

非実験動物における化学物質代謝能の特徴と種差

水川葉月,^{*,a} 池中良徳,^{a,b} 笥 麻友,^c 中山翔太,^a 石塚真由美^a

Characterization of Species Differences in Xenobiotic Metabolism in Non-experimental Animals

Hazuki Mizukawa,^{*,a} Yoshinori Ikenaka,^{a,b} Mayu Kakehi,^c Shouta Nakayama,^a and Mayumi Ishizuka^a^aGraduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University; Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan;^bWater Research Group, Unit for Environmental Sciences and Management, North-West University; Potchefstroom Campus, North-West University, Private Bag X6001, Potchefstroom, 2520, South Africa; and ^cFaculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University; Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan.

(Received September 2, 2016)

The ability to metabolize xenobiotics in organisms has a wide degree of variation among organisms. This is caused by differences in the pattern of xenobiotic bioaccumulation among organisms, which affects their tolerance. It has been reported in the veterinary field that glucuronidation (UGT) activity in cats, acetylation activity in dogs and sulfation (SULT) activity in pigs are sub-vital in these species, respectively, and require close attention when prescribing the medicine. On the other hand, information about species differences in xenobiotics metabolism remains insufficient, especially in non-experimental animals. In the present study, we tried to elucidate xenobiotic metabolism ability, especially in phase II UGT conjugation of various non-experimental animals, by using newly constructed *in vivo*, *in vitro* and genomic techniques. The results indicated that marine mammals (Steller sea lion, northern fur seal, and Caspian seal) showed UGT activity as low as that in cats, which was significantly lower than in rats and dogs. Furthermore, UGT1A6 pseudogenes were found in the Steller sea lion and Northern fur seal; all Otariidae species are thought to have the UGT1A6 pseudogene as well. Environmental pollutants and drugs conjugated by UGT are increasing dramatically in the modern world, and their dispersal into the environment can be of great consequence to Carnivora species, whose low xenobiotic glucuronidation capacity makes them highly sensitive to these compounds.

Key words—xenobiotic metabolism; non-experimental animal; species difference; conjugation

1. はじめに

化学物質に対する最も基本的な生体防御機構は異物代謝系である。生物の異物代謝機構は大きく分けて3つ存在する。1つ目は、細菌や植物、動物に至るまでのほとんどすべての生物に存在する酸化酵素、シトクロム P450 (CYPs) による異物代謝において主要な第 I 相反応である。2つ目は第 II 相反応と呼ばれる抱合反応であり、第 I 相反応によって生成した官能基にグルクロン酸や硫酸塩、アミノ酸などの水溶性物質と結合させ水溶性を上昇させ、対外

への排泄を促進させる。3つ目は排出トランスポーターによる体外への排泄を言う第 III 相反応である。

各生物が持つ異物代謝系には大きな種差があることが報告されており、これらの動物種差が、各動物の化学物質に対する感受性に強く寄与することが知られている。例えば、第 II 相抱合反応において、ネコではグルクロン酸抱合酵素 (UDP-glucuronosyltransferase; UGT) の中でも異物代謝を担う *UTG1A6* 遺伝子の偽遺伝子化が知られており、¹⁾ そのほかにもイヌにおけるアセチル化抱合能の欠如やブタの低い硫酸抱合能は獣医学領域では既知の事実であり、治療の際の投薬には注意を要する。しかしながら、これら異物代謝系の動物種差に関する知見は、一部の実験動物では明らかなものの、希少野生動物や家畜を含むほとんどの生物種で十分に解明されていない。

UGT は、UGT1 と UGT2 の 2 つのファミリーに大別され、その中にも UGT1A や UGT2B といった

^a北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北 18 条西 9 丁目), ^bNorth-West University (Potchefstroom Campus, North-West University, Private Bag X6001, Potchefstroom, 2520, South Africa), ^c北海道大学獣医学部 (〒060-0818 札幌市北区北 18 条西 9 丁目)

*e-mail: hazuki.mizukawa@vetmed.hokudai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 136 年会シンポジウム S66 で発表した内容を中心に記述したものである。

