

## BPA を用いた Crj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験

野田 修志<sup>1</sup>、菅野 純<sup>2</sup><sup>1</sup> 財団法人 化学物質評価研究機構\*<sup>2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

ホルモン活性に焦点を  
おいたスクリーニング  
手法の開発と確立と  
詳細試験に資する  
優先リストの作成  
を進めるとの趣旨を  
削除し、ビスフェ  
ノールAの曝露影響  
のみ記述

研究要旨: Bisphenol A (BPA)0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として EE 0.05 mg/kg 群を設定)を SD(IGS)ラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、低用量域及び大量暴露時の出生仔における cleft phallus の誘導及び 7 カ月齢時における性周期異常の誘導について検討したところ、いずれの BPA 投与群においても cleft phallus の出現はみられず、10 週齢時に実施した生殖能力検査においても異常はみられなかったが、7 カ月齢時における性周期検査では異常周期を示す動物が BPA0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、陽性対照群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17、19/22 匹で観察された。以上の結果から、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間に渡る性機能への影響評価が必要である可能性が示唆される。

\* 現在 (株)薬物安全性試験センター

試験法の開発につ  
いて削除し、ビス  
フェノールAの曝  
露影響のみ記述

## A. 研究目的

低用量域の内分泌かく乱化学物質の生態影響を評価する検出指標、試験方法はいまだ確立されていない。そこで、本研究では、内分泌かく乱性化学物質のラット子宮内・経乳汁暴露によって誘導される雌出生仔の遅発性の性周期異常に焦点を当て、低用量の内分泌かく乱影響が次世代に及ぼす影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。

## B. 研究方法

10 週齢の雌 CrI: CD (SD) IGS BR ラット (日本チャールス・リバー株式会社、日野飼育センター)を 60 匹、雄を 30 匹購入した。5 日間の検疫、馴化期間終了後、健常である事が確認された雌を雄ラットと共

に夕刻に交配用ケージに移し、2 対 1 の割合で一晩同居させた。翌朝膣栓及び膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。交尾確認日ごとに確認順に各群に振り分けた。BPA の 0、0.005、0.5、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として EE 0.05 mg/kg 群を設定) の用量を、各群 10、10、10、10、10 及び 10 匹の交尾が確認された雌に対し妊娠 6 日から分娩後 20 日(離乳前日)まで毎日強制経口投与した。投与用量は当機構で実施した投与用量設定試験を基に決定した。投与量は最新の体重値を基に算出した。

母動物の全例について、妊娠 0 日から哺育状態も含めて分娩後 21 日(出生仔の離乳日)まで毎日 1 回以上観察した。体重は

試験法の開発につ  
いて削除し、ビス  
フェノールAの曝  
露影響のみ記述

妊娠 0、6、14、17 及び 20 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日(出生仔の離乳日)に測定した。妊娠動物の全例を自然分娩させ妊娠期間、出産数(率)を求めた。分娩日を分娩 0 日とした。交尾が確認された全動物は分娩 21 日(離乳日)にエーテル麻酔下で安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。子宮は切開して硫酸アンモニウムに浸漬後着床痕数を算出し、出生数(率)を求めた。

出生仔については、出生日(0 日齢)に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、出産生仔数、出産生仔性比、出産生仔外表(口腔内を含む)の検査を行った。一般状態については剖検日まで毎日 1 回以上観察した。体重は 0、4、7、14 及び 21 日齢(出生仔の離乳日)に測定した。4 日齢に生存する全出生仔について肛門 - 生殖突起間距離をデジタル式ノギス (Digimatic Caliper CD-15CP、株式会社ミットヨ、神奈川)を用いて 0.01 mm 単位で測定した後、同腹出生仔数を 10 匹(雌雄各々 5 匹)になるよう無作為抽出法を用いて調整した。哺育期間中を通して生仔数、死亡仔数の検査を行った。生存する雌離乳仔全例について、21 日齢から膣開口を観察した。また、生存する雄離乳仔全例について、35 日齢から陰茎包皮分離検査を実施した。

1 匹/腹の雌出生仔について、10 週齢から 14 日間以上膣垢を採取し、性周期を観察、休止期を呈する動物をCO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>麻酔下で放血安楽死させた後、尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部距離、尿道開口部-膣開口部距離をデジタル式ノギスを用いて 0.01mm 単位で測定した後、器官・組織の肉眼的観察を行った。1 匹/

腹の雄出生仔については 13 週齢に達した動物を順次CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>麻酔下で放血安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。剖検時に精巢、精巢上体、精囊、腹葉前立腺、脳、子宮、卵巣、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定、約 24 時間後に測定を行った。

雌雄各 2 匹/腹の出生仔について生殖能力検査を実施した。雌は 10 週齢に達した時点で同用量群の雄ラットと共に夕刻に交配用ケージに移し、1 対 1 の割合で一晩同居させた。翌朝膣栓及び膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。交尾が確認された雌は妊娠 20 日に帝王切開し、帝王切開時に妊娠黄体数、着床数、胚・胎仔死亡数(早期、後期吸収胚及び死亡胎仔に分類)、生存胎仔数、生存胎仔性比、生存胎仔体重、生存胎仔胎盤重量、生存胎仔外表を調べた。また、生殖能力検査群の雄 2 匹/腹の出生仔については、交配相手の生殖能力検査が終了した 16 週齢以降、順次CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>麻酔下で放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。各剖検日に卵巣、精巢、精巢上体、腹葉前立腺、精囊、陰茎龟头(陰茎骨を含む)、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体を採取し、湿重量を測定した。なお、帝王切開した動物の子宮、卵巣重量測定は実施しなかった。甲状腺、下垂体については 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定、約 24 時間後に測定を行った。

雌雄各 2 匹/腹の出生仔については、遅発性の影響の有無を確認する目的で、7

追加

「、以降週1回に加え、包皮分離日、膣開口日及び剖検日」を削除

ヵ月齢まで継続して観察を行った。雌については、3ヶ月齢以降、長期間性周期観察を行った。膣スメアはAM9:00 から11:00の間に採取した。14日間連続採取後、2週間休止のサイクルを7ヶ月齢まで繰り返し行い、ギムザ染色後性周期を観察後、normal、persistent estrus(休止期が5-9日継続)、constant estrus(休止期が10日以上継続)、persitent estrus(発情期が3-7日継続)、constant estrus(発情期が8日以上継続)に分類した。7ヶ月齢に達した動物は14日間以上膣垢を採取し、性周期を観察、休止期を呈する動物をCO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>麻酔下で放血し安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。雄出生仔については7ヶ月齢に達した動物をCO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>麻酔下で放血し安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。剖検時に**精巢、精巢上体、精囊、腹葉前立腺、脳、子宮、卵巣、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体**を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については10%中性緩衝ホルマリン液で固定、約24時間後に測定を行った。

は雌雄とも出生仔の体重に媒体対照と比較し低値がみられた(Fig. 2)。

離乳から10週齢まで、雌出生仔において何れのBPA投与群においても一般状態に異常はみられず、媒体対照群とほぼ同様な体重推移を示したが(Fig. 3)、雄出生仔では、**EE投与群では4週齢から、BPA400 mg/kg群では6週齢以降**有意な低値がみられた(Fig. 3)。膣開口検査では、何れのBPA投与群でも膣開口日齢及び膣開口日体重に媒体対照群との間に差はみられなかった(Table 1)。陰茎亀頭包皮分離検査では、何れのBPA投与群でも包皮分離日齢及び包皮分離日体重に媒体対照群との間に差はみられなかった(Table 2)。13週齢時、**BPA投与群の雌外性器形態計測学的検査において媒体対照群との間に差はみられなかった(Fig. 4)**。13週齢時の剖検では、何れのBPA投与群でも投与に起因すると考えられる異常はみられず、器官重量では雌雄出生仔の絶対及び相対重量共にBPA投与に起因すると考えられる異常はみられなかった(Figs 5-8)。

10週齢以降では、BPA400 mg/kg群雌の1例において、4ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、腎臓に結節(19×6×5 mm)がみられ、**組織学的に腎芽腫であり肺への多発性転移を伴っていた**。また、BPA 0.005 mg/kg群の雌1匹において、5ヵ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、皮下に結節(φ30 mm)がみられ、組織学的に乳腺の腺癌であった。雄では、0.005 mg/kg群の1例で4ヵ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、腎臓に結節(10×8×7 mm)がみられ、**組織学的に腎芽腫であ**

Fig2 Fig3

追加

追加

190×60×50  
19×6×5

追加

100×80×70  
10×8×7

追加

### C. 研究結果

母動物の一般状態において、妊娠期間及び授乳期間を通して異常はみられず、分娩状況にも異常はみられなかった。

妊娠期間、母動物の体重推移においてはBPA 400 mg/kg群及びEE 50 μg/kg群で媒体対照と比較し低値がみられた。哺育期間では統計学的有意差はみられなかった(Fig. 1)。

出生から離乳まで、何れのBPA投与群の出生仔においても、媒体対照群と同様な体重推移を示した。EE 50 μg/kg群で

試験法の開発について削除し、ビスフェノールAの曝露影響のみ記述

mg μg

追加

り肺への多発性転移を伴っていた。この他、一般状態に異常はみられなかった。体重では、雌出生仔において何れの BPA 投与群においても媒体対照群とほぼ同様な体重推移を示したが、雄出生仔では、EE 投与群及び BPA 0.05、400 mg/kg 群で最終屠殺時まで継続して有意な低値がみられた(Fig. 9)。

性周期検査結果を Tables 3, 4 に示す。3 か月齢時においては、BPA400 mg/kg 群の 2/17 例で性周期の異常がみられたほか媒体対照群とその他の BPA 投与群で異常はみられなかった。4 か月齢時には媒体対照群で異常はみられなかったが、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 2/19、1/19、4/24、3/17 例が性周期の異常を示した。5 か月齢時には媒体対照群、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、7/19、3/19、5/24、6/17 例が性周期の異常を示した。6 か月齢時には媒体対照群、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、8/19、4/19、7/24、6/17 例が性周期の異常を示した。7 か月齢時には媒体対照群、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17 例が性周期の異常を示した。

なお、BPA0.005 mg/kg 群では 6 か月齢以降、その他の BPA 投与群では 7 か月齢時に性周期異常を示す動物数が統計学的有意に増加した。EE 投与群では、3 か月齢時には 6/22 例が既に異常周期を呈しており、5 か月齢以降異常周期を示す動物数は統計学的有意に増加した。

追加 → 7 か月齢解剖時の雄の絶対臓器重量 (Fig.10-1 及び 10-2) 及び相対臓器重量 (Fig.11-1 及び 11-2) で溶媒対照群に比して有意に変動したものを以下に記す。精巢

の絶対重量が、BPA0.05、400mg/kg 群及び EE 投与群で低下、相対重量は BPA400mg/kg 群で上昇した。精巢上体の絶対重量が EE 投与群で低値であり、相対重量は BPA400mg/kg 群で高値であった。精囊の絶対重量が BPA0.005、0.05mg/kg 群及び EE 投与群で低値であった。腹葉前立腺の絶対重量が BPA0.05mg/kg 群及び EE 投与群で低値であった。脳の絶対重量が BPA0.05mg/kg 以上の群及び EE 投与群で低値であり、相対重量は BPA0.005 及び 400mg/kg 群で高値であった。下垂体の絶対重量が EE 投与群で低値であった。甲状腺の絶対重量が BPA40 及び 400mg/kg 群で低値であった。副腎の相対重量が EE 投与群で高値であった。腎臓の絶対重量が BPA0.005、400mg/kg 群及び EE 投与群で低値であった。肝臓の絶対重量が BPA0.005、0.05、400mg/kg 群及び EE 投与群で、相対重量が BPA0.05mg/kg 群で低値であった。

7 か月齢解剖時の雌の絶対臓器重量 (Fig.12-1 及び 12-2) 及び相対臓器重量 (Fig.13-1 及び 13-2) で溶媒対照群に比して有意に変動したものを以下に記す。子宮の相対重量が EE 投与群で低値であった。甲状腺の絶対重量が BPA40 及び 400mg/kg 群で、相対重量が BPA40mg/kg 群で低値であった。

病理組織学的検査の結果を Table 5 に示した。媒体対照群を含め、腎臓、卵巣、輸卵管、子宮、膣、下垂体及び乳腺に種々の病変がみられた(Table 5)。

D. 考察 ← 以前我々は、EE(0、0.5、5、50 µg/kg/day)

試験法の開発について削除し、ビスフェノール A の曝露影響のみ記述

をSD(IGS)ラット妊娠6日から分娩後20日まで母ラットに経口投与し、出生仔の生殖能力の検討に加え6ヵ月齢における性周期検査及び剖検を行った結果、10週齢時での生殖能力検査では異常を示さないが、雌の出生仔に外性器の形態異常(cleft phallus)、pre-middle ageにおける性周期検査及び病理学的検査によって50µg/kg群で性周期の異常及び卵胞嚢胞等、ラットの生殖機能の老化過程においてみられる所見と同等の所見を得た。ラットにおいて、通常(2~3ヵ月齢)の生殖能力検査で異常を示さないが、その後性周期の異常、無排卵状態に陥る病態は、delayed anovulation syndromeとして、テストステロンの新生時期投与などによって引き起こされる事が知られており、生殖機能の老化が早期に現れる結果として生じる事が示唆されている。今回我々は、弱いエストロゲン作用を有するとされるbisphenol A (BPA)の0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/dayをSD(IGS)ラットの妊娠6日から分娩後20日まで母ラットに経口投与し、低用量域及び大量暴露時の出生仔へのcleft phallusの誘導、並びにpre-middle ageにおける性周期異常の誘導について検討した。

追加

その結果、いずれのBPA投与群においても肛門-生殖突起間距離、膣開口日齢、陰茎亀頭包皮分離日齢、10週齢時に実施した剖検、雌外性器形態計測学的検査、器官重量測定、生殖能力検査においても異常はみられなかった。しかしながら、7ヵ月齢時における性周期検査では異常周期を示す動物がBPA0、0.005、0.05、40、400 mg/kg群で各々1/16、11/19、8/19、11/24、

