

1,7,7-トリメチル 3-[4-(メチルフェニル)メチレン]ピジクロ[2.2.1]ヘプタン-2-オン (4-メチルベンジリデン=カンファー) (CAS no. 36861-47-9)

文献信頼性評価結果

示唆された作用							
エストロゲン	抗エストロゲン	アンドロゲン	抗アンドロゲン	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	脱皮ホルモン	その他*
○	○	—	○	○	○	—	○

○：既存知見から示唆された作用

—：既存知見から示唆されなかった作用

*その他：視床下部—下垂体—生殖腺軸への作用等

4-メチルベンジリデン=カンファーの内分泌かく乱作用に関連する報告として、動物試験の報告において、抗エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、抗プロゲステロン様作用、内分泌ホルモン関連コアクチベータに対する作用、甲状腺ホルモン様作用、視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用を示すこと、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用、抗プロゲステロン作用を示すことが示唆された。

(1)生殖影響

● Durrer ら(2005)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 0.7、7、24、47mg/kg/day (餌中濃度 10、100、330、660ppm に相当)を5～6週齢 F₀ (投与開始10週間後に交配を開始し妊娠、哺育中も投与継続)から10週齢 F₁ まで混餌投与した雌雄 LE ラットへの影響(12週齢雌 F₁)が検討されている。その結果として、0.7mg/kg/day のばく露群で子宮中プロゲステロン受容体 PR-A 蛋白質相対発現量の低値、7mg/kg/day のばく露群で子宮中インスリン様成長因子 IGF-1 mRNA 相対発現量の高値(47mg/kg/day 群では低値)、24mg/kg/day 以上のばく露群で子宮中 PR mRNA 相対発現量、子宮中エストロゲン受容体 ERα mRNA 相対発現量の低値、24mg/kg/day のばく露群で子宮中アンドロゲン受容体 AR mRNA 相対発現量の低値、子宮絶対及び相対重量の高値、47mg/kg/day のばく露群で子宮中 ERα 蛋白質相対発現量の低値が認められた。なお、体重、子宮中 ERβ mRNA 相対発現量、子宮中 PR-B 蛋白質相対発現量、子宮中 ERβ 蛋白質相対発現量には影響は認められなかった。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 0.7、7、24mg/kg/day (餌中濃度 10、100、330ppm に相当)を5～6週齢 F₀ (投与開始10週間後に交配を開始し妊娠、哺育中も投与継続)から12週齢 F₁ まで混餌投与した雌雄 LE ラットへの影響(10週齢 F₁ 雌を卵巣摘出し、12週齢でエストラジオール 10μg/kg を単回皮下投与し6時間後)が検討されている。その結果として、0.7mg/kg/day のばく露群で子宮中ステロイド受容体コアクチベータ SRC-1 蛋白質相対発現量の低値(発現誘導率の低値)、7mg/kg/day 以上のばく露群で子宮中 PR mRNA 相対発現量の低値(発現誘導率の低値)、24mg/kg/day のばく露群で子宮中 IGF-1 mRNA 相対発現量、子宮中 SRC-1 mRNA 相対発現量の低値(発現誘導率の低値)、子宮中 ERα mRNA 相対発現量、子宮中 AR mRNA 相対発現量の高値(発現抑制率の低値)が認められた。なお、子宮中 ERβ mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

想定される作用メカニズム：抗エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、抗プロゲステ

ロン様作用、内分泌ホルモン関連コアクチベータに対する作用

- Faass ら(2009)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 7、24mg/kg/day (餌中濃度 100、300ppm に相当)を 5～6 週齢 F₀ (投与開始 10 週間後に交配を開始し妊娠、哺育中も投与継続)から 11～13 週齢 F₁ まで混餌投与した雌雄 LE ラットへの影響(11～13 週齢雌 F₁)が検討されている。その結果として、7 mg/kg/day 以上のばく露群で性行動試験におけるロードシス行動頻度、性行動試験におけるロードシス行動を示す個体率、視床下部腹内側核(VMH: Ventromedial hypothalamus)中プロゲステロン受容体(PR) mRNA 相対発現量、VMH 中エストロゲン受容体(ER) α mRNA 相対発現量、内側視索前野(MPOA: medial preoptic area)中 ER α mRNA 相対発現量の低値、性行動試験における拒否行動を示す個体率の高値、24mg/kg/day のばく露群で性行動試験における求愛行動(proceptive behavior、特にジャンピング行動及び耳を震わせる行動)頻度の低値、VMH 中ステロイド受容体コアクチベータ(SRC-1) mRNA 相対発現量、MPOA 中 SRC-1 mRNA 相対発現量の高値が認められた。なお、体重、発情周期所要日数、発情周期に占める各期(発情間期、発情前期、発情期)割合、MPOA 中 PR mRNA 相対発現量、MPOA 中 ER β mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

