

DTU Fødevareinstituttet



Fødevarestyrelsen

22. marts 2010
ulha

DTU Fødevareinstituttets vurdering af industriens nye developmental neurotoxicity studie (DNT, OECD TG 426) med bisphenol A og studiets betydning for Fødevareinstituttets vurdering af bisphenol A's eventuelle skadelige effekter på udvikling af nervesystem og adfærd

Baggrund

Fødevarestyrelsen har anmodet DTU Fødevareinstituttet om at vurdere, om industriens nye developmental neurotoxicity studie i rotter (DNT, OECD TG 426) med bisphenol A kan dokumentere, at bisphenol A i lave doser har skadelig effekt på udvikling af nervesystem eller adfærd. Betydningen af de nye data for DTU Fødevareinstituttets tidligere vurdering af bisphenol A's eventuelle skadelige effekter på udvikling af nervesystem og adfærd vurderes også. Dette følger anvisningerne i OECD TG 426, hvor der under evaluering af data (paragraf 48) står: *"Data from all studies relevant to the evaluation of developmental neurotoxicity, including human studies, case reports, and experimental animal studies (e.g., toxicokinetic data, structure-activity information, data from other toxicity studies) should be included in this characterization."*

DTU Fødevareinstituttets vurdering af bisphenol A (BPA) før dette nye studie var:

"DTU Fødevareinstituttet har vurderet de tilgængelige studier, hvor BPA er rapporteret at kunne påvirke udviklingen af nervesystemet hos gnavere efter lavdosiseksponering. DTU Fødevareinstituttet mener ikke, at de har en tilstrækkelig styrke, som kan begrunde ændring af den NOAEL, som danner grundlag for EFSA's TDI på 50 mikrogram/kg."

DTU Fødevareinstituttet påpeger dog, at man finder det formålstjenligt, at der bliver foretaget veltilrettelagte og veludførte undersøgelser på gnavere til afklaring af de udestående spørgsmål mht. evt. effekter på udviklingen af nervesystemet i lavdosisområdet samt afklaring af deres relevans for mennesker."

Det nye developmental neurotoxicity studie følger anbefalingerne fra VKM (2008) om at udføre et GLP studie efter OECD guideline 426 for at adressere usikkerheden mht. potentielle lavdosis-effekter af BPA, der er rejst på baggrund af fire developmental neurotoxicity studier

(Adriani *et al.*, 2003; Carr *et al.*, 2003; Negishi *et al.*, 2004; Ryan and Vandenberg, 2006). De samme fire studier var allerede af nogle medlemslande foreslået som relevante i EU risikovurderingen af BPA (EU, 2008). Overordnet set tyder disse studier på, at lave doser af BPA kan påvirke angst-relateret adfærd hos hunafkom, men ikke hanafkom (Adriani *et al.*, 2003, Ryan and Vandenberg, 2006) og forårsage nedsat impulsivitet/øget indlæring eller nedsat indlæring hos hanafkom (Adriani *et al.*, 2003 and Negishi *et al.*, 2004). Studiet udført af Carr *et al.* (2003) viste en effekt på rotteunger doseret direkte med 250 µg/kg bw BPA i adfærdstestning af indlæring og hukommelse.

Der er nyere developmental neurotoxicity studier med lavdosiseksponering med BPA som DTU Fødevareinstituttet har vurderet, og som derfor medtages i denne vurdering nemlig Gioiosa *et al.* (2007), Ryan *et al.* (2009) og Braun *et al.* (2009).

Gioiosa *et al.* (2007) beskriver resultater fra oral BPA dosering af drægtige CD-1 mus.. Der blev rapporteret effekter af bisphenol A på især de normalt sete adfærdsforskelle mellem hanner og hunners udforskning af nye områder. Disse resultater tyder på, at der har været effekter på kønsdifferentieringen af hjernen hos fostre eller nyfødte. Forsøget inkluderer et tilstrækkeligt antal dyr per kuld, der er taget højde for kuldeffekt i den statistiske analyse, og der er anvendt en relevant doseringsvej og relevante adfærdsmetoder. Forsøget er dog begrænset af, at der kun er anvendt et dosisniveau (10 µg/kg), dvs. at der ikke er mulighed for at vurdere dosis-respons forhold i forsøget.

