

著者名: Naciff JM, Daston GP.

論文題名: Toxicogenomic approach to endocrine disruptors: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity.

出典: Toxicol Pathol. 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:59-70. Review.

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 遺伝子
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、()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 (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。
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:

米国EPAが提案しているエンドクリン化合物のスクリーニング試験系Tier1とTier2に関して2種類の主要な問題点を特定した。(1)内分泌攪乱に対して最も感受性の高い発生段階に相当していない。その主な理由は、発生影響は隠れやすくモデル開発中に経済的にスクリーニングする手段がないからである。(2)このプログラムで個々の化合物をスクリーニングするには経費が高い。即ち、同時に複数の化合物のエンドクリン活性を正確、迅速かつ経済的に評価する手法が必要である。内分泌攪乱物質の隠れた発生影響の大部分は、胚や胎児の遺伝子発現の迅速な変化が先行すると仮定している。よって、異なる化合物の潜在的エストロゲン活性を評価する方法は、これらの特定の化学物質にばく露された組織/器官で誘導された遺伝子発現パターンを特定することである。この論文では、このスクリーニング手法の利用可能性と内分泌攪乱活性を持つ特定の化合物の作用機序を示した。

結果のまとめは、

1. エストロゲン活性のある化学物質に関する転写プロファイルの特徴の特定
17- α -エチニルエストラジオール(EE)(0.5, 1, 10 μ g/kg/日)、ゲニステイン(0.1, 10, 100 mg/kg/日)、BPA(5, 50, 400 mg/kg/日)をラットに妊娠20日、または11-20日の間に投与した。それぞれのばく露は、母獣や子供に何の影響も引き起さなかった。また、胎児の生殖器官に何ら組織学的変化はなかった。しかし、遺伝子発現レベルでは、影響が見られ、EE、BPA、ゲニステインばく露に共通した子宮と卵巣の66個の遺伝子発現に有意な変化が検出された。(Fig. 2)
2. エストロゲンばく露に対する思春期前の反応
EE(0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/kg/日)をピーナッツ油に溶解し、生まれて直ぐのラットに1日1回皮下投与した。生後24日目、そして、最終投与から24時間後の子宮と精巣を調べた。その結果、0.1と10 μ g/kg/日で遺伝子変化が生じ、それは用量依存的に増加し、U字型でなく直線的であった。(Fig. 3, 4)
3. エストロゲンばく露により誘導される発生段階に特異的な遺伝子発現

エストロゲンばく露により誘導される発生段階に特異的な遺伝子発現変化は、胎児期と思春期の EE ばく露による遺伝子変化を比較すると、ある遺伝子では両方で変化しているものの変化の方向が逆であった。胎児で特異的に発現する遺伝子は、エストロゲン類の永久的な有害性の原因である可能性があり、その一つが Dermo-1 蛋白の遺伝子であるが、雌の生殖器官の発生に対する機能的役割は不明である。

(Table 1)

4. エストロゲン作用メカニズムについて何が分かっているのか?

EE 子宮ばく露によって、エストロゲン作用メカニズムとしては、生殖系のエストロゲン性刺激反応には osteopontin (sialoprotein) の upregulation そして matrilysin (metalloprotease の一種) と CD44 (受容体の一種) の downregulation が同時に働き、そして、恐らくそれが必要であることが明らかとなった。(Fig. 5)

以上のことから、転写プロファイルがエストロゲン系の内分泌攪乱作用の可能性を特定するハイスループットスクリーニング試験法開発のバイオマーカーとしての使用可能性を持つ遺伝子発現変化を同定する機会を与えることを示している。

添付資料

Fig. 2, 3, 4, 5 & Table 1

評価者のコメント:

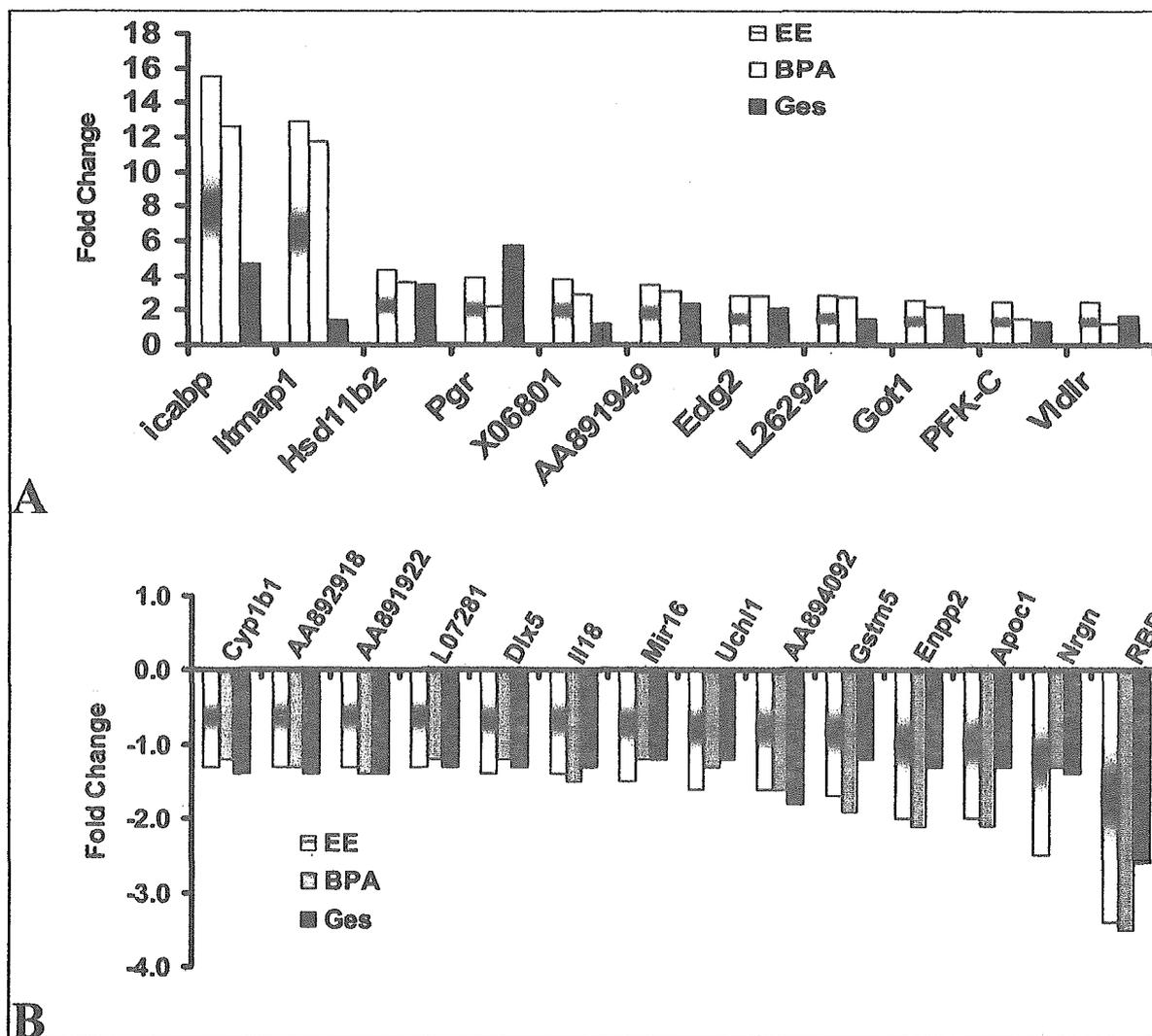


FIGURE 2.—Gene expression changes induced by EE, BPA, and genistein in the fetal uterus/ovaries of the rat. Representative gene expression changes elicited by transplacental exposure to 400 mg bisphenol A/kg/day (BPA), 100 mg genistein/kg/day (Ges), or 10 μ g 17 α -ethynyl estradiol/kg/day (EE), from GD11 to GD20. The average (n = 5) fold change was calculated by comparing the expression level of each gene transcript in treated tissues to the respective vehicle-treated controls (n = 5). Transplacental exposure to EE, BPA or genistein elicits significant and reproducible changes in the expression level of a common set of genes in the developing uterus/ovaries of the female rat. A representative set of upregulated (A) and downregulated genes (B) is shown. Transcripts are identified by their gene symbol (Entrez GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=geo>) or their GenBank accession number.

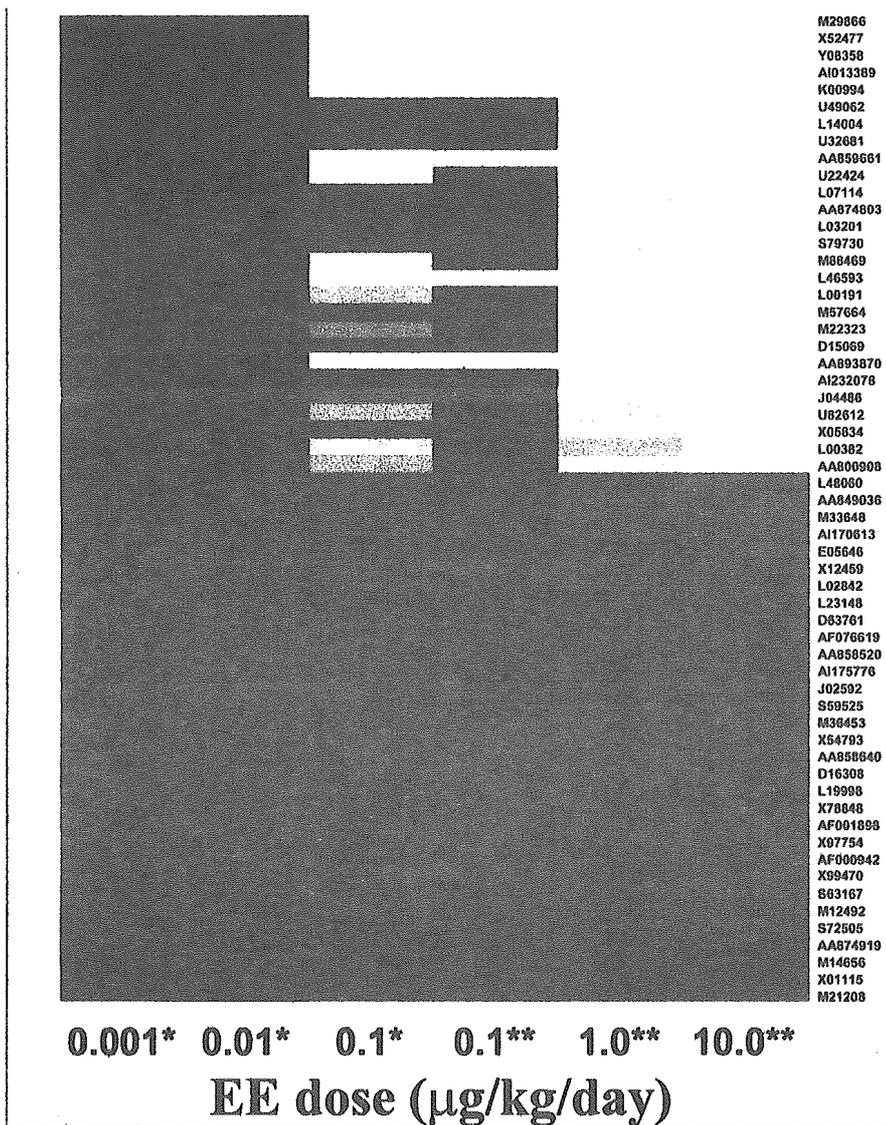


FIGURE 3.—Eisen diagram (or heat map) of a representative set of genes whose expression is modified in a dose-dependent manner by EE exposure in the uterus and ovaries of the prepubertal rat. Some of the genes showing a robust response to EE exposure ($p < 0.0001$, in multiple statistical tests) are shown in this diagram (58 transcripts are displayed), their identity is indicated by the GenBank accession number. Each cell of the data table is represented as a color-coded rectangle in which the color indicates the expression value (fold change calculated as indicated, Figure 2) of unaffected (black), upregulated (red), or downregulated (green) genes.

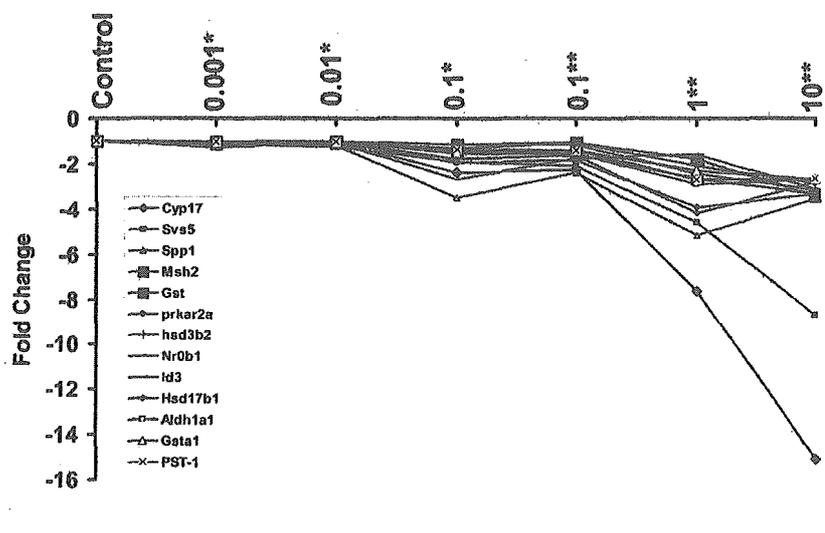
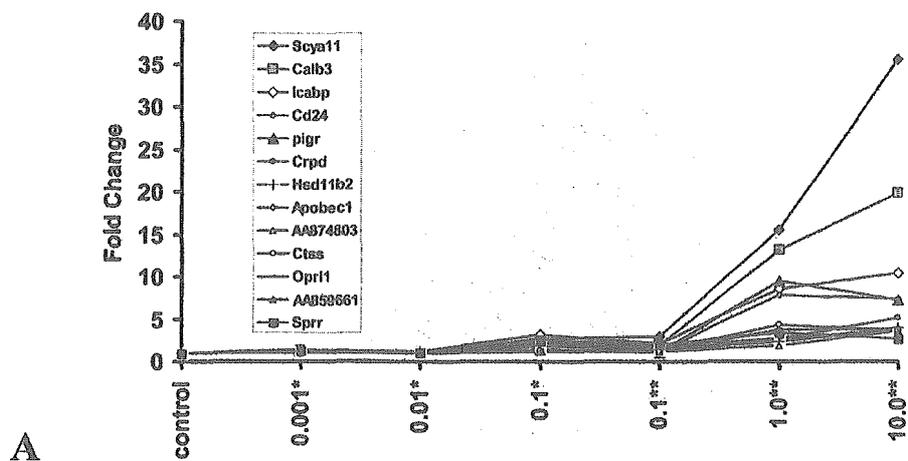


