

NO. 176 文献番号： 11171525

担当者 内田 康一

著者名： Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM.

論文題名： The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A.

出典： Environ Health Perspect. 2001 Jan;109(1):55-60.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、(x)マウス、()人、()その他 _____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(x)生殖系、()その他 _____
3. 影響の種類 ()細胞、(x)組織、(x)個体、()その他 _____
4. 曝露方法 ()経口、(x)埋め込み、その他 _____
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、(x)出生後、()成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 50, 75, 100 mg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度： (陰開口： 0.1 mg/kg body weight)
8. 観察時期 ()出生前、()出生後、(x)思春期、()成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、(x)なし
GLP に準拠 ()はい、(x)いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称 _____、(x)いいえ

論文の概要

エストロゲン作用の評価方法として用いられてきた子宮重量測定法では、用いる実験動物の種や系統により感受性が異なり、様々な結果が報告されてきた。本報では、未成熟雌マウス (CD-1) を用い、BPA を子宮へ注入曝露させ、エンドポイントとして子宮重量の他、表皮細胞形態、ラクトフェリンタンパクの発現、PCNA (proliferating cell antigen) の発現等についても同時に観察した。

その結果、BPA 曝露により、エストラジオール (E2) と同様に、陰開口、子宮重量増加、表皮細胞形態変化、ラクトフェリン発現等の誘導が観察された。

一方、子宮重量法で有意な差が確認されたのは、BPA 100 mg/kg/day の場合のみであり、他のエンドポイントに比べ感度が低かった。これより、*in vivo* にてエストロゲン作用を評価するには、より感度の高い試験評価法の改良・開発が必要と考えられた。

添付資料

Fig. 1

評価者のコメント

エストロゲン作用の感受性が、実験動物の種、系統により異なり多様であることを認識させてくれる重要な報告である。11種類ものエンドポイントを観察/測定しているが、estradiol を陽性対照として個々の試験系の確認をするなど、一定の信頼性を確保する配慮がなされている。

子宮開口率と子宮重量については、用量依存的に影響を受けずにU字型となっているが、各エンドポイントの感受性や再現性、陽性対照との比較検討等が更に必要と思われる。

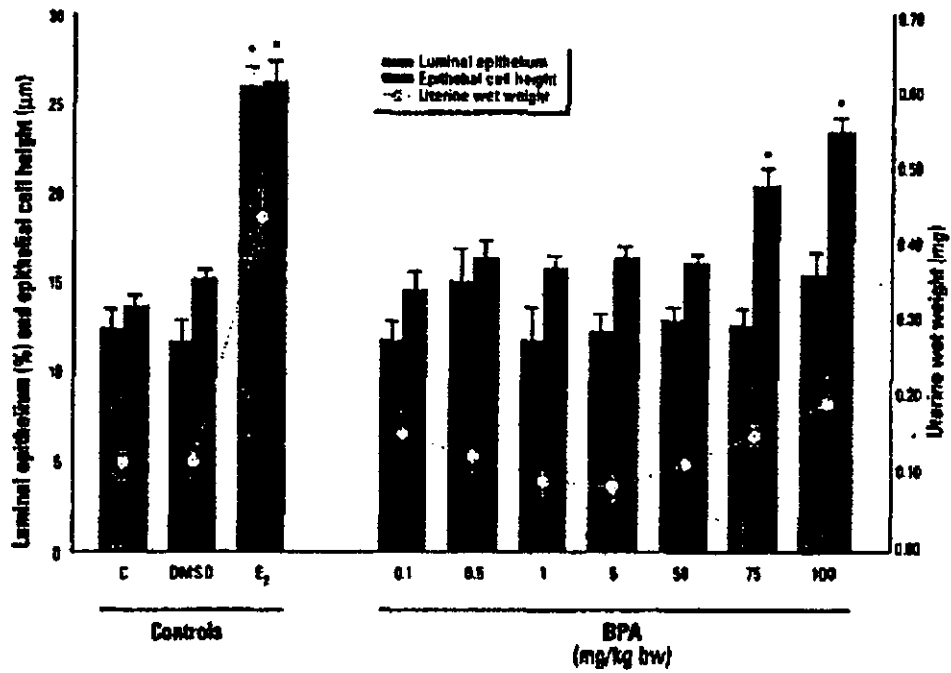


Figure 1. Differences in relative area of luminal epithelium (the percentage of uterus occupied by luminal epithelium), height of luminal epithelium, and uterine wet weight of immature mice exposed to BPA concentrations ranging from 0.1 to 100 mg/kg/day. C, untreated control. Bars represent mean values \pm SEM. *Significantly different ($p < 0.05$) relative to C and DMSO control groups combined.

NO. 90 文献番号：

担当者 関澤 純

著者名：Milman, HA, Bosland MC, Walden PD, Heinze JE

論文題名：Evaluation of the adequacy of published studies of low-dose effects of bisphenol A on the rodent prostate for use in human risk assessment.

出典：Environ Health Perspect. 111(7): A382(2003)

チェック項目：

1. 対象生物 ラット、 マウス、 人、 その他_____
2. 影響の標的臓器 神経系、 免疫系、 生殖系、 その他_____
3. 影響の種類 細胞、 組織、 個体、 その他_____
4. 曝露方法 経口、 埋め込み、その他_____
5. 曝露時期 胚・胎児、 周産期、 出生後、 成熟動物、 細胞
6. 曝露濃度 用量段階（他の論文を引用）
7. 観察された影響の種類と濃度
（他の論文を引用）
8. 観察時期 出生前、 出生後、 思春期、 成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 あり、 なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 あり、 なし
GLP に準拠 はい、 いいえ
ガイドラインへの準拠 はい：ガイドラインの名称_____、 いいえ

論文の概要

Schoenfelder et al (2002) Environ Health Perspect. 110, A703-707 が early life. exposure について長期の追加試験が必要と述べたことに対して、二つの重要な多世代試験 (Ema et al. (2001) Reproduct. Toxicol. 15, 505-523; Tyl et al (2002) Toxicol. Sci. 68: 121-146) で多種の観察項目についても低用量影響は見られなかったとしている。

添付資料

通信文であり、図表はない。

評価者のコメント

通信文である。

NO. 117 文献番号 : 11955943

担当者 迫田篤信

著者名 : T. Nagao, Y. Saito, K. Usumi, S. Yoshimura, H. Ono

論文題名 : Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage.

出典 : Reproductive Toxicology 16 (2002) 123-130

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、(x)マウス、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(x)生殖系、()その他_____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、(x)個体、()その他_____
4. 曝露方法 (x)経口、()埋め込み、その他_____
5. 曝露時期 (x)胚・胎児、()周産期、(x)出生後、(x)成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
7. 観察された影響の種類と濃度 (_____)
(_____)
8. 観察時期 ()出生前、(x)出生後、()思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、(x)なし: 添付の EU リスク評価文献リスト中の掲載の有無
GLP に準拠 ()はい、(x)いいえ 論文中に「GLP に準拠」の記述の有無
ガイドラインへの準拠 ()はい: ガイドラインの名称 _____、(x)いいえ

論文の概要

発達段階の異なるエストロゲン感受性系統 C57BL/6N マウスを bisphenol A に経口曝露し、雄の生殖器官への影響を調べた。用量は 2,20,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である。成獣、離乳直後、胚/胎児の各発達段階について検討した。体重、生殖器官重量(精巣、副睾丸、精囊)、精巣上体の精子濃度、腹側前立腺を含む生殖器の組織に bisphenol A 投与の影響は認められなかった。低用量の bisphenol A への曝露は、エストロゲン感受性系統 C57BL/6N マウスの精子濃度や雄の生殖器官の発達に影響しないことを示した。

