

## 紫外線吸収剤及びその関連化合物によるエストロゲン様作用

松本比佐志,<sup>\*,a</sup> 足立伸一,<sup>b</sup> 鈴木定彦<sup>c</sup>

## Estrogenic Activity of Ultraviolet Absorbers and the Related Compounds

Hisashi MATSUMOTO,<sup>\*,a</sup> Shinichi ADACHI,<sup>b</sup> and Yasuhiko SUZUKI<sup>c</sup>

Departments of Food and Drugs,<sup>a</sup> and Environmental Health,<sup>b</sup> Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan, and Department of Microbiology and Pathology, Faculty of Medicine, Tottori University,<sup>c</sup> 86 Nishi-cho, Yonago 683-8503, Japan

(Received January 31, 2005; Accepted May 1, 2005)

The estrogenic activities of ultraviolet absorbers and their related compounds were investigated using MCF-7 cell proliferation assay. Nine of 33 chemicals (benzophenone, 2,4-dihydroxybenzophenone, 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone, 4-hydroxybenzophenone, 3-(4-methylbenzylidene) camphor, ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (etocrylene) and 2-ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (octocrylene)) were positive compared with the vehicle control. Benzhydrol, ethyl cinnamate and 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone were weakly active. When each xenoestrogen was added to the cells along with ICI 182780, an estrogen receptor (ER) antagonist, the cell growth was reduced according to its doses. Therefore, the cell proliferation was suggested to generate through ER. Most of these chemicals were also positive using CHOOSER assay, a new method of testing estrogenic activity of xenoestrogen. Each xenoestrogen was also confirmed to bind to ER $\alpha$  and ER $\beta$  using a human ER competitive binding assay against 17 $\beta$ -estradiol. The concentration order of the strength of its inhibitory effect using both ER $\alpha$  and ER $\beta$  was similar to that of MCF-7 cell proliferation assay, except for benzyl 4-hydroxybenzoate (B4HB). B4HB showed a stronger activity on CHOOSER assay and the competitive binding assay using both ER $\alpha$  and ER $\beta$ , although there was no activity observed on MCF-7 cell proliferation assay. Our findings were to detect the estrogenic activity of etocrylene and octocrylene *in vitro*, in addition to confirming the activities of some ultraviolet absorbers as previously reported.

**Key words**—UV absorbers; estrogenicity; etocrylene; octocrylene; MCF-7 cells; competitive binding assay

## 緒 論

日常生活の中で紫外線吸収剤は、サングラスや衣料品、UV カット洗剤・柔軟材、プラスチック製品、化粧品や医療器具などで使用されており、近年では使用品目や使用量の拡大が認められるようになってきている。<sup>1)</sup> 化粧品中の紫外線吸収剤については、紫外線による皮膚障害や皮膚がんの防御に効果があり、<sup>2,3)</sup> 特に紅斑性狼瘡患者にとっては有効である<sup>4)</sup> という報告がある。一方、2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3) などの benzophenone (BP) 類、3-(4-methylbenzylidene) camphor (4MBC), octyl methoxycinnamate (OMC), octocrylene (OCR)

などは、皮膚搔痒や接触アレルギーを引き起こすと言う報告、<sup>5-7)</sup> BP-3, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (BP-4), OMC, homosalate, octyl salicylate などは、2,4-dichlorophenoxyacetic acid などの農薬の皮膚透過を促進し吸収し易くする作用があると言う報告<sup>8,9)</sup> や、空気が充満した OMC, OCR, 4-aminobenzoic acid (PABA) などの水溶液に太陽光を照射すると細胞毒性を示す一重項酸素が生成すると言う報告がある。<sup>10)</sup> また、BP は、エストロゲン生成に関与するアロマトーゼチトクローム P450 との拮抗阻害が確認されたため、<sup>11)</sup> 内分泌機能を攪乱し、環境中の生物やヒトに悪影響を及ぼす可能性のある物質 (内分泌攪乱化学物質) の 1 つに指定されている。<sup>12)</sup>

最近では、BP のみならず、BP の誘導体及び代謝物にも内分泌攪乱作用が検出されることが報告さ

<sup>a</sup>大阪府立公衆衛生研究所食品医薬品部, <sup>b</sup>同生活環境部, <sup>c</sup>鳥取大学医学部微生物病理研究部門  
e-mail: matumoto@iph.pref.osaka.jp

れてきた。例えば、食品保存容器プラスチックに使用される紫外線吸収剤のエストロゲン様作用を yeast two-hybrid assay にて調べると、BP 誘導体のいくつかのものに活性が認められた。<sup>13)</sup> そのうちの数種類については既に MCF-7 細胞増殖検出系、<sup>14-16)</sup> recombinant yeast assay、<sup>17)</sup> エストロゲン受容体 (ER) への結合競合試験<sup>16,18,19)</sup> や uterotrophic assay<sup>15,19)</sup> で陽性になっている化合物である。また、薬物代謝酵素誘導剤を投与したラット肝ホモジネート 9000 xg 上清画分による処理によって得られた BP 類 3 種 (BP, BP-3, 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-8)) の代謝物に yeast two-hybrid assay によるエストロゲン様活性が認められた。<sup>20)</sup> したがって、エストロゲン作用物質の検索には、単一の化合物だけでなく、その誘導体などの構造類縁体、及び代謝物も検討対象にすることが望ましい。

化粧品に使用される BP 類以外の紫外線吸収剤も同様に、エストロゲン様作用を示すことが近年明らかとなった。すなわち、BP-3 とともに 4MBC や OMC は、MCF-7 細胞を用いた細胞増殖作用、ER 拮抗剤の ICI 182780 共存下での増殖活性の抑制、pS2 protein の誘導などの *in vitro* での影響や、餌や皮膚を介した投与により子宮重量の上昇が観察されたとの報告がみられる。<sup>15,21)</sup>

一方、自然環境や生態系への紫外線吸収剤の汚染が認められてきた。例えば、スイスの湖水では脂溶性の紫外線吸収剤 (OMC, 4MBC, BP-3, OCR など) が検出され、<sup>22)</sup> ドイツの湖に生息する perch や roach などの魚類に脂肪中 ppm オーダーの紫外線吸収剤が検出された。<sup>23)</sup> また、ドイツ女性の母乳中に紫外線吸収剤の BP-3, 4MBC, OMC, homosalate, isoamyl *p*-methoxycinnamate, octyl dimethyl PABA の分析を試みたところ、BP-3 や OMC が脂肪重量当たり数 10 から数 100 ppb の濃度で汚染が検出されたとの報告がある。<sup>24)</sup> したがって、環境中の生物に対する悪影響、あるいは胎児や新生児への母乳を介した移行による影響を含むヒトに対する健康影響が懸念される。

