

の低用量影響についての文献調査（関澤・井藤）

内分泌かく乱化学物質候補のひとつとしてあげられているビスフェノール A につき低用量影響問題に関してデータに基づいた評価が行える好個の材料として、文献的な評価を行った。あわせて関連研究の推進と外部による検証の支援の一助として、評価情報をデータベースにまとめた。ここ数年神経系への影響、それも胎生期、授乳期暴露についての報告が急増している。他方、生殖器系への影響としては低用量作用を否定する論文が増えている。最近の評価として、1) BPA には弱いエストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用、従来の弱いエストロゲン様作用では説明できない作用があり、2) 肝臓等における中間代謝産物は BPA そのものよりも強いエストロゲン様活性を有する可能性があり、3) サルはラットにくらべ経口由来の BPA の吸収能力が高いという意見はヒトへの低用量でのリスクを考えるにあたって注意を要する。4) OECD で試験法が標準化され文献的にもっとも数多く低用量作用が議論される子宮肥大試験ではエストロゲン様以外の作用を検出することは難しいため、他のアッセイ（特に神経系の影響を考慮しうる）系の標準化が望まれる。

I-2. 食物等異物受容体結合物の調査：
アリールヒドロカーボン受容体 (AhR) に対してリガンドとなり得る、食品を含む種々の物質の調査研究。（松井）

AhR リガンドは広い範囲の食品中に普遍的に存在しているようである。しかし、そのリガンドの化学構造や食品中の存在量に関してはほとんど情報がなく、今後の研究が必要である。AhR が細胞周期に影響を与えるメカニズムは CDK 阻害タンパクの誘導、RB との結合などがある。CDK 阻害タンパクの誘導には、様々な相互作用が存在するらしい。現在 AhR と NF κ B との相互作用について明らかにしつつある。

I-3. 成長初期の前立腺におけるエストロゲン影響：（杉村）

マウス前立腺における扁平上皮化生は、エストロゲンが TGF α の発現を誘導した結果、過剰量の TGF α が病変を誘導している可能性が示唆された。

I-4. 低用量発がん：発がん二段階法を用いた低用量発がんの検討（福島）

α -BHC のラット肝への作用にはホルミシス現象が見られ、確実に発がんの閾値が存在する。すなわち、 α -BHC のラット肝発がん作用を DEN をイニシエーターとする長期投与方法で検討した。肝腫瘍の発生頻度は高用量投与群では増加し、低用量群では減少傾向を示し、以前の結果を合わせると閾値が存在すると結論できる。

II. 基盤研究

II-1. 生殖・ステロイド代謝部門：（井

口、笹野)

II-1.1. 雌性生殖器官への作用メカニズムの解明 (井口)

マウスの新生仔期から成獣にいたるまで雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子を解析したところ、応答遺伝子群はその成育段階で大きく変化することがわかった。すなわち、エストロゲンが不可逆的な影響を及ぼしうる出生直後の臨界期では、発現が変動する遺伝子は限られており、成獣で応答する遺伝子群とも異なっていた。こうした臨界期に特異的に発現変動する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高く、現在その解析を進めている。

II-1.2. 低用量の内分泌かく乱物質とヒト性ステロイド代謝との関連性に関する研究：ヒト由来のエストロゲン受容体 (ER) 陽性細胞を用いたエストロゲン作用の新たな展開について (笹野)

ヒト骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対して種々の内分泌かく乱物質の与える影響を検討する本研究では内分泌かく乱化学物質がヒト成人骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであった。又その影響は化合物によって質的な差を示した。内分泌かく乱化学物質は胎児組織、生殖器 (生殖能) に対しては重要な影響をおこす事が報告されてはいるが、同じく重要な性ステロイド標的組織であ

る成人骨組織においてその影響は推察はされてきたものの科学的な検証は殆ど行われてはきていない。そこで今回内分泌かく乱物質のヒト骨芽細胞に対しての影響の一部を明らかにすることができたが、今後、種々の内分泌かく乱化学物質の標的組織としてさらなる詳細な検討が必要であると考えられた。

II-2. 免疫・感染防御系：(廣川、山崎)

II-2.1. 低用量内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (廣川)

母体に摂取された BPA が胎盤を通して、胎仔に作用し、子宮内胎仔死亡や胸腺萎縮をもたらすことが分かった。

- (1) 妊娠マウスに高濃度ではなく、低濃度の BPA を飲ませた場合に、子宮内胎児死亡が増加する。
- (2) 子宮内死亡を起こさず生存した胎仔、および新生仔についてその胸腺を調べてみると、萎縮性変化があり、胸腺リンパ球の増殖・分化が抑制されていることが分かった。

II-2.2. 内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究 (山崎)

リンパ球への影響については Jurkat 細胞を用い、マクロファージへの影響については HL60 細胞を用いて解析を行った。Jurkat 細胞への NP、BPA、DBP への遺伝子レベルでの影響については

解析途中である。HL60 細胞の遊走能は、高濃度のノニルフェノール (NP)、ビスフェノール A (BPA)、フタル酸ジブチル (DBP) で低下した。

II-3. 神経系・行動系：(菅野、粟生)

II-3.1. 神経系初期発生における核内受容体の機能及び内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析 (菅野)

マウスでは、胎児期のエストロゲン様内分泌かく乱化学物質への暴露により、神経幹細胞の自己複製能、分化能に影響が生じることが示唆された。また、胎児神経幹細胞では GR や TRα などの核内受容体が発現していることが明らかとなり、次年度以降これらの受容体シグナル系のクロストークに着目した解析を加えていく必要がある。

II-3.2. 内分泌かく乱物質の神経行動学的評価とその脳内機序の解明 (粟生)

ラットでは、BPA は探索行動、不安・うつに影響を及ぼし、扁桃体内側核領域の機能にも影響を与える。すなわち、BPA の出産前 1 週間の胎生期曝露は、従来の周産期曝露と同様に、耐容 1 日摂取量以下の極微量でも探索行動の性分化を消失させる。また、強制水泳試験におけるうつ反応やストレス対処行動、高架十字迷路試験における不安反応も影響を受ける。さらに扁桃体内側核領域のニューロンの嗅覚応答様式の性差にも影響を及ぼすことが示唆される。

II-4. 核内レセプター系：(加藤、Parhar)

II-4.1. 核内性ステロイドホルモンレセプターによる転写制御の影響に関する研究 (加藤)

