

平成 24 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薬

(1) 被験物質

試験対象物質及び試験に用いた試薬（被験物質）を表 1 に示した。

被験物質の純度は 95%以上であった。被験物質は、あらかじめジメチルスルホキシド（溶解助剤）に $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ で溶解させた試験原液を調製し、使用時まで -20°C で保存しておいた。試験では、これをジメチルスルホキシドで適宜希釈して使用した。

表 1 被験物質

| 物質名 | CAS番号 | 供給者 | ロット番号 | 純度 |
|---------------------------|------------|--------------------|------------|--------|
| 2,4,6-トリブロモフェノール | 118-79-6 | 東京化成工業株式会社 | FGK01 | 99.7% |
| フェノバルビタールナトリウム | 57-30-7 | 和光純薬工業株式会社 | TLQ4248 | 98.2% |
| アクリルアミド | 79-06-1 | Sigma-Aldrich inc. | 021M01711V | 100% |
| アラクロール | 15972-60-8 | 和光純薬工業株式会社 | EPH5279 | 99.9% |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | 94-75-7 | 和光純薬工業株式会社 | KWR2176 | 99.6% |
| テトラブロモビスフェノールA | 79-94-7 | 東京化成工業株式会社 | T556F | 99.9% |
| ナフタレン | 91-20-3 | 和光純薬工業株式会社 | WEQ6753 | 99.7% |
| モリネート | 2212-67-1 | 和光純薬工業株式会社 | KWR2172 | 99.4% |
| りん酸トリフェニル | 115-86-6 | 東京化成工業株式会社 | E8M7H-RK | 99.9% |
| 2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール | 128-37-0 | Sigma-Aldrich inc. | 021M0068V | 100% |
| 1-ナフトール | 90-15-3 | 和光純薬工業株式会社 | DCG0392 | 100.0% |
| 4-tert-ペンチルフェノール | 80-46-6 | 和光純薬工業株式会社 | KLR3033 | >97.0% |
| メソミル | 16752-77-5 | 和光純薬工業株式会社 | KWE1910 | 100.0% |

注) 純度は試薬供給者提供の試験成績書による。

(2) 陽性対照物質

レポータージーン試験において、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、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及び甲状腺ホルモン作用の各試験において、それぞれ 17 β エストラジオール

(E2)、4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT)、11-ケトテストステロン (11KT)、2-ヒドロキシフルタミド (OHF)、トリヨードサイロニン (T3) を陽性対照物質として用いた。抗甲状腺ホルモン作用については、現時点で適切な化学物質がないことから、陽性対照物質での試験は実施しなかった。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各試験では、それぞれ 17β エストラジオール、11-ケトテストステロン及びトリヨードサイロニンを試験系に共添加する陽性物質とした。

試験に用いた陽性対照物質の試薬 (被験物質) の純度は 95%以上であった (表 2)。陽性対照物質の各試薬は、培地へ添加する際の溶解助剤として使用したジメチルスルホキシド (溶媒) に溶解させて使用した。各陽性対照物質については、被験物質と同様に、ジメチルスルホキシドに $1 \times 10^{-2} \text{M}$ で溶解させた溶液を調製、 -20°C で保存しておき、試験実施時に溶媒で適宜希釈して使用した。

表 2 陽性対照物質

| 物質名 | CAS番号 | 供給者 | ロット番号 | 純度 |
|----------------|------------|---------------------|-----------|-------|
| 17β エストラジオール | 50-28-2 | 和光純薬工業株式会社 | ASG1282 | 98.6% |
| 4-ヒドロキシタモキシフェン | 65213-48-1 | Sigma-Aldrich, inc. | 020M4068 | 99.9% |
| 11-ケトテストステロン | 564-35-2 | Sigma-Aldrich, inc. | 31K4084 | 99% |
| 2-ヒドロキシフルタミド | 52806-53-8 | Sigma-Aldrich, inc. | 090M4732V | >99% |
| トリヨードサイロニン | 6893-02-3 | Sigma-Aldrich, inc. | 016K1628 | 98% |

注) 純度は、試薬の供給者提供の試験成績書による。

(3) 溶解助剤

試験対象物質及び陽性対照物質を試験液 (培地) に添加するための溶解助剤として、ジメチルスルホキシド (純度>99%、和光純薬工業株式会社) を用いた。

2. 試験濃度

試験濃度は、既存文献等から得られた各試験物質の水溶解度、予備実験から判断した試験に使用する動物細胞 (HEK293 及び HepG2) に対して毒性を発現しない濃度もしくは $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ のうち、最も低い濃度を試験最高濃度として、公比 10 以下で 5 濃度を設定した (表 3)。

動物細胞に対する毒性については、レポータージーン試験と同様の手順によりマイクロプレートに播種・培養した動物細胞 (HEK293 又は HepG2) に、 $1.0 \times 10^{-4} \sim 10^{-6} \text{M}$ (一部の物質では 10^{-7}M) の試験物質を添加し、さらに 40 時間の培養後、AlamarBlue® 生細胞試薬 (Invitrogen 社) を加え、 37°C で 1 時間のインキュベート後、570nm 及び 600nm での吸光度を測定した。AlamarBlue® 生細胞試薬は、レザズリンを有効成分とし、生細胞内に取り込まれると赤色の強蛍光を発するレゾルフィンに還元される。そのときの吸光度 (又は蛍光強度) が生細胞数と比例することから、吸光

度の測定値の Control との比較により、試験物質でばく露された動物細胞での生細胞数を定量的に評価できる。本試験では、対照区に対して、20%を超える吸光度の低下がみられた場合、当該濃度で動物細胞に毒性を示したと判断した。

陽性対照物質の試験濃度は、EC₅₀ 値又は IC₅₀ 値を適切に算出できるように設定した。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各試験において、試験系に共添加する陽性物質の添加濃度は、それぞれ 2×10⁻¹⁰M (17β エストラジオール)、1×10⁻⁸M (11-ケトテストステロン)、2×10⁻⁹M (3,3',5'-トリヨード-L-サイロニン) とした。

表 3 試験濃度

| 物質名 | 水溶解度 (M) | 細胞毒性の発現 | | | | 試験 最高濃度 |
|---------------------------|----------------------|---------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | | 動物細胞 | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | |
| 2,4,6-トリブロモフェノール | 1.3x10 ⁻⁴ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| フェノバルビタールナトリウム | 3.9x10 ⁻¹ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| アクリルアミド | 2.8x10 ⁰ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| アラクロール | 8.9x10 ⁻⁴ | HEK293 | + | + | - | 10 ⁻⁵ M |
| | | HepG2 | + | - | - | |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | 4.0x10 ⁻³ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| テトラブロモビスフェノールA | 1.7x10 ⁻³ | HEK293 | + | - | - | 10 ⁻⁵ M |
| | | HepG2 | + | - | - | |
| ナフタレン | 2.3x10 ⁻⁴ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| モリネート | 4.3x10 ⁻³ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| りん酸トリフェニル | 5.8x10 ⁻⁶ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁵ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| 2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール | 2.7x10 ⁻⁶ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁵ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| 1-ナフトール | 6.0x10 ⁻³ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |
| 4-tert-ペンチルフェノール | 2.3x10 ⁻⁴ | HEK293 | + | - | - | 10 ⁻⁵ M |
| | | HepG2 | + | - | - | |
| メソミル | 3.6x10 ⁻¹ | HEK293 | - | - | - | 10 ⁻⁴ M |
| | | HepG2 | - | - | - | |

注) 被験物質の水溶解度の情報源: <http://www.chemicalbook.com/>

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 (甲状腺ホルモン作用検出系及び抗甲状腺ホル

モン作用検出系)の各試験は、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た(別添1)。また、試験において、データの解析手法、妥当性や有効性の考え方等については、OECD テストガイドライン (TG455: Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogen Agonist-Activity of Chemicals、Draft TG: Stably Transfected Human Androgen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist Agonist/Antagonist Activity of Chemicals)を参考にした。

すべての試験は、24穴マイクロプレート1枚を1単位(1試験)として実施した。試験の方法及び手順は以下のとおりであった。また、各試験の条件を表4に示した。

レポータージーン試験の手順

| 試験細胞系の培養(暴露) | 発光強度の測定 |
|----------------------------------|----------------------|
| 培地(24穴プレート)へ細胞播種 | 培地の除去 |
| ↓ | ↓ |
| 培養(5%CO ₂ 、37°C、24時間) | 細胞溶解液の添加 |
| ↓ | ↓ |
| ベクター(3種類)の細胞導入 | (細胞溶解) |
| ↓ | ↓ |
| 培養(5%CO ₂ 、37°C、4時間) | ホタルルシフェリン(発光基質)添加 |
| ↓ | ↓ |
| 被験物質(及び陽生物質)の添加 | ホタルルシフェリン発光強度の測定 |
| ↓ | ↓ |
| 培養(5%CO ₂ 、37°C、40時間) | ウミシイタケルシフェリン(発光基質)添加 |
| ↓ | ↓ |
| (発光強度の測定) | ウミシイタケルシフェリン発光強度の測定 |

(1) メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験

常法により凍結保存株を融解、培養した HEK293 (ヒト胎児腎臓由来細胞)を 24穴マイクロプレートの各ウェルに 5×10^4 細胞ずつ播種し、5%CO₂及び 37°C に設定された CO₂インキュベータ内で 24 時間、静置培養した。培地は、2mM L-glutamine 及び 10% FCS を含む DMEM (ダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地)を用いた。24 時間の培養後、各ウェルに、medakaERalpha/pcDNA3.1 (メダカの ER α を発現するベクター)、ERE-TK-Luc (ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に ER 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター)及び pRL-TK-RLuc (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)をそれぞれ 0.2 μ g、0.4 μ g 及び 0.1 μ g、トランスフェクション試薬の FuGENE 6 (プロメガ株式会社)を 1.8 μ L 添加した。3 種類のベクター及びトランスフェクション試薬の添加後、マイクロプレートを CO₂インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内にベクターを一過的

に導入させた。

エストロゲン作用の試験では、ベクター導入後、被験物質（又は陽性対照物質）を試験濃度の 10^3 倍の濃度で溶解させた DMSO 溶液をウェル（培地 1mL）あたり $1\mu\text{L}$ 添加した。また、陰性対照についてはウェル（培地 1mL）あたり DMSO を $1\mu\text{L}$ 添加した。抗エストロゲン作用の試験では、ベクター導入後、被験物質の各試験濃度について、試験濃度の 10^3 倍の濃度で被験物質を溶解させた DMSO 溶液及び共添加濃度の 10^3 倍の濃度で陽性物質（ 17β エストラジオール）を溶解させた DMSO 溶液をウェル（培地 1mL）あたりそれぞれ $1\mu\text{L}$ ずつ添加した。また、陽性対照については、陽性対照物質を溶解させた DMSO 溶液及び DMSO をウェル（培地 1mL）あたりそれぞれ $1\mu\text{L}$ ずつ、陰性対照については DMSO をウェル（培地 1mL）あたり $2\mu\text{L}$ 添加した。試験は、すべての試験濃度、陰性対照及び陽性対照について 3 連（濃度あたり 3 ウェル）で行った。

被験物質（又は陽性対照物質）の添加後、マイクロプレートは CO_2 インキュベータ内で静置し、さらに 40 時間、培養（化学物質へのばく露）を行った。ばく露完了後、各ウェル内の培養液を除去、PBS で洗浄した後、細胞溶解剤 PLB（プロメガ株式会社）を $100\mu\text{L}$ 添加してウェル内の HEK293 を溶解した。各ウェルの細胞溶解液を 96 穴マイクロプレートに分取し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System（プロメガ株式会社）を用いて、ホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度をルミノメーター（TriStar LB941、Berthold Technology）で測定した。

（2）メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験

常法により凍結保存株を融解、培養した HepG2（ヒト肝がん由来細胞）を 24 穴マイクロプレートの各ウェルに 5×10^4 細胞ずつ播種し、 $5\% \text{CO}_2$ 及び 37°C に設定された CO_2 インキュベータ内で 24 時間、静置培養した。培地は、 2mM L-glutamine 及び $10\% \text{FCS}$ を含む DMEM を用いた。24 時間の培養後、各ウェルに、medakaARbeta/pcDNA3.1（メダカの AR β を発現する試験レポーターベクター）、MMTV-Luc（ホタルルシフェラーゼ遺伝子の upstream に AR 応答エレメントを組み込んだベクター）及び pRL-TK-RLuc（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）をそれぞれ 0.2 、 0.4 及び $0.1\mu\text{g}$ 、トランスフェクション試薬の FuGENE HD（プロメガ株式会社）を $1.8\mu\text{L}$ 添加した。3 種類のベクター及びトランスフェクション試薬の添加後、マイクロプレートを CO_2 インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内にベクターを一過的に導入させた。

アンドロゲン作用の試験では、ベクター導入後、被験物質又は陽性対照物質を試験濃度の 10^3 倍の濃度で溶解させた DMSO 溶液をウェル（培地 1mL）あたり $1\mu\text{L}$ 添加した。また、陰性対照についてはウェル（培地 1mL）あたり DMSO を $1\mu\text{L}$ 添加した。抗アンドロゲン作用の試験では、ベクター導入後、被験物質の各試験濃度については、試験濃度の 10^3 倍の濃度で被験物質を溶解させた DMSO 溶液及び共添加濃度の 10^3 倍の濃度で陽性物質（ 11- ケトテストステロン）を溶解させた DMSO 溶液をウェル（培地 1mL）あたりそれぞれ $1\mu\text{L}$ ずつ添加した。また、陽性対照については陽性対照物質を溶解させた DMSO 溶液及び DMSO をウェル（培地 1mL）あたりそれぞれ $1\mu\text{L}$

