

Adriamycin の殺細胞効果の加温および Cepharanthine による修飾

岡山大学医学部放射線医学教室 (主任: 青野 要教授)

水 田 昭 文

(昭和63年12月16日)

Key words : Adriamycin, cepharantine, 加温, 殺細胞効果

緒 言

癌化学療法において, 制癌剤耐性細胞の克服は重要な課題である。ある種の制癌剤は, その殺細胞効果を細胞内に取りこまれることにより発現しており, また制癌剤耐性獲得細胞は, 細胞内からの制癌剤の排泄機能が增强されていることが報告されている。そのため, 制癌剤の細胞内への流入の促進および排泄の抑制により細胞内への制癌剤の蓄積を増加させれば, 殺細胞効果を增强することができ, 化学療法における制癌剤耐性細胞の克服も可能になると考えられる。

Adriamycin (以下 ADR) は, 現在高頻度に用いられる制癌剤の1つであり作用機序は DNA に結合し, 引き続いておこる DNA 合成を抑制することによって殺細胞効果をもたらすと考えられている^{1,2)}。その効果の発現には細胞内への ADR の取り込みが不可欠であり, 細胞内の ADR の蓄積を増加させることにより, その殺細胞効果を增强することが可能である。著者らは細胞内 ADR 濃度が flow cytometry (FCM) により測定できるのを利用して³⁻¹²⁾、加温および各種薬剤との併用による ADR の細胞内への流入促進, 排泄抑制について NIH 3 T 3 細胞を使用して研究し, また, 加温と Cepharanthine (以下 CEP) による ADR の細胞内濃度の上昇が殺細胞効果として認められるかを, NIH 3 T 3 細胞を用いたコロニー形成法により観察した。

材 料 と 方 法

細胞: 実験に使用した細胞は NIH 3 T 3 細胞 (Temple 大学 Baserga 教授から供与) で Dulbecco's modified Eagle medium (日水製薬, 以下 DMEM, Penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml を含む) に 10% calf serum (Gibco) を添加して継代培養した。それぞれ 25 cm² flask (Falcon) に 4×10^5 個の細胞を植え, 48 時間後に対数増殖期にある細胞を実験に使用した。

加温: 加温は恒温槽で flask を水中に設置して行った。温度は基準温度計にて測定し, 温度変化は $\pm 0.05^\circ\text{C}$ であった。加温した温度は 37.0, 39.0, 41.0, 42.0, 43.0, 44.0 $^\circ\text{C}$ である。

細胞内 ADR 量の測定: ADR 処理後冷 Phosphate buffer saline (PBS) にて 3 回洗浄し, Trypsin 処理し, 遠心後冷 PBS にて細胞浮遊液とし水中に保ち, 直ちに FCM にて測定した。一方, ADR の細胞外への排泄を観察する場合は 60 分間 ADR 処理後洗浄し, 新しい培養液 (各種薬剤を含有群と不含群) と交換し, 4 時間後に計測した。FCM は FACS III (Becton Dickinson Co.) を使用し, 488nm で励起し, 530nm 以上の蛍光量を, 縦軸に細胞数をとったヒストグラムを描かせた。FCM で得られた曲線の積分値を測定した細胞数で割ったものを平均蛍光量とした。この値より無処理細胞の平均自然蛍光量を差し引いた量を平均細胞内 ADR 量とした。

ADR: ADR (協和発酵より供与) を蒸留水で溶解後, 凍結保存したものを実験の都度溶解し,

DMEMにて希釈して使用した、ADR処理は細胞内ADR量を計測する場合は処理濃度10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、処理時間60分で、また、殺細胞効果を観察する場合は処理濃度0.10 $\mu\text{g/ml}$ (実験によっては最高1.0 $\mu\text{g/ml}$)、処理時間30分(実験によっては最長180分)でおこなった。なお、ADRの使用はYellow light下で、ADR処理は恒温槽でflaskを加温しながらおこなった。

CEP: CEP(化研生薬より供与)を蒸留水で1000 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したものを冷凍保存し、実験の都度DMEMで希釈し最終濃度1.0 $\mu\text{g/ml}$ で使用した。CEP処理は37°C CO₂インキュベーター内で30分間前処理した後、恒温槽内にて30分間加温、もしくは同時にADR処理を併用しておこなった。また後処理としては、1) DMEMで3回洗浄後 CEP 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を加えたDMEMを再度使用して240分37°C、CO₂インキュベーター内で処理した群、2) 加温とADR処理後、コロニー形成のため植えかえたdishの培養液に CEP 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を加え11日間処理した群、3) 後処理しなかった群の3種類を用いた。

薬物処理: 細胞内ADRの取り込みを測定する場合、2.3 $\mu\text{g/ml}$ Verapamil(エーザイ製薬)、1.0 $\mu\text{g/ml}$ Lidcaine(藤沢薬品)、1% Ethanol、1% Dimethyl sulfoxide(DMSO: sigma)並びに1.0 $\mu\text{g/ml}$ Polyprenoic acid(エーザイ製薬)をADR処理前30分に投与した。

殺細胞効果: Trypsin処理により細胞浮遊液を作製し、3 cm dish(Falcon)に6 ml DMEMとともに 2.0×10^3 個の細胞を植えた。11日間培養後固定染色し細胞数50個以上のコロニーを数え、コントロールとの生存率比を求めた。なおADR処理 CEP処理したものはTripsin処理前にDMEMにて3回洗浄した。

