

防かび剤に分類される農薬を単独でそれぞれ添加したところすべてにエストロゲン様作用が検出された。さらに、3種類の農薬の組み合わせすべてにおいて混合して添加すると、単独で添加したときと比較してエストロゲン様作用の増強が確認された。また、このエストロゲン様作用の増強は厚生労働省の定める農薬に残留する基準値と比較しても非常に微量であるということがいえる。

現在、農薬の複合影響に関する国内及び国外での科学的な知見や国際的な基準に基づいた十分な報告はない。今回の研究以外にも、環境中に存在するエストロゲン様作用を持つ物質と農薬が複合したとき、生体に対して強いエストロゲン活性をもたらす影響がおこる可能性がある。我々が報告した研究を鋭意進めていく必要性は明らかであり、また関連する研究を繰り返し行うことは大切である。

得られた成果の今後の活用

今後、更に対象となる内分泌かく乱物質を広げ検討を行っていきたいと考えている。

F. 研究発表

学会発表

環境ホルモン学会、第7回研究発表会、複数農薬共存農作物におけるエストロゲン活性エンハンス効果、眞鍋真

理、神田靖士、小嶋美穂子、堀伸二郎、西山利正 関西医科大学公衆衛生学講座

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 農薬のエストロゲン活性

A. 研究目的

現在、わが国では食品衛生法によって農薬 229 種類に残留基準が設定されている。また、環境省がリストアップしている 65 種類の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のうち 6 割以上が農薬である。以上から、本研究では検出頻度の高い農薬について、エストロゲン活性および抗エストロゲン活性を評価した。また、1 農産物から 2~5 種の農薬が検出されることが多いことから、エストロゲン活性および抗エストロゲン活性のみられた農薬を 2 種類組み合わせでエストロゲン活性を測定した。さらに農薬のラット肝 S9 代謝物についてエストロゲン活性を評価するため、ビスフェノール A (BPA) を用いて検討した。

B. 研究方法

1. E-CALUX Assay 法

米国 XDS 社が開発し、(株)日吉とライセンス契約を締結している E-CALUX Assay 法によってエストロゲン活性および抗エストロゲン活性を測定した。本法はヒト卵巣がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンと ER との結合をルシフェラーゼ活性により検出するものであり、2003 年のボストンで開催されたダイオキシンの国際シンポジウムにおい

てバリエーションの報告がされている³⁰⁾。レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドの構造を図 8 に、E-CALUX Assay 法の原理を図 9 に示した。細胞質中で ER は熱ショックタンパク 90 (hsp90) と結合して存在するが、リガンドが細胞壁を通過して入ってくると、ER はリガンドと結合し hsp90 から解離して、Estrogen Responsive Elements (EREs) に結合する。結合情報がレポーター遺伝子に伝わり、ルシフェラーゼ遺伝子は活性化され、情報が mRNA に転写される。さらに mRNA が翻訳され、ルシフェラーゼが合成される。そこへ、ルシフェリンを加えて発光させ、ルミノメーターで発光量を測定することによりエストロゲン活性を検出、定量する。

方法のフローを図 10 に示した。10⁻²M 農薬標準液 (DMSO) 4 μl を用い、DMSO 4 μl で希釈した。2 種混合は、標準液 2 μl ずつを用い、同様に希釈した。培地を 400 μl 加えるので、最終最大濃度は 10⁻⁴M となる。

2. ラット肝 S9 による代謝方法

ビスフェノール A (BPA) を用いて S9 代謝実験の検討を行った。オリエンタル酵母社製エームステスト用 S9/コファクター A セット (フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボン誘導) を用い、BPA の代謝確認には

HPLC(31)を用いた。HPLC のカラムは Wakosil 5C18 4.6mm×150mm を用い、移動相はメタノール/水=3:2 (v/v)、流速 0.8ml/min、検出は UV230nm である。確立した方法を図 11 に示した。

3. 測定農薬

滋賀県内で過去に、検出された農薬について測定した。測定農薬は、ピレスロイド農薬 8 種 (エトフェンプロックス、シフルトリン、シシペルメトリン、フェンバレレート、フェンプロパトリン、フルシトリネート、フルバリネート、ペルメトリン)、有機塩素系農薬 3 種 (キャプタン、ジクロフルアニド、ジコホール)、有機リン系農薬 7 種 (アセフェート、クロルピリホス、ダイアジノン、トルクロホスメチル、プロチオホス、マラチオン、メタミドホス)、その他 14 種 (OPP、TBZ、イマザリル、クロルフェナピル、クロルフルアズロン、ジフェニール、テブフェンピラド、トリフルミゾール、ハルフェンプロックス、ビテルタノール、ピリプロキシフェン、フルフェノクスロン、プロシミドン、ルフェヌロン) の計 32 種類である。測定農薬の分類と分子量を表 5 に示した。

C. 研究結果

1. エストロゲン活性

E2 の最大活性値を 100%とした時、

10%の作用を示す濃度 (EC_{10}) は、 $3.2 \times 10^{-12}M$ であった。エストロゲン活性がみられた農薬は、5 種で、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンである。

EC_{10} は、それぞれ、 $7.7 \times 10^{-6}M$ 、 $3.3 \times 10^{-6}M$ 、 $4.6 \times 10^{-4}M$ 、 $2.2 \times 10^{-6}M$ 、 $2.9 \times 10^{-6}M$ であった。さらに、活性のみられた農薬について、今まで複数検出されたものを 2 種類組み合わせてエストロゲン活性を測定したところ単独の場合より活性が高くなった。また、OPP には活性がみられなかったが、TBZ と組み合わせることにより TBZ のみの活性より高くなった。図 12 に、その反応曲線を示した。

