

ホウレンソウ葉カロテノイドがヒト白血病細胞株の分化に及ぼす影響

高木茂明・樋詰和久・木村吉伸・蓑和田潤^{a)}・松尾良信^{a)}

(生物資源開発学講座)

Received June 15, 1992

Effect of Spinach Carotenoids on Differentiation of Some Human Leukemia Cell Lines

Shigeaki TAKAGI, Kazuhisa HIZUME, Yoshinobu KIMURA, Jun MINOWADA^{a)}
and Yoshinobu MATSUO^{a)}

(Department of Bioresources Chemistry)

Differentiation inducing activities of spinach carotenoids on some human leukemia cell lines were studied to establish the appropriate assay method and the suitable cell lines.

Spinach carotene showed a weak differentiation inducing activity on ML-1, ML-2, and HL-60, while lutein, violaxanthin and neoxanthin showed no activity. Spinach carotene and β -carotene lowered the cell viability 80-85%, but the above xanthophylls showed no toxicity. The activity of spinach carotene was increased by making a co-aggregate of the carotene with lutein, indicating the increase of the interaction between the cell and the carotene. Useful assay methods for determining cell differentiation were both NBT reduction and indirect fluorescent antibody testing. The above three cell lines, ML-1, ML-2 and HL-60, were useful for these studies. HL-60 was the most sensitive cell line in experiments using spinach carotene.

緒 言

近年、カロテノイドの腫瘍細胞増殖抑制作用が注目されており^{1,2,3)}、 α -カロテンなどのカロテン類が発癌におけるプロモーション作用を抑制することも明らかにされて来ている。これら生理活性におけるカロテノイドの機能の一部は細胞の分化促進にあると考えられるが、レチノイドによる細胞分化活性はこれまで認められているものの⁴⁾、カロテノイドによる直接の作用活性についての知見は見当たらない。そこで、我々はヒト白血病培養細胞に直接カロテノイドを与えることによって、細胞の分化に及ぼす影響を調べ、さらに細胞分化の指標となる細胞の選抜についても検討した。

材 料 及 び 方 法

ヒト白血病細胞；ヒト骨髓性白血病細胞株のうち、白血球前駆体である骨髓芽球のML-1、ML-2細胞、及び骨髓球のHL-60細胞の3種のcell lineを用いた。

a) 林原塾生物化学研究所藤崎細胞センター (Fujisaki Cell Center Institute of Biochemistry, Hayashibara Co., Ltd.)

培地と培養条件；組織培養フラスコ（Corining #25100）を用いて5%非動化ウシ胎児血清添加 RPMI-1640培地（Table 1）中5% CO₂、37℃の条件下で培養を行い、二日に一度培地交換を行いながら継代培養し、対数増殖期（細胞密度 = 0.5x10⁶から3.0x10⁶ cells/ml）にあるものを使用した。

カロテノイド； α -カロテン、 β -カロテンは市販品（和光純薬）を0.38 mM ジメチルスルフォキシド（DMSO）溶液又はアセトン溶液として供試した。緑葉カロテン画分はホウレンソウ葉のアセトン抽出物をケン化し、その不鹸化画分をエーテル、石油エーテル混液（4：6 v/v）に溶解し、同じ溶媒で平衡にしたアルミナカラムに吸着させた後（2.6x20cmカラム、ICN Alumina N-Super I）、同じ溶媒で溶出させた色素を緑葉カロテン画分とし DNSO、またはアセトン溶液として供試した。ビオラキサンチン及びネオキサンチンはそれぞれエーテル：アセトン比17：3と、1：4で引き続き溶出させた面分をアセトン溶液として使用した。ルテインは既報⁵⁾に従って調製した。

細胞試験培養条件；ヒト白血病細胞株の各細胞培養液（細胞密度 = 0.75x10⁶cells/ml）35 mlから遠心分離（1,000rpm x 5 min）により細胞を集め、RPMI-1640培地に5%ウシ胎児血清を加えた培地48mlに懸濁させたのち、15mlずつ組織培養フラスコに分注し、カロテノイド溶液を加えて5% CO₂下、37℃において所定時間ごとに一定量取り出して細胞生存率の測定、及び細胞分化活性測定に供した。

