

## In vitro에서 Bisphenol A 노출에 의한 세포성 면역반응의 변화

표 명 윤<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 8, 2005; Revised February 15, 2005)

### Alternation in the Cell-mediated Immune Reaction by Bisphenol A Exposure *in vitro*

Myoung-Yun Pyo<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — In order to investigate the effects of bisphenol A (BPA) on cell mediated immune reaction *in vitro* we examined the allogenic mixed lymphocyte reaction (MLR), splenocytes proliferation (SP) to T cell mitogens and IFN- $\gamma$  production. Splenocytes of Balb/c mice ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were co-cultured with different numbers of mitomycin C-treated mature dendritic cells (DCs) in presence of BPA (25, 50, 100  $\mu$ M) and [ $^3$ H]thymidine incorporation (cpm) was measured by scintillation counting. Splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells/well) were cultured with mitogens, Con A (2  $\mu$ g/ml), PHA (5  $\mu$ g/ml) and IL-2 (0.1  $\mu$ g/ml), or PMA (5 ng/ml) and INO (1  $\mu$ g/ml) in presence of BPA (1, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M) and SP was assessed by MTT assay. IFN- $\gamma$  levels in culture supernatant were determined by ELISA. At low concentration, BPA slightly increased MLR, SP and IFN- $\gamma$  levels, but at higher concentration it showed significant inhibitory effects on these immunological parameters. These results indicate that BPA is able to alternate cell-mediated immune reaction.

**Keywords** □ bisphenol A, mixed lymphocyte reaction, splenocytes proliferation, IFN- $\gamma$

Bisphenol A(BPA: 4,4'-isopropylidenediphenol)는 치과용 수지와 식품포장재, 캔, 병마개 등에 이용되는 epoxy resin과 polycarbonate제조에 사용되는 monomer이며 내분비계 장애물질로 분류되고 있는 xenobiotics이다. 근래에 BPA가 polycarbonate flask,<sup>1)</sup> 멸균한 polycarbonate 재질의 우유병,<sup>2)</sup> 시판되는 통조림 식품,<sup>3)</sup> 심폐기<sup>4)</sup>나 치과용 수지<sup>5)</sup> 등에서 유출되는 것으로 보고되었으며, BPA가 태반을 통과하여 모체 뿐 아니라 태아, 태반에서도 검출된 것으로 보고되어<sup>6)</sup> 인체에 미치는 영향에 대한 관심이 높아지고 있다.

BPA의 estrogenic activity,<sup>7,8)</sup> 유전독성,<sup>9)</sup> 생식독성<sup>10)</sup>은 이미 잘 알려져 있고, 그 외에도 BPA가 human plasma sex hormone binding protein(hSHBG)과 결합하여 체내에서 작용함으로써 체내에 hSHBG와 결합하지 않은 estrogen과 testosterone의 양을 증가시켜 체내의 호르몬 균형을 잃게 하거나<sup>11)</sup> 뇌에도 영향을 미칠 수 있다고 보고되어 있다.<sup>12)</sup>

이처럼 BPA의 유전독성, 발암성, 생식독성 등에 대한 연구가 많이 보고된 것에 비해 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 보고되지 않았다. BPA를 생쥐에 급성노출 시킨 후 면역 병리학적 변화, 혈중 IgM 항체 생성능, 임파구 증식능 등에 미치는 영향이 보고된 바 있다.<sup>13)</sup> 본 연구에서는 *in vitro*에서 BPA가 세포성 면역반응에 미치는 영향을 평가하고자 혼합임파구반응, mitogen에 대한 비장세포 증식능 및 cytokine의 일종인 IFN- $\gamma$  생성 변화를 측정하였다.

### 실험 방법

#### 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 RPMI 1640 medium powder와 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Co.에서, mouse IFN- $\gamma$  set은 PharMingen에서 구입하였으며, 기타 시약은 세포 배양용 및 특급으로 구입하였다. 실험기기로는 CO<sub>2</sub> incubator(New Brunswick Scientific Inc.), ELISA microplate reader(ELX800, BIO-TEK instruments), Automatic cell harvester(SKATRON),  $\beta$ -Liquid scintillation counter(Bekman) 등을 이용하였다.

