アミノ酸インバランス輸液による抗癌剤の抗腫瘍効果増強に関する基礎的研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 服部, 和伸
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9258

アミノ酸インバランス輸液による抗癌剤の抗腫瘍効果増強に関する基礎的研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）
服　部　和　伸

近年，フッ化ピリミジン系抗癌剤とその調節因子の併用による生化学的調節 (biochemical modulation) が，抗腫瘍効果の増強を図る手段として注目されている．本研究では，アミノ酸インバランス輸液がフッ化ピリミジン系抗癌剤の生化学的調節の調節因子となりうるかどうかを明らかにすることを目的とし，抗腫瘍効果と宿主に及ぼす影響を検討した．腹水肝癌 AH130 を背部に移植した雄性ラットに7日間，中心静脈栄養法を施行した．実験群として総合アミノ酸製剤とテガフール併用群 (n=6) (Ⅰ)，KKM-1 (メチオニンとシスチンを除いたアミノ酸製剤) とテガフール併用群 (n=7) (Ⅱ)，KKM-2 (KKM-1 にアルギニンを増量したアミノ酸製剤) とテガフール併用群 (n=5) (Ⅲ)，KKM-2 単独群 (n=6) (Ⅳ)，経口摂取群 (n=6) (Ⅴ) を設定した．Ⅰ群からⅣ群の非蛋白カロリーは 200kcal/kg/日とし，Ⅰ群からⅢ群のテガフールは100mg/kg/日とした．腫瘍重量の変化，宿主体重の変化，窒素平衡，血漿遊離アミノ酸濃度，血液生化学検査，各臓器内テガフールおよび5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) 濃度，腫瘍細胞の核 DNA 量および増殖核細胞抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 標識率を測定した．腫瘍重量の増加はⅡ群は 2.5±1.6 ($\bar{x}$ ±SD)g，Ⅲ群は 1.2±0.5g と，Ⅴ群の 5.8±2.6g に比較して有意に抑制された ($P<0.01$) が，宿主体重はⅠ群～Ⅳ群で減少し，Ⅴ群でのみ増加した．累積窒素平衡はⅠ群，Ⅱ群では正であったが，Ⅲ群，Ⅳ群では負であった．血漿遊離アミノ酸濃度ではアルギニンはⅢ群，Ⅳ群でⅠ群，Ⅱ群，Ⅴ群と比較して有意な上昇を認めた ($P<0.01$)．メチオニンはⅡ群，Ⅲ群，Ⅳ群でⅤ群に比較して有意な減少を認めた ($P<0.05$)．血清尿素窒素，クレアチニン，血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ，グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼに差はなかった．一方，テガフールの臓器内濃度はいずれの群でも同レベルであったが，5-FU 濃度は腫瘍内で血清の20～40倍と著明に高く，Ⅱ群，Ⅲ群では各臓器での濃度もⅠ群よりも高い傾向にあった．つぎに腹水肝癌 AH130 を腹腔内に移植した雄性ラットに7日間，中心静脈栄養法を施行した．フローサイトメトリーによる腹水癌細胞の核 DNA 量の測定では，Ⅲ群はⅡ群，Ⅳ群に比較して G_0G_1 期細胞数の増加と G_2M 期細胞数の減少をみたが，S 期は同程度であった．フローサイトメトリーによる PCNA 標識率の測定では，Ⅲ群は30±16%と，Ⅰ群，Ⅱ群，Ⅴ群と比較して有意に低値を示した ($P<0.01$)．以上の成績から，テガフールはアミノ酸インバランス輸液との併用により，その抗腫瘍効果が増強され，アミノ酸インバランス輸液はフッ化ピリミジン系抗癌剤の生化学的調節となりうると考えられ，今後，癌治療の有効な療法として期待できるものと考えられた．

Key words amino acid imbalance, anticancer agents, biochemical modulation, flow cytometry, proliferating cell nuclear antigen

各種診断技術の進歩は，悪性腫瘍の早期発見の機会増加と，その治療成績の向上をもたらした．しかし，いまだに遠隔転移や広範なリンパ節転移をきたした状態で発見される場合も多く，かかる症例の治療予後は極めて不良である．局所病から全身病へと進展した消化器悪性腫瘍には，化学療法，放射線療法などに手術を組み合わせた集学的治療が試みられている．近年，各種抗癌剤の作用機序の解明にともない，より確実に選択的な腫瘍細胞毒性を発揮する薬剤の投与法が注目されている．このような理論的な薬剤併用療法は，生化学的調節 (biochemical modulation) と称される．生化学的調節の理論に基づいた化学療法では，抗腫瘍効果を発揮する作用薬剤 (effector) と，作用薬剤の抗腫瘍効果を増強する調節薬剤 (modulator) を併用する．消化器癌に対する化学療法では，5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) が作用薬剤として選択されることが多い．葉酸代謝拮抗剤やプラチナ誘導体は，5-FU の抗腫瘍効果を増強する調節薬剤として臨床的にその有用性が報告され始めている[1)2)]．本研究では，メチオニン代謝が葉酸代謝と深い関係を有していること，尿素サイクルとピリミジンの新規 (de novo) 合成系がカルバモイル燐酸 (carbamoyl phosphate, CP) を共通の基質とすることに着目し，アミノ酸インバランス輸液が 5-FU

平成8年9月30日受付，平成8年11月5日受理

Abbreviations：BSA, bovine serum albumin; BUN, blood urea nitrogen; $CH_2H_4PteGlu$, methylenetetrahydrofolylglutamate; CP, carbamoyl phosphate; Cr, creatinine; 5-FU, 5-fluorouracil; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TP, thymidine phosphorylase; TPN, total parenteral nutrition; TS, thymidylate synthase

の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した．

材料および方法

Ⅰ．実験材料

1．実験動物

約6週齢の雄性ドンリューラット（静岡実験動物，浜松）を使用し，約1週間の馴化の後に実験に用いた．実験開始までは，一定の空調室内で固形飼料 CRF-1（日本チャールズリバー，大和）および，水道水を自由経口摂取させた．

2．腫瘍細胞

金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授より分与されたラット腹水肝癌 AH-130 を使用した．AH-130 細胞はドンリューラット腹腔内に移植，継代して，移植10日目の腹水細胞を実験に使用した．

3．癌細胞浮遊液の調節

AH130 移植ラットから採取した癌性腹水を，生理的食塩水にて希釈して，トリパンブルー排除試験法により生細胞数 1×10^8 個/ml となるように調節した．

4．輸液製剤

高張グルコース電解質液としてパレメンタール®A および B（森下ルセル，東京），総合アミノ酸製剤としてモリプロン®（森下ルセル）を使用した．アミノ酸インバランス輸液として，KKM-1（モリプロンからメチオニン，シスチンを除き，他のアミノ酸を等モル比で増量した製剤），KKM-2（メチオニン，シスチンを除き，他のアミノ酸の50％をアルギニンで置換した製剤）を使用した（表1）．

5．抗癌剤

抗癌剤はテガフール [1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil, FT-207]（大鵬薬品工業，東京）を使用した．

6．輸液システム

無拘束下にラットに輸液を施行する装置としてバイオカニューラ®（バイオ・メディカ，大阪）を使用した．輸液の注入には微量輸液ポンプ（マイポンB型®，バイオ・メディカ）を使用した．

Ⅱ．アミノ酸インバランス輸液と抗癌剤併用による抗腫瘍効果増強の検討（実験1）

1．実験群の設定

担癌ラットは，輸液内容により「テルアミノ＋テガフール投与群」（Ⅰ群）（n＝6），「KKM-1＋テガフール投与群」（Ⅱ群）（n＝7），「KKM-2＋テガフール投与群」（Ⅲ群）（n＝5），「KKM-2単独投与群」（Ⅳ群）（n＝6），「経口自由摂取群」（Ⅴ群）（n＝6）の5群に分けて実験を施行した．

