

## 4-ヒドロキシ安息香酸メチル (CAS no. 99-76-3)

### 試験管内試験結果

#### 1. 試験項目

4-ヒドロキシ安息香酸メチルについて、下表に示す試験項目（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。

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	脱皮ホルモン	その他*
P	N	—	—	—	—	—	—

P : EC<sub>50</sub> 又は IC<sub>50</sub> 値が検出

N : EC<sub>50</sub> 又は IC<sub>50</sub> 値が検出不可

\* : その他

○ : 試験対象としたが、まだ実施していない作用モード

— : 試験対象としなかった作用モード

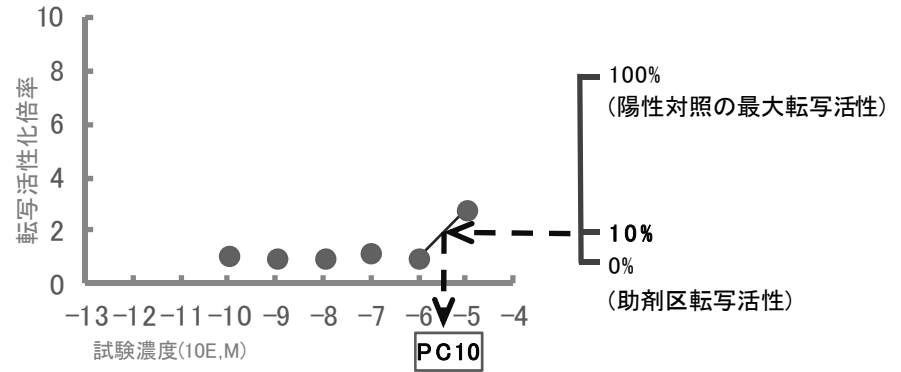
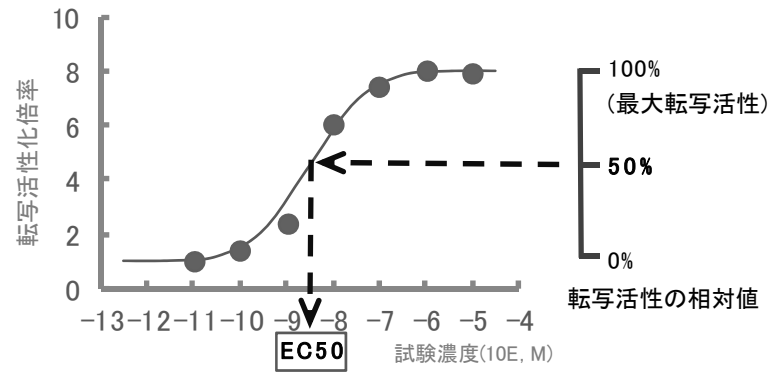
#### 2. 試験方法

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。

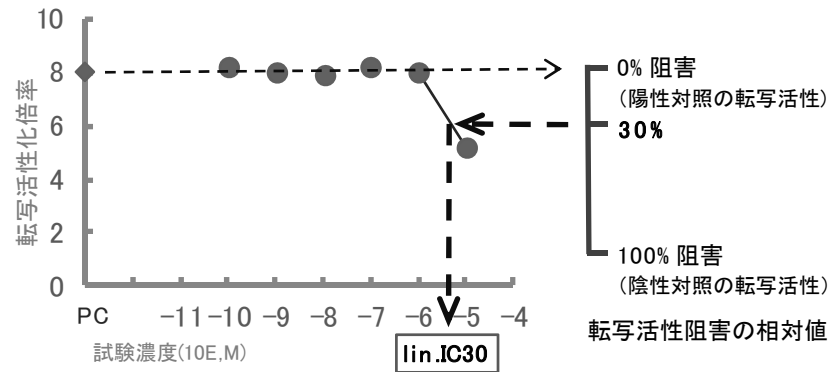
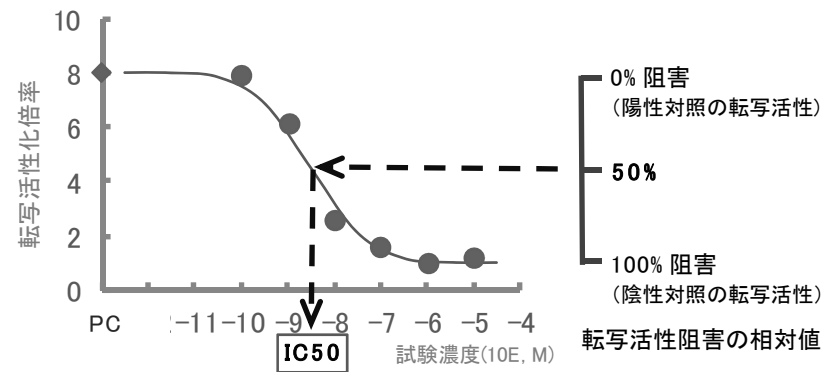
試験は、純度 95% 以上の試薬を用いて行った。また、試験が適切に実施されたことの確認及び試験対象物質の転写活性化能又は転写活性化阻害の相対的な強さ（相対活性比）を推定するために、試験対象物質での試験と並行して、陽性対照物質（エストロゲン作用：17β エストラジオール、抗エストロゲン作用：4-ヒドロキシタモキシフェン）による試験を実施した。

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（発光強度比）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<sub>50</sub> 値（又は PC<sub>10</sub> 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<sub>50</sub> 値（又は linIC<sub>30</sub> 値）を求めた。また、EC<sub>50</sub> 値又は IC<sub>50</sub> 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。

