

植物葉の多環芳香族炭化水素の作用に及ぼす影響

久留戸涼子, 油目 桃, 櫻井 正剛, 大浦 健

The Effects of Plant Leaves on the Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Ryoko KURUTO, Momo ABURAME, Seigo SAKURAI, Takeshi OHURA

2016年11月18日受理

抄 録

近年、環境汚染物質の増加に伴い、様々な疾患が増加し、重篤化しているのではないかと考えられている。そこで、これらの作用を抑制するような物質の探索を試みた。本研究では、緑茶、べにふうき、松葉に注目した。これまで多環芳香族炭化水素(PAHs)の1つである benz[*a*]anthracene (BaA)、及びその塩素置換体 ClBaA が、乳がん細胞 MCF-7 を増殖させる作用があることを報告したが、これらと植物葉を複合曝露した。BaA と ClBaA は、濃度依存的に細胞増殖能を高めたが、緑茶とべにふうきの原液の添加により、細胞死が起こった。10 倍希釈では、増殖能を抑制する傾向が認められた。松葉の原液では、増殖能が大きく低下したが、細胞死を起こさなかった。また、BaA と松葉の組み合わせで、遺伝子発現レベルを解析した。pS2、CYP1A1、IL-6 に関して、松葉自体は発現レベルを上昇させないが、BaA による 3 遺伝子の発現上昇を抑制した。従って、松葉には BaA の作用を遺伝子レベルで抑える効果があることが考えられた。

キーワード：緑茶、べにふうき、松葉、BaA、ClBaA

1. 研究の背景

環境中には、人間の生産活動により、様々な化学物質が排出され、環境汚染が問題となっている。これらには、人体に有害な影響を与えるものもあり、近年こういった環境汚染物質により、様々な疾患が増加し、重篤化しているのではないかと考えられている。

これまで、環境中で検出されるエストロジェン類や多環芳香族炭化水素 (PAHs)、及びその二次副生成物であるハロゲン置換体について、それらの合成試料などを用いて、エストロジェン様作用があるかどうかを中心に調べてきた (1-6)。PAHs は、ダイオキシン類と同様、様々な燃焼過程で生成され、環境中に排出されている。PAHs は体内に吸収後、細胞内で芳香族炭化水素受容体 (AhR) と結合してシトクローム

P450 (CYP) 1A1 や 1B1 等の薬物代謝酵素を誘導し、発がん性、変異原性だけでなく、内分泌攪乱作用もあることが報告されてきた。さらにハロゲンが付加された化合物は、付加されたハロゲンが多いほど不燃性、脂溶性があり、その難分解性、蓄積性が増すとされる。従って、少量であっても食物連鎖による生物濃縮などによって、生体への影響も懸念されている。塩素化 PAHs や臭素化 PAHs が、実際に大気微粒子中に存在することも明らかにされ、発生源についても推定されている (7-9)。

ヒト乳がん細胞 MCF-7 は、エストロゲン受容体 (ER) を発現しており、女性ホルモンであるエストロゲン (Estrogen、以下 E_2) の存在下で、細胞増殖能が増すことが知られている (10)。従って、エストロゲンと同様に MCF-7 細胞の増殖能を高める効果のある物質は、エストロゲン様作用があると判断することができる。PAHs の中でも benz[a]anthracene (BaA) を初めとして、乳がん細胞の増殖能を高め、エストロゲン様作用を示すものが存在し、その塩素置換体や臭素置換体の中にも、親物質と同様にエストロゲン様作用を示すものもあった (4-6, 11-13)。これらは、乳がん細胞の増殖に寄与し、症状の重篤化につながる可能性も考えられた。

一方、植物には、フラボノイドをはじめとして、人体に対して有効な様々な成分があることが知られている。抗がん、抗菌、抗酸化などの作用があるとされる緑茶、花粉症の軽減に効果があるとされるべにふうきは、健康食品としても飲用されている。緑茶は、お茶の渋みの成分であるカテキンが失われずに残っているもので、紅茶やほうじ茶などの種類がある中で、最も多くカテキンを含んでいる。カテキンはポリフェノールの一種であり、強い抗酸化作用を持っている。その他に、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、カフェインなどの栄養素も含まれている。べにふうきは、日本のべにほまれと中国のダージリンを交配してつくられたもので、カテキン含量が多く、抗アレルギー成分のスクリクチニンと、メチル化カテキンを豊富に含んでいる。べにふうきを飲んだ半数の花粉症患者の症状が緩和されたというデータもある (14, 15)。最近では、松葉に含まれる成分やその効果についても注目されている。当大学の所在地である静岡市では、平成 25 年に世界文化遺産として三保松原が登録された。景観維持のために多くの松葉が伐採され、その廃棄費用もかかるため、この松葉の有効活用の取り組みが考えられている。松葉には、ケルセチンが多く含まれ、抗腫瘍活性も認められるという報告もある (16, 17)。これら植物葉には、環境汚染物質の有害作用を軽減する効果があるのではないかと期待される。

そこで、本研究では、植物葉が細胞にどのような影響を及ぼすかを、環境汚染物質との複合曝露を中心に解析し、リスク軽減に寄与するかどうか検証することにした。抑制効果が認められれば、環境汚染物質の有害作用を軽減し、それが原因とされる疾患の減少に寄与できるものと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、環境汚染物質として、PAHs の 1 つである BaA、及びその塩素置換体 ClBaA に注目した。これらは、乳がん細胞 MCF-7 の増殖能を高め、エストロジェ

