

アトラジン (CAS no. 1912-24-9)

試験管内試験結果

1. 試験項目

アトラジンについて、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	N	N	N	N	N	—

P : EC₅₀ 又は IC₅₀ 値が検出

N : EC₅₀ 又は IC₅₀ 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

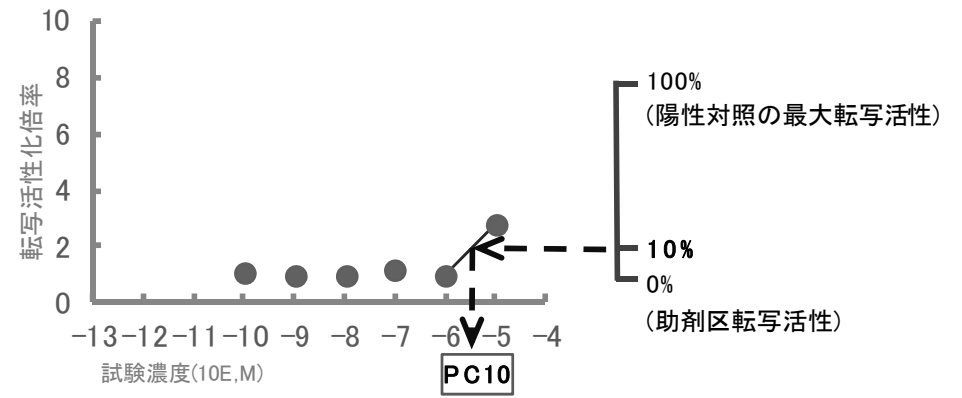
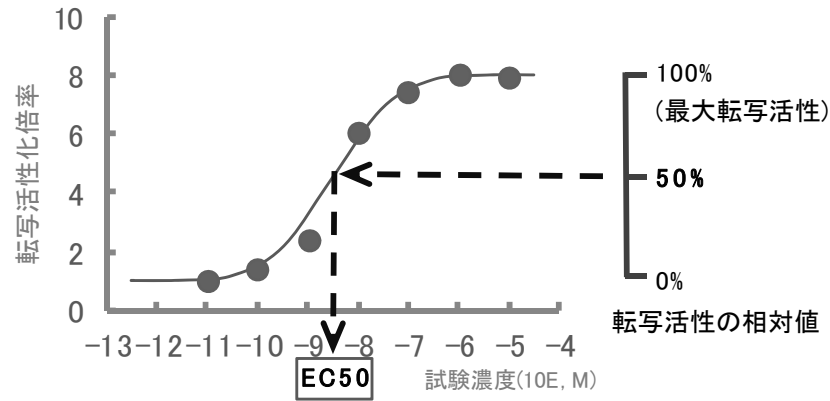
すべての試験項目のレポータージーン試験は、一過性発現細胞系による受容体遺伝子及びレポーター遺伝子等の細胞導入効率の変動を標準化できるデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を用いて実施した。

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それぞれ試験系に 2×10⁻¹⁰ M、1×10⁻⁸ 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、脱皮ホルモン作用：20-ヒドロキシエクジソン)による試験を実施した。

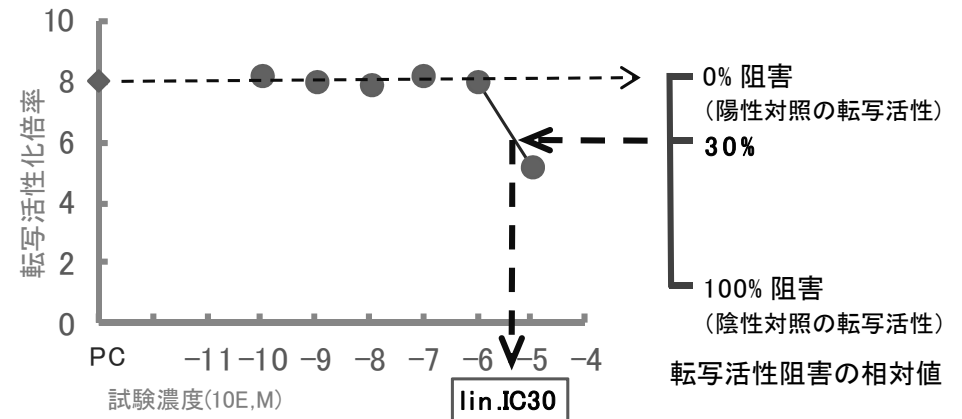
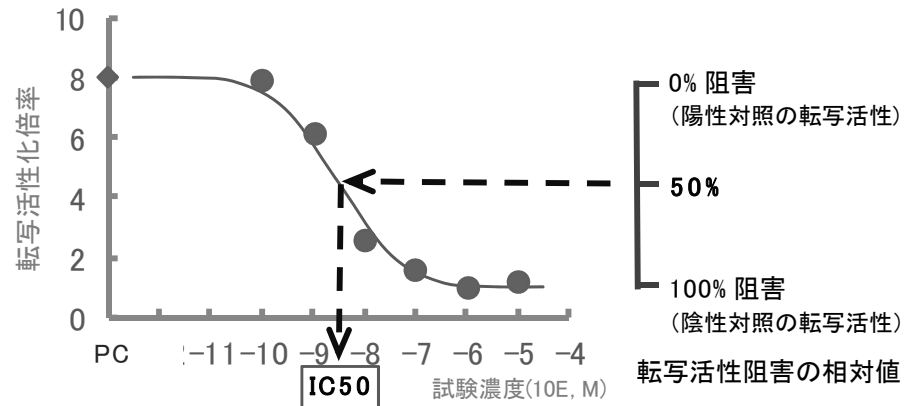
各試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり 3 連で行った。アゴニスト検出系の試験では、ベクターを一過的に導入した培養細胞を被験物質でばく露した後、ホタルルシフェラーゼの発光強度でホルモン応答による転写活性、ウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で内部コントロールの転写活性を測定し、それらの比（発光強度比）を求めた。各試験濃度における転写活性化倍率