性ホルモンレセプターの転写制御能をレセプター相互作用因子の観点から検討した。すなわち、男性及び女性ホルモンレセプターに結合する新たな転写共役因子を同定し、それらが内分泌かく乱物質の標的分子候補である可能性が考えられた。また、ダイオキシンレセプターとの会合による新たな性ホルモンかく乱作用の分子機構を明らかにした。

II-4.2. 核内レセプターを介した内分泌かく乱化学物質の生体影響 (Parhar)

単一細胞内遺伝子発現解析手法により、非哺乳動物において初めてステロイド異生物性受容体 PXR が GnRH1 と GnRH3 ニューロンに局在し、生殖腺の発達および性行動の調節に関与する可能性が示唆された。

II-5. マイクロアレイ基盤研究：マイクロアレイ基盤整備 遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立 (五十嵐・井上)

網羅的遺伝子発現解析を用いることで、今後各班員の研究方向決定に影響を与える結果が短期間のうちに得られる可能性があることが確認された。

すなわち、網羅的遺伝子発現解析技

術は、数万のマーカーを対象に内分泌かく乱候補化学物質の影響を迅速に検討できる有効な技術である。本研究で示されてきているように、この技術は、はっきりした形で影響が現れることが少ない内分泌かく乱化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析する際に本領を発揮するものと期待される。

F. 健康危惧情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T: Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 2: 12-6, 2004.

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect* 111: 1411-20, 2003.

著書・総説など

Hirabayashi Y and Inoue T: Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology. In: Borlak J (ed), *Handbook of Toxicogenomics*, pp583-608. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

Inoue T. Introduction : Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Li GX, Kanno J, and Inoue T. On the Mechanistic Differences of Benzene-induced Leukemogenesis between Wild type and p53 Knockout Mice. In: K. Tanaka, T. Takabatake, K. Fujikawa, T. Matsumoto, and F. Sato (eds.), *Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellular Response and Cancer Development*, pp. 110-116. Aomori: Institute for Environmental Sciences, 2003.

2. 学会発表

Inoue T: The Use of Toxicogenomics data in risk assessment—Potential applications of Toxicogenomics in risk assessment—. The 5th Princess Chulabhorn International Science Congress (2004. 8. 22) [Bangkok, Thailand, 2004]

Inoue T: Toxicogenomics as a tool of predictive toxicology. 10th International Congress of

Toxicology. (2004.7.13) [Tampere, Finland, Toxicology and Applied Pharmacology 197 (3): 265, 2004]

Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li GX, Kim DY, Kanno J, Inoue T: Hematological toxicogenomics addressing the mechanisms of benzene-induced epigenetic /genotoxic changes. (2004.7.13) [Tampere, Finland, Toxicology and Applied Pharmacology 197 (3): 277, 2004]

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T: Aryl-hydrocarbon- receptor-signaling keeps stem cell kinetics dormant. International Society for Stem Cell Research 2nd Annual Meeting (2004.6.11) [Boston MA, Final Program p104; 2004]

Inoue T: Symposium 5. Pharmaco- & Toxicogenomics Symposium: S5-3. Strategy of predictive Toxicogenomics a reverse toxicogenomics. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology The 61st Annual Meeting 2004 (2004.5.27) [Seoul, Korea, Meeting abstract 100; 2004]

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他 (データベース等)

該当しない

Ⅱ. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

ビスフェノールAの低用量影響評価の検討と評価情報データベース作成

分担研究者 関澤 純 徳島大学総合科学部 教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質候補のひとつとしてあげられているビスフェノールAについて多くの研究が精力的になされ、とりわけ低用量影響問題に関しデータに基づいた評価が行える好個の材料として文献的な評価を行った。あわせて関連研究の推進と外部による検証の支援の一助として、評価情報をデータ集にまとめた。ここ数年生殖器系への影響としては低用量作用を否定する論文が増えている。最近の評価として、1)BPA には弱いエストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用のほか、従来の弱いエストロゲン様作用では説明できない作用があり、2) 免疫系や神経系への影響、それも胎生期、授乳期暴露についての報告が急増している。3)肝臓等における中間代謝産物は BPA そのものよりも強いエストロゲン様活性を有する可能性があり、4) サルとげっ歯類で吸収・分布・代謝・排泄に違いがあることはヒトへの低用量でのリスクを考える上で注意を要する。OECD でガイドラインが設定された子宮肥大試験ではエストロゲン様以外の作用を検出することは難しいため、神経行動影響などを考慮した他のアッセイ系の標準化が望まれる。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質候補のひとつとしてあげられているビスフェノールA（BPA）について多くの研究が精力的になされ、内分泌かく乱化学物質とりわけ低用量影響問題に関してデータに基づいた評価が行える好個の材料として、文献的な評価を行う。BPAの低用量影響として、どのような生物学的な現象が見られており、その証拠としての研究報告の信頼性と、データの生物学的な意義を検証する。あわせて関連研究の推進と外部による検証の支援の一助として、評価情報をデータベースにまとめることを行う。

B. 研究方法

過去5年間のBPAによる低用量影響に関係すると考えられる文献をMEDLINEで検索し原報を入手した。野生生物への影響や分析法に関する文献約40数報を省き、計約200報を得た。これらにつきBPAの低用量影響の証拠の確からしさと、影響の内容、およびデータの信頼性について評価し検討する上で、以下に記した基準から選別し、標的器官別に影響のあり方をまとめた。結果を総合して低用量作用の蓋然性について考察を加えた。別途、評価情報のデータ集を表1のフォーマットにより作成した。本文献調査は表2の専門家からなる作業グループを作り作業を行った。

表1 フォーマット

文献番号： 担当者_____

著者名：

論文題名：.

