

環境省請負業務

令和7年度

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験管内試験

(フタル酸ジエチル他 24 物質)実施業務

報告書

令和8年3月

 いであ株式会社

目次

目次.....	i
要旨.....	iii
I. 業務の概要.....	1
1. 背景及び目的.....	1
2. 実施内容.....	1
2-1 試験対象物質のレポータージーン試験の実施.....	1
2-2 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告.....	2
II. 試験対象物質のレポータージーン試験の実施.....	3
1. レポータージーン試験.....	3
1-1 レポータージーン試験法の概要.....	3
1-2 本業務に用いた試験系.....	3
1-3 試験対象作用及びホルモン受容体の種類.....	4
1-4 試験対象物質及び作用モード.....	5
1-5 陽性対照物質.....	7
1-6 アンタゴニスト検出系試験での陽性物質の共添加.....	8
1-7 陰性対照.....	8
2. 材料及び方法.....	9
2-1 試薬.....	9
2-2 培地.....	11
2-3 溶解助剤.....	11
2-4 試験濃度.....	11
2-5 試験方法及び手順.....	13
2-6 データの解析方法.....	19
2-7 試験の有効性.....	21
3. 結果.....	22
3-1 メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験.....	22
3-2 メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験.....	24
3-3 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.....	26
3-4 ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験.....	28
3-5 ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験.....	29
III. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告.....	39
参考文献.....	39
付属資料.....	資 1～資 25

要 旨

本業務では、EXTEND2022 の枠組みの下で試験対象に選定された 25 物質(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及びカルバマゼピン)について、第1段階の試験管内試験として、試験生物種のホルモン受容体を用いるレポータージーン試験を実施した。各試験で対象とした内分泌かく乱作用及び試験物質数は以下のとおりであった。

- メダカ ER α レポータージーン試験: エストロゲン作用 (12 物質) 及び抗エストロゲン作用 (11 物質)
- メダカ AR β レポータージーン試験: アンドロゲン作用 (10 物質) 及び抗アンドロゲン作用 (10 物質)
- 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 (10 物質) 及び抗甲状腺ホルモン作用 (6 物質)
- ミジンコ EcR レポータージーン試験: 脱皮ホルモン作用 (2 物質)
- ミジンコ JhR レポータージーン試験: 脱皮ホルモン作用 (3 物質)

メダカ ER α レポータージーン試験

エストロゲン作用の試験では、4 物質が陽性反応(メダカ ER α に対する転写活性化)を示し、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 3.5×10^{-6} M) が得られた。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は、それぞれ 0.0014%、0.0042%、0.00088% 及び 0.00041% であった。その他の 8 物質については、メダカ ER α に対する転写活性化は確認できなかった。抗エストロゲン作用の試験では、フタル酸ジシクロヘキシルが陽性反応(試験系に添加した 17 β -エストラジオールによるメダカ ER α の転写活性に対する阻害作用)を示し、IC₅₀ (6.8×10^{-6} M) が得られた。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は 0.026% であった。その他の 10 物質については、17 β -エストラジオール(メダカ ER α の天然リガンド)によるメダカ ER α の転写活性に対する阻害作用は確認できなかった。

メダカ AR β レポータージーン試験

アンドロゲン作用の試験では、10 物質全てに関して、メダカ AR β に対する転写活性化は確認できなかった。抗アンドロゲン作用の試験でも、10 物質全てに関して、試験系に添加した 11-ケトテストステロン(メダカ AR β の天然リガンド)によるメダカ AR β の転写活性

に対する阻害作用は確認できなかった。

ニシツメガエル TR β レポータージーン試験

エストロゲン作用の試験では、TRIAC (チラトリコール) が陽性反応 (ニシツメガエル TR β に対する転写活性化) を示し、EC₅₀ (1.6×10^{-9} M) が得られた。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は 50% であった。その他の 9 物質については、ニシツメガエル TR β に対する転写活性化は確認できなかった。抗甲状腺ホルモン作用の試験では、p-メトキシケイ皮酸 2-エチルヘキシルが陽性反応 (試験系に添加したトリヨードサイロニンによるニシツメガエル TR β の転写活性に対する阻害作用) を示し、linIC₃₀ (2.4×10^{-5} M) が得られた。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は 1.2% であった。その他の 5 物質については、トリヨードサイロニン (ニシツメガエル TR β の天然リガンド) によるニシツメガエル TR β の転写活性に対する阻害作用は確認できなかった。

ミジンコ EcR レポータージーン試験

脱皮ホルモン作用の試験において、p-メトキシケイ皮酸 2-エチルヘキシルが陽性反応 (ミジンコ EcR に対する転写活性化) を示し、PC₁₀ (2.4×10^{-5} M) が得られた。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は 0.63% であった。その他の 1 物質については、ミジンコ EcR に対する転写活性化は確認できなかった。

ミジンコ JhR レポータージーン試験

幼若ホルモン作用の試験において、ピリプロキシフェンが陽性反応 (ミジンコ JhR に対する転写活性化) を示し、EC₅₀ (9.0×10^{-8} M) が得られた。その陽性対照物質 (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は 400% であった。その他の 2 物質については、ミジンコ JhR に対する転写活性化は確認できなかった。

Summary

In this work, as a Tier-1 *in vitro* assay, reporter gene assays using specific hormone receptors of test organisms were conducted for 25 substances (di-n-butyl phthalate, diethyl phthalate, bisphenol B, 2-ethylhexyl p-methoxycinnamate, benzophenone-3, propyzamide, butylparaben, bisphenol S, dicyclohexyl phthalate, butylbenzyl phthalate, dibenzothiophene, isobutylparaben, styrene, ethylene glycol monoethyl ether, perfluorododecanoic acid, thiourea, thiram, perchloric acid, perfluorooctanoic acid, phenytoin, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, TRIAC (tiratricol), atrazine, pyriproxyfen, and carbamazepine), which have been selected as a candidate test substance under the framework of the EXTEND2022 program. The subject endocrine-related effects and the number of substances applied to the assays were as follows.

- Medaka ER α reporter gene assay: estrogenic activity (for 12 substances) and anti-estrogenic activity (for 11 substances)
- Medaka AR β reporter gene assay: androgenic activity (for 10 substances) and anti-androgenic activity (for 10 substances)
- *Xenopus tropicalis* TR β reporter gene assay: thyroid hormone-like activity (for 10 substances) and anti-thyroid hormone activity (for six substances)
- Daphnid EcR reporter gene assay: ecdyson-like activity (for two substances)
- Daphnid JhR reporter gene assay: juvenile hormone-like activity (for three substances)

Medaka ER α reporter gene assay

In the estrogenic activity assays, four substances showed a positive response (activating transcription of medaka ER α). The., EC₅₀s of 5.2×10^{-6} and 1.7×10^{-5} M for bisphenol B and isobutylparaben, respectively, and PC₁₀s of 1.6×10^{-6} and 3.5×10^{-6} M for butylparaben and butylbenzyl phthalate, respectively, were obtained. Their relative potencies to the reference chemical (17 β -estradiol) were estimated to be 0.0014, 0.00042, 0.00088, and 0.00041%, respectively. No transactivational activity of medaka ER α was suggested for the other eight substances tested. In the assays for anti-estrogenic activity, dicyclohexyl phthalate showed a positive response (inhibiting transcriptional activation of medaka ER α induced by 17 β -estradiol, a natural ligand of the receptor that was added to the test system) and an IC₅₀ of 6.8×10^{-6} M was obtained. Its relative potency compared with the reference chemical (4-hydroxytamoxifen) was estimated to be 0.026%. No inhibition of transcriptional activation of medaka ER α by 17 β -estradiol was observed in the other 10 substances assayed.

Medaka AR β reporter gene assay

No transactivational activity of medaka AR β was observed for any of all 10 substances assayed. In assays for anti-estrogenic effect, no inhibition of transcriptional activation of medaka AR β induced by 11-ketotestosterone, a natural ligand of the receptor, was

observed with any of the 10 substances tested.

X. tropicalis TR β reporter gene assay

In the assays for thyroid hormone-like activity, TRIAC (tiratricol) suggested a positive response (activating transcription of *X. tropicalis* TR β), and an EC₅₀ of 1.6×10^{-9} M, for which relative activity to the reference chemical (triiodothyronine) was estimated to be 50% was obtained. No transactivational activity of *X. tropicalis* TR β was suggested for the other nine substances tested. In the assays for anti-thyroid hormone activity, 2-ethylhexyl p-methoxycinnamate showed a positive response (inhibiting transcriptional activation of *X. tropicalis* TR β induced by triiodothyronine, a natural ligand of the receptor that was added to the test system) and linIC₃₀ of 2.4×10^{-5} M of which relative activity to the reference chemical (NH-3) was estimated to be 1.2% was obtained. No inhibition of transcriptional activation on *X. tropicalis* TR β induced by triiodothyronine was found in the other five substances.

Daphnid EcR reporter gene assay

2-ethylhexyl p-methoxycinnamate showed a positive response (activating transcription of Daphnid EcR), and PC₁₀ of 2.4×10^{-5} M, for which relative activity to the reference chemical (20-hydroxyecdysone) was estimated to be 0.63% was obtained. For another test substance, no transcriptional activity on the receptor was observed in the thyroid hormone-like activity assay.

Daphnid JhR reporter gene assay

Pyriproxyfen elicited a positive response (activating transcription of Daphnid EcR), and an EC₅₀ of 9.0×10^{-8} M was obtained. Its relative potency compared to the reference chemical (methyl farnesoate) was estimated at 400%. No transcriptional activity on the receptor was suggested in the other two substances assayed.

I. 業務の概要

1. 背景及び目的

環境省では、令和 4 年 10 月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2022—」を取りまとめた。EXTEND2022 では、化学物質の内分泌かく乱作用についての評価手法の確立と評価の実施を加速化して進めるとの方針の下で、化学物質の環境中の存在状況に関する情報を活用して検討対象物質を絞り込み、物質の評価を進めるとともに、試験及び評価の考え方や枠組みについて検討を行い、第1段階及び第2段階の2段階で内分泌かく乱作用に関する試験及び評価を行う枠組みが示されている。また、検討対象物質に関して最新の文献情報によって内分泌かく乱作用に関連する影響の評価を行い、試験対象となり得る物質として選定された化学物質については、生物の生殖、甲状腺又は成長に及ぼす影響に関して、内分泌かく乱作用の有無を調べるための第1段階の試験が実施されている。

このような背景の下、本業務では、環境省が実施する化学物質の内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータの集積を目的として、試験対象となり得るとされた物質について、EXTEND2022 に示された内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組みにおいて、第1段階の試験管内試験として採用されているレポータージーン試験を実施した。

2. 実施内容

2-1 試験対象物質のレポータージーン試験の実施

本業務では、環境省が過年度に実施した化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告(既存文献)についての信頼性評価の結果、試験対象となり得る物質とされた 25 種類の化学物質(以下、試験対象物質)について、第1段階の試験管内試験として採用されている試験生物種のホルモン受容体を用いるレポータージーン試験(計 64 試験)を実施した。レポータージーン試験では、信頼性評価において想定された作用モードについて、作用の有無を確認するとともに、作用を有することが示唆された試験対象物質について、EC₅₀(最大転写活性の 50%の転写活性を示す濃度)又は IC₅₀(陽性物質の転写活性を 50%阻害する濃度)等のデータを収集した。

- エストロゲン作用(エストロゲン受容体に対するアゴニスト作用)
- 抗エストロゲン作用(エストロゲン受容体に対するアンタゴニスト作用)
- アンドロゲン作用(アンドロゲン受容体に対するアゴニスト作用)
- 抗アンドロゲン作用(アンドロゲン受容体に対するアンタゴニスト作用)
- 甲状腺ホルモン作用(甲状腺ホルモン受容体に対するアゴニスト作用)
- 抗甲状腺ホルモン作用(甲状腺ホルモン受容体に対するアンタゴニスト作用)
- 脱皮ホルモン作用(脱皮ホルモン受容体に対するアゴニスト作用)
- 幼若ホルモン作用(幼若ホルモン受容体に対するアンタゴニスト作用)

2-2 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告

本業務で実施したレポータージーン試験について、環境省が別途開催したEXTEND2022 に基づく会議に提出するための資料を作成するとともに、同会議に出席して本業務で実施した試験の結果の報告等を行った。

II. 試験対象物質のレポータージーン試験の実施

1. レポータージーン試験

1-1 レポータージーン試験法の概要

生体内では、ホルモン物質が細胞膜や核内に存在するホルモン受容体と結合、二量体を形成し、さらにホルモン応答性遺伝子のシス領域(構造遺伝子上流又は下流にある遺伝子転写量の調節領域)に結合することにより、ホルモン応答性遺伝子の転写を促進する。本業務で実施したレポータージーン試験は、この生体内での反応を培養した動物細胞内で再現することにより、試験対象とする化学物質について、本来のホルモンと類似する作用(ホルモン様作用)や本来のホルモンの働きを阻害する作用(抗ホルモン作用)を定量的に評価する手法である。

一般に、化学物質のホルモン様作用の評価を目的とするレポータージーン試験では、試験系として、評価対象とするホルモンの受容体を発現する遺伝子が組み込まれたベクター、リガンド(ホルモンやホルモン様作用がある化学物質)と結合した受容体の応答性遺伝子の下流側にレポーター遺伝子が組み込まれたベクターを人為的に導入(トランスフェクション)した動物細胞を用いる。また、これら2種のベクターに加えて、レポーター遺伝子とは異なる生物種のルシフェラーゼ等の酵素を恒常的に発現するコントロールレポーター遺伝子が組み込まれたベクターをトランスフェクションするデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法では、宿主とする動物細胞への導入効率や試験容器内の動物細胞数の変動等をコントロールレポーター遺伝子の発現量から補正(標準化)するため、レポーター遺伝子の発現量のレプリケート(繰り返し)間の変動が低減できる。

1-2 本業務に用いた試験系

本業務では、各作用モードに関して、試験ごとにレポーター遺伝子が組み込まれたベクターを継代培養した動物細胞(宿主)に導入(トランスフェクション)する一過性発現細胞系を用いてレポータージーン試験を実施した。

本業務で用いたレポータージーン試験は、2種類のルシフェラーゼを使用するデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法を基本原理とする試験系である。この試験系では、宿主として用いる動物細胞(ヒト胎児腎細胞 293 株(HEK293)、ヒト肝癌由来細胞株(HepG2 又はチャイニーズハムスター卵巣細胞株(CHO))に導入する試験レポーターベクターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子、コントロールレポーターベクターにウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれている。これらのベクターとホルモン受容体発現ベクターを人為的に導入した動物細胞系(試験系)に、細胞内で発現させる受容体と特異的に結合する化学物質(以下、リガンド)が入ると、ホルモン受容体発現ベクターに組み込まれている遺伝子から生合成されたホルモン受容体と結合し、生体内と相同のメカニズムの下でホタルルシフェラーゼが生成される。細胞内でのホタルルシフェラーゼの生成量とレポーター遺伝子の発現量(ホルモン受容体を介したシス領域の転写活性化能)は相関しているため、ルシフェラーゼの基質(ホタルルシフェリン)を試験系に加えた際に生じる発光の強さ(発光強度)を測定することにより、間接的に細胞内での遺伝子発現量を推定できる。一方、コントロールレポーターベクターに組み込まれたウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子

は、動物細胞への導入後、細胞内で恒常的に発現する。また、試験レポーターベクターとコントロールレポーターベクターの試験系への導入効率は相関する。そのためウミシタケルシフェリンの発光強度を用いてホタルルシフェリンの発光強度を補正することにより、試験系へのベクターの導入効率に依存するばらつきが低減し、定量性が向上する。試験では、この補正されたホタルルシフェリンの発光強度（相対発光強度）の変動に基づいて、試験系に添加した化学物質のホルモン受容体に対する転写活性化能やリガンドによる転写活性化能に対する阻害能を定量評価する。

本業務で実施したレポータージーン試験の基本原則であるデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法の概要を図 1-2-1 に示した。

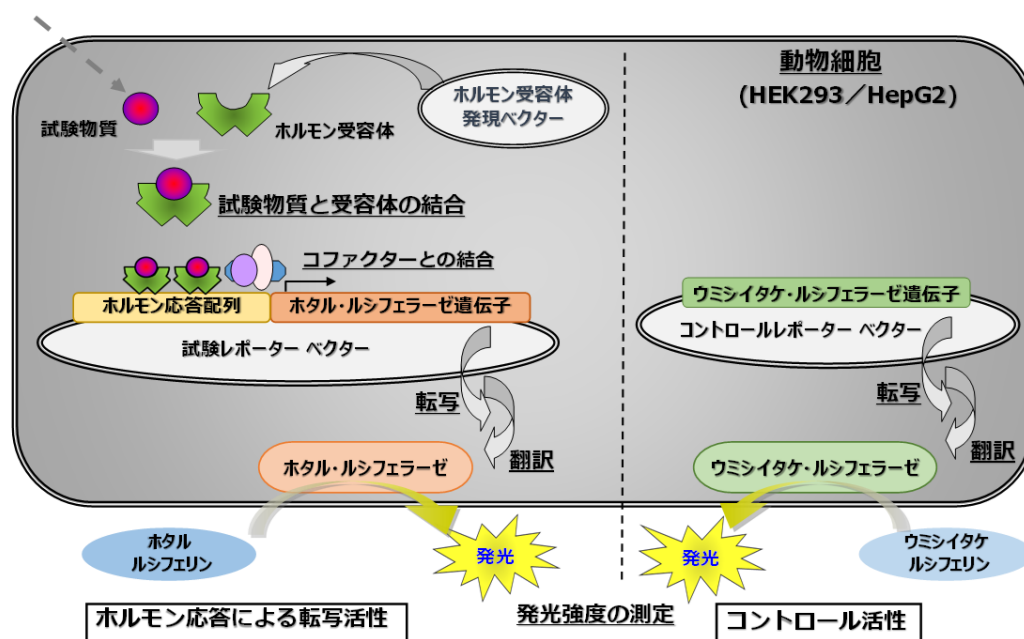


図 1-2-1 本業務に用いた試験系（デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法）の概要

本業務では、レポータージーン試験に関して、化学物質（試験対象物質）の生体内でのホルモン様作用を評価するアゴニスト検出系試験と生体内でのホルモンの作用に対する阻害作用を評価するアンタゴニスト検出系試験を実施した。アゴニスト検出系試験では、試験系に試験対象物質のみを添加し、ホルモン受容体に対する転写活性化能（ホルモン様作用）を定量的に評価した。また、アンタゴニスト検出系試験では、試験系に試験対象物質と一緒にホルモン受容体の天然リガンド（本来のホルモン）を添加し、天然リガンドのホルモン受容体に対する転写活性化能に対する試験対象物質の阻害作用を定量的に評価した。

1-3 試験対象作用及びホルモン受容体の種類

本業務では、レポータージーン試験に関して、エストロゲン作用、アンドロゲン作用、甲

甲状腺ホルモン作用、脱皮ホルモン作用又は幼若ホルモン作用を対象としたアゴニスト系試験並びに抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用又は抗甲状腺ホルモン作用を対象としたアゴニスト系試験を実施した。

試験対象とした作用モード及び試験系に導入したホルモン受容体の種類(生物種及びサブタイプ)を表 1-3-1 に示した。

表 1-3-1 レポータージーン試験の対象とした作用モード及びホルモン受容体

作用モード	レポータージーン試験に用いた受容体	
	生物種	受容体の種類(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 α
抗エストロゲン作用	メダカ	エストロゲン受容体 α
アンドロゲン作用	メダカ	アンドロゲン受容体 β
抗アンドロゲン作用	メダカ	アンドロゲン受容体 β
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
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
脱皮ホルモン作用	オオミジンコ	脱皮ホルモン受容体
幼若ホルモン作用	ミジンコ	幼若ホルモン受容体

1-4 試験対象物質及び作用モード

本業務では、フタル酸ジ-n-ブチル(CAS 84-74-2)、フタル酸ジエチル(CAS 84-66-2)、ビスフェノール B(CAS 77-40-7)、p-メトキシケイ皮酸 2-エチルヘキシル(CAS 5466-77-3)、ベンゾフェノン-3(CAS 131-57-7)、プロピザミド(CAS 23950-58-5)、ブチルパラベン(CAS 94-26-8)、ビスフェノール S(CAS 80-09-1)、フタル酸ジシクロヘキシル(CAS 84-61-7)、フタル酸ブチルベンジル(CAS 85-68-7)、ジベンゾチオフェン(CAS 132-65-0)、イソブチルパラベン(CAS 4247-02-3)、スチレン(CAS 100-42-5)、エチレングリコールモノエチルエーテル(CAS 110-80-5)、ペルフルオロドデカン酸(CAS 307-55-1)、チオ尿素(CAS 62-56-6)、チウラム(CAS 137-26-8)、過塩素酸(CAS 7601-90-3)、ペルフルオロオクタン酸(CAS 335-67-1)、フェニトイン(CAS 57-41-0)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(CAS 94-75-7)、TRIAC(チラトリコール)(CAS 51-24-1)、アトラジン(CAS 1912-24-9)、ピリプロキシフェン(CAS 95737-68-1)及びカルバマゼピン(CAS 298-46-4)を対象としてレポータージーン試験を実施した。

試験対象物質は、環境省が過年度に実施した化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告(文献情報)に基づく信頼性評価において、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得ると判断されたが、得られた知見に関して、試験管内試験に関する情報が十分ではないとされた化学物質である。本業務では、試験対象物質に関して、信頼性評価において試験管内試験に関する情報(既存知見)が十分ではないと評価された作用モードを対象として、試験管内試験(レポータージーン試験)を実施した。試験は、メダカのエストロゲン受容体 α (ER α)を用いるメダカ ER α レポータージーン試験では、エストロゲン作用及び抗エストロゲン作用について 12 物質及び 11 物質、メダカのアンドロゲン受容体 β

(AR β)を用いるメダカ AR β レポータージーン試験では、アンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用について各 10 物質、ニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)を用いるニシツメガエル TR β レポータージーン試験では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 10 物質及び 6 物質、ミジンコの脱皮ホルモン受容体 (EcR)を用いるミジンコ EcR レポータージーン試験では脱皮ホルモン作用について 2 物質、ミジンコの幼若ホルモン受容体 (JhR)を用いるミジンコ JhR レポータージーン試験では幼若ホルモン作用について 3 物質を対象として実施した。

本業務の試験対象物質及びレポータージーン試験で対象とした作用モードを表 1-4-1 に示した。また、試験対象物質の物理化学的性状等を付属資料 1 に示した。

表 1-4-1 試験対象物質及び試験対象作用モード

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	12	11	10	10

表 1-4-1 (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

1-5 陽性対照物質

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、脱皮ホルモン作用又は幼若ホルモン作用を評価するための試験(アゴニスト検出系試験)では、試験系が適切に機能したことの確認及び試験対象物質に関して得られた影響濃度の相対的な強さを評価するために、試験系に用いられるホルモン受容体の天然リガンドを陽性対照物質として用いた。また、抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用又は抗甲状腺ホルモン作用を評価するための試験(アンタゴニスト検出系試験)では、アゴニスト検出系試験と同様に、試験系が適切に機能したことの確認及び試験対象物質に関して得られた影響濃度の相対的な強さを評価するために、それぞれの試験に用いるホルモン受容体の天然リガンドによる転写活性に対して相対的に強い阻害作用を持つことが既知の化学物質を陽性対照物質とし

て用いた。

各作用モードの試験で用いた陽性対照物質を表 1-5-1 に示した。また、陽性対照物質の物理化学的性状等は付属資料 2 に示した。

表 1-5-1 陽性対照物質

試験系	陽性対照物質
エストロゲン作用試験	17 β -エストラジオール (CAS 50-28-2)
抗エストロゲン作用試験	4-ヒドロキシタモキシフェン (CAS 68047-06-3)
アンドロゲン作用試験	11-ケトテストステロン (CAS 564-35-2)
抗アンドロゲン作用試験	2-ヒドロキシフルタミド (CAS 52806-53-8)
甲状腺ホルモン作用試験	トリヨードサイロニン (CAS 6893-02-3)
抗甲状腺ホルモン作用試験	NH-3 (CAS 447415-26-1)
脱皮ホルモン作用試験	20-ヒドロキシエクジソン (CAS 5289-74-7)
幼若ホルモン作用試験	ファルネセン酸メチル (CAS 10485-70-8)

注) NH-3 の化学名は以下のとおり。

{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

1-6 アンタゴニスト検出系試験での陽性物質の共添加

アンタゴニスト検出系試験では、試験対象物質の転写活性化阻害能を推定するために、試験系に試験に用いるホルモン受容体に対する転写活性化作用を有する陽性物質を所定の濃度で試験対象物質と一緒に添加した。共添加した陽性物質は、アゴニスト検出系試験における陽性対照物質と同じ化学物質である。また、試験系への添加濃度は、過年度に実施されたアゴニスト検出系試験で得られた最大転写活性の 95%を目安に設定した。

各アンタゴニスト検出系試験で添加した陽性物質及び添加濃度を表 1-6-1 に示した。

表 1-6-1 アンタゴニスト検出系試験での共添加物質及び添加濃度

試験系	共添加した陽性物質
抗エストロゲン作用検出試験	17 β -エストラジオール (添加濃度: 1.0×10^{-9} M)
抗アンドロゲン作用検出試験	11-ケトテストステロン (添加濃度: 5.0×10^{-8} M)
抗甲状腺ホルモン作用検出試験	トリヨードサイロニン (添加濃度: 1.0×10^{-8} M)

1-7 陰性対照

アゴニスト検出系試験及びアンタゴニスト検出系試験では、それぞれ試験系に添加した試験対象物質、陽性対照物質又は陽性物質以外の要因によって試験レポーターベクターに組み込まれたホタルルシフェラーゼ遺伝子が発現していないことを確認するため、試験対象物質等を添加するために用いる溶解助剤のみを添加する陰性対照を設定した。

2. 材料及び方法

2-1 試薬

本業務では、試験対象物質及び陽性対照物質に関して、入手可能な製品(試薬)の中で純度が最も高いものを試験に供した。供試した試薬の純度は、95%以上であった。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段階試験管内試験と同様に過塩素酸ナトリウムを用いた。

アンタゴニスト検出系試験(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、試験系に共添加する陽性物質として、アゴニスト検出系試験(エストロゲン作用、アンドロゲン作用及び甲状腺ホルモン作用の試験)で陽性対照物質とした17 β -エストラジオール、11-ケトテストステロン及びトリヨードサイロニンの試薬を用いた。

本業務で用いた試験対象物質及び陽性対照物質の試薬の供給者、ロット番号及び純度を表 2-1-1 に示した。

表 2-1-1 レポータージーン試験に供した試験対象物質及び陽性対照物質の試薬

		供給者	ロット番号	純度
試験対象物質	フタル酸ジ-n-ブチル	F-WAKO	KSQ2269	99.8 %
	フタル酸ジエチル	F-WAKO	KSK2052	99.9 %
	ビスフェノールB	TCI	DQ8XH	99.5 %
	p-メキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	TCI	IKJDA	99.3 %
	ベンゾフェノン-3	TCI	VJYSI	100 %
	プロピザミド	SIGMA	BCCJ3170	99.2 %
	ブチルパラベン	TCI	QUGLO	100 %
	ビスフェノールS	TCI	4HCUG	99.8 %
	フタル酸ジシクロヘキシル	TCI	WCYSH	99.8 %
	フタル酸ブチルベンジル	TCI	TMXHI	98.2 %
	ジベンゾチオフェン	TCI	SXTEI	99.9 %
	イソブチルパラベン	TCI	MC53B	99.7 %
	スチレン	AccuStandard	27837	100 %
	エチレングリコールモノエチルエーテル	TCI	ENY4L	100 %
	ペルフルオロデカン酸	F-WAKO	ELH4314	99.0 %
	チオ尿素	TCI	JB4XE	99.0 %
	チウラム	TCI	BY8SO	99.6 %
	過塩素酸ナトリウム	F-WAKO	ELN7438	98.8 %
	ペルフルオロオクタン酸	F-WAKO	ELH5719	99.2 %
	フェニトイン	TCI	Y5D2D	98.9 %
	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	TCI	V64QI	100 %
	TRIAC (チラトリコール)	TCI	2LLRE	96.9 %
	アトラジン	TCI	5FYWL	99.1 %
	ピリプロキシフェン	TCI	ZBVBE	99.8 %
	カルバマゼピン	F-WAKO	TPM4038	99.7 %
陽性対照物質	17 β -エストラジオール	F-WAKO	PAG3388	99.9%
	4-ヒドロキシタモキシフェン	SIGMA	0000367381	100%
	11-ケトテストステロン	SIGMA	0000486499	100%
	2-ヒドロキシフルタミド	SIGMA	293744	99.0%
	トリヨードサイロニン	TCI	CV4DH	99.1%
	NH-3	TargetMol	247579	99.4%
	20-ヒドロキシエクジソン	TCI	QSIUF	97.5%
	ファルネセン酸メチル	Echelon	E00291-159	95.0%

注) 試薬の純度は、供給者提供の試験成績書による。供給者の略号は以下のとおり。

TCI: 東京化成工業株式会社、F-WAKO: 富士フィルム和光純薬株式会社、
SIGMA: Sigma-Aldrich Co. LLC、AccuStandard: AccuStandard, Inc.、TargetMol:
TargetMol Chemicals Inc.、Echelon: Echelon Biosciences Inc.

