

参考資料 2

EXTEND2010 に基づく平成 23 年度第 2 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会

資料 3-2 (一部修正)

平成 23 年度第 1 段階試験管内試験の実施結果について

1. 試験対象物質及び作用モード

資料 3-1 「表 2 第 1 段階試験群として実施する試験管内試験」に基づき、これまでの信頼性評価において「試験対象となり得る物質」された物質のうち、下記表 1 に示した物質及び作用モードについて、それぞれ試験管内試験を実施した。

表 1 試験対象物質及び作用モード

試験対象物質	試験対象とした作用モード				
	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	抗甲状腺ホルモン作用
エストロン	○				
フェンチオン				○	
カルバリル	○	○		○	○
カルボフラン	○			○	
シアナジン		○			
ジウロン		○		○	
ジクロルボス				○	
ジクロロプロモメタン	○	○	○	○	
ダイアジノン	○	○	○	○	
フェニトイン		○	○		○
フェニトロチオン			○	○	
ペルフルオロオクタン酸	○	○	○	○	○
試験数 (合計 30 試験)	6 試験	7 試験	5 試験	9 試験	3 試験

2. レポータージーン試験について

(1) 実施したレポータージーン試験の原理

レポータージーン試験は、ホルモン受容体遺伝子及びレポーター遺伝子等の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適用した一過性発現細胞系を用いて行った。

(2) レポータージーン試験に用いるホルモン受容体の種類

各作用モードのレポータージーン試験に用いたホルモン受容体の生物種及びサブタイプを表2に示した。

表2 レポータージーン試験に用いたホルモン受容体の種類

作用モード	レポータージーン試験に用いた受容体	
	生物種	受容体の種類 (サブタイプ)
エストロゲン作用	メダカ	エストロゲン受容体 α
抗エストロゲン作用	メダカ	エストロゲン受容体 α
アンドロゲン作用	メダカ	アンドロゲン受容体 β
抗アンドロゲン作用	メダカ	アンドロゲン受容体 β
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

3. 試験方法及び条件

レポータージーン試験は、OECD の TG455 (Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogen Agonist-Activity of Chemicals) 及び Draft TG (Stably Transfected Human Androgen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist/Antagonist Activity of Chemicals) も参考に、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方法及び条件に準じて、以下の方法及び条件により実施した。なお、試験方法及び条件等の詳細については別添に示した。

(1) 被験物質 (供試試薬)

試験には、純度 98% 以上の試薬を用いた。なお、各被験物質は、培地に添加するために溶媒 (ジメチルスルホキシド) に溶解して使用した。

(2) 陽性対照物質

各作用モードの試験では、試験対象物質とは別に表3に示す陽性対照物質による試験 (確認試験) を並行して実施し、適切な EC₅₀ 値又は IC₅₀ 値が得られること (試験が適切に実施されたこと) を確認した (ただし、抗甲状腺ホルモン作用については、現時点で適当な陽性対照物質がないことから今回は確認試験を実施しなかった)。

陽性対照物質についても、試験には純度 98% 以上の試薬を用いた。

表3 陽性対照物質

作用モード	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
抗アンドロゲン作用	2-ヒドロキシフルタミド

(3) 試験濃度

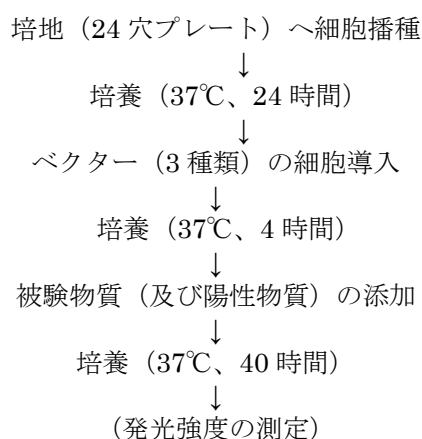
各試験対象物質について、別途、培地への溶解度や試験に使用する動物細胞に対する毒性を調べた。その結果、培地への溶解が可能で、かつ動物細胞に毒性を示さないと判断された濃度を試験最高濃度 ($1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 又は $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$) として、公比 10 で希釈した 5 濃度を試験濃度とした。

また、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試験において、試験系に共添加する陽性物質 (17βエストラジオール、11-ケトテストステロン、3,3',5-トリヨード-L-チロニン) の添加濃度は、それぞれの EC₅₀ 値に相当する $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $2 \times 10^{-9} \text{M}$ とした。

(4) 試験の手順及び条件等

各作用モードのレポータージーン試験は、以下の手順により表4に示した条件で実施した。

試験細胞系の培養 (ばく露)



発光強度の測定

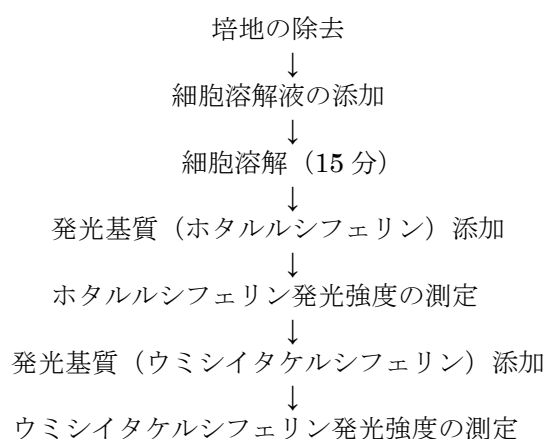


表4 レポーター遺伝子試験の条件

	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	抗甲状腺ホルモン作用
細胞株	HEK293		HepG2		HEK293
受容体発現ベクター	medaka ER alpha/pcDNA		medaka AR beta/pcDNA		<i>tropicalis</i> TR beta/pcDNA
試験レポーターベクター	ERE-TK-Luc		MMTV-Luc		TRE-minP-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 含有)				
試験環境	37°C、5%CO ₂				
細胞播種数	5×10 ⁴ 細胞/well				
連数	3well/濃度				
試験液量	1 mL/well				
溶媒終濃度	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%

(5) データ解析

アゴニスト検出系の試験（エストロゲン作用及びアンドロゲン作用の試験）については、被験物質の濃度区の転写活性化倍率に陰性対照区と比較して有意な用量依存的反応（転写活性化倍率の上昇）が認められた場合に、非線形回帰モデルにより EC₅₀ 値（最大転写活性の 50%の転写活性を示す濃度）を算出した（図1）。ただし、算出された EC₅₀ 値が試験最高濃度より高濃度であった場合は、適切な EC₅₀ 値が得られなかったと判断し、別途、参考値として、陽性対照物質（PC）の最大転写活性の 10%値相当の転写活性を示す濃度（PC₁₀）を転写活性化倍率が 10%値をまたぐ2点を用いて直線回帰式から算出した。

