

達して作用することは現実に起こっていると考えてよいだろう。

電気生理解析は、非常に高感度である。成獣ラット海馬スライスを用いて、CA1,CA3,DGの3領域で同時にNMDA刺激による長期抑圧LTDを多電極電気生理で測定した。エストラジオール, DES, BPAなどの急性効果を解析したところ、これらは、1-100 nMという低濃度でLTDを促進した。このLTD促進効果はER α のアゴニストPPTでも同様に得られたが、ER β のアゴニストDPNでは抑制されたので、多分ER α を介した効果であろう。このように、環境ホルモンがナノモルの低濃度でシナプス伝達を攪乱する効果がはっきりと観測された。この結果は、過去に色々な測定系で発表されている「核受容体ER α を介する遺伝子発現作用効果で比較すると、エストラジオール1 nM程度と同じ影響を及ぼすには、BPAは1000-10000 nM程度も必要であり、BPAの女性ホルモン様作用は1万倍も弱い」、という報告とは非常に異なる。BPAは膜に効果的に溶け込むので、脳神経細胞のシナプス膜に急性的に作用する際には、体細胞での遺伝子転写を介する場合より作用効果が大きく、攪乱効果が格段に強いとも推測される。一方、ノニルフェノール(NP)やオクチルフェノール(OP)はLTDを抑制し、トリブチルスズ(TBT)はLTDには何も目立った影響は与えなかった。

環境ホルモンの影響を感度よく調べる、もう一つの方法として、神経スパイン(シナプス後部)の密度と形態を解析した。電気生理では、シナプスを形成する活性型の神経スパインしか測定できないが、この形態解析法では、シナプスを形成しない神経スパインも含んだ全てのスパインが解析できる。成獣海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして、個々のスパインを可視化する。その結果海馬スライスにエストラジオールを2時間作用させるだけで、CA1領域で全スパイン密度が増加し、特にthinスパインが選択的に増加することを発見した。エストラジオール, DES, BPA共に1-100 nMという低濃度で非常に良く似たスパイン増加効果を示した。更なる解析結果から、ER α アゴニストのPPTがエストラジオールと同じようなスパイン増加効果を示すことから、これらの作用はER α を介して行われていることを確認した。MAP Kinase, NMDA受容体をブロックするとこのエストラジオール効果は消失することなど、薬理的に情報伝達経路を解析した。ここで発見した、記憶場所の候補であるスパインが増加することは、環境ホルモンが外来性の神経成長因子として働くことを示している。

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
特別協力研究報告書

低用量内分泌かく乱化学物質の免疫応答制御に及ぼす影響に関する研究

協力研究者 五十嵐美德 国立がんセンター研究所薬効試験部 主任研究官

研究要旨

低用量の bisphenol A (BPA) の免疫系に及ぼす影響について、免疫応答制御するナチュラルキラーT(NKT)細胞のサイトカイン産生に着目し、解析した。BPA の NKT 細胞の増殖および Th1 および Th2 サイトカイン (IFN- γ および IL-4) 産生に対する影響を *in vitro* で解析した。その結果、NKT 細胞のサイトカイン産生は 10^{-5} M 以下の濃度の BPA は NKT 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。BPA の濃度依存的に NKT 細胞のサイトカイン産生は Th2 優位となった。BPA が NKT 細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生のバランスに影響を及ぼすことから、アレルギー疾患などの発症に関連する可能性が考えられた。

A. 研究目的

低用量の bisphenol A (BPA) の免疫系に及ぼす影響について、ナチュラルキラーT(NKT)細胞の T ヘルパー1(Th1)/Th2 バランスの制御機構に着目し、解析した。

エストロゲンは T ヘルパー 1 (Th1)/Th2 反応のバランスに作用し、自己免疫の発症との関連が示唆されている。また内分泌かく乱化学物質もサイトカイン産生に影響を及ぼすことが報告されている。そこで Th1 および Th2 サイトカインを迅速に多量に産生し、免疫応答を制御する NKT 細胞のサイトカイン産生に及ぼす BPA の影響を明らかにすることを目的とし、解析した。

BPA の NKT 細胞の増殖および Th1 および Th2 サイトカイン (IFN- γ および IL-4) 産生に対する影響を *in vitro* で解析した。

