

Verapamil による制癌剤の効果増強について

—人培養腎癌細胞株に対する効果—

長崎大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 斉藤 泰教授)

渡 辺 義 博

ENHANCEMENT OF CYTOTOXICITY OF ANTICANCER DRUGS BY VERAPAMIL —EFFECTS ON ESTABLISHED HUMAN RENAL TUMOR CELL LINE—

Yoshihiro Watanabe

Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan
(Director: Prof. Y. Saito)

We have examined the enhancing effect of verapamil on the cytotoxicity of vincristine (VCR), adriamycin (ADM) and cis-platinum (CDDP) against the established cell line from human renal cell carcinoma (NUR) and primary human kidney cell (PHK). To test the effect of cytotoxicity, we have assayed cell growth curve and ^3H -thymidine incorporation. And effects of verapamil on the uptake and release of anticancer drugs were examined by measurement of cellular radioactivity of ^3H -VCR and ^3H -daunomycin. The concentration of verapamil using anticancer drugs was $1.0\mu\text{g/ml}$ which itself showed no cytotoxicity.

The results we obtained were as follows: 1) Verapamil showed enhanced cytotoxicity of ADM, VCR and CDDP in the growth curve and reduced the ^3H -thymidine incorporation for NUR cell. The concentration of verapamil which could enhance the cytotoxicity of ADM against NUR cell was proved to be $0.1\mu\text{g/ml}$ and over.

2) The IC_{50} of ADM, VCR and CDDP for NUR cell by ^3H -thymidine incorporation were 0.095, 4.81 and $1.01\mu\text{g/ml}$, respectively, while in the presence of verapamil ($1.0\mu\text{g/ml}$) the IC_{50} were shifted to 0.039, 1.29 and $0.508\mu\text{g/ml}$, respectively.

3) By verapamil, the uptake of ^3H -VCR and ^3H -daunomycin into NUR cells were increased and the release of ^3H -VCR from NUR cells was also inhibited. But verapamil had no effect on the release of ^3H -daunomycin from NUR cells.

4) In PHK cell, we observed a slight enhancing effect of verapamil on the cytotoxicity of VCR, ADM and CDDP, but the degree was so slight that it seemed to be able to ignore. The uptake of ^3H -VCR and ^3H -daunomycin into PHK cells showed a small increase by verapamil.

要旨: 当教室で樹立した人培養腎癌細胞株 (NUR) および人正常腎細胞 (PHK) を用い, ビンクリスチン (VCR), アドリアマイシン (ADM), シスプラチン (CDDP) に対する verapamil の効果増強作用について検討した。殺細胞効果については, 細胞の増殖曲線, ^3H -thymidine incorporation 法で検討した。また細胞内における ^3H -VCR, ^3H -daunomycin の取り込みを経時的に測定し, 取り込みおよび放出に対する verapamil の影響をみた。verapamil の濃度は細胞毒性を示さない $1.0\mu\text{g/ml}$ とした。verapamil は NUR cell の増殖曲線, ^3H -thymidine incorporation のいずれにおいても ADM, VCR, CDDP の殺細胞効果を増強させ, ^3H -thymidine incorporation の抑制でみると IC_{50} (drug concentration for 50% inhibition) は各々制癌剤単独で 0.095, 4.81, $1.01\mu\text{g/ml}$ であったものが, verapamil $1.0\mu\text{g/ml}$ の併用で, 0.039, 1.29, $0.508\mu\text{g/ml}$ となった。また NUR cell に対し, ADM の効果増強を生じる verapamil の最小濃度は, 約 $0.1\mu\text{g/ml}$ であり, その増強効果は濃度依存性に高められた。 ^3H -VCR, ^3H -daunomycin の NUR cell への取り込みは verapamil によって, いずれも増加した。しかし細胞外放出に対しては, ^3H -VCR は verapamil によって抑制される傾向を示したが, ^3H -daunomycin については, その影響を認

めなかった。PHK cell についても ^3H -thymidine incorporation によって VCR, ADM, CDDP に対する verapamil の影響を検討したが、いずれも軽度であった。また、PHK cell への ^3H -VCR, ^3H -daunomycin の取り込みに対する verapamil の影響も極軽度であった。

結 言

進行性腎癌は泌尿器科領域の悪性腫瘍の中でも、極めて予後不良な疾患であり、最近のめざましい化学療法法の進歩にもかかわらず、これといった有効な制癌剤も見つかっていない。最近では IFN 療法¹⁾がこの疾患の first choice となっているが満足な成績は得られていない。

最近、鶴尾ら²⁾³⁾は adriamycin や vincristine に耐性となった P388 白血病細胞に対し、これら制癌剤に Ca 拮抗剤を併用することで、その耐性が克服できることを報告した。腎細胞癌についても、制癌剤に対し強い抵抗性を有することから、われわれは腎癌細胞は P388 白血病細胞同様、制癌剤に耐性ないし低感受性を有するものと考え、その克服によって治療の手がかりが得られるのではないかと考えた。ある種の制癌剤が臨床的に有効であったという報告⁴⁾⁵⁾に加え stem cell assay によって有効薬剤の選択も可能となっており、これら薬剤を効果的に投与すれば、腎癌の化学療法も違った展開が期待できる。そこでわれわれは、当教室において樹立した人培養腎癌細胞株⁶⁾ (NUR) および人正常腎細胞を用い、verapamil が制癌剤の効果あるいは毒性を更に増強させるかどうか、またその機序について検討を行ない、若干の知見を得たので、考察を加えて報告する。

