

癌に対する抗酸化性食品成分の作用解析

Analysis on the Effects of Antioxidants in Foods  
on the Proliferation, Metastasis  
and Cancer Cachexia of Hepatoma

2001.3

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
生物工学専攻

小築 康弘



①

癌に対する抗酸化性食品成分の作用解析  
Analysis on the Effects of Antioxidants in Foods  
on the Proliferation, Metastasis  
and Cancer Cachexia of Hepatoma

2001. 3

東京農工大学大学院

連合農学研究科

生物工学専攻

小築 康弘

## 目次

第一章 序論 .....	1
第二章 癌細胞の増殖と浸潤に対するカロテノイドの作用解析 .....	4
2-1 背景と目的 .....	4
2-2 実験方法 .....	4
2-3 結果 .....	6
2-4 考察 .....	8
第三章 癌細胞の増殖と浸潤に対するクルクミンの作用解析 .....	14
3-1 背景と目的 .....	14
3-2 実験方法 .....	14
3-3 結果 .....	16
3-4 考察 .....	17
第四章 癌細胞の増殖と浸潤に対するレスベラトロールの作用解析 .....	23
4-1 背景と目的 .....	23
4-2 実験方法 .....	23
4-3 結果 .....	25
4-4 考察 .....	26
第五章 癌性高脂血症に対するレスベラトロールの作用解析 .....	33
5-1 背景と目的 .....	33
5-2 実験方法 .....	33
5-3 結果 .....	35
5-4 考察 .....	36
第六章 総括 .....	43
謝辞 .....	46
参考文献 .....	47



## 略語一覧

AX:	アスタキサンチン
BC:	$\beta$ -カロテン
Ch:	コレステロール
CMC:	カルボキシメチルセルロースナトリウム
COX:	シクロオキシゲナーゼ
CS:	牛血清
CURS:	クルクミンを経口投与したラット血清
ECM:	細胞外マトリックス
HDL:	高密度リポタンパク質
HX:	ヒポキサンチン
IL:	インターロイキン
LDL:	低密度リポタンパク質
LOX:	リポキシゲナーゼ
MEM:	イーグルの最小必須培地
PBS (-):	(カルシウム, マグネシウム不含) リン酸緩衝化生理食塩水
RERS:	レスベラトロールを経口投与したラット血清
SEM:	標準誤差
TBA:	チオバルビツール酸
TBARS:	チオバルビツール酸反応生成物
TG:	トリグリセライド



- THC: テトラヒドロクルクミン
- TNF: 腫瘍壊死因子
- VLDL: 超低密度リポタンパク質
- XO: キサンチンオキシダーゼ
- ZX: ゼアキサンチン
- 20C: 20%カゼイン食
- 1R: 20%カゼイン食に 1 ppm のレスベラトロールを添加した食餌
- 10R: 20%カゼイン食に 10 ppm のレスベラトロールを添加した食餌
- 50R: 20%カゼイン食に 50 ppm のレスベラトロールを添加した食餌
- 100R: 20%カゼイン食に 100 ppm のレスベラトロールを添加した食餌



## 第一章 序論

癌は 1981 年以來、日本における死亡原因の第一位を占めており、1996 年の癌による死亡者数は死亡原因の 3 割を占める 27 万人であった（厚生白書、1997）。癌治療が困難な原因がいくつか考えられる。まず、癌細胞の“無限増殖性”があげられ、外科的手術により体から癌細胞を一掃するのを困難にしている“転移性”（清水、1996）、さらに癌治療への耐用力を少なくする原因となる“悪液質”があげられる（平田、1999）。

癌細胞のもつ二大特性として、無限増殖性と転移性があげられる。特に、転移は複数のステップからなり、それは次のようなステップである。（1）癌細胞の原発部位からの離脱、（2）癌細胞の血管・リンパ管あるいは腹腔内などへの侵入、（3）体液の流れによる遠隔臓器への運搬、（4）新たな場所（臓器）での癌細胞の再増殖、という過程を経る（Ruoslahti, 1996）。他組織への癌細胞の移動を意味する“浸潤”というステップが転移の各ステップの中でも特徴的かつ重要である（Liotta *et al.*, 1983）。この癌細胞の浸潤を薬剤や食品因子で阻害することができれば宿主の延命が図れるものと考えられる。そのような因子を見出すため、これまでに、ニワトリの漿尿膜を利用した検定系（Armstrong *et al.*, 1982; Chambers *et al.*, 1982; Easty and Easty, 1974）や細胞外マトリックスをコートした膜を利用したポイデンチャンバーアッセイ（Albini *et al.*, 1987; Welch *et al.*, 1989）など、いくつかの *in vitro* 浸潤能検定系が使われている。しかしながら、癌細胞の浸潤を抑制する効果的な方法を見つけるのは、二つの理由で難しいこととなっている。第一に、*in vitro* 検定系における癌細胞の“浸潤”という現象とその元来の宿主内で起こる“浸潤”という振る舞いの相関は低いことがあげられる（Noel *et al.*, 1991; Poste *et al.*, 1980）。Akedo ら（Akedo *et al.*, 1986）は初代培養した腸間膜由来中皮細胞層下へのラット腹水肝癌 AH130 細胞の浸潤を測定する *in vitro*



検定系を開発し、その系が宿主であるラットの腹腔内での浸潤とよく相関することを見出した。第二に、*in vitro*系で効果のあった物質が*in vivo*では効果のないことがしばしばあることである。しかし、本研究室の三浦ら (Miura *et al.*, 1997a) が、*in vitro*系で効果のあった物質を投与したラットの血清を*in vitro*系の培地に添加する系を用いて検討する方法を開発した。*In vivo*系での効果を調べる困難さを、この方法を採用することにより簡便に検討することができると考えられる。

ラット腹水肝癌 AH109A 細胞は、AH130 と同様に腹水の中で増殖し、その過程の中で腸間膜 (あるいは他の中皮細胞層) へと浸潤する。本研究室では、ラット腸間膜由来中皮細胞と AH109A 細胞を使用した浸潤能検定系を用いて、食品や食品因子の癌細胞浸潤抑制作用を調べてきた。その中でも、お茶、コーヒー、あるいはそれらを経口投与したラットの血清が浸潤を抑制することが見出された (Miura *et al.*, 1997a; Miura *et al.*, 1997b; Zhang *et al.*, 1999; Yagasaki *et al.*, 2000)。これらお茶やコーヒーは抗酸化性食品因子であるポリフェノールを含んでいるため、我々は一般の抗酸化物質も癌細胞の浸潤を抑制するとの仮説をたてるに至った。

癌は食欲不振、栄養障害、体重減少、ときには免疫異常や鬱状態の原因となる悪液質を引き起こす (平田, 1999)。進行担癌病態・癌悪液質にともなう代謝異常は糖・蛋白質・脂質・電解質のいずれの物質においても認められ (Sakurai and Klein, 1998)、その基本型は異化であり、耐糖能低下、肝における糖新生亢進、蛋白分解、脂肪組織消耗として代表される。その中でも脂質代謝異常に注目すると、担癌時にはしばしば高脂血症が起こることが知られている (Barclay, M. *et al.*, 1970; Nydegger and Butler, 1972; Kannan and Baker, 1975; Alsabti, 1979; Hirayama *et al.*, 1979; Bálint and Holczinger, 1984; Irikura *et al.*, 1985; Clark and Crain, 1986; Noguchi *et al.*, 1991)。腹水肝癌 AH109A 細胞をラットの背部に皮下移植し、固



形癌が形成されると、血清リポタンパク質異常に基づく高脂血症が発生する（矢ヶ崎，1999）。これまでに本研究室では，メチオニン（1.2%），シスチン（1.2%）またはメチオニン（1.2%）+グリシン（2.5%）（Yagasaki *et al.*, 1986），魚油（Kawasaki *et al.*, 1995），キャベツ抽出物（Komatsu *et al.*, 1998）は担癌ラットにおける血清コレステロールレベルの上昇を抑制することを見出している。

近年，食品因子のうち栄養素でない成分にも有効な生理・薬理学的作用のあることが明らかにされつつある。そこで本研究では，非栄養素，特に抗酸化性食品因子に注目し，癌細胞の増殖・浸潤・転移と癌性悪液質の一症状としての高脂血症に対するこれら成分の有効性と作用機構を *in vitro* と *in vivo* の両系で明らかにすることを目的としている。



## 第二章 癌細胞の増殖と浸潤に対するカロテノイドの作用解析

### 2-1 背景と目的

カロテノイドは緑黄色野菜や果実、あるいは甲殻類に含まれる色素であり、抗酸化性食品因子である。カロテノイドは炭化水素カロテノイドであるカロテンと六員環に酸素が付加した構造をもつキサントフィルに分類される。疫学的調査により、これら食品因子は発癌抑制作用のあることが期待されている (Peto *et al.*, 1981; Vainio and Rautalahti, 1998)。そこで、本章では癌細胞の増殖・浸潤に対する8種のカロテノイド ( $\alpha$ -カロテン,  $\beta$ -カロテン, リコペン,  $\beta$ -クリプトキサンチン, ゼアキサンチン, ルテイン, カンタキサンチン, アスタキサンチン, Fig. 2-1) の効果を検討した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 材料

$\alpha$ -カロテン,  $\beta$ -カロテン, リコペン, ルテインおよびアスタキサンチンは Sigma (St. Louis, MO, USA) より,  $\beta$ -クリプトキサンチン, ゼアキサンチンおよびカンタキサンチンはフナコシ (東京) より購入した。これら8種のカロテノイドはジメチルスルフォキシド (DMSO, Sigma) にそれぞれ溶解し, 培地に DMSO の濃度が 0.5% になるように添加した。対照の培地には 0.5% DMSO のみを添加した。



## 2-2-2 肝癌 AH109A 細胞の培養

ラット腹水肝癌 AH109A 細胞（東北大学 加齢医学研究所 (仙台) より分与された）をドンリュウ系雄ラット（NRC 榛名, 群馬）の腹腔内で維持した。蓄積した腹水より AH109A 細胞を単離し 10% 牛血清（CS, JRH, Lenexa, KS, USA）を含むイーグルの最小必須培地（MEM, 日水製薬, 東京）で培養した。混入したマクロファージや好中球を除くために、少なくとも一週間培養した後、以下の実験に使用した。

## 2-2-3 *In vitro*における AH109A 細胞の増殖能の測定

増殖能の測定は WST-1（同仁化学研究所, 熊本）法により（Ishiyama *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1999）, あるいは DNA へ取り込まれた [<sup>3</sup>H]thymidine（20 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, USA）の放射能を測定することにより（Yagasaki *et al.*, 1992）評価した。

## 2-2-4 *In vitro*における AH109A 細胞の浸潤能の測定

浸潤能の測定は明度らの方法（Akedo *et al.*, 1986）の変法（Miura *et al.*, 1997a）により評価した。ドンリュウ系雄ラット（4~6 週齢）から腸間膜を摘出し、0.25% トリプシン（1:250, Sigma）を溶解した（カルシウム, マグネシウム不含）リン酸緩衝化生理食塩水（PBS (-)）中で 20 分間、37°C でインキュベートし、10% CS/MEM を同量添加してトリプシンを不活化した。金網でろ過後、10% CS/MEM を入れた 2 mm グリッド付き 60 mmφ シャーレ（Corning, Cambridge, MA, USA）に  $1.5 \times 10^5$  の腸間膜に由来する中皮細胞を播種した。コンフルエン



トになるまで培養し（7～10日間），中皮細胞単層上に  $2.4 \times 10^5$  の AH109A 細胞を重層した．24 時間培養後，位相差顕微鏡（CK40，オリンパス光学工業，東京）で中皮細胞層下に潜り込んだ AH109A 細胞の細胞数およびコロニー数を 10 区画数え， $1 \text{ cm}^2$  当たりに換算した値を浸潤能の指標とした．

#### 2-2-5 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いた AH109A 細胞の活性酸素処理

AH109A 細胞を (1) 10% CS/MEM, (2) 10% CS/MEM +  $5 \mu\text{M}$  カロテノイド, (3) 10% CS/MEM +  $4 \mu\text{g/ml}$  ヒポキサンチン (HX, Sigma) +  $7 \times 10^4 \text{ U/ml}$  キサンチンオキシダーゼ (XO, Sigma), (4) 10% CS/MEM +  $5 \mu\text{M}$  カロテノイド +  $4 \mu\text{g/ml}$  HX +  $7 \times 10^4 \text{ U/ml}$  XO の 4 種の培地で 4 時間培養した (Shinkai *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1997) . 培地を除去し，10% CS/MEM に懸濁後，活性酸素処理した AH109A 細胞を， $5 \mu\text{M}$  カロテノイドを含むあるいは含まない 10% CS/MEM 中の中皮細胞単層上に重層し，2-2-4 に準じ浸潤能を測定した．

#### 2-2-6 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で示した．二群間の比較は Student's *t*-test により，三群以上の比較は一元配置の分散分析を行い，危険率 5% で有意であったときに Tukey test により行った．

#### 2-3 結果



本実験では8種のカロテノイドを選び (Fig. 2-1), 癌細胞の増殖・浸潤に対する効果を検討した. カロテンとして, 最もよく知られている $\beta$ -カロテン (BC), 一つの六員環内の二重結合の位置が BC とは異なる位置にある $\alpha$ -カロテン, BC の二つの六員環が開裂した構造をもつリコペンを選んだ. キサントフィルとして, BC の六員環の一つに一個の水酸基の付いた $\beta$ -クリプトキサンチン, さらにもう一つの環に一個の水酸基の付いたゼアキサンチン (ZX), 一つの六員環内の二重結合の位置が ZX とは異なる位置にあるルテイン, BC の二つの六員環にそれぞれオキソ基の付いたカンタキサンチン, さらにそれぞれに水酸基が付いたアスタキサンチン (AX) を選んだ.

まず, AH109A 細胞の増殖に対するこれら8種のカロテノイドの効果を WST-1 法で検討した. これらカロテノイドは0~20  $\mu$ M では増殖に影響を与えなかった (Fig. 2-2). しかし, 生存している細胞は WST-1 を黄色ホルマザンにし, また, カロテノイドは主に黄色がかった色をしているものが多いため, WST-1 法により得た結果を $^3\text{H}$ チミジンの DNA への取り込みを測定する方法により再評価した. 再評価は BC についてのみ行ったが, やはり BC (0~20  $\mu$ M) は AH109A 細胞の増殖に影響を与えなかった. 次に, AH109A 細胞の浸潤に対する影響を評価した. 調べたすべてのカロテノイドにおいて, 5  $\mu$ M まで濃度依存的に浸潤を抑制し, その効果は20  $\mu$ M まで持続したが, 8種の構造の異なるカロテノイドの中で, 効果に違いは見られなかった (Fig. 2-3).

