

Pedunculagin의 Macrophage에 대한 항암활성 및 Nitric Oxide 생성

이도익[#] · 김형근 · 이민원 · 최영욱 · 김하형 · 김은주*

중앙대학교 약학대학, *한국화학연구소

(Received March 13, 2000)

Augmentation of Macrophage Cytotoxicity and NO Production by Pedunculagin

Do Ik Lee[#], Hyung Keun Kim, Min Won Lee, Young Wook Choi,
Ha Hyung Kim and Eun Joo Kim*

College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — Pedunculagin is an ellagitannin purified from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*. The effects of pedunculagin on the immune system have been characterized to induce enhancement of NK (natural killer) cell cytotoxicities against tumor cells. The present study investigated whether pedunculagin can enhance macrophage cytotoxicity against P815 tumor cells. Macrophage cultured with pedunculagin enhanced cytotoxicity in a dose dependent manner. In addition, the same treatments increased NO production, which plays important roles in the immune system. Taken together, these results demonstrate that pedunculagin significantly enhances cytolytic activities of macrophage.

Keywords □ Pedunculagin, Macrophage, NO production, Antitumor activity.

입상에서 암을 치료하는 요법으로서 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 약물요법 등이 있다. 그러나 암은 전이를 일으키는 특성 때문에 암발생 부위에 대한 국소적 치료만으로는 암의 퇴치가 불가능한 경우가 많으므로 전신요법인 약물요법이 기본적으로 병행되고 있다.^{1,2)} 최근까지 개발되어온 항암제들은 대부분 세포독성을 이용하여 항암 효과를 기대하는 것이었다. 이러한 세포독성은 단지 암세포에만 영향을 미치는 것이 아니라 일반 정상세포나 면역계의 세포들에게도 영향을 미쳐 부작용을 일으킨다. 따라서 항암제 개발의 연구과제는 이러한 부작용을 줄이면서 더욱 뛰어난 항암 효과를 나타내는 약물을 개발하는 것이다. 이에 이용되는 것으로는 drug delivery system, preorder 등이

있으나, 암세포 표면의 항원들이 제대로 밝혀지지 않는 한 현실적인 어려움이 많다. 이런 이유로 많은 연구자들은 면역학적 측면에서 면역 증강을 통한 항암 효과에 관심을 갖게 되었고, 이제는 새로운 각도에서 새로운 면역조절 물질의 개발에 초점을 두어 연구할 필요가 있다. 이러한 노력으로 최근에는 천연물, 특히 식물정제 물질에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.

그 중 생체 내에서 다양한 활성을 지닌 tannin은 angiotensin-converting enzyme(ACE) 저해효과,^{3,4)} protein kinase C의 억제효과,⁵⁾ DNA topoisomerase II의 억제효과,^{6,7)} DNA breakage 효과,^{8,9)} 항정신성효과,¹⁰⁾ 항신부전효과,^{11,12)} 항고혈압효과,¹³⁾ 항allergy효과,¹⁴⁾ blood urea nitrogen 감소효과,^{15,16)} 항균효과,¹⁷⁾ 항virus 효과¹⁸⁻²²⁾ 등 그밖에 여러 가지 활성²³⁻²⁵⁾이 보고되었다. 특히 최근의 연구에서 항암효과가 있다고 보고 되었다.²⁶⁻²⁸⁾

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-822-1469

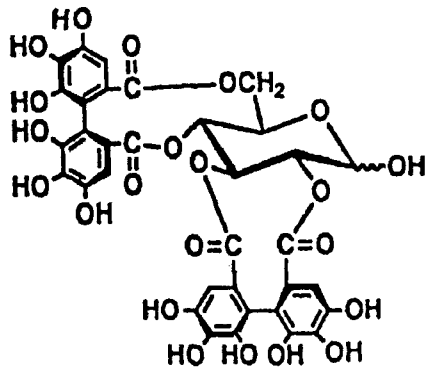


Fig. 1 - The structure of pedunculagin. ($C_{34}H_{24}O_{22}$ M.W. = 784.55)