2. 抗エストロゲン活性

抗エストロゲン活性がみられたのは、ベンゾイルウレア系のクロルフルアズロンで、イマザリルとクロルフェナピルにもわずかに抗エストロゲン活性がみられた。図 13 に抗エストロゲン活性の反応曲線を示した。

3. S9 代謝

ビスフェノール A (BPA) を用いて S9 代謝実験の検討を行った。直接セルに S9 を加えて代謝させることを試みたが、セルの分解が考えられたので、

あらかじめ代謝させ、S9 を不活性とした後、セルに暴露することにした。S9 代謝の反応温度は 37°C とし、反応時間は 0.5、1、2、4、8、24、48 時間で検討したが、1 時間以降には変化がなかった。余裕をみて反応時間は 2 時間とした。S9 とコファクターの添加量の検討を行った。S9 量とコファクター量の比を 1 : 0、1 : 1、1 : 2、1 : 4、1 : 9 (通常使用比) とした。BPA の代謝量は順に 75%、90%、76%、64%、47% であった。代謝量のもっとも多かった 1 : 1 の混合比で S9 代謝を行うことにした。不活性化は、98°C、10 分の加熱処理を行った。不活性化後、0.45 μ m でろ過した検液を通常と同様にセルに暴露し、活性を測定した。BPA および活性のみられた農薬の反応曲線を図 14 に示した。BPA は代謝後もエストロゲン活性に変化はなかった。ペルメトリンおよび OPP はエストロゲン活性がなかったが、代謝後わずかではあるが活性がみられた。TBZ は代謝後、低くなった。EC₁₀ は、それぞれ、 4.9×10^{-4} M、 1.4×10^{-4} M、 2.8×10^{-4} M、であった。

抗エストロゲン活性のみられた S9 代謝物はなかった。

D. 考察

化学物質の内分泌攪乱性は、最終的には動物実験による慢性毒性試験や

次世代への影響を検討し、疫学調査や環境評価によって判断されると考えられるが、事前に *in vitro* 試験を実施し、スクリーニングすることは重要である。この *in vitro* 試験については、E-スクリーン試験、酵母 Two-Hybrid 試験、レポーター遺伝子転写活性試験等多くの方法がある。今回は、ER α および β 両方を発現し、E₂ の検出感度が 0.33pg/g と高感度であるレポーター遺伝子転写活性の ER-CALUX Assay を用いて、残留農薬調査で検出頻度の高い農薬についてエストロゲン活性を測定した。ピレスロイド系農薬でペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレレートは環境省の 65 種類の内分泌攪乱作用が疑われる物質にリストアップされており、また E-スクリーン試験でエストロゲン活性があったという報告³²⁾があるが、今回の ER-CALUX Assay ではエストロゲン活性および抗エストロゲン活性はみられなかった。この 3 種については酵母 Two-Hybrid 試験³³⁾、でもエストロゲン活性はみられていない。今回エストロゲン活性のみられた 5 農薬のうち報告があるのは、トルクロホスメチルのみで、E-スクリーン試験で弱いエストロゲン活性があった³⁴⁾ということである。

活性のみられた農薬および活性があるとされている一部の農薬につい

て、残留農薬基準値と残留農薬分析により検出された値を表2に示した。農薬検出値をモル濃度に換算すると約 $0.003 \sim 1.74 \times 10^{-4} \text{M}$ であった。過去5年間における最大検出値を示したのでTBZは $1.74 \times 10^{-4} \text{M}$ と高いが、最近では $1/100 \sim 1/50$ の値となっている。エストロゲン活性のみられた農薬の検出値は、約 10^{-6}M 以下で、エストロゲン活性のみられない濃度であった。

農薬を2種類あわせて測定し、その影響をみた報告はない。今回、エストロゲン活性のみられた農薬5種および活性はみられなかったがTBZと同時に使われているOPPについて、検出事例にしたがって2種類組み合わせで活性を測定した。ダイアジノンとトルクロホスメチルの混合はあまり変わらなかったが、ピリプロキシフェンとプロチオホス、TBZとOPPの混合は活性の増加がみられ、相加効果があることがわかった。とくに、OPPはエストロゲン活性がみられなかったが、TBZとの共存によって、TBZ単独よりエストロゲン活性が高くなった。しかし、活性のみられた濃度は実際の検出値より高いものであった。

化学物質は生体内に取り込まれると主に肝臓の異物代謝酵素によって代謝される。代謝生成物のエストロゲン活性を評価することは生体への影響を考える上で重要である。今回は、

農薬をラット肝S9により代謝させ、エストロゲン活性について測定した。まず、BPAを用いて代謝方法を検討し、その条件で32農薬を代謝させた。BPA代謝物のエストロゲン活性は数倍に増大するという報告³⁵⁾、低下するという報告^{33,36)}があるが、今回は代謝後の活性はわずかに低くなるがほとんど変化しなかった。使用したS9はエームテスト用のオリエンタル酵母社製「S9/コファクターAセット」である。ラット肝誘導法やS9フラクション組成、また、代謝方法が異なり、さらに測定法が異なるので、どれがどうとはいえないが、BPAは代謝後も、エストロゲン活性がみられることが言える。代謝後、エストロゲン活性のみられた農薬は3種で、ペルメトリンおよびOPPは親化合物にはエストロゲン活性はみられなかったが代謝物には活性がみられ、TBZは親化合物より低い活性となった。活性がみられたとはいえ、低い活性でありまた農薬のエストロゲン活性のみられた濃度も農薬残留基準や検出濃度から考えて実際には摂取しない値であった。また、BPA代謝物に抗エストロゲン活性があるという報告^{33,35)}があるが、E-CALUX Assay法では、BPA、BPA代謝物両方ともに抗エストロゲン活性はみられなかった。農薬の代謝物で、今回、抗エストロゲン活性はみられなかったが、シペルメ

