抗腫瘍剤 Adriamycin の抗腫瘍効果及び副作用発現機序からみた
Biochemical Modulator Methylxanthine 誘導体の作用

佐塚泰之,* 岩崎綾乃, 広田貞雄
静岡県立大学薬学部

Effects of Methylxanthine Derivatives on Antitumor Activity and
Toxic Side Effect of Adriamycin Induced by
Inhibition of DNA Biosynthesis

Yasuyuki SADZUKA,* Ayano IWAZAKI, and Sadao HIROTA
*School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,
52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan*

(Received December 9, 1997)

The antitumor activity of adriamycin (ADR) was enhanced by combination with theobromine or pentoxifylline. Theobromine increased the concentration of ADR in the tumor without any effects on that in the heart and the liver. The influence of the combination of theobromine or pentoxifylline with ADR on the lipid peroxide level (indicating the ADR-induced side effect) and on DNA biosynthesis (indicating the side effect and antitumor activity) were examined. When ADR was administered into mice, the lipid peroxide level in the liver and the heart increased. However, the combination of theobromine or pentoxifylline did not enhance the ADR-induced increment of the lipid peroxide level in the liver, and moreover, it inhibited that in the heart. The decrease of DNA biosynthesis in the liver and the heart, induced by ADR, were not enhanced by combination with theobromine or pentoxifylline. On the other hand, the combination of theobromine with ADR significantly increased the inhibition of DNA biosynthesis in the tumor. These findings indicate that the combination of theobromine or pentoxifylline with ADR have no effect on the side effects of ADR in the liver and the heart, with the increase of antitumor activity of ADR in the tumor, and it is suggested that these drugs will be of value as a biochemical modulator of ADR.

Key words—theobromine; pentoxifylline; adriamycin; DNA biosynthesis; lipid peroxide

緒 言

現在使用されている医薬品のほとんどは、薬効を発揮する標的部位への送達が有効に行われているとはいい難く、これが薬効低下のみならず副作用発現の原因になっている。これまでに、標的部位への送達を目的として種々の試みがなされており、薬物の高分子化といった化学修飾とともに、リポソーム、マイクロスフェアといった製剤化により基礎研究の分野において、良好な成績を収めてきている。しかしながら、この観点より製剤化された薬物が医薬品としてヒトへの適用に至った例は希である。著者らは、これまでに、抗腫瘍薬のリポソーム化による

drug delivery system (DDS)¹⁻⁴⁾ のみならず、効果増強薬併用による DDS の有用性を明らかにしている。⁵⁻⁹⁾

併用薬による抗腫瘍剤の効果増強としては、5-fluorouracil (5-FU) を effector として用いた際の leucovorin や cisplatin に代表される biochemical modulation¹⁰⁾ が一般的であり、基本的には modulator 自身は抗腫瘍作用を有さないが、effector の作用メカニズムに関与することにより抗腫瘍効果を増強する。DDS による biochemical modulation としては耐性腫瘍に対する耐性解除を目的とした verapamil などがある。¹¹⁾ これら併用薬による効果増強は製剤化による DDS に比べ臨床応用が容易である反面、効果増強に主眼をおく余り副作用に対する検討が不十分である。著者らはこれまでに感受性腫瘍に対する抗腫瘍剤 adriamycin (ADR) の抗腫瘍効果を methylxanthine 誘導体である caffeine が増強することを明らかにしてきており、本作用は腫瘍細胞からの ADR の流出を caffeine が阻害することによる腫瘍中での ADR の維持によることを示唆している。⁵⁻⁷⁾ また、本作用は正常組織中では発現せず、ADR の副作用を増強しないことが明確となっている。⁹⁾ ADR の抗腫瘍効果増強作用は methylxanthine 誘導体である theobromine や pentoxifylline でも caffeine と同等以上に認められている⁸⁾ が、ADR の副作用に対する作用は明らかではなく、治療効率の増大という観点からはその有用性は明確になっていない。

