

アミノ酸インバランス輸液製剤の抗腫瘍効果に関する基礎的研究 吉田肉腫担癌ラットによる実験的検討

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: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9140

アミノ酸インバランス輸液製剤の抗腫瘍効果に関する基礎的研究

—吉田肉腫担癌ラットによる実験的検討—

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

松 智 彦

アミノ酸インバランスが腫瘍増殖を抑制することが知られている。今回著者は、ピリミジンヌクレオチドの生合成系 (*de novo* 合成系) と尿素サイクルが、カルバミルリン酸 (carbamoyl phosphate) を共通の基質とすることに着目した。そして本研究では、尿素サイクルの賦活によるピリミジン合成抑制を目的として、アルギニンを過剰に含み、これにオルニチンを添加した輸液製剤、金沢アルギニン・オルニチン増量輸液 1 号 (Kanazawa arginine and ornithine enriched solution number 1, KAO-1) を作成し、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ (aspartate transcarbamylase) 阻害作用を有している N-フォスホンアセチル-L-アスパルテート (N-(phosphonacetyl)-L-aspartate, PALA) との併用による抗腫瘍効果と宿主に及ぼす影響を検討した。実験動物には吉田肉腫を接種した雄性ドリュウラットを用い、総合アミノ酸投与群 (I 群), KAO-1 投与群 (II 群), PALA 投与群 (III 群), KAO-1+PALA 投与群 (IV 群) の 4 群にわけ、8 日間にわたって無拘束下に中心静脈栄養を施行した。輸液期間中の窒素平衡、腫瘍重量、実験前後の宿主体重、および実験終了時の血液生化学検査、血漿遊離アミノ酸濃度、尿中アミノ酸量、肝組織中遊離アミノ酸濃度、腫瘍組織中遊離アミノ酸濃度、腫瘍細胞ヒストグラム、腫瘍内核 DNA, RNA および蛋白量を測定した。輸液期間中の累積窒素平衡は、全例で正の値を示し各群間に差を認めなかった。輸液終了時の腫瘍重量をみると、I 群と比較して II 群, IV 群で有意の腫瘍増殖抑制を認め ($p < 0.01$), II 群と比較しても IV 群では有意に腫瘍増殖が抑制されていた ($p < 0.05$)。また、宿主体重の変化には各群間に差を認めなかった。血液生化学検査では、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値はいずれも I 群と比較し、他の 3 群では有意に低下していた ($p < 0.01$)。また、血小板数は逆に I 群と比較し II 群 ($p < 0.01$) および IV 群 ($p < 0.05$) での増加を認めた。また II 群, IV 群に血清尿素窒素の有意な上昇と血清尿酸値の有意な低下を認めたが ($p < 0.01$), 肝機能障害や腎機能障害の発生を示唆する所見はなかった。血漿遊離アミノ酸濃度では、I 群と比較して II 群でシトルリン, オルニチン, アルギニンの有意な上昇を認めた (シトルリン, オルニチン $p < 0.05$; アルギニン $p < 0.01$)。また III 群では、シトルリンとアルギニンの有意な上昇を認め (シトルリン $p < 0.05$; アルギニン $p < 0.01$), IV 群でも、シトルリン, オルニチン, アルギニンの有意な上昇を認めた ($p < 0.01$)。尿中アミノ酸分析では、I 群と比較して II 群と IV 群でシトルリン, オルニチン, アルギニンの有意な排泄増加を認めた。一方、III 群では逆にアルギニンとシトルリンの尿中排泄量が有意に低下していた。肝組織中遊離アミノ酸濃度では I 群と II 群の間には有意差を認めなかったが、III 群, IV 群では I 群と比較して全般的に遊離アミノ酸の有意な増加を認めた。腫瘍組織中遊離アミノ酸濃度では、I 群と比較して II 群 ($p < 0.05$) と IV 群 ($p < 0.01$) ではオルニチンの有意な上昇を認めた。腫瘍細胞の細胞周期分析の結果では、II 群および IV 群において S 期への細胞集積が認められた。腫瘍細胞の核 DNA 量, RNA 量および蛋白量の変化をみると、II 群, IV 群で RNA 量の有意な減少 ($p < 0.05$) と DNA 量の減少傾向を認めた。以上のアミノ酸分析結果から、過剰に投与されたアルギニンとオルニチンは尿素サイクルに流入し、順調に代謝されるものと推測された。一方、III 群の血漿シトルリン値の推移から、PALA はカルバミルリン酸のピリミジンへの代謝を有効に阻止するものと考えられた。以上の成績により、KAO-1 の投与によって担癌生体内で尿素サイクルが賦活され、腫瘍の増殖が抑制されることが示された。また、PALA は有効にアスパラギン酸トランスカルバミラーゼを阻害すると推測され、KAO-1 との併用によりその抗腫瘍効果を増強させることが判明した。

Key words amino acid imbalance, urea cycle, PALA, arginine, ornithine

癌化学療法が臨床に應用されて約50年、癌治療のなかで化学療法の果たす役割は近年飛躍的に高まっている。なかでも、核酸代謝関連酵素阻害や DNA 二重鎖の複製阻害は、分裂能の高い細胞により大きな障害を与えるための悪性腫瘍の化学療法に

しばしば應用される¹⁻³⁾。代表的な代謝拮抗剤 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) の標的酵素であるチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) も、ピリミジンヌクレオチドの生合成系 (*de novo* 合成系) 律速酵素である。しかし、かかる代

平成7年3月20日受付, 平成7年5月1日受理

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ATC, aspartate transcarbamylase; dUMP, deoxyuridine monophosphate; FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate; 5-FU, 5-fluorouracil; γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase; IR, inhibition rate; KAO-1, Kanazawa arginine and ornithine enriched

謝系は生体維持にきわめて重要であるため、薬理作用からの逃避と解釈される標的酵素の誘導や捕囚子の相対的欠乏が容易に生ずる¹⁰⁾。これらの事象は、抗癌剤に対する腫瘍の低感受性として捉えられ、消化器癌に対する化学療法で良好な成績が得られない要因になると考えられる。このような事態の打開には、観点の異なる新たな化学療法の模索が必要である。

著者は、ピリミジンヌクレオチドの生合成系と尿素サイクルが、カルバミルリン酸 (carbamoyl phosphate) を共通の基質とすることに着目した。尿素サイクルのメンバーであるアルギニンの大量投与は、腫瘍細胞内への核酸合成前駆物質の取り込みを抑制することが報告されているが¹⁰⁾、それはカルバミルリン酸の消費によりピリミジン合成の基質が不足するためと解釈される。本研究では、アルギニンに加えて同じく尿素サイクルのメンバーであるオルニチンを増量させた新組成アミノ酸輸液、

金沢アルギニン・オルニチン増量輸液 1 号 (Kanazawa arginine and ornithine enriched solution number 1, KAO-1) 作成し、いわゆるアルギニン・オルニチン・インバランスが腫瘍増殖におよぼす影響をラット担癌モデルを用いて検討した。一方、カルバミルリン酸は、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ (aspartate transcarbamylase, ATC) に代謝されてピリミジンの生合成に、オルニチントランスカルバミラーゼ (ornithine transcarbamylase, OTC) に代謝されて尿素サイクルに流入する。したがって、カルバミルリン酸の欠乏下に ATC 阻害剤を併用すれば、より確実なピリミジンヌクレオチド合成抑制が得られると考えられる。そこで ATC 阻害剤 N-フォスホニル-L-アスパルテート (N-(phosphonacetyl)-L-aspartate, PALA) と KAO-1 との併用効果を、同じく担癌ラットを用いた実験で検討した。

対象および方法

1. 実験材料

1. 実験動物

全実験を通じ、6 週齢の雌性ドンリューラット (静岡実験動物、浜松) を使用した。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、厚木) および、水道水を自由経口摂取せしめた。

2. 腫瘍

ドンリューラット由来の吉田肉腫は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をうけた。吉田肉腫は、同系ラット腹腔内に接種、継代し接種 7 日目の腹水細胞を実験に供した。

3. 輸液製剤

高張グルコース電解室液としてパレメンタール[®]A および B (森下ルセル、大阪) を、また総合アミノ酸製剤として国連食糧農業委員会・世界保健機構 (Food and Agriculture Organization of the United Nations・World Health Organization, FAO・WHO) 基準に基づく市販アミノ酸輸液、モリブロン[®] (森下ルセル) を使用した。さらにアルギニン・オルニチン・インバランス輸液として KAO-1 を使用した。KAO-1 は、モリブロン[®] にアルギニン、オルニチンを増量し、総アミノ酸含有量がモリブロン[®] と等しくなるように調整してある (表 1)。また ATC 阻害剤である PALA は^{8)~10)}、US BIOSCIENCE 社 (Philadelphia, U. S. A.) より分与を受けた。

Table 1. Amino acid composition of Moripron and KAO-1

Amino acids	Moripron (W/V%)	KAO-1 (W/V%)
Isoleucine	0.560	0.255
Leucine	1.250	0.569
Lysine · HCl	1.100	0.500
Methionine	0.350	0.159
Phenylalanine	0.935	0.425
Threonine	0.650	0.296
Tryptophan	0.130	0.059
Valine	0.450	0.205
Alanine	0.620	0.282
Arginine · HCl	0.955	3.150
Aspartic acid	0.380	0.173
Cystine · HCl	0.145	0.066
Glutamic acid	0.650	0.296
Histidine · HCl · H ₂ O	0.811	0.369
Proline	0.330	0.150
Serine	0.220	0.100
Tyrosine	0.035	0.016
Glycine	1.070	0.487
Ornithine · HCl	—	2.730

Total free amino acids are contained 10.000 W/V% in Moripron, and 8.939 W/V% in KAO-1. The ratio of essential/non-essential amino acids are 1.09 in Moripron, and 0.38 in KAO-1.