トリン、ペルメトリン、エトフェンプロックス、OPP の代謝物で抗エストロゲン活性がみられたという報告がある³³⁾。

環境省がリストアップしている 65 種類の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のうち 6 割以上が農薬であり、残留農薬の試験を行って 1 つの農産物から多種類の農薬が検出されることが多いことから、この研究を行った。エストロゲン活性、抗エストロゲン活性を有する農薬はあったが、高頻度で検出される濃度では活性はなかった。また、2 種類混合した場合、エストロゲン活性は高くなったが、この場合もかなり高濃度における活性で、通常の農薬使用では心配のないものであった。しかし、組み合わせて活性を測定したのはごく一部の農薬であり、もっと低濃度で活性がみられる可能性もある。さらに、今回は 2 種類の混合であったが 3 種類、4 種類の混合でどうなるかは未知である。また、生体内での代謝変換による活性が心配されることから、S9 による代謝生成物の活性をみたが、エストロゲン活性がみられるようになった農薬もあったが、これも通常の農薬使用から考えると、問題のないものであった。農薬が残留基準内で使用されている限り、今回調査した農薬については、内分泌攪乱作用に関して悪影響はないと考

える。

E. 結論

1. トルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、チアベンダゾール、ピリプロキシフェンにエストロゲン活性がみられた。
2. ダイアジノンとトルクロホスメチル、ピリプロキシフェンとプロチオホス、OPP と TBZ を組み合わせることにより、単独の場合よりエストロゲン活性が高くなった。
3. 抗エストロゲン活性がみられたのは、クロルフルアズロン、イマザリル、クロルフェナピルである。
4. ビスフェノール A (BPA) を用いて S9 代謝実験系を検討した。
5. BPA 代謝物のエストロゲン活性は、BPA よりわずかに低いけどほとんど変わらなかった。TBZ 代謝物と親化合物にはエストロゲン活性のなかったペルメトリン代謝物および OPP 代謝物にエストロゲン活性がみられた。

参考文献

- 1) 中里光男ら：衛生化学、34、401、1988
- 2) 掘 伸二郎ら：防菌防黴誌、18、87、1990
- 3) 北田善三ら：食衛誌、23、21、1982
- 4) Kirada, Y. et al. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65, 1302, 1982

- 5) Fjimoto N, Maruyama S, Ito A. Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2. *Endocrine Journal* 46:389-396, 1999.
- 6) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992 Sep 12;305(6854):609-13.
- 7) Moccia RD, Fox GA, Britton A: A quantitative assessment of thyroid histopathology of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Great Lakes and a hypothesis on the causal role of environmental contaminants. *J Wildl Dis.* 1986 Jan;22(1):60-70.
- 8) 環境ホルモン学会、第6回研究発表会、E-CALUX assayによる農薬のエストロゲン活性の評価、小嶋美穂子、藪下尚智、佐々木真理、福永健治、西山利正
- 9) Mihoko Kojima, Kenji Fukunaga, Mari Sasaki, Masafumi Nakamura, Motohiro Tuji, Toshimasa Nishiyama, Estrogenic activities of pesticides using an in vitro reporter gene assay, *International journal of environmental health.* contributing to the Journal
- 10) Kuiper GG; Enmark E; Pelto-Huikko M; Nilsson S. Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 11;93(12):5925-30.
- 11) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998;139(10):4252-63
- 12) Tsai, MJ, O'Malley, BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:451.
- 13) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P; Mark M, Chambon P, et al, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995 Dec 15;83(6):835-9.
- 14) McGuire WL, De La Garza M, Chamness GC. Evaluation of estrogen receptor assays in human breast cancer tissue.

- Cancer Res 1977 Mar;37(3):637-9.
- 15) Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dakeyama F, Matsuo M, Nishihara T. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. Toxicol Appl Pharmacol. 1999 Jan 1;154(1):76-83.
- 16) Nishikawa J, Saito K, Sasaki M, Tomigahara Y, Nishihara T. Molecular cloning and functional characterization of a novel nuclear receptor similar to an embryonic benzoate receptor BXR. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 14;277(1):209-15.
- 17) Zhang L, Khan IA, Foran CM. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2002 Jun;132(2):203-11.
- 18) 農林水産省、農薬取締法
- 19) Hughes CL Jr. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. Environ Health Perspect. 1988 Jun;78:171-4.
- 20) Hiroyuki K, Eiji K, Shinji T, Kazuhito N, Kunihiro K. Screening for Estrogen and Androgen Receptor Activities in 200 Pesticides by In Vitro Reporter Gene Assay Using Chinese Hamster Ovary cells, Environmental Health Perspectives. 2004 April 112(5):524-531
- 21) Olmstead AW, LeBlanc GA. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. Environ Health Perspect. 2003 Jun;111(7):919-24.
- 22) Chizuru Nisioka, Masumi Miyoshi, Hisao Fujita, Takaaki Mouri, Hiroyuki Kuroda, A survey of fungicides in imported citrus fruits and banana, 71-74, 1997
- 23) 環境省、環境ホルモン戦略 SPEED'98, 1998(2000年11月改訂)
- 24) Edward J Calabres, Toxicological consequences of multiple chemical interactions: a primer. Toxicology. 1995 Dec 28;105(2-3):121-35.
- 25) John A. McLachlan. Synergistic Effect of Environmental Estrogens; Report Withdrawn.

