

## 資料 3-2

メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  レポーター遺伝子試験（抗アンドロゲン作用）  
の検証について(案)

## 1. 経緯及び実施内容

平成 22 年度から平成 25 年度まで、試験候補物質とされた 26 物質について、抗アンドロゲン作用の確認を目的としたメダカ AR  $\beta$  レポーター遺伝子試験を実施した結果、11 物質に関して、メダカ AR  $\beta$  に対する抗アンドロゲン作用（試験系に添加した 11-ケトテストステロンによるメダカ AR  $\beta$  の転写活性に対する阻害作用）を有することが示唆された（別添 1）。特に平成 23 年度に試験を実施したジクロロブプロモメタン、ダイアジノン、フェニトロチオン及びペルフルオロオクタン酸(PFOA)の4物質については、算出された IC<sub>50</sub> 値が陽性対照物質の 2-ヒドロキシフルタミド(2-OHT)の IC<sub>50</sub> 値の 1/2.7~1/31 と小さく、2-OHT よりもメダカ AR  $\beta$  に対する抗アンドロゲン作用が強いことが示唆される結果であった。しかし一方で、得られた結果が抗アンドロゲン作用とは関係しない作用（偽陽性）による可能性も考えられたことから、別途、下記の検証試験を行い上記4物質の試験結果の妥当性を検討した。なお、メダカ AR  $\beta$  レポーター遺伝子試験では、転写活性に対する有意な阻害作用を示す結果が得られた場合（IC<sub>50</sub> 値又は linIC<sub>30</sub> 値が得られた場合）には、結果の再現性を確認するために別日に追試験（2回目の試験）を実施し、1回目と同様の反応（転写活性に対する阻害）が得られることを確認している（別添 2）。

上記の抗アンドロゲン作用に関するメダカ AR  $\beta$  レポーター遺伝子試験では、試験系に 11-ケトテストステロン(11-KT)を  $1.0 \times 10^{-8}$ M の濃度で添加し、その転写活性化能に対する試験物質の阻害作用を調べるが、検証では、11-KT の添加濃度を  $1.0 \times 10^{-7}$ M あるいは  $1.0 \times 10^{-6}$ M とした条件での試験も行い、それぞれから算出した IC<sub>50</sub> 値と 11-KT 濃度の関係から偽陽性の可能性について検証した。PFOA を対象とした一連の試験では、11-KT の各添加濃度条件において、11-KT の転写活性に有意な低下（阻害）がみられ、それぞれ IC<sub>50</sub> 値が得られた。しかし、PFOA での試験から得られた 11-KT 共添加濃度と IC<sub>50</sub> 値の関係は、2-OHT の試験から得られた 11-KT の共添加濃度に依存して IC<sub>50</sub> 値が高くなるという一般的な競合反応で想定される関係とは異なっていた（図 1）。また、その他の過年度に実施した試験で IC<sub>50</sub> 値が得られた物質（比較的強い抗アンドロゲン作用を有することが示唆された物質）について、同様の検証を行った結果、PFOA と同様に、過年度の試験から得られた結果が偽陽性あるいは抗アンドロゲン作用の強さが過大に評価されていた可能性が示唆された。これら一連の検証では、偽陽性を生じさせた原因を特定できなかったが、試験に供する動物細胞の状態に起因（依存）して生じた可能性が高いと考えられた。

以上を踏まえて、メダカ AR $\beta$ レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用試験)の protocol について、偽陽性を生じさせる可能性がある要因を検討し、それらを踏まえて適正化(修正)を図った。また、適正化した protocol に基づいて、過年度に実施した試験において陽性の結果(転写活性に対する有意な阻害作用を示す結果)が得られている試験対象物質を対象に再試験を行った。

