

## 肺腺癌細胞における Cremophor EL による etoposide (VP-16) の 殺細胞効果増強についての検討

須金紀雄<sup>1</sup>・辻野一郎<sup>1</sup>・山崎哲男<sup>1</sup>・高橋典明<sup>1</sup>・  
赤柴恒人<sup>1</sup>・澤田海彦<sup>1</sup>・堀江孝至<sup>1</sup>

**要旨** 目的．cyclosporin A の溶媒として用いられている Cremophor EL の etoposide (VP-16) の抗腫瘍効果増強についてヒト肺癌細胞株を用いて検討した．方法．細胞生存率の測定には，ヒト肺腺癌細胞株 (PC-14)，ヒト類上皮癌細胞株 (KB)，ヒト肺小細胞癌細胞株 (H69) に対して growth inhibition assay を行った．さらに，PC-14 に対しては in vitro clonogenic assay も行った．各細胞系における抗腫瘍剤の細胞内蓄積量の差を [<sup>3</sup>H]VP-16 を用いて比較検討した．MDR1 (multidrug resistance) 遺伝子の発現に関する mRNA の測定には，定量的 PCR 法を用いた．結果．PC-14 において，in vitro clonogenic assay で Cremophor EL の濃度が 250 μg/ml の条件下では VP-16 単剤に対して 100 倍以上の殺細胞効果増強が認められた．VP-16 の細胞内蓄積量は PC-14, A549 (ヒト肺腺癌細胞株) において有意な増加が認められた．また，MDR 遺伝子の mRNA の増幅は PC-14, A549 において認められなかった．結論．Cremophor EL は肺腺癌細胞における VP-16 の殺細胞効果を増強し，これは VP-16 の細胞内蓄積量の増加が原因と考えられた．そしてこの現象は，MDR 遺伝子の発現に関連したものではないと考えられた．(肺癌．2003;43:307-313)

**索引用語** クレモフォー EL，エトポシド，肺腺癌細胞，殺細胞効果，多剤耐性

## Effect of Cremophor EL on Cell-killing by Etoposide in Human Lung Adenocarcinoma Cells

Toshio Sugane<sup>1</sup>; Ichiro Tsujino<sup>1</sup>; Tetsuo Yamazaki<sup>1</sup>; Noriaki Takahashi<sup>1</sup>;  
Tsuneto Akashiba<sup>1</sup>; Umihiko Sawada<sup>1</sup>; Takashi Horie<sup>1</sup>

**ABSTRACT** **Objective.** Cremophor EL (polyoxyethylene castor oil) used as a solvent for cyclosporin A, was investigated to determine whether it enhances the effects of cell-killing by etoposide (VP-16) in human lung carcinoma cells in vitro. **Methods.** Survival fractions were measured by in vitro growth inhibition assay in PC-14 (human adenocarcinoma), KB (human epidermoid carcinoma), H69 (human small cell lung carcinoma) cells. The results were also confirmed by in vitro clonogenic assay in PC-14 cells. The intracellular accumulations of [<sup>3</sup>H]VP-16 were counted with a liquid scintillation counter in PC-14, KB, H69 and A549 (human adenocarcinoma) cells. The expression of MDR1 gene mRNA was measured by real-time quantitative PCR assay. **Results.** In PC-14 cells, 250 μg/ml of Cremophor EL enhanced the VP-16 sensitivity by over 10<sup>2</sup> times in clonogenic assay without obvious cell damage by itself. The intracellular accumulation of VP-16 was enhanced by Cremophor EL in both PC-14 and A549 cells, but not in KB or H69. Although Cremophor EL has been known to reverse the multidrug resistance (MDR) phenotype, we did not detect the MDR gene in PC-14 and A549 cells. **Conclusion.** Cremophor EL enhances the effect of cell-killing by VP-16 in human lung adenocarcinoma cells via enhancement of VP-16 influx, that is not related with the MDR reversal. (JJLC. 2003;43:307-313)

<sup>1</sup> 日本大学医学部内科学講座内科一．  
別刷請求先：須金紀雄，日本大学医学部内科学講座内科一，  
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1．  
<sup>1</sup>First Department of Internal Medicine, Nihon University School  
of Medicine, Japan.

Reprints: Toshio Sugane, First Department of Internal Medicine,  
Nihon University School of Medicine, 30-1 Ooyaguchikamimachi,  
Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan.

Received December 6, 2002; accepted June 2, 2003.

