

平成30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(改)(案)

1. 試験対象物質及び試験項目

平成30年度の第1段階試験管内試験(レポータージーン試験)の試験対象物質及び試験の対象となる作用モードを表1-1に示した。

表1-1 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	抗エストロゲン	アンドロゲン	抗アンドロゲン
メフェナム酸	○	○	○	○
メラミン	○	○	○	○
2,4-ジクロロフェノール	○	○	○	○
ジブチルスズ		○		
ピレン	○	○	○	○
フェニトロチオン	○	○		
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸		○		○
フェンチオン	○			
カルボフラン		○	○	
アクリルアミド	○	○		
フェノール	○		○	
フルタミド	○	○	○	
二硫化炭素	○	○	○	
グリホサート	○	○	○	
ニトロベンゼン	○	○	○	
りん酸トリクレジル	○		○	○
カルベンダジム	○	○		○
アクリロニトリル	○	○	○	
ジブプロモクロロメタン	○	○	○	

表 1-1 (つづき)

試験対象物質	試験対象とした作用モード			
	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
ブタクロール		○	○	○
プロシミドン		○		
酢酸クロルマジノン	○			
マンゼブ	○	○		
マンネブ	○	○	○	
ジメテート		○	○	○
フタル酸ジイソブチル		○		
試験数	19	22	16	9

注) ジブチルスズ:レポーター遺伝子試験にはジブチルスズ二塩化物を用いた。

2. 方法及び材料

(1) ホルモン受容体の種類

すべての作用モードに関して、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 Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて一過性発現細胞系により試験を行った(図 2-1)。

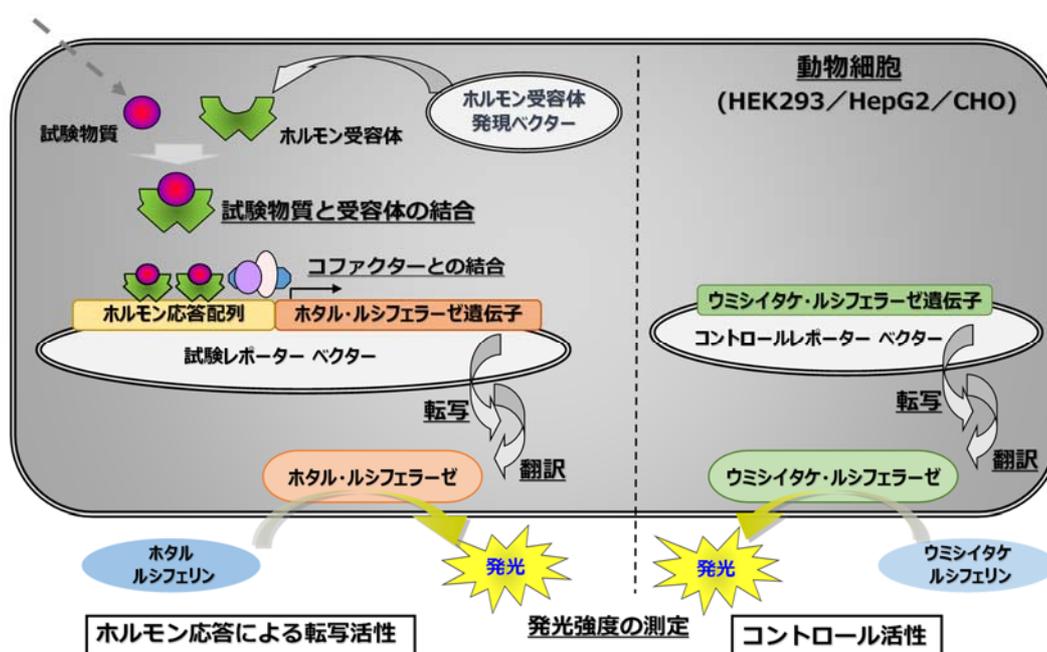


図 2-1 レポーター遺伝子試験の概要

(2) ホルモン受容体の種類

各作用モードの試験には、以下のホルモン受容体(生物種及びサブタイプ)を用いた。

- エストロゲン作用: メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- 抗エストロゲン作用: メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- アンドロゲン作用: メダカアンドロゲン受容体 β (AR β)
- 抗アンドロゲン作用: メダカアンドロゲン受容体 β (AR β)

(3) 試薬及び試験濃度

試験には、マンゼブ及びマンネブを除いて、純度 98%以上の試薬を供した。マンゼブ(又はマンコゼブ)及びマンネブについては、入手可能な範囲で最も純度が高い試薬(純度 91.0%及び 90.2%)を試験に供した。試験濃度は、試験対象物質の動物細胞に対する毒性及び培地への溶解性を考慮して決定した。

(4) 陽性物質及びアンタゴニスト系試験での共添加濃度

各作用モードの試験では、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に対する相対的な強さを推定するために、試験対象物質での試験と並行して、以下の陽性対照物質による試験を実施した。

- 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

アンタゴニスト系試験(抗エストロゲン作用及び抗アンドロゲン作用の試験)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、エストロゲン作用又はアンドロゲン作用試験での最大転写活性の 95%程度となる濃度を目安に陽性物質を添加した(17β -エストラジオール(1×10^{-9} M)又は 11-ケトテストステロン(5×10^{-8} M))。