FIGURE 4.—Dose-response analysis of a representative group of genes whose expression is modified by EE exposure in the uterus and ovaries of the immature rat. Representative gene expression changes elicited in immature female rats on PND 20 after treatment with a single daily injection (s.c.) with the indicated doses of EE (μg 17- α -ethynyl estradiol/kg/day), for 4 days, and determined after 24 hours of the last dose. The average fold change was calculated as indicated in Figure 2, with an $n = 6$ (*) or an $n = 5$ (**), for each individual transcript. There is a clear evidence of the dose-response to EE exposure in both upregulated (A), or downregulated (B) genes. Transcripts are identified by their gene symbol (Entrez GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=geo>)) or their GenBank accession number.

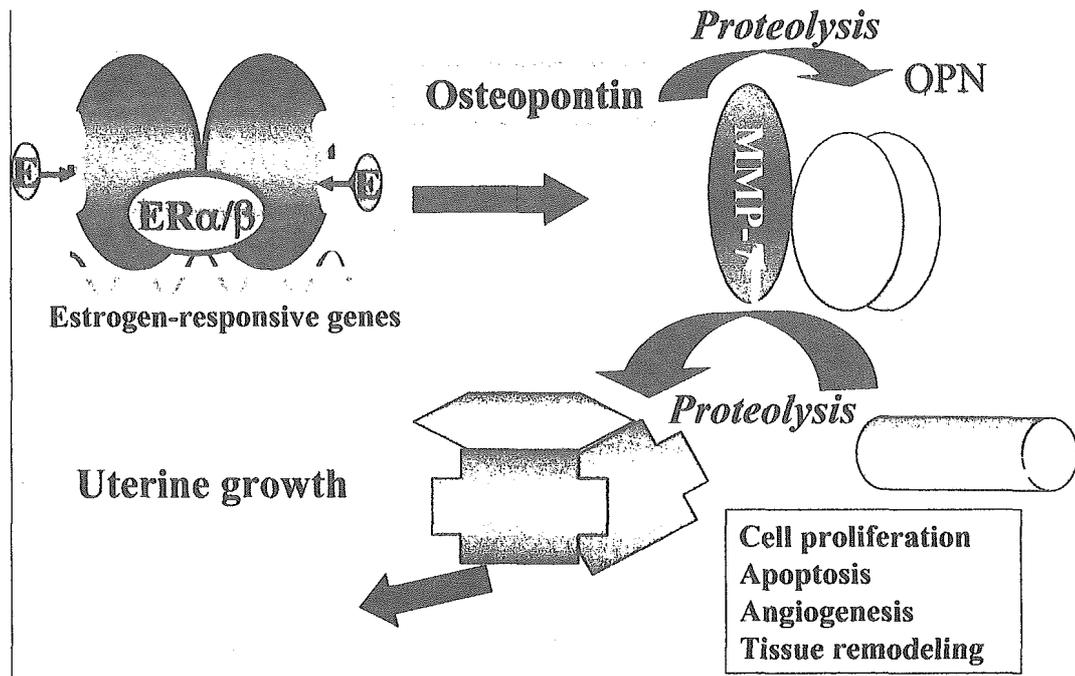


FIGURE 5.—Schematic representation of the use of transcript profiling data to better understand the mechanism of action of estrogen. The classical mechanism of estrogen action involves interaction of ligand (E) with the estrogen receptor (ER, α or β), as a homodimer, subsequently the ER-E complex binds to specific cis-active elements of the promoter regions of estrogen-responsive genes. This complex interacts with other proteins (corepressors or coactivators, not shown for simplicity) in order to modify the expression of a particular gene, resulting in its upregulation (upward arrow) or downregulation (downward arrow). In our studies, we determined that exposure to chemicals with estrogenic activity, at relatively high doses (i.e., 1 to 10 μg EE/kg/day) induce a decrease in the expression level of the gene encoding osteopontin (OPN), and the upregulation of matrilysin (MMP-7) and CD44 heparan sulfate proteoglycan (CD44), among other genes. This is a schematic representation of these gene products, as well as the ones for heparin-binding epidermal growth factor precursor (pro-HB-EGF) and the receptor for the mature HB-EGF, ErbB4 (a member of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases). In this model, MMP-7 proteolytically cleaves osteopontin, decreasing further the level of this gene product. CD44 binds proHB-EGF and active MMP-7. MMP-7 proteolytically cleaves proHB-EGF, generating mature HB-EGF, which is presented by CD44 to ErbB4. Activation of ErbB4 by HB-EGF results in tyrosine phosphorylation of its intracellular domain and the transduction of signals that promote cell survival, and tissue remodeling, among other activities, that converge in a uterotrophic response. The mechanism of interaction between the gene products displayed is presently unknown and the representation is purely speculative.

TABLE 1.—Gene transcripts whose expression is modified by 17- α -ethynyl estradiol in fetal and prepubertal (UA) uterus/ovaries of the rat.

