

ビスフェノール A のラット及びマウスの精巣及び雄性副生殖器に対する毒性 (I) - 用量相関及び種差・系統差 -

高橋 省*, 田中 豊人*, 大石 眞之*, 長井 二三子*, 長澤 明道*,
湯澤 勝広*, 高橋 博*, 矢野 範男*, 久保 喜一*, 安藤 弘*,
小縣 昭夫*, 上村 尚*, 加納 いつ*

Toxicity of Bisphenol A on Testis and Male Accessory Organs in Rats and Mice (I) - Dose-Response Relationship and Species Differences -

Osamu Takahashi*, Toyohito Tanaka*, Shinshi Oishi*, Fumiko Nagai*, Akemichi Nagasawa*,
Katsuhiko Yuzawa*, Hiroshi Takahashi*, Norio Yano*, Yoshikazu Kubo*, Hiroshi Ando*,
Akio Ogata*, Hisashi Kamimura* and Itsu Kano*

Keywords : ビスフェノール A bisphenol A, 精巣 testis, 雄性副生殖器 male accessory organs, ラット rat, マウス mouse, 毒性 toxicity, 種差 species differences, 内分泌攪乱物質 endocrine disruptors

緒 言

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネート樹脂及びエポキシ樹脂等の原材料であるが、環境ホルモン作用が認められたため、食器等からの溶出が問題になった。東京都では、給食用ポリカーボネート製食器及びびんからの BPA の溶出実態調査を行い、東京都内分泌かく乱化学物質専門家会議に報告した^{1,2)}。つまりその溶出量は最高で約 200 ppb で、日本における許容基準 2.5 ppm 以下であった¹⁻⁷⁾。また、BPA は水道水及び河川水にも 1.4 ppb 以下の量が検出されている^{2,8,9)}。

BPA のエストロゲン作用は *in vitro* 及び *in vivo* の系で再確認されていて^{10,11)}、その活性はエストラジオール(E2) やジエチルスチルベストロール(DES)の 1,000 分の 1 から 1,000,000 分の 1 である。

BPA に発癌性、催奇形性は認められず、上記のように弱いエストロゲン作用しか有しないが、vom Saal ら^{12,13)}により、母マウスの妊娠期間中に 2 µg/kg/day という極低用量の BPA を経口投与すると、生まれた雄マウスの生殖能力が異常になるという報告もあった。BPA の極微量の毒性は、用量に比例した用量反応関係を有せず、再現性も有しない^{14,15)}。

米国毒性計画(NTP)及び環境科学研究所(NIEHS)は専門家による会議を開き、内分泌攪乱物質の低用量問題に関する報告書を出した¹⁶⁾。その BPA に関する小委員会は「BPA が低用量で作用する可能性はある」と結論したが、その根拠は Ben-Jonathan ら^{17,18)} が報告した 5 mg/kg/day 前後を最小用量とする通常の用量反応関係を有する血清プロラクチン濃度上昇作用及び子宮への組織学的影響であり、vom Saal らの報告ではない。従ってこの低用量は 5

mg/kg/day を指している。

以上のように BPA の動物への主な影響は、子宮重量増加作用及び雄生殖器への作用の二つであるが、子宮重量増加が性周期に伴う生理的反応とも考えられるのに反し、雄生殖器への器質的影響は明らかに毒性と考えられる。低用量の経胎盤曝露による作用の信憑性は後にして、BPA を離乳期から成熟期まで投与した場合においても雄生殖器に対し毒性を有するか否か、を確認する必要があると考えた。本報告は比較的大量の BPA を雄 F344 ラットに投与して生殖毒性の有無を確認し、さらにラット 2 系統及びマウス 2 系統を用いて種差・系統差の検討を行った結果をまとめたものである。

材料と方法

投与物質 東京化成試薬一級、2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン、通称ビスフェノール A (BPA)を購入し使用した。ロット番号は GH01 で、純度はガスクロマトグラフィで 99.0% 以上である。

動物及び飼料 使用した雄ラットは、Fischer (F344/DuCrj), Crj:Wistar 及び HsdHot:Holtzman SD 系で、それぞれ日本 Charles River 及び Harlan Sprague-Dawley から 4 週齢で購入し直ちに投与を開始した。また雄マウスは Crj:CD-1(ICR)及び C57BL/6CrSlc 系でそれぞれ日本 Charles River 及び日本エスエルシーより購入した。飼料は日本クレアの CE-2 を使用した。