(5) 試験手順及び条件

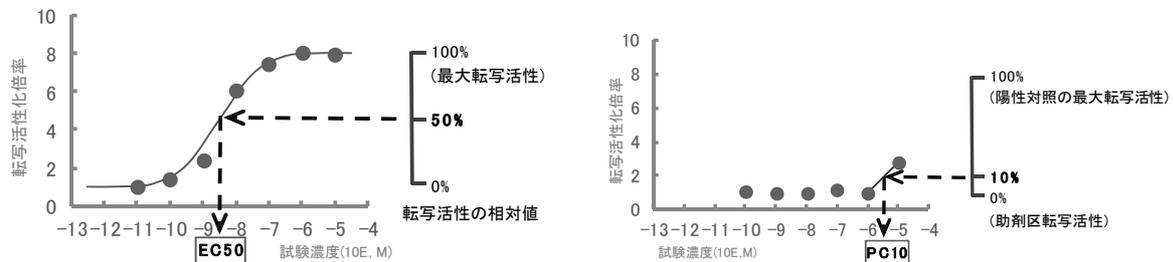
試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり 3 又は 5 連(ウェル)で行った。試験では、専用の試薬を用いて一過的にベクターを導入した培養細胞を被験物質で暴露し、ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼの発光強度からホルモン受容体を介した作用による転写活性と内部コントロールの転写活性を定量化し、それらの比(発光強度比)を求めた。さらに、各試験濃度について、この発光強度比を助剤対照の発光強度比で除した転写活性化倍率を求めた。各作用での試験における条件の詳細を別添 1 に示した。

有意な反応が得られた試験対象物質については、追試験を実施して同様の結果が得られること(再現性)を確認した。

(6) データ解析

アゴニスト系試験(エストロゲン作用、アンドロゲン作用の試験)では、試験濃度範囲において有意な転写活性化(転写活性化倍率の有意な上昇)が認められた試験対象物質については、図 2-2 に示すように、その作用濃度として EC_{50} 値又は PC_{10} 値を算出した。また、アンタゴニスト系試験(抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用の試験)では、試験濃度範囲において有意な転写活性阻害(転写活性化倍率の有意な低下)が認められた試験対象物質については、その作用濃度として IC_{50} 値又は $linIC_{30}$ 値を算出した。作用濃度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)も算出した。

アゴニスト系試験



アンタゴニスト系試験

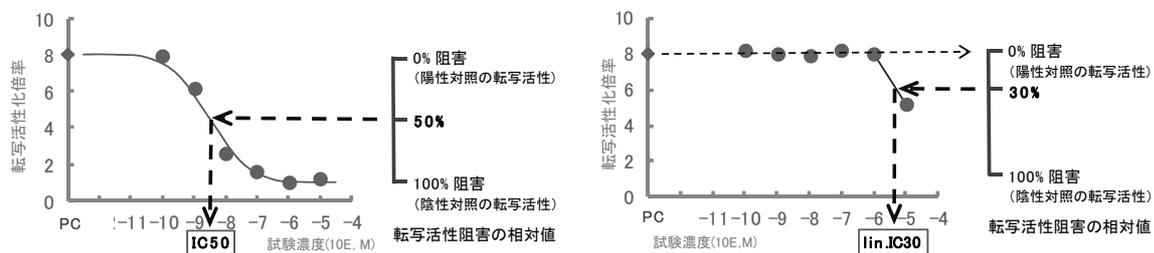


図 2-2 アゴニスト系試験及びアンタゴニスト系試験における作用濃度の算出

3. 結果

(1) メダカ ER α レポータージーン試験(エストロゲン作用)

エストロゲン作用を対象とした試験管内試験(メダカ ER α レポータージーン試験)の結果を表 3-1 及び図 3-1 に示した。

試験対象とした 19 物質のうち、2,4-ジクロロフェノール及びりん酸トリクレジルにおいて、試験濃度範囲で転写活性化倍率に有意な上昇がみられ、メダカ ER α に対する転写活性化作用(エストロゲン作用)を有することが示唆された。エストロゲン作用に関して、試験から得られた 2,4-ジクロロフェノールの PC₁₀ は 1.8×10^{-5} M、りん酸トリクレジルの EC₅₀ は 2.3×10^{-6} M、それらの陽性対照物質(17 β -エストラジオール)に対する相対活性比は 0.000067% 及び 0.0029% であった。その他の 17 物質については、試験濃度範囲で転写活性化倍率に有意な上昇(メダカ ER α に対する転写活性化)は認められなかった。