そこで、既報告以外の紫外線吸収剤のうち化粧品に添加される可能性があるものにもエストロゲン様活性が認められるか否かを調べるのがヒトの健康影響を考慮する上で重要と考えられるため、個々の

成分及びその関連化合物によるエストロゲン様活性を MCF-7 細胞による細胞増殖試験、<sup>25,26)</sup> ヒトのエストロゲン反応遺伝子導入のチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHOOSER) による酵素活性試験、<sup>27)</sup> 及びヒト ER に対する女性ホルモン 17 $\beta$ -estradiol (E2) との結合競合試験<sup>26)</sup> を指標として測定した。その結果、従来の報告以外の化合物にも活性陽性の物質を検出したので報告する。

## 実験方法

**1. 試薬及び材料** 17 $\beta$ -estradiol (E2, 純度 97% 以上), bisphenol A (純度 99.6%, BPA と略す) は 榊和光純薬工業 (大阪) から, Cell counting kit-8 は 榊同仁化学研究所 (熊本) から, また ICI 182780 (ICI と略す) は, Tocris Cookson Ltd. (Bristol, 英国) から購入した。ヒト血清 AB 型は 榊大日本製薬 (大阪) から購入した。検討化合物は、紫外線吸収剤として化粧品に添加される可能性のある化合物で、紫外線吸収剤及びその関連化合物 33 種であった。その内訳は benzophenone 系 11 種, benzoate 系 4 種, cinnamate 系 5 種, salicylate 系 4 種, その他 9 種であり, Table 1 に示した。

ヒト乳がん培養細胞 MCF-7 (subline 173) は, Dr. A. M. Soto (Tufts 大学, 米国 Boston) から坂部 貢博士 (北里大学) を介して供与された。また, エストロゲン様活性の測定のため, 遺伝子下流に耐熱性の alkaline phosphatase を連結したヒトのエストロゲン反応遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHOOSER) を用いた (試験法を CHOOSER assay と略す)。<sup>27)</sup> ヒトエストロゲン受容体 (ER) 結合競合試験には, ELISA キットの Ligand Screening System-Estrogen Receptor  $\alpha$  及び  $\beta$  (東洋紡績株, 大阪) を使用した。

## 方 法

**1. MCF-7 細胞増殖試験** ヒト乳がん培養細胞 MCF-7 に化合物を添加した際の細胞増殖を指標としてエストロゲン様作用活性を検討した。すなわち, Dr. Soto ら<sup>25)</sup> による E-screen assay の改良法である大久保及び加納の方法<sup>26)</sup> に準じて試験を行った。概要は以下の通りである。MCF-7 細胞を 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% 空気, 湿度飽和の条件下, 40 mg/l ゲンタマイシン (Bio-Whittaker Co., Walkersville,

Table 1. List of UV Absorbers

Chemical name (abbreviated name)	Cas No.	Content (%)	Source
<b>1. Benzophenones and related compounds</b>			
Benzhydrol (BHR)	91-01-0	>95.0	WP
Benzophenone (BP)	119-61-9	>98.0	WP
2,4-Dihydroxybenzophenone (BP-1)	131-56-6	TQ*	BASF
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone (BP-2)	131-55-5	TQ*	BASF
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3)	131-57-7	>99.0	TC
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (BP-4)	4065-45-6	>97.0	BASF
2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (BP-6)	131-54-4	>95.0	WP
2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-8)	131-53-3	>95.0	WP
2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone-5,5'-disulfonate disodium salt (BP-9)	76656-36-5	TQ*	BASF
2-Hydroxy-4-octyloxybenzophenone (BP-12)	1843-05-6	>99.0	WP
4-Hydroxybenzophenone (4HBP)	1137-42-4	>98.0	TC
<b>2. Benzoates</b>			
Benzyl 4-hydroxybenzoate (B4HB)	94-18-8	>97.0	KK
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	>99.5	WP
2-Ethylhexyl 4-(dimethylamino) benzoate	21245-02-3	>98.0	TC
Benzoic acid, 4,4',4''-(1,3,5-triazine-2,4,6-triyltriimino) tris-, tris(2-ethylhexyl) ester	88122-99-0	TQ*	IC
<b>3. Cinnamates</b>			
Ethyl cinnamate (ETCM)	103-36-6	>97.0	WP
4-Methoxycinnamic acid	830-09-1	>99.0	TC
2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate	5466-77-3	>96.0	TC
Isopentyl 4-methoxycinnamate	71617-10-2	TQ*	H & R
2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, diester with 1,3-dihydroxy-2-(2-ethyl-1-oxohexyl)oxypropane	—	TQ*	NS
<b>4. Salicylates</b>			
Benzyl salicylate	118-58-1	>97.0	WP
2-Hydroxyethyl salicylate	87-28-5	>98.0	WP
2-Ethylhexyl salicylate	118-60-5	>98.0	TC
3,3,5-Trimethylcyclohexyl salicylate (homosalate)	118-56-9	—	S-A
<b>5. Others</b>			
3-(4-Methylbenzylidene) camphor (4MBC)	38102-62-4	>99.5	ME
Ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (ECR)	5232-99-5	>97.0	WP
2-Ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR)	6197-30-4	TQ*	BASF
3-Imidazol-4-ylacrylic acid	104-98-3	>98.0	TC
3-Benzylidenephthalide	575-61-1	>99.0	TC
2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl) benzotriazole	2440-22-4	>97.0	WP
2-(3- <i>t</i> -Butyl-2-hydroxy-5-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole	3896-11-5	>97.0	WP
2-Phenyl- <i>1H</i> -benzimidazole-5-sulphonic acid	27503-81-7	>98.0	ME
1-[4-(1,1-Dimethylethyl) phenyl]-3-(4-methoxyphenyl) propane-1,3-dione	70356-09-1	TQ*	IC

\* TQ (technical quality). WP: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), KK: Kanto Kagaku Co., Ltd. (Tokyo, Japan), TC: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan), IC: Iwase Cosfa Co., Ltd. (Osaka, Japan), BASF: BASF Aktiengesellschaft (Ludwigshafen, Germany), ME: MERCK KGaA (Darmstadt, Germany), H & R: Haarman & Reimer Corp. (Holzminden, Germany), S-A: Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), NS: Nisshin Seiyu Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