出典：

チェック項目：

1. 対象生物 ()ラット、()マウス、()人、()その他_____
2. 影響の標的臓器 ()神経系、()免疫系、()生殖系、()その他_____
3. 影響の種類 ()細胞、()組織、()個体、()その他_____
4. 曝露方法 ()経口、()埋め込み、その他_____
5. 曝露時期 ()胚・胎児、()周産期、()出生後、()成熟動物、()細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入_____)
7. 観察された影響の種類と濃度：一番低い影響濃度のみ記入。複数あれば記入。
統計的な信頼性などの問題はコメント欄に記す。(_____
(_____) (_____)
8. 観察時期 ()出生前、()出生後、()思春期、()成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ()あり、()なし
10. 試験の信頼性について下記項目でチェックする。
EU リスク評価 ()あり、()なし：EU リスク評価文献リスト中の掲載の有無
GLP に準拠 ()はい、()いいえ 論文中に「GLP に準拠」の記述の有無
ガイドラインへの準拠 ()はい：ガイドラインの名称____、()いいえ

論文の概要：(200～400字)

添付資料 (文献の内容を理解する上で重要な図表) 論文中からそのまま使えるようにコピーして添付。添付した図表の番号を記す。

評価者のコメント：(200字程度以下で記述) 報告の信頼性について前記項目でチェックした以外に、評価者のコメントについての注意をよく読み、気付いた点を記す。

表2 ビスフェノールAの低用量影響についての文献調査 専門家 (50音順)

井藤 悦朗	宇部興産(株)	環境安全部
稲葉 克彦	(株)三井化学分析センター	安全科学研究部化学品安全性試験センター
内田 康一	三菱化学(株)	技術・生産センター 環境安全・品質保証部
大関 一男	ダウ・ケミカル日本(株)	エポキシ製品・中間体事業本部
大西 純一	(社)日本化学物質安全・情報センター	
川島 浩	新日鐵化学(株)	環境・安全・品質保証部
迫田 篤信	出光石油化学(株)	安全環境品質保証室
佐二木順子	千葉県衛生研究所	食品化学研究室
関澤 純	徳島大学総合科学部	
中西 義則	ジャパンエポキシレジン(株)	技術環境室
根岸 隆之	青山学院大学理工学部	化学・生命科学分子生物学研究室
花田 秀一	(社)日本化学工業協会	
吉塚 直伸	花王(株)	安全性評価研究センター

低用量影響の確からしさについて文献の選別を行う基準は以下のとおり。

- (A) in vitro 試験か、in vivo 試験か？
- (B) 用量—反応関係が明確で従来の無作用量に比べ十分低い濃度での試験か？
- (C) 曝露時期はどうか？
- (D) ヒトへの影響評価についての妥当性はあるか？

C. 研究結果

(1) はじめに

ビスフェノールAの低用量影響として、どのような生物学的な現象が見られており、その証拠としての研究報告の信頼性と、データの生物学的な意義を文献的に検証した。内分泌かく乱化学物質について2000年にNTPが低用量影響評価ワークショップを開催、翌年欧州でより小規模なワークショップが持たれたが、この問題について最終的な決着は見られていない。今回の試みは

BPAをひとつの材料としてひとつの結論を得ることを目指した。

(2) 低用量作用に関する文献の選別

試験系について生体レベルの試験か、それ以外の研究報告の区別で見ると表3のようであった。生体レベル試験のうち、用いた用量段階からいって低用量域をカバーしていると考えられるものは51件であった。曝露時期の別で見ると胚・胎児期35件、周産期23件、出生後41件、成熟動物54件、その他株細胞45件であった。ヒトへの影響評価の観点からはレビュー文献を含めて検討した。

生体影響の蓋然性が境界領域に位置するものと考えられているBPAについて、2000年から2004年の5年間に報告の見られた168件の文献について、低用量影響データの有無の確認の上、12名の専門家の協力を得て、レビューとデータ集の作成に着手した。さらに追加的にいくつかの最新

の報告も調査の対象とした。

表3 試験系による報告の種別

in vitro 試験	62 件
in vivo 試験	126 件

調査項目は、著者名、論文原題名、出典、対象生物、影響標的臓器、影響レベル(細胞・組織・個体)、暴露方法、暴露時期(胎生期など)、暴露濃度と用量段階、試験記録信頼性保証、および、論文の概要などからなる。調査対象は、ラット 76、マウス 45、ヒト 5、その他 62(げっ歯類やヒト由来の細胞など)からなり、標的臓器は、神経系 16、免疫系 8、生殖系 91、その他 42 などとなっている。

以下は標的器官別に低用量影響の生物学的な蓋然性について判断する上で鍵となる知見を要約する。

(3) 生殖系への影響

生殖系への低用量影響評価に焦点をあてた研究として表 4A に示す二つの報告がある。それぞれ 2 世代あるいは 3 世代の試験で生殖系への影響に限らない種々のエンドポイントについて検査した結果、低用量投与において、統計学のおよび生物学的に有意な影響は観察されなかった。胎児期曝露がもっとも問題となるが、この時期におけるヒトと実験動物における内分泌学的な違いについての知見は、ヒトにおける影響の生物学的な蓋然性が低いであろうことを支持している。

WHO/IPCS¹⁾でも指摘されたように高感受性期としての胚、胎児、新生児期における生体側の状況についての知見が報告されて

いる。受容体の発現については、新生児雄ラットの発生段階で AR を発現している細胞はすべて ER を発現し、セルトリ細胞で ER β は AR よりはるかに早く発現しており、胎児の生殖細胞を含むほとんどの芽細胞では ER β を発現しているが AR は発現しておらず、外部からの EDC への応答を考える上で重要である²⁾。

しかしヒトにおける状況がどのような知見が決定的に参考となる。この意味では、NTP の低用量影響ワークショップでも検討されなかった事柄のひとつとしてヒトとマウスの妊娠における内分泌学的な種差につき、性ホルモンの生成・変換臓器とその時期、および濃度と存在状況の違いが指摘され、その結果マウスで観察された生殖系への影響がヒトでは見られないであろうと推論されている。すなわちマウス・ラットは 17beta-estradiol (E2) とエストロンを生産するがヒトはこれに加えてエストリオールを生産するという違いのみならず、ヒト母親の妊娠後期における血中 E2 は 15-20 ng/mL でラット・マウスの妊娠後期の 30-60 pg/mL の数百倍である。胎児中濃度はヒト (5-10 ng/mL)、マウス (100-150 pg/mL) と 50-100 倍である。ヒト胎児血ではさらに妊娠後期にエストロン(10-15 ng/mL)、エストリオール(50-100 ng/mL)濃度も高い。ヒトでは性分化は 7-14 週(胎児血中の E2 は 2-6 ng/mL)と早期であるがマウスで 15 日以降(胎児血中の E2 は 100-150 pg/mL)でずっと後になる。さらにヒト胎児血漿中遊離 E2 は 1-4.5%だが、マウス血漿中遊離 E2 は 0.2%と推定される。ちなみに vom Saalらがマウスの子宮内での胎児の位置による分娩後の前立腺のアンドロゲン感受性効果

