

저분자 polymannuronate의 인체 대장암세포 증식 및 DNA 합성 저해 효과

김인혜 · 남택정*

부경대학교 식품생명공학부

Received September 2, 2005 / Accepted November 8, 2005

Inhibitory Effect of Low-molecularized Polymannuronate on Proliferation and DNA Synthesis of Human Colon Cancer Cells. In-Hye Kim and Taek-Jeong Nam*. *Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea* – This study investigated the proliferation and DNA synthesis inhibitory effect of concentrations (0.01%, 0.1%, 0.25%, 0.5%) when added whole molecular-, 40 kDa-, or 10 kDa polymannuronate on human colon cancer cells, HT-29, DLD-1, and WiDr, *in vitro*. In order to determine the proliferation inhibitory effect of low-molecularized polymannuronate, the treatment of whole molecular-, 40 kDa-, 10 kDa polymannuronate (0.25%) to the HT-29 cancer cells inhibited proliferation of cancer cells by 41%, 69.1%, and 75.6%, respectively. DLD-1 cancer cell was not relation of molecular weight and concentration. WiDr cancer cell depend on concentration without molecular weight. In addition, whole molecular-, 40 kDa-, 10 kDa polymannuronate (0.25%) significantly inhibited DNA synthesis of HT-29 cancer cells by 78%, 58%, and 56%, respectively. And morphological changes not found under microscope by polymannuronate. Therefore polymannuronate would be helpful to colon cancer treatment as well as cancer prevention and this study would be the basic source for further research of polymannuronate.

Key words – Low-molecularized polymannuronate, Human colon cancer cell, Proliferation inhibition, DNA synthesis

경제 수준의 향상과 함께 국민소득의 향상으로 동물성 식품소비량이 현저히 늘어났으며, 서구화된 식생활로 식이섬유 함량이 적은 가공식품의 섭취가 잦아짐에 따라 대장암과 같은 성인병과 비만증이 증가하게 되었다. 역학적 연구에서 육류와 대장암은 유의적인 양의 상관관계를 가지며[7], 고섬유식을 하는 집단에서는 위험도가 감소한다는 것을 확인하였다[2]. 따라서, 이를 예방하기 위하여 지질과 같은 열량원의 가치는 적은 반면 점질 다당류 식이섬유인 알긴산 등의 생리활성 물질이 풍부하게 함유되어 있는 식품인 미역, 다시마와 같은 해조류의 식이섬유에 대한 관심이 새롭게 부각되고 있다[1]. 이러한 이유로 가공식품에는 식이섬유를 첨가하고 있고 식이섬유의 생리작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[5,8,9].

알긴산은 갈조류의 세포막 또는 세포간 물질로 함유되어 있는 다당류로, mannuronate와 guluronate로 구성되어 있으며[4,6], 중금속의 체외배출작용[3], 이온교환반응에 의한 혈압 상승억제작용[10,15], 혈중 콜레스테롤 저하작용[13,16], 정장 및 변비개선작용[19], 장내 유해미생물의 증식억제작용[14] 및 항종양성[11] 등과 같은 생리효과를 가진다고 알려져 있다. 특히, 알긴산의 생리효과는 분자량의 크기와 점도에 영향을 받는 것으로 알려져 있으며[16], 동물실험 결과, polymannuronate가 많이 함유된 급이군에서 혈청 및 간장 콜레스

테롤 저하 등 지질대사 개선이 더 효과가 있다고 하였다[20]. 또한, 염산으로 부분가수분해하여 얻은 polymannuronate는 용해도 및 담즙산 결합능을 현저히 증가시키며, 혈청 및 간장 지질 중의 콜레스테롤 수준에 대하여 유의적인 저감효과를 보였다고 하였다[17]. 그러나, 알긴산과 관련된 실험은 대부분 *in vivo*수준이며, 세포수준에서 살펴본 실험은 거의 없는 실정이다.