表 3-1 エストロゲン作用に関する試験管内試験の結果

試験対象物質	エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
メフェナム酸	(得られなかった)	
メラミン	(得られなかった)	
2,4-ジクロロフェノール	PC ₁₀ = 1.8×10^{-5} M	0.000067%
ピレン	(得られなかった)	
フェニトロチオン	(得られなかった)	
フェンチオン	(得られなかった)	
アクリルアミド	(得られなかった)	
フェノール	(得られなかった)	
フルタミド	(得られなかった)	
二硫化炭素	(得られなかった)	
グリホサート	(得られなかった)	
ニトロベンゼン	(得られなかった)	
りん酸トリクレジル	EC ₅₀ = 2.3×10^{-6} M	0.0029%
カルベンダジム	(得られなかった)	
アクリロニトリル	(得られなかった)	
ジブロモクロロメタン	(得られなかった)	
酢酸クロルマジノン	(得られなかった)	
マンゼブ	(得られなかった)	
マンネブ	(得られなかった)	
17 β エストラジオール	EC ₅₀ = 6.6×10^{-11} M PC ₁₀ = 1.2×10^{-11} M	

(2)メダカ ER α レポータージーン試験(抗エストロゲン作用)

抗エストロゲン作用を対象とした試験管内試験(メダカ ER α レポータージーン試験)の結果を表 3-2 及び図 3-2 に示した。

試験対象とした 22 物質のうち、メフェナム酸に関して、試験濃度範囲において陽性物質(17 β -エストラジオール)によるメダカ ER α の転写活性化倍率に有意な低下がみられ、メダカ ER α に対する転写活性化阻害作用(抗エストロゲン作用)を有することが示唆された。メフェナム酸に関して試験から得られた linIC₃₀ は 6.5×10^{-5} M であり、それらの陽性対照物質(4-ヒドロキシタモキシフェン)に対する相対活性比は、0.00026%であった。その他の 21 物質については、試験濃度範囲において陽性物質によるメダカ ER α の転写活性化倍率に有意な低下(メダカ ER α の転写活性に対する阻害作用)は認められなかった。

表 3-2 抗エストロゲン作用に関する試験管内試験の結果

試験対象物質	抗エストロゲン作用	
	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
メフェナム酸	linIC ₃₀ = 6.5×10^{-5} M	0.00026%
メラミン	(得られなかった)	
2,4-ジクロロフェノール	(得られなかった)	
ジブチルスズ	(得られなかった)	
ピレン	(得られなかった)	
フェニトロチオン	(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)	
カルボフラン	(得られなかった)	
アクリルアミド	(得られなかった)	
フルタミド	(得られなかった)	
二硫化炭素	(得られなかった)	
グリホサート	(得られなかった)	
ニトロベンゼン	(得られなかった)	
カルベンダジム	(得られなかった)	
アクリロニトリル	(得られなかった)	
ジブロモクロロメタン	(得られなかった)	
ブタクロール	(得られなかった)	
プロシミドン	(得られなかった)	
マンゼブ	(得られなかった)	
マンネブ	(得られなかった)	
ジメテート	(得られなかった)	
フタル酸ジイソブチル	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC ₅₀ = 1.9×10^{-9} M linIC ₃₀ = 1.7×10^{-10} M	

(3)メダカ ARβレポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)

アンドロゲン作用を対象とした試験管内試験(メダカ ARβレポーター遺伝子試験)の結果を表 3-3 及び図 3-3 に示した。

試験対象とした 16 物質において、試験濃度範囲で転写活性化倍率に有意な上昇(メダカ ARβ に対する転写活性化)は認められなかった。

表 3-3 アンドロゲン作用に関する試験管内試験の結果

試験対象物質	アンドロゲン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
メフェナム酸	(得られなかった)	
メラミン	(得られなかった)	
2,4-ジクロロフェノール	(得られなかった)	
ピレン	(得られなかった)	
カルボフラン	(得られなかった)	
フェノール	(得られなかった)	
フルタミド	(得られなかった)	
二硫化炭素	(得られなかった)	
グリホサート	(得られなかった)	
ニトロベンゼン	(得られなかった)	
りん酸トリクレジル	(得られなかった)	
アクリロニトリル	(得られなかった)	
ジブロモクロロメタン	(得られなかった)	
ブタクロール	(得られなかった)	
マンネブ	(得られなかった)	
ジメテート	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 3.5 × 10 ⁻⁹ M	

(3)メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)

アンドロゲン作用を対象とした試験管内試験(メダカ AR β レポーター遺伝子試験)の結果を表 3-4 及び図 3-4 に示した。

試験対象とした 9 物質において、試験濃度範囲で 11-ケトテストステロン(陽性物質)によるメダカ AR β の転写活性化倍率に有意な低下(メダカ AR β の転写活性に対する阻害作用)は認められなかった。

表 3-4 アンドロゲン作用に関する試験管内試験の結果

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
メフェナム酸	(得られなかった)	
メラミン	(得られなかった)	
2,4-ジクロロフェノール	(得られなかった)	
ピレン	(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)	
りん酸トリクレジル	(得られなかった)	
カルベンダジム	(得られなかった)	
ブタクロール	(得られなかった)	
ジメテート	(得られなかった)	
2-ヒドロキシフルタミド	IC ₅₀ = 4.9 × 10 ⁻⁷ M	

