
原 著

Nilvadipine による 5'-DFUR の増強効果

谷 口 雅 彦

徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 小池靖夫 教授)

(平成8年9月20日受付)

Antineoplastic activity of the combination of nilvadipine and 5'-deoxy-5-fluorouridine

Masahiko Taniguchi

Department of Otolaryngology, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

(Director: Prof. Yasuo Koike)

SUMMARY

An experiment was designed to study the efficacy of the combined administration of the nilvadipine as a calcium channel blocker which was estimated less toxic for heart. As for SCC-25 cells, KB cells and Hela cells, the effect of the combination of nilvadipine and 5'-DFUR was tested in vitro.

Furthermore, each cell was stained immunohistochemically by ABC method and efficacy brought about by the combined administration of nilvadipine as a chemosensitizer was investigated.

At the same time, each cell was studied from the view point of correlation with P-glycoprotein. As for SCC-25 cells, having incubated 48 hours, significantly additive effects in combination of $0.1 \mu \text{g ml}^{-1}$ of nilvadipine and $16 \mu \text{g ml}^{-1}$ of 5'-DFUR were recognized statistically (examination- I). KB cells showed the additive effect, but were not significant statistically.

On the other hand, the immunohistochemical stain by ABC method was performed on SCC-25 and KB cells and it turned out that P-glycoprotein was positive.

For further additive effects for 5'-DFUR by nilvadipine, it was indicated that the mechanism had been correlated with P-glycoprotein.

(received September 20, 1996)

Key words : nilvadipine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, antineoplastic activity

癌化学療法の進歩にはめざましいものがあるが、最近注目されている問題の1つに抗癌剤に対する耐性獲得の現象がある。元来、抗癌剤に対して感受性が低下

している場合を自然耐性 natural resistance と呼び、突然変異や抗癌剤の治療によって誘起される場合を獲得耐性 acquired resistance とよんで区別している

(桑野, 1983).

後者の場合、癌細胞は最初に用いた薬剤に対して耐性になるだけでなく、構造も作用機作も全く異なる他の抗癌剤に対しても交叉耐性になることが多い。これを獲得性多剤耐性と呼び、化学療法上の大きな問題となっている(植田, 1988)。多剤耐性のひとつの説明として、これら癌細胞では各種抗癌剤が共通の機構で細胞外に積極的に排泄されるため細胞内抗癌剤の蓄積が低くなり、癌細胞が抗癌剤に抵抗するということが考えられている。つまり排出機構に共通性があるため、一旦ある抗癌剤が排出される耐性機構が獲得されると、他種抗癌剤も同様に積極的に排泄されるようになり、他種抗癌剤に対しても耐性を示すようになるのだと考えられている(鶴尾, 1986)。

またこの機構に、P-glycoproteinと呼ばれる分子内二重構造をもつ蛋白質が関与するといわれ、その機能を抑制するCa拮抗剤を抗癌剤とともに耐性細胞に用いると、著しい抗癌剤の細胞内蓄積が認められるといわれている(鶴尾, 1986)。

今回筆者は、多剤耐性でない細胞に関してもCa拮抗剤を加えることにより作用の増強がみられないかどうかについて検討した。すなわち、SCC-25細胞、KB細胞、HeLa細胞に対して、5'-DFURを投与し、Ca拮抗薬であるNilvadipineの併用による効果の増強の有無につき実験的検討を行った。さらに、それぞれの細胞に対し、ABC法によりP-glycoproteinの免疫組織化学染色をおこない、Ca拮抗薬であるNilvadipineの併用による効果とP-glycoproteinとの関係につき考察をおこなった。

材料および方法

A. 実験IおよびII

SCC-25細胞、KB細胞、HeLa細胞の3種類の培養細胞に対して、5'-DFURに、4種類の濃度のNilvadipineを加えて接触させた群と、5'-DFURのみを接触させた群での比較を以下の2つの実験について行った。

