

平成 29 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 29 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						
	E	aE	A	aA	T	aT	Ec
フルタミド				○			
二硫化炭素				○			
フェンバレレート				○			
グリホサート				○			
ニトロベンゼン				○			
トリクロサン				○			
フタル酸ジイソブチル				○			
ベノミル				○			
トリクロ酢酸				○			
フィプロニル				○			
アクリロニトリル				○			
ジブロモクロロメタン				○			
テブフェノジド							○
4-ノニルフェノール(分岐型)				○			
4-tert-オクチルフェノール				○			
ビスフェノールA				○			
クロタロニル(TPN)					○	○	○
カルバリル			○				
シマジン	○		○	○			
テブコナゾール			○				
プロピコナゾール			○				
リニユロン	○	○	○	○	○	○	
酢酸クロルマジノン		○					
フルオランテン				○			

表 1-1 (つづき)

試験対象物質	試験対象とした作用モード						
	E	aE	A	aA	T	aT	Ec
マンゼブ(又はマンコゼブ))			○	○	○	○	
マンネブ				○	○	○	
クロルピリホス	○	○		○	○	○	
ジメテート	○				○	○	
エチレングリコールモノエチルエーテル					○	○	
トナリド	○	○		○			
ベンゾフェノン-2	○	○		○	○	○	
イプロジオン	○	○	○	○			
ノニルフェノールエトキシレート類	○						
ペンディメタリン	○						
スルファメキサゾール	○			○			
17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール	○						
試験数	11	6	7	25	8	8	2

注1) ノニルフェノールエトキシレート類は、重合度(エチレンオキシド基数)が1~15のノニルフェノールエトキシレートを等量混合したもの。

注2) 試験対象とした作用モードの略号は、以下のとおり。

E:エストロゲン作用、aE:抗エストロゲン作用、A:アンドロゲン作用、aA:抗アンドロゲン作用、T:甲状腺ホルモン作用、aT:抗甲状腺ホルモン作用、Ec:脱皮ホルモン作用

## 2. 方法及び材料

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)。各作用モードの試験には、以下のホルモン受容体を用いた。

### 試験に用いたホルモン受容体(生物種及びサブタイプ)

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

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

アンドロゲン作用: メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  (AR $\beta$ )

抗アンドロゲン作用: メダカアンドロゲン受容体  $\beta$  (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  $\beta$  (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  $\beta$  (AR $\beta$ )

脱皮ホルモン作用: オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR)

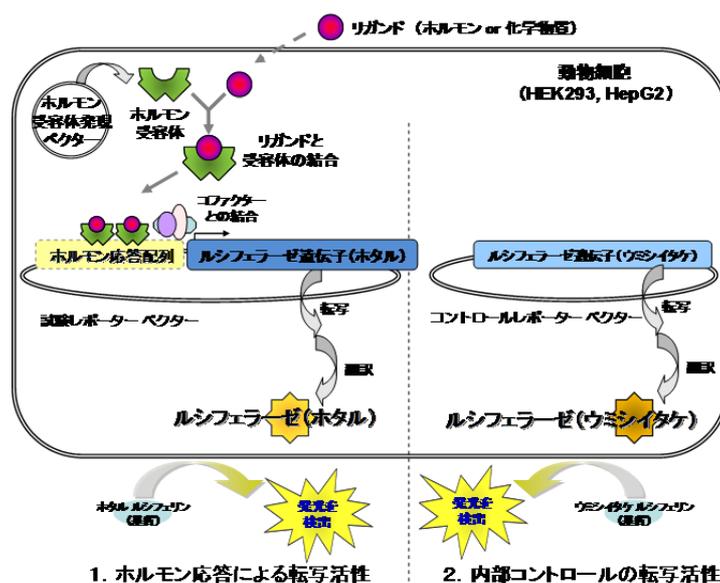


図 2-1 レポーター遺伝子試験の概要

試験には、マンゼブ(又はマンコゼブ)及びマンネブを除いて、純度 97%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。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<sup>-9</sup> M)、11-ケトテストステロン(5×10<sup>-8</sup> M)又はトリヨードサイロニン(1×10<sup>-8</sup> M))。抗甲状腺ホルモン作用を除く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。

