

ヒドラジン (CAS no. 302-01-2)

試験管内試験結果

1. 試験項目

ヒドラジンについて、下表に示す試験項目（作用）を対象として、第1段階試験管内試験（レポーター遺伝子試験）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	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

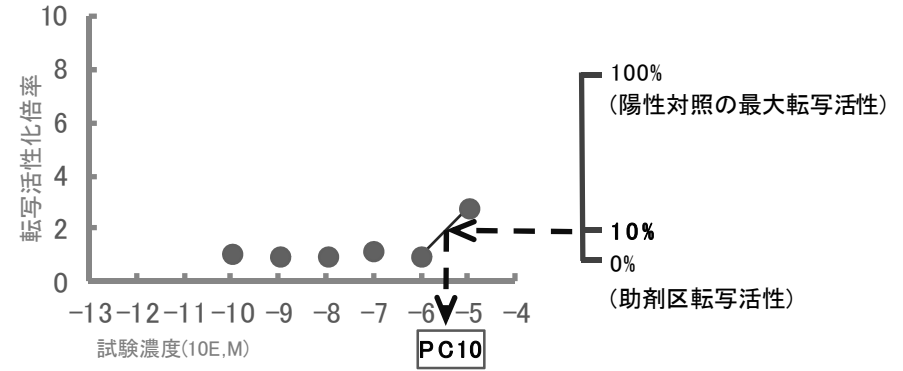
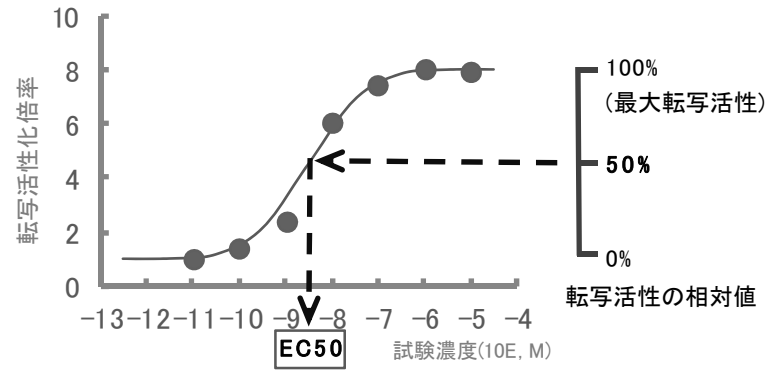
— : 試験対象としなかった作用モード

* : その他

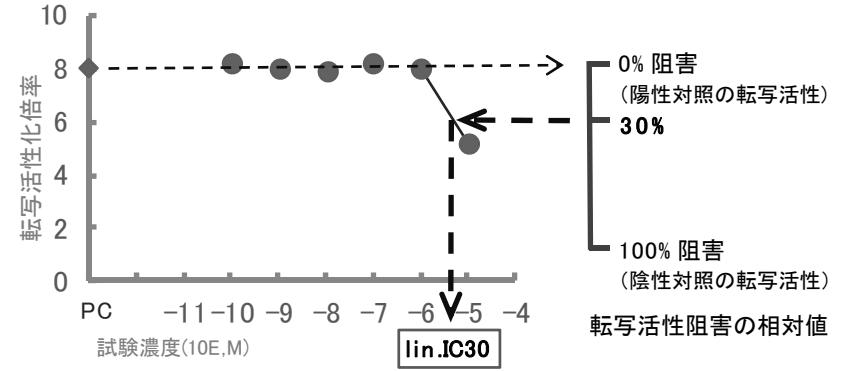
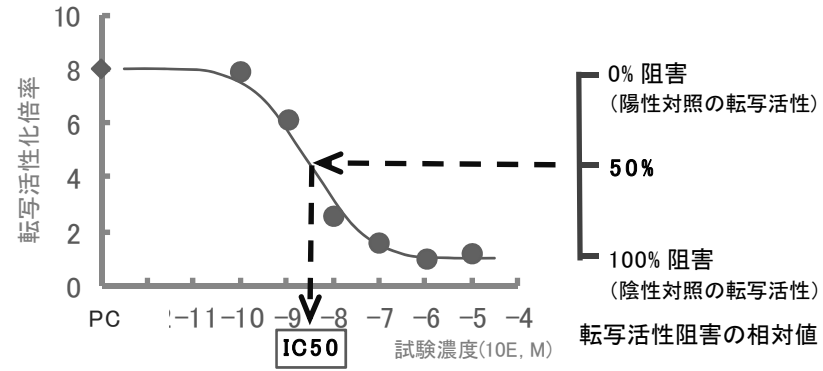
2. 試験方法