また、上記ばく露後の 11～13 週齢雄 F₁ においては、7 mg/kg/day 以上のばく露群で VMH 中 ER α mRNA 相対発現量の低値、MPOA 中 PR mRNA 相対発現量の高値、24mg/kg/day のばく露群で MPOA 中 ER α mRNA 相対発現量の低値が認められた。なお、VMH 中 PR mRNA 相対発現量、VMH 中 SRC-1 mRNA 相対発現量、MPOA 中 ER β mRNA 相対発現量、MPOA 中 SRC-1 mRNA 相対発現量には影響は認められなかった。

想定される作用メカニズム：抗エストロゲン様作用

- Hofkamp ら(2008)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 0.7、7 mg/kg/day (餌中濃度 10、100ppm に相当)を 5～6 週齢 F₀ (投与開始 10 週間後に交配を開始し妊娠、哺育中も投与継続)から混餌投与した LE ラットへの影響(出産日の F₁ 雄について 3D 解析にて試験)が検討されている。その結果として、7 mg/kg/day のばく露群で凝固腺表面積、精囊表面積、前立腺総表面積、前立腺背葉表面積、前立腺腹葉表面積、付属生殖腺総表面積、前立腺背葉尾部における管芽数、発達期前立腺における総管芽数、前立腺間葉充填物(VMP: Ventral Mesenchymal Pad)体積の高値が認められた。なお、前立腺側葉表面積、前立腺背葉頭部における管芽数、前立腺側葉における管芽数、前立腺腹葉における管芽数には影響は認められなかった。

想定される作用メカニズム：その他の作用

- Schlumpf ら(2004)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%)を 20 日齢から 3 日間経口投与した(投与量の記載なし)雌 LE ラットへの影響が検討されている。その結果として、EC₅₀ 値 309mg/kg/day の用量で子宮肥大試験における陽性反応が認められた。

想定される作用メカニズム：エストロゲン作用

(2)甲状腺影響

- Schmutzler ら(2004)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck) 2,500、12,500ppm(大豆無添加餌中濃度)を 14 週齢から 12 週間混餌投与した雌 SD ラット(14 週齢時に卵巣摘出处置)への影響が検討されている。その結果として、2,500ppm 以上のばく露群で血清中サイロキシン濃度の低値、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度の高値、2,500ppm のばく露群で血清中トリヨードサイロニン濃度の高値が認められた。なお、肝臓中 5'-デヨージナーゼ比活性、肝臓中リ

ンゴ酸酵素比活性、腎臓中リンゴ酸酵素比活性、心臓中リンゴ酸酵素比活性には影響は認められなかった。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck) 12,500ppm(大豆添加餌中濃度)を14週齢から12週間混餌投与した雌SDラット(14週齢時に卵巣摘出处置)への影響が検討されている。その結果として、血清中トリヨードサイロニン濃度、血清中サイロキシン濃度の低値、血清中甲状腺刺激ホルモン濃度、肝臓中リンゴ酸酵素比活性の高値が認められた。なお、肝臓中5'-デオジナーゼ比活性、腎臓中リンゴ酸酵素比活性、心臓中リンゴ酸酵素比活性には影響は認められなかった。

想定される作用メカニズム：甲状腺ホルモン様作用、視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用

なお、本試験結果の解釈にあたっては、試験管内試験の結果が提示されているものの、試験濃度範囲の記載がない等、実験条件に関する詳細な記載がない点に注意を要すると判断された。

(3)エストロゲン作用

- Schlumpf ら(2004)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 0.001、0.01、0.1、0.3、0.6、1、3、6、10 μ M(=0.254、2.54、25.4、76.3、153、254、763、1,530、2,540 μ g/L)の濃度に6日間ばく露したヒト乳がん細胞MCF-7による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、EC₅₀値3.99 μ M(=1,015 μ g/L)の濃度で細胞増殖誘導が認められた。

- Schreurs ら(2005)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck) 0.1～10 μ M(=25.4～2,540 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト胎児腎細胞HEK293(ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値6.2 μ M(=1,600 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck) 0.1～10 μ M(=25.4～2,540 μ g/L)の濃度に24時間ばく露したヒト胎児腎細胞HEK293(ヒトエストロゲン受容体 β を発現)によるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値14 μ M(=3,600 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導が認められた。

- Jiménez-Díaz ら(2013)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Sigma-Aldrich) 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=2.54、7.62、25.4、76.2、254、762、2,540 μ g/L)の濃度に144時間ばく露したヒト乳がん細胞MCF-7による細胞増殖試験が検討されている。その結果として、EC₅₀値24.14 μ M(=6,140 μ g/L)の濃度で細胞増殖誘導が認められた。