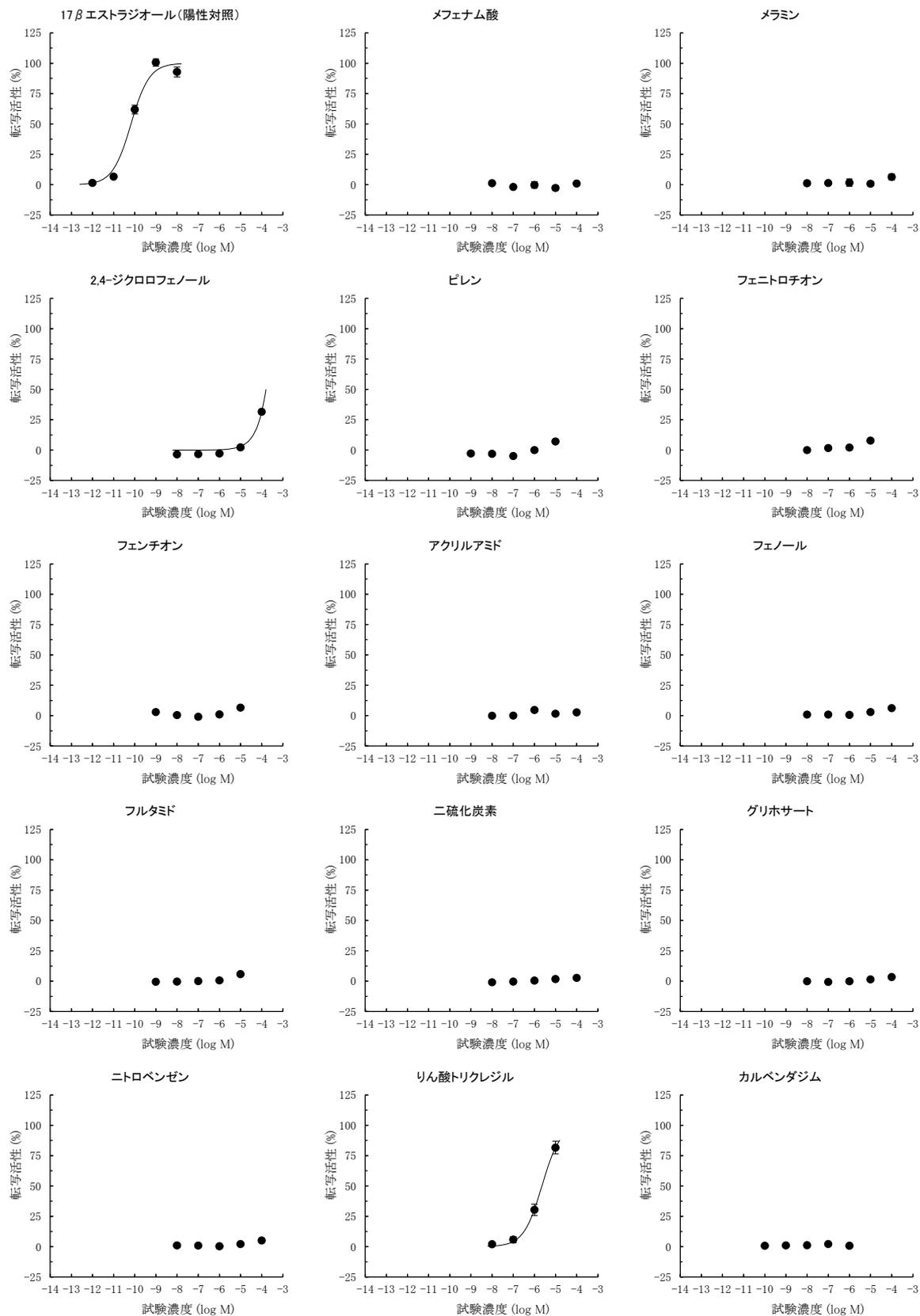


図 3-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用) 結果

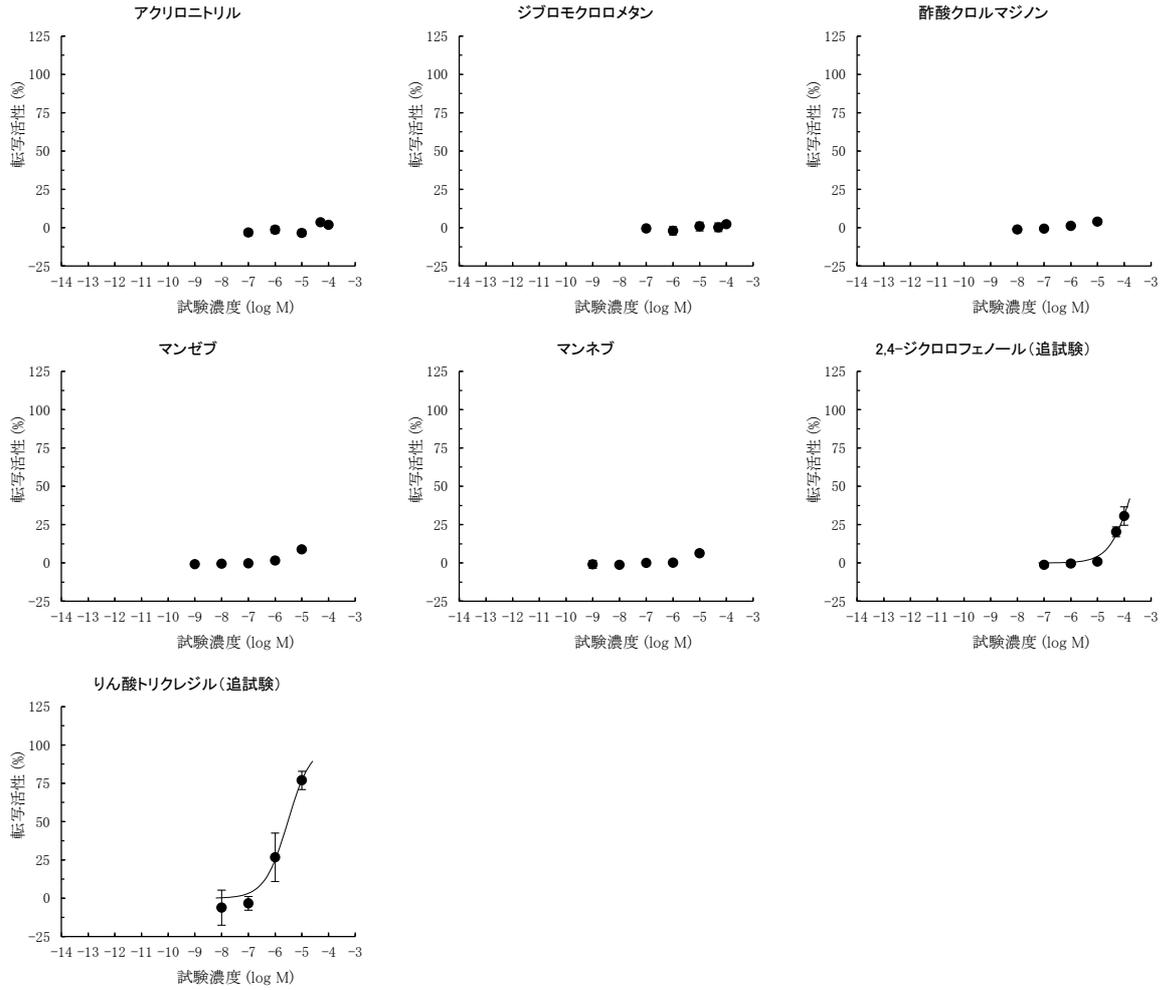


図 3-1(つづき) メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)結果

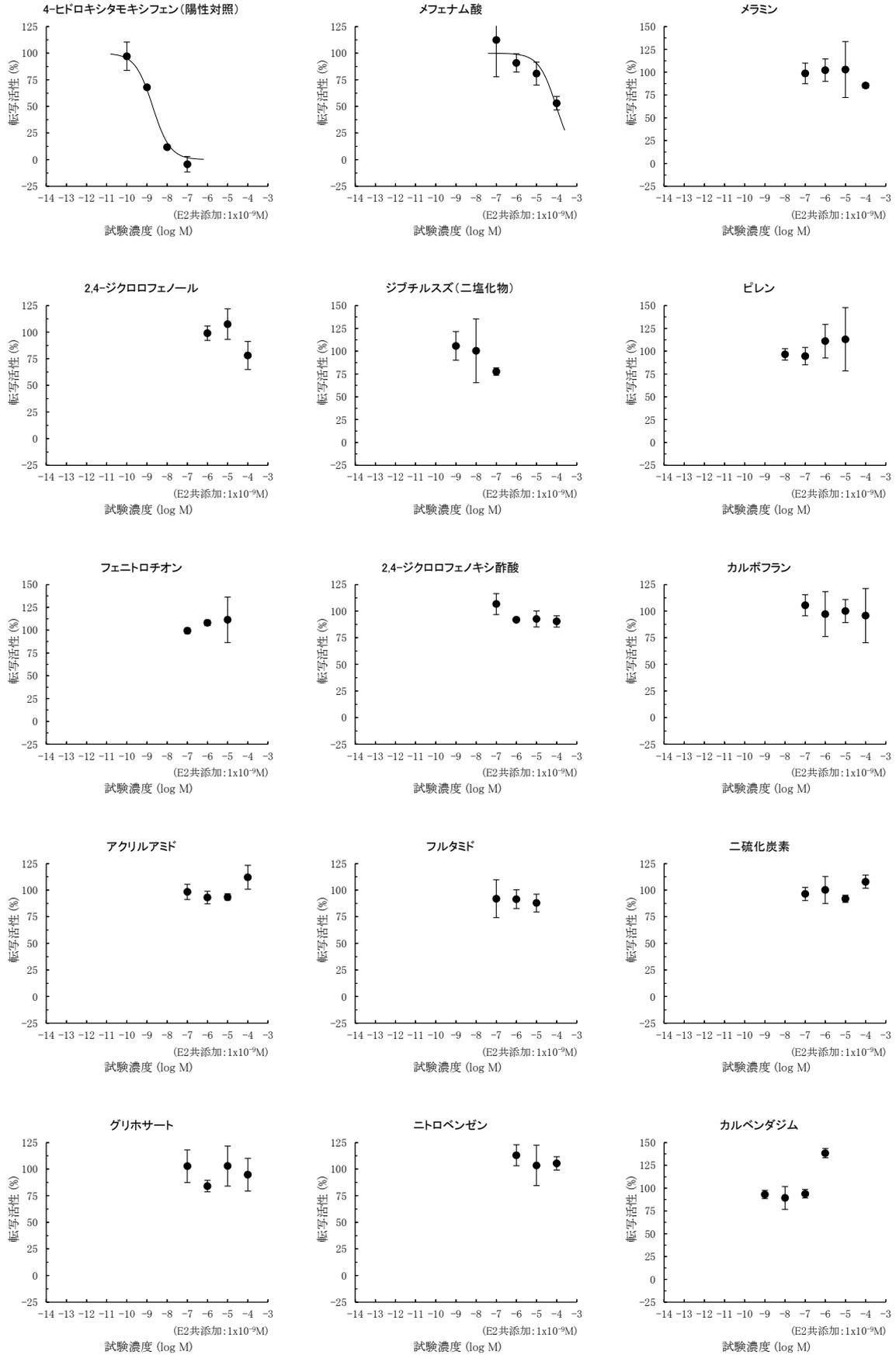


図 3-2 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

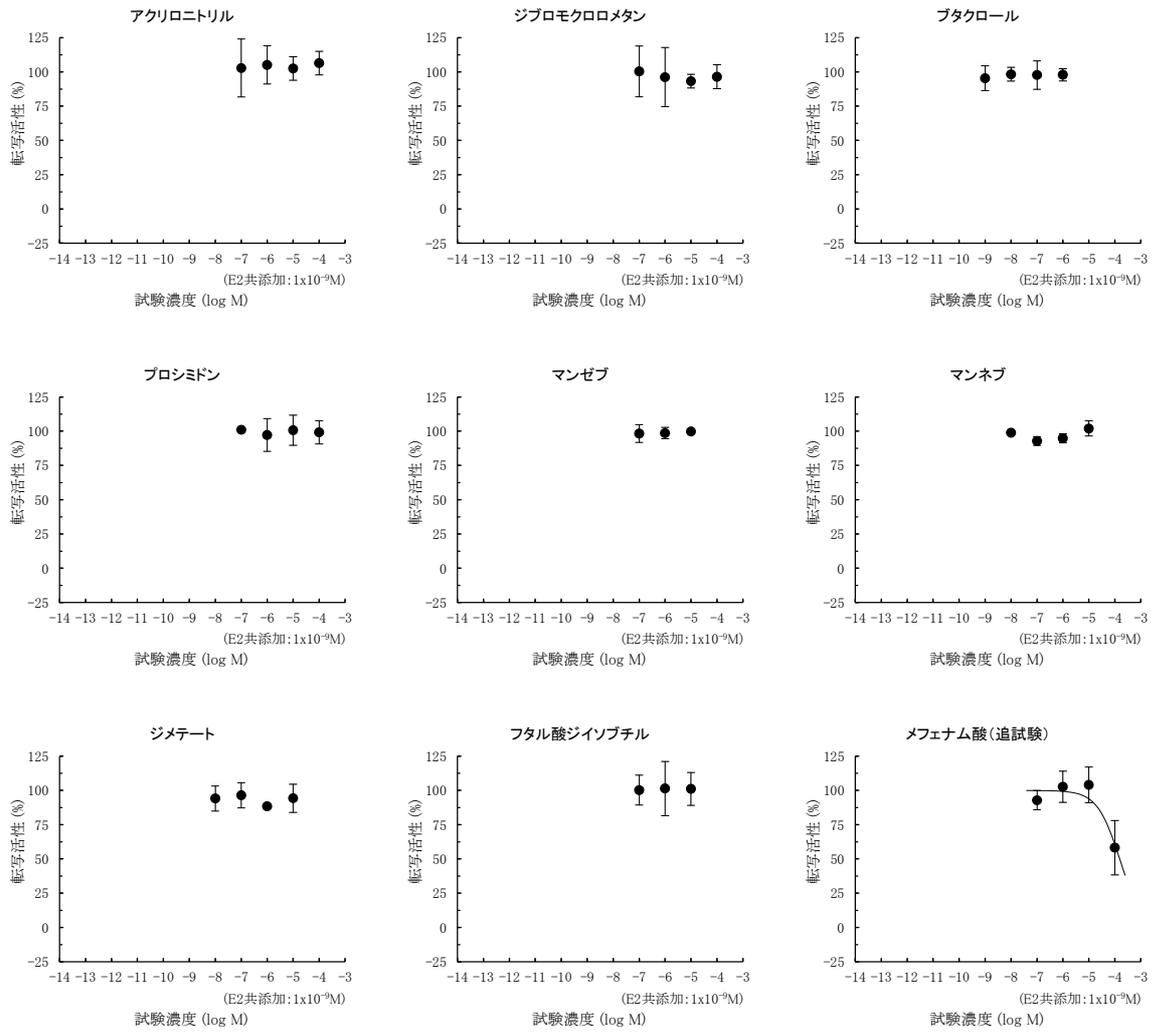


