

〈原著〉

神経特異エノラーゼ (NSE) 測定における基準範囲の検討

堀田 多恵子¹⁾、安井 彩¹⁾、丸山 奏恵¹⁾、川述 由希子¹⁾、藤野 恵子¹⁾、
山中 基子¹⁾、小野 美由紀¹⁾、栢森 裕三¹⁾、康 東天^{1),2)}

Reference range study in a neuron-specific enolase (NSE) assay

Taeko Hotta¹⁾, Aya Yasui¹⁾, Kanae Maruyama¹⁾, Yukiko Kawanobe¹⁾, Keiko Fujino¹⁾,
Motoko Yamanaka¹⁾, Miyuki Ono¹⁾, Yuzo Kayamori¹⁾ and Dongchon Kang^{1),2)}

Summary Neuron-specific enolase (NSE) is widely used as a marker of small-cell lung cancer. Upper reference range for total plasma NSE level in adults is usually 12.0 ng/mL, as arranged by the manufacturer of the measurement kit. However, in more than 30% of the medical checkup clients in our hospital a high NSE value was observed. To investigate its causes, we optimized preanalytical factors for measurement such as time before centrifugation, preserving time and temperature. A group of 315 apparently healthy subjects were enrolled for reference range study and we estimated the 95th percentiles for each analyte.

The upper limit of the reference range was 15.1 ng/mL when we used 136 samples measured within one hour after blood sampling, against 16.1 ng/mL when such limitation was not applied (270 samples). We recommend an other upper limit value of 16.3 ng/ml, if not possible for the pre-analytical regulation such as delayed measurement.

Key words: Neuron-specific enolase (NSE), Storage condition, Hemolysis, Reference range

I. 緒言

エノラーゼは α 、 β 、 γ の3種類のサブユニットからなる二量体の解糖系酵素であり、 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ の5つのアイソザイムが存在する^{1,2)}。うち、 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$ は主として神

経組織に特異的に存在することから、神経特異エノラーゼ (neuron specific enolase、以下NSE) と呼ばれている³⁾。NSEは特に肺小細胞癌および神経芽細胞腫において高い陽性率を示すことから^{4,6)}、主として、これら疾患の診断や治療効果の判定に有用な腫瘍マーカーとして、広く臨床

¹⁾九州大学病院検査部

²⁾九州大学大学院医学研究院 臨床検査医学分野
〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1

受領日 平成23年10月9日

受理日 平成23年10月20日

¹⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory of Medicine, Kyushu University Hospital.

²⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory of Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences.

3-1-1 Maedashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

応用されている。当院の先進予防医療センター（人間ドック）においても癌ドック項目として使用されている。ところが受診者の約30%が基準範囲の上限（12.0 ng/mL）を超えており測定値の信頼性で問題になった（Fig. 1）。

NSEは血中の赤血球、血小板、リンパ球にも含まれるため溶血の影響により上昇する^{7,8)}ことや凍結融解の影響を受けること⁹⁾が知られている。今回、検査前における検体の取り扱いがNSEの測定値に与える影響に着目して幾つかの検討を実施し、さらに、それらを考慮したエクルーシス試薬NSEの基準範囲を検討したので、以下に報告する。

II. 方法と材料

1. 対象

当院の職員およびボランティアを中心とする健常者315名（男性111名：22～64歳、平均36.7歳、女性204名：22～60歳、平均31.6歳）より、問診票および同意文書への記入により同意を取得後、採血した。採血管は分離剤入り真空採血管インセパックII-D（積水化学工業）及びベノジェクトオートセップ血清分離剤凝固促進フィルム（テルモ株式会社）を用い、1,800gで5分