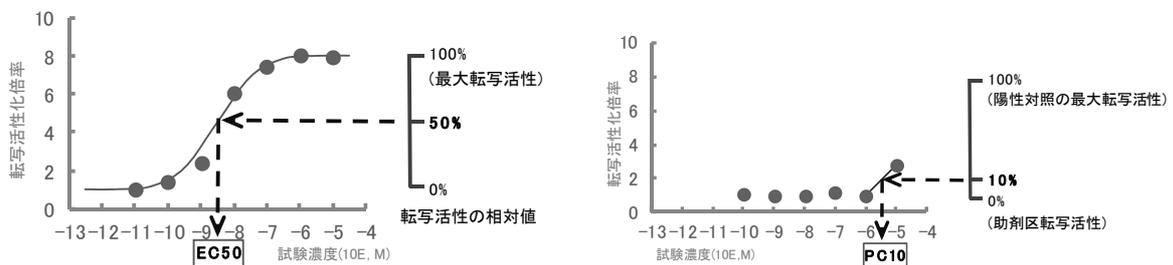
#### 陽性対照物質

- 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

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。アゴニスト系試験(エストロゲン作用、アンドロゲン作用、甲状腺ホルモン作用、脱皮ホルモン作用の試験)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、抗甲状腺ホルモン作用)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。なお、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(抗アンドロゲン作用の試験では、入手源が異なる培養細胞を用いて追試験を行った)。各試験の試験条件を別添1に示した。

### アゴニスト系試験



### アンタゴニスト系試験

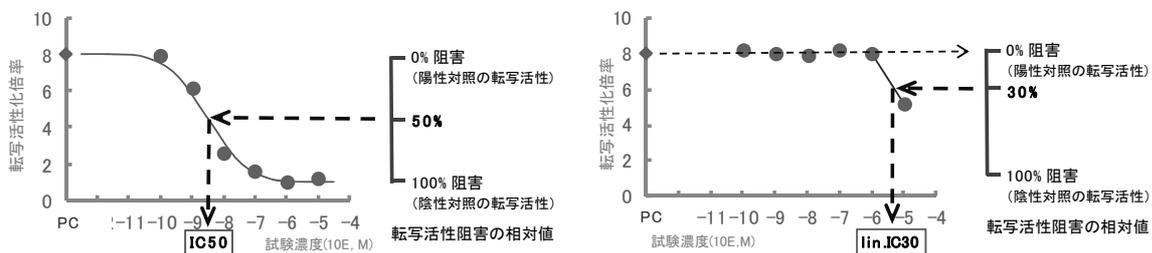


図 2-2 アゴニスト系試験及びアンタゴニスト系試験における作用濃度の算出

### 3. 結果

平成 29 年度の第 1 段階試験管内試験(レポータージーン試験)のうち、現時点までに試験及びデータの解析が終了したエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、甲状腺ホルモン作用及び抗甲状腺ホルモン作用について結果をとりまとめた。

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

エストロゲン作用を対象とした試験管内試験(メダカ ER $\alpha$  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 11 物質のうち、クロルピリホス、ベンゾフェノン-2、ペンディメタリン、スルファメトキサゾール及び 17 $\alpha$ -エチニルエストラジオールの 5 物質に関して、試験濃度範囲において転写活性化倍率に有意な上昇がみられ、メダカ ER $\alpha$  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。ベンゾフェノン-2、ペンディメタリン、スルファメトキサゾール及び 17 $\alpha$ -エチニルエストラジオールについては EC<sub>50</sub> 値(1.6 $\times 10^{-6}$  M、3.3 $\times 10^{-6}$  M、9.7 $\times 10^{-6}$  M 及び 5.1 $\times 10^{-11}$  M)が得られ、それらの 17 $\beta$  エストラジオール(陽性対象物質)に対する相対活性比は 0.010%、0.0050%、0.0017% 及び 320%であった。また、クロルピリホスについては PC<sub>10</sub> 値が得られ(1.1 $\times 10^{-6}$ )、その 17 $\beta$  エストラジオールに対する相対活性比は 0.0019%であった。シマジン、リニュロン、ジメテート、トナリド、イプロジオン及びノニルフェノールエトキシレート類の 7 物質については、試験濃度範囲において転写活性化倍率に有意な上昇は認められず、エストロゲン作用に関する EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 値は得られなかった。

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 <sub>50</sub> 又はPC <sub>10</sub>	相対活性比
シマジン	(得られなかった)	
リニュロン	(得られなかった)	
クロルピリホス	PC <sub>10</sub> = 1.1 $\times 10^{-6}$ M	0.0019 %
ジメテート	(得られなかった)	
トナリド	(得られなかった)	
ベンゾフェノン-2	EC <sub>50</sub> = 1.6 $\times 10^{-6}$ M	0.010 %
イプロジオン	(得られなかった)	
ノニルフェノールエトキシレート類	(得られなかった)	
ペンディメタリン	EC <sub>50</sub> = 3.3 $\times 10^{-6}$ M	0.0050 %
スルファメトキサゾール	EC <sub>50</sub> = 9.7 $\times 10^{-6}$ M	0.0017 %
17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール	EC <sub>50</sub> = 5.1 $\times 10^{-11}$ M	320 %
17 $\beta$ エストラジオール	EC <sub>50</sub> = 1.6 $\times 10^{-10}$ M PC <sub>10</sub> = 2.0 $\times 10^{-11}$ M	

(2)メダカ ER $\alpha$ 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を対象とした試験管内試験(メダカ ER $\alpha$ レポーター遺伝子試験)の結果を表 3-2 及び図 3-2 に示した。

