

---

**原 著**

---

**Dipyridamole による 5'-DFUR の増強効果の検討**

記 本 晃 治

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10年9月1日受付)

SCC-25細胞, FRO細胞, KB細胞に対して, 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) と, Dipyridamole (DP) の併用による5'-DFURの抗腫瘍効果増強の有無につき, 主としてMTT assayを用い, in vitroで実験的検討を行った。さらに, L細胞において5'-DFURとDP併用による影響についても検討した。

FRO細胞, KB細胞に対しては, DPによる5'-DFURの明らかな増強効果は認めず, 併用により抗腫瘍効果が低下する傾向がみられた。これに対し, SCC-25細胞ではDPの併用により, 5'-DFURの抗腫瘍効果の有意な増強を認めた。さらに, L細胞においては, DP併用により増殖抑制が有意に減弱したことより, 耳鼻咽喉科領域における主たる癌組織型の扁平上皮癌に対して, DPが5'-DFURの効果を増強し, 正常細胞に対しては副作用を軽減させる可能性があると考えられた。

最近多くの抗癌剤が開発され, その進歩はめざましいが, 化学療法により治療を期待できる癌は限られている。また, 単剤での効果にも限界があるのが, 現状である。このため多剤併用などにより, 既存の抗癌剤の抗腫瘍活性を増強させたり, 副作用を軽減させることにより治療効果を向上させる努力がなされている。Biochemical Modulationもそのひとつである。Biochemical Modulationは癌化学療法の場合において, 抗癌剤 (effector) を投与する前後, あるいは同時に, ほかの抗癌剤あるいは非抗癌剤 (modulator) を投与することによってeffectorの薬理動態を変化させ, 抗腫瘍効果を高めたり, 正常細胞に対するeffectorの障害, 副作用を軽減させることで, 化学療法係数を増大させ, 癌化学療法の効果を増強させようとするものである<sup>1,2)</sup>。5-fluorouracil (FUra) に対するmodulatorとしてはMethotrexate<sup>3,4)</sup>, Leucovorin<sup>5)</sup>, Uracil<sup>6,7)</sup>, Interferon<sup>8)</sup>などがある。また, Dipyridamole (DP) がFUraの抗

腫瘍効果を増強するとの報告もある<sup>9)</sup>。

今回筆者は, SCC-25細胞, FRO細胞, KB細胞に対して, FUraの潜在活性型薬剤である5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) とDPの併用による, 5'-DFURの抗腫瘍効果増強の有無につき, 主としてMTT assayを用い, in vitroでの実験的検討を行った。さらに, L細胞において5'-DFURとDP併用による影響についても検討した。

**材料および方法****使用細胞および培地**

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。培地としてEagle's Minimum Essential Medium培地 (大日本製薬株式会社) とハムF-12培地 (大日本製薬株式会社) 等量に, 10% fetal calf serum (BIO WHITTAKER社), L-glutamine (292mg/l), hydrocortisone (0.36μg/ml), penicillin (100U/ml), streptomycin (100μg/ml) を加えて使用した。

FRO細胞 (甲状腺未分化癌) は, 山下俊一教授 (長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設発症予防部門) より提供をうけた。培地としてRPMI1640培地 (大日本製薬株式会社) に, 10% fetal calf serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100μg/ml) を加えて使用した。

KB細胞 (epidermoid carcinoma) 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。培地としてMinimum Essential Medium培地 (大日本製薬株式会社) に, 10% fetal calf serum, L-glutamine (292mg/l), gentamycin (25μg/ml) を加えて使用した。

L細胞 (マウス皮下組織) 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。培地としてハ

ム F-12培地に, 10% fetal calf serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) を加えて使用した。

実験1: SCC-25細胞を用いて, 0.1%トリパン青液で染色し算定盤により測定した細胞数と MTT assay での測定結果との相関を調べた。

細胞数の測定は, 以下のように行った。

- 1) 平底24well のプレートで, 各濃度の培養細胞の上清を吸引で除去し, 0.125%トリプシン500 $\mu$ l で, プレートより残った培地を取り除き, その後0.125%トリプシン 1 ml を加えた。
- 2) 15分間, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>の incubator 内に静置した。
- 3) パスツールピペットで細胞を剥がし, 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認し, パスツールピペットでチューブに入れた。
- 4) 培地を 4 ml 加えて計 5 ml にした。
- 5) 1000rpm で 5分間遠心した。
- 6) 上清をデカンテーションして捨て, 培地を 1 ml 加えた。
- 7) 0.1%トリパン青液を用いて, 細胞数を算定盤にて測定した。

上記の実験と併行して, MTT assay にての測定も行った。MTT assay は CHEMICON 社の MTT-CELL GROWTH ASSAY キットを用いた。well 内の培養細胞に, 培地0.5ml と MTT: (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyl tetrazolium bromide) を 0.05 ml 加え37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>の incubator 内で 4時間反応させた。反応終了後, isopropanol with 0.04N HCl を 0.5ml 用いて formazan を溶出させ, 570nm の吸光度を ELISA reader (Sj eia AUTO READER, 三光純薬) により測定した。