Table 2. Composition of TPN solution (/body/day)

Group ^{a)}	Parental A,B (ml)	Moripron (ml)	KAO-1 (ml)	Glucose (g)	Amino acids (g)	Na ⁺ (mEq)	K ⁺ (mEq)	Cl ⁻ (mEq)	Ca ²⁺ (mEq)	Mg ²⁺ (mEq)	Total volume (ml)	Total calorie (Kcal)	Non-protein calorie (Kcal)	NPC/N ratio	E/N ratio
I, III	45	22	—	14.1	2.20	5.21	1.69	4.66	0.45	0.34	67	65.2	56.4	169	1.09
II, IV	45	—	22	14.1	1.97	3.90	1.69	9.23	0.45	0.34	67	64.3	56.4	137	0.38

TPN, total parenteral nutrition; NPC/N ratio, ratio of non-protein calories/nitrogen; E/N ratio, ratio of essential/non-essential amino acids.

^{a)} During the following 8 days, the cannulated rats received the four different regimens. Group I, regular amino acid+hyperalimentation; group II, KAO-1+hyperalimentation; group III, regular amino acid+hyperalimentation+PALA; group IV, KAO-1+hyperalimentation+PALA, and PALA was injected 20 mg intravenously to rats on day 1, 2 and 3.

solution number 1; NO, nitric oxide; NPC/N, non-protein calories/nitrogen; OTC, ornithine transcarbamylase; PALA, N-(phosphonacetyl)-L-aspartate; PBS, phosphate buffered solution; PI, propidium iodide; TC, ternary complex; TS, thymidylate synthase; UA, uric acid; UTP, uridine triphosphate; WHO, World Health Organization

4. 輸液システム

ラットに対し無拘束下に輸液を行うための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。また輸液の注入には、電動輸液ポンプ(マイポンB型®, バイオ・メディカ) を使用した。

II. 実験方法

1. 腫瘍細胞浮遊液の調整

吉田肉腫移植ラットから採取した癌性腹水を 0.1M 磷酸緩衝液 pH7.4 (phosphate buffered solution, PBS) にて約 5 倍に希釈し、トリパンプルー (0.2%, Merck, フランクフルト, ドイツ) 排除試験法により生細胞数をカウント後、生細胞数 2×10^6 個/ml となるように PBS にて希釈し、腫瘍細胞浮遊液を調整した。

2. KAO-1 と PALA の単独および併用による抗腫瘍効果と宿主におよぼす影響の評価

1) 実験群の設定

担癌ラットは総合アミノ酸製剤投与群 (I 群, 対象群), KAO-1 投与群 (II 群), 総合アミノ酸製剤+PALA 投与群 (III 群), KAO-1+PALA 投与群 (IV 群) に分け、各群 6 匹とした。

I ~ IV 群のグルコース投与量は、70.4g/kg/日 (281.7kcal/kg/日) とした。また、I, III 群の総合アミノ酸製剤投与量は 110ml/kg/日、窒素投与量 1.67g/kg/日、非蛋白カロリー/窒素比 (non-protein calories/nitrogen ratio, NPC/N ratio) は約 169 と

した。一方、II, IV 群のアミノ酸製剤投与量は 110ml/kg/日、窒素投与量 2.06g/kg/日、NPC/N 比は約 137 とした (表 2)。また輸液開始第 1 日目は輸液量を 50% とし、2 日目以後は 100% とした。なお、III 群および IV 群では第 1, 2, 3 日目に PALA 20mg/匹を静注した。

2) 実験計画

ドンリューラットの背部皮下に腫瘍細胞浮遊液 0.5ml (生細胞数 1×10^6 個) を接種した。3 日後、腫瘍径が約 3mm に達した時点で 24 時間絶食させ、次いでペントバルビタール (大日本, 大阪) 40mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に Steiger ら¹¹⁾, 宗田ら¹²⁾ の方法に準じて、外径 1mm のシリコンラバーチューブを先端が右心房入口部付近に位置するように挿入し、無拘束下に 8 日間の持続輸液を開始した。

3) 測定項目

i. 体重および腫瘍重量

輸液開始直前と 8 日間の輸液終了後の 2 回、体重を測定し、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、輸液前後の宿主体重の増減を輸液直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, cm) と短径 (W, cm) を計測し、次式によって算出した。

$$\text{腫瘍重量 (g)} = L \times W^2 / 2$$

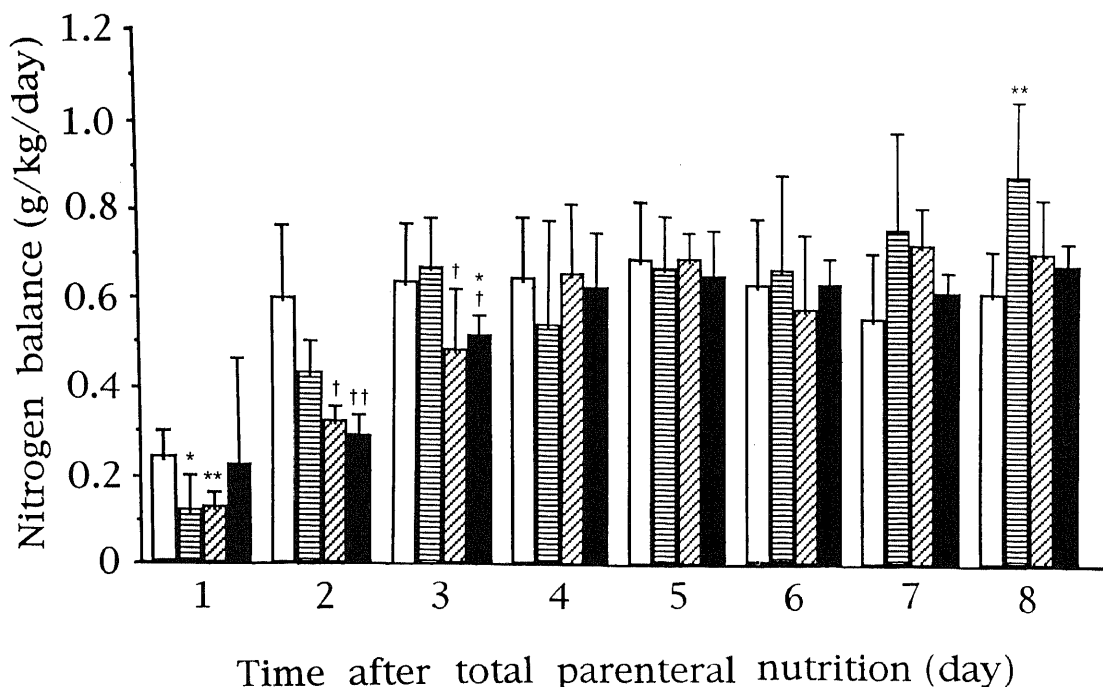


Fig. 1. Cumulative nitrogen balance in rats of 4 experimental groups after a 8-day infusion. Yoshida sarcoma cells (1×10^6) were inoculated into subepidermal tissue of posterior wall of rats. After 3 days, and after 24 hours fasting, catheter was inserted into the superior vena cava via the internal jugular vein and externalized at the mid scapular region to permit unrestricted movement within the cages and metabolic unit. During the following 8 days, the cannulated rats received the four different regimens. Group I, regular amino acid+hyperalimentation; group II, KAO-1+hyperalimentation; group III, regular amino acid+hyperalimentation+PALA; group IV, KAO-1+hyperalimentation+PALA, and PALA was injected 20 mg intravenously to rats on day 1, 2 and 3. Cumulative nitrogen balance was defined by the formula of: Total nitrogen administered-total nitrogen excreted in urine. □, group I; ▨, group II; ▩, group III; ■, group IV. Results are expressed as $\bar{x} \pm SD$ (n=6). *p<0.05 vs. group I, **p<0.01 vs. group I, †p<0.05 vs. group II, ††p<0.01 vs. group II. Significant by the Student's t test.

