

Rhodamine 123 のヒト由来前立腺癌培養細胞の 増殖に及ぼす影響に関する研究

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

吉 江 貫

EFFECTS OF RHODAMINE 123 ON THE CELL GROWTH OF HUMAN PROSTATE CARCINOMA CELLS IN VITRO AND IN VIVO

TOHRU YOSHIE

Department of Urology, Nara Medical University

Received September 29, 1995

Abstract: A lot of novel chemotherapeutic agents have been developed recently, improving the management of urogenital carcinomas. However, effective chemotherapy has not yet been established for advanced renal cell carcinoma and hormone relapsing prostate carcinoma. Most of the chemotherapeutic agents target DNA in tumor cells; therefore, the new agents functioning in different mechanisms to inhibit tumor cell growth are expected for the treatment of these carcinomas.

Rhodamine 123 (Rh), a red fluorescent dye, has the property to accumulate more and be retained longer in the mitochondria of malignant transformed cells than in those of normal cells.

In this study, the suppressive effect of Rh on the growth of cultured prostate carcinoma cells (PC-3 and LNCaP) was examined in vitro and in vivo.

Rh suppressed the growth of PC-3 and LNCaP cells significantly. The accumulation and retention of Rh in PC-3 cells was demonstrated both in vitro and in PC-3 tumor cells implanted in nude mice. Methylglyoxal Bis(guanylhydrazone) (MGBG) and 2-deoxy-D-glucose (2 DG) suppressed the growth of PC-3 and LNCaP cells when each was administered in combination with Rh; namely, these agents seem to modulate the suppressing effect of Rh on the growth of tumor cells.

These results indicate that Rh has the potential to be an anticancer agent against prostate carcinomas.

Index Terms

rhodamine 123, cell growth, human prostate carcinoma cells, 2-deoxy-D-glucose, methylglyoxal bis (guanylhydrazone)

緒 言

今日、尿路性器癌に対する治療成績は集学的治療体系の普及により向上し、特に化学療法が有効である精巣癌、膀胱癌の治療成績は飛躍的に向上している¹⁾²⁾。一方、抗

男性内分泌療法や免疫療法が開発されてはいるものの、有効な化学療法が確立していない前立腺癌や腎細胞癌では十分に成績をあげていないのが現状である³⁾⁴⁾。前立腺癌に対する抗男性内分泌療法は初期治療として80%以上の症例で有効であるが、その半数以上が3年以内に再

燃する。このような再燃癌やホルモン不応癌に対する治療は姑息的な治療の域を出ないのが現状で⁵⁾⁶⁾、有効な抗癌剤の開発が望まれている。

現在用いられている抗癌剤は核酸を標的とするものが大半を占めている。一方、癌細胞における解糖系の異常についてはすでに多くの知見が報告されているが⁷⁾、抗癌剤として解糖系ならびにミトコンドリアにおける電子伝達、酸化リン酸化反応を標的とするものの報告は少ない。

Rhodamine 123 は赤色蛍光色素でミトコンドリアに選択的に集積する特性⁸⁾があり癌細胞では正常細胞と比較してより多く、より長時間蓄積し⁹⁾ミトコンドリア毒性を示し、癌細胞の増殖を抑制する極めて特異な特性を有することが近年、報告されている¹⁰⁾。

今回、ヒト前立腺癌細胞(PC-3, LNCaP)を用いて Rhodamine 123 の細胞増殖抑制効果を *in vitro*, *in vivo* について検討するとともに、ミトコンドリア系外での解糖系阻害剤である 2-deoxy-D-glucose(2 DG), および癌細胞増殖に必要なとされるポリアミンの合成抑制作用とともにミトコンドリア毒性をもつとされる Methylglyoxal Bis(guanyldiazide)(MGBG) の併用効果も検討したので報告する。

実験材料

①試験薬剤

Rhodamine 123 [Methyl O-(6-amino-3'imino-3 H-xanthen-9-yl) benzonate monohydrochloride, 分子量 380.83, Sigma Chemical Co., ST. Louis, U. S. A.] (以下 Rh と略す) は、脂溶性で陽性に荷電した励起波長 511 nm の赤色蛍光色素である。DMSO で溶解した後、生理食塩水で最終濃度 10 mg/ml に希釈して遮光下に冷所保存し、使用にあたって生理食塩水で適宜希釈し、培養液に添加した (Fig. 1)。

2-deoxy-D-glucose (和光純薬, 京都) (以下 2 DG と略す) は、ミトコンドリア外の解糖系阻害剤で、冷所保存し、使用にあたって生理食塩水で添加培養液中濃度が 50, 500 μ g/ml になるように希釈し培養液に添加した。

Methylglyoxal Bis(guanyldiazide) (MGBG), (Aldrich Chemi. Co, MI. U. S. A.) はミトコンドリア毒性を示すポリアミン合成阻害剤で、DMSO で 10 mg/ml に溶解し冷所保存し使用にあたって生理食塩水で適宜希釈して培養液に添加した。

②培養細胞ならびに培養条件

ヒト由来前立腺癌培養細胞としてホルモン非依存性の PC-3¹¹⁾ とホルモン依存性の LNCaP¹²⁾ (大日本製薬 cell

bank, 東京) を用いた。

培養液は、PC-3 には 7% fetal bovine serum (FBS) 添加 F12 K を、LNCaP には 10% FBS 添加 RPMI 1640 (大日本製薬 [ICN 社, オーストラリア], 大阪) を用い、それぞれ組織培養用フラスコ (Corning 25100, 岩城硝子, 船橋) 中で、37°C, 5% CO₂ の条件下に継代培養した。培養液にはそれぞれベニシリン G (萬有製薬, 東京) 100 unit/ml, 硫酸ストレプトマイシン (明治製薬, 東京) 100 μ g/ml を加えた。in vitro 実験では、原則として培養液 1 ml を添加した Falcon の 35 mm petridish に 1×10^5 細胞を播種し、24 時間後に試験薬剤を添加した。添加後 24 時間で試験薬剤無添加の培養液に交換し、それ以後の培養液交換は実験終了まで行わなかった。試験薬剤添加後 1, 3, 7, 9 日目に 0.01% EDTA 加 0.25% trypsin を用いて細胞を遊離単一化し、trypan blue 溶液と混和して、生細胞数を血球計算盤で顕微鏡下に計測した。

③実験動物

ヒト前立腺癌由来培養細胞を移植する動物は 8 週齢、体重 20 g の BALB/c AnNCrj-nu 雄性ヌードマウス (日本チャールスリバー, 神奈川) を用い、滅菌ケージに 5 匹ずつ入れ、ヌードマウス用滅菌餌を自由に摂取させた。

④細胞および組織内 Rh 濃度測定方法

Rh の細胞および組織内濃度測定は高速液体クロマトグラフィー法 (High performance liquid chromatography: HPLC) で測定した。使用したイオン交換カラムは TSK-Gef. ODS 80 TM (東洋ソーダ, 東京) を、溶離液は 60% HPLC 用エタノールを用い、カラム温度 35°C, flow rate 1.2 ml/min の条件で、蛍光検出器 (FS-8000, 東洋ソーダ, 東京) を使用して、励起波長 511 nm, 蛍光波長 575 nm で測定した。測定に先だて標準液とした Rh 溶液を用いて retention time を設定し、生体サンプルを

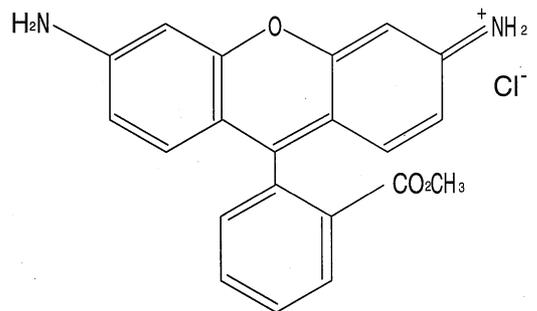


Fig. 1. The chemical structure of rhodamine 123.

測定した¹³⁾¹⁴⁾.

細胞内 Rh は AH 2 蛍光顕微鏡(オリンパス, 東京)を使用し, 波長 575 nm で観察した.