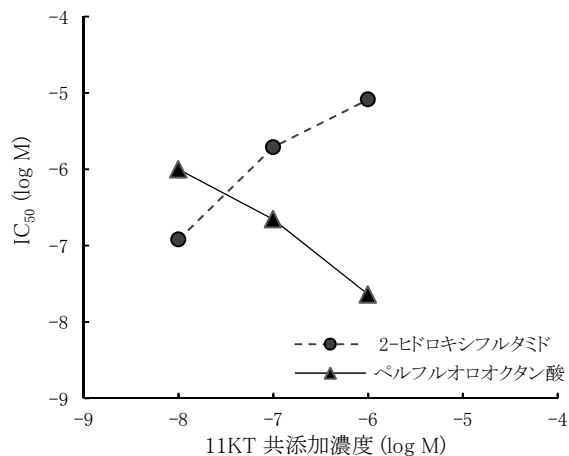


図1 11-KT 共添加濃度と IC<sub>50</sub> 値の関係

## 2. 試験プロトコルの変更

抗アンドロゲン作用の検出を目的とするメダカ AR $\beta$ レポーター遺伝子試験では、動物細胞に導入された遺伝子から発現した受容体(メダカ AR $\beta$ )を介したリガンド(11-KT)の転写活性化能の低下から作用の有無を評価する。そのため受容体を介さない作用であっても転写活性化能の指標とする酵素(ルシフェラーゼ)の生成量やその活性が何らかの影響を受ければ、転写活性の指標として測定する発光強度も低下し、結果的に転写活性阻害と同様の結果を示すことになる。特に、このような作用が試験物質濃度依存的に生じた場合には、試験物質の毒性による生残細胞率の低下などを除いて、真の陽性反応と区別することは難しい。

メダカ AR $\beta$ レポーター遺伝子試験は、HepG2 細胞を用いた一過性発現系であり、市販の試薬(FuGENE HD, プロメガ)を用いてレポーター遺伝子を動物細胞に導入するため、導入効率が低いと遺伝子産物量(ルシフェラーゼ生成量)が少なくなる。試験物質が酵素反応などに対して一定の阻害作用を示すような場合には、試験結果(ルシフェリンの発光強度)に与える影響は相対的に大きくなり、その結果として偽陽性を生じる可能性が考えられる。この点を考慮して、試験条件の再検討を行い、遺伝子導入に用いる試薬の添加量を変更した(培養液あたりの添加量を約 1.7 倍に増加)。

上記の検証は、別途実施しているレポーター遺伝子試験と同じく 96 穴マイクロプレートを用いて行ったが(平成 22 年度~平成 24 年度の試験では 24 穴マイクロプレートを使

用)、一部の試験で明らかなエッジ効果がみられたため、基本的にエッジ部分の穴を使用しない配置で培養(ばく露)を行うこととした。

過年度に実施した試験では、転写活性に対する有意な阻害作用を示す結果が得られた場合には、別日(3日~1週間後)に追試験を実施して再現性の確認を行っていたが、前述のとおり、過年度の試験では2回の試験で同様の反応がみられたため、結果的に偽陽性と推察される反応を見逃していた。本試験と追試験で使用する動物細胞(HepG2)の状態が類似していると、追試験でも偽反応が起こる可能性が考えられることから、追試験を実施する場合は本試験と履歴(入手源)が異なる細胞株を試験に用いることとした。

### 3. 変更した試験プロトコルでの再試験の結果

過年度に実施した試験で陽性の結果が得られている 11 物質について、前項のとおり変更したプロトコルに基づいて再試験を実施した。

再試験では、各試験対象物質について、過年度の試験と同じ細胞株(HepG2 株 A)及び新たに購入した細胞株(HepG2 株 B)を用いて試験を行い、いずれかの試験において試験物質を添加したばく露区における転写活性化倍率が陽性対照区の 70%未満であった場合には、再度、同様の試験を実施した(追試験)。追試験を含めた4回のうち、2回以上の試験で 11-KT の転写活性に 30%を超える阻害が認められた物質については、試験系に共添加した 11-KT によるメダカ AR $\beta$ の転写活性に対する阻害作用が示唆されると判断し、各試験から得られた IC<sub>50</sub> 値又は linIC<sub>30</sub> 値の最小値を試験結果とした。また、IC<sub>50</sub> 値又は linIC<sub>30</sub> 値が算出された物質については、試験対象物質での再試験と並行して試験を実施した 2-OHF(陽性対照物質)の IC<sub>50</sub> 値及び linIC<sub>30</sub> 値の中央値に対する相対活性比を算出した。

