

NO. 180文献番号: 11133394

担当者 内田 康一

著者名: Yamasaki K, Sawaki M, Takatsuki M.

論文題名: Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A.

出典: Environ Health Perspect. 2000 Dec;108(12):1147-50.

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 皮下注入(sc)
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 経口: 0, 40, 160, 800 mg/kg/day ;  
皮下: 0, 8, 40, 160 mg/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度: (皮下注入 8 mg/kg/day で子宮重量増加)  
(経口投与 160 mg/kg/day で子宮重量増加) ( \_\_\_\_\_ )
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  
GLP に準拠  はい、 いいえ  
ガイドラインへの準拠  はい: ガイドラインの名称 the guide for animal experimentation  
prepared by the Japanese Association for Laboratory Animal Science.、 いいえ

論文の概要

エストロゲン作用を検出するスクリーニング試験法として OECD にて提案されている未成熟ラットの子宮重量アッセイ法を用い、BPAの低用量投与の影響を調べた。また子宮重量測定時期の影響を検討するために、子宮重量の経時的変化を測定した。

その結果、8mg/kg/day 皮下注射で子宮重量の増加が観察され、本報による子宮重量法は、感度が高いスクリーニング試験法として利用できることが確認できた。

また子宮摘出時期は、被験物質の最終投与後 24 時間後が安定しており、この時期が適当と考えられた。

添付資料

Table 2, Table 4, Table 5

評価者のコメント

投与経路として経口と皮下注射の2通りを行い、血漿中濃度の確認、再現性試験、子宮摘出最適時期も把握しており、試験系としての信頼性は高いと考えられる。エストロゲン作用を検出する試験系としては、皮下注射において 8mg/kg で有意差が検出されているが、再現性は若干弱く、評価系としてはこのレベルが下限と考えられる。

**Table 2. Uterine weight of rats administered BPA for 3 days beginning on PND 18.**

Route/study	Dose (mg/kg/day)	Wet weight (mg)	Blotted weight (mg)	Relative wet weight (mg/100g)	Relative blotted weight (mg/100g)	
Subcutaneous	Study 1	Vehicle control	27.1 ± 3.6	26.5 ± 3.7	57.2 ± 6.4	55.8 ± 6.7
		8	31.1 ± 3.6*	30.3 ± 3.5*	67.8 ± 10.4*	66.1 ± 9.7*
		40	39.5 ± 4.6**	38.6 ± 4.4**	86.2 ± 8.7**	84.2 ± 8.4**
		160	55.7 ± 10.5**	54.7 ± 10.3**	122.1 ± 18.9**	119.8 ± 18.7**
	Study 2	Vehicle control	27.6 ± 2.8	27.0 ± 2.5	58.4 ± 7.0	57.1 ± 6.4
		8	31.0 ± 4.5	30.4 ± 4.4	66.6 ± 8.3*	65.2 ± 8.2*
		40	40.7 ± 4.2**	39.7 ± 4.0**	87.1 ± 8.2**	84.8 ± 7.6**
		160	58.4 ± 8.5**	57.4 ± 8.0**	131.1 ± 21.7**	129.0 ± 20.0**
Oral	Study 1	Vehicle control	27.7 ± 5.2	27.1 ± 5.1	59.5 ± 7.2	58.2 ± 7.3
		40	27.1 ± 2.5	26.4 ± 2.3	59.9 ± 6.0	58.4 ± 5.7
		160	30.5 ± 2.5	29.8 ± 2.6	67.3 ± 6.1*	65.8 ± 6.0*
		800	40.0 ± 6.6**	39.1 ± 6.7**	89.0 ± 14.6**	87.1 ± 14.4**
	Study 2	Vehicle control	27.7 ± 3.0	27.1 ± 3.0	59.5 ± 6.0	58.2 ± 5.7
		40	29.8 ± 4.8	29.0 ± 4.8	63.1 ± 9.0	61.3 ± 9.2
		160	31.9 ± 5.1*	31.0 ± 5.1*	69.1 ± 10.3*	67.4 ± 10.2*
		800	41.0 ± 4.0**	39.9 ± 4.0**	92.2 ± 8.3**	89.5 ± 8.1**

Values shown are mean ± SD.

\*Significantly different from corresponding vehicle control at  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different from corresponding vehicle control at  $p < 0.01$ .

**Table 4. Absolute uterine weights of rats 6, 12, 18, and 24 hr after last sc administration of BPA.**

Hour	Dose (mg/kg/day)	Wet weight (mg) <sup>a</sup>	Blotted weight (mg) <sup>a</sup>	Wet weight (% of control)	CV (wet weight)
6	Vehicle control	27.8 ± 5.2	27.2 ± 5.0	100	18.7
	8	36.5 ± 8.5*	34.9 ± 7.4*	131	23.2
	40	55.8 ± 12.9**	53.4 ± 12.3**	200	23.2
	160	75.8 ± 11.1**	72.5 ± 10.8**	273	14.6
12	Vehicle control	28.9 ± 6.2	28.0 ± 6.1	100	21.4
	8	32.2 ± 1.8	31.1 ± 1.7	111	5.5
	40	50.1 ± 5.8**	48.6 ± 5.3**	173	11.6
	160	63.4 ± 9.8**	62.0 ± 9.5**	219	15.4
18	Vehicle control	28.3 ± 4.7	27.3 ± 4.5	100	16.6
	8	33.1 ± 5.3*	32.4 ± 5.4*	117	16.1
	40	41.1 ± 5.6**	39.9 ± 5.4**	145	13.7
	160	52.8 ± 7.4**	51.6 ± 7.0**	186	14.1
24	Vehicle control	27.6 ± 4.2	27.0 ± 4.1	100	15.2
	8	36.6 ± 5.1**	35.7 ± 5.2**	133	14.1
	40	40.1 ± 5.5**	39.4 ± 5.1**	146	13.7
	160	53.5 ± 9.4**	52.3 ± 9.5**	194	17.7

CV, coefficient of variation.

<sup>a</sup>Values shown are mean ± SD. \*Significantly different from corresponding vehicle control at  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different from corresponding vehicle control at  $p < 0.01$ .