「BPA0.005mg/kg群から観察した」を詳細に記述

11/17例で観察された。持続して発情期がみられる場合、手技的要因により偽妊娠状態に陥った可能性も疑われる。そこで、本実験でみられた性周期異常の中でもpersistent estrus及びconstant estrusを呈した動物の発現状況に注目したところ、媒体対照群では、5ヵ月齢以降1例で性周期の異常を示す動物がみられたが、BPA最低用量群である0.005 mg/kg群では4ヵ月齢以降観察され、7ヵ月齢においては媒体対照群で1/16例のみであったのに対し0.005 mg/kg群では11/19例と約半数を占めていた。なお、BPA最高用量群である400 mg/kg群においては2例ではあるが3ヵ月齢時に性周期の異常(persistent diestrus及びconstant estrus)を示す動物が観察され、4ヵ月齢時にはその性周期の回復がみられたが、その原因は不明であった。以上のことから低濃度BPAの子宮内・経乳汁暴露によってもpre-middle ageにおける性周期異常が誘導される可能性が示唆された。なお、EE暴露群においては、既に3ヵ月齢時点から性周期の異常を示す動物が観察され、7ヵ月齢の時点では殆どの動物が性周期の異常を示していた。このことから、EEの子宮内・経乳汁暴露によって誘導されたpre-middle ageにおける性周期の異常に関しては、再現性のある変化であることが確認された。

追加

10/11 11/19

詳細な記述に変更

生殖機能の老化の本態は、未だ解明されていない。子宮内・経乳汁暴露によって引き起こされる性周期異常の原因としては中枢の神経内分泌系の異常や卵巣側、すなわちoocyte reserveの減少等が考えられるが、ヒトにおいてはDES daughterとcontrolでoocyte reserveは変わらなかった

という報告(Sangvai ら、1997)がある。いずれにせよ、BPA 及び EE の子宮内・経乳汁暴露により pre-middle age における性周期の異常がみられた原因については本研究からは不明であり、今後、本実験結果の再現性、他のエストロゲン作用を有する物質による pre-middle age における性周期異常が誘導されるかの検証、及び、そのメカニズム解析等が必要と考えられる。

なお、BPA では EE と比較し、より低濃度で性周期の異常がみられた原因については不明であるが、 $\alpha$ フェト蛋白(AFP)やアルブミン等の血中蛋白との結合性に差がある可能性も考えられる。また、BPA は複数の核内受容体とも結合することが知られていることから、BPA によってみられた性周期異常がエストロゲン受容体を介さないメカニズムによって引き起こされた可能性も考えられる。

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、遅発性の性周期異常を評価するための観察項目は設定されておらず、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間に渡る性機能への影響に関する評価が必要である可能性が示唆される。

追加 → 現在、ヒトでの BPA の許容摂取量は 0.05 mg/kg/day とされている。しかしながら、本実験結果はそれ以下の投与用量で遅発性の性周期異常がみられており、実験結果の再現性を確認することが来年度の最重要課題と考えられる。また、平成 17 年度は BPA によってみられた pre-middle age における性周期異常の再現性を検討する

と共に、ポリカーボネート製ケージ、床敷き、給水瓶等 BPA のラット飼育環境中濃度を測定する予定である。

#### E. 結論 ←

Bishpenol A(BPA)の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day を SD(IGS)ラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、低用量域及び大量暴露時の出生仔への cleft phallus の誘導、並びに pre-middle age における性周期異常の誘導の有無について検討した。その結果、いずれの BPA 投与群においても肛門-生殖突起間距離、膣開口日齢、陰茎亀頭包皮分離日齢、13 週齢時に実施した剖検、雌外性器形態計測学的検査、器官重量測定、生殖能力検査においても異常はみられなかった。しかしながら、7ヶ月齢時における性周期検査では異常周期を示す動物が BPA0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、EE 群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17、19/22 匹で観察され、低濃度 BPA の子宮内・経乳汁暴露によっても 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。尚、7ヶ月齢の臓器重量に、有意差を伴う変動が認められたが、変動幅が小さいこと、用量作用関係に関連臓器間での一貫性が乏しいことから、逆 U 字応答の可能性を含めても BPA 暴露による変動であるとの判定を下すことは困難であると考察れる。確認実験の結果との整合性を持って最終的な判定をする必要がある。

以上の結果、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間に渡る性機能への影響に関する評価が必要である可能性が示唆される。

試験法の開発について削除し、ビスフェノール A の曝露影響のみ記述

10 13

追加

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産所有権の出願、登録状況、特  
許取得及び実用新案登録

なし。

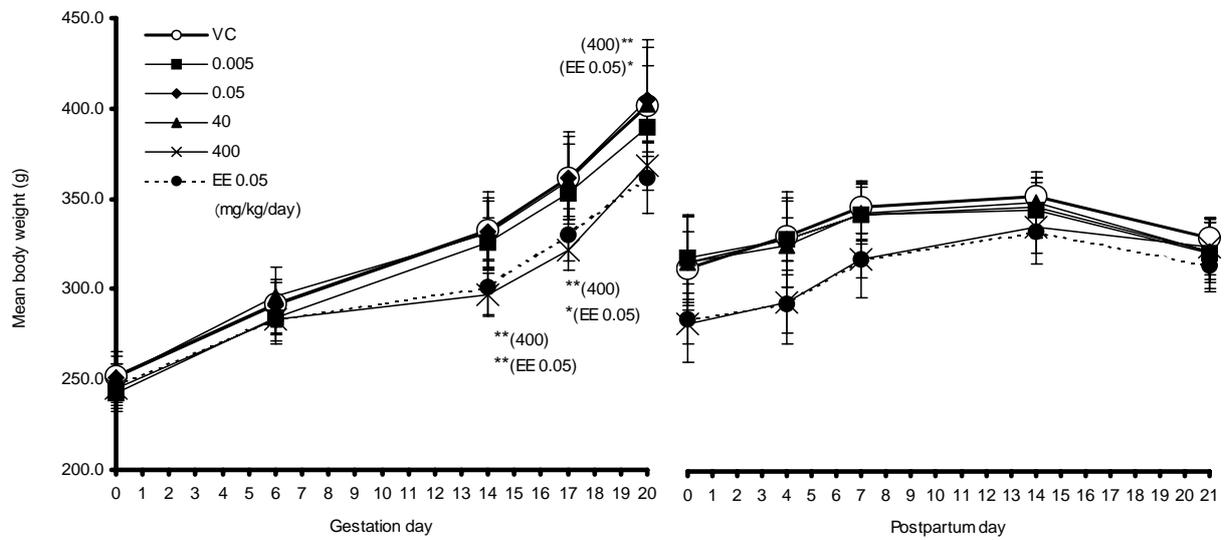


Fig. 1. Mean body weight of dams.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

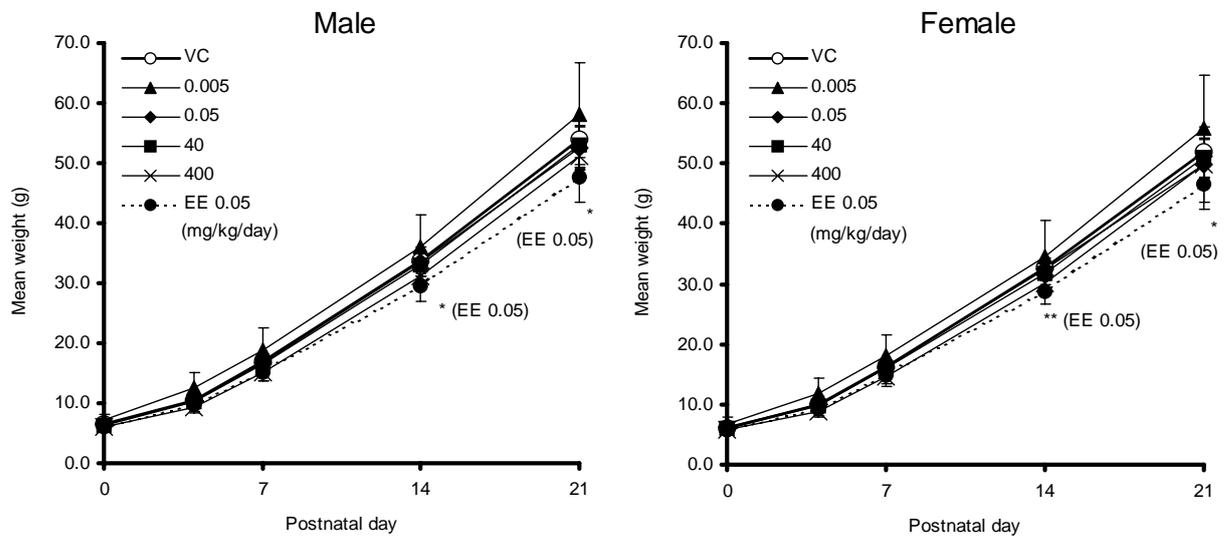


Fig. 2. Mean body weight of offspring (birth to weaning).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

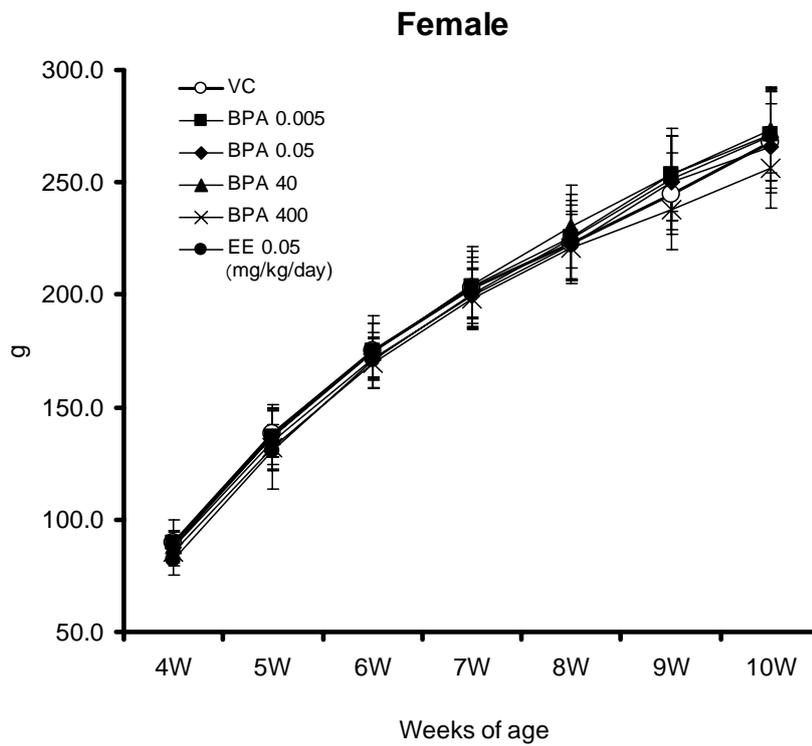
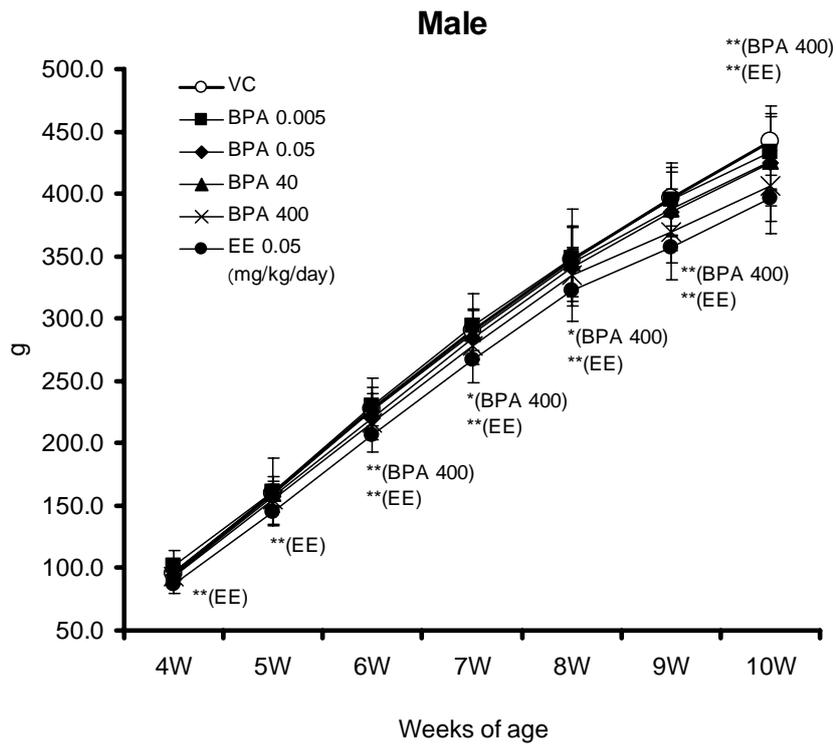


Fig. 3. Mean body weight of offspring (4-10 weeks of age).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

Table 1. Vaginal opening of offspring

| Dose (mg/kg/day) | n  | Mean age at VO | body weight at VO |
|------------------|----|----------------|-------------------|
| VC               | 39 | 34.1 ± 3.0     | 129.5 ± 18.5      |
| 0.005            | 39 | 33.8 ± 2.5     | 127.0 ± 18.0      |
| 0.05             | 43 | 33.5 ± 2.0     | 123.0 ± 13.4      |
| 40               | 50 | 33.9 ± 2.3     | 127.6 ± 14.6      |
| 400              | 45 | 33.9 ± 1.8     | 123.8 ± 14.0      |
| EE 0.05          | 50 | 33.3 ± 1.7     | 118.2 ± 12.2      |

Not significant.

Table 2. Preputial separation of offspring

| Dose (mg/kg/day) | n  | Mean age at PPS | body weight at PPS |
|------------------|----|-----------------|--------------------|
| VC               | 41 | 39.8 ± 1.2      | 204.5 ± 13.0       |
| 0.005            | 48 | 40.0 ± 1.0      | 206.8 ± 35.0       |
| 0.05             | 55 | 40.3 ± 1.5      | 204.7 ± 13.3       |
| 40               | 49 | 40.3 ± 1.6      | 209.7 ± 17.0       |
| 400              | 45 | 40.5 ± 1.5      | 202.9 ± 14.2       |
| EE 0.05          | 50 | 41.5 ± 1.8      | 200.8 ± 14.7       |

Not significant.