再試験の結果を表1に示す(各試験の結果は別添3)。再試験の対象とした 11 物質のうち、カルバリル、ジウロン、フェニトロチオン、ペルフルオロオクタン酸及び 4-*tert*-ペンチルフェノールの5物質については、11-KT によるメダカ AR $\beta$ の転写活性に対する阻害作用が示唆された。カルボフラン、ジクロロブロモメタン、ダイアジノン、アトラジン、デカブロモジフェニルエーテル及びフェノールの5物質については、11-KT によるメダカ AR $\beta$ の転写活性に対する阻害作用は示唆されなかった(ジクロロブロモメタン及びダイアジノンでは、4回行った試験のうち1回で 11-KT の転写活性に 30%を超える阻害がみられた)。

なお、上記と並行して試験を実施した 2-OHF(陽性対照物質)の IC<sub>50</sub> 値は  $1.1 \times 10^{-7}$  ~  $4.2 \times 10^{-7}$  M (n=10) であり、過年度(平成 23 年度~平成 25 年度)に実施した試験で得られた IC<sub>50</sub> 値の範囲内 ( $6.1 \times 10^{-8}$  ~  $4.4 \times 10^{-7}$  M) にあった。また、別途実施した生物試験(*in vivo* 試験)においてメダカの二次性徴(尻びれの乳頭状突起)の発現に有意な影響(低下)を及ぼすことが示唆されているピンクロゾリン及び酢酸シプロテロンを用いて試験を実施した結果、適切な濃度-反応関係がみられたことから、今回の試験プロトコルの変更により、感度の低下や偽陰性を生じる可能性はないと考えられる。

表1 再試験の結果

実施年度	試験物質	試験結果 (抗アンドロゲン作用)	
		IC <sub>50</sub> 又はlinIC <sub>30</sub>	相対活性比
平成22年度	2,4-トルエンジアミン	(得られなかった。)	—
	p-ジクロロベンゼン	(得られなかった。)	—
	N,N-ジメチルホルムアミド	(得られなかった。)	—
	ヒドラジン	(得られなかった。)	—
平成23年度	フェンチオン	(得られなかった。)	—
	カルバリル	linIC <sub>30</sub> = 3.1×10 <sup>-6</sup> M	0.97%
	カルボフラン	(得られなかった。)	—
	ジウロン	linIC <sub>30</sub> = 5.4×10 <sup>-6</sup> M	0.56%
	ジクロルボス	(得られなかった。)	—
	ジクロロプロモメタン	(得られなかった。)	—
	ダイアジノン	(得られなかった。)	—
	フェントロチオン	IC <sub>50</sub> = 5.6×10 <sup>-6</sup> M	2.7%
	ペルフルオロオクタン酸	IC <sub>50</sub> = 7.1×10 <sup>-5</sup> M	0.21%
平成24年度	フェノバルビタール	(得られなかった。)	—
	アクリルアミド	(得られなかった。)	—
	アラクロール	(得られなかった。)	—
	テトラプロモビスフェノールA	(得られなかった。)	—
	モリネート	(得られなかった。)	—
	りん酸トリフェニル	(得られなかった。)	—
	2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール	(得られなかった。)	—
	1-ナフトール	(得られなかった。)	—
	4-tert-ペンチルフェノール	linIC <sub>30</sub> = 1.7×10 <sup>-5</sup> M	0.18%
	メソミル	(得られなかった。)	—
	平成25年度	アトラジン	(得られなかった。)
デカプロモジフェニルエーテル		(得られなかった。)	—
フェノール		(得られなかった。)	—
陽性対照物質	2-ヒドロキシフルタミド	IC <sub>50</sub> = 1.5×10 <sup>-7</sup> M linIC <sub>30</sub> = 3.0×10 <sup>-8</sup> M	
参考	ピンクロゾリン	IC <sub>50</sub> = 3.9×10 <sup>-7</sup> M	3.8%
	酢酸シプロテロン	IC <sub>50</sub> = 1.5×10 <sup>-7</sup> M	7.5%

注)  の物質は過年度の試験で転写活性阻害が認められていないため再試験は実施しなかった。  
相対活性比は2-ヒドロキシフルタミドのIC<sub>50</sub>又はlinIC<sub>30</sub>に対する相対比を示す。