**Table 5. Relative uterine weights of rats 6, 12, 18 and 24 hr after last sc administration of BPA.**

Hour	Dose (mg/kg/day)	Wet weight (mg/100g) <sup>a</sup>	Blotted weight (mg/100g) <sup>a</sup>	Wet weight (% of control)	CV (wet weight)
6	Vehicle control	66.4 ± 8.1	65.0 ± 8.0	100	12.1
	8	87.5 ± 18.2**	82.8 ± 15.8**	132	20.8
	40	132.4 ± 23.3**	127.2 ± 22.0**	200	17.6
	160	189.8 ± 25.8**	181.2 ± 25.8**	286	13.6
12	Vehicle control	66.4 ± 12.1	67.3 ± 11.4	100	18.2
	8	78.0 ± 7.4	75.4 ± 6.7	112	9.4
	40	122.2 ± 17.6**	118.5 ± 16.1**	176	14.4
	160	152.2 ± 20.2**	148.8 ± 19.8**	219	13.3
18	Vehicle control	62.2 ± 10.9	59.8 ± 10.5	100	17.5
	8	70.7 ± 8.8	69.2 ± 9.0*	114	12.5
	40	87.3 ± 10.8**	84.8 ± 10.4**	140	12.4
	160	115.7 ± 15.8**	113.0 ± 14.7**	186	13.7
24	Vehicle control	62.6 ± 7.1	60.7 ± 7.2	100	11.5
	8	76.3 ± 12.2**	74.3 ± 12.4**	123	16.0
	40	88.9 ± 10.5**	87.3 ± 9.8**	143	11.8
	160	118.0 ± 19.4**	115.2 ± 19.5**	191	16.4

CV, coefficient of variation.

<sup>a</sup>Values shown are mean ± SD. \*Significantly different from corresponding vehicle control at  $p < 0.05$ . \*\*Significantly different from corresponding vehicle control at  $p < 0.01$ .

**免疫系への影響**

**生体レベルでの影響データ**

著者名: Adriani W, Seta DD, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F, Laviola G.

論文題名: Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A.

出典: Environ Health Perspect. 111(4):395-401.(2003)

チェック項目:

1. 対象生物 (x)ラット SD、( )マウス、( )人、( )その他\_\_\_\_\_
2. 影響の標的臓器 (x)神経系、( )免疫系、( )生殖系、(x)その他 行動
3. 影響の種類 ( )細胞、( )組織、(x)個体、( )その他\_\_\_\_\_
4. 曝露方法 (x)経口、( )埋め込み、その他 micropipette
5. 曝露時期 (x)胚・胎児、(x)周産期、(x)出生後、( )成熟動物、( )細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 40 μg/kg in arachis (peanut)oil)
7. 観察された影響の種類と濃度 (新しいことへのチャレンジ能の低下, 衝撃行動能の低下, 雄ラットの feminization, 覚せい剤(amphetamine)への反応低下 40 μg/kg )
8. 観察時期 ( )出生前、( )出生後、(x)思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)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、(x)なし  
GLP に準拠 ( )はい、(x)いいえ  
ガイドラインへの準拠 ( )はい: ガイドラインの名称 \_\_\_\_\_、(x)いいえ

論文の概要

mating 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。思春期には 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 暴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 暴露雄ラットで、衝撃行動能 (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。

添付資料 Fig, 1, 3, 4

評価者のコメント:

胎児期から乳のみ期に環境汚染濃度に近い低濃度の BPA の暴露を受けると 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 暴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。論文 No. 57 と類似の実験結果である。

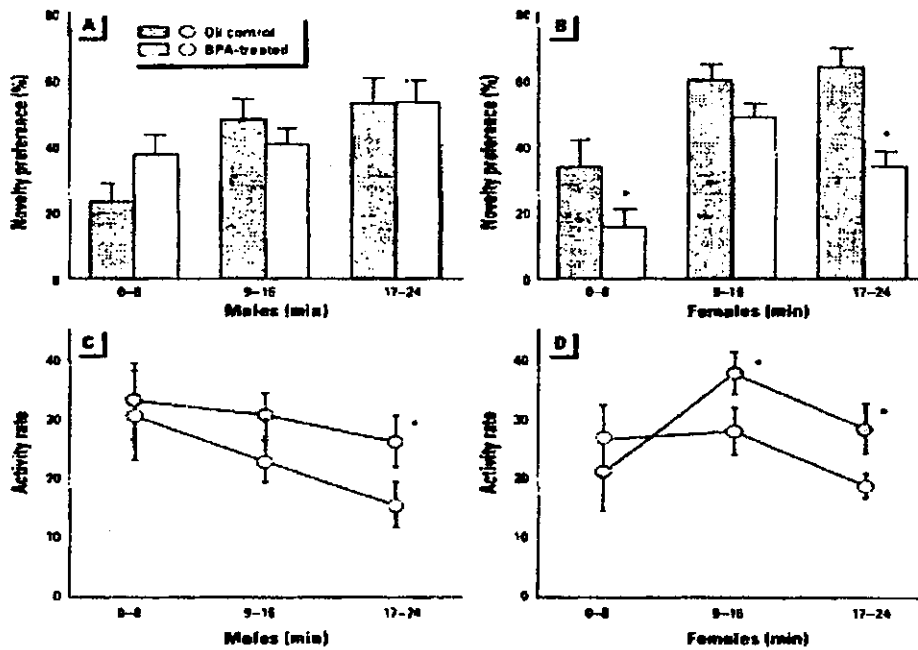


Figure 1. (A,B) Mean ( $\pm$  SE) percentage of time spent in the novel compartment by subjects of both sexes on testing day (experiment 1). (C,D) Mean ( $\pm$  SE) activity rate, measured as number of line crossings per minute, shown by subjects of both sexes in the novel compartment on testing day. During the pretreatment period (days 1-3), subjects were familiarized to one compartment. On testing day, animals were placed in the familiar compartment. After 5 min, a partition was removed and subjects were allowed free access to a novel compartment of the apparatus for a 24-min session.  
\* $p < 0.05$  in comparisons between BPA and control perinatal treatments ( $n = 9$ )

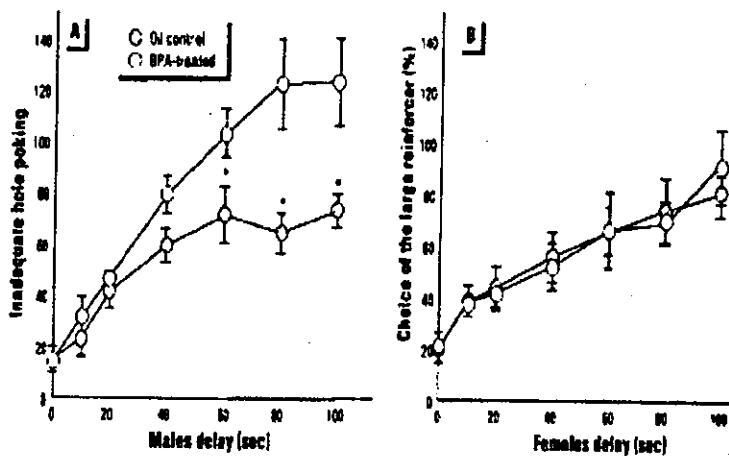


Figure 3. Mean ( $\pm$  SE) frequency of inadequate responding at the IAS hole (i.e., nose poking during the length of the delay, when it was without any consequence) shown by rats during the test for impulsivity (experiment 2). These data reveal that, when animals were waiting for the delivery of the large reinforcer, they failed to rest and were demanding the immediate one. A clear-cut demasculinization in the restlessness profile was evident.