- Science 1997;277:462-3
- 26) Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Harris CA, Routledge EJ, Sumpter JP. Synergy between synthetic oestrogens? Nature 1997;385:494
- 27) Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJ Jr, McLachlan JA., Science, Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals, Science. 1996 Jun 7;272(5267):1489-92.
- 28) Nikander E; Metsa-Heikkila M; Ylikorkala O. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;89(3):1207-12
- 29) Lissin LW, Cooke JP, Phytoestrogens and cardiovascular health. J Am Coll Cardiol 2000 May;35(6):14
- 30) John D. Gorden, Andrew C. Chu, Michael D. Chu, Charlotte L. Taylor, Michael S. Denison, George C. Clark, Validation of the LUMI-CELL ER recombinant bioassay for rapid evaluation of chemicals for potential estrogenic activity. Organohalogen Compounds, Volumes 60-65, Dioxin 2003 Boston, MA
- 31) 瀧野昭彦, 津田泰三, 小嶋美穂子, 原田浩之, 村木一枝, 和田稔, 魚肉・缶詰中のビスフェノール A の HPLC による分析法の検討, 食衛誌. Vol. 40, No. 4, 325-333 (1999)
- 32) Haiyan Chen, Jigao Xiao, Gang Hu, Jianwei Zhou, Hang Xiao, Xinru Wang, Estrogenicity of Organophosphorus and pyrethroid pesticides. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 65: 1419-1435, 2002
- 33) 白石不二雄, 国立環境研究所: 化学物質のエストロゲン活性データ,
- 34) 小島弘幸, 桂英二, 兼俊明夫, 堀義宏, 末吉達也, 根岸正彦, 殺菌剤トルクロホスメチルのエストロゲン様作用について, 第9回環境科学討論会, 2000 札幌
- 35) Yoshihara S, Makishima M, Suzuki N, Ohta S. Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. Toxicol. Sci., 62, 221- 227 (2001)
- 36) Legler J, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, van der Burg B, Murk AJ. Detection of

estrogenic activity in
sediment-associated compounds
using in vitro reporter gene
assays. Sci Total Environ. 2002
Jul3;293(1):69-83