따라서, 본 연구는 polymannuronate를 부분 가수분해하여 분자량별로 제조한 40 kDa, 10 kDa polymannuronate와 전분자량 polymannuronate가 인체 대장암세포의 증식과 DNA 합성에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 whole molecular-, 40 kDa-, 10 kDa-polymannuronate는 (주) KBP (경기도, Korea)에서 제공받아 실험직전에 각 세포배양액에 녹여 사용하였다. 인체 대장암 세포인 HT-29 (KCLB 30038)은 Korea Cell Line Bank (서울, Korea)에서, DLD-1 (ATCC CCL-221)과 WiDr (ATCC CCL-218)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분양받아 배양하여 실험에 사용하였다. 세포배양에 사용한 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, phosphate buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin 등은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-6337, Fax : +82-51-620-6330

E-mail : namtj@pknu.ac.kr

입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Utah, USA)에서, 세포 증식을 측정하기 위해 사용된 Celltiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit는 Promega (Wisconsin, USA)에서 구입하였으며, 세포 배양에 사용한 1회용 밀봉 제품은 Corning (NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. Minimum Essential Medium Eagle (MEM)등 기타 실험에 필요한 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

대장암세포 배양

HT-29 대장암세포는 RPMI 1640 배양액에, DLD-1, WiDr 대장암세포는 MEM 배지에 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 항생제 (100 units/mL penicillin, 100 units/mL streptomycin)와 10% FBS를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 자라면 PBS-EDTA로 monolayer를 씻어내고 0.25% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 96-well plate와 24-well plate에 분주하여 실험에 사용하였다.

Polymannuronate가 대장암세포 증식에 미치는 영향 측정

HT-29, DLD-1, WiDr 대장암세포에 각각의 polymannuronate를 처리하였을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 각 대장암세포를 10% FBS가 포함된 배양액으로 희석하여 96-well plate에 40,000 cells/well의 밀도로 분주하였다. 24시간 배양한 후에 serum free media로 배양액을 교환하여 24시간 serum starvation 시켰다. 그 후 배양액에 각 polymannuronate를 0.01%, 0.1%, 0.25%, 0.5%의 농도로 첨가하여 24시간 배양하였다. Celltiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit를 사용하여 ELISA plate reader (VERSA max tunable microplate reader, Molecular Devices, USA)로 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 증식 정도는 대조군에 대한 실험군의 %로 계산하였다.

Polymannuronate가 대장암세포의 DNA 합성에 미치는 영향 측정

각각의 polymannuronate가 DNA 합성에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 세포를 13 mm diameter cell culture coverslip을 넣은 24-well plate에 50,000 cells/well의 밀도로 분주하고, 10% FBS를 함유한 배양액으로 희석하여 배양하였다. 각 well 당 세포가 60% 정도 자라면, SFM으로 교환하여 24시간 동안 배양한 후, 각 polymannuronate를 0.01%, 0.1%, 0.25%, 0.5%의 농도별로 첨가하였다. [³H] thymidine을 200,000 cpm/well의 농도로 첨가하여 37°C incubator에서 24시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거하고 5% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 다음, 탈이온수로 2회 세척한 후에 70% 에탄올을 첨가하여 실온에 5분간

방치하였다. Cell culture coverslip을 cocktail solution에 넣고 liquid scintillation counter (Wallac 1409, Amersham Pharmacia Co., England)로 cpm을 측정하여 세포의 DNA 합성 정도를 계산하였다.

Polymannuronate의 대장암세포의 형태학적 변화 측정

각각의 polymannuronate를 첨가하였을 때, 대장암세포의 형태학적 관찰 및 생존율을 육안으로 살펴보기 위해서 대장암 세포를 24-well plate에 100,000 cells/well의 농도로 분주하고 10% FBS를 함유한 배양액으로 희석하여 배양하였다. 각 well 당 세포가 60% 정도 자랐을 때, SFM으로 교환하여 24시간 동안 배양한 후, 각 polymannuronate를 0.01%, 0.1%, 0.25%, 0.5%의 농도별로 첨가하여 24시간 배양한 후 현미경 상에서 세포의 형태와 증식 정도를 관찰하였다.

실험결과와 통계처리

본 연구의 모든 분석수치는 각 실험군의 평균±표준편차로 나타내었고, 결과는 SPSS PC 프로그램(version 10.0)을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군간의 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

Polymannuronate가 대장암세포 증식에 미치는 영향

HT-29 인체 대장암세포 증식 억제 효과

각 polymannuronate의 HT-29세포에 대한 암세포 증식 억제 효과는 Fig. 1과 같다. Polymannuronate의 분자량이 감소할수록, 각 polymannuronate의 농도가 증가할수록 HT-29 대장암세포의 증식 억제 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 즉, whole molecular polymannuronate를 0.25%의 농도로 처리하였을 때, 41.0%의 증식 억제율을 보였고 0.1%의 농도로 40 kDa polymannuronate를 처리하였을 때, 56.6%의 증식 억제율을 보였으며 10 kDa polymannuronate를 0.1%의 농도로 처리하였을 때, 69.5%의 증식 억제율을 보여 polymannuronate는 HT-29 대장암세포에 대하여 증식 억제 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