ン応答遺伝子である pS2、AhR 標的遺伝子である CYP1A1、炎症マーカーである IL-6 の遺伝子発現レベルを上昇させることが明らかになっている (4-6, 18)。これらと、植物葉の緑茶、べにふうき、松葉の粉末抽出物を複合曝露させ、乳がん細胞の増殖能に対してどのような影響があるか、pS2、CYP1A1、IL-6 の遺伝子発現レベルがどのように変化するか、調べることにした。

3. 方法

3-1. ClBaA の合成及び精製

既に確立した方法に従い、BaA を親物質として、塩素置換体 7-ClBaA を単離精製した (4, 19, 20) (Fig. 1)。塩素置換体は、親物質と N-クロロコハク酸イミドを炭酸プロピレン中で、100°C で、2 ~ 3 時間処理し、HPLC により精製し、NMR と GC/MS により確認した。

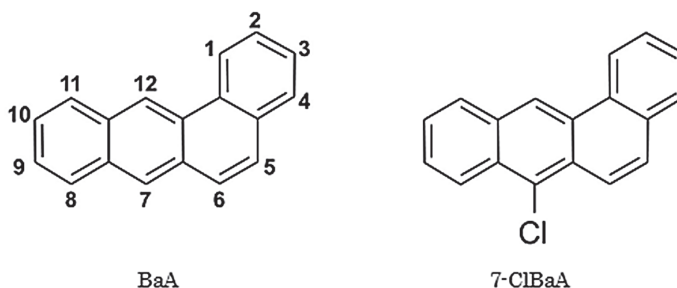


Fig. 1 Chemical structures of BaA and ClBaA.

3-2. 植物葉の調製

今回は、茶葉の粉末として、秋山園 (静岡県富士市今泉) のやれるっ茶 (緑茶) とべにふうきの粉末を用いた。粉末飲用としては、1 g を 500 mL の水に溶かしている。これを 10 倍濃い状態、粉末 1 g 当たり 50 ml の PBS(-) に溶解し、室温で 3 時間、時々攪拌した。3000 回転で 10 分間遠心分離して非溶解分を除き、上清をろ過滅菌し原液とした。

また、三保松原の松葉を採集し、粉碎した粉末も同様に調製し、松葉原液とした。

3-3. 細胞培養

MCF-7 細胞 (H. Hagenmaier, University of Tuebingen, Germany より分与) を、10% 牛血清 (ICN Biomedicals) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日水製薬) で、5% CO₂、37°C 下で培養した。

3-4. 細胞増殖試験

① 活性炭処理をした 10% 牛血清 (Hyclone) を含む phenol red-free DMEM (Gibco) に、細胞を 5×10^4 個/mL となるように懸濁し、96 穴プレートに、 5×10^3 個/

well となるように 100 μ l ずつ播種した。

② 4 時間後に、目的の濃度となるように検査試料を加え、さらに 3 日間培養した。植物葉については、調製した原液、これを PBS(-) で 10 倍希釈した希釈液を、培地の 1/10 量となるように加えた。コントロールには、E₂ の溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えた。また、陽性コントロールとして、10⁻¹² ~ 10⁻⁹ M E₂ を毎回行った。

③ 3 日後、細胞増殖試験用試薬である cell counting kit-8 (Dojin) (21, 22) を各ウェルに加えミキシングし、2 時間呈色反応を行った。

④ マイクロプレートリーダー EL808 (BioTek) を用い、450 nm (参照波長 630 nm) の吸光度を測定した。

3-5. 遺伝子発現レベルの解析

① 3-4. の①と同様に細胞を DMEM に懸濁し、10 cm シャーレに、7.4 × 10⁵ 個 / dish となるように播種した。

② 24 時間後に、培地を phenol red-free DMEM に交換した。

③ さらに 24 時間後に、目的の濃度となるように検査試料を加えた。コントロールには、試料の溶媒である DMSO を加えた。

④ RNA の抽出：試料添加 24 時間後に、RNeasy Mini Kit 及び RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて、RNA 抽出を行った。

⑤ cDNA への変換：Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) により、RNA を cDNA に変換した。

⑥ Real-time PCR：QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を使用して、④で作成した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR システム Mx3000P (ストラタジーン社) を用いて、real-time PCR を行った。標的遺伝子は、pS2、CY-P1A1、IL-6 とした (5)。内部標準遺伝子として GAPDH を用いた。

4. 結果

4-1. 細胞増殖試験

4-1-1. BaA 及び ClBaA と緑茶の複合効果

緑茶の原液、10 倍希釈に、BaA の濃度を 10⁻⁸ ~ 10⁻⁵ M に変化させて、細胞に曝露した (Fig. 3 A)。E₂ 単独では 10⁻¹⁰、10⁻⁹ M、BaA 単独では 10⁻⁵ M をピークに濃度依存的に細胞増殖能を高めた。BaA と緑茶の原液を複合曝露させたものでは、細胞死が起こっていた (Fig. 2 B)。これは、緑茶の原液のみの場合にも認められた。BaA と緑茶の 10 倍希釈を複合させたものでは、BaA 単独と比べて細胞増殖能が BaA の各濃度で低くなる傾向にあった。10⁻⁶、10⁻⁵ M の高濃度の BaA ほど、大きく低下した。緑茶の 10 倍希釈のみでは、コントロールと同程度の増殖能を示し、細胞死は起こらなかった。

