

《ノート》

Neuron Specific Enolase (NSE) RIA kit (Pharmacia) の基礎的・臨床的検討

Basic and Clinical Studies of Measurement of Neuron Specific Enolase (NSE) Using Pharmacia NSE RIA Kit

小泉 満* 遠藤 啓吾* 中島 言子* 阪原 晴海*
中島 鉄夫* 太田 仁八* 河村 泰孝* 松井祐佐公**
鳥塚 莞爾*

Mitsuru KOIZUMI*, Keigo ENDO*, Kotoko NAKAJIMA*, Harumi SAKAHARA*,
Tetsuo NAKASHIMA*, Hitoya OHTA*, Yasutaka KAWAMURA*,
Yusakimi MATSUI** and Kanji TORIZUKA*

*Department of Nuclear Medicine, Kyoto University Hospital

**Research Institute of TB and Chest Disease, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

I. はじめに

エノラーゼは、2-ホスホグリセレートを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る。そのうち、 γ サブユニットを有する $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$ 型のアイソザイムは、神経組織に特異的に存在し、Neuron Specific Enolase(NSE)と呼ばれている¹⁻⁴⁾。

NSE は、APUD 系腫瘍⁵⁾、神経芽細胞腫^{6,7)}、肺小細胞癌^{3,9)} の細胞中でも発見されており、これらの患者血清中では NSE が上昇する。すなわち、神経芽細胞腫^{6,7)}、肺小細胞癌^{3,9,14)}、腓島癌¹⁰⁾ などでは、血中 NSE 濃度測定 of 臨床的有用性が報告されている。

今回、ファルマシア社製“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

びに血清 NSE 濃度測定 of 臨床的有用性の検討を行い若干の知見を得たので報告する。

II. 方法および検討事項

本キットは、2 抗体法ラジオイムノアッセイの原理に基づき測定する。すなわち、血清 (標準液) 50 μ l に、¹²⁵I-NSE 50 μ l と抗 NSE 抗血清 50 μ l を加え、混和後、室温にて 3 時間放置。第 2 抗体をセファロースにつけたデカンテーション用試薬を加え、混和後、室温にて 30 分間インキュベートする。その後、1,500 \times g で 10 分間遠心分離後、デカンテーションを行い、沈澱物の放射能を測定。標準曲線を作成、検体の NSE 濃度を讀みとる。

基礎的検討として、反応時間と反応温度の標準曲線に及ぼす影響、標準曲線と測定値の再現性、希釈試験、添加回収試験、溶血の NSE 測定値に及ぼす影響を検討した。臨床検討としては、正常人 69 例、各種良性疾患 105 例、消化器癌 51 例、生殖器癌 32 例、肺癌 74 例、合計 331 例について血清

Key words: Neuron Specific Enolase, Tumor marker, Small cell lung cancer.

* 京都大学医学部附属病院核医学科

** 京都大学附属結核胸部疾患研究所

受付: 60 年 8 月 14 日

最終稿受付: 60 年 10 月 18 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院核医学科

小 泉 満

NSE 値を測定した。また、肺癌症例では、他の腫瘍マーカー Carcinoembryonic antigen (CEA) (第一ラジオアイソトープ研究所) および, Squamous cell carcinoma related antigen (SCC) (ダイナボット社) 濃度も同一患者血清で測定し, NSE との比較検討を行った。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 反応時間と反応温度の標準曲線に及ぼす影響

反応温度を室温として ($20^{\circ}\text{C}\sim 22^{\circ}\text{C}$), 第1反応時間を, 30, 60, 90, 120, 180, 210, 240 分と変化した場合の標準曲線に及ぼす影響について検討した。反応時間30分, 60分とくに高濃度において高値を呈したが, 150~240 分においては, ほぼ同様の標準曲線が得られ, コントロール血清の濃度もほぼ同一であった (Fig. 1)。

つぎに, 第1反応の反応時間を3時間とし反応温度を, 8°C , 室温 ($20^{\circ}\text{C}\sim 22^{\circ}\text{C}$), 37°C と変化した場合の標準曲線を作成したところ, ほぼ一致した標準曲線が得られ (Fig. 略), キットの指示書に従い, 第1反応は, 室温3時間の反応条件で良いと考えられた。

さらに, 第1反応は, 室温3時間と一定にして, 第2反応時間を, 15, 30, 60, 180 分と変えさせ標準曲線を作成した場合にも, ほぼ一致した標準曲線が得られた。よって, 第2反応もキットの指示書のとおりに, 30分間の反応条件で行った。