Ryan *et al.* (2009) beskriver resultaterne af to forsøg, hvor grupper af drægtige Long Evans rotter er blevet sondedoseret med ethinyl østradiol eller BPA i lave doser. Der blev ikke fundet effekter af BPA, mens doseringen med EE2 førte til effekter på reproduktionsorganer og adfærd. Der blev dog kun undersøgt hununger i studiet og for en del af adfærdundersøgelserne var gruppestørrelsen så lille og følsomheden dermed så lav, at det vurderes, at fraværet af effekter på hunungers adfærd i disse studier ikke kan anvendes til at konkludere, at BPA ikke har nogen effekt på udviklingen af nervesystem og adfærd.

Braun *et al.* (2009) beskriver et epidemiologisk studie af sammenhængen mellem BPA koncentration i urin hos moderen under graviditeten og adfærden hos hendes børn. Der blev fundet en korrelation mellem især pigebørn, der havde udadvendt og aggressiv adfærd, og den mængde BPA, mødrene havde været udsat for under deres graviditet. Studiet er den første undersøgelse, som antyder, at udsættelsen for BPA i fostertilstanden kan påvirke adfærden hos mennesker. Undersøgelsen beviser dog ikke en årsags-sammenhæng, men viser blot en korrelation, og der er derfor brug for yderligere epidemiologiske studier på dette område for at afklare om udsættelse for BPA, mens hjernen udvikles, kan forårsage adfærdændringer hos børn.

Industriens nye developmental neurotoxicity studie i rotter - tilrettelæggelse af studiet

Studiet blev udført i henhold til OECD test guideline 426 Developmental neurotoxicity study og i overensstemmelse med GLP. Studiet er derfor som sådan et veldokumenteret standardstudie.

Der er anvendt et udvidet antal doser, der også inkluderer lavdosiseksponering. Der var fem dosisgrupper og en kontrolgruppe med 23-24 drægtige dyr per gruppe. BPA blev givet via foderet i koncentrationer på 0 (kontrol), 0,15; 1,5; 75; 750 og 2250 mg/kg foder (dvs. ppm i foderet) til grupper af 24 parrede hunrotter (CrI:CD, Sprague Dawley) fra gestationsdag 0 til ungedag 21. Indtaget af BPA blev estimeret til henholdsvis 0; 0,01; 0,12; 5,85; 56,4 og 164 mg/kg bw/dag i drægtighedsperioden og 0; 0,03; 0,25; 13,1; 129 og 410 mg/kg bw/dag i laktationsperioden (dieperioden). Mødrene blev undersøgt for generelle tegn på toksicitet, og ungerne blev undersøgt for generel toksicitet og effekter på nervesystemets udvikling og funktion. Dette inkluderede både adfærd og histologi af hjernen.

Doseringsvejen via foderet er relevant, fordi mennesker primært bliver udsat for BPA fra fødevarer eller drikkevarer. Valget af doser spænder fra lave doser til højere doser, der forårsager mindre generelle toksiske effekter hos mødrene. Koncentration af BPA i foderet og dyrenes foderindtagelse blev målt gennem hele studiet. For disse punkter opfylder studiet det anbefalede i OECD TG 426.

Planteøstrogener i foderet (sum of aglycon enheder af daidzin, daidzein, genistin, genistein, glycitin, glycitein og coumestrol) blev målt til 0,03% (300 µg/g). Det er et relativt lavt niveau, som ikke forventes at have påvirket forsøgets resultater væsentligt.

Der er ikke udført målinger af interne BPA niveauer i studiet. Dette er ikke i modstrid med OECD TG 426, men begrænser studiets anvendelighed til risikovurdering af BPA.

Studiet er tilrettelagt som et ”standard” forsøg udført efter OECD TG 426, dvs. det er ikke designet med udgangspunkt i de observationer af skadelige effekter af BPA på udvikling af nervesystem eller adfærd, der er fundet i de tidligere begrænsede forsøg. Dette er en meget væsentlig svaghed ved studiet, der begrænser dets anvendelighed til risikovurdering af BPA. Derfor lever studiet ikke op til anbefalingerne for principperne for testningen i OECD TG 426, da der i paragraf 6 står: *“Additional available animals in each group could be used for specific neurobehavioral, neuropathological, neurochemical or electrophysiological procedures that may supplement the data obtained from the examinations recommended by this guideline (14)(15)(16)(17). The supplemental procedures can be particularly useful when empirical observation, anticipated effects, or mechanism/mode of action indicates a specific type of neurotoxicity.”*