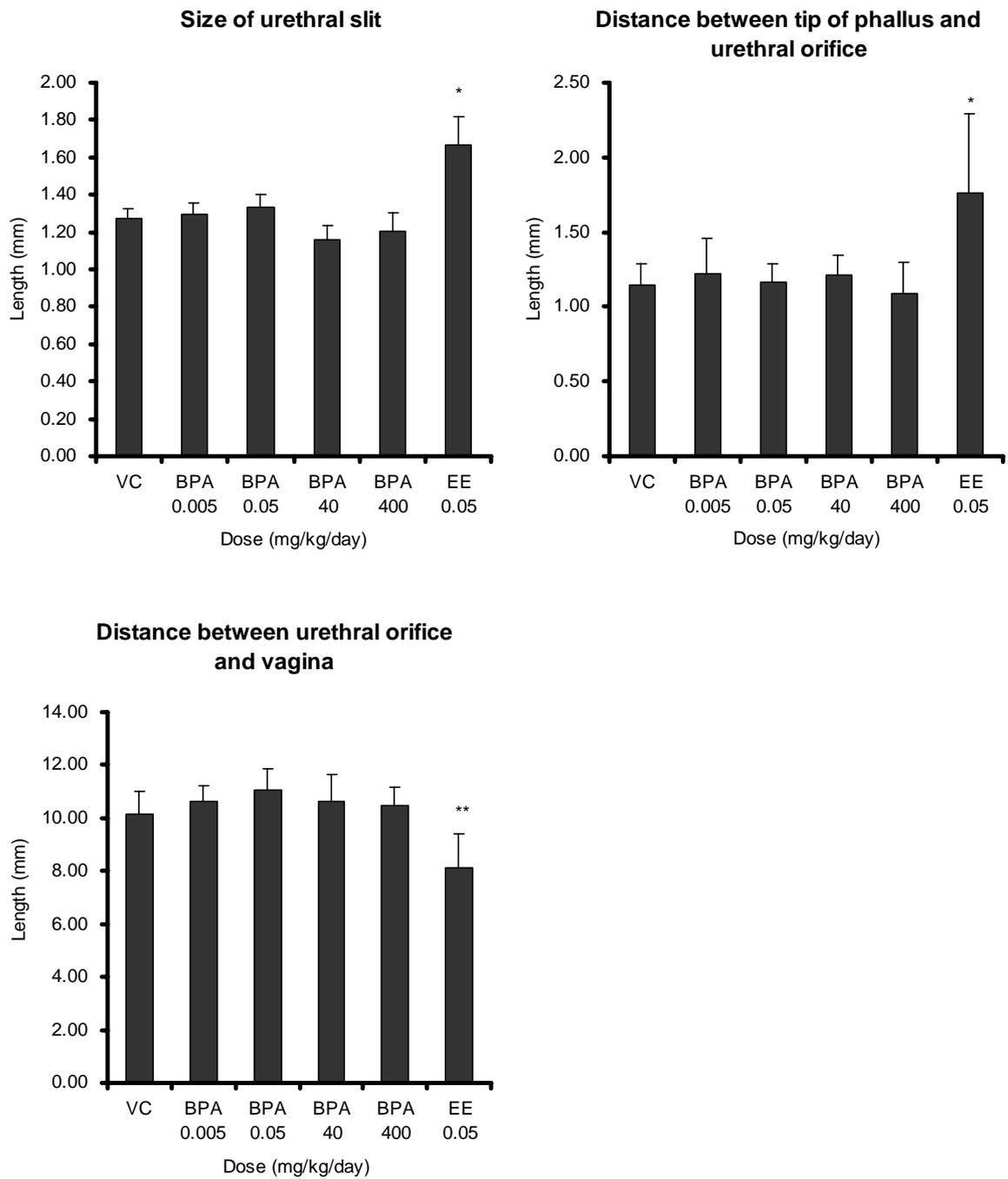


Fig. 4. Morphometry of the female external genitalia on 13 weeks of age.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

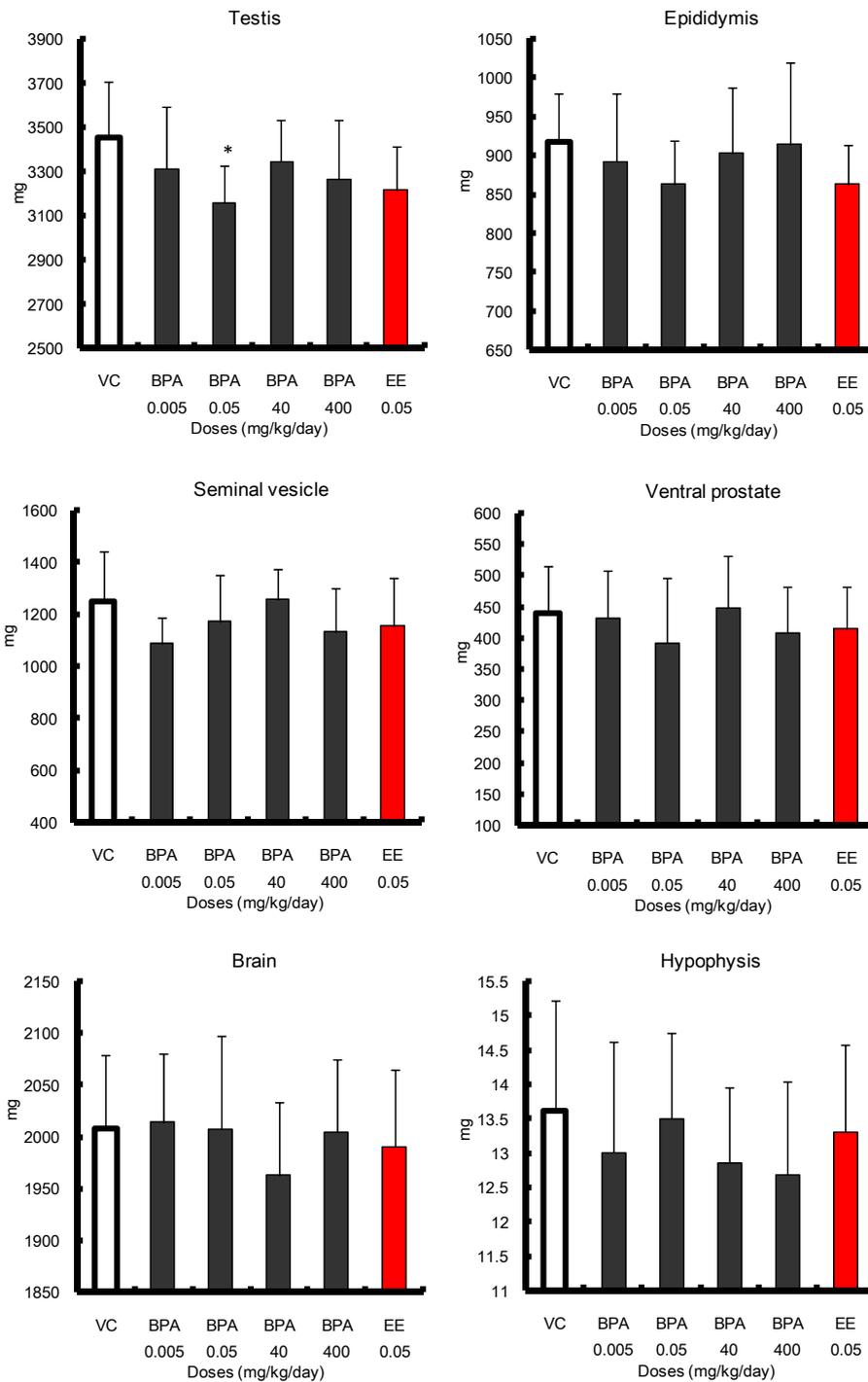


Fig. 5-1. Absolute organ weights of male rats on 13 weeks of age.

\* $p < 0.05$  (Dunnett's test)

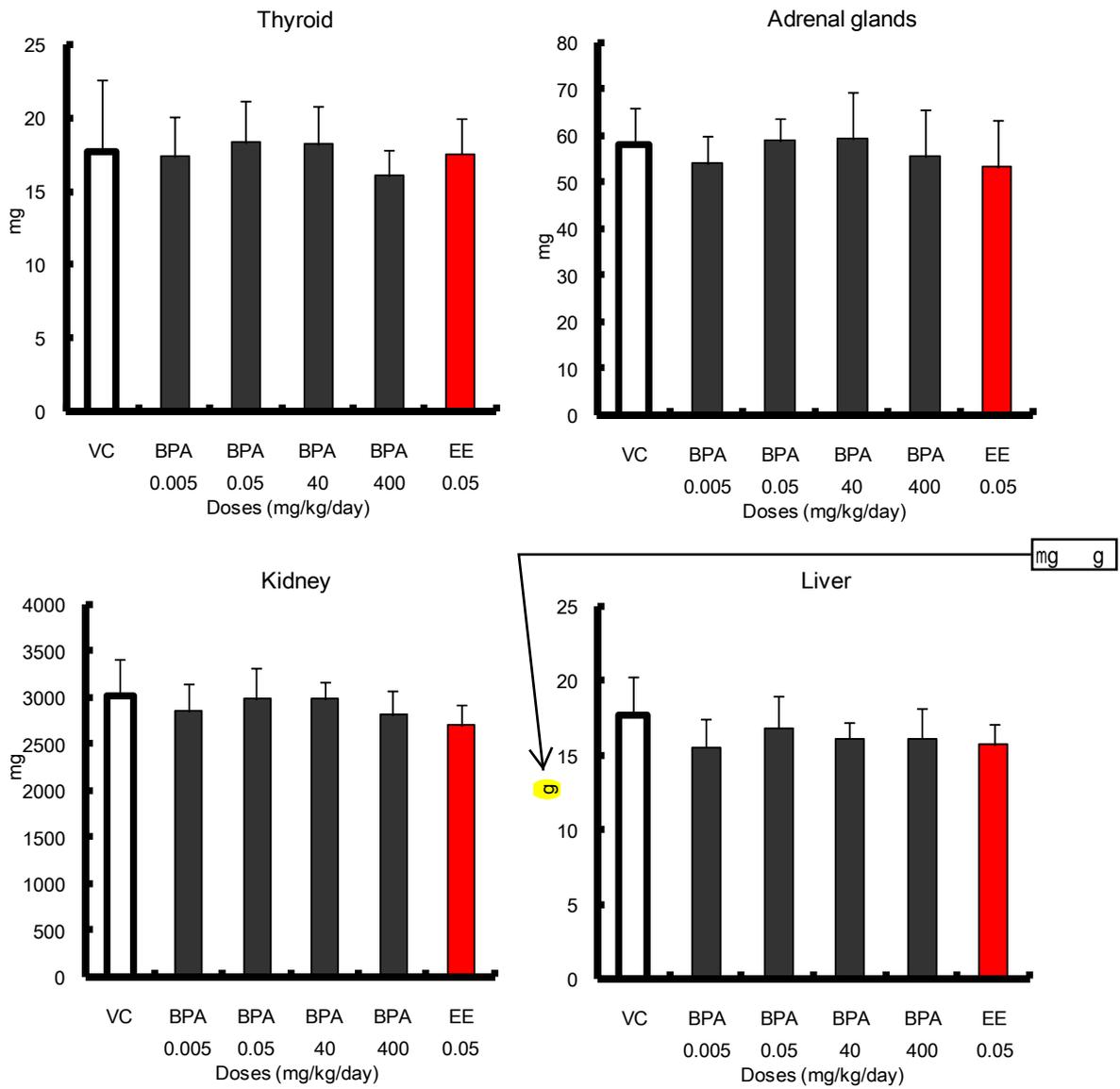


Fig. 5-2. Absolute organ weights of male rats on 13 weeks of age.

Not significant

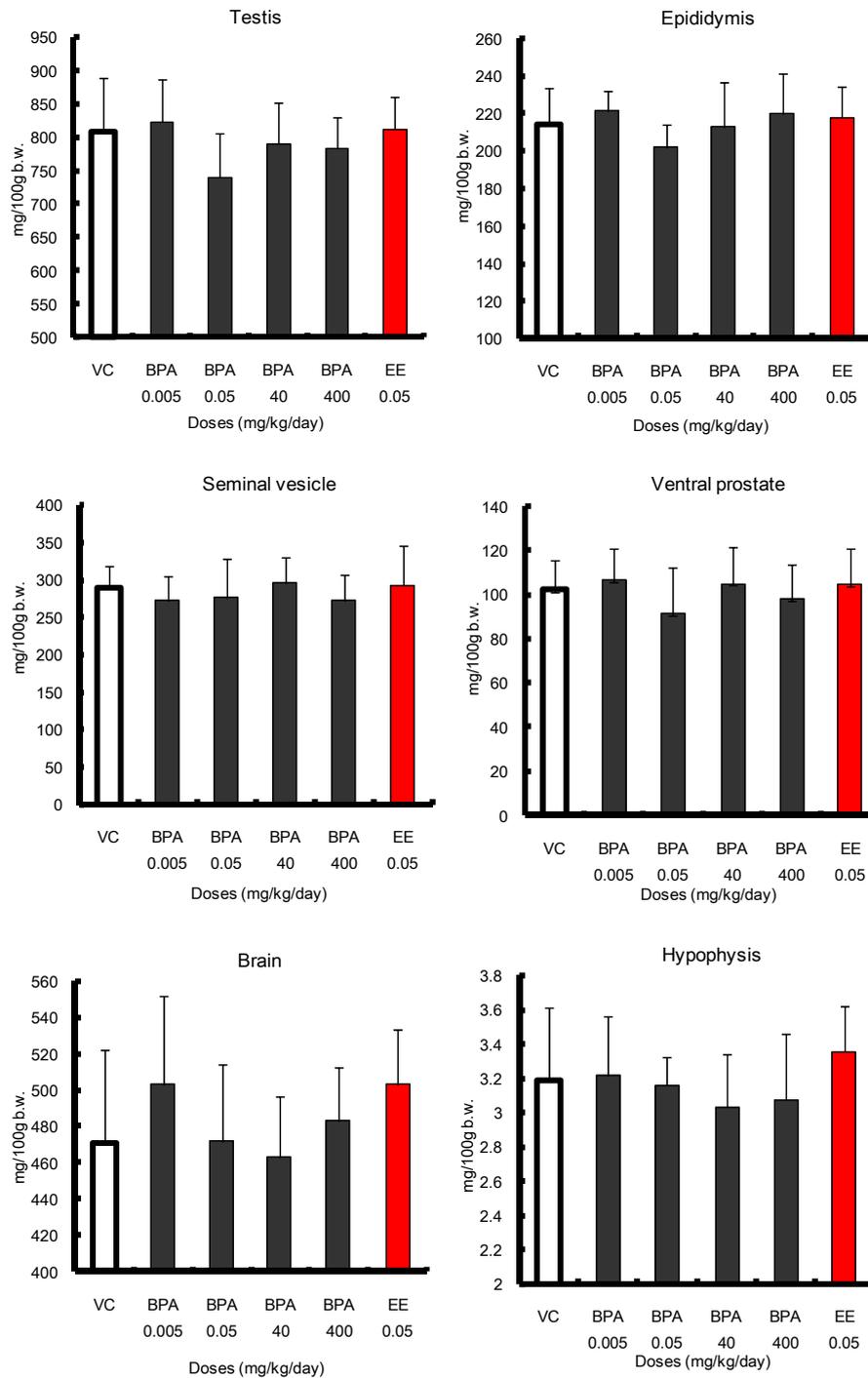


Fig. 6-1. Relative organ weights of male rats on 13 weeks of age.

