

肺小細胞癌の化学療法に関する研究

第 1 編

Adriamycin 耐性ヒト肺小細胞癌細胞株の耐性解除に関する検討

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

山 下 英 敏

(平成 3 年 9 月 12 日受稿)

Key words : human small cell lung cancer cells in culture,
ADM resistant subline, reversal of resistance

緒 言

肺小細胞癌は増殖速度が速く、早期より広範な遠隔転移をきたす悪性度の高い腫瘍の一つであり、未だ予後不良の疾患であるが、固型癌の中では抗癌剤に高感受性であるという一面もあり、近年の多剤併用化学療法を主体とする集学的治療の開発導入により30-40%の完全寛解がもたらされるようになった¹⁾²⁾。しかし、治療継続中にもかかわらず大多数の完全寛解例において再発は免れ得ず、薬剤耐性の獲得などは治療上の大きな問題点となっている。このような耐性化の原因としては、肺小細胞癌の不均一性による耐性細胞の selection とともに、治療を繰り返すことで腫瘍細胞が抗癌剤に対して耐性を獲得する、いわゆる acquired resistance などが考えられ、臨床における再発という病態に大きく関与していると考えられる。したがって、肺小細胞癌における薬剤耐性の機序を解明し、耐性の克服を検討することは、本疾患の治療成績を向上させるために極めて重要な課題と言える。Adriamycin (ADM) は肺小細胞癌に対して最も有効な抗癌剤のひとつであるが、以前われわれは、ヒト肺小細胞癌細胞株 (SBC-3) より ADM に対する耐性株 (SBC-3/ADM) を作製し、その耐性発現機序として、influx の低下と efflux の亢進に基づく抗癌剤の uptake の減少が主因であることを報告した³⁾。今回 SBC-3/ADM

を獲得耐性モデルとして用いて、細胞膜の透過性を変化させ抗癌剤の細胞内 uptake を増加させると考えられている種々の膜修飾物質を ADM と併用することにより、耐性解除について若干の検討を試みたので、その成績を報告する。

実験材料と方法

1. 腫瘍細胞

当教室において樹立したヒト肺小細胞癌細胞株 (SBC-3)⁴⁾と、SBC-3 を in vitro で ADM と持続的に接触させ、最終的に cloning を行うことにより作製された ADM 耐性株 (SBC-3/ADM)³⁾を用いた。両細胞株とも10%ウシ胎児血清加 RPMI 1640培養液を含む培養フラスコ (Falcon 3013) 中に継代維持されている。

2. 薬 剤

抗癌剤として、adriamycin (ADM; 協和発酵) を、また、膜修飾物質としてポリエン系抗生物質の amphotericin B (スクイブ) とカルシウム拮抗剤の verapamil (エーザイ)、抗不整脈剤の quinidine (日研科薬)、ビスコクラウリン型アルカロイドの cepharanthin (化研生薬)、向リソゾーム薬剤の chloroquine (Sigma chemical Co.) を使用した。ADM, verapamil, cepharanthin, chloroquine は生理食塩水にて、amphotericin B は蒸留水にて、quinidine は難溶性のため RPMI 1640 にて使用直前に溶解し、これを用いた。

3. 両細胞株に対する hyperthermia と ADM の併用効果

まず hyperthermia 単独の効果を検討するため、ADM 非添加にて SBC-3 および SBC-3/ADM の単一細胞浮遊液を 42℃ と 43℃ の恒温槽中で加温し、soft agar clonogenic assay⁵⁾を行なって、各 incubation time における両細胞株の surviving fraction を求めた。これをもとに、単独では両細胞株に殺細胞効果を示さない温度を得、その温度と 37℃ において SBC-3 および SBC-3/ADM を ADM と 1 時間接触させたのち、soft agar clonogenic assay を用いて hyperthermia による ADM の効果増強作用を検討した。すなわち、まず単一細胞浮遊液を作製し、それぞれの温度下で種々の濃度の ADM と 1 時間接触させたのち洗浄し、0.3% agar と 15% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培養液に浮遊させ、あらかじめ準備しておいた feeder layer (0.5% agar と 15% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培養液) 上に重層した。37℃、5% CO₂ 下にて 2 週間静置培養後、コロニー数を算定した。各濃度における surviving fraction を、ADM 非添加におけるコロニー数に対する比率で表わし、dose response curve を作成した。それぞれの温度での両細胞株に対する ADM の殺細胞効果は、dose response curve より求めた 70% 殺細胞濃度 (LD₇₀) で比較した。