実験計画 実験 1 . F344 ラットに対する BPA の精巣毒性の用量反応関係 ラット(4 週齢)を 8 匹ずつ 4 群に分け、BPA を 0, 0.25, 0.5, 1.0% 含む飼料を 44 日間与えた。投与期間中は体重測定、飼料摂取量測定、症状観察を行った。

* 東京都健康安全研究センター環境保健部薬理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

投与終了後、採血解剖し、精巢、精巢上体、前立腺、精囊、包皮腺等の重量を測定した。精巢はホルマリン固定しパラフィン包埋後、組織切片を作製しヘマトキシリン-エオジン染色し、病理組織学的検査を行った。

実験2. ラット及びマウスに対する種差及び系統差 4週齢のCrj:Wistar系, HsdHot:Holtzman SD系のラット及びCrj:CD-1(ICR)系, C57BL/6CrSlc系のマウスをおのおの8匹ずつ2群に分け、BPAを0, 0.25%含む飼料を2ヶ月間与えた。症状観察及び解剖後の処理は実験1に準じた。

病理組織学的検査 F344 ラットについては以下の所見をグレードを付して計数した。すなわち、精細管萎縮は3等級とし、+は小型精細管が多い、2+は全精細管が明らかに小型、3+は全精細管が非常に小さいもの。精子形成低下について、+は多くの精細管内に精子細胞が少ない、2+は精子形成が明らかに減少している場合、3+は精子細胞が全く見られないもの。またステップ19精子細胞減少については、+が約10%以下の減少、2+が明らかな減少、3+が90%以上の減少である。ステージI-VIにおける線状精子細胞の配列の乱れについては、わずかなもの(+と、明瞭で全体に及ぶもの(2+)とした。Crj:Wistar系, HsdHot:Holtzman SD系のラット及びCrj:CD-1(ICR)系, C57BL/6CrSlc系のマウスについては、投与による大きな影響が認められなかったため、煩雑になるのでグレード等の説明を省く。精子形成の4ステージ(I-VI, VII-VIII, IX-XI, XII-XIV)について、その精細管の数をF344ラットは全30個、その他は100個について計数し、全体に対するパーセントで示した。ラットの組織病理学的観察は伊東ら¹⁹⁾に従った。マウスの精子形成の4ステージ(I-VI, VII-VIII, IX-X, XI-XII)も100個について計数した。マウスの組織病理学的観察はRadovskyら²⁰⁾に従った。

一日精子生産量(DSP)及び精巢上体精子保有量(ESR)の測定 精巢内精子量及びDSPはRobbら²¹⁾の方法を一部改変し測定した。すなわち-80°Cで保存しておいたラット、マウスの精巢を10から20mlのTriton X-100を0.05%含む生理食塩水と一緒にポリトロン型ホモジュナイザーで破碎後、同溶液で希釈しトリパンブルーで染色後、線形精子細胞の核の数を血球計算盤上で計測した。DSPは精巢1個当たりの計測数(精巢内精子量)をステップ17から19精子細胞経過日数の6.3日あるいは6.1日(それぞれHoltzman系, Wistar系)で割って求めた^{21,22)}。マウスの場合はステップ14から16精子細胞経過日数4.8日を使った^{23,24)}。ESRは上記精巢内精子量と同様の方法により測定した。

血清テストステロン(T)濃度の測定 血清T濃度はエンザイムイムノアッセイキット(Oxford Biomedical Research Inc.)を用いて測定した。

統計処理 計量値は平均値に標準偏差を付して表現した。有意差検定はStudentのt検定、Dunnett検定などを使用した²⁵⁾。病理検査はカイ二乗検定、Mantel-Haenzel検定、Fisher直接確率検定などを行った。有意水準はP<0.05とした。