Ⅰ～Ⅳ群の非蛋白カロリー投与量は 160ml/kg/日（グルコース50g/kg/日，200kcal/kg/日）とし，アミノ酸製剤投与量は 70ml/kg/日（アミノ酸 7.4g/kg/日，窒素 1.19g/kg/日）とした．また，Ⅰ～Ⅳ群の非蛋白カロリー/窒素（non-protein calories/nitrogen, NPC/N）比は168とした．Ⅰ～Ⅲ群のテガフール投与量は 100mg/kg/日とし，輸液に混じて持続的に投与した．なお，Ⅴ群には固形飼料 CRF-1 および水道水を自由経口摂取させた（表2）．

2．担癌動物の作成

ドンリューラットの背部皮下に AH-130 癌細胞浮遊液 0.1ml（1×10^7 個）を接種した．腫瘍の生着を確認後，24時間絶食させ，移植4日目にネンブタール®（pentobarbital sodium，ダイナボット，大阪）の腹腔内投与による麻酔下に Steigerら[3]の方法に準じて，右頚静脈より上大静脈にシリコンカテーテルを挿入し，無拘束下に7日間持続点滴を行った．

なお，静脈炎による血管外漏出を起こしたり，チューブトラ

Table 1. Amino acid composition of Moripron, KKM-1, and KKM-2

Amino acid	Composition (W/V%)		
	Moriprone	KKM-1	KKM-2
Alanine	0.620	0.650	0.357
Arginine	0.955	1.000	5.300
Aspartic acid	0.380	0.400	0.220
Cystine	0.145	—	—
Glutamic acid	0.650	0.680	0.375
Glycine	1.070	1.120	0.615
Histidine	0.811	0.850	0.465
Isoleucine	0.560	0.585	0.320
Leucine	1.250	1.310	0.720
Lysine	1.100	1.155	0.635
Methionine	0.350	—	—
Phenylalanine	0.935	0.980	0.540
Proline	0.330	0.345	0.190
Serime	0.220	0.230	0.125
Threonine	0.650	0.680	0.375
Tyrosine	0.035	0.035	0.020
Tryptophan	0.135	0.135	0.075
Valine	0.450	0.470	0.260
Total	10.646	10.625	10.592

KKM-1, amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine ; KKM-2, KKM-1 supplemented arginine.

ブル等で輸液を続けられなくなった例は実験から除外した．

3．測定事項

1）体重および腫瘍重量

点滴開始時と7日間の点滴終了後の2回，体重を計測した．各時点での計測値から腫瘍重量を差し引いた値を宿主体重とした．宿主体重の変化は，点滴前後の宿主体重の増減を点滴前値に対する百分率で表した．腫瘍重量はスライディングキャリパーを使用して腫瘍の長径 (L, mm) と短径 (W, mm) を計測し，腫瘍重量 (mg)＝$L \times W^2/2$，によって算出した．

2）窒素平衡

点滴期間中は毎日採尿し，Kjeldahl 法[4]を用いて尿中総窒素量の測定をした．尿中の総窒素量から輸液中の窒素量を差し引いて窒素平衡を求めた．点滴期間中の糞便排泄量は，きわめて少量のため無視した．

3）血液生化学検査

7日間の点滴終了時，心穿刺にて採血し，以下の項目について測定した．

i．血漿アミノ酸

高速アミノ酸自動分析機 L-8500 (日立，東京) によって，血漿アミノ酸を測定した．

ii．血清尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN)

血清 BUN はウレアーゼ UV 法[5]によって測定した．

iii．血清クレアチニン (creatinine, Cr)

血清 Cr はヤッフェ (Jaffe) 法[6]によって測定した．

iv．血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (glutamic oxaloacetic transaminase, GOT) およびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamic pyruvic transaminase, GPT)

血清 GOT および GPT は日本臨床化学会勧告法[7]で測定した．

4）臓器・血中のテガフールおよび5-FU濃度

7日間の点滴終了時に心穿刺にて脱血後，屠殺して各組織を摘出した．血液からは血漿を分離し凍結保存した．また，摘出後の臓器は貯留血液を除去し，直ちに凍結保存した．血中および組織中のテガフール濃度は高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatogrphy, HPLC) 法，5-FU濃度はガスクロマトグラフィー・マスフラグメントグラフィー (gas chromatography-mass fragmentography, GC-MS) 法にて測定した．すなわち，各臓器は 0.1～1.0g を氷冷下，生理食塩水で均一に懸濁し，2500rpm で20分間遠心分離後の上清 1.0ml を取った．この血漿および臓器懸濁希釈液を内部標準物質 $^{15}N_2$-5-FU (セントラル薬品，東京) 100 μl と蒸留水 2.0ml で希釈し，5N の塩酸 50 μl を加え，クロロホルム (和光，東京) による溶媒抽出法を用いた．テガフールはクロロホルム層を50℃恒温槽内，窒素下で蒸発乾固し，蒸留水 1.0ml を加え，検出器に UV-8011 を使用した高速液体クロマトグラフ (㈱東ソー，東京) を使用し，次の条件下で測定した．カラム ODS-80TM (㈱東ソー) を使用し，カラム温度は40℃として，移動相はメタノール：水 (1：9) を用い，流速は 800 μl/分で検出波長は 254nm とした．

水層に含まれる 5-FU は酢酸エチル (和光) 40ml を加え，50℃恒温槽内，窒素下で蒸発乾固した．さらに酢酸エチル 2.0ml を加え振盪，デカンテーションを2回繰り返し，50℃恒温槽内，窒素下で蒸発乾固し，酢酸エチル 200 μl を加えたものと 5-FU 標準液 (和光) 50 μl・内部標準物質 $^{15}N_2$-5-FU 100 μl を混合し，50℃恒温槽内，窒素下で蒸発乾固した．シリル化混合試薬としてN, O-ビス (メチルシリル)-トリフロロアセトアミド [N, O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA] (和光) 1ml とピリミジン (Piece Chemical Co., Rockford, USA) 1ml とトルエン (和光) 2ml を混合したものを 50 μl 加え，85℃で30分間加熱し，HP6880 シリーズ-2 型ガスクロマトグラフ (Hewrett-Packard, Santa Clara, USA) を連結した Automass 型質量分析計 (日本電子，東京) を使用して，次の条件下で測定した．0.25mm×30mm のカラム DB-17 (J&W Scientific, Sacramento, USA) を装着し，注入部温度300℃，検出部温度220℃，流速 15ml/分，担体ガスはヘリウムを用いた．

Ⅲ．アミノ酸インバランス輸液と抗癌剤併用による核 DNA 量および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 標識率の測定 (実験2)

1．実験群の設定

実験1と同様に，担癌ラットを輸液内容により，「テルアミノ＋テガフール 投与群」(Ⅰ群) (n＝6)，「KKM-1＋テガフール投与群」(Ⅱ群) (n＝6)，「KKM-2＋テガフール投与群」(Ⅲ群) (n＝6)，「KKM-2 単独投与群」(Ⅳ群) (n＝6)，「経口自由摂取群」(Ⅴ群) (n＝6) の5群に分けた．

2．担癌動物の作成

ドンリューラットの腹腔内に AH-130 癌細胞浮遊液 0.1ml (1×10^7 個) を接種した．3日後から24時間絶食させ，実験1と同様に4日目から無拘束下に7日間持続点滴を行った．

なお，静脈炎による血管外漏出を起こしたり，チューブトラブル等で輸液を続けられなくなった例は実験から除外した．

3．核 DNA 量と PCNA 標識率の測定

1）核 DNA 量と PCNA の同時二重蛍光染色

点滴終了時にラット腹腔内より癌性腹水 1ml を採取し，赤血球除去用トリス緩衝液 15ml と混和し，室温に8分間放置後，

Table 2. Daily regimens of total parenteral nutrition (per kg)

Group[a]	Glucose (g)	Electrolytes (mEq)						Acetate (mEq)	Gluconate (mEq)	Sulfate (mEq)	Amino acids				Tegafur (mg)
		Na	K	Ca	Mg	Cl	P				Essential (g)	Non-essential (g)	E/N ratio	NPC/N ratio	
Ⅰ	50	17.6	6.0	1.6	1.2	15.3	1.6	10.0	1.6	1.2	3.8	3.6	1.04	168	100
Ⅱ	50	17.0	6.0	1.6	1.2	14.5	1.6	10.0	1.6	1.2	3.7	3.7	1.00	168	100
Ⅲ	50	13.6	6.0	1.6	1.2	26.2	1.6	10.0	1.6	1.2	2.0	5.4	0.37	168	100
Ⅳ	50	13.6	6.0	1.6	1.2	26.2	1.6	10.0	1.6	1.2	2.0	5.4	0.37	168	−

mEq, milliequivalent ; E/N ratio, of essential/none-essential amino acid ; NPC/N ratio, ratio of non-protein calories/nitrogen.
[a]Group Ⅰ, balanced amino acid solution with Tegafur group ; group Ⅱ, KKM-1 (amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine) with Tegafur group ; group Ⅲ, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur group ; Ⅳ, KKM-2 group.