4. 両細胞株に対する amphotericin B, verapamil, quinidine, cepharanthin, chloroquine と ADM の併用効果

amphotericin B, verapamil, quinidine, cepharanthin, chloroquine についても同様に、まず ADM 非添加にて両細胞株に対するそれぞれの膜修飾物質の dose response curve を作成し、単独では殺細胞効果を示さない最高濃度を求めた。次に、その濃度の薬剤と ADM を 37℃ にて 1 時間接触させ、soft agar clonogenic assay を用いて両細胞株に対するこれら各薬剤による ADM の効果増強作用を検討した。

5. 両細胞株における [³H] daunomycin の細胞内蓄積に及ぼす verapamil の効果

薬剤の細胞内 uptake は、[³H] adriamycin が入手不能のため、類縁化合物で adriamycin と

完全交叉耐性を認める³⁾ daunomycin 標識化合物 [³H] daunomycin を用いて行なった。すなわち、両細胞株を単一細胞浮遊液としたのち、verapamil (10 μM) 添加あるいは非添加にて 37℃、Hank's balanced solution 中で [³H] daunomycin (1 μM) と接触させ、経時的に採取した細胞を永冷して反応を停止し、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-700) にてそれぞれ放射活性を測定した。

また、efflux は verapamil 非添加後 uptake がほぼ plateau に達する 30 分の時点で、細胞浮遊液中より [³H] daunomycin を洗浄除去し、さらに、verapamil (10 μM) 添加あるいは非添加にて経時的に細胞内残留放射活性を測定した。clonogenic assay を用いる実験では少なくとも 2 回の実験をくりかえし行ない、その結果を総合して成績とした。

成 績

1. Hyperthermia による ADM の効果増強作用

SBC-3 および SBC-3/ADM に対する 42℃、43℃ での hyperthermia 単独による殺細胞効果を図. 1 に示す。42℃ の場合は、3 時間の加温でも両細胞株に対して殺細胞効果は認められなかったが、43℃ の場合、加温後 30 分よりほぼ同等に時間依存性の殺細胞効果が認められた。この結果に基づいて、ADM との併用に際しては単独で殺細胞効果を示さない 42℃ を用いた。

42℃ と 37℃ における両細胞株の ADM に対する dose response curve を図. 2 に示す。37℃ における ADM の LD₇₀ は、SBC-3 6.0×10^{-8} M, SBC-3/ADM 180×10^{-8} M であったが、hyperthermia (42℃) 併用による LD₇₀ は、それぞれ 2.8×10^{-8} M, 140×10^{-8} であった。すなわち、SBC-3 においては hyperthermia による ADM の効果増強が認められたが、SBC-3/ADM ではほとんど差は認められなかった。

2. Amphotericin B による ADM の効果増強作用

amphotericin B 単独における SBC-3 の surviving fraction は 50 μM : 100%, 100 μM : 47%, 250 μM : 4% であり、SBC-3/ADM でも