Accession no.	Gene name	Gene symbol	Average fold change induced by EE ($\mu\text{g/kg/day}$)					
			UA 0.1	UA 1.0	UA 10	Fetal 0.5	Fetal 1.0	Fetal 10
K00994	Intestinal calcium-binding protein	icabp	2.1	8.5	10.5	2.7	2.0	28.1
Y13275	Transmembrane 4 superfamily member 3 or D6.1A protein	Tm4sf3	1.2	3.0	5.5	-1.5	-1.6	-1.2
X73524	Desmin	DES	1.1	3.0	4.9	1.1	-1.3	1.5
U23056	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule	Ceacam1	-1.0	3.4	4.5	1.1	1.3	1.7
U22424	Hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β type 2	Hsd11b2	1.0	2.3	4.0	1.6	1.6	4.3
S79730	Opioid receptor-like ORL1 receptor	Oprl1	1.4	2.7	3.6	1.5	1.3	1.5
L26292	FSH-regulated protein or Kruppel-like factor 4	Klf4	1.1	2.8	3.3	1.1	1.3	2.7
M88469	f-spondin	Sponf	1.1	2.4	3.2	1.1	1.1	1.3
AA859837	Guanine deaminase	Gda	-1.1	2.6	3.2	-1.2	-1.2	-1.2
M15562	MHC class II alpha chain RT1.D alpha		1.4	2.0	2.9	-1.0	-1.1	-1.2
U53184	LPS-induced TNF- α factor or Estrogen-responsive uterine gene	Litaf	1.1	1.8	2.7	1.1	1.1	1.2
L00191	Fibronectin	fn	1.2	2.0	2.6	1.2	1.6	1.2
M57664	Creatine kinase, brain	Ckb	1.3	1.9	2.6	-1.0	1.0	1.6
M22323	Actin, γ 2, smooth muscle, enteric	Actg2	1.3	2.2	2.5	1.2	1.5	1.6
M32062	Fc receptor, IgG, low affinity III	Fcgr3	1.4	2.3	2.5	1.2	1.2	1.4
A1072634	Cytokeratin-18		1.1	1.7	2.3	-1.3	-1.1	1.3
AA998683	Heat shock 27 kDa protein	Hsp27	-1.0	1.7	2.1	-1.0	1.4	1.6
AA799726	ESTs		-1.0	1.7	2.0	-1.5	-1.5	-1.2
A1012030	Matrix Gla protein	Mgp	-1.1	-1.7	-2.0	1.2	1.1	1.6
AA891785	ESTs, Weakly similar to isocitrate dehydrogenase		-1.2	-1.8	-2.0	1.0	1.1	1.2
U49055	CTD-binding SR-like protein rA8 or RNA binding motif protein 16		1.0	-1.4	-2.0	-1.0	-1.1	-1.2
X04229	Glutathione-S-transferase	Gst	-1.2	-1.8	-2.1	-1.1	-1.0	-1.3
L23148	Inhibitor of DNA binding 1, helix-loop-helix protein	Id1	1.0	-1.6	-2.1	-1.1	1.1	1.3
A1229291	ESTs, similar to purine-rich element binding protein A		-1.2	-1.8	-2.1	-1.2	-1.6	-1.2
U42427	Anti-Mullerian hormone type 2 receptor	Amhr2	-1.3	-1.6	-2.3	-1.4	-1.3	-1.6
J03914	Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)	Gstm2	-1.1	-1.9	-2.4	-1.1	-1.0	-1.2
A1137583	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix	Id2	1.1	-1.9	-2.6	1.0	-1.0	1.2
AF001898	Aldehyde dehydrogenase 1, subfamily A1	Aldh1a1	-1.5	-2.9	-2.7	1.2	-1.2	-1.2
S63167	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase type II	HSDB3	-1.6	-2.4	-3.2	2.2	1.0	1.9
A1230256	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix	Id2	-1.5	-2.5	-3.6	1.3	1.7	1.6
M31837	Insulin-like growth factor-binding protein 3	Igfbp3	-1.2	-3.0	-4.4	-1.1	1.0	-1.4
D49494	Prepro bone inducing protein	Gdf10	-1.2	-2.9	-4.6	1.1	1.2	1.3
A1176456	Metallothionein-2 and metallothionein-1 genes		-1.6	-10.2	-12.0	-1.6	-1.6	-2.0

担当者 関澤 純

著者名: Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A.

論文題名: Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice.

出典: In Vivo. 2005 May-Jun;19(3):487-94.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット (x) マウス、() 人、() その他 ()細胞
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 経皮
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 (10 mg/kg bw x 4)
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、() 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。
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 _____、()いいえ

論文の概要:

15日令のCDマウスにBPA、genistein、resveratrol、zearalenone、zeranol、DES 10 mg/kg bwを4日間経皮投与した。genistein、zearalenone、zeranolは膣開口を早め、性周期を長期化させたが、他では影響なく、またすべての物質による子宮、膣、乳腺の形態異常は認められなかった。

添付資料

特になし。

評価者のコメント:

極めて高濃度かつ、経皮投与の実験である。

担当者 大西 純一

著者名: Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A.

論文題名: Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring.

出典: *Reprod Toxicol.* 2004 Aug-Sep;18(6):803-11.

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 s.c. injection (皮下注射)
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 (0.5, 10 mg/kg/日)
7. 観察された影響の種類と濃度:
(思春期の開始(膣開口)の促進(10 mg/kg)、性周期期間、発情期間の増加(0.5 mg/kg)、黄体、膣上皮角化の欠如(0.5 mg/kg)、乳腺の分化の促進(10 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。
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:

BPAを含む5種類の外因性エストロゲンの雌仔マウスの生殖器官や乳腺への影響をヒトばく露レベルあるいはそれ以上のレベルで調べた。BPAを妊娠マウスに妊娠15日から4日間、0.5または10 mg/kg/日の割合で投与した。

その結果、BPAは思春期の開始(膣開口)を促進させ、性周期期間、発情期間を増加させた。また、黄体、膣上皮角化の欠如が、4週齢の仔で高用量の50%、低用量の33%に認められた。黄体のあるマウスに処理した場合、乳腺の分化が4週齢の仔で促進された。

添付資料

Table 1, 2, 3 Fig. 6

評価者のコメント:

Table 1
Age at vaginal opening in female offspring of mothers exposed to xenoestrogen (four daily injections, beginning on gestational day 15)

Test chemical	Dose	Vaginal opening (days)
Untreated		26.0 ± 0.2
Genistein	0.5 mg/kg × 4	25.0 ± 0.2**
	10 mg/kg × 4	25.5 ± 0.2*
Resveratrol	0.5 mg/kg × 4	25.7 ± 0.1
	10 mg/kg × 4	26.0 ± 0.1
Zearalenone	0.5 mg/kg × 4	24.8 ± 0.1**
	10 mg/kg × 4	24.4 ± 0.2**
Bisphenol A	0.5 mg/kg × 4	25.8 ± 0.2
	10 mg/kg × 4	24.8 ± 0.2**
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg × 4	24.5 ± 0.1**
	10 µg/kg × 4	24.1 ± 0.2**

Values represent mean ± S.E. Each group consists of 24 mice.

* $P < 0.05$, compared with untreated controls.

** $P < 0.01$, compared with untreated controls.

Table 2
Estrous cycle alteration in female offspring of mothers exposed to xenoestrogen (four daily injections, beginning on gestational day 15)

Test chemical	Dose	One cycle length	Percent of time spent in	
			Estrus	Diestrus
Untreated		5.2 ± 0.1	18.7 ± 0.4	24.2 ± 2.1
Genistein	0.5 mg/kg × 4	6.4 ± 0.3**	15.9 ± 0.7	31.0 ± 1.7**
	10 mg/kg × 4	7.2 ± 0.4**	14.3 ± 0.8	34.5 ± 1.8**
Resveratrol	0.5 mg/kg × 4	6.5 ± 0.2**	14.7 ± 0.9	33.7 ± 2.7**
	10 mg/kg × 4	6.1 ± 0.2**	15.1 ± 0.5	29.8 ± 1.7
Zearalenone	0.5 mg/kg × 4	7.7 ± 0.3**	29.8 ± 4.7**	29.8 ± 3.0
	10 mg/kg × 4	10.9 ± 0.5**	48.4 ± 4.0**	23.4 ± 2.2
Bisphenol A	0.5 mg/kg × 4	8.0 ± 0.4**	13.1 ± 0.6	38.9 ± 2.0**
	10 mg/kg × 4	8.2 ± 0.3**	13.9 ± 0.4	40.5 ± 1.2**
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg × 4	5.5 ± 0.1	17.5 ± 0.7	30.2 ± 2.1*
	10 µg/kg × 4	5.8 ± 0.1*	17.5 ± 0.9	37.3 ± 1.7**

Values represent mean ± S.E. (days).