間遠心して得られた血清により検討を実施した。溶血の有無は目視により確認し、わずかでも溶血が認められた検体は「溶血あり」と判定した。

2. 機器および試薬

機器として電気化学発光免疫測定装置「モジュラーアナリティクスE170」を、試薬として「エクルーシス試薬NSE」を使用した（ともにロシュ・ダイアグノスティクス株式会社）。キャリアプレート（「エクルーシスNSEキャリアプレート」）およびコントロール（「エクルーシス腫瘍マーカーコントロール」）は、上記試薬専用である。

3. 測定原理および方法

電気化学発光免疫測定法（ECLIA法：electrochemiluminescence immunoassay method）を測定原理とする。第1反応は検体20 μ Lにビオチン化抗NSE抗体70 μ Lおよびルテニウム錯体標識抗NSE抗体70 μ Lを添加後、9分間反応させる。第2反応はストレプトアビジンコーティング磁性マイクロパーティクルを添加後、9分間反応させる。続いて反応混合液を測定セルに吸引し、未反応試薬を除去後、光電子増倍管にて620 nm付近の発光強度を測定する。以上の操作は全自

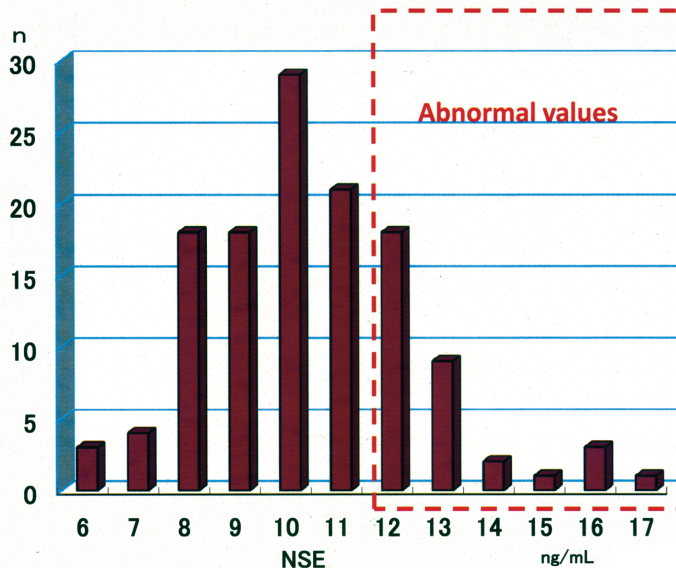


Fig. 1 Histogram of the measured values of NSE medical checkup in the last six months.

動で実施される。

4. 統計解析

採血管の違いによる影響は、高速凝固のインセパック II-Dと非高速凝固のベノジェクトオートセップとの間で関連2群間t検定により有意差検定を実施した。

検体安定性は、まず、検体保存開始直前の値を100%として個々の測定時のNSE測定値を相対比(%)に換算した後、正規性を確認したうえで、平均の有意差を関連2群間のt検定、等分散性をF検定により検定した。遠心処理までの経過時間の影響は、自然対数変換により正規化したNSE測定値につき平均および標準偏差を求め、群間有意差は関連多群のTukey検定により検定した。

基準範囲の設定を目的としてNSEを測定した検体315例に関しては、溶血の有無、採血後の経過時間、性別、年齢、喫煙歴の有無の5因子それぞれにより群分けし、自然対数変換により正規化した各群のNSE値について平均を求めるとともに、群間有意差を独立2群間のt検定(溶血の有無、性別、年齢、喫煙歴の有無)あるいは独立多群のTukey検定(遠心後の経過時間)により検定した。なお、群間有意差が認められた場合でも、NCCLS(現CLSI)ガイドラインの記載¹⁰⁾に基づき、各群の平均の差が全体の95%信頼区間幅の25%を超えない場合は、同一群として基準範囲を設定した。

基準範囲は、最初に溶血検体45例を除外後、残る270例により採血後の経過時間別および270例全体について算出した。「エクルーシス試薬NSE」の添付文書に記載されている既存の基準範囲と同様に、ノンパラメトリックな手法による95パーセンタイル値を各群における基準範囲上限値とした。