MD) 含有の 5% 牛胎児血清 (FBS, ㈱三光純薬, 東京) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Life-Tech Oriental Inc., 東京) により継代培養した. MCF-7 細胞は, 1 mM EDTA 含有の 0.25% トリプシン (Life-Tech Oriental Inc.) で細胞を剥離したのち, ゲンタマイシン含有の 5% FBS 含有 DMEM を用いて 4000 個/ウェルになるように 96 穴ウェルプレートに播種した. 24 時間培養後, 播種用培地を除去し, フェノールレッド (PR) 不含 DMEM でウェルを 2 回洗浄したのち, 実験用培地である 10% CDHuS (チャーコール, デキストラン処理ヒト AB 型血清) 含有 PR 不含 DMEM に交換した. 被験化合物はジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解したのち, PR 不含 DMEM で段階希釈し, 各ウェルに加えて 5 日間培養した. コントロールとして終濃度 0.1% の DMSO を, 陽性対照として E2 又は BPA をウェルに加えた. 培養終了後, 各ウェルに cell counting kit-8 を加え, 37°C, 3 時間反応を行った. その後すぐに, マイクロプレートリーダーを用い, OD590 を対照として OD450 nm における各ウェルの値を測定した. 被験化合物のエストロゲン様活性値 REC<sub>10</sub> は, E2 による最大活性値を基にその 10% 活性が得られるときの被験化合物の濃度を, 反応曲線グラフより求めた.

ICI による細胞増殖抑制試験は, 被験化合物単独で細胞増殖作用の高活性を示す濃度で, ICI 共存下 5 日間培養し, 増殖細胞量を cell counting kit-8 による上記方法にて測定した.

**2. CHOOSER Assay** CHOOSER 細胞を用いて MCF-7 細胞増殖作用を示した化合物によるエストロゲン様活性を調べた.<sup>27)</sup> 概要は以下の通り. 継代培養された細胞をトリプシン処理して遊離細胞を得たのち, 血清不含の Xten™ GO (Thermo Trace 社, Noble Park, Victoria, Australia) を用いて 20000 個/ウェルになるように 96 穴ウェルプレートに播種した. これに被験化合物を加え, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% 空気, 湿度飽和の条件下, 2 日間培養した. コントロールとして終濃度 0.1% の DMSO を, 陽性対照として E2 又は BPA をウェルに加えた. 培養後, 60°C で 30 分間熱処理を加えた. 冷却後, BluePhos™ (KPL Inc., Gaithersburg, ML, USA) を基質として加え alkaline phosphatase 活性を 600 nm で測定した.

**3. ヒトエストロゲン受容体 (ER) 結合競合試験** MCF-7 細胞増殖作用を示した化合物について, ER 結合競合試験 (ヒトエストロゲンレセプター ER $\alpha$ ,  $\beta$  に対する結合能の測定) を E2 に対する結合競合試験として検討した. 実験の詳細は, 東洋紡績㈱のプロトコールに従った. 概略は以下の通り. 96 穴ポリスチレンプレートのウェルに一定量のヒトエストロゲンレセプター溶液, 試料, 一定量の E2 の順に添加し, 4°C, 60 分間インキュベートしたのち, その反応液を抗 E2 モノクロナル抗体の接着したマイクロプレートウェルに採取し, これに E2-horseradish peroxidase 複合体を加えて 4°C, 60 分間インキュベートした. ウェルを洗浄後, 基質を加え 37°C, 20 分間インキュベートし, 1 N 硫酸を加えて反応を停止したのちすぐに, マイクロプレートリーダーにより 650 nm を対照として 450 nm で吸光度を測定した. 化合物によるレセプターへの結合の阻害率は, 陽性対照 3 $\times$ 10<sup>-7</sup> M DES 存在下での吸光度を 100%, DES が存在しないときの吸光度を 0% として, 化合物を反応させたときの吸光度から求めた.

**4. データの統計処理** 本実験で得られたデータについては, 一元配置分散分析により要因 (化合物添加) の有意を検討し, また, 対照群と添加群の比較のため, Dunnett の方法による平均値の多重比較検定 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) を行った.

## 結 果

Figure 1 に, 各被験化合物による MCF-7 細胞増殖試験の用量-反応曲線を示した. 陽性対照の BPA は, 10<sup>-7</sup> M から 3 $\times$ 10<sup>-5</sup> M (最大活性) の範囲で濃度依存的に細胞増殖が認められたが, 10<sup>-4</sup> M では細胞毒性によると思われる活性低下が観察された. ここには図示していないが, 同様に陽性対照の E2 にも 10<sup>-12</sup>—3 $\times$ 10<sup>-9</sup> M の範囲で濃度依存的に細胞増殖が認められた. BP-2 は, BPA とほぼ同様の細胞増殖曲線を示した. BP-1 や 4HBP では 10<sup>-6</sup> M から 3 $\times$ 10<sup>-5</sup> M (最大活性) 範囲で濃度依存的に細胞増殖が認められたが, 10<sup>-4</sup> M では細胞毒性によると思われる活性減少がみられた. 4MBC, etocrylene (ECR), BP-3, BP-6 では 3 $\times$ 10<sup>-6</sup>—10<sup>-4</sup> M の範囲で濃度依存的に細胞増殖が認められた (ただし, 4MBC では, 10<sup>-4</sup> M で活性減少を観察した). これ

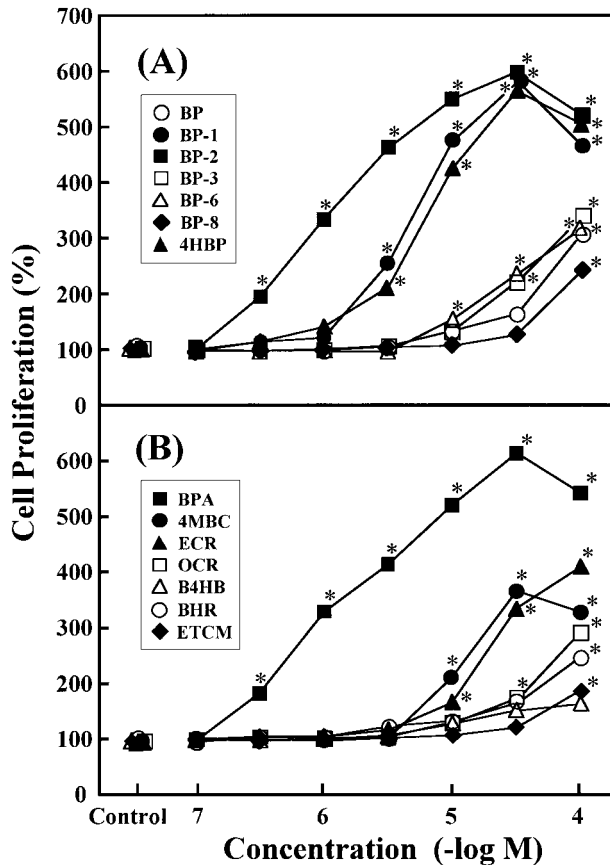


Fig. 1. Proliferation of Cultured MCF-7 Human Breast Cancer Cells by UV Absorbers

