

原 著

Neuron Specific Enolase (NSE) キットの
基礎的および臨床的検討

東京女子医科大学 ラジオアッセイ科 (科長: 出村博教授)

アベ ユウジ ジビキ カズコ モリカワ ジュンジ
阿部 裕司・地曳 和子・森川 惇二*
オダギリエミ デムラ レイコ デムラ ヒロシ
小田桐恵美・出村 黎子・出村 博

(受付 昭和61年4月1日)

Basic and Clinical Evaluation of Neuron Specific Enolase (NSE) RIA kit

Yūji ABE, Kazuko JIBIKI, Junji MORIKAWA*, Emi ODAGIRI,
Reiko DEMURA and Hiroshi DEMURARadioassay Center (Director: Prof. Hiroshi DEMURA)
Tokyo Women's Medical College

*Eiken ICL

Radioimmunoassay kit for neuron specific enolase (NSE) marketed by Eiken ICL was evaluated basically as well as clinically. The kit was handled easily and a whole procedure was rapid enough for a routine test. Average C.V. for intra- and inter-assay variations were 4.6 and 5.0%, respectively. Dilution and recovery tests gave good results. Normal serum levels for men and women were 6.2 ± 1.4 and 6.1 ± 0.8 ng/ml respectively. Incidence of positive test was as high as 60.7% in patients with lung cancer with the highest rate of 80% in small cell carcinoma. Incidence of positive test increased with an advance of stage in lung cancer and fluctuated reflecting an efficacy of the treatment. In addition, NSE was found to be elevated in patients with brain tumor, neuroblastoma, breast cancer, ovarian cancer, prolactinoma and acromegaly.

はじめに

NSEは解糖系の酵素である Enolase の一種で, Enolase が持つ3種類のサブユニット, α , β , γ のうち γ 型を有するものである。Enolase は3つのサブユニットの二重体構造をとり, 5種類のアイソザイム, $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$, $\beta\gamma$, $\gamma\gamma$ が知られている。これらのうち, $\beta\gamma$, $\gamma\gamma$ 型は特に神経細胞, 軸索突起に特異的であるため neuron specific enolase (NSE) と呼ばれている。NSE は, 中枢神経組織以外にも, 末梢神経組織, 神経内分泌細胞, 赤血球, 血小板, 血清等に微量に存在する事が判明している^{1)~3)}。さらに中枢神経組織の破壊

や, 神経内分泌細胞由来の腫瘍(以下 APUDoma)においても血中濃度の上昇がおり, 特に神経芽細胞腫および, 肺小細胞癌に特異性が高く, 腫瘍マーカーとして注目されている^{4)~5)}。今回我々は, 栄研イムノケミカル研究所で開発された, 「NSE (γ -エノラーゼ) “栄研”」キットを使用する機会を得, 基礎的ならびに臨床的検討を行なったので報告する。

方 法

キットの内容および調製 (50回用)

- 1) NSE 抗血清(凍結乾燥品) 1バイアル…精製水10ml を加え溶解する。
- 2) ^{125}I 標識 NSE 溶液 1バイアル…精製水8ml を加え混和する。

* 栄研 ICL

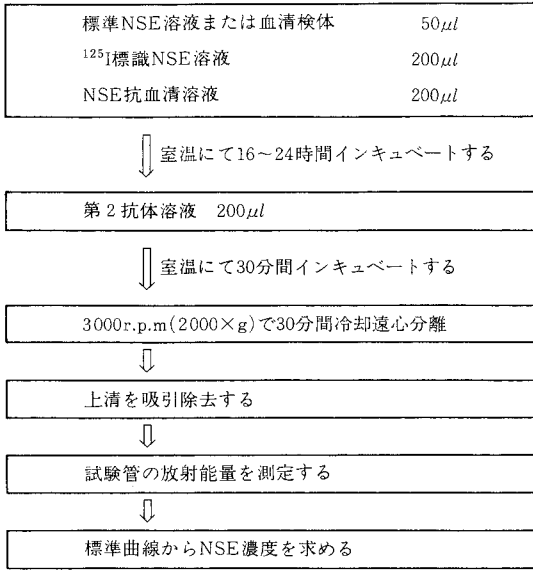
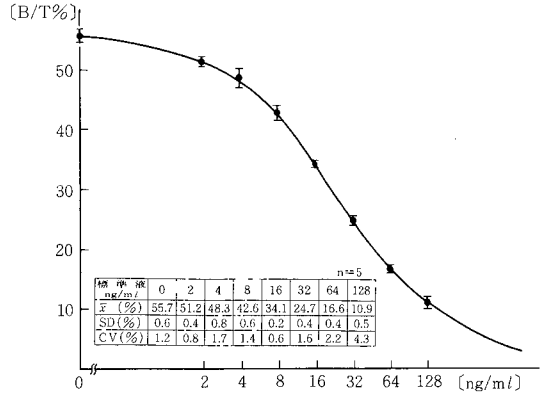