© 2003 The Japan Lung Cancer Society

**KEY WORDS** Cremophor EL, Etoposide ( VP-16 ), Human lung adenocarcinoma cells, Effect of cell-killing, Multidrug resistance

## はじめに

臨床において、ある種の薬剤により抗腫瘍剤の作用を増強し、生存期間の延長が得られれば、抗腫瘍剤の副作用の軽減につながり、抗腫瘍剤に対する薬剤耐性の解除とともに、悪性腫瘍の治療上有意義なことであると考えられる。

抗癌剤の薬剤耐性では多剤耐性が有名であり、多剤耐性には classical multidrug resistance ( classical MDR ), atypical multidrug resistance ( atypical MDR ), MDR-associated protein ( MRP ) などの機序が考えられている。なかでも classical MDR に関しては細胞膜上に P 糖蛋白 ( P-glycoprotein, P-gp ) と呼ばれる糖蛋白が過剰に発現することにより、抗腫瘍剤に対して排出ポンプとして作用することで、細胞内薬剤濃度を低下させるという機序が明確にされている。<sup>1-4</sup> この classical MDR には、それを解除する薬剤が存在し、その代表的なものとしては、verapamil ( VER ) などのカルシウム拮抗剤、cyclosporin A ( CyA ) などが知られている。<sup>5-12</sup> これらの薬剤は、P-gp の排出ポンプ作用による細胞外への薬剤排泄を阻害することで、耐性を解除するとされている。また、CyA の溶媒であり非イオン性界面活性剤の一つである Cremophor EL も、抗腫瘍剤に対する多剤耐性を解除することが知られている。<sup>13</sup>

さらに、etoposide ( VP-16 ) の溶媒である非イオン性界面活性剤の Tween 80 が、肺腺癌細胞に対して、あるいは、cisplatin 耐性肺腺癌細胞に対して、他の癌細胞 ( 類上皮癌細胞、肺小細胞癌細胞 ) より VP-16 の感受性を増強したということが知られている。<sup>14</sup> そこで、我々は、Cremophor EL が in vitro において VP-16 の抗腫瘍効果を増強しうかどうかをヒト肺癌細胞株を用いて検討し、さらに、その機序および MDR との関連についても検討を行ったので報告する。

## 実験材料

### 1. 細胞

ヒト肺腺癌細胞株 ( PC-14 ), ヒト類上皮癌細胞株 ( KB ), ヒト肺小細胞癌細胞株 ( H69 ) は国立がんセンター西條長宏博士、また、ヒト骨髄性白血病細胞株 ( K562 ), adriamycin 耐性ヒト骨髄性白血病細胞株 ( K562/ADM ) は東大医科学研究所の鶴尾隆博士より寄与されたものを用いた。

ヒト肺腺癌細胞株 ( A549 ) は American Type Culture Collection ( Rockville, MD ) より購入した。それぞれの細胞は 10% fetal calf serum 加, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin 添加 RPMI 1640 medium 中で 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件下で培養して対数増殖期の細胞を実験に用いた。

### 2. 薬剤

VP-16 は、日本化薬より提供されたものを使用した。非イオン性界面活性剤で VP-16 の溶媒である Tween 80 の影響をなくすため、VP-16 の原末を dimethylsulfoxide ( DMSO ) に溶解し 1 mg/ml とし、遮光状態に保ちながら 2 ヶ月以内に使用した。

Cremophor EL は、Sigma Chemical より購入したものを蒸留水で希釈し 1 mg/ml とし、遮光状態に保ちながら 2 ヶ月以内に使用した。[ <sup>3</sup>H ] VP-16 ( 475 mCi/mmol ) は Morevek Biochemical ( Brea, CA ) より購入して使用した。

## 実験方法

### 1. Cremophor EL の VP-16 による細胞増殖抑制効果に対する影響

VP-16 による細胞増殖抑制効果と、それに対する Cremophor EL の影響を見るため pilot study として、PC-14, KB, H69 それぞれの細胞株について growth inhibition assay を行った。

1  $\times$  10<sup>5</sup> 個の細胞を 24 穴細胞培養 dish ( Falcon No. 3504 ) 中で 10% fetal calf serum 加, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin 添加 RPMI 1640 medium と VP-16 濃度 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  )、Cremophor EL ( 濃度 100, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) とともに 3 日間、5% CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件下で培養した後、細胞数を Coulter Counter で測定した。

増殖抑制効果を growth medium のみで培養した細胞数に対する比率の百分率で示した。

### 2. PC-14 における Cremophor EL による VP-16 の殺細胞効果の増強について

実験 1 で PC-14 についてのみ、Cremophor EL による有意な細胞増殖抑制効果を認めたため、PC-14 における Cremophor EL による VP-16 の殺細胞効果の増強を確定するために in vitro clonogenic assay を用いた。