すべての検定は有意水準を5%として実施した。また、統計解析ソフトウェアはStatFlex ver. 6.0(株式会社アーテック)を用いた。

Ⅲ. 結果

1. 測定再現性

2濃度の試薬専用コントロールを用いてNSE測定値の再現性を確認したところ、10重測定における同時再現性はTM1(平均:13.61 ng/mL)でCV 0.6%、TM2(平均:134.3 ng/mL)で0.8%、10日間の日差再現性はTM1(平均:15.13 ng/mL)でCV 0.9%、TM2(平均:133.0 ng/mL)で1.1%であり、ともに良好であった(Table 1)。

2. 採血管の影響

2種類の分離剤入り真空採血管、インセパック II-Dとベノジェクトオートセップを用い、計10名より各採血管1本ずつ10セット得られた血清検体についてNSE測定値を比較した。1標本t検定による有意確率Pは0.159であり、両群の間に有意差は認められなかった(Fig. 2)。

3. 検体安定性

計10名より得られた血清検体をそれぞれ凍結(-30℃)・冷蔵(4℃)・室温(21℃)の各条件に分けて24時間保存した後、NSEを測定した。その結果、24時間保存直前を100%とした相対比(%)に換算した場合、各保存条件における平均は凍結101%・冷蔵93%・室温83%であった。ただし、既報⁹⁾の通り、ばらつき(CV)は凍結(6.9%)と冷蔵(2.5%)より有意(p=0.002)に大きい傾向が認められた(Table 2)。

そこで、凍結の影響について、さらに詳細に検討するため、-30℃と-80℃の2種類の凍結条件により同様の検討を実施した。その結果、

Table 1 Precision with Kit Controls

	Intraassay (Within-run)		Interassay (between-run)	
	Control 1	Control 2	control 1	control 2
N	10	10	10	10
Mean (ng/mL)	13.61	134.3	15.13	133.0
SD (ng/mL)	0.08	1.06	0.14	1.42
CV (%)	0.6	0.8	0.9	1.1

平均は凍結保存直前を100%としたとき-30℃が97%、-80℃が100%といずれも良好であったが、CVは-80℃の1.9%に対し-30℃は5.4%で

あり、-30℃保存は-80℃と比較して有意 ($p < 0.001$) にばらつきが大きい傾向を示し、最初の検討結果が再現された (Table 3)。

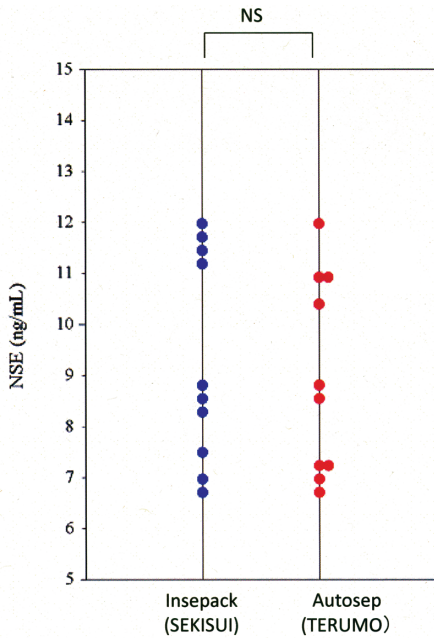


Fig. 2 Levels of NSE in relation to blood collection tubes.

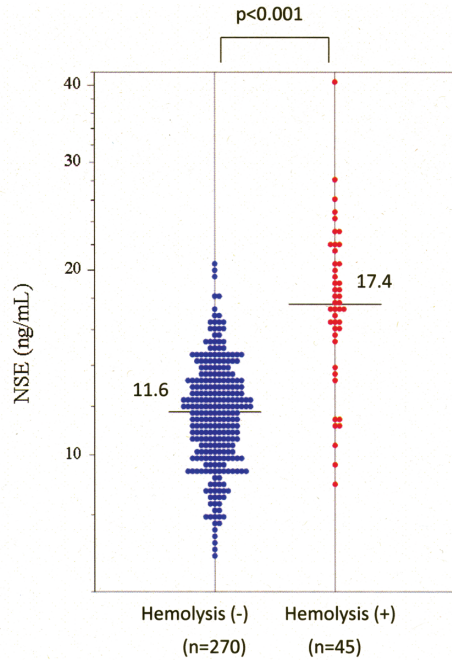


Fig. 4 Levels of NSE in relation to hemolysis.

