アンスラサイクリン系薬物の初代培養肝実質細胞からの グルコース分泌に与える影響と細胞傷害性

奥村 学*, 岩切智美, 日高宗明, 高村徳人, 児玉裕文, 有森和彦
宮崎医科大学医学部附属病院薬剤部†

Influences of Anthracyclines on Glucose Secretion and Cytotoxicity in Primary Culture of Rat Hepatocytes

Manabu Okumura*, Tomomi Iwakiri, Muneaki Hidaka, Norito Takamura,
Hirofumi Kodama and Kazuhiko Arimori
Department of Pharmacy, Miyazaki Medical College Hospital†

[Received May 8, 2001
Accepted September 3, 2001]

Anthracyclines have been used to cure a variety of cancers, and they are one of the most effective anti-cancer drugs. However, due to the simultaneous occurrence of serious side effects, successful chemotherapy is difficult to administer in clinical cancer treatment. Therefore, to evaluate the side effects, we examined the influence of anthracycline derivatives, especially epirubicin (EPI), on the glucose secretion and cytotoxicity of anthracycline derivatives in primary culture of rat hepatocytes.

In this study, EPI reduced the spontaneous glucose secretion dose-dependently in a primary culture of rat hepatocytes. However, EPI enhanced the increased-secretion induced by glucagon, and the potency of such enhancement at low concentrations was stronger than that at high concentrations. In contrast, aclarubicin (ACL) reduced both the spontaneous glucose secretion and the increased-secretion. Furthermore, Anthracycline derivatives increased the lactate dehydrogenase (LDH) leakage both time- and dose- dependently, and the potency order was idarubicin $\geq$ ACL > daunorubicin > EPI. The degree of cytotoxicity as evaluated by measuring the glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels and by performing an MTT-assay was also similar to the results obtained for LDH leakage.

These results suggest that EPI stimulates the sensitivity of rat hepatocytes to other endogenous agents, and this influence may be involved in the degree of cytotoxicity for anthracycline derivatives.

Keywords — anthracyclines, epirubicin, glucose secretion, cytotoxicity, hepatocytes

緒 言

今日、高齢化や食生活を含めた人体を取り巻く環境の多様な変化により、癌罹患率が年々上昇する傾向にあり、それに伴い抗悪性腫瘍剤による化学療法の役割は臨床における手術によらない癌治療法として大きな位置を

占めてきている。抗悪性腫瘍剤の抗腫瘍作用は悪性腫瘍細胞に対する感受性の正常細胞との違いを利用し、悪性腫瘍細胞に対し選択的に作用させ増殖を抑制させることに基づくが、悪性腫瘍細胞と正常細胞の両細胞に及ぼす影響に質的あるいは量的な違いが少なく、正常細胞に対しても毒性を示す。そのため、悪性腫瘍細胞に対し効果

† 宮崎県宮崎郡清武町木原5200; 5200, Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki-gun, Miyazaki, 889-1692 Japan

の強い薬物ほど重篤な副作用をまねくこととなり、積極的な使用の障害となっているのが現状である。

抗悪性腫瘍剤は代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、植物アルカロイド、ホルモンおよびその拮抗剤等の細胞毒性薬と、インターフェロンを代表とする免疫機構に間接的に関与することにより作用する生体応答修飾物質に大別される。このうち、現在の癌化学療法は直接的に悪性腫瘍細胞に作用し、効果発現の有無の明瞭な細胞毒性薬に依存するところが大きく、その中でも感染症の化学療法と同様、選択性の比較的良好な抗生物質に由来するアンスラサイクリン系薬物の臨床における使用頻度が高くなってきている。

さらに最近、抗悪性腫瘍剤による癌化学療法において副作用とともに問題となってきているのが、抗悪性腫瘍剤に対する悪性腫瘍細胞の耐性化である。その要因の一つとして p-糖蛋白質の誘導による抗悪性腫瘍剤の細胞外への排出が考えられている。アンスラサイクリン系薬物の耐性化に関しても悪性腫瘍細胞における p-糖蛋白質の誘導が起因していることが報告^{1,2)}されている。