ずつ、陰性対照については DMSO をウェル（培地 1mL）あたり 2 μ L 添加した。試験は、すべての試験濃度、陰性対照及び陽性対照について 3 連（濃度あたり 3 ウェル）で行った。

被験物質（又は陽性対照物質）の添加後、マイクロプレートは CO₂ インキュベータ内で静置し、さらに 40 時間培養した。培養の完了後、各ウェル内の培養液を除去、PBS で洗浄した後、細胞溶解剤 PLB（プロメガ株式会社）を 100 μ L 添加してウェル内の HepG2 を溶解した。各ウェルの細胞溶解液を 96 穴マイクロプレートに分取し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System（プロメガ株式会社）を用いて、ホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度をルミノメーター（TriStar LB941、Berthold Technology）で測定した。

（3）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

常法により凍結保存株を融解、培養した HEK293（ヒト胎児腎臓由来細胞）を 24 穴マイクロプレートの各ウェルに 5 \times 10⁴ 細胞ずつ播種し、5%CO₂ 及び 37°C に設定された CO₂ インキュベータ内で 24 時間、静置培養した。培地は、2mM L-glutamine 及び 10% FCS を含む DMEM（ダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地）を用いた。24 時間の培養後、各ウェルに、tropicalis TR beta/pcDNA（ニシツメガエルの TR β を発現するベクター）、TRE-minP-*Luc*（ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に TR 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター）及び pRL-TK-*RLuc*（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）をそれぞれ 0.2 μ g、0.4 μ g 及び 0.1 μ g、トランスフェクション試薬の FuGENE 6（プロメガ株式会社）を 1.8 μ L 添加した。3 種類のベクター及びトランスフェクション試薬の添加後、マイクロプレートを CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内にベクターを一過的に導入させた。

甲状腺ホルモン作用の試験では、ベクター導入後、被験物質又は陽性対照物質を試験濃度の 10³ 倍の濃度で溶解させた DMSO 溶液をウェル（培地 1mL）あたり 1 μ L 添加した。また、陰性対照についてはウェル（培地 1mL）あたり DMSO を 1 μ L 添加した。抗甲状腺ホルモン作用の試験では、ベクター導入後、被験物質を試験濃度の 10³ 倍の濃度で溶解させた DMSO 溶液及び共添加濃度の 10³ 倍の濃度で陽性物質（トリヨードサイロニン）を溶解させた DMSO 溶液をウェル（培地 1mL）あたりそれぞれ 1 μ L ずつ添加した。また、陽性対照については陽性物質を溶解させた DMSO 溶液及び DMSO をウェル（培地 1mL）あたりそれぞれ 1 μ L ずつ、陰性対照については DMSO をウェル（培地 1mL）あたり 2 μ L 添加した。試験は、すべての試験濃度、陰性対照及び陽性対照について 3 連（濃度あたり 3 ウェル）で行った。

被験物質（又は陽性対照物質）の添加後、マイクロプレートは CO₂ インキュベータ内で静置し、さらに 40 時間、培養（化学物質へのばく露）を行った。ばく露完了後、各ウェル内の培養液を除去、PBS で洗浄した後、細胞溶解剤 PLB（プロメガ株式会社）を 100 μ L 添加してウェル内の HEK293 を溶解した。各ウェルの細胞溶解液を 96 穴マイクロプレートに分取し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System（プロメガ株式会社）を用いて、ホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度

をルミノメーター (TriStar LB941、Berthold Technology) で測定した。

4. データ解析

各試験から得られたホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度の測定データを用いて、以下のとおり、アゴニスト検出系試験 (エストロゲン作用、アンドロゲン作用又は甲状腺ホルモン作用の試験) について、試験対象物質の EC_{50} 値 (最大転写活性の 50% の転写活性を示す濃度) 又は PC_{10} 値 (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)、アンタゴニスト検出系試験 (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、 IC_{50} 値 (陽性物質の転写活性を 50% 阻害する濃度) 又は $linIC_{30}$ 値 (陽性物質の転写活性を 30% 阻害する濃度) を算出した。

(1) 転写活性化倍率の算出

レポータージーン試験から得られた測定データについて、各ウェルのホタルルシフェラーゼの発光強度をウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で除した相対発光強度を算出した。次に、被験物質 (試験対象物質又は陽性対照物質) の各ウェルについて、相対発光強度を陰性対照の相対発光強度 (陰性対照の 3 ウェルの平均値) で除した転写活性化倍率 (fold activation) を算出した。

(2) アゴニスト系試験での EC_{50} 値及び PC_{10} 値の算出

アゴニスト検出系の試験データについては、はじめに各ウェルの転写活性化倍率のデータを用いて、被験物質の試験濃度の転写活性化倍率に陰性対照区と比較して有意かつ濃度依存的な反応 (転写活性化倍率の上昇) が認められるかを一元配置分散分析及び Williams' multiple comparison test により統計学的に検定した。検定の結果、転写活性化倍率に統計学的に有意な上昇が認められた場合には、各試験濃度における転写活性化倍率の 3 ウェルの平均値を用いて非線形回帰モデル (3-parameter のシグモイド曲線) により EC_{50} 値を算出した。非線形回帰モデルによるデータ解析には、専用の解析ソフト GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いた。なお、非線形回帰モデルから算出された EC_{50} 値が最高試験濃度よりも高濃度であった場合には、当該結果の妥当性は低いと考えられるため試験結果として採用しなかった。また、非線形回帰モデルで適切に EC_{50} 値が算出できなかった試験のうち、最高試験濃度での転写活性化倍率が並行して実施した陽性対照物質の試験から得られた最大転写活性の 10% 値を超える場合には、陽性対照物質の最大転写活性の 10% 値を挟む 2 点に (試験濃度) の転写活性化倍率を用いて直線回帰 (linear regression) により PC_{10} 値を算出した。

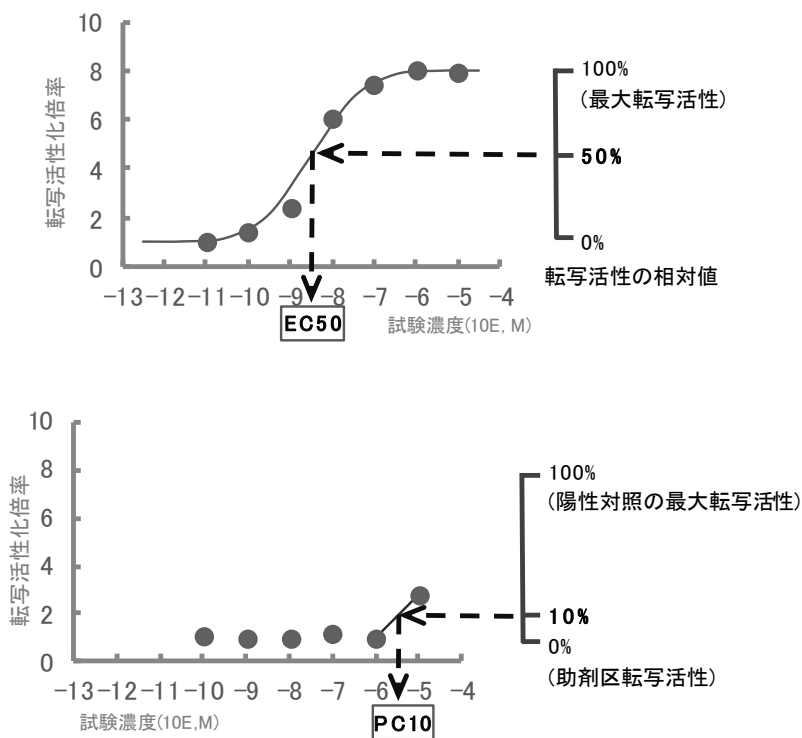


図1 アゴニスト検出系の試験での EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値の算出

(3) アンタゴニスト系試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値の算出

アンタゴニスト検出系の試験データについては、はじめに各ウェルの転写活性化倍率のデータを用いて、被験物質の試験濃度の転写活性化倍率に陽性対照区と比較して有意かつ濃度依存的な反応（転写活性化倍率の低下）が認められるかを一元配置分散分析及び Williams' multiple comparison test により統計学的に検定した。検定の結果、転写活性化倍率に統計学的に有意な低下が認められた場合には、各試験濃度における転写活性化倍率の平均値を用いて、上側範囲を陽性対照の転写活性化倍率、下側範囲を陰性対照の転写活性化倍率とする非線形回帰モデル（3-parameter のシグモイド曲線）により、IC₅₀ 値を算出した。非線形回帰モデルによるデータ解析は、専用の解析ソフト GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて行った。なお、非線形回帰モデルで算出した IC₅₀ 値が最高試験濃度よりも高濃度であった場合には、当該結果の妥当性は低いと考えられるため試験結果として採用しなかった。また、非線形回帰モデルで適切に IC₅₀ 値が算出できなかった試験のうち、最高試験濃度での転写活性化倍率に陽性対照と比較して 30%以上の低下がみられた場合、すなわち最高試験濃度における転写活性化倍率が陽性対照区の 70%未満であった場合には、陽性対照区の転写活性化倍率の 70%値を挟む 2 点（試験濃度）の転写活性化倍率を用いて直線回帰 (linear regression) により linIC₃₀ 値を算出した。

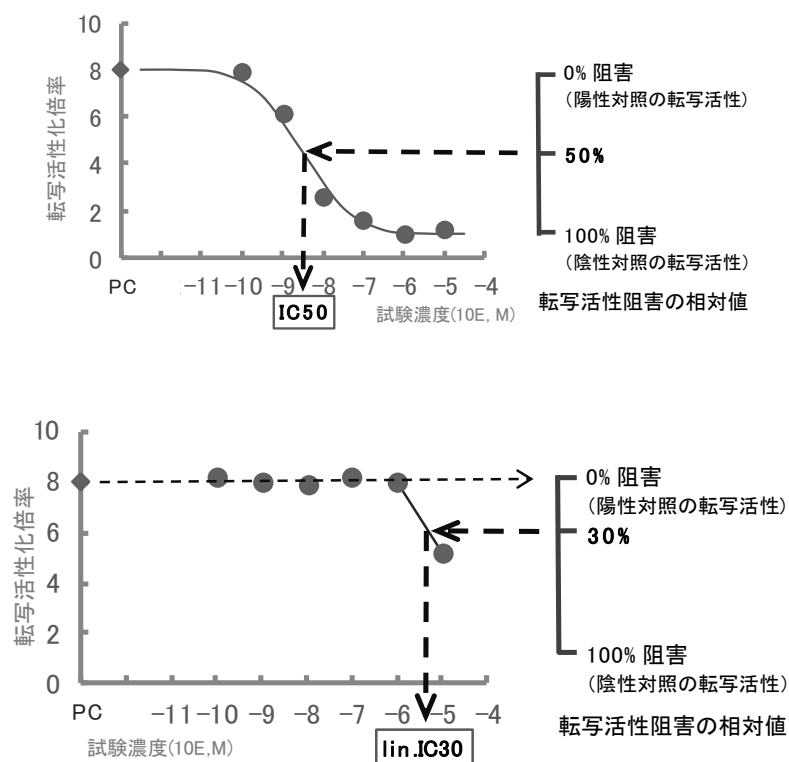


図2 アンタゴニスト検出系の試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値の算出

(4) 相対活性比の算出

アゴニスト検出系試験において、EC₅₀ 値又は PC₁₀ 値が得られた被験物質については、それらの陽性対照物質の EC₅₀ 値又は PC₁₀ 値に対する相対活性比を算出した。また、アンタゴニスト検出系試験（抗甲状腺ホルモン作用を除く）についても、同様に、IC₅₀ 値又は linIC₃₀ 値が得られた被験物質については、それらの陽性対照物質の IC₅₀ 値又は linIC₃₀ 値に対する相対活性比を算出した。

5. 試験の有効性について

アゴニスト系試験については、並行して実施した陽性対照物質での試験（同一日に同一起源の動物細胞を用いて実施した試験）において最大転写活性化倍率が4以上であった場合に、試験が有効とみなした。また、アンタゴニスト系の試験（抗甲状腺ホルモン作用試験は除く）については、並行して実施した陽性対照物質での試験及び各試験対象物質での試験において、陽性物質のみ添加した条件での転写活性化倍率が3以上であった場合に、試験が有効とみなした。

表 4 レポーター遺伝子試験の条件

| | メダカエストロゲン受容体 α 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 | | 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 | |
|---------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| | 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 |
| 試験容器 | 24穴マイクロプレート | | 24穴マイクロプレート | | 24穴マイクロプレート | |
| 動物細胞株 | HEK293 | | HepG2 | | HEK293 | |
| 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 | 1 mL/well | | 1 mL/well | | 1 mL/well | |
| 細胞播種数 | 5×10^4 細胞/well | | 5×10^4 細胞/well | | 5×10^4 細胞/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 ₂ 、40時間 | | 37°C、5% CO ₂ 、40時間 | | 37°C、5% CO ₂ 、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) | |
| 共添加陽性物質 及び濃度 | — | 17 β エストラジオール 2×10^{-10} M | — | 11-ケトテストステロン 1×10^{-8} M | — | トリヨードサイロニン 2×10^{-9} M |
| 助剤及び終濃度 | DMSO 0.1% | DMSO 0.2% | DMSO 0.1% | DMSO 0.2% | DMSO 0.1% | DMSO 0.2% |

6. 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（エストロゲン作用及び抗エストロゲン作用）の結果を表 5 に示した。また、エストロゲン作用試験の結果を図 3、抗エストロゲン作用試験の結果を 4 に示した。なお、各試験の結果を試験濃度での転写活性化倍率で示したグラフを別添 2 に示した。

