

平成 27 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(案)

1. 試験対象物質及び試験項目

平成 27 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	アンドロゲン	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン
トリクロサン	○	○		○	○
フタル酸ジイソブチル	○				
ベノミル	○	○			
カルベンダジム			○	○	○
トリクロロ酢酸	○				
フィプロニル				○	○
4-ノニルフェノール(分岐型)			○	○	○
4-tert-オクチルフェノール					○
ビスフェノールA		○	○		○
試験数	4	3	3	4	6

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。

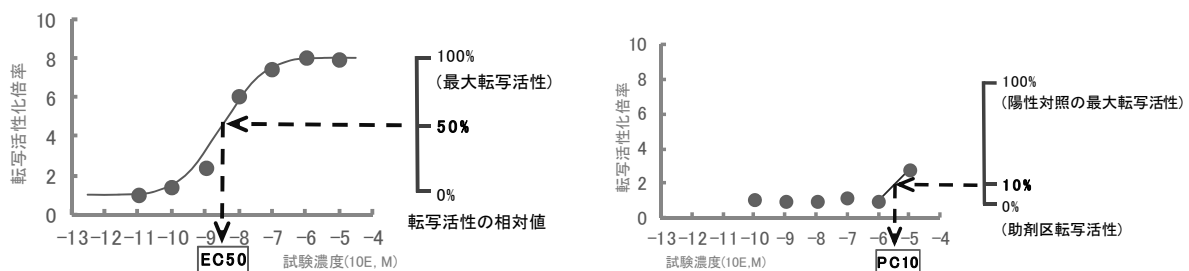
- ・エストロゲン及び抗エストロゲン作用:メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- ・アンドロゲン作用:メダカアンドロゲン受容体 β (AR β)
- ・甲状腺ホルモン及び抗甲状腺ホルモン作用:ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)

試験には、4-ノニルフェノール(分岐型)を除き、純度 97%以上の試薬を用いて行った(4-ノニルフェノール(分岐型)の試薬の純度は 92.7%)。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、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 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 又は $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 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、アンドロゲン作用:11-ケトテストステロン、甲状腺ホルモン作用:トリヨードサイロニン)による試験を実施した。試験濃度は、試薬の動物細胞に対する毒性及び培地への溶解性を考慮して決定した。

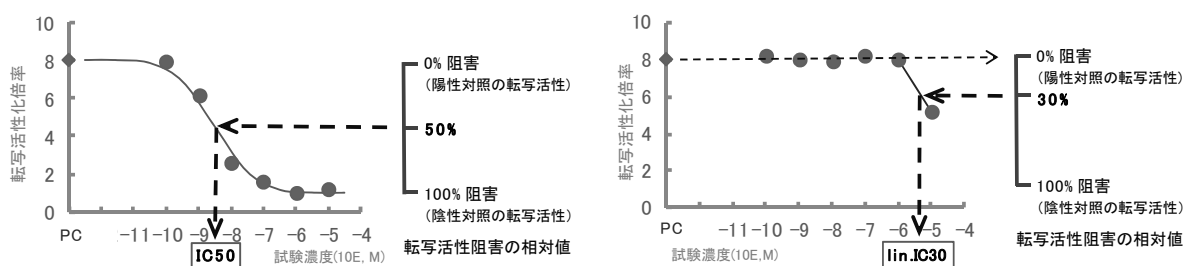
各試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり3連以上で行った。アゴニスト検出系の試験では、ベクターを一過的に導入した培養細胞を被験物質でばく露した後、ホタルルシフェラーゼの発光強度でホルモン応答による転写活性、ウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で内部コントロールの転写活性を測定し、それらの比(発行強度比)を求めた(試験条件等は別添1)。

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



2. 結果

試験管内試験の結果を表2-1～表2-5及び図1-1～図1-5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、試験対象としたトリクロサン及びフタル酸ジイソブチルに関して、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。ただし、トリクロサン及びフタル酸ジイソブチルとも EC₅₀ 値は得られず、PC₁₀ 値は 2.0×10^{-6} M 及び 3.0×10^{-6} M、17 β エストラジオールに対する相対活性比は 0.0017% 及び 0.0011% であった。ベノミル及びトリクロ酢酸の2物質に関して、試験濃度範囲において、メダカ ER α に対する有意な転写活性化は認められず、EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値は得られなかった。

抗エストロゲン作用試験の結果、試験対象としたトリクロサン、ベノミル及びビスフェノールAの3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)は認められず、IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値は得られなかった。

