

FIG. 1. Activity of DES (a) and BPA (b) in immature mouse uterotrophic assays conducted using the sc injection route of administration. The dose-response curve for DES (closed circles) was derived from three separate experiments and is compared to previously published data by Shelby *et al.* (1996, open circles). † indicates the lowest dose (0.5 µg/kg) at which DES was significantly different from the controls ($P < 0.01$). The data for BPA were derived from eight separate experiments (Table 1). DES (10 µg/kg) was a concurrent positive control in the BPA experiments. The numbers of animals at each dose level are indicated at each point.

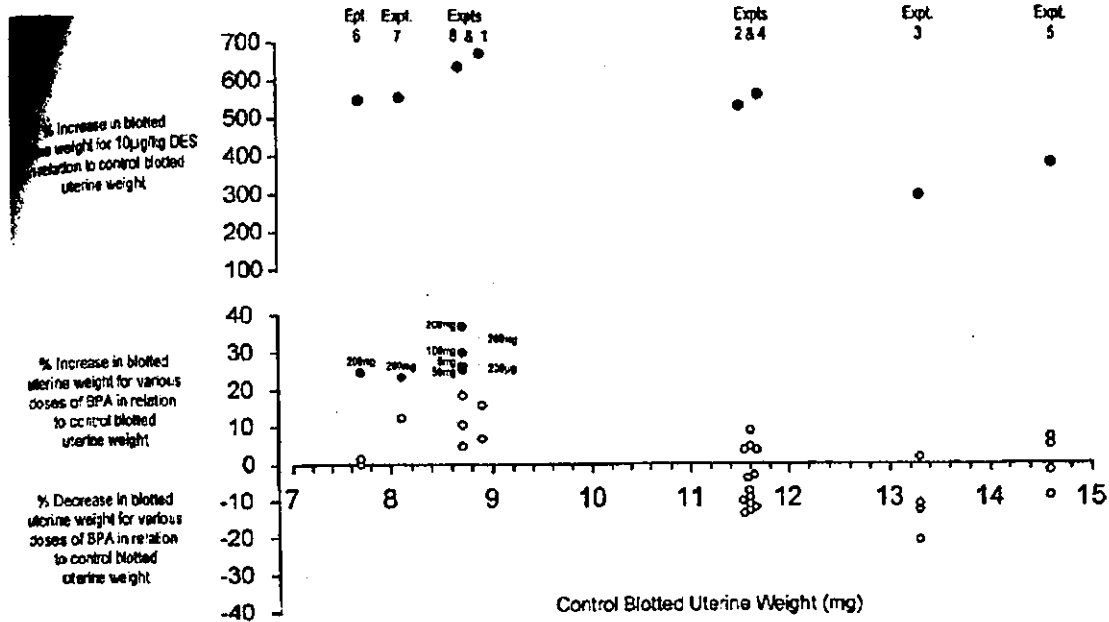


FIG. 2. Percentage increase (positive control agent DES and BPA) or decrease (BPA) in uterine blotted weight in relation to control blotted uterine weight for each individual experiment (Expts. 1-8 from Table 1). Significant increases in uterine blotted weight are indicated (derived from Table 1); open circles, nonsignificant; gray circles, $P < 0.05$; black circles, $P < 0.01$. The dose levels at which the uterine blotted weight of BPA-exposed animals was significantly different from controls are also indicated. The BPA data for Expts. 2 and 4 have been lightly displaced as the control blotted uterine weight for Expts. 2 and 4 were the same. All of the DES data are for a 10 µg/kg dose, and all experiments involved sc injection.

TABLE 2
Overall Database for the Exposure of Immature Mice to BPA by sc Injection

Expt. No	Mean initial control RW \pm SD	Dose level BPA (μ g/kg)															
		0	0.02	0.2	2.0	20	200	500	1000	2000	5000	10,000	20,000	50,000	100,000	200,000	500,000
30 mm blotted uterine weight (mg)																	
1	16.1 \pm 1.4	8.9					11.2*			9.5			10.3				11.0*
2	16.2 \pm 1.7	11.6	10.0	10.7	10.5	11.6	10.1		10.4				10.2				12.5
3	14.1 \pm 2.3	13.3		10.6	13.5								10.5				11.6
4	16.4 \pm 1.3	11.6		12.3	12.0								11.1				12.2
5	15.6 \pm 1.3	14.6			13.2					15.6							14.3
6	11.2 \pm 1.3	7.7				7.7	7.8										9.6**
7	11.9 \pm 1.5	8.1				9.1	9.1										10.0**
8	13.4 \pm 1.7	8.7				10.3		9.2	9.8				11.0**	9.6		10.9**	11.2**
Overall mean \pm SD (n)		10.3 \pm 4.4 (110)	10.0 \pm 1.8 (8)	10.5 \pm 2.8 (28)	12.5 \pm 3.4 (48)	8.9 \pm 2.8 (34)	10.5 \pm 4.2 (30)	9.1 \pm 2.4 (12)	9.6 \pm 2.6 (12)	13.0 \pm 5.1 (35)	11.0 \pm 2.0 (12)	9.6 \pm 1.4 (12)	10.5 \pm 1.7 (30)	10.9 \pm 1.4 (12)	11.3 \pm 1.8 (12)	11.4 \pm 2.5 (10)	12.0 \pm 2.8 (16)

Note. Data are presented as the group mean blotted uterine weight for individual experiments. All data for the relevant dose were then combined to give an overall mean \pm SD. Data were assessed for statistical significance by ANOVA; *P < 0.05; **P < 0.01. n, number of tissues analyzed to give final data. All combined data were not significantly different from the combined controls (Fig. 1b).

TABLE 3
Height (μ m) of Immature Mouse Uterine Epithelium and Endometrium Following Exposure to BPA for 3 Days by either sc Injection (Expts. 6 and 8) or Oral Gavage (Expt. 9)

Expt. No./route	Compound	Dose (μ g)	No. animals	Hypertrophy (μ m)		
				Epithelium	Endometrium	
, sc injection	AO	5 ml	19*	12.0 \pm 2.1	110.1 \pm 30.9	
		20 μ g	19*	11.5 \pm 1.5	114.0 \pm 25.3	
	BPA	200 μ g	19*	11.0 \pm 1.4	135.4 \pm 85.2	
		200 mg	20	12.0 \pm 1.2	120.0 \pm 19.8	
, sc injection	DES	10 μ g	5	31.7 \pm 1.9**	155.2 \pm 40.5*	
		5 ml	12	12.1 \pm 2.8	112.2 \pm 37.6	
	BPA	200 μ g	12	11.6 \pm 1.5	110.6 \pm 21.4	
		500 μ g	12	11.3 \pm 1.8	101.9 \pm 18.6	
		1 mg	12	11.1 \pm 1.1	118.6 \pm 26.8	
		5 mg	12	11.6 \pm 1.3	122.1 \pm 14.2	
		10 mg	12	11.2 \pm 1.3	111.2 \pm 27.4	
		50 mg	12	12.4 \pm 1.1	114.8 \pm 19.7	
		100 mg	12	12.9 \pm 1.8	111.3 \pm 19.5	
		200 mg	12	13.8 \pm 1.8*	129.1 \pm 25.4	
, Oral gavage	DES	10 μ g	12	32.7 \pm 4.0**	289.8 \pm 57.2**	
		5 ml	12	10.4 \pm 1.4	126.1 \pm 42.4	
	BPA	500 μ g	12	10.2 \pm 1.2	135.8 \pm 28.3	
		1 mg	12	10.7 \pm 0.8	138.0 \pm 24.9	
		5 mg	12	10.0 \pm 0.8	120.9 \pm 20.4	
		10 mg	12	10.6 \pm 0.9	128.2 \pm 21.6	
		50 mg	12	10.4 \pm 1.5	130.0 \pm 23.6	
		100 mg	12	9.9 \pm 1.3	125.2 \pm 23.6	
		200 mg	12	10.2 \pm 1.3	136.2 \pm 18.1	
		300 mg	12	11.1 \pm 2.8	130.6 \pm 17.0	
		DES	10 μ g	11*	27.1 \pm 2.9**	225.4 \pm 43.2**