\* $p < 0.05$  in multiple comparisons between BPA and control perinatal treatments ( $n = 9$ )

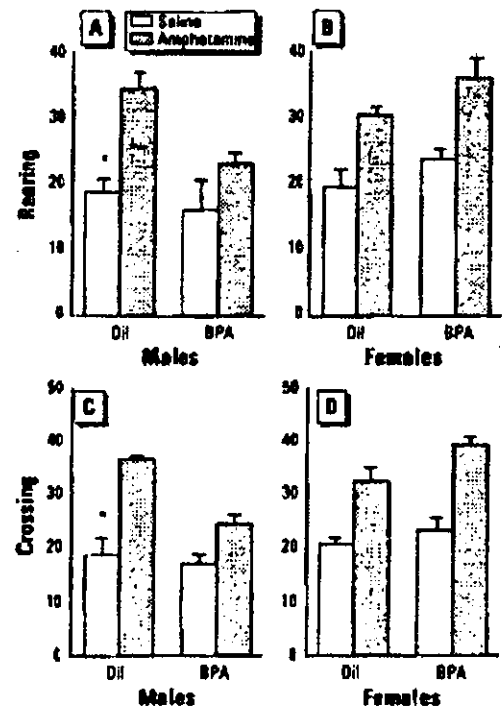


Figure 4. Mean ( $\pm$  SE) frequency of rearing (A,B) and crossing (C,D), shown by rats of both sexes in the open-field test (experiment 3). Subjects received either a SAL ( $n = 4$ ) or an AMPH (1 mg/kg,  $n = 5$ ) injection immediately before being placed for 30 min in the open field.

\* $p < 0.05$  in multiple comparisons performed between SAL- and AMPH-injected subjects

No. 64 文献番号：12535155

担当者 佐二木 順子

著者名：Funabashi T, Sano A, Mitsushima D, Kimura F.

論文題名：Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats.

出典：J Neuroendocrinol. 15(2):134-40.(2003)

チェック項目：

1. 対象生物 ラット Wister 卵巣切除、マウス B6C3F1、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 皮下注射
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 BPA: 4, 40, 400, 4000  $\mu$ g/kg/day, 40 mg/kg/day E2: 40  $\mu$ g/kg/day)
7. 観察された影響の種類と濃度 (PR cells /area 増加: 400  $\mu$ g/kg/day)  
(sexual behavior: rejection 回数 40 mg/kg/day)
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  
GLP に準拠 はい、いいえ  
ガイドラインへの準拠 はい：ガイドラインの名称 動物飼育は横浜市大医学部動物委員会のガイドライン準拠、いいえ

論文の概要

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  $\mu$ g/kg/day), BPA (400  $\mu$ g/kg/day) の皮下投与は対照ラット投与に比べ、PR 発現を有意に増加させ、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。これらの結果は、BPA が視床下部の PR system への影響を介して、生殖機能に影響を及ぼし、それは性行為にも及ぶことが示唆された。

添付資料 Fig. 3, 4, 5

評価者のコメント：

たとえ、ラットでも 400  $\mu$ g/kg/day という低濃度で行動にまで明らかな結果が出るという事実は追試に値するし、他の内分泌かく乱物質が共存するとどうなるのか等慎重な検討が必要である。

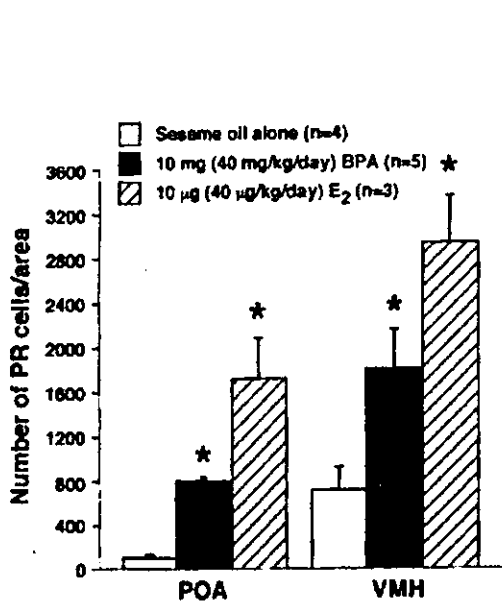


FIG. 3. The estimated total number of progesterone receptor (PR) immunoreactive cells for each area. Each column and vertical line indicate the mean  $\pm$  SEM, respectively. Numbers in brackets refer to the number of rats. \*P < 0.05 versus rats injected with sesame oil alone. Further details of the statistics are given within the text. POA, Preoptic area; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus.

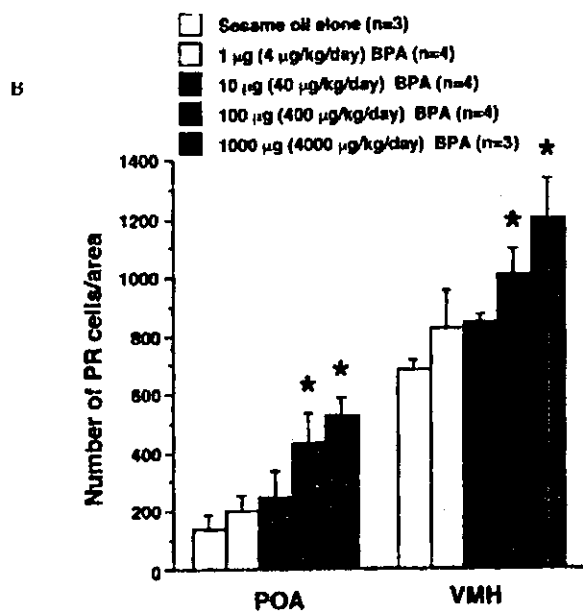


FIG. 4. Dose-related increase in the number of progesterone receptor (PR) immunoreactive cells appearing after injection of bisphenol A (BPA) for each area. Each column and vertical line indicate the mean  $\pm$  SEM, respectively. Numbers in brackets refer to the number of rats. \*P < 0.05 versus rats injected with sesame oil alone. Further details of the statistics are given within the text. POA, Preoptic area; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus.

