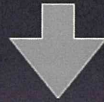
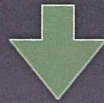


BPAおよびNPの作用

- ★PC12細胞モデル（神経分化）
- ★神経幹細胞モデル（神経分化）
- ★3T3線維芽細胞の細胞死実験系

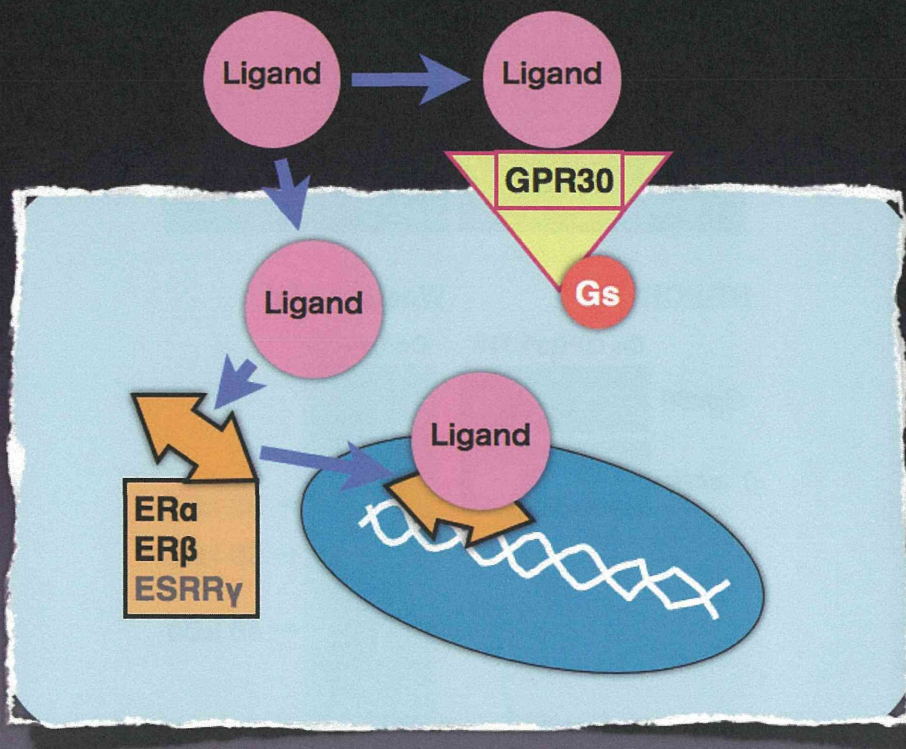


- ★作用機序
- ★標的分子

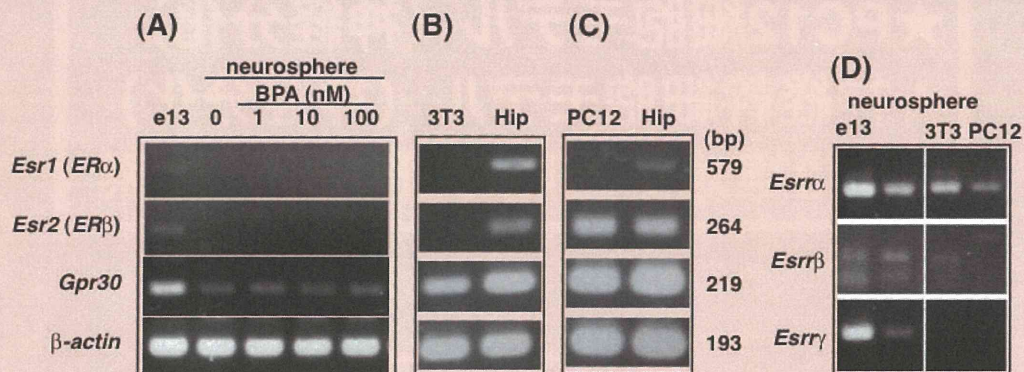


- ★インビトロ評価系の確立

エストロゲン受容体



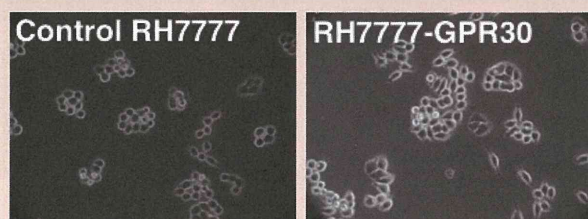
エストロゲン受容体、エストロゲン関連受容体の遺伝子発現の遺伝子発現



神経上皮細胞-----GPR30, $ER\alpha$, $ER\beta$, $ESRR\gamma$
 PC12細胞-----GPR30, $ER\beta$
 3T3線維芽細胞---GPR30

