

## 資料 2-3

平成 28 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 28 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	抗アン ドロゲン	甲状腺ホ ルモン	抗甲状腺 ホルモン
テブコナゾール	○	○		○	○	○
ブタクロール	○				○	○
フルオランテン	○					○
プロシミドン	○		○	○	○	○
2-ブロモプロパン		○		○		
1-ブロモプロパン					○	○
ペルフルオロドデカン酸						○
メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	○	○			○	○
メトラクロール					○	○
スチレン					○	○
4-ヒドロキシ安息香酸プロピ ル(プロピルパラベン)	○	○				
2-メチルプロパン-2-オール ( <i>t</i> -ブチルアルコール)					○	○
プロピコナゾール	○	○		○	○	○
酢酸クロルマジノン			○	○		
チオ尿素					○	○
ジラム					○	○
試験数	7	5	2	5	11	13

## 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。

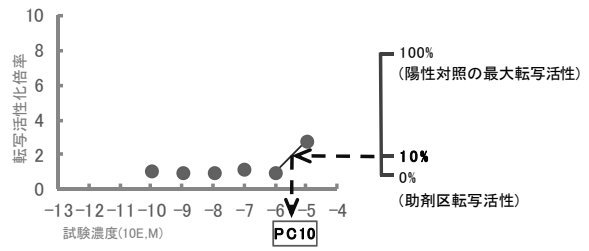
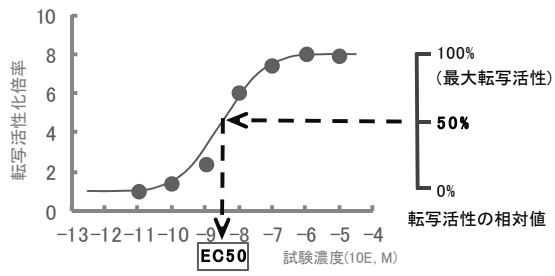
- ・エストロゲン及び抗エストロゲン作用:メダカエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )
- ・アンドロゲン及び抗アンドロゲン作用:メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  (AR  $\beta$ )
- ・甲状腺ホルモン及び抗甲状腺ホルモン作用:ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体  $\beta$  (TR  $\beta$ )

試験には、純度 95%以上の試薬を用いて行った。抗エストロゲン作用、抗アンド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、17  $\beta$  エストラジオール、11-ケトテストステロン又はトリヨードサイロニンをそれぞれ試験系に  $2 \times 10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M 又は  $1 \times 10^{-8}$  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:17  $\beta$  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、抗アンドロゲン作用:2-ヒドロキシフルタミド、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。

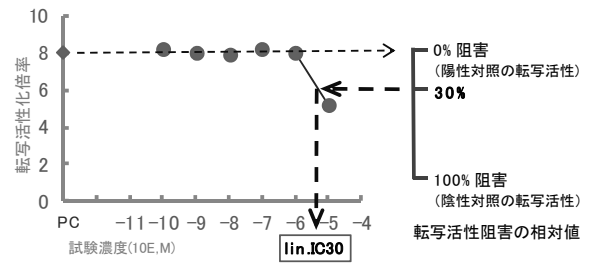
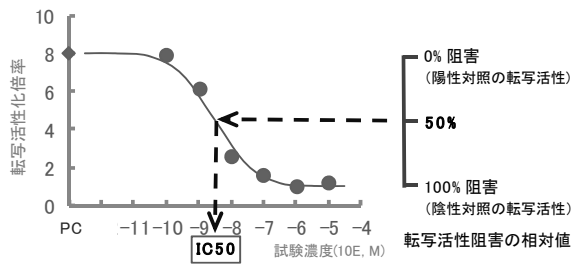
各試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり5連で行った。アゴニスト検出系の試験では、ベクターを一過的に導入した培養細胞を被験物質で暴露した後、ホタルルシフェラーゼの発光強度でホルモン応答による転写活性、ウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で内部コントロールの転写活性を測定し、それらの比(発行強度比)を求めた(試験条件等は別添 1)。