C57BL/6 マウス(雄 8~12 週齢)の脾細胞を BPA (10^{-11} ~ 10^{-4} M) 、 IL-2(100IU/ml) と α -galactosylceramide (α -GC: 100ng/ml) で 4 日間、培養した。NKT 細胞の IFN- γ および IL-4 の産生について、細胞内サイトカイン染色法および培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法にて測定した。また、NKT 細胞の増殖について、MTT 法および培養後の脾細胞を CD1d/ α -GC テトラマーを用いて染色し、フローサイトメーターにて NKT 細胞の比率を解析した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

国立がんセンター動物実験倫理委員会規定に基づき、動物実験を行なった。

C. 研究結果

NKT細胞の活性化によるTh1およびTh2サイトカイン産生のバランスに及ぼすBPA(濃度 10^{-4} ~ 10^{-9} M)の影響を *in vitro* で解析した。その結果、 10^{-5} M以下のBPAの濃度ではNKT細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。しかし、BPAの濃度依存的にTh2優位な(IL-4/IFN- γ 比の増加)サイトカイン産生となった。

マウス脾細胞中にNKT細胞は1.5%程度存在する。 α -GCとIL-2の存在下で培養することによって10~20%までに増幅する。 α -GCに特異的なNKT細胞をCD1d/ α -GCテトラマーを用いて培養後のNKT細胞を同定した結果、 10^{-11} ~ 10^{-5} MのBPAではNKT細胞の増幅に変化は認められなかった。 10^{-4} MのBPA存在下ではNKT細胞の著明な減少が認められた。また 10^{-11} ~ 10^{-5} MのBPAの濃度では培養後の細胞の増殖率には変化が認められないが、 10^{-4} Mの濃度では増殖率が著明に減少した。

NKT細胞は活性に伴ってTh1/Th2サイトカインを産生する。培養上清中のIFN- γ を測定した結果、BPAの濃度依存的に減少傾向にあった。これに対して、IL-4は 10^{-11} ~ 10^{-6} MのBPAの濃度ではIL-4の産生に影響を与えないが、 10^{-5} Mでは若干増加が認められた。細胞増殖に影響を与える 10^{-4} M BPA濃度ではIL-4の産生が著明に減少した。BPAの濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生が認められた。

NKT細胞の細胞内サイトカインを解析した結果、IL-4およびIFN- γ 陽性NKT細胞の比率はコントロールと比較してBPA(10^{-11} ~ 10^{-5} M)の濃度では変化

が認められなかった。しかし、IFN- γ 強陽性のNKT細胞の比率が、BPAの濃度増加に伴い減少した。

D. 考 察

内分泌かく乱化学物質がTh1/Th2バランスをTh2優位にすることが報告されている。Th2細胞が原因の一つであるアレルギー疾患の近年の増加と内分泌かく乱化学物質との関連が示唆されている。多量のTh1およびTh2サイトカインを産生し、Th1/Th2バランスを制御する機能を有するNKT細胞は抗腫瘍活性、感染防御、自己免疫疾患の発症の抑制やアレルギーに関与することが明らかとなっている。内分泌かく乱化学物質のNKT細胞に及ぼす影響を解析することは、意義がある。

NKT細胞のBPAの濃度依存的にTh2優位なサイトカイン産生を示す結果から、BPAがNKT細胞を介した免疫応答に影響を与えることが示唆された。しかしながら、高濃度BPA(10^{-4} M)ではNKT細胞自身の増殖抑制を誘導し、Th1/Th2サイトカインの産生を低下させる為に、低濃度のBPAがNKT細胞のTh1/Th2バランスに影響を与えられられる。

BPAによるTh2優位なNKT細胞のサイトカイン産生は多量にIFN- γ 産生する能力のあるNKT細胞(細胞内IFN- γ 強陽性NKT細胞)の減少による。BPAは多量にIFN- γ 産生するNKT細胞に影響を及ぼすことが示唆された。

