

カテキン4種異性体のJB6細胞系における 発がんプロモーション抑制作用

中村好志*^{1,2}・安野武明*³・江崎秀男*¹・石川美登子*¹

Inhibitory Effect of Four Catechin Isomers on the Tumor Promotion
in Mouse Epidermal JB6 Cell Lines

Yoshiyuki NAKAMURA, Takeaki YASUNO, Hideo ESAKI and Mitoko ISHIKAWA

1. はじめに

2003年の我が国の死亡統計確定値によると¹⁾、悪性新生物（がん）による死亡者は男女含めて309,543人（全死亡者の30.5%）と、30%を超えている。この7月の新聞記事²⁾に、がん発症者数の統計（がん登録）があまり正確ではなく、実際の発症者は、1.3倍の62万人に上ると推定されることがのっていた。いずれにしても、毎年、60万人ががんにより、その半数に相当する人数が死亡していることになる。「健康日本21」を持ち出すまでもなく、健やかに長生きをしたいと願う庶民にとって、もはや、官製のヘルスプロモーションに任せ切りにはできない事態である。戦後一貫して行ってきた厚生省（当時）の食生活指導が功を奏して？ 胃がんにはやっと歯止めがかかり、ここ1,2年、死亡者数は減少に転じているが、大腸がんや肺がんは増加をたどり全体としては、増えてしまっているのである。著名な学者の疫学研究から、食生活や喫煙ががんの発症要因として大きく関わっていることが、遍く知られるところとなっているが、ヒトの欲望の一つは「食」にはじまって「食」に終わる。「食生活改善」は口で言うほど容易ではなく、これが部位別がん死亡率のモグラたたきに終わっては何もならない。

著者らは、こうした願いを込めて日夜基礎研究を行っているが、このところ時代の寵児になった感のする「カテキン」も解らないことがまだまだ多い。製茶に含まれるカテキンは、ほとんどが(-)-epi体であり、最近のカテキン研究のほとんどすべてはこれに集中している。しかし、カテキンはよく知られているように、広義のフラボノイドとして分類され、フェニルアラニンやチロシンを出発物質として、4-クマロイル CoAを経て、フラボノイド、アントシアニン系色素、あるいは、リグノイドなどが生合成される。カテキン類

*¹ 生活科学部 食品栄養学科

*² 静岡県大 食品栄養科学部

*³ 静岡県大 薬学部

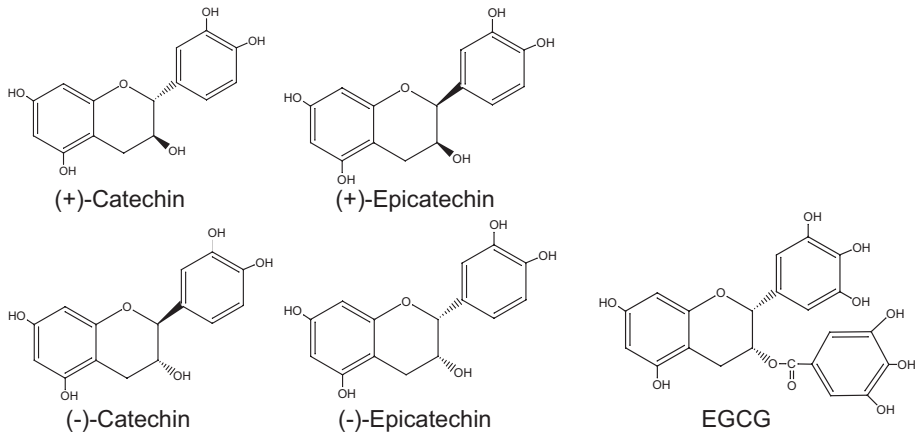


Fig. 1 Chemical structures of four catechin isomers and EGCG

は2位の炭素と3位の炭素が不斉炭素となっているために、同一の化学構造でも立体構造の異なる4種の形をとることができ、生合成的には最初、(+)-catechin〔+C〕ができると考えられるが、このほか、(-)-catechin〔-C〕、(-)-epicatechin〔-EC〕、および(+)-epicatechin〔+EC〕が存在する(図1)。