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  $EC_{50}$  (又は  $PC_{10}$ )、アンタゴニスト系試験では転写活性阻害の有無及び  $IC_{50}$  (又は  $lin.IC_{30}$ ) を求めた。また、 $EC_{50}$  又は  $IC_{50}$  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 $EC_{50}$ 及び $PC_{10}$ の算出



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



## 2. 結果

試験管内試験の結果を表2-1～2-6、表3及び図1-1～1-6に示した。

### (1)メダカエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )レポータージーン試験

エストロゲン作用試験では、試験を実施した7物質のうち、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル(プロピルパラベン)の1物質において、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  $\alpha$  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。EC<sub>50</sub> 値は、 $7.0 \times 10^{-6}$  M で、17 $\beta$  エストラジオール(陽性対照物質)に対する相対活性比は、0.000033 であった。その他の6物質については、試験濃度範囲において、メダカ ER  $\alpha$  に対する有意な転写活性化は認められず、EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 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5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 $\beta$  エストラジオールによるメダカ ER  $\alpha$  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、IC<sub>50</sub> 値及び lin.IC<sub>30</sub> 値は得られなかった。

### (2)メダカアンドロゲン受容体 $\beta$ (AR $\beta$ )レポータージーン試験

アンドロゲン作用試験の結果、試験対象とした2物質に関して、試験濃度範囲において、メダカ AR  $\alpha$  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、EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 値は得られなかった。

抗アンドロゲン作用試験の結果、試験を実施した5物質のうち、プロシミドン及び酢酸クロルマジノンの2物質において、試験濃度範囲において、試験系に共添加した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有意な阻害作用(抗アンドロゲン作用)が認められた。プロシミドンの IC<sub>50</sub> 値は、 $6.1 \times 10^{-5}$  M で、2-ヒドロキシフルタミド(陽性対照物質)に対する相対活性比は、0.015 であった。酢酸クロルマジノンの lin.IC<sub>30</sub> 値は、 $4.9 \times 10^{-7}$  M で、2-ヒドロキシフルタミド(陽性対照物質)に対する相対活性比は、1.39 であった。その他の3物質については、試験濃度範囲において、試験系に共添加した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有意な阻害作用(抗アンドロゲン作用)は認められず、IC<sub>50</sub> 値及び lin.IC<sub>30</sub> 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 $\beta$ (TR $\beta$ )レポータージーン試験

甲状腺ホルモン作用試験の結果、試験対象とした11物質に関して、試験濃度範囲において、ニシツメガエル TR  $\beta$  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、EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 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13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  $\beta$  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、IC<sub>50</sub> 値及び lin.IC<sub>30</sub> 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 <sub>50</sub> 又はPC <sub>10</sub>	相対活性比
テブコナゾール	(得られなかった)	
ブタクロール	(得られなかった)	
フルオランテン	(得られなかった)	
プロシミドン	(得られなかった)	
メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	(得られなかった)	
4-ヒドロキシ安息香酸プロピル	EC <sub>50</sub> = 7.0 × 10 <sup>-6</sup> M	0.0033 %
プロピコナゾール	(得られなかった)	
17β エストラジオール	EC <sub>50</sub> = 2.3 × 10 <sup>-10</sup> 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 <sub>50</sub> 又はlinIC <sub>30</sub>	相対活性比
テブコナゾール	(得られなかった)	
2-ブロモプロパン	(得られなかった)	
メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	(得られなかった)	
4-ヒドロキシ安息香酸プロピル	(得られなかった)	
プロピコナゾール	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC <sub>50</sub> = 2.6 × 10 <sup>-9</sup> 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 <sub>50</sub> 又はPC <sub>10</sub>	相対活性比
プロシミドン	(得られなかった)	
酢酸クロルマジノン	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC <sub>50</sub> = 6.7 × 10 <sup>-9</sup> M	

