新規dihydropyridine化合物の
抗癌剤耐性克服に関する研究

木上　昭

目次

総論の部 …… 1

緒言 …… 1

第一章　新規dihydropyridine化合物の in vitro での多剤耐性克服効果とその作用機序 …… 4

第１節　種々のdihydropyridine化合物の in vitro での耐性克服作用 …… 4

第２節　種々のdihydropyridine化合物の[^{3}H]ビンクリスチンの細胞内蓄積に及ぼす影響 …… 9

第３節　[^{125}I]NASVによるＰ－糖蛋白質への光親和性標識に対する種々のdihydropyridine化合物の及ぼす影響 …… １２

第４節　小括ならびに考察 …… １５

第二章　新規合成dihydropyridine化合物の in vivo におけるビンクリスチン耐性克服作用とカルシウム拮抗作用、およびＰ－糖蛋白質への光親和性結合の阻害作用 …… １７

第１節　抗癌剤感受性または耐性細胞移植マウスでのビンクリスチンとＮＫ化合物との併用効果 …… １７

第２節　ＮＫ化合物のカルシウム拮抗作用 …… ２８

第３節　ＮＫ化合物の血圧降下作用 …… ２８

第４節　ＮＫ化合物の急性毒性作用 …… ３０

第５節　[^{3}H]アジドピンのＰ－糖蛋白質への標識に対するＮＫ化合物による阻害作用 …… ３０

第６節　小括ならびに考察 …… ３２

第三章　ビンクリスチン耐性白血病細胞マウスを用いた２つの dihydropyridine化合物による種々の抗癌剤に対する耐性克服作用 …… ３６

第１節　抗癌剤感受性または耐性細胞培養系でのNK-250およびNK-252によるビンクリスチンの作用増強効果 …… ３８

第２節　[^{3}H]アジドピンのＰ－糖蛋白質への光親和性標識に対するNK-250またはNK-252の阻害作用 …… ３９

第３節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのNK-250またはNK-252単独での抗癌作用 …… ４０

第４節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのビンクリスチンとNK-250またはNK-252との併用効果 …… ４２

第５節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのビンブラスチンまたはビンデシンとNK-250またはNK-252との併用効果 …… ４５

第６節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのアクチノマイシンＤとNK-250またはNK-252との併用効果 …… ４７

第７節　P388/SまたはP388/VCRマウス白血病細胞培養系でのNK-250またはNK-252によるエトポシドの作用増強効果 …… ４８

第８節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのエトポシドとNK-250との併用効果 …… ４９

第９節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのエトポシドとNK-252との併用効果 …… ５４

第10節　小括ならびに考察 …… ５５

結論 …… ５９

謝辞 …… ６１

実験の部 …… ６２

第１章　実験の部 …… ６２

第２章　実験の部 …… ６５

第３章　実験の部 …… ６８

引用文献 …… ７０

総論の部

緒言

癌に対する化学療法が近年大きく進展し、実際に白血病などの一部の癌は治癒可能な疾病となった。しかし化学療法には抗癌剤耐性腫瘍の出現という大きな障害が残されている[1,2]。抗癌剤耐性には、腫瘍の出現初めから抗癌剤が効きにくい自然耐性と、治療当初には抗癌剤がよく効いていた腫瘍が、治療を続けているうちに抗癌剤が効かなくなってしまう獲得耐性がある。後者の場合、治療に用いた抗癌剤に対して耐性になるだけではなく、構造や作用に類似性の低い種々の抗癌剤に対して同時に耐性になることが多く、そのため治療上の大きな障害になっている[3,4]。耐性を克服し、化学療法をより有効な治療法とするためには、耐性獲得の機能を解明する必要がある。この耐性機構に関する研究は、近年飛躍的に進歩しつつある。その中でも特に進展をみせたのは多剤耐性の分子機構の研究である[5,6]。ビンカアルカロイド、あるいはアンスラサイクリン等の抗癌剤に対して感受性が低下した多剤耐性を示す癌では、Ｐ－糖蛋白質と呼ばれる膜蛋白質が発現されていることが観察された[7]。Ｐ－糖蛋白質は抗癌剤排出のポンプ作用をもつことが、その遺伝子構造から推定されるに至った[8]。

抗癌剤に高感受性を示す培養癌細胞を、低濃度の抗癌剤に接触させ、徐々に濃度を上昇させて段階的に選別していくと、その抗癌剤に対して抵抗性を示す癌細胞を得ることができる。このようにして得られた耐性細胞は、癌の患者でみられるように、多くの抗癌剤に対して同時に耐性を示すため、多剤耐性のモデルとして研究されてきた[9]。その結果多剤耐性となった細胞は、抗癌剤の排出速度の増大によって細胞内の薬剤濃度が低く維持されていることがわかった[10]。しかもその排出速度は、ＡＴＰaseの阻害剤を共存させると低下するので、エネルギー

に依存した反応であると考えられた[11]。また多剤耐性細胞では、Ｐ－糖蛋白質の遺伝子の発現上昇や増幅が起こっていること、さらにＰ－糖蛋白質と呼ばれる分子量１７０kDaの膜蛋白質が、耐性度に応じて多量に発現していることなどの特徴がみられた[12]。これらのことから、多剤耐性細胞においてＰ－糖蛋白質が能動的に抗癌剤を細胞外に排出している可能性が示唆された。

Ｐ－糖蛋白質をコードしているのはＭＤＲ－１遺伝子であり、多くの種類の抗癌剤に抵抗性を示す癌において、この遺伝子のmＲＮＡの発現上昇が認められている。P-糖蛋白質の構造は疎水性領域と親水性領域とを一つのユニットとして、それが２回繰返した構造をしていることが明らかとなった[13]。それぞれの疎水性領域には膜貫通領域が６つずつ、合計１２個存在しており、Ｐ－糖蛋白質が膜貫通型の蛋白質であることを示している。親水性領域は大腸菌の膜輸送蛋白質にみられるＡＴＰ結合部位と相同性をもっており、現在これらの蛋白質は原核生物から真核生物にまでひろがる膜輸送蛋白質のスーパーファミリーを形成していると考えられる[14]。また、ＭＤＲ－１遺伝子はヒトの正常組織の一部でも発現しており、副腎皮質および髄質の細胞表面、肝臓胆汁管、腎臓近位尿細管、大腸等の上皮細胞表面、血液脳関門などの部位で発現している[15-18]。これら正常組織でのＭＤＲ－１遺伝子産物としてのＰ－糖蛋白質の機能は、代謝物を分泌したり、有害物を尿、胆汁、血液、消化管中への排出であるといわれている。

このようなＰ－糖蛋白質による耐性機序の解明と共に耐性克服薬剤の研究も進展した。鶴尾らは、ベラパミル、ジルチアゼム、ニフェジピンなどのカルシウム拮抗剤が多剤耐性を克服することを報告した[19-21]。これらの薬剤は、ビンクリスチンやアドリアマイシンに耐性を示すマウス白血病細胞からの抗癌剤の排出を阻害し、同細胞内での抗癌剤の蓄積を増加させて耐性細胞に対する殺細胞効果を亢進させた。その後、カルシウム拮抗剤以外の多くの薬剤が耐性克服作用をもつことも、報告されている。しかしカルシウム拮抗剤を含むこれらの多くの薬剤は、

耐性克服作用を発現する前に、本来の薬理作用が発現し、そのまま耐性克服剤とするには大きな障害となっている。

本研究において著者は、多くの新規合成dihydropyridine化合物について耐性克服作用を検討し、カルシウム拮抗作用が少ない化合物を見出すとともに、その作用機序について解析を加え、さらに抗癌剤耐性白血病マウスを用いて、種々の抗癌剤に対する耐性克服作用について検討した。その結果について、以下３章にわたって述べた。すなわち、第１章では、種々の新規合成dihydropyridine化合物についてin vitroでの耐性克服作用およびその作用機序の検討を行ない、その結果をもとに第２章では、in vivoでの検討に加えて副作用の検討を行なった。さらに第３章では、選ばれた２つの化合物について多剤耐性に属するいくつかの抗癌剤について、その耐性克服作用の検討を行ない、多剤耐性克服剤の可能性について考察を加えた。

第１章　新規dihydropyridine化合物の in vitro での多剤耐性克服効果とその作用機序[22)]

癌化学療法の際に大きな障害となっている多剤耐性を克服するために、耐性細胞中に発現しているＰ－糖蛋白質の機能を阻害する薬剤を見出すことが、現在重要な問題となっている。Ｐ－糖蛋白質に対する研究は世界的にひろがっているが、耐性克服薬剤としては、臨床では未だ有効な薬剤は見出されていない。著者の目的は耐性を克服する薬剤を見出すことにある。

従来より報告されているなかには、多剤耐性克服薬剤の本質的な性質として、カチオン性で両親媒性が必要であるとする報告がある[23)]。いま１つの性質として、耐性克服効果を有するとされている薬剤のなかには、たとえばレセルピンやセファランチンは、ヨードラベルしたビンカアルカロイド誘導体によるＰ－糖蛋白質との光親和性結合を阻害することが知られている[24,25)]。さらにいくつかのdihydropyridine化合物は耐性克服効果を有することも報告されている。

そこで本章では、多数の新規dihydropyridine化合物について in vitro での耐性克服作用を検討し、活性のある化合物についてその作用機序を検討した。さらにこれらの化合物について、Ｐ－糖蛋白質との光親和性結合阻害作用を検討し、それらの耐性克服作用との関係について考察した。実験では、抗癌剤感受性のヒトＫＢ癌細胞とその多剤耐性細胞ＫＢ－Ｃ１を用いた[26)]。抗癌剤はおもにビンクリスチンを用いて耐性克服効果を検討し、各細胞でのビンクリスチンの流入、排出、蓄積に及ぼす影響を検討した。

第１節　種々のdihydropyridine化合物の in vitro での耐性克服作用

1,4-dihydropyridineの基本構造式を Fig.1(a)に、２４個のdihydropyridine

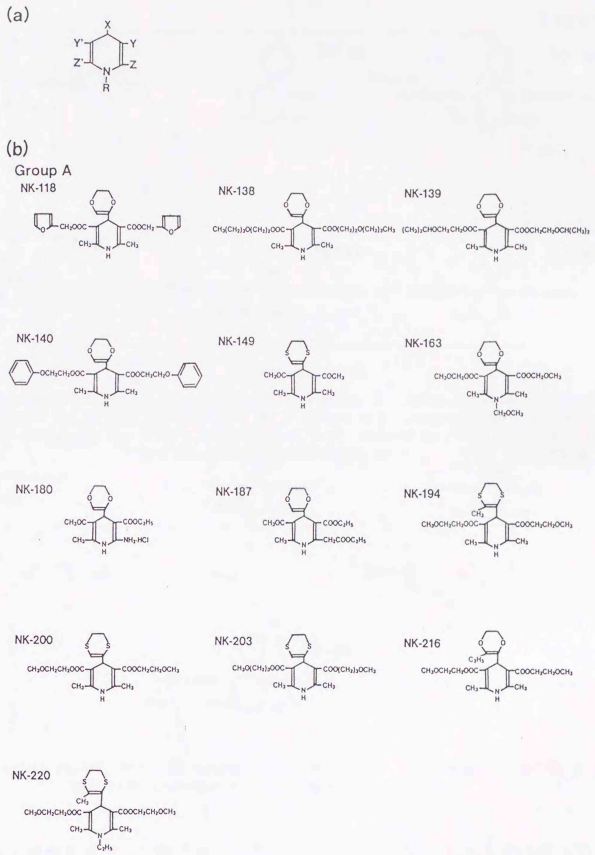


Fig. 1. Chemical structures of 1,4-dihydropyridine analogs. Shown are (a) the basic structure of 1,4-dihydropyridine and (b) the structures of its analogs.

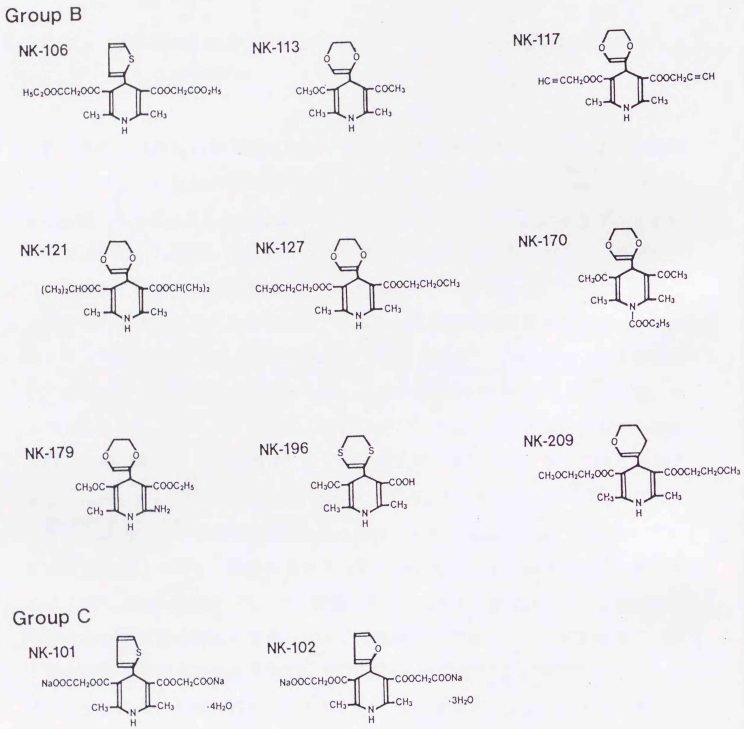


Fig. 1. Chemical structures of 1,4-dihydropyridine analogs. Shown are (a) the basic structure of 1,4-dihydropyridine and (b) the structures of its analogs.

化合物の構造式は Fig. 1 (b) に示した。集落形成試験はヒトＫＢ細胞とそのコルヒチン耐性のＫＢ－Ｃ１細胞を用いて、各細胞の３００個を１０％牛血清添加

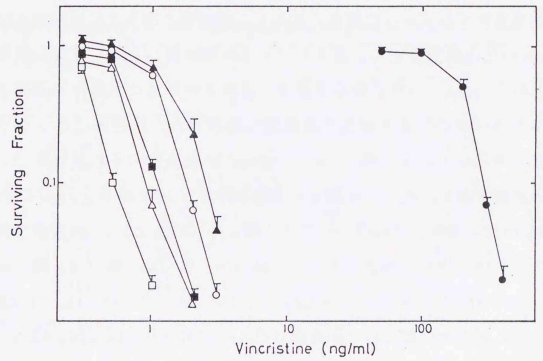


Fig. 2. Effects of NK-138 and NK-194 on resistance to vincristine. The effects of NK-138 and NK-194 on drug resistance in KB (○, △, □) and KB-C1 (●, ▲, ■) cells in the absence (○, ●) or presence of 10 μg/ml NK-138 (△, ▲) and 50 μg/ml NK-194 (□, ■) were examined by colony formation assay. Values are means of triplicate experiments.

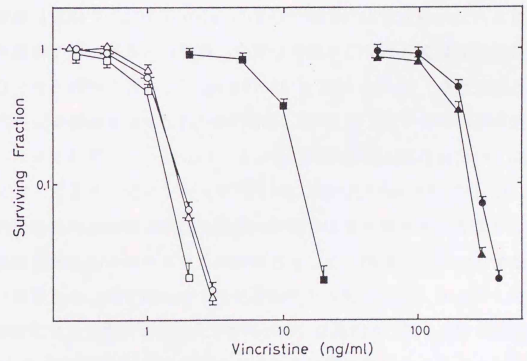


Fig. 3. Effects of NK-113 and NK-101 on drug resistance to vincristine. The effects of NK-113 and NK-101 on drug resistance in KB (□, △, □) and KB-C1 (●, ▲, ■) cells in the absence (○, ●) or presence of 100 μg/ml NK-113 (□, ■) and 300 μg/ml NK-101(△, ▲) were examined by colony formation assay. Values are means ± SD of triplicate experiments.

ＭＥＭ培養液にてシャーレに播き、その１６時間後に種々の抗癌剤およびdihydropyridine化合物を添加し、３７℃で１０日間培養した後、集落の数を測定した。各dihydropyridine化合物の用量は、それぞれ単独に用量作用曲線を求め、その８０％生存率の用量を耐性克服試験に使用した。抗癌剤はビンクリスチン（ＶＣＲ）を用いて、２４個のdihydropyridine化合物のそれぞれについて３回ずつ集落形成試験を行ない、用量作用曲線を作成し、その結果より２４個のdihydropyridine化合物を、３つグループに分類した（Fig. 1b）。ほぼ完全に耐性を克服した１３化合物をグループＡとし、NK-118、NK-138、NK-139、NK-140、NK-149、NK-163、NK-180、NK-187、NK-194、NK-200、NK-203、NK-216、NK-220であった。部分的に耐性を克服した９化合物はグループＢとし、NK-106、NK-113、NK-117、NK-121、NK-127、NK-170、NK-179、NK-196、NK-209であった。耐性克服作用の認められなかった２化合物、NK-101およびNK-102を、グループＣとした。代表的なdihydropyridine化合物の、耐性克服作用を示す集落形成試験の例をFig. 2またはFig. 3に示した。ＫＢ－Ｃ１細胞はＫＢ細胞と比較してＶＣＲに約150倍耐性であった。10μg/mlのNK-138または50μg/mlのNK-194とＶＣＲとを共存させると、ＫＢ－Ｃ１細胞でのＶＣＲ耐性を完全に克服し、ＫＢ－Ｃ１細胞でのＶＣＲに対する感受性を、NK-138 または NK-194存在下で、ＫＢ細胞でのＶＣＲに対する感受性と同程度までにした（Fig. 2）。NK-113はＶＣＲ耐性を部分的に克服したが、NK-101には作用は認められなかった（Fig. 3）。

NK-101、NK-113、NK-138またはNK-194とダウノマイシン、ＶＣＲ、ビンブラスチンまたはアクチノマイシンＤとの種々の組み合わせにおける用量作用曲線から得られた値をTable 1 に要約した。ここで用いたＫＢ－Ｃ１細胞の耐性度はダウノマイシン、ＶＣＲ、ビンブラスチン、アクチノマイシンＤの各抗癌剤に対して１３～１５０倍であった。各抗癌剤（ダウノマイシン、ＶＣＲ、ビンブラスチン、アクチノマイシンＤ）の用量作用曲線はdihydropyridine化合物存在または非存

Table 1. Effects of dihydropyridine analogs on drug resistance of KB-C1 cells*

Cell line	Dihydropyridine analogs (μg/ml)		Relative resistance to			
			DAU	VCR	VLB	Act-D
KB		0	1.0	1.0	1.0	1.0
	NK-138	10	0.9 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	NK-194	50	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2
	NK-113	10	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1
	NK-101	150	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
KB-C1		0	13.3 ± 1.3	150.3 ± 2.1	52.4 ± 1.9	16.0 ± 1.4
	NK-138	10	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1
	NK-194	50	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1
	NK-113	10	3.4 ± 0.2	7.9 ± 1.4	6.7 ± 1.2	3.8 ± 0.4
	NK-101	150	13.1 ± 0.8	142.5 ± 3.8	48.6 ± 1.2	15.6 ± 0.6

* Abbreviations: DAU, daunomycin; VCR, vincristine; VLB, vinblastine; and Act-D, actinomycin-D. Values are means (± SE) of three experiments.

