血液回収自己輸血におけるマイトマイシンC使用に関する研究

福井 明* 高折 益彦* 三宅 康之** 難波 正義***

* 川崎医科大学麻酔科学教室

** 川崎医科大学中央検査部

*** 川崎医科大学実験病理学教室

(昭和60年10月8日受付)

APPLICATION OF MITOMYCIN C FOR THE INTRAOPERATIVE BLOOD SALVAGING AUTOTRANSFUSION IN PATIENTS WITH MALIGNANT NEOPLASMA

Akira Fukui*, Masuhiko Takaori*, Yasuhisa Miyake** and
Masayoshi Namba***

Cultured malignant cells, HeLa cells, human gastric cancer cells or human lung cancer cells, were exposed to either mitomycin C or bleomycin, concentration of which were varied from $5\mu\text{g}/\text{dl}$ to $400\mu\text{g}/\text{dl}$, for either 10, 20, or 30 minutes in vitro. As a result, mitomycin C with concentration of $200\mu\text{g}/\text{dl}$ could inhibit growth and not form colony of the malignant cells on the culture media. However bleomycin showed no inhibition of the growth and colony formation of the malignant cells under the above exposures at all.

These data should be applied to intraoperative autologous blood transfusion for a case, in whom malignant cells may migrate in the salvaged red blood cells. Namely, it was advocated that 30mg of mitomycin C should be mixed with collected red blood cells concentrated in a separating ball (Haemonetics Cell Saver®: 250ml) and should be left in place for 20 minutes for prevention of generalized dissemination of the malignant neoplasma.

It was recognized also that mitomycin C permeated into the intracellular space of red cells and its concentration was about one fifth of that in the extracellular space after 20 minutes. However no change in deformability of erythrocyte was detected.

要 旨

HeLa cell, human gastric cancer cell, human lung cancer cell の3種類の培養悪性腫瘍細胞を in vitro にて $5\sim 400\mu\text{g}/\text{dl}$ の6段階濃度の mitomycin C (MMC), あるいは bleomycin にそれぞれ10, 20, 30分の曝露を行い, 最低有効腫瘍細胞死滅条件を求めた。その結果, bleomycin ではいかなる条件設定でも培養液上での腫瘍細胞増殖, コロニー形成がみとめられ, MMC については $200\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上, 20分間以上の曝露にて腫瘍細胞の生育, コロニー形成はみとめられなかった。なお, $200\mu\text{g}/\text{dl}$ 以下の濃度ではたとえ曝露時間を30分まで延長させても細胞生育阻止効果はえられ

なかった。

この成績は血液回収自己輸血中に, 悪性腫瘍細胞が混入する可能性のある場合に应用される。すなわち, 実地臨床使用時には, 回収赤血球が分離ボール内 (Haemonetics Cell Saver®: 250ml) に集積した時点で, 30mg の MMC を赤血球と混合し, 20分間放置することによってその目的を達する。このような MMC 曝露中, MMC の一部が赤血球内へ移行すること (曝露濃度の1/5量) がみとめられたが, これにともなう赤血球機能, すくなくとも赤血球変形能には変化がみとめられなかった。

序 言

輸血後肝炎の発生、輸血用血液の不足など多くの問題を含む同種血輸血に比べ、あらゆる面で安全性が高い自己輸血が近年見直されてきている。当院でも図1に示すようにHaemonetic Cell Saver®を用いた血液回収自己輸血 (Intraoperative blood salvaging autotransfusion, 以下IATと略す)を広範子宮全摘術、股関節全置換術などの臼蓋形成を含む股関節手術、椎弓切除や側弯症などの脊髄手術など臨床40症例以上に施行し、同種血輸血の回避に努めている。しかし本法は悪性腫瘍細胞や細菌が回収される血液に混入する場合、あるいはその可能性がある場合でも禁忌となっている。

かつて某施設において子宮外妊娠破裂によると思われた腹腔内出血血液の輸血を行ったところ、その回収血液中に纖毛上皮腫細胞が混在していたため、腫瘍細胞の全身性播種を来し、患者の予後を極めて悪化させたという事実がある。したがって回収血液への腫瘍細胞の混合については特に注意すべきものであるとともに、たとえ予想せざる混合があってもかかる合併症を発生させないように工夫が必要である。

われわれは、当初輸血用マイクロフィルターを用いて腫瘍細胞の除去を試みたが、この方法では全く目的を達し得ないことをみとめた。そこで今回、抗腫瘍薬を用いたIAT血よりの腫瘍細胞を短