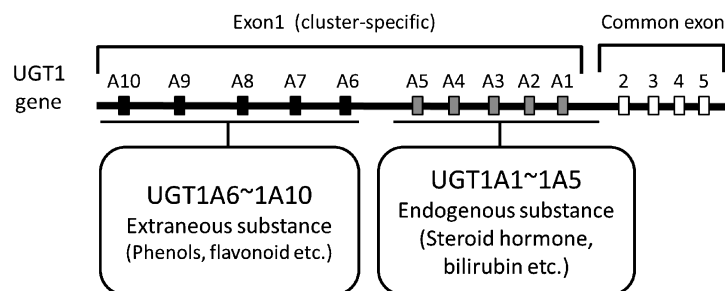


Fig. 1. Schematic Diagram of UGT1A Gene Clusters Sequence

UGT1A6 to UGT1A10 related to xenobiotic metabolize (such as phenol or flavonoid) and UGT1A1 to UGT1A5 are relating to metabolism of endogenous substance.

サブファミリーに分けられる。²⁾ *UGT1A* 遺伝子は、分子種毎に固有な Exon1 が並び、下流に共通の Exon2-5 が存在する (Fig. 1)。そのため、基質特異性は Exon1 配列によって決定され、*UGT1A1-1A5* はステロイドホルモンやビリルビンといった生体内生理物質を代謝する一方、*UGT1A6-10* はフェノールやフラボノイドといった生体外異物を代謝する。³⁾

そこで、本総説では多様な生物種の異物代謝酵素、とりわけ第 II 酵素に注目し、非実験動物の代謝能の特徴を明らかにするとともに、動物種差についてマッピングを実施した。具体的には、1) UGT 活性に及ぼす影響について肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝活性試験と遺伝子情報を用いた解析でマッピング、2) 環境汚染物質であるピレンと希少野生動物の尿を用いた *in vivo* 解析によるアプローチ、3) グルクロン酸抱合能の欠損が認められているネコは実環境中の化学物質汚染に対してどのようなリスクがあるか、について現在までに明らかとなっている研究結果を報告する。

2. 代謝活性及び遺伝子解析によるアプローチ

ネコにおける *UGT1A6* 遺伝子の偽遺伝子化によるグルクロン酸抱合能の低活性は獣医学分野において周知の事実であるが、ネコ以外の生物でもグルクロン酸抱合活性が低い動物はいるのだろうか。

近年、ネコを含む食肉目の *UGT1A6* 遺伝子の系統解析結果が報告された。⁴⁾ 遺伝子情報を用いた系統解析は、各動物が持つ異物代謝系を分類する上で極めて有効な手法である。その結果、ライオンやトラなどのネコ科動物では *UGT1A6* 遺伝子の偽遺伝子化が明らかとなった。それだけでなく、ブラウンハイエナやキタゾウアザラシでも *UGT1A6* 遺伝子

の偽遺伝子化が判明し、ネコ科動物以外でも *UGT1A6* 偽遺伝子化による異物代謝能の弱さが推察された。中でも、アシカやアザラシといった鯨脚類は、海洋生態系の高次栄養段階に位置することから、生物濃縮を介して生体内に環境汚染物質を高濃度で蓄積しており、その毒性が懸念されている。⁵⁾ しかしながら、鯨脚類における UGT の遺伝子情報や酵素活性に関する研究はごくわずかであり、異物代謝能に関する情報はほとんどない。

そこで、われわれは鯨脚類 3 種及びイヌ、ネコ、ラットの肝ミクロソームを用いて酵素活性試験及び遺伝子配列の解析を実施した。その結果、内因性物質である β -エストラジオールを基質としたときの UGT 活性効率 (V_{max}/K_m) はイヌで最大値を示し、鯨脚類のトド、キタオットセイ、カスピカイアザラシ及びネコはイヌと比べ低値を示したが、種による有意な差は認められなかった。⁶⁾ 一方、生体外異物である多環芳香族炭化水素の 1-ヒドロキシピレン及び解熱鎮痛薬のアセトアミノフェンを基質として UGT 活性を測定したところ、*UGT1A6* の偽遺伝子化が認められていないイヌにおいて酵素効率は最大値を示したのに対し、トド、キタオットセイ、カスピカイアザラシ及びネコはイヌの 10 分の 1 程度であり、イヌやラットに比べ有意に低値を示した。⁶⁾ このことから、ネコ及び鯨脚類の *UGT1A6* を介した異物代謝能はイヌやラットと比較して極めて低く、トド、キタオットセイ、カスピカイアザラシにおいても *UGT1A6* 遺伝子の偽遺伝子化が推察された。

