

バナジウム水の肉腫細胞 (S-180) 移植マウスにおける 肉腫形成抑制作用並びにヒト子宮頸部癌由来培養 HeLa S-3 細胞増殖抑制・細胞障害作用

渡 邊 隆 司・山 下 沙 織・渡 邊 賢太郎

バナジウム水は、肉腫 (S-180) 担癌マウスに対して著しい抗腫瘍 (肉腫形成抑制) 作用およびヒト子宮頸部由来癌細胞 (HeLa S-3) 増殖抑制・細胞障害作用を示した。また、有効濃度におけるバナジウム水の正常個体および正常培養細胞における亜急性・急性毒性作用は殆ど認められなかった。一方、バナジウム水による宿主免疫系機能〔抗酸化作用、リンパ球数・多形核白血球数比 (L/P) 活性増強作用〕の特異的賦活化作用はみられなかった。以上の結果から、バナジウム水の担癌マウスおよびヒト培養癌細胞に対する抗腫瘍作用並びに癌細胞増殖抑制・細胞障害作用は、本物質の癌抑制免疫系の機能増強促進作用に起因することよりも、むしろ癌細胞膜レベルで何らかの変化・変異が生じたことに基づいているであろうことが示唆された。

キーワード：バナジウム水、ヒト子宮頸部癌由来細胞障害作用、肉腫形成抑制作用、
癌細胞膜機能障害

【緒 言】

南北アメリカ大陸のインディオ達は、山岳地帯、砂漠地帯あるいは多雨多湿地帯に自生する種々の天然植物や天然物質の中で、様々な疾患に対して薬効を示す天然素材を見出し、民間療養薬用植物類として何世紀にも亘って伝承し続け、現在に至っていることは周知のところである。一方、各種癌に対する予防や治療に用いられている薬用植物類は豊富であり、これら天然素材の抗腫瘍効果の生理学的・薬理学的あるいは生化学的メカニズムが詳細に解明され、医療用として用いられている薬用天然物としては、プロポリス、アガリスク、パフィア、ガラナあるいはキャツクロウなどが有名であり、これらに関する学術論文も多数報告されている。

ところで、このような天然素材の生理学的・薬理学的効果から、視点を置き換えて、ヒトの生体内では生合成が不可能で且つ生命維持に不可欠な 2 種の微量栄養素 (ビタミン類、ミネラル類=無機質類) の中で、ミネラル類の抗腫瘍効果作用の有無について着眼した。ミネラル類では、一般的によく知られている物質、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、鉄分、亜鉛、マグネシウム、リンなどが挙げられるが、あまり知られていないミネラル類で、しかも天然物質や自然水に微量に含まれているミネラルの抗腫瘍効果作用についての研究を試みた。中でも、バナジウムは、マッシュルーム、黒コショウ、パセリ、あるいはエビ・カニなどの甲殻類に微量に含まれているものの、その存在と栄養学的な面であり知られていないのが現状である¹⁾。

近年になって、バナジウムの生理学的・薬理学的作用が注目され、特に生活習慣病に関与するアドレナリン様作用^{2, 3)}、血糖降下促進作用^{4, 5)}、脂肪細胞からの中性脂肪除去・遊離促進作用^{6, 7)}あるいは肥満予防作用^{8, 9)}などを有することが報告されようになった。これに対して、生活習慣病の範疇に組み入れられている癌に対するバナジウムの抗腫瘍効果作用についての詳細な報告は今のところみられない。

そこで、ミネラル類の中で、特にバナジウムを研究材料として用い、本物質のマウス肉腫(Sarcoma-180)並びにヒト子宮頸部癌由来培養癌細胞(HeLa S-3)に対する抗腫瘍効果作用について、in vivo系およびin vitro系の実験システムで検討すると共に、バナジウムは、ごく微量ながら飲料水にも含まれていることから、個体レベルおよび細胞レベルにおける亜急性・急性毒性作用の有無についても併せて検討した。

【材料と方法】

1. 被検バナジウム液および供試動物

バナジウム液(92 μ g/ml)は、エビス高原クリニック・先端医療(研)より、分与されたものを実験に供試した。試料用バナジウム水は、蒸留水にて調整した。供試動物は、ICR雄マウス(5週齢)を日本クレア社より購入し、実験に用いた。

2. 供試癌細胞

①Sarcoma-180固形癌細胞は、ICR雄マウス鼠径部皮下移植法で継代した細胞と②関東化学社より購入したヒト子宮頸部癌由来癌細胞株(HeLa S-3)を、増殖用培養液にて継代培養した細胞を用いた。

3. マウス腹腔内浸出細胞の採取法

ICR雄マウス腹腔内に10%胎児牛血清(FBS)添加イーグルMEM培養液5 mlを注射器にて注入し十分に揉みほぐした後、同注射器で回収した腹腔内浸出液中の細胞群を亜急性・急性毒性試験に用いた。