結 果

1. ADRの加温による細胞内取り込み量の変化

加温により、ADRの細胞内の増加がみとめられており(図1)、加温がADRの細胞内への流入を促進させ、また加温する温度が高温になるほどさらに流入を促進させていることがあきらかである。

2. 加温および薬剤によるADRの細胞内取り込みと排泄

他剤との併用では、Verapamil、CEP併用により細胞内ADR濃度の軽度の上昇とともに両薬剤においては著明な排泄抑制効果のみとめた。その他のEthanol、Lidocaine等の著者の試みた薬剤では期待する効果を得られなかった(図2)。以上の結果より、ADRの細胞内への流入の促進は加温により最も得られ、さらにCEPを併用することにより排泄が抑制され、さらにADRの細胞内濃度の上昇が得られると考えられる。

3. 加温による殺細胞効果

加温のみによるNIH 3 T 3細胞の殺細胞効果を経時的に観察した(図3)。39.0、41.0°Cの加温では殺細胞効果はほとんどみられなかったが、42.0、43.0、44.0°Cの加温では殺細胞効果のみとめ、それは温度の増加および加温時間の延長につれ増大した。

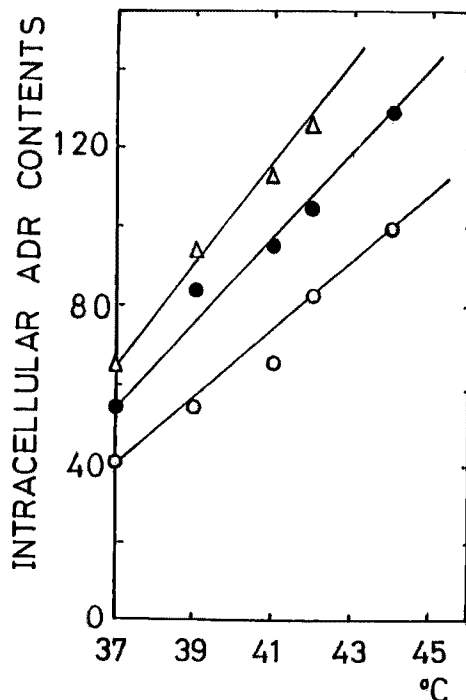


図1 Adriamycin (ADR)の加温による細胞内蓄積量の変化
37.0, 39.0, 41.0, 42.0, 44.0°CにてADR 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 処理 処理時間 30分(○), 60分(●), 90分(△)

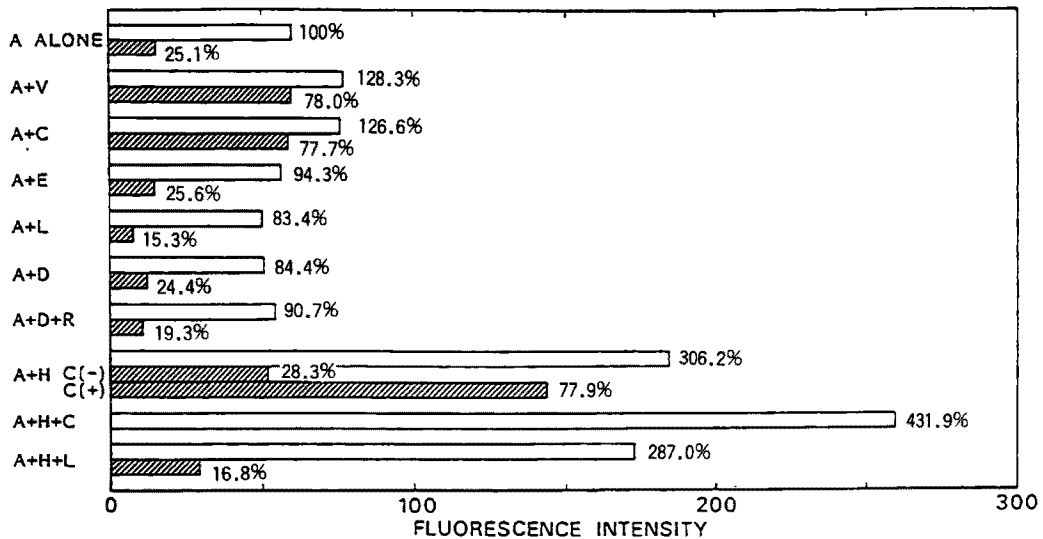


図2 加温および薬剤の併用による ADR の細胞内取り込みと排泄
 37.0℃, 60分間, ADR (5.0μg/ml) で処理直後に細胞内の ADR 量を計測 (上段の棒グラフ), 洗浄後 ADR 不含の培養液 (各種薬剤を含む) と交換後240分後の ADR 量を計測 (下段の棒グラフ)

- A : ADR (5.0μg/ml)
- V : VERAPAMIL (2.3μg/ml)
- C : CEPHARANTINE (1.0μg/ml)
- E : ETHANOL (1.0%)
- L : LIDOCAINE (1.0μg/ml)
- D : DIMEHYLSULFXIDE (1.0%)
- R : POLYPRENOIC ACID (1.0μg/ml)
- H : HYPERTHERMIA (43℃)

4. 各温度における ADR の殺細胞効果

NIH 3 T 3 細胞に ADR 0.10μg/ml を添加直後より 37.0, 39.0, 41.0, 43.0℃ における殺細胞効果を ADR 添加後 180 分まで経過観察した (図 4). 37.0, 39.0, 41.0, 43.0℃ と温度の増加にともなって殺細胞効果が増大した. また ADR 処理および加温時間が延長するにつれて殺細胞効果は増強した.

