

Rauwolfia Alkaloidsによるピンブラスチン増感作用について

著者	宮本 謙一, 涌沢 伸哉, 柳岡 利一, 越浦 良三
雑誌名	薬学雑誌
巻	104
号	12
ページ	1295-1300
発行年	1984-12-25
URL	http://hdl.handle.net/2297/7051

薬学雑誌 [JAPANESE JOURNAL OF PHARMACOLOGY]
104 (12) 1295-1300 (1984)

Rauwolfia Alkaloids によるビンブラスチン増感作用について

宮本謙一, 涌沢伸哉,* 柳岡利一, 越浦良三

北陸大学薬学部

Studies on Enhancement of Sensitivity to Vinblastine by Rauwolfia Alkaloids

KENICHI MIYAMOTO, SHINYA WAKUSAWA,* TOSHIKAZU YANAOKA
and RYOZO KOSHIURA

Department of Pharmacology, Hokuriku University School of Pharmacy,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanagawa, 920-11, Japan

(Received August 13, 1984)

The effect of six Rauwolfia alkaloids on the growth inhibitory effect of vinblastine (VBL) in rat ascites hepatoma AH66 cells was investigated. When cells were treated with VBL and each alkaloid for 30 min, reserpine, rescinnamine, syrosingopine, and ajmaline markedly potentiated the effect of VBL, but dimethylaminoethylreserpinate hydrochloride (DMAR) and yohimbine did not influence. On the other hand, in the continuous treatment for 2 d, DMAR and yohimbine also potentiated the effect of VBL. All of alkaloids increased the intracellular VBL content. Among these alkaloids, reserpine markedly suppressed the activities of Mg^{++} ATPase and Ca^{++} ATPase in the plasma membrane and DMAR suppressed the activities of adenosine triphosphatase (ATPase) except (Na^{+} - K^{+}) ATPase. Reserpine and DMAR did not affect the VBL binding to microtubules. Reserpine inhibited the microtubule polymerization by itself and synergistically acted with VBL on microtubules but DMAR did not affect the polymerization and the effect of VBL.

From the results, it was indicated that all of Rauwolfia alkaloids suppressed the active extrusion of VBL, increased the intracellular VBL content, and potentiated the effect of VBL on AH66 cells. Moreover, it was suggested that some of alkaloids including reserpine could enhance the effect of VBL even by a short term treatment because of their synergistical interaction with VBL on microtubules.

Keywords—vinblastine; Rauwolfia alkaloid; ATPase; microtubule; vinblastine sensitivity enhancement; AH66 cell

先に著者らは, major tranquilizer の一つであるレセルピンが, マウス白血病 L1210¹⁾ や各種のラット腹水肝癌²⁾ に対する腫瘍抑制剤の効果を相乗的に高めることを報告してきた。さらに, レセルピンは, ラット腹水肝癌細胞のうちビンブラスチン (VBL) により低感受性の株に対して強い VBL 増感作用を示し, ほぼ完全にその VBL 自然耐性を克服できることを示した。³⁾

今回は, ラット腹水肝癌細胞のうち VBL に対して最も感受性の低かった AH66 細胞を用いて, レセルピンを含む一連の Rauwolfia alkaloids の VBL の細胞増殖抑制作用に対する影響を検討したところ, いずれの alkaloids も VBL の効果を高めるが, alkaloids 間の VBL 増感模式に違いを認めたので報告する。

実 験 の 部

実験材料

癌細胞 ラット腹水肝癌 AH66 細胞をドンリュウ系 6 週齢雌性ラット (静岡実験動物養殖協同組合) の腹腔内に 1 週間毎に移植して継代維持した。実験には, 細胞移植後 1 週間の細胞を用いた。

使用薬物 レセルピン, ヨヒンビン塩酸塩 (Sigma), 硫酸ビンブラスチン (VBL: 塩野製薬), ³H-VBL (9.9 Ci/mmol, Amersham), adenosine triphosphate disodium salt (ATP·2Na: 半井化学), レシナミン, シロシゴピン, アジマリン, dimethylaminoethylreserpinate hydrochloride (DMAR) は, 北陸製薬株式会社より供与された。その他の試薬は和光純薬の特級品を用いた。なお, レセルピン, レシナミン, シロシゴピン, アジマリン

