

Fig. 5.

Fig. 5. Northern blot analysis for CaBP-9K mRNA expression. Animals were treated with low (10) and high (100) dose A- and time (3–72 h)-dependent manner. Total RNA (5 µg) was subjected to Northern blot analysis. After hybridization with a 32P-labeled probe and exposure to X-ray film, the signal was analyzed by molecular analysis program (Gene 1.5.0a; Dow, IRR, BioRad). The experiments were repeated three times. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison tests. The values represent mean ± SD, (P < 0.05, 0.01).

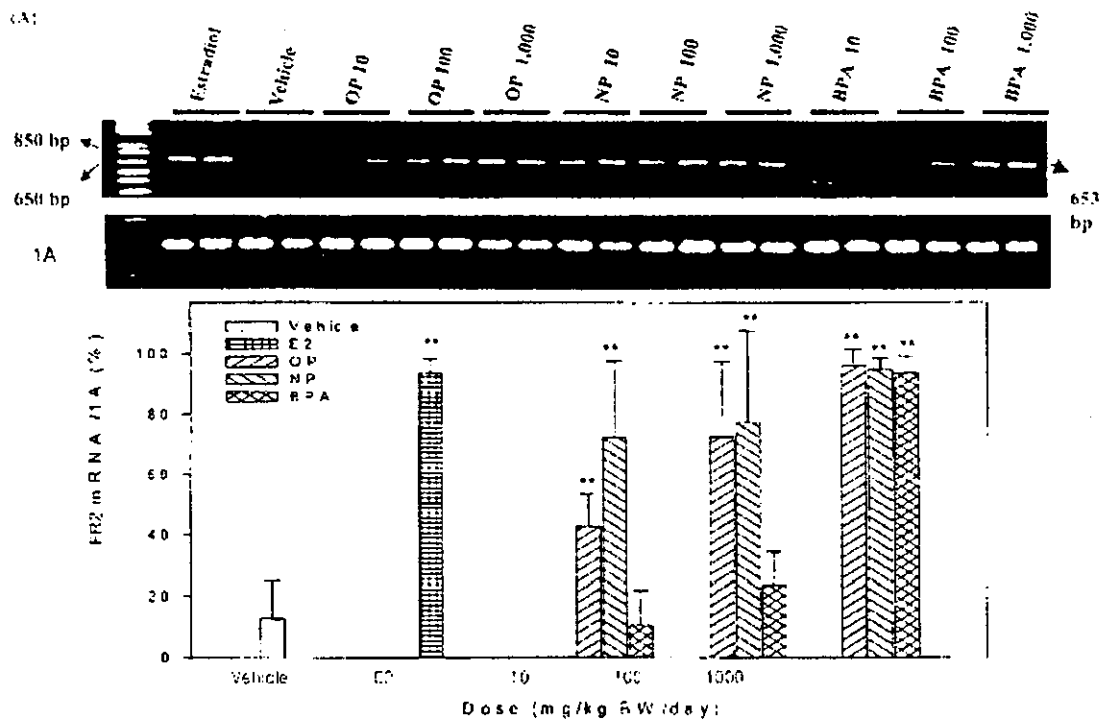


Fig. 4. Quantification of ER2 mRNA expression using semi-quantitative RT-PCR assay. Animals were treated with the compounds (i.e. dose: A) and tank (B)-dependent manner. Total RNA (5 μ g) was reverse transcribed, and the aliquots (1 μ l) were amplified for 35 cycles and 15 cycles using a set of specific primers for ER2 and 1A gene, respectively. The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide, and photograph was scanned and analyzed using molecular analysis program version 1.5 (Gel Doc 1000, Bio-Rad). For expression level of ER2 mRNA was normalized against 1A mRNA expression level. The experiments were repeated three times. Data was analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison tests. The values represent mean \pm SD. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

NO. 213 文献番号：10641015

担当者 内田 康一

著者名：Ashby J, Lefevre PA.

論文題名：The peripubertal male rat assay as an alternative to the Hershberger castrated male rat assay for the detection of anti-androgens, oestrogens and metabolic modulators.

出典：J Appl Toxicol. 2000 Jan-Feb;20(1):35-47.

チェック項目：

1. 対象生物 雄ラット、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（記入 100, 150, 200 mg/kg）
7. 観察された影響の種類と濃度：（影響なし）
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

抗アンドロゲン/アンドロゲンの検出法として、これまで精巣を摘出した成熟雄ラットを使用する Hershberger 法が用いられていた。精巣摘出せずとも評価できる方法として、出生直後の雄ラット (peripubertal male rat) を用いた評価系を開発するために、被験物質 (13 物質) の曝露時期、生殖器官への影響 (重量変化、包皮分離時期) を調べた。

被験物質の種類、出生後に曝露させる時期により、影響の程度は異なっていた。

BPA については、いずれのエンドポイントにおいても、影響は観察されなかった。

添付資料

Table 4, 6, 7, 12

Fig. 2, 14

評価者のコメント

げっ歯類を用いた uterotrophic assay では、BPA は影響物質として容易に検出されているが、peripubertal male rat を用いた本報では、BPA による影響は殆ど認められなかった。スクリーニング試験では、このような食違いは起こりがちであり、各種試験方法およびデータを validate し、様々な内分泌攪乱化学物質の active dose level について、国際的にも早く合意すべきであると著者も指摘している。

Table 4. Absolute tissue weights from 35-36-day-old AP rats given 14 consecutive daily oral doses of the indicated compounds^a

Treatment (mg kg ⁻¹)	Initial body weight (g)	Final body weight at pnd 50 (g)	Liver (g)	Combined kidneys (g)	Combined testes (g)	Combined epididymides (mg)	Combined seminal vesicles (mg)	Prostate (mg)
HPMC (5 ml)	128.0 ± 19.1	226.2 ± 26.3	11.3 ± 1.1	1.9 ± 0.2	2.6 ± 0.2	378.3 ± 34.0	352.1 ± 68.9	144.0 ± 33.0
FLU (25)	128.5 ± 12.2	229.4 ± 18.2	12.2 ± 1.3*	1.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	254.5 ± 19.2**	143.9 ± 8.8**	88.6 ± 13.8**
FIN (25)	128.4 ± 12.6	223.9 ± 19.0	11.0 ± 1.3	1.8 ± 0.2	2.5 ± 0.1*	300.2 ± 41.4**	184.0 ± 29.3**	96.3 ± 18.5**
DES (40 µg)	128.7 ± 12.1	202.1 ± 14.4*	10.6 ± 1.1	1.7 ± 0.2	2.3 ± 0.2**	303.5 ± 40.2**	161.0 ± 29.2**	102.9 ± 53.6*
BPA (100)	127.8 ± 11.8	221.6 ± 17.0	11.6 ± 1.6	1.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2	350.9 ± 26.2	337.0 ± 61.1	121.2 ± 20.5
KETO (15)	129.3 ± 13.9	228.2 ± 20.6	11.6 ± 1.4	1.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1	348.9 ± 23.8*	326.9 ± 59.6	130.3 ± 12.3

^aTen animals per group. Body weight changes assessed for statistical significance using a two-sided Student's t-test: *P < 0.05; **P < 0.01.

