

令和3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

令和3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 試験対象物質及び試験対象とした作用モード

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	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン
クロトリマゾール	○	○	○	○		
ペルメトリン	○	○		○	○	○
エチレンチオウレア	○	○	○	○	○	○
ジクロフェナク	○	○	○	○	○	○
安息香酸ベンジル	○					
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	○	○	○	○	○	○
4-メチルベンジリデン=カンファー	○	○		○	○	○
試験数	7	6	4	6	5	5

注) ペルメトリンについては trans 体(trans-ペルメトリン)を試験に用いた。

2. 方法及び材料

(1) 試験法の概要

すべての作用モードに関して、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いた一過性発現細胞系により試験を行った(図 2-1)。本試験法では、試験ごとに継代培養した動物細胞にホルモン受容体発現ベクター及び試験レポーターベクターを人為的に導入するが、同時に導入するコントロールレポーターベクターの発現量に基づいて、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。

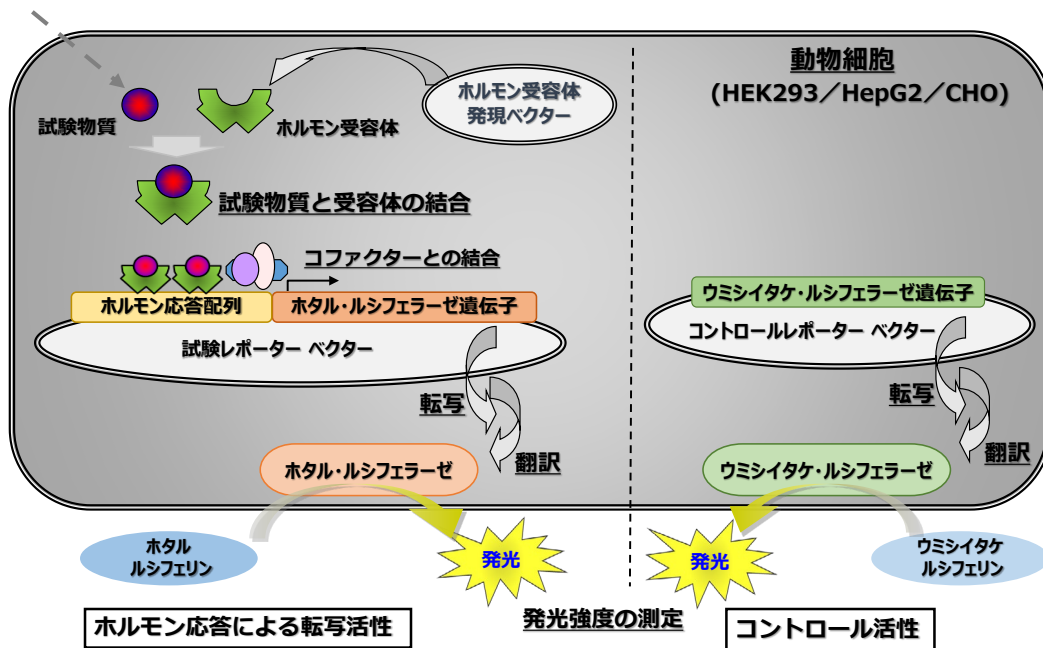


図 2-1 レポーター遺伝子試験の概要

(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 ($ER\alpha$)

抗エストロゲン作用: メダカエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$)

アンドロゲン作用: メダカアンドロゲン受容体 β ($AR\beta$)

抗アンドロゲン作用: メダカアンドロゲン受容体 β ($AR\beta$)

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 ($TR\beta$)

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 ($TR\beta$)

(3) 試薬及び試験濃度

試験には、純度 98%以上の試薬を供した。

(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、抗甲状腺ホルモン作用を除く各作用に関して、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

甲状腺ホルモン作用: トリヨードサイロニン

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及び抗甲状腺ホルモン作用の試験)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、アンドロゲン作用又は甲状腺ホルモ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)、11-ケトテストステロン(5×10^{-8} M)又はトリヨードサイロニン(1×10^{-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 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。試験濃度については、培地へ溶解可能な濃度、細胞毒性を発現しない濃度又は 10^{-4} M のうち、最も低い濃度を最高濃度とする 5 濃度(アゴニスト系試験)又は 4 濃度(アンタゴニスト系試験)を基本とした。