DLD-1 인체 대장암세포 증식 억제 효과

각 polymannuronate의 DLD-1에 대한 암세포 증식 억제 효과는 Fig. 2와 같다. DLD-1 대장암세포에 처리한 polymannuronate의 분자량과 농도는 증식 억제와는 관련이 없는 것으로 나타났다. 전체적인 경향을 살펴볼 때, 분자량이 감소할수록 증식율이 억제되는 것처럼 보이나, 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 또한, 10 kDa polymannuronate를 0.01~0.5%의 농도로 처리하였을 때에는 48.2~57.2%의 증식 억제율을 보였다. 즉, DLD-1 대장암세포에 polymannuronate를 처리하였을 때에는 증식 억제효과를 보이지 않는 것으로

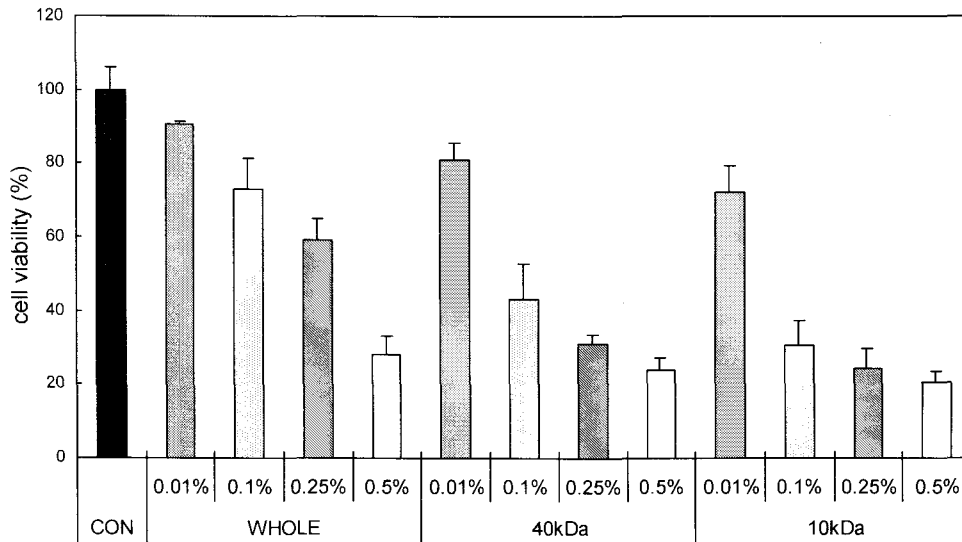


Fig. 1. Effect of low-molecular weight polymannuronates on the growth of HT-29 colorectal adenocarcinoma cells. HT-29 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after seeding, the cells were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 1 day with of without low-molecular weight polymannuronates (0.01~0.5%), and viable cell number were estimated by the Celltiter 96 AQueous Non-Ra dioactive Cell Proliferation Assay Kit. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level of singnificances as determined by Duncan's multiple range test.