Cell numbers after treatment with chemicals are indicated as percentages of that with 0.1% DMSO (100%). Each point is the mean of 3 determinations and each coefficient of variation was less than 12%. E2 (17 $\beta$ -estradiol) was able to increase the number of MCF-7 human breast cancer cells by 99, 290, 506 and 559% (maximum activity) at  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-9}$  M, respectively. (A) ■: 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP-2), ●: 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1), ▲: 4-hydroxybenzophenone (4HBP), ◆: 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-8), □: 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3), △: 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (BP-6), ○: benzophenone (BP); (B) ■: Bisphenol A (BPA), ●: 3-(4-methylbenzylidene) camphor (4MBC), ▲: ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (ECR), ◆: ethyl cinnamate (ETCM), □: 2-ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR), △: benzyl 4-hydroxybenzoate (B4HB), ○: benzhydrol (BHR). \*Values are significantly different from the negative control ( $p < 0.01$ ).

らに比べると、OCR, BP, BP-8, BHR は活性が低い。また、ETCM では  $10^{-4}$  M で活性がわずかに認められたが、B4HB では活性上昇はほとんど認められなかった。

MCF-7 細胞増殖試験で活性陽性を示した被験化合物について CHOOSER assay を行ったときの用量-反応曲線を Fig. 2 に示した。陽性対照の BPA は、 $10^{-8}$  M から  $10^{-6}$  M (最大活性) の範囲で濃度依存的に alkaline phosphatase 活性が認められたが、 $10^{-5}$  M では  $10^{-6}$  M に比べて活性の増強は認められ

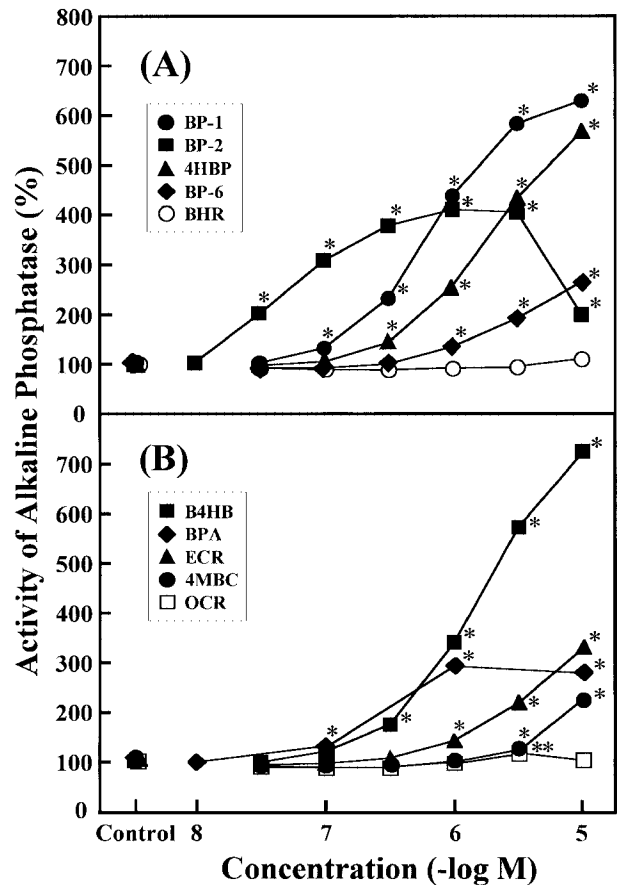


Fig. 2. Dose Response Curves of the Activities on CHOOSER Assay by UV Absorbers

Values of the activities on CHOOSER assay after treatment with chemicals are indicated as percentages of that with 0.1% DMSO (100%). Each point is the mean of 4 determinations and each coefficient of variation was less than 10%. E2 (17 $\beta$ -estradiol) was able to increase the activity of alkaline phosphatase of CHOOSER cells by 93, 237, 346 and 400% (maximum activity) at  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M, respectively. (A) ■: 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP-2), ●: 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1), ▲: 4-hydroxybenzophenone (4HBP), ◆: 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (BP-6), ○: benzhydrol (BHR); (B) ■: benzyl 4-hydroxybenzoate (B4HB), ◆: Bisphenol A (BPA), ▲: ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (ECR), ●: 3-(4-methylbenzylidene) camphor (4MBC), □: 2-ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR). \*Values are significantly different from the negative control ( $p < 0.01$ ). \*\*Values are significantly different from the negative control ( $p < 0.05$ ).

なかった。ここには図示していないが、同様に陽性対照の E2 にも  $10^{-12}$ — $10^{-8}$  M の範囲で濃度依存的に酵素活性の上昇が認められた。BP-2 では、 $10^{-8}$ — $10^{-6}$  M の範囲で濃度依存的に活性が上昇し、 $3 \times 10^{-6}$  M では活性値はプラトーに達したが、 $10^{-5}$  M では活性減少が観察された。BP-1 は  $10^{-7}$  M から、B4HB, 4HBP は  $3 \times 10^{-7}$  M から、ECR, BP-6 は  $10^{-6}$  M から濃度依存的に活性増加が認められ、 $10^{-5}$  M で最大活性を示した。4MBC は、 $3 \times 10^{-6}$  M から  $10^{-5}$  M まで活性上昇が認められたがその強度

は弱い。OCR では、 $3 \times 10^{-6}$  M で活性がわずかに認められたが、BHR では活性上昇は認められなかった。

Figure 1 及び 2 で示した用量—反応曲線を基にして被験化合物のエストロゲン様活性値 ( $REC_{10}$ ) を表した (Table 2)。同時に、各化合物の E2 に対する相対的な  $REC_{10}$  の値 (相対活性値: 被験化合物の  $REC_{10}$  値/E2 の  $EC_{10}$  値) を示した。記載のない化合物については、 $REC_{10}$  が測定できない化合物でエストロゲン様活性が認められないものと判断した。MCF-7 細胞増殖試験では、その強度は、BP-2 = BPA > BP-1 = 4HBP > 4MBC = ECR = BP-6 = BP-3 > OCR = BHR = BP > BP-8 = B4HB = ETCM が得られた。各被験化合物の E2 に対する活性比は、高いもので約  $10^{-5}$ 、低いもので  $10^{-8}$  オーダーの値であった。CHOOSER assay では、その強度は BP-2 > BP-1 = BPA = B4HB = 4HBP > ECR = BP-6 > 4MBC > OCR = BHR が得られた。各被験化合物の E2 に対する活性比は、高いもので約  $10^{-4}$ 、低いもので  $10^{-7}$  オーダー以下の値となった。

