

## 第 1 段階試験管内試験の実施結果について

## 1. 材料 (供試物質)

## (1) 被験物質

メダカエストロゲン受容体レポータージーン試験及びメダカアンドロゲン受容体レポータージーン試験の被験物質として、以下の試薬を用いた。被験物質は、溶媒に  $10^{-1}$  M で溶解したものを調製して  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し、使用時に適宜、溶媒で希釈して使用した。

表 1 被験物質

化学名	略名	CAS No.	MW	入手先	純度
2,4,6-トリブロモフェノール (2,4,6-Tribromophenol)	TBP	118-79-6	330.8	Sigma	99.7%
2,4-トルエンジアミン (2,4-Toluenediamine)	TDA	95-80-7	122.17	Sigma	99.7%
<i>p</i> -ジクロロベンゼン ( <i>p</i> -Dichlorobenzene)	PDCB	106-46-7	147	Sigma	99.9%
<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド ( <i>N,N</i> -Dimethylformamide)	DMF	68-12-2	73.09	Sigma	99.9%
ヒドラジン (Hydrazine)	HDZ	302-01-2	32.05	TGI	98.4%
フェンチオン (Fenthion)	MPP	55-38-9	278.3	Wako	99.3%

## (2) 陽性対照物質

メダカエストロゲン受容体レポータージーン試験及びメダカアンドロゲン受容体レポータージーン試験では、各作用について、以下の物質を陽性対照物質として用いた。陽性対照物質の供試試薬は、溶媒に  $10^{-1}$  M で溶解したものを調製して  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し、使用時に適宜、溶媒で希釈して使用した。

表 2 陽性対照物質

作用	陽性対照物質	略名	CAS No.	MW	入手先	純度
エストロゲン作用	17β エストラジオール (17β-Estradiol)	E2	50-28-2	272.4	Wako	>97%
抗エストロゲン作用	4-ヒドロキシタモキシフェン (4-Hydroxytamoxifen)	OHT	68047-06-3	387.5	Sigma	99.9%
アンドロゲン作用	11 ケトテストステロン (11-ketotestosterone)	11KT	564-35-2	302.4	Sigma	≥98%
抗アンドロゲン作用	フルタミド (Flutamide)	FLU	13311-84-7	276.2	Sigma	100%

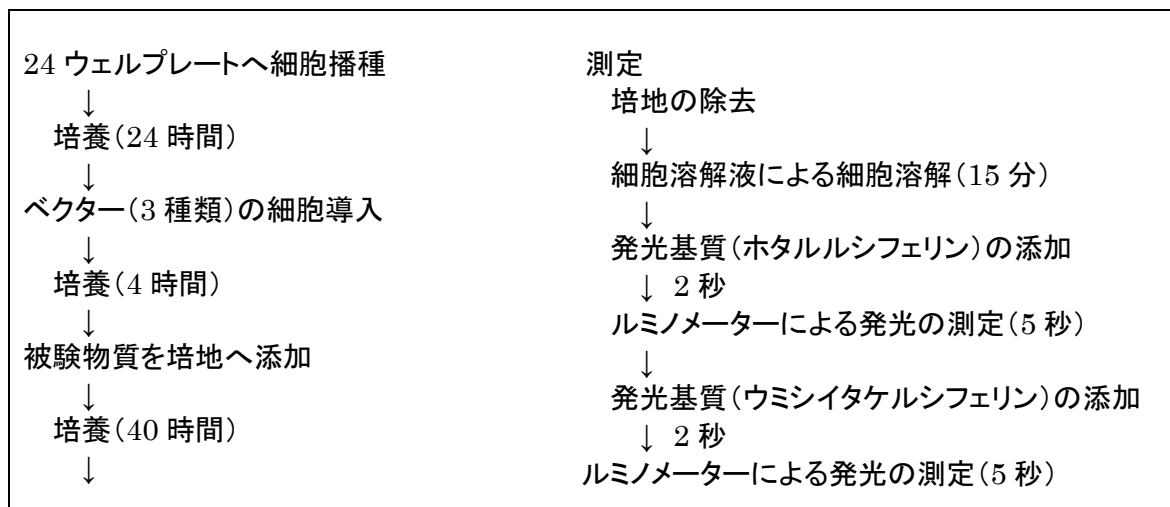
### (3) 溶媒

被験物質及び陽性対照物質を培地に添加するための溶媒には、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide、DMSO) を用いた。

## 2. 方法

OECD TG455(Stably Transfected Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogen Agonist-Activity of Chemicals)を参考に、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究において開発したメダカエストロゲン受容体レポーター遺伝子試験及びメダカアンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験を今回採用した。開発に際し既存の方法<sup>1~7)</sup>も参照した。なお、今回実施したレポーター遺伝子試験の原理について、添付資料 1 にまとめた。

