

Experimental Studies on the Influence of Amino Acid Imbalance Solutions on Tumor Growth

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/2297/7769

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

金沢大学医学部第一外科学教室 (主任: 岩 喬教授)

大 村 健 二

(昭和60年1月21日受付)

本研究は、癌治療におけるアミノ酸インバランスの意義を追求し、副作用の少ない有用なアミノ酸混合液の開発を目的として行なわれた。まず、腫瘍増殖と宿主の窒素平衡の関係などをしらべる実験では、腹水肝癌 AH 130 を移植した雄性ドングラットに対し、3種のアミノ酸製剤を7日間連続して点滴注入した。実験群として、総合アミノ酸製剤(I)、methionine 及び cystine を含まないアミノ酸製剤(II)、IIに arginine を過量に加えた製剤(III)、生理食塩水(IV)をそれぞれ投与した群に、非輸液群(V)を加えた5群を設定した。またI群~IV群には21.7%濃度のブドウ糖を投与した。輸液期間中、I群では正の窒素平衡を示したが、体重変化はなく、腫瘍重量は増加した。ところが、II群、III群及びIV群では、窒素平衡がすべて負であり、体重も減少し、とくにIV群では著明であった。これらの3群における腫瘍重量は、いずれも減少しており、とくにIII群に著明であった。II群、III群及びIV群では、血清 GOT, GPT, クレアチニン値の上昇は認められなかったが、血清 BUN 値はIII群でわずかに上昇していた。肝の組織学的検索では、わずかに脂肪肝の発生がみられた。次に雄性ドングラットの腹腔内に AH 130 細胞を移植し、6日後にさきの実験と同様のスケジュールで輸液を行った。輸液終了後、各群の腹水癌細胞について³H-thymidine 及び³H-uridine の取り込みを測定した。その結果、II群及びIII群において、これら前駆物質の取り込みがともに抑制されていた。以上の成績から、アミノ酸インバランス輸液は、癌治療における補助療法として有用であると思われる。

Key words amino acid imbalance, total parenteral nutrition, host-tumor relationship.

担癌宿主においては腫瘍の増殖にともなって様々な代謝障害や代謝変動がおこっている。腫瘍が存在することによって起る消化管通過障害や、体液・血液喪失に起因する低栄養状態など、発生機序が解明されているものもあるが、腫瘍が産生する未知の有毒物質によるのではないかと推測される代謝障害もみられている。生体内の蛋白代謝はその1つであり、腫瘍が一定の大きさに増殖すると、転移巣が認められない臓器においても自己蛋白の異化作用が起り、担癌宿主の窒素平衡は負となってくる¹⁾。このような蛋白代謝障害は、栄養物の経口摂取が低下することとあまって重篤な低栄養状態を惹起し、個々の正常臓器機能を低下

させることになる。さらに、このような状態では、細胞性免疫能の低下をきたすことも報告されており²⁾⁻⁴⁾、これが腫瘍の増殖を助長するという悪循環を生ずる結果となる。従って、悪性腫瘍の治療を行う際には、腫瘍主体的に傾いている代謝の流れを、宿主主体的のものに変える必要がある。

Elvehjem⁵⁾は、生体に投与する蛋白に、特定のアミノ酸を少量添加することによって、制限アミノ酸の不足を助長し、そのために発育障害が生ずることを報告し、これをアミノ酸インバランスと命名した。アミノ酸インバランスは、その後蛋白代謝のみならず核酸代謝にも影響することが報告され⁶⁾、悪性腫瘍治療への応用

Abbreviations: Arg, arginine; BUN blood urea nitrogen; Cr, creatinine; DNA, deoxyribonucleic acid; 5-FU, 5-fluorouracil; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine;

が試みられたが、現在までのところ、実用的手段を開発するまでには至っていない。

今回、著者は経静脈的にアミノ酸を投与することによって、確実にアミノ酸インバランスを惹起できるものと考え、独自に新組成のアミノ酸インバランス輸液 KKM-1 及び KKM-2 を調整し、投与アミノ酸の組成を変化させた場合にみられる宿主ならびに腫瘍に及ぼす影響を動物実験モデルにおいて検討した。

材料および方法

I. 実験材料

1. 実験動物

全実験を通じ、約6週齢の雄性ドリュウラット(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型飼料(Charles River社製)及び水道水を自由経口摂取せしめた。

2. 腫瘍

ドリュウラット由来のラット腹水肝癌AH-130は金沢大学がん研究所より分与をうけた。AH-130細胞は同系ラット腹腔内に移植、継代し、移植10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質液としてパレメンタール®A及びB(大五栄養, グルコース濃度32.5 W/V%)を、また総合アミノ酸製剤としてFAO/WHO基準⁹⁾にもとづく市販のアミノ酸輸液モリブロン®を使用した。さらにアミノ酸インバランス輸液としてKKM-1及びKKM-2を使用した。モリブロン®, KKM-1及びKKM-2のアミノ酸組成は表1に一括表示した。KKM-1ではモリブロン®の組成から含流アミノ酸methionine (Met), cystine (Cys)を除き、他のアミノ酸を等モル比率で増量し、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。また、KKM-2ではKKM-1と同様、Met及びCysを含まないうえに全アミノ酸の50%をarginine (Arg)で置換し、残り50%はモリブロン®中に含まれるMet, Cys及びArg以外のアミノ酸の比率の約1/2に調整してある。

4. 輸液シンテム

ラットに対し無拘束下に輸液を行うための装置としてBio-Cannula®(バイオ・メディカ社製)を使用した。また、輸液の注入には、電動輸液ポンプ(マイボンB型®, バイオ・メディカ社製)を使用した。

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

	Moripron	KKM-1	KKM-2
Ile	0.560	0.585	0.320
Ieu	1.250	1.310	0.720
Lys	1.100	1.155	0.635
Met	0.350	—	—
Phe	0.935	0.980	0.540
Thr	0.650	0.680	0.375
Trp	0.135	0.135	0.075
Val	0.450	0.470	0.260
His	0.811	0.850	0.465
Cys	0.145	—	—
Tyr	0.035	0.035	0.020
Ala	0.620	0.650	0.357
Arg	0.955	1.000	5.300
Asp	0.380	0.400	0.220
Glu	0.650	0.680	0.375
Gly	1.070	1.120	0.615
Pro	0.330	0.345	0.190
Ser	0.220	0.230	0.125
Total	10.641	10.625	10.610

(M/V%)

II. 実験方法

1. 癌細胞浮遊液の調整

AH-130移植ラットから採取した癌性腹水を、燐酸緩衝液, pH 7.4 (PBS) にて約5倍に希釈し、トリパン・ブルー (0.2%, Merck) 排除試験法により生細胞数をカウント後、生細胞数 1×10^8 個/ml となるようにPBSにて希釈し、癌細胞浮遊液を調整した。

2. 実験1: アミノ酸インバランスの誘導と検査事項

1) 実験群の設定

担癌ラットは各群6匹宛とし、次の5群に分けた。

I群(対照群), 総合アミノ酸製剤(モリブロン®)投与群

II群, KKM-1投与群

III群, KKM-2投与群

IV群, 生理食塩水投与群

V群, 固型飼料の経口自由摂取群

I~IV群の高張グルコース液投与量は、遠藤ら¹⁰⁾の方法に準じ、160 ml/kg/day (グルコース 50 g/kg/

Met, methionine; NPC, non-protein calories; PBS, phosphate buffered saline; Phe, phenylalanine; RNA, ribonucleic acid; TdR, thymidine; Thr, threonine; TPN, total parenteral nutrition; Trp, tryptophane; Tyr, tyrosine; UR, uridine; Val, valine.