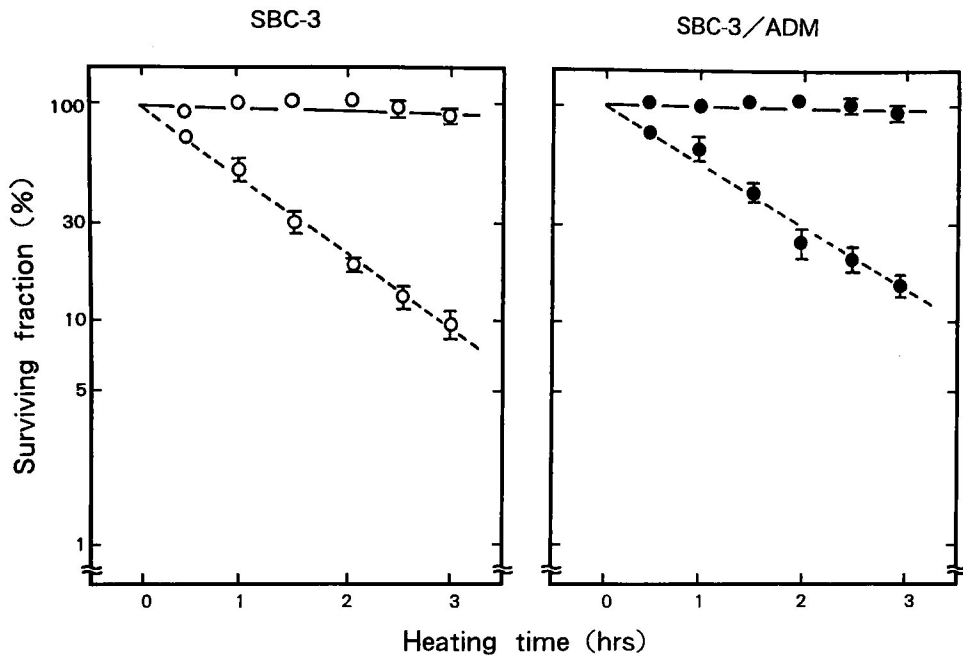


図1 SBC-3およびSBC-3/ADMに対するhyperthermia単独での殺細胞効果

○—○; SBC-3, 42°C ○---○; SBC-3, 43°C
●—●; SBC-3/ADM, 42°C ●---●; SBC-3/ADM, 43°C

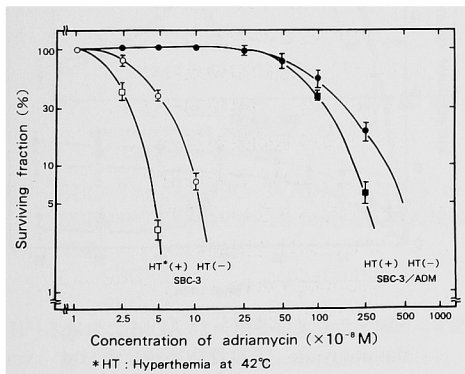


図2 SBC-3およびSBC-3/ADMに対するhyperthermia併用でのadriamycinの殺細胞効果

○; SBC-3, 37°C
□; SBC-3, 42°C
●; SBC-3/ADM, 37°C
■; SBC-3/ADM, 42°C

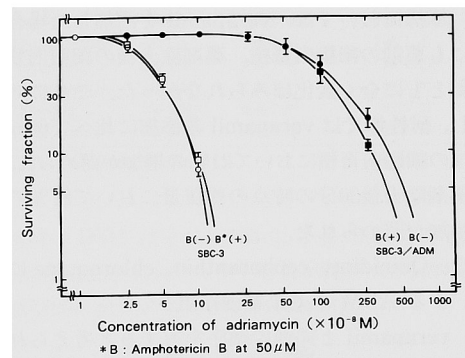


図3 SBC-3およびSBC-3/ADMに対するamphotericin B併用でのadriamycinの殺細胞効果

○; SBC-3, amphotericin B (-)
□; SBC-3, amphotericin B (+)
●; SBC-3/ADM, amphotericin B (-)
■; SBC-3/ADM, amphotericin B (+)

ほぼ同様の成績が得られたため、ADMとの併用に際しては50μMを用いた。図3に示すように、この濃度のamphotericin B併用における

ADMの LD_{50} は、SBC-3 6.0×10^{-8} M, SBC-3/ADM 5.0×10^{-8} Mであり、両細胞株ともにamphotericin BによるADMの効果増強作

用はほとんど認められなかった。

3. Verapamil による ADM の効果増強作用

verapamil 単独での SBC-3 の surviving fraction は $10\mu\text{M}$; 100%, $50\mu\text{M}$; 84%, $100\mu\text{M}$; 57% であり, SBC-3 /ADM についてもほぼ同様で, $10\mu\text{M}$ では単独の殺細胞効果は認められなかった。verapamil ($10\mu\text{M}$) と併用した場合の ADM の LD_{70} は, SBC-3 では $6.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ と全く不変であったのに対し, SBC-3 /ADM では $56 \times 10^{-8} \text{ M}$ と非添加時に比べ明らかに低値となり, 耐性株においてのみ効果増強が認められた (図. 4)。

4. [^3H] daunomycin の uptake study における verapamil の影響

両細胞株に対し, verapamil 添加あるいは非添加にて uptake study を行なった結果を図. 5 に示す。verapamil 非添加では60分後の [^3H] daunomycin の細胞内蓄積は, 原株 25.9 pmol/ml packed cell, 耐性株 2.65 pmol/ml packed cell であり, 後者において 1/10 に減少していた。薬剤除去後30分の時点における細胞内残留放射性活性は, 原株では基準値の50%にとどまったのに対し, 耐性株では17%であった。

原株においては, verapamil を添加した場合にも薬剤の細胞内蓄積, 薬剤除去後の細胞内残留ともに全く変化はみられなかった。これに対し, 耐性株では verapamil 非添加に比べて60分後の細胞内蓄積において21%の増加が認められ, 薬剤除去後30分の時点の残留量において81%の増加が認められた。

5. Quinidine, cepharanthin, chloroquine による ADM の効果増強作用

verapamil と同様の機序を有すると考えられる quinidine, cepharanthin, chloroquine についても単独では殺細胞効果を示さない最高濃度を求めた結果, それぞれ $50\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ を得た。図. 6 に示すごとく, quinidine ($50\mu\text{M}$) と併用した場合には, ADM の LD_{70} は SBC-3 において $6.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ と不変であったのに対し, SBC-3 /ADM においては $52 \times 10^{-8} \text{ M}$ と非添加時に比べて低値であり, 同様に, cepharanthin ($10\mu\text{M}$), chloroquine ($50\mu\text{M}$) 併用では SBC-3 の LD_{70} は全く不変であったのに対し, SBC

