

第 1 段階試験管内試験の安定化に係る検討について

今回採用した第 1 段階試験管内試験について、試験結果の再現性を確保するため、共通の試験条件の下で、複数試験機関の間で検証試験を実施する必要性が指摘されていた。また、同一の試験機関で実施した試験結果においても、陽性対照物質の転写活性化倍率にばらつきが認められたため、試験の安定化についての検討の必要性も指摘されていた。

平成 23 年度に実施した試験結果の安定化に係る検討結果を以下にまとめた。

1. メダカエストロゲン受容体 α (ER α) レポータージーン試験

本試験は、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞に、メダカの ER α 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レポータージーン試験である。

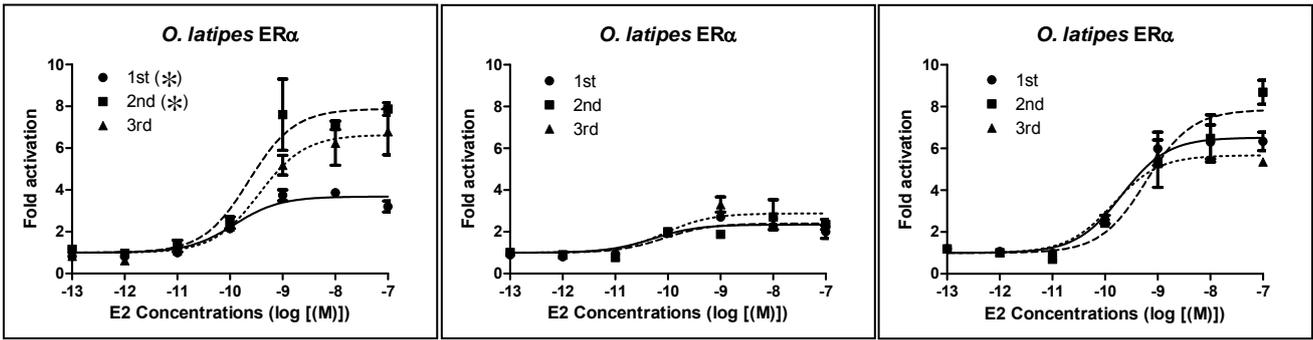
(1) エストロゲン作用検出系 (17 β -エストラジオール : E2)

同一の試験機関で実施した平成 22 年度の試験結果 (参考資料 1) では、陽性対照物質 (E2) の転写活性化倍率の最大値は約 4 であり、23 年度の試験結果 (参考資料 2) では約 8 であった。

これらを踏まえ、23 年度に、22 年度及び 23 年度に試験を実施した試験機関 (Lab. 1) を含む 3 試験機関により検証試験を実施した。

その結果、陽性対照物質 (E2) の転写活性化倍率の最大値は、Lab. 1 : 6.6 (1 試験)、Lab. 2 : 2.3~2.9 (3 試験)、Lab. 3 : 5.7~7.9 (3 試験) であり、同一試験機関内の結果は安定していたが、試験機関間で値に開きがあった。このうち、最大値が最も低かった Lab. 2 において、試験に用いる細胞の状態を改良 (継代期間は 3 か月未満 (継代数は 12 回) とし、増殖率は 1 週間に 20~30 倍 (10cm シャーレに 5×10^5 細胞を撒いて、1 週間後に 1×10^7 細胞以上) で培養) し、再試験を行ったところ、最大値は 4.2~6.5 (3 試験) となり、安定化の傾向が認められた。

検証試験の結果



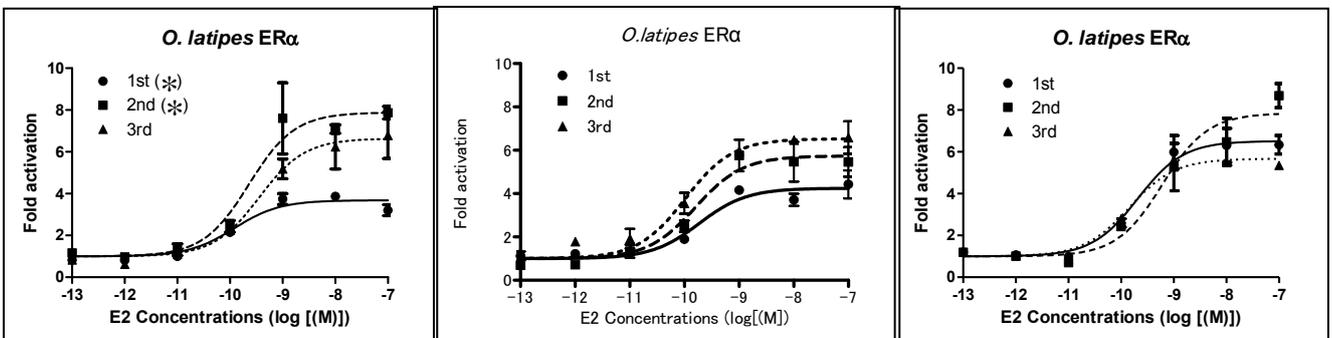
Lab.1

Lab. 2

Lab.3

(注)グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

再試験(Lab. 2)の結果



Lab.1

Lab. 2 (再)