Industriens nye developmental neurotoxicity studie i rotter - studiets resultater

Mødre generation (Fo)

Der sås nedsat foderindtagelse i de første tre dage af drægtigheden i de to højeste dosisgrupper samt nedsat vægtforøgelse i den første uge af drægtigheden i de samme to grupper. Et af de drægtige dyr fra den højest doserede gruppe, dvs. 2250 ppm, døde i forbindelse med fødsel. Der var ingen fund, der kunne forklare, hvorfor dyret døde. Da det kun sås hos et dyr kan det være et tilfældigt fund, men det kan også afspejle, at højere doser af BPA end de anvendte evt. kan påvirke evnen til at føde.

Der var ingen effekter på drægtighedslængden, antal unger per kuld eller kønsfordeling i kuldene.

Ungernes overlevelse, vækst og generel udvikling

Ungerne i de to højeste dosisgrupper tog mindre på fra ungedag 7-14 og vejede mindre ved fravæning efter 3 uger. Den generelle udvikling af ungerne bedømt ud fra oprette-refleks (surface righting response) i den første uge efter fødslen og tidspunkt for kønsmodning var heller ikke påvirket.

Kliniske observationer af ungerne

Der sås ingen statistisk signifikante BPA relaterede effekter ved de kliniske observationer af ungerne på ungedag 4, 11, 21, 35, 45, and 60. Rykvise bevægelser af lemmer, hoved eller krop og/eller rykvise spring med alle fire lemmer i luften (registreret som krampetrækninger og kaldet ”popcorn anfald”) blev observeret hos to unger i 750 ppm gruppen og fire unger i 2250 ppm gruppen på ungedag 11 alene. I et follow-up studie (0 og 2250 ppm, med 15 og 30 kuld) sås dette ikke, og det er ikke rapporteret i nogen af de andre studier, der er med i EURLAR (2003, 2008). Der er derfor nogen tvivl om relevansen af dette fund, men det kan ikke helt forkastes, da resultaterne udviser dosis-respons sammenhæng. NOAEL for dette fund er 5,85 mg/kg/dag og dermed af samme størrelse som det NOAEL for BPA (5 mg/kg bw/dag), der er anvendt af EFSA som udgangspunkt for fastsættelse af den nuværende TDI.

Motorisk aktivitet hos ungerne

Motorisk aktivitet blev målt med fotoceller på ungedag 13, 17, 21 og 61 og var ikke påvirket af BPA.

Motorisk aktivitet er normalt forskelligt hos hanner og hunner efter kønsmodning, idet hunner har højere aktivitetsniveau end hanner. Dette ser også ud til at være tilfældet i kontrolgrupperne i de to forsøg med modelstoffer, som laboratoriet har udført for at vise, at testningen kan påvise effekt på aktiviteten. Resultaterne er kun vist som gennemsnit og spredning i figurer, men baseret på aflæsning af figurerne er aktivitetsniveauet hos kontrolhunnerne omkring 33% og 55% højere end hos kontrolhannerne (tabel 1). Forskellen er ikke testet statistisk i rapporten, men baseret på spredningerne i de fundne data er forskellen mellem kønnene sandsynligvis statistisk signifikante i begge forsøg. Dette tyder på at, testningen i disse modelforsøg lever op til det forventede, og at modellen derfor er velegnet til at undersøge påvirkninger, der ændrer de normale adfærdsforskelle mellem hanner og hunner.

Resultaterne i kontrolgruppen i BPA forsøget viser en væsentlig lavere forskel mellem hanner og hunner, dvs. kun 8% højere aktivitet hos kontrolhunnerne sammenlignet med kontrolhannerne (tabel 1). Denne forskel er ikke testet statistisk i kontroldyrene i rapporten. Da spredningen i aktivitet er relativt høj i kontroldyrene, dvs. 26% for hunner og 18% hos hanner, og dermed væsentlig højere end forskellen mellem hanner og hunner på 8% vurderes det, at der sandsynligvis ikke vil være statistisk signifikant forskel mellem kønnene i kontrolgruppen i BPA forsøget. Den foretagne testning af BPA er derfor ikke velegnet til at vurdere om BPA kan forårsage effekter, der ændrer på de normalt sete adfærdsforskelle mellem hanner og hunner.