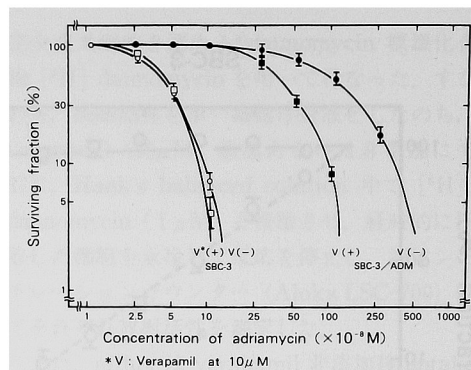


図4 SBC-3 および SBC-3 /ADM に対する verapamil 併用での adriamycin の殺細胞効果
○; SBC-3, verapamil (-)
□; SBC-3, verapamil (+)
●; SBC-3 /ADM, verapamil (-)
■; SBC-3 /ADM, verapamil (+)

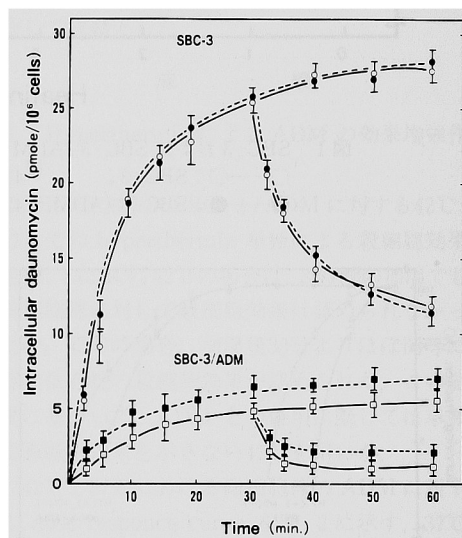


図5 SBC-3 および SBC-3 /ADM における [^3H] daunomycin の細胞内蓄積に及ぼす verapamil の効果
○—○; SBC-3, verapamil (-)
●—●; SBC-3, verapamil (+)
□—□; SBC-3 /ADM, verapamil (-)
■—■; SBC-3 /ADM, verapamil (+)

-3 /ADM のそれはそれぞれ $62 \times 10^{-8} \text{ M}$ (図. 7), $95 \times 10^{-8} \text{ M}$ (図. 8) と, 非添加時に比べて低値を示し, 明らかな効果増強が認められた。

6. Dose modifying factor の検討

各膜修飾物質による ADM の効果増強作用は,

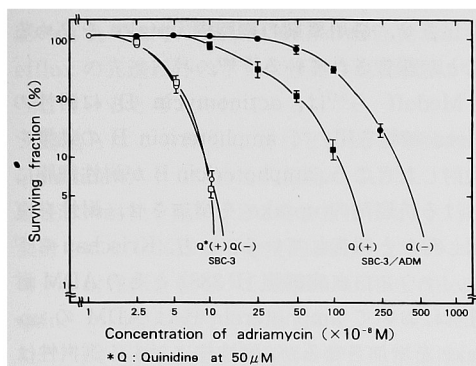


図6 SBC-3 および SBC-3/ADM に対する quinidine 併用での adriamycin の殺細胞効果

- ; SBC-3, quinidine (-)
 □ ; SBC-3, quinidine (+)
 ● ; SBC-3/ADM, quinidine (-)
 ■ ; SBC-3/ADM, quinidine (+)

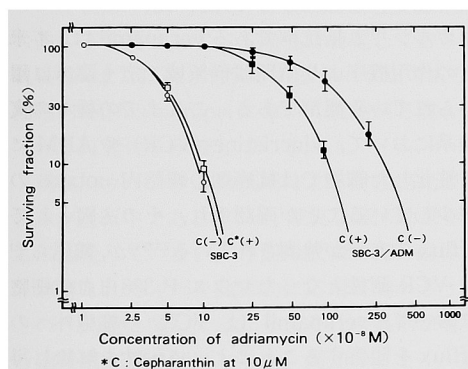


図7 SBC-3 および SBC-3/ADM に対する cepharanthin 併用での adriamycin の殺細胞効果

- ; SBC-3, cepharanthin (-)
 □ ; SBC-3, cepharanthin (+)
 ● ; SBC-3/ADM, cepharanthin (-)
 ■ ; SBC-3/ADM, cepharanthin (+)

ADM 単独での LD_{70} に対する膜修飾物質併用時の LD_{70} の比 (dose modifying factor ; DMF) を求めて検討した。表. 1 は, 6つの膜修飾物質を併用した際の両細胞株に対する ADM の LD_{70} および DMF を示しているが, SBC-3/ADM に対する hyperthermia および amphotericin B 併用時の DMF は, それぞれ1.2, 1.3であり, 耐性解除は得られなかった。一方, verapamil, quinidine, cepharanthin および chloroquine 併