### 実施したレポーター遺伝子試験の基本的な流れ



試験手順および試験条件の詳細（表）を以下に示す。

(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

24 穴マイクロプレートに播種、24 時間培養したヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞 ( $5 \times 10^4$  細胞/well) に、メダカの ER $\alpha$  を発現するベクター、ER 応答エレメントをホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだベクター (ERE-TK-Luc) 及び恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現するコントロールベクター (pRL-TK-RLuc) を一過的に導入した。導入試薬は Fugene 6 (プロメガ社) を用いた。ベクターの導入 4 時間後に下記 a) 又は b) に示す方法で被験物質等を添加した。

a) エストロゲン作用検出系

被験物質の濃度区は、それぞれ DMSO に溶解した被験物質を終濃度として  $1 \times 10^{-5}$  ~  $1 \times 10^{-11}$  M (公比 10) となるように培養液中に添加した。陽性対照物質 (E2) の濃度区は、同様にそれぞれ  $1 \times 10^{-7}$  ~  $1 \times 10^{-13}$  M (公比 10) となるように添加した。すべてにおいて DMSO の終濃度は 0.1% とした。また、陰性対照区は、DMSO を終濃度 0.1% で添加した。

b) 抗エストロゲン作用検出系

被験物質の濃度区は、DMSO に溶解させた E2 を培養液中に終濃度として  $2 \times 10^{-10}$  M で添加し、そこに、それぞれ DMSO に溶解した被験物質を終濃度として  $1 \times 10^{-5}$  ~  $1 \times 10^{-11}$  M (公比 10) となるように添加した。陽性対照物質 (OHT) の濃度区は、同様にそれぞれ  $1 \times 10^{-7}$  ~  $1 \times 10^{-12}$  M (公比 10) となるように添加した。また、陽性対照区は、E2 ( $2 \times 10^{-10}$  M) を添加し、そこに DMSO を添加した。すべてにおいて DMSO の終濃度は 0.2% とした。また、陰性対照区は、DMSO を終濃度 0.2% で添加した。

被験物質（又は陽性対照物質）の添加から 40 時間、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置培養した。培養完了後、細胞を溶解し、基質を添加してホタル及びウミシイタケルシフェリンの発光強度を Dual-Luciferase Assay System (プロメガ社) を用いてルミノメーターで測定し、相対発光強度 (ホタル/ウミシイタケ) を算出した。被験物質の濃度区の相対発光強度を陰性対照区の相対発光強度 (平均値) で除した値を転写活性化倍率 (fold activation) とした。

(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

24 穴マイクロプレートに播種、24 時間培養したヒト肝がん細胞由来の HepG2 細胞 ( $5 \times 10^4$  細胞/well) に、メダカの AR $\beta$  を発現するベクター、AR 応答エレメント (mouse mammary tumor virus (MMTV) 由来) を持つ MMTV プロモーターをホタルのルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだベクター (ARE-MMTV-Luc) 及び恒常的にウミシイタケのルシフェラーゼが発現するコントロールのベクター (pRL-TK-RLuc) を一過的に

導入した。導入試薬は Fugene HD (プロメガ社) を用いた。ベクターの導入 4 時間後に下記 a) 又は b) に示す方法で被験物質等を添加した。

a) アンδροゲン作用検出系

被験物質の濃度区は、それぞれ DMSO に溶解した被験物質を終濃度として  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-11}$  M (公比 10) となるように培養液中に添加した。陽性対照物質 (11KT) の濃度区は、同様にそれぞれ  $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-12}$  M (公比 10) となるように添加した。すべてにおいて DMSO の終濃度は 0.1% とした。また、陰性対照区は、DMSO を終濃度 0.1% で添加した。

b) 抗アンδροゲン作用検出系

被験物質の濃度区は、DMSO に溶解させた 11KT を培養液中に終濃度として  $1 \times 10^{-8}$  M で添加し、そこに、それぞれ DMSO に溶解した被験物質を終濃度として  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-7}$  M (公比 10) となるように添加した。陽性対照物質 (FLU) の濃度区は、同様にそれぞれ  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-7}$  M (公比 10) となるように添加した。また、陽性対照区は、11KT ( $1 \times 10^{-8}$  M) を添加し、そこに DMSO を添加した。すべてにおいて DMSO の終濃度は 0.2% とした。また、陰性対照区は、DMSO を終濃度 0.2% で添加した。

被験物質 (又は陽性対照物質) の添加から 40 時間、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置培養した。培養完了後、細胞を溶解し、基質を添加してホタル及びウミシイタケルシフェリンの発光強度を Dual-Luciferase Assay System (プロメガ社) を用いてルミノメーターで測定し、相対発光強度 (ホタル/ウミシイタケ) を算出した。被験物質の濃度区の相対発光強度を陰性対照区の相対発光強度 (平均値) で除した値を転写活性化倍率 (fold activation) とした。

今回実施したレポーター遺伝子試験の条件

	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
細胞株	HEK293		HepG2	
受容体発現ベクター	medaka ER alpha/pcDNA		medaka AR beta/pcDNA	
試験レポーターベクター	ERE-TK-Luc		ARE-MMTV-Luc	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK-Rluc			
試験用培地	DMEM (2mM L-glutamine、10% FCS を含む)			
試験環境	37°C、CO2 インキュベータ			
細胞播種数	5 x 10 <sup>4</sup> cells/ウェル (24 ウェルプレート)			
連数	3 ウェル/濃度			
試験液量	1 mL			
溶媒	ジメチルスルホキシド(DMSO)			
溶媒終濃度	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%
被験物質添加終濃度 (試験濃度)	10 <sup>-11</sup> ~10 <sup>-5</sup> M 公比 10	10 <sup>-10</sup> ~10 <sup>-5</sup> M 公比 10	10 <sup>-11</sup> ~10 <sup>-5</sup> M 公比 10	10 <sup>-8</sup> ~10 <sup>-5</sup> M 公比 10
共添加物質及び添加濃度	-	E2 2 x 10 <sup>-10</sup> M	-	11KT 1 x 10 <sup>-8</sup> M
陽性対照物質	E2	OHT	11KT	FLU
陽性対照物質添加終濃度	10 <sup>-13</sup> ~10 <sup>-7</sup> M 公比 10	10 <sup>-12</sup> ~10 <sup>-7</sup> M 公比 10	10 <sup>-12</sup> ~10 <sup>-6</sup> M 公比 10	10 <sup>-11</sup> ~10 <sup>-6</sup> M 公比 10

