

No.74 文献番号：12460799

担当者 佐二木 順子

著者名：Papaconstantinou AD, Fisher BR, Umbreit TH, Brown KM.(米)

論文題名：Increases in mouse uterine heat shock protein levels are a sensitive and specific response to uterotrophic agents.

出典：Environ Health Perspect. 2002 Dec;110(12):1207-12.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、(x)マウス B6C3F1 卵巣切除マウス、()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 皮下注射
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 (記入 BPA: 100 mg/kg/day E2: 2 μg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度：(BPA: 100 mg/kg/day、E2: 2 μg/kg/day、子宮重量増加、hsp72, hsp73, hsp90α, grp94, の増加)
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 (x)はい：ガイドラインの名称(NIH Using Animals in Intramural Research Guidelines, 1998)、()いいえ

論文の概要：子宮内 heat shock protein (hsp) の増加がエストロゲンの特異的な作用か、ホルモン作用を持つ偽の化学物質によっても生じるのかについて調べた。BPA の 4 日にわたる卵巣除去マウスへの皮下投与は子宮重量、hsp90α glucose-regulated protein (grp94) のレベルを有意に増加させた。子宮重量の増加は E2 (2 μg/kg/day) に比べるとずっと少なかったが、hsp90α、grp94 レベルは E2 と変わらなかった。エストロゲンの検出法として、子宮内 heat shock protein (hsp) を測定する方法は子宮重量を測定する方法よりずっと感受性が高い。

添付資料 Table 1

評価者のコメント：本研究は、BPA の生体への影響を見ることが目的ではなく、ホルモン作用の検査法の開発に重きを置いている。しかし、用いられた化学物質の中で、BPA が女性ホルモン様の作用を示すことは明らかである。BPA の作用は、E2 の約 1/50,000 である。天然エストロゲンに比べるとエストロゲン作用は著しく低い、他の薬剤 (フタル酸エステル) に比べると 50 倍以上高い。本実験での 4 日という短期間の投与で生じる子宮での変化 (重量ならびに hsp の増加) は低レベル慢性試験の追試に値する。

Table 1. Summary of effects on all uterine parameters examined.

Treatment	Uterine weight	Luminal epithelial height	Vacuolar degeneration ^a	Stromal leukocyte infiltration ^a	hsp90α	grp94	hsp72	hsp73
E ₂	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+
TAM	+++	+++	NE	++	+++	++	+++	NE
DES	+++	+++	NE	+++	+++	++	+++	NE
DEX	NE	NE	NE	NE	ND	NE	ND	NE
MXC	+	+	NE	NE	++	++	NE	NE
CM	++	+	+++	+	++	++	NE	NE
DBP	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	NE
BPA	++	+	+	+	++	++	NE	+
MED	NE	NE	NE	NE	NE	NE	ND	NE
PHY	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Abbreviations: ND, not detected; NE, no effect.

^aRanges are based on frequency of observance: +++, seen in more than 75% of sections; ++, seen in more than 50% of sections; +, seen in more than 0% of sections.

No. 92 文献番号 : 12161000

担当者 稲葉 克彦

著者名 : Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C.

論文題名 : Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines.

出典 : Mol Cell Endocrinol. 2002 Jul 31;193(1-2):43-9.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(X)その他 ヒト由来培養細胞株 (HELN α 、HELN β およびPALM細胞)
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、(X)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 培地への添加
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 (ERアゴニスト活性測定: 10^{-7} Mから 10^{-5} Mまで5段階、ARアンタゴニスト活性: 10^{-6} Mから 10^{-5} Mまで4段階)
7. 観察された影響の種類と濃度: (BPAアゴニスト活性: $EC_{50} = 0.2\mu\text{M}$ for ER α 、E2アゴニスト活性: $EC_{50} = 8\text{pM}$ for ER α)
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

HeLa または PC-3 細胞に対して性ホルモンレセプターおよびレポーター遺伝子が導入された安定発現細胞 (HELN α 、HELN β およびPALM細胞) に、BPAを含む複数の phenyl 誘導体を処理し、性ホルモン受容体への作用を官能基に関する構造活性相関的な考察を含めて検討した (構造活性相関的記載は省略)。BPAのERに対するアゴニスト活性 (EC_{50}) は、ER α に対して $0.2\mu\text{M}$ 、ER β に対して $0.2\mu\text{M}$ 、E2では α 、 β に対してそれぞれ 8pM および 20pM であった。RBA (relative binding affinity と思われる) は、ER α において 0.05 、ER β において 0.04 であった。また、ARアンタゴニスト活性では、 $IC_{50} = 7\mu\text{M}$ 、 $K_i = 18\mu\text{M}$ だった。

添付資料 Table. 1、Fig. 2, 3

評価者のコメント

安定発現細胞の感度、精度、再現性等、系の信頼性についての記載が文献にないことから、結果の信頼性を評価するためには、周辺の文献を評価することが重要である。また、統計処理などが実施されていないため、最低発現濃度を得ることができず、報告された EC_{50} などの記載にとどめた。

