

資料 2-1

平成 26 年度第1段階試験管内試験(レポーター遺伝子試験)の
実施結果について(要約)(案)

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(レポーター遺伝子試験)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遺伝子試験は、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。

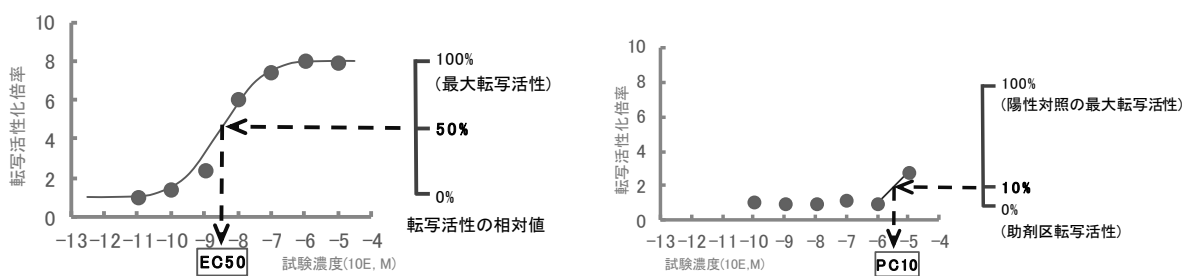
- ・エストロゲン及び抗エストロゲン作用:メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- ・甲状腺ホルモン及び抗甲状腺ホルモン作用:ニツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)
- ・脱皮ホルモン作用:オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR)

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遺伝子試験では、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、17 β 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 2×10^{-9} M 又は 1×10^{-8} 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

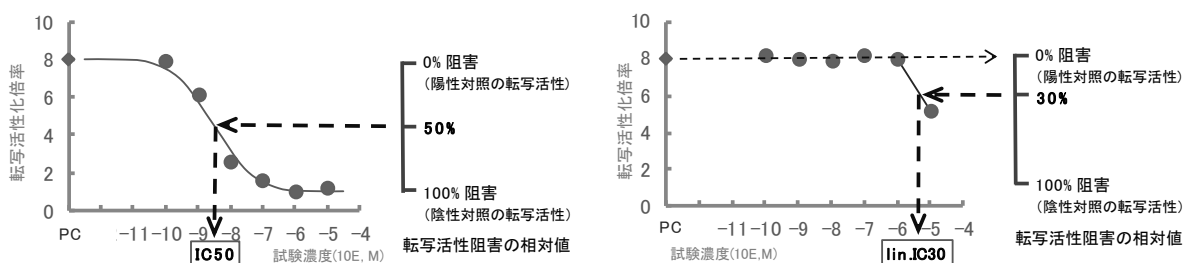
象物質の転写活性化能又は転写活性化阻害の相対的な強さ(相対活性比)を推定するために、試験対象物質での試験と並行して、陽性対照物質(エストロゲン作用:17βエストラジオール、抗エストロゲン作用:4-ヒドロキシタモキシフェン、甲状腺ホルモン作用:トリヨードサイロニン、脱皮ホルモン作用:20-ヒドロキシエクジソン)による試験を実施した。

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 EC₅₀ 値(又は PC₁₀ 値)、アンタゴニスト系試験では転写活性阻害の有無及び IC₅₀ 値(又は linIC₃₀ 値)を求めた。また、EC₅₀ 値又は IC₅₀ 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 EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値の算出



アンタゴニスト系試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 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	