2) 標準曲線

標準 NSE 溶液を用いて作成した標準曲線は, 2~200 ng/ml の間できれいな曲線が得られ, 最小検出感度は 2 ng/ml である。10回のアッセイでの標準 NSE の変動係数 (C.V.) は, それぞれ, 1.17~4.80% と非常に良好な標準曲線の再現性が得られた (Fig. 2)。

3) 血清 NSE 濃度測定の再現性

同時再現性をみるために, 濃度の異なる4検体を同一キットを用いて10回測定したところ, 変動係数は, 2.4~7.7% であった。また, 3検体を異なる10キットで測定したキット間変動係数は, 4.6~9.6% と, 低濃度域でやや変動係数が高かったが, ほぼ満足すべき成績であった (Table 1)。

4) 希釈試験

濃度の異なる2種類の患者血清を, キット添付の希釈液にて, $1/2\sim 1/64$ 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することができた (Fig. 3)。

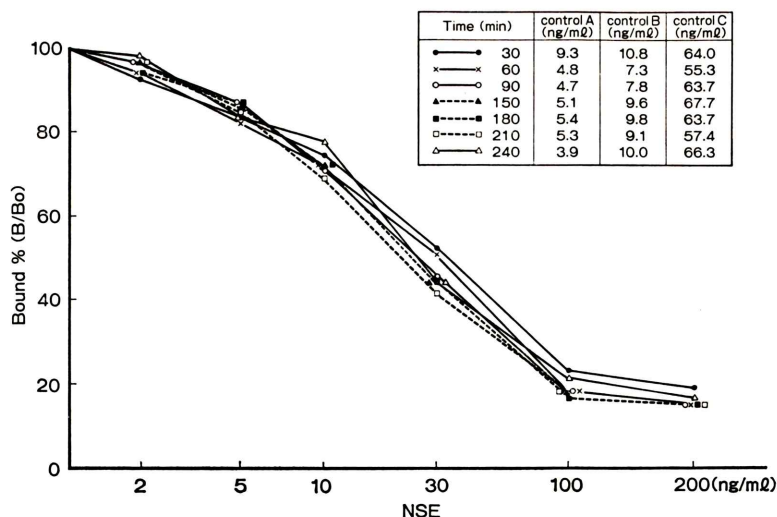


Fig. 1 Effect of incubation time on the standard curves and serum NSE values.

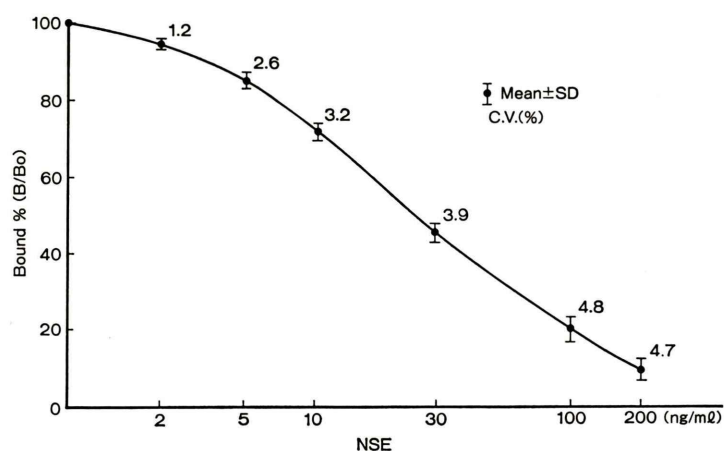


Fig. 2 Reproducibility of standard curve.

Table 1 Intra- and inter-assay variations

Sample	n	mean(ng/ml)	S.D.(ng/ml)	C.V.(%)
Intra-assay				
A	10	6.5	0.15	3.8
B	10	8.2	0.44	5.6
C	10	20.0	1.00	5.3
D	10	45.0	1.26	3.0
Inter-assay				
E	10	6.0	0.55	9.6
F	10	19.1	0.92	5.1
G	10	47.4	2.06	4.6

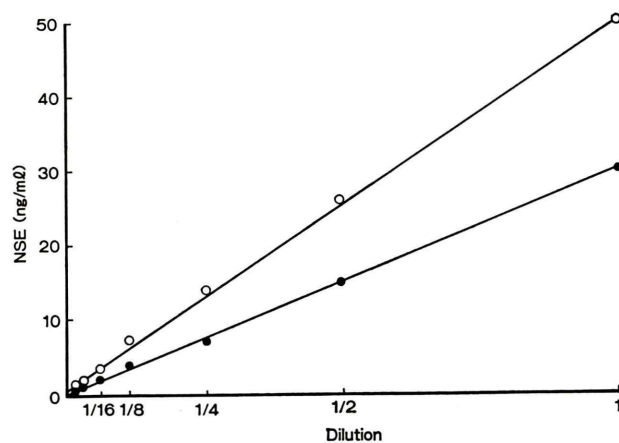


Fig. 3 Dilution test.