カロテノイドは抗酸化性食品因子である. ゆえに, カロテノイドの抗浸潤作用にその抗酸化性が関与しているとの仮説をたて, 以下の実験を行った. Shinkai らは HX-XO とともに前培養したラット腹水肝癌 AH130 細胞の浸潤能が亢進することを見出している (Shinkai *et al.*, 1986). そこで, HX-XO によりスーパーオキシドを発生させた培地で AH109A 細胞を前培養したところ, 浸潤能が約1.4倍に亢進した (Fig. 2-4). 前培養時に BC (カロテン)



または AX (キサントフィル) を HX-XO とともに添加することで、この活性酸素による浸潤能の亢進は抑制された。興味深いことに、前培養時に BC または AX のみを添加し、中皮細胞との共培養時に通常の 10% CS/MEM で培養した AH109A 細胞の浸潤が、実際に浸潤が起こる段階でカロテノイドは培地に存在しないにも関わらず抑制された。

#### 2-4 考察

本章では、8 種のカロテノイドの癌細胞の増殖および浸潤に対する効果を検討した。これらの食品因子は 0~20  $\mu\text{M}$  で増殖には影響を与えずに (Fig. 2-2) , 浸潤のみを抑制した (Fig. 2-3) . 8 種の物質間の構造的な違い (六員環内の二重結合の  $\alpha \cdot \beta$  位, 六員環の有無, オキシ基・水酸基の数や位置) は抗浸潤作用に差を与えなかった。このことから、これらカロテノイドに共通の構造である共役二重結合が抗浸潤作用には重要であること、および、カロテノイドのもつプロビタミン A 活性は抗浸潤作用には関与しないことが示唆された。

次に、カロテノイドの抗酸化作用と抗浸潤作用との関与の可能性を検討した。HX-XO により活性酸素を発生させた培地で前培養した AH109A 細胞の浸潤能は有意に亢進した (Fig. 2-4) . BC および AX は前培養時に HX-XO とともに共存することで、この浸潤能の亢進を抑制した。HX-XO 系では活性酸素種、特にスーパーオキシドが発生するので、この結果はカロテノイドのもつ抗酸化能、特にスーパーオキシド捕捉能 (Zhao *et al.*, 1998) が抗浸潤作用に関与することを示唆している。Stahl ら (Stahl *et al.*, 1997) はカロテノイドの一重項酸素消去能が分子内に存在する共役二重結合の数に依存することを報告している。つまり、この報告は共役二重結合と抗酸化能がカロテノイドの抗浸潤作用に重要であると



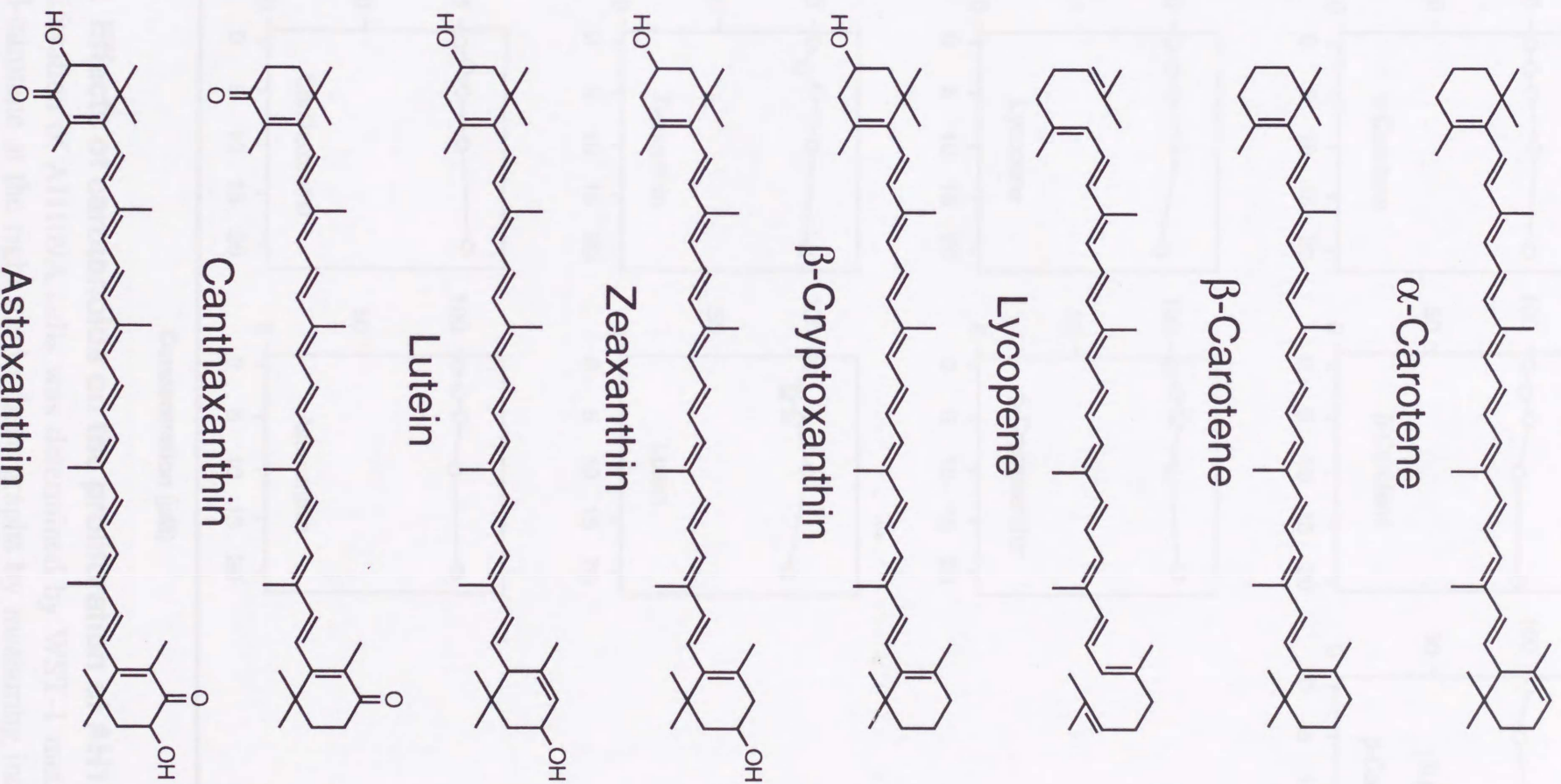
いう我々の示唆を支持するものであると考えられる。

実際に癌細胞が浸潤する段階で培地中にカロテノイドが存在しないにも関わらず、 $5\ \mu\text{M}$ のBCおよびAXは前培養段階のみに添加されることでAH109A細胞の浸潤を抑制した (Fig. 2-4)。カロテノイドは一般に脂溶性であることから生体膜やリポタンパク質の脂質相に存在して、脂質過酸化反応の進行を抑制する可能性があり (寺尾ら, 1997), これらの結果により、カロテノイドは細胞内、特に細胞膜に留まり、活性酸素種を抑制することで浸潤を抑制していることが推察される。



