

ヒト血清中の抗酸化性ビタミン濃度と ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) 消去活性の関係について

内田博之¹ 高橋美保子¹ 小田切陽一²

The relationship between concentrations of antioxidative vitamins
and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) - eliminating activity of human serum

Uchida Hiroyuki¹ Takahashi Mihoko¹ Odagiri Youichi²

(1997年 9 月 1 日受付)

ABSTRACT

Activated oxygen radicals are important for initiating free-radical reactions in vivo, and are thus well recognized as sources of oxidative cellular damage including DNA lesions which may be involved in the etiologies of cancer and aging. Conversely, to prevent the free-radical reactions, antioxidants in the place of these activated radicals are important. In extracellular circumstances, antioxidative substances in serum such as vitamins, proteins, sugars or lipids may play an important role in protecting of cells against oxidative stress by activated oxygen radicals or secondarily induced peroxides. In the present study, we attempted to determine if selected vitamins (folic acid, vitamin C, vitamin B 12, β -carotene and α -tocopherol) in serum had any effect on the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) -eliminating activity of serum.

The data of $\cdot\text{OH}$ -eliminating activity and serum vitamin concentrations from 27 healthy donors were statistically analyzed by simple correlations coefficient analysis. Significant correlation between $\cdot\text{OH}$ -eliminating activity and serum level of folic acid ($r=0.5708$; $p<0.01$) or vitamin C ($r=0.5731$; $p<0.01$) were detected while no relationship was detected for the other micronutrients. Then the data were analyzed by multiple regression analysis with $\cdot\text{OH}$ -eliminating activity as the dependent variable. The results of this analysis again showed that a strong relationship existed between $\cdot\text{OH}$ -eliminating activity and folic acid ($\beta=0.5730$; $p=0.0052$) or vitamin C ($\beta=0.5006$; $p=0.0309$) levels.

These results suggest that highly water-soluble vitamins in serum, eg of such as folic acid and vitamin C may contribute significantly to the elimination of $\cdot\text{OH}$ at the extracellular level, in contrast to lipid-soluble vitamins such as β -carotene or α -tocopherol.

Key Words : Human serum, Antioxidative vitamin, Hydroxyl radical

¹埼玉医科大学 医学部 (公衆衛生学)

²本学 人間・健康の科学

I. 緒言

活性酸素ラジカル (activated oxygen radical) は、生体内において free radical 反応を生じさせる原因となる。この反応は DNA を標的分子として、遺伝子突然変異、DNA 修復異常、不定期 DNA 合成を誘発するほか、染色体異常、姉妹染色分体交換、小核形成などの染色体傷害も引き起こす。そのため活性酸素ラジカルは、発がんや加齢の原因とされる DNA 傷害を含めた細胞の酸化的傷害の原因として注目されている¹⁻⁵⁾。活性酸素ラジカルの発生する場所に存在する抗酸化物質は、ラジカルを捕捉して free radical 反応を防ぐ作用を示す。そのため細胞外環境である血清中では、ビタミン類、タンパク質、糖質、脂質などの成分が、活性酸素ラジカルや二次的に生じた過酸化物質による酸化的ストレスに対する防御の上で重要な役割を担っていると考えられる⁶⁾。血清成分の中でビタミン濃度は、生活習慣、特に食生活の影響を強く受け、血清のラジカル除去能力の個人差を考える上で最も重要と考えられる。生体内の活性酸素としては、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、1重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、ペルオキシラジカルなどがあり、 $\cdot\text{OH}$ は活性酸素の中で最も反応性が高いため強い酸化的細胞傷害を与える⁷⁾。

本研究では、血清成分中の抗酸化性ビタミンの $\cdot\text{OH}$ 除去能への寄与を明らかにするために健常人における血清の $\cdot\text{OH}$ 除去活性を電子スピン共鳴法により測定し、同時に血清中の抗酸化性ビタミン濃度を測定しその関連を検討した。

II. 試料と方法

1. 試料

血液提供者は19歳から67歳 (平均年齢±標準偏差: 35.4 ± 16.3 歳) の健常な男女27人 (男性10人, 女性17人) であり、採血はプラスチック

シリンジを用いて肘静脈より行った。これらの血液提供者はいずれも非喫煙者であり、投薬等の医療行為を受けていない者とした。血液は2,000 gで15分間遠心分離を行い、得られた血清は各種ビタミン濃度の測定と電子スピン共鳴 (ESR; Electron spin resonance) スペクトロメトリ分析に使用した。血清は、測定開始時まで -85°C において凍結保存を行った。