した。

結 果

F344 ラットに対する BPA の精巢毒性の用量反応関係

1.0及び0.5%BPA摂取群において体重増加率が有意に低下し、最終体重は対照群のそれぞれ82及び87%であった(表1)。飼料摂取量から計算したBPA摂取量は0.25, 0.5及び1.0%群でそれぞれ235, 466及び950 mg/kg/dayであった。器官重量は精巢上体、精囊(凝固腺を含む)、側背葉前立腺、包皮腺、脳下垂体の絶対重量が投与群で用量依存的に減少した(表1)。これらのうち相対重量でも用量依存的減少を認めたものは精巢上体、精囊、側背葉前立腺、包皮腺の4器官である(表1)。精巢傷害はあまり重篤なものではないが、0.5%以上の群において精細管の径が短くなる精細管萎縮が観察された(表2, 写真1)。また投与群において後期精子細胞の減少、配列の乱れ、精子形成低下が認められた。精子形成の4ステージに属する精細管の割合は投与群において、ステージI-VIの精細管の減少、ステージIX-XI及びXII-XIVの増加が認められた(表3)。血清T濃度の平均値は、対照群、0.25, 0.5及び1.0%BPA投与群において2.01, 4.19, 2.81及び2.94 ng/mlであり0.25%群が対照群に対しDunnett検定で、有意に高かった。

表1. F344 ラットの体重及び器官重量 (N=8)

	対照群	BPA 0.25%	BPA 0.5%	BPA 1.0%
終体重 (g)	202.9±14.5	191.9±15.3	176.0±12.7*	166.6±19.0*
器官重量 (絶対重量)				
精巢 (g)	2.16±0.23	2.04±0.43	1.82±0.52	1.78±0.45
精巢上体 (mg)	377±141	307±121	253±99*	235±72*
精囊及び凝固腺 (mg)	360±119	316±174	218±95	190±60*
腹葉前立腺 (mg)	348±228	372±114	307±80	306±94
側背葉前立腺 (mg)	165±63	144±16	109±24	90.4±17.0*
包皮腺 (mg)	214±47	159±41*	138±26*	132±34*
脳下垂体 (mg)	7.3±0.8	6.7±1.0	6.4±0.6	6.1±0.7*
器官重量 (体重100g当たりの相対重量)				
精巢 (g)	1.06±0.07	1.05±0.16	1.02±0.24	1.05±0.17
精巢上体 (mg)	183±57	158±54	142±54	139±30
精囊及び凝固腺 (mg)	175±46	161±83	122±49	112±26
腹葉前立腺 (mg)	171±112	197±69	175±47	183±48
側背葉前立腺 (mg)	80.2±26.3	75.1±5.3	61.7±9.9	54.3±8.3*
包皮腺 (mg)	105±17	82.2±15.8*	78.1±10.0*	78.6±15.2*
脳下垂体 (mg)	3.6±0.2	3.5±0.3	3.6±0.2	3.7±0.2

*Dunnett 検定において有意。

表2. F344 ラット精細管の病理組織学的所見 (N=8)

	グ レ ード	対照群	BPA 0.25%	BPA 0.5%	BPA 1.0%
精細管萎縮 †					
	+	0	3	0	1
	2+	0	0	6*	5*
	3+	0	0	0	1
精子形成低下 †					
	+	0	2	3	2
	2+	0	0	1	4*
	3+	0	0	1	1
ステップ19 精子細胞減少 †					
	+	0	2	1	0
	2+	0	0	1	1
	3+	0	1	2	2
ステージI-VI 線状精子細胞の配列乱れ †					
	+	0	4*	1	1
	2+	0	1	1	6*

* Fisher 直接確率検定有意。

† カイ二乗検定有意。

‡ Mantel-Haenzel 検定有意。

ラット及びマウスに対する種差及び系統差

Wistar系及びHoltzman系ラットにBPAを経飼料的に0.25%の濃度で与えた場合(平均BPA摂取量はそれぞれ204, 226 mg/kg/day)、終体重、器官重量、剖検所見におい