は、水に不溶のため、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、実験には、最終 DMSO 濃度が 0.5% 以下となるように加えた。したがって、0.5% DMSO を対照とした。

実験方法

細胞培養 Eagle's minimum essential medium (MEM: pH 7.4, 日水製薬) 中細胞 (6×10^6 cells/2 ml) を VBL, 各 alkaloid と 37°C にて 30 分間接触させた後、リン酸緩衝液 (PBS: pH 7.4) にて洗浄し、ウシ胎仔血清 (京都徹研) 10% 添加した MEM 中に再浮遊させ、35 mm プラスチックシャーレ (Falcon) 中、炭酸ガス培養器 (池本理化) 内にて 37°C, 2 日間培養した。2 日間連続接触実験では、細胞と薬物を血清添加 MEM 中 2 日間培養した。培養後、総細胞数を計数し、培養開始時よりの増殖率を VBL の対数濃度に対してプロットし、50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) を求めた。

細胞内 VBL 取り込み量の測定 細胞 (5×10^6 cells/ml) をウシ胎仔血清 10% 添加 MEM に浮遊させ、37°C にて 10 分間前培養後、 1×10^{-6} M の各 alkaloid 存在下あるいは非存在下 $0.1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-VBL}$ と非放射性 VBL 1×10^{-7} M を添加し 30 分間培養した。培養後、細胞浮遊液 1 ml を 1 検体として冷 PBS にて洗浄し、Protosol® (New England Nuclear) 1 ml にて溶解し、トルエンシンチレーター (polyphenylene oxide 4 g, 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)benzene 0.1 g トルエン 1 l) 中放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-230) により測定した。

細胞内 Alkaloids 取り込み量の測定 ウシ胎仔血清 10% 添加 MEM 中細胞 (5×10^7 cells/5 ml) を VBL 存在下あるいは非存在下レセルピンあるいは DMAR とともに 37°C にて 30 分間培養した後、細胞を冷 PBS にて洗浄後、ホモジナイズし、ホモジネートを 3 倍量のクロロホルム:メタノール (3:1) 混液にて、次いで 3 倍量のクロロホルムにて振盪抽出し、クロロホルム層を減圧乾固後、レセルピン処理細胞抽出物は 0.5 ml のクロロホルムに、DMAR 抽出物は 0.5 ml のメタノールに再溶解し、その 5 μl を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に付した。なお、上記抽出法によりレセルピンと DMAR の回収率はほぼ 100% であった。

HPLC の装置及び条件 装置: 日立 HPLC 638-30, 検出器: 日立 635-M LC detector, 波長: レセルピンについては 270 nm, DMAR については 230 nm, カラム: 東洋曹達 TSK gel Silica-150 (粒子径 5 μm , カラムサイズ 4.6×250 mm), 移動相: レセルピンについてはヘキサン:エタノール:酢酸:トリエチルアミン (7:3:0.05:0.03), DMAR についてはヘキサン:エタノール:酢酸:トリエチルアミン (2:8:0.05:0.04), 流速: 1.0 ml/min, 記録計: Sic intelligent integrator Model 7000A. 以上の測定条件において、レセルピンあるいは DMAR のピークは注入後それぞれ約 6 分で現われ、ピーク高の比により、あらかじめ作成しておいたそれぞれの検量線により定量した。

細胞膜調製法 前報^{3b)}の方法に従って調製し、細胞膜のマーカー酵素としての ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase の比活性が約 10 倍のものを実験に用いた。

ATPase 活性の測定 Mocros ら⁴⁾の方法に準じた前報^{3b)}の記述に従い、($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase, Mg^{2+} ATPase, Ca_2^+ ATPase, ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) ATPase 活性を測定した。

