

フィプロニル (CAS no. 120068-37-3)

試験管内試験結果

1. 試験項目

フィプロニルについて、下表に示す試験項目（作用）を対象として、第1段階試験管内試験（レポータージーン試験）を実施した。

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	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	脱皮ホルモン	その他*
－	－	－	○	N	N	－	－

P : EC₅₀ 又は IC₅₀ 値が検出

○ : 試験対象としたが、まだ実施していない作用モード

N : EC₅₀ 又は IC₅₀ 値が検出不可

－ : 試験対象としなかった作用モード

* : その他

2. 試験方法

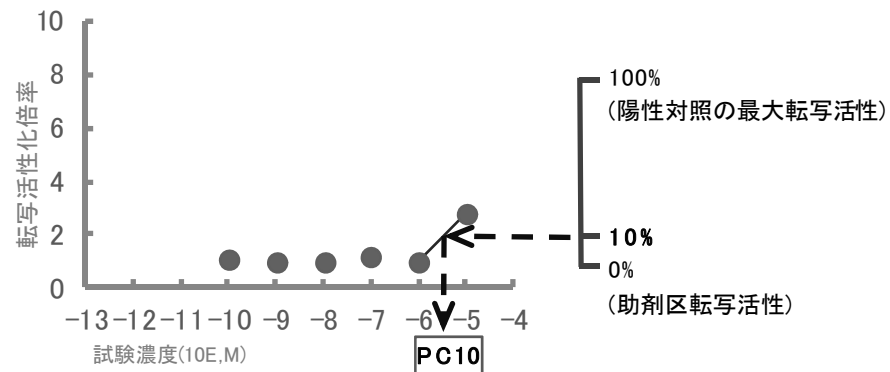
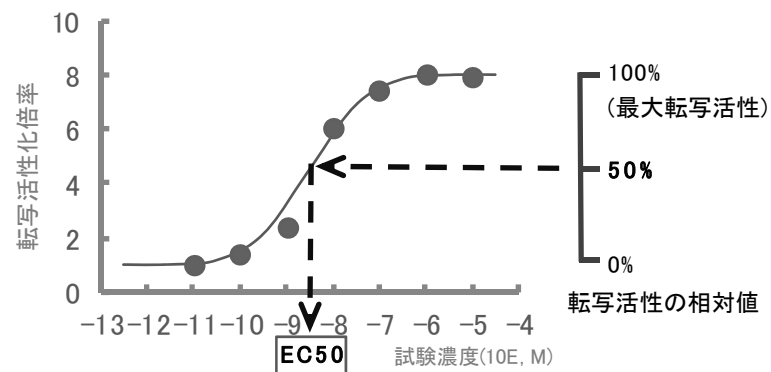
すべての試験項目のレポータージーン試験は、一過性発現細胞系による受容体遺伝子及びレポーター遺伝子等の細胞導入効率の変動を標準化できるデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を用いて実施した。

試験には、純度 97%以上の試薬を用いて行った。また、試験が適切に実施されたことの確認及び試験対象物質の転写活性化能又は転写活性化阻害の相対的な強さ（相対活性比）を推定するために、試験対象物質での試験と並行して、陽性対照物質（甲状腺ホルモン作用：トリヨードサイロニン）による試験を実施した。試験濃度は、試薬の動物細胞に対する毒性及び培地への溶解性を考慮して決定した。