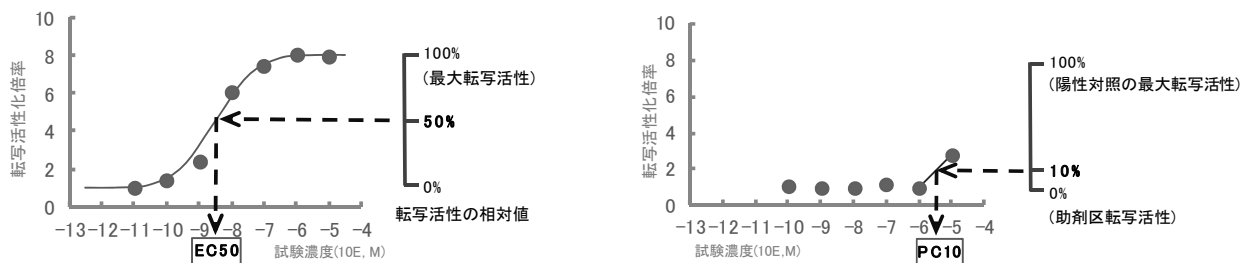


図1 アゴニスト検出系の試験での EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値の算出

アンタゴニスト検出系の試験（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試験）については、被験物質の各濃度の転写活性化倍率に陽性対照区と比較して有意な濃度依存的な転写活性化倍率の低下が認められ、かつ、少なくとも試験最高濃度において転写活性化倍率が陽性対照区の 50%未満であった場合に、非線形回帰モデルにより IC₅₀ 値（陽性物質の転写活性を 50%阻害する濃度）を算出した（図 2）。試験最高濃度での転写活性化倍率に陽性対照区の 30%以上の阻害がみられた場合には、参考値として陽性対照物質の転写活性化倍率の 30%相当の転写活性阻害を示す濃度（lin.IC₃₀）を転写活性化倍率が 30%値をまたぐ 2 点を用いて直線回帰式（linear regression）から算出した。

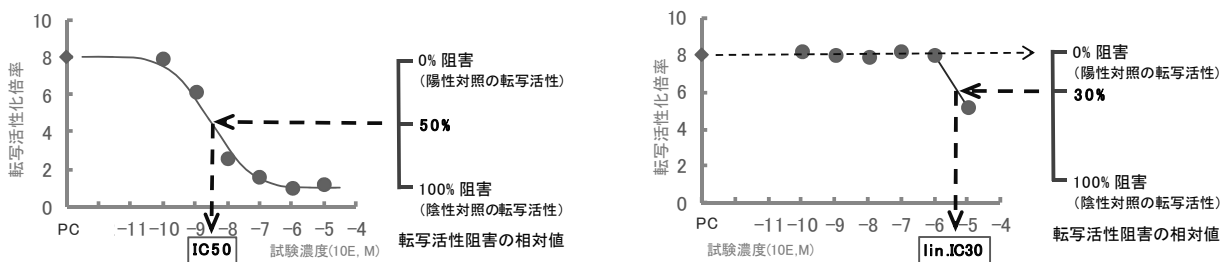


図 2 アンタゴニスト検出系の試験での IC₅₀ 値及び lin.IC₃₀ 値の算出

なお、アゴニスト検出系試験において EC₅₀ 値又は PC₁₀ 値が算出された物質及びアンタゴニスト検出系試験において IC₅₀ 値又は lin.IC₃₀ 値が算出された物質については、それらを基に陽性対照物質に対する相対活性比（Relative Potency）を算出した。

4. 結果

メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験では、エストロゲン作用に関しては、エストロンにおいて転写活性化倍率に濃度依存的な上昇がみられた。EC₅₀ 値は 5.4×10^{-9} M、相対活性比は 17 β エストラジオール（E2）の 4.3×10^{-2} であった。また、ダイアジノンにおいて試験最高濃度で転写活性倍率の上昇がみられた。PC₁₀ 値は 1.0×10^{-5} M、相対活性比は E2 の 2.1×10^{-6} であった。抗エストロゲン作用に関しては、シアナジン及びフェニトインにおいて転写活性化倍率に濃度依存的低下がみられた。それぞれの IC₅₀ 値は 5.2×10^{-7} M 及び 1.7×10^{-6} M、相対活性比は 4-ヒドロキシタモキシフェンの 5.3×10^{-4} 及び 1.6×10^{-4} であった。

メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験では、アンドロゲン作用に関しては、試験濃度範囲において転写活性がみられた物質はなかった。抗アンドロゲン作用に関しては、ジクロロブロモメタン、ダイアジノン、フェニトロチオン及びペルフルオロオクタン

酸において転写活性化倍率に濃度依存的低下がみられた。それぞれの IC₅₀ 値は 2.9×10⁻⁸ M、2.7×10⁻⁹M、2.0×10⁻⁹M及び 1.9×10⁻⁸M、相対活性比は 2-ヒドロキシフルタミド (HF) の 2.8、29.8、39.8 及び 4.4 であった。また、カルバリル、カルボフラン及びジウロンにおいて、試験最高濃度で転写活性倍率の低下がみられた。それぞれの lin.IC₃₀ 値は 2.9×10⁻⁶M、3.0×10⁻⁵M及び 4.8×10⁻⁶M、相対活性比は HF の 9.1×10⁻³、8.9×10⁻⁴ 及び 5.5×10⁻³ であった。フェンチオン、ジクロロボス及びフェニトインについては、試験濃度範囲において、メダカアンドロゲン受容体 β 遺伝子の転写活性又は転写阻害活性はみられなかった。

ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポータージーン試験では、抗甲状腺ホルモン作用に関して、フェニトインにおいて試験最高濃度でわずかに転写活性倍率の低下がみられた。lin.IC₃₀ 値は 6.3×10⁻⁵Mであった。

表5 メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験の結果

被験物質	メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験			
	エストロゲン作用		抗エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 値(M)	相対活性比	IC ₅₀ 値(M)	相対活性比
エストロン	5.4×10 ⁻⁹	4.3×10 ⁻²		
カルバリル	得られなかった	—	得られなかった	
カルボフラン	得られなかった	—		
シアナジン			6.1×10 ⁻⁷	5.3×10 ⁻⁴
ジウロン			得られなかった	—
ジクロプロモメタン	得られなかった	—	得られなかった	—
ダイアジノン	(PC ₁₀ =1.0×10 ⁻⁵)	2.1×10 ⁻⁶	得られなかった	—
フェニトイン			2.1×10 ⁻⁶	1.6×10 ⁻⁴
ペルフルオロオクタン酸	得られなかった	—	得られなかった	—
(陽性対照物質)				
17βエストラジオール	2.3×10 ⁻¹⁰ (PC ₁₀ =2.2×10 ⁻¹¹)	1		
4-ヒドロキシタモキシフェン			(試験 1) 3.3×10 ⁻¹⁰ (試験 2) 2.8×10 ⁻¹⁰	1