4. バナジウム水のSarcoma-180固形癌に対する抗腫瘍作用

Sarcoma-180細胞浮遊液(2×10^7 コ/ml)の0.05ml(1×10^6 コ/マウス)をICR雄マウス(各群:10匹宛)の右鼠径部に皮下移植した。移植後1日目から34日間(計35日間=5週間)に亘って、被検試料であるバナジウム水0.5 ml(92 μ g/mlおよび184 μ g/ml)を1日に1回連日経口投与した(46 μ g/マウス、92 μ g/マウス)。なお、対照群には、蒸留水0.5 mlを実験群と同様の条件下で経口投与した。①移植後1週間目毎に5週間に亘って肥大化した肉腫の短径と長径をノギスにて計測し、面積(mm²)を求めた。②移植後、5週目に肥大化した肉腫を外科的に摘出し重量を計測した。③腫瘍形成抑制率は、次式から算定した。抑制率(%) = $(Cw - Tw) / Cw \times 100$ (Cw = 対照群の平均腫瘍重量、Tw = 実験群の平均腫瘍重量)

5. バナジウム水の末梢血リンパ球/多形核白血球比 (L/P活性) に対する作用

実験は、常法に従っておこなった。即ち、ICR雄マウスの同腹の新生仔マウスを2群に分け、対照群には生理食塩水を腹腔内投与(0.02 ml/マウス)、実験群にはバナジウム水(0.92 μ g/0.02 ml/マウス、1.84 μ g/0.02 ml/マウス)腹腔内投与した。投与直前(対照群)、投与後、6、10および14日に尾静脈から採血し、静脈血の塗抹標本を作製し、ライト染色した後、顕微鏡下で100コの血球当りのリンパ球数(L)と多形核白血球数(P)の比(L/P比)を求めた。

6. バナジウム水の抗酸化作用(一重項活性酸素消去能)

ICR雄マウス(各群=6)にバナジウム水0.5 ml(92 μ g/mlおよび184 μ g/ml)を1日に1回連日経口投与した(46 μ g/マウス、92 μ g/マウス)。なお、対照群には蒸留水0.5 mlを実験群と同様の条件下で経口投与した。投与開始後15日目のマウスにペントバルビタールナトリウム麻酔剤0.3ml(0.1ml/ml)を接種後、心採血し、フリーラジカル自動分析装置FRAS4(株ウイスマー)を用いて抗酸化能をBAP法にて測定した。なお、BAP測定法の原理は次の通りである。[BAP Test法] 3価鉄塩FeCl₃は特定のチオシアン酸塩誘導物を含む無色の溶液に溶解するとFe³⁺イオンの機能として赤色を呈し、血漿を添加すると血漿中の抗酸化物質の作用により、Fe²⁺イオンに還元され脱色される。この変化を光度計で測定し血漿の抗酸化力を評価する。

7. バナジウム水のヒト子宮頸部癌由来培養癌細胞(HeLa S-3)に対する増殖抑制および細胞障害作用

10%胎児牛血清(FBS)添加イーグルMEM培養液(栄研化学社)に、ヒト由来HeLa S-3細胞(3 x 10⁵コ/ml)を浮遊させ、この細胞浮遊液の各2 mlをプラスチックマイクロプレート(6ウェル、径:30 mm)に添加(6 x 10⁵コ/ウェル)した後、5% CO₂ インキュベーター(37℃)にて培養した。3時間培養後、ウェル内をリン酸生食緩衝液(PBS)で2回洗浄し、さらに各濃度含有バナジウム(5.75 μ g/ml、23.0 μ g/mlおよび64.0 μ g/ml MEM)添加10% FBS・イーグルMEM培養液の4 mlを各々のウェルに加え、7日間培養を続けた(最終バナジウム水:23 μ g/ウェル、92 μ g/ウェル、368 μ g/ウェル)。培養直後(3時間後)、培養後3、5および7日目に実験群(n=3)および対照群(n=3)のウェル表面に増殖した細胞を0.2% エチレンジアミン-4酢酸(EDTA)液にて剥離した後、PBSに再浮遊させ細胞数を顕微鏡下にて算定した。一方、7日間培養細胞の①増殖状態と②細胞形態を観察するためにウェルをメタノール固定・ギムザ染色した後、対照群および実験群の細胞群を写真撮影した。

8. バナジウム水の亜急性・急性毒性試験

1) in vivo系における正常マウスに対する毒性試験

ICR雄マウス(5週齢)を平均体重がほぼ同じになるように対照群とバナジウム摂取群(実験群)になるように分配した(10匹/各群)。なお、対照群は蒸留水を、バナジウム水摂取群はバナジウム水(92 μ g/ml)を、各々吸水瓶に入れ9週間に亘って自由摂取させ、1週間毎に体重を測定した。

2) in vitro 系における正常マウス腹腔内浸出培養細胞に対する毒性試験

ICR雄マウス腹腔内に10% FBSイーグルMEM培養液 5 mlを注入し、実験方法 (3) に準じて腹部を十分に採みほぐした後、再び注入培養液を採取した。採取した腹腔浸出液を遠心 (500 rpm、5 分間) し、沈殿細胞層に10% FBSイーグルMEM液を加え、この細胞浮遊液 2 ml (1.0×10^6 コ/ml) をプラスチックマイクロプレート (6 ウエル、径30mm) に添加した後 (2.0×10^6 コ/ml)、30分間インキュベーターにて保温した。その後、各濃度含有バナジウム・10% FBSイーグルMEM液 2 ml ($46 \mu\text{g/ml}$ 、 $92 \mu\text{g/ml}$) をウエルに添加し、さらに3時間保温した (最終バナジウム水： $92 \mu\text{g/ウエル}$ 、 $184 \mu\text{g/ウエル}$)。リンパ球にはプレート表面への付着能がないために、培養液を静かにアスピレーターにて吸引し、その後メタノール固定・ギムザ染色したウエル上の細胞数を顕微鏡下で算定すると共に写真撮影した。