⑤統計

in vitro 実験での各数値は 3 回施行値の平均値で表示し, 各群間比較は対応のない t-検定にて行い, P 値が 0.05 以下の場合, 有意とした. また in vivo 実験の各群間の移植腫瘍体積の比較は, 対応のない t-検定にて行い, P 値が 0.05 以下の場合, 有意とした. 各群の腫瘍移植ヌードマウスの実測生存率は, Kaplan-Meier 法にて, またその検定には Generalized Wilcoxon test にて行った.

実験方法と結果

I. Rh の培養細胞内での分布と濃度に関する検討

実験 I-1: 蛍光顕微鏡による観察

方法: PC-3 を Falcon の 35 mm petridish に入れたカバーガラス上に 1×10^4 細胞を播種し, 24 時間後に最終 Rh 濃度が $5 \mu\text{g/ml}$ になるように Rh 溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加し, 24 時間経過後, Rh 無添加培養液に交換し, その 1 時間後および 72 時間後に蛍光顕微鏡で細胞内の蛍光を観察した.

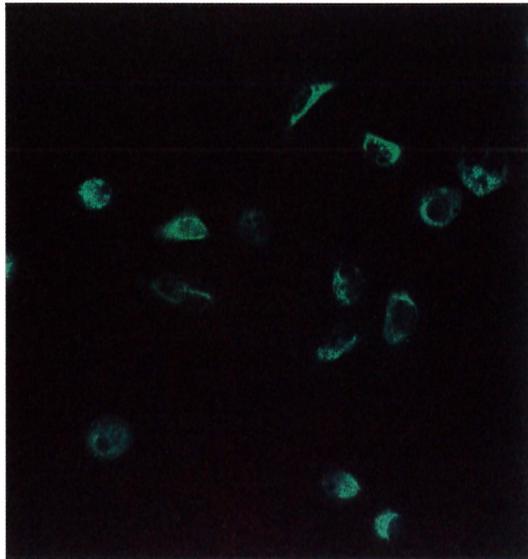
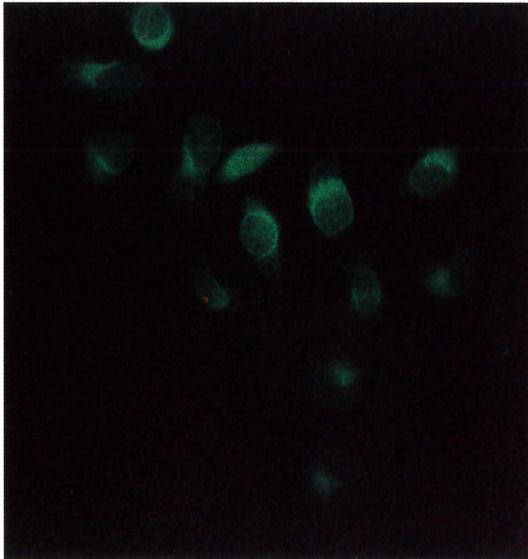
結果: Rh を 24 時間添加した PC-3 は Rh 無添加培養液に交換した 1 時間後では細胞質内に Rh の蛍光が明瞭

に確認され, 72 時間後にも同程度の蛍光が確認された. 蛍光は PC-3 の細胞質内に認めるが, 核内には認められなかった(Plate 1).

実験 I-2: HPLC による細胞内 Rh 濃度の検討

方法: PC-3 1×10^6 細胞を播種し, 4 日後に最終 Rh 濃度が $2.5 \mu\text{g/ml}$ になるように Rh 溶液 $100 \mu\text{l}$ を 24 時間添加後, 無添加培養液に交換し, 直後, 6 時間後, 24 時間後, 72 時間経過後にそれぞれ培養液を取り除き, 生理食塩水で 3 回以上洗浄した後に, trypsin で細胞の遊離単一化の処理を行い, 培養細胞を回収し細胞数を算定した. 回収した細胞を蒸留水 2 ml 中に移して, 氷中でホモジュネートし, 10 分間遠心分離し, その浮遊液 1 ml をウルトラセントリー 30(東洋ソーダ, 東京)を用いた 3500 rpm, 6 時間の遠心濾過法で除蛋白し, 得られた検体のうち $200 \mu\text{l}$ を HPLC 法で Rh 濃度を測定した. 最終的に 1×10^6 細胞に換算して標記した. なお, クロマトグラム上で生体サンプルの Rh のピークが, 標準サンプルの retention time と同一部位であることの確認には computer analyzer(CP-8000, 東洋ソーダ, 東京)を使用し, 測定ピークの解析を行い Rh 濃度を測定した¹³⁾¹⁴⁾(Fig. 2).

結果: Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$ を 24 時間添加させた直後の PC-3 1×10^6 細胞中の Rh 濃度は $12.2 \mu\text{M}$ で, 6 時間後には $7.90 \mu\text{M}$ (64.8%), 24 時間後では $7.10 \mu\text{M}$ (58.2%)



(A) PC-3 for 1 hour

(B) PC-3 for 3 days

Plate 1. Fluorescence micrographs.

Cells(PC-3) were stained with Rh($5 \mu\text{g/ml}$) for 24 hours, washed and kept in dye-free medium for 1 hour(A) and for 3 days(B).

と滞留し、72時間後では検出限界以下に低下した (Table 1).

以上の結果から、Rh はヒト前立腺癌細胞(PC-3)内に 24 時間経過後も 58.2%が滞留することが示された。

II. Rh のヒト前立腺癌培養細胞の増殖への影響を検討する in vitro 実験

Rh の添加濃度ならびに添加時間に関する予備実験を行い、PC-3、LNCaP ともに細胞播種 24 時間で増殖期に達するが、この時点の Rh の添加が 6 時間以内では、両細胞ともに有意に増殖抑制が認められなかったため、以後の実験における Rh の添加時間は 24 時間として実験を行った。

実験 II-1: Rh 単独添加による細胞増殖抑制について

方法: PC-3, LNCaP をそれぞれ 1×10^6 細胞播種した 24 時間後に培養液に Rh を添加した。添加した Rh 溶液は各濃度とも 100 μ l と一定とし、Rh 最終濃度が 0, 1.0, 2.5, 5.0 および 10 μ g/ml になるように調整して培養液に添加した。Rh を 24 時間添加させた後に、培養液を Rh 無添加培養液に交換して観察し、Rh 添加後 1 日、

3 日, 7 日, 9 日目に細胞数を算定した。

結果: PC-3 はいずれの Rh の濃度においても対照群と比較して細胞増殖が用量に依存して抑制された。10 μ g/ml 投与群では添加後 9 日目まで細胞数は減少した。1~5 μ g/ml 投与群では 3 日目までは対照群より細胞増殖は抑制される傾向がみられたが、以後はこの細胞数を保って 9 日目まで経過した。3 日目で Rh 5.0 μ g/ml 以上の群で、対照群と比較して有意の細胞増殖抑制効果 ($P < 0.05$) がみられた。また 7 日, 9 日目では Rh 1.0 μ g/ml 以上のすべての群で、対照群と比較して有意の細胞増殖抑制 ($P < 0.05$) がみられた (Fig. 3)。

LNCaP については PC-3 と同様にいずれの Rh の濃度においても対照群と比較して細胞増殖が用量に依存して抑制された。5 μ g/ml 以上の投与群では細胞数は減少し、1~2.5 μ g/ml 投与群では対照群よりは細胞増殖は抑制されるものの増殖傾向が 9 日目までみられた。また細胞は 9 日目には 7 日目と比較して、対照群を除くすべての群で再増殖する傾向がみられた。7 日, 9 日目で Rh 1.0 μ g/ml 以上のすべての群で対照群と比較して有意の細胞増殖抑制 ($P < 0.05$) がみられた (Fig. 4)。

Table 1. Intracellular concentration of Rh (μ M/ 10^6 cells) after exposure for 24hours

Cell	Pre-exposure	Time after exposure to Rh for 24hours			
		0 h	6 h	24h	72h
PC-3	N. D.	12.2	7.90	7.10	N. D.