時間に死滅、除去する方法を企図し研究したので報告する。

方 法

I: 抗腫瘍薬による腫瘍細胞除去に関する基礎実験

抗腫瘍薬としてマイトマイシンC (以下MMCと略す) およびブレオマイシン (以下BLMと略す) を選択し、腫瘍細胞をin vitroにおいて短時間に死滅さすこれら薬剤有効濃度とその有効作用時間の決定を試みた。標的腫瘍細胞には継代培養されている人子宮頸癌の株細胞 HeLa cell, 人肺癌の株細胞である human lung cancer cell (HLC), 人胃癌の株細胞である human gastric cancer cell (HGC), の3種の腫瘍細胞を用いた。

培養液は, Eagl's minimum essential medium (MEN) に牛胎児血清10%を添加し, 3種の腫瘍細胞をこの培養液中にて, 炭酸ガス濃度5%, 温度37℃, 湿度100%の条件下で培養し, 腫瘍細胞が培養液1ml中に 200×10^4 個以上になるまで増殖させた。この培養液1mlに下記濃度になるようにMMCおよび, BLMを混入し, クリンベッチ内にて所定時間放置した。すなわちMMCおよびBLM濃度は, 5, 10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$, 曝露時間は10, 20, 30分とした。また対照群としては, これらの薬剤の代わりに生理食塩水を用いた。そして10, 20, 30分のクリンベッチ内での曝露を行った。これら処理された標的腫瘍細胞群を3,000回

図1 血液回収型自己輸血施行の図 (Cell Saver®利用)

文献5)から引用改変

転, 5分遠沈にて集め, 再度新しい培養液10mlにて2回洗浄後, 培養液5mlを含む直径6cmシャーレ内に展開, よく攪拌後, 上記炭酸ガスインキュベーター内で10日間培養した。10日後, 培養細胞をメタノールにて固定(15分間)した後, ギムザ染色(3時間)を行い, 生着したコロニー数を算定した。そしてコロニー形成のみられないものについては, 腫瘍細胞の死滅と判定した。

II: MMCの赤血球への取り込みに関する研究
健康成人の静脈血10mlを採取し, 直ちにヘパリン化の後, 200 μ g/mlのMMC 10mlと十分混和し室温にて20分間放置した。そして3,000回転, 10分間の遠沈を行い, その上澄液ならびに洗浄赤血球に蒸留水1mlを加えて溶血させたヘモグロビン液のMMC濃度を測定した。なおMMC濃度は, 協和醗酵工業株式会社技術部の協力を得て, 同社研究室内において生物学的検定によって測定した。同様の実験測定は異なる実験日に計3回行った。

III: MMC曝露後MMCの赤血球変形能に及ぼす影響

赤血球変形能の測定は, ReidらのSchmid-Schönbein変法¹⁾を用いて行った。すなわち, 20cmH₂Oの陰圧下で1分間にGeneral Electric社製, 細孔直径5 μ のnuclepore membrane (N500 CPRO1300)を通過する血液量を測定した。この試

験膜は厚さ10 μ m, 直後13mmの円形ポリカーボネート膜で, 直径5 μ の円形孔が1cm²あたり4 $\times$ 10⁵個を有する。またホルダーはGeneral Electric社製のポリカーボネートで作られた13mmポップトップ・ホルダー(FHO13PL00110)を用いた。

すなわち, ホルダーに試験膜を装置した後, 1mlのガラス注射筒をホルダーに接続し, 測定血液を正確に1mlまで満たし, 図2の吸引瓶(filter reservoir)中を20cmH₂Oの陰圧にすると同時にストップウォッチを作動させ, 1mlの血液が試験膜を通過する時間を測定した。この操作を同一血液について3回行ってその平均値を記録し, 1分間に試験膜を通過する赤血球の容積を測定した。そして以下の式を用いて変形指数 defemrmability indndex: DI²⁾を算出した。

$$DI \text{ (ml/min)} = 1\text{ml} \times \text{Ht} \times 60/X$$

X: 血液1mlがmembraneを通過する時間(秒)

Ht: ヘマトクリット値(%)

血液と器具は37℃に保たれるように, 装置をすべて37℃の恒温庫に格納して行った。

検体には, 健康成人5名の静脈血を採血しヘパリン化し, 1) 全血, 2) 生理食塩水にて洗浄した濃厚赤血球, 3) 200 μ g/mlのMMCに20分間曝露後, 生理食塩水にて洗浄した赤血球の3検体を測定した。