添付資料:

Table 3, Fig 2

評価者のコメント

植物エストロゲンの含有量の低い飼料を使用。試験動物がエストロゲン感受性であることについてもしっかりと確認されている。曝露動物数も多く、試験の信頼性は高い。

Table 3
Reproductive organ weights in male C57BL/6N mice exposed to BPA at various stages

| Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) | No. mice treated | Start of treatment (Administration period) | Age at termination | No. males/No. litters | Final body weight (g) | Testes (g) | Epididymides (g) | Seminal vesicles (g) |
|---|------------------|--|--------------------|-----------------------|-------------------------------|--|--|---|
| 0 | 20 males | 12 weeks old (6 days) | 17 weeks old | 15 | 29.77 \pm 0.59 ^a | 0.150 \pm 0.008 ^a 0.302 \pm 0.042 ^a | 0.071 \pm 0.003 0.237 \pm 0.015 | 0.419 \pm 0.016 1.491 \pm 0.033 |
| 2 | 20 males | 12 weeks old (6 days) | 17 weeks old | 15 | 29.00 \pm 0.47 | 0.157 \pm 0.001 0.536 \pm 0.013 | 0.072 \pm 0.001 0.246 \pm 0.006 | 0.417 \pm 0.030 1.431 \pm 0.128 |
| 20 | 20 males | 12 weeks old (6 days) | 17 weeks old | 15 | 29.81 \pm 0.77 | 0.159 \pm 0.005 0.539 \pm 0.026 | 0.078 \pm 0.003 0.262 \pm 0.013 | 0.407 \pm 0.008 1.366 \pm 0.050 |
| 200 | 20 males | 12 weeks old (6 days) | 17 weeks old | 15 | 29.75 \pm 0.75 | 0.159 \pm 0.004 0.545 \pm 0.017 | 0.072 \pm 0.001 0.246 \pm 0.011 | 0.411 \pm 0.020 1.382 \pm 0.083 |
| 0 | 30 males | 21 days old (21 days) | 6 weeks old | 25/10 | 17.15 \pm 0.29 | 0.119 \pm 0.002 0.713 \pm 0.014 | 0.031 \pm 0.001 0.181 \pm 0.006 | 0.045 \pm 0.003 0.259 \pm 0.014 |
| 2 | 30 males | 21 days old (21 days) | 6 weeks old | 25/10 | 18.22 \pm 0.67 | 0.117 \pm 0.017 0.663 \pm 0.084 | 0.033 \pm 0.003 0.187 \pm 0.013 | 0.044 \pm 0.006 0.247 \pm 0.028 |
| 20 | 30 males | 21 days old (21 days) | 6 weeks old | 25/10 | 16.06 \pm 0.83 | 0.116 \pm 0.012 0.701 \pm 0.056 | 0.030 \pm 0.003 0.184 \pm 0.011 | 0.043 \pm 0.008 0.253 \pm 0.041 |
| 200 | 30 males | 21 days old (21 days) | 6 weeks old | 25/10 | 16.83 \pm 0.34 | 0.115 \pm 0.006 0.677 \pm 0.038 | 0.030 \pm 0.001 0.173 \pm 0.007 | 0.045 \pm 0.003 0.263 \pm 0.014 |
| 0 | 10 dams | Gestational day 11 (7 days) | 12 weeks old | 25/10 | 24.70 \pm 0.28 | 0.149 \pm 0.003 0.617 \pm 0.014 | 0.060 \pm 0.001 0.249 \pm 0.004 | 0.248 \pm 0.006 1.028 \pm 0.027 |
| 2 | 10 dams | Gestational day 11 (7 days) | 12 weeks old | 25/10 | 23.99 \pm 0.50 | 0.146 \pm 0.003 0.612 \pm 0.012 | 0.058 \pm 0.002 0.242 \pm 0.006 | 0.234 \pm 0.003 [*] 0.968 \pm 0.038 |
| 20 | 10 dams | Gestational day 11 (7 days) | 12 weeks old | 25/10 | 23.85 \pm 0.25 | 0.142 \pm 0.002 0.594 \pm 0.009 | 0.057 \pm 0.002 0.239 \pm 0.007 | 0.243 \pm 0.011 1.009 \pm 0.047 |
| 200 | 10 dams | Gestational day 11 (7 days) | 12 weeks old | 25/10 | 24.75 \pm 0.52 | 0.149 \pm 0.003 0.608 \pm 0.012 | 0.060 \pm 0.001 0.240 \pm 0.005 | 0.250 \pm 0.008 1.008 \pm 0.022 |

^amean \pm S.E.

^babsolute weight.

^crelative weight (organ weight/terminal body weight) \times 100.

^{*}Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Five males in each group were anesthetized and transcardiac perfusion was performed for histologic observation testes, epididymides, seminal vesicles, and prostates with an electron microscope

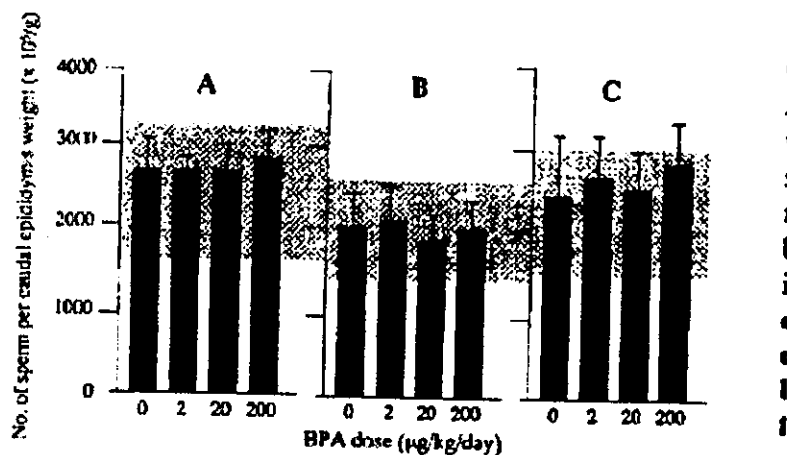


Fig. 2. Numbers of sperm per gram cauda epididymis of male C57BL/6N mice exposed to low-dose BPA at various developmental stages; (A) sexually mature, (B) juvenile, or (C) embryonic/fetal stage. The shadowed regions represent the range of sperm number per gram cauda epididymis in the historical controls in C57BL/6N male mice (left, 17-18 weeks old; middle; 6 weeks old; right, 12-13 weeks old)

NO. 21 文献番号：

担当者 関澤 純

著者名：Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L.

論文題名：The OECD Program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: Dietary Phytoestrogen analysis.

出典：Environ Health Perspect. 111(12): 1559-1567(2003)

チェック項目：

1. 対象生物 (x)ラット、()マウス、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(x)生殖系、()その他_____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、(x)個体、()その他_____
4. 曝露方法 (x)経口、()埋め込み、その他 皮下
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、(x)出生後、(x)成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階(強制経口 600 mg/kg/day、皮下 300 mg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度 (50 mg/kg 体重減少および体重増加減少)
(強制経口 600 mg/kg/day、皮下 300 mg/kg/day 子宮重量増加)
8. 観察時期 ()出生前、()出生後、(x)思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、()なし
GLP に準拠 (x)はい、()いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称 OECD Phase2 Validation study、()いいえ

論文の概要

OECD Phase2 Validation study の一環として餌中の植物エストロゲンの混入率と、それによる子宮重量測定への影響を調べた。未成熟雌ラットおよび卵巣切除ラットを用いる標準試験法により参加した 21 ラボの餌中の植物エストロゲン (genistein, daidzein, coumestrol) 濃度を調べた結果、低濃度の植物エストロゲンは子宮重量測定に影響を及ぼさないと判定された。

添付資料

評価者のコメント：

Bisphenol A や nonylphenol のような弱いエストロゲンの活性を調べる際に餌中の植物エストロゲン濃度が total genistein として 40-50 mg/kg/day を超えるような場合は注意すべきと指摘された。前の報告(Kanno et al. Environ Health Perspect.111,1550-1558 (2003))では経口投与の場合、Bisphenol A と genistein のエストロゲン活性の相対強度として Bisphenol A は genistein の 0.06 倍程度と評価されている。

NO. 24 文献番号：

担当者 関澤 純

著者名：Owens W, Koeter HBWM.

