

参考資料 2-3

資料 2-1

平成 26 年度第1段階試験管内試験(レポータージーン試験)の
実施結果について(要約)

1. 試験対象物質及び試験項目

平成 26 年度は、表 1 に示す試験対象物質及び試験項目(作用)を対象として、第 1 段階試験管内試験(レポータージーン試験)を実施した。

表 1 試験対象物質及び試験項目

試験対象物質	試験対象とした作用モード				
	エストロゲン	抗エストロゲン	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	脱皮ホルモン
フルタミド			○	○	○
二硫化炭素			○	○	
フェンバレレート	○	○	○	○	
過塩素酸			○	○	
りん酸トリクレジル		○			
試験数	1	2	4	4	1

2. 方法及び材料

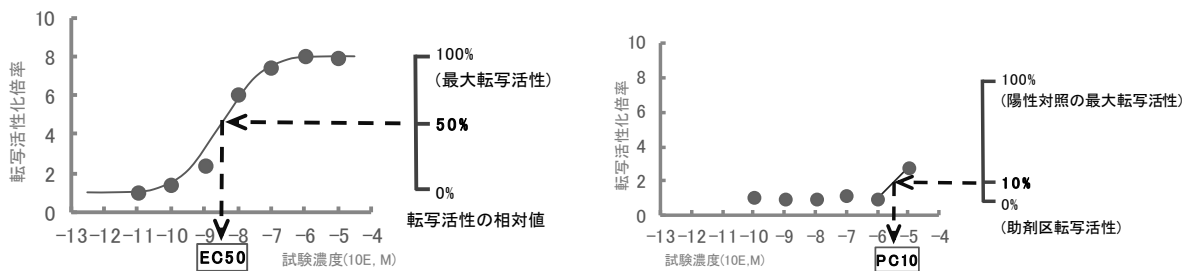
すべての試験項目のレポータージーン試験は、一過性発現細胞系による受容体遺伝子及びレポーター遺伝子等の細胞導入効率の変動を標準化できるデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を用いて実施した。各試験には、以下のホルモン受容体(生物種及びサブタイプ)を用いた。

- ・エストロゲン及び抗エストロゲン作用:メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- ・甲状腺ホルモン及び抗甲状腺ホルモン作用:ニツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)
- ・脱皮ホルモン作用:オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR)

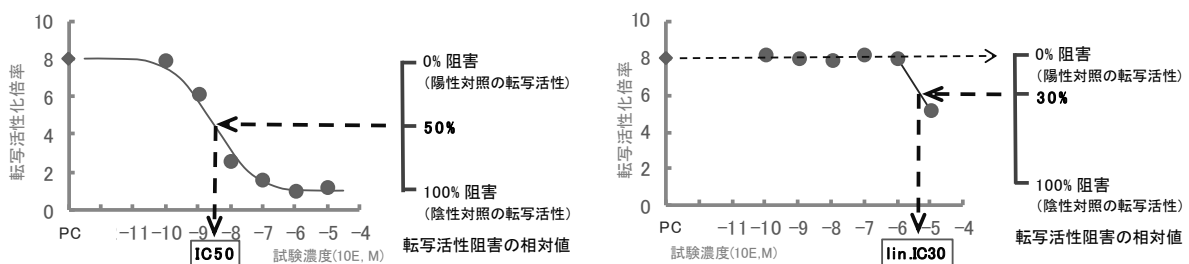
試験は、純度 95%以上の試薬を用いて行った。抗エストロゲン作用及び抗甲状腺ホルモン作用のレポータージーン試験では、試験対象物質の阻害作用を確認するための共添加物質として、17βエストラジオール又はトリヨードサイロニンそれぞれ試験系に $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 又は $1 \times 10^{-8} \text{M}$ で添加した。また、試験が適切に実施されたことの確認及び試験対象物質の転写活性化能又は転写活性化阻害の相対的な強さ(相対活性比)を推定するために、試験対象物質での試験と並行して、陽性対照物質(エストロゲン作用:17βエストラジオール、抗エストロゲン作用:4-ヒドロキシタモキシフェン、甲状腺ホルモン作用:トリヨードサイロニン、脱皮ホルモン作用:20-ヒドロキシエクジソン)による試験を実施した。