2-2 培地

レポータージーン試験に用いる動物細胞の継代培養には、2 mM L-グルタミン酸及び活性炭/デキストラン処理 10%ウシ胎仔血清 (Hyclone Laboratories Inc) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Merck KGaA) を用いた。また、レポータージーン試験の試験溶液 (試験対象物質等を添加した培地) の調製にも、同じ培地を用いた。

2-3 溶解助剤

本業務では、供試試薬を試験系 (培地) に添加する際の溶解助剤として、ジメチルスルホキシド (DMSO、富士フィルム和光純薬株式会社、純度>99%) を用いた。

2-4 試験濃度

本業務では、試験対象物質に関して、以下のとおり、助剤及び培地への溶解性並びにレポータージーン試験で宿主とする動物細胞に対する毒性を事前に調べ、それらの結果を勘案して試験濃度を設定した。

(1) 試験対象物質の助剤及び培地への溶解性並びに細胞毒性に関する検討

DMSO への溶解性を検討するため、各試験対象物質について、 2×10^{-4} mol の試薬を 2 mL (2×10^{-3} L) の助剤に添加し、十分に攪拌してから、溶液中の不溶粒子の有無を確認した。溶液中に不溶粒子がみられない場合、助剤への溶解性は 1×10^{-1} M 以上と判断した。溶液中に不溶粒子がみられた場合には、助剤への溶解性は 1×10^{-1} M 未満と判断し、同様の手順で 10 倍量の助剤への溶解性を確認した。本業務の試験対象物質については、 1×10^{-1} M 又は 1×10^{-2} M で助剤に溶解した。

試験対象物質の培地への溶解性及び動物細胞に対する毒性 (細胞毒性) を検討するため、後述のレポータージーン試験と同様の方法により、 1×10^{-4} M、 1×10^{-5} M 及び 1×10^{-6} M の 3 濃度で各試験対象物質を含む試験用培地を調製し、試験と同条件下で動物細胞 (HEK293、HepG2 又は CHO) への暴露 (40 時間の静置培養) を行った。暴露後、顕微鏡下でウェル内を観察し、不溶粒子の形成がみられた場合に、試験対象物質が試験条件下で培地に溶解しないと判断した。また、暴露後の動物細胞に関して、死細胞あるいは委縮した状態の細胞が概ね 20% を超える場合及び試験対象物質を添加せずに培養した対照と比較して明らかに細胞の増殖が悪い場合に、細胞毒性が認められると判断した。

各試験対象物質の助剤及び培地への溶解性並びに細胞毒性に関する検討の結果を付属資料 3 に示した。

(2) 試験濃度の設定

試験対象物質でのレポータージーン試験における試験濃度 (設定濃度) は、前項に示す検討の結果を踏まえて、(1) 一次原液の 1/1,000 の濃度、(2) 試験用培地に溶解可能な濃度、(3) 細胞毒性を示さない濃度のうち、最も低い濃度を試験最高濃度として、以下、アゴニスト検出系試験では公比 10 とする計 5 濃度、アンタゴニスト検出系試験では公比 10 とする計 4 濃度とした。ただし、設定濃度で試験を実施した結果、有意な反応が認めら

れたものの、当初の設定濃度では影響濃度 (EC_{50} 、 IC_{50} 等) が適切に推定できないと判断された場合には、上記に拠らず、適宜、再試験のための試験濃度を再設定した。

本業務で設定した試験対象物質の試験最高濃度を表 2-4-1 に示した。

表 2-4-1 レポータージーン試験での試験対象物質の設定最高濃度

試験対象物質	試験最高濃度
フタル酸ジ-n-ブチル	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
フタル酸ジエチル	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ビスフェノールB	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
p-メキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ベンゾフェノン-3	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
プロピザミド	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ブチルパラベン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ビスフェノールS	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
フタル酸ジシクロヘキシル	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
フタル酸ブチルベンジル	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
ジベンゾチオフェン	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
イソブチルパラベン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
スチレン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
エチレングリコールモノエチルエーテル	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ペルフルオロドデカン酸	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
チオ尿素	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
チウラム	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
過塩素酸	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ペルフルオロオクタン酸	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
フェニトイン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
TRIAC (チラトリコール)	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
アトラジン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ピリプロキシフェン	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
カルバマゼピン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)

陽性対照物質の試験濃度(設定濃度)は、過年度に実施された試験の結果等を参考に、試験対象物質と同様に、アゴニスト検出系試験では計 5 濃度、アンタゴニスト検出系試験では計 4 濃度とした。試験濃度の公比も、試験対象物質と同様に 10 としたが、ファルネセン酸メチルについては、細胞毒性を考慮して試験最高濃度のみ公比を 3.2 とした。

本業務で設定した陽性対照物質の試験最高濃度を表 2-4-2 に示した。

表 2-4-2 レポータージーン試験での陽性対照物質の設定最高濃度

陽性対照物質	試験最高濃度
17β-エストラジオール	$1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($0.01 \mu \text{ M}$)
4-ヒドロキシタモキシフェン	$1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($0.1 \mu \text{ M}$)
11-ケトテストステロン	$1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($1 \mu \text{ M}$)
2-ヒドロキシフルタミド	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
トリヨードサイロニン	$1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($0.1 \mu \text{ M}$)
NH-3	$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($10 \mu \text{ M}$)
20-ヒドロキシエクジソン	$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($100 \mu \text{ M}$)
ファルネセン酸メチル	$1.0 \times 10^{-4.5} \text{ M}$ ($32 \mu \text{ M}$)

2-5 試験方法及び手順

本業務では、以下に示す方法及び手順により、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法に基づく一過性発現細胞系（試験系）を準備し、試験対象物質又は陽性対照物質（以下、供試物質）を用いたレポータージーン試験を実施した。すべての試験は、96 穴マイクロプレートを試験容器として、試験濃度当たり 5 連（5 ウェル）で実施した。試験対象物質での試験を実施する際は、並行して陽性対照物質での試験を実施し、その結果から同一日に使用した試験系が適切に機能していることを確認した。

(1) 試験用培地の調製

レポータージーン試験では、不溶粒子を生じさせないように所定濃度の供試物質を含む培地を調製するため、試験濃度の 10 倍濃度で供試物質を含有する培地（濃縮試験用培地）を、動物細胞及び一定量の培地を入れたウェルに添加した。供試物質の濃縮試験用培地は、以下の手順により、試験の直前に調製した。

アゴニスト検出系試験では、供試物質の一次原液を試験濃度の 1,000 倍濃度となるように助剤で希釈し、それを培地に 1 mL 当たり 0.010 mL 添加した試験濃度の 10 倍の供試物質及び 1.0% (v/v) の助剤を含む培地を濃縮試験用培地とした。陰性対照については、助剤のみを 1.0% (v/v) の濃度で添加した培地を濃縮試験用培地とした。アンタゴニスト検出系試験では、試験濃度の 1,000 倍濃度となるように助剤で希釈した供試物質及び共添加する陽性物質の一次原液を培地に 1 mL 当たり 0.010 mL ずつ添加した試験濃度の 10 倍の供試物質、陽性物質及び 2.0% (v/v) の助剤を含む培地を濃縮試験用培地とし、助剤のみを 2.0% (v/v) の濃度で添加した培地を陰性対照の濃縮試験用培地とした。

(2) 動物細胞の継代培養

レポータージーン試験で宿主として用いる動物細胞株（ヒト胎児腎細胞 293 株（HEK293）、ヒト肝癌由来細胞（HepG2）又はチャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO））は、それぞれ試験に必要な細胞数を得るために、凍結保存されていた株を融解したものを 100 mm ディッシュで継代培養した。

(3) 動物細胞へのベクターの導入及び試験対象物質による暴露

メダカ ER α レポータージーン試験、メダカ AR β レポータージーン試験、ニシツメガエル TR β レポータージーン試験、ミジンコ EcR レポータージーン試験及びミジンコ JhR レポータージーン試験の条件を表 2-5-1 に示した。

各レポータージーン試験では、それぞれ以下の手順により、各種ベクターを動物細胞へ導入し、試験対象物質へ暴露した。

メダカ ER α レポータージーン試験

継代培養した動物細胞 HEK293 を 7.0×10^4 cells/mL の密度で懸濁させた培地を試験容器のウェルに 0.200 mL (1.4×10^4 cells/well) ずつ分注した。動物細胞を播種したマイクロプレートは、温度を 37℃、CO₂ 濃度を 5% に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した。24 時間後、培養した動物細胞の状態に問題がないことを確認してから、各ウェルに、受容体(メダカ ER α) 発現ベクター (5 ng の medaka ERalpha/pcDNA3.1)、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に ER 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター (10 ng の ERE-TK-Luc)、恒常的にウミシイタケルシフェラーゼを発現するコントロールベクター (20 ng の pRL-TK-Rluc) 及び 0.0006 mL のトランスフェクション試薬 FuGENE® 6 (プロメガ株式会社) を含む培地 0.020 mL を添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置して、3 種類のベクターを動物細胞内に導入(トランスフェクション)した。ベクターの導入後、プレートデザイン(マイクロプレート内の供試物質の各濃度区及び陰性対照の配置) に応じて、各ウェルに供試物質又は陰性対照の濃縮試験用培地を 0.0244 mL ずつ添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 40 時間静置(暴露)した。

メダカ AR β レポータージーン試験

継代培養した動物細胞 HepG2 を 7.0×10^4 cells/mL の密度で懸濁させた培地を試験容器のウェルに 0.200 mL (1.4×10^4 cells/well) ずつ分注した。動物細胞を播種したマイクロプレートは、温度を 37℃、CO₂ 濃度を 5% に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した。24 時間後、培養した動物細胞の状態に問題がないことを確認してから、各ウェルに、受容体(メダカ AR β) 発現ベクター (40 ng の medaka ARbeta/pcDNA3.1)、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に AR 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター (80 ng の ARE-MMTV-Luc)、恒常的にウミシイタケルシフェラーゼを発現するコントロールレポーターベクター (20 ng の pRL-TK-Rluc) 及び 0.0012 mL のトランスフェクション試薬 FuGENE® HD (プロメガ株式会社) を含む培地 0.020 mL を添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置して、3 種類のベクターを動物細胞内に導入した。ベクターの導入後、プレートデザインに応じて、各ウェルに供試物質又は陰性対照の濃縮試験用培地を 0.0244 mL ずつ添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 40 時間静置(暴露)した。

ニシツメガエル TR β レポータージーン試験

継代培養した動物細胞 HEK293 を 7.0×10^4 cells/mL の密度で懸濁させた培地を試験容器のウェルに 0.200 mL (1.4×10^4 cells/well) ずつ分注した。動物細胞を播種したマイクロプレートは、温度を 37℃、CO₂ 濃度を 5% に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間

静置した。24 時間後、培養した動物細胞の状態に問題がないことを確認してから、各ウェルに、受容体（ニシツメガエル TR β ）発現ベクター（40 ng の tropicalis TR beta/pcDNA3.1）、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に TR 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター（80 ng の TRE-minP-Luc）、恒常的にウミシイタケルシフェラーゼを発現するコントロールレポーターベクター（20 ng の pRL-TK-Rluc）及び 0.0006 mL のトランスフェクション試薬 FuGENE® 6（プロメガ株式会社）を含む培地 0.020 mL を添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置して、3 種類のベクターを動物細胞内に導入した。ベクターの導入後、プレートデザインに応じて、各ウェルに供試物質又は陰性対照の濃縮試験用培地を 0.0244 mL ずつ添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 40 時間静置（暴露）した。

ミジンコ EcR レポーター遺伝子試験

継代培養した動物細胞 CHO を 2.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁させた培地を試験容器のウェルに 0.200 mL (5.0×10^3 cells/well) ずつ分注した。動物細胞を播種したマイクロプレートは、温度を 37°C、CO₂ 濃度を 5% に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した。24 時間後、培養した動物細胞の状態に問題がないことを確認してから、各ウェルに、受容体（ミジンコ EcR）発現ベクター（6 ng の D. magna EcR/pBIND（恒常的にウミシイタケルシフェラーゼを発現するコントロールレポーターベクターを兼ねる）、6 ng の pACT-dapUSP(LBD) 及び 20 ng の pACT-droTaiman(LXXLL)）、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む試験レポーターベクター（60ng の pG5-Luc）及び 0.0006 mL のトランスフェクション試薬 FuGENE® HD（プロメガ株式会社）を含む培地 0.020 mL を添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置して、4 種類のベクターを動物細胞内に導入した。ベクターの導入後、プレートデザインに応じて、各ウェルに供試物質又は陰性対照の濃縮試験用培地を 0.0244 mL ずつ添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 40 時間静置（暴露）した。

ミジンコ JhR レポーター遺伝子試験

継代培養した動物細胞 CHO を 2.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁させた培地を試験容器のウェルに 0.200 mL (5.0×10^3 cells/well) ずつ分注した。動物細胞を播種したマイクロプレートは、温度を 37°C、CO₂ 濃度を 5% に設定した CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した。24 時間後、培養した動物細胞の状態に問題がないことを確認してから、各ウェルに受容体（JhR）発現ベクター（40 ng の pcDNA-Met 及び 40 ng の pcDNA-SRC）、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に JhR 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター（80 ng の pTcJHRE-Luc）、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に TR 応答エレメントを組み込んだ試験レポーターベクター（20 ng の pRL-TK-Rluc）及び 0.0012 mL のトランスフェクション試薬 FuGENE® HD（プロメガ株式会社）を含む培地 0.020 mL を添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 4 時間静置して、4 種類のベクターを動物細胞内に導入した。ベクターの導入後、プレートデザインに応じて、各ウェルに供試物質又は陰性対照の濃縮試験用培地を 0.0244 mL ずつ添加し、さらに CO₂ インキュベータ内で 40 時間静置（暴露）した。

(4) ルシフェリン発光の強度測定

供試物質への 40 時間の暴露終了後、マイクロプレートごとに各ウェル内のホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼに依存するホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度を以下の手順により測定した。

各ウェルについて、動物細胞を吸引しないように注意して培地を除去してから、りん酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) を 0.100 mL ずつ添加し、細胞等を洗浄した。りん酸緩衝生理食塩水を除去後、Passive Lysis Buffer (プロメガ株式会社) を純水で 1:4 (v/v) で希釈した細胞溶解試薬を各ウェルに 0.050 mL ずつ添加し、プレートシェーカーで 15 分間、連続振とうして、ウェル内の動物細胞を溶解させた。各ウェルの細胞溶解液を 0.010 mL ずつ 96 穴ホワイต์マイクロプレートに分取し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (プロメガ株式会社) により、ホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度を製品付属のプロトコルに従い、ルミノメーター (TriStar LB941、Berthold Technology) で測定した。

表 2-5-1 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°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 (1×10^{-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°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 (5×10^{-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)

表 2-5-1 (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°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)
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	5.0×10^3 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°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)	
助剤及び添加濃度	DMSO (0.1% v/v)	

2-6 データの解析方法

レポータージーン試験で測定したホタルルシフェリン及びウミシイタケルシフェリンの発光強度に基づいて、アゴニスト検出系試験では、試験に用いたホルモン受容体に対する転写活性化(アゴニスト作用)の有無及び影響濃度、アンタゴニスト検出系試験では、試験に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(アンタゴニスト作用)の有無及び影響濃度を解析した。ただし、試験後の動物細胞の状態又はコントロールベクター由来のウミシイタケルシフェリンの発光強度から試験対象物質の毒性影響が示唆された試験濃度から得られたデータは影響濃度の解析には使用しなかった。

(1) 転写活性化倍率の算出

アゴニスト検出系試験及びアンタゴニスト検出系試験ともに、以下の手順により、マイクロプレート(試験容器)ごとに各ウェルの転写活性化倍率を算出した。

ウェルごとにホタルルシフェラーゼの発光強度をウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で除した値(相対発光強度)を算出した。陰性対照については、同一マイクロプレート内の5ウェルの平均値(平均相対強度)を算出した。陰性対照を含むすべてのウェルについて、相対発光強度を陰性対照の平均相対発光強度で除した値を転写活性化倍率とした。

(2) 影響濃度の推定

アゴニスト検出系試験

試験の結果、少なくとも試験最高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、 EC_{50} (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 PC_{10} (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。 EC_{50} 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、解析ソフト GraphPad Prism(GraphPad Software)を用いて、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 EC_{50} が試験最高濃度より高濃度となった場合(EC_{50} 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、 PC_{10} を算出した。 PC_{10} は、同一日に実施した陽性対照物質の EC_{50} 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。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 EC_{50} が及び PC_{10} (必要な場合)を算出した。

試験の結果、試験最高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。

アゴニスト検出系試験での EC_{50} 及び PC_{10} 推定の概念を図2-6-1に示した。

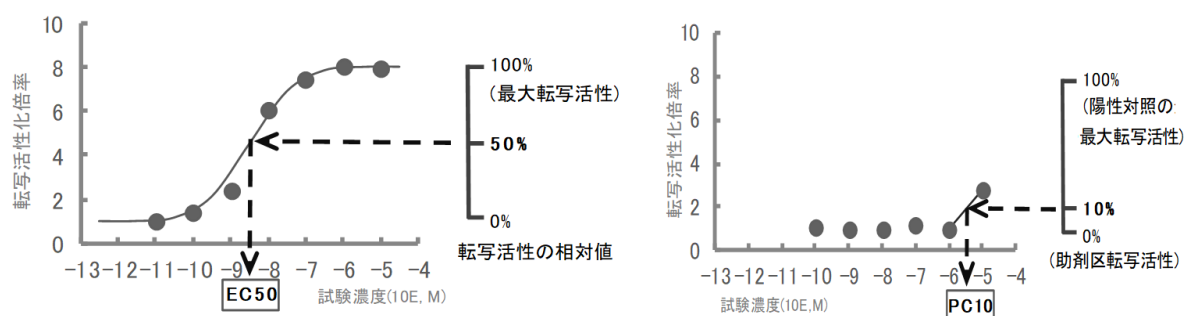


図 2-6-1 アゴニスト検出系試験での EC_{50} 及び PC_{10} 推定法 の概念

アンタゴニスト検出系試験

試験の結果、少なくとも試験最高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、 IC_{50} （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 $linIC_{30}$ （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。 IC_{50} 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、専用の解析ソフト GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて、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 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) は、当該値は採用せず、以下のとおり、 $linIC_{30}$ を算出した。 $linIC_{30}$ 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 IC_{50} 及び $linIC_{30}$ (必要な場合) を算出した。

試験の結果、試験最高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。

アンタゴニスト検出系試験での IC_{50} 及び $linIC_{30}$ 推定の概念を図 2-6-2 に示した。

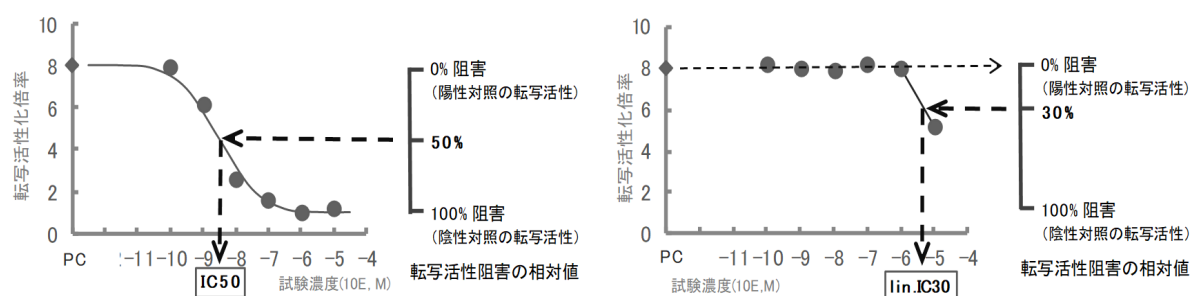


図 2-6-2 アンタゴニスト検出系試験での IC_{50} 及び $linIC_{30}$ 推定 の概念

(4) 相対活性比の算出

アゴニスト検出系試験では、 EC_{50} 又は PC_{10} が得られた試験対象物質に関して、同一日に並行して試験を実施した陽性対照物質の EC_{50} 又は PC_{10} に対する比率(%)として相対活性比(Relative potency)を算出した。同様に、アンタゴニスト検出系試験では、 IC_{50} 又は $linIC_{30}$ が得られた試験対象物質に関して、同一日に並行して試験を実施した陽性対照物質の IC_{50} 又は $linIC_{30}$ に対する比率(%)として相対活性比を算出した。

(5) データの妥当性の検証

アゴニスト検出系試験において、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される結果が得られた試験対象物質については、再度、試験(追試験)を実施して、結果の妥当性(再現性)を確認した。また、アンタゴニスト検出系試験において、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される結果が得られた試験対象物質についても、同様に、追試験を実施して、結果の妥当性(再現性)を確認した。追試験では、より適切に影響濃度が推定できるように、必要に応じて、試験濃度の範囲や公比を調整した。追試験の結果、1 回目の試験と同様の影響濃度が得られた場合には、結果に再現性が認められると判断した。追試験において、1 回目の試験と異なる結果が得られた場合には、再度、追試験(追々試験)を実施し、3 回の試験のうち 2 回に共通する結果を試験対象物質の試験結果とした。追試験を実施した試験対象物質の影響濃度については、原則として 1 回目の試験から得られた結果を採用したが、追試験を異なる設定濃度で実施した場合には、線形回帰モデルへの適合度等も考慮して採用する影響濃度を決定した。

2-7 試験の有効性

本業務では、過年度に環境省が実施した検討結果及び EXTEND2010 に基づく平成 24 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での検討結果を踏まえて、アゴニスト検出系試験及びアンタゴニスト検出系試験それぞれに関して、以下の基準を満たす場合に、試験が妥当かつ適正に実施されたと判断した。実施した試験が、以下の基準を満たさなかった場合、当該試験は無効とし、新たに試験(再試験)を実施した。

アゴニスト検出系試験

同一日に並行して実施した陽性対照物質での試験における最大転写活性化倍率(線形回帰モデルによる推定値)が 4 以上であること。

アンタゴニスト検出系試験

同一マイクロプレート(試験容器)の陽性対照(共添加物質のみ添加した系)における転写活性化倍率(5 ウェルの平均値)が 3 以上であること。

3. 結果

3-1 メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験

(1) エストロゲン作用

メダカ ER α レポータージーン試験から得られた試験対象物質のエストロゲン作用に関する影響濃度を表 3-1-1 に取りまとめた。

メダカ ER α レポータージーン試験の結果、ブチルパラベン、ビスフェノール S、フタル酸ブチルベンジル及びイソブチルパラベンに関して、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、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た。エストロゲン作用に関する影響濃度として、ビスフェノール S 及びイソブチルパラベンについては 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は PC₁₀ (1.6×10^{-6} M 及び 3.5×10^{-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 0.00041% であった。フタル酸ジシクロヘキシル、ジベンゾチオフェン、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、チウラム及び過塩素酸については、試験濃度範囲においてメダカ ER α に対する転写活性化作用(転写活性化倍率の有意な上昇)は認められず、エストロゲン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰により EC₅₀ が得られた物質では最大転写活性化倍率の推定値、EC₅₀ が推定できなかった物質では並行実施した陽性対照物質での試験における最大転写活性化倍率値を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率)の関係を図 3-1-1 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-1-1 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