De to undersøgelser med modelstoffer rapporterer data for både total aktivitet og bevægelsesaktivitet, som er to forskellige typer aktivitet. Total aktivitet dækker både større og mindre bevægelser, mens bevægelsesaktivitet kun omfatter de større bevægelser, dvs. dyrene har flyttet sig fra en fotocelle til en anden. Data i BPA studiet omfatter kun total aktivitet, og desværre ikke bevægelsesaktivitet. Der er i rapporten ikke givet en forklaring på, hvorfor bevægelsesaktiviteten ikke er undersøgt.

Tabel 1. Motorisk aktivitet. Kønsforskkel hos kontroldyr

Studie	Total aktivitet, 60 min			Forsk. ift. hanners aktivitet
	Hanner	Hunner	Forsk. (%)	
BPA forsøg	5342	5773	431 (8%)	8%
Modelstof 1	1800	2400	600 (33%)	33%
Modelstof 2	2500	3800	1300 (52%)	52%

Auditory Startle Test af afkommet

Auditory startle response blev undersøgt på ungedag 20 og 60 og var ikke påvirket af BPA. Auditory startle response indebærer udsættelse for pludselige, kortvarige og høje lyde, der medfører en forskrækkelsesreaktion (et spjæt) i dyret.

Kontroldata i BPA studiet, de historiske kontroldata i rapporten og data i publicerede artikler viser generelt ikke kønsforskelle i Auditory startle response. Dette effektmål er derfor ikke velegnet til at vurdere om BPA kan forårsage effekter, der ændrer på de normalt sete adfærdsforskelle mellem hanner og hunner.

Indlæring og hukommelse i Biel svømme labyrint

Biel svømme labyrint er en adfærdstest, der undersøger rumlig indlæringsevne. Dyrene placeres i starten af labyrinten, og dyrets opgave er at finde vej gennem labyrinten med en række valg mellem at dreje til højre eller venstre og dermed finde frem til en platform ved afslutning af labyrinten.

Undersøgelserne af indlæring og hukommelse blev startet på ungedag 22 og 62. Der blev testet 1 afkom/køn/kuld. Der blev således ikke anvendt samme afkom i de to perioder, fordi der ikke kan testes for indlæring i en test, dyrene tidligere har lært at udføre.

Effektmålet for indlæring og hukommelse var antal fejl i labyrinten. Der blev i begge perioder udført 4 forløb henover 7 dage, dvs.

- dag 1: test af svømmeevne og motivation
- dag 2-3: Test A med 2 ture i labyrinten per dag, i alt 4 ture (tur 1-4)
- dag 4-6: Test B med 2 ture per dag i modsat retning gennem labyrinten, i alt 6 ture (tur 5-10)
- dag 7: Test C med 2 ture i samme retning som i Test A.

Der blev ikke fundet forskelle på svømmeevnen mellem grupperne.

På ungedag 22 var antallet af fejl signifikant lavere hos hunungerne i 0,15 og 2250 ppm grupperne end i kontrolgruppen for Test B (tur 5-10). Antal fejl hos kontrolhunnerne var dog højere end den historiske kontrol, mens antal fejl i BPA grupperne var på niveau med den historiske kontrol. Som følge af dette vurderes det, at de signifikante resultater i 0,15 og 2250 ppm (mg/kg) grupperne sandsynligvis er tilfældige fund.

På ungedag 62 var antallet af fejl hos hannerne i 0,15 ppm gruppen signifikant højere end hos hannerne i kontrolgruppen for Test A (tur 1-4), se figur 1A. Antal fejl i kontrolgruppen var dog lavere i tur 3 og 4 end historisk kontrol, og dette kan have bidraget til den signifikante effekt (se figur 1B), men antal fejl hos 0,15 ppm hannerne synes også at være højere end historisk kontrol. Derudover er indlæringskurven, dvs. antallet af fejl henover de 4 ture, ændret hos 0,15 ppm hannerne på en måde, der peger på en forringet indlæringssevne hos disse hanner. Hvis denne effekt var blevet set i den højeste BPA gruppe ville den blive vurderet som tegn på, at BPA kan påvirke indlæringssevnen. Effekten er imidlertid set ved den laveste BPA dosis og ikke hos dyrene udsat for højere doser af BPA, dvs. der er ikke et "normalt" dosis-respons forløb. Der er på nuværende tidspunkt rejst tvivl mht. om alle kemiske stoffers effekter nødvendigvis vil udvise et "normalt" dosis-respons forløb. For visse hormonforstyrrende påvirkninger er det f.eks. vist at lave doser kan fremkalde én slags effekter, mens højere doser har andre effekter. Mekanismen bag BPAs eventuelle effekter på hjernens udvikling kendes ikke, og det er derfor vanskeligt at have klare forventninger mht. dosis-responsforløb. Det vurderes derfor, at fundet af forringet indlæringssevne hos 0,15 ppm (10-30 µg/kg bw/dag) hannerne kan være tegn på en lavdosis effekt af BPA, men det kan også være et tilfældigt fund.