(オスに挟まれるか、メスにはさまれるか)を示すために投与で用いた E2 レベルは子宮血中の遊離体で 0.11 pg/mL から 0.21 pg/mL への増加に相当し、より高い濃度では変化は見られなかった。ヒトにおいては遥かに高濃度の天然エストロゲンにさらされており微量の比較的弱い外界からのホルモン活性物質にさらされたとしてもマウスやラットで見られたと同じ現象が起こるとは考えにくい³⁾。

BPA 無添加の群を加えて、低用量曝露を考慮した(最低用量 0.001 から 500mg/kg/day) 7 段階の用量設定で、一群が n=30 の 3 世代試験が Ty1 らにより実施され、報告されている。その結果、母獣曝露による次世代の生殖系への無影響量は 50mg/kg/日と推定され、また、体重増加に対する無影響量は 5mg/kg/日であることが示された⁴⁾。

SD ラットにおける低濃度 BPA 慢性曝露の影響を GLP に準拠した実験で 2 世代にわたり評価した。各世代において体重、臓器重量、性成熟などを綿密に検討した。生殖器肛門距離についてはいくぶん影響があるようにみられたが、これを含め有意差があった項目も単一の曝露濃度のみで見られ用量依存性を示さなかったり、成長とともに縦断的に見てもある一時点のみであったため、結論としては 0.2-200 μ g/kg の濃度での 2 世代曝露は成熟・生殖に影響を与えないと考えられた⁵⁾。

(4) 免疫系への影響

生体レベルでの影響データ

免疫系への低用量影響の蓋然性について評価する上で参考となるデータを表 4B にまとめた。自己免疫疾患モデルマウスに低用量 (2.5 mgBPA/kg/day 混餌投与) を投

与した時に、蛋白尿発症が遅れ自己免疫疾患の発症を抑制する知見が得られ、BPA は ER 結合によりマウスの免疫機能を修飾する可能性が示された。BPA 皮下投与 (5mg/kg) したマウスの腹腔内に非病原性大腸菌を接種し大腸菌の排除能を調べたところ、BPA 未処理マウスに比べ低下し、BPA は非特異的な生体防御能を低下させると推察され 0.5mg/kg 以下で本影響が出ないことからこの値が NOEL とされた。

NZB/NZW マウスは自己免疫疾患 lupus の自然発症モデルだが、BPA 投与マウスでは lupus 症徴である蛋白尿発症が平均 7 週遅延し 5 週齢から 8 ヶ月齢まで BPA を投与した時に蛋白尿マウスは観察されなかった。5 週齢の C57BL/6 マウスおよび lupus 発症 NZB/NZW マウスを 2.5 μ gBPA/kg/day 混餌投与で 1 週間飼育し ConA 刺激脾細胞が分泌する INF- γ を測定した。BPA 不含で飼育した対照マウスに比べ、C57BL/6 雄で 40%、雌で 28% 有意に減少していた。lupus 発症前の雌 NZB/NZW マウスでも ConA 刺激脾細胞が分泌する INF- γ レベルが有意に減少し、LPS 刺激脾細胞分泌 IgG2a レベルが約 50% まで減少した。エストロゲン受容体に BPA が結合する結果、エストロゲンとは逆の作用が生じることを述べており、むしろ lupus に対する保護的な作用を示す。これは ConA 刺激脾細胞分泌 INF- γ はエストロゲンで増加するが、逆に BPA 投与で INF- γ は減少し、NZB/NZW マウス lupus 症徴蛋白尿発症の遅延が生じたものと推察している⁶⁾。

BPA を予め皮下投与 (5mg/kg) したマウスの腹腔内に大腸菌 K-12 株を接種し非病原性大腸菌に対する排除能におよぼす BPA の

影響評価を行った。脾臓の T および B 細胞は減少し、大腸菌接種後 24 時間以内の菌排除能は未処理マウスに比べ減少していた。BPA は好中球の腹腔内への過剰な遊走を誘導するが大腸菌に対する貪食能は低下させた。BPA は脾臓内のマクロファージおよびリンパ球細胞数を減少させ、感染に対する防御能を減少させた。BPA は非特異的な生体防御能を低下させると推察され用量依存性の検討から 0.5mg/kg 以下で本影響が出ないことから、この値を NOEL とした⁷⁾。

マウスに 25mgBPA/kg, ip 隔日 3 回投与し、KLH 感作後 CD4⁺T 細胞の *in vitro* 抗原刺激を行ったところ IL-4 産生が促進し血中抗原特異的 IgE 抗体が有意に増加した。IL-4 産生促進効果の機構解析の結果、T 細胞の転写因子 NF-AT を介し IL-4 遺伝子プロモーターを活性化することで BPA の促進効果が発揮されると判明した。BPA の IL-4 産生促進は、Ca²⁺ influx の阻害剤の nitrendipin および calcineurin inhibitor である FK506 により有意に減少した。10 mg/kg 経口投与の場合、最大血中濃度は 14.7ng/ml だが、ヒト血清中に観察される BPA 濃度は 1-2 ng/ml とする報告もあり本研究は比較的高い濃度での試験と考えられる。*in vitro* で、10~50 μM で有意な差を示すが、換算では 2.3~11.4 μg/ml となり、上記血中濃度 (14.7 ng/ml) の約 150~700 倍の濃い濃度で行っていることになる⁸⁾。

免疫系細胞レベル

ケモカイン産生に対する E2 及び BPA の影響を評価した。MCP-1 は動脈硬化症、糸球体腎炎、肺線維症、関節リウマチで発現が亢進、主に血中モノサイトの遊走および活性化を誘導する因子だがヒト乳がん由来

MCF-7 細胞は IL-1 α に反応して大量の MCP-1 を産生する。MCF-7 に E2 を作用させると用量依存的に MCP-1 産生を阻害する。一方、BPA は 500nM (114ng/ml) で MCP-1 産生を阻害するが、その能力は E2 に比べ 1/1000~1/10000 低い。E2 および BPA は MCF-7 細胞の IL-1 α 誘導 MCP-1 mRNA 発現を阻害したが、NF-κB の 2 つの結合部位 A1 及び A2 への結合によるものであった⁹⁾。

