



Title	グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制
Author(s)	小川, 晴幾
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144143
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

主論文

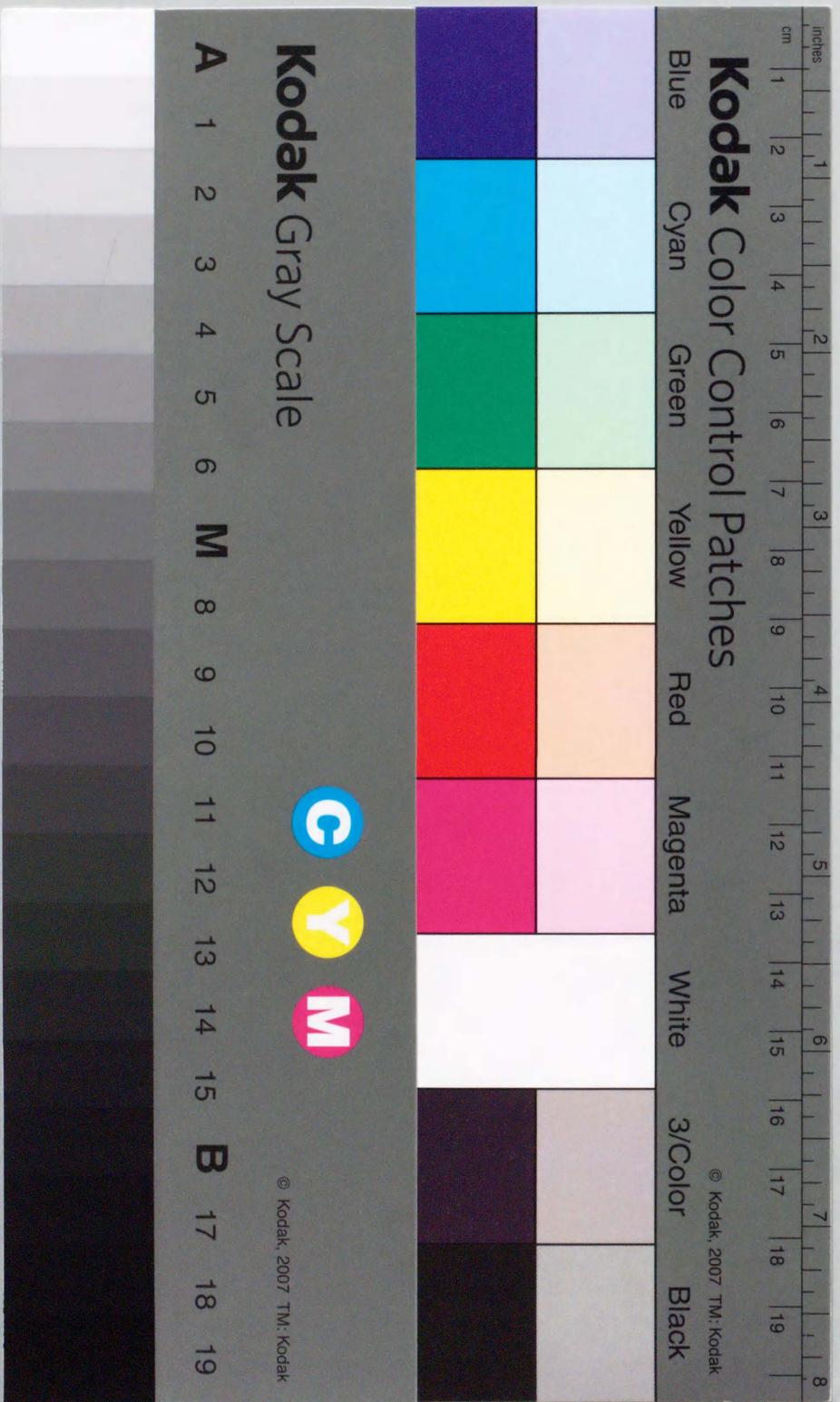
大阪大学医学雑誌
第46巻第1号 平成6年1月

①
グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制
Inhibition of Tumor Cell Invasion by Guanidine Analogues