実験I：培養細胞と薬剤とを48時間接触させ、48時間後に細胞数をカウントした。

実験II：培養細胞と薬剤とを3時間接触させ、1週間後に細胞数をカウントした。

実験のプロトコールは、以下に示すとおりである。

実験I：

1. 平底24 wellプレートに、 1×10^5 個/ml/wellずつの細胞を播いた。

2. 約18時間、37°C、5%CO₂でincubateし細胞が付着したところへ、16 μg/mlの5'-DFURと0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 μg/mlのNilvadipineをそれぞれ接触させた。

3. 48時間後に、それぞれの上清を吸引で除去し、トリプシン500 μlで、プレートより培地を取り除き、その後トリプシン1 mlをくわえた。

4. 15分間、incubator内に静置した。

5. パスツールピペットで細胞を剥がして顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認し、各時間の各濃度ごとにパスツールピペットでチューブに入れた。

6. 培地を4 ml加えて計5 mlにした。

7. 1000 rpmで5分間遠心した。

8. 上清をデカンテーションして捨て、SCC用培地を1 mlくわえた。

9. 0.1%トリパン青液を用いて、細胞数を測定した。

10. 対照として、5'-DFURを接触させず同様の実験をおこなった。

実験II：

実験Iと同様な手順で行い、薬剤と3時間接触させた後、1週間後に細胞数をカウントした。

※SCC-25細胞(舌、ヒト扁平上皮癌)は、AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION社のものを用いた。

※KB細胞は、桑野信彦教授(当時大分医大、現在九州大学)より提供をうけた。

※5'-DFURは、日本ロシュ株式会社より、Nilvadipine(ニバジール®)は、藤沢薬品工業株式会社よりそれぞれ提供をうけた。

B. 実験III

SCC-25細胞、KB細胞、HeLa細胞の3種類の培養細胞に対して、ABC法によりP-glycoproteinの免疫組織化学染色をおこなった。

実験のプロトコールは、以下に示すとおりである。

1. 培養細胞を、スライドガラスに塗布し乾燥させた。

2. 冷アセトンで5分間、固定した。

3. リン酸緩衝液(PBS)(1/15 M, pH 7.2, 0.1% Tween-20 含)で3分間3回洗浄した。

4. 10%正常ウサギ血清/PBSで室温で15分間反応させ、非特異反応のブロッキングを行った。

5. P-glycoprotein抗体(第1抗体)を室温で3時間反応させた。(1次反応)

※negative controlとして正常マウス血清を同様に

反応させた。

※第一抗体 (P-glycoprotein 抗体, 抗ヒトモノクローナル) (AUSTRAL Biologicals社) は, PBS で30倍に希釈して使用した。

6. リン酸緩衝液 (PBS) (1/15 M, pH 7.2, 0.1% Tween-20 含) で洗浄した。(3分×5回)

7. ビオチン結合第二抗体 (抗マウス IgG) (ヤギ血清) を室温で10分間反応させた。(2次反応)

8. リン酸緩衝液 (PBS) (1/15 M, pH 7.2, 0.1% Tween-20 含) で3分間, 3回洗浄した。

9. ABC 溶液 (ストレプトアビジン-ビオチン-ペル

オキシダーゼ複合体) を室温で5分間反応させた。(3次反応)

10. リン酸緩衝液 (PBS) (1/15 M, pH 7.2, 0.1% Tween-20 含) で3分間, 3回洗浄した。

11. 次の発色液で5分間反応させた。

DAB 25 mg + H₂O₂ 50 μl / 100 ml Tris · HCl pH 7.4

12. 蒸留水で5分間水洗を行った。

13. ヘマトキシリンで5分間核の染色を行った。

14. アルコール・キシレン系で脱水および透徹を行った。

15. 封入後, 顕微鏡で観察を行った。

Table 1 SCC-25 cells, being incubated 48 hours and counted, showed significantly additive effects in combination of 0.1 μg ml⁻¹ of nilvadipine and 16 μg ml⁻¹ of 5'-DFUR. Data represent means and SDs.