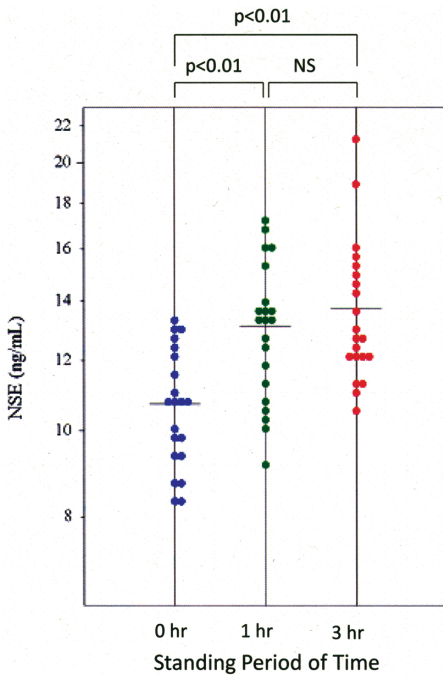


Fig. 3 Levels of NSE in relation to standing period of time before centrifugation.

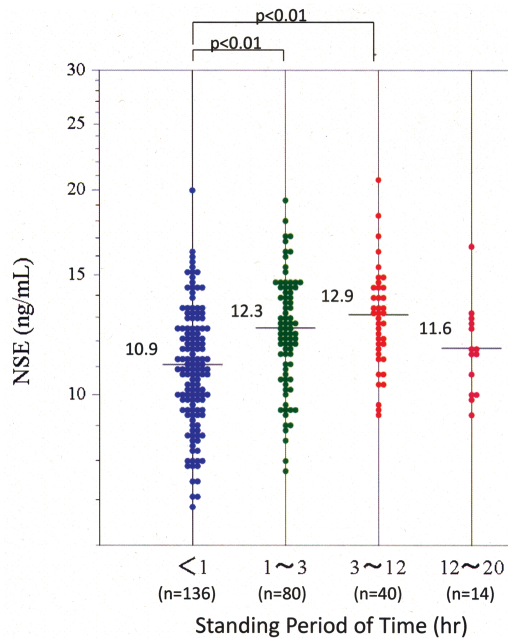


Fig. 5 Levels of NSE in relation to standing period of time before centrifugation.

Table 2 Serum Stability - percent vs. fresh samples (1)

Storage Condition	Freeze (-30°C)	Cool (4 °C)	Room Temp. (21 °C)
n	10	10	10
% Mean (%)	101	93	83
P value	—	0.003	0.001
CV (%)	6.9	2.5	8.5
P value	—	0.002	0.494

Table 3 Serum stability - percent vs. fresh samples (2)

Storage Condition	Freeze (-30°C)	Deep Frz. (-80°C)
n	44	44
% Mean (%)	97	100
P value	—	<0.001
CV (%)	5.4	1.9
P value	—	<0.001

4. 遠心処理までの経過時間

計21名より、それぞれあらかじめ複数の採血管に分けて血液を採取した。これらを採血直後(30分以内)・1時間後・3時間後に遠心処理し、得られた血清のNSE測定値を、分布の正規性を得るため自然対数変換したのちに比較した。その結果、各遠心条件における平均は採血直後10.6 ng/mL・1時間後12.9 ng/mL・3時間後13.5 ng/mLであり、経過時間の延長に伴い測定値が上昇する傾向が認められ、採血直後と1時間後の平均には有意差が認められた ($p < 0.01$)。一方、1時間後と3時間後の平均には有意差は認められなかった (Fig. 3)。