大阪大学医学部産婦人科教室
Dept. of Obstetrics and Gynecology, Osaka Univ. Med. School

小川 晴幾
Haruki Ogawa

(平成5年11月16日受付)



グアニジン誘導体による癌細胞の浸潤抑制
Inhibition of Tumor Cell Invasion by Guanidine Analogs

大阪大学医学部産婦人科教室

Dept. of Obstetrics and Gynecology, Osaka Univ. Med. School

小川 晴幾
Haruki Ogawa

(平成5年11月16日受付)

The inhibitory effect of the guanidine analogues amiloride, guanethidine and triamterene on the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells, AH130, was studied. The invasive capacity of AH130 was estimated in vitro by counting the number of penetrated single tumor cells and tumor cell colonies beneath a cultured mesothelial cell monolayer. (H. Akedo et al., Cancer Res., 46 : 2416-2422, 1986). These agents suppressed the invasive capacity of a highly invasive clone, MM1, in a dose-dependent manner. We previously reported that serum was required for the in vitro invasion by MM1 cells (Jpn. J. Cancer Res., 82 : 493-496, 1991). Serum addition to MM1 cell suspension caused an increase in intracellular pH (pHi) as well as transient elevation of intracellular free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ spike), whereas serum addition to a poorly invasive clone, W1 caused neither pHi change nor $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ spike. The agents suppressed these ionic changes in MM1 cells in a dose-dependent manner. These results may indicate that serum, which induced the invasion, stimulated the intracellular signal transduction system related to $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchange and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ spike, and that amiloride and its guanidine analogues inhibited the invasion through the suppression of this system.

Key Words : Ascites hepatoma, Amiloride, Triamterene, Guanethidine, Invasion, Intracellular signal transduction

緒 言

癌の進展に関わるのはただ単に細胞の増殖だけではなく、癌浸潤、癌転移は治療に対する1つの大きな障害となっている。したがって浸潤の予防と抑制は癌治療の新しい指針となってきている。浸潤の機序を解明し、その抑制剤を検索するため、我々は in vitro で浸潤能を測定できるモデルを開発した¹⁾。このモデルは癌細胞をラットの腹腔内に注入することによってできる浸潤性腫瘍の大きさとよく相關する。このモデルを使って我々は幾つかの浸潤促進物質^{2~5)}や浸潤抑制物質^{6~8)}を見い出してきたが、それらは癌の浸潤能が宿主によって影響されることを示唆している。

た⁹⁾。このモデルでは中皮細胞や血管内皮細胞を単層培養し、その上に癌細胞を重層培養して浸潤能を測定するが、培養液には10%の胎仔血清が加えられている。しかし血清を除くと浸潤は認められない¹⁰⁾。また血清を加えるとすぐに浸潤が開始される。血清は0.4%牛血清アルブミン、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インシュリン、25ng/ml EGF (Epidermal growth factor)、100ng/ml IGF-I (Insulin-like growth factor)、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HGF (Hepatocyte growth factor)、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ フィプロネクチン、あるいは8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヴィトロネクチンで代用できない¹¹⁾。血清より部分的に精製した分画を加えると浸潤誘発作用は認められるが

増殖促進作用は認めない。最近我々はオレオイル-リゾフォスファチジン酸やフォスフォリバーゼDの添加が血清の添加と同程度の浸潤誘発を起こすことを報告した¹¹⁾。リゾフォスファチジン酸による細胞刺激が浸潤を誘発する機構を解析する目的で、癌細胞を前もって、rho低分子量G蛋白を特異的にADPリボシル化して失活させるボツリヌス毒素C3で処理したところ、リゾフォスファチジン酸の作用が抑制された¹¹⁾ことからGTP結合タンパクを介する細胞内情報伝達が浸潤に関与していると考えられた。