表 2-4 試験管内試験の結果（抗アンドロゲン作用）

試験対象物質	抗アンドロゲン作用	
	IC <sub>50</sub> 又はlinIC <sub>30</sub>	相対活性比
テブコナゾール	(得られなかった)	
プロシミドン	IC <sub>50</sub> = 6.1 × 10 <sup>-5</sup> M	1.5 %
2-ブロモプロパン	(得られなかった)	
プロピコナゾール	(得られなかった)	
酢酸クロルマジノン	linIC <sub>30</sub> = 4.9 × 10 <sup>-7</sup> M	139 %
2-ヒドロキシフルタミド	IC <sub>50</sub> = 9.1 × 10 <sup>-7</sup> M linIC <sub>30</sub> = 6.8 × 10 <sup>-7</sup> M	

表 2-5 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 <sub>50</sub> 又はPC <sub>10</sub>	相対活性比
テブコナゾール	(得られなかった)	
ブタクロール	(得られなかった)	
プロシミドン	(得られなかった)	
1-ブロモプロパン	(得られなかった)	
メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	(得られなかった)	
メラクロール	(得られなかった)	
スチレン	(得られなかった)	
2-メチルプロパン-2-オール	(得られなかった)	
プロピコナゾール	(得られなかった)	
チオ尿素	(得られなかった)	
ジラム	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC <sub>50</sub> = 3.7 × 10 <sup>-9</sup> M	

表 2-6 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 <sub>50</sub> 又はlnIC <sub>30</sub>	相対活性比
テブコナゾール	(得られなかった)	
ブタクロール	(得られなかった)	
フルオランテン	(得られなかった)	
プロシミドン	(得られなかった)	
1-ブロモプロパン	(得られなかった)	
ペルフルオロドデカン酸	(得られなかった)	
メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	(得られなかった)	
トラクロール	(得られなかった)	
スチレン	(得られなかった)	
2-メチルプロパン-2-オール	(得られなかった)	
プロピコナゾール	(得られなかった)	
チオ尿素	(得られなかった)	
ジラム	(得られなかった)	

表3 試験結果のまとめ

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	抗アン ドロゲン	甲状腺ホ ルモン	抗甲状腺 ホルモン
テブコナゾール	N	N		N	N	N
ブタクロール	N				N	N
フルオランテン	N					N
プロシミドン	N		N	<b>P</b>	N	N
2-ブロモプロパン		N		N		
1-ブロモプロパン					N	N
ペルフルオロドデカン酸						N
メチル- <i>t</i> -ブチルエーテル	N	N			N	N
メラクロール					N	N
スチレン					N	N
4-ヒドロキシ安息香酸プロピ ル(プロピルパラベン)	<b>P</b>	N				
2-メチルプロパン-2-オール ( <i>t</i> -ブチルアルコール)					N	N
プロピコナゾール	N	N		N	N	N
酢酸クロルマジノン			N	<b>P</b>		
チオ尿素					N	N
ジラム					N	N