エストロゲン作用試験では、試験を実施した 9 物質のうち、りん酸トリフェニル、1-ナフトール及び 4-*tert*-ペンチルフェノールの 3 物質において、試験濃度に依存的な転写活性化倍率の有意な上昇がみられた。これらの物質の EC₅₀ 値は、それぞれ 9.7×10^{-6} M、 7.8×10^{-5} M、 1.0×10^{-6} M、17 β エストラジオール（陽性対照物質）に対する相対活性比は、 2.1×10^{-5} 、 2.7×10^{-6} 及び 2.1×10^{-4} であった（相対活性比は 17 β エストラジオールの 3 回目試験の結果との比較）。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試験では、試験を実施した 4 物質について、試験濃度範囲において 2×10^{-10} M の 17 β エストラジオール共存下で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

| | 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 (M) | 相対活性比 | IC ₅₀ (M) | 相対活性比 |
| フェノバルビタール | 得られなかった。 | | 得られなかった。 | |
| アラクロール | 得られなかった。 | | | |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | 得られなかった。 | | | |
| テトラブロモビスフェノールA | 得られなかった。 | | 得られなかった。 | |
| モリネート | | | 得られなかった。 | |
| りん酸トリフェニル | 9.7×10^{-6} | 0.0021% | | |
| 2,6-ジ- <i>tert</i> -ブチル-4-メチルフェノール | 得られなかった。 | | | |
| 1-ナフトール | 7.8×10^{-5} | 0.00027% | | |
| 4- <i>tert</i> -ペンチルフェノール | 1.0×10^{-6} | 0.021% | | |
| メソミル | 得られなかった。 | | 得られなかった。 | |
| 17 β エストラジオール | 2.2×10^{-10} (1回目試験) | | | |
| | 1.3×10^{-10} (2回目試験) | | | |
| | 2.1×10^{-10} (3回目試験) | | | |
| 4-ヒドロキシタモキシフェン | | | 2.8×10^{-10} (1回目試験) | |
| | | | 4.7×10^{-10} (2回目試験) | |

注) 灰色網掛け: 試験対象外

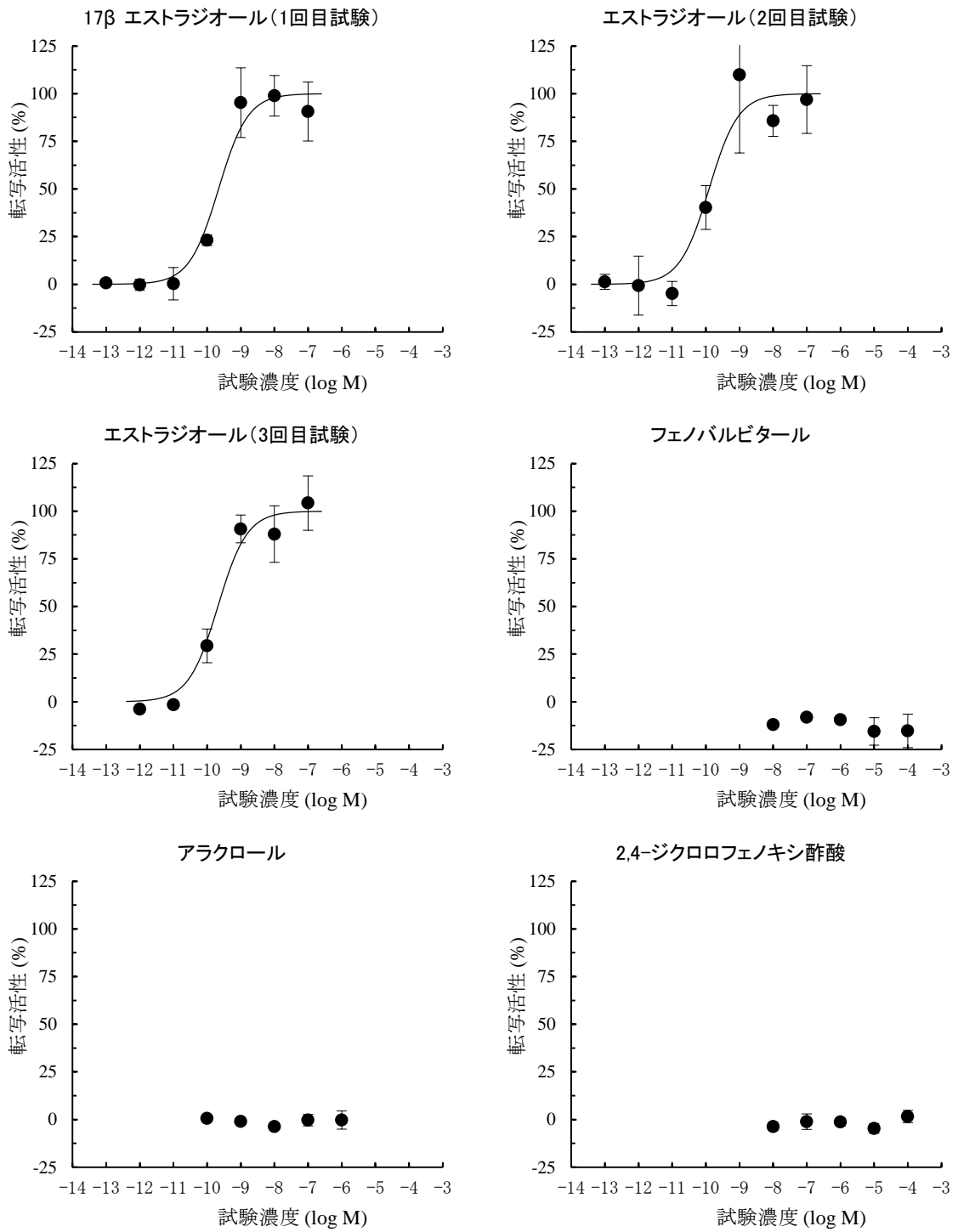


図 3(1) メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用) の結果

注) 転写活性(%)は、EC₅₀ 値が算出できた試験では、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰式から算出した最大転写活性化倍率を 100%とした。転写活性に有意な上昇がみられなかった試験では、並行実施した陽性対照物質の試験の最大転写活性化倍率を 100%とした。

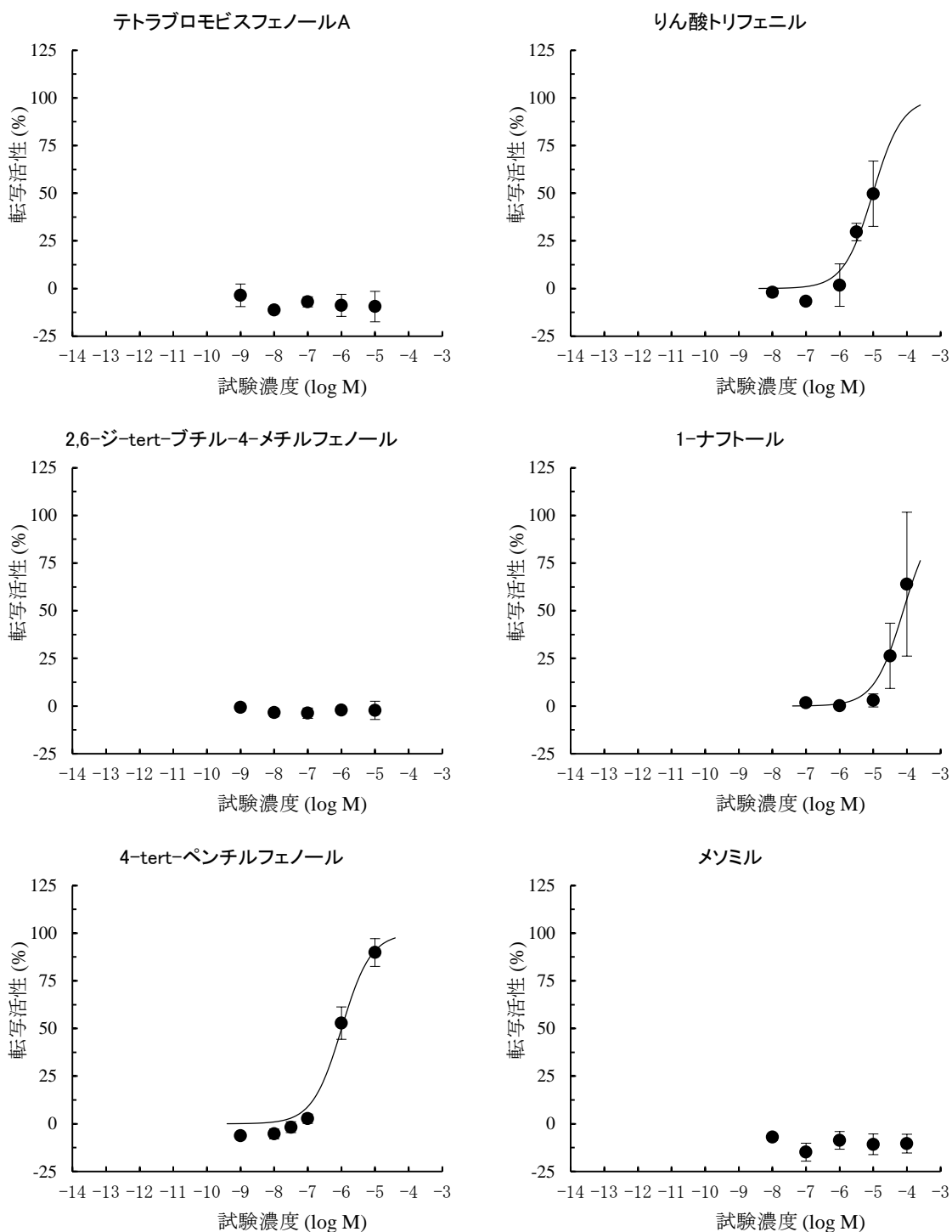


図 3(2) メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)の結果

注) 転写活性(%)は、EC₅₀ 値が算出できた試験では、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰式から算出した最大転写活性化倍率を 100%とした。転写活性に有意な上昇がみられなかった試験では、並行実施した陽性対照物質の試験の最大転写活性化倍率を 100%とした。

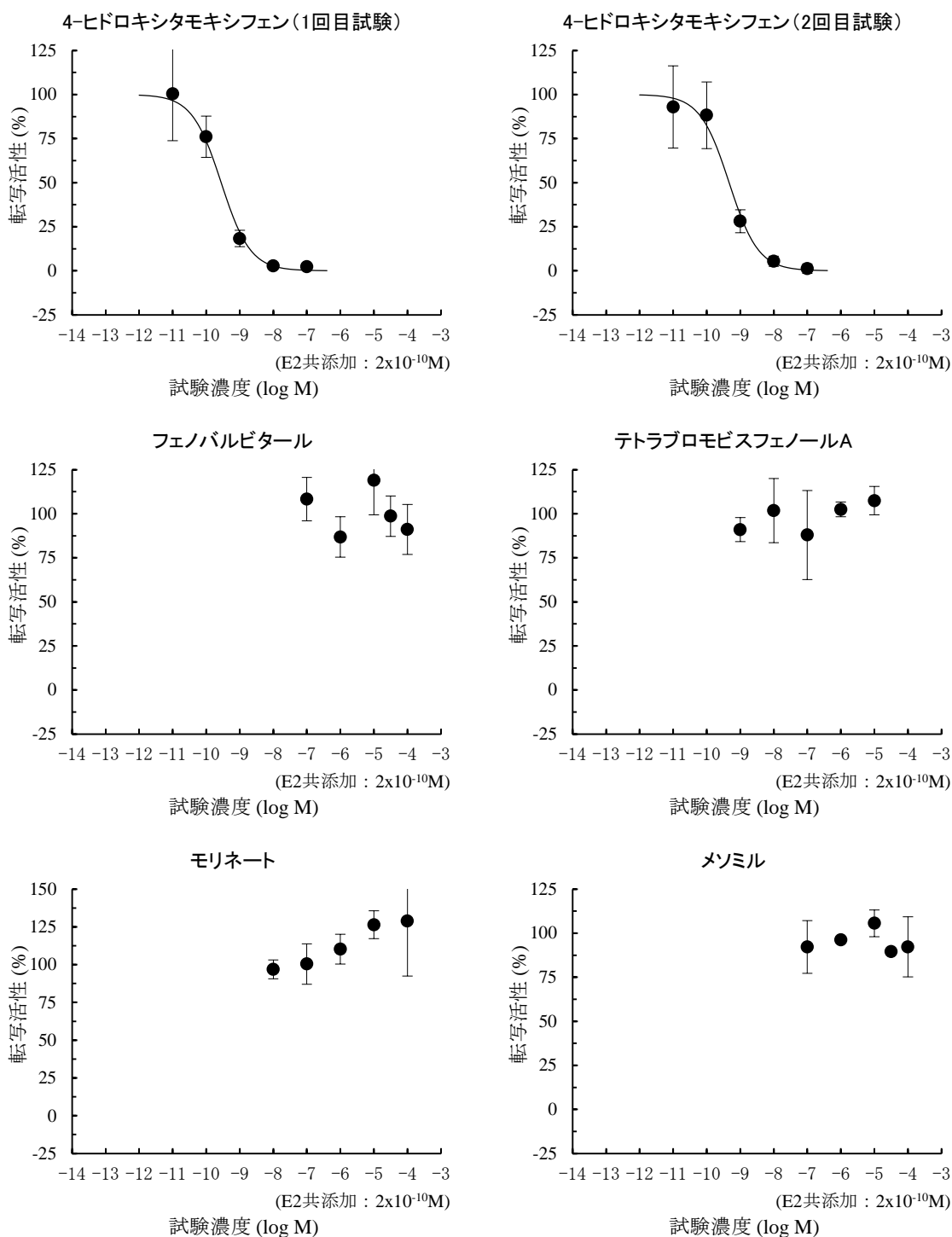


図4 メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用) の結果

注) 転写活性(%)は、陽性物質のみ添加条件での転写活性化倍率を 100%、非線形回帰式から算出した最小転写活性化倍率又は助剤対照の転写活性化倍率 (非線形回帰式が得られなかった試験) を 0%とした。