各試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり 3 連以上で行った。アゴニスト検出系の試験では、ベクターを一過的に導入した培養細胞を被験物質でばく露した後、ホタルルシフェラーゼの発光強度でホルモン応答による転写活性、ウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で内部コントロールの転写活性を測定し、それらの比(発行強度比)を求めた。各試験濃度における転写活性化倍率(助剤対照の発光強度比に対する試験濃度での発光強度比の割合)から、以下により、アゴニスト系試験では転写活性の有無及び EC_{50} 値(又は PC_{10} 値)、アンタゴニスト系試験では転写活性阻害の有無及び IC_{50} 値(又は $linIC_{30}$ 値)を求めた。また、 EC_{50} 値又は IC_{50} 値等が得られた場合には、それらを基に陽性対照物質の活性に対する比率(相対活性比)を算出した。

アゴニスト系試験での EC_{50} 値及び PC_{10} 値の算出



アンタゴニスト系試験での IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値の算出



3. 結果

試験管内試験の結果を表 2 に示した。

(1) メダカエストロゲン受容体 α (ER α) レポーター遺伝子試験

エストロゲン作用試験の結果、試験対象としたフェンバレレートに関して、試験濃度範囲において転写活性化倍率に有意な増加がみられ、メダカ ER α に対して転写活性化(エストロゲン作用)を有することが示唆された。フェンバレレートに関して EC₅₀ 値は得られず、PC₁₀ 値は 2.4×10^{-6} M、17 β エストラジオールに対する相対活性比は 0.0000049 であった。

抗エストロゲン作用試験の結果、試験対象としたフェンバレレート及びりん酸トリクレジルの 2 物質に関して、試験濃度範囲において、試験系に共添加した 17 β エストラジオールによるメダカ ER α の転写活性に対する有意な阻害作用(抗エストロゲン作用)は認められなかった。したがって、これらの物質に関して IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値は得られなかった。

(2) ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β) レポーター遺伝子試験

甲状腺ホルモン作用試験の結果、試験対象としたフルタミド、二硫化炭素、フェンバレレート及び過塩素酸(ナトリウム塩)の 4 物質に関して、試験濃度範囲において、ニシツメガエル TR β の転写活性化(甲状腺ホルモン作用)は認められず、これらの物質に関して EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値は得られなかった。

抗甲状腺ホルモン作用試験の結果、試験対象としたフルタミド、二硫化炭素、フェンバレレート及び過塩素酸(ナトリウム塩)の 4 物質に関して、試験濃度範囲において、試験系に共添加したトリヨードサイロニンによるニシツメガエル TR β の転写活性に対する有意な阻害作用(抗甲状腺ホルモン作用)は認められず、IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値は得られなかった。

(3) オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR) レポーター遺伝子試験

脱皮ホルモン作用試験の結果、試験対象としたフルタミドに関して、試験濃度範囲において、オオミジンコ EcR の転写活性化(脱皮ホルモン作用)は認められなかった。したがって、フルタミドに関して EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値は得られなかった。

表 2 試験管内試験の結果

(1) エストロゲン作用

試験対象物質	エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
フェンバレレート	PC ₁₀ = 2.4 × 10 ⁻⁶ M	0.00049%
17β エストラジオール	EC ₅₀ = 8.4 × 10 ⁻¹¹ M PC ₁₀ = 1.2 × 10 ⁻¹¹ M	

(2) 抗エストロゲン作用

試験対象物質	抗エストロゲン作用	
	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
フェンバレレート	(得られなかった)	
りん酸トリクレジル	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC ₅₀ = 8.7 × 10 ⁻¹⁰ M	

(3) 甲状腺ホルモン作用

試験対象物質	甲状腺ホルモン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
フルタミド	(得られなかった)	
二硫化炭素	(得られなかった)	
フェンバレレート	(得られなかった)	
過塩素酸	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 6.2 × 10 ⁻¹⁰ M	

(4) 抗甲状腺ホルモン作用

試験対象物質	抗甲状腺ホルモン作用	
	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
フルタミド	(得られなかった)	
二硫化炭素	(得られなかった)	
フェンバレレート	(得られなかった)	
過塩素酸	(得られなかった)	

表 2 (つづき)

(5) 脱皮ホルモン作用

試験対象物質	脱皮ホルモン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
フルタミド	(得られなかった)	
20-ヒドロキシエクジソン	EC ₅₀ = 1.8 × 10 ⁻⁵ M	