材料ならびに方法

1. 細胞

使用した細胞は当教室において樹立株化した人培養腎癌細胞 (NUR) および腎細胞癌の正常腎組織部分からトリプシン処理にて培養に移した人正常腎細胞 (PHK) である。これら細胞の培養は炭酸ガス培養器 (37°C, 5%CO₂) 内で行ない、細胞培養液は eagle MEM (日本製薬) および 10% fetal calf serum (FCS: Gibco 社) を用いた。

2. 制癌剤および Ca 拮抗剤

使用した制癌剤は、硫酸ビンクリスチン (VCR: 塩義製薬)、塩酸ドキソルピシン (ADM: 協和発酵)、シスプラチン (CDDP: ブリストルマイヤーズ) である。Ca 拮抗剤としては、エーザイ株式会社の提供により純度 99.9% の verapamil 原末を MEM で希釈して使用した。

3. radiochemicals

^3H -thymidine (specific activity 43Ci/mmol~48Ci/mmol: Amersham 社)

^3H -daunomycin (specific activity 4.3~5.0Ci/mmol: New England Nuclear 社)

^3H -vincristine sulphate (specific activity 4.4~7.6 Ci/mmol: Amersham 社)

4. 実験方法

培養細胞に制癌剤および verapamil を接触させ、その影響を増殖曲線、 ^3H -thymidine の取り込みで観察した。さらに ^3H -daunomycin, ^3H -VCR を細胞と接触させ、その細胞内放射活性を測定することによって、verapamil の影響を検討した。

(1) 増殖曲線への影響

対数増殖期にある NUR cell を 35×10mm ペトリディッシュ (Falcon) に $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 個づつ分注し、炭酸ガス培養器内に静置した。48 時間培養後、各種薬剤を 24~48 時間接触させ、0.02% EDTA および 0.25% trypsin にて細胞を剥離し血球計算盤にて細胞数を計算し、薬剤無処置の control と比較した。

(2) ^3H -thymidine の取り込み

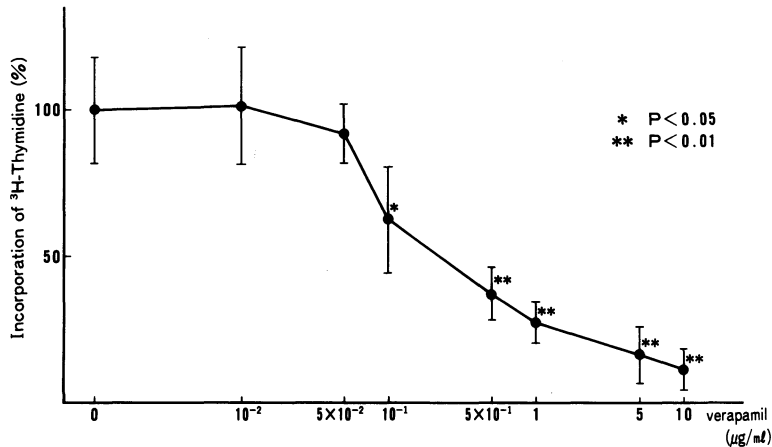
金武ら⁷⁾の方法に準じて施行した。即ち NUR cell および PHK cell を 35mm ペトリディッシュに 2×10^5 個づつまき、対数増殖期になったところで、制癌剤および verapamil を 24 時間接触させた後、 ^3H -thymidine を最終濃度 1μCi/ml で 24 時間取り込ませ、1N-NaOH で細胞を破壊した。次に 10% cold trichloroacetic acid (TCA) を加えて acid insoluble DNA fraction を milipore filter (pore size 0.45μm) にかかけ、これを scintillant で溶かし、液体シンチレーションにて count を行なった。なお、assay は全て triplicate で行なった。

(3) 制癌剤効果増強を生じうる verapamil 濃度の検討

実験(2)の方法を用い、ADM の濃度を 0.1μg/ml に固定し verapamil の最終濃度を 0~10μg/ml まで変化させて相乗効果の生じる verapamil の最小濃度を調べた。

(4) ^3H -daunomycin および ^3H -VCR の取り込みと放出

Fig. 1 The effect of various concentrations of verapamil under the concentration of $0.1\mu\text{g/ml}$ ADM on NUR cell