また ADR の濃度の変化における殺細胞効果の観察をおこない, 37.0, 39.0, 41.0, 43.0℃ のいずれの温度においても濃度の上昇にともなって殺細胞効果が増強した (図 5).

5. 加温における CEP の殺細胞効果

CEP 処理に 37.0, 39.0, 41.0, 43.0℃ 30 分間の加温を併用し, その殺細胞効果を観察した (図 6). さらに図 6 にあらわした生存率を, 加温のみによる生存率 (図 3 参照) で除することによ

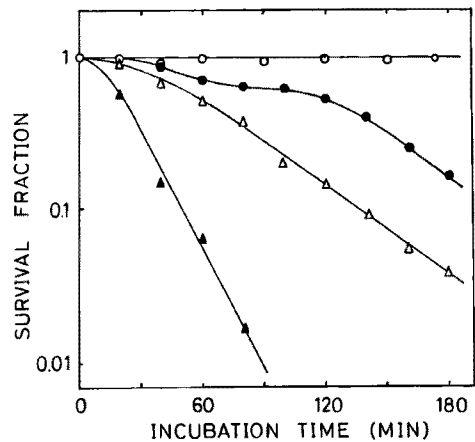


図3 加温による殺細胞効果
 41.0℃ (○), 42.0℃ (●), 43.0℃ (△), 44.0℃ (▲) にて加温

り、CEPの殺細胞効果の相乗効果をあらわすグラフを得た(図7)。CEP処理60分(前処理30分、加温30分)および300分(前処理30分、加温30分、後処理240分)における殺細胞効果は、37.0、39.0、41.0℃においてほとんどみられず、43.0℃で生

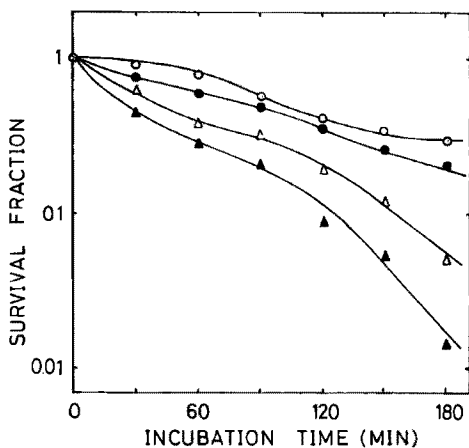


図4 加温によるADRの殺細胞効果の変化
30分間、ADR (0.10 μ g) 処理に37℃ (○)、
39℃ (●)、41℃ (△)、43℃ (▲) の加温を
併用

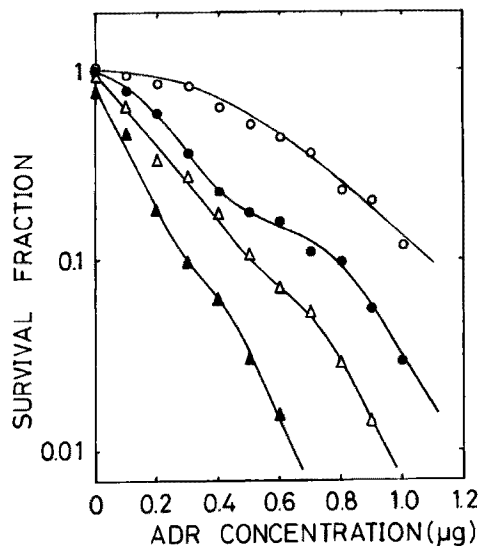


図5 ADRの濃度による殺細胞効果の変化
37℃ (○)、39℃ (●)、41℃ (△)、43℃ (▲)
の加温を併用してADR処理

存率がやや低下したが、図7よりそれは30分加温による殺細胞効果が大半をしめており、CEPによる殺細胞効果は43.0℃でもほとんどみられなかった。すなわちCEP処理60分、300分では、殺細胞効果およびその加温による相乗効果はみとめられなかった。CEP後処理11日目では明らかな殺細胞効果を認め、加温する温度が上昇するにつれて殺細胞効果がわずかに増強した。

6. ADRの殺細胞効果の加温CEP処理による変化

CEP処理に加温+ADR処理30分を併用(以下三者併用)して殺細胞効果を観察した(図8)。CEP処理の時間が後処理0分、240分、11日と延長するほど殺細胞効果が増強し、また加温する温度が37.0、39.0、41.0、43.0℃と上昇するにつれても殺細胞効果は増強した。

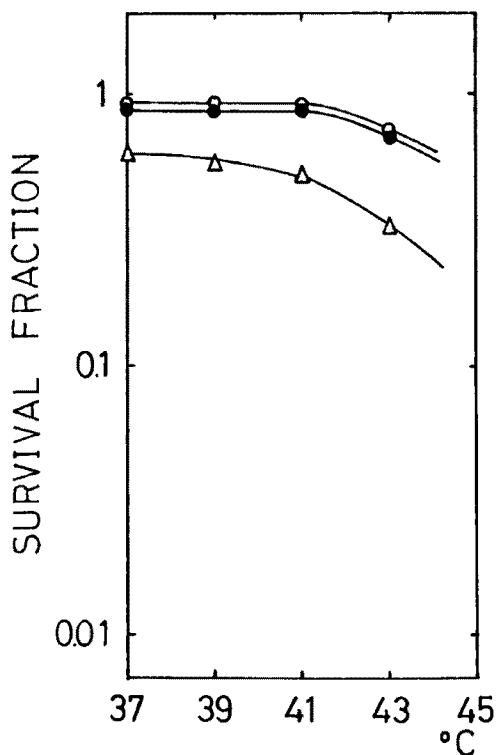


図6 CEPによる殺細胞効果
後処理なし (○)、後処理240 (●)、後処理11
日 (△)