2. 各種ビタミンの測定

- (1) 葉酸: CLIA 法を用いた葉酸分析キットであるケミルミ ACS-葉酸 (チバコーニング社) を使用して分析した。
- (2) ビタミン C: Speak ら⁸⁾の方法により、血清からタンパク質を除去し、次にアスコルビン酸オキシダーゼ処理を行い、O-フェニレンジアミンで誘導体化後、HPLC 分析を行った。
- (3) ビタミン B12: CLIA 法を用いたビタミン B12分析キットであるケミルミ ACS-ビタミン B12 (チバコーニング社) を使用して分析した。
- (4) β -カロチン: 加美山ら⁹⁾の方法により、血清中の β -カロチンをヘキサン抽出し、HPLC 分析を行った。
- (5) α -トコフェロール: Abe ら¹⁰⁾の方法により、血清中の α -トコフェロールをヘキサン抽出し、HPLC 分析を行った。

3. ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) 消去活性の測定

- (1) $\cdot\text{OH}$ の発生と ESR スペクトロメトリ分析

4℃の蒸留水1 ml をポリスチレンチューブに入れ、次にスピントラップ剤として5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を50 mM の濃度になるまで添加し、X-ray 照射器 (CMB-2, Softex, 東京) を使用して4 Gy を照射した。X-ray の照射条件は電圧を40 kVp、電流を4.5 mA、照射距離を500 mm、線量率を1 Gy/min とした。一方、4℃の血清200 μl と4℃の蒸留水800 μl をポリスチレンチューブ (血清濃度

20%)に入れ、DMPOを50 mMの濃度になるまで添加し、X-ray照射器により4 Gyを照射した。X-ray照射後直ちに、ポリスチレンチューブは氷上で冷却し、その中の試料溶液はフラット石英セルに移した後、ESRスペクトロメトリ分析を行った。ESRスペクトルはESPRITコンピュータシステムを装着したJEOL-RE-1 X X-band spectrometer (日本電子

(株)、東京)により記録した。分析条件はmicrowave powerを8 mW、magnetic fieldを 334.0 ± 5.0 mT、modulation amplitudeを0.1 mT、modulation frequencyを100 kHz、steep timeを5.0 mT/min、response timeを0.03 sec、scanning timeを20 secとなるように設定した。X-ray照射後、分析開始までの時間は130秒とした。 $\cdot\text{OH}$ の検出は、DMPOをスピントラップ剤として使っているために、DMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトシグナルとして検出した。

(2) $\cdot\text{OH}$ 消去活性の測定

DMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトのシグナル強度は内部標準の Mn^{2+} シグナル強度に対する相対強度として求めた。シグナル強度の算出には、4つのDMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトのうち第2シグナルと両側の Mn^{2+} シグナルを使用した。

$\cdot\text{OH}$ 消去活性の算出には、次に示す式を使用した。

$$\begin{aligned} \cdot\text{OH} \text{ 消去活性}(\%) = & \{ (\text{蒸留水の DMPO-}\cdot\text{OH} \text{ アダクトシグナル強度}) - (\text{血清を20\%含む蒸留水の DMPO-}\cdot\text{OH} \text{ アダクトシグナル強度}) \} \\ & / (\text{蒸留水の DMPO-}\cdot\text{OH} \text{ アダクトシグナル強度}) \times 100 \end{aligned}$$

Ⅲ. 結果

ESRスペクトルは、DMPOをスピントラップ剤として使っているために、DMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトとして検出し、そのパターンは図1.に示した。図1. (A)は、スピントラップ剤のDMPOを添加しただけの蒸留水のDMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトシグナルを示した。このシグナルは14.9Gに1:2:2:1の比率の4つ組パターンを示した。両側に現れた強いシグナルは、 Mn^{2+} に由来するシグナルである。図1. (B)は、図1. (A)と同条件で血清を20%加えた試料のDMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトシグナルの典型例を示した。図1. (A)に比べ図1. (B)のDMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトシグナルが明らかに低減していることより、血清には、 $\cdot\text{OH}$ を消去す