図2 マイクロフィルター法による赤血球変形能測定装置

文献2)から引用改変

統計処理は non-paired student test を用いて、すべての成績は平均±標準偏差で表示した。

成 績

研究 I

5, 10, 50 μ g/ml 濃度の MMC に対しては、曝露時間を10, 20, 30分と変えてもすべて対照群（コロニー数は無数）に等しいコロニー生着数を示した。一方、200 μ g/ml の MMC 濃度に対しては、20, 30分の曝露によってすべて腫瘍細胞の生着をみとめなかったが、10分間の曝露では生着をみとめた。3種の腫瘍細胞いずれにおいても、50, 100, 200 μ g/ml の MMC 濃度、10, 20, 30分の曝露時間では、曝露時間の増加、濃度の増加に従ってコロニー出現数は減少し、200 μ g/ml の MMC 濃度において、曝露時間20分でコロニー形成がみとめられなくなった(表1)。また、BLM については、5~400 μ g/ml までの6段階、10, 20, 30分の曝露、すべてにおいて対照群と変わらない腫瘍細胞の生着がみとめられた。

研究 II

赤血球を浸漬させた液の MMC 濃度は56±7 μ g/ml、生理食塩水により洗浄した後の赤血球中の MMC 濃度は12±1 μ g/ml であって、赤血球中に外界濃度の約1/5濃度の MMC が検出された。

研究 III

全血の DI は1.86±0.41であったが、生理食塩

表1 各腫瘍細胞に対する MMC の死滅効果(コロニー出現数)

	MMC 濃度 曝露時間 min	50	100	200
	$\mu\text{g/ml}$			
Hela cell (n=5)	10	25±8	12±3	3±1
	20	22±8	6±2	0±0
	30	12±3	7±2	0±0
HGC cell (n=5)	10	14±4	4±1	4±1
	20	14±2	4±2	0±0
	30	7±1	3±2	0±0
HLC cell (n=5)	10	7±1	4±1	1±1
	20	6±1	3±1	0±0
	30	5±2	1±1	0±0

(mean±SD)

表2 赤血球変形能指数(D.I)

(n=5)			
	全 血	洗浄赤血球	MMC 曝露後 洗浄赤血球
D.I. ml/min	1.86±0.41	126.93±10.99	126.08±14.99
(mean±SD)			

水にて洗浄した赤血球の DI は126.93±10.99、200 μ g/ml の MMC に20分間曝露後、生理食塩水にて洗浄、遠心した濃厚赤血球の DI は、126.08±14.99であり、後2者間に有意差はみとめられなかった(表2)。

考 察

1928年の Maynard³⁾, Butler⁴⁾らが行った手術野へ出血した血液を回収し再利用する自己輸血は、種々の汚染物質が輸血用血液中に混入されるため、合併症が多く過去約40年間全く顧みられることがなかった。しかしながら赤血球洗浄をきわめて効率的に行いうる Cell Saver[®] (Haemonetics) や赤血球よりも大きな細胞や異物を除去しうる輸血用マイクロフィルターなどの出現により、安全に手術野出血血液回収自己輸血を実施できるようになってきた。当院では昭和58年より、Haemonetics Cell Saver[®]を用いた本法と、血液希釈自己輸血とを併用することによって術中、術後を通じて患者の安定した循環動態と末梢への酸素供給を維持し、同種血輸血の回避に努力してきた^{5)~8)}。

しかし本法には、前述したごとく悪性腫瘍細胞の全身性播腫の危険性を伴わないわけではない。そこでもし回収赤血球に混入する悪性腫瘍細胞を捕捉するか、もしくはこれを速やかに死滅させる方法が開発されれば、たとえ対象者に予想せざる悪性腫瘍が存在していて、これが回収赤血球中に混入するようなことがあっても、患者に危険をもたらすような事態の回避が可能となろう。それゆえにわれわれは、MMC あるいは BLM を用いて腫瘍細胞を速やかに死滅させる方法を試みて、上記の結果を得た。