NUR cell, PHK cell を35mm ペトリディッシュに 2×10^5 個づつまき、対数増殖期になったところで、³H-daunomycin, ³H-VCR を MEM 単独および最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ verapamil 入り MEM に溶かし30秒~24時間細胞と接触させた。NUR cell と接触させる³H-VCR, ³H-daunomycin の最終濃度はいずれも $10^{-2}\mu\text{g/ml}$ とし、また PHK cell と接触させる³H-VCR, ³H-daunomycin の最終濃度は各々 $10^{-2}\mu\text{g/ml}$, $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ とした。次に10%TCA ですばやく洗浄後、1N-NaOH で細胞を破壊し scintillant を10ml 加え、scintillation counter で経時的に細胞内 RI 活性を測定した。細胞外放出に対する実験としては、まず NUR cell を上記同様に培養後、³H-VCR, ³H-daunomycin を7時間接触させて、十分に細胞内に取り込ませた。つづいて medium を吸引後、MEM 単独と $1\mu\text{g/ml}$ verapamil 入り MEM に medium をかえ、その直後から細胞内 RI 活性を経時的に測定した。

結 果

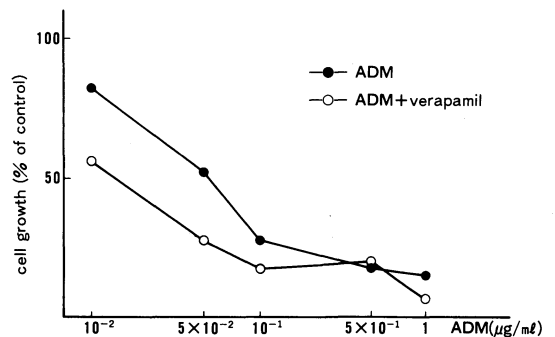
(1) Verapamil の培養細胞に及ぼす影響

verapamil の濃度を $0 \sim 10\mu\text{g/ml}$ まで変化させ NUR cell, PHK cell に対する影響を³H-thymidine incorporation によって検討した。NUR cell, PHK cell いずれも $1\mu\text{g/ml}$ までは、ほとんど影響なく、細胞に対する毒性は $5\mu\text{g/ml}$ (NUR: $p < 0.01$, PHK: $p < 0.01$) 位から生じてきた。

(2) 相乗効果を生じうる verapamil の濃度

Fig. 1 は ADM の濃度を $0.1\mu\text{g/ml}$ に固定し、verapamil の最終濃度を $0 \sim 10\mu\text{g/ml}$ まで変化させ、

Fig. 2 The effect of various concentrations of ADM alone (●) or in the present of verapamil (○) on the growth of NUR cell



NUR cell に対し相乗効果の生じる verapamil の濃度を³H-thymidine の取り込みによってみたものである。相乗効果は verapamil $10^{-1}\mu\text{g/ml}$ 位から生じ ($p < 0.05$), 濃度依存性にその効果が強くなることが観察された。(1) および (2) の実験結果より、制癌剤と併用する verapamil の濃度は、それ自体細胞毒性が無く、かつ十分な相乗効果が得られる $1\mu\text{g/ml}$ とした。

(3) ADM, VCR, CDDP に verapamil を併用した場合の NUR cell に対する殺細胞効果

ADM (Fig. 2), VCR (Fig. 3), CDDP (Fig. 4) いずれも verapamil の併用投与により NUR cell に対する殺細胞効果は更に増強した。

(4) ADM, VCR, CDDP に verapamil を併用した場合の培養細胞の³H-thymidine 取り込みに与える影響

Fig. 3 The effect of various concentrations of VCR alone (●) or in the presence of verapamil (○) on the growth of NUR cell

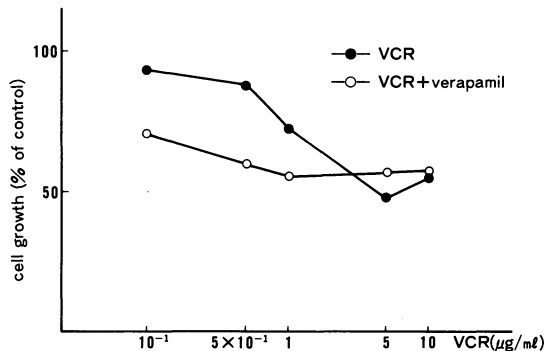
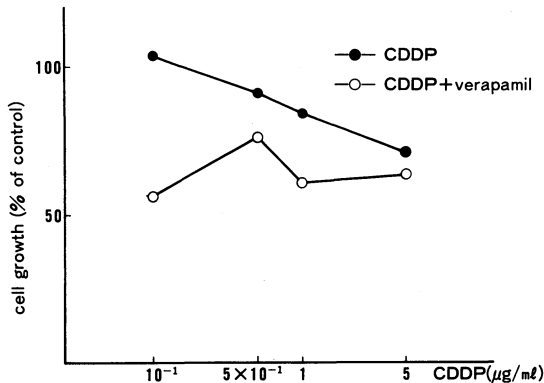


Fig. 4 The effect of various concentrations of CDDP alone (●) or in the presence of verapamil (○) on the growth of NUR cell