実験2: SCC-25細胞, FRO 細胞の培養細胞に対する 5'-DFUR の dose response curve を MTT assay により求めた。実験のプロトコールは以下に示すとおりである。

- 1) 平底24well プレートに, SCC-25細胞は  $2 \times 10^4$  個/ml/well, FRO 細胞では  $5 \times 10^3$  個/ml/well ずつ細胞を播いた。
- 2) 18時間, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>で incubate し細胞が付着したところへ, 薬剤を各濃度に培地中に溶解・調整し, この薬剤を含む培地で培地交換することにより薬剤を接触させた。5'-DFUR の濃度は 7.5, 15.0, 30.0, 60.0 $\mu$ g/ml とし, 接触時間はそ

れぞれ 3, 6, 24, 48, 72時間とした。

- 3) 5'-DFUR を接触させた後, 各 well を薬剤を含まない培地にて 3回洗浄し薬剤を除去し, 培地を加えて培養を継続した。
- 4) 薬剤接触開始より72時間後に, MTT assay を用いて測定を行った。
- 5) 対照として, 5'-DFUR を接触させず同様の実験を行った。

※5'-DFUR は, 日本ロシユ株式会社より提供をうけた。

実験3: SCC-25細胞, FRO 細胞, KB 細胞の培養細胞に対して, 5'-DFUR と DP の併用による効果につき検討を加えた。DP の接触濃度は 2.5 $\mu$ g/ml とした。培養開始細胞数は, SCC-25細胞:  $2 \times 10^4$  個/ml/well, FRO 細胞:  $5 \times 10^3$  個/ml/well, KB 細胞:  $1 \times 10^4$  個/ml/well とし, 実験2と同様の方法で薬剤を72時間接触させた後, MTT assay により測定した。さらに, SCC-25細胞についてはトリパン青染色により算定盤で細胞数を測定した。

※Dipyridamole は, 日本ベーリンガー・インゲルハイム株式会社より提供をうけた。

実験4: 正常細胞に DP が及ぼす影響を調べる目的で L 細胞の培養細胞に対する 5'-DFUR と DP の作用について検討を加えた。L 細胞の培養開始細胞数は  $5 \times 10^3$  個/ml/well とした。5'-DFUR の接触濃度は 30 $\mu$ g/ml, DP の接触濃度は 2.5 $\mu$ g/ml, 接触時間は72時間とし, 薬剤接触後, MTT assay を用いて測定を行った。

#### 統計的検定

有意差の検定には, Mann-Whitney 検定を用い, 相関の検定には, Pearson の相関係数を利用した。

実験1については, 算定盤・MTT assay とともに各濃度 6 well の測定結果を使用して検定した。

実験2, 実験3, 実験4については, 12well の測定結果につき検討した。

#### 結 果

実験1: MTT assay では, 各濃度の細胞の吸光度から細胞を含まない吸光度を差し引いたものを optical density (O.D.) として示した。細胞数と formazan 生成の関係は, 相関係数 0.989 ( $P < 0.01$ ) で, 吸光度は生細胞を正確に反映していると考えられた。(図1)

図1 SCC-25細胞での MTT assay と細胞数の関係

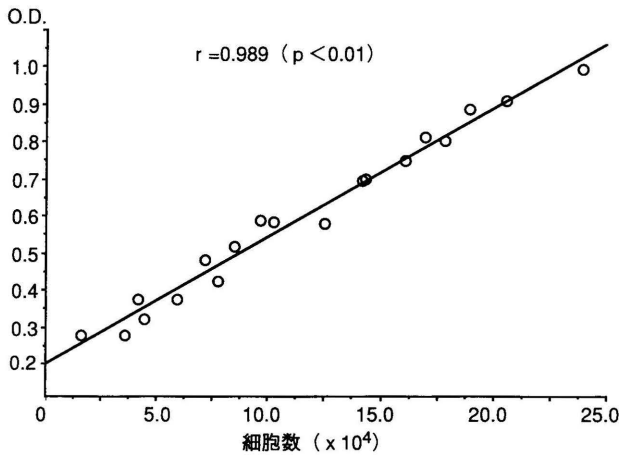
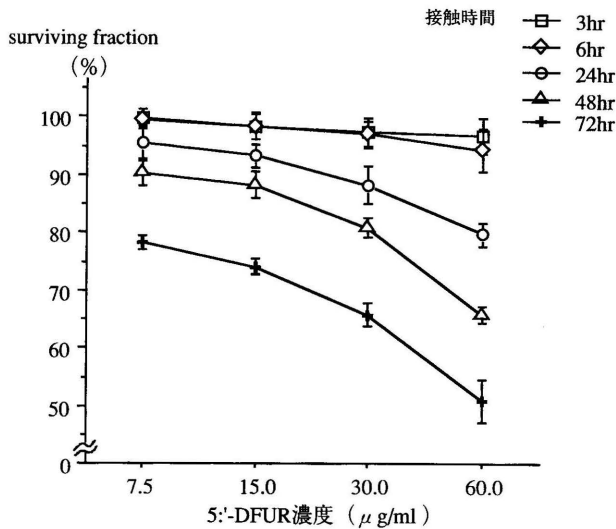


