

原 著

Neuron Specific Enolase の体内動態に関する研究 —ラットおよびヒトにおける血中半減期, 代謝, 排泄—

東京女子医科大学 第2内科学教室 (主任: 出村 博教授)

モリ カワ ジュン ジ
森 川 惇 二

(受付 平成2年12月21日)

Studies on the Metabolic Dynamics of Neuron Specific Enolase (NSE): The Half-life, Metabolism and Excretion in Human and Rat

Junji MORIKAWA

Department of Medicine II (Director: Prof. Hiroshi DEMURA)
Tokyo Women's Medical College

The dynamics of neuron specific enolase (NSE), a useful tumor maker for a diagnosis and an observation of the therapeutic effect of neuroblastoma and small cell lung carcinoma, were studied in rats and humans using immunological and radiometric methods.

Our immunological study confirmed that the half-life of NSE, its disappearance rate from the blood, was 2 hours and 40 minutes in human and 2 hours and 30 minutes in rats. It was suggested that the liver was the main metabolic organ, since portal ligation resulted in very slow clearance and large proportion of unmetabolized NSE compared with normal. A systemic autoradiography of rats produced 1 hour after NSE administration showed a high concentration of radioactivity distributed in the renal cortex and blood vessels. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the radioactivity revealed that the kidneys as well as the plasma contained NSE and other radioactive metabolites at the ratio of 40% and 60%, respectively.

Within 24 hours after administration, 94.0% and 1.2% of the given dose of NSE were excreted into urine and feces respectively. The residual portion in the body after 72 hours was only 1.3%. This implies that the main route of the excretion of NSE is the kidney. However, in clinical cases with hepatic and renal dysfunction the NSE level remained within the normal range, and no distinct effect of the liver and the kidney on NSE was recognized.

緒 言

哺乳動物組織に広く分布する enolase (EC 4.2.1.11) は, Mg^{2+} の存在下で 2-phosphoglycerate から phosphoenolpyruvate への反応を触媒する古くから知られている解糖系酵素である. enolase は, 3 種類の subunit (α , β , γ) から成る homodimer または hybrid で, 現在 5 種類の isoenzyme ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$) の存在が確認されている. このうち, γ -subunit は 1975 年

Rider と Taylor¹⁾ によってラット脳で発見された. 翌年 Marangos²⁾ が, この γ -subunit は彼らより 10 年以前に Moore と McGregor³⁾ によって既に発見されている 14-3-2 神経組織特異蛋白と同じであることを報告した. 神経生化学の研究が進み, $\gamma\gamma$ -enolase が neuron のみに分布し, glia 細胞中では存在しないことから 1978 年 Schmeckel ら⁴⁾ が $\gamma\gamma$ -enolase を neuron-specific enolase (NSE) と命名した. しかし, その後各組織の詳しい免疫

組織化学的検索により神経組織中のみならず脳下垂体細胞、膵ラ島細胞など、いわゆる神経内分泌細胞(APUD)、赤血球、白血球、血小板、リンパ球⁵⁾などにも脳に較べると微量ではあるがかなりの濃度でNSEが含まれることが明らかにされている。

NSEは臓器特異性があるものの、種特異性はなく、異種の動物間に交差反応が認められる。この免疫特異性を利用した高感度免疫アッセイ法が開発された。これらの方法により1981年にTapiaら⁶⁾、次いで翌年にCarneyら⁷⁾は、神経内分泌細胞から発生する腫瘍(APUDoma)が多量のNSEを産生していることを報告した。特に腫瘍細胞の著しい増殖と壊死、崩壊を伴う神経芽細胞腫⁸⁾や肺小細胞癌⁷⁾で血清NSEの高値が認められた。さらに、血清NSEはAPUD系細胞由来の腫瘍に対し、診断のみならず治療効果の判定に重要なマーカーとされている。しかしながらNSEの血中消失速度などの体内動態はほとんど不明である。そこで我々は、NSEの血中半減期、代謝および排泄に関し、放射能測定および免疫活性の測定により、ラット並びにヒトにおけるNSEの体内動態挙動に関して基礎的・臨床的検討を加え、知見を得たので報告する。

対象および方法

1. 実験動物

4～8週齢のWister系雄性ラットを日本チャールス・リバー(株)より購入し、恒温(22±1℃)、恒湿(60±10%)の環境下で、1週間の予備飼育の後、挙動正常で体重増加の順調なものを選んで実験に供した。飼料としては、日本クレア(株)社製飼育・繁殖用固形飼料CE-2を用い、飲水は放射能測定用として0.1%KI水を与えた。全実験期間中、飼料および水は自由に摂取させた。

2. 精製ヒトNSEと¹²⁵I標識NSEの作製

精製ヒトNSEは愛知県心身障害者コロニー加藤兼房博士らがヒト脳抽出液よりDEAEセルロースカラム、ゲル濾過法、等電点分画法、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを組み合わせて精製した標品⁵⁾⁹⁾を使用した。この精製NSEはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

法(SDS-PAGE)で分子量約50,000の位置に単一バンドを示し、投与するまで5mM Mg²⁺を含む50%グリセロール(pH 7.0)中に-20℃で保存した。

