

網膜芽細胞腫の眼球保存療法の研究

—摘出眼杯網膜電図に及ぼすメルファランの影響—

上田 満之¹⁾, 田辺 譲二¹⁾, 鈴木 俊之¹⁾, 酒井 宏之¹⁾
望月 清文¹⁾, 北野 貢市¹⁾, 猪俣 素子²⁾, 金子 明博³⁾

¹⁾金沢大学医学部眼科学教室, ²⁾国立がんセンター研究所薬効試験部, ³⁾国立がんセンター中央病院眼科

要 約

網膜芽細胞腫の眼球保存療法としてのメルファラン (アルキル化剤系抗癌剤) の安全性に関する基礎研究として, メルファランの正常網膜 (ウサギ, ヒト) に及ぼす影響を摘出眼杯網膜電図を指標として検討した. メルファラン 10 $\mu\text{g/ml}$ および 40 $\mu\text{g/ml}$ では, ウサギおよびヒトの a 波, b 波および律動様小波は変化しなかった. メルファラン 50 $\mu\text{g/ml}$ では, ウサギの b 波振幅が有意に低下したが, その変化は可逆的であった. Colony

assay によるメルファランの最小有効濃度 (4 $\mu\text{g/ml}$) を考慮すると, メルファランは網膜芽細胞腫の化学療法に用いる有力な薬剤の 1 つと考えられる. (日眼会誌 98: 352—356, 1994)

キーワード: メルファラン, 摘出眼杯網膜電図, 網膜芽細胞腫, 眼球温熱化学療法

Conservative Therapy for Retinoblastoma —Effect of Melphalan on *in vitro* Electroretinogram—

Mitsuyuki Ueda¹⁾, Jhoji Tanabe¹⁾, Toshiyuki Suzuki¹⁾,
Hiroyuki Sakai¹⁾, Kiyofumi Mochizuki¹⁾, Kohichi Kitano¹⁾,
Motoko Inomata²⁾ and Akihiro Kaneko³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine

²⁾Pharmacology Division, National Cancer Center Research Institute

³⁾Department of Ophthalmology, National Cancer Center Hospital

Abstract

The effect of melphalan (an alkylating anti-cancer drug) on rabbit and human *in vitro* ERGs was studied to establish the non-toxic concentration of melphalan in chemotherapy for retinoblastoma. The ERGs were recorded before and 15 min after the perfusate was changed from the control solution to a melphalan-containing solution. Melphalan 10 $\mu\text{g/ml}$ and 40 $\mu\text{g/ml}$ caused no significant effect on the a-wave, the b-wave, or the oscillatory potential in either the rabbit or the human *in vitro*

ERG. Melphalan 50 $\mu\text{g/ml}$ significantly reduced the b-wave, but the change was reversible. Considering the minimum inhibitory concentration of melphalan against retinoblastoma cells on colony assay (4 $\mu\text{g/ml}$), melphalan is one of the most effective drugs for the conservative treatment of retinoblastoma. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 352—356, 1994)

Key words: Melphalan, *In vitro* ERG, Retinoblastoma, Chemo-thermotherapy

I 緒 言

網膜芽細胞腫の眼球保存療法として放射線療法, 光凝固療法, 冷凍凝固療法, ヘマトポルフィン誘導体光化学

療法, 全身化学療法などが現在行われている. しかし, これらの療法は, ①失明率が高い, ②有効率が低い, ③再発率が高い, ④副作用が発生しやすいなどの種々の問題点を有し, 未だ満足できる療法ではない. そこで,

別刷請求先: 920 石川県金沢市宝町 13-1 金沢大学医学部眼科学教室 上田 満之

(平成 5 年 7 月 6 日受付, 平成 5 年 12 月 3 日改訂受理)

Reprint requests to: Mitsuyuki Ueda, M.D. Department of Ophthalmology, Kanazawa University School of Medicine, 13-1 Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa-ken 920, Japan

(Received July 6, 1993 and accepted in revised form December 3, 1993)

