

単純クマリン類の感作性及び交差反応性

政本 幸三

大阪成蹊女子短期大学家政学科

Sensitization and Crossreaction of Simple Coumarins

Yukimitsu MASAMOTO

Department of Home Economics, Osaka Seikei Women's College, 3-10-62, Aikawa, Higashiyodogawa-ku, Osaka 533-0007, Japan

(Received September 6, 2000; Accepted October 27, 2000)

The contact sensitization of 11 simple coumarins was examined by subcutaneous sensitizing of guinea pigs, and the structure-activity relationship and cross-reactivity were investigated. Esculetin, 4-methylesculetin, and daphnetin were found to be strong sensitizers, and 4-hydroxy-coumarin to be a moderate sensitizer. Other simple coumarins tested had a weak sensitivity to mild sensitizers. The results suggest that the introduction of hydroxy group, especially adjacent substitution at the 6, 7, and 8 positions of the coumarin ring with two hydroxy groups, may play an important role in exhibiting the contact sensitization activity. The cross-reactivity was observed between esculetin and 4-methylesculetin, esculin or isoscoporetin, and also between daphnetin and 4-methylumbelliferone or umbelliferone, although there was no mutual cross-reactivity between esculetin and daphnetin. It is interesting to note that guinea pigs, which had a weak sensitivity to umbelliferone, showed a strong cross-reactivity to daphnetin, while those, which had a weak sensitivity to daphnetin, showed a weak cross-reactivity to umbelliferone. It is assumed that a skin-protein conjugation at 5 or 6 positions of the coumarin ring is important to elicit the cross-reactivity of esculetin or daphnetin groups.

Key words—simple coumarins; contact sensitization; cross-reactivity; guinea pig; daphnetin; umbelliferone

緒 言

クマリン類は植物界に遊離あるいは配糖体として広く分布し、特にセリ科、ミカン科などの樹皮、葉、根に多く含まれている。今日では天然物また合成物として1,000種類以上のクマリン化合物が見い出されている。

クマリン類には光感作促進、抗炎症、種子発芽抑制、冠状血管拡張、殺虫・抗菌作用などの生理・薬理作用が報告されている。¹⁻⁴⁾なかでもソラレン、8-メトキシソラレンなどのフロクマリン類の光毒性作用については皮膚科領域で幅広く研究され、Psoralen Photochemotherapy (PUVA) 療法として尋常性乾癬、尋常性白斑、円形脱毛症、アトピー性皮膚炎など各種皮膚疾患の治療に用いられている。⁵⁻⁹⁾

一方、単純クマリン類は古くより香料やサンスクリーン剤として化粧品領域で応用され、光接触性皮膚炎や接触性皮膚炎発生の報告も散見される。¹⁰⁻¹³⁾しかし、単純クマリン類を皮膚科領域に適用した場合の安全性に関する研究報告はKaidbey^{14,15)}やHausen¹⁶⁻¹⁸⁾らの報告があるものの、系統的研究は非常に少ない。著者は単純クマリン類を今後皮膚科領域や化粧品領域に予防、治療の目的で利用するこ

とを考えると、クマリン類の主構造及び置換基の種類と皮膚刺激性、接触感作性などの諸性質との関係を正しく理解することが大切であると考え、本研究を行った。本研究ではモルモットによる実験感作を誘導し、単純クマリン類の1) 水酸基の結合数、2) 水酸基の結合位置、3) 蛋白結合性、4) 皮内代謝性につき比較検討し、感作性あるいは交差感作性の発現と構造との関係の解明を試みたので報告する。

実験の部

1. 実験材料

使用した11種類の検体はFig. 1に示す構造式を持つ一連の単純クマリン類である。4-methylesculetin (4MET), esculetin (ET), 4-methylumbelliferone (4MU), 4-hydroxycoumarin (4HC), umbelliferone (Um), coumarin (Cm), esculin (EL), daphnetin (DH), 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin (57DH4MC), isoscopoletin (isoS), scoparone (SPA) はすべてExtrasynthese S. A. 社製の試薬を特に精製せずに用いた。

