

## 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D、2,4-PA) (CAS no. 94-75-7)

### 試験管内試験結果

#### 1. 試験項目

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸について、下表に示す試験項目（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。

| 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 | 甲状腺ホルモン | 抗甲状腺ホルモン | 脱皮ホルモン | その他* |
| N            | N       | N      | N       | —       | N        | —      | —    |

P：EC<sub>50</sub>又はIC<sub>50</sub>値が検出

N：EC<sub>50</sub>又はIC<sub>50</sub>値が検出不可

\*：その他

○：試験対象としたが、まだ実施していない作用モード

—：試験対象としなかった作用モード

#### 2. 試験方法

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。

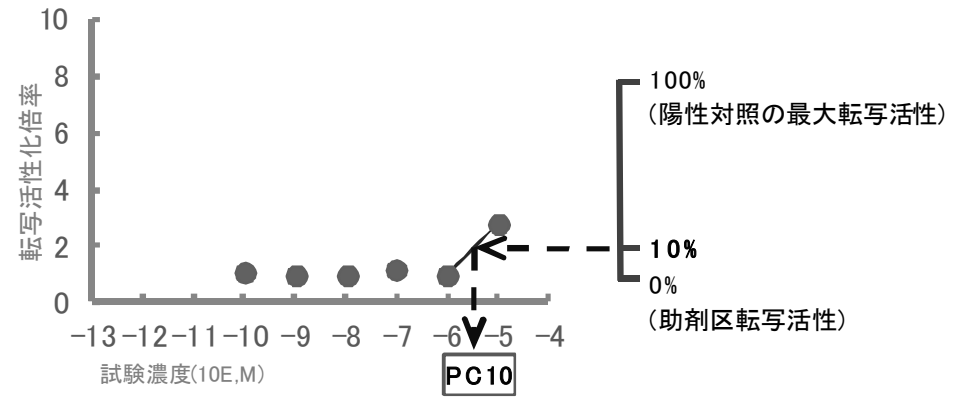
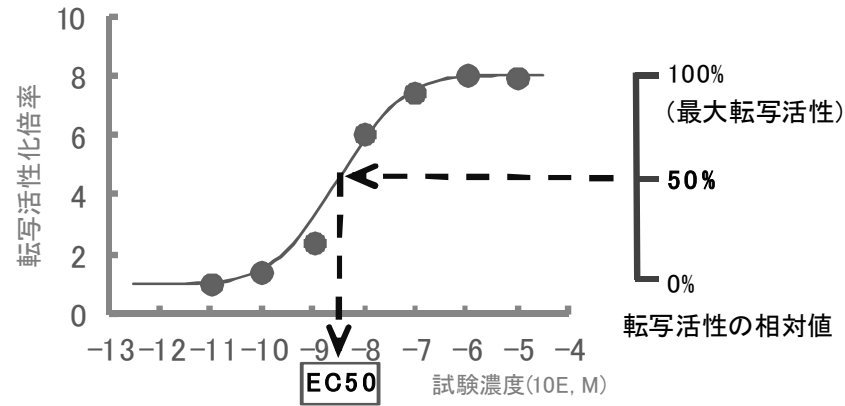
試験には、純度95%以上の試薬を用いて行った。また、試験が適切に実施されたことの確認及び試験対象物質の転写活性化能又は転写活性化阻害の相対的な強さ（相対活性比）を推定するために、試験対象物質での試験と並行して、陽性対照物質（エストロゲン作用：17β-エストラジオール、抗エストロゲン作用：4-ヒドロキシタモキシフェン、アンドロゲン作用：11-ケトテストステロン、抗アンドロゲン作用：2-ヒドロキシフルタミド、甲状腺ホルモン作用：トリヨードサイロニン）による試験を実施した。試験濃度は、試薬の動物細胞に対する毒性及び培地への溶解性を考慮して決定した。

各試験は、96穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり3連以上で行った。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ばく露した後、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（発光強度比）を求めた。