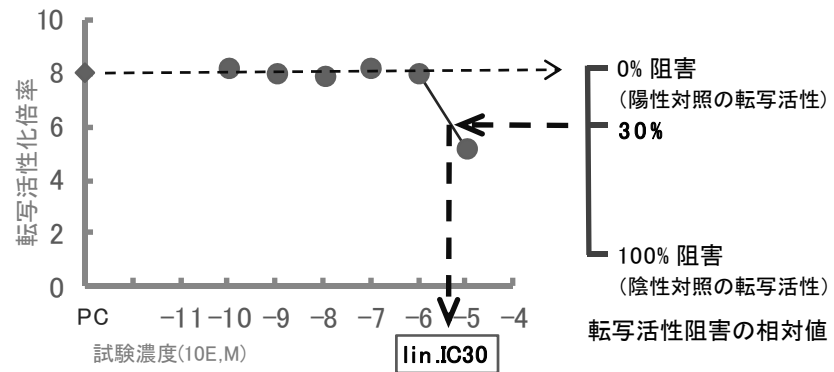
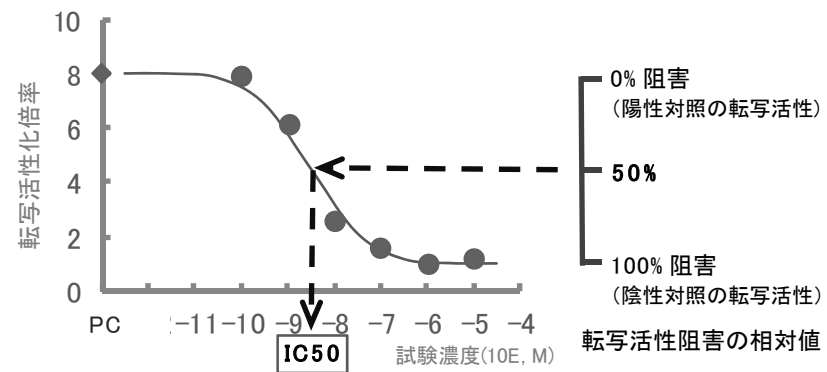
各試験は、96 穴マイクロプレートを用いて、濃度あたり 3 連以上で行った。アゴニスト検出系の試験では、ベクターを一過的に導入した培養細胞を被験物質でばく露した後、ホタルルシフェラーゼの発光強度でホルモン応答による転写活性、ウミシイタケルシフェラーゼの発光強度で内部コントロールの転写活性を測定し、それらの比（発光強度比）を求めた。

各試験濃度における転写活性化倍率（助剤対照の発光強度比に対する試験濃度での発光強度比の割合）から、以下により、アゴニスト系試験では転写活性の有無及び EC₅₀ 値（又は PC₁₀ 値）、アンタゴニスト系試験では転写活性阻害の有無及び IC₅₀ 値（又は linIC₃₀ 値）を求めた。また、EC₅₀ 値又は IC₅₀ 値等が得られた場合には、それらを基に陽性対照物質の活性に対する比率（相対活性比）を算出した。

アゴニスト検出系の試験での EC_{50} 値及び PC_{10} 値の算出



アンタゴニスト検出系の試験での IC_{50} 値及び $linIC_{30}$ 値の算出

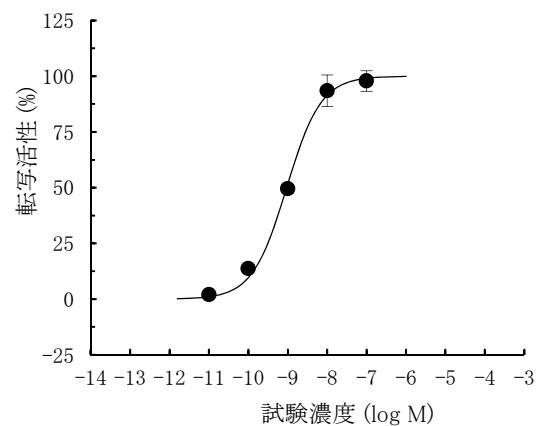


3. 結果

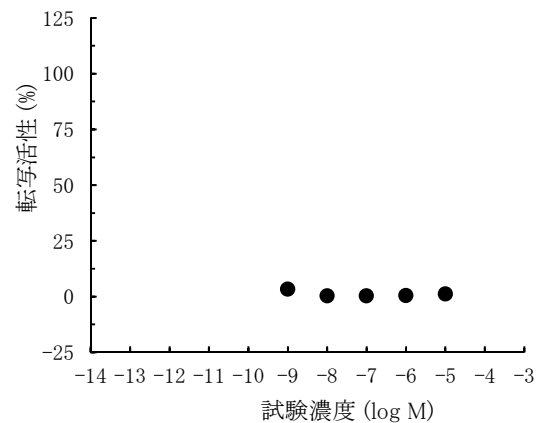
(1) ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β) レポーター遺伝子試験 (甲状腺ホルモン作用)

