

Cisplatin 耐性ヒト卵巣癌細胞株の誘導と その細胞生物学的性状の解析

新潟大学医学部産科婦人科学教室

吉谷 徳夫 安達 茂実 三沢 芳夫 湯沢 秀夫
本多 達雄 金沢 浩二 竹内 正七

香川医科大学母子科学講座

田中 耕平

Isolation of Cisplatin-resistant Subline from Human Ovarian Cancer Cell Line and Analysis of its Cell-biological Characteristics

Norio YOSHIYA, Shigemi ADACHI, Yoshio MISAWA,
Hideo YUZAWA, Tatsuo HONDA, Koji KANAZAWA
and Shoshichi TAKEUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Niigata University, Niigata

Kohei TANAKA

Department of Perinato-Gynecology, Kagawa Medical School, Kagawa

概要 ヒト卵巣未分化癌細胞株 TYK-nu を用い、低濃度の Cisplatin(CDDP)含培地より培養を開始し、段階的に CDDP 濃度を高めることにより、TYK-nu 株が完全に死滅する CDDP 含培地においても増殖し得る CDDP 耐性株 TYK-nu (R) の誘導に成功し、その細胞生物学的性状および CDDP の新誘導体 Carboplatin (CBDCA) に対する感受性を検討し、以下の結果を得た。

1. TYK-nu (R) 株は TYK-nu 株に比較し、細胞境界が不明瞭で、細胞の大小不同が顕著であるが、電顕による観察および免疫酵素抗体法による各種染色態度においては差異は認められなかつた。倍加時間は TYK-nu 株が43時間、CDDP0.5 μ g/ml 含培地での TYK-nu (R) 株のそれは48時間であつた。

2. CDDP および CBDCA96時間接触後、増殖抑制法にて算定した IC₅₀ (μ g/ml) は、TYK-nu 株では CDDP0.035, CBDCA0.5, TYK-nu (R) 株では各々0.62, 2.0であつた。

3. CDDP (2.0 μ g/ml) 2時間接触後測定した細胞内 CDDP 濃度は両株の間に差を認めなかつた。

4. 染色体分析においては、両株ともに多くは高2倍体域に分布するが、TYK-nu 株のモードは56であるのに対し、TYK-nu (R) 株では51であつた。TYK-nu (R) 株の核型分析において、ほぼ共通して7番染色体長腕の欠失が観察された。

5. CDDP (0.2 μ g/ml) および CBDCA (2.0 μ g/ml) 48時間接触後に解析した DNA histogram では、TYK-nu 株において各薬剤接触により S および G2+M 期の減少がみられたが、TYK-nu (R) 株では薬剤非接触群と同様の所見を示した。

以上より、TYK-nu(R)株は親株に比較し17.7倍の CDDP 耐性を示し、CBDCA に対しても交叉耐性を示した。耐性発現機序としては、核型分析の結果より遺伝子上に生じた変異が関与している可能性が示唆された。

Synopsis The cisplatin (CDDP)-resistant subline TYK-nu (R) was developed by culturing TYK-nu (human ovarian cancer cell line in vitro) with exposure to CDDP in stepwise increasing concentrations. The characteristics of both cell lines were compared and the results were as follows;

1. Both cell lines formed a monolayer in a pavement-like arrangement and large cells were occasionally present in TYK-nu (R) rather than TYK-nu. The population doubling time of TYK-nu and TYK-nu (R) was 43hr and 48hr, respectively.

2. IC₅₀ (μ g/ml) in 96hr treatment with CDDP and carboplatin (CBDCA) was 0.035 and 0.5 in TYK-nu and 0.62 and 2.0 in TYK-nu (R), respectively.

3. In the intracellular CDDP concentration, there was no marked difference between TYK-nu and TYK-nu (R) after CDDP ($2.0\mu\text{g/ml}$) treatment in 2hr.

4. After treatment with CDDP ($0.2\mu\text{g/ml}$) or CBDCA ($2.0\mu\text{g/ml}$), a decrease in S and G2+M compartments was observed in the pattern of the DNA histogram of TYK-nu, but not in that of TYK-nu (R).

5. The majority of chromosomes in both cell lines were in hyperdiploid areas and the mode of TYK-nu and TYK-nu (R) was 56 and 51, respectively. The karyotype of TYK-nu (R) showed deletion of chromosome 7q.

Thus, compared to TYK-nu, TYK-nu (R) was 17.7 times more resistant to CDDP and 4 times more resistant to CBDCA. The results suggest that the mechanism of resistance to CDDP may be due to genetic changes at the cellular level.