また、実験終了時の I 群および他の 3 群の腫瘍重量から、次式によって腫瘍増殖阻止率 (inhibition rate, IR) を算出した。

$$IR = (1 - \text{各群の平均腫瘍重量} / \text{I 群の平均腫瘍重量}) \times 100$$

ii. 窒素平衡値

輸液期間中に排泄された尿は、トルエン 0.1ml を滴下したフラスコに採取し、毎日 Kjeldahl 法¹³⁾にて尿中総窒素を測定算出した。これを輸液中の窒素量から差し引いて窒素平衡値を求めた。なお、輸液開始 24 時間前からの絶食のため、輸液期間中の糞便排泄量はきわめて少量であり、糞便中の窒素量は無視した。

iii. 血液生化学検査

8 日間の輸液終了後、ペントバルビタール 40mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に開腹し、下大静脈からヘパリン採血を行い、以下の検査を施行した。

a. 血液一般検査および血液生化学検査

赤血球数、白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、血小板数、血清尿素窒素、クレアチニン、尿酸、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GTP)、アスパラテートアミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase, AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, ALT)、血清総蛋白量、血清アルブミン値、アルブミン/グロブリン比、総コレステロール、中性脂肪を測定した。

b. 血漿遊離アミノ酸濃度

アミノ酸自動分析機 JLC-300 (日本電子, 東京) によって、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、アラニン、シトルリン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロニン、フェニルアラニン、オルニチン、ヒスチジン、リジン、トリプトファン、アルギニン、プロリンの 22 種のアミノ酸を測定

した。

iv. 尿中遊離アミノ酸量

実験最終日の 24 時間蓄尿の尿中アミノ酸量を血漿遊離アミノ酸濃度測定と同様の方法で測定した。

v. 肝組織中遊離アミノ酸濃度

輸液終了時に肝臓を 1g 前後採取し、10% トリクロル酢酸 5ml を加えて Potter-Elevehjelm ガラスホモジナイザーにより細碎懸濁して蛋白を固定し、3,000rpm, 20 分間遠心後、上清を採取した。採取した上清のアミノグラムを血漿遊離アミノ酸濃度測定と同様の方法で測定した。

vi. 腫瘍組織中遊離アミノ酸濃度

肝組織中遊離アミノ酸濃度と同様に測定した。

vii. 腫瘍細胞のヒストグラム解析

摘出標本について、佐々木らの方法¹⁴⁾に従い以下の処理を行った。摘出した腫瘍塊を PBS で十分に洗浄し、眼科鉗で細切した。組織を 0.25% トリプシン溶液 (Sigma, St. Louis, U. S. A.) で 37°C, 30 分処理し、単細胞懸濁液 (single cell suspension) を作成し、この状態を顕微鏡にて確認した。これを 70% エタノールで固定後、1500rpm にて 5 分間遠心分離し上澄みを除去した。これに生理食塩水を加え数回攪拌し、再度 1500rpm にて 5 分間遠心し上澄みを除去した。ペプシン (和光純薬工業, 大阪) 100mg を 0.2% HCL 100ml に溶解してペプシン液を作製し、その 2ml を上記の沈査に混和、37°C で 15 分間処理後 1500rpm で 10 分間遠心し上澄みを除去した。次に RNase (Sigma) 10mg を生理食塩水 10ml に溶かして、RNase 液を作製し、その 2ml を前記沈査に混和、37°C, 15 分間処理し 1500rpm, 10 分間遠心し上澄みを除去した。ついで生理食塩水を加え 1500rpm, 10 分間遠心し上澄みを除去した。0.1M トリス緩衝液 (Tris Buffer) 1000ml に対しヨウ化プロピジウム (propidium iodide, PI) を 50mg 溶かした PI 染色液を作成し、この 5ml を前記の沈査に加えて 30 分間暗所にて反応せしめ染

Table 3. Blood contents in each experimental group

Group	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	Plt ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
I	119 \pm 41 ^{d)}	864 \pm 36	15.4 \pm 0.5	46.4 \pm 1.6	816 \pm 63
II	111 \pm 61	778 \pm 12**	12.8 \pm 0.5**	40.3 \pm 2.2**	1278 \pm 217**
III	132 \pm 28	752 \pm 41**	13.7 \pm 0.7**	38.3 \pm 1.2**	969 \pm 147
IV	145 \pm 30	717 \pm 22**	13.3 \pm 0.5**	37.1 \pm 0.6**	1041 \pm 99*

WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; Plt, platelet.

^{d)} $\bar{x} \pm \text{SD}$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I.

Table 4. Serum biochemistry in each experimental group

Group	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	UA (mg/dl)	ALP (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	T.P (g/dl)	Alb (g/dl)	A/G ratio	T. Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)
I	8.5 \pm 1.4 ^{d)}	0.33 \pm 0.10	2.2 \pm 0.2	253 \pm 30	2.7 \pm 0.8	64 \pm 16	8 \pm 4	4.9 \pm 0.7	3.2 \pm 0.6	1.90 \pm 0.46	91 \pm 20	37 \pm 22
II	20.3 \pm 2.0**	0.32 \pm 0.08	1.6 \pm 0.8**	238 \pm 50	2.8 \pm 3.3	73 \pm 18	7 \pm 5	5.7 \pm 0.8	3.4 \pm 0.5	1.51 \pm 0.32	62 \pm 12*	40 \pm 15
III	9.7 \pm 0.2	0.28 \pm 0.08	2.1 \pm 0.3	244 \pm 24	4.2 \pm 2.1	63 \pm 10	7 \pm 3	4.8 \pm 0.4	2.8 \pm 0.2*	1.41 \pm 0.20	73 \pm 13	38 \pm 3
IV	20.7 \pm 2.0**	0.30 \pm 0.09	1.4 \pm 0.3**	236 \pm 47	3.2 \pm 2.9	54 \pm 17	4 \pm 2	5.4 \pm 0.6	3.1 \pm 0.5	1.33 \pm 0.24	63 \pm 7*	38 \pm 2

BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; UA, uric acid; ALP, alkaline phosphatase; γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T.P, total protein; Alb, serum albumin; A/G, albumin-globulin ratio; T. Chol, total cholesterol; TG, triglyceride.

^{d)} $\bar{x} \pm \text{SD}$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I.

色を行った。この試料を用いて FACSscan (Becton-Dickinson, New Jersey, U. S. A.) により DNA ヒストグラムを求め細胞周期を解析した。内部標準として正常リンパ球を使用し、変動係数値 (coefficient of variation, CV) は 2% 以下となるよう調整した。

viii. 腫瘍内核 DNA, RNA および蛋白量の測定

核 DNA, RNA 量をエチジウムブロマイド (ethidium bromide) を用いた蛍光法¹⁵⁾により測定した。また、核蛋白量は Lowry 法¹⁶⁾により測定した。

III. 統計学的処理

各測定値は平均値±標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) で表示し、有意差検定には Student's t 検定を用い、危険率 5% 以下をもって有意と判定した。

成 績

I. 体重および腫瘍重量の変化

8日間輸液後の宿主の体重変化は、輸液前に比較し I 群が $5.35 \pm 2.82\%$, II 群が $3.13 \pm 0.75\%$, III 群が $4.30 \pm 2.53\%$, IV 群が $3.12 \pm 0.68\%$ であり、各群間に有意差を認めなかった。腫瘍重量の変化をみると、輸液開始 3, 5, 7, 8 日後の腫瘍重量は I 群でそれぞれ $0.73 \pm 0.18g$, $2.48 \pm 0.42g$, $5.50 \pm 1.35g$, $5.53 \pm 1.17g$, II 群で $0.30 \pm 0.06g$, $1.89 \pm 0.44g$, $2.91 \pm 0.98g$, $3.17 \pm 0.58g$, III 群で $0.51 \pm 0.43g$, $1.38 \pm 0.46g$, $2.27 \pm 0.33g$, $3.56 \pm 1.16g$, IV 群で $0.43 \pm 0.13g$, $1.12 \pm 0.37g$, $2.04 \pm 0.72g$, $2.15 \pm 0.81g$ であった。全期間を通じて I 群と II 群および IV 群の腫瘍重量の間には有意差を認め、輸液終了時には II 群と IV 群の間にも有意差を認めた。腫瘍増殖阻止率 (IR) % は、II 群では

42.7% , III 群では 35.6% , IV 群では 61.1% であった。

II. 窒素平衡の変動

各群ラットの輸液期間中における窒素平衡を図 1 に示した。各群とも、輸液期間中は終始正の窒素平衡を示した。輸液第 1 日目では手術侵襲および輸液量が 50% のこともあまって全群低い正の窒素平衡であったが、I 群と比較して II 群, III 群では有意に不良であった。輸液第 2 日目, 3 日目では I 群と比較して III 群, IV 群において有意に不良な窒素平衡を示した。第 4 日目以後では最終日の II 群に有意な上昇を認めた以外、各群とも安定した正の窒素平衡を示した。8 日間の累積窒素平衡をみると、I 群が 4.69 ± 0.79 (g 窒素/kg), II 群が 4.53 ± 0.49 , III 群が 4.37 ± 0.41 , IV 群が 4.32 ± 0.42 であり、各群間には有意差を認めなかった。

III. 血液一般検査および血液生化学検査

輸液終了時の各群の白血球数には、有意差を認めなかった。一方、赤血球数は I 群が 864 ± 36 ($\times 10^4/mm^3$), II 群が 778 ± 12 ($\times 10^4/mm^3$), III 群が 752 ± 41 ($\times 10^4/mm^3$), IV 群が 717 ± 22 ($\times 10^4/mm^3$) と I 群と比較して、他の 3 群では有意に低下していた。ヘモグロビン値、ヘマトクリット値も同様に I 群と比較して、他の 3 群では有意に低下していた。また、血小板数は I 群が 817 ± 63 ($\times 10^3/mm^3$), II 群が 1278 ± 217 ($\times 10^3/mm^3$), III 群が 969 ± 147 ($\times 10^3/mm^3$), IV 群が 1041 ± 99 ($\times 10^3/mm^3$) であり、I 群と比較し他の 3 群で増加しており、I 群と II 群および I 群と IV 群の間に有意差を認めた (表 3)。