1992년 Gail 등은 tannin의 가수분해물인 ellagic acid, 그리고 그 몇몇 관련 유도체가 mouse의 피부암에 유효하다고 보고하였으며,²⁹⁾ 1993년 Miyamoto 등은 5개의 ellagitannin이 *in vivo*에서 항암효과가 있었고, interleukin-1 β (IL-1 β)의 유도를 증진시킨다고 보고하였다.³⁰⁾ 또 sarcoma-180으로 복수암을 유발시킨 mouse에 45개의 ellagitannin을 처리한 결과, 21개의 ellagitannin이 유효하였다고 보고하였다.³¹⁾ 1992년 Kashiwada 등은 129 종의 tannin과 관련 화합물의 tumor cell에 대한 cytotoxicity를 연구보고 하였으며, 그 중 몇몇 tannin은 뛰어난 항암효과가 있다고 보고하였다.³²⁾

본 연구에서는 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제한³³⁾ ellagitannin의 일종인 pedunculagin(2,3,4,6-(s)-HHDP(Hexahydroxy-dephenoyl)-D-glucose, M.W.=784.55, Fig. 1)의 대식세포에 대한 항암효과를 *in vitro*에서 검색하였다.

실험방법

재료 및 시약 - 식물정제 tannin, pedunculagin은 중앙대학교 약학대학 생약학교실에서 제공받아 실험에 사용하였다. Dimethylsulfoxide(Sigma. Chem. Co., U.S.A.), Trypan blue(Sigma. Chem. Co., U.S.A.), RPMI1640 medium powder(Gibco., U.S.A.), Fetal bovine serum(Gibco., U.S.A.), Griess Reagent(Sigma Chem. Co., U.S.A.), LPS(*E.coli* serotype 0111: B4) Sigma Chem. Co., U.S.A.), MTT(Sigma Chem. Co., U.S.A.), Penicillin-Streptomycin(Gibco., U.S.A.), Recombinant IFN- γ (R&D, U.S.A.), Sodium nitrite

(Sigma Chem. Co., U.S.A.), Trypsin-EDTA(Gibco., U.S.A.)을 구입하여 사용하였다.

실험동물 - 6주령 된 ICR mouse(20~25g ♂)를 사용하였다. ICR계 mouse는 중앙동물에서 5주령 된 것을 구입하여 1주의 적응기를 거친 후 사용하였다.

세포주 - Mouse mastocytoma인 P815, mouse lymphoma인 Yac-1 등 총 2개의 tumor cell line을 실험에 사용하였다.

세포배양 - 위 모든 세포주는 Fetal Bovine Serum (FBS) 10%가 첨가된 RPMI 1640 medium에서 1일에 2회 계대배양하였으며, 37°C, 5% CO₂, 95% air로 맞춘 CO₂-incubator에서 배양하였다. FBS는 사용 전 56°C에서 30분간 heat-inactivation시켰다.

세포현탁액 조제 - 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 tumor cells의 배양은 실험하기 24시간 전에 75 cm² screw-capped culture flask에 2~3 × 10⁵ cells/ml의 농도로 tumor cell을 넣어 배양시켰다(Spinner culture). 이렇게 배양한 배양액의 세포수는 24시간 후에 보통 0.8~1.0 × 10⁶ cells/ml이 된다. 이 세포현탁액을 신선한 medium으로 희석하여 최종 농도 1~5 × 10⁵ cells/ml이 되도록 하였다(Run bottle).

Peritoneal Macrophage Separation - 6주령 (20~25g ♂)된 ICR mouse를 경구 탈취로 급사시킨 후 복부의 skin을 벗기고 serum free RPMI 1640 medium 6ml와 air 3 ml를 복강에 주사하고 2~3분간 마사지후 다시 주사기를 이용하여 회수한다. 이 과정을 3회 반복하여 복강내의 세포를 거의 취하도록 한다. 침전된 세포를 1 × 10⁶ cell/ml가 되도록 10%-FBS를 포함한 RPMI 1640 medium에 부유시키고 37°C, 5% CO₂, 95% air로 맞춘 CO₂-incubator에서 2시간 배양하여 plate에 부착된 macrophage만을 취했다.