Key words: Ovarian cancer • In vitro cell line • Cisplatin-resistance • Carboplatin

緒 言

Cisplatin (CDDP) は種々の悪性腫瘍に対し強い抗腫瘍効果を示し、婦人科領域では、とりわけ卵巢癌において優れた有効性が認められ¹⁾、現在、多剤併用による卵巢癌化学療法のための中心的抗癌剤として導入され、従来の化学療法に比較し高い奏功率が報告されている⁸⁾¹²⁾。しかし、CDDP に抵抗性を示す症例や再発症例ではその治療が極めて困難であり、今後の卵巢癌治療成績の向上を図るうえで、有効な新抗癌剤の開発とともに CDDP 耐性機序の解明は重要な課題である。

これまで Methotrexate⁶⁾, Adriamycin¹⁹⁾, Vincristine²⁴⁾, Etoposide¹⁶⁾等の耐性細胞株が誘導され、種々の検討による有意義な情報が提供されており、CDDP 耐性機序解析の目的において耐性細胞株の誘導は有用な研究方法と考えられる。今回、ヒト卵巢癌細胞株より CDDP に対する耐性株を誘導し、その細胞生物学的性状および CDDP の新誘導体 Carboplatin (CBDCA) に対する感受性を検討したので報告する。

研究方法

1. 培養材料および培養方法

当教室において樹立したヒト卵巢未分化癌由来細胞株 TYK-nu 株を用いた。TYK-nu 株の細胞形態は、多核巨細胞を混じたほぼ均一な多角細胞からなり、上皮様敷石状配列を示し増殖する⁷⁾。細胞の継代維持および実験においては、10% 準牛胎児血清 (以下 FCS, 三菱化成) 添加 Eagle MEM (日水製薬) を用い、 37°C 、5% CO_2 Incubator 内で静置培養し、0.25% trypsin と 0.01% EDTA 併用による細胞分散を行い継代した。

2. CDDP 耐性株の誘導

CDDP 耐性株の誘導は Galivan の方法に準じて行つた¹⁴⁾。すなわち、TYK-nu 株細胞 1×10^5 個/35mm plastic dish (Corning) の細胞密度で、培養開始より CDDP (ブリストル・マイヤーズ) $0.02\mu\text{g/ml}$ を加え培養した。CDDP 非添加培地における TYK-nu 株と同様の安定した増殖と継代操作が可能となるまで培養継代を繰り返し、その後、CDDP 濃度を段階的に増量しつつ同様の培養継代を行つた。この操作により約 6 カ月後に CDDP $0.5\mu\text{g/ml}$ の濃度においても増殖する耐性株 TYK-nu (R) 株を誘導した。

3. 形態および増殖

1) 顕微鏡的検索

位相差顕微鏡下での観察のほかに、Lab-Tek chamber slide (MILES) に付着させた細胞を 95% エタノール固定後、Hematoxylin-eosin (HE) 染色、Periodic acid schiff (PAS) 染色、Diastase 消化試験後 PAS 染色を行い観察した。また、既報⁷⁾に準じて超薄切片を作成し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛で二重染色後、透過型電子顕微鏡 (日立 HS-9) による観察も行つた。

2) 増殖曲線、倍加時間

1×10^5 個の TYK-nu (R) 株を 35mm plastic dish に播種し、培養開始時点より CDDP $0.5\mu\text{g/ml}$ 含培地中にて培養し、2 日ごとに medium change を行い、生細胞数を 0.4% Nigrosin を用いて算定し、増殖曲線を作成し倍加時間を求めた。実験は各 point ごとに triplicate にて 2 回以上行い、CDDP 非含培地において同様の方法にて得られた TYK-nu 株の増殖と比較した。

4. 酵素抗体法による HLA 抗原の検索

Lab-Tek chamber に 1×10^5 個の細胞を播種

し、一定時間 CDDP 非含培地にて培養したのち、PBS にて洗浄し Acetone 固定(10分)後、ABC 法にて HLA-A, B, C(Sera-lab 社: $\times 100$), HLA-DR (Cappel 社: $\times 120$) の染色を行い、染色態度を観察した。

5. 薬剤感受性

TYK-nu 株および TYK-nu (R) 株細胞を各々 1×10^5 個 35mm plastic dish に播種し、培養開始時点より CDDP および CBDCA (プリストル・マイヤーズ) を添加し、48 時間後に medium change を行い、培養開始 96 時間後に細胞を剥離採取し生細胞数を算定し、抗癌剤非含培地における生細胞数に対する比率を算定し作成した dose response curve より両細胞株に対する各薬剤の IC₅₀ (50% inhibition concentration) を求めた。実験は各 point ごとに triplicate にて 2 回行つた。

6. CDDP 濃度

1) 細胞内 CDDP 濃度

両株細胞 (1×10^8 個) を CDDP 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 含 MEM 培地に浮遊させ、37°C 恒温槽内にて 2 時間振蕩しつつ接触させた後、PBS にて遠心洗浄し、回収した細胞を用いて、原子吸光度法にて細胞内 CDDP 濃度を測定した²⁰⁾。