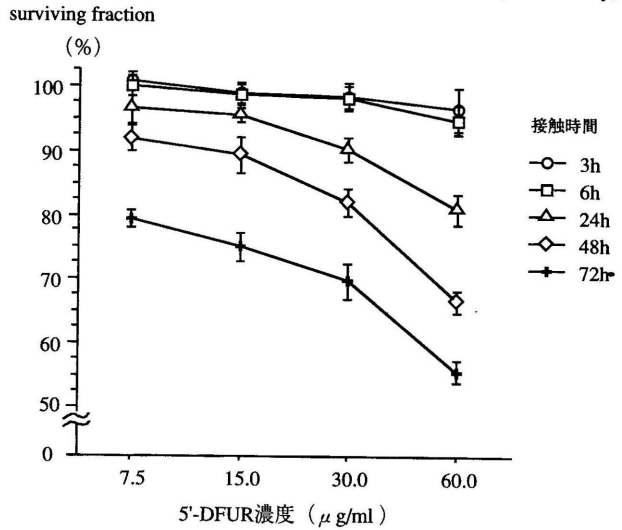
図2 SCC-25細胞における 5'-DFUR の surviving fraction curve (MTT assay)



実験2：対照を100%とした場合のそれぞれの薬剤濃度、接触時間での吸光度の比を surviving fraction とし、SCC-25細胞、FRO細胞に対する 5'-DFUR の surviving fraction curve を作製した。(図2, 3) いずれの細胞も、5'-DFUR を長時間接触させると増殖抑制が強くなり、時間依存性の抑制を示した。

実験3：SCC-25細胞に対してDP2.5µg/mlのみ、5'-DFUR30µg/mlのみ、5'-DFUR30µg/mlとDP2.5µg/ml、5'-DFUR60µg/mlを72時間接触させ、MTT assay にて測定した surviving fraction を図4に示す。DP2.5µg/ml 単独の場合、増殖抑制は認めなかった。5'-DFUR30µg/ml と DP2.5µg/ml を併用した際には

図3 FRO細胞における 5'-DFUR の surviving fraction curve (MTT assay)



5'-DFUR30µg/ml 単独に比して有意な増殖抑制の増強を認めた ( $P < 0.05$ )。さらに併用時では surviving fraction 平均 48.05% で、5'-DFUR 60 µg/ml 単独 (surviving fraction 平均 50.85%) と同程度以上の効果を認めた。

SCC-25細胞に対して、DP2.5µg/ml 単独、5'-DFUR 7.5µg/ml・15.0µg/ml 単独、5'-DFUR 7.5µg/ml・15.0µg/ml と DP2.5µg/ml 併用にて、それぞれの薬剤を72時間接触させた後、トリパン青染色にて細胞数を測定した結果を図5に示す。5'-DFUR 単独に比して、DP を併用したものは、いずれも有意に増殖抑制が強くなった ( $p < 0.05$ )。5'-DFUR 7.5µg/ml と DP2.5µg/ml 併用した際には surviving fraction 平均 31.90% で、5'-DFUR 15.0µg/ml 単独 (surviving fraction 平均 37.06%) 以上の増殖抑制を認めた。

FRO細胞、KB細胞に対しては、DPの明らかな増強効果は認めず、併用により抗腫瘍効果が低下する傾向がみられた。(図6, 図7)

実験4：L細胞に対しては、5'-DFUR 単独では増殖抑制を示したが、DP併用にて有意な増殖抑制の減弱を認めた ( $p < 0.05$ )。(図8)

## 考 察

Biochemical Modulation の概念によるFUraの modulator としてはFUraの制癌効果増強作用を持つ、Methotrexate, Leucovorin, Uracil, Interferon などが

図4 SCC-25細胞における薬剤の効果 (接触時間72時間 MTT assay)

