

methionine 欠如アミノ酸輸液をbiochemical modulatorとした 5-fluorouracilの抗腫瘍効果増強に関する臨床的研究

鳥取大学医学部外科学第一教室 (主任 貝原信明教授)

前田迪郎, 金子徹也, 貝原信明

A clinical study on enhanced antitumor activity of
5-fluorouracil by a methionine-free amino acid solution
as a biochemical modulator.

Michio MAETA, Tetsuya KANEKO, Nobuaki KAIBARA
*Department of Surgery, Faculty of Medicine,
Tottori University, Yonago 683, Japan.*

ABSTRACT

A study of the effects of methionine-free amino acid solution(AO-90) on the metabolism of 5-fluorouracil(5-FU) was performed in patients with advanced gastric or colorectal cancers. Total parenteral nutrition with either AO-90 (AO/F group) or conventional amino acid solution(C/F group) in combination with 5-FU was performed for 7days preoperatively under the fasting condition. The administration of AO-90 showed a decreased level of serum methionine and resulted in the subsequent increased tendency in the intratumorous levels of both folate and methylene tetrahydrofolate compared to those of the C/F group. In the AO/F group, the inhibition rate of thymidylate synthase in the tumor was higher than that of the C/F group. These results indicate that AO-90 plays an important role in the metabolism of 5-FU and seems to contribute to the increased antitumor effect of 5-FU as a biochemical modulator.

(Accepted on December 13, 1994)

Key words : methionine-free amino acid solution, AO-90, biochemical modulation, 5-FU

進行消化器癌に対し5-fluorouracil(5-FU)を中心とした化学療法が約30年にわたり行われているが、その成績は必ずしも満足できるものではない。しかし、5-FUを明らかに凌ぐ新薬がないことから、5-FUの効果を増強する工夫が現在までに種々おこなわれてきている。

こうした背景から、5-FUの抗腫瘍活性増強や副作用軽減を目的としたbiochemical modulationの試みが、最近盛んに検討されている¹⁾。進行胃癌に対するmethotrexate(MTX)/5-FU交代療法¹³⁾や、大腸癌に対し欧米では既に標準治療となっているleucovorin(LV)/5-FU併用療法²⁾など

は、biochemical modulationの理論に基づく代表的な併用化学療法であり、MTXやLVの葉酸や核酸合成系などに及ぼす影響を利用し5-FUの効果を高めようとする方法である。

methionine欠如アミノ酸輸液 (AO-90) も5-FUの効果を増強し得るbiochemical modulatorであり、LVと同様に葉酸合成系に影響を及ぼし、還元型葉酸濃度を上昇させることに伴うthymidylate synthase阻害の増強により、5-FUの抗腫瘍活性が上昇することが基礎実験にて示されている⁶⁾。しかし、臨床症例におけるAO-90のこの点に関する検討は今までのところなされていない。

今回、AO-90の5-FUに対するbiochemical modulatorとしての役割を臨床症例において検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

1. 対象

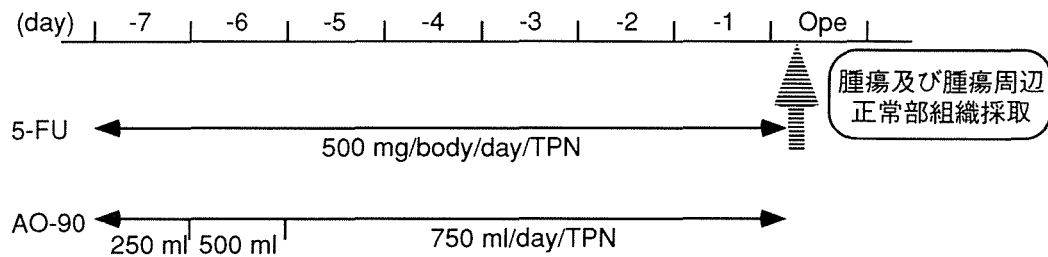
対象は進行胃・大腸癌の初回手術症例で、抗癌

剤使用歴および高カロリー輸液 (TPN) 施行歴の無い症例である。術前1週間にアミノ酸輸液としてAO-90を糖・電解質液およびビタミンと共にTPNにて投与し、同時に5-FU (500 mg/body/day) を輸液バッグに添加し持続点滴静注した。またAO-90の代わりにmethionineを含有する市販総合アミノ酸液アミパレンを用いた比較検討群を設けた {AO-90投与群 (以下AO/F群), アミパレン投与群 (以下C/F群) とともに各々7例}。