図1 操作法



15回の測定による標準溶液(B/T%)の測定間誤差

| | | | | | | | | |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 標準液 (ng/ml) | 0 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| \bar{x} (%) | 51.4 | 48.5 | 45.1 | 39.5 | 31.2 | 22.6 | 15.2 | 10.3 |
| SD (%) | 3.8 | 3.5 | 3.1 | 2.6 | 2.1 | 1.4 | 1.1 | 0.7 |
| CV (%) | 7.4 | 7.3 | 6.8 | 6.5 | 6.6 | 6.4 | 7.4 | 7.1 |

図2 標準曲線と測定間誤差

3) 標準NSE溶液0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ng/ml 各1バイアル...調製済み。

4) 第二抗体(凍結乾燥品)1バイアル...精製水10mlを加え溶解する。

操作法

操作法は図1に示した方法で行なった。

結果

I. 基礎的検討

1. 標準曲線

同一測定内で各濃度の標準液を5回測定し標準曲線の平均値±標準偏差(\bar{x} ±S.D.)を図2に示した。各濃度での変動係数(C.V.)は0.6~4.3%であった。さらに異なる測定間で15回測定した結果、各濃度のC.V.は6.4~7.4%であった。

2. インキュベーションの条件

第1インキュベーション時間の検討では、全ての操作を室温で行ない第2インキュベーション時間を30分とし、第1インキュベーション時間を0, 3, 6, 16, 20, 48時間と変化させた結果、16時間ではほぼ平衡に達し、以後48時間までほとんど変化がみられなかった(図3)。

第2インキュベーション時間の検討では全ての操作を室温で行ない第1インキュベーション時間を20時間とし、第2インキュベーション時間を0,

表1 再現性

| | | | | |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | n=10 | | | |
| | 測定内再現性 | | 測定間再現性 | |
| | Control 1 | Control 2 | Control 1 | Control 2 |
| \bar{x} ±SD (ng/ml) | 5.1±0.3 | 43.1±1.5 | 5.1±0.2 | 42.8±2.0 |
| CV(%) | 6.5 | 3.4 | 4.4 | 4.7 |
| SE | 0.1 | 0.5 | 0.1 | 0.6 |

15, 30, 60, 120分と変化させた結果、15~120分の間では大きな変動がみられなかった(図4)。

3. 再現性

2種類の濃度の異なる血清について測定内再現性と測定間再現性の検討を行なった。同一測定内において10回測定し再現性を求めた結果 \bar{x} ±S.D.はそれぞれ5.1±0.3, 43.1±1.5ng/mlであり、C.V.は、6.5, 3.4%であった。異なる測定間において10回測定した \bar{x} ±S.D.は、5.1±0.2, 42.8±2.0 ng/mlで、C.V.は、4.4, 4.7%であった(表1)。