蛋白量の測定 ウシ血清アルブミンを対照として Lowry 法⁵⁾に従い測定した。

粗 Microtubule 重合度の測定 細胞を 0.01 M MgCl_2 含有 0.01 M リン酸緩衝液 (PM 緩衝液: pH 6.5) に浮遊させ、テフロン球の Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズしたのち、4°C で 100000 g にて 1 時間遠心し、得られた上清を 0.1 mM GTP 含有 PM 緩衝液にて 0.16 mg 蛋白/ml に調整しこれを粗 microtubule 溶液とした。この 5 ml に VBL あるいは各 alkaloid を加え、37°C にて経時的に Ostwald 型粘度計を用いて溶液の比粘度 (η_{sp}) を求めた。

細胞内 Microtubule 結合 VBL の測定 ウシ胎仔血清 10% 含有 MEM 中細胞 (2.5×10^7 cells/5 ml) を各 alkaloid 存在, 非存在下, $^3\text{H-VBL}$ 0.1 μCi 及び非放射性 VBL 1×10^{-7} M と共に 37°C にて 1 時間培養後、冷却遠心により細胞を集め、冷 PBS で 3 回洗浄後、PM 緩衝液 7 ml を加えてホモジナイズした。このホモジネートのうち 50 μl を Protosol® 1 ml にて可溶化し、細胞内 VBL 量の測定に用い、残りを 4°C にて 100000 g 1 時間遠心し、得られた上清をあらかじめ PM 緩衝液にて平衡とした DEAE-Cellulose 濾紙 (Whatmann DE81) にのせ、自然濾過により microtubule を吸着後、冷 PM 緩衝液にて洗浄、乾燥後、トルエンシンチレーター中放射活性を測定した。

結 果

1. VBL の細胞増殖抑制作用に及ぼす Rauwolfia Alkaloids の影響

Table I は、AH66 細胞を 6 種の Rauwolfia alkaloids 存在下、VBL と 30 分間接触させた後、2 日間培養後

TABLE I. Combined Growth Inhibitory Effect of VBL with Rauwolfia Alkaloids in AH66 Cells Treated for 30 min

Alkaloids	Concentration (M)	IC ₅₀ of VBL (M)	Ratio ^{a)}
None		2.5×10^{-6}	1.0
Reserpine	3×10^{-6}	1.0×10^{-6}	2.5
Rescinnamine	3×10^{-6}	8.0×10^{-7}	3.1
Syrosingopine	3×10^{-6}	1.2×10^{-6}	2.1
Ajmaline	3×10^{-6}	1.3×10^{-6}	1.9
DMAR	1×10^{-4}	2.5×10^{-6}	1.0
Yohimbine	1×10^{-4}	2.5×10^{-6}	1.0

a) Increase in cytotoxicity as compared to the IC₅₀ without each Rauwolfia alkaloid.

の VBL の 50% 増殖抑制濃度 (IC₅₀) を比較して示したものである。レセルピンを始め、レンナミン、シロシンゴピン、アジマリンは、 3×10^{-6} M で VBL の増殖抑制作用をそれぞれ約 2—3 倍に増強したが、DMAR、ヨヒンビンでは、 1×10^{-4} M にも VBL の作用には何ら影響を及ぼさなかった。Table II は、各 alkaloid と VBL 共存下細胞を 2 日間培養した時の結果である。この併用条件においては、全ての alkaloids が 30 分処理の際よりも低い濃度で VBL の作用を相乗的に高めることが明らかとなった。なお、0.5% DMSO 及び各 Rauwolfia alkaloid は、そのもの単独では細胞の増殖には何ら影響を示さなかった。

以上より、全ての Rauwolfia alkaloids は VBL 増感作用を示すが、レセルピン、レンナミン、シロシンゴピン、アジマリン等の 1 群と DMAR、ヨヒンビンとの間にはその作用様式の違いが示唆された。

2. VBL の細胞内取り込みにおよぼす Rauwolfia Alkaloids の影響

各 alkaloid 1×10^{-5} M と VBL 1.1×10^{-7} M 共存下 30 分間の細胞内 VBL 量を示したのが Fig. 1 である。レセルピン、レンナミン、シロシンゴピン等、30 分処理にても強い VBL 増感作用をもたらした薬物は、いずれも VBL の取り込みを 4 倍以上に高めたが、若干作用の弱かったアジマリンによる VBL 取り込み増加は 3 倍程度にとどまった。一方、30 分処理にては何ら VBL と併用効果を示さなかった DMAR やヨヒンビンについても 2 倍程度の VBL 取り込み亢進作用を示した。さらに、DMAR については Fig. 2 A に示すように接触濃度を 1×10^{-4} M と上げることにより、細胞内 VBL 取り込み量もさらに増加した。なお、0.5% DMSO は VBL の細胞内取り込みには明らかな影響を及ぼさなかった。