TPN施行1週間は原則として絶食とし、輸血、血液製剤および5-FU以外の抗癌剤は使用しなかった。AO-90とアミパレンのアミノ酸組成を表1に、薬剤の投与量およびスケジュールを図1に示した。AO/F, C/F両群の決定は無作為に行われたが、TPN施行前には両群の症例にTPNと5-FU投与の意義を話し、さらにAO/F群の症例にはAO-90の効能と起こり得る副作用を説明した。全ての対象はいずれもこれらの術前処置に同意が得られた症例である。

表1. アミノ酸組成表

成分	AO-90 (g/100ml)	アミパレン (TEO-10) (g/100ml)
L-ロイシン	1.23	1.40
L-イソロイシン	0.55	0.80
L-バリン	0.61	0.80
酢酸L-リジン (L-リジンとして)	2.10 (1.49)	1.48 (1.05)
L-トレオニン	0.54	0.57
L-トリプトファン	0.18	0.20
L-メチオニン	-	0.39
L-フェニルアラニン	0.87	0.70
L-システイン	-	0.10
L-チロシン	-	0.05
L-アルギニン	0.66	1.05
L-ヒスチジン	0.30	0.50
L-アラニン	-	0.80
L-プロリン	-	0.50
L-セリン	-	0.30
アミノ酢酸	1.00	0.59
L-アスパラギン酸	-	0.10
L-グルタミン酸	-	0.10
総アミノ酸量	7.43	10.00
総窒素量	1.19	1.57



- * C/F群はAO-90の代わりに比較検討としてアミパレン[®]を手術日7～6日間の2日間を400 ml/day, -5～術日まで600 ml/dayを投与する。
- * 高カロリー基本液などは両群で同じとする。

図1. 投薬スケジュール

2. 方法

手術時、速やかに切除標本から腫瘍組織および腫瘍周辺部正常組織を各々2gずつ採取し、ドライアイスで挟み瞬間凍結して15分以内に -70°C のdeep freezerにて保存し、5-FUはHPLC法¹⁰⁾、thymidylate synthase (TS)活性、葉酸およびメチレン葉酸は大家らの方法¹¹⁾、fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP)はSpearらの方法¹⁴⁾により定量した。

なお投薬開始前 (TPN開始前)、投薬終了日 (手術日, TPN 1週目) および投薬終了後1週目 (術後1週目) に採血を行ない、血液学的検査、血液生化学的検査、rapid turnover proteinおよびアミノ酸分析等を行ないAO-90投与による影響を調査した。

統計処理法は、TS阻害率、TS分画、5-FU、FdUMP、葉酸およびメチレン葉酸などの抗腫瘍性に及ぼす項目のみ、AO/F群とC/F群との群間比較をMann-WhitneyのU検定を用い実施した。

また、AO/F、C/F群各々の群内に於ける腫瘍組織と正常組織の比較については、抗腫瘍性に及ぼす項目はWilcoxon signed-Rank Testを用いた。総蛋白およびアルブミンは投薬開始前と投薬終了後1週目をWilcoxon signed-Rank Testにて、rapid turnover proteinおよびmethionineは時間 (投薬開始前、投薬終了日、投薬終了後1週目) と被験者とを因子として2元配置分散分析を行い、時間因子に有意差 ($P < 0.05$) があつた場合は、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行い検討した。

結 果

癌種、性別、年齢、身長、試験前体重、前治療歴の有無、腫瘍組織型および試験前PSグレードなどの主な背景因子については、両群に大差は認められなかった。

1. 血液、生化学検査

AO/F群、C/F群ともに術前1週間のTPNによる自覚的副作用は認められなかった。また、血液学的検査および血液生化学的検査についても、投薬開始前と投薬終了後1週目との間に臨床上問題と思われる影響は認められず、手術による影響が多少認められたのみで全例順調な術後経過をたどり退院した。

2. 栄養評価

栄養状態を反映する総蛋白、アルブミンの推移を図2に、代謝半減期のより短いrapid turnover protein (プレアルブミン、トランスフェリン、レチノール結合蛋白) の推移を図3、4、5に示した。

総蛋白、アルブミンは、両群ともに投薬開始前に比し投薬終了後1週目には術侵襲の影響を受け、概ね有意な低下を示した。3種のrapid turnover proteinの推移も、総蛋白、アルブミンと同様に両群とも投薬終了後1週目には投薬開始前又は投薬終了日に比して低下する傾向がみられた。しかし、投薬開始前に対する投薬終了日のrapid turnover proteinの挙動は両群で異なり、