試験対象としたリニュロン、酢酸クロルマジノン、クロルピリホス、トナリド、ベンゾフェノン-2、イプロジオンの 6 物質に関して、試験濃度範囲において 17 $\beta$  エストラジオール(供添加した陽性物質)によるメダカ ER $\alpha$  の転写活性化倍率に有意な低下(メダカ ER $\alpha$  の転写活性に対する阻害作用)は認められず、抗エストロゲン作用に関する IC<sub>50</sub> 値及び linIC<sub>30</sub> 値は得られなかった。

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 <sub>50</sub> 又はlinIC <sub>30</sub>	相対活性比
リニュロン	(得られなかった)	
酢酸クロルマジノン	(得られなかった)	
クロルピリホス	(得られなかった)	
トナリド	(得られなかった)	
ベンゾフェノン-2	(得られなかった)	
イプロジオン	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC <sub>50</sub> = 1.6 × 10 <sup>-9</sup> 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。

試験対象としたカルバリル、シマジン、テブコナゾール、プロピコナゾール、リニユロンマンゼブ(又はマンコゼブ)及びイプロジオンの 7 質に関して、試験濃度範囲において、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)は認められず、アンドロゲン作用に関して EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 値は得られなかった。

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 <sub>50</sub> 又はPC <sub>10</sub>	相対活性比
カルバリル	(得られなかった)	
シマジン	(得られなかった)	
テブコナゾール	(得られなかった)	
プロピコナゾール	(得られなかった)	
リニユロン	(得られなかった)	
マンゼブ又はマンコゼブ	(得られなかった)	
イプロジオン	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC <sub>50</sub> = 3.2 × 10 <sup>-8</sup> M	

(4) ニシツメガエル TR $\beta$  レポータージーン試験(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 $\beta$  レポータージーン試験)の結果を表 3-4 及び図 3-4 示した。

試験対象としたクロタロニル(TPN)、リニュロン、マンゼブ(又はマンコゼブ)、マンネブ、クロルピリホス、ジメテート、エチレングリコールモノエチルエーテル及びベンゾフェノン-2 の 8 物質に関して、試験濃度範囲において転写活性化倍率に有意な上昇(ニシツメガエル TR $\beta$  に対する転写活性化)は認められず、甲状腺ホルモン作用に関する EC<sub>50</sub> 値及び PC<sub>10</sub> 値は得られなかった。

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 <sub>50</sub> 又はPC <sub>10</sub>	相対活性比
クロタロニル(TPN)	(得られなかった)	
リニュロン	(得られなかった)	
マンゼブ又はマンコゼブ	(得られなかった)	
マンネブ	(得られなかった)	
クロルピリホス	(得られなかった)	
ジメテート	(得られなかった)	
エチレングリコールモノエチルエーテル	(得られなかった)	
ベンゾフェノン-2	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC <sub>50</sub> = 4.8 × 10 <sup>-9</sup> M	

(5) ニシツメガエル TRβ 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 TRβ レポーター遺伝子試験) の結果を表 3-5 及び図 3-5 示した。

試験対象とした 8 物質のうち、ベンゾフェノン-2 に関して、試験濃度範囲においてトリヨードサイロニン (陽性物質) によるニシツメガエル TRβ の転写活性化倍率に有意な低下がみられ、ニシツメガエル TRβ に対する転写活性化阻害作用 (抗甲状腺ホルモン作用) を有することが示唆された。ベンゾフェノン-2 について、試験から得られた IC<sub>50</sub> 値は  $7.9 \times 10^{-5}$  M であった (甲状腺ホルモン作用については、適切な陽性対照物質がないため相対活性比は算出していない)。

クロロタロニル (TPN)、リニュロン、マンゼブ又はマンコゼブ、マンネブ、クロルピリホス、ジメテート及びエチレングリコールモノエチルエーテルの 7 物質については、試験濃度範囲においてトリヨードサイロニンによるニシツメガエル TRβ の転写活性化倍率に有意な低下は認められず、抗甲状腺ホルモン作用に関する IC<sub>50</sub> 値及び linIC<sub>30</sub> 値は得られなかった。

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 <sub>50</sub> 又はlinIC <sub>30</sub>	相対活性比
クロロタロニル (TPN)	(得られなかった)	
リニュロン	(得られなかった)	
マンゼブ又はマンコゼブ	(得られなかった)	
マンネブ	(得られなかった)	
クロルピリホス	(得られなかった)	
ジメテート	(得られなかった)	
エチレングリコールモノエチルエーテル	(得られなかった)	
ベンゾフェノン-2	IC <sub>50</sub> = $7.9 \times 10^{-5}$ M	—