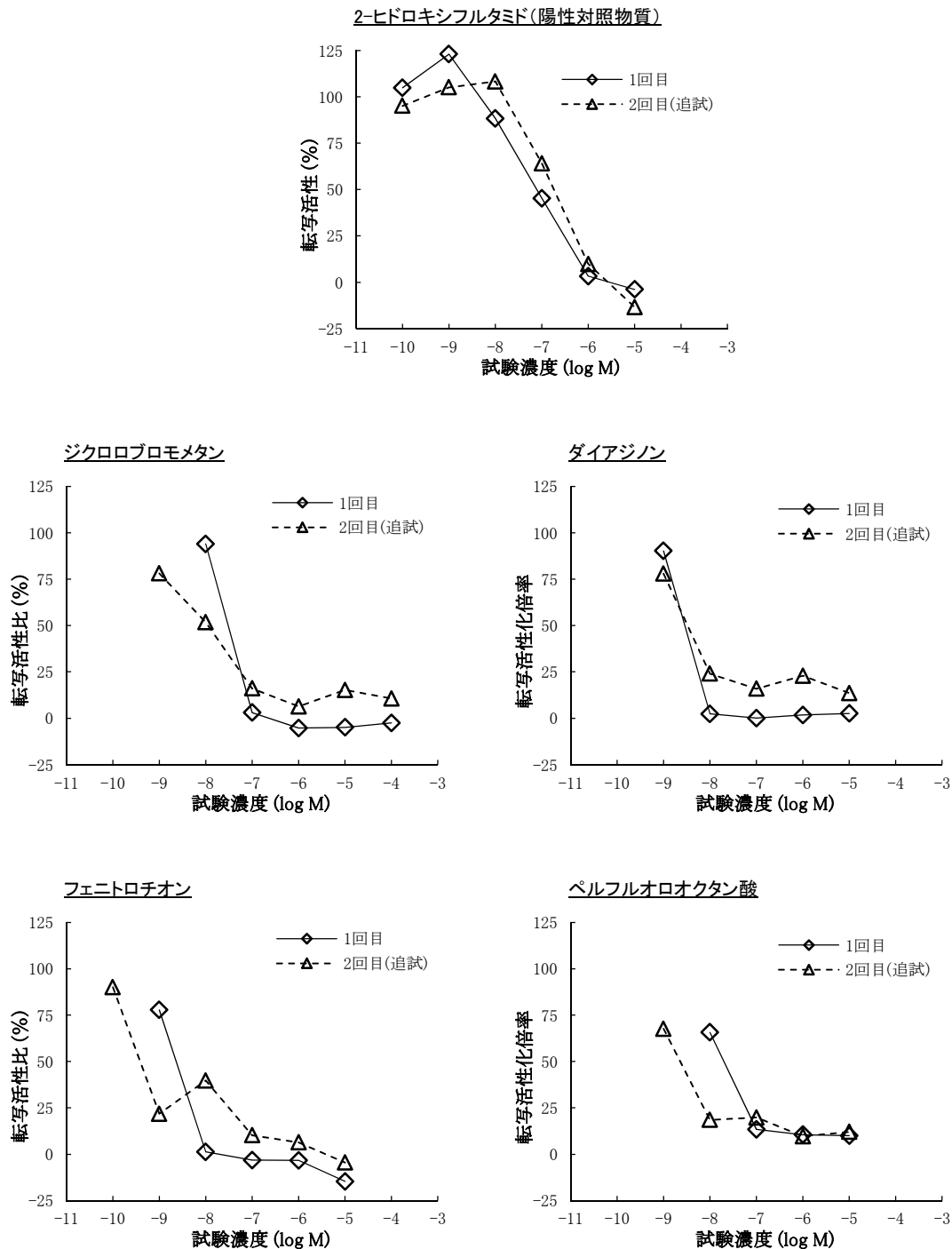
(別添1)