2) 培養上清中の CDDP 濃度

CDDP 非含培地において、両株細胞が confluent の状態に達した時点で、CDDP 1.0 $\mu\text{g/ml}$ を含む 10% FCS 添加 MEM 培地に換え、経時的に培養上清中の全 (Total) および蛋白非結合型 (Free) Platinum (Pt.) 濃度を duplicate にて前記方法で測定した。Free Pt. の測定は、採取した培養上清を Centrifree MPS-3 (Amicon) を用いて 1,200g、15 分間の遠心による限外濾過法にて得た検体を測定した。

7. 染色体分析

活発な増殖期にある細胞を用いて染色体分析を行つた。 1×10^6 個の培養細胞を MEM 5ml に浮遊させ、コルセミド (GIBCO) (最終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$) を加え 37°C、2 時間培養後、遠心 (800rpm、5 分間) し上清を捨て、37°C に温めた 0.075M KCl 4ml を加え 20 分間低張処理を行つた。カルノア液を同量加え細胞を浮遊させ 10 分間弱固定後、遠心しカルノア液を換え再浮遊させ 20 分間強固定の後、冷却した slide glass 上に細胞を滴下し、火炎固定にて作成した標本を trypsin 処理による G-binding を行い染色体数の算定、核型分析を行つた。

ルノア液を換え再浮遊させ 20 分間強固定の後、冷却した slide glass 上に細胞を滴下し、火炎固定にて作成した標本を trypsin 処理による G-binding を行い染色体数の算定、核型分析を行つた。

8. DAN histogram

CDDP 非含培地において confluent の状態に達した両株細胞を用い、CDDP (0.2 $\mu\text{g/ml}$) および CBDCA (2.0 $\mu\text{g/ml}$) 含培地にて 48 時間培養後、細胞を剥離分散し、PBS にて 2 回洗浄、70% エタノール固定を行い測定まで -20°C に保存。測定は、固定後の細胞を PBS にて 2 回遠心洗浄後、0.1% RNase (Sigma) 処理 (37°C、30 分) した後、Ethidium Bromide (E. B.) 溶液 (E. B. 10 $\mu\text{g/ml}$, 0.1% Na-citrate, 0.1% Triton X-100) にて DNA 染色 (4°C、30 分) 施行。測定直前に細胞浮遊液を 40 μ mesh filter に通し、Cytofluorograf 50H (Ortho 社) にて DNA histogram を作成し分析した。

研究成績

1. 形態・増殖および染色態度

CDDP 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 含培地における TYK-nu (R) 株の細胞形態は、TYK-nu 株と同様に上皮様敷石状配列を示し、confluent の状態に達しても pile up する傾向はほとんどみられない。しかし、TYK-nu 株に比較して細胞境界が不明瞭で、細胞の大小不同が著明に認められる (写真 1 ~ 4)。電顕的検索では両株とも同様の所見を示し、cilia 様の細胞突起を有し、分泌顆粒や分泌空胞は認めず、接着装置としては少数の desmosome が観察された。

TYK-nu 株の倍加時間は 43 時間。CDDP 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 含培地における TYK-nu (R) 株の増殖は、培養開始後 2 日目より対数増殖期に入り、10 日目まではほぼ直線的に増加し、倍加時間は 48 時間であつた (図 1)。TYK-nu (R) 株は CDDP 非含培地において 10 代以上継代後も形態所見に変化はなく、CDDP 含培地においても安定した増殖を示した。

PAS 染色および免疫酵素抗体法による各種染色態度においては両株細胞に差異はみられなかつた (表 1)。

2. 薬剤感受性

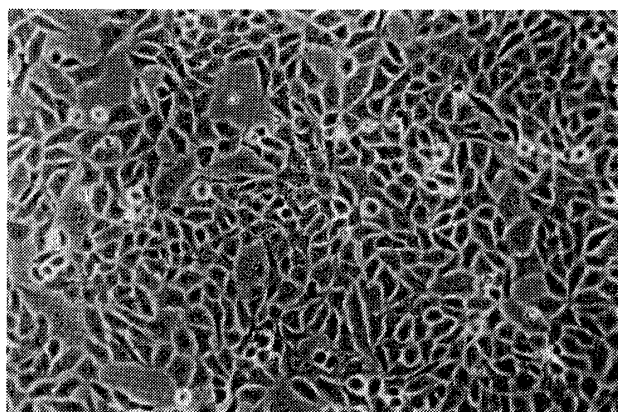


写真1 Morphological finding of TYK-nu. (Phase contrast, $\times 100$)

