

2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン(紫外線吸収剤)は 中間代謝物を介してエストロゲン様作用を誘導する

中 川 好 男*, 長 井 二三子*, 鈴 木 俊 也**

2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone, an UV-Absorber, induces Xenoestrogenic Effects through Some Intermediary Metabolites

Yoshio NAKAGAWA*, Fumiko NAGAI* and Toshinari SUZUKI**

Keywords : 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, 紫外線吸収剤 UV Absorber, 代謝 metabolism, エストロゲン様作用 estrogenic effect, 細胞毒性 cytotoxicity, 肝細胞 hepatocytes, MCF-7 細胞 MCF-7 cells

緒 言

ベンゾフェノン誘導体は、紫外線吸収剤として日焼け止めの化粧品、光安定化剤として合成樹脂の皮膜等に長年使用されてきた。同化合物の生体への影響、特に安全性(毒性)については多数の詳細な報告がある¹⁻⁵⁾。代表的な紫外線吸収剤である 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン(HMB; 慣用名 benzophenone-3/oxybenzone)は低毒性の化合物(ラットの経口 LD₅₀ >6 g/kg¹⁾)であるが、ラット及びマウスにおいて、細胞質の空胞化を伴った肝肥大、尿細管傷害を伴った腎重量増加を惹起し、肝と腎が標的器官であると報告されている^{6,7)}。代謝実験において、経口あるいは経皮的に取り込まれた HMB は肝臓で迅速に代謝を受けたのち、尿及び胆汁を経て体外に排泄される⁸⁾。その時の代謝物として親物質 HMB の *O*-脱メチル化体である 2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン(DHB; Fig. 3), DHB 芳香環の水酸化体である 2,3,4-トリヒドロキシベンゾフェノン(THB; Fig. 7), HMB 芳香環の水酸化体である 2,2'-ジヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン(DHMB; Fig. 7)及びこれらのグルクロン酸-, 硫酸-抱合体が明らかにされている⁸⁾。

近年、食品添加物をはじめ環境中の様々な化学物質に起因する内分泌かく乱作用が多数報告され、ヒト及び動物の生殖機能への悪影響が危惧されている。例えばビスフェノール A (BPA) 及び類縁のフェノール性化合物によるエストロゲン様作用が *in vivo* 及び *in vitro* の実験系で明らかにされた⁹⁻¹⁴⁾。未置換型ベンゾフェノン(ジフェニルメタン)もまた環境省による内分泌かく乱化学物質リスト(SPEED' 98/JEA)¹⁵⁾に挙げられた 65 対象物質のひとつである。以前、著者らはベンゾフェノンがラット肝細胞で速やかに代謝され、中間代謝物のひとつである 4-ヒドロキシベンゾフェノンに *in vivo* 及び *in vitro* でエストロゲン様作

用を発現することを報告した^{16,17)}。本研究はベンゾフェノン誘導体である HMB のラット肝細胞における代謝様式と親物質及び代謝物によるエストロゲン様活性の発現を、エストロゲン受容体結合能とエストロゲン受容体陽性の MCF-7 細胞の増殖能により比較検討した。

実 験 方 法

1. 試薬

HMB, DHB, DHMB, THB, BPA は東京化成工業(株)製, 17 β -エストラジオール(E₂), ジエチルスチルベストール(DES)は Sigma Chemicals 製, コラゲナーゼは和光純薬工業(株)製を用いた。このほかの試薬は市販の特級規格またはそれ以上のものを使用した。

2. 遊離肝細胞の調製と被験物質の暴露

遊離肝細胞は雄性 F344/DuCrj 系ラット(200-250 g, 日本チャールズ・リバー)の肝臓を Moldéus ら¹⁸⁾の EGTA/コラゲナーゼ二段灌流法により調製した。肝細胞は Krebs-Henseleit 緩衝液(0.1 %アルブミン, 12.5 mM HEPES 含有; pH 7.4)に分散(10⁶ 細胞/mL)させた。95 % 酸素 - 5 % 二酸化炭素(carbogen)気流下, 37°C に加温した細胞浮遊液にジメチルスルホキシド(DMSO; 終濃度 0.5 %以下)に溶解した被験物質を加え反応を開始した。反応開始後、定時に細胞浮遊液を分取し、細胞死、細胞内アデニンヌクレオチド(ATP, ADP, AMP)濃度、HMB 代謝物の同定とそれらの濃度を測定した。