平成22年度～平成25年度のメダカAR $\beta$ レポーター遺伝子試験の結果

実施年度	試験物質	試験結果 (抗アンドロゲン作用)	
		IC <sub>50</sub> 又はlinIC <sub>30</sub>	相対活性比
平成22年度	2,4-トルエンジアミン	(得られなかった。)	—
	p-ジクロロベンゼン	(得られなかった。)	—
	N,N-ジメチルホルムアミド	(得られなかった。)	—
	ヒドラジン	(得られなかった。)	—
平成23年度	フェンチオン	(得られなかった。)	—
	カルバリル	linIC <sub>30</sub> = 2.9×10 <sup>-6</sup> M	0.91%
	カルボフラン	linIC <sub>30</sub> = 3.0×10 <sup>-5</sup> M	0.09%
	ジウロン	linIC <sub>30</sub> = 4.8×10 <sup>-6</sup> M	0.55%
	ジクロルボス	(得られなかった。)	—
	ジクロロプロモメタン	IC <sub>50</sub> = 2.9×10 <sup>-8</sup> M	278%
	ダイアジノン	IC <sub>50</sub> = 2.7×10 <sup>-9</sup> M	2980%
	フェントロチオン	IC <sub>50</sub> = 2.0×10 <sup>-9</sup> M	3980%
	ペルフルオロオクタン酸	IC <sub>50</sub> = 1.9×10 <sup>-8</sup> M	438%
平成24年度	フェノバルビタール	(得られなかった。)	—
	アクリルアミド	(得られなかった。)	—
	アラクロール	(得られなかった。)	—
	テトラプロモビスフェノールA	(得られなかった。)	—
	モリネート	(得られなかった。)	—
	りん酸トリフェニル	(得られなかった。)	—
	2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール	(得られなかった。)	—
	1-ナフトール	(得られなかった。)	—
	4-tert-ペンチルフェノール	IC <sub>50</sub> = 4.1×10 <sup>-6</sup> M	3.1%
	メソミル	(得られなかった。)	—
平成25年度	アトラジン	IC <sub>50</sub> = 2.5×10 <sup>-5</sup> M	0.24%
	デカブロモジフェニルエーテル	IC <sub>50</sub> = 1.8×10 <sup>-7</sup> M	33%
	フェノール	IC <sub>50</sub> = 2.8×10 <sup>-5</sup> M	0.22%

注) 相対活性比は同時に実施した2-ヒドロキシフルタミドのIC<sub>50</sub>又はlinIC<sub>30</sub>に対する相対比を示す。

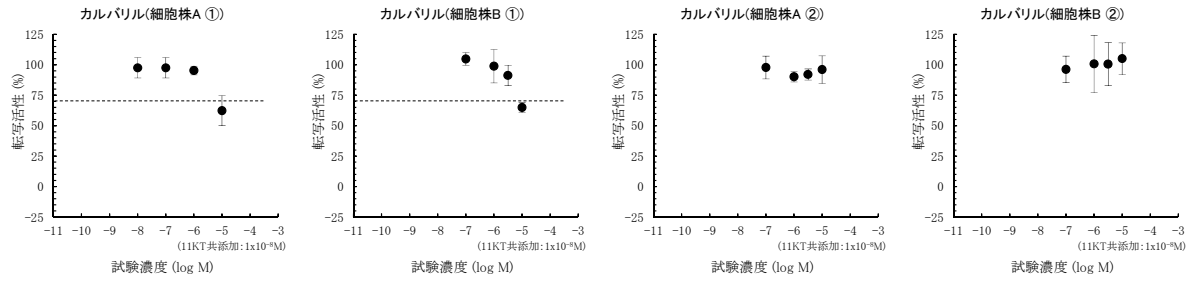
平成 23 年度に実施したメダカ AR  $\beta$ レポーター遺伝子試験の結果



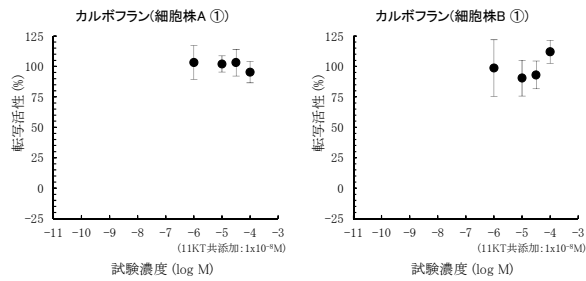
注) 転写活性比は、11-KT(陽性物質)のみを添加した陽性対照区の転写活性化倍率を 100%、陰性対照区(助剤のみ添加)の転写活性化倍率を 0%とした場合の相対値。