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9573 (팩스) 02-710-9573  
(E-mail) mypyo@sdic.sookmyung.ac.kr

### 실험동물

6~8 주령인 Balb/c, C57BL/6, ICR 생쥐를 (주)오리엔트에서 구입하여 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험동물실에서 2~3주간 적응시킨 후, 체중  $23 \pm 2$  g의 생쥐를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는  $21 \sim 24^\circ\text{C}$ , 습도는 40~60%, 명암교대는 12시간을 유지하였다.

### 실험물질 조제

실험물질인 bisphenol A(BPA, Sigma)를 실험 직전에 microplate well 내에서의 최종농도가 1, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 이 되도록 ethanol 0.01% 함유 RPMI-1640 배지에 용해하여 실험하였다.

### 수지상세포 획득

Lutz 등의<sup>14)</sup> 방법에 준하여 골수의 전구세포에서 성숙 수지상세포(bone marrow dendritic cells, DCs)를 획득하여 실험하였다. 즉, C57BL/6의 골수를 PBS로 씻어서 얻은 골수세포를 원심분리(1500 rpm, 10 min)한 후, 10% FBS와 1% penicilline-streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지액 1 ml당 약  $2 \times 10^6$  세포가 되도록 멸균 petri dish(직경 100 mm)에 심고, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) 50 ng/ml를 첨가하여 배양(5%  $\text{CO}_2$ ,  $36^\circ\text{C}$ )하기 시작하였다. 10% FBS-RPMI 배지를 2일 간격으로 교환하고 동시에 GM-CSF 50 ng/ml를 첨가하여 배양을 계속하여 9일째에 성숙 수지상세포를 얻어 실험에 사용하였다.

### 혼합림파구반응 측정

Bach 등<sup>15)</sup>의 혼합림파구반응(mixed lymphocyte response, MLR)의 실험방법을 약간 변형시켜 다음과 같이 실험하였다. i) Responder cells 액: Balb/c 마우스의 비장을 적출하여 빙냉의 RPMI-1640 배지에 넣고 frosted microscope slides를 이용하여 만든 세포액을 원심분리(1000 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ )하고 비장세포 침전물에 RBC lysis buffer를 가하여 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 침전된 비장세포에 일정량의 10% FBS-RPMI 배지액을 가한 후 trypan blue exclusion method<sup>16)</sup>로 살아있는 비장세포수를 측정하여  $3 \times 10^6$  cells/ml로 조정하였다. ii) Stimulator cells 액: 성숙 수지상세포액의 농도를 약  $1 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 10% FBS-RPMI 배지액을 가하여 조정하였다. 이 세포액 1 ml당 mitomycin C 액(1 mg/ml) 50  $\mu\text{l}$ 을 가하여 방치(5%  $\text{CO}_2$ ,  $36^\circ\text{C}$ , 20 min)한 후 3회 원심분리하여 세척하고 살아있는 세포수를 측정하여  $1.5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  cells/ml이 되게 10% FBS-RPMI 배지액을 가하였다. iii) Cocultivation: 96 well round-bottomed microplate의 well에 responder cell액 50  $\mu\text{l}$ ( $1.5 \times 10^5$  cells/well)을 가하고 mitomycin C로 처리한  $1.5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도의 stimulator

cell 액을 각각 100  $\mu\text{l}$ (15,000, 10,000, 5,000 cells/well)을 첨가하여 96시간 동안 배양(5%  $\text{CO}_2$ ,  $36^\circ\text{C}$ )하였다. 배양이 끝나기 16시간 전에 1  $\mu\text{Ci}$ 의  $^3\text{H}$ -thymidin액 20  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 배양을 계속하였다. iv) Cell harvesting 및 count: 배양된 세포를 automatic cell harvester로 수확 후  $\beta$ -liquid scintillation counter로 counts per minute(cpm)을 측정하였다.