MCF-7 細胞増殖試験で活性陽性を示した各々の化合物と ER 拮抗剤 ICI を同時に加えて ICI による MCF-7 細胞の増殖抑制試験を検討した (Fig. 3)。

E2,  $5 \times 10^{-10}$  M 添加時の細胞増殖作用 (コントロール値 (100%) の 5.8 倍増加) に対して、さらに ICI,  $10^{-6}$  M を添加すると細胞増殖がほとんど抑制され、コントロール値に近いことが分かった。BP-1, BP-2, 4HBP や 4MBC では、高活性を示す濃度 ( $3 \times 10^{-5}$  M) に対し ICI 濃度  $10^{-6}$  M で細胞増殖が抑制された。同様に ECR など他の MCF-7 細胞増殖作用を示す化合物においても、各化合物の高活性を示す濃度 ( $10^{-4}$  M) に対し ICI 濃度  $10^{-6}$  M で細胞増殖が抑制された。また、ここには図示していないが、上記の濃度の各化合物の細胞増殖作用は、ICI の添加濃度  $10^{-9}$  から  $10^{-6}$  M の範囲で濃度依存的に抑制されることが分かった。

Table 3 に  $ER\alpha$  及び  $\beta$  を用いたヒトエストロゲン受容体 (ER) 結合競合試験の結果を示した。図に表していないが、 $ER\alpha$  では、陽性対照の BPA は、 $10^{-7}$ — $10^{-4}$  M の間で濃度依存的に結合競合活性が認められた。同様に、BP-1, BP-2 は、 $10^{-8}$ — $10^{-5}$  M の間で、4HBP, B4HB, ECR, 4MBC は  $10^{-6}$ — $10^{-3}$  M の間で、また、BP, BP-3, BP-6, OCR, BHR は  $10^{-5}$ — $10^{-3}$  M の間で濃度依存的に結合競合活性が認められた。その活性強度は、Relative binding ability (RBA) からみて BP-2 > BP-1 = BPA >

Table 2. Estrogenic Activities of UV Absorbers Tested by MCF-7 Cell Proliferation and CHOOSER Assays and Level of Activity Relative to that of  $17\beta$ -Estradiol

Chemical name (abbreviated name)	MCF-7 assay*		CHOOSER assay	
	$REC_{10}$ (M) <sup>a)</sup>	RA <sup>b)</sup>	$REC_{10}$ (M) <sup>a)</sup>	RA <sup>b)</sup>
17 $\beta$ -Estradiol (E2)	$5.0 \times 10^{-12}$	10 <sup>6</sup>	$5.2 \times 10^{-12}$	10 <sup>6</sup>
Bisphenol A (BPA)	$2.6 \times 10^{-7}$	19	$1.6 \times 10^{-7}$	33
Benzophenone (BP)	$2.5 \times 10^{-5}$	0.20	—	—
2,4-Dihydroxybenzophenone (BP-1)	$1.2 \times 10^{-6}$	4.2	$1.5 \times 10^{-7}$	35
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone (BP-2)	$1.9 \times 10^{-7}$	26	$1.5 \times 10^{-8}$	350
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3)	$1.2 \times 10^{-5}$	0.42	—	—
2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (BP-6)	$9.6 \times 10^{-6}$	0.52	$1.4 \times 10^{-6}$	3.7
2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-8)	$5.2 \times 10^{-5}$	0.10	—	—
4-Hydroxybenzophenone (4HBP)	$1.2 \times 10^{-6}$	4.2	$3.4 \times 10^{-7}$	15
Benzhydrol (BHR)	$2.2 \times 10^{-5}$	0.23	$> 1.0 \times 10^{-5}$	$< 0.52$
Ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (ECR)	$7.5 \times 10^{-6}$	0.66	$1.1 \times 10^{-6}$	4.7
2-Ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR)	$1.7 \times 10^{-5}$	0.29	$> 1.0 \times 10^{-5}$	$< 0.52$
Benzyl 4-hydroxybenzoate (B4HB)	$5.8 \times 10^{-5}$	0.09	$2.5 \times 10^{-7}$	21
3-(4-Methylbenzylidene) camphor (4MBC)	$6.3 \times 10^{-6}$	0.79	$4.8 \times 10^{-6}$	1.1
Ethyl cinnamate (ETCM)	$7.3 \times 10^{-5}$	0.07	—	—

\* MCF-7 cell proliferation assay. —: Not tested. a)  $REC_{10}$  is the concentration of the chemical showing 10% of the activity of E2 using MCF-7 cell proliferation or CHOOSER assay and the value was obtained from the graph curve plotted by the assay. b) The value of RA (relative activity) was represented as the ratio of the  $REC_{10}$  value of each chemical to that of E2. The RA value for E2 was arbitrarily set at 10<sup>6</sup>.

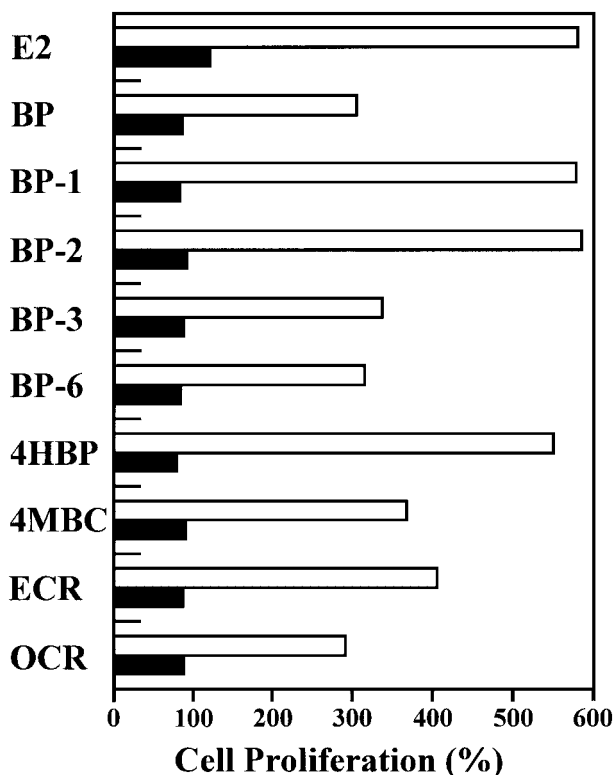


Fig. 3. Inhibitory Effects of ICI 182780 against the Proliferation of Cultured MCF-7 Breast Cancer Cells by UV Absorbers