Table 2. Ingredients of nutritional regimens

	Group I	Group II	Group III	Group IV
	(per kg/day)	(per kg/day)	(per kg/day)	(per kg/day)
Glucose	50 g	50 g	50 g	50 g
Electrolytes				
Sodium	17.6 mEq	17.0 mEq	13.6 mEq	20.8 mEq
Potassium	6.0 mEq	6.0 mEq	6.0 mEq	6.0 mEq
Calcium	1.6 mEq	1.6 mEq	1.6 mEq	1.6 mEq
Magnesium	1.2 mEq	1.2 mEq	1.2 mEq	1.2 mEq
Chloride	15.3 mEq	14.5 mEq	26.2 mEq	15.4 mEq
Acetate	10.0 mEq	10.0 mEq	10.0 mEq	10.0 mEq
Phosphate	1.6 mEq	1.6 mEq	1.6 mEq	1.6 mEq
Gluconate	1.6 mEq	1.6 mEq	1.6 mEq	1.6 mEq
Sulfate	1.2 mEq	1.2 mEq	1.2 mEq	1.2 mEq
Amino acids				
Essential	3.8 g	3.7 g	2.0 g	—
Non-essential	3.6 g	3.7 g	5.4 g	—
E/N ratio*	1.04	1.00	0.37	—
NPC/N ratio**	168	168	168	—

mEq, Milliequivalent; *, Ratio of essential/non-essential amino acids; **, Ratio of non-protein calories/nitrogen.

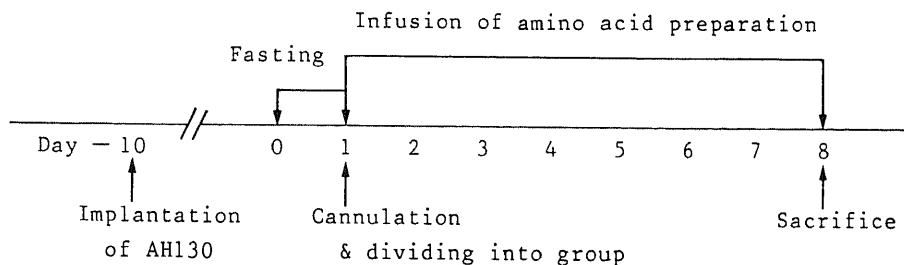


Fig. 1. Protocol of experimental procedure.

day, 200 kcal/kg/day)とした。また、I～III群のアミノ酸製剤投与量は70 ml/kg/day(アミノ酸7.4 g/kg/day, 窒素1.19 g/kg/day)とした。I～III群の非蛋白カロリー/窒素比(NPC/N ratio)は約168である。なお、IV群には70 ml/kg/dayの生理食塩水を投与した。各群の輸液の組成は表2に示した。

2) 実験計画

30匹のドンリュウラットの側腹壁皮下に前記癌細胞浮遊液0.1 ml(生細胞数 1×10^7 個)を接種した。10～12日後、腫瘍径が約20 mmに達した時点で24時間絶食させ、次いでNembutal®(pentobarbital-Na)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、右頸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日間輸液の持続点滴を行った(図1)。

3) 測定事項

i) 体重及び腫瘍重量

点滴開始直前と、7日間の点滴終了後の2回体重を計測し、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、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、次式によって算出した。

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

腫瘍重量の変化は、点滴前後の腫瘍重量の増減を、点滴前値に対する百分率で表した。

ii) 窒素平衡値

点滴期間中に排泄された尿は、トルエン0.1 mlを滴下したフラスコに採取し、毎日Kjeldahl法にて尿中総

窒素量を測定、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、点滴開始24時間前からの絶食のため、点滴期間中の糞便排泄量はきわめて少量であったので、糞便中の窒素量は無視することとした。

iii) 血液生化学検査

7日間の点滴終了後、Nembutal®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し、以下の項目について測定した。

a. 血漿アミノ酸

アミノ酸自動分析機(JLC-200 A, 日本電子)によって、9種のアミノ酸、すなわち valine (Val), Met, isoleucine (Ile), leucine (Leu), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), lysine (Lys), histidine (His), Arg を定量した。

b. 血清 GOT 及び GPT

血清 GOT 及び GPT は SSCC 準拠法で測定した。

c. 血清尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN)

血清 BUN は Urease UV 法によって測定した。

d. 血清クレアチニン (creatinine, Cr)

血清 Cr は安田反応法によって測定した。

4) 病理組織学的検査

実験終了後のラットは脱血屠殺後、肝を摘出しホルマリン固定した。固定後、切片標本を作製し、H-E 染色、PAS 染色、ジアスターゼ処理 PAS 染色およびズダン-III 染色を施行したものについて、肝細胞内の脂肪沈着及びグリコーゲン量などを観察した。

3. 実験2: アミノ酸インバランス輸液投与後のラット腹水癌細胞における³H-thymidine (³H-TdR) 及び³H-uridine (³H-UR) の取り込み

1) 実験群の設定

実験1におけると同様、I群は総合アミノ酸製剤を、II群はKKM-1を、III群はKKM-2を、IV群は食塩水をそれぞれ投与する群に分け、各群3匹宛とした。

2) 実験計画

12匹のドンリユーラットの腹腔内に前記癌細胞浮遊液 0.1 ml (生細胞数 1×10^7 個) を接種した。5日後から24時間の絶食を行い、実験1と同様の方法で上大静脈にカニューレーションを施し、無拘束下に7日間輸液の持続点滴を行った。

3) ³H-TdR 及び³H-UR の取り込み

点滴終了時にラットの腹腔内から癌性腹水約 1 ml を採取し、ただちに 10 ml の赤血球除去用トリス緩衝液 (pH 7.65) と混和、室温に 5 分間放置後、1500 rpm, 10 分間遠心した。細胞は MEM 培地 (日水製薬) で 1 回洗浄後、80 メッシュのステンレス網で濾過し、さらにもう 1 回 MEM 培地で洗浄した。洗浄癌細胞は 5 %

仔牛血清加 MEM 培地に浮遊せしめ、 1×10^6 個/ml の癌細胞浮遊液を調製した。1 検体につき 6 本のゴム栓付小試験管を用意し、それぞれに上記癌細胞浮遊液を 1 ml 宛分注し、その 3 体には methyl-³H-TdR (日本アイソトープ協会) 1 μ Ci を、残り 3 本には 6-³H-UR (日本アイソトープ協会) 1 μ Ci をそれぞれ添加した。37°C, 60 分間のインキュベーション後、ただちに氷冷し、グラスフィルター (ϕ 24 mm, Whatman 社製) で細胞を濾集した。フィルター上の細胞は、生食水で 2 回、5 % トリクロール酢酸で 2 回、エタノール・エーテル混和液 (4 : 1) で 2 回洗浄後、風乾した。グラスフィルターは、風乾後 10 ml のトルエン・シンチレーター (ACS II, Amersham 社製) を含むバイアル瓶に入れ、液体シンチレーションカウンター (LSC-700, アロカ社製) により放射活性を測定した。