4℃リン酸緩衝液，pH 7.4 (phosphate-buffered saline，PBS) 10ml を加えて，反応を停止した．直ちに，1500rpm，5分間遠心し，4℃ PBS 10ml で2回洗浄後，40μ のナイロンメッシュ (NBC 工業，大阪) を通し，70%エタノール 30ml で固定し，測定まで4℃にて冷蔵保存した．エタノール固定した細胞を4℃ PBS で2回洗浄後，4℃0.2%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin，BSA) (Sigma，St. Louis，USA) 加 PBS で遠心洗浄し，0.5%ツィーン20 (Tween20) (Sigma)，0.5% BSA (DAKO，Glostrup，Denmark)，10%筋注ヒトγグロブリン (ミドリ十字，大阪) 加 PBS 250μl に浮遊させ，非特異的抗体の結合を防止した．5分間放置後，0.5%ツィーン20，0.5% BSA，10%筋注ヒトγグロブリン加 PBS で20倍に希釈した抗 PCNA 抗体 (PC-10，DAKOPATTS，Copenhagen，Denmark) 100μl を加え，混和した．4℃の条件下で60分間反応させ，0.2% BSA 加 PBS で遠心洗浄し，0.5%ツィーン20，0.5% BSA，10%筋注ヒトγグロブリン加 PBS 250μl に再浮遊させた．5分間放置後，0.5%ツィーン20，0.5% BSA，10%筋注ヒトγグロブリン加 PBS で50倍に希釈した蛍光イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate，FITC) 標識二次抗体 (F313，DAKOPATTS) 100μl を加え，混和した．4℃の条件下で30分間反応させ，0.2% BSA 加 PBS で遠心洗浄し，ヨウ化プロピジウム (propidium iodide，PI) (Hoechst，Frankfurt，Germany) 10μg/ml と RNase (Sigma) 200μg/ml を加え，室温で1時間放置して，4℃で遮光して1時間以内に，フローサイトメーターにより測定した．

2）フローサイトメーターによる定量的解析

核 DNA 量はフローサイトメーター EPICS PROFILE II (Coulter Electronics Inc.，Miami，USA) を用いて測定した．染色された細胞を 488nm のアルゴンレーザーで励起し，FITC は 560nm のショートパスフィルター，PI は590nm のロングパスフィルターを用いて約20,000個の細胞を測定した．なお，内部標準として正常リンパ球を使用し，あらかじめ標識粒子にて，変動係数 (coeffient of variation，CV) が2.0以下となるように調整した．DNA ヒストグラムによる細胞回転解析は Bruce Bagwell の方法[8]を用いて行い，各期にある細胞の比率を解析した．なお，G_0G_1 ピークの CV が10%以上の場合は測定不能例と

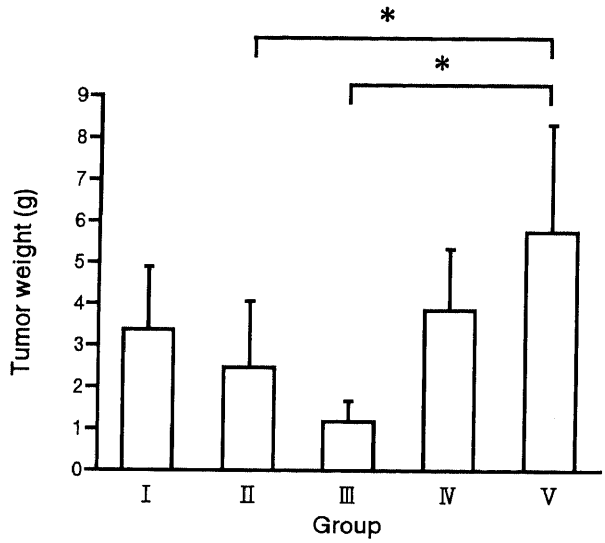

Fig. 1. Tumor weight in rats of 5 experimental groups after a 7-day infusion. Group I, balanced amino acid solution with Tegafur group; group II, KKM-1 (amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine) with Tegafur group; group III, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur group; group IV, KKM-2 group; group V, standard diet by mouth. *P<0.01. Vertical bars represent $\bar{x} \pm$SD.

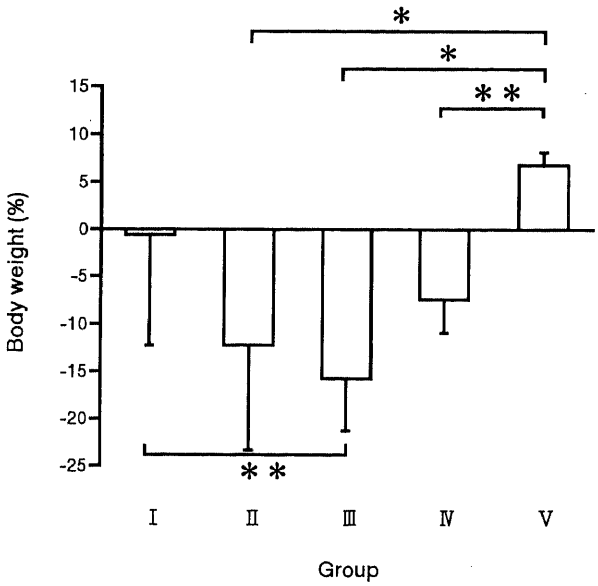

Fig. 2. Changes in body weight. The changes in body weight were defined by the formula of: [(Tb−Cb)/Cb]×100. (Tb, body weight after a 7-day infusion; Cb, body weight before infusion). Group I, balanced amino acid solution with Tegafur group; group II, KKM-1 (amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine) with Tegafur group; group III, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur group; group IV, KKM-2 group; group V, standard diet by mouth. *P<0.01; **P<0.05. Vertical bars represent $\bar{x} \pm$ SD.

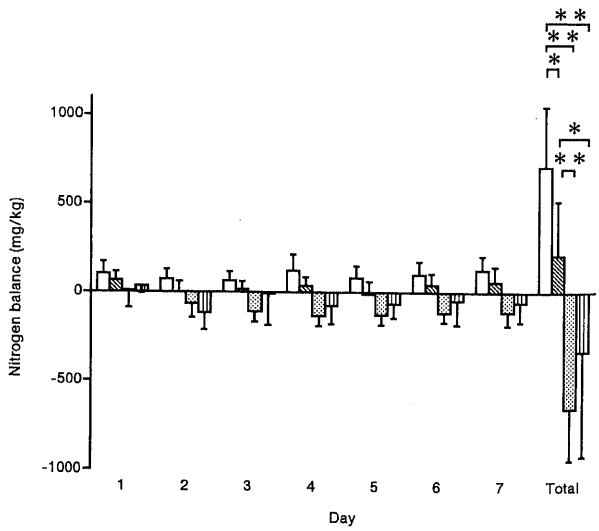

Fig. 3. Nitrogen balance in rats of 5 experimental groups during a 7-day infusion. Nitrogen balance was defined by the formula of: Nitrogen administrated −nitrogen excreted in urine. □, group I; ▧, group II; ▤, group III; ▥, group IV. *P<0.01; **P<0.005. Vertical bars represent $\bar{x}\pm$SD.