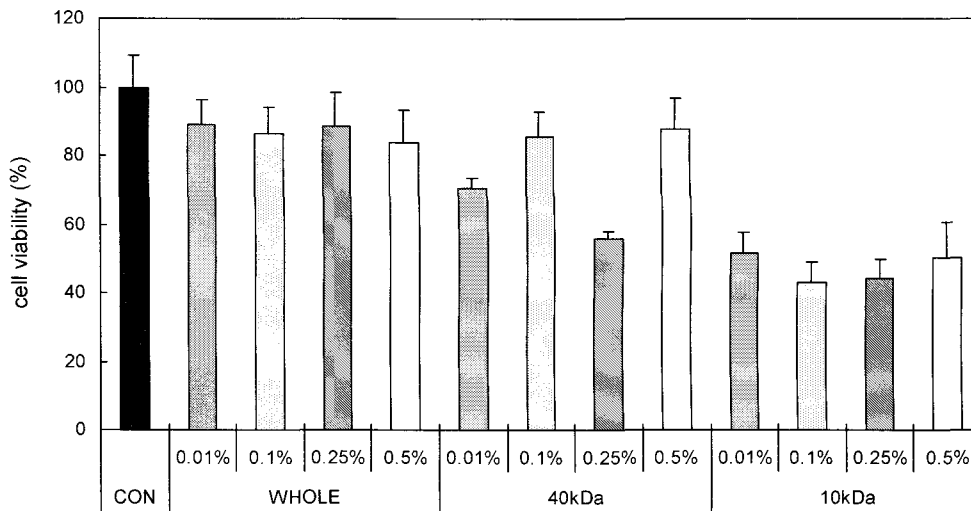


Fig. 2. Effect of low-molecular weight polymannuronates on the growth of DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells. DLD-1 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after seeding, the cells were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 1 day with of without low-molecular weight polymannuronates (0.01~0.5%), and viable cell number were estimated by the Celltiter 96 AQueous Non-Ra dioactive Cell Proliferation Assay Kit. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level of singnificances as determined by Duncan's multiple range test.

나타났다.

WiDr 인체 대장암세포 증식 억제 효과
 각 polymannuronate의 WiDr에 대한 암세포 증식 억제

효과는 Fig. 3과 같다. Polymannuronate의 분자량이 감소할수록, 각 polymannuronate의 농도가 증가할수록 WiDr 대장암세포의 증식억제 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 즉,

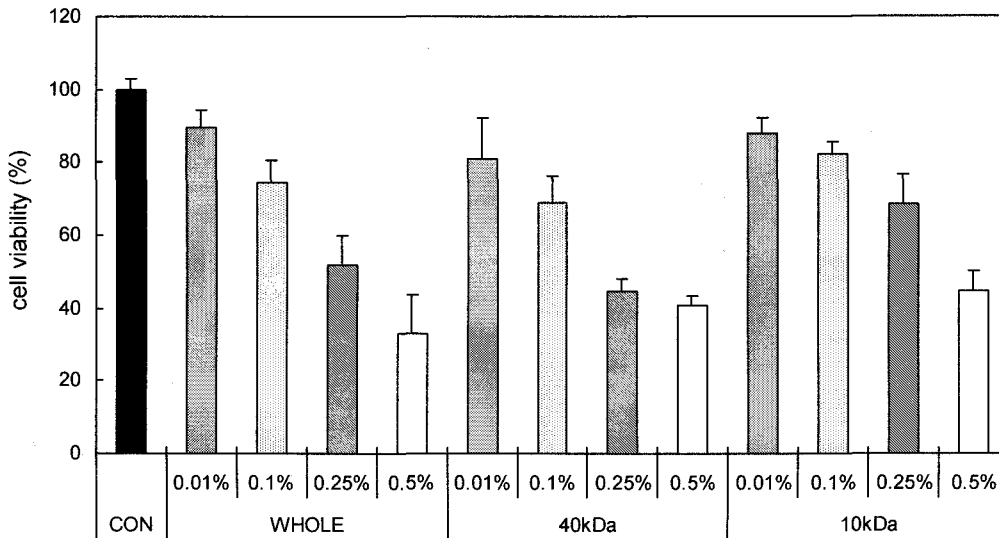


Fig. 3. Effect of low-molecular weight polymannuronates on the growth of WiDr human colorectal adenocarcinoma cells. WiDr cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after seeding, the cells were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 1 day with or without low-molecular weight polymannuronates (0.01~0.5%), and viable cell number were estimated by the Celltiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

whole molecular polymannuronate를 0.25%의 농도로 처리하였을 때, 48.1%의 증식 억제율을 보였고 0.25%의 농도로 40 kDa polymannuronate를 처리하였을 때, 55.3%의 증식 억제율을 보였으며 10 kDa polymannuronate를 0.5%의 농도로 처리하였을 때, 55.6%의 증식 억제율을 보여 polymannuronate는 WiDr 대장암세포에 대하여 증식 억제 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

이상으로, HT-29, DLD-1, WiDr 인체 대장암세포에 polymannuronate를 처리하였을 때 세포의 증식 억제 효과를 살펴보았다. 그 결과, HT-29 대장암세포에서 가장 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 모든 분자량의 0.25% 농도에서 50%의 증식 억제율을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

Polymannuronate가 대장암세포의 DNA 합성에 미치는 영향

각 polymannuronate를 인체 대장암세포에 처리하였을 때 각 분자량별 0.25%의 농도에서 50%의 증식억제를 보였던 HT-29세포에 $[^3H]$ thymidine으로 표지해서 세포내 DNA 합성에 어떠한 영향을 미치는 지 살펴보았다. 각 분자량별과 농도에 따른 DNA 합성정도를 Fig. 4에 나타내었다. DNA 합성율은 농도가 증가할수록 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나, 분자량에 따른 차이는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 전반적인 결과에 비추어볼 때, polymannuronate로 처리한 HT-29 대장암세포의 증식 억제 효과는 DNA 합성

능의 감소에 기인한 것으로 보인다.