金子ら¹⁾は上記の保存療法の限界を克服するための眼球温熱化学療法を考案した。この方法はアルキル化剤系抗癌剤の1つであるメルファランを内頸動脈または眼動脈に選択的に注入し、次いで眼球加温装置²⁾で眼球を加温するという療法である。メルファランは、アルキル化剤のうちナイトロジェンマスタード型に属し、腫瘍細胞内の求核センターと反応してアルキル化を起こし核酸合成を阻害することにより腫瘍細胞増殖阻止をもたらすといわれ³⁾、本邦では臨床的には多発性骨髄腫の治療に使用されている。メルファランを網膜芽細胞腫の治療剤に選択した理由は、二重軟寒天培地での網膜芽細胞腫の colony assay による抗癌剤の感受性試験において、マイトマイシンやビンクリスチンなどの12種の抗癌剤のうち、メルファランが最も強力な colony 形成阻止力を呈したからである⁴⁾。

眼球温熱化学療法を実際に網膜芽細胞腫の症例に使用し、良好な結果を金子ら¹⁾は経験した。しかし、この治療に際して、メルファランによる腫瘍細胞以外の正常眼組織（特に網膜）の障害の有無が問題となる。著者らは、この点を鑑み眼球温熱化学療法の安全性に関する基礎的研究として、メルファランの網膜に及ぼす影響を摘出眼杯網膜電図(ERG)を指標として検討した。

II 実験方法

体重2~3kgの白色ウサギ2匹3眼、有色ウサギ3匹5眼および上顎洞癌の眼窩内浸潤により摘出のやむなきに至った3症例3眼を用いた。これらの3眼では腫瘍細胞の眼球内浸潤はなかった。眼杯の作製方法、浸漬液用容器、灌流装置および灌流条件は柴田⁵⁾に準じた。略記すれば、ウサギでは24時間以上暗順応を施した後、塩酸ケタミン(ケタラル®、三共、東京)麻酔下で眼球を摘出

し、直ちに、浸漬液(長山第II液⁶⁾)に浸しながら眼球赤道部で切半し網膜、脈絡膜および強膜から成る眼杯を作製した。ヒト眼の場合には、眼球摘出後に直ちに生理的食塩水に浸しながら速やかに手術室からERG記録室に搬送し、上記と同様な方法で眼杯を作製した。眼杯は直ちに2個の浸漬液用容器(容量各100ml)間に固定された。浸漬液を各容器内に毎分25mlの流速で灌流しながら各容器内の浸漬液に100%酸素ガスを毎分1リットルの割合で通気して浸漬液のpHを8.0~8.2に維持した⁷⁾。浸漬液の温度をウォーマコイル(八光商事、東京)により $31 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した⁷⁾。刺激光源としてキセノン・アーク灯(Xenon Arc 45, 三双製作所、東京)を用い、白色矩形波刺激光(網膜面照度 $3.3 \times 10^3 \text{ lux}$, 持続時間200 msec)により惹起されたa波、b波および律動様小波(oscillatory potential, OP)を記録した。ERGは眼杯をはさむ2個の浸漬液用容器内に固定された一対の銀・塩化銀電極(臨床心電図用円盤状電極NS-type, 日本光電、東京)によって導出され、直流増幅器(RDU-5, 日本光電)によって増幅された。ただし、OPの記録には時定数3 msecの交流増幅器(AB-622 M, 日本光電)を用いた。

対照灌流液である長山第II液灌流中でERGの安定な対照波形を記録した後、メルファラン(シグマ、セントルイス、米国)を長山第II液中に10, 40あるいは $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し、メルファラン添加液の灌流開始15分後にERGを再び記録した。さらに、再度長山第II液に戻して15分間灌流した後にERGを記録し、ERG変化の可逆性を検討した。