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 = 3.5×10^{-6} M	0.00041%
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	

(2) 抗エストロゲン作用

メダカ ER α レポーター遺伝子試験から得られた試験対象物質の抗エストロゲン作用に関する影響濃度を表 3-1-2 に取りまとめた。

メダカ ER α レポーター遺伝子試験の結果、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転写活性化倍率の有意な低下がみられ、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有することが示唆された。抗エストロゲン作用に関する影響濃度として、フタル酸ジシクロヘキシルについては 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。ブチルパラベン、ビスフェノール S、フタル酸ブチルベンジル、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、チウラム及び過塩素酸については、試験濃度範囲において、試験系に添加された陽性物質(17 β -エストラジオール)によるメダカ ER α の転写活性に対する阻害作用(転写活性化倍率の有意な低下)は認められず、抗エストロゲン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(陽性対照の転写活性化倍率(平均値)を 100%、陰性対照の転写活性化倍率(平均値)を 0%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率の相対百分率)の関係を図 3-1-2 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-1-2 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	

3-2 メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験

(1) アンドロゲン作用

メダカ AR β レポータージーン試験から得られた試験対象物質のアンドロゲン作用に関する影響濃度を表 3-2-1 に取りまとめた。

メダカ AR β レポータージーン試験の結果、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、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、チウラム及び過塩素酸に関して、試験濃度範囲においてメダカ AR β に対する転写活性化作用(転写活性化倍率の有意な上昇)は認められず、アンドロゲン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰により EC₅₀ が得られた物質では最大転写活性化倍率の推定値、EC₅₀ が推定できなかった物質では並行実施した陽性対照物質での試験における最大転写活性化倍率値を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率)の関係を図 3-2-1 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-2-1 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	

(2) 抗アンドロゲン作用

メダカ AR β レポータージーン試験から得られた試験対象物質の抗アンドロゲン作用に関する影響濃度を表 3-2-2 に取りまとめた。

メダカ AR β レポータージーン試験の結果、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、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、チウラム及び過塩素酸に関して、試験濃度範囲において、試験系に添加された陽性物質(11-ケトテストステロン)によるメダカ AR β の転写活性に対する阻害作用(転写活性化倍率の有意な低下)は認められず、抗アンドロゲン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(陽性対照の転写活性化倍率(平均値)を 100%、陰性対照の転写活性化倍率(平均値)を 0%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率の相対百分率)の関係を図 3-2-2 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-2-2 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lnIC 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	

3-3 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

(1) 甲状腺ホルモン作用

ニシツメガエル TR β レポータージーン試験から得られた試験対象物質の甲状腺ホルモン作用に関する影響濃度を表 3-3-1 に取りまとめた。

ニシツメガエル TR β レポータージーン試験の結果、TRIAC(チラトリコール)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、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、甲状腺ホルモン作用に関する影響濃度として、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。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、ペルフルオロオクタノ酸、フェニトイン及び 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸については、試験濃度範囲においてニシツメガエル TR β に対する転写活性化作用(転写活性化倍率の有意な上昇)は認められず、甲状腺ホルモン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰により EC₅₀ が得られた物質では最大転写活性化倍率の推定値、EC₅₀ が推定できなかった物質では並行実施した陽性対照物質での試験における最大転写活性化倍率値を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率)の関係を図 3-3-1 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-3-1 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)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	

(2) 抗甲状腺ホルモン作用

ニシツメガエル TR β レポータージーン試験から得られた試験対象物質の抗甲状腺ホルモン作用に関する影響濃度を表 3-3-2 に取りまとめた。

ニシツメガエル TR β レポータージーン試験の結果、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転写活性化倍率の有意な低下がみられ、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有することが示唆され、抗甲状腺ホルモン作用に関する影響濃度として、 linIC_{30} (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。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 及びプロピザミドについては、試験濃度範囲において、試験系に添加された陽性物質(トリヨードサイロニン)によるニシツメガエル TR β の転写活性に対する阻害作用(転写活性化倍率の有意な低下)は認められず、抗甲状腺ホルモン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(陽性対照の転写活性化倍率(平均値)を 100%、陰性対照の転写活性化倍率(平均値)を 0%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率の相対百分率)の関係を図 3-3-2 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-3-2 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

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	

3-4 ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験

ミジンコ EcR レポータージーン試験から得られた試験対象物質の脱皮ホルモン作用に関する影響濃度を表 3-4-1 に取りまとめた。

ミジンコ EcR レポータージーン試験の結果、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(脱皮ホルモン作用)を有することが示唆され、脱皮ホルモン作用に関する影響濃度として、PC₁₀(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。ベンゾフェノン-3 については、試験濃度範囲においてミジンコ EcR に対する転写活性化作用(転写活性化倍率の有意な上昇)は認められず、脱皮ホルモン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰により EC₅₀ が得られた物質では最大転写活性化倍率の推定値、EC₅₀ が推定できなかった物質では並行実施した陽性対照物質での試験における最大転写活性化倍率値を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率)の関係を図 3-4-1 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-4-1 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-メトキシケイ皮酸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	

3-5 ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験

ミジンコ JhR レポータージーン試験から得られた試験対象物質の幼若ホルモン作用に関する影響濃度を表 3-5-1 に取りまとめた。

ミジンコ JhR レポータージーン試験の結果、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、EC₅₀ (9.0×10^{-8} M) が得られた。また、その陽性対照物質(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。アトラジン及びカルバマゼピンについては、試験濃度範囲においてミジンコ JhR に対する転写活性化作用(転写活性化倍率の有意な上昇)は認められず、幼若ホルモン作用に関する影響濃度は得られなかった。

各試験対象物質に関して、試験における試験濃度と転写活性率(助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰により EC₅₀ が得られた物質では最大転写活性化倍率の推定値、EC₅₀ が推定できなかった物質では並行実施した陽性対照物質での試験における最大転写活性化倍率値を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率)の関係を図 3-5-1 に示した。また、各試験における試験濃度と転写活性化倍率の関係を付属資料 4、発光強度比及び転写活性比の測定値を付属資料 5 に示した。

表 3-5-1 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	

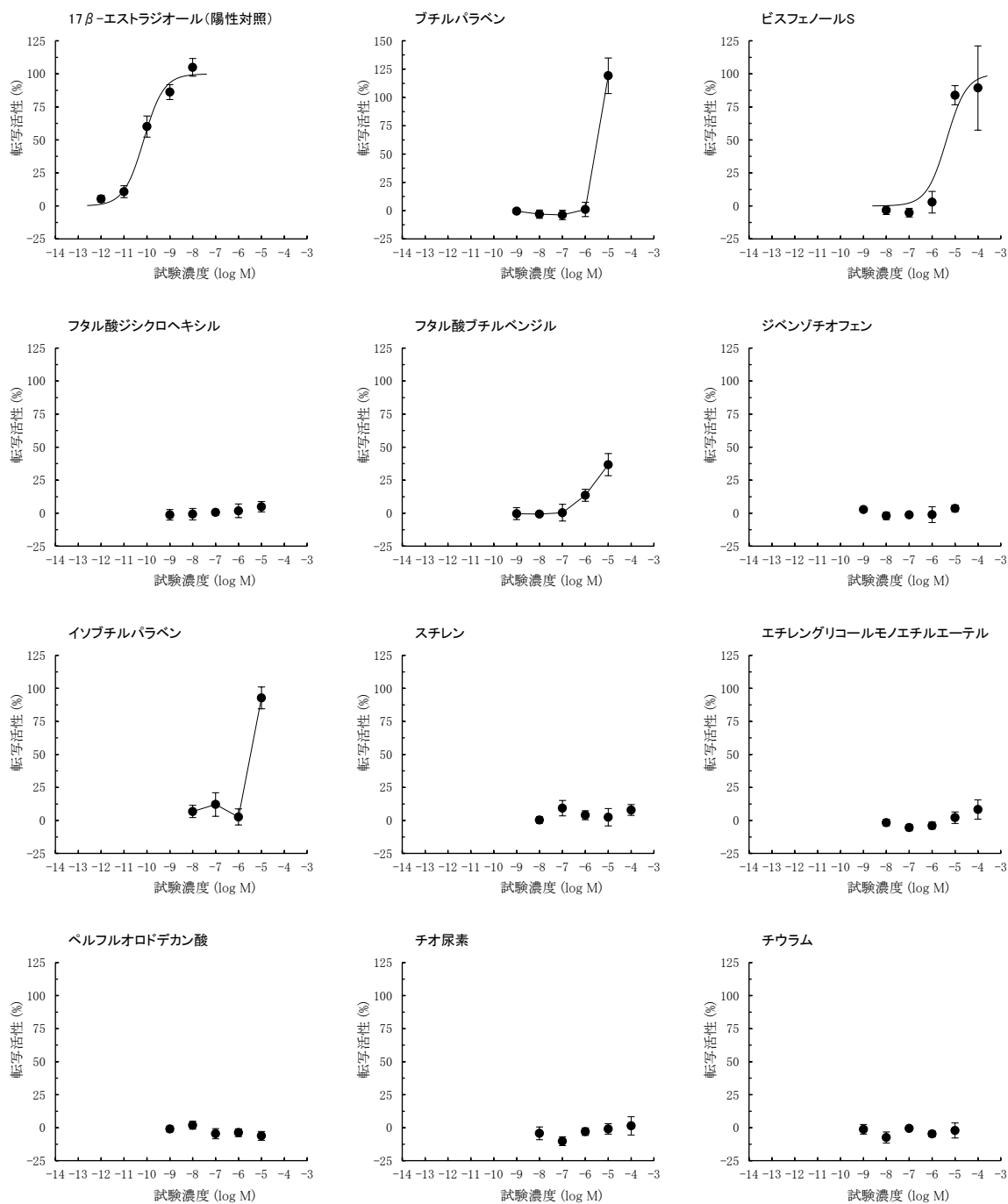


図 3-1-1 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)結果

注) 転写活性(%)は、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰による最大転写活性化倍率の推定値(EC₅₀ が推定できなかった試験対象物質では、並行して実施した陽性対照物質の試験で得られた値)を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率を示す。

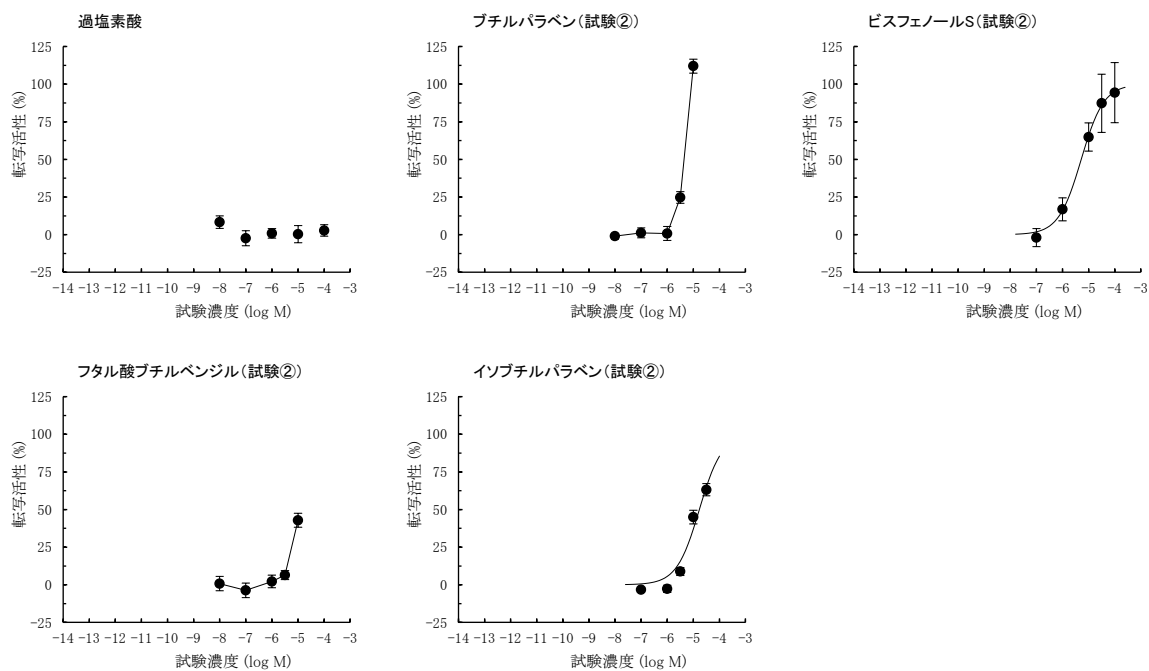


図 3-1-1 (つづき)

注) 転写活性(%)は、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰による最大転写活性化倍率の推定値 (EC_{50} が推定できなかった試験対象物質では、並行して実施した陽性対照物質の試験で得られた値)を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率を示す。

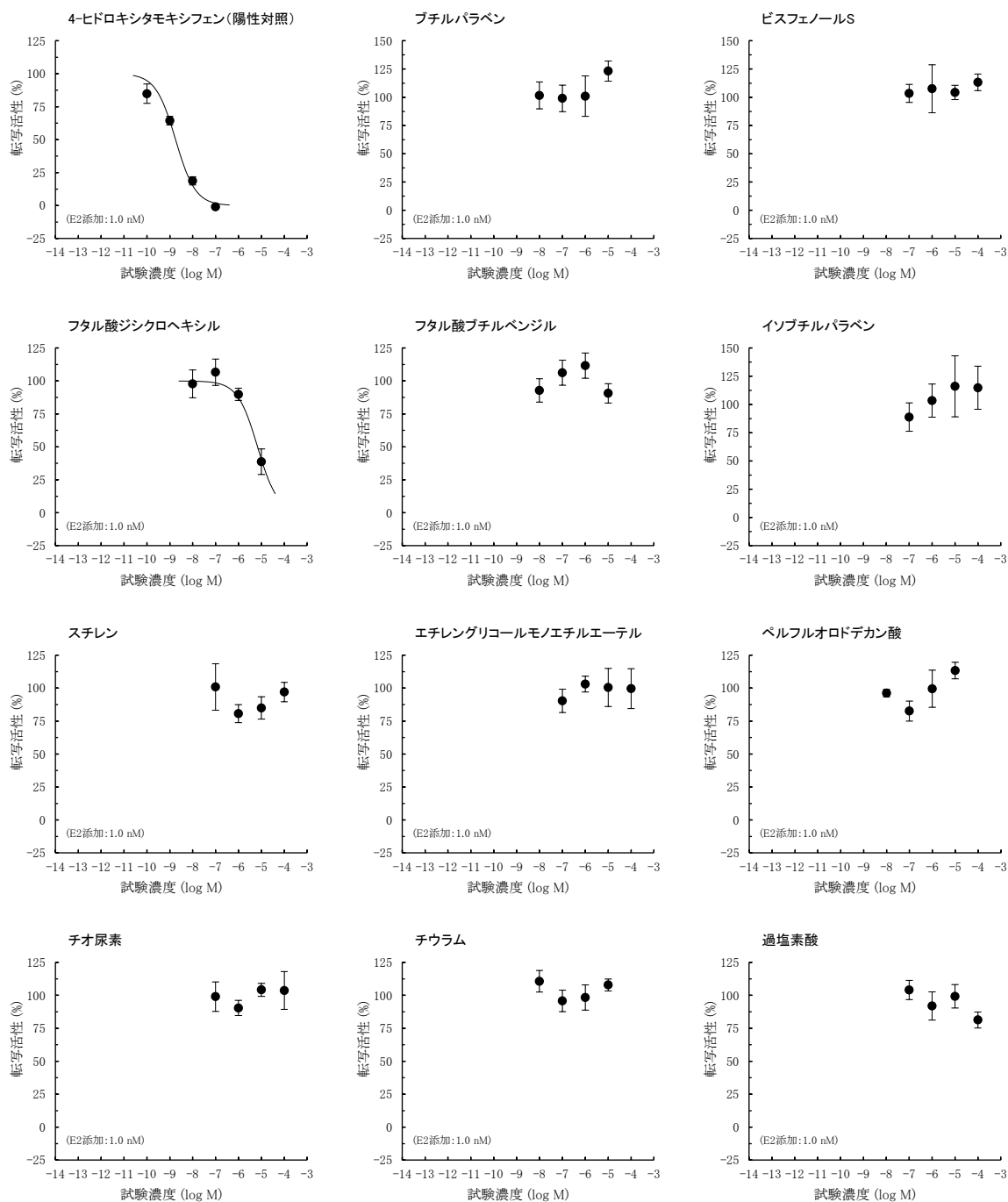


図 3-1-2 メダカ ER α レポーター遺伝子試験(抗エストロゲン作用)結果

注) 転写活性(%)は、陽性対照の転写活性化倍率(平均値)を100%、陰性対照の転写活性化倍率(平均値)を0%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率の相対百分率を示す。

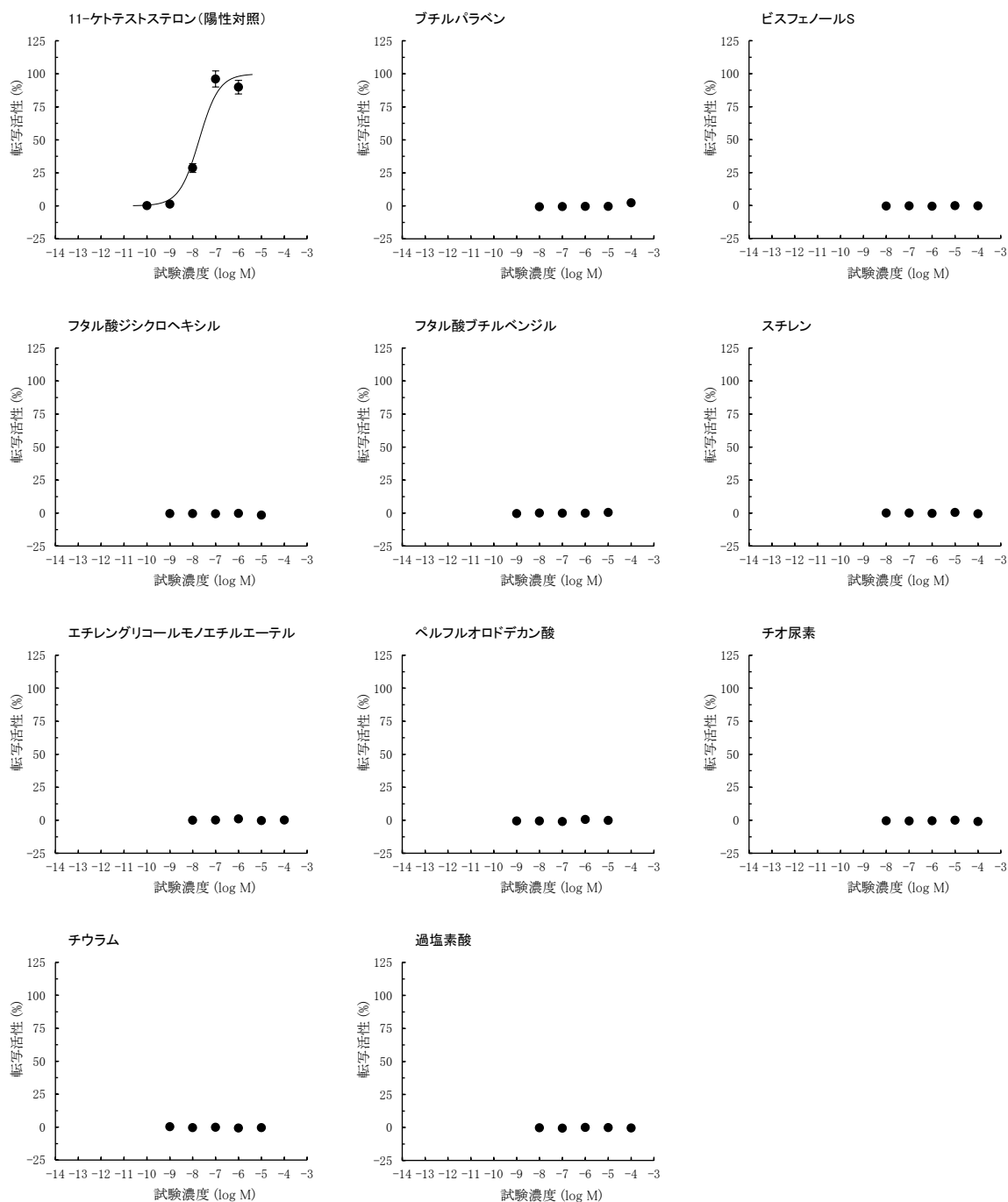


図 3-2-1 メダカ AR β レポータージーン試験(アンドロゲン作用)結果

注) 転写活性(%)は、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰による最大転写活性化倍率の推定値 (EC_{50} が推定できなかった試験対象物質では、並行して実施した陽性対照物質の試験で得られた値)を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率を示す。

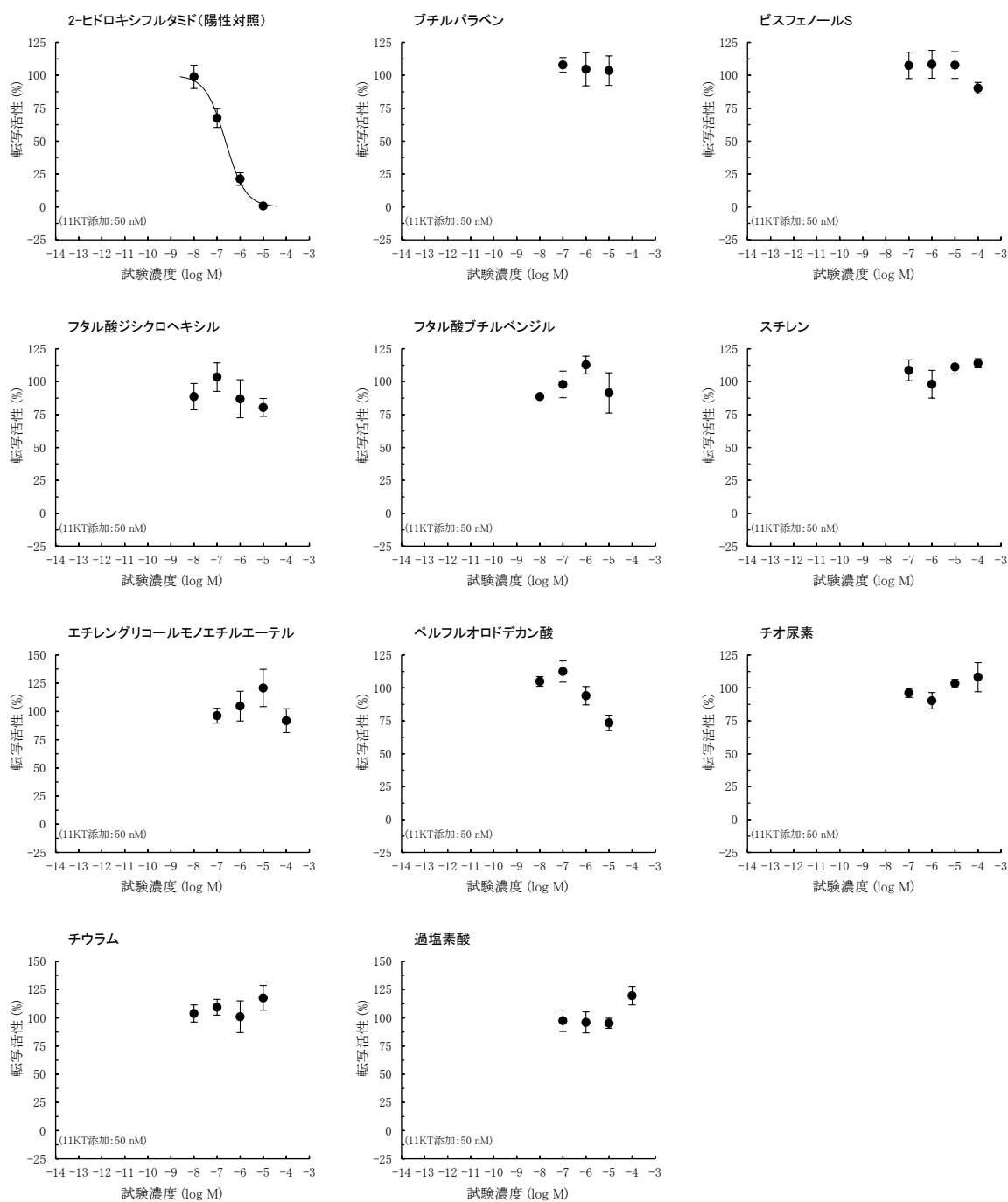


図 3-2-2 メダカ AR β レポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用) 結果

注) 転写活性 (%) は、陽性対照の転写活性化倍率 (平均値) を 100%、陰性対照の転写活性化倍率 (平均値) を 0% とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率の相対百分率を示す。