E. 結 論

10^{-5} M以下の濃度のBPAは *in vitro* でのNKT細胞の増殖に影響を及ぼさない。しかしBPAの濃度依存的にNKT細胞のサイトカイン産生をTh2優位に偏らせることが明らかとなった。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwatani M, Ikarashi Y, Mineishi S, Asaka M, and Wakasugi H. An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: Importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. **Transplantation**. 2005; 80:1145-52.
2. ©Ikarashi Y, Iizuka A, Heike Y, Yoshida M, Takaue Y, and Wakasugi H. Cytokine production and migration of *in vitro*-expanded NK1.1⁺ invariant V α 14 natural killer T (V α 14iNKT) cells using α -galactosylceramide and IL-2. **Immunol Lett**. 2005; 101:160-167.
3. Ohashi M, Yoshida K, Kushida M, Miura Y, Ohnami S, Ikarashi Y, Kitade Y, Yoshida T, and Aoki K. Adenovirus-mediated interferon α gene transfer induces regional direct cytotoxicity and possible systemic immunity against pancreatic cancer. **Br J Cancer**. 2005; 93:441-449.
4. Ikarashi Y, Iizuka A, Koshidaka Y, Heike Y, Takaue Y, Yoshida M, Kronenberg M, Wakasugi H. Phenotypical and functional alterations during the expansion phase of invariant V α 14 natural killer T (V α 14iNKT) cells in mice primed with α -galactosylceramide **Immunology**. 2005; 116:30-37.
5. Harada Y, Imataki O, Heike Y, Kawai H, Shimosaka A, Mori S, Kami M, Tanosaki R, Ikarashi Y, Yoshida M, Wakasugi H, Saito S, Takaue Y, Takei M, and Kakizoe T. Expansion of α -galactosylceramide-stimulated V α 24⁺ NKT cells cultured in the absence of animal materials. **J Immunother**. 2005; 28:314-21.
6. Fujii H, Seki S, Kobayashi S, Kitada T, Kawakita N, Adachi K, Tsutsui H, Nakanishi K, Fujiwara H, Ikarashi Y, Taniguchi M, Mitchell K, Ikemoto M, Nakajima Y, Arakawa T, and Kaneda K. A murine model of NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide/d-galactosamine. **Virchows Arch**. 2005; 446: 663-73.
7. Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. **Blood**. 2005; 106: 184-192.
8. Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Takemitsu T, Saito K, Wang L, Ikarashi Y, Wakasugi H, Nakayama T, Taniguchi M, Kuribayashi K, Old LJ, and Shiku Y. Accelerated chemically-induced tumor development

mediated by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in wild-type hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005; 105: 9253-9257.

9. Kaneda H, Takeda K, Ota T, Kaduka Y, Akiba H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Kinoshita K, Yagita H, Okumura K. ICOS costimulates invariant NKT cell activation. **Biochem Biophys Res Commun.** 2005; 327:201-7.

10. 五十嵐美徳、若杉尋 NKT 細胞細胞の認識する抗原 血液・腫瘍科 科学評論社 2005; 51: 390-395.

2. 学会発表

1. 吉田光二、森川隆之、五十嵐美徳、若杉尋。PKCβII を発現させた HLE 細胞におけるグニディマクリンの p21 長期発現誘導による G2 期停止 第 64 回日本癌学会学術総会（札幌）2005 年

2. 小田慶太郎、若杉尋、吉田光二、平家勇司、五十嵐美徳、森川隆之、白川一男、橋本大定。血管擬態を呈するヒト IBC, PNET モデルマウスに対する COX-2 プロモーター導入アデノウイルスベクターによる遺伝子治療 第 64 回日本癌学会学術総会（札幌）2005 年

3. 今滝修、平家勇司、飯塚明、五十嵐美徳、高上洋一、若杉尋。G-CSF 投与後の末梢血単核球成分由来 Vα24 陽性 NKT 細胞の増殖効率改善と CD14 陽性細胞上の CD1d 分子発現の関係 第 64 回日本癌学会学術総会（札幌）

2005 年

4. 五十嵐美徳、飯塚明、河上千尋、平家勇司、高上洋一、若杉尋。NKT 細胞由来 IL-4 による NK 細胞の機能的な変化 第 35 回日本免疫学会学術総会（横浜）2005 年