血液生化学検査においては、血清尿素窒素が I 群では 8.5 ± 1.4 (mg/dl), II 群では 20.3 ± 2.0 (mg/dl), III 群では 9.7 ± 0.2 (mg/dl), IV 群では 20.7 ± 2.0 (mg/dl) であり I 群と比

Table 5. Plasma amino acid levels in each experimental group

Amino acid	Concentration of amino acid ($\mu\text{mol/dl}$) in group			
	I	II	III	IV
Aspartic acid	10.2 ± 1.7^a	$14.3 \pm 3.4^*$	$5.2 \pm 0.9^{**}$	$7.5 \pm 2.6^†$
Threonine	73.5 ± 11.1	57.7 ± 16.9	$174.3 \pm 39.3^{**}$	$59.5 \pm 3.7^*$
Serine	27.1 ± 6.7	$51.1 \pm 3.0^{**}$	46.5 ± 15.1	$28.4 \pm 6.2^†$
Asparagine	8.3 ± 1.4	10.4 ± 4.0	6.7 ± 0.6	6.7 ± 0.9
Glutamic acid	60.2 ± 16.7	55.2 ± 11.5	$25.1 \pm 1.1^{**}$	$33.4 \pm 13.1^{**†}$
Glutamine	23.4 ± 29.4	57.4 ± 14.3	51.1 ± 6.5	$37.3 \pm 10.3^†$
Glycine	74.1 ± 6.4	68.8 ± 20.5	87.5 ± 14.6	$36.9 \pm 5.2^{**†}$
Alanine	82.7 ± 12.6	$71.2 \pm 8.4^*$	96.3 ± 9.0	90.7 ± 17.2
Citrulline	3.8 ± 0.5	$8.3 \pm 2.5^*$	$5.9 \pm 1.0^*$	$6.9 \pm 0.4^{**}$
Valine	30.8 ± 3.2	$23.9 \pm 3.8^{**}$	$18.8 \pm 3.4^{**}$	$15.5 \pm 2.5^{**†}$
Cystine	4.5 ± 2.3	$0.9 \pm 0.5^{**}$	$1.3 \pm 0.2^*$	$0.5 \pm 0.2^{**}$
Methionine	4.4 ± 0.8	6.9 ± 2.3	$7.6 \pm 1.4^*$	4.9 ± 0.6
Isoleucine	17.8 ± 1.4	17.4 ± 2.7	$11.3 \pm 2.0^{**}$	$11.6 \pm 2.4^{**†}$
Leucine	27.4 ± 2.2	26.7 ± 4.5	26.0 ± 4.1	$20.8 \pm 3.2^{*†}$
Tyrosine	8.8 ± 0.6	9.9 ± 3.9	8.6 ± 0.4	$6.1 \pm 1.0^{**†}$
Phenylalanine	12.0 ± 0.9	13.7 ± 4.0	14.0 ± 2.1	$9.6 \pm 1.2^{*†}$
Ornithine	25.9 ± 2.5	$65.2 \pm 28.1^*$	23.4 ± 7.5	$74.6 \pm 2.4^{**}$
Histidine	11.1 ± 1.3	$8.9 \pm 1.4^*$	11.7 ± 1.0	$8.2 \pm 1.6^*$
Lysine	40.4 ± 3.9	38.2 ± 12.9	$63.9 \pm 5.9^{**}$	$25.3 \pm 4.4^{**}$
Tryptophan	4.3 ± 1.6	$5.7 \pm 1.1^{**}$	5.2 ± 1.1	$4.0 \pm 0.5^†$
Arginine	1.6 ± 0.7	$16.6 \pm 2.3^{**}$	$9.2 \pm 3.8^{**}$	$30.1 \pm 6.7^{**†}$
Proline	16.4 ± 1.3	19.0 ± 3.7	$24.6 \pm 1.2^{**}$	$24.4 \pm 2.1^{**†}$

^a $\bar{x} \pm SD$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I, † $p < 0.05$ vs. Group II, ‡ $p < 0.01$ vs. Group II.

Table 6. Urine amino acid levels in each experimental group

Amino acid	Volume of amino acid ($\mu\text{mol}/\text{dl}$) in group			
	I	II	III	IV
Aspartic acid	0.87 \pm 0.45 ^{a)}	0.28 \pm 0.14*	0.27 \pm 0.02*	0.92 \pm 0.63
Threonine	7.53 \pm 6.17	0.55 \pm 0.24*	0.69 \pm 0.23*	12.26 \pm 1.63 [†]
Serine	1.25 \pm 1.10	0.18 \pm 0.17	0.12 \pm 0.18	1.07 \pm 1.04
Asparagine	0.35 \pm 0.34	0.00	0.07 \pm 0.05	0.06 \pm 0.09
Glutamic acid	2.82 \pm 2.03	14.99 \pm 10.82*	0.80 \pm 0.19	5.63 \pm 0.22*
Glutamine	0.86 \pm 0.97	4.46 \pm 4.01	0.00	0.15 \pm 0.15 [†]
Glycine	25.35 \pm 4.69	12.01 \pm 10.18*	15.41 \pm 3.66*	57.36 \pm 36.72 [†]
Alanine	5.25 \pm 1.63	2.96 \pm 2.05	5.07 \pm 1.89	28.30 \pm 20.08** [†]
Citrulline	1.78 \pm 0.58	12.17 \pm 7.44*	0.66 \pm 0.20**	20.97 \pm 7.78**
Valine	1.03 \pm 0.90	0.12 \pm 0.14	0.39 \pm 0.26	1.49 \pm 1.02 [†]
Cystine	2.68 \pm 1.60	0.86 \pm 0.52	0.38 \pm 0.28*	3.01 \pm 1.40 [†]
Methionine	0.92 \pm 0.74	0.08 \pm 0.09*	0.08 \pm 0.12*	0.17 \pm 0.09
Isoleucine	0.82 \pm 0.84	0.06 \pm 0.07	0.00*	0.36 \pm 0.16 [†]
Leucine	2.10 \pm 2.24	0.04 \pm 0.09	0.12 \pm 0.11	0.44 \pm 0.17 [†]
Tyrosine	0.30 \pm 0.21	0.58 \pm 0.53	0.00*	1.20 \pm 0.66*
Phenylalanine	1.72 \pm 1.31	0.69 \pm 0.19	0.46 \pm 0.36	1.83 \pm 0.49 [†]
Ornithine	0.50 \pm 0.36	78.72 \pm 52.93*	0.65 \pm 0.29	38.79 \pm 10.02**
Histidine	4.64 \pm 1.27	2.01 \pm 1.24*	2.51 \pm 0.51*	6.77 \pm 4.36
Lysine	3.42 \pm 2.16	36.85 \pm 24.23*	1.36 \pm 0.76	30.96 \pm 5.79**
Tryptophan	0.19 \pm 0.06	0.00**	0.00**	0.00**
Arginine	2.59 \pm 1.76	38.87 \pm 26.15*	0.62 \pm 0.20*	12.58 \pm 8.04*
Proline	1.91 \pm 0.82	1.75 \pm 1.57	2.58 \pm 1.75	3.71 \pm 1.99

^{a)} $\bar{x} \pm \text{SD}$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I, [†] $p < 0.05$ vs. Group II, [†] $p < 0.01$ vs. Group II.

Table 7. Amino acid concentration of liver in each experimental group

Amino acid	Concentration of amino acid ($\mu\text{mol}/\text{dl}$) in group			
	I	II	III	IV
Aspartic acid	5.66 \pm 2.92 ^{a)}	5.05 \pm 0.98	9.72 \pm 2.25*	17.97 \pm 2.54*** [†]
Threonine	9.22 \pm 3.63	9.44 \pm 7.29	27.25 \pm 8.25**	25.74 \pm 4.73*** [†]
Serine	9.79 \pm 1.24	13.22 \pm 8.60	23.79 \pm 1.69**	29.59 \pm 6.34*** [†]
Asparagine	2.27 \pm 1.43	3.63 \pm 3.06	11.13 \pm 0.85**	14.01 \pm 4.91*** [†]
Glutamic acid	13.94 \pm 3.50	11.38 \pm 2.24	19.90 \pm 2.18**	27.11 \pm 4.94*** [†]
Glutamine	9.68 \pm 4.79	10.68 \pm 3.38	16.03 \pm 1.10*	15.03 \pm 0.72* [†]
Glycine	21.99 \pm 3.75	19.07 \pm 4.00	28.60 \pm 3.76*	32.13 \pm 5.97* [†]
Alanine	26.87 \pm 13.75	21.51 \pm 6.00	36.59 \pm 2.79	48.69 \pm 8.64* [†]
Citrulline	1.58 \pm 0.87	1.00 \pm 0.34	1.77 \pm 0.92	3.14 \pm 0.90* [†]
Valine	4.86 \pm 1.80	4.55 \pm 2.33	10.37 \pm 0.51**	13.33 \pm 3.59*** [†]
Cystine	0.12 \pm 0.25	0.01 \pm 0.02	0.03 \pm 0.03	0.13 \pm 0.08 [†]
Methionine	1.94 \pm 0.51	4.54 \pm 5.46	4.75 \pm 0.27**	5.93 \pm 1.58**
Isoleucine	2.72 \pm 0.86	2.75 \pm 1.37	6.34 \pm 0.43**	8.20 \pm 2.12** [†]
Leucine	5.55 \pm 1.87	5.60 \pm 3.03	13.89 \pm 1.57**	16.71 \pm 4.31*** [†]
Tyrosine	3.17 \pm 2.03	2.47 \pm 1.14	5.54 \pm 0.32*	6.58 \pm 1.83* [†]
Phenylalanine	2.49 \pm 0.66	2.74 \pm 1.65	6.95 \pm 0.76**	8.27 \pm 2.16*** [†]
Ornithine	5.37 \pm 1.46	6.32 \pm 3.75	9.61 \pm 0.61**	19.63 \pm 3.93*** [†]
Histidine	2.42 \pm 0.17	2.09 \pm 1.16	4.84 \pm 0.47**	5.78 \pm 0.72*** [†]
Lysine	8.47 \pm 4.41	6.56 \pm 3.00	12.76 \pm 0.26	16.53 \pm 3.48*** [†]
Tryptophan	0.43 \pm 0.09	0.53 \pm 0.36	1.22 \pm 0.32**	1.81 \pm 0.59*** [†]
Arginine	0.02 \pm 0.03	0.06 \pm 0.07	0.18 \pm 0.11*	0.21 \pm 0.09*** [†]
Proline	4.80 \pm 2.52	4.11 \pm 1.29	8.82 \pm 0.14*	12.14 \pm 2.72*** [†]