Table 6. Absolute tissue weights from 22-23-day-old AP rats given 14 consecutive daily oral doses of the indicated compounds^a

Treatment (mg kg ⁻¹)	Initial body weight (g)	Final body weight at pnd 37 (g)	Liver (g)	Combined kidneys (g)	Combined testes (g)	Combined epididymides (mg)	Combined seminal vesicles (mg)	Prostate (mg)
HPMC (5 ml)	53.7 ± 8.3	145.2 ± 17.9	6.8 ± 1.0	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	146.7 ± 21.8	96.4 ± 15.8	69.3 ± 15.4
MC (50)	53.4 ± 7.8	143.7 ± 19.2	6.9 ± 0.9	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	137.5 ± 19.9	96.7 ± 21.0	68.2 ± 15.9
MC (100)	53.4 ± 8.0	135.0 ± 16.6	6.5 ± 1.1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	140.1 ± 33.4	86.8 ± 21.7	61.4 ± 16.0
KETO (25)	53.4 ± 6.6	143.8 ± 17.8	7.1 ± 1.3	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	137.9 ± 18.2	93.9 ± 18.8	69.1 ± 12.8
BPA (200) ^b	52.6 ± 6.8	141.8 ± 13.4	6.9 ± 0.7	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	136.2 ± 14.8	97.0 ± 12.0	75.7 ± 11.6
DES (40 µg)	54.4 ± 6.8	133.2 ± 13.6	6.6 ± 0.9	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.2**	113.7 ± 20.4**	71.6 ± 5.4**	48.1 ± 9.3**
Sham-dosed	53.5 ± 8.3	145.9 ± 14.7	7.0 ± 0.8	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	145.4 ± 17.6	99.8 ± 9.0	73.8 ± 8.9

^aTen animals per group. Body weight changes assessed for statistical significance using a two-sided Student's t-test: *P < 0.05; **P < 0.01.

^bEight animals per group.

Table 7. Absolute tissue weights from 35-36-day-old AP rats given 20 consecutive daily oral doses of the indicated compounds^a

Treatment (mg kg ⁻¹)	Initial body weight (g)	Final body weight at pnd 56 (g)	Liver (g)	Combined kidneys (g)	Combined testes (g)	Combined epididymides (mg)	Combined seminal vesicles (mg)	Prostate (mg)
HPMC (5 ml)	132.6 ± 15.2	286.9 ± 24.2	13.9 ± 1.5	2.1 ± 0.2	2.9 ± 0.1	577.6 ± 87.2	604.9 ± 68.4	190.0 ± 19.4
MC (50) ^b	126.0 ± 17.2	253.8 ± 21.3**	12.5 ± 1.2	1.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1	524.0 ± 52.0	439.0 ± 99.8	144.2 ± 29.3*
MC (100)	126.7 ± 13.0	246.7 ± 11.1**	12.4 ± 0.9*	1.9 ± 0.2	2.7 ± 0.1	506.2 ± 27.2	356.3 ± 72.8**	150.4 ± 15.1
BPA (100)	126.3 ± 13.5	270.4 ± 15.2	13.1 ± 0.9	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1	544.0 ± 43.3	568.2 ± 90.2	180.6 ± 25.3
BPA (150)	126.5 ± 12.3	270.1 ± 17.4	13.7 ± 1.8*	2.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2	523.6 ± 62.5	520.0 ± 105.1	177.2 ± 34.2
BPA (200)	125.9 ± 12.5	270.3 ± 25.5	13.5 ± 2.0	2.0 ± 0.2	2.9 ± 0.2	538.9 ± 63.7	590.9 ± 107.8	175.5 ± 15.6
DES (40 µg)	125.8 ± 13.2	249.5 ± 22.8**	13.7 ± 1.6**	1.9 ± 0.2	2.6 ± 0.2**	470.9 ± 63.2	302.9 ± 81.7**	137.6 ± 30.7*

^aTen animals per group. Body weight changes assessed for statistical significance using a two-sided Student's t-test:

*P < 0.05; **P < 0.01.

^bNine animals per group.

Table 12. Day of prepuce separation (PPS) in animals given the indicated treatments

