

令和 7 年度第 1 段階試験管内試験(レポータージーン試験)
(その 2 : 25 物質・64 試験) の結果について(案)

いであ株式会社

1. 試験対象物質及び試験項目

本業務で実施した第 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それぞれ試験対象とした作用モードを表 1-1 に示した。

本業務では、25 物質を試験対象物質として、計 64 試験を実施した。

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
フタル酸ジ-n-ブチル				
フタル酸ジエチル				
ビスフェノールB				
p-メキシケイ皮酸2-エチルヘキシル				
ベンゾフェノン-3				
プロピザミド				
ブチルパラベン	○	○	○	○
ビスフェノールS	○	○	○	○
フタル酸ジシクロヘキシル	○	○	○	○
フタル酸ブチルベンジル	○	○	○	○
ジベンゾチオフェン	○			
イソブチルパラベン	○	○		
スチレン	○	○	○	○
エチレングリコールモノエチルエーテル	○	○	○	○
ペルフルオロドデカン酸	○	○	○	○
チオ尿素	○	○	○	○
チウラム	○	○	○	○
過塩素酸	○	○	○	○
ペルフルオロオクタン酸				
フェニトイン				
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸				
TRIAC(チラトリコール)				
アトラジン				
ピリプロキシフェン				
カルバマゼピン				
試験数	12	11	10	10

表 1-1 試験対象物質及び試験対象とした作用モード(つづき)

試験対象物質	試験対象とした作用モード			
	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	脱皮ホルモン	幼若ホルモン
フタル酸ジ-n-ブチル	○	○		
フタル酸ジエチル	○	○		
ビスフェノールB	○	○		
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	○	○	○	
ベンゾフェノン-3	○	○	○	
プロピザミド	○	○		
ブチルパラベン				
ビスフェノールS				
フタル酸ジシクロヘキシル				
フタル酸ブチルベンジル				
ジベンゾチオフェン				
イソブチルパラベン				
スチレン				
エチレングリコールモノエチルエーテル				
ペルフルオロドデカン酸				
チオ尿素				
チウラム				
過塩素酸				
ペルフルオロオクタン酸	○			
フェニトイン	○			
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	○			
TRIAC (チラトリコール)	○			
アトラジン				○
ピリプロキシフェン				○
カルバマゼピン				○
試験数	10	6	2	3

2. 方法及び材料

2-1. 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。

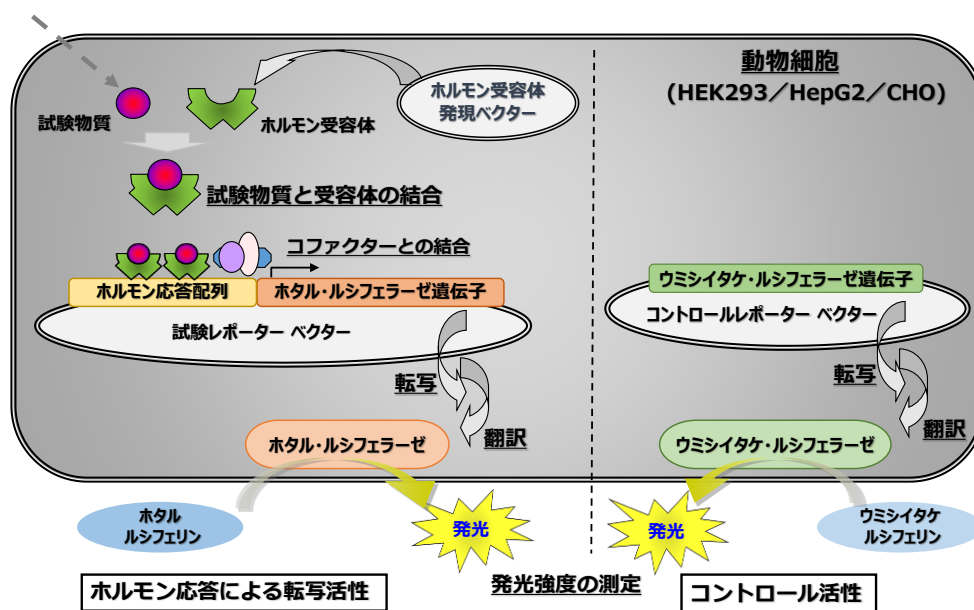


図 2-1 レポーター遺伝子試験の概要

2-2. 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 ($TR\beta$)
脱皮ホルモン作用:	オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR)
幼若ホルモン作用:	ミジンコ幼若ホルモン受容体 (JhR)

2-3. 試薬及び試験濃度

試験に供した試験対象物質試薬の純度は 95%以上 (96.9~100%) であった。

過塩素酸については、純度が高い試薬が入手できなかったため、過年度に実施された第

1段階試験管内と同様に過塩素酸ナトリウムを用いた。

2-4. 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、各作用(抗甲状腺ホルモン作用を除く)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:	17 β 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
抗甲状腺ホルモン作用:	NH-3 ({4-[4-ヒドロキシ-3'-イソプロピル-5-(4-ニトロフェニルエチニル)ベンジル]-3,5-ジメチルフェノキシ}酢酸
脱皮ホルモン作用:	20-ヒドロキシエクジソン
幼若ホルモン作用:	ファルネセン酸メチル

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、エストロゲン作用又はアンドロゲン作用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(17 β 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))。

2-5. 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(試験条件は、別添-1参照)。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、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。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。

試験の結果、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。

2-6. データ解析

(1) 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、少なくとも最高試験濃度における転写活性化倍率が、同一日に実施した陽性対照物質の試験から推定された最大転写活性化倍率の 10% 値を超えた試験対象物質については、用いたホルモン受容体に対する転写活性化作用を有することが示唆されると判断し、EC₅₀ (推定される最大転写活性の 50% の転写活性を示す濃度) 又は PC₁₀ (陽性対照物質の試験から推定された最大転写活性倍率の 10% 値相当の転写活性を示す濃度) を算出した。EC₅₀ は、試験濃度の対数値を x、当該試験濃度における転写活性化倍率の平均値を y、下側範囲を陰性対照の平均転写活性化倍率 (1.0) として、非線形回帰モデル (3-parameter シグモイドモデル) により推定した。ただし、算出された EC₅₀ が試験最高濃度より高濃度となった場合 (EC₅₀ が外挿推定値となった場合) は、当該値を採用せず、以下のとおり、PC₁₀ を算出した。PC₁₀ は、同一日に実施した陽性対照物質の EC₅₀ 推定で得られた最大活性化倍率の 10% 値を挟む 2 点の試験濃度の対数値及び平均転写活性化倍率から直線回帰 (linear regression) により算出した (図 2-2)。