E2:17β -エストラジオール OHT:4-ヒドロキシタモキシフェン

11KT:11-ケトテストステロン FLU:フルタミド

(3) データ解析

a) エストロゲン作用及びアンドロゲン作用 (アゴニスト作用) 検出系の解析

陽性対照物質 (E2 又は 11KT) の転写活性化倍率 (fold activation) の最大値が 2 以上であった場合に、正常な応答が得られていると判定し、以下の解析を行った。

被験物質の各濃度区について、転写活性化倍率に陰性対照区と比較して有意かつ用量依存的な反応 (転写活性化倍率の上昇) が認められるかを統計学的に検定した (ANOVA 及び Williams' multiple comparison test)。有意な反応が認められる場合には、解析ソフト (GraphPad Prism、GraphPad Software 社) を用いて、3-parameter の非線形回帰モデル (解析ソフトの”log(agonist) vs. response (three parameters)”) によって EC<sub>50</sub> (最大転写活性の 50%の転写活性を示す濃度) を算出した。さらに EC<sub>50</sub> が得られた被験物質については、陽性対照物質 (E2 又は 11KT) の EC<sub>50</sub> に対する相対

活性比 (Relative potency, %) を算出した。EC<sub>50</sub> が算出できなかった場合には、参考値として陽性対照物質の最大転写活性の 10% 値相当の転写活性を示す濃度 (PC<sub>10</sub>) を算出した。また、試験濃度範囲において転写活性化倍率に有意な反応が認められなかった場合には、(試験濃度範囲において) 被験物質がメダカ ER $\alpha$  又は AR $\beta$  遺伝子の転写活性 (エストロゲン又はアンドロゲン作用) を示さなかったと結論した。

#### b) 抗エストロゲン作用及び抗アンドロゲン作用 (アンタゴニスト作用) 検出系の解析

陽性対照物質 (OHT 又は FLU) に共添加させた E2 又は 11KT の転写活性化倍率 (fold activation) の最大値が 2 以上であった場合に、正常な応答が得られていると判定し、以下の解析を行った。

被験物質の各濃度区について、転写活性化倍率に陽性対照区と比較して有意かつ用量依存的な反応 (転写活性化倍率の低下) が認められるかを統計学的に検定した (ANOVA 及び Williams' multiple comparison test)。有意な反応が認められる場合には、解析ソフト (GraphPad Prism、GraphPad Software 社) を用いて、3-parameter の非線形回帰モデル (解析ソフトの "log(agonist) vs. response (three parameters)") によって IC<sub>50</sub> (最大転写活性を 50% 阻害を示す濃度) を算出した。さらに IC<sub>50</sub> が得られた被験物質については、陽性対照物質 (OHT 又は FLU) の IC<sub>50</sub> に対する相対活性比 (Relative potency, %) を算出した。IC<sub>50</sub> が算出できなかった場合には、参考値として陽性対照物質の最大転写活性の 30% の転写阻害活性を示す濃度 (linIC<sub>30</sub>) を算出した。また、試験濃度範囲において転写活性化倍率に有意な反応が認められなかった場合には、(試験濃度範囲において) 被験物質がメダカ ER $\alpha$  又は AR $\beta$  遺伝子の転写阻害活性 (抗エストロゲン又は抗アンドロゲン作用) を示さなかったと結論した。

### 3. 結果

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

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は、エストロゲン作用に関して、2,4-トルエンジアミン (TDA)、*p*-ジクロロベンゼン (PDCB)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、ヒドラジン (HDN) の 4 物質、抗エストロゲン作用に関して 2,4,6-トリブロモフェノール (TBP)、*p*-ジクロロベンゼン (PDCB)、ヒドラジン (HDZ)、フェンチオン (MPP) の 4 物質について実施した。

試験の結果、エストロゲン作用に関して、TDA、PDCB、DMF 及び HDN のいずれにおいても、試験濃度範囲 ( $\sim 1 \times 10^{-5}$  M (10  $\mu$ M)) においてメダカ ER $\alpha$  に対する転写活性 (エストロゲン作用) は認められなかった (表 3 及び図 1)。陽性対照物質 (E2) の EC<sub>50</sub> は  $9.7 \times 10^{-11}$  M であった。

また、抗エストロゲン作用に関して、TBP、PDCB、HDN 及び MPP のいずれにおいても、試験濃度範囲 ( $\sim 1 \times 10^{-5}$  M (10  $\mu$ M)) においてメダカ ER $\alpha$  に対する転写阻害活性 (抗エストロゲン作用) は認められなかった (表 3 及び図 2)。陽性対照物質 (OHT) の IC<sub>50</sub> は  $2.3 \times 10^{-10}$  M であった (E2 共添濃度:  $2 \times 10^{-10}$  M)。

