

学位論文題名

可移植性ヒト腫瘍および VX-7 ウサギ腫瘍に対する
 α -リノレン酸の抗腫瘍効果

学位論文内容の要旨

I. 目 的

多くの疫学的研究から、食餌性脂肪酸とくに ω -3系脂肪酸と種々の腫瘍の発生率との間には密接な関係があり、 ω -3系脂肪酸は腫瘍の発生に抑制的に働く事が明らかにされた。さらに、 ω -3系脂肪酸を添加した飼料で飼育されたラットではDMBA, NMUやその他の発癌物質による発癌が顕著に抑制される事も確かめられている。ところが、非経口的に、すなわち皮下投与や動注によって ω -3系脂肪酸の抗腫瘍効果を調べた研究はごく少なく、特にヒトの腫瘍についての研究は皆無である。本研究では、 ω -3系脂肪酸の一つである α -リノレン酸の抗腫瘍化学療法剤としての開発を目的として、ヌードマウスに移植した種々のヒト腫瘍に対する効果を検討した。さらに転移抑制の効果を調べるために、ウサギのVX-7腫瘍細胞を後肢下腿足根関節部の表在性皮膚リンパ管より移植した後に α -リノレン酸を、油性造影剤であるリピオドールをキャリアとして同リンパ管より投与して肺への転移抑制の効果を検討した。

II. 方 法

1. 実験動物

ヌードマウスは国立予防衛生研究所獣疫部(現・獣医科学部)および日本クレア株式会社生産の雌性BALB/C(nu+/nu+)の8-10週令のものをを用いた。ウサギは株式会社船橋農場生産の日本白色種家兎(3Kg以上)を用いた。

2. 腫瘍細胞とその移植

以下の可移植性ヒト腫瘍の分与を受け実験に使用した。胃癌; MKN-1, MKN-28(国立予防衛生研究所奥村秀夫博士より)、Horiuchi, ALL(東京大学医科学研究所須藤カツ子博士より)、肺癌; NOC-S(奥村博士より)、Taneda(須藤博士より)、Lu-65(国立ガンセンター研究所広橋説雄博士より)、Lx-1(癌研究所化学療法センター稲葉実博士より)、肝癌; Matsuda(須藤博士より)、Li-7(広橋博士より)、悪性黒色腫; PL-14(

奥村博士より)、SK-14(国立がんセンター研究所小出勉博士より)、絨毛上皮癌;GCH-nu(奥村博士より)、子宮頸癌;SKG-III(奥村博士より)、膀胱癌;Kuronuma(須藤博士より)、副腎癌;Sawayama(須藤博士より)、乳癌;Mx-1(北里研究所病院久保田哲朗博士より)。

MKN-1, MKN-28, NOC-S, PL-14, GCH-nu, SKG-IIIは組織培養系で維持し、実験にあたってはPBSで 4×10^5 cells/mlに調整して、その0.25mlをヌードマウスの腸骨陵部皮下に移植した。その他の腫瘍株はヌードマウスで継代維持し実験に際しては、腫瘍塊を氷上で細切して粥状とし、その1ml(腫瘍塊5-6mm角分)をヌードマウスの腸骨陵部皮下にトラカールで移植した。株式会社船橋農場由来のウサギVx-7腫瘍を前記の家兎で継代した。実験に際しては、腫瘍塊を氷上で細切し、ステンレスメッシュで濾過後トリパンブルーで生細胞を数え、PBSで 10^6 cells/mlに調整した。その細胞懸濁液0.5mlをツルース針(NO.6号)で、ウサギ後肢下腿足根関節付近の表在性皮膚リンパ管より注入した。

3. α -リノレン酸の投与

α -リノレン酸はシグマ社製の純度98%のものを使用した。乳化剤として使用した水素化ヒマシ油エチレンオキサイド付加物(CHO-60)は日光ケミカル社より分与を受けた。リピオドールはラボトワール・ゲルベフランス社より購入した。CHO-60を0.4%に含むPBSに α -リノレン酸を20mg/mlとなるように加え、超音波で乳化した。この乳化物またはPBSで4倍に希釈した乳化物を、移植腫瘍塊の周辺の皮下に0.25ml/マウス/日で投与した。別に転移抑制実験としてVX-7を移植した日より8日目に、腫瘍を移植したのと同じ部位よりリピオドール:リノレン酸=1:2混液を0.42ml/Kgで投与した。

4. 評価

MKN-1, MKN-28, NOC-S, PL-14, GCH-nu, SKG-IIIについては腫瘍移植後マウスが腫瘍死するまで飼育し、生存日数を治療群と非治療群で比較した。その他の腫瘍株については、腫瘍移植後31日目に腫瘍塊を切り出し、その重量を測定して両群で比較した。VX-7の場合は、腫瘍移植後25日目に剖検し、膝下リンパ節の重量を測定すると共に肺への転移の有無を肉眼的に調べ、両群を比較した。