2. モルモット皮下投与法による感作性及び交差感作性試験

感作性試験の方法はFig. 2に示す。ハートレー系白色モルモット(雌性、6週令)を各群12匹ずつ

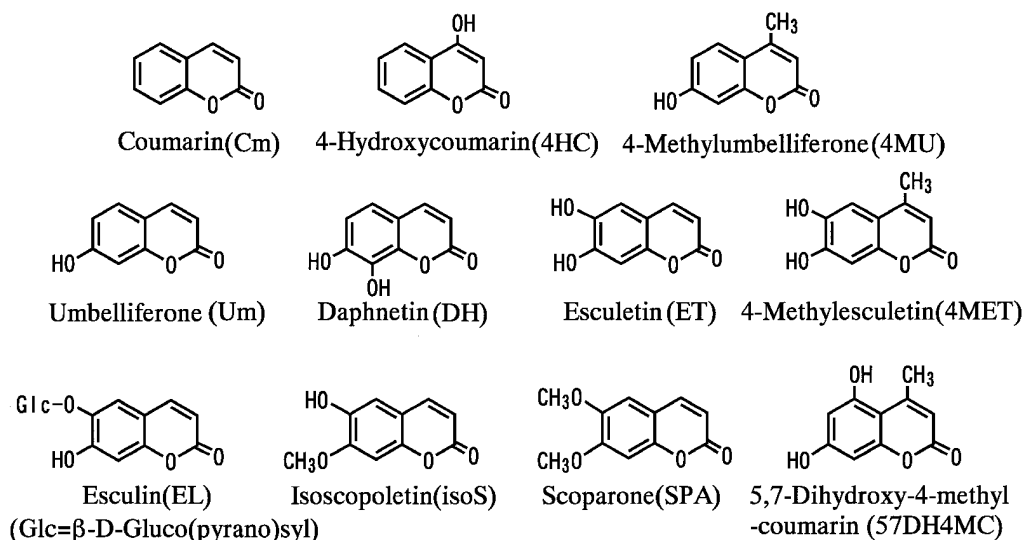


Fig. 1. Chemical Structures of Simple Coumarins Tested

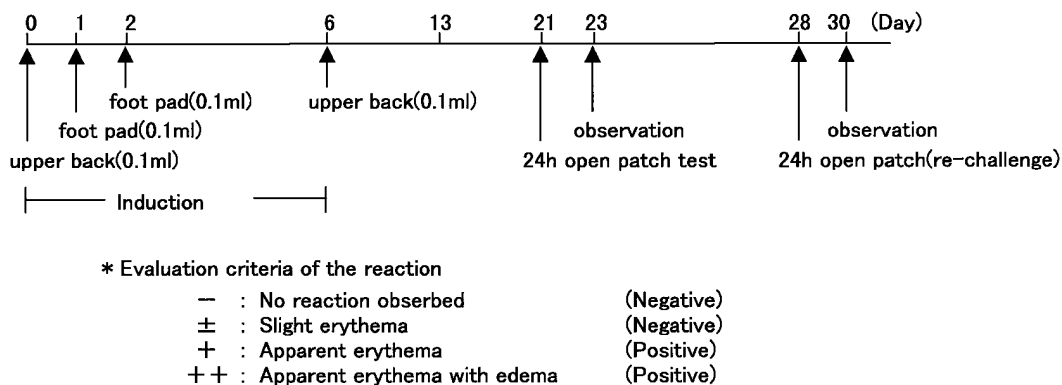


Fig. 2. Sensitization Schedule and Evaluation Criteria

を感作実験に供した。検体の0.1 M含有 Freund's Complete Adjuvant (FCA) を乳鉢にて混合可溶化したものを用い、モルモットの頸、足掌の皮下に1週間に4回、すなわち1日1回、1カ所、3日連続皮下注射(0.1 ml×3)さらに4日後に再度頸部に1回の計4回の皮下注射を行った。最初の感作日より4週間後、検体の 10^{-1} Mと 10^{-2} M含有エタノール溶液0.02 mlの単純塗布惹起を行い、48時間後、Fig. 2の判定基準に従って判定した。感作性の強度はMagnusson and Kligman¹⁹⁾の方法に従って区分した。