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

アゴニスト系試験での影響濃度の算出

アゴニスト系試験では、少なくとも試験最高濃度に関して、助剤対照区と比較して転写活性化倍率に有意な上昇が認められた場合に(t test, $p < 0.05$)、各試験濃度における平均転写活性化倍率を用いて、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 EC_{50} を推定した。ただし、非線形回帰モデルによる解析から得られた EC_{50} が試験最高濃度よりも高濃度であった場合(EC_{50} が外挿推定値となった場合)には、当該値は採用せずに、試験最高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で試験における最大転写活性の 10%を超えている場合には、別途、 PC_{10} を算出した。 PC_{10} については、図 2-2 に示すように、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)により算出した。最高試験濃度において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試験物質については、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} 及び PC_{10} のいずれも得られなかったと結論した。

アンタゴニスト系試験での影響濃度の算出

アンタゴニスト系試験では、少なくとも試験最高濃度に関して、陽性対照区と比較して

転写活性化倍率に有意な低下が認められた場合に(t test, $p < 0.05$)、各試験濃度における平均転写活性化倍率を用いて、上側範囲を陽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 IC_{50} を推定した。ただし、非線形回帰モデルによる解析から得られた IC_{50} が試験最高濃度よりも高濃度であった場合 (IC_{50} が外挿推定値となった場合)には、当該値は採用せずに、試験最高濃度における転写活性化倍率が陽性対照区の転写活性化倍率の 70%未満であった場合には、別途、 $linIC_{30}$ を算出した。 $linIC_{30}$ については、図 2-3 に示すように、陽性対照区における最大転写活性化倍率の 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)により算出した。最高試験濃において転写活性化倍率に陽性対照区と比較して有意な低下が認められなかった試験物質については、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} 及び $linIC_{30}$ のいずれも得られなかったと結論した。