*In vitro*에서는 외부 자극에 대해 항암작용을 쉽게 알아볼 수 있도록 inflammatory macrophage를 이용하기 위해 thioglycolate를 3 ml를 복강으로 투여하고 위와 동일한 방법으로 macrophage를 취한 다음 trypsin-EDTA와 scraper를 이용하여 부유 시키고 원하는 농도로 희석하였다.

Macrophage Antitumor Activity - 6주령(20~25g ♂)된 ICR mouse로부터 분리한 inflammatory macrophage를 96 well plate에 well당 1 × 10⁵개의 cell을 넣어 effector cell로 사용하였으며, 대조군은

D-PBS buffer, 실험군은 pedunculagin을 각각 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로, positive control로는 IFN- γ 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ 를 함께 20시간을 처리한 후, target cell인 P815와의 비율이 10:1이 되도록 하여 함께 20시간을 배양하였다. 이 때 각 well의 총 부피는 2 μL 가 되도록 하였다. 이 후 MTT assay를 실시하여 *in vitro*에서의 macrophage antitumor activity를 측정하였다.

Macrophage NO Production - ICR mouse 6주령(20~25g ♂)을 각 약물투여 농도 당 5마리씩을 준비하여 대조군은 D-PBS buffer를, 실험군은 각각 1, 5, 10 mg/kg의 용량으로 mouse 복강에 주사하였다. 이 때 약물의 양은 0.1 mL이 되도록 조정하였다. 약물을 mouse 복강에 주사하고 20시간 후 복강에서 macrophage를 위에서 기술한 대로 분리하여 12 well plate에 well당 1×10^5 cells/mL 농도로 조절하여 2 mL씩 넣었다. 이것을 4, 20, 30, 40 시간 동안 더 CO₂ incubator에서 배양한 후 각 측정 시간별로 상징액 100 μL 만을 취하여 96 well plate에 옮기고, 동량의 Griess reagent를 넣고 방치하였다. 이 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrite의 검량선과 비교하여 NO의 생성량을 계산하였다.

MTT Assay - MTT assay는 세포의 생존 능력, 증식성, 활성 등을 측정할 수 있는 분석방법으로 감도가 뛰어나고 정량이 가능하며 믿을 수 있는 색조 측정 분석법이다.³⁶⁾ 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 진청색의 비수용성인 Formosan 물질로 변화시킬 수 있는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.³⁴⁻³⁶⁾ MTT로 얻은 결과는 [³H]-thymidine uptake 분석법에서 얻은 결과와 동일하다. MTT 분석법은 분화는 하지 않지만 여전히 살아있는 세포의 검출에 특히 유용하다. 그러므로 이 분석법은 증식과 세포 활성을 구분하는 데에도 사용할 수 있다. 이 기술은 multiwell scanning spectrophotometer(microELISA reader)를 사용할 경우 매우 정확하게 많은 양의 시료를 처리할 수도 있다.

MTT 분석법은 반응의 최고 속도를 측정함으로써 세포활성을 정량화 하는 데에도 사용될 수 있다. 주어

진 세포 활성의 두 상을 비교하기 위한 다른 방법으로는 살아있는 세포와 같은 양만큼 생성된 MTT formazan의 측정으로 가능하다.