### T cell mitogen에 대한 비장세포 증식능 측정

ICR 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 빙냉의 RPMI-1640 배지에 넣고 frosted microscope slides로 비장세포액을 만들어 원심분리(1000 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ )하였다. 세포침전물에 RBC lysis buffer를 가하여 적혈구를 용혈시키고 원심분리하였다. 상등액을 제거하여 PBS로 2회 원심분리하여 세척하고 10% FBS-RPMI 1640 배지를 가한 후 viable cell을 trypan blue exclusion method<sup>16)</sup>로 측정하여  $4 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 비장세포액을 만들었다.

비장세포액 100  $\mu\text{l}$ ( $2 \times 10^6$  cells/ml)를 96 well flat-bottomed plate(Greiner) 각 well에 가하고 30분간 배양(5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ )하여 안정시켰다. BPA의 최종 농도가 well 내에서 1, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 이 되도록 하고 Con A(Concanavalin A; 2  $\mu\text{g/ml}$ ), PHA (Phytohemagglutinin; 5  $\mu\text{g/ml}$ )와 IL-2(Interleukin-2; 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), 또는 PMA(Phorbol myristate acetate; 5ng/ml)와 INO (Ionomycin calcium salt; 1  $\mu\text{g/ml}$ )를 각각 가하여 3일간 배양하였다. MTT assay<sup>17)</sup>는 생존 세포의 효소 작용에 의해 MTT 시약이 환원되어 생성되는 formazan의 양을 측정함으로써 세포독성 연구에 자주 사용되며  $^3\text{H}$ -thymidine uptake assay의 결과와 유사한 것으로 보고되어<sup>18)</sup> 이 방법으로 각 mitogen에 대한 비장세포 증식능을 측정하였다.

### IFN- $\gamma$ 생성 측정

혼합림파구반응과 비장세포 증식능 실험시 배양하여 얻은 배양액을 각각  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였고, 배양액 중의 IFN- $\gamma$  생성 정도는 PharMingen에서 제공한 sandwich ELISA법에 준하여 실험하였다. 즉, anti-mouse IFN- $\gamma$  monoclonal antibody를 96 well flat-bottomed plate(Dynex Immulon 4HBX)에 도포한 후 acetate plate sealer로 밀봉하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 방치한 후 washing buffer로 3회 세척하고 blank well을 제외한 well에 각각 200  $\mu\text{l}$ 의 10% FBS-PBS를 가하고 2 시간 동안 실온에서 방치하였다. 실험군의 배양액을 96 well flat-bottomed plate 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 duplicate로 가하고, 검량선을 작성하기 위해서는 recombinant mouse IFN- $\gamma$ 를 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/ml 농도로 희석하여 100  $\mu\text{l}$ 씩 duplicate로 가하고, plate를 acetate plate sealer로 봉하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 방치하였다. 96 well flat bottomed plate를 5회 반복 세척한 후, bio-

tinylated anti-mouse IFN- $\gamma$  polyclonal antibody 용액을 well당 100  $\mu$ 씩 가하고 2시간 후에 다시 5회 세척하고 100  $\mu$ 의 avidin-horseradish peroxidase conjugate 용액을 각 well에 가하였다. 실온에서 30분간 방치한 뒤 plate를 7회 세척하고, 각 well에 TMB와 hydrogen peroxidase를 같은 부피로 혼합한 TMB substrate 용액을 100  $\mu$ 씩 가하고 15분 후 50  $\mu$ 의 2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 반응을 정지시킨 다음 30분 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 IFN- $\gamma$ 을 정량하였다.

### 통계처리

각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고, 대조군과의 차이를 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