5. 基準範囲の算出

健康者315名より得られた血清検体についてNSEを測定したのち、以下の手順により基準範囲を算出した。採血後の経過時間(採血から測定開始まで)は全体に幅広く分布するよう配慮し、すべて記録した。遠心後の血清検体は、間を置かず速やかに測定した。

1) 測定値分布

溶血の有無、採血後の経過時間、性別、年齢、喫煙歴の有無の5因子それぞれによりNSE

値を群分けした後、分布の正規性を得るため自然対数変換し、各群の平均を比較した。

① 溶血の有無

5因子のうちNSE値に最も大きな影響を与えたのは溶血の有無であった。非溶血群の平均11.6 ng/mLに対して溶血群の平均は17.4 ng/mLであり、有意な差 ($p < 0.001$) を認めた (Fig. 4)。また、2群の平均差5.8 ng/mLは、溶血の有無を区別しない全315例の95%信頼区間幅14.2 ng/mLの25%を大きく超えた。

② 採血後の経過時間続いて溶血検体45例を除外した後、採血後の経過時間の影響を調べた。

その結果、各群の平均は1時間未満(平均10.9 ng/mL)と1~3時間(平均12.3 ng/mL)および3~12時間(平均12.9 ng/mL)と上昇傾向を示し、1時間未満群との差は有意 ($p < 0.01$) であったが、その後、12~20時間(平均11.6 ng/mL)では平均は低下し、1時間未満群と12~20時間群の2群間には有意差を認めなかった (Fig. 5)。また、各群間の平均差は最大2.0 ng/mLであり、これらは全て、経過時間を区別しない全270例の95%信頼区間幅9.2 ng/mLの25%以内であった。

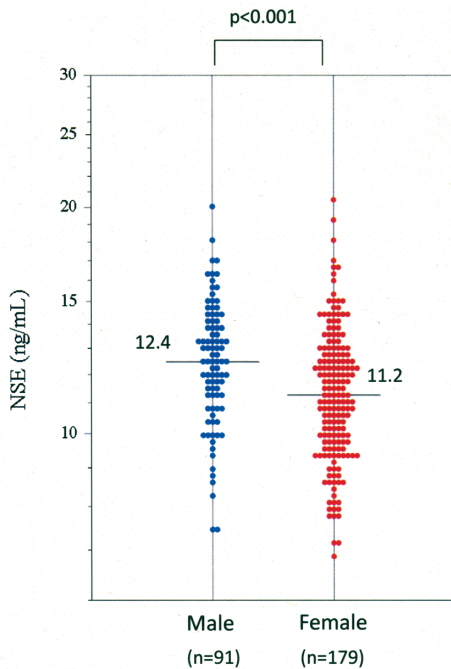


Fig. 6 Levels of NSE in relation to sex.

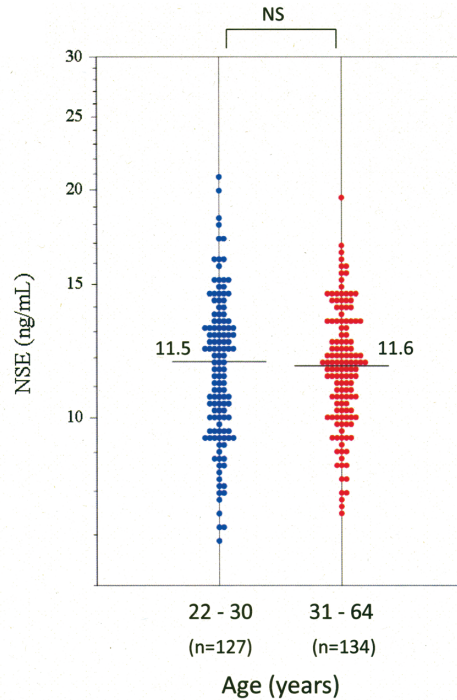


Fig. 7 Levels of NSE in relation to age.