表3 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の結果

被験物質	メダカエストロゲン受容体 $\alpha$ 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	
	EC <sub>50</sub> (M)	Relative potency (%)	IC <sub>50</sub> (M)	Relative potency (%)
2,4,6-トリブロモフェノール			得られなかった	—
2,4-トルエンジアミン	得られなかった	—		
<i>p</i> -ジクロロベンゼン	得られなかった	—	得られなかった	—
<i>N,N</i> -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	—	得られなかった	—
フェンチオン			得られなかった	—
17 $\beta$ エストラジオール	9.7 x 10 <sup>-11</sup>	100		
4-ヒドロキシタモキシフェン			2.3 x 10 <sup>-10</sup> (試験 1)	100
			3.8 x 10 <sup>-10</sup> (試験 2)	

■: 試験対象外

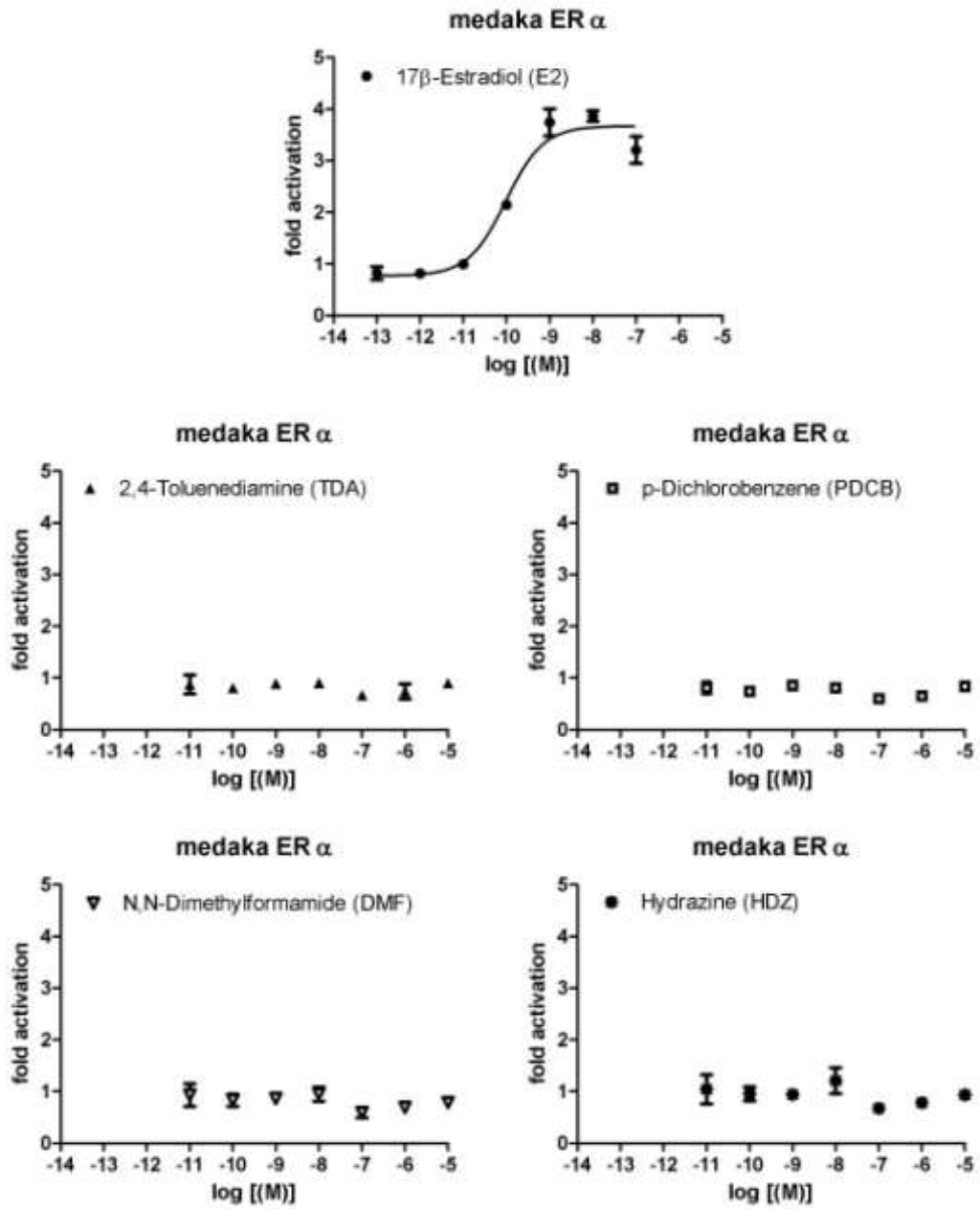
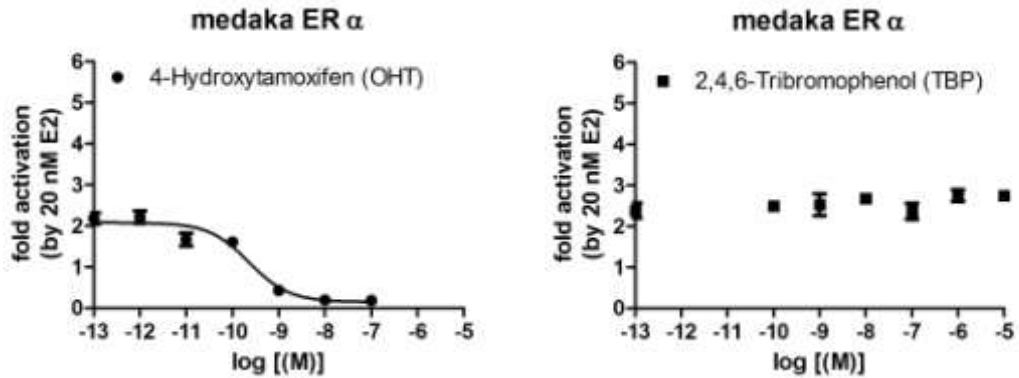