図1 DMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトのESRスペクトル

(A) DMPO 50 mMを含む蒸留水に4 GyのX線を照射したときのスペクトル。(B) DMPO 50 mMと血清20%を含む蒸留水に4 GyのX線を照射したときのスペクトル。DMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトの第2シグナルは矢印で示した。両サイドのシグナルは内部標準の Mn^{2+} に由来する。DMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトのシグナル強度は Mn^{2+} シグナル強度に対するDMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトの第2シグナルの割合として求めた。ESRスペクトロメトリの分析条件はmicrowave powerを8 mW、magnetic fieldを 334.0 ± 5.0 mT、modulation amplitudeを0.1 mT、modulation frequencyを100 kHz、sweep timeを5.0 mT/min、response timeを0.03 sec、scanning timeを20 secとした。

表1 血清中抗酸化性ビタミン濃度と・OH消去活性の測定結果

ビタミン, REA	最大値	最小値	Mean±SD
Folic acid (ng/ml)	11.6	3.7	7.3±2.1
Vitamin C (μg/ml)	11.2	0.7	4.6±2.6
Vitamin B12 (pg/ml)	1135.0	268.0	570.9±209.9
β-carotene (μg/dl)	162.6	9.5	38.5±29.4
α-tocopherol (μg/ml)	16.5	6.2	10.3±2.4
REA (%)	65.8	3.0	33.7±15.2

REA: relative ・OH-eliminating activity
Mean±SD: mean±standard deviation (n=27)

表2 年齢と血清中抗酸化性ビタミン濃度、・OH消去活性の関係

ビタミン, REA		相関係数
Folic acid	vs. Age	0.3438
Vitamin C	vs. Age	-0.1459
Vitamin B12	vs. Age	0.0827
β-carotene	vs. Age	-0.0006
α-tocopherol	vs. Age	0.1860
REA	vs. Age	-0.1008

REA: relative ・OH-eliminating activity

る活性が認められた。・OH消去活性の最高値は65.8%、最低値は3.0%（平均値±標準偏差＝33.7±15.2%）であった。

各被検者において測定された各種ビタミン濃度と・OH消去活性の平均値を表1に示した。まずこれらの測定値に対する加齢影響を評価するために年齢と葉酸、ビタミンC、ビタミンB12、β-カロチン、α-トコフェロール濃度の相関係数を求めたところ、表2.に示すように、それぞれ0.3438、-0.1459、0.0827、-0.0006、0.1860であった。年齢と各種ビタミン濃度との間には、葉酸濃度が加齢に伴い上昇する傾向を認めたが、いずれの場合にも有意な相関関係は認められなかった。また、年齢と・OH消去活性の相関係数は-0.1008であり、有意な相関関係は認められなかった。