^{a)} $\bar{x} \pm \text{SD}$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I, [†] $p < 0.05$ vs. Group II, [†] $p < 0.01$ vs. Group II.

較してⅡ群, Ⅳ群に有意な上昇を認めた. 尿酸値ではⅠ群が 2.2 ± 0.2 (mg/dl), Ⅱ群が 1.6 ± 0.8 (mg/dl), Ⅲ群が 2.1 ± 0.3 (mg/dl), Ⅳ群が 1.4 ± 0.3 (mg/dl) でありⅠ群と比較してⅡ群, Ⅳ群に有意な低下を認めた. またⅡ群, Ⅳ群に総コレステロール値の有意な低下を認めたが, クレアチニン, ALP, γ -GTP, AST, ALT, 血清総蛋白質量, 中性脂肪には, 各群間に有意差を認めなかった (表4).

Ⅳ. 血漿遊離アミノ酸濃度

各群ラットの輸液終了時の血漿遊離アミノ酸濃度を表5に示した. Ⅰ群と比較してⅡ群ではアスパラギン酸, シトルリン, オルニチン, トリプトファン, セリン, アルギニンの有意な上昇および, アラニン, シスチン, ヒスチジン, バリンの有意な低下を認めた. また, Ⅲ群ではⅠ群と比較してシトルリン, スレオニン, メチオニン, リジン, アルギニン, プロリンの上昇および, シスチン, アスパラギン酸, グルタミン酸, バリン, イソロイシンの有意な低下を認めた. さらに, Ⅳ群ではシトルリン, オルニチン, アルギニン, プロリンの有意な上昇および, スレオニン, シスチン, ロイシン, フェニルアラニン, ヒスチジン, グルタミン酸, グリシン, バリン, イソロイシン, チロシン, リジンの有意な低下を認めた. Ⅱ群とⅣ群の比較では, Ⅳ群においてプロリン, アルギニンの有意な上昇および, グルタミン, ロイシン, チロシン, フェニルアラニン, トリプトファン, アスパラギン酸, セリン, グルタミン酸, グリシン, バリン, イソロイシンの有意な低下を認めた.

Ⅴ. 尿中アミノ酸量

各群の輸液8日目の尿中アミノ酸排泄量を表6に示した. Ⅰ群と比較してⅡ群ではグルタミン酸, シトルリン, オルニチン, リジン, アルギニン排泄量の有意な増加および, アスパラ

ギン酸, スレオニン, グリシン, メチオニン, ヒスチジンの有意な減少を認めた. また, Ⅲ群ではⅠ群と比較してアミノ酸の排泄量が全般的に減少し, アスパラギン酸, スレオニン, グリシン, シスチン, メチオニン, チロシン, ヒスチジン, アルギニン, シトルリン, トリプトファンでは有意差を認めた. さらに, Ⅳ群ではグルタミン酸, アラニン, チロシン, リジン, アルギニン, シトルリン, オルニチンの有意な増加およびトリプトファンの有意な減少を認めた. また, Ⅱ群とⅣ群の比較ではⅣ群においてグリシン, アラニン, バリン, シスチン, イソロイシン, スレオニン, ロイシン, フェニルアラニンの有意な増加およびグルタミンの有意な減少を認めた.

Ⅵ. 肝組織中遊離アミノ酸濃度

輸液終了時の各群の肝組織内遊離アミノ酸濃度を表7に示した. Ⅰ群とⅡ群の間には有意差を認めなかったが, Ⅰ群と比較してⅢ群ではアスパラギン酸, スレオニン, セリン, アスパラギン, グルタミン酸, グルタミン, グリシン, バリン, メチオニン, イソロイシン, ロイシン, チロシン, フェニルアラニン, オルニチン, ヒスチジン, トリプトファン, アルギニン, プロリンの有意な上昇を, Ⅳ群ではシスチン以外の測定した全てのアミノ酸の有意な上昇を認めた. またⅡ群とⅣ群の比較ではメチオニン以外の測定した全てのアミノ酸の有意な上昇を認めた.

Ⅶ. 腫瘍内組織中遊離アミノ酸濃度

輸液終了時の各群の腫瘍組織中遊離アミノ酸濃度を表8に示した. Ⅰ群と比較してⅡ群ではオルニチンの有意な上昇を認めた ($p < 0.05$). Ⅲ群ではシトルリン, シスチンの有意な低下を ($p < 0.05$), さらにⅣ群ではオルニチンの有意な上昇を認めた ($p < 0.01$). また, Ⅱ群とⅣ群との比較では, Ⅳ群においてアラ

Table 8. Amino acid concentration of tumor in each experimental group

Amino acid	Concentration of amino acid ($\mu\text{mol/dl}$) in group			
	I	II	III	IV
Aspartic acid	8.21 ± 3.74^a	7.30 ± 3.43	5.59 ± 1.25	7.13 ± 2.44
Threonine	12.80 ± 4.72	10.59 ± 6.14	17.37 ± 3.74	15.15 ± 3.47
Serine	10.12 ± 5.53	9.56 ± 3.24	8.91 ± 1.95	8.69 ± 2.35
Asparagine	9.59 ± 5.65	9.09 ± 5.64	6.15 ± 1.70	7.23 ± 2.09
Glutamic acid	21.07 ± 9.49	18.00 ± 2.97	14.15 ± 2.43	18.86 ± 5.16
Glutamine	5.23 ± 3.48	5.89 ± 2.97	2.95 ± 0.51	3.66 ± 1.05
Glycine	26.41 ± 7.16	22.09 ± 7.83	22.33 ± 2.71	22.76 ± 5.66
Alanine	24.91 ± 12.36	18.22 ± 6.77	13.87 ± 2.15	$27.83 \pm 8.87^†$
Citrulline	1.03 ± 0.40	1.05 ± 0.47	$0.47 \pm 0.05^{**}$	0.69 ± 0.22
Valine	9.68 ± 5.19	7.76 ± 2.69	5.65 ± 1.05	7.15 ± 1.70
Cystine	0.65 ± 0.41	0.44 ± 0.21	$0.06 \pm 0.06^*$	0.36 ± 0.19
Methionine	3.45 ± 2.43	3.37 ± 1.77	2.27 ± 0.49	2.89 ± 0.75
Isoleucine	5.48 ± 2.93	5.08 ± 2.03	3.48 ± 0.48	4.43 ± 1.01
Leucine	11.62 ± 7.16	18.80 ± 5.13	7.62 ± 1.24	10.19 ± 3.15
Tyrosine	7.60 ± 6.57	4.64 ± 2.01	3.13 ± 0.46	3.99 ± 1.22
Phenylalanine	6.05 ± 3.72	5.39 ± 2.17	3.93 ± 0.61	5.47 ± 1.61
Ornithine	5.04 ± 2.56	$10.07 \pm 3.06^*$	4.58 ± 1.08	$13.90 \pm 2.40^{**}$
Histidine	3.45 ± 1.23	2.93 ± 1.02	2.30 ± 0.22	3.25 ± 0.61
Lysine	13.12 ± 9.55	10.18 ± 3.51	9.10 ± 1.09	9.81 ± 2.31
Tryptophan	1.61 ± 1.04	1.60 ± 0.99	1.03 ± 0.34	1.33 ± 0.28
Arginine	2.63 ± 1.41	2.89 ± 3.32	1.10 ± 0.43	$5.81 \pm 3.90^†$
Proline	11.97 ± 5.98	10.07 ± 3.91	7.40 ± 0.99	10.93 ± 2.15

^{a)} $\bar{x} \pm \text{SD}$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I, † $p < 0.05$ vs. Group II.

Table 9. Analysis of tumor cell cycle by flowcytometry

Group	Percentage of cell cycle phase of		
	G ₁	S	G ₂ +M
I	51.0±6.0 ^d	41.4±7.4	7.4±1.5
II	36.8±4.4**	55.4±5.1**	7.2±1.1
III	57.4±10.3	34.6±8.8	8.2±1.6
IV	40.4±4.4**	52.2±4.1*	8.0±1.0

^d) $\bar{x} \pm SD$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I, ** $p < 0.01$ vs. Group I.