5. 飯塚明、五十嵐美徳、平家勇司、北川昌伸、廣川勝いく、若杉尋、高上洋一。体外での NKT 細胞の増殖第 35 回日本免疫学会学術総会（横浜）2005 年

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他（データベース等）

特になし

ビスフェノールAの低用量影響評価データ集

監修 徳島大学総合科学部教授 関澤 純

平成18年3月

平成17年度厚生労働科学研究（化学物質リスク研究事業）
「内分泌かく乱物質の生体影響メカニズム（低用量効果・複合効果を含む）
に関する総合研究」（井上 達 班長）の分担研究
「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」
による研究成果

目次

はじめに	1
生殖系への影響	
生体レベルでの影響データ	
Ashby J, Odum J. Gene expression changes in the immature rat uterus: effects of uterotrophic and sub-uterotrophic doses of bisphenol A. sub-uterotrophic doses of bisphenol A.	17
Ashby J, Tinwell H, Odum J, Lefevre P. Natural variability and the influence of concurrent control values on the detection and interpretation of low-dose or weak endocrine toxicities.	22
Greim HA. The endocrine and reproductive system: adverse effects of hormonally active substances?	24
Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats.	25
Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, Momoeda M, Ikezuki Y, Okamura A, Yokota H, Taketani Y. Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia.	26
Hong EJ, Choi KC, Jung YW, Leung PC, Jeung EB. Transfer of maternally injected endocrine disruptors through breast milk during lactation induces neonatal Calbindin-D9k in the rat model.	27
Jung YW, Hong EJ, Choi KC, Jeung EB. Novel progestogenic activity of environmental endocrine disruptors in the upregulation of calbindin-D9k in an immature mouse model.	29
Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds.	30
Kurebayashi H, Nagatsuka SI, Nemoto H, Noguchi H, Ohno Y. Disposition of low doses of (14C)-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats.	33

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract.	36
Munoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice.	41
Naciff JM, Daston GP. Toxicogenomic approach to endocrine disrupters: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity.	44
Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice.	51
Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring.	52
Owens JW, Chaney JG Weighing the results of differing 'low dose' studies of the mouse prostate by Nagel, Cagen, and Ashby: Quantification of experimental power and statistical results.	55
Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals.	56
Razzoli M, Valsecchi P, Palanza P. Chronic exposure to low doses bisphenol A interferes with pair-bonding and exploration in female Mongolian gerbils.	57
Schonfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring	59
Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W. Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats.	63
Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone.	67
Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage.	69

Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A.	72
Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction.	74
Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra.	76
Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats.	79
Toyama Y, Yuasa S. Effects of neonatal administration of 17beta-estradiol, beta-estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis.	80
Tsutsumi O. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction.	82
vom Saal FS, Nagel SC, Timms BG, Welshons WV. Implications for human health of the extensive bisphenol A literature showing adverse effects at low doses: a response to attempts to mislead the public.	84
vom Saal FS, Nagel SC, Timms BG, Welshons WV. The importance of appropriate controls, animal feed, and animal models in interpreting results from low-dose studies of bisphenol A	86
Wang Y, Thuillier R, Culty M. Prenatal estrogen exposure differentially affects estrogen receptor-associated proteins in rat testis gonocytes.	87
Yoshida M, Shimomoto T, Katashima S, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Maternal exposure to low doses of bisphenol a has no effects on development of female reproductive tract and uterine carcinogenesis in Donryu rats.	89

生殖系への影響

その他

Can A, Semiz O, Cinar O. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis.	91
Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants.	94
Hong EJ, Choi KC, Jeung EB. Maternal exposure to bisphenol a during late pregnancy resulted in an increase of Calbindin-D9k mRNA and protein in maternal and postnatal rat uteri.	96
Mlynarcikova A, Kolena J, Fickova M, Scsukova S. Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate.	99
Naciff JM, Hess KA, Overmann GJ, Torontali SM, Carr GJ, Tiesman JP, Foertsch LM, Richardson BD, Martinez JE, Daston GP. Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17{alpha}-ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A.	101
Takahashi O, Oishi S. Male reproductive toxicity of four bisphenol antioxidants in mice and rats and their estrogenic effect.	103
Terasaka S, Aita Y, Inoue A, Hayashi S, Nishigaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Wada-Kiyama Y, Sakuma Y, Akaba S, Tanaka J, Sone H, Yonemoto J, Tanji M, Kiyama R. Using a customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals.	104
Terasaki M, Shiraishi F, Nishikawa T, Edmonds JS, Morita M, Makino M Estrogenic activity of impurities in industrial grade bisphenol A.	105
Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE. Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status.	107
Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro.	111