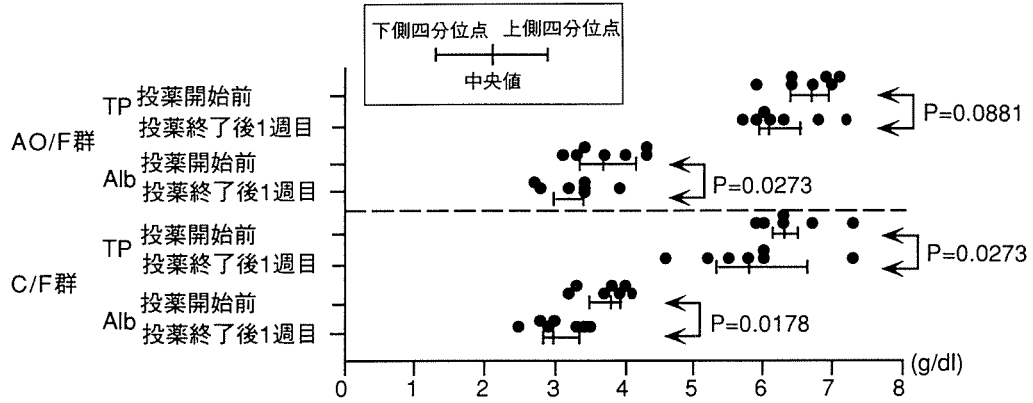


図2. 総蛋白, アルブミン濃度

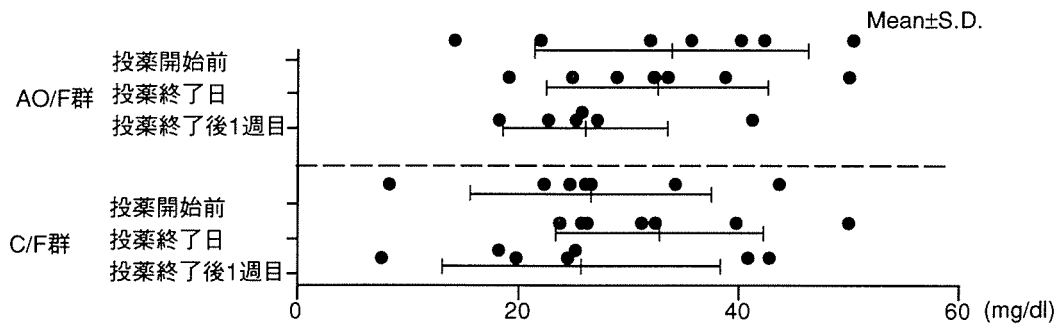


図3. 血中プレアルブミン濃度

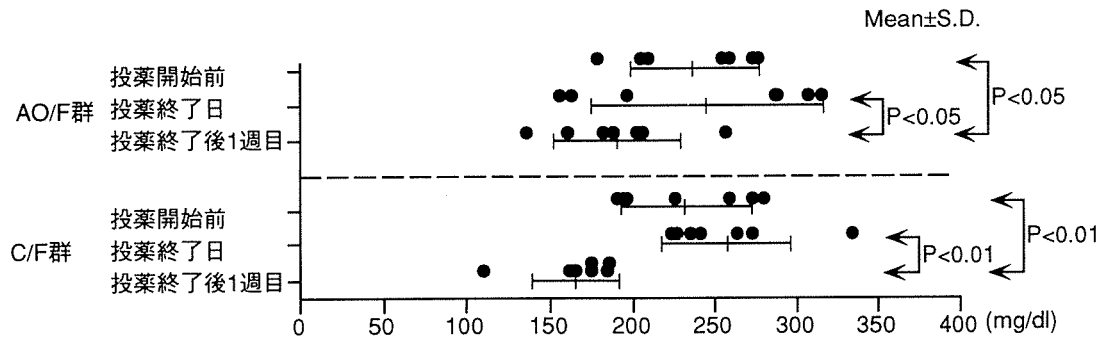


図4. 血中トランスフェリン濃度

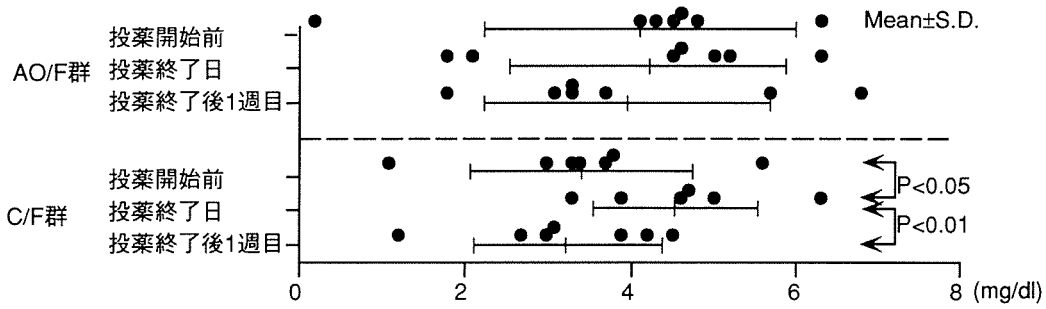


図5. 血中レチノール結合蛋白濃度

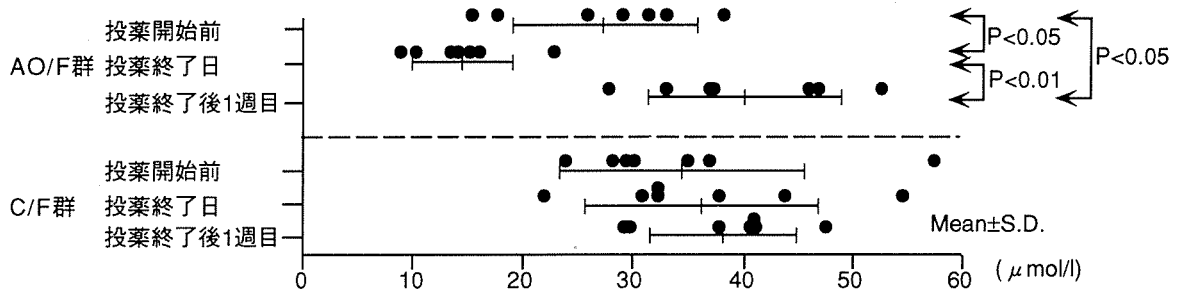


図6. 血中methionine濃度

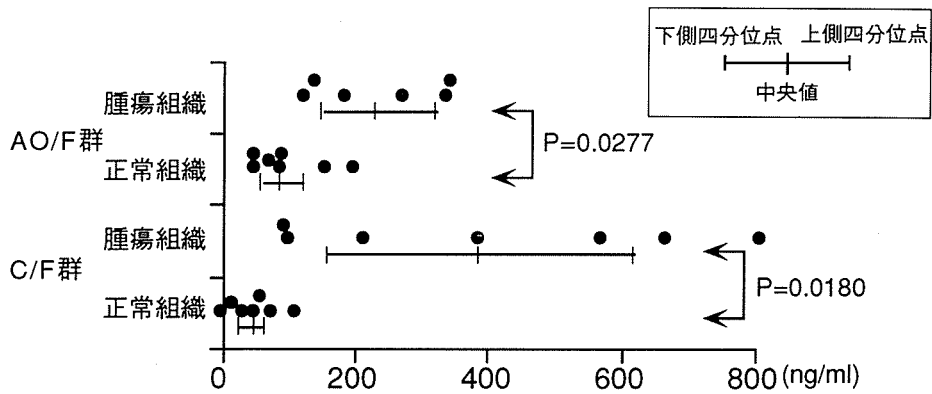


