

●厚生労働省による「最新版・内分泌かく乱化学物質のスクリーニング及び試験法案のレポート」を菅野がOECDに提出した。

●子宮肥大試験は、ピアレビューが終了し、ガイドライン案作成終了段階に達し、追加データ等の検討を行った。

D. 考察

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

神経障害性に関しては、必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定される。本研究班では、高次行動異常を当面の焦点に、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響の確認実験系の導入のための基礎的事項が特に低用量域を含めて得られた。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル（人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル）、あるいはIV型免疫応答のモデルであるLocal Lymph Node Assayの改良形を用いて、化学物質による自己免疫及び獲得免疫機能の修飾の影響を当面の対象として解析した。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析を行った。本研究により、一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要が改めて示されたと考える。

以上、懸念される毒性指標として、神経・行動、免疫毒性等、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標を設定し、引き続き網羅的に確認しつつ、受容体原性毒性の立場を踏まえた試験スキームに則り、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な体制を確立すべく、研究開発を進めてきた。これらは、内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的なガイドラインの開発に有用な結果をもたらしたと考える。

(2) ラットを用いたBPAの子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討（委託研究：委託先：財団法人 化学物質評価研究機構）、及びラットを用いたDiethylstilbestrol (DES)の経胎盤・経母乳暴露による低用量晩発影響の検討（委託研究：委託先：財団法人 食品農医薬品安全性評価センター）

ラットを用いたBPAの子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討

平成16年度の研究において、陽性対照物質であるEE (0.05 mg/kg/day) 及び高用量BPA (40、400 mg/kg/day) のみならず、低用量BPA (5、50 µg/kg/day) の妊娠期・授乳期投与によっても pre-

middle ageにおける性周期異常が誘導されることが示唆された。現在、ヒトでのBPA許容摂取量は50 µg/kg/dayとされている。前回の実験結果では、その用量での経胎盤及び経母乳投与により雌出生児で遅発性の性周期異常が起こることが示された。平成17年度の研究ではそれを確認するため、ほぼ同様のプロトコールにより、0、0.5、5、50 µg/kg/dayの用量でBPAをラットの妊娠期から授乳期にかけて投与し、得られた雌出生児の性周期の発現状況に注目し12ヶ月齢まで継続して観察する確認実験を実施した。

確認実験の母動物について、分娩時から哺育期にかけて、すべてのBPA投与群の母動物に、死亡（媒体対照群0匹、BPA 0.5 µg/kg群2匹、BPA 5 µg/kg群1匹、BPA 5 µg/kg群0匹）或いは哺育拒否（媒体対照群0匹、BPA 0.5 µg/kg群2匹、BPA 5 µg/kg群2匹、BPA 5 µg/kg群1匹）が認められ、出産から離乳に至る期間における総産児死亡数は媒体対照群に比較して全ての群で有意に高い値を示した（媒体対照群9匹（6%）に対しBPA 0.5 µg/kg群19匹（16%）、BPA 5 µg/kg群30匹（23%）、BPA 50 µg/kg群26匹（18%））。死亡及び哺育拒否を認めた母動物には、乳腺発達不良が認められ、児の直接の死亡原因は授乳されなかった事であると考えられる。母動物の死因については、0.5 µg/kg群において分娩後に死亡した1例は、気管内に白色泡沫、肺の暗赤色化、水腫性変化及び肺断面に泡沫が観察された事から、誤投与の可能性が示唆される。それ以外の個体については不明であるが、副腎の腫大が認められており、何らかの持続的なストレスが加わった可能性が指摘される。にもかかわらず、出産前の母動物には、一般状態観察および体重の推移からは異常は指摘されていなかった。産児死亡に関わる母動物の異常は、すべて出産後に観察されたものである（着床痕数に差がない等。ただし、出産前に乳腺の発達状態は確認していない）。母動物の異常所見は用量相関性が明瞭でないもののBPA投与群に認められた。離乳までの間の産児死亡数にも用量相関なく何れのBPA投与群においても有意な増加が認められた。離乳までの死亡率は0～16.7%との資料があり¹⁾、本実験の媒体対照群（9%）は大きく異常であるとは認定しがたいと考えるが、これに対してのBPA投与群での20%前後への有意な増加の原因は不明であった。

産児死亡率に差があったことから、性周期検査に供した動物数が群間で同一ではない（46対34対35対46）。よって当実験の成立の可否が問題となるが、1) 妊娠0日から出産までの母動物の体重推移において対照群との差は認められず、また、妊娠0日から20日までの体重増加量は媒体対照群150.4±13.6g、

BPA 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群 148.5 \pm 19.1g、BPA 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群 147.9 \pm 18.0g、BPA50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群 153.6 \pm 15.6g であり、背景データ²³ (日本チャールス・リバー: 149g、ポリサーチセンター: 146 \pm 21.7g) と遜色がないこと、2) 性周期検査に供した児動物については、生後 7 日目以降、離乳前、離乳後の一般状態および体重推移に異常は認められず順調な生育であったと考えられること、の 2 点から、性周期検査に供した児動物については評価が可能であると考え。特に最低用量群と中間用量群の動物数が少ないことによって信頼性が低いとしても、最高用量群については、児動物数が媒体対照群と同等数確保されていることから、十分な評価が可能であると考え。

なお、文献的に妊娠 SD ラットに 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の BPA を投与すると授乳、児を巢内に連れ戻す行動、グルーミングなどの哺育行動を低下させる⁴ との報告があることから、本試験で認められた BPA 投与群における出産直後の母動物の異常所見とそれによる児動物死亡率増加と、BPA 投与との間に関連性がある可能性が考察される。しかし、今回の試験結果は可能性を指摘するに留まるものである。