¹²⁵I標識NSEは20μgの精製ヒトNSEと1mCiNa¹²⁵I(RCC社)を25μg Iodogen¹⁰⁾(1,3,4,6-tetrachloro-3α, 6α, diphenylglycoluril)のコートチューブ中で15分間反応させて標識した。なお、¹²⁵I標識NSEと遊離の¹²⁵IはSephadex G-25およびDEAEで分離した。得られた標識化合物の比放射能は35μCi/μgであり、NSE 1分子に¹²⁵I原子が1個標識された計算となる。使用直前にセルロースアセテート膜電気泳動で検定した放射化学的純度は96.0%以上であった。

3. NSE免疫活性測定

精製ヒトNSEを各群10匹のラットに静脈内投与後、所定時間に尾静脈より採血し血清検体を得た。測定法は1985年我々が本邦で最初に開発したradioimmunoassay¹¹⁾の変法を用いた。すなわち検体または標準NSE溶液(各々0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128ng/mlとなるようにNSEフリーのヒト血清で調製)50μl, 1%正常家兎血清を含有する抗ヒトNSE家兎血清溶液200μl(60,000倍希釈)を加え25℃で20時間プレインキュベートし、さらに¹²⁵I標識NSE溶液200μl(約22,000cpm)を加えて25℃で20時間反応させたのち、至適沈降比に調製した抗家兎IgG山羊血清溶液200μlを加え、生じた沈澱を3,000rpmで30分間4℃で冷却遠心分離する。上清を吸引除去し、沈澱の放射能を計測する。同時に測定した標準NSEの標準曲線から検体中のNSE濃度を求め、所定時間での濃度を次式のように投与時の血清NSEの理論値に対する割合で表現した。

NSE免疫活性濃度比(%)

$$= \frac{\text{血清検体(ng/mg)}}{\text{投与NSE量(ng)/体重(g)} \times 0.042} \times 100$$

なお、赤血球中には少量ながらNSEが存在するため、肉眼的に溶血の認められた検体は対象から除外した。

4. 血液中放射能の測定

¹²⁵I標識NSEを静脈内投与後、所定時間に各群

10匹のラットからヘパリン処理したマイクロピペットを用い、尾静脈より採血し、50 μ lの放射能を γ -ウエルカウンター (Aloka, ARC-251) で計測した。血液中放射能は、次式に基づき投与時の血液中放射能理論値に対する割合で求めた。

血液中放射能濃度比(%)

$$= \frac{\text{血液中放射能(dpm/ml)}}{\text{投与放射能(dpm)/体重(g)} \times 0.07} \times 100$$

なお、計数効率の補正には外部標準線源法を用いた。

5. 血漿、肝臓および腎臓中放射性代謝物の分析

正常ラット、肝門脈結紮および腎動脈結紮ラットに¹²⁵I 標識 NSE を静脈内投与した。所定時間に下大静脈よりヘパリン採血後、放血死させ直ちに肝臓および腎臓を摘出しホモジナイズした。得られた血漿、肝臓および腎臓のホモジネートを精秤し、総放射能を計測した(F_t)。次に5%TCA(トリクロロ酢酸)を等容量加え沈澱物を遠心分離し、沈澱物中の放射能を計測した(F_{tca})。

なお、F_t値およびF_{tca}値は次式に基づき計算した。

$$F_t \text{ 値} = \frac{\text{試料中放射能(dpm/ml)}}{\text{投与放射能(dpm)/体重(g)}} \times 100$$

$$F_{tca} \text{ 値} = F_t \text{ 値} \times (\text{TCA 処理沈澱画分}(\%) / 100)$$

さらに血漿、肝臓および腎臓のホモジネートの SDS-PAGE を行い、泳動後のゲル上の放射能分布をフジックスパイオイメージアナライザー BAS2000により分析した。

6. 尿中 NSE 免疫活性および尿・糞中放射能測定による排泄率の測定

精製 NSE および¹²⁵I 標識 NSE を静脈内投与したラットを代謝ケージに収め、投与後72時間までの尿および糞を分画採取し、各々均質化させた後、尿1.0mlのNSE免疫活性測定および放射能を計測した。また、糞はその300~500mgを精秤し、放射能のみ計測後、尿・糞中への排泄率(%)を求めた。

7. 全身オートラジオグラフィ

¹²⁵I 標識 NSE の投与1時間後にラットをエーテル麻酔し、呼吸停止後液体窒素中に浸漬して急速凍結した。マイクローム(ライツ1400型)で厚

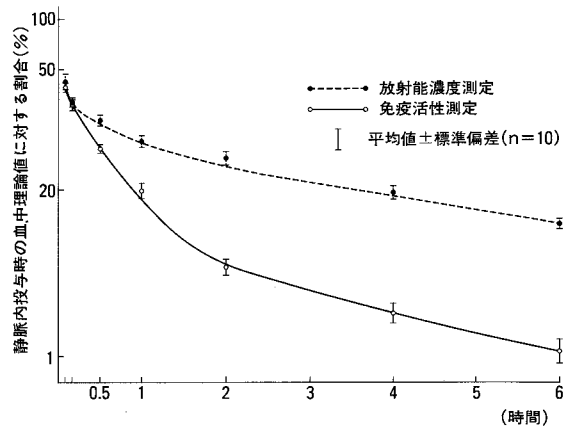


図1 NSE 静脈内投与後の免疫活性および放射能の血中消失パターン(ラット)

