

《ノート》

Anthracycline 系抗癌剤による心筋障害の 血清診断の可能性

——心筋ミオシン軽鎖 I 測定 RIA キットの検討——

Evaluation of Serological Detection of Anthracycline-Induced Myocardial
Damage: Possible Application of an Immunoradiometric Assay Kit
for Cardiac Myosin Light Chain I

木村 良子* 宮川 正男* 阿多まり子** 棚田 修二*
濱本 研* 石根 正博*** 羽藤 高明****

Yoshiko KIMURA*, Masao MIYAGAWA*, Mariko ATA**, Shuji TANADA*,
Ken HAMAMOTO*, Masahiro ISHINE*** and Takaaki HATOU****

*Department of Radiology, **Division of Radiology, ****First Department of Internal Medicine,
Ehime University School of Medicine

***Division of Radiology, Oita City Medical Association ALMEIDA Memorial Hospital

I. 緒 言

anthracycline 系, anthraquinone 系抗癌剤 (以下 A 系抗癌剤) は, 各種の悪性腫瘍に高い有効性を示し, 様々な併用療法に中心的抗癌剤として組み入れられているが, 蓄積性, 不可逆性の心毒性を有するため, 副作用の発現を早期に検出し, 治療方針を変更していくことは临床上重要である。しかし, 自覚症状, 理学的所見等は, 心筋障害が高度になって初めて出現する。このため, 心電図, 心エコーカルディオグラフィ, 心プールシンチグラフィ, 心筋シンチグラフィ, 心筋生検などの手

段で, 心筋障害の発現を検出することが試みられている¹⁻⁷⁾。しかし, 心電図の異常の発現頻度は早期にはかならずしも高くはなく, その他の検査を各治療ごとに行うことは患者の負担やコストの面で非現実的である。

A 系抗癌剤の心筋障害の機序については, ミトコンドリアのフラビン脱水素酵素と薬剤の酸素分子の間の電子の転移の際に生ずるフリーラジカルによる組織障害⁸⁻¹⁰⁾などの様々な説が提唱されているが, 結果的には障害をうけた心筋は壊死に陥る。心筋壊死により, 心筋線維を構成するミオシンが崩壊し軽鎖が血液中に流出する¹¹⁾。最近, 心筋ミオシン軽鎖 I 測定キットが開発され, 心筋梗塞, 心筋炎等の心筋壊死の検出に有用であることが報告されている^{12,13)}。そこで, このキットにより A 系抗癌剤による心筋壊死の発生が検出できるかどうかの検討を行った。

* 愛媛大学医学部放射線科

** 同 附属病院中央放射線部

*** 同 第一内科

**** 大分市医師会立アルメイダ病院放射線科

受付: 3 年 5 月 27 日

最終稿受付: 3 年 9 月 5 日

別刷請求先: 愛媛県温泉郡重信町志津川 (☎ 791-02)

愛媛大学医学部放射線科

木村 良子

Key words: Myosin light chain I, Myocardial injury, Anthracycline, RIA.

II. 対象と方法

1. 測定キット 心筋ミオシン軽鎖測定キットは、ミオシン LI キット「ヤマサ」を使用した。測定原理は two-step immunoradiometric assay 法に基づく試験管固相法である。標準試薬にはブタ心筋ミオシン軽鎖 I を用いている。アッセイは、キット操作手順に従って行い、インキュベーションは 20°C に設定したインキュベーター内で行った。温度による影響の検討の際には、インキュベーター温度をそれぞれの温度に変更した。

2. 動物モデル 雄ウィスター系ラット 20 匹にアドリアマイシンを 3 mg/kg ずつ腹腔内投与し、約 20 mg/kg および 30 mg/kg 投与した時点で、心臓採血、もしくは静脈採血し、血清中ミオシン値を測定した (Fig. 1)。