Concentration of Nilvadipine (μg/ml)	number of cells (×10 ⁵ /well)	
	5'-DFUR(+)	5'-DFUR(-)
0	1.0±0.3	1.9±0.4
0.0125	1.0±0.3	1.8±0.4
0.025	0.9±0.3	1.8±0.4
0.05	0.8±0.3	1.8±0.4
0.1	0.7±0.4*	1.8±0.4

* p<0.05 vs. control by Student's t-test.

Table 2 SCC-25 cells, being incubated 3 hours and counted after 1 week, did not reveal significant difference between the groups with and without nilvadipine.

Concentration of Nilvadipine (μg/ml)	number of cells (×10 ⁵ /well)	
	5'-DFUR(+)	5'-DFUR(-)
0	2.3±0.6	2.8±0.3
0.0125	2.3±0.7	
0.025	2.1±0.6	
0.05	2.1±0.6	
0.1	2.1±0.6	2.7±0.2

Table 3 KB cells being incubated 48 hours and counted, showed additive effects in combination of 0.1 μg ml⁻¹ of nilvadipine and 16 μg ml⁻¹ of 5'-DFUR, even though these difference were not statistically significant.

Concentration of Nilvadipine (μg/ml)	number of cells (×10 ⁵ /well)	
	5'-DFUR(+)	5'-DFUR(-)
0	2.1±1.3	2.5±1.1
0.0125	1.9±1.2	2.4±1.0
0.025	1.6±0.8	2.4±1.0
0.05	1.4±0.8	2.4±0.9
0.1	1.2±0.6	2.4±1.1

Table 4 KB cells being incubated 3 hours and counted after 1 week, showed not significantly.

Concentration of Nilvadipine (μg/ml)	number of cells (×10 ⁵ /well)	
	5'-DFUR(+)	5'-DFUR(-)
0	5.3±0.9	6.1±0.8
0.0125	5.3±1.2	
0.025	5.3±1.1	
0.05	5.5±1.1	
0.1	5.3±1.1	6.1±0.6

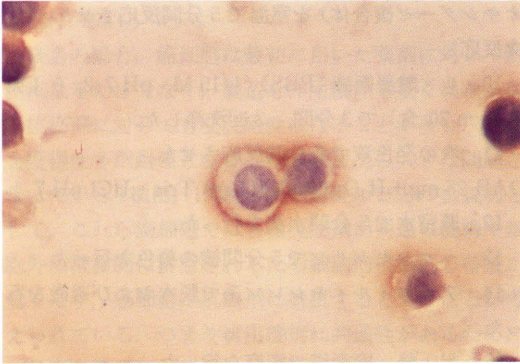


Fig. 1 SCC-25 cells (top) and KB cells (bottom) showed a P-glycoprotein-positive picture by immunohistochemical stain of ABC method. Both cell membranes showed a brown ring-enhancement. ($\times 400$)

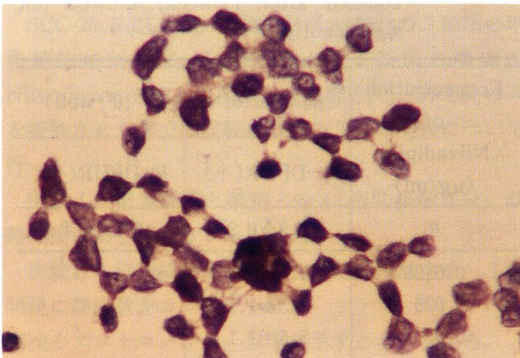


Fig. 2 HeLa cells showed P-glycoprotein-negative picture by immunohistochemical stain of ABC method. ($\times 400$)