(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



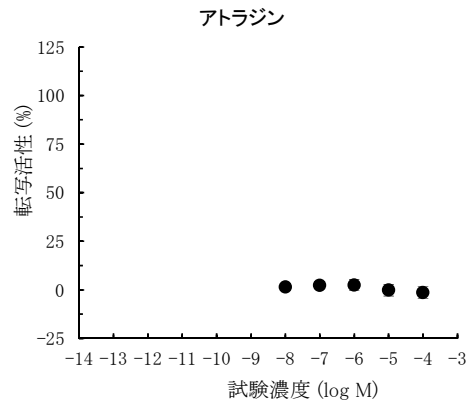
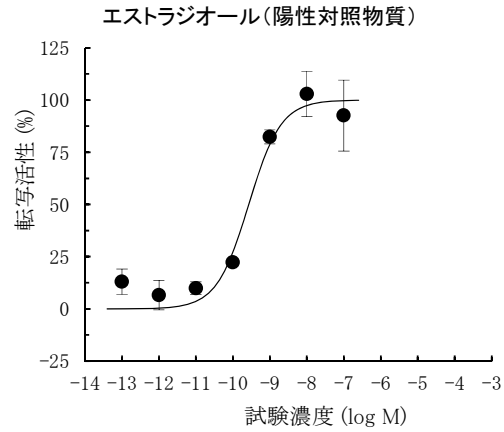
アンタゴニスト系試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値の算出



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)

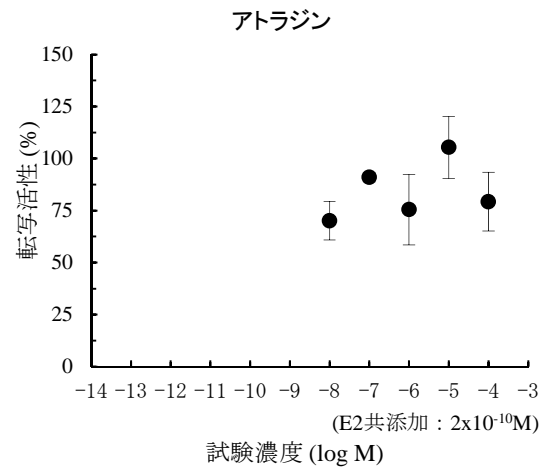
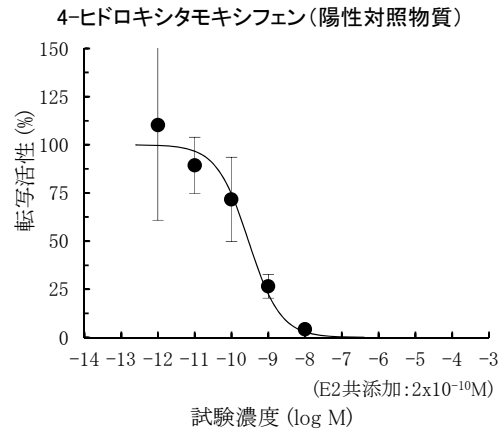
エストロゲン作用については、メダカ ER α の転写活性化は認められなかった。



試験対象物質	エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又は PC ₁₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)	
17 β エストラジオール	EC ₅₀ = 2.7 × 10 ⁻¹⁰ M	