III. 結 果

1. ヌードマウスに移植したヒト腫瘍に対する α -リノレン酸の効果

腫瘍移植後3日目から1日1回連続4日間250mg/Kg/日で α -リノレン酸を皮下投与した場合、MKN-1では100%の個体で腫瘍が消失した(200日以上腫瘍のない状態で生存)。以下、MKN-28:57%, NOC-S:25%, PL-14:75%の個体で腫瘍が完全消失した。GCH-nuとSKG-IIIは全く反応しなかった。その他の腫瘍について、腫瘍移植後31日目の腫瘍塊の平均重量を、それぞれの非治療群と比較すると、高投与量におけるT/C比は、Taneda:4, Lu-65:84, Lx-1:34, Matsuda:82, Li-7:47, SK-14:31, Kuronuma:49, Sawayama:16, Mx-1:101であった。Taneda, Lx-1, SK-14, Sawayamaで有効(+)、Li-7とKuronumaでは平均腫瘍重量が有意に減少した。Lu-65とMatsudaの平均腫瘍重量の減少は有意ではなかったが対照群より若干減少した。Mx-1は全く反応しなかった。

非連続的に、すなわち腫瘍移植後3, 13, 17, 24日目に α -リノレン酸を投

与した場合、高投与量におけるT/CはHoriuchi:68, ALL:24, Taneda:34, Lu-65:73, Lx-1:23, Li-7:50, SK-14:47, Kuronuma:53, Sawayama:65, Mx-1: 92であった。ALL, Taneda, Lx-1に対しては有効(+)、Li-7, SK-14, Kuronumaに対しては有意な腫瘍重量の減少を示したが、Horiuchi, Lu-65, Sawayamaの腫瘍重量の減少は有意ではなかった。Mx-1はほとんど反応しなかった。

2. VX-7に対する α -リノレン酸の効果

VX-7を後肢下腿足根関節付近のリンパ管より移植した後25日目に剖検すると、非治療群及びリピオドールのみを投与した群では100%の個体で肺に転移結節が認められたが、8日目に α -リノレン酸を投与した群では25%の個体に小さな転移結節が認められたにすぎない。また、膝下リンパ節の平均腫瘍重量は非治療群6.16g, リピオドールのみ投与群3.82gであったが α -リノレン酸投与群では0.84gで、明らかに有意な現象を認めた。

IV. 考 察

新しい抗腫瘍化学療法剤の開発を目的として、 α -リノレン酸の非経口投与によるヒト腫瘍に対する増殖抑制効果を調べたところ、17種の腫瘍株のうち4株で腫瘍退縮、5株でT/Cが42%以下、3株でT/Cが42%以上ではあるが対照群と比べて有意に腫瘍重量が減少した。別の2株では有意ではなかったが腫瘍重量の減少が認められた。本実験で使用したヒト腫瘍—ヌードマウスの系は、化学療法剤の効果判定という点では最もよく臨床結果と一致すると言われているので本実験の結果は、 α -リノレン酸の臨床応用にとってきわめて有意義な結果と考える。現在使用されている抗腫瘍化学療法剤には一般に副作用の強いものが多いが、 α -リノレン酸は動物の細胞膜等の構成成分であるため副作用が弱く本実験に使用した用法、用量(250mg/Kg/日x4)では全く障害が認められなかった。従って、より多量に投与する事も可能と思われる。また、今後既存の抗腫瘍化学療法剤と組み合わせたり、種々のDDSを考慮する事により、より広範な腫瘍に有効性を発揮する事が期待できる。

α -リノレン酸の抗腫瘍活性の作用機序については種々の機作が考えられるが、これまでの実験から α -リノレン酸が腫瘍細胞に特異的に取り込まれ細胞膜の流動性を高める事が判明したので、それらの事により腫瘍細胞にドラチックな障害を与えるものと推察できる。

ウサギを使った転移抑制実験では本実験が人間の身体で起きる転移をどの程度まで真に反映しているかという問題はあるが、腫瘍細胞を注入したのと同じリンパ管に α -リノレン酸を投与した場合、肺での転移結節形成が有意に抑制された。本実験では α -リノレン酸をリピオドールとの混合液として投与したが、これはリピオドールと混合する事により、リピオドールの徐放性を利用しようとしたためである。このような徐放性の獲得は α -リノレン酸の有効性をいっそう高めるものと期待される。

V. 結 語

ω -3高度不飽和脂肪酸である α -リノレン酸はヒト可移植性腫瘍17株のう

ち12株の増殖を顕著に抑制した。また経リンパ管的に移植したウサギVX-7腫瘍の肺での転移結節形成を著しく抑制した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 講 師 小 山 富 康

