

平成 25 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験項目

平成 25 年度は、表 1 に示す試験対象物質及び試験項目(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。

表 1 試験対象物質及び試験項目

試験物質	試験項目(作用)						
	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
りん酸トリフェニル		○					
アトラジン	○	○	○	○	○	○	○
シマジン		○					
デカブロモジフェニルエーテル	○	○		○	○	○	
2,4-ジニトロフェノール						○	
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	○	○		○			
フェノール		○		○			
試験数	3	6	1	3	2	3	1

2. 方法及び材料

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。各試験には、以下のホルモン受容体(生物種及びサブタイプ)を用いた。

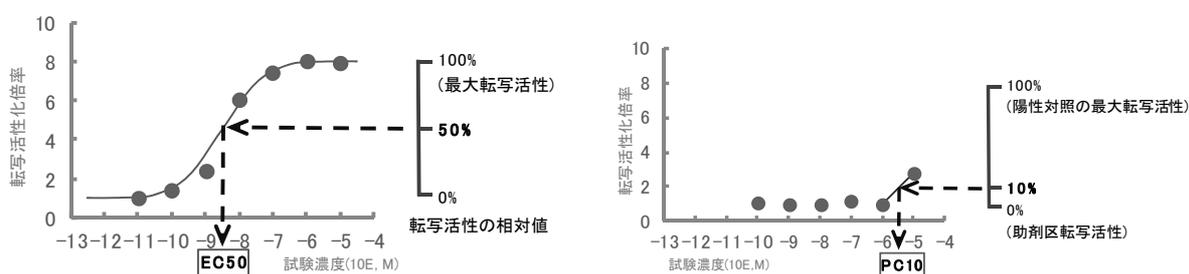
- ・エストロゲン及び抗エストロゲン作用:メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- ・アンドロゲン及び抗アンドロゲン作用:メダカアンドロゲン受容体 β (AR β)
- ・甲状腺ホルモン及び抗甲状腺ホルモン作用:ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)
- ・脱皮ホルモン作用:オオミジンコ脱皮ホルモン受容体(EcR)

試験は、純度 95%以上の試薬を用いて行った。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レポータージーン試験では、試験対象物質の阻害作用を確認するための共添加物質として、17 β エストラジオール、11-ケトテストステロン又はトリヨードサイロニンをそれぞれ試験系に 2×10^{-9} M、 1×10^{-8} M 又は 1×10^{-8} M で添加した。ま

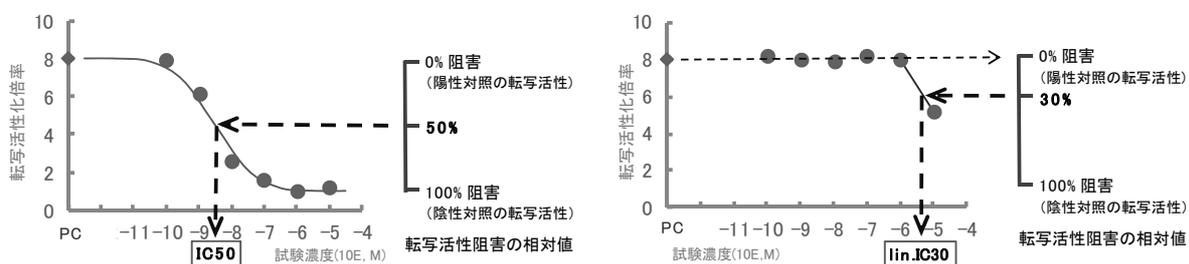
た、試験が適切に実施されたことの確認及び試験対象物質の転写活性化能又は転写活性化阻害の相対的な強さ(相対活性比)を推定するために、試験対象物質での試験と並行して、陽性対照物質(エストロゲン作用:17βエストラジオール、抗エストロゲン作用:4-ヒドロキシタモキシフェン、アンドロゲン作用:11-ケトテストステロン、抗アンドロゲン作用:2-ヒドロキシフルタミド、甲状腺ホルモン作用:トリヨードサイロニン、脱皮ホルモン作用:20-ヒドロキシエクジソン)による試験を実施した。

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暴露した後、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(発行強度比)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 EC₅₀ 値(又は PC₁₀ 値)、アンタゴニスト系試験では転写活性阻害の有無及び IC₅₀ 値(又は linIC₃₀ 値)を求めた。また、EC₅₀ 値又は IC₅₀ 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。

アゴニスト系試験での EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値の算出



アンタゴニスト系試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値の算出



3. 結果

試験管内試験の結果を表2に示した。

(1)メダカエストロゲン受容体 α (ER α)レポーター遺伝子試験

エストロゲン作用については、試験対象とした3物質(アトラジン、デカブロモジフェニルエーテル、4-ヒドロキシ安息香酸メチル)のうち、4-ヒドロキシ安息香酸メチルにおいて、メダカ ER α に対する転写活性化が認められ、その EC₅₀ 値は、 7.0×10^{-5} M、17 β 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 0.0000038 であった。他の2物質には、メダカ ER α の転写活性化は認められなかった。

抗エストロゲン作用については、試験対象とした6物質(りん酸トリフェニル、アトラジン、シマジン、デカブロモジフェニルエーテル、4-ヒドロキシ安息香酸メチル、フェノール)には、メダカ ER α に対する転写活性化阻害は認められなかった。

(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

アンドロゲン作用については、試験を実施した1物質(アトラジン)には、メダカ AR β に対する転写活性化は認められなかった。

抗アンドロゲン作用については、試験を実施したアトラジン、デカブロモジフェニルエーテル、フェノールの3物質において、メダカ AR β に対する転写活性化阻害が認められ、IC₅₀ 値は、 2.5×10^{-5} M、 1.8×10^{-7} M 及び 2.8×10^{-5} M、2 ヒドロキシフルタミド(陽性対照物質)の転写活性阻害に対する相対活性比は、0.0024、0.33 及び 0.0022 であった。

(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

甲状腺ホルモン作用については、試験を実施した2物質(アトラジン、デカブロモジフェニルエーテル)には、ニシツメガエル TR β に対する転写活性化は認められなかった。

抗甲状腺ホルモン作用については、試験を実施した3物質(アトラジン、デカブロモジフェニルエーテル、2,4-ジニトロフェノール)において、ニシツメガエル TR β に対する転写活性化阻害が認められなかった。

(4)オオミジンコ脱皮ホルモン受容体(EcR)レポーター遺伝子試験

脱皮ホルモン作用については、試験を実施した1物質(アトラジン)において、オオミジンコ EcR に対する転写活性化は認められなかった。

表 2 試験管内試験の結果

試験物質	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		抗エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
りん酸トリフェニル			(得られなかった)	
アトラジン	(得られなかった)		(得られなかった)	
シマジン			(得られなかった)	
デカブプロモジフェニルエーテル	(得られなかった)		(得られなかった)	
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	EC ₅₀ = 7.0 × 10 ⁻⁵ M	0.00038 %	(得られなかった)	
フェノール			(得られなかった)	
(PC) 17 β エストラジオール	EC ₅₀ = 2.7 × 10 ⁻¹⁰ M			
(PC) 4-ヒドロキシタモキシフェン			IC ₅₀ = 2.9 × 10 ⁻¹⁰ M	
	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 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)		IC ₅₀ = 2.5 × 10 ⁻⁵ M	0.24 %
デカブプロモジフェニルエーテル			IC ₅₀ = 1.8 × 10 ⁻⁷ M	33 %
フェノール			IC ₅₀ = 2.8 × 10 ⁻⁵ M	0.22 %
(PC) 11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 6.3 × 10 ⁻⁹ M			
(PC) 2-ヒドロキシフルタミド			IC ₅₀ = 6.1 × 10 ⁻⁸ M	
	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 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)		(得られなかった)	
デカブプロモジフェニルエーテル	(得られなかった)		(得られなかった)	
2,4-ジニトロフェノール			(得られなかった)	
(PC) トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 2.3 × 10 ⁻¹⁰ M			
	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			
	脱皮ホルモン作用			
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比		
(得られなかった)				
(PC) 20-ヒドロキシエクジソン	EC ₅₀ = 2.2 × 10 ⁻⁶ M			

■ : 試験対象外

(PC) : 陽性対照物質

平成 25 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(案)

1. 試験対象物質及び試験項目

平成 25 年度第 1 段階試験管内試験の試験対象物質及び試験項目(作用)を表 1-1 に示した。また、試験対象とした各作用モードのレポータージーン試験で用いたホルモン受容体の種類(生物種及びサブタイプ)を表 1-2 に示した。

平成 25 年度第 1 段階試験管内試験(レポータージーン試験)では、7 物質に関して、エストロゲン作用について 3 物質、抗エストロゲン作用について 6 物質、アンドロゲン作用について 1 物質、抗アンドロゲン作用について 3 物質、甲状腺ホルモン作用について 2 物質、抗甲状腺ホルモン作用について 3 物質、脱皮ホルモン作用について 1 物質を対象として計 19 試験を実施した。また、各作用モードに関して、陽性対照物質を用いた試験も実施した。

表 1-1 試験対象物質及び試験項目

試験物質	試験項目(作用)						
	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
りん酸トリフェニル		○					
アトラジン	○	○	○	○	○	○	○
シマジン		○					
デカプロモジフェニルエーテル	○	○		○	○	○	
2,4-ジニトロフェノール						○	
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	○	○					
フェノール		○		○			
試験数	3	6	1	3	2	3	1

表 1-2 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
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
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
脱皮ホルモン作用	オオミジンコ	脱皮ホルモン受容体

2. 試薬

(1)被験物質

試験に供した試験対象物質試薬(被験物質)の供給者、ロット及び純度等を表2-1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 1×10^{-1} 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(DMSO)で適宜希釈して使用した。

