

## ドキシソルビシン, メルファランおよびメトトレキサートの 抗腫瘍効果に影響する食品の検討

岩本祥子<sup>1</sup>, 須永克佳<sup>\*1</sup>, 原田園子<sup>1</sup>,  
大久保温子<sup>1</sup>, 津田整<sup>1</sup>

(2011年4月25日受付; 2011年8月11日受理)

**要旨:** 近年では機能的食品やハーブ, 健康食品などを用いた補完代替療法への関心が高まり, がんの予防効果や抗腫瘍活性が期待される食品やハーブ類の使用が増加している。それらの食品の機能的性の研究は活発に行われているが, 化学療法薬との相互作用についてはあまり検討されていない。本実験では俗に悪性腫瘍に有効とされ, がんの化学療法を受けている患者が積極的に摂取する可能性がある8種の食品やハーブの酢酸エチル抽出物を被検試料として, 化学療法薬であるドキシソルビシン (DOX), メルファラン (L-PAM) およびメトトレキサート (MTX) と相互作用を引き起こす可能性について検討した。ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞に対する DOX, L-PAM または MTX の生存細胞数の減少作用に対する被検試料の影響を検討した結果, チンピおよびホウレン草, 緑茶が L-PAM の作用を, また, チンピおよびブロッコリー, 緑茶が DOX の作用を減弱する効果が認められ, 抗腫瘍効果を減弱する可能性が示唆された。

**キーワード:** 抗がん剤, アポトーシス, HepG2 細胞, 食品-医薬品相互作用, 初代培養肝実質細胞

がんの治療は手術, 放射線, 化学療法が主要なものであり, それぞれ単独あるいは併用して行われる。近年では機能的食品やハーブ, 健康食品などを用いた補完代替療法 (CAM: Complementary and Alternative Medicine) への関心が高まり, がんの予防効果や抗腫瘍活性が期待される食品やハーブ類が様々な視点から検討されている<sup>1-5)</sup>。2005年に報告された国内のがん患者に対する CAM の利用実態に関する調査において, 44.6% のがん患者が何かしらの CAM を利用していることが明らかになっている<sup>6)</sup>。

がんに限らず, 薬物療法における重要な課題として医薬品間の相互作用と共に医薬品と CAM を含めた食品との相互作用が挙げられる。最近ではハーブやいわゆる健康食品, 一般食品においても医薬品との相互作用が注目され研究も徐々に増加している<sup>7)</sup>。食品と医薬品の相互作用は, 医薬品間と同様に大きく薬物動態学的相互作用と薬力学的相互作用に分けて考えることが可能である。薬物動態学的相互作用は薬物の吸収, 分布, 代謝および排泄過程で生じるもので, よく知られたグレープフルーツの相互作用は吸収過程で生じ, この範疇に含まれる。多くの場合, 消化管内における物理化学的機序, 薬物代謝酵素あるいは薬物トランスポーターの阻害や誘導が重要な要因となる<sup>7)</sup>。一方, 薬力学的相互作用は薬物の薬理作用発現過程で生じる相互作用で, ビタミン K 高含有

食品によるワルファリンの作用減弱が古くから知られている。食品は多様であり嗜好も個人差が非常に大きいため因果関係と影響の程度の評価が難しい現状であるが, 最近では薬物との薬物動態学的相互作用に関しては多くの研究が行われるようになってきており, 新しい相互作用に関するデータも蓄積してきている<sup>7)</sup>。しかしながら, 薬力学的相互作用に関しては食品の機能的性から推測される例を除いてはあまり研究されていないのが現状である。CAM として使用されるハーブ, 健康食品や一般食品の中にはがん予防効果や抗腫瘍活性において化学療法薬と相加・相乗あるいは拮抗作用により治療効果や副作用発現に著しく影響を与える可能性のあるものも想定できる。

今回, 我々は俗に“がんに効く”といわれ, 化学療法を受けるがん患者が積極的に摂取する可能性のあるいくつかの食品やハーブと抗腫瘍薬の薬力学的あるいは細胞レベルでの相互作用が生じる可能性を探ることを目的として, ヒト肝臓がん細胞株である HepG2 細胞を用いて検討を行った。

被検試料としてこれまでがんの予防や抗腫瘍活性に関する何らかの報告があるアシタバ (*Angelica keiskei*)<sup>8)</sup>, キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*)<sup>9)</sup>, ブロッコリー (*Brassica oleracea* var. *italica*)<sup>9)</sup>, ショウガ (*Zingiber officinale*)<sup>10)11)</sup>, チンピ (ウンシュウミカン: *Citrus*

\* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: ksunaga@josai.ac.jp)

<sup>1</sup> 城西大学薬学部医療栄養学科 (350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

*unchiu*)<sup>12)</sup>, ニンニク (*Allium sativum*)<sup>9)</sup>, ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*)<sup>3)13)</sup> およびチャ (*Thea sinensis*)<sup>14)</sup> を選択し, それらの酢酸エチル抽出物を使用した。

抗腫瘍薬としてドキシソルピシン (DOX), メルファラン (L-phenylalanine mustard, L-PAM) およびメトトレキサート (MTX) についてそれらの抗腫瘍活性に対する被検試料の効果を検討した。DOXは別名アドリアマイシンで, 腫瘍細胞のDNAと複合体を形成してDNAポリメラーゼ, RNAポリメラーゼおよびトポイソメラーゼII反応を阻害することで細胞増殖を抑制する, アントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質である。葉酸拮抗薬であるMTXは, 核酸合成に必要なジヒドロ葉酸還元酵素の働きを阻止することにより細胞の増殖を抑制する。正常細胞や感受性の高いがん細胞には葉酸トランスポーターを介して能動的に取り込まれ<sup>15)</sup>, 殺細胞作用を示す。DOXとMTXはP-糖タンパク質 (P-gp) あるいは多剤耐性関連タンパク質 (MRP) ファミリーの基質となることが知られている。L-PAMはナイトロジェンマスタードにフェニルアラニン結合させ, 腫瘍細胞への親和性を高めたアルキル化薬であり, 細胞内に取り込まれた後にDNA鎖間またはDNA鎖内架橋形成あるいはDNA-蛋白架橋形成を通して抗腫瘍作用や骨髄抑制作用を示す。