※染色キットは、免疫組織染色用 Pathostain ABC-POD (M) Kit (和光純薬工業株式会社) を使用した。

※統計的検定には、対応のない t 検定を用いた。

結 果

A. 実験 I および II

1. SCC-25 細胞に関しては、実験 I において、5'-DFUR 16 $\mu\text{g/ml}$ に、Nilvadipine 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を加え接触させた群と 5'-DFUR 16 $\mu\text{g/ml}$ のみを接触させた群との間で、統計的有意差が認められ ($p < 0.05$)、Nilvadipine による 5'-DFUR の作用の増強を認めた。実験 II においては統計的有意差は認められなかった。

(Table 1-2)

2. KB 細胞に関しては、実験 I では Nilvadipine の投与で細胞数は減少したが、実験 II では細胞数は減少せず、ともに統計的有意差は認めなかった。(Table 3-4)

3. HeLa 細胞に関しては、実験 I, II とも Nilvadipine の投与で細胞数は減少しなかった。

B. 実験 III

1. SCC-25 細胞, KB 細胞はすべて、細胞膜が褐色に染色され P-glycoprotein 陽性であった。(Fig. 1)

2. HeLa 細胞はすべて、細胞膜が染色されず、P-glycoprotein 陰性であった。(Fig. 2)

考 察

癌治療において、外科的切除手技あるいは放射線治療の技術的進歩はめざましいものがあるが、外科的あるいは放射線治療が対象となし得ない症例も依然存在する。また、全身化している進行癌症例に対する唯一の治療法は化学療法である。現在、化学療法を施行するうえで大きな問題となっているのが癌細胞の耐性獲得、特に獲得性多剤耐性である。抗癌剤多剤耐性の機序としては、Lane (1979) によると(1)癌細胞自身の生化学的な変化 (2)薬理学的な動力学 (pharmacodynamics) (3)宿主の免疫学的不全 (4)細胞周期、特に G_0 期の癌細胞数の増加などが関与する細胞の動力学 (cell kinetics) (5)未知の機構などがあげられる。

これまで多剤耐性を克服し、抗癌剤を効果的に利用するためにいろいろな試みがなされてきたが、大きくわけて、(1)剤型の転換による効果の増強 (2)他の治療法との併用による効果の増強 (3)非抗癌剤との併用による効果の増強の3つに分けられる。剤型転換には、liposome (Inaba ら, 1981)、マイクロカプセル (Kato

ら, 1980), 油性懸濁液 (Takahashi ら, 1976) などが用いられ, 臨床に応用されつつある。他の治療法との併用では, 放射線療法, 外科療法, 免疫療法, 温熱療法などがあり, 抗癌剤同士の併用では, 多剤併用療法があげられる。また, 非抗癌剤との併用では, アンギオテンシンII (佐藤ら, 1981), Ca 拮抗剤などがあげられ, 特に後者は, 最近注目されている。

多剤耐性を示す細胞に推察される機構のひとつに, 薬物の細胞内とりこみ減少ならびに細胞外放出増大という変化があげられる。抗癌剤は, 細胞膜を通して細胞内に輸送され効果を発現する。したがって, 抗癌剤の効果は薬剤の細胞内での蓄積と維持の度合いに密接な関係をもっている。稲葉ら (1979) によれば, *in vivo* において P388 感受性株では, adriamycin や daunorubicin の細胞内全体活性の 50~70% が 1 時間のインキュベーション後細胞内に保持されている時に, anthracycline 系抗生物質耐性細胞ではほとんど細胞内に保持されていなかった (能動性 efflux の亢進)。他にも, マウス白血病 L5178Y 細胞から ADR 耐性株を単離した田中らによっても同じような報告がある (田中, 1980; Sugimoto ら, 1981)。したがって, もし膜作用物質を用い膜を介しての抗癌剤の流入, 流出をコントロールできれば抗癌剤の効果増強がはかれることが推察される。