통계처리 - 실험 결과는 평균치와 실험에 대한 standard error를 계산하였고, 대조군과의 차이를 student T-test를 사용하여 효력을 검증하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

본 실험은 pedunculagin이 macrophage를 직접 활성화시켜 항암작용을 발휘하는지 알아보기 위하여 mouse로부터 inflammatory macrophage를 취하여 실험을 한 결과, macrophage의 cytotoxicity는 용량의 존적으로 증가하였으며 특히 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 control군보다 각각 19.74, 30.77%의 cytotoxicity가 증가한 것으로 나타났고 이는 LPS와 IFN- γ 를 투여한 positive control군의 18.28%보다도 더 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

Pedunculagin이 생체 내에서 macrophage를 activation시키는지 알아보기 위하여 pedunculagin을 각각 1, 5, 10 mg/kg을 복강으로 투여하고 20시간 후에 macrophage를 취한 후 antitumor activity를 측정하였

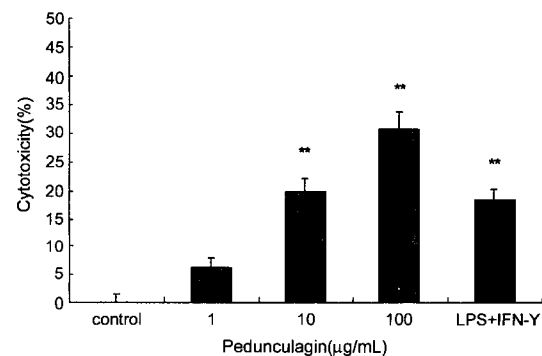


Fig. 2 - Effects of pedunculagin on cytolytic activity of macrophage *in vitro*. Thioglycolate-elicited macrophages were collected by peritoneum lavage. Peritoneal macrophage were cultured with pedunculagin for 20 hrs in various concentrations. After culture, cells were harvested and macrophage cytotoxicity was determined by MTT assay. P815 cells were used as target cells and the Effect cell : Target cell ratio was 10:1.(** p<0.01).

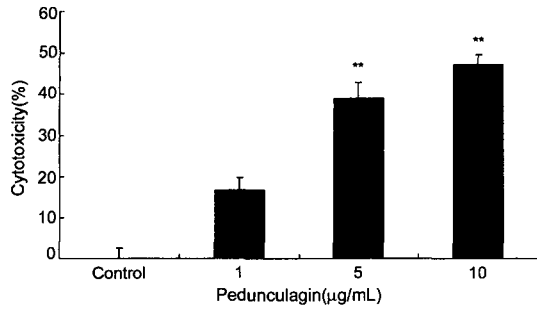


Fig. 3 – Enhancement of macrophage cytotoxicity in mice treated with pedunculagin. To examine macrophage activity *in vivo*, various concentrations of pedunculagin were injected i.p. to mice. After 20 hrs later, macrophages were isolated and used to determine macrophage cytotoxicity against P815 cells. The Effect cell : Target cell ratio was 10 : 1 (** $p < 0.01$)

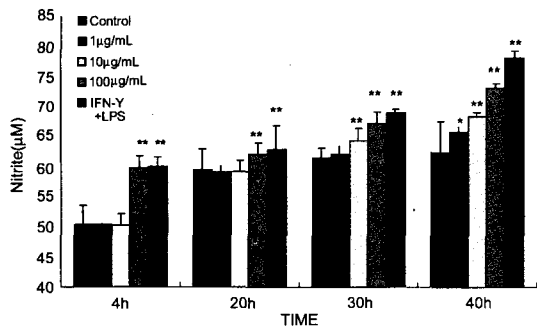


Fig. 4 – Effects of pedunculagin on NO production of macrophage *in vitro*. Thioglycolate-elicited macrophages were collected by peritoneum lavage. Macrophages were cultured with media(control) or pedunculagin for various concentrations as indicated. After 20 hr incubation, culture supernatants were harvested and used to determine NO production (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

다. 그 결과, 1 mg/kg에서는 유의성이 없었으며 5, 10 mg/kg의 용량에서는 대조군에 비해 각각 38.81%, 47.08% cytotoxicity가 증가한 것으로 나타났다(Fig. 3).