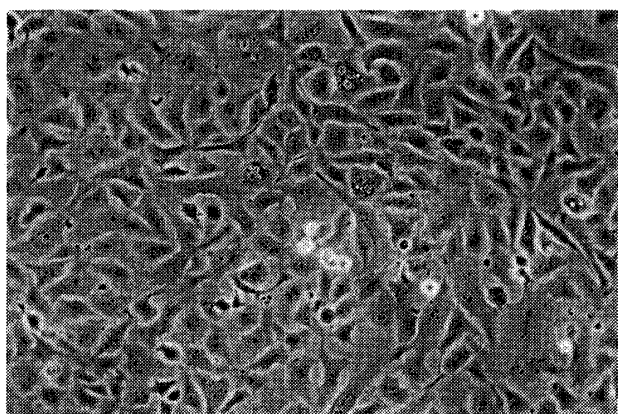


写真2 Morphological finding of TYK-nu(R). (Phase contrast, $\times 100$)

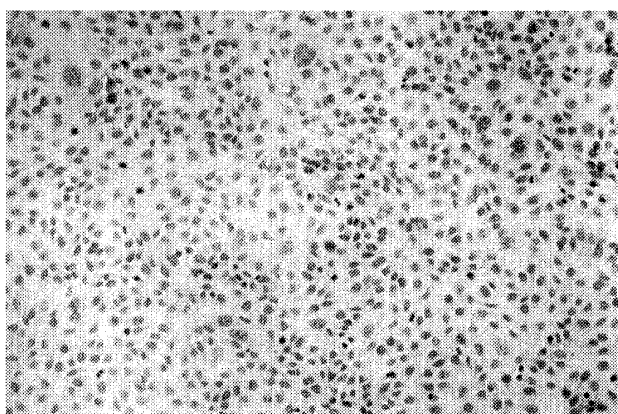


写真3 Morphological finding of TYK-nu. (HE, $\times 100$)

CDDP および CBDCA96時間接触後, dose response curve より求めた各薬剤の IC_{50} ($\mu g/ml$) は, TYK-nu 株では CDDP0.035, CBDCA0.5, TYK-nu (R) 株では各々0.62, 2.0

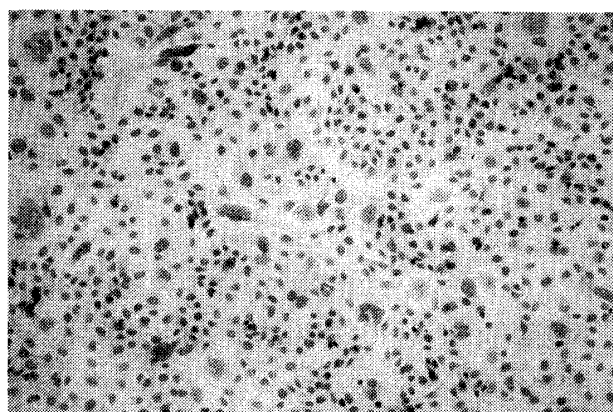


写真4 Morphological finding of TYK-nu (R). (HE, $\times 100$)

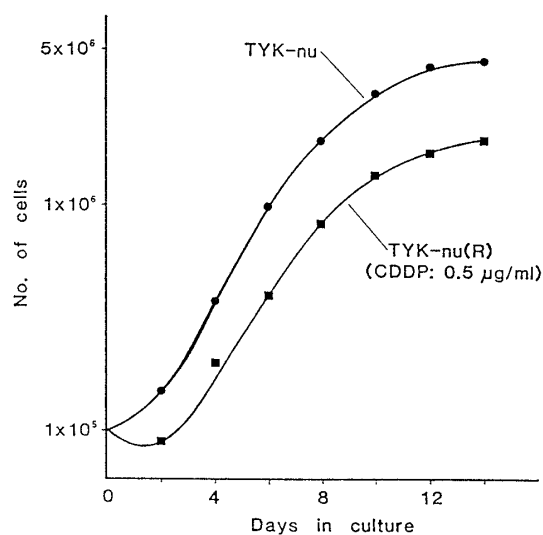


図1 Growth curves of TYK-nu and TYK-nu (R)

表1 Results of PAS staining and immunohistochemical staining

Staining	Cell line	
	TYK-nu	TYK-nu(R)
PAS	+	+
PAS(Diastase digestion)	-	-
HLA-A,B,C	+	+
HLA-DR	-	-

であり, TYK-nu (R) 株は TYK-nu 株に比較し, 17.7倍の CDDP 耐性を示し, CBDCA に対しても 4 倍の耐性を示した (表2).