血清に含まれているような多種の生物活性物質が細胞表面にある受容体に結合すると初期の変化として細胞のイオン輸送の変化が観察されることが報告されている¹²⁾。この変化を抑制すると生物活性までも抑制される。例えばアミロライドは腫瘍の増殖を抑制することが報告されている¹³⁾。種々のグアニジン誘導体はアミロライドと較べてナトリウムイオンの流入をより効果的に抑制することが報告されている。Kaczorowski, G. J. らによるとアミロライドのアシルグアニジン誘導体はその作用発現のために陽イオン化されなければならない¹⁴⁾。本論文では浸潤における細胞内情報伝達を知り、新しい抗浸潤薬を探索するためにラット腹水肝癌(AH細胞)の細胞内pHi(pHi)および細胞内カルシウムイオン($[Ca^{2+}]_i$)に対する血清の効果を調べた。また癌の浸潤に対するアミロライドとその構造類似体の効果を調べた。

対象および方法

1) 試薬

アミロライド(3,5-diamino-6-chloro-N-(diaminomethylene)-pyrazinecarboxamide), 生血清アルブミン, インスリン, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) は Sigma 社より購入した。1,2-(5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy) -2- (2'-amino-5'-methylphenoxy) -ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid, K salt (fura-2), fura-2-AM, 2, 7-Bis (carboxyethyl)-5, 6-carboxy-fluorescein (BCECF), BCECF-AM は和光化学工業より購入した。胎仔血清(FCS)は Cell Culture Laboratories から購入した。グアネチヂン((2-hexahydro-1(2H)-azocinyl)-ethyl)-guanidine sulphate)およびトリアムテレン(2,4,7-triamino-6-phenylpteridine)は各々日本チバガイギ社および住友製薬より供与された。

2) 培養細胞

ラット腹水肝癌 AH130 (AH細胞) は Eagle's minimum essential medium に 10% FCS を加えた培養液(modified MEM)にて培養した。低浸潤細胞株 W1 は AH 細胞から限界希釈法により分離された。高浸潤細胞株 MM1 は AH 細胞から軟寒天法にて分離された。

3) 細胞内pHiの測定

W1 または MM1 (3×10^7) を 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES-Na, 5mM glucose, 1mM CaCl₂

(HEPES-glucose 液, pH7.4) で洗浄し、10ml 液に再浮遊させ、1 μM の BCECF-AM を加えて 37°C で 30 分間反応させた。2 度上記洗浄液で洗浄後同じ溶液に再浮遊させ、その 0.2ml (3×10^6) を 1.5ml HEPES-glucose 液に加えた。pHi は細胞内に取り込ませた BCECF の蛍光強度で計測し、K⁺/H⁺ イオノフォアであるニジエリシンを使って水素イオン平衡法で較正した。蛍光強度は AMINCO SPF-500 (励起波長 506nm, 測定波長 530nm) により測定した。

4) 細胞内遊離カルシウムイオンの測定

W1 または MM1 (3×10^7) を HEPES-glucose 液, pH7.4 で洗浄し、10ml 液に再浮遊させ、6 μM の fura-2-AM を加えて 37°C で 30 分間反応させた。2 度洗浄後同じ溶液に再浮遊させ、その 0.2ml (3×10^6) を 1.8ml HEPES-glucose 液に加えた。 $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内に取り込ませた fura-2 の蛍光強度で計測し、イオノフォアであるイオノマイシンおよび EDTA を使って較正した。蛍光強度は AMINCO SPF-500 (励起波長 340nm, 測定波長 510nm) により測定した。

5) 浸潤能の測定

浸潤能の測定は以前報告した方法によった¹。すなわち、ラットの腸間膜より採取した中皮細胞を 35mm 培養皿に単層培養し (M 細胞層)，その上に W1 または MM1 細胞を 1×10^5 個蒔いて 37°C で 24 時間培養した。M 細胞層下に侵入した癌細胞とコロニー数を位相差顕微鏡を用いて数えて浸潤能とした。アミロライドとトリアムテレンは少量の DMSO に溶解し、培養液に加えた。浸潤能の抑制度は DMSO のみを培養液に加えた時の浸潤能に対する割合で示した。グアネチヂンは少量の PBS に溶解し、培養液に加えた。浸潤能の抑制度は PBS のみを培養液に加えた時の浸潤能に対する割合で示した。