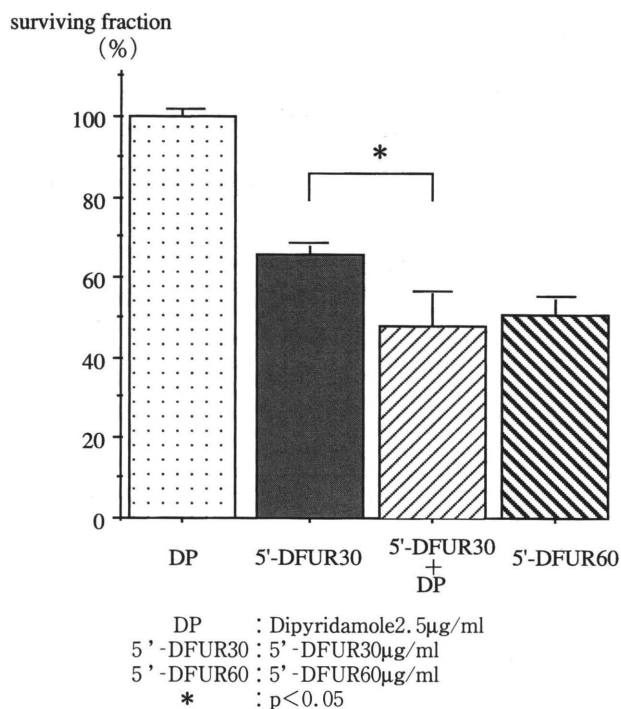
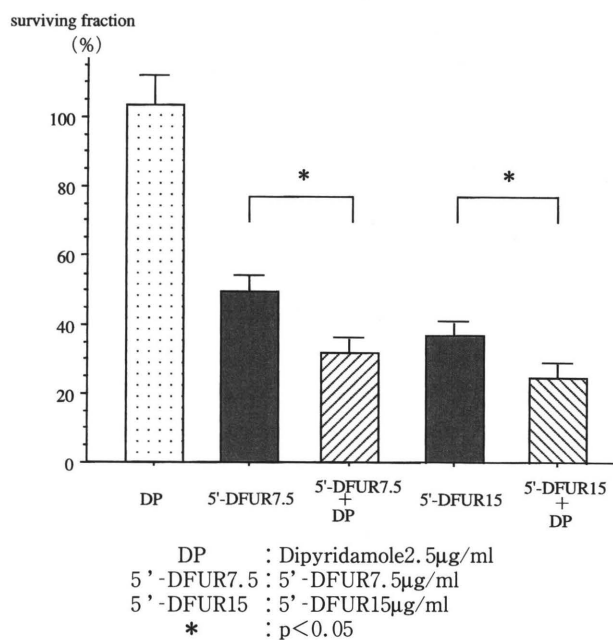


図5 SCC-25細胞における薬剤の効果 (接触時間72時間 cell count)



あり、DPもその一つである。一方、DPにより効果が増強される抗癌剤 (effector) としては、FUraの他、Adriamycin<sup>10)</sup>、Methotrexate<sup>11,12)</sup>、Vincristine<sup>13)</sup>、Acivicin<sup>14)</sup>などが報告されている。

図6 FRO細胞における薬剤の効果 (接触時間72時間 MTT assay)

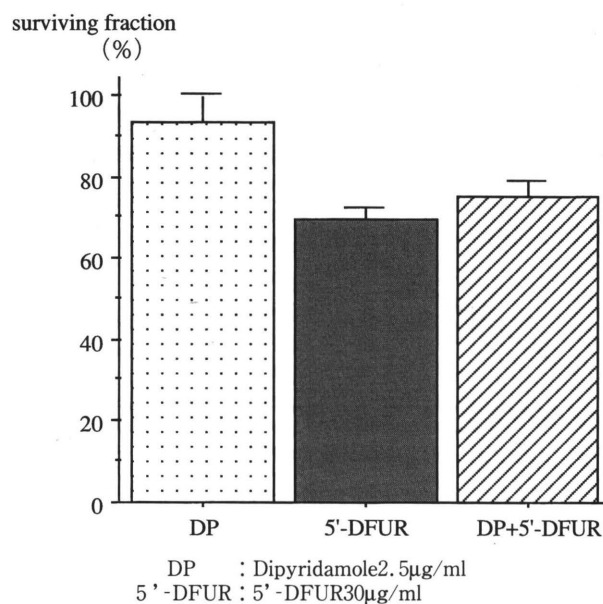
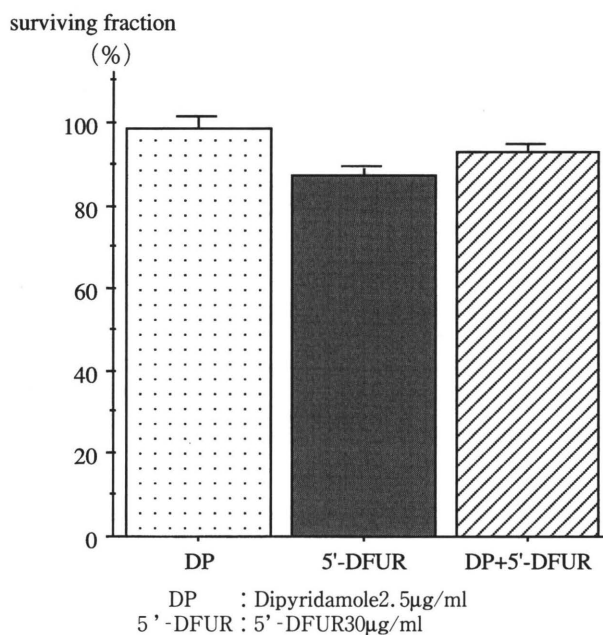
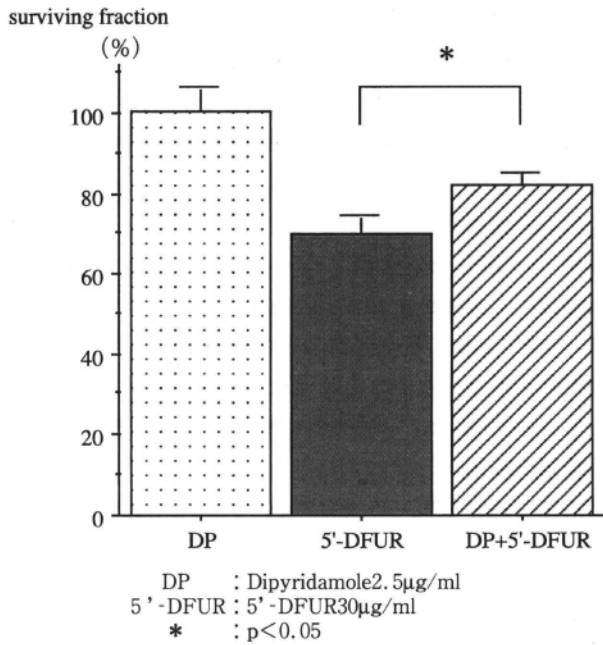