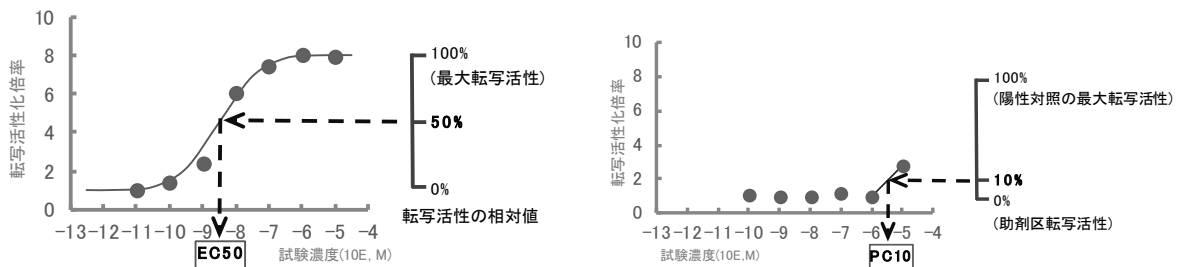


図 2-2 アゴニスト系試験における影響濃度の算出

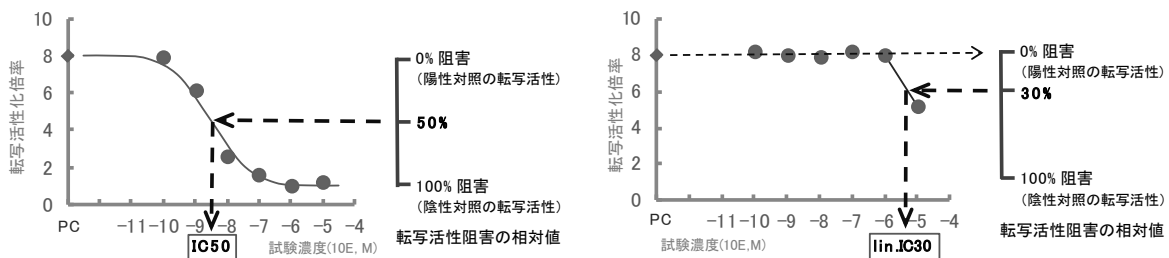


図 2-3 アンタゴニスト系試験における影響濃度の算出

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7物質のうち、ペルメトリン、安息香酸ベンジル及び 4-メチルベンジリデン=カンファーに関して、メダカ ER α に対する転写活性化が認められ、影響濃度として、安息香酸ベンジル及び 4-メチルベンジリデン=カンファーでは EC₅₀(6.0×10⁻⁵ M 及び 2.7×10⁻⁵ M)、ペルメトリンでは PC₁₀(5.5×10⁻⁶ M)が得られた。なお、それらの陽性対照物質(17 β -エストラジオール)のエストロゲン作用に対する相対活性比は、それぞれ 0.00028%、0.00063%及び 0.00033%であった。その他の4物質については、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
クロトリマゾール	(得られなかった)	
ペルメトリン	PC ₁₀ = 5.5×10 ⁻⁶ M	0.00033%
エチレンチオウレア	(得られなかった)	
ジクロフェナク	(得られなかった)	
安息香酸ベンジル	EC ₅₀ = 6.0×10 ⁻⁵ M	0.00028%
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	(得られなかった)	
4-メチルベンジリデン=カンファー	EC ₅₀ = 2.7×10 ⁻⁵ M	0.00063%
17 β エストラジオール	EC ₅₀ = 1.7×10 ⁻¹⁰ M PC ₁₀ = 1.8×10 ⁻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6物質に関して、試験濃度範囲で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
クロトリマゾール	(得られなかった)	
ペルメトリン	(得られなかった)	
エチレンチオウレア	(得られなかった)	
ジクロフェナク	(得られなかった)	
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	(得られなかった)	
4-メチルベンジリデン=カンファー	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC ₅₀ = 7.2 × 10 ⁻⁹ M	

(3)メダカ ARβレポータージーン試験(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レポータージーン試験)の結果を表 3-3 及び図 3-3 に示した。

試験対象とした4物質に関して、試験濃度範囲でメダカ 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
クロトリマゾール	(得られなかった)	
エチレンチオウレア	(得られなかった)	
ジクロフェナク	(得られなかった)	
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 3.1 × 10 ⁻⁹ M	

(4)メダカ ARβ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を対象とした試験管内試験(メダカ ARβレポータージーン試験)の結果を表 3-4 及び図 3-4 に示した。

試験対象とした6物質のうち、ジクロフェナクに関してメダカ ARβの陽性物質による転写活性に対する阻害作用が認められ、影響濃度として linIC₃₀(3.0 × 10⁻⁵ M)が得られた。なお、その陽性対照物質(2-ヒドロキシフルタミド)の抗アンドロゲン作用に対する相対活性比は 1.9%であった。その他の5物質については、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 抗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
クロトリマゾール	(得られなかった)	
ペルメトリン	(得られなかった)	
エチレンチオウレア	(得られなかった)	
ジクロフェナク	linIC ₃₀ = 3.0 × 10 ⁻⁵ M	1.9%
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	(得られなかった)	
4-メチルベンジリデン=カンファー	(得られなかった)	
2-ヒドロキシフルタミド	IC ₅₀ = 7.3 × 10 ⁻⁷ M linIC ₃₀ = 5.7 × 10 ⁻⁷ M	

(5) ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)

甲状腺ホルモン作用を対象とした試験管内試験(ニシツメガエル TR 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5質に関して、試験濃度範囲で転写活性化倍率の有意な上昇(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。

表 3-5 甲状腺ホルモン作用に関する試験管内試験の結果

試験対象物質	甲状腺ホルモン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
ペルメトリン	(得られなかった)	
エチレンチオウレア	(得られなかった)	
ジクロフェナク	(得られなかった)	
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	(得られなかった)	
4-メチルベンジリデン=カンファー	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 4.2 × 10 ⁻⁹ M	

(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)

抗甲状腺ホルモン作用を対象とした試験管内試験(ニシツメガエル TR β レポータージ

ーン試験)の結果を表 3-6 及び図 3-6 に示した。

試験対象とした5物質のうち、ジクロフェナクに関してニシツメガエル TR β の陽性物質による転写活性に対する阻害作用が認められ、影響濃度として IC₅₀ (3.9×10^{-5} M) が得られた。なお、抗甲状腺ホルモン作用については、陽性対照物質が設定されていないため相対活性比は算出していない。

表 3-6 抗甲状腺ホルモン作用に関する試験管内試験の結果

試験対象物質	抗甲状腺ホルモン作用	
	IC ₅₀ 又はlinIC ₃₀	相対活性比
ペルメリン	(得られなかった)	
エチレンチオウレア	(得られなかった)	
ジクロフェナク	IC ₅₀ = 3.9×10^{-5} M	—
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	(得られなかった)	
4-メチルベンジリデン=カンファー	(得られなかった)	