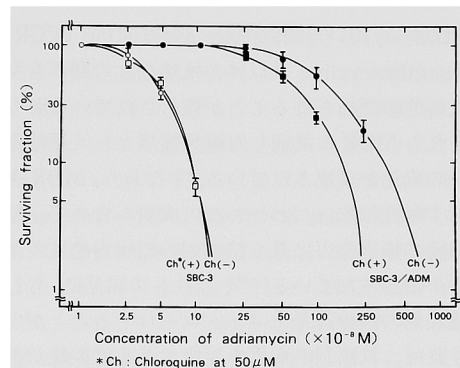


図8 SBC-3 および SBC-3/ADM に対する chloroquine 併用での adriamycin の殺細胞効果

- ; SBC-3, chloroquine (-)
 □ ; SBC-3, chloroquine (+)
 ● ; SBC-3/ADM, chloroquine (-)
 ■ ; SBC-3/ADM, chloroquine (+)

表1 SBC-3 および SBC-3/ADM における種々の Modifier による adriamycin の効果増強作用

Modifier	LD_{70} ($\times 10^{-8}M$) of ADM against	
	SBC-3	SBC-3/ADM
none	6.0	180
Amphotericin B (50 μM)	6.0(1.0)*	150(1.2)
Hyperthermia (42°C)	2.8(2.1)	140(1.3)
Verapamil (10 μM)	6.0(1.0)	56(3.2)
Cepharanthin (10 μM)	6.5(1.1)	62(2.9)
Quinidine (50 μM)	6.0(1.0)	52(3.5)
Chloroquine (50 μM)	6.0(1.0)	95(1.9)

() * : Dose modifying factor

用時の DMF はそれぞれ3.2, 2.9, 3.5, 1.9で, chloroquine においてやや効果が弱かったものの, 部分的に耐性の解除が認められた。

考 察

肺小細胞癌をはじめとして, もともと抗癌剤に高感受性の腫瘍が化学療法中に抵抗性となり, さらに未使用の抗癌剤に対しても反応しなくなる現象は臨床的にしばしば経験される。実験腫瘍においても, 腫瘍細胞がひとつの抗癌剤に耐性になると, 構造式や作用機序の異なる他の薬剤に対しても交叉耐性を示す multi-drug resistance (MDR) の現象が知られている⁶⁾⁷⁾。ヒト肺小細胞癌由来の ADM 耐性株 (SBC-3/

ADM)を用いた検討でも, vincristine (VCR)等 anthracycline 系以外の抗癌剤との間にも交叉耐性の認められることが報告されているが³⁾, これら MDR に共通した耐性機構として膜輸送系の変化が重視されている。すなわち, MDR を示す耐性細胞は, われわれの成績も含めて, 細胞膜の輸送障害に基く抗癌剤の細胞内濃度の減少が確認されている³⁾⁸⁾⁹⁾。これらの知見は, もし抗癌剤の膜輸送系をコントロールすることができれば, 抗癌剤の耐性を克服できる可能性があることを示唆している。そこで今回, 著者は細胞膜の透過性を変化させ, 薬剤の細胞内濃度を高め得ると考えられる膜修飾物質を用いることで耐性の解除を試みた。

従来より, ADM の *in vitro* 細胞毒性が 42°C - 45°C の hyperthermia によって強調され¹⁰⁾¹¹⁾, その機序として, hyperthermia による細胞膜での透過性の亢進に基く薬剤の細胞内濃度の増加が報告されている¹²⁾¹³⁾。抗癌剤に耐性となった細胞に hyperthermia との併用が耐性解除に有効か否かに関して, Li¹⁴⁾は ADM に耐性のチャイニーズハムスター線維芽細胞において, hyperthermia は耐性の克服に貢献しなかったと述べている。これに対して, Dewey¹⁵⁾は BCNU 耐性ラット脳腫瘍細胞で, また Wallner ら¹⁶⁾は Cisplatin 耐性チャイニーズハムスター卵巣細胞で, hyperthermia による部分的な耐性解除が可能であったと報告している。

今回の検討では, 原株で hyperthermia による ADM の効果増強作用が得られたものの, 耐性株においては効果の増強は認められなかった。一方, 両細胞株の heat sensitivity はほぼ同等であった。よって, この実験系において hyperthermia は ADM 耐性細胞に対して殺細胞効果を保持しているが, ADM に対する耐性を克服することは困難であると考えられた。