免疫系への影響

生体レベルでの影響データ

Yoshino S, Yamaki K, Li X, Sai T, Yanagisawa R, Takano H, Taneda S, Hayashi H, Mori Y.
Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. 113

Yurino H, Ishikawa S, Sato T, Akadegawa K, Ito T, Ueha S, Inadera H, Matsushima K.
Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. 115

神経行動への影響

生体レベルでの影響データ

Della Seta D, Minder I, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F.
Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats 117

Fujimoto T, Kubo T, Aou S.
Placental exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats. 118

Funabashi T, Kawaguchi M, Furuta M, Fukushima A, Kimura F.
Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. 119

Hutter JC, Luu HM, Kim CS.
A dynamic simulation of bisphenol A dosimetry in neuroendocrine organs. 121

Imamura L, Kurashina K, Kawahira T, Omoteno M, Tsuda M.
Additional repression of activity-dependent c-fos and BDNF mRNA expression by lipophilic compounds accompanying a decrease in Ca²⁺ influx into neurons. 122

Ishido M, Masuo Y, Kunimoto M, Oka S, Morita M.
Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. 123

Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T.
Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. 124

Laviola G, Gioiosa L, Adriani W, Palanza P.
D-amphetamine-related reinforcing effects are reduced in mice exposed prenatally to estrogenic endocrine disruptors. 125

MacLusky NJ, Hajszan T, Leranthy C. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract.	127
Masuo Y, Morita M, Oka S, Ishido M. Motor hyperactivity caused by a deficit in dopaminergic neurons and the effects of endocrine disruptors: a study inspired by the physiological roles of PACAP in the brain.	128
Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats.	129
Porrini S, Belloni V, Della Seta D, Farabollini F, Giannelli G, Dessi-Fulgheri F. Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats.	130
鈴木 勉、水尾圭祐、宮川和也、成田 年 Bisphenol-A の胎児期及び授乳期曝露による脳内報酬系に及ぼす影響	131
吉川 泰弘 環境化学物質の脳への影響の動物行動による評価	133
Zoeller RT. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals?	134
Zsarnovszky A, Le HH, Wang HS, Belcher SM. Ontogeny of rapid estrogen-mediated ERK1/2 signaling in the rat cerebellar cortex in vivo: potent non-genomic agonist and endocrine disrupting activity of the xenoestrogen bisphenol A.	138
神経行動への影響	
その他	
Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways.	139
Yanagihara N, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Utsunomiya K, Liu M, Tanaka K. Stimulation of catecholamine synthesis by environmental estrogenic pollutants.	140

その他

生体レベルでの影響データ

Adachi T, Yasuda K, Mori C, Yoshinaga M, Aoki N, Tsujimoto G, Tsuda K. Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors.	141
Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population.	142
Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid.	143
藤巻可弓、荒川千夏子、吉永 淳、渡辺知保、芹澤滋子、今井秀樹、白石寛明、水本賀文 尿中代謝産物排泄量から推定した日本人妊婦のビスフェノールA摂取量	145
福渡 勉、鈴木千絵、佐々木隆造、柴田克己 代謝攪乱物質ビスフェノールAのトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の攪乱作用部位	146
樋口正之、宮田大典、川村誠二、植田英一、今中雅章、外海泰秀 病院給食を用いたフェノール類の一日摂取量の推定	149
Inoue H, Tsuruta A, Kudo S, Ishii T, Fukushima Y, Iwano H, Yokota H, Kato S. Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats.	150
Jaeg JP, Perdu E, Dolo L, Debrauwer L, Cravedi JP, Zalko D. Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions.	153
Kamrin MA. Bisphenol A: a scientific evaluation.	155
Kim CS, Sapienza PP, Ross IA, Johnson W, Luu HM, Hutter JC. Distribution of bisphenol A in the neuroendocrine organs of female rats	156
Lemmen JG, Arends RJ, van der Saag PT, van der Burg B. In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A.	157
Mohri T, Yoshida S. Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse oocytes.	158
Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>), and chimpanzees (<i>Pan troglodytes</i>).	159