Cell numbers after treatment with chemicals in the absence (white bar) and the presence (black bar) of ICI 182780 ( $10^{-6}$  M) are indicated as percentages of that with 0.1% DMSO (100%). The concentrations of the chemicals were as follows; 17 $\beta$ -estradiol (E2),  $5 \times 10^{-10}$  M; 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP-2), 4-hydroxybenzophenone (4HBP), and 3-(4-methylbenzylidene) camphor (4MBC),  $3 \times 10^{-5}$  M; benzophenone (BP), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3), 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (BP-6), ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (ECR) and 2-ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR),  $10^{-4}$  M. Each point is the mean of 6 determinations and each coefficient of variation was less than 7%.

4HBP = B4HB > 4MBC = ECR > BP-6 = BP-3 > OCR = BP > BHR の順となった。ER $\beta$  では、陽性対照の BPA 及び BP-2 は、 $10^{-8}$ — $10^{-5}$  M の間で濃度依存的に結合競合活性が認められた (図に示さず)。同様に、BP-1, B4HB, 4HBP, ECR は  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  M の間で、4MBC, BP-3, BP-6 は  $10^{-6}$ — $10^{-3}$  M の間で、また、OCR, BP, BHR は  $10^{-5}$ — $10^{-3}$  M の間で濃度依存的に結合競合活性が認められた。その活性強度は、BP-2 > BPA > BP-1 = B4HB = ECR > 4HBP > 4MBC = BP-3 = BP-6 > OCR = BP > BHR の順となった。

## 考 察

化粧品に使用される可能性がある紫外線吸収剤及

びその関連化合物 33 種類のエストロゲン様作用を MCF-7 ヒト乳がん培養細胞の増殖試験に供したところ、9 化合物に作用陽性のものが認められた。また、ICI の同時添加時に MCF-7 細胞増殖抑制が起こることから、これらの化合物による作用は ER を介した反応により生じることが示唆された。これらの化合物のエストロゲン様作用を CHOOSER 細胞による酵素活性試験、及び ER 結合競合試験により検討すると、MCF-7 細胞増殖試験とほぼ類似の結果が得られた。従来の報告では、*in vitro* 及び *in vivo* の実験により、BP 類、4MBC、OMC などにエストロゲン様活性が認められてきた。<sup>15,19,21)</sup> 本実験では、BP 類や 4MBC の *in vitro* での活性を確認するとともに、新たに ECR や OCR に活性が認められた。

MCF-7 細胞増殖試験を用いて BP 類のエストロゲン様作用物質の検索を行った従来の報告では、BP-1 (活性検出濃度:  $10^{-8}$  M), BP-3 (EC<sub>50</sub>:  $3.73 \times 10^{-6}$  M), BP-8 (活性検出濃度:  $10^{-7}$  M), 4HBP (活性検出濃度:  $10^{-5}$  M) に活性が認められた。<sup>14-16)</sup> 本報告でも同様に、これらの化合物に活性を認めた (ただし、BP-8 では活性が弱い)、既報告に比べると化合物によっては数倍高いあるいは数 10 から数 100 倍低いと言う値を示した。従来の報告では、BP には活性が認められていない<sup>14)</sup> が、本報告では BP に弱いエストロゲン様活性を認めた。また、4MBC では、本報告の EC<sub>10</sub> の値より低い EC<sub>50</sub> 値が報告されている。<sup>15)</sup> 他に、BP-2 に BPA と同程度の比較的強い活性、ECR や BP-6 に中程度の活性、OCR や BHR に弱い活性が認められた。また、これらの化合物に比べて B4HB や ETCM では活性上昇がほとんど認められなかった。しかしながら、Darbre *et al.* は、B4HB が MCF-7 細胞の ER への結合競合試験や uterotrophic assay で陽性であるとともに、MCF-7 細胞増殖作用 ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  M) を持つと報告している。<sup>28)</sup> これらの化合物による活性の強弱は、使用した MCF-7 細胞の *subline* や細胞増殖試験の endpoint 測定条件などの相違に基づくものと考えられる。

Yeast two-hybrid assay による BP 類のエストロゲン様作用活性が Kawamura Y. *et al.*<sup>13)</sup> や Nishihara T. *et al.*<sup>29)</sup> によって既に報告されている。本実験の MCF-7 細胞増殖試験による活性検出濃度は、

Table 3. Competitive Binding Activities of UV Absorbers to Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) against 17 $\beta$ -Estradiol and Relative Binding Affinity to that of Diethylstilbestrol

Chemical name (abbreviated name)	ER $\alpha$		ER $\beta$	
	IC <sub>50</sub> (M) <sup>a)</sup>	RBA <sup>b)</sup>	IC <sub>50</sub> (M) <sup>a)</sup>	RBA <sup>b)</sup>
Diethylstilbestrol (DES)	$3.8 \times 10^{-8}$	10 <sup>3</sup>	$1.9 \times 10^{-8}$	10 <sup>3</sup>
Bisphenol A (BPA)	$1.1 \times 10^{-6}$	35	$6.2 \times 10^{-7}$	31
Benzophenone (BP)	$5.2 \times 10^{-4}$	0.07	$8.7 \times 10^{-5}$	0.22
2,4-Dihydroxybenzophenone (BP-1)	$8.6 \times 10^{-7}$	44	$2.2 \times 10^{-6}$	8.6
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone (BP-2)	$2.9 \times 10^{-7}$	130	$1.8 \times 10^{-7}$	110
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3)	$7.0 \times 10^{-5}$	0.54	$1.5 \times 10^{-5}$	1.3
2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (BP-6)	$6.9 \times 10^{-5}$	0.55	$1.7 \times 10^{-5}$	1.1
4-Hydroxybenzophenone (4HBP)	$6.3 \times 10^{-6}$	6.0	$5.8 \times 10^{-6}$	3.3
Benzhydrol (BHR)	$>1.0 \times 10^{-3}$	$<0.04$	$2.4 \times 10^{-4}$	0.08
Ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (ECR)	$1.4 \times 10^{-5}$	2.7	$2.8 \times 10^{-6}$	6.8
2-Ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR)	$4.8 \times 10^{-4}$	0.08	$6.0 \times 10^{-5}$	0.32
Benzyl 4-hydroxybenzoate (B4HB)	$7.3 \times 10^{-6}$	5.2	$2.8 \times 10^{-6}$	6.8
3-(4-Methylbenzylidene) camphor (4MBC)	$1.2 \times 10^{-5}$	3.2	$1.4 \times 10^{-5}$	1.4

Three determinations were conducted at each dose of chemical using the estrogen receptor binding assay. Each coefficient of variation was under 13%. The graph of activity by each chemical was plotted using each point designated by the mean. a) IC<sub>50</sub> is the concentration of the chemical that inhibits the binding of 17 $\beta$ -estradiol to ER by 50% and the value was obtained from the graph curve. b) The value of RBA (relative binding affinity) was represented as ratio of the IC<sub>50</sub> of each chemical to that of DES. The RBA value for DES was arbitrarily set at 10<sup>3</sup>.