3. 臨床例の検討 ① 心筋梗塞：1989 年 12 月から 1990 年 3 月までにアルメイダ病院救急部に心筋梗塞の疑いで入院した患者 13 例で、入院当日より 3 日間採血した。② A 系抗癌剤投与例：1989 年 12 月から 1990 年 9 月まで、愛媛大学放射線科および第一内科にて A 系抗癌剤を中心とする化学療法が施行された造血器悪性腫瘍症例において、化学療法施行前、抗癌剤投与後 1 日目、2 日目、3 日目、7 日目に採血した。それぞれの血清は分離後測定時まで -20°C に凍結保存した。各検体の測定は採血から 1 か月以内に検討し、同一症例、もしくは同一治療における血清は同一アッセイ内で行った。

A 系抗癌剤の心筋毒性が 1~2% 発生する投与量より、各薬剤のアドリアマイシン (doxorubicin:

DXR) に対する比を Table 1 のように設定した。

総投与量の計算は、使用量×DXR の総和とした。

12 例 19 コースの治療における検体を採取した。症例の概要を Table 2 に示す。これら症例の治療前後の肝機能、腎機能は正常であった。心電図上、1 例に I 度の AV ブロックを認めたが、治療後の変化は認めなかった。

III. 結果

1. キットの基礎的検討 10~60 ng/ml 濃度の検体によるキットの同時再現性は C.V. 2.1~3.4%、日差再現性は C.V. 2.8~8.3% であり、同時再現性の方が良好であったため、臨床例の同一症例の検体は同一アッセイ内で行った。回収率 69~99% と若干不良であったが、これは回収試験に使用した標準試薬がブタ心筋ミオシンを使用しているためと考えられる。キットに添付されている希釈液で、血清サンプルおよびラット心筋の抽出液にて作成した検体を希釈して測定した希釈試験は、300 ng/ml 濃度のものまで希釈倍率と測定値の間に良好な直線性が得られた。しかし、Fig. 2a に示すように、インキュベーション温度の変化による測定値の変動は大きかった。これは、標準曲線を作成するための標準試薬のカウント数が、20°C で最大になるのに対し (Fig. 2b)、検体では温度の低下とともにカウント数が上昇するためであった。ブタ心筋ミオシン、ヒト心筋ミオシン、ラット心筋ミオシンの温度変化に対する溶液中での存在状態の変化の差があるものと思われる。

測定感度は、0 ng/ml の C.V. と標準試薬を希釈したサンプルの C.V. との比較による検討から

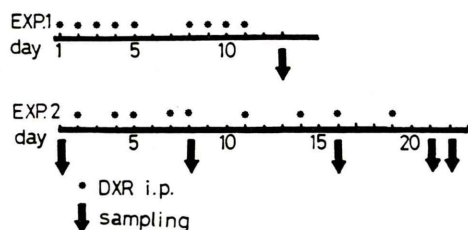


Fig. 1 Schedules of doxorubicin administration and serum sampling.

Table 1 DXR ratio of various anthracyclines and anthraquinones determined according to their cardiotoxicity

	DXR ratio
Doxorubicin	1
Daunorubicin	1
Epirubicin	1/2
Acclarubicin	1/2
Mitoxantrone	5

Table 2 Characteristics of patients treated with anthracyclines or anthraquinones

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Previous anthracycline dose	Current anthracycline dose	Current treatment
1	male	18	ALL	260*	130*	DXR, CPA, MTX, PSL
2	female	28	AML	200	180	DNR, AraC, 6MP, PSL
3	female	32	ALL	0	60	DXR, VCR, CPA, PSL
4	female	36	NHL	100	50	DXR, VDS, CPA, PSL
5	male	44	NHL	70	90	DXR, VDS, CPA, PSL
6	male	48	NHL	330 600-660	60 20	ACR, BHAC, Etop, PSL MIT, VDS, Etop, MTX, BLM, mPSL
7	female	56	NHL	0-240	60	DXR, CPA, VCR, PSL
8	male	59	NHL	50	50	DXR, CPA, VCR, PSL
9	male	68	NHL	200	50	DXR, CPA, VCR, PSL
10	male	70	NHL	25	25	EPR, CPA, VCR, PSL
11	male	73	NHL	0	40	DXR, CPA, VCR, PSL
12	female	78	NHL	200	30	MIT, CPA, Etop, PSL