OECD TG455(Stably Transfected Human Estrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogen Agonist-Activity of Chemicals)を参考に、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究において開発したメダカエストロゲン受容体レポーター遺伝子試験及びメダカアンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験を今回採用した。開発に際し既存の方法^{1~7)}も参照した。

アゴニスト検出系の試験での EC₅₀ 値及び PC₁₀ 値の算出



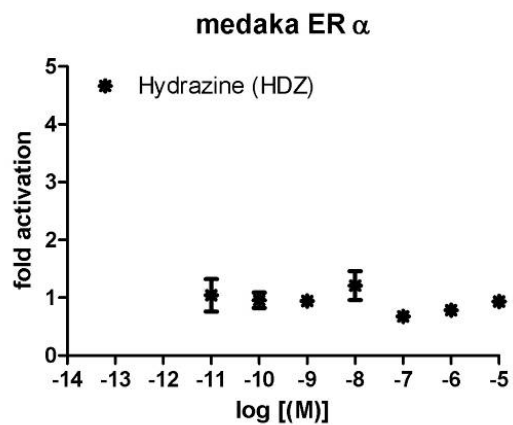
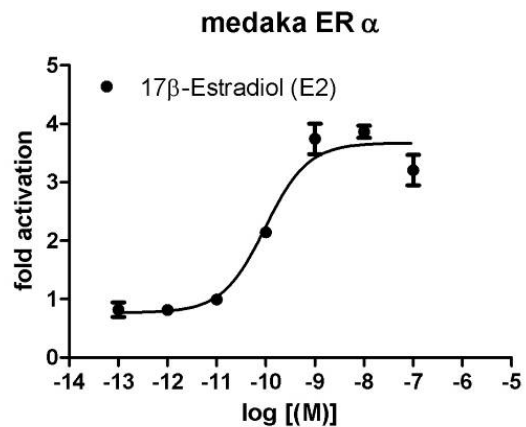
アンタゴニスト検出系の試験での IC₅₀ 値及び linIC₃₀ 値の算出



3. 結果

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

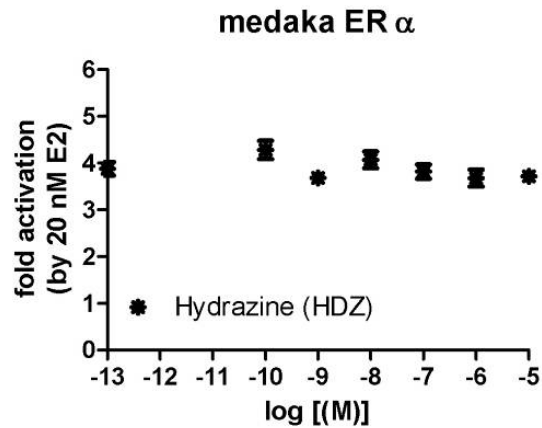
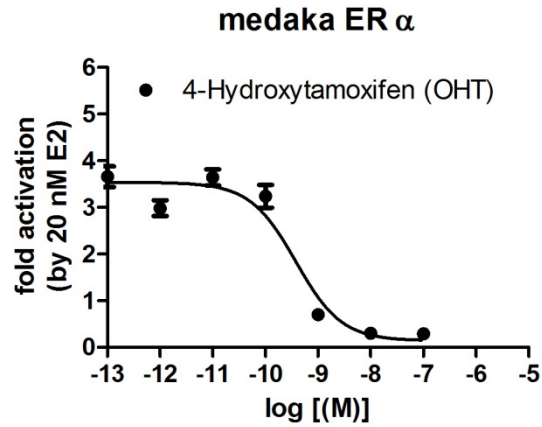
エストロゲン作用に関して、試験濃度範囲においてメダカ $ER\alpha$ に対する転写活性化は認められなかった。