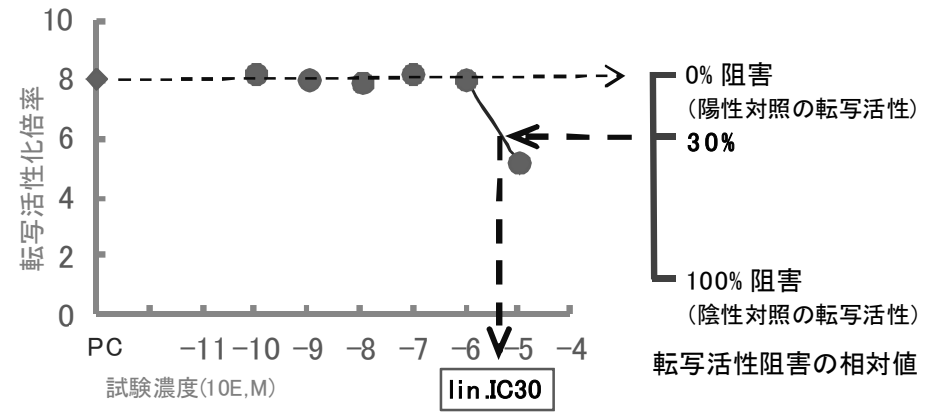
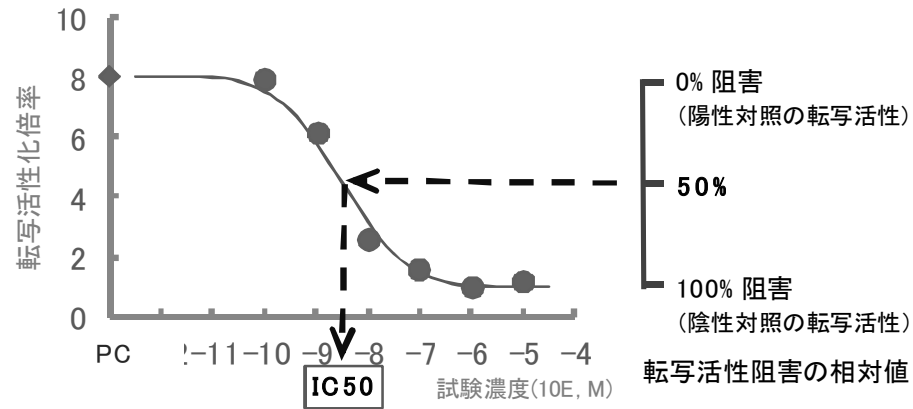
各試験濃度における転写活性化倍率（助剤対照の発光強度比に対する試験濃度での発光強度比の割合）から、以下により、アゴニ

スト系試験では転写活性の有無及び  $EC_{50}$  値（又は  $PC_{10}$  値）、アンタゴニスト系試験では転写活性阻害の有無及び  $IC_{50}$  値（又は  $linIC_{30}$  値）を求めた。また、 $EC_{50}$  値又は  $IC_{50}$  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。