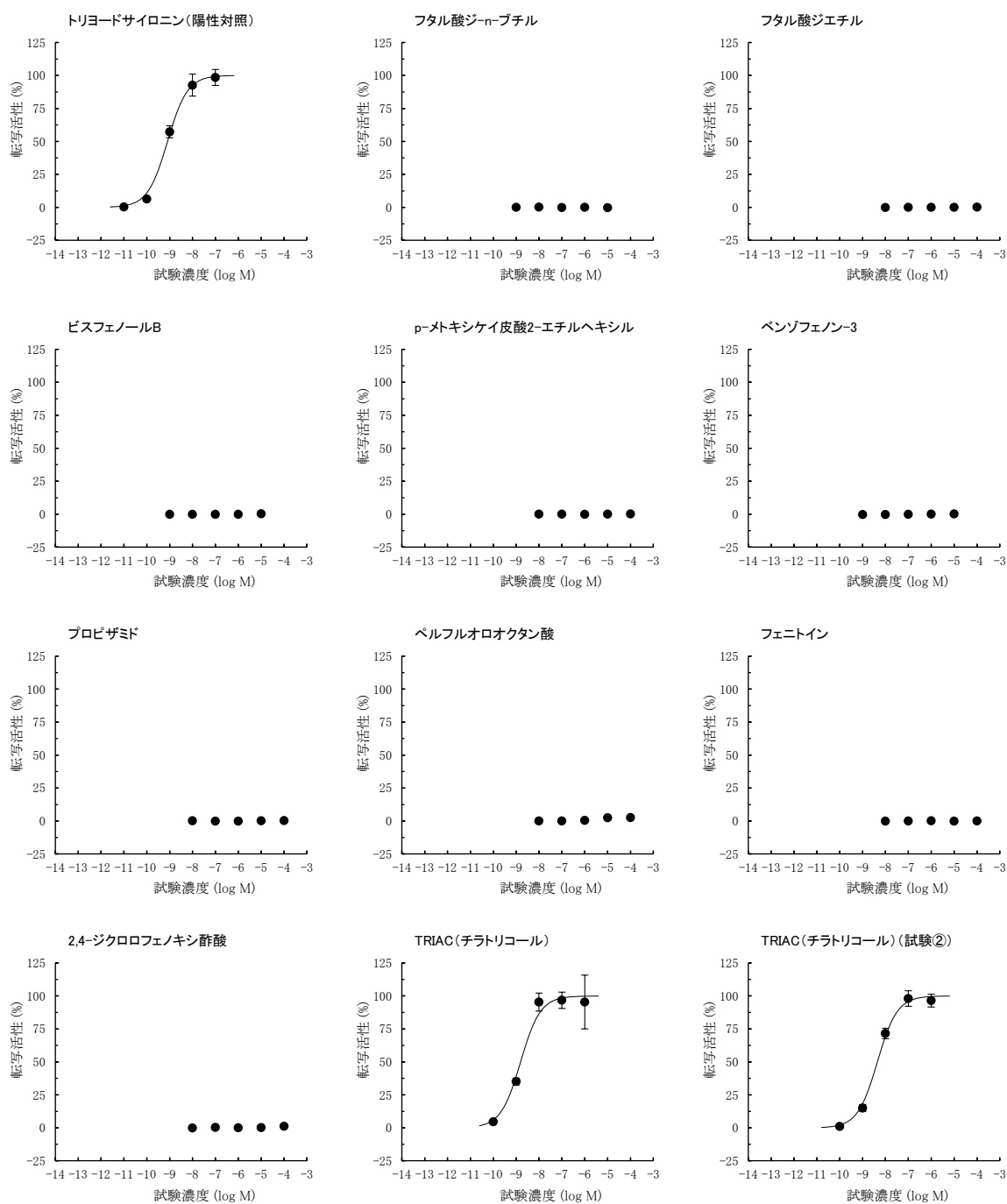


図 3-3-1 ニシツメガエル $TR\beta$ レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)結果

注) 転写活性(%)は、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰による最大転写活性化倍率の推定値(EC_{50} が推定できなかった試験対象物質では、並行して実施した陽性対照物質の試験で得られた値)を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率を示す。

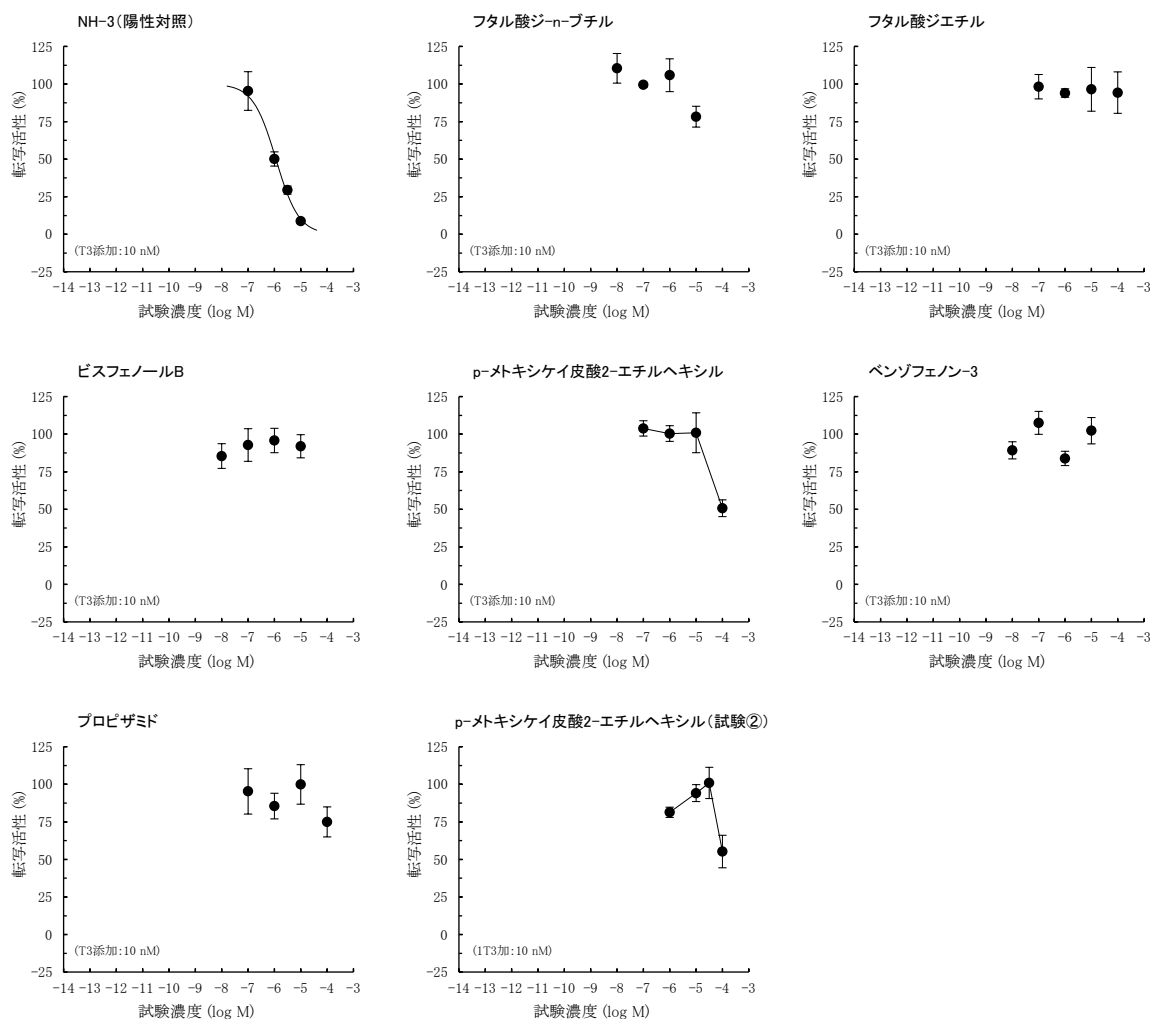


図 3-3-2 ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン作用) 結果

注) 転写活性 (%) は、陽性対照の転写活性化倍率 (平均値) を 100%、陰性対照の転写活性化倍率 (平均値) を 0% とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率の相対百分率を示す。

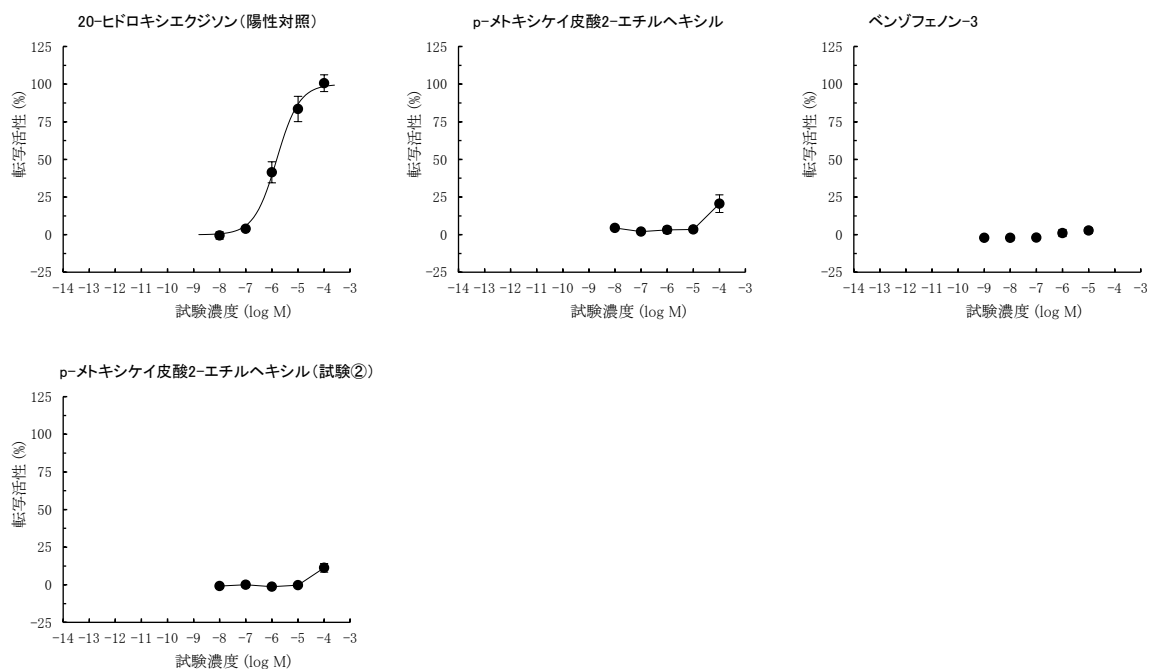


図 3-4-1 ミジンコ EcR レポーター遺伝子試験(脱皮ホルモン作用)結果

注) 転写活性(%)は、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰による最大転写活性化倍率の推定値 (EC_{50} が推定できなかった試験対象物質では、並行して実施した陽性対照物質の試験で得られた値)を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率を示す。

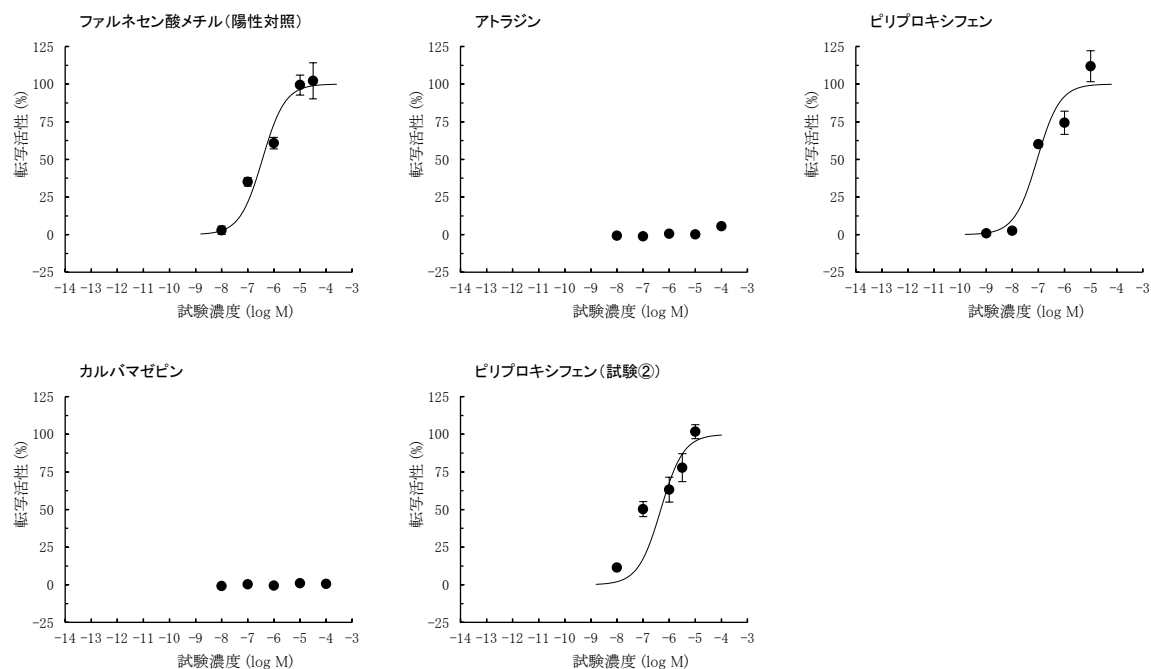


図 3-5-1 ミジンコ JhR レポーター遺伝子試験(幼若ホルモン作用)結果

注) 転写活性(%)は、助剤対照の転写活性化倍率を 0%、非線形回帰による最大転写活性化倍率の推定値 (EC_{50} が推定できなかった試験対象物質では、並行して実施した陽性対照物質の試験で得られた値)を 100%とした場合の各試験濃度における転写活性化倍率(平均値)の相対百分率を示す。

III. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告

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)に関して、以下の環境省が開催した EXTEND2022 に基づく会議に提出するための資料を作成するとともに、同会議に出席して本業務で実施した試験の結果の報告等を行った。

会議名：令和7年度第2回内分泌かく乱作用に係る生態影響評価検討班会議

開催日：令和8年3月11日

参考文献

いであ株式会社(2011):平成22年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英・日米二国間協力及びOECD等への国際協力推進に係る業務. 業務報告書.

いであ株式会社(2017):平成28年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英・日米二国間協力及びOECD等への国際協力推進に係る業務. 業務報告書.

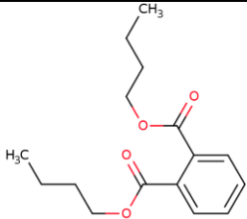
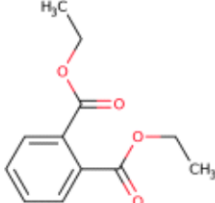
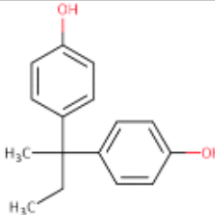
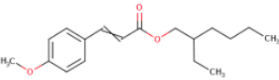
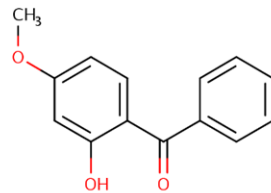
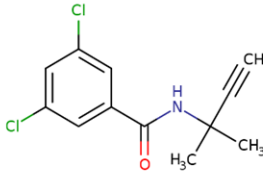
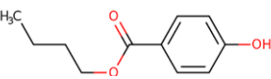
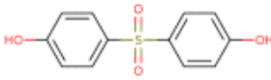
いであ株式会社(2024):令和5年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験管内試験(4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル他11物質)実施業務. 報告書.

OECD(2021):Test Guideline No. 455, Performance-based test guideline for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists and antagonists. OECD Guideline for the testing of chemicals.

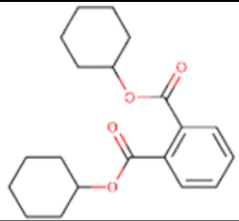
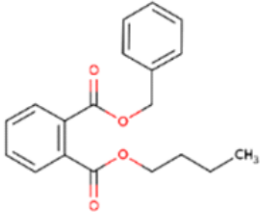
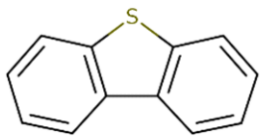
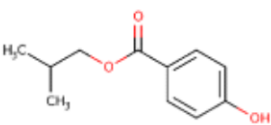
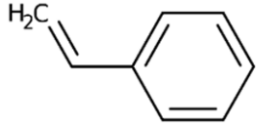
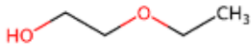
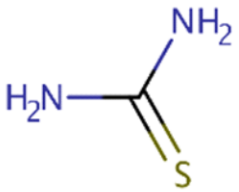
OECD(2023):Test Guideline No. 458, Stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals. OECD Guideline for the testing of chemicals.

付属資料

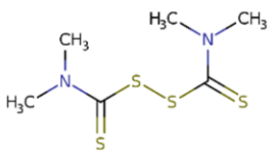
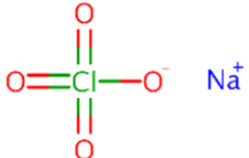
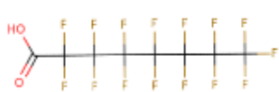
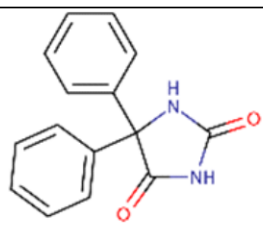
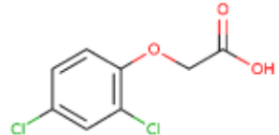
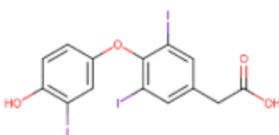
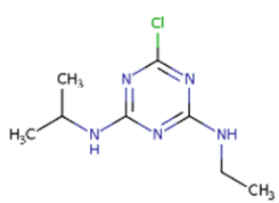
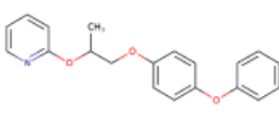
付属資料 1 試験対象物質の物理化学的性状等

(1) フタル酸ジ-n-ブチル		
CAS番号	84-74-2	
分子式	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	
分子量	278.348	
水溶解度	3.55 x10 ⁻⁵ to 5.25 x10 ⁻⁵ mol/L (Experimental)	
(2) フタル酸ジエチル		
CAS番号	84-66-2	
分子式	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	
分子量	222.24	
水溶解度	2.63 x10 ⁻³ to 4.90 x10 ⁻³ mol/L (Experimental)	
(3) ビスフェノールB		
CAS番号	77-40-7	
分子式	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	
分子量	242.318	
水溶解度	2.20 x10 ⁻⁴ to 1.05 x10 ⁻³ mol/L (Predicted)	
(4) p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル		
CAS番号	5466-77-3	
分子式	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	
分子量	290.403	
水溶解度	1.41 x10 ⁻⁷ to 1.67 x10 ⁻⁶ mol/L (Experimental)	
(5) ベンゾフェノン-3		
CAS番号	131-57-7	
分子式	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	
分子量	228.247	
水溶解度	1.31 x10 ⁻⁵ to 5.61 x10 ⁻⁴ mol/L (Experimental)	
(6) プロピザミド		
CAS番号	23950-58-5	
分子式	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	
分子量	256.13	
水溶解度	3.52 x10 ⁻⁵ to 5.89 x10 ⁻⁵ mol/L (Experimental)	
(7) ブチルパラベン		
CAS番号	94-26-8	
分子式	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	
分子量	194.23	
水溶解度	7.93 x10 ⁻⁴ to 1.91x10 ⁻³ mol/L (Experimental)	
(8) ビスフェノールS		
CAS番号	80-09-1	
分子式	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S	
分子量	250.27	
水溶解度	4.40x10 ⁻³ mol/L (Experimental)	

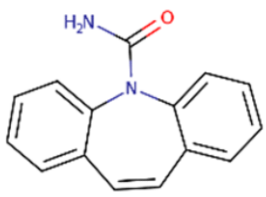
付属資料 1 (つづき)

(9) フタル酸ジシクロヘキシル		
CAS番号	84-61-7	
分子式	$C_{20}H_{26}O_4$	
分子量	330.424	
水溶解度	3.07×10^{-6} to 1.21×10^{-5} mol/L (Experimental)	
(10) フタル酸ブチルベンジル		
CAS番号	85-68-7	
分子式	$C_{19}H_{20}O_4$	
分子量	312.365	
水溶解度	2.14×10^{-6} to 9.28×10^{-6} mol/L (Experimental)	
(11) ジベンゾチオフェン		
CAS番号	132-65-0	
分子式	$C_{12}H_8S$	
分子量	184.26	
水溶解度	6.17×10^{-6} to 4.17×10^{-5} mol/L (Experimental)	
(12) イソブチルパラベン		
CAS番号	4247-02-3	
分子式	$C_{11}H_{14}O_3$	
分子量	194.23	
水溶解度	1.48×10^{-3} to 2.90×10^{-3} (Predicted)	
(13) スチレン		
CAS番号	100-42-5	
分子式	C_8H_8	
分子量	104.152	
水溶解度	1.51×10^{-3} to 3.26×10^{-3} mol/L (Experimental)	
(14) エチレングリコールモノエチルエーテル		
CAS番号	110-80-5	
分子式	$C_4H_{10}O_2$	
分子量	90.122	
水溶解度	11.1 to 11.2 mol/L (Experimental)	
(15) ペルフルオロドデカン酸		
CAS番号	307-55-1	
分子式	$C_{12}HF_{23}O_2$	
分子量	614.101	
水溶解度	8.47×10^{-7} mol/L (Experimental)	
(16) チオ尿素		
CAS番号	62-56-6	
分子式	CH_4N_2S	
分子量	76.12	
水溶解度	0.394 to 2.19 mol/L (Experimental)	

付属資料 1 (つづき)

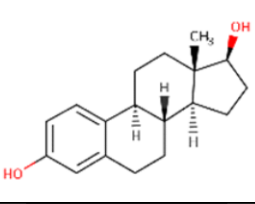
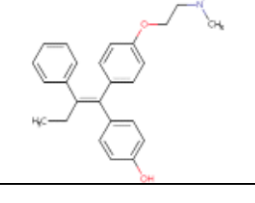
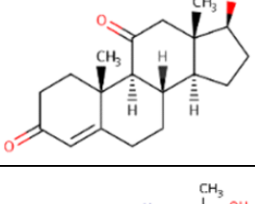
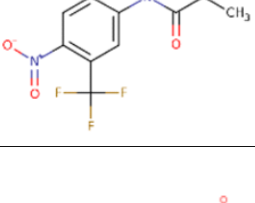
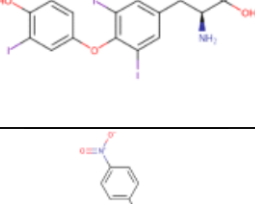
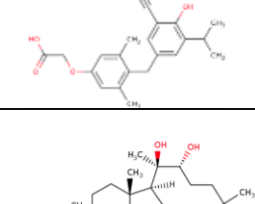
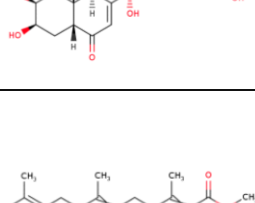
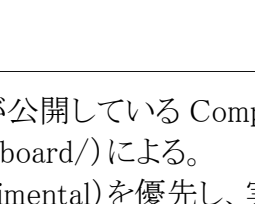
(17) チウラム		
CAS番号	137-26-8	
分子式	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄	
分子量	240.42	
水溶解度	6.85x10 ⁻⁵ to 1.26x10 ⁻⁴ mol/L (Experimental)	
(18) 過塩素酸ナトリウム		
CAS番号	7601-89-0	
分子式	ClNaO ₄	
分子量	122.44	
水溶解度	1.71x10 ⁻² mol/L (Experimental)	
(19) ペルフルオロオクタン酸		
CAS番号	335-67-1	
分子式	C ₈ HF ₁₅ O ₂	
分子量	414.07	
水溶解度	2.31x10 ⁻⁸ to 2.50x10 ⁻² mol/L (Experimental)	
(20) フェニトイン		
CAS番号	57-41-0	
分子式	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	
分子量	252.273	
水溶解度	7.53x10 ⁻⁵ to 2.82x10 ⁻⁴ mol/L (Experimental)	
(21) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸		
CAS番号	94-75-7	
分子式	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	
分子量	221.03	
水溶解度	2.44x10 ⁻³ to 0.105 mol/L (Experimental)	
(22) TRIAC (チラトリコール)		
CAS番号	51-24-1	
分子式	C ₁₄ H ₉ I ₃ O ₄	
分子量	621.935	
水溶解度	2.40x10 ⁻⁵ to 3.30x10 ⁻⁴ (Predicted)	
(23) アトラジン		
CAS番号	1912-24-9	
分子式	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	
分子量	215.69	
水溶解度	1.39 x10 ⁻⁴ to 3.24 x10 ⁻⁴ mol/L (Experimental)	
(24) ピリプロキシフェン		
CAS番号	95737-68-1	
分子式	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	
分子量	321.376	
水溶解度	1.15x10 ⁻⁶ mol/L (Experimental)	

付属資料 1 (つづき)

(25) カルバマゼピン		
CAS番号	298-46-4	
分子式	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	
分子量	236.274	
水溶解度	4.74 x10 ⁻⁴ to 9.73 x10 ⁻⁴ mol/L (Experimental)	

注) 上記の物理化学的性状に関する情報は、米国環境保護庁が公開している CompTox Chemicals Dashboard v2.7.0 (<https://comptox.epa.gov/dashboard/>) による。
 水溶解度のデータ(最低から最高の範囲)は、実験値 (Experimental)を優先し、実験値が登録されていない場合には推定値 (Predicted)を記載した。

付属資料 2 陽性対照物質及び共添加物質の物理化学的性状等

(1) 17β-エストラジオール		
CAS番号	50-28-2	
分子式	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	
分子量	272.388	
水溶解度	9.33 x10 ⁻⁶ to 1.66 x10 ⁻⁵ mol/L (Experimental)	
(2) 4-ヒドロキシタモキシフェン		
CAS番号	68047-06-3	
分子式	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	
分子量	387.523	
水溶解度	1.66 mol/L (Experimental)	
(3) 11-ケトテストステロン		
CAS番号	564-35-2	
分子式	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	
分子量	302.414	
水溶解度	1.22 x10 ⁻⁴ to 4.60 x10 ⁻⁴ mol/L (Predicted)	
(4) 2-ヒドロキシフルタミド		
CAS番号	52806-53-8	
分子式	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₄	
分子量	292.214	
水溶解度	8.05 x10 ⁻⁵ to 0.170 mol/L (Predicted)	
(5) トリヨードサイロニン		
CAS番号	6893-02-3	
分子式	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	
分子量	650.977	
水溶解度	6.03x10 ⁻⁶ (Experimental)	
(6) NH-3		
CAS番号	447415-26-1	
分子式	C ₂₈ H ₂₇ NO ₆	
分子量	473.525	
水溶解度	8.20x10 ⁻⁶ to 2.51x10 ⁻⁵ (Predicted)	
(7) 20-ヒドロキソエクジソン		
CAS番号	5289-74-7	
分子式	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	
分子量	480.642	
水溶解度	1.07 x10 ⁻⁴ to 5.40 x10 ⁻³ (Predicted)	
(8) ファルネセン酸メチル		
CAS番号	10485-70-8	
分子式	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	
分子量	250.382	
水溶解度	情報なし	

注) 上記の物理化学的性状に関する情報は、米国環境保護庁が公開している CompTox Chemicals Dashboard v2.7.0 (<https://comptox.epa.gov/dashboard/>) による。
 水溶解度のデータ(最低から最高の範囲)は、実験値 (Experimental) を優先し、実験値が登録されていない場合には推定値 (Predicted) を記載した。