Note. Fewer uteri were used in Expt. 6 for histopathology than the uterotrophic assay (see Table 1) because five from each group were stored at -70°C for possible future investigations. Data were assessed for statistical significance by ANOVA; *P < 0.05; **P < 0.01.
* The slides from one animal could not be analyzed.

TABLE 4
Labeling Index in the Immature Mouse Uterine Epithelium and Endometrial Glands and Stroma Following Exposure to BPA for 3 Days by either sc Injection (Expts. 6 and 8) or Oral Gavage (Expt. 9)

Expt. No./route	Compound	Dose (kg)	No. animals	% Cells labeled			
				Epithelium	Glands	Stroma	
6, sc injection	AO	5 ml	15 ^a	4.7 ± 4.9	23.4 ± 11.1	5.4 ± 4.4	
		20 µg	19 ^a	6.7 ± 4.9	21.1 ± 9.6	5.7 ± 4.4	
	BPA	200 µg	19 ^a	5.9 ± 5.4	21.9 ± 8.6	5.1 ± 4.4	
		200 mg	20	44.4 ± 18.3 ^{***}	50.2 ± 11.2 ^{***}	17.4 ± 8.8	
8, sc injection	DES	10 µg	5	66.7 ± 12.4 ^{***}	52.6 ± 6.8 ^{**}	37.9 ± 8.8	
	AO	5 ml	12	13.3 ± 16.2	31.4 ± 13.1	11.4 ± 8.8	
	BPA	200 µg	12	10.6 ± 10.2	26.4 ± 8.8	13.5 ± 8.8	
		500 µg	12	13.4 ± 12.2	34.3 ± 16.3	12.0 ± 8.8	
		1 mg	12	15.8 ± 8.8	34.2 ± 10.4	11.5 ± 8.8	
		6 mg	12	21.5 ± 11.8 [*]	35.8 ± 9.3	14.6 ± 8.8	
		10 mg	12	20.2 ± 11.2	40.4 ± 12.6	15.2 ± 8.8	
		50 mg	12	32.7 ± 15.2 ^{**}	50.1 ± 11.1 ^{***}	17.6 ± 8.8	
		100 mg	12	29.3 ± 14.7 ^{**}	43.8 ± 10.6 ^{**}	12.0 ± 8.8	
		200 mg	12	66.2 ± 12.5 ^{***}	54.9 ± 14.7 ^{***}	15.1 ± 8.8	
		DES	10 µg	12	74.2 ± 14.5 ^{***}	42.4 ± 13.6	34.4 ± 8.8
		AO	5 ml	12	11.7 ± 5.6	41.7 ± 18.9	10.3 ± 8.8
9, Oral gavage	BPA	500 µg	12	16.0 ± 11.0	36.5 ± 13.8	17.5 ± 8.8	
		1 mg	11 ^b	22.6 ± 21.4	49.1 ± 18.1	17.3 ± 8.8	
		5 mg	12	19.4 ± 15.2	46.3 ± 10.4	22.3 ± 8.8	
		10 mg	12	18.2 ± 9.5	37.7 ± 16.3	26.1 ± 8.8	
		50 mg	12	17.5 ± 12.1	46.4 ± 11.3	16.5 ± 8.8	
		100 mg	12	18.8 ± 12.0	35.8 ± 12.3	16.8 ± 8.8	
		200 mg	12	32.9 ± 11.5 ^{**}	53.3 ± 10.3	27.4 ± 8.8	
		300 mg	12	56.6 ± 26.2 ^{**}	64.3 ± 20.4 ^{***}	28.1 ± 8.8	
		DES	10 µg	11 ^b	84.0 ± 6.8 ^{***}	62.2 ± 14.4 ^{***}	43.6 ± 8.8

Notes: Fewer uteri were used in Expt. 6 for histopathology than the uterotrophic assay (see Table 1) because 5 from each group were sacrificed at -70°C for possible future investigations. Data were assessed for statistical significance using ANOVA; *P < 0.05; **P < 0.01.

^a Two slides from two animals could not be analyzed.

^b The slides from one animal could not be analyzed.

TABLE 5
Data for BPA Generated in Expts. 6-9

Expt. No./route	Assay parameter	Dose level of BPA (µg/kg)												
		20	200	500	1000	2000	5000	10,000	20,000	50,000	100,000	200,000	500,000	
1 sc	Uterine blotted weight	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 sc	Uterine blotted weight	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Epithelium LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Glands LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Stroma LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Epithelial height	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Endometrial height	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7 sc	Uterine blotted weight	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
8 sc	Uterine blotted weight	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Epithelium LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Glands LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Stroma LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Epithelial height	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*
	Endometrial height	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9 Oral	Uterine blotted weight	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Epithelium LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Glands LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Stroma LI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	**
	Epithelial height	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Endometrial height	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Note: Data were analyzed for statistical significance by ANOVA; *P < 0.05; **P < 0.01. LI, labeling index as measured in BudR-gal cells; —, negative assay outcomes.

NO. 114 文献番号 : 11985600

担当者 迫田篤信

著者名 : Katsumi Toda, Chisato Miyaura, Teruhiko Okada, Yutaka Shizuta

論文題名 : Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene(*Cyp19*)

出典 : Eur. J. Biochem. 269, 2214-2222 (2002)

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 骨
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、() 出生後、(X) 成熟動物、() 細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (餌に混合、0.1 wt%, 1 wt%)
7. 観察された影響の種類と濃度 (Cyp19 ノックアウトマウスの子宮重量、PR、卵巣組織、骨質量 0.1wt %)
(_____)
(_____)
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 () 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

アロマトラーゼ遺伝子(*Cyp19*)ノックアウトマウス(ArKO)は卵巣の出血、濾胞の減少、子宮サイズの減少、骨量の減少などを示す。この ArKO マウスに 0.1wt% 又は 1wt% の bisphenol A を 5 ヶ月間食餌投与してその影響を観察した。その結果、投与量依存性をもって、卵巣の縮退、子宮サイズの減少、骨量の減少が阻止された。ArKO マウスの子宮ではプロゲステロンレセプター、血管内皮成長因子 Mrna の発現が消失したが、bisphenol A を摂取した場合には野生タイプと同レベルに回復した。一方、野生タイプでは卵巣、子宮、骨構造への影響は認められなかった。BPA が ArKO マウスの子宮及び骨組織に対して女性ホルモン作用があることが確認された。