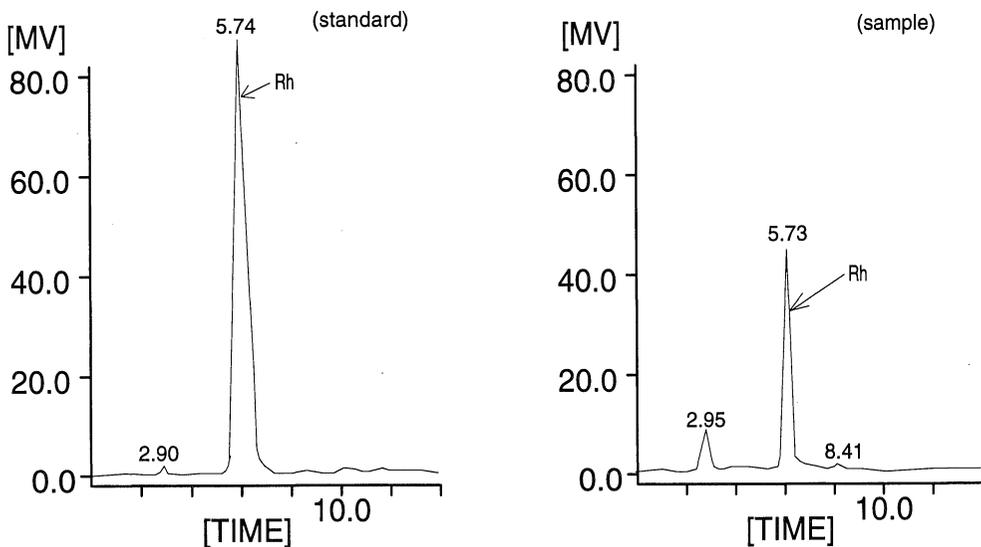


Fig. 2. Determination of Rh by HPLC.

以上の結果から、Rh は用量依存的にヒト前立腺癌由来細胞の増殖を抑制することが明らかになった。また、Rh による細胞増殖の抑制を修飾する薬剤の検討には Rh 単独では増殖抑制が軽度である $2.5 \mu\text{g/ml}$ が適切と考えられ、以後の Rh に対する chemical modulation の検討にはこの濃度を用いた。

実験 II-2: Rh の細胞増殖抑制におよぼす 2 DG, MGBG の影響

方法: 2 DG の影響について PC-3, LNCaP のいずれにもそれぞれ 1×10^5 細胞播種した 24 時間後に最終濃度 0, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ になるように 2 DG 溶液を 100 μl 加え、さらに 24 時間経過後、無添加培養液 1 ml と交換し、2 DG 添加後 1 日、3 日、7 日、9 日目の細胞数を算定した。また 2 DG 添加培養液を 24 時間経過後も 9 日目まで継続投与する群を作成して、同様に 2 DG 添加後 1 日、3 日、7 日、9 日目の細胞数を算定した。

MGBG の影響について細胞播種 24 時間後に最終濃度が 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように MGBG 溶液を 100 μl 加え、24 時間後に無添加培養液に交換し、MGBG 添加後 1 日、3 日、7 日、9 日目の細胞数を算定した。

2 DG の併用効果について Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$ と 2 DG の各濃度を 24 時間併用添加後、無添加培養液に交換し、同様に細胞増殖について検討した。さらに Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$

と 2 DG の各濃度を 24 時間併用添加後、各濃度の 2 DG 添加培養液に交換、9 日目まで継続し、同様に Rh 添加後 1 日、3 日、7 日、9 日目の細胞数を算定した。

MGBG の併用効果について Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$ と MGBG の各濃度を 24 時間併用添加後、無添加培養液に交換し同様に細胞数を算定した。

結果: PC-3 では、2 DG 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 単独(24 時間)群、2 DG 50 $\mu\text{g/ml}$ 単独(継続)群において添加後 1 日、3 日、7 日、9 日目を通じ対照群と比較して細胞増殖の抑制はみられなかった。2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ 単独(継続)群では 3 日、7 日、9 日目で対照群と比較して有意な抑制($P < 0.05$)を認めた(Fig. 5)。また、LNCaP は 2 DG 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 単独(24 時間)群、2 DG 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 単独(継続)群において対照群と比較して細胞増殖の抑制はなかった(Fig. 6)。

MGBG 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 単独(24 時間)群は、濃度に関係なく PC-3, LNCaP ともにその増殖は抑制されなかった(Fig. 7, Fig. 8)。

Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$ (24 時間)+2 DG 50 $\mu\text{g/ml}$ (24 時間)併用群、Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$ (24 時間)+2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ (24 時間)併用群において、PC-3, LNCaP 細胞ともに試験薬剤添加後 1 日目より 9 日目を通じて Rh 単独群と比較して増殖抑制効果はみられなかった(Fig. 9, Fig. 10)。

Rh $2.5 \mu\text{g/ml}$ (24 時間)+2 DG 50 $\mu\text{g/ml}$ (継続)併用

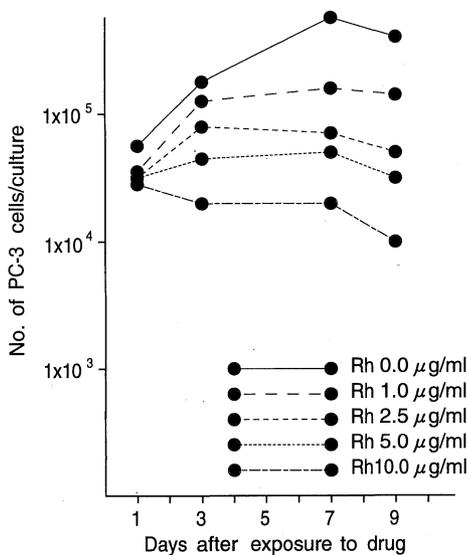


Fig. 3. Effect of Rh on PC-3 cell growth.

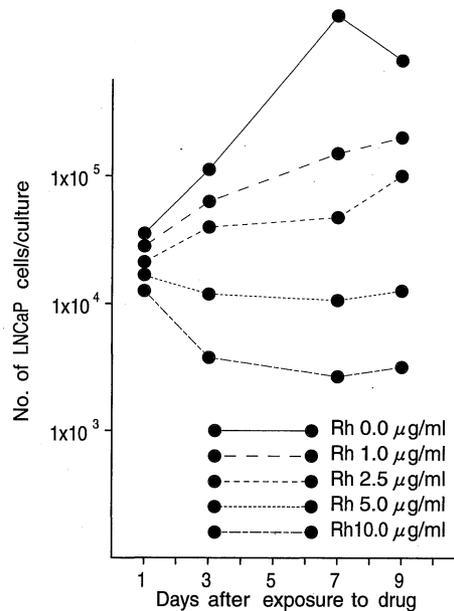


Fig. 4. Effect of Rh on LNCaP cell growth.

群では、PC-3、LNCaPともに添加後3日目より9日目を通じて、Rh単独添加群と比較して増殖抑制に変化はみられず併用効果を認めなかった。Rh 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (24時間)+2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ (継続)併用群では、PC-3で添加後3日、7日、9日目を通じ、Rh単独添加群と比較して播種細胞数の増加を認めず、有意な抑制($p < 0.05$)を認め併用効果を示した(Fig. 11)。LNCaPで3日目に播種細胞数の減少を認め、7日、9日目には徐々に増加するも、Rh単独添加群と比較して有意の抑制効果($P < 0.05$)を認め併用効果を示した(Fig. 12)。

Rh 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (24時間)+MGBG 1 $\mu\text{g/ml}$ (24時間)併用群、Rh 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (24時間)+MGBG 10 $\mu\text{g/ml}$ (24時間)併用群において、PC-3でRh単独群と比較して、MGBG 1 $\mu\text{g/ml}$ では抑制はみられなかったが、MGBG 10 $\mu\text{g/ml}$ では有意の抑制($P < 0.05$)がみられ、併用効果を認めた(Fig. 13)。また、LNCaPではMGBGの併用効果は認められなかった(Fig. 14)。

III. ヒト前立腺癌細胞の培養液中の腫瘍マーカーについて

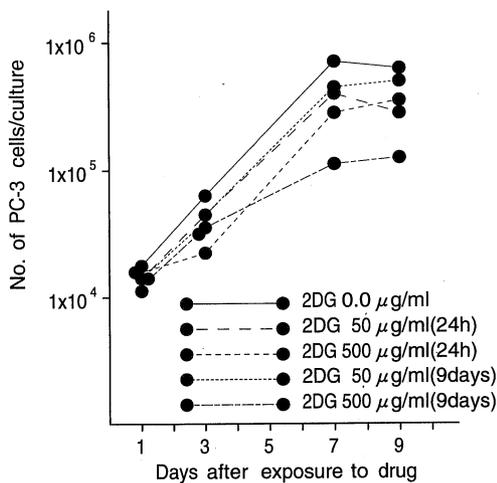


Fig. 5. Effect of 2DG on PC-3 cell growth.