カテキンはリンゴやブドウなどの樹木性植物の果実に多く含まれており、通常、+Cの型で存在するが、緑茶の熱湯抽出物中には(-)-epi体が主で、-ECは(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)とともに緑茶の主成分として知られている。このように茶葉(製茶)浸出液中のカテキンは、教科書的にはほとんどが(-)-epi体であるが、最近これを否定する報告³⁾があり、茶葉から超音波抽出を行うと(+)-体が主として検出されるという。この理由は未だ十分に解明されていないが、製茶工程の熱処理により異性化、エピ化を起こす⁴⁾ためと考えられる。

カテキンには異性体によって生物活性が異なることも報告されており、立体異性体や光学異性体の違いに十分な注意を払う必要があるが、4種をそろえて比較検討した例はない。茶カテキンの研究が現在のように流行するようになる前は、動物体内への吸収や代謝も(+)-カテキン体を用いた研究が先行していた⁵⁾。著者らは、+Cが果実に普遍的に存在することと、(-)-epi体を主体とする茶カテキンと同様な機能が期待できるかということに興味をもち、4種異性体を用いて発がんプロモーションの抑制に関して比較検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 装置・器具および試薬

(i) 使用器具・装置

培養用のプラスチック器具はNalgen Nunc、またはCorning Costarのγ線滅菌済みを用いた。炭酸ガス孵卵器：平沢、WJ-22F、高圧蒸気滅菌：三洋、MBA-30、クリーンベンチ：日立、CCV-1601EC、マイクロプレートリーダー：Perkin Elmer、HTS7000、培養倒立

顕微鏡：ニコン，ECRIPSE TS-100を用いた。

(ii) 試薬・培養液

精製水：イオン交換水をミリ Q 試薬グレード純水製造システムで精製したもの。3% L-グルタミン液，7.5% NaHCO₃液，リン酸生理緩衝液（PBS），0.05% トリプシン-0.02% EDTA 溶液は細胞培養用，DMSO（ドータイトスペクトロゾール），組織固定用10% 中性緩衝ホルマリン液（和光純薬），TPA（和光純薬），1.25% 寒天（Difco bacto agar），および牛胎児血清（非働化 FBS，イワキ，IWAKI-500，Lot No. B70520）を用いた。4% または 8% FBS-MEM 培養液：イーグル MEM 粉末培地①（日水製薬）から常法により調製した。0.1% クリスタルバイオレット溶液：クリスタルバイオレット（和光純薬，特級）1.0g を秤量し，200ml のエタノールを加えて溶解し，更に，精製水を800ml 加え，冷蔵保存。クエン酸アルコール緩衝液：クエン酸アルコール・2 水和物（和光純薬，特級）4.48g を秤量し，150ml の精製水を加えて溶解し，更に，0.1 N HCl（和光純薬，特級）97.5ml，エタノール 250ml を順に加え，冷蔵保存。

2.2 使用細胞の種類と維持・継代

JB6細胞プロモーション感受性株 p⁺（Cl 41 および Cl 22-3m）⁶⁾を 8% FBS-MEM 培養液，JB6細胞トランスホーマント（T₆₂₇₄³）を 4% FBS-MEM 培養液で維持，3～4 日ごとに培養液を交換した。継代は週 1 回，1～2×10⁴ cells/25cm² プラスチックフラスコ中の培養液を取り除き PBS(-) で 2 回洗浄，0.05% トリプシン-0.02% EDTA 溶液 0.5ml を加え，約 3 分間放置した後，細胞の剥離の様子を検鏡して，8% FBS-MEM 培養液 1 ml 加えトリプシンの作用を止め，細胞浮遊液を調製した。8% FBS-MEM 培養液 4 ml を分注したフラスコ中に細胞浮遊液を1～2×10⁴ cells/dish になるように加え，CO₂ インキュベーター（37℃，95% air，5% CO₂）中で培養した。実験には，対数増殖期のものを用いた。