4. 希釈試験

濃度の異なる4種類の血清について希釈試験を行なった結果、いずれも良好な直線性を示した(図5)。

5. 添加回収率試験

濃度の異なる2種類の血清にそれぞれ、0~128

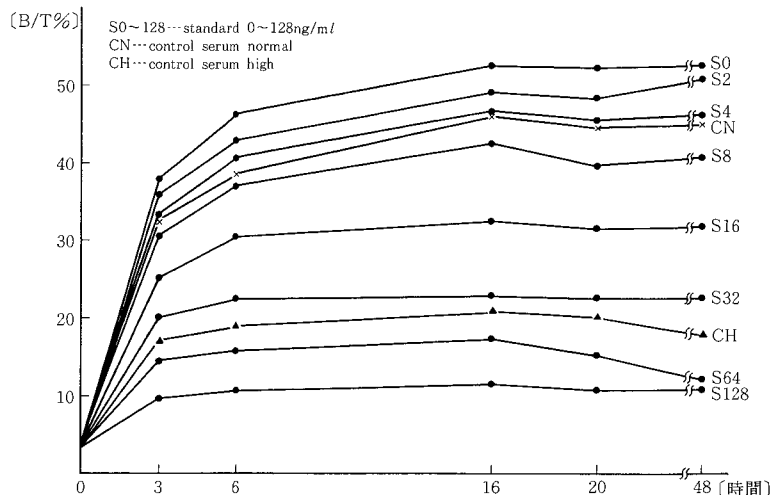


図3 第1インキュベーション時間の検討

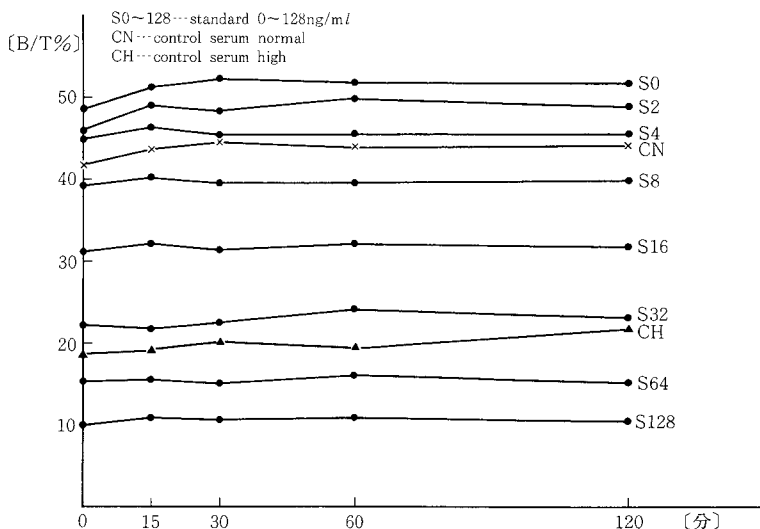


図4 第2インキュベーション時間の検討

ng/ml濃度の標準液を1:1に添加した際の回収率は、低濃度血清では、89.8~106.9%、平均97.8%、高濃度血清では、96.5~101.5%、平均98.4%であった(表2)。

6. 溶血による影響

凍結、融解により完全溶血させた5種類の正常者血清を同一人の非溶血血清で希釈し、ヘモグロビン(以下Hb)濃度8.3~155mg/mlとしそれぞれのNSE濃度を測定した。非溶血血清の平均は8.9ng/mlであったが、最高Hb濃度では平均27.1

ng/mlまで上昇した(図6)。また非溶血血清のNSE濃度を1として溶血血清のNSE濃度の上昇をみると、Hb濃度10ng/ml前後のとき平均約1.2倍、20mg/dl前後のとき平均約1.4倍、35mg/dl前後のとき平均約2倍の上昇を示した。

II. 臨床的検討

1. 対象

正常健康成人25例(男18例、女7例)と、肺癌28例、胃癌13例、膵癌6例、大腸癌12例、肝癌21例、乳癌9例、卵巣癌7例、副腎癌1例、甲状腺

表2 添加回収率試験

| 添加量 | Control 1 | | | Control 2 | | |
|--------|-----------|---------|-------|-----------|---------|-------|
| | 実測値 | 理論値 | 回収率 | 実測値 | 理論値 | 回収率 |
| 0ng/ml | 2.9ng/ml | — ng/ml | — % | 22.1ng/ml | — ng/ml | — % |
| 1 | 3.7 | 3.9 | 94.9 | 22.9 | 23.1 | 99.1 |
| 2 | 4.4 | 4.9 | 89.8 | 24.2 | 24.1 | 100.4 |
| 4 | 6.5 | 6.9 | 94.2 | 26.5 | 26.1 | 101.5 |
| 8 | 10.9 | 10.9 | 100.0 | 29.1 | 30.1 | 96.7 |
| 16 | 20.2 | 18.9 | 106.9 | 37.0 | 38.1 | 97.1 |
| 32 | 34.5 | 34.9 | 98.9 | 52.9 | 54.1 | 97.8 |
| 64 | 66.8 | 66.9 | 99.9 | 83.1 | 86.1 | 96.5 |