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

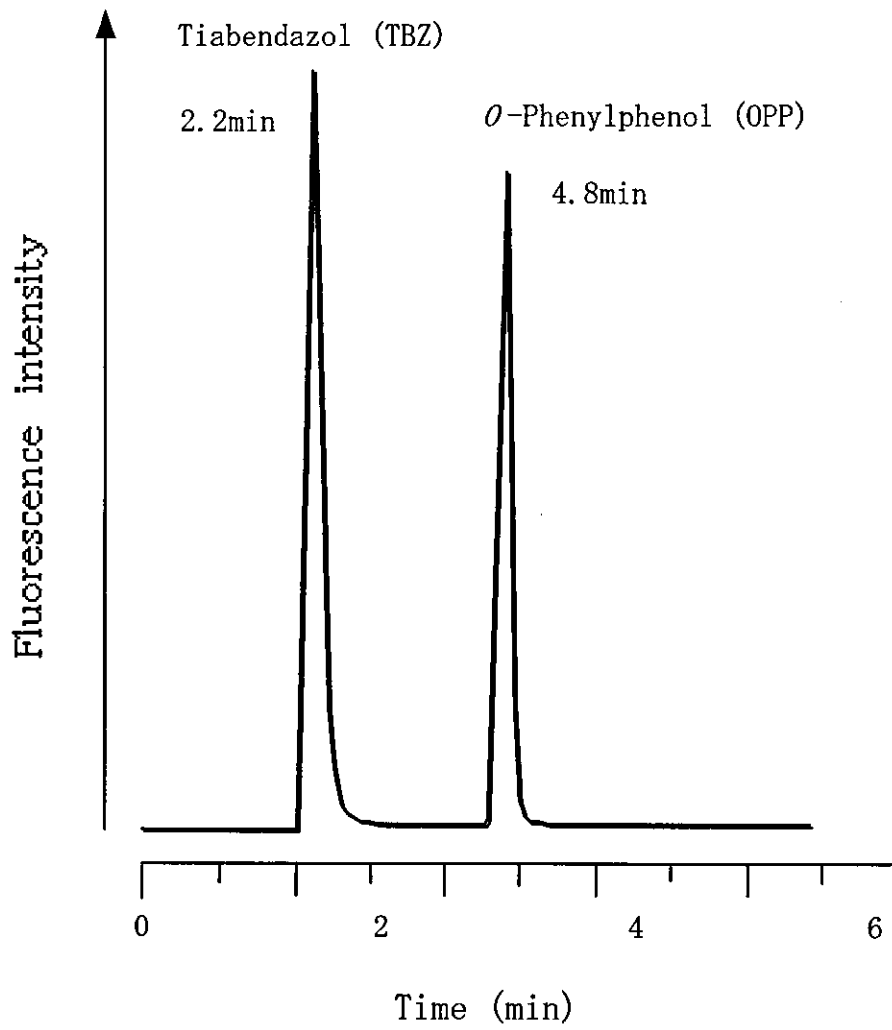


図1 OPPおよびTBZ標準品のクロマトグラム

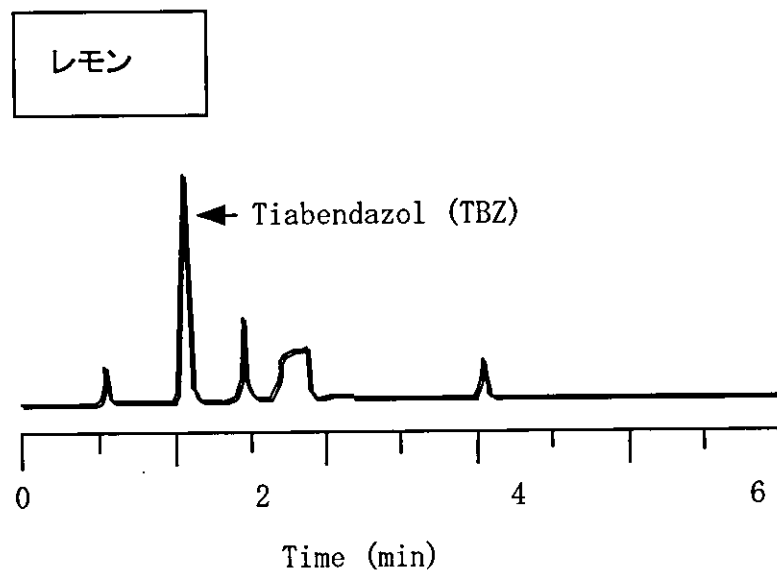
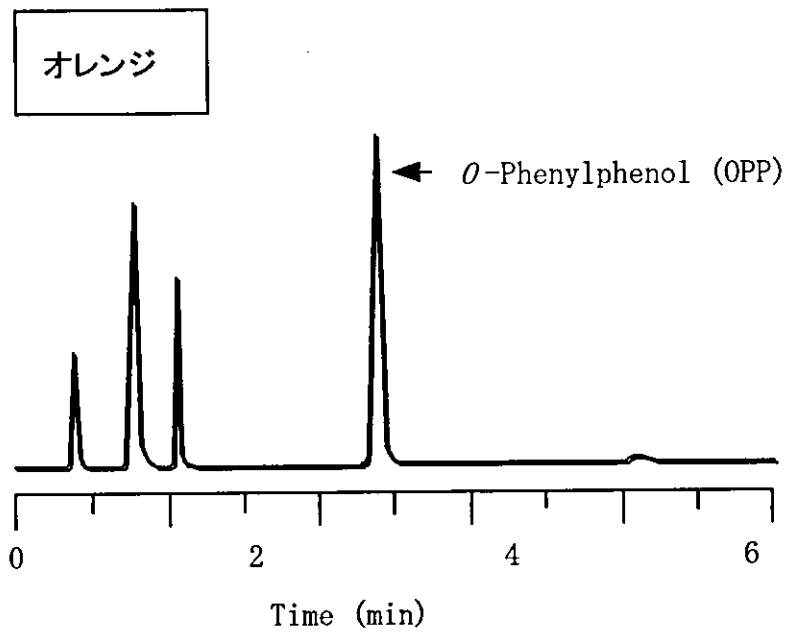


図2 オレンジおよびレモン中の OPP, TBZ のクロマトグラム

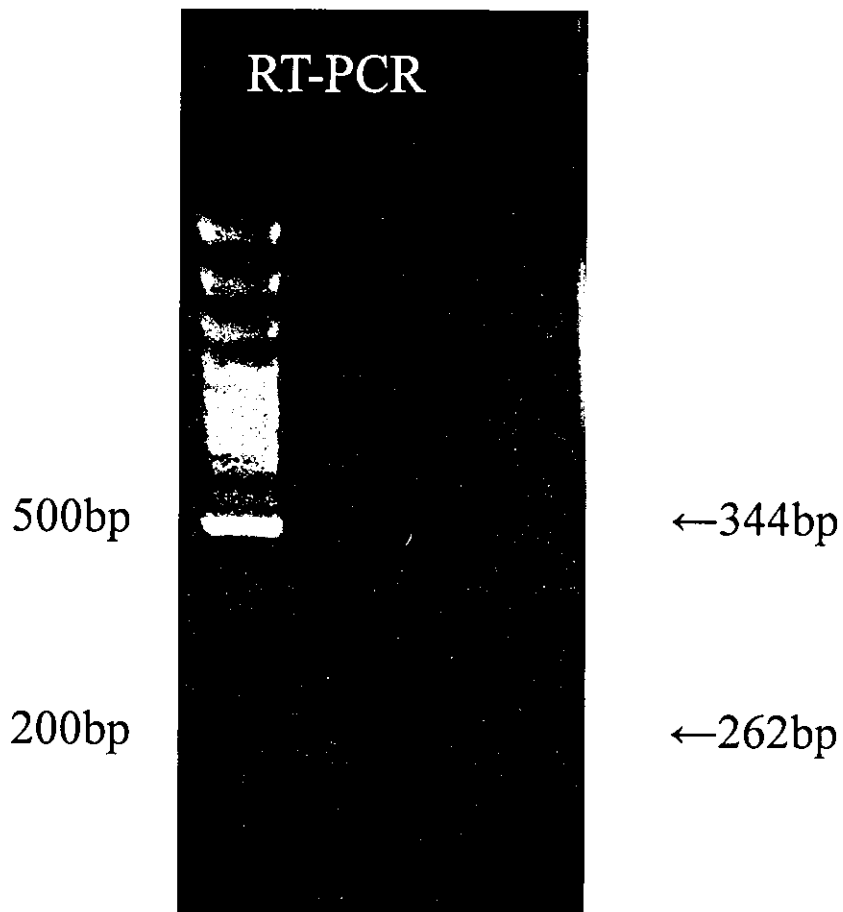
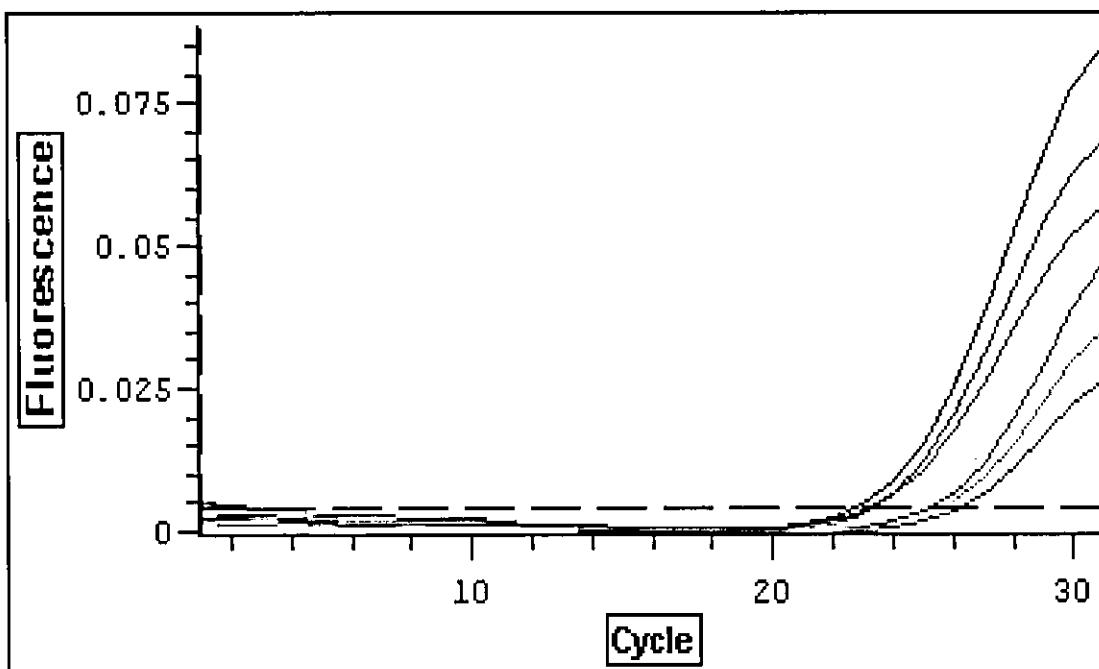