緑茶と ClBaA との複合曝露についても、同様であった (Fig. 3 B)。

4-1-2. BaA 及び ClBaA とべにふうきの複合効果

べにふうきの原液、10 倍希釈に、BaA の濃度を $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M に変化させて曝露した (Fig. 4C)。E₂ 単独では 10^{-10} 、 10^{-9} M、BaA 単独では 10^{-5} M をピークに濃度依存的に細胞増殖を高めた。BaA とべにふうきの原液を複合させたものでは、細胞死が起こっていた。これは、べにふうきの原液のみの場合にも認められた。BaA とべにふうきの 10 倍希釈を複合させたものでは、BaA 単独と比べて細胞増殖能がやや低下する傾向にあった。べにふうきの 10 倍希釈のみでは、コントロールと同程度の増殖能を示し、細胞死は起こらなかった。

べにふうきと ClBaA との複合曝露についても、原液では細胞死が起こり、10 倍希釈では ClBaA の濃度が 10^{-6} 、 10^{-5} M で、細胞増殖能が低下する傾向にあった (Fig. 4D)。

4-1-3. BaA 及び ClBaA と松葉の複合効果

松葉の原液、10 倍希釈に、BaA の濃度を $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M に変化させて曝露した (Fig. 5E)。E₂ 単独では 10^{-10} 、 10^{-9} M、BaA 単独では 10^{-5} M をピークに濃度依存的に細胞増殖を高めた。BaA と松葉の原液を複合させたものでは、BaA 単独と比べて、細胞増殖能が BaA の各濃度で大きく低下した。しかし、細胞死は起こっていなかった。BaA と松葉の 10 倍希釈を複合させたものでは、BaA 単独の時とほぼ変わらない結果となった。松葉の原液、10 倍希釈のみの場合は、コントロールと同程度の増殖能を示し、細胞死は起こらなかった。

松葉の原液、10 倍希釈に、ClBaA の濃度を $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M に変化させて曝露した (Fig. 5F)。ClBaA と松葉の原液を複合曝露させたものでは、BaA と同様に、ClBaA 単独と比べて細胞増殖能が ClBaA の各濃度で大きく低下した。しかし、細胞死は起こっていなかった。ClBaA と松葉の 10 倍希釈を複合させたものでは、ClBaA 単独と比べて、細胞増殖能が ClBaA の各濃度で低い傾向が見られた。

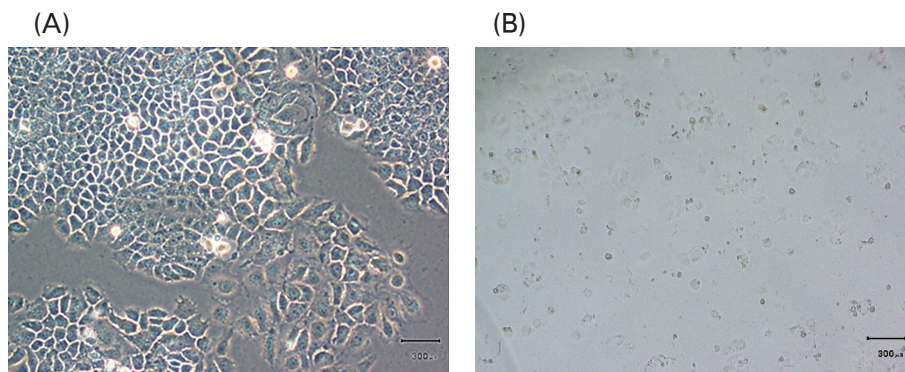


Fig. 2 Light microscopy showing (A) alive and (B) dead MCF-7 cells.