単純クマリン類間の交差感作性は上記単純塗布惹起7日後、各々11種のクマリン類を 10^{-1} M濃度で、同操作により再惹起を行い、反応の有無を判定した。

検体の皮膚一次刺激性評価は次のようにして行った。つまり検体を含まないFCAを同様の方法で感作誘導した一群10匹のモルモットに検体の 10^{-1} Mと 10^{-2} M含有エタノール溶液を0.02 ml単純塗布

し、48時間後肉眼判定を行った。本濃度では何ら刺激反応は認めなかった。

3. 単純クマリン類の Human Serum Albumin (HSA) への結合性実験

1.1% HSA (Sigma社製, Fraction V) 含有0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4) 9.9 mlに検体の 1.5×10^{-3} M DMSO溶液0.1 mlを加えて最終濃度を 1.5×10^{-4} Mとし、37°Cで反応させた。24時間後、2倍量のメタノールを添加、よく混合し、2時間冷所で放置した。次に3,000 r.p.m, 10分間遠心後、得られた上清液中の検体濃度(A)はHPLC法により測定した。装置は島津LC-3AとSPD-2Aを用い、カラムはNucleosil-10C₁₈(4φ×250 mm Nagel), 移動相はメタノール-0.01 Mリン酸緩衝液(pH 2.5)(3:7 V/V), カラム温度は室温, 流速1.0 ml/min, 検出波長230 nm又は340 nm, 注入量20 μlで測定した。

一方HSA溶液を含まない0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を用い調製した検体溶液を同様に処理して得られた上清液中の濃度(B)を測定し、(B-

A/B)×100(%) の式から蛋白結合率を計算した。

4. モルモット皮膚組織による代謝試験

1) 酵素溶液の調製 ハートレー系白色モルモット (雌, 6 週令) の腹側部の毛を刈り, 剃毛後断頭・屠殺し, 十分に放血させる。皮膚面は 70% アルコール溶液で洗浄後, 皮膚を剥離し, 皮下脂肪組織を解剖用ハサミを用い, できるだけ取り除き, 約 0.5 cm 角に細切した。ついで皮膚重量の 2 倍量の冷 150 mM 塩化カリウム溶液を加え, 氷冷下でホモジナイズ後, 3,000 r.p.m, 10 分間遠心分離を行い, 得られた上清液を酵素液として使用した。酵素液は HSA を標品とし, Lowry 法により蛋白量を測定した。えらばれた酵素溶液の蛋白量は 1.42 mg/ml であった。

2) 基質溶液の調製 基質として esculin, umbelliferone, isoscapoletin を用い, すべて 1.5×10^{-3} M DMSO 溶液とした。

3) *In vitro* 代謝実験 代謝反応は基質溶液 0.1 ml, 酵素溶液として皮膚抽出液 0.2 ml 及び 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 0.7 ml を混合し, 37°C, 18 時間反応させた。反応後 2% メタリン酸水溶液 9 ml を添加し, 反応を停止させた。2 時間放置後, 3,000 r.p.m, 10 分間冷却遠心し, 得られた上清液を上記 HPLC 分析条件で定性, 定量を行った。また陽性対照として, アーモンド β -glucosidase (東洋紡製 11.1 units/mg) 溶液, 陰性対照として, 加熱処理 (80°C, 10 分間) 酵素溶液 0.2 ml を添加した反応液について同様の操作で定性, 定量を行った。反応液から得られた各ピークの保持時間 (RT) と標準物質の RT と一致した反応物について, それらの検量線から生成量, 残存量 (未変化体) を算出した。

結 果

1. 単純クマリン類 11 種類の感作性試験

単純クマリン類の 0.1 M 濃度感作動物での開放塗布惹起試験の結果を Table 1 に示した。 10^{-1} M と

10^{-2} M 惹起濃度での感作率を平均し, Magnusson and Kligman の方法に従って感作性の強度を区分した。4-Methylesculetin, esculetin 及び daphnetin はランク IV (strong), 4-hydroxycoumarin はランク III (moderate), isoscapoletin と esculin はランク II (mild) となる。5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin, 4-methylumbelliferone, scoparone, coumarin そして umbelliferone の計 5 化合物はランク I (weak) となり, ほとんど感作性を認めなかった。