修正プロトコルによる再試験の結果

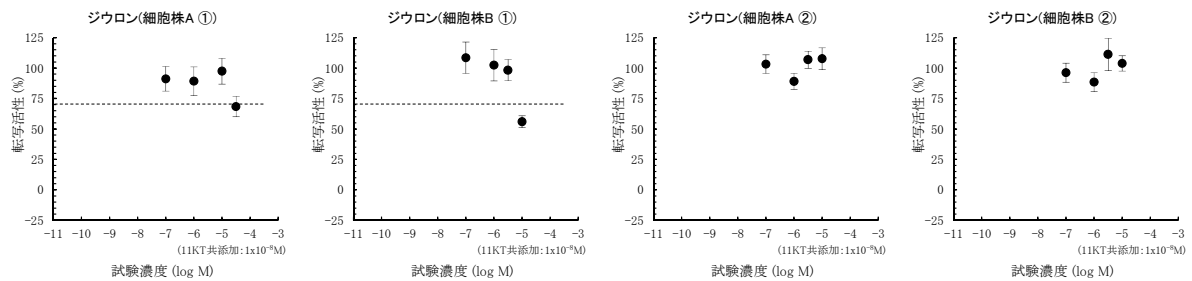
カルバリル



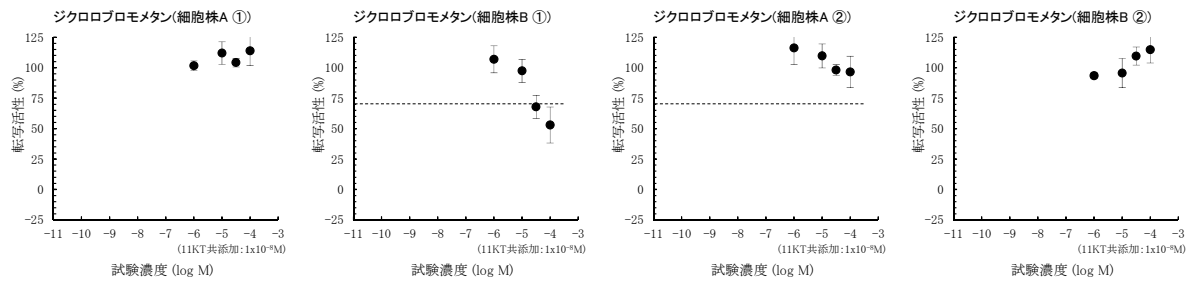
カルボフラン



ジウロン

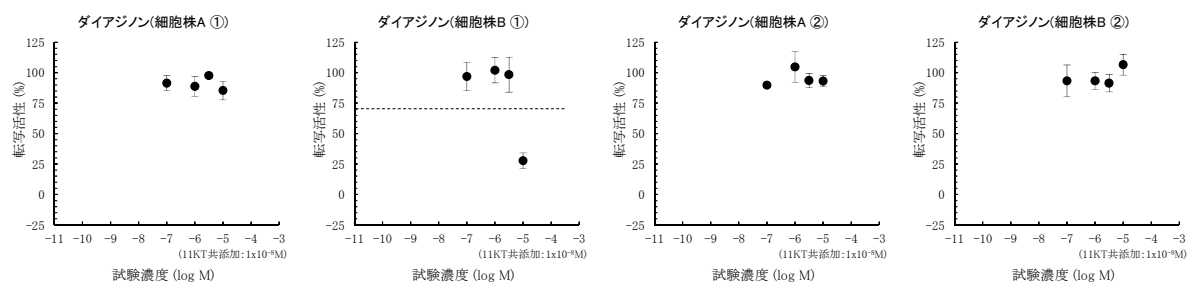


ジクロロプロモメタン

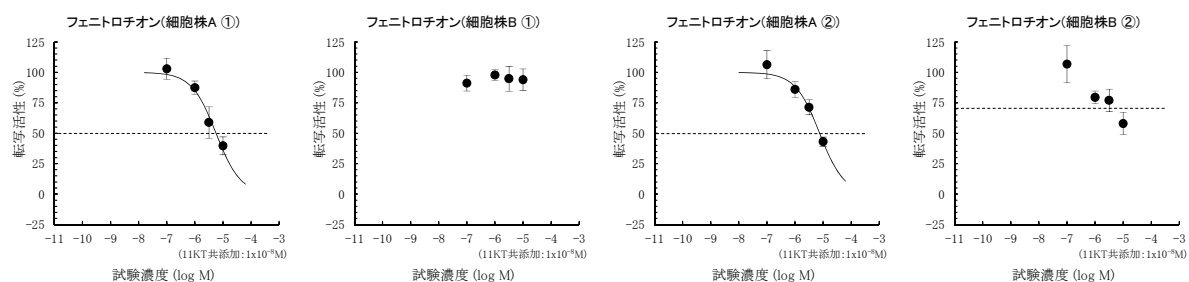