表2-1 被験物質

物質名	CAS番号	供給者	ロット番号	純度
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%
アトラジン	1912-24-9	和光純薬工業株式会社	ALF0763	99.5%
シマジン	122-34-9	和光純薬工業株式会社	EPH5288	99.9%
デカブプロモジフェニルエーテル	1163-19-5	和光純薬工業株式会社	STK4322	100%
2,4-ジニトロフェノール	51-28-5	Sigma-Aldrich Co.	U7957	>98%
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	99-76-3	和光純薬工業株式会社	PDG2749	100%
フェノール	108-95-2	和光純薬工業株式会社	AWF1171	100%

注) 純度は、試薬の供給者提供の試験成績書による。

(2)陽性対照物質

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活性比の推定等のために、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、脱皮ホルモン作用の抗甲状腺ホルモン作用を除く各試験において、 17β エストラジオール、4-ヒドロキシタモキシフェン、11-ケトテストステロン、2-ヒドロキシフルタミド、トリヨードサイロニン、20-ヒドロキシエクジソンを陽性対照物質として用いた。また、抗エストロゲン、抗アンドロゲン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又は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試薬の詳細を表2-2に示した。

表2-2 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	98.0%
20-ヒドロキシエクジソン	5289-74-7	Sigma-Aldrich, inc.	070M1540V	>93%

注) 純度は、試薬の供給者提供の試験成績書による。

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、DMSO 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。

(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。

3. 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)に対する毒性等を考慮して最高濃度を設定し、以下、公比 10 で 5 濃度を基本とした。各試験対象物質の試験濃度を表3-1に示した。

表2-2 試験濃度

物質名	試験濃度
りん酸トリフェニル	$1.0 \times 10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$ (0.1nM ~ $10 \mu\text{M}$)
アトラジン	$1.0 \times 10^{-9} \sim 10^{-4} \text{M}$ (1nM ~ $100 \mu\text{M}$)
シマジン	$1.0 \times 10^{-11} \sim 10^{-6} \text{M}$ (0.01nM ~ $1 \mu\text{M}$)
デカブロモジフェニルエーテル	$1.0 \times 10^{-11} \sim 10^{-6} \text{M}$ (0.01nM ~ $1 \mu\text{M}$)
2,4-ジニトロフェノール	$1.0 \times 10^{-10} \sim 10^{-5} \text{M}$ (0.1nM ~ $10 \mu\text{M}$)
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	$1.0 \times 10^{-9} \sim 10^{-4} \text{M}$ (1nM ~ $100 \mu\text{M}$)
フェノール	$1.0 \times 10^{-9} \sim 10^{-4} \text{M}$ (1nM ~ $100 \mu\text{M}$)

陽性対照物質の試験濃度は、過年度までの結果等を参考に、 EC_{50} 値又は IC_{50} 値を適切に算出できるように設定した。また、アンタゴニスト作用試験において、試験系に共添加する陽性対照物質の添加濃度は、抗エストロゲン作用試験の 17β -エストラジオールが $2.0 \times 10^{-10} \text{M}$ 、抗アンドロゲン作用試験の 11-ケトテストステロンが $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 、抗甲状腺ホルモン作用試験のトリヨードサイロニンが $2.0 \times 10^{-8} \text{M}$ とした。

4. 試験方法

すべての作用のレポーター遺伝子試験は、一過性発現細胞系を用いた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により実施した。レポーター遺伝子試験におけるデータの解析手法、妥当性や有効性

の考え方は OECD テストガイドラインを参考にした。デュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法の基本的な原理を図4-1に示した。

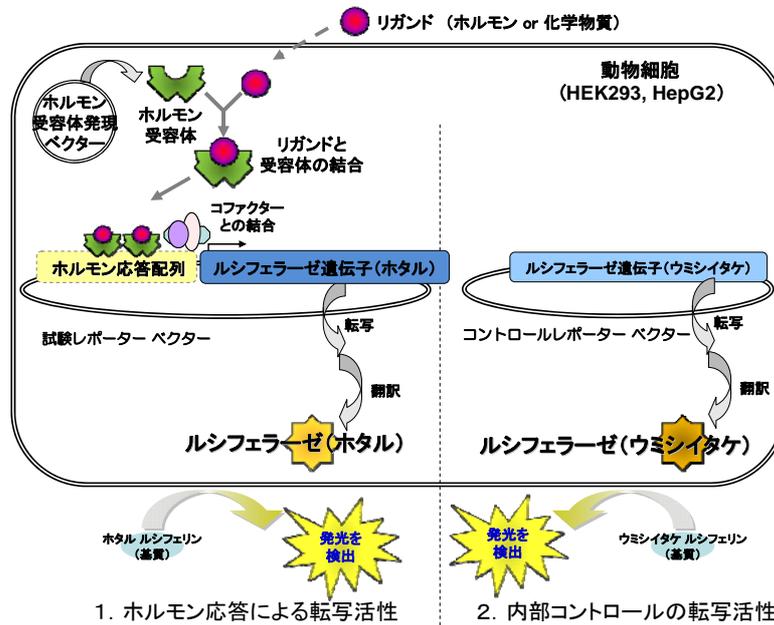


図4-1 デュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法の原理

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及びオオミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験の各試験を表4-1に示した。また、試験の実施手順は以下に示すとおりである。

試験細胞系の培養(暴露)	発光強度の測定
培地(マイクロプレート)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 レポーター遺伝子試験

試験対象物質及び陽性対照物質でのメダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用試験及び抗エストロゲン作用試験)は、以下の方法及び手順により実施した。なお、試験を実施する直前に、試験濃度の 1,000 倍濃度で被験物質を溶解させた DMSO 溶液を試験用培地(2mM L-glutamine 及びチャコールデキストランで処理した 10%ウシ胎仔血清(FCS)を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地(DMEM))に 1mL あたり 0.010mL 添加することにより、1.0%(v/v)の溶解助剤及び試験濃度の 10 倍の被験物質を含む培地を調製しておいた。また、陰性対照区について、DMSO のみを 1.0%(v/v)の濃度で添加した培地を調製しておいた。抗エストロゲン作用試験では、同様に、試験濃度の 1,000 倍濃度で被験物質を溶解させた DMSO 溶液及び同じく 17 β -エストラジオール(共添加物質)を共添濃度の 1,000 倍濃度で溶解させた DMSO 溶液をそれぞれ培地に 1mL あたり 0.010mL ずつ添加することにより、2.0%(v/v)の溶解助剤及び試験濃度の 10 倍の被験物質及び共添加物質を含む培地並びに陰性対照として用いる DMSO のみを 2.0%(v/v)の濃度で添加した培地を調製しておいた。

あらかじめ 100mm ディッシュを用いて継代培養しておいたヒト胎児腎臓由来細胞株(HEK293)を 7×10^4 cells/mL の密度で試験用培地に懸濁させ、ここから 0.200mL ずつ 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注、動物細胞を 1.4×10^4 cells/well で播種し、37°C、5%CO₂ に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置培養した。24 時間の培養後、40ng の medakaERalpha/pcDNA3.1(メダカの ER α を発現するベクター)、80ng の ERE-TK-Luc(ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に 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)、20ng の 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)及び 0.0006mL のトランスフェクション試薬 FuGENE 6(プロメガ株式会社)を含む培地 0.020mL を各ウェルに添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内に 3 種のベクターをトランスフェクションさせた。

ベクターの導入後、エストロゲン作用試験では、上記により調製した 10 倍濃度の被験物質及び DMSO を含む培地、抗エストロゲン作用試験では、10 倍濃度の被験物質、共添加物質及び DMSO を含む培地を試験濃度あたり 3 連(以上)のウェルに 0.024mL ずつ添加した。被験物質の添加後、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 時間の培養(化学物質へのばく露)を行った。

(2)メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験

試験対象物質及び陽性対照物質でのメダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用試験及び抗アンドロゲン作用試験)は、以下の方法及び手順により実施した。なお、試験を実施する直前に、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験と同様に、被験物質及び溶解助剤、被験物質と共添加物質(11 ケトテストステロン)及び溶解助剤を所定の濃度で試験用培地(2mM L-glutamine 及びチャコールデキストランで処理した 10%ウシ胎仔血清(FCS)を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地(DMEM))に添加、調製しておいた。

あらかじめ 100mm ディッシュを用いて継代培養しておいたヒト肝臓腫瘍由来細胞株(HepG2)を 7×10^4 cells/mL の密度で試験用培地に懸濁させ、ここから 0.200mL ずつ 96 穴マイクロプレート

の各ウェルに分注、動物細胞を 1.4×10^4 cells/well で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ に設定した CO_2 インキュベータ内で 24 時間静置培養した。24 時間の培養後、40ng の 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)、80ng の MMTV-Luc(ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に AR 応答エレメントを組み込んだベクター)、20ng の 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)及び 0.0006mL のトランスフェクション試薬 FuGENE HD(プロメガ株式会社)を含む培地 20 μL を各ウェルに添加し、さらに CO_2 インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内に 3 種のベクターをトランスフェクションさせた。

ベクターの導入後、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験と同様に、試験濃度あたり 3 連(以上)のウェルに、あらかじめ調製した 10 倍濃度の被験物質及び DMSO を含む培地、抗アンドロゲン作用試験では 10 倍濃度の被験物質、共添加物質及び DMSO を含む培地を 0.0.024mL ずつ添加した。被験物質の添加後、マイクロプレートに CO_2 インキュベータ内で静置し、さらに 40 時間の培養(化学物質へのばく露)を行った。

