

# Ca<sup>2+</sup>拮抗剤併用癌化学療法の基礎的検討

— In vitro, In vivo における効果と解析 —

川崎医科大学 消化器外科  
(指導: 佐野開三教授)

岩 本 末 治

(昭和62年2月24日受理)

## Fundamental Studies on Cancer Chemotherapy Combined with Ca<sup>2+</sup> Antagonist

— In Vitro and In Vivo Studies —

Sueharu Iwamoto

Division of Gastroenterology, Department of Surgery  
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 24, 1987)

Ca<sup>2+</sup>拮抗剤 Verapamil を制癌剤, 主として 5-FU (その他 ADM, VCR, BLM) と併用し, その抗腫瘍効果に及ぼす影響を, まず培養細胞を用い *in vitro* で検索, ついでこの成績にもとづき *in vivo* の実験として, 担癌マウスに 5-FU と Verapamil を連日併用投与し, *survival* に及ぼす影響をも検討した.

### I. In vitro

1. Verapamil は単独でも高濃度では増殖抑制がみられたが, 5 μM 以下の低濃度ではほとんど影響しなかった.
2. 増殖に影響のない濃度の Verapamil を 5-FU と併用すると, 制癌剤が低濃度であるほどより大きい効果増強が認められた.
3. <sup>14</sup>C-5-FU を用いた細胞内取り込み実験では, <sup>14</sup>C-5-FU は細胞内へ経時的に移行するが, これに Verapamil 5 μM を併用すると, 無添加の <sup>14</sup>C-5-FU 単独群に比べて, 5-FU の移行は有意に高値となった.

### II. In vivo

1. Verapamil 単独では, 大量を負荷しても抗腫瘍効果はみられなかった.
2. 5-FU 5 mg/kg と Verapamil 20 mg/kg を併用すると, 投与期間に関係なく併用効果を認め, 5-FU 単独群に比べ有意の生存期間の延長を得, 低濃度で併用効果のあることが判った.
3. 5-FU と Verapamil 40 mg/kg との併用は, 併用にもとづく副作用が出現し, 5-FU 単独投与群に比べ生存期間はかえって短縮した.

以上より, 5-FU においても Verapamil との併用効果が示されたが, その機序についてはいまだ不明な点が多い. 5-FU と Verapamil の併用は, 投与方法や投与量の決定にはなお慎重を要すとしても, 癌化学療法における効果増強の新しい可能性として期待される.

The influence of the Ca<sup>2+</sup> antagonist on anticancer agents has not as yet well been clarified.

Many reports have implied that the Ca<sup>2+</sup> antagonist enhances the effect of anticancer drugs (Vinca-alkaloid, anthracycline agents) on drug resistant cells. However, there have been a few reports on the effect of the Ca<sup>2+</sup> antagonist on sensitive tumor cells.

This report deals with the effect of Verapamil as at of the Ca<sup>2+</sup> antagonist on chiefly 5-FU on Ehrlich ascites tumor cells (EA cells), both in vitro and in vivo.

#### I. In vitro

1. Verapamil inhibited the growth of EA cells by itself at a high concentration.
2. Verapamil enhanced greatly the cytotoxicity of 5-FU at a noncytotoxic dose, and even at a low concentration.
3. A kinetic experiment showed that the uptake of <sup>14</sup>C-5-FU into EA cells increased with time. It was observed that the amount of cellular <sup>14</sup>C-5-FU is greatly increased in the presence of 5 μM Verapamil.

#### II. In vivo

1. Verapamil alone showed no therapeutic effect even at a high dose.
2. When 5-FU (5 mg/kg) was administered with Verapamil (20 mg/kg), the life span of EA cell-bearing mice was significantly prolonged, irrespective of administration.
3. When 5-FU was administered with Verapamil (40 mg/kg), an inverse effect appeared, and the life span was shortened as compared with the group of mice to whom 5-FU was administered alone.

These results suggest that the combined use of Verapamil with 5-FU may provide better treatment for human cancer, although the mechanism still remains unknown.

Key Words ① Ca<sup>2+</sup> antagonist ② Membrane transport  
③ Cancer chemotherapy

## I. 緒 言

抗癌化学療法の効果増強を目的として、Ca<sup>2+</sup>拮抗剤併用の是非が最近注目されているが、本剤には、ある種の薬剤耐性癌細胞の耐性を克服する可能性のあることが知らされ、幾多の基礎的研究が推進されている。<sup>1)~9)</sup>

本療法の薬剤感受性細胞に対する効果の検討はいまだ少ないが、<sup>10), 11)</sup> 耐性細胞に見られるような併用効果が得られるとすれば、制癌剤の効果増強にとどまらず、薬剤の減量化による副

作用の軽減にもつながり、より長期にわたる継続治療の可能性が期待される。

Ca<sup>2+</sup>拮抗剤を併用する制癌剤のうち、弗化ピリミジン系薬剤での検討はほとんどない。<sup>12)</sup> 今回著者は、消化器癌に対する主要制癌剤である 5-fluorouracil (5-FU) を中心に、その他 Adriamycin (ADM), Bleomycin (BLM), Vincristine (VCR) を用い、これらの制癌剤の効果に Ca<sup>2+</sup>拮抗剤 Verapamil が及ぼす影響を in vitro, in vivo で検討した。

## II. In vitro

### 1. 実験材料

#### (1) 実験腫瘍

実験腫瘍は、当教室において、雄性、ICR マウス（日本クレア K.K.）の腹腔内で移植継代している Ehrlich ascites tumor cell（以下 EA cells と略す）を使用した。

EA cells を腹腔内移植後6～8日目に腹水を無菌的に採取して、10 ml の Eagle MEM（日本製薬 K.K.）に浮遊させ、1,000 rpm, 10min 遠沈したのち、沈渣細胞をさらに MEM で2回洗浄後、10% fetal bovine serum (FBS, Flow Lab. Australia) 添加培養液中で primary culture を行い、対数増殖期にあるものを使用した。

#### (2) 薬 剤

Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤としては、Verapamil (C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·HCl, Eisai Co. Tokyo) を使用した。制癌剤としては、主に 5-fluorouracil (5-FU, Kyowa Hakko Co. Tokyo) を用いたが、その他 Adriamycin (ADM, Kyowa Hakko Co. Tokyo), Vincristine (VCR, Shionogi Co. Tokyo), Bleomycin (BLM, Nippon Kayaku Co. Tokyo) をも使用した。また、5-FU の細胞内への取り込み実験には、5-fluoro-[6-<sup>14</sup>C]-uracil (<sup>14</sup>C-5-FU, specific activity 432 μCi/mg, Amersham, Japan) を用いた。