Not significant.

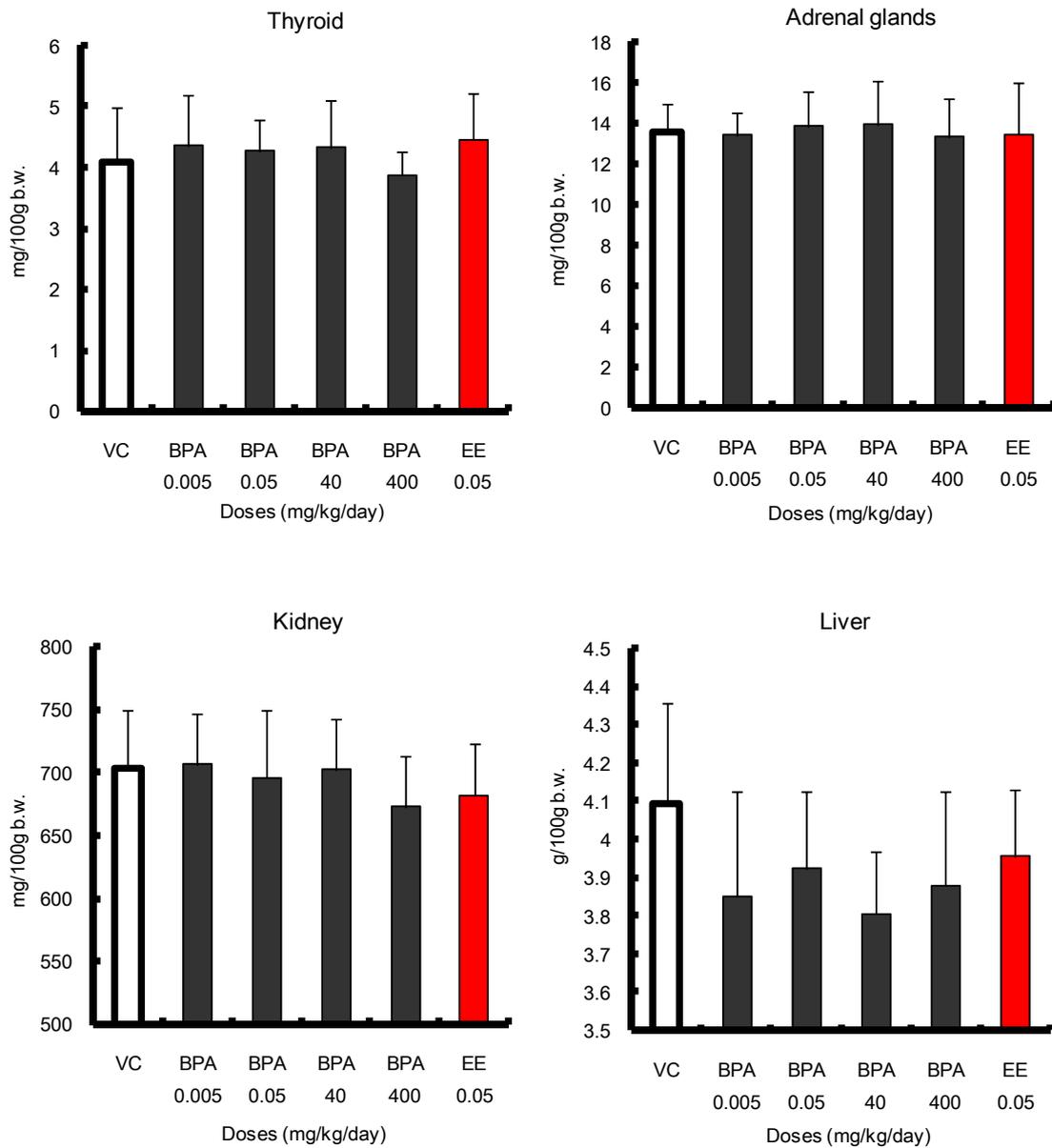


Fig. 6-2. Relative organ weights of male rats on 13 weeks of age.

Not significant.