図7. 組織内5-FU濃度

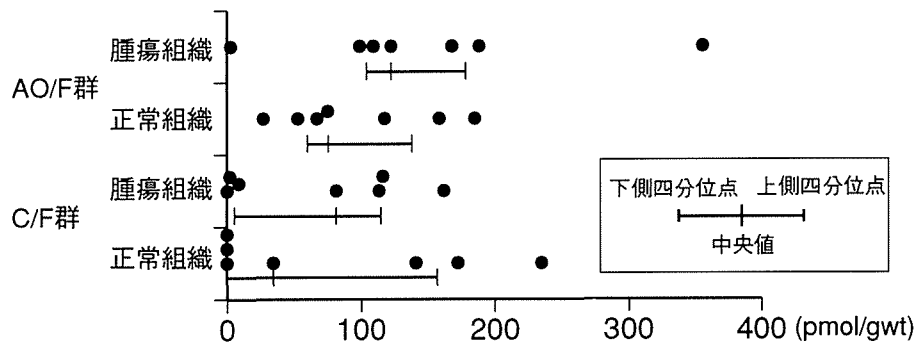


図8. 組織内FdUMP濃度

AO/F群が、ほぼ同等もしくは若干の低下傾向を示したのに対し、C/F群では逆に上昇傾向を示し、アミパレン投与による栄養改善効果が示された。

3. 血中遊離アミノ酸

投薬開始前に比し投薬終了日にAO/F群で上昇を認めたアミノ酸はthreonine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophanおよびlysineの各アミノ酸であり、逆に低下を認めたのはmethionineとprolineであった。他方、C/F群では大きな変動を認めたものはみられなかった。