(2) メダカアンドロゲン受容体 β (AR β) レポーター遺伝子試験

アンドロゲン作用試験の結果、試験対象としたカルベンダジム、4-ニルフェノール(分岐型)及びビスフェノール A の3物質に関して、試験濃度範囲において、メダカ AR α に対する有意な転写活性化(アンドロゲン作用)は認められず、EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値は得られなかった。

(3) 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、試験対象としたトリクロサン、カルベンダジム、フィプロニル及び 4-ニルフェノール(分岐型)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 に対する有意な転写活性化(甲状腺ホルモン作用)は認められず、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、試験対象としたトリクロサン、カルベンダジム、フィプロニル、4-ニルフェノール(分岐型)、4-*t*-オクチルフェノール及びビスフェノール A の6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。

表 2-1 試験管内試験の結果（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
トリクロサン	PC ₁₀ = 2.0 × 10 ⁻⁶ M	0.0017%
フタル酸ジイソブチル	PC ₁₀ = 3.0 × 10 ⁻⁶ M	0.0011%
ベノミル	(得られなかった)	
トリクロロ酢酸	(得られなかった)	
17β エストラジオール	EC ₅₀ = 3.8 × 10 ⁻¹⁰ M PC ₁₀ = 3.4 × 10 ⁻¹¹ M	

表 2-2 試験管内試験の結果（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
トリクロサン	(得られなかった)	
ベノミル	(得られなかった)	
ビスフェノールA	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC ₅₀ = 4.9 × 10 ⁻¹⁰ M	

表 2-3 試験管内試験の結果（アンドロゲン作用）

試験対象物質	アンドロゲン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
カルベンダジム	(得られなかった)	
4-ノニルフェノール(分岐型)	(得られなかった)	
ビスフェノールA	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 9.3 × 10 ⁻⁹ M	

表 2-4 試験管内試験の結果（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
トリクロサン	(得られなかった)	
カルベンダジム	(得られなかった)	
フィプロニル	(得られなかった)	
4-ノニルフェノール(分岐型)	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 9.4 × 10 ⁻¹⁰ M	

表 2-5 試験管内試験の結果（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
トリクロサン	(得られなかった)	
カルベンダジム	(得られなかった)	
フィプロニル	(得られなかった)	
4-ノニルフェノール(分岐型)	(得られなかった)	
4- <i>t</i> -オクチルフェノール	(得られなかった)	
ビスフェノールA	(得られなかった)	