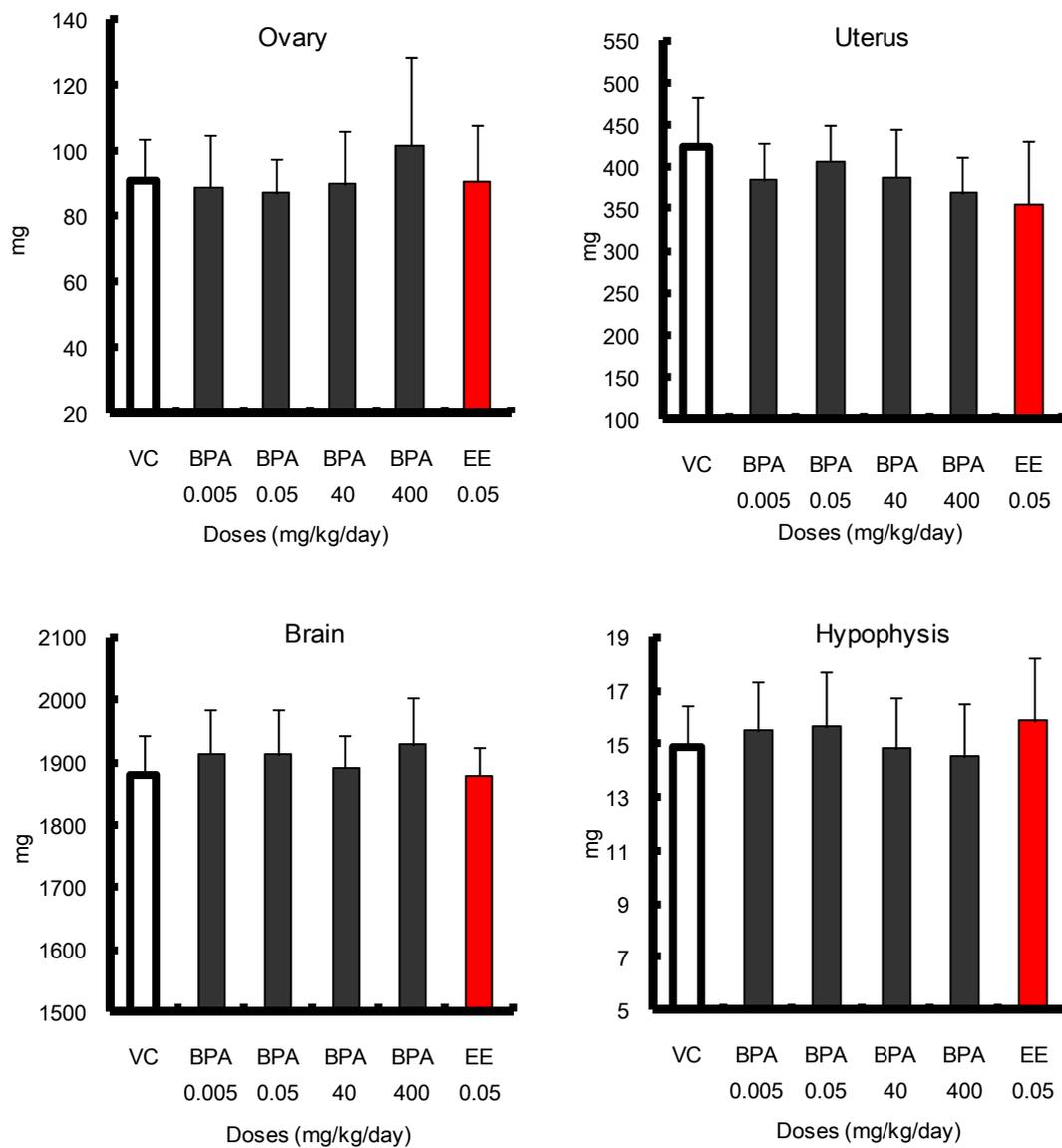


Fig. 7-1. Absolute organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

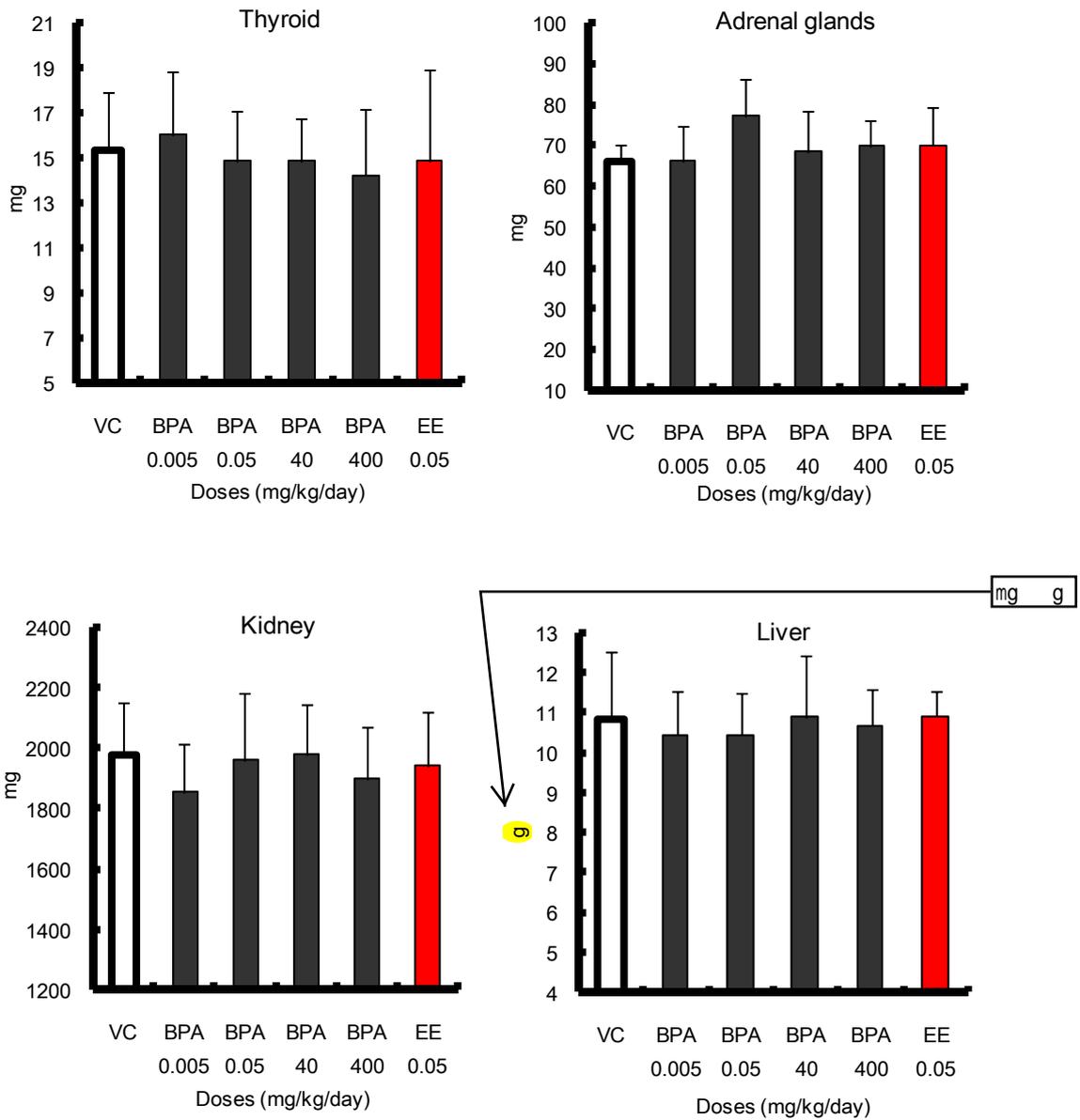


Fig. 7-2. Absolute organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

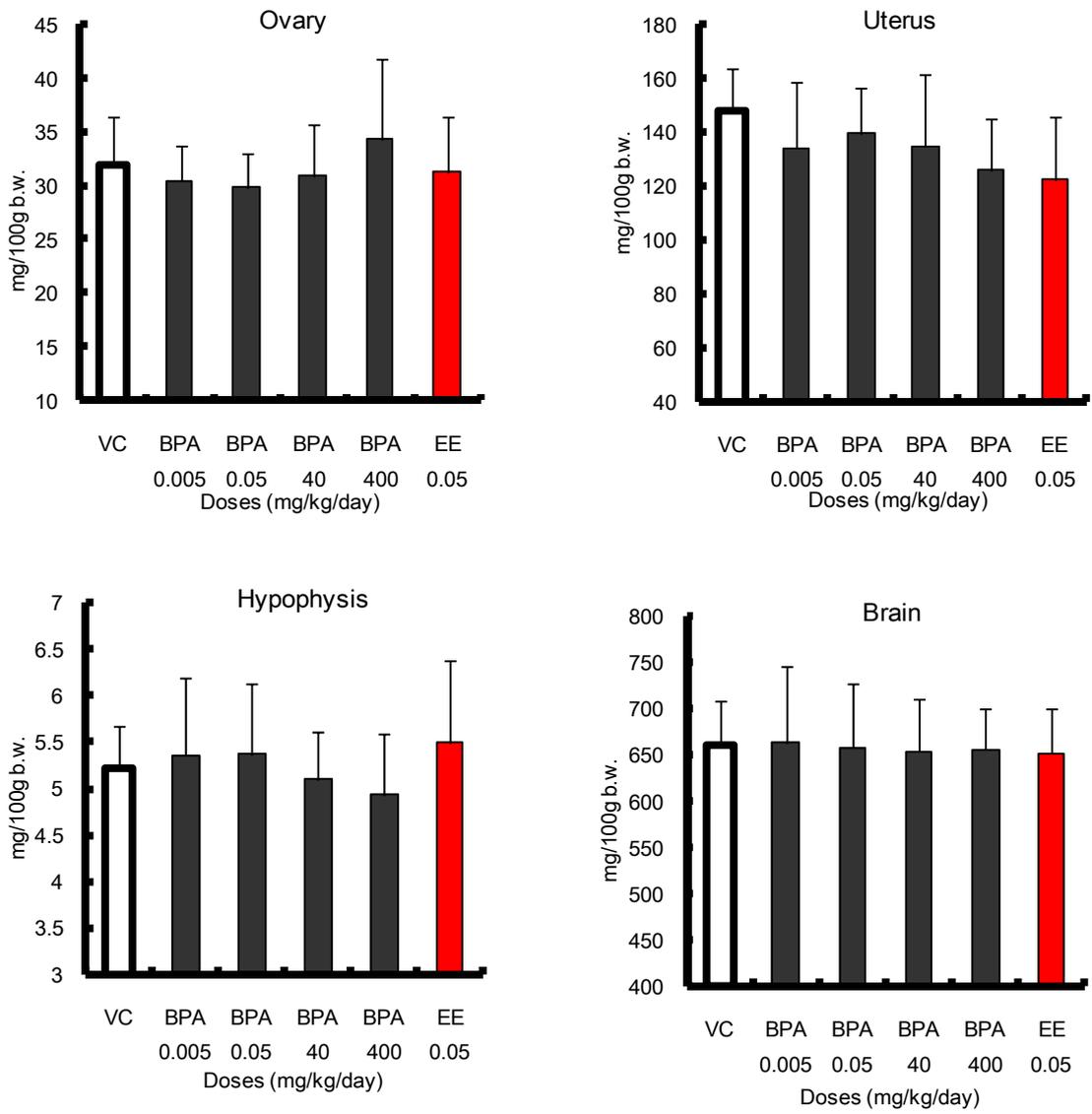


Fig. 8-1. Relative organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

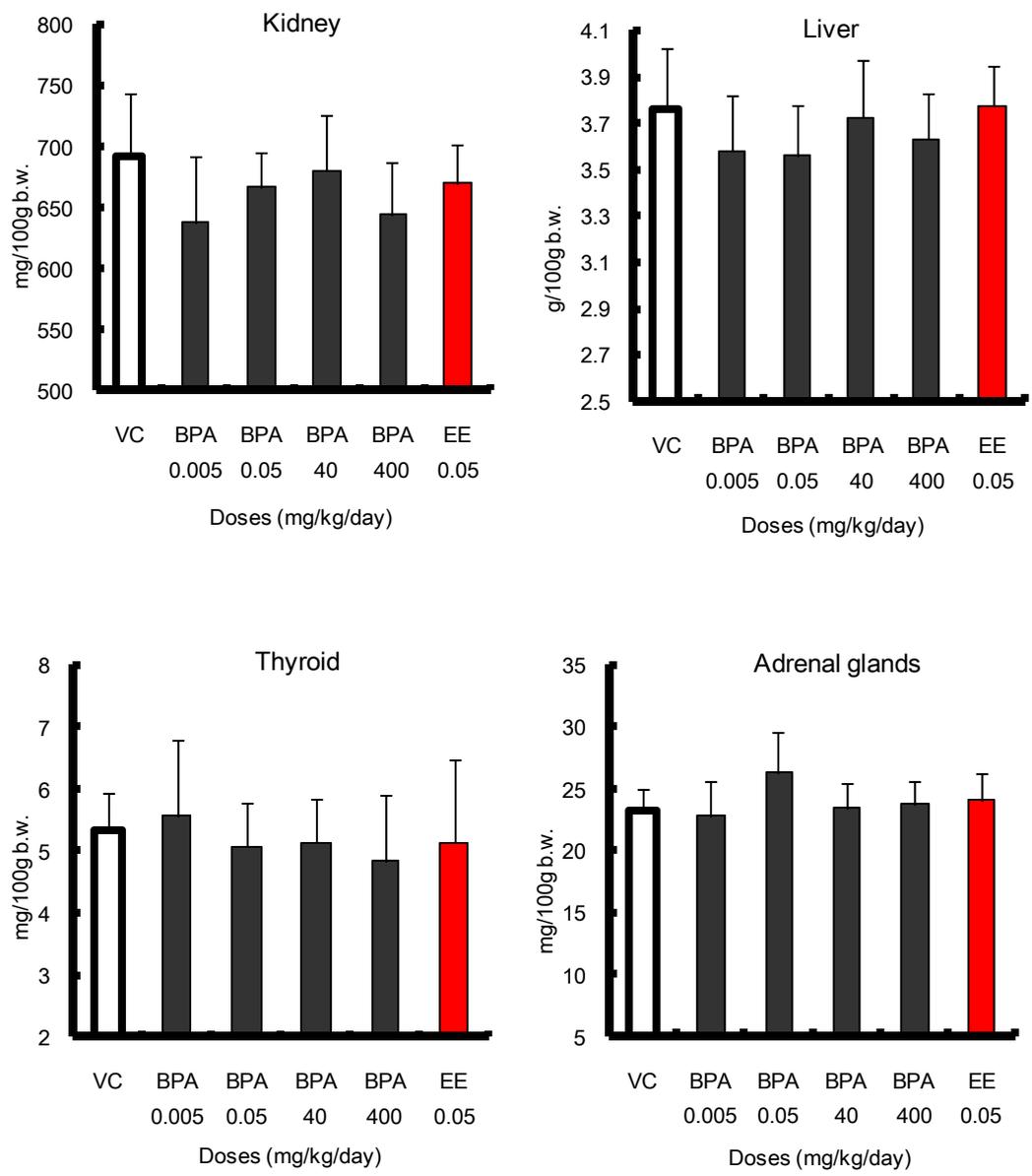


Fig. 8-2. Relative organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

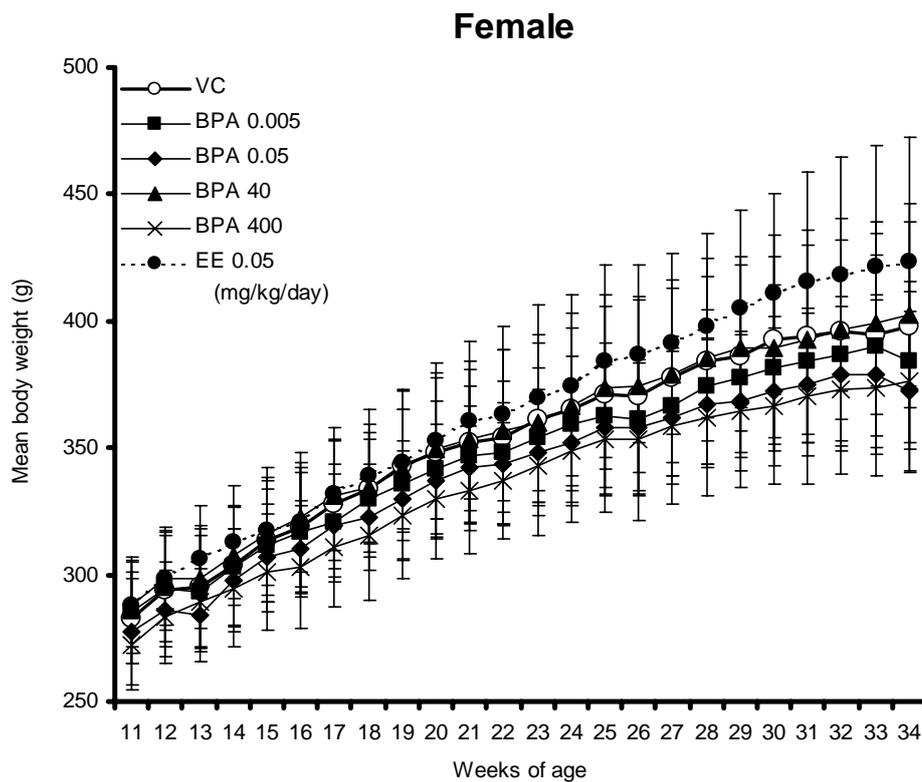
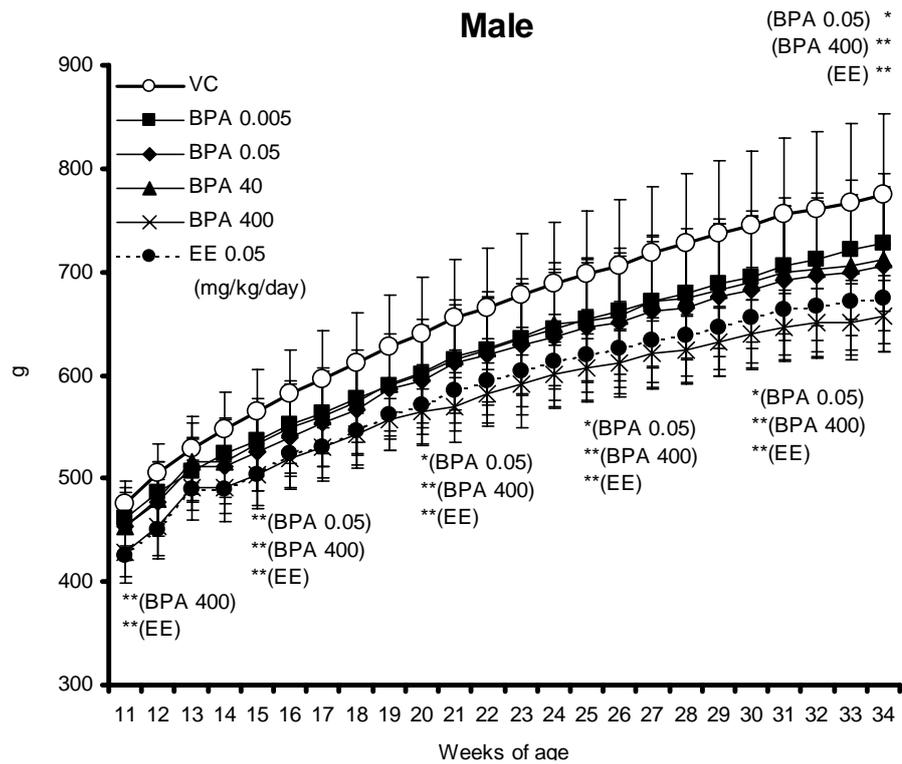


Fig. 9. Mean body weight of offspring (11-34 weeks of age).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

Table 3. Summary of estrus cycle.

|                        | VC        | BPA 0.005 | BPA 0.05 | BPA 40 | BPA 400 | EE 0.05 |
|------------------------|-----------|-----------|----------|--------|---------|---------|
|                        | mg/kg/day |           |          |        |         |         |
| <b>3 months of age</b> |           |           |          |        |         |         |
| <b>Normal cycle</b>    | 16/16     | 19/19     | 19/19    | 24/24  | 15/17   | 16/22   |
| <b>Abnormal cycle</b>  |           |           |          |        | 2/17    | 6/22    |
| Persistent diestrus    |           |           |          |        | 1/17    | 3/22    |
| Constant diestrus      |           |           |          |        |         | 3/22    |
| Persistent estrus      |           |           |          |        |         |         |
| Constant estrus        |           |           |          |        | 1/17    |         |
| <b>4 months of age</b> |           |           |          |        |         |         |
| <b>Normal cycle</b>    | 16/16     | 17/19     | 18/19    | 20/24  | 14/17   | 15/22   |
| <b>Abnormal cycle</b>  |           | 2/19      | 1/19     | 4/24   | 3/17    | 7/22    |
| Persistent diestrus    |           | 1/19      | 1/19     |        | 2/17    | 2/22    |
| Constant diestrus      |           | 1/19      |          | 4/24   | 1/17    | 5/22    |
| Persistent estrus      |           |           |          |        |         |         |
| Constant estrus        |           |           |          |        |         |         |
| <b>5 months of age</b> |           |           |          |        |         |         |
| <b>Normal cycle</b>    | 15/16     | 12/19     | 16/19    | 19/24  | 11/17   | 10/22   |
| <b>Abnormal cycle</b>  | 1/16      | 7/19      | 3/19     | 5/24   | 6/17    | 12/22** |
| Persistent diestrus    |           | 5/19      | 2/19     |        | 2/17    | 3/22    |
| Constant diestrus      |           | 1/19      | 1/19     | 5/24   | 4/17    | 7/22    |
| Persistent estrus      | 1/16      | 1/19      |          |        |         | 2/22    |
| Constant estrus        |           |           |          |        |         |         |
| <b>6 months of age</b> |           |           |          |        |         |         |
| <b>Normal cycle</b>    | 15/16     | 11/19     | 15/19    | 17/24  | 11/17   | 5/22    |
| <b>Abnormal cycle</b>  | 1/16      | 8/19*     | 4/19     | 7/24   | 6/17    | 17/22** |
| Persistent diestrus    |           | 1/19      | 3/19     | 2/24   | 3/17    | 5/22    |
| Constant diestrus      |           | 6/19      | 1/19     | 5/24   | 3/17    | 10/22   |
| Persistent estrus      | 1/16      | 1/19      |          |        |         | 1/22    |
| Constant estrus        |           |           |          |        |         | 1/22    |
| <b>7 months of age</b> |           |           |          |        |         |         |
| <b>Normal cycle</b>    | 15/16     | 8/19      | 11/19    | 13/24  | 6/17    | 3/22    |
| <b>Abnormal cycle</b>  | 1/16      | 11/19**   | 8/19*    | 11/24* | 11/17** | 19/22** |
| Persistent diestrus    |           |           |          |        | 1/17    | 1/22    |
| Constant diestrus      |           | 1/19      |          |        | 1/17    | 7/22    |
| Persistent estrus      |           | 1/19      | 4/19     | 3/24   | 2/17    | 1/22    |
| Constant estrus        | 1/16      | 9/19      | 4/19     | 8/24   | 7/17    | 10/22   |

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Chi-square test)

One animal with mammary adenocarcinoma in the BPA 0.005 mg/kg group and one animal with nephroblastoma in the BPA 400 mg/kg group were not examined.

Table 4-1. Individual representation of estrus cycle.