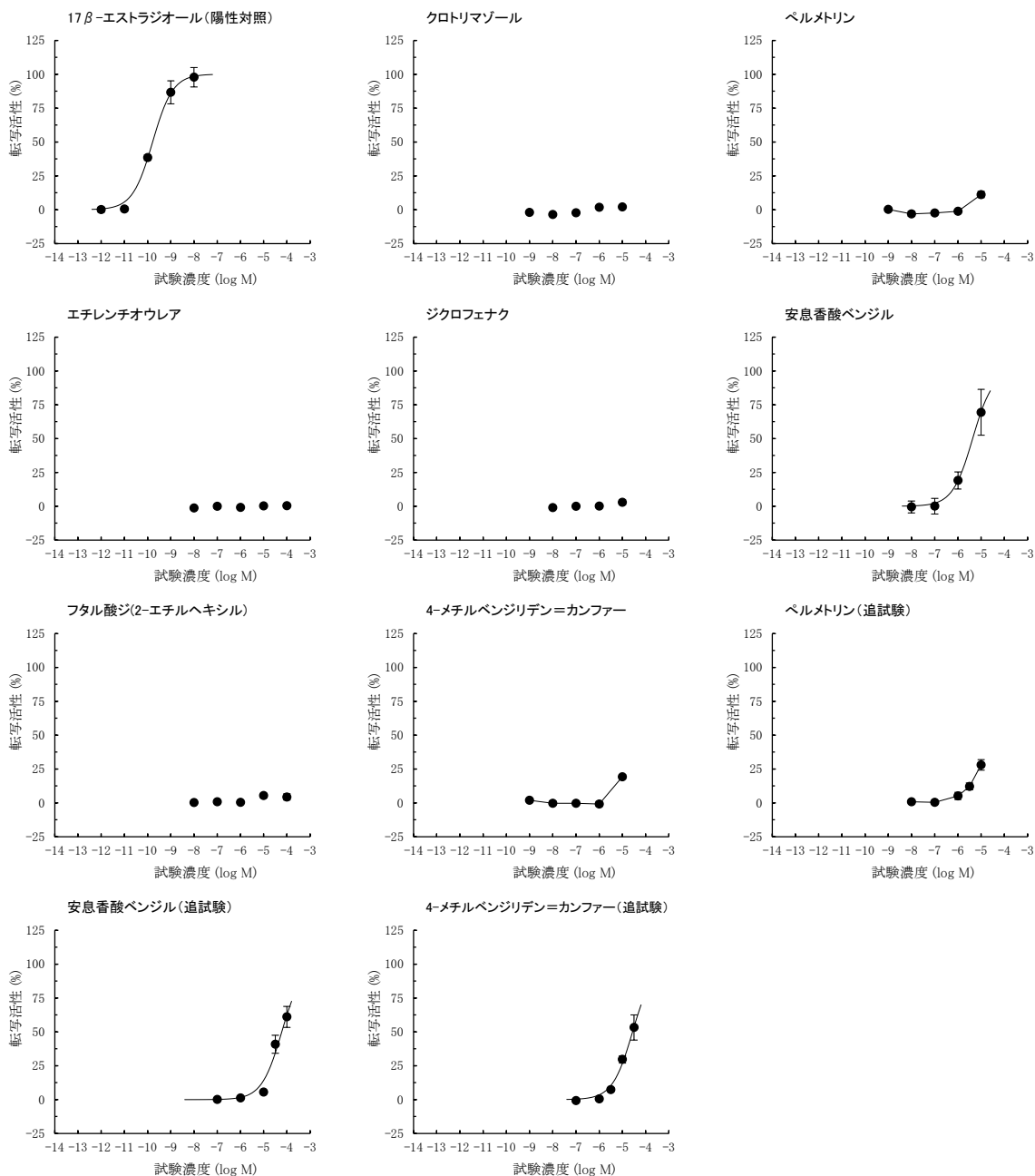


図 3-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)の結果

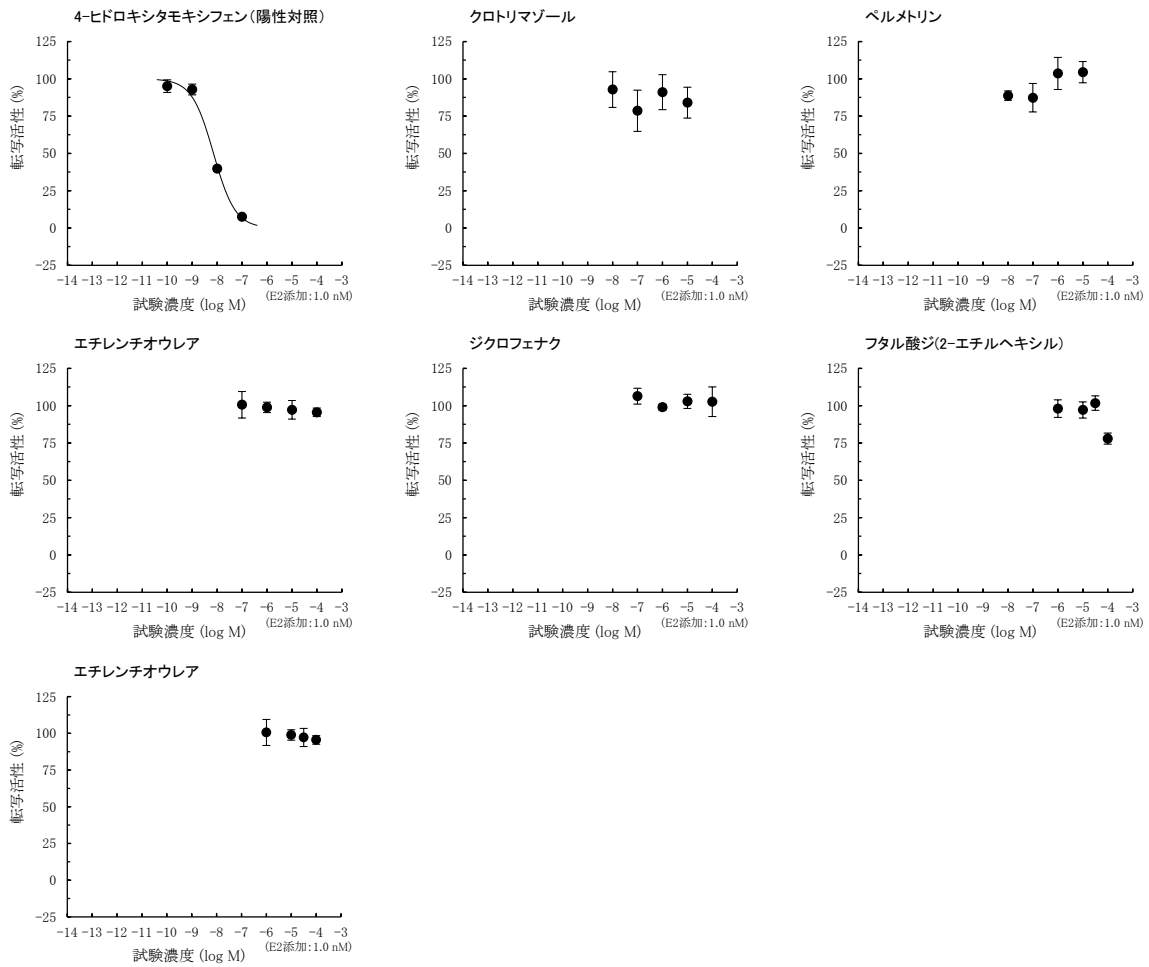


図 3-2 メダカ ER α レポータージーン試験(抗エストロゲン作用)の結果

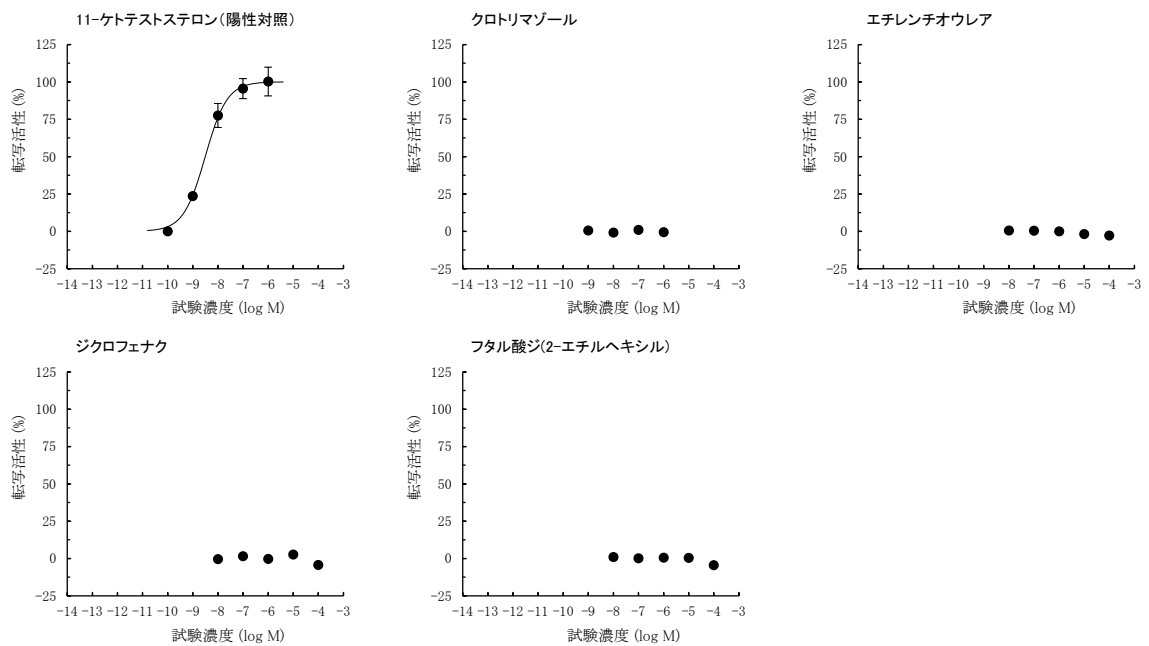


図 3-3 メダカ AR β レポータージーン試験(アンドロゲン作用)の結果

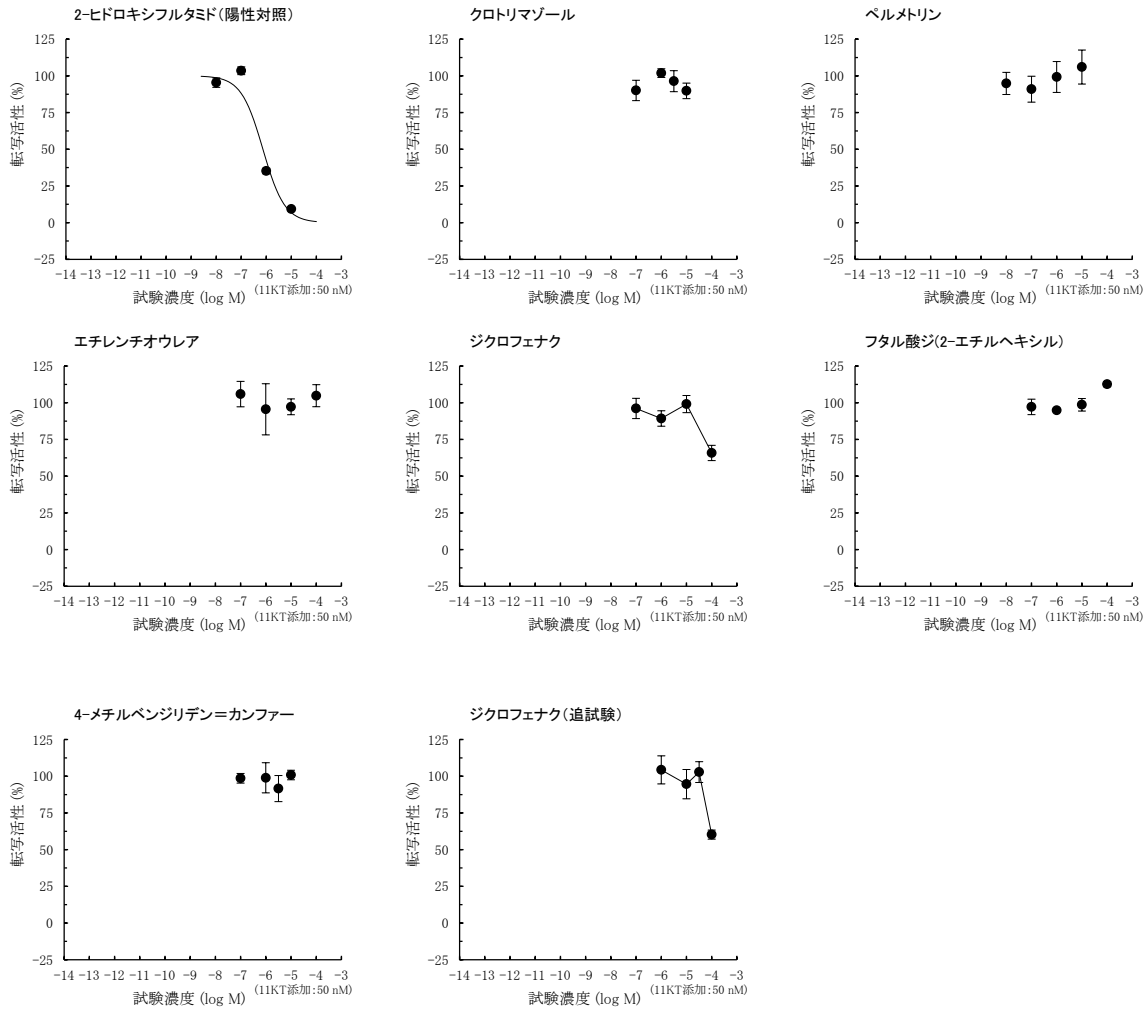


図 3-4 メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果

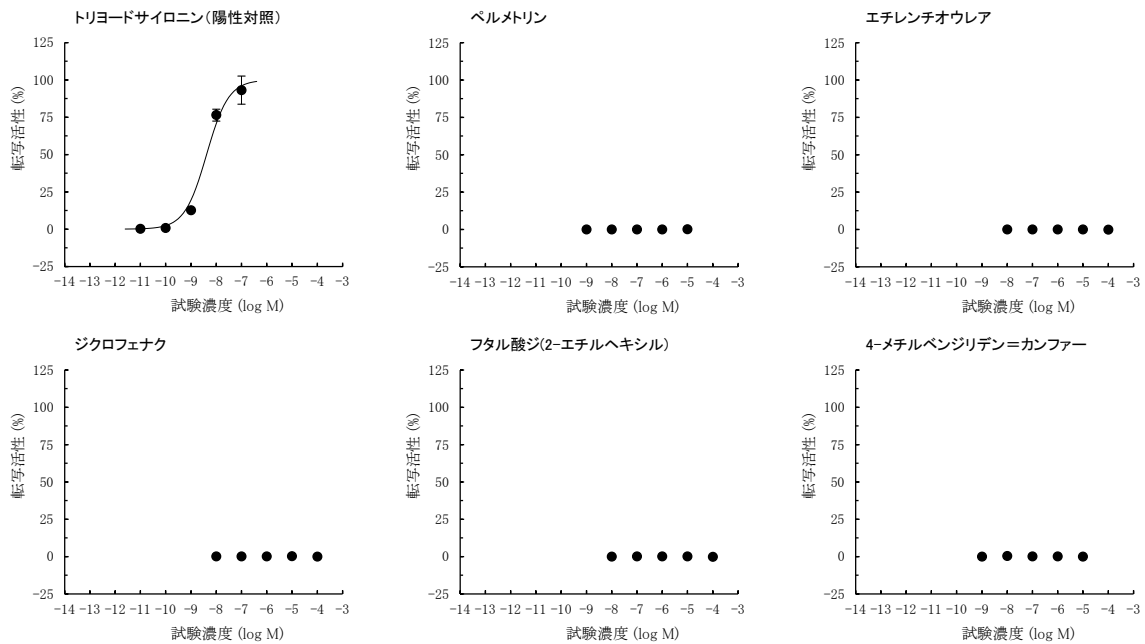