結果

癌の浸潤における細胞内情報伝達を調べるために、胎仔血清(FCS)を加える前後で MM1 の細胞内 pH (pHi) を測定した。HEPES-glucose 液 (pH7.4) に浮遊した高浸潤細胞株 MM1 と低浸潤細胞株 W1 の pHi はともに 7.40 であったが、FCS (HEPES-glucose 液 (pH7.4)) に対して透析してある)を MM1 に加える (終濃度 10%) と、MM1 の pHi は時間依存性に 5 分間で 0.12 上昇した (Figure 1)。しかし透析済み FCS のこのような効果は W1 では小さく pHi 上昇は MM1 と較べて 4 分の 1 程度であった。この pHi の上昇に対するアミロライドの影響を調べるために、200 μM のアミロライドを FCS とともに加えた。Figure 1 に示されたように、MM1 の pHi の上昇は認められなかった。その後、FCS 添加後 7 分でアミロライドを加えると MM1 のその後の pHi の上昇は完全に抑制された。

細胞内遊離カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) は pHi に反応して変化することが知られているため¹⁵⁾ FCS の添加による MM1 の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を fura-2 を indicator として測定したが、変化の度合が小さいので、in vitro 浸潤の誘発にお

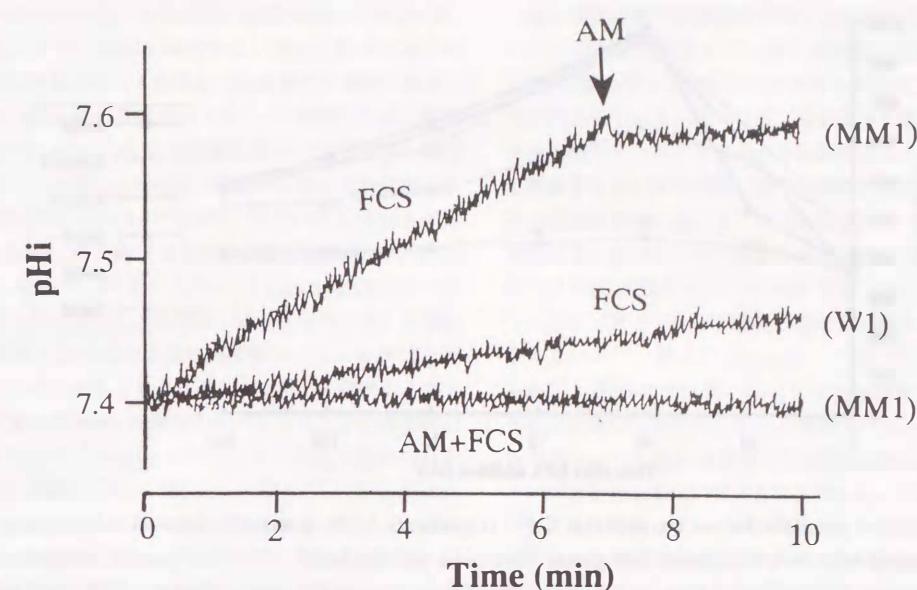


Figure 1. Effect of FCS and amiloride on cytoplasmic pH in AH cells. Routinely cultured W1 or MM1 cells were prepared and loaded with BCECF as described under "Materials and Methods". The loaded cell suspension (3×10^6 cells in 0.2ml HEPES-glucose buffer) was added into 1.5ml HEPES-glucose buffer and measured for its fluorescence intensity. The resting pHi of AH cells was estimated to be 7.40. When FCS was added into the resting state of MM1 cells, a highly invasive clone, suspended in HEPES-glucose buffer, pHi of MM1 cells increased in a time-dependent manner. However, pHi change by FCS of W1 cells, a poorly invasive clone, was much smaller. When 200 μM of amiloride was added together with FCS, no increase of pHi of MM1 cells was observed. When amiloride was added 7 min. After the addition of FCS, the drug completely impaired the pHi increase of MM1 cells.