児動物の器官重量について、3 ヶ月齢時の雌 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で甲状腺の相対重量低値、7 ヶ月齢時の雌 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で脳の絶対重量低値、肝臓及び腎臓の相対重量低値、12 ヶ月齢時の雄 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群における精巣の絶対重量高値、雄 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で腎臓の絶対重量低値がみられている。器官重量変化は、投与用量及び期間との関連は明確ではなく、従来の毒性所見の判定によるならば、BPA 固有の影響であるかは明らかではない。しかしながら、前年度の実験における EE 投与群と BPA 投与群の器官重量変化の傾向と類似する項目があり、エストロゲン受容体を介した影響を反映している可能性が考えられる。

性周期検査において、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、4 ヶ月齢では constant estrus が 1/23 例、5 ヶ月齢では persistent estrus が 1/23 例、6 ヶ月齢では constant estrus が 1/23 例でみられ、7 ヶ月例で persistent estrus 及び constant estrus が各々 1/23 例、4/23 例、8 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus が各々 2/23 例、7/23 例、9 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus が各々 4/23 例、8/23 例、10 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus が各々 1/23 例、10/23 例、11 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus が各々 2/23 例、8/23 例、12 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus が各々 6/23 例、5/23 例で観察された。統計学的には、persistent estrus または constant estrus を呈する動物の出現頻度は 7、8、9、10 及び 12 ヶ月齢時に において媒体対照群に比較して有意に増加した。

5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、6 ヶ月齢で persistent estrus 及び

constant estrus を呈する動物が 1/22 例ずつ出現し、7 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 1/22、2/22 例、8 ヶ月齢では constant estrus を呈する動物が 2/22 例、9 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 5/22、2/22 例、10 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 1/22、3/22 例、11 ヶ月例では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 3/22、6/22 例、12 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 4/22、5/22 例でみられた。統計学的には、persistent estrus または constant estrus を呈する動物の出現頻度は 9 及び 12 ヶ月齢時 において媒体対照群に比較して有意に増加した。

50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群において、5 ヶ月齢時までは異常はみられなかった。しかしながら、6 ヶ月齢において、3/30 例が constant estrus を呈し、7 ヶ月齢時には 6/30 例が constant estrus を呈した。以降、8 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 2/18 例、8/18 例、9 ヶ月齢では persistent estrus 及び constant estrus を呈する動物が各々 2/18 例、4/18 例、10 ヶ月齢では persistent estrus が 3/18 例、constant estrus が 9/18 例、11 ヶ月齢では persistent estrus が 4/18 例、constant estrus が 6/18 例、12 ヶ月齢では persistent estrus が 3/18 例、constant estrus が 9/18 例観察された。統計学的には、persistent estrus または constant estrus を呈する動物 の出現頻度は 7、8、9、10、11 及び 12 ヶ月齢時で有意に増加した。Estrus の異常を示した (persistent estrus または consistent estrus を示した) 例数は、7 ヶ月以降、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意な増加をほぼ毎月示し、また、12 ヶ月齢時には、BPA 投与群すべてが有意な増加を示した。

陽性対照物質である Ethinyl estradiol (EE) の妊娠期・授乳期投与によって遅発性の性周期異常が引き起こされることが調べられている。EE は、強力な estrogen receptor (ER) アゴニストであることから、EE によってみられる遅発性の性周期異常は、ER が大きく関与しているものと推察される。BPA による変化には EE と共通点があり、主に ER を介して発現していると考えられる。なお、BPA は様々な核内受容体とも結合することが知られており、ER を介さないメカニズムが関与した可能性は残されるが、本研究結果では明らかではない。性周期は、視床下部-下垂体-生殖腺のフィードバックループによって調節されていることから、性周期に異常がみられる場合、視床下部、下垂体、卵巣、子宮のいずれか、又は複数の器官に機能的変化があったことが予測される。本研究結果では、標的器官を特定する結果は得られず、BPA の妊娠期・授乳期投与によって引き起こされる性周期異常の原因は不明である。今

後の課題として、BPA がラット胎生期又は授乳期のいかなる段階でどこに影響を及ぼしたのか、その作用機序を解明していく必要があると考えられる。

以上の結果、BPA の妊娠期・授乳期投与によって誘導された pre-middle age における性周期の異常は、用量相関性は明瞭でなく全ての BPA 投与群において有意に認められ、少なくとも、もっとも信頼性の高い 50 µg/kg 群においては生物学的な有意性をもって観察されたものと判断された。先行実験と合わせて再現性のある変化であることが確認されたと考える。このことは、遅発性の性周期異常が、内分泌かく乱性確定試験法としての一生涯試験における検査項目として考慮に値するものであることをも示したと考える。

・参考文献

1. Cj : CD (SD) IGS Rat の背景データ 生殖・発生 1998 年 6 月 財団法人食品農薬薬品安全性評価センター
2. Cj : CD (SD) IGS ラットの生殖・発生に関する背景データ 1999 年 4 月 日本チャールス・リバー株式会社
3. Cj : CD (SD) IGS Rat の生殖生理値 1998 年 11 月 株式会社ボゾリサーチセンター
4. Della Seta D. et al., Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Res Bull*, 65(3), 255-60, 2005.

ラットを用いた Diethylstilbestrol の経胎盤・経母乳暴露による低用量晩発影響の検討

陽性対象物質 DES の試験は、現在実施中であり、試験終了後に考察を記載する。

E. 結論

これまでリスク評価のための試験法として考えられてきた多世代繁殖試験や、EPA によって提案されている *in utero* through lactational exposure 案には、遅発性の機能異常等を評価するための長期観察項目は設定されていない。今回、委託研究により、平成 16 年度の研究において、Bisphenol A (BPA) の高用量投与時のみならず、低用量の妊娠期・授乳期投与によっても pre-middle age における性周期異常が誘導される可能性が示された。本年度の研究では、ほぼ同様のプロトコールにより、0.5、5、50 µg/kg/day の用量で BPA をラットの妊娠期から授乳期にかけて投与し、得られた雌出生児の性周期を最長 12 ヶ月齢まで継続して検査した。その結果、性周期検査において、すくなくとも BPA 50 µg/kg 群では平成 16 年度の研究において実施した実験の結果と合致する結果が得られたことから、低用量