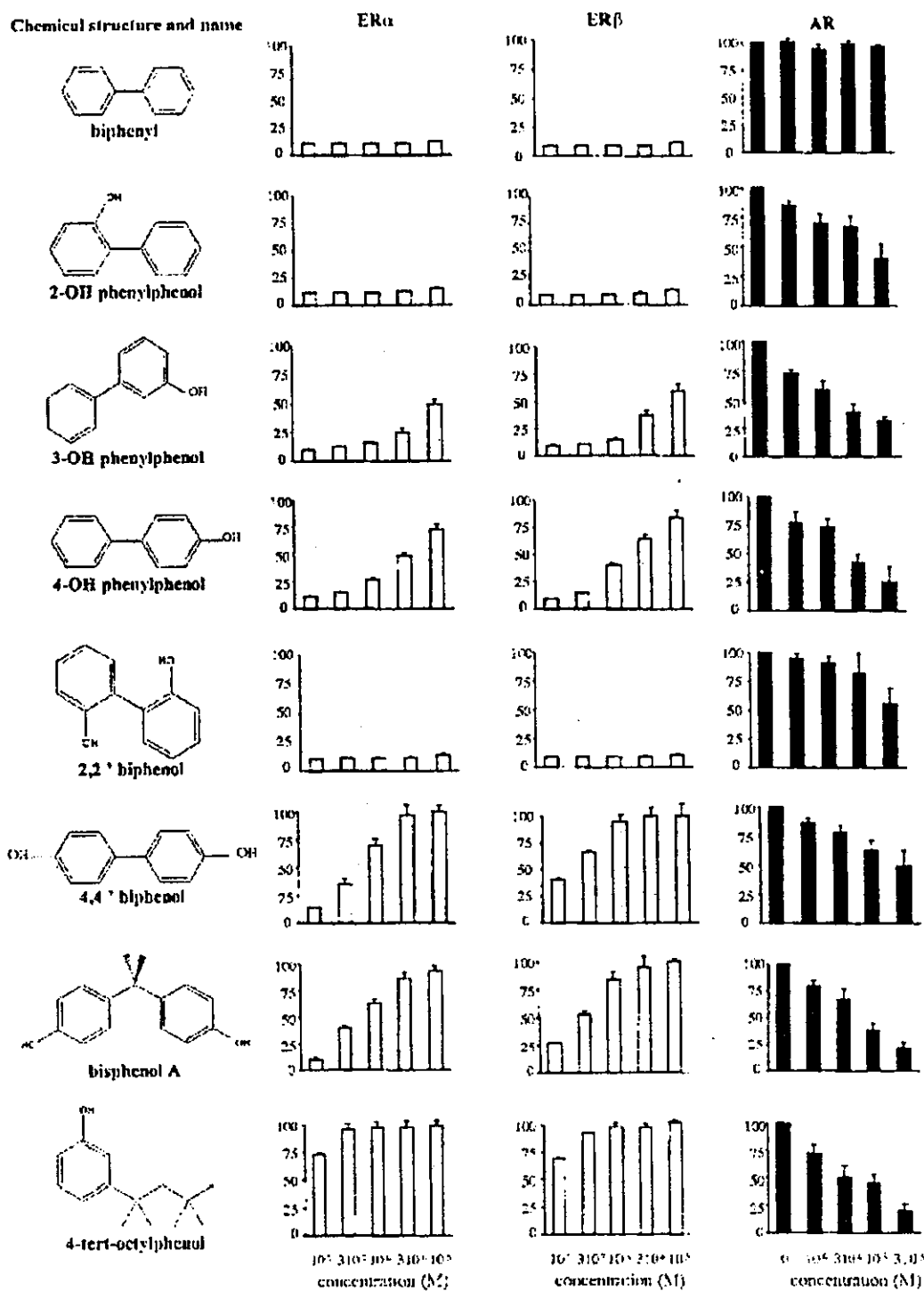


Fig. 2. ER α , ER β , and AR activity of various phenyl-derived compounds. Experiments with HELN α and HELN β cells were performed as described in Fig. 1. PALM cells were incubated with R1881 (10⁻⁹ M) alone or in presence of increasing concentrations, ranging from 10⁻⁷ to 3 \times 10⁻⁵ M, of various phenyl-derived compounds. Results are expressed as a percentage of luciferase activity measured per well. The 100% value was only used for

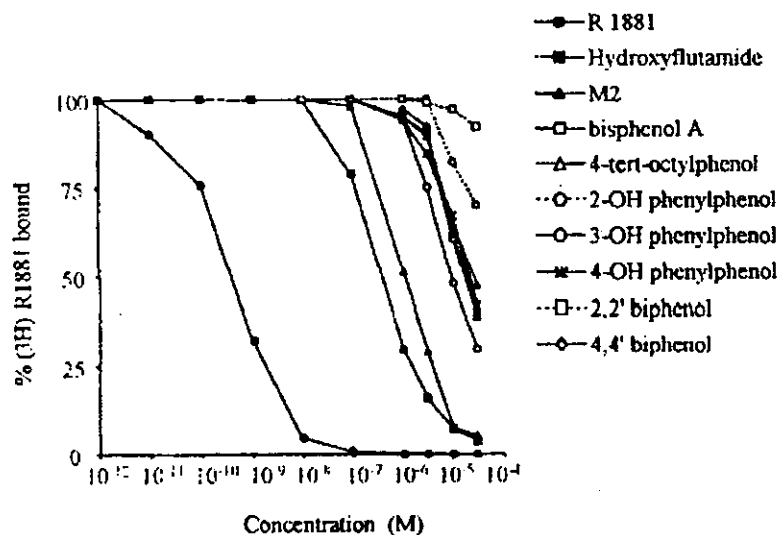


Fig. 4. Competitive inhibition of [³H] R 1881 binding to androgen receptor by various phenyl-derived compounds. PALM cells were incubated with different concentrations of each compound in presence of 10⁻¹² M [³H] R1881.

Table 1
Values, in μM , of IC₅₀ and RBA for H1ELN cells and of IC₅₀ and Ki for PALM cells obtained for different phenyl-derived compounds tested as described in Section 2

	ER α		ER β		AR	
	IC ₅₀ (μM)	RBA	IC ₅₀ (μM)	RBA	IC ₅₀ (μM)	Ki (μM)
Broteryl	> 50	ND	> 50	ND	> 50	> 50
2-OH phenylphenol	> 50	ND	> 50	ND	20	> 50
3-OH phenylphenol	10	ND	6	ND	5	9
4-OH phenylphenol	3	ND	2	ND	7	20
2,2' biphenol	> 50	ND	> 50	ND	40	> 50
4,4' biphenol	0.5	0.01	0.2	0.03	10	20
Bisphenol-A	0.2	0.05	0.2	0.04	7	18
4- <i>tert</i> -Octylphenol	0.04	0.07	0.04	0.1	3	25

IC₅₀ of each compound was the concentration at which 50% of the maximal activity was reached. The 100% activity was obtained in presence of E2 10⁻⁷ M. The RBA of each competitor was calculated as the ratio of concentrations of E2 and competitor required to reduce the specific radioligand binding by 50% (=ratio of IC₅₀ values). IC₅₀ was the concentration which decreased the maximal activity to 50%. The 100% activity was obtained in presence of R1881 10⁻¹⁰ M. Ki was the concentrations of competitor required to reduce the specific radioligand binding by 50%.

No. 87 文献番号：12207000

担当者 根岸 隆之

著者名：Quesada I, Fuentes E, Viso-Leon MC, Soria B, Ripoll C, Nadal A.

論文題名：Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB.

出典：FASEB J. 2002 Oct;16(12):1671-3. Epub 2002 Aug 21.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x) その他 細胞 (Swiss albino OF1 mouse 由来膵臓βcell)
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、(x) その他 膵臓βcell
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 1 nM BPA)
7. 観察された影響の種類と濃度 (1nM BPA でβcell における細胞内 Ca₂₊の上昇)
(1nM BPA でβcell における CREB のリン酸化)
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 (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

マウスの膵臓から得たβcell において 1nM BPA は細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした。また 1nMBPA は 8mM Glucose 誘発 CREB のリン酸化を 35%程度上昇させた。これらの効果は 1nME2 と同程度であった。またこの BPA の効果は ICI182,780 で抑制されなかったことから、細胞内 Estrogen receptor (ER) を介さない、つまり細胞膜上の ER を介している可能性が示された。

添付資料：Fig. 2.