Mouse로부터 inflammatory macrophage를 분리하여 pedunculagin을 각각 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 20시간을 처리한 후 신선한 배지에서 4, 20, 30, 40 시간 더 배양하여 그 상등액으로부터 NO의 분비량을 nitrite로 확인하였다. 그 결과 용량 의존적으로 NO의 분비가 증가하였는데, 100 µg/mL에서는 4시간 후부터 유의성 있게 증가하였고 10 µg/mL에서는 30시간 후부터, 1 µg/mL은 40시간 후에 유의성 있게

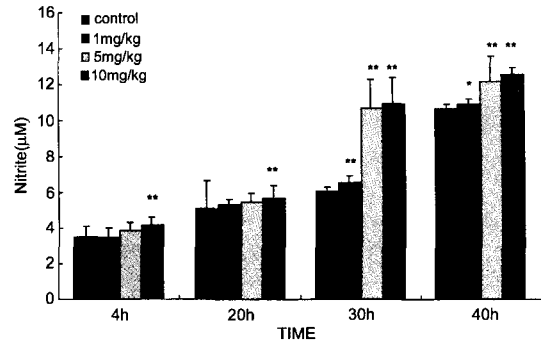


Fig. 5 – Enhancement of NO production in mice treated with pedunculagin. To examine NO production *in vivo*, various concentrations of pedunculagin were injected i.p.. After 20 hrs later, macrophage were collected and incubated for various time periods as indicated. Culture supernatants were harvested to measure NO production (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

증가하였다(Fig. 4).

Pedunculagin을 각각 1, 5, 10 mg/kg을 복강으로 투여하고 20시간 후 mouse들에서 macrophage를 분리하여 4, 20, 30, 40시간 후에 NO의 분비량을 측정하였다. 그 결과 10 mg/kg을 투여한 것은 4시간 후부터 유의성 있게 증가하였으며 1, 5 mg/kg을 투여한 것은 30 시간 후부터 유의성 있게 증가하였다. 또한 NO의 분비량은 투여한 약물의 용량에 의존적으로 증가하는 모습을 나타냈다(Fig. 5).

고 찰

식물에서 정제된 ellagitannin의 일종인 pedunculagin(2,3,4,6,-(s)-HHDP(Hexahydroxydephenoyl)-D-glucose, M.W.=784.55) (Fig. 1)의 면역계 세포 중 macrophage 항암효과를 측정하였다. Pedunculagin 성분은 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제된 ellagitannin의 일종이다. 본 연구실에서 발표한 이전의 보고서에 의하면 pedunculagin은 *in vitro*에서 HL-60, K-562, L-1210, L5178Y, P388 등의 tumor cell line에 대해 직접적인 cytotoxicity를 나타냈다.

Macrophage의 antitumor activity를 위한 실험에서 pedunculagin은 *in vivo*와 *in vitro*에서 모두 macrophage의 cytotoxicity를 대조군에 비해 용량 의존적으로 증가시켰으나, *in vivo*에서의 1 mg/kg을 투여하였

을 때와 *in vitro*에서 1 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여했을 때는 유의성이 없었다. 그러나 *in vitro*에서 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여한 것은 LPS와 IFN- γ 를 투여한 positive control 보다 macrophage의 cytotoxicity를 오히려 더 증가되었다. 이런 현상은 pedunculagin이 macrophage에 직접 작용하여 활성을 증가시키는 것을 의미한다.