なお、全実験を通じ、測定値の有意差検定は、Cochran-cox の t 検定法によった。

成 績

種々のアミノ酸輸液を点滴注入した AH 130 担癌ラットにおける、1) 宿主体重及び腫瘍重量の変化、2) 窒素平衡の増減、3) 血液の生化学的変化等について検討した。

I. 体重及び腫瘍重量の変化

7日間点滴後の宿主の体重変化は、点滴前に比較し、I群が $-0.95 \pm 4.25\%$ (mean \pm S.D., 以下同様)、II

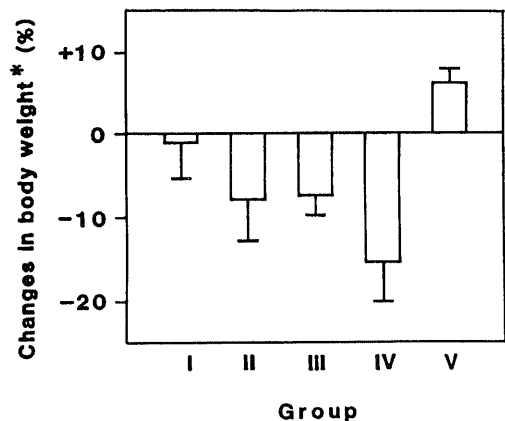


Fig. 2. Changes in body weight. The changes in body weight were defined by the formula of:

$$\frac{(Tb - Cb)}{Cb} \times 100$$

(Tb, body weight before sacrifice; Cb, body weight before cannulation). *, Mean \pm S.D. Group I vs. group III and group III vs. group IV, $p < 0.05$; group I vs. group IV, $p < 0.01$.

群が $-7.90 \pm 5.01\%$, III群が $-7.30 \pm 2.29\%$, IV群が $-15.40 \pm 4.56\%$, V群が $+6.20 \pm 1.64\%$ であり, I群とIII群間 ($p < 0.05$), I群とIV群間 ($p < 0.01$), またIII群とIV群間 ($p < 0.05$) にそれぞれ明らかに有意差が認められた (図2). 一方, 腫瘍重量の変化については, I群が $+23.83 \pm 60.06\%$ (mean \pm S. D., 以下同様), II群が $-29.00 \pm 43.90\%$, III群が $-38.50 \pm 27.29\%$, IV群が $-22.00 \pm 55.15\%$, V群が $+92.33 \pm 135.15\%$ であり, 統計学上各群間に有意差が認められないものの, II群, III群, 及びIV群では明らかに腫瘍重量の減少が認められ, とくにII群及びIII群のアミノ酸インバランス輸液群に著明であった (図3).

II. 窒素平衡の変動

各群ラットの点滴期間中における窒素平衡は, 図4に示した. I群では点滴期間中絡始正の値を示したが, II群では, 点滴期間の後半に至ってわずかに正の窒素平衡を示したものの, 前半では著明に負の平衡を示した. またIII群及びIV群では, 点滴期間中終始負の平衡を示した. 累積窒素平衡 (7日間) についてみると, I群が $+2.24 \pm 0.72$ (g nitrogen/kg, mean \pm S. D., 以下同様), II群が -0.66 ± 1.21 , III群が -1.83 ± 0.48 , IV群が -2.80 ± 0.60 であり, I群とII群間 ($p < 0.01$),

I群とIII群間 ($p < 0.001$), I群とIV群間 ($p < 0.001$) にそれぞれ有意差が認められた. さらに, II群またはIII群とIV群間にも, それぞれ有意差 ($p < 0.05$) を認め

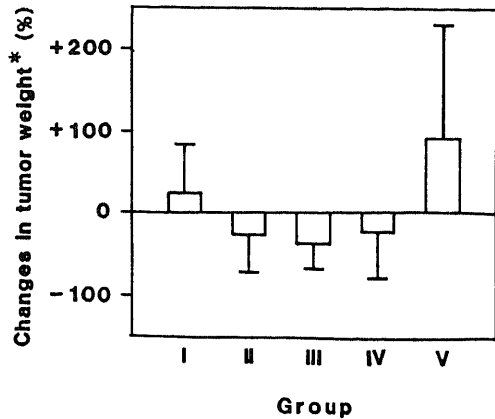


Fig. 3. Changes in tumor weight. The changes in tumor weight were defined by the formula of:

$$\frac{(T_t - C_t)}{C_t} \times 100$$

(T_t , tumor weight before sacrifice; C_t , tumor weight before cannulation). *, Mean \pm S. D.

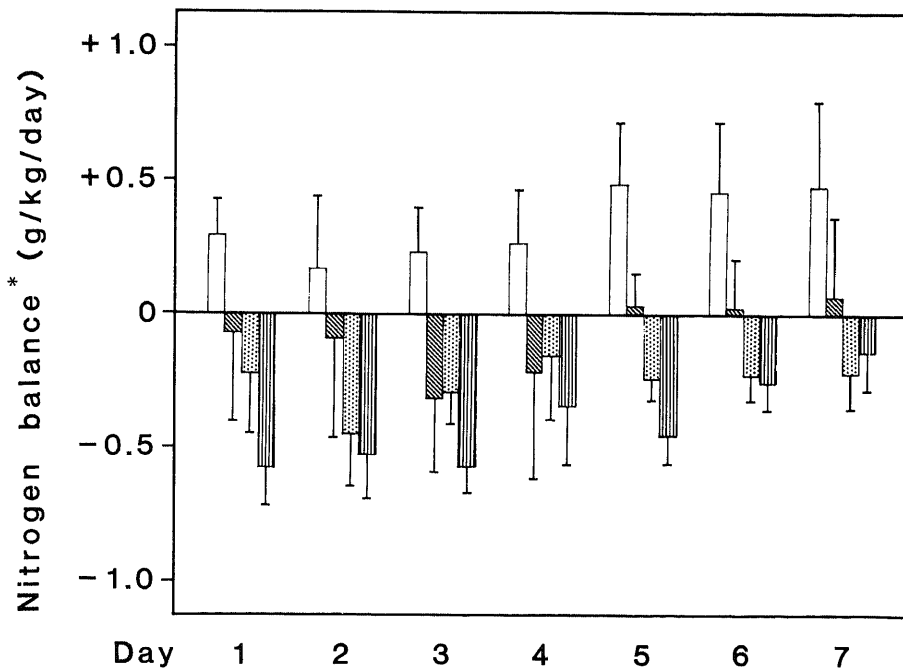


Fig. 4. Nitrogen balance in rats of 4 experimental groups during 7 days of infusion. □, group I; ▨, group II; ▩, group III; ▪, group IV. Nitrogen balance was defined by the formula of: Nitrogen administrated - nitrogen excreted in urine. *, Mean \pm S. D.

た (図5).