また、上記の検証のため、これら鯨脚類 3 種の *UGT1A6* Exon1 の部分クローニングを行ったところ、カスピカイアザラシでは *UGT1A6* の塩基変異

は認められなかった。一方、トドとキタオットセイでは、塩基配列中に2塩基の挿入が確認され、これらの挿入に伴うストップコドンの発生が起こっていることが明らかとなった。⁶⁾ この結果より、トド及びキタオットセイの *UGT1A6* が偽遺伝子化していることが判明し、キタゾウアザラシ以外の鱈脚類でも偽遺伝子化していることを本研究で初めて明らかにした。カスピカイアザラシでは偽遺伝子化は認められないものの、*UGT1A6* 活性はトド、キタオットセイと同様に低値であり、この現象はフェレットにおいても報告されている。⁷⁾ そのため、*UGT1A6* 遺伝子のみならず、遺伝子データベースを網羅的に解析し、ゲノム上の遺伝子の並びを比較するシテニー解析も実施したところ、解析を行ったすべての動物種（ヒト、ラット、イヌ、ネコ、フェレット、セイウチ）において、*UGT1A* 遺伝子は *USP40* と *MROH2A* という2つの遺伝子の間に保存されていることを世界で初めて明らかにした。⁶⁾ また、*USP40* と *MROH2A* の間には *DnaJB3* という遺伝子が存在しており、*DnaJB3* とそれぞれの遺伝子の遺伝子間距離を比較したところ、*MROH2A* と *DnaJB3* との遺伝子間距離は6種で大きな違いは認められなかった。その一方、*DnaJB3* と *USP40* との遺伝子間距離は、イヌでは133 kbであったのに対し、ネコ、セイウチ、フェレットでは38–58 kbとイヌのわずか半分以下の距離しかないことが判明した。また、*UGT1A3–UGT1A5* 及び *UGT1A7–UGT1A10* の領域において、ヒト、ラット、イヌでは遺伝子重複により複数の Exon1 が存在していた

が、ネコ、セイウチ、フェレットでは遺伝子重複がみられなかった。すなわち、ヒトやラット、イヌでは進化的に異物代謝に関与する *UGT* 遺伝子に遺伝子重複が生じその遺伝子数が増加していったことが考えられるのに対し、ネコやフェレットでは遺伝子重複は起こらなかったと推察され、低い異物代謝能の一因と考えられる。

以上より、*in vitro* 代謝活性測定と遺伝子解析、シテニー解析を組み合わせた新規解析手法を用いることにより第II相代謝の種差について新たにマッピングが可能となった。新規解析手法を用いて食肉目であるイヌ、ネコ、トド、キタオットセイ、カスピカイアザラシについて解析したところ、食肉目において *UGT1A* 分子種に大きな種差があることが判明し、*UGT1A6–UGT1A10* の偽遺伝子化及び遺伝子重複の有無が各生物種の代謝能に影響を与えることが示唆された。

3. 環境基質と哺乳動物の尿を用いた *in vivo* 解析によるアプローチ

多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAHs) の一種であるピレンは、工業製品などの燃焼による発生や排ガスにも含まれる環境汚染物質であり、ヒトや魚類、貝類など様々な生物から検出されている。ラットにおいてはその代謝パスウェイが報告されており、CYPsによる水酸化代謝の後、*UGT* によるグルクロン酸抱合、硫酸転移酵素 (sulfotransferase; *SULT*) による硫酸抱合、水酸基がもう1個置換するジオール体が生成される (Fig. 2)。⁸⁾ これらの代謝物をラット尿中から検出し

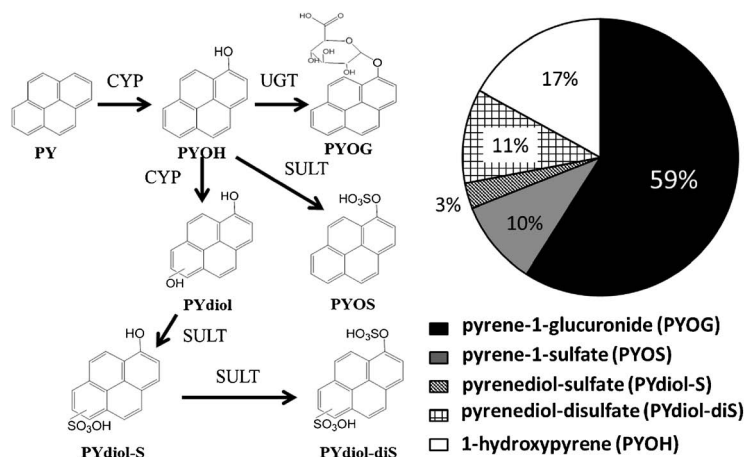


Fig. 2. Metabolic Pathways of Pyrene in Rat (left) and Composition of Pyrene Metabolites in Rat Urine (right)