Table 2 Recovery

Sample		Added (ng)			
		0	5	15	50
A	measured(ng/ml)	3.0	8.5	18	57
	recovery (%)		(106)	(100)	(108)
B	measured(ng/ml)	6.7	11.5	21.5	66
	recovery (%)		(98)	(99)	(116)
C	measured(ng/ml)	26	29	40.5	80
	recovery (%)		(94)	(99)	(105)

Mean±SD=102.8±6.8%

	n	NSE (ng/ml)			
		5	10	20	100
Control	69	•	•	•	•
Pancreatitis	12	•	•	•	•
Cholelithiasis	12	•	•	•	•
Gastric ulcer	4	•	•	•	•
Diabetes Mellitus	3	•	•	•	•
Chronic renal failure	14	•	•	•	•
Chronic hepatitis	4	•	•	•	•
Liver cirrhosis	11	•	•	•	•
Diffuse panbronchiolitis	13	•	•	•	•
Emphysema	10	•	•	•	•
Bronchiectasis	5	•	•	•	•
Pulmonary tuberculosis	17	•	•	•	•
Miscellaneous benign pulmonary diseases	9	•	•	•	•

Fig. 4 Serum NSE levels in normal controls and patients with various benign diseases.

5) 添加回収試験

3種類の異なる血清に、キット添付の標準品を添加し、その回収率を検討した。血清検体の回収率は、94～119% 平均 102.8% でややばらつきはあるもののほぼ満足すべき結果であった (Table 2)。

6) 溶血の影響

NSE は赤血球内に存在することが知られているため^{7,11)}、溶血による NSE 測定値に及ぼす影響を検討したところ、溶血により NSE は、著しく高値として測定されることが明らかとなった。すなわち、非溶血時 5 ng/ml の正常人血液を軽度

溶血させると 12.8 ng/ml に、強溶血させた場合には 118 ng/ml と、見かけ上非常に高値に測定された。

2. 臨床的検討

1) 健常成人の血清 NSE 値

20歳～55歳までの成人男女69名の血清 NSE 値を測定したところ、2.0～12.6 ng/ml の間に分布し、その平均値は、5.01±1.84 ng/ml (平均値±標準偏差) であった。そこで、これまでの報告どおり^{9,10,12)} 血清 NSE 濃度の正常上限値を 10 ng/ml として以下の検討を行ったが、健常人69例中2例

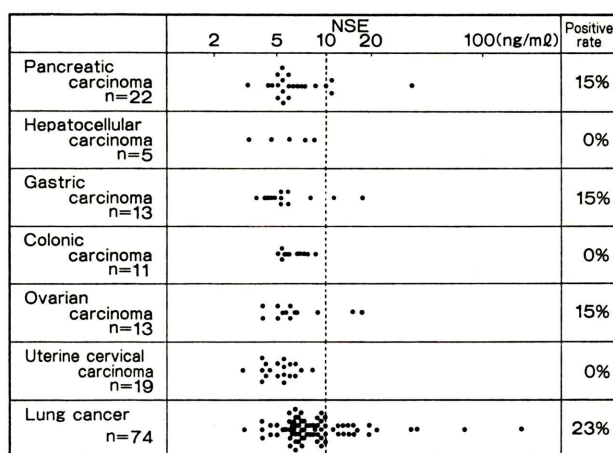


Fig. 5 Serum NSE levels in patients with various malignant diseases.

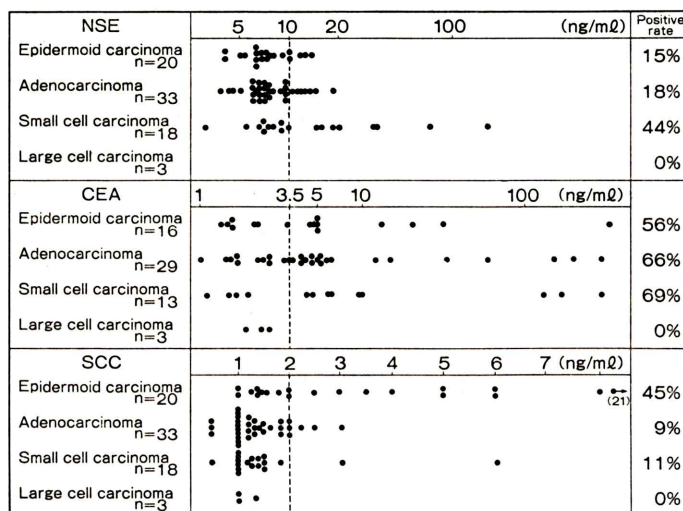


Fig. 6 Serum NSE, CEA and SCC levels in patients with lung cancer.