(3)ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポーター遺伝子試験

試験対象物質及び陽性対照物質での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試験及び抗甲状腺ホルモン作用試験)は、以下の方法及び手順により実施した。なお、試験を実施する直前に、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験と同様に、被験物質及び溶解助剤、被験物質と共添加物質(トリヨードサイロニン)及び溶解助剤を所定の濃度で試験用培地(2mM L-glutamine 及びチャコールデキストランで処理した 10%ウシ胎仔血清(FCS)を含むダルベッコ・フオークト変法イーグル最小必須培地(DMEM))に添加、調製しておいた。

あらかじめ 100mm ディッシュを用いて継代培養しておいたヒト胎児腎臓由来細胞株(HEK293)を 7×10^4 cells/mL の密度で試験用培地に懸濁させ、ここから 0.200mL ずつ 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注、動物細胞を 1.4×10^4 cells/well で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ に設定した CO_2 インキュベータ内で 24 時間静置培養した。24 時間の培養後、40ng の tropicalis TR beta/pcDNA(ニシツメガエルの TR β を発現するベクター)、80ng の 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)、20ng の 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)及び 0.0006mL のトランスフェクション試薬 FuGENE 6(プロメガ株式会社)を含む培地 0.020mL を各ウェルに添加し、さらに CO_2 インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内に 3 種のベクターをトランスフェクションさせた。

ベクターの導入後、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験と同様に、試験濃度あたり 3 連(以上)のウェルに、あらかじめ調製した 10 倍濃度の被験物質及び DMSO を含む培地、抗アンドロゲン作用試験では 10 倍濃度の被験物質、共添加物質及び DMSO を含む培地を 0.0.024mL ずつ添加した。被験物質の添加後、マイクロプレートに CO_2 インキュベータ内で静置し、さらに 40 時間の培養(化学物質へのばく露)を行った。

(4)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

試験対象物質及び陽性対照物質での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(脱皮ホルモン作用試験)は以下の方法及び手順により実施した。なお、試験を実施する直前に、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験と同様に、被験物質及び溶解助剤を所定の濃度で試験用培地(2mM L-glutamine 及びチャコールデキストランで処理した 10%ウシ胎仔血清(FCS)を含むダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地/栄養混合物 F-12 ハム(DMEM/F12))に添加、調製しておいた。

あらかじめ 100mm ディッシュで継代培養しておいたチャイニーズハムスター卵巣由来繊維芽細胞株(CHO)を 7×10^4 cells/mL の密度で試験用培地に懸濁させ、ここから 0.200mL ずつ 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注、動物細胞を 1.4×10^4 cells/well で播種し、37°C、5%CO₂に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置培養した。24 時間の培養後、6ng の pBIND-dapEcR(オオミジンコの脱皮ホルモン受容体 EcR を発現するベクター)、6ng の ACT-dapUSP(LBD)及び 20ng の pACT-droTaiman(LXXLL)及び 60ng の pG5-Luc、0.0002mL のトランスフェクション試薬 FuGENE HG(プロメガ株式会社)を含む培地 20 μ L を各ウェルに添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置し、動物細胞内に 4 種のベクター(ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に EcR 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等)をトランスフェクションさせた。

ベクターの導入後、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験と同様に、試験濃度あたり 3 連(以上)のウェルに、あらかじめ調製した 10 倍濃度の被験物質及び DMSO を含む培地を 0.0.024mL ずつ添加した。被験物質の添加後、マイクロプレートを CO₂ インキュベータ内で静置し、さらに 40 時間の培養(化学物質へのばく露)を行った。

上記によるばく露完了後、各ウェル内の培地を除去し、PBS で洗浄した後、細胞溶解試薬(Passive Lysis Buffer(プロメガ株式会社)を純水で 1:4 v/v で希釈したものを)50 μ L 添加してウェル内の動物細胞を溶解した。各ウェル内の溶液 10 μ L を 96 穴ホワイト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。

表4-1 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		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	1.4×10^4 細胞/well		1.4×10^4 細胞/well		1.4×10^4 細胞/well		1.4×10^4 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 ₂ 、40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)		3連/濃度(ウェル)
共添加陽性物質 (共添加濃度)	—	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^{-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%)

5. 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。

アゴニスト系試験における EC_{50} 値及び PC_{10} 値、アンタゴニスト系試験における IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値の概念を図5-1に示した。

(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(陰性対照の各ウェルの平均値)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

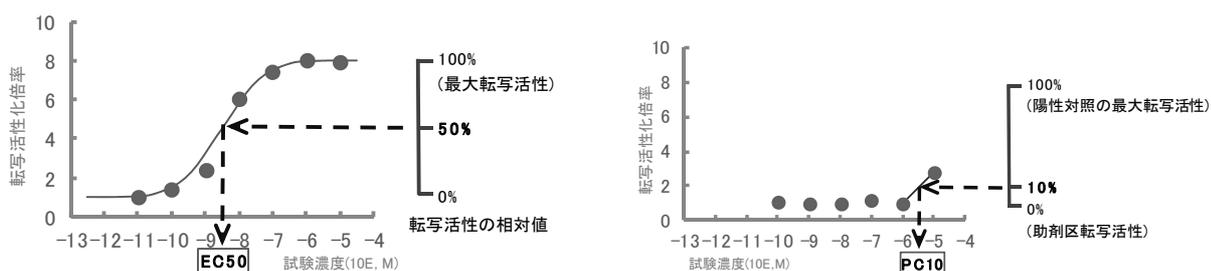
被験物質の試験最高濃度と陰性対照区の転写活性化倍率について、t検定により統計的に検定した。最高試験濃度の転写活性化倍率に統計的に有意な上昇が認められた被験物質について、各試験濃度における平均転写活性化倍率を用いて EC_{50} 値又は PC_{10} 値を算出した。 EC_{50} 値については、下側範囲を陰性対照の転写活性化倍率とする 3-parameter シグモイドモデル(非線形回帰)により算出した。非線形回帰モデルによるデータ解析は、専用の解析ソフト GraphPad Prism(GraphPad Software)を用いて行った。また、試験最高濃度の転写活性化倍率に統計的に有意な上昇が認められたものの、非線形回帰モデルによる解析から得られた EC_{50} 値が試験最高濃度よりも高濃度(EC_{50} 値が外挿推定値)となった場合は、陽性対照物質の最大転写活性の 10%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 PC_{10} 値を算出した。ただし、検定により、試験最高濃度において転写活性化倍率に有意な上昇が認められた場合でも、平均転写活性化倍率が陽性対照物質の最大転写活性の 10%値より小さかった場合には PC_{10} 値を算出しなかった。また、試験濃度範囲において被験物質の転写活性化倍率に陰性対照区と比較して有意な上昇が認められなかった被験物質及び最高試験濃度における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%値を超えなかった被験物質については、試験濃度範囲において試験対象としたホルモン受容体に対する転写活性化が認められず、 EC_{50} 値及び PC_{10} 値のいずれも得られなかったと結論した。

(3) アンタゴニスト系試験での IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値の算出

被験物質の試験最高濃度と陽性対照区の転写活性化倍率について、t検定により統計的に検定した。最高試験濃度の転写活性化倍率に統計的に有意な低下が認められた被験物質について、各試験濃度における平均転写活性化倍率を用いて IC_{50} 値又は $linIC_{30}$ 値を算出した。 IC_{50} 値に

については、下側範囲を陰性対照の転写活性化倍率とする 3-parameter シグモイドモデル(非線形回帰)により算出した。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。また、試験最高濃度の転写活性化倍率に統計学的に有意な上昇が認められたものの、非線形回帰モデルによる解析から得られた IC_{50} 値が試験最高濃度よりも高濃度(IC_{50} 値が外挿推定値)となった場合は、陽性対照物質の最大転写活性の 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 $linIC_{30}$ 値を算出した。ただし、検定により、試験最高濃度において転写活性化倍率に有意な上昇が認められた場合でも、平均転写活性化倍率が陽性対照物質の最大転写活性の 70%値より大きかった場合には $linIC_{30}$ 値を算出しなかった。また、試験濃度範囲において被験物質の転写活性化倍率に陰性対照区と比較して有意な低下(転写活性化阻害)が認められなかった被験物質及び最高試験濃度における転写活性化倍率に並行して実施した陽性対照物質の最大転写活性と比較して 30%を超える阻害がみられなかった被験物質については、試験濃度範囲において試験対象としたホルモン受容体に対する転写活性化阻害が認められず、 IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値のいずれも得られなかったと結論した。

アゴニスト系試験での EC_{50} 値及び PC_{10} 値の算出



アンタゴニスト系試験での IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値の算出

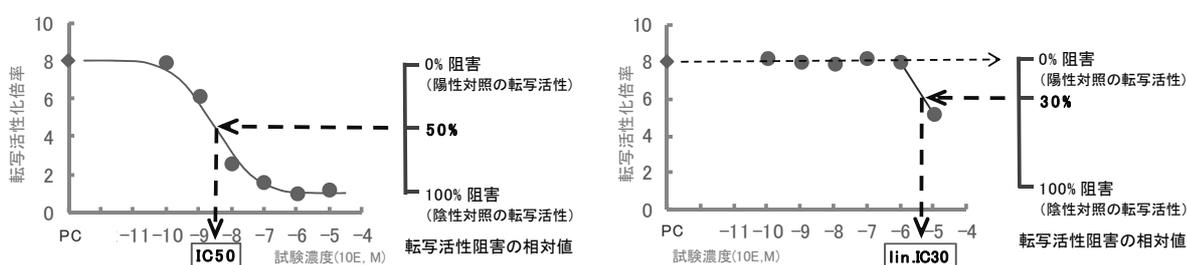


図5-1 EC_{50} 値及び PC_{10} 値並びに IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値の算出