図1 各被験物質の転写活性 (メダカ ER $\alpha$ )



試験 1



試験 2

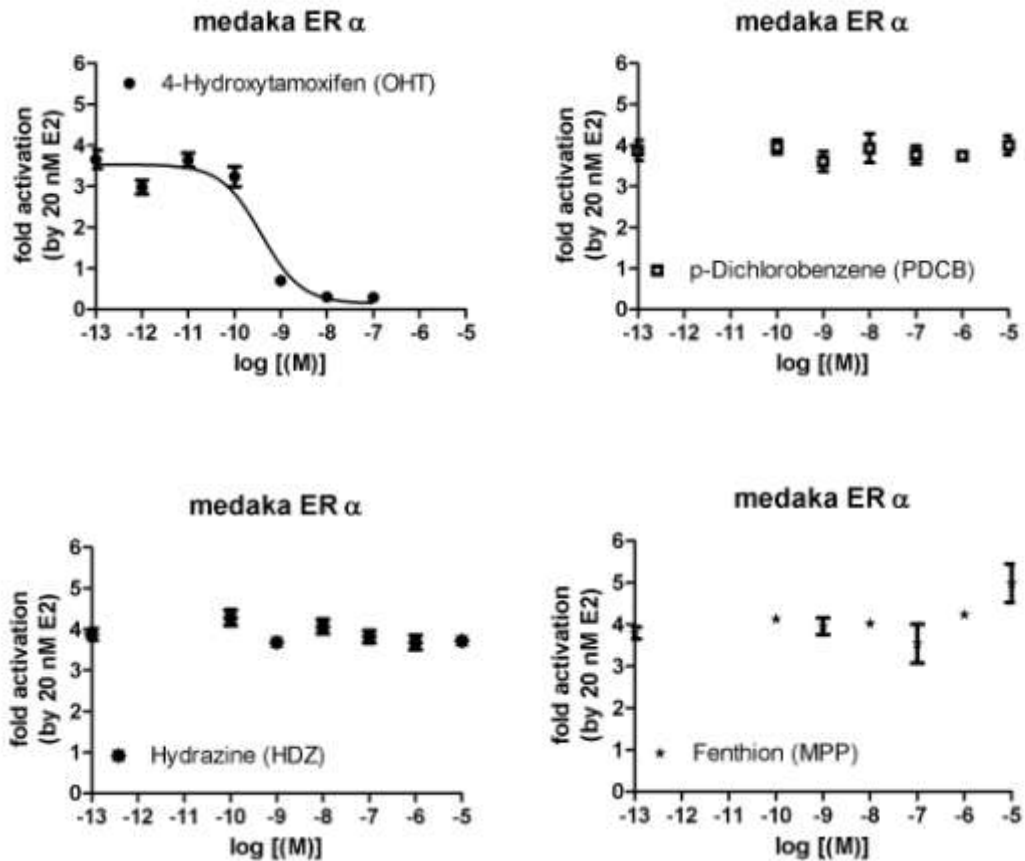


図 2 E2 共存下における各被験物質の転写阻害活性 (メダカ ER $\alpha$ )

(2) メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  レポーター遺伝子試験

メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  (AR $\beta$ ) レポーター遺伝子試験は、アンドロゲン作用に関して、ヒドラジン (HDN) 及びフェンチオン (MPP) の 2 物質、抗アンドロゲン作用に関して、2,4-トルエンジアミン (TDA)、*p*-ジクロロベンゼン (PDCB)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 及びヒドラジン (HDZ) の 4 物質について実施した。

試験の結果、アンドロゲン作用に関して、HDN 及び MPP のいずれにおいても、試験濃度範囲 ( $\sim 1 \times 10^{-5}$  M (10  $\mu$ M)) においてメダカ AR $\beta$  に対する転写活性 (アンドロゲン作用) は認められなかった (表 4 及び図 3)。陽性対照物質 (11KT) の EC<sub>50</sub> は  $3.2 \times 10^{-9}$  M であった。

また、抗アンドロゲン作用に関して、TDA、PDCB、DMF 及び HDZ のいずれにおいても、試験濃度範囲 ( $\sim 1 \times 10^{-5}$  M (10  $\mu$ M)) においてメダカ AR $\beta$  に対する転写阻害活性 (抗アンドロゲン作用) は認められなかった (表 4 及び図 4)。陽性対照物質 (FLU) の IC<sub>50</sub> は  $4.2 \times 10^{-6}$  M であった (11KT 共添濃度:  $1 \times 10^{-8}$  M)。