3. HMB 代謝物の同定と定量

分取した細胞浮遊液(0.5 mL)に等量の冷メタノールを加えたのち、遠心分離した上清中の HMB と代謝物を HPLC

* 東京都健康安全研究センター環境保健部薬理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

** 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科

で分析した. カラムは Capcell pak C18 (4.6 mm i.d. x 250 mm, 粒径 $5\mu\text{m}$; Shiseido 製) または Richrosorb RP-18 (10 mm i.d. x 250 mm, 粒径 $7\mu\text{m}$; Merck KgaA 製) を用い, 移動相はメタノール/0.1 M 磷酸水素二アンモニウム溶液 (50/50, v/v, pH 5.3), 流量は 1.0 mL/分, 測定波長は 260 nm であった. クロマトグラム上の HMB 及び代謝物 (DHB, DHMB, THB) は, 1) 標準物質のカラム保持時間 (RT), 2) 試料-標準物質混合クロマトグラフィ, 3) 溶出ピークの質量スペクトル等で同定し, また各ピーク濃度は標準品の既知濃度より算出した. なお細胞浮遊液に添加後直ちにメタノールで抽出した各標準品の回収率は, いずれも 85 % 以上であった. 細胞浮遊液中の抱合体は, β -グルクロニダーゼまたはスルファターゼにより酵素的に加水分解したのち, 遊離した代謝物を HPLC で定量した.

4. HMB 代謝物の質量分析

Richrosorb RP-18 カラムより分離した各分画は Sep-Pak カートリッジ (Waters 製) で濃縮したのち, HPLC システムに連結したネガティブモード・エレクトロスプレーイオン化 (-ESI) /質量分析装置 (Water mass spectrometer ZMD) でスペクトルを得た. HPLC の移動相はメタノール/水 (10/90, v/v), 流量は 0.2 mL/分であった. 質量スペクトルは, コーン電圧 40 V において 100 から 1000 Da 域を 1 秒毎に反復走査した.

5. 細胞傷害とアデニンヌクレオチドの測定

細胞死は 0.16 % トリパンプルーの排除能により, またブレップ細胞数はブレップ (水泡様小突起) を発現した生細胞を顕微鏡で計数した. 調製直後の肝細胞の生存率は 85 % 以上であった. アデニンヌクレオチドは Jones¹⁹⁾ による HPLC 法で測定した.

6. HMB とその代謝物のエストロゲン様活性の測定

(1) 競合結合試験: エストロゲン受容体における E_2 と各化合物の競合的結合能は, エストロゲン-R (α) 結合スクリーニングキット (和光純薬工業製) により測定した.

(2) MCF-7 細胞増殖試験²⁰⁾; American Type Culture Collection (Manassas, VA) より入手したヒト乳ガン由来 MCF-7 細胞は, RPMI-1640 培地 (フェノールレッド無添加, 5 % 牛胎仔血清 (FCS), 15 mM HEPES, $50\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン, 50 U/mL ペニシリン, 10 ng/mL インスリン添加) で予備培養した. 本培養はエストロゲン・フリーの FCS 添加 RPMI-1640 培地に同細胞を分散させ, 96 穴プレートに播種 (4×10^3 細胞/穴) した. 24 時間後, DMSO に溶解した E_2 (陽性対照; 1 nM) 又は各化合物 (1 nM - 500 μM) を加え, 37 °C, 5 % CO_2 条件下で 5 日間培養した. 細胞数は WST-8 (Dojindo Lab. 製) を用いて測定した.

7. 統計解析

対照群と各処置群間の有意差は Dunnett の多重比較法で

検定し, 有意水準を 5 % 以下とした.

結 果

1. ラット肝細胞に及ぼす HMB の毒性

HMB は暴露濃度 (0.25 - 1.0 mM) と時間 (0-3 時間) に依存して細胞死を惹起し, 細胞内 ATP とアデニンヌクレオチド濃度の減少を伴った (Fig. 1). 1 mM HMB は細胞死前に顕著なブレップの形成を誘導した. なお HMB とその主代謝物である DHB を 0.5 mM 濃度で 1 時間暴露したところ, 細胞毒性の強さは $\text{HMB} < \text{DHB}$ であった: HMB, $33.2 \pm 4.7\%$; DHB, $78.5 \pm 5.2\%$ (平均値 $\pm$ SE; $n=3$).