(2) メダカアンドロゲン受容体 β (AR β) 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（アンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用）の結果を表 6 に示した。また、アンドロゲン作用試験の結果を図 5、抗アンドロゲン作用試験の結果を図 6 に示した。なお、各試験の結果を試験濃度での転写活性化倍率で示したグラフを別添 2 に示した。

アンドロゲン作用試験では、試験を実施した 5 物質について、試験濃度範囲においてメダカアンドロゲン受容体 β 遺伝子の有意な転写活性はみられなかった。

抗アンドロゲン作用試験では、試験を実施した 10 物質のうち、4-*tert*-ペンチルフェノールにおいて試験濃度に依存的な転写活性化倍率の有意な低下がみられ、その IC₅₀ 値は 4.1×10^{-6} M、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 3.1×10^{-2} であった（相対活性比は 2-ヒドロキシフルタミドの 2 回目試験の結果との比較）。その他の 9 物質については、試験濃度範囲において 1×10^{-8} M の 11-ケトテストステロン共存下で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 レポータージーン試験の結果

| | 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 | | 抗アンドロゲン作用 | |
| | EC ₅₀ (M) | 相対活性比 | IC ₅₀ (M) | 相対活性比 |
| フェノバルビタール | 得られなかった。 | | 得られなかった。 | |
| アクリルアミド | 得られなかった。 | | 得られなかった。 | |
| アラクロール | | | 得られなかった。 | |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | 得られなかった。 | | | |
| テトラプロモビスフェノールA | | | 得られなかった。 | |
| ナフタレン | 得られなかった。 | | | |
| モリネート | 得られなかった。 | | 得られなかった。 | |
| りん酸トリフェニル | | | 得られなかった。 | |
| 2,6-ジ- <i>tert</i> -ブチル-4-メチルフェノール | | | 得られなかった。 | |
| 1-ナフトール | | | 得られなかった。 | |
| 4- <i>tert</i> -ペンチルフェノール | | | 4.1×10^{-6} | 3.1% |
| メソミル | | | 得られなかった。 | |
| 11-ケトテストステロン | 1.0×10^{-8} (1回目試験) | | | |
| | 8.8×10^{-10} (2回目試験) | | | |
| 2-ヒドロキシフルタミド | | | 4.4×10^{-7} (1回目試験) | |
| | | | 1.3×10^{-7} (2回目試験) | |
| | | | 8.6×10^{-8} (3回目試験) | |

注) 灰色網掛け: 試験対象外

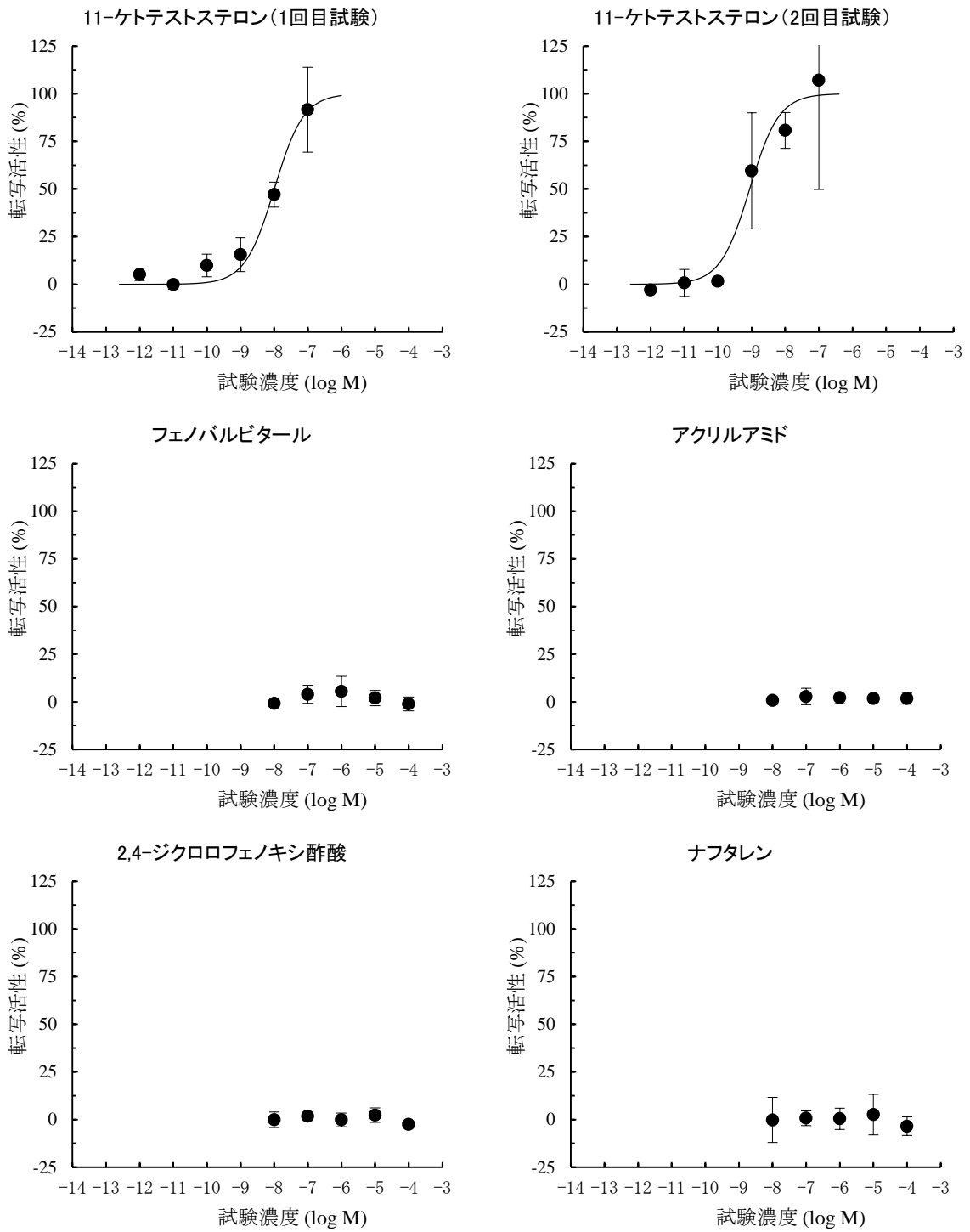


図5 メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)の結果

注) 転写活性(%)は、EC₅₀値が算出できた試験では、助剤対照の転写活性化倍率を0%、非線形回帰式から算出した最大転写活性化倍率を100%とした。転写活性に有意な上昇がみられなかった試験では、並行実施した陽性対照物質の試験の最大転写活性化倍率を100%とした。

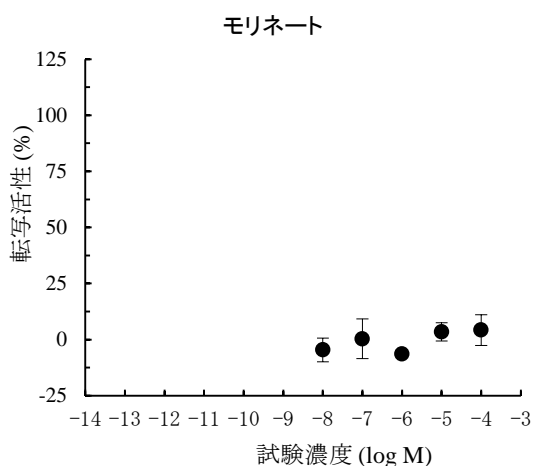


図 5(2) メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験 (アンドロゲン作用) の結果

注) 転写活性(%)は、 EC_{50} 値が算出できた試験では、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰式から算出した最大転写活性化倍率を 100%とした。転写活性に有意な上昇がみられなかった試験では、並行実施した陽性対照物質の試験の最大転写活性化倍率を 100%とした。

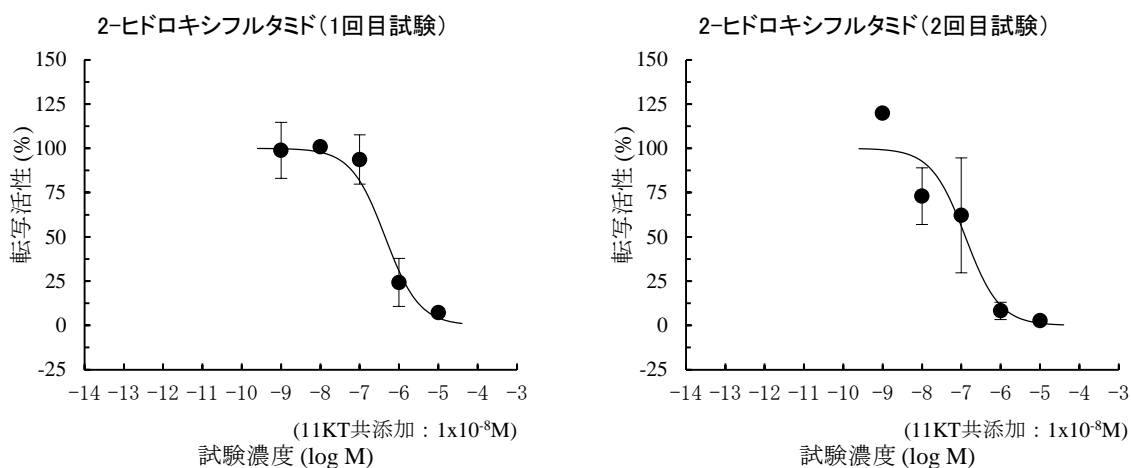


図 6 メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用) の結果

注) 転写活性(%)は、陽性物質のみ添加条件での転写活性化倍率を 100%、非線形回帰式から算出した最小転写活性化倍率又は助剤対照の転写活性化倍率 (非線形回帰式が得られなかった試験) を 0%とした。

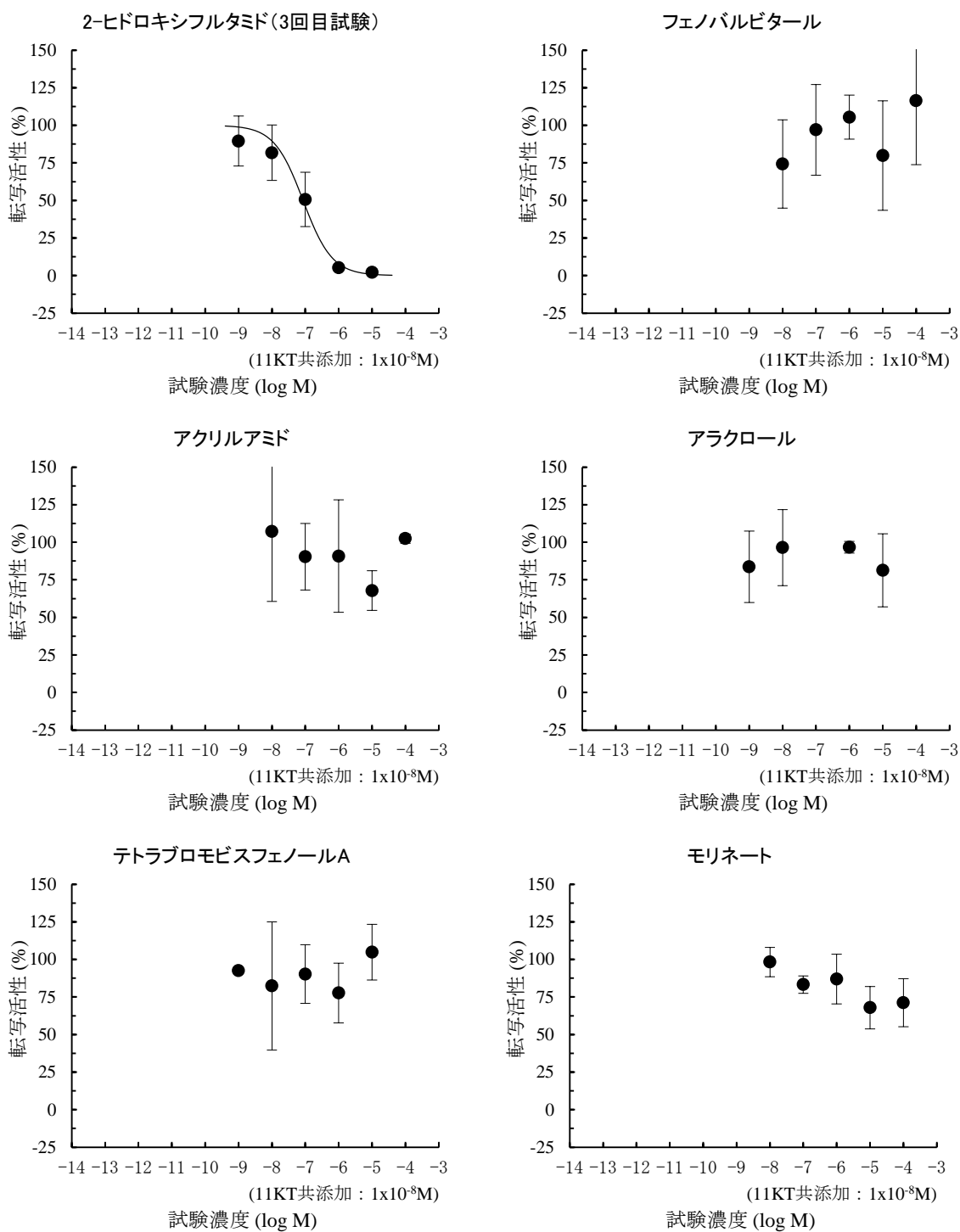


図 6(2) メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果

注) 転写活性(%)は、陽性物質のみ添加条件での転写活性化倍率を 100%、非線形回帰式から算出した最小転写活性化倍率又は助剤対照の転写活性化倍率(非線形回帰式が得られなかった試験)を 0%とした。