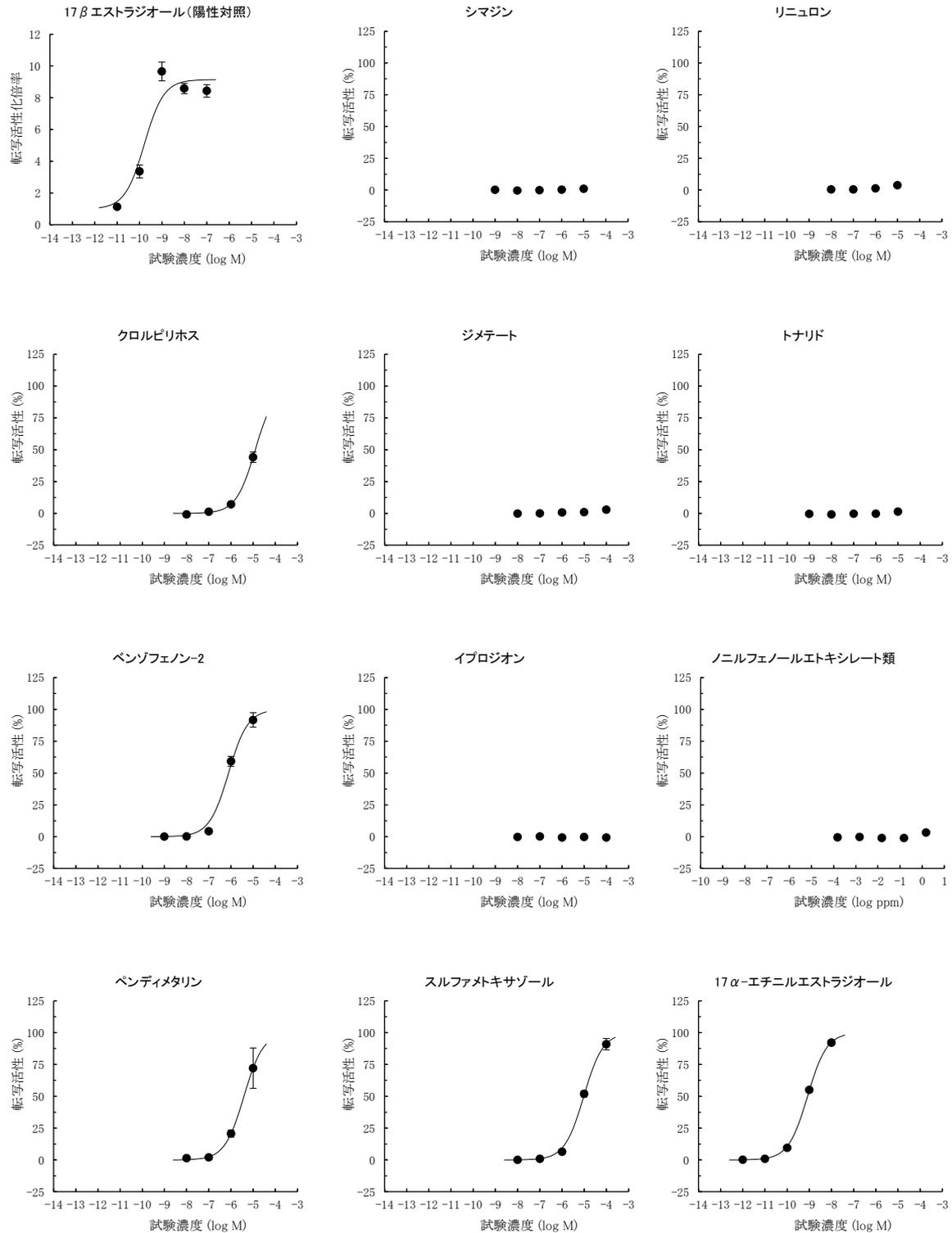


図 3-1 メダカ ER $\alpha$  レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)結果

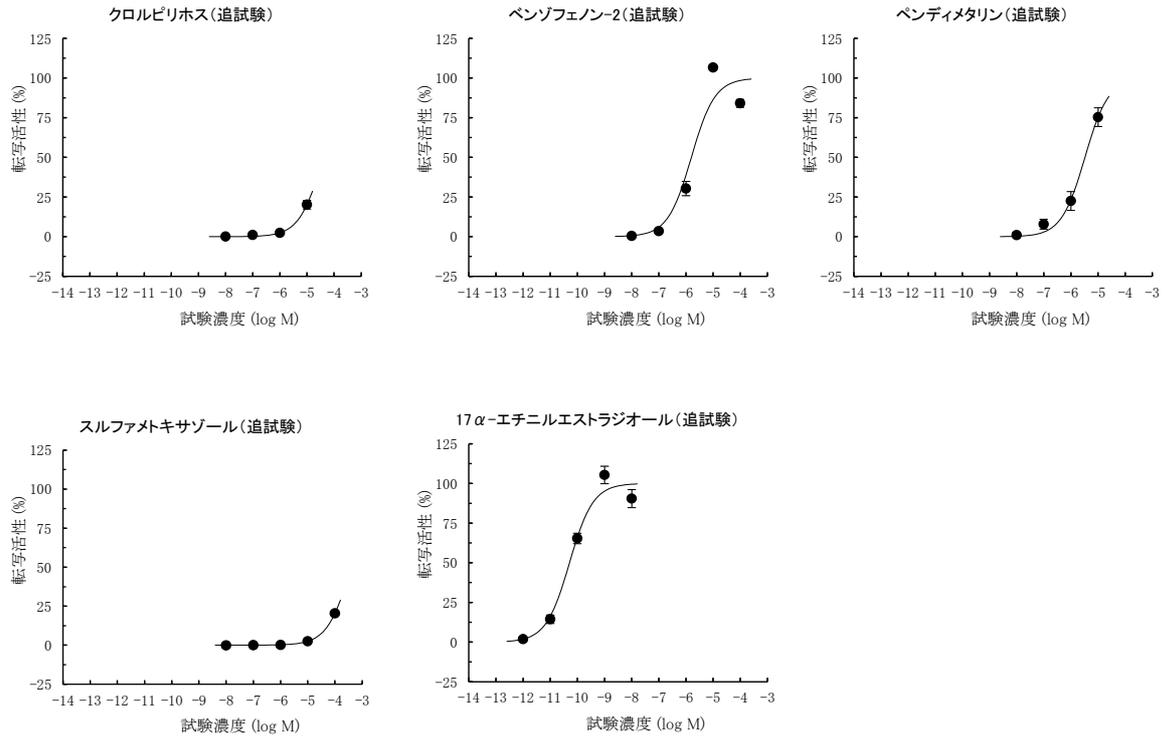


図 3-1(つづき) メダカ ER $\alpha$  レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用) 結果