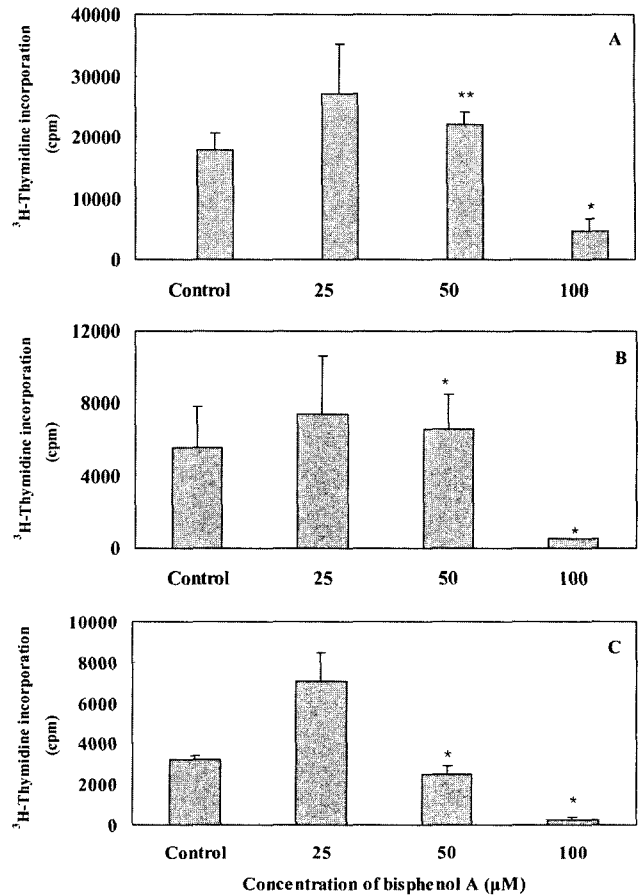
### 혼합림파구반응에 미치는 영향

Balb/c 마우스의 비장세포인 responder cell( $1.5 \times 10^5$  cells)과 mitomycin C로 처리한 성숙 수지상세포(DCs)인 stimulator cell (15,000, 10,000, 5,000 cells)을 혼합하고 동시에 BPA의 최종 농도 25, 50 또는 100  $\mu$ M을 가하여 배양한 후 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation(cpm)을 측정하여 BPA가 *in vitro*에서 마우스의 혼합림파구반응(MLR)에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. BPA를 처리하지 않은 대조군과 비교해 보면, 25  $\mu$ M 농도에서는 성숙 수지상세포수에 관계없이 혼합림파구반응이 증가(15,000 DC; 53.1%, 10,000 DC; 34.3%, 5,000 DC; 118.8%) 되었으며, 50  $\mu$ M에서는 15,000 DC의 경우에는 24.7%, 10,000 DC의 경우에는 18.8% 증가되었으나 5,000 DC의 경우에는 23.1% 감소되었다. 또한 100  $\mu$ M에서는 stimulator cell 수에 관계없이 유의성있게(p<0.05) 감소(15,000 DC; 73.2%, 10,000 DC; 90.5%, 5000 DC; 91.6%) 되었다. 이상의 결과로 보면, 고농도의 BPA는 혼합림파구반응을 억제하나 저농도의 BPA는 증가시키는 것으로 보인다.

### T cell mitogen에 대한 비장세포 증식능에 미치는 영향

BPA가 *in vitro*에서 T 세포 증식능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 마우스 비장세포에 최종농도가 1, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M이 되도록 BPA를 가하고 T cell mitogen으로 Con A를 가하거나 PHA와 IL-2 또는 PMA와 INO를 동시에 가한 후 비장세포 증식 정도를 MTT assay로 실험한 결과를 Table I에 나타내었다.

Con A에 의한 증식능은 10, 25, 50, 100  $\mu$ M에서 대조군에 비해 각각 흡광도가 4.7%, 24.4%, 45.1%, 72.4%가 낮아져 농도에 의존적으로 감소하였고 특히, 50  $\mu$ M과 100  $\mu$ M에서는 유의성있는 감소를 나타내었다. 그러나 1  $\mu$ M에서는 오히려 4.8%가 증가하여 저농도의 BPA가 Con A에 의한 증식능을 약간 증가시키는



**Fig. 1** – Effect of BPA on the allogenic mixed lymphocyte reaction. Cells from mouse (C57BL/6) bone marrow were cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for 8 days and mature dendritic cells (DCs) were prepared. Balb/c splenocytes ( $1.5 \times 10^5$ /well) were co-cultured with different numbers of mitomycin C-treated DCs (A: 15,000, B: 10,000, C: 5,000) for 96 hrs in presence of bisphenol A (BPA). [<sup>3</sup>H]thymidine was added for the final 16 hrs of culture and [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation (cpm) was measured by scintillation counting. Results are the mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments and all experiments were done in duplicate. Significant difference from control group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