H23.24報告

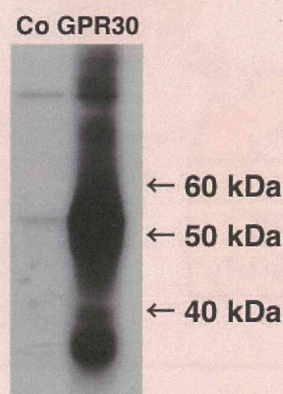
GPR30発現細胞の確立



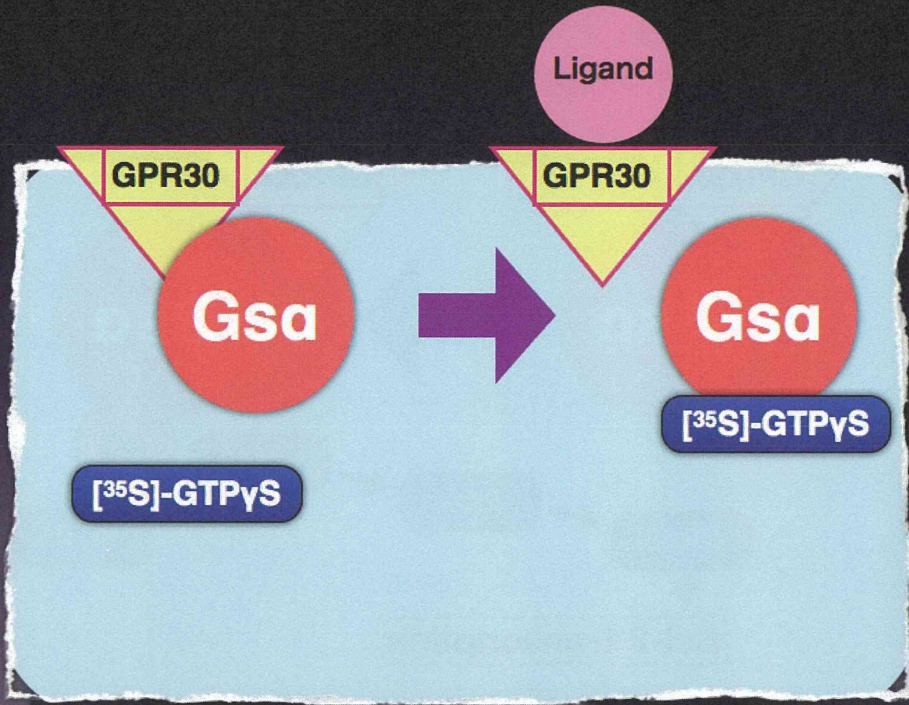
RT-PCR



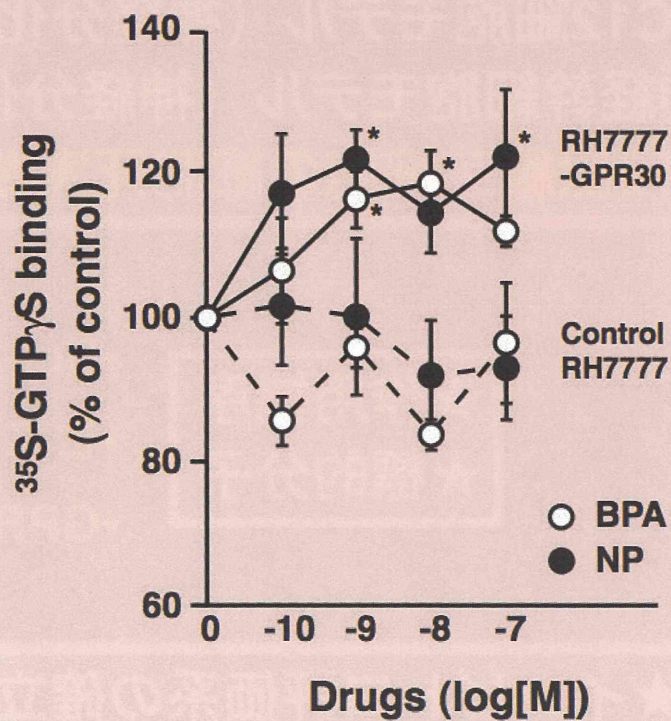
Western blot



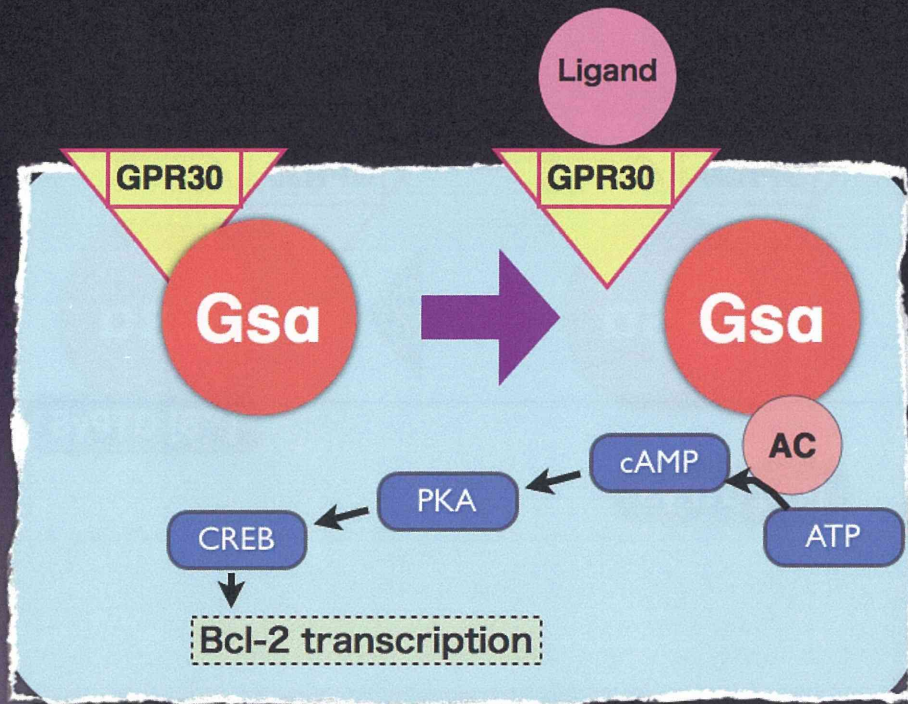
GPR30の活性化評価法



GPR30発現細胞の確立



GPR30によるBcl-2発現制御



BPAおよびNPの作用

- ★PC12細胞モデル（神経分化）
- ★神経幹細胞モデル（神経分化）
- ★3T3線維芽細胞の細胞死実験系

★作用機序
★標的分子

- Bcl-2発現
- ヒストン修飾
- GPR30の関与

★インビトロ評価系の確立

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、

それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

(平成 25 年度) 分担研究報告書

Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスを用いた化学物質の神経標的解析

研究分担者 渡邊 肇・大阪大学・教授

研究要旨

化学物質に対する高感受性が考えられる子どもへの有害性発現メカニズムの解明を目的として、エストロゲン受容体遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製した。エストロゲン受容体遺伝子の発現制御領域を含む約 180kb のゲノム領域を単離し、エストロゲン受容体遺伝子をβガラクトシダーゼ遺伝子に置換したトランスジーンを作製し、CD-1 マウスの受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを2系統作製した。このβガラクトシダーゼ遺伝子には tau 遺伝子が融合されており、神経系を中心としてエストロゲン受容体発現細胞の変化の解析が可能であり、発生・発達期の脳が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにすることができる。作製したマウスにおけるβガラクトシダーゼ遺伝子の発現部位を X-gal 染色により確認したところ、生殖器、脳を含めてその発現が確認された。

A. 研究目的

本研究では、エストロゲン様化学物質の新生児期における有害性発現メカニズムを明らかにするためにエストロゲン受容体遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製する。新生仔期にビスフェノール A やエストロゲン様化学物質の暴露を行い、神経系を中心としたエストロゲン受容体発現部位の解析を行うことにより、発生・発達期の脳が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにし、試験スキームの最適化に資する。

B. 研究方法

本研究では、新生児期のエストロゲン暴露影

響をエストロゲン受容体の時空間的、機能的な解析から明らかにするために、エストロゲン受容体遺伝子の制御下にβガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したマウスを利用する。これにより本来エストロゲン受容体を発現している組織、部位を正確に明らかにするだけでなく、新生児期のエストロゲン暴露による発現状態の変化を明らかにすることができる。

このため、エストロゲン受容体遺伝子の上流を含む BAC クローンを用い、エストロゲン受容体のコード領域をβガラクトシダーゼ遺伝子に置換した遺伝子改変マウスを利用する。βガラクトシダーゼ遺伝子遺伝子産物を染色すること

で、容易にエストロゲン受容体の発現部位を細胞レベルで明らかにすることが可能となる。

さらに神経系における解析を容易にするために、tau 遺伝子を融合させた β ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、エストロゲン受容体を発現している神経線維の投射を明らかにする。tau 遺伝子は微小管タンパク質に結合することから、tau 遺伝子を融合させた β ガラクトシダーゼは軸索を輸送され、発現細胞の神経投射を解析することが可能となる。したがってこのトランスジェニックマウスを解析することにより、ビスフェノール A またはエストロゲン等を暴露した場合、神経系への影響も多く報告されているが、この遺伝子改変マウスを用いることにより、エストロゲン受容体の発現部位の変化を解析すると同時に、神経投射の変化を明らかにすることが可能となる。

これにより、新生児期のエストロゲン暴露が及ぼす影響をエストロゲン受容体の時空間的な変化、機能的な変化から解析することが可能であり、暴露により観察されるエストロゲン応答の変化の原因を明らかにすることができる。

(倫理面への配慮)

本研究においては組換え DNA 実験が含まれるが、これは大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会承認を受けており、動物実験については、大阪大学大学院工学研究科実験動物委員会で承認を受けている。

C. 研究結果

UCSC ゲノムデータベースを検索し、マウス BAC ライブラリーからエストロゲン受容体 α 遺伝子上流域を含む BAC クローンを選択した。レポーター遺伝子をインフレームで挿入するために、翻訳開始 ATG コドンを含むクローン、RP23-7 D5 を選択し、ライフテクノロジー社から入手した。一方、レポーター遺伝子は、神経軸索を可視化することを目的として tau-lacZ を用いることと

した。

tau 遺伝子はウシ由来の N 末端側 383 アミノ酸を含む領域で大腸菌由来の β ガラクトシダーゼ遺伝子とインフレームで融合しており、この融合遺伝子の下流には SV40 由来のポリ A シグナルを配している。

この tau-lacZ 遺伝子については、UCSD の Thomas 教授から分与を受けた。

BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子を組込むために、Red/ET 相同組換え法 (GeneBridges 社) を用いた。BAC 側の挿入予定部位の配列を合成し、tau-lacZ レポーター遺伝子の両末端に PCR 法によって融合させたのちに、この DNA 断片をリコンビナーゼと共に RP23-7 D5BAC クローンを有する大腸菌に導入した。薬剤耐性を指標として、最終的に RP23-7 D5BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子が挿入されたクローンを得た。

得られたクローンを大量精製し、塩基配列を確認したところ、予定通りの組換えが生じており、エストロゲン受容体 α 遺伝子の翻訳開始 ATG 以下が tau-lacZ に置換されていることを確認した。一方、6 塩基切断型の制限酵素数種類を用いて、詳細な制限酵素地図を作製し全体の構造を確認したところ、tau-lacZ 遺伝子由来の DNA 断片が確認されただけでなく、本来相同組換えによって除去されたはずの DNA 断片の存在も確認されたことから、BAC クローンが二量体となって存在していることが明らかになった。この二量体と RP23-7 D5BAC クローンをパルスフィールドゲル電気泳動で解析したところ、ほぼ同等の大きさを示していたことから、もともと配布している RP23-7 D5BAC クローンがすでに二量体となっていることが推察された。これらは制限酵素 PI-SceI で切断すると単量体となり、tau-lacZ 組換えクローンとオリジナルの RP23-7 D5 クローンに分けることができ、現在この組換え単量体を大腸菌に再導入しクローン化を進めると同

時に、一方で環状のままインジェクションを行いトランスジェニックマウスの作製を進め、解析を行っている。

構築したプラスミドについては、347 個の CD-1 マウス受精卵にインジェクションし、253 個を移植、25 匹の仔を得た。これらの仔について、PCR によりトランスジーンを確認したところ、2 系統に構築した遺伝子が導入されていることが確認できた。これら 2 系統について交配を行ったところ、トランスジーンについては、正常な割合で仔に伝搬したことから、問題なく生殖系列に導入されていることが確認できた。

これらのマウスの成獣（8 週齢）について種々の組織から切片を作成、もしくはホールマウントによる X-gal 染色を行い、X-gal 発現部位を確認した。メスマウスの卵巣、子宮、膈などにおいて非常に強い発現が見られたのみならず、脳内では視床下部腹内側核などにおいてその発現が見られた。これらの X-gal シグナルが検出された部位は、今までに知られているエストロゲン受容体発現部位と一致していることから、このトランスジェニックマウスにおいては、X-gal シグナルがエストロゲン受容体の発現を忠実に反映していると考えられた。