* Corrected dose to DXR (dose×DXR ratio); DXR: doxorubicin, DNR: daunorubicin, ACR: aclarubicin, EPR: epirubicin, MIT: mitoxantrone, CPA: cyclophosphamide, VCR: vincristine, VDS: vindesine, Etop: etoposide, MTX: methotrexate, AraC: cytosine arabinoside, BLM: bleomycin, 6MP: 6-mercaptopurine, PSL: prednisolone, mPSL: methyl prednisolone

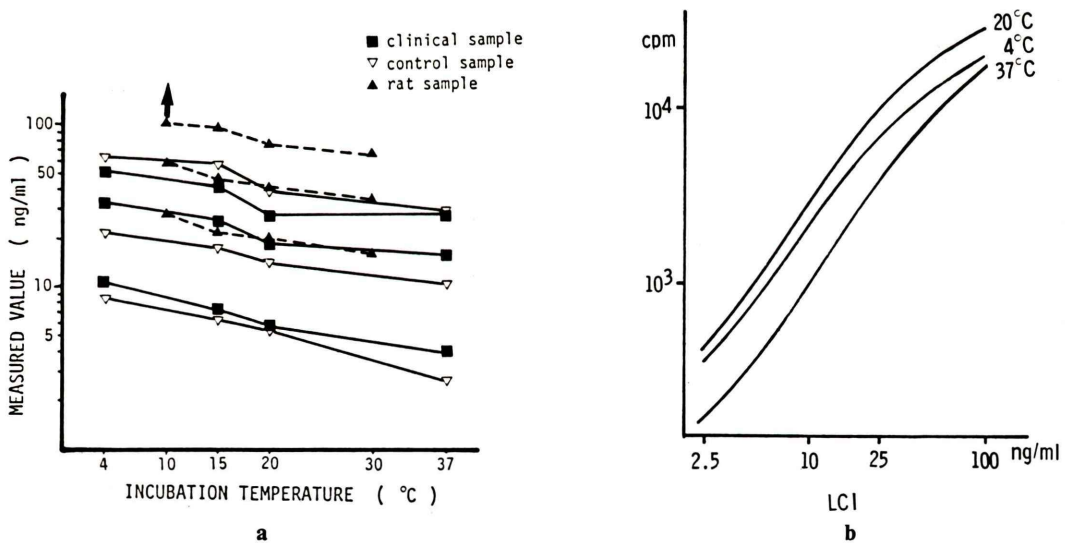


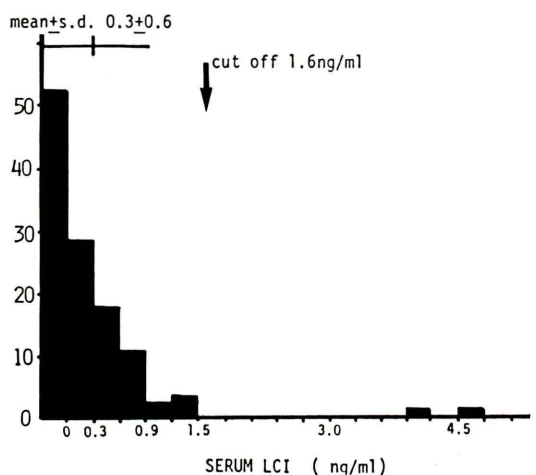
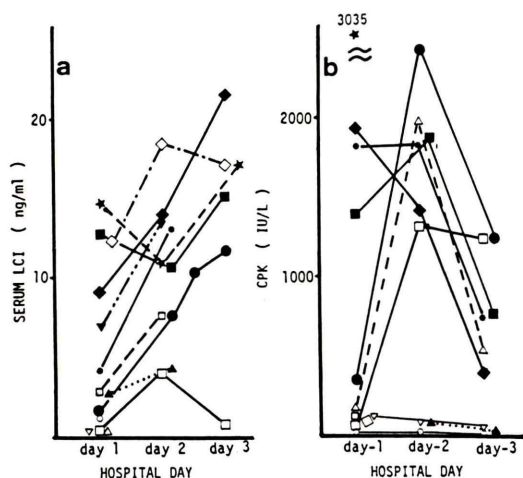
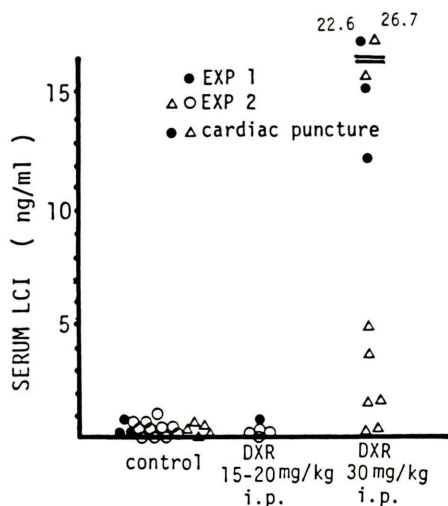
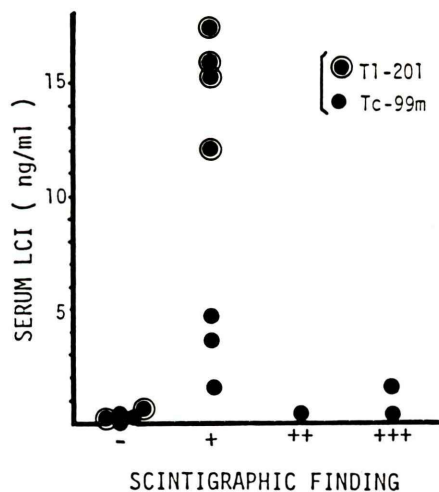
Fig. 2 Effect of incubation temperature on measured LCI levels with the assay kit.
a) Measured LCI levels of various samples. Measured levels were higher at 4°C than 20°C.
b) Standard curves at various temperature. The maximum RI counts were observed at 20°C.