細胞計数；所定時間培養を行った細胞液200 μ lに0.1%トリパンブルー液200 μ lを加えヘモサイトメーターを用いて生細胞数と全細胞数を顕微鏡下で計数した。

NBT還元法；所定時間培養を行った細胞液200 μ lから遠心分離（1,000rpm x 5 min）により細胞を集め生理食塩水で1回洗浄後0.2% NBT、200mg/ml TPA、40 μ l/ml DMSO、及び10%非動化ウシ胎児血清を含む PRMI-1640培地200 μ lに懸濁し37℃で30 min インキュベートする。ヘモサイトメーターを用いて顕微鏡下で青紫色のホルマザンを沈着した陽性細胞数と全細胞数を計測し（合計200細胞以上）、全細胞数に対する陽性細胞数の%を求め、分化

Table 1 Ingredient composition of RPMI-1640 culture medium

Amino Acids	(mg/L)	Vitamins	(mg/L)	Inorganic Salts	(mg/L)
L-Arginine (free base)	200.0	Biotin	0.2	NaCl	6,000.0
L-Asparagine-H ₂ O	56.8	D-Ca-Pantothenate	0.25	KCl	400.0
L-Aspartic Acid	20.0	Choline Chloride	3.0	Ca (NO ₃) ₂ ·H ₂ O	100.0
L-Cystine	50.0	Folic Acid	1.0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	100.0
L-Glutamic Acid	20.0	i-Inositol	35.0	NaHCO ₃	2,000.0
L-Glutamine	300.0	Nicotinamide	1.0	Na ₂ HPO ₄	800.7
Glycine	10.0	p-Aminobenzoic Acid	1.0		
L-Histidine (free base)	15.0	Pyridoxine-HCL	1.0		
L-Hydroxyproline	20.0	Riboflavin	0.2	Other Components	(mg/L)
L-Isoleucine	50.0	Thiamin-HCl	1.0		
L-Leucine	50.0	Vitamin B ₁₂	0.005	Glucose	2,000.0
L-Lysine-HCl	40.0			Glutathione	1.0
L-Methionine	15.0			Phenol Red	5.0
L-Phenylalanine	15.0				
L-Proline	20.0				
L-Serine	30.0				
L-Threonine	20.0				
L-Tryptophan	5.0				
L-Tyrosine	20.0				
L-Valine	20.0				

誘導率とした。

EA 浮遊液の調製と EA-ロゼット形成法；1,0mlの 5 % ウシ赤血球懸濁液と1,0mlのウサギ抗ウシ赤血球血清を37℃, 30min 感作させたあと生理食塩水に再懸濁させて4℃で保存する(EA-浮遊液)。細胞培養液を1,000rpm x 5 min 遠沈して得たペレットを生理食塩水0.1ml, EA-浮遊液0.1mlを加えて懸濁後室温, 90min 間インキュベートする。その後, 軽く遠沈後(800 rpm x 30min) 沈殿をとってトリパンブルー染色し, 顕微鏡下200個以上の細胞を数えてEA-ロゼット形成を判定する。

間接蛍光抗体法による細胞表層分化抗原の分析法；分化抗原 CD-15に対しては VIM-D5モノクローナル抗体を, MY-8に対しては Anti-MY 8 モノクローナル抗体を一次抗体として使用した。5日間培養後 FITC 標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法により細胞表層上に発現した上記分化抗原をフローサイトメーターにより定量した。分析法の概略は次のとおりである。細胞培養液 (1×10^6 cell) を $15\mu\text{l}$ の生理食塩水に懸濁させて一次抗体 $15\mu\text{l}$ を加えて30min インキュベートする。生理食塩水 $750\mu\text{l}$ を加えて1,000rpm x 5 min遠沈してペレットに $15\mu\text{l}$ の蛍光標識二次抗体 (anti-IgG, anti-IgM) を加えて懸濁後37℃, 30min インキュベートし $750\mu\text{l}$ の生理食塩水を加えた後遠沈 (1,000rpm x 5 min) し, 細胞を $500\mu\text{l}$ の同溶液の懸濁して EPICS Profile Analyzer にかける。細胞表層における分化抗原を持つ細胞数をその蛍光強度による分布として測定する。