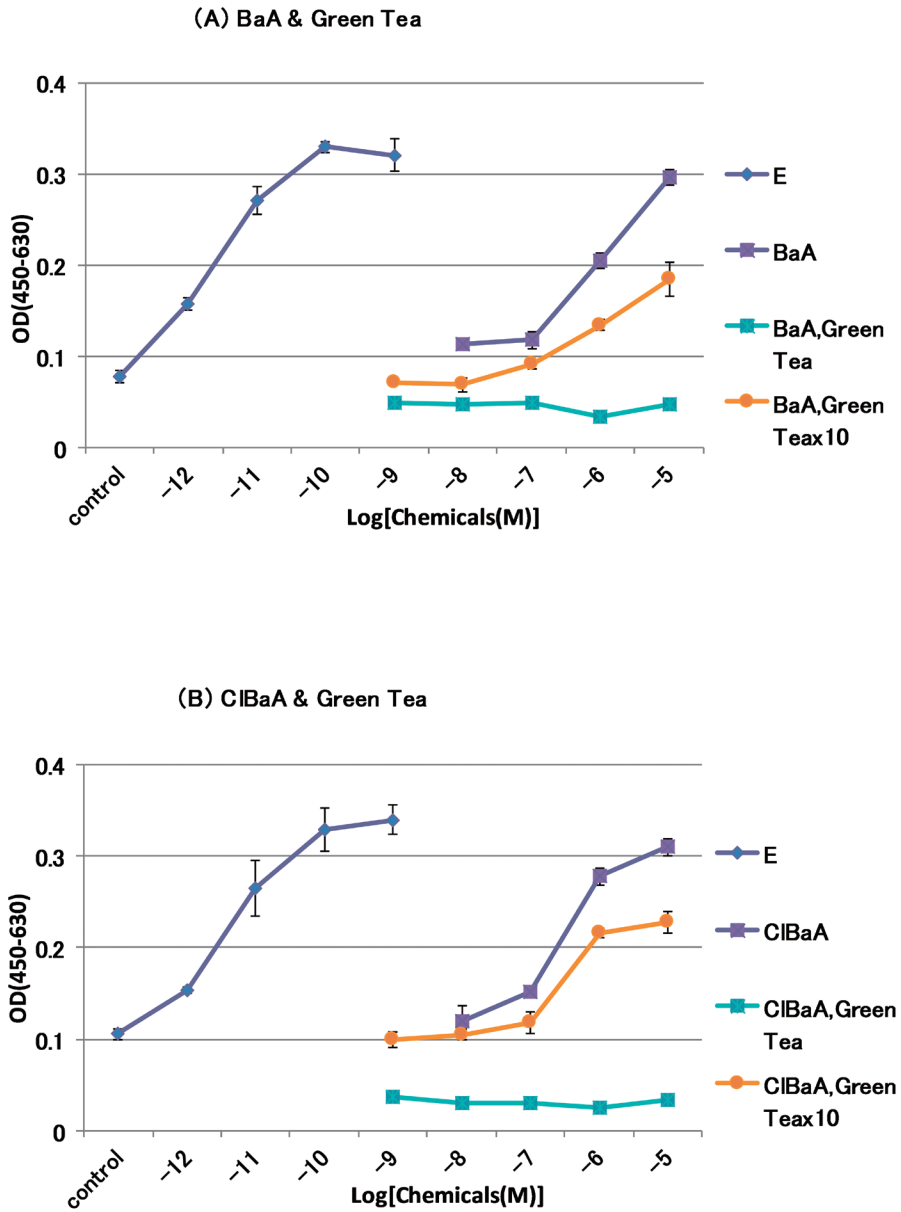


Fig. 3 Effects of BaA, CIBaA and Green tea on the growth of MCF-7 cells. E: E₂, x10: 10-fold dilution.

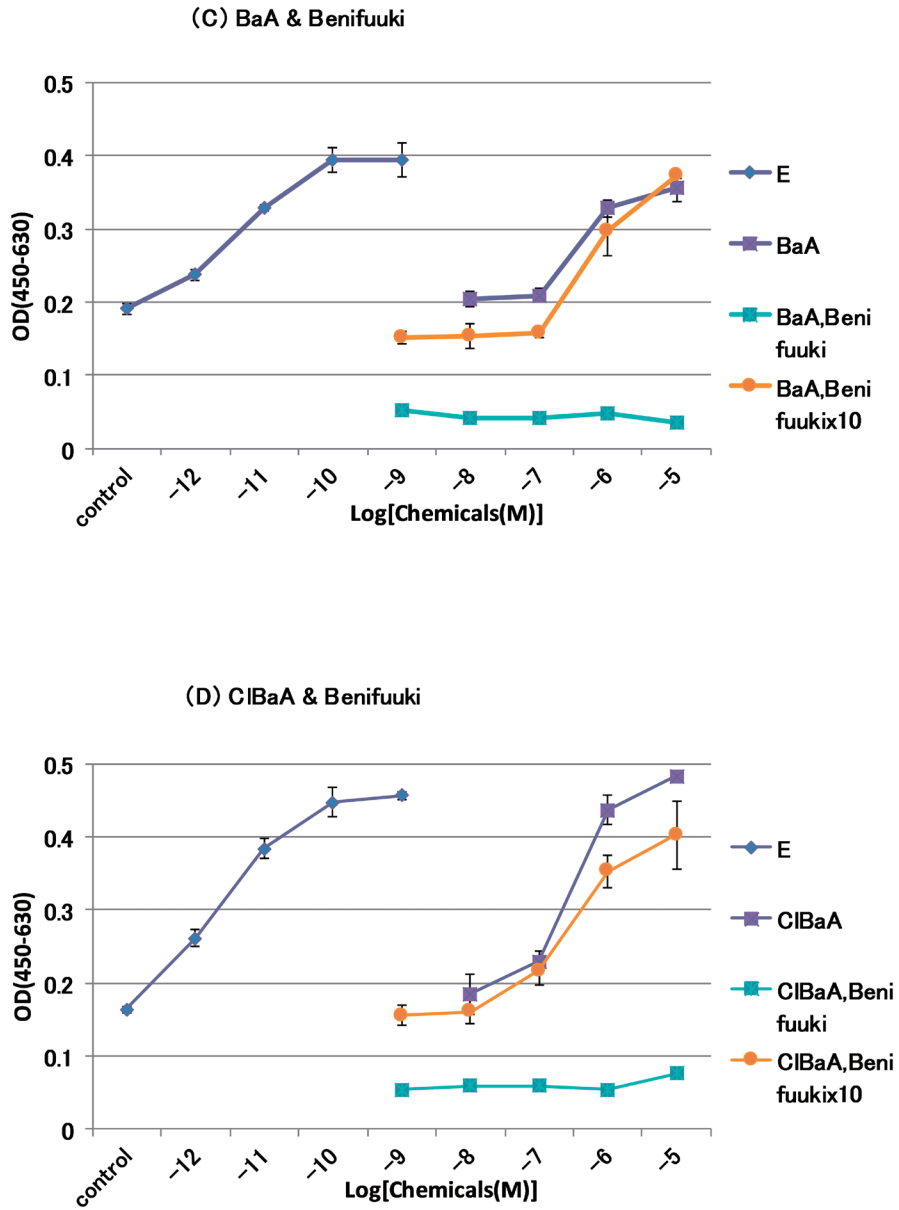


Fig. 4 Effects of BaA, CIBaA and Benifuuki on the growth of MCF-7 cells. E: E₂, x10: 10-fold dilution.