Anthracycline 系制癌剤である ADR は、DNA と特異的に結合、DNA 生合成を阻害することにより、癌細胞致死をもたらすとされている。^{12, 13)} また、近年、トポイソメラーゼ II 活性を ADR が阻害することも示されている。¹⁴⁻¹⁷⁾ これらの作用が腫瘍細胞で発揮されると抗腫瘍効果となるが、正常組織では重篤な副作用となる。ADR の副作用としては、心筋に対する障害が最も重篤なものであり、ADR の DNA 生合成阻害作用に基づく脂質過酸化防御酵素活性の低下とそれに続く過酸化脂質レベル上昇が、特に心臓において顕著に発生することに起因していると報告されている。¹⁸⁻²³⁾

そこで今回、ADR の抗腫瘍作用及び副作用発現のメカニズムである正常組織及び腫瘍中における DNA 生合成阻害に注目し、theobromine 及び pentoxifylline の作用を明らかにした。また、これら作用と抗腫瘍効果及び過酸化脂質レベルをパラメーターとした副作用に対する影響との関連を検討し、治療効率の増大を目的とした biochemical modulator としての両薬物の有用性を示した。

実 験 の 部

1. 試薬 ADR は協和発酵より購入した Adriacin® 10 mg/vial を生理食塩液に溶解して用いた。Caffeine, theobromine, 2-thiobarbituric acid (TBA), Scintisol Ex-H® は和光純薬より購入した。Pentoxifylline は Sigma 社から購入した。[2-¹⁴C] thymidine (1.85 MBq/ml) は DNA 前駆体として用い、Amersham 社より購入した。

その他の試薬は、入手できる最も純度の高いものをそのまま使用し、常法に従って調製して用いた。

2. 実験動物 CDF₁ 系雄性マウス (5 週齢, 体重 20—25 g) は、日本 SLC(株)より購入したものを使用した。動物は、室温 25±1℃, 湿度 55±5% にて飼育し、標準実験飼料と水は自由に与えた。すべての実験において動物は各群 6—7 匹で行った。

3. 抗腫瘍効果 Ehrlich ascites carcinoma (5×10⁵ cells/animal) をマウスの背部皮下に植え付け固形腫瘍とした。植え付け 10, 12, 14, 16 日目に ADR (2.0 mg/kg/d×4 d) を、また、植え付け 11, 13, 15, 17 日目に pentoxifylline もしくは theobromine (10 mg/kg/d×4 d) を隔日で 4

回、腹腔内投与し、植え付け 18 日後、頸椎脱臼にて動物を屠殺し、腫瘍及び心臓、肝臓を摘出、各組織中の ADR 濃度を蛍光法²⁴⁾により測定した。

4. 過酸化脂質レベル 各マウスに pentoxifylline, theobromine 10 mg/kg/d を 5 日間連続腹腔内投与し、投与 2 日目の被検薬投与の 3 時間前に、ADR 15 mg/kg を腹腔内投与した。薬物投与最終日の翌日、マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、心臓、肝臓、腎臓及び肺を摘出、生理食塩液にて洗浄後、湿重量を測定し、Potter 型テフロンホモジナイザーでホモジネート液を調製し、試料中の過酸化脂質レベルは、TBA 蛍光光度法、²⁵⁾ glutathione peroxidase (GSHpx) 活性は Hafeman らの方法²⁶⁾で測定した。

5. DNA 生合成阻害 抗腫瘍実験と同様のスケジュールにより担癌マウスに ADR 及び pentoxifylline, theobromine を投与し、腫瘍移植 18 日後、²⁻¹⁴C-thymidine (2.0 MBq/kg) を腹腔内投与し、3 時間後に解剖した。心臓、肝臓、腫瘍を摘出し、前述と同様にホモジネート液を調製した。DNA 分画の分離は、Schmidt-Thannhauser-Schneider 法²⁷⁻²⁹⁾に従って行い、DNA 分画中の放射活性より thymidine 取り込み量を算出した。