評価者のコメント：細胞を使った実験ではあるが、極低濃度 1nMBPA での影響を初めて報告した論文である。この濃度は実際のヒトであり得る濃度である (数百 pM から数 nM)。しかし実際の個体で影響がみられるかどうかは不明。特徴的なのは同じ濃度の E2 とほぼ同じ強さを BPA が示していることと、細胞膜上の ER に対する BPA の影響の可能性を初めて示したことである。今回はβcell であるが、他の細胞あるいはヒト細胞でも同様の効果があるかどうかは気になる。

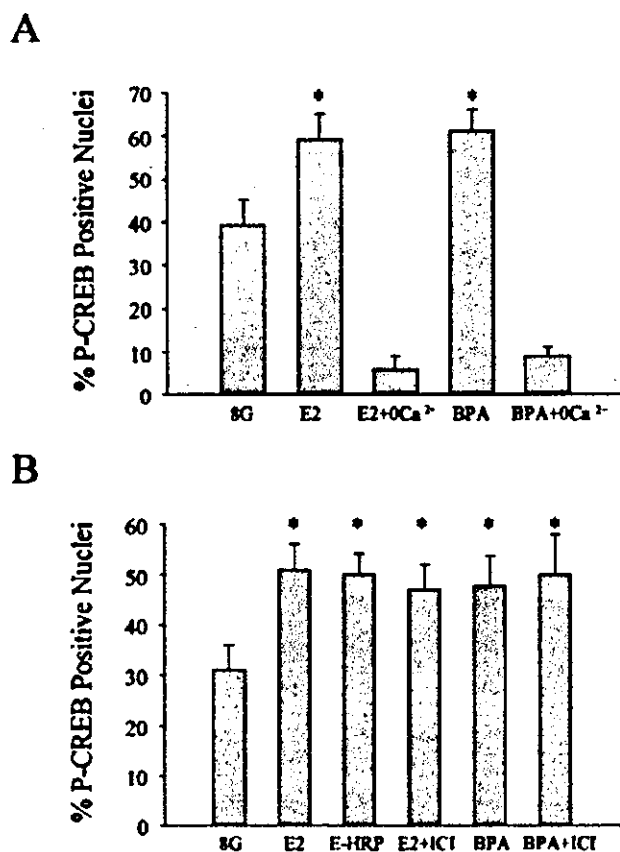


Figure 2. A) Summary of the effects of treatment with 8 mM glucose (8G), 1 nM 17 β -estradiol (E2), 1 nM 17 β -estradiol in the absence of extracellular Ca²⁺ (E2+0Ca²⁺), 1 nM bisphenol-A (BPA), 1 nM BPA in the absence of extracellular Ca²⁺ (BPA+ 0Ca²⁺); all stimuli were in the presence of 8 mM glucose. B) Summary of the effects of treatment with 8 mM glucose (8G), 1 nM 17 β -estradiol (E2), 1 nM E2 conjugated to horseradish peroxidase (E-HRP), 1 nM 17 β -E2 in the presence of 1 μ M ICI 182,780 (E2+ICI), 1 nM bisphenol-A (BPA), 1 nM bisphenol-A in the presence of 1 μ M ICI 182,780 (BPA+ICI); all stimuli were in the presence of 8 mM glucose. Numbers are expressed as percentage \pm SE of cells positive for nuclear P-CREB. Results are representative of at least 150 cells in at least 3 different experiments. * $P < 0.05$, Student's *t* test comparing each condition with 8G.

NO. 170 文献番号：11248142

担当者 関澤 純

著者名：Rajapakse N, Ong D, Kortenkamp A

論文題名：Defining the Impact of Weakly Estrogenic Chemicals on the Action of Steroidal Estrogens

出典：TOXICOLOGICAL SCIENCES 2001 Apr 60(2), 296-304

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x) その他 細胞
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 _____
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(他の論文を引用)
7. 観察された影響の種類と濃度
In vitro 試験
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

Bisphenol A(BPA), o,p'-DDT を酵母レポーターアッセイで 17β -estradiol (E2) と共存させた時の効果を検討した。個々の物質が違ったサイトに独立に働くという仮定ではなく、同じサイトに加算的に働く効果が見られた。生体内で実際に共存していると思われる濃度(BPA/E2=5,000)では目だった効果は見られなかったが、影響濃度の比率に応じて混合した時(BPA/E2=20,000)には加算効果が見られたことから、複数のエストロゲン物質が共存した時の効果は無視できないと考えられた。

添付資料

評価者のコメント

in vitro 試験の結果であり、生体内で働くいくつかの複雑な条件が考慮されていないことになるが原理的には考慮すべき内容を指摘した。

NO. 192 文献番号：10964929

担当者 井藤 悦朗

著者名：Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP.

論文題名：Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta.

出典：J Biol Chem. 275(46):35986-93, 2000.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x)その他 試験管内再構築試験系
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、(x)その他 ER受容体
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、()個体、(x)その他 コアクチベーターのリクルート能力
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 試験管内
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^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M)
7. 観察された影響の種類と濃度：(10^{-6} M ER α , β の結合親和性あり)
(10^{-4} M ER β を介したコアクチベーターのリクルート能力を示した)
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

大腸菌にヒト型のエストロゲン受容体 (ER) α 、 β 、およびコアクチベーター (SRC-1, TIF2) を共発現させたのち、グルタチオンセファロースビーズに固定した。アゴニストの存在で受容体とコアクチベーターの集合体が検出される。検出されるタンパク量によってアゴニスト活性の強度が測定できる。BPAのERとコアクチベーターによるリクルート能力は従来のエストロゲン様活性といわれた受容体結合親和性の強度に比べると、ER α では従来の1/100の活性であり、ER β では1/10で、受容体への親和性ほど強いものではなかった。

添付資料

Fig1, 2, 4, 5, 8

評価者のコメント

これまでの評価方法はERに結合するかどうか、その物質の受容体への親和性はどの程度かに集中していたが、この論文では受容体に結合できる物質がどの程度アゴニスト活性を有するかという点まで議論できる点で非常に有用な方法である。しかも、ERの2つのサブタイプに対する活性を評価できる。しかしながら、方法が十分にバリデートされているかどうかは不明。

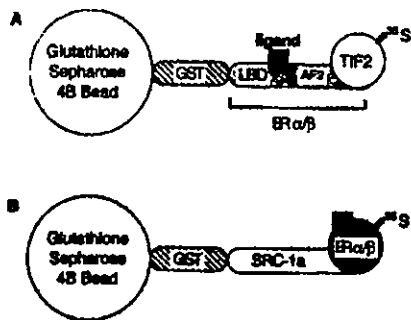


FIG. 1. Two GST pull-down assays were used to investigate the receptor-coactivator interactions in the presence of different ligands. The ability of radiolabeled TIF2 to interact with the hER was investigated using a GST fusion protein containing the LBD and AF-2 of either hER α or hER β (A). In contrast, the ability of radiolabeled ER α or ER β (entire protein) to interact with SRC-1 α was investigated using a GST-SRC-1 α fusion protein (B). The GST fusion proteins associate with the beads, and the ligands interact with the LBD of the ER. Ligand-induced conformational changes in the tertiary structure of the estrogen receptor are associated with differences in the receptor's ability to interact with coactivator proteins (TIF2 or SRC-1 α).