(2.9%) が偽陽性を示した。

2) 各種良性疾患患者の血清 NSE 値

各種良性疾患患者における血清 NSE 値は、114 例中 8 例 (7.0%) が 10 ng/ml を越える値を示した。ただ偽陽性例の多くは、12.5 ng/ml 以下のごく軽度の上昇であったが、び慢性汎細気管支炎の 1 例では 17 ng/ml、肺結核の 1 例では 14 ng/ml を示した (Fig. 4)。

3) 各種悪性疾患患者の血清 NSE 値

各種癌患者 157 例の血清 NSE を Fig. 5 に示す。

消化器癌、生殖器癌とも少数の陽性例は認められるものの大多数 (90.5%) では、血清 NSE 濃度は、10 ng/ml 以下であった。これに対し、肺癌患者では、74 例中 17 例 (23%) が陽性で、しかも著しい高値を示す症例が認められるため、さらに以下のごとく検討を加えた。

4) 肺癌病理組織像と血清 NSE, CEA, SCC 濃度

肺癌 74 例を病理組織型に従い分類すると、各群により、血清 NSE の陽性率、測定値には著しい

差異が認められた (Fig. 6). 15 ng/ml 以上の高値を示した肺癌組織型の多くは小細胞癌であり, 腺癌, 類上皮癌でも若干の陽性例が見られるものの, そのNSE濃度は1例を除き15 ng/ml 以下であった, これに対し, CEAは, 測定し得た61例中37例(61%)が, SCCでは, 74例中14例(19%)が陽性であった. CEAは, 腺癌, 類上皮癌, 小細胞癌いずれにおいても上昇する傾向が認められたがSCCでは, 類上皮癌での陽性率が高い.

肺癌患者血清CEA, NSE, SCC濃度の間には有意な相関関係は認められなかった ($p < 0.05$).

IV. 考 察

NSEは神経組織より精製されたものであるが, 発生源の類似したAPUD系腫瘍にも存在することが明らかにされている⁵⁾. したがって今回検討した肺小細胞癌の他に, 神経芽細胞腫, 褐色細胞腫におけるNSE測定の有用性も報告されている^{6,7,15)}.

NSE-RIAキットは, 2抗体法に基づいており測定値の再現性は良好で, 短時間のインキュベーションにより測定可能であった. 操作は簡便で, 希釈試験, 回収試験とも良好で, 基礎的検討は満足すべきものと考えられる. ただ, NSEが赤血球内に含まれているため溶血は測定値の著しい誤差をきたす. 検体の取り扱いには十分な注意が必要であるが, 癌末期には, ごくまれに二次性の溶血性貧血をきたすことがあり¹³⁾, この場合には正確な血清NSE濃度の測定は困難であると考えられる.

臨床的検討では, 健常成人69名の血清NSE濃度は, 5.01 ± 1.84 (平均値 \pm 標準偏差) ng/ml であったが, 他の報告も参考にし^{9,10,12)}, カットオフ値を10 ng/ml と設定した. 血清NSEの偽陽性を呈したものは, 健常成人2.8%, 良性疾患6.7%と少なく. しかもほとんどが, 12.5 ng/ml 以下のごく軽度の上昇であった. 一方, 肺癌, 特に小細胞癌では著しく高値をきたす症例があり, 肺小細胞癌の診断に有用であると考えられる. 肺小細胞癌は, 肺癌の中でも特異であり, 早期より転移しや

すく, 治療は, 手術よりも放射線療法, 抗癌剤が有効な症例が多い. したがって, NSEが著しい高値を示す場合には, 肺小細胞癌が強く疑われ治療の有効な選択の助けとなる.

しかし, 肺小細胞癌でもその陽性率は18例中8例(44%)とそれほど高くない. 陽性例の多くは進行癌でCEAも陽性の症例がほとんどであった.