注) P:作用が認められた、N:作用が認められなかった



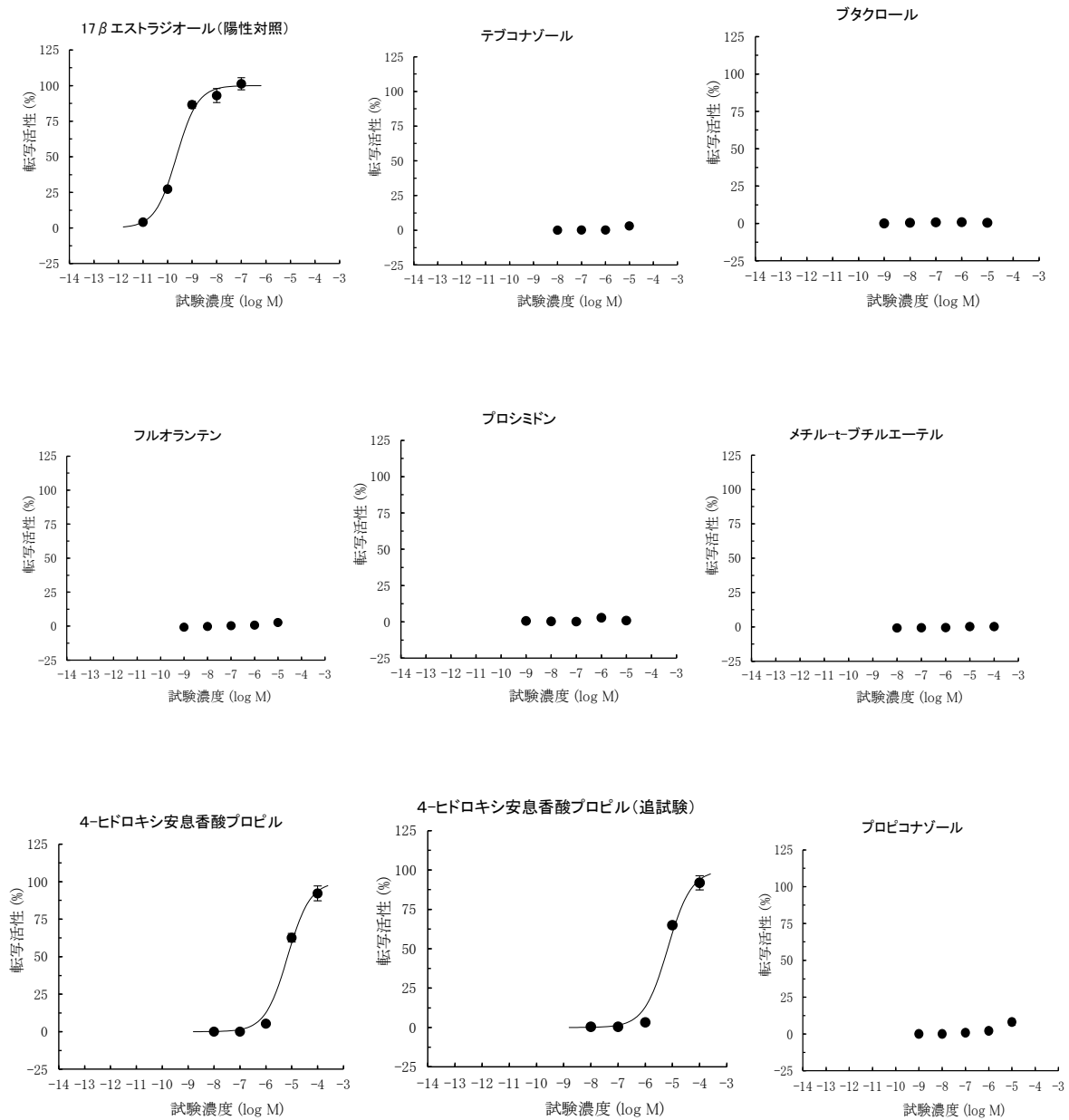


図 1-1 試験管内試験の結果 (エストロゲン作用)