マウス脾臓細胞の抗体産生に対する影響評価で E2 は IgM および IgE 産生を亢進させたが、BPA は IgM レベルを生理的濃度で亢進させた。アレルギーの観点から IgE 分泌は重要だが、E2 は 1 μM 以上で IgE 分泌を亢進し、BPA は 10nM~100 μM (2.3~23ng/ml) の範囲で IgE 分泌が陰性対照より低い値を示した。また E2 は 10nM~10 μM で、さらに BPA は 10nM~100 μM の広い範囲で陰性対照より高い値を示し IgM 分泌を亢進させた。同一個体から採取した細胞を triplicate で培養し統計処理し個体差が考慮されていない可能性がある。最低濃度 10nM でも対照と差があり影響が出る最低濃度が推定できないなどいくつかの問題を含んでいる¹⁰⁾。

(5) 神経行動への影響

生体レベルでの影響データ

神経行動への影響について表 4C にまとめた。ラット胎児期、乳児期の 30 μg/kg/day の BPA 曝露で性行為頻度の低下が見られ、マウスでは BPA (10 μg/kg/日) を胎生期 (GD14-18) および妊娠期 (GD14-18) に暴露により育仔時間の低下、交尾から離乳期まで BPA を母ラットに与えると出生後 35-45 日仔ラットのチャレンジ能と、覚せい剤への反応の鈍化が見られるなど、これまでに問

題とされた以外の影響の観察結果が報告されていた。

ラットの胎児期、乳児期に $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ という経口参照量 (RfD) 以下の BPA に暴露しても生殖能には影響がなかったが、雌で open-field behavior の活発化、脳内 locus coeruleus (LC) volume の増加を示し雌と雄が逆の行動をとり $30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では、性行為頻度の低下が見られた。 30 、 $300 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与で通常雌雄差がみられる open-field behavior (frequency of rearing, staying in the center) に雌雄差がなくなり、性的二型性を示す神経核の一つである locus coeruleus (LC) (青斑核) volume ならびに LC 内のニューロン数の雌雄差に逆転現象が観察された¹¹⁾。

交配時から離乳 (時期不明) まで BPA を混餌投与 (0 , 0.002 , 0.5 , $2\text{mg}/\text{g food}$) し ddY マウスの行動試験を行った。methamphetamine による conditioned place preference 法を適用したがいずれの暴露濃度においても BPA 暴露濃度依存的にその嗜好性が増強された。対照群と BPA $2\text{mg}/\text{g food}$ 群のみ検討を行ったが、methamphetamine 誘発活動量増加が BPA 暴露により増強され、連続投与による依存性も増強された。ドーパミン系の異常を BPA 暴露で D1 ドーパミン受容体 (D1DR) 機能が増加していることと、D1DRmRNA 発現の増加により示した。methamphetamine の標的分子である Dopamine transporter および Type2 VMAT のタンパク発現量には影響は見られなかった。混餌投与なので強制経口投与と濃度の直接比較がしにくいだが、筆者らは $10\text{ng}/\text{mL}$ の BPA が検出されたと記している (どの暴露濃度か不明)。最

初の実験以外は全て $2\text{mg}/\text{g food}$ 暴露群のみとの比較であるが、1日に体重の $1/10$ 程度の餌を食べるとすれば $200\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ となりかなり高濃度であると思われるが、最初の実験 (conditioned place preference 法) ではこの濃度の $1/1000$ の濃度の暴露でも影響が見られ低濃度暴露でさまざまな実験を行うことが望まれた¹²⁾。

メス CD-1 マウスに BPA ($10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) を胎生期 (GD14-18) および妊娠期 (GD14-18) に暴露し育仔行動 (PND2-15) に与える影響を検討した。育仔行動の観察項目は哺乳、巣作り、休憩、身繕い、巣外活動、および摂餌・水である。仔マウスにおいて Cliff-drop aversion (テーブルの端に身を乗り出させその状態から落下を回避する能力)、righting reflex (仰向けにおかれた状態からうつぶせる能力) を検討したが影響は見られなかった。胎生期または妊娠期のみに BPA 暴露の場合、仔に接する時間が有意に低下したが、胎生期および妊娠期ともに暴露した場合そのような影響はみられず、胎生期暴露により BPA に対する感受性が変化したと推察している。育仔行動の変化は次世代の育仔行動を変化させることが知られているとし BPA の育仔行動への微細な影響は世代を重ねると累積する可能性があるとしているが説明に無理がある¹³⁾。

雌マウスに 0.002 , 0.5 , $2 \text{mg}/\text{kg}$ の食餌中 BPA 濃度を交配から乳児期まで投与したところ、無影響レベルのモルヒネとの併用による嗜好影響および過剰運動が量依存的に見られた。この条件下ではモルヒネによる G タンパクの活性化や腹側中脳での μ オ

ピオイド受容体発現の変化は見られなかった。出生前また新生児期の BPA 曝露は中枢のドーパミン生成システムの発達に影響を及ぼすと考えられた¹⁴⁾。

Obata らは成熟 Wistar ラットのドーパミン神経核終末である線条体に直接 BPA を含む人工髄液を灌流して OH ラジカルの発生状況を観察したが、最高濃度の $10\mu\text{M}$ でも有意な変化を認めていない¹⁵⁾。

Khurana らは生後 1-5 日の未成熟な F344 ラット (雌雄) に体重当り mg オーダーの BPA を皮下投与したところ、思春期、成熟期において神経内分泌系を介したエストロゲン様のかく乱を認める論文を発表している。曝露時期から遅れて BPA の影響が発現し、しかも雌雄で ER 受容体を介した反応が異なることを示した最初の報告である¹⁶⁾。

Ema らの GLP に準拠した低濃度 BPA 慢性曝露の影響を 2 世代にわたり評価した実験で、運動機能発達 (reflex test) についても検討されたが、 $0.2\text{--}200\mu\text{g/kg}$ の濃度での 2 世代曝露は成熟に影響を与えないと考えられた⁵⁾。

卵巣切除ラットの視床下部の progesterone receptor (PR) 発現ならびに性行為に及ぼす BPA の影響を調べた。E2 ($40\mu\text{g/kg/day}$)、BPA ($400\mu\text{g/kg/day}$) の皮下投与で対照に比べ、PR 発現は有意に増加し、BPA による増加は濃度依存的であった。BPA+progesterone の投与ラットは E2+progesterone ラットで観察される正常な性行為はなく、拒絶行為が主であった。BPA が視床下部の PR system への影響を介して生殖機能に影響をおよぼし性行為にもおよぼことが示唆された。 $400\mu\text{g/kg/day}$ という低濃度で行動に明らかな