5  $\times$  10<sup>2</sup> 個の PC-14 を 20% fetal calf serum 添加 1.7% methyl cellulose 培地中で、それぞれ VP-16 濃度 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  )、Cremophor EL ( 濃度 0, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) とともに 35 mm petri dish ( Falcon No. 3001 ) で培養した。5% CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件下で 7 日間培養後、倒立顕微鏡

下で 10 個以上の細胞によって形成されたコロニーをカウントすることにより survival fraction を算定し殺細胞効果を判定した。

### 3. Cremophor EL 単独の殺細胞効果

2 と同様に in vitro clonogenic assay を用いて, PC-14 における Cremophor EL (0, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の濃度の違いによる殺細胞効果について検討した。

### 4. 細胞内 VP-16 蓄積量の測定およびそれに対する Cremophor EL の影響

細胞内 VP-16 蓄積量の測定には  $[^3\text{H}]$ VP-16 を用いた。PC-14, A549, KB, H69 を Falcon No. 2054 チューブ内で  $[^3\text{H}]$ VP-16 2  $\mu\text{M}$  を含む Cremophor EL 存在下での growth medium 中で 3 時間, 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。

Cremophor EL の濃度は 0, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を用いた。

培養後, それぞれ 0.5 ml ずつを氷冷した 10 ml の 5% fetal calf serum 添加 RPMI1640 で 1 回洗浄し, その後, 同様に氷冷した 10 ml の PBS で 2 回洗浄して遠沈しペレットとした細胞を Protosol で 1 晩溶解し, さらに, 10 ml の Econofluor を加え放射活性を液体シンチレーターで測定した。

この結果についての統計学的検索は, t 検定を用いて有意差の検討を行った。

### 5. VP-16 の細胞外への efflux の測定とそれに対する Cremophor EL の影響

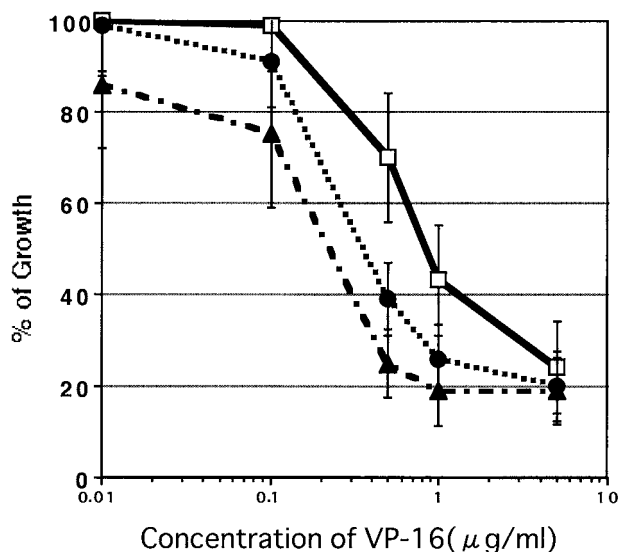
PC-14 を growth medium 中で 2  $\mu\text{M}$  の  $[^3\text{H}]$ VP-16 とともに 37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 時間培養した後, 0, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の Cremophor EL とそれぞれ, 0, 5, 15, 30 分間 37  $^{\circ}\text{C}$  で incubation して, 3 と同様に細胞内  $[^3\text{H}]$ VP-16 濃度を測定した。

### 6. Real-time PCR による MDR1 (P-gp をコードする遺伝子) 発現の定量

K562/5 (ヒト骨髄性白血病細胞株), K562/ADM (adriamycin 耐性ヒト骨髄性白血病細胞株) の MDR1 の発現を見るため Real-time PCR を用い PC-14, A549 と比較した。蛍光色素をラベルした TaqMan probe は Primer-Express software (PE Biosystems) により作成された。各 primer は下記のものを用いた。

MDR1 の primer は forward: 5'-CCATCCTGTTTGAC-TGCAGCAT-3', reverse: 5'-GTCACAGAGGAAGAGATT-GTGAGG-3', TaqMan probe: 5'-CTGGAACATTGCCTAT-GGAGACAACAGCC-3' を用いた<sup>15</sup>

Real-time PCR の測定には, TaqMan PCR core reagent kit を用い ABI PRISM7700 Sequence Detection System を用いて Pongers-Willems らの方法<sup>16</sup> を用いて行った。



**Figure 1.** Effect of Cremophor EL on cell growth of PC-14 cells exposed to VP-16. Growth inhibition assay without Cremophor EL (□) with Cremophor EL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (○), 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (△) in PC-14 cells.