### 2. 実験方法

#### (1) Verapamil の培養細胞への添加

5×10<sup>4</sup>個の EA cells を 60 mm シャーレ (Falcon, Oxnard, Calif.) 内に 5 ml の培養液とともに浮遊させ、Verapamil は、phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) で、溶解し、2, 5, 10, 20, 50, 100 μM の濃度の Verapamil を 0.1 ml に調整して加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。72時間後、ピペッテングにて全細胞を集め、直ちに 0.5% Trypan blue を用いて生細胞を計測し、PBS のみ添加した control 群に対する比を、% で表した。

#### (2) 5-FU と Verapamil の併用

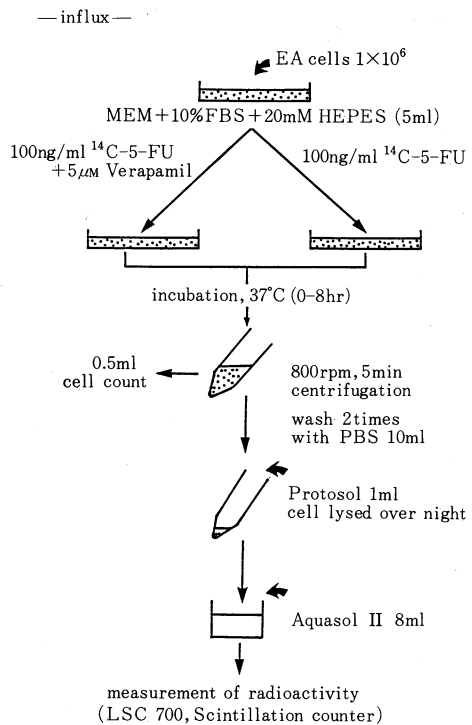
(1) と同様に 5×10<sup>4</sup>個の EA cells を、5, 25, 50, 100 ng/ml の 5-FU を含む培養液中で培養した。72時間後 control 群と比較、5-FU の抗腫瘍効果を測定した。さらに Verapamil 2, 5 μM を添加し、72時間後、control 群、5-FU 単独群とともに細胞数を計測した。

#### (3) 細胞形態の観察

(2) と同一の実験系で、培養開始後 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間において、細胞形態に及ぼす影響を光学顕微鏡下に観察した。

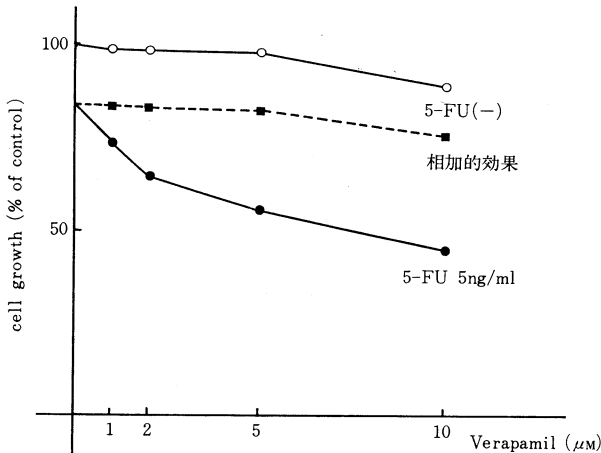
#### (4) Verapamil 添加時における 5-FU の細胞内への取り込み実験 (Fig. 1)

1×10<sup>6</sup>個の EA cells を、MEM+10% FBS に 20 mM HEPES (2-hydroxyl-1-piperazine

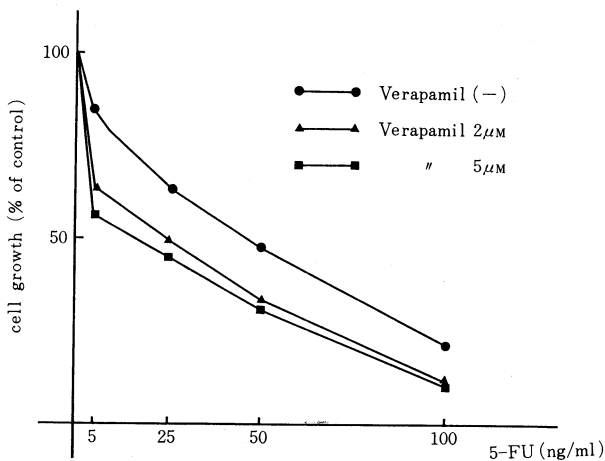


**Fig. 1.** Effects of Verapamil on the uptake of <sup>14</sup>C-5-FU by EA cells. EA cells (1×10<sup>6</sup>) were incubated in 5 ml of MEM+10% FBS+20 mM HEPES at 37°C with 100 ng/ml <sup>14</sup>C-5-FU in the absence or presence of Verapamil at 5 μM.

ethanesulfonic acid, pH 7.4) buffer を加えた培養液 5 ml 中に浮遊させ、これに 5 μM Verapamil と <sup>14</sup>C でラベルした 5-FU (100 ng/ml), <sup>14</sup>C-5-FU を加え、37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。実験開始前、開始後 2, 4, 6, 8 時間に細胞数を count するとともに、**Figure 1** に示すごとく細胞を採取、組織可溶剤 Protosol (New England Nuclear) 1 ml を加えて溶解し、1 N 酢酸で中和した後、Aquasol-II シンチレーター (New England Nuclear) を加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-700) を用いて、1 × 10<sup>6</sup> 個あたりの細胞内放射活性を測定し比較した。



**Fig. 2.** Effects of Verapamil on growth-inhibitory action of 5-FU on EA cells.



**Fig. 3.** Effects of Verapamil on growth-inhibitory action of 5-FU on EA cells.

### 3. 結果

(1) Verapamil が EA cells の増殖に及ぼす直接的影響

Verapamil の培養液中濃度が 5 μM 以下では、EA cells の増殖は control 群との間に有意の差は認められなかったが、これより高濃度では増殖の抑制が認められた。特に 20 μM 以上では直線的な増殖抑制がみられ、50 μM では 46%、100 μM では 96% の抑制がみられた。