さ15 μ mに薄切し、切片を凍結乾燥後ルミラー膜で被覆密封して高感度X線フィルム(サクラMARG)と密着し、適正露出期間の後写真処理を行った。

8. ヒト対象

2歳男児の左副腎原発神経芽細胞腫の全摘出時の血中NSEの推移より血中半減期を求めた。肝・腎機能障害による血清NSEの変動を調べるため肝炎患者28例、肝硬変患者39例および腎機能障害として腎炎患者33例、透析患者13例を対象とした。なお、コントロールとして健常者血清30例を使用した。

結果

1. NSE 血中半減期(ラット)

精製 NSE 15 μ g/kg を10匹のラットに静脈内投与後、所定時間に血清NSE免疫活性を測定した。図1に示すように5分から10分、1時間、4時間、6時間までの各観察時点の投与量に対する割合の mean \pm SD はそれぞれ79.3 \pm 3.8, 61.4 \pm 4.2, 19.5 \pm 2.0, 3.6 \pm 0.3, 2.2 \pm 0.3%であり、平均変動係数は1.2%(0.2~2.3)とよく近似していた。投与後2時間までは30~40分、2時間以降は2時間30分の半減期で血中から消失し、投与後24時間後に10ng/ml以下に低下した。

一方、¹²⁵I 標識 NSE 6.28 μ Ci 投与後の血中放射能の時間的推移は5分、10分、1時間、4時間、6時間の各時点で、42.72 \pm 5.0, 31.66 \pm 1.6,

表1 血漿中放射能濃度 (^{125}I -NSE 投与後1時間のラット)

		総放射能 (F_t 値)	TCA 処理 沈澱画分(%)	TCA 沈澱画分 放射能 (F_{tca} 値)
正 常	5分	1,230.92±201.39	89.74± 9.57	1,104.63±126.40
	15分	975.14±612.32	78.25± 6.58	763.05± 54.27
	30分	502.92± 47.27	48.72± 2.70	245.02± 32.83
	1時間	308.92± 33.05	43.56± 2.63	134.57± 9.31
肝門脈 結紮	5分	3,340.00±203.74	86.66± 5.97	2,894.44±237.34
	15分	3,715.57±352.98	90.46± 5.41	3,361.10±369.71
	30分	2,360.97±278.40	85.05± 6.00	2,008.00±188.75
	1時間	2,321.20±201.39	92.98±12.39	2,158.25±309.47
腎動脈 結紮	5分	1,755.05±124.62	73.53± 4.43	1,290.49±103.54
	15分	1,264.93± 96.88	70.03± 2.40	885.83± 80.00
	30分	911.65± 75.33	73.84± 5.29	673.16± 55.60
	1時間	468.89± 32.46	48.55± 5.02	227.65± 27.89

表2 肝臓および腎臓における放射能濃度 (^{125}I -NSE 投与後5分, 1時間のラット)

	投与後5分のラット			投与後1時間のラット			
	正 常	肝 門 脈 結 紮	腎 動 脈 結 紮	正 常	肝 門 脈 結 紮	腎 動 脈 結 紮	
肝 臓	総放射能 (F_t 値)	473.17±52.36	38.36± 2.07	394.89±42.52	141.41±17.33	301.17±23.85	211.29±19.94
	TCA 処理 沈澱画分(%)	81.67± 6.23	75.88± 9.64	89.60± 7.55	49.57± 2.41	80.14± 3.64	49.24± 3.31
	TCA 沈澱画分 放射能 (F_{tca} 値)	386.44±33.18	29.11± 4.01	353.82±39.36	70.10± 5.93	241.36±16.51	104.04± 8.92
腎 臓	総放射能 (F_t 値)	316.84±23.77	340.91±29.41	7.91± 0.78	212.11±35.82	300.83±33.06	63.62± 4.67
	TCA 処理 沈澱画分(%)	72.86± 5.34	74.88± 6.63	41.58± 5.09	47.70± 2.17	76.34± 4.38	58.43± 6.89
	TCA 沈澱画分 放射能 (F_{tca} 値)	230.85±25.82	255.27±23.14	3.29± 1.01	101.18± 6.82	229.65±14.58	37.17± 5.61

19.19±1.4, 9.53±0.8, 6.20±0.4%であり, 投与1時間後には血中放射能が19.2%に低下した。その後, 減少の割合が緩やかとなって, 1時間以降は3時間30分の半減期を示し, 24時間後には5分後の1%以下に減少した。

2. NSE 代謝物の分析 (ラット)

表1, 2に ^{125}I 標識NSE投与後のラットの血漿, 肝臓および腎臓中の F_t およびTCA沈澱画分(%)と計算により求めた F_{tca} の時間的推移を示した。

血漿中では正常および腎動脈結紮ラットとも投与後5分の F_t は減少し, 1時間後には1/4となっ

た。同時に F_{tca} は1/10まで低下し5分時点より1時間後では分解・代謝がより進んでいることがわかる。しかし, 肝門脈結紮ラットの1時間後 F_t は高値を示し, さらに F_{tca} 値も正常ラットの2倍であった。