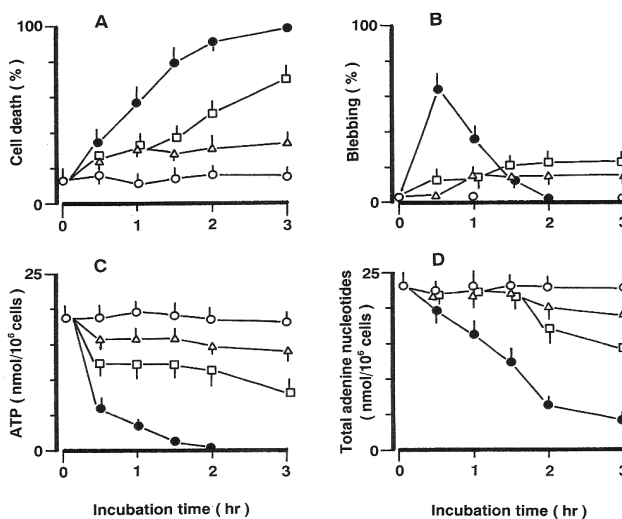


Fig. 1. Effects of HMB on Cell Death (A), Blebbing (B), and Intracellular Levels of ATP (C) and Total Adenine Nucleotides (D). Keys: (○) 0 mM, (△) 0.25 mM, (□) 0.5 mM, (●) 1.0 mM. Values are expressed as the means $\pm$ SE of three experiments.

2. ラット肝細胞における HMB の代謝

HMB の代謝様式を明らかにするため, 0.25 mM (低毒性濃度) 暴露の肝細胞浮遊液を HPLC で分析した (Fig. 2). 溶出パターンを経時変化が示すように, 親物質・HMB (RT, 16.0 分) は 3 時間のインキュベーションで完全に消失した. この消失は, DHB (脱メチル化体; RT, 9.1 分) とピーク b (RT, 7.5 分) の一時的な増加を伴った (Figs. 2, 3, 4). 予備実験において, Krebs-Henseleit 緩衝液に加えた HMB と DHB は carbogen 気流下 37 °C で 3 時間安定であったことにより, 細胞浮遊液中の両化合物の量的変動は酵素的反応に依存することを示している. ピーク b に溶出した物質は, 既知の HMB 代謝物である DHMB (RT, 10.0 分) または THB (RT, 5.9 分) に一致しなかった. これら両物質は反応 1 時間後, 微量代謝物 (DHMB, 0.1 μM ; THB, 0.2 μM) として検出された. ピーク b の -ESI/MS スペクトルは, m/z 243 の分子イオン (M-H^- に相当) とベースピークイオン m/z 228 (酸素原子ひとつ分の減少に相当) が存在することにより (Fig. 3), HMB に酸素原子がひとつ付加