■ : 試験対象外

表6 メダカアンドロゲン受容体β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β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 ₅₀ 値(M)	相対活性比	IC ₅₀ 値(M)	相対活性比
フェンチオン			得られなかった	—
カルバリル			(lin.IC ₃₀ =2.9×10 ⁻⁶)	9.1×10 ⁻³
カルボフラン			(lin.IC ₃₀ =3.0×10 ⁻⁵)	8.9×10 ⁻⁴
ジウロン			(lin.IC ₃₀ =4.8×10 ⁻⁶)	5.5×10 ⁻³
ジクロルボス			得られなかった	—
ジクロロプロモメタン	得られなかった	—	2.9×10 ⁻⁸	2.8
ダイアジノン	得られなかった	—	2.7×10 ⁻⁹	29.8
フェニトイン	得られなかった	—		
フェニトロチオン	得られなかった	—	2.0×10 ⁻⁹	39.8
ペルフルオロオクタン酸	得られなかった	—	1.9×10 ⁻⁸	4.4
(陽性対照物質)				
11-ケトテストステロン	4.7×10 ⁻⁹	1		
2-ヒドロキシフルタミド			(試験1) 8.2×10 ⁻⁸ (lin.IC ₃₀ =2.7×10 ⁻⁸) (試験2) 1.0×10 ⁻⁷ (lin.IC ₃₀ =3.4×10 ⁻⁸)	1

：試験対象外

表7 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の結果

被験物質	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			
	甲状腺ホルモン作用		抗甲状腺ホルモン作用	
	EC ₅₀ 値(M)	相対活性比	IC ₅₀ 値(M)	相対活性比
カルバリル			得られなかった	—
フェニトイン			(lin.IC ₃₀ =6.3×10 ⁻⁵)	—
ペルフルオロオクタン酸			得られなかった	—
(陽性対照物質)				
3,3',5'-トリヨード-L-チロニン	1.9×10 ⁻⁹	—		

：試験対象外

参考 試験対象物質の主な用途

試験対象物質	主な用途
エストロン	女性ホルモンの代謝物質
フェンチオン	農薬（殺虫剤）
カルバリル	農薬（殺虫剤）
カルボフラン	殺虫剤、防虫剤（日本では農薬登録されていない）
シアナジン	農薬（除草剤）
ジウロン	農薬（除草剤）
ジクロルボス	農薬（殺虫剤）
ジクロロブロモメタン	水道水の殺菌時の副生成物
ダイアジノン	農薬（殺虫剤）
フェニトイン	医薬品（抗てんかん薬）
フェニトロチオン	農薬（殺虫剤）
ペルフルオロオクタン酸	フッ素ポリマー製造時の助剤

平成 23 年度第 1 段階試験管内試験（レポータージーン試験）結果について

1. 試験対象物質及び試薬

(1) 被験物質

試験対象物質及び後述の各試験に供した材料（試薬）の入手先及び純度等を表 1 に示した。

本試験に供した試薬（被験物質）は、すべて純度 98%以上であった。被験物質は、溶媒に 10^{-1} M で溶解したものを調製して -20°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	CAS No.	MW	入手先	純度
エストロン (Estrone)	53-16-7	270.37	Wako	100%
フェンチオン (Fenthion)	55-38-9	278.33	Wako	99.3%
カルバリル (Carbaryl)	63-25-2	201.22	Wako	99%
カルボフラン (Carbofuran)	1563-66-2	221.25	Wako	99.8%
シアナジン (Cyanazine)	21725-46-2	240.69	Wako	99.4%
ジウロン (Diuron)	330-54-1	233.09	Sigma	99.5%
ジクロロボス ((Dichlorvos)	62-73-7	220.98	Sigma	98.9%
ジクロロブロモメタン (Bromodichloromethane)	75-27-4	163.83	Sigma	98.3%
ダイアジノン (Diazinon)	333-41-5	304.35	Wako	99.6%
フェニトイン (Phenytoin)	57-41-0	252.27	Sigma	99%
フェニトロチオン (Fenitrothion)	122-14-5	277.23	Wako	99.1%
ペルフルオロオクタン酸 (Perfluorooctanoic Acid)	335-67-1	414.07	Sigma	96.9%

(2) 陽性対照物質

レポータージーン試験での各作用モードの陽性対照物質及び本試験に供した試薬の入手先及び純度等を表 2 に示した。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°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 (略号)	CAS No.	MW	入手先	純度
エストロゲン作用	17 β エストラジオール (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 (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 (11KT)	564-35-2	302.4	Sigma	\geq 98%
抗アンドロゲン作用	2-ヒドロキシフルタミド (HF)	13311-84-7	276.2	Sigma	100%
甲状腺ホルモン作用	3,3',5'-トリヨード-L-チロニン (T3)	6893-02-3	650.9	Sigma	>99%

2. 試験濃度

試験濃度の設定にあたり、各試験対象物質について、予備実験を行い培地への溶解性（試験物質の添加により沈殿を生じないこと）及び試験に使用する動物細胞（HEK293 及び HepG2）に対する毒性を調べた。レポータージーン試験と同様の手順により各試験対象物質を $1.0 \times 10^{-3} \sim 10^{-6}$ M の濃度範囲で培地に添加し、40 時間後に顕微鏡下で観察し培地中の沈殿の有無により溶解性を確認した。さらに各ウェルに alamarBlue® 生細胞試薬（Invitrogen 社）を加え、37°C でインキュベート（1 時間）したのち、570nm 及び 600nm での吸光度を測定した。alamarBlue® 生細胞試薬は、レサズリンを有効成分とし、生細胞内に取り込まれると赤色で強い蛍光を発するレゾルフィンに還元され、その吸光度（又は蛍光強度）を測定することにより生細胞数を定量的に評価できる。各試験対照物質について、吸光度が対照区に対して 20% 以上低下した濃度については動物細胞に対する毒性を示したと判断した。

以上の予備検討の結果を基に、表 3 に示した培地への溶解が可能で、かつ動物細胞に毒性を示さない最も高い濃度を試験での最高濃度とする 5 濃度（公比 10）を試験濃度とした。

表 3 設定試験濃度

		予備検討結果				設定試験濃度
		10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	
エストロン	沈殿形成	+	+	-	-	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HEK293)	- (91%)	- (92%)	- (95%)	- (95%)	
フェンチオン	細胞毒性 (HepG2)	- (102%)	- (100%)	- (102%)	- (111%)	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	沈殿形成	+	+	-	-	
カルバリル	細胞毒性 (HEK293)	- (97%)	- (91%)	- (100%)	- (100%)	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HepG2)	- (93%)	- (93%)	- (100%)	- (97%)	
カルボフラン	沈殿形成	-	-	-	-	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
シアナジン	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-4} M ~ 10^{-8} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
ジウロン	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
ジクロロボス	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
ジクロロプロモメタン	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-4} M ~ 10^{-8} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
ダイアジノン	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
フェニトイン	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-4} M ~ 10^{-8} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
フェニトロチオン	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-5} M ~ 10^{-9} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	
ベルフルオロオクタン酸	細胞毒性 (HepG2)	+	+	-	-	10^{-4} M ~ 10^{-8} M
	細胞毒性 (HEK293)	+	+	-	-	