Experiment no.	Initial age of rats (days)	No. of rats	Treatment (no. of doses × mg kg ⁻¹)	Recovery period (days)	Initial body weight (g ± SD)	Day of PPS (±SD)	Body weight on day of PPS (g ± SD)	Final body weight at pnd 55 (g ± SD)	Percentage of control bodywt	Change in day of PPS
1 (Table 7)	35-38	10	HPMC (20 × 6 ml)	-	132.6 ± 15.2	44.0 ± 2.5	189.5 ± 18.1	286.9 ± 24.2		
		9	MC (20 × 50)	-	126.0 ± 17.2	45.0 ± 2.7	179.1 ± 23.3	253.8 ± 21.3**	88.5	+1.0
		10	MC (20 × 100)	-	126.7 ± 13.0	44.7 ± 1.6	177.1 ± 18.3	246.7 ± 11.1**	86.0	+0.7
		10	BPA (20 × 100)	-	126.3 ± 13.5	43.4 ± 2.6	174.1 ± 21.4	270.4 ± 15.2	94.3	-0.6
		10	BPA (20 × 150)	-	126.5 ± 12.3	44.0 ± 2.7	178.4 ± 20.5	270.1 ± 17.4	94.1	0
		10	BPA (20 × 200)	-	125.9 ± 12.5	44.6 ± 2.5	180.2 ± 16.1	270.3 ± 25.5	94.2	+0.6
		10	DES (20 × 40 µg)	-	125.8 ± 13.2	46.9 ± 2.3*	191.2 ± 23.1	249.5 ± 22.8**	87.0	+2.9
2 (Table 5)	35-38	9	HPMC (20 × 5 ml)	-	138.7 ± 19.8	42.9 ± 1.3	188.7 ± 18.4	290.9 ± 32.0		
		10	DBP (20 × 500)	-	136.3 ± 17.3	43.2 ± 1.5	186.8 ± 23.8	285.4 ± 30.2	96.5	+0.3
		10	BBP (20 × 500)	-	137.9 ± 18.3	42.4 ± 1.0	183.2 ± 19.0	284.5 ± 24.9	97.8	-0.5
		10	DES (20 × 40 µg)	-	137.3 ± 16.0	44.3 ± 2.6	183.8 ± 12.9	245.5 ± 25.0**	84.4	+1.4
		10	DDE (20 × 100)	-	138.6 ± 16.7	43.3 ± 1.3	185.3 ± 19.1	287.1 ± 27.8	98.7	+0.4
		10	KETO (20 × 25)	-	137.1 ± 15.8	42.6 ± 0.7	184.7 ± 20.2	291.9 ± 20.7	100.3	-0.3
3 (Table 10)	22-23	10	HPMC (14 × 5 ml)	20	51.9 ± 7.2	43.6 ± 2.4	198.0 ± 20.0	302.2 ± 23.0		
		10	DDE (14 × 100)	20	51.0 ± 7.5	45.4 ± 2.3	207.1 ± 18.3	269.7 ± 21.7**	89.2	+1.8
		10	DBP (14 × 500)	20	51.2 ± 6.9	45.0 ± 2.0	206.0 ± 8.8	294.6 ± 21.8	97.5	+1.4
		10	DES (14 × 40 µg)	20	51.2 ± 6.4	48.9 ± 3.2**	223.1 ± 17.3**	275.9 ± 18.0*	91.3	+5.3
4 (Table 11)	22-23	10	HPMC (34 × 5 ml)	-	50.9 ± 6.9	43.0 ± 2.0	187.5 ± 16.5	289.4 ± 23.9		
		10	DDE (34 × 100)	-	52.4 ± 5.7	45.1 ± 1.6*	203.7 ± 15.5†	294.0 ± 23.9	101.8	+2.1
		10	DBP (34 × 500)	-	51.7 ± 6.6	44.9 ± 2.3†	204.6 ± 21.0†	293.2 ± 29.2	101.3	+1.9
		7*	DES (34 × 40 µg)	-	53.4 ± 4.8	53.9 ± 2.1**	227.5 ± 17.6**	244.9 ± 15.2**	84.6	+10.9

*Data are shown from the seven out of ten animals that underwent PPS by the end of the experiment (ca. 55 days after weaning). Statistical analysis of data by two-sided Student's *t*-test: **P* < 0.05; ***P* < 0.01. Using a one-sided Student's *t*-test: †*P* < 0.05. The table numbers indicate where the organ data may be found.

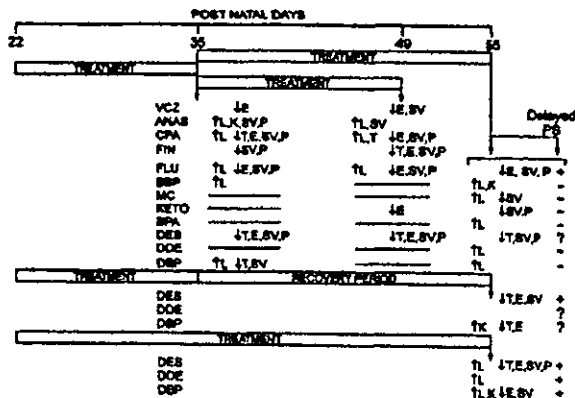


Figure 2. Summary of the data generated using various test protocols for the peripubertal male rat assay. Shaded areas indicate periods of daily dosing; the open area indicates a recovery period after dosing. | and | indicate statistically significant increases or decreases, respectively, in a particular organ weight. The conclusions for changes in the day of PPS are based on Fig. 5 (see Discussion).

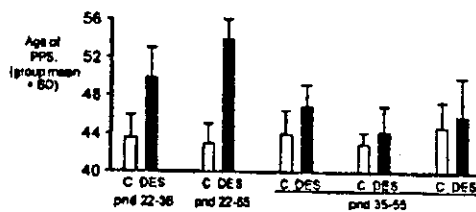


Figure 4. Day of prepuce separation (PPS) for animals exposed to DES over the postnatal days (pnd) shown. Data are from Table 12 except for the last entry (Table 13). The data illustrate the variability in control values for day of PPS between experiments and the need to expose animals to DES immediately after weaning in order to produce significant delays in PPS.

NO. 207 文献番号: 10814893

担当者 中西 義則

著者名: Ashby J, Odum J, Paton D, Lefevre PA, Beresford N, Sumpter JP

論文題名: Re-evaluation of the first synthetic estrogen, 1-keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene, and bisphenol A, using both the ovariectomised rat model used in 1933 and additional assays

出典: Toxicology Letters **115**, 231-238 (2000)

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 (total 100mg/ラット)
7. 観察された影響の種類と濃度: (total 100mg/ラット: 子宮重量増加及び膣角質化)
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

Alpk: AP fSD (Wistar 系統) 種メスラットを 6-8 週齢で卵巣切除して、BPA を 16.7mg/回 x 2 回/日 x 3 日 (合計 100mg) 皮下注射投与した。BPA 及び対照物質 E 2 で各々、子宮重量法及び膣角質化ともに作用が認められた ($P < 0.01$)。

同時に試験した 1-keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene 及びその 4-異性体は子宮重量法及び膣角質化で作用が認められなかった (その他に ER 結合試験、Yeast 試験を実施)。これは Cook らの報告 (1933) と異なった結果であった。

添付資料

評価者のコメント

子宮重量法及び膣角質化で BPA のエンドクリン作用を再確認したもので新規な事実はない。1-keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene 及びその 4-異性体については過去の研究発表結果が再現できず、エンドクリン活性物質に関する報告の再現性への疑問を示している。結論として、特にエンドクリン活性物質リストの取り扱いには注意すべきことが述べられている。

No. 42 文献番号：12773777

担当者 佐二木 順子

著者名：Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J.

論文題名：The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97.