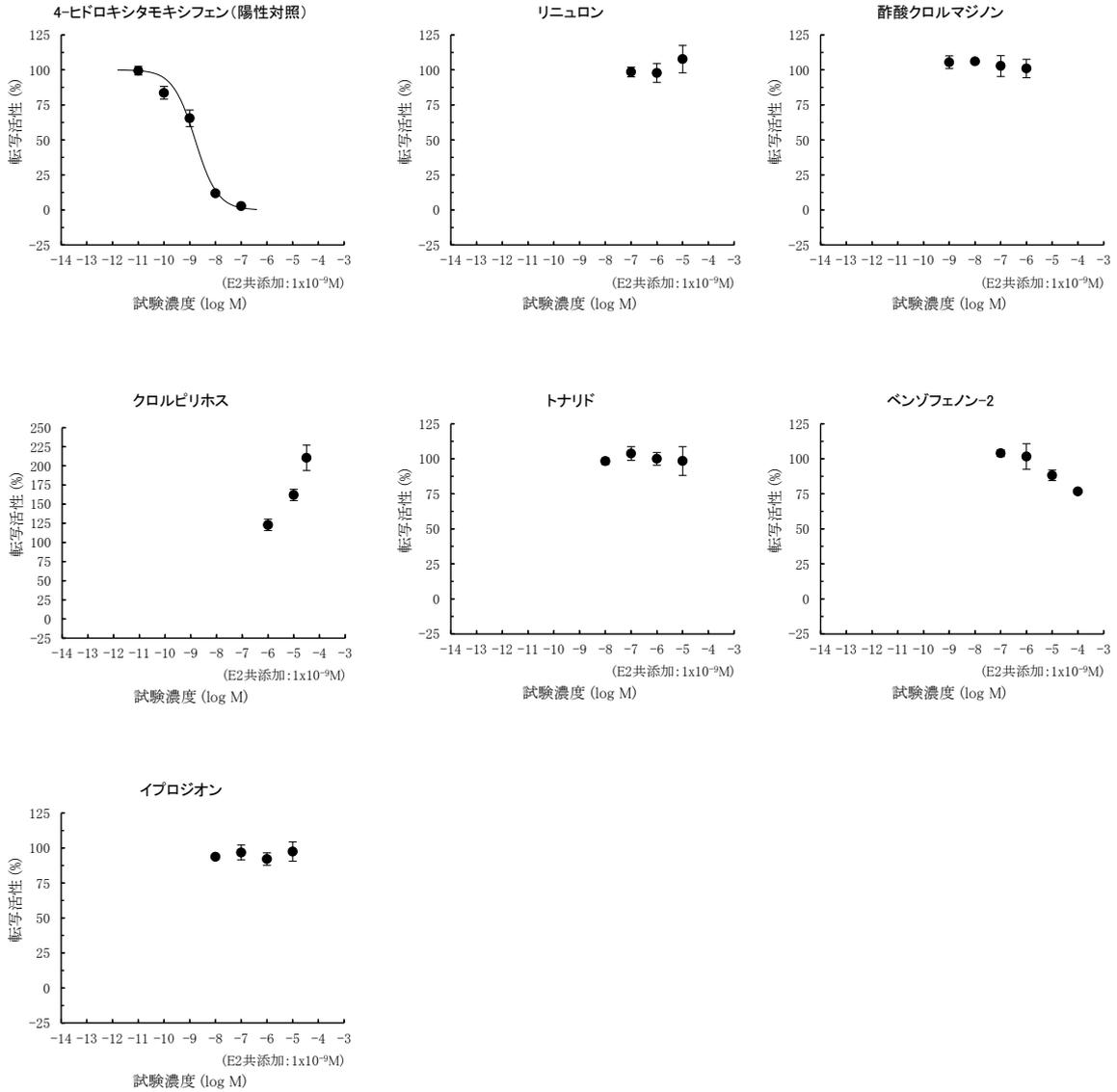


図 3-2 メダカ ER $\alpha$  レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