2.3 発がんプロモーション抑制試験

試験は次の手順で行う。①はじめに，細胞毒性試験を行い，実質的に細胞毒性が認められない濃度範囲で，② TPA 誘導軟寒天コロニー形成試験を行う。コロニー形成が TPA 陽性対照より減少した場合，この減少が真にプロモーション段階の抑制であるか否かを決めるため次の検討を行う。この場合，1) 真の，発がんプロモーション過程の抑制のほか，2) TPA が膜レセプターに結合する前に被験物質との結合により不活性化，3) TPA のレセプターへの結合阻害，4) 腫瘍化細胞に対する特異的増殖阻害，5) トランスホーマントの形質遺伝子発現の抑制などが含まれる。そこで③トランスホーマントを用いた軟寒天コロニー形成試験を行い，抑制がない場合は，1) のプロモーション過程そのものの抑制が起こっていると判断する。一方，抑制が見られた場合には，4) または 5) の可能性が考えられ，プロモーション過程の抑制ではないと判断される。最後に 4) と 5) の区別のために④トランスホーマントに対する細胞毒性試験を行う。

① 濃度設定のための細胞増殖試験

JB6細胞プロモーション感受性株（Cl 22-3m または Cl 41）を2×10⁴ cells/ml の細胞浮遊液を48穴プレートに0.5ml/well ずつ播種した。24時間後，被験物質（5 濃度）を，TPA（1 ng/ml）または DMSO（対照）とともに加え処理した。3 日後，対数増殖期にある細胞

を10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4, 和光純薬) を0.5ml/well 加えて, 20分間固定し, 次いで, 0.1% クリスタルバイオレット溶液0.2ml/well を加えて30分間染色して, 水洗, 風乾する。これにクエン酸アルコール緩衝液0.5ml/well を加えて色素を抽出し, この50 μ l を96穴プレートに移してマイクロプレートリーダー (570nm) により吸光度を測定した。溶媒対照群の吸光度を100% として細胞生存率を算出し, 8% 以上の細胞増殖が得られる濃度を上限に軟寒天コロニー形成試験を行った。

② TPA 誘導軟寒天コロニー形成試験

既報⁷⁾に準じて行った。すなわち, 50ml チューブに TPA (2 μ g/ml を15 μ l), 被験物質 (2000倍溶液15 μ l) を分注する。次に45°Cに保温した0.5% 寒天-MEM 培養液 (2 \times MEM 培養液80ml, PBS 20ml, FBS 20ml, 1.25% 寒天80ml) 30ml を素早く混和して, この各7 ml を60mm プラスチックシャーレに加えて広げ, 放冷, 固化させる (30~60分)。次に, 50ml チューブに TPA (2 μ g/ml を7.5 μ l), 被験物質 (2000倍溶液を7.5 μ l) を分注し, 45°Cに保温した0.5% 寒天-MEM 培養液10ml を50ml チューブに加え, 素早く混和し, その3 ml を使用細胞浮遊液 (Cl 41またはCl 22-3m, 2 \times 10⁴ cells/ml) 1.5ml をあらかじめ分注しておいた15ml チューブに加えて混和し, この1.5ml (最終寒天濃度: 0.33%) をはじめに用意した0.5% 寒天-MEM 平板上に一様に広げる。寒天層が固化したら (30~60分) 37°C, CO₂ インキュベーター (95% air, 5% CO₂) に入れ14日間培養したのち, 一定の基準でコロニーを計数した。1 シャーレにつき1 cm² の2カ所を計数し, その平均に24を乗じて1平板あたり, すなわち, 1 \times 10⁴ cells あたりのコロニー数とする。実験はすべて1用量につき2枚のシャーレを用いた。なお, 抑制効果は TPA 陽性対照を100% として表した。