III. 血液生化学検査値の変動

1. 血漿アミノ酸

各群ラットにおける血漿中のアミノ酸濃度は表3に示した。血漿 Val 値は、I 群が 126.8 ± 46.4 (nmol/ml, mean \pm S. D., 以下同様), II 群が 204.6 ± 35.5 , III 群が 159.7 ± 28.3 , IV 群が 133.9 ± 35.6 , V 群が 193.0 ± 36.8 であり, II 群では I 群と比較し有意に上昇 ($p < 0.05$) が認められた。血漿 Met については, I 群が 48.2 ± 6.6 , II 群が 23.0 ± 4.1 , III 群が 20.5 ± 10.2 , IV 群が 39.9 ± 7.1 , V 群が 49.5 ± 8.4 であり, アミノ酸インバ

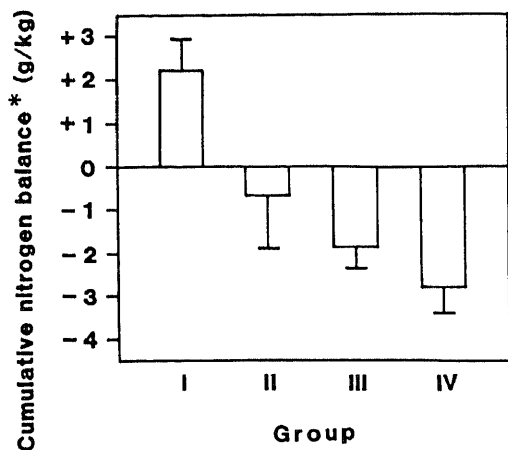


Fig. 5. Cumulative nitrogen balance in rats of 4 experimental groups after a 7-day infusion. Cumulative nitrogen balance was defined by the formula of: Total nitrogen administrated - total nitrogen excreted in urine. *, Mean \pm S. D. Group I vs. group II, $p < 0.01$; group I vs. group III and group I vs. group IV, $p < 0.001$; group II vs. group IV and group III vs. group IV, $p < 0.05$; group II vs. group III, NS.

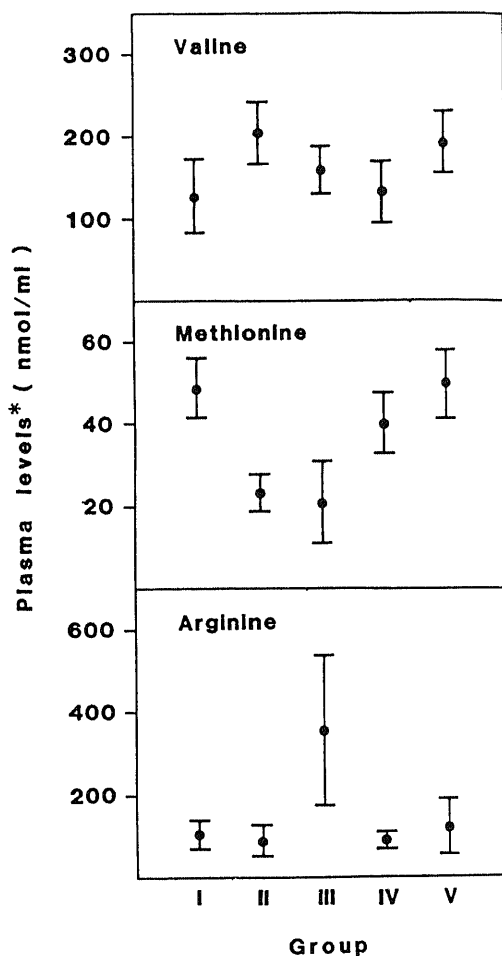


Fig. 6. Some amino acid levels in plasma from rats of 5 experimental groups. *, Mean \pm S. D. Valine: group I vs. group II, $p < 0.05$. Methionine: group I vs. group II and group I vs. group III, $p < 0.01$. Arginine: group I vs. group III, $p < 0.05$.

Table 3. Amino acid levels in plasma from rats of 5 experimental groups

	Concentration of amino acid (nmol/ml, mean \pm S. D.)				
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V
Val	126.8 ± 46.4	$204.6 \pm 35.5^*$	159.7 ± 28.3	133.9 ± 35.6	$193.0 \pm 36.8^*$
Met	48.2 ± 6.6	$23.0 \pm 4.1^{**}$	$20.5 \pm 10.2^{**}$	39.9 ± 7.1	49.5 ± 8.4
Ile	63.4 ± 19.8	91.7 ± 18.8	82.8 ± 15.9	58.2 ± 20.4	79.4 ± 14.2
Leu	133.0 ± 40.2	184.8 ± 28.1	166.2 ± 22.6	114.7 ± 36.9	142.3 ± 23.3
Tyr	67.4 ± 17.5	76.6 ± 10.5	46.3 ± 12.4	69.9 ± 16.1	74.1 ± 8.7
Phe	81.3 ± 23.0	76.3 ± 10.3	77.7 ± 18.1	74.1 ± 24.1	66.9 ± 6.7
Lys	369.5 ± 85.5	333.0 ± 130.4	310.8 ± 57.7	404.1 ± 103.5	377.1 ± 55.7
His	76.5 ± 12.8	68.5 ± 8.1	82.0 ± 12.3	77.4 ± 12.1	77.1 ± 10.2
Arg	106.4 ± 32.7	87.3 ± 33.2	$354.4 \pm 176.8^*$	89.2 ± 11.4	122.1 ± 66.8

* and **: Significantly different from group I (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

ランス輸液を投与したII群及びIII群のMet値は、他群と比較して有意に低値 ($p < 0.01$) であった。一方、血漿Arg値については、I群が 106.4 ± 32.7 , II群が 87.3 ± 33.2 , III群が 354.4 ± 176.8 , IV群が 89.2 ± 11.4 , V群が 121.1 ± 66.8 であり、III群に有意の上昇 ($p < 0.05$) が認められた (図6)。

2. 血清 GOT 及び GPT 値

II群, III群及びIV群のラットの血清 GOT 及び GPT 値は、健常ラットの GOT, GPT 値以下であり、とくに GPT 値についてはむしろ低下していた (図7)。

3. 血清 BUN 及び Cr 値

アミノ酸インバランス輸液投与ラットにおける血清 BUN 値及び Cr 値は、健常ラットの BUN 値及び Cr 値と対比して、図8に示した。II群及びIV群は、BUN 値, Cr 値はすべて正常値以下であり、とくにIV群の BUN 値は低下していた。一方、III群では BUN が6例

中5例で正常値を超えていたが、Cr 値については正常値の範囲内であった。

IV. ラット肝の病理組織学的検索

I群ラットでは肝細胞内にほとんど脂肪滴を認めなかった。II群では、中等度の脂肪変性が認められ、脂肪滴の沈着は汎小葉性であった。III群ラットの肝には、高度の脂肪変性が認められ、とくに小葉中心に強度であった。またIV群でも小葉中間領域～小葉辺縁に脂肪滴の沈着がみられたが、その程度はII群及びIII群に比し軽度であった(写真1)。一方、肝内グリコーゲン量は、IV群でやや減少しているものの、他3群ではすべて正常範囲内であった。

V. アミノ酸インバランス輸液を投与した担癌ラットの腹水腫瘍細胞における ^3H -TdR 及び ^3H -URの取り込み

腫瘍細胞 1×10^6 個あたりの ^3H -TdR の取り込み

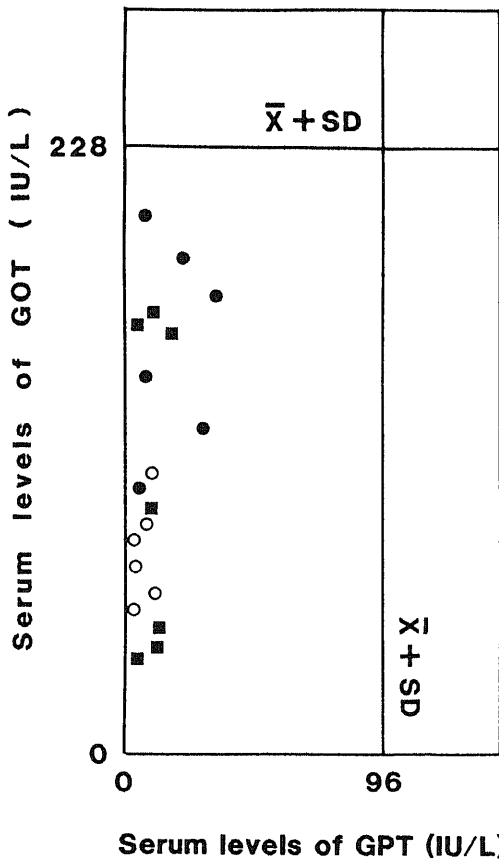


Fig. 7. Serum levels of GOT and GPT after a 7-day infusion. $\bar{X} + S. D.$, mean value + S. D. from 6 healthy rats. ■, group II; ●, group III; ○, group IV.