・OH消去活性と各種ビタミン濃度の関係を図2に示した。・OH消去活性と葉酸、ビタミンC、ビタミンB12、β-カロチン、α-トコ

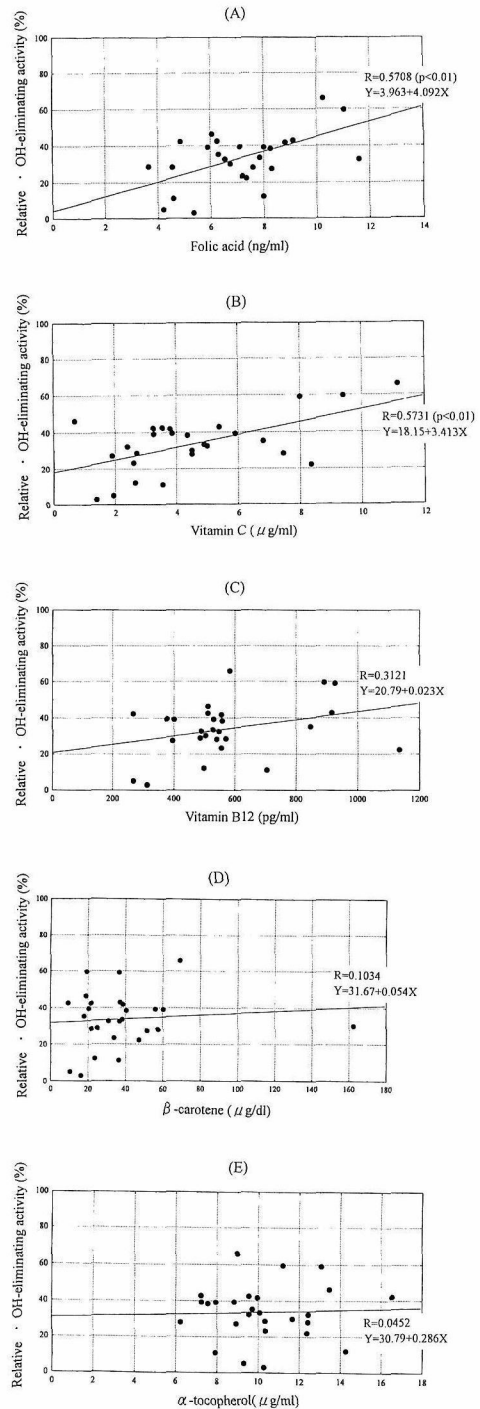


図2 説明 血清の・OH消去活性と抗酸化性ビタミン濃度の散布図

図2 説明： 相関係数と回帰直線式は図中に示した。(A)・OH 消去活性と葉酸。(B)・OH 消去活性とビタミン C。(C)・OH 消去活性とビタミン B12。(D)・OH 消去活性と β -カロチン。(E)・OH 消去活性と α -トコフェロール。

表3 血清の・OH 消去活性と抗酸化性ビタミン濃度、年齢の重回帰分析

ビタミン, 年	β -値	p-値
Folic acid	0.5730	0.0052
Vitamin C	0.5006	0.0309
Vitamin B12	-0.1678	0.4264
β -carotene	-0.0639	0.6862
α -tocopherol	0.1364	0.3945
Age	-0.2821	0.1352

フェロール濃度の相関係数は、それぞれ0.5708 ($p < 0.01$)、0.5731 ($p < 0.01$)、0.3121、0.1034、0.0452であり、・OH 消去活性と葉酸、ビタミン C 濃度の間には有意な正の相関関係が認められた。一方、血清の・OH ラジカル消去活性とビタミン B12、 β -カロチン、 α -トコフェロールとの間には相関関係は認められなかった。

葉酸の加齢影響やビタミン相互の影響を考慮して検討するために、・OH 消去活性を従属変数、各種ビタミン濃度と年齢を独立変数とした重回帰分析を行い、その結果を表3に示した。葉酸、ビタミン C、ビタミン B12、 β -カロチン、 α -トコフェロール濃度の β 値は、それぞれ0.5730 ($p=0.0052$)、0.5006 ($p=0.0309$)、-0.1678 ($p=0.4264$)、-0.0639 ($p=0.6862$)、0.1364 ($p=0.3945$) であった。これらの中で β 値が高値を示し・OH 消去活性に最も強く関係しているのは葉酸であり、次にビタミン C であった。一方、年齢の β 値は-0.2821 ($p=0.1352$) であり、・OH 消去活性に関係していないことが示唆された。

IV. 考察

・OH のような活性酸素は、細胞内外の種々の物質と反応し、特に DNA に対して酸化的傷害を招来し、がんや老化の原因となることが知られている^{11,12)}。DNA の酸化的傷害に対する生体の防御機構には、酵素反応によるものと非酵素反応によるものとがある。酵素反応には、内在性スーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼによるものがある^{13,14)}。一方、非酵素反応には、ビタミン、タンパク質、糖質、脂質等の生体成分によるものがあり⁶⁾、これらの成分は活性酸素の中でも特に反応性の高い・OH と容易に反応する¹⁵⁾。血清のような細胞外体液には、内在性スーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼのような活性酸素消去酵素の活性は著しく低いので、血清中では主に非酵素的反応が行われていると推測される。本研究では、血清成分中の抗酸化性ビタミン類の・OH 消去能への寄与について検討した。

血清の・OH 消去活性は、DMPO-・OH アダクトシグナル強度として ESR スペクトロメトリ分析により測定した。得られたスペクトルは14.9G に1:2:2:1の比率の4つ組パターンを示し、典型的な DMPO-・OH アダクトシグナルであった¹⁶⁾。Tanigawa ら¹⁷⁾のように、・OH の発生に Fenton 反応を使う方法に比べ、著者らのように X-ray 照射を行う方が、血清の・OH 消去活性を迅速かつ簡便に分析することができた。このため27人の血清の・OH 消去活性の個体差を容易に比較することが可能となり、本研究で行った一定条件下の比較では・OH 消去活性の個人差は最高で20倍もあることが明らかとなった。この個人差の原因として加齢や血清成分(ビタミン濃度等)を想定し検討したところ、年齢と各種ビタミン濃度、・OH 消去活性との関係は単純回帰分析の結果、葉酸濃度が加齢に伴い上昇する傾向を認めたが、他は明らかでなかった。

・OH 消去活性と各種ビタミン濃度との関係は、単純回帰分析の結果、葉酸とビタミンCの影響を強く受けており、このことより血清中のような水溶性環境では、脂溶性ビタミンより水溶性ビタミンの方が血清の・OH 消去能への寄与が大きいと考えられた。