しかしながら、有害物質の細胞外への排出が有害作用の発現を抑制する生理的防御機構であることを考慮すると、正常細胞における p-糖蛋白質の誘導は抗悪性腫瘍剤による副作用発現を抑制する重要な生理的現象であると言える。ゆえに、抗悪性腫瘍剤による副作用の発現およびその強度は p-糖蛋白質の誘導後より、むしろ誘導以前の方が強いものと考えられる。ところが、p-糖蛋白質の誘導以前における抗悪性腫瘍剤の細胞傷害性に関する報告はほとんどなされていないのが現状である。これらのことから、p-糖蛋白質の誘導以前の正常細胞に対する抗悪性腫瘍剤の作用を検討することにより、癌化学療法時の副作用の軽減や未然の防止に貢献出来るものと考ええる。

そこで、今回ラット初代培養肝実質細胞を用い、副作用の比較的少ないとされるエピルビシン (EPI) を中心にアンスラサイクリン系薬物による肝細胞の糖分泌機能に対する影響、細胞増殖活性に対する影響、および細胞毒性の各指標に対する影響について、各アンスラサイクリン系薬物間の差異を比較し、機能に与える作用と細胞傷害性との関連性を検討した。

方 法

1. 動物および試薬

Wistar 系雄性ラットは九動 (株) より購入した。コラゲナーゼは和光純薬工業 (株) より、コラーゲンをコートしたカルチャープレートおよびマイクロプレートは岩城硝子 (株) より購入した。EPI, ダウノルビシン

(DAU), アクラルビシン (ACL) およびイダルビシン (IDL) はそれぞれ協和醗酵工業 (株), 明治製菓 (株), 山之内製薬 (株), ファルマシア・アップジョン (株) より購入した。LDH の測定には LDH 測定キット® (日本商事 (株), 現); (株) アズウェル) を, GOT および GPT の測定にはトランスナーゼ® (日水製薬 (株)) を使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

なお、動物実験は宮崎医科大学動物実験倫理審査委員会の承認を得て行った。

2. 肝実質細胞の単離、培養法

Bissell 等の方法³⁾を応用し、Wistar 系雄性ラット (200g) をペントバルビタールにて麻酔し、全身消毒後開腹した。露出させた門脈にカニューレを挿入後、下大静脈を切断し、 Ca^{2+} -free の前灌流用緩衝液で灌流を行った。十分な脱血後、灌流液をコラゲナーゼ溶液に交換し、消化の状況を確認しながら約20分間灌流した。消化終了後、シャーレ上で細分し、再び Ca^{2+} -free の前灌流用緩衝液を加え、先太の駒込ピペットで軽くピペッティングし細胞を分散した。分散した細胞はナイロンメッシュでろ過した後、低速遠沈 (1000rpm, 8 min)-デカントを繰り返し、肝実質細胞を単離した。このときの細胞の生存率は98%以上であり、この得られた初代細胞はコラーゲンをコートしたカルチャープレートおよびマイクロプレート上で37℃, 5%CO₂条件下、24時間培養後、各実験に供せられた。

3. グルコース分泌量測定

24穴カルチャープレートにて肝実質細胞を24時間培養後、グルコース-free の Hanks 液で2回細胞を洗浄することにより細胞外のグルコースを取り除き、グルカゴン投与後60分後に培養液を回収した。なお、アンスラサイクリン系薬物はグルカゴン投与30分前に投与した。回収された培養液は低速 (1000 rpm, 8 min) 遠沈後、上清を分取し、発色試薬 (glucose oxidase 4 mg, peroxidase 2 mg, aminoantipyrine 5 mg, dimethylaniline 15 μ L を 100mL の 0.1M 磷酸カリウム溶液に溶解し調製) を加え、37℃で30分間反応させた後、波長550nm の吸光度を指標としてグルコース分泌量を測定した。

4. lactate dehydrogenase (LDH) 逸脱量測定

24穴カルチャープレートにて肝実質細胞を24時間培養後、各濃度のアンスラサイクリン系薬物を投与し、各時間経過後の細胞内と培養液中の LDH 量を測定し、総 LDH 量に対する培養液中に逸脱した割合で評価した。

5. glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) および glutamic pyruvic transaminase (GPT) の測定