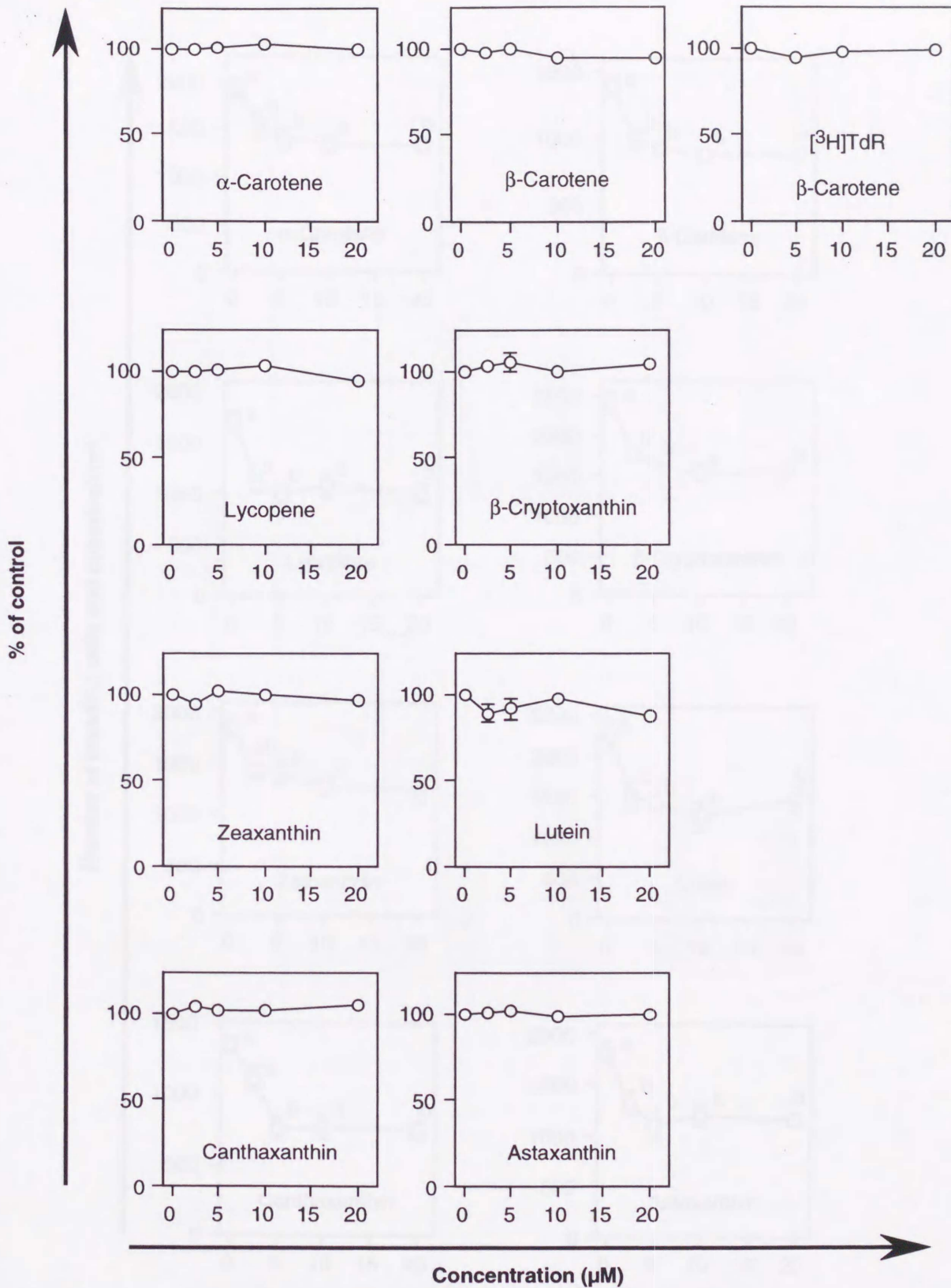
Fig. 2-1 Structures of carotenoids





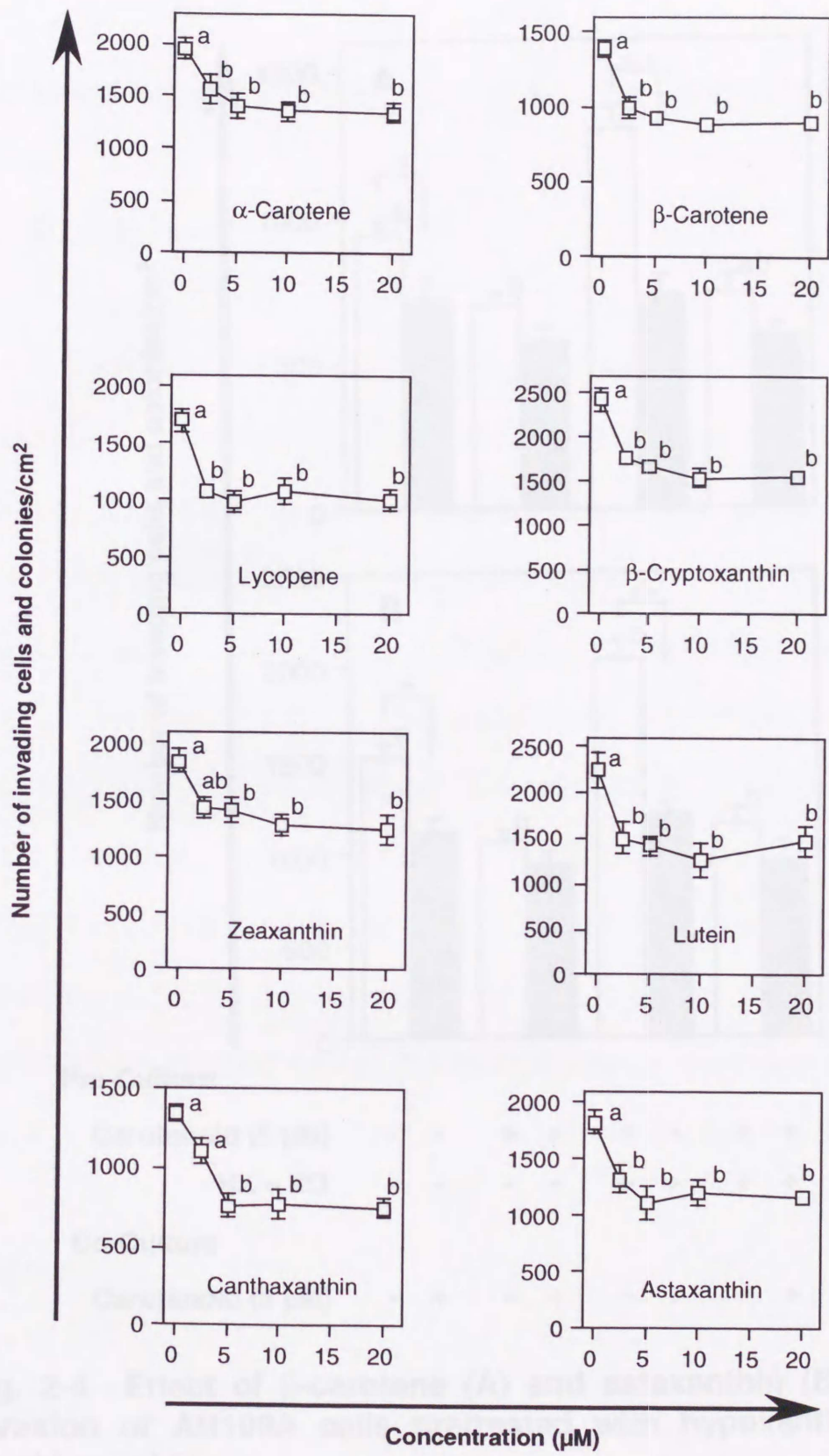
**Fig. 2-1 Structures of carotenoids**





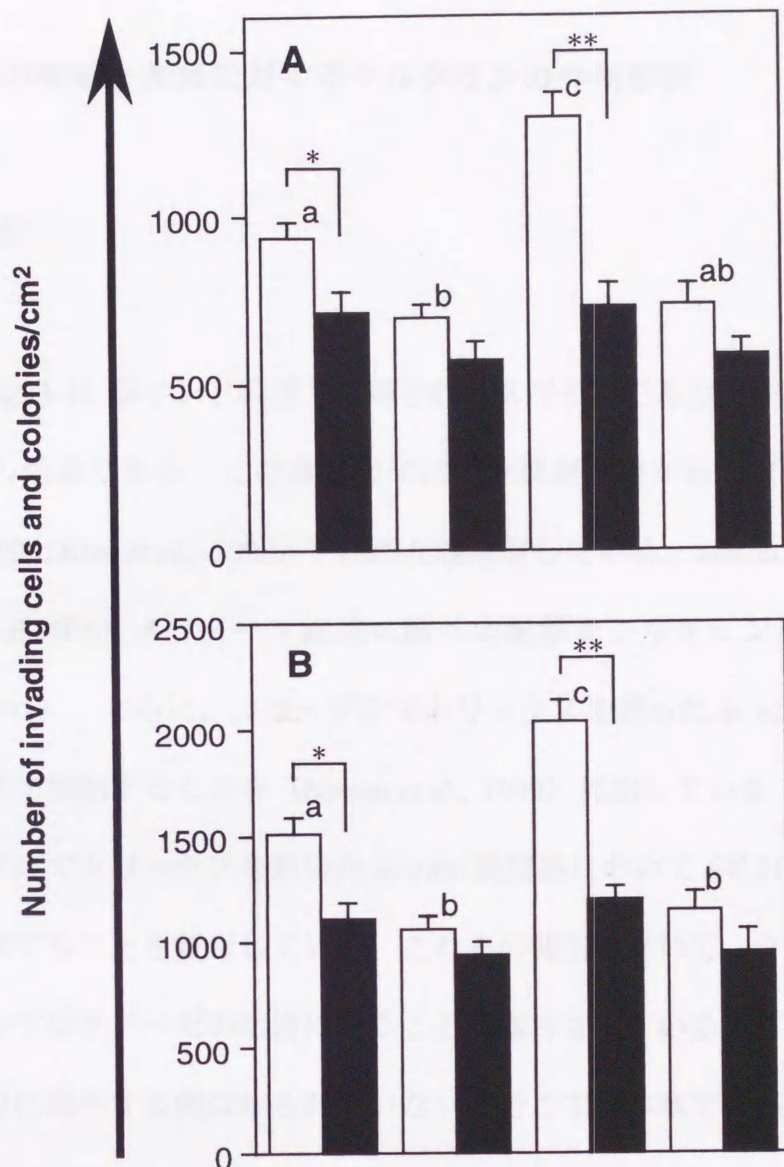
**Fig. 2-2 Effects of carotenoids on the proliferation of AH109A cells**  
 The proliferation of AH109A cells was determined by WST-1 method except data of  $\beta$ -carotene at the right top in these graphs by measuring incorporation of [ $^3\text{H}$ ]thymidine into DNA. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells.





**Fig. 2-3 Effects of carotenoids on the invasion of AH109A cells**  
 Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.





Pre-Culture

Carotenoid (5  $\mu$ M) - - + + - - + +

HX + XO - - - - + + + +

Co-Culture

Carotenoid (5  $\mu$ M) - + - + - + - +

**Fig. 2-4 Effect of  $\beta$ -carotene (A) and astaxanthin (B) on the invasion of AH109A cells pretreated with hypoxanthine and xanthine oxidase**

Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test. Asterisks indicate statistically significant differences ( $*P < 0.01$ ,  $**P < 0.001$ ) by Student's  $t$  test.



### 第三章 癌細胞の増殖と浸潤に対するクルクミンの作用解析

#### 3-1 背景と目的

クルクミン (Fig. 3-1) はインド料理で使用されるスパイスであるターメリック (ウコン) に含まれる黄色の色素である。この食品因子は発癌抑制作用があり (Huang *et al.*, 1997; Kawamori *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1998), 抗酸化性を有している。Menon らはマウス尾静脈内に注入された B16F10 メラノーマ細胞の肺への転移をクルクミンが抑制することを (Menon *et al.*, 1995), さらに, コラーゲンマトリックスを使った *in vitro* 検定系においてクルクミンが浸潤を抑制することを (Menon *et al.*, 1999) 見出している。Lin ら (Lin *et al.*, 1998) はマトリゲルマトリックスを用いた *in vitro* 検定系において SK-Hep-1 細胞の浸潤をクルクミンが抑制することを報告している。これらの報告において, クルクミンの抗浸潤抑制作用はメタロプロテアーゼの阻害によることが報告されているが, クルクミンの抗酸化性が抗浸潤作用に関与する例は知られていない。そこで, 本章では癌細胞の増殖・浸潤に対するクルクミンの効果を検討し, その作用への抗酸化作用の関与を明らかにすることが目的である。さらに, *in vivo* におけるクルクミンの作用の可能性を検討した。

#### 3-2 実験方法

##### 3-2-1 材料

クルクミン (和光純薬工業, 大阪) は DMSO (Sigma) に溶解し, 培地に DMSO の濃度



が0.5%になるように添加した。対照の培地には0.5% DMSOのみを添加した。

### 3-2-2 肝癌 AH109A 細胞の培養

2-2-2 に準じた。

### 3-2-3 *In vitro*における AH109A 細胞の増殖能の測定

2-2-3 に準じた。

### 3-2-4 *In vitro*における AH109A 細胞の浸潤能の測定

2-2-4 に準じた。

### 3-2-5 *Ex vivo*浸潤能検定

クルクミン (100 mg/ml) を 0.3% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC, 和光純薬工業) に懸濁した。5 週齢のドンリュウ系雄ラットを一晩絶食し、体重 100 g あたり 1 ml のクルクミン懸濁液または 0.3% CMC (溶媒対照) を経口投与し、0, 1, 3, 6, 12 時間後に血液を採取した。血清を調製し、Millex (0.22  $\mu$ M, Millipore, Bedford, MA, USA) を装着したテルモシリンジ (10 ml, テルモ, 東京) を用いて濾過滅菌したものを、CS の代わりに 10% になるように実験培地に添加し、2-2-4 に準じて浸潤能を測定した。



### 3-2-6 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いた AH109A 細胞の活性酸素処理

クルクミン (5  $\mu\text{M}$ ) の効果の検討は 2-2-5 に準じた。クルクミンを経口投与したラット血清の効果の検討は、実験培地としてクルクミン投与 1 時間後に採取したラット血清または 0.3% CMC 投与 1 時間後に採取したラット血清を MEM に 10% になるように添加したものをを用いて 2-2-5 に準じて行った。

### 3-2-7 統計処理

測定値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。二群間の比較は Student's *t*-test により、三群以上の比較は一元配置の分散分析を行い、危険率 5% で有意であったときに Tukey test または Dunnett test により行った。

## 3-3 結果

はじめに、クルクミン (Fig. 3-1) を実験培地に直接添加したときの癌細胞の増殖・浸潤に与える影響を検討した。WST-1 法により AH109A 細胞の増殖に対するクルクミンの効果調べたところ、0~20  $\mu\text{M}$  の範囲では影響は見られなかった (Fig. 3-2A)。カロテノイドと同様に (2-3 参照) クルクミンは黄色色素であるため、この結果を [ $^3\text{H}$ ]チミジンの DNA への取り込みを測定する方法により確認したが、0~20  $\mu\text{M}$  の範囲で AH109A 細胞の増殖に影響を与えなかった (Fig. 3-2B)。一方、この濃度範囲でクルクミンは浸潤を有意に抑制



した (Fig. 3-2C) . この作用はカロテノイドの作用と同様に, 5  $\mu$ M まで濃度依存的に浸潤を抑制し, その効果は 20  $\mu$ M まで持続した.

クルクミンの *in vivo* における浸潤抑制作用の可能性を検討するために, クルクミンを経口投与したラットの血清 (CURS) を *in vitro* 検定系の培地に添加することで AH109A 細胞の浸潤能を測定した. クルクミン懸濁液 (100 mg/ml/100 g body weight) をラットに投与後, 0, 1, 3, 6, 12 時間後に血液を採取し, 血清を調製した. この血清を MEM に 10% になるように添加したものをを用いて, 浸潤能を測定した. クルクミン投与 0 時間後に比べ 1, 3, 6 時間後で CURS は AH109A 細胞の浸潤を有意に抑制し, 投与同時間後に対応する溶媒対照群の浸潤能に対しても 1, 3, 6, 12 時間後で有意に抑制した (Fig. 3-3) . その抑制効果は投与一時間後をピークとし, 時間と共に弱まっていった.

クルクミンも前章で取り上げたカロテノイドと同様に抗酸化性食品因子である. ゆえに, クルクミンの抗浸潤作用にも, その抗酸化性が関与しているとの仮説をたて, HX-XO 系によって浸潤能の亢進した AH109A 細胞に対する効果を検討した. クルクミン (5  $\mu$ M, Fig. 3-4A) および CURS (Fig. 3-4B) は前培養時に HX-XO を含む培地に共存することで, 活性酸素による AH109A 細胞の浸潤能亢進を抑制した.

### 3-4 考察

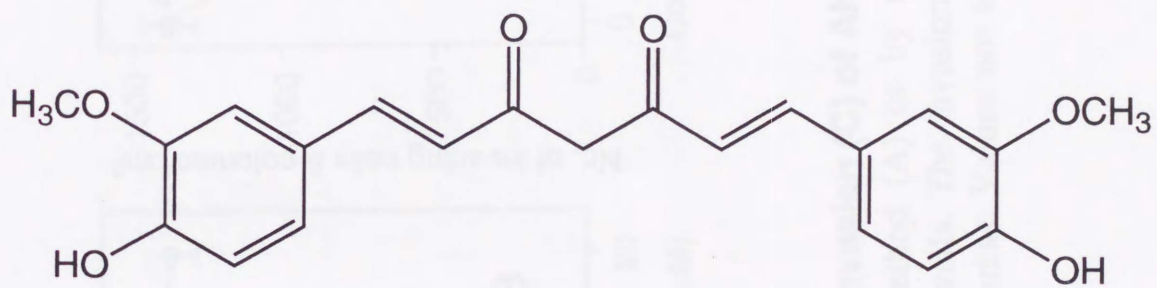
本章では, AH109A 細胞の増殖・浸潤に対するクルクミンの効果, およびクルクミン投与したラットの血清を *in vitro* 検定系の実験培地に添加することで, *in vivo* におけるクルクミンの作用の可能性を検討した. クルクミン (0~20  $\mu$ M) は増殖に影響を与えることなく, AH109A 細胞の浸潤を有意に抑制した (Fig. 3-2) . さらに, CURS (100 mg/ml/100 g body



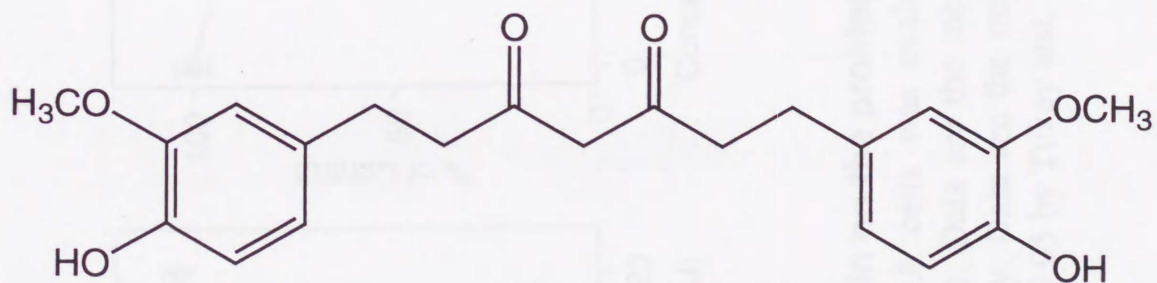
weight) も浸潤を有意に抑制した (Fig. 3-3) . これらの結果は肝癌細胞の浸潤を血中のクルクミンあるいはその代謝産物が抑制したことを示唆する. つまり, *in vivo* においてもクルクミンは抗浸潤作用をもつことが期待される.

Holder ら (Holder *et al.*, 1978) はテトラヒドロクルクミン (THC, Fig. 3-1) が *in vivo* における主要な代謝産物であることを報告している. また, 大澤ら (Osawa *et al.*, 1995; Sugiyama *et al.*, 1996; 大澤, 1997; 大澤, 1998) はクルクミンは経口で摂取すると腸管の部分でテトラヒドロタイプのクルクミン類縁体に変換され, さらに, THC はクルクミンよりも強力な抗酸化力を示すことを明らかにした. クルクミンはカロテノイド (第二章参照; Kozuki *et al.*, 2000) と同様に増殖には影響を与えずに癌細胞の浸潤のみを抑制した. クルクミンとカロテノイドの癌細胞に対する作用は類似しており, カロテノイドはもちろんのこと, クルクミンおよび THC は抗酸化性食品因子であるので, それら物質のもつ抗酸化性が抗浸潤抑制作用に関与するとの仮説をたて, HX-XO 系による癌細胞浸潤能の亢進に対するクルクミンの作用を検討した. 前培養時に HX-XO とともに共存することで, クルクミンおよび CURS は活性酸素種による AH109A 細胞の浸潤能亢進を抑制した (Fig. 3-4) . これらの結果より, クルクミンのもつ抗酸化作用, 特にスーパーオキシド捕捉能 (Reddy and Lokesh, 1994; Sreejayan and Rao, 1996) が抗浸潤作用に関与していることが示唆された.