1 ng/ml と判断されたが、標準曲線に挿入した読みとり値を測定値として表した。1 ng/ml 前後の検体を同一ロットで測定した場合 0.16~0.35 ng/ml の標準偏差をとった (Table 3)。

2. 正常対象群血清心筋ミオシン軽鎖値 19 歳から 56 歳までの正常 114 名の血清ミオシン軽鎖値は大半が 1 ng/ml 以下であり、平均±標準偏差は 0.3±0.6 ng/ml、2 標準偏差をカットオフ値と

Table 3 Standard deviations of measured values of low LCI samples

Sample	n	Mean (ng/ml)	S.D.	C.V. (%)
1	8	0.88	0.25	28.40
2	7	1.33	0.30	22.56
3	5	2.00	0.16	8.00
4	10	0.32	0.18	56.25
5	6	6.74	0.20	2.97

**Fig. 3** Serum LCI levels in 114 normal subjects.**Fig. 4** Serum LCI and CPK levels in 11 patients with acute myocardial infarction and 2 patients (○▽) with chest pain which was revealed to be due to pleuritis or erosive gastritis. a. LCI levels. b. CPK levels.**Fig. 5** Serum LCI levels in doxorubicin-injected rats. control vs. 30 mg i.p.: $p < 0.01$ **Fig. 6** Scintigraphic findings and serum LCI levels in doxorubicin-injected rats.