24穴カルチャープレートにて肝実質細胞を24時間培養後、アンスラサイクリン系薬物を投与し、12時間経過後の培養液中の GOT および GPT 量を測定した。

6. 細胞増殖活性測定

96穴のマイクロプレートにて24時間培養した細胞に各アンスラサイクリン系薬物を投与し、12時間培養後、抗生物質および各ホルモンを除いた10%のFBSを含む培養液に替え、5 mg/mL に調製した MTT 溶液を10 μ L 添加した。4時間培養後、0.04M HCl を含むイソプロパノールを100 μ L 加え、生成された MTT ホルマゾンにピペティングにより完全に溶解し、リファレンス波長を630nm として570nm の吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

なお、単離された細胞は、すべて MTT 法により、吸光度0.25以上の細胞増殖活性が良好であることが確認されたものを使用した。

7. 統計

実験成績はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、有意差の検定には多重性を考慮し、分散分析および Fisher の PLSD 法を用い危険率5%および1%以下の場合をもって有意な差とした。

結 果

最初に、グリコーゲン分解活性の測定を行い、今回単離培養された肝実質細胞が正常であり、グルコース分泌機能を保持していることを確認した。初代培養肝実質細胞からのグルコース分泌はグルカゴンの投与により有意に亢進され、その作用はグルカゴンの生理的末梢血中濃度 (1×10^{-10} M) 以上においてグルカゴン濃度に依存的に増強された (Fig. 1)。

さらに、この作用はグルカゴン投与後60分間、時間依存的であった (Fig. 2)。これらのことから、われわれが今回単離、培養した細胞が十分な肝機能を維持した細胞であることが確認できる。タイムコースにおいて投与後60分を経過するとグルコース分泌が減少しているが、これはグルカゴンの安定性を含めた作用持続時間の限界によるものと、投与後60分間のグルコース分泌と、基礎代謝に基づくグルコース利用による細胞内へのグルコースの取り込みが、60分を境に逆転するためと考えられる。このため、今回のグルコース分泌に対する各アンスラサイクリン系薬物の作用の検討は、グルカゴン投与後60分間における分泌量で評価した。

Fig. 1. Effects of Glucagon on Glucose Secretion in Primary Culture of Rat Hepatocytes.

The cells were incubated with glucagon in the indicated concentration for 60 min. The values of glucose secretion were expressed as absorbance at 550nm of the samples developed by color-producing reagents. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

Fig. 2. Time Course of Glucose Secretion in the Presence (●) or Absence (○) of Glucagon (10^{-7} M) in Primary Culture of Rat Hepatocytes.

The values of glucose secretion were expressed as absorbance at 550nm of the samples developed by color-producing reagents. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

このグルカゴンによるグルコース分泌亢進作用を利用し、肝機能に対するアンスラサイクリン系薬物の影響の検討を行った。EPI は、ラット初代培養肝実質細胞からのグルコースの基礎分泌に対し、抑制的に作用したが、グルカゴンにより亢進されたグルコース分泌に対して

は、高濃度 ($1 \times 10^{-4} \text{M}$ 以上) において抑制し、低濃度 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$ 以下) において促進する二相性を示した。一方 ACL は、基礎分泌およびグルカゴンによる分泌亢進作用の両方に対し抑制するのみであった (Fig. 3)。

次にこの代謝機能に対するアンスラサイクリン系薬物の作用と細胞傷害性との関係を検討するために、細胞傷害の指標である細胞からの LDH の逸脱について検討を行った。LDH の逸脱は、EPI の投与により $1 \times 10^{-8} \text{M}$ では各作用時間に関係なく著しい相違を認めなかったが、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上では各作用時間依存的に増強する傾向を示し、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ における12時間作用では、有意に増強された (Fig. 4)。

さらにこの EPI による細胞傷害性を他のアンスラサイクリン系薬物である DAU, ACL, IDL と比較検討を行った。DAU の投与により、この細胞外 LDH 逸脱は、EPI と同濃度 ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) において、若干高いもののコントロールに対して2倍前後とはほぼ同強度であったのに対し、ACL および IDL においてはコントロールに対し4倍前後と遥かに強い細胞傷害性を示した (Fig. 5)。

また、この傾向は GOT および GPT の細胞外遊離濃度においても認められ、ACL および IDL は EPI および DAU に対し著しく高い値を示した (Table 1)。

最後に、細胞傷害の直接的指標である細胞増殖活性への影響を MTT 法により検討した。各薬物とも細胞増殖活性を濃度依存的に抑制したが、LDH, GOT, および GPT の結果と同様に EPI および DAU と ACL および IDL の両者間に共通した傾向が認められた (Fig. 6)。