ポリエン系抗生物質である amphotericin B は, 臨床的には抗真菌剤として使用されているが, ある種の薬剤と併用することにより, *in vitro* および *in vivo* での細胞致死効果を相乗的に増加させることが確認されている¹⁷⁾¹⁸⁾。また, その相乗効果の機序として, amphotericin B が細胞膜のステロールと特異的に結合して膜透過性を

変化させ, 併用薬剤の細胞内 uptake を高めることが報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。

Medoff ら²¹⁾は, actinomycin D に耐性の Hera 細胞を用いて amphotericin B の効果を検討したところ, amphotericin B が耐性細胞における抗癌剤の uptake を増加させ, 耐性を克服し得たと報告している。一方, Krischan ら²²⁾は, マウス白血病細胞 (P 388) とその ADM 耐性株において amphotericin B は ADM の uptake を増加させるが, 耐性株に対する選択性はなく, むしろ原株におよぼす効果の方が大きかったと述べている。今回の成績では, 原株, 耐性株とも amphotericin B による ADM の効果増強作用は認められなかったが, この理由として, 他の amphotericin B 感受性細胞に比し今回用いた小細胞癌細胞株の細胞膜ステロール含量が乏しい可能性も考えられた。

カルシウム拮抗剤である verapamil は, 本来その作用機序より循環器科領域で広く臨床に用いられている薬剤である。これまでの種々の実験系において, vincristine (VCR) や ADM に耐性化した細胞では抗癌剤の細胞内 uptake の減少していることが確認され, その主因として efflux の亢進が強調されている²³⁾²⁴⁾が, 鶴尾ら²⁵⁾は VCR 耐性となったマウス P 388 白血病細胞において, verapamil は VCR の細胞外への efflux を阻害することによって耐性を解除し得ることを見いだした。さらに彼らは, P 388 白血病細胞の ADM 耐性株においても verapamil による耐性の克服が可能で²⁶⁾, 同様の現象が他のカルシウム拮抗剤や, カルモジュリン阻害剤を用いても認められると報告している²⁷⁾²⁸⁾。

今回のヒト肺小細胞癌由来の ADM 耐性株を用いた成績でも, ADM に対する耐性は verapamil によって部分的ながら克服され, その耐性解除の機序は SBC-3/ADM において亢進している efflux を阻害したためと考えられた。SBC-3/ADM では efflux の亢進とともに influx の低下も認められており³⁾, verapamil のみでは完全な耐性解除は困難と思われた。他の報告者の検討でも, verapamil は VCR 耐性細胞においてはほぼ完全に耐性を解除し得るが, ADM 耐性細胞では部分的な耐性解除にとどまることが

認められており²⁹⁾³⁰⁾, ADM の耐性発現には efflux の亢進以外のさらに複雑な耐性機構が関与していると考えられている。

鶴尾らはこの結果に着目し、抗不整脈剤の quinidine が P 388白血病細胞の ADM, VCR 耐性株の耐性を克服することを報告した³¹⁾。また、桑野らはヒト KB 扁平上皮癌細胞株とそのコルヒチン耐性株をもちいて、cepharanthin, chloroquine が同様に耐性を克服することを見いだした³²⁾³³⁾。さらに、これら3薬剤の耐性発現機序は、verapamil と同じく耐性株の efflux の亢進を阻害することであった³¹⁾³²⁾³³⁾。今回の小細胞癌 ADM 耐性株を用いた検討でも、quinidine, cepharanthin, chloroquine は verapamil とほぼ同等に部分的ながら耐性の克服が可能であった。なぜこれらの薬剤が efflux の亢進を阻害するかについて秋山³⁴⁾は、ADM とこれら耐性克服剤に共通する性質は、すべて陽性に荷電しており両親媒性（または疎水性）であるという点であり、細胞内 efflux pompe において抗癌剤と競合している可能性を示唆している。

現在、カルシウム拮抗剤による耐性癌克服の試みが進行中である³⁵⁾³⁶⁾が、確実な臨床効果を得るには至っていない。今回の成績で部分耐性解除が得られた4剤を臨床的に応用可能かどうかという問題に関しては、それぞれの薬剤が有する副作用が最も問題となる。周知のごとく、副作用として verapamil は徐脈と血圧低下、quinidine は高度伝導障害、chloroquine はクロロキン網膜症が認められ、今回の実験で用いた濃度が、いずれも臨床的に投与される濃度より数十倍から数百倍の高濃度であることを考えあわせると、これら3剤をこのまま臨床応用することは困難であるかも知れない。これに対し、cepharanthin には重篤な副作用はなく、今回の実験と同様に可能な限り大量に投与することを前提とすると、cepharanthin が最も有望と考えられる。