表 4 メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  レポーター遺伝子試験の結果

被験物質	メダカアンドロゲン受容体 $\beta$ レポーター遺伝子試験			
	アンドロゲン作用		抗アンドロゲン作用	
	EC <sub>50</sub> (M)	Relative potency (%)	IC <sub>50</sub> (M)	Relative potency (%)
2,4,6-トリブロモフェノール				
2,4-トルエンジアミン			得られなかった	—
<i>p</i> -ジクロロベンゼン			得られなかった	—
<i>N,N</i> -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	—	得られなかった	—
フェンチオン	得られなかった	—		
11 ケトテストステロン	$3.2 \times 10^{-9}$	100		
フルタミド			$4.2 \times 10^{-6}$	100

■: 試験対象外

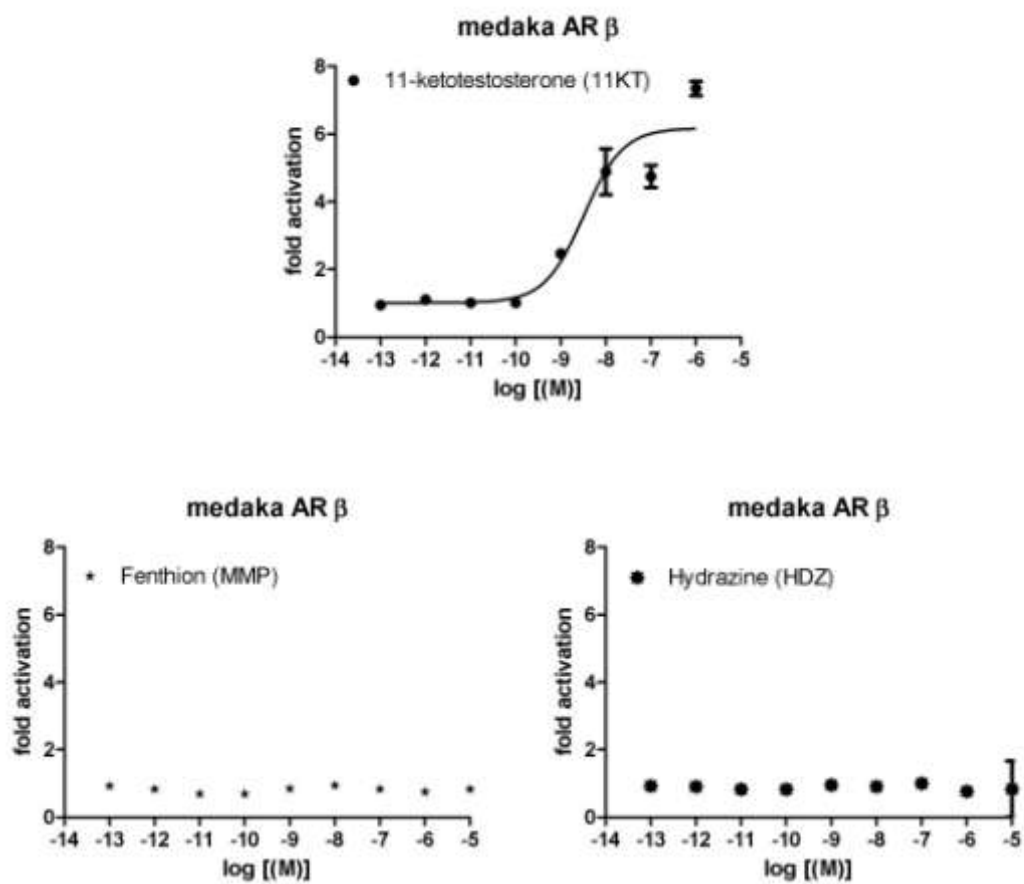


図3 各被験物質の転写活性 (メダカ AR $\beta$ )