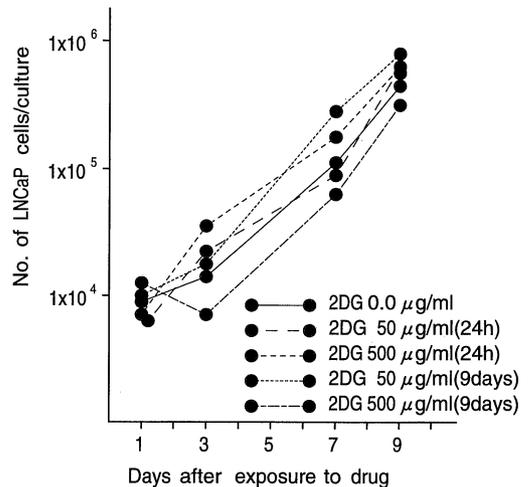


Fig. 6. Effect of 2DG on LNCaP cell growth.

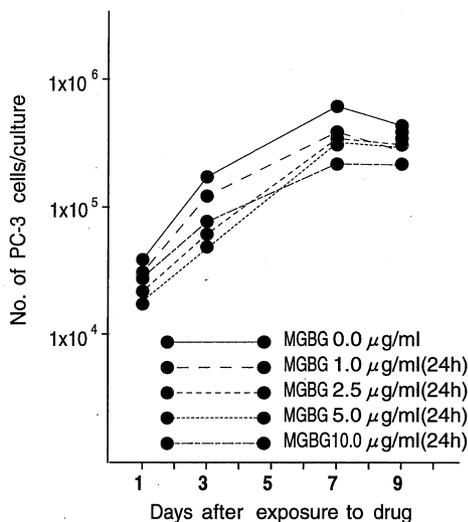


Fig. 7. Effect of MGBG on PC-3 cell growth.

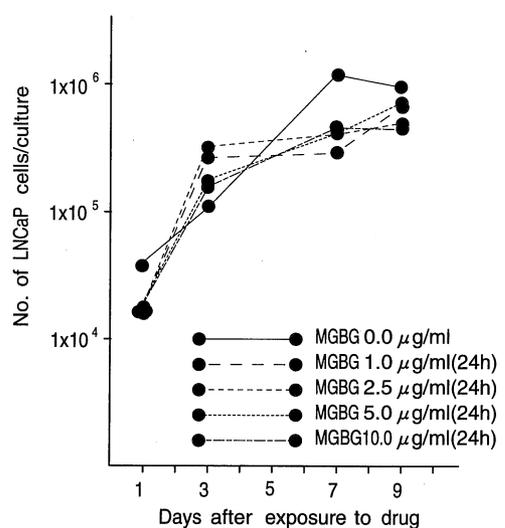


Fig. 8. Effect of MGBG on LNCaP cell growth.

方法： 実験II-1, 2における, Rh 2.5, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独(24時間)群, 2 DG 50, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独(継続)群および Rh 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (24時間)+2 DG 50, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (継続)併用群の各時間経過後の LNCaP 培養液中の Prostatic specific antigen(PA)をマーケット M-PA を用いて酵素免疫法で, Prostatic acid phosphatase(PAP)を PAP 栄研を用いて RIA 2 抗体法で測定した. なお, PC-3 培養液中の腫瘍マーカーを測定した結果, PC-3 では PA および PAP のいずれもが極めて低値であり, 今回は LNCaP のみを対象とした.

結果: LNCaP 培養液中の PAP 測定値は, Rh 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独(24時間)群では, 対照群と比較して Rh 添加後 3日目の PAP 値は, 対照群が 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったのに対し 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下と抑制を認めたが, 7日目以降 PAP 値は徐々に上昇し, 9日目には対照の 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対し, 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と有意の抑制は認められなかった. Rh 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独(24時間)群では, PAP 値の変動は 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合と同様で経時的な上昇が認められたが, 9日目でも PAP 値 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と対照群の 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と比較して低値を示した. また PA 値についても同様の変動が

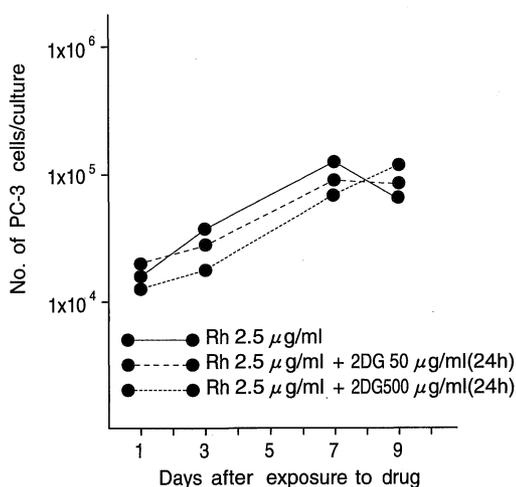


Fig. 9. Effect of Rh plus 2DG on PC-3 cell growth.

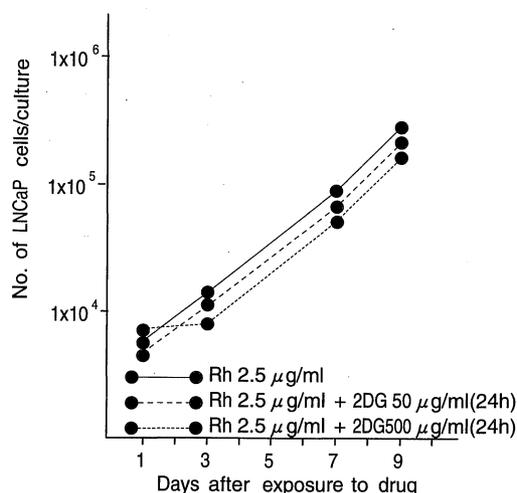


Fig. 10. Effect of Rh plus 2DG on LNCaP cell growth.

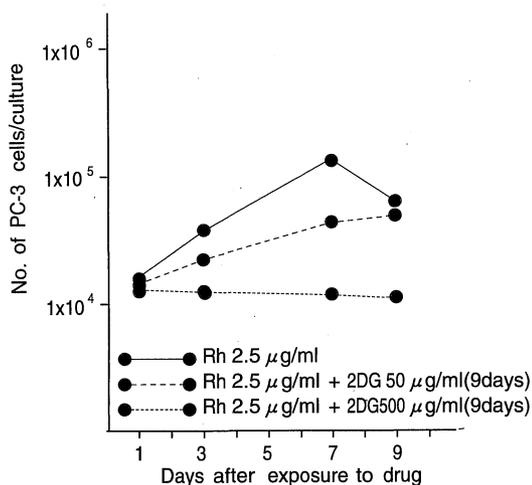


Fig. 11. Effect of Rh plus 2DG on PC-3 cell growth.

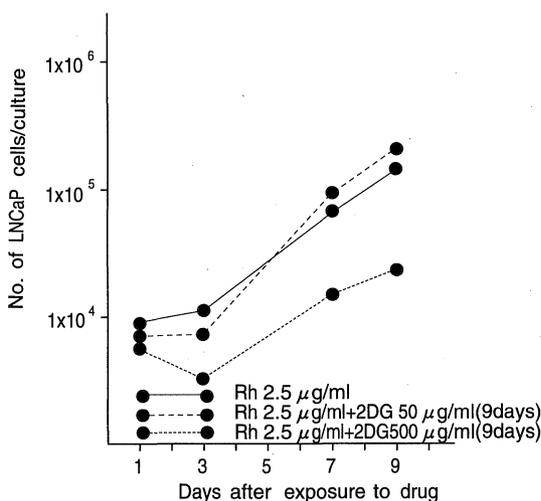


Fig. 12. Effect of Rh plus 2DG on LNCaP cell growth.