加温のみによる殺細胞効果を除くため、三者併用による生存率(図8)を加温による生存率(図3参照)で除して図9を得た。図9は三者併用の殺細胞効果の中のADR処理とCEP処理を併用したために生じた殺細胞効果であり、やはり加温する温度の上昇、CEP処理時間の延長により増強している。

次に加温およびADR処理30分による殺細胞効果を除くため、三者併用による生存率を加温およびADR処理30分による生存率で除することにより(図8より算出)、図10を得た。図10は三者併用において、CEP処理を加えたことにより生じた殺細胞効果をあらわしており、CEP処理0分、240分ではグラフは傾斜がゆるやかになってくるが、加温する温度につれやはり生存率の低

下をみとめた。なお、加温+CEP処理では後処理0分、240分で殺細胞効果に大差をみとめなかったがADRを加えることにより、その差は顕著になっている。

同様な方法で図6、図8より三者併用の殺細胞効果で加温+CEP処理によるものを除き、ADRを加えたことにより生じた殺細胞効果を表わす図11を得た。このグラフもADR処理時間の延長、加温する温度の上昇による生存率の低下をみとめている。

さらに図7、図10より、三者併用の殺細胞効果で加温、ADR処理による殺細胞効果およびCEP処理のみによる殺細胞効果を除き、三者併用の相乗効果として得られた殺細胞効果のグラ

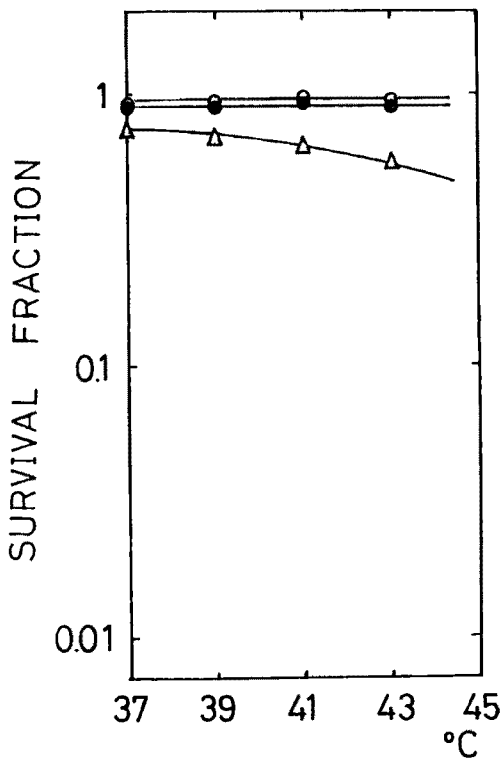


図7 加温による殺細胞効果を除いたCEPによる殺細胞効果
 図3および図6より算出
 後処理なし(○)、後処理20分(●)、後処理11日(△)

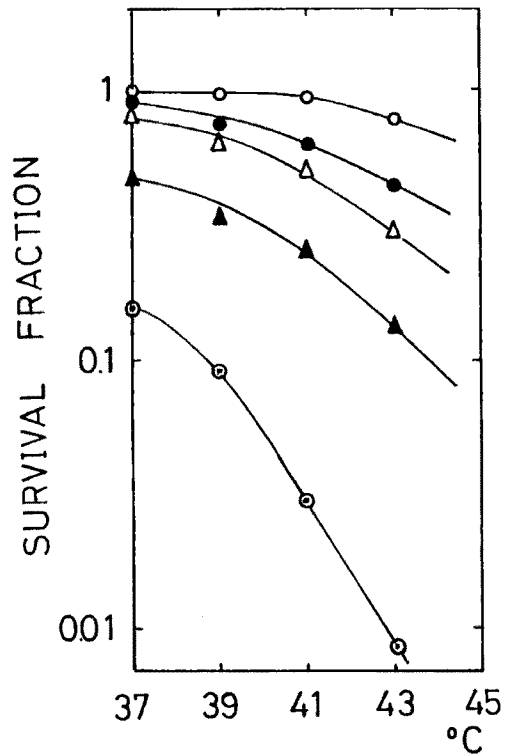


図8 加温+CEP処理併用によるADRの殺細胞効果の変化
 加温(○)、加温+ADR(●)、加温+ADR+CEP後処理なし(△)、加温+ADR+CEP後処理240分(▲)、加温+ADR+CEP後処理11日(●)

フを算出した(図12)。三者併用により生じた殺細胞効果における相乗効果も加温する温度の上昇, CEP 処理時間の延長により増強をみとめた。

考 察

現在、化学構造も作用機序も異なる多くの制癌剤に対して同時に耐性となっているような多剤耐性癌細胞の研究が多くなされている¹⁴⁻²⁶⁾。その多剤耐性細胞では感受性細胞に比べ、細胞内の薬剤の蓄積量が少なくなっており、それは一度細胞内に取り込まれた制癌剤が感受性細胞よりすみやかに排泄するためである^{1,14,15)}。その機序としては細胞膜のエネルギー依存の薬剤排泄機構が活発化することが考えられ^{1,14)}、それに