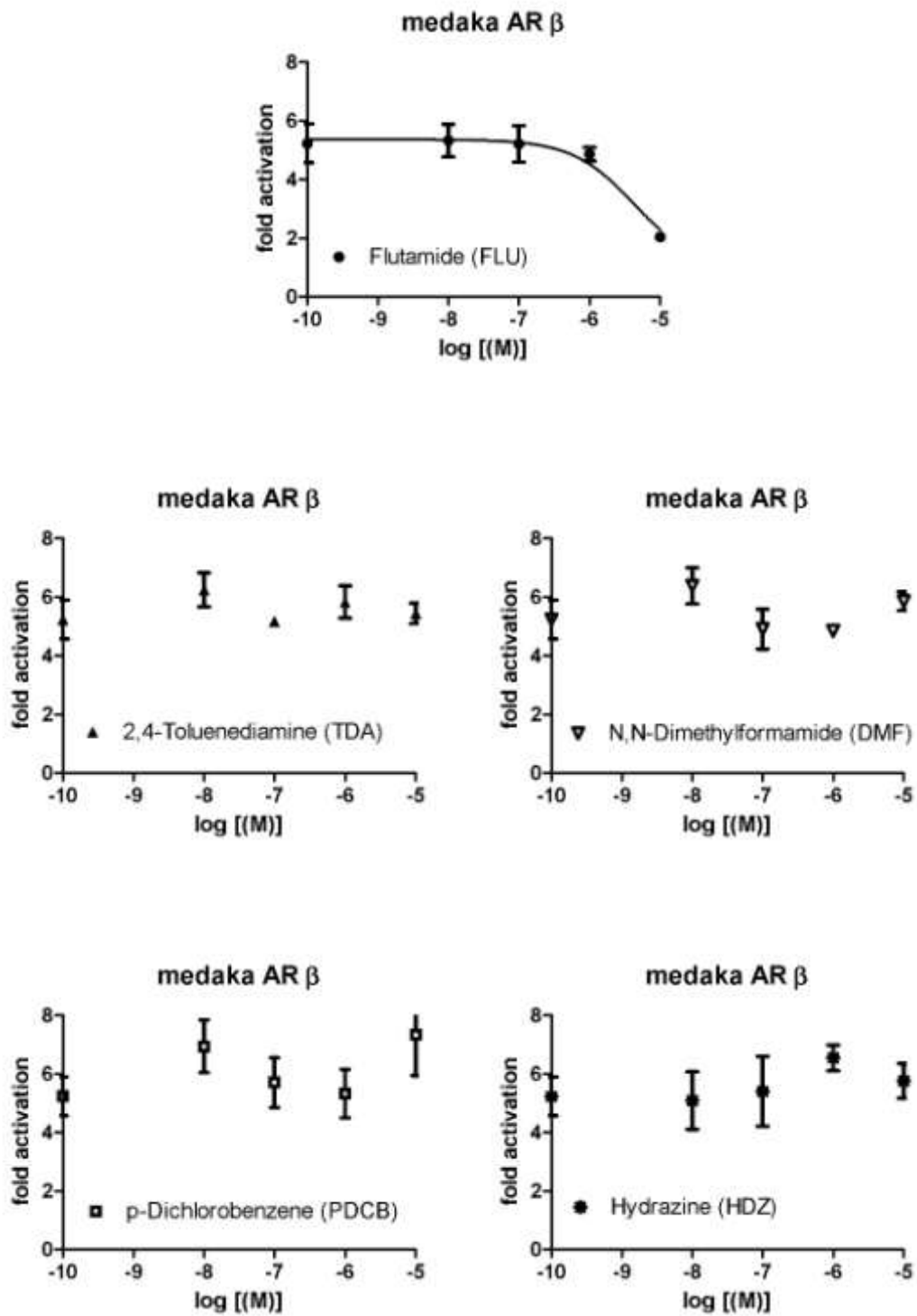


図4 11KT共存下における各被験物質の転写阻害活性 (メダカ AR $\beta$ )

#### 4. 引用文献

- 1) Katsu Y, Taniguchi E, Urushitani H, Miyagawa S, Takase M, Kubokawa K, Tooi O, Oka T, Santo N, Myburgh J, Matsuno A, Iguchi T. Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors. *Gen Comp Endocrinol.* 168, 220-230 (2010).
- 2) Katsu Y, Kubokawa K, Urushitani H, Iguchi T. Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen and androgen response elements. *Endocrinology* 151, 639-648 (2010).
- 3) Katsu, Y., S. Kohno, S. Hyodo, S. Ijiri, S. Adachi, A. Hara, L.J. Guillette, T. Iguchi, T, Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish. *Endocrinology* 149, 6300-6310 (2008).
- 4) Katsu Y, Hinago M, Sone K, Urushitani H, Guillette LJ Jr, Iguchi T. *In vitro* assessment of transcriptional activation of the estrogen and androgen receptors of mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*. *Mol Cell Endocrinol.* 276, 10-17 (2007).
- 5) Katsu Y, Lange A, Urushitani H, Ichikawa R, Paull GC, Cahill LL, Jobling S, Tyler CR, Iguchi T. Functional associations between two estrogen receptors, environmental estrogens, and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*). *Environ Sci Technol.* 41, 3368-3374 (2007).
- 6) Katsu Y., S. Kohno, T. Oka, N. Mitsui, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, Y. Fukumoto, K. Kuwahara, K. Ashikaga, S. Minami, Y. Ohta, S. Kato, L.J. Guillette, T. Iguchi, Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ , ESR1) of Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257-258, 84-94 (2006).
- 7) Katsu Y, Bermudez DS, Braun EL, Helbing C, Miyagawa S, Gunderson MP, Kohno S, Bryan TA, Guillette LJ Jr, Iguchi T. Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen Comp Endocrinol.* 136, 122-33(2004).



### フェンチオンの試験結果について

フェンチオンについては、抗エストロゲン作用の検出を目的に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を実施したが、その結果において、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$  で E2 共存下での転写活性に上昇が認められた。そのため、参考としてフェンチオンについてエストロゲン作用検出系での試験を実施した。

その結果、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$  で転写活性の上昇がみられた (図 1)。この試験結果において EC<sub>50</sub> は算出できなかったが、PC<sub>10</sub> は  $3.2 \times 10^{-6} \text{M}$ 、その相対活性比 (E2 の EC<sub>10</sub> に対する相対比) は 0.00041% であった (表 1)。なお、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$  では細胞毒性が認められた。

表 1 フェンチオンの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結果 (参考)

被験物質	メダカエストロゲン受容体 $\alpha$ 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	
	EC <sub>10</sub> (M)	Relative potency (%)	IC <sub>50</sub> (M)	Relative potency (%)
フェンチオン	NA (PC <sub>10</sub> = $3.2 \times 10^{-6}$ )	0.00041		
17 $\beta$ エストラジオール	$1.3 \times 10^{-11}$	100		