Poole A, van Herwijnen P, Weideli H, Thomas MC, Ransbotyn G, Vance C. Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE).	160
Shin BS, Kim CH, Jun YS, Kim DH, Lee BM, Yoon CH, Park EH, Lee KC, Han SY, Park KL, Kim HS, Yoo SD. Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A.	161
Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Gender difference in serum bisphenol A levels may be caused by liver UDP-glucuronosyltransferase activity in rats.	162
Teeguarden JG, Waechter JM Jr, Clewell HJ 3rd, Covington TR, Barton HA. Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach.	164
Terasaka H, Kadoma Y, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells	166
Volkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by HLPC-MS/MS.	167
vom Saal FS, Hughes C An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment.	168
その他	
その他	
Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, Nadal A. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca ²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans.	171
Alum A, Yoon Y, Westerhoff P, Abbaszadegan M. Oxidation of bisphenol A, 17beta-estradiol, and 17alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity.	172
Ishido M, Morita M, Oka S, Masuo Y. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats.	174

Jin H, Audus KL. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line.	175
Kubo T, Maezawa N, Osada M, Katsumura S, Funae Y, Imaoka S. Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1alpha.	177
Lehmann L, Metzler M. Bisphenol A and its methylated congeners inhibit growth and interfere with microtubules in human fibroblasts in vitro.	181
Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism.	183
Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway.	188
Mu X, Rider CV, Hwang GS, Hoy H, LeBlanc GA. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways.	192
Nishizawa H, Morita M, Sugimoto M, Imanishi S, Manabe N. Effects of in utero exposure to bisphenol a on mRNA expression of arylhydrocarbon and retinoid receptors in murine embryos.	197
Olsen CM, Meussen-Elholm ET, Hongslo JK, Stenersen J, Tollefsen KE Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison.	201
Pfeiffer E, Metzler M. Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices.	203
Reistad T, Mariussen E, Fonnum F. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C.	206

Sato K, Ohyama K, Aoki N, Iida M, Nagai F. Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen.	211
Singleton DW, Feng Y, Yang J, Puga A, Lee AV, Khan SA. Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells.	214
Singleton DW, Feng Y, Chen Y, Busch SJ, Lee AV, Puga A, Khan SA. Bisphenol-A and estradiol exert novel gene regulation in human MCF-7 derived breast cancer cells.	215
Stroheker T, Picard K, Lhuguenot JC, Canivenc-Lavier MC, Chagnon MC. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines.	218
Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Kyo S, Nakata T, Noda M, Shindoh M, Kohgo T, Sano H. Bisphenol A from dental polycarbonate crown upregulates the expression of hTERT.	219
Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Finnerty CC Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens.	221
Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca ²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells.	223

ビスフェノールAの低用量影響評価データ集(2006年3月版)について

徳島大学総合科学部教授 関澤 純

はじめに

厚生労働省は平成10年4月より「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」により内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討を進め、中間報告とその補足を公表してきた。

われわれは厚生労働省の支援により「内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究—特に低用量効果・複合効果・作用機構について」研究班(井上達班長)で検討を進めてきたが、本研究班では内分泌かく乱化学物質の低用量影響の生物学的蓋然性に関し現時点でどのような新たな知見が得られつつあるかにつき検討を行った。本データ集はその研究成果の一部として、内分泌かく乱化学物質の一候補として多くの研究が精力的になされてきたビスフェノールA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結果をデータ集として提供するものである。すなわちビスフェノール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、そのエビデンス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を試みた。

昨年度に同様な企図のもと、NTPワークショップで検討された以降に公表された論文について検討を行ったデータ集をまとめたが、このデータ集はその後の新知見について文献検索をし、まとめたものである。昨年度は2000年から2004年始めまでの5年間の文献を検索したが、それ以降より2005年9月までのビスフェノールA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化学的分析法に関する文献を省いて得られた文献について、ビスフェノールAの低用量影響のエビデンスとしての確からしさと、影響の内容、およびデータの信頼性について評価するデータ集を一定のフォーマットにより作成した。文献検索実施後に出版された論文でも低用量影響評価において重要と思われた論文が見出された場合は、これらも検討対象に追加した。なお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。