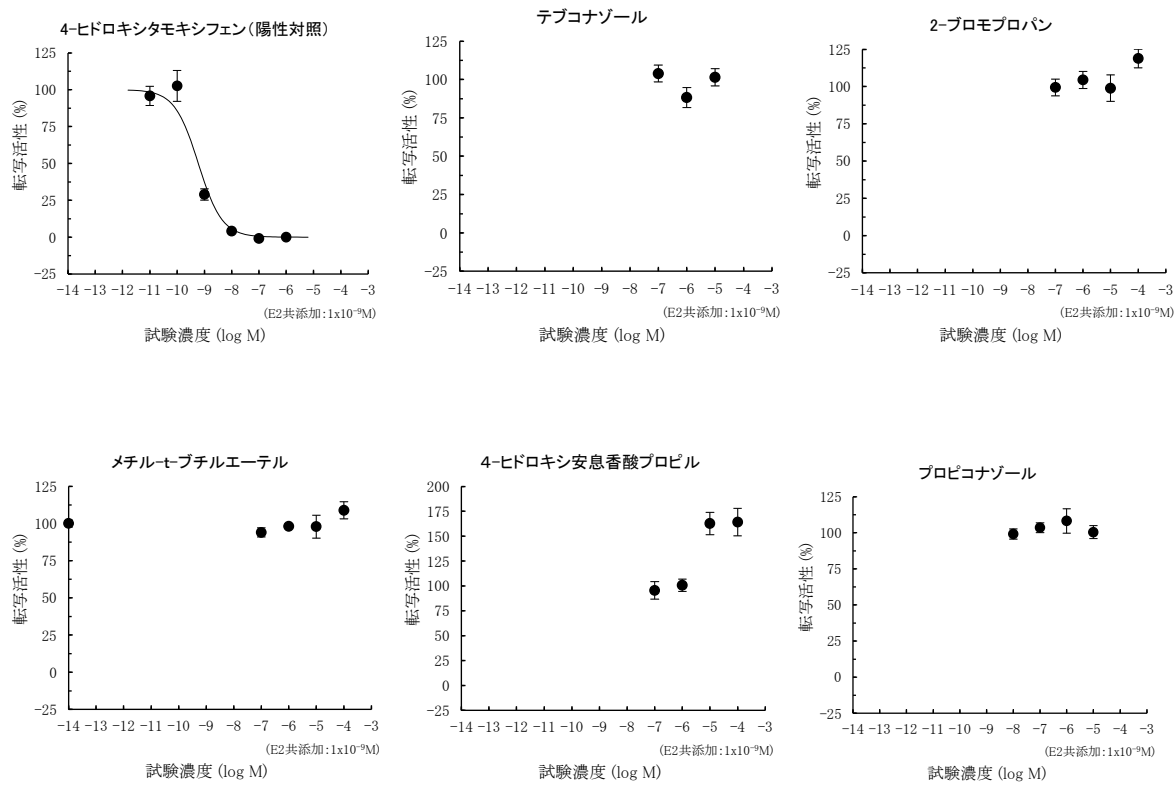


図 1-2 試験管内試験の結果 (抗エストロゲン作用)

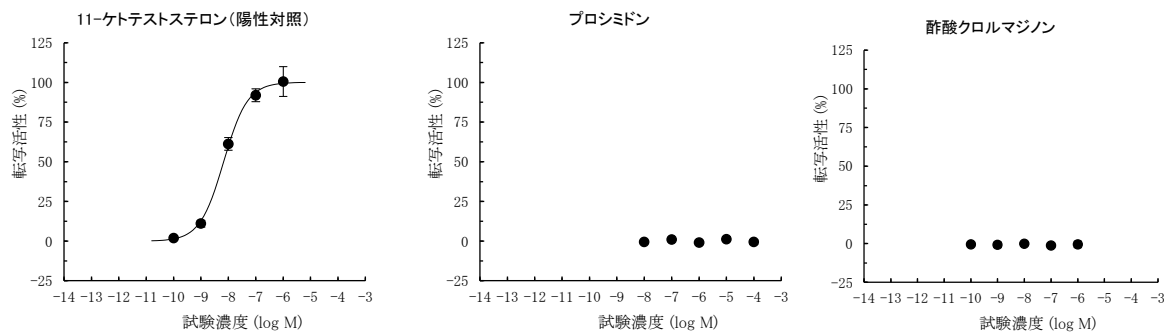


図 1-3 試験管内試験の結果 (アンドロゲン作用)