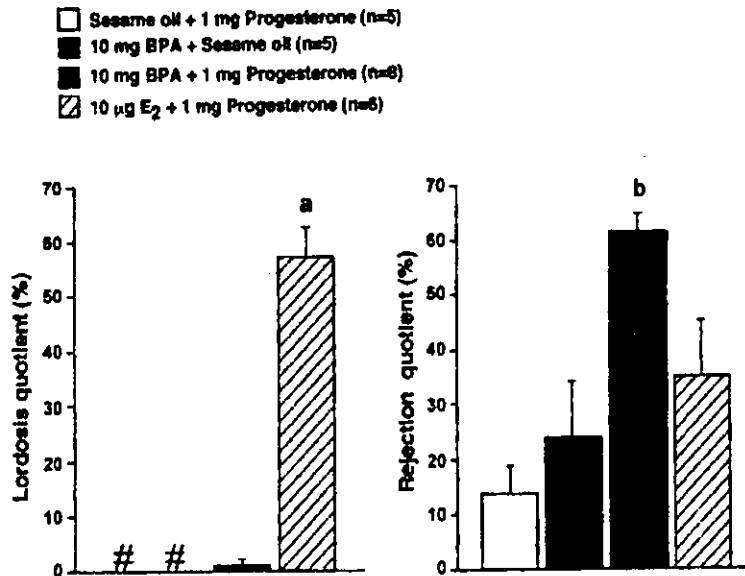


FIG. 5. Effects of injection of sesame oil alone, bisphenol A (BPA), or 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>), followed by injection of sesame oil or progesterone on sexual behaviour in ovariectomized (OVX) rats. Each column and vertical line indicate the mean  $\pm$  SEM, respectively. Numbers in brackets refer to the number of rats. #P < 0.01 versus the other three treatment groups. \*P < 0.05 versus the oil + progesterone group and the BPA + sesame oil group. \*N: lordosis was observed. Further details of the statistics are given within the text.

NO.048 文献番号： 12709020

担当者 吉塚直伸

著者名 : Lee MH, Chung SW, Kang BY, Park J, Lee CH, Hwang SY, Kim TS.

論文題名 : 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+.

出典 : Immunology. 109(1):76-86. (2003)

チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット、(x)マウス (BALB/c)、( )人、( )その他\_\_\_\_\_
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、(x)免疫系、( )生殖系、( )その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 ( )細胞、( )組織、(x)個体、( )その他\_\_\_\_\_
4. 曝露方法 ( )経口、( )埋め込み、その他 i.p. injection
5. 曝露時期 ( )胚・胎児、( )周産期、( )出生後、(x)成熟動物、( )細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 25mg/kg の投与量で1日おきに1週間投与。1用量段階)
7. 観察された影響の種類と濃度 (BPA25mg/kg, ip 隔日3回投与:KLH 感作マウス CD4+の in vitro 抗原刺激 IL-4 産生を促進、また血中抗原特異的 IgE が有意に増加)
8. 観察時期 ( )出生前、( )出生後、( )思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ( )あり、(x)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、(x)なし  
GLP に準拠 ( )はい、(x)いいえ  
ガイドラインへの準拠 (x)はい: ガイドラインの名称 the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals、( )いいえ

論文の概要

IL-4 は、アレルギーの免疫反応に深く関与しているが、その IL-4 産生に対する BPA の影響を検索。BPA は、KLH で感作したマウス CD4 陽性 T 細胞の IL-4 産生を濃度依存的に促進。in vivo での BPA 曝露によって、KLH で感作したマウスの CD4 陽性 T 細胞の IL-4 産生、及び血清中抗原特異的 IgE レベルは有意に増加。IL-4 産生促進効果の機構解析を行ったところ、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ていることが判明。また BPA による IL-4 産生促進は、Ca2+ influx の阻害剤である nitrendipine および、calcineurin inhibitor である FK506 によって有意に減少。

添付資料 : Figure 4. Figure 5

評価者のコメント : 濃度が高いことを著者は認めているが、過去の事例から妥当だとしている。その理由として、BPA を投与したとき、得られる血清中の濃度は低いので影響評価のためには高くせざるを得ない。最も低濃度での研究例として VEGF 遺伝子発現に及ぼす影響を調べた研究 (本調査: No159、PubMed : 11393178、i. p. 37.5mg/kg) の曝露例をあげ比較。また、10mg/kg での経口投与の場合、その最大血中濃度は 14.7ng/ml であること (Ref.40) をあげ妥当だとしている。しかし、ヒト血清中に観察される BPA 濃度は 1-2ng/ml とする報告もあることから本研究は比較的高い濃度での試験と考えられる。また著者は、in vitro の実験で、10~50µM で有意な差を示しているが、換算すると 2.3~11.4µg/ml となる。上記血中濃度 (14.7ng/ml) の約 150~700 倍の濃い濃度で行っていることになり、報告された現象は実際的といえるか疑問。



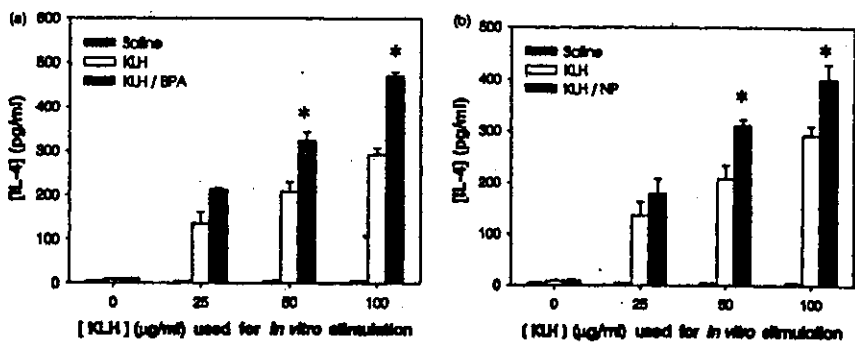


Figure 4. IL-4 production by lymph node cells in KLH-primed mice treated *in vivo* with BPA or NP. Mice (5 per group) were injected in the footpad with 100 µg KLH in alum. The mice were injected i.p. with BPA (25 mg/kg) (a), NP (5 mg/kg) (b) or saline every other day for 1 week. Control mice received saline alone. One week after the second immunization with KLH, lymph node cells were restimulated *in vitro* with KLH (0–100 µg/ml) for 4 days. IL-4 levels in the culture supernatants were analyzed by ELISA. The data represent the mean ± SEM ( $n = 3$ ). \* $P < 0.01$  relative to groups without BPA or NP treatment.