このトランスジェニックマウスを用いて、雌雄における視床下部腹内側核における X-gal シグナルを比較したところ、メスにおけるシグナルが多数、かつ強く観察された。このことから、脳内におけるエストロゲン受容体発現の性的二型についても X-gal シグナルの差として検出できることが明らかになった。

一方、新生児期に DES 暴露したマウスにおいては、その X-gal シグナルが弱くなる傾向が得られている。基本的なプロトコールとしては、生後 0 日から 4 日までの 5 日間に合成エストロゲンを曝露し、成熟後卵巣を摘出し、脳における lacZ の発現を解析した。このことは、新生児期のエストロゲン暴露がエストロゲン受容体発

現の時空間的な変化を誘起していることを示唆しており、暴露により観察されるエストロゲン応答の変化の原因を明らかにできる可能性がある。

D. 考察

本研究においてエストロゲン受容体発現細胞を簡便に可視化可能なマウスを作製することができた。このマウスにおける lacZ 陽性細胞の部位は今までに知られているエストロゲン受容体発現部位を反映しているように観察されたが、*in situ* ハイブリダイゼーションなどにより、mRNA の発現パターンとの整合性を確認する必要がある。またニッスル染色など他の染色法や免疫染色を併用し、X-gal シグナル陽性細胞について明確にする必要がある。

一方、脳内における X-gal シグナルについては、その再現性の確認と定量的な比較を行う必要がある。特に雌雄差、曝露による差などが示唆されたが、相互の差異を定量的に比較する必要がある。特に、DES 暴露による影響について再現性を確認し、その感受性のある時期、用量を明確にすることが可能になれば、BPA を含みその他の化学物質影響を定量的に評価することが可能になると思われる。

今後の展開

新生児期におけるビスフェノール A などの曝露を行い、X-gal シグナルの発現に及ぼす影響を明らかにする。これにより、ビスフェノール A をはじめとする、いわゆる遅発影響を誘起する低用量曝露における、エストロゲン受容体の関与を明らかにする。エストロゲン受容体が関与している場合には、エストロゲン受容体発現に着目した新たな試験スキームを提言できる。

将来的には、エストロゲン陽性細胞を標識可能なことから、これらの細胞を選択しエピジェネティック変化等について解析が可能となる。またコンディショナルノックアウトマウス等によ

り、新生児期のエストロゲン受容体発現を抑制することにより、遅発性影響の分子メカニズム解明の有力な手段となる。

一方、エストロゲン受容体が関与していないことが明らかになった場合は、従来のエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体を中心とした「試験スキーム」では不十分であることを提言できる。この場合には、候補となる標的遺伝子について、本研究と類似の標的細胞を可視化したトランスジェニックマウス等を作製することにより、分子メカニズムの解明と同時に新たな「試験スキーム」の提言につなげることが可能となる。

E. 結論

エストロゲン受容体遺伝子の制御領域 180kB を含む BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、CD-1 マウス受精卵にインジェクションすることにより、tau-lacZ レポーター遺伝子導入マウスを 2 系統作製した。

F. 研究発表

1. Vesnarinone Suppresses TNF α mRNA Expression by Inhibiting Valosine-Containing Protein.

Hotta, K., Nashimoto, K., Yasumura, E., Suzuki, M., Azuma, M., Izumi, Y., Shima, D., Nabeshima, R., Hiramoto, M., Okada, A., Sakata-Sogawa, K., Tokunaga, M., Ito, T., Ando, H., Sakamoto, S., Kabe, Y., Aizawa, S., Imai, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, H. and Handa, H. (2013)

Mol Pharmacol. 83: 930-938.

2. Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells.

Taylor JA, Richter CA, Suzuki A, Watanabe H, Iguchi T, Coser KR, Shioda T, Vom Saal FS. PLoS One. (2012) 7(10):e48311. doi: 10.1371/journal.pone.0048311. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23144751

3. Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice.

Kakuta, H., Tanaka, M., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. and Sato, T. (2012) Reprod Toxicol. 33: 35-44.

4. Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice.

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi K, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y. Toxicology. (2012) 14; 296: 13-9. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22445810

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Tau融合エストロゲン受容体 レポーター マウスを用いた 化学物質の神経標的解析

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻
渡邊 肇

発生・発達期の脳に対する低用量暴露により
成長後に誘発される「遅発影響」

Bisphenol Aの曝露影響の報告が多い

例えば Pub Medで

“Brain” and “bisphenol A” 214報

“Brain” and “nonylphenol” 75報

“Brain” and “phtalate” 94報

研究目的

エストロゲンおよびエストロゲン様作用を有する化学物質を、新生児期マウスに暴露し、エストロゲン受容体の量的、機能的変化を明らかにすることにより、幼若期特有の有害性発現のメカニズムを遺伝子レベルから明らかにする。

Studies of BPA Effects on Sex-Differentiation and BPA Sex-Specific Effects on Behavior Using 40 µg/kg d Dose by o.i. in SD Rats

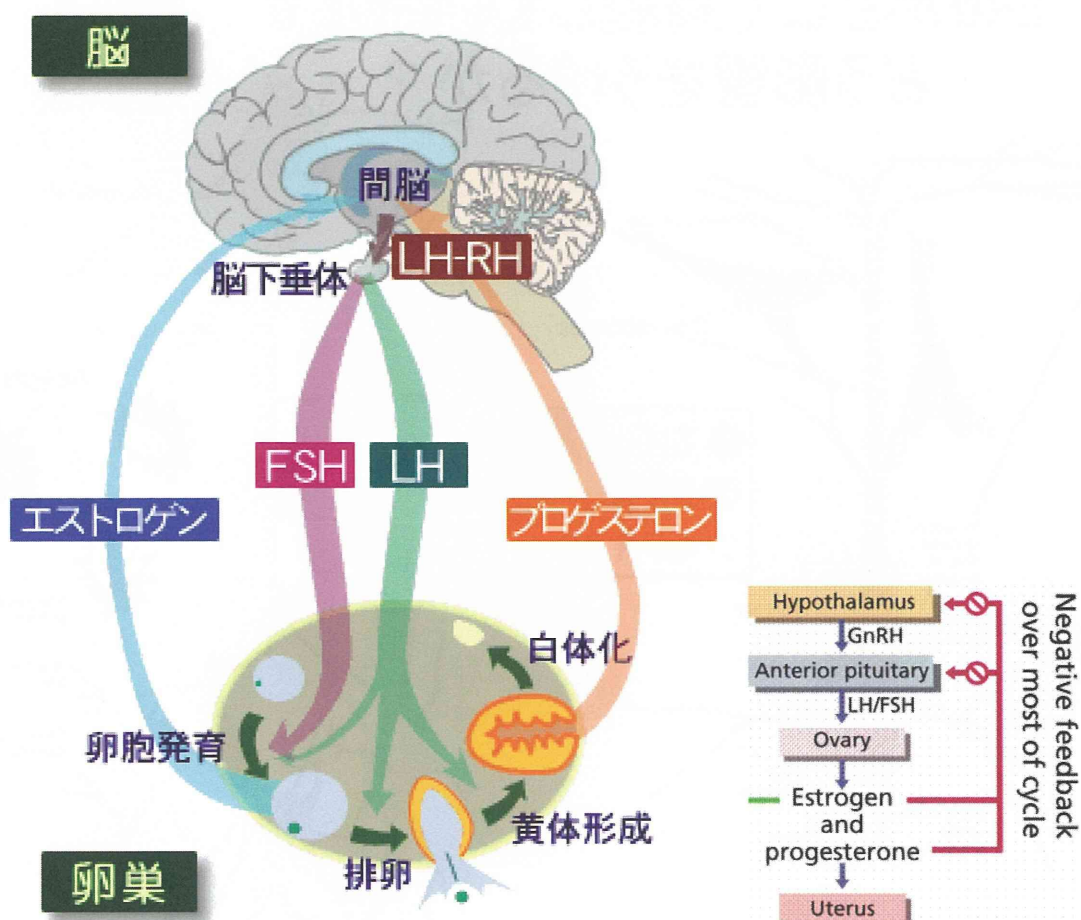
Study	Exposure period dose	Endpoint age at assessment	Findings
<i>Prenatal or postnatal exposure</i>			
Farabollini et al. (2002) NTP-A EU (2008)	Pregnancy or lactation (cross fostered) 40 µg/kg d o.i.	Socio sexual behavior, PND 100	↑ latency to intromission (pre) ↑ number of intromissions (post) ↑ genital sniffing (pre)
Aloisi et al. (2002) NTP-A EU (2008)	Pregnancy or lactation (cross fostered) 40 µg/kg d o.i.	Pain response. PNW 22	↑ limb flexion (pre) ↓ paw jerk (post)
<i>Prenatal and postnatal exposure</i>			
Farabollini et al. (1999) NTP-A EU (2008)	Pregnancy and lactation 40 µg/kg d; or GD 14–PND 6 400 µg/kg d o.i.	Exploration, (holeboard) anxiety (elevated plus maze) PND 85	↓ head dipping ↓ activity ↓ anxiety
Dessi-Fulgheri et al. (2002) NTP-A EU (2008)	Pregnancy and lactation 40 µg/kg d; or GD 14–PND 6 400 µg/kg d o.i.	Juvenile social interaction, 8 factors derived from PCA of behavior scoring PND 25, 35, 45	↑ play directed to females ↓ low intensity mating behavior ↓ sociosexual exploration males ↑ sociosexual exploration females ↓ social interest
Della Seta et al. (2005) NTP-A Porrini et al.(2005) EU (2008) NTP-A	Pregnancy and lactation; 40 µg/kg d o.i. Pregnancy and lactation; 40 µg/kg d o.i.	Maternal behavior PND 3, 4; PND 8, 9 Social behavior of female offspring PND 35,45, 55	↓ duration licking grooming pups ↑ social/nonsoc explore ↓ play with males ↓ social grooming
Adriani et al. (2003) NTP-A EU (2008)	Pregnancy and lactation 40 µg/kg d o.i.	Novelty preference PND 30–45 Activity PND 35–45 Impulsive behavior “adult” Amphetamine response “adult”	↓ females ↑ males and females ↓ males and females ↓ males
Della Seta et al. (2006) NTP-A EU (2008)	PND 23–30 40 µg/kg d o.i.	Male social and sexual behavior PND 45, 90	↓ latency to intromission