2. 単純クマリン類の HSA との結合性試験

11 種の単純クマリン類の HSA との結合率を Table 2 に示した。高い結合率を示したのは 2 個の水酸基を両隣に持つ daphnetin と esculetin で, それぞれ 44.0%, 42.4% であった。ついで 4-methylesculetin が 27.4% であった。他のクマリン類の蛋白結合率は 1—6% と軽度であった。

3. 単純クマリン類の交差感作性試験

単純クマリン類 11 種類による再惹起 48 時間後の判定結果を Table 3 に示した。交差感作反応は es-

Table 2. Binding Rate of Simple Coumarins on Human Serum Albumin

Substance	Binding rate (%)
4-Methylumbelliferone	6.5
4-Methylesculetin	27.4
Esculetin	42.4
Umbelliferone	2.0
Coumarin	1.8
4-Hydroxycoumarin	3.3
Esculin	5.2
Daphnetin	44.0
Isoscapoletin	1.3
Scoparone	3.1
5,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin	—

— : not done

Table 1. Sensitizing Potencies of Simple Coumarins

Substance	Sensitization rate (%)		Grade	Judgement
	10^{-1} M	10^{-2} M		
4-Methylumbelliferone	8	0	I	Weak
4-Methylesculetin	100	42	IV	Strong
Esculetin	100	50	IV	Strong
Umbelliferone	8	0	I	Weak
Coumarin	0	0	I	Weak
4-Hydroxycoumarin	75	33	III	Moderate
Esculin	25	0	II	Mild
Daphnetin	100	50	IV	Strong
Isoscapoletin	25	0	II	Mild
Scoparone	0	0	I	Weak
5,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin	0	0	I	Weak

Table 3. Results of Cross-Challenge Test of Simple Coumarins

Sensitizer	Crossreaction rate (%)										
	Challenge chemicals										
	4MU	4MET	ET	Um	Cm	4HC	EL	DH	isoS	SPA	57DH4MC
4-Methylumbelliferone (4MU)	8	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0
4-Methylesculetin (4MET)	0	100	100	0	0	0	33	0	0	0	0
Esculetin (ET)	0	67	100	0	0	0	50	0	33	0	0
Umbelliferone (Um)	8	0	0	8	0	0	0	100	0	0	0
Coumarin (Cm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-Hydroxycoumarin (4HC)	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0
Esculin (EL)	0	0	50	0	0	0	25	0	0	0	0
Daphnetin (DH)	8	0	0	17	0	0	0	100	0	0	0
Isoscoupoletin (isoS)	0	0	42	0	0	0	0	0	25	0	0
Scoparone (SPA)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (57DH4MC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4. Metabolites of Esculin, Isoscoupoletin and Umbelliferone by Homogenized Guinea Pig Skin Extracts, and Enzymatic Hydrolysis of Esculin by β -Glucosidase

Substrate	Enzyme source	Detected substance	Concentration (M)
Esculin	Skin extract ¹⁾	Esculin	0.77×10^{-4}
		Esculetin	0.64×10^{-4}
	β -Glucosidase ²⁾	Esculin	0.99×10^{-4}
		Esculetin	0.53×10^{-4}
	Heat-treated skin extract ¹⁾	Esculin	1.49×10^{-4}
Isoscoupoletin	Skin extract ¹⁾	Isoscoupoletin	1.40×10^{-4}
	Heat-treated skin extract ¹⁾	Isoscoupoletin	1.45×10^{-4}
Umbelliferone	Skin extract ¹⁾	Umbelliferone	1.30×10^{-4}
	Heat-treated skin extract ¹⁾	Umbelliferone	1.45×10^{-4}