3. 結果・考察

3.1 JB6細胞に対する細胞毒性

カテキンの4種の異性体についてJB6培養細胞発がんプロモーション感受性株 (p⁺) であるCl 22-3m およびCl 41の2種類を用いて, 細胞毒性試験を行った。カテキンの異性体4種のうち, +C および-C と+EC の3者には100 μ g/ml (345 μ M) までの濃度範囲ではほとんど毒性が認められなかったが, -EC では30 μ g/ml (104 μ M) 以上で毒性が現れるようになり, 345 μ M では溶媒対照の9.2% にまで細胞増殖が抑制された。EGCG は10 μ g/ml (21.8 μ M) 以上で細胞毒性を示した (図2)。

3.2 JB6細胞プロモーション感受性株のTPA 誘導軟寒天コロニー形成の抑制

TPA 誘導軟寒天コロニー形成抑制試験の結果は図3のようになった。カテキンの異性体4種の中では+C が最も強く濃度依存的にコロニー形成を抑制し, 104 μ M で陽性対照の10.3% と顕著な効果を認めた。-C と+EC もほぼ同様な抑制を認めたが, -EC では弱く, 104 μ M の一点でのみコロニー形成を抑制した。EGCG はすでに報告されているように⁸⁾, 2.18~21.8 μ M で中程度のコロニー形成の抑制が見られた。

3.3 JB6細胞の悪性腫瘍化株の軟寒天コロニー形成と細胞増殖に対する影響

JB6細胞の TPA 処理により悪性腫瘍化の形質を獲得した株である T³₆₂₇₄ を用いて, カテ

カテキン 4 種異性体の JB6 細胞系における発がんプロモーション抑制作用

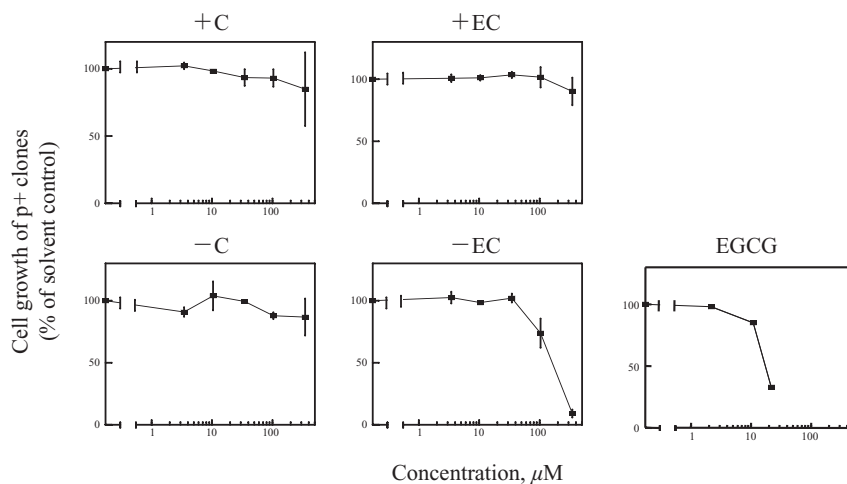


Fig. 2 Effect of catechins on the cell growth of JB6 tumor promotion sensitive clones. Cell growth in the presence of catechin isomers or EGCG is expressed as a % of solvent control. Each point is the average of 2 cell lines of JB6 p⁺, Cl 22-3m and Cl 41.