NA: 試験濃度範囲において転写活性又は転写阻害活性は認められたが、EC<sub>50</sub> 又は IC<sub>50</sub> が算出できなかったことを示す。

PC<sub>10</sub>: 陽性対照物質の最大転写活性の 10% 値相当の転写活性を示す濃度。

■: 試験対象外

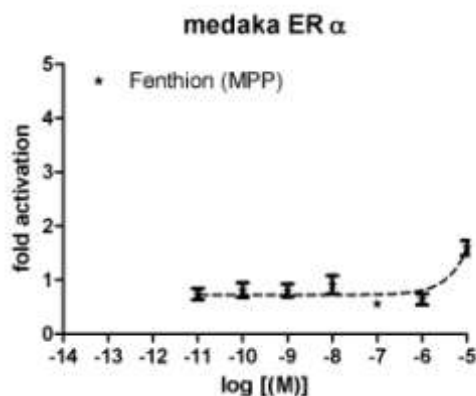


図 1 フェンチオンの転写活性 (メダカ ER $\alpha$ )





今回実施したレポータージーン試験について

レポータージーン試験は、ホルモン受容体発現ベクターと目的とするホルモン（受容体）応答配列の下流にレポーター遺伝子（ホタルルシフェラーゼ遺伝子等）を人為的に組み込んだプラスミドベクター（試験レポーターベクター）を細胞内に導入し、被験物質が受容体へ結合したときに生体内のホルモンと同様のメカニズムで発現する遺伝子産物の量（酵素活性）を化学発光法によって検出する試験法である。これによりホルモン受容体を介した化学物質の転写活性を推定することができる。

本試験で使用したアッセイシステム（Dual-Luciferase® Reporter Assay System, プロメガ社）では、ウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだコントロールレポーターベクターを、試験レポーターベクターと同時に細胞へ導入することによって、ベクターの細胞への導入効率やウェル間の細胞数の違いを標準化することができる。

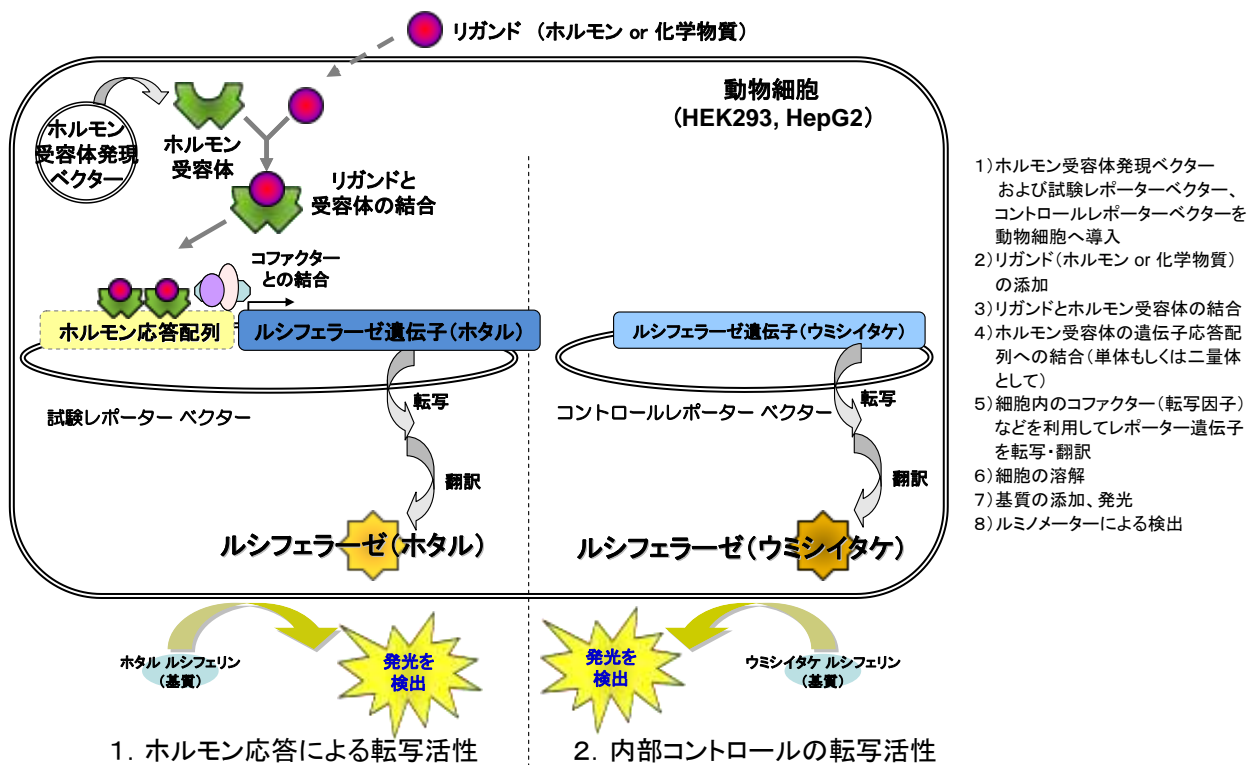


図1 今回実施したレポータージーン試験の原理