3. CDDP 濃度

細胞内 CDDP 濃度 ($\mu g/10^8 cells$) は, TYK-nu 株では 0.414 ± 0.071 ($n=3$), TYK-nu (R) 株で

表2 Sensitivity of TYK-nu and TYK-nu(R) to cisplatin and carboplatin

Cell line	IC ₅₀ (μ g/ml)	
	CDDP	CBDCA
TYK-nu	0.035	0.5
TYK-nu(R)	0.62	2.0

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

表3 Intracellular cisplatin concentration

Cell line	Cisplatin conc. (μ g/10 ⁸ cells)
TYK-nu	0.414 $\pm$ 0.071
TYK-nu(R)	0.396 $\pm$ 0.013

表4 Serial changes of total and free platinum concentration in culture medium containing cisplatin (1 μ g/ml)

Cell line		Cisplatin concentration (μ g/ml)			
		1hr*	2hr	4hr	24hr
Cell free	Total Pt.	1.02	0.99	0.98	0.92
	Free Pt.	0.93	1.00	0.98	0.71
TYK-nu	Total Pt.	0.87	0.97	—	1.09
	Free Pt.	0.87	0.87	—	0.67
TYK-nu(R)	Total Pt.	0.98	1.04	—	1.02
	Free Pt.	0.92	0.94	—	0.72

*hours after culture

は0.396 $\pm$ 0.013 (n=3)であり両株の間に有意差は認められなかった(表3)。培養上清におけるPt. 濃度の経時的变化をみると、細胞を含まないdishにおいては、4時間後まではほぼ100%、24時間後においても約80%がFree Pt. として存在していた。培養細胞を含むdishでは、2時間後において約90%、24時間後において約70%がFree Pt. として存在していた(表4)。

4. 染色体分析

両株ともに多くは高2倍体域に分布し、TYK-nu株(継代134代目)のモードは56であるのに対し、CDDP0.5 μ g/ml含培地において十数代継代後のTYK-nu(R)株のモードは51であった(図2, 3)。核型分析においては、TYK-nu株では既報⁷⁾

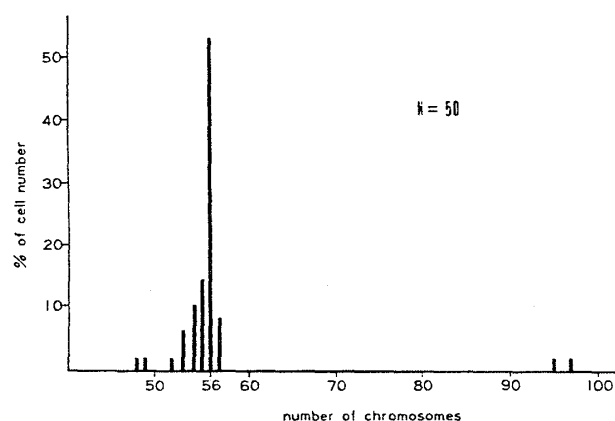


図2 Histogram of chromosome in TYK-nu

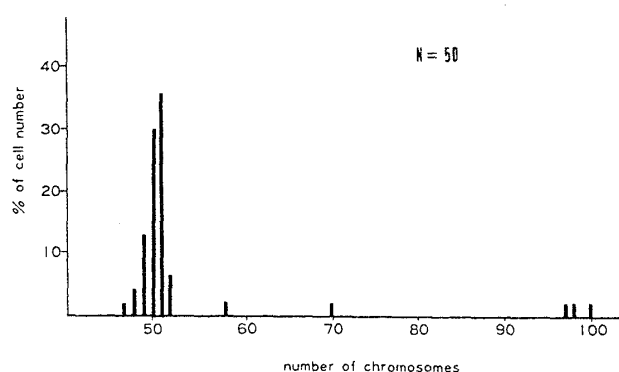


図3 Histogram of chromosome in TYK-nu(R)

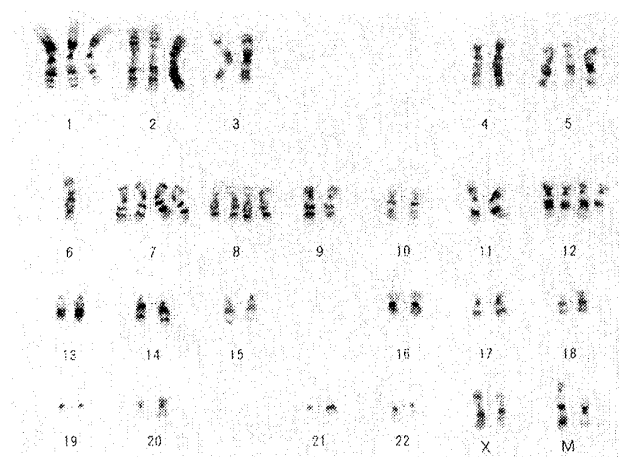


写真5 Karyotype of TYK-nu.(染色体数56)

と同様、特定部位の trisomy, tetrasomy がみられ、また、marker 染色体も観察された(写真5)。耐性株における特徴的所見として、ほぼ共通して7番染色体の一部に長腕の欠失(7q-)が観察された(写真6)。