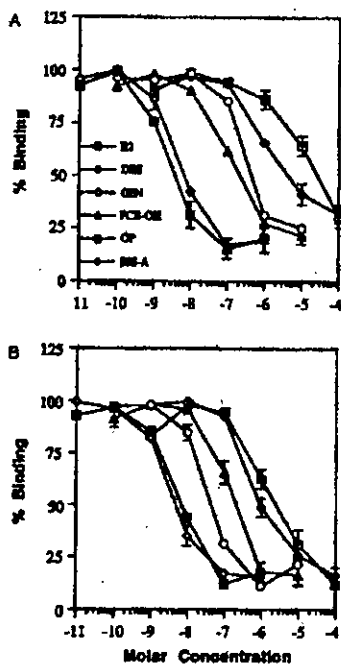


FIG. 2. Ligand binding assays. Competitive displacement of tritiated 17 β -estradiol from *in vitro* translated hER α (A) and hER β (B) by a range of xenoestrogens. Unbound radioligand was removed after incubation (16 h at 4 °C) as described. Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific bound counts from the total counts, and this was expressed as a percentage of the maximum obtainable response (Max. Binding) with excess tritiated 17 β -estradiol alone (value arbitrarily set at 100%). Values represent the mean \pm S.E. of four separate experiments.

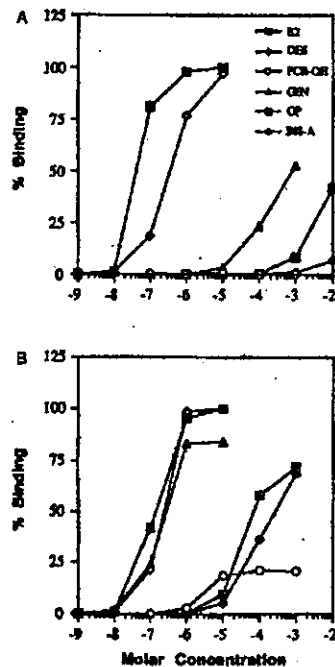


FIG. 4. Results of GST pull-down assay showing the dose-dependent recruitment of TIF2 by ER α (A) and ER β (B) complexed to a range of xenoestrogens. *In vitro* translated 35 S-TIF2 proteins were incubated with glutathione-Sepharose beads carrying GST-AP2 fusion proteins with various concentrations of E2, DES, PCB-OH, Gen, OP, or Bis-A. Recruitment of 35 S-TIF2 was quantified by scintillation counting as described. Results are expressed arbitrarily as a percentage of the maximum inducible response in the assay. The responses shown are representative of at least four independent experiments, which gave similar results.

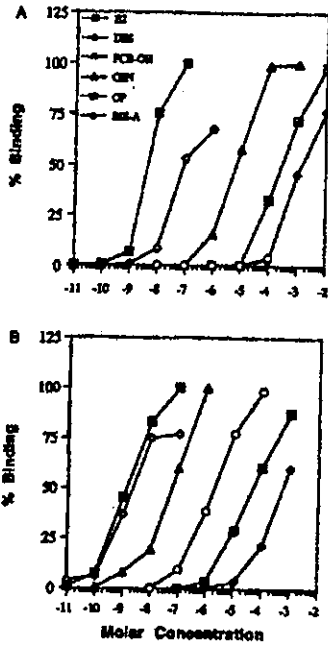


Fig. 5. Results of GST pull-down assay showing the dose-dependent recruitment of SRC-1 α by ER α (A) and ER β (B) complexed to a range of xenoestrogens. *In vitro* translated ³⁵S-ER α or ³⁵S-ER β proteins were incubated with glutathione-Sepharose beads carrying GST-SRC1 α fusion proteins with various concentrations of E2, DES, PCB-OH, Gen, OP, or Bis-A. Receptor-coactivator recruitment was quantified by scintillation counting as described. Results are expressed arbitrarily as a percentage of the maximum inducible response in the assay. The responses shown are representative of at least four independent experiments, which gave similar results.

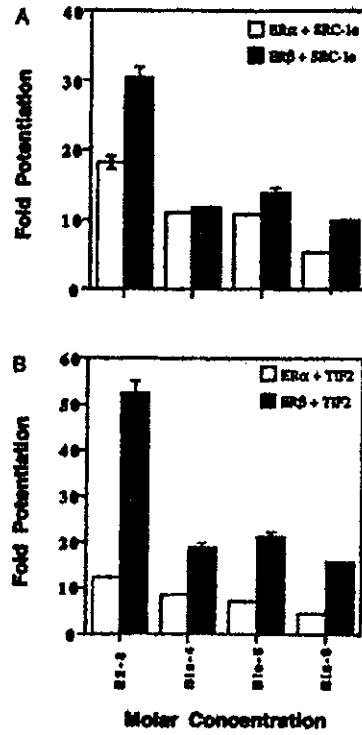


Fig. 8. Potentiation of reporter gene activity by ER α -AF2 and ER β -AF2 with E2 and Bis in the presence of excess coactivator. Transiently transfected HeLa cells, carrying expression vectors for either Gal4-AF2 α or Gal4-AF2 β , were assessed for their ability to stimulate reporter gene expression (p(Gal4)₃-TK-GL3) with E2 (10⁻⁸ M) or Bis (10⁻⁴ to 10⁻⁶ M) in the presence of excess SRC-1 α (A) or TIF2 (B). Results (potentiation) are expressed as increase in the response above the base-line level in the absence of hormones. Mean values \pm S.D. from a representative experiment are presented.

NO.143 文献番号：11686642

担当者 大西 純一

著者名：Sajiki J

論文題名：Decomposition of bisphenol-A (BPA) by radical oxygen.