【結 果】

1. バナジウム水のマウス由来Sarcoma-180固形癌移植マウスに対する抗腫瘍作用

1) Sarcoma-180細胞のマウス皮下移植後における腫瘍面積の経時的推移

ICR雄マウス ($n=10$) の右鼠径部皮下に供試肉腫細胞 (1×10^6 コ/マウス) を移植し、移植後1日目から5週間に亘り、バナジウム水 ($46 \mu\text{g}$ あるいは $92 \mu\text{g}/0.5 \text{ ml/マウス}$) を連日経口投与した (1 回/日)。その結果、図1に示すように、バナジウム水 $46 \mu\text{g}$ 投与群での肥大化肉腫面積増加推移パターンは、対照群におけるそれに比べて、多少とも腫瘍面積の増加抑制作用がみられたものの有意性は認められなかった。これに対して、バナジウム水 $92 \mu\text{g}$ 投与群では、投与後5週目に著しい有意性が得られた ($p < 0.05$)。

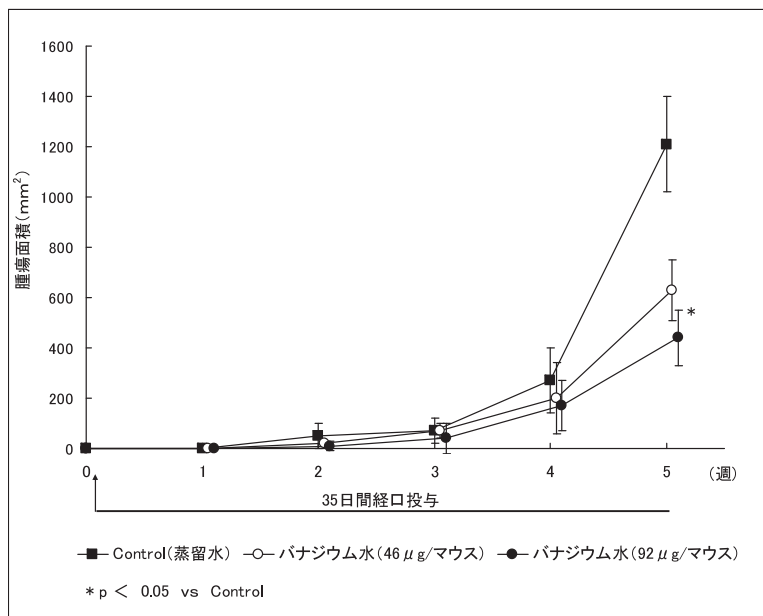


図1 Sarcoma-180細胞のマウス皮下移植後における腫瘍面積の経時的推移

2) Sarcoma-180細胞の皮下移植後5週目における摘出肉腫重量および肉腫形成抑制率

S-180肉腫細胞の皮下移植後、5週目に肥大化した肉腫を摘出し、その重量を計測したところ、図2に示すように、対照群 (n=8、実験中2匹死亡) における肉腫の平均重量は、

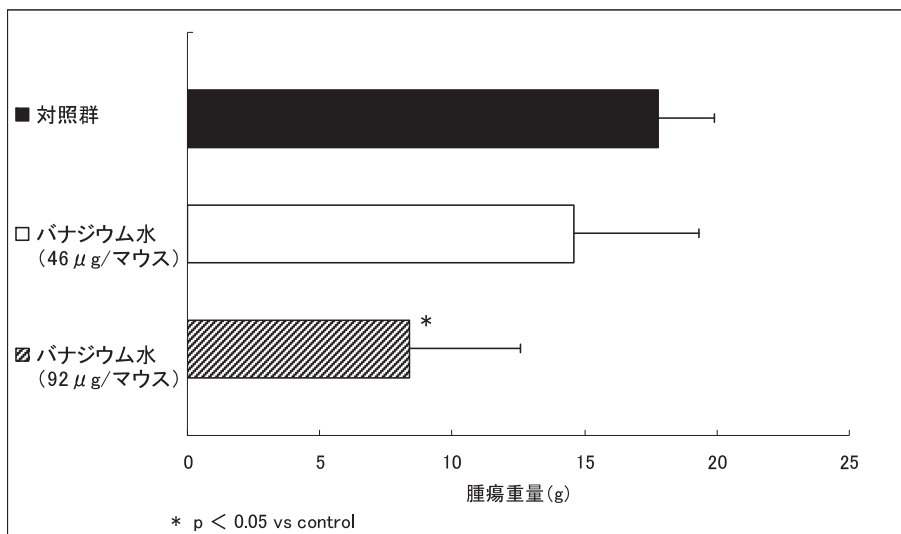
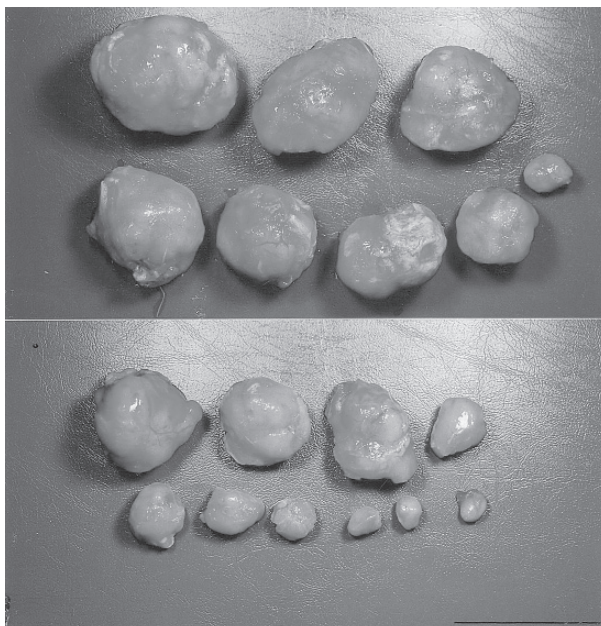