NUR cell については ADM (Fig. 5), VCR (Fig. 6), CDDP (Fig. 7) いずれも verapamil との併用により ³H-thymidine の取り込みは低下し DNA 合成阻害が強くなることが明らかとなった。即ち ADM では 10⁻¹ μg/ml (p < 0.01), VCR では 10⁻¹, 5 × 10⁻¹ μg/ml (p < 0.01), 1 μg/ml (p < 0.05), CDDP では 10⁻¹, 5 × 10⁻¹ μg/ml (p < 0.01) の濃度において統計学的に有意差を認めた。また IC₅₀ でみると ADM, VCR, CDDP 各々単独では 0.095, 4.81, 1.01 μg/ml であったものが verapamil 1.0 μg/ml を加えることで 0.039, 1.29, 0.508 μg/ml となり, 2.0~3.7 倍の相乗効果が得られた。PHK cell については, ADM, VCR, CDDP いずれも verapamil の併用による ³H-thymidine 取り込みへの影響は極めて軽度で統計学的有意差は無かった。

(5) ³H-VCR および ³H-daunomycin の細胞内取り込みに対する verapamil の影響

Fig. 5 The effect of ADM only (●) and ADM + verapamil (○) on the incorporation of ³H-thymidine in NUR cell

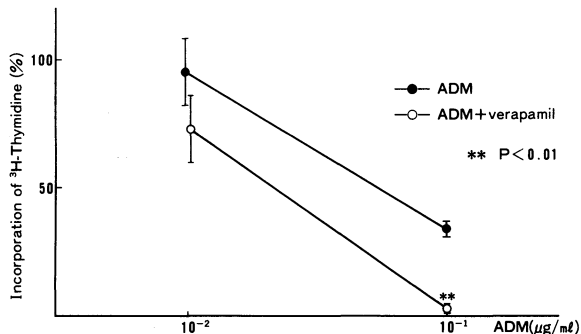


Fig. 6 The effect of VCR only (●) and VCR + verapamil on the incorporation of ³H-thymidine in NUR cell

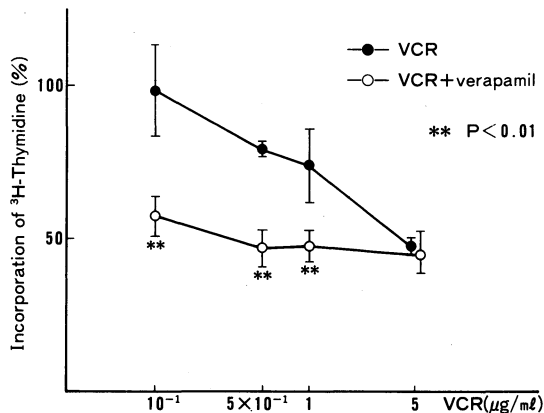
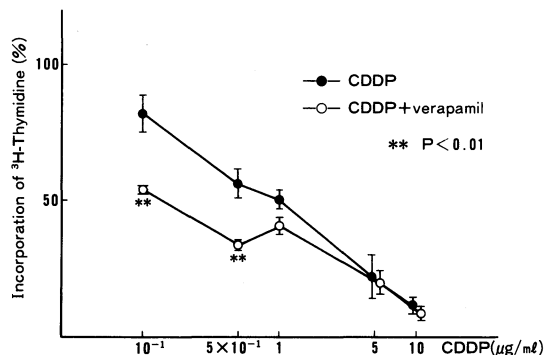


Fig. 7 The effect of CDDP only (●) and CDDP + verapamil (○) on the incorporation of ³H-thymidine in NUR cell



NUR cell への ³H-VCR (Fig. 8), ³H-daunomycin (Fig. 9) の取り込みは verapamil によって増強され,

Fig. 8 The effect of verapamil on the uptake of ^3H -VCR in NUR cell CPM: count per minute of radioisotope

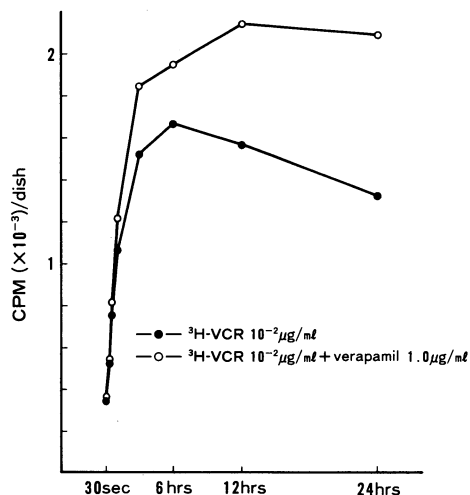
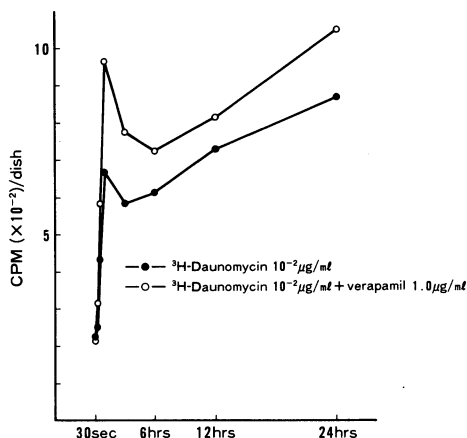