いて FCS と同程度あるいはそれ以上の効果を持つリゾフォスファチジン酸(LPA)を添加し $[Ca^{2+}]_i$ の変化を追跡した。Figure 2 に示すように LPA 投与後 48 秒で鋭い上昇があり、その後ゆっくりとした下降が認められた ($[Ca^{2+}]_i$ spike)。この現象は W1 では認められなかった。この $[Ca^{2+}]_i$ spike に対するアミロライドの影響はこの薬剤の 510nm での自己蛍光のために測定できなかった。しかしアミロライドの構造類似体であり同様な薬理作用をもつグアネチヂンは自己蛍光を示ないので、グアネチヂンの効果を調べたところ濃度依存性にこの $[Ca^{2+}]_i$ spike を抑制することが明らかとなった (IC₅₀=1mM) (Figure 2)。

次に浸潤に対するアミロライド、グアネチヂンその他のグアニジン誘導体の効果を検討した (Figure 3)。MM1 の M 細胞層への浸潤はアミロライドを培養液に加えることで濃度依存性に抑制され、200 μM のアミロライドで約 80% の抑制が観察された。IC₅₀ は 30 μM であった。我々の浸潤モデルは癌細胞と M 細胞との重層培養であるためアミロライドの効果は M 細胞に対するものである可能性がある。

そこで MM1 細胞あるいは M 細胞をアミロライドで前処理して浸潤抑制効果を調べたが、全く抑制を認めなかった。このようにアミロライドの効果は可逆的で、その作用対象がいずれの細胞か明らかにはできなかった。アミロライドは幾つかの細胞株で増殖抑制作用をもつことが報告されているため¹³⁾、MM1 の増殖に与えるアミロライドの効果を調べた。100-200 μM のアミロライドは浸潤測定時間 (20 時間) 内で増殖を抑制しなかった。しかしさらに 72 時間まで調べると 100 および 200 μM のアミロライドは各々 21% と 59% の増殖抑制を示した。このことより浸潤における細胞内情報伝達経路は細胞増殖の経路と部分的に同一であることが推察された。アミロライドの構造類似体であるグアネチヂンとトリアムテレンも濃度依存性に浸潤を抑制した。グアネチヂンとトリアムテレンの IC₅₀ は各々 200 および 40 μM であった。

考察

我々は既に MM1 が M 細胞層に浸潤するためには培養液中に血清があることが不可欠であることを報告した¹⁰⁾。

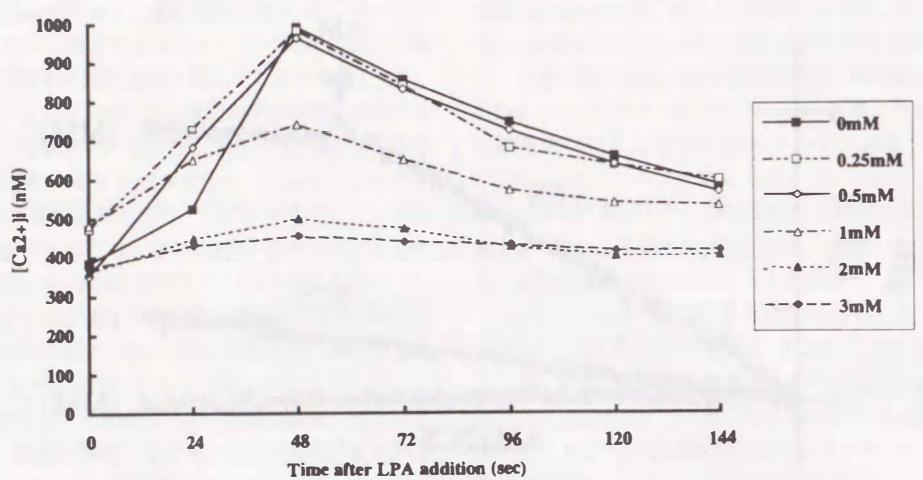


Figure 2. Effect of guanethidine on intracellular Ca^{2+} response to LPA. Routinely cultured MM1 cells were prepared and loaded with fura-2 as described under "Materials and Methods". The fluorescence intensity of 0.2ml of cell suspension ($2 \times 10^7/\text{ml}$) added into 1.8ml of HEPES-glucose buffer was measured. LPA addition instantaneously resulted in a sharp increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ followed by its slower decrease ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ spike). Guanethidine suppressed the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spike of MM1 cells in a dose-dependent manner. IC₅₀ was estimated to be 1mM.