出典：Environ Int. 2001 Oct;27(4):315-20.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x)その他 溶出試験
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 _____)
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、(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

以前の実験で PC チューブから血清への溶出は脂溶性物質の存在によることが示唆されていた。本試験の目的は PC チューブから水へ溶出する BPA 濃度へのリン脂質のような極性物質の影響を調べることである。PC チューブからホスファジルエタノールアミン(PhE)含有の水へ溶出した BPA の濃度変化を水だけの場合と比較した。BPA 濃度は経時的に増加し、水への溶出速度は PhE 含有水よりも 3 倍速く、5 週間後に 55.8ng/ml に達した。添加直後の回収率は 95%以上であるが、インキュベートすると PhE 含水中では BPA 濃度は経時的に減少した。過酸化水素存在下で、時間と 3 価の鉄イオン濃度に依存した BPA 濃度の減少が認められた。これらの結果は、BPA が過酸化脂質を含むラジカル酸素によって分解されることを示唆している。脂質酸化のパラメータであるチオバルビツール酸の値が BPA を含む過酸化水素と 3 価の鉄の混合溶液で減少したので、ラジカル酸素の BPA 酸化のために脂質酸化が阻害されることが示唆された。

添付資料

Fig 1 と Fig. 5

評価者のコメント

BPA の毒性を理解するため、酸化系による BPA のセミキノン中間体を含む BPA 代謝系が提案されており、BPA の酸化とラジカル酸素及び酸化脂質との関連性の示唆は毒性メカニズムと関連してくる。PC チューブからの BPA 溶出はリン脂質があると水よりも 3 倍速い。

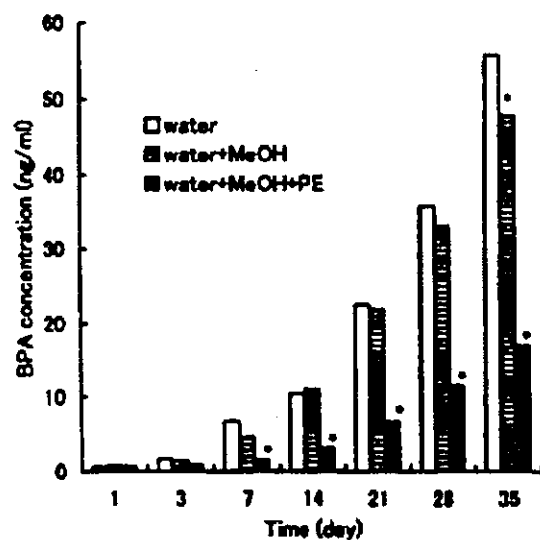


Fig. 1. Change of BPA concentrations in water samples leached from PC tube as a function of time. Data represent the mean of duplicates. All samples in PC tubes were allowed to stand at 37°C. * Significant difference in the value between water samples at the same day ($P < 0.01$).

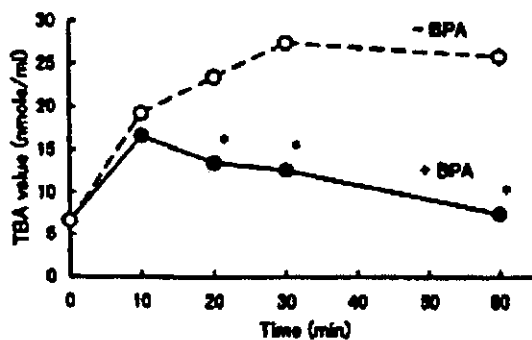


Fig. 5. A change of TBA value in water at the presence of radical oxygen with or without BPA as a function of time after addition of 250 ng/ml BPA. Radical oxygen was produced by adding 0.44 mM Fe_2^+ and 3% H_2O_2 to water at room temperature. * Significant difference ($P < 0.01$) between the TBA values in samples with and without BPA at the same assay time.

著者名 : Schrader TJ, Langlois I, Soper K, Cherry W.

論文題名 : Mutagenicity of bisphenol A (4,4'-isopropylidenediphenol) in vitro: effects of nitrosylation.

出典 : Teratog Carcinog Mutagen. 2002;22(6):425-41.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(×)その他 サルモネラ菌
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、(×)その他 サルモネラ菌
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、()個体、(×)その他 サルモネラ菌変異コロニー数の増加
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 培地への添加
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、()出生後、()成熟動物、(×)細胞(細菌)
6. 曝露濃度 用量段階 (Ames Salmonella/microsome アッセイ : 0.1ug から 1,000 ug/plate まで5段階、Ames II™ アッセイ : 1 から 200 ug/plate まで4段階、NBP アッセイ : max 500 ug)
7. 観察された影響の種類と濃度 (Ames Salmonella/microsome アッセイ : ニトロシル化 BPA で 100 ug/plate) (Ames II™ アッセイ : ニトロシル化 BPA で 100 ug/plate) (NBP アッセイ : ニトロシル化 BPA でおおよそ 30ug/ml)
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 による乳腺や前立腺の変化は発がん性に起因する可能性があるとの動機から BPA および化学的にニトロシル化させた BPA の変異原性を評価した。BPA はそれ自体では、変異原性を示さなかったが、ニトロシル化させた BPA は、TA98 および 100 株で変異原性を示した。また、Ames II™ アッセイの結果から、塩基レベルで、変異の内容が明らかになった。一方、4(-4'-Nitrobenzyl)-Pyridine との結合を見る NBP アッセイで、NBP とニトロシル化 BPA の結合性が確認され、ニトロシル化 BPA の求電子的な DNA アダクト形成能が示唆された。

添付資料 Table. I, II, III

評価者のコメント:

前立腺や乳腺の変化を BPA の発がん性に関連する可能性があるとする仮説はユニークだが、今回の結果でこれら現象を説明するには至っていない。また、ニトロシル化後の被験物質の化学分析的同定や純度分析などがまったく実施されていないことなどから供試されたニトロシル化 BPA とされる化学物質が、真にニトロシル化 BPA であることや、各試験ごとのニトロシル化 BPA に化学的同等性があることなど何の保証もなく、その意味で信頼性を欠く文献と評価した。(以上)

Table I. *Salmonella* TA98/Microsome Assay of Nitrosylated Bisphenol A (Revertants/Plate)^a

Test chemical (μ g/plate)	Bisphenol A dissolved in DMSO		Bisphenol A dissolved in acetic acid buffer pH 4.0		Bisphenol A dissolved in inactive nitrosylation solution		Nitrosylated Bisphenol A	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	29.7 \pm 3.3	30.7 \pm 5.7	48.7 \pm 9.3	40.0 \pm 5.5	52.3 \pm 5.8	47.3 \pm 1.9	39.3 \pm 6.7	48.7 \pm 12.7
0.1	24.7 \pm 5.8	37.7 \pm 13.8	44.7 \pm 10.5	28.3 \pm 6.4	49.0 \pm 2.9	43.0 \pm 3.2	55.3 \pm 5.2	63.0 \pm 8.5
1	40.3 \pm 11.5	38.3 \pm 6.9	43.3 \pm 13.9	41.3 \pm 11.0	46.7 \pm 4.7	40.3 \pm 1.8	67.3 \pm 6.6	62.7 \pm 0.3
10	29.3 \pm 4.5	49.0 \pm 9.5	40.0 \pm 6.7	35.3 \pm 11.8	51.7 \pm 1.9	36.7 \pm 5.5	67.0 \pm 9.6	84.7 \pm 6.7
100	30.7 \pm 6.9	34.7 \pm 11.7	29.7 \pm 6.3	24.3 \pm 9.8	62.7 \pm 5.9	45.0 \pm 5.7	121.0 \pm 3.5	125.7 \pm 9.8
1,000	41.7 \pm 36.2	38.7 \pm 12.4	19.0 \pm 13.7	40.0 \pm 9.3	62.3 \pm 13.0	69.7 \pm 11.4	373.7 \pm 33.2	455.3 \pm 28.4

^a Revertants are presented as means of triplicate plates \pm standard error. Aroclor-induced rat liver S9 (50 μ /plate) was used for metabolic activation. Positive controls: 2-nitrofluorene -S9 618.0 \pm 36.1 revertants/plate; benzo[a]pyrene +S9 414.0 \pm 28.8 revertants/plate.