なお、投薬終了後1週目のアミノ酸の推移は両群ともに手術侵襲や出血量、術中および術後の輸血、血液製剤投与などの影響を受け、変動を示すアミノ酸が多くみられた。

methionineの推移について図6に示したが、AO/F群で投薬開始前に比し投薬終了日には有意な低下を示し、投薬終了後1週目には速やかに回復し投薬開始前よりもむしろ高値を示した。C/F群では目立った変動はみられなかった。

4. 5-FUおよびその代謝産物

腫瘍および正常組織内の5-FUとその活性代謝産物FdUMP濃度を図7, 8に示した。5-FUは両群ともに正常組織に比して腫瘍組織での濃度が有意に高く、またC/F群ではAO/F群に比べ5-FU濃度の広範囲な分布が示された。FdUMPでは両群ともに腫瘍組織と正常組織との間に一定の傾向は認められなかった。

5. 葉酸, メチレン葉酸

腫瘍および正常組織内の葉酸, メチレン葉酸の濃度を図9, 10に示した。葉酸およびメチレン葉酸に一定の傾向は認められなかったが、AO/F群ではC/F群に比して高値を示す症例が腫瘍組織, 正常組織の双方で認められた。

6. TS分画, TS阻害率

TS分画 (TS·free, TS·total)を図11, 12に示した。TS·freeはAO/F群では正常組織に比して腫瘍組織で有意な高値が示されたが、C/F群では有意差は認められなかった。TS·totalでも、AO/F群では正常組織に比して腫瘍組織で有意な高値が示された。腫瘍組織でのTS·totalはC/F群に比してAO/F群で有意に高値であった ($P = 0.0088$)。

測定したTS·free, TS·totalより求められたTS阻害率を図13に示した {TS阻害率 (%) = $[(TS \cdot total - TS \cdot free) \div TS \cdot total] \times 100$ }。

AO/F群では正常組織に比して腫瘍組織で阻害率が高くなる傾向がみられたが、C/F群ではこの傾向は認められなかった。またAO/F群での腫瘍組織のTS阻害率は、C/F群のそれよりも高値となる傾向が認められた。

考 察

進行消化器癌患者は、いわゆる癌悪液質、あるいは消化管の癌性狭窄に基づく食物の通過障害により栄養低下状態を伴うことが多く、このような症例にはTPNによる栄養管理が広く行われている。このTPNによる栄養状態の維持、改善により癌化学療法の適応は明らかに拡大されたと言え

