

担当者 根岸 隆之

著者名: 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.

論文題名: Using a customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals.

出典: Environ Health Perspect. 2004 May;112(7):773-81.

チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット、( )マウス、(x)人、(x)その他 MCF-7
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、( )免疫系、(x)生殖系、( )その他 \_\_\_\_\_
3. 影響の種類 (x)細胞、( )組織、( )個体、( )その他 \_\_\_\_\_
4. 曝露方法 ( )経口、( )埋め込み、(x)その他 培養液暴露
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  $\mu$ M )
7. 観察された影響の種類と濃度:  
( 10  $\mu$ MBPA : MCF-7 に遺伝子発現変化 )
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。  
GLP に準拠 ( )はい、(x)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 \_\_\_\_\_、(x)いいえ

論文の概要:

化学物質のエストロゲン様活性を細胞の遺伝子発現プロファイルを利用するためにエストロゲン感受性遺伝子を集積したカスタムアレイを作成した。エストラジオール (10 nM) を陽性対照とし、estriol (10 nM)、estrone (10 nM)、genistein (10 nM)、diethylstilbestrol (10 nM)、bisphenol A (10  $\mu$ M)、nonylphenol (10  $\mu$ M)、methoxychlor (10  $\mu$ M)、dioxin について株化細胞である MCF-7 細胞に暴露して3日目にカスタムアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、estriol (R=0.929)、estrone (R=0.847)、genistein (R=0.909) はエストラジオールと高い相関を示したが、BPA はそれに比較すると低い正の相関 (R=0.651) を示した。他の化学物質も正の相関を示した。この様に細胞の遺伝子発現変化を用いてエストロゲン活性を評価することは有用であると考えられる。

添付資料

特になし。

評価者のコメント

EstrArray と命名されたカスタムアレイである。このようにエストロゲン感受性遺伝子を集積させたカスタムアレイは細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に探ることができる。多数の遺伝子発現を同時にみるのでスクリーニング系としても優れていると考えられる。

担当者 関澤 純

著者名: Terasaki M, Shiraiishi F, Nishikawa T, Edmonds JS, Morita M, Makino M

論文題名: Estrogenic activity of impurities in industrial grade bisphenol A.

出典: Environ Sci Technol. 2005 May 15;39(10):3703-7.

チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット ( )マウス、( )人、( )その他 (x)細胞
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、( )免疫系、(x)生殖系、( )その他 \_\_\_\_\_
3. 影響の種類 (x)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 ( )
7. 観察された影響の種類と濃度:  
( )
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:

Yeast two hybrid assay を用い工業用 BPA 中の不純物の  $10^{-8}ME_2$  の 10% レベルのエストロゲン活性を示す濃度を調べた。最大濃度 (2~3%) の不純物 (OH 置換異性体) は BPA の約 0.3 倍であり、最も高い相対活性 (2.3 倍) を示した不純物の濃度は 0.07~0.81% であった。

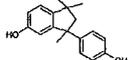
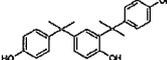
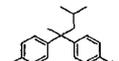
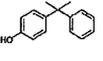
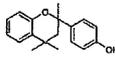
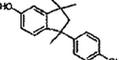
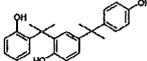
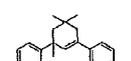
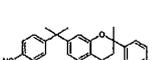
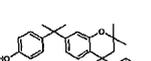
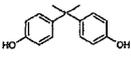
添付資料

Table 1.

評価者のコメント:

不純物の中には相対的により高いエストロゲン活性を示すものがあると報告しているが、その程度や混入濃度は調べられた範囲では問題となるレベルではない。

**TABLE 1. Compounds Found as Impurities in Samples of Industrial Grade Bisphenol A and Their Estrogenicities in Yeast Two-Hybrid Assays**

Compound no.	Structure	% composition <sup>a</sup>				hER $\alpha$ assay <sup>b</sup>			medER $\alpha$ assay <sup>c</sup>		
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	REC <sub>10</sub> <sup>d</sup>	S.D. <sup>e</sup>	Activity <sup>f</sup>	REC <sub>10</sub> <sup>d</sup>	S.D. <sup>e</sup>	Activity <sup>f</sup>
1		0.01	0.04	0.01	0.02	Not active	Not active	Not active	Not active	Not active	Not active
2		0.22	0.03	0.05	0.03	11000	2200	0.8	5500	1300	0.5
3		2.95	0.82	2.33	0.23	2900	320	3.0	1800	350	1.4
4		0.04	<0.01	0.03	0.03	Not active	Not active	Not active	9100	660	0.3
5		0.09	Not detected	0.04	Not detected	9700	440	0.9	3800	390	0.6
6		0.81	0.07	0.38	0.01	20000	2500	0.4	5600	340	0.4
7		0.01	Not detected	0.01	0.01	1000	210	8.5	280	26	8.9
8		<0.01	0.02	<0.01	<0.01	710	70	12	380	46	6.5
9		0.07	0.06	0.02	0.02	2900	620	3.0	380	40	6.6
10		0.13	0.03	0.07	0.02	970	100	9.0	320	58	7.7
11		0.19	0.02	0.10	Not detected						
12		0.04	<0.01	0.02	0.01						
13		0.03	Not detected	0.01	Not detected						
14		0.05	0.11	0.03	0.03						
15		0.02	0.02	0.01	Not detected						
BPA <sup>a</sup>		95.3	95.3	95.4	96.8	8700	370	1.0	2500	440	1.0
17 $\beta$ -estradiol						0.20	0.03	44000	0.83	0.10	3000

<sup>a</sup> Sample 1: Aldrich Chemical Co. Lot No. JU06612EU (97%). Sample 2: Aldrich Chemical Co. Lot No. CA18206TO (97%). Sample 3: Aldrich Chemical Co. Lot No. JS03830LR (97%). Sample 4: Acros Organics Lot No. A014744401 (97%). <sup>b</sup> Yeast two-hybrid assay incorporating the human estrogen receptor  $\alpha$ . <sup>c</sup> Yeast two-hybrid assay incorporating the medaka fish (*Oryzias latipes*) estrogen receptor  $\alpha$ . <sup>d</sup> Concentration of the compound showing 10% of the activity of  $10^{-8}$  M 17 $\beta$ -estradiol (mean,  $n = 4$ ). <sup>e</sup> Standard deviation. <sup>f</sup> Activity relative to laboratory grade BPA. <sup>g</sup> Laboratory grade bisphenol A (99+%).