本研究では, これら作用機序および特性の異なる抗悪性腫瘍薬によるHepG2細胞増殖抑制あるいは細胞傷害活性と被検食品の相互作用について検討した。すなわち, 食品が抗腫瘍薬の作用を増強あるいは減弱させる可能性, あるいは食品の機能性として抗腫瘍作用の観点から検討した。

## 実験方法

### 1. 細胞培養

**1.1 HepG2細胞の培養** 本研究にはヒト肝がん由来細胞株HepG2細胞(理化学研究所細胞バンク)を用いた。HepG2細胞は0.1 mg/mLストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) および100 U/mLペニシリンG (Sigma-Aldrich) 含有DMEM (Gibco) に10%牛胎児血清を添加した培養液に懸濁し, 直径100 mmのシャーレまたは24穴プレート上に播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養した。

**1.2 初代培養ラット肝実質細胞** 実験動物はWistar系雄性ラット(三協ラボサービス)(体重約200 g)を使用し, 実験に供するまで実験動物用固形飼料MF(オリエンタル酵母)および水道水を自由摂取させ, 室温23±1-2°C, 湿度55±10-15%, 明暗サイクル12 h(明期7:00-19:00), 照明150-300ルクス(床土85 cm)の環境で飼育した。なお, 動物実験は, 総理府の「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」および城西大学生命科学研究センターの「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従って行った。

初代培養肝実質細胞の調製は, コラゲナーゼ灌流法

にて行った<sup>16)</sup>。分散した肝実質細胞は10<sup>-9</sup> Mデキサメサゾン (Sigma-Aldrich), 10<sup>-9</sup> Mインスリン (Sigma-Aldrich), 0.1 mg/mLストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) および100 U/mLペニシリンG (Sigma-Aldrich) 含有DMEMに5%牛胎児血清を添加した培養液に懸濁し, 24穴プレートに2.5×10<sup>5</sup>細胞/ウエルで播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養した。培養3時間後に培養液を交換して未接着細胞を除き, 培養を継続し24時間後に実験に使用した。

### 2. 抗悪性腫瘍薬および被検試料抽出物の調製

使用した抗悪性腫瘍薬としてメトトレキサート (MTX) およびメルファラン (L-PAM), ドキシソルピシン (DOX) はDMSO (Sigma-Aldrich, 組織培養グレード) に溶解して使用した。被検試料はアシタバおよびキャベツ, ショウガ, チンピ, ニンニク, ブロccoli, ホウレンソウ, チャとし, それぞれ乾燥物400 mgに対して4 mLの酢酸エチル (和光純薬工業(株)) を加え, 2時間振盪した後, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) を行い, 酢酸エチル層を別の遠沈管に移し, 減圧下で酢酸エチル層を濃縮, 乾固し, 200 μLのDMSOに溶解して試料とした。

### 3. 被検試料による抗腫瘍薬の作用に対する影響の検討

**3.1 被検試料および抗悪性腫瘍薬の細胞生存率に対する影響** HepG2細胞を24穴プレートに4×10<sup>5</sup> cells/well (8×10<sup>5</sup> cells/mL) で播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。播種後約24時間, 細胞がサブコンフルエントの状態に達した後, 各被検試料 (0.018-18 mg/mL) および抗悪性腫瘍薬としてDOX (0.1 μM), MTX (10 μM) またはL-PAM (10 μM) を培養液へ添加し, さらに24または48時間培養した後, 細胞生存率の測定または総RNAの抽出に供した。

**3.2 細胞生存率の測定** 細胞生存率の測定にはMTTアッセイ法を用いた。3.1にて処置した培養細胞を用いて以下のとおり行った。培養液をHanks液にて洗浄後, 1 mg/mL MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (和光純薬)) をHanks液に溶解した溶液を0.25 mL添加し, 30分間インキュベーションした。溶解液として50 mL/100 mL N,N-ジメチルホルムアミド (和光純薬), 20 g/100 mL SDS (和光純薬) を80%酢酸:1 N塩酸=1:1溶液でpH 4.7に調製した溶液を0.2 mL加え, 一晚CO<sub>2</sub> インキュベーター中でインキュベーションした。その後マイクロプレートリーダー (Wallac 1420 ARVOsx) にて波長570 nmの吸光度を測定した。細胞生存率はコントロール群の吸光度を100%とし, コントロールに対する割合で算出した。

**3.3 アポトーシス関連遺伝子および薬物代謝酵素, 薬物トランスポーター遺伝子発現の検討** 3.1にて処理した直径100 mmのシャーレからラバーポリスマンにて細胞をかき取り, 3,000 rpm, 5分間の遠心により回収した細胞ペレットからAGPC法<sup>17)</sup> に従って総RNA

表1 リアルタイム RT-PCR で使用したプライマー

Target gene	Primer	Sequence	Expect product
gapdh	forward	5' GGTGAAGGTCGGAGTCAACG3'	123 bp
	reverse	5' ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG3'	
bad	forward	5' CGGAGGATGAGTGACGAGTT3'	123 bp
	reverse	5' CCACCAGGACTGGAAGACTC3'	
bax	forward	5' AACATGGAGCTGCAGAGGAT3'	104 bp
	reverse	5' CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA3'	
bcl-2	forward	5' GTCTGGGAATCGATCTGAA3'	121 bp
	reverse	5' GCAACGATCCCATCAATCTT3'	
caspase-3	forward	5' GGTTCATCCAGTCGCTTTGT3'	100 bp
	reverse	5' AATTCTGTTGCCACCTTTCG3'	
mdr1	forward	5' CTGTATTGTTTCCACCACGA3'	138 bp
	reverse	5' AGGGTGTCAAATTTATGAGGCAGT3'	
mrp1	forward	5' GGGCTGCGAAAGTCGT3'	80 bp
	reverse	5' AGCCCTTGATAGCCACGTG3'	
mrp2	forward	5' ACTGTTGGCTTTGTTCTGTCCA3'	99 bp
	reverse	5' CAACAGCCACAATGTTGGTCTCTA3'	
mrp3	forward	5' GGTGGATGCCAACCAGAGAA3'	85 bp
	reverse	5' GCAGTTCACCCACGAACCTCC3'	
cyp3a4	forward	5' TCTGGGATGAGAGCCATCACTA3'	86 bp
	reverse	5' AGCCAGCAAAGAGCAACAC3'	

