

2-ブロモプロパン (CAS no. 75-26-3)

試験管内試験結果

1. 試験項目

2-ブロモプロパンについて、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。

| 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 | — | — | — | — |

P : EC₅₀ 又は IC₅₀ 値が検出

○ : 試験対象としたが、まだ実施していない作用モード

N : EC₅₀ 又は IC₅₀ 値が検出不可

— : 試験対象としなかった作用モード

* : その他

2. 試験方法

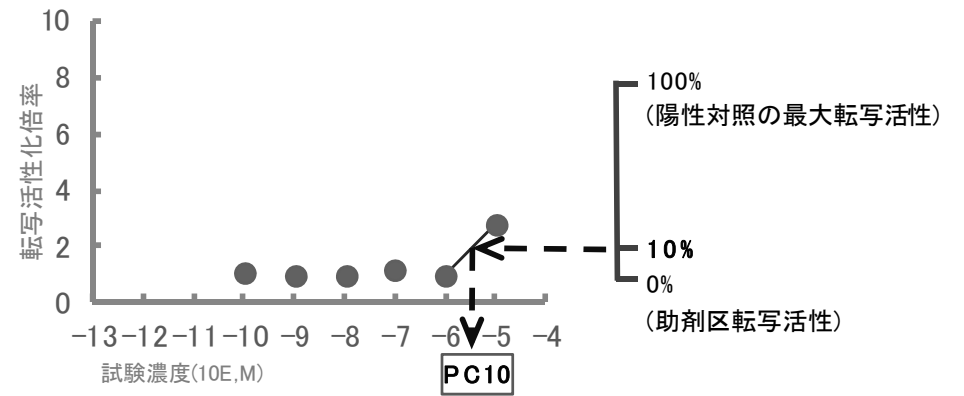
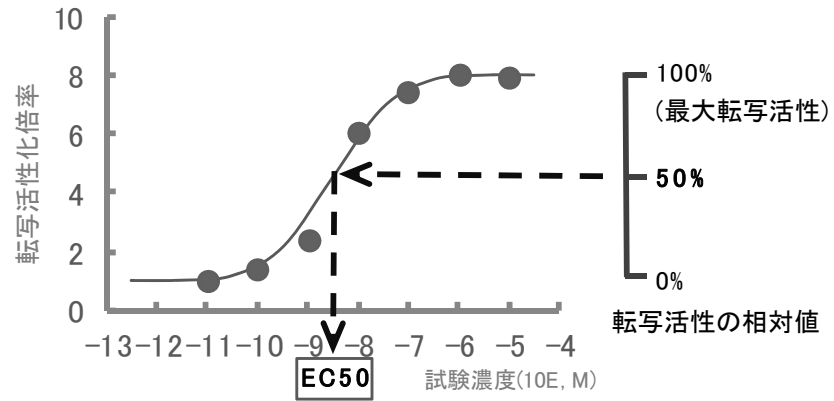
すべての試験項目のレポータージーン試験は、一過性発現細胞系による受容体遺伝子及びレポーター遺伝子等の細胞導入効率の変動を標準化できるデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を用いて実施した。

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、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それぞれ試験系に 2×10⁻⁹ M、5×10⁻⁸ 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)による試験を実施した。

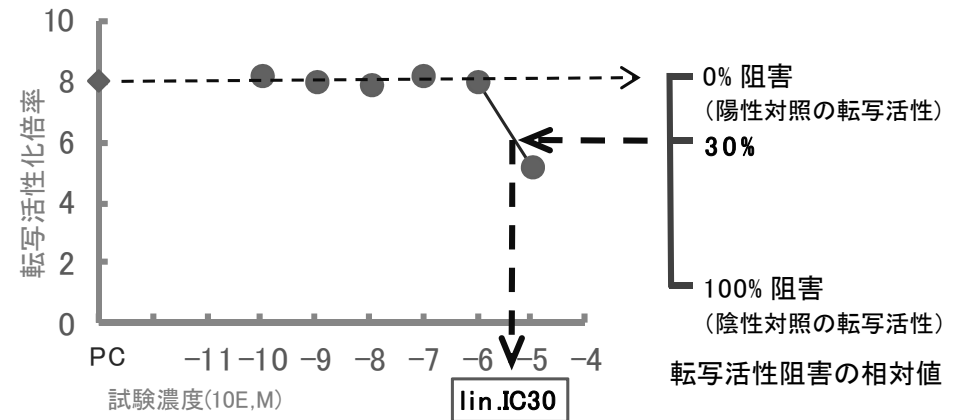
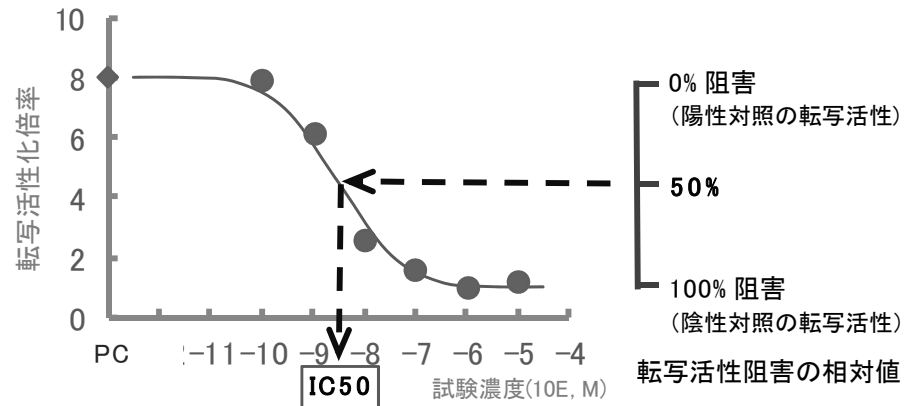
各試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり 5 連で行った。アゴニスト検出系の試験では、ベクターを一過的に導入した培養細胞を被験物質でばく露した後、ホタルルシフェラーゼの発光強度でホルモン応答による転写活性、ウミシイタケルシフェラ