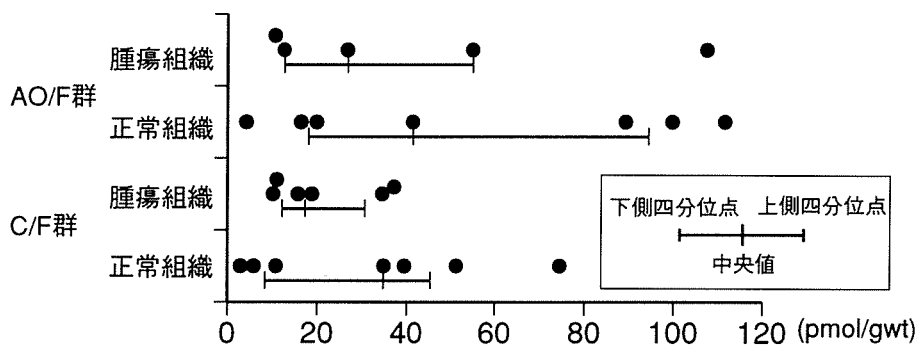


図9. 組織内葉酸濃度

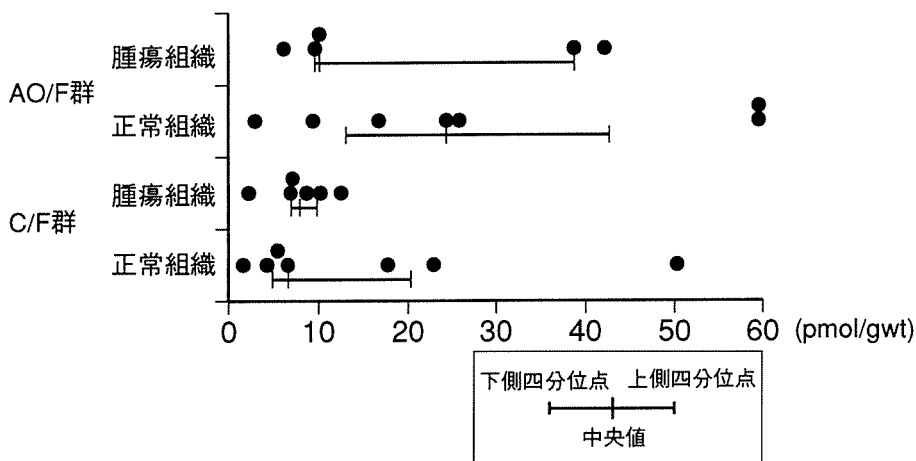


図10. 組織内メチレン葉酸濃度

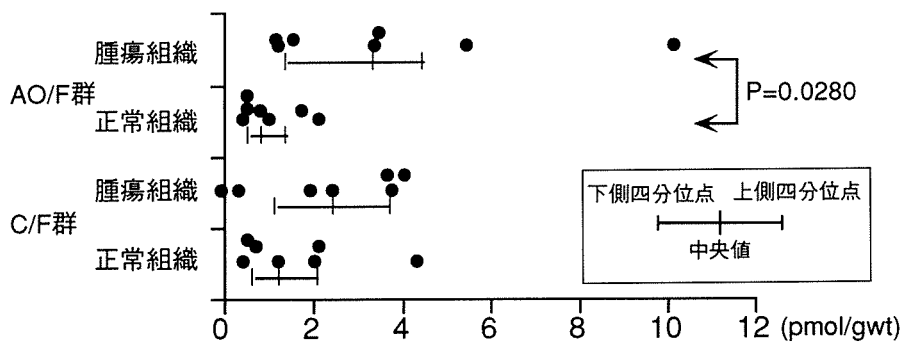


図11. 組織内チミジル酸合成酵素分画 (TS-free量)

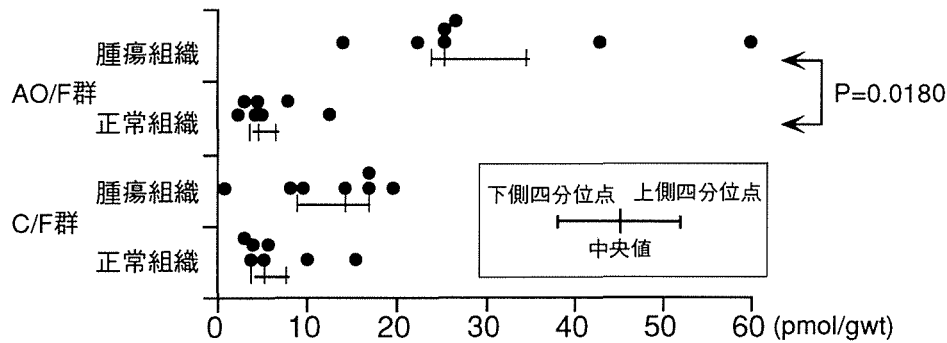


図12. 組織内チミジル酸合成酵素分画 (TS・total量)

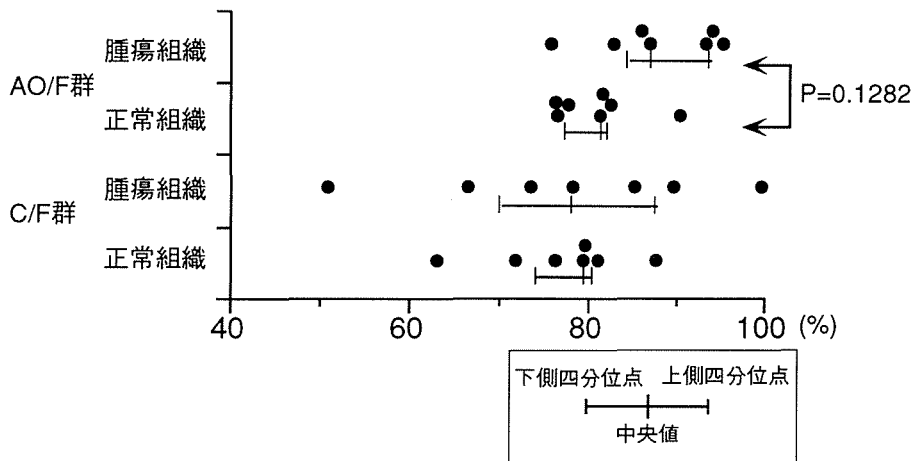


図13. 組織内TS阻害率

る。しかし、進行消化器癌症例に対しTPNを併用した化学療法の成績では、抗腫瘍効果および延命効果ともに化学療法単独での成績と比べ大差ないことや⁹⁾、TPNによる癌の増殖や転移を促進することの危惧を示す報告^{8, 16, 17)}もあり、問題点も多いことが指摘されている。