結 果

1. ML-2 培養細胞株に対するカロテノイドの分化誘導効果

NBT 還元法によって ML-2 細胞に対するカロテノイドの分化誘導効果を調べた。 $0.9\mu\text{M}$ 緑葉カロテン濃度において2及び3日培養後陽性細胞の割合がブランクの4～5倍となり, 弱い誘導効果が認められた (Table 2)。 β -カロテンは誘導効果を示さなかった。また, 両者における ML-2 の増殖及び生存率曲線はブランクとほぼ同じであり, 細胞への毒性はほとんどみとめられなかった。

Table 2 Differentiation inducing activities^{a)} of spinach carotene on ML-2 with NBT reducing method

Cluture time	Blank	Spinach carotene ^{b)}	β -Carotene ^{b)}
2 day	0.4	1.8	0.5
3	0.2	1.2	0.2

a) Percent of NBT positive cells to total cell namber.

b) $0.9\mu\text{M}$.

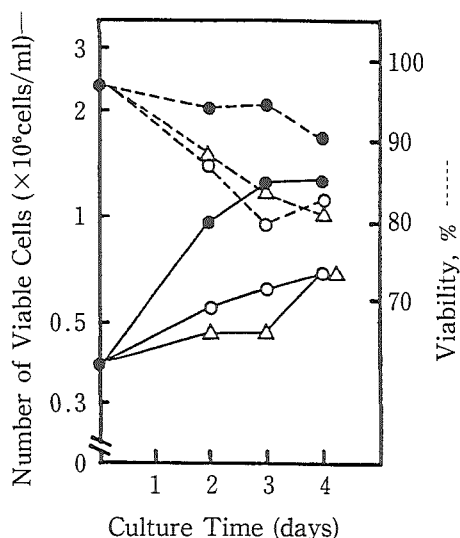
Table 3 Carotenoids bound on ML-1 cell surfaces^{a)}

Carotenoid	Viable cell number (Cells/ml)	Carotenoid bound on cell surface (pmol/cell)
Blank	10.2×10^6	0
α -carotene	10.2×10^6	1.18×10^{-5}
β -carotene	10.4×10^6	0.96×10^{-4}
Violaxanthin	8.5×10^6	1.40×10^{-4}
Neoxanthin	11.2×10^6	0.78×10^{-4}
Lutein	18.0×10^6	4.70×10^{-3}

a) Cultured for 5 days.

Table 4 Differentiation inducing rate of ML-2 cell by spinach carotene-lutein co-aggregate (%)

Culture time (day)	Carotene conc. (μM)					
	0.9			1.8		
	Lutein/carotene (M/M)					
	0	2.5	5.0	0	2.5	5.0
2	0	1.9	0.9	0	2.2	0.5
3	0.3	1.9	2.7	0.3	2.9	2.3
4	0.3	1.9	1.8	0.3	4.1	5.1

**Fig. 1** Proliferation and viability of ML-2 cells incubated with spinach carotene-lutein co-aggregate. Spinach carotene, 1.8 μM . ●, Blank control. Molar ratio of spinach carotene to lutein, ○, 2.5; △, 5.0.