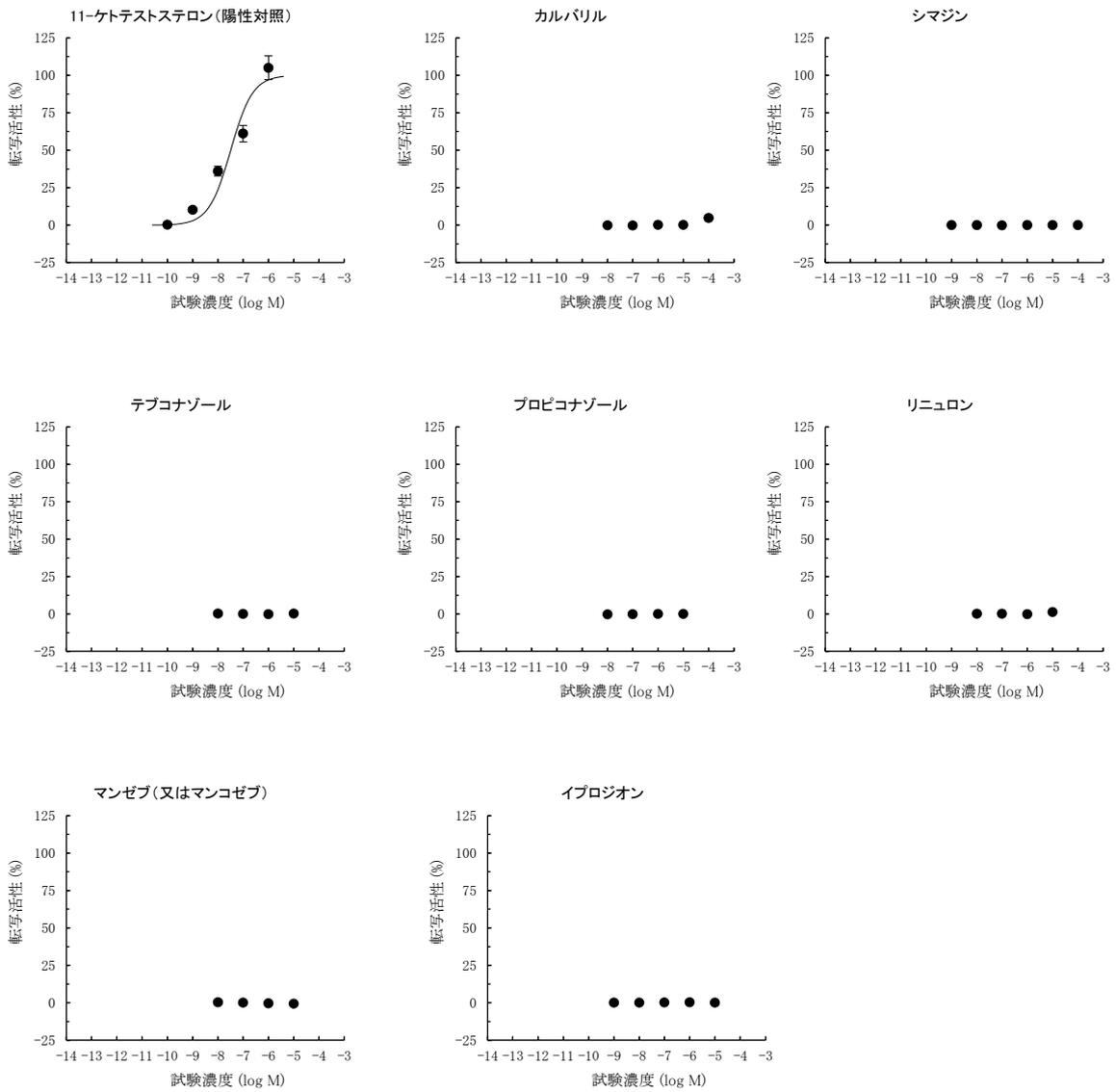


図 3-3 メダカ AR  $\beta$  レポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)結果