Lab.3

(注)グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

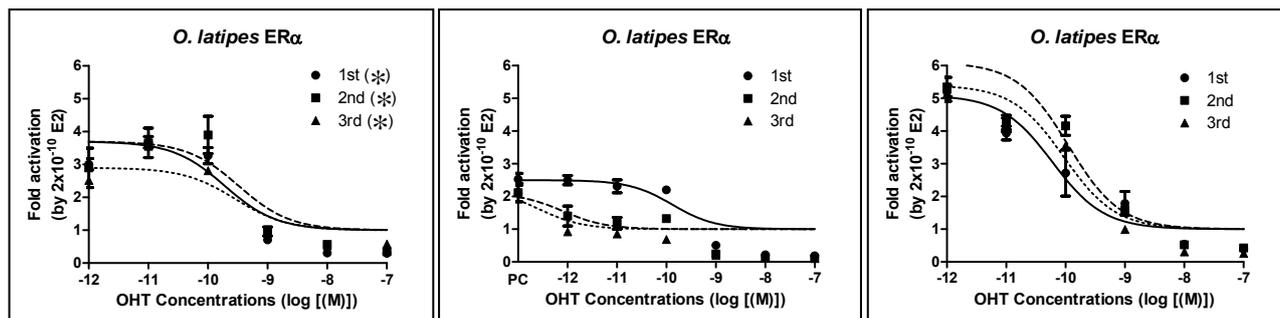
(2) 抗エストロゲン作用検出系 (E2 : 2×10^{-10} M)

同一の試験機関で実施した平成 22 年度の試験結果 (参考資料 1) では、陽性対照物質 (E2) の転写活性化倍率が、約 2 (2 試験) と約 4 (4 試験) であり、23 年度の試験結果 (参考資料 2) では、約 4~4.5 (3 試験) と約 2.5~3.5 (6 試験) であった。

これらを踏まえ、23 年度に、2 試験機関により検証試験 (4-ヒドロキシタモキシフェンによる E2 の転写活性化阻害) を実施した。

その結果、陽性対照物質 (E2) の転写活性化倍率は、Lab. 2 : 2.1~2.5 (3 試験)、Lab. 3 : 5~6 (3 試験) であり、同一試験機関内の結果は安定していたが、試験機関間で値に開きがあった。このうち、転写活性化倍率が低かった Lab. 2 において、(1)と同様の、試験に用いる細胞の状態を改良して再試験を行ったところ、最大値は 2.0~4.6 (3 試験) となり、安定化の傾向が認められた。

検証試験の結果



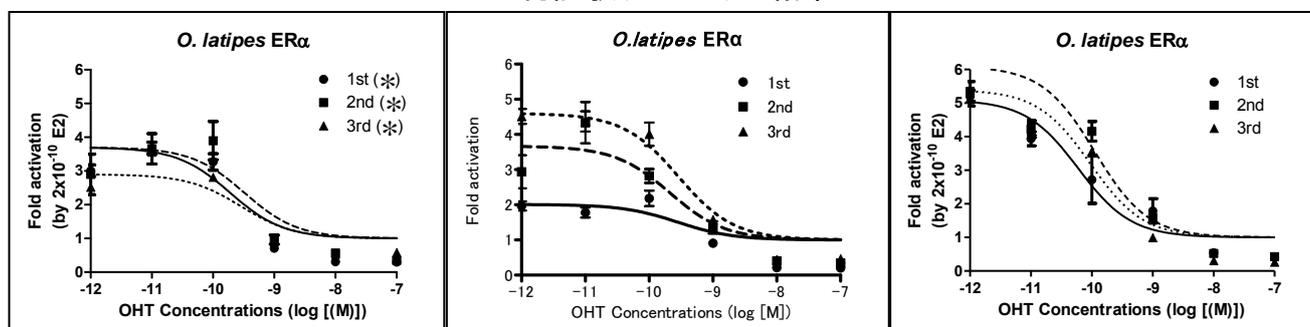
Lab.1(参考)

Lab. 2

Lab.3

(注)グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

再試験(Lab. 2)の結果



Lab.1(参考)

Lab. 2(再)

Lab.3

(注)グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

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

本試験は、ヒト肝がん細胞由来の HepG2 細胞 (5×10^4 細胞/well) に、メダカの AR β 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 (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レポーター遺伝子試験である。