図2 Sarcoma-180 細胞の皮下移植後5週目における摘出肉腫重量

経口投与後5週目におけるザルコーマS-180の摘出像



上段：対照群（蒸留水） 下段：バナジウム水（92 μg/ml） Bar：20mm

17.8±2.1 gであったのに対してバナジウム水 (46 μ g/マウス) 投与群 (n=10) での平均肉腫重量は14.6±4.7 gであり、多少とも低い値であったものの有意差はみられなかった。これに対して、バナジウム水92 μ g/マウス投与群 (n=10) の平均肉腫重量は、8.4±4.2 gであり有意差が認められた ($p < 0.05$)。また、5週目に摘出した対照群および実験群の肉腫の写真像においても、対照群と92 μ g投与群間との肉腫の大きさに、肉眼的にも極めて顕著な差が確認された(肉腫写真像：参照)。一方、バナジウム水の46 μ g/マウス投与群および92 μ g/マウス投与群の投与後5週目における肉腫形成の抑制率は、20.3%および50.8% ($p < 0.05$) であり、肉腫重量のそれらと一致した結果が得られた (図表、省略)。

2. バナジウム水のL/P 活性増加作用

図3に示すように、バナジウム水0.92および1.84 μ g/マウス投与群それぞれのL/P比は投与後6、10、14日目といずれの群においても対照群のそれよりも高い値を示したが、実験期間中有意性は認められなかった。

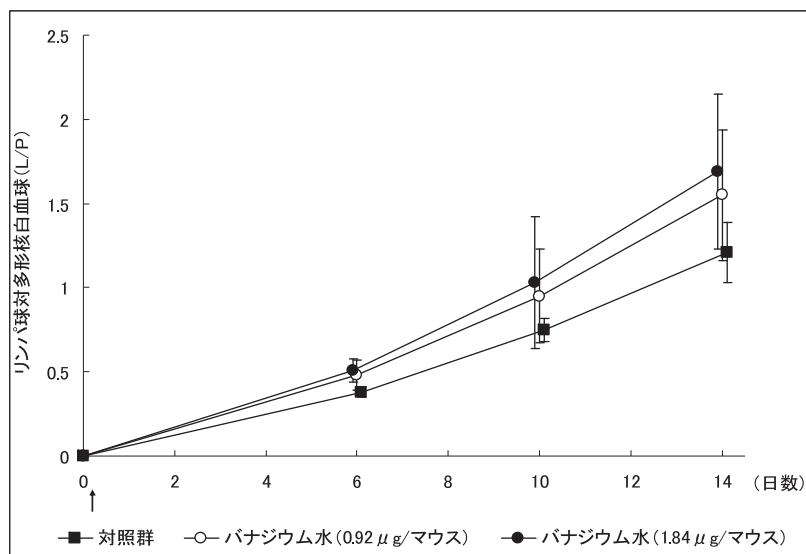


図3 バナジウム水のリンパ球対多形核白血球比 (L/P 活性)

3. バナジウム水の抗酸化作用 (一重項活性酸素消去能)

BAP測定法を用いて抗酸化能を測定したところ、対照群が2446±179 μ mol/Lであったのに対して、バナジウム水46 μ g/マウス投与群は2615±201 μ mol/L、バナジウム水92 μ g/マウス投与群では2575±121 μ mol/Lとなり、対照群と比較して多少とも抗酸化能の上昇がみられたが有意性は認められなかった (図4参照)。