(2) EA cells における 5-FU の cytotoxicity

EA cells は、5-FU 濃度が上昇するにつれてその増殖が抑制され、5 ng/ml で 15%、25 ng/ml で 30%、100 ng/ml では 75% の抑制率を示し、IC<sub>50</sub> は 45~50 ng/ml であった。

(3) Verapamil が制癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響

5-FU 濃度を 5 ng/ml とし、これに Verapamil を 1, 2, 5, 10 μM 加えた場合、いずれの濃度においても、Verapamil の併用は相乗の効果をもたらした。最も強い抑制は、5 μM の場合に認められた (**Fig. 2**)。

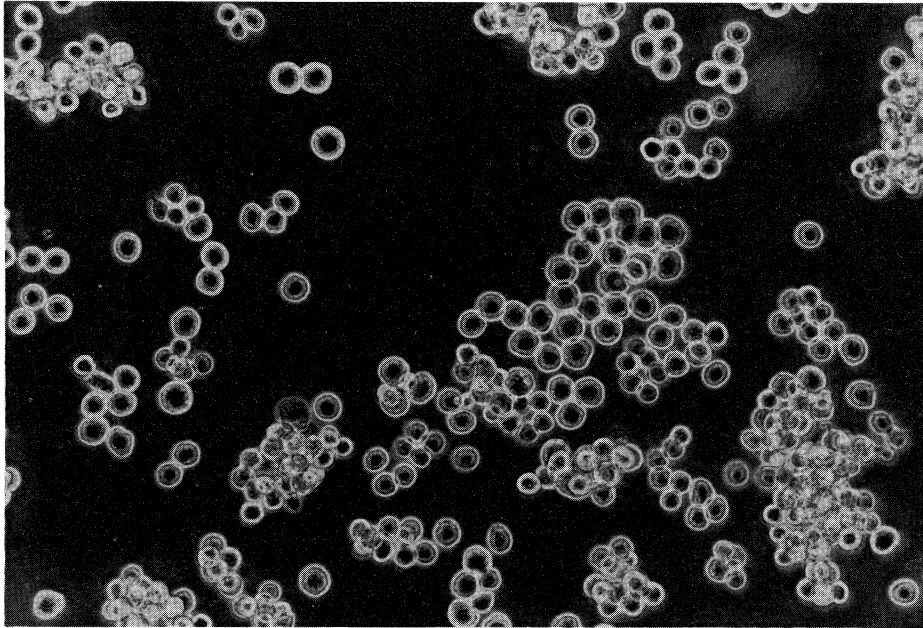
**Table 1.** Effects of Verapamil on growth-inhibitory action of various antitumor drugs in EA cells.

Drugs	Dose (ng/ml)	Inhibitory rate (% of control)	
		Verapamil 5 μM (-)	Verapamil 5 μM (+)
5-FU	5	15.0	46.3
	25	30.1	57.8
	50	47.3	71.4
	100	75.2	93.8
VCR	0.1	12.1	38.5
	1	21.3	62.4
	5	31.3	86.2
ADM	1	5.8	33.2
	5	21.3	56.4
	10	30.4	83.8
BLM	0.1*	7.2	35.1
	0.5	20.4	42.8
	1	36.3	51.8
	2	48.1	61.3

(\* μg/ml)

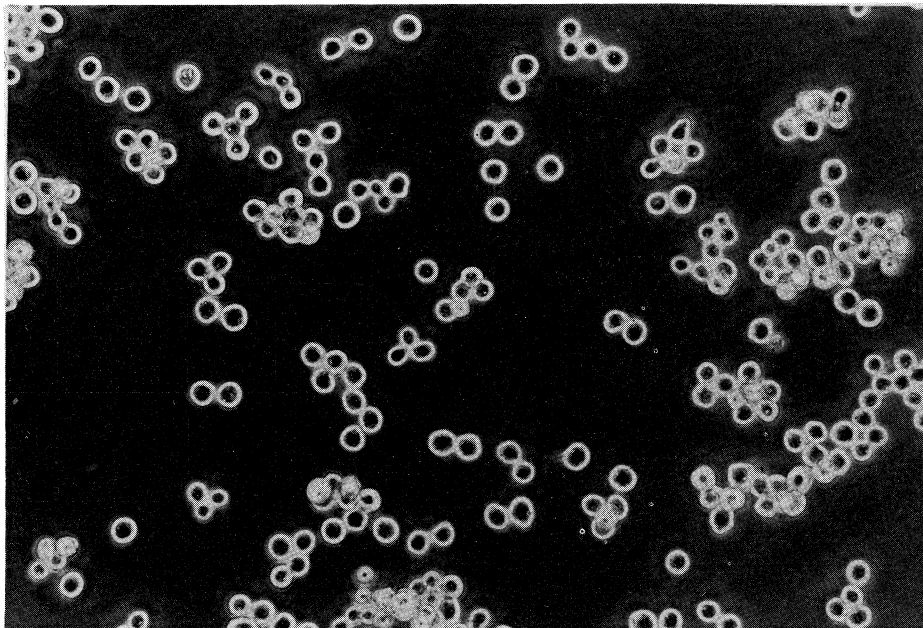
次いで、5-FU濃度を5, 25, 50, 100 ng/mlとし、これに Verapamil 2, 5  $\mu$ Mを併用すると、5-FU単独群に比べていずれの濃度におい

ても抑制率の増大がみられた。Verapamil 2  $\mu$ Mと5  $\mu$ Mの間には有意の差はみられなかった (Fig. 3).



**Fig. 4.** Changes in the morphology of EA cells treated by 5-FU combined with Verapamil (72 hrs after treatment) ( $\times 200$ ).