1) Protein concentration: 28.4 μ g/ml, 2) Almond β -D-Glucosidase: 5.6×10^{-1} μ g/ml (11.1 units/mg)

culetinと4-methylesculetin, esculinあるいはisoscopoletin間, daphnetinとumbelliferoneあるいは4-methylumbelliferone間に認められた。4-hydroxycoumarin, scoparone, 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarinは他の単純クマリン類と何ら交差反応性を示さなかった。

4. Esculin, umbelliferone, isoscoupoletinのin vitro皮内代謝実験

11種類の単純クマリン類の中で、それ自身の感受性は弱いが、他の単純クマリン類と高い交差反応性を示したumbelliferone, esculin, isoscoupoletinを取り上げ、モルモット皮膚組織抽出物を酵素液とした代謝実験を行った。その結果をTable 4に示した。3種クマリン類の中で明確に代謝物が検出されたのはesculinのみである。その代謝物はHPLC分析で標品との比較よりesculetinであると同定された。さらに、 β -glucosidaseの作用によりesculinからesculetinが簡単に生成されることも確認した (Table

4及びFig. 3)。一方、isoscoupoletin, umbelliferoneの反応溶液からは何ら新しい代謝物は検出されなかった。

考 察

化学物質の構造と皮膚反応性との間にある種の相関性が存在することは知られている。TakaseとKonishi²⁰⁾はキサントゲン系色素の中で光毒性を発現する化合物は構造中にいくつかのハロゲン分子を持つこと、皮膚構成成分と安定結合し、皮内残留性の高いことなどの特徴を指摘している。著者²¹⁻²⁴⁾らはフェノール性水酸基に対しオルト、パラ位に水酸基を持つ2価、3価フェノールの感受性は高く、かつ水酸基の増加につれ増大すること、また皮膚刺激性と接触感受性の発現には置換基(水酸基、アミノ基など)の種類や置換基の相対的結合位置(オルト、メタ、パラなど)が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

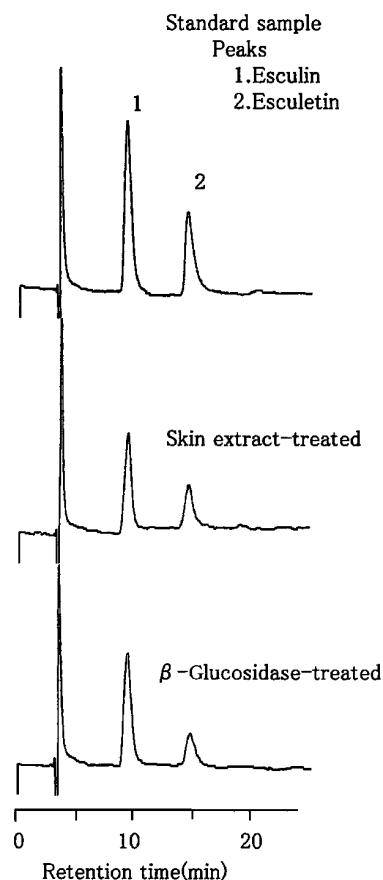


Fig. 3. HPLC Patterns of the Hydrolytic Products Obtained from Esculin Treated with Guinea Pig Skin Extract or β -Glucosidase

The retention times of esculin and esculetin are about 9.4, 14.5 min, respectively.

今回著者が取り上げた単純クマリン類の皮膚安全性に関する研究は少ない。Hausen¹⁶⁻¹⁸⁾らは単純クマリン類の化学構造と接触感作性について検討し、5と7位あるいは6と7位に水酸基を持つ esculetin, 4-methylesculetin, 5,7-dihydroxycoumarin に感作性が認められること、4位が methyl 化されると感作性は低下することを報告している。著者は本論文において11種類の単純クマリン類について別の感作誘導法を用い、感作性の強さを分類した。その結果、基本構造である coumarin には感作性は認められないが、4-hydroxycoumarin, umbelliferone と 4-methylumbelliferone との比較より、感作性の発現には 4-methyl 基の寄与はないが、4-OH 基は強く寄与している。次に芳香環上の7位に水酸基を持つ umbelliferone では弱いながらも感作性が認められた。さらに隣接位に2個の水酸基を持つ esculetin と daphnetin では強い感作性を示した。しかし、互いにメタ位の関係にある位置に2個の水酸基を持つ 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin には感作性を認めなかった。また2個の水酸基の1個が methyl 化あるいは glucosyl 化された isoscoupletin, esculin では