**Vehicle control**

|    | 3             | 4 | 5  | 6  | 7  |
|----|---------------|---|----|----|----|
|    | months of age |   |    |    |    |
| 1  | N             | N | N  | N  | N  |
| 2  | N             | N | N  | N  | N  |
| 3  | N             | N | N  | N  | N  |
| 4  | N             | N | N  | N  | N  |
| 5  | N             | N | N  | N  | N  |
| 6  | N             | N | N  | N  | N  |
| 7  | N             | N | N  | N  | N  |
| 8  | N             | N | N  | N  | N  |
| 9  | N             | N | PE | PE | CE |
| 10 | N             | N | N  | N  | N  |
| 11 | N             | N | N  | N  | N  |
| 12 | N             | N | N  | N  | N  |
| 13 | N             | N | N  | N  | N  |
| 14 | N             | N | N  | N  | N  |
| 15 | N             | N | N  | N  | N  |
| 16 | N             | N | N  | N  | N  |

**BPA 0.005 mg/kg/day**

|    | 3             | 4  | 5  | 6  | 7  |
|----|---------------|----|----|----|----|
|    | months of age |    |    |    |    |
| 1  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 2  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 3  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 4  | N             | CD | CD | CD | PE |
| 5  | N             | N  | N  | PE | CE |
| 6  | N             | N  | N  | CD | CE |
| 7  | N             | PD | PD | CD | CE |
| 8  | N             | N  | PE | CD | CE |
| 9  | N             | N  | PD | CD | CE |
| 10 | N             | N  | PD | CD | CE |
| 11 | N             | N  | PD | PD | CE |
| 12 | N             | N  | PD | N  | CE |
| 13 | N             | N  | N  | N  | CE |
| 14 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 15 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 16 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 17 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 18 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 19 | N             | N  | N  | N  | CD |

PD, persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)

CD, constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)

PE, persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)

CE, constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)

One animal with mammary adenocarcinoma in the BPA 0.005 mg/kg group was excluded.

Table 4-2. Individual representation of estrus cycle.

**BPA 0.05 mg/kg/day**

|    | 3             | 4  | 5  | 6  | 7  |
|----|---------------|----|----|----|----|
|    | months of age |    |    |    |    |
| 1  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 2  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 3  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 4  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 5  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 6  | N             | N  | PD | PD | N  |
| 7  | N             | N  | N  | N  | PE |
| 8  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 9  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 10 | N             | N  | N  | N  | CE |
| 11 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 12 | N             | N  | N  | N  | PE |
| 13 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 14 | N             | PD | PD | PD | PE |
| 15 | N             | N  | N  | PD | N  |
| 16 | N             | N  | CD | CD | CE |
| 17 | N             | N  | N  | N  | CE |
| 18 | N             | N  | N  | N  | CE |
| 19 | N             | N  | N  | N  | PE |

**BPA 40 mg/kg/day**

|    | 3             | 4  | 5  | 6  | 7  |
|----|---------------|----|----|----|----|
|    | months of age |    |    |    |    |
| 1  | N             | N  | N  | N  | CE |
| 2  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 3  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 4  | N             | N  | CD | CD | PE |
| 5  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 6  | N             | N  | N  | N  | CE |
| 7  | N             | N  | CD | CD | CE |
| 8  | N             | CD | CD | PD | CE |
| 9  | N             | CD | CD | CD | CE |
| 10 | N             | N  | N  | N  | PE |
| 11 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 12 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 13 | N             | N  | N  | PD | CE |
| 14 | N             | CD | N  | N  | N  |
| 15 | N             | N  | N  | N  | CE |
| 16 | N             | N  | CD | CD | CE |
| 17 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 18 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 19 | N             | N  | N  | N  | PE |
| 20 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 21 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 22 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 23 | N             | CD | N  | CD | N  |
| 24 | N             | N  | N  | N  | N  |

PD, persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)

CD, constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)

PE, persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)

CE, constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)

Table 4-3. Individual representation of estrus cycle.

**BPA 400 mg/kg/day**

|    | months of age |    |    |    |    |
|----|---------------|----|----|----|----|
|    | 3             | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 2  | N             | N  | N  | N  | CE |
| 3  | N             | PD | CD | PD | PD |
| 4  | N             | N  | N  | N  | N  |
| 5  | N             | N  | CD | CD | PE |
| 6  | N             | N  | N  | N  | PE |
| 7  | N             | N  | N  | N  | CE |
| 8  | N             | N  | PD | N  | CE |
| 9  | N             | N  | N  | N  | CD |
| 10 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 11 | N             | CD | CD | CD | CE |
| 12 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 13 | CE            | N  | CD | PD | CE |
| 14 | PD            | N  | N  | PD | N  |
| 15 | N             | N  | PD | CD | CE |
| 16 | N             | PD | N  | N  | CE |
| 17 | N             | N  | N  | N  | N  |

**EE 0.05 mg/kg/day**

|    | months of age |    |    |    |    |
|----|---------------|----|----|----|----|
|    | 3             | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1  | N             | N  | PD | CD | CE |
| 2  | N             | N  | N  | N  | CE |
| 3  | CD            | PD | PD | CD | CE |
| 4  | CD            | CD | CD | CD | CE |
| 5  | N             | N  | N  | N  | CE |
| 6  | N             | N  | N  | N  | CD |
| 7  | PD            | N  | PD | CD | CD |
| 8  | N             | CD | CD | PD | CD |
| 9  | N             | N  | PE | CD | CD |
| 10 | N             | N  | CD | CD | PD |
| 11 | PD            | CD | PE | CE | CE |
| 12 | N             | CD | CD | CD | PE |
| 13 | N             | N  | N  | CD | CE |
| 14 | N             | N  | N  | PE | CE |
| 15 | N             | N  | N  | PD | CE |
| 16 | N             | N  | CD | PD | CE |
| 17 | PD            | PD | CD | CD | CD |
| 18 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 19 | N             | N  | N  | N  | N  |
| 20 | N             | N  | N  | PD | N  |
| 21 | N             | CD | N  | CD | CD |
| 22 | CD            | N  | CD | PD | CD |

PD, persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)

CD, constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)

PE, persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)

CE, constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)

One animal with nephroblastoma in the BPA 400 mg/kg group was excluded.

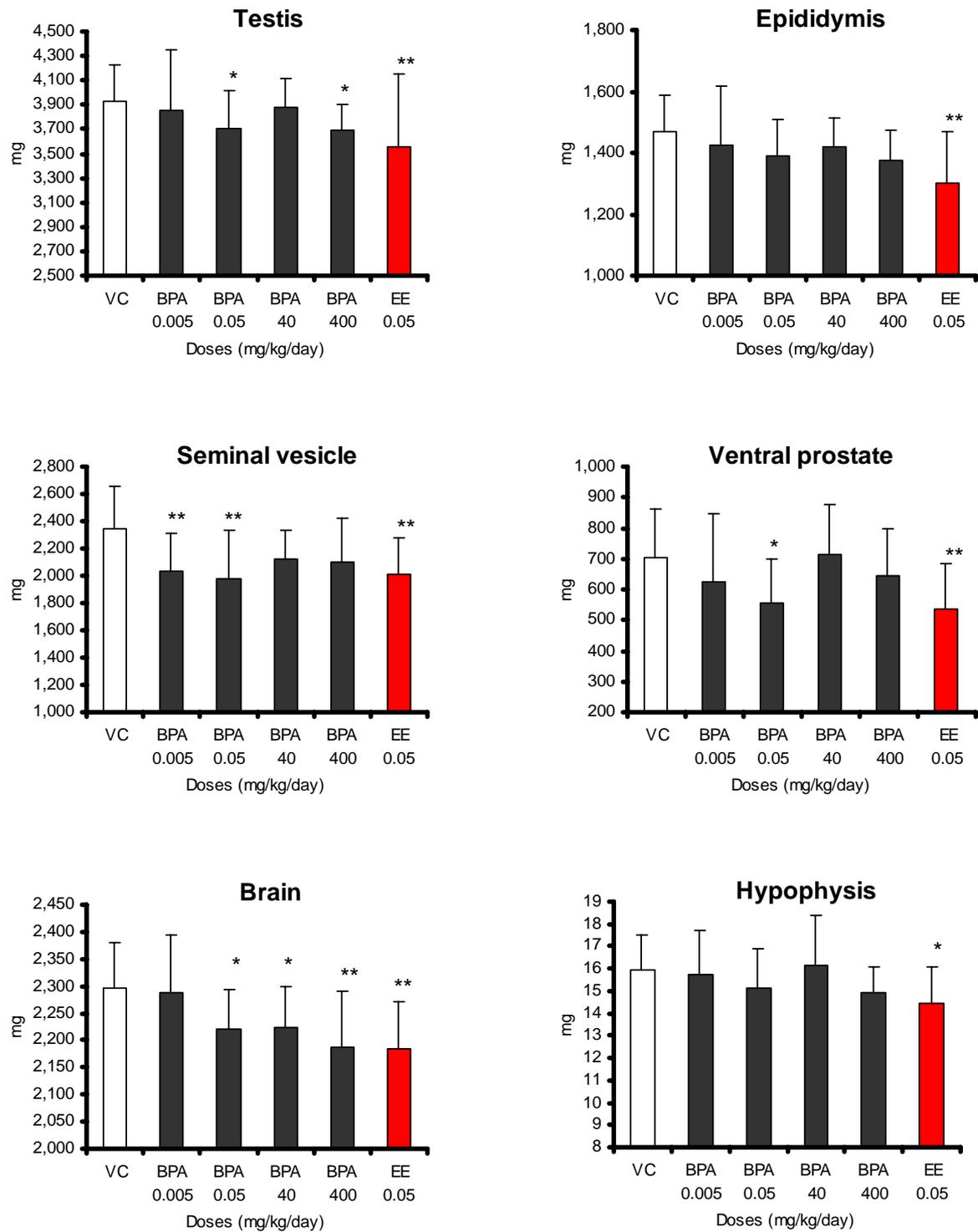


Fig. 10-1. Absolute organ weights of male rats on 7 months of age.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

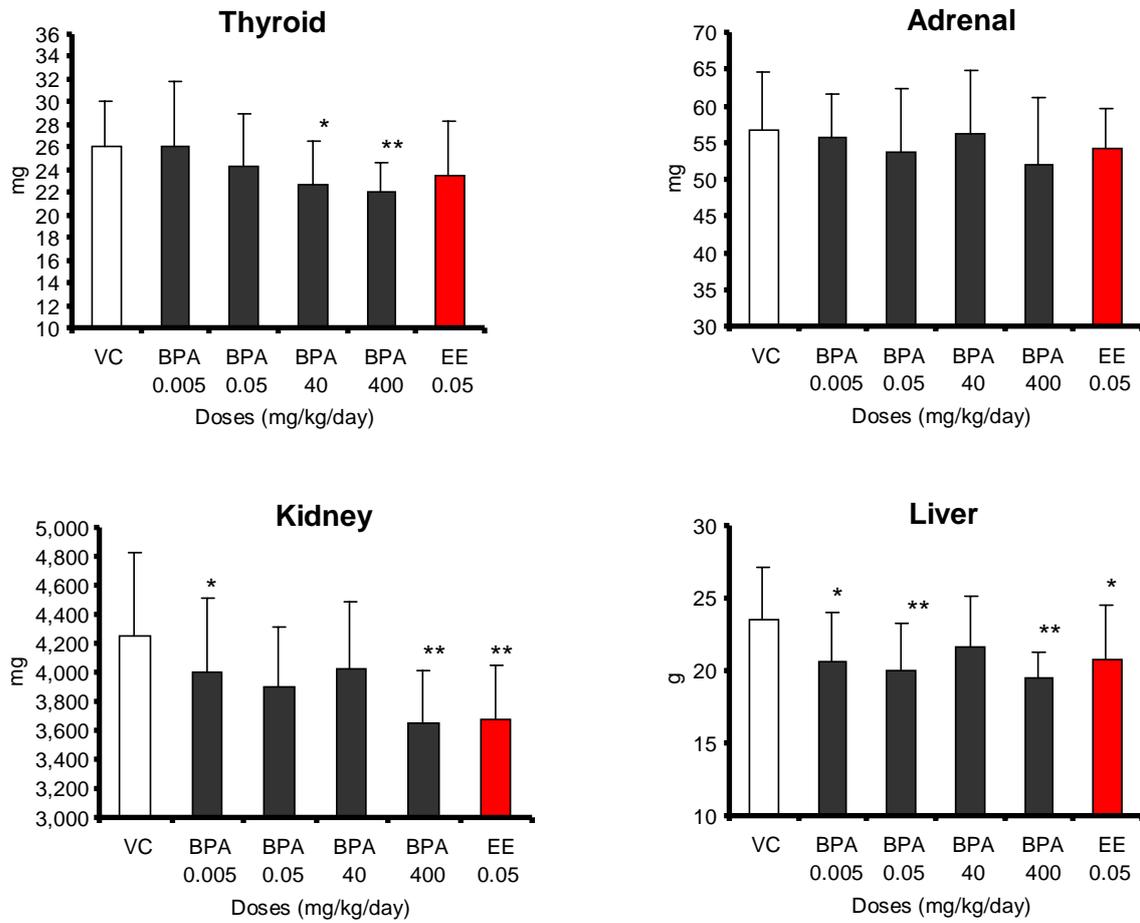


Fig. 10-2. Absolute organ weights of male rats on 7 months of age.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