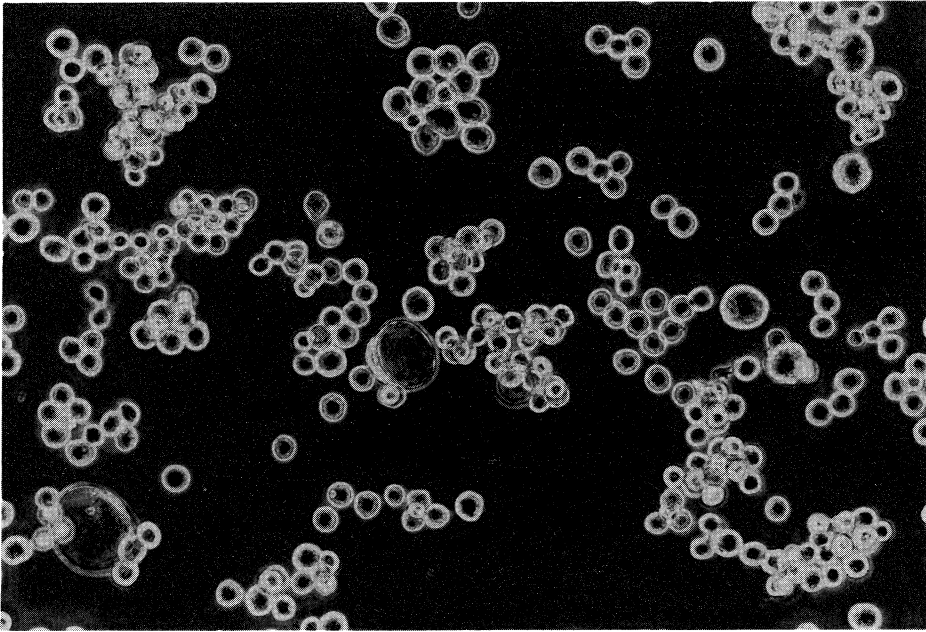
a) control (untreated).



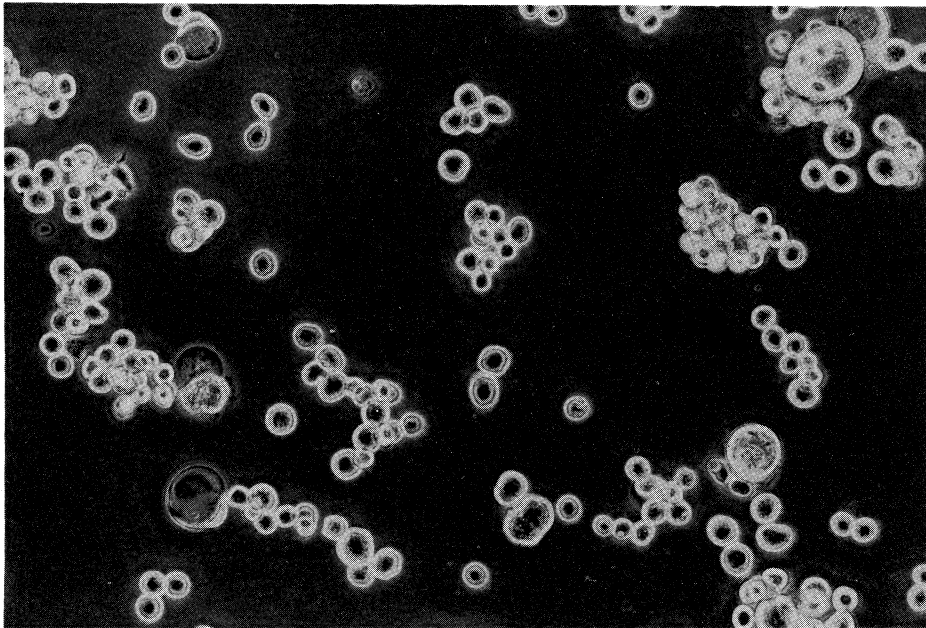
b) Verapamil (5  $\mu$ M) no significant change.

Verapamil 5  $\mu$ M の存在下における, 5-FU 濃度による EA cells 抑制率の違いをみると, 5 ng/ml で 3.1 倍の増大, 25 ng/ml で 1.8 倍, 100 ng/ml で 1.3 倍であり, 低濃度ほど効果の増強が著明であった。

以上の結果は, 他の制癌剤でも程度の差はあれ同様に認められ, ADM と Verapamil 5  $\mu$ M の併用では, 1 ng/ml で 5.7 倍, 10 ng/ml で 2.8 倍, BLM は 0.1  $\mu$ g/ml で約 5 倍, 1  $\mu$ g/ml では 1.4 倍, VCR では 0.1 ng/ml で 3.2 倍,



c) 5-FU (5 ng/ml) swelling and ballooning of the cell were observed.



d) 5-FU (5 ng/ml)+Verapamil (5  $\mu$ M) exaggerated effects observed in Fig. 4c.

5 ng/ml では2.8倍の効果増強がみられた (Table 1).

IC<sub>50</sub> の検討では、5-FU は2.6倍、ADM は4.4倍、BLM は2.1倍、VCR は6.2倍の効果増強となった。

#### (4) 形態学的変化

5-FU および Verapamil と接触後、6、12、24、48、72時間でEA cells を光学顕微鏡下に観察した。5-FU 単独群では6~8時間後から、細胞の膨化、風船化が出現し、それらは経時的に増強された。Verapamil の濃度が5 μM 以下の場合、ほとんど形態に影響がみられず、5-FU と Verapamil との併用の場合は、5-FU 単独時の変化が増強される傾向にあった (Fig. 4 a, b, c, d).

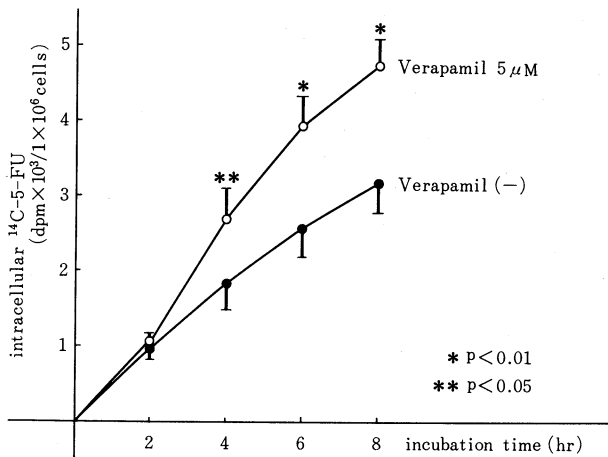


Fig. 5. Effects of Verapamil on the uptake of <sup>14</sup>C-5-FU on EA cells.