5. DNA histogram

TYK-nu株においては、CDDPおよびCBDCA48時間接触により、S, G2+M期が障害されdebrisの増加によりG1 peakの幅が広がりS,

G2+Mのpeakが不明瞭となつたのに対し、TYK-nu(R)株では薬剤非接触群と同様の所見を示した(図4)。

考 案

生体内動態からみたCDDPの抗腫瘍効果についての検討より、生体内に投与されたCDDPは速やかに血漿蛋白と結合し、抗腫瘍効果の低い蛋白結合型Pt.となり、高い抗腫瘍活性を有するFree Pt.は、投与後数時間で血中より検出されなくなることが報告されている²⁾⁴⁾。今回検討した培地中のFree Pt.の経時的推移から、CDDP添加24時間後においても生体内と比較し高率(約70%)にFree Pt.として存在していることが判明し、CDDPの殺細胞効果を急速に減弱させることのない条件下で耐性細胞株を誘導し得たものと考えられた。

抗癌剤耐性と関連する染色体所見としては、MTX耐性細胞におけるdihydrofolate

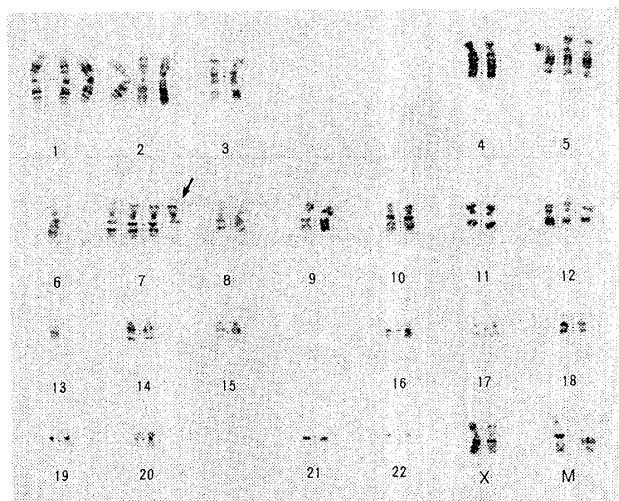


写真6 Karyotype of TYK-nu(R). (染色体数52, 矢印は長腕の欠失した7番染色体)