(4) 相対活性比の算出

アゴニスト検出系試験において、 EC_{50} 値又は PC_{10} 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。

6. 試験の有効性について

アゴニスト検出系試験については、被験物質と同一のマイクロプレートプレートにおける陽性対照物質(17β エストラジオール、11 ケトテストステロン、トリヨードサイロニン、20-ヒドロキシエクジソン)の最大転写活性化倍率(平均)が 4 以上であった場合、当該マイクロプレートで実施した一連の被験物質(試験対象物質)の試験は有効であった(適切に実施された)と判断した。アンタゴニスト検出系試験については、同一のマイクロプレートプレートにおける陽性物質(17β エストラジオール、11-ケトテストステロン又はトリヨードサイロニン)のみを添加した陽性対照区の転写活性化倍率(平均)が 3 以上であった場合、当該マイクロプレートで実施した一連の被験物質(試験対象物質)の試験は有効であったと判断した。

7. 結果

(1)メダカエストロゲン受容体 α(ER α)レポーター遺伝子試験

メダカエストロゲン受容体 α(ER α)レポーター遺伝子試験の結果を表7-1に示した。また、各試験対象物質の結果(試験濃度と転写活性の関係)を図7-1及び図7-2に示した。

エストロゲン作用試験の結果、試験対象とした 3 物質のうち、4-ヒドロキシ安息香酸メチルに関して、試験濃度範囲で転写活性化倍率の有意な増加がみられ、その EC₅₀ 値は、 7.0×10^{-5} M、17β エストラジオール(陽性対照物質)に対する相対活性比は 0.00038%であった。アトラジン及びデカブプロモジフェニルエーテルについては、試験濃度範囲において、メダカ ER α の転写活性化は認められなかった(したがって、これらの物質に関して EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値は得られなかった)。

抗エストロゲン作用試験の結果、試験対象としたりん酸トリフェニル、アトラジン、シマジン、デカブプロモジフェニルエーテル、4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びフェノールの 6 物質に関して、試験濃度範囲において、試験系に共添加した 17β エストラジオールのメダカ ER α に対する転写活性への阻害は認められなかった。

表7-1 メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験の結果

試験物質	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		抗エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
りん酸トリフェニル			(得られなかった)	
アトラジン	(得られなかった)		(得られなかった)	
シマジン			(得られなかった)	
デカブロモジフェニルエーテル	(得られなかった)		(得られなかった)	
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	EC ₅₀ = 7.0 × 10 ⁻⁵ M	0.00038 %	(得られなかった)	
フェノール			(得られなかった)	
(PC) 17 β エストラジオール	EC ₅₀ = 2.7 × 10 ⁻¹⁰ M			
(PC) 4-ヒドロキシタモキシフェン			IC ₅₀ = 2.9 × 10 ⁻¹⁰ M	

■ : 試験対象外 (PC) : 陽性対照物質

(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 (AR β)レポーター遺伝子試験の結果を表7-2に示した。また、各試験対象物質の結果(試験濃度と転写活性の関係)を図7-3及び図7-4に示した。

アンドロゲン作用試験の結果、試験対象としたアトラジンに関して、試験濃度範囲において、メダカAR β に対する転写活性化は認められなかった。

抗アンドロゲン作用試験の結果、抗アンドロゲン作用試験の結果、試験対象としたアトラジン、デカブロモジフェニルエーテル、フェノールの3物質において、転写活性倍率に有意な低下がみられ、試験系に添加した11-ケトテストステロンによるメダカAR β の転写活性に対するIC₅₀値は、2.5 × 10⁻⁵M、1.8 × 10⁻⁷M及び2.8 × 10⁻⁵M、それらの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、0.24%、33%及び0.22%であった。

表7-2 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

試験物質	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 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)		IC ₅₀ = 2.5 × 10 ⁻⁵ M	0.24 %
デカブロモジフェニルエーテル			IC ₅₀ = 1.8 × 10 ⁻⁷ M	33 %
フェノール			IC ₅₀ = 2.8 × 10 ⁻⁵ M	0.22 %
(PC) 11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 6.3 × 10 ⁻⁹ M			
(PC) 2-ヒドロキシフルタミド			IC ₅₀ = 6.1 × 10 ⁻⁸ M	

■ : 試験対象外 (PC) : 陽性対照物質

(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 (TR β)レポーター遺伝子試験の結果を表7-3に示した。また、各試験対象物質の結果(試験濃度と転写活性の関係)を図7-5及び図7-6に示した。

甲状腺ホルモン作用試験の結果、試験対象としたアトラジン及びデカブロモジフェニルエーテルにおいて、ニシツメガエル TR β に対する転写活性化は認められなかった。

抗甲状腺ホルモン作用試験の結果、試験対象としたアトラジン、デカブロモジフェニルエーテル及び 2,4-ジニトロフェノールに関して、試験系に共添加したトリヨードサイロニンのニシツメガエル TR β に対する転写活性への阻害は認められなかった。

表7-3 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の結果

試験物質	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 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)		(得られなかった)	
デカブロモジフェニルエーテル	(得られなかった)		(得られなかった)	
2,4-ジニトロフェノール			(得られなかった)	
(PC) トリヨードサイロニン				

■ :試験対象外 (PC) :陽性対照物質

(4)オオミジンコ脱皮ホルモン受容体(EcR)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(EcR)レポーター遺伝子試験の結果を表7-4に示した。また、各試験対象物質の結果(試験濃度と転写活性の関係)を図7-7に示した。

脱皮ホルモン作用試験の結果、試験対象としたアトラジンに関して、試験濃度範囲において、オオミジンコ EcR に対する転写活性化は認められなかった。

表7-4 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の結果

試験物質	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			
	脱皮ホルモン作用		抗脱皮ホルモン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)			
(PC) 20-ヒドロキシエクジソン	EC ₅₀ = 2.2 × 10 ⁻⁶ M			

■ :試験対象外 (PC) :陽性対照物質

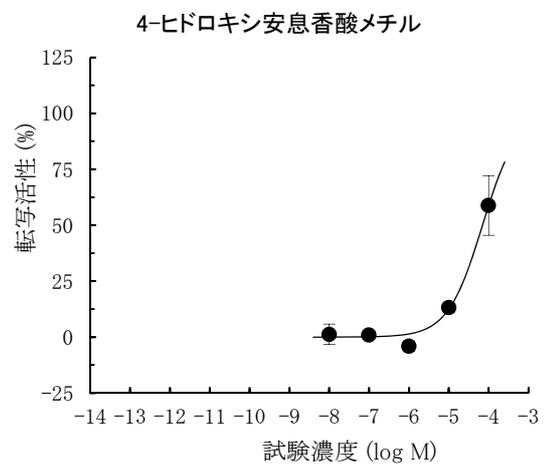
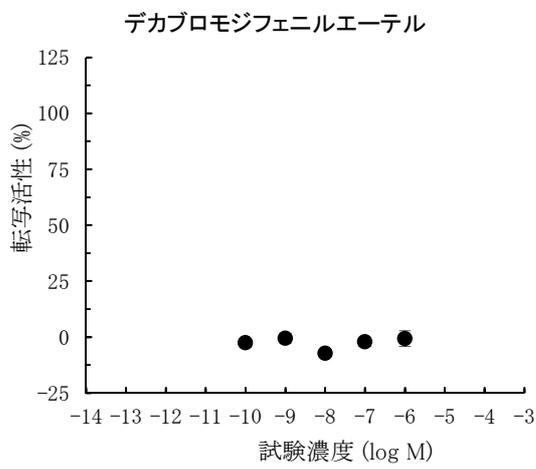
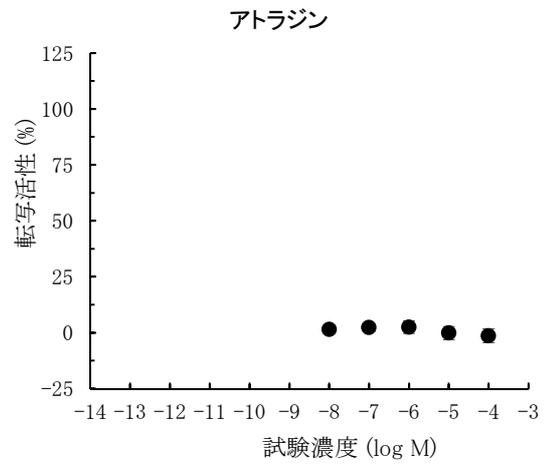
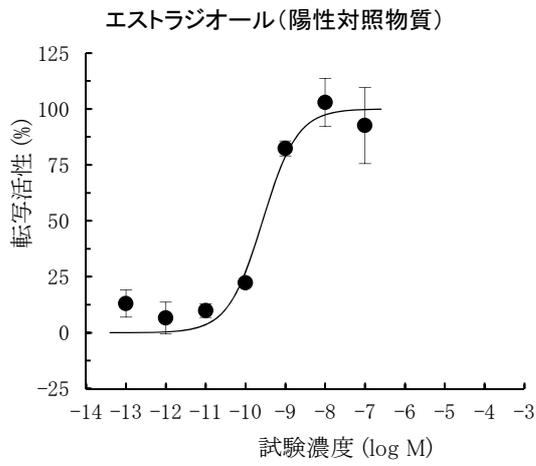