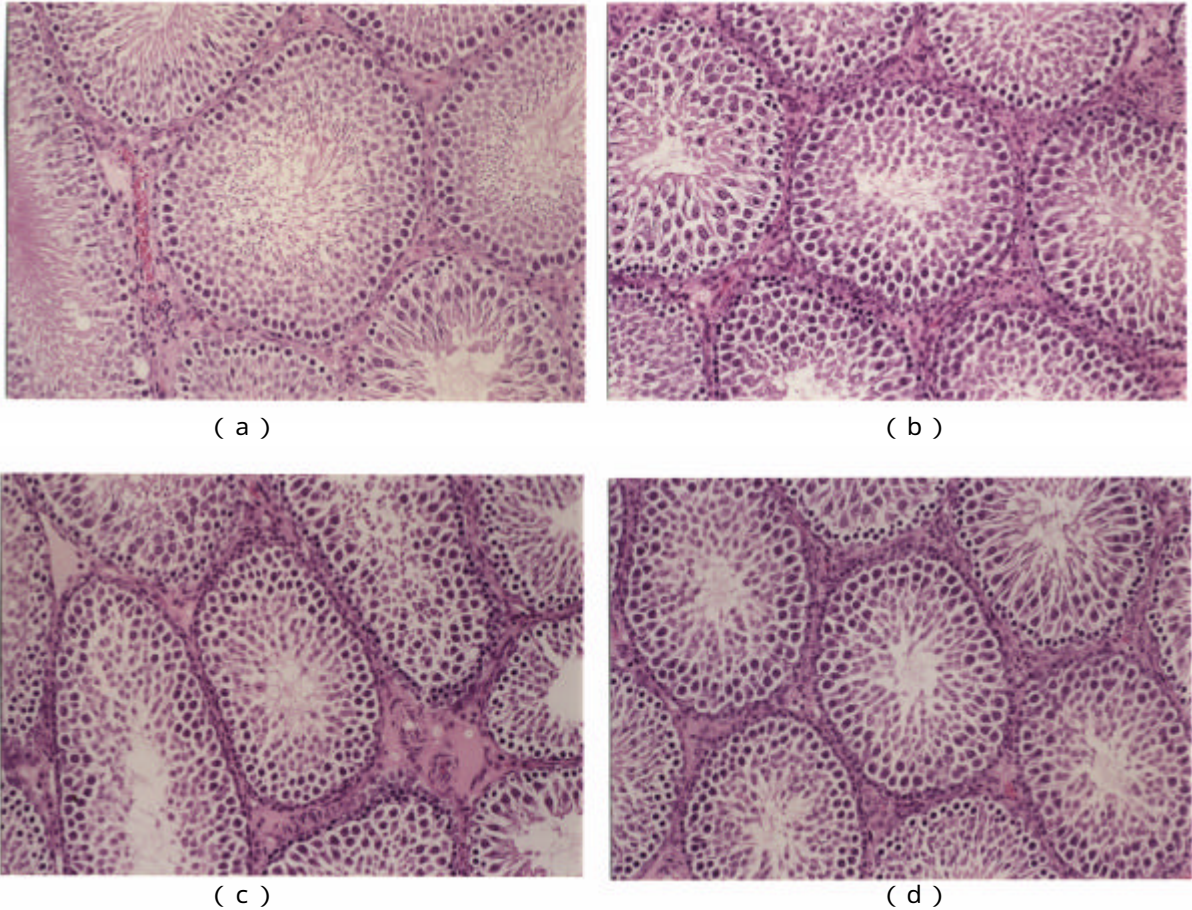


写真 1 . ビスフェノールA (BPA) を経口摂取したラットの精巣頭微鏡写真
(ヘマトキシリン - エオジン染色, 50 倍)

(a) 対象群, (b) 0.25% BPA 投与群, (c) 0.5% BPA 投与群, (d) 1.0% BPA 投与群

て投与の影響は認められなかった (表 4) . 精巣の組織病理所見においても明瞭な変化は認められず (表 5) , 精子形成の 4 ステージ に属する精細管の割合も明瞭な変化はなかった (表 6) . DSP, ESR, 血清 T 濃度にも有意差はなかった (表 7) . マウスにおいても (平均 BPA 摂取量は C57BL/6 系, ICR 系でそれぞれ 400, 396 mg/kg/day) , 精巣重量の軽度増加, 精巣上体重量の減少などが見られるものの, 器官重量, 精巣の病理組織所見, 精子形成の 4 ステージ に属する精細管の割合, DSP, ESR 及び血清 T 濃度等全体的にみて目立った変化は認められなかった (表 8-11) .

表 3 . F344 ラット精細管の精子形成ステージの割合
(N = 8)

ステージ	対照群	BPA 0.25%	BPA 0.5%	BPA 1.0%
I-VI	56.3±10.6	23.0±13.7*	16.7±11.4*	26.2±15.9*
VII-VIII	26.7±6.4	20.9±12.2	12.9±8.8	15.8±11.7
IX-XI	6.7±3.1	23.0±18.8*	34.6±29.4*	26.5±21.7*
XII-XIV	10.4±7.0	33.2±13.0*	37.1±16.7*	30.7±6.1*

*Dunnett 検定有意.