論文題名：The OECD Program to validate the rat uterotrophic bioassay：An Overview.

出典：Environ Health Perspect. 111(12): 1527-1529(2003)

チェック項目：

1. 対象生物 (x)ラット、()マウス、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(x)生殖系、()その他_____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、(x)個体、()その他_____
4. 曝露方法 (x)経口、()埋め込み、その他 皮下
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、(x)出生後、(x)成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (強制経口 600 mg/kg/day、皮下 300 mg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度 (50 mg/kg 体重減少および体重増加減少)
(強制経口 600 mg/kg/day、皮下 300 mg/kg/day 子宮重量増加)
8. 観察時期 ()出生前、()出生後、(x)思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、()なし
GLP に準拠 (x)はい、()いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称 OECD Phase2 Validation study、()いいえ

論文の概要

OECD Validation program について総括した。Phase1 では強力なエストロゲン物質である Ethinylestradiol とアンタゴニストである ZM189, 154 を用い、Phase 2 では弱いエストロゲン物質として bisphenolA, genistein, methoxychlor, nonylphenol, o,p' -DDT の 5 種を用いたが、子宮重量増加試験法は有用なエストロゲン物質検査法として確立された。

添付資料

評価者のコメント

プロトコルについて可能な諸問題点を検討した結果、本法を用いる上で十分なサポートデータが得られたとあって良いとしている。

No. 75 文献番号： 12446607

担当者 花田秀一

著者名：Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, Atanassova N, Sharpe RM.

論文題名：Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance.

出典：Endocrinology 143(12):4797-4808. (2002 Dec.)

チェック項目：

1. 対象生物 (X)ラット、()マウス、()人、()その他 _____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(X)生殖系、()その他 _____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、(X)個体、()その他 _____
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 皮下投与
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、(X)出生後、()成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 100 μ g/body、出生後 2, 4, 6, 8, 10 および 12 日)
7. 観察された影響の種類と濃度 (評価した 100 μ g/body で影響無し)
8. 観察時期 ()出生前、(X)出生後、()思春期、()成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (X)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、(X)なし
GLP に準拠 ()はい、(X)いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称 _____、(X)いいえ

論文の概要

ラット新生仔期の diethylstilbestrol (DES) 曝露によって惹起される精巣/生殖管の異常は、エストロゲン-アンドロゲンバランスのかく乱によってもたらされるという仮説について検討した。新生仔期の雄性ラットを用い、単独投与ではほとんど影響を与えない用量の DES (0.1 μ g) にアンドロゲン作用を抑制する物質を併用してその反応を検討した。種々の反応は、DES 単独投与に比べて併用投与で強く観察された。BPA(100 μ g) の単独もしくは併用投与では、なんら影響は認められなかった。これらの結果より、アンドロゲン作用の抑制は、生殖管のエストロゲンへの感受性を高めることが示唆された。生殖管のある部位における発達においては、エストロゲン-アンドロゲンバランスは、これらホルモンの単独の濃度よりも重要であると思われる。

添付資料

Fig. 3、Fig. 6、Fig. 7(いずれも影響なしのデータ)

評価者のコメント

エストロゲン様物質の低用量作用の解明の一環として実施されたもので、その物質自体の濃度よりも生体内での存在バランスの方が重要であるとの仮説の証明を行ったものである。典型的な合成ホルモンの DES については、仮説を裏付ける結果が得られているようだが、弱エストロゲン作用物質での証明はできていない。BPA の 100 μ g/body での影響なしの結果は、信頼できる。

FIG. 5. Effect of neonatal treatment with vehicle (control), 10 μ g DES, 0.1 μ g DES, GnRH α , 0.1 μ g DES plus GnRH α , bisphenol A (BPA), or BPA plus GnRH α on *rat* testis lumen area (μ m) and on plasma testosterone levels (bottom) at 15 d of age. The dashed line shows the mean control value. The data shown are mean \pm SD for 3-10 animals/group. ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$; **** $P < 0.001$ compared with the respective control value.

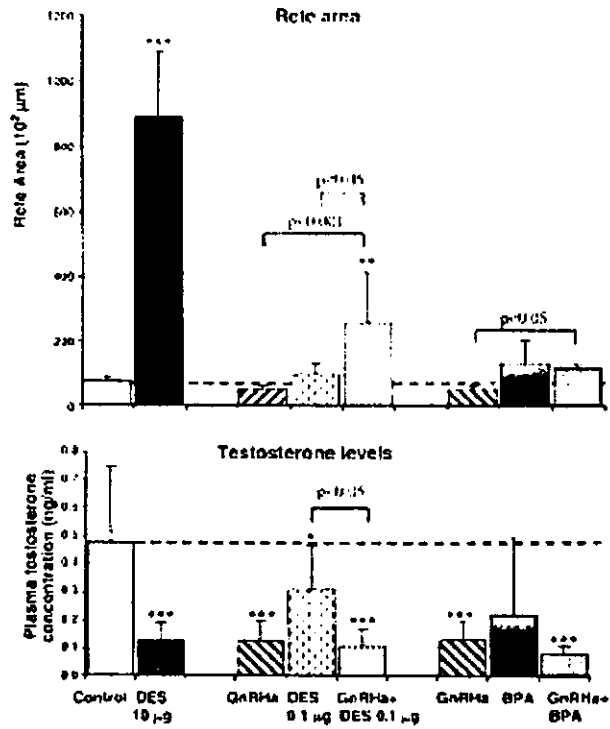


FIG. 6. Effect of neonatal treatment with vehicle (control), 10 μ g DES, 0.1 μ g DES, GnRH α , 0.1 μ g DES plus GnRH α , Flutamide (Flut), 0.1 μ g DES plus flutamide, bisphenol A (BPA), or BPA plus GnRH α on the average luminal area of an efferent duct at 15 d of age (top) and on plasma testosterone levels (bottom) at 15 d of age. The dashed line shows the mean control value. The data shown are the mean \pm SD for 3-10 animals/group. ** $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ compared with the respective control value.