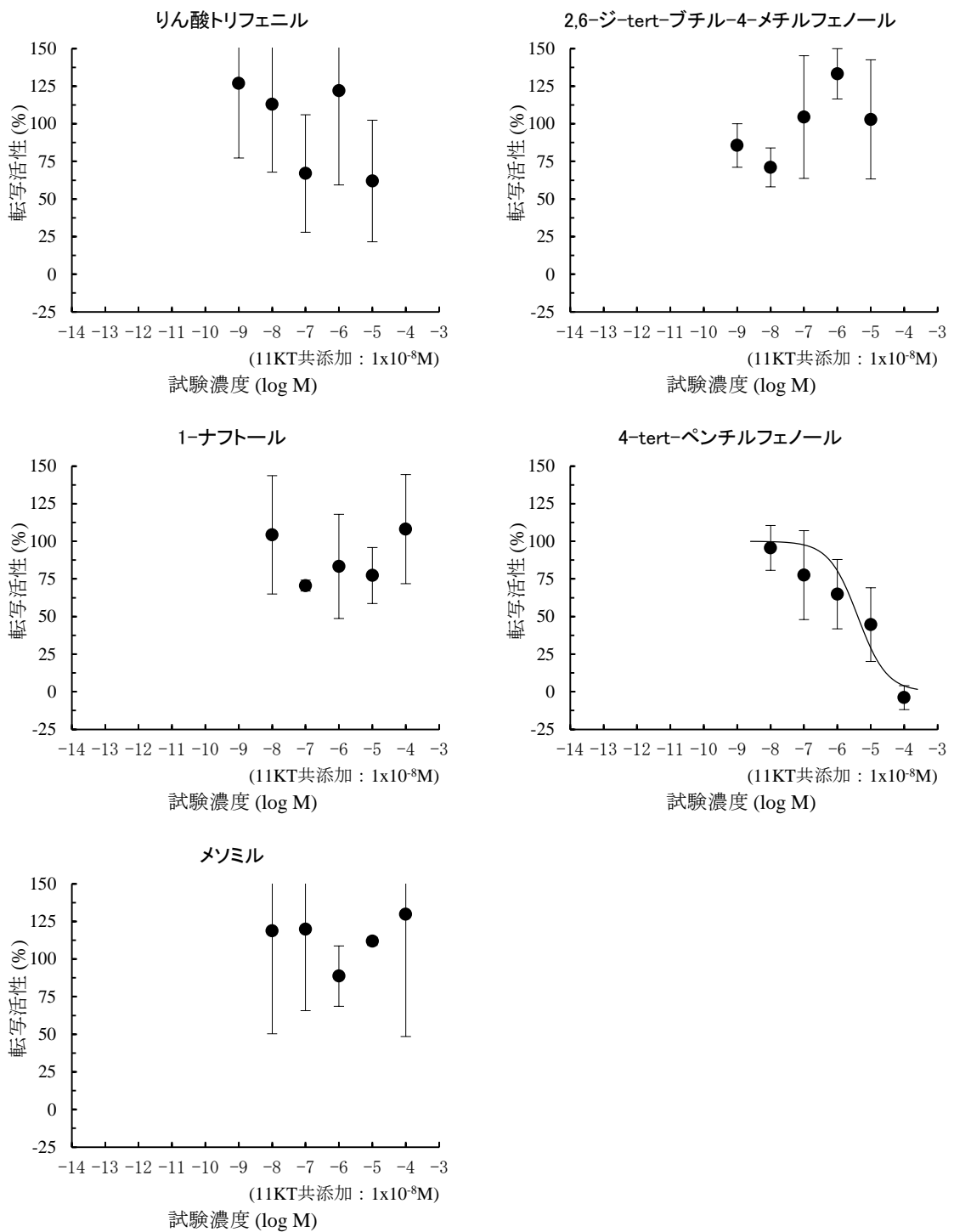


図 6(3) メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果

注) 転写活性(%)は、陽性物質のみ添加条件での転写活性化倍率を 100%、非線形回帰式から算出した最小転写活性化倍率又は助剤対照の転写活性化倍率(非線形回帰式が得られなかった試験)を 0%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

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及び抗甲状腺ホルモン作用）の結果を表 7 に示した。また、甲状腺ホルモン作用試験の結果を図 7、抗甲状腺ホルモン作用試験の結果を図 8 に示した。なお、各試験の結果を試験濃度での転写活性化倍率で示したグラフを別添 2 に示した。

甲状腺ホルモン作用試験では、試験を実施した 3 物質については、試験濃度範囲においてニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β 遺伝子の有意な転写活性はみられなかった。

抗甲状腺ホルモン作用試験では、試験を実施した 6 物質のうち、2,4,6-トリブロモフェノールにおいて、試験濃度に依存的な転写活性化倍率の有意な低下がみられ、その IC₅₀ 値は $4.6 \times 10^{-5} \text{M}$ であった（抗甲状腺ホルモン作用試験では陽性対照物質がないことから相対活性比は算出できない）。その他の 3 物質については、試験濃度範囲において $2 \times 10^{-9} \text{M}$ のトリヨードサイロニン共存下でメダカ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

| | 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 (M) | 相対活性比 | IC ₅₀ (M) | 相対活性比 |
| 2,4,6-トリブロモフェノール | | | 4.6×10^{-5} | — |
| フェノバルビタール | 得られなかった | | 得られなかった | |
| アラクロール | 得られなかった | | 得られなかった | |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | | | 得られなかった | |
| テトラブロモビスフェノールA | 得られなかった | | 得られなかった | |
| 1-ナフトール | | | 得られなかった | |
| トリヨードサイロニン | 1.4×10^{-9} | | | |

注) 灰色網掛け: 試験対象外

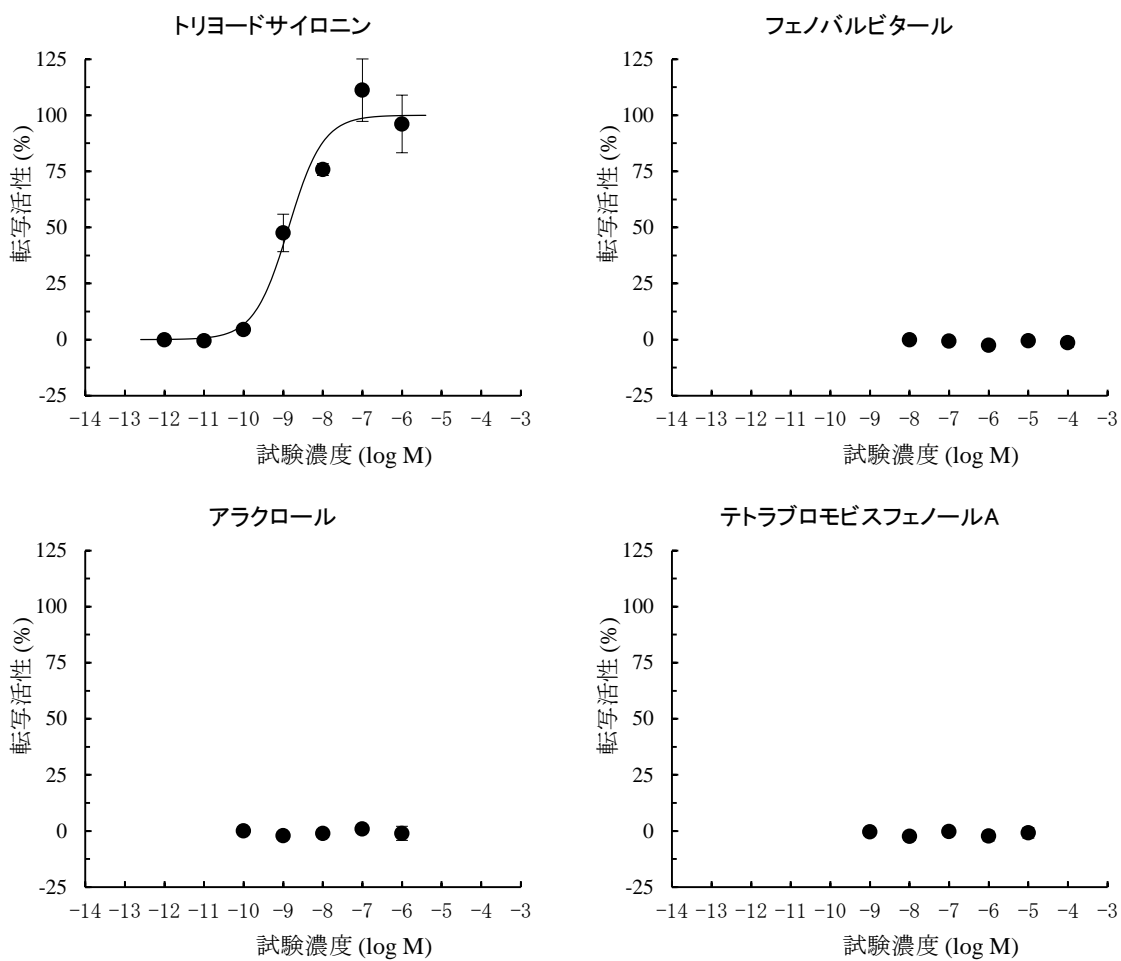


図 7 ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)の結果

注) 転写活性(%)は、 EC_{50} 値が算出できた試験では、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰式から算出した最大転写活性化倍率を 100%とした。転写活性に有意な上昇がみられなかった試験では、並行実施した陽性対照物質の試験の最大転写活性化倍率を 100%とした。

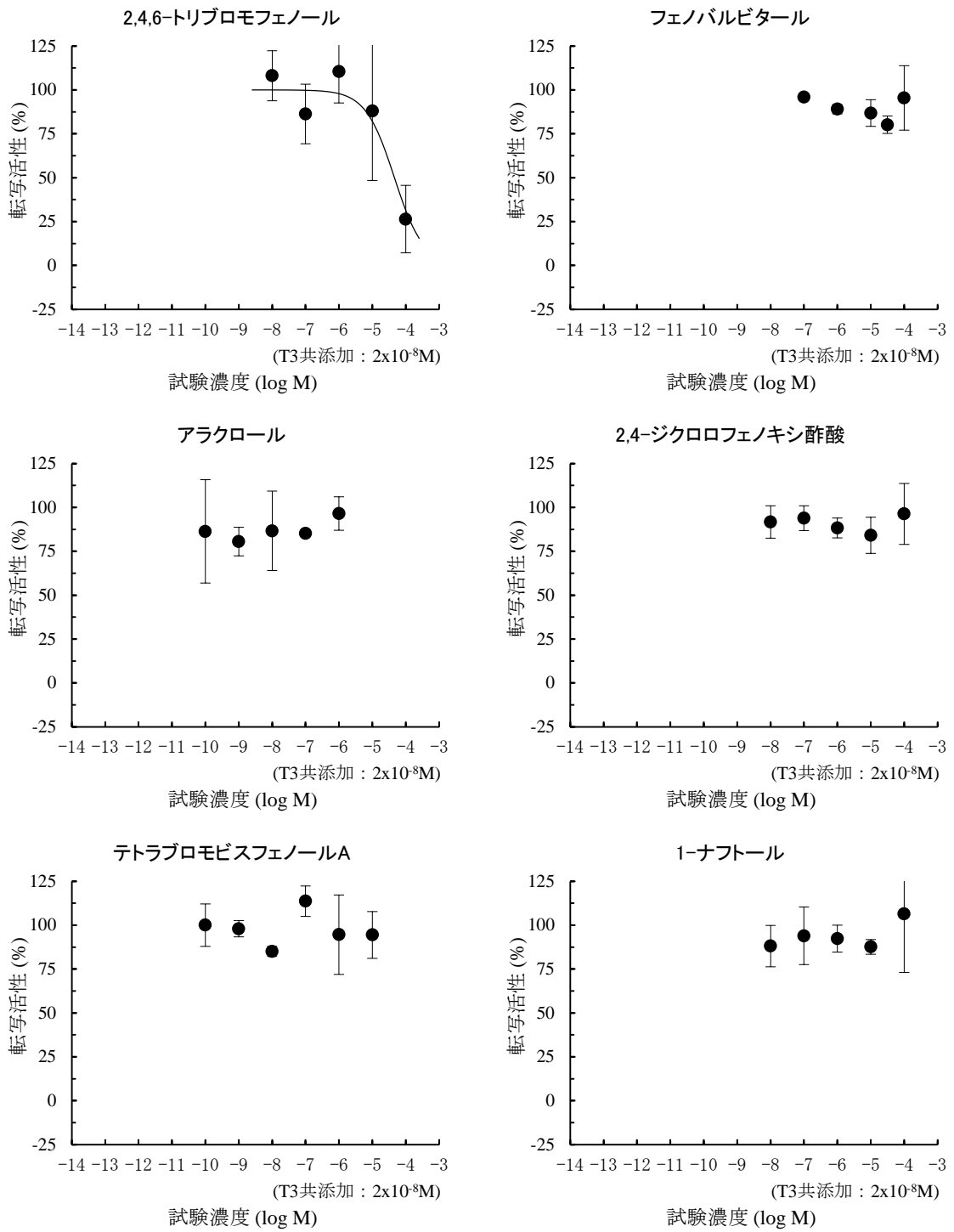
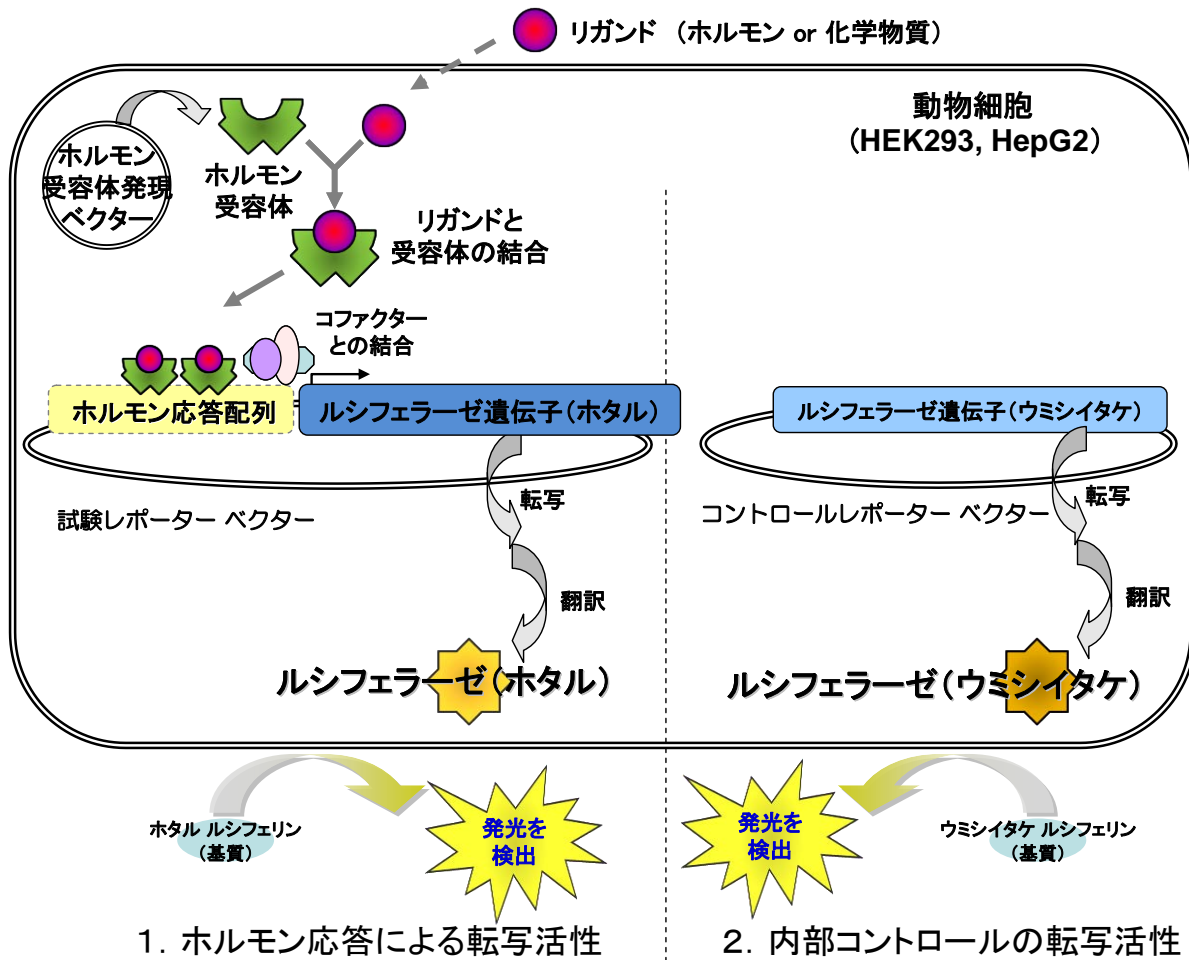