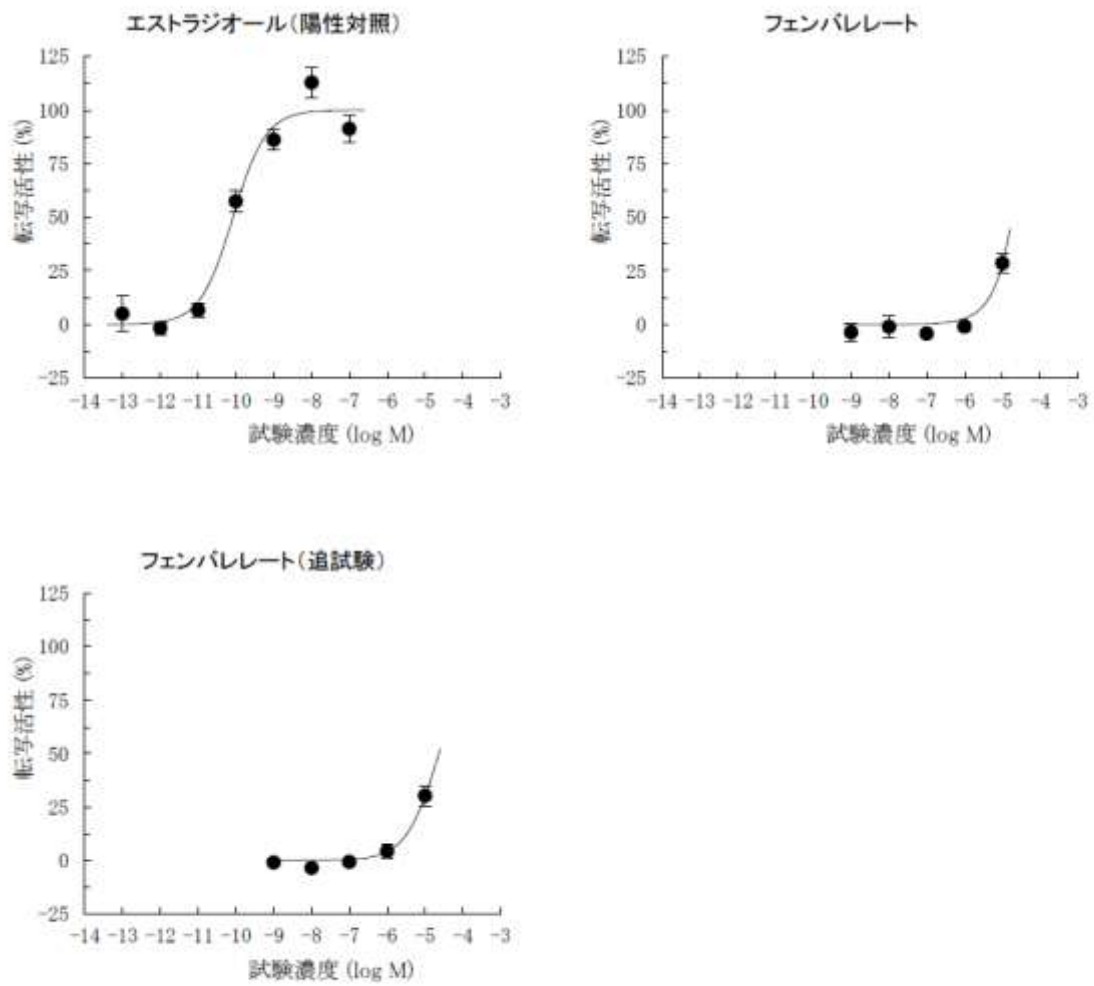


図 5-1-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)結果

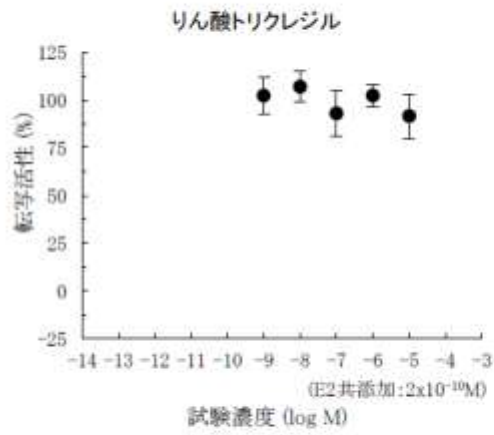
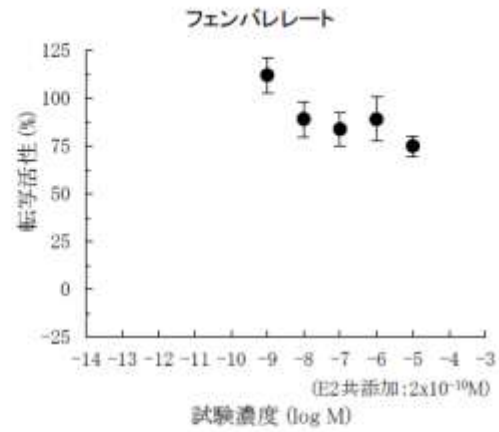
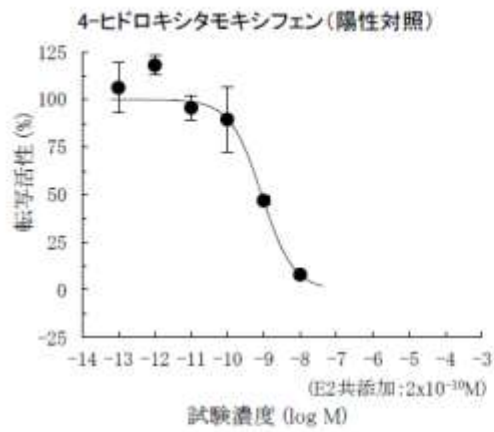