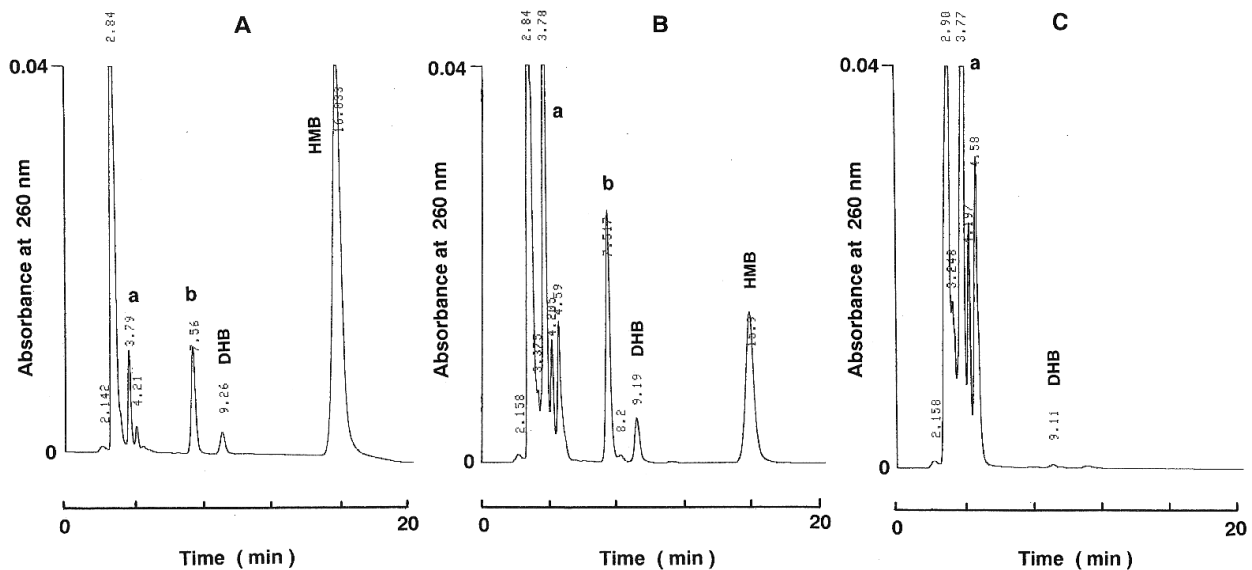


Fig. 2. Typical HPLC Elution Profiles of Metabolites in Hepatocytes Suspensions treated with 0.25 mM HMB after 5 min (A), 1 h (B), and 3 h (C) Incubation. Peaks are glucuronides derived from HMB/its metabolites (a: RT, 3.8 min), a hydroxylated intermediate of HMB (b: RT, 7.5 min), DHB (RT, 9.2 min) and HMB (RT, 16.0 min).

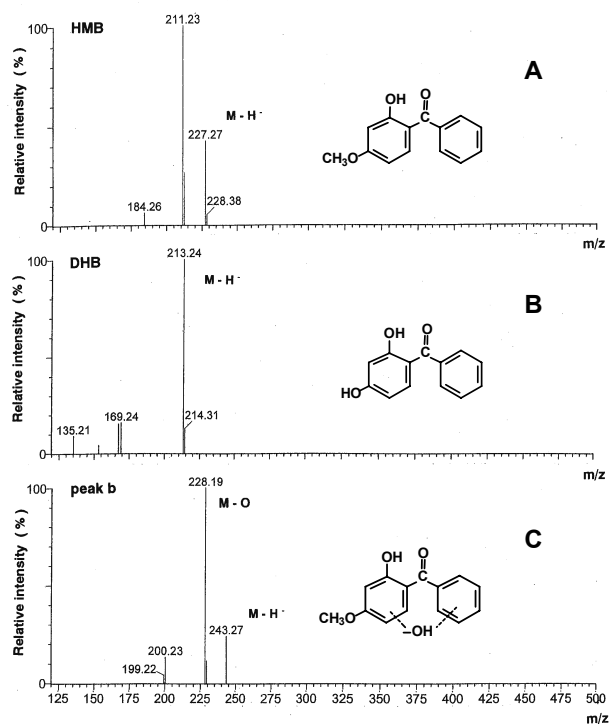


Fig. 3. Typical -ESI Mass Spectra of HMB (A), DHB (B) and peak b (C)

した中間代謝物 (DHMB-異性体; 酸素の付加位置は不明) であることが示唆された。一方、ピーク a (RT, 3.8 分) に溶出した物質は β -グルクロニダーゼで酵素的に加水分解され、遊離の HMB, DHB, DHMB-異性体 (ピーク b) を再生したことにより、親物質と両代謝物由来のグルクロ

ン酸抱合体群であることを示した。なおピーク a に続く二つのピーク (RT, 4.2 分と RT, 4.6 分) はともに β -グルクロニダーゼ, スルファターゼに対して抵抗性を示した。

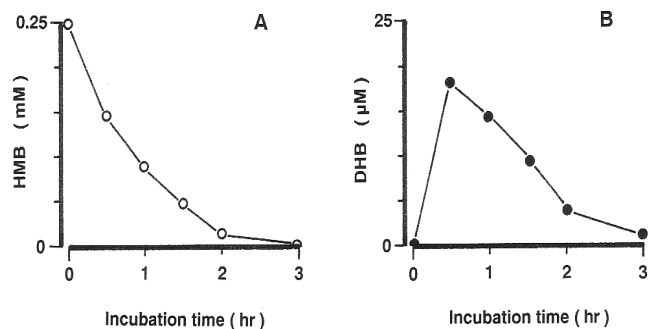


Fig. 4. Changes in the Levels of HMB (A) and DHB (B) in Rat Hepatocytes treated with 0.25 mM HMB for 3 h. Values are the averages of two experiments.