担当者 関澤 純

著者名: Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE.

論文題名: Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status.

出典: Cancer Res. 2005 Jan 1;65(1):54-65.

チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット ( )マウス、(x)人、( )その他 (x)細胞
2. 影響の標的臓器 ( )神経系、( )免疫系、(x)生殖系、( )その他\_\_\_\_\_
3. 影響の種類 (x)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 ( )
7. 観察された影響の種類と濃度:  
( )
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。  
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:

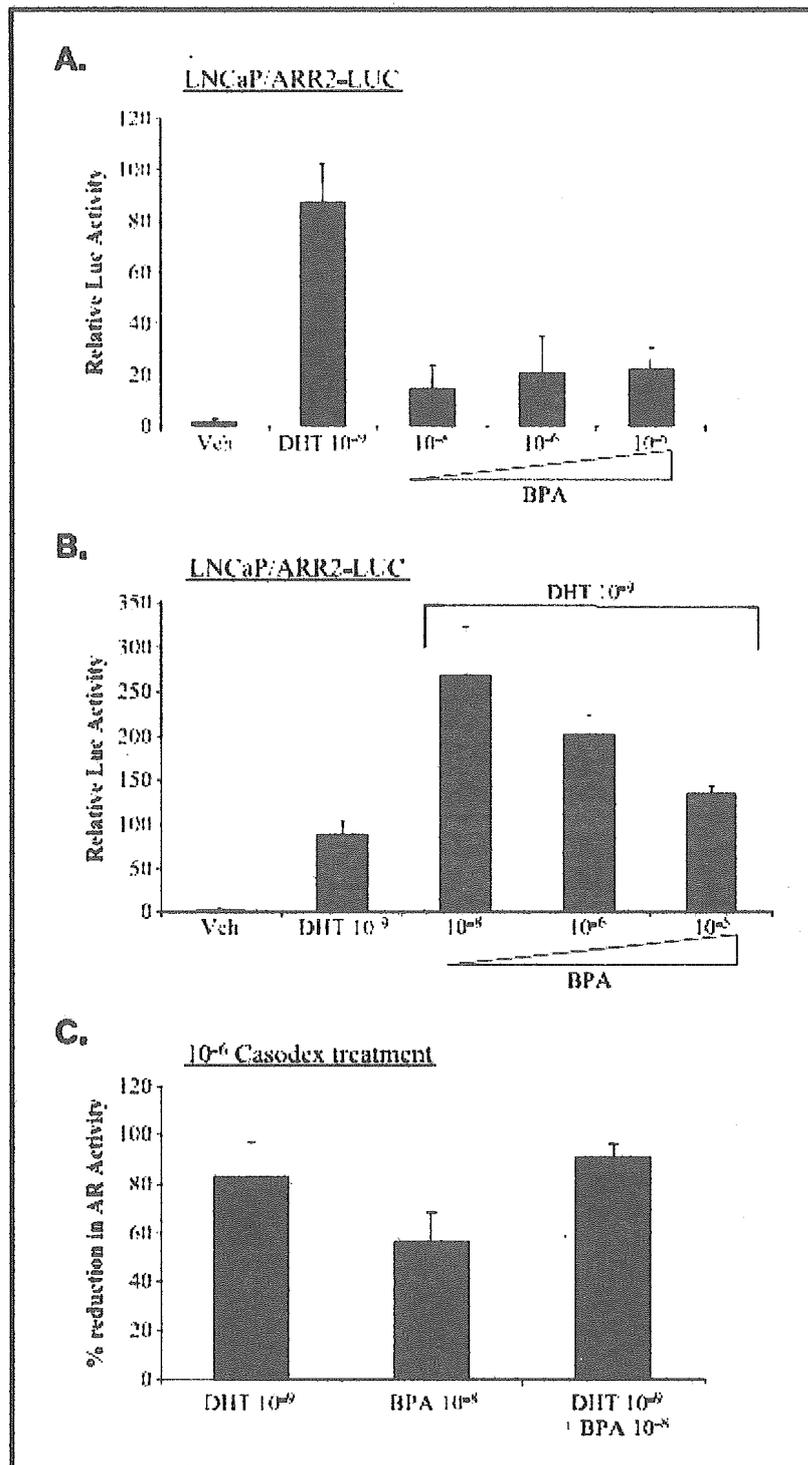
BPAはDihydrotestosteroneと非競合的にAndrogen receptor(AR)結合を阻害する。BPAは腫瘍由来の変異ARに結合しAR依存性の複数の遺伝子発現を誘導し、前立腺特異抗原を発現させる。BPAは腫瘍由来の変異ARに作用し、Androgen非依存性の前立腺がん細胞を活性化させる。