在下で集落形成試験の結果より作成した。NK-138とNK-194はダウノマイシン、ＶＣＲ、ビンブラスチンまたはアクチノマイシンＤのＫＢ－Ｃ１細胞に対する多剤耐性をほぼ完全に克服した。NK-113は部分的な多剤耐性克服作用しか示さず、またNK-101には克服作用はなかった。これらの結果によりグループＡとしてNK-138とNK-194を、グループＢとしてNK-113を、グループＣとしてNK-101を分類した。

第２節　種々のdihydropyridine化合物の［^{3}H］ビンクリスチンの細胞内蓄積に及ぼす影響

種々のdihydropyridine化合物がどのようにして多剤耐性を克服するかを調べるために、ＫＢおよびＫＢ－Ｃ１細胞内で［^{3}H］ＶＣＲの蓄積に対する影響を検討した（Fig. 4）。Dihydropyridine化合物非存在下で、ＫＢ－Ｃ１細胞内でのＶＣＲ濃度はＫＢ細胞での場合と比較して約１／１０であったが、復帰変異細胞（ＫＢ-Ｃ１-Ｒ２）ではＫＢ細胞での場合と同程度であった。Dihydropyridine

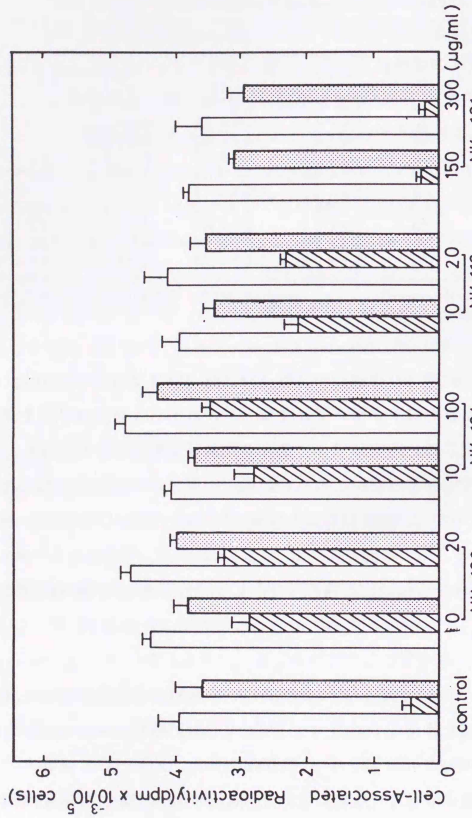


Fig. 4. Effects of dihydropyridine analogs on the accumulation of [^{3}H]vincristine in KB, KB-C1 and KB-C1-R2 cells. The intracellular levels of vincristine in the presence of two concentrations of dihydropyridine analogs in KB (□), KB-C1 (▨), and KB-C1-R2 (▩) cells were determined as described in Materials and Methods. Values are means ± SD of triplicate experiments.

化合物存在下で、ＫＢおよびＫＢ－Ｃ１－Ｒ２の両細胞内のＶＣＲの蓄積には有意な差はみられなかった。ところが、NK-138またはNK-194はＫＢ－Ｃ１細胞内のＶＣＲ蓄積を約８倍増加させた。NK-101はＫＢ－Ｃ１細胞内のＶＣＲ蓄積を増加させず、NK-113は約５倍増加させた（Fig. 4）。この結果、dihydropyridine化合物による多剤耐性克服効果は、ＫＢ－Ｃ１細胞内のＶＣＲ蓄積量と緊密な関係にあることが明らかになった。

次に、NK-138またはNK-194によるＫＢ－Ｃ１細胞内の抗癌剤蓄積の増加が、薬物の排出の阻害によるか否かを検討した。NK-194非存在下で、細胞を６０分培養すると、ＫＢ-Ｃ１細胞では約70％のＶＣＲが排出されたのに対し、ＫＢ細胞では約90％のＶＣＲが残存していた。この時、50μg/mlのNK-194を培養液中に加えると、ＫＢ－Ｃ１細胞でのＶＣＲの排出はほぼ完全に阻害された（Fig. 5）。

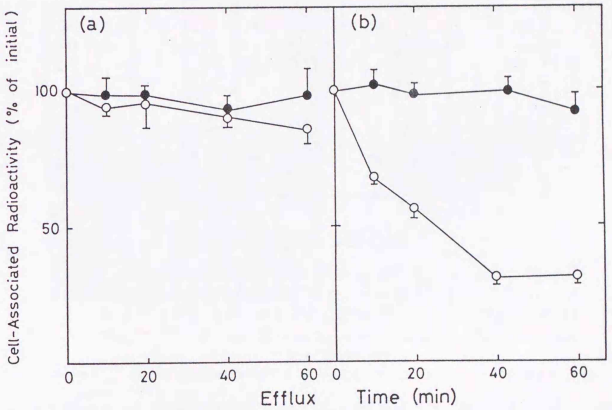


Fig. 5. Effect of NK-194 on efflux of vincristine. The release of vincristine in the absence (○) or presence (●) of 50 μg/ml NK-194 from KB (a) and KB-C1 (b) cells was followed. Values are means ± SD of triplicate determinations.

対照的に、薬剤感受性のＫＢ細胞でのＶＣＲの排出は影響されなかった。データには示さなかったが、［^{3}H］ダウノマイシンの場合でも、NK-138またはNK-194存在下で、細胞内蓄積を増加させ、排出を減弱させた。

ＶＣＲの細胞内流入に対するNK-194の影響を、［^{3}H］ＶＣＲを１分間、細胞内に取込ませることで検討した。Fig.6に示すように、NK-194存在下または非存在下で、ＫＢおよびＫＢ－Ｃ１細胞間での有意な差は認められなかった。

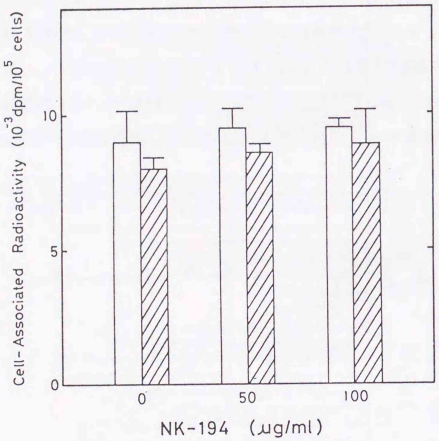


Fig. 6. Effect of NK-194 on influx of vincristine. The influx of vincristine (1 min uptake) was measured in the absence or presence of 50 or 100 μg/ml NK-194. Key: KB (□) and KB-C1 (▨). Values are means ± SD of triplicate experiments.

第３節　［^{125}I］NASVによるＰ－糖蛋白質への光親和性標識に対する種々のdihydropyridine化合物の及ぼす影響

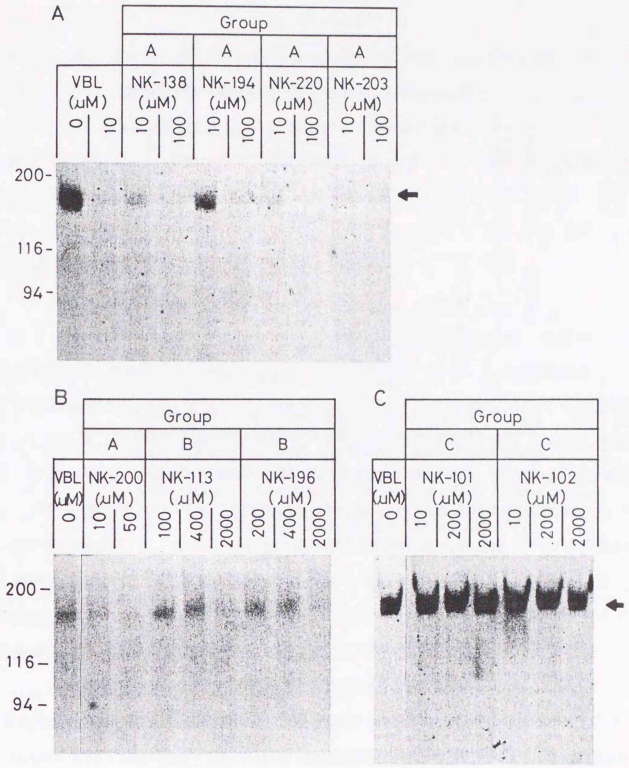


Fig. 7. Inhibition of [^{125}I]NASV labeling of the 150- to 170-kD P-glycoprotein in membrane vesicles by nine dihydropyridine analogs. KB-C1 vesicle (80 μg protein/lane) were incubated with [^{125}I]NASV in the absence or presence of the indicated drug concentrations. Autoradiograms were developed after a 96-hr exposure. Molecular size markers at the left are in kilodaltons. The arrow indicates the position of a 150- to 170-kD band seen by Coomassie blue staining. A, B and C show classes of dihydropyridine analogs, group A, group B and group C, respectively. Group A: drugs that almost completely overcame drug resistance; Group B: drugs that partially reversed resistance; Group C: drugs that did not overcome resistance. VBL: vinblastine.

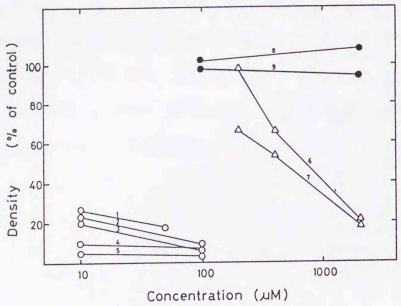


Fig. 8. Quantitative measurement of the inhibition of [^{125}I]NASV photolabeling. The density of the bands on the autoradiogram was determined. Data are expressed as a percent of the density of the photolabeling of P-glycoprotein in the absence of dihydropyridine analogs. Key: (○) group A, (△) group B, and (●) group C; (1) NK-200, (2) NK-194, (3) NK-138, (4) NK-220, (5) NK-203, (6) NK-113, (7) NK-196, (8) NK-101, and (9) NK-102.

ビンブラスチン誘導体である［^{125}I］NASVは、抗癌剤耐性のＫＢ－Ｃ１細胞に過剰発現している150～170kDaのＰ－糖蛋白質に特異的に結合して標識する。しかし、抗癌剤感受性のＫＢ細胞または復帰変異細胞の膜Ｐ－糖蛋白質への結合はみられない[25,27]。多剤耐性の克服薬剤であるベラパミル、キニジン、セファランチン、イソブレノイドはこの光親和性結合を阻害する[24,25,28]。そこで、dihydropyridine化合物がＫＢ－Ｃ１細胞の膜Ｐ－糖蛋白質への［^{125}I］NASVの結合・標識化を阻害するかどうか検討した（Fig.7）。Fig.8に、光標識化したFig.7のＰ－糖蛋白質バンドの密度を測定した結果を示した。グループＡに分類

した NK-138、NK-194、NK-200、NK-203 および NK-220は 10～100μMで、［^{125}I］NASVによるＰ－糖蛋白質への標識を阻害した(Fig.7およびFig.8)。グループＢのNK-113およびNK-196は200μMの濃度ではその結合を阻害しなかったが、400～2000μMで阻害した。グループＣのNK-101およびNK-102は、2000μMの高濃度でも阻害しなかった（Fig.7およびFig.8）。

第４節　小括ならびに考察

ニフェジピンやニカルジピンなどのdihydropyridine骨格を持つ化合物に多剤耐性克服作用があることが報告され[20,29]、著者は Fig.1 に化学構造を示した２４個の新規dihydropyridine化合物について、ヒトＫＢ腫瘍細胞の多剤耐性クローンであるＫＢ－Ｃ１細胞を用いて、耐性克服作用の検討を行なった。その結果、それぞれのdihydropyridine化合物の耐性克服作用の強さを基に、３つのグループに分類した：Ａ（強い耐性克服作用を持つ）、Ｂ（他の克服薬剤と比べやや弱い活性を持つ）、Ｃ（作用を持たない）。耐性克服作用の強さによる分類は、多剤耐性細胞内での抗癌剤の蓄積量の増加させる点で、緊密に関連していることが明確となった。この蓄積量の増加の作用機序として、抗癌剤を取込ませた多剤耐性細胞からの抗癌剤の排出について検討した結果、強い耐性克服作用を持つグループＡのNK-194はこの排出をほぼ完全に阻害することが明らかとなった。従って、抗癌剤耐性克服効果を持つdihydropyridine化合物は、多剤耐性細胞からの抗癌剤の排出を阻害することにより、耐性細胞内の抗癌剤の蓄積量を増加させ、耐性克服作用を発現していると考えられた。

一般的に多剤耐性を克服する薬物の多くは、多剤耐性細胞で亢進している抗癌剤排出を抑制する。Ｐ－糖蛋白質はいくつかの抗癌剤の細胞内濃度を制御する排出ポンプであると考えられている[30,31]。Cornwell ら[25]は最初に、多剤耐性

ＫＢ細胞の150～170kDaの糖蛋白質が、ビンブラスチン誘導体で特異的に標識され、ベラパミルはその特異的な結合を阻害することを示した。多剤耐性を克服するカルシウムチャネル拮抗剤も多剤耐性細胞の膜に結合することが報告されている[32]。カルシウムチャネル拮抗作用を持つdihydropyridine化合物である、アジドピンを光反応性・標識化すると、Ｐ－糖蛋白質と特異的に結合することが知られている[33]。秋山ら[24]は以前に、多剤耐性を克服するたいていの化合物によって、それらの化学構造とは無関係に、Ｐ－糖蛋白質の光親和性結合を阻害することを示した。

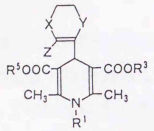
この章では、２４個の構造の類似したdihydropyridine化合物を試験したが、耐性克服作用の強いグループＡのなかの５化合物は光親和性結合を強く阻害し、作用のないグループＣの２化合物は阻害作用を示さず、部分的な耐性克服効果を示すグループＢのなかの２化合物は中間的な阻害作用を示した。従って、ビンブラスチン誘導体を用いた膜Ｐ－糖蛋白質への光親和性標識に対する阻害作用を定量的に測定するという方法は、抗癌剤耐性を克服する物質の迅速な検索のための方法として、有用であると示唆された。

第２章　新規合成dihydropyridine化合物の in vivo におけるビンクリスチン耐性克服作用とカルシウム拮抗作用、およびＰ－糖蛋白質への光親和性結合の阻害作用[34]

多剤耐性の克服は、癌化学療法を成功させるために重要である。実験的な多剤耐性の克服は主にin vitroで研究されており、in vivoでの研究は少ない。ベラパミルやニカルジピンなどのカルシウム拮抗剤では、in vitroおよびin vivoで、耐性克服作用を示すことが報告されている[8,19,21,29,35-39]。しかし、これらのカルシウム拮抗剤を臨床的に使用する場合は、それらの強い血圧降下作用が治療上、大きな障害となる[40,41]。従って、カルシウム拮抗作用がなく、抗癌剤耐性克服作用が強い物質こそが、癌化学療法に用いる価値があると言える。著者は第１章において、いくつかのdihydropyridine化合物とビンクリスチンとを組み合わせると、多剤耐性ヒト癌ＫＢ細胞で、ビンクリスチンの細胞内蓄積を高めることにより多剤耐性が克服されることを示した。この作用のメカニズムは、多剤耐性細胞中より種々の脂溶性抗癌剤を除くための排出ポンプとして細胞表面に存在するＰ－糖蛋白質に関連していた。この章では、第１章で示した中のいくつかの化合物に加え、さらに57個のdihydropyridine化合物（ＮＫ化合物、Fig.9）の in vivoでのビンクリスチン耐性克服作用、カルシウム拮抗作用および血圧降下作用を検討した。同時にまた、ＮＫ化合物のいくつかについて、［^{3}H］アジドピンによるＰ－糖蛋白質との光親和性標識に対する阻害作用を検討した。

第１節　抗癌剤感受性（P388/S）または耐性（P388/VCR）細胞移植マウスでのビンクリスチンとＮＫ化合物との併用効果

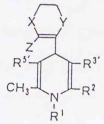
抗癌剤感受性（P388/S）細胞を移植したマウスに、移植後１～５日後まで毎日、



A

Members of NK-compound	X	Y	Z	R^1	R^3, $R^{5'}$	Inhibition of K^+-contracture (%)
138	O	O	H	H	$(CH_2)_2O(CH_2)_3CH_3$	75.9
219	S	S	H	CH_2CH_3	$(CH_2)_3OCH_3$	12.9
194	S	S	CH_3	H	$(CH_2)_2OCH_3$	21.3
218	S	S	CH_3	H	$(CH_2)_3OCH_3$	46.0
220	S	S	CH_3	CH_2CH_3	$(CH_2)_2OCH_3$	0
142	O	O	H	H	$(CH_2)_2OCH_2$-⬡	74.4
216	O	O	CH_2CH_3	H	$(CH_2)_2OCH_3$	0
236	O	O	H	CH_2CH_3	$(CH_2)_2O(CH_2)_3CH_3$	35.0
209	O	CH_2	H	H	$(CH_2)_2OCH_3$	2.8
200	S	S	H	H	$(CH_2)_2OCH_3$	28.2
203	S	S	H	H	$(CH_2)_3OCH_3$	66.9
217	O	O	CH_2CH_3	CH_2CH_3	$(CH_2)_2OCH_3$	15.7
215	O	O	CH_3	CH_2CH_3	$(CH_2)_2OCH_3$	5.2
163	O	O	H	CH_2OCH_3	CH_2OCH_3	1.3
139	O	O	H	H	$(CH_2)_2OCH(CH_3)_2$	9.2
127	O	O	H	H	$(CH_2)_2OCH_3$	1.6
153	O	O	H	H	CH_2OCH_3	0
140	O	O	H	H	$(CH_2)_2O$-⬡	66.4
235	S	S	CH_3	H	$(CH_2)_2O(CH_2)_3CH_3$	68.8

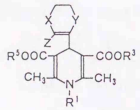
Fig. 9. Chemical Structures and calcium antagonistic activities of 1,4-dihydropyridine derivatives (NK-compounds). Calcium antagonistic activity is expressed as the inhibition rate (percentage) of high potassium (56 mM) depolarization-induced contraction (K^+-contracture) in isolated rat rectum by the NK-compounds. The NK-compounds were tested at a concentration of 10^{-7}mol. *A*, Group I of NK-compounds having alkoxyalkyl ester substituents at positions 3, 5 of the 1,4-dihydropyridine.