Table 3. Plasma aminogram in rats of five experimental groups

Amino acid	Concentration of amino acid ($\bar{X}\pm$SD, nmol/ml) in group				
	I	II	III	IV	V
Alanine	2.1±7.2	2.0±4.6	1.1±3.0	1.6±2.8	0
Arginine	136.0±27.3	123.8±40.0	340.3±155.8*	354.4±41.1*	158.4±39.0
Aspartic acid	40.7±17.5	53.9±31.3	42.4±21.9	43.2±18.0	32.4±7.9
Cystine	14.2±13.9	11.4±10.5	10.1±12.0	12.7±13.3	8.7±9.5
Glycine	445.8±148.8	363.3±146.8	301.7±74.4	518.6±113.4**	508.8±173.0**
Histidine	73.8±27.3	100.1±42.5	79.1±27.2	82.0±12.3	70.3±26.8
Isoleucine	115.4±39.4	126.3±38.0	102.5±35.6	82.8±28.2	98.5±32.9
Leucine	233.3±81.0	280.4±93.3	220.1±78.6	166.2±56.0	178.2±69.1
Lysine	430.0±133.9	477.1±224.2	479.0±172.8	416.5±79.2	429.0±124.2
Methionine	48.1±7.8	32.7±7.7***	39.8±18.1***	28.1±13.4***	61.4±26.7
Phenylalanine	102.9±29.4	112.2±33.2	89.7±30.5	77.7±20.6	84.8±34.5
Proline	184.5±111.4	136.7±39.1	139.1±29.8	166.3±82.2	158.8±33.7
Serine	417.6±163.8	367.4±180.9	383.6±112.8	426.4±134.3	252.3±46.6
Threonine	495.2±255.2	492.1±344.5	429.4±150.2	410.5±273.5	246.7±39.1
Tryptophan	66.3±25.5	51.3±16.5	44.1±11.7	47.4±18.7	73.0±15.1
Tyrosine	84.5±50.3	54.7±11.2	68.2±37.1	60.1±21.5	70.6±19.3
Valine	263.5±75.0	272.3±72.7	230±94.8	223.6±65.2	207.8±81.2

Group I, balanced amino acid solution with Tegafur group ; group II, KKM-1 (amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine) with Tegafur group ; group III, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur group ; group IV, KKM-2 group ; group V, standard diets by mouth.
* Significantly different from group I, II, and V at P<0.01, ** Significantly different from group III at P<0.05, *** Significantly different from group V at P<0.05.

Table 4. Serum biochemial findings after a 7-day infusion

Group[a)]	BUN ($\bar{x}\pm$SD, mg/dl)	Cr ($\bar{x}\pm$SD, mg/dl)	GOT ($\bar{x}\pm$SD, IU/l)	GPT ($\bar{x}\pm$SD, IU/l)
I	13.2±1.4	0.53±0.05	80±18	9.2±2.8
II	16.0±3.2	0.42±0.10	102±56	11.7±2.9
III	21.3±8.9	0.40±0.11	135±37	10.8±2.2
IV	14.7±5.8	0.33±0.49	135±35	14.2±6.3
V	13.8±3.6	0.46±0.52	107±22	10.7±2.7

[a)] Group I, balanced amino acid solution with Tegafur group ; group II, KKM-1 (amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine) with Tegafur group ; group III, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur group ; group IV, KKM-2 group ; group V, standard diets by mouth.

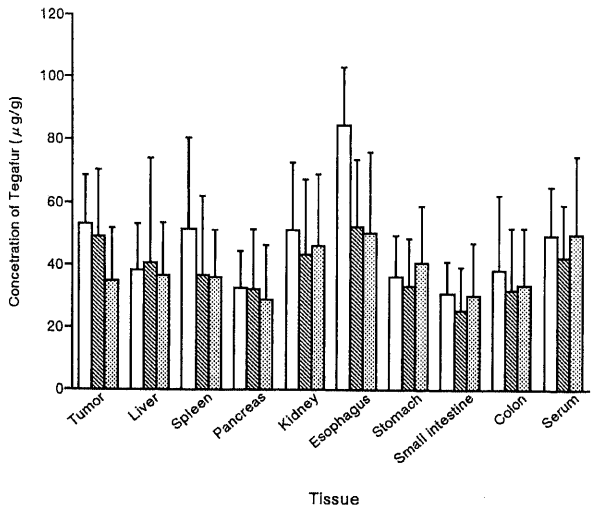

Fig. 4. Tissue concentrations of Tegafur from rats of the three experimental groups. □, group I ; ▧, group II ; ▥, group III. Vertical bars represent $\bar{x}\pm$SD.

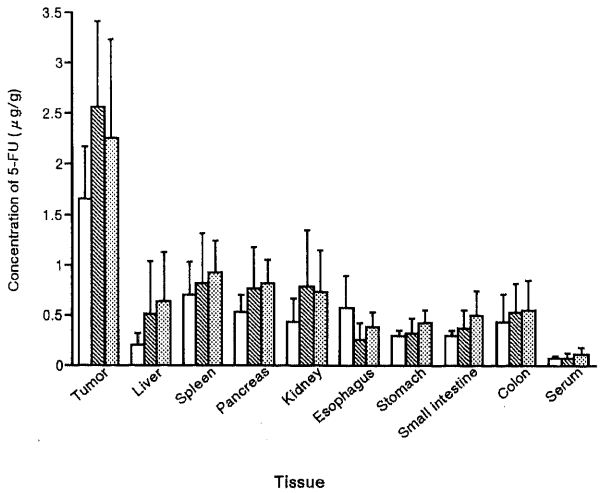

Fig. 5. Tissue concentrations of 5-fluorouracil (5-FU) from rats of the three experimental groups. □, group I ; ▧, group II ; ▥, group III. Vertical bars represent $\bar{x}\pm$SD.

し評価対象外とした．

PCNA 陽性細胞は一次抗体である抗 PCNA 抗体を加えていない陰性標準測定 (negative control study) を行い，FITC 標識率が1％以下になるようにカットオフ値を定め，それより上を PCNA 陽性細胞とみなした．全カウント数に対する陽性細胞数の割合 (%) を PCNA 標識率とした．

Ⅳ．統計学的解析

各測定値は $\bar{x}$ ±SD で表示した．平均値の有意差検定は，一元配置分散分析法を用いて行い，それぞれ危険率5％以下をもって有意差ありと判定した．

成　　績

Ⅰ．腫瘍重量および宿主体重の変化 (図1，2)

7日間の点滴終了時の腫瘍重量は点滴前と比較すると，Ⅱ群は 2.5±1.6g，Ⅲ群は 1.2±0.5g であり，Ⅴ群の 5.8±2.6g と比較して有意に少ない腫瘍重量を示した (P<0.01)．

宿主の体重の変化についてはⅠ群とⅢ群の間 (P<0.05)，Ⅱ群とⅤ群の間 (P<0.01)，Ⅲ群とⅤ群の間 (P<0.01)，Ⅳ群とⅤ群の間 (P<0.05) にそれぞれ有意差が認められた．

Ⅱ．窒素平衡の変化 (図3)

Ⅰ群は中心静脈栄養を施行中は終始正の窒素平衡を示した．Ⅱ群は，5日目を除いて正の平衡を示した．Ⅲ群とⅣ群は2日目以降は負の平衡を示した．累積窒素平衡はⅠ群が 711±340mg/kg，Ⅱ群が 210±308mg/kg，Ⅲ群が−656±291mg/kg，Ⅳ群が−336±589mg/kg であり，Ⅰ群とⅡ群の間 (P<0.01)，Ⅰ群とⅢ群の間 (P<0.005)，Ⅰ群とⅣ群の間 (P<0.005)，Ⅱ群とⅢ群の間 (P<0.01)，Ⅱ群とⅣ群の間 (P<0.005) にそれぞれ有意差が認められた．

Ⅲ．血液生化学検査

1．血漿アミノ酸分析 (表3)