Fig. 9 The effect of verapamil on the uptake of ^3H -daunomycin in NUR cell



^3H -VCR については顕著であった。しかし PHK cell での ^3H -VCR, ^3H -daunomycin の取り込みについては、前者で軽度影響がみられたものの、後者ではその影響はみられなかった。

(6) ^3H -VCR および ^3H -daunomycin の細胞外放出に対する verapamil の影響

NUR cell からの ^3H -VCR の放出は verapamil によって抑制される傾向を示したが (Fig. 10), ^3H -daunomycin の放出は verapamil によって全く抑制されなかった (Fig. 11)。

Fig. 10 The effect of verapamil on the release of ^3H -VCR from NUR cell

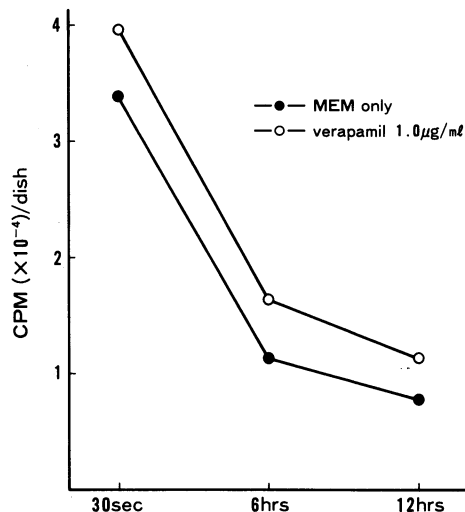
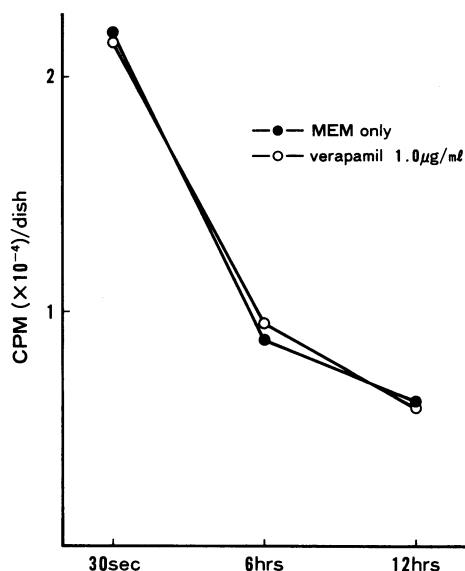


Fig. 11 The effect of verapamil on the release of ^3H -daunomycin from NUR cell



考 案

進行性腎癌の治療において最も問題となるのが、腎癌細胞の制癌剤に対する低感受性である。桜本⁹⁾は腎細胞癌および尿路上皮癌に対し stem cell assay によって制癌剤感受性試験を行ない、腎細胞癌の感受性が20%程度であり、尿路上皮癌の50~75%に比べてかなり低いことを報告した。Lieber⁹⁾や Sarosdy ら¹⁰⁾は6~11%程度と報告しており、Fleischmann ら¹¹⁾に

至っては、感受性を示す薬剤はほとんど無かったと述べている。増田ら¹²⁾は UFT 投与後の腎腫瘍組織内濃度を測定し、比較的高い濃度が維持できることを示したが、その臨床効果は満足のいくものではない。このように十分な濃度の制癌剤との接触にもかかわらず抗腫瘍効果が期待できないということは、腎細胞癌が既に何らかの機序で薬剤耐性を獲得しているものと考えざるを得ない。しかし、この耐性を克服できれば、腎細胞癌の化学療法にも新しい展開が期待できる。しかも腎細胞癌には、vinblastine, ADM, CDDP, UFT などに比較的感受性を有するものがあり、これら制癌剤の効果を更に増強できれば、治療成績も向上しうものと思われる。

制癌剤の効果を高める方法としては、制癌剤の combination therapy, 制癌剤と非制癌剤との併用, 制癌剤の剤型を変えて投与する方法などがある。最近、鶴尾らは Ca 拮抗剤を制癌剤と併用投与することによって制癌剤の効果を増強させる報告を行なった。彼らは P388 白血病細胞²⁾³⁾やヒト骨髓性白血病 K562 細胞¹³⁾を用いた in vivo, in vitro の実験で、VCR や ADM に耐性となったものが verapamil の併用投与によって感受性細胞へと戻り死滅することを証明した。さらに彼ら¹⁴⁾は耐性細胞のみならず、低感受性細胞も Ca 拮抗剤によって感受性を増感できることを各種細胞を用いて明らかにし、各細胞間の heterogeneity が克服できることを報告した。