を抽出した。得られた総 RNA の 5  $\mu$ g から以下のとおり cDNA を作成した。M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen) 添付の first-strand buffer 中, 0.5  $\mu$ g oligo (dT)<sub>12-18</sub>, 0.2 mM dNTP mix, 10 mM DTT, 10 units RNase inhibitor, 20 units M-MLV 逆転写酵素の組成中, 37 $^{\circ}$ C, 50 分間のインキュベーションを行った。Real-time PCR は SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (タカラバイオ(株)) を用い, iCycler iQ<sup>TM</sup> Multi-Color Real Time PCR Detection System により発現量測定を行った。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C, 10 秒間, 60 $^{\circ}$ C, 30 秒間, 55 $^{\circ}$ C, 1 分間にて 45 サイクル行った。使用したプライマー配列および増幅産物のサイズを表 1 に示した。

#### 4. 抗腫瘍作用の期待できる食品の腫瘍選択性の検討

初代培養ラット肝実質細胞の培養開始 24 時間後に抗悪性腫瘍薬または被検食品を添加しさらに 48 時間培養を継続し細胞生存率を MTT assay 法にて計測した。

#### 5. 統計処理

本研究で得られた実験結果は, 平均値  $\pm$  標準誤差 (Mean  $\pm$  SE) で示した。比較は二元配置分散分析後, Dunnett の多重比較により解析した。統計における有意水準は 5% とした。統計処理は, エクセル統計 2004 により行った。

### 実験結果

#### 1. HepG2 細胞の細胞生存率への影響の検討

**1.1 抗腫瘍薬** MTX, L-PAM および DOX の HepG2 細胞への細胞生存率低下作用の検討はそれぞれ  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M を培養液中に添加し, 添加後 24 時間および 48 時間において行った (図 1)。その結果, いずれの抗悪性腫瘍薬においても暴露時間と濃度に依存して生存率の

低下を示した。抗悪性腫瘍薬単独で中程度の細胞傷害活性を示す濃度が各抗悪性腫瘍薬と被検試料の相互作用を効率良く評価できると思われたため, 被検試料が抗腫瘍薬の効果に及ぼす影響の検討には MTX および L-PAM は最終濃度 10  $\mu$ M, DOX は 0.1  $\mu$ M を用い, 添加後 48 時間において検討することとした。

**1.2 被検試料抽出物** 単独あるいは抗腫瘍薬との併用 HepG2 細胞の生存率に対する各処理群の影響について表 2 に示した。被検試料単独の効果はそれぞれ 0.018–18 mg/mL の濃度範囲で検討した。アシタバ, ショウガおよびホウレンソウは 0.018 mg/mL の低濃度から有意な生存率低下作用が認められた。一方, キャベツ, チンピ, ニンニク, ブロッコリーおよびチャでは, 程度の差はあるものの単独では HepG2 細胞の生存率への影響は限られたものであった。

MTX と各食品抽出物の併用では, MTX の作用を減弱する食品は認められなかったが, アシタバ, キャベツ, ショウガ, ホウレンソウおよびチャの 1.8 mg/mL あるいは 18 mg/mL において相加的な細胞生存率の低下が観察された。チンピ, ホウレンソウおよびチャの 0.018–1.8 mg/mL において, L-PAM の生存率低下作用を完全に打ち消す効果が認められた。一方で, キャベツ, ショウガ, ニンニク, ホウレンソウおよびチャの 18 mg/mL において相加的な細胞生存率の低下が認められた。また, DOX の HepG2 細胞への細胞傷害作用をブロッコリーの 0.018 mg/mL およびチャの 0.018–1.8 mg/mL において有意に減弱した。また, 有意ではないもののチンピおよびホウレンソウの 0.018–1.8 mg/mL で DOX の作用を減弱する傾向が認められた。一方で, アシタバ, キャベツ, ショウガ, ニンニク, ホウレンソウおよびチャの

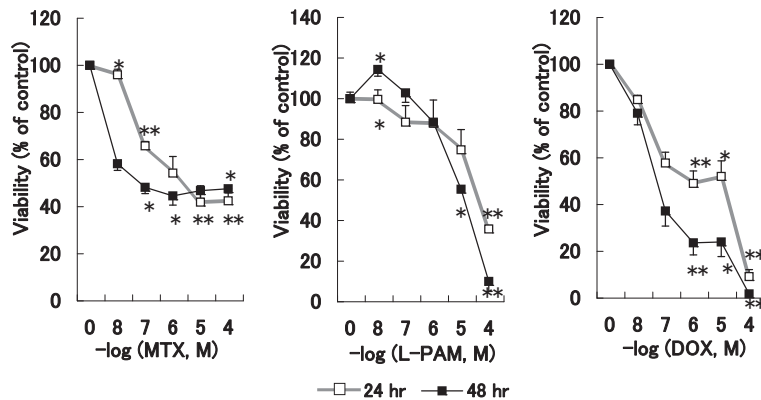


図1 MTX, L-PAM および DOX の HepG2 細胞生存率に対する影響の用量反応曲線  
 HepG2 細胞を 24 穴プレートに  $4 \times 10^5$  cells/well で播種し、培養 24 時間後に各抗悪性腫瘍薬を最終濃度  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M の濃度で添加し、24 または 48 時間後に MTT assay により細胞生存率の計測を行った。データは平均値 ± 標準誤差 ( $n=3$ ) で表す。有意差検定は Dunnett による多重比較で行い、有意水準は 5% とした。\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  はコントロールとの比較を表す。