血漿アルギニン濃度は，Ⅰ群が 136.0±27.3nmol/ml，Ⅱ群が 123.8±40.0nmol/ml，Ⅲ群が 340.3±155.8nmol/ml，Ⅳ群が 354.4±41.1nmol/ml，Ⅴ群が 158.4±39.0nmol/ml であり，Ⅲ群，Ⅳ群でⅠ群，Ⅱ群，Ⅴ群に比較して有意に増加していた (P<0.01)．血漿グリシン濃度は，Ⅰ群が 445.8±148.8nmol/ml，Ⅱ群が 363.3±146.8nmol/ml，Ⅲ群が 301.7±74.4nmol/ml，Ⅳ群が 518.6±113.4nmol/ml，Ⅴ群が 508.8±173.0nmol/ml であり，Ⅲ群がⅣ群，Ⅴ群に比較して有意に減少していた (P<0.05)．血漿メチオニン濃度は，Ⅰ群が 48.1±7.8nmol/ml，Ⅱ群が 32.7±7.7nmol/ml，Ⅲ群が 39.8±18.1nmol/ml，Ⅳ群が28.1±13.4nmol/ml，Ⅴ群 61.4±26.7nmol/ml であり，Ⅱ群，Ⅲ群，Ⅳ群でⅤ群に比較して有意に減少していた (P<0.05)．

2．血清 BUN および Cr (表4)

血清 BUN の値は，Ⅲ群が 21.3±8.9mg/dl と高い傾向にあったが有意差はなかった．血清 Cr の値は，各群間でほぼ同様な値を示した．

3．血清 GOT および GPT (表4)

血清 GOT の値は，各群間でほぼ同様な値を示した．血清 GPT の値も，各群間でほぼ同様な値を示した．

Ⅳ．臓器・血中のテガフールおよび 5-FU 濃度

1．臓器・血中テガフール濃度 (図4)

テガフール濃度は，腫瘍内ではⅠ群が 53.0±15.7 μg/g，Ⅱ群が 49.1±21.1 μg/g，Ⅲ群が 35.0±16.7 μg/g であり，各群間で有意差はなかった．各臓器内ではいずれの群間でも有意差はなかった．血清ではⅠ群が 49.3±15.8 μg/g，Ⅱ群が 42.1±17.1 μg/g，Ⅲ群が 49.8±25.0 μg/g であり，各群間で有意差はなかった．また，いずれの群でも腫瘍，各臓器，血清の濃度には有意差を認めなかった．

2．臓器・血中 5-FU 濃度 (図5)

5-FU 濃度は，腫瘍内ではⅠ群が 1.65±0.52 μg/g，Ⅱ群が 2.57±0.85 μg/g，Ⅲ群が 2.26±0.97 μg/g であり，他の臓器に比較して著明に高く，血清の20～40倍，腹腔内臓器の2～10倍の濃度であった．また，有意差はなかったがⅡ群，Ⅲ群でⅠ群に比較して高くなっていた．各臓器内では血清の3～12倍で，有意差はないもののⅡ群，Ⅲ群では，ほぼすべての臓器でⅠ群より高くなっていた．血清ではⅠ群が 0.07±0.02 μg/g，Ⅱ群が 0.07±0.05 μg/g，Ⅲ群が 0.12±0.07 μg/g であり，各群間で有意差はなかった．

Ⅴ．核 DNA 量 (表5)

点滴終了時の DNA 解析において，G_0G_1 期細胞数は，Ⅲ群は 46.0±8.9％と，Ⅱ群の 26.4±5.9％，Ⅳ群の 31.4±5.3％と比較して有意な増加を認めた (P<0.05)．S 期細胞数は，各群間で

Table 5. Flow cytometric analysis after a 7-day infusion

Group	Phase of cell cycle ($\bar{x}$±SD, %)		
	G_0G_1	S	G_2M
Ⅰ	34.7±7.9	41.2±5.0	23.6±6.6
Ⅱ	26.4±5.9*	44.5±9.5	29.1±6.2**
Ⅲ	46.0±8.9	37.7±8.0	16.4±4.6
Ⅳ	31.4±5.3**	42.2±9.0	26.3±8.1**
Ⅴ	39.6±13.1	40.3±12.0	20.2±6.1

Group Ⅰ, balanced amino acid solution with Tegafur group ; group Ⅱ, KKM-1 (amino acid imbalance solution lacking methionine and cystine) with Tegafur group ; group Ⅲ, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur group ; group Ⅳ, KKM-2 group ; group Ⅴ, standard diets by mouth.
* Significantly different from group Ⅲ at P<0.01, ** Sigunificantly different from group Ⅲ at P<0.05.

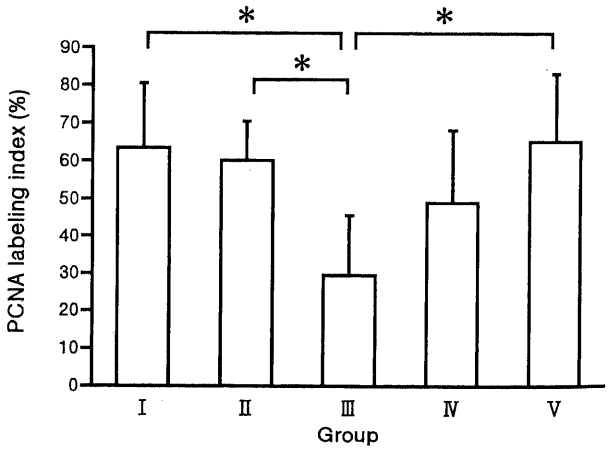

Fig. 6. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) labeling index of AH130 ascites cells from rats of 5 experimental groups after a 7-day infusion. PCNA labeling index was defined by the formula of: (number of PCNA positive cells/number of total counted cells)×100. *P<0.01. Vertical bars represent $\bar{x}$ ±SD.

差は認めなかった．G_2M 期細胞数は，Ⅲ群が 16.4±4.6%と，Ⅱ群の 29.1±6.2%，Ⅳ群の 26.3±8.1%と比較して有意に減少していた ($P<0.05$)．

Ⅵ．PCNA 標識率 (図 6)

PCNA 標識率は，KKM-2 をテガフールと併用したⅢ群は 30±16%，KKM-2 を単独投与したⅣ群は 49±19%と低下し，Ⅲ群はⅠ群，Ⅱ群，Ⅴ群と比較して有意の低値を示した ($P<0.01$)．

考　　察

アミノ酸インバランスは，当初は特定の制限アミノ酸を添加した栄養によって惹起される重篤かつ可逆的な栄養障害と定義されていた[9]．その機序は，第二制限アミノ酸の補給によって助長される高度な第一制限アミノ酸の不足に伴う蛋白合成障害と推定され，血液悪性疾患を中心に臨床応用も試みられた[10]．しかし，アミノ酸インバランスは，単独使用による抗腫瘍効果が広く認められるに至らなかった．その理由には，人体内に存在する豊富なアミノ酸プールがインバランスに対する緩衝作用を発揮することと，経口栄養では確実にアミノ酸インバランスを誘導できないことが考えられる．

臨床医学の分野において，過去30年の間に最も著しく進歩を遂げたものの一つに栄養管理法がある．流量の豊富な静脈に輸液を投与する中心静脈栄養法 (total parenteral nutrition, TPN) は，限られた輸液量で必要かつ十分な栄養素を生体に供給することを可能にした．栄養状態の改善を目的として術前の栄養管理や[11]，消化管の安静を強いられる術後の栄養管理に TPN は新たな境地を拓いた．低栄養に起因する細胞性免疫能の低下にも TPN の有用性が報告されており[12]，抗癌剤の消化管毒性への対処にも TPN は必須と言える[13]．一方，栄養の投与は腫瘍増殖を促進し，宿主に悪影響を及ぼすとの報告もある[14][15]．これらの成績から，担癌生体に適した栄養管理の確立は急務であると言って過言ではない．投与アミノ酸の組成を自由に変えられることは，TPN の特徴の一つである．TPN の普及とともに，経静脈的なアミノ酸製剤の投与により惹起したアミノ酸インバランスが悪性腫瘍の発育に及ぼす影響を検討する試みが再開された．