添付資料

Fig5, Fig6

評価者のコメント

1 wt%は 1,160 mg/kg に相当するとされており、かなりの高用量であるが、Wild type では、体重、子宮重量等への影響は観察されていない。
植物エストロゲンでも同様の影響があることが報告されており、bisphenol A が本報告のような影響を示すことは有りうると思われる。

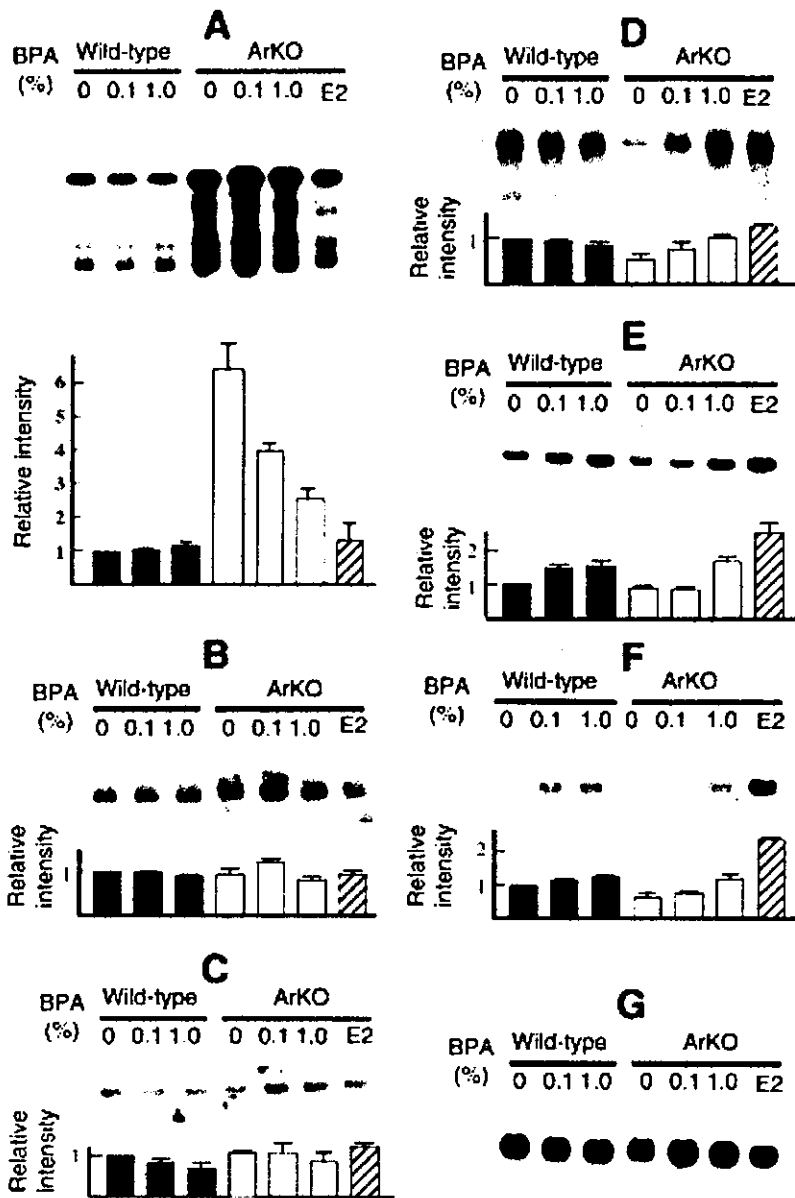


Fig. 5. Alterations in gene expression in the ovaries of ArKO mice fed diets supplemented with BPA. The expression of IGF-I (A), IGF-II (B), FSH receptor (C), IGF-I receptor (D), BMP15 (E), GDF9 (F) and GAPDH (G) mRNAs was analyzed by Northern blot hybridization using 15 μ g of total RNA from the ovaries of wild-type or ArKO mice. Mice were fed chow diet supplemented with 0%, 0.1%, or 1% BPA from 5 weeks of age until 5 months of age. Signals of the respective mRNAs were analyzed using a radioactive image analyzer (BAS 2000) and normalized relative to GAPDH mRNA levels to calculate the relative intensity. The total RNA of the ovaries from the ArKO mice supplemented with E2 was also analyzed (E2). The experiment was repeated at least twice for quantification of the signals.