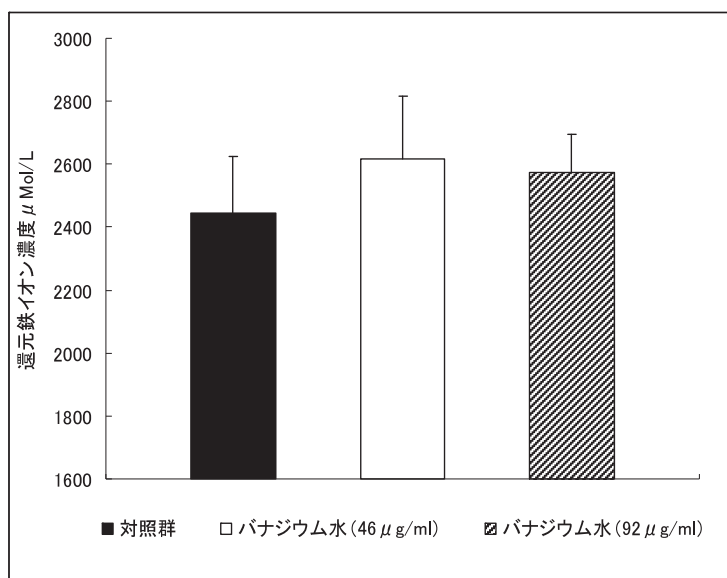


図4 バナジウム水の抗酸化作用

4. バナジウム水のヒト子宮頸部癌由来HeLa S-3培養細胞に対する細胞増殖抑制および細胞障害作用

図5に示すように、バナジウム水(23 μg/ウエル)でHeLa S-3培養細胞を処理した場合の細胞増殖推移のパターンは、対照群のそれと比較して、多少とも低い値で推移したが、著しい増殖抑制作用は認められなかった。これに対して、92 μgのバナジウム水処理群において、培養3日目以降の細胞増殖傾向は認められず、5日目以降では極めて高い有意性のある増殖抑制作用がみられた(5日目: $p < 0.05$, 7日目: $p < 0.01$)。一方、368 μgバナジウム水処理群においては、HeLa S-3癌細胞に対する細胞障害作用は、さらに顕著となり、細胞数の著しい減少パターンを示した(5日目以降: $p < 0.01$)。なお、培養7日目の細胞写真像を観察した場合、下の写真に示すように、対照群の細胞数および細胞形態と比較して、23 μgバナジウム水処理群では細胞形態変化は認められず、細胞分裂像や細胞質からの偽足の良好な伸延、さらには核小体も鮮明に観察された。これに対して、HeLa S-3細胞を92 μgおよび368 μgのバナジウムで処理した場合、細胞数の著しい減少とそれに伴う細胞の壊死、核質部の崩壊、裸核細胞や細胞質・偽足の萎縮が殆んどどの細胞にみられ、図5のデータと一致した細胞像が肉眼的にも観察された(細胞写真像: 参照)。

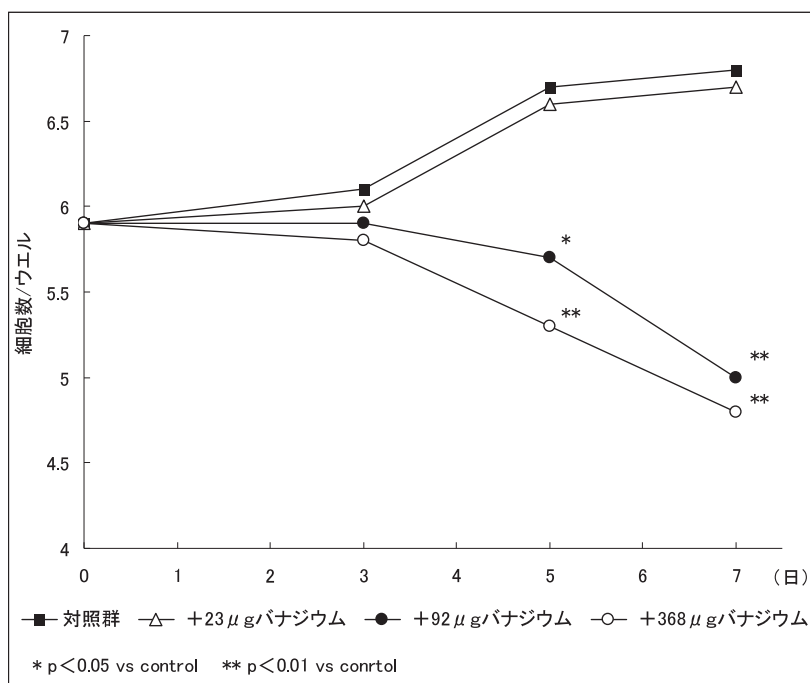
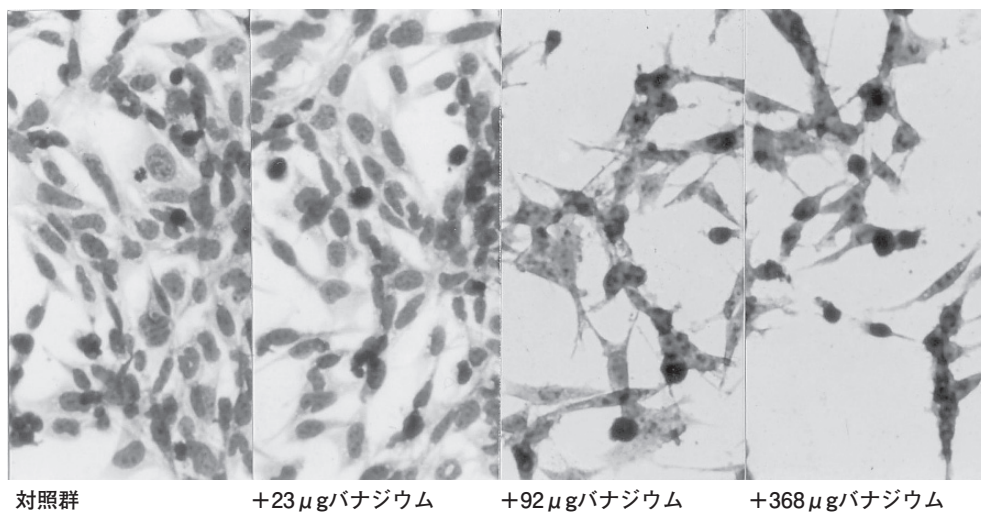