肝臓中の F_t , F_{tca} とも正常および腎動脈結紮ラットの傾向は同じであった。肝門脈結紮ラットでは当然のことながら F_t は5分後ではまだ低値を示していた。1時間後には肝臓に集積され, 大分子に留まる代謝物が多いことを示唆した。

腎臓中についても肝臓と同様に肝門脈の結紮で腎臓に大分子代謝物の割合が多いことを示す結果

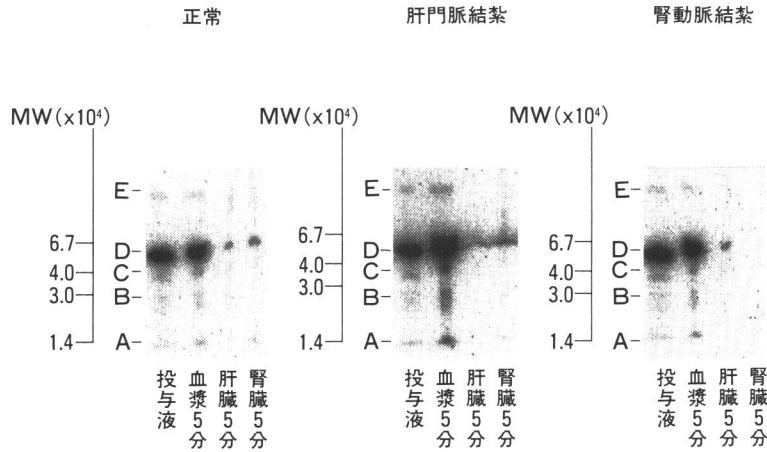


図2 血漿，肝臓および腎臓における放射性代謝物の SDS-PAGE オートラジオグラフ (^{125}I -NSE 投与後 5 分のラット)

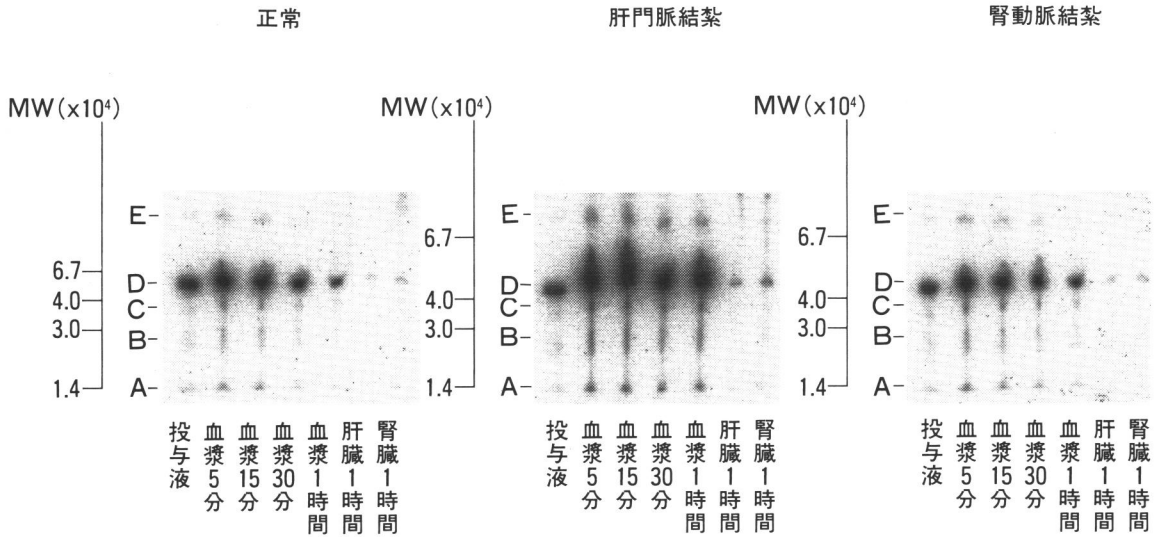


図3 血漿，肝臓および腎臓における放射性代謝物の SDS-PAGE オートグラフ (^{125}I -NSE 投与後 1 時間のラット)

であった。

図2および図3に投与後5分，1時間の血漿，肝臓および腎臓中のNSE代謝物をSDS-PAGEにより分離し放射能分布を示した。その際に認められた放射性画分を低分子側からA，B，C，D，Eと名付け，それぞれの画分の放射能配分比を泳動像より求めた結果を表3，4に示した。この際Dは精製NSEと泳動位置が一致したことからNSE未変化体と考えられた。血漿のSDS-PAGE

は正常，肝門脈結紮および腎動脈結紮ラットで各時点のTCA沈澱画分の90%以上がNSE画分に認められた。また肝臓と腎臓では放射性配分比が正常，肝門脈結紮および腎動脈結紮ラットとも各画分の電気泳動パターンに大きな相違は認められず，TCA沈澱画分の70~90%がNSE未変化体であることが推測できた。なお投与後5分の腎動脈結紮ラットにおける腎臓の放射能配分比は放射能が低く，有意な放射能分布が得られなかった。

表3 血漿中放射性代謝物の配分比 ($^{125}\text{I-NSE}$ 投与後 5 分, 1 時間のラット)