これまでにも, 抗癌剤の膜の透過性促進や放出を減少させる物質として, ポリエン系抗生剤 (桑野, 1981), ビタミンA (桑野, 1983), Verapamil (鶴尾, 1981; Turuo ら, 1981), Nifedipin (鶴尾, 1989), Dibucaine (稲葉, 1979), Chlorpromazine (稲葉, 1979), スクワレン (Yamaguchi ら, 1985), イソプレノイド (Yamaguchi ら, 1986) などが報告されている。Turuo ら (1981) によれば, マウス白血病細胞 P388 とその adriamycin および vincristine 耐性細胞を用いた実験において, vincristine 耐性細胞では, verapamil によって 10 倍以上の vincristine の蓄積がもたらされた。また, adriamycin 耐性細胞においても 2 倍以上の adriamycin の蓄積がみられた。これは, 抗癌剤の細胞外放出 (efflux) 機構が verapamil によりおさえられたと考えることができる。また, 臨床的には verapamil の血中濃度は 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まであげられることが報告されている (Rogan ら, 1984)。

これまでにも臨床に用いられているカルシウム拮抗薬には, Verapamil, Diltiazem, Nifedipine 等があるが, これらのカルシウム拮抗薬を用いた報告で血圧降下や不整脈が認められる場合が多い。一例として,

verapamil を用いた症例で血圧低下や 1 度房室ブロックは必発で, 左心不全, 2 度房室ブロック, 完全房室ブロックが, 約 20~30% の患者に生じるという報告がある (Miller ら, 1991)。そこで, いかにか副作用の少ない Ca 拮抗剤を選択するかが問題になってくる。

今回用いた Nilvadipine (ニバジール[®]) は, Nifedipine, Nicardipine, Diltiazem 等に比べると, 心筋に比べ血管選択性の Ca 拮抗作用をもち, かつ持続性であり, 血管平滑筋の中でも脳血管および冠血管に対する選択性が高い。よって, 心機能に悪影響を及ぼさず, 脳血流, 冠血流などの重要臓器の血流量をバランスよく増加させる作用時間の長い Ca 拮抗薬である。

一方 5'-DFUR (5'-deoxy-5-fluorouridine) (フルツロン[®]) は, 5-FU の潜在活性型であり生体内では, pyrimidine nucleoside phosphorylase により 5-FU に転換して DNA 合成を阻害する。この酵素は小腸などを除き正常組織に比べて腫瘍組織に多く存在することから, 腫瘍特異性が期待できる化合物である。本研究においては, まず Nilvadipine の濃度を変化させ, 5'-DFUR に対する効果の増強につき, トリパンプルー法にて細胞数をカウントすることにより比較検討した。

まず, 予備実験をおこない, Nilvadipine についてはそれ単独で細胞に対して毒性を示さない濃度の範囲 (0~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で濃度を変化させた。5'-DFUR の濃度については, SCC-25 細胞に対して, 0, 4, 16, 32, 64, ($\mu\text{g}/\text{ml}$) と濃度を変化させたものを投与し 2, 4, 7, 10, 14 日目に細胞数のカウントを行い, 2 日後, 7 日後にコントロールと比べて有意差の得る最小濃度, つまり 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に定めた。

結果では, 実験 I における SCC-25 細胞にのみ統計的有意差が認められたが, 実験 I の KB 細胞においても差が生じる傾向がみられた。今回, SCC-25 細胞については, 5'-DFUR 単独で感受性が認められ, Nilvadipine によりその作用が増強された。このことは, 感受性のある細胞に対しても抗癌剤の作用の増強をおこし得ることを示唆すると考えられる。一方多剤耐性を示す細胞は, 膜成分に変化をうけているという点が注目されている。Kartner ら (1983) は, Hamster 細胞の多剤耐性株に関する研究で, 分子量 17 万の細胞膜の糖蛋白質の発現の増加をとまっていたと報告している。この糖蛋白質は P-glycoprotein と呼ばれ, 分子内二重構造をもつ蛋白質であり, 物質の膜輸送に関与する蛋白質であると推定されている (Gerlach ら, 1986; Chen ら, 1986)。