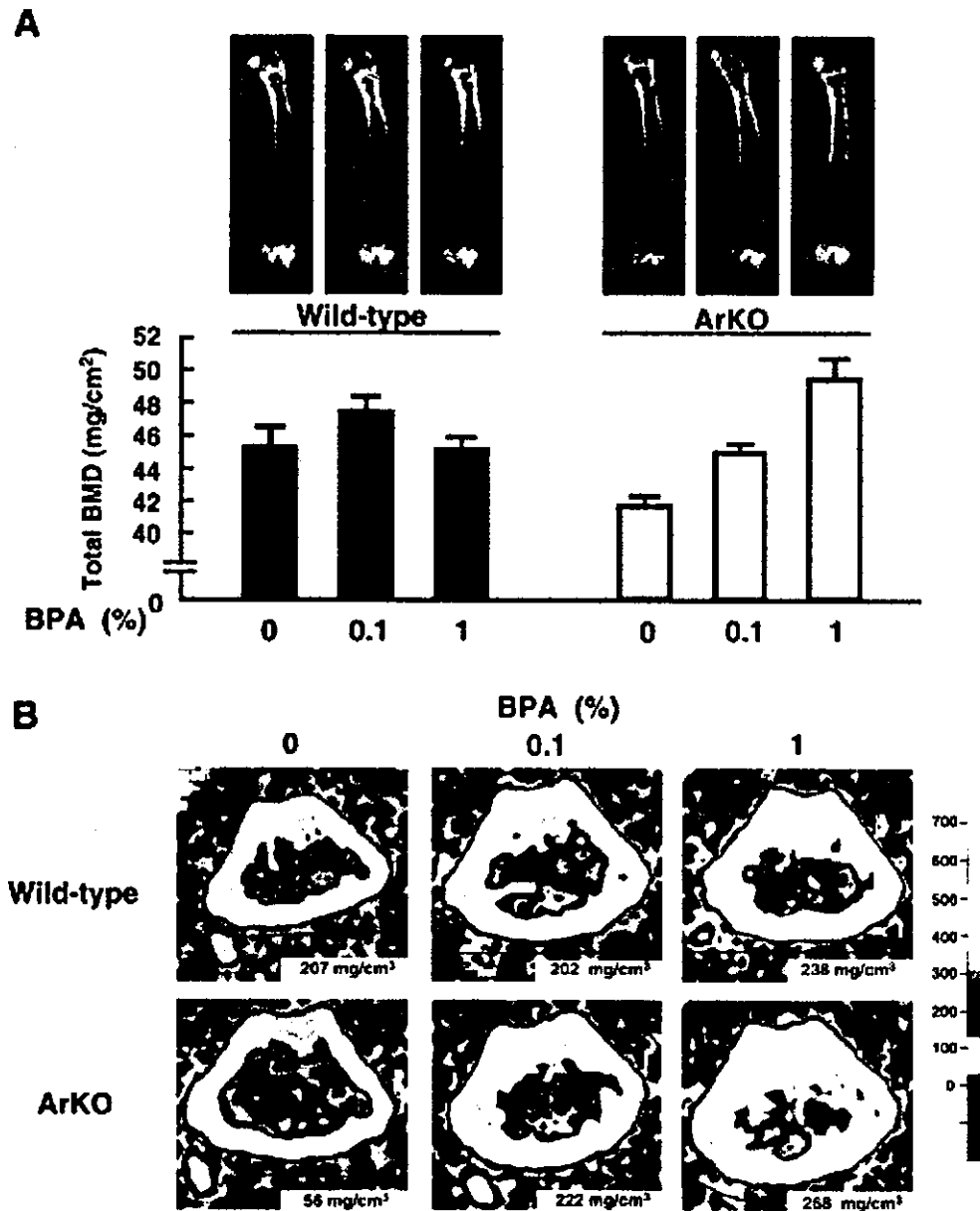


Fig. 6. Effects of dietary BPA on bone mass in wild-type and ArKO mice. Wild-type and ArKO mice were fed diets supplemented with 0%, 0.1% or 1% BPA from 5 weeks of age until 5 months of age. (A) Femurs were dissected from the mice, and BMD was measured in the total area of the femur. *, Significantly different from 0% BPA group, $P < 0.05$. The data are expressed as the mean \pm SEM. The upper panel shows soft X-ray radiographs of the femurs collected from animals of each group. Note that there was marked bone loss in ArKO mice, and that the bone loss was prevented by dietary BPA. (B) pQCT analysis of femoral distal metaphysis. Scanning was performed at a site 1.2 mm from the growth plate, and the density of trabecular bone was determined visually as described in Materials and methods. The value of trabecular bone density (mg per cm³) is shown in each panel.

No.4 文献番号：14709801

担当者 佐二木 順子

著者名：Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Gabriele S, Carpino A, Rago V, Di Gioia ML, Leggio A, Bonofiglio D, Maggiolini M, Liguori A. (イタリア)

論文題名：The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells.

出典：Endocrine. 22(3):275-84. (2003)

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、(x)人由来 MCF 7 breast cancer cells、()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 (x)細胞、()組織、()個体、()その他_____
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 培地添加
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 (記入 BPA, E2, 0.1 nM-10 μM(2.3 mg/kg) 2h-5days)
7. 観察された影響の種類と濃度 (MCF7 (野生株、変異株) ERαを活性化(half-maximal stimulation)、10nM) (HeLa 細胞の hormone-binding domains の転写活性を亢進、1 μM) (MCF7 (野生株) ERα and pS2 m-RNA の増加、1 μM) (E2 と同程度の HeLa の細胞増殖、10⁻⁸M)
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 (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

生鮮食品中の BPA 濃度を測定した。その結果から 0.1 nM-10 μM を設定した。BPA (1 μM) は MCF7 の wt (野生株), SH (変異株) 両細胞で内因性の ERα を活性化したが、hydroxytamoxifen の添加で元にもどった。HeLa 細胞では、キメラタンパクを導入した実験や ERα 変異株での実験結果で BPA のエストロゲン様反応を認めた。なお、BPA は MCF7 のエストロゲン標的遺伝子 ps2 に過敏に反応し、wt, SH 両細胞の増殖も高めた。

添付資料 Figs, 3,7

評価者のコメント：本研究では BPA のほか、ノニルフェノール (NP) も同時に検討しているが、エストロゲン効果は BPA が NP より強い。女性ホルモン関与のガン細胞への BPA の影響は明らかであると考えられる。本研究では、生鮮食品中で BPA 濃度の分析をしており、オレンジやトマトから 1 ppm という高い値を報告している。しかし、本論文では検出限界や回収率等、分析を行う上での基礎的な記載がなく、信憑性に問題が残る。GC/MS クロマトを見ると、BPA のピークの前に妨害ピークがあり、この物質の影響を受けていないか気にかかる。

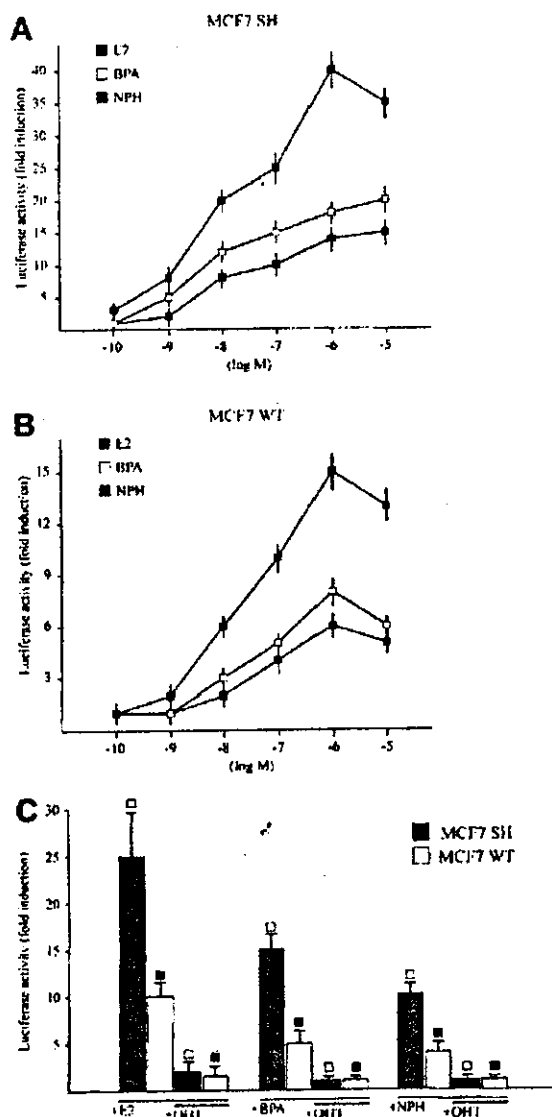


Fig. 3. BPA and NPH activate endogenous ER α . The indicated human breast cancer cell lines (A, MCF7SH; B, MCF7wt) were transfected with the luciferase reporter plasmid XETL (carrying firefly luciferase sequences under the control of an estrogen response element upstream of the thymidine kinase promoter), and treated with increasing concentrations (logarithmic scale) of E2, BPA, and NPH. Luciferase activities were standardized to the expression of renilla used as an internal transfection control, and reported as the ratio of induced activity to activity in absence of ligand. Values of cells receiving vehicle were set as onefold induction, upon which the results of treatments were calculated. (C) Activation by xenoestrogens is mediated by ER α . Transfected MCF7SH and MCF7wt cells were treated with 100 nM of E2, BPA, and NPH with or without 10 μ M of the antiestrogen hydroxytamoxifen (OHT). Each data point represents the mean of triplicate samples of a representative experiment. \square $p < 0.05$.