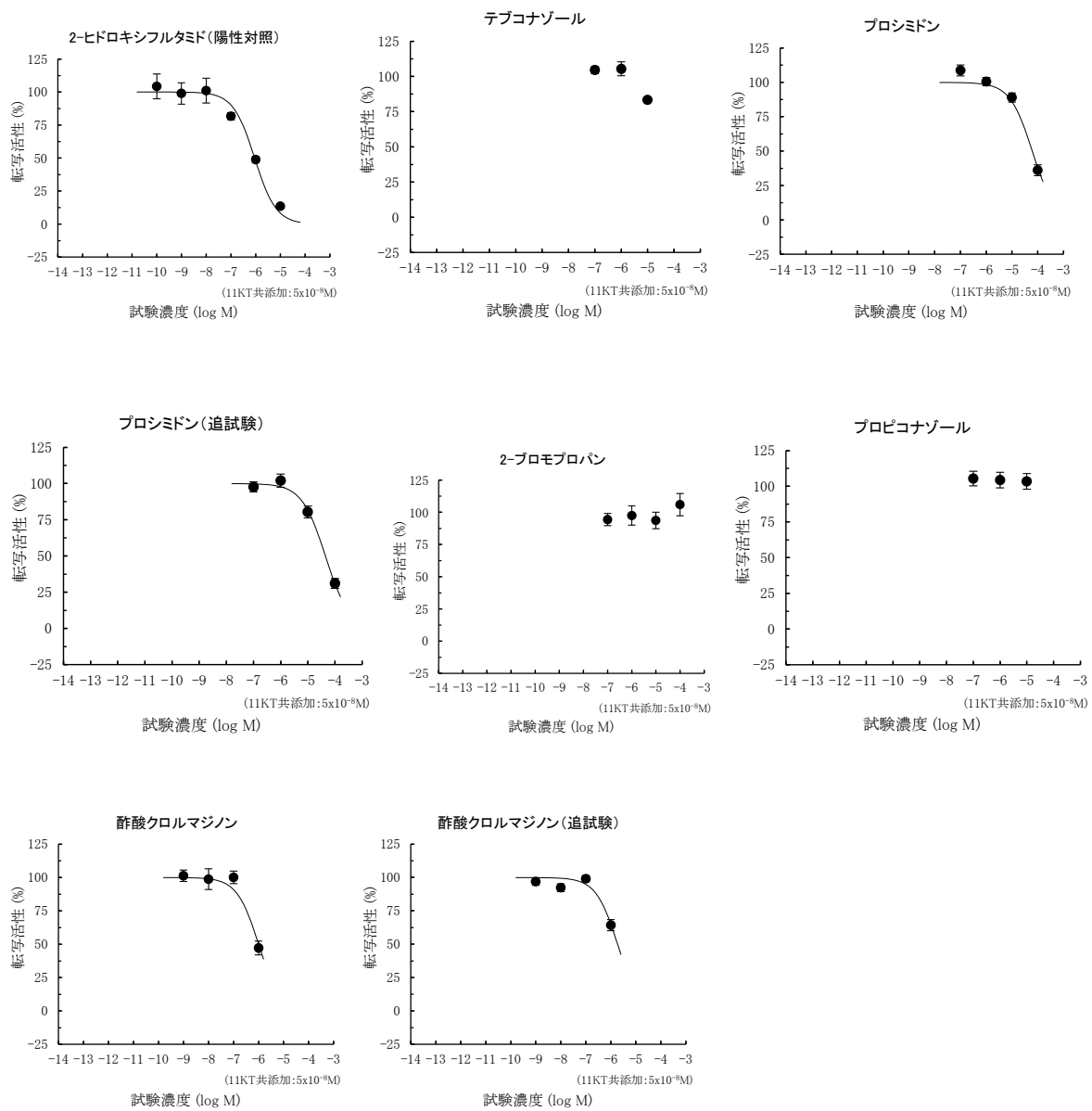


図 1-4 試験管内試験の結果 (抗アンドロゲン作用)