P-glycoprotein は正常細胞にも存在する蛋白質であり、Fojo ら (1987) は耐性遺伝子 *mdr1* の mRNA は、副腎(とくに皮質)には、実験癌耐性株と同じ程度にまた、腎にも強く発現し、肺、肝、小腸、大腸にも中程度に検出されたと報告している。

P-glycoprotein の機能は、正常細胞において有害物質を細胞外に排出し、耐性癌においても毒物である抗癌剤を細胞外に排出することと考えられている。Hamada ら (1987) は、P-glycoprotein は、Cキナーゼによってリン酸化される蛋白質であることを見いだしている。彼らは、P-glycoprotein が、リン酸化されることによりその機能が制御されるとし、そのリン酸化はカルシウム拮抗剤によって亢進するとしている。

今回筆者はそれぞれの細胞に対して、ABC 法にて P-glycoprotein の免疫組織学染色を行ったが、その結果 SCC-25 細胞、KB 細胞では、細胞膜が褐色に染色され、P-glycoprotein 陽性であったが、HeLa 細胞では、細胞膜が染色されず、P-glycoprotein 陰性であった。すなわち、Nilvadipine によって 5'-DFUR の作用の増強を認めた細胞では、その作用増強の機序において、P-glycoprotein が関与している可能性が示唆された。よって、今回の実験系においては、多剤耐性のいかにかわらず、P-glycoprotein 陽性である細胞に関しては、Nilvadipine によって 5'-DFUR の作用が増強される可能性があるということになる。臨床における投薬効果の判定にあたっては、宿主の薬剤耐性も考慮にいれなければならないが、今回の実験系では、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Nilvadipine が増強効果を示しているので、薬剤投与により癌組織中に 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Nilvadipine が出現し、かつ副作用がなければ、Nilvadipine によって 5'-DFUR の抗癌作用を増強させる治療法は有効でありうると考えられた。

結 論

SCC-25 細胞、KB 細胞、HeLa 細胞に対して、5'-DFUR を投与し、Ca 拮抗薬である Nilvadipine の併用による効果の増強につき実験を行い、それぞれの細胞に対し、ABC 法により P-glycoprotein の免疫組織学染色をおこなった。

1. SCC-25 細胞に関しては、培養細胞と 48 時間接触させた実験 I において、5'-DFUR 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に Nilvadipine 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた群と 5'-DFUR 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のみの群で統計的有意差が認められ、Nilvadipine による 5'-DFUR の作用の増強を認めた。実験 I の KB 細胞においても差が認められたが、統計

的に有意ではなかった。

2. ABC 法による P-glycoprotein の免疫組織化学染色では SCC-25 細胞、KB 細胞はすべて、細胞膜が褐色に染色され、P-glycoprotein 陽性であった。

3. Nilvadipine によって 5'-DFUR の作用の増強を認めた細胞に対しては、その作用増強の機序において、P-glycoprotein が関与している可能性が示唆された。

稿を終わるに当たり、御指導御校閲の労を賜りました小池靖夫教授に深謝致します。また、直接御指導、御教示をいただいた野口病院 野口志郎院長、具体的な実験手技でご協力いただいた野口病院検査科 足立光男氏、丸田淳子氏、安岡陽子氏に深謝いたします。

文 献

- Chen, C.-J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Roninson, I. B. (1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47, 381-389
- Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1987): Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 265-269
- Gerlach, J. H., Endicott, J. A., Juranka, P. F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K. L. and Ling, V. (1986): Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*, 324(4), 485-489
- Hamada, H., Hagiwara, K., Nakajima, T. and Tsuruo, T. (1987): Phosphorylation of the Mr 170,000 to 18,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: Effects of verapamil, trifluoperazine, and phorbol esters. *Cancer Res.*, 47, 2860-2865
- Inaba, M., Yoshida, N. and Tsukagoshi, S. (1981): Preferential action of liposome-entrapped 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea on lung