B

Members of NK-compound	X, Y	Z	R^1	R^2	$R^{3'}$	$R^{5'}$	Inhibition of K^+-contracture (%)
213	O	CH_3	CH_2OCH_3	CH_3	$COOCH_2C{\equiv}CH$	$COOCH_2C{\equiv}CH$	6.5
229	O	H	H	CH_3	$COO(CH_2)_2N(CH_3)_2$	$COO(CH_2)_2CH_3$	9.1
201	S	H	H	CH_3	$COOCH_2C{\equiv}CH$	$COOCH_2C{\equiv}CH$	56.4
225	O	H	H	CH_3	$COO(CH_2)_3CH_3$	$COO(CH_2)_3CH_3$	46.2
202	S	H	CH_2CH_3	CH_3	$COOCH_2C{\equiv}CH$	$COOCH_2C{\equiv}CH$	6.1
227	O	H	H	CH_3	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	8.4
187	O	H	H	$CH_2COOCH_2CH_3$	$COOCH_2CH_3$	$COCH_3$	0
113	O	H	H	CH_3	$COCH_3$	$COCH_3$	2.2
232	O	H	H	CH_3	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	$COO(CH_2)_2C{\equiv}N$	0
179	O	H	H	NH_2	$COOCH_2CH_3$	$COCH_3$	3.6
106	⬠(S)		H	CH_3	$COOCH_2COOCH_2CH_3$	$COOCH_2COOCH_2CH_3$	5.1
234	O	H	H	NH_2	$COOCH_2CH_3$	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	10.3
228	O	H	H	CH_3	COOH	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	24.9
226	O	H	H	CH_3	$COO(CH_2)_7CH_3$	$COO(CH_2)_7CH_3$	0
231	O	H	$COCH_3$	CH_3	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	$COO(CH_2)_{14}CH_3$	0
121	O	H	H	CH_3	$COOCH(CH_3)_2$	$COOCH(CH_3)_2$	14.5
117	O	H	H	CH_3	$COOCH_2C{\equiv}CH$	$COOCH_2C{\equiv}CH$	0.7
118	O	H	H	CH_3	$COOCH_2$-⬠(O)	$COOCH_2$-⬠(O)	33.4

Fig. 9. *B*, Group II compounds which possess acetyl or hydroxy carbonyl substituents or alkyl ester (other than alkoxyalkyl, pyridylalkyl, and alkylaminoalkyl esters) at positions 3, 5. The substituent at position 4 of the 1,4-dihydro- pyridine of NK-106 is 2-thiophenyl.



C

Members of NK-compound	X, Y	Z	R^1	R^3, R^5	Inhibition of K^+-contracture(%)
250	S	CH_3	H	CH_2-(pyridyl)	41.9
239	S	H	H	$(CH_2)_3$-(pyridyl)	68.0
252	O	H	H	CH_2-(pyridyl)-CH_2CH_3	30.7
237	O	H	H	CH_2-(pyridyl)-CH_3	0
242	O	H	H	$(CH_2)_3$-(pyridyl)	0
246	S	H	H	CH_2-(pyridyl)	40.8
241	S	H	H	CH_2-(pyridyl)-CH_3	66.6
253	O	H	H	$(CH_2)_2$-(pyridyl)	5.2
126	O	H	H	CH_2-(pyridyl)	11.2
249	S	H	H	CH_2-(pyridyl)	18.7
248	O	H	H	$(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)$-(benzene)	0
238	S	H	H	$(CH_2)_2$-(morpholine)	0
240	O	H	H	$(CH_2)_2$-(morpholine)	0
255	S	H	H	CH_2-(pyridyl)-CH_2CH_3	72.6
247	O	CH_3	H	CH_2-(pyridyl)	16.3
256	O	H	CH_2CH_3	CH_2-(pyridyl)	0
122	O	H	H	$(CH_2)_2N(CH_3)_2$	7.1
243	O	H	H	$(CH_2)_2$-(pyrrolidine)	11.7
245	S	CH_3	H	CH_2-(pyridyl)	51.7
251	O	H	H	CH_2-(pyridyl)	–

Fig. 9. *C*, Group III compounds which have pyridylalkyl or alkylaminoalkyl esters substituents at positions 3, 5.

１日１回、腹腔内にビンクリスチン（ＶＣＲ）を投与すると、マウスの生存期間は増加した。30μg/kgのＶＣＲ用量では、平均の生存日数は12.9～14.7日であった（Table 2～4）。ＶＣＲとＮＫ化合物併用投与群では、ＶＣＲ単独投与群に比べて、P388/S移植マウス生存期間の有意な増加作用はなかった。１つの例外として、NK-242とＶＣＲ併用群ではＶＣＲ単独群に比べて、P388/S移植マウス生存期間を有意に（$p<0.05$）延長した（Table 4）。抗癌剤耐性（P388/VCR）細胞移植マウスでは、30μg/kgのＶＣＲ単独投与群の平均生存日数は9.8～14.5日であった（Table 2～4）。Fig.9Ａに示す、1,4-dihydropyridine骨格の３、５位にalkoxyalkyl ester基を有するグループＩの中では、NK-138はＶＣＲとの併用により、P388/VCR細胞移植マウスの生存期間を延長させ、ＶＣＲ単独投与群に対する延命率（T/V）は135％であった。このグループＩの中での、耐性克服効果は、NK-138だけが、Ａ級（T/V値が130％以上）と評価された化合物であり、７化合物（NK-219、NK-194、NK-218、NK-220、NK-142、NK-216 および NK-236）をＢ級（T/V値が110～130％）と評価し、他の１１化合物をＣ級（T/V値が110％以下）と評価した（Table 2）。Fig.9Bに示す、1,4-dihydropyridine骨格の３、５位に、alkoxyalkyl、pyridylalkyl または alkylaminoalkyl ester 以外の alkyl ester 基と acetylまたは hydroxycarbonyl 基を有する化合物をグループⅡとした。このグループⅡの中では、Ａ級と評価されるものはなく、２化合物（NK-213とNK-229）がＢ級の下限（それぞれのT/V値が112％および113％）であり、他の１６化合物はP388/VCR細胞移植マウスの生存期間の延長作用はなかった（Table 3）。対照的に、Fig.9Cに示す、1,4-dihydropyridine 骨格の３、５位に、pyridylalkyl または alkylaminoalkyl ester基を有する化合物の、グループⅢに属する５化合物（NK-250、NK-239、NK-252、NK-237 および NK-242）をＡ級と評価し、それらのT/V値は130～138％であった（Table 4）。さらにグループⅢに属する９化合物（NK-246、NK-241、NK-253、NK-126、NK-249、NK-248、NK-238、NK-240 および

Table. 2. Effects of NK-compounds (Group I: alkoxyalkyl ester substituents at positions 3,5 of the 1,4-dihydropyridine) on antitumor activity of VCR in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.

Male $CD2F_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of the P388/S or P388/VCR cell line on Day 0. Drugs were given i.p. daily from Days 1 to 5. The control group consisted of 12 to 22 mice, the VCR alone group consisted of 6 to 12 mice, and the group treated with VCR and NK-compound consisted of 5 to 6 mice.

		P388/S					P388/VCR				
		Survival time (days)[c]					Survival time (days)				
Grade[a]	Members of NK-compound[b]	Control	VCR alone[e]	VCR and NK-compound	T/C (%)[d]	T/V (%)	Control	VCR alone	VCR and NK-compound	T/C (%)	T/V (%)
A	1 3 8	9.1	14.2	14.2	156 (a)[f]	100	11.5	11.5	15.5	135 (a)	135 (d)[g]
B	2 1 9	9.0	14.5	15.2	169 (a)	105	11.0	12.6	15.0	136 (a)	119 (d)
	1 9 4	9.1	14.2	14.2	156 (a)	100	11.5	11.5	13.5	118 (b)	118 (e)
	2 1 8	8.7	14.2	14.2	163 (a)	100	11.0	12.6	14.5	132 (c)	115
	2 2 0	9.3	14.2	14.5	156 (a)	102	11.4	13.6	15.2	133 (b)	112
	1 4 2	8.0	13.7	14.0	175 (a)	102	10.3	11.4	12.7	123 (a)	111 (e)
	2 1 6	9.1	14.1	15.0	165 (a)	106	11.0	12.6	14.0	127 (c)	111
	2 3 6	9.0	14.5	14.8	164 (a)	102	11.0	12.6	13.8	125 (c)	110
C	2 0 9	9.1	14.1	14.5	159 (a)	103	11.0	12.6	13.7	125 (a)	109
	2 0 0	9.1	14.1	15.2	167 (a)	108	10.9	11.8	12.8	117 (b)	108
	2 0 3	9.0	14.5	14.7	163 (a)	101	11.0	12.6	13.2	120 (c)	105
	2 1 7	8.7	14.2	13.8	159 (a)	97	12.0	12.5	12.8	107	102
	2 1 5	9.0	14.5	14.3	159 (a)	99	11.0	12.6	12.7	115 (a)	101
	1 6 3	9.1	14.1	14.0	154 (a)	99	10.9	11.8	11.8	108 (c)	100
	1 3 9	10.0	14.4	13.7	137 (a)	95	12.7	14.5	14.2	112	98
	1 2 7	9.3	14.2	14.0	151 (a)	99	11.4	13.6	13.0	114	96
	1 5 3	9.1	14.7	14.0	154 (a)	95	10.8	13.3	12.3	114 (c)	92
	1 4 0	9.3	14.2	11.0	118 (a)	77 (f)	11.4	13.6	11.3	99	83 (e)
	2 3 5	9.0	14.5	14.2	158 (a)	98	11.0	12.6	9.0	82	71

[a] Grade A: T/V% ≧ 130%; Grade B: 110% ≦ T/V% < 130%; Grade C: T/V% < 110%.
[b] NK-compound, 100 mg/kg/day in vehicle (0.5% CMC containing 0.1% Tween 80).
[c] Each value represents the mean.
[d] T/C (%) for the group treated with VCR and NK-compound.
[e] VCR, 30 μg/kg/day in sterilized physiological saline.
[f] Significant difference from control group by Student's and Cochran's *t* tests: $P < 0.001$ (a); $P < 0.01$ (b); $P < 0.05$ (c).
[g] Significant difference from VCR alone group by Student's and Cochran's *t* tests: $P < 0.001$ (d); $P < 0.05$ (e); $P < 0.01$ (f).

Table. 3. Effects of NK-compounds (Group II: other alkyl ester, acetyl, or hydroxycarbonyl substituents at positions 3,5 of the 1,4-dihydropyridine) on antitumor activity of VCR in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.

Male $CD2F_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of the P388/S or P388/VCR cell line on Day 0. Drugs were given i.p. daily from Days 1 to 5. The control group consisted of 12 to 22 mice, the VCR alone group consisted of 6 to 12 mice, and the group treated with VCR and NK-compound consisted of 5 to 6 mice.

		P388/S					P388/VCR				
		Survival time (days)[c]					Survival time (days)				
Grade[a]	Members of NK-compound[b]	Control	VCR alone[e]	VCR and NK-compound	T/C (%)[d]	T/V (%)	Control	VCR alone	VCR and NK-compound	T/C (%)	T/V (%)
B	2 1 3	9.0	14.5	13.8	153 (a)[f]	95	11.0	12.6	14.2	129 (b)	113 (d)[g]
	2 2 9	8.7	14.2	13.6	156 (a)	96	12.0	12.5	14.0	117[g]	112
C	2 0 1	8.0	13.7	13.0	163 (a)	95	10.3	11.4	11.8	115 (b)	104
	2 2 5	9.1	14.1	13.7	151 (a)	97	10.9	11.8	12.2	112 (b)	103
	2 0 2	9.0	14.5	12.5	139 (a)	86 (e)	11.0	12.6	12.8	116 (a)	102
	2 2 7	8.7	14.2	11.2	129 (a)	79 (e)	12.0	12.5	12.7	106	102
	1 8 7	9.1	14.1	14.5	159 (a)	103	10.9	11.8	11.8	108	100
	1 1 3	8.7	14.0	13.8	159 (a)	99	11.9	12.8	12.5	105	98
	2 3 2	8.7	14.2	11.0	126 (b)	77 (e)	12.0	12.5	12.2	102	98
	1 7 9	9.1	14.1	14.2	156 (a)	101	10.9	11.8	11.3	104	96
	1 0 6	8.7	14.0	13.4	154 (a)	96	11.9	12.8	12.0	101	94
	2 3 4	9.0	14.5	11.7	130 (a)	81 (e)	11.0	12.6	11.7	106	93
	2 2 8	8.7	14.2	10.2	117 (a)	72 (e)	12.0	12.5	11.6	97	93
	2 2 6	9.1	14.1	11.8	130 (a)	84 (e)	10.9	11.8	10.7	98	91
	2 3 1	8.7	14.2	11.0	126 (a)	77 (e)	12.0	12.5	11.2	93	90 (d)
	1 2 1	10.0	14.4	12.0	120 (b)	83 (e)	12.7	14.5	12.0	94 (b)	83 (e)
	1 1 7	8.7	14.0	11.5	132 (a)	82 (f)	11.9	12.8	10.3	87 (c)	80 (d)
	1 1 8	10.0	14.4	11.0	110 (b)	76 (e)	12.7	14.5	10.0	79 (a)	69 (e)

[a] Grade B: 110% ≦ T/V% < 130%; Grade C: T/V% < 110%.
[b] NK-compounds 100 mg/kg/day in vehicle (0.5% CMC containing 0.1% Tween 80).
[c] Each value represents the mean.
[d] T/C (%) for the group treated with VCR and NK-compound.
[e] VCR, 30 μg/kg/day in sterilized physiological saline.
[f] Significant difference from control group by Student's and Cochran's *t* tests: $P < 0.001$ (a); $P < 0.01$ (b); $P < 0.05$ (c).
[g] Significant difference from VCR alone group by Student's and Cochran's *t* tests: $P < 0.05$ (d); $P < 0.001$ (e); $P < 0.01$ (f).

Table. 4. Effects of NK-compounds (Group III: pyridylalkyl or alkylaminoalkyl esters substituents at positions 3,5 of the 1,4-dihydropyridine) on antitumor activity of VCR in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.

Male $CD2F_1$ mice were inoculated i.p. with 10^{-6} cells of the P388/S or P388/VCR cell line on Day 0. Drugs were given i.p. daily from Days 1 to 5. The control group consisted of 12 to 22 mice, the VCR alone group consisted of 6 to 12 mice, and the group treated with VCR and NK-compound consisted of 5 to 6 mice.

		P388/S					P388/VCR				
		Survival time (days)[c]					Survival time (days)				
Grade[a]	Members of NK-compound[b]	Control	VCR alone[e]	VCR and NK-compound	T/C (%)[d]	T/V (%)	Control	VCR alone	VCR and NK-compound	T/C (%)	T/V (%)
A	250	8.2	12.9	12.8	156 (a)[f]	99	9.8	9.8	13.5	138 (a)	138 (d)[g]
	239	8.6	14.3	14.3	146 (a)	100	9.8	10.5	14.0	143 (a)	133 (d)
	252	8.3	14.2	14.3	145 (a)	101	10.9	11.3	14.8	136 (b)	131 (e)
	237	8.6	14.2	14.2	165 (a)	99	9.8	10.5	13.7	140 (a)	130 (d)
	242	8.6	14.3	15.3	178 (a)	107 (f)	9.8	10.5	13.7	140 (a)	130 (e)
B	246	8.8	13.8	14.0	159 (a)	101	10.3	11.4	14.2	138 (a)	125 (d)
	241	8.6	14.3	13.0	151 (a)	91 (e)	9.8	10.5	13.0	133 (a)	124 (d)
	253	9.3	13.2	14.2	153 (a)	108	10.9	11.3	13.7	126 (b)	121 (f)
	126	8.7	14.2	14.5	167 (a)	102	10.7	11.8	14.2	133 (b)	120 (e)
	249	8.0	13.7	13.2	165 (a)	96	10.3	11.4	13.5	131 (a)	118 (d)
	248	8.8	13.8	13.6	155 (a)	99	10.3	11.4	13.3	129 (a)	117 (e)
	238	8.6	14.3	14.3	166 (a)	100	9.8	10.5	12.2	124 (b)	116 (e)
	240	8.6	14.3	14.5	169 (a)	101	9.8	10.5	11.8	120 (c)	112
	255	9.2	13.7	12.5	139 (a)	91	9.8	10.3	11.5	117 (a)	112 (e)
C	247	8.8	13.8	12.8	145 (a)	93	10.3	11.4	12.2	118 (b)	107
	256	9.7	13.8	14.7	152 (b)	107	10.3	10.8	11.5	112 (c)	106
	122	8.0	13.7	13.8	173 (a)	101	10.3	11.4	11.5	111 (c)	100
	243	8.8	13.8	14.3	163 (a)	104	10.3	11.4	11.4	111 (c)	100
	245	8.8	13.8	11.7	133 (a)	85 (e)	10.3	11.4	11.2	109 (c)	98
	251	8.8	13.3	12.2	139 (a)	92 (f)	10.6	11.0	10.8	102	98

[a] Grade A: T/V% ≧ 130%; Grade B: 110% ≦ T/V% < 130%; Grade C: T/V% < 110%.
[b] NK-compound, 100 mg/kg/day in vehicle (0.5% CMC containing 0.1% Tween 80).
[c] Each value represents the mean.
[d] T/C(%) for the group treated with VCR and NK-compound.
[e] VCR, 30 μg/kg/day in sterilized physiological saline.
[f] Significant difference from control group by Student's and Cochran's *t* tests: $P < 0.001$ (a); $P < 0.01$ (b); $P < 0.05$ (c).
[g] Significant difference from VCR alone group by Student's and Cochran's *t* tests: $P < 0.001$ (d); $P < 0.01$ (e); $P < 0.05$ (f).

NK-255）のT/V値は112～125％でありＢ級と評価し、残りの６化合物をＣ級とした（Table 4）。

５７個のＮＫ化合物の中で、NK-242はP388/S細胞およびP388/VCR細胞移植マウスの両系で、ＶＣＲの作用を増強させた唯一の化合物であった。Table 5に示したように、NK-242とＶＣＲとの組み合わせはＶＣＲ単独投与に比べて、両系のマウスの生存期間を有意に延長した。200 mg/kgのNK-242と50μg/kgのＶＣＲを５日間併用投与すると、P388/S細胞移植マウスでのT/V値は127％であったが、 10μg/kgのＶＣＲとの５日間併用投与では生存期間の延長はなかった。P388/VCR細胞移植マウスでは、200 mg/kgのNK-242と50μg/kgのＶＣＲとの１０日間併用投与群を除いて、NK-242やＶＣＲの用量および投与期間に比例して、ＶＣＲ耐性克服作用が認められた。種々の組み合わせの中での最大の耐性克服効果（T/V値が139％）は、200 mg/kgのNK-242と10μg/kgのＶＣＲとの１０日間併用投与の組み

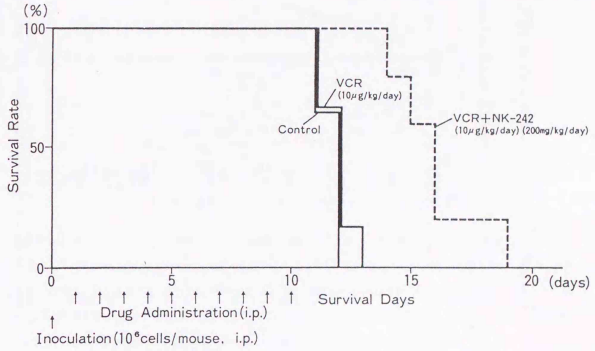


Fig. 10. Effects of NK-242 on antitumor activity of VCR in P388/VCR-bearing mice. Male $CD2F_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of the P388/VCR cell line on Day 0. NK-242 and VCR were given i.p. daily from Days 1 to 10.