結果が出る事実は追試に値し慎重な検討が必要である¹⁷⁾。

交尾から離乳期まで BPA を母ラットに与えた。出生後 35-45 日に仔ラットの novelty seeking 実験と 70 日以降に行動の実験 (impulsivity と覚せい剤への反応試験) をした。 $40\mu\text{g/kg}$ 投与で思春期に novelty preference への BPA の影響に雌雄差がみられた (雄では BPA の影響なし、雌では行動能低下)。BPA 曝露ラットでは新しいことへのチャレンジ能 (activity rate) が、雌雄とも劣った。成熟期の BPA 曝露雄ラットで、衝動行動能 (impulsivity) ならびに覚せい剤 (amphetamine) への反応に低下が認められ、雄ラットの女性化が明らかであった。胎児期から乳のみ期に環境汚染濃度に近い低濃度の BPA の曝露を受けると adult になってからの行動に変化が見られ、覚せい剤への反応も鈍くなる。これらの行動の変化は交感神経系の障害に基づくものであろう。胎生初期の器官が分化する時期に BPA 曝露を受けるとラットやマウスでは何らかの行動障害が起きるようだ¹⁸⁾。

妊娠 15 日から生後 10 日まで母ラットに 60, 600, 3000 ppm BPA を soy free の餌に混餌投与したが、仔ラット (出生後 3, 11 週) の下垂体ホルモンの luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) prolactin (PRL) に何ら変化は見られなかった。BPA は餌中で分解する可能性があるが餌中の BPA 濃度のモニターがなく BPA の影響を正しく反映しているのか疑問が残る¹⁹⁾。

4 週令の雌羊 6 頭に 3.5 mg/kg BPA (溶媒は 10% alcohol in corn oil) を週 2 回連続 7 週間筋注、5 週後に卵巣切除術を施

こしたが切除した卵巢重量に影響はなかった。手術2週間後、BPA暴露羊のLH、FSH(卵胞刺激ホルモン)ともに正常に増加したが、15分毎6時間採血した際、LH濃度、amplitude、frequencyともにBPA暴露羊で、有意な値の低下が認められた。思春期以前の雌羊へのBPA暴露はgonadotrophin分泌能や生殖機能に何らかの影響を与える可能性がある。大型哺乳動物を用いた低用量投与実験例であり無視できない結果だが、筋注投与であり普遍妥当性は低い²⁰⁾。

SDラットにBPAを経口投与(1, 10, 50 mg/kg/day、妊娠6日-出生後21日)した。1 mg/kg暴露で母体体重の増加は抑制したが、出生数、F1の体重上昇には影響がなかった。F1(出生後15日:PND15)の血漿中T4濃度の上昇、海馬RC3/neurogranin mRNA発現増加があった。新生仔(PND4, 8, 15, 35)の血漿中T4を測定した結果、PND15の時点のみでBPA暴露によるT4上昇が観察されたがTSHは影響を受けなかった。PND15の海馬における甲状腺ホルモン依存遺伝子の一つであるRC3/NeurograninのmRNA発現上昇が観察されたが皮質では影響は見られなかった。BPAは生体内の甲状腺ホルモンにおける下垂体を介する負のフィードバックをかく乱するが、TRaという甲状腺ホルモン受容体については拮抗作用がないと推察した。PND15のT4はANOVAの記述にとどまり、多重比較では1mg/kgでも有意に上昇しているのに10mg/kg群以上でT4上昇が見られたと表記され不明確な点が多い。BPAがTRb特異的アンタゴニストでありin vitro系よりも感受性の高い部位(海馬>皮質のように)が存在するとすればネガティブフィードバックかく乱によるT4の上

昇とRC3の発現上昇の結果がうまく説明できる。別の可能性として脳内にBPAはほとんど届かず、限りなく無作用でSystemicな甲状腺ホルモンフィードバックをかく乱するだけでも結果は説明できる。BPA 1mg/kgの経口投与で母体重量の増加を抑えたという報告は例がなく抗甲状腺ホルモン様作用の存在が確かであるならば、エストロゲン様作用に関する低用量作用の論議を別の角度で繰り返す必要すらある²¹⁾。

妊娠SDラットに妊娠直前からPND23までBPAを40, 400 mg/kg/dayで暴露し、PMD10またはPND23の次世代個体(雌雄不明)の辺縁系におけるsomatostatin受容体2(sst2)の活性(somatostatin ([¹²⁵I]-Tyr⁰-SRIF14)との結合能)に対する周産期BPA暴露の影響を検討した。後頭部全体(PND23)でみたときのsst2活性はBPA暴露により上昇した。sst2と[¹²⁵I]-Tyr-SRIF14の結合は2種類(高結合タイプと低結合タイプ)を分けて大脳辺縁系でBPA 400 mg/kg/day暴露のsst2活性に対する影響をPND10とPND23において各部位について検討した。周産期BPA暴露は大脳辺縁系のsst2活性を変化させることが示され、BPA暴露によりある時期のある部位のsst2レベルは変化(上昇または減少)していたが、その変化に規則性はほとんどなく統括的解釈が不可能である。動物実験の記述に不明確な点が多くBPAの脳機能発達への影響の有無という点では非常に興味深い、結果が複雑すぎる²²⁾。

細胞レベルでの影響

マウス海馬由来細胞株HT-22においてglutamateおよびamyloid β 誘発細胞死に対する保護作用について検討した。BPAは

500nM で細胞死に対する阻害(保護)作用を示した。また glutamate 暴露により glucocorticoid 容体の核内移行が見られたが、これに先立つ 24hr 1 μ M BPA 暴露はこれも阻害した²²⁾。

GABA-A 受容体 (Wistar ラットまたはウシ由来) をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、GABA (1, 10, 1000 μ M) による興奮性の反応に対する BPA の影響を調べている。GABA による興奮性の反応を 10 μ M の BPA は対照実験に比べて 20%増強した²³⁾。