われわれは、これらの報告に基づき、泌尿器科領域でも最も制癌剤の感受性が低いと考えられている腎細胞癌において、Ca 拮抗剤である verapamil の制癌剤感受性増強の可能性について、in vitro による実験を行なった。結論から言えば verapamil は NUR cell に対する ADM, VCR, CDDP の殺細胞効果を更に増強させることが細胞増殖曲線および³H-thymidine の取り込みによって明らかとなったが、併用効果の程度は制癌剤の種類によって若干異なっていた。増殖曲線でみた場合、ADM は他の CDDP, VCR に比べ殺細胞効果が強く、単独でも IC_{50} が $0.05 \mu\text{g/ml}$, verapamil 併用では $0.018 \mu\text{g/ml}$ と約 3 倍の併用効果を示したが、CDDP, VCR については、verapamil 併用によって増強効果はみられるものの 50% 以上の抑制は認められず低感受性であった。³H-thymidine の取り込みでみた場合もよく似た結果が得られた。つまり ADM の場合、単独では得られない IC_{90} 以上の抑制効果が verapamil 併用によってみられたのに対し、VCR の場合、相乗効

果は明らかに認められるものの、 IC_{55} 以上の抑制効果にはいたらなかった。この理由としては、VCR が強い時間依存性薬剤であり、細胞接触時間が 24 時間で不充分であった可能性も考えられる。従って各種薬剤の接触時間については検討の必要があると思われた。CDDP に関しては実験当初、verapamil の相乗効果は予期していなかったが、結果的にはその効果が認められ、CDDP の細胞内濃度測定などによる機序の解明が必要であろう。いずれにしても、ADM, VCR, CDDP に対する verapamil の相乗効果は、制癌剤が低濃度である程、明らかであり、高濃度となるにつれて、はっきりしなくなる傾向があり、低濃度の制癌剤であっても verapamil によって充分殺細胞効果が得られることが示唆された。

制癌剤の相乗効果が得られる verapamil の最小濃度は鶴尾ら¹³⁾によれば約 $0.3 \mu\text{g/ml}$ であり、われわれの実験でも $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ で明らかな相乗効果が認められた。verapamil そのものの細胞毒性については鶴尾ら¹³⁾は、human hemopoietic tumor cell lines では $6.6 \mu\text{M}$ ($3 \mu\text{g/ml}$) まで、P388 白血病細胞では $20 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) までは cell growth に全く影響しないと述べているが、われわれの実験では NUR cell に対する毒性は $5 \mu\text{g/ml}$ 位から生じており、細胞によって毒性濃度が異なることが示された。

Ca 拮抗剤による制癌剤効果増強の機序について鶴尾ら¹⁴⁾は verapamil が VCR, ADM の efflux を阻害し、VCR, ADM の細胞内蓄積が高まることによって制癌剤効果が増強するということを³H-VCR, ³H-ADM の細胞内濃度測定によって推論した。Yanovich ら¹⁵⁾も flow cytometry によって p388 daunomycin 耐性細胞内の daunomycin 濃度を測定し同様の機序を報告した。さらに Rogan¹⁶⁾も ADM 耐性細胞であるヒト卵巣腫瘍 A1847 における ADM の細胞外排出が verapamil によって抑制されることを述べた。われわれもこの機序が NUR cell において証明できうるものが³H-VCR, ³H-daunomycin を細胞内に取り込ませてその radioactivity を測定し間接的に細胞内濃度をみた。VCR については細胞内蓄積の増強、細胞外排出の抑制の両面に verapamil が関与していることがわかった。しかし、daunomycin については verapamil は細胞内蓄積を高めるが、細胞外排出は全く抑制しなかった。従ってこれからは、細胞内取り込みにのみ verapamil が作用したことになり諸家の報告^{14)~16)}と異なっている。flow cytometry などによる再検討も必

要かと思われる。VCR については細胞外排出の抑制が結果的に細胞内蓄積をもたらしたと考えられるが、細胞内への取り込みに対し verapamil がはたして促進作用をもつかどうかは今後の検討課題であろう。

またわれわれは正常人腎細胞に対する verapamil の影響についても調べたが、NUR cell と比較すると、制癌剤の毒性増強作用は軽度であった。もっともこれは正常腎細胞が NUR cell と比べ、制癌剤に高い感受性を有するため、その差が出なかったものと思われる。正常細胞に対する毒性増強を検討した実験は少ないが、Simpson ら¹⁷⁾はマウスの膀胱内注入として ADM や thiotepa に verapamil を併用し、主要臓器に対する副作用を組織学的検査および組織重量測定で検討し、verapamil によって副作用が増強することは無いとの報告を行なった。

われわれは2名の患者に対し verapamil 160mg の内服投与を行ない経時的に血中濃度を測定した。verapamil, norverapamil いずれも3時間で最高となり、verapamil 156.9ng/ml~1045.3ng/ml, norverapamil 89.3ng/ml~468.1ng/ml であった。濃度に差があるのは1名は測定日前日までの29日間 verapamil を1日240mg 連日内服投与していたためで、投与前値が既に高く、薬剤の蓄積が認められた。もう1名は当日のみ内服したものである。norverapamil¹⁸⁾は verapamil 経口投与後に検出される N-脱メチル代謝物であり、verapamil の約20%に相当する冠血管拡張作用を有するとされているが、人における詳細な薬理学的作用はわかっていない。しかし verapamil が経口投与でも1045.3ng/ml と制癌剤との相乗効果を期待できる濃度が得られ、投与後2~4時間は700ng/ml 以上の濃度を維持できたことは臨床応用が充分可能であることを示している。また両者とも血圧低下などの副作用も無く安全性には問題なかった。

verapamil は心筋細胞の slow channel を block することによって Ca^{++} の細胞内濃度を下げることが知られているが、癌細胞においても Ca^{++} 濃度の低下が直接制癌剤の排泄抑制に関与している可能性がある。verapamil は脳下垂体、ランゲルハンス島、副腎皮質、甲状腺などからのホルモン分泌を抑制することが知られているが^{19)~21)}、細胞内 Ca^{++} 濃度が低下すると、これらホルモン分泌が抑制されることが知られており、制癌剤の efflux 抑制機構との関連性が示唆されており今後解明されるべき興味ある問題である。