Table. 5. Effects of NK-242 and 237 on antitumor activity of VCR in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.

Male CD2F$_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of the P388/S or P388/VCR cell line on Day 0. Drugs were given i.p. daily from Days 1 to 5 (Experiments 1 and 2) and from Days 1 to 10 (Experiment 3).

Drugs[a]	Dose (mg/kg/day)	No. of mice	Survival time (days)	T/C (%)	T/V (%)
Experiment 1 (P388/S)					
Control		12	9.3 ± 0.5[b]	100	
NK-242	200	5	9.0 ± 0	97 (a)[c]	
VCR (10 μg/kg/day)		5	12.6 ± 0.9	135 (b)	100
+ NK-242	200	6	12.3 ± 0.5	132 (c)	98
VCR (50 μg/kg/day)		6	13.8 ± 1.5	148 (c)	100
+ NK-242	200	6	17.5 ± 2.1	188 (c)	127 (d)[d]
Experiment 2 (P388/VCR)					
Control		18	10.9 ± 0.5	100	
NK-242	200	5	11.2 ± 0.4	103	
VCR (10 μg/kg/day)		6	10.7 ± 0.8	98	100
+ NK-242	100	6	12.2 ± 0.4	112 (c)	114 (d)
+ NK-242	200	6	13.0 ± 0	119 (c)	122 (e)
VCR (50 μg/kg/day)		6	11.0 ± 1.1	101	100
+ NK-242	100	6	13.5 ± 0.8	124 (c)	123 (d)
+ NK-242	200	6	14.3 ± 0.5	131 (c)	130 (e)
Experiment 3 (P388/VCR)					
Control		17	10.6 ± 0.5	100	
VCR (10 μg/kg/day)		6	10.8 ± 0.8	102	100
+ NK-237	100	6	12.3 ± 0.8	116 (b)	114 (d)
+ NK-237	200	6	13.0 ± 0.9	123 (b)	120 (d)
+ NK-242	100	6	13.3 ± 1.4	125 (b)	123 (d)
+ NK-242	200	5	15.0 ± 1.9	142 (b)	139 (d)
VCR (50 μg/kg/day)		6	11.2 ± 1.2	106	100
+ NK-237	100	6	13.3 ± 0.5	125 (b)	119 (d)
+ NK-237	200	6	14.3 ± 1.0	135 (b)	128 (e)
+ NK-242	100	6	15.3 ± 1.5	144 (c)	137 (e)
+ NK-242	200	6	14.2 ± 3.3	134 (a)	127

[a] NK-242 and NK-237 were suspended in vehicle (0.5% CMC containing 0.1% Tween 80), and VCR was dissolved in sterilized physiological saline.
[b] Mean ± SD.
[c] Significantly different from control group by Student's *t* test and Cochran's *t* test: $P < 0.05$ (a); $P < 0.01$ (b); $P < 0.001$ (c).
[d] Significantly different from VCR alone group by Student's *t* test and Cochran's *t* test: $P < 0.01$ (d); $P < 0.001$ (e).

合わせであった（Fig.10 および Table 5）。データには示していないが、200 mg/kgの NK-242と100または200μg/kgのＶＣＲでの１０日間併用投与群では、P388/VCR細胞移植マウスで自発運動や体重が減少するような毒性徴候がみられ、この群の生存期間はＶＣＲ単独投与群と比べて短くなった。P388/VCR細胞移植マウスにおいて、NK-237の耐性克服効果はどの用量でもNK-242の効果より弱かった（Table 5の実験 3）。対照として用いたニカルジピンの75 mg/kgと30μg/kgの

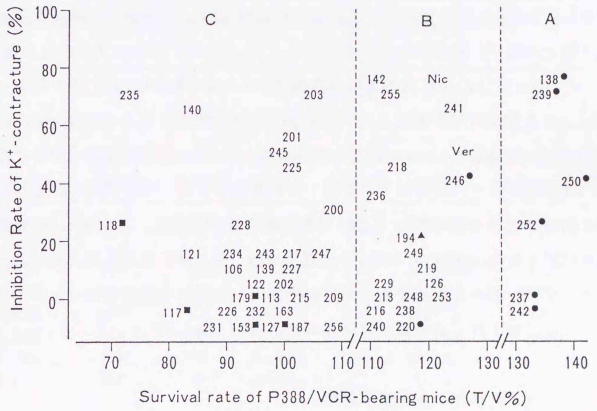


Fig. 11. Classification into grades of NK-compounds on the basis of the survival rate (T/V%) of P388/VCR-bearing mice and inhibition rate (%) of K^+-contracture and the inhibition of photolabeling of P-glycoprotein. Each number represents the member of the NK-compound. The T/V values were derived from shown in Table 2 to 4, and inhibition rate of K^+-contracture from Fig. 9. *Nic*, nicardipine; *Ver*, verapamil. Fourteen NK-compounds were examined on the inhibition of the photoaffinity labeling of P-glycoprotein as seen in Table 7. ●,NK-componds that inhibited almost completely the photolabeling at 1 to 10 μM; ▲,those that inhibited the labeling more than 50% at 10 to 100 μM; ■,those that did not inhibit at 100 μM.

ＶＣＲでの１０日間投与群のT/V値は123％であり、またベラパミルの60 mg/kgと30μg/kgのＶＣＲでの５日間投与群のT/V値は127％であった（Fig.11）。

第２節　ＮＫ化合物のカルシウム拮抗作用

すべてのＮＫ化合物のカルシウム拮抗作用を、１０$^{-7}$Ｍの濃度で検討したが、NK-113は１０$^{-6}$Ｍで測定した。それぞれのＮＫ化合物の、カリウム拘縮での阻害率をFig.9に示した。グループＩとⅡの化合物では、カルシウム拮抗作用と構造的特徴との間に、関連はみられなかった。 ところが、グループⅢの化合物では1,4-dihydropyridine骨格の４位の置換基がdioxene環かdithien環かによって、カルシウム拮抗作用が変化した（Fig.9C）。すなわち、1,4-dihydropyridine骨格の４位の置換基がdioxene環であるNK-242とdithien環であるNK-239の化学構造は、４位以外はすべて同じであるが、それぞれの１０$^{-7}$Ｍの濃度でのカリウム拘縮の阻害率は、それぞれ０％と68.0％であった。同様に、４位がdioxene環であるNK-237とdithien環であるNK-241の阻害率は、それぞれ０％と66.6％であった。ニカルジピンのカリウム拘縮での阻害率は、１０$^{-8}$Ｍの濃度で73.1％であり、ベラパミルでは１０$^{-7}$Ｍの濃度で50.2％であった（Fig.11）。

第３節　ＮＫ化合物の血圧降下作用

Ａ級と評価した６個のＮＫ化合物の血圧降下作用を自然発症高血圧ラットを用いて検討した（Table 6）。ＮＫ化合物の100 mg/kgの経口投与では血圧降下作用はほとんどみられなかった。一方、10 mg/kgのニカルジピンやベラパミルの経口投与では、投与60分後に平均血圧がそれぞれ100、48 mmHg降下した。100 mg/kgのNK-237またはNK-250の腹腔内投与60分後では、血圧降下作用はみられなかった。

NK-239またはNK-242の血圧降下作用は中程度で、NK-252は緩和な作用であり、それらの平均血圧降下はそれぞれ71、63、32 mmHgであった。NK-138は顕著な血圧降下作用を持つ唯一の化合物であり、その平均血圧降下は145 mmHgであった。他方、ニカルジピンやベラパミルの10 mg/kgでの腹腔内投与では、平均体血圧がそれぞれ122、56 mmHg降下した。

Table 6. Effects of NK-compounds, nicardipine, and verapamil on SBP in conscious spontaneously hypertensive rats and acute toxicity in mice.

Drugs[a]	Dose (mg/kg)	SBP (mm of Hg)[b] p.o. Initial	p.o. 60min	i.p. Initial	i.p. 60min	Toxicity (LD_{50}, mg/kg, i.p.)[c]
Control	-	175	175(0)[d]	205	218(+13)	
NK-138	100	180	174(6)	228	83(145)	1189
NK-237	100	186	195(+9)	219	204(15)	>2000
NK-239	100	171	156(15)	233	162(71)	1297
NK-242	100	193	178(15)	226	163(63)	1063
NK-250	100	189	174(15)	198	187(11)	
NK-252	100	189	183(6)	221	187(34)	>2000
Nicardipine	10	183	83(100)	208	86(122)	144[e]
Verapamil	10	189	141(48)	210	154(56)	68[f]

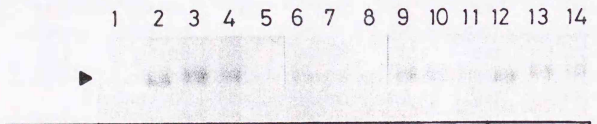
[a]Each drug was suspended in vehicle (0.5% CMC containing 0.1% Tween 80).
[b]Each value represents the mean value obtained from 3 experiments. Drugs were given by p.o. or i.p. administration.
[c]Each value represents the 50% lethal dose calculated from the probit method.
[d]Numbers in parentheses, variation from initial SBP
[e]This value was cited from Ref. 42.
[f]This value was cited from Ref. 43.

第４節　ＮＫ化合物の急性毒性作用

NK-237またはNK-252を2000 mg/kgの用量でマウスに腹腔内投与しても、投与後１０日間観察している間に死亡例はなかった。Table 6に示すように、Ａ級と評価したＮＫ化合物の50％致死量は腹腔内投与で1063～1297 mg/kgの用量であり、ニカルジピンやベラパミルでは68または144 mg/kgの用量であった[42,43]。

第５節　[^{3}H] アジドピンのＰ－糖蛋白質への標識に対するＮＫ化合物による阻害作用

１４個のdihydropyridine化合物、すなわちＡ級と評価した６個のＮＫ化合物、Ｂ級の３個およびＣ級の５個の化合物を、光親和性標識の試験に用いた。その中で、３個のＮＫ化合物、Ａ級のNK-242、Ｂ級のNK-194およびＣ級のNK-153による



Drugs μM	None	None	Ceph			NK-242			NK-194			NK-153		
			1	10	10^2	1	10	10^2	1	10	10^2	1	10	10^2

Fig. 12. Inhibition of [^{3}H]azidopine labeling of the M_r 170,000 P-glycoprotein in membrane vesicles by three dihydropyridine derivatives. VJ-300 vesicles (80 μg of protein per lane) (*Lanes 2* to *14*) were incubated with [^{3}H]azidopine in the absence or presence of the indicated drug concentrations. Autoradiograms were developed after 1-wk exposure. KB vesicles (*Lane 1*) were also examined as control. Cepharanthine (*Ceph*) was also tested. *Arrowhead*, M_r 170,000 P-glycoprotein.

Table 7. Concentration of 14 derivatives of 1,4-dihydropyridine that inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by [^{3}H]azidopine.

Fourteen NK-compounds were classified into three groups. Group 1 inhibited almost completely the labeling at 1 to 10 μmol; Group 2 inhibited more than 50% of the labeling at 10 to 100 μmol; Group 3 did not inhibit the labeling at 100 μmol. Examples are shown in Fig. 3: Group 1 (NK-242); Group 2 (NK-194); and Group 3 (NK-127).

Group	Concentration for inhibition (μM)	1,4-Dihydropyridine derivatives
1	1–10	NK-138, NK-220, NK-237, NK-239, NK-242, NK-246, NK-250, NK-252
2	10–100	NK-194
3	>100	NK-117, NK-118, NK-127, NK-153, NK-179

光親和性ラベル化の阻害作用の例をFig. 12に示した。[^{3}H] アジドピンのＰ－糖蛋白質への光親和性結合の阻害を定量的に測定するために、それらの標識化によるバンドの密度分析を実施した。NK-242は1～10μMでＰ－糖蛋白質への光親和性標識をほぼ完全に阻害し、NK-194では10～100μMで、対照のバンドの50％以上阻害したが、NK-153は100μMでその結合を阻害しなかった。Ｐ－糖蛋白質への光親和性標識を阻害すると報告されているセファランチンは、10～100μMでその結合を阻害した[24]。光親和性標識の阻害の程度に従って、１４個のＮＫ化合物を、３つのグループ（１、２および３）に分類した（Table 7）。Fig. 11にまとめて示すように、Ａ級の６個全部のＮＫ化合物（NK-138、NK-237、NK-239、NK-242、NK-250およびNK-252）と、Ｂ級の２個のＮＫ化合物（NK-220およびNK-246）は

1～10μMで、光親和性標識を完全に阻害することが認められた。B級と評価したNK-194は10～100μMで、その標識を50％以上阻害したが、C級と評価した全てのＮＫ化合物は、100μMでその標識を阻害しなかった。

第６節　小括ならびに考察

抗癌剤に対する多剤耐性を克服できる薬剤は多岐にわたり、種々のカルシウム拮抗剤[8,19,29,34-37]、カルモジュリン阻害剤[20,44,45]、リソソーム性アミン[23]、イソプレノイド[46,47]、ビスコクラウリンアルカロイド[24,48,49]、レチノイド[50]等が報告されている。しかし、これらの化合物はそれらの治療効果が充分でなかったり、副作用があったり、また研究段階であり、臨床的な癌化学療法にはまだ用いられていない。著者は第１章で、いくつかのdihydropyridine化合物とビンクリスチンとを組み合わせると、多剤耐性ヒト癌ＫＢ細胞で、ビンクリスチンの細胞内蓄積を高めることにより、多剤耐性を克服することを示した。さらに２４個の新規dihydropyridine化合物については、１３化合物がin vitroで多剤耐性を完全に克服し、９化合物が部分的に克服し、２化合物には作用がないことを述べた。作用が認められた２２化合物の中から、１８化合物について、本章でのin vivoでの検討結果、４化合物にのみ耐性克服効果が認められ、その中の１化合物（NK-138）に強い効果が認められた。本章では、さらに新規に合成したdihydropyridine化合物を加え、５７化合物について、ビンクリスチン耐性白血病細胞移植マウスを用いて、ビンクリスチン耐性を克服するかどうか検討した。ビンクリスチン耐性白血病細胞移植マウスの生存期間の延長作用の程度により、６化合物にＡ級と評価できる強い耐性克服作用がみられ、１８化合物にＢ級と評価される弱い作用があり、残りの３３化合物には作用が認められずＣ級と評価した。Ａ級と評価した６化合物はニカルジピンやベラパミルより強い耐性克服作用

を有していた。特に、ビンクリスチンとＡ級のNK-242との併用では、P388/VCR細胞移植マウスでのビンクリスチン耐性を克服する作用だけでなく、P388/S細胞移植マウスでのビンクリスチンの増強作用も認められた。

第１章で、in vitroでの多剤耐性を克服する化合物の活性は、その分子全体の疎水性と緊密な関係があることを示唆した。本章では、疎水性を増加させる目的で、1,4-dihydropyridine骨格の３、５位に、種々の置換基を付与するように新規にＮＫ化合物を合成した。３、５位にalkoxyalkyl ester基を有するグループⅠの１９化合物では、Ａ級が１個、Ｂ級が７個見出された（Table 2）。３、５位に、他のalkyl ester基とacetylまたはhydroxycarbonyl ester基を有するグループⅡの１８化合物では、Ａ級と評価されるものはなく、Ｂ級が２個であった（Table 3）。３、５位にpyridylalkylまたはalkylaminoalkyl ester基を有するグループⅢの２０化合物では、Ａ級が５個Ｂ級が９個見出された（Table 4）。３、５位に長いアルキル鎖を持つグループⅡのいくつかのＮＫ化合物は、グループⅠやⅢのＮＫ化合物より、高い疎水性を持っているのにかかわらず、耐性克服活性の増加はみられなかった。従って、本章で検討した５７個のＮＫ化合物については、分子全体の疎水性を増加させても必ずしも耐性克服活性を増加させることはないと言えるかもしれない。さらに、1,4-dihydropyridine骨格の３、５位に pyridylalkyl ester基の導入は、ビンクリスチン耐性克服効果には好ましいことと考えられる。

ニカルジピンやベラパミルの実験的治療への適用は、多剤耐性を克服するために高用量を必要とするために、大きな問題であり、その強いカルシウム拮抗作用のため、冠血管拡張、血圧降下、不整脈を起こす[39,40]。ＮＫ化合物のカルシウム拮抗作用を、摘出ラット直腸でのカリウム拘縮に対する阻害作用で検討した結果、いくつかはカルシウム拮抗作用を全く示さず、他のものは中程度の活性があった。このことは、1,4-dihydropyridine骨格の４位の置換基がカルシウム拮抗作

用の発現に重要な役割を示唆しているのかもしれない。例えば、グループⅢの化合物の中で、４位がdithien環の化合物のカルシウム拮抗作用は、４位がdioxene環である化合物での作用より、非常に強い作用であった。Fig.11に示すように、ＮＫ化合物のカルシウム拮抗作用と耐性克服作用との間に相関はなかった。Ａ級と評価した６個のＮＫ化合物の血圧降下作用はニカルジピンやベラパミルの作用より、明らかに弱かった。これらのＮＫ化合物の血圧降下作用と、in vitroでのカルシウム拮抗作用とでは、大まかな相関性があるが、これらの両活性と耐性克服作用とには相関はなかった。従って、NK-237やNK-250のような化合物の適用により、耐性克服作用では強い活性を示すが、心血管系には影響がないということが、期待できる。さらに、これらのＬＤ$_{50}$値が、ニカルジピンやベラパミルの公表値に比べ、たいへん大きい値である。以上のことを考えあわせると、これらのＮＫ化合物の安全域は、ニカルジピンやベラパミルの安全域より優れていると考えられる。