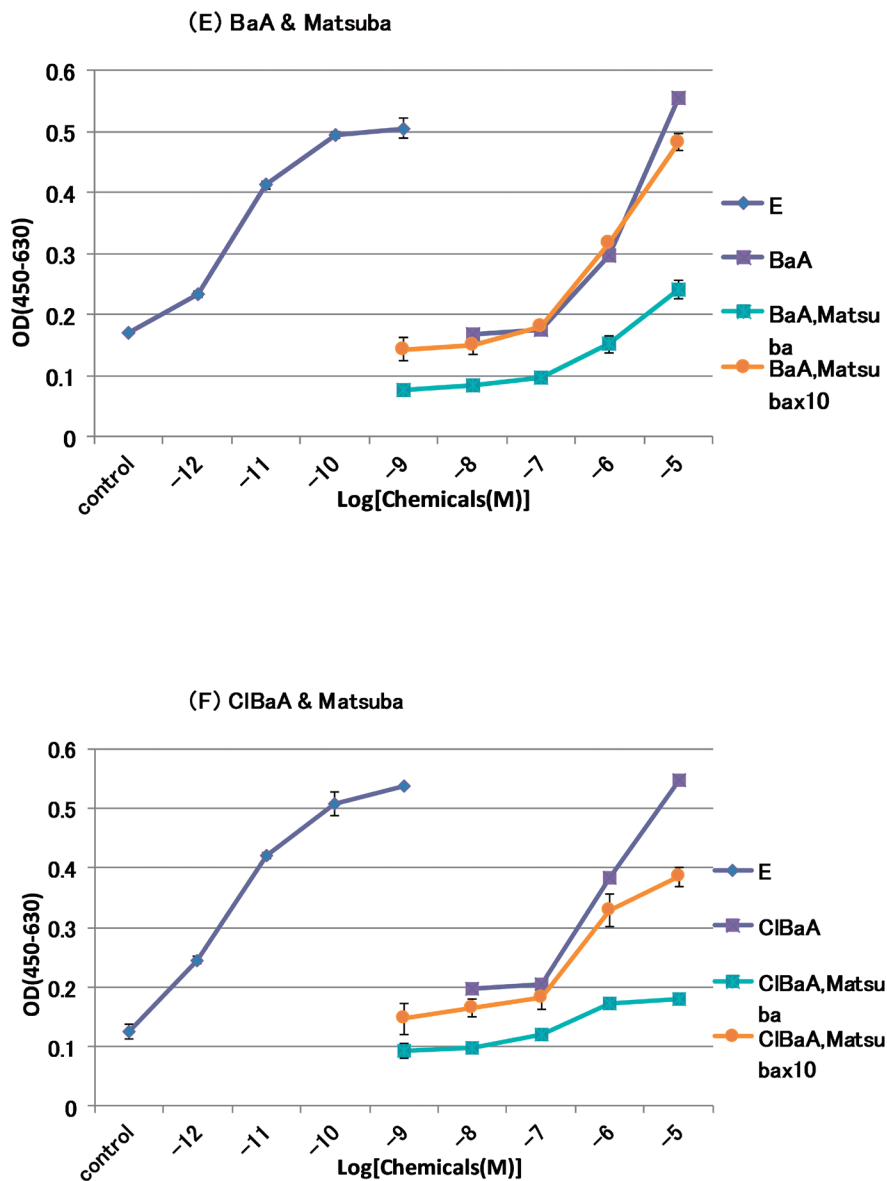


Fig. 5 Effects of BaA, CIBaA and Matsuba on the growth of MCF-7 cells.
E: E₂, x10: 10-fold dilution.

4-2. 標的遺伝子発現レベルの解析

4-1. 細胞増殖試験において、細胞死が起こらなかった松葉について、BaA とのいくつかの組み合わせで MCF-7 細胞に曝露し、遺伝子発現レベルの変化を調べた。標的遺伝子は、pS2、CYP1A1、IL-6 の 3 つとし、コントロールの溶媒である DMSO 曝露での値を 1 とし、内部標準遺伝子として用いた GAPDH で補正し、発現量を相対的に表した。

4-2-1. pS2

10^5 M BaA は 10^6 M BaA よりも発現量が約 2 倍高く、 10^{10} M E_2 は発現量が一番高かった (Fig. 6A)。松葉の 10 倍希釈と原液では、どちらも発現量が同程度で、 10^6 M BaA よりも少し低い結果となった。 10^6 M BaA と松葉の 10 倍希釈を複合曝露させたものでは、 10^6 M BaA 単独よりも低下した。しかし、 10^6 M BaA と松葉の原液を複合させたものでは、 10^6 M BaA 単独よりも若干発現量が高かった。 10^5 M BaA と松葉の 10 倍希釈を複合させたものでは、 10^5 M BaA 単独より低下した。 10^5 M BaA と松葉の原液を複合曝露させたものでは、さらに低下した。