表2 抗悪性腫瘍薬および被検試料の単独あるいは併用による HepG2 細胞生存率に対する影響

Specimens (mg/mL)	Drug (-)	MTX (+) (10 μM)	L-PAM (+) (10 μM)	DOX (+) (0.1 μM)
None	100 ± 2.5	68.4 ± 2.8**	79.5 ± 6.3**	63.0 ± 6.6**
Ashitaba	0.018	67.6 ± 3.7**	66.8 ± 1.2	77.8 ± 5.2
	0.18	63.1 ± 4.2**	58.9 ± 2.6	71.7 ± 5.2
	1.8	63.6 ± 4.7**	57.5 ± 2.6 <sup>+</sup>	71.4 ± 3.8
	18	60.9 ± 3.5**	46.6 ± 17.1	51.1 ± 18.8
Cabbage	0.018	86.3 ± 0.2*	67.6 ± 1.5	70.2 ± 7.2
	0.18	90.2 ± 1.8*	62.9 ± 2.5	62.1 ± 3.6
	1.8	90.3 ± 2.4*	66.0 ± 3.5	69.9 ± 2.7
	18	74.5 ± 4.4**	53.3 ± 0.8 <sup>++</sup>	56.5 ± 2.5 <sup>+</sup>
Ginger	0.018	65.1 ± 3.8**	67.1 ± 3.1	75.6 ± 6.2
	0.18	60.6 ± 2.3**	59.7 ± 4.7	70.5 ± 6.4
	1.8	59.2 ± 2.3**	51.0 ± 0.4 <sup>++</sup>	67.1 ± 3.5
	18	0.84 ± 0.1**	8.0 ± 6.3 <sup>++</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>++</sup>
Citrus unshiu peel	0.018	90.4 ± 2.8	66.4 ± 3.5	101.5 ± 2.9 <sup>+</sup>
	0.18	89.7 ± 2.6*	62.3 ± 3.9	100.2 ± 3.7
	1.8	90.8 ± 2.6	61.4 ± 4.8	103.1 ± 3.3 <sup>+</sup>
	18	81.3 ± 7.9	54.5 ± 10.4	67.7 ± 11.0
Garlic	0.018	90.2 ± 2.5	65.4 ± 4.6	87.8 ± 4.2
	0.18	86.5 ± 3.7*	62.9 ± 3.8	70.0 ± 6.4
	1.8	91.0 ± 3.9	63.3 ± 5.7	68.5 ± 2.1
	18	58.8 ± 0.5*	51.3 ± 10.2	46.2 ± 1.8 <sup>++</sup>
Broccoli	0.018	93.1 ± 3.6	66.2 ± 4.4	79.5 ± 4.2
	0.18	96.5 ± 3.2	62.3 ± 5.4	76.9 ± 5.2
	1.8	94.1 ± 3.9	67.5 ± 5.9	77.4 ± 4.9
	18	84.7 ± 7.5	59.3 ± 6.4	65.9 ± 9.1
Spinach	0.018	70.8 ± 2.0**	63.8 ± 3.3	105.4 ± 3.2 <sup>+</sup>
	0.18	68.6 ± 3.6**	57.5 ± 3.5	101.8 ± 4.4 <sup>+</sup>
	1.8	60.2 ± 3.8**	60.4 ± 3.8	103.4 ± 2.3 <sup>+</sup>
	18	54.0 ± 1.4**	43.0 ± 8.7 <sup>+</sup>	39.1 ± 6.5 <sup>++</sup>
Tea	0.018	95.4 ± 0.8	69.5 ± 2.8	101.0 ± 2.7 <sup>+</sup>
	0.18	95.6 ± 0.4	68.9 ± 2.3	100.7 ± 3.2
	1.8	89.7 ± 3.6	65.7 ± 2.1	102.1 ± 3.1 <sup>+</sup>
	18	71.5 ± 4.6**	51.4 ± 4.0 <sup>++</sup>	49.7 ± 1.7 <sup>+</sup>

HepG2 細胞を 24 well plate に  $4 \times 10^5$  cells/well で播種し、培養 24 時間後に各抗悪性腫瘍薬または DMSO および被検試料を培養液に添加し 48 時間後に MTT assay により細胞生存率の計測を行った。データは平均値 ± 標準誤差 ( $n=3$ ) で表す。有意差検定は Dunnett の多重比較で行い、有意水準は 5% とした。\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  は被検試料単独または抗腫瘍薬単独時の生存率と溶媒のみ添加したコントロール群の生存率との有意差を表し、<sup>++</sup> $p < 0.01$ , <sup>+</sup> $p < 0.05$  は抗腫瘍薬と被検食品を併用したときの生存率とそれぞれ抗腫瘍薬単独時の生存率との比較を表す。