## 結果

### 1. Cremophor EL の VP-16 による細胞増殖抑制効果に対する影響

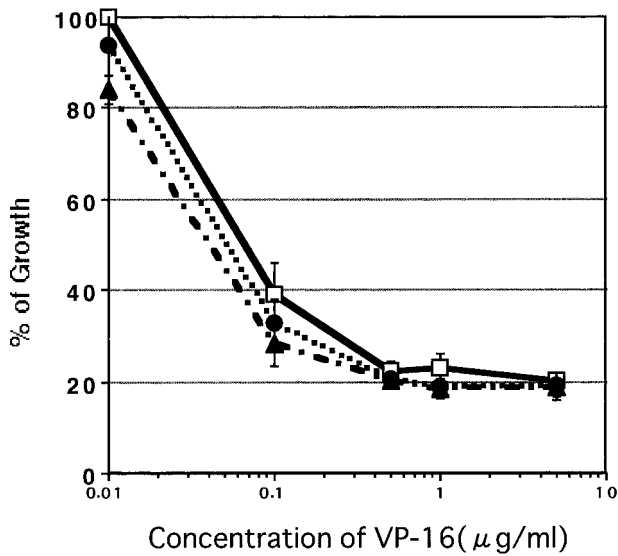
PC-14 では, VP-16 の細胞増殖抑制効果に Cremophor EL による用量依存性の増強を認め (Figure 1), 対照として用いた KB, H69 では, Cremophor EL による細胞増殖抑制効果の増強は認められなかった (Figure 2, 3)。

### 2. PC-14 における Cremophor EL による VP-16 の殺細胞効果の増強について

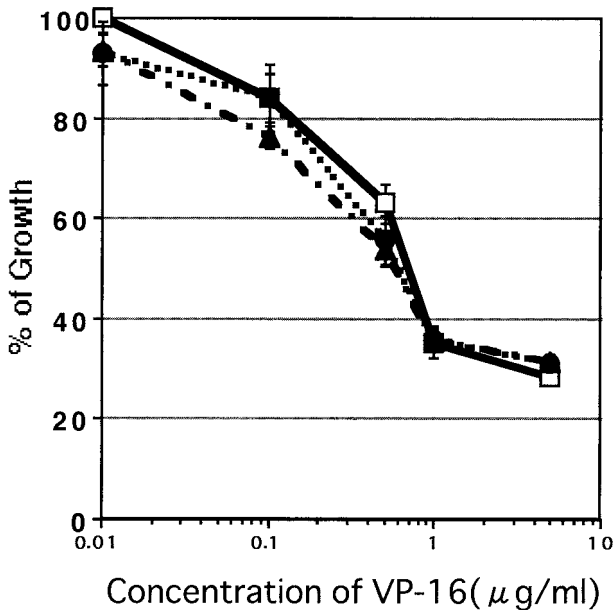
PC-14 を用いた in vitro clonogenic assay では, Figure 4 のように Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , VP-16 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の条件下で, survival fraction は limit of detection (survival fraction  $2.2 \times 10^{-3}$  以下は算定出来ない) を下回ると考えられた。したがって, VP-16 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下では, survival fraction が control で  $2.5 \times 10^{-1}$ , Cremophor EL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  併用の場合, それぞれ  $4.9 \times 10^{-2}$ ,  $2.2 \times 10^{-3}$  以下と減少していた。

### 3. Cremophor EL 単独の殺細胞効果

Cremophor EL (50, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の濃度の違いによる殺細胞効果については, Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  において survival fraction はそれぞれ  $7.0 \times 10^{-1}$ ,  $3.0 \times 10^{-1}$  であった (Figure 5)。Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  における survival fraction は  $7.0 \times 10^{-1}$  という事より, 実験 2 での Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  併用による survival fraction の減少には, 殺細胞効果として

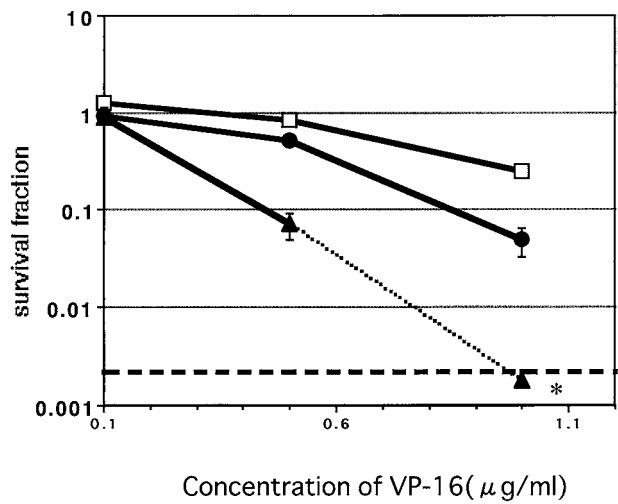


**Figure 2.** Effect of Cremophor EL on cell growth of KB cells exposed to VP-16. Growth inhibition assay without Cremophor EL (□) with Cremophor EL 100 µg/ml (○), 250 µg/ml (△) in KB cells.