- Schmitt ら(2008)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Schlumpf Mより譲渡) 0.01、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300 μ M(=2.54、25.4、76.2、254、762、2,540、7,620、25,400、76,200 μ g/L)の濃度に24時間ばく露した酵母(ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた β -ガラクトシダーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、EC₅₀値44.3 μ M(=11,300 μ g/L)の濃度で β -ガラクトシダーゼ発現誘導が認められた。

なお、本試験結果の解釈にあたっては、図の一部にエラーバー表示及び有意差表記の記載がない点、EC₅₀値の妥当性に疑問ある点に注意を要すると判断された。

(4) エストロゲン作用又は抗エストロゲン作用

- Schlumpf ら(2004)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 0.6、1、3、6、10、30、60、100、300、600 μ M(=153、254、763、1,530、2,540、7,300、15,300、25,400、73,000、153,000 μ g/L)の濃度でヒトエストロゲン受容体 β による標識 17 β -エストラジオール(濃度未記載)に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 35.3 μ M(=8,980 μ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 0.6、1、3、6、10、30、60、100、300、600 μ M(=25.4、254、763、1,530、2,540、7,300、15,300、25,400、73,000 μ g/L)の濃度でブタ子宮サイトゾルによる標識 17 β -エストラジオール(濃度未記載)に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 112 μ M(=28,500 μ g/L)の濃度で結合阻害が認められた。

なお、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck、99.7-99.9%) 1、3、6、10、30、60、100、300、600 μ M(=254、763、1,530、2,540、7,300、15,300、25,400、73,000、153,000 μ g/L)の濃度でヒトエストロゲン受容体 α による標識 17 β -エストラジオール(濃度未記載)に対する結合阻害(競合結合)試験が検討されているが、結合阻害は認められなかった。

(5) 抗エストロゲン作用

- Kunz と Fent (2006)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、99%) 0.01～10,000 μ M(=2.54～2,540,000 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露(17 β -エストラジオール 0.17nM 共存下)した酵母(ヒトエストロゲン受容体 α を発現)によるレポーターアッセイ(エストロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた β -ガラクトシダーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 87.3 μ M(=22,200 μ g/L)の濃度で β -ガラクトシダーゼ発現誘導の阻害が認められた。

(6) 抗アンドロゲン作用

- Schreurs ら(2005)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck) 0.1、1、10 μ M(=25.4、254、2,540 μ g/L)の濃度に 24 時間ばく露(ジヒドロテストステロン 0.1nM 共存下)したヒト胎児腎細胞 HEK293 (ヒトアンドロゲン受容体 α を発現)によるレポーターアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 7.1 μ M(=1,800 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。
- Jiménez-Díaz ら(2013)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Sigma-Aldrich) 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μ M(=2.54、7.62、25.4、76.2、254、762、2,540 μ g/L)の濃度に 40 時間ばく露(アンドロゲン受容体アゴニスト R1881 0.2nM 共存下)したヒト前立腺がん細胞 PC3 (ヒトアンドロゲン受容体を発現)によるレポーターアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 9.12 μ M(=2,320 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。
- Kunz と Fent (2006)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、99%) 0.01～10,000 μ M(=2.54～2,540,000 μ g/L)の濃度に 72 時間ばく露(ジヒドロテストステロン 1.3nM 共存下)した酵母(ヒトアンドロゲン受容体を発現)によるレポーターアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いた β -ガラクトシダーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 11.8 μ M(=2,900 μ g/L)の濃度で β -ガラクトシダーゼ発現誘導の阻害が認

められた。

- Nashev ら(2010)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、98%) 20 μ M(=5,080 μ g/L)までの濃度に24時間ばく露(テストステロン 0.2nM 共存下)したヒト胎児腎細胞 HEK293 (ヒトアンドロゲン受容体を発現)によるレポーターアッセイ(アンドロゲン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、20 μ M(=5,080 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、98%) 0.1~20 μ M(=25.4~5,080 μ g/L)の濃度に40分ばく露したヒト胎児腎細胞 HEK-293(試験対象酵素を細胞中で大量発現した非破壊細胞)への影響が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 5.9 μ M(=1,500 μ g/L)の濃度で、ヒト2型17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ比活性(標識17 β -エストラジオール 200nM のテストステロンへの変換)の阻害が認められた。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、98%) 0.1~20 μ M(=25.4~5,080 μ g/L)の濃度に30~60分ばく露したヒト胎児腎細胞 HEK-293(試験対象酵素を細胞中で大量発現した非破壊細胞)への影響が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 10.7 μ M(=2,700 μ g/L)の濃度で、ヒト3型17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ比活性(標識アンドロステンジオン 200nM のテストステロンへの変換)の阻害が認められた。