Yeast two-hybrid assay に比べ BP-1 で同程度, BP-2, BP-3, 及び BP-8 でおおむね 1 桁及び 2 桁低い濃度であった。また, Yeast two-hybrid assay で陰性の結果でも MCF-7 細胞増殖試験で陽性となるもの (BP, BP-6) も見受けられた。BP-4 及び BP-12 は両 assay で陰性となった。したがって, *in vitro* のエストロゲン様作用検出系である MCF-7 細胞増殖試験や Yeast two-hybrid assay では, 試験時間の長短, 検出感度の良し悪し, assay 系への代謝活性化の組み込みなどの実験上の長所・短所を選択して試験することが望まれる。<sup>30)</sup>

BP 類数種の ER 結合競合試験 (ER $\alpha$ ) を調べた報告<sup>16,18)</sup> と比較すると, 本実験ではより低い濃度で結合することが分かった。例えば, BP-1 の IC<sub>50</sub> 値は  $5 \times 10^{-5}$  M<sup>16)</sup> 又は  $3.65 \times 10^{-5}$  M<sup>18)</sup> の既報告に対し,  $8.6 \times 10^{-7}$  M の値が得られた (約 50 倍の感度差)。また, 4HBP では, その IC<sub>50</sub> 値は  $5 \times 10^{-5}$  M<sup>19)</sup> に対し,  $6.3 \times 10^{-6}$  M の値が得られた (約 8 倍の感度差)。この差異は, 使用した ER の相違 (ヒト由来とラット子宮由来の ER), や E2 を標識する化合物の違い (fluorescein, <sup>3</sup>H, や horseradish peroxidase) を含む操作法の相違に基づくと考えられるが, これらの assay 法を比較検討した報告はほとんど認められず, その詳細は不明である。一方,

BHR では  $>5 \times 10^{-4}$  M<sup>19)</sup> の既報告に対し,  $>1.0 \times 10^{-3}$  M を示した。他にも BP, BP-2, BP-3, BP-6, ECR, OCR, B4HB, 4MBC に活性が認められた。これらの活性値は, MCF-7 細胞増殖試験による活性強度の順位と比較すると B4HB を除いておおむね同様な順位関係を示した。また, ER $\beta$  の生体内での機能や ER $\alpha$  との関係はいまだよく解明されていない<sup>30)</sup> が, ER $\alpha$  及び ER $\beta$  を用いて E2 との結合に対する合成化学物質や phytoestrogen の結合競合試験を調べた報告では, BPA, 水酸化 PCB, DDT 類, アルキルフェノール類などの合成化学物質の結合性は, ER $\alpha$  と ER $\beta$  では類似の傾向であったが, いくつかの phytoestrogen ではおおむね ER $\alpha$  より, ER $\beta$  の方が一桁強い結合競合が生じた。<sup>26,31)</sup> 本報告でも, 紫外線吸収剤及びその関連物質による ER $\alpha$  と ER $\beta$  の結合競合強度の比率は, 数倍以内の相違であり, 既報告の合成化学物質による結合競合と類似の傾向を示した。

CHOOSER assay は, MCF-7 細胞増殖試験と同程度の活性発現, 短期間 (2 日間) の試験期間, 試験行程の煩雑さ (例えば, 血清中の女性ホルモンの除去操作など) の回避という特徴を持っている。<sup>27)</sup> 得られたエストロゲン様作用物質の MCF-7 細胞増殖試験と CHOOSER assay による比較を行うと,



おおむね前者で活性の強い化合物は後者でも活性が高い傾向を示した。例外は B4HB で、MCF-7 細胞増殖試験で陰性であったが、CHOOSER assay では活性が比較的高い化合物に分類された。CHOOSER 細胞ではトリプシン処理後すぐに B4HB を投与することで B4HB が細胞質又は細胞核内の ER<sup>30</sup> に接触する機会が多いのに対して、MCF-7 細胞増殖試験では、トリプシン処理後の 24 時間、前培養したのち B4HB を投与することにより B4HB が ER に結合する可能性の低いのが原因と推察されるが、詳細は明らかではない。B4HB は細胞内で benzyl benzoate から代謝されると考えられるが、この親化合物は MCF-7 細胞増殖試験にて全く活性を示さない。<sup>32</sup> B4HB が CHOOSER assay 並びに ER 結合競合試験で陽性であることを考えると、MCF-7 細胞膜で透過抑制を受け、細胞内では活性に寄与する B4HB の生成量が少ないのが原因と考えられる。

*In vitro* にてエストロゲン様作用が観察された化合物が、代謝、排泄、循環、臓器特異性などの多様な系から成り立つ *in vivo* の uterotrophic assay で、活性を示すとは限らない。例えば、BP-3 (1000–1500 mg/kg/day), 4MBC (309 mg/kg/day), 及び OMC (934 mg/kg/day) は、*in vitro* 及び *in vivo* の両 assay で活性を示すが、octyl dimethyl-PABA, homosalate は MCF-7 細胞増殖試験で陽性に対して、uterotrophic assay では不活性との報告がある。<sup>15</sup> ただし、われわれの結果では homosalate に MCF-7 細胞増殖活性は観察されなかった。また、4HBP (100 mg/kg/day) による uterotrophic 活性陽性に対して、BP や BHR (400 mg/kg/day 以下) では活性陰性と言う報告がある<sup>19</sup> が、*in vitro* の本実験では、BP は陽性となり、かならずしも一致する結果とはならなかった。