これまでの報告では, 肺癌の腫瘍マーカーとしてはCEAが最も優れているとされている. 今回の検討でも, CEAは肺癌症例のうち61%で陽性であった. 一方, 子宮頸癌の腫瘍マーカーとして開発されたSCCは, 肺の類上皮癌でも上昇することが知られており, 今回の検討でもSCCの陽性率は肺癌のうち類上皮癌で最も高かった. すなわち, 肺癌では, CEAが最も優れた腫瘍マーカーで特に腺癌に有用とされており, NSEが高値の場合には小細胞癌を, SCCが高値の場合には類上皮癌を疑うことができよう. つまり, 肺癌では腫瘍マーカーの測定により, ある程度その病理組織像を予測することが可能になる訳で, きわめて興味深い.

血清NSE濃度の測定は今回検討した肺小細胞癌以外にも, 神経芽細胞腫^{6,7)}, 膵島癌¹⁰⁾や褐色細胞腫¹⁵⁾でも有用であると報告されている. 免疫組織染色ではこれらの腫瘍組織にNSEの局在が証明されているが, 血清NSE濃度を上昇させるにはかなりの腫瘍重量が必要なようである. 例えば米田らの報告¹⁵⁾では褐色細胞腫患者における血清NSE濃度は8.1 ng/ml (平均値) と正常人よりは有意に高値だが, NSE測定の臨床的有用性に関しては十分検討されていない. また神経芽細胞腫でもNSE上昇例はいずれも進行病期の症例である.

NSEを含めてこれら腫瘍マーカーが陽性となるのは, いずれもかなり進行した症例に多い. 今後さらに早期癌でも陽性として検出されるような感度に優れ, しかも疾患特異性の高い新しい腫瘍マーカーの開発が期待される.

V. ま と め

NSE・RIA キット (Pharmacia) の基礎的ならびに臨床的検討を行い、以下の結果が得られた。

1) 操作は簡便で、短時間で結果が得られ、測定値の再現性は良好であるなど、基礎的検討は満足できるものであった。

2) しかし、溶血した場合には見かけ上 NSE が高値として測定されるため、検体の取り扱いには注意が必要である。

3) 健常人、良性疾病患者における偽陽性率は低い。

4) 悪性腫瘍患者では肺小細胞癌で高値を示す症例が多い。したがって NSE, CEA, SCC の測定によりある程度肺癌の病理組織像の予測が可能と思われる。

謝辞：NSE・RIA キットを提供していただいたシオノギ製薬に深謝いたします。

文 献

- 1) Fletcher L, Rider CC, Taylor CB: Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta* **452**: 245-252, 1976
- 2) Marangos PJ, Zis AP, Clark RL, et al: Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: Structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res* **150**: 117-133, 1978
- 3) Odelstad L, Pählman S, Nilsson K, et al: Neuron-specific enolase in relation to differentiation in human neuroblastoma. *Brain Res* **224**: 69-82, 1981
- 4) Schmechel D, Marangos PJ, Zis AP, et al: Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science* **199**: 313-315, 1978
- 5) Tapia FJ, Polak JM, Barbosa AJA, et al: Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet* **i**: 808-810, 1981
- 6) Odelstad L, Pählman S, Lackgren G, et al: Neuron specific enolase: A marker for differential diagnosis neuroblastoma and Wilms' tumour. *J Ped Surg* **17**: 381-385, 1982
- 7) 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
- 8) 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* **i**: 583-585, 1982
- 9) Ariyoshi Y, Kato K, Ishiguro Y, et al: Evaluation of serum neuron-specific enolase as a tumour marker for carcinoma of the lung. *Gann* **74**: 219-225, 1983
- 10) Prinz RA, Marangos PJ: Serum neuron specific enolase: A serum for nonfunctioning pancreatic islet cell carcinoma. *Am J Surg* **145**: 77-81, 1983
- 11) Pahlman S, Esschner T, Bergh J, et al: Neuron-specific enolase as a marker for neuroblastoma and small-cell carcinoma of the lung. *Tumour Biol* **5**: 119-126, 1984
- 12) 木村茂樹, 山本良平, 加藤兼房, 他: Neuron-Specific Enolase (NSE) 測定試薬の開発と臨床評価. *最新医学* **5**: 1102-1103, 1985
- 13) Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Brithell TC, Athens JW, Foester J: Clinical hematology, The red cell fragmentation syndrome, 7th edition, Wintrobe MM, Lee & Febiger, Philadelphia, pp. 934-953, 1974
- 14) 有吉 寛: 肺癌の新しい腫瘍マーカー neuron specific enolase の意義. *癌の臨床* **30**: 569-573, 1984
- 15) 米田正弘, 杵野謙次, 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**: 545-549, 1985