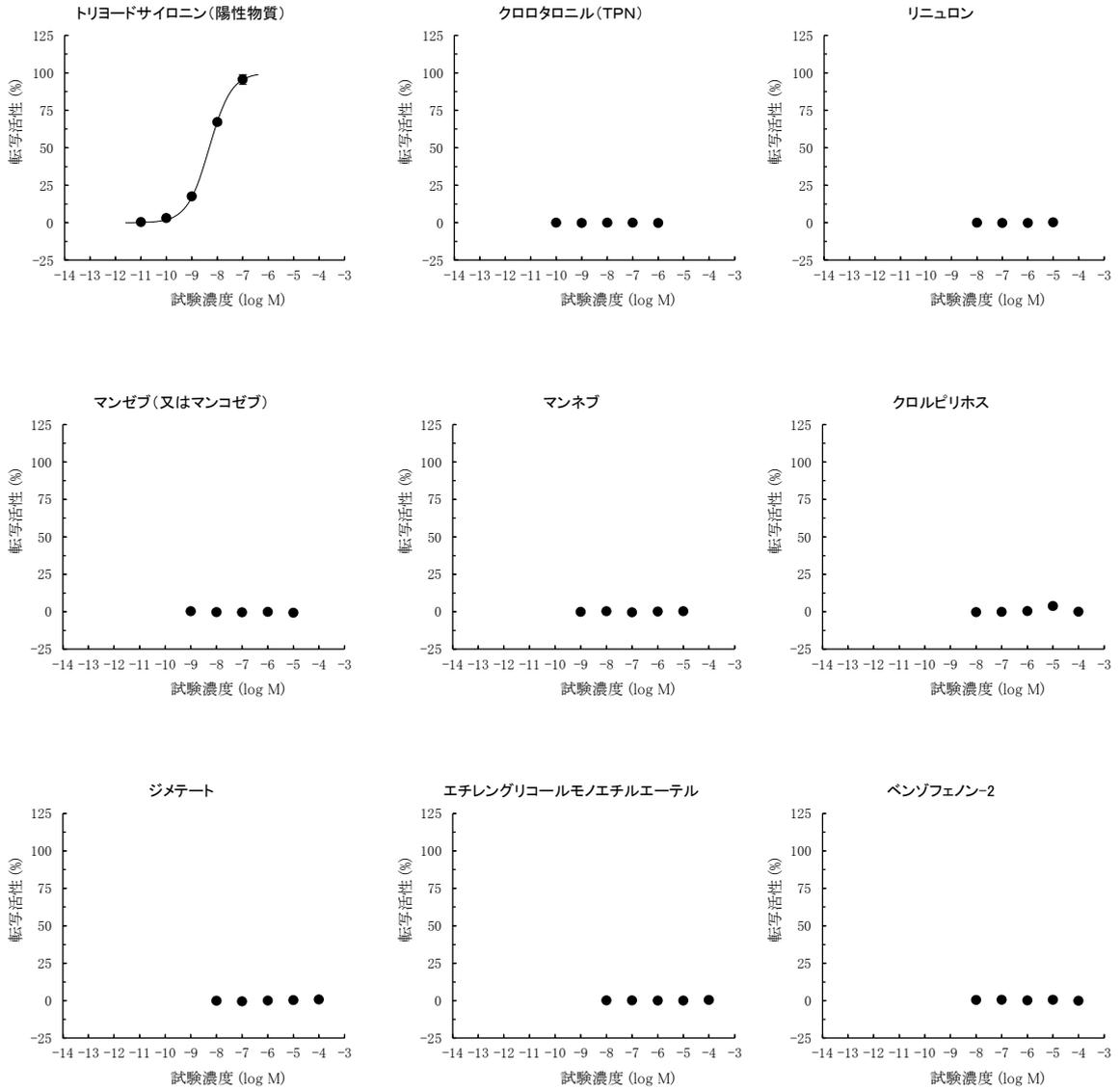


図 3-4 ニシツメガエル TRβ レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)結果

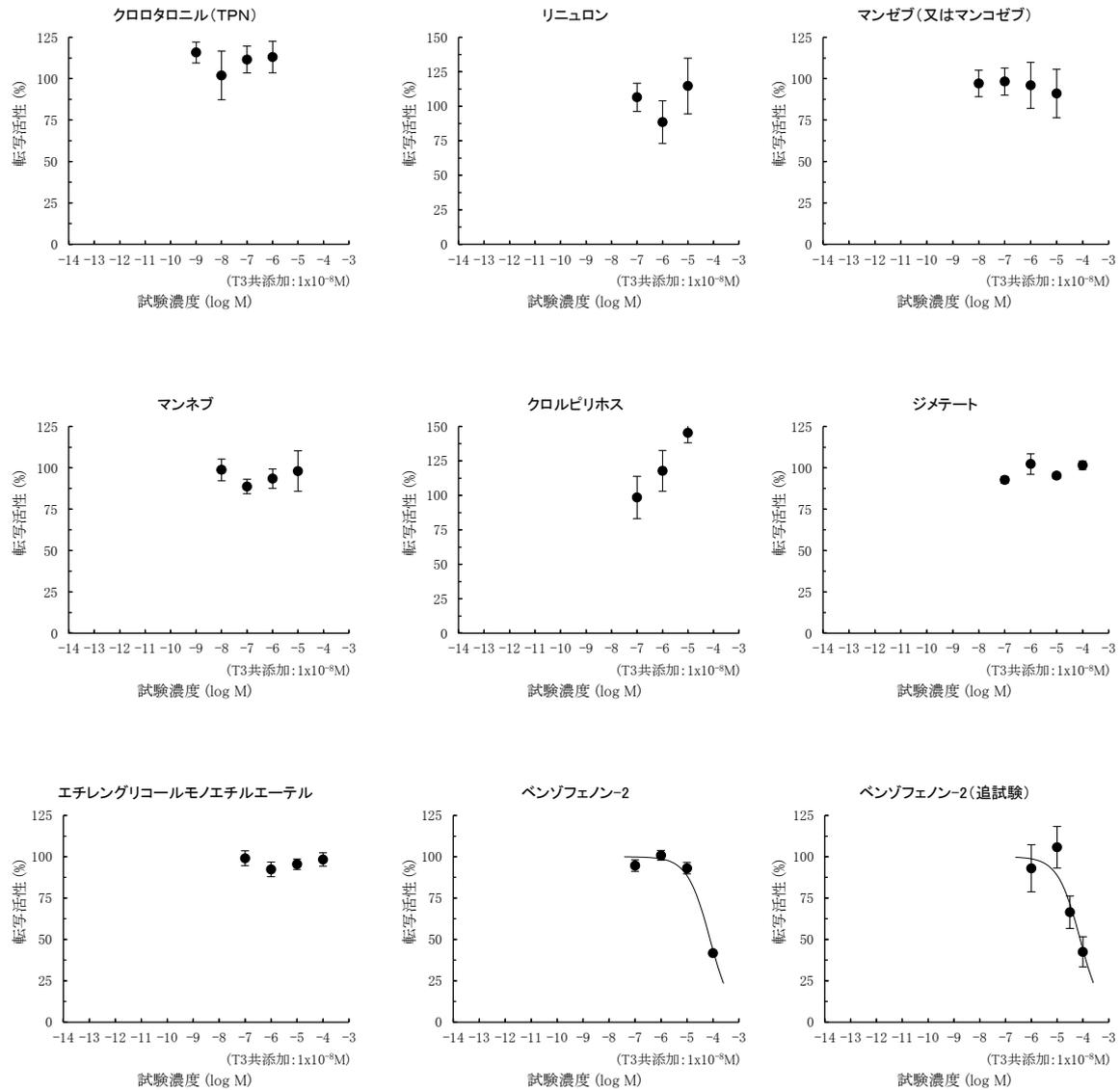


図 3-5 ニシツメガエル TRβ レポーター遺伝子試験(抗甲状腺ホルモン作用)結果

(別添 1)

(1) メダカ ER $\alpha$ 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	$1.4 \times 10^4$ 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	
培養環境及び時間	37°C、5 % CO <sub>2</sub> 、40時間	
連数	5連(well)/濃度	
共添加陽性物質及び添加濃度	—	17 $\beta$ エストラジオール ( $1 \times 10^{-9}$ M)
助剤及び最終濃度	DMSO 0.1 %	DMSO 0.2 %

(2) メダカ AR $\beta$ 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	$1.4 \times 10^4$ 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	
培養環境及び時間	37°C、5% CO <sub>2</sub> 、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 ( $5 \times 10^{-8}$ M)
助剤及び最終濃度	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%