付属資料 3 試験対象物質の細胞毒性及び培地への溶解性の検討

レポータージーン試験と同じ手順及び条件で、継代的に培養した動物細胞 (HEK293、HepG2 及び CHO) を 96 ウェルマイクロプレート (試験容器) に播種し、CO₂ インキュベータ内 (37℃、5%CO₂) で静置培養した。各試験対象物質について、所定濃度となるように、濃縮試験用培地をウェルに添加し、レポータージーン試験と同じ条件で 40 時間の暴露 (CO₂ インキュベータ内での静置培養) を行った。試験対象物質の添加濃度は 10⁻⁴~10⁻⁶ M、試験濃度当たりの繰り返し数は 3 連 (ウェル) とした。

暴露後、倒立顕微鏡下で細胞の状態及び培養液中の不溶粒子の形成等を観察した。検鏡の結果、助剤対照と比較して、死細胞又は形態に異常が認められる細胞の明らかな増加が認められた濃度及び細胞数の増加が明らかに悪い濃度については、試験対象物質の動物細胞に対する毒性 (細胞毒性) が認められる濃度と判断した。また、培地中に不溶粒子が確認された試験濃度については、試験対象物質を適切に培地へ溶解できない濃度と判断した。

上記の結果から、以下の区分に従い、細胞毒性が認められず (CT-) かつ培地に溶解可能 (IP-) と判断された最高濃度を試験における試験最高濃度 (設定濃度) とした。

CT+: 細胞毒性 (Cytotoxicity) が認められる。

CT-: 細胞毒性 (Cytotoxicity) は認められない。

IP+: 不溶粒子 (Insoluble particle) の形成が認められる。

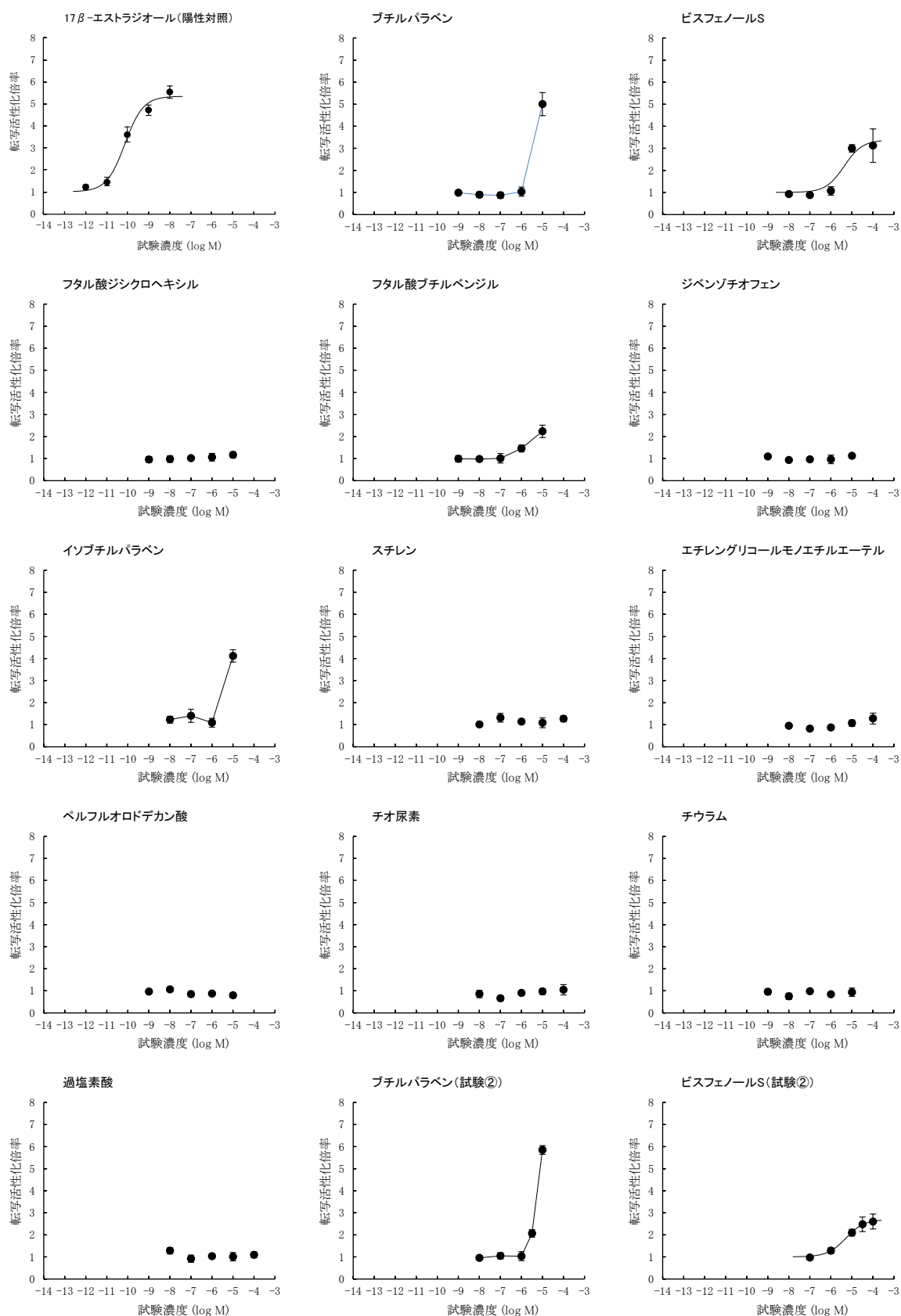
IP-: 不溶粒子 (Insoluble particle) の形成は認められない。

試験対象物質の細胞毒性及び培地への溶解性の検討結果

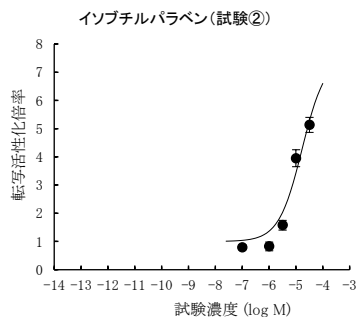
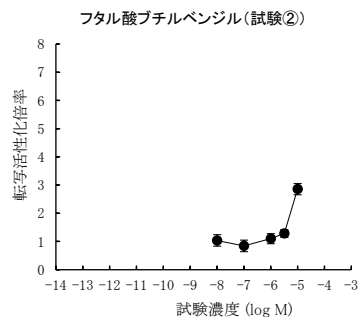
物質名	細胞株:HEK293			細胞株:HepG2			細胞株:CHO		
	1.0×10^{-4} M	1.0×10^{-5} M	1.0×10^{-6} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M	1×10^{-4} M	1×10^{-5} M	1×10^{-6} M
フタル酸ジ-n-ブチル	CT+, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
フタル酸ジエチル	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
ビスフェノールB	CT+, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-
ベンゾフェノン-3	CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-
プロピザミド	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
ブチルパラベン	CT+, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
ビスフェノールS	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
フタル酸ジシクロヘキシル	CT+, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
フタル酸ブチルベンジル	CT+, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
ジベンゾチオフェン	CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
イソブチルパラベン	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
スチレン	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
エチレングリコールモノエチルエーテル	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
ペルフルオロドデカン酸	CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
チオ尿素	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
チウラム	CT+, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT+, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
過塩素酸ナトリウム	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)		
ペルフルオロオクタノ酸	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
フェニトイン	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
TRIAC(チラトリコール)	CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-	(試験対象外)			(試験対象外)		
アトラジン	(試験対象外)			(試験対象外)			CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-
ピリプロキシフェン	(試験対象外)			(試験対象外)			CT-, IP+	CT-, IP-	CT-, IP-
カルバマゼピン	(試験対象外)			(試験対象外)			CT-, IP-	CT-, IP-	CT-, IP-

付属資料 4 レポーター遺伝子試験の結果(試験濃度と転写活性化倍率の関係)

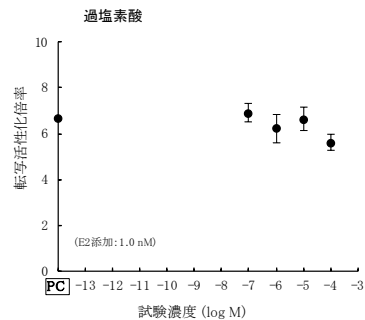
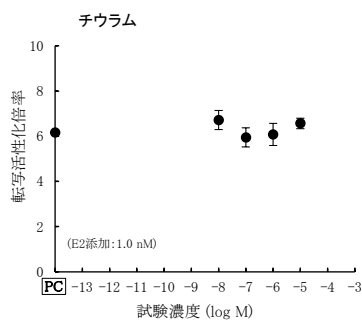
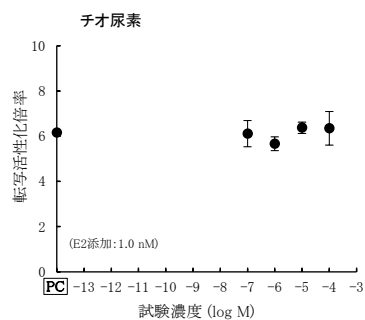
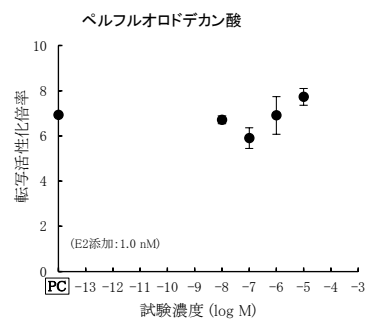
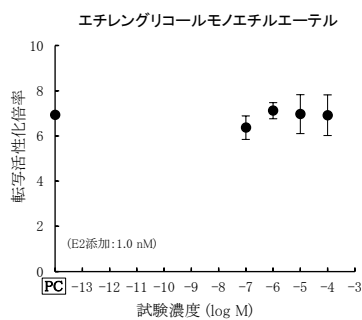
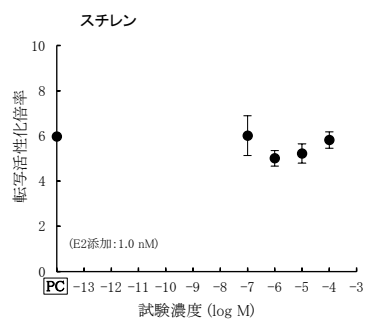
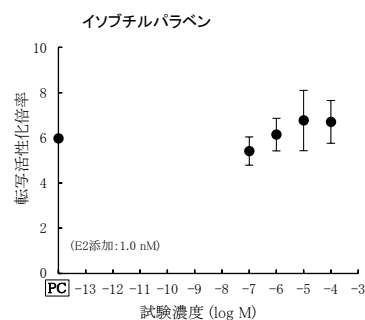
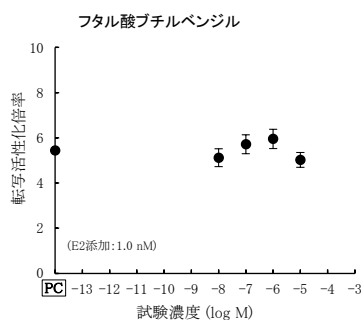
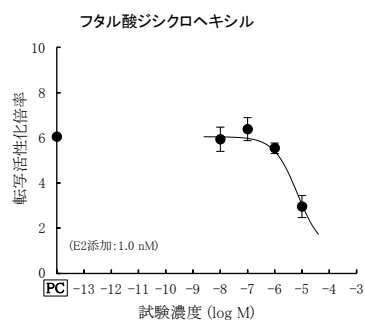
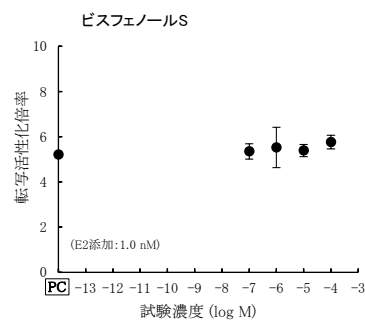
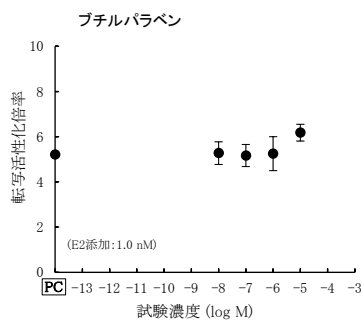
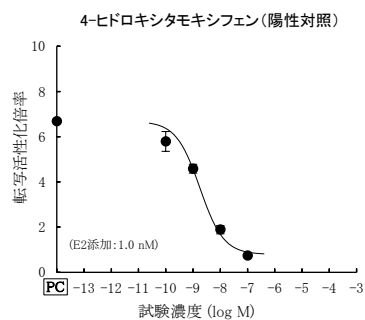
(1) メダカ ER α レポーター遺伝子試験(エストロゲン作用)



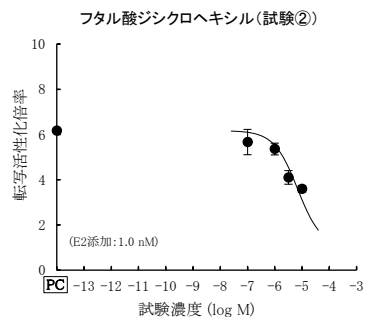
(1) (つづき)



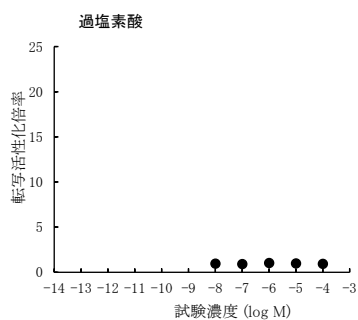
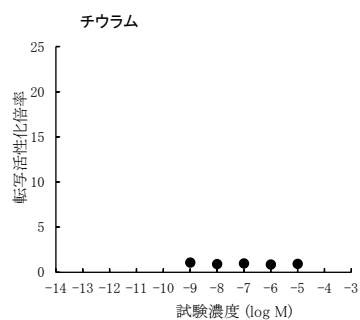
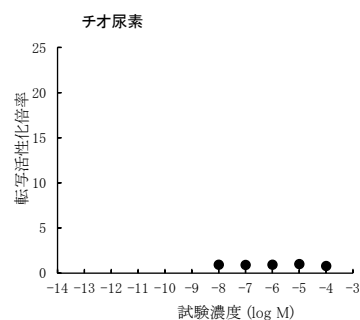
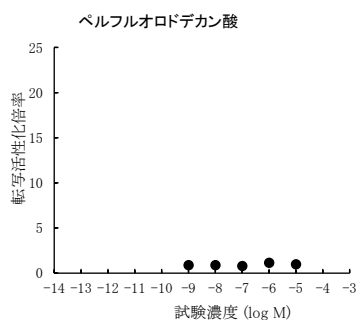
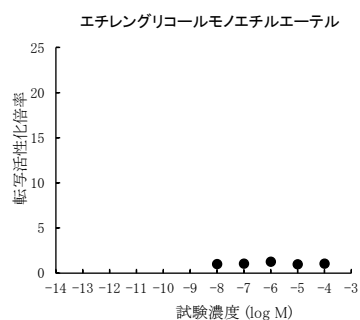
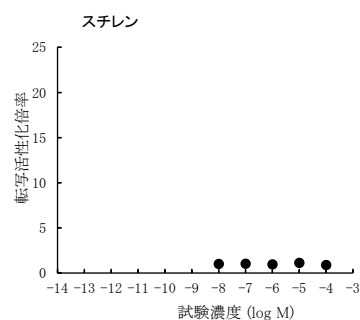
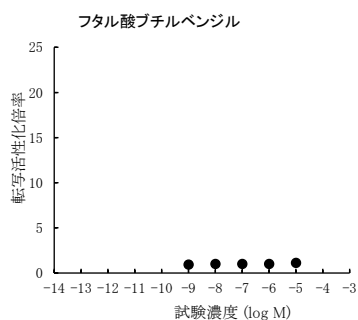
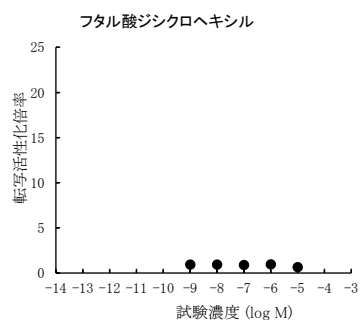
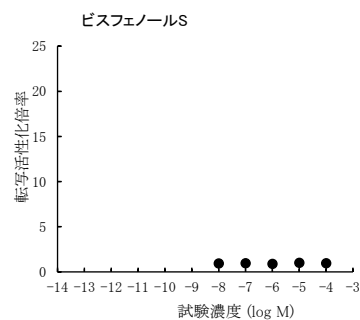
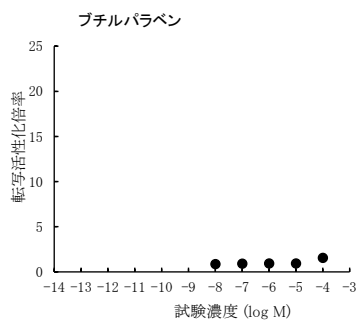
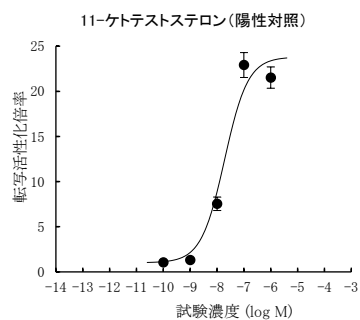
(2) メダカ ER α レポーターゼン試験(抗エストロゲン作用)



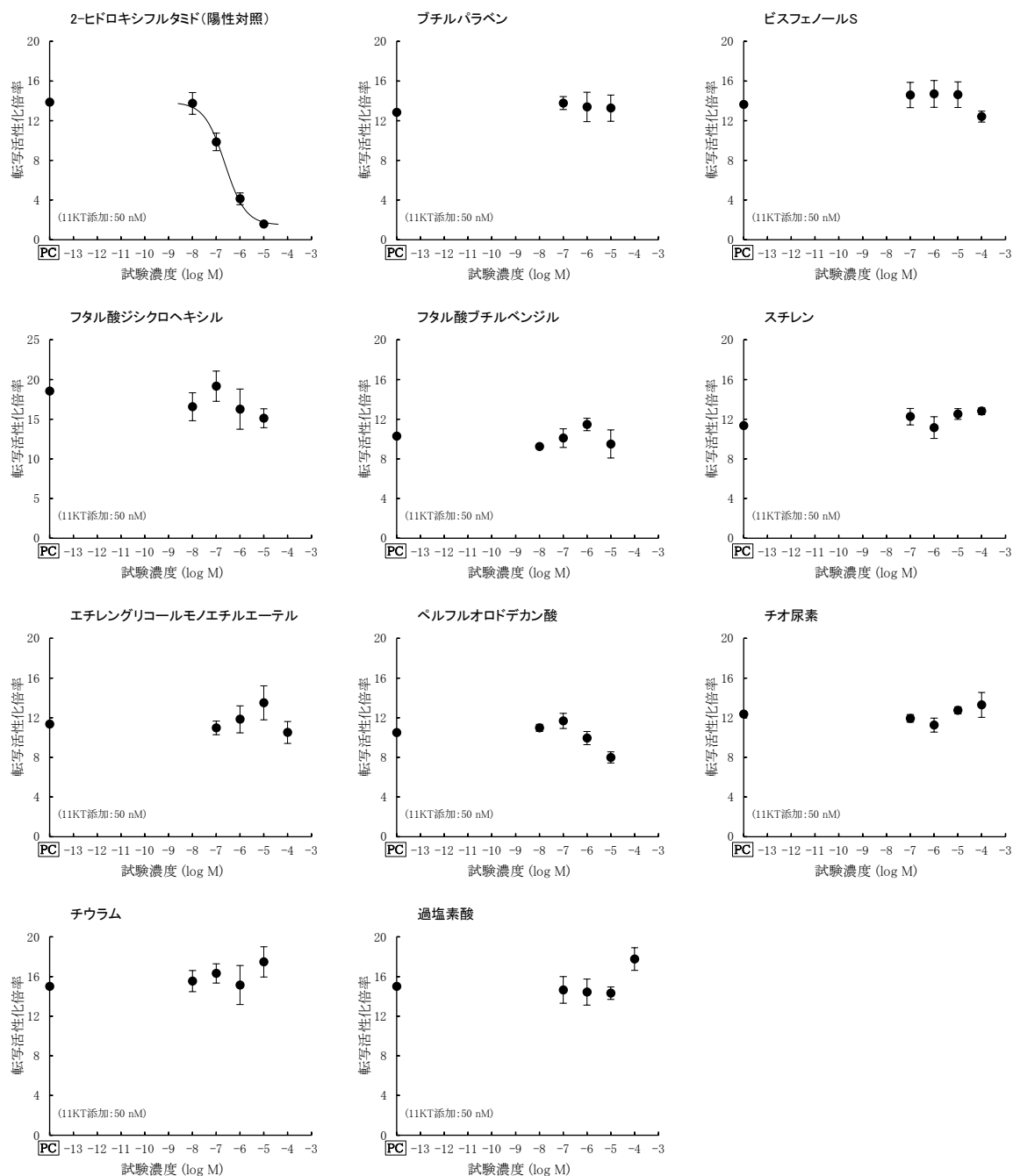
(2) つづき



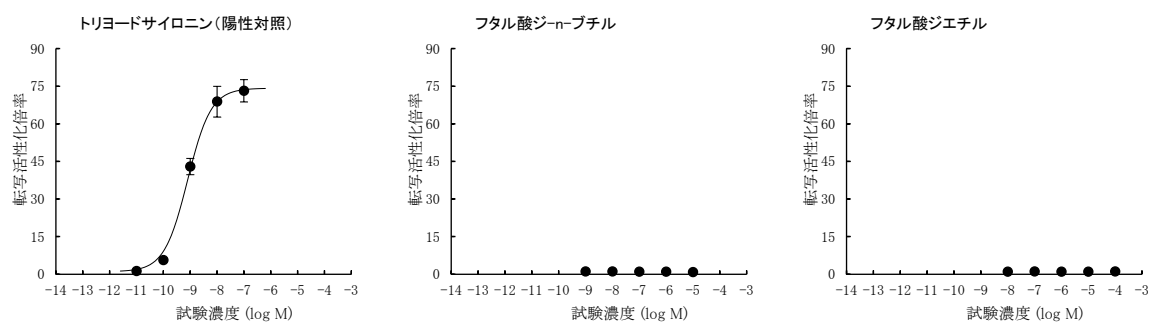
(3) メダカ AR β レポーター遺伝子試験(アンドロゲン作用)



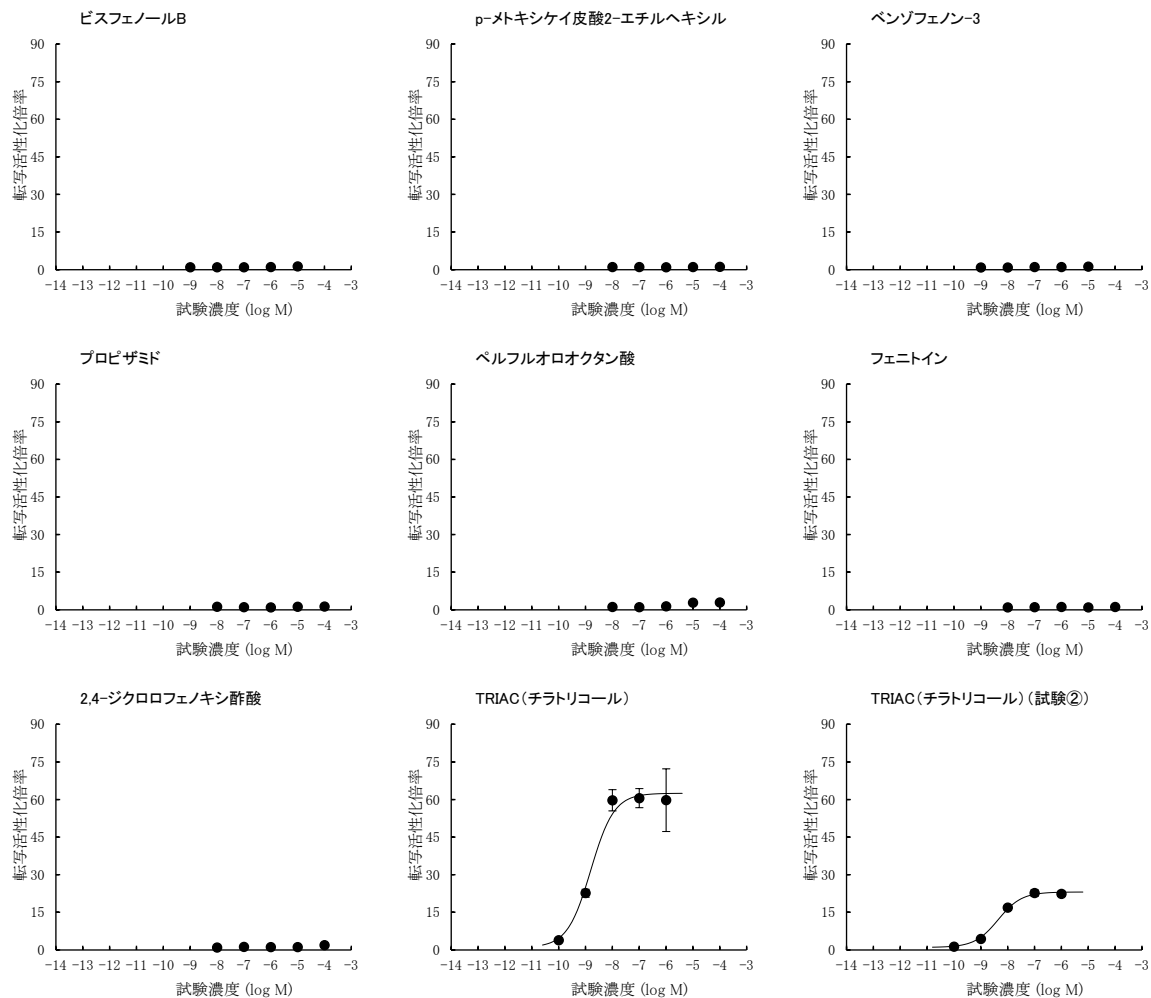
(4) メダカ AR β レポーター遺伝子試験(抗アンドロゲン作用)