Table II. *Salmonella* TA100/Microsome Assay of Nitrosylated Bisphenol A (Revertants/Plate)^a

Test chemical (μ g/plate)	Bisphenol A dissolved in DMSO		Bisphenol A dissolved in acetic acid buffer pH 4.0		Bisphenol A dissolved in inactive nitrosylation solution		Nitrosylated Bisphenol A	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	141.3 \pm 8.6	153 \pm 2.0	165.7 \pm 18.8	175.0 \pm 13.6	172.0 \pm 4.2	150.7 \pm 8.7	170.7 \pm 4.1	192.0 \pm 9.0
0.1	144.3 \pm 12.1	151.7 \pm 12.7	140.7 \pm 13.7	168.7 \pm 11.3	137.7 \pm 3.3	140.7 \pm 10.8	201.7 \pm 3.8	242.7 \pm 27.7
1	158.7 \pm 10.1	173 \pm 24.6	146.3 \pm 19.6	153.7 \pm 7.2	114.0 \pm 15.9	135.3 \pm 4.9	214.0 \pm 3.5	277.0 \pm 22.3
10	142.7 \pm 4.7	144.3 \pm 14.1	140.0 \pm 12.7	146.7 \pm 9.2	121.3 \pm 0.7	139.7 \pm 15.2	222.7 \pm 17.5	295.7 \pm 14.3
100	138.3 \pm 8.7	151.3 \pm 4.3	129.0 \pm 16.6	135.0 \pm 12.9	168.7 \pm 16.5	174.7 \pm 14.6	268.7 \pm 7.1	406.0 \pm 5.9
1,000	75.7 \pm 11.8	182.0 \pm 23.4	234.0 \pm 58.2	105.7 \pm 12.3	78.0 \pm 12.5	234.0 \pm 20.6	375.3 \pm 25.2	626.7 \pm 21.7

^a Revertants are presented as means of triplicate plates \pm standard error. Aroclor-induced rat liver S9 (50 μ /plate) was used for metabolic activation. Positive controls: sodium azide, -S9 1749.3 \pm 59.2 revertants/plate; benzo[a]pyrene +S9 649.7 \pm 11.0 c/plate.

Table III. Spectrum of Mutagenic Changes Induced by Bisphenol A in the AMES IITM Assay (Well Positive for Growth Per 48 Wells Seeded)^a

Nitrosylated Bisphenol A (μ g/plate)	TA7001		TA7002		TA7003		TA7004		TA7005		TA7006		TA1537	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	0.3	0	3.3	3.0	0	0	0.7	2.3	1.3	6.7	0.3	0.7	0	1.3
	\pm 0.3	\pm 0	\pm 0.3	\pm 1.0	\pm 0	\pm 0	\pm 0.7	\pm 0.3	\pm 0.9	\pm 0.3	\pm 0.3	\pm 0.3	\pm 0	\pm 0.7
1	0	0	0.3	0	0	0	1.3	2.0	1.3	1.0	0	0.3	0.7	0.3
	\pm 0	\pm 0	\pm 0.3	\pm 0	\pm 0	\pm 0	\pm 0.3	\pm 0.6	\pm 0.9	\pm 0.6	\pm 0	\pm 0.3	\pm 0.3	\pm 0.3
10	0.7	0	1.7	0	0	0	2.7	1.0	4.3	2.0	0	0	1.7	1.3
	\pm 0.3	\pm 0	\pm 0.3	\pm 0	\pm 0	\pm 0	\pm 0.3	\pm 0	\pm 2.2	\pm 3.0	\pm 0	\pm 0	\pm 1.2	\pm 0.9
100	0.3	0	6.3	2.0	0.3	0	2.0	3.7	5.3	5.3	1.0	1.3	3.0	1.7
	\pm 0.3	\pm 0	\pm 1.5	\pm 0	\pm 0.3	\pm 0	\pm 0	\pm 1.9	\pm 0.9	\pm 0.9	\pm 0.6	\pm 0.3	\pm 0.6	\pm 1.7
1000	1.0	0	7.3	2.3	0.3	0.7	4.7	11.3	9.0	5.0	1.7	2.3	3.3	3.0
	\pm 0	\pm 0	\pm 1.2	\pm 0.3	\pm 0.3	\pm 0.7	\pm 0.9	\pm 2.2	\pm 2.3	\pm 2.1	\pm 1.2	\pm 0.7	\pm 0.7	\pm 1.5
Positive controls	m4AC 50 μ g/ml	N/A	MMS 500 μ g/ml	B[a]P 100 μ g/ml	SN 0.05 μ g/ml	N/A	4-NQO 10 μ g/ml	2-AA 50 μ g/ml	4-NQO 10 μ g/ml	2-AA 50 μ g/ml	4-NQO 10 μ g/ml	2-AA 50 μ g/ml	2-NF 10 μ g/ml	2-AA 50 μ g/ml
	24.7 \pm 0.9	N/A	16.3 \pm 0.7	17.7 \pm 1.7	1.7 \pm 0.3	N/A	47.7 \pm 0.3	43.0 \pm 0	48.0 \pm 0	46.7 \pm 0.3	52.0 \pm 2.5	23.7 \pm 1.3	44.7 \pm 0.9	33.3 \pm 2.0

^a Revertants are presented as means of triplicate counts of wells positive for growth in groups of 48 tested \pm standard error. Aroclor-induced rat liver 45% S9 was used for metabolic activation. Positive controls: m4AC, m4 aminocytidine; MMS, methylmethanesulfonate; B[a]P, benzo[a]pyrene; SN, streptomycin; 4-NQO, 4-nitroquinoline oxide; 2-AA, 2-aminonaphthalene; 2-NF, 2-nitrofluorene.

No. 81 文献番号：12206822

担当者 稲葉 克彦

著者名：Shimizu M, Ohta K, Matsumoto Y, Fukuoka M, Ohno Y, Ozawa S.

論文題名：Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells.

出典：Toxicol In Vitro. 2002 Oct;16(5):549-56.