出典：Toxicol Sci. 74(1):129-38. Epub 2003 May 28.(2003)

チェック項目：

1. 対象生物 (x)ラット Sprague-Dawley、()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 (x)経口、()埋め込み、その他 oral gavage_____
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 20 μ g/kg/day, 2, 200 mg/kg/day in 6.5%ethanol in corn oil)
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、(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
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

これまで報告された論文のうち10報はBPAがdaily sperm production (DSP)に影響を与えない、5報は与えるというものだが、中でもSakaue et al (2001)は低濃度(20 μ g/kg/day)で影響あり(DSP減少)としている。Sakaue et al とほぼ同様の条件で同種ラットを用い、餌も同じ物を使用し、実験を行ったが、すべての濃度のBPAでDSPに影響を与えなかった。対照ラットについての実験で、餌の違いがDSPに差をもたらしたが、繰り返し実験では差がなく、確証は得られなかった。このSakaue et al との差が何に起因するかについて、一つはDSPのサンプル処理法の違い(polytron か、waring blender かその他の特殊な方法か)がDSP値に影響を与える。DSPの表示にも問題がある。DSP/testis ではなく、DSP/g testis で表示すると、SDやCV値が小さくなり、化学物質の影響評価がやりやすい。なお、同じ種のラットでもその育種、飼育の経過が動物業者間で異なることも一つの要因かもしれない。これが原因だとすると、化学物質の影響評価をする場合、データを比較する上で重大問題になる。

添付資料 特になし

評価者のコメント：Sakaue, J. Occup. Health 43:185(2001)の実験を忠実に再現しようとした基礎的な研究である。同種のラットを用いてもたらされる実験者間の結果の差が何に起因するかを追及した。餌の検討までされており、このような綿密な実験は、小規模な研究施設では不可能であり、貴重な実験結果である。Low dose 評価を行う上で、論文間差は避けられないので、各項目(例えば、発がん性、生殖機能など)で統計処理を行い、影響有無しの評価を下すべきであろう。

NO. 189 文献番号 : 11014247

担当者 大関一男

著者名 : N.Atanassova, C.Mckinnell, K.J.Turner, M.Walker, JS.Fisher, M.Morley, MR.Millar, NP.Groome, RM.Sharpe

論文題名 : Comparative effects of Neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogen on Spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: Evidence for Stimulatory effects of Low estrogen levels.

出典 : Endocrinology 141 no.10 : 3898-3907, 2000

チェック項目:

1. 対象生物 (x)ラット、()マウス、()人、()その他 Wister rat
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、()個体、()その他 精巣重量, seminiferous tubule lumen formation, germ cell apoptotic index, spermatocyte nuclear volume per Sertoli cell nuclear volume
4. 曝露方法 (x)経口、()埋め込み、その他 sc injection
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 DES ; 0.01-10 μ g, BPA ; 0.5mg)
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、(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

18日齢で、Diethylstilbestrol は dose-dependent に精子形成阻害(精巣重量減少など)をおこすが、低投与(0.01, 0.1 μ g)ではセルトリ細胞ユニットあたりの精母細胞核体積は増加している。Bisphenol-A, octylphenol でも増加を示す。adulthood で新生児期に DES を暴露された場合、精巣重量が dose dependent に減少するが、0.01 μ g 投与群で mating, 繁殖が観察された。Bisphenol-A では、精巣の重量は増加、通常の mating, 繁殖が観察される。ラットの新生児期における Diethylstilbestrol の low dose 暴露は思春期の精子生成に影響を及ぼすが、Bisphenol-A の高投与ではそうしたことはおむね良好であり、人が新生児期、思春期に Bisphenol-A の暴露を受けても精子形成や繁殖に悪影響を受けることは考えにくい

添付資料

Fig-2、3、4、5

評価者のコメント

この研究では、DES が dose-dependent に精子形成阻害(精巣重量減少など)を阻害する結果を示す一方で、極めて低い投与領域(0.01, 0.1 μ g)で、mating や繁殖が観察されていることを示しており、低用量作用とはいったい何かを考える上で 興味ある結果である。

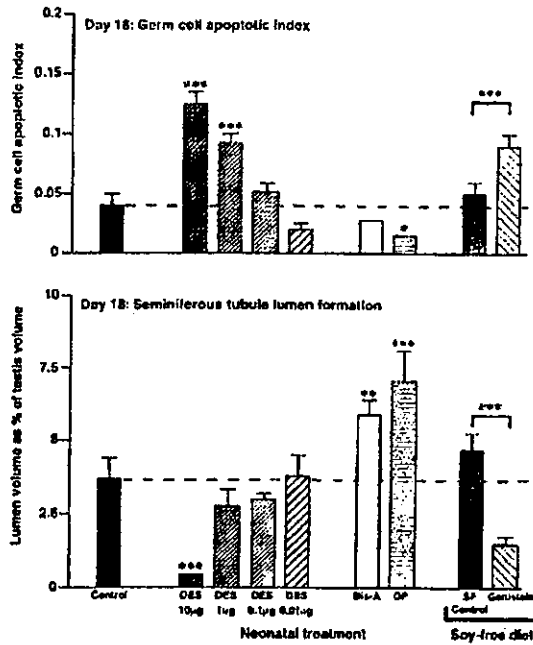


FIG. 2. Effect of neonatal treatment with DES, Bis-A, or OP maintenance of rats on a soy-free diet (SF control) or the administration of genistein on the germ cell apoptotic index and lumen formation in the seminiferous tubules in rats, aged 18 days. Each column is the mean \pm SEM for 7-14 rats/group from two separate experiments, except for DES (0.01 μ g), where the data derive from five animals from a single experiment. Note that with the exception of SF control and genistein groups, all animals were maintained on a standard soy-containing diet. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (compared with the appropriate control).

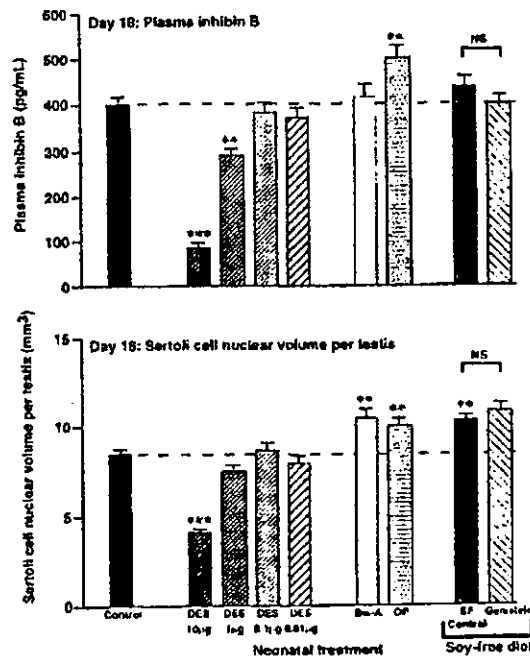


FIG. 3. Effect of neonatal treatment with DES, Bis-A, or OP maintenance of rats on a soy-free diet (SF control) or administration of genistein on plasma levels of inhibin B and Sertoli cell nuclear volume per testis in rats, aged 18 days. Each column is the mean \pm SEM for 7-14 rats/group from two separate experiments, except for DES (0.01 μ g) where the data derive from five animals from a single experiment. Note that with the exception of SF control and genistein groups, all animals were maintained on a standard soy-containing diet. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (compared with the appropriate control).