また、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、98%) 20 μ M(=5,080 μ g/L)までの濃度でヒト胎児腎細胞 HEK-293(試験対象酵素を細胞中で大量発現したサイトゾル)への影響が検討されている。その結果として、20 μ M(=5,080 μ g/L)の濃度で、ヒト1型17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ比活性(標識エストロン 200nM の17 β -エストラジオールへの変換)の阻害が認められた。

なお、4-メチルベンジリデン=カンファー(Merck、98%) 0.1~20 μ M(=25.4~5,080 μ g/L)の濃度に3~5時間ばく露したヒト胎児腎細胞 HEK-293(試験対象酵素を細胞中で大量発現した非破壊細胞)への影響が検討されているが、ヒト5型17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ比活性(標識アンドロステンジオン 200nM のテストステロンへの変換)には阻害は認められなかった。

(7)抗プロゲステロン作用

- Schreurs ら(2005)によって、4-メチルベンジリデン=カンファー(Eusolex 6300、Merck) 0.001、0.01、0.1、1、5、10 μ M(=0.254、2.54、25.4、254、1270、2,540 μ g/L)の濃度に24時間ばく露(プロゲステロンアゴニスト ORG2058 20pM 共存下)したヒト骨肉腫細胞 U2-OS(ヒトプロゲステロン受容体を発現)によるレポーターアッセイ(プロゲステロン応答配列をもつレポーター遺伝子導入細胞を用いたルシフェラーゼ発現誘導)が検討されている。その結果として、IC₅₀ 値 0.9 μ M(=230 μ g/L)の濃度でルシフェラーゼ発現誘導の阻害が認められた。

参考文献

- Sieratowicz A, Kaiser D, Behr M, Oettken M and Oehlmann, J (2011) Acute and chronic toxicity four of four frequently used UV Filter substances for *Desmodemus subspicatus* and *Daphnia magna*. Journal of Environmental Science and Health Part A, 1311-1319.
- Kunz PY, Galicia HF and Fent K (2006) Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of UV filters in fish. Toxicological Sciences, 90 (2), 349-361.
- Durrer S, Maerkel K, Schlumpf M and Lichtensteiger W (2005) Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. Endocrinology, 146 (5), 2130-2139.
- Faass O, Schlumpf M, Reolon S, Henseler M, Maerkel K, Durrer S and Lichtensteiger W (2009) Female sexual behavior, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters. Neurotoxicology, 30 (2), 249-260.
- Hofkamp L, Bradley S, Tresguerres J, Lichtensteiger W, Schlumpf M and Timms B (2008) Region-specific growth effects in the developing rat prostate following fetal exposure to estrogenic ultraviolet filters. Environmental Health Perspectives, 116 (7), 867-872.
- Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R and Lichtensteiger W (2004) Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. Toxicology, 199 (2-3), 109-120.
- Schreurs RH, Sonneveld E, Jansen JH, Seinen W and van der Burg B (2005) Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. Toxicological Sciences, 83 (2), 264-272.
- Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Grüters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W and Köhrle J (2004) Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. Toxicology, 205 (1-2) 95-102.
- Jiménez-Díaz I, Molina-Molina JM, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A, Real M, Sáenz JM, Fernández MF and Olea N (2013) Simultaneous determination of the UV-filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. Assessment of their *in vitro* endocrine activity. Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 936, 80-87.
- Schmitt C, Oetken M, Dittberner O, Wagner M and Oehlmann J (2008) Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987), 152 (2), 322-329.
- Kunz PY and Fent K (2006) Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of *in vivo* and *in vitro* estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. Aquatic Toxicology, 79 (4), 305-324.
- Nashev LG, Schuster D, Laggner C, Sodha S, Langer T, Wolber G and Odermatt A (2010) The UV-filter benzophenone-1 inhibits 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3: Virtual screening as a strategy to identify potential endocrine disrupting chemicals. Biochemical Pharmacology, 79 (8), 1189-1199.
- Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W and Schlumpf M (2003) UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. Toxicological Sciences, 74 (1), 43-50.

Rehfeld A, Dissing S and Skakkebaek NE (2016) Chemical UV Filters Mimic the Effect of Progesterone on Ca(2+) Signaling in Human Sperm Cells. *Endocrinology*, 157 (11), 4297-4308.

Schiffer C, Müller A, Egeberg DL, Alvarez L, Brenker C, Rehfeld A, Frederiksen H, Wäschle B, Kaupp UB, Balbach M, Wachten D, Skakkebaek NE, Almstrup K and Strünker T (2014) Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO reports*, 15, 758-765.

(令和2年度第1回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料1-2より抜粋)