表3 抗腫瘍薬および被検試料の初代培養ラット肝実質細胞の生存率に対する影響

Specimens		Viability (%)	
MTX	10 $\mu$ M	105.7 $\pm$ 7.2	(154.5)
L-PAM	10 $\mu$ M	107.0 $\pm$ 5.4	(134.6)
DOX	0.1 $\mu$ M	100.9 $\pm$ 2.8	(160.2)
Ashitaba	0.018 mg/mL	127.5 $\pm$ 7.4	(188.5)
	0.18 mg/mL	117.4 $\pm$ 7.2	(193.0)
	1.8 mg/mL	40.9 $\pm$ 2.3	(64.7)
	18 mg/mL	19.0 $\pm$ 2.2	(31.2) *
Cabbage	0.018 mg/mL	107.1 $\pm$ 11.6	(124.1) **
	0.18 mg/mL	97.2 $\pm$ 6.2	(107.7)
	1.8 mg/mL	92.8 $\pm$ 7.9	(102.8)
	18 mg/mL	71.4 $\pm$ 7.1	(95.8)
Ginger	0.018 mg/mL	91.1 $\pm$ 4.9	(140.0) *
	0.18 mg/mL	92.4 $\pm$ 7.7	(152.4)
	1.8 mg/mL	76.3 $\pm$ 3.9	(128.9)
	18 mg/mL	10.0 $\pm$ 2.2	(1190)
Citrus unshiu peel	0.018 mg/mL	130.3 $\pm$ 2.9	(144.1) **
	0.18 mg/mL	106.4 $\pm$ 3.1	(118.5) **
	1.8 mg/mL	99.2 $\pm$ 6.7	(109.2)
Garlic	18 mg/mL	88.5 $\pm$ 4.0	(108.8)
	0.018 mg/mL	105.9 $\pm$ 10.0	(117.3)
	0.18 mg/mL	100.4 $\pm$ 4.5	(116.2)
	1.8 mg/mL	94.5 $\pm$ 10.0	(103.8)
Broccoli	18 mg/mL	90.9 $\pm$ 11.3	(154.6)
	0.018 mg/mL	116.3 $\pm$ 10.1	(124.9)
	0.18 mg/mL	115.5 $\pm$ 16.3	(119.8)
	1.8 mg/mL	111.1 $\pm$ 14.0	(118.1)
Spinach	18 mg/mL	96.0 $\pm$ 6.4	(113.4)
	0.018 mg/mL	86.5 $\pm$ 3.6	(122.2)
	0.18 mg/mL	93.5 $\pm$ 3.3	(136.3)
	1.8 mg/mL	96.6 $\pm$ 4.5	(16.5)
Tea	18 mg/mL	42.5 $\pm$ 6.7	(78.8) *
	0.018 mg/mL	100.6 $\pm$ 4.8	(105.4)
	0.18 mg/mL	110.4 $\pm$ 3.7	(115.5)
	1.8 mg/mL	103.1 $\pm$ 4.1	(115.0)
	18 mg/mL	101.5 $\pm$ 5.1	(142.0)

初代培養ラット肝実質細胞に抗悪性腫瘍薬または被検試料を添加し48時間後にMTT assayにて細胞生存率を検討し、HepG2細胞と比較した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n=3$ ) で表し、( ) 内は同じ処理におけるHepG2細胞の生存率を100としたときの割合を示す。有意差検定はDunnettの多重比較で行い、有意水準は5%とした。\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ は同じ処理におけるHepG2細胞の生存率との比較を表す。

18 mg/mLでは相加的な細胞生存率の低下を示した。

## 2. 抗腫瘍作用の期待できる食品の腫瘍選択性の検討

今回使用した抗悪性腫瘍薬あるいは被検試料のがん細胞への選択的傷害活性(腫瘍選択性)についての検討結果を表3に示した。HepG2細胞に対して用いたのと同じ濃度の10  $\mu$ M MTX, 10  $\mu$ M L-PAMまたは0.1  $\mu$ M DOXを正常細胞としてのラット初代培養肝実質細胞に添加し、48時間後に細胞生存率を測定し、HepG2のデータと比較した。その結果、いずれの抗腫瘍薬も使用した

濃度ではラット初代培養肝実質細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった。また、被検試料による細胞傷害活性の腫瘍選択性について検討したところ、アシタバの1.8 mg/mLと18 mg/mLおよびホウレンソウの18 mg/mLにおいては正常細胞の生存率低下作用が著しく認められた。一方、キャベツ、ショウガ、チンピ、ブロッコリー、ニンニク、ホウレンソウおよびチャではHepG2細胞生存率低下作用の方が正常細胞より強い傾向が認められた。

## 3. リアルタイム RT-PCR における遺伝子発現に対する影響の検討

HepG2細胞に対する抗腫瘍薬の傷害性を減弱した食品抽出物について、アポトーシス関連遺伝子、薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの遺伝子発現に対する効果を検討した(表4)。

**3.1** アポトーシス関連遺伝子 DOX単独ではカスパーゼ-3 (caspase-3) mRNAの発現がコントロールに対して3.3倍の増加傾向を示したが、チンピの併用ではコントロールに対して1.3倍、ブロッコリーでは1.7倍、チャでは2倍といずれもカスパーゼ-3 mRNA発現量の減少が認められた。同様にbax mRNA発現は、DOXでコントロールの1.9倍であったがチンピ、ブロッコリーおよびチャが発現を減少させた。また、bad mRNAについては、DOX単独時の発現量に対してブロッコリーが低下させる傾向が認められた。一方、L-PAM単独時の遺伝子発現に対して大きく影響する食品抽出物は見いだされなかった。

**3.2** 薬物代謝および薬物トランスポーター関連遺伝子 DOX単独時にmdr1 mRNAがコントロールに対して2.6倍の増加を示したが、チンピ併用時には1.6倍と減少傾向を示した。また、cyp3a4 mRNAに関して、L-PAM単独でも3.5倍の増加が認められたが、チンピとの併用で11.1倍と発現量が増加した。一方、DOX単独時のcyp3a4 mRNA発現はコントロールの2.4倍を示したが、チンピとの併用では0.8倍と減少させた。

## 考 察

本研究は、化学療法を受ける患者のがんの改善効果を期待して摂取する可能性のある食品やハーブと抗腫瘍薬の相互作用、すなわち食品やハーブが抗腫瘍薬の作用を減弱または増強する可能性について検討することを目的とした。その結果、被検試料単独ではHepG2細胞に対してアシタバ、ショウガおよびホウレンソウで強い生存率低下作用を示した(表2)が、正常細胞としての初代培養肝実質細胞に対しては、高濃度のアシタバとホウレンソウを除き細胞生存率への影響が低い傾向が認められた(表3)。さらに、その他の被検試料および検討した3種の抗悪性腫瘍薬においても同様の傾向が認められ、がん細胞に選択的な傷害活性を示した。したがって、これらの被検食品は本実験においてHepG2細胞の増殖サイ