図 5 HeLa S-3 培養細胞の経時的増殖推移

培養後7日目のヒト子宮頸部癌由来HeLa S-3細胞像



5. バジウム水の亜急性・急性毒性試験

1) 正常マウス固体レベルでの毒性

図 6 に示すように、対照群および実験群における正常マウスの体重は、実験開始から 2 週間までは同様の傾向で増加し、3 週目からバナジウム水摂取群の平均体重が対照群のそれよりも

多少とも増加したものの、その後9週目までは対照群の平均体重がバナジウム水摂取群のそれと大差なく、2群間における体重の有意差は認められなかった。

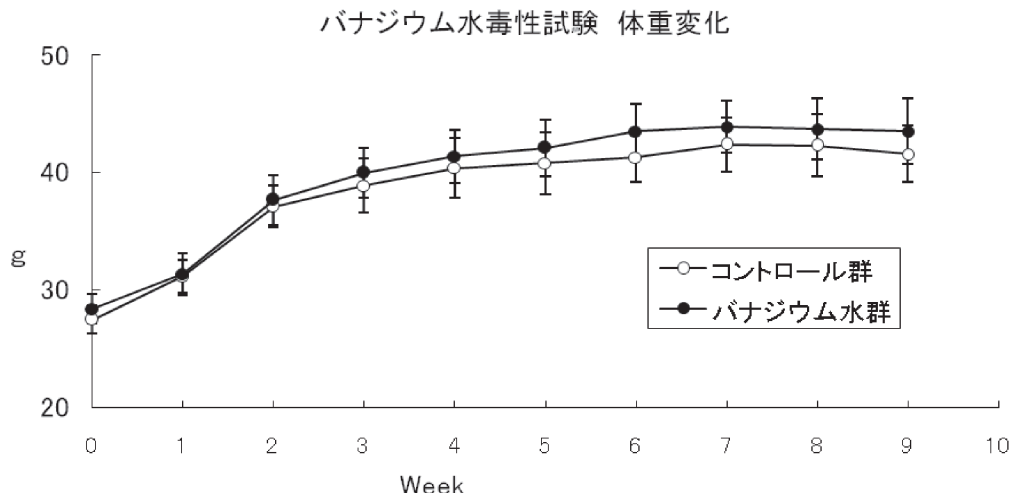


図6 バナジウム水投与におけるマウス体重の経時的推移

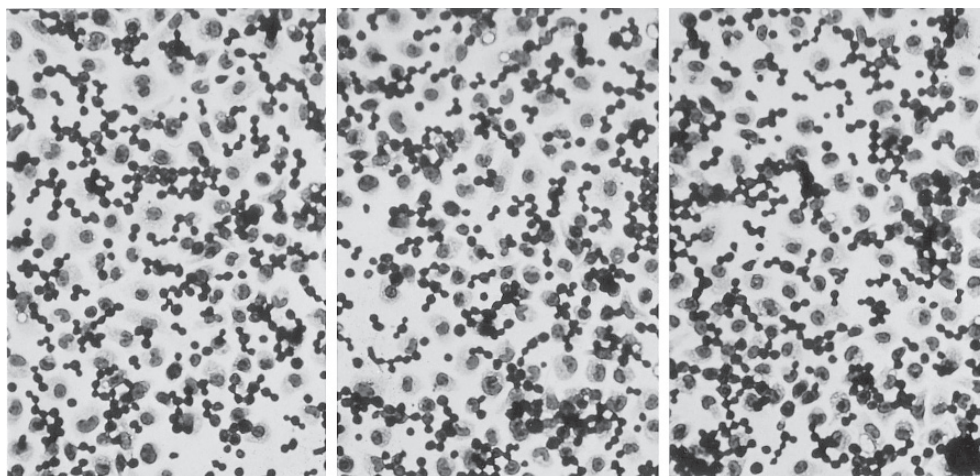
2) 正常マウス由来細胞レベルでの毒性

正常ICR雄マウス腹腔内浸出培養細胞群に対するバナジウム水(92 μ g/ウエル、184 μ g/ウエル)の毒性の有無について調べたところ、表1に示すように、対照群の総細胞数(約 2.6×10^6 コ/ウエル)と比較して、殆んど大差なく $2.0 \sim 2.2 \times 10^6$ コ/ウエルのレベルであった。また、この表の下段に示すようにバナジウム処理群におけるリンパ球様細胞と貪食細胞様細胞(マクロファージ様)の比率は、53～54%対46～47%であり、対照群のそれら(約57%/43%)とほぼ同様の値であったことから、正常細胞レベルでのバナジウムの亜急性・急性毒性は認められなかった。一方、腹腔内浸出細胞群の細胞像を肉眼的に観察したところ、下の写真に示すように、保温3時間後の対照群とバナジウム処理2群間での総細胞数の差は殆んどみられず、マクロファージ様細胞の細胞質の拡がりや紡錘形の形態変化も認められなかった。