③ 性別

同じく溶血検体を除外後、性別の影響について調べたところ、男性（平均12.4 ng/mL）が女性（平均11.2 ng/mL）と比してややNSE値が高い傾向が認められた（ $p < 0.001$ ）。しかしながら、その差は1.2 ng/mLであり、男女を区別しない全270例の95%信頼区間幅9.2 ng/mLの25%以内であった。（Fig. 6）。

④ 年齢、喫煙歴の有無

同じく溶血検体を除外後、年齢や喫煙歴の影響について調べたところ、ともに有意差を認めなかった（Fig. 7, Fig. 8）。

2) 基準範囲の設定

上記の検討結果、溶血検体45例を除外した後、残る270例を用いて採血後の経過時間別に基準範囲を算出した。

腫瘍マーカーの測定においては、癌患者（悪性疾患群）は高値側に出現する事が想定され、低値異常の臨床的意義は少ないと思われる。ま

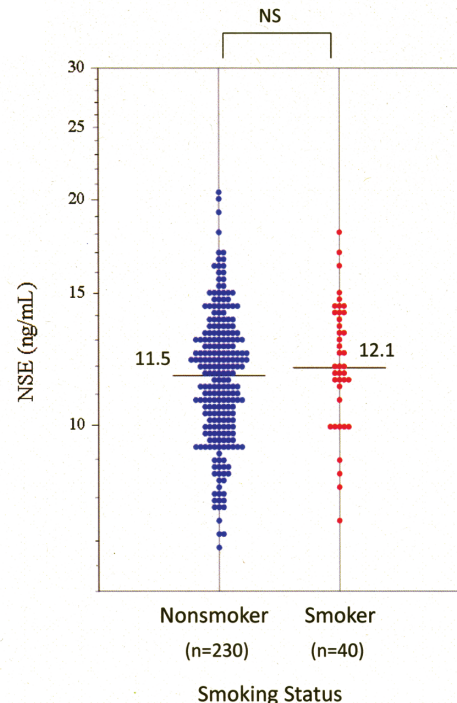


Fig. 8 Levels of NSE in relation to smoking status.

Table 4 Reference Range

Time after Collection (hr)		n	NSE conc. (ng/mL)	
Range	Median		Median	Ref. Value (95 percentile)
T<1	0.5	136	10.9	15.1
1≤T<3	2.3	80	12.4	16.7
3≤T<12	9.5	40	13.1	17.2
12≤T<20	17.0	14	11.6	14.4
All	1.0	270	11.8	16.1

た、本試薬の添付文書に記載されている基準範囲は、ノンパラメトリックな手法による95パーセンタイル値を上限值としている。よって、今回の検討においても同様に基準範囲上限としての95パーセンタイル値を求めた。

その結果、採血後の経過時間が1時間未満の測定条件下においては、15.1 ng/mLの結果を得た。これに対し、採血後1時間以上における上側95パーセンタイル値は、採血後1～3時間：16.7 ng/mL、3～12時間：17.2 ng/mLであり、採血後から緩やかな上昇傾向が認められたが、採血後12～20時間については、逆に14.4 ng/mLと若干の低下傾向が認められた。

加えて、採血後の溶血検体を除いた全270例の基準範囲上限値を求めたところ16.1 ng/mLとなった (Table 4)。

Ⅳ. 考察

本検討において「エクルーシス試薬NSE」における基準範囲を算出するにあたり、幾つかの予備検討を実施した。

まず、専用コントロールを用いて再現性を確認したところ、同時・日差ともに極めて良好であった事から、本試薬における測定値のばらつきは十分に小さいと判断された。また、2種類の血清分離剤入り真空採血管（インセパックⅡ-D、ベノジェクトオートセップ）を用いたところ、両採血管の測定値には有意差は認められず、ともにNSE測定用血清の採取に使用して問題ないと考えられた。