注) カッコ内の数値は、吸光度測定値 (570nm) の助剤対照に対する割合を示す。

また、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試験において、試験系に共添加する陽性物質（17β エストラジオール、11-ケトテストステロン、3,3',5'-トリヨード-L-チロニン）の添加濃度については、これまでに実施した試験結果を基にそれぞれの EC₅₀ 値に相当する 2×10^{-10} M（17β エストラジオール）、 1×10^{-8} M（11-ケトテストステロン）、 2×10^{-9} M（3,3',5'-トリヨード-L-チロニン）とした。

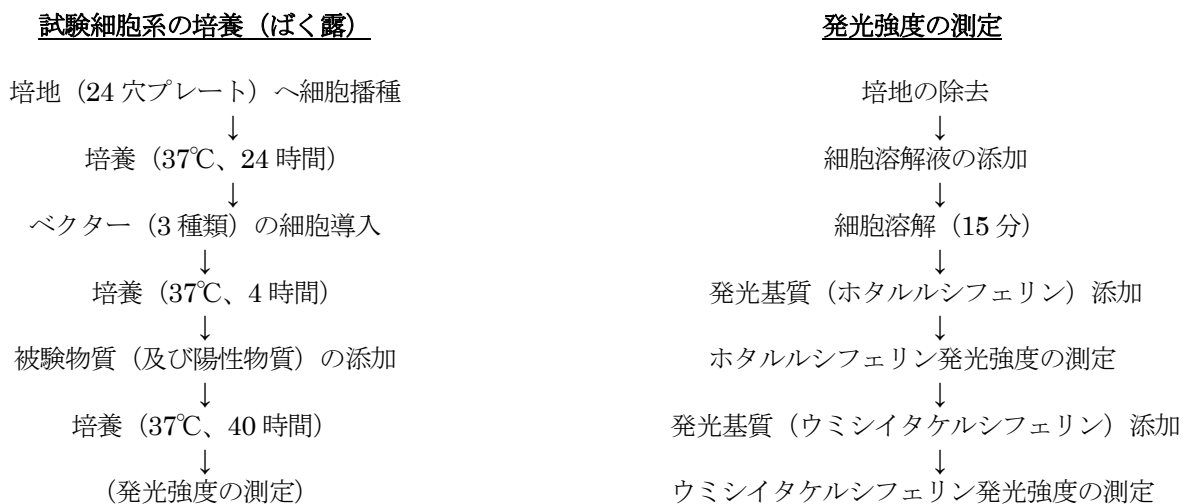
3. 試験方法

メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験（エストロゲン作用検出系及び抗エストロゲン作用検出系）、メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験（アンドロゲン作用検出系及び抗アンドロゲン作用検出系）及びニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポータージーン試験（抗甲状腺ホルモン作用検出系）を実施した。

各レポータージーン試験については、ホルモン受容体遺伝子及びレポーター遺伝子等の導入効率の変動を標準化できる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デュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を適用した一過性発現細胞系を用いた。また、試験の実施にあたっては、OECD の TG455 (Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogen Agonist-Activity of Chemicals) 及び Draft TG (Stably Transfected Human Androgen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist Agonist/Antagonist Activity of Chemicals) も参考に、既存文献の方法¹⁷⁾も参照した。

実施したデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を適用したレポータージーン試験の手順は以下のとおりである。また、各レポータージーン試験の条件は、表4に示すとおりであった。

デュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法によるレポータージーン試験の手順の概要



(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

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 (5×10^4 細胞/well) 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の upstream 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事前検討により設定した濃度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 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-13}$ 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 2×10^{-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事前検討により設定した濃度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 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ M (公比 10) となるように添加した。また、陽性対照区は、E2 (2×10^{-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、CO₂ 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 β (AR β) レポーター遺伝子試験

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 (5×10^4 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。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) アンドロゲン作用検出系

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事前検討により設定した濃度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) 抗アンドロゲン作用検出系

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 1×10^{-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事前検討により設定した濃度となるように添加した。陽性対照物質 (HF) 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 (1×10^{-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、CO₂ 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。

(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

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 (5×10^4 細胞/well) に、ニシツメガエル (*X. 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。導入試薬は Fugene 6 (プロメガ社) を用いた。ベクターの導入 4 時間後に下記に示す方法で被験物質等を添加した。

被験物質の濃度区は、DMSO に溶解させた T3 を培養液中に終濃度として 2×10^{-9} 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事前検討により設定した濃度となるように添加した。

また、陽性対照区は、T3 (2×10^{-9} 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。

なお、抗甲状腺ホルモン作用については、現時点で適切な陽性対照物質がないため、上記の試験と並行的に甲状腺ホルモン作用検出系の試験を実施して、適切な反応 (EC_{50}) が得られることを確認した。

被験物質 (又は陽性対照物質) の添加から 40 時間、 CO_2 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。

(4) データ解析

a) エストロゲン作用及びアンドロゲン作用の試験結果の解析

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 4 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_{50} 値 (最大転写活性の 50% の転写活性を示す濃度) を算出した。また、 EC_{50} 値が算出できなかった物質のうち、最高試験濃度における転写活性化倍率が陽性対照物質の最大転写活性の 10% 値を超えた場合には、10% 値をまたぐ 2 点の転写活性化倍率を用いて、直線回帰式 (linear regression) から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_{10}) を算出した。 EC_{50} 値又は PC_{10} 値が得られた被験物質については、並行的に実施した陽性対照物質 (E2 又は 11KT) での試験から得られた EC_{50} 値又は PC_{10} 値に対する相対活性比 (Relative potency) 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。

なお、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) での EC_{50} 値及び PC_{10} 値の算出法の概要を図 1 に示した。

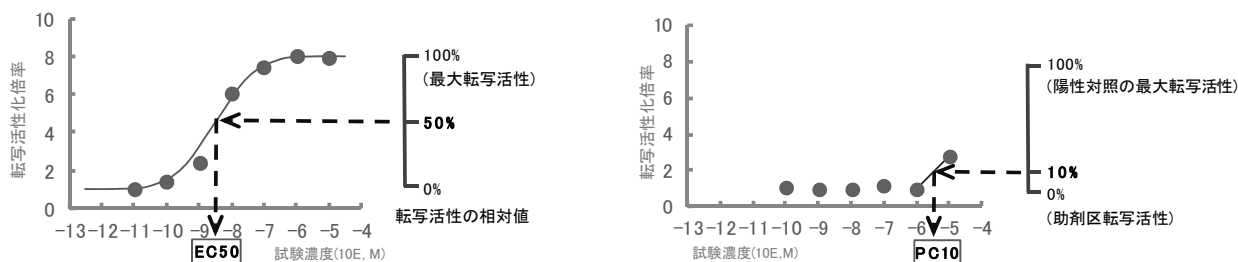


図 1 アゴニスト検出系の試験での EC_{50} 値及び PC_{10} 値の算出

b) 抗エストロゲン作用及び抗アンドロゲン作用の試験結果の解析

陽性対照区 (E2 又は 11KT のみを添加) の転写活性化倍率 (fold activation) 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 IC₅₀ 値（最大転写活性を 50%阻害を示す濃度）を算出した。また、IC₅₀ 値が算出できなかった物質のうち、最高試験濃度における転写活性化倍率に陽性対照区に比較して 30%以上の低下がみられた場合には、陽性対照区の転写活性化倍率の 70%値をまたぐ 2 点の転写活性化倍率を用いて、直線回帰式(linear regression)から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（lin.IC₃₀）を算出した。IC₅₀ 値又は lin.IC₃₀ 値が得られた被験物質については、陽性対照物質（OHT 又は HF）の IC₅₀ 値又は lin.IC₃₀ 値に対する相対活性比（Relative potency）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 α 又は AR β 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。