PCA, principal components analysis; o.i., oral instillation; PND, postnatal day; GD, gestation day; BPA, bisphenol A.

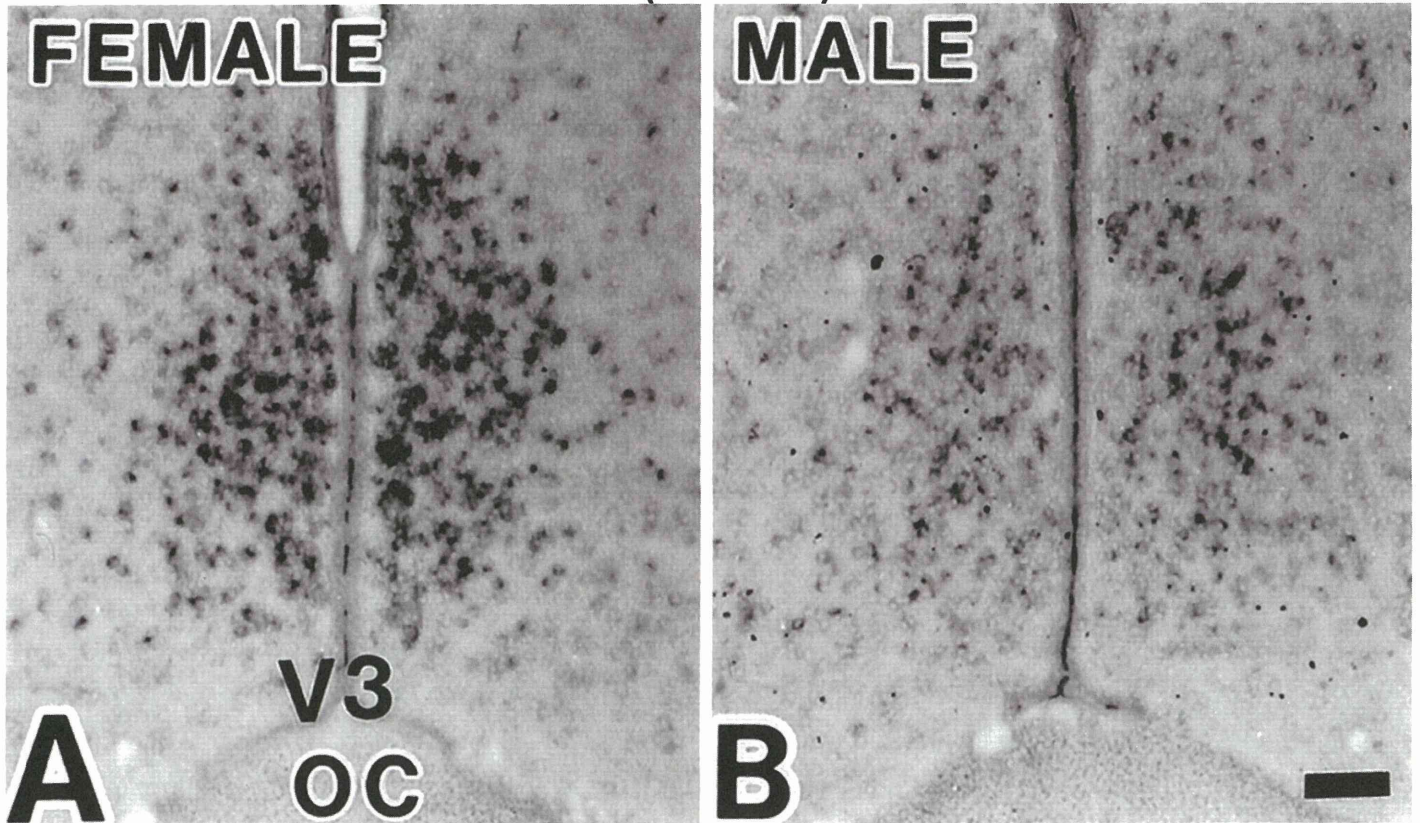
Studies of Sexual Differentiation of the Brain and Behavior in Wistar Rats Exposed Via Drinking Water to Low Doses of BPA (≤ 1.5 mg/kg d)

Study	Exposure time/dose	Endpoint	BPA effect
Kubo et al. (2001) NTP-A EU (2008)	GD 0-PND 21 0 and 1.5 mg/kg d Drinking water	Reproductive organ weights	No effect
		Hormones (LH, FSH, and E ₂ /T)	No effect
		Brain: SDN-POA, Volume	Cont: sex diff BPA: sex diff
		Brain: Locus Coeruleus Volume, cell #	Cont: sex diff BPA: no sex diff
		Behavior: Exploratory	Cont: sex diff BPA: no sex diff
		Behavior: Passive avoidance	Cont: sex diff BPA: no sex diff
Fujimoto et al. (2006) NTP-A EU (2008)	GD 13-PND 0 0 and 15 μ g/kg d Drinking water	Behavior: Exploratory	Cont: sex diff BPA: no sex diff
		Behavior: Passive avoidance	Cont: sex diff BPA: sex diff
		Behavior: Forced Swim	Cont: sex diff BPA: no sex diff
		Behavior: Elevated Plus maze	Cont: no sex diff BPA: no sex diff

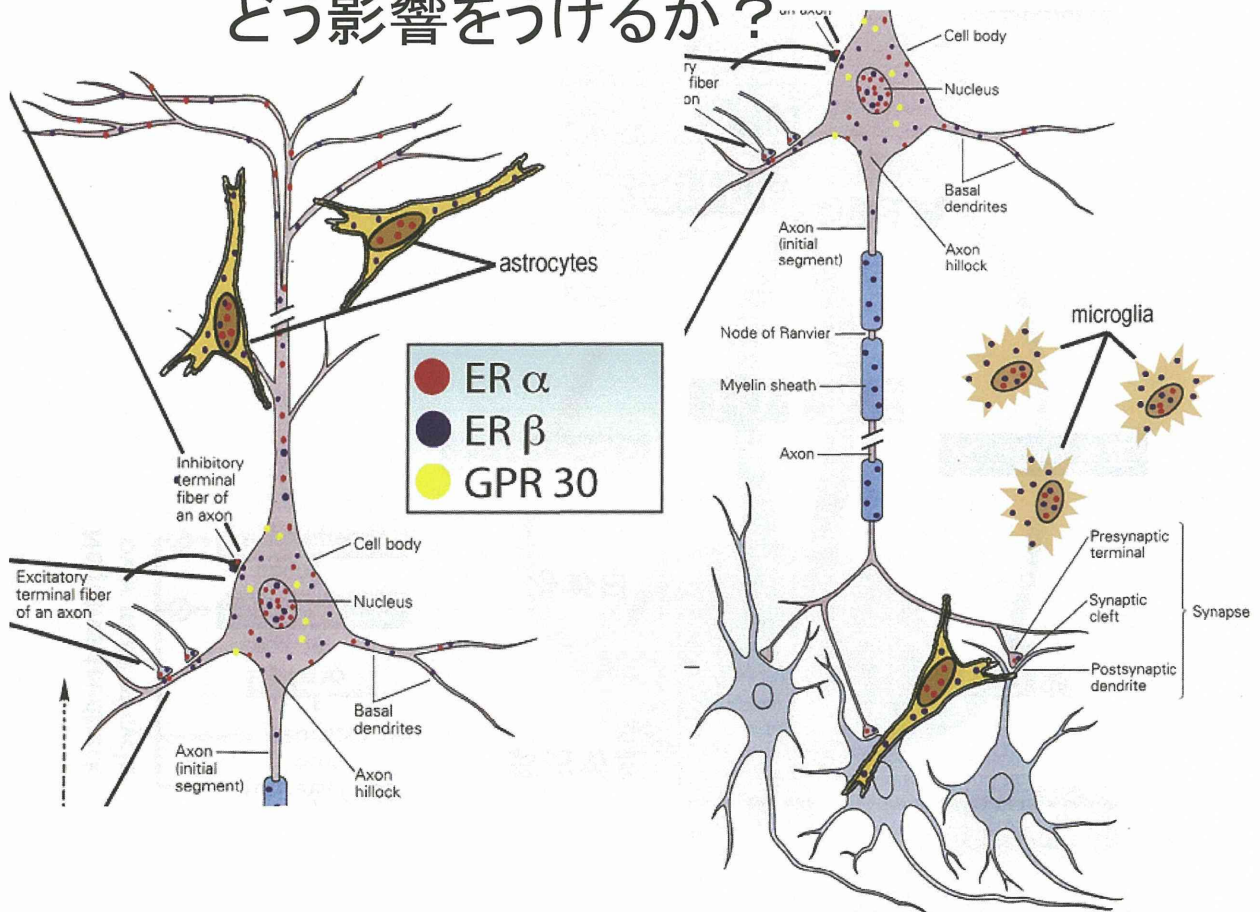
問題点: どの程度エストロゲン曝露影響と共通しているか?
 エストロゲン受容体がどの程度関与しているか?
 その作用機序は?
 —エストロゲン受容体を対象としたスキームで十分かを検証—