図3 MtT/Se 細胞のERの発現をRT-PCR法を用いて確認。

ER α (344bp) ER β (242bp)



α / β	Cycle	Mean
alpha 1	21.1	22.0
alpha 2	21.7	
alpha 3	23.3	
beta 1	25.1	25.6
beta 2	25.6	
beta 3	26.2	

$$25.6 - 23.8 = 1.8 \quad 2^{1.8} = 3.5 \quad ER\alpha : ER\beta = 78 : 22$$

図4 MtT/Se 細胞の mRNA レベルにおける ER α ・ β の発現割合の検討。横軸にサイクル数、縦軸に発光量を示した。それぞれが点線の示すラインと交わるサイクル数より平均値を算出した。

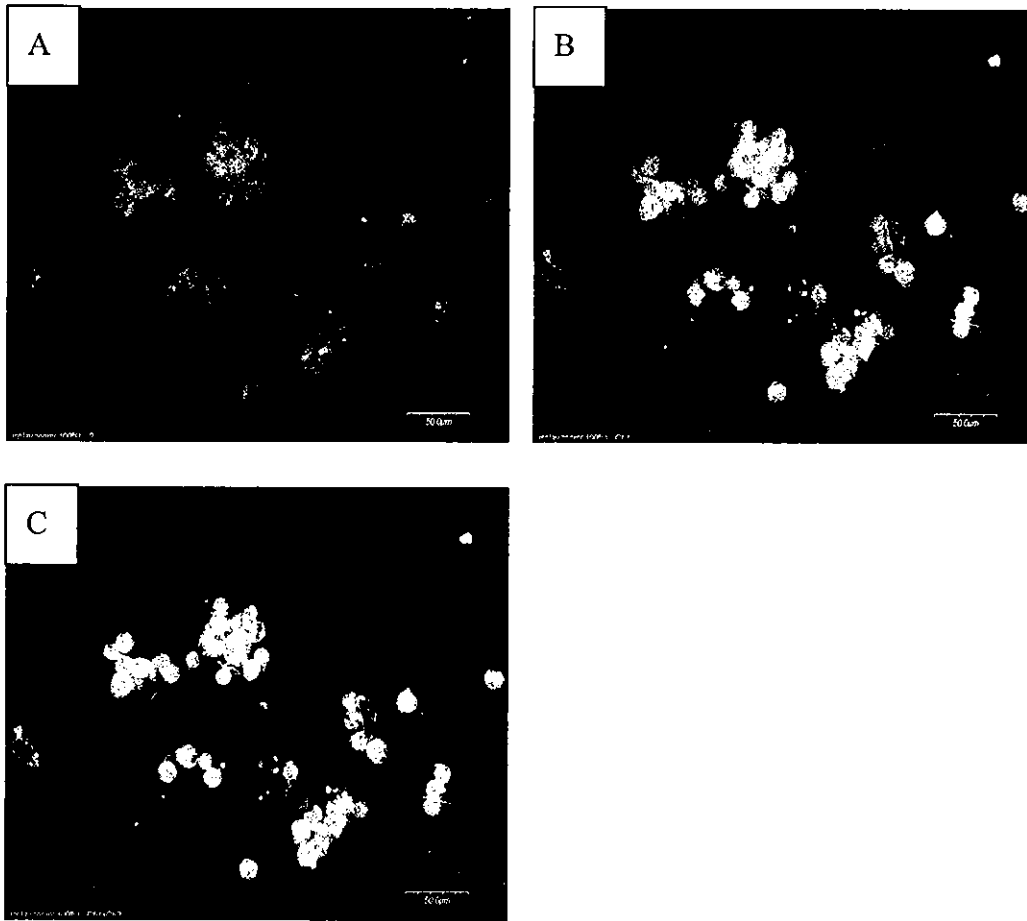
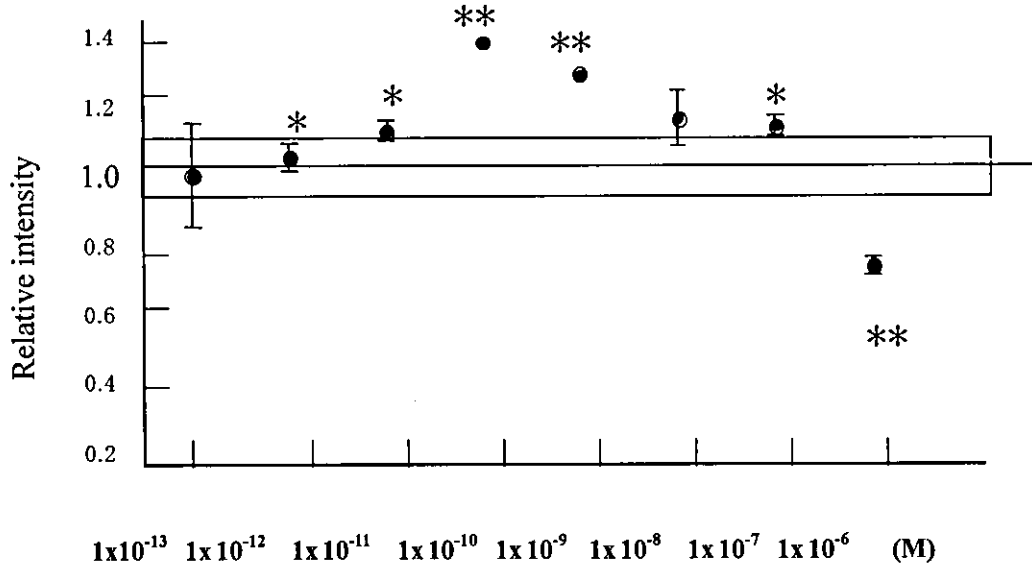