認められ、Rh 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 単独(24時間)群の9日目では対照群で 15.0 $\mu\text{g/ml}$ に対し 2.8 $\mu\text{g/ml}$ と低値を示した。

2 DG 単独(継続)群における PA, PAP 値の変動は実験期間中対照群と比較して変化なく抑制は認められなかったが、Rh 2.5 $\mu\text{g/ml}$ + 2 DG 50 $\mu\text{g/ml}$ 併用群では、Rh 単独時と比較して PAP 値は9日目で 0.8 $\mu\text{g/ml}$ とやや低値を示し、併用効果が認められたが、PA 値は9日目で 14.0 $\mu\text{g/ml}$ と併用効果は認められなかった。Rh 2.5 $\mu\text{g/ml}$ + 2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ 併用添加群では、PAP 値は Rh 単独時と比較して7日目で 0.7 $\mu\text{g/ml}$ と高値であったが、9日目で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下に抑制され、併用効果を認めた。PA 値は7日目まで 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下と低値で9日目でも 9.3 $\mu\text{g/ml}$ と再上昇は認められるものの併用効果が認められた(Table 2)。

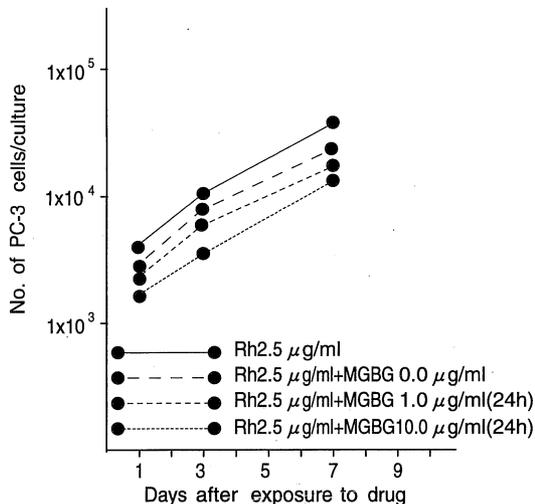


Fig. 13. Effect of Rh plus MGBG on PC-3 cell growth.

IV. ヒト前立腺癌細胞の増殖抑制に及ぼす Rh の影響に関する in vivo 実験

予備実験として、体重 20 g のヌードマウス 16 匹に対し、trypsin 処理した PC-3, LNCaP をそれぞれ 2×10^6 細胞/0.5 ml/匹を 26 G の皮内針を用いて右側腹部に皮下移植し、その可移植性を検討した。その結果、PC-3 は 16 匹中 14 匹生着し、一方 LNCaP は 16 匹中 2 匹に生着したのみであった。以上の結果より、以後の in vivo 実験には PC-3 を用いて実験を行った。

実験 IV-1: ヒト前立腺癌細胞担癌マウスにおける Rh の体内分布に関する検討

方法: PC-3 を移植した 100 日目の担癌ヌードマウス 3 匹の腹腔内に 26 G 皮内針にて Rh 溶液 0.5 ml を 10 mg/kg (培養液換算で 10 $\mu\text{g/ml}$ 相当)投与し、6 時間後、24 時間後、72 時間後に各 1 匹ずつ屠殺し諸臓器を摘出し

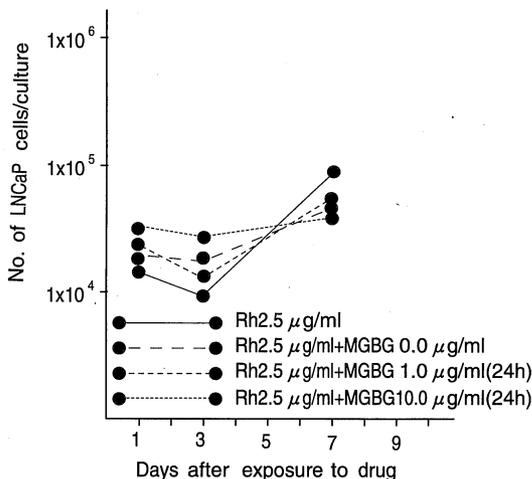


Fig. 14. Effect of Rh plus MGBG on LNCaP cell growth.

Table 2. Changes of PAP and PA in Culture Medium of LNCaP

Treatment	PAP (ng/ml)				PA (ng/ml)			
	Day 1	Day 3	Day 7	Day 9	Day 1	Day 3	Day 7	Day 9
Control	<0.5	0.7	0.8	1.3	1.7	<1.5	5.0	15.0
+Rh2.5 μg	<0.5	<0.5	0.5	1.2	1.8	<1.5	<1.5	16.0
+Rh5.0 μg	<0.5	<0.5	0.5	0.7	2.0	<1.5	<1.5	2.8
+2-DG50 μg	0.5	<0.5	0.6	1.7	1.6	<1.5	6.0	34.0
+2-DG500 μg	0.6	0.7	0.5	1.8	1.5	<1.5	6.3	46.0
+Rh2.5 μg +2-DG50 μg	0.6	<0.5	<0.5	0.8	<1.5	<1.5	<1.5	14.0
+Rh2.5 μg +2-DG500 μg	0.5	0.5	0.7	<0.5	<1.5	<1.5	<1.5	9.3

た. 前処置として細胞内 Rh 濃度の測定と同様に各組織を 150~300 mg 採取し蒸留水 2 ml にて氷中でホモジネートし, これをさらに 3500 rpm で 10 分間遠心し, その上清 1 ml をサンプルとした. 除蛋白処置としてウルトラセント-30 を使用し, 3500 rpm で 6 時間遠心濾過し, その上清 200 μ l を取り HPLC により, 組織内 Rh 濃度を測定した¹³⁾¹⁴⁾.

結果: Rh(10 mg/kg)腹腔内投与後, 6 時間後の組織内 Rh 濃度は肝, 腎においてそれぞれ 8.35, 7.05 μ M/kg と高値を示し, 次いで心臓, 小腸がそれぞれ 4.45, 4.08 μ M

/kg と高かった. 腫瘍内 Rh 濃度は 3.10 μ M/kg で肺, 血液などと同等の濃度であった. Rh 投与 24 時間後では肝, 腎, 腫瘍組織における濃度の差は認められず, 添加 6 時間後の測定値と比較すると肝, 腎で 2.38, 2.46 % であるのに対し, 腫瘍では 3.87 % と高く, 腫瘍における Rh の長い滞留性が示された. また心臓では 2.60×10^{-1} μ M/kg と他の臓器と比較して高濃度であり, また 6 時間値の 5.8 % が滞留した. 72 時間後では心臓, 脾, 精巣は検出限界以下となり肝, 腎では濃度がやや高いものの, 全臓器で 6 時間値と比較して 1 % 以下に減少した

Table 3. Tissue Rh concentration (μ M/kg) after intraperitoneal administration of Rh(10mg/kg) in PC-3 implanted nude mice

Tissue	Concentration of Rh (μ M/kg)		
	Hours after injection		
	6 h	24h(%)*	72h(%)*
Liver	8.35	1.99×10^{-1} (2.38)	7.80×10^{-2} (0.93)
Kidney	7.05	1.74×10^{-1} (2.46)	4.10×10^{-2} (0.58)
Heart	4.45	2.60×10^{-1} (5.80)	N. D.
Lung	2.80	1.14×10^{-1} (4.07)	1.60×10^{-2} (0.57)
Spleen	2.29	5.50×10^{-2} (2.40)	N. D.
Intestine	4.08	6.00×10^{-2} (1.47)	2.90×10^{-2} (0.58)
Testis	2.58	6.25×10^{-2} (2.42)	N. D.
Blood	3.19	3.90×10^{-2} (1.22)	1.50×10^{-2} (0.47)
Tumor	3.10	1.20×10^{-1} (3.87)	3.10×10^{-2} (1.00)

* : Rh conc/Rh conc after 6 h

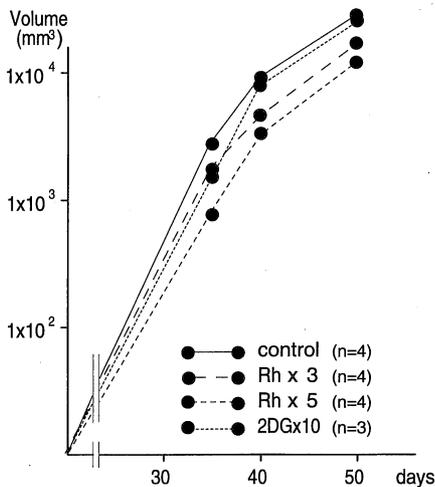


Fig. 15. PC-3 tumor growth curves in nude mice (BALB/C) receiving intraperitoneal injections of Rh (5mg/kg, 3 or 5 times) or 2DG (500mg/kg, 10 times) every 2 days started 1 day after implantation.