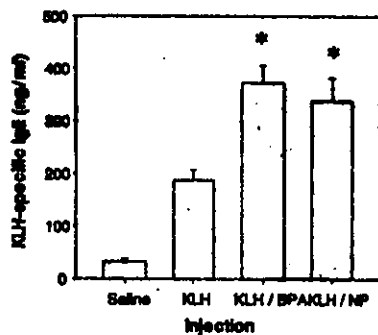


Figure 5. Effect of BPA or NP on KLH-specific IgE levels in the sera of KLH-primed mice. Mice (five per group) were treated with the same protocol as described in the legend of Fig. 4. One week after the second immunization with KLH, KLH-specific IgE levels in the sera were determined by ELISA. The experiment was repeated twice with similar results. \* $P < 0.01$  relative to a group treated with KLH alone.

NO. 010 文献番号： 14644661

担当者 吉塚直伸

著者名：Sawai C, Anderson K, Walsler-Kuntz D.

論文題名：Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice.

出典：Environ Health Perspect. 111(16):1883-7. (2003)

チェック項目：

1. 対象生物 ( )ラット、(x) マウス (NZB/NZW, C57BL/6)、( ) 人、( ) その他\_\_
2. 影響の標的臓器 ( ) 神経系、(x) 免疫系、( ) 生殖系、( ) その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 ( ) 細胞、( ) 組織、(x) 個体、( ) その他\_\_\_\_\_
4. 曝露方法 ( ) 経口、( ) 埋め込み、その他 混餌投与
5. 曝露時期 ( ) 胚・胎児、( ) 周産期、( ) 出生後、(x) 成熟動物、( ) 細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 2.5µgBPA/kg/day, 7days)
7. 観察された影響の種類と濃度 (投与 C57BL/6, ConA 刺激脾細胞分泌 INF-γ量が雌雄とも統計的有意に減少(Fig2)) (投与 NZB/NZW, 蛋白尿を指標とした糸球体腎炎発症遅延(Fig5))
8. 観察時期 ( ) 出生前、( ) 出生後、( ) 思春期、(x) 成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ( ) あり、(x) 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、(x) なし  
GLP に準拠 ( ) はい、(x) いいえ  
ガイドラインへの準拠 (x) はい：ガイドラインの名称 the Institutional Animal Care and Use Committee、( ) いいえ

論文の概要

エストロゲン受容体結合性 BPA のマウスの免疫系への影響を in vivo で研究。5 週齢の C57BL/6 マウス及び lupus 発症 NZB/NZW マウスを 2.5µgBPA/kg/day の低用量の混餌投与で 1 週間飼育し、**ConA 刺激脾細胞が分泌する INF-γ**を測定。BPA 不含で飼育した対照マウスに比べ、C57BL/6 雄で 40%、雌で 28%、**いずれも有意に減少していた**。一方、lupus 発症前の雌 NZB/NZW マウスを上記濃度で飼育したところ、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% にまで減少した。また上記投与 NZB/NZW マウスにおいて lupus の症徴である蛋白尿発症が平均 7 週遅延した。

添付資料

Figure 2 および Figure 5

評価者のコメント

NZB/NZW マウスは自己免疫疾患 lupus を自然発症するモデルマウス。本論文は、エストロゲン受容体に BPA が結合する結果生じるエストロゲンとは逆の作用が生じることを報告する論文。BPA の有害性を論じるものではなく、むしろ lupus に対する protective な作用を示すもの。

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、その結果、NZB/NZW マウス lupus 症徴蛋白尿発症の遅延が生じた。5 週齢から 8 ヶ月齢まで BPA を投与したマウスでは蛋白尿を生じたマウスは観察されなかったと記述 (データなし)。BPA は低用量で免疫系における ER-α及び/または ER-βに結合して INF-g を低下させると推論。

添付資料

Figure 2 および Figure 5

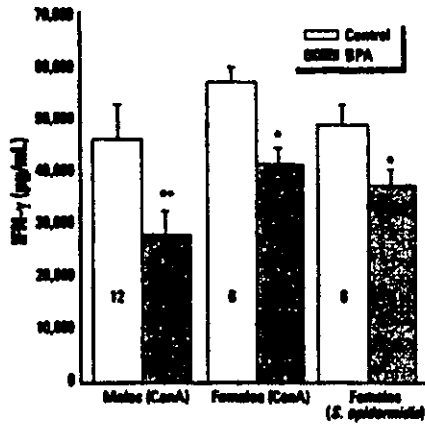


Figure 2. Decreased IFN- $\gamma$  concentration in 6-week-old NZB/NZW mice after an oral dose of 2.5  $\mu$ g BPA/kg bw/day for 7 days. Twenty-four-hour supernatants from splenic mononuclear cells isolated 2-4 days after the last BPA dose were stimulated with either 4.0  $\mu$ g/ml ConA or heat-killed *S. epidermidis* and assayed for cytokine production by ELISA. The data represent the mean  $\pm$  SEM. Numbers within the bars indicate the number of animals per treatment. \* $p < 0.05$ , and \*\* $p < 0.01$  by paired Student's *t*-test.

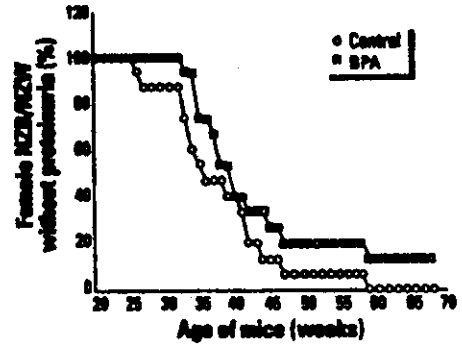


Figure 5. Development of proteinuria in 5- to 6-week-old female NZB/NZW mice fed PBS ( $n = 15$ ) or BPA ( $n = 15$ ) daily for 7 days.

NO.069 文献番号： 12505275

担当者 吉塚直伸

著者名：Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga F, Naito H, Suzuki Y.

論文題名：Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic Escherichia coli.

出典：Toxicol Lett. 2003 Jan 13;136(3):217-27.