の BPA の妊娠期・授乳期投与によって遅発性の性周期異常が誘発される現象は再現性のある変化であることが確認されたと考える。OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れ、ここで提案した「齧歯類一生涯試験」の更なる開発、バリデーションを進展させる必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H. Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. *Bone* (2007)

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol*. 2006 Apr 13; 20(9):2141-55 (2006)

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development*. 2006 May; 133(9): 1625-34. Epub 2006 Mar 22[Epub ahead of print]

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific *Mesp2* expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 7;103(10):3651-6. Epub 2006 Feb 27

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. *Pathol*. 2006 Apr 25[Epub ahead of print]; 209(4): 522-31 (2006)

2. 学会発表

菅野 純、低用量問題の研究の現状と課題、第 17 回環境ホルモン学会講演会、2007 年 2 月 28 日、東京

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

国内特許申請中（特願 2003-317031、特願
2004-219285）

【添付図表内訳】

Figure 1. Mean body weights of dams

Figure 2. Mean body weights of offspring - birth to weaning

Figure 3. Mean body weights of offspring - twenty eight to 364 days of age

Table 1-1. Body weights of dams - group mean values

Table 1-2. Body weights of offspring during postpartum period - group mean values

Table 1-3. Body weights of offspring in post weaning development - group mean values

Table 2-1. Litter sizes and implantations - group mean values

Table 3-1. General appearance of offspring at birth - summary

Table 4-1. Physical development test; vaginal opening of offspring - summary

Table 4-2. Physical development test; preputial separation of offspring - summary

Table 5-1. Estrus cycle - summary

Table 5-2. Estrus cycle - individual findings

Table 6-1. Organ weights of dams - group mean values

Table 6-2. Organ weights of offspring at 3 months after birth - group mean values

Table 6-3. Organ weights of offspring at 7 months after birth - group mean values

Table 6-4. Organ weights of male offspring at 12 months after birth - group mean values

Table 6-5. Organ weights of female offspring at 12 months after birth - group mean values

Table 7-1. Macroscopic examinations of dams - group distribution of findings

Table 7-2. Macroscopic examinations of offspring at 3 months after birth -group distribution of findings

Table 7-3. Macroscopic examinations of offspring at 7 months after birth -group distribution of findings

Table 7-4. Macroscopic examinations of offspring at 12 months after birth -group distribution of findings

Addendum 1-1. Body weights of dams - individual values

Addendum 1-2. Body weights of offspring during postpartum period - litter mean values

Addendum 1-3. Body weights of male offspring in post weaning development - individual values

Addendum 1-4. Body weights of female offspring in post weaning development - individual values

Addendum 2-1. Litter sizes and implantations - individual values

Addendum 3-1. General appearance of offspring at birth - individual findings

Addendum 4-1. Physical development test; Vaginal opening of offspring - individual values

Addendum 4-2. Physical development test; Preputial separation of offspring - individual values

Addendum 5-1. Estrus cycle - individual findings following the time course at 3 months

Addendum 5-2. Estrus cycle - individual findings following the time course at 4 months

Addendum 5-3. Estrus cycle - individual findings following the time course at 5 months

Addendum 5-4. Estrus cycle - individual findings following the time course at 6 months

Addendum 5-5. Estrus cycle - individual findings following the time course at 7 months

Addendum 5-6. Estrus cycle - individual findings following the time course at 8 months

Addendum 5-7. Estrus cycle - individual findings following the time course at 9 months

Addendum 5-8. Estrus cycle - individual findings following the time course at 10 months

Addendum 5-9. Estrus cycle - individual findings following the time course at 11 months

Addendum 5-10. Estrus cycle - individual findings following the time course at 12 months

Addendum 5-11. Estrus cycle summary

Addendum 6-1. Organ weights of dams - individual values

Addendum 6-2. Organ weights of female offspring at 3 months after birth - individual values

Addendum 6-3. Organ weights of female offspring at 7 months after birth - individual values

Addendum 6-4. Organ weights of male offspring at 12 months after birth - individual values

Addendum 6-5. Organ weights of female offspring at 12 months after birth - individual values

Addendum 7-1. Macroscopic examinations of dams - individual findings

Addendum 7-2. Macroscopic examinations of offspring at 3 months after birth - individual findings

Addendum 7-3. Macroscopic examinations of offspring at 7 months after birth - individual findings

Addendum 7-4. Macroscopic examinations of offspring at 12 months after birth - individual findings