2. 白血病細胞表層とカロテノイドとの相互作用

緑葉カロテンと β -カロテンの白血病細胞株に対する活性が低く、又両者で相異を生じる原因として細胞との相互作用及び緑葉カロテン画分に β -カロテン以外のカロテノイドの混在などが考えられる。そこで α -カロテン、 β -カロテン、ルテイン、ピオラキニン、ネオキサニンを用いて各カロテノイドの細胞への付着取り込み性について調べた。各20ml細胞懸濁液(ML-1)、に各カロテノイド濃度が1 μM になるように加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下5日間培養を行った後、各培養液から8mlとって細胞表層結合カロテノイド定量に、又200 μl を細胞数測定に供した。細胞に付着又は取り込まれたカロテノイドの定量は次のように行った。5日間インキュベートした細胞培養液から遠沈して得た細胞を10mlの生理食塩水で洗浄後、全体をエーテル:石油エーテル(1:1)10mlによって抽出し、分液、溶媒留去、脱水を経てエタノール3mlに溶解して吸収スペクトルを測定した。結果をTable 3に示す。供試カロテノイド中でルテインの付着

取り込み量は他と比較して30~50倍を示しており、カロテン類は細胞と相互作用を行いにくいことがわかる。又、ルテインのときには細胞が橙黄色に着色しているのが肉眼で観察された。さらに、ルテイン区における生細胞数はブランク等とくらべて特に多い。

3. 緑葉カロテン-ルテイン複合体の ML-2 細胞に対する分化誘導効果

Table 2に示したようにカロテン類の結合量はルテインのその約1/50に過ぎないことが明らかになったので、細胞へのカロテノイドの相互作用を増加させるため β -カロテンをルテインとの複合体(Co-aggregate)としてML-2細胞の分化誘導活性を調べた。 β -カロテンに対するルテインのモル比を2.5及び5.0として β -カロテン濃度を0.9 μM 及び1.8 μM で調べた結果、 β -カロテン濃度が高くルテイン量が多い場合にNBT陽性細胞を増し、経時的増大が認められた(Table 4)。1.8 μM -カロテンのとき生存率の低下が観察された(Fig. 1)。

4. 細胞分化誘導評価法の検討

分化誘導の評価法としてここまではNBT還元法を用いているが、緑葉カロテンのML-

2細胞への分化誘導活性は再現性が認められたものの、5%程度と低くNBT還元法がカロテノイドの細胞分化に及ぼす活性を測定するのに必ずしも適当とは言えない。すなわち、NBT還元法では白血病細胞が顆粒球以外の方向への分化誘導を示す場合には活性を見落すこともあると思われる。そこで、他の分化誘導評価法としてEA-ロゼット形成法(FCレセプターの検出)、及び間接蛍光抗体法を用い、それに加えてライト染色による細胞形態変化の顕微鏡観察法を用いて適切な評価法の選定を行った。まず細胞分化誘導物質として知られているレチノイン酸を用いてML-1, ML-2, 及びHL-60に対する活性をNBT還元法で調べると、レチノイン酸による濃度依存性が認められるが、緑葉カロテノイドの活性より少し高い値を与えた。すなわち500 nMレチノイン酸のときML-1, ML-2, HL-60は各5%, 6.5%, 12.3%であった。レチノイン酸のHL-60に対する分化誘導活性は約90%であるとされている⁶⁾が、本実験においては12.3%(5日培養)に過ぎなかった。このことから、本実験においてNBT還元法が必ずしも最適の細胞分化誘導活性判定法とは言えないことがわかる。次に、ロゼット形成法の有用性を調べた(Fig. 2)。EA-ロゼット形成率はML-1細胞に対して経時的かつ濃度依存性が認められ、レチノイン酸の分化誘導活性の評価法としては有効であるように見える。これに対して、ML-2, HL-60にたいしては(1)未処理の細胞ですでに50%程度のFC-レセプターが発現していること、(2)EA-ロゼット形成率の経時の変動のパラツキが大きいことから、本法はレチノイン酸ひいてはカロテノイドによるヒト白血球細胞分化の評価