一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



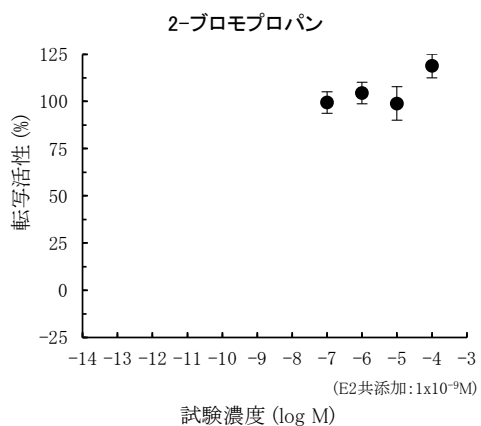
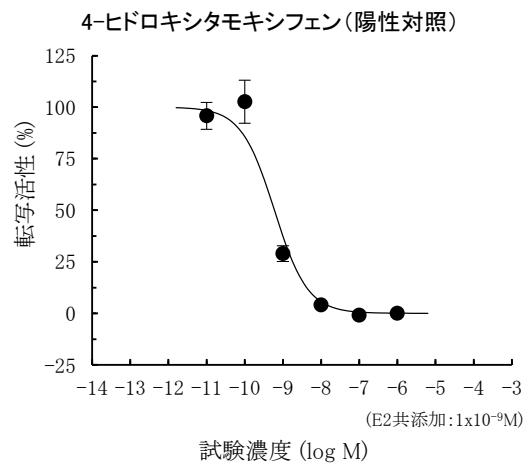
アンタゴニスト系試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値の算出



3. 結果

(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 (抗エストロゲン作用)

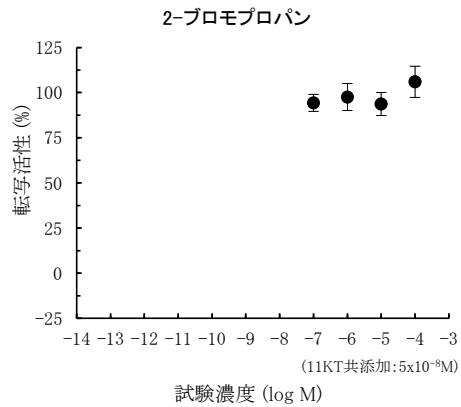
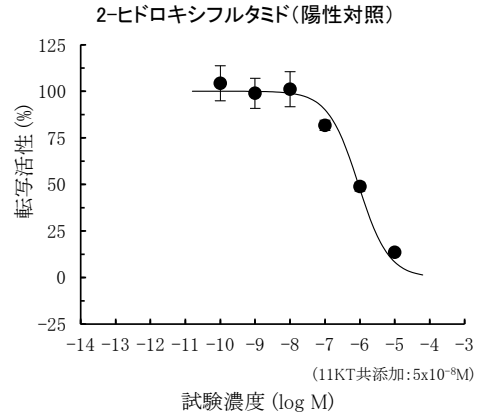
抗エストロゲン作用については、試験濃度範囲において、 17β -エストラジオール 2×10^{-9} M 共添加条件でメダカエストロゲン受容体 α の転写活性化阻害は認められなかった。



| 試験対象物質 | 抗エストロゲン作用 | |
|----------------|---|-------|
| | IC ₅₀ 又は linIC ₃₀ | 相対活性比 |
| 2-ブロモプロパン | (得られなかった) | |
| 4-ヒドロキシタモキシフェン | IC ₅₀ = 2.6×10^{-9} M | |

(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 (抗アンドロゲン作用)

抗アンドロゲン作用試験について、試験濃度範囲において、11-ケトテストステロン 1×10^{-8} M 共添加条件でメダカアンドロゲン受容体 β に対する転写活性化阻害はみられなかった。



| 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 |
| 2-ブロモプロパン | (得られなかった) | |
| 2-ヒドロキシフルタミド | IC ₅₀ = 9.1×10^{-7} M linIC ₃₀ = 6.8×10^{-7} M | |

| 試験条件等 | メダカ ER α レポータージーン試験 | | メダカ AR β レポータージーン試験 | | ニシツメガエル TR 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 | 甲状腺ホルモン作用 | 抗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 | |
| 動物細胞株 | HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株) | | HepG2 (ヒト肝腫瘍細胞株) | | HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株) | |
| 試験培地 | DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS 含有) | | DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS 含有) | | DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS 含有) | |
| 試験液量 | 0.2 mL/well | | 0.2 mL/well | | 0.2 mL/well | |
| 細胞播種数 | 1.4×10 ⁴ cells/well | | 1.4×10 ⁴ cells/well | | 1.4×10 ⁴ cells/well | |
| 受容体発現ベクター | medaka ER alpha/pcDNA | | medaka AR beta/pcDNA | | tropicalis TR beta/pcDNA | |
| 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> | |
| 培養環境及び時間 | 37℃、5% CO ₂ 、40 時間 | | 37℃、5% CO ₂ 、40 時間 | | 37℃、5% CO ₂ 、40 時間 | |
| 連数 | 5 連(well)/濃度 | | 5 連(well)/濃度 | | 5 連(well)/濃度 | |
| 共添加物質(陽性物質) 及び濃度 | — | 17 β -エストラジオール 2×10 ⁻⁹ M | — | 11-ケトテストステロン 5×10 ⁻⁸ M | — | トリヨードサイロニン 1×10 ⁻⁸ 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 % |

(平成 29 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 2-3 より抜粋)