6. *In Vitro* での Ehrlich 腫瘍細胞における Thymidine Uptake 測定法 Ehrlich ascites carcinoma 2.5×10^6 cells/ml, ADR 9 nmol/ml を含む Eagle's MEM 培地を 30 分間、37°C でインキュベーションした。インキュベーション後、氷冷し、150g, 3 分間遠心分離して上清を除き、細胞を Eagle's MEM 培地で 1 回洗浄した後、再分散させた。次に被検薬を添加して 1.0 ml とした培地を 37°C で 10 分間プレインキュベーション後、²⁻¹⁴C-thymidine 水溶液 37 kBq/ml を加え、混和し、さらに 30 分間インキュベーションした。その後、細胞より DNA 分画を分離し、DNA 分画中の放射活性より thymidine 取り込み量を算出した。

7. 統計処理 各データの統計処理は、Student's *t*-test と ANOVA にて行った。

結 果

1. ADR の抗腫瘍効果に対する Methylxanthine 誘導体の影響 Control 群を 100% とした時の各群の腫瘍重量並びに腫瘍、心臓、肝臓中の ADR 濃度を Table 1 に示す。腫瘍重量は、control 群 (2.35 ± 0.32 g) に比べ ADR 単独投与群で 21.5% ($p < 0.05$) 低下し、pentoxifylline 及び theobromine 併用はこの低下をそれぞれ 2.7 倍 ($p < 0.001$), 2.8 倍 ($p < 0.001$) に増強した。また、この時、腫瘍中の ADR 濃度は theobromine 併用により ADR 単独投与群の 2.1 倍 ($p < 0.01$) を示し、pentoxifylline でも 1.2 倍に上昇傾向を示した。これに対し、正常組織である心臓及び肝臓中では、これら methylxanthine 誘導体併用による ADR 濃度の変化は認められなかった。

Table 1. Effects of Methylxanthines on the Changes in Tumor Weight and ADR Concentrations in Mouse Tumors, Heart and Liver

Drug	Tumor weight (%)	ADR concentration (μ g/g tissue)		
		Tumor	Heart	Liver
Control	100.00 ± 11.04			
ADR	$78.54 \pm 12.44^a)$	0.108 ± 0.008	0.364 ± 0.032	1.092 ± 0.108
ADR + pentoxifylline	$41.40 \pm 9.31^{b, c)}$	0.128 ± 0.012	0.340 ± 0.040	1.044 ± 0.148
ADR + theobromine	$39.53 \pm 6.55^{b, d)}$	$0.224 \pm 0.008^d)$	0.372 ± 0.037	0.768 ± 0.148

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5—6 mice. Significant differences from the control level are indicated by a) $p < 0.05$ and b) $p < 0.001$, and from the ADR only level are indicated by c) $p < 0.05$ and d) $p < 0.01$.

Fig. 1. Effect of Pentoxifylline and Theobromine on ADR-Induced Change of Lipid Peroxide (LPO) in the Liver and the Heart of Mice

Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 6–7 mice. Significant differences from the level of control are indicated by a) $p < 0.05$ and b) $p < 0.01$. Significant differences from the level of ADR only are indicated by d) $p < 0.05$ and e) $p < 0.01$.