文献は11人の研究協力者が分担し、試験対象生物、影響の標的臓器、影響の種類、曝露方法、曝露時期、曝露濃度と用量段階、観察された影響の種類と濃度、観察時期、論文における低用量影響への関心、試験の信頼性についてなど、いくつかの指標の有無についてチェックするとともに、論文の概要と重要な図表の添付、評価者のコメントをまとめた。データ集の体裁はできるかぎり統一を図ったが、チェック項目の判断、論文の概要、評価者のコメントについては、それぞれ分担協力者の判断にゆだねた。文献は影響の標的臓器により大別しリストしたが、この分類は研究協力者がチェックした項目を参照にしている。多種類の影響の標的臓器がある場合には論文を特徴づける影響により分類し、また特に *in vitro* 試験については用いられた細胞の種類や指標によって分類した。

低用量作用について、米国環境保護庁（US EPA）は「ヒトの通常の暴露の範囲または、で採用している生殖・発生毒性評価のための標準試験法において一般に使用されている用量よりも低い用量で起こる生物学的変化」と定義しており、基本的にこの定義を参照した。

お願いとお断り

個々のシートはそれぞれ担当者が作成し、体裁の不ぞろいな点については、データ集の編集は関澤が行ったが、時間の関係などで不十分な点もあると思う。また内容についてもその後いくつかの重要と思われる報告が見られ、本データ集をご覧の諸兄姉からお気づきの点をお知らせいただければ幸いである。

参考のために厚生労働科学研究の分担報告書に一部加筆したものを添付する。個々の文章はデータ集の記述から採用したところが多く、必ずしもすべての情報を要約しているわけではない。本報告書およびデータ集の内容はレビュー論文として投稿中であり、無断でデータの利用や引用をすることをお断りする。

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム（低用量効果・複合効果を含む）
に関する総合研究」分担研究報告書（一部加筆）

胚・胎児期の曝露による神経行動関連を中心としたビスフェノールAの低用量影響の検討
関澤 純 徳島大学総合科学部

研究要旨

ビスフェノールAによる低用量影響に関し文献的な評価を行い評価情報をデータ集にまとめた。ここ数年胎生期、授乳期暴露による神経系への影響の報告が急増しこの点に着目して検討した。個体レベルでは生殖器系への影響に関する報告が減り周産期の一過性曝露による神経系への影響に関する報告が相対的に多い。細胞レベルでは様々な報告があり遺伝子発現の網羅的解析も散見された。周産期は神経系の器官形成期で最もホルモン感受性が強い時期であり、行動レベルでの性差の消失と組織学的に青斑核や Bed nucleus の性差の消失に関する報告がある。NTP 長期毒性試験での体重減少の LOEL 5mg/kg よりも低い曝露濃度で影響が観察されており典型的なエストロゲン様作用以外に焦点をあてた毒性学的な試験と考察が必要とされている。生体の生理作用の制御やホメオスタシスにおける内分泌系、免疫系、神経系の共同作用に対する化学物質によるかく乱作用の可能性と有害リスクの評価はきわめて重要であり低用量影響リスクを検討する上で基本となる試験系とリスクの評価法の確立が求められる。

A. 研究目的

ビスフェノールAの周産期曝露による神経系への影響を中心に低用量影響問題に関して文献的な評価を行う。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検証し、評価情報をデータ集にまとめる。

B. 研究方法

ビスフェノールAの公表文献を MEDLINE（2004年3月31日から2005年9月23日まで）で検索し得られた489文献から野生生物への影響や分析法の文献などを除外し102報を得、要約を作成した。文献検索後

に低用量影響評価に重要と思われる論文が見出された場合は、検討対象に追加した。文献の原報を入手し、内容により分別した。テーマに沿って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検討した。データ集は表1のフォーマットにより作成し、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。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である。

- (A) ヒトに関する知見か？ *in vitro* 試験か？
in vivo 試験か？
- (B) 用量—反応関係が明確でじゅうらい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？

表1 フォーマット

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。
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:

添付資料 (文献の内容を理解する上で重要な図表)

評価者のコメント: 報告の信頼性について前記項目 10. でチェックした以外に、評価者が気付いた点を記す。