試験対象物質	エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又は PC ₁₀	相対活性比
ヒドラジン	(得られなかった)	
17 β -エストラジオール	9.7 × 10 ⁻¹¹	100%

(2) メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)

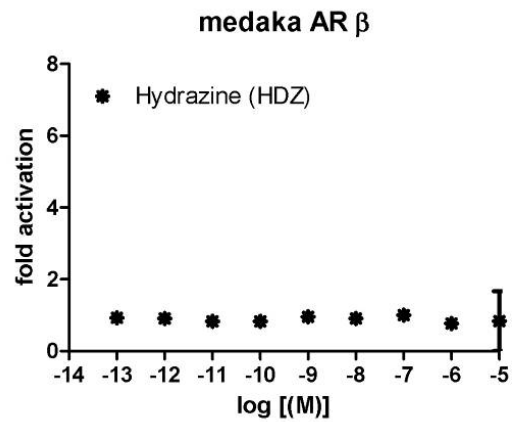
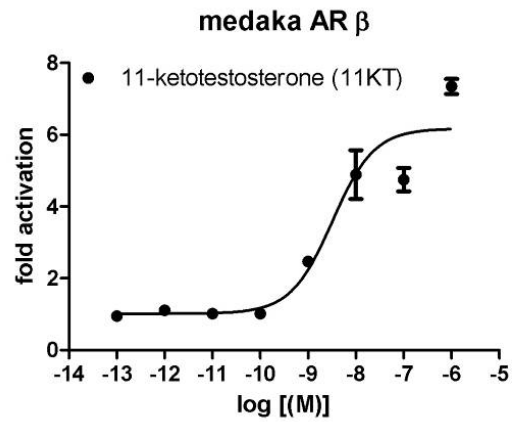
抗エストロゲン作用に関して、試験濃度範囲において 2×10^{-10} M の 17β -エストラジオール共存下でメダカエストロゲン受容体 α に対する転写活性化阻害はみられなかった。



試験対象物質	抗エストロゲン作用	
	EC ₅₀ 又は PC ₁₀	相対活性比
ヒドラジン	(得られなかった)	
4-ヒドロキシタモキシフェン	3.8×10^{-10}	100%

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

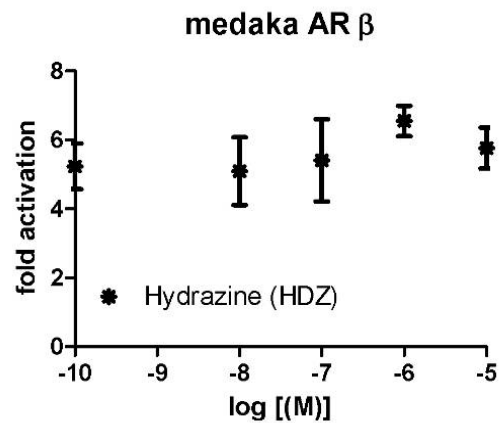
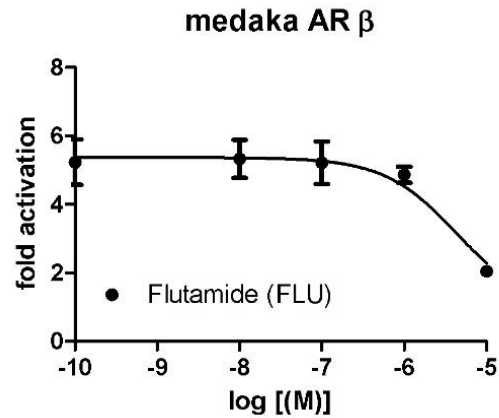
アンドロゲン作用に関して、試験濃度範囲においてメダカ $AR\beta$ に対する転写活性化は認められなかった。



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
ヒドラジン	(得られなかった)	
11 ケトテストステロン	3.2 × 10 ⁻⁹	100%