3. HMB 代謝物のエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) に対する結合能

$ER\alpha$ に対する HMB および代謝物: DHB, DHMB, THB の親和性の強さは、蛍光標識 E_2 との競合結合能により比較した (Fig. 5)。これら化合物のおおよそ 50% 阻害濃度は、DES が 1×10^{-8} M, BPA が 1×10^{-5} M, DHB が 5×10^{-5} M, THB が 5×10^{-4} M であった。つまり結合能は既知のエストロゲン様物質である DES が最強で、ついで BPA, DHB, THB の順であった。親物質 HMB と DHMB は 10^{-9} - 10^{-4} M の範

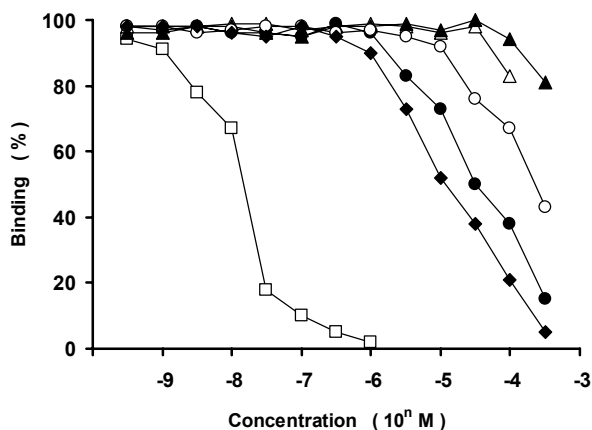


Fig. 5. Competitive Binding Assay of HMB, its Metabolites, BPA and DES for Human Recombinant Estrogen Receptor α . These compounds were tested at concentrations ranging from 5×10^{-10} M to 5×10^{-4} M. Values are expressed as the means from three determination. Keys: HMB, Δ ; DHMB, $\bullet$; DHMB, $\blacktriangle$; THMB, $\circ$; BPA, $\diamond$; DES, $\square$.

围において E_2 との顕著な競合反応がみられなかった。

4. HMB 代謝物による MCF-7 細胞増殖活性

Fig. 6 は MCF-7 細胞の増殖に及ぼす HMB と代謝物の影響を示す。暴露 5 日間において、陽性対照物質 DES (1×10^{-9} M) は対照群 (DMSO) に比べ細胞数を約 2.7 倍増加させた。DHB は濃度 (10^{-8} – 10^{-6} M) 依存的に細胞数を増加させ、 10^{-6} M で約 2.5 倍に達した。また DHMB と THMB (10^{-7} – 10^{-6} M) も細胞を増殖させたが、親物質 HMB は顕著な細胞増殖を示さなかった。一方、HMB、DHMB、THMB はいずれも 10^{-4} M 以上で細胞数を有意に減少させ、これら化合物による細胞傷害の誘導を示唆した。

考 察

ここで得られた結果は、HMB がラット肝細胞において暴露濃度と時間に依存した細胞毒性を惹起し、同時に細胞内 ATP、アデニンヌクレオチドプールの枯渇を伴うことを示している。この HMB による肝細胞傷害の発現は、肝臓が同化合物の標的器官のひとつ⁶⁾であることを支持している。また細胞内 ATP の急激な枯渇は、HMB の標的部位がミトコンドリア呼吸系^{21–25)}であることを示唆している。肝細胞にお