考 察

BPA の雄に対する生殖毒性の有無を確認するため比較的大量の BPA を投与してその効果を見た. F344 系ラットの BPA 投与群で精巣上体, 精囊, 側背葉前立腺, 包皮腺の絶対重量及び相対重量が用量依存的に減少し, 精細管萎縮等の組織変化が観察された. 精細管のステージバランスも変化した. 以上の結果より, BPA は雄ラットに対し生殖毒性を有することが示唆された. 用量反応関係から, F344 ラットに対する最小毒性量は 200 mg/kg/day 前後と推定される. E2 を経飼料的にラットに与えた場合, BPA と類似の生殖毒性が認められ, 700 µg/kg/day 以上で用量依存的に精巣及び精巣上体重量, DSP, 血清 T 濃度を低下させる²⁶⁾ので, BPA の効力は E2 の 1,000 から 10,000 分の 1 と考えられる. 雄ラットに対する生殖毒性が BPA と E2 で類似の上, BPA のエストロゲン作用は in vitro 及び in vivo の系で再確認されていて^{10,11)}, その活性はエストラジオール (E2) やジエチルstilbestロール (DES) の 1,000 分の 1 から 1,000,000 分の 1 であるとされるので, BPA の雄生殖器への毒性はそのエストロゲン作用に基づくものであろうと考えられる.

表4. Wistar及びHoltzmanラットの体重及び器官重量 (N = 8)

	Wistar 対照群	Wistar 0.25% BPA	Holtzman 対照群	Holtzman 0.25% BPA
終体重 (g)	436.3±33.6	434.9±28.6	529.1±78.5	516.5±44.9
器官重量 (絶対重量)				
精巣 (g)	3.52±0.27	3.53±0.13	4.24±0.38	4.07±0.31
精巣上体 (g)	1.10±0.06	1.11±0.05	1.35±0.16	1.30±0.12
精囊及び凝固腺 (g)	1.30±0.17	1.36±0.22	—	—
腹葉前立腺 (mg)	615±125	575±94	—	—
側背葉前立腺 (mg)	149±58	143±66	—	—
包皮腺 (mg)	218±58	222±37	277±117	229±78
器官重量 (体重 100 g 当たりの相対重量)				
精巣 (mg)	809±70	814±56	810±84	789±42
精巣上体 (mg)	252±16	256±20	256±24	253±26
精囊及び凝固腺 (mg)	297±36	314±54	—	—
腹葉前立腺 (mg)	141±25	133±23	—	—
側背葉前立腺 (mg)	33.7±11.9	32.9±14.5	—	—
包皮腺 (mg)	50.5±14.1	51.2±8.7	51.8±19.0	44.6±14.1

—測定せず.

表5. Wistar及びHoltzmanラット精細管の病理組織学的所見 (N = 8)

	グ レ ー ド	Wistar 対照群	Wistar 0.25% BPA	Holtzman 対照群	Holtzman 0.25% BPA
精細管萎縮	±	0	4*†	3	6
空胞変性	+	0	0	1	2
剥離	+	0	0	1	0
脱落塊	2+	0	1	0	1†
巨細胞	±	0	0	1	2
ステージ VII-VIII 後期精子細胞減少	+	1	1	2	4
ステージ VII-VIII 後期精子細胞剥離	2+	0	0	1	2
後期精子細胞脱落塊	+	1	0	0	0
	2+	0	0	0	0

* Fisher 直接確率検定有意.

† カイ二乗検定有意.

‡ Mantel-Haenszel 検定有意.

表6. Wistar及びHoltzmanラット精細管の精子形成ステージの割合 (N = 8)

ステージ	Wistar 対照群	Wistar 0.25% BPA	Holtzman 対照群	Holtzman 0.25% BPA
I-VI	50.3±12.5	55.9±2.9	48.3±5.6	53.9±6.2
VII-VIII	26.0±4.5	29.8±6.0	30.6±3.4	28.0±2.3
IX-XI	8.4±1.4	4.8±2.5*	6.7±3.5	6.2±2.6
XII-XIV	11.5±2.3	9.5±3.4	14.4±4.2	11.9±5.7

* Student t 検定有意.