PYOG: pyrene-1-glucuronide; PYOS: pyrene-1-sulfate; PYOH: 1-hydroxypyrene; PYdiol-diS: pyrenediol-disulfate; PYdiol-S: pyrenediol-sulfate.

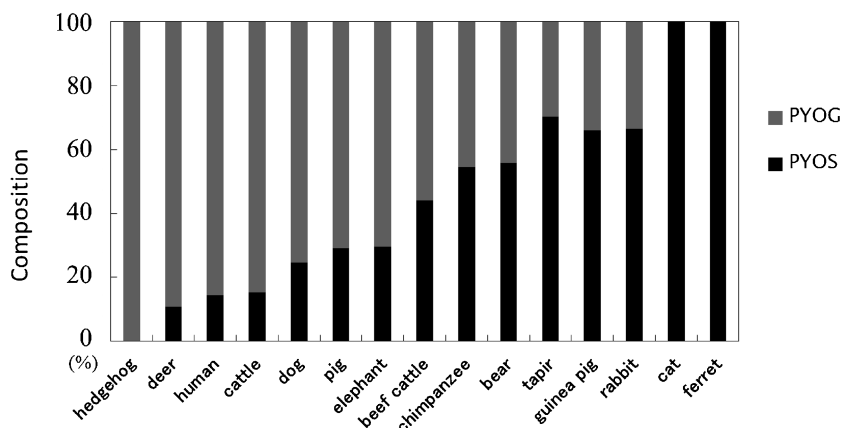


Fig. 3. Composition of PYOG and PYOS as Pyrene Metabolites in Mammalian Urine
PYOG: pyrene-1-glucuronide; PYOS: pyrene-1-sulfate.

たところ、59%がグルクロン酸抱合体であったのに対し、硫酸抱合体はわずか10%程度であった。⁸⁾ また、17%が水酸化体として排出されることも明らかとなった (Fig. 2)。以上の結果より、ラットのピレン代謝においては、グルクロン酸抱合が主要代謝経路であり、硫酸抱合はわずかであることが明らかとなった。それでは、他の生物、特にグルクロン酸抱合能の欠損が知られているネコ科動物や硫酸抱合能が低いとされるブタではどうだろうか。

野生動物、ペット、家畜として飼育されている動物及びヒトを含む全15種 (乳牛、肉牛、シカ、ヒト、バク、クマ、チンパンジー、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ゾウ、ハリネズミ、ブタ、フェレット) の尿を採取し、グルクロン酸抱合体 (pyrene-1-glucuronide; PYOG) 及び硫酸抱合体 (pyrene-1-sulfate; PYOS) の比を算出したところ、ネコとフェレット、ハリネズミを除くすべての種ではPYOGとPYOSのいずれも検出され、その比は種によって大きく異なることが明らかとなった (Fig. 3)。一方、ネコとフェレットではPYOGが検出されず (Fig. 3)、*in vitro* 試験と同様、*in vivo* でも活性が低いことが示された。

上記に記した通り、以上の結果から種による抱合体化能の違いが示唆されたが、その中でもブタについて注目した。獣医学分野において、古くからブタの硫酸抱合能は極めて低いとされてきたため、⁹⁾ PYOSの検出量は皆無若しくはごくわずかであると予想した。しかしながら、本研究においてブタ尿中からPYOSが検出され、その割合は約30%程度であることが分かった (Fig. 3)。そこで、ブタ尿に