Polymannuronate가 대장암세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

위의 결과로부터, HT-29 대장암세포에 polymannuronate를 처리하였을 때 저분자화 될수록, 농도가 증가할수록 DNA 합성능이 감소하여 최종적으로 암세포의 증식 억제를 가진다는 것을 확인하였다. 이로 인한 대장암세포의 형태학적 변화를 살펴보고자 HT-29 대장암세포를 24-well plate에 분주하여 polymannuronate를 처리하여 현미경상에서 관찰한 것을 Fig. 5에 나타내었다. 앞선 결과와 동일하게, 분자량이 감소할수록, 농도가 증가할수록 대장암세포의 형태의 변화 없이 세포의 증식이 지연되는 것을 확인할 수 있었다.

해조류에 의한 암세포 증식억제 효과에 관한 다른 연구들을 살펴보면, 톳과 미역의 열수추출물을 쥐에게 10일간 투여한 결과 56.6%와 69.8%의 종양 증식억제 효과를 보였다고 하였다. 미역과 다시마의 다당류 분획은 sarcoma-180 세포에 대하여 항암작용을 나타내었으며[18], 또한 *Sargassum fulvellum*에서 분리한 알긴산은 대식세포의 활성을 통해서 항암활성을 나타낸다고 하였다[11]. 또한, 일본에서 주로 식용되는 Wakame(미역)과 Mekonbu(다시마)의 수용액 성분은 쥐의 유방암에 대해 강한 저해작용을 보였고, Mekonbu 수용액은 MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 등 3가지 인체 유방암 세포의 apoptosis를 유발하여 유방암 세포에 대한 증식 억제 작용을

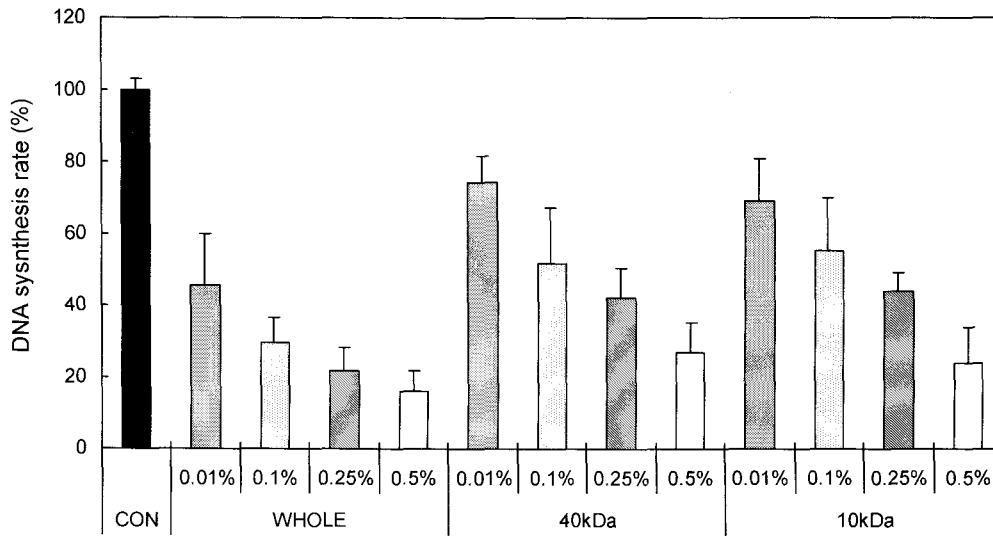


Fig. 4. Effect of low-molecular weight polymannuronates on the [³H] thymidine incorporation in HT-29 human colon cancer cells. HT-29 cells were seeded in 24-well plates at a density of 5×10⁴ cells/well with medium supplemented with 10% FBS. 60% confluent after seeding, the cells were serum-starved for 24hrs. Cells treated for 1 day with of without low-molecular weight polymannuronates (0.01~0.5%), [³H] thymidine was then added and the incubation was continued for another 24hrs to measure the incorporation into DNA. DNA synthesis rate of cell were estimated by the [³H] thymidine incorporation assay. Means with different letters are significantly different at the 0.05 level of singnificances as determined by Duncan's multiple range test.