続いて検体安定性について調べたところ、-80℃凍結ではNSE測定値が保存開始前に比して平均100%、ばらつきもCV 1.9%と小さく、最もすぐれた保存条件であった。その他の条件で

は、-30℃凍結、冷蔵（4℃）、室温（21℃）の順に安定であったが、-30℃凍結に関しては、-80℃凍結や冷蔵と比較して有意に測定値のばらつきが大きかった。NSEは0℃に近い温度で緩やかに凍結された場合、二量体としての立体構造が一部破壊されるため、試薬に用いられている抗NSE抗体はこれを認識できなくなるとされており⁹⁾、これが-30℃凍結におけるばらつきの原因と推測される。したがって短時間の保存であれば、-30℃以上の温度での凍結よりも冷蔵のほうが適していると考えられた。

さらに、採血から遠心処理までの経過時間の影響を調べたところ、経過時間の延長に伴いNSE測定値が有意に上昇する傾向が認められた。NSEは赤血球・血小板・リンパ球などの血球中にも含まれるため、溶血により上昇すると報告されている⁷⁻⁸⁾。つまり、本傾向は、採血後に微小な血球破壊が経時的に進行し、血清中にNSEが漏出することに起因するものと推察される。よってNSE測定用の検体は採血後速やかに遠心処理する事、血球分離剤入りの採血管を用いる事により血球からの漏出の影響を最小限に止める事が望ましい。

以上の検討結果を考慮したうえで、NSEの基準範囲を設定することを試みた。まず、健康者315名より得られた血清検体のNSEを測定、得られた測定値を溶血の有無、採血後の経過時間、性別、年齢、喫煙歴の有無の5因子により群分けし、それぞれの影響を確認した。

その結果、5因子のうちNSE値に最も大きな影響を与えたのは溶血の有無であった。非溶血群（平均11.6 ng/mL）と溶血群（平均17.4 ng/mL）の間で顕著な差が確認された事から、基準範囲の設定に際しては溶血検体45例を除外するのが妥当と判断した。

続いて溶血検体除外後の270例につき採血後の経過時間（採血から遠心、測定まで）の影響を調べたところ、NSE値は経過時間の延長に伴い上昇を続けるが、3～12時間をピークとして以降はやや低下する傾向を示した。これは採血後の溶血によるNSE漏出は採血直後において盛んであるが以降は徐々に沈静化する事、12時間後以降においては溶血による上昇よりも検体安定性に起因する低下のほうが優位である事を意味すると推察された。

NSE測定値に群間有意差を認めた溶血の有無、採血後の経過時間、性別の3因子は、NCCLS（現CLSI）のガイドライン¹⁰を参照し、群間の平均差が全体の95%基準範囲幅の25%を超えるか否かを調べた。その結果、溶血の有無に関しては25%を大きく超えたが、採血後の経過時間や性別に関しては25%を超えなかったことから、溶血検体を除外すれば群分けをせずに全体として基準範囲を設定することが可能と考えられた。

そこで、溶血検体45例を除外後、採血後の経過時間が1時間未満の望ましい条件で得られた136例を用いて基準範囲を設定したところ、15.1 ng/mL以内の結果を得た。一方、採血後の経過時間を限定しない全270例から同様に基準範囲を求めたところ16.1 ng/mL以内の結果を得た。

「エクルーシス試薬NSE」の添付文書には、国内での検討結果から12.0 ng/mL以内（n=261）、海外での検討結果から16.3 ng/mL以内（n=547）の2種類の基準範囲が記載されている。この2つの基準範囲の差は、国内検討時には採血後約30分以内に遠心処理され、その後24時間以内に測定された検体を用いたのに対し、海外検討時¹¹には採血後の経過時間が2時間以内に遠心処理された検体を用いたことに起因していると推測される。