アゴニスト検出系の試験での EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 値の算出



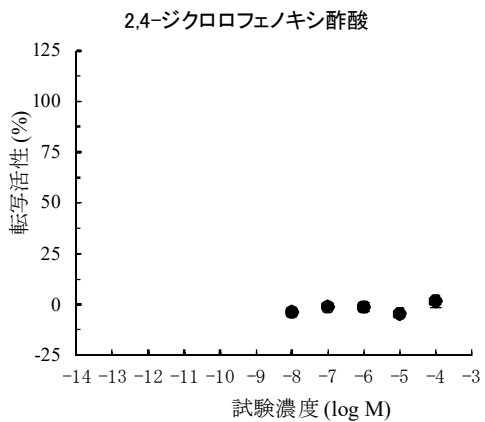
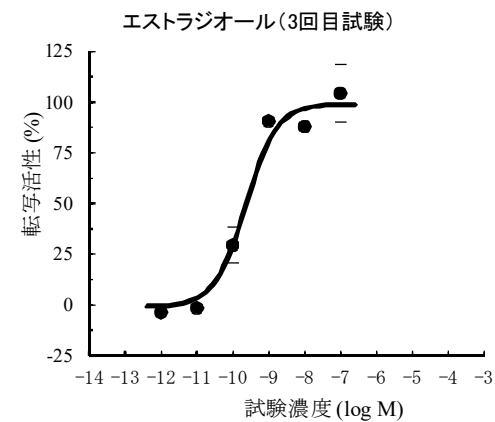
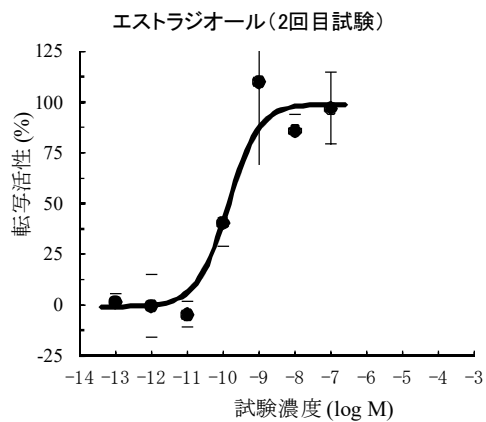
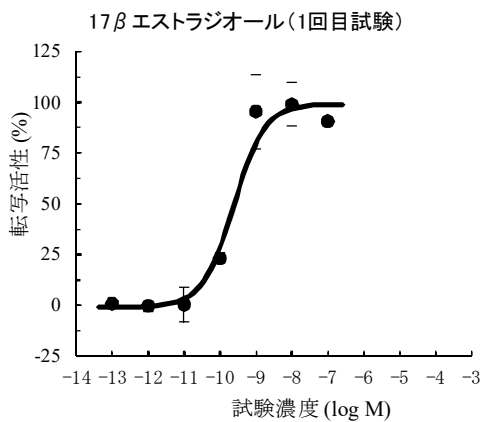
アンタゴニスト検出系の試験での IC<sub>50</sub> 値及び linIC<sub>30</sub> 値の算出



### 3. 結果

#### (1) メダカエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ) レポータージーン試験 (エストロゲン作用)

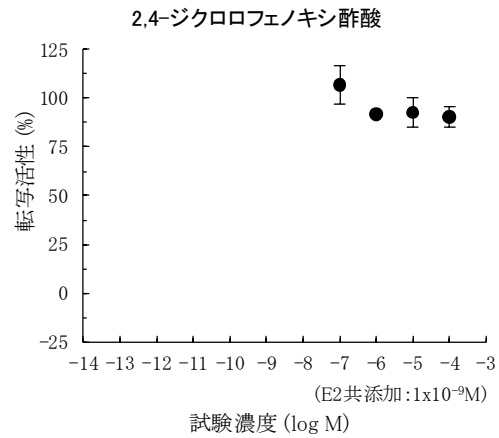
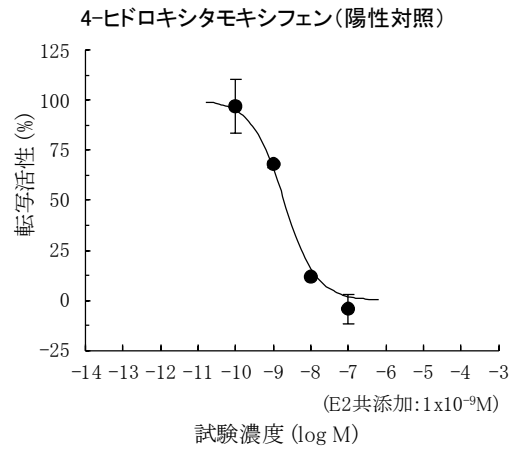
エストロゲン作用については、メダカ ER $\alpha$  の転写活性化は認められなかった。



| 試験対象物質               | エストロゲン作用  |       |
|----------------------|---|-------|
|                      | EC <sub>50</sub> 又は PC <sub>10</sub>                  | 相対活性比 |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸      | (得られなかった)   |       |
| 17 $\beta$ -エストラジオール | EC <sub>50</sub> = 2.2 × 10 <sup>-10</sup> M (1 回目試験) |       |
|                      | EC <sub>50</sub> = 1.3 × 10 <sup>-10</sup> M (2 回目試験) |       |
|                      | EC <sub>50</sub> = 2.1 × 10 <sup>-10</sup> M (3 回目試験) |       |