^{201}Tl -scintigraphic finding —: normal, +: washout rate $> 50\%$, ++: washout rate 50–25%, +++: washout rate $< 25\%$.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -scintigraphic finding —: normal, +: slightly higher cardiac uptake than background, ++: cardiac uptake was as much as that of vertebrae, +++: intermediate uptake between + and ++.

— vs. +: $p < 0.01$

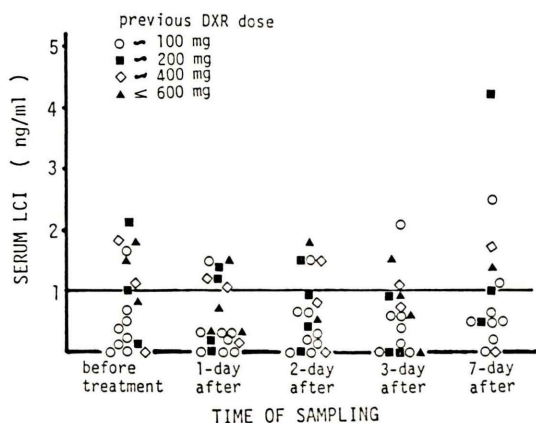


Fig. 7 Serum LCI levels in patients treated with anthracyclines or anthraquinones.

すると 1.6 ng/ml がカットオフ値となった (Fig. 3).

3. 心筋梗塞患者血清ミオシン軽鎖値 心筋梗塞の疑いで入院した患者 13 例の入院当日より 3 日間の血清ミオシン軽鎖値と CPK 値を Fig. 4 に示す。CPK は入院時ないしは翌日にピークを示すのに対し、ミオシン軽鎖値は経時的に上昇した。このことより、A 系抗癌剤投与時の心筋障害を検出できるかどうかの検討には、抗癌剤投与翌日より数日以降のほうが可能性が高いと考えられた。

4. DXR 心筋障害ラットの血清ミオシン軽鎖

DXR を投与されていないラット血清中のミオシン軽鎖値は、このキットで測定した場合、全例測定感度以下であった。15~20 mg/kg 投与されたラットにおいても、ミオシン軽鎖値の上昇はみられなかった。しかし、30 mg/kg 以上投与されたラットにおいてミオシン軽鎖値の上昇を認めた (Fig. 5)。採血時に施行した ^{201}Tl 心筋シンチグラフィもしくは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pyrophosphate シンチグラフィの異常所見¹⁵⁾を、 ^{201}Tl では washout rate の低下より、また $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ではバックグラウンドおよび椎体の取り込みとの比較より定性的に分類し、ミオシン値との関係をみたものを Fig. 6 に示した。

5. A 系抗癌剤治療例の検討 Fig. 7 に治療前後の血清ミオシン軽鎖値を示す。治療後 1~2 日目は治療前値と比較してほとんど変動を認めなかった。この間のミオシン軽鎖値の変動は、 -0.17

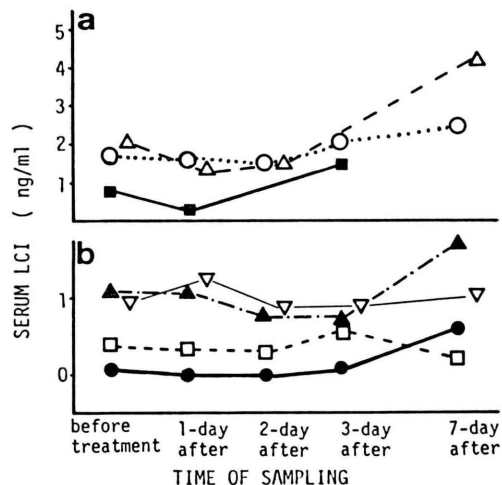


Fig. 8 Serum LCI levels in 4 patients whose serum LCI increased after chemotherapy.

a) Case 1, 2 and 3.

b) Case 4. The patient was treated with CHOP regimen. ● 1st cycle, □ 2nd cycle, ▽ 3rd cycle, ▲ 5th cycle.