OCR の毒性については、ニュージーランド白ウサギを用いて 13 週間局所塗布を行ったところ、用量—反応依存性の skin irritation や体重減少がわずかながら観察された。<sup>33</sup> 一方、マウスでの発生毒性、チャイニーズハムスター卵巣細胞による染色体異常誘発試験やマウスリンパ腫細胞による forward gene mutation を測定する遺伝毒性では、無添加群に対して有意な結果は得られなかった。しかしながら、OCR は、接触アレルギーの誘発や、太陽光による一重項酸素の生成を促す可能性がある。<sup>10</sup> 本実

験では、OCR に弱いエストロゲン様作用が観察された。一方、ECR は、その毒性並びに環境中の検出状況についてはほとんど明らかとなっていないが、今回の試験化合物では中程度のエストロゲン様作用を示したことから、その使用方法や環境中の汚染状況の把握が望まれるところである。現在の日本の化粧品基準では、4MBC や ECR の化粧品類への使用に関する許認可は下りていない<sup>34</sup>が、BP 類、OMC, OCR などの紫外線吸収剤とともにこれらの化合物の環境中への負荷がどの程度か、あるいは母乳などの生体への負荷があるとすればどの程度なのかを明らかにすることがヒトの健康影響や環境生物に対する影響を考える上で大変重要なことと考えられる。

**謝辞** MCF-7 ヒト乳がん培養細胞をご供与頂いた Tufts 大学, Dr. A. M. Soto に深謝する。MCF-7 細胞を用いた細胞増殖試験をご教授頂いた、北里大学, 坂部 貢博士, 並びにサントリー研究所, 藤井 互博士に深謝する。また、被験化合物の入手にご尽力頂いた大阪教育大学, 杉浦 渉講師 (元大阪府立公衆衛生研究所) に深謝する。本実験の一部は、厚生労働省の厚生労働科学研究費補助金によって行われたものである。

## REFERENCES AND NOTES

- 1) Yamanoi H., *Fine Chem.*, **33**, 28–38 (2004).
- 2) Moloney F. J., Collins S., Murphy G. M., *Am. J. Clin. Dermatol.*, **3**, 185–191 (2002).
- 3) Naylor M. F., Farmer K. C., *Arch. Dermatol.*, **133**, 1146–1154 (1997).
- 4) Stege H., Budde M. A., Grether-Beck S., Krutmann J., *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16**, 256–259 (2000).
- 5) Schauder S., Ippen H., *Contact Dermatitis*, **37**, 221–232 (1997).
- 6) Bourrain J. L., Amblard P., Beani J. C., *Contact Dermatitis*, **48**, 45–46 (2003).
- 7) Carrotte-Lefebvre I., Bonneville A., Segard M., Delaporte E., Thomas P., *Contact Dermatitis*, **48**, 46–47 (2003).
- 8) Brand R. M., Spalding M., Mueller C., *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **40**, 827–832 (2002).
- 9) Brand R. M., Pike J., Wilson R. M., Charron A. R., *Toxicol. Ind. Health*, **19**, 9–16 (2003).

- 10) Allen J. M., Gossett C. J., Allen S. K., *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 605–609 (1996).
- 11) Vaz A. D., Coon M. J., Peege H., Menon K. M., *Drug Metab. Dispos.*, **20**, 108–112 (1992).
- 12) Japanese Ministry of the Environment, Strategic Program on Environmental Endocrine Disruptors '98 (1998). Available in <http://www.env.go.jp/chemi/end/endindex.html>, cited November, 2000.
- 13) Kawamura Y., Ogawa Y., Nishimura T., Kikuchi Y., Nishikawa J., Nishihara T., Tamamoto K., *J. Health Sci.*, **49**, 205–212 (2003).
- 14) Nakagawa Y., Suzuki T., Tayama S., *Toxicology*, **156**, 27–36 (2000).
- 15) Schlumpf M., Cotton B., Conscience M., Haller V., Steinmann B., Lichtensteiger W., *Environ. Health Perspect.*, **109**, 239–244 (2001).
- 16) Nakagawa Y., Suzuki T., *Chem. Biol. Interact.*, **156**, 27–36 (2002).
- 17) Schultz T. W., Seward J. R., Sinks G. D., *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 301–304 (2000).
- 18) Blair R. M., Fang H., Branham W. S., Hass B. S., Dial S. L., Moland C. L., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheehan D. M., *Toxicol. Sci.*, **54**, 138–153 (2000).
- 19) Nakagawa Y., Tayama K., *Arch. Toxicol.*, **75**, 74–79 (2001).
- 20) Takatori S., Kitagawa Y., Oda H., Miwa G., Nishikawa J., Nishihara T., Nakazawa H., Hori S., *J Health Sci.*, **49**, 91–98 (2003).
- 21) Tinwell H., Lefevre P. A., Moffat G. J., Burns A., Odum J., Spurway T. D., Orphanides G., Ashby J., *Environ. Health Perspect.*, **110**, 533–536 (2002).
- 22) Poiger T., Buser H. R., Balmer M. E., Bergqvist P. A., Muller M. D., *Chemosphere*, **55**, 951–963 (2004).
- 23) Nagtegaal M., Ternes T. A., Baumann W., Nagel R., *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.*, **9**, 79–86 (1997).
- 24) Hany J., Nagel R., *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **91**, 341–345 (1995).
- 25) Soto A. M., Sonnenschein C., Chung K. L., Fernandez M. F., Olea N., Serrano F. O., *Environ. Health Perspect.*, **103**(suppl 7), 113–122 (1995).
- 26) Okubo T., Kano I., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 443–452 (2003).
- 27) Adachi S., Yamamoto K., Oda H., Ono Y., Suzuki Y., *J. Water Environ. Technol.*, **28**, 451–456 (2005).
- 28) Darbre P. D., Byford J. R., Shaw L. E., Hall S., Coldham N. G., Pope G. S., Sauer M. J., *J. Appl. Toxicol.*, **23**, 43–51 (2003).
- 29) Nishihara T., Nishikawa J., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M., Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., Utsumi H., *J. Health Sci.*, **46**, 282–298 (2000).
- 30) Kaneko H., Syouno H., Matsuo M., *Kagaku*, **68**, 598–605 (1998).
- 31) Kuiper G. G. J. M., Lemmen J. G., Carlsson B., Corton J. C., Safe S. H., van der Saag P. T., van der Burg B., Gustafsson J.-A., *Endocrinology*, **139**, 4252–4263 (1998).
- 32) Hashimoto Y., Kawaguchi M., Miyazaki K., Nakamura M., *Dent. Mater.*, **19**, 341–346 (2003).
- 33) Odio M. R., Azri-Meehan S., Robison S. H., Kraus A. L., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 355–368 (1994).
- 34) Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, Ministerial announcement No. 331 (29/9/2000).