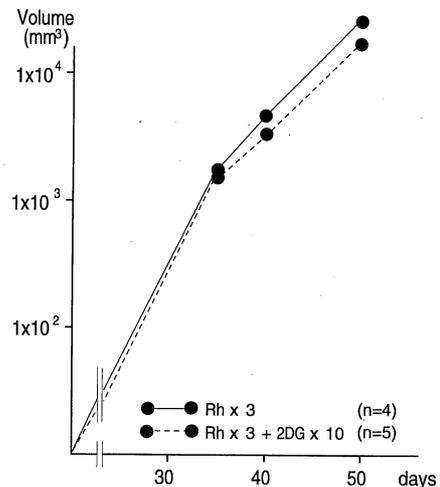


Fig. 16. PC-3 tumor growth curves in nude mice (BALB/C) receiving intraperitoneal injections of Rh (5mg/kg, 3 times) or Rh + 2DG (500mg/kg, 10 times) every 2 days started 1 day after implantation.

(Table 3).

実験Ⅳ-2: Rh のヒト前立腺癌培養細胞の増殖に及ぼす in vivo における検討

方法: Herr et al.¹⁵⁾の腎細胞癌における実験系に準じて体重 20 g のヌードマウス 30 匹に 2×10^6 細胞/0.5 ml/匹の PC-3 を皮下移植し, 翌日より Rh 5 mg/kg/day を隔日に 3 回または 5 回腹腔内投与し, 2 DG は 500 mg/kg/day を隔日に 10 回腹腔内投与した. また同様の投与

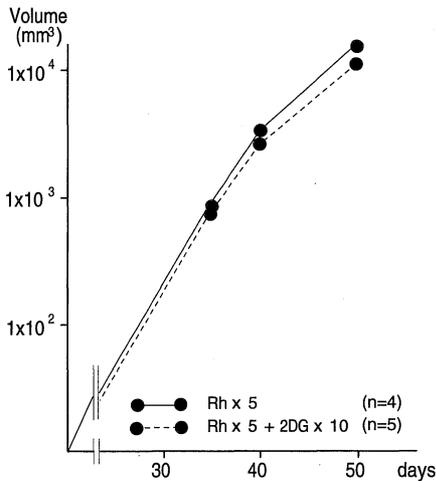


Fig. 17. PC-3 tumor growth curves in nude mice (BALB/C) receiving intraperitoneal injections of Rh (5mg/kg, 5 times) or Rh +2DG (500mg/kg, 10 times) every 2 days started 1 days after implantation.

スケジュールで Rh 5 mg/kg 投与と 2 DG 500 mg/kg 投与を併用して行った. 各群の動物数は Rh, 2 DG 非投与対照群: 6 匹(内 2 匹非生着), Rhx 3 回投与群: 5 匹(内 1 匹非生着), Rhx 5 回投与群: 4 匹(全例生着), 2 DG 投与群: 5 匹(内 2 匹非生着), Rhx 3 回投与+2 DG 併用群: 5 匹(全例生着), Rhx 5 回投与+2 DG 併用群: 5 匹(全例生着)を用いた. 全群において 50 日まで移植腫瘍の長径, 短径を週 2 回測定し, 楕円形と仮定してその体積を求め, その腫瘍増殖について検討した. また, 各群の動物は移植後 100 日まで観察し, その生存について検討した.

結果: 今回用いた Rh, 2 DG の投与量ではヌードマウスには急性毒性や行動異常を示唆する所見は観察されなかった.

移植腫瘍が生着したヌードマウスのみを対象として試験薬剤の単独投与の結果を見ると, 移植 35 日目に対照群, Rh×3 回投与群, Rh×5 回投与群の PC-3 移植腫瘍はそれぞれ平均 $3.7 \times 10^3 \text{mm}^3$, $1.7 \times 10^3 \text{mm}^3$, $8.1 \times 10^2 \text{mm}^3$ であった. 40 日目にはそれぞれ $8.9 \times 10^3 \text{mm}^3$, $3.7 \times 10^3 \text{mm}^3$, $2.6 \times 10^3 \text{mm}^3$ となり, さらに 50 日目では $2.3 \times 10^4 \text{mm}^3$, $1.6 \times 10^4 \text{mm}^3$, $9.6 \times 10^3 \text{mm}^3$ と Rh 投与群は対照群と比較して腫瘍体積が小さく, さらに Rh×3 回投与群と Rh×5 回投与群を比較すると後者で腫瘍体積はさらに小さくなっていった. 40 日目では Rh×3 回群は対照群と比較して腫瘍増殖の有意な抑制効果 ($P < 0.05$) がみられた. 2 DG 単独投与群では, 移植 35 日目で腫瘍体積が対照群と比較して $1.5 \times 10^3 \text{mm}^3$ とやや小さかったが 40

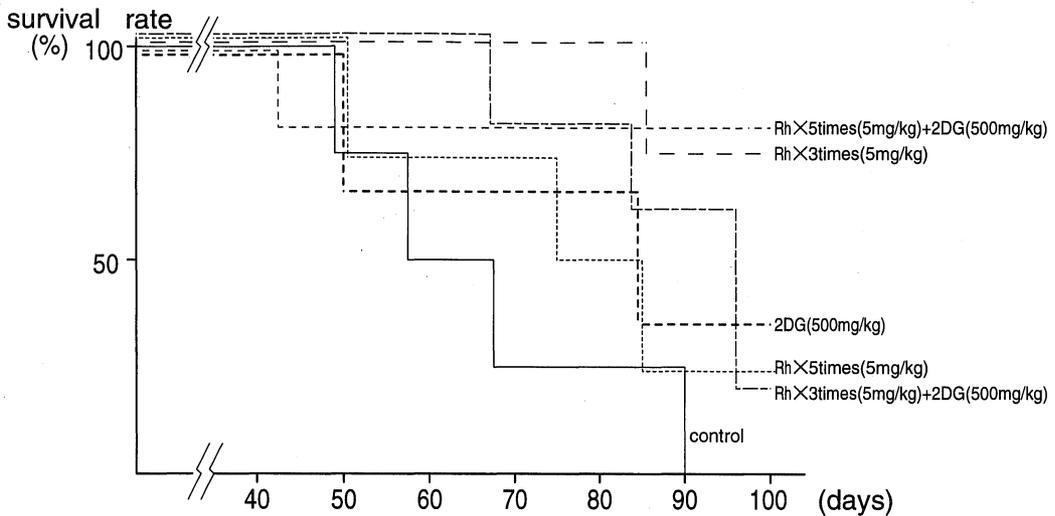


Fig. 18. Effects of Rh and 2DG on survival rates of PC-3 implanted nude mice.

日目, 50 日目では差はみられなかった(Fig. 15).

併用投与の結果を見ると, Rh×3 回+2 DG 併用群, Rh×5 回+2 DG 併用群の移植腫瘍の増殖は, いずれも観察期間中において Rh 単独投与群とその腫瘍体積には差はみられなかった(Fig. 16, Fig. 17).

PC-3 の移植後のヌードマウスの生存についてみると, 50 日目まではいずれの群においても死亡は認められなかった. 対照群 4 匹では, PC-3 移植後 51 日目, 57 日目, 65 日目にそれぞれ 1 匹死亡し, 90 日後にはすべて死亡した. これに対し, Rh×3 回投与群 4 匹では 83 日目に 1 匹死亡した以外, 残る 3 匹は観察期間である 100 日以上にわたって生存した. Rh×5 回投与群 4 匹では 53 日目, 76 日目, 86 日目にそれぞれ 1 匹死亡したが, 1 匹は 100 日以上生存した. 2 DG 投与群 3 匹では 57 日目, 83 日目にそれぞれ 1 匹死亡したが, 1 匹は 100 日以上生存した. Rh×3 回+2 DG 併用投与群 5 匹では 63 日目, 83 日目にそれぞれ 1 匹死亡, 96 日目に 2 匹死亡し, 1 匹のみ 100 日以上生存した. Rh×5 回+2 DG 併用投与群 5 匹では 50 日目に 1 匹死亡したが, 残り 4 匹は 100 日以上生存した(Fig. 18). 観察期間を 100 日で打ち切り, それぞれの Kaplan-Meier 法による平均生存日数をみると, 対照群が 65.75 日であったのに比較して, Rh×3 回投与群は 95.75 日, Rh×5 回投与群は 78.75 日, 2 DG 単独投与群は 80.0 日, Rh×3 回+2 DG 併用投与群は 87.6 日, Rh×5 回+2 DG 併用投与群は 90.0 日と, いずれも対照群に比較して平均生存期間は延長し, 統計学的には Rh×3 回投与群および Rh×3 回+2 DG 併用投与群は, 対照群と比較して有意の生存期間の延長($P < 0.05$)が認められた.