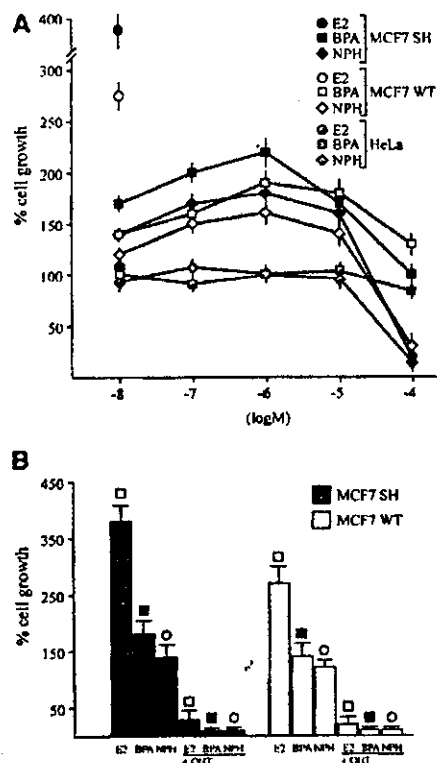


Fig. 7. BPA and NPH stimulate the proliferation of breast cancer cells. (A) Both xenoestrogens stimulate MCF7wt and MCF7SH cell growth, only NPH is cytotoxic at very high concentration, even for HeLa cells. Low numbers of cells were seeded in 24-multiwell plates, treated with 10 nM of E2 or increasing concentrations (logarithmic scale) of both xenoestrogens, and counted on d 6 as described in *Material and Methods*. Cell numbers are expressed as a percentage of number of cells treated with vehicle alone. (B) Proliferative effects are ER α -mediated. Proliferation of MCF7wt and MCF7SH cells was assayed as above except that cells were treated with 100 nM E2 and xenoestrogens plus 10 μ M OHT. Each data point is the average of several independent experiments. \square $p < 0.05$.

No.19 文献番号： 12963004

担当者 花田秀一

著者名：Michael G. Wade, Alice Lee, Avril McMahon, Gerard Cooke, Ivan Curran

論文題名：The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats.

出典：Food and Chemical Toxicology 41, 1517-1525. (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、(X)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、(X)出生後、()成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階(記入 600 mg/kg/day の1用量のみ、生後21日目の離乳時から3日間)
7. 観察された影響の種類と濃度(600 mg/kg/day で子宮重量の増加、子宮 Peroxidase 活性の上昇、子宮上皮組織厚の増加)
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 Canadian Council for Animal Care guidelines、()いいえ

論文の概要

未熟ラットの子宮重量増加反応に及ぼす飼料中の isoflavones (IF) の影響を強エストロゲン作用物質として EE (1 μ g/kg/day) を、弱エストロゲン作用物質として BPA (600 mg/kg/day) を用いて検討した。飼料は、実質的に IF フリーである大豆を基本とした飼料 (AIN 93G) に IF の濃縮物 (Novasoy) を添加して調製した (0, 5, 25, 250, 1250 mg/kg diet)。その結果、非刺激条件下では、IF 含有の最も高い飼料においてのみ、子宮重量の増加 (A)、Peroxidase 活性の上昇 (B)、子宮上皮組織厚の増加 (C) が認められ、これらの変化は、EE もしくは BPA 投与によっても認められた。EE もしくは BPA による A および C の作用に対する飼料の影響は認められなかったが、EE による B の作用は、IF 含有の最も高い飼料によって相乗的に促進された。よって、飼料中の IF 含量は、子宮重量やエストロゲン作用に影響を及ぼす可能性があり、ウテロトロピックアッセイの感度を減じる可能性があるが、現状の飼料に含まれる IF が外因性エストロゲンに対する子宮の反応に影響するという仮説を支持するものではない。

添付資料 Fig. 2、Fig. 3、Fig. 4

評価者のコメント：

試験系の保証、飼料の分析など必要な資料は示されている。また、試験結果は、適切な統計処理に基づいて評価されているので記載内容の信頼性は高いと判断された。

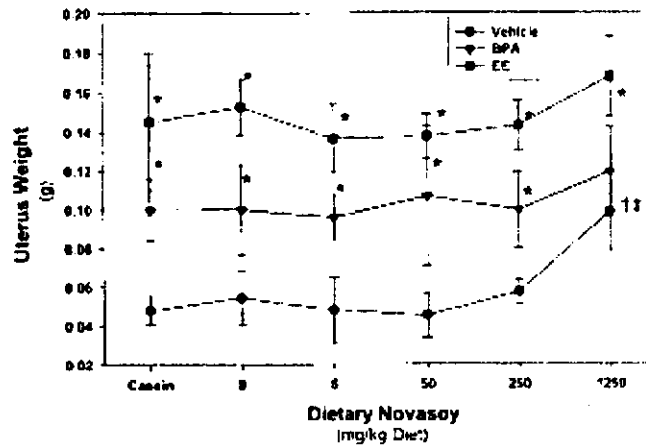


Fig. 2. Effects of dietary isoflavone on uterine weight of animals treated with EE, BPA or vehicle for 3 days. Results are reported as mean \pm standard deviation of blotted uterine weight for six animals per group. * Indicates significant difference from vehicle treated animal from the same diet group. † Indicates significant difference from similarly treated animals fed casein-based control diet. ‡ Indicates significant difference from similarly treated animals fed soy-based control diet.

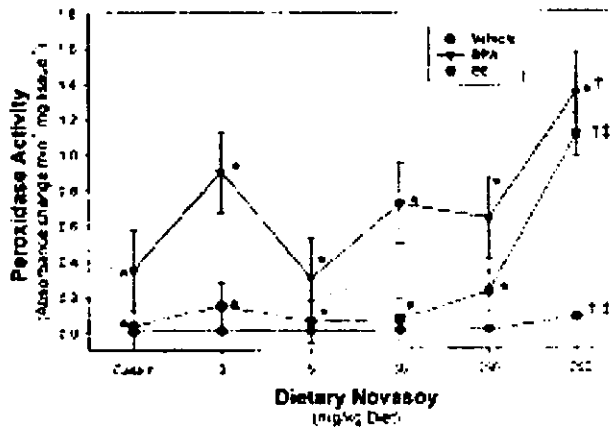


Fig. 3

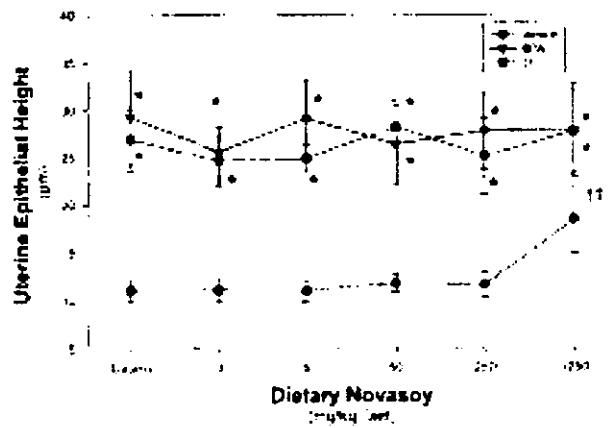


Fig. 4

NO. 142 文献番号 : 11689155

担当者 川島 浩

著者名 : Washington W, Hubert L, Jones D, Gray WG.

論文題名 : Bisphenol a binds to the low-affinity estrogen binding site.