添付資料

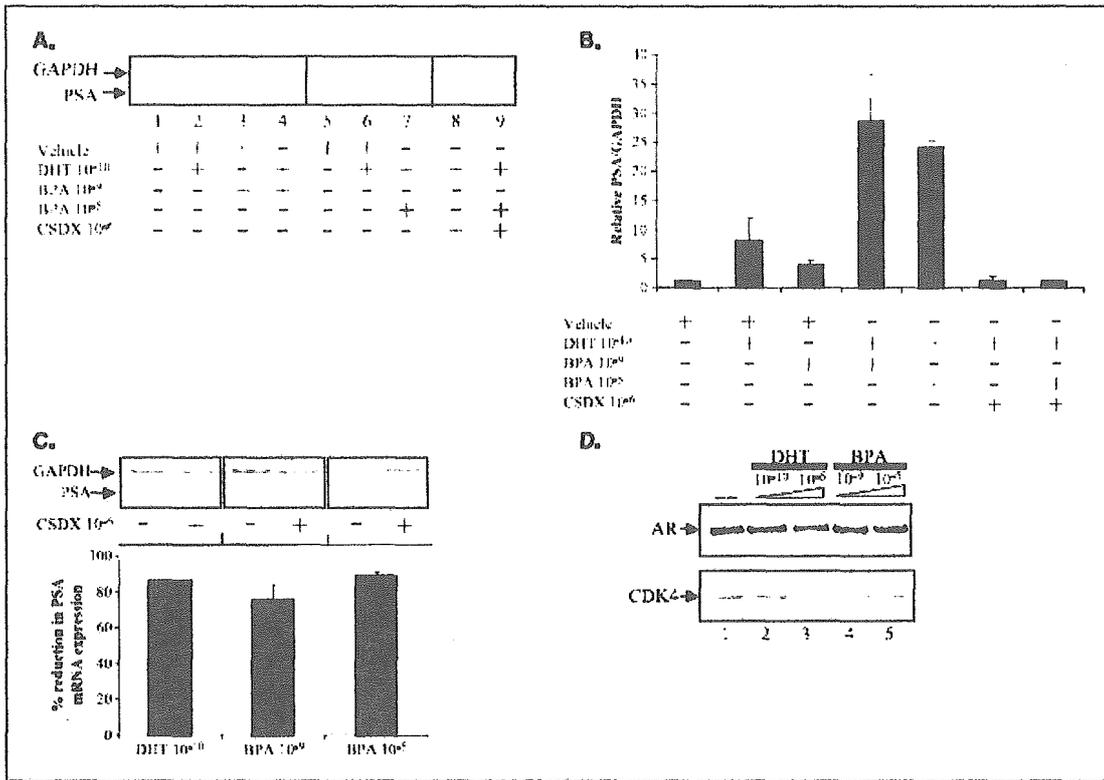
Figure 1, Figure 2, Figure 3.

評価者のコメント:

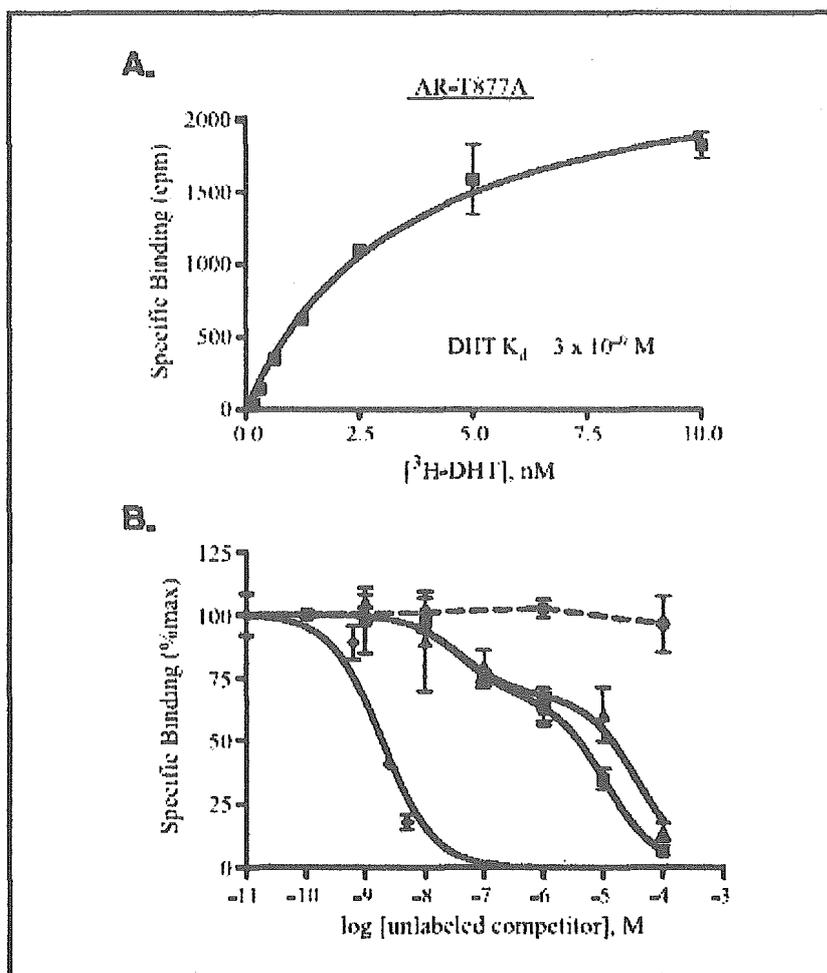
BPAのARへの結合とAR依存遺伝子発現の機作について検討したものである。



**Figure 1.** BPA activates endogenous AR-T877A and potentiates androgen-mediated AR transactivation. LNCaP cells were transfected in the absence of steroids with the probasin reporter (ARR2-LUC, 1.0  $\mu$ g), CMV- $\beta$ -galactosidase expression plasmid (0.5  $\mu$ g), and an empty vector (pcDNA3.1, 1.5  $\mu$ g). After transfection, cells were stimulated as indicated with increasing concentrations of BPA either in the absence **A**, or in the presence **B**, of  $10^{-9}$  mol/L DHT for 48 hours. *Columns*, average relative luciferase activities from at least three independent experiments; *bars*, SD. **C**, cells were pretreated with  $10^{-6}$  mol/L Casodex for 4 hours prior to the addition of corresponding treatments. Cells were stimulated for 48 hours and luciferase activity was measured. *Columns*, average percentage reduction in AR activity in the presence of Casodex compared with corresponding AR activity in the absence of the drug; *bars*, SD.