学 位 論 文 題 名

可移植性ヒト腫瘍および VX-7 ウサギ腫瘍に対する α -リノレン酸の抗腫瘍効果

食餌性脂肪酸のなかで ω -3系脂肪酸ががんの発生に抑制的に働くことが、多くの疫学的研究および動物を用いた発癌予防実験の成績として報告されている。また、申請者らは ω -3系脂肪酸の一種である α -リノレン酸 (ALA) が数系のマウスの実験癌に抗腫瘍効果を示すことを観察した。そこで、ALA が新しい癌化学療法剤として有用であるか否かを検索するために、ヒトの株化癌細胞のヌードマウスにおける増殖に対するALAの抑制効果と、あわせてウサギVx-7腫瘍の肺転移に対するALAの抑制効果を検討した。

実験では8-10週令の雌ヌードマウス (BALB/C nu⁺/nu⁺) に皮下移植して増殖させた胃癌4株、肺癌4株、肝癌2株、悪性黒色腫2株、および絨毛上皮癌、子宮頸癌、脾臓癌、副腎癌、乳癌各1株のさまざまな臓器由来の、異なった組織型の17株のヒト癌細胞を対象とした。ALAは水素化ヒマシ油エチレンオキサイド付加物 (CHO-60) を乳化剤として腫瘍局所に投与した。またVx-7の転移モデルではウサギ後肢のリンパ管より癌細胞を注入し、ALAをリビオドールに混合して同一リンパ管より投与した。ヒト癌-ヌードマウスの実験ではALAの投与方法、判定方法を換えた4法を試みた。①ヒト癌細胞移植後3日目から1日1回連続4日間ALAを250mg/kg/日で治療すると、胃癌MKN-1では100%のマウスで

腫瘍が消失した。また、胃癌 MKN-28、肺癌 NOC-S、悪性黒色腫 PL-14 ではそれぞれ57%、25%、75%のマウスで腫瘍が消失し、残りのマウスの平均生存期間を非治療群に比べ有意に延長した。しかし、絨毛上皮癌 GCH-nu、子宮頸癌 SKG-11に対しては治療効果がなかった。②上記以外の株については移植後31日目の腫瘍重量を非治療群と治療群で比較するT/Cで判定した結果、肺癌 Taneda、Lx-1、Li-7、悪性黒色腫 Sk-14、副腎癌 SawayamaではT/Cがそれぞれ4、34、47、31、16と明らかな効果を示し、肺癌 Lu-65、肝癌 Matsuda、膵臓癌 Kuronumaでもそれぞれ84、82、49と抑制傾向を示した。しかし乳癌 Mx-1では101と全く効果を示さなかった。③1回の投量を62.5mg/kgと減量しても同様の抑制効果が観察されたが、250mg/kgに比べるとその程度は弱かった。④投与方法を1週1回4回と間歇的にした場合にも250mg/kg投与ではそれぞれのT/Cが胃癌 Horiuchi: 68、ALL:24、肺癌 Taneda: 34、Lu-65:73、Lx-1:23、肝癌 Li-7:50、悪性黒色腫 Sk-14:47、膵臓癌 Kuronuma:53、副腎癌 Sawayama:65、乳癌 Mx-1:92であり、連続4日間投与に比べると程度は弱くなったが、ほぼ同様の抗腫瘍効果が観察された。

また、ウサギ腫瘍 Vx-7の肺転移への効果は、肺転移陽性例が、リビオドール単独群、対照群ではともに100%であったのに対し、リビオドール混合ALA投与群では25%に減少し明らかな抑制効果が観察された。またVx-7注入領域リンパ節への転移程度を示す膝窩リンパ節の重量も非治療群では6.16gであったのに対し、リビドール混合ALA投与群では0.84gと有意に抑制された。

以上の実験成績は、ALAの抗腫瘍効果が多種類のヒト癌細胞株およびウサギのVx-7腫瘍に対しても発揮されることを示している。このことは、 ω -3脂肪酸の一種 α -リノレン酸(ALA)は、既存の癌化学療法剤にくらべ宿主生体への障害性が弱く、宿主介在性の効果を発揮しやすいという申請者らの以前の実験成績を考えあわせると、新しい癌化学療法剤として有望であることを示唆している。本研究には、ALAの抗腫瘍効果の作用機作や至適投与経路など解明しなければならない問題点が残っているが、多くのヒ

ト癌細胞株を標的として、ヌードマウスを用いて生体内での抗腫瘍効果を示していることは今後の癌治療薬剤の開発に多くの示唆を与えるものである。

口答発表にあたって、石橋教授より、多くの脂肪酸のなかから、とくに ω -3脂肪酸を選択した理由、生体内に常在する脂肪酸が抗腫瘍効果を発揮する理由など、小山富康教授からはALAによって、細胞膜の流動性が上昇する理由、癌細胞が破壊される様式などの質問があったが、申請者は適切な応答をなし得た。

石橋教授、小山教授には個別に審査を受け、申請者の当該分野に関する幅広い知識を含めた関連事項についての質疑応答により、合格と判定された。

以上、本研究は、既存の癌化学療法剤とは異なった作用機作の癌治療薬の開発にとって示唆に富む研究成果を含むものと評価できる。よって、博士（医学）の学位に相当すると判定した。