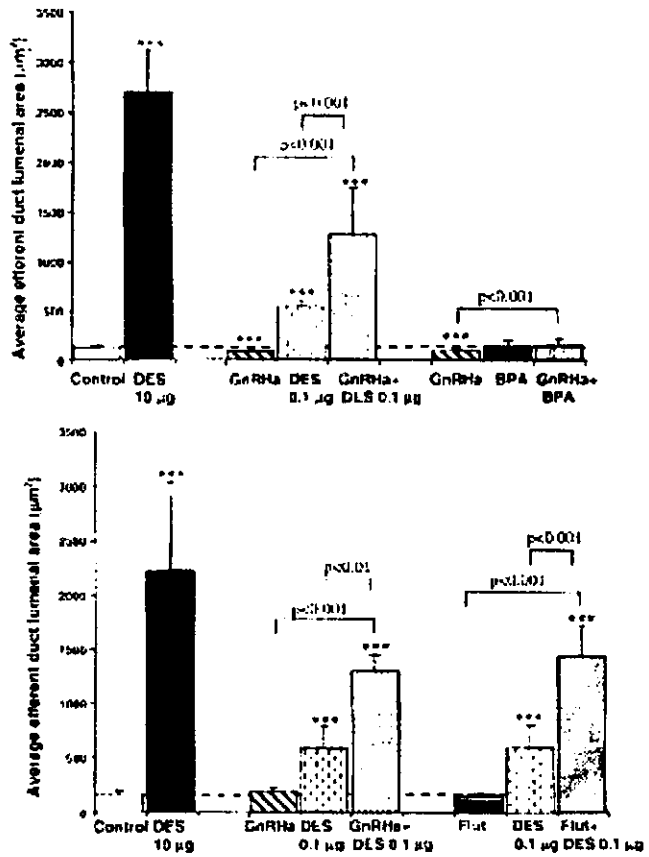
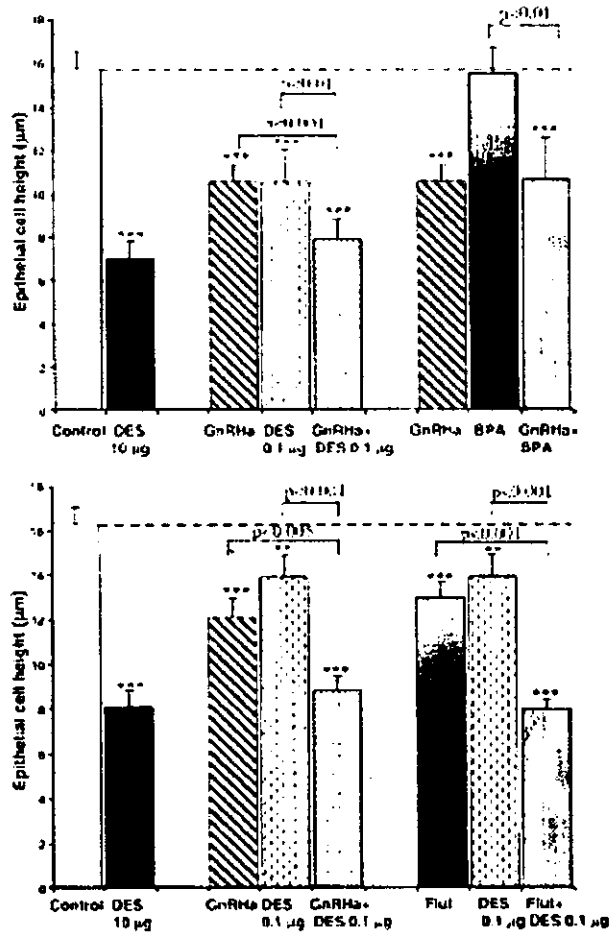


Fig. 7. Effect of neonatal treatment with vehicle (control), 10 μ g DES, 0.1 μ g DES, GnRHs, 0.1 μ g DES plus GnRHs, flutamide (Flut), 0.1 μ g DES plus flutamide, bosprenol A (BPA), or BPA plus GnRHs on epithelial cell height in the efferent ducts at 15 d (top) and/or 18 d (bottom) of age. The dashed line shows the mean control value. The data shown are the mean \pm SD for 3-10 animals/group. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (compared with the respective control value).



No. 154 文献番号：11485865

担当者 根岸 隆之

著者名：Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM.

論文題名：Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels.

出典：Environ Health Perspect. 2001 Jul;109(7):675-80.

チェック項目：

1. 対象生物 ラット (SD)、 マウス、 人、 その他 _____
2. 影響の標的臓器 神経系、 免疫系、 生殖系、 その他 体重
3. 影響の種類 細胞、 組織、 個体、 その他 _____
4. 曝露方法 経口、 埋め込み、その他 _____
5. 曝露時期 胚・胎児、 周産期、 出生後、 成熟動物、 細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 0.1, 1.2 mg/kg/day (体重、性周期、LH (黄体刺激ホルモン) 濃度)、0.15, 1.90, 16.90 mg/kg/day (Uterotrophic assay))
7. 観察された影響の種類と濃度：(0.1 mg/kg/day オスメス体重増加) (1.2 mg/kg/day 性周期異常 (遅延)) (1.2 mg/kg/day メス 血中 LH 濃度低下)
8. 観察時期 出生前、 出生後、 思春期、 成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 あり、 なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 あり、 なし
GLP に準拠 はい、 いいえ
ガイドラインへの準拠 はい：ガイドラインの名称 _____、 いいえ

論文の概要

SD ラットにおいて妊娠 6 日目から離乳まで 0.1, 1.2 mg/kg/day の濃度で飲水投与を行った。暴露母体から生まれた次世代個体は出生直後から体重増加を示し、成熟後もつづいた。また 1.2 mg/kg/day メスにおいて性周期の乱れ (1 周期の延長) および卵巣摘出後の血中 LH 濃度の減少がみられた。成熟同系ラットにおいて 3 段階の濃度 (項目 7) 曝露を行い Uterotrophic assay を行ったところ有意な子宮重量増加は起こらなかった。

添付資料：Fig. 1., Fig. 2.

評価者のコメント：

低用量作用議論の火付け役になった論文の一つである。さらに逆 U 字型 (低濃度群の方が高濃度群よりも体重増加が激しい) の結果も報告している。しかし、1 群の母体数は 6 と毒性学としては少ないところが問題となろう。

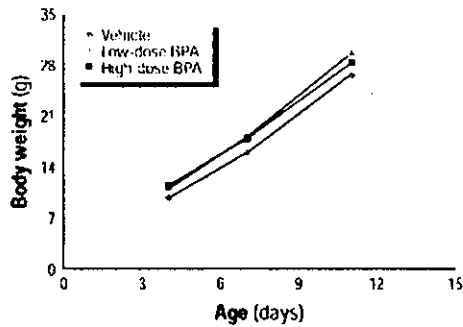


Figure 1. Mean body weights during postnatal development. Mean body weights (\pm SEM) of male and female offspring on postnatal days 4, 7, and 11 are depicted. Vehicle, $n = 53$. Low-dose BPA, approximately 0.1 mg/kg bw/day; $n = 40$. High-dose BPA approximately 1.2 mg/kg bw/day, $n = 51$. Although the mean body weight \pm SEM have been graphed for each data point, the SEMs are not clearly visible because the range of SEMs for all data points was between 0.9 and 1.4% of the mean. Offspring of animals exposed to high-dose or low-dose BPA were heavier than those born to control females ($p < 0.0001$).