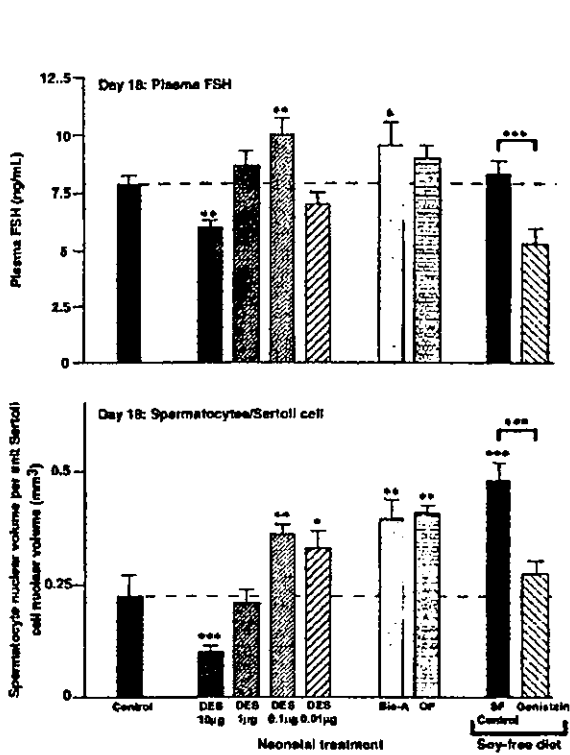


FIG. 4. Effect of neonatal treatment with DES, Bis-A, or OP maintenance of rats on a soy-free diet (SF control) or administration of genistein on plasma levels of FSH and spermatocyte nuclear volume per unit Sertoli cell nuclear volume in rats, aged 18 days. Each column is the mean \pm SEM for 7-14 rats/group from two separate experiments, except for DES (0.01 μ g) where the data derive from five animals from a single experiment. Note that with the exception of SF control and genistein groups, all animals were maintained on a standard soy-containing diet. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (compared with the appropriate control).

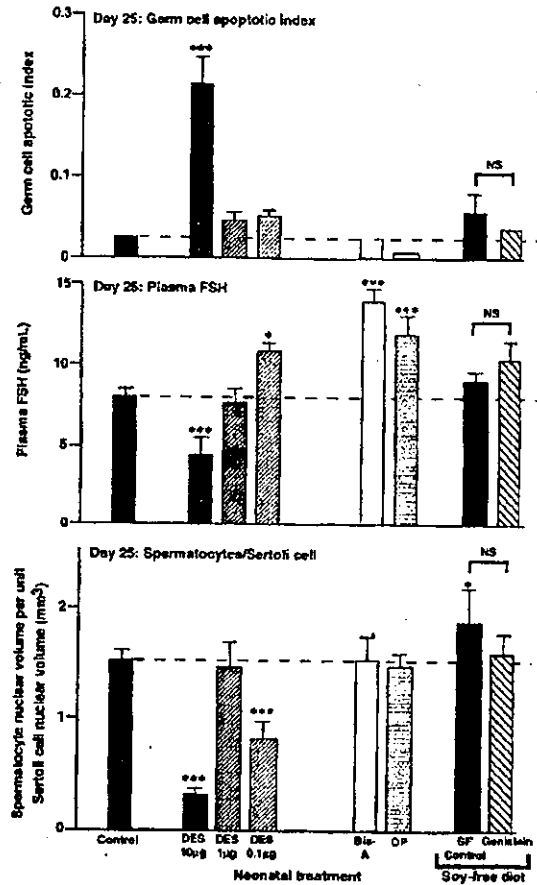


FIG. 5. Effect of neonatal treatment with DES, Bis-A, or OP maintenance of rats on a soy-free diet (SF control) or administration of genistein on the germ cell apoptotic index, plasma levels of FSH, and spermatocyte nuclear volume per unit Sertoli cell nuclear volume in rats, aged 25 days. Each column is the mean \pm SEM for 4-12 rats/group. Note that with the exception of SF control and genistein groups, all animals were maintained on a standard soy-containing diet. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (compared with the appropriate control).

著者名：Bendridi N, Mappus E, Grenot C, Lejeune H, Yves Cuilleron C, Pugeat M.

論文題名：Intravenous injection of human sex steroid hormone-binding globulin in mouse decreases blood clearance rate and testicular accumulation of orally administered [2-125I]iodobisphenol A.

出典：Steroids. 2002 Jun;67(7):637-45.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、(×)マウス (Balb/C)、()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 ()
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 (×)いいえ

論文の概要

BPA あるいはその誘導体である 2-Mono-iodobisphenol A または 2,2'-Di-iodobisphenol A のヒトステロイドホルモン結合グロブリン (hSHBG) への結合性 (RBA ; Relative binding affinity) や hSHBG を尾静脈より投与された成熟雄マウス (Balb/C) における血中濃度の消長や精巣、精巣上体への蓄積が調べられた。BPA の RBA は天然のステロイドに対して低く、E2 の 58.9 に対して 0.20 であった。その他の誘導体も 0.50 未満であった。尾静脈投与によって、ヒト体内中で生理的に可能な範囲と思われる hSHBG 濃度 (27-267nM) に維持したマウス血中で、2-Mono-iodobisphenol A の濃度低下は抑制されたが、hSHBG によるその抑制効果は、2-iodoestrodiol に対するほうが強かった。また、精巣への 2-Mono-iodobisphenol A の蓄積も hSHBG 存在下で抑制された。