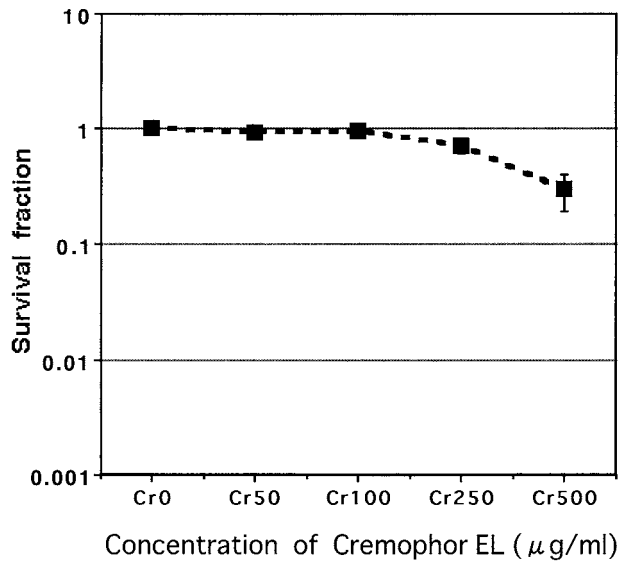


**Figure 3.** Effect of Cremophor EL on cell growth of H69 cells exposed to VP-16. Growth inhibition assay without Cremophor EL (□) with Cremophor EL 100 µg/ml (○), 250 µg/ml (△) in H69 cells.

Cremophor EL が大きく影響していた結果とは考えにくい。



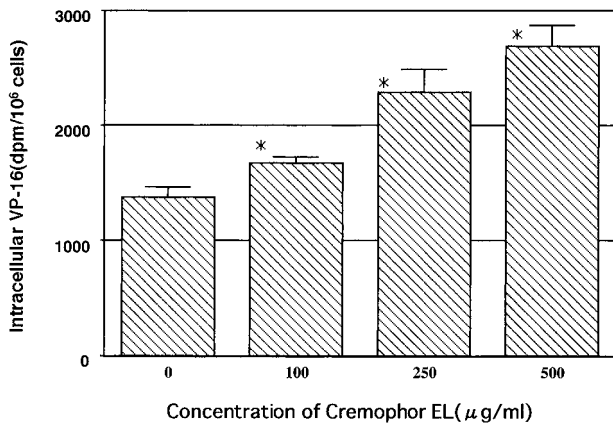
**Figure 4.** Effect of Cremophor EL on cell killing by VP-16 in PC-14 cells in vitro clonogenic assay. In vitro clonogenic assay without Cremophor EL (□) with Cremophor EL 100 µg/ml (○), 250 µg/ml (△) in PC-14 cells. Limit of Detection was  $2.2 \times 10^{-3}$  (---) \*Under the limit of detection.



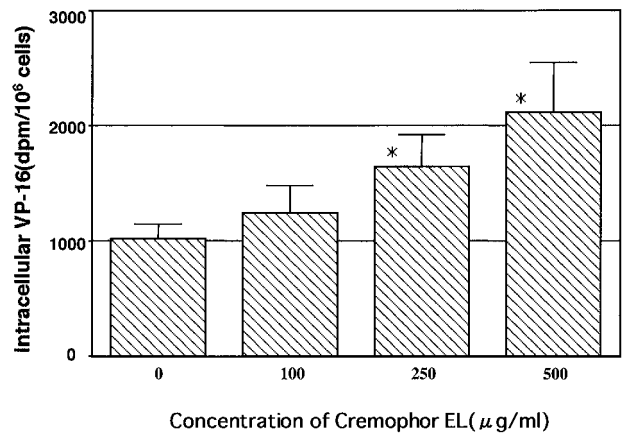
**Figure 5.** Cell-killing effect of Cremophor EL in PC-14 cells. In vitro clonogenic assay without Cremophor EL, with Cremophor EL 100 µg/ml, 250 µg/ml in PC-14 cells.