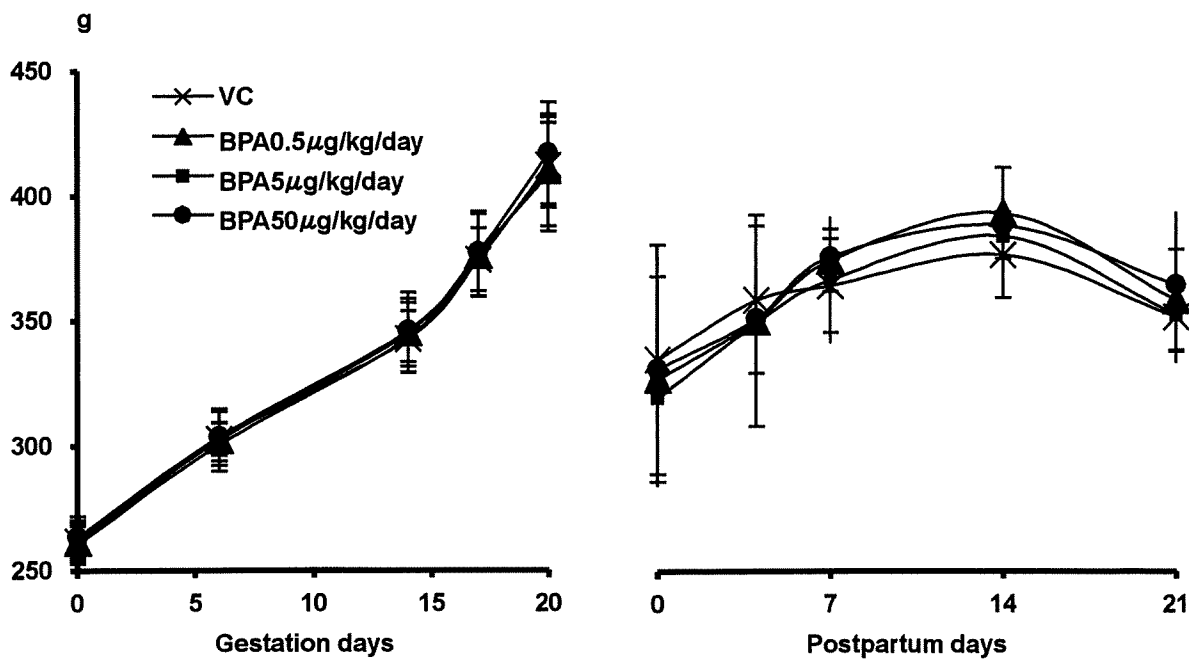


Figure 1. Mean body weights of dams
Not significant

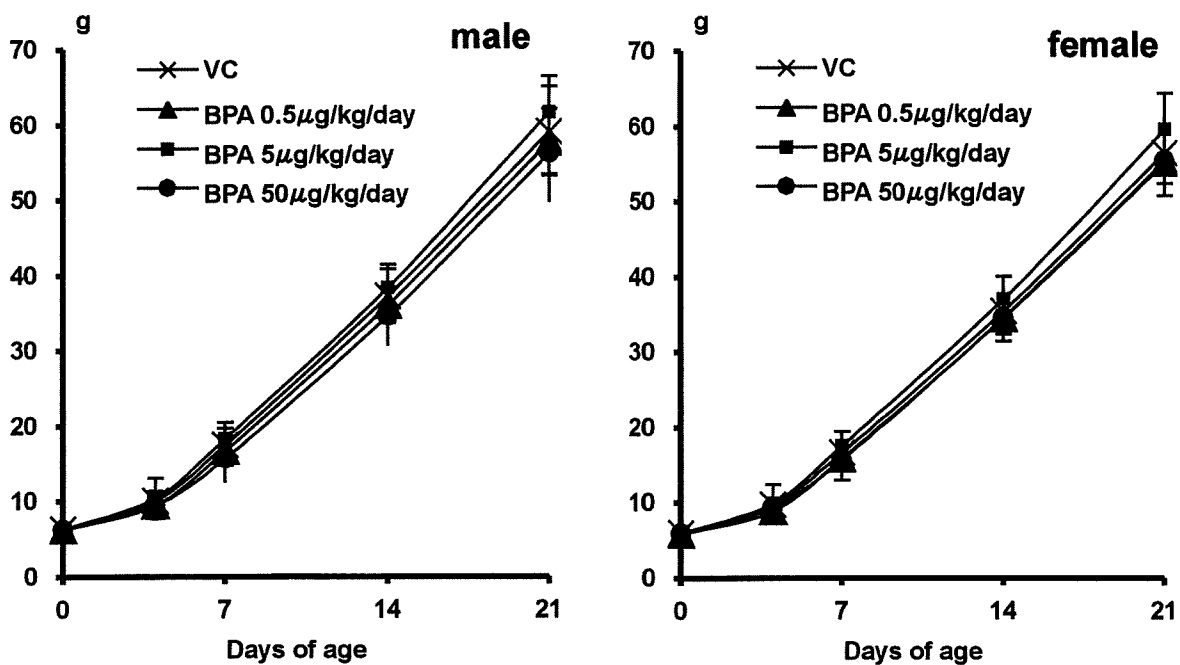


Figure 2. Mean body weights of offspring - birth to weaning
Not significant

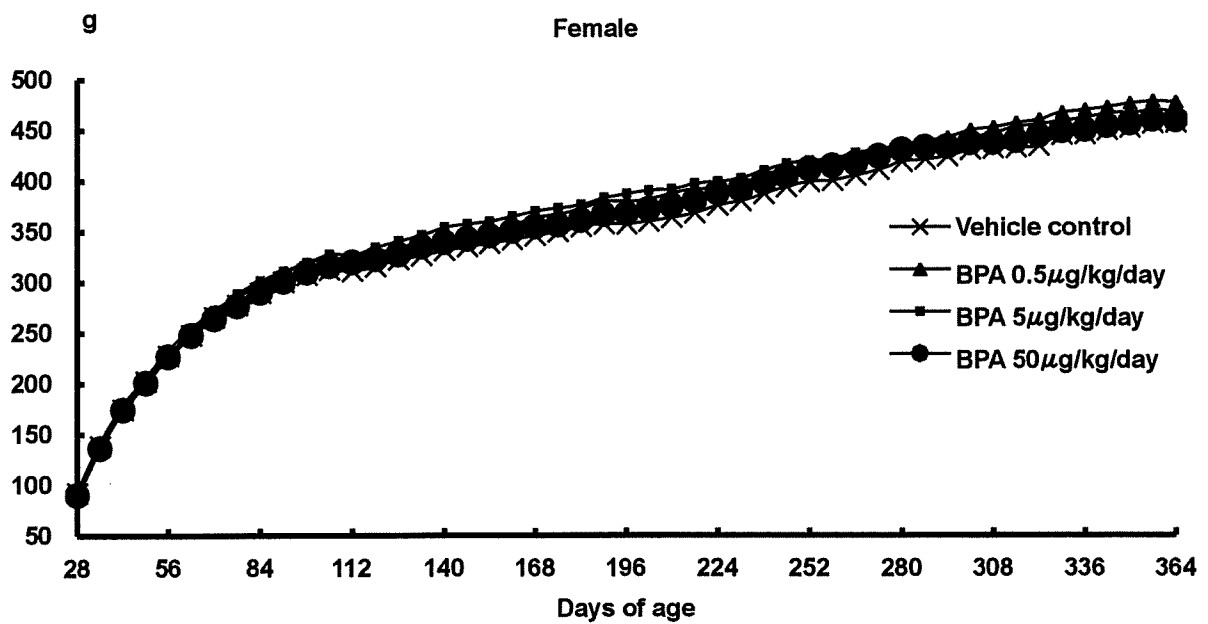
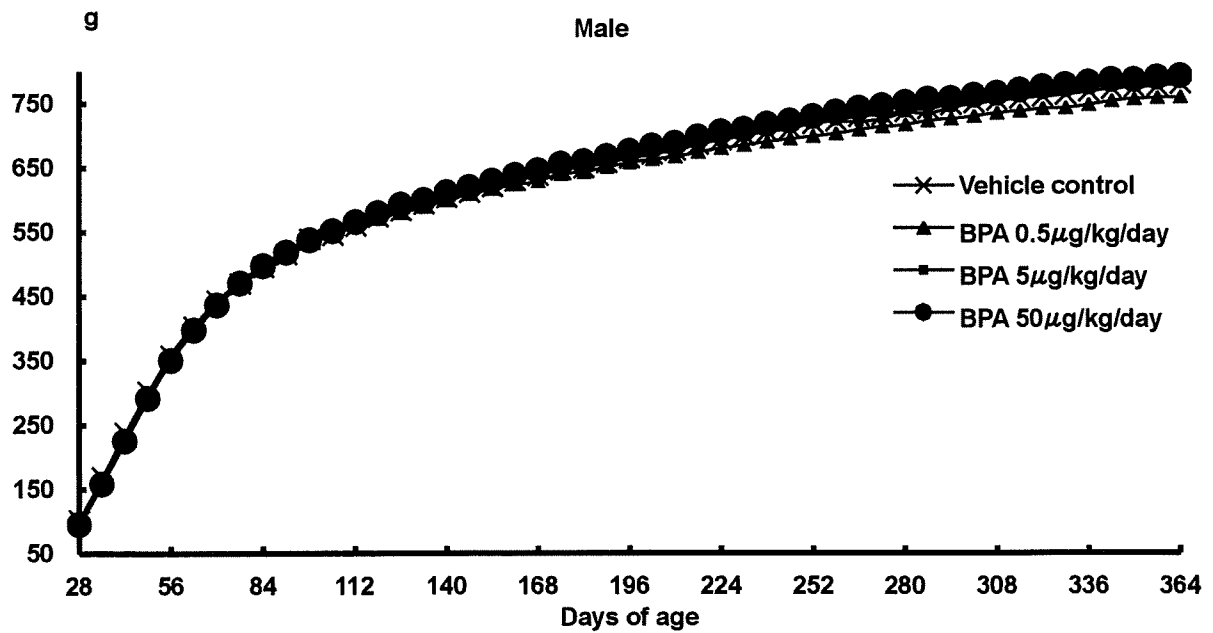


Figure 3. Mean body weights of offspring - twenty eight to 364 days of age

Table 1-1. Body weights of dams - group mean values

Exp.group ($\mu\text{g/kg/day}$)	Gestational period (days)						Postpartum period (days)					
	0	6	14	17	20		0	4	7	14	21	
Vehicle	261.8	302.7	342.8	374.5	412.2		311.1	328.2	332.2	341.1	323.3	
S.D.	7.5	6.3	11.1	12.6	17		33	21.1	13.4	12.4	9.9	
n	10	10	10	10	10		10	10	10	10	10	
BPA	261.6	302.4	345.4	376.1	410.1		305.4	322.1	339.5	353.1	328.2	
S.D.	8.7	12.5	16	16.7	22.4		29.6	30.4	9	13.1	14.5	
n	10	10	10	10	10		8	7	6	6	6	
BPA	260.7	300.7	343.3	376.7	408.7		300.1	321.4	333.8	346.5	323.9	
S.D.	7.4	8.6	14	17	22.9		25.6	26.9	18.2	11	13.8	
n	10	10	10	10	10		10	9	8	7	7	
BPA	263.5	303.8	346.1	377.4	417.0		308.3	322.8	340.6	349.6	332.6	
S.D.	8.4	9.9	12.6	15.6	20.4		29.4	27.3	11.3	15.5	20.8	
n	10	10	10	10	10		10	10	9	9	9	

Table 1-2. Body weights of offspring during postpartum period - group mean values