チェック項目：

1. 対象生物 ( )ラット、(x)マウス (BALB/c)、( )人、( )その他\_\_\_\_\_
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、(x)免疫系、( )生殖系、( )その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 ( )細胞、( )組織、(x)個体、( )その他\_\_\_\_\_
4. 曝露方法 ( )経口、( )埋め込み、その他 皮下投与
5. 曝露時期 ( )胚・胎児、( )周産期、( )出生後、(x)成熟動物、( )細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (記入 5mg/kg 体重, 1日1回 s.c. 投与, 5日間,)
7. 観察された影響の種類と濃度 (BPA 投与7日後、大腸菌を腹腔内投与し、その後生菌数を計測。BPA5mg/kg 体重投与時に菌排除能が統計的に有意に低下した)
8. 観察時期 ( )出生前、( )出生後、( )思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 (x)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、(x)なし  
GLP に準拠 ( )はい、(x)いいえ  
ガイドラインへの準拠 (x)はい：ガイドラインの名称 Principle Law on Animal Experimentation of National Institute of Health Science、( )いいえ

論文の概要

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。予め BPA を皮下投与 (5 mg/kg) したマウスの腹腔内に大腸菌 K-12 株を投与した。BPA を予め投与することで脾臓内の T 及び B 細胞は減少した。大腸菌を投与後、**初期段階(24 時間以内)で菌を排除する能力は、BPA 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していた。マクロファージおよびリンパ球に関して、BPA は脾臓内の細胞数を減少させ、感染に対する防御能を減少させた。MCP-1 の産生は、BPA 投与によって増強されたが、感染後 IL-6 の産生は低下した。以上の結果から BPA は、非特異的な生体防御能を低下させているものと推察した。

添付資料

Fig.5

評価者のコメント

用量依存的な検索を行い、**0.5mg/kg 以下の濃度で本影響が出ていないことを指摘し、この値を NOEL** としている。

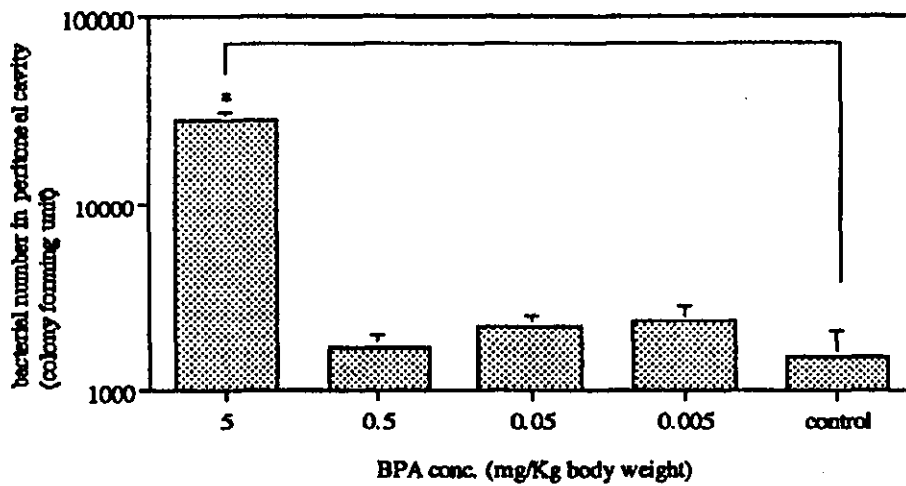


Fig. 5. The dose-response of BPA on the bacterial clearance in the peritoneal cavity. Mice treated with various concentrations of BPA for 5 days s.c. were infected with  $1.0 \times 10^8$  *E. coli* K-12 by intra-peritoneal 3 days after the end of treatment. Peritoneal exudates were obtained 24 h after infection and the viable bacteria were counted. Data was expressed as the arithmetic mean and S.E. Each group consisted of five mice. Asterisk indicates a significant difference between the treatment group and control group ( $P < 0.01$ ).

NO.067 文献番号： 12510852

担当者 吉塚直伸

著者名：Youn JY, Park HY, Lee JW, Jung IO, Choi KH, Kim K, Cho KH.

論文題名：Evaluation of the immune response following exposure of mice to bisphenol A: induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells.

出典：Arch Pharm Res. 25(6):946-53. (2002)

出典：

チェック項目：

1. 対象生物 ( )ラット、(x)マウス(ICR)、( )人、( )その他
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、(x)免疫系、( )生殖系、( )その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 ( )細胞、( )組織、(x)個体、( )その他\_\_\_\_\_
4. 曝露方法 (x)経口、( )埋め込み、その他 飲料水, 4週間
5. 曝露時期 ( )胚・胎児、( )周産期、( )出生後、(x)成熟動物、( )細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (0, 0.015, 1.5 & 30 mg BPA/ml[1%ethanol]の3濃度の飲料水を自由摂取)
7. 観察された影響の種類と濃度 (0.015mg/ml 飲料水, ConA 刺激脾臓細胞の増殖活性を有意に亢進)  
(0.015mg/ml 飲料水, 脾細胞 RT-PCR で IL-4 が抑制、IFN- $\gamma$ の亢進)
8. 観察時期 ( )出生前、( )出生後、( )思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ( )あり、(x)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、(x)なし  
GLP に準拠 ( )はい、(x)いいえ  
ガイドラインへの準拠 ( )はい：ガイドラインの名称\_\_\_\_\_、(x)いいえ

論文の概要

BPA を飲料水 (3 濃度) として 4 週間投与。BPA 処理によって体重、脾臓重量、脾臓リンパ球の subpopulation の分布に変化は認められず。一方、BPA は脾臓からの prolactin 産生を亢進させ、ConA 刺激によって誘導される脾臓細胞の増殖活性を有意に亢進 ( $p < 0.001$ )。さらに、BPA 処理によって、Th2 タイプのサイトカイン IL-4 が抑制される中であって、Th1 タイプのサイトカイン IFN- $\gamma$ の産生が誘導。同時に転写因子 GATA-3 と IRF-1 の RT-PCR の結果とも一致した。以上、BPA のエストロゲン様の活性による prolactin 産生誘導は、サイトカインプロファイルに影響を与え、細胞性免疫の不均衡を生じさせた結論。

添付資料

Fig.-2, Fig.-3

評価者のコメント

一般的に BPA 投与で IgE の亢進、IL-4 の亢進など Th2 シフトが報告されている (Lee MH et al, 本調査 No048)。しかし、本論文では INF- $\gamma$ 亢進を示し、Th1 シフトとしている。