対照波形のa波、b波およびOPの振幅ならびに頂点潜時のそれぞれの値を100%として、メルファラン灌流中に記録されたそれぞれの波形の値を百分率で表し、そ

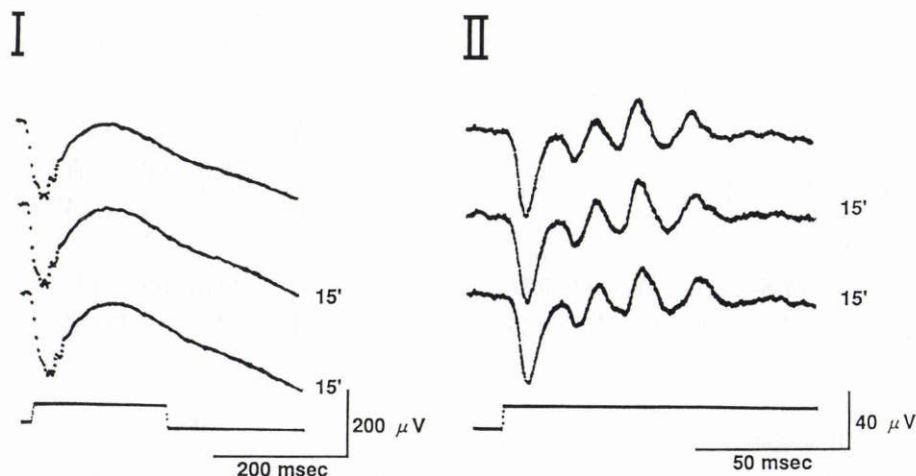


図1 メルファラン $10 \mu\text{g/ml}$ のウサギ摘出眼杯網膜電図に及ぼす影響。

メルファラン $10 \mu\text{g/ml}$ では、a波、b波およびOPの振幅および頂点潜時には変化はみられなかった。図1~3, 5および6において刺激光の網膜面照度は $3.3 \times 10^3 \text{ lux}$ であり、最上方の波形は対照浸漬液を、上から2番目の波形はメルファランを含む浸漬液を、最下方の波形は再度対照浸漬液を灌流中に記録された。I: 直流増幅, II: 交流増幅(時定数3 msec)

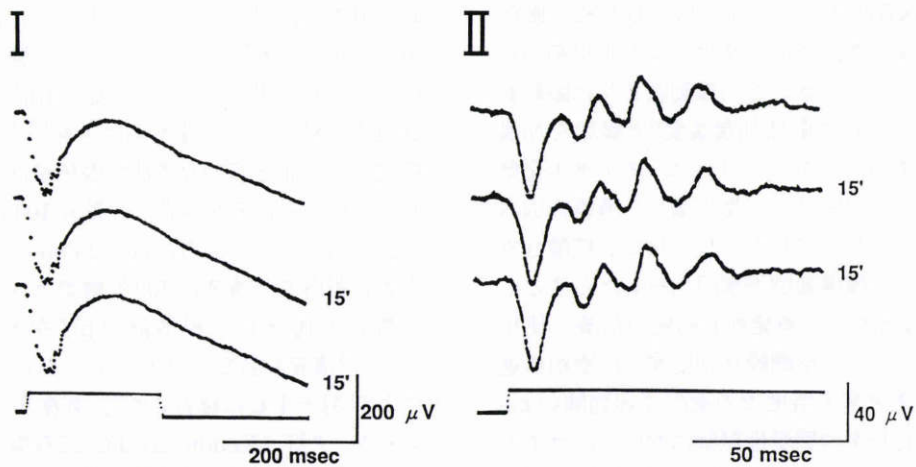


図2 メルファラン 40 $\mu\text{g/ml}$ のウサギ摘出眼杯網膜電図に及ぼす影響。
メルファラン 40 $\mu\text{g/ml}$ では、a 波、b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった。I : 直流増幅, II : 交流増幅 (時定数 3 msec)