c) 抗甲状腺ホルモン作用の試験結果の解析

陽性対照区（T3 のみを添加）の転写活性化倍率（fold activation）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 IC₅₀ 値（最大転写活性を 50%阻害を示す濃度）を算出した。また、IC₅₀ 値が算出できなかった物質のうち、最高試験濃度における転写活性化倍率に陽性対照区に比較して 30%以上の低下がみられた場合には、陽性対照区の転写活性化倍率の 70%値をまたぐ 2 点の転写活性化倍率を用いて、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（lin.IC₃₀）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）被験物質がニシツメガエル TR β 遺伝子の転写阻害活性（抗甲状腺ホルモン作用）を示さなかったと結論した。なお、甲状腺ホルモン作用のレポーター遺伝子試験については、陽性対照物質での試験を実施しなかったため、IC₅₀ 値又は lin.IC₃₀ 値を算出した物質でもその相対活性比は算出しなかった。

なお、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（アゴニスト作用）での IC₅₀ 値及び lin.IC₃₀ 値の算出法の概要を図 2 に示した。

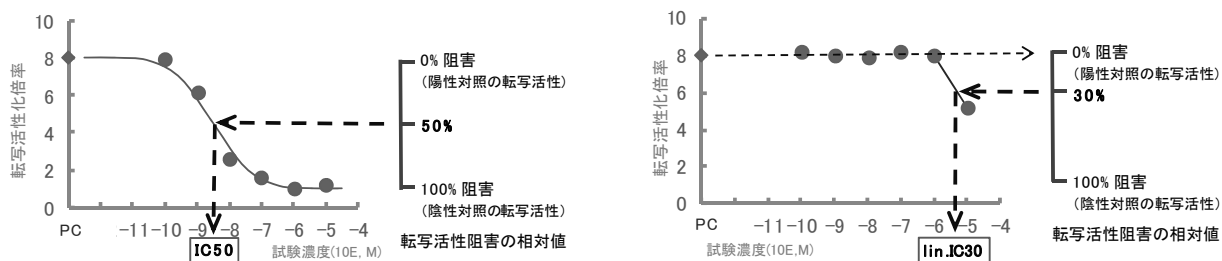


図 2 アンタゴニスト検出系の試験での IC₅₀ 値及び lin.IC₃₀ 値の算出

表4 レポータージーン試験の条件

	メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験		メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験		ニシツメガエル 甲状腺ホルモン受容体 β レポータージーン試験
	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	抗甲状腺ホルモン作用
細胞株	HEK293		HepG2		HEK293
受容体発現ベクター	medaka ER alpha/pcDNA		medaka AR beta/pcDNA		<i>tropicalis</i> TR beta/pcDNA
試験レポーターベクター	ERE-TK- <i>Luc</i>		MMTV- <i>Luc</i>		TRE-minP- <i>Luc</i>
コントロールレポーターベクター	pRL-TK- <i>Rluc</i>				
試験用培地	DMEM (2mM L-glutamine、10% FCS 含有)				
試験環境	37°C、5%CO ₂				
細胞播種数	5×10 ⁴ 細胞/well				
連数	3well/濃度				
試験液量	1 mL/well				
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%	0.2%
被験物質添加濃度 (試験濃度)	最高濃度 : 10 ⁻⁴ ~10 ⁻⁵ M、最低濃度 : 10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁹ M (公比 10)				
陽性物質及び共添加濃度	-	E2、2×10 ⁻¹⁰ M		11KT、1×10 ⁻⁸ M	T3、2×10 ⁻⁸ M
溶媒終濃度	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%

4. 結果

(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

メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験の結果をまとめて表 5 に示した。また、各試験の結果を図 3 及び図 4 に示した。

エストロゲン作用に関しては、エストロンにおいて転写活性化倍率に濃度依存的な上昇がみられた。その EC₅₀ 値は $5.4 \times 10^{-9} \text{M}$ 、相対活性比は 17β エストラジオール (E2) の 4.3×10^{-2} であった。また、ダイアジノンにおいて試験最高濃度で転写活性化倍率の上昇がみられた。その PC₁₀ 値は $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、相対活性比は E2 の 2.1×10^{-6} であった。他の 4 物質については、試験濃度範囲において、メダカエストロゲン受容体 α 遺伝子の転写活性はみられなかった。

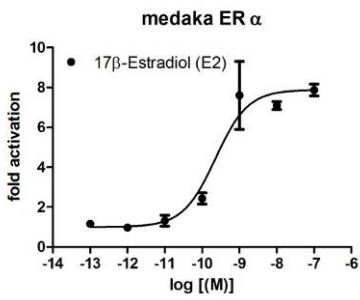
抗エストロゲン作用に関しては、シアナジン及びフェニトインにおいて転写活性化倍率に濃度依存的な低下がみられた。その IC₅₀ 値は、それぞれ $5.2 \times 10^{-7} \text{M}$ 及び $1.7 \times 10^{-6} \text{M}$ 、相対活性比は 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) の 5.3×10^{-4} 及び 1.6×10^{-4} であった。他の 5 物質については、試験濃度範囲において $2 \times 10^{-10} \text{M}$ の 17β エストラジオール共存下でのメダカエストロゲン受容体 α 遺伝子の転写阻害活性はみられなかった。

表 5 メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験の結果

被験物質	メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験			
	エストロゲン作用		抗エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 値(M)	相対活性比	IC ₅₀ 値(M)	相対活性比
エストロン	5.4×10^{-9}	4.3×10^{-2}		
カルバルル	得られなかった	—	得られなかった	
カルボフラン	得られなかった	—		
シアナジン			6.1×10^{-7}	5.3×10^{-4}
ジウロン			得られなかった	—
ジクロロプロモメタン	得られなかった	—	得られなかった	—
ダイアジノン	(PC ₁₀ = 1.0×10^{-5})	2.1×10^{-6}	得られなかった	—
フェニトイン			2.1×10^{-6}	1.6×10^{-4}
ペルフルオロオクタン酸	得られなかった	—	得られなかった	—
(陽性対照物質)				
17 β エストラジオール	2.3×10^{-10} (PC ₁₀ = 2.2×10^{-11})	1		
4-ヒドロキシタモキシフェン			(試験 1) 3.3×10^{-10} (試験 2) 2.8×10^{-10}	1