			TCA 沈澱画分 放射能濃度 (F_{TCA} 値)	放射性代謝物の配分比(%)				
				A	B	C	D	E
投与後 1 時間	正 常	5 分	1,104.63±126.40	1	2	3	92	1
		15分	763.05± 54.27	1	2	3	92	2
		30分	245.02± 32.83	1	2	4	91	1
		1 時間	134.57± 9.31	2	2	3	90	3
	肝門脈結紮	5 分	2,894.44±237.34	1	2	3	92	2
		15分	3,361.10±369.71	1	2	3	92	2
		30分	2,008.00±188.75	1	2	3	91	2
		1 時間	2,158.25±309.47	1	2	4	91	2
	腎動脈結紮	5 分	1,290.49±103.54	1	2	2	93	1
		15分	885.83± 80.00	2	2	3	92	1
		30分	673.16± 55.60	2	2	4	91	1
		1 時間	227.65± 27.89	3	3	4	90	1

表4 肝臓および腎臓中放射性代謝物の配分比 ($^{125}\text{I-NSE}$ 投与後 5 分, 1 時間のラット)

			TCA 沈澱画分 放射能濃度 (F_{TCA} 値)	放射性代謝物の配分比(%)				
				A	B	C	D	E
肝	投与後 5 分	正 常	386.44±33.18	3	6	8	75	8
		肝門脈結紮	29.11± 4.01	1	3	6	87	3
		腎動脈結紮	353.82±39.36	—	1	10	86	3
臓	投与後 1 時間	正 常	70.10± 5.93	—	3	7	90	—
		肝門脈結紮	241.36±16.51	1	3	6	80	10
		腎動脈結紮	104.04± 8.92	3	3	4	88	2
腎	投与後 5 分	正 常	230.85±25.82	9	2	10	70	9
		肝門脈結紮	255.27±23.14	3	4	7	79	7
		腎動脈結紮	3.29± 1.01	—	—	—	—	—
臓	投与後 1 時間	正 常	101.18± 6.82	4	4	4	77	11
		肝門脈結紮	229.65±14.58	5	5	8	70	12
		腎動脈結紮	37.17± 5.61	3	3	2	84	8

腎動脈結紮投与後 5 分のラットについては有意な放射能分布が得られなかった。

3. 尿・糞中排泄率の測定 (ラット)

精製 NSE $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 静脈内投与後のラット ($n=3$) の 24 時間尿の NSE を免疫活性測定により求めた結果, 24 時間尿中 NSE 排泄率は 0.20 ± 0.05 (mean±SD)% であった。

次に, ^{125}I 標識 NSE の静脈内投与後 6, 24, 48, 72 時間まで各区分ごとに尿および糞中放射能を投

与量で除した値を区間排泄率とし, 全観察区間の総和を累積排泄率として図 4 に示した。

尿への排泄率は, 0~6 時間では投与量の $57.31 \pm 8.08\%$ で, なお 43% 程度が体内に存在していることを示唆した。投与後 24 時間で $93.93 \pm 2.68\%$ が, 48 時間では $95.50 \pm 1.24\%$ が尿中に排泄された。糞中への排泄はほとんど計測されず, 24

時間までの累積排泄率でわずかに $1.15 \pm 0.23\%$ に過ぎなかった。また72時間後における体内残存率は $1.25 \pm 0.25\%$ と僅少であった。

4. 全身オートラジオグラフィ (ラット)

^{125}I 標識 NSE 静脈内投与 1 時間後の結果を図 5 に示した。まず、左腎臓を通る切断面からは腎臓皮質が非常に高い放射能を示しており、続いて血管壁、赤脾および骨髄がいくぶん高濃度であつ

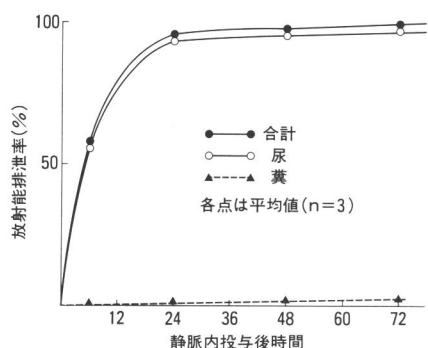


図4 尿・糞中放射能排泄率 (ラット)

た。正中線面では大動脈および動脈系に高い濃度の黒化像を記録した。肝臓、胃内容物および腸管内容物にもわずかな放射能を認めた。

5. ヒト NSE 血中半減期

症例は各種画像診断、血液・尿検査の結果臨床病期 Stage III の左副腎原発神経芽細胞腫と診断された 2 歳男児である。Cyclophosphamide と Adriamycin を中心とする化学療法を開始し腫瘍が縮小し、血清 NSE 値の低下傾向が認められたものの術前 81ng/ml と異常高値を示した例である。入院 3 カ月目の腫瘍全摘術直後より血清 NSE 値を連続で測定した。手術直後 130ng/ml と高値を示し、1 時間30分以降は 2 時間20分の半減期で血清中より消失した(図 6)。全摘術後化学療法と平行して同時に体外照射 (30Gray) を施行し、NSE をはじめ各種の腫瘍マーカーも完全に正常範囲内にとどまっていた。