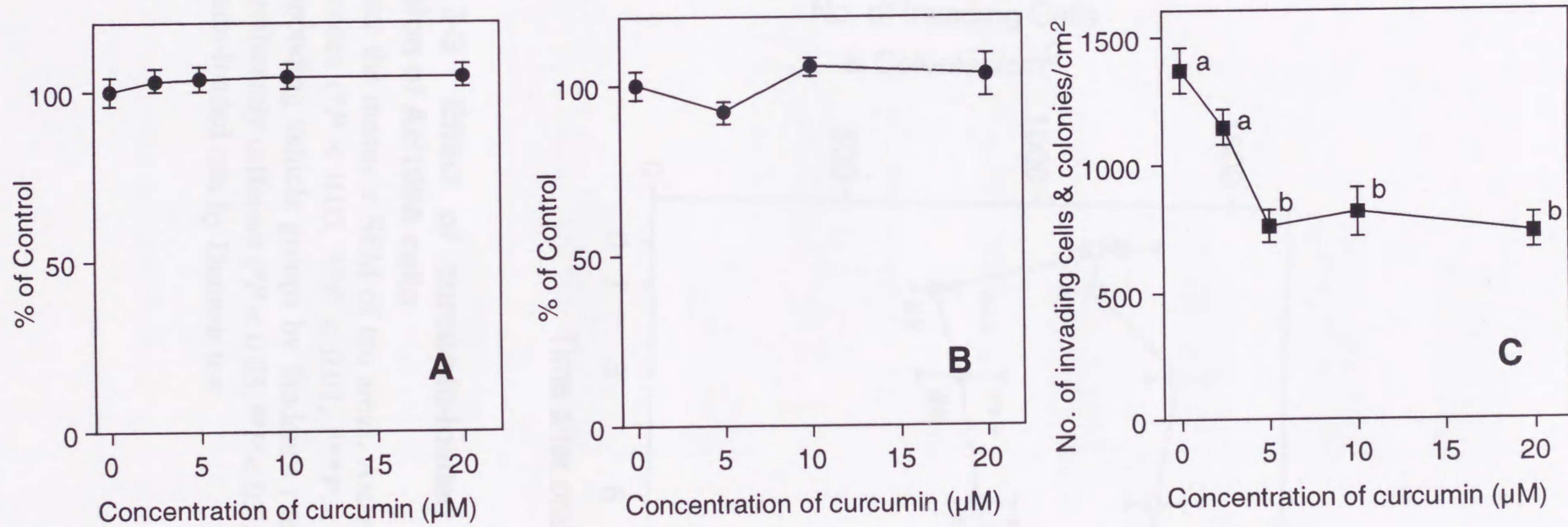


Curcumin



Tetrahydrocurcumin

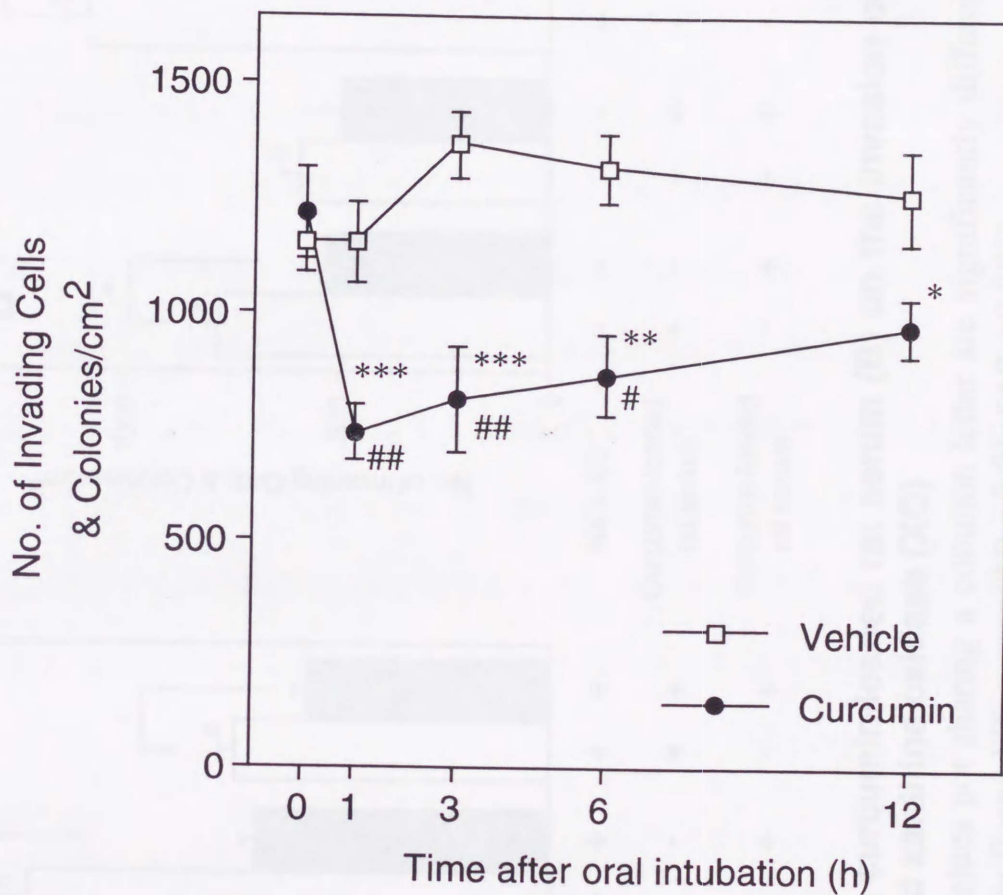
Fig. 3-1 Structures of curcumin and tetrahydrocurcumin



**Fig. 3-2 Effect of curcumin on the proliferation (A, B) and invasion (C) of AH109A cells**

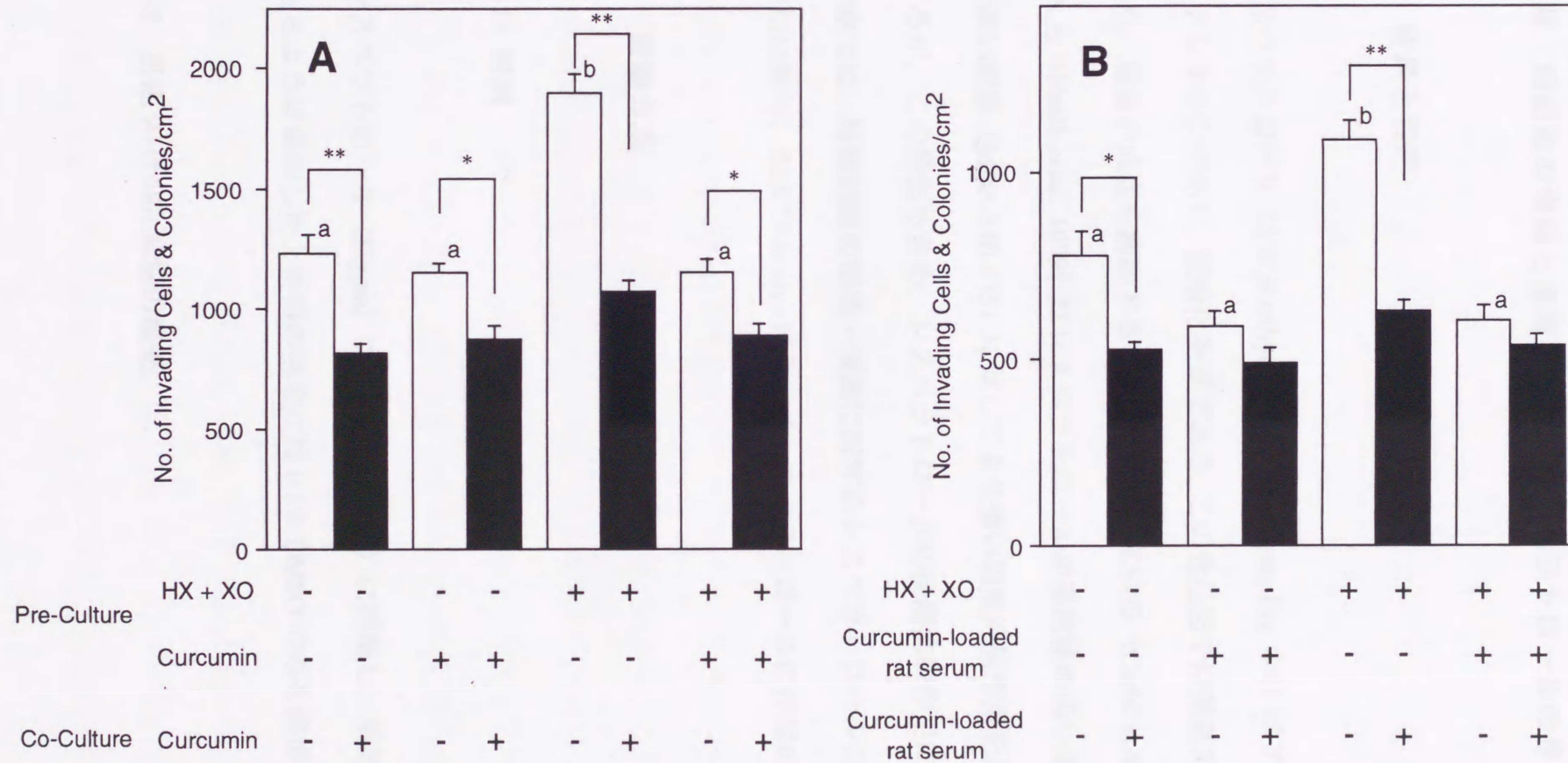
The proliferation of AH109A cells was evaluated by WST-1 method (A) or by measuring incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine into DNA (B). Data are the means ± SEM of six wells. The invasion of AH109A cells (C) was determined by invasion assay. Data are the means ± SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.





**Fig. 3-3 Effect of curcumin-loaded rat serum on the invasion of AH109A cells**

Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Asterisks indicate significant differences ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ) compared with corresponding vehicle groups by Student's *t* test. Sharps show values are significantly different ( $\#P < 0.05$ ,  $##P < 0.01$ ) from 0-h value of the curcumin-loaded rats by Dunnett test.



**Fig. 3-4 Effects of curcumin (A) and curcumin-loaded rat serum (B) on the invasion of AH109A cells pretreated with hypoxanthine (HX) and xanthine oxidase (XO)**

Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test. Asterisks indicate statistically significant differences ( $*P < 0.01$ ,  $**P < 0.001$ ).



## 第四章 癌細胞の増殖と浸潤に対するレスベラトロールの作用解析

### 4-1 背景と目的

レスベラトロール (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene, Fig. 4-1) はブドウの果皮に含まれるフィトアレキシンであり, 抗酸化物質である. この食品因子は発癌抑制作用 (Jang et al., 1997) があり, 腫瘍の成長を抑制することが見出されている (Carbó *et al.*, 1999; Surh *et al.*, 1999). Heish ら (Heish *et al.*, 1999) はレスベラトロールが浸潤能の低い細胞 (MCF-7) よりも浸潤能の高い細胞 (MDA-MB-435) に対してより強い増殖抑制作用を示すことを報告している. ところが, この報告も含め, レスベラトロールの浸潤抑制作用に関する報告はない. そこで本章では, 肝癌細胞の増殖・浸潤に対するレスベラトロールの効果, その作用への抗酸化作用の関与, および *in vivo* におけるレスベラトロールの作用の可能性を検討した.

### 4-2 実験方法

#### 4-2-1 材料

レスベラトロール (Sigma) は DMSO (Sigma) に溶解し, 培地に DMSO の濃度が 0.5% になるように添加した. 対照の培地には 0.5% DMSO のみを添加した.

#### 4-2-2 肝癌 AH109A 細胞の培養

2-2-2 に準じた。

#### 4-2-3 *In vitro*における AH109A 細胞の増殖能の測定

2-2-3 に準じた。

#### 4-2-4 *In vitro*における AH109A 細胞の浸潤能の測定

2-2-4 に準じた。

#### 4-2-5 *Ex vivo*増殖能・浸潤能検定

*In vivo*での作用の可能性を検討するために、レスベラトロールを経口投与したラットの血清を *in vitro* 検定系の培地に添加することで増殖・浸潤に与える影響を評価した。はじめに、時間依存的な効果を検討するために、レスベラトロール (15 mg/ml) を 0.3% CMC (和光純薬工業) に懸濁した。5 週齢のドンリュウ系雄ラットを一晩絶食し、体重 150 g あたり 0.5 ml のレスベラトロール懸濁液または 0.3% CMC (溶媒対照) を経口投与し、0, 1, 3, 6, 12 時間後に血液を採取した。次に、濃度依存的な効果を検討するため、体重 150 g あたり 0.5 ml のレスベラトロール懸濁液 (0, 3, 15, 30, 300 mg/ml) を経口投与し、1 時間後に血液を採取した。血清を調製し、Millex (0.22  $\mu$ M, Millipore) を装着したテルモシリンジ (10 ml, テルモ) を用いて濾過滅菌したものを、CS の代わりに 10% になるように実験培地に添加し、2-2-3 に準じて増殖能を、2-2-4 に準じて浸潤能を測定した。



#### 4-2-6 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いた AH109A 細胞の活性酸素処理

レスベラトロール (50  $\mu\text{M}$ ) の効果の検討は 2-2-5 に準じた。レスベラトロールを経口投与したラット血清の効果の検討は、実験培地としてレスベラトロール (5 mg/100 g body weight) 投与 1 時間後に採取したラット血清または 0.3% CMC 投与 1 時間後に採取したラット血清を MEM に 10% になるように添加したものをを用いて 2-2-5 に準じて行った。

#### 4-2-7 統計処理

測定値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。二群間の比較は Student's *t*-test により、三群以上の比較は一元配置の分散分析を行い、危険率 5% で有意であったときに Tukey test または Dunnett test により行った。

### 4-3 結果

まず、肝癌細胞の増殖・浸潤に対するレスベラトロール (Fig. 4-1) の効果を検討した。レスベラトロールは 100・200  $\mu\text{M}$  で濃度依存的に増殖を抑制した (Fig. 4-2A)。しかし、50  $\mu\text{M}$  までは増殖に影響を与えなかった。一方、この食品因子は 25  $\mu\text{M}$  で浸潤を有意に抑制し、さらに濃度依存的に ( $\sim$ 200  $\mu\text{M}$ ) その浸潤抑制作用を強めた (Fig. 4-2B)。