考 察

尿路性器癌の治療は化学療法を中心とした補助療法の進歩により, その成績は向上したが^{1,2)}, 抗男性ホルモンの反応しない前立腺癌や腎細胞癌に対する化学療法の治療成績は満足できるものではない^{3,4,5,6)}. ホルモン不応前立腺癌に対しては有効な治療はなく, 化学療法でも自覚症状の軽減などの近接効果は見られるものの生存率の改善には寄与していないのが現状である. 進行癌に対する治療としての化学療法は, 全身療法として今後ますます重要な位置を占め, 抗癌剤の感受性の増強や副作用の軽減などの支持療法の確立とともに, これらの治療の困難な癌腫に対する新しい展開による抗癌剤の開発が望まれる.

従来用いられてきた抗癌剤の多くは核酸代謝関連物質であり, 糖代謝に関連した抗癌剤は未だ開発されていない. 癌細胞の代謝において糖代謝は最も詳細に研究され,

癌の特徴的な糖代謝の所見が得られているが⁷⁾, 糖代謝に関連した抗癌剤は未だ発見されておらず, とくに細胞内エネルギー代謝に深く関与するミトコンドリアを標的にした抗癌剤についてはほとんど検討されておらず, 将来この方面での発展が期待されている.

Rh は比較的新しく開発された赤色色素で, 脂溶性で陽性に荷電しており, 511 nm の励起で蛍光を発する. 1980 年に Johnson et al.⁸⁾ によってミトコンドリアに選択的に集積される性質が明らかになり, ミトコンドリアの生体染色にその有用性が見いだされた. 1982 年に Summerhayes et al.⁹⁾ によって malignant transformed cells のミトコンドリアにより多く, より長時間集積する性質が見いだされ, さらに Barnal et al.¹⁰⁾ により in vitro で癌細胞に対する選択的な毒性とマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍活性が報告され, ミトコンドリアを標的とする抗癌剤としての可能性が見いだされた.

Rh による癌細胞の増殖抑制のメカニズムは, Rh が癌細胞のミトコンドリアにより多く集積し, より長時間蓄積する特性により, ミトコンドリア依存性のエネルギー代謝, すなわち oxidoreductase の阻害並びに酸化リン酸化障害が正常細胞に比較して顕著に発現して, 細胞毒性を示すとされている¹⁰⁾.

今回, Rh による前立腺癌細胞の増殖抑制の検討において, 抗男性ホルモン療法に対する異なる応答能を示す確立された培養細胞株を用いた. すなわち PC-3 は抗男性ホルモン療法抵抗性の進行前立腺癌症例の腰椎転移組織に由来する grade 4 の前立腺腺癌であり¹¹⁾, 一方, LNCaP は進行前立腺癌症例の鎖骨リンパ節転移組織に由来するものであるが, androgen receptor を有する前立腺腺癌¹²⁾である. 今回, in vitro 実験の培養液中の前立腺腫瘍マーカーの測定において, PC-3 は PA, PAP のいずれにおいてもその産生は低く, 一方, LNCaP は細胞増殖によく相関した結果を示し, PC-3 と LNCaP は PA および PAP の産生能においても異なる特性が見いだされ, また, 抗男性ホルモン療法抵抗性前立腺癌細胞ではその増殖と腫瘍マーカーが相関しない興味ある結果を示した.

本研究において, Rh が抗男性ホルモン療法に対する応答能の異なるこれら 2 株の細胞増殖を in vitro で用量に相関して抑制し, また, PC-3 担癌ヌードマウスの移植腫瘍の増殖抑制および生存期間の延長が観察されたことは, 進行前立腺癌に対する Rh の抗腫瘍効果を示唆する極めて興味深い結果を見いだした. しかしながら, Rh による細胞増殖抑制効果は殺細胞効果によるというよりは, ミトコンドリアでのエネルギー代謝の阻害による静細胞

効果に起因するものと考えられている。In vitro において7日目以降の再増殖が観察されたことから、今後、さらに Rh 単独で長期間投与や繰り返し投与について検討する必要があるものの、ホルモン不応前立腺癌治療において核酸を標的とする抗癌剤に有用なものが少ない現状において、この種の薬剤の有用性を示唆するものと考えられた。同様の結果は、1987年および1995年に Arcadi et al^{17,18)}が、種々のヒトならびにラットの前立腺癌細胞の移植腫瘍に対して Rh が毒性効果を有することを報告している。実験に用いた各群の mice 数は少ないものの今回の PC-3 移植腫瘍を用いた in vivo の検討において、PC-3 移植後の短期投与にもかかわらず、Rh や 2 DG を投与するいずれの群の mice 平均生存期間の延長が観察され、Rh の in vitro におけるヒト由来前立腺癌細胞の増殖抑制効果を再現する結果を示した。今回の検討では 2 DG との併用投与の明らかな効果は観察されなかったが、Herr et al¹⁹⁾は Rh によるラット腎細胞癌の増殖抑制実験において、Rh は単剤でラット腎細胞癌の増殖を抑制するものの、その効果はさらに 2 DG や MGBG などの糖代謝阻害剤で増強されることを報告しており、今後、in vitro における Rh 単独ならびに 2 DG および MGBG との併用など、用量・用法の検討が必要である。

2 DG は glucose のアナログで、体内の 2 DG リン酸に代謝され、解糖系ホスホヘキソースイソメラーゼによるフルクトース 6-リン酸の合成をブロックする解糖系阻害剤¹⁹⁾である。MGBG の正確な作用機序は明らかではないが、ポリアミン合成阻害作用とともにミトコンドリアに選択的に取り込まれ毒性を持つことが知られている^{20,21)}。本研究では Rh の細胞増殖抑制効果を増強するものとして、Rh と異なる作用点を有する 2 DG と MGBG を用いたが、in vitro で、2 DG、MGBG は、単剤では明らかな毒性を示さない用量の Rh と併用して作用させることにより Rh の毒性に増強効果がみられたことから、エネルギー代謝阻害剤の抗癌剤としての有用性を示唆する興味深い結果を示したものと考えられる。

Rh はそれ自体の抗癌作用の他、ヘマトポルフィリン誘導体と同様の光感作への増強作用¹³⁾および温熱療法²²⁾への増強効果が報告され、その存在はさらに注目を集めている。一方、Rh はすでに基礎医学分野において細胞形態、細胞生理・薬理学などにおいて生体染色剤として広く用いられており、他の化学療法剤との併用も期待されているが、内因性薬剤耐性の主因である MDR 1 による影響を受けること^{23,24)}も報告されており、今後更に、他の耐性克服剤^{25,26)}との併用について検討を進める必要がある。

結 語

赤色蛍光色素で、そのミトコンドリア毒性により癌細胞の増殖を抑制するとされる Rhodamine 123 (Rh) のホルモン非依存性前立腺癌培養細胞株 PC-3、ホルモン依存性前立腺癌培養細胞株 LNCaP に対する増殖抑制効果を in vitro ならびに in vivo において検討した。また、ミトコンドリア外解糖系阻害剤である 2 DG およびポリアミン合成阻害作用とミトコンドリア毒性をもつ MGBG の併用効果についても検討した。