#### 4. 細胞内 VP-16 蓄積量の測定およびそれに対する Cremophor EL の影響

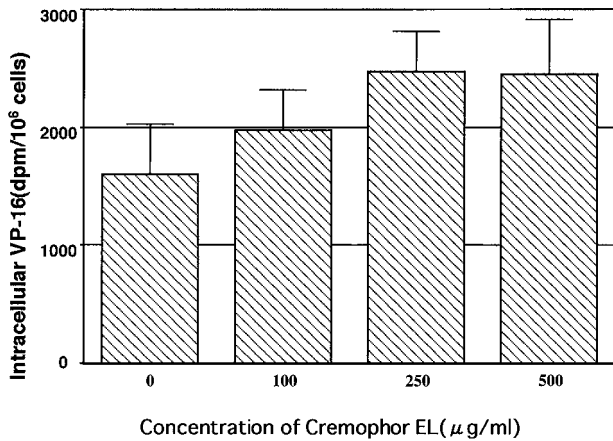
PC-14, KB, H69 を用いた [ $^3\text{H}$ ]VP-16 の細胞内蓄積量の測定では、PC-14 において Cremophor EL の用量依存性に [ $^3\text{H}$ ]VP-16 の細胞内蓄積量の段階的な増加が認められた。Cremophor EL の濃度 100, 250, 500 µg/ml でそれ



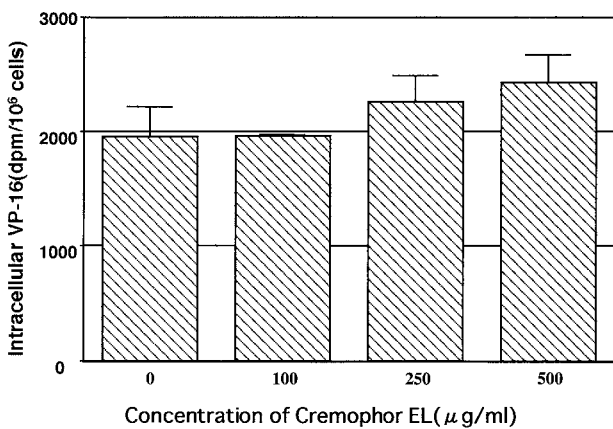
**Figure 6.** The effect of Cremophor EL on the accumulation of VP-16 in PC-14 cells. \*Significantly different from the accumulation of VP-16 in Cremophor EL 0 μg/ml in PC-14 cells, P < 0.05.



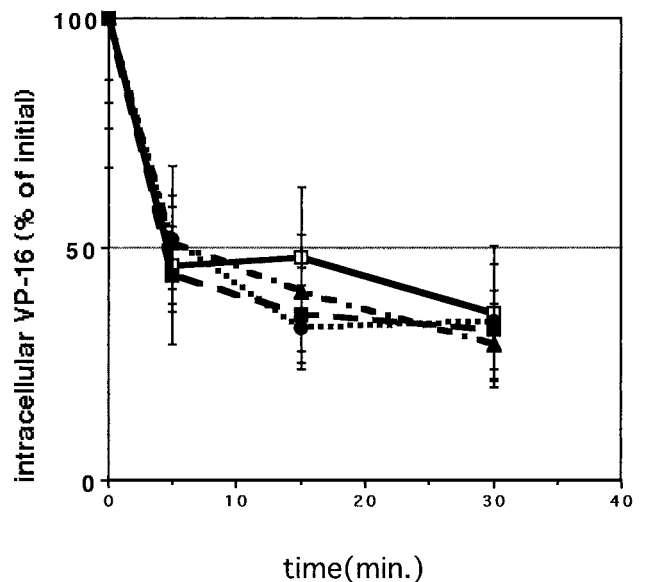
**Figure 9.** The effect of Cremophor EL on the accumulation of VP-16 in A549 cells. \*Significantly different from the accumulation of VP-16 in Cremophor EL 0 μg/ml in A549 cells, P < 0.05.



**Figure 7.** The effect of Cremophor EL on the accumulation of VP-16 in KB cells.



**Figure 8.** The effect of Cremophor EL on the accumulation of VP-16 in H69 cells.



**Figure 10.** The effect of Cremophor EL on the efflux of VP-16 in PC-14 cells. PC-14 cells were incubated without Cremophor EL (○) with Cremophor EL 100 μg/ml (□), 250 μg/ml (△), 500 μg/ml (◇) in PC-14 cells.