甲状腺ホルモン作用については、ニシツメガエル TR β の有意な転写活性化は認められず、EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値は得られなかった。

トリヨードサイロニン (陽性対照)



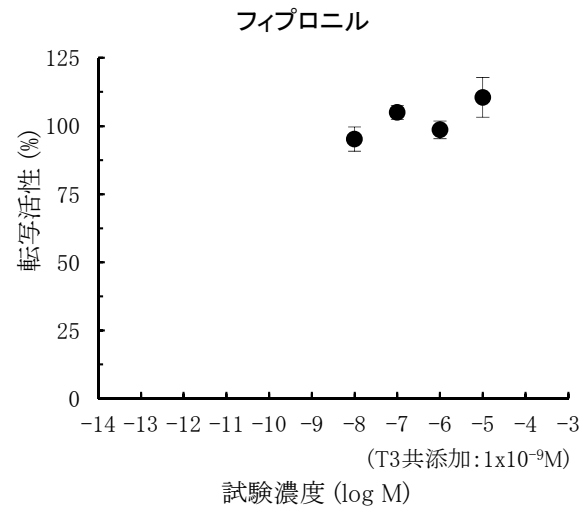
フィプロニル



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
フィプロニル	(得られなかった)	
トリヨードサイロニン	EC ₅₀ = 9.4 × 10 ⁻¹⁰ M	

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

抗甲状腺ホルモン作用については、トリヨードサイロニン 1×10^{-9} M 共添加条件でトリヨードサイロニンによるニシツメガエル TR β の転写活性に対する有意な阻害作用は認められず、IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値は得られなかった。



試験対象物質	抗甲状腺ホルモン作用	
	IC ₅₀ 又は linIC ₃₀	相対活性比
フィプロニル	(得られなかった)	

試験条件等	メダカER α レポーター遺伝子試験		メダカAR β レポーター遺伝子試験	ニシツメガエルTR β レポーター遺伝子試験	
	エストロゲン作用	抗エストロゲン作用	アンドロゲン作用試験	甲状腺ホルモン作用	抗甲状腺ホルモン作用
試験容器	96穴マイクロプレート		96穴マイクロプレート	96穴マイクロプレート	
動物細胞株	HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株)		HepG2 (ヒト肝腫瘍細胞株)	HEK293 (ヒト胎児腎由来細胞株)	
試験培地	DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS含有)		DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS含有)	DMEM (2mM L-glutamine、 10%FCS含有)	
試験液量	0.2 mL/well		0.2 mL/well	0.2 mL/well	
細胞播種数	1.4×10^4 cells/well		1.4×10^4 cells/well	1.4×10^4 cells/well	
受容体発現ベクター	medaka ERalpha/pcDNA		medaka ARbeta/pcDNA	tropicalis TR beta/pcDNA	
試験レポーターベクター	ERE-TK-Luc		ARE-MMTV-Luc	TRE-minP-Luc	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK-Rluc		pRL-TK-Rluc	pRL-TK-Rluc	
培養環境及び時間	37°C、5% CO ₂ 、40時間		37°C、5% CO ₂ 、40時間	37°C、5% CO ₂ 、40時間	
連数	5連(well)/濃度		5連(well)/濃度	5連(well)/濃度	
共添加物質(陽性物質) 及び濃度	—	17 β エストラジオール 2×10^{-10} M	—	—	トリヨードサイロニン 1×10^{-9} M
助剤及び終濃度	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%	DMSO 0.1%	DMSO 0.1%	DMSO 0.2%

(平成 28 年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料 3-3 より抜粋)