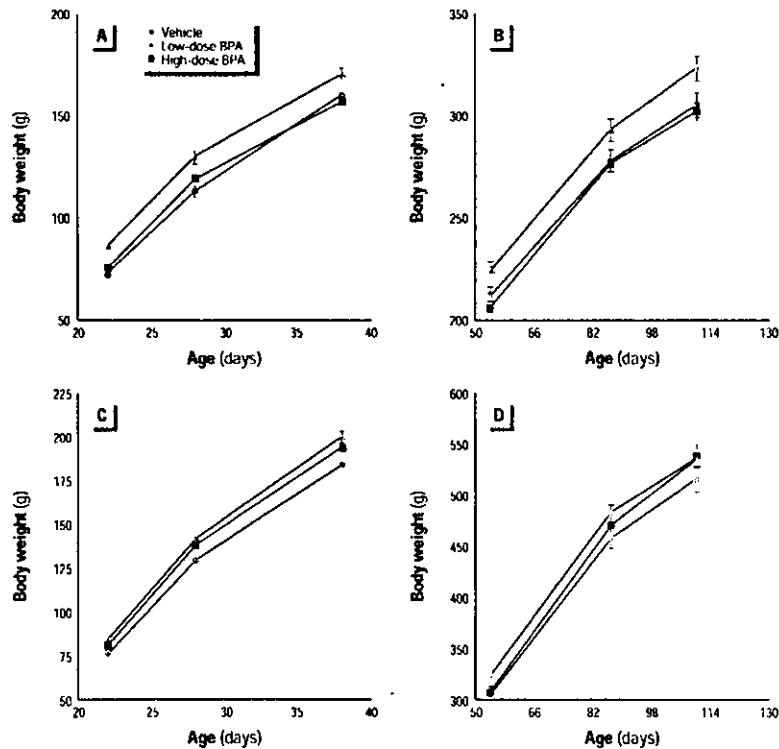


Figure 2. Body weights of male and female offspring from weaning to adulthood (22 through 110 days of age). Mean body weights (\pm SEM) of female (A,B) and male (C,D) offspring born to mothers exposed to BPA (low dose or high dose) or vehicle only (controls) in their drinking water. Vehicle, $n = 23$ females, 27 males. Low-dose BPA, $n = 18$ females, 19 males. High-dose BPA, $n = 28$ females and 19 males. At many of the time points depicted, both male and female offspring of animals born to control females weighed less than offspring of BPA-treated females. Female offspring of animals exposed to low-dose BPA were heavier than female offspring of control or high-dose BPA animals. As in Figure 1, some SEMs are not visible in the graph because of their low values.

NO. 209 文献番号 : 10806411

担当者 関澤 純

著者名 : Sheehan D.M

論文題名 : Activity of Environmentally Relevant Low Doses of Endocrine Disruptors and the Bisphenol A Controversy: Initial Results Confirmed

出典 :

チェック項目 :

1. 対象生物 ()ラット、(x) マウス、() 人、() その他 _____
2. 影響の標的臓器 () 神経系、() 免疫系、(x) 生殖系、() その他 _____
3. 影響の種類 () 細胞、() 組織、(x) 個体、() その他 _____
4. 曝露方法 () 経口、() 埋め込み、その他 _____
5. 曝露時期 (x) 胚・胎児、() 周産期、() 出生後、(x) 成熟動物、() 細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (他の論文を引用)
7. 観察された影響の種類と濃度
(他の論文を引用)
8. 観察時期 () 出生前、() 出生後、(x) 思春期、(x) 成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、()なし
GLP に準拠 ()はい、(x)いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい : ガイドラインの名称 _____、(x)いいえ

論文の概要

既に他の論文に発表したデータのレビューである。妊娠後期にマウスを低濃度の bisphenol A で処理すると仔の雄に出生直後に肛門生殖器間距離増加 (エストロゲンの影響)、前立腺重量、前立腺のアンドロゲンレセプターへの結合の増加、精巣上体重量の減少が見られ、成熟期まで影響は残った。

添付資料

レビュー論文であり、図表はない。

評価者のコメント

レビュー論文であり、内分泌かく乱の可能性を示すと思われる低用量影響について記述している。

NO. 119 文献番号 : 11955941

担当者 迫田篤信

著者名 : A. Suzuki, A. Sugihara, K. Uchida, T. Sato, Y. Ohta, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Iguchi

論文題名 : Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice

出典 : Reproductive Toxicology 16 (2002) 107-116

チェック項目 :

1. 対象生物 ()ラット、(x)マウス、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(x)生殖系、()その他_____
3. 影響の種類 ()細胞、(x)組織、(x)個体、()その他_____
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 皮下注射
5. 曝露時期 ()胚・胎児、(x)周産期、(x)出生後、()成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (10 mg/kg, 100 mg/kg)
7. 観察された影響の種類と濃度
(出生後曝露 : 100mg/kg 膈、子宮の層化、多卵性濾胞)
(_____)
(_____)
8. 観察時期 ()出生前、(x)出生後、()思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ()あり、(x)なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、(x)なし
GLP に準拠 ()はい、(x)いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい : ガイドラインの名称 _____、(x)いいえ

論文の概要

bisphenol A 又は DES を妊娠マウスに GD 10~18 日の間、皮下注射で投与した。bisphenol A の用量は 10mg/kg, 100mg/kg。DES の用量は、67 μ g/kg。67 μ g/kg の DES に曝露したマウスは不妊であり、卵巣とは無関係に膈や子宮の層化が観察された。bisphenol A に曝露されたマウスではこれらの現象は観察されなかった。bisphenol A 曝露群及び 0.67 μ g/kg の DES 曝露群では産児の数及び性比にコントロール群との差なし。出生後の曝露群では生後 5 日間、bisphenol A (15, 150 μ g/pup) 又は DES (0.3, 3 μ g/pup) を皮下注射した。150 μ g/pup の bisphenol A に曝露した群及び DES 曝露群では、卵巣とは無関係な膈や子宮の層化及び、一つの濾胞の中に複数の卵母細胞を持つ多卵性濾胞が観察された。出生直後に高用量の bisphenol A 投与は卵巣とは無関係に膈や子宮の層化を引き起こすことを示す。

添付資料 :

Table 1, Table 6

評価者のコメント

- 150 μ g/pup=100 mg/kg に相当。100mg/kg も皮下投与すれば有害影響があるかもしれない。低用量効果に着目した研究ではない。

Table 1. Reproductive organ findings after prenatal exposure of mice on gestation days 10-18

| Maternal treatment | n | Mice with corpora lutea at 30 days (%) | Ovariectomized mice at 40 days with epithelial stratification (%) | |
|-----------------------------------|----|--|---|---------|
| | | | Vaginal | Uterine |
| Sesame oil | 9 | 7 (78) | 0 | 0 |
| DES ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw) | | | | |
| 0.0067 | 11 | 6 (55) | 0 | 0 |
| 0.067 | 5 | 4 (80) | 0 | 0 |
| 0.67 | 12 | 6 (50) | 1 (8) | 0 |
| 6.7 | 7 | 2* (29) | 0 | 0 |
| 67 | 8 | 0* | 8* (100) | 7* (88) |
| BPA (mg/kg bw) | | | | |
| 10 | 9 | 4* (44) | 0 | 0 |
| 100 | 8 | 5 (63) | 0 | 0 |

* $P < 0.05$ compared to sesame oil control (Fisher's exact probability test).

Table 6. Polyovular follicles (PF) in 30-day-old mice exposed postnatally to DES or BPA

| | Mice with PF/ mice examined (%) | Polyovular follicles per mouse (mean \pm se) | | |
|------------|------------------------------------|--|-------------------|---------------------|
| | | Total PF per mouse | 2-oocyte PF/mouse | 3-5-oocyte PF/mouse |
| Sesame oil | 6/15 (40) | 0.2 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | 0 |
| DES | | | | |
| 0.3 | 17/17* (100) | 4.0 \pm 1.0* | 3.7 \pm 0.9* | 0.3 \pm 0.1 |
| 3 | 17/17* (100) | 7.2 \pm 0.7* | 5.9 \pm 0.6* | 1.3 \pm 0.2 |
| BPA | | | | |
| 15 | 10/16 (63) | 0.3 \pm 0.1 | 0.3 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.1 |
| 150 | 15/17* (88) | 0.8 \pm 0.3* | 0.8 \pm 0.2* | 0.1 \pm 0.0 |

* $P < 0.05$ vs sesame oil control (Fisher's exact probability test).

NO.1 文献番号：15064164

担当者 井藤 悦朗

著者名：Tinwell, H., Ashby, J.,

論文題名：Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens.