図7 KB細胞における薬剤の効果 (接触時間72時間 MTT assay)



Hirose<sup>13)</sup>らは、leukaemiaとlymphomaのcell lineにおいて、VincristineとDPを併用した場合、Vincristine単独に比べて細胞内のVincristine濃度が上昇し、抗腫瘍効果が増強したと報告している。Asohら<sup>15)</sup>はKBcellの薬剤耐性株VJ-300, HC-7-5/VCRを用いて、Vincristine, Actinomycin DとDPを併用した際には、Vincristine, Actinomycin Dの細胞外排出が減少し、細

図8 L細胞における薬剤の効果 (接触時間72時間 MTT assay)



胞内濃度が上昇して耐性が克服され、さらに、VJ-300においてDPを作用させた際に、170kDaのbandをもつP-glycoproteinの発現が阻害されたと報告している。

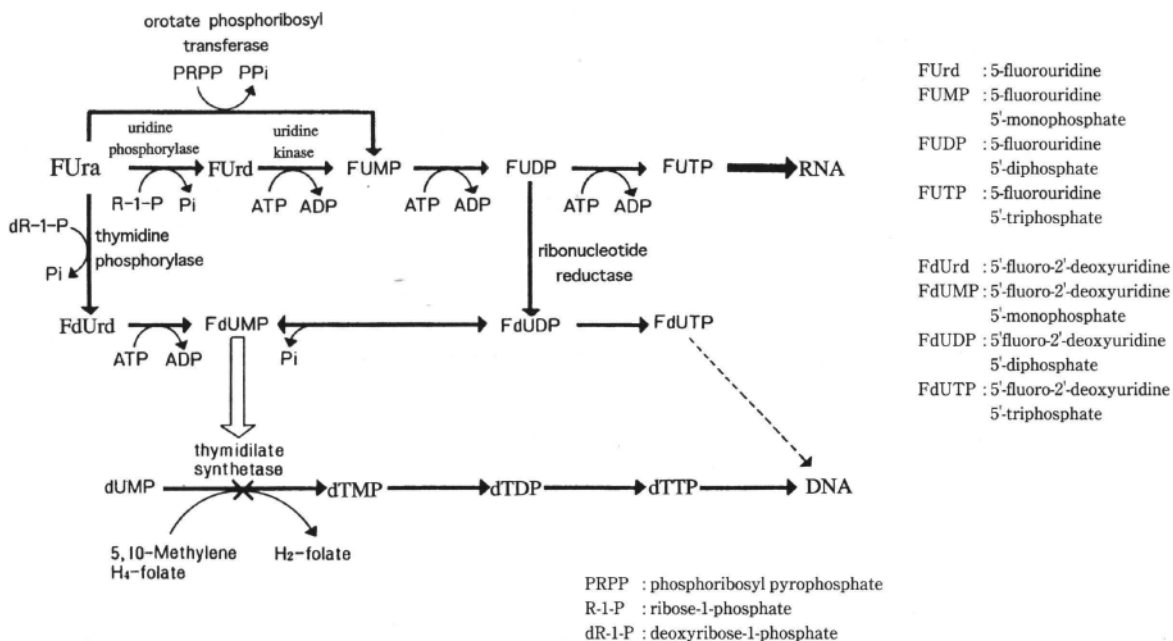
今回の実験で使用した5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR)は、5-fluorouracil (FUra)の潜在活性型であり、生体内では、pyrimidine nucleoside phosphorylaseによりFUraに転換され、その効果を発揮する薬剤であ

る。この酵素は小腸などを除き、正常細胞に比べて腫瘍細胞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。

FUraの作用機序はRNAの機能障害とDNAの合成阻害である。FUraは細胞内に取り込まれ、orotate phosphoribosyl transferaseによりFUMPに変換された後、リン酸化を受けてFUTPとなり、RNAに取り込まれ、RNAの機能障害を起こす。また、FUraがuridine phosphorylaseによりFUrdに変換された後、uridine kinaseによってFUMPとなる経路もある。DNAに関しては、FUDPからribonucleotide reductaseによってFdUDPとなり、脱リン酸化されてFdUMPに変換され、これが5, 10-CH<sub>2</sub>-FH<sub>4</sub>, thymidylate synthetaseと三量複合体を形成してdTMP合成を阻害し、結果としてDNA合成の基質であるdTTPを枯渇させ、DNA合成を阻害する。さらに、FUraからthymidine phosphorylaseによってFdUrdに、その後FdUMPに変換される経路もある(図9)。