것으로 보이나 유의성은 없었다. T cell mitogen인 PHA와 T 세포 성장인자(T cell growth factor)인 IL-2를 동시에 처리하거나 PMA와 INO를 동시에 처리하여 측정된 비장세포 증식능 결과도 대조군에 비해 1  $\mu$ M 농도에서는 각각 5.1%, 11.3%, 10  $\mu$ M 농도에서는 각각 6.2% 28.0% 증가를 보였으나, 25  $\mu$ M에서 각각 10.7%, 12.1%, 50  $\mu$ M에서는 각각 37.3%, 37.6%, 100  $\mu$ M에서는 39.0%, 69.5% 농도 의존적으로 감소하였다. 이상의 결과를 종합해 보면, 본 연구의 혼합림파구반응에 대한 작용과 마찬가지로 *in vitro*에서 저농도의 BPA는 T-cell mitogen에 대한 비장세포의 증식능을 증가시키고 고농도에서는 감소시키는 작용을

Table I - Effects of BPA on the mitogen-induced splenocytes proliferation

Exp. groups (μM)	Mitogens		
	Con A	PHA+IL-2	PMA+INO
Control	0.537±0.179	0.177±0.044	0.282±0.01
BPA 1	0.563±0.192 (+4.8%)	0.186±0.056 (+5.1%)	0.314±0.045 (+11.3%)
BPA 10	0.512±0.181 (-4.7%)	0.188±0.070 (+6.2%)	0.361±0.060 (+28.0%)
BPA 25	0.406±0.166 (-24.4%)	0.158±0.045 (-10.7%)	0.248±0.056 (-12.1%)
BPA 50	0.295±0.095* (-45.1%)	0.111±0.019* (-37.3%)	0.176±0.021 (-37.6%)
BPA 100	0.148±0.023** (-72.4%)	0.108±0.036** (-39.0%)	0.086±0.036* (-69.5%)

Splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells/well) were cultured with mitogens, Con A ( $2 \mu\text{g/ml}$ ), PHA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) and IL-2 ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ), or PMA ( $5 \text{ ng/ml}$ ) and INO ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of BPA for 72 hrs. Splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. Results are expressed as the means  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments and all experiments were done in triplicate. Significant difference from control group (\* $P < 0.05$ ).

나타내었다. Jontell 등<sup>19)</sup>과 Yamashita 등<sup>20)</sup>도 저농도의 BPA에 의해 Con A에 대한 비장세포 증식능이 증가된다고 보고하였다. 그러므로 BPA의 세포성 면역반응에 미치는 영향은 농도에 따라 억제 또는 증가시키는 것으로 나타나 그 기전에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

**IFN-γ 생성에 미치는 영향**

Balb/c 마우스의 비장세포인 responder cell( $1.5 \times 10^5$  cells)과 mitomycin C(MMC)로 처리한 성숙 수지상세포(DCs)인 stimulator cell(5,000 DCs)을 혼합하고 동시에 BPA의 최종농도 25, 50 또

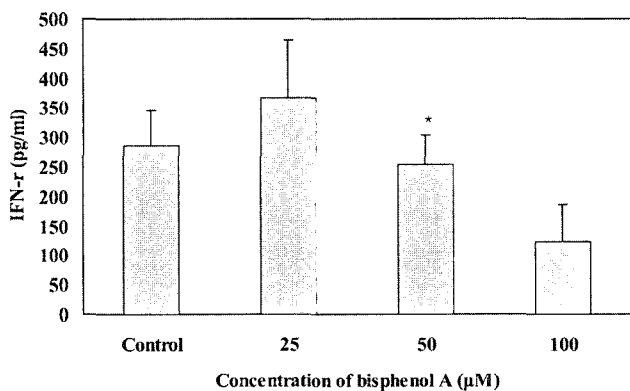


Fig. 2 - Effect of BPA on IFN-γ production in allogenic mixed lymphocyte reaction. Splenocytes of Balb/c ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were co-cultured with mitomycin C-treated DCs (5,000) for 96 hrs in the presence of BPA. IFN-γ levels in culture supernatants were determined by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments and all experiments were done in duplicate. Significant difference from control group (\* $p < 0.05$ ).