表4 遺伝子発現量への影響

Specimens	bad	bax	bcl-2	caspase 3	mdr1	mrp1	mrp2	mrp3	cyp3a4
MTX	3.2	1.7	1.1	2.0	2.6	2.8	2.4	1.7	2.1
L-PAM	1.4	1.0	1.0	1.6	1.6	0.7	1.5	1.0	3.5
DOX	2.2	1.9	0.6	3.3	2.6	1.1	1.7	1.0	2.4
Citrus unshiu peel	2	1.1	0.9	2.3	2.0	0.9	1.6	1.4	1.5
Broccoli	1.8	0.8	0.8	1.1	2.6	0.7	1.3	0.9	1.8
Spinach	1.8	1.1	0.9	2.3	1.6	0.9	1.4	1.0	1.2
Tea	0.9	1.0	0.8	2.0	2.1	1.0	1.4	1.0	1.5
L-PAM + Citrus unshiu	1.5	0.8	1.0	1.8	1.8	0.8	1.5	0.9	11.1
DOX + Citrus unshiu	2.1	0.8	0.7	1.3	1.6	1.0	1.4	0.9	0.8
DOX + Broccoli	1.3	1.1	0.9	1.7	2.2	1.4	1.8	0.8	2.7
L-PAM + Spinach	1.8	1.2	1.3	1.8	2.3	1.2	2.1	1.1	4.0
L-PAM + Tea	1.1	1.0	0.7	1.5	1.9	0.9	1.8	0.8	3.1
DOX + Tea	1.9	1.0	0.7	2.0	2.0	0.8	1.4	0.7	2.2

HepG2 細胞を 24 well plate に  $4 \times 10^5$  cells/well で播種し、培養 24 時間後に各抗悪性腫瘍薬または DMSO および被検試料を培養液に添加し 24 時間後に総 RNA を回収した。各遺伝子の発現値は gapdh により標準化し、コントロールを 1 とした相対値の平均値 ( $n=3$ ) で示した。

クルへ影響することで特異的に抗腫瘍活性を示すことが強く示唆された。一方、チンピ、ブロッコリーおよびチャは DOX, また、チンピ、ハウレンソウおよびチャは L-PAM による HepG2 細胞の細胞生存率の低下を有意に抑制する作用、すなわち抗腫瘍活性を減弱させる可能性のあることを見いだした (表 2)。

チンピはウンシュウミカンの成熟果皮を乾燥させた生薬で、芳香・苦味健胃、鎮咳作用などを有する。ウンシュウミカンの果皮は、清涼飲料の原料としても用いられており、ハーブサプリメントとしての使用が考えられる素材である。食品として摂取する他の被検試料とは異なるが、本研究では生薬のチンピを用いて検討した。チンピにはこれまで骨髓性白血病細胞の分化を促進する作用<sup>12)</sup>、ヒトリンパ芽球様白血病細胞 (MOLT-4) への C 型肝炎ウイルスの感染を抑制する作用<sup>18)</sup> などが報告されている。また、ハウレンソウをはじめ、バセリ、タマネギ、ネギ、ピーマン、チャ、ニンジン、ニンニクなどには DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を阻害することが知られているスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) が豊富に含まれ、がん細胞の増殖を抑制する可能性が指摘されている<sup>13)</sup>。さらに、チャ類に含まれるフラボノイドの一種であるエピガロカテキンガレートが肝がん細胞である SMMC7721 細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>19)</sup>。キャベツやブロッコリーなどのアブラナ科野菜に含まれるイソチオシアネート類のスルホラファンなどは第 II 相の異物代謝系を誘導する活性を有しており、発がん抑制作用をはじめ、ヘリコバクター・ピロリを含む細菌に対する抗菌作用や抗炎症作用など多くの有益な効果が知られている<sup>20)21)</sup>。以上のように、本研究で検討した被検試料は抗腫瘍作用が期待できる食品として、これまで CAM として利用されてきたものであり、本研究において抗腫瘍薬と併用するとその作用を減弱させる可能性が示されたことは重要な知見である。

DOX はアントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質であり薬物排出トランスポーターである P-gp あるいは MRP の基質となることが知られ、特に P-gp による細胞外排出が多剤耐性と関連することが知られている<sup>22)</sup>。また、その抗腫瘍作用や心毒性に活性酸素 (ROS) の産生が密接に関与するとされている<sup>23)</sup>。DOX の抗腫瘍活性および心毒性に関して、ブロッコリーに含まれる抗酸化物質である N-アセチル-L-システイン (NAC) が動物実験で DOX との併用によりその心毒性を減弱する一方で、抗腫瘍効果も減弱する可能性があることが報告されている<sup>23-25)</sup>。さらにチンピの主要成分であるヘスペリジン<sup>26)</sup> やハウレンソウ由来の抗酸化物質<sup>27)</sup>、熟成ニンニク、ブドウ種子、ヘーゼルナッツ<sup>28)</sup> が DOX の心毒性を低減することが報告されており、これらの食品については DOX の抗腫瘍活性への影響は述べられていないが、心毒性のみならず主作用である抗腫瘍活性にも影響する可能性が強く示唆される。また、最近になってスルホラファンやチャポリフェノールが転写因子である Nrf2 の分解系を抑制することで解毒酵素類の発現を増加して DOX やパクリタキセルによる化学療法に抵抗性を生じることも報告されている<sup>29)</sup>。本研究ではチンピおよびブロッコリーが有意に DOX の抗腫瘍活性を抑制し、また有意ではないもののハウレンソウが抑制傾向を示した。これらの被検試料による DOX の作用減弱に抗酸化作用を有する成分や薬物代謝酵素系の発現状態を修飾する成分が関与することが推察された。今後、抗酸化作用を有する成分や薬物代謝酵素系に影響を及ぼす成分を含有する食品も幅広く検討する必要があると考えられる。

本実験で認められた抗腫瘍薬、被検試料それぞれの単独あるいは併用における HepG2 の細胞生存率への影響について、アポトーシス関連遺伝子<sup>30)</sup> の発現変化についても検討した。本実験ではアポトーシス実行を担うセリンプロテアーゼであるカスパーゼ-3 およびアポトーシ