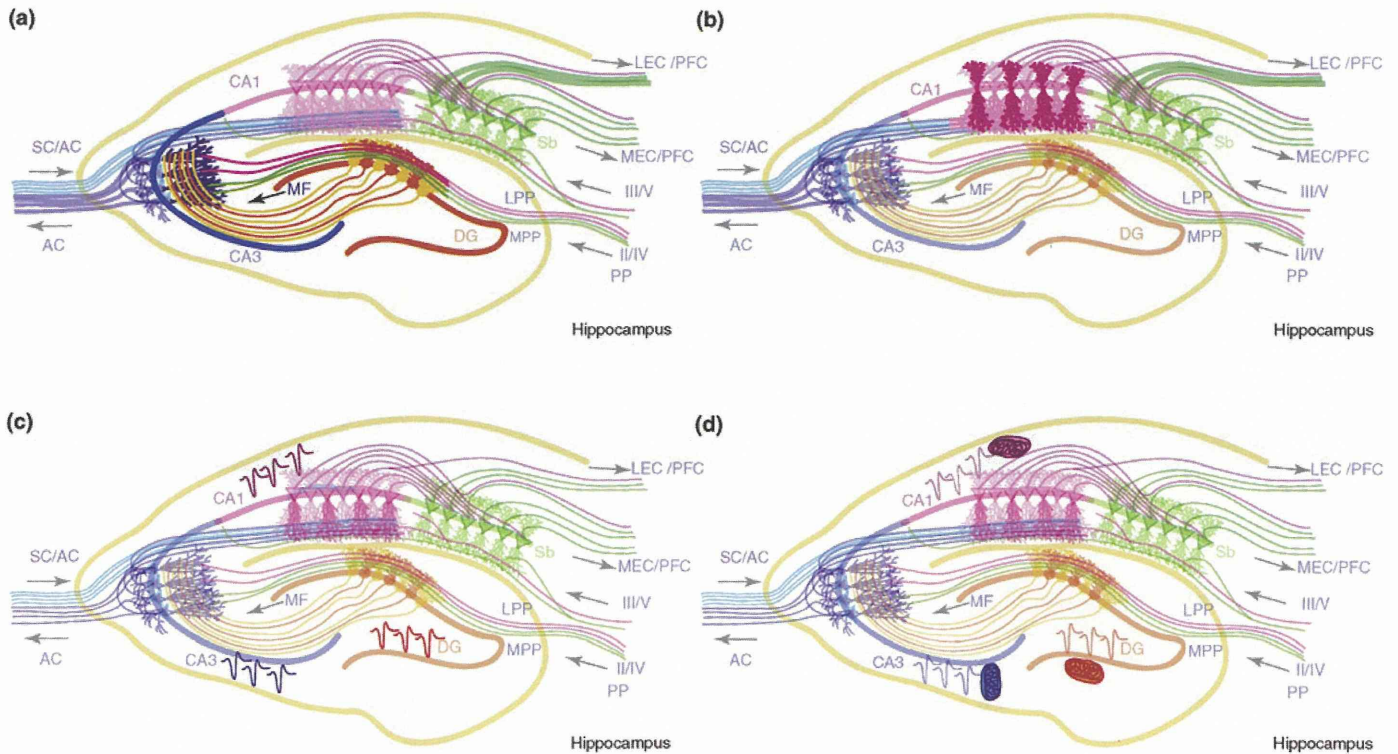
ラットにおけるEra(mRNA)の性的二型



ERαがどこで発現しているか？
どう影響を受けるか？



ER α を発現しているニューロンの投射は？



→ BAC-レポーター システムを用いて検証する

BAC-レポーター システム の利用

articles

A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes

Shiaoching Gong¹, Chen Zheng¹, Martin L. Doughty¹, Kasia Losos¹, Nicholas Didkovsky², Uta B. Schambra⁴, Norma J. Nowak⁵, Alexandra Joyner⁶, Gabrielle Leblanc⁷, Mary E. Hatten² & Nathaniel Heintz³

¹GENSAT Project, ²Laboratory of Developmental Neurobiology and ³Laboratory of Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, Box 260, New York 10021, USA

⁴Department of Anatomy and Cell Biology, East Tennessee State University, Tennessee 37614, USA

⁵Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York 14263, USA

⁶Developmental Genetics Program, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, Department of Cell Biology, New York University School of Medicine and Howard Hughes Medical Institute, New York 10016, USA

⁷National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, Maryland 20892, USA

The mammalian central nervous system (CNS) contains a remarkable array of neural cells, each with a complex pattern of connections that together generate perceptions and higher brain functions. Here we describe a large-scale screen to create an atlas of CNS gene expression at the cellular level, and to provide a library of verified bacterial artificial chromosome (BAC) vectors and transgenic mouse lines that offer experimental access to CNS regions, cell classes and pathways. We illustrate the use of this atlas to derive novel insights into gene function in neural cells, and into principal steps of CNS development. The atlas, library of BAC vectors and BAC transgenic mice generated in this screen provide a rich resource that allows a broad array of investigations not previously available to the neuroscience community.

Nature (2003) 425 917-925

Cited 462 times

The GENSAT Project at The Rockefeller University

GENSAT is an NIH-funded, publicly available gene expression atlas of the developing and adult central nervous system in the mouse. The project also generates transgenic BAC-EGFP reporter and BAC-Cre recombinase driver mouse lines, which are available as research resources to the scientific community.

Enter GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas)

Principle Investigator: Nathaniel Heintz

Project Officer: Laura Mamounas

Supported by: National Institute of Neurological Disorders and Stroke, contract # NO1-NS-7-2370

BAC Modification Core
Shiaoching Gong
Sanjay Mehta
Sri Ramullu Pullagura
Lalit Rajeev Reddybattula
Cuidong Wang

BAC Transgenic Core
Huifen Feng
Jesse Llerena
Kim Schwabe
Lanzhen Yan

Histology Core
Terence Duarte
Ana Milosevic
Paul Dyer
Christine Grevstad
Nadiya Kryachko
Christine Lai
Ming Pearly
Yu Wei

Annotation Core
Chen Zheng
Laura Kus
Ana Milosevic

Bioinformatics Core
Nick Didkovsky



WWW.GENSAT.ORG

ER α 遺伝子に融合させることにより、
ER α 遺伝子を発現しているニューロンの投射を
明らかにする

Cells of embryonic mouse brain (right) can be tagged by replacing the coding region of a native gene (*TrkC*, in this example) with that of the EGFP 'reporter'. Immunohistochemical detection of EGFP, magnified in the image above, reveals that *TrkC* is normally expressed in nerves that carry sensory information from the face to the brain. The technique allows the nerve-cell projections as well as the cell bodies (small round dots) to be traced.