添付資料 Table 1,3 および Fig. 4

評価者のコメント

マウス投与による実験は、2-Mono-iodobisphenol A のみで行われているが、hSHBG に対する RBA の差が誘導体間で、極端に大きくないため、他の誘導体への予想は可能と思われる。尾静脈投与によってヒトの体内濃度に設定したマウス体内で精巣への 2-Mono-iodobisphenol A の蓄積が低下した点について、hSHBG との結合が、精巣への BPA 蓄積に防御的に働くことを示唆するものと論文中では考察されている。

Table 1
Relative binding affinities for hSHBG

Ligands	RBA (%)
Testosterone	100
Estradiol	58.9 ± 1.6 ^a
2-Iodoestradiol	175.5 ± 27.6 ^a
2,4-Di-iodoestradiol	23.90 ± 3.06 ^a
Bisphenol A	0.70 ± 0.01 ^a
2-Mono-iodobisphenol A	0.325 ± 0.100 ^a
2,2'-Di-iodobisphenol A	0.48 ± 0.12 ^a

Table 3
Percentage of ingested radioactivity measured in testes and epididymes

Time after ingestion of [2- ¹²⁵ I]iodobisphenol A (h)	Testes		Epididymes	
	Absence of hSHBG	Presence of hSHBG	Absence of hSHBG	Presence of hSHBG ^a
1.5	0.020 ± 0.010	0.020 ± 0.010	0.050 ± 0.014	0.061 ± 0.042 ^a
3	0.017 ± 0.012	0.007 ± 0.006 ^a	0.030 ± 0.000	0.040 ± 0.030 ^a
5	0.010 ± 0.014	0.010 ± 0.000 ^a	0.015 ± 0.021	0.043 ± 0.029 ^a
15	0.280 ± 0.014	0.017 ± 0.015 ^a	0.330 ± 0.000	0.040 ± 0.010 ^a
24	0.250 ± 0.028	0.053 ± 0.040 ^a	0.290 ± 0.350	0.057 ± 0.060 ^a
48	0.370 ± 0.335	0.190 ± 0.130 ^a	0.285 ± 0.370	0.033 ± 0.159 ^a

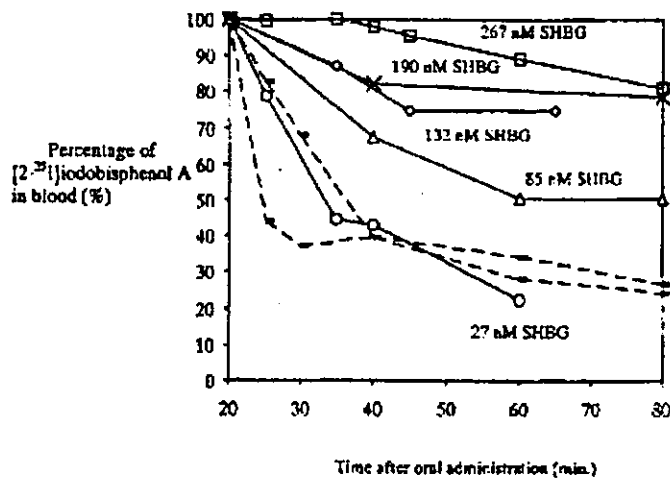


Fig. 4. Time-dependent blood clearance of orally ingested [2-¹²⁵I]iodobisphenol A in the absence of blood hSHBG (---) (the broken lines represent the highest and the lowest values of radioactivity measured in the absence of circulating hSHBG), or in the presence of 27 nM (○), 85 nM (△), 132 nM (◇), 190 nM (×) and 267 nM (□) of blood hSHBG concentrations. The maximal blood concentration of [2-¹²⁵I]iodobisphenol A at *t* = 20 min is taken as 100%.

NO. 134 文献番号 : 11764168

担当者 中西 義則

著者名 : Berg C, Halldin K, Brunstrom B

論文題名 : Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos

出典 : Environmental Toxicology and Chemistry 20(12) 2836-2840 (2001)

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x)その他 ウズラ、ニワトリ
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、()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 (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 (記入 67 μ g、200 μ g/卵)
7. 観察された影響の種類と濃度 : (200 μ g/卵 : メスウズラのミューラー管奇形)
(200 μ g/卵 : オスニワトリの卵精巢生成) (67 μ g/卵 : ニワトリ胚の死)
8. 観察時期 (x)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 (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:

BPA、tetrabromobisphenol A (TBBA)、及び diethylstilbestrol (DES) をピーナッツ油とレシチンのエマルジョン (BPA は溶剤としてプロピレングリコールも併用) にしてニワトリ及びウズラの卵黄に注入してエストロゲン様発生影響を調べた。注入時期はウズラはふ卵 3 日目、ニワトリは 4 日に行い、羽化予想日の 2 日前 (各ふ卵 15 日目、19 日目) に解剖した。TBBA (45 μ g/卵) ではウズラ、ニワトリとも胚の高死亡率を示したが、BPA はニワトリでのみ胚死亡率増加を示した。

BPA 200 μ g/卵投与では、メスウズラの 6/14 にミューラー管奇形が見られ (P=0.035)、オスニワトリに 55% の左精巢の雌化 (卵精巢) (P=0.0003) が見られた。オスウズラのミューラー管とメスニワトリの精巢への影響はなかった。TBBA はウズラ、ニワトリともミューラー管と精巢への影響は見られなかった。陽性対照の DES は両種とも死亡率増加はなかったが、両種でオスの卵精巢形成とメスウズラのミューラー管奇形を生じた。BPA 及び TBBA の鳥類エンドクリン作用及び胚毒性を調べた最初の報告である。

添付資料

Table 1、Table 2、Table 3

評価者のコメント:

BPA、TBBA が鳥類にエンドクリン様作用を生じる可能性を示した初めての研究報告であり、陽性対照の DES の結果と対比して試験の信頼性はあると思われる。ウズラとニワトリで影響度が大きく異なっておりその作用機構については更なる検討を要する。これまで BPA、TBBA とも鳥類への蓄積は報告されておらず、野生生物への影響を直ちに示すものではない。

Table 1. Mortality by day 15 in quail embryos and day 19 in chicken embryos treated in ovo on day 3 (quail) or day 4 (chicken) of incubation

Treatment ($\mu\text{g/g}$ egg)	Mortality ^a (%)	
	Quail	Chicken
Control ^b	26 (11/43)	24 (20/83)
Bisphenol A (67)	15 (5/33)	48 (40/84)**
Bisphenol A (200)	43 (17/40)	71 (65/91)***
Diethylstilbestrol (0.002)	27 (8/30)	32 (11/34)
Diethylstilbestrol (0.02)	22 (7/32)	21 (15/71)
Diethylstilbestrol (0.2)	—	35 (12/34)
Control ^c	13 (6/47)	8 (2/24)
Tetrabromobisphenol A (15)	23 (10/44)	25 (6/24)
Tetrabromobisphenol A (45)	80 (20/25)***	96 (24/25)***

^a The ratio (in parentheses) represents the number of dead embryos divided by the number of eggs treated. The mortality in the treatment groups was compared with the control frequency using Fisher's exact test.