(2) メダカエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) レポーターゼーン試験 (抗エストロゲン作用)

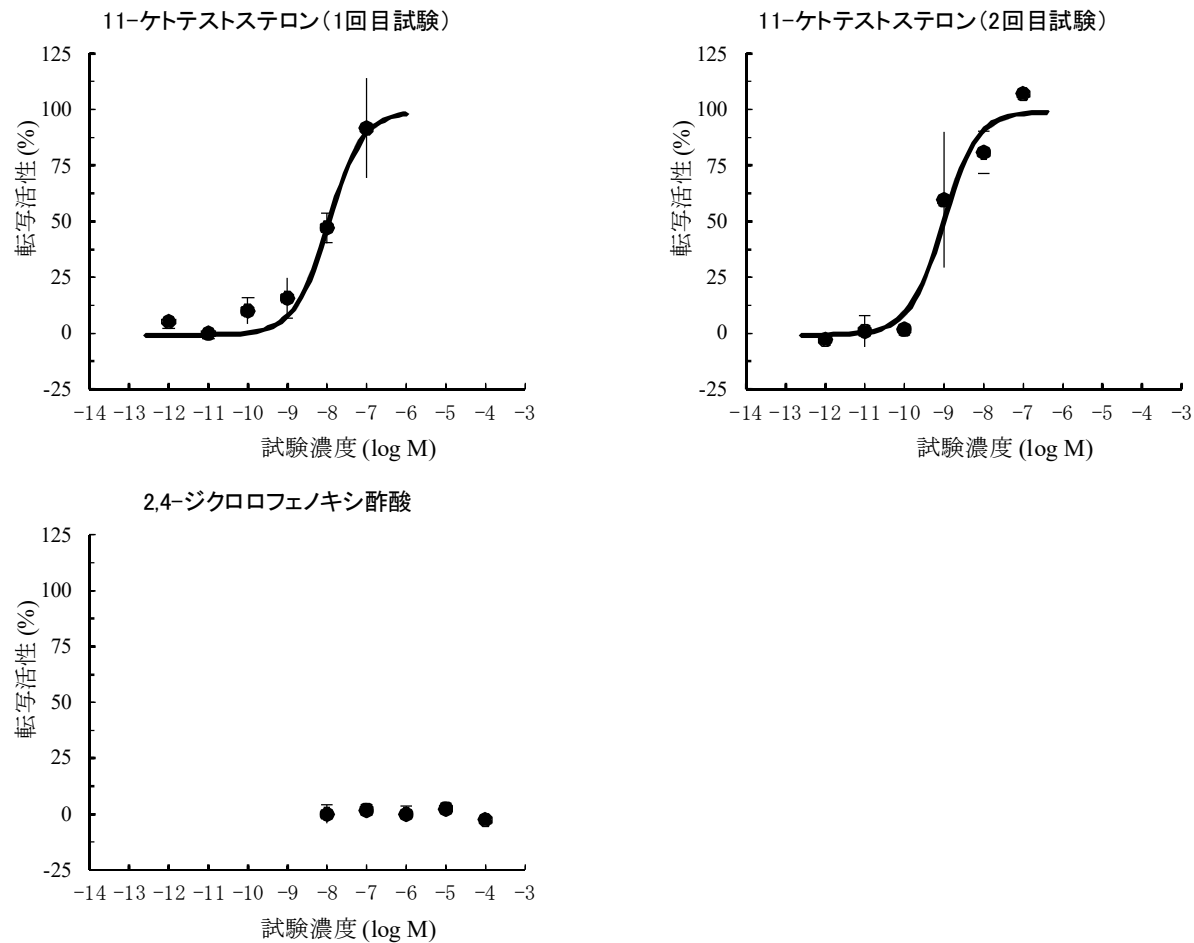
抗エストロゲン作用については、 $17\beta$ -エストラジオール  $1 \times 10^{-9}$  M 共添加条件でメダカ ER $\alpha$  の転写活性化阻害は認められなかった。



| 試験対象物質          | 抗エストロゲン作用  |       |
|-----------------|--|-------|
|                 | IC <sub>50</sub> 又は linIC <sub>30</sub>  | 相対活性比 |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | (得られなかった)  |       |
| 4-ヒドロキシタモキシフェン  | IC <sub>50</sub> = $1.9 \times 10^{-9}$ M<br>linIC <sub>30</sub> = $1.7 \times 10^{-10}$ M |       |