4-2-2. CYP1A1

10^5 M BaA は発現量が一番高く、 10^6 M BaA よりも約 1.5 倍高かった (Fig. 6B)。 E_2 や松葉の 10 倍希釈と原液では、発現量が低かった。 10^6 M BaA と松葉の 10 倍希釈を複合曝露させたものでは、 10^6 M BaA 単独と発現量がほぼ変わらなかったが、 10^6 M BaA と松葉の原液を複合させたものでは、 10^6 M BaA 単独よりも少し低い結果となった。 10^5 M BaA と松葉の 10 倍希釈を複合させたものでは、 10^5 M BaA 単独より低かった。 10^5 M BaA と松葉の原液を複合させたものでは、さらに低下し、 10^5 M BaA 単独の発現量の約半分であった。

4-2-3. IL-6

10^{10} M E_2 の発現量はコントロール値よりも低かった。 10^5 M BaA は発現量が一番高く、 10^6 M BaA よりも約 1.3 倍高かった (Fig. 6C)。松葉の 10 倍希釈のみではコントロール値よりも発現量が少し高く、松葉の原液のみではコントロール値よりも少し低い結果となった。 10^6 M BaA と松葉の 10 倍希釈を複合させたものでは、 10^6 M BaA 単独よりも発現量が低かった。BaA の 10^6 M と松葉の原液を複合させたものでは、さらに低下した。 10^5 M BaA と松葉の 10 倍希釈を複合させたものでは、 10^5 M BaA 単独よりも発現量が低かった。 10^5 M BaA と松葉の原液を複合させたものは、さらに低下した。

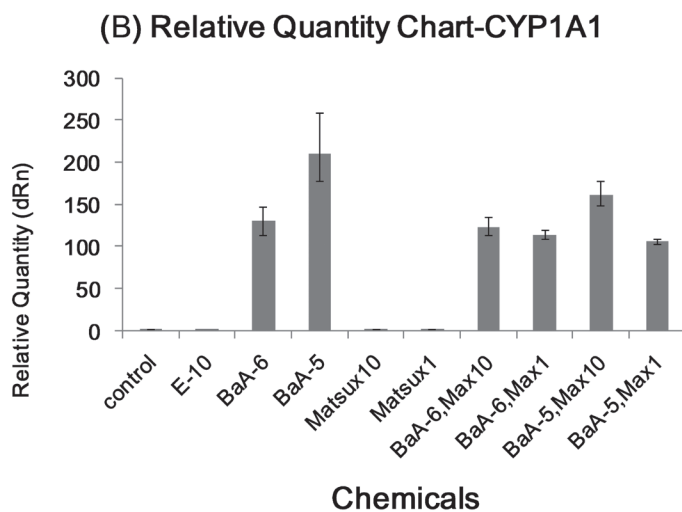
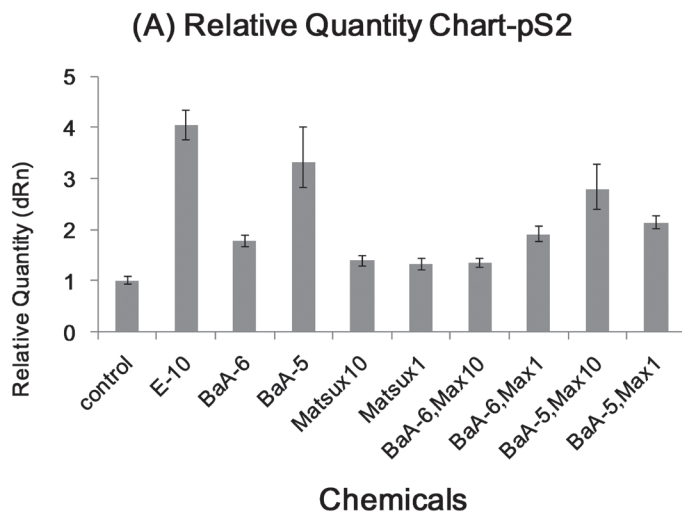


Fig. 6A, B Induction of pS2 and CYP1A1 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

E-10: 10^{-10} M E_2 , BaA-6: 10^{-6} M BaA, BaA-5: 10^{-5} M BaA, Mastu, Ma: Mastuba, x10: 10-fold dilution, x1: not diluted.

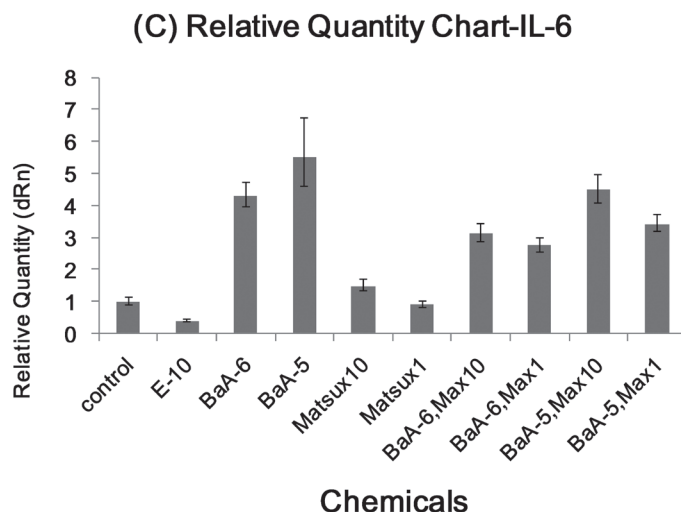


Fig. 6C Induction of IL-6 in MCF-7 cells. The values are expressed as potency relative to that of the control (DMSO).