**Figure 2.** BPA potentiates ligand-dependent transactivation of endogenous AR targets in prostate carcinoma cells. *A.* LNCaP cells were treated as indicated for 48 hours and RNA was harvested and used for cDNA synthesis. Amplification of PSA and GAPDH was done in the presence of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP. PCR products were separated on non-denaturing 6% PAGE and visualized on a PhosphorImager. *B.* PSA expression was normalized to GAPDH (internal control) and quantified using a PhosphorImager. Relative expression from at least two independent experiments. Bars, SD. *C.* LNCaP cells were pretreated with  $10^{-6}$  mol/L Casodex (CSDX) for 4 hours before the addition of either  $10^{-10}$  mol/L DHT,  $10^{-9}$  mol/L BPA, or  $10^{-8}$  mol/L BPA for 48 hours. Reverse transcription-PCR was done and PSA mRNA expression was quantified as in *A.* Columns, average percentage reduction in PSA mRNA expression in Casodex-treated samples. *D.* LNCaP cells were cultured in steroid-free medium and treated as indicated for 72 hours. Cells were harvested and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting for AR and CDK4. Levels of CDK4 expression served as a loading control.



**Figure 3.** BPA inhibits androgen binding to AR-T877A in a noncompetitive manner. **A.** AR-T877A protein was produced *in vitro* and incubated with increasing concentrations of [ $^3\text{H}$ ]DHT as indicated. Reactions were carried out for 16 hours at 4°C. Ligand-bound receptor and unbound ligands were separated using hydroxyapatite beads. Counts per minute were measured using the scintillation counter, and values were adjusted for nonspecific binding determined by adding 500-fold excess unlabeled DHT. Two independent experiments analyzed and graphed using Prism software with the following formula:  $\text{binding} = \text{max} \cdot \frac{[^3\text{H}]\text{ligand}}{K_d + [^3\text{H}]\text{ligand}}$ , where max = maximum possible binding. **B.** AR-T877A protein was produced *in vitro* as in **A** and incubated with  $2 \times 10^{-9}$  mol/L [ $^3\text{H}$ ]DHT and increasing concentrations of either DHT ( $\blacklozenge$ ) or BPA ( $\blacksquare$ ). Cholesterol (CHL;  $\bullet$ ) served as a negative control. Competition analyses in the presence of  $20 \times 10^{-9}$  mol/L [ $^3\text{H}$ ]DHT and increasing concentrations of BPA ( $\blacktriangle$ ) are also shown. Three independent experiments analyzed as in **A**. DHT competition curve was fit to the formula:  $\text{binding} = \frac{[^3\text{H}]\text{ligand} \cdot \text{max}}{[^3\text{H}]\text{ligand} + K_d [1 + (\text{competitor})/K]}$ , where max = maximum possible binding. BPA competition curves did not fit this simple, one-site competitive binding model.

担当者 関澤 純

著者名: Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR.

論文題名: Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro.

出典: Toxicology. 2005 Sep 14; [Epub ahead of print]

チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット ( )マウス、( )人、( )その他 (x)細胞
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 (x)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 ( )
7. 観察された影響の種類と濃度:  
( )
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:

African monkey kidney cell にヒトの androgen receptor (AR) を導入した系で BPA は 1 nM Dihydrotestosterone による遺伝子発現を  $IC_{50} 7.46 \times 10^{-7} M$  で抑制したが自らは遺伝子誘導活性を示さなかった。

Figure 2, Figure 3

評価者のコメント:

BPA は AR の antagonist として作用するという報告である。

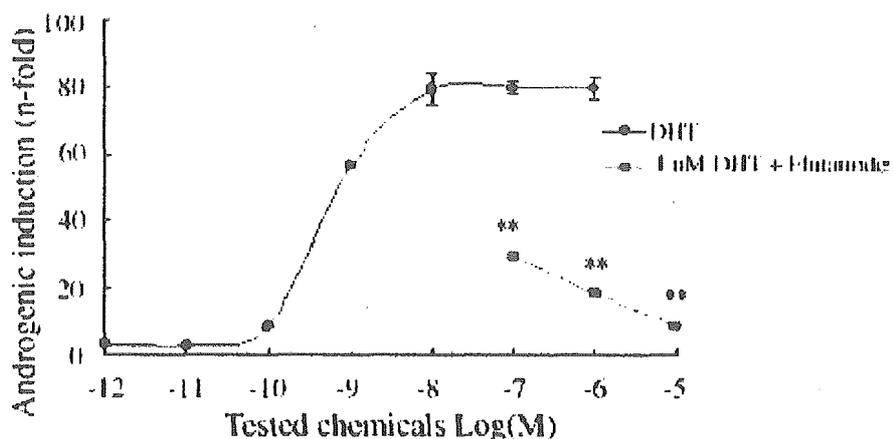


Fig. 2. AR agonistic and antagonistic activities of flutamide in the AR reporter gene assay using the CV-1 cells. Cells were treated with increasing concentrations of the chemicals for measurement of agonistic activity. In order to measure the AR antagonistic activity of flutamide, 1 nM of DHT was added along with the test chemical. Values are mean  $\pm$  S.D. \*\* Indicates  $P < 0.01$  compared with 1 nM of DHT positive control values.