現在，アミノ酸インバランスは，特定のアミノ酸を欠乏させた場合に惹起される代謝障害に加え，ある種のアミノ酸を過剰に投与した際やアミノ酸代謝拮抗剤を投与した際に引き起こされる代謝障害も包括する用語として認識されている．欠乏させることによって腫瘍増殖を抑制するアミノ酸としてはフェニールアラニン[10]，メチオニン[16]，シスチン[16]，バリン[17]，トリプトファン[18]，グルタミン[19]などが報告されている．一方，過剰投与が腫瘍増殖を抑制するとされているものにアルギニン[20]，グルタミン[21]などがある．本研究では，後述する理由でメチオニンおよびシスチン欠乏とアルギニン過剰投与を組み合わせたインバランス輸液を作成し，テガフールとの併用効果を検討した．

本研究に用いたテガフールは 5-FU の誘導体であり，p450 や腫瘍に存在するチミジンホスホリラーゼ (thymidine phosphorylase, TP) により，生体内で徐々に 5-FU に変換される．さらに，5-FU は三つの経路によってリン酸化を受けて抗腫瘍作用を発揮する．その代謝産物の一つである 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン一燐酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, FdUMP) は，チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) およびメチレンテトラヒドロ葉酸 (methylenetetrahydrofolylglutamate, $CH_2H_4PteGlu$) とともに三者結合体 (ternary complex, TC) を形成し，TS を不活化する．また，DNA の合成阻害と，5'-フルオロウリジン三燐酸 (5'-fluorouridine-triphosphate, FUTP) に代謝された後，RNA に取り込まれて，RNA の機能障害を引き起こす系も考えられている[22]．TS は，ピリミジンヌクレオチドの新規合成系の律速酵素であり，その完全阻害は確実に細胞死につながると推定される．しかし，5-FU による TS 阻害はさまざまな細胞内環境に影響され，結果として腫瘍細胞は 5-FU に対して低い感受性を示すことになる．TS の基質であるデオキシウリジン一燐酸 (deoxyuridine monophosphate, dUMP) の高値や TS の基質結合部位数の高値，$CH_2H_4PteGlu$ の供給不足はいずれも TS の不完全阻害の要因になる[23]．

KKM-1 はメチオニン，シスチンを除いたアミノ酸インバランス輸液である．特に，メチオニンは蛋白合成の開始アミノ酸であり，DNA や RNA などのメチル化反応のメチル基供与体であることから，腫瘍の増殖に不可欠とされ，各種アミノ酸のなかでも腫瘍細胞の取り込みが最も高いとされている[24]．さらに，腫瘍内のメチオニン濃度が低下すると，その低下を補うためにホモシステインがメチオニンへ転換される．この際，補因子としてメチルテトラヒドロ葉酸 (methyltetrahydrofolylglutamate, $CH_3H_4PteGlu$) が使用され，ホモシステインにメチル基が供給される．以上の反応の結果，メチオニンとともに $CH_2H_4PteGlu$ の前駆体であるテトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolyglutamate, $H_4PteGlu$) が生成される．したがってメチオニン欠乏輸液は，$CH_2H_4PteGlu$ 不足による TS の不完全阻害に由来する腫瘍細胞の 5-FU 低感受性を打破する調節因子 (modulator) と考えられる[25]．

KKM-2 では，メチオニンとシスチンを欠乏させたうえにアルギニンを大量に添加してあり，前述の調節因子効果に加えて尿素回路の賦活化を期待した．尿素回路とピリミジンの新規合成系は CP を共通の基質としており，CP の生成量が一定であるとすると，尿素回路の賦活化はピリミジンの新規合成系の抑制になると考えられる．実際に，中野[26]はアルギニンを大量投与したラットにおいて尿素回路のオルニチントランスカルバモイラーゼ (ornitine transcarbamoylase, OTC) 活性は上昇するが，ピリミジン合成の初期段階を触媒する酵素であるアスパラギン酸トランスカルバモイラーゼ (asparate transcarbamoylase, ATC) 活性は低下していることを報告した．大村[27]は AH-130 担癌ラットに KKM-2 を投与し，腫瘍増殖の抑制と腫瘍細胞による ^{3}H-チミジンおよび ^{3}H-ウリジンの取り込み低下を報告し，核酸合成抑制の結果であると結論づけている．したがって，アルギニンを過剰に含有する KKM-2 には，異なった機序でピリミジンの新規合成系を抑制することによるテガフールの相乗効果が期待できる．本研究に使用した AH-130 細胞は，酵素活性からみるとピリミジンの新規合成系が有意であり，サルベージ経路の活性は低い[28]．標的酵素活性の高低が当該酵素の阻害効率，ひいては抗腫瘍効果にいかなる影響を及ぼすかについては，さまざまな細胞内環境が影響するために定説はない．

本研究では，固形飼料を自由摂取させたⅤ群と比較して，テガフールに KKM-1 または KKM-2 を併用したⅡ群，Ⅲ群で有意な腫瘍増殖抑制が観察された ($P<0.01$)．一方，テガフール

を総合アミノ酸製剤とともに使用したⅠ群やKKM-2を単独使用したⅣ群では，Ⅴ群と比較して腫瘍重量に差を認めなかった．したがって，Ⅱ群およびⅢ群にみられた腫瘍増殖抑制効果は，アミノ酸インバランス輸液とテガフールの相乗効果の結果と解釈された．宿主の体重に関しては，Ⅰ群では輸液前後でほとんど変化を示さず，Ⅱ群，Ⅲ群ではそれぞれ平均12%，16%の減少を認めた．血液生化学検査では，アミノ酸インバランスとテガフールの併用による肝機能障害は認めなかったものの，両者の併用は宿主の蛋白代謝にも少なからず影響を及ぼしているものと考えられた．特に，Ⅲ群では累積窒素平衡の値が負であり，他群との間に有意差が認められた．

アミノ酸インバランス輸液の併用がテガフールの代謝に及ぼす影響を観察するために，各種臓器内のテガフール，5-FU濃度を測定した．その結果，テガフールの臓器内濃度には各臓器間，各群間で差はみられなかった．一方，Ⅰ～Ⅲ群の腫瘍内5-FU濃度は，各臓器と比較して著明に高く，有意差を認めた($P<0.05$)，とくにアミノ酸インバランス輸液併用群ではより高い傾向がみられた．しかし，種々の臓器については，各群間に5-FU濃度の差を認めなかった．アミノ酸インバランス輸液併用群では，腫瘍内や各臓器内のテガフールが他群と同レベルであるにも関わらず，同部で高い5-FU濃度が得られた．このことから，アミノ酸インバランス輸液併用群における組織内でのテガフールから5-FUへの転換促進，もしくは5-FUの分解抑制が示唆された．その機序としては，アミノ酸インバランス輸液施行時のp450やTPの活性の上昇，あるいは5-FUの分解経路の律速酵素であるジヒドロウラシル脱水素酵素 (dihydrouracil dehydrogenase, DHUD) 活性の低下が考えられた．

腫瘍組織は，正常組織と比較して高いTP活性を示すことが報告されている[29]．アミノ酸インバランス輸液併用群では，腫瘍組織内のみならず各種臓器の正常組織においても高い5-FU濃度が得られたため，アミノ酸インバランスによりDHUDが阻害された可能性が高いと考えられた．5-FUによるTS阻害効率を高めるためには，FdUMPと還元型葉酸がともに高い濃度で存在することが必要である[23]．還元型葉酸については，KKM-1，KKM-2を含めたメチオニン欠乏輸液，白金製剤などがその濃度を上昇させる調節因子であるとされ，一部で臨床応用も開始されている．加えてKKM-2投与群では，5-FUの高い腫瘍組織内濃度が観察された．これらは，より確実なTS阻害に帰結するものと解釈される．