Fig.-3 の PCR 産物 (IL-4) の電気泳動像を見ると、水のみ投与のバンドに比べ 0%BPA、すなわち 1% エタノール投与ではバンドが著しく小さくなっており、(INF- $\gamma$ ) のバンドも出ている。このことから BPA を飲料水に溶かすために用いている 1%エタノールの影響が強く出ていることが分かる。また、INF- $\gamma$ が亢進しているとのデータも PCR だけで、INF- $\gamma$ の蛋白質や活性で証明することなく結論している。いずれのデータも BPA 濃度に対する濃度依存性に疑問が持たれる。また、BPA のエストロゲン作用に注目しているものの陽性対照としてエストロゲンを用いていない。

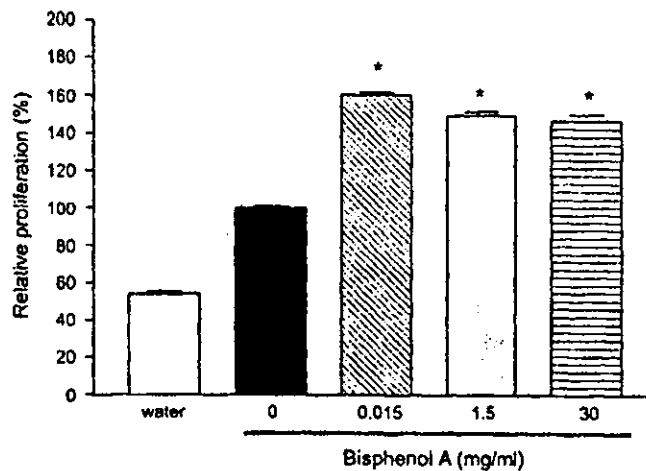


Fig. 2. Effect of bisphenol A on proliferation of splenocyte in response to Con A. Spleen lymphocytes ( $4 \times 10^6$ ) from mice treated with water or various dose of BPA as indicated on the graph for 4 weeks were cultured for 48 hr with Con A ( $2 \mu\text{g/ml}$ ). After 48 hr stimulation, the cultures pulsed for 4 hrs with  $0.3 \text{ mg/ml}$  XTT in combination with  $1.25 \text{ mM}$  PMS for proliferation XTT assay. \*  $P < 0.001$ .

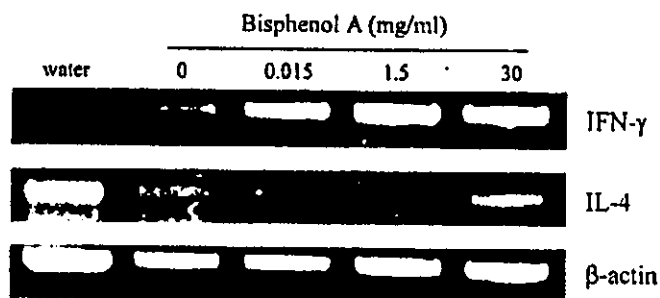


Fig. 3. Effect of bisphenol A on cytokine profile in spleen. Bisphenol A treatment for 4 weeks showed the Th1 cytokine dominant profile. Total RNAs were extracted from spleens of mice exposed to drinking water in the presence and absence of bisphenol A as described in Materials and Methods and subjected to RT-PCR. Expected sizes of products are 243, 180 and 349 bp for IFN- $\gamma$ , IL-4 and  $\beta$ -actin, respectively.

免疫系への影響

その他



NO.083 文献番号： 12392075

担当者 吉塚直伸

著者名：Han D, Denison MS, Tachibana H, Yamada K.

論文題名：Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes.

出典：Biol Pharm Bull. 2002 Oct;25(10):1263-7.

チェック項目：

1. 対象生物 ( )ラット、(x)マウス (BALB/c)、( )人、( )その他\_\_\_\_\_
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、(x)免疫系、( )生殖系、( )その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 (x)細胞、( )組織、( )個体、( )その他 splenocyte
4. 曝露方法 ( )経口、( )埋め込み、その他 培養系
5. 曝露時期 ( )胚・胎児、( )周産期、( )出生後、( )成熟動物、(x)細胞
6. 曝露濃度 用量段階 ( $10^{-8}$ )~ $10^{-3}$ M)
7. 観察された影響の種類と濃度 (1 $\mu$ Mをピークに  $10^{-8}$ ~ $10^{-4}$ Mの範囲で IgM 産生を亢進させたが、IgE, IgA, IgG の産生には影響を与えなかった)
8. 観察時期 ( )出生前、( )出生後、( )思春期、(x)成熟期
9. 論文中に低用量影響への関心 ( )あり、(x)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、(x)なし  
GLP に準拠 ( )はい、(x)いいえ  
ガイドラインへの準拠 ( )はい：ガイドラインの名称\_\_\_\_\_、(x)いいえ

論文の概要

マウス脾臓細胞による Ig 分泌に対するエストロゲン様物質の影響を検討。17 $\beta$ -estradiol(ES)は IgM および IgE 産生を亢進させたが、DES は IgE レベルのみを亢進させた。一方、tamoxifen と BPA は、IgM レベルを生理的濃度で亢進させた。daidzein は IgM 及び IgE レベルを 10 $\mu$ M 濃度で亢進させたが、genistein は 10 $\mu$ M 濃度で IgM レベルを低下させ、IgE を増加させた。quercetin 及び luteolin は IgE レベルをすべての濃度で増加させたが、IgA, IgG 及び IgM のレベルに影響を与えなかった。以上の結果から環境エストロゲンはマウス脾細胞の抗体産生に影響を与えると推察。

添付資料

Fig. 2

評価者のコメント

特になし

- ①実験上の問題：方法の項を読む限り同一個体から採取した細胞を triplicate で培養し統計処理している。個体差を考慮した実験が望ましい。
- ②BPA の影響を観察した実験 Fig2 で、最低濃度( $10^{-8}$ M)でも対照と差があり、影響が出る濃度が推定できない。
- ③ES は  $10^{-5}$ M 以上で IgE 分泌を亢進しているが、BPA は  $10^{-8}$ ~ $10^{-4}$ の範囲で IgE 分泌が陰性対照より低い値を示す。低いこと理由は無記載。アレルギーの観点から IgE 分泌は重要。