図 3-5 メニツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)の結果

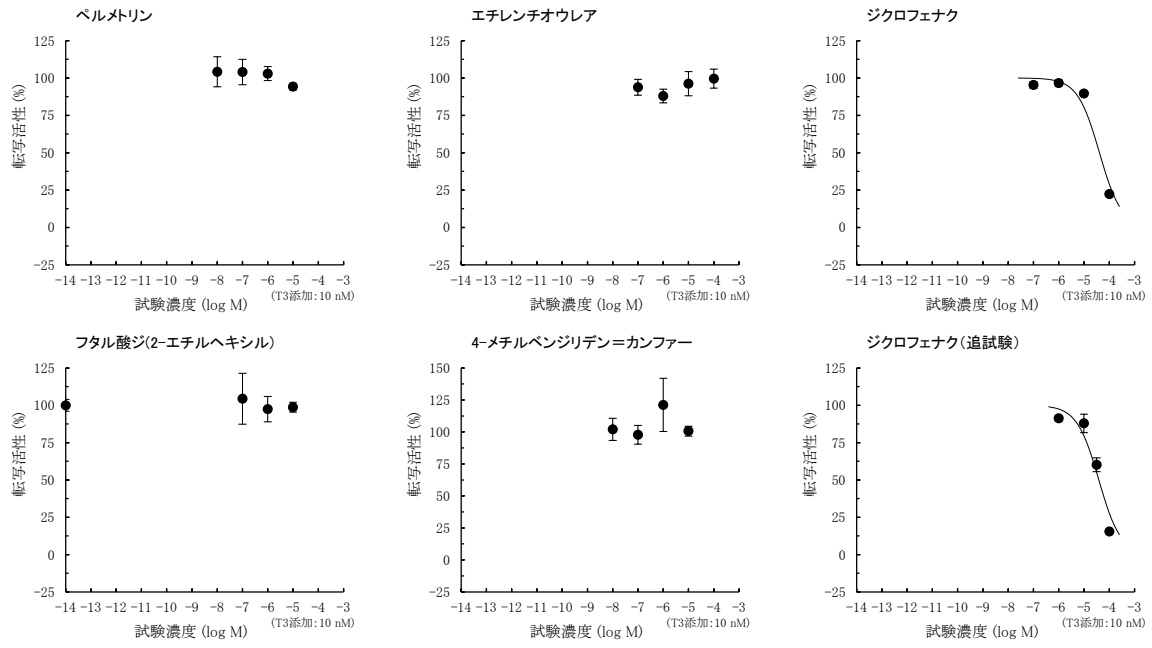


図 3-6 メニツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(抗甲状腺ホルモン作用)の結果

レポーター遺伝子試験の試験条件

試験条件	メダカER α レポーター遺伝子試験	
	アゴニスト検出系試験 (エストロゲン作用)	アンタゴニスト検出系試験 (抗エストロゲン作用)
試験容器	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	ヒト胎児腎由来細胞(HEK293)	
試験培地	ダルベッコ改変イーグル培地(2 mM L-glutamine及び活性炭/デキストラン処理10%ウシ胎仔血清含有)	