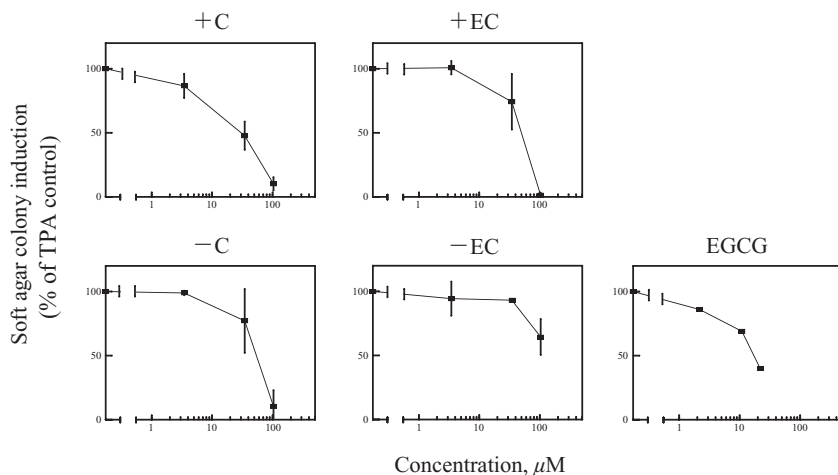


Fig. 3 Effect of catechins on the soft agar colony induction by TPA in JB6 tumor promotion sensitive clones. Anchorage independent colony induction in the presence of catechin isomers or EGCG is expressed as a % of TPA control. Each point is the average of 2 cell lines of JB6 p⁺, Cl 22-3m and Cl 41.

キンの 4 種異性体について、軟寒天コロニー形成に対する影響を検討し、図 4 に図 3 の結果とともに示した。カテキンの異性体 4 種のうち、+C は 104μM まで全く影響を示さなかったが、-C、+EC および -EC は 104μM で 50% 以上のコロニー形成抑制を示した。また、EGCG は 2.18μM 以上で濃度依存的なコロニー形の抑制を示した。さらに、このコロニー形成抑制作用の中には細胞毒性が含まれている可能性があるので T³₆₂₇₄ に対する細胞毒性試験を行った。その結果 (図 4) +C を含むカテキン異性体 4 種はいずれも 104μM

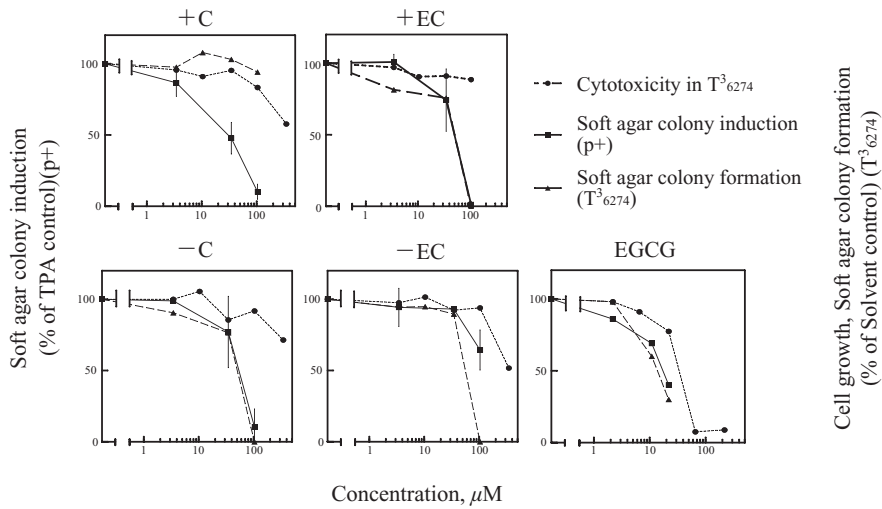


Fig. 4 Comparison of JB6 p⁺ cells (Cl 22-3m and Cl 41) transformation, JB6 Tx cell (T³₆₂₇₄) colony formation, and cell growth of JB6 Tx cell (T³₆₂₇₄) in the presence of catechin isomers or EGCG. Each effect is expressed as a % of TPA or solvent control.