Macrophage가 분비하는 NO의 생성 시험에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 NO의 생성이 증가하는 것으로 나타났다. *In vitro*에서 NO의 생성은 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여했을 때는 처음 4시간 후부터 유의성 있는 증가를 보였고, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여했을 때는 시간이 지날수록 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다. 또 시간이 지날수록 NO의 생성이 용량 의존적인 양상이 뚜렷했다. *In vivo*에서도 *in vitro*와 마찬가지로 10 mg/kg을 투여했을 때는 4시간 후부터 유의성이 있었으나, 1, 5 mg/kg을 투여했을 때는 30시간이 지난 후에야 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. 이는 macrophage의 antitumor activity가 *in vitro*에서 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리했을 때 positive control보다도 효과가 컸던 것과 연결시켜 볼 때 면역계 세포의 활성 증강에 영향을 미쳐 암세포를 공격하는 독성물질인 NO의 생성을 증가시켜 antitumor activity도 커지는 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 pedunculagin은 직접적인 항암제로서의 가능성과 더불어 면역증강물질로서의 가능성을 제시하고 있으며 pedunculagin의 면역학적 활성기전은 앞으로 계속 규명되어야 할 과제이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건의료기술연구개발사업의 지원과 중앙대학교 연구기자재 구입 지원 프로그램의 도움을 받은 결과이며 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

- 1) Gilman, A. D., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad. F. : *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Ed., Macmillan Publishing Co., New York, p.1268 (1988).
- 2) Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Hayes, P. E., Yee, G. G. and Posey, L. M. : *Pharmacotherapy a Pathophysiologic Approach*, Elsevier, Amsterdam, p.1343 (1989).
- 3) Inokuchi, J., Okabe, H., Yamaguchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Ozaki, M. : Inhibition of angiotensin-converting enzyme in crude drugs II. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 264 (1985).
- 4) Uchida, S., Ikare, N., Ohta, H., Niwa, M., Nonaka, G., Nishioka, I., and Ozaki, M. : Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin converting enzyme. *Japan. J. Pharmacol.* **43**, 242 (1987).
- 5) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P. and Lee, K. H. : Tannins as selective inhibitors of protein kinase C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2**, 239 (1992).
- 6) Kuramamochi, M. A., Kuramamochi, H., Kobayashi, F., Ekimoto, H., Talahashi, K., Kadota, S., Takamori, Y. and Kikuchi, T. : Woodfruticosin(woodfordin C), a new inhibitor of DNA topoisomerase II, Experimental antitumor activity. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1961 (1992).
- 7) Kashima, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Lee, K. J., Bori, I., Fukushima, Y., Bastow, K. F. and Lee K. H. : Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* **82**, 487 (1993).
- 8) Shirahata, S., Murakami, H., Nishirama, K., Sugata, I., Shinogara, K., Nonaka G., Nishioka, I. and Oura, H. : DNA breakage by hydrolyzable Tannins in the presence of cupric ion. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1033 (1985).
- 9) Shirahata, S., Murakami, H., Nishirama, K., Yamada, K., Nonaka, G., Nishioka, I. and Oura, H. : DNA breakage by flavin-3-ol and procyanidins in the presence of cupric ion. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 299 (1989).
- 10) Ukei, S., Nishioka, I., Fujiwara, M. and Nanoka, G. : Psychotropic effects of rhubarb. *Gendaitoyoigaku* **7**, 98 (1986).
- 11) Yokako, T., Lee, T. W., Oura, H., Nonaka, G., and Nishioka, I. : Effect of magnesium lithospermate B in rats with sodium-induced hypertension and renal failure. *Nephron* **60**, 460 (1992).
- 12) Yokozawa, T., Suzuki, M., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Effect of extracts obtained from rhubarb in rats with chronic renal failure. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4718 (1986).
- 13) Inokuchi, J. I. : Antihypertensive substance in seeds