図 3-2(つづき) メダカ ER α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

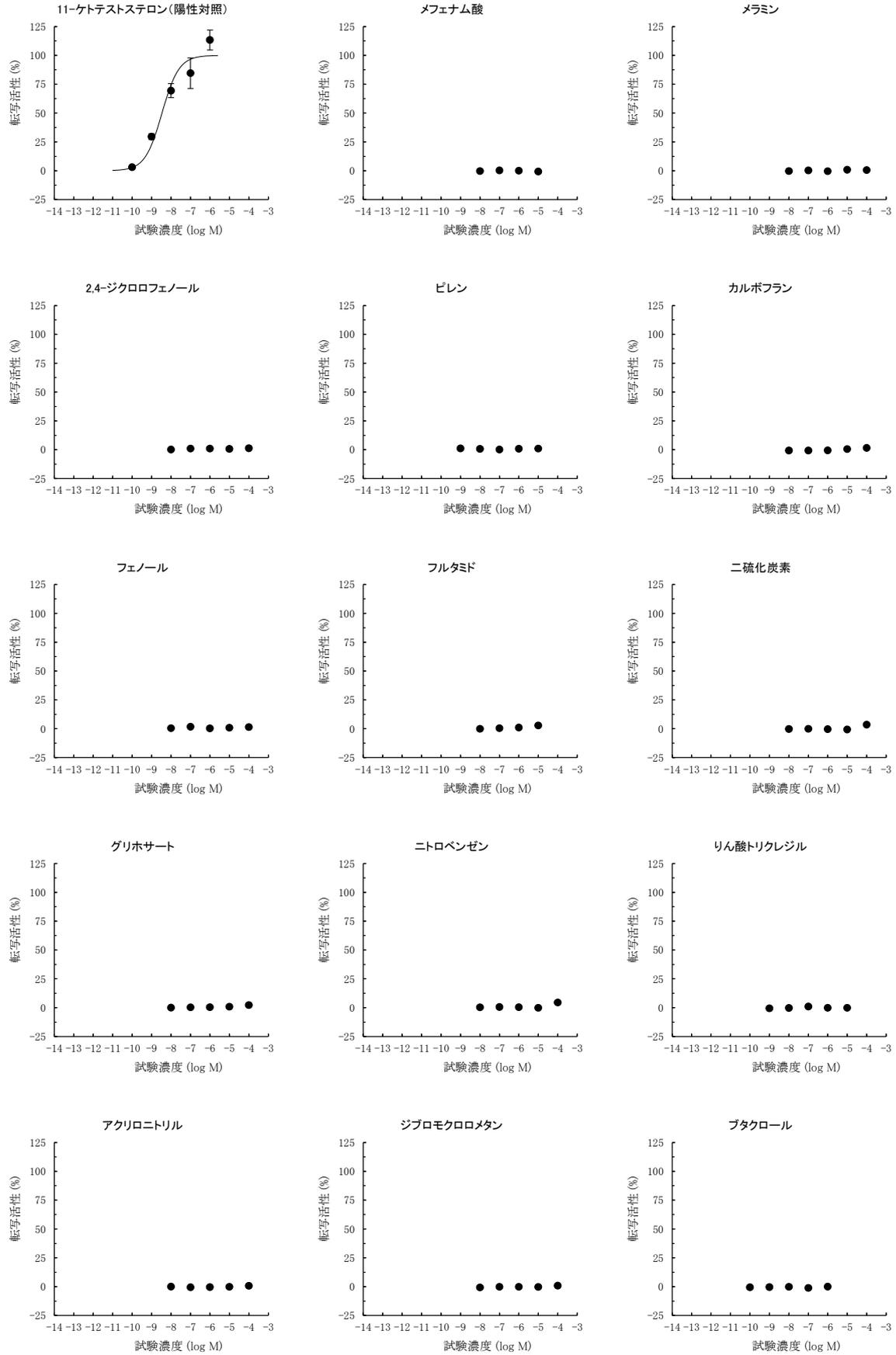


図 3-3 メダカ AR β レポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)結果

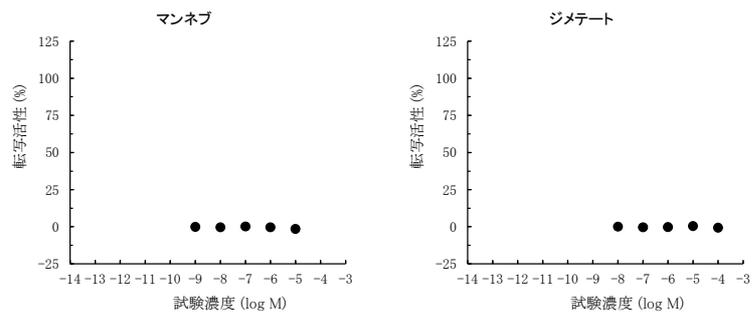


図 3-3(つづき) メダカ AR β レポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)結果

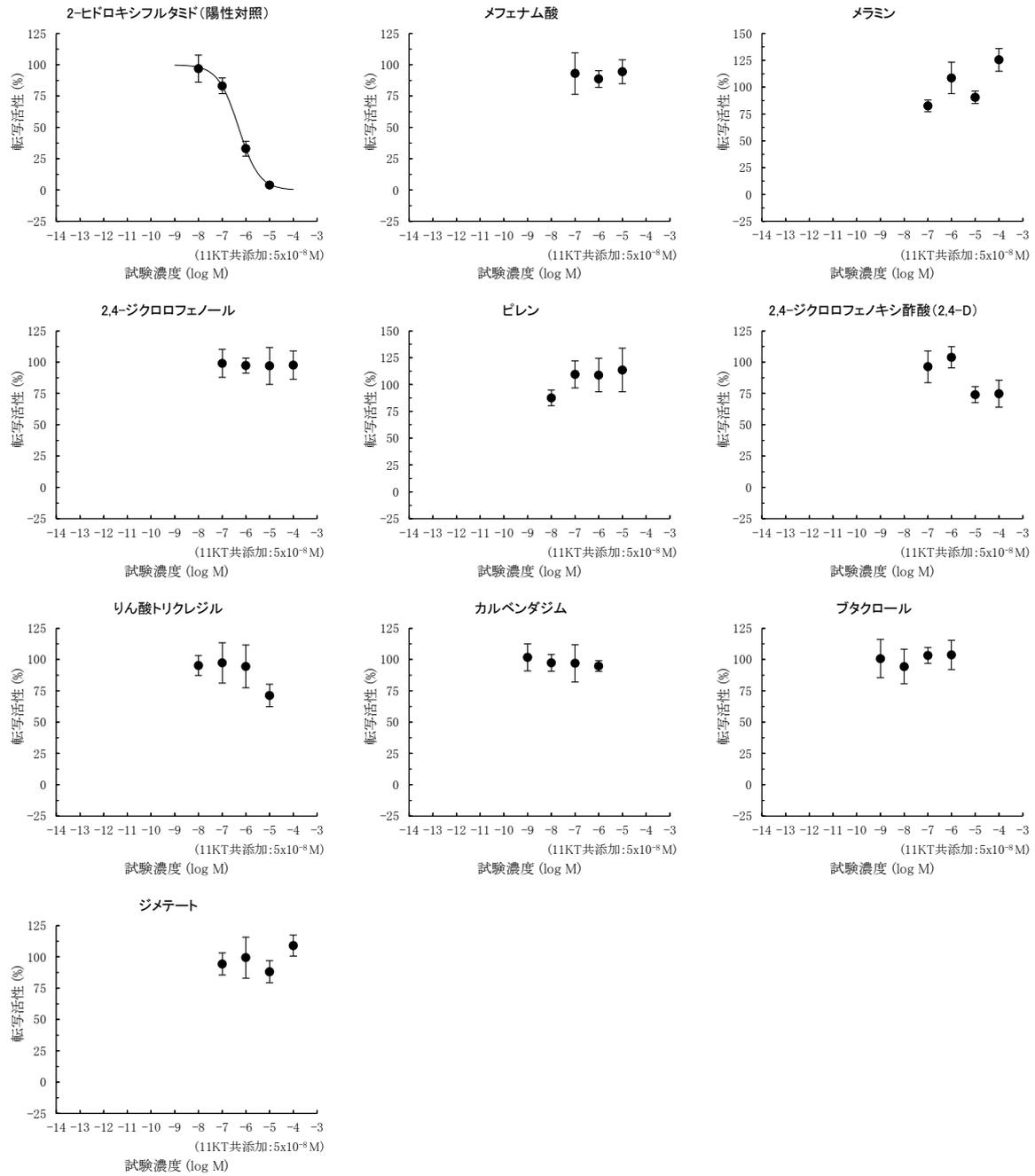


図 3-4 メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)結果