表1 正常ICRマウス腹腔内浸出培養細胞数および細胞分類

n=3	摂取バナジウム濃度 (μ g/ウエル)		
	0	92	184
総細胞数/ウエル	$2.6 \pm 0.7 \times 10^6$	$2.2 \pm 0.5 \times 10^6$	$2.0 \pm 1.0 \times 10^6$
リンパ球様細胞 (%)	56.8 ± 5.2	54.3 ± 3.4	52.9 ± 4.8
貪食細胞様細胞 (%)	43.2 ± 2.9	45.7 ± 4.7	47.1 ± 2.6

正常ICR系マウス腹腔内浸出培養細胞群の細胞像



対照群

＋92 μ gバナジウム

＋184 μ gバナジウム

【考 察】

バナジウム (vanadium ; V) は、元素の中で23番目 (原子番号23) の重金属で、バナジウムの由来は、スカンジナビア神話の中の女神「バナス」から命名されたものである。バナジウムは火山岩 (特に火成岩) の玄武岩 (バサルト層に分布) に多量に含まれており、その結果、火山山麓の地下水脈にも他のミネラルと同様に含まれており、火山山麓の地下水脈から湧き出している伏流水は、100 ml当り 8 ～ 10 μ g のバナジウムを含有していることがすでに知られている¹⁾。一方、バナジウムは、植物、海洋生物、海水および土壌などに広く分布しており¹⁰⁾、ヒトの場合は食物や飲料水から、10 ～ 60 μ g のバナジウムを自然な形で摂取しているのもので、体内には常に微量に存在していることも報告されている¹⁾。しかし、ヒトに対するバナジウムの明確な栄養学的必須性は、今なお不明である。最近になって、各種生活習慣病に対するバナジウムの血糖低下促進作用^{4, 5)}、高脂血症抑制作用^{6, 7)}、肥満予防効果^{8, 9)}あるいはアドレナリン様作用^{2, 3)}などに関する研究が盛んにおこなわれている。他方、生活習慣病のひとつでもある癌に対するバナジウムの系統的な抗腫瘍作用の有無に関する詳細な研究報告は、現在までのところみられない。

そこで、今回バナジウム水の抗腫瘍効果作用の有無について、まずin vivoの系での検討をおこなったところ、マウス由来Sarcoma-180肉腫細胞を鼠径部皮下に移植した担癌マウスに対して、マウス当り92 μ g のバナジウム水を5週間に亘って連日経口投与したところ、有意性のある肉腫形成抑制効果が認められた (図1、図2および肉腫写真像：参照)。一方、in vitro系において、92 μ g バナジウム水でヒト子宮頸部癌由来の培養癌細胞 (HeLa S-3) を処理したところ、HeLa S-3細胞に対して、著しい増殖抑制・細胞障害作用を示すことも確認された (図5および培養細胞写真像：参照)。このように、バナジウム水は、強い抗腫瘍効果および癌細胞増殖抑制作用を示すことが証明された。効能を示したバナジウム量 (92 μ g) を体重 1 kg 当りに

換算した場合、約 3 mg/kg となり、50 ～ 60 kgのヒトに対しては、連日150 ～ 180 mgのバナジウム水を投与したことになる。この投与量は、一般の医薬品剤などと比較しても決して多くはないものの、連日35日間に亘っての投与に対するバナジウム水の亜急性あるいは急性毒性の発現の可能性も懸念されたので、この範囲のバナジウム水投与量での①固体レベルおよび②培養正常細胞レベルにおけるバナジウム水の毒性作用の発現の有無について調べたところ、これらレベルでの毒性作用は殆んど認められなかったことから（図7、表1および細胞写真像:参照）、バナジウムは、肉腫癌に対する発癌予防効果作用を有するであろうことが立証された。