図7-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)結果

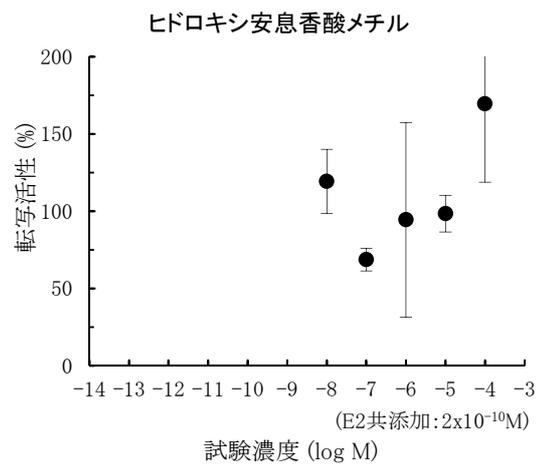
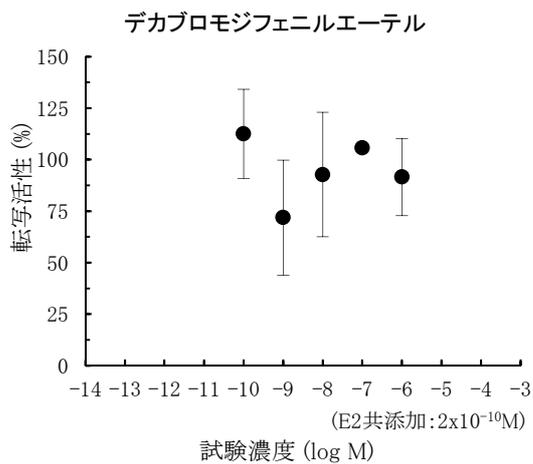
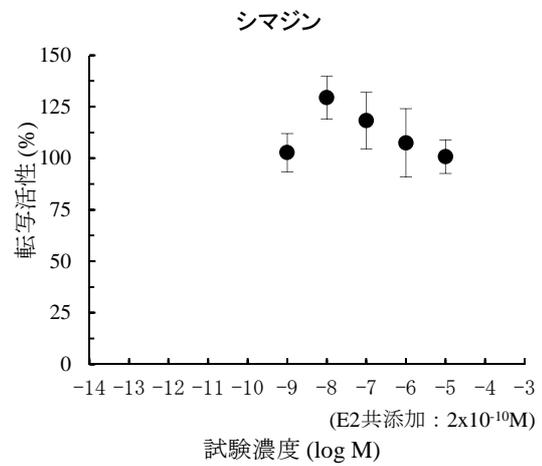
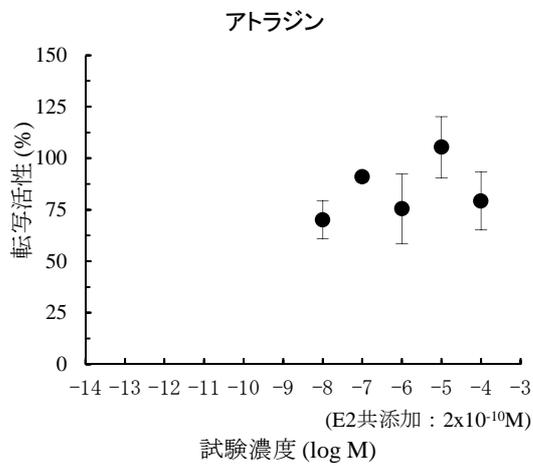
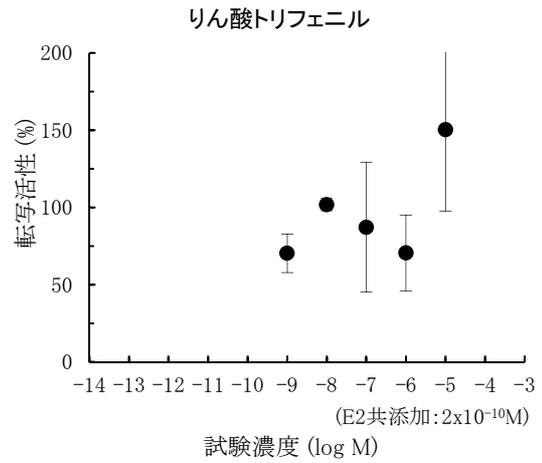
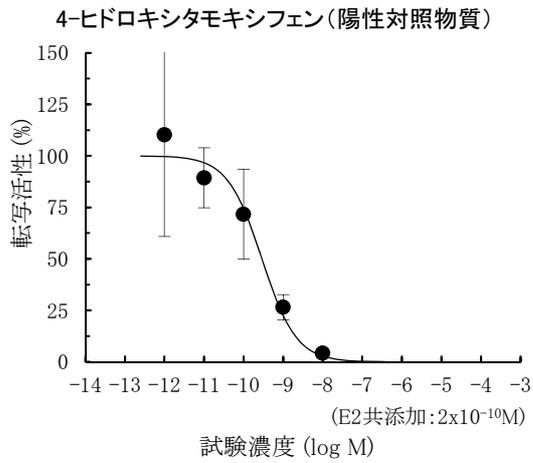


図7-2 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

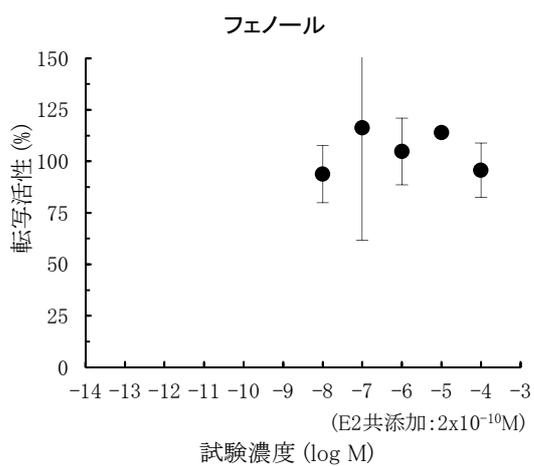


図7-2(つづき) メダカ ER α レポータージーン試験(抗エストロゲン作用)結果

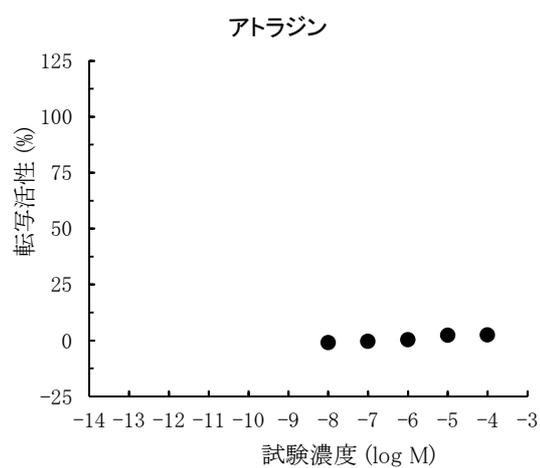
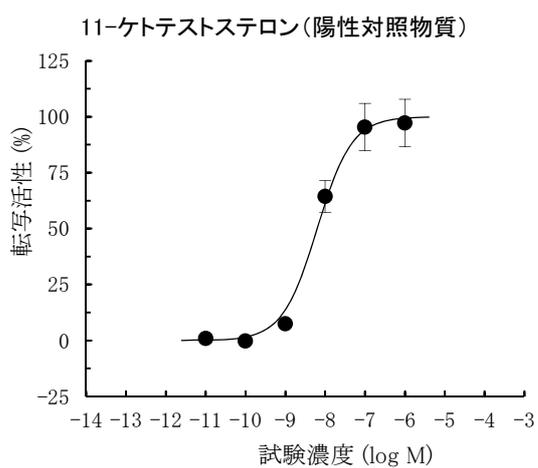


図7-3 メダカ AR β レポータージーン試験(アンドロゲン作用)結果

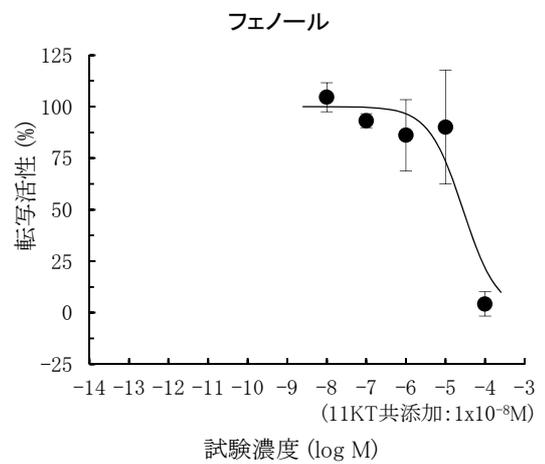
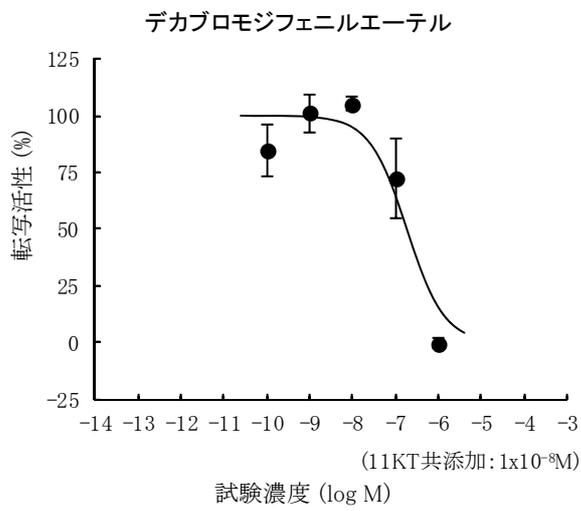
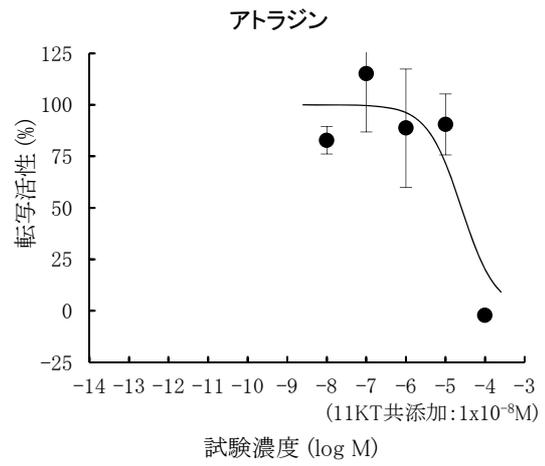
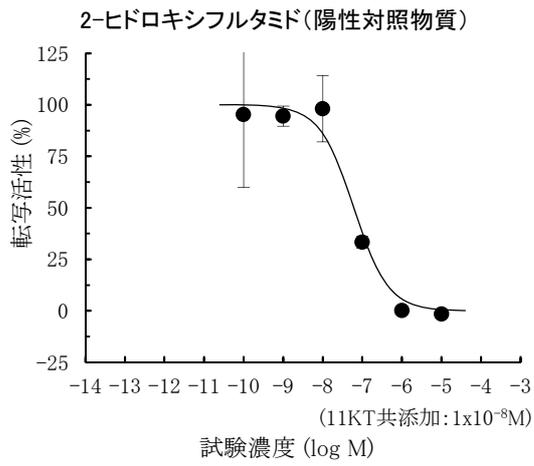