#### (5) Verapamilが<sup>14</sup>C-5-FUの細胞内取り込みに及ぼす影響

<sup>14</sup>Cでラベルした5-FUは、経時的に細胞内へ移行するが、Verapamil 5 μMの添加によって、4時間後から細胞内の5-FU量が5-FU単独群に比べて増加し、4、6、8時間で、2716.9 ± 886.2, 3669.3 ± 452.8, 4640.0 ± 347.3 dpm/1 × 10<sup>6</sup> cellとなった。一方5-FU単独群では、1885.5 ± 226.4, 2645.3 ± 186.3, 3451.9 ± 415.7 dpm/1 × 10<sup>6</sup> cellであり、単独群に比べて有意の取り込みの上昇を示した (p < 0.05, p < 0.01, p < 0.01) (Fig. 5).

### III. In vivo

#### 1. 実験材料

##### (1) 実験腫瘍

実験腫瘍はin vitroで用いたEA cellsを使用した。

##### (2) 実験動物

実験動物は、雄性、7週齢のICRマウス(体重28~30g)を使用した。

##### (3) 薬剤

Ca<sup>2+</sup>拮抗剤としては、in vitroと同様Verapamilを使用し、制癌剤は5-FUのみを用いた。

#### 2. 実験方法

##### (1) EA cellsのICRマウスへの移植

移植後6~8日目のICRマウス腹腔内

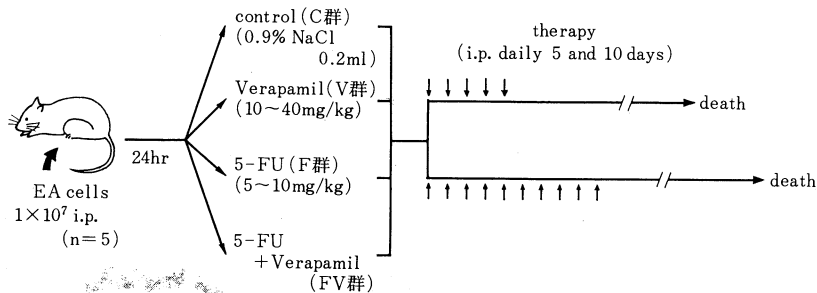


Fig. 6. Effects of Verapamil on antitumor activity of 5-FU in EA cells bearing mice. Each group of 5 ICR mice was given i.p. implants of 10<sup>7</sup> EA cells on Day 0, and drugs were given i.p. daily from Day 1 to 5 or 10.

から EA cells を採取し, Hanks solution (阪大微研) 中に浮遊させ,  $1 \times 10^7$  個が 0.2 ml となるように調整し, 26G ツベルクリン針で腹腔内へ移植した。

## (2) 治療

EA cells 移植後 24 時間に, control 群 (以下 C 群), Verapamil 単独投与群 (以下 V 群), 5-FU 単独投与群 (以下 F 群), 5-FU と Verapamil の併用投与群 (以下 FV 群) の 4 群に分け (1 群 = 5 匹), これらをそれぞれ 5 日間連日投与群と 10 日間連日投与群の 2 群として, 各々の survival をみた (Fig. 6).

5-FU, Verapamil はともに生理的食塩水に溶解し, C, V, F および FV 群とも投与量を 0.2 ml として, 腹腔内へ注入した。

control 群は生理的食塩水のみを腹腔内へ注入した。

## 3. 結果

$1 \times 10^7$  個の EA cells を移植した場合の平均生存日数は,  $15.0 \pm 0.8$  日であり, 無処置および C 群とも生存率には差がなかった。

### (1) Verapamil 単独投与が survival に及ぼす影響

Verapamil 単独投与群は, 50 mg/kg 以上で

は急死するものが多く, 今回は検討から除外した。in vivo では大量負荷による抗腫瘍効果は認められなかった。

10, 20 mg/kg 投与群は, 5 日間および 10 日間投与に関係なく, 生存率は C 群との間に差はみられなかった。40 mg/kg で 10 日間連日投与群は C 群に比べて平均生存期間が  $13.8 \pm 1.5$  日 ( $p < 0.5$ ) と短くなり, Verapamil の慢性毒性によるものではないかと考えられた。

### (2) 5-FU と Verapamil の併用効果

FV 群を投与量から以下の 6 群に分けた。すなわち, i) FVa 群 (5-FU 5 mg/kg + Verapamil 10 mg/kg), ii) FVb 群 (5-FU 10 mg/kg + Verapamil 10 mg/kg), iii) FVc 群 (5-FU 5 mg/kg + Verapamil 20 mg/kg), iv) FVd 群 (5-FU 10 mg/kg + Verapamil 20 mg/kg), v) FVe 群 (5-FU 5 mg/kg + Verapamil 40 mg/kg), vi) FVf 群 (5-FU 10 mg/kg + Verapamil 40 mg/kg), さらにこれらを 5 日間連日投与群と 10 日間連日投与群の 2 群に分け, それぞれ FVa 5, FVa 10 群として以下同様に 12 の subgroup にし, それぞれに対応する 5-FU 単独投与群を Fa 5, Fa 10 群として, survival を比較検討した (Table 2)。

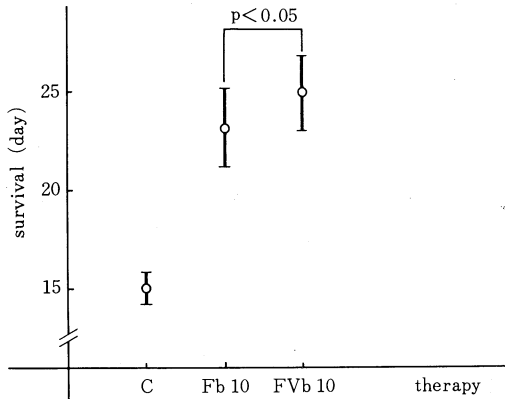
**Table 2.** Effects of Verapamil on antitumor activity of 5-FU in tumor bearing mice. (compare FV with F)