^b Eggs treated with the propylene glycol-based emulsion served as controls for the diethylstilbestrol (DES)- and bisphenol A-treated eggs.

^c Eggs treated with the oil/lecithin/water emulsion served as controls for the tetrabromobisphenol-treated eggs.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table 2. Frequencies of 15-d-old quail embryos exhibiting malformations of the reproductive organs following injection into the yolk on day 3 of incubation

Treatment ($\mu\text{g/g}$ egg)	Females with abnormal Müllerian ducts ^a (%)	Males with an ovotestis ^b (%)
Control ^c	7 (1/15)	33 (4/12)
Bisphenol A (67)	30 (3/10)	44 (7/16)
Bisphenol A (200)	43 (6/14)*	50 (5/10)
Diethylstilbestrol (0.002)	55 (6/11)*	63 (5/8)
Diethylstilbestrol (0.02)	87 (13/15)***	89 (8/9)*
Control ^d	0 (0/1)	45 (5/11)
Tetrabromobisphenol A (15)	0 (0/5)	50 (9/18)

^a The ratio (in parentheses) represents the number of affected embryos divided by the number of embryos examined. The malformation frequencies in the treatment groups were compared with the control frequency using Fisher's exact test.

^b Defined as presence of a cortex containing five or more germ cells in meiotic prophase in at least one of the sections of the left testis.

^c Eggs treated with the propylene glycol-based emulsion served as controls for the diethylstilbestrol- and bisphenol A-treated eggs.

^d Eggs treated with the oil/lecithin/water emulsion served as controls for the tetrabromobisphenol-treated eggs.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Table 3. Frequencies of 19-d-old chicken embryos exhibiting malformations of the reproductive organs following injection into the yolk on day 4 of incubation

Treatment ($\mu\text{g/g}$ egg)	Females with abnormal Müllerian ducts ^a (%)	Males with an ovotestis ^b (%)
Control ^c	10 (3/30)	0 (0/20)
Bisphenol A (67)	3 (1/29)	0 (0/7)
Bisphenol A (200)	30 (3/10)	55 (6/11)***
Diethylstilbestrol (0.002)	0 (0/10)	0 (0/9)
Diethylstilbestrol (0.02)	7 (1/15)	4 (1/23)
Diethylstilbestrol (0.2)	36 (5/14)	63 (5/8)**
Control ^d	0 (0/9)	0 (0/13)
Tetrabromobisphenol A (15)	0 (0/12)	0 (0/5)

^a The ratio (in parentheses) represents the number of affected embryos divided by the number of embryos examined. The malformation frequencies in the treatment groups were compared with the control frequency using Fisher's exact test.

^b Defined as presence of a cortex containing five or more germ cells in meiotic prophase in at least one of the sections of the left testis.

^c Eggs treated with the propylene glycol-based emulsion served as controls for the diethylstilbestrol- and bisphenol A-treated eggs.

^d Eggs treated with the oil/lecithin/water emulsion served as controls for the tetrabromobisphenol-treated eggs.

*** $p < 0.001$.

NO. 205 文献番号 : 10825674

担当者 中西 義則

著者名 : Cummings A M, Laws S C

論文題名 : .Assessment of estrogenicity by using the delayed implanting rat model and examples

出典 : Reproductive Toxicology 14, 111-117(2000)

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、()個体、(x)その他 受精卵着床
4. 曝露方法 (x)経口、(x)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 (経口 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300 mg/kg ; 皮下注射 : 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/kg)
7. 観察された影響の種類と濃度 : (受精卵着床の誘発 皮下注射 50mg/kg)
8. 観察時期 (x)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、(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

メス Holtzman ラットを受精後 2 日目に下垂体切除と progesterone 投与を行い胚の着床遅延を施した後、7 日目に BPA, methoxychlor, 及び 4-t-octylphenol を経口又は皮下注射して着床影響を調べた。皮下注射による BPA 用量 50mg/kg 以上で用量相関のある着床誘発が起き (P<0.05), 200mg/kg で 100% の着床がみられた。Methoxychlor でも同様の結果であったが 4-t-octylphenol は 400mg/kg で 100% 着床したもののそれより低い用量では作用がなかった。対照投与した Estrone 1 µg/kg では 100% の着床があった。

添付資料

評価者のコメント

下垂体切除、着床遅延モデルがエンドクリン作用物質の活性評価に有効であることの検証として行われた研究であるが、複雑なプロセスを要する試験であり、エンドクリン作用のスクリーニング方法としての価値及びその生物学的意義は不明である。

著者名 : P. Diel, S.Olff, S.Schmidt, H. Michna

論文題名 : Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and

coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7

出典 : J. Steroid Biochemistry & Molecular Biology 80 (2002) 61-70

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、(x)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、()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、(x)細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (10^{-8} ~ 10^{-5} M)
7. 観察された影響の種類と濃度
(10^{-6} M 細胞サイクル、アポトーシス)
(_____)
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、(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

細胞増殖、アポトーシス誘導、プロゲステロンレセプター(PR)・アンドロゲンレセプター(AR)mRNA・ER α プロテインの発現をE2と比較検討した。さらに選択的ERモジュレーターである(SERM)ラロキシフェン(RAL)と純抗エストロゲンファスロデックス(ICI182780)の作用と比較検討した。PRmRNAはcoumestrol, DDTでは発現量が増加したが、bisphenol Aとoctyl phenolでは発現が抑制された。octyl phenolはMCF7細胞の増殖を促進したが、bisphenol Aは細胞増殖を引き起こさなかった。はMCF7細胞には古典的な女性ホルモン様の作用をしないと結論づけた。

(ICI182780): 全ての組織に対して抗エストロゲン作用

RAL: 骨細胞にはアゴニストとして、乳腺にはアンタゴニストとして作

添付資料:

特になし

評価者のコメント

bisphenol A が従来言われているのと異なり、MCF-7の増殖を誘導しないとの結果。bisphenol Aは他の物質とは違うということを言いたいらしい。

No.06 文献番号： 14689164

担当者 花田秀一

著者名：P. Diel, S. Schmidt, G. Vollmer, P. Janning, A. Upmeier, H. Michna, HM. Bolt, G. H. Degen
論文題名：Comparative responses of three rat strains(DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens.