試験の結果、最高試験濃度における転写活性化倍率が陽性対照物質の試験で推定された最大転写活性化倍率の 10% 値を超えなかった試験対象物質については、試験濃度の範囲で、用いたホルモン受容体に対する転写活性化作用は認められず、影響濃度は得られなかったと結論した。

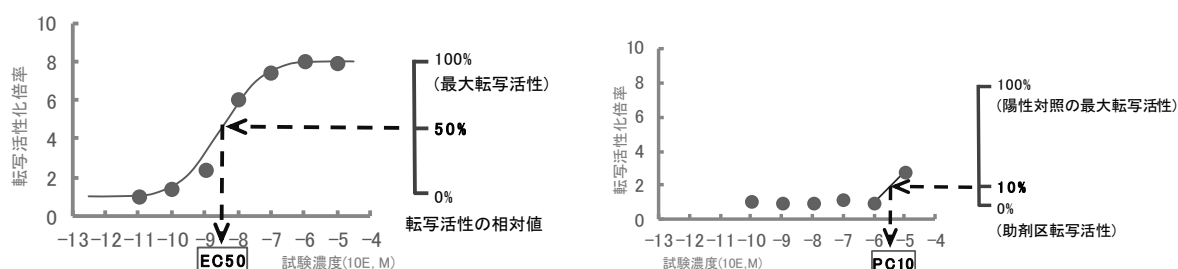


図 2-2 アゴニスト系試験における影響濃度の算出

(2) 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、少なくとも最高試験濃度における転写活性化倍率が、陽性対照 (陽性物質のみ添加したウェル) の転写活性化倍率の 70% 値未満となった試験対象物質については、用いたホルモン受容体の陽性物質による転写活性化に対する阻害作用を有することが示唆されると判断し、以下のとおり、IC₅₀ (試験系に共添加した陽性物質によるホルモン受容体の転写活性を 50% 阻害する濃度) 又は linIC₃₀ (試験系に共添加した陽性物質によるホルモン受容体の転写活性を 30% 阻害する濃度) を推定した。IC₅₀ は、試験濃度の対数値を x、当該試験濃度における転写活性化倍率の平均値を y として、非線形回帰モデル (3-parameter) により推定した。ただし、算出された IC₅₀ が試験最高濃度よりも高濃度であった場合 (IC₅₀ が外挿推定値となった場合) は、当該値は採用せず、以下のとおり、linIC₃₀ を算出した。linIC₃₀ は、同一マイクロプレートで実施した陽性対照における平均転写活性化倍

率の 70% 値を挟む 2 点の試験濃度の対数値及び平均転写活性化倍率から直線回帰 (linear regression) により算出した。陽性対照物質についても、適切な試験濃度範囲のデータを用いて、試験対象物質と同様に IC₅₀ 及び linIC₃₀ (必要な場合) を算出した (図 2-3)。

試験の結果、最高試験濃度における転写活性化倍率が陽性対照の転写活性化倍率の 70% 以上であった試験対象物質については、試験濃度の範囲で、対象としたホルモン受容体の陽性物質による転写活性化に対する阻害作用は認められず、影響濃度は得られなかったと結論した。

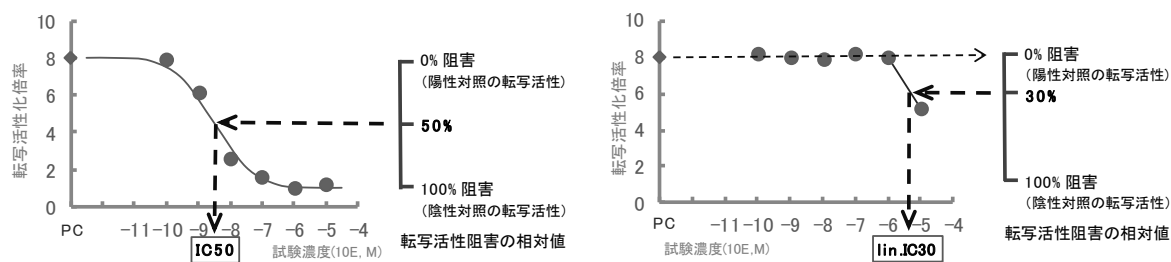


図 2-3 アンタゴニスト系試験における影響濃度の算出

3. 結果

3-1. メダカ ER α レポータージーン試験(エストロゲン作用)

エストロゲン作用に関するメダカ 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 12 物質のうち、4 物質に関して、メダカ ER α 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る転写活性化倍率の上昇が認められ、影響濃度として、ビスフェノール S 及びイソブチルパラベンについて EC₅₀ (5.2×10^{-6} M 及び 1.7×10^{-5} M)、ブチルパラベン及びフタル酸ブチルベンジルについて PC₁₀ (1.6×10^{-6} M 及び 2.5×10^{-6} M) が得られた。また、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 0.0014%、0.00042%、0.00088% 及び 0.00056% 及び 0.00061% であった。その他の 8 物質については、試験濃度範囲でメダカ ER α に対する転写活性化は認められなかった。

表 3-1 メダカ ER α レポータージーン試験(エストロゲン作用)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
ブチルパラベン	PC ₁₀ = 1.6×10^{-6} M	0.00088%
ビスフェノール S	EC ₅₀ = 5.2×10^{-6} M	0.0014%
フタル酸ジシクロヘキシル	(得られなかった)	
フタル酸ブチルベンジル	PC ₁₀ = 2.5×10^{-6} M	0.00056%
ジベンゾチオフェン	(得られなかった)	
イソブチルパラベン	EC ₅₀ = 1.7×10^{-5} M	0.00042%
スチレン	(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)	
ペルフルオロドデカン酸	(得られなかった)	
チオ尿素	(得られなかった)	
チウラム	(得られなかった)	
過塩素酸	(得られなかった)	
17 β エストラジオール	EC ₅₀ = 7.2×10^{-11} M PC ₁₀ = 1.4×10^{-11} M	

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)