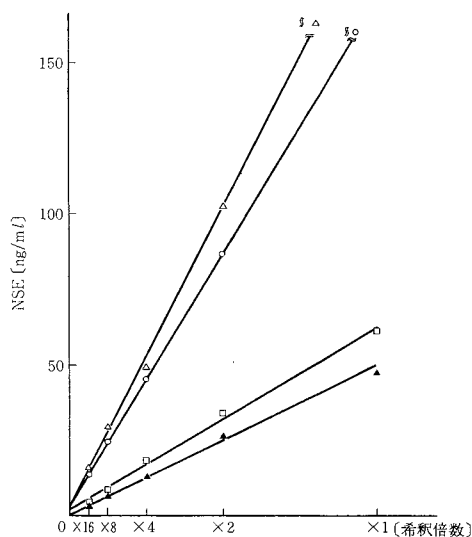


図5 希釈試験

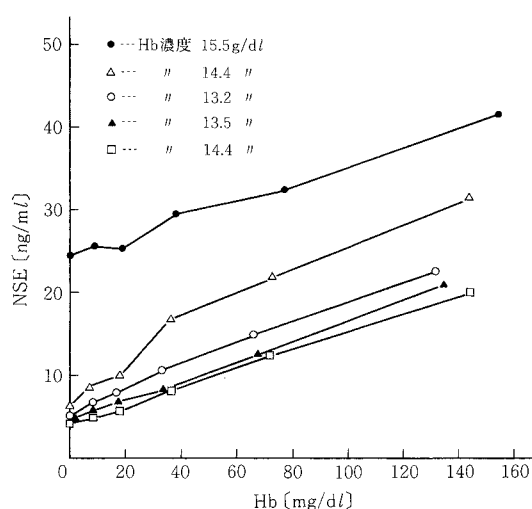


図6 NSE測定における溶血の影響

癌15例，グルカゴノーマ1例，インスリノーマ4例，神経芽細胞腫1例，脳腫瘍3例，末端肥大症12例，プロラクチノーマ6例，褐色細胞腫2例，肝硬変12例，肝炎20例の計173例を対象とした。

2. 正常者の血清 NSE 濃度

正常者の NSE 値は，3.4～9.3ng/ml の範囲に分布し， $\bar{x} \pm S.D.$ は， 6.1 ± 1.3 ng/ml で，男子 6.2 ± 1.4 ng/ml，女子 6.1 ± 0.8 ng/ml で男女差は認められなかった。

3. 各種疾患の血清 NSE 濃度

正常値を10ng/ml以下とし，各種疾患における NSE 濃度と陽性率を図7に示した。それぞれの陽

性率をみると，脳腫瘍100%(3/3)，神経芽細胞腫100%(1/1)，肺癌60.7%(17/28)，乳癌55.6%(5/9)，プロラクチノーマ50.0%(3/6)，卵巣癌42.9%(3/7)，末端肥大症33.3%(4/12)であり，褐色細胞腫，インスリノーマ，膵癌，肝硬変ではいずれも陽性例を認めなかった。

肺癌28例の成績を組織型別に図8に示した。小細胞癌10例，大細胞癌1例，腺癌5例，扁平上皮癌6例で，それぞれの NSE 濃度の平均値と陽性率は，小細胞癌52.3ng/ml，80.0%(8/10)，大細胞癌6.2ng/ml，0%(0/1)，腺癌11.1ng/ml，60.0%(3/5)，扁平上皮癌8.0ng/ml，33.3%(2/

