性を検討した (Table 2)。同一キット内の変動係数は 4.9~10.0%, 異なるキット間での変動係数は 8.2~10.2% であった。

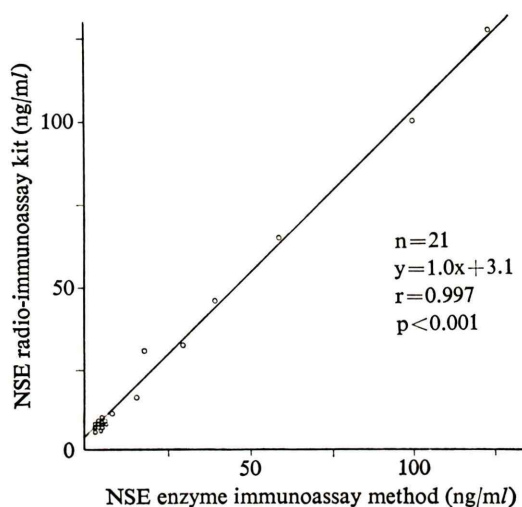


Fig. 4 Relationship between serum NSE values determined by RIA kit and EIA method.

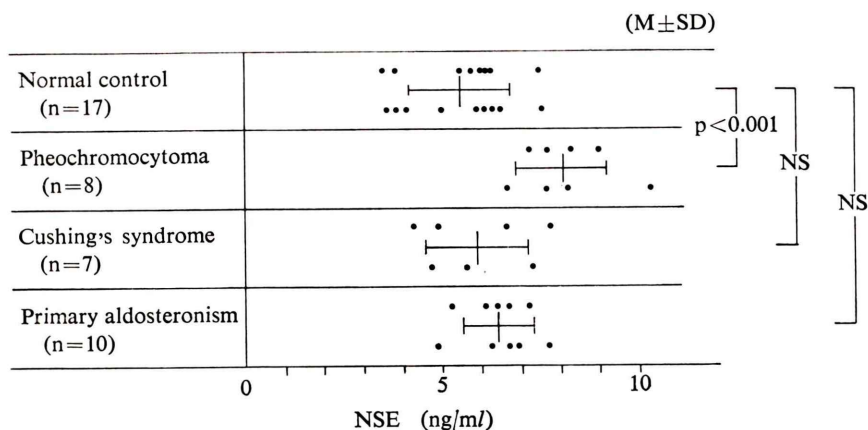


Fig. 5 Serum NSE levels in normal controls and patients with various adrenal tumors.

6) NSE EIA との相関

同一検体を本キットおよび Kato らが開発した Enzyme Immunoassay 系⁵⁾にて測定し、両測定値の相関を検討したところ、 $r=0.997$, $p<0.001$ と推計学的に有意な正の相関が認められた (Fig. 4).

4. 臨床的検討

対象は、名古屋大学医学部附属病院第一内科を訪れ、同第二外科において手術にて確認された、褐色細胞腫 8 名、クッシング症候群 7 名、原発性アルドステロン症 10 名および正常者 17 名で、早朝空腹時に採血し遠心分離の後、血清を NSE 測定まで -20°C で保存した、

1) 正常者および各種副腎腫瘍患者における血清 NSE 値 (Fig. 5)

正常者 17 名の血清 NSE 値は、 $3.5\sim 7.6\text{ ng/ml}$ 、平均 $\pm\text{SD}$ は、 $5.5\pm 1.3\text{ ng/ml}$ であった。褐色細胞腫 8 名では、 $6.6\sim 10.3\text{ ng/ml}$ 、平均 $\pm\text{SD}$ は、 8.1 ± 1.1 で、正常者に比し、有意 ($p<0.001$) の高値を示した。クッシング症候群 7 名では、 $4.3\sim 7.6\text{ ng/ml}$ 、平均 $\pm\text{SD}$ は、 5.9 ± 1.4 、また原発性アルドステロン症 10 名では、 $4.9\sim 7.7\text{ ng/ml}$ 、平均 $\pm\text{SD}$ は、 6.4 ± 0.86 で、ともに正常者との間に有意差を認めなかった。

III. 考 案

従来、Neuron-Specific Enolase (NSE) の測定は、一部研究施設において測定が可能で、多くの知見が報告されており、NSE 測定系の普及が望まれていた。