抗エストロゲン作用に関するメダカ 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 11 物質のうち、フタル酸ジシクロヘキシルに関して、試験濃度範囲において、メダカ ER α の陽性物質(17 β -エストラジオール)による転写活性に対する阻害作用を示唆する転写活性化倍率の有意な低下がみられ、影響濃度として、IC₅₀ (6.8×10^{-6} M) が得られた。また、その陽性対照物質(4-ヒドロキシタモキシフェン)の抗エストロゲン作用に対する

相対活性比は、0.026%であった。その他の 10 物質については、試験濃度範囲で 17 β -エストラジオールによるメダカ ER α の転写活性化倍率に有意な低下(メダカ 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 3-2 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

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
ブチルパラベン	(得られなかった)	
ビスフェノールS	(得られなかった)	
フタル酸ジシクロヘキシル	IC ₅₀ = 6.8×10^{-6} M	0.026%
フタル酸ブチルベンジル	(得られなかった)	
イソブチルパラベン	(得られなかった)	
スチレン	(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)	
ペルフルオロドデカン酸	(得られなかった)	
チオ尿素	(得られなかった)	
チウラム	(得られなかった)	
過塩素酸	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	IC ₅₀ = 1.8×10^{-9} M	

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)

アンドロゲン作用に関するメダカ AR β 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 10 物質に関して、試験濃度範囲でメダカ AR β に対する転写活性化は認められなかった。

表 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

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
ブチルパラベン	(得られなかった)	
ビスフェノールS	(得られなかった)	
フタル酸ジシクロヘキシル	(得られなかった)	
フタル酸ブチルベンジル	(得られなかった)	
スチレン	(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)	
ペルフルオロドデカン酸	(得られなかった)	
チオ尿素	(得られなかった)	
チウラム	(得られなかった)	
過塩素酸	(得られなかった)	
11-ケトテストステロン	EC ₅₀ = 1.9×10^{-8} M	

3-4. メダカ 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に関するメダカ AR β 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 10 物質に関して、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 メダカ AR β レポータージーン試験(抗アンドロゲン作用)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
ブチルパラベン	(得られなかった)	
ビスフェノールS	(得られなかった)	
フタル酸ジシクロヘキシル	(得られなかった)	
フタル酸ブチルベンジル	(得られなかった)	
スチレン	(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)	
ペルフルオロドデカン酸	(得られなかった)	
チオ尿素	(得られなかった)	
チウラム	(得られなかった)	
過塩素酸	(得られなかった)	
2-ヒドロキシフルタミド	IC ₅₀ = 2.3×10^{-7} M	

3-5. ニシツメガエル TR β 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に関するニシツメガエル TR β レポータージーン試験の結果を表 3-5 及び図 3-5 に示した。

試験対象とした 10 物質のうち、TRIAC(チラトリコール)に関して、ニシツメガエル TR β に対する転写活性化作用(甲状腺ホルモン作用)を有することが示唆される転写活性化倍率の上昇が認められ、影響濃度として EC₅₀(1.6×10^{-9} M)が得られた。また、その陽性対照物質(トリヨードサイロニン)の甲状腺ホルモン作用に対する相対活性比は、50%であった。その他の 9 物質については、試験濃度範囲でニシツメガエル TR β に対する転写活性化は認められなかった。

表 3-5 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)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
フタル酸ジ-n-ブチル	(得られなかった)	
フタル酸ジエチル	(得られなかった)	
ビスフェノールB	(得られなかった)	
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	(得られなかった)	
ベンゾフェノン-3	(得られなかった)	
プロピザミド	(得られなかった)	
ペルフルオロオクタン酸	(得られなかった)	
フェニトイン	(得られなかった)	
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	(得られなかった)	
TRIAC (チラトリコール)	EC ₅₀ = 1.6×10^{-9} M	50%
トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 8.0×10^{-10} M	

3-6. 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に関するニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験の結果を表 3-6 及び図 3-6 に示した。

試験対象とした 6 物質のうち、p-メトキシケイ皮酸 2-エチルヘキシルに関して、試験濃度範囲において、ニシツメガエル TR β の陽性物質(トリヨードサイロニン)による転写活性に対する阻害作用を示唆する転写活性化倍率の有意な低下がみられ、影響濃度として linIC₃₀ (2.4×10^{-5} M) が得られた。また、その陽性対照物質(NH-3)の抗甲状腺ホルモン作用に対する相対活性比は 1.2%であった。その他の 5 物質については、試験濃度範囲でトリヨードサイロニンによるニシツメガエル TR β の転写活性化倍率に有意な低下(ニシツメガエル TR β の転写活性に対する阻害作用)は認められなかった。

表 3-6 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)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
フタル酸ジ-n-ブチル	(得られなかった)	
フタル酸ジエチル	(得られなかった)	
ビスフェノールB	(得られなかった)	
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	linIC ₃₀ = 2.4×10^{-5} M	1.2%
ベンゾフェノン-3	(得られなかった)	
プロピザミド	(得られなかった)	
NH-3	IC ₅₀ = 1.1×10^{-6} M linIC ₃₀ = 2.8×10^{-7} M	

3-7. ミジンコ EcR レポータージーン試験(脱皮ホルモン作用)

脱皮ホルモン作用に関するミジンコ EcR レポータージーン試験の結果を表 3-7 及び図 3-7 に示した。

試験対象とした 2 物質のうち、p-メキシケイ皮酸 2-エチルヘキシルに関して、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、ミジンコ EcR に転写活性化作用(脱皮ホルモン作用)を有することが示唆され、影響濃度として PC_{10} (2.4×10^{-5} M) が得られた。また、その陽性対照物質(20-ヒドロキシエクジソン)の脱皮ホルモン作用に対する相対活性比は、0.63%であった。その他の 1 物質については、試験濃度範囲でミジンコ EcR に対する転写活性化は認められなかった。

表 3-7 ミジンコ EcR レポータージーン試験(脱皮ホルモン作用)の結果

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
p-メキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	PC ₁₀ = 2.4×10^{-5} M	0.63%
ベンゾフェノン-3	(得られなかった)	
20-ヒドロキシエクジソン	EC ₅₀ = 1.5×10^{-6} M PC ₁₀ = 1.5×10^{-7} M	

3-8. ミジンコ JhR レポータージーン試験(幼若ホルモン作用)