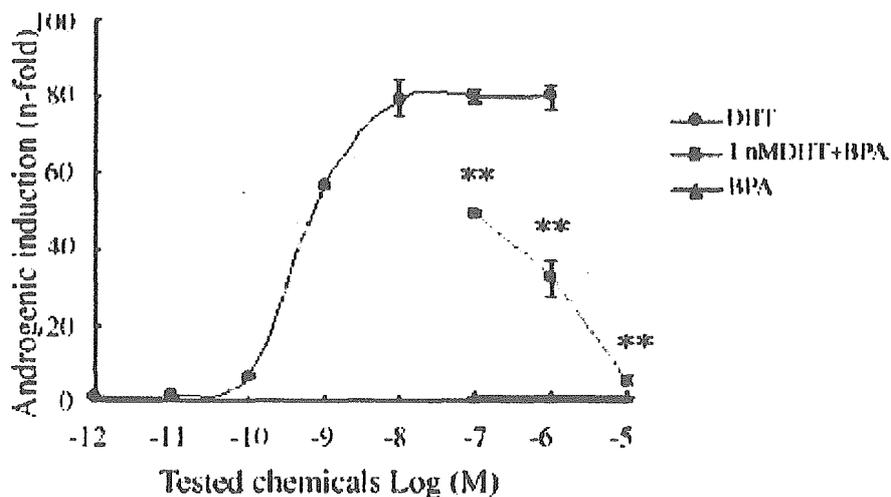


Fig. 3. AR agonistic and antagonistic activities of BPA in the AR reporter gene assay using the CV-1 cells. Cells were treated with increasing concentrations of the chemicals for measurement of agonistic activity. In order to measure the AR antagonistic activity of BPA, 1 nM of DHT was added along with the test chemical. Values are mean  $\pm$  S.D. \*\* Indicates  $P < 0.01$  compared with 1 nM of DHT positive control values.

免疫系への影響  
生体レベルでの影響データ

担当者 吉塚直伸

著者名: Yoshino S, Yamaki K, Li X, Sai T, Yanagisawa R, Takano H, Taneda S, Hayashi H, Mori Y.

論文題名: Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice.

出典: Immunology. 2004 Jul;112(3):489-95.

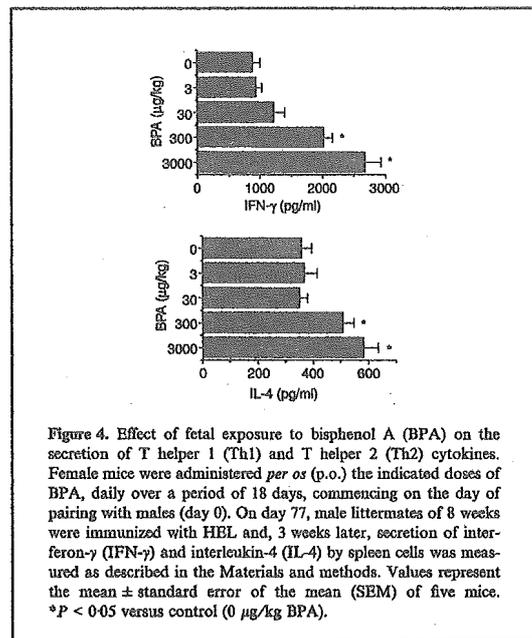
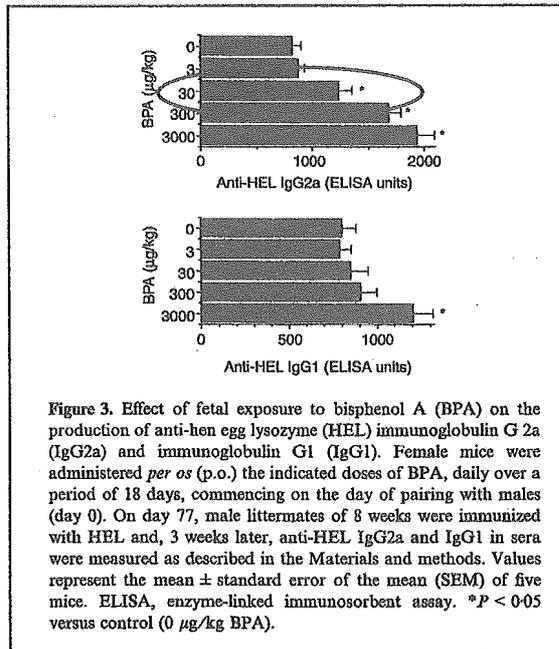
チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット、(x) 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 ( ) 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 \_\_\_\_\_
5. 曝露時期 ( ) 胚・胎児、( ) 周産期、( ) 出生後、( ) 成熟動物、( ) 細胞、  
(x) その他 17日間、雌に暴露後、交配し誕生する仔が8週齢になった時の観察
6. 曝露濃度 用量段階 (0, 3, 30, 300, 3000  $\mu$ g/kg マウス体重 )
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。複数あればそれらを記入。統計的な信頼性などの問題はコメント欄に記す。  
(30  $\mu$ g/kg 投与マウスの仔でTh1 優位の現象が観察された)
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。  
GLP に準拠 ( )はい、(x)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 (x)はい: ガイドラインの名称  
the ethical guideline of Kobe Pharmaceutical University、( )いいえ

論文の概要:

マウス免疫系に及ぼす出生前 BPA 曝露の影響を検討。Virgin な雌マウスにさまざまな濃度の BPA を 17 日間経口投与し、繁殖用の雄と pairing を行った。77 日目、即ち生まれた子獣が 8 週齢になった時点で雄マウスを鶏卵リゾチーム (HEL) で免疫し、3 週後、血清中の抗 HEL-IgG と、抗原に対する脾臓細胞の増殖活性を測定した。脾臓リンパ球から分泌される抗 HEL-IgG2a 及び IFN-gamma を Th1 タイプの反応として、また抗 HEL-IgG1 及び IL-4 を Th2 タイプの反応として測定した。胎児期に BPA に曝露されると、抗原特異的な細胞増殖反応が亢進すると同時に有意な抗 HEL-IgG が上昇した。Th1 反応と Th2 反応の両方が、胎児期の BPA 曝露で増強されたが、Th1 の増強は Th2 のそれより大きなものと思われる。Flow Cytometry により胎児期に BPA に曝露したマウスの脾臓細胞を解析したところ、対照群に比べ CD3(+) CD4(+)細胞と CD3(+) CD8(+)細胞がそれぞれ 1.3 倍及び 2 倍に増加していた。同様の結果が、妊娠中に母体経路で曝露した雌からも得られている。以上、胎児期に BPA に曝露することによって、成獣になった時点で免疫系、特に Th1 反応が亢進することが推察された。