これらの抗腫瘍薬を大量間欠投与法として成人に対して用いるときは、MMC で10~20mg/週

を⁹⁾¹⁰⁾BLMで15~30mg/週×2¹¹⁾を静脈内に投与する。この投与量では投与直後、静脈血内で4~15 $\mu\text{g/ml}$ 、組織液(細胞外液)中で1~3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に達し、癌細胞に対して増殖抑制作用を発揮するものと云われている。一方、*in vitro*において腫瘍細胞を死滅さすMMCの濃度に関する報告は少なく、MMC、BLMとの接触時間、特に短時間接触時間における腫瘍細胞死滅効果について研究した報告はほとんどみとめられない。したがって悪性腫瘍を有する患者において手術野出血血液回収自己輸血をMMCあるいはBLMを用いて安全に施行するには、使用するMMC、あるいはBLMの濃度とそれぞれに曝露する時間との決定が必要であった。

われわれが行った第Iの研究で、MMC濃度200 $\mu\text{g/ml}$ 、20分間の曝露で腫瘍細胞の増殖、コロニー形成はみとめられなかった。この濃度を臨床例、すなわちHaemonetics Cell Saver®回路内におけるMMCの腫瘍細胞死滅に応用して誤りがないものと判定された。

しかるにBLM処理によっては、われわれが行った、5~400 $\mu\text{g/ml}$ 、10~30分の曝露時間では全く腫瘍細胞の死滅を来すことができなかった。下山¹²⁾によれば、抗癌性抗生物質である、MMC、BLMは両者とも、殺細胞作用が濃度依存性であり、速効性かつ遅効性群のtype Ibに分類され、また作用機序も二重鎖DNAと結合し、架橋形成を行うとされている。MMCで増殖、コロニー形成がみとめられなかったにもかかわらず、BLMでこれがみとめられた理由として、以下の点が考えられた。すなわち、1) MMCと同濃度、同曝露時間を用いたこと(実施臨床ではさらに高濃度、長時間曝露は不可能であるが)、2) MMCがquinome, methyl urethane, aziridineの3つの抗癌活性基を持っているため広い抗癌スペクトルを有しているが、BLMはSH化合物、あるいは H_2O_2 の存在下で活性化されるという特性を有し、成熟型扁平上皮癌に有効であるスペクトル範囲の問題、3) 検査対象とした悪性腫瘍細胞に対する適合性の問題、などが考えられた¹³⁾。

MMCによる腫瘍細胞死滅、除去の実施は以下

のごとくである。すなわち、赤血球回収により図1の分離ボール(容量250ml)がほぼ赤血球で満たされる時に30mgのMMCをこのボール内に注入し、1~2分間、分離ボールを回転させることにより、MMCと赤血球を充分に混合させる。そして後から回収された血液のボール内注入を停止し、20分間静止状態でMMCを腫瘍細胞に作用させる(分離ボール容量は250mlであるが、平均赤血球濃度が50%であるので、腫瘍細胞が浮遊する自由空間は125mlとなる。そこで実質、腫瘍細胞が接するMMC濃度は約200 $\mu\text{g/ml}$ となる)。その後通常使用量⁵⁾の2~3倍、すなわち2,000~3,000mlの生理食塩水にて連続的に赤血球を洗浄し、直ちに戻し輸血バックに移し、濃厚赤血球100mlに対しMMC 20mgを添加し腫瘍細胞の死滅効果を強化している。

MMCの赤血球生成系への影響については、Gualati¹⁴⁾とPavy¹⁵⁾は溶血性貧血を、戸村ら¹⁶⁾が再生不良性貧血を指摘報告している。しかし、MMCが*in vitro*で直接赤血球そのものに対しての影響、たとえば赤血球の酸素運搬能、赤血球変形能の変化などに関する報告は皆無に等しい。MMCが上記曝露によって赤血球表面に結合、あるいはその中に浸透しているものであれば、このような赤血球の生理的機能に影響を及ぼすものと考え、赤血球へのMMC吸収について検討した。その結果、外界濃度の約1/5量のMMCが赤血球にみとめられた。このMMCが赤血球のいずれの部分に存在するのかは今後の研究によらなければならないが、最も可能性の高いものは赤血球表面への付着であろう。もしそれが事実であった場合、赤血球膜に変化を生じ、それが赤血球変形能に変化を与えるとすれば、微小循環における酸素運搬体としての赤血球機能が失われる結果も招きかねない。この点に鑑み、われわれはまず赤血球変形能についての検討を行ったが、MMC曝露後洗浄赤血球と、洗浄赤血球の赤血球変形能との間に有意差はみとめられず、MMC処理赤血球を自己輸血した場合でも末梢微小循環系におけるこの赤血球血管内通過性に問題を生じるような事態は発生しないと考えてよいと思われる。