### (3) メダカアンドロゲン受容体 $\beta$ (AR $\beta$ ) レポーターゼン試験 (アンドロゲン作用)

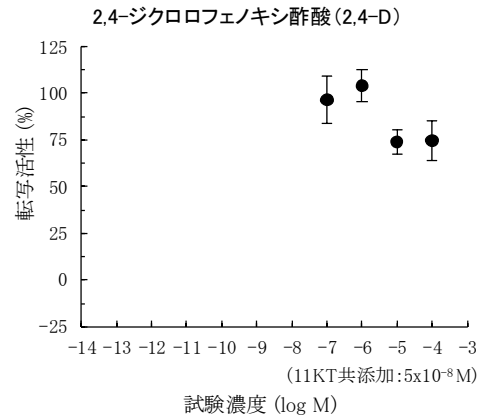
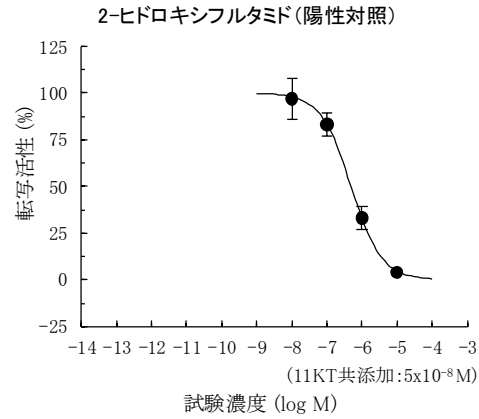
アンドロゲン作用については、メダカ AR $\beta$  の転写活性化は認められなかった。



| 試験対象物質          | アンドロゲン作用  |       |
|-----------------|---|-------|
|                 | EC <sub>50</sub> 又は PC <sub>10</sub>  | 相対活性比 |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | (得られなかった)   |       |
| 11-ケトテストステロン    | EC <sub>50</sub> = 1.0 × 10 <sup>-8</sup> M (1 回目試験)<br>EC <sub>50</sub> = 8.8 × 10 <sup>-10</sup> M (2 回目試験) |       |

#### (4) メダカアンドロゲン受容体 $\beta$ (AR $\beta$ ) レポーターゼーン試験 (抗アンドロゲン作用)

抗アンドロゲン作用については、11-ケトテストステロン  $5 \times 10^{-8}$  M 共添加条件でメダカ AR $\beta$  の転写活性化阻害は認められなかった。

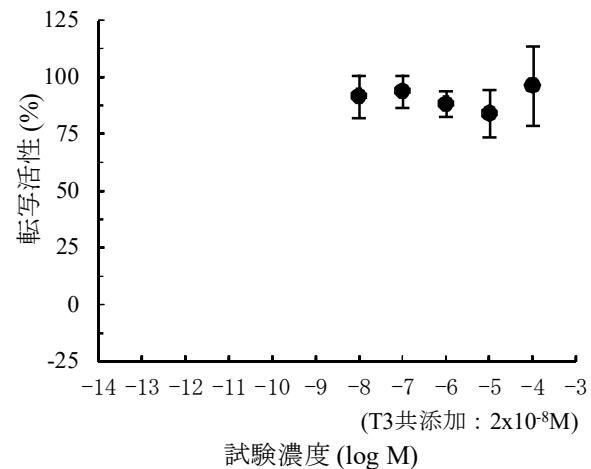


| 試験対象物質          | 抗アンドロゲン作用                                 |       |
|-----------------|---|-------|
|                 | IC <sub>50</sub> 又は linIC <sub>30</sub>   | 相対活性比 |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | (得られなかった)                                 |       |
| 2-ヒドロキシフルタミド    | IC <sub>50</sub> = $4.9 \times 10^{-7}$ M |       |