Table 10. DNA, RNA and protein contents in tumor after TPN

Group	Amount (mg) per 1g tumor tissue		
	DNA	RNA	Protein
I	5.01±0.71 ^d	7.35±0.90	112.8±9.6
II	4.48±0.73	6.20±0.50*	109.4±6.6
III	4.81±0.64	7.13±0.64	111.8±7.7
IV	4.47±0.72	6.15±0.71*	107.7±6.0

^d) $\bar{x} \pm SD$. Each group contained six rats.

* $p < 0.05$ vs. Group I.

ニンの有意な上昇と、アルギニンの有意な上昇を認めた。

Ⅶ. 細胞周期におよぼす影響

輸液終了時の各群の細胞周期分析を表9に示した。I群に比べII群、IV群では、有意なG₁期細胞分画の減少とS期細胞分画の増加を認めた。I群とIII群、およびII群とIV群の比較では有意差を認めなかった。

Ⅷ. 腫瘍内 DNA, RNA および蛋白質におよぼす影響

対照群に比較して、アルギニン・オルニチン・インバランス輸液群 (II群およびIV群) において RNA 量の有意な減少と ($p < 0.05$), DNA 量の減少傾向を認めた (表10)。

考 察

Elvehjem¹⁷⁾は、ある種のアミノ酸を少量添加した飼料で飼育した羊に発育障害が認められることを報告し、投与されるアミノ酸の不適当配合から生じる栄養障害をアミノ酸インバランスと命名した。後に Harper¹⁸⁾は、アミノ酸インバランスを「比較的少量の必須アミノ酸、あるいは組成の乱れた蛋白質を飼料に添加することにより生じ、少量の制限アミノ酸を同時に添加することで防止できる成長障害、もしくはその他の生体に不利益な効果」と定義した。すなわち、当初アミノ酸インバランスは第二、ないし第三制限アミノ酸の添加により助長される第一制限アミノ酸不足を意味していた。その後定義が拡大され、特定のアミノ酸の除去や大量負荷、さらにはアミノ酸代謝拮抗物質によって誘導される代謝障害もアミノ酸インバランスと称されるに至っている。

アミノ酸インバランスを悪性腫瘍の治療に応用する試みは古くよりなされてきた。柚木ら¹⁹⁾はフェニアラニン欠乏食あるいは低フェニアラニン低チロシン食を6例の白血病患者に投与し、急性リンパ性白血病の1例を除き5例の慢性骨髄性白血病を寛解せしめ、本食餌療法のみで十分な臨床効果を期待することは困難であるが、化学療法への薬剤感受性は普通食の場合

よりもはるかに良好であったと報告している。Nishihira ら²⁰⁾は市販の10%総合アミノ酸製剤から特定の必須アミノ酸を欠乏させたアミノ酸インバランス製剤を担癌ラットに投与したとき、バリンを欠乏させた製剤に最も著明な腫瘍増殖抑制効果が認められ、次いでイソロイシンを欠乏させた製剤にも同様の効果が認められることを報告した。これらのインバランスは、必須アミノ酸の欠乏状態を惹起し腫瘍増殖を抑制しようするものである。しかし、体内には骨格筋に代表される膨大なアミノ酸プールが存在するため、必須アミノ酸欠乏は蛋白崩壊を惹起し、速やかにアミノ酸の放出がなされると考えられる。したがって、生体内で特定のアミノ酸欠乏によって腫瘍細胞の増殖が抑制されるかには疑問が多い。メチオニン欠乏輸液も、当初は必須アミノ酸欠乏によって腫瘍増殖を抑制すると考えられ、その有効性が報告されていた²¹⁾。近年、細胞内メチオニン欠乏が還元型葉酸代謝を修飾し、フッ化ピリミジン系抗癌剤の作用を増強することが明かにされた^{22,23)}。メチオニン欠乏輸液の有効性を述べた報告もフッ化ピリミジン系抗癌剤と併用したものが多く、最近ではその作用機序はシスプラチンと同様細胞内のテトラヒドロ葉酸の生合成増加に起因すると説明されている²¹⁾。しかし、メチオニンの前駆物質であるホモシステインは、メチオニンからS-アデノシルメチオニンを介して生成されるものであるため、長期にわたるメチオニンの欠乏輸液が抗腫瘍効果を持続させるという報告にも疑問が残る。嵩原ら²⁴⁾は、非必須アミノ酸のグルタミンの代謝拮抗物質である6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (6-diazo-5-oxo-L-norleucine) を用いて著明な抗腫瘍効果を報告した。非必須アミノ酸の代謝阻害により腫瘍発育の抑制を試みた点が注目される。

過剰のアルギニン負荷により尿素サイクルの代謝が促進されることを裏付ける報告はいくつかある。Schimke は²⁵⁾、健常ラットに2.5%または7.5%のアルギニンを添加したカゼイン飼料を投与することによって、尿中への尿素排泄量を著明に増加せしめることを報告している。また、このアルギニン・インバランスの示す現象は同じ尿素サイクルのメンバーであるオルニチンやシトルリンでも認められ、中西は²⁶⁾カゼイン飼料に5%アルギニンおよび5%オルニチンを添加した実験モデルにおいて、抗腫瘍効果が観察されるとともに宿主へは不利益な影響がないことを報告した。またアルギニンは腫瘍細胞の構成では認められない唯一のアミノ酸であることが観察されており²⁷⁾、アルギニン投与が腫瘍代謝自体に何らかの影響をおよぼすことが期待できる。

本研究に使用した特殊アミノ酸輸液 KAO-1 では、アルギニンを FAO/WHO 基準のおよそ3倍に増量したものである。さらにオルニチンを加え、両者で全アミノ酸の66%を占めている。オルニチンは、OTC の作用を受けてカルバミルリン酸とともにシトルリンに代謝されるため、カルバミルリン酸の尿素サイクル流入に深く関与するアミノ酸と解釈される。オルニチンは通常のアミノ酸には含有されていないが、より円滑な尿素サイクルの回転促進を意図し KAO-1 に添加した。カルバミルリン酸は、アンモニアから尿素を生合成する際の中間代謝産物であるが、ATC に触媒されてアスパラギン酸塩 (aspartate) とともにカルバミルアスパラギン酸 (carbamyl aspartate) となり、ピリミジンの生合成系へと流入する。したがって、カルバミルリン酸の生産量が一定であると仮定すれば、尿素サイクルへ流れるカルバミルリン酸の増加によってピリミジン産生の抑

制が期待できる。

主としてグルタミン酸からグルタミン脱水素酵素により発生したアンモニアは、カルバミルリン酸合成酵素に触媒されてミトコンドリア内で CO_2 と反応し、二分子の ATP を消費してカルバミルリン酸となる。肝細胞内で行われるこの反応は、蛋白合成に関与しないアミノ酸を糖質や脂質に代謝する際のアミノ基処理経路として極めて重要であり、カルバミルリン酸の生成障害はアミノ基の運搬媒体としてのグルタミン酸の蓄積をもたらすと考えられる。本研究における血漿アミノグラムをみると、KAO-1 投与群ではグルタミン酸の上昇を認めず、PALA 投与群ではグルタミン酸の有意な低下を認めた。また、両者の併用群でもグルタミン酸の著明な低下がみられた。これらの結果から、いずれの実験群においてもカルバミルリン酸の産生は障害されていないものと考えられた。次いで、カルバミルリン酸はオルニチンと反応してシトルリンとなりミトコンドリアの外へ出る。細胞質内でシトルリンは、一分子の ATP を消費してアスパラギン酸の α -アミノ基と結合し、アルギノコハク酸を経てアルギニンが合成される。アルギニンの一部は、アルギナーゼによって分解されて尿中に排泄される。また、他の一部はクレアチンを経てクレアチニンに代謝され、同様に尿中に排泄される。KAO-1 投与群の血漿アミノグラムでは、オルニチン、アルギニンに加えてシトルリンの有意な上昇を認めた。したがって、2種の尿素サイクルのメンバー、すなわちアルギニンとオルニチンの過剰投与は、確実に尿素サイクルを賦活化するものと考えられた。なお、オルニチンの一部はグルタミク- γ -セミアルデヒド (glutamic- γ -semialdehyde) を経てプロリンに代謝されるとされているが、本実験ではいずれの群の血漿アミノ酸濃度でもプロリンの上昇は軽度であり、オルニチンからプロリンが生成される経路は量的にはわずかであると考えられた。一方、KAO-1 投与群の血液生化学検査をみると、血清クレアチニン値の上昇を伴わずに血清尿素窒素値が 2.1~2.4 倍に上昇しており、KAO-1 投与によって賦活化された尿素サイクルに流入する窒素の主たる処理経路は、アルギナーゼに触媒される経路であると考えられた。