関連して細胞膜上に存在する分子量約17万のP糖蛋白の影響について多くの報告がなされている¹⁶⁻²¹⁾。

化学療法の効果をあげるためには多剤耐性細胞の克服が重要になっており、そのための非制癌剤の併用についての研究もなされている。膜の透過性を亢進させるような物質として Amphotericin B は、制癌剤の作用を増強する²³⁾。細胞膜透過性亢進物質の併用は多剤耐性細胞の克服に有用のようにも考えられるが、選択性が高くないため、正常細胞への毒性の問題もあって臨床応用は困難である¹⁴⁾。また能動輸送を抑制する薬剤の併用により制癌剤の排泄を抑制し、

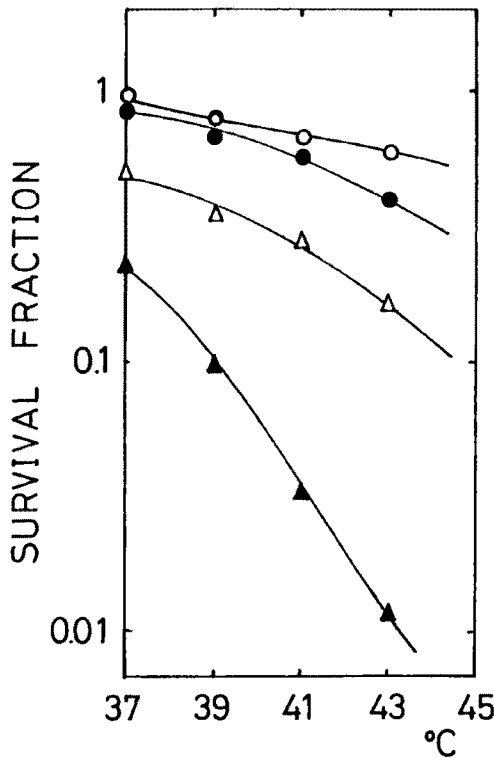


図9 加温による殺細胞効果を除いた加温+CEP 処理併用による ADR の殺細胞効果の変化
 図8より算出
 加温+ADR(○), 加温+ADR+CEP 後処理なし(●), 加温+ADR+CEP 後処理240分(△), 加温+ADR+CEP 後処理1日(▲)

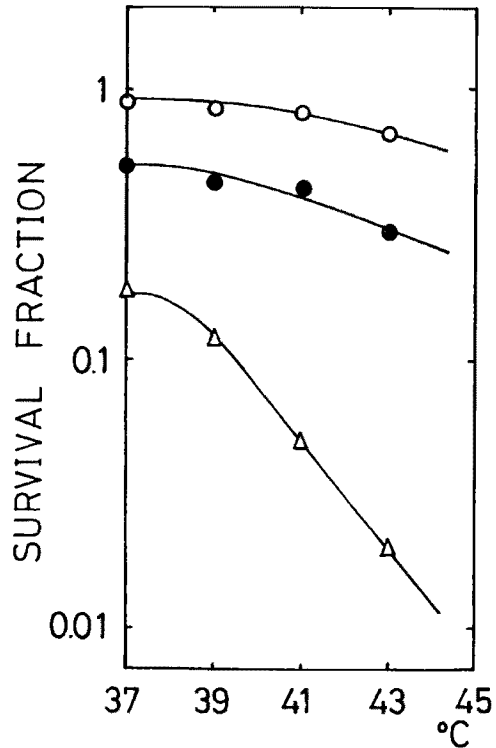


図10 加温+ADR による殺細胞効果を除いた加温+CEP 処理併用による ADR の殺細胞効果の変化
 図8より算出
 加温+ADR+CEP 後処理なし(○), 加温+ADR+CEP 後処理240分(●), 加温+ADR+CEP 後処理11日(△)

多剤耐性を克服する試みもなされている^{24-28,31)}。カルシウム拮抗剤である Verapamil が薬剤排泄を阻害し、耐性を克服することはすでに *in vivo*, *in vitro* の実験とも証明されている²⁴⁻²⁶⁾。その他のカルシウム拮抗剤や Calmodulin 阻害剤^{26,27)} も耐性の克服に有効であるという研究がなされ、これらのいくつかは臨床試験がなされている¹⁴⁾。

著者の NIH 3 T 3 細胞を使った実験では CEP と Verapamil に ADR の排泄抑制作用があることが認められた。Lidocain 等の麻酔薬や Ethanol 等の Alcohol は細胞膜に作用する^{28,29)} ことが知られているため、制癌剤の取り込みおよび排泄に影響を及ぼすことが期待されたが、

細胞内 ADR 蓄積量は増加しなかった。また、細胞分化に影響するとされる DMSO と Retinoid (Polyprenic acid)³⁰⁾ でも細胞膜に影響することが期待されたが、期待した結果が得られなかった。Verapamil に関しては多くの報告がなされているが、臨床で ADR の排泄抑制効果を得るためには臨床使用量以上の投与が必要とされ、臨床で使用することは困難と考えられている。そこで、ADR の排泄抑制する CEP についてさらに殺細胞効果の検討をおこなった。

CEP には細胞膜と結合した酵素である Phospholipase A₂ と Phospholipase C の活性を低下させる作用や³¹⁾細胞膜に取り込まれ脂質二重層の