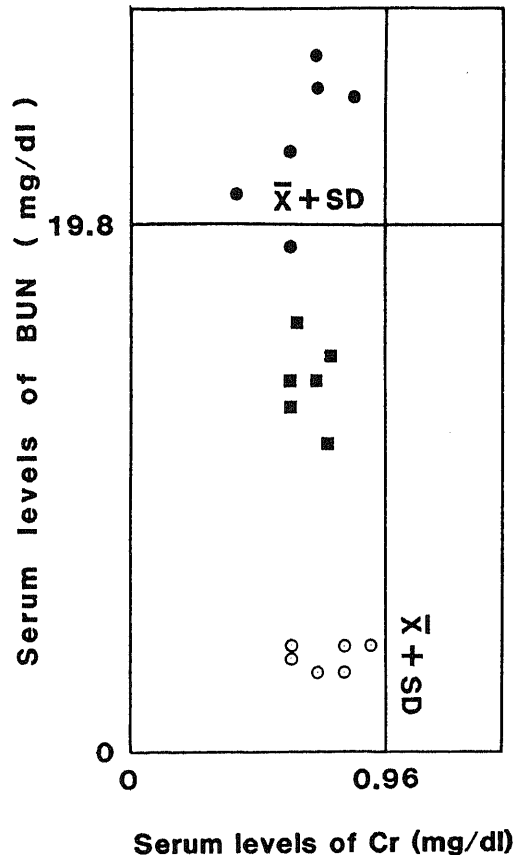


Fig. 8. Serum levels of BUN and creatinine after a 7-days infusion. $\bar{X} + S. D.$, mean value + S. D. from 6 healthy rats. ■, group II; ●, group III; ○, group IV.

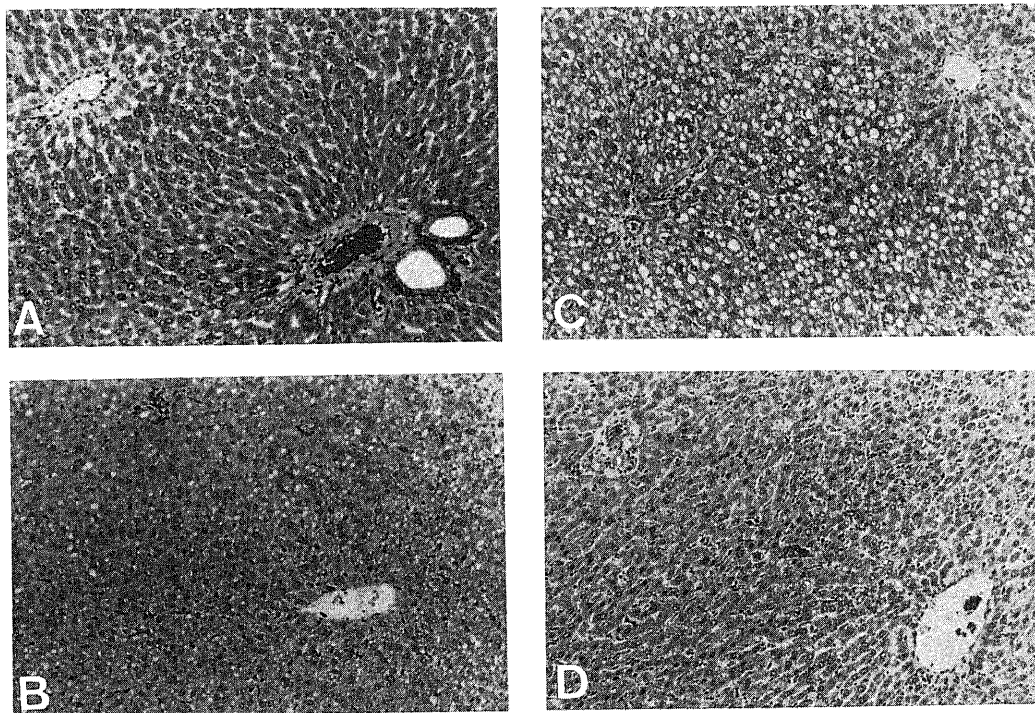


Photo 1. Light micrograph of the liver. A (group I), Few lipid is deposited in hepatic cells; B (group II), Considerable amount of lipid is deposited in hepatic cells panlobularly; C (group III), Marked accumulation of lipid in hepatic cells can be observed. Globules of lipid exists panlobularly but mainly in the center of the lobules; D (group IV), Small amount of lipid is deposited in hepatic cells nearer the peripheries of the lobules. (H-E, $\times 50$)

は、I群が $43,300 \pm 8,877$ (dpm, mean \pm S.D., 以下同様), II群が $29,925 \pm 2,292$, III群が $25,679 \pm 1,599$, IV群が $44,479 \pm 17,235$ であった。II~IV群の値を、I群の平均値に対する百分率で表わすと、II群が $69 \pm 5\%$ (mean \pm S.D., 以下同じ), III群が $59 \pm 4\%$, IV群が $103 \pm 16\%$ となり、IV群では I群とほぼ同程度であったが、II群及びIII群では、取り込みが有意に低下していた ($p < 0.05$)。一方、 ^3H -UR の取り込みについては、I群が $50,800 \pm 8,790$ (dpm, mean \pm S.D., 以下同様), II群が $26,612 \pm 8,804$, III群が $35,505 \pm 2,144$, IV群が $41,779 \pm 6,993$ であり、また同様に I群の平均値に対する他群の値の百分率は、II群が $52 \pm 17\%$ (mean \pm S.D., 以下同様), III群が $70 \pm 4\%$, IV群が $82 \pm 14\%$ であった。II群及びIII群の ^3H -UR 取り込みも I群と比較して低下していたが、統計学上の有意差は認められなかった (図 9)。

考 察

悪性腫瘍細胞の物質代謝は、正常細胞と異なること

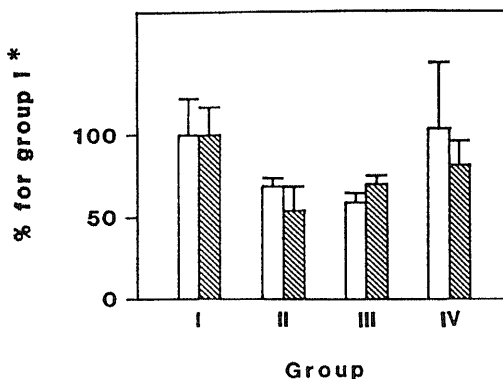


Fig. 9. Profiles of incorporation of ^3H -thymidine or ^3H -uridine into AH-130 ascites cells from rats of 4 experimental groups. \square , ^3H -thymidine; ▨ , ^3H -uridine. *, Mean \pm S.D. ^3H -Thymidine: group I vs. group II and group I vs. group III, $p < 0.05$.