で80%以上の生存率を示し、目立った毒性は認められなかった。EGCGは21.8 μ Mでは77.4%の生存率で弱い毒性を示した。

3.4 カテキン4種異性体とEGCGのJB6細胞系の発がんプロモーションに対する相違

これまでの結果を総合的に考えると、+Cはp⁺株に対する細胞毒性をほとんど認めることなく(図2)、TPA誘導軟寒天コロニー形成を顕著に抑制するのにに対し(図3)、T³₆₂₇₄株のコロニー形成は抑制しないことから(図4)、+Cは発がんプロモーションの段階を特異的に阻害する作用が強い物質と判断される。他の3種のカテキンは、高濃度では、T³₆₂₇₄株のコロニー形成に対する抑制が、p⁺細胞に対する発がんプロモーションの抑制に関与していることが示された。また、-ECではむしろT³₆₂₇₄のコロニー形成に対する抑制作用の方が強く、細胞がトランスホームした以後の段階に対する作用の方が強いと考えられる。また、これら3種は104 μ MまではT³₆₂₇₄の細胞毒性がほとんど現れなかったため、p⁺細胞に対する発がんプロモーションの抑制はトランスホームの軟寒天コロニー形成に関わる遺伝子発現の抑制によるものと考えられる。EGCGに関しては、JB6細胞系を用いた詳細な検討がされており⁸⁾、同細胞系で5 μ g/ml(21.8 μ M)以上の濃度で認められる発がんプロモーション抑制作用のほとんどは悪性腫瘍化細胞に対する選択的増殖阻害であり、アポトーシスの関与を示唆している。今回のT³₆₂₇₄株の結果が以前の報告(悪性腫瘍株としてJB8株を用いている)とやや異なるのは、JB8が発がん剤MNNGにより悪性化した株であり、悪性化度の違いを反映した結果と考えられる。このことは、JB8株とT³₆₂₇₄株を用いて、EGCGによるアポトーシスの誘導が後者において弱いことが予試験的な検討から認められていることから、示唆される。

以上の結果をまとめると表1のようになり、+Cは発がんプロモーションの過程そのも

Table 1 Summary of catechin propeties in JB6 promotion sensitive and transformed variants

JB6 cell variants			Catechins	+C	+EC	−C	−EC	EGCG
p+ cell lines	promotion sensitive	Cell growth inhibition		−	−	−	++	+++
		Inhibition of TPA-induced SA colony formation		+++	+++	+++	++	+++
Tx cell lines	transformants (tumorigenic)	Cell growth inhibition		−	−	−	−	+++
		Inhibition of SA colony formation (T ³ ₆₂₇₄)		−	++	++	++	+++

のを抑制する物質と考えられるが、他の3種カテキンの場合には、発がんプロモーションの過程よりもむしろトランスホーム以後の過程に作用点があることが示唆された。また、−ECはEGCGと類似の作用を示すものであることが示された。

4. カテキン異性体の異なる生物活性と今後の課題

以上の結果から、カテキン4種異性体のうち、+Cのみが発がんプロモーションの過程を特異的に抑制する作用を持つことが明らかとなった。本異性体は食用天然物中に多く存在することから、がん予防へ寄与が期待されるが、検討課題も多い。今回の報告は、JB6細胞系における発がんプロモーション過程で起こる現象を見ているに過ぎないが、相違点があることが明らかになったので、今後作用機序を検討していくことが必要であり、その延長線上には、他の実験系での検討や動物実験での検討が要求される。