血清中の・OH 消去活性には、各種ビタミンが相互に関係し合っていると考えられるため、・OH 消去活性を従属変数、各種ビタミン濃度を独立変数として重回帰分析を行った。その結果・OH 消去活性に最も強く関係しているのは葉酸で次いでビタミンCであることが明らかとなった。これは・OH 消去活性と各種ビタミン濃度の単純回帰分析の結果と同様に、脂溶性ビタミンよりも水溶性のビタミンの方が血清の・OH 消去能力に強く寄与している成分であることが明らかとなった。

Bielski ら¹⁸⁾や Cabell ら¹⁹⁾は、ビタミンC 溶液中に発生させた・OH がビタミンC と速やかに反応することを報告している。Rose²⁰⁾は、ヒト結腸上皮培養細胞を用いて、ビタミンC の・OH 消去能力を調べたところ、培養液中のビタミンC が細胞内の・OH を捕捉することを報告している。Gaziev ら²¹⁾は、葉酸、ビタミンC 等を含む抗酸化性ビタミン溶液を飲用した人と飲用しなかった人との末梢血リンパ球を用いて、自然誘発小核頻度と γ 線誘発小核頻度を測定した。その結果、ビタミン溶液非飲用者は飲用者に比べ、いずれの小核頻度も高値となることを報告している。小核頻度は染色体傷害の程度の指標となるので、ビタミン溶液非飲用者は飲用者に比べ、染色体の傷害の程度が高いことを示している。さらに Odagiri ら²²⁾はビタミンC を飲用させたマウスにおいてはX線で誘発される骨髓細胞中の小核頻度が著しく抑制されることを報告している。これらの報告より、血清中の葉酸やビタミンC が・OH を捕捉してラジカル反応を止め、その抗酸化作用によって細胞を酸化的ストレスから防御する役割を担っていることは、十分に考えられる。

さらに腫瘍発生に与えるビタミンC と葉酸の影響についての報告もみられる。Flagg ら²³⁾は、ヒトの癌と抗酸化ビタミン摂取量との関係を疫学的研究により調査し、ビタミンC が子宮頸癌の発生を予防することを報告している。Grio ら²⁴⁾は、血液中の葉酸濃度が低い人は、高い人に比べ子宮頸部に前癌病変の保有率が高いことを報告しており、これは血中葉酸が発癌の予防効果を持つことを示唆している。Maru ら²⁵⁾は、マウスに hydrazine sulphate を投与すると82%に腫瘍が発生するが、hydrazine sulphate の投与と同時に葉酸を投与すると61%に腫瘍が発生することを報告している。これは、葉酸の抗酸化作用により腫瘍の発生が抑制されることを示している。これらの報告が示すように、体内に摂取されたビタミンC や葉酸は、DNA の酸化的傷害を予防し、腫瘍の発生を予防するものと考えられる。

活性酸素ラジカルには、・OH 以外にも O_2^- 、 H_2O_2 、 1O_2 、ペルオキシラジカルがあり、また血清中の抗酸化物質にはビタミン以外にもタンパク質、糖質、脂質がある。そのため、実際に生じている血清中の活性酸素が関与するラジカルの生成・消去反応については、きわめて複雑な過程を経るものと推察される。本研究では、活性酸素ラジカルに・OH、抗酸化物質にビタミンを取り上げ比較検討を行った。その結果、電子スピン共鳴法によって測定された・OH 消去能には個体差が認められ、血清中の葉酸、ビタミンC 濃度との間に強い相関が認められた。以上のことより、血清中の水溶性ビタミンである葉酸とビタミンC は血清中に発生した・OH の消去に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究の一部は、文部省科学研究費基盤研究(C)の助成を受けた。また、本研究は5th International Conference of Anticarcinogenesis and Antimutagenesis において発表された。