われわれが臨床検討したmethionine欠如アミノ酸輸液AO-90は、これらの問題に対する一つの対応として考えられた進行癌に対するTPN用のアミノ酸輸液で³⁾、5-FUとの併用投与により、その効果の増強が期待できるものである。

5-FUの抗腫瘍作用機序として、DNA合成阻害およびRNA機能障害機構が知られており、臨床で用いられる低濃度長時間の持続静注条件下ではDNA合成阻害が作用機序の中心になると考えられている⁴⁾。すなわち、5-FUから代謝されたFdUMPは、生体に存在するdeoxyuridine monophosphate(dUMP)と競合してTSおよびメ

チレン葉酸と結合し、三重共有結合複合体 (ternary complex) を形成し、TS活性阻害を招く。その結果、dUMPからdeoxythymidine monophosphate(dTMP)への変換が抑制され、de novo回路よりのdTMPの供給が阻害されて腫瘍細胞のDNA合成が障害されるが、この三者のうち量的律速はメチレン葉酸であると考えられている^{5, 7)}。

現在までに、5-FUのbiochemical modulatorとしてのAO-90のDNA合成阻害に及ぼす作用が基礎実験にて明かにされている。すなわち、AO-90を投与することで血中および腫瘍組織中methionine濃度が有意に低下し、homocysteineからmethionineへの変換酵素methionine synthase活性が上昇する。その結果、共役関係にある葉酸サイクルが活性化を受けて組織内メチレン葉酸量が増加することによるternary complexの形成が促進し、TS阻害が有意に高まることが示

唆されている⁶⁾。

今回、AO-90による5-FUのDNA合成阻害に及ぼす影響を、各種パラメーターを測定することにより臨床的に検討するとともに、AO-90投与による安全性についても検討した。AO-90を投与することで、血中methionine濃度は有意な低下を起こすことが確認され、その結果として基礎検討で報告された如く組織内methionine濃度も連動して低下し、methionine synthaseの活性化に伴なう葉酸サイクルの賦活が考えられ、今回の検討でも葉酸およびメチレン葉酸量の上昇傾向が示唆された。

また、腫瘍組織において、TSはAO-90投与により影響を受けTS阻害率は腫瘍で高値となり、AO-90のbiochemical modulatorとしてのDNA合成阻害作用の増強が臨床においても示唆された。

このAO-90と5-FUの併用による抗腫瘍効果増強の作用機序は、LV/5-FU併用療法のそれとほぼ同様と考えられる⁷⁾。LV/5-FU併用療法では、LVの有効血中濃度確保のために本剤の大量投与が必要とされるが、AO-90をLV/5-FU併用療法に加えて検討できるならば、更なる抗腫瘍効果増強と経済性が加味される可能性も考えられる。

他方、安全性については今回の術前1週間のAO-90投与では、臨床上で問題となる自覚症状や臨床検査値の異常変動は特に認められず、全例順調な術後経過をたどり退院している。

また、AO-90投与1週目の血中アミノ酸分画の変動は概ねAO-90のアミノ酸組成を反映していることが示唆されたが、必須アミノ酸であるmethionineを欠如していることから長期に適用される場合には生体にとって大きな負荷がかかることも十分想定される。したがって進行消化器癌に対し5-FU+MMC療法にAO-90を併用することの有用性を示唆する報告¹⁵⁾の如く、2週間投与を1コースとした間歇反復療法が妥当と考えられる。

結 語

methionine欠如アミノ酸輸液AO-90による5-FUのDNA合成阻害作用に及ぼす影響について、進行胃・大腸癌症例を対象に検討を行なった。

AO-90の投与により血中methionine濃度の低下、葉酸・メチレン葉酸濃度の上昇傾向および腫瘍組織でのthymidylate synthase(TS)の変動が観

察された。腫瘍組織でのTS阻害率は正常組織に比して高値となる傾向を認め、かつAO-90の代わりに総合アミノ酸輸液を用いた比較検討群でのTS阻害率よりも高値を示した。