一方，5-FUの高い臓器内濃度は当該臓器の障害，すなわち副作用の発現に結びつく．5-FUの投与量制限因子は消化管毒性であるが，アミノ酸インバランス輸液とテガフールの併用によって高まる5-FUの消化器系臓器内濃度は，これを助長する可能性を有する．化学療法に伴う消化管毒性の軽減を目的とした投与法の工夫，愁訴を緩和する薬剤の併用が必須であると言える．

近年，生物学的悪性度の判定の指標として，フローサイトメトリーによる核DNA量解析の有用性が報告されている[30]．一方，核DNA量は組織学的所見や臨床所見と必ずしも一致せず，予後の指標にならないとの報告もある[31]．核DNA量の解析は，増殖期の細胞核を特異的に染色，測定することができない点，測定試料の条件に差異ある点，腫瘍内多様性 (heterogeneity) の存在する点などが問題となっている．本実験では，KKM-2とテガフール併用群においてKKM-1とテガフール併用群あるいはKKM-2単独群と比較してG_0G_1期の増加と，G_2M期の減少が認められた．しかし，KKM-2とテガフール併用群において総合アミノ酸製剤とテガフール併用群や経口栄養群との比較では有意差は認められなかった．

PCNAは，G_1後期からS期にかけて出現する増殖細胞に特異的な核蛋白で腫瘍増殖能を表す一指標として知られ[32]，その陽性率が高いほど悪性腫瘍の増殖率は高いと考えられている．抗PCNA抗体はパラフィン包埋された標本でも染色可能なため臨床病理学的因子や予後との相関について研究がなされ，その有用性が報告されている[33][34]．中野ら[35]は，胃癌切除例においてPCNA標識率とブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) 標識率は有意に相関し，生物学的悪性度の指標として有用であるとしている．最近ではフローサイトメーターで多数の細胞の検索ができ，より客観的な評価が可能となって，その信頼性が向上した[36]．本研究のPCNA標識率の測定では，KKM-2とテガフール併用群が総合アミノ酸製剤とテガフール併用群，KKM-1とテガフール併用群あるいは経口摂取群に比較して有意差をもって低値を示した．このことは，KKM-2とテガフール併用群では他の群に比較して腫瘍増殖が抑制されていたことを示しており，テガフールの抗腫瘍効果増強作用を表しているものと解釈された．日比野ら[25]はメチオニン欠乏アミノ酸輸液と5-FUの併用によって，5-FU効果の増強がおこったとしている．本研究に用いたKKM-1は，日比野らのAO-90と類似した組成となっているが，抗腫瘍効果，およびDNA，PCNAに及ぼす影響ともにKKM-2に比べて弱く，日比野らとは異なる結果となっている．これは併用している抗癌剤の違いか，あるいは用いている腫瘍細胞の違いによるものと考えられた．KKM-2とテガフールの併用においては抗腫瘍効果，DNA，PCNAに対する作用ともに他の群に比較して明らかに増強しており，両者の併用の有用性を示すものと考えられた．また，核DNA量測定によるS期細胞率とPCNA標識率の不一致は，フローサイトメーターではS期の細胞核を特異的に染色できず，シュミレーションにより理論計算を行うことにより生じたものと考えられた．

今後は，臨床応用するために抗腫瘍効果を維持しつつ，宿主の栄養状態を保ち，消化管への副作用を軽減する投与法についてさらに検討を重ねる必要があるものと思われた．

結　論

腹水肝癌AH130を移植した担癌ラットに対して，メチオニンとシスチンを欠乏させたKKM-1およびさらにアルギニンを増量したKKM-2のアミノ酸インバランス輸液と抗癌剤の併用療法を行い，抗腫瘍効果増強の検討とフローサイトメトリー法による核DNA量とPCNA標識率を検討した．その結果以下の結論を得た．

1．KKM-1およびKKM-2とテガフール併用群では経口摂取群に比較して有意に腫瘍重量の減少を認めた．

2．KKM-1とテガフール併用群，KKM-2とテガフール併用群およびKKM-2単独投与群では宿主体重の減少を認めた．累積窒素平衡はKKM-2とテガフール併用群とKKM-2単独投与群は負を示した．

3．血漿アミノ酸分析ではKKM-1とテガフール併用群は有意にメチオニン濃度の低下を認めた．KKM-2とテガフール併用群とKKM-2単独投与群は有意にメチオニン濃度の低下とア

ルギニン濃度の高値を認めた.

4．血清の BUN，クレアチニン，GOT，GPT の異常は認めなかった.

5．テガフール濃度は各群間，各臓器間では差はなく，5-FU 濃度は腫瘍内で著明に高く，アミノ酸インバランス輸液併用群では総合アミノ酸製剤併用群より高い傾向にあった.

6．KKM-2 とテガフール併用群では KKM-1 とテガフール併用群および KKM-2 単独投与群に比較して有意に G_0G_1 期細胞数の増加と G_2M 期細胞数の減少を認めたが，S 期細胞数は同程度であった.

7．KKM-2 とテガフール併用群では総合アミノ酸製剤とテガフール併用群，KKM-1 とテガフール併用群，経口摂取群に比較して，有意に PCNA 標識率の低下を認めた.

以上の結果から，KKM-2 とテガフール併用療法は総合アミノ酸製剤とテガフール併用群あるいは KKM-2 単独療法に比較して，抗腫瘍効果の増強と PCNA 標識率の低下を認め，集学的治療の一手段となりうると考えられた.

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究の遂行に終始御指導と御助言を頂きました大村健二講師をはじめ金沢大学第一外科学教室の諸先生方に深謝いたします.

なお，本論文の要旨の一部は，第25回日本外科代謝栄養学会，第32回日本消化器外科学会総会において発表した.

文　　献

1） Evans RM, Laskin JD, Hakala MT. Effect of excess folates and deoxyinosine on the activity and site of action of 5-fluorouacil. Cancer Res 41: 3288-3295, 1981

2） Rooney M, Kish J, Jacobs J, Kinzie J, Weaver A, Crissman J, Al-Sarraf M. Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. Cancer 55: 1123-1128, 1985

3） Steiger E, Vars H, Dudrick SJ. A technique for long-term intravenous feeding in unrestrained rats. Arch Surg 104: 330-332, 1972

4） 野本昭三. 臨床化学検査. 臨床検査法提要 (金井　泉, 金井正光編), 第30版, 505-507頁, 金原出版株式会社, 東京, 1993

5） 野口英郷. 生化学・非蛋白窒素化合物. 検査診断ハンドブック (小酒井望, 河合　忠, 福岡良男, 甲野禮作監修), 第1版, 558-559頁, 協和企画通信, 東京, 1985

6） Chasson AL, Grady HJ, Stanley MA. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. Am J Clin Pathol 35: 83-88, 1961

7） 野本昭三. 臨床化学検査. 臨床検査法提要 (金井　泉, 金井正光編), 第30版, 656-662頁, 金原出版株式会社, 東京, 1993

8） Bagwell CB, Hudson JL, Irvin GL. Nonparametric flow cytometry analysis. J Histochem Cytochem 27: 293-296, 1979

9） Elvehjem CA. Amino acid imbalance. Federation Proc 15: 965-970, 1956

10) Allan JD, Ireland JT, Milner J, Moss AD. Treatment of leukemia by amino acid imbalance. Lancet 1: 302-303, 1965

11) Copeland EM, Daly JM, Dudrick SJ. Nutrition as an adjunct to cancer treatment in the adult. Cancer Res 37: 2451-2456, 1977

12) Shamberger RC, Brennan MF, Goodgame JT Jr, Lowry SF, Maher MM, Wesley RA, Pizzo PA. A prospective, randomized study of adjuvant parenteral nutrition in the treatment of sarcomas: Results of metabolic and survival studies. Surgery 96: 1-13, 1984

13) Dudrick SJ, MacFayden BV Jr, Souchon E, Englert D, Copeland EM. Pareteral nutrition techniques in cancer patients. Cancer Res 37: 2440-2450, 1977

14) Torosian MH, Daly JM. Nutritional support in the cancer-bearing host. Cancer 58: 1915-1929, 1986