## 修正プロトコルによる再試験の結果(つづき)

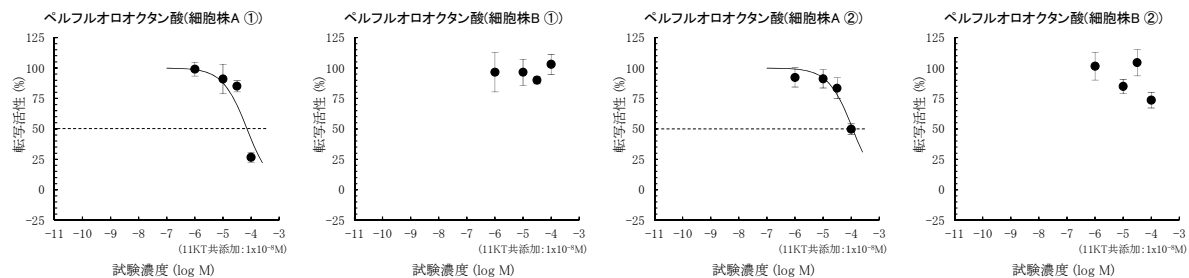
### ダイアジノン



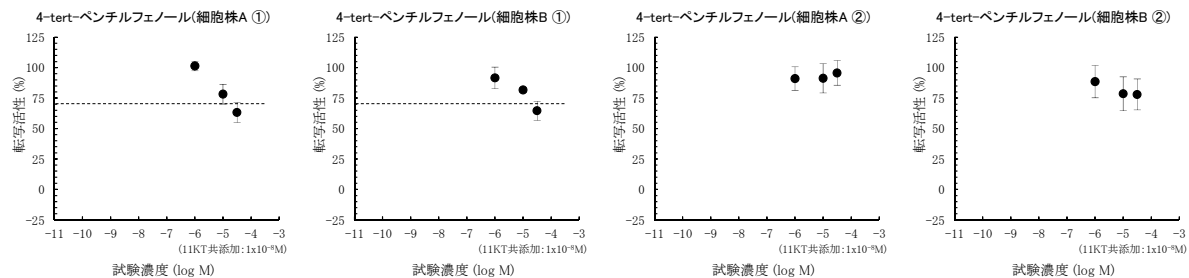
### フェニトロチオン



### ペルフルオロオクタン酸



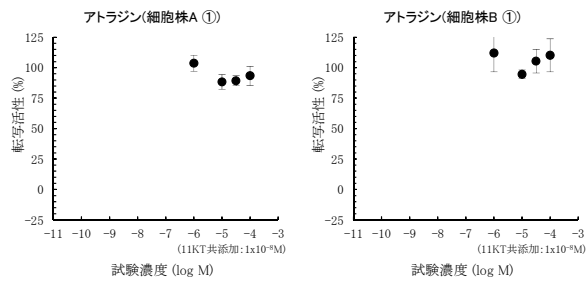
### 4-tert-ペンチルフェノール



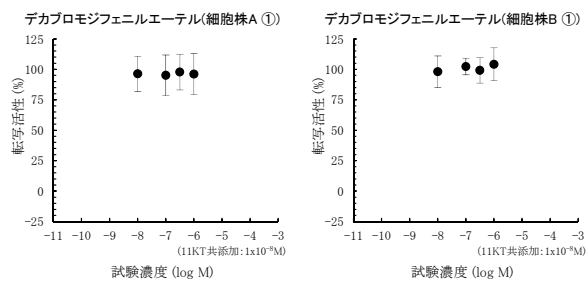