従来より、実験動物腫瘍に対する抗癌剤耐性の研究は広範に行われているが、ヒト腫瘍細胞を用いた検討は少なく、ヒト肺小細胞癌由来の細胞株について耐性解除を試みた成績は未だ報告されていない。今回の成績では、hyperthermia, amphotericin B では耐性の解除はできなかったものの、verapamil, quinidine, cepharanthin, chloroquine により部分的ながら耐性解除が得られた。今後より完全な耐性克服を得るためには、他の膜修飾物質を用いての検討とともに、耐性細胞に対するモノクローナル抗体や耐性遺伝子に関する研究など、別のアプローチも必要と考えられる。

結 論

肺小細胞癌の化学療法中に認められる抗癌剤耐性を克服する目的で、ヒト肺小細胞癌由来の細胞株 (SBC-3) と、その ADM 耐性株 (SBC-3/ADM) を用いて、種々の膜修飾物質による耐性の解除を試みた結果。

1) hyperthermia と amphotericin B は ADM 耐性の解除はできなかった。

2) verapamil との併用では部分的ながら耐性の解除が得られ、その耐性解除の機序は SBC-3/ADM において亢進している efflux を阻害することであった。

3) verapamil と同様の作用を有すると言われている quinidine, cepharanthin, chloroquine においても部分的な耐性の克服が可能であった。

謝 辞

本論文を撰筆するにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、終始御懇篤なる御指導を賜った大熨泰亮助教授、平木俊吉元講師に深謝します。

本論文の要旨は、第29回日本肺癌学会総会（昭和63年10月）にて発表した。

文 献

- 1) 木村郁郎, 大熨泰亮, 平木俊吉: 肺癌の化学療法, 内科 (1987) 59, 439—447.
- 2) Greco FA, Johnson DH, Hainsworth JD and Wolff SN: Chemotherapy of small cell lung cancer.

- Semin Oncol (Suppl. 6) (1985) **12**, 31—37.
- 3) 木村郁郎, 大熨泰亮, 平木俊吉, 宮本宏明: Adriamycin 耐性肺小細胞癌株の樹立とその性状. 癌と化学療法 (1987) **14** (Part. II), 830—836.
 - 4) 岸本信康, 大熨泰亮, 平木俊吉, 三宅賢一, 小沢志郎, 田村哲生, 沼田健之, 河原伸, 田村亮, 宮本宏明, 西井研治, 木村郁郎: ヒト肺小細胞癌5株の培養樹立とそれらの性状について. 肺癌 (1984) **24**, 644.
 - 5) Hiraki S, Ohnoshi T, Numata T, Kishimoto N, Mori K, Yonei T, Yamashita H and Kimura I: Anticancer drug sensitivity by human tumor clonogenic assay. Acta Med Okayama (1987) **40**, 265—269.
 - 6) Bech-Hansen Nt, Till JE and Ling V: Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. J Cell Physiol (1976) **88**, 23—31.
 - 7) Aldrich CD: Pleiotropic phenotype of cultured murine cells resistant to maytansine, vincristine, colchicine, and adriamycin. J Natl Cancer Inst (1979) **63**, 751—757.
 - 8) Giavazzi R, Schollar E and Hart IR: Isolation and preliminary characterization of an adriamycin-resistant murine fibrosarcoma cell line. Cancer Res (1983) **43**, 2216—2222.
 - 9) Ling V, Kartner N, Sudo T, Siminovitch L and Riordan JR: Multidrug-resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells. Cancer Treat Rep (1983) **67**, 869—874.
 - 10) Mizuno S, Amagai M and Ishida A: Synergistic cell killing by antitumor agents and hyperthermia in cultured cells. Gann (1980) **71**, 471—478.
 - 11) Ohnoshi T, Ohnuma T, Beranek JT and Holland JF: Combined cytotoxicity effect of hyperthermia and anthracycline antibiotics on human tumor cells. J Natl Cancer Inst (1985) **74**, 275—281.
 - 12) Hahn GM, Braun J and Har-Kedar I: Thermochemotherapy: synergistic between hyperthermia (42—43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. Proc Natl Acad Sci (1975) USA **72**, 937—940.
 - 13) Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K and Nakanishi T: Intracellular uptake, retention and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia in vitro. Jpn J Cancer Res (1986) **77**, 205—211.
 - 14) Li GC: Thermal biology and physiology in clinical hyperthermia: current status and future needs. Cancer Res (Suppl.) (1984) **44**, 4886 s—4893 s.
 - 15) Dewey WC: Interaction of heat with radiation and chemotherapy. Cancer Res (Suppl.) (1984) **44**, 4714 s—4720 s.
 - 16) Wallner KE, DeGregorio MW and Li GC: Hyperthermic potentiation of cis-diammine-dichloroplatinum (II) cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells resistant to the drug. Cancer Res (1986) **46**, 6242—6245.
 - 17) Kuwano M, Akiyama S, Endo H and Kohga M: Potentiation of fusidic acid and lentinan effects upon normal and transformed fibroblastic cells by amphotericin B. Biochem Biophys Res Commun (1972) **49**, 1241—1248.
 - 18) Medoff G, Valeriote F and Dleckman J: Potentiation of anticancer agents by amphotericin B. J Natl Cancer Inst (1981) **67**, 131—135.
 - 19) 桑野信彦: ポリエン系抗生剤と制がん剤の併用増強の試み. 癌と化学療法 (1981) **8**, 681—688.
 - 20) Presant CA and Carr D: Amphotericin B (Fungizone®) enhancement of nitrogen mustard uptake by human tumor cells. Biochem Biophys Res Commun (1980) **93**, 1067—1073.
 - 21) Medoff J, Medoff G, Goldstein MN, Schlessiuger D and Kobayashi GS: Amphotericin B-induced sensitivity to actinomycin D in drug-resistant Hella cells. Cancer Res (1975) **35**, 2548—2552.
 - 22) Krishan A, Sauerteig A and Gordon K: Effect of Amphotericin B on adriamycin transport in P 388