15) Torosian MH, Donoway RB. Total parenteral nutrition and tumor metastasis. Surgery 109: 597-601, 1991

16) 五関謹秀, 森　重夫, 羽生　丕, 毛受松寿, 村上忠重. 特殊アミノ酸製剤を用いた経中心静脈栄養と抗癌剤の併用 (RT 療法) による腺癌の治療. 日消誌 77: 112, 1980

17) Nishihira T, Takagi T, Kawarabayashi Y, Izumi U, Ohkuma S, Koike N, Toyoda T, Mori S. Anti-cancer therapy with valine-depleted amino acid imbalance solution. Tohoku J Exp Med 156: 259-270, 1988

18) 小池信夫. トリプトファン欠乏インバランス輸液による腫瘍蛋白代謝の研究. 外科と代謝・栄養 22: 101-115, 1988

19) Weisburger JH, Yamamoto RS, Glass RM, Frankel HH. Prevention by arginine glutamate of carcinogenecity of acetamide in rats. Toxicol Appl Pharmacol 14: 163-175, 1969

20) Sauer LA, Stayman JW, Dauchy RT. Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. Cancer Res 46: 3469-3475, 1986

21) Souba WW. Glutamine and Cancer. Ann Surg 218: 715-728, 1993

22) 白坂哲彦. 5FU は DNA, RNA のいずれかに作用するのか. 癌化学療法 up date 17: 42-47, 1991

23) 道伝研司. 消化管癌化学療法における生化学的修飾の研究－とくに三者結合体形成と還元型葉酸代謝を中心に－. 十全医会誌 103: 721-730, 1994

24) 窪田和雄, 松澤大樹, 藤原竹彦, 伊藤健吾, 阿部由直, 畑沢順, 吉岡清郎, 福田　寛, 伊藤正敏, 佐藤多智雄, 清澤源弘, 井戸達雄, 岩田錬, 石渡喜一, 四月朔日聖一. ポジトロン標識アミノ酸による腫瘍診断の比較研究. 核医学 22: 981-987, 1985

25) 日比野豊, 瓦林良和, 桑波田十九男, 上田信彦, 新宮平三. 5-Fluorouracil (5-FU) 耐性吉田肉腫に対する癌用アミノ酸輸液 (メチオニン欠如アミノ酸輸液: AO-90) による5-FU 効果増強. 癌と化学療法 18: 1055-1057, 1991

26) 中野繁則. N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる実験胃癌の誘発に及ぼすアルギニンインバランス飼料の影響. 関西医大誌 26: 428-447, 1974

27) 大村健二. 腫瘍増殖に及ぼすアミノ酸インバランス輸液の影響に関する実験的研究. 十全医会誌 94: 95-107, 1985

28) Ikenaka K, Fukushima M, Nakamura H, Okamoto M, Shirasaka T, Fujii S. Metabolism of pyrimidine nucleocide in various tissues and tumor cells from rodents. Gann 72: 590-597, 1981

29) 原　泰寛, 菅田節朗, 河野　彬, 田中睦子. ヒト腫瘍内における Tegafur の酵素学的分解について. 癌と化学療法 10: 1511-

1517, 1983
30) 小池 宏, 竹内謙二, 増田 亨, 北川達士, 松本好市, 鈴木宏志. 悪性腫瘍における DNA ploidy, proliferative index の臨床的意義. フローサイトメトリー 7: 116-119, 1988
31) Ballantyne KC, James PD, Robins RA, Baldwin RW, Hardcastle JD. Flow cytometric analysis of the DNA content of the gastric cancer. Br J Cancer 56: 52-54, 1987
32) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 309: 374-376, 1984
33) Robbins BA, Vega DD, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM.Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111: 841-845, 1987
34) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 162: 285-294, 1990
35) 中野 浩, 生田目公夫, 仲吉昭夫, 熊田 馨. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 発現率による胃癌増殖活性の評価－その基礎的検討と臨床応用について－. 日外会誌 94: 580-591, 1993
36) 森田克也, 林 義信, 清水淳三, 村上真也, 荒能義彦, 徳楽正人, 渡辺洋宇. 非小細胞肺癌における PCNA 発現率と核 DNA 量の flow cytometry による同時定量解析. 肺癌 34: 453-459, 1994

Experimental Studies on the Enhancement of Anti-tumor Effect of Anticancer Agents with Amino Acid Imbalance Solution

Yoshinobu Hattori, Department of Surgery (Ⅰ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－
J. Juzen Med Soc., **105,** 845－854 (1996)

Key words amino acid imbalance, anticancer agents, biochemical modulation, flow cytometry, proliferating cell nuclear antigen

Abstract

Recently, biochemical modulation of the combined administration of fluoropyrimidines and its regulatory factors has attracted attention due to its enhanced anti-tumor effect. The present studies were performed to determined whether amino acid imbalance solution is the biochemical modulator of fluoropyrimidines. Analysis was made of the influence of the combined administration of amino acid imbalance solution and fluoropyrimidines on anti-tumor effect, and their effect on the host. Male rats bearing AH130 ascites hepatoma in the back recieved total parenteral nutrition (TPN) for seven days. They were divided into five groups: group Ⅰ, balanced amino acid solution with Tegafur (n=6); group Ⅱ, KKM-1 (amino acid solution lacking methionine and cystine) with Tegafur (n=7); group Ⅲ, KKM-2 (KKM-1 supplemented arginine) with Tegafur (n=5); group Ⅳ, KKM-2 (n=6); group Ⅴ, standard diet ad libitum by mouth (n=6). Parenteral nutrients regimens in groups Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, and Ⅳ were isocaloric (200kcal/kg/day). Rats in groups Ⅰ, Ⅱ, and Ⅲ were infused with Tegafur at a dose of 100mg/kg/day. Specifically, analysis was made of the influence of amino acid solution on each of the following: tumor and carcass weight, whole body nitrogen balance, plasma amino acid levels, chemical analysis of blood, tissue concentration of Tegafur and 5-fluorouracil (5FU), nuclear DNA content of the cancer cells, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index of the cancer cells. The mean values plus or minus standard deviations (mean±SD) of increase in tumor weight of rats in groups Ⅱ, Ⅲ, and Ⅴ were 2.5±1.6 g, 1.2±0.5 g, 5.8±2.6 g. A more significant inhibition of tumor growth occurred in groups Ⅱ and Ⅲ than in group Ⅴ rats ($P<0.01$). Rats from groups Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, and Ⅳ lost body weight, but group Ⅴ rats gained body weight. Nitrogen balance in groups Ⅰ and Ⅱ was positive, but in groups Ⅲ and Ⅳ was negative. Plasma free aminograms revealed a more significant increase in arginine in groups Ⅲ and Ⅳ than in groups Ⅰ, Ⅱ, and Ⅴ rats ($P<0.01$), and a more significant decrease in methionine in groups Ⅱ, Ⅲ, and Ⅳ than in group Ⅴ rats ($P<0.05$). Serum BUN, creatinine, GOT, and GPT were at the same level in all five groups. All three Tegafur-infused groups showed the same level for tissue concentration of Tegafur. The tumor concentration of 5FU in these three groups was 20～40 times higher than that of serum. The tissue concentration of 5FU in rats from groups Ⅱ and Ⅲ was higher than in group Ⅰ rats. Male rats bearing AH130 ascites hepatoma in the peritoneum received TPN for seven days under the regimens given above. Ascites cells obtained from the treated rats were analyzed with a flow cytometer. Analysis of nuclear DNA content showed greater cell accumulation in the G_0G_1 phase in rats from groups Ⅱ and Ⅳ than in group Ⅲ rats ($P<0.05$). The PCNA labeling index by flow cytometer in the group Ⅲ rats was 30±16%, significantly lower than in groups Ⅰ, Ⅱ, and Ⅴ ($P<0.01$). These results suggest the anti-tumor effect of fluoropyrimidines is increased by the combined use of amino acid imbalance solution, which is the biochemical modulator of fluoropyrimidines. The combined administration of amino acid imbalance solution and fluoropyrimidines is a useful treatment for patients with cancer.