* $P < 0.05$, compared with untreated controls.

** $P < 0.01$, compared with untreated controls.

Table 3
Absence of corpora lutea in female mice treated with xenoestrogen prenatally

Xenoestrogens	Dose	No. of mice without corpora lutea (%)			
		4	8	12	16 weeks
Untreated		0	0	0	0
Genistein	0.5 mg/kg × 4	0	0	0	0
	10 mg/kg × 4	2 (33)	0	0	0
Resveratrol	0.5 mg/kg × 4	0	0	0	0
	10 mg/kg × 4	1 (17)	0	0	0
Zearalenone	0.5 mg/kg × 4	0	0	0	0
	10 mg/kg × 4	5 (83)	6 (100)	5 (83)	2 (33)
Bisphenol A	0.5 mg/kg × 4	2 (33)	0	0	0
	10 mg/kg × 4	3 (50)	0	0	0
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg × 4	5 (83)	0	0	0
	10 µg/kg × 4	6 (100)	0	0	0

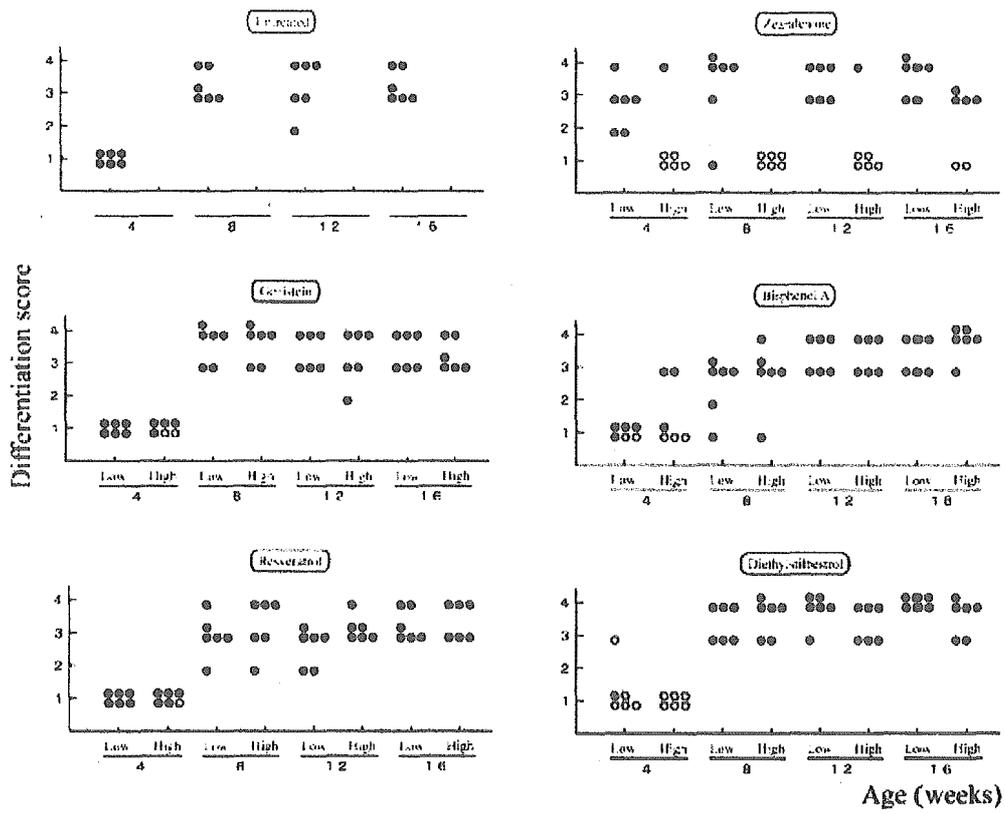


Fig. 6. Degree of mammary gland development in female CD-1 offspring of mothers administered four daily injections of xenestrogen, beginning gestational day 15. (●) Mouse with corpora lutea; (○) mouse without corpora lutea.

担当者 関澤 純

著者名: Owens JW, Chaney JG

論文題名: Weighing the results of differing 'low dose' studies of the mouse prostate by Nagel, Cagen, and Ashby: Quantification of experimental power and statistical results.

出典: Regul Toxicol Pharmacol. 2005 Nov; 43(2)194-202.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット (x)マウス、()人、()その他 ()細胞
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 ()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 (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。
GLPに準拠 ()はい、()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_____、()いいえ

論文の概要:

BPAの胎児の低用量曝露により出生後の前立腺重量に変化が見られたとするNagel報告とAshby報告につき、同様プロトコールのもとに変化が観察されなかったとするCagen報告と可能な限り生データを入手し統計的な検出力と証拠の確からしさについて検討した。体重と臓器重量の関係、同腹効果、餌中の植物エストロゲン、飼育条件の違いも考慮に入れた結果、AshbyとCagenの実験で陽性の効果を見逃した可能性は極めて低く、他方Nagelの実験では擬陽性を検出した可能性があると考えられた。

添付資料

特になし。

評価者のコメント:

本報告に見られるように実験結果が十分統計的な検出に耐えるデータとして報告され、また報告の中で適切な検出がなされている必要がある。

著者名: Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB.

論文題名: The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals.

出典: Andrologia. 2004 Dec;36(6):337-45. Review.

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 ()
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 (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。
GLPに準拠 ()はい、()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_____、()いいえ

論文の概要:

内分泌かく乱物質についての雄の生殖器官への影響と受精能への影響について化合物毎にまとめているレビューである。従って、BPAに関する部分について下記に記載した。

BPAの弱いエストロゲン活性が知られているが、それはノニルフェノールの約1/10未満である。その上に、in vivoのBPAのエストロゲン性は投与経路に依存している。ラットで、BPAの経口投与による生体利用能は低く、肝臓で主に非エストロゲン性のBPAグルクロン酸抱合体に変換する。にもかかわらず、BPAグルクロン酸抱合体は胆汁に移動し、腸肝循環に入るので排泄は低い。一方、ヒトではBPAはグルクロン抱合化され直ぐに腎臓により排泄される。ヒトばく露データは最近まで少なく、2002年の報告では、母親の血漿で0.3-18.9 ng/ml、胎児血漿で0.2-9.2 ng/ml、胎盤組織で1.0-104 ng/gである。雄の生殖への影響は論争中である。しかし、BPAがER(エストロゲン受容体)に結合し、ERを介した遺伝子発現を誘発可能なことの証拠がある。発達中の遺伝子の活性のかく乱や変化が、恐らく成人のホルモン反応性組織を変化させると思われる。ラットで、生後21-35日での2.4 µg/kg/日のBPAばく露は血清中のLH(黄体ホルモン)レベルとテストステロン濃度を抑制した。さらに、ライディヒ細胞のアロマターゼ阻害によりエストロゲン濃度が減少した。雄ラットのBPA 2.4 µg/kg/日の周産期ばく露は成熟ラットの精巣の乾漆細胞液中のテストステロン濃度レベルを減少させた。反対に、雄ラットの300 µg/kgの生後ばく露は生殖に影響しなかった。ラットの2世代試験が低用量(0.2, 2, 20, 200 µg/kg/日)の影響を評価するために実施された。F0、F1世代には、精巣上体の精子数や精子運動性に化合物に関連した変化はなかった。一方、マウスでは100 ng/kg/日のBPAを28日間投与すると、精巣や精巣上体の精子数が減少した。また、精巣や精囊の絶対重量が、この処理グループで減少した。同様の結果が、成熟ラットで非常に低濃度のBPAで報告されている。これらをまとめると、ヒトのリスクアセスメントは非常に困難であり、特に慢性的低濃度ばく露に対してである。いくつかの動物試験で用いた用量は妊婦で検出されたよりもっと低い。

添付資料 なし

評価者のコメント:

要約では、種々の内分泌かく乱物質雄の受精能への影響が報告されているが、BPAとノニルフェノールは相反したデータが報告されていると述べている。

担当者 関澤 純

著者名: Razzoli M, Valsecchi P, Palanza P.