(1) アンドロゲン作用検出系 (11-ケトテストステロン : 11KT)

同一の試験機関で実施した平成 22 年度の試験結果 (参考資料 1) では、陽性対照物質 (11KT) の転写活性化倍率の最大値は約 6 であり、23 年度の試験結果 (参考資料 2) では約 8 であった。

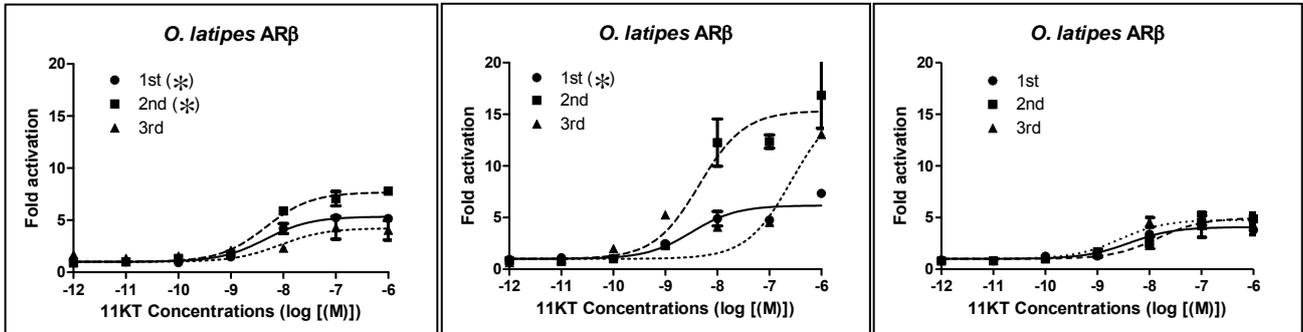
これらを踏まえ、23 年度に、22 年度及び 23 年度に試験を実施した試験機関 (Lab. 1) を含む 3 試験機関により検証試験を実施した。

その結果、陽性対照物質 (11KT) の転写活性化倍率の最大値は、Lab. 1 : 4.2 (1 試験)、Lab. 2 : 15.3~16.2 (3 試験)、Lab. 3 : 4.1~4.8 (3 試験) であり、同一の試験機関

内の結果は安定していたが、試験機関間で値に開きがあった。

本検出系についても、試験に用いる細胞の状態について今回エストロゲン作用検出系で行った改良を実施することにより、安定化するものと期待される。

検証試験の結果



Lab.1

Lab. 2

Lab.3

(注)グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

(2) 抗アンドロゲン作用検出系(11KT : 1×10^{-8} M)

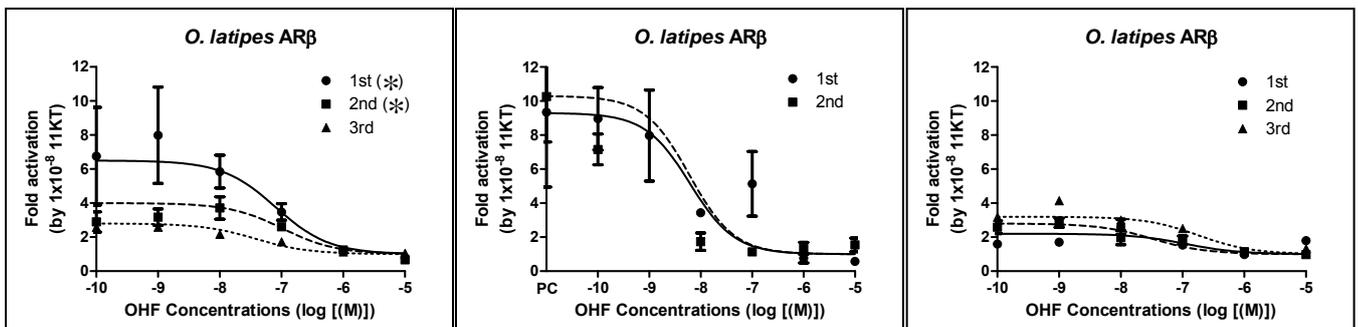
同一の試験機関で実施した平成 22 年度の試験結果 (参考資料 1) では、陽性対照物質 (11KT) の転写活性化倍率が約 5 (5 試験) であり、23 年度の試験結果 (参考資料 2) では約 4~9 (9 試験) と約 3.5~4 (2 試験) であった。

これらを踏まえ、23 年度に、22 年度及び 23 年度に試験を実施した試験機関 (Lab. 1) を含む 3 試験機関により検証試験 (ヒドロキシフルタミドによる 11KT の転写活性化阻害) を実施した。