Dipyridamole (DP)は、冠動脈拡張剤・血小板凝固抑制剤として、以前より臨床に用いられている薬剤で、ヌクレオシドの細胞膜輸送を阻害する作用をもつ。FUraに対するDPの作用は次のように考えられている。すなわち、FUraの作用は細胞外からのthymidineやuridineの供給で阻害されるが、DPにより、これらのヌクレオシドの細胞外からの供給が阻止されることによって、

図9 FUraの代謝



FUra の効果が増強される。さらに、細胞膜輸送の阻害により細胞内のFdUrdの細胞外への輸送も抑制されるため、細胞内FdUrd濃度が増加し、結果的にFdUMP産生が増加し、FUraの効果が増強されると言われている<sup>9)</sup>。

Asohら<sup>15)</sup>は、KBcellとその耐性株のVJ-300において、FUraとDPの併用にて、FUraの抗腫瘍効果の増強を認めたが、FUraの細胞内濃度は変化なかったと報告している。さらに、HeLaおよびB16melanoma細胞においてもFUraとDPの併用効果は認められたが、FUraの細胞内濃度の増加は認めなかったとの報告もあり<sup>16)</sup>、FUraに対するDPの効果はヌクレオシドの細胞膜輸送阻害によるsalvage pathwayの利用低下によるものと考えられる。以上のように、FUraに対するDPの効果、作用機序についての検討は行われているが、検索し得た限りにおいて、5'-DFURとDPの併用効果についての報告は認めない。

そこで、SCC-25細胞、FRO細胞、KB細胞に対して、5'-DFURとDPの併用による、5'-DFURの抗腫瘍効果増強の有無につき、in vitroで実験的検討を行った。今回の実験では、開始細胞数は、予備実験を行い、安定した細胞増殖が得られ、実験時間が細胞の対数増殖期間になるように濃度を求め、SCC-25細胞は $2 \times 10^4$ 個/ml/well、FRO細胞では $5 \times 10^3$ 個/ml/well、KB細胞は $1 \times 10^4$ 個/ml/well、L細胞では $5 \times 10^3$ 個/ml/wellとした。

また、薬剤の効果判定にはMTT assayを用いた。MTT assayはATP合成に関与したTCA cycleの一酵素であるコハク酸脱水素酵素を細胞viabilityの指標として用い、そのコハク酸脱水素酵素の活性を示すための酵素受容体としてmethylthiazol tetrazolium bromide (MTT)を用いる方法である<sup>17-20)</sup>。MTTは淡黄色であるが、水素給体の存在により還元されて紫色のformazanを形成する。この反応は、細胞が死滅すればsuccinic dehydrogenase系酵素の活性を失い、紫色への発色が起こらなくなる。このformazanの色の差を測定することで薬剤の有効性を比較する方法がMTT assayである。実験1において細胞数とformazan生成の関係は、相関係数0.989で、吸光度は生細胞数を正確に反映していると考えられた。また、実験2において5'-DFURが時間依存性の抑制を示したことより、DPの併用効果の判定は、薬剤接触72時間とし、その後MTT assayにて測定を行った。MTT assayでは、培養が短期間で

あり、時間依存性の薬剤の場合、その抗腫瘍効果の判定に対して過小評価する可能性がある。しかし、山内ら<sup>21)</sup>は、耐性株を用いた基礎的実験により3日間培養を行えば評価可能であると述べている。

In vitroでの抗癌剤感受性の結果と臨床効果との相関については60~80%程度の報告が多い。Weisenthal<sup>22)</sup>は、文献上の固形癌における各種の感受性試験の結果と臨床成績との関係を2000例についてまとめ、true positive rate63%、true negative rate92%と報告している。一般に、MTT assay等の抗癌剤感受性試験は、無効な薬剤の使用を避けるという意味で有効であると言われている。また、MTT assayでは細胞の生物学的死と蛋白質である酵素の失活に時間的ずれがあり、細胞の死滅後にも酵素活性が残存している場合があり、抗癌剤感受性試験として利用する場合には、高濃度の制癌剤で処理する必要があると言われている<sup>23)</sup>。実験3においても細胞数を算定盤にて測定した場合とMTT assayによる測定で、差を認めた。そこで、効果判定の基準について、前原ら<sup>24)</sup>は、MTT assayにおいて最高血中濃度の5~10倍の抗癌剤に3日間接触させ、IC<sub>50</sub>値が得られたときに有効と判定している。山本ら<sup>25)</sup>は、最高血中濃度と同程度の濃度で3日間接触させ、対照と比較して吸光度が70%以下になったときに有効と判定している。今回の実験は、薬剤併用による相乗効果を調べることが目的であるため、詳細な検討は行っていないが、MTT assayを抗癌剤感受性試験として使用する際には、判定の基準をどこにするかを考慮する必要があると思われた。しかし、MTT assayは測定が比較的簡単で、結果を数値で示すことができ、特に多くの検体あるいは薬剤についての検討を行う際には測定時間も短縮できるという利点があり、有用な方法と思われた。