- of Arecacatechu L., *Life Sci.* **38**, 1375 (1986).
- 14) Kakegawa, H., Matsumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Inhibition effects of tannins on hyaluronidase activation effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5079 (1985).
 - 15) Shirahata, S., Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Mechanism of the blood urea nitrogen decreasing activity of rhatannin from rhei rhizoma in rat. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2378 (1983).
 - 16) Yokako, T., Fujioka, K., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Effect of rhubarb tannins on uremic toxins. *Nephron* **58**, 155 (1991).
 - 17) Scalbert, A. : Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875 (1991).
 - 18) Fukuchi, K., Sakagami, H., Ikeda, M., Kawazoe, Y., Oh, H. T., Konno, K., Ichikawa, S., Hata, NN., Kondo, H. and Nonoyama, M. : Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances. *Anticancer Res.* **9**, 313 (1989).
 - 19) Kashiwada, Y., Shi, H. P., Nonaka, G., Nishioka, I., Newbold, J. E. and Lee, K. H. : Inhibitory effects of the phenolic constituents of rhubarb on cell cultures producing hepatitis B virus. *Int. J. Orient. Med.* **16**, 135 (1991).
 - 20) Lee, K. H., Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E. and Cueng, Y. C. : Natural products as antiviral agents, Chu, C. K. and Cutler, H. G. (Eds.). *Tannins and Related Compounds as Anti-HIV Agents*, Plenum Press, New York, p. 69 (1992).
 - 21) Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y. C. and Lee, K. H. : Anti-AIDS agents, 2 : Inhibitory effects of tannins on HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* **53**, 587 (1990).
 - 22) Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, H., Nonaka, G., and Nishioka, I. : Structure and antitherapeutic activity among the tannins. *Phytochemistry* **24**, 2245 (1985).
 - 23) 内田 眞, 丹羽 正美, 尾崎 正岩, 森 昭亂 野中源一郎, 西岡 五夫, 縮合型 タンニンの脳卒 中易發病 テット (SHRSP) に対する 延命効果と脂質過酸化抑制作用, *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU.* **5**, 280 (1988).
 - 24) Yokowawa, T., Iwano, M., Dohi, K., Oura, H., Nonaka, G. and Hattori, M., Magnesium lithospermate B suppressed the proliferation of mesangial cell. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKANYAKU.* **9**, 165 (1992).
 - 25) Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Effect of rhatannin on incorporation of precursors into proteins and ribonucleic acids of rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 4494 (1985).
 - 26) Miyamoto, K., Nomura, M., Sasakura, M., Matsui, E., Koshiura, R., Murayama, T., Furukawa, T., Hatano, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Antitumor activity of oenothien B, a unique macrocyclic ellagitannin. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**, 99 (1993c).
 - 27) Yoshida, T., Chou, T., Matsuda, M., Yasuhara, T., Yazaki, K., Hatano, T., Nitta, A. and Okuda, T. : Woodfordin D and oenothien A, trimeric hydrolyzable tannins of macroring structure with antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1157 (1991).
 - 28) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T. : Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica* **55**, 117 (1989).
 - 29) Gali, H., Perchellet, E., Klis, D., Johnson, J. and Perchellet, J. : Antitumor-promoting activities of hydrolyzable tannins in mouse skin. *Carcinogenesis* **13**, 715 (1992).
 - 30) Miyamoto, K., Murayama, T., Nomura, M., Hatano, T., Yoshida, T., Furukawa, T., Koshiura, R. and Okuda, T. : Antitumor activity and interleukin-1 induction by tannins. *Anticancer Res.* **13**, 37 (1993a).
 - 31) Miyamoto, K., Murayama, T., Nomura, M., Hatano, T., Furukawa, T., Yoshida, T., Koshiura, R. and Okuda, T. : Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice. *Bio. Pharm. Bull.* **16**, 379 (1993b).
 - 32) Yoshiki, K., Nonaka, G., Nishioka, I., Chang, J. J. and Lee, K. H. : Antitumor agents, 129 tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.* **55**, 1033 (1992).
 - 33) Lee, M. W., Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Hirsutin, An ellagitannin with a diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*. *Phytochemistry* **31**, 967 (1992).
 - 34) Monsmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular

- growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55 (1983).
- 35) Gerlier D. & Thomasset N. : Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Meth.* **94**, 57 (1986).
- 36) Grailer A., Sollinger H. W., and Burlingham W. J. : A rapid assay for measuring both colony size and cytolytic activity of limiting dilution microcultures. *J. Immunol. Meth.* **107**, 111 (1988).