(2) 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、17 β -エストラジオール 2×10^{-10} M 共添加条件でメダカ ER α の転写活性化阻害は認められなかった。

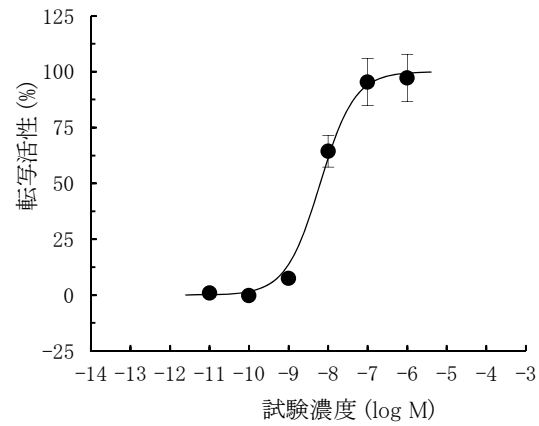


試験対象物質	抗エストロゲン作用	
	IC ₅₀ 又は linIC ₃₀ [M]	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC ₅₀ = 2.9×10^{-10}	

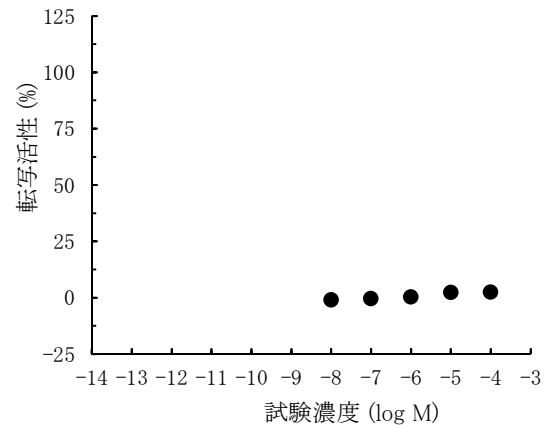
(3) メダカアンドロゲン受容体β (ARβ) レポーター遺伝子試験 (アンドロゲン作用)

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

11-ケトテストステロン(陽性対照物質)