i) FVa (5-FU 5 mg/kg + Verapamil 10 mg/kg)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{FVa } 5 \\ \text{FVa } 10 \end{array} \right\}$ vs $\left\{ \begin{array}{l} \text{Fa } 5 \\ \text{Fa } 10 \end{array} \right\}$	Fa (5-FU 5 mg/kg)
ii) FVb (5-FU 10 mg/kg + Verapamil 10 mg/kg)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{FVb } 5 \\ \text{FVb } 10 \end{array} \right\}$ vs $\left\{ \begin{array}{l} \text{Fb } 5 \\ \text{Fb } 10 \end{array} \right\}$	Fb (5-FU 10 mg/kg)
iii) FVc (5-FU 5 mg/kg + Verapamil 20 mg/kg)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{FVc } 5 \\ \text{FVc } 10 \end{array} \right\}$ vs $\left\{ \begin{array}{l} \text{Fc } 5 \\ \text{Fc } 10 \end{array} \right\}$	Fc (5-FU 5 mg/kg)
iv) FVd (5-FU 10 mg/kg + Verapamil 20 mg/kg)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{FVd } 5 \\ \text{FVd } 10 \end{array} \right\}$ vs $\left\{ \begin{array}{l} \text{Fd } 5 \\ \text{Fd } 10 \end{array} \right\}$	Fd (5-FU 10 mg/kg)
v) FVe (5-FU 5 mg/kg + Verapamil 40 mg/kg)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{FVe } 5 \\ \text{FVe } 10 \end{array} \right\}$ vs $\left\{ \begin{array}{l} \text{Fe } 5 \\ \text{Fe } 10 \end{array} \right\}$	Fe (5-FU 5 mg/kg)
vi) FVf (5-FU 10 mg/kg + Verapamil 40 mg/kg)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{FVf } 5 \\ \text{FVf } 10 \end{array} \right\}$ vs $\left\{ \begin{array}{l} \text{Ff } 5 \\ \text{Ff } 10 \end{array} \right\}$	Ff (5-FU 10 mg/kg)

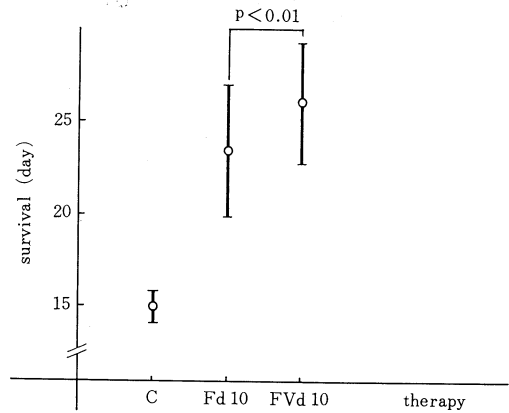
FVa 5: i. p. daily 5 days

FVa 10: i. p. daily 10 days

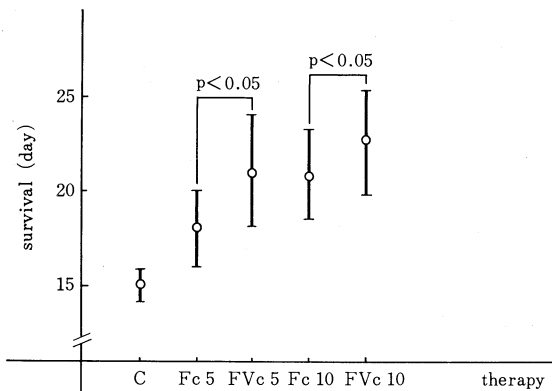




**Fig. 7.** Effects of Verapamil on antitumor activity of 5-FU in EA cells bearing mice. (drugs were given i. p. daily 10 days)



**Fig. 9.** Effects of Verapamil on antitumor activity of 5-FU in EA cells bearing mice. (drugs were given i. p. daily 10 days)



**Fig. 8.** Effects of Verapamil on antitumor activity of 5-FU in EA cells bearing mice. (drugs were given i. p. daily 5 and 10 days)

FVa 5 群, FVa 10 群, FVb 5 群ともに Fa 5 群, Fa 10 群, Fb 5 群に比べて有意の平均生存期間の延長は認められなかった。

FVb 10 群の平均生存期間は  $25.0 \pm 1.9$  日で、5-FU 単独投与群の Fb 10 群の  $23.2 \pm 2.3$  日に対して有意の延命効果を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7)。

FVc 5 群, FVc 10 群の平均生存期間は、それぞれ  $21.2 \pm 2.9$  日,  $22.6 \pm 2.8$  日で、5-FU 単独投与群の Fc 5 群, Fc 10 群の  $18.1 \pm 2.1$  日,  $19.8 \pm 2.3$  日に対して有意の延命効果を認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 8)。

FVd 5 群の平均生存期間は、Fd 5 群とほぼ

同じで有意の差はみられなかったが、FVd 10 群の平均生存期間は  $26.0 \pm 3.3$  日で、単独投与群の Fd 群の  $23.4 \pm 3.6$  日に対して有意の延命効果が得られた ( $p < 0.01$ ) (Fig. 9)。

FVe 5, 10 群および FVf 5, 10 群では、投与日数が重なるにつれて、著しい下痢を来し体重が減少して死亡するものが多くなり、平均生存期間はそれぞれの 5-FU 単独投与群の Fe 5, 10 群, Ff 5, 10 群に比べてかえって短くなった。

#### IV. 考 察

抗癌化学療法には、新しい制癌剤の開発のみならず、従来ある制癌剤を組み合わせ使用したり、またこれに他の療法を併用する、いわゆる集学的治療など種々の方法がある。最近、鶴尾らによって初めて、 $Ca^{2+}$  拮抗剤は細胞膜機能に影響して耐性獲得細胞に変化をもたらし、治療を可能とすることが示された。<sup>1)~9), 13~15)</sup>

$Ca^{2+}$  拮抗剤の併用は、感受性細胞に対してもその効果が期待されるが、著者は、本法の臨床応用の基礎的検討として、 $Ca^{2+}$  拮抗剤のひとつである Verapamil を用い、5-FU を中心とする制癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響を *in vitro* で検討し、その結果から *in vivo* でも併

用効果が期待され、併用における投与方法や至適投与量、および投与期間などについて検討を加えた。

Verapamil は濃度が増すにつれて、単独でも EA cells の増殖を抑制し、10 $\mu$ M 以上では濃度に比例して有意に増殖抑制を示した。この現象が Verapamil の薬理作用によるものか、あるいは、Verapamil が培養液に及ぼす浸透圧の変化によるものかはいまだ不明である。

5-FU と Verapamil の併用は、いずれの条件下でも抗腫瘍効果の増強が認められたが、併用する制癌剤の濃度が低濃度である程その併用効果は大で、この現象は VCR, ADM, BLM においても程度の差はあれ同様に認められた。