そこで、VBL との併用効果において作用様式に違いが示唆された薬物群より、レセルピンと DMAR を選び、その機作を明らかにすべく以下の実験を行った。

3. レセルピンと DMAR の細胞内取り込み量

レセルピンあるいは DMAR のそれぞれ単独、及び VBL 共存下 30 分間の AH66 細胞内取り込み量を示したのが Table III である。レセルピンは細胞外液濃度に依存して細胞内取り込み量は増加した。また 1×10^{-5} M の

TABLE II. Combined Growth Inhibitory Effect of VBL with Rauwolfia Alkaloids in AH66 Cells Treated for Two Days

Alkaloids	Concentration (M)	IC ₅₀ of VBL (M)	Ratio ^{a)}
None		6.0×10^{-5}	1.0
Reserpine	10^{-6}	1.1×10^{-5}	5.5
Rescinnamine	10^{-6}	1.5×10^{-5}	4.0
Syrosingopine	10^{-6}	1.6×10^{-5}	3.8
Ajmaline	10^{-6}	4.0×10^{-5}	1.5
	10^{-6}	1.8×10^{-5}	3.3
DMAR	10^{-4}	5.5×10^{-5}	1.2
	10^{-6}	1.7×10^{-5}	3.5
Yohimbine	10^{-6}	2.5×10^{-5}	2.4
	10^{-5}	1.8×10^{-5}	3.3

a) Increase in cytotoxicity as compared to the IC₅₀ without each Rauwolfia alkaloid.

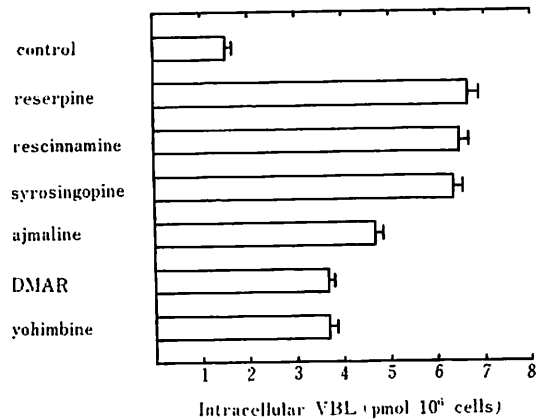


Fig. 1. Effect of Rauwolfia alkaloids on the Intracellular Uptake of VBL in AH66 Cells

The cells were incubated with 1.1×10^{-7} M of VBL and 1×10^{-5} M of each alkaloid for 30 min. Each bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

TABLE III. Uptake of Reserpine and DMAR in AH66 Cells for 30 min and Influence of VBL

Alkaloids	Concentration (M)	Intracellular alkaloid ($\times 10^{-10}$ mol/ 10^6 cells) with VBL		
		Alkaloid alone	10^{-6} M	10^{-5} M
Reserpine	10^{-6}	0.31 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01	0.32 \pm 0.03
	10^{-5}	1.24 \pm 0.47	1.26 \pm 0.22	1.28 \pm 0.31
	10^{-4}	10.30 \pm 1.53		
DMAR	10^{-5}	3.65 \pm 0.52	3.76 \pm 0.43	3.68 \pm 0.50

The cells were incubated with indicated concentrations of Rauwolfia alkaloid for 30 min in the absence or presence of indicated concentration of VBL. Each value is the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

TABLE IV. Effect of Reserpine and DMAR on ATPase Activities of AH66 Cell Plasma Membrane