今回、NSE の radioimmunoassay 系のキット化が成功した。

エノラーゼは、3 種のサブユニットから成り、 γ -サブユニットを含む NSE は、神経組織に特異的に存在している。

本測定系の抗体は、抗 γ サブユニットであり、ヒト $\alpha\alpha$ -エノラーゼ、ヒト $\beta\beta$ -エノラーゼとの交差性はみられず、ヒト $\alpha\gamma$ -エノラーゼと 36.9% の交差性を有した。標準曲線および測定値の再現性も良好で、回収率試験および希釈試験とも満足すべき結果を得た。また、同一検体における、本キ

ットと Kato らが開発した EIA⁵⁾ による測定値の相関は、 $r=0.997$ と良好な正の相関を示した。

本測定法における正常者の血清 NSE 値 ($M\pm\text{SD}$) は、 $5.5\pm 1.3\text{ ng/ml}$ であった。副腎腫瘍患者における血清 NSE 値 ($M\pm\text{SD}$) は、褐色細胞腫で、 $8.1\pm 1.1\text{ ng/ml}$ 、クッシング症候群で、 $5.9\pm 1.4\text{ ng/ml}$ 、および原発性アルドステロン症で、 $6.4\pm 0.86\text{ ng/ml}$ で、褐色細胞腫において、正常者に比し有意 ($p<0.001$) の高値を示した。褐色細胞腫においては、腫瘍組織中に、NSE の存在が証明されており¹²⁾、血清 NSE の臨床的有用性については、今後さらに検討する予定である。

IV. ま と め

榮研 NSE RIA kit の基礎的および臨床的検討を行い、次のような知見を得た。

1. 本測定法の再現性および EIA との相関は良好であった。

2. 本測定法による正常値 ($M\pm 2\text{SD}$) は、 $5.5\pm 2.6\text{ ng/ml}$ であり、褐色細胞腫において有意の高値を示した。

以上、本測定法による血清 NSE 測定は、臨床的に有用であると考えられた。

貴重な血清を提供してくださいました、名古屋大学医学部第二外科内分泌グループの水野茂先生および舟橋啓臣先生に深謝します。

NSE キットを提供された、榮研化学株式会社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Rider CC, Taylor CB: Enolase isoenzymes in rat tissue. Electrophoretic chromatographic, immunological and kinetic properties. *Biochim Biophys Acta* **365**: 285-300, 1974
- 2) Flecher L, Rider CC, Taylor CB: Enolase isozymes III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta* **452**: 245-252, 1976
- 3) Kato K, Okagawa Y, Suzuki F, et al: Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum: A novel marker antigen for muscle disease. *Clin Chim Acta* **131**: 75-85, 1983

- 4) Marangos PJ, Schmechel D, Parma AM, et al: Measurement of Neuronspecific (NSE) and Non-neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue. *J Neurochem* **33**: 319-329, 1979
- 5) Kato K, Asai R, Shimizu A, et al: Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clinica Chimica Acta* **127**: 353-363, 1983
- 6) Ishiguro Y, Kato K, Ito T, et al: Nervous system-specific enolase in serum as a marker for neuroblastoma. *Pediatrics* **72**: 696-700, 1983
- 7) Mokuno K, Kato K, Kawai K, et al: Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J Neurol Sci* **60**: 443-451, 1983
- 8) Ariyoshi Y, Kato K, Ishiguro Y, et al: Evaluation of serum neuron-specific enolase as a Tumor marker for carcinoma of the lung. *Gann* **74**: 219-225, 1983
- 9) Printz RA, Marangos PJ: Use of neuron-specific enolase as a serum marker for neuroendocrine neoplasms. *Surgery* **92**: 887-889, 1982
- 10) 岩瀬克己, 加藤兼房, 長坂顕雄, 他: 内分泌腫瘍における Neuron Specific Enolase. *日内分泌誌* **60**: 582, 1984
- 11) 加藤兼房: ニューロン特異性エノラーゼ. *蛋白質核酸 酵素* **29**: 1101-1116, 1984
- 12) Ishiguro Y, Kato K, Ito T, et al: Determination of three enolase isozymes and S-100 protein in various tumors in children. *Cancer Research* **43**: 6080-6084, 1983