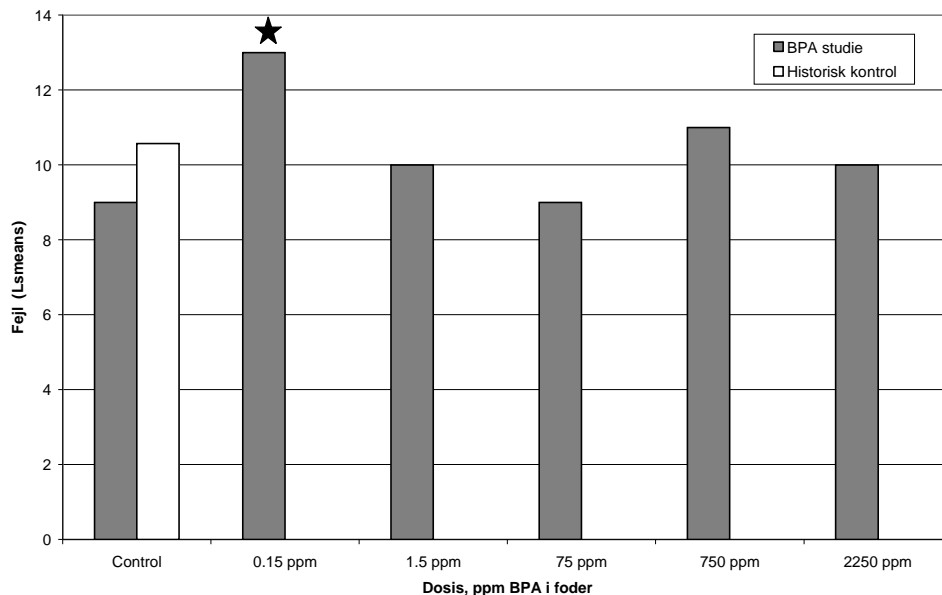
Der blev ikke fundet signifikante ændringer af hannernes adfærd i Test B (tur 5-10) eller C. Antal fejl hos 1,5 ppm BPA hanner og hunner var samlet set højere i tur 7, men ikke forskellig fra kontrolværdier i de 2 ture før tur 7 eller de 3 ture efter tur 7 i Test B, dvs. hhv. tur 5-6 og 8-10. Dette isolerede fund midt i et nyt indlæringsforløb vurderes som tilfældigt.