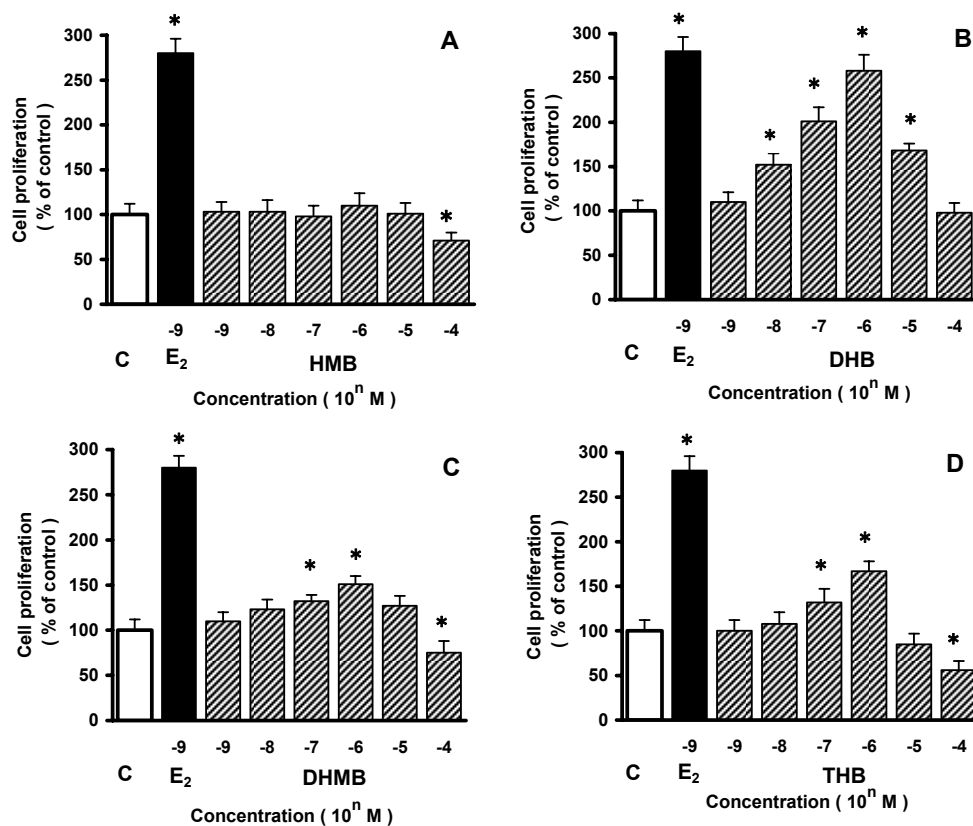


Fig. 6. Effects of HMB (A) and its Metabolites, DHB (B), DHMB (C) and THB (D) on the Growth of MCF-7 Cells. These compounds were tested at concentrations ranging from 10^{-9} M (-9) to 10^{-4} M (-4) for 5 days. Values are the means $\pm$ SE of three or four determinations. C and E_2 indicate untreated control and 17β -estradiol (10^{-9} M)-treated cells, respectively. * $P < 0.05$.

いて、HMB (0.25 mM; 低毒性濃度) はそれ自身の水酸基に基づくグルクロン酸抱合体とともに、二水酸化体である DHB と DHMB-異性体を介したグルクロン酸抱合体に解毒代謝された。Krebs-Henselite 緩衝液において、親物質 HMB は 37 °C, 3 時間, 量・質ともに安定であった。これは DHB と DHMB-異性体の生成が、ミクロゾーム・チトクロム P-450 モノオキシゲナーゼ系による親物質の 4-メトキシ基の酸化的 *O*-脱アルキル化と芳香環の水酸化に依存することを示している (Fig. 7)。これに関連して Okereke ら²⁶⁾は、ラットの皮膚に HMB を塗布したところ、中間代謝物の DHB と THB がチトクロム P-450 誘導薬・フェノバルビタール前処置で増加することを認めた。また HMB を経口投与したラット尿より、HMB, DHB, THB のグルクロン酸抱合体が同定され、HMB がラット体内においてチトクロム P-450 酵素系により 3 つの中間代謝物に変換することが明らかになった⁸⁾。一方、ラット肝細胞を用いた本研究において、未抱合型の DHMB と THB が微量 (各々 0.1 μ M と 0.2 μ M) ではあるが生成した。グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の形成はフェノール性化合物の代謝/排泄における重要な解毒経路である²⁷⁾。これらの結果より、HMB の解毒代謝に少なくとも二経路の存在が確認された (Fig. 7)。つまり一つは直接的な抱合反応系、もう一つはチトクロム P-450 による水酸化体を経由した間接的抱合反応系である。

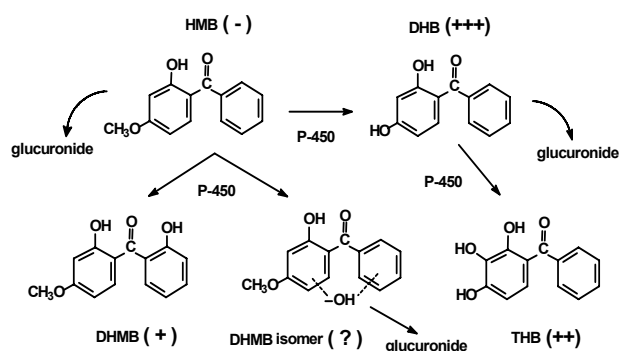


Fig. 7. Proposed Metabolism of HMB in Isolated Rat Hepatocytes and Estrogenic Activities of its Intermediates. Estrogenic activities are shown in parentheses. Key; P-450, cytochrome P-450