図7-4 メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)結果

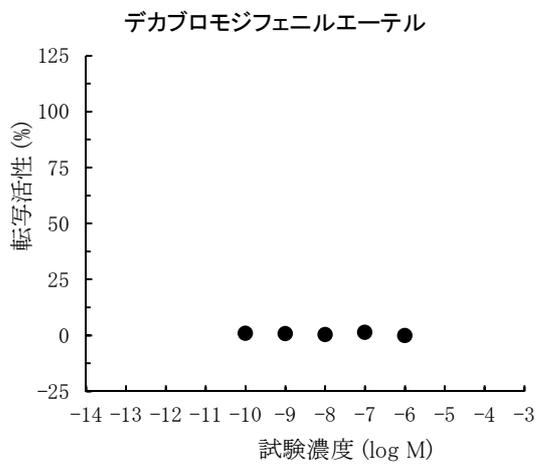
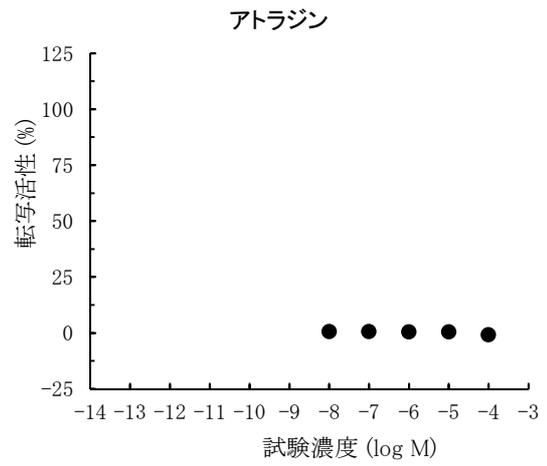
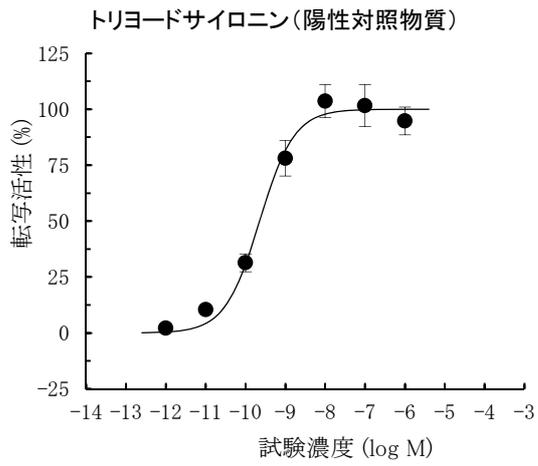


図7-5 ニシツメガエル TR β レポータージーン試験(甲状腺ホルモン作用)結果

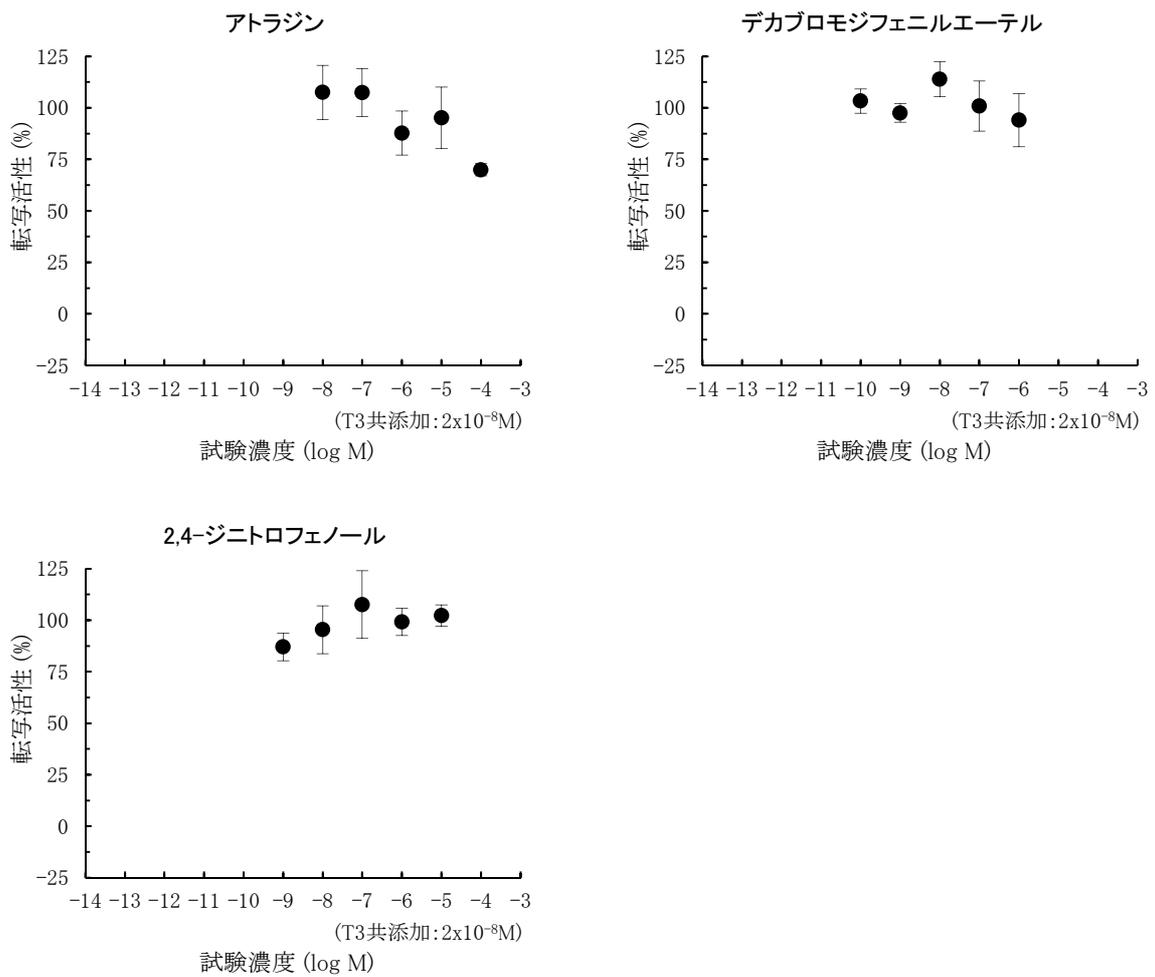


図7-6 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(抗甲状腺ホルモン作用)結果

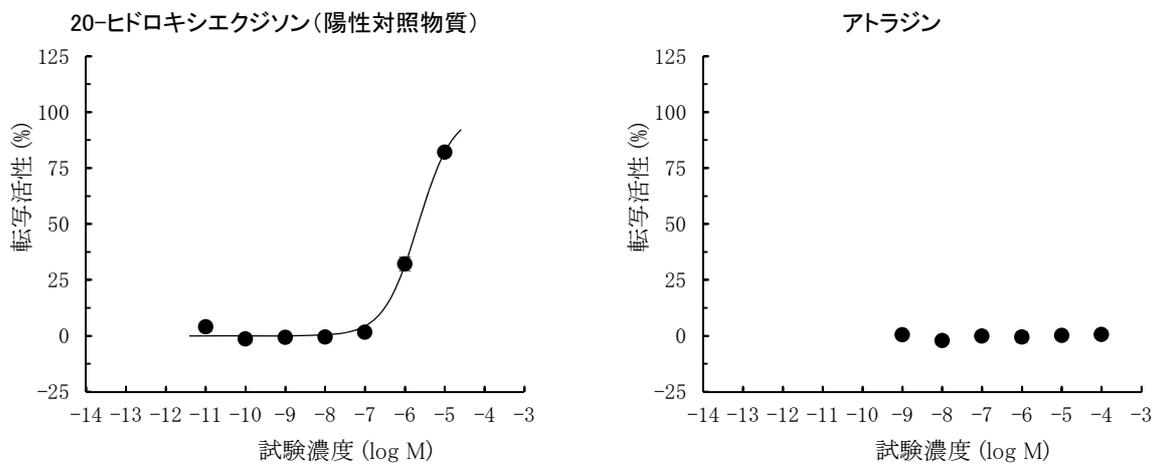
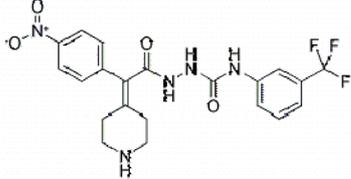