添付資料



交配前に曝露した親から生まれた仔が8週齢に成長したときにTh1/Th2インバランスを評価。Fig3で、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の曝露量でIgG1(Th2)は変化が観察されないが、IgG2a(Th1)では有意に上昇。産生サイトカインもFig4に観られるように、IFN-g(Th1)が大きく上昇しているが、IL-4(Th2)は上昇の幅が少ない。IFN-gの上昇は抗原特異的。一方、他の指標では、IgG(300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、脾臓細胞増殖(3 mg/kg)が観察されている。ヒトの場合、3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ でBPAを摂取している。IgG2aの変化は30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の曝露量で、ヒトの場合の約10倍であり、比較的低い曝露量と言える述べている。

評価者のコメント：

子どもへの影響評価が少ない中で興味深い研究。

著者らは、fetal曝露と表現しているが、実際は交配前の曝露であり、影響の本質が、曝露時期に卵母細胞になされたものか、受精後、器官分化が進むなかで残留したBPAによる影響なのかが不明であり今後の課題といえる。研究は両性の子獣を用いているようだが、結果は片方の性を用いた結果を記述している。実験によって性が異なるが、変化の大きかった性を記述し、他方の性についても同様の変化を観察していると記載し、データを見せていない。Discussionの中で、BPAはエストロゲン受容体(ER $\alpha$ )に結合することを述べている。もし、ER経路の影響なら性差はあっても良いと考えるのが普通であり、これに関する突っ込んだ議論がほしいところである。

担当者 吉塚直伸

著者名: Yurino H, Ishikawa S, Sato T, Akadegawa K, Ito T, Ueha S, Inadera H, Matsushima K.

論文題名: Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells.

出典: Toxicol Sci. 2004 Sep;81(1):139-47.

チェック項目:

1. 対象生物 ( )ラット、(x)マウス、( )人、( )その他 細胞
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、(x)埋め込み、その他 \_\_\_\_\_
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 (6-7 mg を埋め込み。期間中血清 BPA が 8~30ng/mL)
7. 観察された影響の種類と濃度:  
( )
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、( )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、(x)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 (x)はい:  
ガイドラインの名称 the guideline of the University of Tokyo、( )いいえ

論文の概要:

DES 及び BPA が、B1 細胞によって産生される自己抗体を亢進させることを見出した。SLE(Systemic lupus erythematosus:全身紅斑性狼そう)のマウスモデルとして知られる BWF1 マウスに睾丸摘出術を施し、BPA, DES または E2 を充填したシリコンチューブを皮下に移植した。BPA による体重減少及び子宮重量増加は観察されず。E2 の場合と同様、DES 投与マウスは抗 DNA 抗体産生と腎臓糸球体における IgG の沈着を認めた。BPA は対照群と同等。プロメライン処理赤血球特異的な自己抗体産生を PFC 法で調べたところ、DES または BPA 投与マウスで有意に上昇。In vitro における B1 細胞が産生する IgM レベルも DES または BPA によって亢進。ループス腎炎を発症した老化 BWF1 マウスの B1 細胞における ER の発現が亢進。以上の結果から、内分泌かく乱物質が B1 細胞による自己抗体産生に影響することが推察され、自己免疫疾患の原因のひとつの要因を考えられる。

添付資料

Fig5 (右) に示すように BPA によって自己抗体 (phosphatidylcholine に反応) の亢進が見られる。しかし抗 DNA 抗体の上昇が見られなかったのは BPA の estrogenic な作用が弱いからと説明している。

Fig7 は BPA が、B1 細胞が産生する IgM が亢進しているのに対し、B2 細胞由来の抗体は変わらない。この傾向は老化し発症しているマウスで顕著。

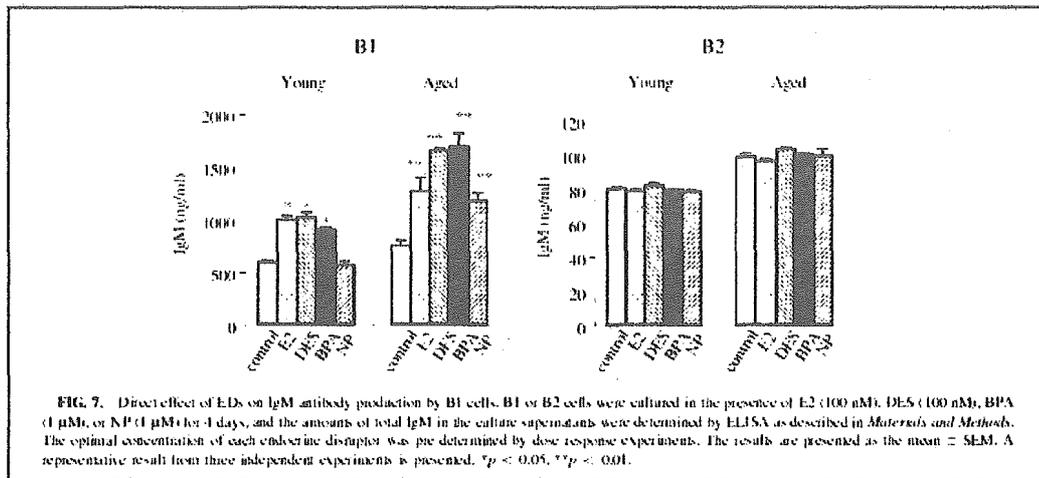


FIG. 7. Direct effect of EDs on IgM antibody production by B1 cells. B1 or B2 cells were cultured in the presence of E2 (100 nM), DE5 (100 nM), BPA (1 μM), or NP (1 μM) for 4 days, and the amounts of total IgM in the culture supernatants were determined by ELISA as described in *Materials and Methods*. The optimal concentration of each endocrine disruptor was pre-determined by dose response experiments. The results are presented as the mean ± SEM. A representative result from three independent experiments is presented. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