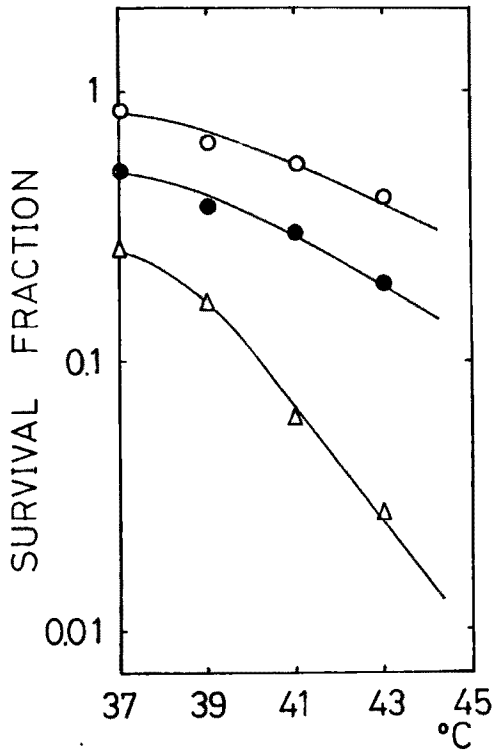


図11 加温+CEP による殺細胞効果を除いた加温+CEP 処理併用による ADR の殺細胞効果の変化

図6および図8より算出

加温+ADR+CEP 後処理なし (○), 加温+ADR+CEP 後処理240分 (●), 加温+ADR+CEP 後処理11日 (△)

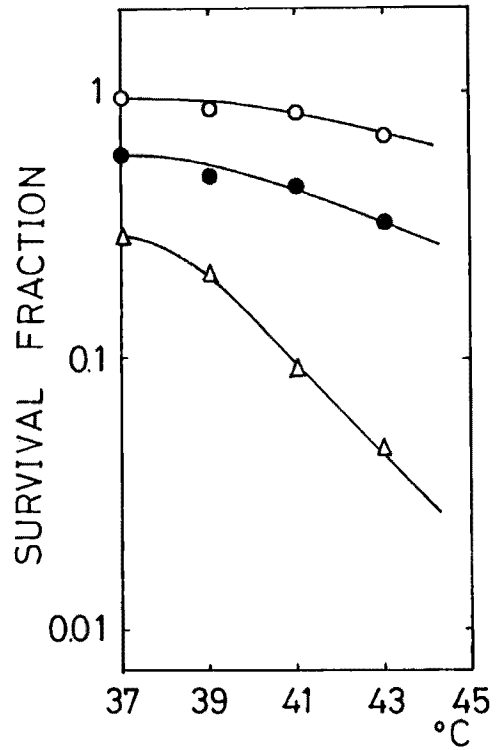


図12 加温+CEP および ADR による殺細胞効果を除いた加温+CEP 処理併用による ADR の殺細胞効果の変化

図7および図10より算出

加温+ADR+CEP 後処理なし (○), 加温+ADR+CEP 後処理240分 (●), 加温+ADR+CEP 後処理11日 (△)

再配列をおこし、膜を安定化させる作用がある^{32,33)}と考えられている。また、CEPにはマイクロブームからカルシウムを放出させ、カルシウム依存の反応を間接的に抑制したり、膜に結合したカルシウムの放出を抑制するという報告²⁶⁾もある。細胞膜でのカルシウムの透過性を変化させる作用もあり³⁴⁾、カルシウムの細胞内濃度に影響を及ぼしている。しかし CEP の ADR の排泄抑制の作用機序は、まだ十分に解明されていない。Verapamil のようなカルシウム拮抗剤では、その排泄抑制は細胞膜での薬剤排泄機構を抑制することが解明されており¹⁾、多剤耐性細胞では Verapamil が P 糖蛋白と結合することが報告されている¹⁾。CEP は細胞内のカルシウム濃度に影響をおよぼしており、カルシウム拮抗剤と類似した作用がみられるとも考えられるが、その解明には今後の研究が期待される。

CEP は比較的毒性の少ない薬剤とされており、1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では毒性はほとんどみとめないとされている⁸⁾。今回の実験でも 1 $\mu\text{g/ml}$ 60分および300分の CEP 処理ではほとんど毒性をみとめなかった。しかし毒性の低い CEP 処理においても、加温 ADR の殺細胞効果の増強をみとめていることは、耐性細胞の克服の方法として加温 ADR 処理への CEP の併用療法は臨床面での有用性が期待される。また加温する温度の上昇につれて毒性の増加が少ないことも温熱療法に制癌剤の排泄抑制剤として併用するのに適していると思われる。

温熱療法は悪性腫瘍の治療法として広くおこなわれるようになってきている。しかし、温熱療法を試みられる症例は温熱療法単独でなく化学療法、放射線療法と併用されることが多い。また化学療法、放射線療法をおこない十分な効果が得られないため、温熱療法が試みられる症例も比較的多くみられる。そのため温熱療法において他の療法との併用の研究は、臨床の面でも重要である。そのため温熱療法と化学療法の併用による殺細胞効果を増強する薬剤の基礎的研究はいずれは臨床への応用が期待されるものである。