図7-7 オオミジンコ EcR レポーター遺伝子試験(脱皮ホルモン作用)結果

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(抗甲状腺ホルモン作用)の陽性対照物質の検討結果について

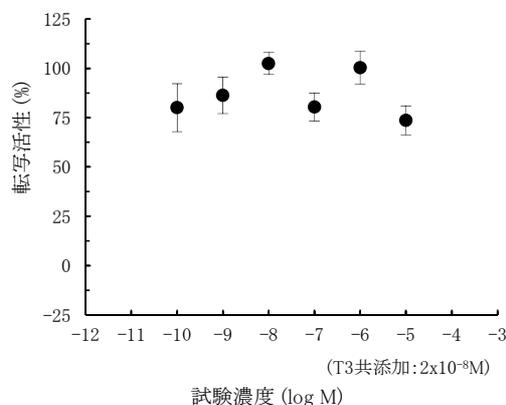
1. 検討内容

ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(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。そこで市販されている化学物質の中では、相対的に強い作用を持つ甲状腺ホルモン受容体アンタゴニストと思われる 1-850 について、ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験を実施し、陽性対照物質として妥当性を検討した。レポーター遺伝子試験の方法、条件及び手順等は、過年度までに実施された試験に準じた。

一般名	1-850	構造式	
化学名	2-(2-(4-Nitrophenyl)-4-piperidinylidene)acetyl-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-hydrazine carboxamide		
CAS番号	251310-57-3		
分子式	C ₂₁ H ₂₀ F ₃ N ₅ O ₄		
分子量	463.4		

2. 結果

試験の結果、試験最高濃度(1.0×10^{-5} M)において若干の転写活性の低下がみられたものの、試験系に共添加した陽性対照物質(トリヨードサイロニン、 2.0×10^{-8} M)のニシツメガエル TR β に対する転写活性化阻害(抗甲状腺ホルモン作用)はみられなかった。なお、1-850 の DMSO への溶解度は 5mg/mL(1.1×10^{-2} M)であり、DMSO の終濃度を 0.2%とする本試験では、これ以上試験濃度を高くすることは困難である。したがって、1-850 については、ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(抗甲状腺ホルモン作用)の陽性対照物質には不適と判断された。



1-850 によるニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験の結果

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(抗アンドロゲン作用)
の試験結果に関する検証について

1. 背景及び検討内容

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については、抗アンドロゲン作用に関して、平成 23 年度及び 24 年度に 19 物質を対象に試験が実施され、そのうち 8 物質において、試験系に共添加した 11-ケトテストステロンのメダカ AR β の転写活性に対する阻害作用(抗アンドロゲン作用)が検出されている。とくに平成 23 年度に試験を実施した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の 4 物質については、試験から得られた IC₅₀ 値を基に算出すると 2-ヒドロキシフルタミドの 2~40 倍相当の強い抗アンドロゲン作用を持つことが示唆される結果であった(表1)。

表1 平成 23 年度メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果

試験対象物質	抗アンドロゲン作用	
	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
フェンチオン	(得られなかった)	
カルバリル	linIC ₃₀ = 2.9 × 10 ⁻⁶ M	0.91%
カルボフラン	linIC ₃₀ = 3.0 × 10 ⁻⁵ M	0.089%
ジウロン	linIC ₃₀ = 4.8 × 10 ⁻⁶ M	0.55%
ジクロルボス	(得られなかった)	
ジクロロブロモメタン	IC ₅₀ = 2.9 × 10 ⁻⁸ M	278%
ダイアジノン	IC ₅₀ = 2.7 × 10 ⁻⁹ M	2984%
フェニトロチオン	IC ₅₀ = 2.0 × 10 ⁻⁹ M	3983%
ペルフルオロオクタン酸	IC ₅₀ = 1.9 × 10 ⁻⁸ M	438%
2-ヒドロキシフルタミド	(試験1) IC ₅₀ = 8.2 × 10 ⁻⁸ M (試験1) linIC ₃₀ = 2.7 × 10 ⁻⁸ M (試験2) IC ₅₀ = 1.0 × 10 ⁻⁷ M (試験2) linIC ₃₀ = 3.4 × 10 ⁻⁸ M	(100%)

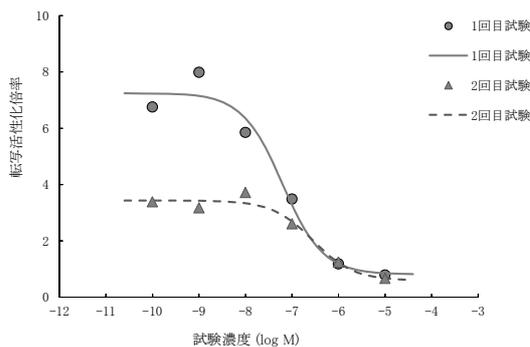
しかし一方で、上記の 4 物質が抗アンドロゲン剤であるフルタミドの活性代謝物(活性型)である 2-ヒドロキシフルタミドよりも強い抗アンドロゲン作用を有することには疑念も残る。平成 23 年度の試験業務では、陽性を示した物質に関して、確認のための追試験が実施されている。ジクロロブロモメタン、フェニトロチオン、ペルフルオロオクタン酸の 3 物質及び 2-ヒドロキシフルタミドそれぞれの 2 回の試験結果は図 1 に示すとおりであった。なお、各試験は 24 穴マイクロプレートを用いて同一条件で実施されたが、1 回目と 2 回目の試験は異なる日に実施されたため、供試時における動物細

胞の状態などは同一ではない。

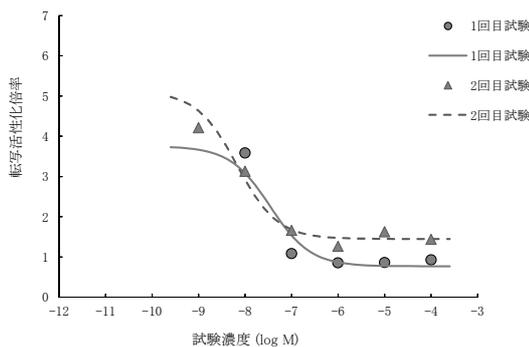
2-ヒドロキシフルタミド(陽性対照物質)では、転写活性化倍率の最大値(以下、最大活性)に差はみられるが、両試験とも 10^{-8}M から転写活性の低下、 10^{-6}M で最低となるほぼ同様の反応曲線が得られている。ジクロロブロモメタンでは、両試験において、 10^{-8}M から 10^{-7}M に転写活性が低下するほぼ類似した反応曲線が得られている。一方、フェニトロチオンについては、1 回目試験では 10^{-9}M から 10^{-8}M にかけて転写活性の急激な低下がみられたが、そのため 2 回目試験では 10^{-10}M からばく露を行ったが、 10^{-9}M では転写活性の低下が大きく、結果として両試験の反応曲線には一桁の差がみられている。同様の傾向は、ペルフルオロオクタン酸においてもみられている。

以上のことから、メダカ AR β レポーター遺伝子試験の抗アンドロゲン作用試験については、試験物質によっては、何らかの要因によって偽陽性の結果が生じている可能性(試験結果が必ずしも抗アンドロゲン作用の強さを反映していない可能性)も考えられる。とくに上記の平成 23 年度の試験物質については、試験結果が偽陽性であった可能性も考えられるため、これらの物質を用いて検証を行った。

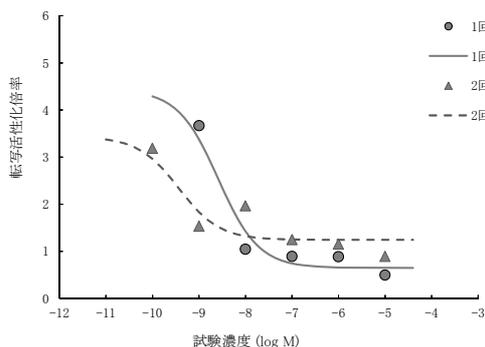
2-ヒドロキシフルタミド(陽性対照物質)



ジクロロブロモメタン



フェニトロチオン



ペルフルオロオクタン酸

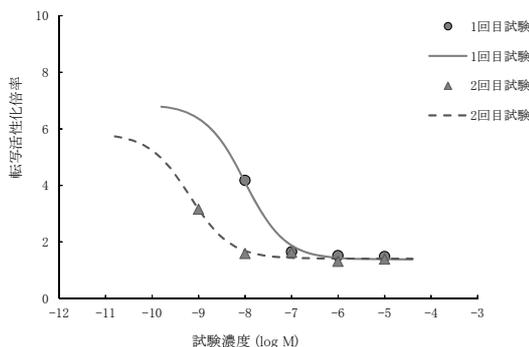


図1 平成23年度に実施した試験管内試験の結果

(1) 検討方法

メダカ AR β レポータージーン試験の抗アンドロゲン作用試験では、試験系に $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ の 11-ケトテストステロン(11-KT)を共添加するが、ここでは、他に $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 及び $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ を加えた 3 段階の共添加濃度で試験を行い、それぞれにおける反応曲線を比較することにより、試験結果の妥当性(偽陽性の可能性)等について検討した。検証では、試験容器として 24 穴マイクロプレート(24-well plate)又は 96 穴マイクロプレート(96-well plate)を用いたが、それぞれでの試験(アッセイ)の方法及び条件等は過年度及び今年度の業務に準じた。