多剤耐性遺伝子、ＭＤＲ－１の発現は、腫瘍細胞での多剤耐性の獲得と密接に関連している[9,30,31]。そのＭＤＲ－１遺伝子は、ある種の抗癌剤の排出ポンプとしての機能を表わす細胞膜に存在する、Ｐ－糖蛋白質をコードしている[10,30,31,51,52]。セファランチン、ベラパミル、レセルピン、イソプレノイドなどの耐性を克服する多くの物質は、この蛋白による排出ポンプ作用を阻害し、また［^{125}I］NASVによるＰ－糖蛋白質の光親和性標識を阻害する[24,25,48]。ＮＫ化合物による多剤耐性克服の機序に関しては、第１章で、強い耐性克服活性を持つＮＫ化合物は、in vitroでの多剤耐性細胞からのビンクリスチンの排出および［^{125}I］NASVによる光親和性結合標識を阻害することを述べた。本章でも、光親和性結合標識の阻害が、in vivoでのビンクリスチン耐性克服作用の強さの程度と関連するか否かを検討した。１４個のＮＫ化合物を検討した中で、Ａ級と評価した６化合物全部と、Ｂ級の３化合物のうち２個が、1～10μMで光親和性標識を

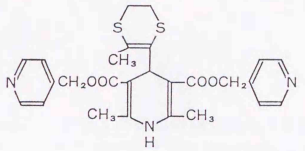
完全に阻害し、Ｂ級と評価した３化合物の中で１個はセファランチンと同様に10～100μMで阻害し、Ｃ級と評価した６化合物全部では100μMで阻害しなかった（Fig.11および12、Table 7）。従って、これらのdihydropyridine誘導体の in vivoでの耐性克服作用は、［^{3}H］アジドピンでのＰ－糖蛋白質への光親和性結合標識を阻害する作用と緊密に相関していることが明らかになった（Fig.11）。多剤耐性細胞の膜Ｐ－糖蛋白質の光親和性標識の実験系は、in vivoでの薬剤耐性を克服できる物質を探索するための有用な in vitro 実験系と考えられる。事実、第１章および第２章に述べた結果より、カルシウム拮抗作用が弱く、強い耐性克服作用を持つNK-237およびNK-247のような化合物が見出された。

第３章　ビンクリスチン耐性白血病マウスを用いた、２つのdihydropyridine化合物による種々の抗癌剤に対する多剤耐性克服作用[53,54]

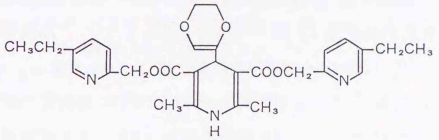
ベラパミルや他のカルシウム拮抗剤は、in vitroおよびin vivoで、ビンカアルカロイドやアンスラサイクリン耐性を克服することが報告されている[19,21,29,35,39]。多剤耐性克服薬剤をin vivoで検討する際に、しばしば癌細胞を動物の腹腔内に移植し、耐性克服薬剤も抗癌剤も腹腔内に投与している。耐性克服薬剤や抗癌剤は、できるなら、癌細胞の移植経路とは異なった投与経路が望ましいと考えられる。耐性克服薬剤を腹腔内投与ではなく他の経路で投与することは、臨床応用のための治療法の開発に際して考えるべき重要な事である。第２章では、５７個のdihydropyridine化合物（ＮＫ化合物）に対して、in vivoでのビンクリスチン耐性克服作用、カルシウム拮抗作用および血圧降下作用を検討した。その中で、カルシウム拮抗作用が弱く、Ｐ－糖蛋白質に高い親和性を持つ４つのＮＫ化合物が、腹腔内投与で、ビンクリスチン耐性白血病細胞を移植したマウスでのビンクリスチンの作用を強めることを示した。本章では４つのＮＫ化合物の中から、データには示していないがP388/VCR移植マウスに４つのＮＫ化合物を経口投与して比較した実験の結果により、最も耐性克服効果が強いとみとめられた２つのＮＫ化合物、NK-250およびNK-252（Fig.13に構造式を示す）について、詳細に検討した。本章の in vivo での実験は、Ｐ３８８白血病細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスを用いて、抗癌剤も腹腔内または静脈内に投与し、ＮＫ化合物は経口投与して検討した。

Ｐ－糖蛋白質を発現している多剤耐性癌細胞は、構造や作用に類似性の低い、種々の抗癌剤、ビンカアルカロイド、アンスラサイクリン、アクチノマイシンＤ、ポドフィロトキシン等に対して同時に耐性となっている[9,21,35,39,55]。エトポ

シドやテニポシドは、メギ科植物由来であるポドフィロトキシンの半合成化合物である。NK-250およびNK-252に関する報告で[55]、これらの化合物が、in vitroでのヒトＫＢ系多剤耐性細胞において、エトポシドの抗癌作用を増強することを示している。また、Ｐ－糖蛋白質以外の耐性機序を持つと思われるヒト多剤耐性細胞においても、エトポシドの作用を増強した。その作用機序として、NK-250およびNK-252はＰ－糖蛋白質が陽性と陰性の両方の多剤耐性細胞および、その親株である感受性細胞において、エトポシドの細胞内蓄積を増加させることを示した。



NK-250



NK-252

Fig. 13. Chemical structures of 1,4-dihydropyridine derivatives (NK-compounds)

第１章で用いた多剤耐性ＫＢ－Ｃ１細胞が種々の抗癌剤に対して耐性となっていることは既に述べた。第２章で用いたマウスＰ３８８白血病細胞も多剤耐性の性質を持っているとされているが、in vivoで種々の抗癌剤に対して耐性を示すという報告は少ない。本章では抗癌剤感受性および耐性のＰ３８８白血病細胞を用いて、 in vitro および in vivo で、種々の抗癌剤に対する２つのＮＫ化合物の耐性克服効果を検討した。抗癌剤は、ビンカアルカロイド系のビンクリスチン(ＶＣＲ)、ビンブラスチン(ＶＬＢ)、ビンデシン(ＶＤＳ)、アクチノマイシンＤ(ＡＣＤ)とエトポシドを用いて、ＮＫ化合物の多剤耐性克服効果について検討した。

第１節　抗癌剤感受性または耐性細胞培養系でのNK-250およびNK-252によるＶＣＲの作用増強効果

抗癌剤耐性（P388/VCR）細胞の抗癌剤に対する感受性を、in vitroでの細胞増殖阻害により抗癌剤感受性（P388/S）細胞と比較した[20]。細胞をＶＣＲ存在下で培養すると、P388/Sでの50％増殖阻害用量は約 4 ng/mlであったが、P388/VCRでは約 85 ng/mlであり、P388/VCRはP388/SよりＶＣＲに対し21倍耐性であった（Fig.14）。NK-250またはNK-252と種々の用量のＶＣＲとの併用効果をP388/SとP388/VCR細胞の増殖に対して比較した。ＶＣＲと5μg/mlの NK-250（Fig.14A）またはNK-252（Fig.14B）との組み合わせで、P388/VCRでのＶＣＲ耐性を完全に克服した。

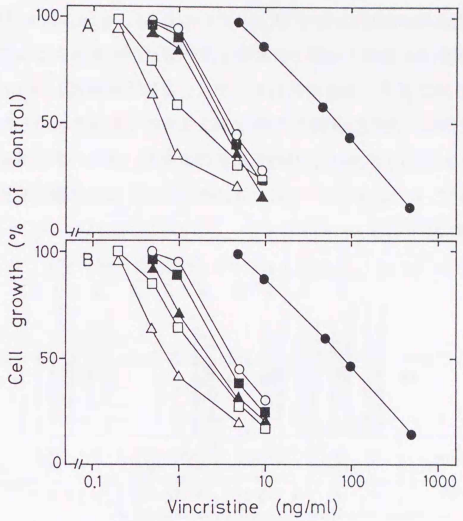


Fig. 14. Reversing effect of NK-250 (A) and NK-252 (B) on VCR-sensitive P388/S leukemia cells and on VCR-resistant P388/VCR leukemia cells *in vitro*. Sensitive P388/S cells were cultured with various concentration of VCR in the absence (○) or in the presence of 5 (□) and 10 (△) μg/ml of NK-250 or NK-252 for 72 h. P388/VCR cells were cultured with VCR in the absence (●) or in the presence of 5 (■) and 10 (▲) μg/ml of NK-250 or NK-252.

第２節　[^{3}H] アジドピンのＰ－糖蛋白質への光親和性標識に対するNK-250またはNK-252の阻害作用

第２章ではヒトＫＢ細胞の耐性変異細胞のVJ-300細胞の細胞膜分画を用いて、

種々のＮＫ化合物の作用について検討した。ここでは、 in vivo 実験で使用したP388/VCR細胞から分離した膜Ｐ－糖蛋白質への［^{3}H］アジドピンでの標識を２つのＮＫ化合物が阻害するか検討した。セファランチンは100μMで、これまでの報告[24]と同様に、光親和性標識活性をほぼ完全に阻害した（Fig.15）。NK-250またはNK-252は［^{3}H］アジドピンの光親和性標識を、それぞれ10または1μMで、完全に阻害した（Fig.15）。このことは、ＮＫ化合物とＰ－糖蛋白質との特異的な関係を示唆している。

Drugs	None	None	Ceph	NK-250	NK-252
μM			1 10 10²	1 10 10²	1 10 10²

Fig. 15. Inhibition of [^{3}H]azidopine labeling of GP170 in membrane vesicles by NK-compounds. P388/VCR vesicles (120 μg of protein per lane) (lanes 2–11) were incubated with [^{3}H]azidopine in the absence or presence of the indicated drug concentrations. Autoradiograms were developed after one week of exposure. P388/S vesicles (lane 1) were also examined as a control. Cepharanthine (Ceph) was also tested. The arrow indicates the expected position of a 170-kDa band based on the use of molecular size markers.

第３節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのNK-250またはNK-252単独での抗癌作用

NK-250またはNK-252がP388/SまたはP388/VCR白血病細胞移植マウスで、種々の

抗癌剤との抗癌作用を増強するか検討する前に、これらのＮＫ化合物の単独での投与で、in vivoでの抗癌作用を示すかどうか検討した。P388/SまたはP388/VCR白血病細胞の10^6個を腹腔内に移植したマウスに、移植後1～5日目までの毎日、NK-250を 1000 mg/kgで経口投与すると、マウスの生存期間をわずかに延長した（Table 8）。しかし、NK-250の100、300 mg/kg投与では抗癌活性はなかった。NK-252を単独で、P388/SまたはP388/VCR移植マウスに経口投与しても、抗癌作用はなかった。従って、NK-250またはNK-252と、種々の抗癌剤との併用投与での検討の際には、両方のＮＫ化合物共に経口投与での最大用量は、300 mg/kgで用いた。

Table 8. Antitumor Activity of NK-250 and NK-252 in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.[a]

Cells	*Drugs*	*Dose* (*mg kg*$^{-1}$)	*Survival time*[b] *T/C* (*range*)	(%)
P388/S				
	Control	0	8.3 (7–10)	100
	NK-250	100	8.8 (8–12)	106
		300	9.0 (8–10)	108
		1000	9.5 (9–10)	114*[c]
	NK-252	100	8.6 (7–10)	104
		300	8.5 (8–9)	102
		1000	8.5 (8–9)	102
P388/VCR				
	Control	0	10.0 (9–11)	100
	NK-250	100	9.8 (8–11)	98
		300	9.3 (8–10)	93
		1000	12.0 (11–14)	120**
	NK-252	100	9.5 (6–11)	95
		300	9.5 (7–10)	95
		1000	10.2 (10–11)	102

[a]Male CD2F$_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of P388/S and P388/VCR cell line on day 0. Each group consisted of six mice. NK-250 and NK-252 were given p.o. daily from day 1 to 5. [b]Mean survival days and the range of survival days. [c]Significantly different from the respective control group by Student's and Cochran's *t*-test; $*P<0.05$, $**P<0.01$.

第４節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのＶＣＲとNK-250またはNK-252との併用効果

ＶＣＲとNK-250またはNK-252との併用抗癌作用を、P388/SまたはP388/VCR移植マウスで検討した。P388/S移植マウスに対して、NK-250を300 mg/kgで10日間経口投与し、同時にＶＣＲを30μg/kgで10日間腹腔内投与した治療実験の結果を、Fig. 16A に示した。Fig. 16B には、P388/VCR移植マウスに対して、NK-250を300 mg/kgで10日間経口投与し、同時にＶＣＲを30μg/kgで10日間腹腔内投与した治療実験の結果を示した。

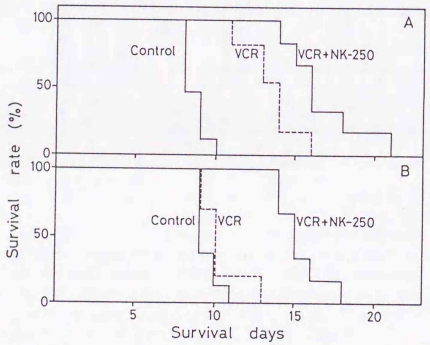


Fig. 16. Effect of NK-250 on antitumor activity of VCR in mice bearing VCR-sensitive P388/S (A) and VCR-resistant P388/VCR (B). Male $CD2F_1$ mice were inoculated ip with 10^6 P388/S or P388/VCR leukemia cells on day 0. VCR (ip) at 30 μg/kg/day and NK-250 (po) at 300 mg/kg/day were given once daily for 10 days starting on day 1. The control group consisted of 16 or 17 mice, the VCR alone group consisted of 10 or 11 mice and the group treated with VCR and NK-250 consisted of 6 mice.

ＶＣＲをP388/S移植マウスの腹腔内に１日１回、１０日間投与すると、その生存期間を用量依存的に延長させた（Table 9）。ＶＣＲとNK-250またはNK-252との併用療法では、ＶＣＲ単独での延命効果と比較して、その生存期間を有意に延長させた。P388/S移植マウスでの最大延命効果（23.7日の平均生存日数）はＶＣＲを100μg/kg、NK-252を300mg/kgで投与した場合に得られた。データには示していないが、ＶＣＲを100μg/kgと多量のNK-250との併用では毒性があった。

Table 9. Effects of NK-250 and NK-252 on Antitumor Activity of VCR in P388/S-bearing mice.[a)]

Dose of VCR (μg/kg/day)	Dose of NK-compounds (mg/kg/day)	Number of mice	Mean survival days (range)	T/C (%)
—	—	17	8.6 (8–10)	100
10	—	12	12.3 (11–13)	143
10	+NK-250 300	6	14.2 (13–15)	165***
10	+NK-252 300	6	14.5 (14–16)	169***
30	—	11	13.5 (11–16)	157
30	+NK-250 300	6	16.7 (14–21)	194**
30	+NK-252 300	6	15.2 (14–16)	177*
100	—	6	17.0 (15–19)	198
100	+NK-252 300	6	23.7 (21–27)	276***

a) Male $CD2F_1$ mice were inoculated ip with 10^6 cells of P388/S on day 0. VCR was given ip once daily from day 1 to day 10. NK-compounds were given po once daily from day 1 to day 10. Asterisks indicate a significant difference from the respective result with the same dose of VCR alone by Student's and Cochran's *t* tests: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

ＶＣＲをP388/VCR移植マウスの腹腔内に、移植１日後より１日１回１０日間投与すると、その生存期間は増加しなかった（Table 10）。ＶＣＲを腹腔内に投与し、NK-250を経口投与した併用療法では、ＶＣＲ単独での生存日数と比較して、その生存期間を有意に延長させた。ＶＣＲのそれぞれの用量について、このNK-250の抗癌作用増強効果は、用量依存的な効果であった。P388/VCR移植マウスでの最大

延命効果（16.2日の平均生存日数）は、ＶＣＲを100μg/kgとNK-250を200 mg/kgとを併用投与した場合に得られた。ＶＣＲを100μg/kgと多量のNK-250（300 mg/kg）との併用では毒性を示し、６匹中３匹に自発運動の抑制および体重減少を伴う毒性による死亡例があった。ＶＣＲとNK-252との併用療法でも、その生存期間を有意に増加させたが、その増強効果はNK-250よりも弱かった。しかし、ＶＣＲとNK- 252で、どの用量の組み合わせにおいても毒性による死亡例はなかった。

Table 10. Effects of NK-250 and NK-252 on Antitumor Activity of VCR in P388/VCR-bearing mice.[a)]

Dose of VCR (μg/kg/day)	Dose of NK-compounds (mg/kg/day)		Number of mice	Mean survival days (range)	T/C (%)
—		—	16	9.5 (9–11)	100
10		—	10	9.4 (9–11)	99
10	+NK-250	200	6	12.3 (12–13)	129***
10		300	6	13.5 (13–14)	142***
10	+NK-252	200	6	11.3 (11–12)	119***
10		300	6	11.5 (10–14)	121*
30		—	10	10.3 (9–13)	108
30	+NK-250	200	6	14.3 (13–16)	151***
30		300	6	15.3 (14–18)	161***
30	+NK-252	200	6	13.8 (12–18)	145**
30		300	6	14.3 (13–17)	151***
100		—	9	10.4 (9–12)	109
100	+NK-250	100	6	13.5 (12–15)	142***
100		200	5	16.2 (13–19)	171**
100		300	6	11.0 (5–17)	116
100	+NK-252	100	6	12.5 (10–15)	132*
100		200	6	14.3 (13–18)	151**
100		300	6	15.3 (14–17)	161***

a) Male $CD2F_1$ mice were inoculated ip with 10^6 cells of P388/VCR on day 0. VCR was given ip once daily from day 1 to day 10. NK-compounds were given po once daily from day 1 to day 10. Asterisks indicate a significant difference from the respective result with the same dose of VCR alone by Student's and Cochran's *t* tests: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

第５節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのビンブラスチン（ＶＬＢ）またはビンデシン（ＶＤＳ）とNK-250またはNK-252との併用効果

ＶＬＢをP388/S移植マウスの腹腔内に１日１回５日間投与すると、その生存期間を用量依存的に延長させ、その平均生存日数はＶＬＢ30と100μg/kgの用量で、

Table 11. Effects of NK-250 and NK-252 on Antitumor Activity of VLB and VDS in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.[a)]