ビスフェノール類の構造は、既知の強力なエストロゲン様物質: DES 及びヘキセストロールに似ている。近年, in vivo と in vitro 実験に基づいて, BPA 及びアルキルフェノール類の一部にエストロゲン様作用の発現が実証された^{9-14, 28)}。本研究において, HMB の中間代謝物が MCF-7 細胞を顕著に増殖させた (Fig. 6)。この時の増殖能は DHB >> THB > DHMB の順であったが, 親物質 HMB には活性がみられなかった。またこの DHB のエストロゲン様作用はエストロゲン受容体結合試験においても確認され, その作用の強さ (IC_{50}) は DHB > THB > DHMB であった (Fig. 5)。なおこの中間代謝物 DHB は, benzophenone-1 とも呼ばれる紫外線吸収剤として上市されている。

一般に, 芳香環 4 位に水酸基をもつアルキルフェノール類は MCF-7 細胞を増殖させる²⁹⁻³¹⁾。例えばアセトアミドフェノール (アセトアミノフェン) 類は同細胞を増殖させるが, その水酸基の位置によりエストロゲン様活性に顕著な差がみられた: 細胞増殖能は *p*(4 位) > *m*(3 位) > *o*(2 位)-異性体の順であった³²⁾。一方, ビフェニール類のエストロゲン様活性が, ミクロゾーム・モノオキシゲナーゼで代謝をうけた水酸化体により発現することも報告されている^{16, 17)}。著者らは, ラット肝細胞において生成したベンゾフェノンの代謝物のうち, 4-ヒドロキシベンゾフェノンにのみエストロゲン様活性があることを in vitro 系 (MCF-7 細胞増殖試験, $ER\alpha$ 競合結合能) 及び in vivo 系 (未成熟または卵巣摘出ラットの子宮肥大試験) で確認した^{16, 17)}。さらに著者らは, 生薬成分のアネトールによるエストロゲン様活性が酸化的 *O*-脱アルキル化代謝物である 4-ヒドロキシ-1-プロペニルベンゼンにより誘導することを in vitro の系で明らかにした³³⁾。このほかにメトキシクロル, メトキシビスフェノールが脱アルキル化反応を介して生じた 4-ヒドロキシ体によりエストロゲン様活性を誘導することが報告されている³⁴⁾。本研究では, HMB-と DHB-グルクロン酸抱合体のエストロゲン様活性については調べていないが, BPA 及びアルキルフェノール由来の抱合体ではエストロゲン受容体への結合能, MCF-7 細胞の増殖能が各親物質に比べて極めて低いという報告がある^{35, 36)}。HMB を経口投与 (混飼 5%) したラットとマウスにおいて, 雌で性周期の延長と雄で精巣上体精子数の減少がみられた⁶⁾。化学物質の体内動態が投与経路に大きく依存する³⁷⁾という事実は, HMB のエストロゲン様作用が経皮的に比べ経口的摂取で強く誘導することを示唆する。最近, Schlumpf ら³⁸⁾は HMB を経口投与 (4 日間) した未成熟ラットにおいて子宮が肥大することを報告した。これらの結果は, ビフェニール類及びビスフェノール類のエストロゲン様活性の発現には少なくとも二つの機序が存在することを示している。一つは 4-ヒドロキシ化合物自体による直接的作用, もう一つは生体内代謝を介して生成した 4-ヒドロキシ代謝中間体による間接的作用である。それゆえに経口的に摂取された HMB は肝などの薬物代謝酵素により DHB を生じ, 未抱合型 DHB が生殖器官を標的にエストロゲン様作用を発現することを示唆している。

要 旨

ラット遊離肝細胞において, HMB は濃度及び反応時間に依存して細胞傷害を惹起し, これに伴って細胞内 ATP が急激に枯渇した。HMB は DHB, HMB 水酸化体 (DHMB-異性体) を経てグルクロン酸抱合体に代謝された。この時, 微量代謝物として未抱合型の THB と DHMB が共存した。 $ER\alpha$ と E_2 の結合は, DHB と THB により濃度依存的に阻害された。またエストロゲン受容体陽性 MCF-7 細胞の増殖能は DHB >> THB > DHMB であったが, 親物質 HMB には同作用がなかった。