E-10: 10^{-10} M E_2 , BaA-6: 10^{-6} M BaA, BaA-5: 10^{-5} M BaA, Mastu, Ma: Mastuba, x10: 10-fold dilution, x1: not diluted.

5. 考察

本研究では、PAHs の 1 つである BaA 及び ClBaA が乳がん細胞 MCF-7 に及ぼす作用に対して、緑茶、べにふうき、松葉といった植物葉がどのような影響を与えるか、細胞増殖能と、pS2、CYP1A1、IL-6 の遺伝子発現レベルに関して調べた。

BaA 及び ClBaA と、緑茶やべにふうきの原液を複合曝露させたものでは、細胞死が起こっていた。これは、緑茶やべにふうきの原液のみの場合にも認められ、BaA 及び ClBaA の有無にかかわらず、緑茶やべにふうきの原液濃度では、MCF-7 細胞に対して細胞毒性を示すことが考えられた。BaA 及び ClBaA と、緑茶やべにふうきの 10 倍希釈を複合曝露させたものでは、BaA 及び ClBaA の各濃度において、単独よりも細胞増殖能が低下した。従って、10 倍希釈の緑茶、べにふうきには、BaA 及び ClBaA のエストロゲン様作用を阻害する働きがあることが考えられた。一方、BaA と松葉の原液を複合曝露させたものでは、BaA の各濃度において、BaA 単独よりも細胞増殖能が大きく低下したが、細胞死を起こさなかった。BaA と松葉の 10 倍希釈を複合曝露させたものでは、BaA 単独と細胞増殖能がほぼ変わらなかった。ClBaA と松葉を複合曝露させたものでは、原液、10 倍希釈共に、濃度依存的に ClBaA 単独よりも細胞増殖能が低下した。従って、松葉には BaA 及び ClBaA のエストロゲン様作用を阻害する働きがあることが考えられた。松葉は、緑茶、べにふ

うきほどの毒性を示さないことから、穏やかに作用する飲用物としての利用も考えられた。

次に、遺伝子発現解析では、BaA、松葉を用いて実験を行った。pS2 遺伝子は、エストロゲン応答遺伝子で、MCF-7 細胞ではエストロゲンの作用により発現レベルが高まることが知られている。従って、pS2 遺伝子の発現量を調べることで、添加した物質がエストロゲン様物質であるのかを判断することができる。pS2 は、 10^{-10} M E_2 で、BaA では濃度依存的に、発現量が高くなった。松葉では、コントロールよりも少し高い程度で、pS2 の発現をあまり誘導しないことが考えられた。BaA と松葉を複合曝露した場合、BaA 単独よりも発現量が低下した。従って、松葉を複合曝露させることで、pS2 の発現が抑制されることが考えられた。CYP1A1 遺伝子は、AhR 標的遺伝子で、PAHs により発現が誘導されることが知られている。 E_2 、松葉では発現レベルが低かった。BaA と松葉を複合曝露した場合、BaA 単独よりも発現量が低下し、松葉が高濃度ほど、その低下の度合いも高まった。従って、松葉には、CYP1A1 の発現レベルを抑制する作用があることが考えられた。IL-6 遺伝子は、炎症マーカーで、IL-6 の発現により炎症や組織障害を起こすのかを判断することができる。IL-6 は、 E_2 や松葉では発現レベルが低く、これらは炎症や組織障害を起こす作用が低いと考えられた。BaA 単独では発現量が高かったが、松葉を複合曝露すると濃度依存的に発現量が低下した。従って、松葉には、IL-6 の発現レベルを抑制する作用があることが考えられた。以上のことから、pS2、CYP1A1、IL-6 の遺伝子発現に関して、松葉自体はいずれの発現レベルも上昇させないが、BaA による pS2、CYP1A1、IL-6 の遺伝子発現の上昇を抑制する効果があることがわかった。今後は、緑茶やべにふうきについても、解析していく予定である。

以上の結果には、植物に含まれるフラボノイドが関係していることも考えられる。植物葉にはフラボノイドが多く含まれ、その効果も検証され、これらの抗がん作用も報告されており、治療薬としての可能性も考えられている (23, 24)。同時に、植物によって含まれるフラボノイドが異なり、植物特有の効果が表れることが考えられる。茶葉ではカテキン、松葉ではケルセチンが多く含まれ、この作用が表れていることが考えられる (25)。また、がん細胞の種類によっても、フラボノイドの効果が異なることが報告されている (26)。今回は、乳がん細胞を用いて、その増殖能を高める BaA や ClBaA の作用に対して、植物葉の緑茶、べにふうき、松葉がどのような効果を示すか調べた。フラボノイドをはじめとした天然の植物由来の成分は、安全な治療薬あるいは食品として、今後益々有効利用されるものと思われる。環境汚染物質に対する効果も、さらに調べていく必要がある。