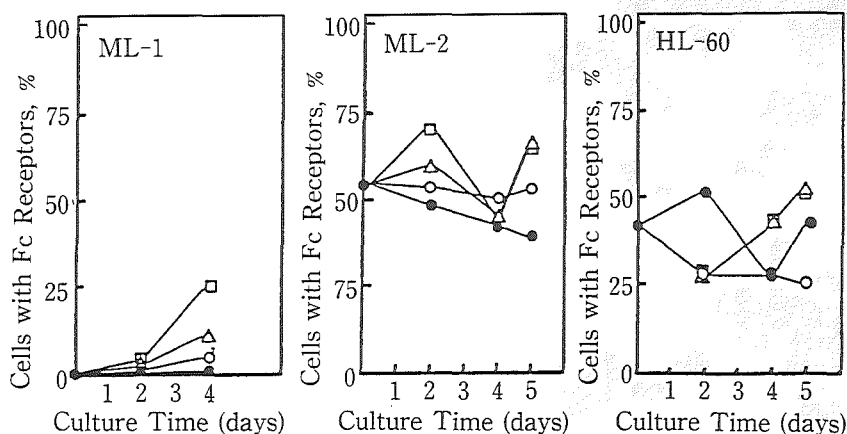


Fig. 2 Differentiation inducing activity of retinoic acid on ML-1, ML-2 and HL-60 with EA-Rosette formation method.
 Retinoic acid : ●, 0 ; ○, 20 nM ; △, 100 nM ; □, 500 nM.

Table 5 Differentiation inducing activity of retinoic acid to ML-1, ML-2 and HL-60 cells by indirect fluorescent antibody testing for CD-15 and MY-8 as differentiation antigen

Antigen Cell line	CD-15			MY-8	
	ML-1	ML-2	HL-60	ML-2	HL-60
Retinoic acid					
0 nM	2.04	2.32	0.65	0.70	0.66
20	3.43	3.59	0.86	0.92	0.93
100	4.10	3.45	1.27	1.26	1.24
500	4.65	3.36	2.68	1.29	1.82

法として適切でないと考えられる。

続いて、間接蛍光抗体法により細胞表層分化抗原の発現誘導活性の判定について検討した。ML-2 の場合 CD-15 と MY-15 両抗原については、レチノイン酸濃度依存的に蛍光強度が増加している (Table 5)。このことから、ML-2 細胞はレチノイン酸により顆粒球方向へ分化することが明らかである。ML-1 についても ML-2 と類似の結果と傾向を示している。また、HL-60 についても同様に CD-15、MY-8 分化抗原の蛍光強度を測定したところ、いずれもレチノイン酸濃度に比例して増加し、顆粒球方向へ分化していることが明らかとなった (Table 5)。これらの結果から、細胞表層分化抗原の発現を検出する方法はレチノイド及びカロテノイド分化誘導活性を検索するのに有用な方法の1つであることがわかった。その場合、HL-60 はとくに有用性が認められる。

次に、ライト染色法を用いて細胞の形態的変化を顕微鏡観察する方法が細胞の分化誘導の定性的評価法として有用であるかどうかを検討した。レチノイン酸 100 nM 及び 500 nM 供試した場合に ML-2 及び HL-60 細胞はいずれも細胞質内に紅紫色の顆粒が多く出現し、さらに核が分葉していることから、これら 2 細胞が共に顆粒球様細胞に明らかに分化しているこ

とが観察された (Fig. 3-A, B)。したがって、本法は分化誘導活性を視覚によって判断するための有用な方法と考えられる。以上の結果から上記の細胞系に共通の評価法としては、間接蛍光抗体法、及びライト染色法が良いことが明らかとなった。レチノイン酸を用いた場合、いずれの方法でも顆粒球方向へ分化していることが示されたにもかかわらず、NBT 還元法での陽性細胞の誘導率が文献⁶⁾と比較して極端に低いことの理由は不明である。

5. 緑葉カロテンの ML-1, ML-2, HL-60 に対する分化誘導活性の検討。

レチノイン酸を用いてヒト白血病細胞株のうちの上記 3 株はいずれも間接蛍光抗体法及びライト染色法による細胞分化指標細胞として有用であることがわかった。そこで、上記の 3 細胞及び 2 方法を用いて緑葉カロテンの分化誘導活性を調べた。