今回の実験では ADR による殺細胞効果の温熱療法による増強は加温単独では明らかな殺細胞

効果のみとめなかった 39.0, 41.0°C の加温ですでに認められた。このことは加温による ADR の殺細胞効果は臨床的に有効とされない比較的低温の加温でも増強されることを示唆している。臨床では温熱療法において、装置、腫瘍部位や患者の苦痛により十分な加温が得られず、そのため期待した治療効果を得られない症例がよくみられる。そこで殺細胞効果のない加温でも、制癌剤との併用によりその殺細胞効果を増強するため、十分な加温を得られない症例においても制癌剤との併用で温熱療法の治療効果を期待できる。

本実験において ADR の殺細胞効果の加温 + CEP 処理による増強をみとめた。その原因として FCM でみられた加温による ADR の細胞内への流入の促進、CEP による細胞外への排泄の抑制が考えられ、癌の集学的療法、特に多剤耐性細胞の克服においての有用性が期待された。しかし、このような加温 + CEP による制癌剤の細胞内蓄積の増加は癌細胞のみならず、正常細胞でもおこりうると考えられ、臨床応用においては副作用、腫瘍選択性の問題の解釈が必要になると思われる。しかしながら化学療法と異なり温熱療法は腫瘍を選択的に治療することをめざす局所療法として試みられることが多く温熱療法の併用は殺細胞効果の増強のみならず腫瘍選択性、副作用の問題の解決法にもなりうると考えられる。

また、局所療法の併用に放射線療法も考えられる。放射線療法も温熱療法の併用は臨床ですでに有用性を広くみとめられており、ADR、CEP をさらに併用することにより殺細胞効果の増強をはかり、また腫瘍選択性の向上もはかれると思われる。今後の研究が期待される。

結 論

制癌剤の殺細胞効果は制癌剤の細胞内蓄積量に大きく影響されその蓄積量は細胞内への制癌剤の流入の促進および排泄の抑制により増加する。著者の Flow cytometry (FCM) を用いて Adriamycin (ADR) の細胞内への流入排泄に対する各種膜作用物質の作用を観察した。また、加温、並びに Cephalanthine (CEP) による ADR

殺細胞効果の増強を検討した。

1. 細胞内への ADR の流入は加温温度が高い程, 処理時間が長い程増加する。
2. 膜作用物質のなかで CEP と Verapamil は細胞内への ADR の流入に対して作用しないが, 細胞外への流出 (排泄) 機構に作用 (抑制) し, ADR の細胞内蓄積量を増加させる。
3. 加温のみによる殺細胞効果は41.0℃以下ではみられず42.0℃以上の加温とともに殺細胞効果が増強した。
4. ADR の殺細胞効果は加温処理により相乗効果を得られたが, その効果は加温単独では殺細胞効果のみられない39.0, 41.0℃においても認められた。
5. 加温 + ADR 処理 + CEP 処理では, 殺細胞効果において相乗効果を認めた。その相乗効果は加温する温度の上昇, および CEP 処理時間の延長により増強された。
6. 制癌剤耐性細胞の克服には制癌剤の流入の

促進, 排泄の抑制により薬剤の細胞内蓄積の増加が重要であり, ADR においては加温 + CEP が有用と考えられ臨床への応用が期待される。

7. 殺細胞効果を有さない加温においても ADR の殺細胞効果を増強することから温熱療法において十分な加温が得られない症例でも制癌剤の併用により治療効果を向上させることが可能と考えられる。

この研究の一部は第5回国際ハイパーサーミアシンポジウムにて報告した。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲賜りました青野要教授に深甚なる謝意を表わします。終始研究の御指導を戴いた岡山大学医療技術短期大学川崎祥二教授に深謝致します。また, 平木祥夫助教授並びに快く御協力下さいました教室員皆様並びに山口大学医学部理学教室佐々木功典講師に心から感謝の意を表わします。

文 献

- 1) 鶴尾 隆: 癌の多剤耐性と其の克服。癌と化療 (1988) 15, 2848—2857.
- 2) Zunino F, Gambetta R, DiMarco A and Zaccara A: Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. *Biochim Biophys Acta* (1972) 277, 489—498.
- 3) Chambers SH, Bleehen NM and Fatson JV: Effect of cell density on intercellular adriamycin concentration and cytotoxicity in exponential and plateau EMT 6 cells. *Br J Cancer* (1984) 49, 301—306.
- 4) Durand RE and Olive PL: Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in single cells in vitro. *Cancer Res* (1981) 41, 3489—3494.
- 5) 川崎祥二, 佐々木功典, 長岡 栄, 江部和勇, 中西 敬, 高橋 学: Adriamycin の細胞内取り込みへの hyperthermia の影響。日医放線会誌 (1984) 44, 727—731.
- 6) Krishan A and Ganapathi R: Laser flow cytometric studies on the intracellular fluorescence of anthracyclines. *Cancer Res* (1980) 40, 3895—3900.
- 7) Muirhead KA, Schmitt TC and Muirhead AR: Determination of linear fluorescence intensities from flow cytometric data accumulated with logarithmic amplifiers. *Cytometry* (1983) 3, 251—256.
- 8) 長岡 栄, 川崎祥二, 佐々木功典, 中西 敬: アルカロイド(セファランチン)によるアドリアマイシンの細胞内取り込みおよび排泄の修飾。医のあゆみ (1985) 133, 260—261.
- 9) Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K and Nakanishi T: Intracellular adriamycin uptake, retention and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia in vitro. *Jpn J Cancer Res (GANN)* (1986) 77, 205—211.
- 10) 佐々木功典, 高橋 学, 川崎祥二, 長岡 栄, 中西 敬: Flow Cytometry による細胞の Adriamycin 取り込み排出の解析。日癌治療会誌 (1984) 19, 1028—1031.