文 献

- 1) Cosmetic Ingredient Review Expert Panel : *J. Am. Coll. Toxicol.*, **2**, 35-77, 1983.
- 2) Lewerenz, H.J., Lewerenz, G. and Plass, R. : *Food Cosmet. Toxicol.*, **10**, 41-50, 1972.
- 3) Lewerenz, H.J., Lewerenz, G. and Plass, R. : *Nahrung*, **16**, 133-134, 1972.
- 4) Hölzle, E. and Plewig, G. : *Hautarzt*, **33**, 391-393, 1982.
- 5) Jonsen, J., Jacobssen, N. and Hensten-Pettersen, A. : Bacterial mutagenesis (Ames Test) as a screening method for carcinogenic substances of dental materials. In Winter, G.E., Leroy, L.J. and De Groot, K. (eds.), *Evaluation of Biomaterials*, 333-339, 1980, Wilery, London.
- 6) National Toxicology Program, NTP technical report on the toxicity studies of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, Administration in feed to F344/N rats and B6C3F mice, *Toxicity Report Ser.* **21**, 1992.
- 7) National Toxicology Program, NTP technical report on the toxicity studies of benzophenone, Administration in feed to F344/N rats and B6C3F mice, *Toxicity Report Ser.* **61**, 2000.
- 8) Okereke, C.S., Kadry, A.M., Abdel-Rahman, M.S., *et al.* : *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 788-791, 1993.
- 9) Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., *et al.* : *Environ. Health Perspect.*, **105**, 30-36, 1997.
- 10) Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., *et al.* : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205-212, 1997.
- 11) Nakagawa, Y. and Tayama, S. : *Arch. Toxicol.*, **74**, 99-105, 2000.
- 12) Nakagawa, Y. and Suzuki, T. : *Xenobiotica*, **31**, 113-123, 2001.
- 13) Nakagawa, Y., Nakajima, K. and Suzuki, T. : *Xenobiotica*, **34**, 257-272, 2004.
- 14) Suzuki, T., Nakagawa, Y., Takano, I., *et al.* : *Environm. Sci. Tech.*, **38**, 2389-2396, 2004.
- 15) <http://www.env.go.jp/en/pol/speed98/sp98.html>
- 16) Nakagawa, Y. and Tayama, K. : *Arch. Toxicol.*, **75**, 74-79, 2001.
- 17) Nakagawa, Y., Suzuki, T. and Tayama, S. : *Toxicology*, **156**, 27-36, 2000.
- 18) Moldéus, P., Hogberg, J. and Orrenius, S. : *Meth. Enzymol.*, **52**, 60-71, 1978.
- 19) Jones, D.P. : *J. Chromatogr.*, **225**, 446-449, 1981.
- 20) Breinholt, V. and Larsen, J.C. : *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 622-629, 1998.
- 21) Nakagawa, Y., Moldéus, P. and Moore, G. : *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 159-165, 1992.
- 22) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S., *et al.* : *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1021-1027, 1995.
- 23) Nakagawa, Y. and Moldéus, P. : *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1907-1914, 1998.
- 24) Nakagawa, Y. and Moore, G. : *Biochem Pharmacol.*, **56**, 811-816, 1999.
- 25) Nakagawa, Y., Suzuki, T., Kamimura, H. *et al.* : *Arch. Toxicol.*, **79**, 312-320, 2005.
- 26) Okereke, C.S., Barat, S.A. and Abdel-Rahman, M.S. : *Toxicol. Lett.*, **80**, 61-67, 1995.
- 27) Kasper, C.B. and Henton, D. : Glucuronidation. In Jakoby, W.B. (ed.), *Enzymatic Basis of Detoxification*, 3-36, 1980, Academic Press, New York.
- 28) vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., *et al.* : *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 239-260, 1998.
- 29) White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., *et al.* : *Endocrinology*, **135**, 175-182, 1994.
- 30) Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 3280-3288, 1997.
- 31) Soni, M.G., Carabin, I.G. and Burdopeck, G.A. : *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 985-1015, 2005.
- 32) Harnagea-Theophilus, E., Miller, M.R. and Rao, N. : *Toxicol. Lett.*, **104**, 11-18, 1999.
- 33) Nakagawa, Y. and Suzuki, T. : *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 63-73, 2003.
- 34) Elsby, R. Maggs, J.L., Ashby, J. *et al.* : *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **296**, 329-337, 2001.
- 35) Certa, H., Fedtke, H.J., Wiegand, H.J., *et al.* : *Arch. Toxicol.*, **71**, 112-122, 1996.
- 36) Matthews, J.B., Twomey, K., and Zacharewski, T.R. : *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 149-157, 2001.
- 37) Klaassen, C.D. : Distribution, excretion and absorption of toxicant. In Klaassen, C.D., Amdure, M.O. and Doull, J. (eds.), *The Basis Science of Poisons*, third ed., 333-64, 1986, Macmillan, New York.
- 38) Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., *et al.* : *Environ. Health Perspect.*, **109**, 239-244, 2001.