図5 ERの免疫染色($ER\alpha$, $ER\beta$)

MtT/Se 細胞のタンパク質レベルでの発現を確認した。

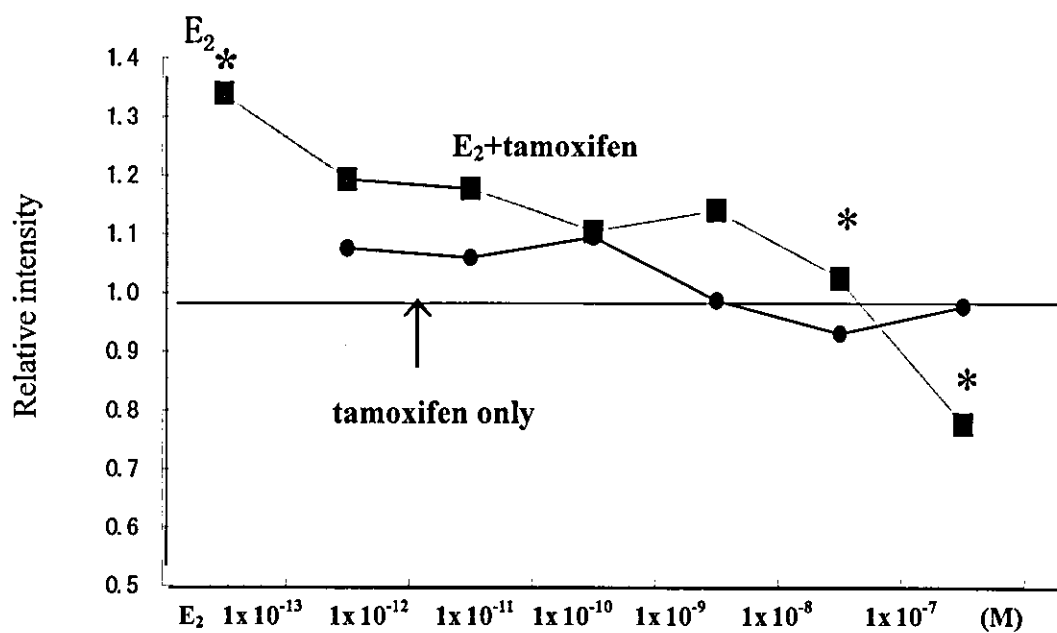
A:写真 $ER\alpha$ B: $ER\beta$ C: merged A and B



Wilcoxon signed rank test

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

図 6 MtT/Se 細胞に 17β エストラジオールのエストロゲン活性の測定。MtT/Se 細胞に各濃度の 17β エストラジオールを添加した際のエストロゲン活性を縦軸にエストロゲン無添加群を“1”とした時の相対値で示した。



Wilcoxon signed rank test

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

図7 ER結合競合試験。E₂(10^{-10} M)及び各濃度のタモキシフェンを添加した際のMtT/Seによる増殖活性を相対値で示した。Tamoxifen only:タモキシフェンをMtT/Se細胞に単独添加した。E₂+tamoxifen:17βエストラジオールをMtT/Se細胞に添加した際に最大活性を示した 10^{-10} Mと横軸濃度のタモキシフェンを添加した。E₂:17βエストラジオール