5-FU は代謝拮抗剤で、VCR, ADM, BLM などとは代謝過程や作用機序も異なるが、制癌剤の膜輸送機構に関しては、薬剤によって特異的とは考え難い。すなわち、効果の増幅にはそれぞれ併用する制癌剤で差はあるが、Verapamil が制癌剤に非選択的に作用し、5-FU においても抗腫瘍効果を高めたものと考えられる。実際的には、5-FU の細胞内への取り込みを <sup>14</sup>C-5-FU を用いて検討した結果、<sup>14</sup>C-5-FU は経時的に細胞内へ取り込まれるが、これに Verapamil を併用することによって、単独群に比べ有意な取り込みの増加のあることがわかった。

鶴尾ら<sup>16)</sup> は、マウスの白血病細胞 P<sub>388</sub> cells を用い、VCR, ADM などと Verapamil を併用して、VCR で 3.8 倍、ADM で 1.8 倍の効果増強を示し、これらの制癌剤に耐性をもつ同細胞に対しては、10 倍から 40 倍もの効果を得たとしている。そして、この耐性の機序は薬剤の efflux の亢進であり、この efflux を Verapamil が阻害するためではないかという。<sup>17)~20)</sup>

また、Kessel<sup>5), 19)</sup> や Ramu ら<sup>20)</sup> は、Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤併用時の制癌剤の細胞内蓄積は、細胞外の Ca<sup>2+</sup> 濃度や、Ca<sup>2+</sup> の流れには関係なく生ずると報告している。実際、癌細胞に正常細胞と同様 Ca<sup>2+</sup> channel に相当する receptor が存在するか否かは不明で、同じ Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤で Verapamil より数段 Ca<sup>2+</sup> influx block

action が強いとされる Nifedipine との併用でも、それに比例して抗腫瘍効果の増強は得られていないことが報告され、<sup>9)</sup> Ca<sup>2+</sup> influx block action と抗腫瘍効果増強とは直接結びつかないことも示されている。

Verapamil と各制癌剤の併用効果をみると、著者の実験でも VCR が最も大きいですが、これは VCR の作用機序が細胞骨格の チュブリンに結合して、その重合を阻害するためである。<sup>21)</sup> すなわち、このチュブリンの機能に Ca<sup>2+</sup> やカルモデュリンが関係しており、<sup>22), 23)</sup> Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤の使用による Ca<sup>2+</sup> 変動が、VCR のチュブリンに対する親和性や反応性を高める結果であると推測している。

Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤がどのような機序で、耐性細胞において亢進した efflux を阻害するのかはいまだ不明で、感受性細胞においても、Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤を併用した場合、制癌剤の influx, efflux に及ぼす影響には関係がないとの報告や、<sup>5), 19), 20)</sup> efflux のみには影響があるとの報告もあり、<sup>17)~21), 16)</sup> 感受性細胞における制癌剤の細胞内蓄積のメカニズムには差があることが示唆されるが、詳細は不明である。

5-FU に Verapamil を併用し、その抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した結果、VCR や ADM に比較してその併用効果は小さいが、制癌剤単独より増殖抑制効果の増強をみ、5-FU の取り込みの検討でも、有意な取り込みの増大がみられた。in vitro の結果から、in vivo においても併用効果が期待され、臨床応用のための基礎的研究として、EA cells を移植した担癌マウスに対する腹腔内投与での survival に及ぼす影響をみた。

5-FU と Verapamil の併用投与では、5-FU が 5 mg/kg, Verapamil が 10 mg/kg の低濃度では併用効果がみられなかったが (FVa 5 群, FVa 10 群, FVb 5 群), 5-FU 10 mg/kg, Verapamil が 10 mg/kg で 10 日間連日投与群 (FVb 10 群) では併用効果がみられ、Fb 10 群に比べ平均生存期間の延長が得られた。これは Verapamil の濃度が不十分だったことが考えられ、投与期間を 10 日間に延長することで延命

効果を得たと考えられる。

5-FU 5 mg/kg と Verapamil 20 mg/kg の併用投与では、投与期間に関係なく効果の増強が認められ、FVc 5 群は5-FU 単独投与群の Fc 10 群よりも長い生存期間が得られ、また FVc 10 群においては、Fb 10 群、Fd 10 群に近い平均生存期間が得られた。この結果は、*in vitro* の結果に類似しており、Verapamil 20 mg/kg 併用時では5-FU 5 mg/kg の方が併用効果を示す群が多く (FVc 5, FVc 10 群) みられた。また、Verapamil は生体内では早く代謝されるため、ある程度以上の濃度が必要であると考えられた。

しかし、Verapamil を 40 mg/kg で併用すると、単独でも10日間連日投与では、やや平均生存期間が  $13.8 \pm 1.5$  日と短縮する傾向にあったが、Verapamil あるいは5-FU 単独投与時には認められなかった著しい下痢などの副作用が発現し、かえって単独投与群より生存期間の短縮がみられた。この現象は、併用による副作用が表面に表れたものではないかと考えられ、併用量によっては過剰反応をひきおこす可能性もあり、併用量の設定には慎重を期すことが必要と考えられた。

*in vivo* において、5-FU と Verapamil の併用投与で12の subgroup を作り、5-FU の投与量、Verapamil の量、投与期間などを検討し、5-FU が 5 mg/kg で Verapamil が 20 mg/kg で最も高い治療効果を得 (FVc 5, FVc 10 群)、投与期間では10日間連日投与群で併用効果が多く得られた (FVb 10 群, FVc 10 群, FVd 10 群)。以上の結果から長期間投与は、当然、併用においても効果的に作用すると考えられるが、併用する Verapamil の量によっては逆の現象をひきおこすこともあり、注意を要するものと思われた。

鶴尾ら<sup>1), 4)</sup> や Lewis ら<sup>24)</sup> は、マウス白血病細胞 P<sub>388</sub> cells や Ehrlich ascites tumor

cells を用いて、担癌マウスに VCR, ADM などと Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤を併用し、連日投与で効果が認められたとしているが、制癌剤の投与方法から考えると耐性癌はともかく、これを日常臨床に応用することは困難と考えられる。

しかしながら、5-FU はその作用性質からも持続的投与がより効果的とされており<sup>25)</sup> 今回の実験結果からその応用の可能性が期待される。

本法を臨床応用する際の最大の問題点と思われるのは、Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤の循環作動薬としての薬理作用であり<sup>26), 27)</sup> 癌化学療法としての使用環境の選択吟味にも注意を要するものと思われる。