Vehicle control	Sex	Postpartum period (days)				
		0	4	7	14	21
		(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
	Mean	6.39	10.14	17.50	37.28	59.14
	S.D.	0.57	1.25	2.23	3.51	5.92
	Number of Dams	10	10	10	10	10
	Mean	6.06	9.79	16.71	35.50	56.48
	S.D.	0.48	1.29	2.27	3.03	5.75
	Number of Dams	10	10	10	10	10

Mean values represent means of litter means within each group

Table 1-2. Body weights of offspring during postpartum period - group mean values continued

		Postpartum period (days)				
		0 (g)	4 (g)	7 (g)	14 (g)	21 (g)
Sex	Mean	6.31	9.49	16.76	36.07	57.79
	S.D.	0.31	1.21	1.97	2.41	4.34
	Number of Dams	8	6	6	6	6
Male	Mean	5.91	8.96	15.87	34.49	55.21
	S.D.	0.26	1.09	1.59	2.09	2.84
	Number of Dams	8	6	6	6	6

Mean values represent means of litter means within each group

**Table 1-2. Body weights of offspring during postpartum period - group mean values
continued**

	BPA 5 μ g/kg/day				
	0	4	7	14	21
Sex	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
Mean	6.40	10.45	18.41	38.36	61.67
S.D.	0.59	2.69	2.13	3.1	4.78
Number of Dams	10	8	7	7	7
Mean	6.05	9.94	17.64	37.10	59.60
S.D.	0.64	2.52	1.83	2.94	4.8
Number of Dams	10	8	7	7	7