論文題名: Chronic exposure to low doses bisphenol A interferes with pair-bonding and exploration in female Mongolian gerbils.

出典: Brain Res Bull. 2005 Apr 15;65(3):249-54. Epub 2004 Dec 18.

チェック項目:

1. 対象生物 ()ラット ()マウス、 ()人、 (x) その他 (アレチネズミ)細胞
2. 影響の標的臓器 (x) 神経系、 ()免疫系、 ()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 ()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 (2、20 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{日}$)
7. 観察された影響の種類と濃度:
(2、20 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{日}$ 投与で雌の雄との社交行動の増加と自由探索行動の低下を観察)
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、 ()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
GLPに準拠 ()はい、 ()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 _____、 ()いいえ

論文の概要:

低用量BPA (2 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{日}$) 及び17 α -ethynylestradiol (0.04 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{日}$) をペア形成後3週間にわたり投与したアレチネズミ雌の雄探索行動をペア行動、自由探索行動試験により検査した結果、BPAは対象に比べて雄との社交行動を増加させ自由探索行動の頻度を低下させた。

添付資料

Figure 1, Figure 2.

評価者のコメント:

行動範囲が低用量で統計的に有意なレベルで観察されたが、その意義については不明である。

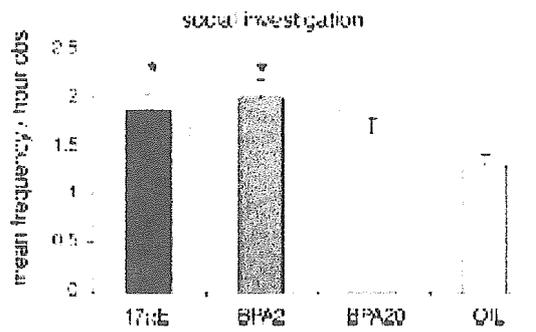


Fig. 1 Effect of chronic (21 days) treatments on social investigation occurring within gerbil pairs. Data represent mean and standard error obtained from social investigative behaviors occurring within pairs over 1-h daily observations. The treatment increased the amount of social investigation occurring within pairs, particularly in pairs of either 17αE or BPA2 groups. Asterisks (*) denote significant differences between each treatment and OIL groups.

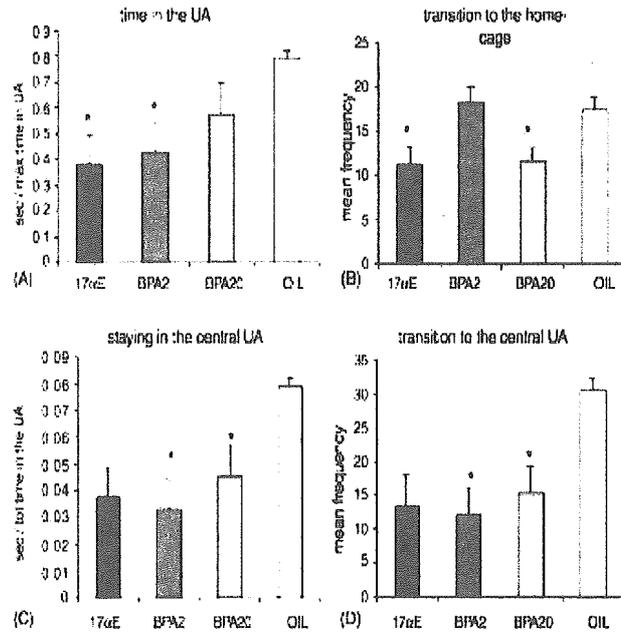


Fig. 2 Effect of chronic (21 days) treatments on behaviors shown by female gerbils in the Free Exploratory Test. Data represent either mean duration over maximum duration of staying in the unfamiliar area (UA) (A, C) or mean frequency (B, D), and standard error. Duration and frequency of staying in the UA was reduced in 17αE as well as BPA treated females (A, B); accordingly, BPA decreased the time spent by females in the central UA (C, D). Asterisks (*) denotes significant differences between each treatment and oil groups.

担当者 井藤 悦朗

著者名: Schonfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I.

論文題名: Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring.

出典: Neoplasia. 6(5):584-94, 2004.

チェック項目:

1. 対象生物 (x)SD ラットメス、()マウス、()人、()その他 細胞
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、()出生後、(x)成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (0.1, 50 mg/kg)
7. 観察された影響の種類と濃度:
(発情期の子宮上皮の菲薄化, ER α 64kd の発現増強 50 mg/kg ; EE2 類似の上皮細胞核の異常, ER β の発現抑制 0.1 mg/kg)
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。
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: ガイドラインの名称 Physiological Society of Germany、()
いいえ

論文の概要:

妊娠 SD ラット (膈内に精子を確認した時を G1 とする。G6-G21) にトウモロコシ澱粉と混合した BPA を投与した。子宮内暴露されたメス (3ヶ月令) を用いて 3 週間各個体の発情周期を調べた。その間、BPA を投与した。各性周期でグループ分けし、4ヶ月令で子宮を取り出し病理標本を作製した。ER α および β の免疫染色およびウエスタンブロット分析を実施した。実験結果から子宮内および成熟期の BPA 暴露により子宮上皮の ER 受容体発現に異常を来しているとの仮説を提唱する。

評価者のコメント:

評価者は当文献の著者に彼らの研究所で面談した経験を有する。論文の作成印象と同様にしっかりした手順で実験を進める体制にある。

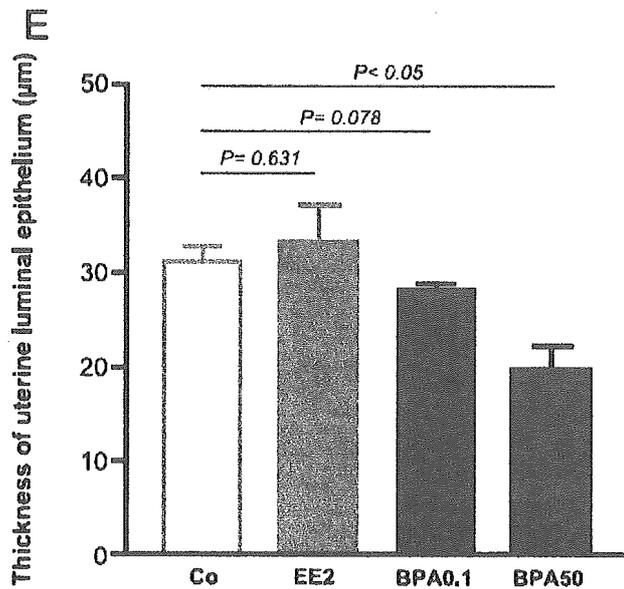
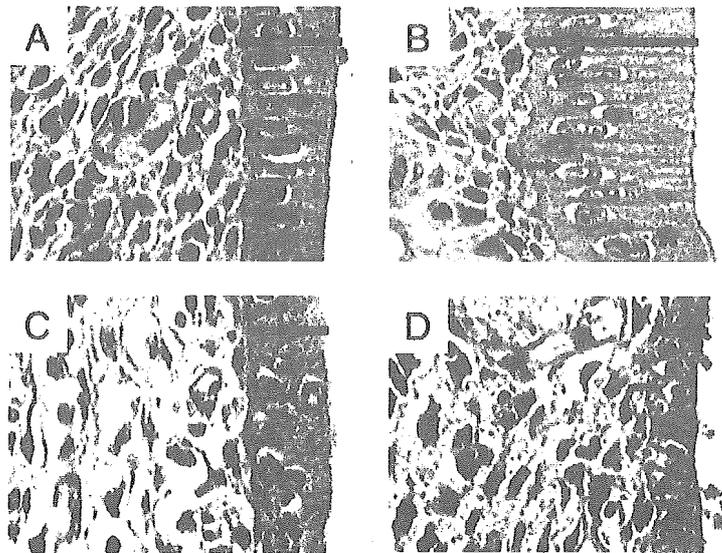
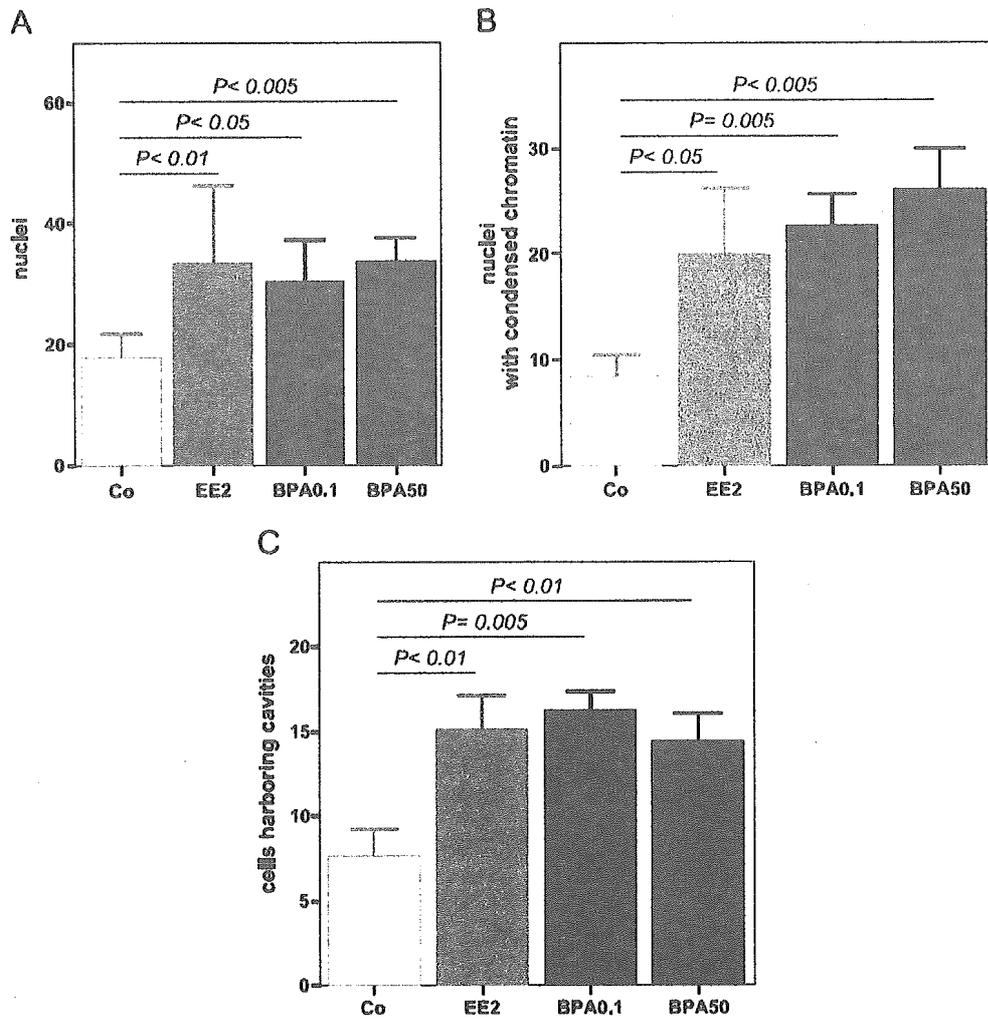


Figure 1. (A–D) Representative high-magnification histology of the rat offspring uterus at estrus. (A) Control (cornstarch-treated animals) group. Typical thickened uterine epithelium at estrus stage (*) with orderly and basally located nuclei. Original magnification, $\times 400$. (B) 0.2 mg/kg EE2 (positive control). Pseudostratified hyperplastic epithelium (*, columnar cells with less orderly and basally located nuclei) harboring cavities (arrows). Original magnification, $\times 400$. (C) 0.1 mg/kg per day BPA. Decreased luminal endometrial epithelium thickness with a foamy appearance (*) and cavities (arrows). Nuclei are less orderly and basally located. Original magnification, $\times 400$. (D) 50 mg/kg per day BPA. Significantly reduced thickness of the total epithelium (*). The luminal endometrial epithelium is riddled with cavities containing nuclei with condensed chromatin (arrows). Original magnification, $\times 400$. (E) Statistical analysis of height (μm) of the luminal epithelial cell layers from rat offspring after in utero treatment with BPA or EE2 at estrus stage. Values are based on analysis of three sections for each uterine specimen (six from each group). Quantification was performed on the digitized images of 10 systematic, randomly selected, representative fields and are reported as the mean \pm SD. Co, control group, $31.0 \pm 3.9 \mu\text{m}$, $n = 6$; EE2, 0.2 mg/kg per day 17 α -ethinyl estradiol group, $33.2 \pm 9.4 \mu\text{m}$, $n = 6$; BPA0.1, 0.1 mg/kg per day BPA, $27.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$, $n = 6$; BPA50, 50 mg/kg per day BPA, $19.2 \pm 6.0 \mu\text{m}$, $n = 6$.