評価者のコメント：

投与方法が、シリコンチューブに粉末の試験物質 6-7mg を封入して埋め込む方法であることから、投与量として他と比較できない。著者は、血清中の BPA 濃度を測定しておりこのデータから曝露量を推定できる。

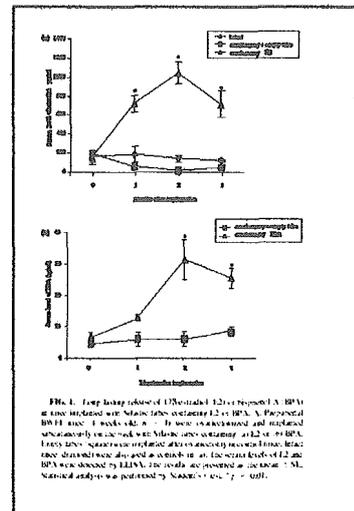


FIG. 4. Long-term release of 17β-estradiol (E2) or BPA from silicone tubes. Silicone tubes containing E2 or BPA (1 μM) were inserted into the uterine horns of mice. The amount of E2 or BPA released from the tubes was determined by ELISA. The results are presented as the mean ± SEM. Statistical analysis was performed by Student's  $t$ -test. \* $p < 0.05$ .

神経行動への影響  
生体レベルでの影響データ

担当者 根岸 隆之、吉塚 直伸

著者名: Della Seta D, Minder I, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F.

論文題名: Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats

出典: Brain Res Bull. 2005 Apr 15;65(3):255-60. Epub 2004 Dec 18.

#### 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、( )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\_\_\_\_\_
5. 曝露時期 ( )胚・胎児、(x)周産期、( )出生後、( )成熟動物、( )細胞
6. 曝露濃度 用量段階 ( 0.040 mg/kg/日 )
7. 観察された影響の種類と濃度  
(BPA 0.040 mg/kg/日新生仔に対する Licking-grooming (舐める、身づくろいする行動) が対照群に比較し有意に減少)
8. 観察時期 ( )出生前、(x)出生後、( )思春期、( )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。  
GLPに準拠 ( )はい、(x)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\_\_\_\_\_、(x)いいえ

#### 論文の概要

妊娠期、授乳期に BPA を 0.040 mg/kg/日の濃度で暴露した母親ラットの仔ラットに対する行動を評価した。対照群、BPA 群ともに母親のオス仔とメス仔に対する出生後 3-4 日および 8-9 日に育児行動に性差が存在していたが、BPA 暴露によりオスメス両方において新生仔に対する Licking-grooming (舐める、身づくろいする行動) が対照群に比較し有意に減少した。対照群に比べ BPA 群は仔獣のうち、とくに雌仔獣よりも雄仔獣に対し ano-genital licking 行動が多く観察された。

#### 添付資料

特になし。

#### 評価者のコメント

この報告は、母子行動はその後の行動に影響をおよぼすことが古くから心理学的、生理学的に知られている事実であることから他の論文で行っている周産期暴露→次世代個体への影響という実験系において次世代個体への BPA 暴露の影響に加え、BPA 暴露を受けている母親の行動の影響を考慮にいれるべきであることを示したという点で重要である。本研究から、妊娠から授乳に至る期間 (出産、授乳、保育へ導くトリガーとしての期間) に低用量の BPA に曝露することによって母獣としての行動に影響があり、BPA が成獣の神経回路に影響を与えていることが推察された。

担当者 関澤 純

著者名: Fujimoto T, Kubo K, Aou S.

論文題名: Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats

出典: Brain Research. 2006 Jan. 1068(1):49-55.

チェック項目:

1. 対象生物 (x)ラット ( )マウス、( )人、( )その他 ( )細胞
2. 影響の標的臓器 (x)神経系、( )免疫系、( )生殖系、(x)その他トリプトファン代謝系
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\_\_\_\_\_
5. 曝露時期 (x)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 (食餌中 0, 0.1, 0.5%)
7. 観察された影響の種類と濃度:  
(15  $\mu$ g/kg/日 ~ 0.1ppm 飲料水中 )
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。  
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:

妊娠 13 日目から出産まで Wistar ラットに飲料水経由で 0.1 ppm BPA を摂取させた。出生 6-9 週にかけて雌雄別に (20-24 匹群) 神経行動毒性 (Open-field test, Elevated plus maze test, Passive avoidance test, Forced swimming test) を評価した。BSA 投与は Open field test ではオスの立上り行動の頻度、時間を上昇、性差を消滅させ、Forced swimming test でも BPA による性差消失が見られ、オスの immobility が上昇した。BPA は depressive response を特にオスにおいて顕著にしたと判断された。

添付資料

特になし。

評価者のコメント:

神経行動毒性の客観的評価方法が提唱され形態的な障害とあわせて機能的な発達障害評価の重要性が増しつつある。

担当者 稲葉 克彦、根岸 隆之

著者名: Funabashi T, Kawaguchi M, Furuta M, Fukushima A, Kimura F.

論文題名: 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.

出典: Psychoneuroendocrinology. 2004 May;29(4):475-85.