が知られている²¹³⁾。とくに、アミノ酸代謝及び核酸代謝における両者の差異は著明である¹⁴⁾。一方、生体の蛋白代謝を阻害するアミノ酸配合としてアミノ酸インバランスが知られている⁷¹⁾⁵⁾。Allanら¹⁶⁾、Harry¹⁷⁾及びLorinczら¹⁸⁾¹⁹⁾は経口栄養でアミノ酸インバランス状態を惹起し、末期癌患者に延命効果を認めたと報告しているが、アミノ酸インバランス療法は、今なお悪性腫瘍に対する安定した治療法として確立されるには至っていない。本研究では、アミノ酸インバランスについての先人の考察を踏まえ、独自に新しいインバランス輸液を調整し、実験モデルにおいてその有効性を検討した。

新製剤 KKM-1 及び KKM-2 はともに含流アミノ酸を全く含んでいない。Kushnerら²⁰⁾によれば、ヒト大腸の高分化型腺癌では、正常の大腸粘膜と比較して Met-tRNA synthetase 活性が4倍に上昇しており、Met は癌組織では要求性の高いアミノ酸と推測される。Cys については Igrehartら²¹⁾がある種の白血病細胞は Cys-の変異体であると報告しているが、Cys もまた Met と同様、癌組織では要求性の高いアミノ酸である可能性が高い。そこでこの2つのアミノ酸が欠如したアミノ酸輸液製剤によって腫瘍の蛋白代謝を抑制しようと試みたわけである。小野寺ら²²⁾は胃癌6例、直腸癌2例に対し、術前に含流アミノ酸 Met 及び Cys を除いた輸液を唯一の窒素源として栄養管理を行い、同時に 5-FU、マイトマイシン C を併用して、胃癌2例の切除標本に、癌細胞の壊死、変性の所見がえられたと報告している。さらに Arg による尿素回路の賦活化を期待して、KKM-2 には大量の Arg (5.3 W/V%) が添加されている。尿素回路と pyrimidine の de novo 合成系は carbamyl phosphate を共通の基質としており、生体内の carbamyl phosphate の生成量が一定であると仮定すると、一方の系の賦活は、自動的に他方の系を抑制することになると考えたのである。中西⁹⁾は8%カゼイン飼料に種々のアミノ酸を加えて担癌ラットを飼育し、Arg, ornithine (Orn), citrulline (Cit), asparagine (Asn) など尿素回路に関与するアミノ酸に腫瘍増殖抑制効果を認めると報告している。また、Weisburgerら²³⁾は、ラット肝に対する acetamide の発癌性が acetamide と等モル Arg の同時投与によって完全に抑制しうることを報告しているが、この場合の Arg もまた尿素回路を賦活して acetamide による発癌を抑制したと考えられる。

7日間の輸液期間中、総合アミノ酸製剤を投与した I 群は、常に正の窒素平衡を示したが、宿主の体重変化では、平均-0.95%と減少していた。すなわち、担癌宿主内に増加した窒素はほとんど腫瘍内に蓄積した

ものと思われる。一方、KKM-1 を投与した II 群の窒素平衡は、点滴開始4日目まで負の窒素平衡を示し、以後はほぼゼロであった。II 群の平均腫瘍重量は 29%減少しているが、宿主体重もこれに対応して 7.9%の減少がみられた。KKM-2 を投与した III 群では、窒素平衡は終始負の値を示し、腫瘍重量は 38%、宿主体重は 7.3%それぞれ減少していた。III 群の窒素平衡が大きく負であるのに、体重減少が少ない理由の1つには、肝などへの脂肪の蓄積も関与していると思われるが、宿主の体重減少がわずかで、腫瘍増殖抑制効果が大であったことは、アミノ酸インバランス療法の本来の目的にかなったものといえよう。IV 群、すなわちアミノ酸非投与群の窒素平衡は当然ながら終始負であり、宿主体重の減少も大で、15.4%であった。腫瘍重量は 22%減少したが、腫瘍増殖抑制効果が II 群及び III 群に比較して小さいのに対して、宿主の体重減少は大であり、宿主に及ぼす低栄養の影響が重篤すぎるものと思われる。アミノ酸非投与群でも腫瘍増殖抑制効果が僅かながら認められたことについては、1) 蛋白合成の基質としてのアミノ酸を投与しなかったために、腫瘍に対するアミノ酸供給も減少したこと、2) 本実験モデルでは、腫瘍が宿主の蛋白を異化し、無制限に取り込む段階には至っていなかったこと、などが考えられる。

血漿アミノ酸分析では II 群及び III 群で Met の有意な低下が認められたが、Met 非投与群の IV 群では、血漿 Met は、I 群と比較してわずかに低下しているに過ぎなかった。II 群及び III 群では、Met 以外のアミノ酸を投与したため、恐らく体内の遊離 Met が蛋白合成に消費され、低値を示したと思われる。一般に、特定のアミノ酸の欠乏状態を惹起するためには、そのアミノ酸の投与を制限するだけでは不十分であり、目的とするアミノ酸以外のアミノ酸を至適比率で組み合わせて投与することも必要であろうと思われる。

一方、II 群及び III 群では、腫瘍細胞内への ³H-TdR, ³H-UR の取り込みも減少しており、DNA 合成の低下が示唆された。これに対し、IV 群では、取り込みの低下を認めなかったことから、II 群及び III 群における前駆物質の取り込み減少は、単に蛋白合成のアミノ酸の欠乏によって細胞分裂が抑制されたのではなく、DNA 合成そのものが抑制されたためと思われる。

血液生化学検査で、血清 GOT 及び GPT の異常変動は認められず、肝機能障害の発生は否定的であった。一方、血清 BUN 及び Cr は特徴的な動態を示した。すなわち Cr は II 群、III 群、IV 群ともに正常範囲内であったのに対し、BUN では III 群の BUN 値が健常ラットのそれを上まわっており、IV 群では健常ラットの

BUN 値より低く示された。また、II群の BUN 値は健康ラットのそれとほぼ同等の範囲内にあった。III群で BUN 値が高いのは、Cr 値が正常であることより、Arg 大量投与による尿素回路賦活化のため、尿素産生が亢進したものとみなされる。さらに、IV群にみられた BUN の低値は、窒素源投与制限による尿素産生抑制のためと思われる。

このように KKM-2 投与群では、Arg 大量投与により、意図した如く尿素回路が賦活化されていると推測されるが、KKM-1 投与群との間に腫瘍増殖抑制効果の差を認めていない。Ikenaka ら¹⁴⁾によれば、本実験に用いた AH 130 細胞では、pyrimidine 合成系のうち de novo 合成系が優位であり salvage 経路の律速酵素活性は低い。従って、尿素回路を賦活化しても de novo 合成系は抑制されにくく、AH 130 腫瘍の増殖に及ぼす影響が少ないと思われる。