*In vivo* での効果の可能性を検討するため、レスベラトロールを経口投与したラットの血清 (RERS) を *in vitro* 検定系の培地に添加することで AH109A 細胞の増殖・浸潤を測定し



た。はじめに、時間依存的な効果を検討した。レスベラトロール懸濁液 (5 mg/100 g body weight) をラットに経口投与後、0, 1, 3, 6, 12 時間後に血液を採取し、血清を調製した。この血清を MEM に 10% になるように添加したものをを用いて、増殖・浸潤能を測定した。レスベラトロール投与 0 時間後に比べ 0.5, 1 時間後で、また、対応する溶媒対照群に対して RERS は肝癌細胞の浸潤を有意に抑制し、この作用は投与 3 時間後に消滅した (Fig. 4-3B)。一方、これらの血清は増殖に対して影響を与えなかった (Fig. 4-3A)。次に、濃度依存的な効果を検討した。レスベラトロール (1, 5, 10, 100 mg/100 g body weight) 投与 1 時間後に血液を採取した。血清を調製し MEM に 10% になるように添加することで実験培地を調製し、増殖および浸潤能を測定した。RERS は増殖には影響を与えなかったが (Fig. 4-4A)、浸潤を濃度依存的に抑制した (Fig. 4-4B)。

カロテノイド (第二章)、クルクミン (第三章) と同様にレスベラトロールも抗酸化物質であるから、HX-XO 系を利用した実験を行った。レスベラトロール (50  $\mu$ M, Fig. 4-5A) および RERS (Fig. 4-5B) は前培養時に HX-XO を含む培地に添加されることで、活性酸素による AH109A 細胞の浸潤能亢進を抑制した。さらに、カロテノイドと同様に (第二章参照)、前培養時にレスベラトロールまたは RERS のみを添加し、中皮細胞との共培養時に通常の 10% CS/MEM で培養した AH109A 細胞の浸潤が、実際に浸潤が起こる段階でレスベラトロールは培地に存在しないにも関わらず有意に抑制された。

#### 4-4 考察

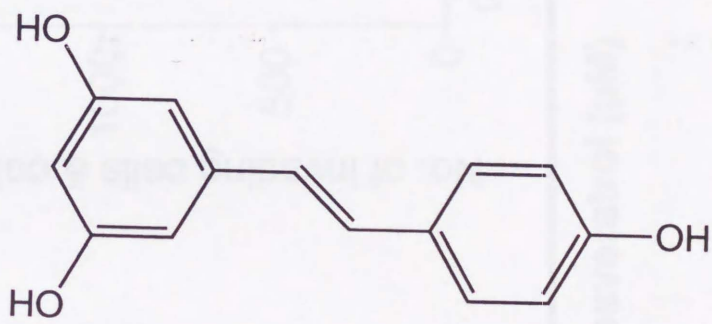
本章ではブドウの果皮に含まれる抗酸化物質であるレスベラトロールに関して検討を行った。レスベラトロールは 100・200  $\mu$ M と高濃度では増殖・浸潤の両方を抑制したが、25



~50  $\mu$ M では浸潤のみを抑制した (Fig. 4-2) . また, RERS (0, 1, 5, 10, 100 mg/100 g body weight) も浸潤のみを抑制した (Fig. 4-3 and 4-4) . レスベラトロール投与 0.5, 1 時間後に RERS は浸潤を有意に抑制し, 3 時間後にその効果は見られなくなった (Fig. 4-3B) . Bertelli ら (Bertelli *et al.*, 1996) はレスベラトロール投与 1 時間後に血中濃度が最高になり, 4 時間で検出できなくなることを見出した. この報告は我々の結果とほぼ同様である (Fig. 4-3) . これらの結果より, 経口投与された場合も, 血中のレスベラトロールあるいはその代謝産物は AH109A 細胞の浸潤を抑制することが示唆され, つまり, *in vivo* においてもレスベラトロールは抗浸潤作用をもつ可能性が示唆された.

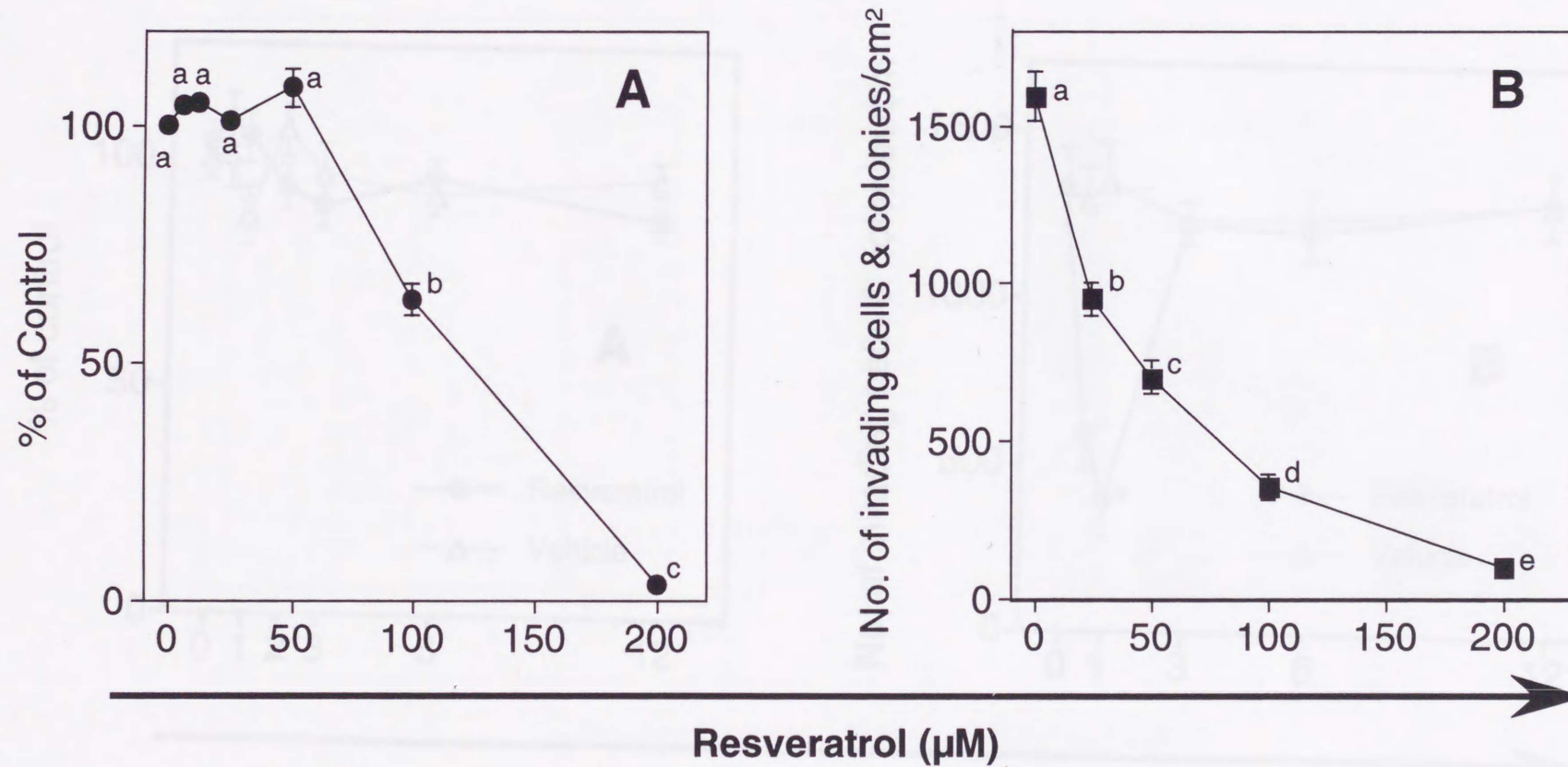
次に, レスベラトロールの抗酸化作用が抗浸潤作用に関与するか否かを検討した. 前培養時に HX-XO とともに添加されることで, レスベラトロールおよび RERS は活性酸素による AH109A 細胞の浸潤能亢進を有意に抑制した (Fig. 4-5) . これらの結果はレスベラトロールの抗酸化能が抗浸潤作用に関与していることを示唆している.

カロテノイドと同様に (第二章参照) , 実際に癌細胞が浸潤する段階で培地中にレスベラトロールが存在しないにも関わらず, レスベラトロールおよび RERS は前培養段階のみに添加されることで AH109A 細胞の浸潤を抑制した (Fig. 4-5) . これらの結果により, レスベラトロールは細胞内, 特に細胞膜に留まり, 浸潤を抑制していることが推察される.



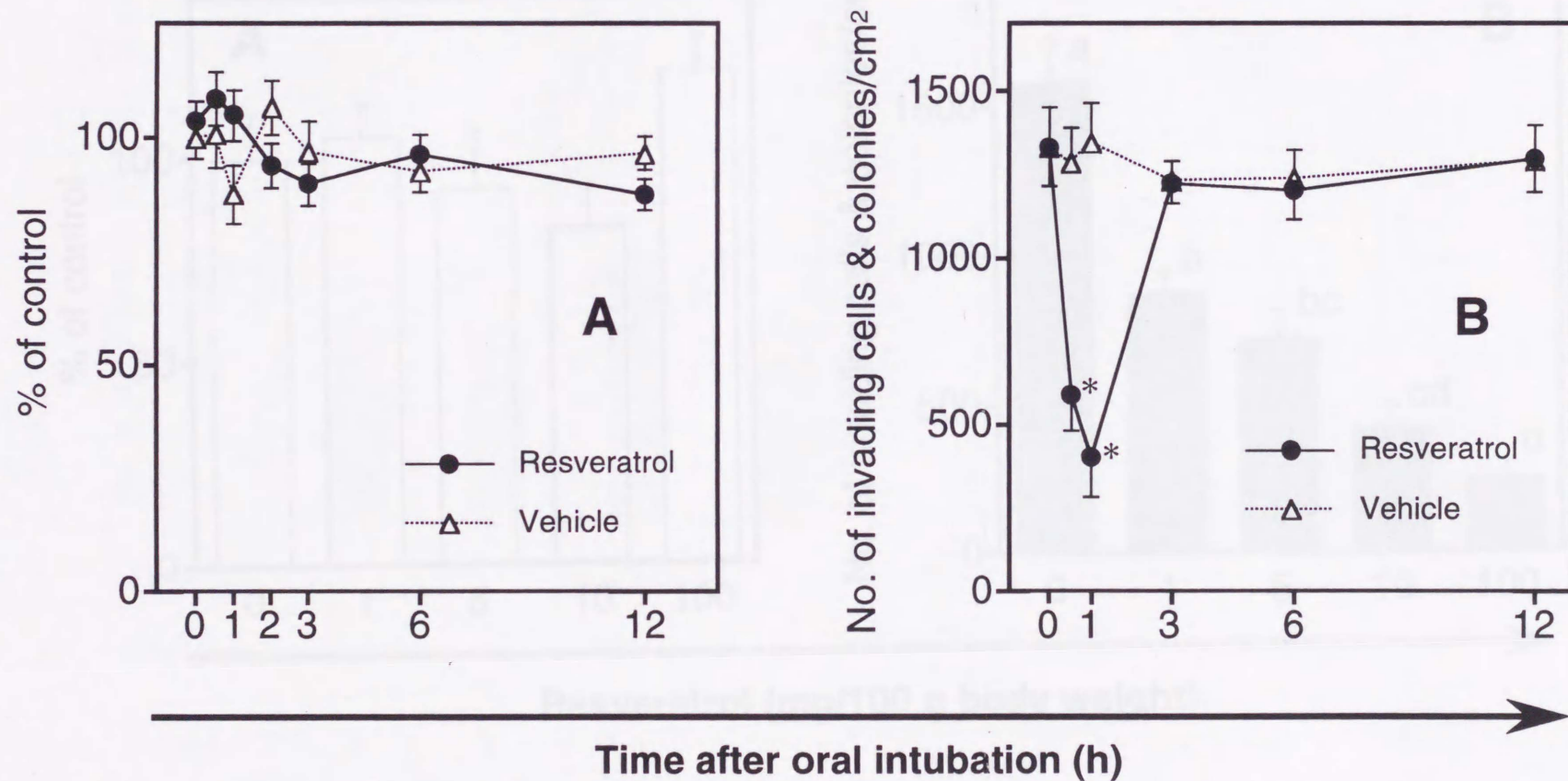
**Fig. 4-1 Structure of resveratrol**





**Fig. 4-2 Effect of resveratrol on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells**

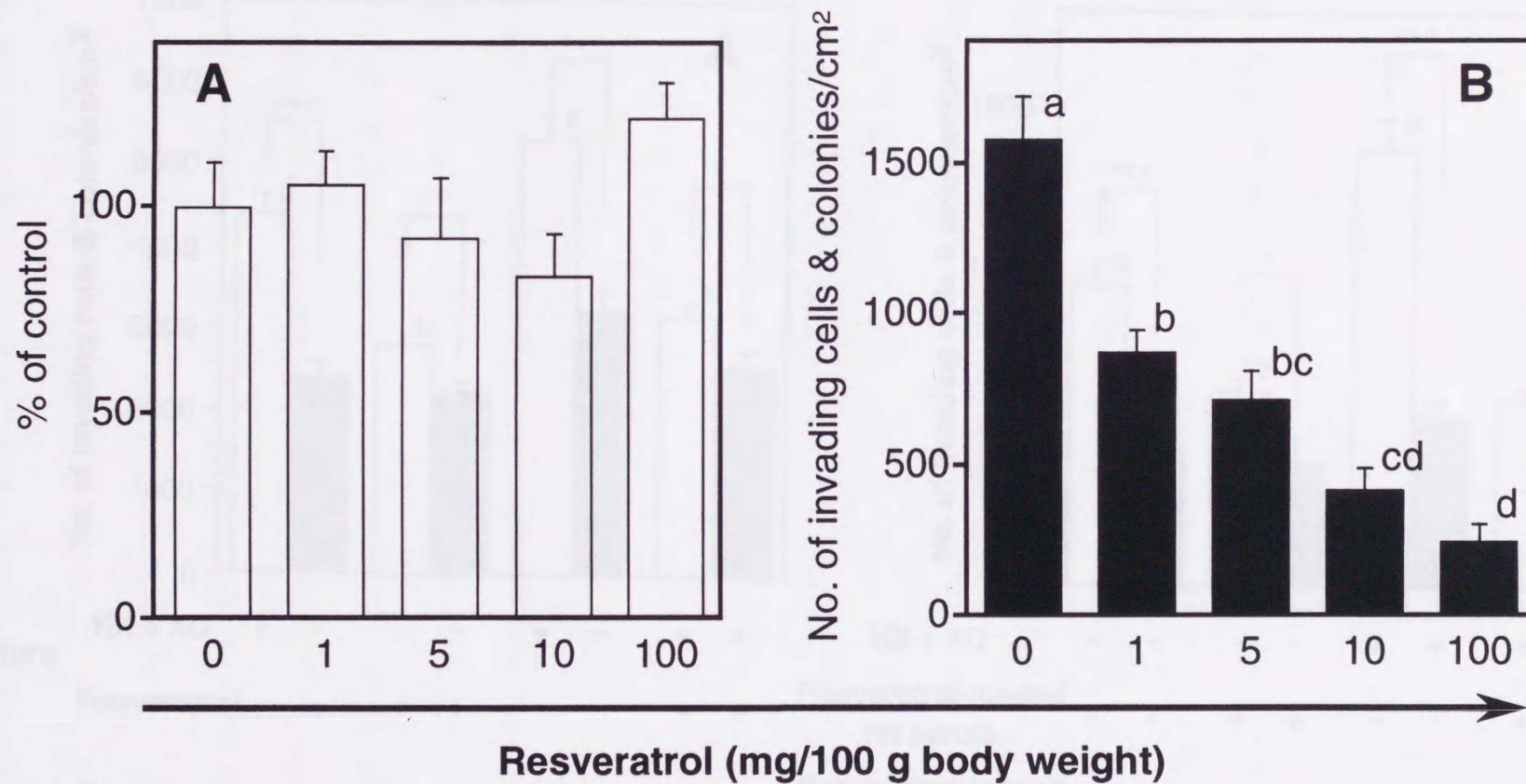
Data are the means  $\pm$  SEM of six wells (A) or ten areas (B). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.