考 察

われわれは、今回の研究においてアンスラサイクリン系薬物、特に EPI を中心にラット初代培養肝実質細胞のグルコース分泌機能に対する作用と細胞傷害性発現について検討を行ったが、両者には関連性が存在し、薬物間において共通した傾向を示すことが明らかとなった。

ACL は、グルコースの基礎分泌およびグルカゴンにより亢進されたグルコース分泌を濃度依存的に抑制するのみであったのに対し、EPI はグルコースの基礎分泌に対し抑制的に作用し、グルカゴンにより亢進されたグルコース分泌に対しては高濃度域で抑制し低濃度域において促進する二相性を示した。基礎分泌に対する抑制作用は細胞傷害を来さない濃度においても確認されることから、薬理的作用としての機能抑制に基づくものである可能性も考えられるが、やはり細胞傷害に起因する影響が関与しているものと考えられる。一方、グルカゴンによるグルコース分泌亢進に対する促進作用は EPI 自身が糖

Fig. 3. Effects of Epirubicin and Aclarubicin of Glucose Secretion Stimulated by Glucagon (10^{-7}M) in Primary Culture of Rat Hepatocytes.

Stimulation is expressed as the amount of glucose in the samples as the percentage of that in the control. The broken line illustrates the stimulation induced by glucagon alone. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

Fig. 4. Leakage of Lactate Dehydrogenase (LDH) Induced by Epirubicin (EPI) in Primary Culture of Rat Hepatocytes.

The cells were incubated in the presence of EPI for the indicated periods in the several concentration. Leakage is expressed as the excessive amount of LDH in the samples as the percentage of that in the control. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. *: Significant at $P < 0.01$ vs control.

Fig. 5. Influences of Anthracycline Derivatives (10^{-4} M) on Lactate Dehydrogenase (LDH) Leakage in Primary Culture of Rat Hepatocytes.

The cells were incubated in the presence of anthracycline derivatives for 12hr. Leakage is expressed as the whole amount of LDH in the samples as the percentage of that in the control. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments.

新生に直接作用したためとは考えにくく、この作用が投与後30分間と短時間におけるものであることと、Kohler

Table 1. Release of Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) and Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT) in Primary Culture of Rat Hepatocytes.

	n	GOT (U/L)	GPT (U/L)
control	5	9.15 $\pm$ 0.38	3.16 $\pm$ 0.30
epirubicin	8	14.48 $\pm$ 0.76**	5.97 $\pm$ 0.35*
daunorubicin	8	68.19 $\pm$ 3.05**	24.91 $\pm$ 1.75**
aclarubicin	8	185.53 $\pm$ 8.00**	51.92 $\pm$ 2.10**
idarubicin	8	217.15 $\pm$ 11.81**	53.67 $\pm$ 1.80**

The cells were incubated in the presence of several anthracycline derivatives (10^{-4} M) for 12hr. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. * and **: Significant at $P < 0.05$ and 0.01 vs control.

等によって骨細胞におけるパラチレオイドホルモンとプロスタグランジン E_2 刺激による cAMP 量の増加に対し、アンスラサイクリン系薬物の一つであるアドリマイシンが特異的な脂質ドメインを介して異なった影響をおよぼすことが報告⁴⁾されていることから、今回のわれわれの結果においても、むしろ EPI が細胞膜表面に物理的に直接作用することによりグルカゴンに対する受容体の親和性を高めた結果か、あるいはその下流の G プロテインやアデニレートシクラーゼの活性化などグルカゴンに対する細胞の感受性を直接的あるいは間接的に亢進させたことによるものではないかと推察される。その結果、この感受性亢進作用と細胞傷害性が相反し合い、高濃度になるに従い分泌量が減少したものと考えられる。さらに、*in vivo* における Pispirigos 等の報告⁵⁾において、EPI 投与後のラット血清中のグルコース濃度がコントロールと比較して初期に若干上昇し、後に有意に漸減すると述べられていることから、われわれの今回の成績は *in vivo* における現象を裏付ける結果となっている。さらにわれわれは、実際 EPI の 1×10^{-10} M 以下の濃度において、グルコース分泌が濃度依存的に上昇することを確認しており、このことから EPI はグルカゴンを始めとする内因性、あるいは外来の物質に対する感受性を亢進させる作用を有し、この作用が副作用、さらには併用薬物との相互作用の発現に何らかの形で関与しているのではないかと考えられる。