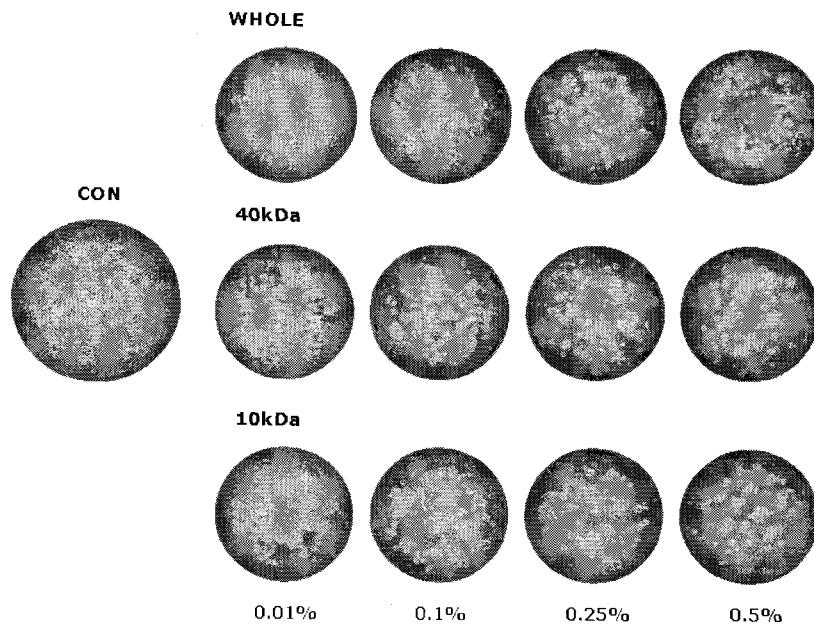


Fig. 5. Photographs of low-molecular weight polymannuronates on the growth in HT-29 human colon cancer cells. HT-29 cells were seeded in 24-well plates at a density of 1×10⁵ cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after seeding, the cells were serum-starved for 24hrs. Photographs after cells treated for 1 day with of without low-molecular weight polymannuronates (0.01~0.5%).

c보였다고 하였다[12]. 본 연구에서는, 알긴산을 부분가수분해하여 구성성분인 polymannuronate를 분리하여 HT-29 대장암세포에 처리하였을 때 DNA 합성 감소로 인하여 세포의

증식이 저해됨을 확인할 수 있었다.

알긴산에 대한 연구는 오랫동안 계속되어 왔지만, 세포수준에서 살펴본 결과는 매우 적은 수준이다. 본 연구는 알긴

산을 세포수준에서 검토하였다는 점에 그 의의가 있으며, 더 나아가 대장암세포의 증식 억제 효과를 세포 신호 전달 수준에서 검토가 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구는 whole molecular-, 40 kDa-, 10 kDa polymannuronate를 대장암세포에 첨가하였을 때 분자량과 농도에 따른 항암효과를 세포수준에서 검토하고자 하였다. 3종류의 인체 대장암세포인 HT-29, DLD-1, WiDr의 증식 억제를 살펴본 결과, HT-29 세포는 모든 polymannuronate 0.25%의 농도에서 50%의 증식 억제 효과를 보였으며 저분자화 될 수록 증식 억제 효과가 증가되었다. DLD-1 세포는 저분자화 정도와 농도증가에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았고, WiDr 세포는 농도증가에 따른 유의적인 효과는 있었으나, 분자량에 의한 차이는 보이지 않았다. 0.25%의 농도에서 50%의 증식 억제 효과를 보인 HT-29 세포의 DNA 합성능을 살펴본 결과, 증식 억제 효과와 유사한 결과를 보였으며, 형태학적인 변화 또한 동일한 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 polymannuronate는 HT-29 대장암세포의 증식억제에 유의적인 효과가 있는 것으로 나타났다. 따라서 polymannuronate는 대장암의 예방뿐 아니라 그 치료에도 도움이 되며 본 연구가 polymannuronate의 효과에 대한 기초적인 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부에서 시행한 해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