2. ADR によるマウス組織中過酸化脂質レベル上昇に対する Methylxanthine 誘導体併用の影響 薬物投与後の肝臓及び心臓における過酸化脂質 (LPO) レベルを Fig. 1 に示す. 肝臓中の過酸化脂質レベルは, ADR 投与群では control 群 (1.013 ± 0.024 nmol/mg protein) の 1.1 倍に有意に上昇した ($p < 0.01$) が, pentoxifylline 併用は, このレベルを更に上昇させることはなく, theobromine 併用は, むしろ減少させる傾向を示した. また, 心臓においては, 過酸化脂質レベルは control 群で 0.723 ± 0.139 nmol/mg protein を示したのに対し, ADR 投与群では 1.251 ± 0.113 nmol/protein であり, control 群の 1.7 倍 ($p < 0.01$) に有意に上昇した. pentoxifylline, theobromine 併用群は, ADR 投与により上昇した過酸化脂質レベルを更に上昇させることはなく, むしろ ADR 投与による上昇をそれぞれ 73.4% ($p < 0.01$), 59.8% ($p < 0.05$) 有意に抑制した.

また, 図には示していないが, 肝臓における GSHpx 活性は, control 群において 190.24 ± 13.17 unit/mg protein を示したが, ADR 投与群においては, 活性低下傾向が認められ (179.50 ± 8.51 unit/mg protein), pentoxifylline, theobromine を併用することによる影響は, ほとんど認められなかった. 心臓における GSHpx 活性は, control 群 6.39 ± 0.35 unit/mg protein に対し, ADR 投与群では control 群の 22.7% ($p < 0.05$) の活性低下 (4.94 ± 1.29 unit/mg protein) が認められたが, この低下は, pentoxifylline, theobromine 併用群においては回復傾向を示した.

腎臓及び肺においては, ADR 投与によるこれらパラメーターの変化に対し, 両薬物は影響を与えることはなかった.

3. ADR による Ehrlich 担癌マウス組織中 DNA 生合成阻害作用に対する Methylxanthine 誘導体の影響 (in Vivo) 肝臓, 心臓における ADR の DNA 生合成阻害に対する pentoxifylline, theobromine 併用の影響を control における取り込みを 100% として Fig. 2 に示す. DNA 生合成の指標となる ^{14}C -thymidine の取り込みは肝臓において ADR 単独投与群で control 群

Fig. 2. Effect of Pentoxifylline and Theobromine on the Inhibition of DNA Biosynthesis Induced by ADR in the Liver and the Heart of Mice

Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 6—7 mice. Significant differences from the level of control are indicated by a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$ and c) $p < 0.001$.

Fig. 3. Effect of Pentoxifylline and Theobromine on the Inhibition of DNA Biosynthesis Induced by ADR in the Tumor of Mice

Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 6—7 mice. Significant differences from the level of control are indicated by a) $p < 0.05$ and b) $p < 0.01$. Significant difference from the level of ADR only is indicated by e) $p < 0.01$.

(14.0 ± 0.8 dpm/mg liver/3 h) より 23.6% ($p < 0.05$) 低下したが, pentoxifylline, theobromine の併用群では, ADR による低下を更に増強することにはなかった. 一方, 心臓では, ADR により, DNA 生合成は control 群 (10.4 ± 0.8 dpm/mg liver/3 h) の 61.5% ($p < 0.001$) に阻害された. し

Table 2. Effect of Theobromine on the Inhibition of Thymidine Uptake Induced by ADR in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells

	Thymidine uptake (% of control)
Control	100.0±2.05
ADR	70.5±3.35 ^{a)}
ADR + Theobromine (0.1 μM)	61.9±3.14 ^{a, b)}

Significant difference from the control level is indicated by a) $p < 0.001$, and from the ADR only level is indicated by b) $p < 0.05$.

かし、この阻害は pentoxifylline, theobromine を併用することにより、それぞれ control 群の 79.6%, 82.7% に回復する傾向を示した。

一方、腫瘍中での ADR による DNA 生合成阻害に対する pentoxifylline, theobromine 併用の影響を Fig. 3 に示す。Control 群 (50.6 ± 4.6 dpm/mg liver/3 h) では、 ^{14}C -thymidine の取り込み量は腫瘍において、肝臓の 3.6 倍 ($p < 0.001$)、心臓の 4.9 倍 ($p < 0.001$) を示し、腫瘍において活発に DNA 生合成が行われていることが示唆された。これに対し、この thymidine 取り込みを ADR 投与群は、20.4% 阻害した。さらに theobromine を併用することにより ADR 単独投与群の 2.2 倍 ($p < 0.01$) の大きな低下を示し、ADR 単独による DNA 生合成阻害を有意に増強した。Pentoxifylline 併用では大きな影響は認められなかった。