(5) ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体  $\beta$  (TR $\beta$ ) レポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン)

抗甲状腺ホルモン作用試験では、試験濃度範囲において  $2 \times 10^{-8}$  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  $\beta$  に対する転写活性化阻害はみられなかった。

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸



| 試験対象物質          | 抗甲状腺ホルモン作用                              |       |
|-----------------|---|-------|
|                 | IC <sub>50</sub> 又は linIC <sub>30</sub> | 相対活性比 |
| 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 | (得られなかった)                               |       |



| レポーター遺伝子試験      | メダカ<br>エストロゲン受容体 $\alpha$ |                             | メダカ<br>アンドロゲン受容体 $\beta$ |                             | ニシツメガエル<br>甲状腺ホルモン受容体 $\beta$ |                           | オオミジンコ<br>脱皮ホルモン受容体  |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|--|
| 動物細胞株           | HEK293<br>(ヒト胎児腎臓由来細胞株)   |                             | HepG2<br>(ヒト肝臓腫瘍細胞株)     |                             | HEK293<br>(ヒト胎児腎臓由来細胞株)       |                           | CHO<br>(チャイニーズハムスター<br>卵巣由来細胞株)                                |
| 受容体発現ベクター       | medaka ER alpha/pcDNA     |                             | medaka AR beta/pcDNA     |                             | tropicalis TR beta/pcDNA      |                           | D. magna EcR/pBIND   |
| 試験レポーターベクター     | ERE-TK- <i>Luc</i>        |                             | ARE-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>       |                             | pRL-TK- <i>Rluc</i>      |                             | pRL-TK- <i>Rluc</i>           |                           | pACT-dapUSP (LBD)<br>pACT-droTaiman (LXXLL)<br>pG5- <i>Luc</i> |
| 試験用培地           | DMEM <sup>1)</sup>        |                             | DMEM <sup>1)</sup>       |                             | DMEM                          |                           | DMEM/F12 <sup>1)</sup>   |
| 検出する作用          | エストロゲン<br>作用              | 抗エストロゲン<br>作用               | アンドロゲン<br>作用             | 抗アンドロゲン<br>作用               | 甲状腺ホルモン<br>作用                 | 抗甲状腺ホルモン<br>作用            | 脱皮ホルモン<br>作用   |
| 助剤 (DMSO) 最終濃度  | 0.1 %                     | 0.2 %                       | 0.1 %                    | 0.2 %                       | 0.1 %                         | 0.2 %                     | 0.1 %  |
| 陽性物質及び共添加濃度     | -                         | E2、0.2~1×10 <sup>-9</sup> M | -                        | 11KT、1~5×10 <sup>-8</sup> M | -                             | T3、1~2×10 <sup>-8</sup> M |  |

#### 共通条件

- ・培養環境及び時間：37℃、5 %CO<sub>2</sub>、40 時間
- ・被験物質添加濃度（試験濃度）：最高濃度として 10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup> M、最低濃度として 10<sup>-8</sup>~10<sup>-11</sup> M、公比 10
- ・試験容器：96 穴マイクロプレート（ただし平成 25 年度までは 24 穴マイクロプレート）
- ・試験液量：0.2 mL/well（ただし平成 25 年度までは 1 mL/well）
- ・細胞播種数：1.4×10<sup>4</sup> cells/well（ただし平成 25 年度までは 5×10<sup>4</sup> cells/well）
- ・連数：5 連(well)/濃度（ただし平成 25 年度までは 3 連(well)/濃度）

#### 備考

1) DMEM 培地は（2 mM L-glutamine 及び 10 % FCS 含有）とする

(EXTEND2010 に基づく平成 25 年度第 1 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料 3-3 より抜粋)  
(平成 30 年度第 2 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料 3-1 より抜粋)  
(令和元年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料 3-1 より抜粋)