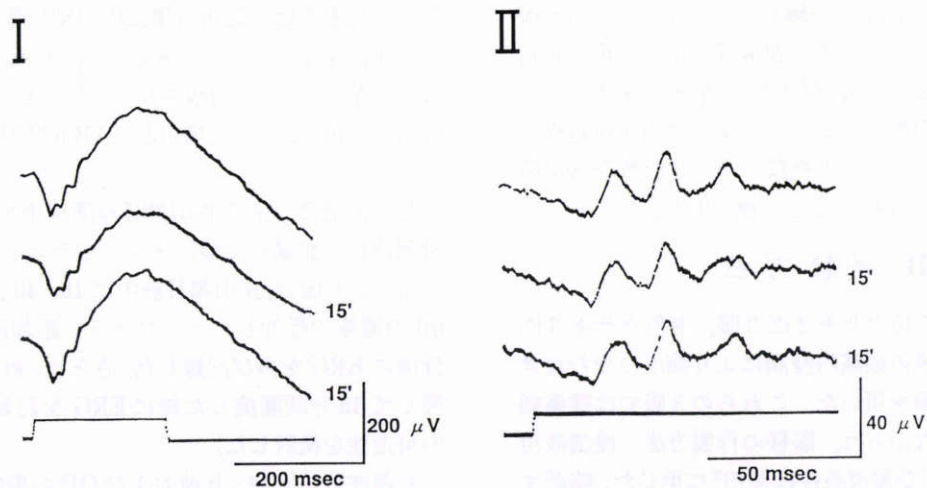


図3 メルファラン 50 $\mu\text{g/ml}$ のウサギ摘出眼杯網膜電図に及ぼす影響。
メルファラン 50 $\mu\text{g/ml}$ では b 波振幅は明らかに低下し、この変化は可逆的であった。a 波および OP の振幅および頂点潜時には変化は見られなかった。I : 直流増幅, II : 交流増幅 (時定数 3 msec)

の平均値を検討した。対照波形とメルファラン灌流中の波形間の平均値の有意差検定には paired t-test を用いた。

III 結 果

1. ウサギ眼における検討

メルファラン 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加群 (白色 2 眼, 有色 5 眼) では、a 波、b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった (図 1)。

メルファラン 40 $\mu\text{g/ml}$ 添加群 (白色 1 眼, 有色 2 眼) では、a 波、b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった (図 2)。

メルファラン 50 $\mu\text{g/ml}$ 添加群 (白色 1 眼, 有色 2 眼) では、a 波および OP の振幅は有意に変化しなかったが、b 波振幅は有意に低下した ($p < 0.05$)。b 波振幅の変化は対照液の再灌流後に回復し、変化は可逆的であった。a

波、b 波および OP の頂点潜時は有意には変化しなかった (図 3, 4)。

2. ヒト眼における検討

メルファラン 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加群 (3 眼) では、a 波、b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった (図 5)。

メルファラン 40 $\mu\text{g/ml}$ 添加群 (3 眼) では、a 波、b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった (図 6)。

IV 考 按

現在、臨床的に網膜芽細胞腫に対する眼球温熱化学療法として、メルファランを内頸動脈に注入する場合には 40 mg/m^2 (体表面積)、選択的に眼動脈に注入する場合には 10 mg/m^2 の注入量が用いられている¹⁾。この注入量における有効性および安全性を検討する場合には、眼内(特

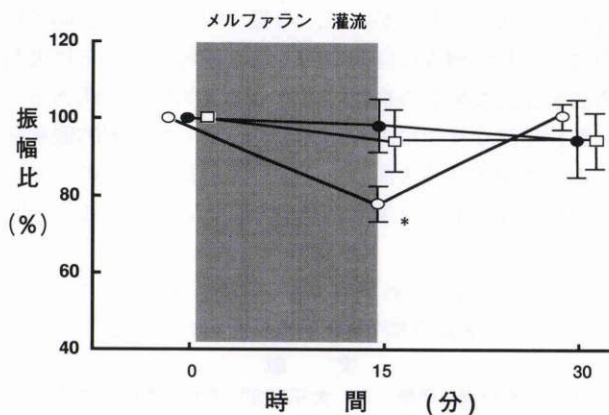


図 4 メルファランのウサギ眼 b 波振幅に及ぼす影響 (平均値±標準偏差).

メルファラン 50 μg/ml では b 波振幅は有意に低下し(p<0.05), この変化は可逆的であった. 縦軸には振幅の変化を百分率で示し, 影をつけた部分はメルファランを灌流した時間帯を示す. 白丸: 50 μg/ml, 黒丸: 40 μg/ml, 四角: 10 μg/ml, *: 時間 0 分と比べて p<0.05 で有意差がみられた.