(3) ニシツメガエル TRβ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)の条件

試験条件	甲状腺ホルモン作用試験 (アゴニスト検出系)	抗甲状腺ホルモン作用試験 (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	0.244 mL/well	
細胞播種数	1.4×10 <sup>4</sup> 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	
培養環境及び時間	37°C、5% CO <sub>2</sub> 、40時間	
連数	5連(well)/濃度	
共添加陽性物質及び添加濃度	—	トリヨードサイロニン (1×10 <sup>-8</sup> M)
助剤及び最終濃度	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%

(4) 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)の条件

試験条件	脱皮ホルモン作用試験(アゴニスト検出系)
試験容器	96穴マイクロプレート
動物細胞株	CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来繊維芽細胞株)
試験培地	DMEM/F12(2mM L-glutamine、10%FCS含有)
試験液量	0.2 mL/well
細胞播種数	1.4×10 <sup>4</sup> cells/well
受容体発現ベクター コントロールレポーターベクター	D. magna EcR/pBIND
コントロールレポーターベクター	pACT-dapUSP (LBD) pACT-droTaiman (LXXLL) pG5-Luc
培養環境及び時間	37°C、5% CO <sub>2</sub> 、40時間
連数	5連(well)/濃度
助剤及び最終濃度	DMSO 0.1%