- 11) 佐々木功典, 高橋 学, 長岡 栄, 川崎祥二: Flow cytometry による3T3細胞内アドリアマイシンの測定. 日癌治療会誌 (1985) **20**, 66—70.
- 12) 佐々木功典, 長岡 栄, 村上知之, 川崎祥二, 高橋 学: 細胞内のアドリアマイシン取り込みに及ぼすカルシウム拮抗剤の影響. 癌と化療 (1985) **12**, 966—968.
- 13) 長岡 栄, 川崎祥二, 狩野裕一, 中村英典, 中西 敏: 各種細胞における Adriamycin の取り込み, 排泄及び感受性の解析. 日癌治療会誌 (1986) **21**, 63—69.
- 14) 鈴木日出夫: 抗癌剤の耐性とその克服をめざして. 蛋・核・酵 (1988) **33**, 94—100.
- 15) 河野公俊, 菊池淳子, 桑野信彦: 薬剤耐性と細胞修飾. 癌と化療 (1988) **10**, 2853—2852.
- 16) Hamada H, Hagiwara K, Nakajima T, Turuo T: Phosphorylation of the M_r 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to tumor cells: effect of verapamil, trifluoperazine and phorbol esters. *Cancer Res* (1987) **47**, 2860—2865.
- 17) Gerlach HJ, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Ling KL: Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature (Lond)* (1986) **324**, 485—489.
- 18) Tsuruo T: Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn J Cancer Res (Gann)* (1988) **79**, 285—296.
- 19) Sugimoto Y, Tsuruo T: DNA-mediated transfer and cloning a human multidrug-resistant gene of adriamycin-resistant myelogenous leukemia K562. *Cancer Res* (1987) **47**, 2620—2625.
- 20) Fojo AT, Ueda K, Salamon DJ, Pohlack DG, Gottesman MM, Pastan I: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 7735—7738.
- 21) Thiebaut F, Turuo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham: Cellular location of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 7735—7738.
- 22) Nagaoka S, Kawasaki S, Karino Y, Sakai K, Nakanishi T: Modification of cellular efflux and cytotoxicity of adriamycin by biscoclaulin alkaloid in vitro. *Eur J Cancer Clin Oncol* (1987) **23**, 1297—1302.
- 23) Krishan A, Sauerteig A, Gordon K: Effect of Amphotericin B on adriamycin transport in P388 cells. *Cancer Res* (1985) **45**, 4097—4102.
- 24) Tsuruo T, Iida H, Tukagoshi S, Sakurai Y: Potentiation of vincristine and adriamycin effect in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* (1983) **43**, 2267—2272.
- 25) Turuo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y: Increased accumulation of tumor cells following incubation with calcium antagonists and calcium inhibitors. *Cancer Res* (1982) **42**, 4730—4733.
- 26) Kessel D, Wiberding C: Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonist. *Cancer Res* (1985) **45**, 1687—1691.
- 27) Turuo T, Iida H, Kitatani Y, Yokota K, Tsukagoshi S, Sakurai Y: Effect of quindine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant cells. *Cancer Res* (1984) **44**, 4303—4307.
- 28) Seeman P: The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol Rev* (1972) **24**, 583—655.
- 29) Henle KJ: Interaction of mono- and polyhydroxy alcohols with hyperthermia in CHO cells. *Radiat Res* (1981) **88**, 392—402.

- 30) 川崎祥二, 長岡 栄, 片山 節, 中西 敬, 佐々木功典, 村上知之: 細胞分化誘導剤によるマウス NIH 3 T 3 細胞の細胞周期の変動. 関西フローサイトメトリー研究会機関誌 (1985) **3**, 33—38.
- 31) Watanabe S: Inhibition of platelet aggregation by cephalanthine is accomplished during the early, membrane-related activation process. *Acta Med Okayama* (1984) **38**, 101—115.
- 32) Sheetz MP, Singer SJ: Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* (1974) **71**, 4457—4461.
- 33) Sato T, Kanaho Y, Fujii T: Relation of the characteristic action of biscochlorine alkaloids on the erythrocyte membrane. *Cell Struct Funct* (1980) **5**, 155—163.
- 34) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y: Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* (1981) **41**, 1967—1972.

**Modification by hyperthermia and cepharanthine of
the Killing effect of adriamycin on NIH 3T3 cells**

Akifumi MIZUTA

Department of Radiation Medicine,

Okayama University Medical School

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Aono)

The cytotoxic effect of anticancer agents depends markedly on the intracellular uptake of the anticancer drug ; its maintenance is increased by accelerating the intracellular uptake of anticancer agent and inhibiting. Using with flow-cytometry, we demonstrated that the intracellular uptake of adriamycin (ADM) is increased by hyperthermia, and that cepharanthine (CEP) and Verapamil inhibit its retention.

We investigated the cytotoxic effect of the combination of ADR, CEP and hyperthermia, using a NIH3T3 cell line. The cytotoxic effect of ADR is increased by hyperthermia ; its effect is acquired at a lower temperature which has no cytotoxic effect alone. With the combination of CEP, ADR and hyperthermia, the cytotoxic effect is further increased. The synergism is increased by the elevation of temperature and a long of exposure time of CEP. The increase of the intracellular accumulation anticanceragent is important to overcome multidrug-resistance, a phenomenon which has that attracted a great deal of attention.