試験液量	0.244 mL/well	
細胞播種数	1.4 \times 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(暴露)環境	37 $^{\circ}$ C、5% CO ₂	
暴露時間	40時間	
試験濃度あたりの連数	5連(ウェル)	
共添加物質及び添加濃度	—	17 β -エストラジオール (1 \times 10 ⁻⁹ M)
助剤及び添加濃度	DMSO(0.1% v/v)	DMSO(0.2% v/v)
試験条件	メダカAR β レポーター遺伝子試験	
	アゴニスト検出系試験 (アンドロゲン作用)	アンタゴニスト検出系試験 (抗アンドロゲン作用)
試験容器	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	ヒト肝癌由来細胞(HepG2)	
試験培地	ダルベッコ改変イーグル培地(2 mM L-glutamine及び活性炭/デキストラン処理10%ウシ胎仔血清含有)	
試験液量	0.244 mL/well	
細胞播種数	1.4 \times 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(暴露)環境	37 $^{\circ}$ C、5% CO ₂	
暴露時間	40時間	
試験濃度あたりの連数	5連(ウェル)	
共添加物質及び添加濃度	—	11-ケトテストステロン (5 \times 10 ⁻⁸ M)
助剤及び添加濃度	DMSO(0.1% v/v)	DMSO(0.2% v/v)

試験条件	ニシツメガエルTR β レポーター遺伝子試験	
	アゴニスト検出系試験 (甲状腺ホルモン作用)	アンタゴニスト検出系試験 (抗甲状腺ホルモン作用)
試験容器	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	ヒト胎児腎由来細胞(HEK293)	
試験培地	ダルベッコ改変イーグル培地(2 mM L-glutamine及び 活性炭/デキストラン処理10%ウシ胎仔血清含有)	
試験液量	0.244 mL/well	
細胞播種数	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	tropicalis TR beta/pcDNA	
試験レポーターベクター	TRE-minP-Luc	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK-Rluc	
培養(暴露)環境	37°C、5% CO ₂	
暴露時間	40時間	
試験濃度あたりの連数	5連(ウェル)	
共添加物質及び添加濃度	—	トリヨードサイロニン (1×10^{-8} M)
助剤及び添加濃度	DMSO (0.1% v/v)	DMSO (0.2% v/v)