(2) 結果

24-well plate でのペルフルオロオクタン酸(PFOA)及び 2-ヒドロキシフルタミド(2-OHF)を用いた検証試験の結果を図2、試験結果に基づく IC_{50} 値と 11-KT の共添加濃度の関係を図3に示した。なお、両物質の試験は異なる日に実施したが、各物質での一連の 3 試験は同じ日に実施している。ペルフルオロオクタン酸の試験では、試験濃度の公比を通常の 10 から 4 と小さくしている。

2-OHF では、試験濃度域全般において 11-KT の共添加濃度に依存して最大活性も高くなる傾向がみられたが、PFOA では 11-KT の共添加濃度と最大活性の関係は不明瞭であった。また、2-OHF では、11-KT の各共添加濃度において明瞭な用量-反応関係がみられた。PFOA でも、11-KT の各共添加濃度において、試験濃度の上昇に伴い転写活性化倍率が漸減する傾向はみられたが、11-KT が $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ の条件(■)では PFOA が $10^{-8} \text{M} \sim 10^{-7} \text{M}$ にかけて転写活性の阻害がみられたのに対して、11-KT の添加濃度が低い $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ (▲)では、逆に PFOA 濃度が高い $10^{-7} \text{M} \sim 10^{-6} \text{M}$ において転写活性の阻害がみられている。その結果、2-OHF では、11-KT の共添加濃度に依存して IC_{50} 値が高くなるという一般的な競合反応で想定される関係を示したが、PFOA では、これとは逆の関係を示し、試験系内の反応(応答)が一般的な競合反応とは異なる作用により阻害されていた可能性が示唆された。

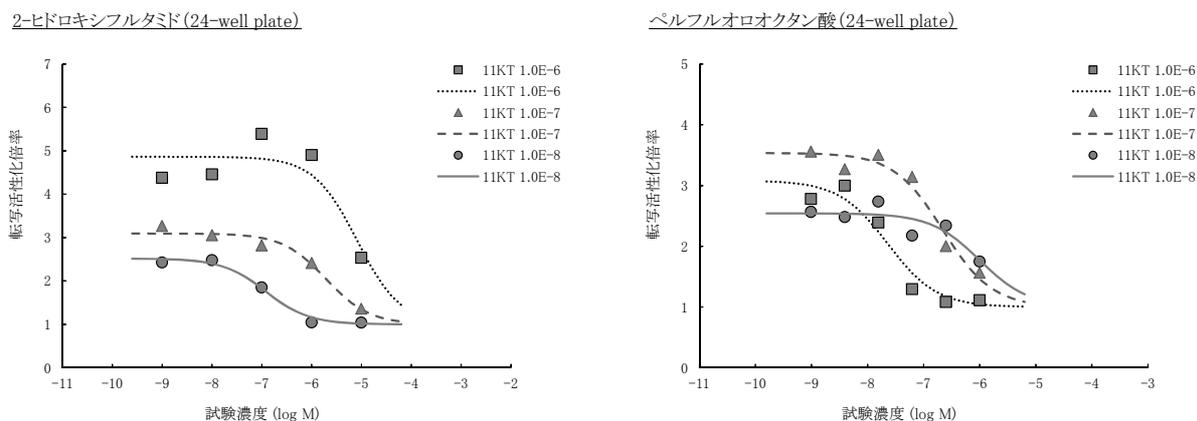


図2 2-OHF及びPFOAでの検証試験結果(24-well plateを用いた試験)

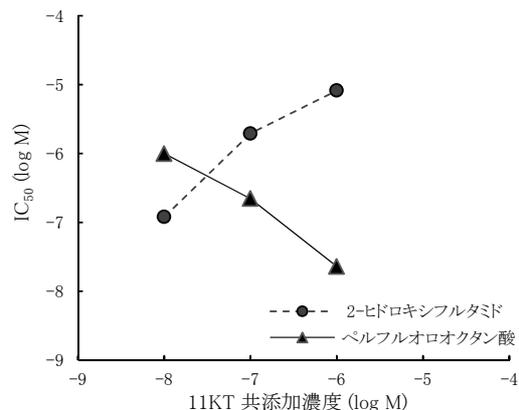


図3 11-KT共添加濃度とIC₅₀の関係

PFOA に関して、96-well plate を用いて実施した検証試験の結果を図 4 に示した。この検証試験では、 $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ と $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ の各共添加濃度の試験を同一のマイクロプレート上で同時に実施しているため、供試した動物細胞の状態やその他の試験条件などに 11-KT の各共添加条件間で差異が生じにくい。検証試験の結果、11-KT の共添加濃度 $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 及び $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ のいずれにおいても、試験濃度範囲において、転写活性化倍率の有意な低下はみられなかった。以上のとおり、PFOA に関して、一連の検証試験から得られた結果は、平成 23 年度の試験結果とは様相が異なるものであり、総合的に判断すると、平成 23 年度の試験でみられた転写活性化倍率の低下は PFOA の添加(作用)とは関連しない変動による偽陽性であった可能性が示唆される。なお、図 4 に示した検証試験において、陽性対照物質(試験系に 11-KT のみを添加)の転写活性化倍率は 14.0(11-KT= $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$)及び 21.3(11-KT= $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$)であった。

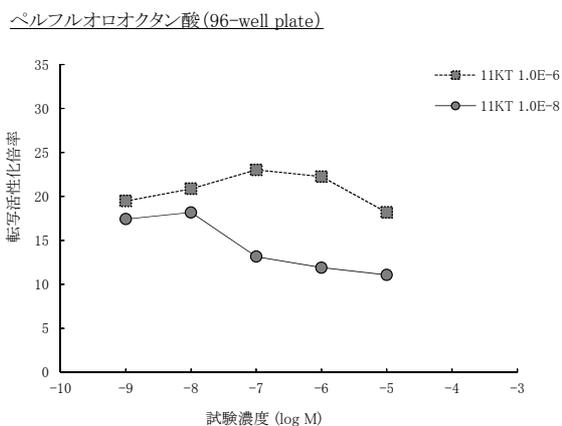
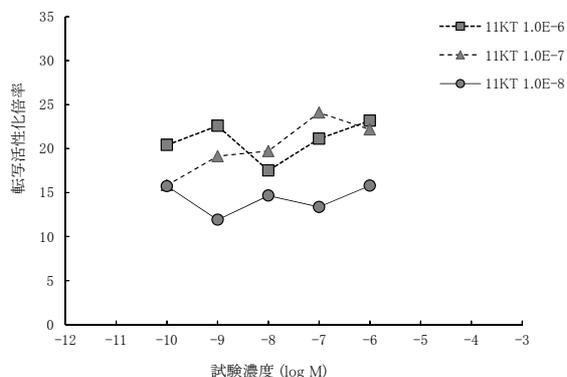


図4 PFOA での検証試験結果(96-well plate)

96-well plate で行ったフェニトロチオン及びジクロロブロモメタンの検証試験の結果を図5に示した。これらの検証試験は、各共添加濃度(3濃度)での試験を同一のマイクロプレート上で同時に実施した。

フェニトロチオンでの検証試験では、11-KT の各共添加濃度において、試験濃度範囲で転写活性化倍率の有意な低下は認められなかった。一方、ジクロロブロモメタンでの検証試験では、11-KT のすべての共添加濃度において転写活性化倍率の有意な低下がみられた。ただし、11-KT の各共添加濃度によらず、転写活性の低下がみられたのは $10^{-4}M$ であった。したがって、この結果から算出した IC_{50} 値は、試験系への 11-KT の共添加濃度によらず一定であった($3.4\sim 4.1\times 10^{-5}M$)。また、これらの試験では、試験濃度 $10^{-7}M$ から $10^{-5}M$ において、ジクロロブロモメタン濃度に依存的に転写活性化倍率が増加する傾向にあった。なお、この検証試験の結果から算出したジクロロブロモメタンの相対活性比は 2-ヒドロキシフルタミドの 0.15%程度となる。

フェニトロチオン(96-well plate)



ジクロロブロモメタン(96-well plate)

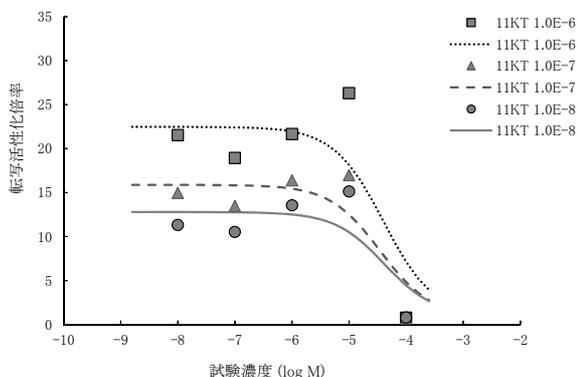


図5 フェニトロチオン及びジクロロブロモメタンでの検証試験結果(96-well plate)

以上のとおり、平成 23 年度に実施した試験結果から、比較的強い抗アンドロゲン作用を有することが示唆されたジクロロブロモメタン、フェニトロチオン及びペルフルオロオクタン酸の 3 物質について検証試験を実施した結果、各物質とも平成 23 年度の試験結果の再現性は低く、抗アンドロゲン作用とは関連しない要因によって生じた偽陽性であった可能性が示唆された。ただし、今回の検証試験の結果のみから、これらの物質が抗アンドロゲン作用を有しないと結論することはできないと考えられる。また、今回の検証試験では、対象としたジクロロブロモメタン、フェニトロチオン及びペルフルオロオクタン酸の各物質において、平成 23 年度の試験結果との関係は異なっており、平成 23 年度の試験結果については再現性が乏しいと考えられる点では一致しているものの、試験結果に影響を及ぼした要因などを特定することは困難であった。既存知見等から抗アンドロゲン作用物質と考えられる物質を用いた検証試験を実施して知見を収集し、それらを踏まえて再検証することが必要と考えられる。