EPI による初代培養肝実質細胞からの LDH の逸脱は濃度および時間依存的であり、その作用は 1×10^{-4} M において投与 6 時間後に比べ 12 時間後にはコントロールの 140% 前後まで有意に上昇した。これは、おそらく EPI 投与後細胞内に取り込まれ細胞傷害が現れるのに数時間を要するためと考えられる。薬物の細胞内取り込みには

Fig. 6. Comparison between Anthracycline Derivatives Determined by MTT Assay on the Cell Proliferation.

The cells were incubated in the presence of anthracycline derivatives in the indicated concentration. Data are each the mean $\pm$ S.E. of 8 experiments.

受動、能動さまざまな機構が考えられるが、抗悪性腫瘍剤、特にアンスラサイクリン系薬物では取り込みおよび排出に関わる膜輸送蛋白質の存在が問題となる。排出に関わるとされるp-糖蛋白質の誘導は、正常細胞において最高に達するのに48時間を要するとされており⁶⁾、今回は示していないが、われわれの研究においても投与後24時間以上の細胞からのLDH逸脱が漸減することを確認している。これらのことより、今回の初代培養におけるEPI投与後12時間後の肝細胞にはp-糖蛋白質の過剰誘導は行われておらず、耐性化を獲得する以前の副作用を反映していると考ええる。

アンスラサイクリン系薬物にはEPIの他に臨床において汎用されているいくつかの薬物があり、各薬物の細胞傷害性の違いを検討するために、一般的に使用頻度の高い他の3種類のアンスラサイクリン系薬物における投与12時間後の細胞外LDH逸脱量について比較を行った。Fig. 5に示すようにDAUはEPIと強度的に同程度であったのに対し、ACLおよびIDLではEPIおよびDAUと比較して遥かに強い細胞傷害性を示した。またGOTおよびGPTの細胞外遊離についても各薬物間にLDHと共通した結果を得た。さらにこれらの結果は同濃度 (1×10^{-4} M) におけるMTT法による細胞増殖活性の成績にも反映し、その抑制強度は $IDL \geq ACL > DAU > EPI$ の順で強く、ACLおよびIDLの ID_{50} が 1×10^{-5} M から 3

$\times 10^{-5}$ Mであるのに対し、DAUでは約 2×10^{-4} Mであり、EPIではさらに高濃度の 1×10^{-3} Mであった。これらのことからアンスラサイクリン系薬物の副作用発現において各薬物間に何らかの共通した関係が存在するものと考えられる。EPIとDAUに関しては、両者の構造式が大変酷似していることから理解できるが、ACLおよびIDLにおいては、両者の構造式が異なっていることから、その構造からの考察は困難であるが、EPIおよびDAUとACLおよびIDLとの間における構造上の相違点を検索すると、4位の位置に前者にはメトキシル基が存在するのに対し、後者には存在しないことが挙げられる。このメトキシル基はアンスラサイクリン系薬物の脂溶性に関与しており、脱メトキシル化により脂溶性が高くなる特徴を示す⁷⁾。このことから、アンスラサイクリン系薬物の細胞傷害性には4位の位置のメトキシル基の存在、非存在による脂溶性の強弱が関与している可能性が示唆される。さらにACLはトリサッカライドであることから、膜輸送蛋白質との親和性がEPIおよびDAUよりも低く、取り込みに関わる膜輸送蛋白質による取り込みが少ない反面、受動拡散による細胞内蓄積がEPIおよびDAUに比べ容易であるためと考えられる。また、ACLは、排出に関わる膜輸送蛋白質であるp-糖蛋白質以外の排出機構により排出されている可能性が示唆されていることから⁸⁾、細胞外に薬物が高濃度に存在する状

態において受動的な排出が困難であるとともに、p-糖蛋白質による排出の依存率の高いEPIおよびDAUに比べ、正常細胞において生理的に存在するp-糖蛋白質による能動的排出が期待出来ないことも一因であると考えられる。また、アンスラサイクリン系薬物に感受性の癌細胞に対するp-糖蛋白質の誘導に関して、われわれの今回の結果と同様にEPIおよびDAUに共通した特徴を示すとする報告⁹⁾がなされていることから、EPIおよびDAUとACLおよびIDLにおいてその細胞傷害性発現に共通した差異が生じたものと推察される。