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(×)その他 株化細胞 (MCF-7)
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、(×)その他 ヒト乳がん株細胞 MCF-7
3. 影響の種類 (×)細胞、()組織、()個体、()その他 細胞増殖誘導および pS2 mRNA レベルの増加
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他 培地への添加
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 (増殖アッセイ：0.03nM から 100nM まで 6段階、pS2 mRNA 発現アッセイ：1nM から 1mM まで6段階)
7. 観察された影響の種類と濃度 (増殖アッセイ：3nM)
(pS2 mRNA 発現アッセイ：1uM)
()
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

ヒト乳がん由来の cell line である MCF-7 cell line に BPA および BPA 硫酸抱合体を処理した (増殖アッセイでは 144 時間、pS2 mRNA 発現アッセイでは 24 時間)。BPA はそれぞれ、増殖アッセイでは 3nM、pS2 mRNA 発現アッセイでは 1uM 以上で増殖や mRNA 発現を誘導したが、BPA と同じ濃度で処理した BPA 硫酸抱合体は、すべての濃度区で活性を示さなかった。陽性対照として処理された estradiol は、増殖アッセイでは 30pM 以上で有意に増殖を誘導し、pS2 mRNA 発現アッセイでは 1uM で発現を誘導したが、統計学的に有意ではなかった。その他、BPA の硫酸抱合体は、p-nitrophenol, dehydroepiandrosterone で、競合的に阻害されること、Quercetin による BPA 硫酸抱合体阻害実験から、BPA の硫酸抱合体は、ST1A3 とよばれる phenol sulfotransferase が主に関与していることが示唆された。

添付資料 Fig. 1, 2

評価者のコメント：細胞を用いた in vitro 試験であり、本結果が BPA の低用量効果に関して何らかの示唆を与えることは難しい。(以上)

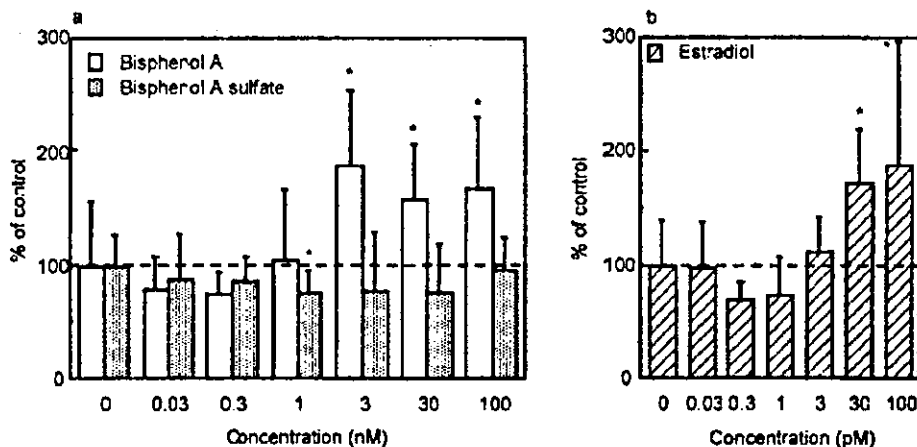


Fig. 1. Cell proliferation of MCF-7 cells cultured in estrogen-deficient medium after exposure to bisphenol A and bisphenol A sulfate for 144 h. (a) Cell proliferation of MCF-7 cells after exposure to bisphenol A and bisphenol A sulfate was measured and shown as described in Section 2. Concentrations of bisphenol A and bisphenol A sulfate were 0.03–100 nM. (b) Cell proliferation of MCF-7 cells after exposure of β -estradiol was examined at the concentrations of 0.03–100 pM. Data were expressed as percentage with respect to the control (no chemicals added). Each data point is the mean \pm SD from 7–8 wells. Statistical significance vs control is shown as * $P < 0.05$.

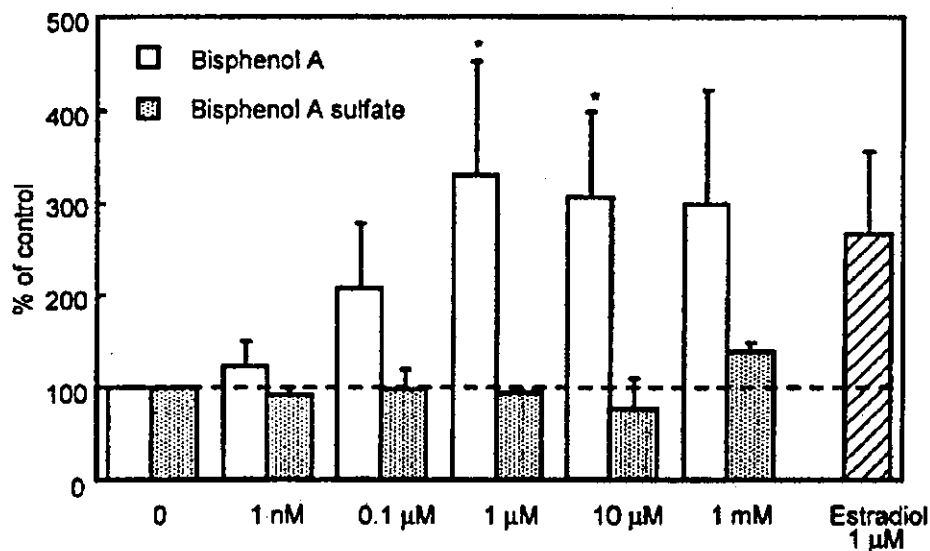


Fig. 2. Expression levels of pS2 mRNA in MCF-7 cells after exposure to bisphenol A and bisphenol A sulfate for 24 h. pS2 mRNA expression levels in MCF-7 cells after exposure to bisphenol A and bisphenol A sulfate were determined by the RT-PCR method as described in Section 2. Data (mean \pm SD) were expressed as percentage with respect to the control (no chemicals added) of three separate determinations. * $P < 0.05$, statistical significance between bisphenol A-treated and control (MeOH) cells, and between bisphenol A sulfate-treated and control (H_2O) cells.

著者名: Sogawa N, Onodera K, Sogawa CA, Mukubo Y, Fukuoka H, Oda N, Furuta H.

論文題名: Bisphenol A enhances cadmium toxicity through estrogen receptor.