アゴニスト検出系の試験での EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 値の算出



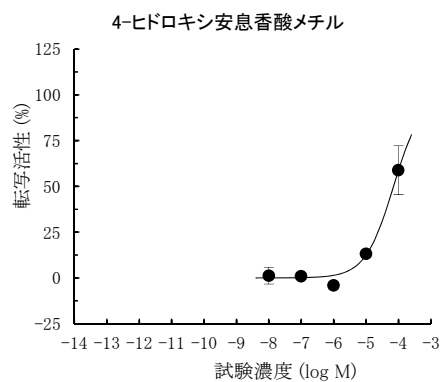
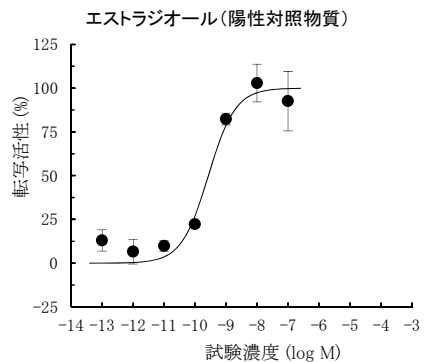
アンタゴニスト検出系の試験での IC<sub>50</sub> 値及び linIC<sub>30</sub> 値の算出



### 3. 結果

#### (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)

エストロゲン作用については、メダカ ER $\alpha$  の転写活性化が認められ、その EC<sub>50</sub> 値は、 $7.0 \times 10^{-5}$  M、17 $\beta$ -エストラジオール (陽性対照物質) の転写活性に対する相対活性比は 0.00038% であった。

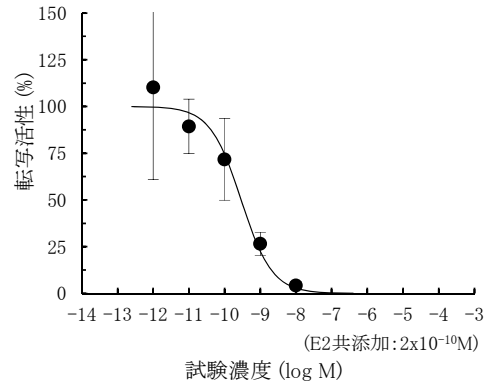


試験対象物質	エストロゲン作用	
	EC <sub>50</sub> 又は PC <sub>10</sub>	相対活性比
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	EC <sub>50</sub> = $7.0 \times 10^{-5}$ M	0.00038%
17 $\beta$ エストラジオール	EC <sub>50</sub> = $2.7 \times 10^{-10}$ M	

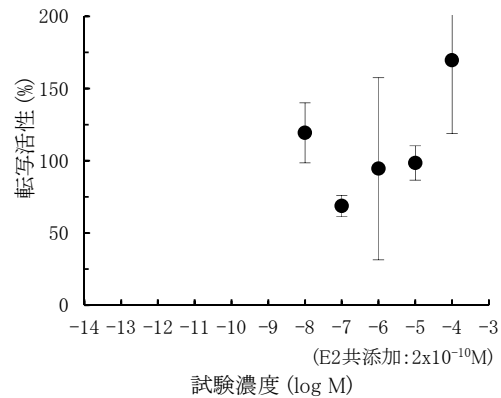
(2) メダカエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)

抗エストロゲン作用については、 $17\beta$ -エストラジオール  $2 \times 10^{-10}$  M 共添加条件でメダカ ER $\alpha$  の転写活性化阻害は認められなかった。

4-ヒドロキシタモキシフェン(陽性対照物質)



ヒドロキシ安息香酸メチル



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
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC <sub>50</sub> = $2.9 \times 10^{-10}$ M	

	メダカ エストロゲン受容体 $\alpha$ レポーター遺伝子試験		メダカ アンドロゲン受容体 $\beta$ レポーター遺伝子試験		ニシツメガエル 甲状腺ホルモン受容体 $\beta$ レポーター遺伝子試験		オオミジンコ 脱皮ホルモン受容体 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	抗アンドロゲン作用	甲状腺ホルモン作用	抗甲状腺ホルモン作用	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		96穴マイクロプレート
動物細胞株	HEK293		HepG2		HEK293		CHO
試験培地	DMEM		DMEM		DMEM		DMEM/F12
試験液量	0.2mL/well		0.2mL/well		0.2mL/well		0.2mL/well
細胞播種数	$1.4 \times 10^4$ 細胞/well		$1.4 \times 10^4$ 細胞/well		$1.4 \times 10^4$ 細胞/well		$1.4 \times 10^4$ 細胞/well
受容体発現ベクター	medaka ERalpha/pcDNA		medaka ARbeta/pcDNA		tropicalis TR beta/pcDNA		D.magna EcR/pBIND
試験レポーター 及び コントロールレポーターベクター	ERE-TK-Luc pRL-TK-Rluc		ARE-MMTV-Luc pRL-TK-Rluc		TRE-minP-Luc pRL-TK-Rluc		pACT-dapUSP(LBD) pACT-droTaiman(LXXLL) pG5-Luc
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		37°C、5% CO <sub>2</sub> 、40時間
連数	3連/濃度(ウェル)		3連/濃度(ウェル)		3連/濃度(ウェル)		3連/濃度(ウェル)
共添加陽性物質 (共添加濃度)	—	17 $\beta$ エストラジオール ( $2 \times 10^{-10}$ M)	—	11-ケトテストステロン ( $1 \times 10^{-8}$ M)	—	トリヨードサイロニン ( $2 \times 10^{-8}$ M)	—
助剤 (添加濃度)	DMSO (0.1%)	DMSO (0.2%)	DMSO (0.1%)	DMSO (0.2%)	DMSO (0.1%)	DMSO (0.2%)	DMSO (0.1%)

(EXTEND2010)に基づく平成26年度第1回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 参考資料2-7より抜粋)