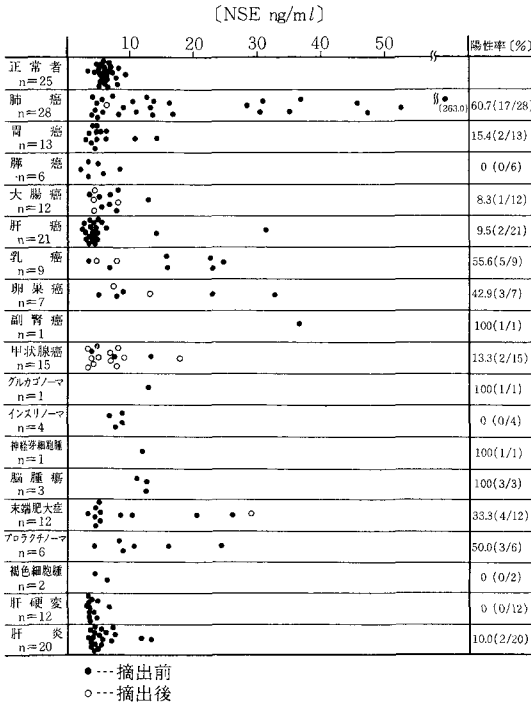


図7 正常者および各種疾患のNSE濃度と陽性率

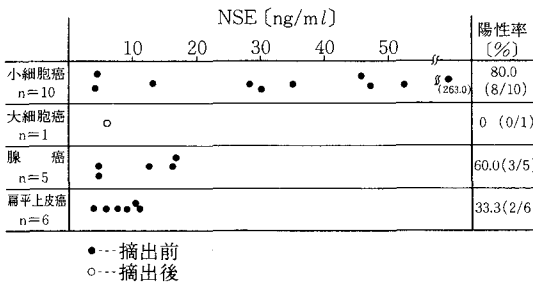


図8 肺癌における組織型分類によるNSE濃度と陽性率

6)であった。またこれらを病期別に分類すると(図9) Stage I 2例(小細胞癌, 腺癌各1例), Stage II 1例(小細胞癌), Stage III 3例(小細胞癌, 大細胞癌, 扁平上皮癌各1例), Stage IV 15例(小細胞癌6例, 腺癌4例, 扁平上皮癌5例)であった。NSE濃度の平均値と陽性率は, Stage I, 4.5 ng/ml 0%(0/2), Stage II, 4.5ng/ml, 0%(0/1), Stage III, 18.6ng/ml, 33.3%(1/3), Stage IV 33.0ng/ml, 73.3%(11/15)であった。

4. 治療経過に伴う血清NSEの変動

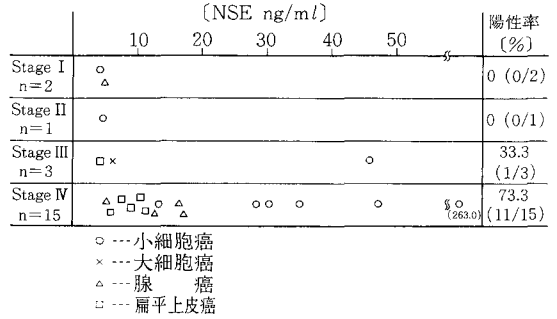


図9 肺癌における病期分類によるNSE濃度と陽性率

肺癌の中で小細胞癌の3症例について, 治療経過に伴うNSEの変動を図10に示した。症例1は臨床病期IIIで, 1回目の化学療法剤(Cyclophosphamide, Oncovin, Adriamycin; 以下C.O.A療法)施行直後のNSE 45.8ng/mlと高値であったが, 2回目施行後は, 4.0~6.1ng/mlと正常範囲まで低下した。臨床所見として2回目の化学療法施行後, 腫瘍の明らかな縮小を認めた。

症例2は臨床病期IVで, 治療前のNSEは263.0 ng/mlと異常高値を示した。1回目のC.O.A療法施行後, 5.0ng/mlまで低下し以後2回の施行により正常範囲内の値を示した。臨床所見は, 2回目の化学療法後腫瘍の縮小を認めた。