アンスラサイクリン系薬物の細胞毒性の発現機序はトポイソメラーゼⅡの阻害、あるいは細胞内におけるフリーラジカルの生成に起因するとされているが¹⁰⁾、線維芽細胞に対するEPIの作用の検討において、SODおよびカタラーゼの同時投与により線維芽細胞の生存率に影響を与えなかったとする報告¹¹⁾がなされていることからフリーラジカルの関与は否定的であり、やはり細胞増殖抑制作用それ自体であるトポイソメラーゼⅡの阻害が主要な発現機序であると考えられる。このことは、抗腫瘍作用と細胞傷害性発現がかなり近接した関係にあることを示しており、本来の抗腫瘍効果を抑制することなく副作用のみを軽減することは大変困難なことであることが伺える。

今回のわれわれの研究成績において、アンスラサイクリン系薬物が、グルカゴンにより亢進されたグルコース分泌に対する作用と細胞傷害性に対して薬物間で共通の傾向を示したことより、その機能に与える影響と細胞傷害性の発現には、両者が複雑に関わり合っており、この両者の制御機構が副作用発現の解明の鍵になるものと推察された。今後、正常あるいは悪性腫瘍細胞のいずれかを選択的に制御する手段の開明も考慮に置き、さらに細胞内取り込みおよび排出機構に関して種々の検討を行う必要があると考える。

引用文献

- 1) L. Campos, D. Guyotat, E. Archimbaud, P. Calmard-Orial, T. Tsuruo, J. Troncy, Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis, *Blood*, **79**, 473-476(1992).
- 2) O. Fardel, P. Loyer, F. Morel, D. Ratanasavanh, A. Guillozo, Modulation of multidrug resistance gene expression in rat hepatocytes maintained under various culture conditions, *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 2259-2262(1992).
- 3) D.M. Bissell, L.H. Hammaker, U.A. J. Meyer, Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture, *Cell. Biol.*, **59**, 722-734(1973).
- 4) G. Kohler, V. Shen, W.A. Peck, Adriamycin inhibits PTH-mediated but not PGE₂-mediated stimulation of cyclic AMP formation in isolated bone cells, *Calcif. Tissue Int.*, **36**, 279-284(1984).
- 5) K. Pispirigos, P. Catsoulakos, G. Karakiulakis, Evaluation of kidney and liver subacute toxicity of antitumor agents using serum biochemical parameters in rats, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **31**, 565-573(1993).
- 6) M.A. Le-Bot, D. Kernalguen, J. Robert, M. Berlion, C. Riche, Modulation of anthracycline accumulation and metabolism in rat hepatocytes in culture by three revertants of multidrug resistance, *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, **35**, 53-58(1994).
- 7) F. Arcamone, L. Bernardi, P. Giardino, B. Patelli, A. Marco, A.M. Casazza, G. Pratesi, P. Reggiani, Synthesis and antitumor activity of 4-demethoxy-daunorubicin, 4-demethoxy-7, 9-diepidaurubicin, and their beta anomers, *Cancer Treat. Rev.*, **60**, 829-834(1976).
- 8) G. Lehne, P. De-Angelis, O.P. Clausen, H.E. Rugstad, Human hepatoma cells rich in P-glycoprotein are sensitive to aclarubicin and resistant to three other anthracyclines, *Br. J. Cancer*, **74**, 1719-1729(1996).
- 9) X.F. Hu, A. Slater, D.M. Wall, P. Kantharidis, J.D. Parkin, A. Cowman, J.R. Zalcberg, Rapid up-regulation of *mdr 1* expression by anthracyclines in a classical multidrug-resistant cell line, *Br. J. Cancer*, **71**, 931-936(1995).
- 10) R. Olinski, P. Jaruga, M. Foksinski, K. Bialkowski, J. Tujakowski, Epirubicin-induced oxidative DNA damage and evidence for its repair in lymphocytes of cancer patients who are undergoing chemotherapy, *Mol. Pharmacol.*, **52**, 882-885(1997).
- 11) R. Henriksson, K. Grankvist, Protective effect of iron chelators on epirubicin-induced fibroblast toxicity, *Cancer Lett.*, **43**, 179-183(1988).