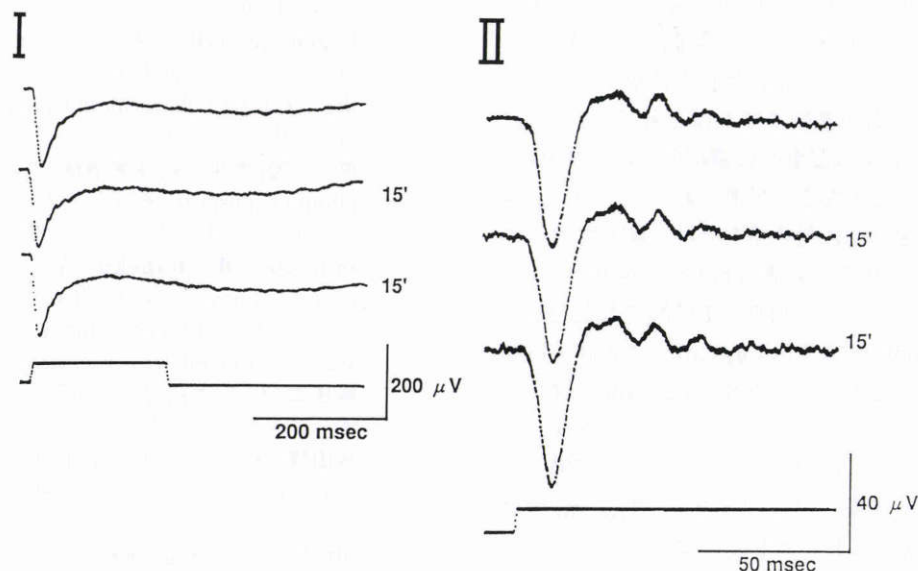


図 5 メルファラン 10 μg/ml のヒト摘出眼杯網膜電図に及ぼす影響.

メルファラン 10 μg/ml では, a 波, b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった. I: 直流増幅, II: 交流増幅 (時定数 3 msec).

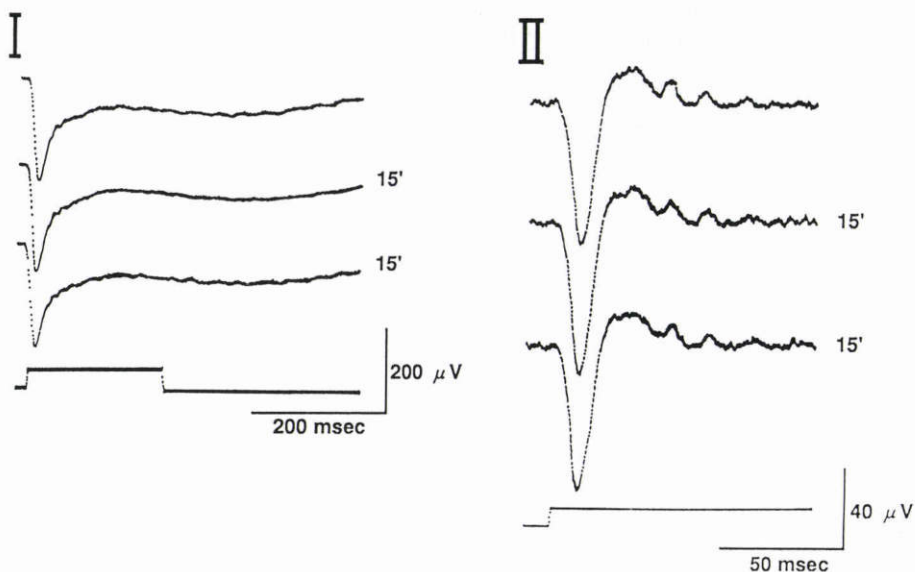


図 6 メルファラン 40 μg/ml のヒト摘出眼杯網膜電図に及ぼす影響.

メルファラン 40 μg/ml では, a 波, b 波および OP の振幅および頂点潜時には変化はみられなかった. I: 直流増幅, II: 交流増幅 (時定数 3 msec).