アフリカツメガエルの卵母細胞に発現したヒト型のニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプ $\alpha 3 \beta 4$ および $\alpha 4 \beta 2$ のアセチルコリンによる反応に対する BPA の影響が調べられた。100 μ M のアセチルコリンに対する各受容体のサブタイプの応答を BPA (100 μ M) は抑制している²⁴⁾。

以上 2 つの論文は哺乳類固有の神経伝達物質の受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた系で細胞内情報伝達に絡んだ卵母細胞の応答に対する BPA の影響を調べているが影響が BPA 特有なものであるか、影響が認められる濃度の妥当性など注意深い検討が必要である。

100 nM staurosporine が引き起こす神経細胞死に E2, BPA がどのような効果を示すか、primary cultured rat hippocampal (海馬) neuron ならびに cortical (皮質) neurons を用いて調べた。hippocampal neuron では、staurosporine が引き起こす LDH の増加、caspase-3 の活性亢進を E2、BPA(10 μ M) とともに有意に抑制した。cortical neurons では、BPA は LDH の増加、caspase-3 の活性亢進を抑制したが、E2(1nM,

10 μ M) は抑制しなかった。さらに、low dose BPA (10 nM) は hippocampal neuron ならびに cortical neurons の caspase-3 の活性亢進を抑え BPA は正常な脳の発達を妨げるかもしれない。メカニズムとしては、BPA が caspase-3 の活性化を妨害し、本来備わった必要な神経細胞死を抑制する。10nM から 10 μ M の間の細かなデータがないが BPA がラットの神経細胞に何らかの影響を与えることは生物学的蓋然性として否定できない²⁵⁾。

BPA は PC-12 cells(ラット副腎の褐色細胞腫由来) から dopamine の遊離を濃度依存的 (細胞内 dopamine 減少は 25 μ M 以上から) に引き起こした。N-type calcium channel の選択的拮抗剤 (ω -conotoxin GVIA) と ryanodine receptor blocker (ryanodine) は BPA が引き出す dopamine の遊離を抑えた。BPA による dopamine の遊離の亢進に細胞膜の receptor が係わっているかを証明するために、guanine nucleotide-binding protein inhibitor (guanosine 5'-(β -thio) diphosphate), cyclic AMP antagonist (Rp-cAMPS), protein kinase A inhibitor (H7 と H89) が BPA 添加の前に加えられた。BPA による dopamine の遊離をこれらすべての薬剤が抑制し dopamine 遊離は遺伝子レベルを介さないシグナル系 (guanine nucleotide-binding protein や N-type calcium channels) が関与していることが示唆された。BPA 暴露は dopamine を産生する神経細胞に影響を及ぼす可能性がある。genomic influences を排除するため、BPA の短時間(10 分間)暴露で実験を行った。in vitro の実験結果であるが使用濃度も低濃度であ

り、BPA が神経細胞に及ぼす影響を示唆する基礎的なものである。BPA のもたらす dopamine 産生亢進の作用機作が同じ作用を示す PCB のそれと異なるという点は、神経細胞への BPA 特有の作用である可能性が考えられる²⁶⁾。

マウス ICR 由来(E17)オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs)の甲状腺ホルモン(T3)による分化誘導をBPA(10 μ M)が抑制した。BPAは形態学的にT3誘発分化を抑制、Trb1およびMBPの発現を抑制するが、その作用はFcRg-Fyn-MBPカスケードおよびT3-TR複合体のCREBリン酸化を阻害するのではないことを明らかにした。100 μ M BPAは細胞死を引き起こす。10 μ M BPA OPCsの甲状腺ホルモン(T3)によるオリゴデンドロサイトへの形態学的分化誘導を阻害、T3によるbHLH-Id2(分化マーカー)の発現上昇の阻害、Trb1の発現抑制(T3の存在に依らず)、MBP(ミエリン塩基性タンパク)の発現抑制)抗甲状腺ホルモン様作用につき細胞レベルで検討した。BPAの濃度が高く低用量作用とは関係ないが、分化について論じた点で新規性は高い。Trb1発現がBPAにより抑制されていて(TRAの発現は変化なし)MBPの発現抑制が検出できたなら、BPAは甲状腺ホルモン受容体の発現をかく乱させるのであり、これが甲状腺ホルモン様作用と呼べるのかは疑問がある。機序が不明故、今後同様の細胞レベルの試験が望まれる²⁷⁾。

(6) 吸収・代謝・分布・排泄について

表4DにはBPAの吸収、代謝、分布に関する知見を要約した。試験管内試験系でBPAより強いエストロゲン活性を示す代謝物が確認されたが、ヒト体内での生成量や分布

は不明である。BPA吸収後、ラットに比べヒトでは抱合活性が強く血中半減期は短く、容易に排泄されるというデータがある。BPAのリスク評価にあたっては実験動物とヒトの間のキネティクスにおける種差や、先に記した胎児期における内分泌ホルモン環境の違いなども十分検討して行う必要がある。

BPAをラット、ヒト、サルやマウス肝臓から得たS9分画で処理したところ yeast two-hybrid アッセイでBPAより強いエストロゲン活性を示し、活性増強の要因と考えられる分子はLC/MSの結果から4-methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP)と同定された。MBPはELISA, YES, yeast two-hybrid, reporter gene assayにおいてBPAよりも数倍~1,000倍強いエストロゲン活性を示した²⁸⁾。

男女3人(詳細実験では男4人)にBPA(5mg)を経口投与し96時間までにグルクロン酸抱合体(glc-BPA)のみが代謝物として血液、尿中に検出された。BPAは検出限界(尿6nM,血液10nM)以下であった。血液中のBPA半減期は6時間以内であった。血液におけるglc-BPA最大値(800nM)は経口投与80分後であった。glc-BPAの腸肝循環システムがあるラットではBPAのクリアランスが遅いが腸肝循環システムが無いヒトではBPAはすぐに抱合され排泄される。人が低用量の曝露を受けた時は比較的短時間にglc-BPAとして排泄されるだろう²⁹⁾。

カニクイザルに¹⁴C-BPAを0.1mg/kg経口、または静脈内投与したところ79-86%の放射活性は投与後7日間の尿で検出され24時間でほぼ全てが回収された。投与後7日間の糞中放射活性は全体の1.8-3.1%であった。投与後48時間までの血