(別添 1)

(1) メダカ ER 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)の条件

試験条件	エストロゲン作用試験 (アゴニスト検出系)	抗エストロゲン作用試験 (アンタゴニスト検出系)
試験容器	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株)	
試験培地	DMEM(2mM L-glutamine、10%FCS含有)	
試験液量	0.2 mL/well	
細胞播種数	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	medaka ERalpha/pcDNA	
試験レポーターベクター	ERE-TK-Luc	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK-Rluc	
培養環境及び時間	37°C、5 % CO ₂ 、40時間	
連数	5連(well)/濃度	
共添加陽性物質及び添加濃度	—	17 β エストラジオール (1×10^{-9} M)
助剤及び最終濃度	DMSO 0.1 %	DMSO 0.2 %

(2) メダカ AR 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)の条件

試験条件	アンドロゲン作用試験 (アゴニスト検出系)	抗アンドロゲン作用試験 (アンタゴニスト検出系)
試験容器	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	HepG2 (ヒト肝腫瘍細胞株)	
試験培地	DMEM(2mM L-glutamine、10%FCS含有)	
試験液量	0.2 mL/well	
細胞播種数	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	medaka ARbeta/pcDNA	
試験レポーターベクター	ARE-MMTV-Luc	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK-Rluc	
培養環境及び時間	37°C、5% CO ₂ 、40時間	
連数	5連(well)/濃度	
共添加陽性物質及び添加濃度	—	11-ケトテストステロン (5×10^{-8} M)
助剤及び最終濃度	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%