出典：Environ Health Perspect. 112(5):575-82.(2004)

チェック項目：

1. 対象生物 ラット、 マウス、 人、 その他 19-20日令のAPラット
2. 影響の標的臓器 神経系、 免疫系、 生殖系、 その他 子宮
3. 影響の種類 細胞、 組織、 個体、 その他 _____
4. 曝露方法 経口、 埋め込み、その他 皮下投与
5. 曝露時期 胚・胎児、 周産期、 出生後、 成熟動物、 細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 600, 300, 150, 75, 30, 15, 7.5, 1.5, 0.75 mg/kg)
7. 観察された影響の種類と濃度 (_____)
(_____) (_____)
8. 観察時期 出生前、 出生後、 思春期、 成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 あり、 なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 あり、 なし
GLP に準拠 はい、 いいえ
ガイドラインへの準拠 はい：ガイドラインの名称 OECD のガイドライン、 いいえ

論文の概要

OECD でバリデーション評価された試験方法に基づいて、思春期ラットの子宮重量に対する estradiol, diethylstilbestrol, ethinyl estradiol, methoxychlor, nonylphenol, genistein, と BPA の混合溶液皮下投与による影響を調べた。in vitro 試験での NOELs で 7 つの化合物を混合した場合、BPA 単独の LOEL は 30mg/kg の 20 倍希釈であっても子宮重量は増加した (Fig5)。陽性対照は ethinyl estradiol の 1 μ g/kg 皮下投与であった。環境に存在するすべてのエストロゲン様活性物質の混合影響を調べることの方が得策である。

添付資料

(Fig5)

評価者のコメント：

OECD でのインビボ試験方法に関する議論を取り込んで、また弱いエストロゲン作用を有する物質、植物エストロゲンおよび医薬品との混合物による影響を評価した。実験は 6 回に分けて実施された。OECD で議論されている試験方法は高感度であり、有用であった。統計処理は 2 つの方法で実施された。使用動物は 8-12 匹/群であった。

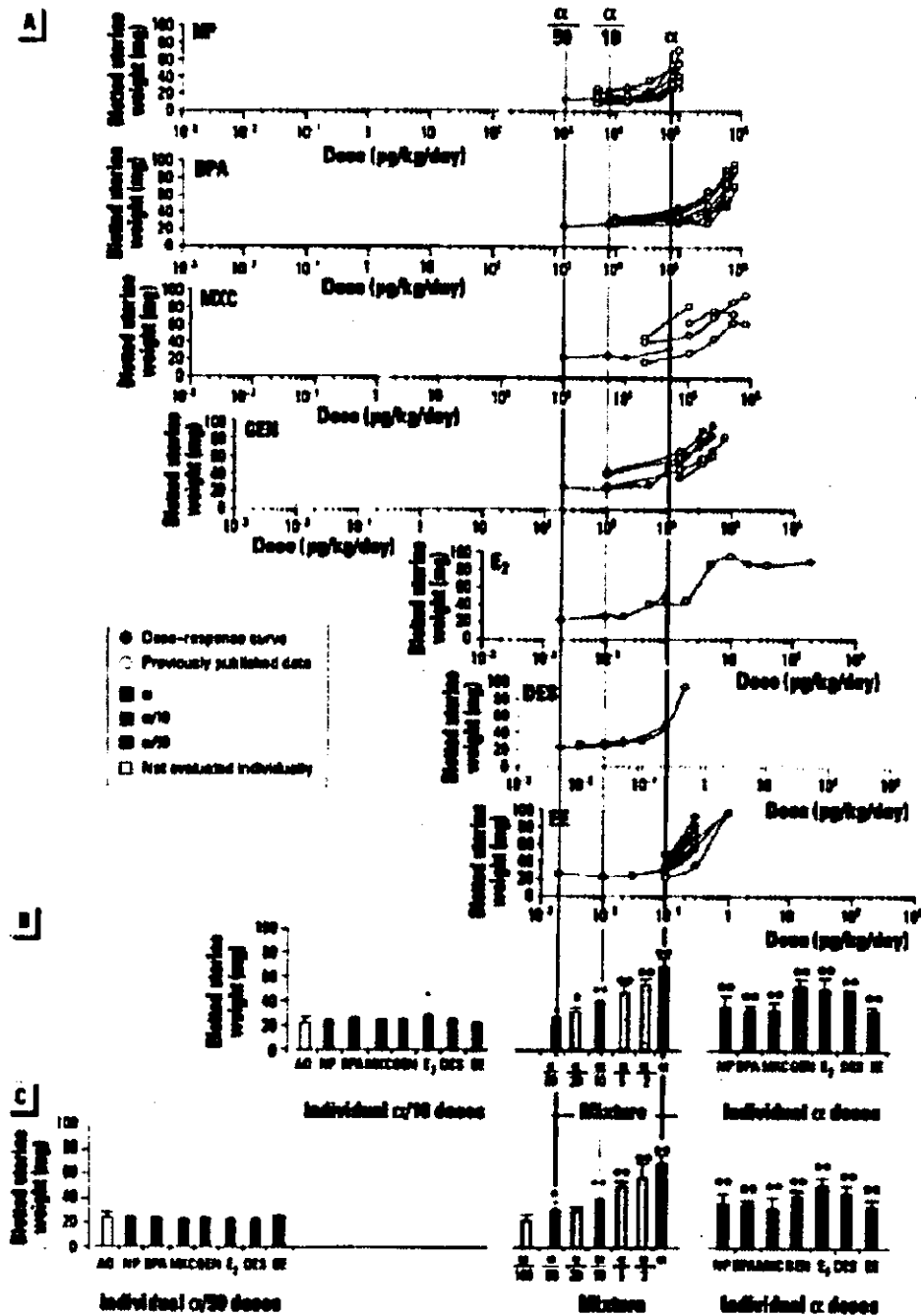


Figure 5. (A) Dose-response curves derived for the seven compounds used in experiments 1-6. These dose responses are compared either with previously published data: NP, BPA, MXC, and GEN (Kanno et al. 2003); EE (Kanno et al. 2001); E₂ (Odum et al. 1997); and DES (in-house data). (B) Uterotrophic data from experiment 5. (C) Uterotrophic data from experiment 6. Error bars indicate SD. The concentrations defined as α , $\alpha/10$, and $\alpha/50$ are highlighted because these were investigated both in mixtures and as individual agents (experiments 5 and 6; Table 3). Data were analyzed for statistical significance by both ANOVA and ANCOVA. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by ANCOVA.

NO. 173 文献番号：11187738

担当者 関澤 純

著者名：堤 治

論文題名：内分泌攪乱化学物質の着床前初期胚への直接作用

出典：日本臨床 58 巻 12 号(12、2000)

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、(x) マウス、() 人、() その他_____
2. 影響の標的臓器 () 神経系、() 免疫系、(x) 生殖系、() その他_____
3. 影響の種類 (x) 細胞、() 組織、(x) 個体、() その他_____
4. 曝露方法 () 経口、() 埋め込み、その他_____
5. 曝露時期 (x) 胚・胎児、() 周産期、() 出生後、() 成熟動物、() 細胞
6. 曝露濃度 用量段階(他の論文を引用)
7. 観察された影響の種類と濃度： 初期胚発育への影響 (1 nM)
：他に発表したデータの引用である
8. 観察時期 (x) 出生前、() 出生後、(x) 思春期、() 成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、(x)なし
GLP に準拠 ()はい、(x)いいえ
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称_____、()いいえ

論文の概要

マウス胚培養の2細胞期から8細胞期に、BPA 1-3 nM を投与して、きわめてわずかな促進効果があり、胚盤胞における発育促進効果はタモキシフェンにより抑えられたという。

添付資料

他で既に発表した論文のデータである

評価者のコメント

胚培養において異物質を外界から投与したときに何らかの影響が起こりえ、そのひとつとしてエストロゲンレセプター経由の影響もありうることを示しているかと思われるが、有害な影響として問題視すべき性質の影響であるか、また生体内の環境で同じことが起こりうるかは不明である。

NO.100 文献番号: 12075117

担当者 井藤 悦朗

著者名: Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM.