中動態は、経口投与では $C_{max}=104-107$ ng-eq/mL、 $AUC=244-265$ ng-eq · h/mL であった。一方静脈内投与では $AUC = 377-382$ ng-eq · h/mL であった。つまり経口投与による bioavailability は 0.66-0.7 であった。血中半減期は経口投与に比較し静脈内投与の方が長かった。静脈内投与後第 1 相半減期は 0.61-0.67 h であり、未変化 BPA の半減期はオスよりメスの方が短かった。血中における主な代謝産物は mono または di-glucuronide 抱合体であり未変化 BPA は 1.5%以下であった³⁰⁾。

F344 ラット (オス) に BPA を 0.1mg/kg の濃度で経口または静脈内投与したところ排出経路は尿よりも糞であり、経口投与の場合は 45-50 %、静脈内投与の場合 58-66 %が胆汁から排出された。BPA の血中半減期は経口の場合 44.5 hr、静脈内投与の場合 39.5 hr で、経口投与の場合 T_{max} は 0.38 hr であった。経口の bioavailability は 0-6 hr、0-48 hr、でそれぞれ 0.54, 0.86 であった。100mg/kg で経口投与した場合の胆汁、尿中の BPA はほとんどがグルクロン酸抱合体で未変化 BPA はほとんどが糞中に存在した。

サルは糞より尿に排泄するのに対し、ラットは主に糞に排泄するという種差があり、ラットでは BPA は主に肝臓でグルクロン酸抱合を受け胆汁に排泄された後、腸内最近により再び脱グルクロン酸抱合され、腸肝循環が生じている可能性が示唆された³¹⁾。

¹⁴C-BPA を生後 4, 7, 21 日 (1 or 10 mg/kg) および 11 週令ラット (10mg/kg) に強制経口投与し、投与後、0.25, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 18, 24h の血液中および臓器中の BPA,

BPA グルクロン酸抱合体 (BPAG) を測定した。生後 4, 7, 21 日では BPA から BPAG の代謝が加齢とともに高まった。BPAG と BPA の血液中濃度が 11 週令に比べると、生後 4, 7, 21 日で高かったのは、肝臓における排泄機能の発達の未熟さによると考えられた。1 mg/kg 投与では血漿中放射活性の 94-100 %が BPAG に代謝されるが、10 mg/kg 投与では 13 種の代謝物質が確認され、低濃度の BPA は、仔ラットに備わった glucuronyl transferases で代謝されエストロゲン性は無くなると考えられる。adult に比べ neonatal period は BPA 代謝が劣り、異物代謝機能の未熟は、BPA の安全性について議論する場合年齢を考慮に入れる必要があることを示している³²⁾。

低濃度の ³H ラベル BPA を妊娠マウス 11 匹に妊娠 17 日目に一回皮下投与し、0.5, 2, 24 時間後の生体内代謝を調べた。CD1 系マウスでは BPA はかなり良く代謝され、代謝物はグルクロン酸抱合体、数種の 2 分子結合体、結合体のメトキシ化物など反応性の高い中間物であった。胎仔では、未変化 BPA, BPA のグルクロン酸化合物、2 糖体 (galactose) との抱合体が同定された。BPA 代謝系はこれまで考えられていたものよりずっと複雑であることが推測された。投与後、直ちに胎盤、羊水、胎仔に BPA が移行し、胎仔中に未代謝 BPA が多く検出される。経口投与の場合、血液中、卵巣、子宮の放射活性は皮下の 1/80, 1/100, 1/22 と低かった³³⁾。

(7) 標的器官別の低用量影響検出結果の整理

表4には、以上に記した生殖系、免疫系、神経行動影響および吸収・代謝・分布・排泄について要約した結果を示した。

引用文献

- 1) IPCS: Global Assessment of the State-of-the -Science of Endocrine Disruptors , WHO/ IPCS/EDC/02.2, World Health Organization, Geneva
- 2) Williams K, McKinnell C, Saunders PTK, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe RM : Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man, Human Reproduction Update 7, 2001, 3 : 236-247.
- 3) Witorsch RJ: Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans:an analytical review of the literature, Food and Chemical Toxicology, 2002, 40:905-912.
- 4) Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM. : Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. Toxicol Sci. 2002 Jul;68(1):121-46.
- 5) Ema M, Fujii S, Furukawa M, Kiguchi M, Ikka T, Harazono A : Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. Reproductive Toxicology, 2001, 15: 505-523.
- 6) Sawai C, Anderson K, Walser-Kuntz D. : Effect of bisphenol A on murine immune function:modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice. : Environ Health Perspect. 2003, 111(16):1883-7.
- 7) Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga F, Naito H, Suzuki Y. : Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic Escherichia coli. Toxicol Lett. 2003 Jan 13;136(3):217-27.
- 8) Lee MH, Chung SW, Kang BY, Park J, Lee CH, Hwang SY, Kim TS. :Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca2+. Immunol. 2003, 109(1):76-86.
- 9) Inadera H, Sekiya T, Yoshimura T, Matsushima K. : Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemo-attractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells. Endocrinology. 2000, 141(1): 50-9.
- 10) Han D, Denison MS, Tachibana H, Yamada K. : Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes. Biol Pharm Bull. 2002 Oct;25(10):1263-7.

- 11) Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. : Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 2003, 45(3):345-56.
- 12) Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, Funae Y, Fushiki S, Fukushima S, Shirai T, Narita M. : Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience.* 2003, 117(3): 639-44.
- 13) Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. : Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect.* 2002, 110 Suppl 3:415-22.
- 14) Mizuo K, Narita M, Yoshida T, Narita M, Suzuki T. : Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addict Biol.* 2004, 9(1):19-25.
- 15) Obata T, Kubota S. : Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci Lett.* 2000, 296(1):41-4.
- 16) Khurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N. : Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinol.* 2000, 141(12):4512-7.
- 17) Funabashi T, Sano A, Mitsushima D, Kimura F. : Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol.* 15(2):134-40. (2003)
- 18) Adriani W, Seta DD, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F, Laviola G. : Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2003, 111(4):395-401.
- 19) Masutomi N, Shibutani M, Takagi H, Uneyama C, Lee KY, Hirose M. : Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch Toxicol.* 78(4):232-40. (2004) Epub 2003 Nov 04.
- 20) Evans NP, North T, Dye S, Sweeney T. : Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol.* 2004, 26(1):61-73.
- 21) Zoeller RT, Bansal R, Parris C. : Bisphenol-A, an Environmental Contaminant that Acts as a Thyroid