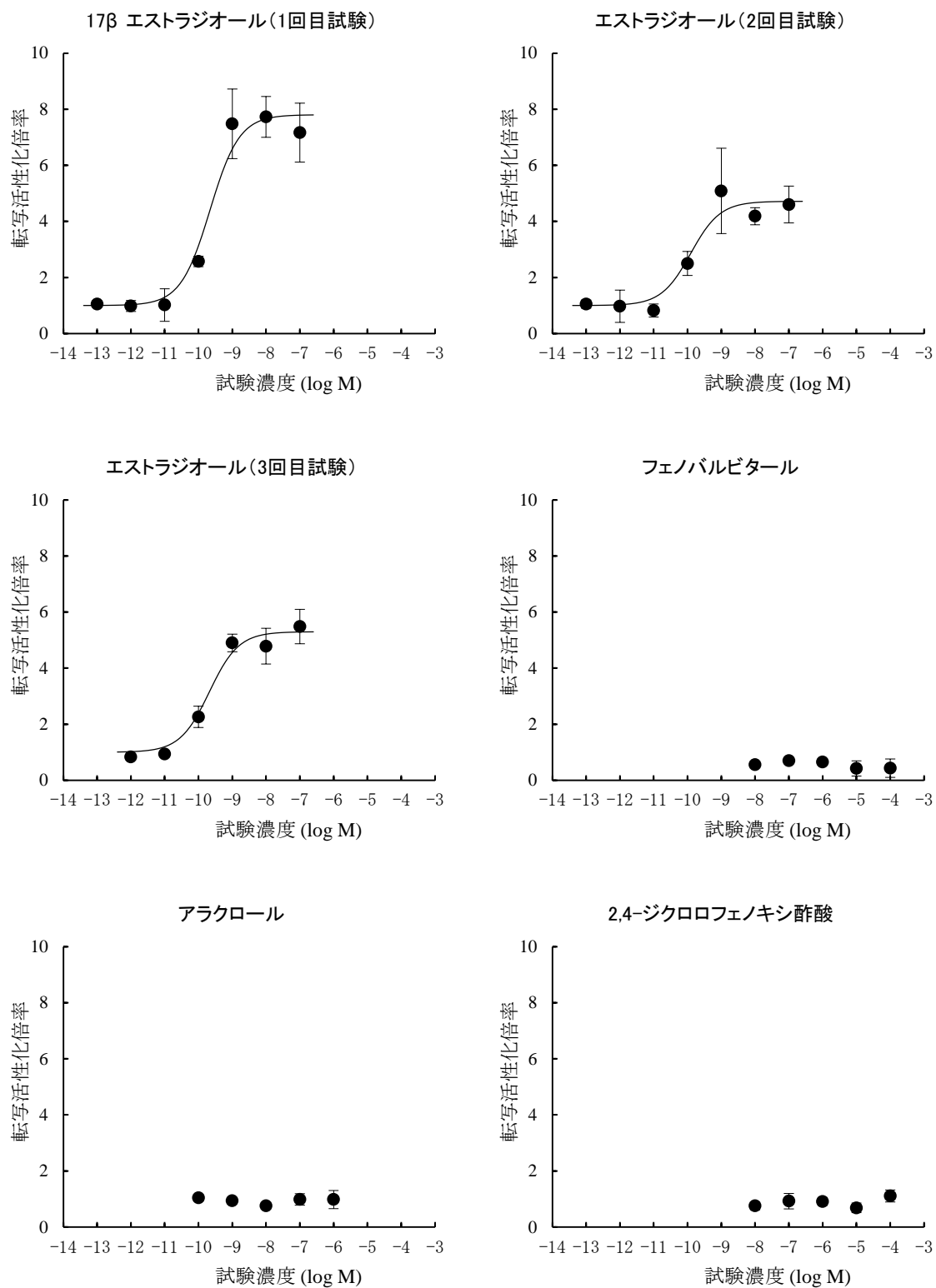
図 8 ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体βレポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン作用) の結果

注) 転写活性(%)は、陽性物質のみ添加条件での転写活性化倍率を 100%、非線形回帰式から算出した最小転写活性化倍率又は助剤対照の転写活性化倍率 (非線形回帰式が得られなかった試験) を 0%とした。

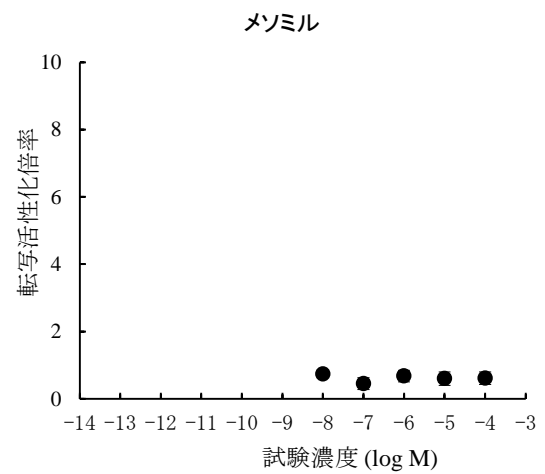
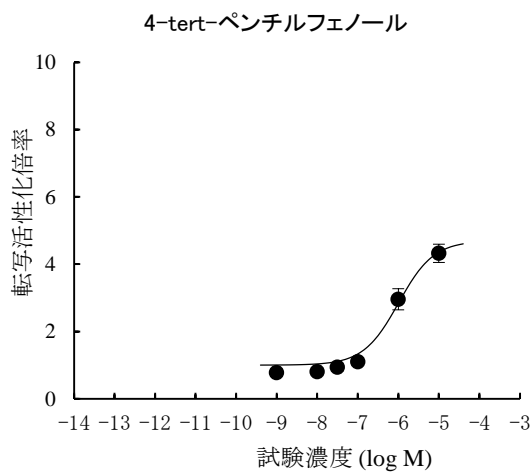
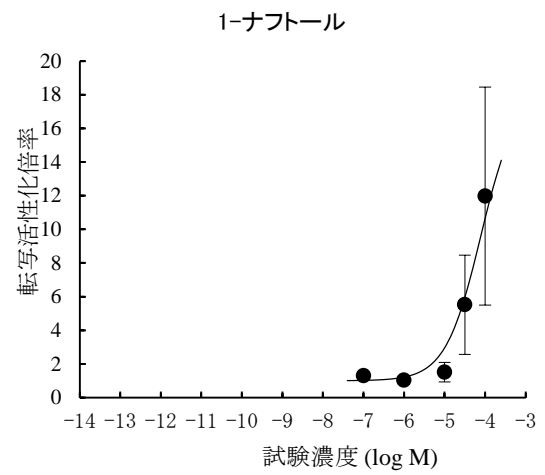
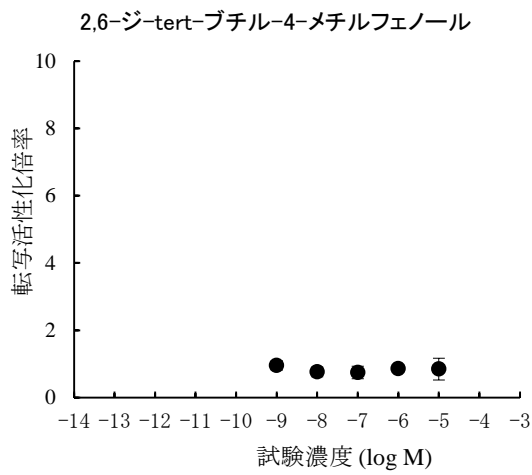
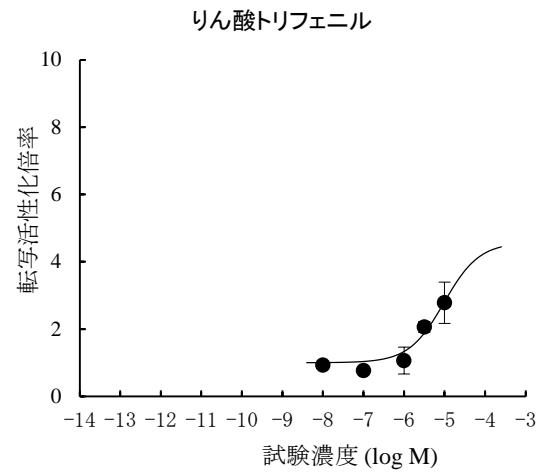
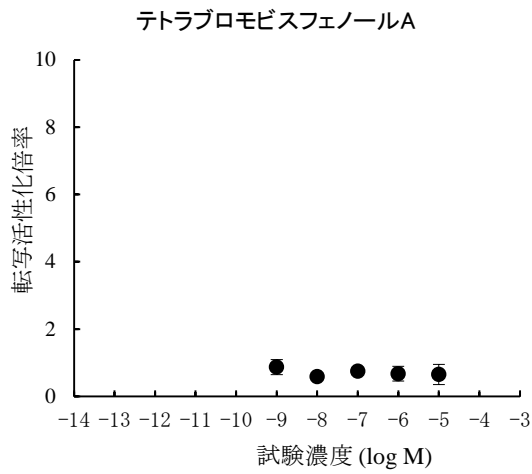