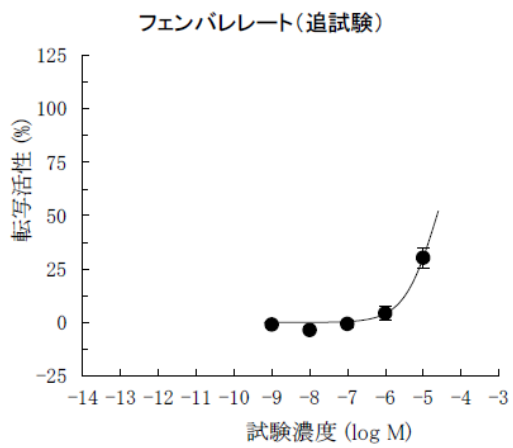
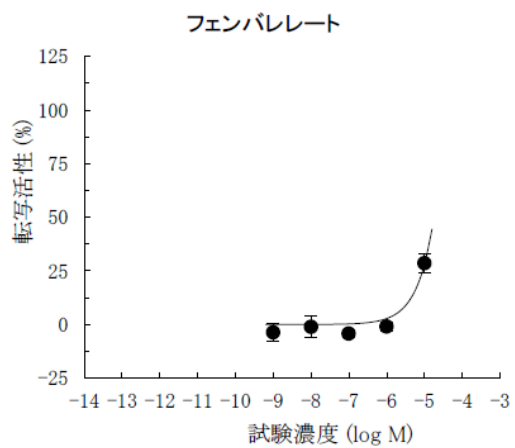
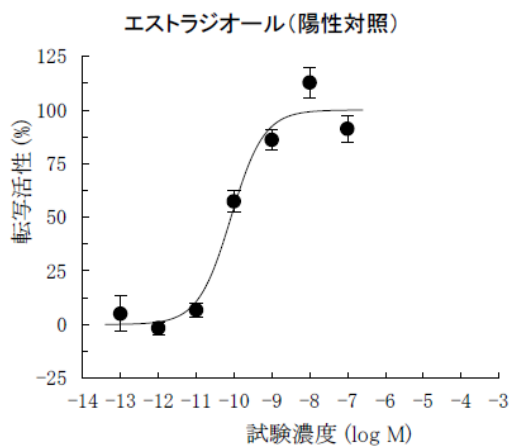


図 5-1-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)結果

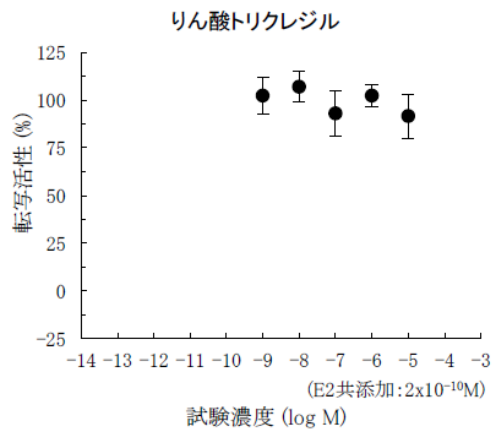
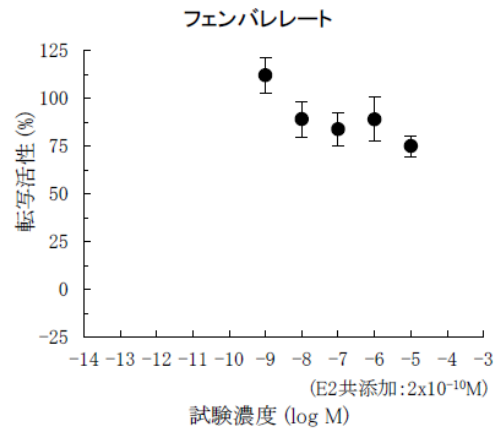
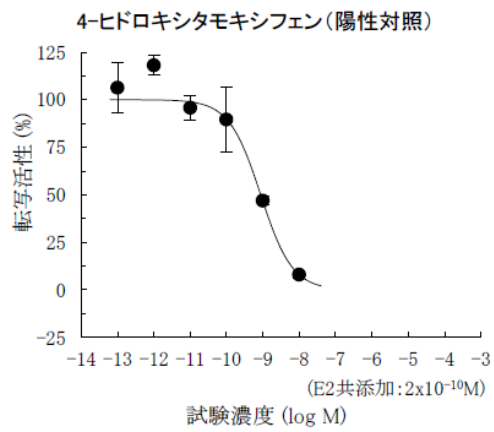