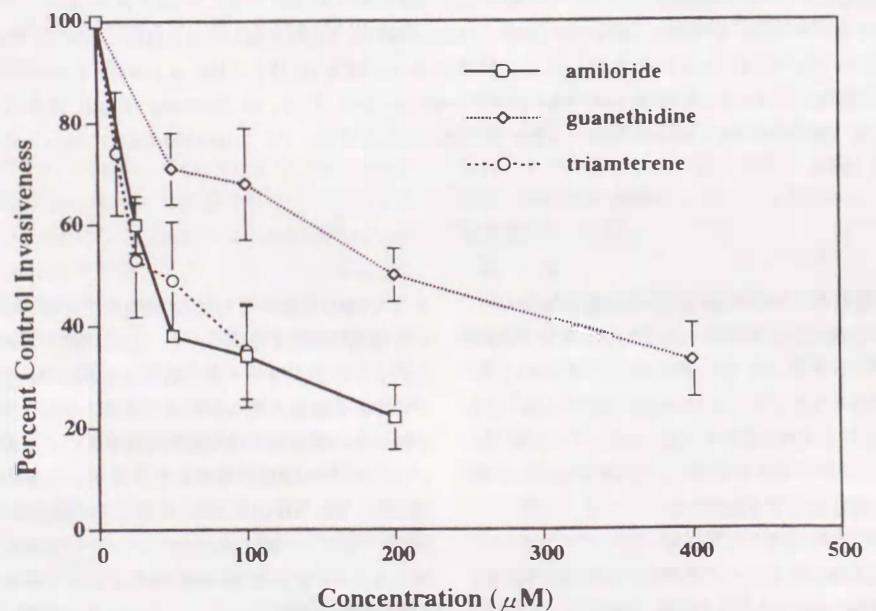


Figure 3. Effect of guanidine analogues on tumor invasiveness. Routinely cultured MM1 cells were prepared and in vitro invasive capacity of the cells was assayed as described under "Materials and Methods". Guanidine analogues added in the invasion assay medium inhibited the invasion of M cell layer by MM1 cells in a dose-dependent manner. Almost 80% inhibition was observed with 200 μM of amiloride. Half maximum inhibition was estimated to be at 30 μM . Almost 70% inhibition was observed with 400 μM of guanethidine. Half maximum inhibition was estimated to be at 200 μM . Almost 70% inhibition was observed with 100 μM of triamterene. Half maximum inhibition was estimated to be at 20 μM . Points, mean of triplicate experiments; bars, SE.

FCS を培養液から除くと癌細胞の浸潤は認められないが、FCS を添加すると浸潤が開始する。FCS に見られるこのような浸潤誘発作用は人血清または血漿でも認められる。浸潤における血清の要求性は MM1-中皮細胞の系に特異的ではなく、MM1 の血管内皮細胞層への浸潤やヒト肺小細胞癌のヒト胸膜中皮細胞層への浸潤に対しても認められる。浸潤に対する血清の作用機序についてはほとんど分かっていない。本実験では血清やこれに代わる LPA の添加により MM1 の pH_i 上昇と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spike が誘起されることが明らかになった。現段階ではこれらのイオンの変化が M 細胞層への浸潤の過程に直接関わっているかは不明である。しかし pH_i 上昇と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spike を抑制するグアニジン誘導体が同時に浸潤を抑制すること及び浸潤抑制が pH_i 上昇と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spike の抑制と同じ濃度で認められることから、浸潤に伴って細胞内 pH や Ca^{2+} の変化が誘起されることが示唆される。低浸潤株である W1 では血清刺激による pH_i や $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spike がほとんど認められないという結果はこの推察を支持する。白血球遊走因子の 1 つである formylmethionylleucylphenylalanine (fMet-Leu-Phe) はアミロイド感受性の $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 逆輸送タンパクを介しての pH_i 上昇を誘導する^[16]が、我々の結果とよく合っている。また IV 型コラーゲンによって A2058 細胞が遊走刺激され、それに重要な役割を示している細胞カルシウムストアからのカルシウム放出をこのコラーゲンが誘導していることが報告されている^[17]。