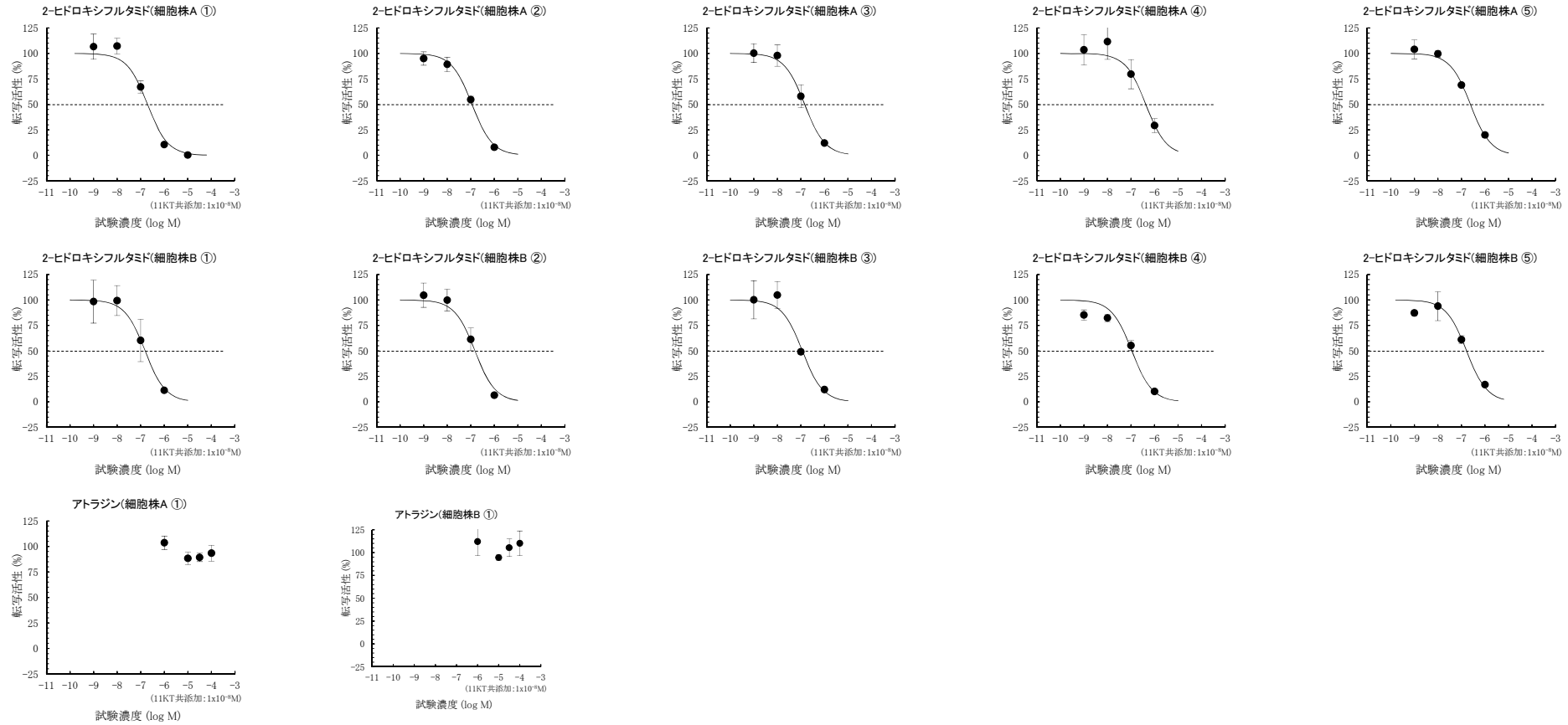
アトラジン



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
アトラジン	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 6.3 × 10 ⁻⁹ M	

(4) メダカアンドロゲン受容体 β (AR β) レポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用)

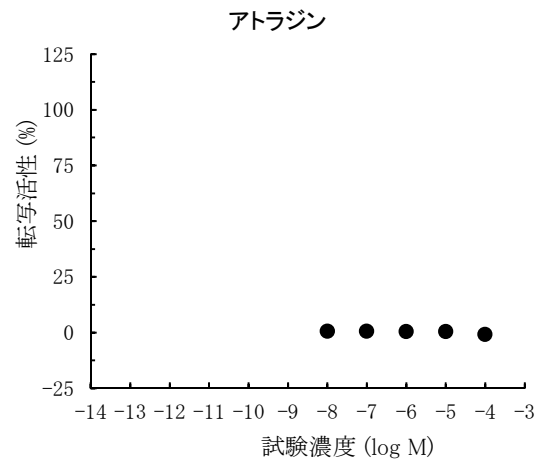
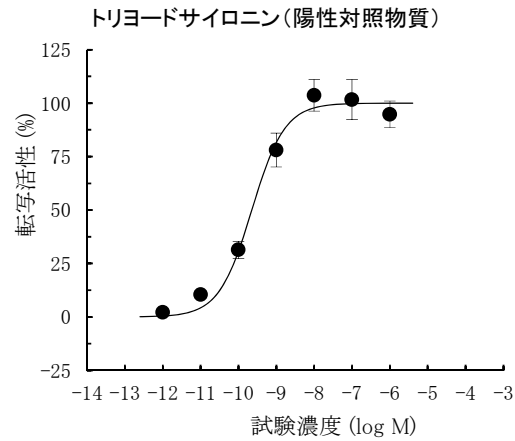
抗アンドロゲン作用については、11-ケトテストステロン 1×10^{-8} M 共添加条件でメダカ AR β の転写活性化阻害は認められなかった。



試験対象物質	抗アンドロゲン作用	
	IC ₅₀ 又は linIC ₃₀ [M]	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)	
2-ヒドロキシフルタミド	1.5×10^{-7} (linIC ₃₀ = 3.0×10^{-8})	100%

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

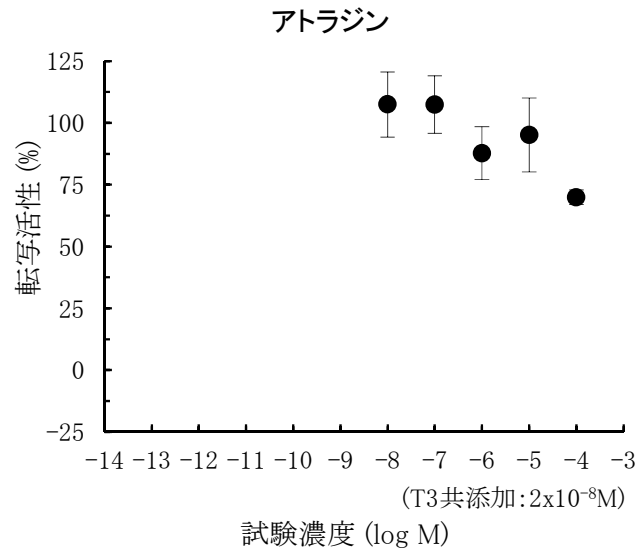
甲状腺ホルモン作用については、ニシツメガエル TR β の転写活性化は認められなかった。