KAO-1 単独投与群の腫瘍重量は、8日間の輸液期間を通じて総合アミノ酸製剤を投与した対照群と比較し有意に低値であった。一方、KAO-1 単独投与群の体重変化や輸液期間中の累積窒素平衡は対照群と遜色なかった。血液一般検査では赤血球減少を認めたが、血液生化学検査では前述した血清尿素窒素の高値以外、有意な異常を認めなかった。輸液終了時の腫瘍細胞の細胞周期解析では、KAO-1 単独投与群に有意な G_1 細胞分画の減少と S 期細胞分画の増加を認めた。腫瘍に含まれる DNA、RNA および蛋白量をみると、対照群と比較して KAO-1 投与群で有意な RNA 量の減少と DNA 量の減少傾向が認められた。これらの結果から、KAO-1 の腫瘍に対する選択的な毒性が証明され、その機序として核酸合成の障害が示唆された。

KAO-1 投与に伴う赤血球減少と血小板増多は PALA との併用時にも認められたが、その機序にはアルギニン-酸化窒素経路 (L-arginine-nitric oxide pathway) の関与が示唆された。Salvemini ら²⁸⁾ は、アルギニンの投与により酸化窒素 (nitric oxide, NO) の産生が亢進すると報告した。NO は強力な血管拡張作用を有しており、KAO-1 投与群では末梢血管拡張に伴う循環血漿量の増加がおり、希釈的に赤血球数の減少を招いたものと解釈された。また、Radomski ら^{29,30)} は、NO の血小板凝

集抑制作用や血小板粘着抑制作用を報告している。KAO-1 投与群にみられた血小板増多にも、NO が関与しているものと考えられた。

カルバミルリン酸は、ピリミジン生合成系の基質でもあり、ATC に触媒されてアスパラギン酸とともにカルバミルアスパラギン酸となる。PALA は、ATC の阻害剤であり、カルバミルリン酸の約1000倍の親和性を持って ATC と結合し^{31,32)}、この合成系初期の律速段階を抑制する。ヌードマウス移植腫瘍を用いた検討で、PALA は投与量依存的に腫瘍組織内のウリジン三リン酸 (uridine triphosphate)、シチジン三リン酸 (cytidine triphosphate) などのピリミジンヌクレオチドプールを縮小する一方、肝、脾などの正常組織には影響を与えないと報告されている³³⁾。PALA 単独投与群の血漿アミノ酸濃度をみると、シトルリンと、アルギニンが対照群と比較して有意の高値を呈している。このことは、ピリミジン合成系抑制に引き続き、カルバミルリン酸が尿素サイクルへ流入したことを示唆していると考えられる。

PALA 投与群の腫瘍重量は、8日間の輸液期間を通じて対照群と比較し低値であったが、統計学的な有意差は認められなかった。また、PALA 投与群の体重変化や輸液期間中の累積窒素平衡は対照群と差はなかった。血液一般検査では、KAO-1 投与群と同様に有意の赤血球減少と血小板の増多傾向を認めたが、血液生化学検査では有意な異常を認めなかった。これらの結果から、PALA の腫瘍に対する選択的な毒性が示された。なお、PALA 投与群にみられた赤血球減少と血小板の増多も KAO-1 投与群と同様の機序によるものと解釈された。

KAO-1 と PALA の併用は、ピリミジン合成の基質の減少とその律速酵素の阻害を同時にもたらすと考えられる。本研究では、KAO-1 と PALA を併用した群で薬剤投与終了時の腫瘍重量が最も少なく、対照群のみならず PALA 単独投与群との間にも有意差を認めた。両者を併用した場合の宿主の体重変化や累積窒素平衡に関しては、対照群や各々を単独投与した場合と差はなかった。また、血液一般検査および血液生化学検査結果からみても両者の併用に伴う副作用の増強はみられなかった。したがって、KAO-1 と PALA を併用は、宿主に対する毒性を増すことなく腫瘍発育抑制効果を増強するものと考えられた。

近年、抗癌剤の作用増強を目的とした腫瘍細胞内の代謝調節が注目されている^{34)~36)}。抗腫瘍効果を期待して投与する主たる薬剤 (作用薬剤) が、より効率良くその作用を発揮できるよう細胞内環境を調節する他剤 (調節薬剤) を併用する方法で、生化学的調節と呼ばれている³⁷⁾。生化学的調節の導入で、腫瘍が本来有している薬剤暴露に伴って獲得した薬剤抵抗性を打破することが可能となりつつある。5-FU は、現在最も頻用されている作用薬剤である。5-FU は、複雑な代謝経路と複数の作用機序を有し種々の条件下で抗腫瘍効果に修飾を受ける³⁸⁾。主たる作用機序は、フッ化デオキシウリジン-リン酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, FdUMP) に代謝された後、還元型葉酸とともに TS と強固に結合し三者結合体 (ternary complex, TC) を形成、TS を不活性化させることである³⁹⁾。この際の TS と FdUMP の結合は、TS の本来の基質であるデオキシウリジン-リン酸 (deoxyuridine monophosphate, dUMP) と競合するものであり、高濃度の dUMP は TS の不完全阻害に帰結する⁴⁰⁾。内因性の dUMP は、カルバミルリン酸とアスパラギン酸に始まるピリミジン生合成系により生成されるため、そ

の合成阻害作用を有する KAO-1, PALA は 5-FU の調節薬剤としても期待されるものと思われた。

結 論

吉田肉腫を移植した担癌ラットに対し、高張ブドウ糖液とともに総合アミノ酸製剤および新たに調整したアルギニン・オルニチン・インバランス輸液 (KAO-1) の一定量を輸液注入し、単独および PALA との併用において輸液のアミノ酸組成が、宿主および腫瘍増殖におよぼす影響について検討した。得られた成績は以下のごとくであった。

1. アルギニン・オルニチン・インバランス輸液投与群 (KAO-1) と総合アミノ酸投与群に宿主体重の有意差を認めず、PALA 併用群においても同様であった。

2. 腫瘍重量の変化では、KAO-1 投与群および PALA 併用群において有意に腫瘍増殖の抑制を認めた。

3. 窒素平衡の変動では、全群輸液期間中終始正の窒素平衡を示し、各群には有意差を認めなかった。

4. KAO-1 投与群および PALA 併用群では血清尿素窒素の上昇および血清尿酸値の低下を認め尿素回路の賦活化と同時に起こる核酸合成の抑制を示した。

5. KAO-1 投与群および PALA 併用群では尿中にシトルリンが著明に排泄されており、体内での尿素回路の賦活化が示唆された。

6. 細胞周期の検討では KAO-1 投与群および PALA 併用群で S 期細胞の増加を認め、アルギニン・オルニチン・インバランス療法の細胞周期への影響が示唆された。

7. KAO-1 投与群および PALA 併用群において腫瘍内 RNA 量の有意な減少と腫瘍内 DNA 量の減少傾向を認めた。

以上の成績から、悪性腫瘍に対するアルギニン・オルニチン・インバランス療法は、意義のある治療法と考えられた。また、PALA はアスパラギン酸トランスカルバミラーゼを有効に阻害するものと推測され、KAO-1 との併用により抗腫瘍効果を増強させることが認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、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を賜りました大村健二講師をはじめ金沢大学第一外科講座の諸先生方に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は第28回中部外科学会総会 (1992年, 福井)、第43回日本消化器外科学会総会 (1994年, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Rooney, M., Kish, J., Jacobs, J., Kinze, 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).
- 2) Cantrell, J. E., Hart, R. D., Taylor, R. F. & Harver, J. H.: Pilot trial of prolonged continuous-infusion 5-fluorouracil and weekly cisplatin in advanced colorectal cancer. *Cancer Treat. Rep.*, 71, 615-618 (1987).
- 3) Bernal, A. G., Cruz, J. J., Sanchez, P., Munoz, A., Nieto, A., Fonseca, E., Calle, R. & Gomez, J. L.: Four-day continuous infusion of cisplatin and 5-fluorouracil in

head and neck cancer. *Cancer*, 63, 1927-1930 (1989).