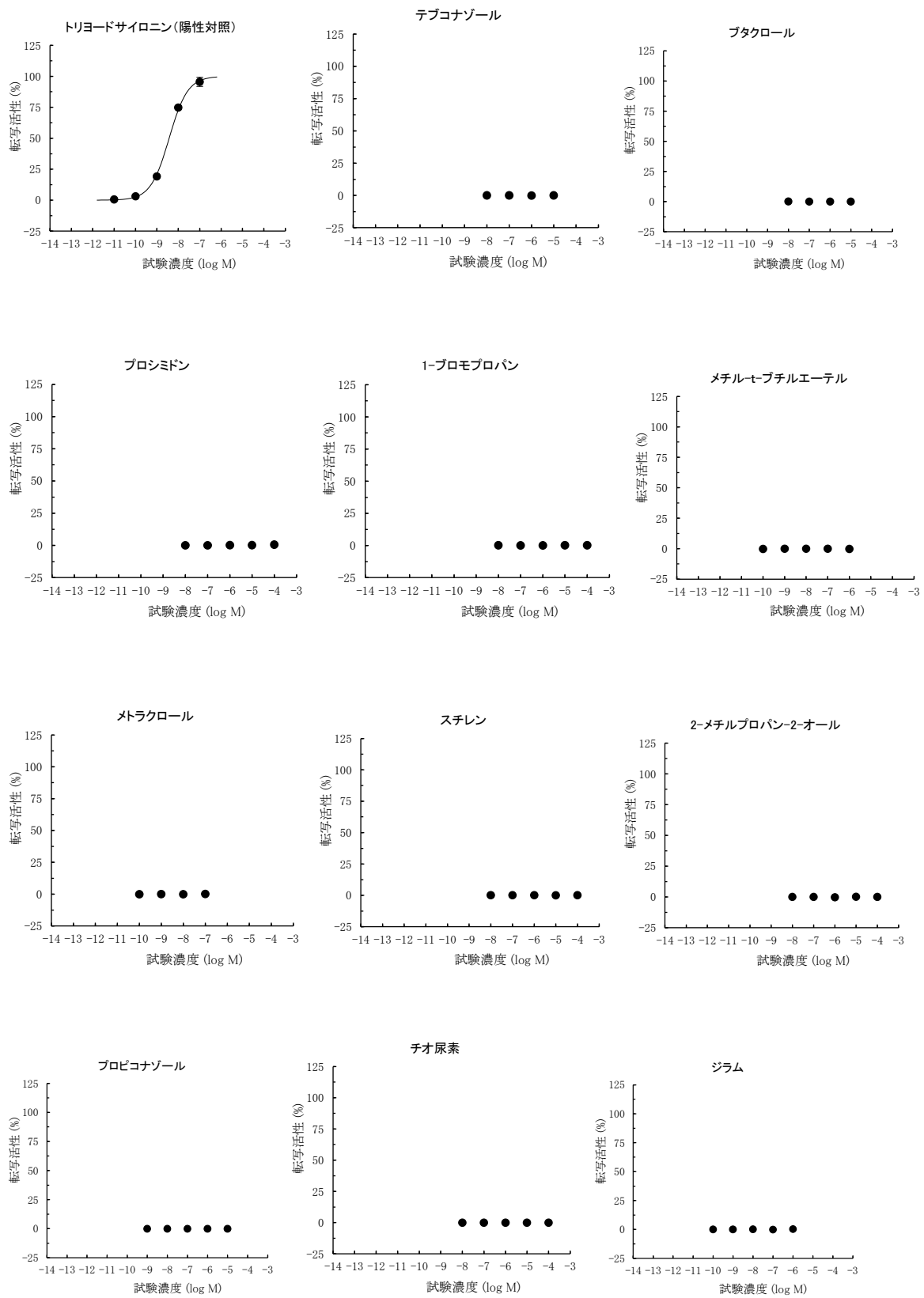


図 1-5 試験管内試験の結果 (甲状腺ホルモン作用)