Drugs	Dose of NK-compounds (mg/kg/day)		P388/S Mean survival days (range)	P388/S T/C (%)	P388/VCR Mean survival days (range)	P388/VCR T/C (%)
Control		—	8.7 (6–10)	100	9.1 (7–10)	100
VLB (30 μg/kg/day)		—	12.2 (10–14)	140	9.2 (8–11)	101
	+NK-250	300	13.3 (12–15)	153	13.0 (10–15)	143**
	+NK-252	300	12.5 (9–16)	144	11.8 (10–14)	130*
VLB (100 μg/kg/day)		—	14.0 (8–16)	161	12.0 (8–16)	132
	+NK-250	300	19.8 (19–22)	228**	15.2 (14–17)	167*
	+NK-252	300	16.2 (13–20)	186	13.0 (12–14)	143
VLB (200 μg/kg/day)		—	13.8 (9–16)	159	12.7 (9–17)	140
	+NK-250	200	20.2 (17–23)	232**	16.7 (10–20)	184*
	+NK-252	300	18.2 (15–23)	209*	13.2 (12–15)	145
Control		—	8.7 (6–10)	100	9.4 (6–11)	100
VDS (10 μg/kg/day)		—	11.0 (8–13)	126	10.3 (10–11)	110
	+NK-250	300	12.5 (11–15)	144	13.2 (12–14)	140
	+NK-252	300	13.2 (9–15)	152	10.7 (9–12)	114
VDS (30 μg/kg/day)		—	12.8 (11–14)	147	10.0 (9–11)	106
	+NK-250	200	15.0 (14–16)	172**	12.8 (11–16)	136**
	+NK-252	200	15.6 (15–17)	179**	12.0 (11–14)	128**
VDS (100 μg/kg/day)		—	14.3 (9–21)	159	9.8 (9–11)	104
	+NK-250	200	17.7 (15–21)	203	16.0 (13–18)	170**
		300	20.7 (16–25)	237*	11.4 (5–19)	121
	+NK-252	200	17.5 (13–21)	201	12.2 (11–13)	130**
		300	19.0 (13–21)	218*	11.2 (7–13)	119

a) Male $CD2F_1$ mice were inoculated ip with 10^6 cells of P388/S or P388/VCR cell line on day 0. VLB (ip), VDS (ip) and NK-compounds (po) were given once daily from day 1 to day 5. The control group consisted of 12–18 mice, the VLB or VDS alone group consisted of 6 mice and the group treated with VLB or VDS and NK-compounds consisted of 5 or 6 mice. Asterisks indicate a significant difference from the respective result with the same dose of VLB or VDS alone by Student's and Cochran's *t* tests: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

それぞれ12.2日、14.0日であったが、ＶＬＢ200μg/kgの用量では13.8日であった（Table 11）。P388/VCR移植マウスを、ＶＬＢ30、100、200μg/kgの用量で、治療した時の平均生存日数は、それぞれ 9.2日、12.0日、12.7日であり、ＶＬＢはP388/VCRに対し、in vivoで弱い交差耐性があることが示唆された。ＶＬＢを腹腔内に、NK-250またはNK-252を経口で、P388/SまたはP388/VCR移植マウスに併用投与すると、ＶＬＢ単独での生存日数と比較して、その生存期間を有意に延長させた（Table 11）。P388/SまたはP388/VCR移植マウスに、ＶＬＢを200μg/kgとNK-250を200 mg/kgとを投与した場合に最大効果が認められ、平均生存日数はそれぞれ20.2日、16.7日であった。NK-252の生存日数における増強効果はNK-250よりも弱かった。

ＶＤＳをP388/S移植マウスの腹腔内に１日１回、５日間投与すると、その生存期間を用量依存的に延長させ、その平均生存日数はＶＤＳ10、30、100μg/kgの用量で、それぞれ11.0日、12.8日、14.3日であった（Table 11）。P388/VCR移植マウスをＶＤＳ10、30、100μg/kgの用量で治療した時の平均生存日数は、それぞれ10.3日、10.0日、9.8日であり、ＶＤＳはP388/VCRに対し、in vivoで交差耐性があることが示唆された。ＶＤＳを腹腔内に、NK-250またはNK-252を経口で、P388/SまたはP388/VCR移植マウスに併用投与すると、ＶＤＳ単独での生存日数と比較して、その生存期間をいずれも有意に延長させた（Table 11）。P388/S移植マウスに、ＶＤＳを100μg/kgと NK-250を300 mg/kg とを投与した場合、またはP388/VCR移植マウスに、ＶＤＳを100μg/kgとNK-250を200 mg/kgとを投与した場合に、最大効果が認められ、平均生存日数はそれぞれ20.7日、16.0日であった。しかし、NK-252の増強効果はNK-250よりも弱かった。 P388/VCR移植マウスに、ＶＤＳを100μg/kgとNK-250を300 mg/kgとを投与した場合に、６匹中３匹が移植後５～７日後に毒性により死亡し、ＶＤＳを100μg/kgとNK-252を300 mg/kgとを投与した場合に、６匹中１匹が移植後７日後に死亡した。

第６節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのアクチノマイシンＤ(ＡＣＤ)とNK-250またはNK-252との併用効果

ＡＣＤをP388/S移植マウスの腹腔内に１日１回、５日間投与すると、その生存期間を用量依存的に延長させた（Table 12）。P388/VCR移植マウスに、ＡＣＤを10、25、50μg/kgの用量で治療した時の平均生存日数は、それぞれ11.6日、12.8日、13.4日であり、ＡＣＤはP388/VCR移植マウスに対し、弱い交差耐性があることが示唆された。ＡＣＤを腹腔内に、NK-250またはNK-252を経口で、P388/SまたはP388/VCR移植マウスに併用投与すると、ＡＣＤ単独での生存日数と比較して、その生存期間を有意に延長させた（Table 12）。P388/VCR移植マウスに、ＡＣＤを50μg/kgとNK-250を300 mg/kgとを投与した場合に最大効果が認められ、平均

Table 12. Effects of NK-250 and NK-252 on Antitumor Activity of ACD in P388/S- and P388/VCR-bearing mice.[a)]

Dose of ACD (μg/kg/day)	Dose of NK-compounds (mg/kg/day)	P388/S Mean survival days (range)	P388/S T/C (%)	P388/VCR Mean survival days (range)	P388/VCR T/C (%)
—	—	8.2 (8–9)	100	9.7 (8–11)	100
10	—	12.8 (10–15)	155	11.6 (10–14)	120
10	+NK-250 300	11.5 (10–13)	140	13.0 (12–14)	134*
10	+NK-252 300	14.3 (13–16)	174	11.8 (7–14)	122
25	—	14.1 (12–17)	171	12.8 (11–14)	132
25	+NK-250 300	15.8 (15–16)	192	15.8 (13–17)	163**
25	+NK-252 300	16.7 (15–18)	203	13.3 (12–16)	137
50	—	16.5 (14–18)	201	13.4 (10–16)	138
50	+NK-250 200	18.2 (17–19)	221**	15.7 (13–19)	162*
50	300	17.5 (15–22)	213	18.2 (15–20)	188***
50	+NK-252 200	17.3 (13–19)	211	14.8 (14–16)	153*
50	300	19.0 (17–21)	231**	17.0 (15–18)	175***

a) Male $CD2F_1$ mice were inoculated ip with 10^6 cells of P388/S or P388/VCR cell line on day 0. ACD (ip) and NK-compounds (po) were given once daily from day 1 to day 5. The control group consisted of 12 to 18 mice, the ACD alone group consisted of 6 to 12 mice and the groups treated with ACD and NK-compounds consisted of 5 or 6 mice. Asterisks indicate a significant difference from the respective result with the same dose of ACD alone by Student's and Cochran's *t* tests: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

生存日数はそれぞれ18.2日であった。ＡＣＤとNK-252またはNK-250で、どの用量の組み合わせにおいても、毒性による死亡例はなかった。

第７節　P388/SまたはP388/VCRマウス白血病細胞培養系でのNK-250または NK-252によるエトポシドの作用増強効果

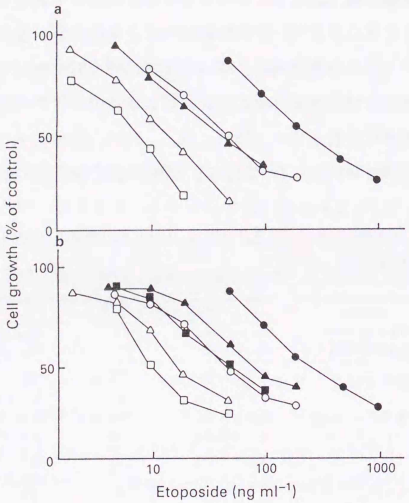


Fig. 17. Effects of NK-250 a and NK-252 b on cytotoxic action of etoposide in P388/S and P388/VCR cells in culture. Exponentially growing P388/S (○, △, □) and P388/VCR (●, ▲, ■) cells were seeded and exposed to various doses of etoposide in the absence (○, ●) or in the presence of 5 μg ml^{-1} (△, ▲) and 10 μg ml^{-1} (□, ■) of NK-250 and NK-252. The cells were further incubated for 4 days and viable cells were scored. Each value is the average of duplicate dishes within the variation of less than 10%. The cell growth (% of control) was presented by normalising cell numbers under various conditions to those in P388/S or P388/VCR in the absence of any drug.

抗癌剤耐性（P388/VCR）細胞のエトポシドに対する感受性を、in vitroでの細胞増殖阻害により、抗癌剤感受性（P388/S）細胞と比較した。P388/S細胞にエトポシドを48時間作用させると、 エトポシドの50％増殖阻害用量は約46 ng/mlであったが、P388/VCRでは約240 ng/mlであり、P388/VCRはP388/Sよりエトポシドに対し5.6倍耐性であった（Fig.17）。NK-250またはNK-252とエトポシドとの併用で、P388/VCR細胞でのエトポシドの交差耐性をほぼ完全に克服した。 NK-250またはNK-252は抗癌剤感受性のP388/S細胞においても、エトポシドの殺細胞効果を増強した。

第８節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのエトポシドとNK-250との併用効果

薬剤感受性または薬剤耐性のP388白血病細胞を移植したマウスにおいて、エトポシドとdihydropyridine化合物との併用投与で、抗癌活性を増強するかどうか検討した。最初に、薬剤感受性P388/S移植マウスで、NK-250とエトポシドとの併用による効果を検討した。エトポシドを腹腔内に投与すると、P388/S白血病細胞を10^6個、腹腔内に移植したマウスの生存期間を延長した（Table 13）。P388/S白血病細胞を10^5個、静脈内に移植したマウスでも、エトポシドを腹腔内に投与すると、同様に、その生存期間を延長した。エトポシド単独では、どの用量でも60日以上生存したマウスはなかった。P388/S細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスに、エトポシドを腹腔内投与し、同時にNK-250を経口投与した併用療法では、エトポシド単独の場合の治療効果に比較して、有意に生存期間を延長した。エトポシドを腹腔内に、NK-250を経口で併用投与した場合に、60日以上の生存例があった。Fig.18Aに、NK-250を経口で、エトポシドを腹腔内に投与した時の、P388/S細胞を腹腔内に移植したマウスでの治療実験の例を示す。エトポシド単独

Table. 13. Effects of NK-250 on antitumor activity of etoposide in drug-sensitive P388/S-bearing mice.[a]

		Etoposide: IP administration[b]				*Etoposide: IV administration*[c]			
		IP inoculation[d]		*IV inoculation*[e]		*IP inoculation*		*IV inoculation*	
Etoposide (mg kg^{-1})	*NK-250* (mg kg^{-1})	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)
0	0	8.4 (8–9)[f]	100	8.3 (8–9)	100	8.9 (6–12)	100	9.6 (9–11)	100
0.3	0	13.4 (12–15)	160	9.0 (9)	108	–[g]	–	–	–
0.3	300	18.4 (17–20)	219***	14.5 (10–19)	175***	–	–	–	–
1.0	0	15.8 (13–18)	188	10.2 (10–11)	123	9.3 (6–12)	104	10.9 (10–11)	114
1.0	300	23.8 (20–32)	283**	27.8 (21–34)	335***	16.0 (15–17)	180***	18.0 (15–19)	188***
3.0	0	20.8 (18–25)	248	13.5 (13–15)	163	11.8 (11–13)	133	12.6 (12–13)	131
3.0	100	39.7 (22–60)	473* 2/6[h]	36.2 (18–60)	436* 1/6	–	–	–	–
3.0	200	41.3 (21–60)	492 3/6	48.5 (33–60)	584** 3/6	17.2 (16–18)	193***	22.5 (19–27)	234***
3.0	300	40.3 (21–60)	480* 2/6	45.3 (9–60)	546* 4/6	21.3 (20–23)	239***	45.3 (28–60)	472*** 2/6
10.0	0	–	–	–	–	16.7 (14–19)	188	17.3 (16–18)	180
10.0	100	–	–	–	–	23.5 (21–29)	264**	51.3 (33–60)	534** 4/6
10.0	200	–	–	–	–	38.8 (22–60)	436* 2/6	53.8 (23–60)	560** 5/6
10.0	300	–	–	–	–	44.0 (30–60)	494** 2/6	26.0 (8–60)	271 2/6

[a]Male CD2F$_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells or i.v. with 10^5 cells of P388/S cell line on day 0. The control group consisted of 13–19 mice, the etoposide alone group consisted of six or 12 mice and the group treated with etoposide and NK-250 consisted of 5–6 mice. NK-250 was given p.o. daily from day 1 to 5. [b]Etoposide was given i.p. daily from day 1 to 5. [c]Etoposide was given i.v. on day 1, 3 and 5. [d]Inoculation of P388/S cells. [e]Mean survival days and the range of survival days. The survival time for mice surviving more than 60 days was taken as 60 days. [f]–: not tested. [g]Significantly different from the respective result with the same dose of the etoposide alone group by Student's and Cochran's *t*-test; $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$. [h]The number of mice surviving 60 days/the number of mice treated.

での効果と比較して、NK-250との併用では、薬剤感受性細胞を移植したマウスの生存期間を有意に延長した。

P388/S細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスに、移植後、1、3、5日目に、エトポシドを静脈内投与すると、マウスの生存期間を用量依存的に延長した（Table 13）。P388/S細胞を、腹腔内または静脈内に移植したマウスにおいて、

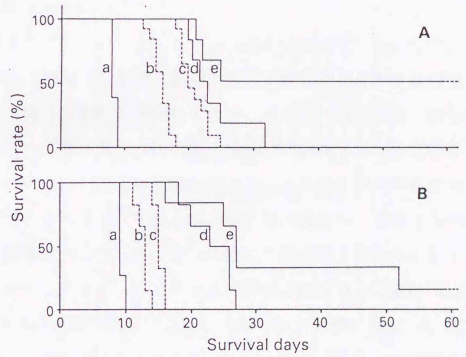


Fig. 18. Effects of NK-250 on antitumour activity of etoposide in P388/S **A** and P388/VCR **B**-bearing mice. Male CD2F$_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of P388/S or P388/VCR cells on day 0. NK-250 was given p.o. and etoposide was given i.p. daily from day 1 to 5. Curves a: control; b: etoposide (1 mg kg^{-1}); c: etoposide (3 mg kg^{-1}); d: etoposide (1 mg kg^{-1}) plus NK-250 (300 mg kg^{-1}), significantly ($P<0.01$) different from the curve b in **a** and $P<0.001$ from the curve b in **b**; e: etoposide (3 mg kg^{-1}) plus NK-250 (200 mg kg^{-1}), significantly ($P<0.05$) different from the curve c in **b**. Each group consisted of six to 12 mice.

エトポシドを静脈内に投与した場合の抗癌作用は、同用量を腹腔内に投与した場合に比べて、より弱い効果であるが、この２つの投与経路での投与回数は異なっており、静脈内投与では３回投与し、腹腔内では５回投与している。NK-250と静脈内投与でのエトポシドとの併用療法では、P388/S細胞を、腹腔内または静脈内に移植したマウスにおいて、エトポシドの同用量での治療効果に比べて、その生存期間を有意に延長した。P388/S細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスにエトポシドを静脈内投与し、NK-250を経口投与した群に、60日以上の生存例があった。

次に、薬剤耐性のP388/VCR細胞を移植したマウスで、NK-250とエトポシドとの併用による抗癌効果を検討した。P388/VCR細胞を、腹腔内に移植したマウスに、エトポシドを単独で腹腔内投与すると、その生存期間を用量依存的に延長した(Table 14)。しかしながら、P388/VCR細胞を静脈内に移植したマウスに、同じ用量のエトポシドを腹腔内投与すると、その生存期間の延長はなかった。P388/VCR細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスにおいて、エトポシドとNK-250の併用投与は、エトポシド単独の同用量での効果に比べて、その生存期間を有意に延長させた。P388/VCR細胞を腹腔内に移植したマウスに、エトポシドを腹腔内に、NK-250を経口投与した併用療法では、60日以上の生存例が認められた。Fig.18BにはP388/VCRを腹腔内に移植したマウスに、エトポシドを腹腔内に、NK-250を経口投与した治療実験の例を示した。しかし、エトポシド単独投与による生存期間の延長作用で、P388/VCR移植マウスでの治療効果は、P388/S移植マウスでの効果に比べて劣り、in vivoで弱い交差耐性があることが示唆された（Fig.18）。

一方、エトポシド単独での静脈内投与では、P388/VCR細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスの生存期間を、有意に延長することはなかった（Table 14）。P388/VCR移植マウスでのエトポシドの静脈内投与での抗癌効果は、腹腔内投与での同じ用量での効果に比べて弱かった。しかし、これら２つの経路による投与回

Table. 14. Effects of NK-250 on antitumor activity of etoposide in VCR-resistant P388/VCR-bearing mice.[a]

		Etoposide: IP administration[b]			*Etoposide: IV administration*[b]		
		IP inoculation[c]		*IV inoculation*	*IP inoculation*		*IV inoculation*
Etoposide ($mg\ kg^{-1}$)	*NK-250* ($mg\ kg^{-1}$)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)	*Survival time* (*Range*)	*T/C survivors* (%)
0	0	9.3 (9–10)[e]	100	9.4 (8–14)	100	9.9 (7–11)	100	9.8 (9–11)	100
0.3	0	12.2 (11–13)	131	9.2 (9–10)	98	–	–	–	–
0.3	300	15.7 (14–17)	169***	11.5 (11–14)	122**	–	–	–	–
1.0	0	12.7 (11–14)	137	9.5 (9–11)	101	10.5 (9–14)	106	10.2 (10–11)	104
1.0	300	23.3 (18–27)	251**	16.0 (14–18)	170***	15.3 (14–18)	155***	15.2 (14–16)	155***
3.0	0	15.2 (14–16)	163	11.7 (10–20)	124	10.8 (9–12)	109	10.3 (10–11)	105
3.0	100	20.7 (17–23)	223***	15.8 (14–17)	168	–	–	–	–
3.0	200	34.2 (16–60)	367*	1/6[f] 23.3 (18–34)	248**	15.7 (14–18)	159***	17.2 (16–20)	176***
3.0	300	28.2 (8–60)	303	1/6 25.2 (7–46)	268	16.8 (12–20)	170**	19.8 (17–23)	202***

[a]Male $CD2F_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells or i.v. with 10^5 cells of P388/VCR cell line on day 0. The control group consisted of 11–17 mice, the etoposide alone group consisted of six or 12 mice and the group treated with etoposide and NK-250 consisted of six mice. NK-250 was given p.o. daily from day 1 to 5. [b]Etoposide was given i.p. daily from day 1 to 5. [c]Etoposide was given i.v. on day 1, 3 and 5. [d]Inoculation of P388/VCR cells. [e]Mean survival days and the range of survival days. The survival time for mice surviving more than 60 days was taken as 60 days. [f]–: not tested. [g]Significantly different from the respective result with the same dose of the etoposide alone group by Student's and Cochran's *t*-test; $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$. [h]The number of mice surviving 60 days/the number of mice treated.