出典：Arch. Toxicol. 78(4), 183-193. (2004)

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、(X)組織、()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 ()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 5, 50, 200mg/kg b.w./day x 3 days)
7. 観察された影響の種類と濃度 (子宮重量; 200 mg/kg b.w. 投与群、この群のSDラットでの血漿中央値は861ng/mL(n=6))
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 ()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 (X)はい：ガイドラインの名称 Institutional Animal Care and Use Committee guidelines、()いいえ

論文の概要

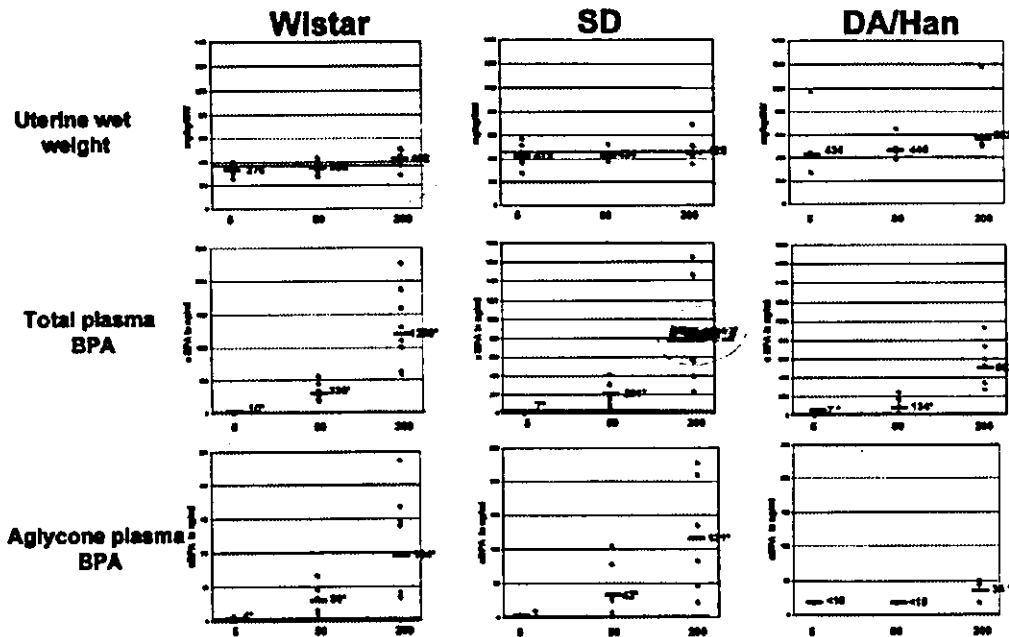
環境化学物質 (BPA, Genistein, Octylphenol の3種、etynilestradiol を陽性対照) に対するラットの反応性に系統差があるか否かを調べた。ラットは、DA/Han、SDおよびWistar の3系統。
結論：ラットの系統差によって、ウテロトロピックアッセイでエストロゲン作用があるとみなされている化学物質のホルモン作用評価に大きな差は生じない。今回の結果は、Owens や Ashby の既報告 (2002) を支持するものである。

添付資料

Fig.1(子宮重量)、Fig.5(Total plasma BPA)、Fig.7 (まとめ表)

評価者のコメント：

数値データは統計処理に基づいて評価されており、また、半定量的なデータについてもかなりの例数を確保 (n=5-7) している事およびBPAの血漿中濃度も測定して暴露状況を把握していることから、測定結果の評価および結論への信頼性は高いと判断した。




- 93 -

	GEN								
	WIS			SD			DA		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
Uterine wet weight									
Uterine epithelium									
Vaginal epithelium									
Uterine Ctu mRNA expression	NO	NO		NO	NO		NO	NO	

	BPA								
	WIS			SD			DA		
	5	50	200	5	50	200	5	50	200
Uterine wet weight									
Uterine epithelium									
Vaginal epithelium									
Uterine Ctu mRNA expression	NO	NO		NO	NO		NO	NO	

	OCT								
	WIS			SD			DA		
	5	50	200	5	50	200	5	50	200
Uterine wet weight									
Uterine epithelium									
Vaginal epithelium									
Uterine Ctu mRNA expression	NO	NO		NO	NO		NO	NO	


 Compilation of the responses to treatment with environmental estrogens in three rat strains. Grey shaded fields indicate a response parameter significantly different from ovariectomized controls for Wistar (WIS), Sprague Dawley (SD), and DA/Han (DA) rats that had received genistein (GEN; 25, 50 or 100 m/kg body weight), bisphenol A (BPA; 5, 50 or 200 m/kg) or *p*-tert-octylphenol (OCT; 5, 50 or 200 m/kg) as daily doses for 3 days. See text for further details

NO. 206 文献番号: 10822019

担当者 中西 義則

著者名: Diel P, Schulz T, Smolnikar K, Strunck E, Vollmer G, Michna H

論文題名: Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity

出典: Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 73, 1-10 (2000)

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 (5, 50, 200 mg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度: (子宮重量増加; 200 mg/kg/day) (mRNA 発現; 200 mg/kg/day)
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

DA/Han 種メスラットで子宮重量試験を行い、経口強制投与でBPAを3日間投与した。用量200 mg/kg/dayで非常に小さいが有意な肥大作用が認められた。肥大が認められた子宮のPCR試験でARmRNA, ERmRNA、及びPRmRNA発現の減少、C3mRNAの発現増加認められ、CLUmRNAとGADPHmRNAには変化がなかった。

同時に試験した物質; EE, DDT, p-t-octylphenol, daizdein、のPCR試験での遺伝子発現パターンと対比するとp-t-octylphenolはEEに類似しているが、BPAは相当に異なったパターンを示した。

添付資料

評価者のコメント

エストロゲン物質の子宮への作用機構を遺伝子レベルで解明しようとした基礎研究であり、BPAなど子宮重量増加を示す物質がそれぞれに異なった遺伝子発現パターンを示すいくつかのグループに類別できることを見出している。それぞれの分子が異なった機構でエンドクリン作用を発現していることを示唆している。子宮肥大作用を示した用量は200 mg/kg/dayでありこれまでの報告されている試験に比べ高用量である。