参考図 1 レポータージーン試験(デュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法)の原理

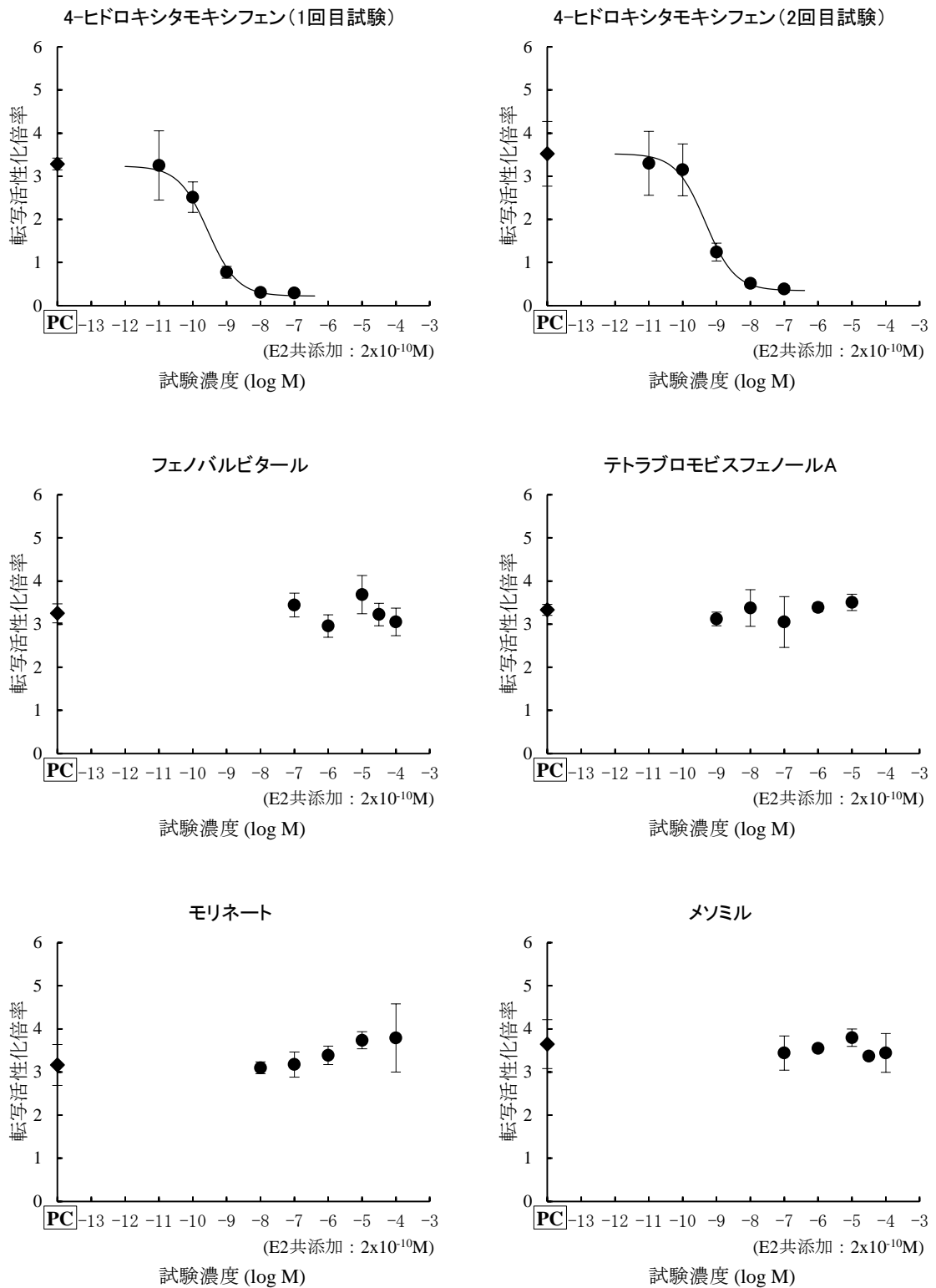
(別添 2)



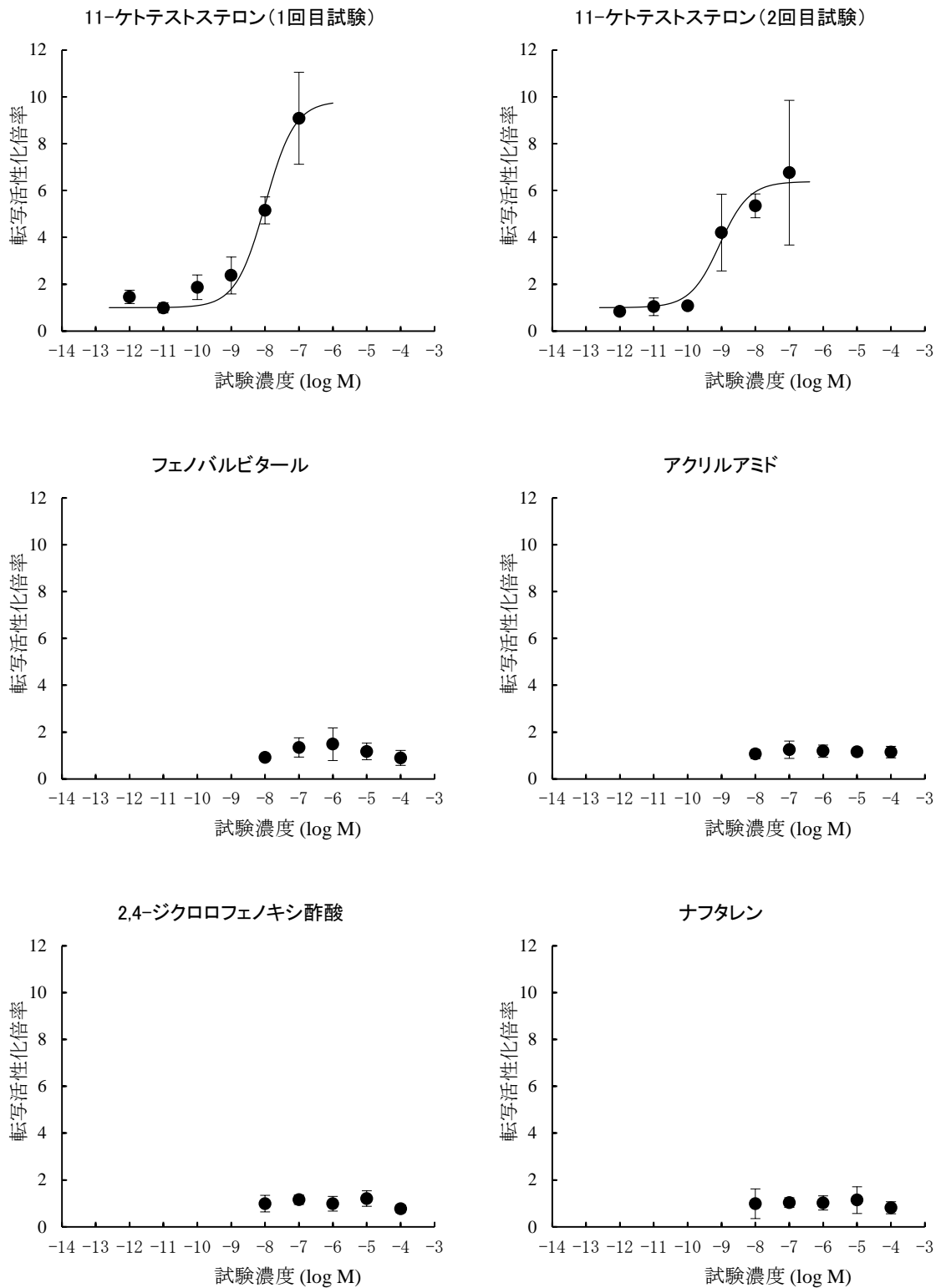
参考図 2(1) メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)の結果



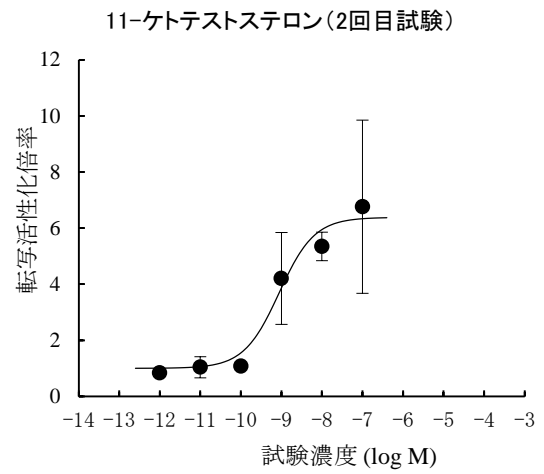
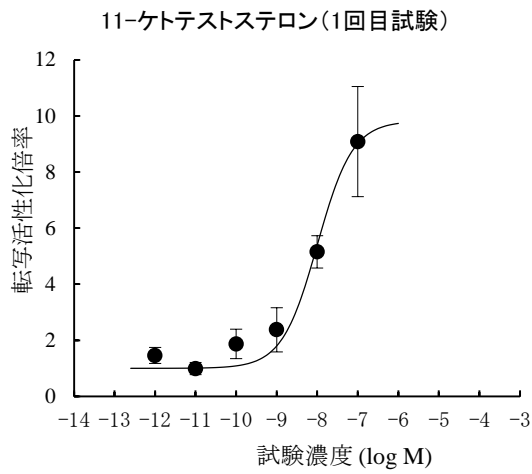
参考図 2(2) メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)の結果



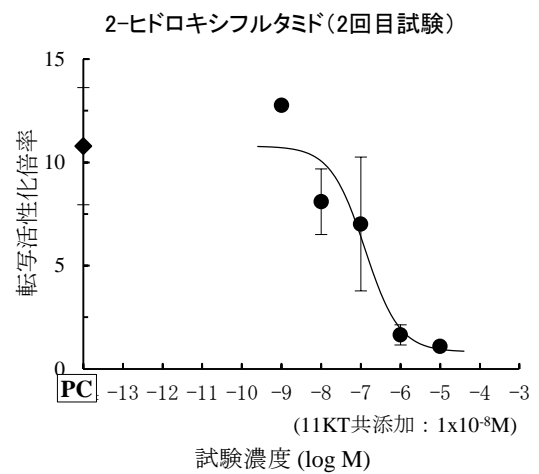
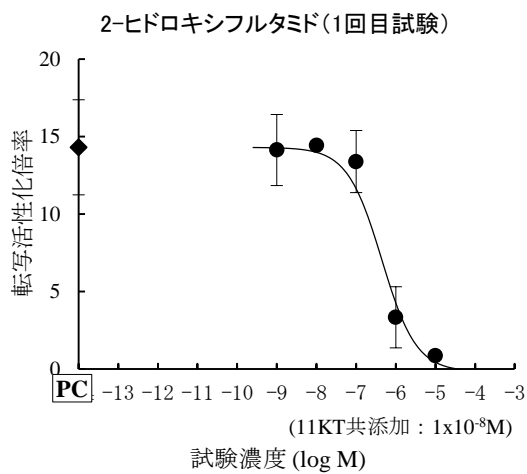
参考図3 メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)の結果



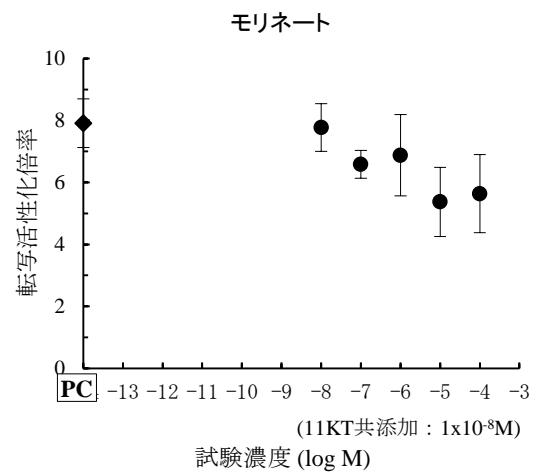
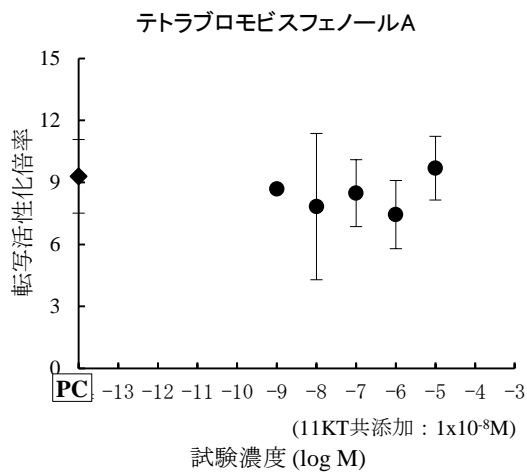
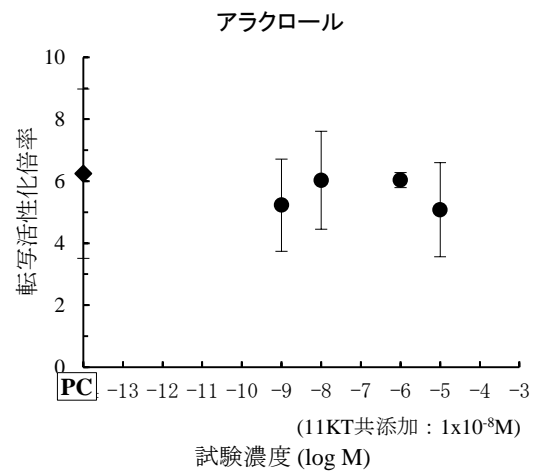
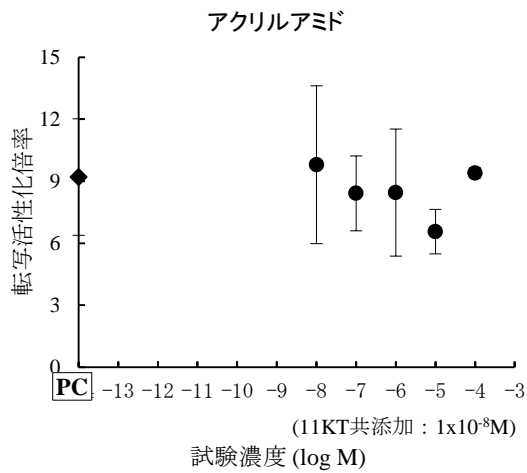
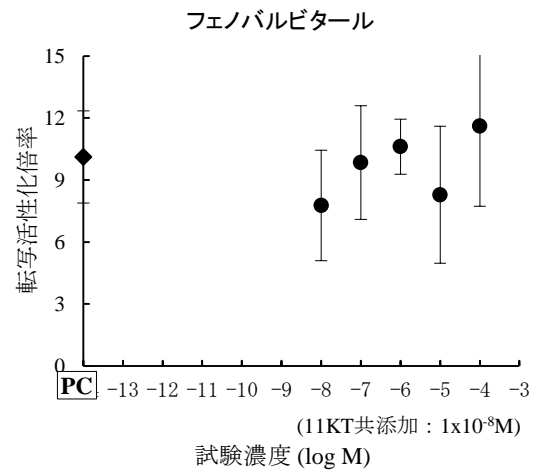
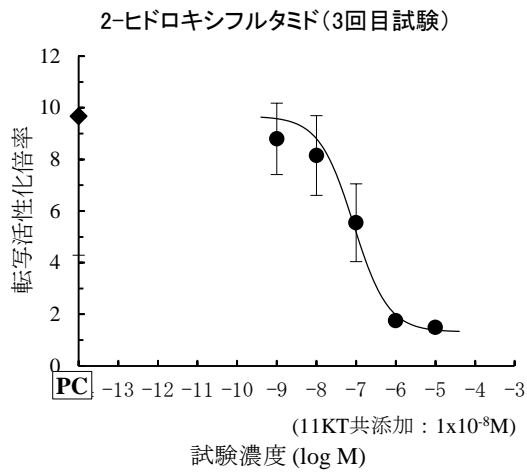
参考図 4 メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験（アンドロゲン作用）の結果