- 4) Omura, K., Misaki, T., Hashimoto, T., Kanehira, E., Watanabe, T., Ishida, F., Watanabe, Y. & Shirasaka, T.: Changes in folate concentration in Yoshida sarcoma after administration of cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 35, 183-187 (1995).
- 5) 大村健二, 橋本琢生, 川上和之, 金平永二, 渡辺 透, 平野勝康, 渡辺俊一, 渡辺洋宇, 白坂哲彦: 5-fluorouracil 投与に伴うチミジル酸合成酵素の基質結合部位数の変化。癌と化学療法, 21, 2007-2011 (1994).
- 6) 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).
- 7) 大村健二, 川浦幸光, 道伝研司, 服部和伸, 岩 喬, 白坂哲彦: アミノ酸インバランス輸液と抗癌剤の併用による抗腫瘍効果。KARKINOS, 3, 921-929 (1990).
- 8) Roberts, M. F., Opella, S. J., Schaffer, M. H., Phillips, M. H. & Stark, G. B.: Evidence from ¹³CNMR for protonation of carbamyl-P and N-(phosphonacetyl)-aspartate in the active site of aspartate transcarbamylase. *J. Biol. Chem.*, 251, 5976-5985 (1976).
- 9) Johnson, R. K., Inouye, T., Goldin, A. & Stark, G. R.: Antitumor activity of N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid, a transition-state inhibitor of aspartate transcarbamylase. *Cancer Res.*, 36, 2720-2725 (1976).
- 10) O'Dwyer, P. J.: The role of low-dose PALA in biochemical modulation. *Pharmac. Ther.*, 48, 371-380 (1990).
- 11) Steiger, E., Vars, H. & Dudrick, S. J.: A technique for long-term intravenous feeding in unrestrained rats. *Arch. Surg.*, 104, 330-332 (1972).
- 12) 宗田滋夫, 岡田 正, 佐谷 稔, 曲直部寿夫: 栄養輸液の実験モデル作製法。医学のあゆみ, 92, 56-57 (1975).
- 13) 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29版, 422-423 頁, 金原, 東京, 1983.
- 14) 佐々木功典, 村上知之, 高橋 学: 新しい方法 (技術)・フローサイトメトリー。病理と臨床, 7, 357-379 (1989).
- 15) Karstan, U. & Wollenberger, A.: Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissues by surface fluorometry. *Anal. Biochem.*, 46, 135-148 (1972).
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis, F. A. & Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 17) Elvehjem, C. A.: Amino acid imbalance. *Federation Proc.*, 15, 965-970 (1956).
- 18) Harper, A. E.: Balance and imbalance of amino acids. *Ann. New York Acad. Sci.*, 69, 1025-1041 (1958).
- 19) 柚木一雄, 立川俱子, 平田睦子: 慢性骨髄性白血病に対する低フェニルアラニン食療法の試み。栄養学誌, 24, 195-204 (1966).
- 20) Nishihira, T., Takagi, T., Kawarabayashi, Y., Izumi, U., Ohkuma, S., Koike, N., Toyoda, T. & Mori S.: Anticancer therapy with valinedepleted amino acid imbalance solution. *Tohoku J. Exp. Med.*, 159, 259-270 (1988).
- 21) 五関謙秀, 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).
- 22) Shirasaka, T., Shimamoto, Y., Ohshimo, H., Saito, H. & Fukushima, M.: Metabolic basis of the synergistic antitumor activities of 5-fluorouracil and cisplatin in rodent tumor models in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 32, 167-172 (1993).
- 23) Scanlon, K. J., Newman, E. M., Lu, Y. & Priest, D. G.: Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8923-8925 (1986).
- 24) 嵩原裕夫, 岡田 哲, 吉岡一夫, Nestor, A. M., 喜多良孝, 村上寛雅, 郷 正宏, 三宅秀則, 古味信彦: グルタミン代謝拮抗剤 (DON) の腫瘍組織における蛋白合成に及ぼす影響. 日本静脈・経腸栄養研究会誌, 4, 208-210 (1989).
- 25) Schimke, R. T.: Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 238, 1012-1018 (1963).
- 26) 中西久仁夫: アルギニン・インバランスによる腫瘍の発育抑制に関する研究. 大阪大医誌, 21, 193-204 (1969).
- 27) Marques, J., Sánchez-Jiménez, F., Medina, M. A., Quesada, A. R. & Núñez de Castro I: Nitrogen metabolism in tumor bearing mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 667-675 (1989).
- 28) Salmini, D., DeNucci, G. & Grygiewski, R. J.: Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6328-6332 (1989).
- 29) Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. & Moncada, S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5193-5197 (1990).
- 30) Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. & Moncada, S.: The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148, 1482-1489 (1987).
- 31) Grem, J. L., King, S. A., O'Dwyer, P. J. & Leyland-Jones, B.: Biochemistry and clinical activity of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate: A review. *Cancer Res.*, 48, 4441-4454 (1988).
- 32) Moore, E. C., Friedman, J., Valdivieso, M., Plunkett, W. & Marti, J. R.: Aspartate carbamoyltransferase activity, drug concentrations, and pyrimidine nucleotides in tissue from patients treated with N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 3317-3321 (1982).
- 33) Moyer, J. D. & Handschumacher, R. E.: Selective inhibition of pyrimidine synthesis and depletion of nucleotide pools by N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *Cancer Res.*, 39, 3089-3094 (1979).
- 34) 大村健二, 道伝研司, 宗本義則, 川上和之, 宮永太門, 橋本琢生, 石田文生, 渡辺洋宇: シスプラチン, 5-FU (UFT) 併用療法による消化器癌の治療. 癌と化学療法, 19, 723-725 (1992).
- 35) 橋本琢生, 大村健二, 石田文生, 渡辺洋宇: 進行・再発消化器癌に対する CDDP・5FU (UFT) 併用療法の臨床効果. 癌と化学療法, 20, 1333-1338 (1993).
- 36) 橋本琢生, 大村健二, 石田文生, 川上和之, 松 智彦, 渡辺洋宇: 術前 5FU (UFT)/CDDP 療法にて Stage Reduction が得られた胃癌の 1 例. 癌と化学療法, 19, 2415-2419 (1992).
- 37) 橋本琢生: フッ化ピリミジン系抗がん剤の抗腫瘍効果増強に関する基礎的研究. 十全医会誌, 102, 658-670 (1993).
- 38) Dohden, K., Ohmura, K. & Watanabe, Y.: Ternary complex formation and reduced folate in surgical specimens of human adenocarcinoma tissues. *Cancer*, 71, 471-480 (1993).
- 39) Kubota, T., Fujita, S., Kodaira, S., Yamamoto, T., Josui, K., Arasawa, Y., Suto, A., Ishibiki, K., Abe, O., Mabuchi, K. & Fuse, M.: Antitumor activity of fluoropyrimidines and thymidylate synthetase inhibition. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 476-482 (1991).
- 40) Spears, C. P., Gustavsson, B. G., Berne, M., Frösing, R., Bernstein, L. & Hayes, A. A.: Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 48, 5894-5900 (1988).

Experimental Studies on Antitumor Activity of Imbalanced Amino Acid Solution-A Study Involving Yoshida Sarcoma-Bearing Rats Tomohiko Matsu, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 104, 351—362 (1995)

Key words amino acid imbalance, urea cycle, PALA, arginine, ornithine

Abstract

The antitumor effects of imbalanced amino acid solution have been recognized in experimental tumor models. Special attention has been paid to the fact that the urea cycle and the *de novo* synthesis system of pyrimidine are metabolic pathways using carbamyl phosphate as a common substrate. In the present study, to inhibit pyrimidine synthesis by activating the urea cycle, I prepared the infusion fluid (Kanazawa arginine and ornithine enriched solution number 1, KAO-1) that contains an excessive amount of arginine and is supplemented with ornithine. I evaluated the antitumor effects of the combined use of KAO-1 and N-(phosphonacetyl)-L-aspartate (PALA) that inhibits aspartate transcarbamylase and their effects on the host.

Male Donryu rats inoculated with Yoshida sarcoma were divided into 4 groups administered general amino acid (Group I), KAO-1 (Group II), PALA (Group III), and KAO-1 in combination with PALA (Group IV). Central venous alimentation was performed without restraint for over 8 days. Whole body nitrogen balance was calculated daily. At the end of the experiment, the rats were killed to measure the tumor and carcass weight. Blood was then taken to analyze the plasma amino acid levels, blood and chemical analysis. The urine amino acid volume and amino acid concentration of liver and tumor were analyzed. The histogram of the tumor cell cycle, DNA, RNA and protein content were also analyzed. The cumulative nitrogen balance during the infusion period was positive in all rats and was similar among the 4 groups. The tumor weight among the groups at the end of infusion was compared. Tumor proliferation was significantly inhibited in Groups II and IV compared with Group I ($p < 0.01$) and in Group IV compared with Group II ($p < 0.05$). The body weight of the host was similar among the 4 groups. The red blood cell count, amount of hemoglobin and hematocrit were decreased in Groups II, III and IV compared with Group I ($p < 0.01$). On the contrary, the blood platelet count was increased in Groups II ($p < 0.01$) and IV ($p < 0.05$) compared with Group I. Blood biochemical examination showed significant increases in serum urea nitrogen, and significant decreases in serum uric acid in Groups II and IV ($p < 0.01$) but no findings suggestive of impaired liver or renal function. Plasma free aminograms revealed significant increases in citrulline, ornithine and arginine in Group II compared with Group I (citrulline and ornithine, $p < 0.05$; arginine, $p < 0.01$) and significant increases in citrulline and arginine in Group III (citrulline, $p < 0.05$; arginine, $p < 0.01$) and significant increases in citrulline, ornithine and arginine in Group IV ($p < 0.01$). The urinary amino acid analysis showed a significant increase in the excretion of citrulline, ornithine and arginine in Groups II and IV compared with Group I but significant decreases in the excretion of arginine and citrulline in Group III. The free aminogram of liver in Group II was similar to those in Group I but the amino acids revealed significant increases in all amino acids in Groups III and IV compared with Group I. The free aminogram of tumor revealed significant increases in ornithine in Groups II ($p < 0.05$) and IV ($p < 0.01$) compared with Group I. Analysis of the cell cycle of the tumor cells showed cell accumulation in the S phase in Groups II and IV. Evaluation of the amounts of nuclear DNA, RNA, and protein in the tumor cells revealed a significant decrease in RNA ($p < 0.05$) and a slight decrease in DNA in Groups II and IV. These findings by amino acid analysis suggest that excessively administered arginine and ornithine enter the urea cycle and are smoothly metabolized. In addition, the plasma citrulline level in Group III indicates that PALA effectively inhibits carbamyl phosphate metabolism into pyrimidine. Thus, KAO-1 administration may activate the urea cycle in the tumor-bearing animals, inhibiting tumor proliferation. PALA appears to effectively inhibit aspartate transcarbamylase, while its anti-tumor effects may be increased by the combined use of KAO-1.