それぞれ t 検定において有意差を認めなかった (Figure 6)。

一方、KB、H69 では、[<sup>3</sup>H]VP-16 の細胞内蓄積量の有意な増加は認められなかった (Figure 7, 8)。

同様の現象が他のヒト肺腺癌細胞においても認められるかどうかを A549 を用いて検討した。結果は、PC-14 と同様に Cremophor EL の濃度 250, 500 μg/ml で [<sup>3</sup>H]VP-16 の細胞内蓄積量の有意な増加を認められた (Figure 9)。

**Table 1.** Cycle thresholds to detect MDR1 mRNA by real-time PCR

	MDR1
K562	36.1 ± 3.2
K562/ADM	17.1 ± 0.2 *
PC-14	38.4 ± 2.3
A549	28.4 ± 1.6
KB	38.2 ± 1.5
H69	35.0 ± 0.5

\* Significantly different from the cycles of K562 cells,  $P < 0.05$ .

#### 5. VP-16 の細胞外への efflux の測定とそれに対する Cremophor EL の影響

PC-14 における [ $^3\text{H}$ ]VP-16 の細胞内蓄積量は、時間とともに減少している。しかし、その減少の仕方に、Cremophor EL の濃度、0, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  による有意な差は認められなかった (Figure 10)。

#### 6. Real-time PCR による MDR1 (P-gp をコードする遺伝子) 発現の定量

K562 に比較して K562/ADM については MDR の mRNA の増幅が認められており、PC-14, A549 においては、KB, H69 と同様に MDR の発現は認められなかった (Table 1)。

### 考 察

現在、肺癌の死亡率は上昇の一途をたどっている。とくに肺腺癌は化学療法を用いても生存率の延長はほとんど得られず、その原因として肺腺癌細胞が抗癌剤に対して自然耐性であることが知られている。この治療効果を改善するためには、新規抗癌剤の開発とともに、現在用いる抗癌剤の作用を増強することも一つの手段であると考えられる。

今回我々は、臨床的に CyA などの脂溶性薬剤の溶解補助剤として用いられている Cremophor EL を用いて、ヒト肺腺癌細胞株の VP-16 感受性が著明に増強されることを見出した。ヒト肺腺癌細胞株 (PC-14) について *in vitro* clonogenic assay を用いた結果、VP-16 単剤接触 (1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  持続接触) での survival fraction が  $2.5 \times 10^{-1}$  であったのに対して、Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を併用することにより  $2.2 \times 10^{-3}$  以下と著明な減少を認め、殺細胞効果の増強と考えられた。また、Cremophor EL 単剤の殺細胞効果については、Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下では survival fraction は  $7.0 \times 10^{-1}$  程度であった。

以上のことから、VP-16 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と Cremophor EL 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  併用によって認められた殺細胞効果増強は、VP-16 の殺細胞効果を Cremophor EL が増強したと考

えられた。

ヒト類上皮癌細胞株 (KB)、ヒト肺小細胞癌細胞株 (H69) においては growth inhibition assay において Cremophor EL は VP-16 の増殖抑制効果に影響を与えなかった。

さらに、[ $^3\text{H}$ ]VP-16 を用いて腫瘍細胞内への VP-16 蓄積に対する Cremophor EL の影響に関しては、PC-14 および別のヒト肺腺癌細胞株である A549 においては、Cremophor EL を添加することによって濃度依存性に細胞内 [ $^3\text{H}$ ]VP-16 蓄積量は増加した。これに対して KB, H69 では Cremophor EL による細胞内 VP-16 蓄積量の増加は認められなかった。

これらの事実から、Cremophor EL における VP-16 の殺細胞効果増強は、VP-16 の細胞内蓄積量の増加によるものであり、肺腺癌細胞株である PC-14, A549 では認められなかったが、腺癌以外の細胞株である KB, H69 では認められない現象であることが確認された。しかしながら、このことが肺腺癌、類上皮癌、小細胞癌のそれぞれの他の細胞株でも再現性が認められるかどうか、あるいは、肺腺癌全体に対して VP-16 の殺細胞効果が増強されるかどうかは、さらなる検討が必要であると考えられる。