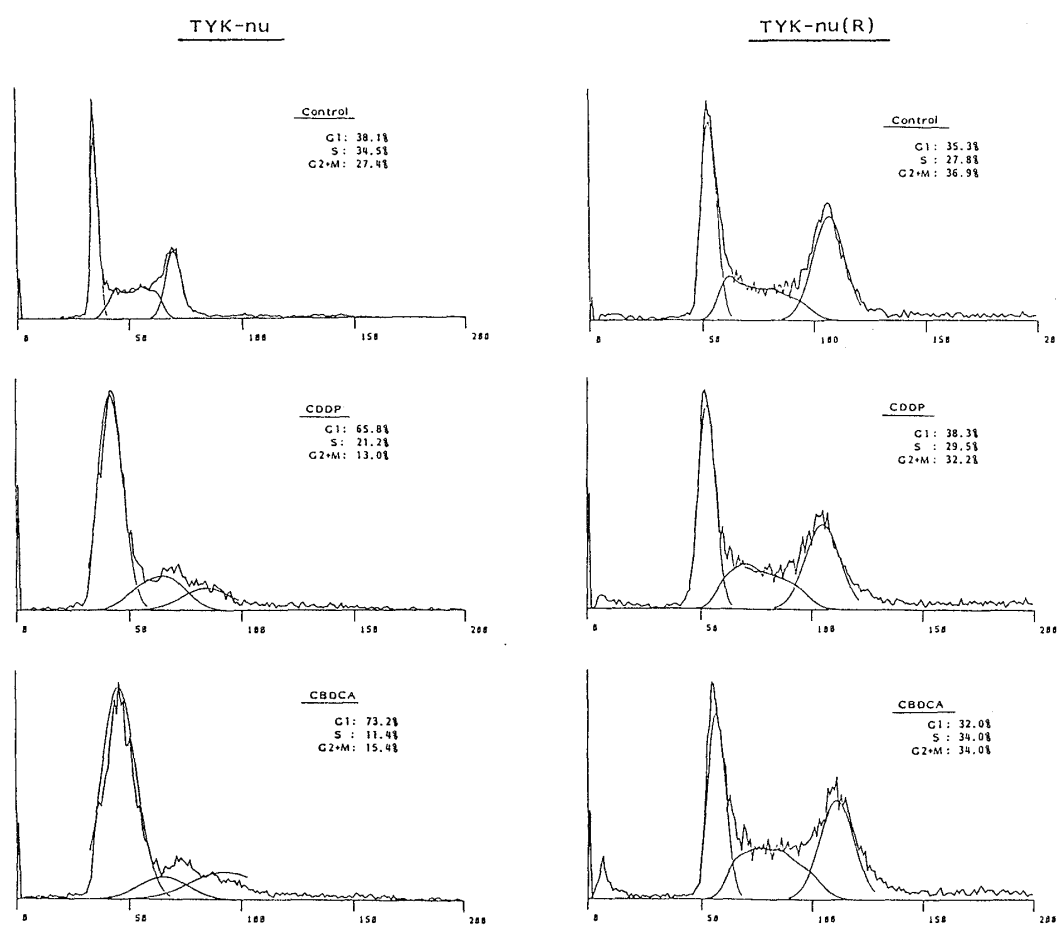


図4 DNA histogram

reductase 活性の上昇との関連性が指摘されている double minute chromosome や homogeneously staining region¹¹⁾のほかはほとんど知られていない。TYK-nu(R)株の核型分析における7q-の出現がCDDP感受性とどのような関連性を有するのか不明であるが、TYK-nu(R)株のCDDP耐性発現機序がmutationによるものであろうと推察されるとともに、染色体の特定の部分欠損症において腫瘍発生頻度が高いことが知られており、欠損部位に腫瘍発生を抑制する遺伝子が存在していると考えられていることから²²⁾、7番染色体長腕にCDDP感受性に関与する遺伝子が存在する可能性も示唆された。

細胞レベルにおけるCDDP耐性機構については、(1)glutathione(GSH)¹⁵⁾やmetallothionein⁹⁾の細胞内増加による薬剤不活性化の亢進、(2)細胞膜におけるNa依存性アミノ酸輸送機構の変化²³⁾、(3)DNA修復能の亢進²¹⁾および(4)流入障害による細胞内薬剤濃度の減少⁵⁾などが報告され、これらの耐性機構を取り崩す方策として、(1)に対しては、細胞内GSH濃度を低下させる目的で、GSH生成を阻害するbuthionine sulfoximine (BSO)¹⁵⁾の併用、(3)に対しては、DNA修復酵素の一つであるO⁶-alkylguanine DNA alkyltransferaseの作用を障害するstreptozotocinの併用³⁾、(4)に対しては、calcium channel blockerの併用¹⁸⁾などが基礎的・臨床的レベルで検討されている。TYK-nu(R)株においては、細胞内薬剤濃度に有意差はみられず、BSOを添加することによりCDDP感受性が亢進することから(未発表)、耐性機構にGSHの関与が推察された。

耐性機構の解析とともに、CDDP耐性細胞に対する種々の抗癌剤の殺細胞効果の検討も重要な課題である。CBDCAはCDDPのdose limiting factorである腎毒性が軽度で、CDDPの約10倍量の投与でCDDPと同等の抗腫瘍効果が期待でき¹⁷⁾、また、CDDP耐性化後の症例にも有効性を認めたことから注目されている第2世代の白金錯体である¹³⁾。今回の検討では、TYK-nu(R)株はCBACDに対して交差耐性を示したが、IC₅₀値より、その耐性の程度は低く、CDDPに対しては

17.7倍であるのに対し、CBDCAに対しては4倍であつた。Behrens et al.¹⁰⁾もCDDP耐性ヒト卵巢癌細胞株を用いてCBDCAを含む3種類のPt. analogueに対する感受性を検討し、いずれの薬剤に対しても交差耐性を示したが、耐性の程度には差が認められたと報告している。これらの知見は、CDDP耐性化後の症例に対する薬剤の選択および投与量設定において有意義なものといえる。

今回、誘導したTYK-nu(R)株はCDDPに対して安定した耐性を示し、これまで報告されている2780^{CP15)}、KFr¹⁸⁾、K562DDP²³⁾などのCDDP耐性ヒト卵巢癌細胞株とともに今後の基礎的研究に有用な細胞株と考えられた。

稿を終えるにあたり、CDDP濃度測定に御協力頂きましたブリストル・マイヤーズ(株)前臨床研究所に感謝致します。本論文の要旨は、第45回日本癌学会総会(昭和61年、札幌)および第39回日本産科婦人科学会学術講演会(昭和62年、東京)において発表した。