今回用いた腹水型実験腫瘍は、培養系と担癌生体との中間の環境にあるものとも考えられ、臨床で多くみられる固形腫瘍に対する化学療法として、本法を応用するのも今後の課題のひとつであろう。

*in vitro* の結果をもとに *in vivo* を中心として検討し、5-FU と Verapamil の併用で抗腫瘍効果を増強させることができたが、この機序についてはいまだ不明な点が多い。癌細胞での Ca<sup>2+</sup> 代謝や<sup>28), 29)</sup> それに Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤が及ぼす影響、併用における副作用の問題など課題は多いが、今後検討を重ねるとともに、至適投与量および投与方法についてもなお検索を進める予定である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った佐野開三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、研究に協力して頂いた当教室員各位にお礼申し上げます。培養技術を御指導いただいた北 昭子主任をはじめ培養センター、動物実験センターの皆様の御厚情に深謝致します。

本論文の要旨は、第61回中国四国外科学会総会において発表した。なお第35回日本化学療法学会総会において発表予定である。

## 文 献

- 1) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Overcoming vincristine-resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through an enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 41: 1967-1972, 1981

- 2) 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—2273, 1983
- 3) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* 42 : 4730—4733, 1982
- 4) Tsuruo, T., Iida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, T. and Sakurai, Y.: Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res.* 43 : 2905—2910, 1983
- 5) Kessel, D. and Wilberding, C.: Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists. *Cancer Res.* 45 : 1687—1691, 1985
- 6) Simpson, W. G.: The calcium channel blocker verapamil and cancer chemotherapy. *Cell Calcium (Scotland)* 6 : 449—467, 1985
- 7) 鶴尾 隆: 制がん剤の膜輸送—カルシウム機能修飾物質による効果増強と耐性の克服. 蛋, 核, 酵 28 : 865—871, 1983
- 8) 鶴尾 隆: 細胞カルシウムと癌化学療法. 癌と化学療法 8 : 1833—1843, 1982
- 9) 鶴尾 隆: Verapamil による抗癌剤の効果増強の試み. 癌と化学療法 8 : 665—671, 1981
- 10) 松岡秀夫, 上尾裕昭, 杉町圭蔵, 甲斐秀信, 松浦 弘, 玉田隆一郎, 井口 潔: カルシウム拮抗剤腫瘍内注入によるアドリアマイシンの抗腫瘍効果増強に関する研究. 日外会誌 86 : 508, 1985
- 11) 佐々木功典, 長岡 栄, 村上知之, 川崎祥二, 高橋 学: 細胞のアドリアマイシン取り込みに及ぼすカルシウム拮抗薬の影響. 癌と化学療法 12 : 966—968, 1985
- 12) 中谷勝紀, 江崎友通, 酒本和則, 杉崎俊照, 宮城信行, 渡辺明彦, 白鳥常男: ノードマウス可移植性ヒト胃癌に対する制癌剤カルモフルールと Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤ニカルジピンの併用効果の検討. 癌と化学療法 12 : 969—971, 1985
- 13) 寺島雅典, 井上雄弘, 向山雄人, 三井郁雄, 小川一誠: 人癌培養株 PC-6, Hattori に対する種々の薬剤による VCR, ADM の効果増強に関する研究. 癌と化学療法 12 : 343—347, 1985
- 14) Simpson, W. G., Tsens, 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
- 15) 赤沢修吾, 本多利雄, 三比和美, ニツ木浩一: カルシウム拮抗剤の併用を試みた Vindesine sulfate, Cis-diammine dichloroplatinum (II) に治療抵抗性食道癌の 2 症例. 癌と化学療法 11 : 943—947, 1984
- 16) Tsuruo, T., Iida, H., Yamasiro, M., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Enhancement of Vincristine and adriamycin induced cytotoxicity by verapamil in P388 leukemia and its sublines resistant of vincristine and adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* 31 : 3138—3140, 1982
- 17) Skousgaard, T.: Mechanism of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 38 : 1785—1791, 1978
- 18) Dano, K.: Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells *Biochim. Biophys. Acta* 323 : 466—483, 1973
- 19) Kessel, D. and Wilberding, C.: Interactions between calcium antagonists, calcium fluxes and anthracycline transport. *Cancer Lett.* 25 : 97—101, 1984
- 20) Ramu, A., Sham, Fc. and Glankiger, D.: Enhancement of oxorubicin and vinblastin sensitivity in anthracycline resistance P388 cells. *Cancer Treat. Rep.* 67 : 895—899, 1983
- 21) Owellen, R. J., Hartke, C. A., Dickerson, R. M. and Hains, F. O.: Inhibition of tubulin microtubule polymerization by drug of vinca alkaloid class. *Cancer Res.* 36 : 1449—1502, 1976
- 22) Welsh, M. J., Dedmair, J. R., Brinkly, B. R. and Means, A. R.: Calcium-dependent regulator

- protein: Localization in mitotic apparatus of eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 1867—1971, 1978
- 23) Marcum, J. M., Dedman, J. R., Brinkly, B. R. and Means, A. R.: Control of microtubule assembly-disassembly by calcium dependent regulator protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 3771—3775, 1978
- 24) Lewis, M. S., Sandra, L. M., Martha, W. W., Ronald, M. W. and Emily, M. D.: Verapamil restoration of daunorubicin responsiveness in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites carcinoma. Am. Soc. clin. Invest. 70: 1131—1134, 1982
- 25) Eugene, E. C. and Domenica, A.: Effects of inhibitors fibrinolytic enzymes on development of pulmonary metastasis. J. Cancer Inst. 33: 753—763, 1964
- 26) 中山貢一: Ca 拮抗薬の薬理学的特性. 医のあゆみ 104: 501—512, 1978
- 27) 桑原 隆, 松永正人, 河合忠一: Ca チャンネルブロッカーの薬理. 日臨 43: 106—110, 1985
- 28) 川原康洋, 吉川 潮, 高井義夫:  $Ca^{2+}$  と蛋白質のリン酸化反応. 代謝 17: 1235—1244, 1980
- 29) 小島清秀: 脂質蛋白代謝の異常. 日臨 44: 89—96, 1986