癌細胞の薬剤耐性のメカニズムは現在の所、全く不

明であるが、最近、耐性細胞表面に出現する p-glycoprotein²²⁾が注目されている。この蛋白は分子量が約170,000で colchicine や daunorubicin に耐性となった chinese hamster ovary cell lines において認められており、pleiotropic drug resistance (PDR)²³⁾との関連性が指摘されている。この PDR は現象的には制癌剤の膜輸送特に排出の亢進が原因になっていると考えられ、Ca 拮抗剤やカルモジュリン阻害剤によって克服できることが最近明らかとなった。現在この PDR を生ずる薬剤は、コルヒチン、ピンカアルカロイド系、アドリアマイシン系に限られており、これら薬剤の使用においては交叉耐性の問題を常に念頭に置く必要がある。われわれは NUR cell を用いて verapamil が VCR, ADM, CDDP の感受性を高めることを報告したが、逆に考えれば、この細胞は PDR を有していた可能性も考えられ、腎細胞癌が化学療法に感受性が低い原因を考える上で興味深い。

verapamil などの Ca 拮抗剤やカルモジュリン阻害剤による制癌剤効果増強の報告は散見される^{24)~28)}ものの臨床応用での報告は極めて少ない。最近では verapamil が血小板凝集を抑制することによって腫瘍の血行性転移をおさえるという報告²⁹⁾もあり、Ca 拮抗剤は腎癌のみならず、広く尿路悪性腫瘍に対し、臨床検討に値するものと思われる。

結 語

人培養腎癌細胞株 (NUR) および人正常腎細胞 (PHK) を用い、VCR, ADM, CDDP に対する verapamil の効果増強について検討した。また NUR cell 内における 3H -VCR, 3H -daunomycin の radioactivity を測定することによって、細胞内取り込みおよび細胞外放出に対する verapamil の影響をみた。

1. NUR 細胞の増殖曲線および 3H -thymidine 取り込みのいずれにおいても verapamil は VCR, ADM, CDDP の殺細胞効果を増強させた。

2. 3H -thymidine の取り込みでみた場合、NUR 細胞に対し verapamil が ADM の殺細胞効果を増強させる最小濃度は約 $0.1\mu g/ml$ であり、濃度依存性にその効果が強くなった。

3. NUR 細胞において 3H -VCR, 3H -daunomycin の細胞内取り込みは verapamil によって増加した。細胞外放出については 3H -VCR は verapamil によって抑制される傾向を示したが、 3H -daunomycin ではその影響は認められなかった。

4. PHK 細胞については VCR, ADM, CDDP に対

する verapamil の影響は, ^3H -thymidine の取り込みでみた場合, 極めて軽度であった。

稿を終るにあたり御指導, 御校閲を賜った恩師斉藤泰教授に心より感謝致します。また終始直接の御指導を頂いた金武洋講師に深謝致します。さらに, 多大なる御協力を頂いた教室員一同に御礼申し上げます。