- cells. *Cancer Res* (1985) **45**, 4097—4102.
- 23) Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y and Johnson RK : active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P 388 leukemia. *Cancer Res* (1979) **39**, 2200—2203.
- 24) Kaye S and Merry S : Tumor cell resistance to anthracyclines-A review. *Cancer Chemother Pharmacol* (1985) **14**, 96—103.
- 25) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Overcoming of vincristine resistance in P 388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* (1981) **41**, 1967—1972.
- 26) Tsuruo T, Iida H, Yamashiro M, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Enhancement of vincristine and adriamycin-induced cytotoxicity by verapamil in P 388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin. *Biochem Pharmacol* (1982) **31**, 3138—3140.
- 27) Tsuruo T, Iida H, Nojiri M, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res* (1983) **43**, 2905—2910.
- 28) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Potentiation of vincristine and adriamycin effects in human hematopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* (1983) **43**, 2267—2272.
- 29) Tsuruo T : Reversal of acquired resistance to vinca alkaloids and anthracycline antibiotics. *Cancer Treat Rep* (1983) **67**, 889—984.
- 30) Beck WT, Cirtain MT, Look T and Ashmun RA : Reversal of vinca alkaloid resistance but not multiple drug resistance in human leukemic cells by verapamil. *Cancer Res* (1986) **46**, 778—784.
- 31) Tsuruo T, Iida H, Kitatani Y, Yokota K, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res* (1984) **44**, 4303—4307.
- 32) Shiraishi N, Akiyama S, Nakagawa M, Kobayashi M and Kuwano M : Effect of bisbenzylisoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res* (1987) **47**, 2413—2416.
- 33) Shiraishi N, Akiyama S, Kobayashi M and Kuwano M : Lysosomotropic agents reverse multiple drug resistance in human cancer cells. *Cancer Letters* (1986) **30**, 251—259.
- 34) 秋山伸一, 菊池 博, 吉村昭彦, 松本 實 : 抗癌剤耐性とその克服最近の知見. *癌と化学療法* (1987) **14** (part. IX), 2617—2625.
- 35) Rogan AM, Hamilton TC and Young RC : Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* (1984) **224**, 994—996.
- 36) 三比和美 : 抗癌剤とカルシウム拮抗剤の併用による治療抵抗性がんの治療成績. *癌と化学療法* (1987) **14** (Part. II), 951—955.

**Studies on chemotherapy for small cell
lung cancer**

**Part 1. Reversal of adriamycin resistance
in human small cell lung cancer cells
in culture**

Hidetoshi YAMASHITA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Using adriamycin-resistant human small cell lung cancer cells (SBC-3/ADM), which were 30-fold more resistant to adriamycin than the parent cells (SBC-3), the ability of membrane-modifying agents to overcome the drug resistance was analyzed by a soft agar clonogenic assay. SBC-3/ADM was not circumvented by hyperthermia of 42°C or amphotericin B at a concentration of 50 μ M. Verapamil did not enhance the adriamycin cytotoxicity in the SBC-3 cells at a concentration of 10 μ M, but a 3.2-fold increase in the drug effect occurred in the SBC-3/ADM cells in terms of LD₇₀. The efflux of intracellular [³H] daunomycin from SBC-3/ADM cells was inhibited by verapamil, while the inhibition did not occur in the parent cells. Furthermore, quinidine (50 μ M), cepharanthin (10 μ M) and chloroquine (50 μ M) enhanced the adriamycin cytotoxicity in the SBC-3/ADM cells. These findings suggest that some membrane-modifying agents could partially overcome the acquired resistance to adriamycin in human small cell lung cancer.