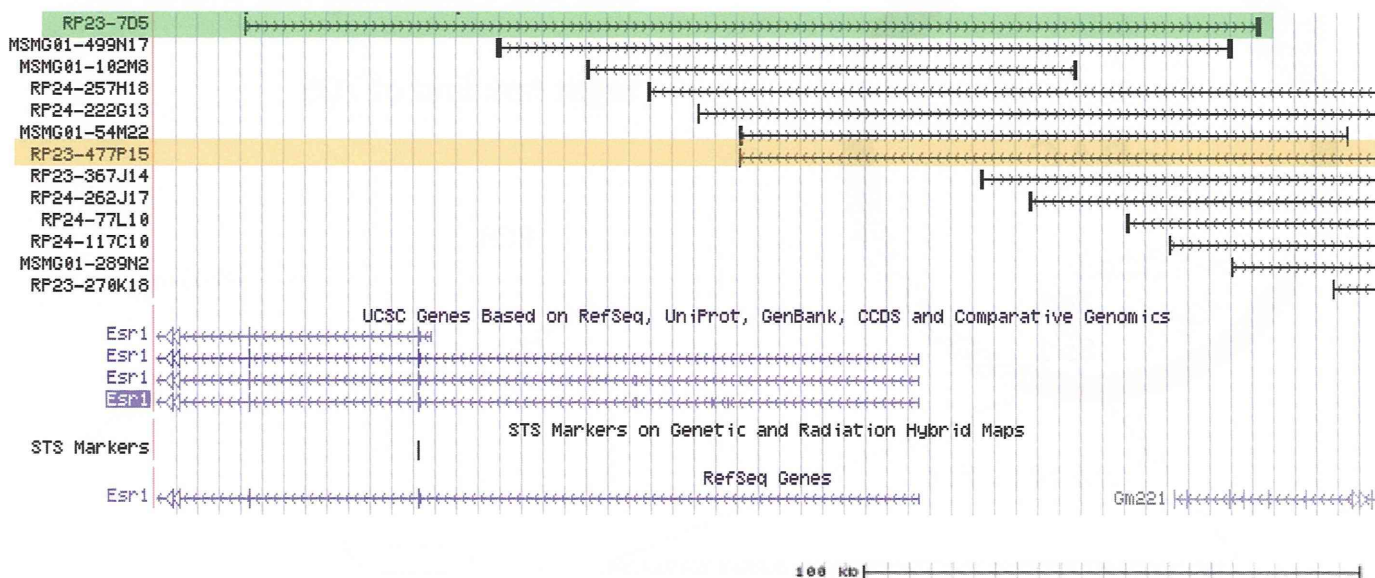
研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認
 1. TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など