高浸潤株である MM1 と低浸潤株である W1 がほとんど同じ増殖曲線(倍加時間: 18 時間)を示すが血清によって誘起されるイオン変化は W1 に較べて MM1 ではるかに大きいことより、これらイオン変化が細胞増殖に対する初期応答である可能性は小さい。この推測は細胞増殖がイオン変化および浸潤を抑制する濃度ではアミロイドで抑制されなかたことによっても裏付けられる。Sparks らによつてアミロイドが移植腫瘍の増殖を抑えることが報告されているが^[18]、Szolgyai-Daniel らは pH_i の変化は細胞増殖に直接関わっていないことを報告している^[19]。彼等は 3 種の腫瘍細胞株の増殖に対するアミロイドの効果を調べているが、2 種の細胞株では増殖は抑制されたが、ほかの 1 種では抑制されなかった。この 3 種の細胞株のあいだでアミロイド存在下での pH_i は同じであった。このことよりアミロイドの増殖抑制は pH_i 制御と明らかな関連は認められない。アミロイドの浸潤抑制効果に対するもう 1 つの解釈は癌の浸潤や転移に関係していると考えられているウロキナーゼ型のプラスミノーゲン活性化因子をアミロイドが抑制するというものであろう^[19]。しかし MM1 による浸潤はアプロチニンのような serine protease inhibitor や trypsin inhibitor である phenylmethylsulphonyl fluoride^[6] や tissue-specific metalloproteinase inhibitor などでは抑制されない。

Anand-Srivastava らは百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパクを介するアデニレートシクラーゼの制御をアミロライドが修飾することを報告している²²⁾。