- metastasis of Lewis lung carcinoma as compared with the free drug. *Gann*, 72, 341-345
- 6 稲葉 実 (1979) : Anthracycline 系抗生物質耐性発現の機序とその克服についての試み. *癌と化学療法*, 6 Suppl. I, 41-48
 - 7 Kartner, N., Riordan, J. R. and Ling, V. (1983) : Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221, 1285-1288
 - 8 Kato, T., Nemoto, R., Mori, H. and Kumagai, I. (1980) : Sustained-release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog. *Cancer*, 46, 14-21
 - 9 桑野信彦 (1981) : ポリエン系抗生剤と制がん剤との併用増強の試み. *癌と化学療法*, 8(5), 681-688
 - 10 桑野信彦 (1983) : 腫瘍耐性の機構. *病態生理*, 2(9), 901-910
 - 11 桑野信彦・小宮山荘太郎 (1983) : 制がん治療におけるビタミンA応用の基礎と臨床的研究. *癌と化学療法*, 10 (2) Part II, 326-332
 - 12 Lane, M. (1979) : Clinical problems of resistance to cancer chemotherapeutic agents. *Fed. Proceed.*, 38 (1), 103-107
 - 13 Miller, T. P., Grogan, T. M., Dalton, W. S., Spier, C. M., Scheper, R. J. and Salmon, S. E. (1991) : P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J. Clin. Oncol.*, 9(1), 17-24
 - 14 Rogan, A. M., Hamilton, T. C., Young, R. C., Klecker, Jr. R. W. and Ozols, R. F. (1984) : Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 224, 994-996
 - 15 佐藤春彦・佐藤和朗・佐藤幸弘・朝村光雄・金丸竜之介・三又陽子・涌井 昭 (1981) : Angiotensin IIによる制癌剤組織到達性の選択的増強の臨床応用. *癌と化学療法*, 8 Suppl., 91-100
 - 16 Sugimoto, Y., Nishimura, T., Suzuki, H. and Tanaka, N. (1981) : Evidence of altered influx of adriamycin into anthracycline-resistant cells. *J. Antibiotics.*, 34(8), 1064-1066
 - 17 Takahashi, T., Ueda, S., Kono, K. and Majima, S. (1976) : Attempt at local administration of anticancer agents in the form of fat emulsion. *Cancer*, 38, 1507-1514
 - 18 田中信男 : 抗癌抗生物質の耐性機構 (1980) *癌と化学療法*, 7(11), 1889-1899
 - 19 鶴尾 隆 (1981) : Verapamil による抗癌剤の増強効果の試み. *癌と化学療法*, 8(5), 665-672
 - 20 鶴尾 隆 (1986) : カルシウム拮抗剤による耐性の克服. *図説臨床癌シリーズ 癌化学療法の進歩* (末舛恵一, 西條長宏編) メジカルレビュー社, 東京, 162-170
 - 21 Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. (1981) : 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
 - 22 鶴尾 隆 (1989) : Ca 拮抗薬の制癌剤効果. *Pharma Medica*, 7(3), 65-68
 - 23 植田和光 (1988) : 癌の多剤耐性はMDR1遺伝子が担っているのか? *蛋白質核酸酵素*, 33(8), 1287-1299
 - 24 Yamaguchi, T., Nakagawa, M., Hidaka, K., Yoshida, T., Sasaki, T., Akiyama, S. and Kuwano, M. (1985) : Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-nitrosourea in a murine tumor system. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 26, 1021-1026
 - 25 Yamaguchi, T., Nakagawa, M., Shiraiishi, N., Yoshida, T., Kiyosue, T., Arita, M., Akiyama, S. and Kuwano, M. (1986) : Overcoming drug resistance in cancer cells with synthetic isoprenoids. *J. N. C. I.*, 76(5), 947-953