感作性は大幅に減弱し、さらに2個の水酸基すべてが methyl 化された scoparone では感作性は消失することを見出した。以上の結果より単純クマリン類の感作性には1個の水酸基が4位に結合するか、芳香環上の隣接位に2個の水酸基が結合することの重要が示唆された。本研究の結果は Hausen らのそれとは必ずしも一致しないが、この差異は感作誘導や誘導の条件の違いなどによるものと思われる。著者の採用した感作誘導法は単純クマリン類の接触感作性を感度よく検出できる優れた方法であると考えられた。

さて、低分子化合物が抗原性を発揮するためには、多くの場合蛋白質と結合して完全抗原になる必要がある。単純クマリン類が接触皮膚炎を発現するためには恐らく表皮内成分と結合するのであろう。今回、強い感作性を認めた 4-methylesculetin, esculetin, daphnetin が *in vitro* 系において Human serum albumin と高い結合性を示したことは感作性発現に皮膚成分、特に蛋白質との結合の重要性が示唆された (Table 2)。しかし、中等度の感作性を示した 4-hydroxycoumarin や esculin などでは明確な蛋白結合性が認められなかった。これらのクマリン類は多分皮内で代謝を受けて生成される化合物が皮膚蛋白と結合し、感作性を発現するものと考えられる。

次に、単純クマリン類の交差感作反応について、著者の実験結果を Fig. 4 にまとめた。交差反応を示した単純クマリン類は大きく2つのグループに分類できる。つまり、esculetin を中心にしたグループと daphnetin を中心にしたグループに区別される。交差反応の発現にはそのままか、あるいは皮内で代謝を受け、両物質が極めて類似した抗原決定構造を示すようになる必要がある。したがって esculetin と daphnetin グループ間の交差反応不成立は皮内で生成される抗原決定構造が各々異なることを示唆している。Esculetin 群の中で、まず 4-methylesculetin と esculetin の交差反応性は両物質の構造上の類似、特に芳香環の置換基及び置換様式の同一性によるものと判断できる。また、esculetin と esculin あるいは isoscoupletin との交差反応については皮内代謝により生成された esculetin が中心的役割を果たしていると考えられる。Esculin については *in vitro* 皮内反応結果が示す通り、皮内において酵素 β -glucosidase の作用により esculetin が生成される。一方、今回の実験結果からは確認できなかったが、isoscoupletin の場合は、多分皮内に存在する methyltransferase により、脱 methyl 化を受け esculetin が生成されている可能性が高いと思われる。Methyltransferase は皮内に存在すること、^{25,26)} また Furuya,²⁷⁾ Braymer, Shetlar et. al.²⁸⁾らは scoparone と scopuletin をウサギとラットに経口投与し、その代謝物を調べた結果、脱 methyl 化を受けた scopuletin, isoscoupletin そして esculetin が生成されるこ

