

ジエチルステイルベステロール陽性対照試験データの検討 再現性を保証しうる試験プロトコル（案）¹

陽性対照としてDESを用いた場合に再現性よく陽性の結果が得られるような試験法の案を提案する。要点をまとめると次のようになる。

- (1) 試験の再現性を確認するために、共同試験を数機関で試料や条件をそろえた上で行う。
- (2) 動物およびこれまでの関連試験について、試験結果の解析に必要な背景データベースを整備する。
- (3) 遺伝子発現解析（たんぱく発現レベル、活性レベルでのチェックを含む）を組み合わせ、生理的なホメオスタシスの作動を含む分子レベルでの反応メカニズムの検討も踏まえた解析を行う。
- (4) 検体、飼料、動物を同一の供給源から配布、供給し、検体については純度と不純物の確認、飼料についてはエストロゲン活性物質の存在を化学分析とin vitro試験系の両者を組み合わせて確認する。
- (5) 必要に応じ、さらにポイントをしばった追加試験を行い再現性、信頼性の精度をあげる。

具体的には以下に記す点に留意しながら、陽性対照としてのDESの数用量段階について、マウスあるいはラットの同じ系統、週令をあわせた動物を同じ供給源から提供する並行試験を複数の機関で行い、再現性の確認を行うとともに、結果において異なる部分については詳細な検討を加える。

¹ 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補別冊中にある、「ジエチルステイルベステロール陽性対照試験データの検討と、結果の再現性を保証しうる試験プロトコルの提案」の一部を抜粋、修正。

試験項目

- 試験動物 : 試験動物の背景について週令による体重変化や、生殖・発生影響関連の基礎的な項目について、参照のための背景データベースを整備し、そのようなデータベースを提供できる動物を用いる。
- 試験材料 : DESおよびビスフェノールAほかを共通の供給源から提供する。
- 用量段階 : DESについては、これまで相反する結果が得られている濃度である0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を含む望ましくはより低い濃度 (0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) とより高い濃度 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を含むこと。
- 飼料のチェック : 植物エストロゲン以外にビスフェノールAなどの混入を少なく管理した餌を用いるか、一定の混入率の餌を用いて並行試験を行う。エストロゲンのチェックには化学分析以外に未知の因子混入の可能性をチェックするため、in vitroのエストロゲン検出系を用いることも可能であろう。
- 投与時期 : 試験の目的に応じて行うが、とりあえず妊娠中および授乳期の投与のみについて検討する。
- 観察時期 : 以下を含むように計画する。3日、20日、3カ月、6カ月
- 観察項目 : 体重、臓器重量 (雄仔については精巣、前立腺を、雌仔については子宮重量を含む)、肛門生殖突起間距離、膣開口、性比、一腹あたりの生存仔数ほか、および行動影響 (攻撃性、運動頻度、甘味嗜好性など)
- 統計解析 : 個々に検定を行うほか、複数機関の間での違いがある場合に、要因の解析を行う。

(了)

「低用量」影響文献についての調査（追加）

調査の背景と目的

昨年度に引き続き、「低用量」影響に関する文献を調査した。低用量¹⁾について報告していると思われる研究報告の文献リストを以下に示す（いずれも今後の評価対象文献としてリストした）。

ここで「低用量」¹⁾とは、ヒトの通常の曝露の範囲、または生殖・発生毒性の評価のための標準的な試験法で一般に使用されている用量範囲よりも低い用量を指す。

結 果

「低用量」での影響について報告していると考えられる文献について、影響の内容を知見にもとづきリストした。

(ア) 報告された知見が従来みられていなかった「低用量」影響について新たに報告された文献

表1 「低用量」影響が報告されている報告の例

文 献	物質 *	用 量 (μ g/kg 体重/日)	エンドポイント	動 物
Gupta C. (2000a)	BPA, etc.	50	肛門生殖突起間距離、 前立腺、精巣上体重量	CD-1 mice
Sakaue et al. (2001)	BPA	20	精巣重量、一日精子 生産数低下など	若い成熟雄 SD rats
Honma et al. (2002)	BPA	2, 20	雌子の早期腔開口しかし 繁殖への影響はなし	妊娠 ICR/Jc1 mice
Palanza et al. (2002)**	BPA	10	F0 の育仔行動	胎齢 14-18 日 CD-1 mice
Farabollini et al. (2002)**	BPA	40	F1 の性行動など	SD rats
Facciolo et al. (2002)***	BPA	400, 40	Somatostatin 受容体活性	SD rats/ F0 胎齢期
Adriani et al. (2003)**	BPA	40	雄子の行動の雌化	周産期 SD rats
Kawai et al. (2003)**	BPA	2, 20	精巣重量低下と一時的な 攻撃行動の亢進	妊娠 CD-1 mice
Kubo et al. (2003)**	BPA	2, 20	F1 仔ラットの行動	ラット Wistar (F0)投 与