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
アトラジン	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 2.3 × 10 ⁻¹⁰ M	

(6) ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β) レポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン作用)

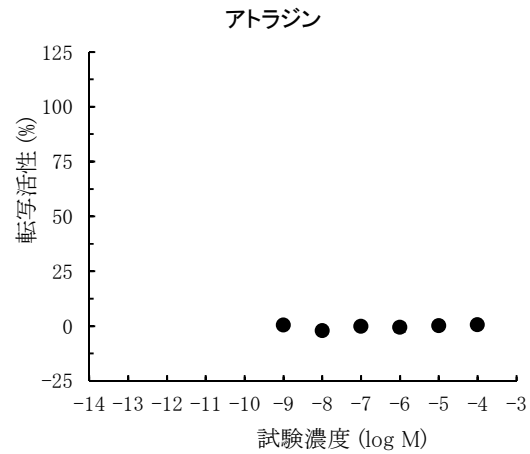
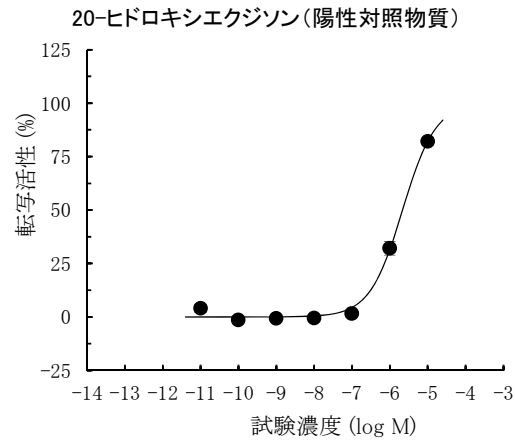
抗甲状腺ホルモン作用については、トリヨードサイロニン 1×10^{-8} M 共添加条件でニシツメガエル TR β の転写活性化阻害が認められなかった。



試験対象物質	抗甲状腺ホルモン作用	
	IC ₅₀ 又は linIC ₃₀ [M]	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)	

(7) オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR) レポーター遺伝子試験 (脱皮ホルモン)

脱皮ホルモン作用については、オオミジンコ EcR の転写活性化は認められなかった。



試験対象物質	脱皮ホルモン作用	
	EC ₅₀ 又は PC ₁₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)	
20-ヒドロキシエクジソン	EC ₅₀ = 2.2 × 10 ⁻⁶ M	

	メダカ エストロゲン受容体 α レポータージーン試験		メダカ アンドロゲン受容体 β レポータージーン試験		ニシツメガエル 甲状腺ホルモン受容体 β レポータージーン試験		オオミジンコ 脱皮ホルモン受容体 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	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		96穴マイクロプレート
動物細胞株	HEK293		HepG2		HEK293		CHO
試験培地	DMEM		DMEM		DMEM		DMEM/F12
試験液量	0.2mL/well		0.2mL/well		0.2mL/well		0.2mL/well
細胞播種数	1.4×10^4 細胞/well		1.4×10^4 細胞/well		1.4×10^4 細胞/well		1.4×10^4 細胞/well
受容体発現ベクター	medaka ERalpha/pcDNA		medaka ARbeta/pcDNA		tropicalis TR beta/pcDNA		D.magna EcR/pBIND
試験レポーター 及び コントロールレポーターベクター	ERE-TK-Luc pRL-TK-Rluc		ARE-MMTV-Luc pRL-TK-Rluc		TRE-minP-Luc pRL-TK-Rluc		pACT-dapUSP(LBD) pACT-droTaiman(LXXLL) pG5-Luc
培養環境及び時間	37°C、5% CO ₂ 、40時間		37°C、5% CO ₂ 、40時間		37°C、5% CO ₂ 、40時間		37°C、5% CO ₂ 、40時間
連数	3連/濃度(ウェル)		3連/濃度(ウェル)		3連/濃度(ウェル)		3連/濃度(ウェル)
共添加陽性物質 (共添加濃度)	—	17 β エストラジオール (2×10^{-10} M)	—	11-ケトテストステロン (1×10^{-8} M)	—	トリヨードサイロニン (2×10^{-8} M)	—
助剤 (添加濃度)	DMSO (0.1%)	DMSO (0.2%)	DMSO (0.1%)	DMSO (0.2%)	DMSO (0.1%)	DMSO (0.2%)	DMSO (0.1%)

(EXTEND2010 に基づく平成 26 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 参考資料 2-7 より抜粋)
(平成 28 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 3-2 より抜粋)