**Fig. 4-3 Time-dependent effect of resveratrol-loaded rat serum on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells**

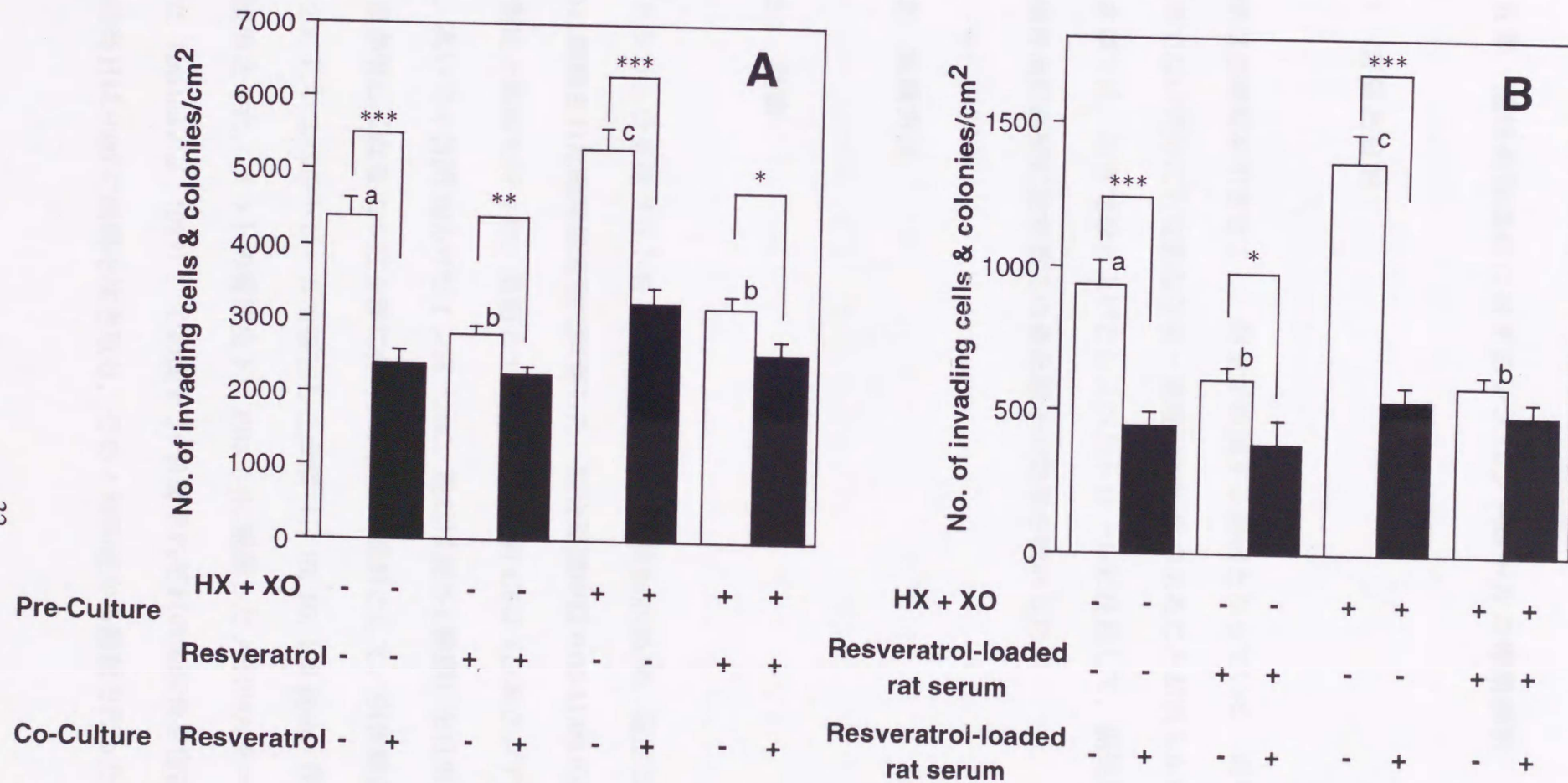
Data are the means  $\pm$  SEM of six wells (A) or ten areas (B). \* Significantly different from the corresponding vehicle group ( $P < 0.001$  by Student's  $t$  test) and from the 0-h value of resveratrol-loaded rats ( $P < 0.01$  by Dunnett test).





**Fig. 4-4 Dose-dependent effect of resveratrol-loaded rat serum on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells**

Data are the means  $\pm$  SEM of six wells (A) or ten areas (B). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.



**Fig. 4-5 Effect of resveratrol (A) and resveratrol-loaded rat serum (B) on the invasion of AH109A cells pretreated with hypoxanthine (HX) and xanthine oxidase (XO)**

Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test. Asterisks indicate statistically significant differences ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ).



## 第五章 癌性高脂血症に対するレスベラトロールの作用解析

### 5-1 背景と目的

癌は悪液質を引き起こし、宿主が衰弱する原因となっている。近年、食品因子のうち栄養素でない成分にも有効な生理・薬理学的作用のあることが明らかにされつつある。そこで本章では、前章で取り上げたレスベラトロールに注目して、癌性悪液質の一症状としての癌性高脂血症に対するこの食品因子の効果を検討した。

### 5-2 実験方法

#### 5-2-1 動物

ドンリュウ系雄ラットを4週齢で購入後、明期 8:00-20:00、温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $60 \pm 5\%$  に調整された動物飼育室で飼育した。飼育期間中は 9:00-11:00 の間に体重および食下量の測定と給餌を行った。最初の3日間は固形飼料 CE-2 (日本クレア, 東京) を自由摂取させ、次いで4日間 20%カゼイン食 (20C, 組成は表 5-1 参照) を自由摂取させた。ラットの体重が等しくなるように5群に分け、1群を対照群として、引き続き 20C を、他の4群には 20C にレスベラトロールを添加した食餌 (1, 10, 50, 100 ppm, 表 5-1 参照) を6日間自由摂取させた。ラットの背部皮下に PBS (-) に懸濁した AH109A を一頭あたり  $5 \times 10^5$  移植した (Irikura *et al.*, 1985)。その後も21日間それぞれの実験食を自由摂取させ、屠殺した。屠殺当日は 9:00 に飼料を抜き取り、その4時間後から屠殺を行った。屠殺時には血液を採

取するとともに、肝臓および固形癌を摘出した。血液より血清を調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。各組織は生理食塩水で洗浄後、濾紙 (No. 1, アドバンテック東洋, 東京) で水分をとり、重量の測定を行った。

本実験の概要を Fig. 5-1 に示した。

### 5-2-2 血清脂質濃度の定量

屠殺時に調製した血清を用いて、血清中のコレステロール (Ch) およびトリグリセライド (TG) の濃度を定量した。

Ch はリポタンパク質中の Ch および総コレステロール (T-Ch) について測定した。高密度リポタンパク質 (HDL)-Ch は、血清リポタンパク質をリンタングステン酸沈殿法 (Irikura *et al.*, 1985) により HDL 画分と超低密度リポタンパク質 (VLDL) および低密度リポタンパク質 (LDL) 画分に分けた。HDL-Ch レベルは HDL 画分を、T-Ch レベルは血清を試料として、コレステロールオキシダーゼ・フェノール法を用いたキットであるコレステロール C-テストワコー (和光純薬) を使用して、製造会社のプロトコールに従い測定した。T-Ch レベルと HDL-Ch レベルの差を求め、(VLDL+LDL)-Ch レベルとした。

TG レベルは血清を試料とし、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ・3,5-ジメトキシ-N-エチル-(2'-ヒドロキシ-3'-スルホプロピル)-アニリンナトリウム法を用いたキットであるトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬) を使用して、製造会社のプロトコールに従い測定した。



### 5-2-3 血清過酸化脂質の測定

血清中の過酸化脂質のレベルは血清を試料とし、チオバルビツール酸 (TBA) 法を用いたキットである過酸化脂質-テストワコー (和光純薬) を使用して、製造会社のプロトコールに従い測定した。

### 5-2-4 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で示した。統計処理は一元配置の分散分析を行い、危険率5%で有意であったときに Tukey test を行った。

## 5-3 結果

はじめに、食下量、屠殺時の体重、体重増加量、肝臓および固形癌重量について示す (Table 5-2)。食下量、屠殺時の体重、体重増加量、肝臓重量に関しては統計的に有意な差は見られなかった。固形癌の形成は5日目頃から見られ始めた (Data not shown)。100 ppm のレスベラトロールを含む 20C (100R, 他の食餌に関しても同様に略す) を摂取したラットにおいて、固形癌重量が最大となり、10R 摂取群のラットにおいて、最小となった (Table 5-2)。この二群間には統計的に有意な差が見られたが、対照群との間には有意な差は見られなかった。

つぎに、血清脂質の変動を検討した (Table 5-3)。血清中の各種 Ch レベル (T-Ch, HDL-Ch, (VLDL+LDL)-Ch) に対して、食餌に添加したレスベラトロールは統計的に有意な変化を与



えなかったが、T-Ch, (VLDL+LDL)-Ch レベルが、対照群に比べ 10R 群, 50R 群で減少傾向が見られ、その傾向は 100R 群では観察されなくなった。血清 TG レベルも同様に、対照群に比べ 10R 群, 50R 群において減少する傾向が見られ、100R 群になると TG レベルは 10R 群・50R 群に比べて有意に上昇した。TG に関しては、100R 群で最高値を示し、10R 群, 50R 群で最低値を示した。

最後に、血清中の過酸化脂質レベルに対する食餌中のレスベラトロールの影響を TBA 法を用いて、チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の量で評価した (Fig. 5-2)。TBARS の高かった対照群および 100R 群に比べ、10R 群, 50R 群で TBARS の有意な減少が見られた。

#### 5-4 考察

本章では、担癌ラットの脂質代謝異常に対するレスベラトロールの効果を食餌にこの物質を添加することで検討した。食下量、屠殺時の体重、体重増加量、肝臓重量、および血清 Ch (T-Ch, HDL-Ch, (VLDL+LDL)-Ch) レベルに対して、レスベラトロール食は統計的に有意な変化を与えなかった (Table 5-2 and 5-3)。しかし、対照群に比べ 10R 群, 50R 群においては、T-Ch, (VLDL+LDL)-Ch, TG レベルが抑制される傾向が見られたが、100R 群になるとこの傾向は観察されなくなった (Table 5-3)。血清過酸化脂質レベルは対照群に比べ 10R 群, 50R 群で有意に減少し、やはり、100R 群でこの抑制作用は消失した。このことから、続発性高脂血症である癌性高脂血症に対してもレスベラトロールは改善的に作用することが示唆された。ラットに AH109A を背部皮下移植すると、その場で固形癌を形成するが、直接的には関係のない腹腔内マクロファージの活性化が見出されている (小松,