本論文の要旨は, 第72回, 73回, 74回日本泌尿器科学会総会, 第22回日本癌治療学会総会において発表した。

文 献

- 1) Quesada, J.R., Swanson, D.A., Trindade, A. and Guterman, J.U.: Renal cell carcinoma: Antitumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Res.*, 43, 940—947, 1983.
- 2) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Overcoming of vincristine resistance in p388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41, 1967—1972, 1981.
- 3) Tsuruo, T., Iida, H., Yamashiro, M., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Enhancement of vincristine and adriamycin-induced cytotoxicity of verapamil in p388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 3138—3140, 1982.
- 4) Baumgartner, G., Heinz, R., Arbes, H., Lenzhofer, R., Pridun, N. and Schüller, J.: Methotrexate-citrovorum factor used alone and in combination chemotherapy for advanced hypernephromas. *Cancer Treat. Rep.*, 64, 41—46, 1980.
- 5) Satake, I., Tari, K., Yamamoto, M. and Nishimura, H.: Neocarzinostatin-induced complete regression of metastatic renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 133, 87—89, 1985.
- 6) 津田暢夫, 斉藤 泰: ヒト腎細胞癌の培養細胞とその生体内での組織構築との比較。細胞, 15, 161—165, 1983.
- 7) Kanetake, H. and Yamamoto, N.: Studies on the mechanism of compensatory renal hypertrophy and hyperplasia in a nephrectomized animal model. I. Evidence for a renotropic growth stimulating factor in uninephrectomized rabbit sera using tissue culture. *Invest. Urol.*, 18, 326—330, 1981.
- 8) 桜本敏夫, 三浦 猛, 窪田吉信: Stem cell assay による制癌剤感受性試験—第2報。腎細胞癌および尿路上皮癌の成績。日泌尿会誌, 76, 645—648, 1985.
- 9) Lieber, M.M. and Kovach, J.S.: Soft agar clonogenic assay for primary human renal carcinoma: In vitro chemotherapeutic drug sensitivity testing. *Invest. Urol.*, 19, 111—114, 1981.
- 10) Sarosdy, M.F., Lamm, D.L., Radwin, H.M. and Von Hoff, D.D.: Clonogenic assay and in vitro chemosensitivity testing of human urologic malignancies. *Cancer*, 50, 1332—1338, 1982.
- 11) Fleischmann, J., Heston, W.D.W. and Fair, W. R.: Renal cell carcinoma and the clonogenic assay. *J. Urol.*, 130, 1060—1062, 1983.
- 12) 増田富士男, 鈴木正泰, 大西哲郎, 伸田浄治郎, 森義人, 飯塚典男, 町田豊平: UFT および FT 投与による腎細胞癌患者の血中および組織内5-FU濃度の検討。癌と化学療法, 12, 320—324, 1985.
- 13) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Potentiation of vincristine and adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.*, 43, 2267—2272, 1983.
- 14) Tsuruo, T.: Reversal of acquired resistance to vinca alkaloids and anthracycline antibiotics. *Cancer Treatment Rep.*, 67, 889—894, 1983.
- 15) Yanovich, S. and Preston, L.: Effects of verapamil on daunomycin cellular retention and cytotoxicity in p388 leukemic cells. *Cancer Res.*, 44, 1743—1747, 1984.
- 16) Rogan, A.M., Hamilton, T.C. and Young, R.C.: Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*, 224, 994—996, 1984.
- 17) Simpson, W.G., Tseng, M.T. and Harty, J.I.: Systemic influence of intravesical chemotherapy with verapamil. *Urol. Res.*, 13, 23—26, 1985.
- 18) Hamann, S.R., Blovin, R.A. and McAllister, Jr. R.G.: Clinical pharmacokinetics of verapamil. *Clinical Pharmacokinetics*, 9, 26—41, 1984.
- 19) Richardson, U.I.: Adrenocorticoprotein secretion by mouse pituitary tumor cells in culture: The role of Ca^{2+} in stimulated and somatostatin-inhibited secretion. *Endo.*, 113, 62—68, 1983.
- 20) Marinis, L.D. and Barbarino, A.: Calcium antagonists and hormone release. 1. Effects of verapamil on insulin release in normal subjects and patients with islet-cell tumor. *Metabolism*, 29, 599—604, 1980.
- 21) Hermansen, K. and Iversen, J.: Effect of verapamil on pancreatic glucagon release from the isolated, perfused canine pancreas. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 37, 139—142, 1979.
- 22) Kartner, N., Shales, M., Riordan, J.R. and Ling, V.: Daunorubicin-resistant chinese hamster

- ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface p-glycoprotein. *Cancer Res.*, **43**, 4413—4419, 1983.
- 23) Curt, G.A., Clendeninn, N.J. and Chabner, B.A.: Drug resistance in cancer. *Cancer Treatment Rep.*, **68**, 87—99, 1984.
 - 24) Ganapathi, R. and Grabowski, D.: Enhancement of sensitivity to adriamycin in resistant p388 leukemia by the calmodulin inhibitor trifluoperazine. *Cancer Res.*, **43**, 3696—3699, 1983.
 - 25) Simpson, W.G., Tseng, M.T., Anderson, K.C. and Harty, J.I.: Verapamil enhancement of chemotherapeutic efficacy in human bladder cancer cells. *J. Urol.*, **132**, 574—576, 1984.
 - 26) Slater, L.M., Murray, S.L. and Wetzel, M.W.: Verapamil restoration of daunorubicin responsiveness in daunorubicin-resistant ehrlich ascites carcinoma. *J. Clin. Invest.*, **70**, 1131—1134, 1982.
 - 27) Ballou, R.J., Simpson, W.G., Harty, J.I. and Tseng, M.T.: Verapamil enhanced in vitro chemosensitivity of a murine bladder carcinoma, FCB. *Urol. Res.*, **14**, 195—200, 1986.
 - 28) Pradhan, S.G., Basrur, V.S., Chitnis, M.P. and Adwani, S.H.: In vitro enhancement of adriamycin cytotoxicity in human myeloid leukemia cells exposed to verapamil. *Oncology*, **41**, 406—408, 1984.
 - 29) Tsuruo, T., Iida, H., Makishima, F., Yamori, T., Kawabata, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Inhibition of spontaneous and experimental tumor metastasis by the calcium antagonist verapamil. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **14**, 30—33, 1985.

(1987年9月18日受理, 特別掲載)