におけるPYOS検出の理由を探るため、ブタ及び比較対象としてラットの肝臓を用いて活性試験を実施したところ、驚くべきことに、酵素効率 (V_{max}/K_m) はラットと比べ高値であることが明らかとなった。¹⁰⁾ このことから、ブタでは基質濃度が低濃度である場合、水酸化化合物を硫酸抱合体化できることが示唆された。一方で、ブタの V_{max} はラットと比べ1/10程度と極めて低い値であった。¹⁰⁾ そのため、ブタの低活性の原因を探るためSULT遺伝子 (*SULT1A1*) の発現量と補酵素量に注目した。硫酸抱合反応では、水酸化物の硫酸化に補酵素として3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate; PAPS) が使用され、抱合反応後、PAPSは3'-ホスホアデノシン-5'-リン酸 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphoric acid; PAP) となる。このPAPS濃度と*SULT1A1* 遺伝子発現量をブタ及びラットの肝臓を用いて測定したところ、いずれもブタではラットと比べ有意に低値であることが判明し (Fig. 4)、ブタにおける低い硫酸抱合能は、*SULT1A1* 遺伝子発現量と補酵素量が低いことが原因であると推察される。一方で、ブタのSULT活性は低いものの、基質濃度が低濃度時は硫酸抱合体化できることも示唆された。

以上より、環境汚染物質であるピレンをマーカー物質とし、その代謝能について、家畜及び希少野生動物の尿を用いてマッピングを行うことができた。尿を用いた*in vivo* 解析においても、抱合体化能は種によって大きく異なることが明らかとなり、ネコとフェレットの低いグルクロン酸抱合能が示唆された。一方ブタでは、活性試験と遺伝子発現量解析に

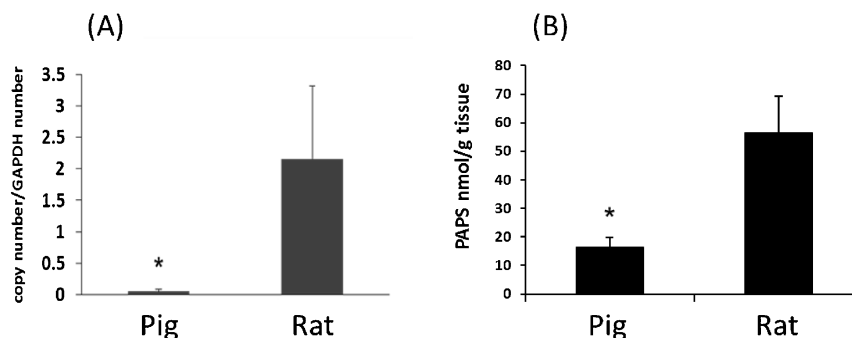


Fig. 4. Expression Value of *SULT1A1* Gene in Liver of Pig and Rat (A) and Concentration of 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate (PAPS) (B)

Student's *t* test, * $p < 0.05$.

よって基質濃度に起因して硫酸抱合体化能が変化することも明らかとなり、*in vivo* 試験と *in vitro* 試験を併せることによって、より詳細なマッピングが可能であると言える。

4. ネコは化学物質のハイリスクアニマルか？

前述の通り、ネコでは *UGT1A6* の偽遺伝子化による低いグルクロン酸抱合能が知られており、化学物質に対する代謝能は他の陸棲哺乳類と比べ低い。獣医療における医薬品投与の際は十分な注意が必要である。これまでに、筆者らは多様な陸棲哺乳類の血中ポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyls; PCBs) 及びその水酸化代謝物 (hydroxylated PCB; OH-PCBs) を分析し、残留レベルや蓄積特性を調査した。¹¹⁾ その結果、親化合物である PCBs の残留組成に生物種間では認められないものの、代謝物である OH-PCBs の異性体組成には大きな種差が認められ、ネコでは低塩素化 (3-5 塩素化) の OH-PCBs が大半を占めたのに対し、他の陸棲哺乳類では高塩素化 (7-8 塩素化) の OH-PCBs が高割合であった。¹¹⁾ とくに、ネコは *UGT1A6* の偽遺伝子化によりフェノール化合物の代謝能が低いと予想されるため、他種とは異なる代謝パターンを示したものと推察される。通常、質量の小さい低塩素化 OH-PCBs は抱合反応や尿、胆汁などによって高塩素化 OH-PCBs よりも比較的体外に排出され易いと考えられる。しかしながら、第 II 相抱合能の低いネコでは、低塩素化 PCBs を代謝できず、生体内に残留していると予想された。このことは、ネコの水酸化代謝物に対する感受性が高いことを示唆しており、生体内動態の解明やリスク評価が今後の課題である。