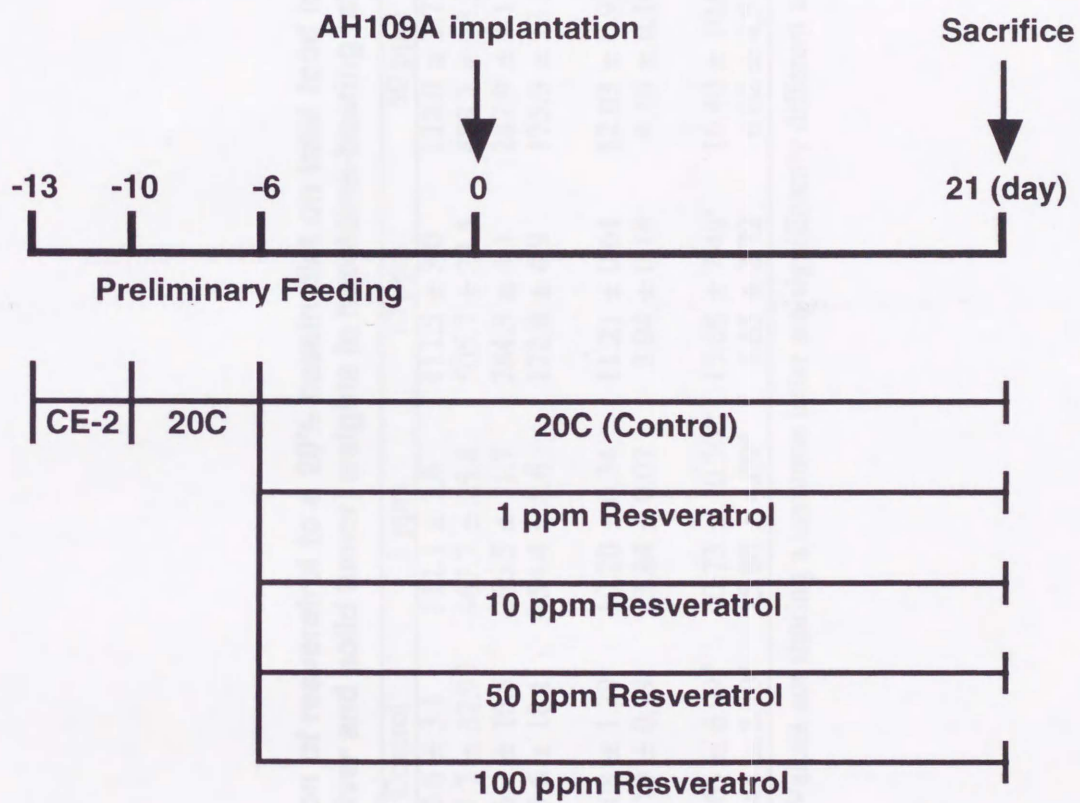
1998) . Alleva ら (Alleva *et al.*, 1994) は腫瘍細胞が可溶性の細胞外マトリックス (ECM) 蛋白質を分泌し, それが血中を移動して他の場所のマクロファージと結合することで活性化するのではないかと考察している. いくつかの癌細胞は ECM 蛋白質を分泌することでマクロファージを活性化すること (Springer, 1990) , ある種の ECM 蛋白質により腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターロイキン (IL) -1 産生能が活性化されること (Armant *et al.*, 1994; Wbb *et al.*, 1990) , 腫瘍細胞の分泌するサイトカインにより TNF 産生が活性化されること (Kao *et al.*, 1994) が報告されている. また, 癌性悪液質には IL-1 などのサイトカインが関与していることが示唆されている (平田, 1999) . TNF- $\alpha$  をはじめとしていくつかのサイトカインの産生には転写因子である NF- $\kappa$ B が関与している (Fox *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1995) が, レスベラトロールが NF- $\kappa$ B インヒビターとして働くことで (Tsai *et al.*, 1999) , 高脂血症を改善する効果を発揮している可能性が推察できる.

**Table 5-1 Composition of experimental diets**

Ingredient (g/kg)	20C	1 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm
Resveratrol <sup>1</sup>	0.000	0.001	0.010	0.050	0.100
Cornstarch <sup>2</sup>	397.486	397.485	397.476	397.436	397.386
Casein <sup>3</sup>	200.000	200.000	200.000	200.000	200.000
$\alpha$ -Cornstarch <sup>2</sup>	132.000	132.000	132.000	132.000	132.000
Sucrose <sup>4</sup>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Soybean Oil <sup>5</sup>	70.000	70.000	70.000	70.000	70.000
Cellulose Powder <sup>3</sup>	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000
Mineral Mixture (AIN-93G) <sup>2,6</sup>	35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
Vitamin Mixture (AIN-93) <sup>2,7</sup>	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
L-Cystine <sup>8</sup>	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
Choline Bitartrate <sup>9</sup>	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
<i>tert</i> -Butylhydroquinone <sup>9</sup>	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

1. Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, USA
2. Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd., Yokohama, Japan
3. Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan
4. Mitsui Sugar Co., Ltd., Tokyo, Japan
5. Miyazawa Yakuhin Co., Ltd., Tokyo, Japan
6. AIN-93G composition
7. AIN-93 composition
8. Ajinomoto Co., Ltd., Tokyo, Japan
9. Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan





**Fig. 5-1 Experimental schedule**

**Table 5-2 Effect of dietary addition of resveratrol to a 20% casein diet on total food intake, final body weight, body weight gain, tissue (liver and solid tumor) weights in hepatoma-bearing rats**

Mesurement	Control	1 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm
Initial Body Weights (g)	110.6 ± 3.1	112.1 ± 3.6	111.5 ± 3.0	112.0 ± 2.7	111.7 ± 2.6
Total Food Intake (g/27 days)	485.7 ± 32.99	467.7 ± 25.4	505.7 ± 23.5	488.1 ± 18.3	438.2 ± 21.5
Final Body Weight (g)	266.2 ± 16.5	266.5 ± 11.7	284.3 ± 4.1	287.9 ± 4.1	257.6 ± 14.4
Body Weight Gain (g/27 days)	155.6 ± 18.1	154.4 ± 8.6	172.8 ± 4.9	175.9 ± 13.8	145.9 ± 12.8
Liver Weight					
Absolute (g)	11.08 ± 1.39	10.20 ± 0.34	11.21 ± 0.64	12.03 ± 0.92	10.09 ± 1.11
Relative (g/100 g body weight)	4.10 ± 0.29	3.84 ± 0.07	3.94 ± 0.18	4.16 ± 0.16	3.87 ± 0.20
Solid Tumor Weight					
Absolute (g)	26.65 ± 6.99 <sup>ab</sup>	40.73 ± 10.30 <sup>ab</sup>	15.68 ± 7.48 <sup>a</sup>	16.40 ± 10.09 <sup>ab</sup>	50.84 ± 5.08 <sup>b</sup>
Relative (g/100 g body weight)	10.44 ± 2.80 <sup>ab</sup>	15.80 ± 4.09 <sup>ab</sup>	5.65 ± 2.72 <sup>a</sup>	6.62 ± 4.51 <sup>ab</sup>	20.26 ± 2.59 <sup>b</sup>

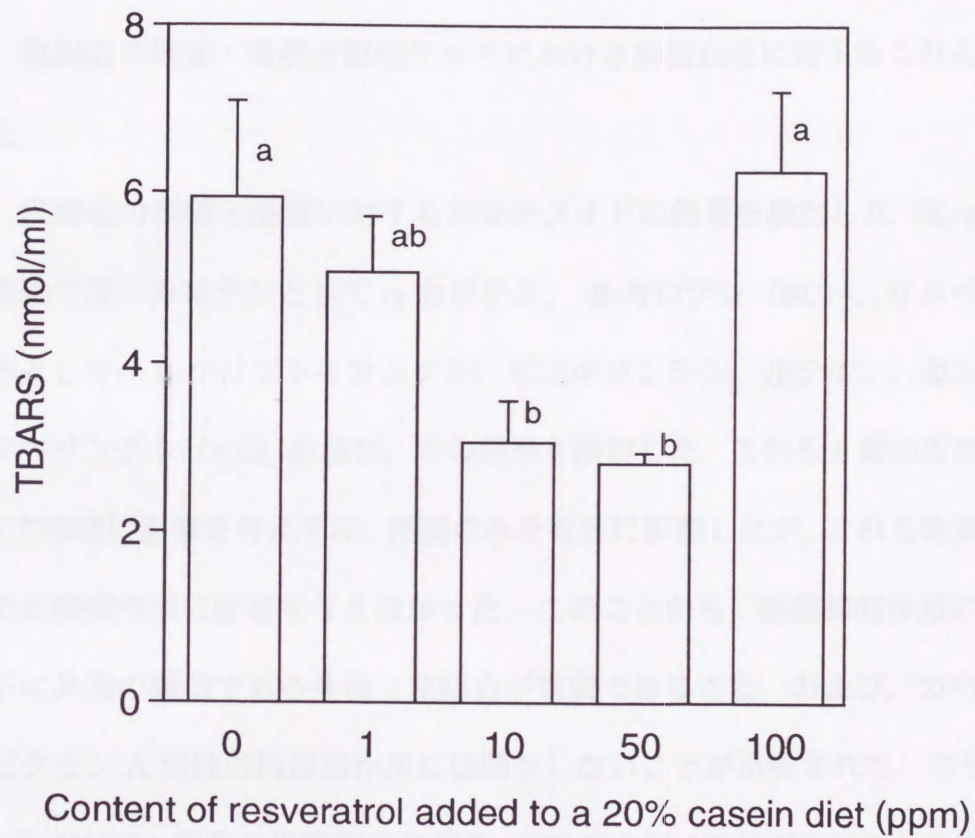
Data are the means ± SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.



**Table 5-3 Effect of dietary addition of resveratrol to a 20% casein diet on serum lipid levels in hepatoma-bearing rats**

Mesurement	Control	1 ppm	10 ppm	50 ppm	100 ppm
Total Cholesterol (mM)	2.54 ± 0.27	2.72 ± 0.32	2.08 ± 0.31	1.78 ± 0.18	2.88 ± 0.3
HDL-Cholesterol (mM)	1.10 ± 0.11	1.08 ± 0.14	0.90 ± 0.11	0.95 ± 0.10	0.98 ± 0.14
(VLDL+LDL)-Cholesterol (mM)	1.44 ± 0.35	1.64 ± 0.28	1.18 ± 0.38	0.83 ± 0.18	1.90 ± 0.15
Triglyceride (mM)	1.37 ± 0.48 <sup>ab</sup>	1.12 ± 0.32 <sup>ab</sup>	0.61 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.92 <sup>b</sup>

Data are the means ± SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.



**Fig. 5-2 Effect of dietary addition of resveratrol to a 20% casein diet on serum lipid peroxide (TBARS) level**

Data are the means  $\pm$  SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey test.



## 第六章 総括

本研究では、抗酸化性食品因子として緑黄色野菜や甲殻類に含まれるカロテノイド、ターメリック（ウコン）に含まれるクルクミン、ブドウの果皮に含まれるレスベラトロールに注目して、癌細胞の増殖・浸潤と担癌ラットにおける高脂血症に対するこれら成分の効果を検討した。

はじめに、癌細胞の増殖・浸潤に対するカロテノイドの効果を検討した（Kozuki *et al.*, 2000）。本実験では、カロテンとして $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン（BC）、リコペンを、キサントフィルとして、 $\beta$ -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、ルテイン、カンタキサンチン、アスタキサンチン（AX）を選び、その効果を検討した。これら8種のカロテノイドは0~20  $\mu$ Mで増殖に影響を与えずに、浸潤のみを有意に抑制したが、これら物質間の構造的な違いはその浸潤作用に影響を与えなかった。このことから、浸潤抑制作用にはこれらカロテノイドに共通の構造である共役二重結合が重要であること、および、カロテノイドのもつプロビタミンA活性は抗浸潤作用には関与しないことが示唆された。さらに、HX-XO処理によるAH109A細胞の浸潤能の亢進を、BCおよびAXはHX-XOとの前培養時に添加されることで抑制した。この結果はカロテノイドのもつ抗酸化能、特にスーパーオキシド捕捉能（Zhao *et al.*, 1998）が抗浸潤作用に関与することを示唆している。しかしながら、カロテノイドのラジカル捕捉能はその構造によってかなり異なるが（長尾ら, 1998）、本実験の結果は構造の違いが浸潤能に影響を与えないというものだった。つまり、カロテノイドのスーパーオキシド捕捉能は抗浸潤作用に関与するものの、部分的関与であることが示唆される。

次に、癌細胞の増殖・浸潤に対するクルクミンの効果を検討した。カロテノイド同様、



クルクミン (0~20  $\mu\text{M}$ ) は増殖に影響を与えることなく, AH109A 細胞の浸潤を有意に抑制した. さらに, クルクミンを経口投与したラットの血清 (CURS) を *in vitro* 検定系の培地に添加したところ, 浸潤抑制作用が見出された. これらの結果より, 血中に存在するクルクミンあるいはその代謝産物が癌細胞の浸潤を抑制したことが示唆された. クルクミンは抗酸化性食品因子であるが, 腸管を経由するとテトラヒドロタイプのクルクミン類縁体に変換され, 類縁体の一つである THC はクルクミンよりも強力な抗酸化力を示す (Osawa *et al.*, 1995; Sugiyama *et al.*, 1996; 大澤, 1997; 大澤, 1998). クルクミンおよび CURS は活性酸素による AH109A 細胞の浸潤能亢進を, 前培養時に HX-XO とともに添加されることで抑制した. これらの結果はクルクミンのもつ抗酸化能, 特にスーパーオキシド捕捉能 (Reddy and Lokesh, 1994; Sreejayan and Rao, 1996) が抗浸潤作用に少なくとも部分的には関与していることを示唆する.

さらに, 抗酸化性食品因子としてレスベラトロールを選び, 癌細胞の増殖・浸潤に対する効果を検討した. 高濃度 (100, 200  $\mu\text{M}$ ) のレスベラトロールは増殖・浸潤の両者を阻害したが, 50  $\mu\text{M}$  までは浸潤のみを抑制した. また, レスベラトロールを経口投与したラットの血清 (RERS) も浸潤のみを抑制した. これらの結果はレスベラトロールの増殖抑制作用と浸潤抑制作用は別の機構であることを表している. さらに, *in vivo* においては浸潤抑制作用をもつことが期待される. 活性酸素による AH109A 細胞の浸潤能亢進を, 前培養時に HX-XO とともに添加されることで, レスベラトロールおよび RERS は抑制した. これらの結果はレスベラトロールの抗酸化能が抗浸潤作用に少なくとも部分的に関与していることを示唆している.