肝の病理組織学的検索では、II群、III群及びIV群に脂肪肝の発生がみられた。その程度はIII群で最も高度であり、次いでII群、IV群の順であった。これまでに threonine (Thr), Lys の制限や、choline 欠乏によって脂肪肝が発生することが報告されており^{24)~26)}、アミノ酸インバランスによる脂肪肝の発生は、熱源の投与量が過分である場合にみられるとされている。これに対し、choline 欠乏に起因する脂肪肝は、カロリー制限を行っても防止することはできず²⁷⁾、発生機序が異なるものと思われる。Yoshida ら²⁸⁾は、ラットを使用した実験で、9%カゼイン飼料に0.3%の Met を添加し、Thr 欠乏のインバランス状態にした群と、これに Thr を加えた群にそれぞれ $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate を投与し、脂肪肝及び体脂肪への取り込みを測定したところ、Thr 欠乏群では肝脂肪、体脂肪への取り込みがいずれも大であった。ところが $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitate を投与して呼気中へ排泄される $^{14}\text{CO}_2$ を測定しても両群の間に差はないことを認めている。これらの結果から、彼らは投与カロリーに比較して、相対的にアミノ酸利用が低下している場合に、投与カロリーの余剰分が肝脂肪の形で蓄積するものと考えた。しかし、著者の実験では、アミノ酸非投与群のIV群で、II群及びIII群に比し、明らかに脂肪の沈着量が少なく、アミノ酸インバランス状態で発生する脂肪肝は、アミノ酸利用の低下だけでは説明できないようである。Singal ら²⁹⁾の実験でも、アミノ酸を著しく欠乏させた状態では肝への脂肪蓄積は認められていない。恐らく余剰のアミノ酸が分解、排泄される過程で脂肪が産生され、体内に蓄積するのであると思われる。GOT 及び GPT 値の異常は認められないものの、脂肪肝という病的状態を誘発する可能性があることからみて、アミノ酸インバランス療法の副

作用として肝毒性が今後の問題点として取り上げられるであろう。そして、脂肪肝の発生を防止するため、脂肪乳剤投与も含めて輸液組成の改良が必要となろう。

ところで悪性腫瘍患者には、低栄養に起因すると思われる免疫機能の低下がしばしばみられ、TPN がかかる免疫不全状態を改善するという報告が多い^{30)~6)}。Barbul ら²⁹⁾はラットに Arg を大量投与する実験モデルにおいて、Arg 大量投与群の体重増加や累積窒素平衡は、通常組成のアミノ酸輸液群のそれらと大差なく、むしろ前者では細胞性免疫能の上昇が認められることを報告している。アミノ酸インバランス、とくにアルギニンインバランスは、少なくとも生体防御機能の維持・改善の観点からも、生体に不利な状態をひきおこすものではないと考えられる。Dudrick ら³⁰⁾は化学療法と TPN を併用することで、腫瘍の増殖を助長することはなく、癌治療の合併症、致死率を抑えられると報告した。今後、化学療法、免疫療法や放射線療法に加えて TPN を併用する、いわゆる集学的治療法の機会はますます増加するものと思われる。ところが、化学療法に TPN を併用しても宿主機能が改善されない症例がしばしばみられる。かかる症例では、担癌宿主自体の物質代謝は、腫瘍の増殖動態いかにによって左右されていると思われる。担癌宿主の窒素平衡が正である間は腫瘍発育は緩徐であるが、負になると腫瘍は急速に増大すること³¹⁾や、癌患者に同じ組成の TPN を行っても、予後が良好、不良の2群に分別され、生存群では総リンパ球数が有意に上昇すること³²⁾がいられている。とにかく、悪性腫瘍の集学的治療を行う際には、腫瘍中心になりつつある物質代謝を宿主中心にする対策が必要であろう。川浦ら³³⁾及び金子ら³⁴⁾は Phe, Cys 及び Trp を欠如し、Arg を増量せしめた輸液を投与することによって、末期癌患者に特有な血漿アミノ酸の濃縮状態が改善し、血漿アミノグラムも正常人の値に近づくとも報告している。アミノ酸インバランス療法は、腫瘍中心の代謝の流れを変え、宿主の栄養状態を良好に保ちながら、抗癌療法の効果増強をはかる手段として大いに期待できるものと思われる。

結 論

腹水肝癌 AH 130 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及び新たに調整したアミノ酸インバランス輸液 (KKM-1, KKM-2) の一定量を点滴注入し、輸液のアミノ酸組成が、宿主機能及び腫瘍増殖に及ぼす影響について検討した。得られた成績は次のごとくである。

1. アミノ酸インバランス輸液投与群では、投与後の宿主体重に約7%の減少が認められ、累積窒素平衡

も負の値を示した。

2. 局所腫瘍重量は、総合アミノ酸製剤投与群で増加したが、アミノ酸インバランス輸液投与群では明らかに減少していた。

3. KKM-1 投与群の血漿アミノ酸分析では、総合アミノ酸製剤投与群に比し、Met に有意の低値 ($p < 0.01$) が認められ、また KKM-2 投与群では、同じく Met に有意の低値 ($p < 0.01$) と Arg に有意の高値 ($p < 0.05$) が認められた。

4. アミノ酸インバランス輸液群で、腫瘍細胞への³H-TdR 及び³H-UR の取り込みは、それぞれ減少していた。

5. いずれの実験群にも血清 GOT 及び GPT の異常変動は認められなかった。

6. また、血清 creatinine にも異常変動は認められなかった。BUN については KKM-2 投与群で高値を示した。

7. アミノ酸インバランス輸液群では、肝脂肪の蓄積傾向がみられ、とくに KKM-2 投与群に著明であった。

以上の成績から、悪性腫瘍に対するアミノ酸インバランス療法は、若干副作用面で考慮すべき点はあるが、少くとも集学的治療の一環として意義ある手段と判断された。

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岩 喬教授、ならびに終始御指導、御教示を頂きました金沢大学がん研究所越村三郎教授に深甚なる謝意を表します。また、御協力、御助言を戴きました第1外科教室ならびに金沢大学がん研究所化学療法部各位に心から感謝致します。