腫瘍細胞の浸潤を抑制するアミロライドの作用は特異的ではなく、この構造類似物質であるグアネチヂンやトリアムテレンもまた浸潤を抑制する。我々は現在ラットをもちいた浸潤実験でのこれらの薬剤の効果を検討中である。これらの薬剤は現在利尿剤としてあるいは降圧剤として臨床で使用されており、薬効や副作用についてよく知られているため抗浸潤薬剤としての臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Akedo H., Shinkai K., Mukai M., Mori Y., Tateishi R., Tanaka K., Yamamoto R., and Morishita T. Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers : a model for tumor invasion. *Cancer Res.*, 46 : 2416-2422, 1986.
- 2) Mukai M., Shinkai K., Tateishi R., Mori R., and Akedo. Macrophage potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res.*, 47 : 2167-2171, 1987.
- 3) Mukai M., Shinkai K., Komatsu K., and Akedo H. Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by transforming growth factor- α . *Jpn. J. Cancer Res.*, 80 : 107-110, 1989.
- 4) Shinkai K., Mukai M., and Akedo H. Superoxide radical potentiates invasive capacity of rat ascites hepatoma cells in vitro. *Cancer Lett.*, 32 : 7-13, 1986.
- 5) Imamura F., Horai T., Mukai M., Shinkai K., and Akedo H. Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by adriamycin. *Cancer Res.*, 50 : 2018-2021, 1990.
- 6) Shinkai K., Mukai M., Komatsu M., and Akedo H. Factor from rat liver with antiinvasive potential on rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res.*, 48 : 3760-3764, 1988.
- 7) Isoai A., Giga-Hama Y., Shinkai K., Mukai M., Akedo H., and Kumagai H. Purification and characterization of tumor invasion-inhibiting factors. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81 : 909-914, 1990.
- 8) Shinkai K., Mukai M., Horai T., Ohigashi H., Nishikawa S., Inoue H., Takeda Y., and Akedo H. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by transmethylation inhibitors. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80 : 716-719, 1989.
- 9) Akedo H., Shinkai K., Mukai M., and Komatsu K. Potentiation and inhibition of tumor cell invasion by host cells and mediators. *Invasion Metastasis*, 9 : 134-148, 1989.
- 10) Imamura F., Horai T., Mukai M., Shinkai K., and Akedo H. Serum requirement for in vitro invasion by tumor cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82 : 493-496, 1991.
- 11) Imamura F., Horai T., Mukai M., Shinkai K., Sawada M., and Akedo H. Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press.
- 12) Rollins B. J., and Stiles C. D. Serum-inducible genes. *Adv. Cancer Res.*, 53 : 1-32, 1989.
- 13) Sparks R. L., Pool T. B., Smith N. K. R., and Cameron I. L. Effects of amiloride on tumor growth and intracellular element content of tumor cells in vivo. *Cancer Res.*, 43 : 73-77, 1983.
- 14) Kaczorowski G. J., Barros F., Dethmers J. K., and Trumble M. J. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange in pituitary plasma membrane vesicles by analogues of Amiloride. *Biochemistry*, 24 : 1394-1403, 1985.
- 15) Kiang J. G. Effect of intracellular pH on cytosolic free $[\text{Ca}^{2+}]$ in human epidermoid A-431 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 207 : 287-296, 1991.
- 16) Grinstein S., and Furuya W. Amiloride-sensitive Na^+/H^+ exchange in human neutrophils : mechanism of activation by chemotactic factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122 : 755-762, 1984.
- 17) Savarese, D. M. F., Russell J. T., Fatatis A., and Liotta L. A. Type IV collagen stimulates and increase in intracellular calcium. *J. Biol. Chem.*, 267 : 21928-21935, 1992.
- 18) Szolgyay-Daniel E., Carlsson J., Zierold K., Holtermann G., Dufau E., and Acker H. Effects of amiloride treatment on U-118 MG and U-251 MG human glioma and HT-29 human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 51 : 1039-1044, 1991.
- 19) Vassalli J. D., and Belin D. Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS lett.*, 214 : 187-191, 1987.
- 20) Liotta L. A., Mandler R., Murano G., Katz D. A., Godon R. K., Chiang P. K., and Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 3302-3306, 1986.
- 21) Stracke M. L., Guirguis R., Liotta L. A., and Schiffmann E. Pertussis toxin inhibits stimulated motility independently of the adenylate cyclase pathway in human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 146 : 339-345, 1987.
- 22) Anand-Srivastava M. B., Gutkowska J., and Cantin M. The presence of atrial-natriuretic-factor receptors of ANF-R2 subtype in rat platelets. *Biochem. J.*, 278 : 211-217, 1991.

: 211-217, 1991.

抄 錄

我々はグアニジニウム基をもつアミロライド、グアネチヂン、トリアムテレンの3薬剤について、ラット腹水肝癌(AH細胞)の浸潤抑制作用を調べた。浸潤能の測定はラットの初代培養中皮細胞層上にAH細胞を重層培養し、AH細胞が中皮細胞層下に侵入して形成されるコロニー数を測定する浸潤モデル系(H. Akedo et al., *Cancer Res.*, 46 : 2416-2422, 1986)を使用した。これら3薬剤は濃度依存性に浸潤抑制効果を示した。我々は以前に、この系では血清無しでは浸潤は認められないことを報告した(*Jpn. J. Cancer Res.*, 82 : 493-496, 1991)。血清をAH細胞の高浸潤株MM1に添加することにより、細胞内pH(pHi)の上昇、遊離カルシウムイオンの一過性上昇($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i spike}}$)がみられるが、低浸潤株W1ではこれらイオン変化はほとんど認められなかった。アミロライドは血清によるMM1のpHiの上昇を濃度依存的に抑制した。また、グアネチヂンは $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i spike}}$ を濃度依存的に抑制した。我々の系において血清は癌浸潤を誘導するが、この作用は Na^+-H^+ 交換やカルシウムイオン交換に関わる細胞内情報伝達を賦活することにより、また、グアニジニウム基をもつアミロライド、グアネチヂン、トリアムテレンの3薬剤はこの作用を抑えることにより、浸潤を抑制すると考えられた。