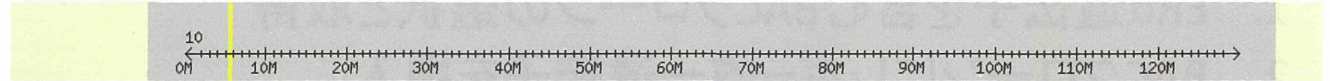
BAC clone selection



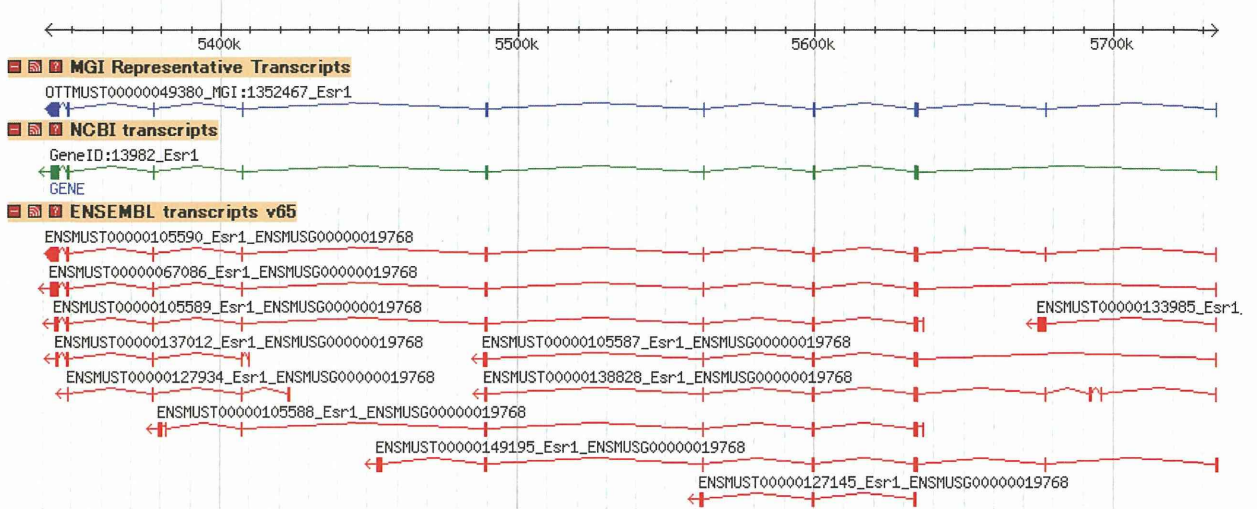
RP23-7D5 and RP23-477P15

Esr1遺伝子のゲノム構造

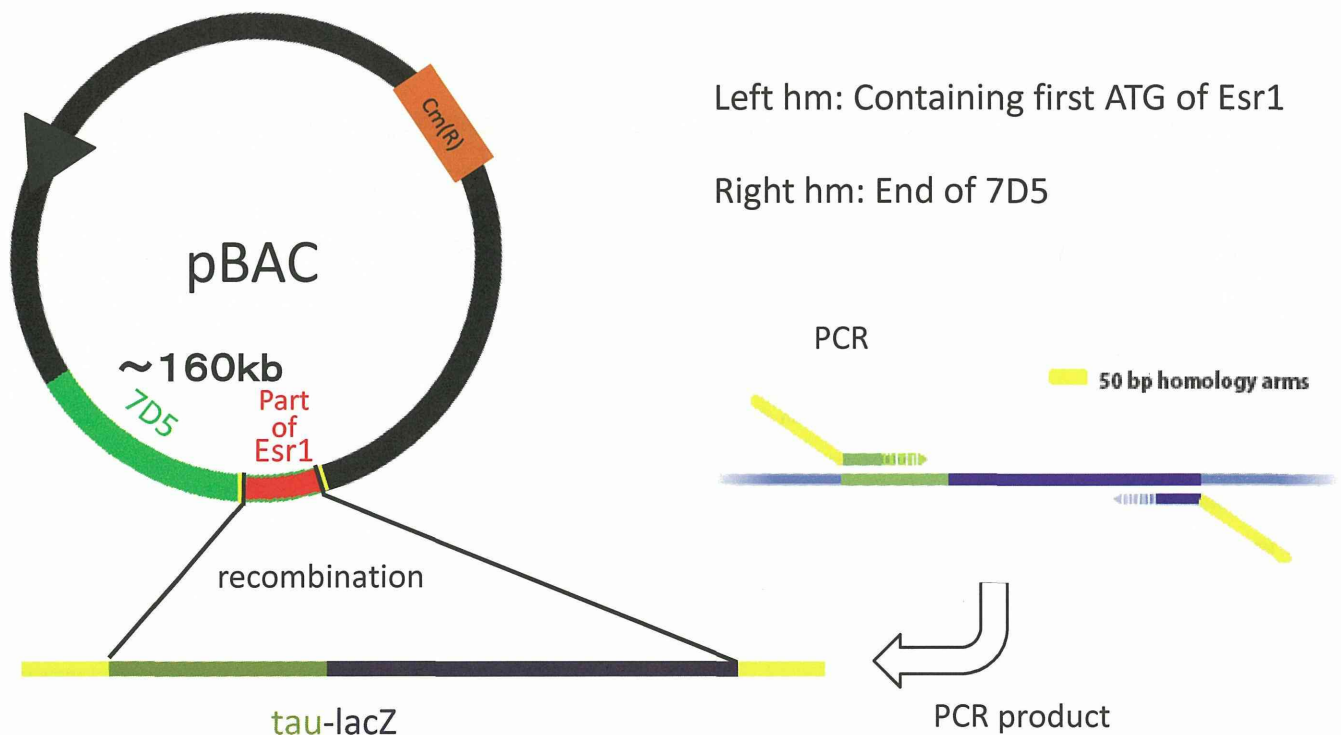
■ オーバービュー



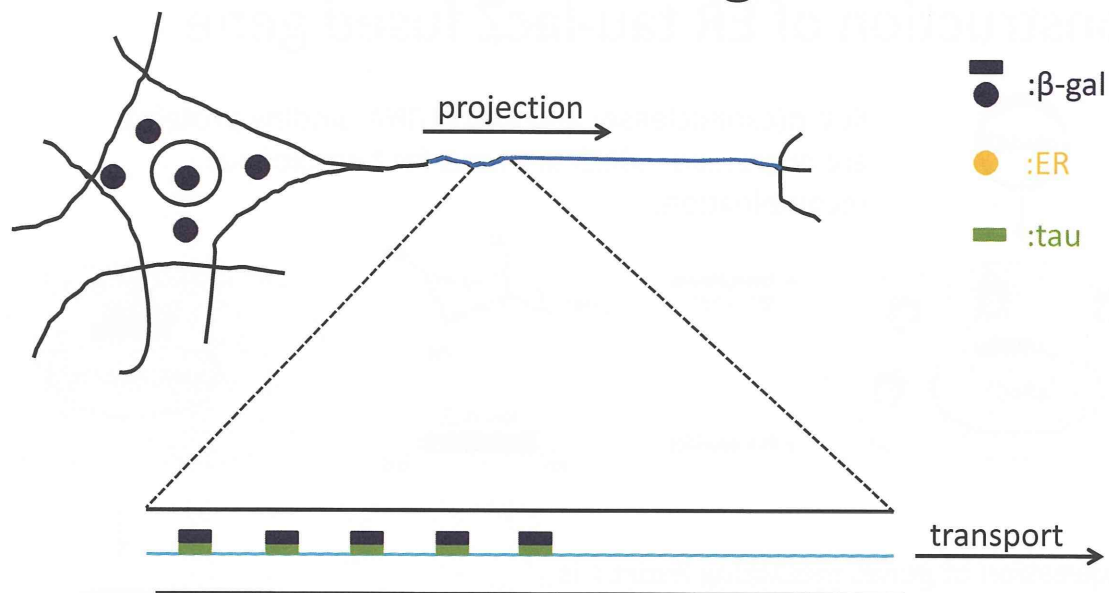
■ 詳細



Design of homology arms and primer



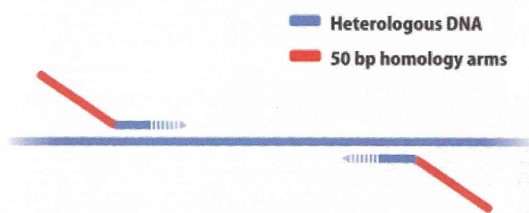
Tau-LacZ gene



tau-lacZ, a fusion of the microtubule-associated protein tau and β -galactosidase

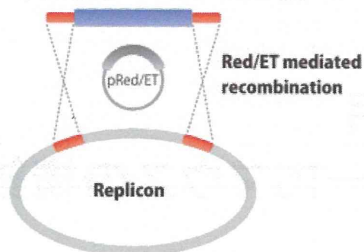
1. ホモロジーアームの付加

Red/ET 相同組換え法では、直鎖 DNA の両末端にわずか 50 bp のホモロジーアームがあれば組換えが可能です。ホモロジーアームは PCR によって簡単にどこにでも付加できます。



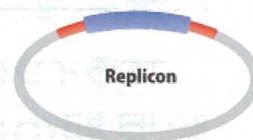
2. 相同組換え

ホモロジーアームを付加した目的 DNA 断片を pRed/ET ベクターを有する *E. coli* に導入します。pRed/ET ベクターの発現を誘導すると相同組換えにより目的の領域が改変されます。