6. 肝臓および腎臓機能障害患者における血清 NSE 値の比較検討

健常者 ($n=30$)、肝炎患者 ($n=28$)、肝硬変患

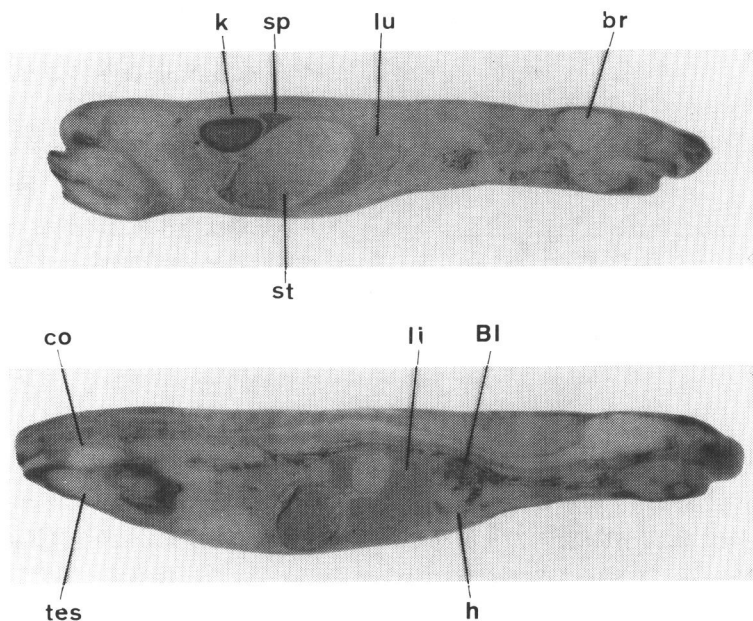


図5 全身オートラジオグラフィ (ラット)

^{125}I 標識 NSE 静脈内投与 1 時間後のラット

br: 脳, h: 心, lu: 肺, li: 肝, k: 腎, sp: 脾, st: 胃, co: 結腸, tes: 精巣, Bl: 血液

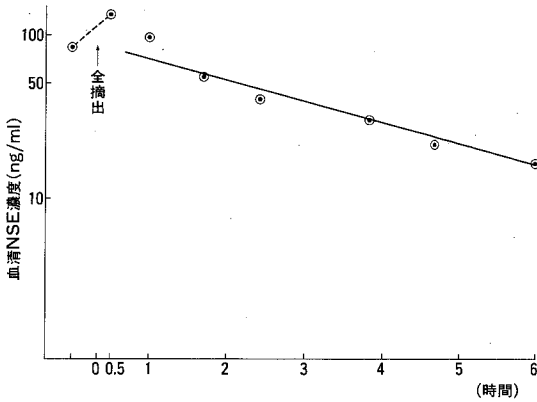


図6 副腎原発神経芽細胞腫の全摘出術症例における血中消失パターン

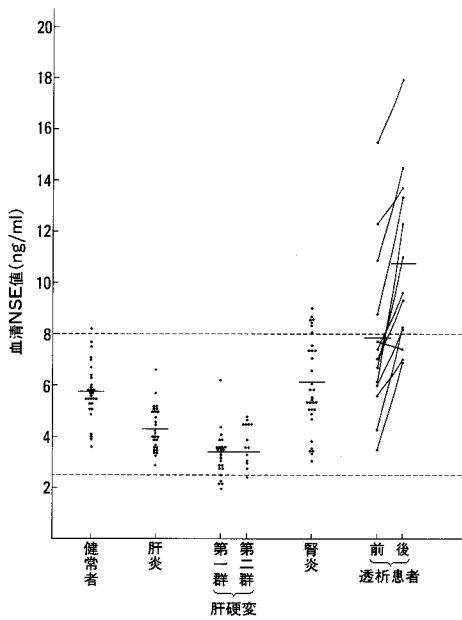


図7 健常者および肝臓・腎臓機能障害患者の血清NSE値

者 (n=39), 腎炎患者 (n=33) および透析前患者 (n=13) の血清 NSE 濃度を図 7 に示した。各群の mean±SD はそれぞれ, 5.73 ± 1.08 , 4.32 ± 0.86 , 3.40 ± 0.84 , 5.96 ± 1.78 , 7.83 ± 3.34 ng/ml であった。重篤な肝機能障害, 特に肝硬変患者は肝癌を併発していない症例のみを対象として, 臨床上の Child 分類 A, B を第 1 群 (3.31 ± 0.88 ng/ml) とし, Child 分類 C を第 2 群 (3.79 ± 0.80 ng/ml)

ml) とした。なお, 第 2 群については採血時に, ①総ビリルビン 3.0 mg/dl 以上, ②肝性胆症陽性, ③腹水あり, ④血清アルブミン 3.0 g/dl 以下, ⑤栄養不良の 5 項目のうち 2 項目以上を満たすものに限定した。その結果, 第 1 群と第 2 群の NSE に有意差はなかった。また, 腎機能障害患者として腎炎および透析患者の透析前の血清 NSE はそれぞれ 5.96 ± 1.78 , 7.83 ± 3.34 ng/ml であった。透析後では 10.75 ± 3.40 ng/ml と高値を示し, 13 例中 12 例が平均 3.5 ng/ml の上昇を示した。