Agent	Concentration (M)	(Na ⁺ -K ⁺)-ATPase	Mg ²⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -ATPase	(Ca ²⁺ -Mg ²⁺)-ATPase
		(% of control)			
0.5% DMSO		93.1 \pm 1.7 ^{a)}	96.4 \pm 1.6	90.4 \pm 1.8 ^{a)}	33.1 \pm 2.8 ^{a)}
Reserpine	1×10^{-5}	91.7 \pm 2.3	83.4 \pm 1.9 ^{b)}	68.3 \pm 1.8 ^{b)}	37.8 \pm 2.4
	3×10^{-5}	93.2 \pm 2.4	71.8 \pm 3.6 ^{b)}	58.6 \pm 2.5 ^{b)}	46.4 \pm 3.8 ^{b)}
DMAR	1×10^{-5}	96.7 \pm 2.3	106.7 \pm 6.7	107.0 \pm 6.4	88.7 \pm 2.1 ^{a)}
	1×10^{-4}	91.1 \pm 2.4 ^{a)}	75.8 \pm 3.9 ^{a)}	72.0 \pm 7.3 ^{a)}	32.0 \pm 6.5 ^{a)}

Control values for (Na⁺-K⁺) ATPase, Mg²⁺ ATPase, Ca²⁺ ATPase and (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase were 12.20 \pm 0.59, 11.68 \pm 0.82, 15.98 \pm 2.44 and 1.61 \pm 0.44 μ mol Pi/mg protein/h respectively. Each value is the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

a) $p < 0.05$ versus non-treated control. b) $p < 0.05$ versus 0.5% DMSO.

接触濃度で両 alkaloids の細胞内取り込み量を比較すると、レセルピンに比して DMAR は約 3 倍多く取り込まれることが明らかとなった。一方、両 alkaloids の細胞内取り込みに対して VBL 1×10^{-6} — 10^{-5} M は何ら相互作用を示さなかった。

4. 細胞膜 ATPase 活性に及ぼすレセルピン、DMAR 及び VBL の影響

AH66 細胞膜の (Na⁺-K⁺) ATPase, Mg²⁺ ATPase, Ca²⁺ ATPase, (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase 活性はそれぞれ、12.20 \pm 0.59, 11.68 \pm 0.82, 15.98 \pm 2.44 μ molPi/mg 蛋白/h であった。これらの ATPase に対してレセルピンは 1×10^{-5} M 以上で (Na⁺-K⁺) ATPase には影響せず、Mg²⁺ ATPase 及び Ca²⁺ ATPase 活性を抑制した。(Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase 活性は 0.5% DMSO で強く抑制されたが、レセルピンでは回復傾向を示した。DMAR は 1×10^{-4} M で (Na⁺-K⁺) ATPase を除く全ての ATPase 活性を抑制した (Table IV)。

5. VBL, レセルピン及び DMAR の粗 Microtubule に対する作用

AH66 細胞をレセルピンあるいは DMAR の共存あるいは非共存下、VBL 1.1×10^{-7} M にて 1 時間処理した後の細胞内 VBL 量と粗 microtubule 画分への VBL 結合量を示したのが Fig. 2 である。VBL 単独処理での粗 microtubule 画分への VBL 結合率は、細胞内 VBL 量の約 1.5% であった。一方、レセルピンや DMAR の併用により細胞内 VBL はそれぞれ増加するが、それに応じて粗 microtubule への VBL の結合量も増加し、両 Rauwolfia alkaloids は VBL の microtubule への結合率を変化させることはなかった。次いで、これらの薬物の microtubule 再構成 (重合) への影響を検討したのが Fig. 3 である。薬物無添加の粗 microtubule 溶液の重合度は約 12 分で peak に達し、溶液の比粘度 (η_{sp}) は最大となるが、VBL は濃度依存的に粘度の上昇を抑制した。また、レセルピンも同様に microtubule 溶液の粘度上昇を抑制し、再構成阻害作用を示し、VBL との併用においても相加的ではあるが、microtubule 再構成を抑制した。しかし、DMAR は、 1×10^{-4} M にても、あるいは VBL との併用にも粗 microtubule 溶液の比粘度を変化させることはなかった。