ス調節因子でアポトーシスを促進する bad および bax, アポトーシスの抑制因子である bcl-2 mRNA について検討した。その結果, DOX による細胞生存率低下作用を抑制したチンピ, ブロッコリーおよびチャが DOX により発現誘導されたカスパーゼ-3 および bax mRNA の発現量をいずれも低下する傾向が認められ, また, ブロッコリーでは bad mRNA の発現低下作用が認められた。さらに, 薬物との相互作用発現において薬物代謝酵素あるいは薬物トランスポーターが最も重要な要因と位置づけられるため, 本実験においては薬物代謝酵素である cyp3a4 mRNA および薬物トランスポーターである mdrl mRNA および mrp1-4 mRNA の発現変化についても検討した。その結果, DOX との併用で大きく発現変化を生じるものは見られなかった。これらの結果は, DOX による HepG2 細胞の生存率低下作用に対する影響にはアポトーシス関連遺伝子の発現変化が密接に関連する可能性を示唆するものである。

L-PAM はアミノ酸トランスポーターで吸収されるため, 高タンパク質食によりその消化管吸収が減少する可能性が指摘されている<sup>31-33)</sup>。今回, 新たに体内動態を介するメカニズムではなくがん細胞への直接的な薬理学的作用によりチンピ, ホウレンソウおよびチャが L-PAM の HepG2 細胞に対する細胞傷害活性を減弱させ, 抗腫瘍活性を消失させる可能性が示された。この点に関して, L-PAM, DOX あるいはシクロホスファミドなどのアルキル化薬によって生じる赤血球の小核形成を硝酸ピスマスや塩化亜鉛などのメタロチオネイン誘導剤が抑制することが報告されている<sup>34)</sup>。メタロチオネインは生理的な抗酸化物質でもあるため, チンピ, ホウレンソウおよびチャの効果には, それらに含まれる抗酸化物質そのものが影響しているか, メタロチオネインを初めとした抗酸化物質の発現誘導が関与する可能性も示唆される。また, L-PAM の作用減弱に伴う代表的なアポトーシス関連遺伝子や薬物代謝酵素, 薬物トランスポーター遺伝子の発現を検討した結果, チャがアポトーシス促進作用のある bad の発現を減少させた。また, ホウレンソウでは L-PAM との併用で bcl-2 の発現量の増加傾向とカスパーゼ-3 の減少傾向を示した。これらの結果は L-PAM による HepG2 抗腫瘍活性の減弱をアポトーシス関連の遺伝子発現変化を介して修飾する可能性が示唆される。さらに薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの発現を検討した結果, L-PAM と併用した食品では, チンピが cyp3a4 を, ホウレンソウでは mdrl および cyp3a4 共に発現量の増加を示した。また, ホウレンソウは mrp1 および mrp2 の発現量を増加させた。この結果は, 細胞レベルでの相互作用の可能性は示されなかったホウレンソウが薬物体内動態への影響を介して MTX の抗腫瘍効果を修飾する可能性について示唆しており, 今後, さらに検討する必要がある。また, MTX 単独で mrp2 の発現量を増加させたが, MTX は mrp2 の基質となるため,

さらに検討が必要である。

抗腫瘍薬単独あるいは被検試料併用下において, 各種トランスポーターおよび CYP3A4 の発現状態を大きく変動させるものが認められた (表 4)。今回使用した DOX, MTX, および L-PAM はいずれもそれ自身は CYP3A4 の基質にはならない。また, DOX と MTX は P-gp の基質となると考えられるが, それら単独時の mdrl 発現量を併用によって大きく変化させる被検試料は認められなかった。したがって, 本研究で明らかとなった抗腫瘍薬の作用減弱に対して CYP3A4 や P-gp の直接的な関連性はないと思われるが, それらの基質となる他の併用薬が存在する場合には, それらの薬物の体内動態に影響を及ぼす可能性がある。この点に関して今後さらに検討が必要と思われる。

以上, 本実験ではがん患者ががんの抑制を目的として日常的に摂取しながら化学療法を受ける可能性のある食品あるいはハーブに注目して, それらが抗腫瘍薬の効果を減弱する可能性のあることを示した。しかしながら, これらの食品あるいはハーブがどのように化学療法薬の作用を減弱させたか明らかではない。また, 今回は被検試料として酢酸エチル抽出物のみを使用したため, 酢酸エチルによって抽出されない成分については検討されていない。そのまま摂取される食品やチャやハーブなどは熱水で抽出して用いられるケースもあるため, 今後はそれらの検討も必要である。さらに, がん抑制作用や化学療法薬の作用増強などの機能性の面からの検討のみならず化学療法の阻害要因についても, 今後詳細な検討を行う必要がある。

## 文 献

- 1) Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P (2008) Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Med* **74**: 1560-9.
- 2) Kaur M, Agarwal C, Agarwal R (2009) Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *J Nutr* **139**: 1806S-12S.
- 3) Maeda N, Matsubara K, Yoshida H, Mizushima Y (2011) Anti-cancer Effect of Spinach Glycoglycerolipids as Angiogenesis Inhibitors Based on the Selective Inhibition of DNA Polymerase Activity. *Mini Rev Med Chem* **11**: 32-8.
- 4) Olaku O, White JD (2010) Herbal therapy use by cancer patients: A literature review on case reports. *Eur J Cancer* **47**: 508-14.
- 5) Li Y, Tollefsbol TO (2010) Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem* **17**: 2141-51.
- 6) Hyodo I, Amano N, Eguchi K, Narabayashi M, Imanishi J, Hirai M, Nakano T, Takashima S (2005) Nationwide survey on complementary and alternative medicine in cancer patients in Japan. *J Clin Oncol* **23**: 2645-54.