Mean values represent means of litter means within each group

**Table 1-2. Body weights of offspring during postpartum period - group mean values
continued**

		Postpartum period (days)				
		0 (g)	4 (g)	7 (g)	14 (g)	21 (g)
Sex	Mean	6.27	9.53	15.73	34.63	56.25
	S.D.	0.77	2.05	3.22	4.01	6.54
	Number of Dams	10	9	9	9	9
Male	Mean	5.99	9.44	15.70	34.62	55.49
	S.D.	0.82	1.97	2.69	3.19	4.69
	Number of Dams	10	9	9	9	9

Mean values represent means of litter means within each group

Table1-3. Body weights of offspring in post weaning development - group mean values

Sex		days after birth																									
		28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	175	182			
Male	Mean	101.3	166.6	237.7	301.8	358.2	402.8	443.5	489.9	496.1	515.6	538.1	546.5	560.1	574.5	594.5	603.7	611.8	620.8	630.3	637.8	646.7	649.9				
	S.D.	10.6	16.4	21.1	27.3	30.8	36.1	45.7	42.0	44.5	46.6	47.4	50.6	54.6	56.0	56.8	57.9	59.4	60.7	61.5	62.7	62.9	64.3				
	n	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19				
Female	Mean	92.1	138.8	174.7	202.7	227.8	248.2	266.0	277.7	289.9	300.5	307.6	312.7	311.7	315.8	322.7	326.3	331.6	335.5	338.9	342.7	346.1	350.3	355.0			
	S.D.	7.9	9.7	12.1	14.8	16.1	17.4	19.3	21.2	22.8	24.3	25.4	25.1	23.4	24.9	25.8	26.0	26.1	27.1	28.4	28.2	28.4	30.9	32.9			
	n	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	30	31	31	31	31	31	31	31	31	31			
		Unit: gram																									
Vehicle control																											
Sex		days after birth																									
		189	196	203	210	217	224	231	238	245	252	259	266	273	280	287	294	301	308	315	322	329	336	343			
Male	Mean	659.2	664.6	670.6	677.2	686.2	693.5	700.3	708.3	711.4	719.1	723.3	729.9	732.3	738.0	742.3	748.1	751.4	754.8	758.5	761.2	763.7	768.4	773.3			
	S.D.	64.5	63.6	63.7	64.0	64.3	69.9	68.2	66.4	66.8	68.6	70.2	71.7	71.6	71.8	73.4	75.9	77.8	77.3	80.1	80.2	81.4	81.2	82.5			
	n	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19			
Female	Mean	357.6	357.9	359.9	363.9	368.5	375.8	390.4	387.6	394.3	399.4	400.7	405.8	411.7	419.2	421.7	424.9	431.3	432.2	432.8	434.8	445.4	446.1	450.1			
	S.D.	33.2	33.5	34.4	34.7	36.7	34.6	36.4	38.9	37.8	40.7	42.2	41.2	41.9	40.8	40.1	43.7	44.6	46.9	48.8	53.5	50.4	53.1	53.0			
	n	31	31	31	31	31	22	18	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18			
		Unit: gram																									
Vehicle control																											
Sex		days after birth																									
		350	357	364																							
Male	Mean	775.4	776.8	780.9																							
	S.D.	82.6	82.8	82.7																							
	n	19	19	19																							
Female	Mean	452.8	457.2	457.8																							
	S.D.	53.8	54.2	57																							
	n	18	18	17																							
		Unit: gram																									

Table 1-3. Body weights of offspring in post weaning development - group mean values
continued

		days after birth																						
Sex		28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	175	182
Male	Mean	98.4	162.1	230.3	296.0	356.1	400.5	438.9	468.0	495.0	514.1	531.9	547.7	555.2	570.7	579.9	589.4	598.7	606.6	617.1	623.8	629.0	639.7	643.3
	S.D.	6.6	11.2	18.0	22.6	27.7	32.6	35.3	36.9	39.9	42.9	44.3	47.8	48.4	53.2	55.5	57.0	58.9	61.1	62.8	65.2	66.7	67.7	68.6
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Female	Mean	90.1	137.3	176.1	203.1	229.8	252.2	272.4	286.1	298.4	309.8	319.2	324.5	323.7	328.7	334.9	339.2	344.1	347.0	350.4	356.5	363.9	367.4	373.1
	S.D.	5.2	8.7	12.7	15.9	18.2	23.9	25.7	27.5	27.4	31.5	30.5	28.8	27.7	25.5	26.7	24.7	24.8	26.5	26.9	28.3	26.5	28.8	28.6
	n	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23

Unit: gram

		days after birth																						
Sex		189	196	203	210	217	224	231	238	245	252	259	266	273	280	287	294	301	308	315	322	329	336	343
Male	Mean	650.8	658.5	663.5	667.4	674.3	679.8	685.3	690.1	695.4	699.1	703.1	708.0	714.4	717.2	722.6	728.0	730.1	734.8	738.0	741.8	743.1	743.2	754.1
	S.D.	70.9	73.8	75.9	76.6	80.5	81.9	82.4	86.1	86.7	86.9	88.4	88.4	93.7	93.0	95.5	95.4	95.7	96.6	97.5	97.5	98.6	98.0	98.8
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Female	Mean	379.7	379.6	382.2	386.1	381.9	391.6	398.4	405.0	412.1	414.7	417.7	425.9	431.3	436.1	439.1	443.3	450.8	452.9	457.3	460.7	467.9	470.3	472.9
	S.D.	31.3	31.6	34.3	35.4	35.8	36.2	37.4	38.9	41.6	41.8	44.7	45.8	45.8	48.0	47.4	50.0	48.7	50.2	52.8	53.3	54.6	56.3	56.6
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23

Unit: gram

		days after birth																			
Sex		350	357	364																	
Male	Mean	757.3	758.7	760.2																	
	S.D.	101.2	103.1	101.0																	
	n	12	12	12																	
Female	Mean	476.3	479.2	477.6																	
	S.D.	60.6	57.7	59.5																	
	n	23	23	23																	

Unit: gram

Table 3-3. Body weights of offspring in post weaning development - group mean values
continued