謝辞

本研究に当たり、緑茶とべにふうきの粉末は、南原愛様から分与していただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Kuruto-Niwa, R., Ito, T., Goto, H., Nakamura, H., Nozawa, R., Terao, Y. : Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 23, 121-128, 2007.
2. Nakamura, H., Shiozawa, T., Terao, Y., Shiraishi, F., Fukazawa, H. : By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *J. Health Science*, 52, 124-131, 2006.
3. Nakamura, H., Kuruto-Niwa, R., Uchida, M., Terao, Y. : Formation of chlorinated estrones via hypochlorous disinfection of wastewater effluent containing estrone. *Chemosphere*, 66, 1441-1448, 2007.
4. Kuruto, R., Ohura, T., Terao, Y. : Effects of the chlorinated derivatives of environmental pollutant on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 30, 377-391, 2010.
5. Kuruto, R., Yamamoto, S., Ohura, T. : Effects of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons on gene expression. *Tokoha Gakuen University Research Review (Faculty of Education)*, 33, 279-294, 2013.
6. Kuruto, R., Abe, T., Yoshida, K., Ohura, T. : The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives on estrogenic action. *Tokoha University Research Review (Faculty of Education)*, 35, 269-290, 2015.
7. Kakimoto, K., Nagayoshi, H., Inazumi, N., Tani, A., Konishi, Y., Kajimura, K., Ohura, T., Nakano, T., Tang, N., Hayakawa, K., Toriba, A. : Identification and characterization of oxidative metabolites of 1-chloropyrene. *Chem. Res. Toxicol.*, 26, 1728-1736, 2015.
8. Kamiya, Y., Ikemori, F., Ohura, T. : Optimization of pretreatment and ionization for GC/MS analysis for the determination of chlorinated PAHs in atmospheric particulate samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 95, 1157-1168, 2015.
9. Ohura, T., Sakakibara, H., Watanabe, I., Shim, W. J., Manage, P. M., Guruge, K. S. : Spatial and vertical distributions of sedimentary halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in moderately polluted areas of Asia. *Environ. Pollut.*, 196, 331-340, 2015.
10. Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. : The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 103, 113-122, 1995.
11. Ohura, T., Morita, M., Makino, M., Amagai, T., Shimo, K. : Aryl hydrocar-

- bon receptor-mediated effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1237-1241, 2007.
12. Sakakibara, H., Ohura, T., Morita, M., Hirabayashi, S., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Shimoi K. : Aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression by chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and cross-talk with estrogen receptors. *Interdiscip. Stud. Environ. Chem.*, 2, 197-202, 2009.
 13. Ohura, T., Morita, M., Kuruto-Niwa, R., Amagai, T., Sakakibara, H., Shimoi, K. : Differential action of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling in breast cancer cells. *Environ. Toxicol.*, 25, 180-187, 2010.
 14. Maeda-Yamamoto, M., Ema, K., Monobe, M., Shibuichi, I., Shinoda, Y., Yamamoto, T., Fujisawa, T. : The efficacy of early treatment of seasonal allergic rhinitis with benifuuki green tea containing O-methylated catechin before pollen exposure: an open randomized study. *Allergol. Int.*, 58, 437-444, 2009.
 15. Masuda, S., Maeda-Yamamoto, M., Usui, S., Fujisawa, T. : 'Benifuuki' green tea containing o-methylated catechin reduces symptoms of Japanese cedar pollinosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Allergol. Int.*, 63, 211-217, 2014.
 16. Yi, J., Wang, Z., Bai, H., Yu, X., Jing, J., Zuo, L. : Optimization of Purification, Identification and Evaluation of the *in Vitro* Antitumor Activity of Polyphenols from *Pinus Koraiensis* Pinecones. *Molecules*. 20, 10450-10467, 2015.
 17. Ortiz-Miranda, A.S., König, P., Kahlert, H., Scholz, F., Osete-Cortina, L., Doménech-Carbó, M.T., Doménech-Carbó, A. : Voltammetric analysis of Pinus needles with physiological, phylogenetic, and forensic applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 4943-4952, 2016.
 18. Horii, Y., Khim, J.S., Higley, E.B., Giesy, J.P., Ohura, T., Kannan, K. : Relative potencies of individual chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons for induction of aryl hydrocarbon receptor-mediated responses. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 2159-2165, 2009.
 19. Kitazawa, A., Amagai, T., Ohura, T. : Temporal trends and relationships of particulate chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in urban air. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 4592-4598, 2006.
 20. Horii, Y., Ok, G., Ohura, T., Kannan, K. : Occurrence and profiles of chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons in waste incinerators. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 1904-1909, 2008.
 21. Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. : A highly

- water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44, 1299-1305, 1997.
22. Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. : A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36, 47, 1999.
 23. Shi, X., Liu, D., Zhang, J., Hu, P., Shen, W., Fan, B., Ma, Q., Wang, X. : Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* contribute to anti-tumor *in vitro*. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16, 245, 2016.
 24. Fatima, N., Ahmad, M.K., Ansari, J.A., Ali, Z., Khan, A.R., Mahdi, A.A. : Anticancer, antioxidant potential and profiling of polyphenolic compounds of *Wrightia tinctoria* Roxb. (R.Br.) bark. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 7, 159-165, 2016.
 25. Su, Q., Peng, M., Zhang, Y., Xu, W., Darko, K.O., Tao, T., Huang, Y., Tao, X., Yang, X. : Quercetin induces bladder cancer cells apoptosis by activation of AMPK signaling pathway. *Am. J. Cancer Res.*, 6, 498-508, 2016.
 26. Sak, K. : Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn. Rev.*, 8, 122-146., 2014.