- Choi, J. H., J. I. Kim, I. S. Kim, J. S. Choi, D. S. Byun and T. H. Yoon. 1991. Dose effect of brown algae (*Undaria pinnatifida*) on inhibitory action of obesity I. Effect on body weight, feed and gross efficiencies, and metabolic body size. *Kor J Gerontol* **1**, 168-172.
- Cummings, J. H., S. A. Bingham, K. W. Heaton and M. A. Eastwood. 1992. Fecal weight colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* **103**, 1783-1789.
- Haug, A. 1961. The affinity of some divalent metals to different types of alginates. *Acta Chem Scand* **15**, 1794-1795.
- Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod. 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research* **32**, 217-225.
- Huh, K.B., J.H. Lee, I. K. Park, K. J. Ahn, Y. J. Jung, M. J. Kim, H. C. Lee, Y. H. Lee and Y. J. Lee. 1993. Influence of total abnormal fat accumulation on serum lipides and lipoproteins in Korean middle-aged men. *J Kor Nutr* **26**, 299-312.
- Nishide, E., Y. Kinoshita, H. Anzai and N. Uchida. 1988. Distribution of hot-water extractable material, water-soluble alginate and alkali-soluble alginate in different parts of *undaria pinnatifida*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**, 1619-1622.
- Reddy, B. B. 1995. Nutritional and colon cancer. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **35**, 175-190.
- Tsai, A. C., J. Elias, J. J. Kelley, R. C. Lin and J. R. K. Robson. 1976. Influence of certain dietary fibers on serum and tissue cholesterol level in rats. *J Nutr* **106**, 118-123.
- Van Itallie T. B. 1978. Dietary fiber and obesity. *Am J Clin Nutr* **31**: S43-52.
- Brussard, J. H., J. M. A. Van Raaij, M. Stasse-Wolthuis, M. B. Katan and J. G. A. J. Hautvast. 1981. Blood pressure and diet in normotensive volunteers: Absence of an effect of dietary fiber, protein, or fat. *Am J Clin Nutr* **34**, 2023-2029.
- Fujihara, M. and T. Nagumo. 1993. An influence of the structure of alginate on the chemotectic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydr Res* **243**, 211-216.
- Funahashi, H., T. Imai, T. Mase, M. Sekiya, K. Yokoi, H. Hayashi, A. Shibata, T. Hayashi, M. Nishikawa, N. Suda, Y. Hibi, Y. Mizuno, K. Tsukamura, A. Hayakawa and S. Tanuma. 2001. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn J Cancer Res* **92**, 483-487.
- Hedeki, O., S. Jitsuo and K. Yoshinari. 1993. Direct control of the constituents ratio in a wide range in alginate produced by *Azobacter vinelandii*. *Biosci Biotech Biochem* **57**, 332-336.
- Hidaka, H., T. Eida, T. Takizawa, T. Tokuzawa and Y. Tashiro. 1986. Effect of fructooligosaccharide on intestinal flora and human health. *Bifido Microbiol* **5**, 37-50.
- Kimmura, T., K. Takahashi, Y. Ueda, H. Obika, Y. Kobayashi and K. Tsuji. 1993. Effects of the primary structure of alginate on fecal excretion of sodium in rats. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **67**, 1177-1183.
- Kobayashi, N., Y. Kanazawa, S. Yamabc, K. Iwata, M. Nishizawa, T. Yamagishi, O. Nishikaze and K. Tsuji. 1997. Effects of depolymerized sodium alginate on serum total cholesterol in healthy women with a high cholesterol intake. *J Home Econ Japan* **48**, 255-230.
- Lee, D. S., T. J. Nam and J. H. Pyeun. 1998. Effect of low molecular alginates on cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and liver lipids in cholesterol-fed rats. *J Kor Fish* **31**, 399-408.
- Ryu, B. H., D. S. Kim, K. J. Cho and D. B. Sin. 1999. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol* **21**, 595-600.
- Suzuki, T., K. Nakai, Y. Yoshie, T. Shirai and T. Hirano. 1993. Digestibility of dietary fiber in brown alga, kombu, by rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 879-884.
- Suzuki, T., K. Nakai, Y. Yoshie, T. Shirai and T. Hirano. 1993. Effects of sodium alginates rich in guluronic and mannuronic acids on cholesterol levels and digestive organs of high-cholesterol-fed rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 545-551.