：試験対象外

(陽性対照物質)



(試験対象物質)

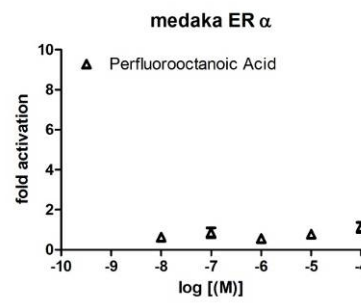
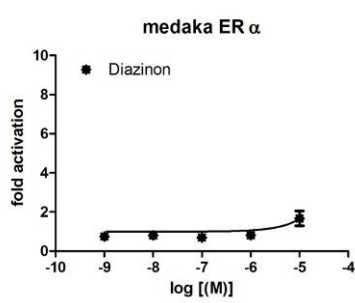
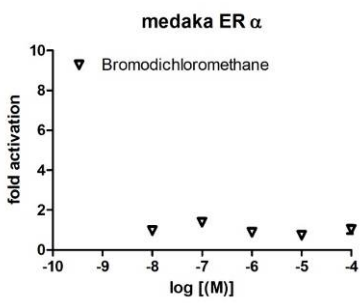
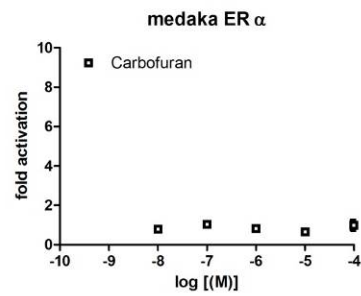
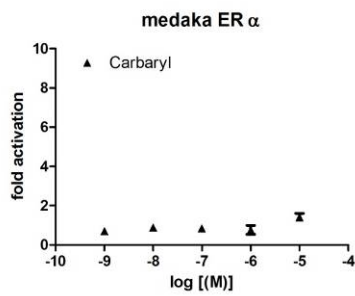
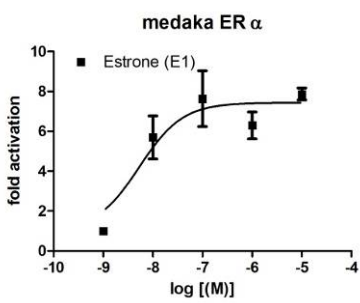


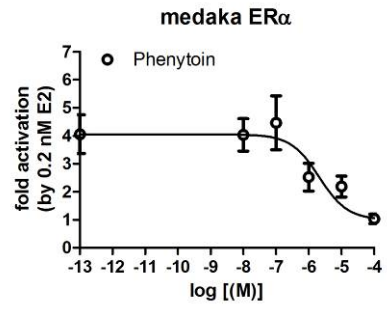
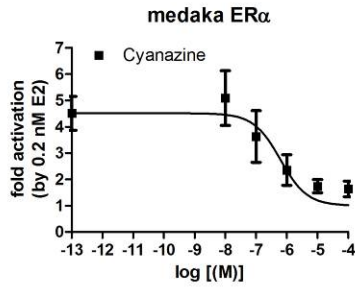
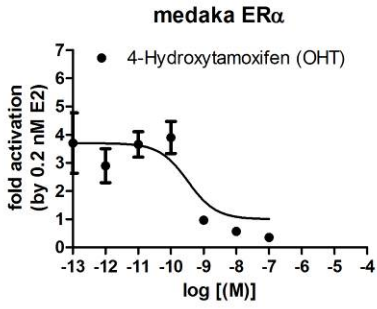
図3 各試験対象物質の転写活性 (メダカ ERα)

注) カルバリル及びダイアジノンについては、 10^{-4} M で細胞毒性がみられたため 10^{-5} M を最高濃度とする 5 濃度で試験を実施した。

試験 1

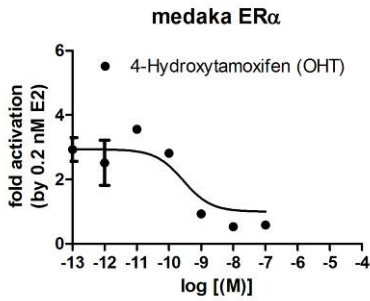
(陽性対照物質)

(試験対象物質)



試験 2

(陽性対照物質)



(試験対象物質)

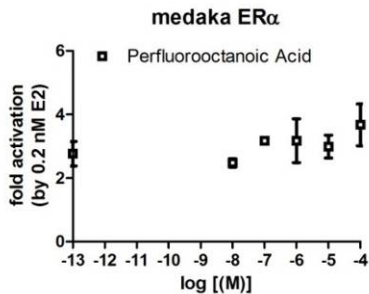
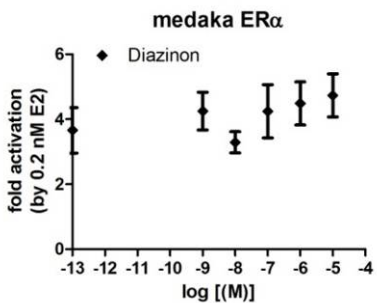
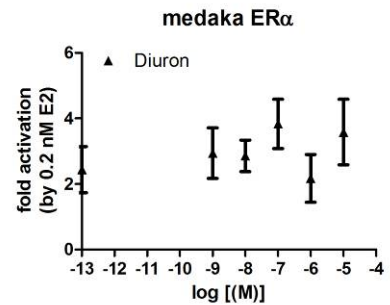
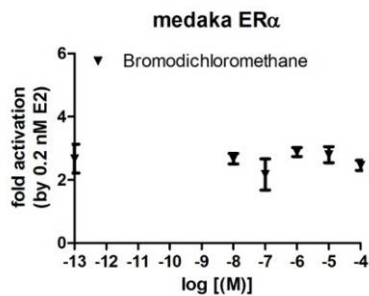
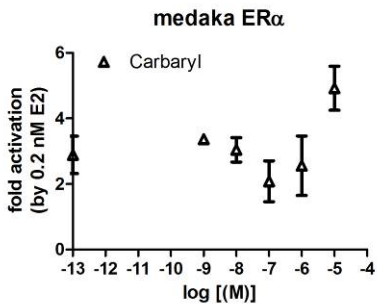


図4 E2 共存下における各試験対象物質の転写阻害活 (メダカ ERα)

注) カルバリル、ジウロン及びダイアジノンについては、 10^{-4} M で細胞毒性がみられたため 10^{-5} M を最高濃度とする5濃度で試験を実施した。

(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

メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験の結果をまとめて表 6 に示した。また、各試験の結果を図 5 及び図 6 に示した。