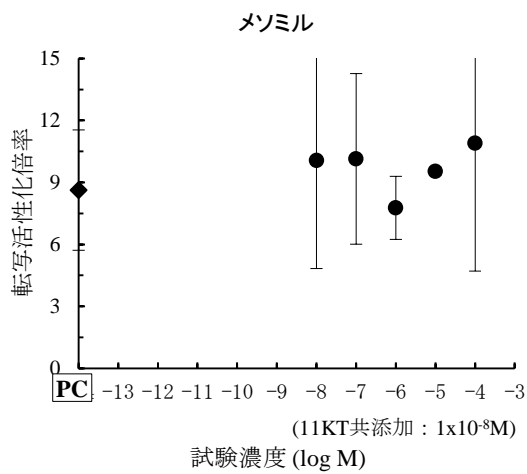
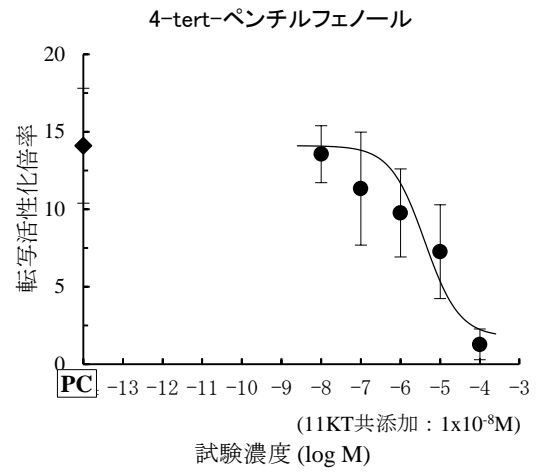
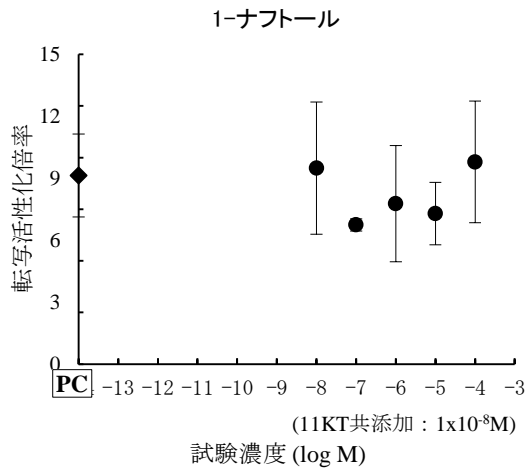
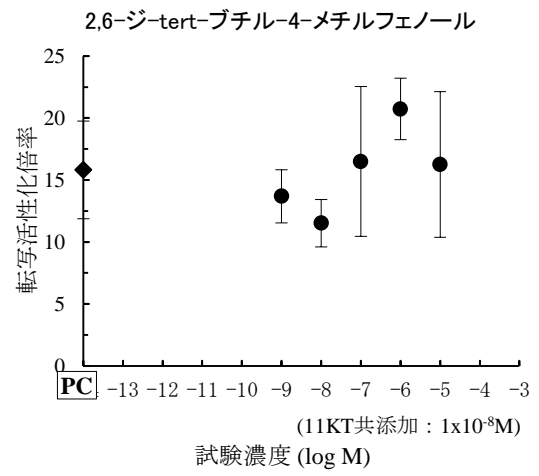
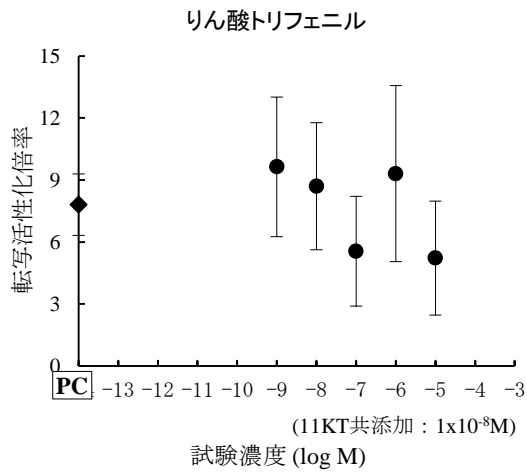
参考図 4(2) メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)の結果



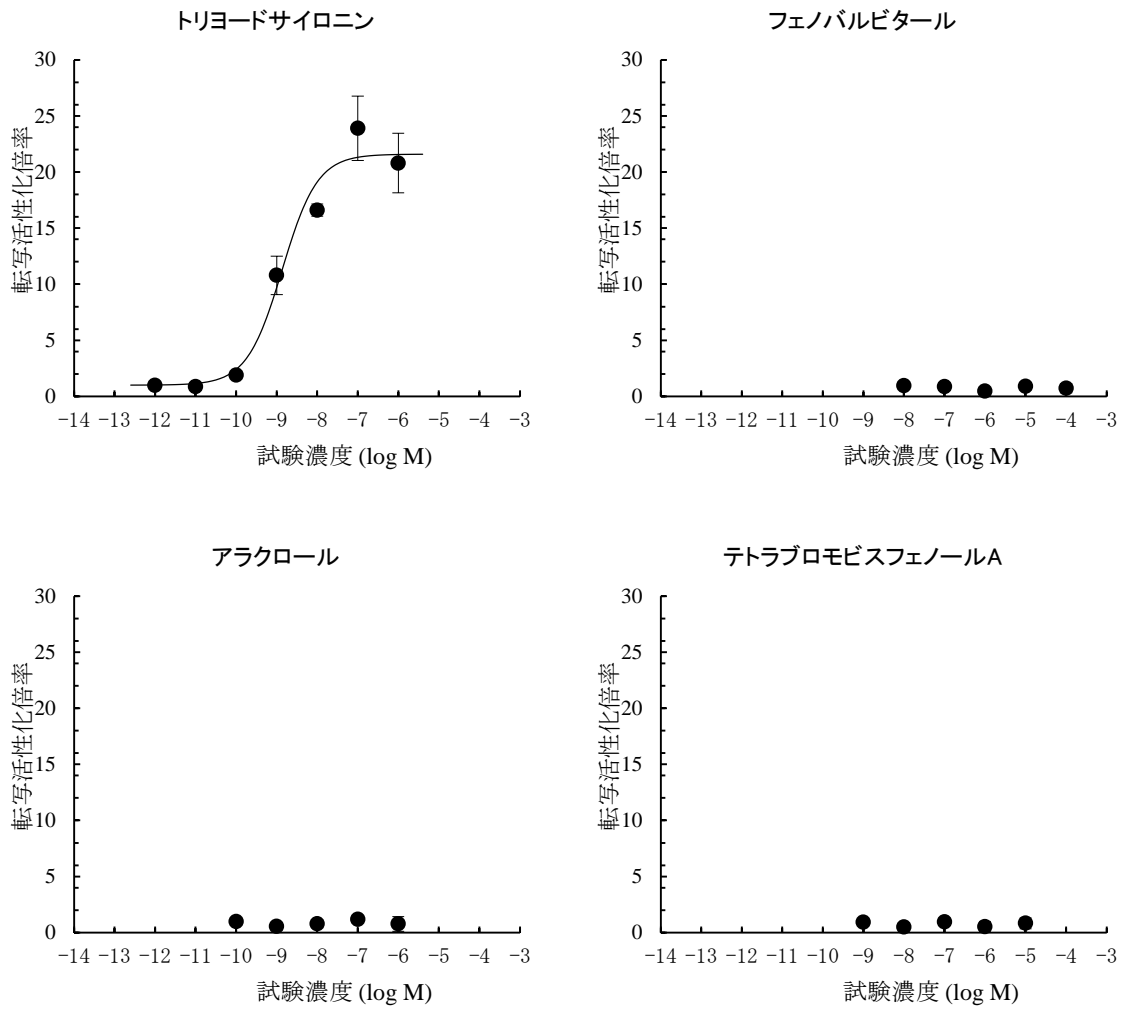
参考図 5 メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果



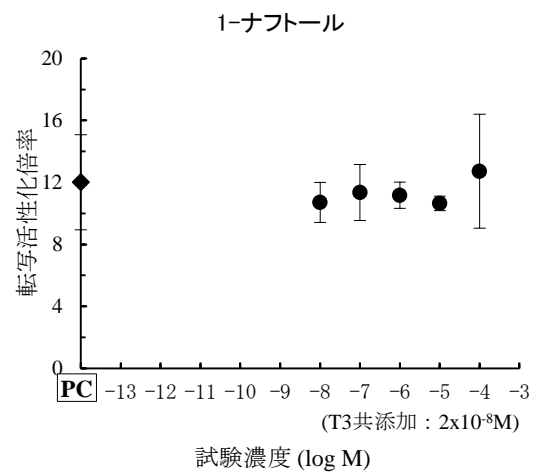
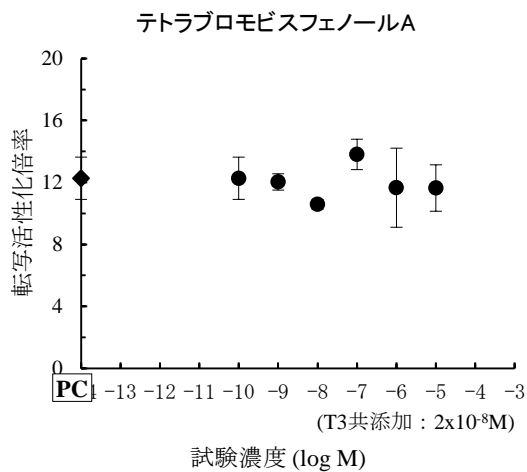
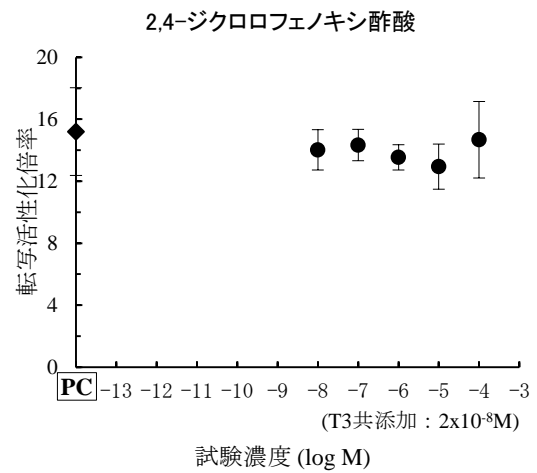
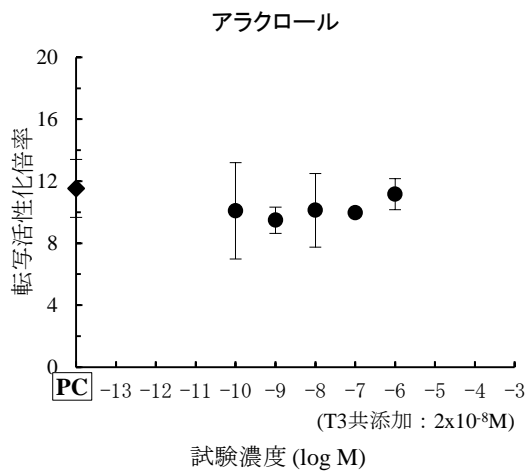
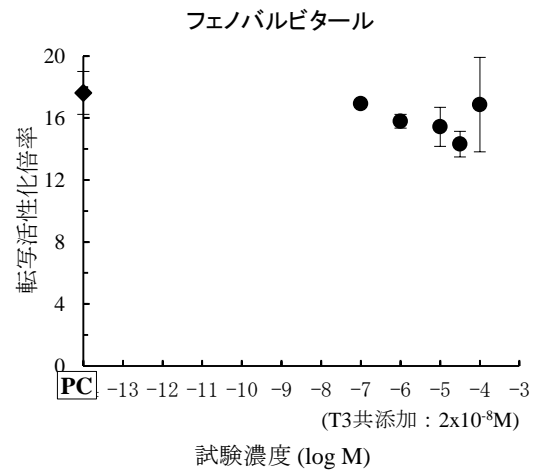
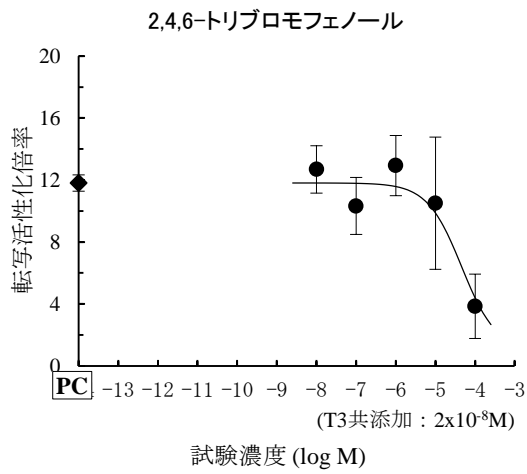
参考図 5(2) メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果



参考図 5(3) メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果



参考図 6 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)の結果



参考図 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 (抗甲状腺ホルモン作用) の結果