ライト染色においては緑葉カロテンはいずれの供試濃度においても、またどの細胞においても形態的変化を誘起しなかった (Fig. 3, C)。一方、間接蛍光抗体法においては、ML-2、及び HL-60 の両細胞については CD-15 と MY-8 分化抗原はいずれも緑葉カロテン濃度に比例してその発現量が増加している

(Table 6)、すなわち、ML-2 及び HL-60 の CD-15 抗原の発現は緑葉カロテン 1 μ M 供試した場合、1.9-2.3 倍蛍光強度が増加して顆粒球方向へ分化が誘導されることがあきらか

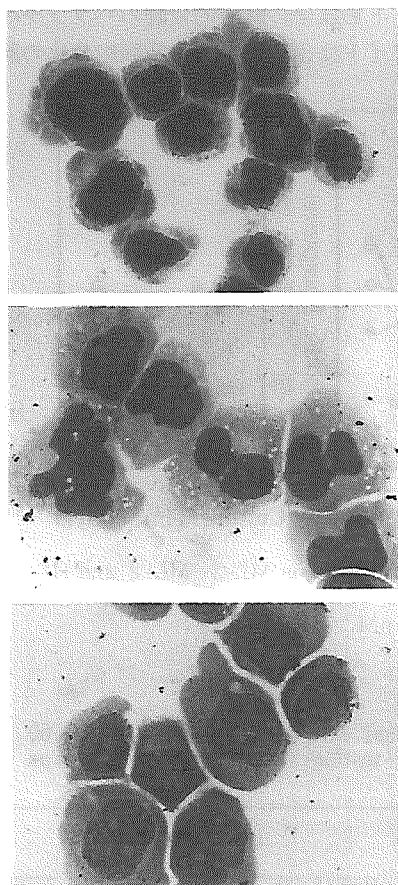
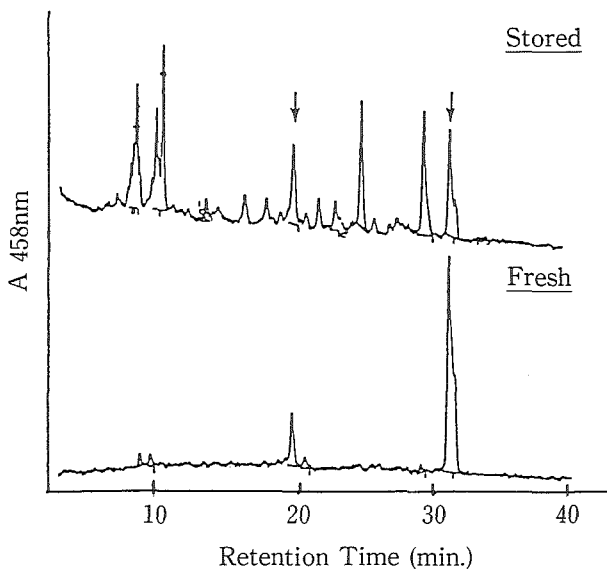


Fig. 3 Photograph of HL-60 cells cultured for 5 days in the presence of retinoic acid or spinach carotene. A, Blank control; B, 500 nM retinoic acid; C, 500 nM spinach carotene.

Table 6 Differentiation inducing activity of spinach carotene to ML-1, ML-2 and HL-60 cell lines by indirect fluorescent antibody testing for both CD-15 and MY-8 as differentiation antigen

Antigen Cell line	CD-15			MY-8	
	ML-1	ML-2	HL-60	ML-2	HL-60
Spinach carotene					
0 nM	1.49	4.46	1.44	1.16	0.73
100	1.97	4.03	1.65	1.48	0.85
500	2.52	5.49	2.61	1.39	1.04
1000	—	8.61	3.38	1.64	1.51


Fig. 4 HPLC chromatogram of spinach carotene freshly prepared or stored for 2 months at -20°C . Column, Capcell Pak C_{18} SG-120 S- $5\mu\text{m}$. Mobile phase; 1) Acetonitrile 2) 1, 2-dichloroethane: 2-propanol (1/2, v/v). Flow rate, 1.0 ml/min. Detection, 458 nm.