図 5-1-2 メダカ $ER\alpha$ レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

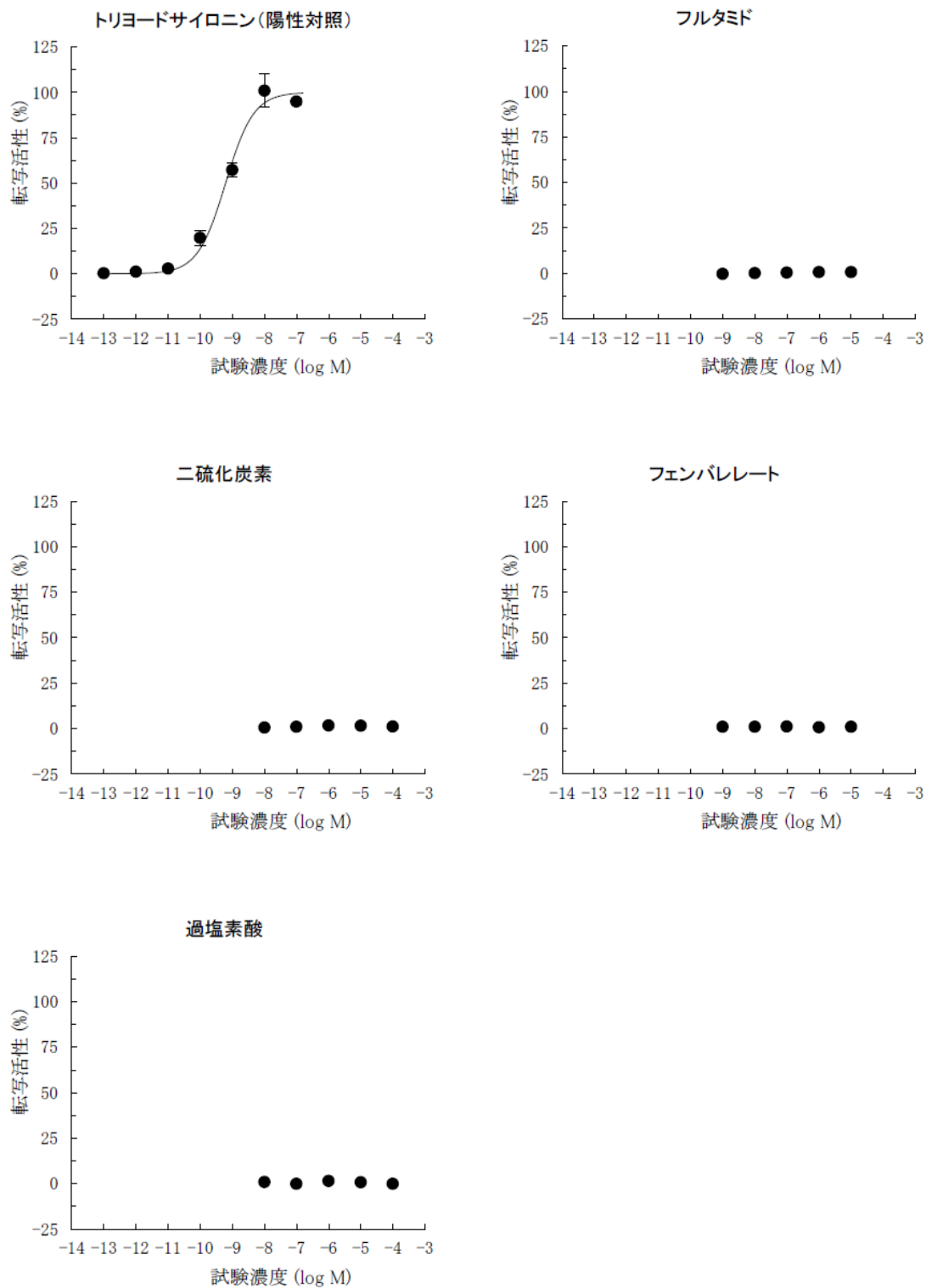


図 5-2-1 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)結果