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

抗アンドロゲン作用に関して、試験濃度範囲において 1×10^{-8} M の 11-ケトテストステロン共存下でメダカアンドロゲン受容体 β に対する転写活性阻害はみられなかった。



試験対象物質	抗アンドロゲン作用	
	EC ₅₀ 又は PC ₁₀	相対活性比
ヒドラジン	(得られなかった)	
フルタミド	4.2×10^{-6}	100%

	エストロゲン作用	抗エストロゲン作用	アンドロゲン作用	抗アンドロゲン作用
細胞株	HEK293		HepG2	
受容体発現ベクター	medaka ER alpha/pcDNA		medaka AR beta/pcDNA	
試験レポーターベクター	ERE-TK- <i>Luc</i>		ARE-MMTV- <i>Luc</i>	
コントロールレポーターベクター	pRL-TK- <i>Rluc</i>			
試験用培地	DMEM (2mM L-glutamine、10% FCS を含む)			
試験環境	37°C、CO ₂ インキュベータ			
細胞播種数	5 × 10 ⁴ cells/ウェル (24 ウェルプレート)			
連数	3 ウェル/濃度			
試験液量	1 mL			
溶媒	ジメチルスルホキシド (DMSO)			
溶媒終濃度	0.1 %	0.2 %	0.1 %	0.2 %
被験物質添加終濃度 (試験濃度)	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ M 公比 10	10 ⁻¹⁰ ~10 ⁻⁵ M 公比 10	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁵ M 公比 10	10 ⁻⁸ ~10 ⁻⁵ M 公比 10
共添加物質及び添加濃度	-	E2 2 × 10 ⁻¹⁰ M	-	11KT 1 × 10 ⁻⁸ M
陽性対照物質	E2	OHT	11KT	FLU
陽性対照物質添加終濃度	10 ⁻¹³ ~10 ⁻⁷ M 公比 10	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁷ M 公比 10	10 ⁻¹² ~10 ⁻⁶ M 公比 10	10 ⁻¹¹ ~10 ⁻⁶ M 公比 10

E2 : 17β-エストラジオール OHT : 4-ヒドロキシタモキシフェン
11KT : 11-ケトテストステロン FLU : フルタミド

4. 引用文献

- 1) Katsu Y, Taniguchi E, Urushitani H, Miyagawa S, Takase M, Kubokawa K, Tooi O, Oka T, Santo N, Myburgh J, Matsuno A, Iguchi T. Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors. *Gen Comp Endocrinol.* 168, 220-230 (2010).
- 2) Katsu Y, Kubokawa K, Urushitani H, Iguchi T. Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen and androgen response elements. *Endocrinology* 151, 639-648 (2010).
- 3) Katsu, Y., S. Kohno, S. Hyodo, S. Ijiri, S. Adachi, A. Hara, L.J. Guillette, T. Iguchi, T. Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish. *Endocrinology* 149, 6300-6310 (2008).
- 4) Katsu Y, Hinago M, Sone K, Urushitani H, Guillette LJ Jr, Iguchi T. *In vitro* assessment of transcriptional activation of the estrogen and androgen receptors of mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*. *Mol Cell Endocrinol.* 276, 10-17 (2007).
- 5) Katsu Y, Lange A, Urushitani H, Ichikawa R, Paull GC, Cahill LL, Jobling S, Tyler CR, Iguchi T. Functional associations between two estrogen receptors, environmental estrogens, and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*). *Environ Sci Technol.* 41, 3368-3374 (2007).
- 6) Katsu Y., S. Kohno, T. Oka, N. Mitsui, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, Y. Fukumoto, K. Kuwahara, K. Ashikaga, S. Minami, Y. Ohta, S. Kato, L.J. Guillette, T. Iguchi, Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER α , ESR1) of Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257-258, 84-94 (2006).
- 7) Katsu Y, Bermudez DS, Braun EL, Helbing C, Miyagawa S, Gunderson MP, Kohno S, Bryan TA, Guillette LJ Jr, Iguchi T. Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen Comp Endocrinol.* 136, 122-33(2004).

(EXTEND2010に基づく平成23年度第2回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 参考資料2より抜粋)