ちなみにわれわれはMMCを用いた腫瘍細胞除去法を既に5症例に実施している。このうち3症例は転移性脊髄腫瘍患者(未分化癌), 2症例は転移性脊髄腫瘍患者(腺癌)で、いずれも椎弓切除術が施行された。洗浄赤血球からの腫瘍細胞診(オートスメア法)は5例すべてにおいて実施しているが、これらの症例に対して行われた自己輸血用血液から腫瘍細胞は全く発見されなかった。むしろ、現在の時点で自己輸血に起因したと思われる腫瘍細胞播種の症状も全くみとめられていない。

ま と め

今回、われわれは血液回収自己輸血中に混入する悪性腫瘍細胞を死滅させる方法としてMMCを用いることを試みた。すなわち回収赤血球が分離ボール内に集積した時点で30mgのMMCを赤血球と混合する方法を開発した。

本法を行う基礎研究として、HeLa Cell, HGC, HLCの3種類の培養悪性腫瘍細胞を用いてin vitroにて5~400 μ g/mlの6段階濃度のMMC,あるいはBLMに10, 20, 30分の3種の曝露を行い、最低有効腫瘍死滅条件を求めたところ、BLMではいかなる条件設定にも腫瘍死滅効果が得られず、MMCにおいては200 μ g/ml, 20分間の上記条件を得た。このようなMMC曝露中、MMCは一部、赤血球内への移行(培養液濃度の1/5量)がみとめられたが、これに伴う赤血球機能、少なくとも赤血球変形能の変化はみとめられなかった。

謝辞 本研究の組織培養技術のご指導をいただいた、川崎医科大学組織培養免疫センターの北 昭子氏はじめ同センターの方々に感謝します。

本稿の要旨は、第33回日本輸血学会総会、1985、5月(東京)において発表した。

文 献

1) Reid, H.L., Barnes, A.J., Lock, P.J., Dormandy,

J.A. and Dormandy, T.L.: A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J. Clin. Pathol.*, 29: 855—858, 1976.

- 2) 沖野 實, 三宅康夫, 木村 潔, 安永幸二郎: マイクロフィルター法による赤血球変形能の基礎的検討. *臨床血液*, 21: 925—931, 1980.
- 3) Maynard, R.L. and Rees, W.T.: A case of ruptured extrauterine pregnancy treated by autotransfusion. *J.A.M.A.*, 92: 1758—1759, 1929.
- 4) Butler, H.B.: Auto-blood-transfusion in two cases of ruptured tubal pregnancy. *Brit. Med. J.*, 2: 1000—1008, 1929.
- 5) 高折益彦, 福井 明, 奥坊康士: 自己輸血, 麻酔, 34: 530—550, 1985.
- 6) 中山雅人, 小川重男, 高折益彦: 拡大血液希釈性自己輸血に関する研究. *日本輸血学会雑誌*, 30: 168—174, 1984.
- 7) 高折益彦, 中山雅人: 同種輸血節減のための各法とその比較. *日本輸血学会雑誌*, 30: 284—286, 1984.
- 8) 高折益彦, 新谷潤二: 同種輸血節減のための各法とその比較. *外科診療*, 27: 309—316, 1985.
- 9) 田口鐵男編集: マイトマイシン—癌化学療法の手引きととも—, 協和企画通信, 東京, 1984, pp. 191—195.
- 10) 古江 尚, 田口鐵男: 抗癌剤の選び方, 使い方, 医学書院, 東京, 1980, pp. 22—32.
- 11) 松永藤雄, 久保明良: がん化学療法の実例. 南江堂, 東京, 1971, pp. 56—59.
- 12) 下山正徳: 制癌剤の Cell-kill-kinetics と至適投与法. *癌と化学療法*, 3: 1103—1110, 1976.
- 13) 古江 尚, 太田和雄, 田口鉄男, 藤田 洗, 塚越茂: 癌化学療法の基礎と臨床(第2版), 癌と化学療法社, 東京, 1973, pp. 205—211.
- 14) Gualati, S.C.: Microangiopathic hemolytic anemia observed after treatment of epidermoid carcinoma with mitomycin C and 5-fluorouracil. *Cancer*, 45: 2252—2257, 1980.
- 15) Pavy, M.D.: Hemolytic-uremic syndrome associated with mitomycin therapy. *Cancer Treat. Rep.*, 66: 457—461, 1982.
- 16) 戸村隆訓, 滝沢義矩, 入交清博: Mytomycin C による再生不良性貧血と腎障害をきたした2症例. *癌の臨床*, 12: 173—176, 1966.