に網膜内)メルファラン濃度, 網膜芽細胞腫細胞に対する有効濃度, さらに眼組織(特に網膜)に障害を与えない濃度などが問題となる。

内頸動脈あるいは眼動脈に注入されたメルファランが網膜に達するには血液網膜関門を通過する必要がある。メルファランの血液網膜関門通過性についての報告は著者らが知る限りではないが, 血液脳関門に関してはマウスに 10 mg/kg を静脈内注射(静注)した5分後の脳内濃度は 0.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, 脳血液濃度比は 0.20 であったという⁸⁾。また, 他の抗癌剤の静注後あるいは患側総頸動脈注射(頸動注)後の腫瘍と血清との濃度比の平均は, 5フルオロウラシル静注後で 1.23, 5フルオロウラシル頸動注後 4.13, マイトマイシン C 静注後で 0, プレオマイシン静注後 0.08, プレオマイシン頸動注後で 1.29 と薬剤によって違いはあるが, 総頸動脈内注射の方が静脈内注射より腫瘍内で高い薬剤濃度が得られるという⁹⁾。よって, 内頸動脈あるいは眼動脈に選択的に注入すれば, 腫瘍内でさらに高濃度となると推測される。一方, メルファランの網膜芽細胞腫に対する有効性に関しては, 二重軟寒天培地での網膜芽細胞腫の colony assay による抗癌剤感受性試験において, 42°C で1時間の加温を併用した場合には, colony 形成は 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では網膜芽細胞腫細胞 13 例のうち 12 例で阻止され, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではすべての例で阻止され, 12 種の抗癌剤のうちメルファランが最も低濃度で colony 形成を阻止したという⁴⁾。網膜への影響に関しては, 本実験でメルファラン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではウサギ摘出眼杯 ERG において b 波振幅は有意に低下したが, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではヒトおよびウサギ摘出眼杯 ERG の各波に影響を及ぼさなかった。上述の 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では正常網膜への影響は少ないものと考えられる。

以上を考慮すると, メルファランを併用した眼球温熱化学療法は網膜芽細胞腫の眼球保存療法の 1 つとして有用であると考えられる。ただし, 本実験では摘出眼杯 ERG という特殊な環境下での網膜への影響のみしか検

討していない。したがって, 今後メルファランを硝子体内に注入して網膜に直接作用させた状態や, さらに温熱療法を加えた場合の網膜への影響の電気生理学的あるいは形態学的な検討により, メルファランの選択的網膜注法や硝子体注法による眼球温熱化学療法により副作用が少なく有効な条件が求められることになると思われる。

本論文の要旨は第 95 回日本眼科学会総会において報告した。河崎一夫教授の御校閲に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 金子明博, 伊勢 泰, 大平睦郎, 高山 順, 洪井壮一郎, 松岡浩司, 他: 眼球温熱化学療法で治癒した, 眼球内に再発した網膜芽細胞腫の 2 例. 臨眼 44: 289—292, 1990.
- 2) Lagendijk JJW: A microwave heating technique for the hyperthermic treatment of tumors in the eye, especially retinoblastoma. Phys Med Biol 27: 1313—1324, 1982.
- 3) 原 宏, 中井一夫, 永井清保: Melphalan(l-phenylalanine mustard) 投与時の人骨髄腫細胞回転に関する研究. 日本血液学会雑誌 34: 614—621, 1971.
- 4) Inomata M, Kaneko A: Chemosensitivity profiles of primary and cultured human retinoblastoma cells in a human tumor colonogenic assay. Jpn J Cancer Res 78: 858—868, 1987.
- 5) 柴田二郎: 家兎摘出眼 ERG に対する浸透圧の影響. 日眼会誌 78: 844—857, 1974.
- 6) 長山理三郎: 摘出家兎網膜 ERG の実験的研究. 第 1 報. 摘出家兎網膜からの ERG の誘導. 日眼会誌 73: 1900—1908, 1969.
- 7) 川口博治, 米村大蔵, 河崎一夫, 柴田二郎, 白倉弘子, 田辺譲二, 他: 家兎眼 *in vitro* ERG におよぼす浸漬液 pH の影響. 日眼会誌 83: 454—462, 1979.
- 8) Mellet LB: Physicochemical consideration and pharmacokinetic behavior in delivery of drugs to the central nervous system. Cancer Treat Rep 61: 527—531, 1977.
- 9) 金子明博: 網膜芽細胞の薬物療法に関する研究. 日眼会誌 81: 855—860, 1977.