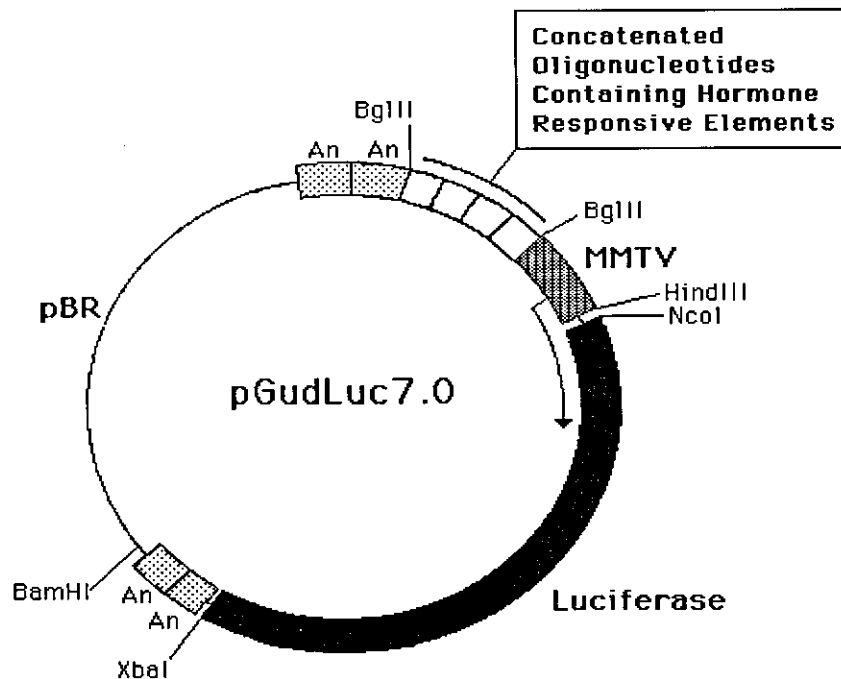


図 8 レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドの構造

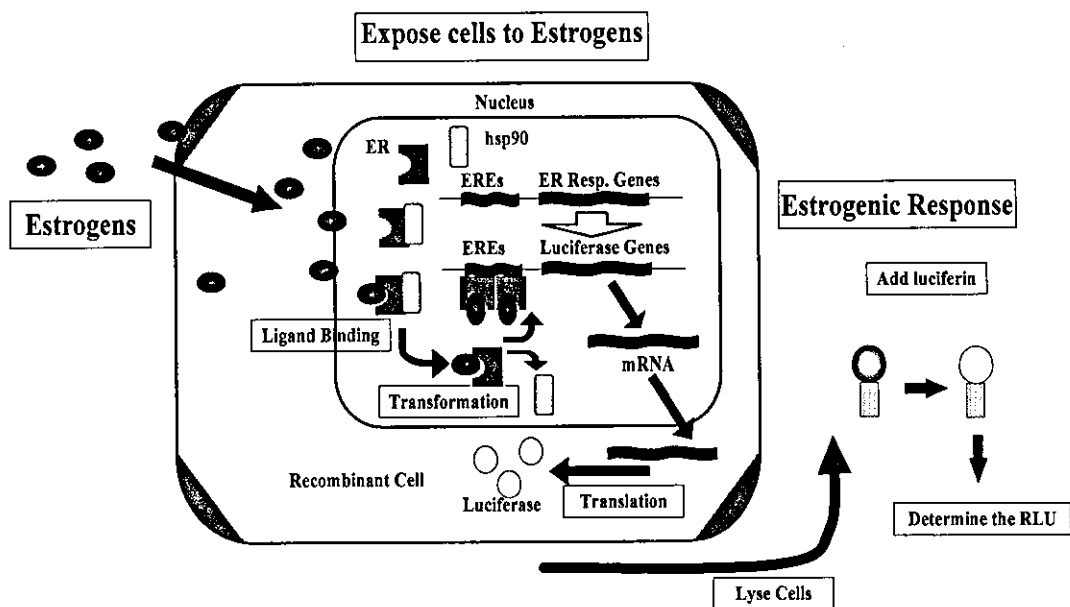


図 9 E-CALUX ASSAY の原理

○ プレート作成

1. フェノールレッド含まないトリプシンで 75cm² フラスコ x2 からハーベストする。DMEM Media(5% Carbon Stripped fetal cald serum +1%penicillin/ streptomycin+2%L-gultamine)でサスペンドする。半分は、RPMI1640 Media(8% fetal calf serum +1%penicillin/Streptomycin)の 75cm² フラスコ x2 に播く。半分は、DMEM Media の 75cm² フラスコ x2 に播く。RPM1640 Media は、DMEM Media のフラスコを準備している間に培養する。
2. 24 時間後、DMEM Media の培地を交換する。
3. 2 を 3 回繰り返す (計 4 回繰り返す)。
4. 24 時間後、トリプシンを使用して、ハーベストする。DMEM10ml でサスペンドする。
5. セルカウント (2.0x10⁵cell/ml)
6. 200μl/well で播く。
7. 36~38°C、5%CO₂ のインキュベーターで 24 時間培養する。

○ 暴露操作

検量線作成

- 1 (1) 10ng/ml の E₂ 4μl
(2) 10ng/ml の E₂ 4μl + DMSO 4μl
(3) (2) 4μl + DMSO 4μl
これを繰り返し、10 段階の標準液を作成する。
- 2 DMEM Media を 400μl 加え、15 秒ボルテックスかける。

サンプル作成

1. (1) 農薬標準液 4μl
(2) 農薬標準液 4μl + DMSO 4μl
(3) (2) 4μl + DMSO 4μl
これを繰り返し、10 段階の農薬系
2. DMEM Media を 400μl (200μL)加え、15 秒ボルテックスかける

暴露

1. 36-38°C、CO₂ 5 %環境下で 15 時間培養する。
2. 190μl ずつ入れて、24 時間インキュベートする。

評価

1. ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定する。
2. 検量線より農薬の pME₂ 当量を計算する。

図 10 E-CALUX Assay 分析フロー

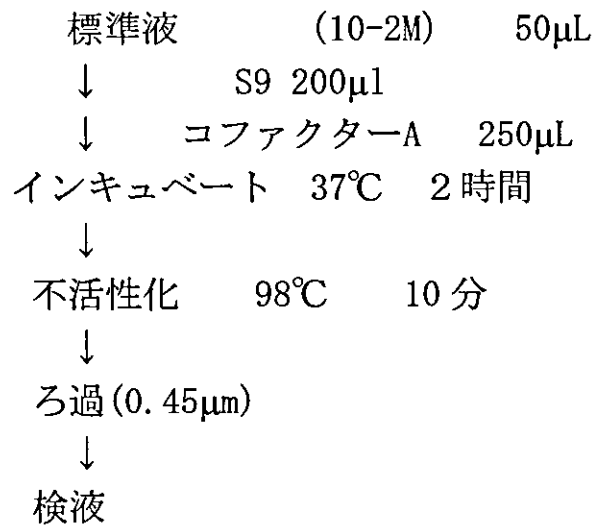


図 11 S9 代謝 分析フロー