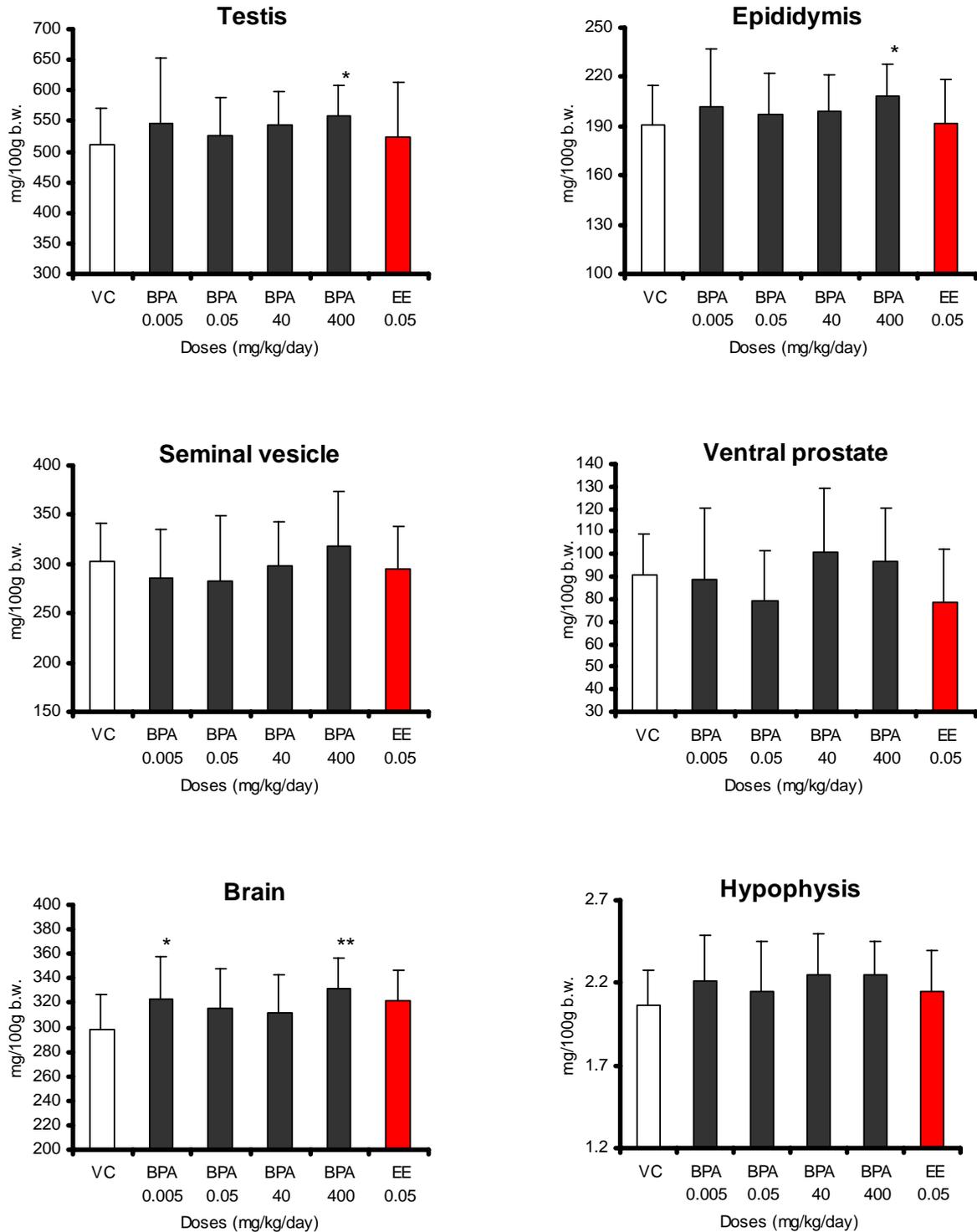


Fig. 11-1. Relative organ weights of male rats on 7 months of age.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

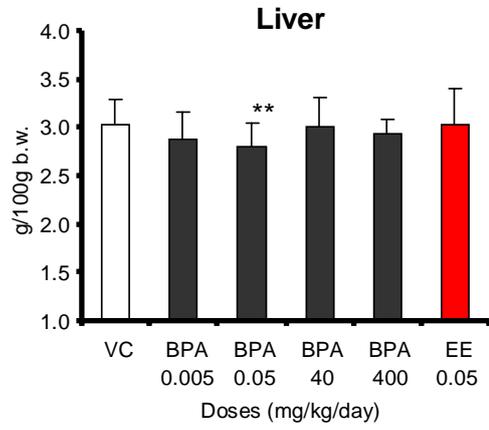
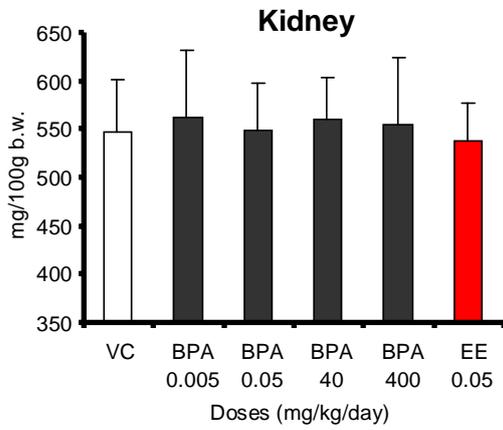
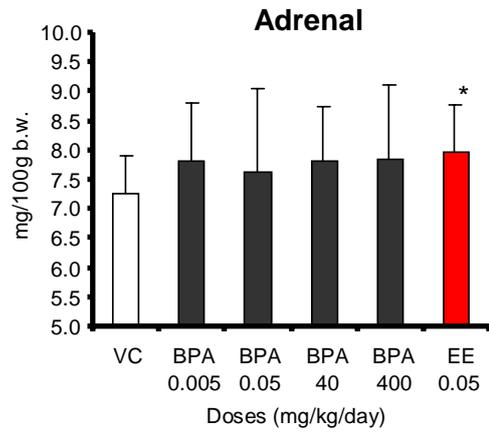
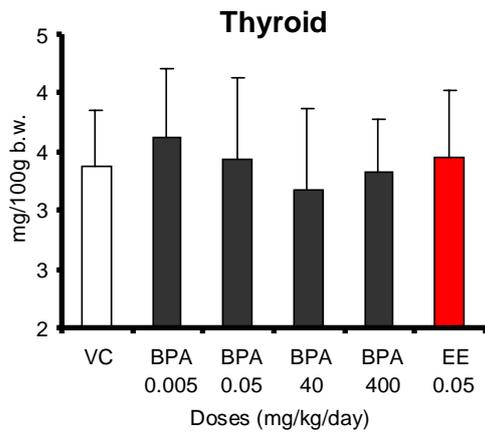


Fig. 11-2. Relative organ weights of male rats on 7 months of age.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

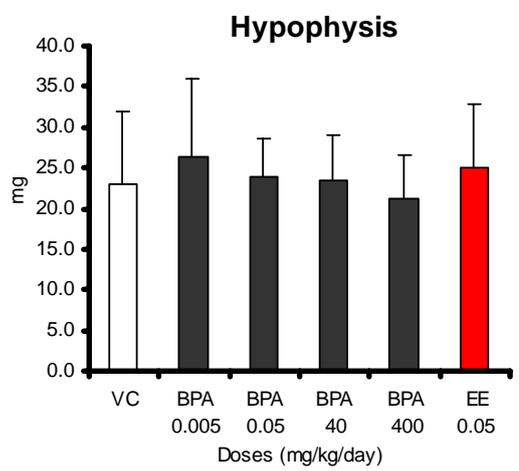
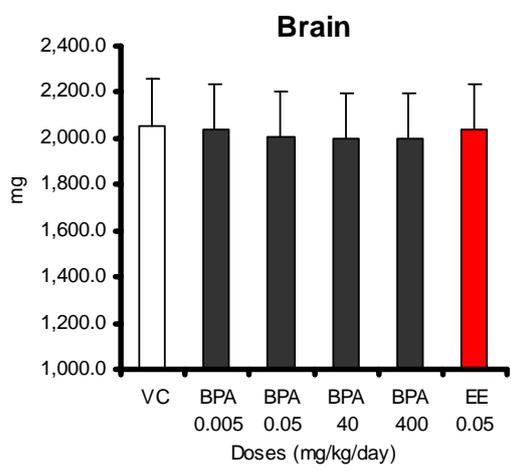
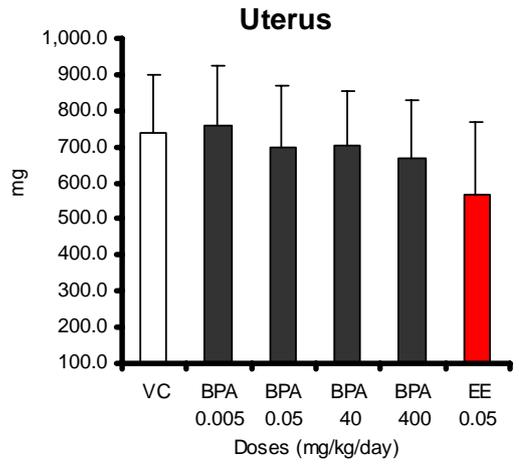
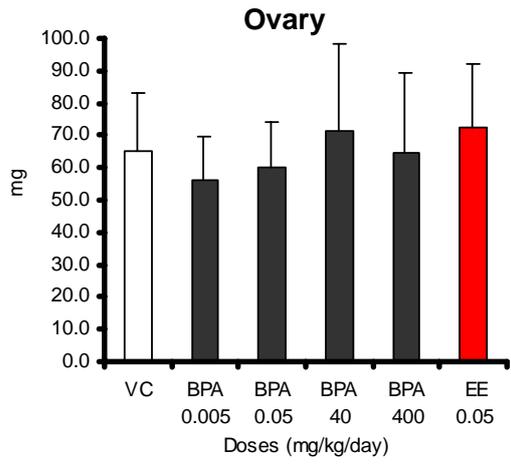


Fig. 12-1. Absolute organ weights of female rats on 7 months of age.

Not significant.

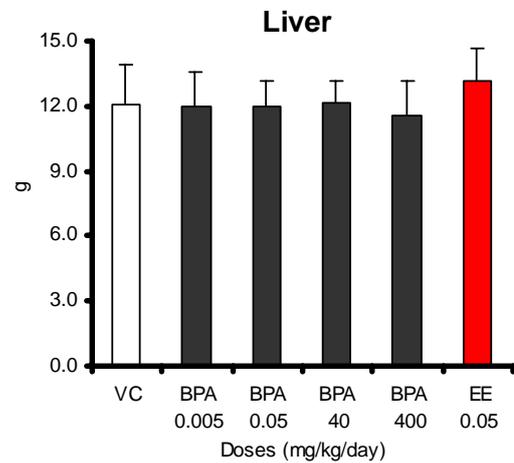
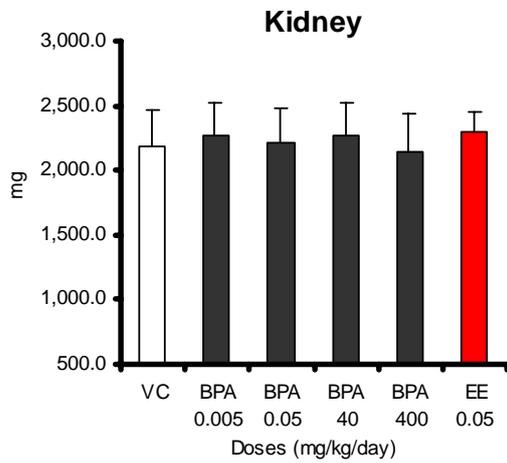
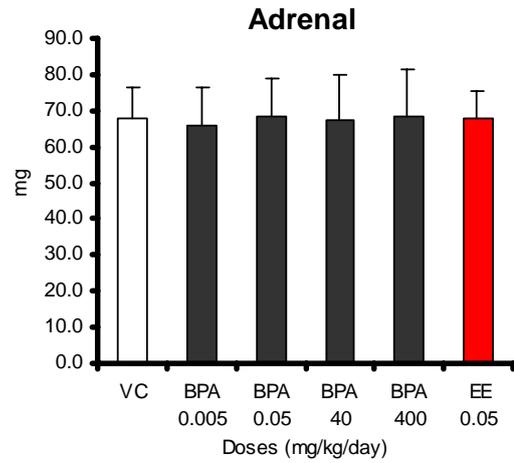
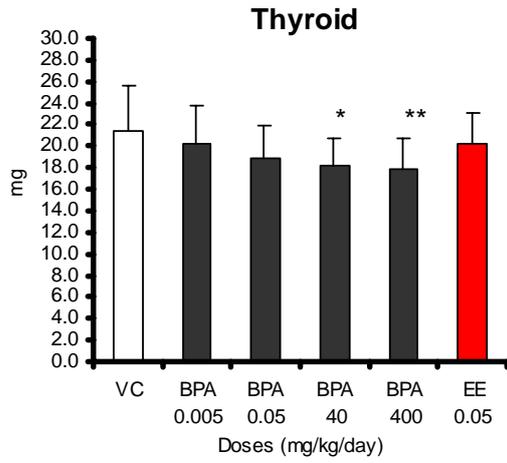


Fig. 12-2. Absolute organ weights of female rats on 7 months of age.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

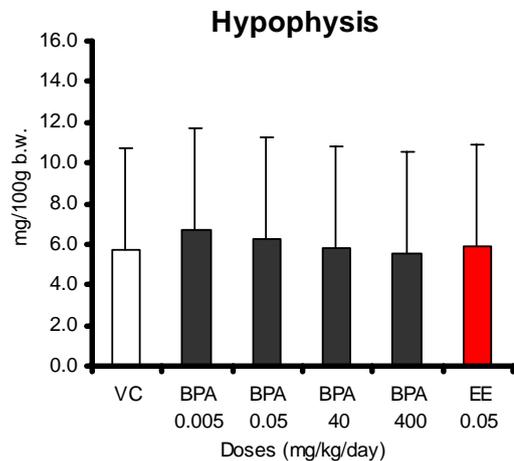
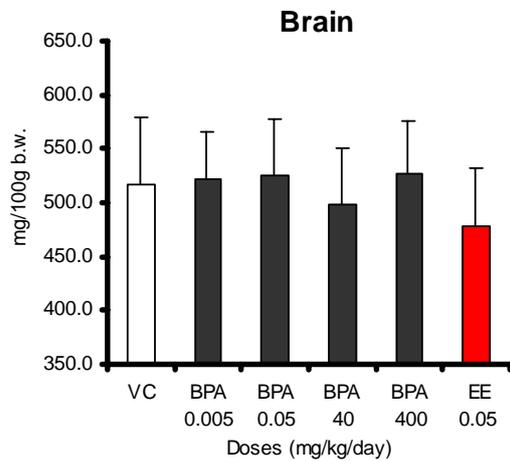
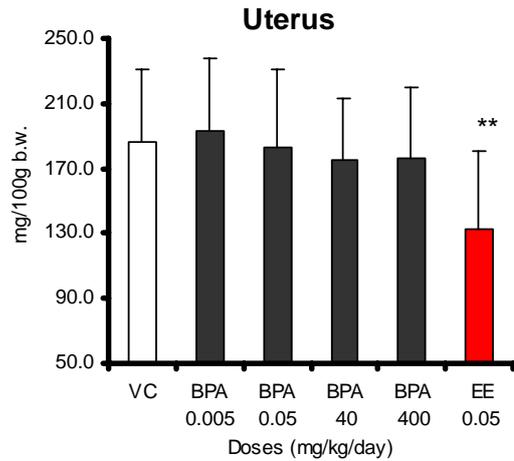
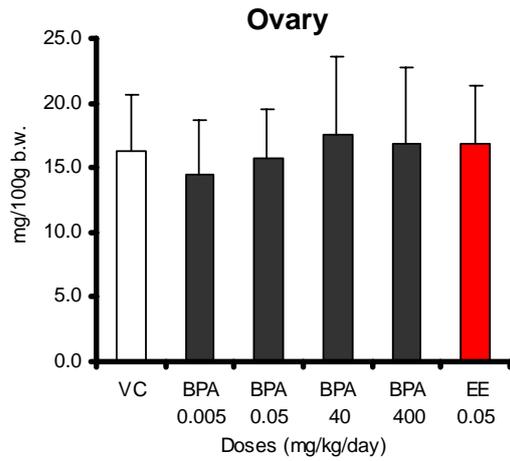


Fig. 13-1. Relative organ weights of female rats on 7 months of age.