## 修正プロトコルによる再試験の結果(つづき)

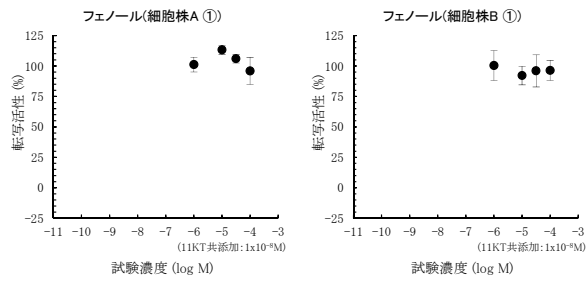
### アトラジン



### デカブロモジフェニルエーテル

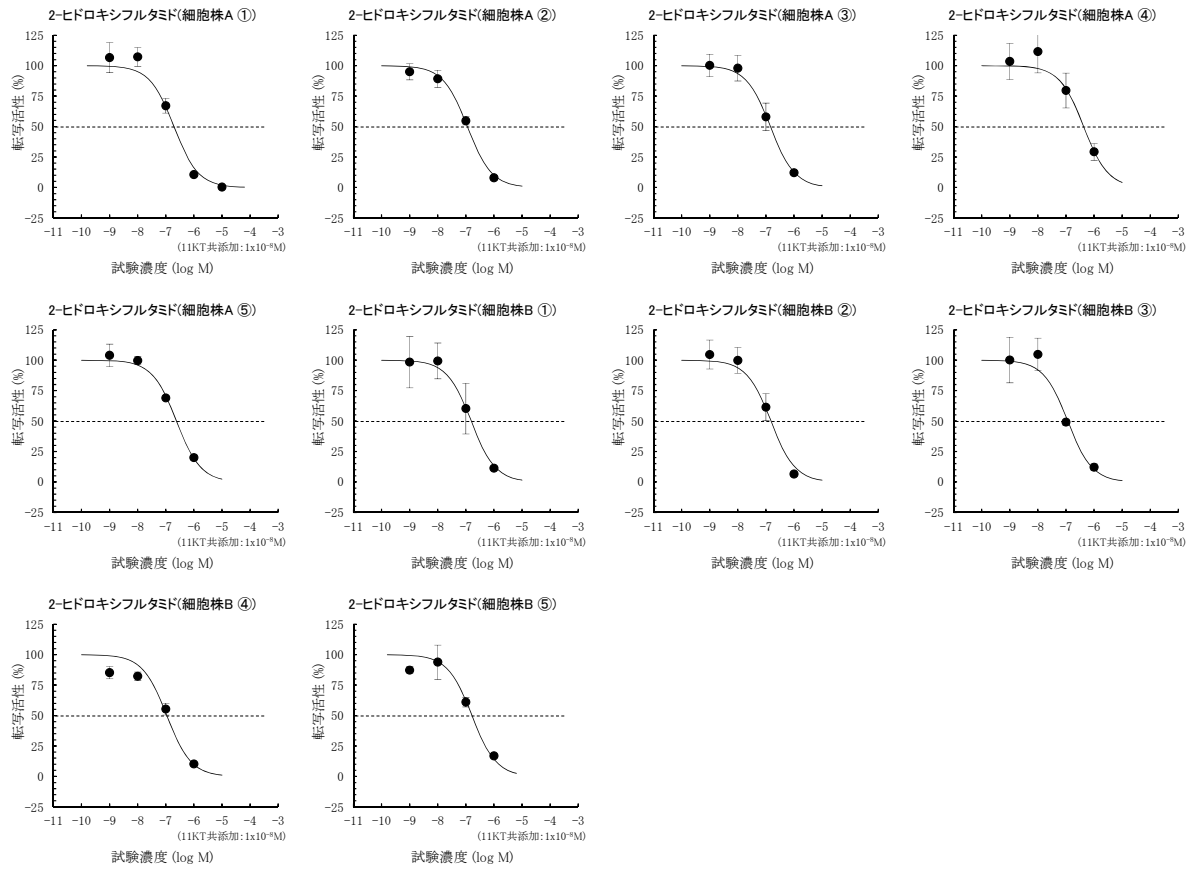


### フェノール

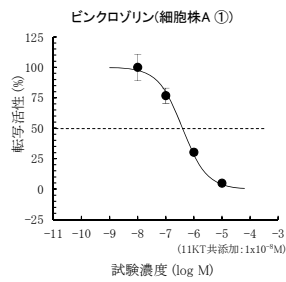


## 修正プロトコルによる再試験の結果(つづき)

### 2-ヒドロキシフルタミド



### ビシクロゾリン



### 酢酸シプロテロン