今回、我々の検討でも1時間未満に遠心処理した検体では15.1 ng/mL、1～3時間以内に遠心処理した場合は16.7 ng/mL、3～12時間処理で17.2 ng/mLと採血後経時的に上昇する結果となった。（Table 4）また、採血後のNSE値の継時的上昇が3～12時間までをピークに減少に転じることから（Fig. 5）、経過時間を限定せずに求めた基準範囲上限値16.1 ng/mLが海外値と近似した理由も、同じく採血後の経過時間の観点から説明し得る。よって遠心処理までの時間を厳密

にコントロールする事が困難な場合は、「エクルーシス試薬NSE」の添付文書記載の2種類の基準値のうち、海外基準値16.3 ng/mLを参考にするのが妥当と考えられた。

V. 結 語

検査前における検体の取り扱いが神経特異エノラーゼ（NSE）の測定値に与える影響に着目して各種条件検討を実施した後、基準範囲を検討した。

NSEの測定には血清検体を使用する。検体の保存条件としては、-80℃が検体安定性・測定再現性ともに良好であり推奨される。短時間の保存であれば、測定ばらつきの大きい-30℃よりも冷蔵（4℃）が望ましい。また、NSEは溶血の影響により上昇するため、溶血検体の測定は避けるべきである。また、採血から遠心までの経過時間の延長に伴い測定値が上昇する傾向を示すため、採血後の遠心分離は速やかに実施する事が望ましい。この点を考慮して溶血検体を除外後、採血からの経過時間が1時間未満の望ましい条件の136例から基準範囲上限値（95パーセンタイル値）を求めた結果、15.1 ng/mLを得た。

一方、採血後の経過時間を限定しない270例により基準範囲上限値を求めたところ、16.1 ng/mLの結果を得た。この事から、当院の人間ドックのように外部委託検査等で遠心処理までの時間を1時間未満にコントロールする事が困難な場合は、「エクルーシス試薬NSE」添付文書記載の海外基準範囲16.3 ng/mL以内を参考にするのが妥当と考えられた。

文 献

- 1) Rider CC et al.: Enolase isoenzymes in rat tissues. Electrophoretic, chromatographic, immunological and kinetic properties. *Biochem Biophys Acta*, 365: 285-300, 1974.
- 2) Fletcher L et al.: Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochem Biophys Acta*, 452: 245-252, 1976.
- 3) Marangos PJ et al.: Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neuron and neuroendocrine cells. *Ann Rev Neurosci*, 10: 269-295, 1987.

- 4) Kulpa J et al.: Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem*, 48(11): 1931-1937, 2002.
- 5) Carney DN et al.: Serum neuron-specific enolase; A marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer. *Lancet* : 583-585, 1982.
- 6) Ishiguro Y et al.: High levels of immuno-reactive nervous system-specific enolase in sera of patients with neuroblastoma. *Clin Chim Acta*, 121: 173-180, 1982.
- 7) Laurent R et al.: Effect of hemolysis and storage condition on neuron-specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid and serum : implications in clinical practice. *Clin Chem Lab Med*, 43(11): 1215-1217, 2005.
- 8) Beaudoux JL et al.: Influence of hemolysis on the measurement of S-100 β protein and neuron specific enolase plasma concentrations during coronary artery bypass grafting. *Clin Chem*, 46(7): 989-990, 2000.
- 9) 花田浩之 他: 全自動電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) 「エクルーシス試薬NSE」による神経特異性エノラーゼ (NSE) 測定試薬の基礎的および臨床的性能評価. *医学と薬学*, 60(4): 657-663, 2008.
- 10) NCCLS document C28-A2 [How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline - Second Edition], June 2000
- 11) Muley T et al.: Technical performance and diagnostic utility of the new Elecsys neuron-specific enolase (NSE) enzyme immunoassay. *Clin Chem Lab Med*, 41(1): 95-103, 2003.