アンドロゲン作用に関しては、試験濃度範囲において転写活性がみられた物質はなかった。

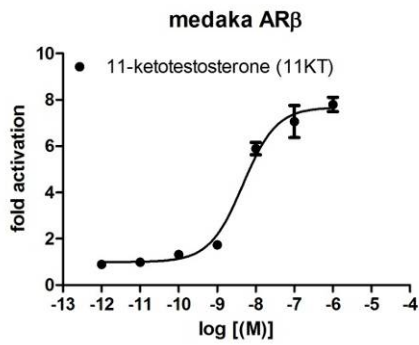
抗アンドロゲン作用に関しては、ジクロロプロモメタン、ダイアジノン、フェニトロチオン及びペルフルオロオクタン酸において転写活性化倍率に濃度依存的な低下がみられ、その IC₅₀ 値は、それぞれ $2.9 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $2.7 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $2.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 及び $1.9 \times 10^{-8} \text{M}$ 、相対活性比は 2-ヒドロキシフルタミド (HF) の 2.8、29.8、39.8 及び 4.4 であった。また、カルバリル、カルボフラン及びジウロンにおいて、試験最高濃度で転写活性倍率の低下がみられ、その lin.I.C₃₀ 値は、それぞれ $2.9 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $3.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 及び $4.8 \times 10^{-6} \text{M}$ 、相対活性比は HF の 9.1×10^{-3} 、 8.9×10^{-4} 及び 5.5×10^{-3} であった。他の 2 物質については、試験濃度範囲において、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の 11-ケトテストステロン共存下でのメダカアンドロゲン受容体 β 遺伝子の転写阻害活性はみられなかった。

表 6 メダカアンドロゲン受容体 β 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 β 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 ₅₀ 値(M)	相対活性比	IC ₅₀ 値(M)	相対活性比
フェンチオン			得られなかった	—
カルバリル			(lin.IC ₃₀ = 2.9×10^{-6})	9.1×10^{-3}
カルボフラン			(lin.IC ₃₀ = 3.0×10^{-5})	8.9×10^{-4}
ジウロン			(lin.IC ₃₀ = 4.8×10^{-6})	5.5×10^{-3}
ジクロルボス			得られなかった	—
ジクロロプロモメタン	得られなかった	—	2.9×10^{-8}	2.8
ダイアジノン	得られなかった	—	2.7×10^{-9}	29.8
フェニトイン	得られなかった	—		
フェニトロチオン	得られなかった	—	2.0×10^{-9}	39.8
ペルフルオロオクタン酸	得られなかった	—	1.9×10^{-8}	4.4
(陽性対照物質)				
11-ケトテストステロン	4.7×10^{-9}	1		
2-ヒドロキシフルタミド			(試験 1) 8.2×10^{-8} (lin.IC ₃₀ = 2.7×10^{-8}) (試験 2) 1.0×10^{-7} (lin.IC ₃₀ = 3.4×10^{-8})	1

■ : 試験対象外

(陽性対照物質)



(試験対象物質)

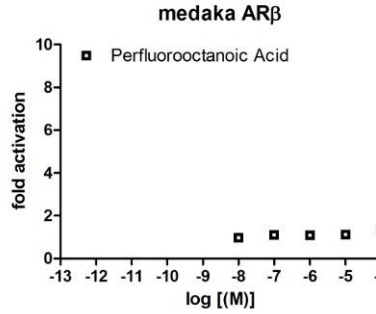
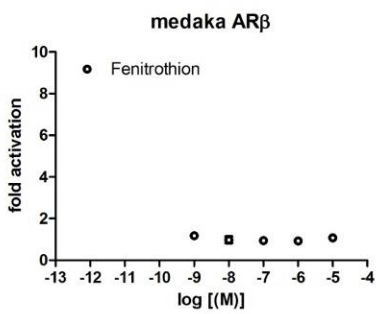
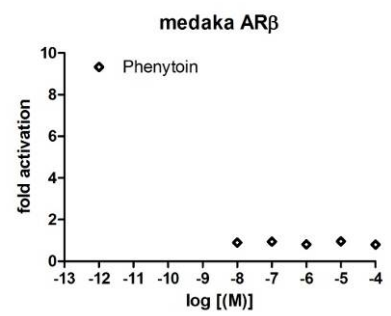
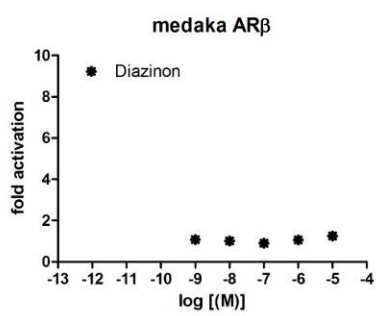
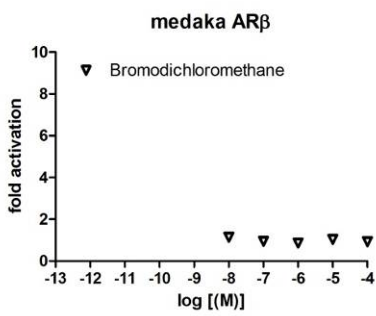
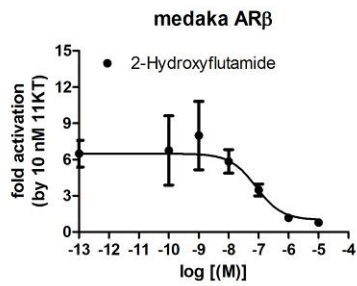


図5 各試験対象物質の転写活性 (メダカ ARβ)

注) ダイアジノン及びフェニトロチオンについては、 $10^{-4}M$ で細胞毒性がみられたため $10^{-5}M$ を最高濃度とする5濃度で試験を実施した。

試験 1

(陽性対照物質)



(試験対象物質)