文 献

- 1) Mider, G. B.: Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects: A review. *Cancer Res.*, **11**, 821-829 (1951).
- 2) Mider, G. B., Fenninger, L. D., Haven, F. L. & Morton, J. J.: The energy expenditure of rats bearing Walker carcinoma 256. *Cancer Res.*, **11**, 731-736 (1951).
- 3) Copeland, E. M., MacFayden, Jr., B. V. & Dudrick, S. J.: Effect of intravenous hyperalimentation on established delayed hypersensitivity in the cancer patient. *Ann. Surg.*, **184**, 60-64 (1976).
- 4) Dionigi, R., Zonta, A., Dominioni, L., Gnes, F. & Ballabio, A.: The effect of total parenteral nutrition on immunodepression due to malnutrition. *Ann. Surg.*, **185**, 467-474 (1977).
- 5) Copeland, E. M., Daly, J. M. & Dudrick, S. J.: Nutrition as an adjunct to cancer treatment in the adult. *Cancer Res.*, **37**, 2451-2456 (1977).
- 6) 坂本純一・大倉国利・市橋秀仁・亀井秀雄・近藤達平: IVH と細胞性免疫能. *外科治療*, **42**, 245-248 (1980).
- 7) Elvehjem, C. A.: Amino acid imbalance. *Federation Proc.*, **15**, 965-970 (1956).
- 8) 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).
- 9) 社団法人. 日本必須アミノ酸協会: 蛋白質必要量: FAO/WHO 共同専門委員会報告 (必須アミノ酸研究委員会訳), 36-43 頁, 第一出版, 東京, 1965.
- 10) 遠藤昌夫・青木克慶・鎌田正一郎・田村洋一郎・荻原裕之・阿部令彦: ラットの中心静脈栄養法とメタボリックケイジ. *外科と代謝・栄養*, **15**, 160-161 (1981).
- 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. *医学のあめみ*, **92**, 56-57 (1975).
- 13) Young, V. R.: Energy metabolism and requirement in the cancer patient. *Cancer Res.*, **37**, 2336-2347 (1977).
- 14) Ikenaka, K., Fukushima, M., Nakamura, H., Okamoto, M., Shirasaka, T. & Fujii, S.: Metabolism of pyrimidine nucleotide in various tissues and tumor cells from rodents. *Gann*, **72**, 590-597 (1981).
- 15) Harper, A. E.: Balance and imbalance of amino acids. *Ann. New York Acad. Sci.*, **69**, 1025-1041 (1958).
- 16) Allan, J. D., Ireland, J. T., Milner, J. & Moss, A. D.: Treatment of leukemia by amino acid imbalance. *Lancet*, **1**, 302-303 (1965).
- 17) Harry, B. D.: Effects of reducing the phenylalanine-tyrosine intake of patients with advanced malignant melanoma. *Cancer*, **19**, 657-664 (1966).
- 18) Lorincz, A. B. & Kuttner, R. E.: Responce of malignancy to phenylalanine restriction. A preliminary report on a new concept of managing malignant disease. *Nebraska State Medical Journal*, **50**, 609-616 (1965).
- 19) Lorincz, A. B. & Kuttner, R. E.: Tumor inhibition by limiting amino acid diet. *JAMA*, **200**, 541 (1967).

- 20) Kushner, J. P., Boll, D., Quagliana, J. & Dickman, S.: Elevated methionine-tRNA synthetase activity in human colon cancer. Proc. Experiment. Biol. Med., 153, 273-276 (1976).
- 21) Igrehart, J. D., York, R. M., Modest, A. P., Lazarus, H. & Livingstone, D. M.: Cystine requirement of continuous human lymphoid cell lines of normal and leukemic origin. J. Biol. Chem., 252, 7184-7191 (1977).
- 22) 小野寺時夫・五関謹秀: 病態別高カロリー輸液 (葛西森夫監集), 127-151 頁, 協和企画, 東京, 1982.
- 23) Weisburger, J. H. Yamamoto, R. S., Glass, R. M. & Frankel, H. H.: Prevention by arginine glutamate of carcinogenicity of acetamide in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 14, 163-175 (1969).
- 24) Singal, S. A., Sydenstricker, V. P. & Littlejohn, J.: Further studies on the effect of some amino acids on the growth and nicotinic acid storage of rats on low casein diets. J. Biol. Chem., 176, 1063-1068 (1948).
- 25) Singal, S. A., Hazan, S. J., Sydenstricker, V. P. & Littlejohn, J. M.: The production of fatty livers in rats on threonine- and lysine-deficiency diets. Arch. Biochem. Biophys., 200, 867-874 (1953).
- 26) Winge, M. E., Harper, A. E., Benton, D. A., Boldt, R. E. & Elvehjem, C. A.: Effect of dietary amino acid balance on fat deposition in the liver of rats fed low protein diets. J. Nutrition, 54, 155-166 (1954).
- 27) Yoshida, A., Ashida, K. & Harper, A. E.: Prevention of fatty liver due to threonine deficiency by moderate caloric restriction. Nature, 189, 917-918 (1961).
- 28) Yoshida, A. & Harper, A. E.: Effect of threonine and choline deficiencies on the metabolism of ^{14}C labeled acetate and palmitate in the intact rat. J. Biol. Chem., 235, 2586-2589 (1960).
- 29) Barbul, A., Wasserkrug, H. L., Penberthy, L. T., Yoshimura, N. N., Tao, R. C. & Efron, G.: Optimal levels of arginine in maintenance intravenous hyperalimentation. J. Par. Enter. Nutr., 8, 281-284 (1984).
- 30) Dudrick, S. J., MacFayden, Jr., B. V., Souchon, E. A., Englert, D. M. & Copeland, E. M.: Parenteral nutrition techniques in cancer patients. Cancer Res., 37, 2440-2450 (1977).
- 31) 佐藤八郎: 担癌体の栄養と腫瘍発育の問題. 臨床外科, 21, 613-618 (1966).
- 32) Eriksson, B. & Douglas, Jr., H. O.: Intravenous hyperalimentation as an adjunct to treatment of malignant disease of upper gastrointestinal tract. JAMA, 243, 2049-2052 (1980).
- 33) 川浦幸光・佐藤日出夫・金子芳夫・大橋 裕・木原鴻洋・深谷月泉・岩 喬・中野 修: アミノ酸インバランス輸液による悪性腫瘍の治療(第1報). 新薬と臨床, 26, 89-92 (1977).
- 34) 金子芳夫・川浦幸光・大村健二・神林清作・岩 喬: 消化器系悪性腫瘍患者に対する高カロリー輸液-抗癌剤あるいはアミノ酸インバランス輸液との併用効果-. 外科と代謝・栄養, 15, 291-298 (1981).

Experimental Studies on the Influence of Amino Acid Imbalance Solutions on Tumor Growth Kenji Omura, Department of Surgery (I) (Director: Prof. T. Iwa), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., 94, 95-107 (1985)

Key words: amino acid imbalance, total parenteral nutrition, host-tumor relationship

Abstract

The present work was pursued to investigate the significance of amino acid imbalance in cancer treatment and to develop a useful formula of amino acid preparation without unfavorable side effect on the host. The first experiment was designed to examine the relationship between tumor growth and nitrogen balance in the host. Male Donryu rats were subcutaneously implanted with AH130 cells. Eleven to 13 days later, they received 3 amino acid regimens for 7 successive days through the catheter inserted into superior vena cava without oral feeding. Five experimental groups were set up: group I, balanced amino acid solution (10 g/dl); group II,

KKM-1 (the same nitrogen content but deficient in methionine and cystine); group III, KKM-2 (deficient in methionine and cystine and supplemented with arginine); group IV, physiologic saline (amino acid depletion); and group V (control untreated). All regimens contained glucose at 21.7% concentration. During the infusion period, group I showed a positive nitrogen balance and an increase in tumor weight without body weight change. By contrast, nitrogen balance in group II, III and IV was all negative with decrease in body weight, especially in group IV. Tumor weight was also reduced in these 3 groups. The reduction was most marked in group III. Serum GOT, GPT and creatinine levels were not elevated in these groups, although slight increase in serum BUN was observed in group III. Microscopic examination of the liver revealed slight fatty degeneration in these groups. In the second experiment, Donryu rats were implanted with AH130 cells intraperitoneally. Six days later, they were treated with the same amino acid regimens mentioned above. Ascites cells obtained from the treated rats were examined for their capacity to incorporate ^3H -thymidine or ^3H -uridine *in vitro*. Uptake of ^3H -labelled precursors was markedly suppressed in the tumor cells from group II and group III. These results suggest that amino acid imbalance therapy is a useful adjunct in cancer treatment and that KKM-2 regimen is an available preparation for clinical trials.