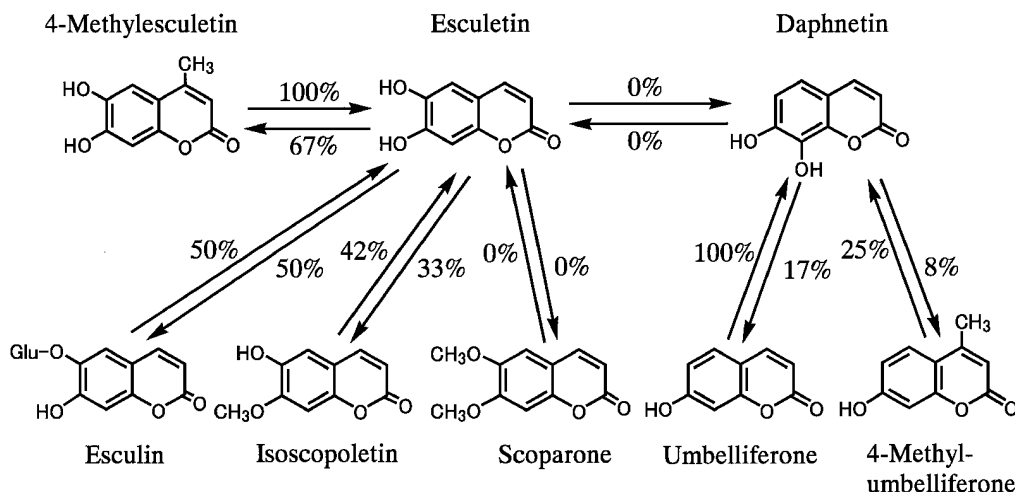


Fig. 4. Cross-Sensitivity Reactions in Daphnetin and Esculetin Groups

と、またその際、脱methyl化反応は6位に起こりやすいこと²⁹⁾などの報告があり、著者の仮説を支持している。このことはesculetinとesculin, isoscopoletinあるいはscoparoneとの交差反応性の強弱は皮内代謝によるesculetin生成量が密接に関係していることを示している。

一方、daphnetinとumbelliferone類との交差反応において、umbelliferone単独の感作性は低い、daphnetinと高い交差反応性を示すという興味ある事実を認めた。Chung³⁰⁾らはaflatoxinとその関連化合物の感作実験で同様の所見を報告している。Umbelliferoneがこの反応を発現するためには皮内代謝を受けdaphnetinと極めて類似した抗原決定構造の形成が必要である。しかし、今回の代謝実験からは何ら新しい生成物の検出はなく、交差反応性を証明する事実は見出せなかった。

Barratt³¹⁾らはphenol系化合物の一般的な付加反応メカニズムとして①poison ivyメカニズム、②phenol性メカニズム、③ベンゼン性メカニズムの3つの反応ルートの存在を報告している。Phenol系化合物とよく似た構造を持つ単純クマリン類についてBarrattの理論を適用し、その感作と交差感作メカニズムについて考察を加えた。先ず隣接位に2個の水酸基を持つdaphnetinとesculetinは皮内でorthoquinoneが生成され、電子配向性より5位、6位あるいは8位で蛋白質と結合し、感作性を発現していると考えるのが一般的であろう。Esculetinの場合、蛋白結合部位としてクマリン核の5位あるいは8位が考えられるが、esculetinと4-methylesculetinの感作性、交差感作性には大きな差が認められないことから、5位での蛋白結合の可能性が考えられる。一方、daphnetinの場合5位あるいは6位との結合が考えられるが、daphnetinの6位がmethoxy化されたfraxetinでは感作性が認められないこと¹⁷⁾より、6位での蛋白との結合が感作性の発現にはよ

り重要であると考えられる。また6位に結合しているからこそumbelliferoneと交差反応が認められたとも考えられる。今まで著者が述べてきたesculetinとdaphnetinを中心にした感作や交差反応メカニズムに関する仮説は、今後研究を進め、検証していきたい。

今回著者は11種類の単純クマリン類の感作性及び交差感作性について解析を行った。その結果、感作性の発現にはクマリン核への水酸基の結合が必要である。特に芳香環上の隣接位に2個の水酸基が結合すると強い感作性を示すこと、水酸基をアルキル基で修飾することで感作性が減弱することを示した。また交差感作性について、単独では弱い感作性を示す単純クマリン類が、強い感作性を示す単純クマリン類と高い交差反応性を示すことが明らかとなった。このことは既に生活環境中に存在する類似物質との交差反応性チェックの必要性や皮内代謝研究の重要性が示唆された。今後、種々の生理、薬理作用を持つ単純クマリン類を化粧品領域や皮膚科領域に予防あるいは治療の目的に応用を考えると、これら一連の化学物質の構造と皮膚安全性との間に存在する構造活性相関を明らかにすることはより安全性の高い化粧品、医薬品の原料や薬剤開発に貢献できるものと思われる。