± 0.27 , -0.08 ± 0.24 であった。そこで、3~7 日目に治療前値より 0.6 ng/ml 以上上昇し、かつ測定感度以上の値をとった症例を選択すると 4 例認められた。

これら症例は全例非ホジキンリンパ腫であったが、治療前抗癌剤投与量は初回治療例から DXR 換算 600 mg 投与まで様々であった。治療後最高値は 1.5~4.5 ng/ml、変動幅は 0.7~2.3 ng/ml であった (Fig. 8)。55 歳女性初発症例では、CHOP 療法 5 コース施行後、総投与量 300 mg で、7 日目のミオシン軽鎖値 1.7 ng/ml と上昇を認めた (Fig. 8b)。初回治療前に施行した心プールシンチで LVEF は 61% であったが、5 回目治療後の LVEF は 45% に低下し、心筋障害が起きていると判断された。

IV. 考 察

新しく開発された、心筋ミオシン軽鎖測定キットは、心筋壊死により崩壊したミオシン軽鎖が血中に流出してくるのを検出する。ミオシン軽鎖の分子量は 20,000~30,000 と小さいため、クリアラ

ンスは比較的速いと考えられる¹⁴⁾。しかし、壊死心筋より徐々に流出するため、クリアランスを上回る一定量の壊死が起きた場合は、血中レベルが上昇すると期待される。DXR による心筋障害においては総量 500 mg/m^2 をこえて投与されると心筋障害の発生頻度が増えると考えられている。この量を 10 回にわたって投与された症例が心不全を起こしたとき、各治療ごとに均等に心筋障害が起きていたと仮定すると、ある程度の心筋梗塞量の $1/10$ の心筋壊死が 1 回の治療で起きていることになる。DXR による障害は、薬剤投与後数日以内に起こると考えられるため、この時期にミオシン軽鎖の上昇が見られれば、心筋障害の発生を推測できると期待される。今回のわれわれの心筋梗塞を起こした症例のミオシン軽鎖値は、発症後 3 日までに $4.1 \sim 21.5 \text{ ng/ml}$ となったが、 $1/10$ 量の 0.4 ng/ml という変動は測定感度近辺の値を考えると測定誤差にはいってしまうと考えられた。そこで、 1 ng/ml 前後の検体の測定変動率を考慮して、 0.6 ng/ml 以上の上昇を異常として検討してみた。

ミオシン軽鎖測定キットは、ラット心筋とも交差反応を示し、希釈性も良好であった。このことは、このキットによりラット心筋ミオシンの相対的な値を測定することは可能であることを示している。ラットのアドリアマイシン心筋障害モデルにおける、血清ミオシン軽鎖値の検討では、心筋に組織学的に軽度のリンパ球浸潤等の変化のみられ始める 30 mg/kg 投与時¹⁵⁾に、血清ミオシン軽鎖値の上昇が見られた。採血時に撮られたシンチグラフィの検討において、異常所見の軽微なラットにおけるミオシン軽鎖値の方が高値を示していたことは興味深い。Tc-pyrophosphate シンチグラフィで中等度～高度の異常所見は、組織学的にはかなり心筋障害の進んだ症例に見られており¹⁵⁾、この時期にはすでにミオシン流出が完了していたとも考えられる。

臨床例においても、19 治療中 4 治療においてミオシン軽鎖値の上昇を認めた。治療前の血清ミオシン軽鎖値は患者の骨格筋を含む筋線維崩壊と腎機能に依存し、個々の症例においては一定レベ