数は異なっている。静脈内投与でのエトポシドと共にNK-250を経口投与すると、P388/VCR細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスの生存期間を、有意に延長させた。

第９節　P388/SまたはP388/VCR移植マウスでのエトポシドとNK-252との併用効果

Table 15. Effects of NK-252 on Antitumor Activity of etoposide in P388/VCR-bearing mice.[a]

Cells	*Etoposide* (*mg kg*$^{-1}$)	*NK-252* (*mg kg*$^{-1}$)	*Survival time* (*Range*)	*T/C* (*%*)	*Survivors*
P388/S					
	0	0	8.4 (8–9)[b]	100	
	0.3	0	13.4 (12–15)	160	
	0.3	300	15.0 (12–17)	179	
	1.0	0	15.8 (13–18)	188	
	1.0	300	20.2 (15–27)	240	
	3.0	0	20.8 (18–25)	248	
	3.0	200	31.3 (22–60)	373	1/6[c]
	3.0	300	39.7 (23–60)	473*[d]	2/6[c]
P388/VCR					
	0	0	9.3 (9–10)	100	
	0.3	0	12.2 (11–13)	131	
	0.3	300	12.8 (10–14)	138	
	1.0	0	12.7 (11–14)	137	
	1.0	300	15.3 (14–17)	165**	
	3.0	0	15.2 (14–16)	163	
	3.0	200	17.7 (15–19)	190**	
	3.0	300	19.8 (17–24)	213**	

[a]Male $CD2F_1$ mice were inoculated i.p. with 10^6 cells of P388/S and P388/VCR cell line on day 0. The control group consisted of 11–13 mice, the etoposide alone group consisted of six to 12 mice and the group treated with etoposide and NK-252 consisted of six mice. NK-252 were given p.o. daily from day 1 to 5. Etoposide was given i.p. daily from day 1 to 5. [b]Mean survival days and the range of survival days; The survival time for each survival mouse was calculated at 60 days. [c]The number of mice surviving 60 days/the number of mice treated. [d]Significantly different from the respective result with the same dose of the etoposide alone group by Student's and Cochran's *t*-test; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

もう一つのdihydropyridine誘導体であるNK-252について、エトポシドとの併用による抗癌効果を、薬剤感受性または薬剤耐性白血病細胞移植マウスを用いて検討した。エトポシドを腹腔内投与し、同時にNK-250を経口投与した併用療法では、同用量でのエトポシド単独の治療効果に比較して、P388/S細胞を腹腔内に移植したマウスで、有意にその生存期間を延長した（Table 15）。しかし、その延命効果はNK-250より弱かった。P388/S細胞を腹腔内に移植したマウスに、エトポシドとNK-252を併用投与した場合に、 60日以上の生存例が認められた。 一方、P388/VCR移植マウスでのエトポシドとNK-252との併用療法では、同用量でのエトポシド単独の治療効果に比較して、有意にその生存期間を延長したが、その延命効果はNK-250より弱かった。

第１０節　小括ならびに考察

ベラパミル[21]、イソプレノイド[46]、ビタミンＡ[50]などは、in vivoで腹腔内投与により抗癌剤に対する耐性を克服できる。これらの薬剤を抗癌剤と組み合わせた時の抗癌作用増強効果は、実際的な癌化学療法において確かめられてはいない。これらの薬剤以外にも多くの薬剤について抗癌作用増強効果が報告がされている。 Kamiwatariら[56]やYoshinariら[57]はそれぞれ、細胞培養系で、dihydropyridine化合物のいくつかが多剤耐性を克服することを報告している。これらの化合物の化学構造は、NK-250やNK-252とは、1,4-dihydropyridine骨格の3,4,5位でまったく異なった置換基であり、それらのin vivoでの効果はまだわかってはいない。Shinodaら[58]は、ニフェジピンの誘導体で、別な1,4-dihydropyridine化合物であるAHC-52が、P388/VCR細胞でのＶＣＲ耐性を完全に克服でき、 P388/VCR移植マウスを用いたＶＣＲとAHC-52との併用療法で、T/C値が206％であることを報告した。カルシウム拮抗作用がニフェジピンより弱いAHC-52は、NK-250や

NK-252とは構造的類似性がみられるが、AHC-52の1、4-dihydropyridine骨格の3、4、5位の置換基は、NK-250やNK-252の置換基とは大きく異なっている。1、4-dihydropyridine化合物に関する、それぞれ別の研究は、実際的使用に適する副作用のない、強い耐性克服薬剤を見出すかもしれない。

薬剤感受性または薬剤耐性癌細胞を移植した動物モデルを用いての治療実験は、薬剤耐性を克服する薬剤の効果を検討するためにしばしば採用されている。多くの実験は腫瘍細胞の移植と化学療法剤の投与での両方で、同じ経路（たとえば、腹腔内による経路）で実施されている。実験治療モデルの確立のためには、腫瘍細胞の移植と化学療法剤の投与での経路を、変化させることが必要である。本章では、最も有望なdihydropyridine化合物としてNK-250とNK-252とを選択し、多剤耐性細胞であるP388/VCRを用いて、種々の抗癌剤の耐性を克服できることを述べてきた。第２章ではNK-250またはNK-252をP388/VCR移植マウスの腹腔内に投与すると、その生存期間を延長させ、T/V値で130％以上であった。本章では、P388/VCR移植マウスに、NK-250またはNK-252を経口投与し、種々の抗癌剤（ＶＣＲ、ＶＬＢ、ＶＤＳ、ＡＣＤ、エトポシド）の組み合わせ治療により、抗癌剤の作用を有意に増強した。しかしデータは示していないが、アドリアマイシンとＮＫ化合物との組み合わせでは、わずかな増強作用しかみられなかった。

本章では、NK-250またはNK-252を経口で、エトポシドを腹腔内または静脈内で併用投与した時に、P388/S細胞を腹腔内または静脈内に移植したマウスの生存期間を、ＶＣＲやＡＣＤとの併用投与の時よりも、強く延長したことを示した。エトポシド単独での抗癌作用は、P388/S細胞の移植の経路を腹腔内から静脈内に変えることで、大きく減弱した。エトポシド（腹腔内または静脈内投与）とNK-250またはNK-252（経口）との組み合わせ療法では、P388/S細胞の移植経路にかかわらず、60日以上の生存例が認められた。従って、NK-250およびNK-252はエトポシドの抗癌作用を増強することが明らかに認められた。一方、本章では薬剤耐性癌

細胞移植マウスに対しても、NK-250およびNK-252はＶＣＲやＡＣＤとの併用投与の時よりも、エトポシドの作用を効果的に増強することを示した。P388/VCR移植マウスでの移植経路やエトポシドの投与経路を変化させても、NK-250との組み合わせで、エトポシドの抗癌作用を回復させた。

セファランチン、ベラパミル、レセルピン、イソプレノイドのような多剤耐性を克服する薬剤は、細胞表面にあるＰ－糖蛋白質が介在する排出ポンプとしての機能を阻害し、［^{125}I］ビンデシンや［^{3}H］アジドピンでのＰ－糖蛋白質への光親和性結合標識を阻害する[28,33,59-61]。NK-250やNK-252および他の強い耐性克服作用を持つdihydropyridine化合物は、ヒトＫＢ癌細胞由来の多剤耐性細胞系である、ＫＢ-Ｃ１やＶＪ-３００の細胞膜のＰ－糖蛋白質への、［^{125}I］ビンデシンや［^{3}H］アジドピンでの光親和性標識を阻害する[22,34]。本章ではさらに、NK-250およびNK-252が、P388/VCR細胞膜小胞体のＰ－糖蛋白質への光親和性標識を、ほぼ完全に阻害することを示した。多剤耐性癌細胞に交差耐性を示す抗癌剤は、Ｐ－糖蛋白質への特異的な親和性を示すと思われるが、P388/VCRのＰ－糖蛋白質への特異的な親和性は、本章で示した抗癌剤のあいだでは異なることが明らかになった。一般に多剤耐性細胞ではポドフィロトキシン系抗癌剤であるエトポシドやテニポシドに対する耐性度は、アンスラサイクリンやビンカアルカロイド等の耐性度に比べると、相対的に低い[6,62]。Ｐ－糖蛋白質はP388/VCR細胞では発現しているが、P388/S細胞では発現していない[53]。P388/VCR白血病細胞を移植したマウスはP388/S白血病細胞を移植したマウスに比べて、エトポシドによる治療において約３倍耐性である（Fig.18）。しかし、ＶＣＲに対しては強い耐性が認められている（Fig.16）。このことは本章で用いた薬剤耐性モデルが、エトポシドに対して、非常に低い耐性度であることを示している。Ｐ－糖蛋白質に対する親和性に対し各抗癌剤に差があることが、P388/VCR移植マウスで、NK-250またはNK-252が増強する効果の差に影響を及ぼしているかもしれない。薬剤代謝機

構の違いや、抗癌剤の作用部位の違いのような他の可能性もまた、ＮＫ化合物による増強作用の差になっているのかもしれない。

NK-250またはNK-252は、in vitroでの薬剤感受性のP388/S細胞で、ＶＣＲやエトポシドの作用を増強し、さらにin vivoでのP388/S移植マウスでのＶＣＲ、ＶＬＢ、ＶＤＳ、ＡＣＤ、エトポシドの作用も増強した。Yalowichら[63-65]は強い多剤耐性克服薬剤であるベラパミルが、培養系での薬剤感受性細胞での、ＶＣＲやエトポシドの効果を増強することを報告している。ＶＣＲやエトポシドの効果増強の機序のひとつの理由として、彼等は、培養系での薬剤感受性細胞中の抗癌剤の蓄積をベラパミルが高めていることを示している。Slaterら[66]もまた、in vivoと同様にin vitroで、薬剤感受性または薬剤耐性の白血病細胞に対して、ベラパミルがエトポシドの効果を増強できることを報告している。ベラパミルによるエトポシドの効果増強が、どのような機序によるものかは明確ではない。NK-250およびNK-252に関する報告[55]で、これらの化合物が、in vitroでの薬剤感受性またはその多剤耐性の両細胞系を用いて、標識したエトポシドの細胞内蓄積を増加させることを示している。しかし、ＮＫ化合物はエトポシドの細胞外への排出は阻害しなかった（未発表データ）。従って、薬剤感受性腫瘍細胞に対しての、NK-250またはNK-252の種々の抗癌剤の効果増強作用の機序として、Ｐ－糖蛋白質が媒介する薬剤排出の阻害作用の関与は、もしあるにしても、ごく僅かであろう。むしろ、腫瘍細胞内へ抗癌剤の輸送を高めることが主な機序と考えられる。しかし、dihydropyridine化合物が誘導する抗癌剤の作用増強は明らかでなく、今後の重要な研究課題である。これまで述べてきた、NK-250またはNK-252に代表されるdihydropyridine化合物は、in vivoでの薬剤感受性および薬剤耐性の両腫瘍で、抗癌剤の作用を亢進させる点で、独特の薬剤であると考えられる。

結論

癌に対する化学療法が近年大きく進展し、実際に白血病などの一部の癌は治癒可能な疾病となったが、化学療法には抗癌剤耐性という大きな障害が残されている。耐性を克服し、化学療法をより有効な治療法とするためには、耐性のメカニズムを解明すると共に、副作用がなく、有効な耐性克服薬剤を見いだす必要がある。鶴尾ら[19]はカルシウム拮抗剤が多剤耐性を克服することを報告したが、これらの薬剤は、耐性克服作用を発現する前に、本来の薬理作用が発現し、そのまま耐性克服剤とするには大きな障害となっている。本研究において著者は、多くの新規合成dihydropyridine化合物について耐性克服作用のスクリーニングを実施し、強い耐性克服作用を持ち、副作用の少ない化合物を検索した。

新規合成dihydropyridine化合物ついて、in vitroでの耐性克服スクリーニングでは有効と思われる化合物は、２４個中１３化合物であり、化合物の分子全体の脂溶性が関与していることが示唆された。これらの化合物の作用機序は、Ｐ－糖蛋白質が発現している耐性細胞からの、抗癌剤の細胞外排出を抑制することによると考えられた。これらの化合物の、Ｐ－糖蛋白質への光親和性結合標識の阻害の程度は、耐性克服作用の程度と相関があることが認められた。さらに新規合成dihydropyridine化合物を加えたin vivoでの耐性克服スクリーニングでは、５７個中６化合物が有効であったが、その中の２化合物はカルシウム拮抗作用が強いことが認められ、４化合物が有効と思われた。しかし、それらの分子全体の脂溶性はあまり高くなく、脂溶性との関連は少ないと思われる。また多くのカルシウム拮抗作用を持つ薬剤が、耐性克服作用を示しているが、本研究においては、耐性克服効果の強さは、カルシウム拮抗作用の強さとも関連が少ないと認められた。Dihydropyridine化合物の分子構造においては、3、5位がpyridylalkyl ester基の導入が、耐性克服効果の発現に好ましいと思われた。このin vivoでの耐性克

服スクリーニングでの結果と、Ｐ－糖蛋白質への光親和性ラベル化の阻害の程度は、緊密な相関があることが認められた。次に、この４化合物の中で２化合物について、経口投与による有効性を、種々の抗癌剤について検討した。マウス白血病系多剤耐性細胞に対し、交差耐性を示す、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンおよびアクチノマイシンＤについて、この２つのdihydropyridine化合物は強い耐性克服作用を示すことが明らかとなった。また、抗癌剤感受性細胞においても、抗癌作用の増強が認められ、その機序は不明であるが、独特の性質を持つ薬剤であると考えられる。しかし、多剤耐性細胞に対し交差耐性を示すアドリアマイシンについては、効果が認められなかった。この２化合物はマウス白血病系多剤耐性細胞のＰ－糖蛋白質への光親和性標識活性に対する阻害効果が強く、耐性克服作用との相関性が再度認められた。マウス白血病系多剤耐性細胞は、エトポシドについても弱い交差耐性が認められ、さらに、細胞の移植経路やエトポシドの投与経路を変化させることにより、その耐性の程度は強くなった。この特別なモデルにおいても、２つのdihydropyridine化合物は、強い耐性克服作用と抗癌作用の増強作用を示した。

２つのdihydropyridine化合物が強い耐性克服作用を示す作用機序については、抗癌剤の排出ポンプとしてのＰ－糖蛋白質の機能を阻害することで説明できるが、Ｐ－糖蛋白質が発現していない抗癌剤感受性細胞における増強作用についての明確な機序は不明である。この問題を解決し、耐性克服薬剤としての安全性を確認すれば、臨床に応用可能な多剤耐性克服薬剤が期待できるであろう。

謝辞

本研究に際し、大分医科大学医学部教授、九州大学医学部教授、桑野信彦先生には、研究テーマの決定から結論に至るまで、終始示唆に富んだ適確なる御指導、御助言を賜わり厚く感謝の意を表します。

また、本研究に際し、終始御指導、御助言を賜わりました大分医科大学医学部助教授、河野公俊先生、並びに有益な御助言と御協力を戴きました鹿児島大学医学部教授、秋山伸一先生、アメリカ合衆国国立癌研究所、Dr. M.M.Cornwell氏、Dr. I.Pastan氏、Dr. M.M.Gottesman氏に深謝致します。

さらに、本研究の機会を与えられ、終始御理解と御助言を賜わりました日研化学株式会社　取締役大宮研究所所長　丹羽俊夫氏、奥村昌也部長、井上陽一部長、鳥畠豊成次長、中山邦夫主席研究員、藤井邦伸主管研究員、鈴木健一主管研究員、並びに元日研化学株式会社取締役　田代生氏、　元日研化学株式会社理事　横尾邦彦氏に感謝の意を表します。

さらに、本研究の一部に有益な御助言と御協力を戴きました大分医科大学医学部生化学教室諸氏、並びに日研化学株式会社大宮研究所探索研究室　吉田洋司主任研究員、佐野哲朗研究員、合成研究室　稲田治明研究員、薬理研究室諸氏、内藤綾氏に感謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜わりました　主査　城西大学　従二和彦教授、副査　城西大学　鮫島啓二郎教授、副査　城西大学　谷　覚教授に深く感謝致します。

最後に、本研究および本論文の作成にあたり、終始御指導並びに御鞭撻を賜わりました　城西大学　薬学部教授　久恒和仁先生、並びに薬学部講師　近藤誠一先生に厚く感謝の意を表します。

実験の部

第１章　実験の部

１．細胞系と培養法

多剤耐性細胞、ＫＢ-Ｃ１（1μg/mlコルヒチンで維持したＫＢ-8-5-11-24）は、コルヒチンの濃度を増加させてヒト癌ＫＢ細胞より選択された[26,67,68]。ＫＢ-Ｃ１-Ｒ２は、コルヒチンを３ヶ月間、ＫＢ-Ｃ１の培養液に添加せずに得られた復帰変異細胞である[48]。細胞は、10％新生牛血清（Microbiological Associates社）、1 mg/ml Bactopeptone（Difco Laboratories社）、0.292 mg/ml グルタミン、100μg/ml カナマイシン、および100単位/ml ペニシリンを含むＭＥＭ（日水製薬）中に、単層培養した[47,51]。

２．実験試料

ダウノマイシン、ビンクリスチン、ビンブラスチンおよびアクチノマイシンＤはSigma社から購入した。［^{3}Ｈ］ビンクリスチンはNew England Nuclear社から購入した。

３．集落形成試験

細胞生存試験は集落形成を用いて検討した[47,48]。 300個のＫＢまたはＫＢ-Ｃ１細胞を、薬物非存在下で60mmシャーレに播いた。その16時間後、種々の薬物を添加し、37℃で10日間培養した後、集落の数を測定した。すべての薬物は使用する前に、dimethyl sulfoxideを用いて、用時調製した。 Dihydropyridine化合物の存在下または非存在下での、ＫＢ-Ｃ１細胞における10％生存時の抗癌剤濃度を、dihydropyridine化合物の非存在下でのＫＢ細胞における10％生存時の抗癌剤濃度で割った値を、相対的耐性度として算出した。Dihydropyridine化合物の用量は、ＫＢまたはＫＢ-Ｃ１細胞でのdihydropyridine化合物単独での死亡率20％以下の用量で用いた。

４．薬剤蓄積試験

細胞をシャーレあたり4×10^5個で播き、37℃で一夜培養した。そして、培養液を血清の入っていないＭＥＭに交換し、dihydropyridine化合物の存在下または非存在下で、34 nM［^{3}Ｈ］ビンクリスチンを加え60分間培養した。その後、細胞を冷リン酸緩衝液で一度洗浄し、細胞を集めた。細胞を冷リン酸緩衝液で３回洗浄し、細胞沈査を水に懸濁し、Scintisol EX-H（和光純薬）と充分に攪拌し、放射活性を測定した[47,48]。