出典 : In Vitro Mol Toxicol. 2001 Spring;14(1):43-51.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x) その他 妊娠ラット子宮抽出液
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 in vitro
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 10^{-4} ~ 10^{-8} M BPA)
7. 観察された影響の種類と濃度 : (BPA $10 \mu\text{M}$ で E2 と Type II EBS の結合を 50%以上阻害)
(BPA の E2-Type II EBS 結合に対する IC_{50} は 5×10^{-6} M) (_____)
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

E2 と妊娠ラットの子宮抽出物より調製した Type II EBS と E2 との結合を $10 \mu\text{M}$ BPA が 50~60%拮抗阻害した。

E2 と Type II EBS 結合に対する BPA の IC_{50} は 5×10^{-6} M、一方 DES は 6×10^{-7} M。BPA の Type II EBS に対する親和性は E2 の 250 分の 1、DES の 8~10 分の 1。 IC_{50} から計算する E2 に対する BPA の相対結合親和性は、ER で 1600 倍低い、Type II EBS では 250 倍低いに過ぎない。BPA は、E2 よりも相対的に Type II EBS への親和性の方が 40~60 倍高い。

添付資料

Fig2、Fig4

評価者のコメント

BPAとともに試験した外因性のestrogen物質のendosulfanは、Type II EBSとの親和性を全く示していないが、元々endosulfanは構造的にBPAと異なり、ERとの親和性はないので結果は予想できる。DESや天然flavonoidsのquercetinは、BPAと同じ親和性を示しているが、DES以外にnonylphenolなどBPAと類似のphenol骨格を持つ他の外因性estrogen物質によるデータがないため評価しにくい。

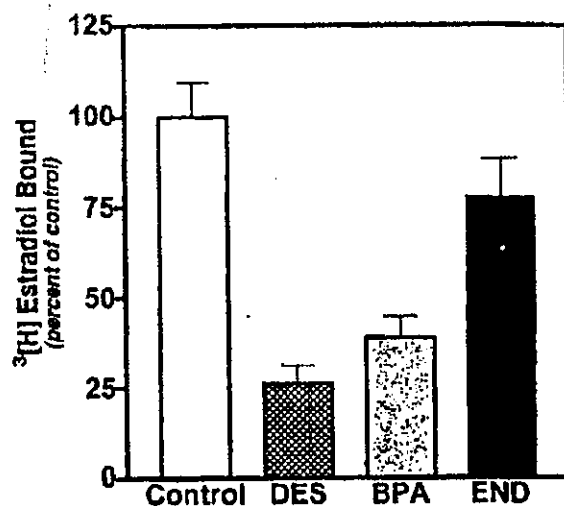


FIG. 2. Bisphenol A competes for binding to Type II EBS. Rat uterine Type II EBS fractions (20.0 μ g protein) were treated with ^3H E2 (20 nM) in the presence and absence of a 500-fold molar excess of BPA (gray bar), DES (patterned bar), or END (black bar). Each bar represents the mean of two experiments performed in duplicates. The results are shown as percentage of the binding that occurred with E2 in the absence of any competitor (open bar). The results shown are Mean \pm S.E.M.

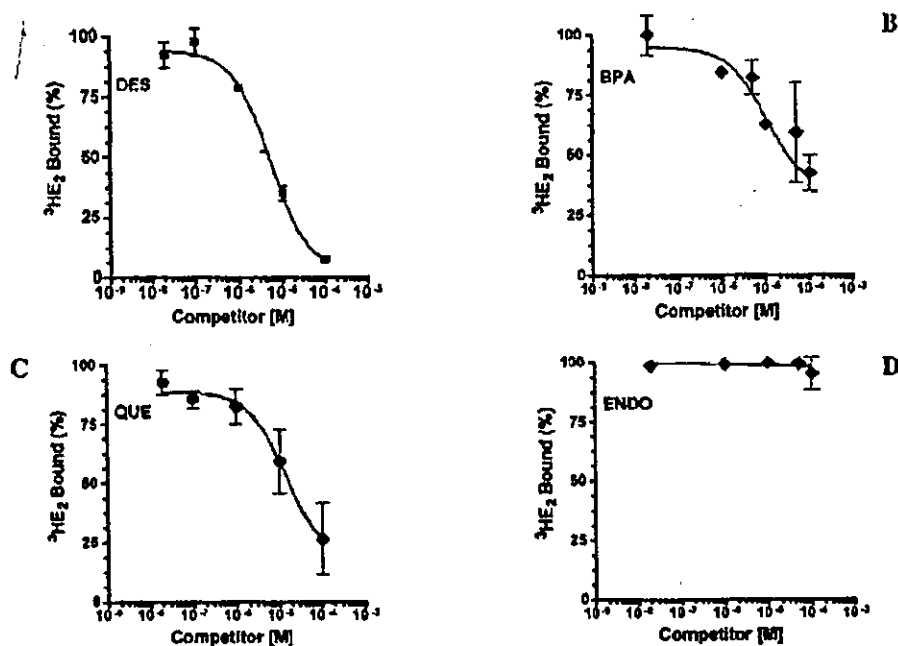


FIG. 4. Competitive binding of environmental estrogens to Type II EBS. Uterine Type II EBS (Q-seph. 0.125 M) was incubated with 2×10^{-11} M ^3H E2 and different concentration of (A) DES, (B) BPA, (C) QUE, (D) ENDO; and the displacement of labeled estradiol was determined as described in Materials and Methods. The IC_{50} and KI for BPA were calculated by the Cheng-Prusoff equation using the Graph Pad II program.

No.11 文献番号：14620671

担当者 花田秀一

著者名:Sumiko WATANABE, Rui-Sheng WANG, Mineyuki MIYAGAWA, Kenichi KOBAYASHI, Megumi SUDA, Soichiro SEKIGUCHI and Takeshi HONMA

論文題名:Imbalance of Testosterone Level in Male Offspring of Rats Perinatally Exposed to Bisphenol A.

出典:Industrial Health 41(4), 338-341. (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、()個体、(X)その他 血漿中・精巣中のホルモン濃度
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 授乳(母獣への経口投与)
5. 曝露時期 (X)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(記入 4, 40, 400 mg/kg b.w. <妊娠6日目から授乳20日目まで>)
7. 観察された影響の種類と濃度 (出生仔/♂の血漿中テストステロン濃度の上昇; 4 mg/kg)
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 ()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

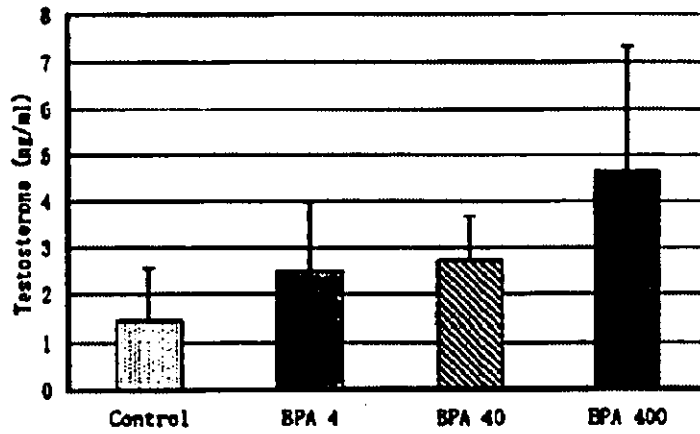
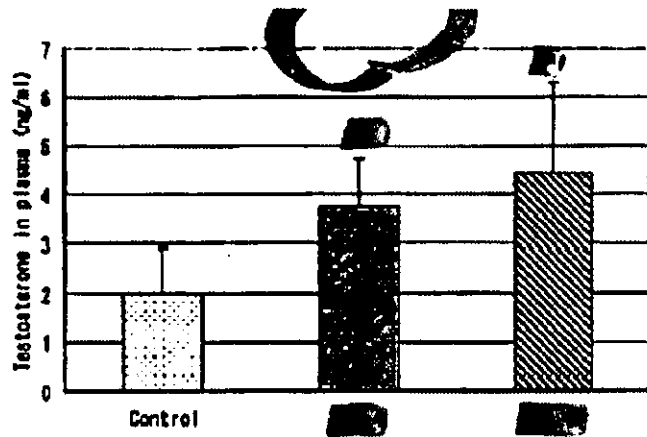
母獣へのBPA曝露が、胎盤と母乳を介して雄性出生仔の生殖系に影響を与えるか否かを調べたもので、測定結果としては、4mg/kg以上の投与群で出生後9週目の血漿中テストステロンの有意な上昇が認められたのみであった。血漿中の他の関連ホルモン(E₂, LH, FSH)には変化が見られなかったため、テストステロン上昇作用は、BPAがテストステロンの代謝に影響しているものと推測している。