\*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)

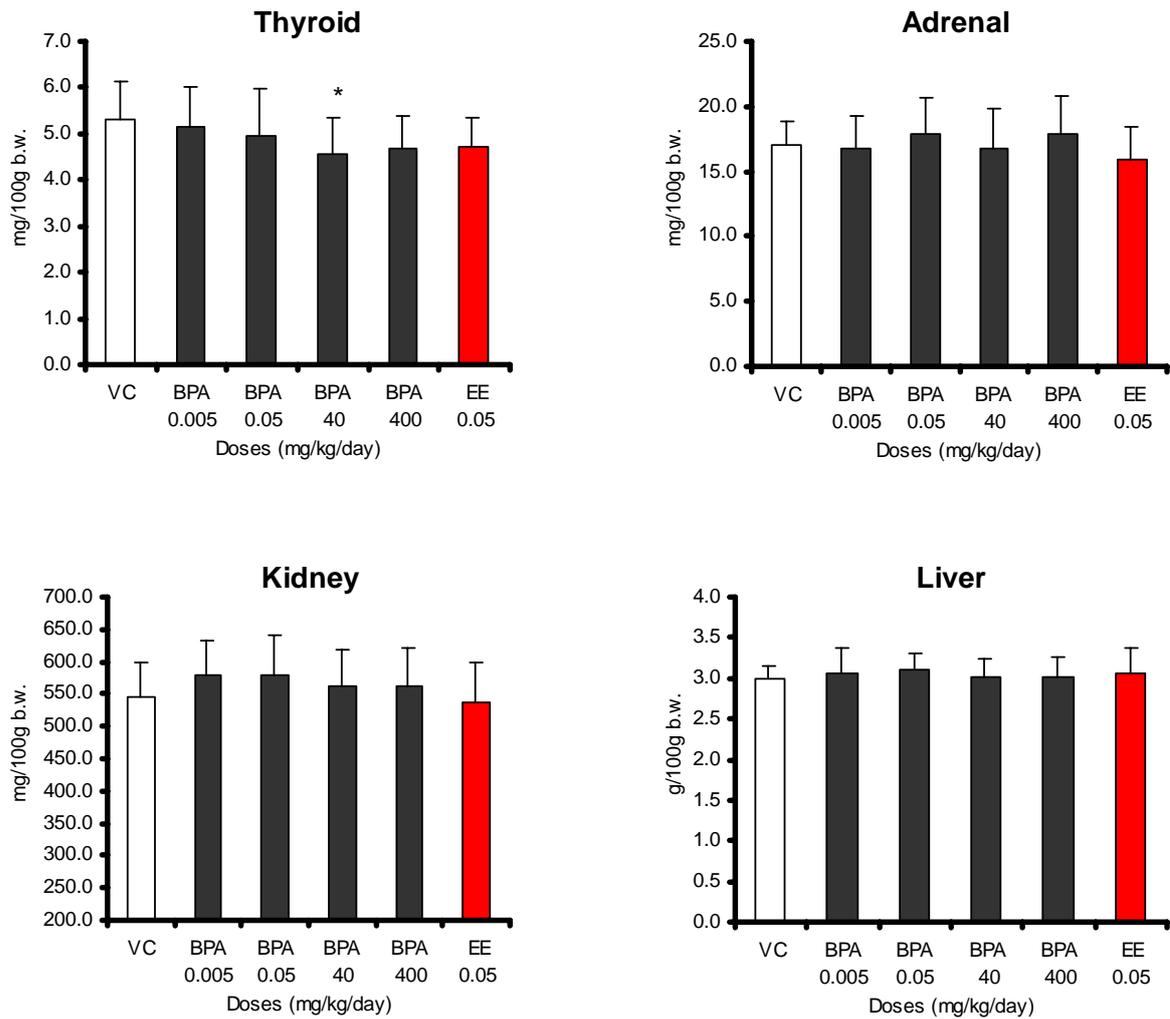


Fig. 13-2. Relative organ weights of female rats on 7 months of age.

\* $p < 0.05$  (Dunnett's test)

Table 5-1から5-4追加

Table 5-1 Summary of histopathological examinations

| Findings                     | Grade | Male              |                 | Female |      |      |       |      |                   |       |
|------------------------------|-------|-------------------|-----------------|--------|------|------|-------|------|-------------------|-------|
|                              |       | 0.005             | Vehicle control | 0.005  | 0.05 | 40   | 400   | EE   | (mg/kg/day)       |       |
|                              |       | ia                | ta              | ta     | ia   | ta   | ta    | ta   | ia                | ta    |
|                              |       | 1 <sup>a)</sup>   | 16              | 19     | 1    | 19   | 24    | 17   | 1                 | 22    |
| <b>Lung</b>                  |       |                   |                 |        |      |      |       |      |                   |       |
| No abnormalities detected    |       | 0/1 <sup>b)</sup> | —               | —      | —    | —    | —     | —    | 0/1               | —     |
| Nephroblastoma               |       | 1/1 <sup>c)</sup> | —               | —      | —    | —    | —     | —    | 1/1 <sup>c)</sup> | —     |
| <b>Kidney</b>                |       |                   |                 |        |      |      |       |      |                   |       |
| No abnormalities detected    |       | 0/1               | —               | —      | —    | —    | —     | —    | 0/1               | —     |
| Nephroblastoma               |       | 1/1               | —               | —      | —    | —    | —     | —    | 1/1               | —     |
| <b>Testis</b>                |       |                   |                 |        |      |      |       |      |                   |       |
| No abnormalities detected    |       | 1/1               |                 |        |      |      |       |      |                   |       |
| <b>Ovary</b>                 |       |                   |                 |        |      |      |       |      |                   |       |
| No abnormalities detected    |       |                   | 8/16            | 7/19   | 1/1  | 8/19 | 11/24 | 7/17 | 0/1               | 10/22 |
|                              | +     |                   | 2/16            | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 0/24  | 0/17 | 0/1               | 1/22  |
| Decreased corpora lutea      | ++    |                   | 1/16            | 1/19   | 0/1  | 6/19 | 2/24  | 0/17 | 0/1               | 1/22  |
|                              | +++   |                   | 3/16            | 9/19   | 0/1  | 3/19 | 9/24  | 9/17 | 0/1               | 9/22  |
| Hemorrhage                   | +     |                   | 0/16            | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 0/24  | 1/17 | 0/1               | 0/22  |
|                              | +     |                   | 4/16            | 1/19   | 0/1  | 3/19 | 2/24  | 1/17 | 0/1               | 3/22  |
| Increased follicular atresia | ++    |                   | 4/16            | 10/19  | 0/1  | 8/19 | 11/24 | 9/17 | 0/1               | 9/22  |
|                              | +++   |                   | 0/16            | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 0/24  | 0/17 | 0/1               | 0/22  |
| Thecoma                      |       |                   | 0/16            | 1/19   | 0/1  | 0/19 | 0/24  | 0/17 | 0/1               | 0/22  |
| <b>Oviduct</b>               |       |                   |                 |        |      |      |       |      |                   |       |
| No abnormalities detected    |       |                   | —               | —      | —    | —    | 1/1   | —    | —                 | —     |

EE, Ethinyl estradiol 50 µg/kg/day.

ta, terminal autopsy; ia, interim autopsy.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

c) Multiple lung metastasis of nephroblastoma

, Not examined.

—

+, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 5-2 Summary of histopathological examinations

| Findings                                    | Grade | Male            |                     | Female |      |       |       |      |             |       |
|---|-------|-----------------|---------------------|--------|------|-------|-------|------|-------------|-------|
|   |       | 0.005           | Vehicle control     | 0.005  | 0.05 | 40    | 400   | EE   | (mg/kg/day) |       |
|   |       | ia              | ta                  | ta     | ia   | ta    | ta    | ia   | ta          |       |
|   |       | 1 <sup>a)</sup> | 16                  | 19     | 1    | 19    | 24    | 17   | 1           | 22    |
| <b>Uterus</b>                               |       |                 |                     |        |      |       |       |      |             |       |
| No abnormalities detected                   |       |                 | 12/16 <sup>b)</sup> | 11/19  | 1/1  | 12/19 | 15/24 | 9/17 | 0/1         | 16/22 |
| Atrophy                                     | +     |                 | 0/16                | 0/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/17 | 0/1         | 1/22  |
| Cyst formation                              | ++    |                 | 0/16                | 1/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/17 | 0/1         | 0/22  |
| Endometrial hyperplasia, papillary          | +     |                 | 0/16                | 1/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/17 | 0/1         | 0/22  |
| Squamous metaplasia of glandular epithelium | +     |                 | 0/16                | 0/19   | 0/1  | 0/19  | 2/24  | 1/17 | 0/1         | 2/22  |
|   | ++    |                 | 1/16                | 0/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 1/17 | 0/1         | 0/22  |
| Tall columnar glandular epithelial cells    | +     |                 | 0/16                | 1/19   | 0/1  | 1/19  | 0/24  | 3/17 | 0/1         | 0/22  |
| Tall columnar surface epithelial cells      | +     |                 | 3/16                | 7/19   | 0/1  | 7/19  | 9/24  | 8/17 | 0/1         | 4/22  |
|   | ++    |                 | 0/16                | 0/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 1/17 | 0/1         | 0/22  |

EE, Ethinyl estradiol 50 µg/kg/day.

ta, terminal autopsy; ia, interim autopsy.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

—, Not examined.

+, slight; ++, moderate.

Table 5-3 Summary of histopathological examinations

| Findings                   | Grade | Male            |                    | Female |      |      |       |      |             |       |
|----------------------------|-------|-----------------|--------------------|--------|------|------|-------|------|-------------|-------|
|                            |       | 0.005           | Vehicle control    | 0.005  | 0.05 | 40   | 400   | EE   | (mg/kg/day) |       |
|                            |       | ia              | ta                 | ta     | ia   | ta   | ta    | ia   | ta          |       |
|                            |       | 1 <sup>a)</sup> | 16                 | 19     | 1    | 19   | 24    | 17   | 1           | 22    |
| <b>Vagina</b>              |       |                 |                    |        |      |      |       |      |             |       |
| No abnormalities detected  |       |                 | 9/16 <sup>b)</sup> | 9/19   | 1/1  | 9/19 | 12/24 | 8/17 | 0/1         | 3/22  |
| Hyperplasia of epithelium  | +     |                 | 5/16               | 9/19   | 0/1  | 6/19 | 9/24  | 8/17 | 0/1         | 10/22 |
|                            | ±     |                 | 2/16               | 0/19   | 0/1  | 1/19 | 1/24  | 1/17 | 0/1         | 3/22  |
| Mucification of epithelium | +     |                 | 2/16               | 0/19   | 0/1  | 4/19 | 2/24  | 2/17 | 0/1         | 6/22  |
|                            | ++    |                 | 1/16               | 1/19   | 0/1  | 1/19 | 3/24  | 0/17 | 0/1         | 4/22  |
|                            | +++   |                 | 0/16               | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 0/24  | 0/17 | 0/1         | 1/22  |
| Polyp                      | +     |                 | 0/16               | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 1/24  | 0/17 | 0/1         | 0/22  |
| Squamous epithelial cyst   | +     |                 | 0/16               | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 1/24  | 0/17 | 0/1         | 0/22  |
| Vaginitis                  | +     |                 | 0/16               | 0/19   | 0/1  | 0/19 | 0/24  | 0/17 | 1/1         | 0/22  |

EE, Ethinyl estradiol 50 µg/kg/day.

ta, terminal autopsy; ia, interim autopsy.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

—, Not examined.

±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

Table 5-4 Summary of histopathological examinations

| Findings                             | Grade | Male            |                     | Female |      |       |       |       |             |       |
|--------------------------------------|-------|-----------------|---------------------|--------|------|-------|-------|-------|-------------|-------|
|                                      |       | 0.005           | Vehicle control     | 0.005  | 0.05 | 40    | 400   | EE    | (mg/kg/day) |       |
|                                      |       | ia              | ta                  | ta     | ia   | ta    | ta    | ia    | ta          |       |
|                                      |       | 1 <sup>a)</sup> | 16                  | 19     | 1    | 19    | 24    | 17    | 1           | 22    |
| <b>Pituitary gland</b>               |       |                 |                     |        |      |       |       |       |             |       |
| No abnormalities detected            |       | —               | 15/16 <sup>b)</sup> | 16/19  | 1/1  | 18/19 | 23/24 | 16/17 | 0/1         | 21/22 |
| Adenoma                              |       | —               | 0/16                | 1/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/18  | 0/1         | 0/22  |
| Diffuse hyperplasia in pars distalis | +     | —               | 1/16                | 0/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/18  | 0/1         | 1/22  |
| Focal hyperplasia in pars distalis   | +     | —               | 0/16                | 2/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/18  | 0/1         | 0/22  |
| Hemorrhage                           | +     | —               | 0/16                | 0/19   | 0/1  | 1/19  | 1/24  | 0/18  | 0/1         | 0/22  |
| Rathke's pouch remnant               | +     | —               | 0/16                | 0/19   | 0/1  | 0/19  | 0/24  | 0/18  | 1/1         | 0/22  |
| <b>Mammary gland</b>                 |       |                 |                     |        |      |       |       |       |             |       |
| No abnormalities detected            |       | —               | —                   | —      | 0/1  | 0/1   | —     | —     | —           | —     |
| Adenocarcinoma                       |       | —               | —                   | —      | 1/1  | 0/1   | —     | —     | —           | —     |
| Fibroadenoma                         |       | —               | —                   | —      | 0/1  | 1/1   | —     | —     | —           | —     |

EE, Ethinyl estradiol 50 µg/kg/day.

ta, terminal autopsy; ia, interim autopsy.

a) Number of animals autopsied.

b) Number of animals affected / Number of animals examined.

—, Not examined.

+, slight.