文 献

1. cisplatin 婦人科研究会グループ(代表 加藤俊): 共同研究によるcisplatinのphase II study. 癌と化療, 9: 694, 1982.
2. 藤井正人, 犬山征夫, 増野精二, 田中寿一, 高岡哲郎: ヒト血漿中でのシスプラチンの抗腫瘍活性について. 癌と化療, 11: 1875, 1984.
3. 藤原康弘, 西條長宏: 抗癌剤の薬剤耐性. Oncol. & Chemother., 3: 411, 1987.
4. 堀内正敏, 犬山征夫, 甲能直幸, 増野精二, 藤井正人: Cis-dichlorodiammineplatinum (II)の体内動態. 癌と化療, 9: 632, 1982.
5. 岩野一郎, 菊池義公: 卵巢癌に対する化学療法の検討. Oncol. & Chemother., 3: 411, 1987.
6. 田中耕平: ヒト絨毛癌細胞株よりのMethotrexate耐性株の誘導と耐性獲得機序について. 日産婦誌, 36: 2129, 1984.
7. 吉谷徳夫: ヒト卵巢癌(FIGO 未分化癌)由来培養細胞株の樹立とその細胞生物学的性状および各種制癌剤に対する感受性の解析. 日産婦誌, 38: 1747, 1986.
8. 湯沢秀夫, 高桑好一, 鈴木孝明, 本間 滋, 吉谷徳夫, 田中邦男, 田中耕平, 丸橋敏宏, 吉沢浩志, 小幡憲郎, 金沢浩二, 竹内正七: 悪性卵巢腫瘍におけるCisplatinを中心とした多剤併用化学療法. 新潟医学会誌, 99: 163, 1985.
9. Bakka, A., Endresen, L., Johnsen, A.B.S., Edminson, P.D. and Rugstad, P.D.: Resistance against cis-dichlorodiammineplatinum in cul-

- tured cells with a high content of metallothionein. *Toxicol. & Appl. Pharmacol.*, 61 : 215, 1981.
10. Behrens, B.C., Hamilton, T.C., Masuda, H., Grotzinger, K.R., Whang-Peng, J., Louie, K.G., Knutsen, T., McKoy, W.M., Young, R.C. and Ozols, R.F. : Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.*, 47 : 414, 1987.
 11. Biedler, J.L., Melera, P.W. and Spengler, B.A. : Specifically altered metaphase chromosomes in antifolate-resistant chinese hamster cells that overproduce dihydrofolate reductase. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2 : 47, 1979.
 12. Bruckner, H.W., Cohen, C.J., Goldberg, J.D., Kabakow, B., Wallach, R.C., Deppe, G., Greenspan, E.M., Gusberg, S.B. and Holland, J.F. : Improved chemotherapy for ovarian cancer with cis-diamminedichloroplatinum and adriamycin. *Cancer*, 47 : 2288, 1981.
 13. Evans, B.D., Raju, K.S., Calvert, A.H., Harland, S.J. and Wiltshaw, E. : Phase II study of JM8, a new platinum analog, in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Treat. Rep.*, 67 : 997, 1983.
 14. Galivan, J. : Transport and metabolism of methotrexate in normal and resistant cultured rat hepatoma cells. *Cancer Res.*, 39 : 735, 1979.
 15. Hamilton, T.C., Winker, M.A., Louie, K.G., Batist, G., Behrens, B.C., Tsuruo, T., Grotzinger, K.R., McKoy, W.M., Young, R.C. and Ozols, R.F. : Augmentation of adriamycin, melpharan, and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and -sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. *Biochem. Pharmacol.*, 34 : 2583, 1985.
 16. Hill, B.T. and Bellamy, A.S. : Establishment of an etoposide-resistant human epithelial tumor cell line in vitro : characterization of patterns of cross-resistance and drug sensitivities. *Int. J. Cancer*, 33 : 599, 1984.
 17. Jones, A.C., Wilson, P.A. and Steel, G.G. : Cell survival in four ovarian carcinoma xenografts following in vitro exposure to melphalan, cisplatin and cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II (CBDCA, JM8). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 13 : 109, 1984.
 18. Kikuchi, Y., Miyauchi, M., Kizawa, I., Oomori, K. and Kato, K. : Establishment of a cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line. *J.N.C.I.*, 77 : 1181, 1986.
 19. Kimura, S. and Okazaki, K. : A close association of adriamycin resistance with expression of cell surface antigens in adriamycin-resistant cell lines of herpes simplex virus type 2-transformed syrian hamster cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76 : 1179, 1985.
 20. LeRoy, A.F., Wehling, M.L., Sponseller, H.L., Friauf, W.S., Solomon, R.E. and Dedrick, R.L. : Analysis of platinum in biological materials by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Biochem. Med.*, 18 : 184, 1977.
 21. Micetich, K., Michaels, S., Jude, G., Kohn, K. and Zwelling, L. : Mechanism of resistance to cis-dichlorodiammine-platinum (II) (DDP) in a line of L1210 cells. *Proc. AACR and ASCO*, 22 : 252, 1981.
 22. Murphree, A.L. and Benedict, W.F. : Retinoblastoma : Clues to human oncogenesis. *Science*, 223 : 1028, 1984.
 23. Shionoya, S., Lu, Y. and Scanlon, K.J. : Properties of amino acid transport systems in K562 cells sensitive and resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, 46 : 3445, 1986.
 24. Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. : Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41 : 1967, 1981.

(No. 6437 昭63・9・6 受付)