- 7) Boullata JI (2010) An introduction to drug-nutrient interactions. In: Handbook of Drug-nutrient Interactions (Boullata JI, Armenti VT, eds), p 3-26. Humana Press, New York.
- 8) Akihisa T, Kikuchi T, Nagai H, Ishii K, Tabata K, Suzuki T (2011) 4-Hydroxyderricin from *Angelica keiskei* Roots Induces Caspase-dependent Apoptotic Cell Death in HL60 Human Leukemia Cells. *J Oleo Sci* **60**: 71-7.
- 9) Stan SD, Kar S, Stoner GD, Singh SV (2008) Bioactive food components and cancer risk reduction. *J Cell Biochem* **104**: 339-56.
- 10) Jeong CH, Bode AM, Pugliese A, Cho YY, Kim HG, Shim JH, Jeon YJ, Li H, Jiang H, Dong Z (2009) [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A4 hydrolase. *Cancer Res* **69**: 5584-91.
- 11) Tuntiwechapikul W, Taka T, Songsomboon C, Kaewtunjai N, Imsumran A, Makonkawkeyoon L, Pimpimon W, Lee TR (2010) Ginger extract inhibits human telomerase reverse transcriptase and c-Myc expression in A549 lung cancer cells. *J Med Food* **13**: 1347-54.
- 12) Sugiyama S, Umehara K, Kuroyanagi M, Ueno A, Taki T (1993) Studies on the differentiation inducers of myeloid leukemic cells from Citrus species. *Chem Pharm Bull* **41**: 714-9.
- 13) Kuriyama I, Musumi K, Yonezawa Y, Takemura M, Maeda N, Iijima H, Hada T, Yoshida H, Mizushima Y (2005) Inhibitory effects of glycolipids fraction from spinach on mammalian DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* **16**: 594-601.
- 14) Kidd PM (2009) Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev* **14**: 226-46.
- 15) Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta KY, Otagiri M, Hayashi Y, Yuasa H (2007) Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **322**: 469-76.
- 16) 中村敏一 (1987) 初代培養肝細胞実験法, p 5-53. 学会出版センター, 東京.
- 17) Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- 18) Suzuki M, Sasaki K, Yoshizaki F, Oguchi K, Fujisawa M, Cyong JC (2005) Anti-hepatitis C virus effect of citrus unshiu peel and its active ingredient nobiletin. *Am J Chin Med* **33**: 87-94.
- 19) Li W, Nie S, Yu Q, Xie M (2009) (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem* **57**: 6685-91.
- 20) Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2399-403.
- 21) Monograph (2010) Sulforophane glucosinolate Monograph. *Altern Med Rev* **15**: 352-60.
- 22) Borst P, Jonkers J, Rottenberg S (2007) What makes tumors multidrug resistant? *Cell Cycle* **6**: 2782-7.
- 23) Kockar MC, Naziroglu M, Celik O, Tola HT, Bayram D, Koyu A (2010) N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct* **28**: 673-7.
- 24) Lamson DW, Brignall MS (1999) Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. *Altern Med Rev* **4**: 304-29.
- 25) Schmitt-Graff A, Scheulen ME (1986) Prevention of adriamycin cardiotoxicity by niacin, isocitrate or N-acetyl-cysteine in mice. A morphological study. *Pathol Res Pract* **181**: 168-74.
- 26) Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA (2009) Hesperidin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J Egypt Natl Canc Inst* **21**: 175-84.
- 27) Breitbart E, Lomnitski L, Nyska A, Malik Z, Bergman M, Sofer Y, Haseman JK, Grossman S (2001) Effects of water-soluble antioxidant from spinach, NAO, on doxorubicin-induced heart injury. *Hum Exp Toxicol* **20**: 337-45.
- 28) Demirkaya E, Avci A, Kesik V, Karslioglu Y, Oztas E, Kismet E, Gokcay E, Durak I, Koseoglu V (2009) Cardioprotective roles of aged garlic extract, grape seed proanthocyanidin, and hazelnut on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* **87**: 633-40.
- 29) Hu L, Miao W, Loignon M, Kandouz M, Batist G (2010) Putative chemopreventive molecules can increase Nrf2-regulated cell defense in some human cancer cell lines, resulting in resistance to common cytotoxic therapies. *Cancer Chemother Pharmacol* **66**: 467-74.
- 30) Yusof YA, Saad SM, Makpol S, Shamaan NA, Ngah WZ (2010) Hot water extract of *Chlorella vulgaris* induced DNA damage and apoptosis. *Clinics* **65**: 1371-7.
- 31) Bosanquet AG, Gilby ED (1984) Comparison of the fed and fasting states on the absorption of melphalan in multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* **12**: 183-6.
- 32) Reece PA, Kotasek D, Morris RG, Dale BM, Sage RE (1986) The effect of food on oral melphalan absorption. *Cancer Chemother Pharmacol* **16**: 194-7.
- 33) del Amo EM, Urtti A, Yliperttula M (2008) Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* **35**: 161-74.
- 34) Nakagawa I, Nishi E, Naganuma A, Imura N (1995) Effect of preinduction of metallothionein synthesis on clastogenicity of anticancer drugs in mice. *Mutat Res* **348**: 37-43.



*J Jpn Soc Nutr Food Sci* **64**: 393–401 (2011)

**Original Paper**

Effect of Foods on Antitumor Activity of Doxorubicin, Melphalan and Methotrexate

Shoko Iwamoto,<sup>1</sup> Katsuyoshi Sunaga,<sup>\*,1</sup> Sonoko Harada,<sup>1</sup>  
Atsuko Ohkubo,<sup>1</sup> and Tadashi Tsuda<sup>1</sup>

(Received April 25, 2011; Accepted August 11, 2011)

**Summary:** Recently, with increasing interest in the cancer-preventive effects of complementary and alternative medicine (CAMs) including functional foods and herbs, their use as health foods has been increasing among cancer patients. Although the antitumoral or cytotoxic activities of CAMs have been well examined, little is known about possible interactions between foods used as CAMs and chemotherapeutic agents. Therefore, in the present study, the effects of ethyl acetate extracts of eight foods or herbs commonly used by cancer patients on the antitumor activity of doxorubicin (DOX), melphalan (L-PAM) or methotrexate (MTX), were investigated in the hepatoma cell line HepG2. The reduction of cell number induced by L-PAM was inhibited by citrus unshiu peel, spinach or green tea extracts, and also the reduction in cell number induced by DOX was inhibited by citrus unshiu peel, broccoli or green tea extracts.

**Key words:** anti-cancer drug, apoptosis, HepG2 cells, food-drug interactions, primary cultured hepatocyte

\* Corresponding author (E-mail: ksunaga@josai.ac.jp)

<sup>1</sup> Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, 1-1 Keyakidai, Saitama, Japan