幼若ホルモン作用に関するミジンコ JhR レポータージーン試験の結果を表 3-8 及び図 3-8 に示した。

試験対象とした 3 物質のうち、ピリプロキシフェンに関して、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、ミジンコ EcR に対する転写活性化作用(幼若ホルモン作用)を有することが示唆され、影響濃度として、EC₅₀ (9.0×10^{-8} M) が得られた。また、その陽性対照物質(20-ヒドロキシエクジソン)の(ファルネセン酸メチル)の幼若ホルモン作用に対する相対活性比は、400%であった。その他の 2 物質については、試験濃度範囲でミジンコ JhR に対する転写活性化は認められなかった。

表 3-8 ミジンコ JhR レポータージーン試験(幼若ホルモン作用)の結果

試験対象物質	幼若ホルモン作用	
	EC ₅₀ 又はPC ₁₀	相対活性比
アトラジン	(得られなかった)	
ピリプロキシフェン	EC ₅₀ = 9.0×10^{-8} M	400%
カルバマゼピン	(得られなかった)	
ファルネセン酸メチル	EC ₅₀ = 3.6×10^{-7} M	

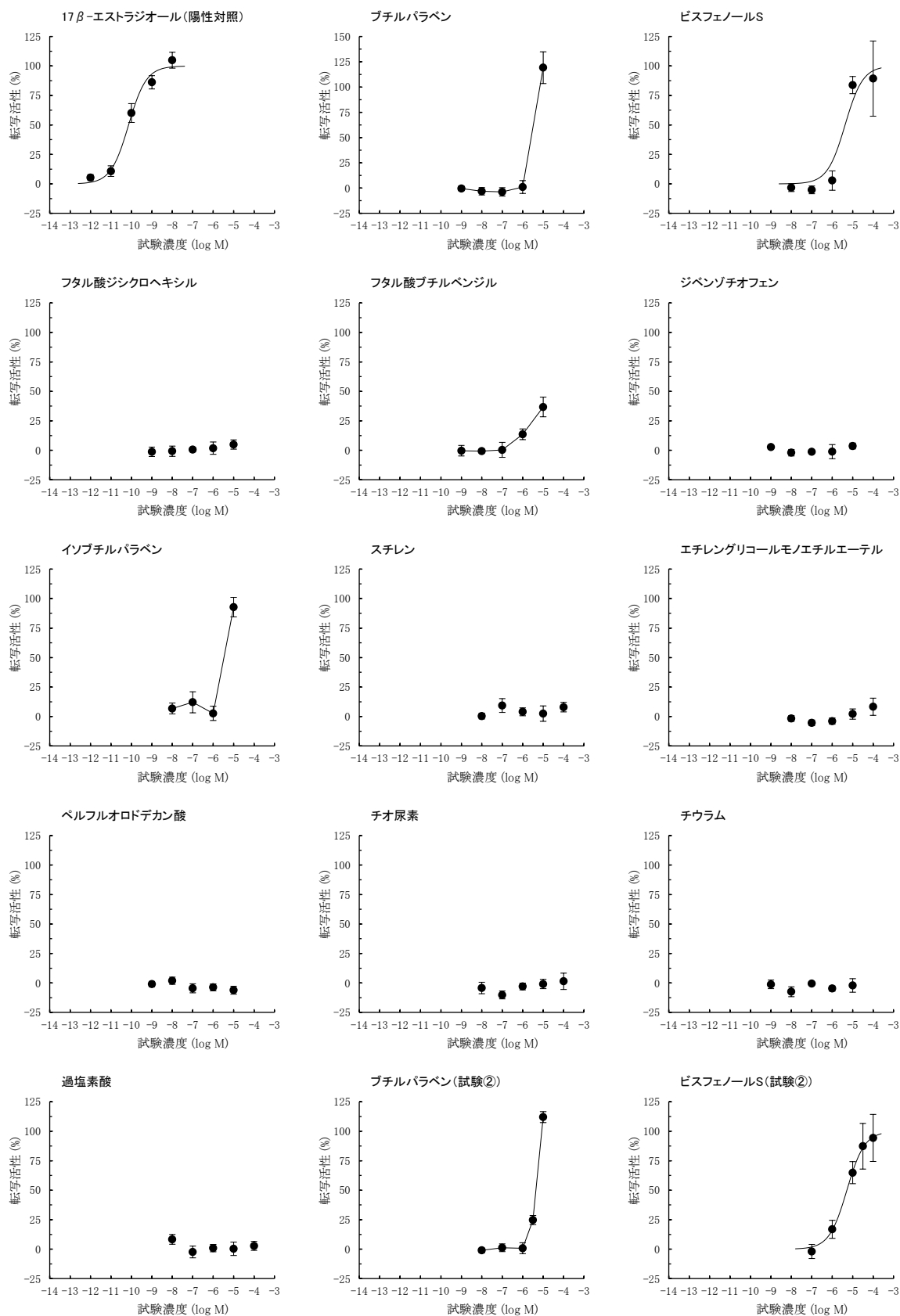


図 3-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)の結果

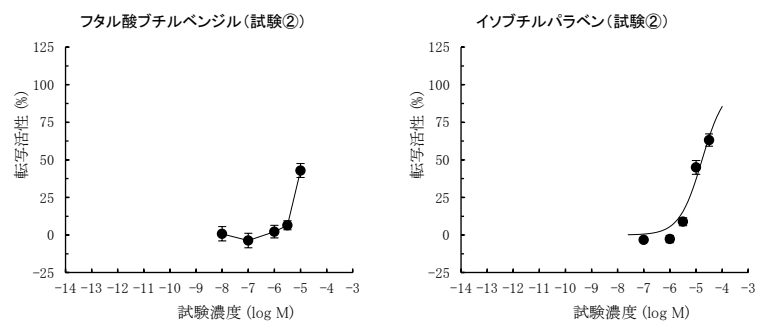


図 3-1 メダカ ER α レポータージーン試験(エストロゲン作用)の結果(つづき)