表7. Wistar及びHoltzmanラットにおける1日精子生産数 (DSP), 精巣上体精子貯蔵数 (ESR) 及び血清テストステロン濃度 (N = 8)

	Wistar 対照群	Wistar 0.25% BPA	Holtzman 対照群	Holtzman 0.25% BPA
DSP (x 10 ⁷)	3.62±1.06	3.72±0.58	4.76±1.14	5.11±0.76
精巣 1 g 当たりの DSP (x 10 ⁷)	1.89±0.30	2.17±0.36	2.28±0.59	2.54±0.31
頭部 ESR (x 10 ⁶)	1.68±0.18	1.87±0.31	2.57±0.37	2.54±0.35
尾部 ESR (x 10 ⁶)	2.54±0.31	2.74±0.57	2.82±0.89	3.17±0.52
精巣上体 1 g 当たりの頭部 ESR (x 10 ⁶)	5.33±0.50	5.79±0.96	6.39±1.41	6.96±1.12
精巣上体 1 g 当たりの尾部 ESR (x 10 ⁶)	11.30±1.41	12.75±1.80	10.81±2.13	12.00±1.20
血清テストステロン濃度 (ng/ml)	4.93±2.73	6.43±2.26	2.96±2.54	3.40±2.53

DSP=daily sperm production; ESR=epididymis seprn reserves.

次に、種差、系統差を知るために Wistar 系、Holtzman 系ラット、C57BL/6 系、ICR 系マウスに対する経飼料的 BPA の影響を検討したが、F344 系ラット以上の毒性は観察されなかった。従って前記 200 mg/kg/day 前後をもって雄生殖毒性に関する最小毒性量あるいは最大無作用量と見なすことが出来る。

表8. C57BL/6 及び CD(ICR)マウスの体重及び器官重量 (N = 8)

	C57BL/6 対照群	C57BL/6 0.25% BPA	CD(ICR) 対照群	CD(ICR) 0.25% BPA
終体重 (g)	28.8±1.1	29.0±2.5	39.5±4.1	39.6±3.6
器官重量 (絶対重量)				
精巣 (mg)	205±16	202±23	218±24	253±26*
精巣上体 (mg)	83.6±7.9	81.1±7.9	115±8	101±4*
精囊及び凝固腺 (mg)	302±33	306±25	325±29	329±65
前立腺 (mg)	28.7±5.1	33.5±6.2	33.1±8.6	28.5±4.8
包皮腺 (mg)	112±18	129±32	211±75	198±31
器官重量 (体重 100 g 当たりの相対重量)				
精巣 (mg)	714±60	699±80	558±80	643±89
精巣上体 (mg)	291±29	281±32	295±33	258±27*
精囊及び凝固腺 (mg)	1049±100	1058±64	830±106	838±177
前立腺 (mg)	99.6±16.2	116.1±21.1	83.9±19.6	72.5±13.7
包皮腺 (mg)	389±52	443±87	534±173	506±100

* Student t 検定有意.

表9. C57BL/6 及び CD(ICR)マウス精細管の病理組織学的所見 (N = 8)

	グ レ ー ド	C57BL/6 対照群	C57BL/6 0.25% BPA	CD(ICR) 対照群	CD(ICR) 0.25% BPA
空胞変性	+	4	1	8	7
剥離	2+	4	7	0	1
脱落塊	+	3	4	1	2
巨細胞	+	1	0	4	1
	2+	5	3	3	2
	2+	1	0	2	0

表10. C57BL/6 及び CD(ICR)マウス精細管の精子形成ステージの割合 (N = 8)

	C57BL/6 対照群	C57BL/6 0.25% BPA	CD(ICR) 対照群	CD(ICR) 0.25% BPA
I-VI	31.5±9.8	33.3±9.0	42.7±5.0	33.4±8.4*
VII-VIII	35.2±6.0	32.4±4.6	27.9±4.0	34.3±12.3
IX-X	17.1±5.2	16.6±8.0	15.5±4.9	14.8±2.9
XI-XII	16.1±7.2	16.3±4.2	13.9±4.1	17.4±6.8

* Student t 検定有意.