図 5-1-2 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

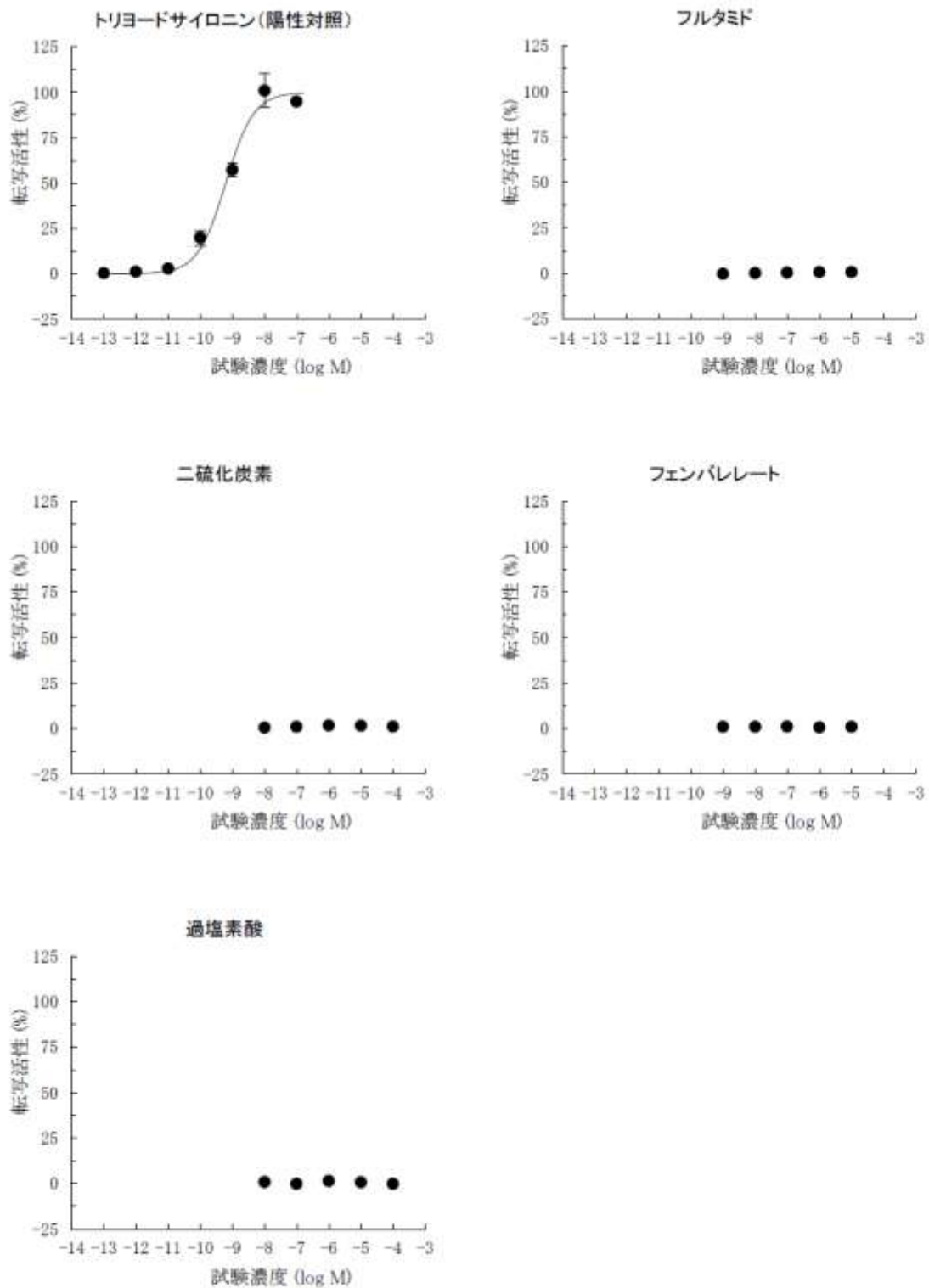


図 5-2-1 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)結果