Sex		BPA 5 µg/kg/day																						
		28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	175	182
Male	Mean	103.8	168.0	237.8	302.0	362.1	405.2	444.3	475.2	498.0	519.3	536.6	546.2	561.0	577.4	585.6	595.7	604.4	614.7	625.2	635.3	641.3	649.3	652.8
	S.D.	9.0	17.6	24.5	28.7	33.3	36.4	39.4	40.6	42.2	43.3	45.0	48.2	48.6	56.5	53.4	54.0	54.2	55.3	57.2	58.5	57.2	59.1	61.1
	n	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	12	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Female	Mean	95.6	142.8	179.5	207.0	234.2	256.0	273.0	289.4	301.9	311.6	319.9	327.9	327.1	334.9	341.0	346.9	354.7	357.7	360.4	365.5	370.0	373.4	376.5
	S.D.	6.9	9.4	12.8	14.7	15.8	16.8	18.4	20.4	20.7	20.9	22.0	23.0	21.5	26.7	28.5	27.9	27.4	28.1	31.0	32.1	32.1	34.8	36.0
	n	35	35	35	35	35	35	35	35	35	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22

Unit: gram

Sex		BPA 5 µg/kg/day																						
		189	196	203	210	217	224	231	238	245	252	259	266	273	280	287	294	301	308	315	322	329	336	343
Male	Mean	662.3	670.0	677.2	683.5	691.8	700.9	706.6	711.5	714.2	719.0	722.2	720.8	726.1	734.9	733.7	742.9	749.9	753.5	759.3	765.0	767.0	775.1	778.4
	S.D.	62.6	64.1	65.1	66.5	68.8	69.9	70.2	69.1	75.1	75.5	73.4	75.7	74.1	76.6	75.0	73.0	77.2	76.0	76.9	78.7	79.7	82.7	81.3
	n	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	13	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Female	Mean	383.4	387.4	390.4	391.7	397.5	399.2	402.7	410.0	416.9	420.5	422.4	428.0	430.7	431.6	435.2	438.6	443.3	447.2	453.9	456.5	458.9	462.7	466.5
	S.D.	35.9	37.5	40.5	39.3	37.9	42.2	43.3	43.4	42.6	45.5	45.8	47.8	49.0	52.4	53.7	56.0	60.3	63.2	62.4	67.0	71.3	73.5	76.5
	n	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22

Unit: gram

Sex		BPA 5 µg/kg/day									
		350	357	364							
Male	Mean	779.4	784.1	787.7							
	S.D.	88.8	86.5	89.2							
	n	14	14	14							
Female	Mean	466.9	469.7	468.8							
	S.D.	78.6	83.9	85.1							
	n	22	22	22							

Unit: gram

Table 1-3. Body weights of offspring in post weaning development - group mean values
continued

Sex	BPA 50 µg/kg/day																							
	days after birth																							
	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91	98	105	112	119	126	133	140	147	154	161	168	175	182	
male	Mean	95.2	157.7	225.5	291.1	350.0	396.9	436.4	468.8	497.0	517.8	537.0	551.0	564.7	579.1	592.2	599.3	611.5	618.3	628.8	637.9	645.2	655.4	658.7
	S.D.	13.6	18.7	22.2	25.7	27.0	28.3	31.3	34.3	35.9	39.3	42.1	44.8	48.5	50.8	51.8	54.1	56.7	57.8	58.2	60.3	61.5	62.5	61.6
	n	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
female	Mean	89.7	136.2	174.2	200.7	226.3	247.3	263.7	276.5	289.7	300.8	309.3	315.9	319.9	322.6	327.4	334.5	339.4	342.1	345.6	350.0	354.3	356.4	361.0
	S.D.	6.8	9.7	12.7	14.5	16.9	19.9	20.1	23.2	24.8	23.4	25.0	25.8	27.5	31.0	30.9	31.9	30.5	31.0	33.6	35.6	35.5	37.7	38.1
	n	46	46	46	46	46	46	44	46	46	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Unit: gram

Sex	BPA 50 µg/kg/day																							
	days after birth																							
	189	196	203	210	217	224	231	238	245	252	259	266	273	280	287	294	301	308	315	322	329	336	343	
male	Mean	667.0	674.9	682.6	687.2	697.5	705.5	709.1	717.2	722.1	729.2	736.0	742.2	746.3	751.2	756.2	757.0	761.6	764.7	770.2	774.7	778.3	781.9	785.6
	S.D.	63.4	66.3	65.1	65.2	66.6	67.8	69.2	69.9	69.5	72.4	73.7	73.9	76.1	76.9	80.3	78.9	78.1	79.0	79.4	80.3	80.8	81.3	78.6
	n	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
female	Mean	366.2	367.2	371.3	375.1	379.9	388.2	391.0	398.2	404.3	411.2	414.5	416.9	424.0	430.3	433.1	433.4	437.3	437.4	439.3	444.6	448.7	449.8	453.5
	S.D.	39.8	40.9	42.4	47.0	49.8	45.9	48.7	50.7	50.1	51.3	53.8	53.9	57.8	56.6	58.2	58.2	58.6	58.6	64.1	64.1	65.7	66.3	70.7
	n	30	30	30	30	30	30	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

Unit: gram

Sex	BPA 50 µg/kg/day			
	days after birth			
	350	357	364	
male	Mean	785.7	789.8	792.3
	S.D.	74.9	76.1	79.6
	n	18	18	18
female	Mean	456.3	480.1	459.7
	S.D.	71.6	72.4	72.9
	n	18	18	17