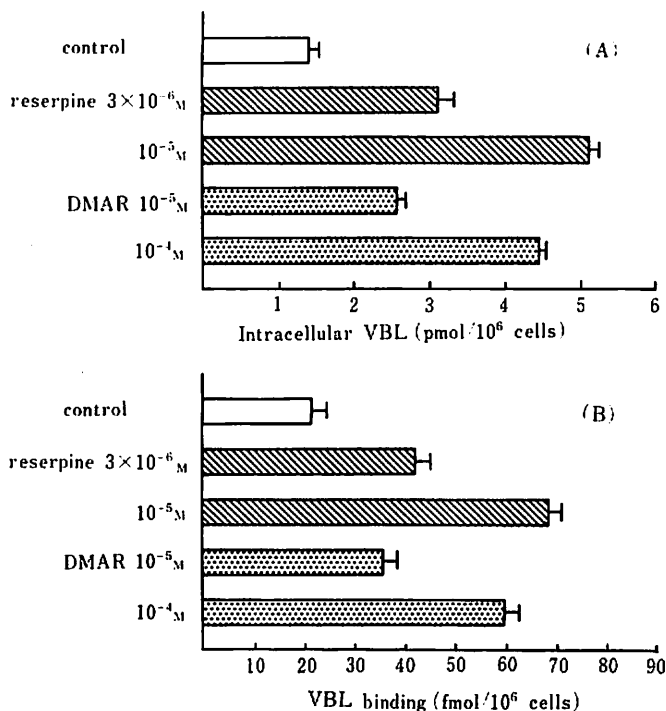


Fig. 2. Effect of Reserpine and DMAR on the Intracellular Uptake of VBL (A) and the VBL Binding to Microtubule (B) in AH66 Cells

The cells were incubated with 1.1×10^{-7} M of VBL and indicated concentration of reserpine or DMAR for 60 min. Each bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

考 察

Rauwolfia alkaloids の制癌増強作用に関しては、著者らは、レセルピンがマウス白血病 L1210¹⁾ や各種のラット腹水肝癌²⁾ について報告しているが、他の alkaloids については、レシナミンの大量がアルキル化型制癌剤 1-chloropropyl-2-chloromethyl-piperidine の L1210 担癌マウスに対する治療効果をもたらし、これを高めることが知られているにすぎない。^{1a)} 本報では、ラット腹水肝癌 AH66 細胞に対する VBL の増殖抑制作用に及ぼす 6 種の Rauwolfia alkaloids の影響を検討したところ、30 分間の短時間処理では、レセルピン、レシナミン、シロシンゴピン、アジマリジンが、VBL の細胞増殖作用を相乗的に高めたが、DMAR、ヨヒンビンは併用効果を示さなかった。しかし、これらの alkaloids と VBL を 2 日間共存させたところ、DMAR やヨヒンビンも VBL 増感作用を示した。前報で著者らは、レセルピンの VBL 増感作用と細胞内 VBL 蓄積作用が良い相関を示し、これがレセルピンの併用機作の 1 つであることを示した。³⁾ そこでこれらの alkaloids の細胞内 VBL 取

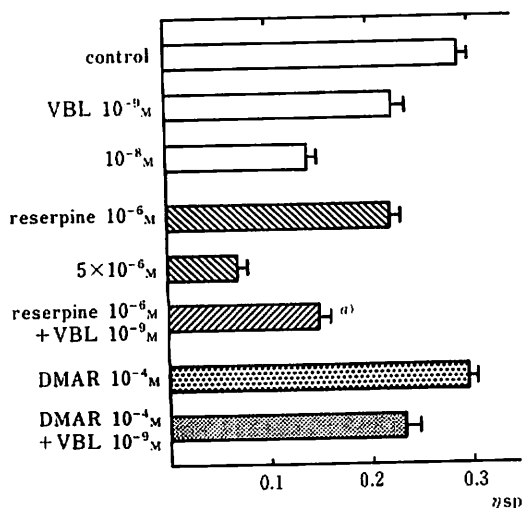


Fig. 3. Effect of VBL, Reserpine and DMAR on the Microtubule Polymerization

See details in the text. Each bar represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.
a) $p < 0.05$ versus 1×10^{-9} M of VBL and 1×10^{-6} M of reserpine.