その結果、陽性対照物質 (11KT) の転写活性化倍率は、Lab. 1 : 2.6 (1 試験)、Lab. 2 : 9.3~10.3 (2 試験)、Lab. 3 : 2.2~3.2 (3 試験) であり、同一の試験機関内の結果は安定していたが、試験機関間で値に開きがあった。

本検出系についても、試験に用いる細胞の状態について今回エストロゲン作用検出系で行った改良を実施することにより、安定化するものと期待される。

検証試験の結果



Lab.1

Lab. 2

Lab.3

(注)グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

3. ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポーター遺伝子試験

本試験は、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞 (5×10^4 細胞/well) に、ニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の TR β を発現するベクター、TR 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 (TRE-minP-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レポーター遺伝子試験である。

(1) 甲状腺ホルモン作用検出系 (トリヨード-L-サイロニン : T3)

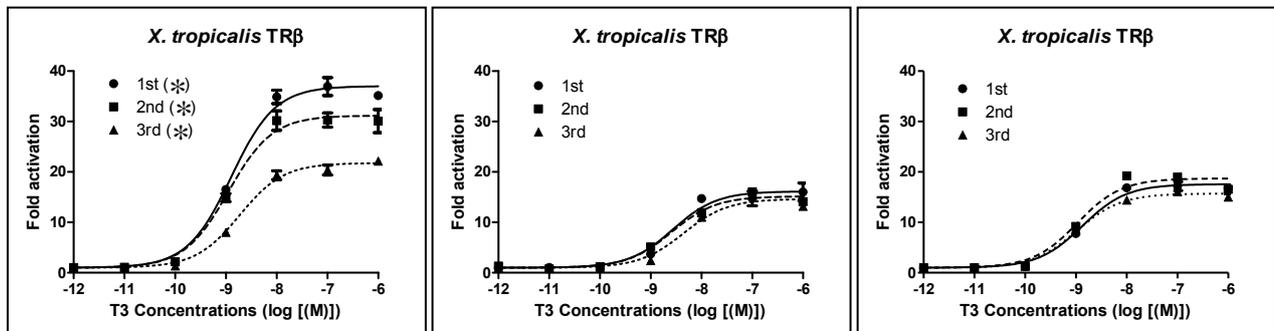
平成 23 年度の試験結果 (参考資料 2) では、陽性対照物質 (T3) の転写活性化倍率の最大値は約 24 であった。

23 年度に、2 試験機関により検証試験を実施した。

その結果、陽性対照物質 (T3) の転写活性化倍率の最大値は、Lab. 2 : 14.7~16.1 (3 試験)、Lab. 3 : 15.7~18.7 (3 試験) であり、同一試験機関内の結果は安定していたが、試験機関間で値に開きがあった。

本検出系についても、試験に用いる細胞の状態について今回エストロゲン作用検出系で行った改良を実施することにより、安定化するものと期待される。

検証試験の結果



Lab.1(参考)

Lab. 2

Lab.3

(注) グラフの星印(*)は、別途環境省が発注した業務において実施された試験結果を活用したものである。

(2) 抗甲状腺ホルモン作用検出系 (T3 : 2×10^{-8} M)

平成 23 年度の試験結果 (参考資料 2) では、陽性対照物質 (T3) の転写活性化倍率は約 10~約 15 (3 試験) であった。

本検出系についても、試験に用いる細胞の状態について今回エストロゲン作用検出系で行った改良を実施することにより、安定化するものと期待される。

4. 今後の対応について（案）

（1）細胞の培養方法の改良

試験に用いる細胞の安定化のため、以下の方法で細胞の培養方法を改良する。

- ・ 継代期間は、3 か月未満（継代数は 12 回）とする。
- ・ 増殖率は、1 週間に 20～30 倍とする。

（10cm シャーレに 5×10^5 細胞を撒き、1 週間後に 1×10^7 細胞以上）

（2）試験の成立条件

エストロゲン作用及びアンドロゲン作用について、アゴニスト作用系の試験では、当面「陽性対照物質の最大転写活性化倍率が 4 以上」を試験の成立条件とし、基本的にはこれを満たす試験結果を採用することとする。アンタゴニスト系の試験では、当面「陽性対照物質のみを添加した条件での転写活性化倍率が 3 以上」を試験の成立条件とし、基本的にはこれを満たす試験結果を採用することとする。

甲状腺ホルモン作用については、試験の成立条件として上記より高い転写活性化倍率の値を採用することが考えられる。当面は今回の検討を踏まえ注意深く試験を行い、その結果の採否についても十分な検討を行うこととし、知見の集積を待って試験の成立条件を設定することとする。

（3）プロトコールの整備

今回実施した試験のプロトコールについては、試験結果の報告資料ごとに記載されている（参考資料 1、参考資料 2）。

今後は、独立したプロトコールを別途作成し、4.（1）、（2）の改良点や試験実施上の留意点等を追加記載していくこととする。