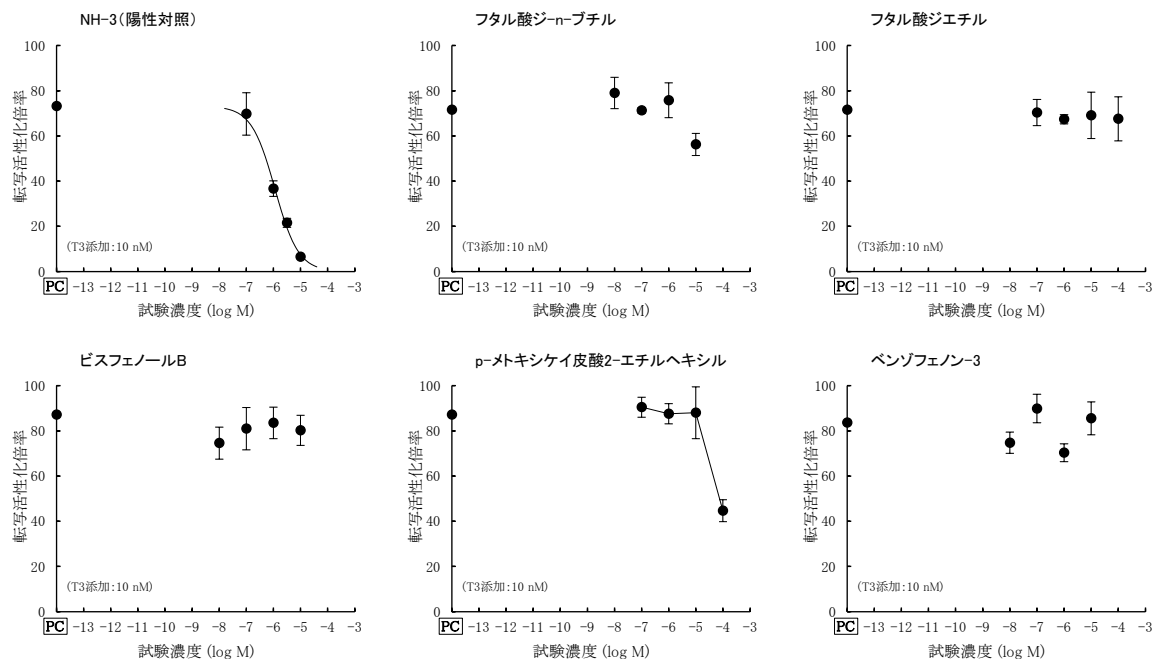
(5) ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験(甲状腺ホルモン作用)



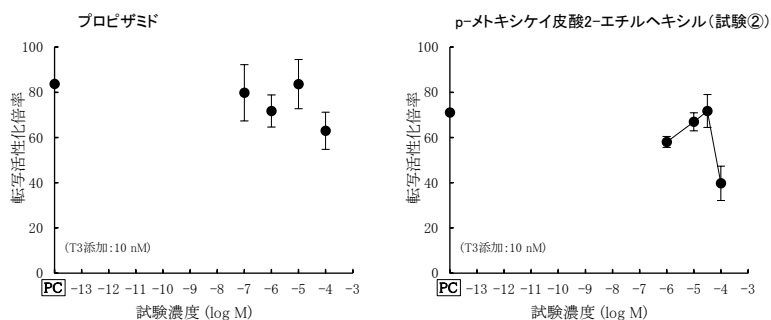
(5) つづき



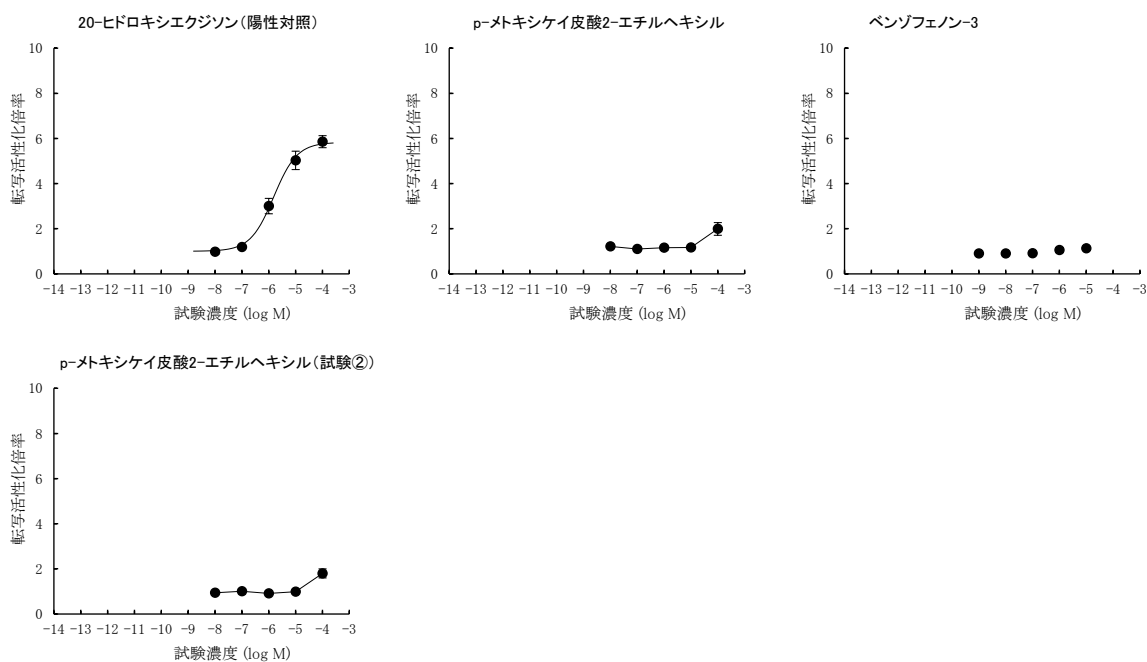
(6) ニシツメガエル TR β レポータージーン試験(抗甲状腺ホルモン作用)



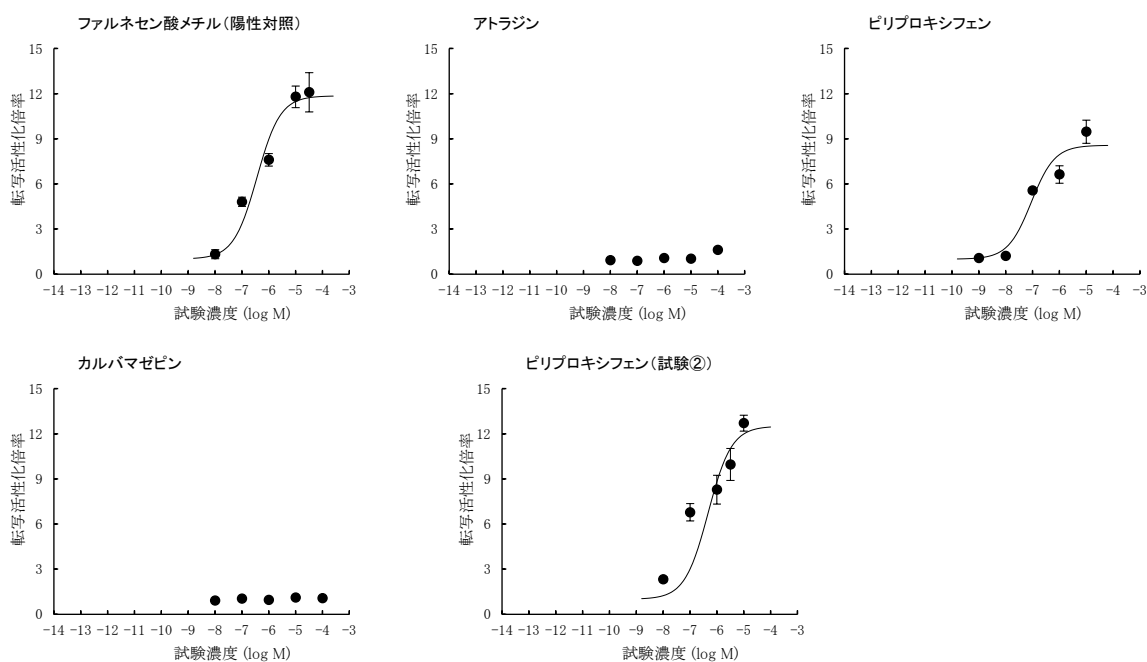
(6) つづき



(7) ミジンコ EcR レポータージーン試験(脱皮ホルモン作用)



(8) ミジンコ JhR レポータージーン試験(幼若ホルモン作用)



付属資料 5 レポータージーン試験 測定データ

(1) メダカ ER α レポータージーン試験(エストロゲン作用)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
17 β -エストラジオール(陽性対照)													
1.0E-08	10.5	10.1	9.76	8.33	8.07	9.35	6.24	5.98	5.78	4.93	4.78	5.54	0.29
1.0E-09	7.70	7.71	8.89	6.72	8.90	7.99	4.56	4.56	5.27	3.98	5.27	4.73	0.25
1.0E-10	6.77	4.03	7.56	6.05	5.99	6.08	4.01	2.39	4.48	3.58	3.55	3.60	0.35
1.0E-11	2.04	1.68	2.22	3.47	2.99	2.48	1.21	0.99	1.31	2.05	1.77	1.47	0.19
1.0E-12	1.79	1.60	2.37	2.64	1.99	2.08	1.06	0.95	1.41	1.56	1.18	1.23	0.11
V.C.	1.18	1.60	2.81	1.61	1.25	1.69	0.70	0.95	1.67	0.95	0.74	1.00	0.17
ブチルパラベン													
1.0E-05	26.6	14.6	21.2	17.6	17.5	19.5	6.83	3.75	5.43	4.52	4.50	5.01	0.53
1.0E-06	6.45	3.29	2.41	5.52	2.49	4.03	1.65	0.84	0.62	1.42	0.64	1.03	0.21
1.0E-07	2.63	4.21	5.14	2.34	2.67	3.40	0.68	1.08	1.32	0.60	0.68	0.87	0.14
1.0E-08	3.35	2.67	4.18	4.95	2.32	3.49	0.86	0.68	1.07	1.27	0.59	0.90	0.12
1.0E-09	3.15	3.17	3.96	4.34	4.60	3.84	0.81	0.81	1.02	1.11	1.18	0.99	0.08
V.C.	4.70	3.96	3.34	3.20	4.28	3.90	1.21	1.02	0.86	0.82	1.10	1.00	0.07
ビスフェノールS													
1.0E-04	18.4	8.25	6.60	17.8	-	12.7	4.50	2.02	1.62	4.35	-	3.12	0.76
1.0E-05	11.4	9.90	13.7	12.7	13.4	12.2	2.78	2.43	3.35	3.11	3.29	2.99	0.17
1.0E-06	2.58	5.80	6.13	2.39	4.87	4.36	0.63	1.42	1.50	0.59	1.19	1.07	0.19
1.0E-07	2.89	4.14	3.28	3.10	4.54	3.59	0.71	1.01	0.80	0.76	1.11	0.88	0.08
1.0E-08	4.13	3.37	4.46	2.72	4.14	3.76	1.01	0.83	1.09	0.67	1.01	0.92	0.08
V.C.	4.89	4.23	3.60	3.79	3.90	4.08	1.20	1.04	0.88	0.93	0.96	1.00	0.06
フタル酸ジシクロヘキシル													
1.0E-05	3.96	3.74	2.33	2.54	4.17	3.35	1.38	1.30	0.81	0.89	1.45	1.17	0.13
1.0E-06	3.59	4.07	3.69	1.28	2.58	3.04	1.25	1.42	1.29	0.45	0.90	1.06	0.18
1.0E-07	3.30	2.27	2.87	3.28	2.89	2.92	1.15	0.79	1.00	1.14	1.01	1.02	0.06
1.0E-08	3.46	3.66	2.94	2.65	1.29	2.80	1.20	1.28	1.02	0.92	0.45	0.97	0.15
1.0E-09	2.42	1.47	2.79	3.55	3.52	2.75	0.84	0.51	0.97	1.24	1.23	0.96	0.13
V.C.	3.12	2.91	3.15	2.74	2.43	2.87	1.09	1.01	1.10	0.95	0.85	1.00	0.05
フタル酸ブチルベンジル													
1.0E-05	8.06	7.06	7.51	3.55	5.90	6.41	2.81	2.46	2.62	1.24	2.05	2.24	0.28
1.0E-06	2.97	3.53	5.08	5.25	4.04	4.18	1.04	1.23	1.77	1.83	1.41	1.45	0.15
1.0E-07	1.03	2.46	2.76	3.53	4.76	2.91	0.36	0.86	0.96	1.23	1.66	1.01	0.21
1.0E-08	3.00	2.34	2.59	3.15	2.97	2.81	1.04	0.82	0.90	1.10	1.03	0.98	0.05
1.0E-09	2.29	2.53	1.70	3.68	4.00	2.84	0.80	0.88	0.59	1.28	1.39	0.99	0.15
V.C.	3.12	2.91	3.15	2.74	2.43	2.87	1.09	1.01	1.10	0.95	0.85	1.00	0.05
ジベンゾチオフェン													
1.0E-05	3.73	3.53	4.14	2.85	2.82	3.41	1.23	1.16	1.36	0.94	0.93	1.12	0.08
1.0E-06	5.13	3.13	1.66	2.73	2.01	2.93	1.69	1.03	0.54	0.90	0.66	0.96	0.20
1.0E-07	2.73	3.18	2.60	3.19	2.91	2.92	0.90	1.05	0.85	1.05	0.96	0.96	0.04
1.0E-08	1.94	3.60	3.02	2.53	3.10	2.84	0.64	1.18	0.99	0.83	1.02	0.93	0.09
1.0E-09	3.50	3.17	2.92	3.80	3.22	3.32	1.15	1.04	0.96	1.25	1.06	1.09	0.05
V.C.	3.28	2.41	3.80	3.41	2.32	3.04	1.08	0.79	1.25	1.12	0.76	1.00	0.10
イソブチルパラベン													
1.0E-05	14.0	9.61	12.9	14.2	11.9	12.5	4.61	3.16	4.23	4.67	3.91	4.12	0.28
1.0E-06	3.73	1.94	2.32	3.14	5.45	3.32	1.23	0.64	0.76	1.03	1.79	1.09	0.20
1.0E-07	1.90	3.98	4.53	3.54	7.45	4.28	0.62	1.31	1.49	1.16	2.45	1.41	0.30
1.0E-08	2.35	3.83	5.31	3.75	3.44	3.73	0.77	1.26	1.74	1.23	1.13	1.23	0.16
V.C.	3.28	2.41	3.80	3.41	2.32	3.04	1.08	0.79	1.25	1.12	0.76	1.00	0.10
スチレン													
1.0E-04	3.26	3.45	4.24	2.70	2.21	3.17	1.30	1.38	1.70	1.08	0.88	1.27	0.14
1.0E-05	3.70	4.11	2.82	1.45	1.47	2.71	1.48	1.64	1.13	0.58	0.59	1.08	0.22
1.0E-06	2.96	3.73	1.97	2.71	2.83	2.84	1.18	1.49	0.79	1.08	1.13	1.13	0.11
1.0E-07	2.73	2.51	4.98	2.40	3.83	3.29	1.09	1.00	1.99	0.96	1.53	1.31	0.20
1.0E-08	2.91	2.90	2.60	1.76	2.48	2.53	1.16	1.16	1.04	0.70	0.99	1.01	0.08
V.C.	2.56	3.05	2.16	2.21	2.53	2.50	1.02	1.22	0.86	0.88	1.01	1.00	0.06
エチレングリコールモノエチルエーテル													
1.0E-04	2.20	3.05	2.86	4.35	6.23	3.74	0.75	1.04	0.98	1.49	2.13	1.28	0.24
1.0E-05	2.97	2.56	2.80	2.52	4.81	3.13	1.02	0.88	0.96	0.86	1.64	1.07	0.15
1.0E-06	2.38	2.72	1.61	2.88	3.11	2.54	0.81	0.93	0.55	0.98	1.07	0.87	0.09
1.0E-07	2.22	2.38	2.56	1.66	3.14	2.39	0.76	0.82	0.88	0.57	1.07	0.82	0.08
1.0E-08	2.22	2.62	2.34	3.35	3.27	2.76	0.76	0.90	0.80	1.15	1.12	0.94	0.08
V.C.	3.24	3.32	2.85	2.01	3.18	2.92	1.11	1.14	0.98	0.69	1.09	1.00	0.08

(1) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
ペルフルオロドデカン酸													
1.0E-05	1.20	2.90	2.35	2.98	3.13	2.51	0.38	0.92	0.74	0.94	0.99	0.79	0.11
1.0E-06	3.52	3.32	2.91	1.93	2.16	2.77	1.11	1.05	0.92	0.61	0.68	0.87	0.10
1.0E-07	2.14	2.02	4.24	2.34	2.68	2.68	0.67	0.64	1.34	0.74	0.85	0.85	0.13
1.0E-08	3.98	3.83	3.74	2.95	2.34	3.37	1.26	1.21	1.18	0.93	0.74	1.06	0.10
1.0E-09	2.19	2.98	3.38	3.61	3.14	3.06	0.69	0.94	1.07	1.14	0.99	0.97	0.08
V.C.	3.92	3.33	3.58	2.59	2.41	3.17	1.24	1.05	1.13	0.82	0.76	1.00	0.09
チオ尿素													
1.0E-04	2.18	2.39	2.31	3.59	6.10	3.32	0.69	0.76	0.73	1.13	1.93	1.05	0.23
1.0E-05	2.04	3.49	2.50	2.87	4.44	3.07	0.64	1.10	0.79	0.91	1.40	0.97	0.13
1.0E-06	3.26	1.72	2.70	3.39	3.20	2.85	1.03	0.54	0.85	1.07	1.01	0.90	0.10
1.0E-07	2.22	1.34	1.21	2.63	3.01	2.08	0.70	0.42	0.38	0.83	0.95	0.66	0.11
1.0E-08	1.09	3.63	3.99	2.57	2.26	2.71	0.34	1.15	1.26	0.81	0.71	0.86	0.16
V.C.	3.92	3.33	3.58	2.59	2.41	3.17	1.24	1.05	1.13	0.82	0.76	1.00	0.09
チウラム													
1.0E-05	2.61	1.55	5.07	2.54	2.52	2.86	0.85	0.51	1.65	0.83	0.82	0.93	0.19
1.0E-06	2.20	3.27	2.28	3.02	2.17	2.59	0.72	1.06	0.74	0.98	0.71	0.84	0.07
1.0E-07	3.21	2.95	3.06	2.75	3.12	3.02	1.04	0.96	1.00	0.89	1.01	0.98	0.03
1.0E-08	2.68	3.03	1.60	0.98	3.24	2.31	0.87	0.98	0.52	0.32	1.05	0.75	0.14
1.0E-09	2.63	3.24	4.22	2.69	1.96	2.95	0.86	1.05	1.37	0.88	0.64	0.96	0.12
V.C.	3.01	3.25	3.98	2.23	2.91	3.07	0.98	1.06	1.29	0.72	0.95	1.00	0.09
過塩素酸													
1.0E-04	3.47	3.32	2.13	4.04	2.36	3.06	1.24	1.18	0.76	1.44	0.84	1.09	0.13
1.0E-05	4.80	2.90	2.35	1.60	2.51	2.83	1.71	1.03	0.84	0.57	0.89	1.01	0.19
1.0E-06	1.94	3.26	3.74	2.78	2.74	2.89	0.69	1.16	1.33	0.99	0.98	1.03	0.11
1.0E-07	1.91	3.42	3.85	1.31	2.41	2.58	0.68	1.22	1.37	0.47	0.86	0.92	0.17
1.0E-08	4.46	4.00	3.66	3.68	2.13	3.59	1.59	1.43	1.31	1.31	0.76	1.28	0.14
V.C.	3.11	2.86	3.18	2.53	2.33	2.80	1.11	1.02	1.14	0.90	0.83	1.00	0.06
ブチルパラベン(試験②)													
1.0E-05	12.3	10.4	10.9	10.1	10.9	10.9	6.57	5.57	5.86	5.41	5.83	5.85	0.20
3.2E-06	4.65	4.18	3.60	2.82	4.06	3.86	2.49	2.24	1.93	1.51	2.18	2.07	0.17
1.0E-06	2.32	3.15	1.82	1.09	1.27	1.93	1.24	1.69	0.98	0.58	0.68	1.03	0.20
1.0E-07	1.15	2.14	2.52	2.43	1.56	1.96	0.61	1.15	1.35	1.30	0.84	1.05	0.14
1.0E-08	1.61	1.42	1.62	2.33	1.94	1.78	0.86	0.76	0.87	1.25	1.04	0.96	0.09
V.C.	2.34	1.06	3.24	1.13	1.57	1.87	1.25	0.57	1.74	0.60	0.84	1.00	0.22
ビスフェノールS(試験②)													
1.0E-04	6.90	7.76	3.34	5.22	6.71	5.99	3.00	3.37	1.45	2.27	2.92	2.60	0.34
3.2E-05	6.07	3.60	7.98	6.32	4.58	5.71	2.64	1.56	3.47	2.75	1.99	2.48	0.33
1.0E-05	5.42	4.07	3.96	4.91	5.81	4.83	2.36	1.77	1.72	2.13	2.52	2.10	0.16
1.0E-06	3.78	3.32	2.69	2.99	2.01	2.96	1.64	1.44	1.17	1.30	0.87	1.29	0.13
1.0E-07	2.40	1.91	1.60	2.24	2.98	2.23	1.04	0.83	0.69	0.97	1.30	0.97	0.10
V.C.	2.23	2.58	2.63	1.05	3.03	2.30	0.97	1.12	1.14	0.45	1.32	1.00	0.15
フタル酸ブチルベンジル(試験②)													
1.0E-05	6.68	5.88	6.83	4.59	6.89	6.18	3.09	2.72	3.16	2.12	3.19	2.86	0.20
3.2E-06	1.90	3.54	2.39	3.07	2.94	2.77	0.88	1.64	1.10	1.42	1.36	1.28	0.13
1.0E-06	2.89	2.80	1.65	3.28	1.24	2.37	1.34	1.29	0.76	1.52	0.57	1.10	0.18
1.0E-07	3.53	1.23	1.17	1.22	1.93	1.82	1.63	0.57	0.54	0.57	0.89	0.84	0.21
1.0E-08	1.73	1.73	3.20	1.15	3.38	2.24	0.80	0.80	1.48	0.53	1.56	1.03	0.20
V.C.	1.75	1.53	1.59	2.20	3.75	2.16	0.81	0.71	0.73	1.02	1.74	1.00	0.19
イソブチルパラベン(試験②)													
3.2E-05	12.2	10.9	10.6	8.80	10.2	10.5	5.94	5.31	5.18	4.29	4.96	5.14	0.27
1.0E-05	9.71	8.11	7.91	5.97	8.74	8.09	4.74	3.96	3.86	2.91	4.27	3.95	0.30
3.2E-06	2.67	2.17	3.63	3.59	4.11	3.23	1.30	1.06	1.77	1.75	2.00	1.58	0.17
1.0E-06	1.35	2.87	1.20	1.12	1.90	1.69	0.66	1.40	0.58	0.55	0.93	0.82	0.16
1.0E-07	1.33	1.71	1.63	1.21	2.22	1.62	0.65	0.83	0.79	0.59	1.08	0.79	0.09
V.C.	2.15	2.15	3.38	0.95	1.62	2.05	1.05	1.05	1.65	0.46	0.79	1.00	0.19