Cremophor EL は現在までに daunorubicin 耐性エーリッヒ腹水癌細胞の耐性を解除した薬剤として知られている。<sup>13</sup> この耐性細胞はいわゆる多剤耐性遺伝子を発現した細胞であり、細胞膜表面上に発現した P-glycoprotein (P-gp) によって細胞内の薬剤が細胞外へ排泄されることにより耐性を獲得すると考えられている。しかし Yamazaki らは classical multidrug resistance (MDR) gene を発現した adriamycin 耐性 K562 細胞株における VP-16 耐性が薬剤の細胞外への排出によるのではなく、VP-16 の細胞内流入が減少しているためであると報告した。<sup>17</sup> さらに持丸らは Cremophor EL が adriamycin 耐性 K562 細胞の VP-16 耐性を減少した細胞内 VP-16 蓄積量を増加させることによって克服すると報告している。<sup>18</sup> MDR を発現している多剤耐性細胞の VP-16 耐性は P-gp の cDNA を transfect した細胞で認められることから、MDR に関連したものであることは間違いないが、P-gp 自体による薬剤排泄ではなく、MDR に関連した何らかの原因で細胞内流入が減少して起こる現象である可能性が高いと考えられる。Cremophor EL はこの減少した薬剤流入を改善して耐性を解除していると考えられた。

一方、ヒト肺腺癌細胞株 PC-14, A549 においては定量的 PCR 法において、KB, H69 と同様に MDR の発現は認められなかった。また VP-16 の細胞外排泄に対しても Cremophor EL は影響を示さなかった。このことから、本実験系における Cremophor EL の VP-16 の細胞内蓄積量増加による殺細胞効果の増強は、多剤耐性 K562 細胞に

おける耐性克服作用と類似しているが、MDR と関連したものではないと考えられた。

Tsujino らは、以前、脂溶性薬剤の溶解補助剤として用いられている non-ionic detergent Tween 80 についてヒト肺腺癌細胞株の VP-16 感受性を増強することを報告した。<sup>14</sup> Tween 80 の場合も VP-16 の細胞内蓄積量を増強して殺細胞効果を増強していたが、KB, H69 細胞の VP-16 感受性には影響を及ぼさなかった。Cremophor EL も Tween 80 も脂溶性薬剤の溶解補助剤として臨床的に用いられている薬剤であり、細胞膜の fluidity やイオンチャンネルに影響を与える可能性がある。

以上の結果からヒト肺腺癌細胞(PC-14, A549)においては、多剤耐性細胞で認められるような細胞膜における VP-16 の流入の低下が存在しており、Cremophor EL は非イオン性界面活性剤 Tween 80 と同様にこの低下した VP-16 の細胞内流入を増加させることによって、VP-16 感受性を増強したと考えられた。

Cremophor EL はすでに臨床の場で, CyA, taxol などの溶媒として使用されており、臨床的安全性が確立されている薬剤である。しかし、今回使用した薬剤濃度については、安全性は未確認であり、今後さらなる検討を続けることによってより明確な機序の解析と今後の臨床応用が期待される。

## REFERENCES

1. Tsuruo T. Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn J Cancer Res.* 1988;79:285-296.
2. Bosch I, Croop J. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288:F37-54.
3. Volm M. Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res.* 1998;18:2905-2917.
4. Nooter K, Stoter G. Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Pathol Res Pract.* 1996;192:768-780.
5. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* 1982;42:4730-4733.
6. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 1981;41:1967-1972.
7. Yusa K, Tsuruo T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res.* 1989;49:5002-5006.
8. Naito M, Hamada H, Tsuruo T. ATP/Mg<sup>2+</sup>-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells. *J Biol Chem.* 1988;263:11887-11891.
9. Naito M, Tsuruo T. Competitive inhibition by verapamil of ATP-dependent high affinity vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells without calcium ion involvement. *Cancer Res.* 1989;49:1452-1455.
10. Tamai I, Safa AR. Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem.* 1990;265:16509-16513.
11. Foxwell BM, Mackie A, Ling V, et al. Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol Pharmacol.* 1989;36:543-546.
12. Coley HM, Twentyman PR, Workman P. The efflux of anthracyclines in multidrug-resistant cell lines. *Biochem Pharmacol.* 1993;46:1317-1326.
13. Friche E, Jensen PB, Sehested M, et al. The solvents cremophor EL and Tween 80 modulate daunorubicin resistance in the multidrug resistant Ehrlich ascites tumor. *Cancer Commun.* 1990;2:297-303.
14. Tsujino I, Yamazaki T, Masutani M, et al. Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43:29-34.
15. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell.* 1986;47:381-389.
16. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998;12:2006-2014.
17. Yamazaki T, Sato Y, Hanai M, et al. Non-ionic detergent Tween 80 modulates VP-16 resistance in classical multidrug resistant K562 cells via enhancement of VP-16 influx. *Cancer Lett.* 2000;149:153-161.
18. 持丸純一郎, 山崎哲男, 澤田海彦, 他. 多剤耐性 K562 白血病細胞の etoposide 耐性における cyclosporin A, cremophor EL の耐性解除機構. 日大医誌. 2000;59:452-458.