*BPA : Bisphenol A; **エンドポイント行動; *** 機能的意味は未検討

表1の参考（過去における報告例）

Palanza et al. (1999)	DES	0.018	包皮腺重量、攻撃性	CD-1 mice
vom Saal et al. (1995)	BPA	2	体重、精囊、精巣上体重量	CF-1 mice
vom Saal et al. (1997) Welshons et al. (1999)	DES	0.02, 0.2, 2.0	前立腺重量	CF-1 mice

¹⁾ USEPA/NIEHS の Low Dose Panel で定義した量は、5mg/kg/day (Melnick et al., 2002).

²⁾ 同上。

(イ) 著者らの記載にもかかわらず、実験上の不備などにより「低用量」影響の存在を示すとは言いえない文献とその理由を表2にまとめる。

表2 実験上の不備などにより低用量影響を示すといいがたい報告とその理由

文献	低用量影響ありと言い難い理由
Howedshell et al, 1999 など	ホルモンの実測値の欠如、ほ育条件の記載の欠如、体重への影響が不明
Nagel et al., 1997, vom Saal et al., 1998	用量段階の不足
Biegel et al, 1998, Cook et al, 1998	用量設定が不適切
Tinwell et al., 2000	子宮への影響は再現性に欠ける
Spearow et al., 1999, 2000	検出系の遺伝的背景と環境曝露に配慮が必要
Newbold, 2000, O'Connor et al., 1998, Wolf et al., 2000	学会発表の要旨などのため詳細が不明
Kubo et al. 2001	1500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 。設定根拠；NOAEL; 50mg/kg/day より低い。
Thayer et al., 2001	反応が大きくない
Aloisi et al., 2002	用量設定が不適切 ^{*2} (40,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)

(ウ) 「低用量」影響が見られないとするあらたな文献

Ashby et al., (1999), (2001)	Cagen et al. (1999a, b)
Elswick et al (2000)	Ema et al. (2001)
Lee (1998)	Odum (1999)
Odum et al.(1999)	Tyl et al. (1999), (2000), (2002)
Kwon et al. (2000) ^{*3}	Palanza et al. (2002) ^{*4}
Tinwell et al. (2002) ^{*5}	

(エ) 報告された内容の記載のみからはいずれとも判断できない文献

Ashby and Tinwell (2000) ^{*6}
Delclos et al. (2000a, b, c, unpublished) ^{*6}
Elswick et al. (2000b)
Laurenzana et al.(2000a, b, unpublished abstract) ^{*6}
vom Saal et al.(2000) ^{*6}
Markey et al. (2001)
Kubo et al. (2001)
Xu et al. (2002) ^{*7}

^{*2} BPA 感作がホルマリン刺激性を亢進するとしている。低用量とは言い難い。

^{*3} 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ にて無影響

^{*4} F0 に無影響

^{*5} 胎齢 6-21 日に 20, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与して、無影響

^{*6} 学会発表要旨などのため詳細が不明な文献

^{*7} F1 ラットの甘味嗜好の性差をエンドポイント。

(オ) 問題点として取り上げた4種類の知見については記載がなかった文献

Ashby et al. (2000a, b) * ⁶	Germolec et al. (2000a,b,c) * ⁶
Khurana et al. (2000)	Odum & Ashby (2000)
Elswick et al. (2000)	
* ⁶ 学会発表要旨などのため詳細が不明な文献	

(カ) その他、代謝動態、培養データなど、調査対象外の参考文献

Voelkel et al. (2002)	BPA 5mg: 54-90* ⁸	ヒトボランティア血液。 血中グルクロン酸抱合体(800nM)。 BPA は検出されず。
Ouchi & Watanabe (2002)	BPA -----	尿中 BPA (0.2 – 19.1 ng/mL)
Inoue et al. (2002)	BPA -----	精子中 BPA 濃度(0 – 12 ng/ml, ELISA; LC-MS にて検出されず)
Schoenfelder et al. (1997)	BPA -----	妊娠母体血中濃度 (0.2 – 9.2 ng/mL)
Wetherill et al. (2002)	BPA -----	BPA が AR を活性化* ⁹
Washington et al. (2001)	BPA -----	10-15 μM で type II low-affinity estrogen binding site へ結合
Silva et al. (2002)	BPA etc. -----	in vitro での BPA や PCBs などの 相加効果