り込みに対する影響を検討したところ、DMAR やヨヒンビンにても他の alkaloids に比して弱いものの VBL 蓄積作用を有することが明らかとなった。さらに DMAR 自身はレセルビンの約 3 倍程度細胞内に取り込まれることも示したが、これらの alkaloids の細胞内取り込みには VBL の相互作用は認められなかった。レセルビンの細胞内蓄積機序は、細胞膜 ATPase 活性の抑制に基づく VBL の細胞外流出抑制によることが示されている。³⁾ DMAR もまた、(Na⁺-K⁺) ATPase を除く細胞膜 ATPase を抑制するが、レセルビンに比して弱かった。しかし、DMAR がレセルビンと同等の VBL 蓄積作用を示すには約 10 倍濃度を要すること、同一濃度で細胞と接触した場合 DMAR がレセルビンより高い細胞内濃度を示すこと等より、DMAR の細胞内 VBL 蓄積機序は ATPase 活性抑制作用より十分説明できる。

さて、Rauwolfia alkaloids による VBL 増感作用に論点をもどすと、Rauwolfia alkaloids はいずれも細胞内 VBL 濃度を高めることより、長時間処理により VBL の効果が強く表れることは理解できる。しかし、レセルビンを始めとする 4 種の alkaloids は 30 分の処理によっても VBL の効果を高めた。VBL の主たる制癌機序は、microtubule に結合しその重合を阻止することにより有糸分裂を阻害することによることはよく知られた事実である。⁶⁾ そこで、Rauwolfia alkaloids の microtubule に対する影響に興味を持たれた。レセルビン、DMAR とも VBL の細胞内 microtubule への結合には影響しなかった。しかしレセルビン自身にも microtubule 重合抑制作用が報告されており、⁷⁾ 本実験においても、レセルビン 5×10^{-6} M は対照に比して microtubule の重合による比粘度を約 1/3 に抑制し、VBL との併用においても相加的に microtubule の重合を抑制した。しかし、DMAR には全くそのような作用はなかった。一方、レセルビン 3×10^{-6} M は VBL の効果を 2.5 倍に (Table I)、 2×10^{-5} M では約 70 倍に高める⁸⁾ が、それぞれ単独では細胞増殖には影響を示さない。ところが、細胞容積よりレセルビンの細胞内濃度を換算すると細胞外液濃度の約 6.5 倍に達することが示されている。^{8b)} すなわち、細胞内でレセルビンが microtubule と接する濃度は極めて高いことが予想され、VBL の作用と併せて短時間の接触にても細胞機能に強力な damage を与えることができるものと考えられる。

以上より、Rauwolfia alkaloids はすべて細胞内 VBL 蓄積をもたらすが、alkaloids のうちのある種のみは、細胞 microtubule に対して VBL と協力的に作用することが明らかとなった。したがって、Rauwolfia alkaloids は作用機序の違いに基づき処理計画を選択することにより、VBL の細胞増殖抑制効果を相乗的に高めることができることを示した。

引用文献

- 1) a) K. Miyamoto, S. Wakusawa, R. Koshiura, *Gann*, **71**, 408 (1980); b) S. Wakusawa, K. Miyamoto, R. Koshiura, *ibid.*, **73**, 637 (1982).
- 2) R. Koshiura, K. Miyamoto, F. Sanae, *Gann*, **71**, 45 (1980).
- 3) a) S. Wakusawa, K. Miyamoto, R. Koshiura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **36**, 187 (1984); b) 涌沢伸哉, 宮本謙一, 柳岡利一, 越浦良三, *薬誌*, **104**, 1288 (1984).
- 4) N. C. Morcos, G. I. Drummond, *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 27 (1980).
- 5) D. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 6) L. Wilson, K. M. Creswell, D. Chin, *Biochemistry*, **14**, 5586 (1975); R. J. Owellen, C. A. Hartke, R. M. Dickerson, F. O. Hains, *Cancer Res.*, **36**, 1499 (1976).
- 7) M. Poffenbarger, G. M. Fuller, *J. Neurochem.*, **28**, 1167 (1977).