within the uterine tissue of rat offspring after *in utero* treatment with EE2 and 0.1 and 50 mg BPA compared with the negative controls. ER α immunoreaction was recognized in nuclei of both epithelium (arrowheads) and stromal cells (arrows). (A) Control (cornstarch-treated animals) group. Weak ER α immunoreaction in nuclei of both epithelium and stromal cells. Less ER α -immunostained uterine luminal epithelial cell nuclei. Original magnification, $\times 400$. (B) 0.2 mg/kg per day EE2 (positive control). Significantly increased population of ER α -immunostained uterine luminal epithelial cell nuclei, as well as a strongly immunostained stromal cell pattern frequently describing a uniform, thick mesenchymal cell layer underlying the luminal epithelium. Original magnification, $\times 400$. (C) 0.1 mg/kg per day BPA. Weak ER α -immunoreaction in nuclei of both epithelium and stromal cells. Less ER α -immunostained uterine luminal epithelial cell nuclei. Original magnification, $\times 400$. (D) 50 mg/kg per day BPA. Significantly increased population of ER α -immunostained uterine luminal epithelial cell nuclei, as well as strongly immunostained stromal cells, which are not organized in a uniform cell layer underlying the epithelium. Stronger immunostaining was also recognized in the cytoplasm of luminal epithelial cells. Original magnification, $\times 400$. (E) Image analysis score of positive ER α -immunostained uterine luminal epithelial cells. Shown is the percentage of ER α -immunostained uterine epithelial cells. Values are based on analysis of nine fields from each section (two sections per uterus) in six rats from each group and are reported as the mean \pm SD. Co, control (cornstarch-treated animals) group, 57 \pm 19%, n = 6; EE2, 0.2 mg/kg per day 17 α -ethinyl estradiol group, 90 \pm 4%, n = 6; BPA0.1, 0.1 mg/kg per day BPA, 67 \pm 7%, n = 6; BPA50, 50 mg/kg per day BPA, 95 \pm 15%, n = 6.

antibody was preincubated with antigen ER3 peptide (data not shown). Substituting TBS containing 0.5% NFDm instead of primary antibody for ER3 led to no more immunoreactivity (data not shown).

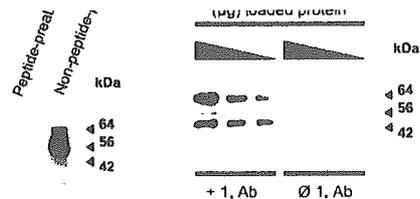


Figure 4. Representative Western blot analyses of ER α expression of uterine protein at estrus stage of female Sprague-Dawley offspring exposed to 17 α -ethinyl estradiol and bisphenol A *in utero*. Gravid dams were fed by gavage on gestation days 6 through 21 with either 2% cornstarch (negative control; Co) at 10 ml/kg per day, 0.2 mg/kg per day EE2 (EE2), used as a positive control, or 0.1 mg/kg per day BPA (BPA0.1) or 50 mg/kg per day BPA (BPA50). The female offspring were then sacrificed in estrus at 4 months of age. (A) The full-length ER α expression at 64 kDa is increased in all female offspring exposed to EE2 and the 50-mg dose of BPA compared with the negative control group. Within the 0.1-mg dose of BPA and the control group only very weak but specific ER α immunobands of the full-length ER α variant at 64 kDa could be detected. Only two immunoreactive bands at 56 and 42 kDa from homogenates of rat uteri from all treated animals showed strong staining. Protein loading was normalized to β -actin using a monoclonal primary antibody at a 1:15,000 dilution (Sigma), which was specific for a band at 42 kDa. The anti-ER α antibody specifically reacted with three bands at 64, 56, and 42 kDa from homogenates of rat uteri. (B) Binding to all immunopositive bands was eliminated when the antibody was preincubated with antigen ER α peptide. (C) Substituting TBS containing 0.5% NFDm (\ominus 1.Ab) instead of primary antibody (+ 1.Ab) for ER α led to no more immunoreactivity. Protein, in the amounts of 14, 30, and 15 μ g, was loaded.

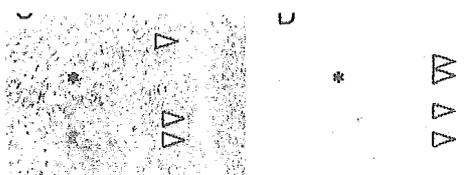


Figure 5. (A–D) Representative high magnification ER β immunostaining within the uterine tissue of rat offspring after in utero treatment with EE2 and 0.1 and 50 mg BPA compared with the negative controls. The brown-red color, which indicates ER β immunoreaction, was recognized dominantly in stromal cells of the mesenchyme (asterisks). (A) Control (comstarch-treated animals) group. Distinct ER β immunoreaction in stromal cells of the mesenchyme. Original magnification, $\times 200$. (B) 0.2 mg/kg per day EE2 (positive control). Weak immunostained mesenchyme. Original magnification, $\times 200$. (C) 0.1 mg/kg per day BPA. Decreased ER β immunoreactions in stromal cells. Original magnification, $\times 200$. (D) 50 mg/kg per day BPA. No ER β immunoreactions within the uterus. Original magnification, $\times 200$. Epithelium (arrow heads).

growth, morphogenesis, cytodifferentiation, and secretory activity [45].

Little is known about the deleterious effects in the uterus after prenatal exposure to BPA. This lack of data might exist because most traditional endpoints of toxicity may not be sensitive enough or not detectable until sexual maturity [39]. Indeed, we previously observed that the reduction in absolute uterine weight in the 0.1-mg BPA-treated group during estrus was qualitatively similar to that seen with the refer-

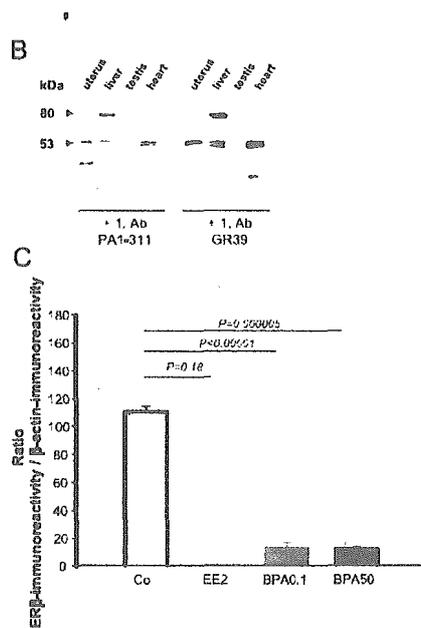


Figure 6. Representative semiquantitative Western blot approach of ER β expression of uterine protein at estrus stage of female Sprague-Dawley offspring exposed to 17 α -ethinyl estradiol and bisphenol A in utero. Gravid

担当者 関澤 純

著者名: Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W.

論文題名: Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats.

出典: Toxicology. 2005 Sep 15;213(1-2):13-24.

チェック項目:

1. 対象生物 (x)ラット ()マウス、()人、()その他 ()細胞
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 ()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:
(33 μ g/Kg bw/日、333 μ g/Kg bw/日)
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、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
GLPに準拠 ()はい、()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_____, ()いいえ

論文の概要:

卵巣切除ラットに3ヶ月間食餌中よりBPAを含むエストロゲン作用物質を投与し、エストロゲンが関与する脂質貯蔵や血清脂質マーカーTSH、T3、T4、LHへの影響を調べた。BPAのin vitroでのER α 競合結合活性(EC₅₀)は4000倍高い濃度であったが、ER β についてはE2のわずか35倍高い濃度(35 nM)と低かった。しかし脂質マーカーやThyroid hormoneには影響は認められなかった。

添付資料

Figure 2, Figure 3, Figure 4.

評価者のコメント:

in vitro ER β 競合結合活性(EC₅₀)は他の報告に比べると、親和性が高い結果を示しているが違いの理由は不明である。