添付資料

Fig.1

評価者のコメント

母獣の血中濃度は測定していないが、強制経口投与であることから、母獣へのBPAの直接曝露と出生仔への非直接曝露は、信頼性が高い。また、出生仔の群わけ等にも問題がなく、測定結果の評価は統計処理に基づいてなされており信頼性は高いと判断した。



The bar represents the mean + SD of 4-6 rats in each group. *Significantly different from the control group.

No. 073 文献番号: 12479269

担当者 根岸 隆之

著者名: Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE.

論文題名: The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells.

出典: Mol Cancer Ther. 2002 May;1(7):515-24.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x) その他 細胞 (LNCaP cell(ヒト prostatic adenocarcinoma))
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 培養液暴露
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 (記入 0.1, 1, 10, 100 nM)
7. 観察された影響の種類と濃度 (0.1nM BPA で LNCaP 細胞増殖促進)
(1.0nMBPA で突然変異(T877A)アンドロジェン受容体(AR-T877A)依存の下流タンパク(CyclinD1, CyclinA, c-Abl) 発現増加、pRB のリン酸化増加および PSA (前立腺特異的タンパク) mRNA 発現増加)
(1.0nMBPA 依存 AR-T877A の核内移行)
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 (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

前立腺癌由来細胞株から得られたアンドロジェン非依存株 (LNCaP) はアンドロジェン受容体(AR)に突然変異 (AR-T877A) を持ち、その受容体は広くステロイドをリガンドとする。この細胞株に対する BPA の影響を検討している。BPA は 0.1, 1, 10nM で細胞増殖活性を見せたが、100nM では効果が無く、1nM を頂点とする逆 U 字を描いた。次に 1nMBPA は AR-T877A の核内移行、その後の ARE(アンドロジェンレスポンスエレメント)へ結合を促した。また 1nMBPA はこの細胞株において各種アンドロジェン依存遺伝子 (CyclinD1, CyclinA, c-Abl, PSA) の発現を促進した。また通常の AR では BPA は AR 依存の転写活性を変化させなかった。以上の結果は前立腺癌においてアンドロジェン非依存性に転換した場合、BPA は極低濃度でも増悪因子となることを示唆する。

添付資料: Fig.1.

評価者のコメント: 筆者が考察で述べるところ、1nMBPA はヒトであり得る濃度である。つまり前立腺癌において第一選択治療法である抗アンドロジェン療法を行った後に再発するアンドロジェン非依存的前立腺癌患者において BPA は増悪因子として働く可能性を示唆する。筆者らは深いコメントは避けているが Fig.1 で明確な逆 U 字 (1nM が頂点) が出現しているのが高濃度で細胞増殖性が見られない理由が明らかでない (例えば 100nM では細胞死が生じる等)。ちなみに BPA はアンドロジェン活性を有さず、通常の AR では活性を示さない。あくまで T877A 変異 AR に限った話である。

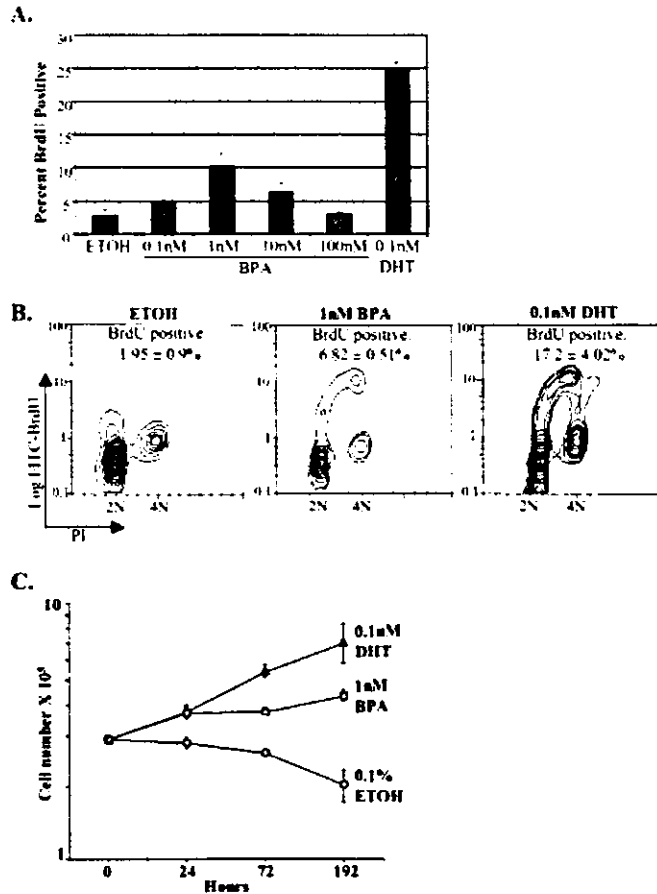


Fig. 1. BPA induces androgen-independent LNCaP cell proliferation. **A.** LNCaP cells were propagated for 72 h in 5% CDT supplemented either with 0.1% ETOH vehicle, increasing BPA concentrations (0.1–100 nM), or 0.1 nM DHT. Cells were then labeled with BrdUrd as described, and BrdUrd incorporation was detected via indirect immunofluorescence. Data shown are the average of at three independent experiments in which at least 250 cells/experiment were analyzed; bars, SD. **B.** LNCaP cells were cultured as indicated for 96 h, pulse-labeled with BrdUrd, and subsequently labeled with PI, as described. Shown are representative contour maps with the log FITC anti-BrdUrd staining versus PI. **C.** LNCaP cells were seeded into 5% CDT serum supplemented with either 0.1% ETOH, 0.1 nM DHT, or 1 nM BPA. Cell number was analyzed at times indicated by counting and trypan blue exclusion. Data shown are the average of two independent experiments; bars, SD.