これまでに、カテキン異性体にはいくつかの生物活性がすでに報告されている。例えば、+Cと+ECはLNCaP細胞あるいはPC3細胞（前立腺がん細胞）の増殖を阻害したという報告がある⁹⁾。同じく+Cと+ECはDLD-1細胞（ヒト結腸がん）におけるCOX-2（cyclooxygenase-2）遺伝子の転写活性を弱いながらも抑制したという報告もある¹⁰⁾。また、+Cは抗腫瘍薬物の副作用としての変異原性を抑制した¹¹⁾。+Cと−ECはともに5-*O*- β -glucuronideに代謝され、これらが*in vivo*での抗酸化性を示す活性構造とされている¹²⁾。−ECはWB-F344細胞（ラット肝上皮）のgap junctional intercellular communication (GJIC)のTPAによる阻害を防ぐという報告などもある¹³⁾。−ECはEGCGのAH109A細胞（ラット肝がん）のラット腸管膜由来中皮細胞への接着および浸潤の抑制作用を高めるという相乗作用の報告もある¹⁴⁾。+Cや−ECはヒトがん細胞（MCF-7, HT-29, A-427, UACC-375）において、EGCGと比較すると1/3〜1/4 ($IC_{50}=40\sim60\mu M$)と弱いながらも増殖抑制作用を示すことが報告されている¹⁵⁾。また、*in vivo*でも+Cがインテグリンを介するcell-survival signalingに変化を起こすことによってAPC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子に欠損のあるC57/BL6J-Min+マウスにおけるアデノーマの発生を抑制したということも報告されており、マウス体重の0.1%にあたる+Cを摂取させた場合、アデノーマの発生頻度を25%まで抑制し、マウス体重の1%ではアデノーマの発生頻度を71%まで抑制したという¹⁶⁾。このようにカテキンががんの進行に対して抑制作用を示すということが示唆されているが、その異性体間における作用の違いについてはよく分かっていない。

カテキン異性体では+Cと+ECがMolt 4B細胞¹⁷⁾で、また、-ECがDU145¹⁸⁾, H661, H1299, H441, HT-29¹⁹⁾細胞でアポトーシスを誘導しないことが報告されているが、-ECはEGCGとの相乗効果でPC-9細胞（ヒト肺がん）の増殖抑制作用を示し、アポトーシス誘導能を高めたという報告もある²⁰⁾。+CはFAK (focal adhesion kinase) のリン酸化を抑制するということが報告されている¹⁶⁾。FAKは細胞のがん化に伴ってチロシン残基がリン酸化される酵素であり、アクチンやFNと深く関わる細胞骨格分子の一つでもあることから、カテキンが発がんプロモーションに伴うアクチンやFNの分布の変化にも影響を及ぼすことが期待される。また、異性体間で異なる作用として、カテキンはリポソーム膜の流動性を減少させるが、その作用はepi-体の方が強いという報告がある²¹⁾。他にも+Cと-ECはラットの肝細胞においてグリコーゲン産生を促進したが、-Cは逆にグリコーゲン産生を抑制し、また、+Cと-ECはグリコーゲン分解を抑制したが、-Cは逆にグリコーゲン分解を促進したという報告もある²²⁾。

このようにカテキンには抗がん作用など、異性体間で生物活性の違いがあることを示す報告は多いが、4種類を同時に比較した報告はこれまでに見あたらないので、構造と活性の間に統一的な知見は示されていない。今後、4種類をそろえて、多面的に比較検討が行われなければならない。

5. ま と め

発がんプロモーションの検出や作用機序の検討に優れた系として知られているマウス表皮由来のJB6細胞系を用いて、4種カテキン異性体の(+)-catechin [+C], (-)-catechin [-C], (-)-epicatechin [-EC], および(+)-epicatechin [+EC]の発がんプロモーション抑制作用を検討して、下記の結果を得た。

1. +C, -C, -EC, +ECはJB6細胞発がんプロモーション感受性株p⁺で100μg/ml (345μM)まで細胞毒性を示さなかったが、-ECは30μg/ml (104μM)以上で毒性を示し、EGCGと類似していた。
2. カテキンはJB6 p⁺株のTPA誘導軟寒天コロニー形成をいずれも30μg/ml以上で抑制したが、+Cの抑制が最も顕著であった。
3. +CはJB6トランスホーマント(Tx)の軟寒天コロニー形成をほとんど抑制しなかったが、他の3種は抑制が認められたことから、+Cのみが発がんプロモーション過程そのものを抑制する物質であることが分かった。