5'-DFURとDPの投与実験結果は、KB細胞、FRO細胞に対しては、5'-DFUR単独では、抗腫瘍効果を認めたものの、DPを併用した場合には、5'-DFURの効果が弱まる傾向を認めた。しかし、Asohら<sup>15)</sup>は、KB細胞においてFUraとDPを併用した際に、FUraの効果増強を認めたことを報告している。これらのことは、DPにより5'-DFURの細胞内への取込みが抑制されている可能性があること、あるいは、5'-DFURよりFUraへの転換抑制がおこっていること等が考えられる。Asohら<sup>15)</sup>は、KB細胞においてFUraの代謝物である5-fluorouridine (FUrd)とDPを併用した場合には、FUrd単独に比べてFUrdの抗腫瘍効果が減弱し、FUrdの細



胞内濃度が低下したと報告している。5'-DFURにも同様のことがおこっている可能性も考えられるが、今回の実験では細胞内濃度の検討は行っていない。

これに対して、SCC-25細胞においては、DP2.5 $\mu$ g/ml併用により、5'-DFURの有義な効果増強を示した( $p < 0.05$ )。また、DP2.5 $\mu$ g/ml単独にては増殖抑制を認めなかったことより、SCC-25細胞に対してDPが5'-DFURのmoduratorとして有効であると言える。また、今回の検討で5'-DFURの有義な効果増強を示したDP濃度は、2.5 $\mu$ g/ml以上であった。DPの血中濃度については、工藤ら<sup>26)</sup>が人工弁置換術後の患者に術直後よりDP100mgの持続点滴、3日目よりDP300mgの経口投与にて、血中濃度は経静脈投与時3 $\mu$ g/ml前後・経口投与時2 $\mu$ g/ml前後であったと報告している。さらに、前原ら<sup>27)</sup>は胃癌患者に対してDP50mgの点滴静注とAdriamycin20mgの静注、およびDP300mg、FUra150mgの経口投与を行い併用療法の臨床試験を行っている。DPの平均血中濃度は点滴中8.8 $\mu$ M (2.17 $\mu$ g/ml)まで上昇し、DP点滴による副作用としては、顔面熱感・頭痛・吐気・上腹部痛であり、いずれも軽度で、点滴終了後に消失し、FUraあるいはAdriamycinの副作用増強はなかったと報告している。さらに、実験4において、正常細胞にDPが及ぼす影響を調べる目的で使用したL細胞においては、DP2.5 $\mu$ g/ml併用にて、5'-DFURの増殖抑制が5'-DFUR単独に比して有意に低くなった( $p < 0.05$ )。以上のことより、耳鼻咽喉科において主たる癌組織型であるsquamous cell carcinomaに対しては、DPが5'-DFURの効果を増強し、一方、正常細胞に対しては5'-DFURの副作用を軽減する可能性もあると考えられた。

しかし、本実験では、扁平上皮癌については、使用した細胞がSCC-25細胞のみであり、正常細胞としてはL細胞のみの検討である。その他の扁平上皮癌由来細胞およびヒトの正常細胞を用いた検討が必要であると考えている。それにより、本実験と同様の結果が得られれば、さらに、薬剤の細胞内濃度測定による5'-DFURに対するDPの作用機序についての検討も行う予定である。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導後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

手技で御協力いただいた野口病院検査科 渡辺陽子氏、脇屋滋子氏、谷川陽子氏に深謝致します。

## 文 献

1. 太田和夫: Biochemical modulation. 医学のあゆみ, 141: 572-575, 1987
2. 堀越茂: Biochemical modulation—その概念と歴史的背景—. 消化器癌, 1: 463-466, 1991
3. Bertino, J.R., Sawicki, W. L., Lindquist, C. A., and Gupta, V. S.: Schedule-dependent antitumor effects of methotrexate and 5-fluorouracil. *Cancer Research*, 37: 327-328, 1977
4. 赤沢修吾, 須田雍夫, 吉田清一: MTX/5-FU 時間差投与方法と消化器癌治療. 消化器癌, 1: 467-474, 1991
5. Berger, S. H. and Hakara, M. T.: Relationship of dUMP and free FdUMP pools to inhibition of thymidylate synthase by 5-fluorouracil. *Mol. Pharmacol.*, 25: 303-309, 1984
6. Fujii, S., Ikeda, K., Fukushima, M., and Shirasaka, T.: Effect of uracil and its derivatives on antitumor activity of 5-fluorouracil and 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil. *Gann*, 69: 763-772, 1978
7. Fujii, S., Kitano, S., Ikeda, K., and Shirasaka, T.: Effect of coadministration of uracil or cytosine on the antitumor activity of clinical doses of 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil and level of 5-fluorouracil in rodents. *Gann*, 70: 209-214, 1979
8. Warder, S., Werstro, R., Weinberg, V., Thompson, D., et al.: Interaction of fluorouracil and interferon in human colon cell lines: Cytotoxic and cytokinetic effect. *Cancer Research*, 50: 5735-5739, 1990
9. Grem, J.L. and Fischer, P.H.: Alteration of fluorouracil metabolism in human colon cancer cells by dipyridamole with a selective increase in fluorodeoxyuridine. *Cancer Research*, 46: 6191-6199
10. Kusumoto, H., Maehara, Y., Anai, H., Kusumoto, T., et al.: Potentiation of Adriamycin Cytotoxicity by Dipyridamole against Hela Cells in vitro and Srcoma 180 Cells in vivo. *Cancer Research*, 48: 1208-1212, 1988
11. Kennedy, D. G., Van den Berg, H.W., Clarke, R., and