考 察

血清 NSE は神経芽細胞腫や肺小細胞癌など, 神経内分泌的性格を有する腫瘍のマーカーとして診断および治療経過の観察に有用である。しかしながら, 腫瘍組織より血中に放出した NSE がどのくらい滞留してどのように代謝・排泄されるかなどについて現在までのところ詳細な研究報告がなく, 加藤ら¹²⁾が放射線治療を受けた胸腺カルチノイド患者を経日測定し, その成績より血中半減期を 24 時間以内と推定しているのみである。

今回我々は, NSE の静脈内投与後におけるその血中半減期, 代謝臓器の検索, 尿・糞中排泄および臓器への分布について NSE 免疫活性測定法または ¹²⁵I 標識 NSE 投与による放射能測定法により検討した。

はじめに統計処理可能なラットで NSE の血中半減期を求めた。その結果, 免疫活性測定による血中半減期は投与後 2 時間まで 30~40 分であり, 2 時間以降は 2 時間 30 分の半減期で血中から消失していた。また, 放射能測定では投与後血中から他の組織に速やかに移行し, 1 時間以降は見かけ上 3 時間 30 分の半減期を示した。両測定による半減期の差異は表 1, 3 に示したように正常ラットにおける 1 時間時点での血漿中総放射能 (F_t 値 = 308.92) から SDS-PAGE オートラジオグラフより求めた NSE 成分放射能 (F_c 値 = 121.11) を差し引いた分にほぼ相当する。すなわち ¹²⁵I 標識 NSE 以外の放射性代謝物の存在を意味している。

ヒトにおける血中半減期を求める場合血清 NSE が高い産生腫瘍の全摘出症例が適しているが, 幸い 2 歳男児の副腎原発神経芽細胞腫の全摘

出症例に遭遇した。

術前にNSEが81ng/mlであったが全摘出直後130ng/mlと上昇した。これは手術によって腫瘍組織からNSEが一時的に血中に放出したものと考えられる。その後2時間40分の半減期で血中から消失した。これらの成績からラットおよびヒトにおけるNSE血中半減期は2時間30分前後であると推測される。今回我々は血中でのNSE半減期を求めたが、1983年Steinbergら¹³⁾はラット脳室内に直接NSEを投与し、その脳脊髄液中での半減期を求め3.9時間であったと報告しており、血中半減期と脳脊髄液中の半減期には大きな違いがないものと思われる。

次にNSEの主な代謝臓器を検討するため、肝臓および腎臓に流入する血管を結紮して血中濃度の推移ならびに代謝物分析から両臓器の代謝寄与の有無を検討した。血漿については正常および腎動脈結紮ラットと比較して肝門脈結紮ラットは1時間までの全ての時点で F_t が高く、加えてTCA処理沈澱画分は85%以上と代謝物も少なく、SDS-PAGE分析によってその画分の90%以上がNSE未変化体と考えられた。投与後1時間のラットにおける肝臓、腎臓のホモジネートでも肝門脈結紮による同様の傾向が認められた。また、肝門脈および腎動脈結紮の両処理によってもSDS-PAGEパターンに正常と大きな差は認められず、分解・代謝パターンには影響は少ないと考えられた。これらの結果より肝門脈結紮処理が体内からのNSEのクリアランスを遅くし、未変化体のまま滞留していることは明らかであり、NSEの主な代謝臓器は肝臓である可能性を示唆していた。

排泄実験では¹²⁵I標識NSE投与後24時間で放射能の94%が尿中に排泄された。しかしながら免疫活性測定による24時間尿中NSE排泄率はわずか0.2%であった。NSEが代謝分解を受けて低分子の蛋白となり腎から尿中に排泄されていると理解できる。また、糞中への排泄はほとんど計測されず72時間までの累積排泄率がわずかに1.91%、体内残存率は1.25%であった。

全身オートラジオグラフィでは他の臓器と比較して腎皮質と血管内に放射能が高濃度に集積して

いた。そのことは投与後1時間の正常ラットにおける腎臓のホモジネートの F_t 値が高いことから理解できる。腎皮質に集積された放射能のうち¹²⁵I標識NSEが37%、その他分子量約4,000以上の放射能代謝物11%およびTCA処理により沈澱しない放射能低分子代謝物52%であった。また、血管内放射能としては血漿(F_t 値=308.92)が主であった。血漿中の放射能代謝物分析結果、¹²⁵I標識NSEは39%、TCA処理沈澱画分5%およびTCA上清画分56%の割合を有していた。なお、遊離¹²⁵Iの腎皮質への集積については¹²⁵Iの体内分布追跡基礎データより投与後1時間ラットにおける腎皮質への集積は1%以下であることを確認している。