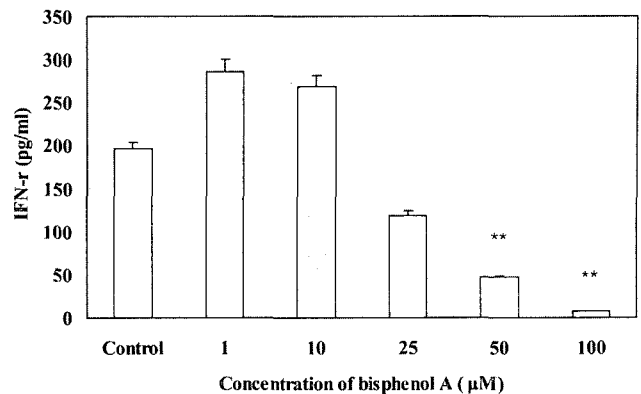


Fig. 3 - Effect of BPA on IFN-γ production from splenocytes stimulated with Con A. Splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells/well) were cultured with Con A ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of BPA for 72 hrs. IFN-γ levels in culture supernatants were determined by ELISA. Results are expressed as the means  $\pm$  S.D. of 3 independent experiments and all experiments were done in triplicate. Significant difference from control group (\*\* $P < 0.01$ ).

는  $100 \mu\text{M}$ 을 가하여 배양한 후 배양액 중의 IFN-γ를 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 IFN-γ의 생성에 미치는 BPA의 영향을 보면, BPA를 처리하지 않은 대조군과 비교해  $25 \mu\text{M}$  농도에서는 유의성은 없었으나 약 29% 정도 증가되었다. 그러나  $50 \mu\text{M}$ 과  $100 \mu\text{M}$  농도에서는 각각 11%와 44% 정도 감소되었다. 그러므로 본 연구의 혼합임파구반응에서와 비슷하게 *in vitro*에서 MMC로 처리된 성숙 수지상세포의 자극으로 생성된 IFN-γ가 BPA의 저농도 노출에서 증가하고 고농도에서는 감소하는 결과를 나타내었다.

또한, *in vitro*에서 마우스 비장세포에 BPA를 1, 10, 25, 50,  $100 \mu\text{M}$ 이 되도록 처리하고 Con A를 가하여 2일간 배양한 배양액 중의 IFN-γ를 sandwich ELISA법으로 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. BPA와 함께 Con A를 처리한 경우에 저농도인 1,  $10 \mu\text{M}$ 에서 대조군에 비해 각각 45.5%, 36.7%가 증가하였고 25, 50,  $100 \mu\text{M}$ 에서는 대조군에 비해 각각 40.1%, 75.7%, 96.3%가 감소하여, 농도에 차이는 있으나 혼합임파구반응의 배양액 중의 IFN-γ 생성에 대한 작용과 비슷하게 저농도의 BPA에서는 IFN-γ 생성능이 증가하고 고농도에서는 감소하는 결과를 보였다.

마우스의 비장세포에 1 nM 농도의 estrogen을 Con A와 함께 처리하면 IFN-γ promotor 에 영향을 주어 IFN-γ mRNA가 증가된다고 보고된 바 있고 BPA가 estrogenic effect를 나타내므로 estrogen과 같이 저농도의 BPA가 IFN-γ promotor 에 영향을 주어 IFN-γ mRNA를 증가시켜 IFN-γ의 생성이 증가될 가능성이 있다. Yoshino 등<sup>21)</sup>은 저농도의 BPA 투여로 Th2 반응의 지표인 IL-4의 생성이 다소 증가되고, Th1 반응의 지표인 IFN-γ 생성이 증가된다고 보고하였으며, Yamashita 등<sup>20)</sup>도 *in vitro*에서 비장세포에 Con A를 가했을 때 IL-4 생성이 증가된다고 보고하여

BPA의 농도에 따라 T세포 매개반응인 세포성 면역반응이 증폭되거나 억제되는 것으로 보인다.