4. ADR による Ehrlich 腫瘍細胞での DNA 生合成阻害に対する theobromine の作用 (*in Vitro*) ADR で前処理した Ehrlich 腫瘍細胞に theobromine を接触させた際の Ehrlich 腫瘍細胞中での DNA 生合成を control を 100% として Table 2 に示す。ADR で処理することにより、 ^{14}C -thymidine の取り込みは control 群 (4.18 ± 0.66 dpm/ 10^4 cells/h) に対し有意に阻害された ($p < 0.001$)。また、theobromine を併用することにより、ADR 単独処理による取り込み低下を更に増幅する傾向が認められ、theobromine 処理では、ADR 単独の 1.4 倍 ($p < 0.05$) の有意な thymidine 取り込み阻害作用を示した。

考 察

Biochemical modulation の観点より、併用薬による抗腫瘍剤の効果増強をはかる際に最も問題となる抗腫瘍剤の副作用に対する作用を抗腫瘍メカニズムと関連づけて検討した。Methylxanthine 誘導体である caffeine は、ADR の副作用を増強することなく、腫瘍中の ADR 濃度を上昇させることにより抗腫瘍効果を増強することが明らかとなっている。⁵⁻⁸⁾ 同じ methylxanthine 誘導体である pentoxifylline, theobromine も ADR の抗腫瘍効果を増強するが、ADR の副作用増強の危険性も持っており、この点に関してはこれまで全く検討されていなかった。Table 1 に示すように、両薬物は、ADR の抗腫瘍効果を有意に増強しており、theobromine では、腫瘍中の ADR 濃度の上昇が顕著であり、これが抗腫瘍効果の増強に結びついたと考えられた。また、pentoxifylline では、わずかな上昇は認められたものの抗腫瘍効果を反映するものではなく、他のファクターの関与も示唆された。これに対し、正常組織である心臓、肝臓においては、両薬物併用による ADR 濃度の上昇は全く認められず、ADR の副作用増強は伴わない可能性が示された。そこで、ADR の副作用発現に密接に関与するとされる過酸化脂質レベル上昇¹⁸⁻²²⁾ 及び正常組織中の DNA 生合成阻害²³⁾ に対する methylxanthine 誘導体併用の影響について検討した。

ADR 投与により、肝臓においては過酸化脂質レベルの有意な上昇が認められたが、pentoxifylline, theobromine の併用はこの過酸化脂質レベル上昇を軽減させる傾向を有していた。また、ADR の最も重篤な副作用である心臓毒性と密接に結びついている心臓中の過酸化脂質レベル上昇を両薬物は有意に抑制した。さらに、ADR の副作用の原因とされる正常組織中の DNA 生合成阻害²³⁾ に対し、pentoxifylline, theobromine 併用は、肝臓で影響を及ぼすことはなく、また、心臓においては回復傾向を示した。このように、methylxanthine 誘導体併用が、ADR による DNA 生合成阻害、過酸化脂質レベルの上昇を抑制する傾向を示したことは、pentoxifylline 及び theobromine が ADR の副作用を増強しない、もしくは軽減させる可能性があることを ADR の副作用発現メカニズムの観点からも示唆するものである。同じ methylxanthine 誘導体である caffeine でも併用による ADR 副作用増強は認められておらず、methylxanthine 誘導体による ADR の効果増強は、一般の biochemical modulator とは異なり、理想的な効果増強薬となる可能性が示唆された。