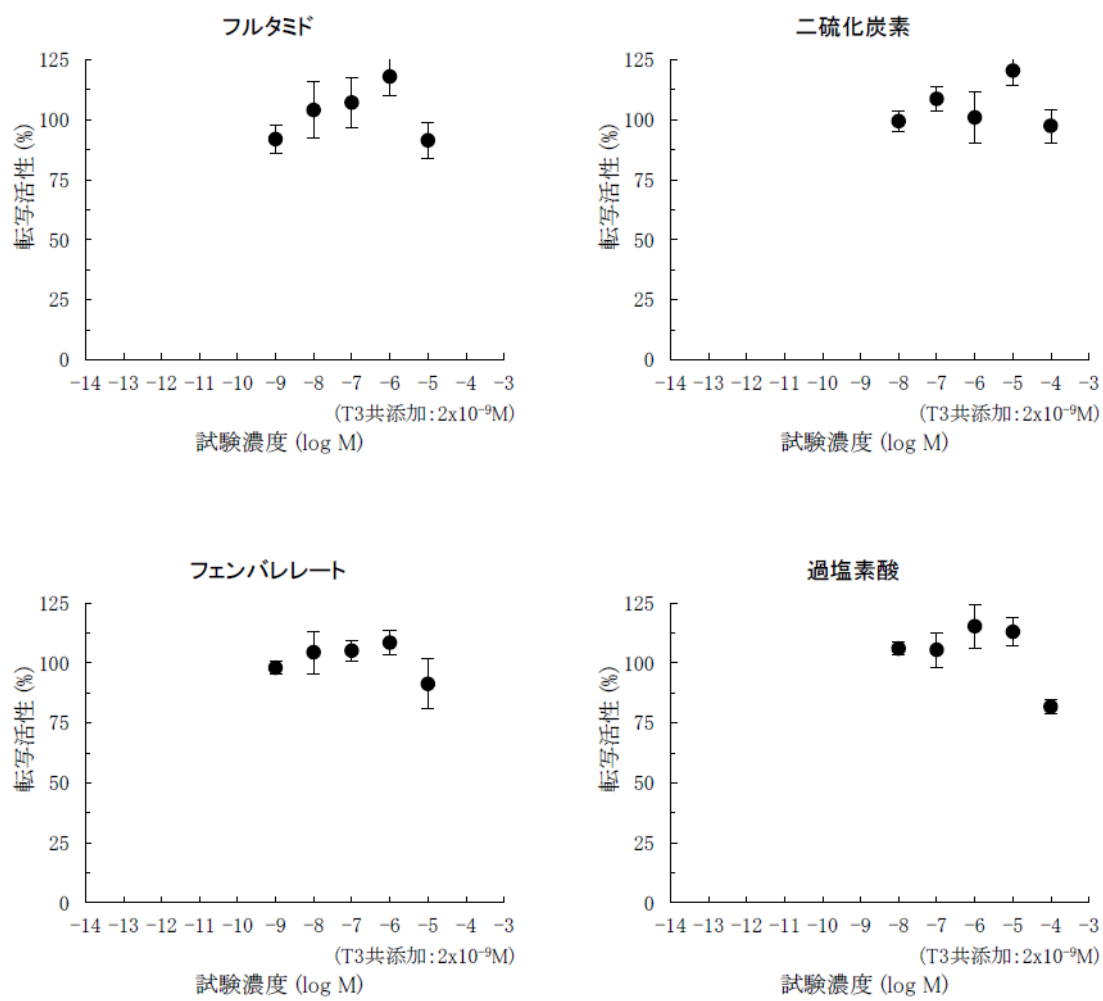


図 5-2-2 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン作用) 結果

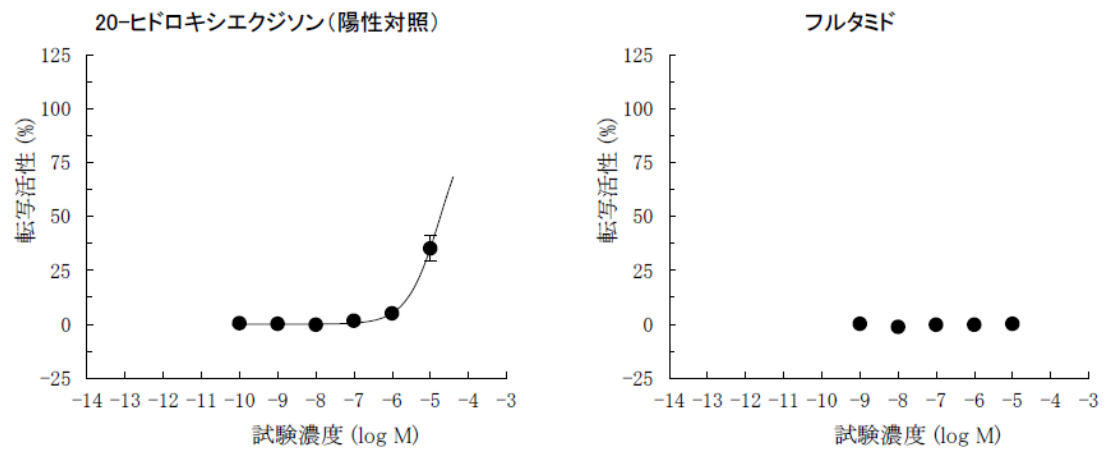


図 5-3-1 オオミジンコ EcR レポーター遺伝子試験 (脱皮ホルモン作用) 結果