Unit: gram

Table 2-1. Litter sizes and implantations - summary

	Vehicle control	BPA 0.5 µg/kg/day	BPA 5 µg/kg/day	BPA 50 µg/kg/day
Total number of dams mated	10	10	10	10
Dead	0	2	1	0
Neglect nursing	0	2	2	1
Gestation (days)	22.0 ± 0.5	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	21.8 ± 0.4
Total number of implantations	153	154	144	153
Implantations per litter	15.3 ± 2.1	15.4 ± 1.4	14.4 ± 2.4	15.3 ± 2.6
Total number of infants	146	121	139	149
Live-born infants total	142	115	128	141
male	84	46	69	79
female	58	69	59	62
live-born infants per litter	14.2 ± 2.1	12.8 ± 3.2	12.8 ± 3.4	14.1 ± 2.3
Stillborn infants total	4	6	11	8
male	1	2	6	6
female	3	2	5	2
sex undetermined	0	2	0	0
stillborn infants per litter	0.4 ± 0.7	0.8 ± 2.1	1.1 ± 2.8	0.8 ± 1.6
Sex ratio(male/female)				
live-born infants	1.4	0.7	1.2	1.3
stillborn infants	0.3	1.0	1.2	3.0
total infants	1.4	0.7 **	1.2	1.3
Total number of live infants at PND4	132	88	92	113
male	81	38	53	64
female	51	50	39	49
Total number of infant at weaning	80	48	55	70
male (used for observations)	34 (20)	14 (12)	20 (14)	24 (18)
female (used for observations)	46 (46)	34 (34)	35 (35)	46 (46)
Total number of infants culled at PND4 a)	52	40	35	43
male	47	24	32	40
female	5	16	3	3
Total number of infants culled at PND3 b)	0	0	7	0
male	0	0	3	0
female	0	0	4	0
Total number of missing infants	1	0	1	2
male	0	0	0	1
female	1	0	1	1
Total number of dead infants from birth to weaning (%)^c	9 (6%)	27 ** (23%)	30 *** (23%)	26 ** (18%)
male	3	8	14	14
female	6	19	16	12
Dead infants per litter	0.9 ± 2.8	1.9 ± 4.2	3 ± 5.1	2.6 ± 5.5
Total number of dead infants from birth to PND4	9	27 **	28 **	26 **
male	3	8	13	14
female	6	19	15	12
Total number of dead infants from PND5 to weaning	0	0	2	0
male	0	0	1	0
female	0	0	1	0

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 Chi-square test

a: Adjusting litter size

b: Their dam was dead at PND3

c : total number of dead infants from birth to weaning / Live-born infants total x 100

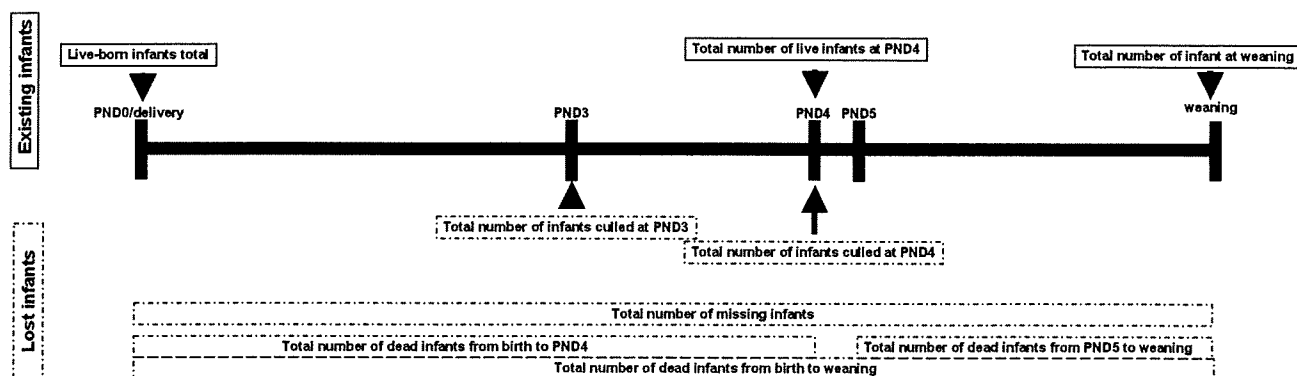


Table 3-1 . General appearance of offspring at birth - summary

Dam ID-No. Dose(μ g/kg)	Male				
	Face/Mouth Eye/Ear	Palate	Abdomen	Tail Anogenital region	Head/Back
Vehicle Control	NAD(84)	NAD(84)	NAD(84)	NAD(84)	NAD(84)
BPA 0.5	NAD(44)	NAD(44)	NAD(44)	NAD(44)	NAD(44)
BPA 5	NAD(69)	NAD(69)	NAD(69)	NAD(69)	NAD(69)
BPA 50	NAD(77)	NAD(76) AD(1)	NAD(77)	NAD(77)	NAD(77)
Dam ID-No. Dose(μ g/kg)	Female				
	Face/Mouth Eye/Ear	Palate	Abdomen	Tail Anogenital region	Head/Back
Vehicle Control	NAD(57)	NAD(57)	NAD(57)	NAD(57)	NAD(57)
BPA 0.5	NAD(62)	NAD(62)	NAD(62)	NAD(62)	NAD(62)
BPA 5	NAD(58)	NAD(58)	NAD(58)	NAD(58)	NAD(58)
BPA 50	NAD(59)	NAD(59)	NAD(58) AD(1)	NAD(59)	NAD(59)

NAD, No abnormalities detected
AD, Abnormalities detected

Table 4-1. Physical development test; vaginal opening of offspring - summary

Maternal dose ($\mu\text{g/Kg/day}$)	Number of animals	Age at vaginal opening (days)	Body weight at vaginal opening (g)
0	46	34.1 \pm 2.2	131.8 \pm 15.4
0.5	34	33.2 \pm 2.3	124.3 \pm 16.5
5	35	34.6 \pm 2.1	139.2 \pm 14.7
50	46	34.3 \pm 2.4	131.3 \pm 21.3

Not significant.

Table 4-2. Physical development test; preputial separation of offspring - summary

Maternal dose (μ g/Kg/day)	Number of animals	Age at complete separation (days)	Body weight at complete separation (g)
0	19	40.5 \pm 1.1	222.0 \pm 20.4
0.5	12	40.2 \pm 1.3	212.1 \pm 22.8
5	14	40.7 \pm 0.6	224.4 \pm 18.2
50	18	41.4 \pm 1.6	218.1 \pm 19.2

Not significant.