５．薬剤の細胞外排出と細胞内流入試験

対数増殖期の細胞をシャーレあたり4×10^5個で播き、37℃で一夜培養し、培養液を交換した。細胞を34 nM［^{3}Ｈ］ビンクリスチンと共に60分間培養した。それぞれのシャーレをリン酸緩衝液で３回洗浄し、dihydropyridine化合物の存在下または非存在下で血清の入っていないＭＥＭを加え、37℃で規定時間培養し、細胞を集め、放射活性を測定した。細胞内流入試験では、細胞を播き、一夜培養し、その培養液を、ブドウ糖および血清の入っていないHanks液に交換した。細胞はdihydropyridine化合物の存在下または非存在下で、37℃で１分間培養し、66 nM［^{3}Ｈ］ビンクリスチンを加え１分間培養した。それぞれのシャーレを冷リン酸緩衝液で３回洗浄し、細胞を集め、放射活性を測定した[47,48]。

６．細胞膜分画の調製

ＫＢまたはＫＢ-Ｃ１細胞をリン酸緩衝液に浮遊させ、超音波処理し、遠沈した。沈査をショ糖密度勾配遠心分離し、細胞膜分画を調製した[27,69]。蛋白質はBradfordの方法[70]で定量した。

７．光親和性標識活性試験

各々の細胞膜分画を、dihydropyridine誘導体存在下または非存在下で、 3.8 μM [^{125}I] NASV (N-(p-azido-[3-^{125}I]-salicyl)-N'-β-aminoethylvindesine) と共に、室温で15分間培養した[25,33,71]。その試料を、25℃で20分間、366nmで照射し、sodium dodecyl sulfate ($NaDodSO_4$) に溶解した。 [^{125}I] NASVで標識した試料を $NaDodSO_4$／5%polyacrylamide／4.5 M urea、pH 7.6のゲルを用いて電気泳動して分画した[58]。

第２章　実験の部

１．実験試料

臨床用ビンクリスチンは塩野義社から購入した。塩酸ベラパミルは和光純薬から、塩酸ニカルジピンはSigma社から購入した。セファランチンは科研製薬から提供された。ＮＫ化合物は日研化学（株）大宮研究所にて合成した。ビンクリスチンは生理食塩液に溶解した。ＮＫ化合物、ベラパミルおよびニカルジピンは、0.1%Tween 80を含む 0.5%carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC) に懸濁した。その懸濁液と規定の濃度のビンクリスチン液を混和し、動物の腹腔内に、体重1gあたり0.01mlの割合で投与した。

２．実験動物

体重22～25 g、6～8週令の雄性BALB/c×DBA/2 ($CD2F_1$) マウスは日本チャールスリバー社から購入した。体重250～300 g、10～14週令の雄性Wistarラットは静岡実験動物農業協同組合から購入した。体重250～300 g、16～17週令の雄性の自然発症高血圧ラット (SHR) は、日本チャールスリバー社から購入した。体重22～25 g、6週令の雄性JCL-ICRマウスは日本クレア社から購入した。動物は自由に飲食させ、温度22～24℃、湿度50～60%、１時間あたり１２回の換気の条件で飼育した。

３．実験腫瘍系

ビンクリスチン感受性のマウス白血病Ｐ３８８細胞 (P388/S) およびビンクリスチン耐性のマウス白血病Ｐ３８８細胞 (P388/VCR) は稲葉実博士（癌研）より分与された[72]。各細胞は１週ごとに、$CD2F_1$マウスの腹腔内に移植して、維持した。

４．抗癌作用の評価

$CD2F_1$マウスの腹腔内に、10^6個のP388/SまたはP388/VCR細胞を含む、希釈した腹水液を0.2 mlに調製して移植した。ビンクリスチンは30μg/kgで、ＮＫ化合物は100 mg/kgで、移植１日後より５日間の毎日、１日１回、腹腔内に投与した。また、各薬剤用量および投与期間は、実験ごとに適宜増減した。抗癌活性は、それぞれの群の平均生存日数により評価し、対照群に対する生存率（T/C％）およびビンクリスチン単独投与群に対する生存率（T/V％）で示した。平均生存日数のデータは Student t 両側検定により解析し、２群間の分散に差がある場合は Cochran t 両側検定により解析し、Ｆ検定により有意差を求めた。

５．カルシウム拮抗作用の評価

ＮＫ化合物および他の薬剤のカルシウム拮抗作用は、ラット直腸を用いて、高濃度カリウムによる脱分極による拘縮（カリウム拘縮）に対する阻害作用にて測定した[73]。直腸断片（約1.5 cm）をWistarラットより摘出し、ロック液（ 154 mM NaCl、5.63 mM KCl、 2.16 mM $CaCl_2$、 2.12 mM $MgCl_2$、 5.95 mM $NaHCO_3$、2.77 mM glucose）で満たした反応槽に1.0 gの張力で固定し、温度37℃、95% O_2および5% CO_2ガスを通気し、その拘縮は張力計（SB-1T、日本光電）にて測定した。高濃度カリウムのロック液はNaClに変えて等モルのKClで調製した。標本をロック液中で45分間安定化し、高濃度カリウム液を5分間処理し、カリウム拘縮を誘導し、ロック液で洗浄した。 カリウム拘縮が一定になった後、 dimethyl sufoxideで溶解した（最終濃度は0.4%）規定濃度のＮＫ化合物および種々の薬物を含むロック液で、５分間処理した。その後、規定濃度の被験化合物を含む高濃度カリウムのロック液でカリウム拘縮を誘導した。

６．血圧降下作用

ＳＨＲの収縮期血圧を意識下で、尾動脈からの非観血的血圧測定装置（KM-209、夏目製作所）を用いて測定した。測定の前に、脈波を検出しやすくするために、55℃で５分間、ラットを予熱した。測定はＮＫ化合物および種々の薬物を経口または腹腔内に単回投与し、その直前および60分後に実施した。

７．急性毒性作用

JCL-ICRマウスを数群に分別し、一群あたり4～5匹とした。死亡率はＮＫ化合物を腹腔内に単回投与し、10日間観察することにより求めた。LD_{50}値はprobit法で算出した。

８．光親和性標識活性試験

［^{125}I］NASVの代わりに、［^{3}H］アジドピン（日本アマシャム）を用いて、第１章７と同様に実施した。

第３章　実験の部

１．実験試料

培養系で用いたビンクリスチンはSigma社から購入した。動物治療実験で用いた臨床用ビンクリスチンとビンデシンは塩野義社から購入した。ビンブラスチンは杏林製薬から、アクチノマイシンＤは万有製薬から購入した。臨床用エトポシドは日本化薬社から購入した。［^{3}H］アジドピンは日本アマシャムから購入した。NK-250およびNK-252は日研化学（株）大宮研究所にて合成した。その化学構造は総論の部、第３章のFig.13に示した。抗癌剤は生理食塩液に溶解し、ＮＫ化合物は0.1％Tween 80を含む 0.5％carboxymethyl cellulose sodium salt（CMC）に懸濁して用いた。

２．実験動物

体重22～25 g、6～8週令の雄性BALB/c×DBA/2（CD2F$_1$）マウスは日本チャールスリバー社から購入した。動物飼育条件は第２章２と同様である。

３．実験腫瘍系

第２章３で示したP388/SおよびP388/VCR細胞を用いた。培養系では、10％牛胎児血清（Flow Laboratories社）、10μM 2-hydroxyethyl disulfide （Aldrich Chemical社）および100μg/ml カナマイシンを含む、RPMI-1640（Grand Island Biological社）中で浮遊させて培養した。

４．培養系細胞増殖抑制試験

P388/SまたはP388/VCR細胞は、各細胞を移植したマウスから、移植後6、7日目に採取し、RPMI-1640培養液に浮遊させ、種々の薬剤を混和させ、5×10^{4}個／ml

で播き、37℃で２日間培養した。0.25％トリプシンを含むカルシウムおよびマグネシウムの入ってないリンゲル液4mlに、細胞浮遊液1mlを加え、37℃で５分間培養した。細胞数はZB1モデルコールターカウンターを用いて測定した。

５．光親和性標識活性試験

P388/VCR細胞を用いて、また［^{125}I］NASVの代わりに、［^{3}H］アジドピン（日本アマシャム）を用いて、第１章７と同様に実施した。

６．抗癌作用の評価

第２章４と同様に実施した。抗癌剤は腹腔内投与の場合は、移植１日後より５～１０日間の毎日投与し、静脈内投与の場合は、移植１日後より１、３、５日目に３回投与した。ＮＫ化合物は経口で、移植１日後より５～１０日間毎日投与した。マウスの観察は移植後６０日目までとした。

引用文献

1) H.L. Davis and T.E. Davis (1979) Cancer Treat. Rep., 63, 809-815.

2) M. Lane (1989) Fed. Proc., 38, 103-107.

3) T. Tsuruo (1988) Jpn. J. Cancer Res., 79, 285-289.

4) I. Pastan and M.M. Gottesman (1987) New Eng. J. Med., 316, 1388-1393.

5) G. Bradley, P.F. Juranka and V. Ling (1988) Biochem. Biophys. Acta, 948, 87-128.

6) W.T. Beck (1987) Biochem. Pharmacol., 36, 2879-2887.

7) D.R. Bell, J.H. Gerlach, N. Kartner, R.N. Buick and V. Ling (1985) J. Clin. Oncol., 3, 311-315.

8) M.M. Gottesman and I. Pastan (1988) Trends Pharmacl. Sci., 9, 54-58.

9) K. Kohno, J. Kikuchi, S. Sato, H. Takano, Y. Saburi, K. Asoh and M. Kuwano (1988) Jpn.J. Cancer Res., 79, 1238-1246.

10) A.T. Fojo, S. Akiyama, M.M. Gottesman and I. Pastan (1985) Cancer Res., 45, 3002-3007.

11) M. Inaba, H. Kobayashi, Y. Sakurai and R.K. Johnson (1979) Cancer Res., 39, 2200-2203.

12) M.M. Gottesman and I. Pastan (1988) J. Biol. Chem., 263, 12163-12166.

13) 植田和光 (1988) 蛋白質,核酸,酵素, 33, 1287-1299.

14) 木岡紀幸、駒野徹、植田和光 (1990) 腫瘍と感染, 6, 443-447.

15) L.J. Goldstein, H. Galski, A.T. Fojo, M. Willingham, S.L. Lai, A. Gazdar, R. Pirker, A. Green, W. Crist, G.M. Brodeur, M. Lieber, J. Cossman, M.M. Gottesman and I. Pastan (1989) J. Natl. Cancer Inst., 81, 116-124.

16) A.T. Fojo, K. Ueda, D.J. Slamon, D.G. Poplack, M.M. Gottesman and I. Pastan (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 265-269.

17) F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M.M. Gottesman, I. Pastan and M.C. Willingham (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7735-7738.

18) I. Sugawara, I. Kataoka, Y. Morishita, H. Hamada, T. Tsuruo, S. Itoyama and S. Mori (1988) Cancer Res., 48, 1926-1929.

19) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai (1981) Cancer Res., 41, 1967-1972.

20) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai (1982) Cancer Res., 42, 4730-4733.

21) T. Tsuruo, H. Iida, M. Nojiri, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai (1983) Cancer Res., 43, 2905-2910.

22) I. Nogae, K. Kohno, J. Kikuchi, M. Kuwano, S. Akiyama, A. Kiue, K. Suzuki, Y. Yoshida, M.M. Cornwell, I. Pastan and M.M. Gottesman (1989) Biochem. Pharmacol., 38, 519-527.

23) N. Shiraishi, S. Akiyama, M. Kobayashi and M. Kuwano (1986) Cancer Letter, 30, 251-259.

24) S. Akiyama, M.M. Cornwell, M. Kuwano, I. Pastan and M.M. Gottesman (1988) Mol. Pharmacol., 33, 144-147.

25) M.M. Cornwell, A.R. Safa, R.L. Felsted, M.M. Gottesman and I. Pastan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3847-3850.

26) S. Akiyama, A.T. Fojo, J.A. Hanover, I. Pastan and M.M. Gottesman

(1985) Cell Mol. Genet., 11, 117-126.

27) M.M. Cornwell, M.M. Gottesman and I. Pastan (1987) J. Biol. Chem., 261, 7921-7928.

28) M.M. Cornwell, I. Pastan and M.M. Gottesman (1987) J. Biol. Chem., 262, 2166-2170.

29) T. Tsuruo, H. Kawabata, N. Nagumo, H. Iida, Y. Kitatani, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai (1985) Cancer Chemother. Pharmacol., 15, 16-19.

30) P. Gros, J. Croop and D. Housman (1986) Cell, 47, 371-380.

31) C. Chen, J.E. Chin, K. Ueda, D.P. Clark, I. Pastan, M.M. Gottesman and I.B. Roninson (1986) Cell, 47, 381-389.

32) M. Kuwano, M. Nakagawa, N. Shiraishi, T. Yamaguchi, J. Kikuchi and S. Akiyama (1986) Cancer Drug Resistance (Ed. Hall T.),163-171.

33) A.R. Safa, C.J. Glover, J.L. Swell, M.B. Meyers, J.L. Biedler and R.L. Felsted (1987) J. Biol. Chem., 262, 7884-7888.

34) A. Kiue, T. Sano, K. Suzuki, H. Inada, M. Okumura, J. Kikuchi, S. Sato, K. Kohno and M. Kuwano (1990) Cancer Res., 50, 310-317.

35) A.M. Rogan, T.C. Hamilton and R.C. Young (1984) Science, 224, 994-996.

36) P. Ince, D.R. Appleton, K.J. Finny, J.P. Sunter and A.J. Watson (1986) Br. J. Cancer, 53, 137-139.

37) J.R. Warr, F. Brewer, M. Anderson and J. Fergusson (1986) Cell Biol. Int. Rep., 10, 389-399.

38) C. Delaporte, J.Y. Charcosset and A. Jacquemin-Sablon (1988) Biochem. Pharmacol., 37, 613-619.

39) D. Kessel and C. Wilberding (1985) Cancer Res., 45, 1687-1691.

40) 本田利雄、三比和美、服部理男 (1983) 癌と化学療法, 10, 2330-2334.

41) M.S. Cario, S. Anas and L. Sender (1989) Cancer Res., 49, 1063-1066.

42) V.H. Haas and G. Hartfelder (1962) Arzneim. Forsh., 12, 549-558.

43) 小谷吉春、佐渡卓朗 (1979) 応用薬理, 18, 301-307.

44) R. Ganapathi and D. Grabowski (1983) Cancer Res., 43, 3696-3699.

45) S. Akiyama, N. Shiraishi, Y. Kuratomi, N. Nakagawa and M. Kuwano (1986) J. Natl. Cancer Inst., 76, 839-844.

46) T. Yamaguchi, N. Nakagawa, N. Shiraishi, T. Yoshida, T. Kiyosue, M. Arita, S. Akiyama and M. Kuwano (1986) J. Natl. Cancer Inst., 76, 947-953.

47) M. Nakagawa, S. Akiyama, T. Yamaguchi, N. Shiraishi, J. Ogata and M. Kuwano (1986) Cancer Res., 46, 4453-4457.

48) N. Shiraishi, S. Akiyama, M. Nakagawa, M. Kobayashi and M. Kuwano (1987) Cancer Res., 47, 2413-2416.

49) S. Komiyama, K. Matsui, S. Kudoh, I. Nogae, Y. Kuratomi, Y. Saburi, K. Asoh, K. Kohno and M. Kuwano (1989) Cancer, 63, 675-681.

50) I. Nogae, J. Kikuchi, T. Yamaguchi, M. Nakagawa, N. Shiraishi and M. Kuwano (1987) Br. J. Cancer, 56, 267-272.

51) J. H. Gerlach, J.A. Endicott, P.F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K.L. Deuchars and V. Ling (1986) Nature, 324, 485-489.

52) M.C. Willingham, M.M. Cornwell, C.O. Cardarelli, M.M. Gottesman and I. Pastan (1986) Cancer Res., 46, 5941-5946.

53) A. Kiue, T. Sano, A. Naito, H. Inada, K. Suzuki, M. Okumura,

J. Kikuchi, S. Sato, H. Takano, K. Kohno and M. Kuwano (1990) Jpn. J. Cancer Res., 81, 1057-1064.

54) A. Kiue, T. Sano, A. Naito, M. Okumura, K. Kohno and M. Kuwano (1991) Br. J. Cancer, 64, 221-226.

55) Y. Watanabe, H. Takano, A. Kiue, K. Kohno and M. Kuwano (1991) Anti-Cancer Drug Des., 6, 47-57.

56) M. Kamiwatari, Y. Nagata, H. Kikuchi, A. Yoshimura, T. Sumizawa, N. Shudo, R. Sakoda, K. Seto and S. Akiyama (1989) Cancer Res., 49, 3190-3195.

57) T. Yoshinari, Y. Iwasawa, K. Miura, I.S. Takahashi, T. Fukuroda, K. Suzuki and A. Okura (1989) Cancer Chemther. Pharmacol., 24, 367-370.

58) H. Shinoda, M. Inaba and T. Tsuruo (1989) Cancer Res., 49, 1722-1726.

59) S. Akiyama, A. Yoshimura, H. Kikuchi, T. Sumizawa, M. Kuwano and Y. Tahara (1989) Mol. Pharmacol., 36, 730-735.

60) P.G. Debenham, K. Kartner, L. Siminovitch, J.R. Riordan and V. Ling (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 881-884.

61) A.R. Safa (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7187-7191.

62) M.K. Danks, J.C. Yalowich and W.T. Beck (1987) Cancer Res., 47, 1297-1301.

63) J.C. Yalowich and W.E. Ross (1984) Cancer Res., 44, 3360-3365.

64) J.C. Yalowich and W.E. Ross (1985) Cancer Res., 45, 1651-1656.

65) J.C. Yalowich, J.R. Zucali, M.A. Gross and W.E. Ross (1985) Cancer Res., 45, 4921-4924.

66) L.M. Slater, S.L. Murray, M.W. WetZel, P. Sweet and M. Stupecky (1986) Cancer Chemther. Pharmacol., 16, 50-54.

67) D.W. Shen, C. Cardarelli, J. Hwang, M.M. Cornwell, N. Richert, S. Ishii, I. Pastan and M.M. Gottesman (1986) J. Biol. Chem., 261, 7762-7770.

68) D.W. Shen, A.T. Fojo, J.E. Chin, I.B. Roninson, N. Richert, I. Pastan and M.M. Gottesman (1986) Science, 232, 643-645.

69) J.E. Lever (1977) J. Biol. Chem., 252, 1990-1997.

70) M.M. Bradford (1976) Anal. Biochem., 72, 248-254.

71) A.R. Safa and R.L. Felsted (1987) J. Biol. Chem., 262, 1261-1267.

72) M. Inaba, R. Fujikura and Y. Sakurai (1979) Jpn. J. Cancer Res., 70, 607-613.

73) T. Magaribuchi, H. Nakajima and A. Kiyomoto (1977) Jpn. J. Pharmacol., 27, 333-339.