REFERENCES

- 1) Sione O. S., *J. Pharmaceutic. Sci.*, **53**, 231-264 (1964).
- 2) Ozeki Y., Ito T., Nakaya S., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **69**, 869-880 (1973).
- 3) Ito T., Abstract of the 9th Annual Meeting of Medical and Pharmaceutical Society of Wakan-Yaku, 1975, pp. 43-50.
- 4) Murray R. D., Mendez J., Bron S. A., "The natural coumarins," Chrochester, John Wiley

- & Son, 1982, pp. 1-455.
- 5) Weissmann I., Hofmann A. J., Wogner G., *Arch Dermatol Res.*, **262**, 333-336 (1978).
 - 6) Morison W. J., Parrish J. A., Fitzpatrick T. B., *Br. J. Dermatol.*, **98**, 25-30 (1978).
 - 7) Heidbreder G., Christophers E., *Arch Dermatol. Res.*, **264**, 331-337 (1979).
 - 8) Anderson T. F., Voorhees J. J., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 235-257 (1980).
 - 9) Yamashita S., Miura Y., Ueki K., Tuboi R., Takamori K., Ogawa H., *Jap. J. Dermatol.*, **109**, 1471-1477 (1997).
 - 10) Malton K. E., *Acta Dermato-venereologica.*, **85**, 117-121 (1979).
 - 11) Comaish J. J., Kersey P. J., *Contact Dermatitis*, **6**, 150-151 (1980).
 - 12) Malton K. E., van Ketel W. G., Nater J. P., Liem O. H., *Contact Dermatitis*, **15**, 289-294 (1986).
 - 13) Hausen B. M., Rothenborg H. W., *Arch. Dermatol.*, **117**, 732-734 (1981).
 - 14) Kaidbey K. H., Kligman A. M., *Contact Dermatitis*, **4**, 277-282 (1978).
 - 15) Kaidbey K. H., Kligman A. M., *Arch. Dermatol.*, **117**, 258-263 (1981).
 - 16) Hausen B. M., Schmieder M., *Contact Dermatitis*, **15**, 157-163 (1986).
 - 17) Hausen B. M., Kallweit M., *Contact Dermatitis*, **15**, 289-294 (1986).
 - 18) Hausen B. M., Berger M., *Contact Dermatitis*, **21**, 141-147 (1989).
 - 19) Magnusson B., Kligman A. M., *J. Inv. Derm.*, **52**, 268-276 (1969).
 - 20) Takase Y., Konish H., "Sunlight and Man," ed. by Fitzpatrick B. T., Normal and Abnormal Photobiologic Responses, University of Tokyo Press, Tokyo, 1972, pp. 445-457.
 - 21) Masamoto Y., Takase Y., *Shinshu Med.*, **28**, 367-374 (1980).
 - 22) Masamoto Y., Takase Y., *Shinshu Med.*, **31**, 522-528 (1983).
 - 23) Tsuyosh T., Masamoto Y., *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **18**, 106-111 (1984).
 - 24) Masamoto Y., Takase Y., *Shinshu Med.*, **35**, 185-193 (1987).
 - 25) Kao J., Carver M. P., "Drug and Metabolism," Mancel Dekker, 1990 pp. 213-218.
 - 26) Thompson D. C., Constantini-Thocdosin D., Molders P., *Chem. Biol. Interactions*, **77**, 137-147 (1991).
 - 27) Furuya J., *Chem. Pharm. Bull.*, **6**, 696-701 (1958).
 - 28) Braymer H. D., Shetlor M. R., Wender S. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 606-610 (1960).
 - 29) Chihara G., Kurosawa N., Mizushima A., Matsuo K., Yoshioka Y., Arimoto K., Sugano S., *Intern. Symp. Mol. Struct. Spectry., Tokyo*, **C117** (1962); *Idem, Chem. Abstr.*, **61**, 4805 (1964).
 - 30) Chung C. W., Giles A. C, Carson J. R., *J. Invest. Dermatol.*, **55**, 396-403 (1970).
 - 31) Barratt D. M., Basketter A. D., *Contact Dermatitis*, **27**, 98-104 (1992).