表11. C57BL/6 及び CD(ICR)マウスにおける1日精子生産数 (DSP), 精巣上体精子貯蔵数 (ESR) 及び血清テストステロン濃度 (N = 8)

	C57BL/6 対照群	C57BL/6 0.25% BPA	CD(ICR) 対照群	CD(ICR) 0.25% BPA
DSP (x 10 ⁶)	4.69±0.84	5.22±0.75	4.66±0.85	5.58±0.91
精巣 1 g 当たりの DSP (x 10 ⁶)	4.68±0.80	5.39±0.63	4.36±0.87	4.49±0.62
頭部 ESR (x 10 ⁶)	1.81±0.63	1.64±0.19	2.21±0.40	2.46±0.17
尾部 ESR (x 10 ⁶)	3.62±0.53	3.63±0.42	3.58±0.39	4.06±0.71
精巣上体 1 g 当たりの頭部 ESR (x 10 ⁶)	8.03±2.90	7.81±0.96	8.70±1.45	9.08±0.63
精巣上体 1 g 当たりの尾部 ESR (x 10 ⁶)	2.59±0.56	2.77±0.33	2.18±0.25	2.39±0.34
血清テストステロン濃度 (ng/ml)	12.98±13.93	19.28±12.94	13.34±12.45	24.54±17.26

DSP=daily sperm production; ESR=epididymis seprn reserves.

結 論

1. BPA は経飼料投与によりラットの精巣及び副生殖器官に対し生殖毒性を惹起する。この作用は BPA のエストロゲン作用に由来すると推定される。
2. BPA の雄に対する生殖毒性において、F344 系ラット以上に感受性の高い系統や種は存在しない。従って生殖毒性に関する最大無作用量は 200 mg/kg/day 前後と考えられる。

(本研究の一部は環境ホルモン学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月で発表した.)

文 献

- 1) 東京都：第1回東京都内分泌かく乱化学物質専門家会議の結果について，1998．
- 2) 東京都：第2回東京都内分泌かく乱化学物質専門家会議の結果について，1999．
- 3) 船山恵市，渡辺悠二，金子令子，他：東京衛研年報，**50**，202-207，1999．
- 4) 河村葉子，佐野比呂美，山田隆：食衛誌，**40**，158-165，1999．
- 5) Muntfort, K.A., Kelly, J., Jickells, S.M. *et al.*: *Food Addit. Contam.*, **14**，737-740，1997．
- 6) Howe, S.R. and Borodinsky, L.: *Food Addit. Contam.*, **15**，370-375，1998．
- 7) 日本食品衛生学会：食衛誌，44，J17-J148，2003．
- 8) 東京都：第3回東京都内分泌かく乱化学物質専門家会議の結果について，1999．
- 9) 環境庁：水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の実態概況調査（夏季）結果（速報）について，1998．
- 10) Yamasaki, K., Sawaki, M. and Takatsuki, M.: *Environ. Health Perspect.*, **108**，1147-1150，2000．
- 11) Gould, J.C., Leonard, L.S., Manes, S.C., *et al.*: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **142**，203-214，1998．
- 12) vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., *et al.*: *Toxicol. Ind. Health*, **14**，239-260，1998．
- 13) Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **105**，70-76，1997．
- 14) Ashby, J., Tinwell, H. and Haseman, J.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**，156-166，1999．
- 15) Cagen, S.Z., Waechter, J.M., Jr., Dimond, S.S., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **50**，36-44，1999．
- 16) National Institute of Environmental Health Sciences and National Toxicology Program: National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review, 2001.
- 17) Steinmetz, R., Brown, N.G., Allen, D.L., *et al.*: *Endocrinology*, **138**，1780-1786，1997．
- 18) Khurana, S., Ranmal, S. and Ben-Jonathan, N.: *Endocrinology*, **141**，4512-4517，2000．
- 19) 伊東信行：最新毒性病理学，219-229，1994，中山書店，東京．
- 20) Radovsky, A., Mitsumori, K. and Chapin, R.E.: Male reproductive tract. In Maronpot, R.R. (ed.), *Pathology of Mouse*，381-407，1999，Cache River Press，Vienna．
- 21) Robb, G.W., Amann, R.P. and Killian, G.J.: *J. Reprod. Fertil.*, **54**，103-107，1978．
- 22) Cooke, P.S., Hess, R.A., Porcelli, J. *et al.*: *Endocrinology*, **129**，244-248，1991．
- 23) Theobald, H.M. and Peterson, R.E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **145**，124-135，1997．
- 24) Lysiak, J.J., Turner, S.D., Nguyen, Q.A.T. *et al.*: *Biol. Reprod.*, **65**，718-725，2001．
- 25) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for toxicologists. In Hayes, A.W. (ed.), *Principles and Methods of Toxicology*, 3rd ed., 221-274，1994，Raven Press，New York.
- 26) Cook, J.C., Johnson, L., O'Conner, J.C., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **44**，155-168，1998．