## 결 론

*In vitro*에서 고농도의 BPA 노출에 의해 mitomycin C 처리한 성숙 수지상세포와 비장세포의 혼합임파구반응, T cell mitogen에 대한 비장세포의 증식능이 억제되었으나 저농도에서는 증가되었다. 또한 혼합임파구반응 및 비장세포 증식능 실험 배양액 중의 IFN- $\gamma$  생성도 이와 비슷하게 저농도의 BPA에서는 IFN- $\gamma$  생성이 증가하고 고농도에서는 감소하는 결과를 나타내었다. 그러므로 BPA는 *in vitro*에서 농도에 따라 세포성 면역반응을 억제 또는 증가시키는 것으로 보여 그 기전에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

## 참고문헌

- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D. : Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endo.* **132**, 2279 (1993).
- Mountfort, K. A., Kelly, J., Jickells, S. M. and Castle, L. : Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. *Food Addit Contam.* **14**, 737 (1997).
- Goodson, A., Summerfield, W. and Cooper, I. : Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit Contam.* **19**, 796 (2002).
- Sakurai, H., Maeda, M., Miyahara, K., Nakayama, M., Murayama, H., Hasegawa, H., Hayakawa, M., Sugiura, T. and Kamikura, K. : Extraction of bisphenol-A from a cardiopulmonary bypass circuit. *Kyobu Geka* **55**, 770 (2002).
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedreaza, V., Soto, A. M. and Sonnenschein, C. : Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives* **104**, 298 (1996).
- Kang, J. and Kondo, F. : Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Res. Vet. Sci.* **73**, 177 (2002).
- Chen, M. Y., Ike, M. and Fujita, M. : Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ. Toxicol.* **17**, 80 (2002).
- Papaconstantinou, A. D., Umbreit, T. H., Fisher, B. R., Goering, P. L., Lappas, N. T. and Brown, K. M. : Bisphenol A-induced increase in uterine weight and alteration in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor. *Toxicol Sci.* **56**, 332 (2000).
- Hiliard, C. A., Armstrong, M. J., Bradt, C. I., Hill, R. B., Greenwood, S. K. and Galloway, S. M. : Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **31**, 316 (1998).
- Morrissey, R. E., George, J. D., Price, C. J., Tyl, R. W., Marr, M. C. and Kimmel, C. A. : The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **8**, 571 (1987).
- Dechaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., Aude Brac de la perriere and Pugeat, M. : Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* **64**, 328 (1999).
- Farabolini, F., Porrini, S., Seta, D. D., Bianchi, F. and Dessi-Fulgheri, F. : Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environmental Health Perspectives* **110**, 409 (2002).
- Pyo, M. Y. and Byun, J. A. : Effects of acute oral administration of bisphenol A on the immune function in mice. *Yakhak Hoeji* **45**, 55 (2001).
- Lutz, M. B., Kukutsh, N., Ogilvie, A. L. J., Roeßner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. : An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Meth.* **223**, 77 (1999).
- Bach, F. H. and Voynow, N. K. : One-way stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science* **153**, 545 (1966).
- Dolye, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G. and Cell & Tissue Culture ; Laboratory procedures, John Wiley & Sons Ltd., U.K. (1993).
- Roh, J. K., Chung, H. C., Koh, E. H., Lee, W. Y., Hahn, J. S. and Kim, B. S. : *In vitro* cytotoxicity of various anticancer drugs to short-term cultured gastric adenocarcinoma cell lines. *J. of Korean Cancer Association* **23**, 3 (1991).
- Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. : Immunology, Gower Medical Publishing. London · New York (1985).
- Jontell, M., Hanks, C. T., Bratel, J. and Bergenholtz, G. : Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J. Dent. Res.* **74**, 1162 (1995).
- Yamashita, U., Sugiura, T. and Kuroda, E. : Effect of endocrine disruptors on immune responses *in vitro*. *J. UOEH* **24**, 1 (2002).
- Yoshino, S., Ohsawa, M., Sakabe, K., Sagai, M. and Mori, Y. : Influence of bisphenol A on the immune system XXVth symposium on toxicology and environmental health 3rd forum on pharmaceutical health science. P-71, 102 (1999).