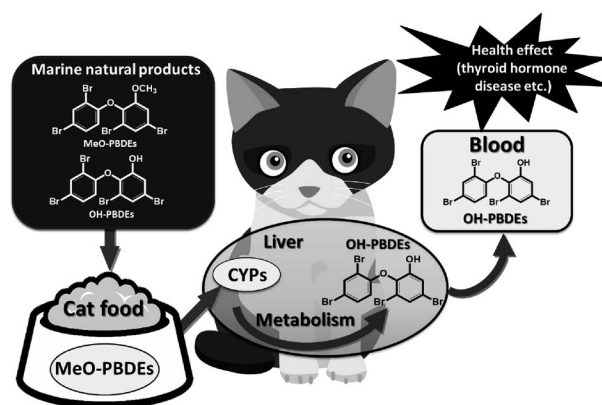


Fig. 5. Scheme of the Behavior of OH-PBDEs and MeO-PBDEs in Cat Bodies

Large amounts of MeO-PBDEs were found in commercial cat food, and it was metabolites to OH-PBDEs in cat liver. However, OH-PBDEs are residue in the cat blood because of low conjugation abilities.

また、ネコはペット動物としてヒトの身近な動物であり、身の回りの様々な化学物質を取り込んでいると考えられる。近年、ペットとして飼育されているネコでは臭素系難燃剤であるポリ臭素化ジフェニルエーテル (polybrominated diphenyl ethers; PBDEs) が高蓄積していることが明らかとなり、増加するネコの甲状腺機能亢進症と PBDEs や水酸化代謝物である水酸化 PBDEs (hydroxylated PBDEs; OH-PBDEs) との関連性が強く疑われている。^{12,13)} PBDEs は身の回りの家電製品や家具に難燃剤として多用されており、その曝露経路はキャットフードなど餌からの取り込みに加え、ハウスダストの体毛付着と毛づくろい (グルーミング) も高濃度曝露の原因と考えられている。

そこで、ペットのネコとイヌの血中 PBDEs 濃度及び OH-PBDEs 濃度を分析し、蓄積パターンと代

謝能力との関連を考察した。その結果、ネコの血中 PBDEs 及び OH-PBDEs 濃度はイヌよりも高値であり、とくに OH-PBDEs はネコ血中で高濃度であったことから餌やグルーミングによるハウスダストからの経口曝露量の差が示唆された。¹³⁾ 近年、OH-PBDEs の曝露経路には PBDEs の曝露とその代謝由来に加え、海藻やシアノバクテリアなどが生成する海洋天然生成物の取り込みが重要視されている。¹⁴⁾ 既報により、同じく海洋天然生成物であるメトキシ PBDEs (methoxylated PBDEs; MeO-PBDEs) を体内に取り込み、脱メチル化の代謝により OH-PBDEs が生成することも報告されている。¹⁵⁾ 曝露源を推定するため餌であるペットフードについても、PBDEs, OH-PBDEs, MeO-PBDEs 濃度を分析したところ、海産物を原材料とするキャットフード中には高濃度の MeO-PBDEs が残留していることが明らかとなった (Fig. 5)。¹³⁾ さらに、ネコの肝細胞を用いた *in vitro* 試験によって MeO-PBDEs は OH-PBDEs へと脱メチル化することも明らかにし、¹³⁾ ネコの血中 OH-PBDEs の起源の一部は、餌から摂取した MeO-PBDEs が代謝によって脱メチル化され血中に残留したものと推察される。OH-PBDEs が神経伝達物質や甲状腺ホルモンに影響を及ぼすことも指摘されており、^{16,17)} ネコは水酸化代謝物によるこの種の毒性がとりわけ懸念される。

ネコでは PCBs 及び PBDEs の水酸化代謝物が高濃度で残留しており、第 II 相抱合反応の弱さから体外に排出できず、健康に対する悪影響が心配される。一方、イヌ血中の OH-PCBs 濃度、OH-PBDEs 濃度は極めて低く、これらは速やかに生体外へと排出されていると予想される。ペット動物であるイヌとネコでも化学物質に対する代謝能は大きく異なり、種特異的なリスク評価が必要であると言える。