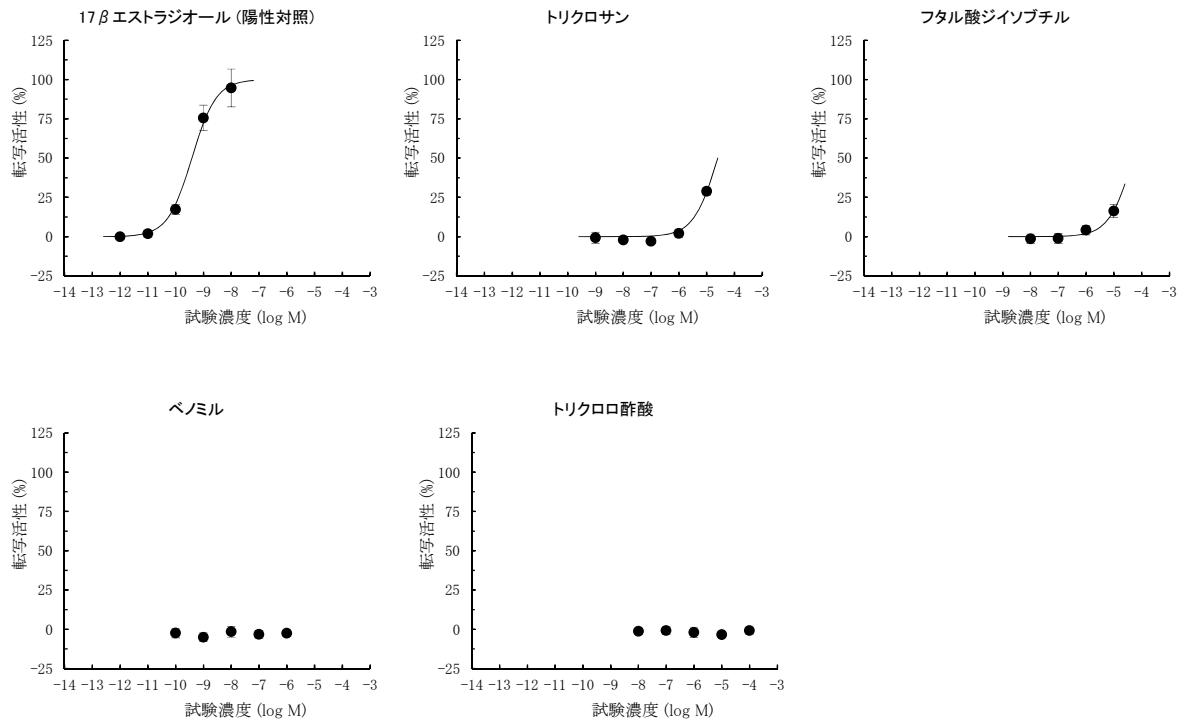


図 1-1 試験管内試験の結果（エストロゲン作用）

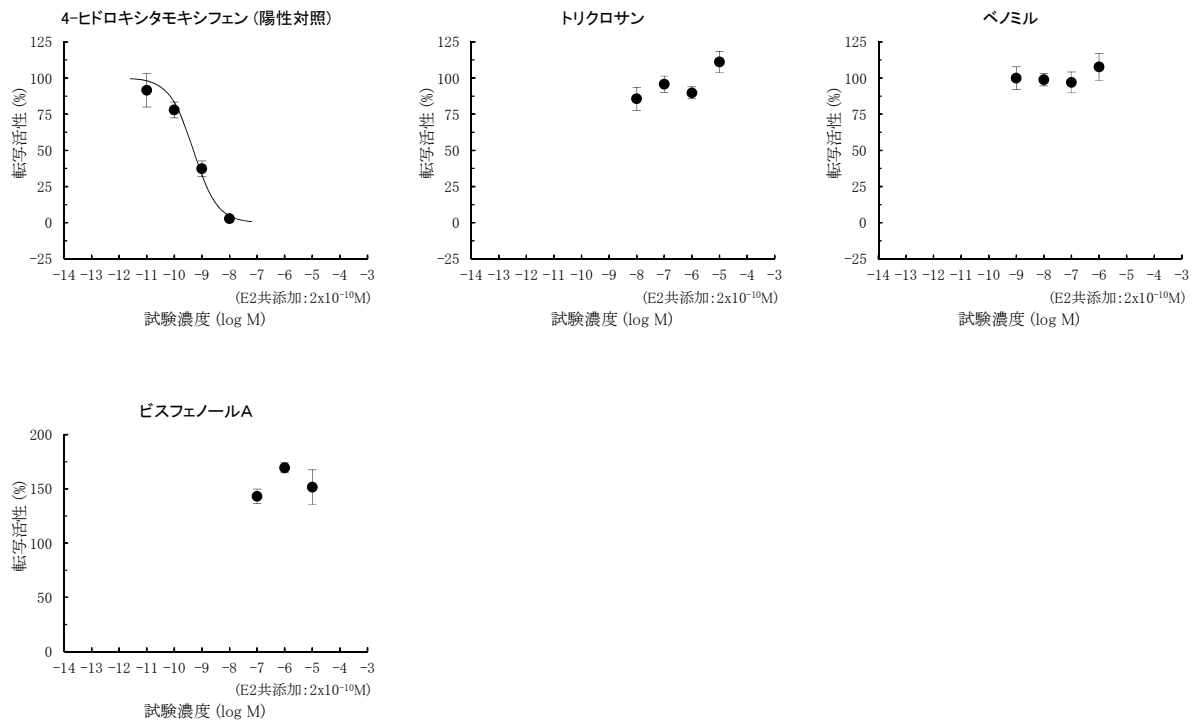


図 1-2 試験管内試験の結果（抗エストロゲン作用）

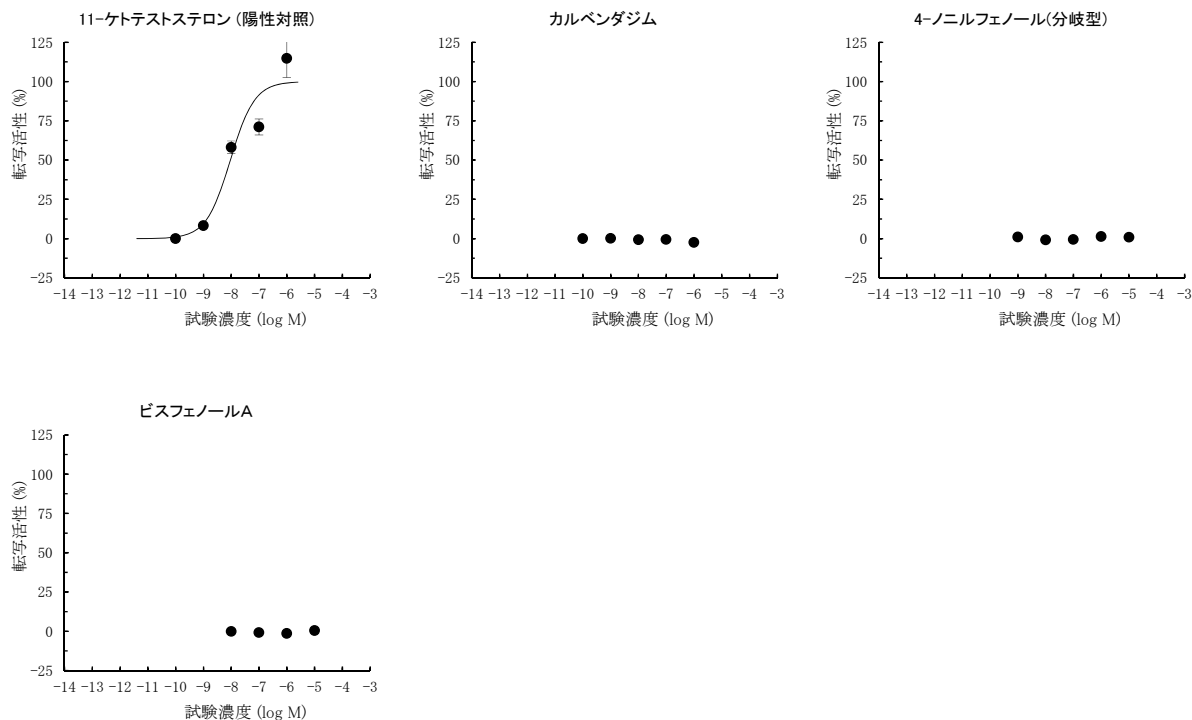


図 1-3 試験管内試験の結果（アンドロゲン作用）

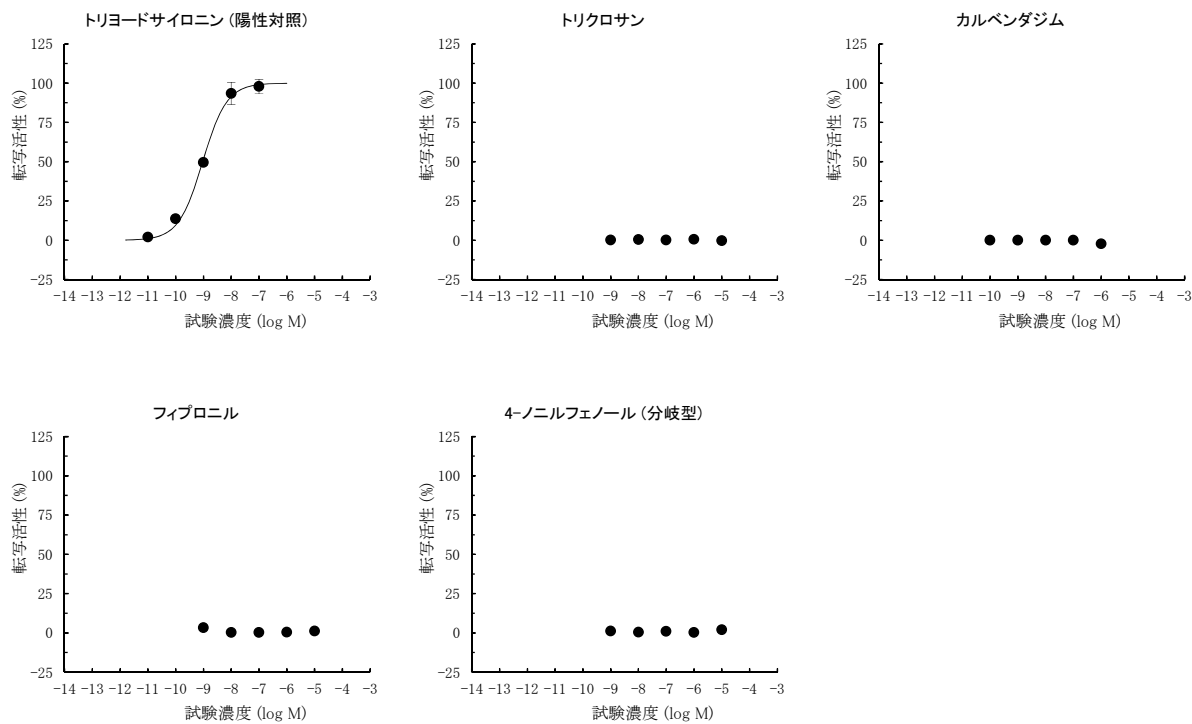


図 1-4 試験管内試験の結果（甲状腺ホルモン作用）

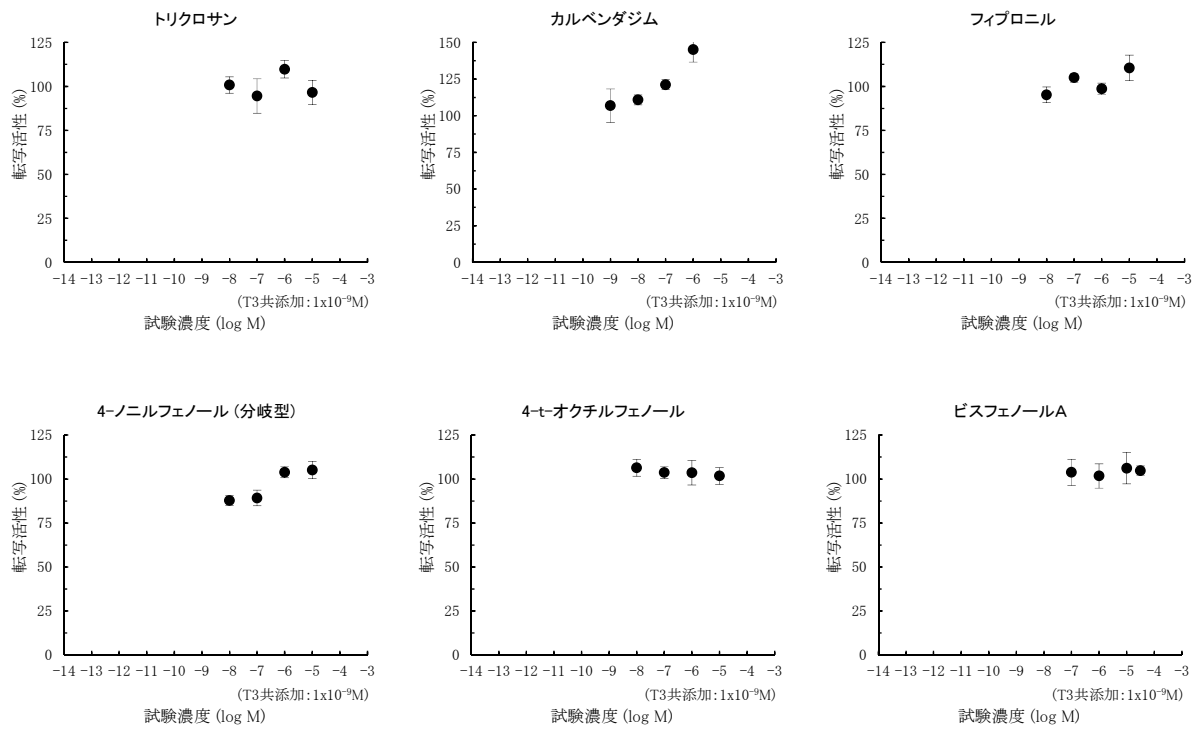


図 1-5 試験管内試験の結果（抗甲状腺ホルモン作用）

(別添 1)

レポーター遺伝子試験の条件

試験条件等	メダカER α レポーター遺伝子試験		メダカAR β レポーター遺伝子試験	ニシツメガエルTR β レポーター遺伝子試験	
	エストロゲン作用	抗エストロゲン作用	アンドロゲン作用試験	甲状腺ホルモン作用	抗甲状腺ホルモン作用
試験容器	96穴マイクロプレート		96穴マイクロプレート	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株)		HepG2 (ヒト肝腫瘍細胞株)	HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株)	
試験培地	DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS含有)		DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS含有)	DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS含有)	
試験液量	0.2 mL/well		0.2 mL/well	0.2 mL/well	
細胞播種数	1.4×10^4 cells/well		1.4×10^4 cells/well	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	medaka ERalpha/pcDNA		medaka ARbeta/pcDNA	tropicalis TR beta/pcDNA	
試験レポーターベクター	ERE-TK-Luc		ARE-MMTV-Luc	TRE-minP-Luc	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK-Rluc		pRL-TK-Rluc	pRL-TK-Rluc	
培養環境及び時間	37°C、5% CO ₂ 、40時間		37°C、5% CO ₂ 、40時間	37°C、5% CO ₂ 、40時間	
連数	5連(well)/濃度		5連(well)/濃度	5連(well)/濃度	
共添加物質(陽性物質) 及び濃度	—	17 β エストラジオール 2×10^{-10} M	—	—	トリヨードサイロニン 1×10^{-9} M
助剤及び終濃度	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%	DMSO 0.1%	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%