これらのことよりAO-90は5-FUのbiochemical modulatorとして抗腫瘍活性の増強に寄与することが考えられた。

文 献

- 1) 相羽恵介 (1988). 5-FU+HDLVの併用. 癌と化学療法 15, 392-408.
- 2) Arbuck, S. G. (1989). Overview of clinical trials using 5-fluorouracil and leucovorin for the treatment of colorectal cancer. Cancer 63, 1036-1044.
- 3) 遠藤昌夫 (1989). アミノ酸輸液の種類とアミノ酸組成の特徴. アミノ酸輸液 (武藤輝一編), pp. 37-60, 医薬ジャーナル社, 東京.
- 4) Evans, R. M. (1980). Assessment of growth-limiting events caused by 5-fluorouracil in mouse cells and human cells. Cancer Res 40, 4113-4122.
- 5) Grem, J. L., Hoth, D. F., Hamilton, J. M., King, S. A. and Jones, B. L. (1987). Overview of current status and future direction of clinical trials with 5-fluorouracil in combination with folinic acid. Cancer Treat Rep 71, 1249-1264.
- 6) 日比野 豊, 瓦林良和, 郡 英明, 上田信彦, 塚越 茂 (1994). 癌治療用アミノ酸輸液 (AO-90) による抗癌剤5-fluorouracilの抗腫瘍効果増強作用とその機序の検討. 癌と化学療法 21, 2021-2028.
- 7) Houghton, J. A., Maroda, S. J., Phillips, J. O. and Houghton P. J. (1981). Biochemical determinants of responsiveness to 5-fluorouracil and its derivatives in xenografts of human colorectal adenocarcinomas in mice. Cancer Research 41, 144-149.
- 8) 岸 清志, 前田迪郎, 西村興亜, 安達秀雄, 古賀成昌 (1985). IVHによる腫瘍増殖とその対策に関する実験的研究. 日本癌治療学会雑誌 20, 963-968.
- 9) 前田迪郎, 古賀成昌, 清水法男, 尾崎行男,

- 金山博友, 浜副隆一, 山根歳章, 狩野卓夫, 小田正之 (1983). 進行胃癌症例に対するIVH併用短期濃厚化学療法 (STIC). 癌と化学療法 10, 2370-2376.
- 10) 丸中照義, 梅野幸彦, 長町正弘, 吉田耕造, 吉田真由美 (1980). 生体資料中の1-(tetra-2-furanyl)-5-fluorouracil (FT-207) 及び5-FUの定量法. 医薬品研究 11, 307-313.
- 11) 大家真治, 岡部博之, 武田節夫, 山田雄次 (1990). CDDPによるUFTの効果増強メカニズムの解明. 癌と化学療法 17, 1321-1326.
- 12) 太田和雄 (1987). Biochemical modulation. 医学のあゆみ 141, 572-575.
- 13) 佐々木常雄, 太田和雄, 井林 淳, 坂田 優, 松岡富男, 石川 誠, 涌井 昭, 小越和栄, 赤沢修吾, 坂井保信, 石渡淳一, 北村正次, 栗原 稔, 藤田昌宏, 小林成禎, 有吉 寛, 村上 稔, 紀藤 毅, 森瀬公友, 由良二郎, 岡 勇二, 恒川 洋, 林 伸行, 梅村幹治, 阿部達生, 大谷 透, 木村郁郎, 佐藤 源, 原 泰寛, 橋本修治, 富永祐民 (1989). 胃癌に対するメソトレキセート・5-FU交代療法と5-FU単独療法の比較試験. メソトレキセート・5-FU交代療法共同Phase III Study. 癌と化学療法 16, 2545-2555.
- 14) Spears, C. P., Shahinian, A. H., Moran, R. G., Heidelberger, C. and Corbett, T. H. (1982). In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition in 5-fluorouracil-sensitive and resistant murine colon adenocarcinomas. Cancer Research 42, 450-456.
- 15) 杉原國扶, 森 昌造, 西平哲郎, 松本 高, 河内三郎, 石川 誠, 高橋通宏, 中島聰總, 神前五郎, 小野寺時夫, 北村正次, 古江 尚, 仁井谷久暢, 遠藤光夫, 五関謹秀, 山崎 繁, 山崎忠光, 白沢光太郎, 南塚俊雄, 増子宣雄, 村田宣夫, 篠原一彦, 藤田秀春, 野手雅幸, 田口鐵男, 太田 潤, 奥野匡宥, 長山正義, 古賀成昌, 前田迪郎, 小立寿成, 阿部重郎, 栗原 稔 (1990). 進行, 再発消化器癌を対象としたmethionine欠如アミノ酸輸液AO-90と抗癌剤 (5-FU, MMC)の併用投与による初期第II相試験. 癌と化学療法 17, 2405-2413.
- 16) Torosian, M. H. and Donoway, R. B. (1991). Total parenteral nutrition and tumor metastasis. Surgery 109, 597-601.
- 17) Yeatman, T. J., Rinsley, G. L. and Brunson, M. E. (1991). Depletion of dietary arginine inhibits growth of metastatic tumor. Arch Surg 126, 1376-1382.