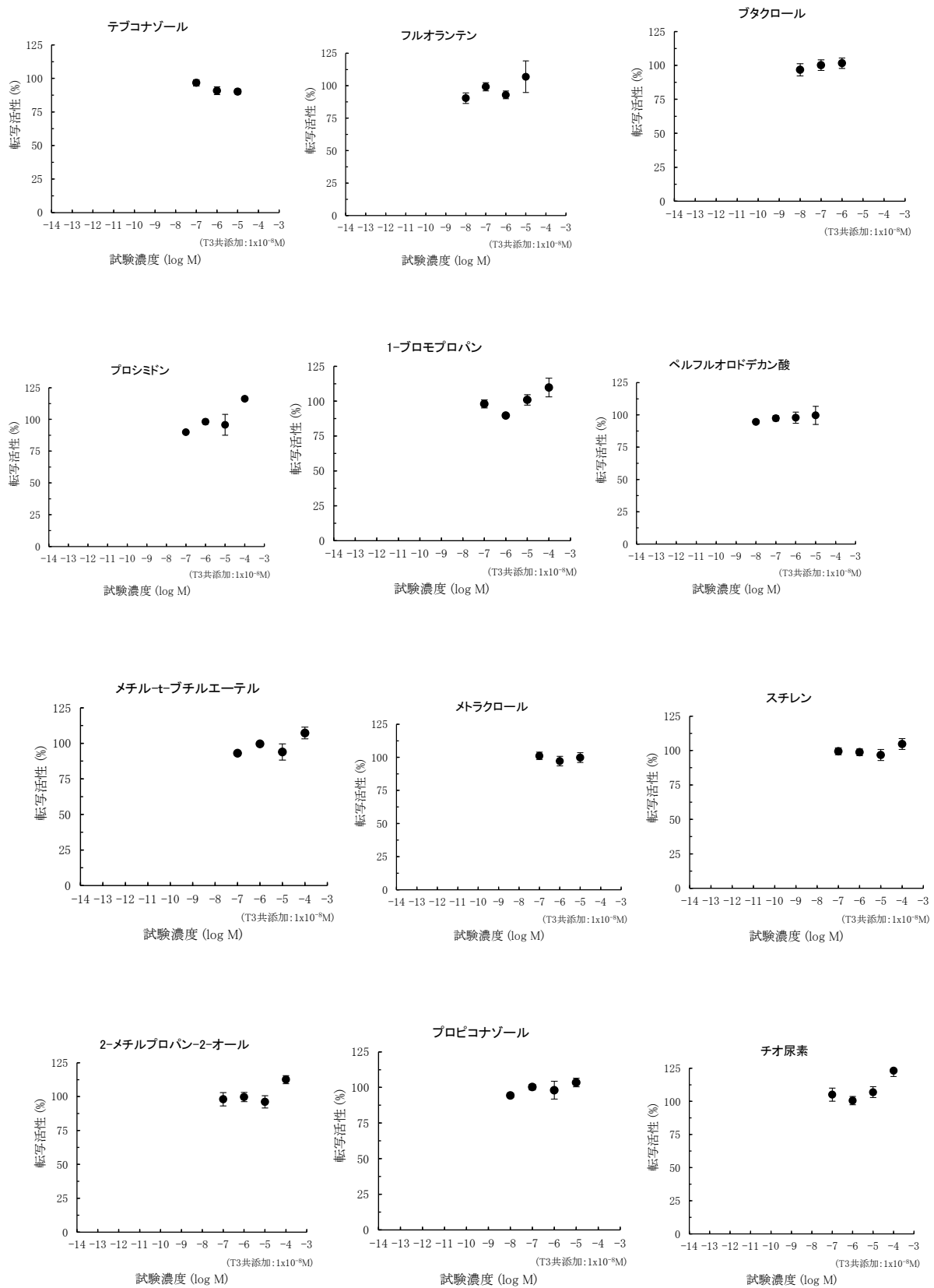


図 1-6 試験管内試験の結果（抗甲状腺ホルモン作用）

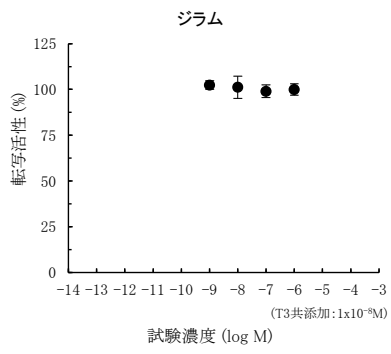


図 1-6 (続き) 試験管内試験の結果 (抗甲状腺ホルモン作用)

(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 $\alpha$ レポーター遺伝子試験		メダカAR $\beta$ レポーター遺伝子試験	ニシツメガエルTR $\beta$ 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	$1.4 \times 10^4$ cells/well		$1.4 \times 10^4$ cells/well	$1.4 \times 10^4$ 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 <sub>2</sub> 、40時間		37°C、5% CO <sub>2</sub> 、40時間	37°C、5% CO <sub>2</sub> 、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 $\beta$ エストラジオール $2 \times 10^{-10}$ M	—	—	トリヨードサイロニン $1 \times 10^{-9}$ M
助剤及び終濃度	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%	DMSO 0.1%	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%