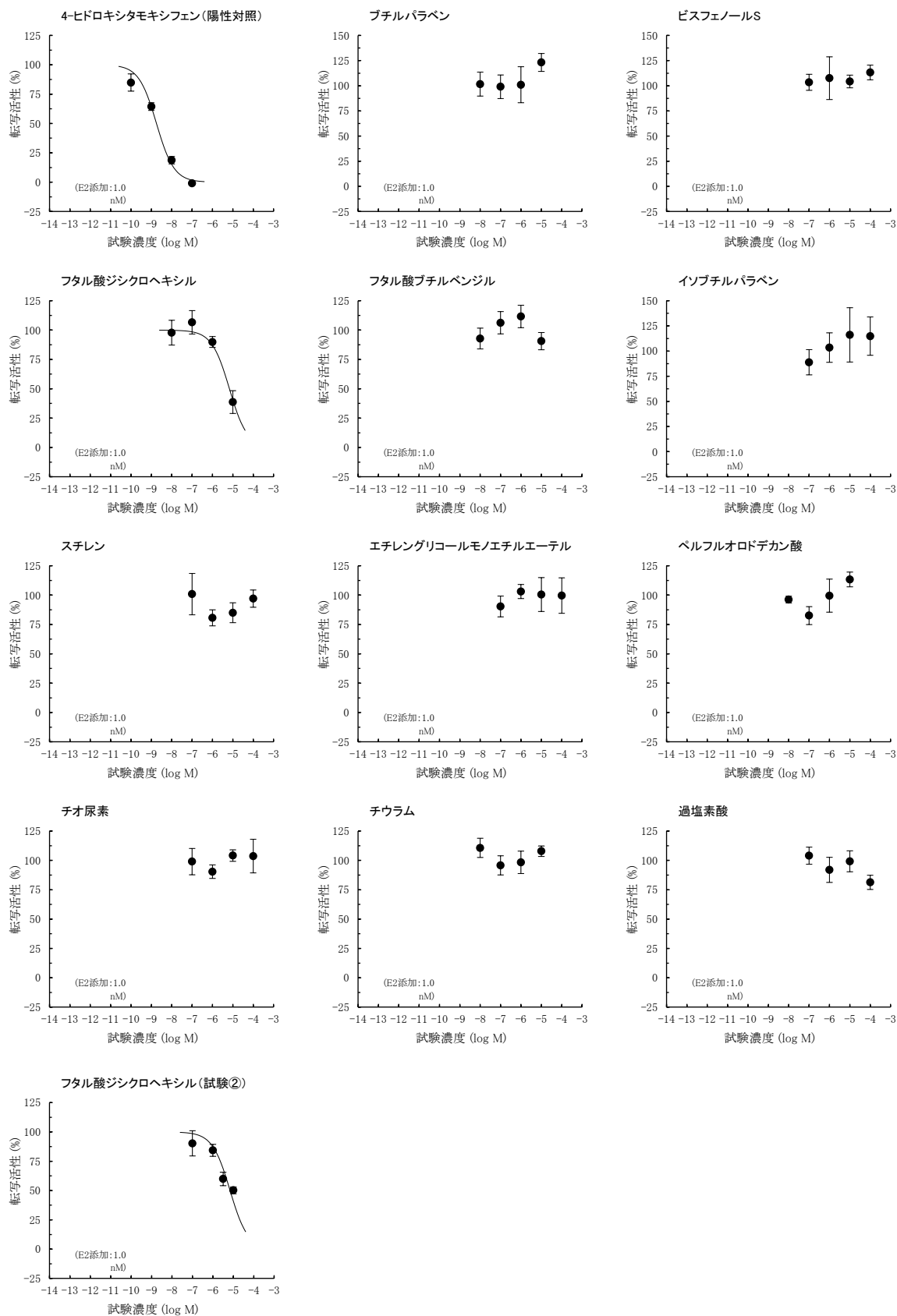


図 3-2 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)の結果

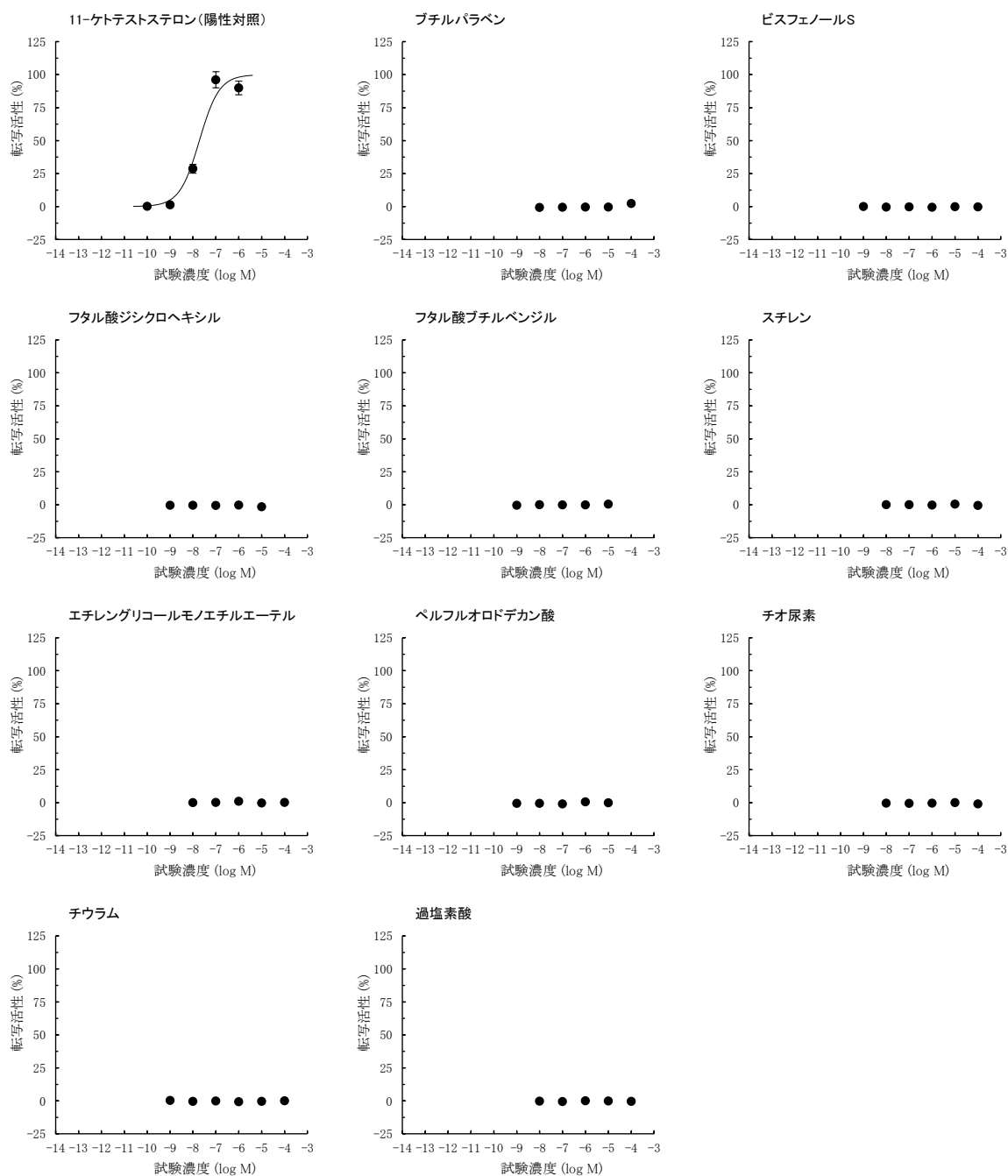


図 3-3 メダカ AR β レポータージーン試験(アンドロゲン作用)の結果

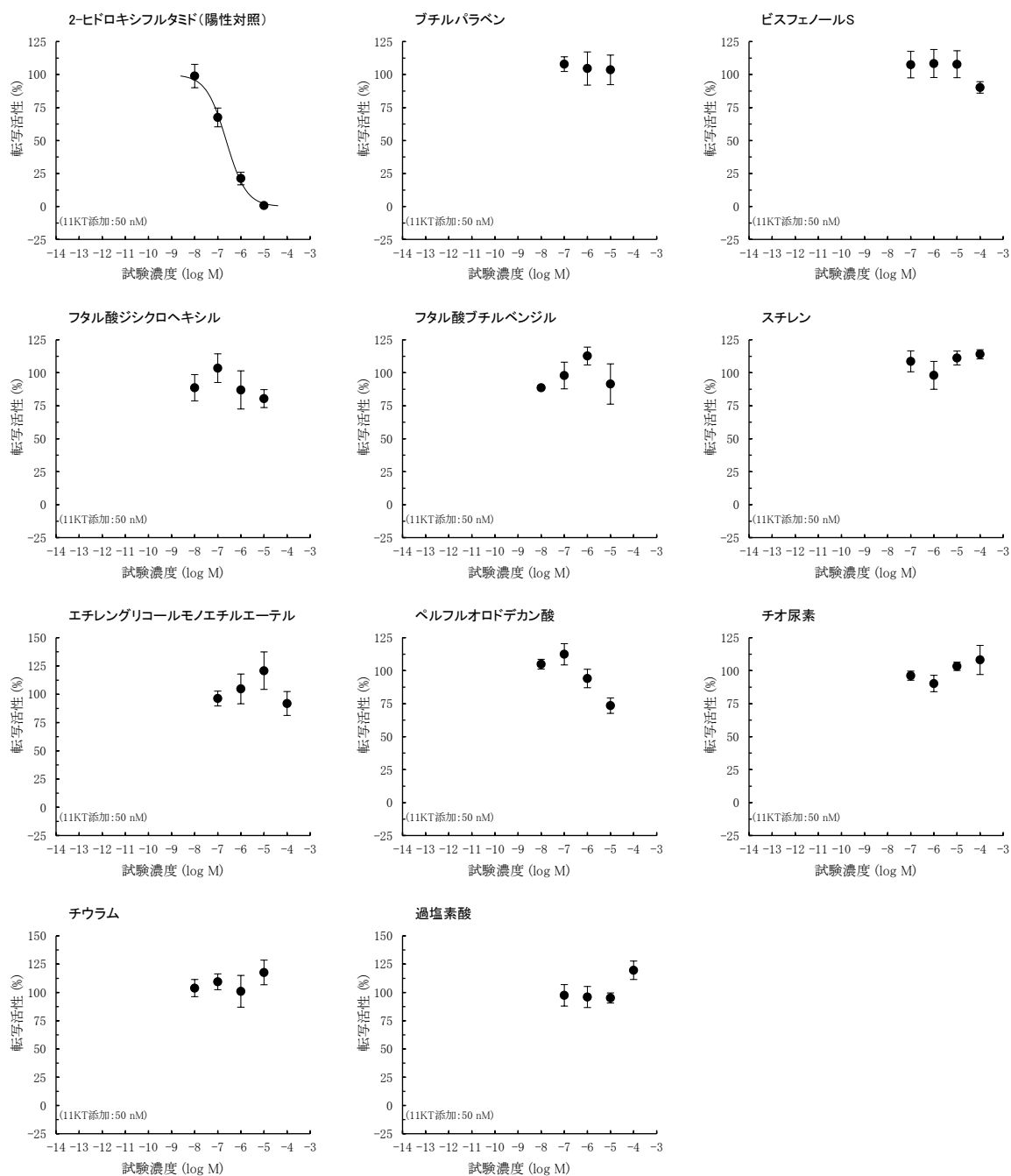


図 3-4 メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)の結果

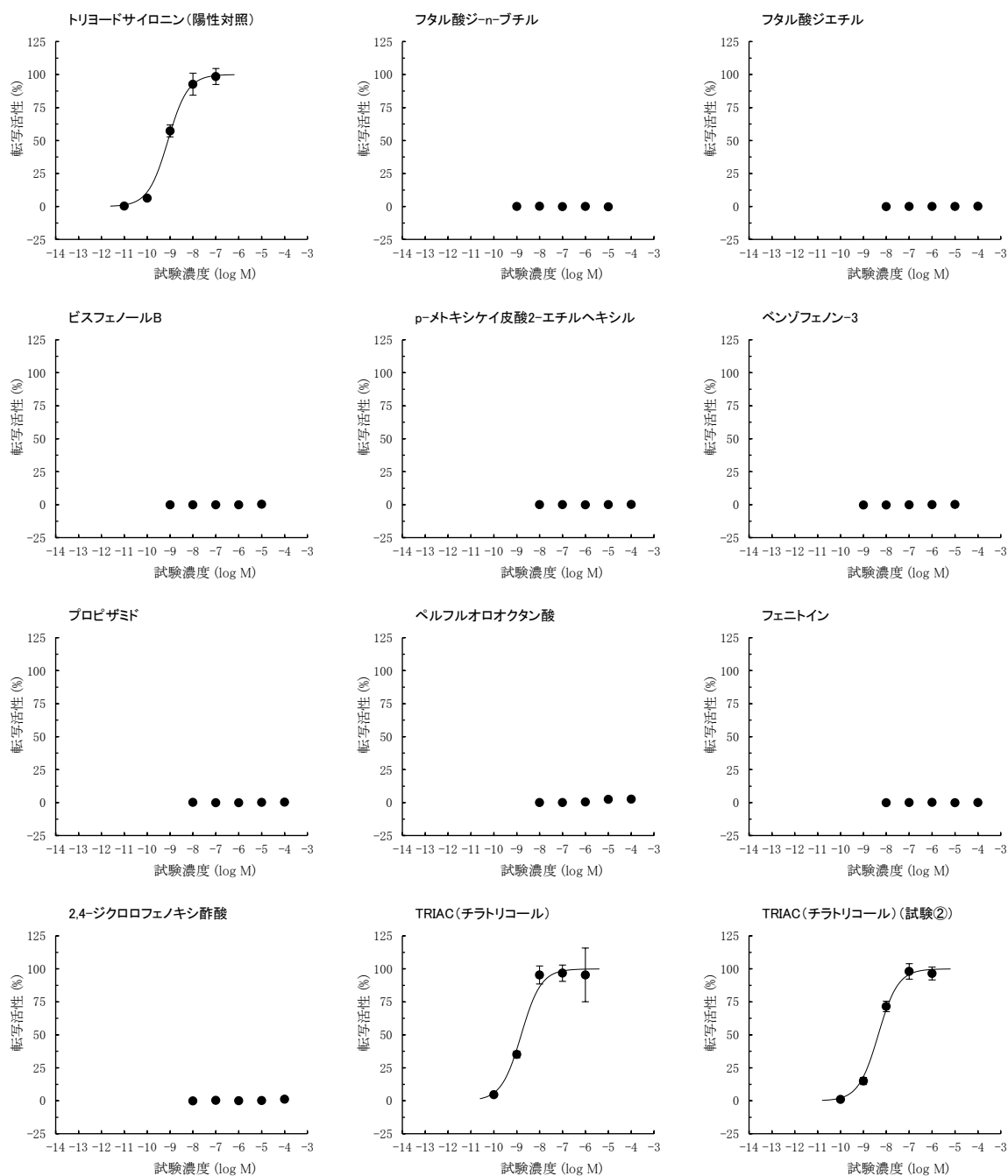


図 3-5 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)の結果

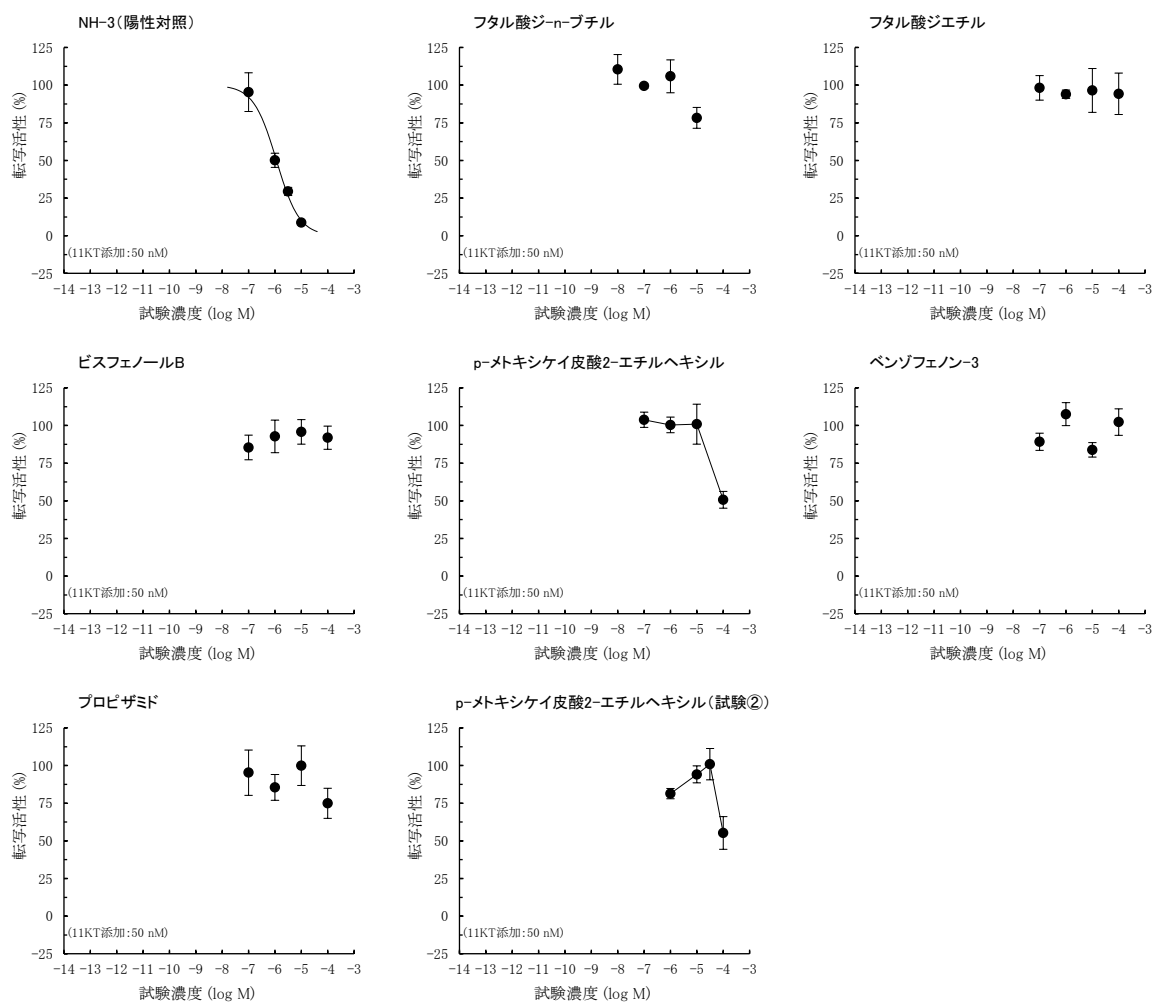


図 3-6 ニシツメガエル TR β レポータージーン試験 (抗甲状腺ホルモン作用) の結果