一方、ADR の抗腫瘍作用発現メカニズムである腫瘍中での DNA 生合成阻害作用を theobromine 併用群は有意に増強した。さらに、*in vitro* において ADR 処理腫瘍細胞に theobromine を接触させた場合、有意な ¹⁴C-thymidine 取り込み阻害が示された。この条件下、theobromine は腫瘍細胞からの ADR efflux を阻害することが明らかとなっており、⁸⁾ theobromine により腫瘍細胞において ADR が維持されたことにより DNA 生合成阻害が増強されたと考えられる。なお、pentoxifylline 及び theobromine とともに単独では腫瘍重量、各組織中の過酸化脂質、DNA 生合成に対し、影響を及ぼさなかった。

以上のように、ADR の DNA 生合成阻害作用に対する theobromine の作用が正常組織ではなく腫瘍においてのみ示されたことは、正常組織及び腫瘍での ADR 分布に対する theobromine の作用の違いと相関している。すなわち、ADR と theobromine を併用することにより、腫瘍では、ADR efflux 抑制が生じ、腫瘍中の ADR 濃度が上昇するため、DNA 生合成が顕著に抑制され抗腫瘍効果が増強される。これに対し、正常組織中では併用により ADR 蓄積は起きず、副作用の増強は認められないと考えられた。この研究で使用した Ehrlich ascites carcinoma 細胞は、薬物排出ポンプである P-glycoprotein や multidrug resistance associated protein は過剰発現しておらず、⁸⁾ methylxanthine 誘導体の作用点は別であることは明らかである。Ehrlich ascites carcinoma 細胞をはじめとする薬剤感受性腫瘍細胞には種々の薬物輸送トランスポーターが出現していることが知られている。^{30, 31)} この発現が正常細胞と腫瘍細胞で異なっている可能性が考えられ、methylxanthine 誘導体は、腫瘍細胞に豊富なトランスポーターに作用することにより細胞内 ADR 濃度を特異的に維持していると推測できる。また、心臓、肝臓において認められる違いに関しても同様の現象が存在するのではないかと考えた。

これに対し、pentoxifylline 併用群では、*in vivo* における腫瘍中 ADR 濃度の増加、DNA 生合成阻害の増強はわずかなものであり、有意な抗腫瘍効果の増強は他のファクターの関与が考えられた。Pentoxifylline は、superoxide anion 生成を阻害する作用があることが確認されており、³²⁾ これにより ADR の心臓中過酸化脂質レベル上昇に由来する副作用を軽減できることは明らかである。また、pentoxifylline は、tumor necrosis factor, interleukin に対する作用を有することが示されている³³⁻³⁶⁾ ことより、これらの作用も pentoxifylline による抗腫瘍効果増強に関与していると考えられる。

以上、ADR の副作用及び抗腫瘍作用発現メカニズムから pentoxifylline, theobromine の作用を検討した結果、副作用発現に影響を与えることなく、腫瘍において、その抗腫瘍作用のみを

増強することが明らかとなった。すなわち、これら薬物の biochemical modulator としての可能性が ADR の作用発現メカニズムからも裏付けられた。今後、ADR の腫瘍への分布性を特異的に高める原因と考えられる methylxanthine 誘導体の腫瘍細胞における ADR efflux 抑制作用に関し、さらに検討を加えることで、methylxanthine 誘導体の biochemical modulator としてのより有効な利用を図ることができると考えられる。