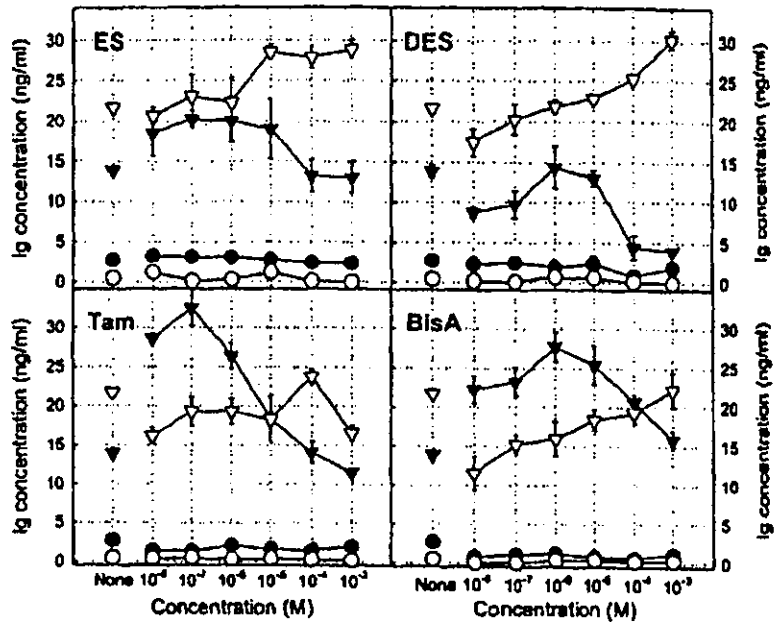


Fig. 2. Dose-Dependent Effect of Natural and Environmental Estrogens on Ig Levels in Mouse Splenocyte Culture Medium

Splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 7 d in PR(-) DMEM medium containing 10% CDFBS in the presence of natural and environmental estrogens. Ig contents of culture supernatant were measured by ELISA. The results are the mean  $\pm$  S.E. for triplicate cultures ( $p < 0.05$ ). ●, IgA; ○, IgG; ▼, IgM; ▽, IgE.

NO. 216 文献番号： 10614622

担当者 吉塚直伸

著者名：Inadera H, Sekiya T, Yoshimura T, Matsushima K.

論文題名：Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells.

出典：Endocrinology. 2000 Jan;141(1):50-9.

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、(x)免疫系、( )生殖系、( )その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 (x)細胞、( )組織、( )個体、( )その他 MCF-7
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、(x)細胞
6. 曝露濃度 用量段階 ( $10^{-7}$  ~  $10^{-6}$ ) M
7. 観察された影響の種類と濃度：(IL-1 $\alpha$ で誘導される MCP-1 産生を  $5 \times 10^{-7}$  M で阻害)
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、(x)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、(x)なし  
GLP に準拠 ( )はい、(x)いいえ  
ガイドラインへの準拠 ( )はい：ガイドラインの名称\_\_\_\_\_、(x)いいえ

論文の概要

ケモカイン産生に対する 17beta-estradiol (E2)及び Xenoestrogens (XE)の影響評価、およびそのメカニズムを解析。MCP-1 は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。ヒト乳がん由来 MCF-7 は IL-1 $\alpha$  に反応して大量の MCP-1 を産生。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。Bisphenol A(BPA)および Nonylphenol(NP)もまた MCP-1 産生を阻害するが、その能力は E2 に比べ 1000 倍~10000 倍低い。E2、BPA および NP は MCF-7 細胞の IL-1 $\alpha$  誘導 MCP-1 mRNA 発現を阻害したが、NF $\kappa$ B の 2 つの結合部位 A1 及び A2 への結合によってその mRNA 発現が阻害された。

添付資料

Fig2

評価者のコメント

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。その産生動態を、MCF-7 細胞を用いて検索。BPA の阻害を E2 及び NP と比較。BPA は NP と同程度の濃度 ( $5 \times 10^{-7}$  M) で阻害しているが、E2 は、 $10^{-11}$  M で阻害。その阻害は MCP-1 遺伝子の転写因子における阻害であることを示す。本論は、BPA の害を指摘したものではなく、エストロゲン受容体を介して作用することを示した論文。

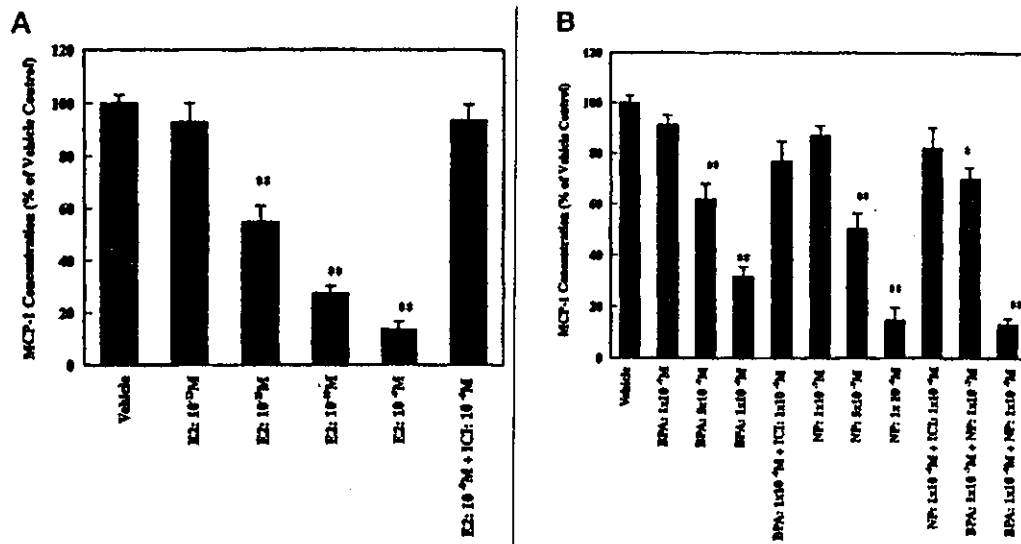


Fig. 2. Effects of E<sub>2</sub> (A) or XEs (B) on MCP-1 production by MCF-7 cells stimulated with IL-1 $\alpha$ . A, Cells were stimulated with IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) in the presence or absence of E<sub>2</sub> for 72 h. The antiestrogen ICI 162,780 was added contemporaneously. MCP-1 concentrations in the culture media were measured by ELISA. The results are translated to the percentages of the control incubation (IL-1 $\alpha$  and ethanol vehicle). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD for three separate experiments. \*\*,  $P < 0.01$ , significant difference from vehicle control, as determined by Student's  $t$  test. B, Cells were stimulated with IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) in the presence or absence of BPA and/or NP for 72 h. The

antiestrogen ICI 162,780 was added contemporaneously. MCP-1 contents in the culture media were measured by ELISA. The results are expressed as a percentage of the control incubation (IL-1 $\alpha$  and ethanol vehicle). Results are the mean  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.05$  \*\*,  $P < 0.01$  (significant difference from vehicle control, as determined by Student's  $t$  test).