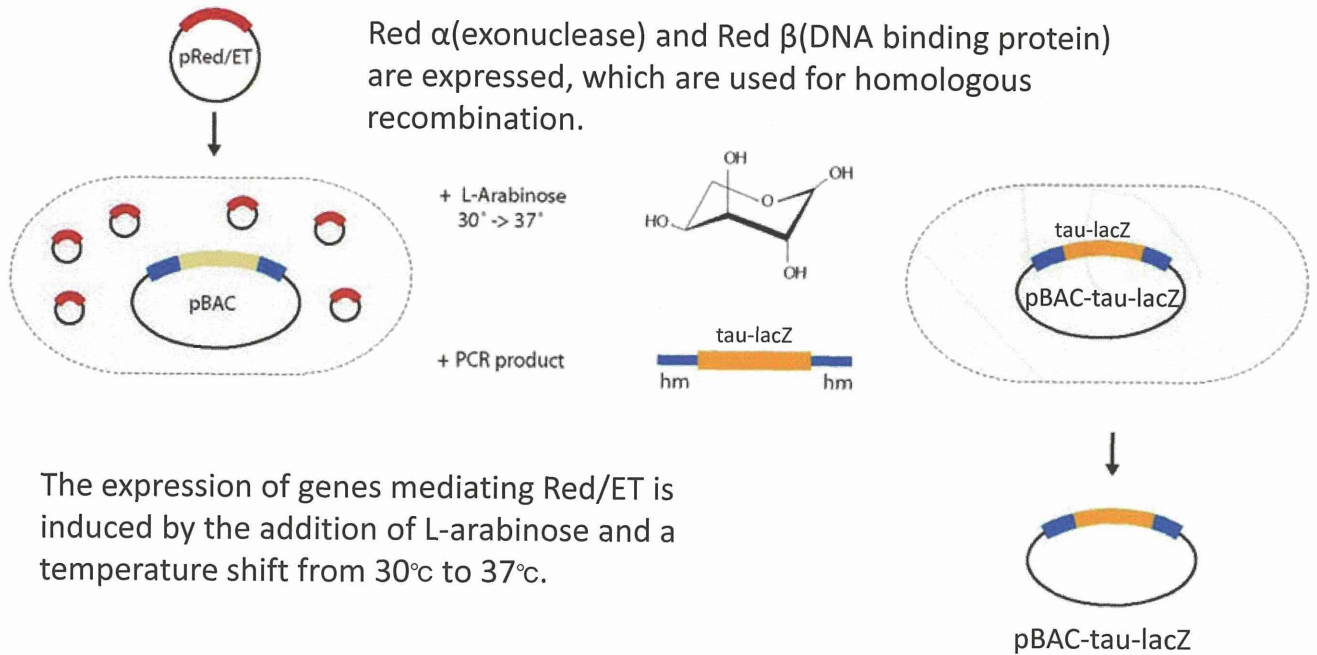


3. セレクション

目的領域が改変された *E. coli* をセレクションする。



Construction of ER tau-lacZ fused gene



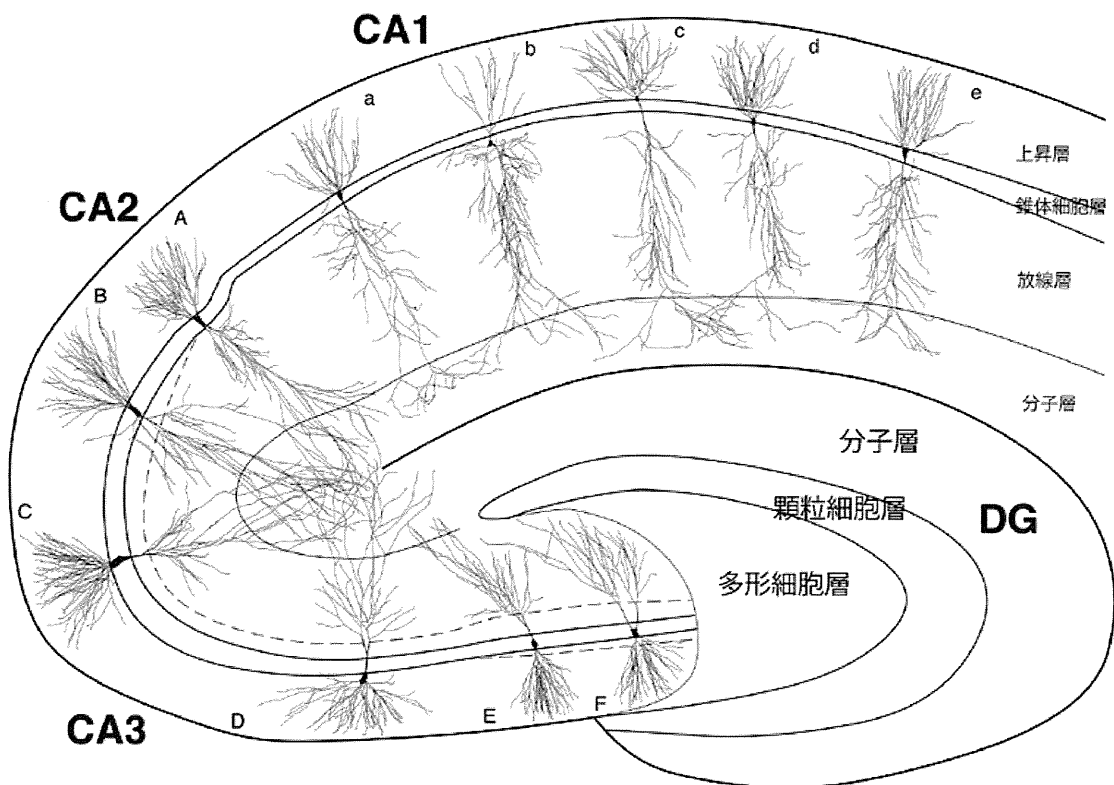
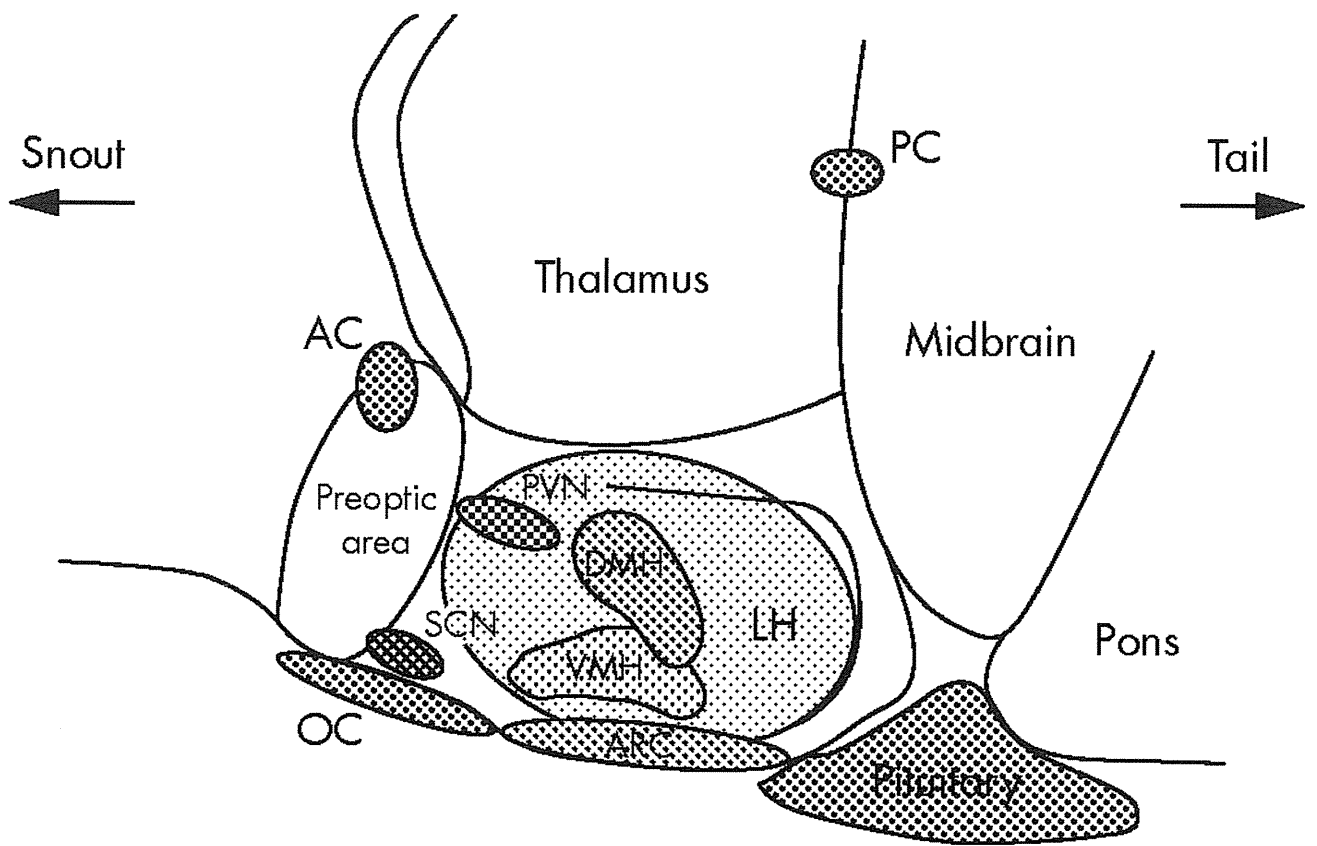
研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製

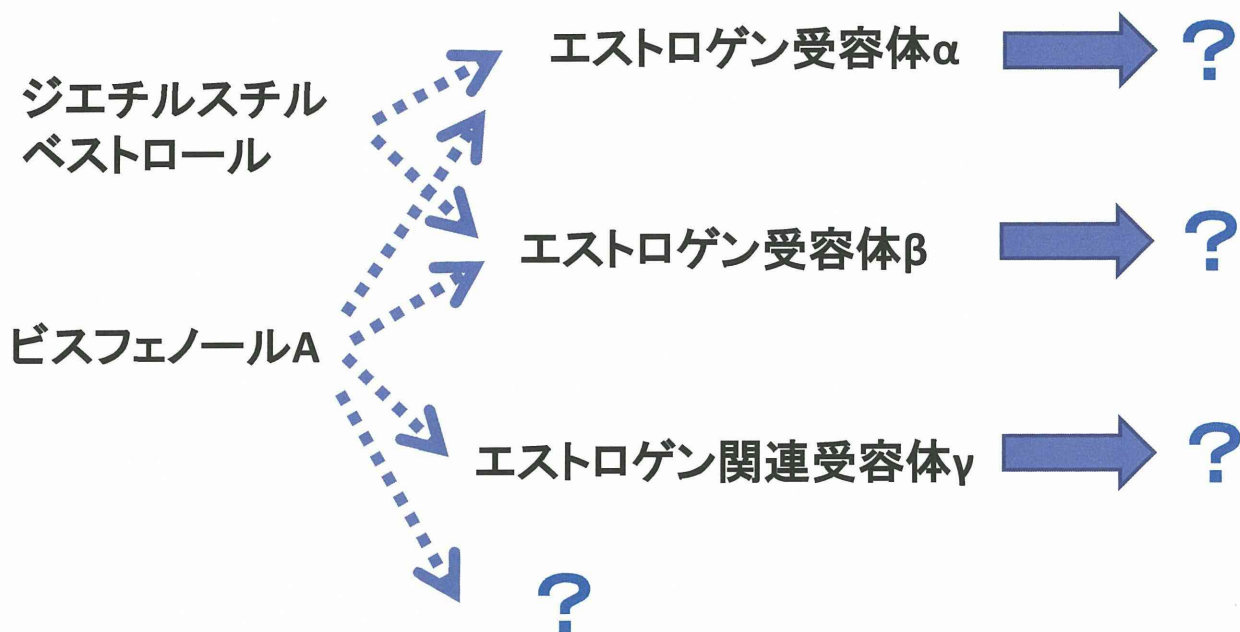
4. レポーター遺伝子の発現の確認
TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など



有害性発現メカニズムの解明



発生・発達期における脳に対するBisphenol Aの 低用量暴露により成長後に誘発される「遅発影響」

Studies of BPA Effects on Sex-Differentiation and BPA Sex-Specific Effects on Behavior Using 40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ Dose by o.i. in SD Rats

Study	Exposure period dose	Endpoint age at assessment	Findings
<i>Prenatal or postnatal exposure</i>			
Farabollini et al. (2002)	Pregnancy or lactation (cross fostered)	Socio sexual behavior, PND 100	↑ latency to intromission (pre) ↑ number of intromissions (post)
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.		↑ genital sniffing (pre)
EU (2008)			↑ limb flexion (pre) ↓ paw jerk (post)
Aloisi et al. (2002)	Pregnancy or lactation (cross fostered)	Pain response. PNW 22	
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.		
EU (2008)			
<i>Prenatal and postnatal exposure</i>			
Farabollini et al. (1999)	Pregnancy and lactation	Exploration, (holeboard) anxiety (elevated plus maze)	↓ head dipping ↓ activity ↓ anxiety
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$; or	PND 85	
EU (2008)	GD 14–PND 6 400 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.		
Dessi-Fulgheri et al. (2002)	Pregnancy and lactation	Juvenile social interaction, 8 factors derived from PCA of behavior scoring	↑ play directed to females ↓ low intensity mating behavior ↓ sociosexual exploration males ↑ sociosexual exploration females ↓ social interest ↓ duration licking grooming pups
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$; or	PND 25, 35, 45	
EU (2008)	GD 14–PND 6 400 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.		
Della Seta et al. (2005)	Pregnancy and lactation;	Maternal behavior	
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.	PND 3, 4; PND 8, 9	
Porrini et al. (2005)	Pregnancy and lactation;	Social behavior of female offspring	↑ social/nonsoc explore ↓ play with males ↓ social grooming
EU (2008)	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$	PND 35, 45, 55	
NTP-A	o.i.		↓ females ↑ males and females ↓ males and females ↓ males
Adriani et al. (2003)	Pregnancy and lactation	Novelty preference PND 30–45	
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.	Activity PND 35–45	
EU (2008)		Impulsive behavior “adult” Amphetamine response “adult”	
Della Seta et al. (2006)	PND 23–30	Male social and sexual behavior	↓ latency to intromission
NTP-A	40 $\mu\text{g}/\text{kg d}$ o.i.	PND 45, 90	
EU (2008)			

PCA, principal components analysis; o.i., oral instillation; PND, postnatal day; GD, gestation day; BPA, bisphenol A.