#### チェック項目

1. 対象生物 (x)ラット、( )マウス、( )人、( )その他 細胞
2. 影響の標的臓器 (x)神経系、( )免疫系、( )生殖系、( )その他 \_\_\_\_\_
3. 影響の種類 ( )細胞、(x)組織、( )個体、( )その他 \_\_\_\_\_
4. 曝露方法 (x)経口、( )埋め込み、その他 \_\_\_\_\_
5. 曝露時期 (x)胚・胎児、(x)周産期、( )出生後、( )成熟動物、( )細胞
6. 曝露濃度 用量段階 (飲料水濃度 0 および 10 mg/l、母獣に対しておよそ 2.5 mg/kg/日)
7. 観察された影響の種類と濃度 (10 mg/l 曝露群で、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン免疫反応ニューロン (CRH ニューロン) の BST (bed nucleus of the stria terminalis; 分界条床核) における性差の消失)
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。  
GLP に準拠 ( )はい、(x)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 \_\_\_\_\_、(x)いいえ

#### 論文の概要

妊娠した雌 Wistar ラット (8 から 11 例) に対して、BPA 濃度 10 mg/l の飲料水を、児動物が離乳するまで曝露した (母獣に対して、およそ 2.5 mg/kg/日に相当)。4~7 ヶ月齢の動物の、雌では発情間期 2 日目から切り取った冠状断面を免疫細胞化学的に染色し、CRH ニューロンの数を、画像を見ることによりカウントした。対照群で認められた CRH ニューロン数の視索前野における性差は、BPA 投与によって影響を受けなかったが、前部および後部 Bed nucleus of the stria terminalis (BST) と呼ばれる神経核におけるコルチコトロピン産生神経細胞の数における性差 (メスの方が多い) が消失した。ただし、両方の性において、BST における CRH ニューロン数の、性差の有意な消失は、雄投与群におけるニューロン数の増加と、雌投与群におけるニューロン数の減少によることが示唆された。一方、有名な性的二型核である SDN-POA の性差には影響を与えなかった。影響が見られた 2.5 mg/kg/日は、Cagen ら (1999) が示した NOAEL である 50 mg/kg/日より低く、内分泌かく乱物質の脳機能へ及ぼす影響には注意が必要である。

#### 添付資料

Figure 3

#### 評価者のコメント:

50 mg/kg/日未満で脳組織に変化が認められたという点で、注意が必要である。メカニズムについては、BPA が雌では estrogen agonist として、雄では estrogen antagonist として作用することで性差が消失した可能性を考察しているが、証明されるには至っていない。今回の研究成果の信頼性を高めるためには、いくつかの濃度段階を設定し、BPA の用量相関性を確認すること、脳に到達することが可能な、BPA 以外のエストロゲン様物質曝露による追加実験の実施が望まれる。後者の実験では、今回認められた結果が、エストロゲン様作用物質に広く認められる内分泌系作用によるものか、BPA 固有の現象か、区別ができる。性差の消失という点ではラットにおいて青斑核 (ノルアドレナリン産生神経細胞が集まる神経核) についても同様の報告がある (Kubo et al., 2003)。

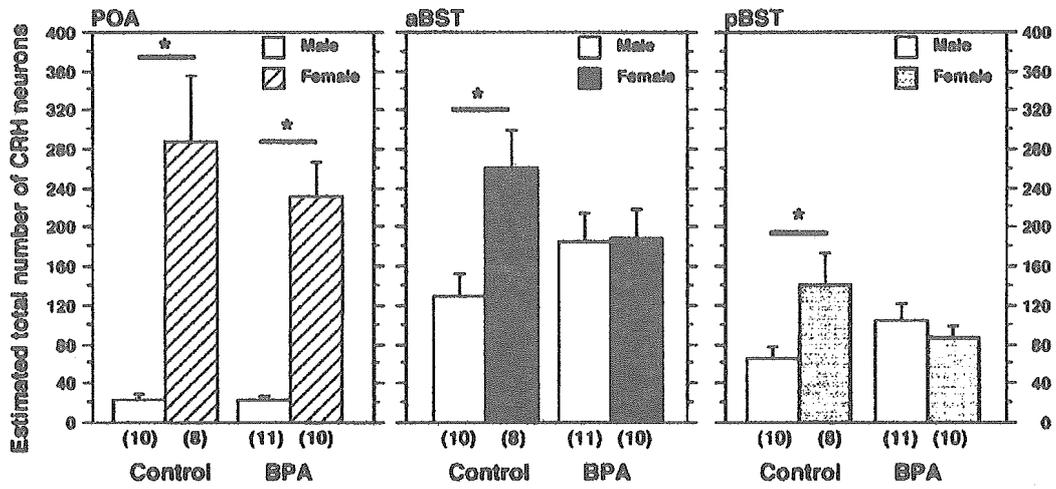


Fig. 3. The estimated total number of CRH-immunoreactive (CRH-ir) neurons in the POA, aBST, and pBST. Each column and vertical line indicate the mean and SEM, respectively. Numbers in brackets refer to the number of rats. \* indicates  $p < 0.05$  vs. male rats. See text for further details of statistics.

担当者 井藤 悦朗

著者名: Hutter JC, Luu HM, Kim CS.

論文題名: A dynamic simulation of bisphenol A dosimetry in neuroendocrine organs.

出典: Toxicol Ind Health. 2004 Jun;20(1-5):29-40.

チェック項目

1. 対象生物 (x)ラット、( )マウス、( )人、( )その他 細胞
2. 影響の標的臓器 (x)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 po, iv, sc, ip
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 ( 0.1, 10 and 100 mg/kg )
7. 観察された影響の種類と濃度:  
( )
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。  
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

過去において実施されたラットのBPA経口、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与後に得られた組織内濃度をもとに体内動態を薬物動態学に基づくモデルにより評価した。主な臓器として下垂体、視床下部、その他の脳部位、脂肪、消化管、肝臓、生殖器、腎臓、血液、血漿タンパク質をコンパートメントとしてアルゴリズムを構築し、実測値によるモデルの妥当性を評価した。投与後急速に減衰する相とたんぱく質に結合して長時間体内に残存する相の2相性を示すことが示された。

添付資料

評価者のコメント:

医薬品開発においては一般的に実施されている動物個体への投与方法を変えた体内動態のデータ収集を既存化学物質であるBPAについて詳細に実施した報告である。