出典: Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2001 Sep;23(7):395-9.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、(x)マウス(♂ddY)、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、(x)その他 肝臓
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(腹腔)、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(記入 10, 100 μ g/kg 単回投与)
7. 観察された影響の種類と濃度 (cadmium 投与により誘導される肝臓中 metallothionein 合成を BPA 10 μ g/kg で阻害) (_____)
8. 観察時期 ()出生前、()出生後、()思春期、(x)成熟期(8週齢)
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 (x)はい: 動物実験に関する日本薬理学会指針、()いいえ論文の概要

metallothionein(MT)は cadmium(Cd)の暴露により肝臓中で誘導合成され、Cdによる毒性を抑える作用をすることが知られている。Cdで誘導されるマウス肝臓中のMT-I mRNAの発現及びMT合成をBPA 10 μ g/kg以上で用量相関的に抑制した。estrogen受容体のアンタゴニストであるtamoxifenを投与することによりBPAによるMT合成抑制作用が阻害されることから、BPAによるMT合成抑制はestrogen受容体を介して作用されるものと考えられた。

添付資料

Fig. 1、Fig. 2、Fig. 3

評価者のコメント

本報告でBPAのMT合成抑制作用によるCd毒性増強を示し、それがestrogen活性に起因することを検証した初めての報告と思われる。米EPAが定めたBPAのヒト許容摂取量50 μ g/kg/dayに近い低用量で影響を示しており、環境中でのBPAとCdとの複合暴露による肝臓障害についての懸念を示している。著者らのこれ以前の文献で、Cd誘導されたMT-I mRNA発現をE2が抑制していることも示しており、estrogenとMT合成の関連性に関して信憑性は高いと考える。データの統計処理は行われているが、2用量、1群4匹で用量相関的と言えるのだろうか。

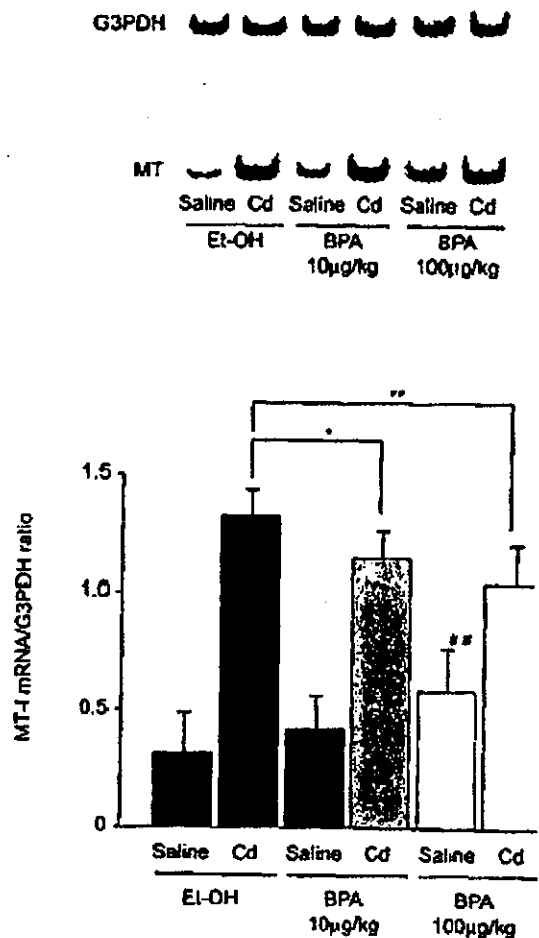


FIG. 1. MT-I mRNA expression in the liver. Autoradiographs of products are shown in the upper panel. Each value shows the mean \pm SD of MT-I mRNA (PSL)/G3PDH mRNA (PSL). The experimental findings were assessed by ANOVA following Fisher's *post hoc* test. $n = 4$. * $p < 0.05$ (compared with the control group injected 0.1% Et-OH).

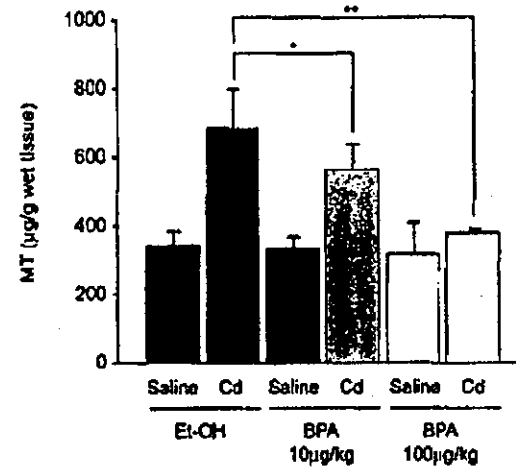


FIG. 2. Effect of BPA on Cd-induced MT synthesis in the liver. Each value shows the mean \pm SD of MT content in the liver. The experimental findings were assessed by ANOVA following Fisher's *post hoc* test. $n = 4$. * $p < 0.05$ (compared with the control group injected 0.1% Et-OH).

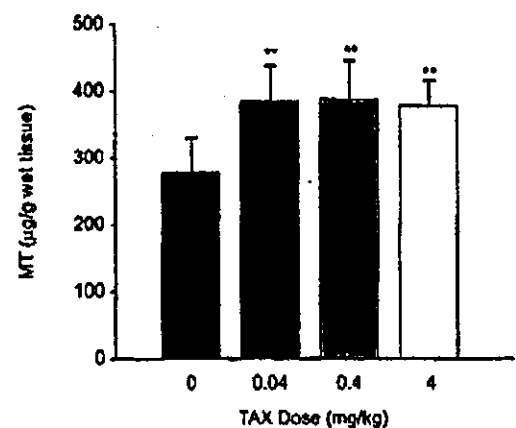


FIG. 3. Recovery of BPA-reduced MT synthesis by tamoxifen (TAX). After tamoxifen injection, all mice were administered with both BPA (100 µg/kg) and Cd (0.5 mg/kg). Each value shows the mean \pm SD of MT content in the liver. The experimental findings were assessed by ANOVA following Fisher's *post hoc* test. $n = 6$. ** $p < 0.01$ (compared with the control group injected 0.1% Et-OH).

NO. 184 文献番号 : 11086226

担当者 大関一男

著者名 : E.Strunck, N.Stemmann, A.Hopert, W.Wunsche, K.frank, G.Vollmer

論文題名 : Relative binding affinity does not predict biological response to xenoestrogens in rat endometrial adenocarcinoma cells

出典 : Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 74 : 73-81, 2000

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、(x) その他 RUCA-1 子宮内膜腺がん細胞培地
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 培地への直接投与
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 BPA ;100-1000 nM)
7. 観察された影響の種類と濃度 : (相対結合親和力、complement3 gene expression)
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

RUCA-I 細胞内、女性ホルモン受容体に対する相対結合親和力において、Bisphenol-A, nonylphenol、p-tert octylphenol、o, p-DDT は estradiol と比べ、少なくとも 1000 倍低い値であり、estradiol >> nonylphenol > BPA ~ p-tert octylphenol > o, p-DDT の順になる。一方、親和力は低いものの Bisphenol-A, nonylphenol、p-tert octylphenol は complement3 の生成を増加させている。RUCA-I は in vitro における環境ホルモン物質の挙動を調査する上で 価値ある子宮内膜系モデルとなりうる。また、今回の結果より、個々の物質の相対結合親和力、biological response に関係がなく、単一のパラメーターによる分析は誤った結論を誘導する可能性があることがわかった。

添付資料

Fig-2、3、4

評価者のコメント

相対結合親和力は biological response (complement C3 gene expression) に必ずしも、関連性があるものではないことを、言及する点で、貴重な報告と言える。筆者らは、こうした親和性からのアプローチよりも、gene expression analysis のほうが、子宮重量法などよりも 感度の高いものとして位置づけた