- Murphy, R.F.: Enhancement of methotrexate cytotoxicity towards the MDA. MB. 436 human breast cancer cell line by dipyridamole. *Biochemical Pharmacology*, 35 : 3053-3056, 1986
12. Van Mouwerik, T.J., Pangallo, C.A., Willson, J. K. V., and Fisher, P. H.: Augmentation of methotrexate cytotoxicity in human colon cancer cells achieved through inhibition of thymidine salvage by dipyridamole. *Biochemical Pharmacology*, 36 : 809-814, 1987
  13. Hirose, M., Takeda, T., Ninomiya, T., Kuroda, Y., et al.: Synergistic inhibitory effects of dipyridamole and vincristine on the growth of human leukemia and lymphoma cell lines. *Br. J. Cancer*, 56 : 413-417, 1987
  14. Zhen, Y., Lui, M.S., and Weber, G.: Effect of acivicin and dipyridamole on hepatoma 3924A cells. *Cancer Research*, 43 : 1616-1619, 1983
  15. Asoh, K., Saburi, Y., Nogae, I., Kohno, K., et al.: Potentiation of some anticancer agents by dipyridamole against drug-sensitive and drug-resistant cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80 : 475-481, 1989
  16. 大塚貞明, 馬場秀夫, 武内秀也, 坂口義久 他: 温熱と dipyridamole の併用による 5-fluorouracil の抗腫瘍効果増強作用とそのメカニズムに関する研究. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.*, 10 : 42-48, 1994
  17. Kondo, T., Imamura, T., and Ichihashi, H.: In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann*, 57 : 113-121, 1966
  18. Kondo, T.: Prediction of response of tumor and host to cancer chemotherapy. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 4 : 251-256, 1971
  19. 斎藤和子, 佐々田裕子, 夏野徹也, 三橋進: 制癌剤感受性テスト SDI の改良法. *癌と化学療法*, 7 : 1952-1958, 1980
  20. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 : 55-63, 1983
  21. 山本昌司, 高木弘: MTT を用いた SDI test. 制癌剤適応決定の基礎と臨床 (近藤達平 編), 1 版, 癌と化学療法社, 東京, 1991, pp. 17-30
  22. Weisenthal, L. M., and Lippman, M. E.: Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treatment Reports*, 69 : 615-632, 1985
  23. Maehara, Y., Anai, H., Tamada, K., and Sugimachi, K.: The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23 : 273-276, 1987
  24. 前原喜彦, 鴻江俊治, 坂口善久, 江見泰徳 他: SDI 法による制癌剤感受性試験. *最新医学*, 45 : 136-146, 1990
  25. 山本嘉昭, 天崎寿夫, 高橋良樹, 石黒達也: 婦人科癌の制癌剤感受性試験—卵巣癌の長期予後との関係. *日産婦会誌*, 45 : S-159, 1993
  26. 工藤龍彦, 北村信夫, 小柳仁 他: 人工弁置換手術後の dipyridamole (persantin) 使用経験. *新薬と臨症*, 26 : 887-890, 1977
  27. 前原喜彦, 楠本宏記, 杉町圭蔵: Biochemical modulation による 5-FU の制癌効果強. *Biotherapy*, 6 : 519-526, 1992



## *Enhancement of the effect of 5'-DFUR by dipyridamole*

*Kohji Kimoto*

*Department of Otorhinolaryngology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima*

*(Director : Prof. Yasuo Koike)*

### SUMMARY

This study was performed to investigate if dipyridamole (DP) had an enhancement effect on antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR). The effect of 5'-DFUR by concomitant use of DP was studied on SCC-25 cells, FRO cells and KB cells in vitro using mainly the MTT assay. The effect of combined administration of 5'-DFUR and DP on L-cells was also examined.

No clear enhancing effect of DP on the antitumor activity of 5'-DFUR was found in FRO cells or KB cells, and a tendency toward decreased the activity of 5'-DFUR was found by concomitant use of DP. In SCC-25 cells, in contrast, the antitumor activity of 5'-DFUR was significantly enhanced by concomitant use of DP. In addition, a growth inhibitory effect of 5'-DFUR on L-cells was significantly suppressed by simultaneous treatment with DP. These results suggest that DP may enhance the antitumor effect of 5'-DFUR on squamous cell carcinoma, which is the main cancer tissue type in the field of otorhinolaryngology, and suppress the adverse effect of 5'-DFUR on normal cells.

Key words : dipyridamole, 5'-deoxy-5-fluorouridine, MTT assay, antitumor activity