症例3は, 臨床病期IVで, 1回目のC.O.A療法施行後も, 30.3ng/mlと高値を示し, 2回目の施行直前には249.0ng/mlまで上昇し, 2回目の施行により193.2ng/mlから91.3ng/mlと減少した。しかし以後再び上昇し, 3回目の施行にもかかわらず265.5ng/mlと高値であった。化学療法剤をVP-16に変更したところ32.6ng/mlまで低下した。臨床所見として, 1回目の治療では著しい効果があり, 腫瘍の縮小も認められたが, その後は効果がみられず, むしろ悪化傾向を示した。化学療法剤を変え一時的に効果がみられ全身状態の改善が認められたが以後再び悪化した。

考 察

血中NSE濃度の測定はこれまでに, MarangosらのRIA法²⁾, 加藤らのEIA法⁷⁾などにより神経芽細胞腫, 肺小細胞癌に特異性が高い事が報告されている。今回の検討に使用した“NSE栄研”キッ

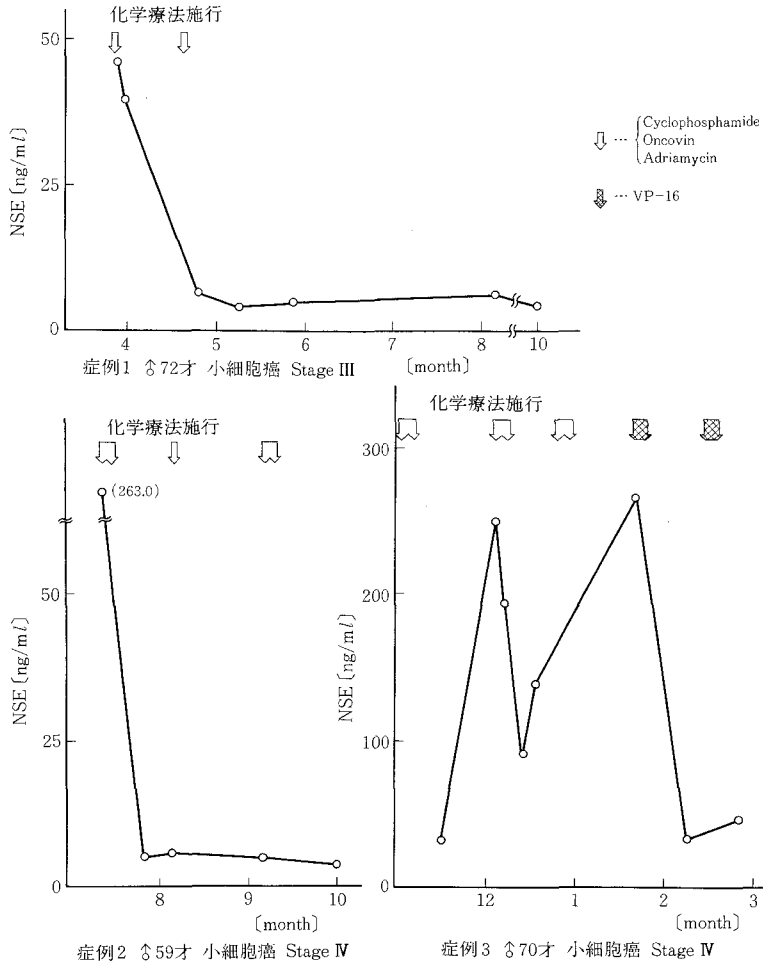


図10 治療経過に伴う血清NSEの変動

トは γ 型エノラーゼ測定用に開発されたもので、 α 、 β 型とは交叉しないため神経内分泌細胞由来の腫瘍(APUDoma)、肺癌などの診断に有用性が高いと考えられる。

本キットは B/F 分離に二抗体法を用い、操作法も簡便であり、基礎的検討において標準曲線は安定しており、再現性、回収率および希釈試験はいずれも良好な結果が得られた。インキュベーションの条件として、第1インキュベーションは室温で16~24時間、第2インキュベーションは室温で30分が最適と思われた。NSE測定における溶血の影響をみると、溶血度の上昇に伴いNSE濃度の明らかな上昇がみられた。これは赤血球中に存在するNSEが血球破壊により逸脱するためと