となった。この結果をレイノイン酸の活性 (Table 5) と比較すると、緑葉カロテンは ML-2 細胞に対してレチノイン酸以上の誘導活性を有することがわかる。一方 HL-60 では、緑葉カロテンの活性はレチノイン酸より少し低い。したがって、緑葉カロテンはレチノイン酸と比較してやや弱い明らかにヒト白血病細胞株の分化誘導活性を持つことがわかる。また、MY-8 分化抗原の発現についても ML-2 及び HL-60 に対し緑葉カロテンは活性を示しているが、これらの値は、レチノイン酸のときの蛍光強度増加に比べて小さいが (Table 6)、顆粒球方向へ分化誘導している。このとき供試した緑葉カロテン画分はアセトン溶液として -20°C に約 4 ヶ月保

存したものであるが、その吸収スペクトルを調製時と 4 ヶ月後のものについて比較すると、短波長側の吸収が増加しているため、保存期間中にカロテンが変化を受けていることが示唆された。逆相 HPLC により調べると Fig. 4 のように β -カロテンと比較して極性の高い物質が生じており、前記の分化誘導活性が緑葉カロテンによるもとは断定しがたい。この点について再度緑葉カロテン及びキサントフィルを単離して追試したところ、各カロテノイドはいずれも ML-2 及び HL-60 の分化誘導を起こさなかったことから、今後さらに検討が必要である。

考 察

本研究はヒト骨髄性白血病細胞株にたいするホウレンソウ葉カロテノイドの分化誘導活性に関する知見を得ることを目的として行ったものであるが、それと同時にその目的に合った

細胞及び評価法の選択を行ったものである。

細胞には骨髓芽球 (Myeloblast III) の ML-1 と ML-2, 及び前骨髓球 (Promyelocyte) の HL-60 を用いこれら未分化細胞が顆粒球 (Granulocyte) 又は単球 (Monocyte) 方向への分化を測定対象とした。分化誘導活性の assay 法として NBT 還元法, 間接蛍光抗体法が上記3種の細胞に対し, カロテノイドの分化活性の評価としても有用であることがわかった。その他の assay 法 (EA-ロゼット形成法及びライト染色法) はレチノイン酸を供試した場合のみ有用であった。緑葉カロテン画分には β -カロテン, α -カロテン及び少量のキサントフィルが含まれているものを用いたが, いずれの細胞に対しても分化誘導を行っていることが示された。これに対し, β -カロテンは活性を示さなかった (Table 2)。これは脂質である β -カロテンと細胞膜との相互作用が弱いことによるものと考え, 細胞膜に親和性の大きい (Table 3) ルテインと共集合体⁷⁾を作らせて供試すると, β -カロテン単独よりも強い活性を示した (Table 4)。このことは, 明らかに β -カロテンと細胞膜との親和性がルテインを仲介して増大し, 分化活性に影響を与えていることを示すものであり, 緑葉カロテンが活性を示す (Table 2) のは混在するキサントフィル類の補助的効果があったためと考えることが出来る。緑葉カロテノイドを充分精製単離して供試したとき β -カロテン, ビオラキササンチン, ネオキササンチン及びルテインはいずれも分化活性を示していない。しかし, 水溶性分子集合体を形成しやすいルテイン存在下で β -カロテンが活性を示したことは細胞に対するカロテノイドの作用を考えるうえで重要な知見になるものと思われる。また, キサントフィル類はほとんど毒性を示さないことも明らかになった。