(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)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
4-ヒドロキシタモキシフェン (陽性対照)													
1.0E-07	1.05	0.74	0.91	0.79	0.63	0.82	0.93	0.66	0.81	0.70	0.56	0.73	0.06
1.0E-08	1.63	2.27	1.66	2.34	2.71	2.12	1.45	2.01	1.47	2.08	2.41	1.89	0.19
1.0E-09	6.00	4.98	4.78	5.14	4.88	5.16	5.33	4.43	4.25	4.56	4.34	4.58	0.19
1.0E-10	7.68	6.64	6.63	4.71	6.89	6.51	6.83	5.90	5.90	4.19	6.13	5.79	0.44
V.C.	1.29	1.17	1.17	0.91	1.08	1.12	1.15	1.04	1.04	0.81	0.96	1.00	0.06
P.C.	7.38	7.68	8.36	7.79	6.35	7.51	6.56	6.83	7.43	6.92	5.65	6.68	0.29
ブチルパラベン													
1.0E-05	9.14	8.62	9.19	7.50	6.65	8.22	6.87	6.48	6.91	5.64	5.00	6.18	0.37
1.0E-06	6.78	8.80	5.35	-	-	6.98	5.10	6.62	4.02	-	-	5.25	0.75
1.0E-07	7.14	7.87	4.47	6.68	8.19	6.87	5.37	5.92	3.36	5.02	6.16	5.17	0.49
1.0E-08	6.83	8.85	7.54	4.74	7.10	7.01	5.14	6.66	5.67	3.57	5.34	5.27	0.50
V.C.	1.33	1.38	1.32	1.31	1.31	1.33	1.00	1.04	0.99	0.98	0.98	1.00	0.01
P.C.	6.07	6.33	7.40	6.71	8.10	6.92	4.57	4.76	5.57	5.05	6.09	5.21	0.28
ビスフェノールS													
1.0E-04	6.42	8.05	8.22	8.61	7.01	7.66	4.83	6.05	6.18	6.48	5.27	5.76	0.31
1.0E-05	7.66	6.46	6.34	8.23	7.12	7.16	5.76	4.86	4.77	6.19	5.36	5.39	0.27
1.0E-06	4.92	10.5	6.02	9.92	5.35	7.34	3.70	7.90	4.53	7.46	4.02	5.52	0.89
1.0E-07	7.96	6.44	6.94	-	-	7.11	5.99	4.84	5.22	-	-	5.35	0.34
V.C.	1.33	1.38	1.32	1.31	1.31	1.33	1.00	1.04	0.99	0.98	0.98	1.00	0.01
P.C.	6.07	6.33	7.40	6.71	8.10	6.92	4.57	4.76	5.57	5.05	6.09	5.21	0.28
フタル酸ジシクロヘキシル													
1.0E-05	5.15	3.14	2.10	5.69	3.70	3.96	3.85	2.35	1.57	4.25	2.77	2.96	0.49
1.0E-06	7.72	6.46	7.79	6.90	8.18	7.41	5.77	4.83	5.82	5.15	6.11	5.54	0.24
1.0E-07	10.4	8.65	6.24	9.10	8.31	8.54	7.78	6.47	4.66	6.80	6.21	6.38	0.51
1.0E-08	7.92	6.90	9.97	6.98	-	7.94	5.92	5.15	7.45	5.21	-	5.94	0.54
V.C.	1.56	1.22	1.27	1.50	1.14	1.34	1.17	0.91	0.95	1.12	0.85	1.00	0.06
P.C.	7.81	8.11	7.58	8.88	-	8.10	5.83	6.06	5.67	6.64	-	6.05	0.21
フタル酸ブチルベンジル													
1.0E-05	7.67	6.98	6.13	5.16	6.57	6.50	5.93	5.39	4.73	3.98	5.07	5.02	0.33
1.0E-06	6.99	9.84	7.03	7.66	6.99	7.70	5.40	7.60	5.43	5.92	5.40	5.95	0.42
1.0E-07	6.75	8.96	6.59	7.28	-	7.40	5.22	6.93	5.10	5.62	-	5.72	0.42
1.0E-08	6.13	7.84	7.01	5.52	-	6.62	4.74	6.06	5.41	4.26	-	5.12	0.39
V.C.	1.01	1.54	1.43	0.99	1.51	1.29	0.78	1.19	1.11	0.76	1.16	1.00	0.09
P.C.	6.08	6.07	7.54	8.45	7.04	7.04	4.70	4.69	5.83	6.53	5.44	5.44	0.35
イソブチルパラベン													
1.0E-04	6.65	6.91	11.8	11.6	6.53	8.71	5.12	5.32	9.10	8.95	5.03	6.70	0.95
1.0E-05	11.3	11.5	8.36	4.03	-	8.79	8.69	8.83	6.44	3.10	-	6.77	1.34
1.0E-06	9.43	9.78	8.06	8.11	4.47	7.97	7.26	7.53	6.20	6.24	3.45	6.14	0.72
1.0E-07	6.56	-	6.21	5.91	9.43	7.03	5.05	-	4.78	4.55	7.26	5.41	0.63
V.C.	1.63	1.38	1.19	1.16	1.14	1.30	1.25	1.06	0.91	0.89	0.88	1.00	0.07
P.C.	7.27	7.50	8.11	7.57	8.30	7.75	5.60	5.78	6.25	5.83	6.39	5.97	0.15
スチレン													
1.0E-04	8.67	5.94	7.18	7.82	8.18	7.56	6.68	4.58	5.53	6.02	6.30	5.82	0.36
1.0E-05	6.10	8.20	6.35	7.92	5.34	6.78	4.70	6.32	4.89	6.10	4.11	5.22	0.42
1.0E-06	7.33	6.89	6.53	5.27	-	6.50	5.64	5.31	5.03	4.05	-	5.01	0.34
1.0E-07	9.17	5.11	6.84	6.38	11.53	7.81	7.06	3.93	5.27	4.91	8.88	6.01	0.88
V.C.	1.63	1.38	1.19	1.16	1.14	1.30	1.25	1.06	0.91	0.89	0.88	1.00	0.07
P.C.	7.27	7.50	8.11	7.57	8.30	7.75	5.60	5.78	6.25	5.83	6.39	5.97	0.15
エチレンジグリコールモノエチルエーテル													
1.0E-04	8.38	6.13	5.01	10.5	9.53	7.91	7.32	5.36	4.38	9.18	8.33	6.91	0.90
1.0E-05	5.98	10.5	6.95	8.45	-	7.97	5.22	9.16	6.08	7.39	-	6.97	0.86
1.0E-06	7.66	8.40	7.40	7.63	9.62	8.14	6.69	7.35	6.47	6.67	8.41	7.12	0.35
1.0E-07	8.04	5.77	7.46	9.00	6.14	7.28	7.03	5.04	6.52	7.87	5.36	6.36	0.52
V.C.	0.99	0.92	1.28	1.51	1.02	1.14	0.87	0.80	1.12	1.32	0.89	1.00	0.10
P.C.	7.43	8.21	7.56	8.54	7.93	7.93	6.49	7.18	6.61	7.47	6.93	6.93	0.18
ペルフルオロドデカン酸													
1.0E-05	8.01	10.4	9.01	8.26	8.52	8.84	7.00	9.09	7.88	7.22	7.45	7.73	0.37
1.0E-06	5.42	9.85	9.11	5.74	9.39	7.90	4.74	8.61	7.96	5.02	8.21	6.91	0.84
1.0E-07	7.91	7.04	6.18	7.60	5.04	6.75	6.91	6.15	5.41	6.64	4.41	5.90	0.45
1.0E-08	7.64	7.78	8.12	6.97	7.88	7.68	6.68	6.81	7.10	6.09	6.89	6.71	0.17
V.C.	0.99	0.92	1.28	1.51	1.02	1.14	0.87	0.80	1.12	1.32	0.89	1.00	0.10
P.C.	7.43	8.21	7.56	8.54	7.93	7.93	6.49	7.18	6.61	7.47	6.93	6.93	0.18

(2) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
チオ尿素													
1.0E-04	8.25	11.4	15.9	12.0	9.19	11.3	4.62	6.40	8.89	6.71	5.14	6.35	0.74
1.0E-05	11.0	12.4	11.8	10.3	-	11.4	6.16	6.93	6.63	5.78	-	6.37	0.25
1.0E-06	8.38	10.4	9.63	10.6	11.6	10.1	4.69	5.81	5.39	5.94	6.50	5.67	0.30
1.0E-07	12.4	12.9	9.37	12.3	7.61	10.9	6.96	7.21	5.25	6.89	4.26	6.11	0.58
V.C.	1.62	1.75	1.90	1.47	2.19	1.79	0.91	0.98	1.06	0.83	1.23	1.00	0.07
P.C.	9.86	10.5	10.3	11.5	12.8	11.0	5.52	5.91	5.79	6.43	7.16	6.16	0.29
チウラム													
1.0E-05	12.7	11.4	12.5	10.4	11.8	11.7	7.09	6.38	6.97	5.80	6.59	6.57	0.23
1.0E-06	13.4	10.9	8.10	11.8	10.1	10.9	7.48	6.11	4.53	6.62	5.65	6.08	0.49
1.0E-07	8.93	9.12	12.7	12.0	10.4	10.6	5.00	5.10	7.11	6.70	5.80	5.95	0.42
1.0E-08	11.9	12.0	9.37	12.6	14.0	12.0	6.69	6.73	5.25	7.03	7.87	6.71	0.42
V.C.	1.62	1.75	1.90	1.47	2.19	1.79	0.91	0.98	1.06	0.83	1.23	1.00	0.07
P.C.	9.86	10.5	10.3	11.5	12.8	11.0	5.52	5.91	5.79	6.43	7.16	6.16	0.29
過塩素酸													
1.0E-04	7.48	5.68	6.83	6.26	5.34	6.32	6.65	5.05	6.07	5.56	4.75	5.62	0.34
1.0E-05	7.18	9.06	5.56	7.90	7.63	7.47	6.39	8.05	4.94	7.03	6.78	6.64	0.51
1.0E-06	8.01	8.80	6.78	4.77	6.63	7.00	7.12	7.82	6.03	4.24	5.90	6.22	0.61
1.0E-07	6.24	7.82	7.36	8.87	8.57	7.77	5.55	6.95	6.55	7.89	7.61	6.91	0.41
V.C.	1.29	1.17	1.17	0.91	1.08	1.12	1.15	1.04	1.04	0.81	0.96	1.00	0.06
P.C.	7.38	7.68	8.36	7.79	6.35	7.51	6.56	6.83	7.43	6.92	5.65	6.68	0.29
フタル酸ジシクロヘキシル (試験②)													
1.0E-05	6.18	7.36	8.00	7.21	7.00	7.15	3.11	3.70	4.03	3.63	3.52	3.60	0.15
3.2E-06	8.93	7.57	8.81	9.35	6.08	8.15	4.49	3.81	4.43	4.70	3.06	4.10	0.30
1.0E-06	10.1	9.17	10.7	11.1	12.3	10.7	5.06	4.61	5.36	5.58	6.17	5.36	0.26
1.0E-07	10.2	7.74	11.2	13.9	13.3	11.3	5.15	3.89	5.61	6.99	6.70	5.67	0.56
V.C.	1.75	2.09	2.13	1.85	2.13	1.99	0.88	1.05	1.07	0.93	1.07	1.00	0.04
P.C.	12.1	13.0	11.4	12.1	12.8	12.3	6.11	6.53	5.72	6.08	6.42	6.17	0.14

(3) メダカ AR β レポータージーン試験 (アンドロゲン作用)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
11-ケトテストステロン (陽性対照)													
1.0E-06	35.5	30.8	27.7	26.2	28.6	29.8	25.7	22.2	20.0	19.0	20.7	21.5	1.17
1.0E-07	34.3	30.9	36.7	31.2	25.4	31.7	24.8	22.3	26.6	22.6	18.3	22.9	1.38
1.0E-08	9.37	10.5	14.3	9.90	8.08	10.4	6.78	7.58	10.3	7.16	5.85	7.54	0.75
1.0E-09	1.99	2.31	1.63	1.41	1.66	1.80	1.44	1.67	1.18	1.02	1.20	1.30	0.11
1.0E-10	1.61	1.30	1.25	1.49	1.54	1.44	1.17	0.94	0.90	1.08	1.11	1.04	0.05
V.C.	1.05	1.35	1.69	1.07	1.76	1.38	0.76	0.98	1.22	0.77	1.27	1.00	0.11
ブチルパラベン													
1.0E-04	2.15	2.78	2.25	2.62	1.94	2.35	1.40	1.81	1.47	1.70	1.27	1.53	0.10
1.0E-05	1.27	1.50	1.26	1.64	1.34	1.40	0.82	0.97	0.82	1.07	0.87	0.91	0.05
1.0E-06	1.18	1.22	1.76	1.26	1.63	1.41	0.77	0.79	1.15	0.82	1.06	0.92	0.08
1.0E-07	1.26	0.99	1.75	1.36	1.46	1.36	0.82	0.64	1.14	0.88	0.95	0.89	0.08
1.0E-08	1.13	1.09	1.35	1.42	1.44	1.29	0.73	0.71	0.88	0.92	0.94	0.84	0.05
V.C.	1.69	1.39	1.55	1.61	1.44	1.54	1.10	0.90	1.01	1.05	0.93	1.00	0.04
ビスフェノールS													
1.0E-04	1.71	1.42	1.51	1.22	1.38	1.45	1.11	0.92	0.98	0.79	0.90	0.94	0.05
1.0E-05	1.25	2.21	1.43	1.27	1.44	1.52	0.81	1.44	0.93	0.83	0.94	0.99	0.11
1.0E-06	1.28	1.27	1.44	1.43	1.30	1.35	0.83	0.83	0.94	0.93	0.85	0.88	0.02
1.0E-07	1.50	1.52	1.69	1.21	1.32	1.45	0.98	0.99	1.10	0.79	0.86	0.94	0.05
1.0E-08	1.62	1.35	1.61	1.16	1.23	1.39	1.05	0.88	1.05	0.75	0.80	0.91	0.06
V.C.	1.69	1.39	1.55	1.61	1.44	1.54	1.10	0.90	1.01	1.05	0.93	1.00	0.04
フタル酸ジシクロヘキシル													
1.0E-05	1.11	1.22	0.73	0.78	0.86	0.94	0.76	0.83	0.50	0.53	0.58	0.64	0.07
1.0E-06	1.61	0.98	1.53	1.51	1.24	1.37	1.09	0.66	1.04	1.02	0.84	0.93	0.08
1.0E-07	1.25	1.20	1.20	1.51	1.20	1.27	0.85	0.81	0.81	1.02	0.81	0.86	0.04
1.0E-08	1.31	1.06	1.22	1.41	1.77	1.36	0.89	0.72	0.83	0.96	1.20	0.92	0.08
1.0E-09	1.39	1.11	1.49	1.44	1.24	1.34	0.94	0.76	1.01	0.98	0.84	0.91	0.05
V.C.	1.41	1.35	1.58	1.57	1.46	1.47	0.96	0.92	1.07	1.06	0.99	1.00	0.03

(3) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
フタル酸ブチルベンジル													
1.0E-05	1.56	1.63	1.92	0.97	2.10	1.64	1.06	1.11	1.30	0.66	1.43	1.11	0.13
1.0E-06	1.47	1.69	1.43	1.26	1.39	1.45	1.00	1.14	0.97	0.86	0.95	0.98	0.05
1.0E-07	0.84	1.34	1.79	1.75	1.55	1.45	0.57	0.91	1.21	1.19	1.05	0.99	0.12
1.0E-08	1.93	1.67	1.18	1.56	1.03	1.47	1.31	1.13	0.80	1.06	0.70	1.00	0.11
1.0E-09	1.66	1.44	0.92	1.34	1.37	1.35	1.13	0.98	0.62	0.91	0.93	0.91	0.08
V.C.	1.41	1.35	1.58	1.57	1.46	1.47	0.96	0.92	1.07	1.06	0.99	1.00	0.03
スチレン													
1.0E-04	1.09	1.54	1.16	1.39	1.23	1.28	0.74	1.06	0.80	0.95	0.84	0.88	0.06
1.0E-05	1.76	1.67	1.78	1.69	1.15	1.61	1.20	1.14	1.22	1.16	0.78	1.10	0.08
1.0E-06	1.02	1.15	1.61	1.33	1.76	1.38	0.70	0.79	1.10	0.91	1.21	0.94	0.09
1.0E-07	1.28	1.40	1.27	1.54	1.88	1.47	0.88	0.96	0.87	1.06	1.29	1.01	0.08
1.0E-08	1.46	1.18	1.70	1.39	1.54	1.45	1.00	0.81	1.16	0.95	1.06	1.00	0.06
V.C.	1.32	1.61	1.38	1.50	1.50	1.46	0.90	1.10	0.95	1.03	1.03	1.00	0.03
エチレングリコールモノエチルエーテル													
1.0E-04	1.73	1.32	1.34	1.65	1.46	1.50	1.18	0.91	0.92	1.13	1.00	1.03	0.06
1.0E-05	1.51	1.43	1.41	1.08	1.53	1.39	1.03	0.98	0.96	0.74	1.05	0.95	0.06
1.0E-06	1.70	1.67	2.32	1.55	1.79	1.81	1.16	1.14	1.59	1.06	1.23	1.24	0.09
1.0E-07	1.60	1.28	1.30	1.49	1.87	1.51	1.10	0.88	0.89	1.02	1.28	1.03	0.07
1.0E-08	1.73	1.42	1.41	1.47	1.21	1.45	1.19	0.97	0.96	1.01	0.83	0.99	0.06
V.C.	1.32	1.61	1.38	1.50	1.50	1.46	0.90	1.10	0.95	1.03	1.03	1.00	0.03
ペルフルオロデカン酸													
1.0E-05	1.19	1.11	1.30	1.96	1.36	1.38	0.83	0.78	0.91	1.37	0.95	0.97	0.10
1.0E-06	1.44	1.53	3.17	1.17	0.77	1.62	1.01	1.07	2.22	0.82	0.54	1.13	0.29
1.0E-07	1.16	1.03	1.58	0.40	1.30	1.10	0.81	0.72	1.11	0.28	0.91	0.77	0.14
1.0E-08	1.46	1.13	1.20	1.20	1.29	1.26	1.02	0.79	0.84	0.84	0.90	0.88	0.04
1.0E-09	1.20	1.37	1.57	0.98	1.09	1.24	0.84	0.96	1.10	0.68	0.76	0.87	0.07
V.C.	1.61	1.48	1.33	1.34	1.39	1.43	1.13	1.04	0.93	0.94	0.97	1.00	0.04
チオ尿素													
1.0E-04	0.78	1.10	0.99	1.16	1.33	1.07	0.57	0.80	0.72	0.85	0.97	0.78	0.07
1.0E-05	1.31	1.41	1.53	1.28	1.33	1.37	0.95	1.02	1.11	0.93	0.97	1.00	0.03
1.0E-06	1.39	1.15	1.23	1.48	1.10	1.27	1.01	0.83	0.90	1.08	0.80	0.92	0.05
1.0E-07	1.67	0.87	1.16	1.18	1.19	1.22	1.22	0.64	0.84	0.86	0.87	0.88	0.09
1.0E-08	1.52	1.66	1.55	0.33	1.18	1.25	1.10	1.21	1.13	0.24	0.86	0.91	0.18
V.C.	1.34	1.38	1.45	1.44	1.26	1.37	0.98	1.01	1.05	1.05	0.92	1.00	0.03
チウラム													
1.0E-05	1.28	1.35	1.27	1.37	1.22	1.30	0.90	0.95	0.90	0.97	0.86	0.92	0.02
1.0E-06	1.14	0.33	1.66	0.96	1.87	1.19	0.80	0.23	1.17	0.68	1.32	0.84	0.19
1.0E-07	1.40	1.47	1.40	1.05	1.49	1.36	0.99	1.04	0.99	0.74	1.05	0.96	0.06
1.0E-08	1.54	1.26	0.91	1.71	0.97	1.28	1.09	0.89	0.64	1.21	0.69	0.90	0.11
1.0E-09	1.21	1.80	1.46	1.50	1.60	1.51	0.86	1.27	1.03	1.06	1.13	1.07	0.07
V.C.	1.49	1.56	1.52	0.87	1.64	1.42	1.05	1.10	1.07	0.62	1.16	1.00	0.10
過塩素酸													
1.0E-04	1.47	1.35	1.15	1.30	1.36	1.33	1.03	0.94	0.80	0.90	0.95	0.92	0.04
1.0E-05	1.60	1.17	1.07	1.42	1.72	1.39	1.11	0.81	0.74	0.99	1.19	0.97	0.09
1.0E-06	1.56	1.32	1.10	1.40	1.84	1.45	1.09	0.92	0.77	0.97	1.28	1.01	0.09
1.0E-07	1.12	1.30	0.93	1.73	1.25	1.27	0.78	0.91	0.65	1.20	0.87	0.88	0.09
1.0E-08	1.19	1.47	1.21	1.55	1.40	1.36	0.83	1.02	0.84	1.08	0.98	0.95	0.05
V.C.	1.33	1.14	1.60	1.33	1.79	1.44	0.92	0.79	1.12	0.93	1.24	1.00	0.08

(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)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
2-ヒドロキシフルタミド (陽性対照)													
1.0E-05	1.67	1.25	1.20	1.27	0.98	1.28	2.05	1.54	1.48	1.56	1.21	1.57	0.14
1.0E-06	4.33	2.06	2.83	2.93	4.61	3.35	5.31	2.53	3.47	3.60	5.66	4.11	0.59
1.0E-07	8.19	6.52	6.73	8.11	10.6	8.02	10.1	8.00	8.26	9.96	13.0	9.85	0.89
1.0E-08	12.6	12.2	11.2	7.76	12.2	11.2	15.5	15.0	13.7	9.53	15.0	13.7	1.09
V.C.	0.91	0.61	0.76	1.02	0.77	0.81	1.11	0.75	0.94	1.25	0.95	1.00	0.08
P.C.	12.4	9.89	12.2	10.7	11.3	11.3	15.3	12.1	15.0	13.1	13.9	13.9	0.58

(4) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
ブチルパラベン													
1.0E-05	12.2	8.50	12.0	14.1	-	11.7	13.8	9.63	13.6	16.0	-	13.3	1.33
1.0E-06	13.8	11.9	8.10	13.6	-	11.8	15.6	13.5	9.17	15.3	-	13.4	1.48
1.0E-07	12.2	11.7	11.0	13.7	-	12.2	13.8	13.2	12.5	15.6	-	13.8	0.66
V.C.	1.00	0.85	1.11	0.57	-	0.88	1.13	0.96	1.26	0.65	-	1.00	0.13
P.C.	12.9	10.5	11.7	10.3	-	11.3	14.6	11.9	13.3	11.6	-	12.8	0.69
ビスフェノールS													
1.0E-04	9.13	10.9	9.01	11.2	9.85	10.0	11.3	13.5	11.2	13.9	12.2	12.4	0.55
1.0E-05	14.3	13.4	10.2	12.4	8.65	11.8	17.7	16.6	12.7	15.4	10.7	14.6	1.29
1.0E-06	10.8	15.9	11.2	11.9	9.57	11.9	13.3	19.7	13.8	14.7	11.9	14.7	1.34
1.0E-07	9.55	15.5	12.3	10.5	11.1	11.8	11.8	19.2	15.2	13.0	13.7	14.6	1.27
V.C.	1.00	0.85	1.11	0.57	0.50	0.81	1.24	1.05	1.38	0.71	0.62	1.00	0.15
P.C.	11.7	10.7	10.4	9.99	12.2	11.0	14.5	13.3	12.9	12.4	15.2	13.6	0.52
フタル酸ジシクロヘキシル													
1.0E-05	15.0	12.9	17.0	16.4	10.9	14.4	15.7	13.6	17.8	17.2	11.4	15.1	1.19
1.0E-06	13.8	15.3	12.5	11.2	24.8	15.5	14.5	16.0	13.1	11.8	26.0	16.3	2.53
1.0E-07	18.0	14.8	24.4	14.5	19.9	18.3	18.8	15.5	25.5	15.2	20.8	19.2	1.91
1.0E-08	14.5	19.8	10.4	15.4	19.0	15.8	15.2	20.7	10.9	16.1	19.9	16.6	1.76
V.C.	1.07	0.79	0.99	0.98	0.94	0.96	1.12	0.83	1.04	1.02	0.98	1.00	0.05
P.C.	18.7	17.8	18.5	17.6	16.1	17.7	19.5	18.7	19.3	18.4	16.8	18.6	0.48
フタル酸ブチルベンジル													
1.0E-05	6.51	9.10	7.74	13.5	14.0	10.2	6.08	8.50	7.23	12.6	13.1	9.49	1.42
1.0E-06	13.5	11.3	13.2	10.1	13.3	12.3	12.6	10.6	12.3	9.43	12.4	11.5	0.63
1.0E-07	9.93	8.52	9.17	13.5	12.9	10.8	9.27	7.96	8.56	12.6	12.1	10.1	0.94
1.0E-08	9.78	9.66	10.2	-	-	9.89	9.14	9.03	9.54	-	-	9.23	0.16
V.C.	1.22	1.23	1.04	0.89	0.97	1.07	1.14	1.15	0.97	0.83	0.91	1.00	0.06
P.C.	13.6	11.3	10.1	11.9	8.23	11.0	12.7	10.5	9.43	11.1	7.69	10.3	0.83
スチレン													
1.0E-04	11.5	11.1	12.2	-	-	11.6	12.7	12.2	13.5	-	-	12.8	0.36
1.0E-05	10.8	12.3	10.9	-	-	11.3	12.0	13.6	12.0	-	-	12.5	0.54
1.0E-06	8.54	11.9	9.83	-	-	10.1	9.42	13.2	10.9	-	-	11.2	1.09
1.0E-07	12.6	10.4	10.3	-	-	11.1	13.9	11.5	11.4	-	-	12.3	0.83
V.C.	0.87	1.05	1.08	0.73	0.79	0.91	0.96	1.16	1.20	0.81	0.88	1.00	0.08
P.C.	11.9	11.4	9.76	8.87	9.57	10.3	13.1	12.5	10.8	9.79	10.6	11.4	0.63
エチレンジグリコールモノエチルエーテル													
1.0E-04	8.65	11.5	8.42	-	-	9.53	9.55	12.7	9.29	-	-	10.5	1.10
1.0E-05	9.81	15.1	11.8	-	-	12.2	10.8	16.7	13.0	-	-	13.5	1.71
1.0E-06	11.1	12.7	8.44	-	-	10.7	12.2	14.0	9.32	-	-	11.8	1.36
1.0E-07	10.6	8.69	10.5	-	-	9.93	11.7	9.59	11.6	-	-	11.0	0.69
V.C.	0.87	1.05	1.08	0.73	0.79	0.91	0.96	1.16	1.20	0.81	0.88	1.00	0.08
P.C.	11.9	11.4	9.76	8.87	9.57	10.3	13.1	12.5	10.8	9.79	10.6	11.4	0.63
ペルフルオロドデカン酸													
1.0E-05	7.22	5.91	7.03	8.95	6.73	7.17	8.04	6.59	7.84	9.98	7.50	7.99	0.56
1.0E-06	11.2	8.33	8.61	7.82	8.56	8.91	12.5	9.29	9.59	8.71	9.55	9.94	0.67
1.0E-07	11.1	11.2	8.86	12.3	8.91	10.5	12.3	12.5	9.88	13.7	9.94	11.7	0.76
1.0E-08	10.6	9.92	10.5	9.10	9.11	9.84	11.8	11.1	11.7	10.2	10.2	11.0	0.35
V.C.	0.75	1.03	1.00	0.81	0.90	0.90	0.84	1.14	1.11	0.90	1.01	1.00	0.06
P.C.	12.3	7.68	8.48	10.8	7.80	9.42	13.7	8.56	9.45	12.1	8.70	10.5	1.02
チオ尿素													
1.0E-04	8.47	13.2	13.0	11.7	-	11.6	9.69	15.1	14.9	13.4	-	13.3	1.26
1.0E-05	12.0	11.2	10.5	10.9	-	11.1	13.7	12.8	12.0	12.5	-	12.7	0.36
1.0E-06	9.90	11.4	8.32	9.81	-	9.84	11.3	13.0	9.51	11.2	-	11.3	0.71
1.0E-07	10.5	11.3	9.75	10.1	-	10.4	12.0	13.0	11.2	11.6	-	11.9	0.39
V.C.	0.89	1.00	0.85	0.76	-	0.87	1.01	1.14	0.97	0.87	-	1.00	0.06
P.C.	11.1	8.99	12.0	11.2	-	10.8	12.7	10.3	13.7	12.8	-	12.4	0.73
チウラム													
1.0E-05	14.4	14.3	13.0	18.2	10.6	14.1	17.8	17.7	16.1	22.6	13.2	17.5	1.52
1.0E-06	17.4	13.9	11.7	9.14	8.92	12.2	21.6	17.2	14.5	11.3	11.1	15.1	1.97
1.0E-07	10.6	12.8	14.1	13.0	15.3	13.2	13.2	15.8	17.5	16.1	19.0	16.3	0.97
1.0E-08	15.6	10.8	12.4	12.8	11.0	12.5	19.3	13.4	15.4	15.9	13.7	15.5	1.06
V.C.	0.93	0.87	0.78	0.68	0.78	0.81	1.15	1.08	0.96	0.84	0.97	1.00	0.05
P.C.	11.3	11.0	12.7	13.6	11.9	12.1	14.0	13.6	15.8	16.9	14.7	15.0	0.59