論文題名: Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats.

出典: Toxicol Sci. 68(1):121-46, 2002.

チェック項目:

1. 対象生物 (x)ラット、()マウス、()人、()その他 CD/SD
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、(x)生殖系、()その他 _____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、(x)個体、()その他 _____
4. 曝露方法 (x)経口、()埋め込み、その他 母獣への曝露
5. 曝露時期 (x)胚・胎児、(x)周産期、(x)出生後、(x)成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 0.001, 0.02, 0.3, 5, 50, and 500 mg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度 (Adult systemic no observed adverse effect level (NOAEL) = 75 ppm (5 mg/kg/day)) (reproductive and postnatal NOAELs = 750 ppm (50 mg/kg/day))
8. 観察時期 ()出生前、(x)出生後、(x)思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
 - EU リスク評価 (x)あり、()なし
 - GLP に準拠 (x)はい、()いいえ
 - ガイドラインへの準拠 (x)はい: ガイドラインの名称 US EPA OPPTS 837.3800、()いいえ

論文の概要

CD/SD ラットの3世代生殖毒性試験(1群30匹)の結果、BPAの成獣に対する無影響量は5mg/kg/日、繁殖毒性および仔獣に対する無影響量は50mg/kg/日と推定された。

添付資料

Fig1、Table5,6

評価者のコメント

生殖器官、繁殖行動に対する無影響量がSDラットでの大規模な試験により示された。NTPの毒性試験結果から示されているLOAELやEPAが示すRfDとも矛盾しない。しかしながら、いわゆる、チルドレンズヘルスの観点で言う、学習能力障害や注意力欠陥多動症を念頭においた発達行動毒性に対する視点からの研究が今後必要であろう。

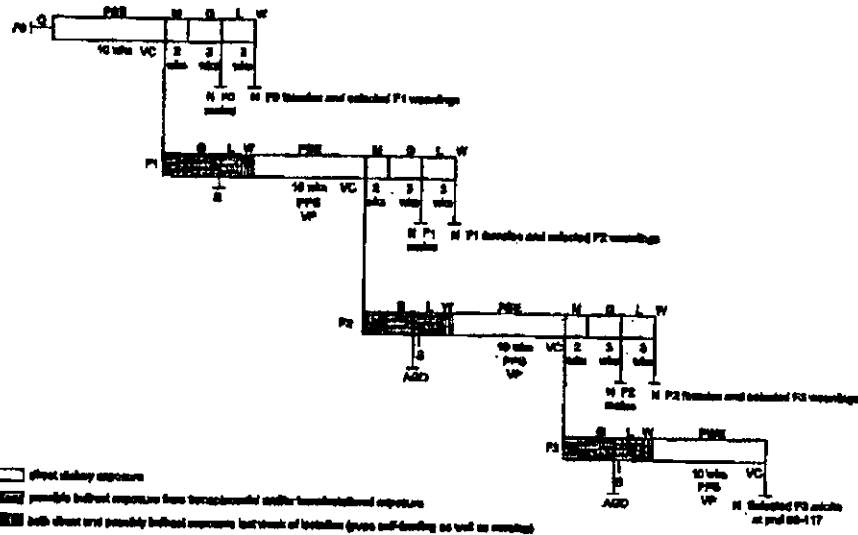


FIG. 1. BFA 3-generation study design. G, gestation (1 week); PBE, prenatally exposure (10 weeks); M, mating (2 weeks); G, gestation (3 weeks); L, lactation (3 weeks); N, necropsy; AGO, anogenital distance on PND 0 for F2 and F3 offspring ("trigger" endpoint); VC, vaginal cytology (evaluated in females during last 3 weeks of prenatal/postnatal period); VP, vaginal patency evaluated in offspring females (PND 22-acquisition); S, standardized litter to 10 pups with equal sex ratio, PND 4; PWE, postwean exposure, 10 weeks, F3 offspring (until PND 96-117); PFS, preputial separation evaluated in offspring males (PND 25-acquisition); W, weaning (PND 21).

TABLE 5
Summary of Selected F0, F1, and F2 Male and Female Reproductive Parameters