5. 総括

これまで、野生動物や家畜における異物代謝能の研究は、試料採取の困難さやその希少性からほとんど明らかになっておらず、不明な点が多かった。環境中の多く存在する化学物質の影響評価はヒトのみならず、野生動物や家畜、ペット動物にまで目を向けることが重要である。様々な生物の異物代謝能とその種差を明らかにすることは、種特異的な正確な毒性・安全性評価を可能にし、化学物質による

汚染リスクを予測・防止する上でも重要であると言える。

謝辞 本研究に供試したアザラシ・トド試料は北海道総合研究機構の和田昭彦氏、北海道水産研究所の服部 薫氏、北海道大学大学院獣医学研究科の坂本健太郎講師の協力の下、提供して頂きました。この場を借りて、深くお礼申し上げます。また、本研究の推進にあたり、日本学術振興会科学研究費助成事業・基盤研究 (A) (50332474)、基盤研究 (B) (26304043)、基盤研究 (B) (15H02825)、挑戦的萌芽研究 (15K12213)、若手研究 (B) (15K1613205) の支援を賜りました。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Court M. H., Greenblatt D. J., *Pharmacogenetics*, **10**, 355–369 (2000).
- 2) Jancova P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E., *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, **154**, 103–116 (2010).
- 3) Li C., Wu Q., *BMC Evol. Biol.*, **7**, 69 (2007).
- 4) Shrestha B., Reed J. M., Starks P. T., Kaufman G. E., Goldstone J. V., Roelke M. E., O'Brien S. J., Koepfli K. P., Frank L. G., Court M. H., *PLoS One*, **6**, e18046 (2011).
- 5) Letcher R. J., Bustnes J. O., Dietz R., Jenssen B. M., Jørgensen E. H., Sonne C., Verreault J., Vijayan M. M., Gabrielsen G. W., *Sci. Total Environ.*, **408**, 2995–3043 (2010).
- 6) Kakehi M., Ikenaka Y., Nakayama S. M., Kawai Y. K., Watanabe K. P., Mizukawa H., Nomiyama K., Tanabe S., Ishizuka M., *Toxicol. Sci.*, **147**, 360–369 (2015).
- 7) Court M. H., *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **24**, 415–422 (2001).
- 8) Saengtienchai A., Ikenaka Y., Darwish W. S., Nakayama S. M., Mizukawa H., Ishizuka M., *J. Vet. Med. Sci.*, **77**, 1261–1267 (2015).
- 9) deBethizy J. D., Hayes J. R., “Principles and Methods of Toxicology, Metabolism: A determinant of toxicology,” ed. by Hayes A. W., 2nd ed., Raven, New York, 1989, pp. 29–66.
- 10) Saengtienchai A., Ikenaka Y., Nakayama S. M., Mizukawa H., Kakehi M., Bortey-Sam

- N., Darwish W. S., Tsubota T., Terasaki M., Poapolathep A., Ishizuka M., *Environ. Toxicol. Chem.*, **33**, 2062–2069 (2014).
- 11) Mizukawa H., Nomiyama K., Nakatsu S., Yachimori S., Hayashi T., Tashiro Y., Nagano Y., Tanabe S., *Environ. Pollut.*, **174**, 28–37 (2013).
- 12) Dye J. A., Venier M., Zhu L., Ward C. R., Hites R. A., Birnbaum L. S., *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 6350–6356 (2007).
- 13) Mizukawa H., Nomiyama K., Nakatsu S., Iwata H., Yoo J., Kubota A., Yamamoto M., Ishizuka M., Ikenaka Y., Nakayama S. M., Kunisue T., Tanabe S., *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 444–452 (2016).
- 14) Malmvärn A., Marsh G., Kautsky L., Athanasiadou M., Bergman A., Asplund L., *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 2990–2997 (2005).
- 15) Wan Y., Wiseman S., Chang H., Zhang X., Jones P. D., Hecker M., Kannan K., Tanabe S., Hu J., Lam M. H., Giesy J. P., *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 7536–7542 (2009).
- 16) Dingemans M. M., de Groot A., van Kleef R. G., Bergman A., van den Berg M., Vijverberg H. P., Westerink R. H., *Environ. Health. Perspect.*, **116**, 637–643 (2008).
- 17) Kojima H., Takeuchi S., Uramaru N., Sugi-hara K., Yoshida T., Kitamura S., *Environ. Health. Perspect.*, **117**, 1210–1218 (2009).