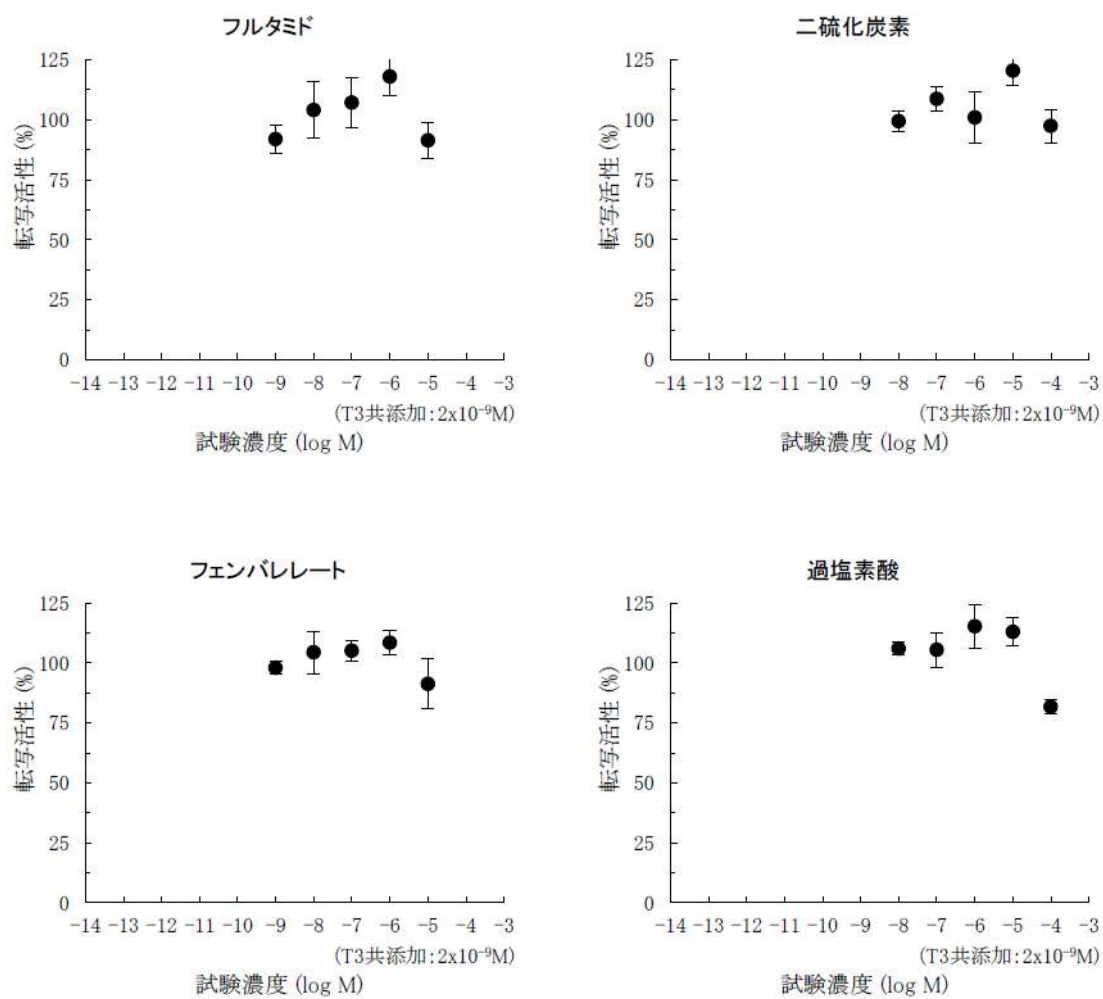


図 5-2-2 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン作用) 結果

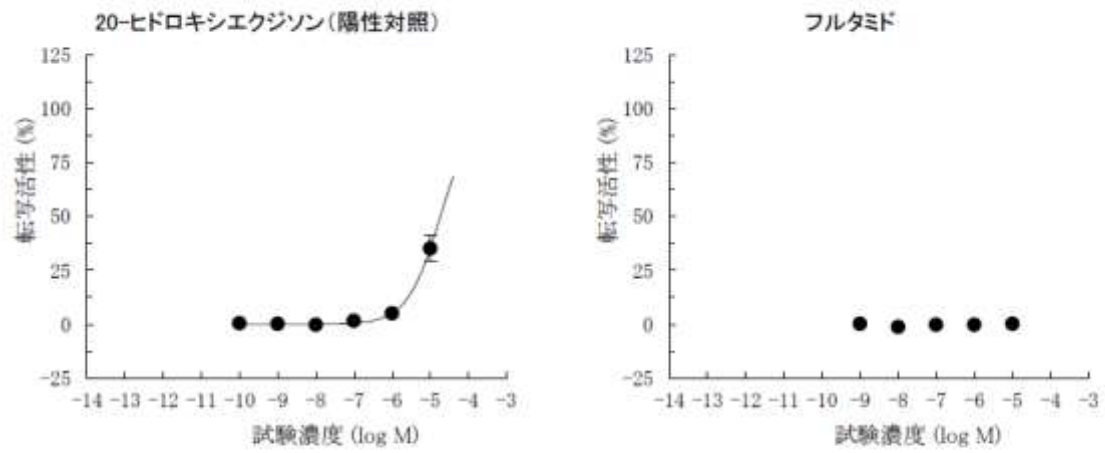


図 5-3-1 オオミジンコ EcR レポーター遺伝子試験 (脱皮ホルモン作用) 結果