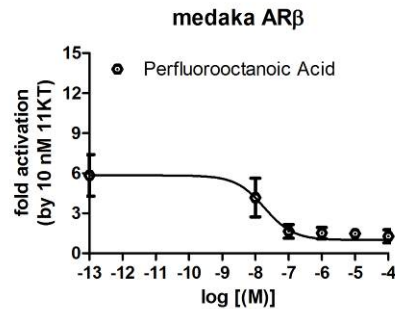
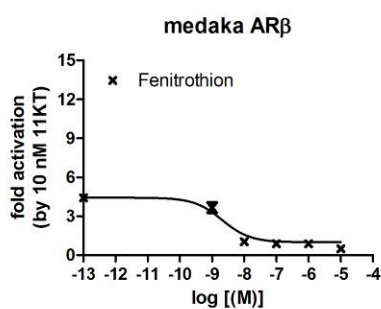
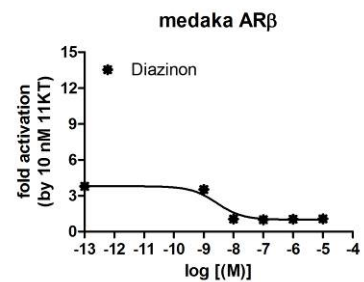
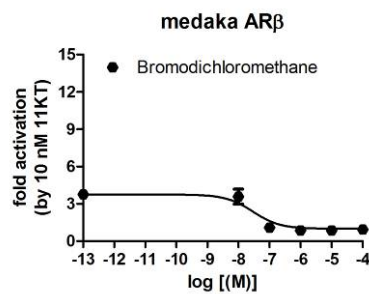
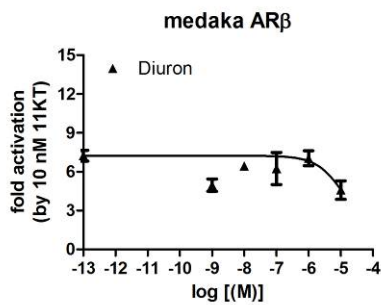
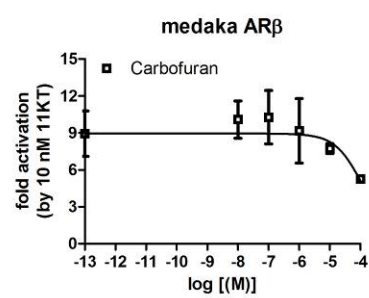
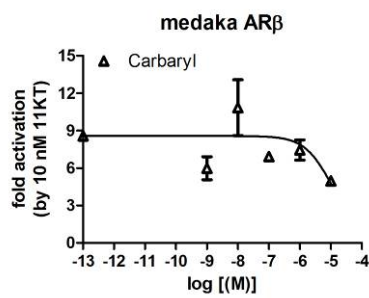
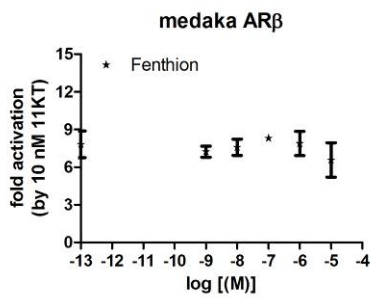


図6 11KT 共存下における各試験対象物質の転写阻害活性 (メダカ ARβ)

注) フェンチオン、カルバリル、ジウロン、ダイアジノン及びフェニトロチオンについては、 $10^{-4}M$ で細胞毒性がみられたため $10^{-5}M$ を最高濃度とする 5 濃度で試験を実施した。

試験 2

(陽性対照物質)

(試験対象物質)

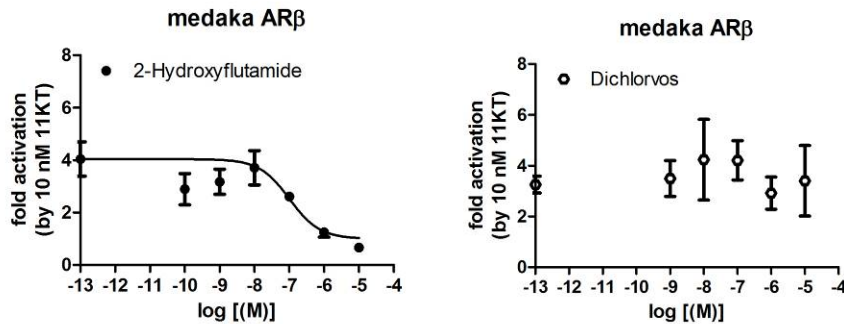


図6 11KT 共存下における各試験対象物質の転写阻害活性 (メダカ ARβ)

注) ジクロロボスについては、 $10^{-4}M$ で細胞毒性がみられたため $10^{-5}M$ を最高濃度とする 5 濃度で試験を実施した。

(3) ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TRβ) 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 β レポーター遺伝子試験の結果をまとめて表7に示した。また、抗甲状腺ホルモン作用の各試験の結果を図7に示した。

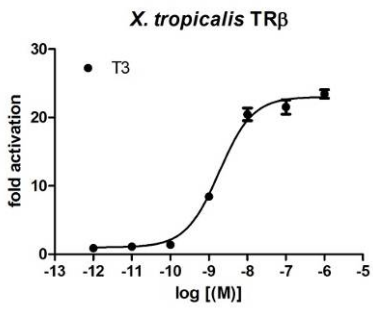
抗甲状腺ホルモン作用に関して、フェニトインにおいて試験最高濃度で転写活性倍率の低下がみられた。その lin.IC₃₀ 値は $6.3 \times 10^{-5}M$ であった (抗甲状腺ホルモン作用については陽性対照物質での試験を実施してないため相対活性比は算出できなかった)。他の2物質については、試験濃度範囲において、 $2 \times 10^{-9}M$ の 3,3',5'-トリヨード-L-チロニン (T3) 共存下でのニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β 遺伝子の転写阻害活性はみられなかった。

表7 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の結果

被験物質	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			
	甲状腺ホルモン作用		抗甲状腺ホルモン作用	
	EC ₅₀ 値(M)	相対活性比	IC ₅₀ 値(M)	相対活性比
カルバリル			得られなかった	—
フェニトイン			(lin.IC ₃₀ = 6.3×10^{-5})	—
ペルフルオロオクタン酸			得られなかった	—
(陽性対照物質)				
3,3',5'-トリヨード-L-チロニン	1.9×10^{-9}	—		

■ : 試験対象外

(参考 甲状腺ホルモン作用の陽性対照物質 (3,3',5-トリヨード-L-チロニン))



(試験対象物質)

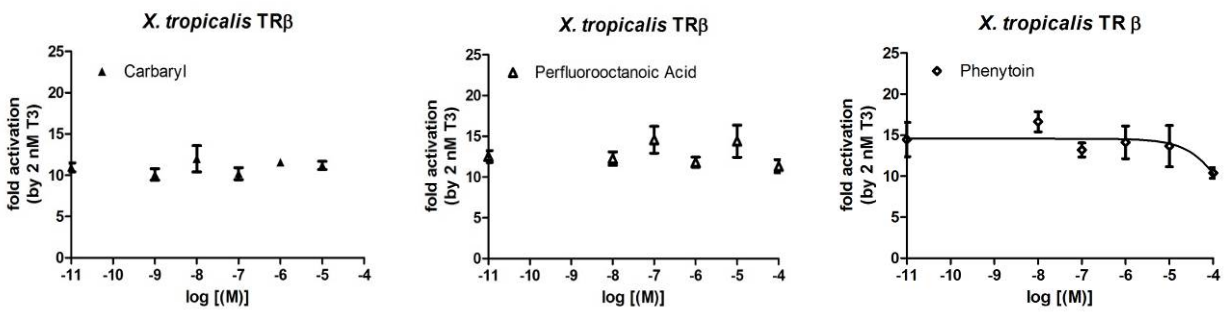


図7 T3 共存下における各試験対象物質の転写阻害活性 (ニシツメガエル TRβ)

注) カルバルリルについては、 10^{-4}M で細胞毒性がみられたため 10^{-5}M を最高濃度とする 5 濃度で試験を実施した。