最近の報告により, アラキドン酸代謝産物が癌細胞の浸潤に関与していることが明らかになっている (Liu *et al.*, 1996; Reich and Martin, 1996; Damtew and Spagnuolo, 1997). カロテ



ノイドはリポキシゲナーゼ (LOX) インヒビター (Lomnitski *et al.*, 1993; Lomnitski *et al.*, 1997), クルクミンは LOX あるいはシクロオキシゲナーゼ (COX) インヒビター (Huang *et al.*, 1991, Began *et al.*, 1998), レスベラトロールは LOX あるいは COX インヒビター (Jang *et al.*, 1997; Maccarrone *et al.*, 1999) であるから, これら食品因子のもつ浸潤抑制作用は LOX または COX の阻害が関与している可能性もある。

さらに, 担癌ラットの脂質代謝異常に対するレスベラトロールの効果を検討した。対照群に比べ, レスベラトロール添加食群において T-Ch, (VLDL+LDL)-Ch, TG の値に減少傾向が見られたものの, HDL-Ch の値も含め統計的に有意な変化ではなかった。血清過酸化脂質レベルは対照群に比べ, 10R 群, 50R 群で有意な抑制が見られた。このことから, 続発性高脂血症である癌性高脂血症に対してもレスベラトロールは抗酸化性を有することが明らかとなった。興味深いことに, 100R 群の過酸化脂質レベルは対照群と同程度であった。この結果から, 担癌時の脂質代謝異常に対してのレスベラトロール作用には至適濃度があることが推察される。

以上, 本研究では緑黄色野菜に含まれるカロテノイド, カレーに用いられるターメリックに含まれるクルクミン, 赤ワインに含まれるレスベラトロールの癌に対する効果を検討し, 特に癌転移の重要なステップである浸潤に有効な効果があることが見出された。これらの食材は我々が日常的に摂取しているものであり, 健康維持に貢献することが期待される。

## 謝辞

本学位論文を終えるにあたり、御指導を賜りました東京農工大学 農学部 矢ヶ崎 一三 教授に感謝いたします。また、適切な御助言を下さいました東京農工大学 農学部 三浦 豊 助教授ならびに茨城大学 農学部 堤 將和 教授に感謝いたします。

研究する上での下地となる部分を学部・修士課程で指導していただいた明治大学 農学部 川端 博秋 講師、公私にわたって御世話になりました明治大学 農学部 前田 理久 講師に感謝いたします。

最後に、数年にわたり苦楽をともにした東京農工大学 農学部 栄養生理化学研究室の皆様  
に感謝し、今後の活躍を期待しています。



## 参考文献

- 大澤 俊彦 (1997) 食品によるフリーラジカル消去, フリーラジカルと疾病予防 (日本栄養・食糧学会 監修), pp. 67-88, 建帛社, 東京.
- 大澤 俊彦 (1998) 天然抗酸化物質, 抗酸化物質のすべて (吉川 敏一 編著), pp. 110-120, 先端医学社, 東京.
- 小松 渡 (1998) サイトカイン産生に対する食餌成分の作用解析, 東京農工大学大学院連合農学研究科博士論文.
- 清水 元治 (1996) 癌転移の分子機構とその阻止, 癌転移の分子医学 (清水 元治 編), pp. 10-21, 羊土社, 東京.
- 長尾 昭彦, 寺尾 純二 (1998) カロテノイドとビタミン A の抗酸化性, 抗酸化物質のすべて (吉川 敏一 編著), pp. 66-73, 先端医学社, 東京.
- 平田 公一 (1999) 癌と栄養障害. *臨床栄養* **94**, 499-505.
- 平成 9 年度版 厚生白書 (1997)
- 矢ヶ崎 一三 (1999) 病態時脂質代謝異常の食品因子による制御. *食品と開発* **34**, 12-14.
- Akedo, H., Shinkai, K., Mukai, M., Mori, Y., Tateishi, R., Tanaka, K., Yamamoto, R., Morishita, T. (1986) Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers: a model for tumor invasion. *Cancer Res.* **46** 2416-2422.
- Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Matrin, G., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M., and McEwan, R. N. (1987) A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* **47**, 3239-3245.
- Alleva, D. G., Burger, C. J., and Elgert, K. D. (1994) Tumor-induced regulation of suppressor



- macrophage nitric oxide and TNF- $\alpha$  production. *J. Immunol.* **153**, 1674-1686.
- Alsabti, E. A. K. (1979) Serum lipids in hepatoma. *Oncology* **36**, 11-14.
- Armant, M., Ishihara, H., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1994) Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon  $\gamma$  secretion and triggering of tumor necrosis factor  $\alpha$  release. *J. Exp. Med.* **180**, 1005-1011.
- Armstrong, P. B., Quigley, J. P., and Sidebottom, E. (1982) Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. *Cancer Res.* **42**, 1826-1837.
- Bálint, Z., and Holczinger, L. (1984) Changes in lipoprotein lipase activity (LPLA) in tumor cells and tissues in mice bearing Ehrlich ascites tumor. *Bull. Cancer (Paris)* **71**, 412-418.
- Barclay, M., Skipski, V. P., Terebus-Kekish, O., Greene, E. M., Kaufman, R. J., and Stock, C. C. (1970) Effects of cancer upon high-density and other lipoproteins. *Cancer Res.* **30**, 2420-2430.
- Began, G., Sudharshan, E., and Rao, A. G. A. (1998) Inhibition of lipoxygenase 1 by phosphatidylcholine micelle-bound curcumin. *Lipids* **33**, 1223-1228.
- Bertelli, A. A. E., Giovannini, L., Stradi, R., Bertelli, A., and Tillement, J.-P. (1996) Plasma, urine and tissue levels of *trans*- and *cis*-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int. J. Tiss. Reac.* **18**, 67-71.
- Carbó, N., Costelli, P., Baccino, F. M., López-Soriano, F. J., and Argilés, J. M. (1999) Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 739-743.
- Chambers, A. F., Shafier, R., and Ling, V. (1982) A model system for studying metastasis using the embryonic chick. *Cancer Res.* **42**, 4018-4025.



- Chen, F., Sun, S. C., Kuh, D. C., Gaydos, L. J., and Demers, L. M. (1995) Essential role of NF- $\kappa$ B activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 985-992.
- Clark, R. W., and Crain, R. C. (1986) Characterization of alterations in plasma lipoprotein lipid and apoprotein profiles accompanying hepatoma-induced hyperlipidemia in rats. *Cancer Res.* **46**, 1894-1903.
- Damtew, B., and Spagnuolo, P. J. (1997) Tumor cell-endothelial cell interactions: evidence for roles for lipoxygenase products of arachidonic acid in metastasis. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **56**, 295-300.
- Easty, D. M., and Easty, G. C. (1974) Measurement of the ability of cells to infiltrate normal tissues *in vitro*. *Br. J. Cancer* **29**, 36-49.
- Fox, E. F., Cantrell, C. H., and Leingang, K. A. (1996) Inhibition of the Kupffer cell inflammatory response by acute ethanol: NF- $\kappa$ B activation and subsequent cytokine production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 134-140.
- Hirayama, C., Yamanishi, Y., and Iriya, T. (1979) Serum cholesterol and squalene in hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta* **91**, 53-57.
- Holder, G. M., Plummer, J. L., and Ryan, A. J. (1978) The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica.* **8**, 761-768.
- Hsieh, T.-C., Burfeind, P., Laud, K., Backer, J. M., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., and Wu, J. M. (1999) Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Int. J. Oncol.* **15**, 245-252.



- Huang, M.-T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T. F., Laskin, J. D., and Conney, A. H. (1991) Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* **51**, 13-19.
- Huang, M.-T., Newmark, H. L., and Frenkel, K. (1997) Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **27**, 26-34.
- Irikura, T., Takagi, K., Okada, K., and Yagasaki, K. (1985) Effect of KCD-232, a new hypolipidemic agent, on serum lipoprotein changes in hepatoma-bearing rats. *Lipids* **20**, 420-424.
- Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M., and He, P. (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1119-1122.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220.
- Kannan, R., and Baker, N. (1975) Tumor extracellular triglycerides in mice during growth of Ehrlich ascites carcinoma. *Lipids* **10**, 770-772.
- Kao, J., Houck, K., Fan, Y., Haehnel, I., Libutti, S. K., Kayton, M. L., Grikscheit, T., Chabot, J., Nowygrod, R., Greenberg, S., Kuang, W.-J., Leung, D. W., Hayward, J. R., Kisiel, W., Heath, M., Brett, J., and Stern, D. M. (1994) Characterization of a novel tumor-derived cytokine. *J. Biol. Chem.* **269**, 25106-25119.
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Kaskey, R. B., Rao, C. V. and Reddy, B. S. (1999) Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during



- the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res.* **59**, 597-601.
- Kawasaki, M., Yagasaki, K., Miura, Y., Funabiki, R. (1995) Reduction of hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats by dietary fish oil. *Lipids* **30**, 431-436.
- Kim, J. M., Araki, S., Kim, D. J., Park, C. B., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H., and Tsuda, H. (1998) Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* **19**, 81-85.
- Komatsu, W., Miura, Y., and Yagasaki, K. (1998) Suppression of hypercholesterolemia in hepatoma-bearing rats by cabbage extract and its component, *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide. *Lipids* **33**, 499-503.
- Kozuki, Y., Miura, Y., and Yagasaki, K. (2000) Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture. *Cancer Lett.* **151**, 111-115.
- Lin, L.-I., Ke, Y.-F., Ko, Y.-C., and Lin, J.-K. (1998) Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion *in vitro* and suppresses matrix metalloproteinase-9 secretion. *Oncology* **55**, 349-353.
- Liotta, L., Rao, C. N., and Barsky, S. H. (1983) Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* **49**, 636-649.
- Liu, X.-H., Connolly, J. M., and Rose, D. P. (1996) Eicosanoids as mediators of linoleic acid-stimulated invasion and type IV collagenase production by a metastatic human breast cancer cell line. *Clin. Exp. Metastasis.* **14**, 145-152.
- Lomnitski, L., Bar-Natan, R., Sklan, D., and Grossman, S. (1993) The interaction between  $\beta$ -carotene and lipoxygenase in plant and animal systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1167**, 331-338.



- Lomnitski, L., Grossman, S., Bergman, M., Sofer, Y., and Sklan, D. (1997) *In vitro* and *in vivo* effects of  $\beta$ -carotene on rat epidermal lipoxygenases. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **67**, 407-414.
- Maccarrone, M., Lorenzon, T., Guerrieri, P., and Agrò, A. F. (1999) Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur. J. Biochem.* **265**, 27-34.
- Menon, L. G., Kuttan, R., and Kuttan, G. (1995) Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett.* **95**, 221-225.
- Menon, L. G., Kuttan, R., and Kuttan, G. (1999) Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett.* **141**, 159-165.
- Miura, Y., Shiomi, H., Sakai, F., and Yagasaki, K. (1997a) Assay systems for screening food components that have anti-proliferative and anti-invasive activity to rat ascites hepatoma cells: *In vitro* and *ex vivo* effects of green tea extract. *Cytotechnology* **23**, 127-132.
- Miura, Y., Furuse, T., and Yagasaki, K. (1997b) Inhibitory effect of serum from rats administered with coffee on the proliferation and invasion of rat ascites hepatoma cells. *Cytotechnology* **25**, 221-225.
- Noel, A., Calle, A., Emonard, H. P., Nusgens, B. V., Simar, L., Foidart, J., Lapiere, C.M., and Foidart, J.-M. (1991) Invasion of reconstituted basement membrane matrix is not correlated with the malignant metastatic cell phenotype. *Cancer Res.* **51**, 405-414.
- Noguchi, Y., Vydelingum, N. A., Younes, R. N., Fried, S. K., and Brennan, M. F. (1991) Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels. *Cancer Res.* **51**, 863-869.
- Nydegger, U. E., and Butler, R. E. (1972) Serum lipoprotein levels in patients with cancer. *Cancer Res.* **32**, 1756-1760.



- Osawa, T., Sugiyama, Y., Inayoshi, M., and Kawakishi, S. (1995) Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1609-1612.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D., and Sporn, M. B. (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **290**, 201-208.
- Poste, G., Doll, J., Hart, I. R., and Fidler, I. J. (1980) *In vitro* selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res.* **40**, 1636-1644.
- Reddy, A. C. P., and Lokesh, B. R. (1994) Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol. Cell. Biol.* **137**, 1-8.
- Reich, R., and Martin, G. R. (1996) Identification of arachidonic acid pathways required for the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells. *Prostaglandins* **51**, 1-17.
- Ruoslahti, E. (1996) How cancer spreads. *Sci. Am.* **275**, 72-77.
- Sakurai, Y., Klein, S. (1998) Metabolic alteration in patients with cancer: nutritional implications. *Surg. Today* **28**, 247-257.
- Shinkai, K., Mukai, M., and Akedo, H. (1986) Superoxide radical potentiates invasive capacity of rat ascites hepatoma cells *in vitro*. *Cancer Lett.* **32**, 7-13.
- Springer, T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434.
- Sreejayan, N., and Rao, M. N. A. (1996) Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* **46**, 169-171.
- Stahl, W., Nicolai, S., Briviba, K., Hanusch, M., Broszeit, G., Peters, M., Martin, H.-D., and Sies, H. (1997) Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* **18**, 89-92.



- Sugiyama, Y., Kawakishi, S., and Osawa, T. (1996) Involvement of the  $\beta$ -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 519-525.
- Surh, Y.-J., Hurh, Y.-J., Kang, J.-Y., Lee, E., Kong, G., and Lee, S. J. (1999) Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* **140**, 1-10.
- Tanaka, M., Kogawa, K., Nishihori, Y., Kuribayashi, K., Nakamura, K., Muramatsu, H., Koike, K., Sakamaki, S, and Niitsu, Y. (1997) Suppression of intracellular Cu-Zn SOD results in enhanced motility and metastasis of Meth A sarcoma cells. *Int. J. Cancer* **73**, 187-192.
- Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF- $\kappa$ B in macrophages by resveratrol. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 673-680.
- Vainio, H., and Rautalahti, M. (1998) An international evaluation of the cancer preventive potential of carotenoids. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 725-728.
- Webb, D. S. A., Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Shaw, S., and Gerrard, T. L. (1990) LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* **249**, 1295-1297.
- Welch, D. R., Lobl, T. J., Seftor, E. A., Wack, P. J., Aeed, P. A., Yohem, K. H., Seftor, R. E. B., and Hendrix, M. J. C. (1989) Use of the membrane invasion culture system (MICS) as a screen for anti-invasive agent. *Int. J. Cancer.* **43**, 449-457.
- Yagasaki, K., Machida, M., and Funabiki, R. (1986) Effects of dietary methionine, cystine, and glycine on endogenous hypercholesterolemia in hepatoma-bearing rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **32**, 643-651.



Yagasaki, K., Miura, Y., Okauchi, R., and Furuse, T. (2000) Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology* **33**, 229-235.

Yagasaki, K., Tanabe, T., Ishihara, K., and Funabiki, R. (1992) Modulation of the proliferation of cultured hepatoma cells by urea cycle-related amino acids. *In: Murakami, H., Shirahata, S., and Tachibana, H. (ed.) Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects. Vol. 4 (pp. 257-263). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London.*

Zhang, G., Y., Miura, Y., and Yagasaki, K. (1999) Effects of green, oolong and black teas and related components on the proliferation and invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology* **31**, 37-44.

Zhao, W., Han, Y., Zhao, B., Hirota, S., Hou, J., and Xin, W. (1998) Effect of carotenoids on the respiratory burst of rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1381**, 77-88.