(4) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
過塩素酸													
1.0E-04	15.6	15.3	15.0	15.1	10.7	14.3	19.3	18.9	18.6	18.7	13.2	17.8	1.14
1.0E-05	11.1	11.2	12.6	10.1	12.8	11.5	13.8	13.9	15.6	12.5	15.9	14.3	0.62
1.0E-06	10.4	15.8	11.0	10.6	10.3	11.6	13.0	19.6	13.7	13.1	12.8	14.4	1.31
1.0E-07	12.5	11.5	14.5	7.96	12.5	11.8	15.6	14.3	18.0	9.88	15.5	14.6	1.34
V.C.	0.93	0.87	0.78	0.68	0.78	0.81	1.15	1.08	0.96	0.84	0.97	1.00	0.05
P.C.	11.3	11.0	12.7	13.6	11.9	12.1	14.0	13.6	15.8	16.9	14.7	15.0	0.59

(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)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
トリヨードサイロニン(陽性対照)													
1.0E-07	50.4	48.8	64.1	63.8	64.2	58.3	63.3	61.3	80.4	80.1	80.6	73.1	4.44
1.0E-08	60.7	54.7	52.7	67.8	38.3	54.8	76.2	68.7	66.2	85.1	48.1	68.9	6.14
1.0E-09	30.3	44.1	29.8	33.7	33.1	34.2	38.0	55.4	37.4	42.4	41.6	43.0	3.26
1.0E-10	3.19	4.37	4.98	5.61	4.13	4.46	4.01	5.49	6.25	7.04	5.19	5.60	0.51
1.0E-11	1.04	0.77	0.71	1.48	0.94	0.99	1.31	0.97	0.89	1.85	1.18	1.24	0.17
V.C.	0.64	0.76	1.17	0.80	0.61	0.80	0.81	0.95	1.47	1.01	0.76	1.00	0.13
フタル酸ジ-n-ブチル													
1.0E-05	0.57	0.69	0.62	0.56	0.69	0.63	0.71	0.86	0.77	0.70	0.86	0.78	0.04
1.0E-06	0.67	1.12	0.65	0.69	0.78	0.78	0.84	1.38	0.81	0.86	0.97	0.97	0.11
1.0E-07	0.81	0.64	0.99	0.74	0.69	0.77	1.01	0.79	1.23	0.91	0.86	0.96	0.08
1.0E-08	1.06	0.68	0.58	1.31	0.74	0.87	1.32	0.84	0.72	1.63	0.92	1.09	0.17
1.0E-09	0.79	0.61	0.52	1.45	0.79	0.83	0.98	0.76	0.65	1.80	0.98	1.03	0.20
V.C.	0.80	0.80	0.82	0.81	0.80	0.81	0.99	1.00	1.02	1.00	0.99	1.00	0.01
フタル酸ジエチル													
1.0E-04	0.94	1.24	0.77	0.77	0.71	0.89	1.17	1.54	0.96	0.96	0.88	1.10	0.12
1.0E-05	0.85	0.70	0.83	0.81	0.75	0.79	1.06	0.87	1.04	1.01	0.93	0.98	0.04
1.0E-06	0.71	0.88	0.87	0.89	0.57	0.78	0.89	1.09	1.08	1.11	0.70	0.97	0.08
1.0E-07	0.85	1.25	0.76	0.48	0.83	0.83	1.06	1.55	0.94	0.59	1.04	1.04	0.15
1.0E-08	0.97	1.04	0.54	0.70	0.58	0.77	1.21	1.30	0.66	0.87	0.71	0.95	0.13
V.C.	0.80	0.80	0.82	0.81	0.80	0.81	0.99	1.00	1.02	1.00	0.99	1.00	0.01
ビスフェノールB													
1.0E-05	0.66	0.87	0.80	1.72	0.72	0.95	0.86	1.13	1.04	2.24	0.94	1.25	0.25
1.0E-06	0.81	0.68	0.74	0.57	0.83	0.73	1.06	0.89	0.97	0.74	1.09	0.95	0.06
1.0E-07	0.70	0.58	0.71	0.64	0.90	0.70	0.91	0.75	0.92	0.83	1.17	0.92	0.07
1.0E-08	0.90	0.52	0.60	0.67	0.69	0.68	1.18	0.68	0.78	0.87	0.91	0.88	0.08
1.0E-09	0.75	0.54	0.62	0.67	0.76	0.67	0.98	0.71	0.82	0.87	0.99	0.87	0.05
V.C.	0.68	0.65	0.82	0.83	0.85	0.77	0.89	0.85	1.08	1.08	1.10	1.00	0.05
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル													
1.0E-04	0.70	0.90	0.79	0.93	0.89	0.84	0.92	1.18	1.03	1.22	1.16	1.10	0.06
1.0E-05	0.85	0.70	0.72	0.71	0.81	0.76	1.11	0.91	0.94	0.93	1.06	0.99	0.04
1.0E-06	0.56	0.74	0.88	0.49	0.81	0.70	0.73	0.97	1.15	0.64	1.06	0.91	0.10
1.0E-07	0.89	0.73	0.81	0.72	0.62	0.75	1.16	0.95	1.05	0.94	0.81	0.98	0.06
1.0E-08	0.85	0.56	0.66	0.76	0.89	0.75	1.12	0.73	0.86	0.99	1.17	0.97	0.08
V.C.	0.68	0.65	0.82	0.83	0.85	0.77	0.89	0.85	1.08	1.08	1.10	1.00	0.05
ベンゾフェノン-3													
1.0E-05	0.90	0.90	0.72	0.92	0.88	0.86	1.17	1.17	0.93	1.19	1.15	1.12	0.05
1.0E-06	0.71	0.71	0.86	0.73	0.84	0.77	0.93	0.92	1.12	0.95	1.09	1.00	0.04
1.0E-07	0.77	0.67	0.68	0.89	0.72	0.74	1.00	0.87	0.88	1.16	0.93	0.97	0.05
1.0E-08	0.78	0.57	0.59	0.68	0.50	0.62	1.01	0.75	0.77	0.88	0.65	0.81	0.06
1.0E-09	0.37	0.71	0.79	0.79	0.59	0.65	0.48	0.92	1.03	1.03	0.77	0.84	0.10
V.C.	0.64	0.45	0.79	1.25	0.71	0.77	0.84	0.58	1.03	1.62	0.93	1.00	0.17
プロピザミド													
1.0E-04	0.87	0.95	0.71	0.89	1.02	0.89	1.22	1.32	0.99	1.25	1.43	1.24	0.07
1.0E-05	0.58	1.46	0.51	0.79	0.84	0.84	0.81	2.05	0.72	1.10	1.18	1.17	0.24
1.0E-06	0.32	0.79	0.74	0.74	0.65	0.65	0.44	1.11	1.03	1.04	0.91	0.91	0.12
1.0E-07	0.78	0.66	0.72	0.54	0.69	0.68	1.09	0.92	1.01	0.75	0.97	0.95	0.06
1.0E-08	1.02	0.84	0.72	0.86	0.64	0.82	1.43	1.18	1.01	1.20	0.90	1.14	0.09
V.C.	0.67	0.81	0.67	0.67	0.75	0.71	0.93	1.13	0.94	0.94	1.05	1.00	0.04

(5) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
ペルフルオロオクタン酸													
1.0E-04	1.02	2.46	0.87	3.83	1.35	1.90	1.53	3.70	1.30	5.77	2.03	2.87	0.84
1.0E-05	2.67	2.64	1.48	1.22	1.18	1.84	4.02	3.98	2.23	1.83	1.78	2.77	0.51
1.0E-06	1.17	0.64	0.75	1.11	0.80	0.89	1.76	0.96	1.12	1.67	1.21	1.34	0.16
1.0E-07	0.71	0.51	0.63	0.85	0.56	0.65	1.06	0.77	0.95	1.28	0.85	0.98	0.09
1.0E-08	0.77	0.83	0.59	0.74	0.54	0.69	1.16	1.25	0.89	1.11	0.82	1.05	0.08
V.C.	0.77	0.66	0.59	0.74	0.57	0.66	1.16	1.00	0.89	1.11	0.85	1.00	0.06
フェニトイン													
1.0E-04	0.90	0.91	1.00	0.58	0.81	0.84	1.14	1.16	1.26	0.74	1.02	1.06	0.09
1.0E-05	0.70	0.64	0.74	0.55	0.82	0.69	0.89	0.81	0.94	0.69	1.04	0.87	0.06
1.0E-06	0.71	0.73	1.57	0.66	0.67	0.87	0.90	0.93	1.99	0.84	0.85	1.10	0.22
1.0E-07	0.77	0.80	0.91	0.68	0.71	0.77	0.98	1.02	1.15	0.86	0.90	0.98	0.05
1.0E-08	0.59	0.50	0.71	0.73	1.12	0.73	0.75	0.64	0.91	0.92	1.42	0.93	0.13
V.C.	0.76	0.73	0.84	0.72	0.88	0.79	0.97	0.93	1.07	0.92	1.11	1.00	0.04
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸													
1.0E-04	0.97	1.11	0.94	1.26	3.12	1.48	1.23	1.41	1.19	1.60	3.96	1.88	0.53
1.0E-05	0.91	0.72	0.70	0.66	1.39	0.88	1.16	0.91	0.89	0.84	1.77	1.11	0.17
1.0E-06	1.17	0.77	0.78	0.74	0.68	0.83	1.48	0.98	0.99	0.94	0.86	1.05	0.11
1.0E-07	0.79	0.70	0.47	1.00	1.74	0.94	1.00	0.89	0.60	1.26	2.21	1.19	0.28
1.0E-08	0.51	0.80	0.65	0.91	0.62	0.70	0.65	1.01	0.82	1.15	0.79	0.89	0.09
V.C.	0.76	0.73	0.84	0.72	0.88	0.79	0.97	0.93	1.07	0.92	1.11	1.00	0.04
TRIAC(チラトリコール)													
1.0E-06	38.7	39.9	47.6	15.3	70.6	42.4	54.5	56.2	67.0	21.5	99.3	59.7	12.5
1.0E-07	45.9	48.8	36.1	47.4	36.9	43.0	64.5	68.6	50.8	66.7	51.9	60.5	3.80
1.0E-08	45.3	48.4	31.8	40.2	46.5	42.4	63.7	68.1	44.7	56.5	65.4	59.7	4.21
1.0E-09	13.8	13.0	18.0	16.6	18.9	16.1	19.4	18.3	25.4	23.4	26.6	22.6	1.62
1.0E-10	2.00	2.77	3.24	2.20	3.43	2.73	2.81	3.90	4.56	3.09	4.82	3.84	0.39
V.C.	0.83	0.67	0.62	0.74	0.70	0.71	1.17	0.94	0.88	1.03	0.98	1.00	0.05
TRIAC(チラトリコール) (試験②)													
1.0E-06	38.8	40.4	45.8	44.9	50.7	44.1	19.6	20.5	23.2	22.7	25.7	22.3	1.07
1.0E-07	49.7	42.5	51.1	37.1	43.4	44.8	25.2	21.5	25.9	18.8	22.0	22.7	1.29
1.0E-08	33.3	32.8	39.6	30.0	30.1	33.2	16.9	16.6	20.1	15.2	15.3	16.8	0.88
1.0E-09	4.78	9.22	12.0	7.79	8.84	8.52	2.42	4.67	6.07	3.95	4.48	4.32	0.59
1.0E-10	2.35	2.54	2.58	2.43	2.08	2.39	1.19	1.29	1.31	1.23	1.05	1.21	0.05
V.C.	2.29	1.96	2.19	1.92	1.52	1.97	1.16	0.99	1.11	0.97	0.77	1.00	0.07

(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)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
NH-3(陽性対照)													
1.0E-05	5.14	3.92	4.12	3.56	5.95	4.54	7.34	5.60	5.88	5.09	8.50	6.48	0.63
3.2E-06	15.3	19.3	10.7	13.9	16.4	15.1	21.8	27.5	15.3	19.8	23.4	21.6	2.01
1.0E-06	26.1	24.6	27.5	17.7	32.6	25.7	37.3	35.1	39.3	25.3	46.5	36.7	3.44
1.0E-07	31.6	58.2	36.0	52.3	66.2	48.8	45.1	83.2	51.4	74.7	94.5	69.8	9.39
V.C.	0.71	0.81	0.83	0.57	0.59	0.70	1.01	1.15	1.18	0.82	0.84	1.00	0.08
P.C.	43.3	47.8	58.2	51.3	55.6	51.2	61.9	68.3	83.1	73.2	79.4	73.2	3.80
フタル酸ジ-n-ブチル													
1.0E-05	40.4	33.8	51.4	45.1	-	42.7	53.3	44.6	67.8	59.4	-	56.2	4.89
1.0E-06	51.3	69.7	64.6	44.4	-	57.5	67.6	91.9	85.1	58.5	-	75.8	7.71
1.0E-07	56.5	53.5	54.3	52.2	-	54.1	74.4	70.4	71.5	68.7	-	71.3	1.19
1.0E-08	48.8	65.6	71.7	53.9	-	60.0	64.3	86.4	94.4	71.0	-	79.0	6.92
V.C.	0.57	0.91	0.89	0.76	0.67	0.76	0.75	1.20	1.17	1.00	0.89	1.00	0.09
P.C.	57.5	50.3	57.6	51.8	54.6	54.3	75.7	66.3	75.9	68.2	72.0	71.6	1.95
フタル酸ジエチル													
1.0E-04	40.3	40.0	53.4	71.4	-	51.3	53.1	52.7	70.4	94.1	-	67.6	9.75
1.0E-05	42.0	73.5	39.5	55.0	-	52.5	55.3	96.8	52.0	72.4	-	69.1	10.2
1.0E-06	48.5	55.5	50.6	49.9	-	51.1	63.9	73.1	66.6	65.8	-	67.4	2.00
1.0E-07	41.0	58.4	53.4	60.7	-	53.4	54.1	76.9	70.4	80.0	-	70.3	5.78
V.C.	0.57	0.91	0.89	0.76	0.67	0.76	0.75	1.20	1.17	1.00	0.89	1.00	0.09
P.C.	57.5	50.3	57.6	51.8	54.6	54.3	75.7	66.3	75.9	68.2	72.0	71.6	1.95

(6) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
ビスフェノールB													
1.0E-05	56.5	57.4	60.9	36.8	61.0	54.5	83.2	84.5	89.7	54.2	89.8	80.3	6.66
1.0E-06	39.8	58.2	60.5	56.5	68.8	56.7	58.5	85.7	89.1	83.1	101	83.5	6.98
1.0E-07	56.2	34.6	57.2	74.5	52.4	55.0	82.8	51.0	84.3	110	77.1	81.0	9.35
1.0E-08	63.2	43.6	39.4	46.1	61.1	50.7	93.1	64.1	58.1	67.8	89.9	74.6	7.09
V.C.	0.46	0.73	0.83	0.77	0.61	0.68	0.68	1.08	1.22	1.13	0.90	1.00	0.10
P.C.	81.4	51.5	50.3	55.3	57.6	59.2	120	75.8	74.0	81.4	84.9	87.2	8.40
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル													
1.0E-04	33.7	19.1	38.7	28.1	32.2	30.4	49.7	28.1	56.9	41.4	47.4	44.7	4.83
1.0E-05	64.3	68.0	51.6	80.4	34.7	59.8	94.6	100	75.9	118	51.1	88.0	11.4
1.0E-06	65.1	54.7	58.5	-	-	59.5	95.9	80.6	86.2	-	-	87.5	4.48
1.0E-07	53.5	55.2	68.4	66.2	64.0	61.5	78.8	81.2	101	97.5	94.2	90.5	4.42
V.C.	0.46	0.73	0.83	0.77	0.61	0.68	0.68	1.08	1.22	1.13	0.90	1.00	0.10
P.C.	81.4	51.5	50.3	55.3	57.6	59.2	120	75.8	74.0	81.4	84.9	87.2	8.40
ベンゾフェノン-3													
1.0E-05	47.1	60.5	69.4	65.5	45.0	57.5	70.1	90.0	103	97.4	66.9	85.6	7.28
1.0E-06	56.4	43.3	47.5	48.0	41.0	47.3	84.0	64.4	70.7	71.4	61.0	70.3	3.93
1.0E-07	77.1	56.9	55.4	58.7	54.0	60.4	115	84.6	82.4	87.3	80.4	89.9	6.32
1.0E-08	43.3	56.5	47.0	59.2	45.3	50.3	64.4	84.1	69.9	88.0	67.4	74.8	4.73
V.C.	0.68	0.81	0.66	0.75	0.46	0.67	1.02	1.20	0.98	1.12	0.68	1.00	0.09
P.C.	57.5	49.4	58.6	65.6	50.1	56.2	85.6	73.4	87.2	97.5	74.6	83.7	4.45
プロピザミド													
1.0E-04	43.5	40.8	22.7	48.8	55.8	42.3	64.7	60.7	33.8	72.6	83.0	62.9	8.23
1.0E-05	46.4	71.1	42.0	76.6	44.8	56.2	69.1	106	62.4	114	66.6	83.6	10.9
1.0E-06	65.8	40.6	48.6	39.0	47.0	48.2	97.9	60.3	72.2	58.1	70.0	71.7	7.09
1.0E-07	40.2	78.4	68.9	37.0	43.6	53.6	59.8	117	103	55.0	64.9	79.8	12.5
V.C.	0.68	0.81	0.66	0.75	0.46	0.67	1.02	1.20	0.98	1.12	0.68	1.00	0.09
P.C.	57.5	49.4	58.6	65.6	50.1	56.2	85.6	73.4	87.2	97.5	74.6	83.7	4.45
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル (試験②)													
1.0E-04	21.5	37.1	21.9	-	-	26.8	31.8	55.0	32.4	-	-	39.7	7.63
3.2E-05	41.5	45.9	57.9	-	-	48.4	61.4	68.0	85.7	-	-	71.7	7.26
1.0E-05	47.8	39.9	48.0	-	-	45.2	70.8	59.0	71.1	-	-	66.9	3.98
1.0E-06	41.5	40.1	36.0	-	-	39.2	61.4	59.3	53.3	-	-	58.0	2.41
V.C.	0.85	0.71	0.47	-	-	0.68	1.26	1.04	0.70	-	-	1.00	0.16
P.C.	53.6	45.8	44.6	-	-	48.0	79.4	67.8	66.0	-	-	71.1	4.20

(7) ミジンコ EcR レポータージーン試験 (脱皮ホルモン作用)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
20-ヒドロキシエクジソン (陽性対照)													
1.0E-04	7.73	8.09	9.27	7.26	8.96	8.26	5.48	5.74	6.57	5.15	6.35	5.86	0.27
1.0E-05	6.87	6.66	6.58	6.03	9.32	7.09	4.87	4.72	4.66	4.28	6.61	5.03	0.41
1.0E-06	5.14	4.49	2.52	3.96	5.04	4.23	3.65	3.19	1.79	2.81	3.58	3.00	0.34
1.0E-07	1.78	1.75	1.41	1.94	1.50	1.68	1.26	1.24	1.00	1.38	1.06	1.19	0.07
1.0E-08	1.19	1.27	1.27	1.13	2.01	1.37	0.84	0.90	0.90	0.80	1.43	0.97	0.11
V.C.	1.32	1.07	1.70	1.22	1.74	1.41	0.94	0.76	1.21	0.86	1.23	1.00	0.09
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル													
1.0E-04	2.24	2.71	3.72	1.71	2.02	2.48	1.80	2.18	2.99	1.37	1.63	1.99	0.28
1.0E-05	1.63	1.40	1.25	1.27	1.69	1.45	1.31	1.13	1.00	1.02	1.36	1.16	0.07
1.0E-06	1.92	1.51	1.28	1.14	1.33	1.44	1.54	1.21	1.03	0.92	1.07	1.15	0.11
1.0E-07	1.41	1.51	1.32	1.45	1.12	1.36	1.13	1.21	1.06	1.17	0.90	1.09	0.05
1.0E-08	1.33	1.69	1.78	1.53	1.23	1.51	1.07	1.36	1.43	1.23	0.99	1.21	0.08
V.C.	1.00	1.41	1.66	0.85	1.30	1.24	0.80	1.13	1.33	0.68	1.05	1.00	0.12
ベンゾフェノン-3													
1.0E-05	1.75	1.27	1.53	1.91	1.99	1.69	1.17	0.85	1.02	1.28	1.33	1.13	0.09
1.0E-06	1.41	1.62	1.23	1.40	2.21	1.58	0.94	1.09	0.82	0.93	1.48	1.05	0.11
1.0E-07	1.39	1.26	1.59	1.25	1.28	1.35	0.93	0.84	1.06	0.83	0.86	0.90	0.04
1.0E-08	1.29	1.83	1.24	1.09	1.25	1.34	0.86	1.22	0.83	0.73	0.84	0.90	0.09
1.0E-09	1.62	1.50	1.24	1.27	1.11	1.35	1.09	1.00	0.83	0.85	0.74	0.90	0.06
V.C.	1.58	1.45	1.31	1.59	1.55	1.50	1.06	0.97	0.88	1.06	1.03	1.00	0.04

(7) つづき

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
p-メトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル (試験②)													
1.0E-04	2.40	2.74	2.54	3.91	2.13	2.74	1.57	1.80	1.66	2.56	1.39	1.80	0.20
1.0E-05	1.35	1.62	1.72	1.65	1.19	1.51	0.88	1.06	1.13	1.08	0.78	0.99	0.07
1.0E-06	1.39	1.60	1.28	1.22	1.45	1.39	0.91	1.05	0.84	0.80	0.95	0.91	0.04
1.0E-07	1.35	2.26	1.20	1.35	1.51	1.54	0.89	1.48	0.78	0.88	0.99	1.00	0.12
1.0E-08	1.74	1.44	1.55	1.18	1.29	1.44	1.14	0.94	1.01	0.77	0.85	0.94	0.06
V.C.	1.31	2.27	1.29	1.47	1.30	1.53	0.86	1.49	0.84	0.96	0.85	1.00	0.12

(8) ミジンコ JhR レポータージーン試験 (幼若ホルモン作用)

試験濃度	発光強度比 (Pluc/Rluc)						転写活性比						
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	平均	標準誤差
ファルネセン酸メチル (陽性対照)													
3.2E-05	194	291	191	227	322	245	9.57	14.4	9.42	11.2	15.9	12.1	1.30
1.0E-05	220	193	275	247	258	239	10.9	9.54	13.6	12.2	12.7	11.8	0.72
1.0E-06	150	149	182	158	131	154	7.42	7.33	8.99	7.79	6.46	7.60	0.41
1.0E-07	114	98.8	84.9	91.6	—	97.4	5.64	4.88	4.19	4.52	—	4.81	0.31
1.0E-08	47.7	12.6	18.8	23.7	30.8	26.7	2.36	0.62	0.93	1.17	1.52	1.32	0.30
V.C.	19.6	23.4	19.8	20.8	17.6	20.3	0.97	1.16	0.98	1.03	0.87	1.00	0.05
アトラジン													
1.0E-04	42.0	49.6	29.2	30.5	32.9	36.9	1.82	2.16	1.27	1.33	1.43	1.60	0.17
1.0E-05	26.2	9.59	27.3	24.4	29.4	23.4	1.14	0.42	1.19	1.06	1.28	1.02	0.15
1.0E-06	27.1	21.9	23.5	22.9	26.4	24.4	1.18	0.95	1.02	0.99	1.15	1.06	0.04
1.0E-07	20.7	19.9	17.5	27.4	15.8	20.2	0.90	0.86	0.76	1.19	0.69	0.88	0.09
1.0E-08	21.0	26.5	20.2	18.6	19.9	21.2	0.91	1.15	0.88	0.81	0.86	0.92	0.06
V.C.	23.8	19.5	21.6	30.9	19.3	23.0	1.03	0.85	0.94	1.34	0.84	1.00	0.09
ピリプロキシフェン													
1.0E-05	262	247	218	159	203	218	11.4	10.7	9.48	6.93	8.83	9.47	0.78
1.0E-06	170	192	151	118	131	152	7.40	8.35	6.56	5.11	5.71	6.63	0.58
1.0E-07	124	117	133	136	129	128	5.38	5.10	5.79	5.91	5.59	5.55	0.14
1.0E-08	32.9	30.9	27.3	20.0	26.9	27.6	1.43	1.34	1.19	0.87	1.17	1.20	0.10
1.0E-09	28.7	22.9	23.6	23.2	23.9	24.4	1.25	0.99	1.02	1.01	1.04	1.06	0.05
V.C.	23.8	19.5	21.6	30.9	19.3	23.0	1.03	0.85	0.94	1.34	0.84	1.00	0.09
カルバマゼピン													
1.0E-04	28.5	19.9	24.4	25.6	18.4	23.4	1.30	0.91	1.11	1.17	0.84	1.07	0.08
1.0E-05	20.4	28.1	26.3	24.0	22.9	24.3	0.93	1.28	1.20	1.10	1.04	1.11	0.06
1.0E-06	18.5	21.2	22.0	24.7	17.5	20.8	0.85	0.97	1.00	1.12	0.80	0.95	0.06
1.0E-07	23.1	20.2	22.8	24.1	—	22.6	1.05	0.92	1.04	1.10	—	1.03	0.04
1.0E-08	19.0	16.2	19.1	24.0	21.0	19.8	0.87	0.74	0.87	1.09	0.96	0.90	0.06
V.C.	21.0	21.9	18.1	22.4	26.2	21.9	0.96	1.00	0.83	1.02	1.19	1.00	0.06
ピリプロキシフェン (試験②)													
1.0E-05	154	175	172	164	138	161	12.2	13.9	13.6	13.0	10.9	12.7	0.53
3.2E-06	169	87.0	118	137	119	126	13.4	6.87	9.34	10.8	9.41	9.96	1.06
1.0E-06	150	87.3	83.4	94.0	110	105	11.8	6.90	6.59	7.43	8.65	8.28	0.95
1.0E-07	102	99.0	90.0	71.3	66.3	85.8	8.09	7.82	7.11	5.64	5.24	6.78	0.57
1.0E-08	31.5	35.4	24.7	31.3	23.8	29.4	2.49	2.80	1.95	2.47	1.88	2.32	0.17
V.C.	11.4	11.1	13.6	12.9	14.2	12.7	0.90	0.88	1.08	1.02	1.12	1.00	0.05