以上のことから、+CはEGCGと異なる機序で発がんプロモーションを顕著に、かつ特異的に抑制する物質であることが明らかとなった。+Cは野菜や果物に広く存在し摂取量も多いことから、がん予防に一定の役割を果たしている可能性が期待される。一方、茶葉中には元来+C体が存在し、熱湯抽出物に-EC体が主として存在するのは変化した結果であるとする報告が最近現れているので、生物活性の評価の面からもこれに注目していきたい。

謝辞：本研究の一部は、平成14年度静岡県立大学・後藤研究（茶先端生命科学研究）および本学学園研究費助成金(B)の助成を受けて行われたものであり、記して感謝申し上げる。

引用文献

- 1) 厚生労働省 HP (<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei03/hyo4.html>) (2004 年 9 月).
- 2) 読売新聞, 平成 16 年 7 月 28 日付け東京朝刊, 1 面.
- 3) 伊藤里恵, 井之上浩一, 吉村吉博, 中澤裕之, 山本敦, 小玉修嗣, 松永明信: 茶飲料中のカテキン類の動態, 日本薬学会要旨集, p. 163 (2002).
- 4) 伊那和夫: チャの化学成分と機能, 伊那ら編 (弘学出版), pp. 20–26 (2002).
- 5) 仲川清隆, 宮沢陽夫: 茶の機能——生体機能の新たな可能性——, 村松ら編 (学会出版センター), pp. 52–59 (2002).
- 6) 中村好志: 動物培養細胞マニュアル (瀬野悍二, 小山秀機, 黒木登志夫編, 共立出版), pp. 167–169 (1993).
- 7) Nakamura Y, Gindhart TD, Winterstein D, Tomita I, Seed J. L, Colburn NH: *Carcinogenesis*, **9**, 203–207 (1988).
- 8) 中村好志, 富田 勲: 環境変異原研究, **17**, 107–114 (1995).
- 9) Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E: *Nutr Cancer*. **37**, 223–33 (2000).
- 10) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K: *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 686–91 (2000).
- 11) Gentile JM, Rahimi S, Zweisler j, Gentile GJ, Ferguson LR: *Mutat Res.* **402**, 289–298 (1998).
- 12) Harada M, Kan Y, Naoki H, Fukui Y, Kageyama N, Nakai M, Miki W, Kiso Y: *Biosci Biotechnol Biochem.*, **63**, 973–7 (1999).
- 13) Kang KS, Kang BC, Lee BJ, Che JH, Li GX, Trosko JE, Lee YS: *Cancer Lett.*, **152**, 97–106 (2000).
- 14) Zhang G, Miura Y, Yagasaki K: *Cancer Lett.*, **159**, 169–73 (2000).
- 15) Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wüchter GA, Krutzsch M, Wymer J, Guillen JM, *Anticancer Drugs*, **7**, 461–468 (1996).
- 16) Weyant MJ, Carithers AM, Dannenberg AJ, Bertagnolli MM: *Cancer Res.*, **61**, 118–125 (2001).
- 17) Achiwa Y, Hibasami H, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T: *Biosci Biotechnol Biochem.*, **61**, 1099–101 (1997).
- 18) Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, Kwok TT: *Life Sci.*, **68**, 1207–14 (2001).
- 19) Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS: *Carcinogenesis*, **19**, 611–6 (1998).
- 20) Suganuma M, Okabe S, Kai Y, Sueoka N., Sueoka E: Fujiki H: *Cancer Res.*, **59**, 44–7 (1999).
- 21) Tsuchiya H: *Chem Biol Interact*, **134**, 41–54 (2001).
- 22) Nyfeler F, Moser UK, Walter P: *Biochim Biophys Acta*, **763**, 50–7 (1983).