1. Rh の培養細胞内での分布と濃度に関する検討において、Rh はホルモン依存性に関係なく前立腺癌細胞に長く滞留することが確認された。また、Rh は前立腺癌細胞の核内には認められず、細胞質内に認められた。

2. Rh のヒト前立腺癌培養細胞の増殖への影響に関する in vitro 実験において、Rh の用量依存的増殖抑制効果を認めた。2 DG、MGBG 単独では、2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ (継続) 群で軽度の増殖抑制が PC-3 に認められた以外は、有意な増殖抑制効果は認められなかった。2 DG、MGBG の Rh との併用効果については、Rh+2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ (継続) 群および Rh+MGBG 10 $\mu\text{g/ml}$ (24 時間) 群で PC-3 に併用効果が認められた。

3. ヒト前立腺癌細胞の培養液中の腫瘍マーカーを検討した結果、Rh の用量依存的な PA、PAP 産生の抑制効果が認められた。2 DG 単独では、その抑制効果が認められなかった。Rh との併用効果については、Rh+2 DG 500 $\mu\text{g/ml}$ 群に認められた。いずれも前立腺癌培養細胞増殖に関する in vitro 実験と同様の結果であった。

4. Rh のヒト前立腺癌細胞(PC-3)担癌マウスにおける体内分布に関する in vivo 実験において、投与された Rh はまず肝、腎に高濃度に集積するが、時間経過とともに腫瘍に長く滞留することが示された。

5. Rh のヒト前立腺癌細胞の増殖抑制におよぼす影響に関する in vivo 実験において、Rh は PC-3 移植腫瘍の増殖抑制効果を示したが、2 DG は増殖抑制効果はなく、また Rh との併用効果も認められなかった。しかしながら、Rh、2 DG はヒト前立腺癌担癌マウスの生存期間を延長させた。

以上より、Rh は前立腺癌細胞の増殖を in vitro ならびに in vivo において抑制し、その抑制効果は biochemical modulator である 2 DG、MGBG により修飾される可能性が示唆されたが、今後、さらに温熱療法、光力学的治療及び抗癌剤による修飾を検討する必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました泌尿器科学教室岡島英五郎教授に心より感謝の意を表しますとともに、御校閲・御助言賜りました腫瘍病理学教室小西陽一教授ならびに第2解剖学教室山本浩司教授に深謝いたします。また、日々の研究にあたり直接御指導・御助言をいただいた泌尿器科学教室平尾佳彦助教授、また、実験遂行に当たり直接御指導いただいた泌尿器科学教室北川恒代医学博士に心から感謝いたします。また、本研究に御助力いただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Bosl, G. J.** : Treatment of germ cell tumors at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center : 1960 to present. *in* Contemporary issues in clinical oncology, Vol. 5, Genitourinary Cancer. (Garnick, M. B., ed.). Churchill Livingstone, New York, p45-59, 1985.
- 2) **Perry, J. J.** and **Muss, H. B.** : Management of disseminated disease in the patients with bladder cancer. *Urol. Clin. North Amer.* **21** : 661-672. 1994.
- 3) **Torti, F. M.** and **Lum, B. L.** : Chemotherapy in prostate cancer. *in* Contemporary issues in clinical oncology, Vol. 5, Genitourinary Cancer. (Garnick, M. B., ed.). Churchill Livingstone, New York, p125-161, 1985.
- 4) **Taneja, S. S., Pierce W., Figlin, R.** and **Belldgrum, A.** : Management of disseminated kidney cancer. *Urol. Clin. North Amer.* **21** : 625-637. 1994.
- 5) 平尾佳彦, 窪田一男, 吉江 貫, 田畑尚一, 三馬省二, 大園誠一郎, 岡島英五郎, 佐々木憲二, 吉川元祥, 妻谷憲一, 平田直也, 青山秀雄 : 前立腺癌に対する化学療法. *泌尿紀要.* **37** : 817-824, 1991.
- 6) 岡田謙一郎, 秋野裕信, 鈴木裕志, 三輪吉司, 齊川茂樹, 藤田知洋, 青木芳隆, 岩岡 香 : 進行前立腺癌の治療. *泌尿紀要.* **40** : 945-950, 1994.
- 7) **Warburg, O.** : On the origin of cancer cells. *Science* **123** : 309-314, 1956.
- 8) **Johnson, L. V., Walsh, M. L.** and **Chen, L. B.** : Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77** : 990-994, 1980.
- 9) **Summerhayes, I. C., Lampidis, T. J., Bernal, S. D., Nadakavukaren, J. J., Nadakavukaren, K. K., Sefherd, E. L.** and **Chen, L. B.** : Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79** : 5292-5296, 1982.
- 10) **Bernal, S. D., Lampidis, T. J., Summerhayes, I. C.** and **Chen, L. B.** : Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells in vitro. *Science* **218** : 1117-1118, 1982.
- 11) **Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F.** and **Jones, L. W.** : Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17** : 16-23, 1979.
- 12) **Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A.** and **Murphy, G. P.** : LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43** : 1809-1818, 1983.
- 13) **Castro, D. J., Saxton, R. E., Fetterman, H. R., Casrto, D. J.** and **Ward, P. H.** : Rhodamine-123 as a new photochemosensitizing agent with the argon laser : "nonthermal" and thermal effects on human squamous carcinoma cells in vitro. *Laryngoscope* **97** : 554-561, 1987.
- 14) **Banes, A. J., Link, G. W., Beckman, Jr, W. C., Camps, J. L.** and **Powers, S. K.** : High-performance liquid chromatographic quantitation of rhodamine 123 and 110 from tissues and cultured cells. *J. Chromato.* **356** : 301-309, 1986.
- 15) **Herr, H. W., Huffman, J. L., Huryk, R., Heston, W. D. W., Melamed, M. R.** and **Whitmore, Jr, W. F.** : Anticarcinoma activity of Rhodamine 123 against a murine renal adenocarcinoma. *Cancer Res.* **48** : 2061-2063, 1988.
- 16) **Modica-Napolitano, J. S.** and **Aprille, J. R.** : Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res.* **47** : 4361-4365, 1987.
- 17) **Arcadi, J. A.** : Rhodamine-123 as effective agent in rat prostate tumor R3327-H. *Urology* **18** : 501-503, 1986.
- 18) **Arcadi, J. A., Narayan, S. K., Techy, G., Chuen-Pei, N. G., Saroufeem, R. M. G.** and

- Jones, L. W.** : Studies of rhodamine-123 : effect on rat prostate cancer and human prostate cancer cell in vitro. *J. Surg. Onco.* **59** : 86-93, 1995.
- 19) **Wick, A. N., Drury, D. R., Nakada, H. I., Wolfe, J. B., Britton, B. and Grabowski, R.** : Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J. Biol. Chem.* **224** : 963-969, 1956.
- 20) **Morris, D. R., Jorstad, C. M. and Seyfried, C. E.** : Inhibition of the synthesis of polyamines and DNA in activated lymphocytes by a combination of α -methyl-ornithine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Cancer Res.* **37** : 3169-3172, 1977.
- 21) **Pine, M. J. and Dipaolo, J. A.** : The antimitochondrial action of 2-chloro-4', 4''-bis(2-imidazolyl) terephthalanilide and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Cancer Res.* **26** : 18-25, 1966.
- 22) **Kim, J. H., Kim, S. H. and Alfieri, A. A.** : Interaction of hyperthermia and rhodamine 123 in HeLa S-3 cells in culture. *Int. J. hyperthermia* **1** : 247-253, 1985.
- 23) **Tapiero, H., Munck, J. N., Fourcade, A., and Lamoidis, T. J.** : Cross-resistance to rhodamine 123 in adriamycin and daunorubicin-resistant Friend leukemia cell variants. *Cancer Res.* **44** : 5544-5549, 1984.
- 24) **Efferth, T., Lohrke, H. and Volm, M.** : Reciprocal correlation between expression of p-glycoprotein and accumulation of rhodamine 123 in human tumors. *Anticancer Res.* **9** : 1633-1638, 1989.
- 25) **Krag, D. N., Theon, A. P., Gan, L., Shen, T. S. and Wardell, J.** : Reversal of thermochemotherapeutic resistance to rhodamine 123 by verapamil. *Int. J. Hyperthermia* **6** : 933-941, 1990.
- 26) **Lampidis, T. J., Munck, J. N., Krishan, A. and Tapiero, H.** : Reversal of resistance to rhodamine 123 in adriamycin-resistant friend leukemia cells. *Cancer Res.* **45** : 2626-2631, 1985.