文献

- 1) D. Harman: *The aging process*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 7124-7128, 1981.
- 2) T. Nakayama, T. Kimura, M. Kodama, et al.: *Generation of hydrogen peroxide and their superoxide anion from active metabolites of naphthylamines and aminoazo dyes*, *Carcinogenesis*, 4, 765-769, 1983.
- 3) C. Nagata, M. Kodama, Y. Ioki, et al.: *Free radicals produced from chemical carcinogens and their significance in carcinogenesis*, In R.A. Floyd (ed.), *Free radicals and Cancer*, Marcel Dekker, New York and Basel, 1-62, 1982.
- 4) D. Harman: *The free radical theory of aging*, In O. Hayashi, M. Mino (eds.), *Clinical and Nutritional Aspects of Vitamin E*, Elsevier, Amsterdam, 385-393, 1987.
- 5) W. A. Pryor: *Cancer and free radicals*, In D.M. Shankel, P. E. Hartman, T. Kada, et al. (eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Plenum Press, New York, 45-59, 1986.
- 6) M. G. Simic, S. V. Jovanovic: *Mechanisms of inactivation of oxygen radicals by dietary antioxidants and their models*, In Y. Kuroda, M. Delbert, M. Shankel, et al. (eds.), *Antimutagenesis and anticarcinogenesis Mechanisms II*, Plenum Press, New York, 127-137, 1990.
- 7) 二本鋭雄、島崎弘幸: 活性酸素、八木國夫、中野稔監修、医師薬出版、1-32、1987.
- 8) A. J. Speek, J. Schrijver, W. H. P. Schreurs: *Fluorometric determination of total vitamin C in whole blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization*, *J. Chromatogr.*, 305, 53-60, 1984
- 9) 加美山茂利、田近久美子、伊藤宜則: カロチンの測定法、臨床検査、31、268-274、1987.
- 10) K. Abe, G. Katsui: *Determination of tocopherols in serum by high speed liquid chromatography*, *Vitamins*, 49, 259-263, 1975.
- 11) S. C. Sahu: *Role of oxygen free radicals in the molecular mechanisms of carcinogenesis: A review*, *Environ. Carcino. Ecotox. Revs.*, C 9, 83-112, 1991.
- 12) C. E. Cross, B. Halliwell, E. T. Bolish, et al.: *Oxygen radicals and human disease*, *Ann. Intern. Med.*, 107, 526-545, 1987.
- 13) A. P. Autor, G. McLennan, A. W. Fox: *Oxygen free radicals generated by dihydroxyfumarate and ionizing radiation: Cytotoxic effect on isolated pulmonary macrophages*, In R.S. Bhatnagar (ed.), *Molecular Basis of Environment Toxicity*, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 51-67, 1980.
- 14) G. McLennan, L. W. Oberley, A. P. Autor: *The role of oxygen-derived free radicals in radiation-induced damage and death of nondividing eucaryotic cells*, *Radiat. Res.*, 84, 122-132, 1980.
- 15) G. Czapski: *Reaction of $\bullet OH$* , *Method. Enzymol.*, 105, 209-215, 1984.
- 16) G. R. Buettner: *The spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals*, In L.W. Oberly (ed.), *Superoxide Dismutase*, Vol.2, CRC Press, Boca Raton, F.L., 63-81, 1984.
- 17) T. Tanigawa: *Determination of hydroxyl radical scavenging activity by electron spin resonance*, *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, 99, 133-143, 1990.
- 18) B. H. J. Bielski, H.W. Richter: *Some properties of the ascorbate free radical*, *Acad. Sci.*, 258, 231-237, 1975.
- 19) D. E. Cabell, B. H. J. Bielski: *Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO_2 / O_2 -radicals*. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study, 87, 1809-1812, 1983.
- 20) R. C. Rose: *Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals: A radiation model*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169, 430-436, 1990.
- 21) A. I. Gaziev, G.R. Sologub, L. A. Fomenko, et al.: *Effect of vitamin-antioxidant micronutrients on the frequency of spontaneous and in vitro gamma-ray-induced micronuclei in lymphocytes of donors: the age factor*, *Carcinogenesis*, 17, 493-499, 1996.
- 22) Y. Odagiri, T. Karube, H. Katayama, et al.: *Modification of the clastogenic activity of X-ray and 6-mercaptopurine in mice by prefeeding with vitamin C and E*, *J. Nutr.*, 122, 1553-1558, 1992.
- 23) E. W. Flagg, R. J. Coates, R. S. Greenberg: *Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans*, *J. Am. Coll. Nutr.*, 14, 419-427, 1995.
- 24) R. Grió, R. Piacentino, G. L. Marchino, et al.: *Antineoplastic activity of antioxidant vitamins: the role of folic acid in the prevention of cervical dysplasia*, *Panminerva Med.*, 35, 193-196, 1993.
- 25) G. B. Maru, S. V. Bhidé: *Effect of antioxidants and antitoxinants of isoniazid on the formation of lung tumours in*

mice by isoniazid and hydrazine sulphate, Cancer Lett.,
17, 75-80, 1982.