ルをとるものと考えられる。実際、個々の症例において経時的に測定したミオシン軽鎖値の治療前値に対する変動は小さいものであった (1 日目 -0.17 ± 0.27 , 2 日目 -0.08 ± 0.24)。したがって、治療前値と治療後のミオシン軽鎖値を比較することにより、心筋障害の進行を検出しようと期待される。今回の検討症例は、19 コースときわめて少ない数の検討であり、A 系抗癌剤の投与量も心筋障害出現頻度の増加する 500 mg/m^2 未満の症例ばかりであったが、治療後の値が上昇する例が認められ、1 例において LVEF の低下を認めたことは、ミオシン軽鎖測定による抗癌剤の心筋障害を早期にモニターしうる可能性を示している。治療後数日間はミオシン軽鎖値の上昇は見られず、採血時期としては 7 日後 (もう少し後にピークがある可能性もあるが) が適当と思われる。

V. 結 語

1. 心筋ミオシン軽鎖測定キットによる anthracycline, anthraquinone 系抗癌剤による心筋障害検出の可能性について検討した。

2. キットの信頼性は良好であったが、アッセイ温度の厳密さが要求された。

3. アドリアマイシン心筋障害ラットモデルにおいて、 30 mg/kg 投与ラットのミオシン軽鎖値の上昇を認めた。

4. anthracycline, anthraquinone 系抗癌剤を投与された 12 症例 19 コースにおいて、4 例でミオシン軽鎖値の上昇を認め、心プールシンチグラフィを施行された 1 例で LVEF 低下を認めた。

5. 治療前後のミオシン軽鎖値を測定することにより、心筋障害を検出できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Minow RA, Benjamin RS, Lee ET, et al: QRS voltage change with adriamycin administration. *Cancer Treat Rep* 62: 931-934, 1978
- 2) Balcerzak SP, Christakis J, Lewis RP, et al: Systolic time intervals in monitoring adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* 62: 893-899, 1978

- 3) Bloom KR, Bini RM, Williams CM, et al: Echocardiography in adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* **41**: 1265-1269, 1978
- 4) Bristow MR, Mason JW, Billingham ME, et al: Doxorubicin cardiomyopathy; evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Ann Int Med* **88**: 168-175, 1978
- 5) Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, et al: Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* **62**: 865-872, 1978
- 6) Singer JW, Narahara KA, Ritchie JL, et al: Time- and dose-dependent changes in ejection fraction determined by radionuclide angiography after anthracycline therapy. *Cancer Treat Rep* **62**: 945-948, 1978
- 7) Alexander J, Dainiak N, Berger HJ, et al: Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiography. *N Engl J Med* **300**: 278-283, 1979
- 8) Doroshow JH, Akman S, Chu F-F, et al: Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmacol Ther* **47**: 359-370, 1990
- 9) Oslon RD, Mushlin PS: Doxorubicin cardiotoxicity; analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* **4**: 3076-3086, 1990
- 10) Mimnaugh EG, Trush MA, Gram TE: Enhancement of rat heart microsomal lipid peroxidation following doxorubicin treatment in vivo. *Cancer Treat Rep* **67**: 731-733, 1983
- 11) Nagai R, Ueda S, Yazaki Y: Radioimmunoassay of cardiac myosin light chain II in the serum following experimental myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* **86**: 683-688, 1979
- 12) 永井良三, 矢崎義雄, 小坂樹徳: ラジオイムノアッセイによる血中ヒト心筋ミオシン軽鎖 I の測定および急性心筋梗塞におけるその臨床的意義. *日内会誌* **70**: 1098-1104, 1981
- 13) 高久史麿, 矢崎義雄, 永井良三, 他: モノクローナル抗体を用いた心筋ミオシン軽鎖 I の測定キット (ミオシン LI キット「ヤマサ」) の開発と急性心筋梗塞症におけるその臨床的意義. *最新医学* **44**: 1708-1719, 1989
- 14) 矢崎義雄, 永井良三: 虚血による心筋障害——心筋細胞構築崩壊過程からの検討——. *医学のあゆみ* **122**: 716-724, 1982
- 15) Miyagawa M, Tanada S, Hamamoto K: Scintigraphic evaluation of myocardial uptake of thallium-201 and technetium-99m pyrophosphate utilizing a rat model of chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Eur J Nucl Med*: in press