| Parameter | BFA dietary concentration (ppm) | | | | | | | |
|--|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|--|
| | 0 | 0.05 | 0.5 | 4.5 | 75 | 200 | 2000 | |
| Female | | | | | | | | |
| Vaginal cycle length (days) | | | | | | | | |
| F0 | 4.58 ± 0.23 | 4.49 ± 0.08 | 4.48 ± 0.20 | 4.58 ± 0.11 | 4.57 ± 0.14 | 4.61 ± 0.18 | 4.36 ± 0.09 | |
| F1 | 4.41 ± 0.08 | 4.47 ± 0.15 | 4.19 ± 0.08 | 4.78 ± 0.15 | 4.94 ± 0.21 | 4.68 ± 0.11 | 4.58 ± 0.11 | |
| F2 | 4.34 ± 0.23 | 4.48 ± 0.36 | 4.39 ± 0.14 | 4.41 ± 0.25 | 4.17 ± 0.07 | 4.34 ± 0.29 | 4.38 ± 0.11 | |
| F3 | 4.52 ± 0.30 | 4.34 ± 0.23 | 4.71 ± 0.09 | 4.39 ± 0.38 | 4.68 ± 0.31 | 4.38 ± 0.21 | 4.31 ± 0.09 | |
| Follicular interval (days) | | | | | | | | |
| F0 | 3.0 ± 0.3 | 2.4 ± 0.2 | 2.3 ± 0.3 | 2.9 ± 0.3 | 3.4 ± 0.3 | 2.3 ± 0.2 | 3.4 ± 0.5 | |
| F1 | 3.0 ± 0.6 | 2.5 ± 0.3 | 2.7 ± 0.3 | 3.4 ± 0.4 | 3.1 ± 0.4 | 2.8 ± 0.3 | 2.7 ± 0.2 | |
| F2 | 3.1 ± 0.4 | 2.9 ± 0.2 | 2.9 ± 0.2 | 2.7 ± 0.2 | 2.9 ± 0.2 | 2.7 ± 0.2 | 3.1 ± 0.3 | |
| Oestrus length (days) | | | | | | | | |
| F0 | 23.1 ± 0.4 | 23.4 ± 0.1 | 23.1 ± 0.1 | 22.1 ± 0.1 | 22.2 ± 0.1 | 22.6 ± 0.1 | 22.1 ± 0.1 | |
| F1 | 21.8 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | 21.9 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | 21.9 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | |
| F2 | 22.0 ± 0.1 | 22.3 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | 22.0 ± 0.1 | 22.1 ± 0.1 | 22.1 ± 0.1 | |
| No. implantation sites | | | | | | | | |
| F0 | 14.23 ± 0.62 | 16.04 ± 0.31 | 14.63 ± 0.48 | 13.39 ± 0.51 | 14.94 ± 0.44 | 14.04 ± 0.48 | 11.89 ± 0.50** | |
| F1 | 15.08 ± 0.44 | 16.33 ± 0.48 | 13.13 ± 0.64 | 14.89 ± 0.79 | 15.73 ± 0.59 | 14.08 ± 0.38 | 11.88 ± 0.45*** | |
| F2 | 15.35 ± 0.38 | 15.88 ± 0.38 | 14.0 ± 0.50** | 14.19 ± 0.77 | 15.11 ± 0.39 | 14.44 ± 0.35 | 12.44 ± 0.28*** | |
| No. total corpora | | | | | | | | |
| F0 | 14.4 ± 0.4 | 14.8 ± 0.7 | 14.3 ± 0.3 | 13.6 ± 0.8 | 14.8 ± 0.3 | 13.1 ± 0.5 | 11.8 ± 0.4** | |
| F1 | 14.9 ± 0.6 | 15.1 ± 0.5 | 14.3 ± 0.7 | 14.7 ± 0.7 | 14.9 ± 0.8 | 14.6 ± 0.5 | 11.4 ± 0.5*** | |
| F2 | 14.9 ± 0.4 | 14.3 ± 0.4 | 13.9 ± 0.9** | 13.4 ± 0.5 | 14.1 ± 0.4 | 13.8 ± 0.4 | 11.2 ± 0.4*** | |
| % Postimplantation mortality | | | | | | | | |
| F0 | 3.46 ± 1.25 | 6.86 ± 2.87 | 7.62 ± 1.78 | 8.46 ± 1.48 | 14.71 ± 4.28 | 9.86 ± 3.85 | 11.37 ± 3.64 | |
| F1 | 3.36 ± 1.88 | 6.11 ± 1.51 | 7.39 ± 1.97 | 6.44 ± 1.79 | 7.64 ± 1.91 | 7.37 ± 1.69 | 11.08 ± 2.31 | |
| F2 | 3.62 ± 1.34 | 7.17 ± 1.69 | 6.99 ± 1.67 | 18.89 ± 3.81 | 7.26 ± 1.77 | 4.87 ± 1.37 | 13.39 ± 3.17 | |
| Follicular volume (mm ³) | | | | | | | | |
| F0 | 148.9 ± 94.6 | | | | | | 453.3 ± 26.9* | |
| F1 | 161.8 ± 27.4 | | | | | | 469.7 ± 46.4 | |
| F2 | 488.2 ± 21.7 | | | | | | 728.8 ± 23.3 | |
| F3 | 394.6 ± 25.7 | | | | | | 375.4 ± 26.9 | |
| Male | | | | | | | | |
| Spermatid sperm concentration (10 ⁶ /ml) | | | | | | | | |
| F0 | 663.74 ± 28.87 | 709.88 ± 26.76 | 752.89 ± 28.88 | 846.46 ± 29.89 | 774.28 ± 32.88 | 742.48 ± 26.46 | 784.23 ± 29.23 | |
| F1 | 662.88 ± 27.28 | 649.28 ± 25.88 | 698.88 ± 28.88 | 611.18 ± 23.28 | 694.38 ± 28.88 | 621.37 ± 26.19 | 571.31 ± 27.78** | |
| F2 | 664.28 ± 25.23 | 685.41 ± 29.44 | 682.82 ± 28.28 | 644.46 ± 24.28 | 684.14 ± 23.97 | 661.24 ± 28.18 | 677.38 ± 28.13 | |
| F3 | 663.88 ± 28.23 | 677.19 ± 28.11 | 611.27 ± 26.47 | 621.34 ± 28.24 | 683.96 ± 24.26 | 663.36 ± 21.26 | 667.68 ± 27.68 | |
| Sperm motility (%) | | | | | | | | |
| F0 | 77.5 ± 2.1 | 77.7 ± 3.6 | 78.4 ± 1.5 | 76.9 ± 1.8 | 76.9 ± 2.9 | 77.9 ± 1.4 | 79.1 ± 1.5 | |
| F1 | 76.4 ± 1.9 | 76.8 ± 1.7 | 78.8 ± 1.4 | 79.8 ± 1.4 | 79.2 ± 1.9 | 81.8 ± 0.6 | 79.2 ± 1.5 | |
| F2 | 79.8 ± 1.4 | 76.1 ± 2.8 | 76.8 ± 1.8 | 76.1 ± 2.1 | 77.8 ± 1.4 | 78.7 ± 1.2 | 76.4 ± 1.8 | |
| F3 | 73.4 ± 1.8 | 89.1 ± 1.8 | 78.1 ± 1.9 | 73.4 ± 1.9 | 88.2 ± 3.8 | 88.1 ± 2.8 | 74.4 ± 1.8 | |
| % Abnormal sperm | | | | | | | | |
| F0 | 1.39 ± 0.26 | 1.72 ± 0.21 | 2.08 ± 0.24 | 2.28 ± 0.28 | 2.14 ± 0.27 | 2.21 ± 0.27 | 1.38 ± 0.14 | |
| F1 | 1.98 ± 0.14 | 4.12 ± 2.28 | 2.44 ± 1.23 | 1.94 ± 0.13 | 2.48 ± 0.41 | 1.81 ± 0.14 | 1.91 ± 0.18 | |
| F2 | 1.19 ± 0.49 | 4.88 ± 2.88 | 4.48 ± 2.28 | 3.71 ± 1.38 | 3.47 ± 1.13 | 2.08 ± 0.25 | 1.82 ± 0.17 | |
| F3 | 1.73 ± 0.14 | 1.34 ± 0.28 | 1.88 ± 0.28 | 2.28 ± 0.28 | 4.38 ± 4.18 | 1.79 ± 0.14 | 2.88 ± 0.14 | |
| Daily sperm production (10 ⁶ /day) | | | | | | | | |
| F0 | 31.89 ± 1.37 | 37.39 ± 1.87 | 34.23 ± 1.53 | 31.94 ± 1.48 | 31.98 ± 1.33 | 23.99 ± 1.44 | 23.94 ± 1.38 | |
| F1 | 46.75 ± 2.79 | 48.28 ± 2.88 | 48.78 ± 3.13 | 46.31 ± 2.88 | 44.42 ± 1.36 | 44.98 ± 1.64 | 44.67 ± 1.79 | |
| F2 | 37.13 ± 2.23 | 38.38 ± 3.38 | 36.77 ± 2.34 | 36.14 ± 2.62 | 36.68 ± 1.87 | 31.38 ± 2.66 | 33.88 ± 2.44 | |
| F3 | 34.88 ± 1.71 | 28.77 ± 1.28 | 36.48 ± 0.94 | 33.87 ± 1.52 | 36.68 ± 1.78 | 31.87 ± 1.69 | 38.31 ± 1.28** | |
| Efficiency of daily sperm production (10 ⁶ /g testis/day) | | | | | | | | |
| F0 | 11.38 ± 0.74 | 7.91 ± 0.94 | 38.82 ± 0.81 | 14.28 ± 0.74 | 18.87 ± 1.18 | 20.76 ± 0.85 | 18.14 ± 0.74 | |
| F1 | 26.91 ± 1.41 | 38.28 ± 1.68 | 34.28 ± 1.21 | 25.82 ± 1.48 | 24.77 ± 1.18 | 23.44 ± 1.14 | 22.51 ± 1.27 | |
| F2 | 19.82 ± 1.13 | 7.64 ± 0.38 | 28.87 ± 1.13 | 74.88 ± 1.35 | 26.17 ± 1.17 | 18.86 ± 1.36 | 28.88 ± 1.38 | |
| F3 | 19.18 ± 0.99 | 38.28 ± 0.84 | 48.28 ± 0.71 | 18.28 ± 0.89 | 77.88 ± 0.64 | 38.28 ± 0.84 | 42.28 ± 0.71 | |

Note: Additional parameters evaluated include: mating and fertility indices for both sexes; gestational index; number dead pups on postnatal day (PND) 8; stillbirth index; and live birth index for females; and vascular haemoglobinemia-resistant spermated head concentration for males (data not shown).
 *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; as compared to control values using appropriate statistical methods; data presented as mean ± SEM.
 **p < 0.01; as compared to control values using appropriate statistical methods; data presented as mean ± SEM.
 ***p < 0.001; as compared to control values using appropriate statistical methods; data presented as mean ± SEM.