NO.124 文献番号：11906184

担当者 迫田篤信

著者名：J. Xu, Y. Osuga, T. Yano, Y. Morita, X. Tang, T. Fujiwara, Y. Takai, H. Matsumi, K. Koga
Y. Taketani, O. Tsutsumi

論文題名：Bisphenol A Induces Apoptosis and G2-to-M Arrest of Ovarian Granulosa Cells

出典：Biochemical and Biophysical Research Communications 292, 456-462(2002)

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、() 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 (100fM~100 μ M)
7. 観察された影響の種類と濃度
(卵巣顆粒膜細胞のアポトーシス 100 pM)
(_____)
(_____)
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 (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

マウス卵巣の顆粒膜細胞への bisphenol A の影響を検討。100 fM~100 μ M の濃度で 24~72 時間培養。bisphenol A は顆粒膜細胞の生存率を用量、時間依存的に減少させた。最も低い影響濃度は 100 pM。TUNEL 分析によれば、bisphenol A は顆粒膜細胞のアポトーシスを促進した。細胞周期の G2 期から M 期への分裂の停止を引き起こした。bisphenol A はプロテインレベルでアポトーシスを促進する Bax の発現を増加させ、アポトーシスを抑制する Bcl2 の発現を減少させた。

添付資料：

Fig 1

評価者のコメント

100 pM=20 ng/L で濃度としては、十分低濃度である。in vitro の結果から低用量効果を説明することが可能か、小生は残念ながら知見がない。In vivo で同様の影響があるか確認する必要があるのではないだろうか。

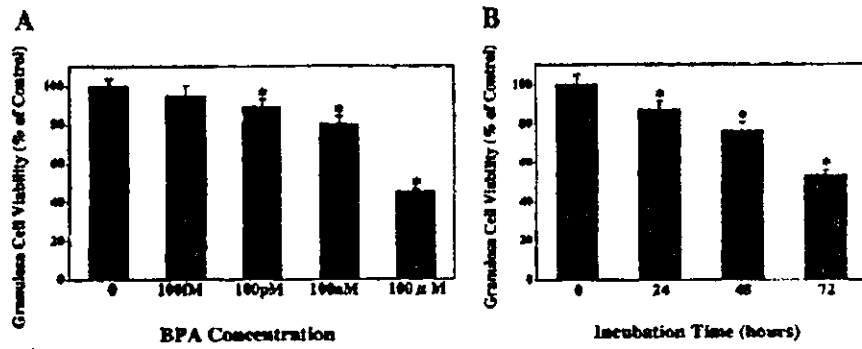


FIG. 1. Effects of bisphenol A (BPA) on granulosa cell viability. Granulosa cells were incubated with various concentrations of BPA (0, 100 nM-100 μM) for 72 h (A) and with 100 μM BPA for 0, 24, 48, and 72 h (B). Cell viability was determined by MTS assay. Relative viability is shown as the percentage absorbance of the sample with respect to that of the control (without BPA or 0 h). Values represent the means ± SEM from at least three independent analyses. Significantly different from the control: * $P < 0.05$.

No. 79 文献番号： 12415423

担当者 花田秀一

著者名：Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M.

論文題名：Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given diets of different phytoestrogen content and the ovarian changes with ICI 182,780 or antide.

出典：Arch Toxicol. 76(11):613-620. (2002 Nov.)

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 ()経口、()埋め込み、その他 皮下投与(生後20日目から3日間)
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 1, 3, 10 mg/kg b.w./day)
7. 観察された影響の種類と濃度 (最高用量の10 mg/kgでも影響なし)
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 ()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 日本動物実験協会の動物実験ガイドライン、()いいえ

論文の概要

未成熟ラットを用いた uterotrophic assay 系に対する飼料中に含まれる植物エストロゲン (PE) の影響を検討した。エストロゲン作用物質としては、ethinylestradiol (EE)、BPA、4-nonylphenol (NP) および genistein (G) を用い、飼料としては、定型 MF 飼料 (PE 含量；299.8 μ g/g)、改変型 NIH-07 飼料(同；139.0 μ g/g)および PE を低減化した改変型 NIH-07 飼料 (同；31.9 μ g/g) を使用した。その結果、一般状態や体重に薬剤投与の影響は認められなかった。種々の PE 含量の飼料における各薬剤の子宮増加反応の感受性に本質的な差は認められなかったことから、比較的低レベルの飼料中の PE は、未成熟ラットを用いた uterotrophic assay 系の感受性に影響しないものと判断された。ただし、BPA では、10mg/kg においても卵巣および子宮重量に影響は認められなかった。

添付資料

Table 3. (卵巣と子宮重量への影響なしのデータ)

評価者のコメント

GLP 施設での試験結果であり (GLP 準拠は記載されていないが)、適切な統計処理に基づくデータ解釈であるため、結論の信頼性は高いと判断した。

Table 3. Body, uterus and ovary weights of immature rats given bisphenol A (BPA) subcutaneously from 20 days of age for 1 day while being fed diets of varied phytoestrogen content. Data are expressed as means \pm SD. MF commercial diet, NIH-07 modified NIH-07 open formula diet, NIH-07PLD modified NIH-07 phytoestrogen-low diet

Diet	BPA dose (mg/kg)	n	Body weight (g)	Uterus wet weight		Uterus blotted weight		Ovary weight	
				Absolute (mg)	Relative (vg/100 g)	Absolute (mg)	Relative (mg/100 g)	Absolute (mg)	Relative (vg/100 g)
MF	0 (Vehicle control)	6	65.2 \pm 4.7	40.7 \pm 11.7	62.8 \pm 19.0	39.3 \pm 11.1	50.9 \pm 18.1	18.8 \pm 2.9	28.9 \pm 4.7
	1	6	65.7 \pm 4.6	36.4 \pm 3.3	55.3 \pm 5.1	33.0 \pm 3.7	53.2 \pm 5.5	20.1 \pm 3.1	30.7 \pm 5.1
	3	6	66.7 \pm 7.6	40.8 \pm 4.4	61.1 \pm 5.1	39.5 \pm 4.2	59.1 \pm 4.7	20.9 \pm 2.3	31.3 \pm 3.3
	10	6	65.4 \pm 5.6	44.7 \pm 5.0	68.4 \pm 6.6	43.7 \pm 4.6	66.9 \pm 6.2	19.0 \pm 3.8	29.2 \pm 5.9
NIH-07	0 (Vehicle control)	6	66.6 \pm 5.7	38.2 \pm 7.7	58.2 \pm 15.7	37.6 \pm 7.3	57.3 \pm 15.1	18.9 \pm 2.1	28.5 \pm 3.1
	1	6	64.8 \pm 7.0	42.1 \pm 9.5	62.5 \pm 15.4	39.0 \pm 9.4	60.8 \pm 14.9	16.9 \pm 1.3	26.7 \pm 2.7
	3	6	66.2 \pm 6.0	39.9 \pm 4.7	60.3 \pm 6.0	39.0 \pm 4.8	58.9 \pm 6.2	20.2 \pm 2.5	30.6 \pm 1.9
	10	6	64.9 \pm 6.7	47.8 \pm 9.5	73.1 \pm 8.3	49.9 \pm 9.3	71.9 \pm 8.7	19.5 \pm 3.6	30.8 \pm 6.5
NIH-07PLD	0 (Vehicle control)	6	73.4 \pm 2.3	39.3 \pm 5.3	53.4 \pm 6.5	38.3 \pm 5.4	52.1 \pm 6.6	20.0 \pm 2.1	27.7 \pm 2.8
	1	6	71.4 \pm 3.1	37.2 \pm 8.0	52.1 \pm 10.8	36.2 \pm 7.9	50.7 \pm 10.6	21.0 \pm 3.0	29.6 \pm 5.1
	3	6	71.4 \pm 2.4	38.5 \pm 5.4	54.0 \pm 8.2	37.2 \pm 5.5	52.2 \pm 8.3	17.3 \pm 2.2	24.2 \pm 2.8
	10	6	73.2 \pm 5.1	47.3 \pm 6.7	64.6 \pm 8.1	46.4 \pm 6.5	63.4 \pm 7.8	20.7 \pm 2.2	28.3 \pm 2.7