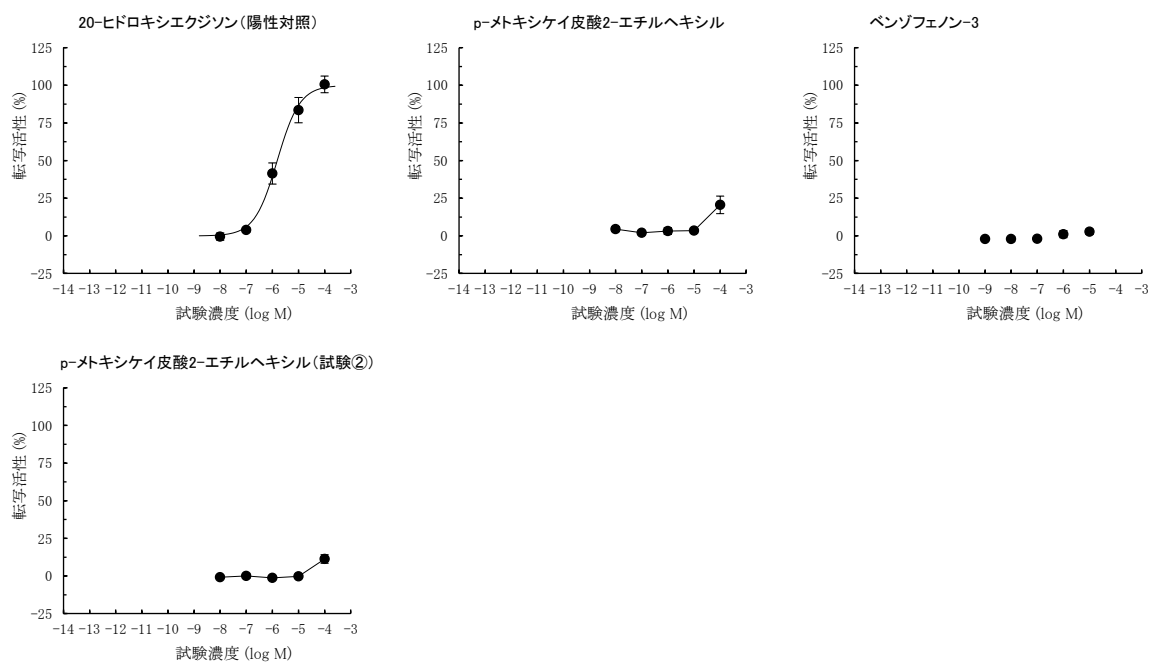


図 3-7 ミジンコ EcR レポーター遺伝子試験(脱皮ホルモン作用)の結果

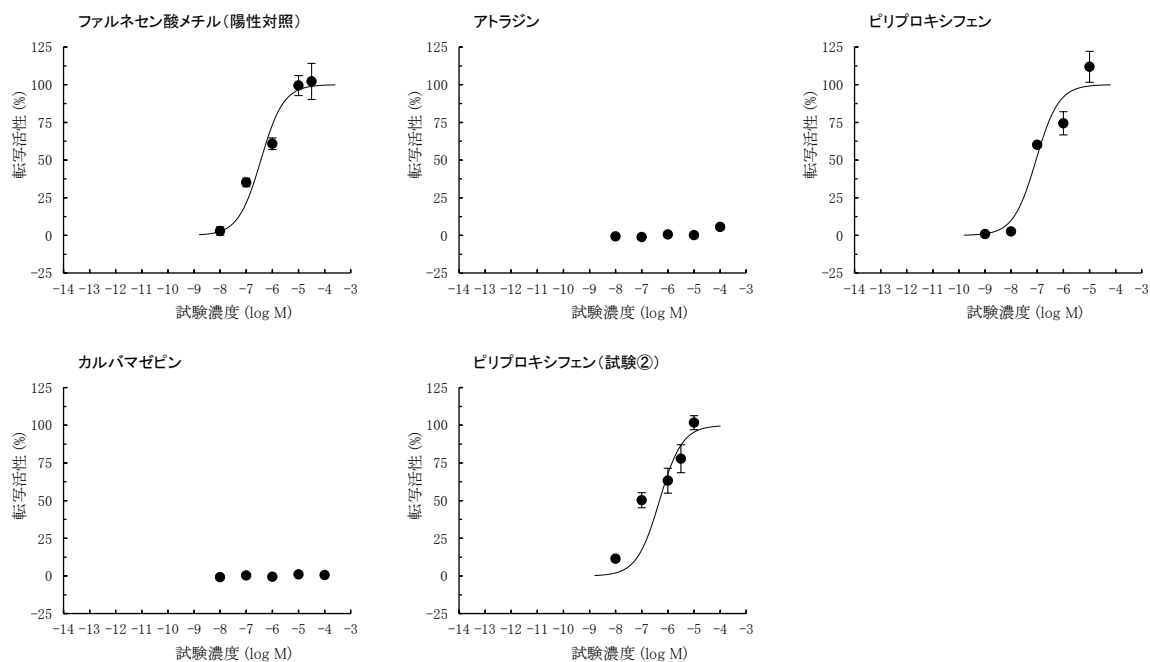


図 3-8 ミジンコ JhR レポーター遺伝子試験(幼若ホルモン作用)の結果

レポータージーン試験の試験条件

試験条件	メダカER α レポータージーン試験	
	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	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	medaka ERalpha/pcDNA3.1	
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℃、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 (1×10^{-9} M)
助剤及び添加濃度	DMSO又はメタノール (0.1% v/v)	DMSO又はメタノール (0.2% v/v)
試験条件	メダカAR β レポータージーン試験	
	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	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	medaka ARbeta/pcDNA3.1	
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℃、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 (5×10^{-8} M)
助剤及び添加濃度	DMSO又はメタノール (0.1% v/v)	DMSO又はメタノール (0.2% v/v)

レポーター遺伝子試験の試験条件(つづき)

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/pcDNA3.1	
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℃、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)

試験条件	ミジンコEcR レポーター遺伝子試験	ミジンコJhR レポーター遺伝子試験
	アゴニスト検出系試験 (脱皮ホルモン作用)	アゴニスト検出系試験 (脱皮ホルモン作用)
試験容器	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	チャイニーズハムスター卵巣由来繊維芽細胞(CHO)	
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	D. magna EcR/pBIND pACT-dapUSP (LBD) pACT-droTaiman (LXXLL)	pcDNA-Met pcDNA-SRC
レポーターベクター	pG5-Luc	pTcJHRE-Luc
培養(暴露)環境	37℃、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)	
助剤及び添加濃度	DMSO (0.1% v/v)	