考えられ、溶血検体による測定は偽陽性と認められるため避けるべきであると考えられた。

臨床的検討では、肺癌に於て高い陽性率を示し、なかでも小細胞癌では80%と他の組織型に比べて高い値を示した。これは小細胞癌のなかで燕麦細胞癌の細胞質に神経分泌様顆粒が存在する⁸⁾ためと考えられる。また臨床病期別にNSE濃度を比較すると、早期の症例が少ないため明確な結論を得られないが、今回の検討では抽出可能な比較的早期の肺癌においては小細胞癌でも血中NSE濃度は低値であり、病期の進行に伴い陽性率も高くなる傾向がみられた。さらに進行例での治療に対するNSEの変動が明らかで、今回の症例では放射線療法を施行した例がなかったが、対象とし

た3例はいずれも化学療法施行後血中NSE濃度の著明な低下をみた。またいずれの症例においても臨床的に腫瘍の縮少が認められ、治療による効果が血中NSE値とよく一致した。従って血中NSE濃度の測定は治療効果の判定、あるいは再発のモニターとしての有用性が高いと思われた。

他の悪性腫瘍では、消化器癌に於て高値例が少なかったが、乳癌、卵巣癌では高値を示す例があり陽性率も50%前後と比較的高率であった。また甲状腺癌15例の組織型は、未分化癌1例、濾胞腺癌1例、乳頭腺癌13例であり、髄様癌の症例はなかった。高値を示した2例中1例は乳頭腺癌で肺に転移が認められた。1例は未分化癌で、脳、肺に転移が認められた。

下垂体腫瘍、神経芽細胞腫、インスリノーマ、グルカゴノーマ、甲状腺髄様癌などは、肺癌における燕麦細胞癌と同様の分泌顆粒が認められ^{9)~11)}この分泌顆粒がNSE上昇に関与していると示唆される。今回の検討で、プロラクチノーマ、末端肥大症、神経芽細胞腫、グルカゴノーマに於て高値例がみられたが、インスリノーマでは低値であり、今後これらの腫瘍についても症例を増し詳細に検討する必要があると思われた。

まとめ

栄研イムノケミカル研究所で開発されたNSE測定用キットを用いて基礎的、臨床的検討を行なった結果、基礎的検討では、操作法が簡便であり、再現性、回収率、希釈試験等いずれも良好な結果であった。溶血によりNSE値の上昇が認められるため、溶血検体での測定は避けるべきであると思われた。臨床的検討では、肺癌、特に小細胞癌に於て高い特異性を示し、組織型の診断、病期の診断、治療効果の判定、再発のモニターとし

て有用性が高いと思われた。

最後にキットを提供していただいた栄研イムノケミカル研究所に謝意を表します。

文 献

- 1) Schmechel, D., Marangos, P.J. and Brightman, M.: Neuron-specific-enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276 834 ~ 836 (1978)
- 2) Marangos, P.J., Schmechel, D., Parma, A. M., et al.: Measurement of neuron-specific (NSE) and non-specific (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue. *J Neurochem* 33 319~329 (1979)
- 3) Brown, K.W., Kynoch, P.A. and Tompson, R. J.: Immunoreactive nervous system specific enolase (14-3-2 protein) in human serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 101 257~264 (1980)
- 4) Tapia, F.J., Polak, J.M., Barbosa, J.A., et al.: Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumors. *Lancet* 1 808 ~ 811 (1981)
- 5) Carney, D.N., Marangos, P.J., Inde, D.C., 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)
- 6) 石黒士雄・伊藤喬広・ほか: 神経芽細胞腫の新しい血中マーカー物質: Nervous system-specific enolase (NSE). *日小外会誌* 18 1303 ~ 1309 (1982)
- 7) Kato, K., Suzuki, F. and Umeda, Y.: Highly sensitive immunoassays for three forms of rat brain enolase. *J Neurochem* 36 793~797 (1981)
- 8) 池田勤也: 肺癌の細胞診—臨床病理学的アプローチ. 医学書院, 79~82 (1985)
- 9) 日本病理学会編: 病理学領域における電顕応用. 医歯薬出版株式会社 387~390 (1985)
- 10) 石川七郎・ほか: 臨床腫瘍学. 朝倉書店 1303~1306 (1982)