このバナジウム水のマウス由来Sarcoma-180肉腫癌に対する効果作用が、どのようなメカニズムに基づくものであるのかについての推論を述べる。まず、考えられることは、抗腫瘍免疫機能の亢進である。そこでバナジウム水L/P活性化促進作用（図3：参照）と抗酸化促進作用（図4：参照）について調べたところ、バナジウム処理群でのL/P活性あるいは抗酸化促進作用は、対照群のそれらと比較して多少とも差がみとめられたものの、有意性のある結果は得られなかった。これら結果から、*in vivo*系におけるバナジウム水の肉腫形成抑制作用は、バナジウムそのものが免疫システム機能を賦活化し、間接的に肉腫の肥大化を抑制したのではなく、マウス当たり100万個の肉腫細胞（HeLa S-3）が移植された直後からバナジウムによって直接的に傷害・破壊されたであろうことが推察された。次に、バナジウム水の腫瘍細胞（Sarcoma-180細胞およびHeLa S-3細胞）への直接的な障害作用の可能性について詳しく述べる。高濃度のミネラルは、培養癌細胞内の浸透圧維持や細胞内の水分平衡調節機構維持に影響を与えると共に、癌化細胞や突然変異細胞の細胞膜表面は本来正常細胞膜表面と比較して酸性側に傾いているが、高濃度のミネラル処理によって癌細胞の酸・塩基平衡維持機能のバランスが崩れることにより、細胞膜表面が塩基性化し、その結果細胞壊死が生じる報告がある^{9, 10)}。他方、バナジウム水は、ATP分解酵素を活性化させることから^{3, 7, 11)}、癌細胞が分裂・増殖するために最も必要とするATPエネルギーの供給に何らかの支障をきたすことによる自己崩壊の誘発がさらに促進された可能性が極めて大であろう。

今回の*in vitro*系での実験におけるバナジウム水処理後の培養 HeLa S-3 細胞の細胞像を詳しく観察したところ、細胞の核膜と細胞質の境界が極めて不鮮明であったことから核膜に異常が生じており、同時に細胞質そのものの萎縮も顕著であった。特に注目される病理学的所見では、裸核状態の細胞像が多数認められ、細胞体の萎縮・崩壊が著しかったことである（図5、細胞写真像：参照）。このように、本研究の実験結果を踏まえて、このふたつの推論を勘案した場合、バナジウム水の供試2種類の肉腫細胞に対する癌形成抑制作用あるいは癌細胞増殖抑制作用の発現は、免疫機能の活性化・亢進作用に基づくものであるというよりは、むしろバナジウム水のこれら癌細胞への直接的な障害作用、特に癌細胞膜への直接的作用に起因するものであろうことが強く示唆された。今後、バナジウム水の癌細胞膜に対する傷害作用機序並びに悪性度の高い癌腫、特に腺癌細胞に対してバナジウムの抗腫瘍効果についての検討をおこなうと共に、大量のバナジウム投与による血液学的検査、肝機能検査や腎機能検査も併せて進めたい。

【結語】

バナジウム水 ($92 \mu\text{g}/\text{マウス}$) は、*in vivo*系でのマウス由来Sarcoma-180細胞 (10^6 コ/マウス) 移植に対して強い肉腫形成抑制作用を示し、また*in vitro*系でのヒト子宮頸部癌由来 HeLa-S3 癌細胞に対しても ($92 \mu\text{g}/10^5$ コ培養細胞/ウエル)、強い細胞増殖抑制作用を示した。一方、実験に用いた濃度でのバナジウム水は、正常個体レベルおよび正常細胞レベルでの亜急性・急性毒性を誘発しなかった。以上の結果を総括すると、バナジウム水の供試2種の癌細胞に対する抗腫瘍効果作用は、癌細胞への直接的な細胞障害作用に基づくものであろうことが強く示唆された。

【主要文献】

- 1) Ueki, H. New biological actions of vanadium (Reviews), Jpn. Pharmaceutical Sci., 633-646, 2003.
- 2) Sun, G., Sekar, N., Gershov, E. and Fridkin, M. Vanadate restores glucose-6-phosphate in diabetic rats. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279: 403-410, 2000.
- 3) Okamatsu, Y., Uozumi, A. and Kimura, K. Uncoupling protein 1 contributes to fat reducing effect of leptin. 233-341, 2007.
- 4) Shechter, Y. Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implication for future treatment of diabetes. Diabetes, 39: 1-5, 1990.
- 5) Cusi, K., Cukier, S., Torres, M. and Redondo, J.C. Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 1410-1419, 2001.
- 6) Sekar, N., Li, J., Gefel, D. and Scheter, Y. Independent signal-transduction of glycogenesis in rat adipocytes. Endocrinol. 140: 1125-1133, 2004.
- 7) Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T. and Ui, M. Essential role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. J. Biol. Chem. 269: 3568-3573, 1994.
- 8) Shisheva, A., and Shechter Y. Vanadate selectively inhibits receptor function in rat adipocytes. Biochemistry, 31: 8059-8063, 1992.
- 9) Elberg, G., He, Z. and Sekar, N. Vanadate activates membranous nonreceptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. Diabetes, 46: 1684-1690, 1997.
- 10) 渡邊 隆司、大槻 誠。海洋由来ミネラル結晶製剤の *in vitro/in vivo* 系における癌細胞細胞傷害作用並びに移植癌細胞増殖抑制作用。日本臨床免疫学会誌、28巻 (4号増刊号)、308-308、2005。
- 11) Dubyak, G.R. and Klein zeller, A. The insulin-mimetic effects of vanadate as a ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase inhibitor. J. Biol. Chem. 255: 5306-5312, 1990.

共同執筆の分担について

渡邊隆司 (四天王寺大学) : 実験構築と論文作成

山下沙織 (ニプロファーマ(株) 研究開発) : 実験

渡邊賢太郎 (東京大学理学部関連基礎科学) : 実験