*⁸ μg/kg。USEPA/NIEHS の設定用量を充たすが、充分低用量と言い難い。

*⁹ 培養細胞特性の可能性。

参考文献

- Adriani W, Della Seta D, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F, Laviola G (2003) Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Env. Health Persp.* 111: 395-401
- Aloisi AM, Della Seta D, Rendo C, Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Farabollini F. (2002) Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. *Brain Res* 937: 1-7.
- Ashby J. (2001) Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans. *Toxicol Lett* 120: 233-242.
- Ashby, J. Tinwell, H. and Haseman, J. (1999) Lack of Effects for Low Dose Levels of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on the Prostate Gland of CF-1 Mice Exposed in utero, *Regul Toxicol Pharmacol.* 30,156-166
- Atanassova, N., Makinnell, C., Turner, K. J., Walker, M., Fisher, J. S., Morley, M. Millar, M. R., Groome, N. P., and Sharpe, R. M. (2000) Comparative Effects of Neonatal Exposure of Male rats to Potent and Weak (Environmental) Estrogens on Spermatogenesis at Puberty and the Relationship to Adult Testis Size and Fertility: Evidence for Stimulatory Effects of Low Estrogen Levels, *Endocrinology*, 141(10),3898-3907
- Cagen, S. Z., Waechter, J. M., Dimond, S. S., Breslin, W. J., Butala, J. H., Jekat, F. W., Joiner, R. L., Shiotsuka, R. N., Veenstra, G. E., and Harris, L. R. (1999a), Normal Reproductive Organ Development in CF-1 Mice following Prenatal Exposure to Bisphenol A, *Toxicol. Sci.*50,36-44
- Chapin, R. E., and Sloane, R. A. (1997a), Reproductive Assessment by Continuous Breeding: Evolving Study Design and Summaries of Ninety Studies, *Environ. Health Perspect*, 105 (Suppl.1),199-205
Lamb, J., (1997a) Diethylstilbestrol, *Environ. Health Perspect*, 105(Suppl.1) 301-302
- Chapin, R.E., and Sloane, R. A. (1997b), Reproductive assessment by continuous breeding: evolving study design and summaries of ninety studies, *Environ. Health Perspect*, 105 (Suppl.1),199-205
Lamb, J.. (1997b) Diethylstilbestrol, *Environ. Health Perspect*, 105(Suppl.1) 303-304
- Facciolo RM, Alo R, Madeo M, Canonaco M, Dessi-Fulgheri F. (2002) Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst (2). *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 397-402.
- Elsby R., Maggs JL, Asby J & Park K. (2001) Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: Implications for extrapolation to humans, *J.Pharmacol. Exper.Therapeut.* 297, 103-113
- Elswick, B. A., Janszen, D. B., Gould, J. C., Stedman, D. B., and Welsh, F. (2000a), Effects of Perinatal Exposure to Low Doses of Bisphenol A in Male Offspring of Sprague-Dawley Rats, *Toxicol. Sci.* 54. 256A
- Elswick, BA Welsh F, Janszen DB. (2000b) Effect of different sampling designs on outcome of endocrine disruptor studies. *Reprod Toxicol* 14: 359-367.
- Ema M, Fujii S, Furukawa M, Kiguchi M, Ikka T & Harazono A (2001) Rat two generation reproductive toxicity study of bisphenol A, *Reprod. Toxicol.*, 15, 505-523
- Facciolo RM, Alo R, Madeo M, Canonaco M, Dessi-Fulgheri F. (2002) Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst (2). *Environ Health Perspect* 110Suppl 3: 397-402.

- Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, Bianchi F, Dessi-Fulgheri F. (2002) Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 110 suppl 3: 409-414.
- Gupta, C. (2000a) Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals, *Proc Exp. Biol. Med.*, 224(2), 61-68
- Gupta, C. (2000b) The role of estrogen receptor, androgen receptor and growth factors in diethylstilbestrol-induced programming of prostate differentiation, *Urol Res* 28,223-229
- Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T (2002) Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction, *Reproductive Toxicology* 16: 117-122
- Inoue K, Wada M, Higuchi T, Oshio S, Umeda T, Yoshimura Y, Nakazawa H. (2002) Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 773: 97-102.
- Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M, Kubo C (2003) Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A, *Env. Health Persp.* 111: 175-178
- Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. (2003) Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res* 45: 345-356.
- Kubo K, Arai O, Ogata R, Omura M, Hori T, Aou S. (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett* 304: 73-76.
- Khurana S, Rnamal S and Ben-Jonathan N (2000) Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alteration in estrogen receptor expression, *Endocrinology*, 141: 4512-4517
- Kwon S, Stedman DB, Elswick BA, Cattley RC, Welsh F. (2000) Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci* 55: 399-406.
- Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM. (2001) The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 109: 55-60.
- Mcabee, M. D., and DonCarlos, L. L. (1999) Estrogen, But Not Androgens, Regulates Androgen Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Developing Male Rat Forebrain, *Endocrinology*, 140(8), 3674-3681
- Mckinnell, C, Atanassova, N., Williams, K., Fisher J. S., Walker M., Turner, K. J., Saunders, P. T. K., and Sharpe, R. M. J. (2001) Suppression of Androgen Action and the Induction of Gross Abnormalities of the Reproductive Tract in Male rats Treated Neonatally With Diethylstilbestrol, *Andrology*,32(2), 323-338
- Newbold,R.(1995) Cellular and Molecular Effects of Developmental Exposure to Diethylstilbestrol: Implications for other Environmental Estrogens, *Environ. Health Perspect.*, 103(Suppl.7)
- Newbold, R. R., (2000) Dose Related Change in Male Reproductive Tract Tissues Following Prenatal

Exposure to Diethylstilbestrol(DES),
Submitted to :The Low Dose Endocrine Disrupter Panel, Oct. 2000

- Nikula H, Talonpoika T, Kaleva M & Toppari J Inhibition of hCG-stimulated steroidgenesis in cultured mouse Leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols, *Toxicol Appl. Pharmacol.* 157, 166-173
- Odum, J. Pyrah, I. T., Foster, J. R., Van Miller, J. P., Joiner, R. L., and Ashby et al. (1999), Comparative Activities of p-Nonylphenol and Diethylstilbestrol in Noble Rat Mammary Gland and Uterotrophic Assays, *Regul Toxicol Pharmacol*, 29, 184-195
- Palanza P., Parmigiani, S. Liu, H. and vom Saal, F. S. (1999) Prenatal Exposure to Low Doses of the Estrogenic Chemicals Diethylstilbestrol and o,p'-DDT Alters Aggressive Behavior of Male and Female House Mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64(4) 665-672
- Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. (2002) Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 415-422.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ & Waechter Jr. JM The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration, *Toxicol. Sci.*, 54, 3-18
- Rothschildt. C., Boylan E. S., Calhoon R. E. and Vonderhaar B. K. (1987) Transplacental Effects of Diethylstilbestrol on Mammary Development and Tumorigenesis in Female ACI Rats, *Cancer Research* 47, 4508-4516
- Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, Kurosawa S, Kurohmaru M, Hayashi Y, Aoki Y, Yonemoto J & Tohyama C (2001) Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J. of Occupational Health*, 43:185-190.
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. (2002) Something from "nothing" –eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 36: 1751-1756.
- Tinwell, H., Joiner, R., Pate, I., Soames, A., Foster, J., and Ashby, J., (2000) Uterotrophic Activity of Bisphenol A in the Immature Mouse, *Regul Toxicol Pharmacol*, 32, 118-126
- US EPA (1993) Integrated Risk Information System <http://www.epa.gov/iris/search.htm>
- Voelkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. (2002) Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15: 1281-1287.
- vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel S, Parmigiani S & Welshons WV (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior *Toxicol. Ind. Health*, 14 (1/2): 239-260.
- vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P. P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Dhar, M. D., Ganjam, V. K., Parmigiani, S., and Welshons, W. V. (1997) Prostate Enlargement in Mice due to Fetal Exposure to Low Doses of Estradiol or Diethylstilbestrol and Opposite effects at High Doses, *Proc. Natl. Acad. Polit Sci.* 94,2056-2061
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE. (2002) The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1: 525-524.

Xu X, Liu Y, Imai H, Sadamatsu M, Kato N, Kawato S, Tsutsumi O. (2002) The effect of intrauterine and lactational exposure to bisphenol A (BPA) on locomotor activity and spatial learning of rats. Abstract of 32th Annual Meeting of Society of Neuroscience.