これらの細胞分化誘導の方向はいずれも顆粒球にむいており, NBT 還元法及 CD-15, MY-8 に対する間接蛍光抗体法が活性測定に有用であることを明らかにできた。さらに, ここで用いた3種の細胞はいずれも分化誘導活性測定に有用であるが, なかでも HL-60は CD-15 分化抗原と組み合わせることによって, 検討した限りにおいては本目的に最も良い細胞であることがわかった。現在, 動物体内におけるカロテノイド (なかでもヒト, サルなどカロテノイド蓄積動物) の生理的作用については細胞分化, 活性酸素消去剤^{8,9)}, 生殖機能への関与などが挙げられて¹⁰⁾いるが不明の点が多い。本報告の結果は, 近年のガン予防に対する β -カロテンの効果について基礎的データを与えており, 細胞が完全には分化していない細胞株に対するカロテノイドの分化誘導効果を調べるための assay 系の確立と共に, それに使用し得る細胞株を選抜して今後の同様な目的を持った研究の参考に供することのできるものとする。

摘 要

ハウレンソウ緑葉カロテノイドのヒト骨髓性白血病細胞株に対する分化誘導活性を調べると同時に, その目的に合致する活性測定法の選択, 及び細胞株の選択を行った。

ハウレンソウ葉カロテンは ML-1, ML-2 及び HL-60細胞の分化誘導活性を示し, ルテイン, ビオラキササンチン, ネオキササンチンのキサントフィル類は活性を示さなかった。ハウレンソウ葉カロテンは細胞の生存率を80-85%に低下させるが, キサントフィルの毒性は極めて弱い。そのカロテンの分化誘導活性はルテインとの共集合体を作らせることによって増加しており, これはカロテンと細胞との相互作用の増加を示すものである。カロテノイドを用いた場合の分化誘導活性測定法としては NBT 還元法と間接蛍光抗体法が有用であった。試験細胞として上記3細胞株はいずれも有用であるが, なかでも HL-60はハウレンソウ葉カロテンによる分化誘導活性を最も強く受ける。

謝 辞

この研究は、平成元年度から3年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究「生物生産のための細胞選抜と細胞育種」を分担して行ったものである。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Tomita Y., K. Himeno, K. Nomoto, H. Endo, and T. Hirohata : Augmentation of tumor immunity against syngeneic tumors in mice by β -carotene. *J. N. C. I.*, **78**, 679—681 (1987)
- 2) Pung A., J. E. Rundhang, C. N. Yoshizawa and J. S. Bertram : β -carotene and canthaxanthin inhibit chemically and physically induced neoplastic transformation in 10T 1/2 cels. *Carcinogenesis*, **9**, 1533—1539 (1988)
- 3) 西野輔翼, 村越倫明, 高安淳子, 木村 修, 河村恵美子, 酒井敏行, 今西二郎 : 天然カロテンによる神経芽細胞腫 GOTO 細胞の増殖抑制機構. *生化学*, **60**, 638 (1988)
- 4) Thaller C. and G. Eichele : Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature*, 327 625—628 (1987)
- 5) 高木茂明 : ホウレンソウ葉から Lutein の結晶単離について. *岡山大学農学報*, **44**, 44—46 (1974)
- 6) Breitman T. R., S. E. Selonick and S. T. Collins : Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL—60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**, 2936—2940 (1980)
- 7) 高木茂明, 井藤隆之, 中島明夫, 木村吉伸, 竹田邦雄 : 遊離型胆液酸によって水系に分散されたルテインの分光学的挙動と形態. *農化誌*, 投稿中
- 8) Foote C. S., Y. C. Chang and R. W. Denny : Carotenoid quenching of singlet oxygen parallels biological protection. *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 5216—5218 (1970)
- 9) Fiala E. S., S. R. Bandara and J. H. Weisberger : Naturally occuring anticarcinogenic substances in foodstuffs. *Ann. Rev. Nutr.*, **5**, 295—321 (1985)
- 10) 末木一夫 : カロテノイド (β -カロテンの代謝と生理活性を中接に). *油化学*, **40**, 121—127 (1991)