引 用 文 献

- 1) Sadzuka Y., Nakai S., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., *J. Drug Targeting*, **3**, 31—37 (1995).
- 2) Sadzuka Y., Nakai S., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., *Cancer Lett.*, **111**, 77—86 (1997).
- 3) 佐塚泰之, 中井慎一郎, 宮城島惇夫, 野澤靖夫, 広田貞雄, *Drug Delivery System*, **10**, 181—188 (1995).
- 4) Sadzuka Y., Hirotsu S., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., *J. Liposome Res.*, **7**, 241—260 (1997).
- 5) Sadzuka Y., Mochizuki E., Takino Y., *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 348—353 (1993).
- 6) Sadzuka Y., Mochizuki E., Takino Y., *Toxicol. Lett.*, **75**, 39—49 (1995).
- 7) Sadzuka Y., Mochizuki E., Takino Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 159—161 (1995).
- 8) Sadzuka Y., Iwazaki A., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 594—599 (1995).
- 9) Sadzuka Y., Sugiyama T., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., *Cancer Lett.*, **105**, 203—209 (1996).
- 10) 小西敏郎, 出月康夫, *CRC*, **1**, 88—97 (1992).
- 11) Harker W. G., Bauer D., Etiz B. B., Newman R. A., Sikic B. I., *Cancer Res.*, **46**, 2369—2373 (1986).
- 12) Di Marco A., *Cancer Chemother. Rep.*, **6**, 91—106 (1975).
- 13) 太田和雄, 大熊 攻, 最新医学, **63**, 1060—1067 (1981).
- 14) Tewey K. M., Chen G. L., Nelson E. M., Liu L. F., *J. Biol. Chem.*, **259**, 9182—9187 (1984).
- 15) Chen G. L., Yang L., Rowe T. C., Halligan B. D., Tewey K. M., Liu L. F., *J. Biol. Chem.*, **259**, 13560—13566 (1984).
- 16) 河野公俊, 和田守正, 臨床検査, **39**, 454—456 (1995).
- 17) Tewey K. M., Rowe T. C., Yang L., Halligan B. D., Liu L. F., *Sciences*, **226**, 466—468 (1984).
- 18) Myer C. E., McGuire W. P., Young R. C., *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 961—962 (1976).
- 19) Myer C. E., McGuire W. P., Liss R. H., Ifrim I., Grotzinger K., Young R. C., *Sciences*, **197**, 165—167 (1977).
- 20) Tanizawa H., Sazuka Y., Takino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1714—1718 (1983).
- 21) Sazuka Y., Hirose T., Hashimoto J., Tanizawa H., Takino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4110—4116 (1984).
- 22) Sazuka Y., Tanizawa H., Takino Y., *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 89—94 (1989).
- 23) Sazuka Y., Tanizawa H., Takino Y., *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 1000—1005 (1989).

- 24) Shinozawa S., Mimaki Y., Araki Y., Oda T., *J. Chromatogr.*, **196**, 463—469 (1980).
- 25) Tanizawa H., Sazuka Y., Takino Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2910—2914 (1981).
- 26) Hafeman D. G., Sunde R. A., Hoekstra W. G., *J. Nutr.*, **104**, 580—587 (1974).
- 27) Schmidt G., Thannhauser S. J., *J. Biol. Chem.*, **161**, 83—89 (1945).
- 28) Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, **161**, 293—303 (1945).
- 29) Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, **164**, 747—751 (1946).
- 30) Sugimoto Y., Nishimura T., Suzuki H., Tanaka N., *J. Antibiotics*, **34**, 1200—1205 (1981).
- 31) Nagasawa K., Ohnishi N., Yokoyama T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 750—759 (1997).
- 32) Thiel M., Bardenheuer H., Poch G., Madel C., Peter K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 53—58 (1991).
- 33) Rao K. M. K., Currie M. S., McChachren S. S., Cohen H. J., *Cell. Immun.*, **135**, 314—325 (1991).
- 34) Edwards M. J., Heniford B. T., Klar A. E., Doak K. W., Miller F. N., *J. Clin. Invest.*, **90**, 637—641 (1992).
- 35) Martich G. D., Danner R. L., Ceska M., Suffredini A. F., *J. Exp. Med.*, **173**, 1021—1024 (1991).
- 36) Kumar K. V., Das U. N., Kumar G. S., Das N. P., Tan B. K., *Asia Pacific J. Pharmacol.*, **7**, 89—93 (1992).