血清NSEは神経細胞、神経内分泌細胞起源の悪性腫瘍やその類似性のある肺小細胞癌で特異的に高値を示すことが知られている。そこで上述のラット実験結果に基づき、NSEの主要代謝および排泄臓器をそれぞれ肝臓、腎臓とした場合、臨床でそれらの臓器機能障害の程度が異なる患者で血清NSE値にどのような影響を及ぼすかを検討した。なお、統計学的解析はStudentのt検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。肝機能障害のうち肝炎および肝硬変患者とも健常者に比較して血清NSE値の有意な低値($p < 0.0001$)を示し、また肝硬変患者では肝炎患者より有意に低かった($p = 0.0002$)。しかし肝硬変患者のうち重篤度の異なるChild分類A、BとChild分類Cでは有意な差は認められなかった($p = 0.1005$)。次に腎機能障害について健常者と比較すると、腎炎患者で有意差がなく($p = 0.5338$)、透析前患者では有意な高値を示した($p = 0.0449$)。腎炎患者と透析前患者とで有意差は認められなかった($p = 0.0752$)。特に透析患者はバラツキがあるものの高値であった。その原因は不明であるが、同一患者で透析後NSE値が一時的に上昇することから、腎透析によりNSEが多量に存在している白血球、血小板、赤血球等の血球成分が物理的に破壊されるためであると推察される。

本法によるNSEのcut-off値を8ng/ml(mean+2SD)以下と設定すると、健常者とそれぞ

れの機能障害患者で有意差は認められるものの、ほぼ正常範囲内であつ平均値の差異が約 2ng/ml 以下の変動であつた。臨床的に NSE の主要代謝および排泄にあずかる肝・腎機能不全患者において血中 NSE が高値となることもなく、血中半減期も約 3.5 時間と短いことから血中 NSE が異常高値を示す神経芽細胞腫や肺小細胞癌患者では常に腫瘍から大量の NSE が血中に放出されているものと考えられた。

まとめ

ラットおよびヒトにおける NSE の血中半減期、代謝・排泄などの体内動態について検討し以下の結論を得た。

1) ラットにおける NSE の静脈内投与後の血中半減期は 2 時間 30 分であり、また、副腎原発神経芽細胞腫の全摘出時の 1 症例より求めたヒト血中半減期は 2 時間 40 分と互いに近似していた。

2) ラットにおける ^{125}I 標識 NSE の主要代謝臓器検索のため、肝臓および腎臓の代謝寄与の有無について調べた。その結果、肝門脈結紮ラットでは正常および腎動脈結紮ラットと比較して体内からの NSE のクリアランスが著しく遅く、NSE の未変化体を大量に含むことから NSE は主に肝臓で代謝されることが示唆された。

3) ^{125}I 標識 NSE 投与後 24 時間で投与量の 93.93 ± 2.68 (mean \pm SD) % が尿中に排泄され、糞中の累積排泄率は 1.15 ± 0.23 % であつた。しかしながら免疫活性測定による 24 時間尿中 NSE 排泄率は 0.2 % であり、NSE が代謝分解を受けて低分子となり速やかに腎臓から尿中に排泄されていることが示された。

4) ^{125}I 標識 NSE 静脈内投与後 1 時間後の全身オートグラフィによると腎皮質と血管内に高い放射能集積が認められた。その集積放射能のうち、 ^{125}I 標識 NSE が 37.0 ~ 39.0 %、その他の放射能代謝物が 61.0 ~ 63.0 % の割合であつた。なお、遊離の ^{125}I は 1 % 以下であつた。

5) 臨床的に肝・腎機能障害の程度が血清 NSE 値に及ぼす影響について調べたが、正常範囲にとどまり、肝臓、腎臓の明らかな影響は認められなかった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京女子医科大学第 II 内科学教室出村博教授ならびに出村黎子教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に終始御助言、御援助を頂きました愛知県心身障害者コロニー発達研究所生化学加藤兼房部長に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) **Rider CC, Taylor CB:** Evidence for a new form of enolase in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 66 : 814-820, 1975
- 2) **Marangos PJ, Zomzely-Neurath C, York C:** Determination and characterization of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 68 : 1309-1316, 1976
- 3) **Moore BW, McGregor D:** Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem* 240 : 1647-1653, 1965
- 4) **Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M:** Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276 : 834-836, 1978
- 5) **Kato K, Asai R, Shimizu A et al:** Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clin Chim Acta* 127 : 353-363, 1983
- 6) **Tapia FJ, Polak JM, Barbosa AJA et al:** Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumor. *Lancet* 13(March) : 583-585, 1981
- 7) **Carney DN, Marangos PJ, Inde 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
- 8) **Ishiguro Y, Kato K, Shimizu A et al:** High levels of immunoreactive nervous system-specific enolase in sera of patients with neuroblastoma. *Clin Chem Acta* 121 : 173-180, 1982
- 9) **Shimizu A, Suzuki F, Kato K:** Characterization of $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ and $\alpha\gamma$ human enolase isozymes and preparation of hybrid enolases ($\alpha\gamma$, $\beta\gamma$ and $\alpha\beta$) from homodimeric forms. *Biochem Biophys Acta* 748 : 278-284, 1983
- 10) **Fraker PJ, Speck JC:** Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80 : 849-857, 1978

- 11) **Notomi T, Morikawa J, Kato K et al:**
Radioimmunoassay development for human
neuron-specific enolase with some clinical
results in lung cancers and neuroblastoma.
Tumour Biol 6 : 57-66, 1985
- 12) 加藤兼房 : ニューロン特異性エノラーゼ, 蛋・核・
酵 29 : 1101-1116, 1984
- 13) **Steinberg R, Scarna H, Keller A et al:**
Release of neuron specific enolase (NSE) in
cerebrospinal fluid following experimental
lesions of the rat brain. *Neurochem Int* 5 :
145-151, 1983
-