Neuropatologi

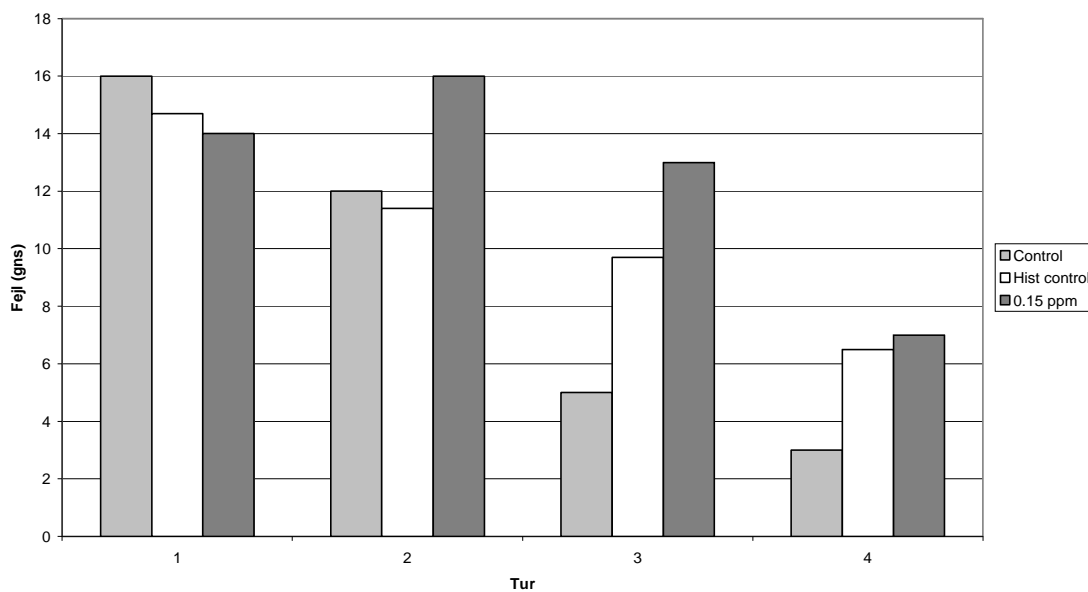
Neuropatologi blev undersøgt på ungedag 21 og 72, hvor hjernen fra én han og én hun per kuld blev undersøgt makroskopisk, og hjernen fra 10 unger per køn per hold blev undersøgt med kvalitativ histopatologi og morfometriske målinger.

Der sås ingen signifikante effekter af BPA eksponeringen.

Antal fejl hos hanafkom i adfærdstest for indlæring og hukommelse (Biel labyrinth), Test A



Antal fejl hos hanafkom i adfærdstest for indlæring og hukommelse (Biel labyrinth), Test A



Figur 1. Antal fejl hos voksent hanafkom i adfærdstest for indlæring og hukommelse (Biel labyrinth).
 Fig. 1A (øverst): Det gennemsnitlige antal fejl for de 4 ture i Test A i kontrolgruppe, historisk kontrol og de fem grupper doseret med BPA. * $p < 0,05$ ($p = 0,037$).
 Fig. 1B (nederst): Det gennemsnitlige antal fejl i hver af de 4 ture i Test A i kontrolgruppe, historisk kontrol og gruppen doseret med 0,15 ppm BPA i foderet (10-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/dag).

Samlet vurdering og konklusion

Studiet svarer til anbefalingerne i OECD test guideline 426. Studiets styrker er doseringsvejen via foderet, anvendelsen af fem doser fra meget lave til højere doser og et tilstrækkeligt antal kuld per gruppe (n=23-24). Studiets svagheder er, at der ikke er målinger af interne BPA niveauer, at de udførte adfærdstest ikke er velegnede til at vurdere om BPA kan forårsage effekter, der ændrer på de normalt sete adfærdsforskelle mellem hanner og hunner, og at der generelt synes at være ret stor variation i adfærdsdata.

Studiet giver ikke klare beviser for, at BPA har skadelige effekter på de typer adfærd, der er undersøgt i studiet, men giver anledning til en vis usikkerhed mht. effekter på indlæringsevnen, fordi der er fundet forringet indlæringsevne hos hanungerne ved lav dosering med BPA. Hvis denne effekt var blevet set i den højeste BPA gruppe, ville vurderingen være, at BPA kan påvirke indlæringsevnen. Effekten er imidlertid set ved den laveste BPA dosis og ikke hos dyrene udsat for højere doser af BPA, dvs. der er ikke en "normal" dosis-respons sammenhæng. Der er på nuværende tidspunkt rejst tvivl mht., om alle kemiske stoffers effekter nødvendigvis vil udvise et "normalt" dosis-respons forløb. For visse hormonforstyrrende påvirkninger er det f.eks. vist, at lave doser kan føre til én slags effekt, mens højere doser har andre effekter. Mekanismen bag BPAs eventuelle effekter på hjernens udvikling kendes ikke, og det er derfor vanskeligt at have klare forventninger mht. dosis-responsforløb. Det vurderes derfor, at fundet af forringet indlæringsevne hos hanungerne kan være tegn på en lavdosis-effekt af BPA, men det kan også være et tilfældigt fund. Studiets resultater kan således ikke anvendes til at fastlægge et robust NOAEL for effekter på hjernens udvikling og på adfærd.

En meget væsentlig svaghed ved studiet er, at det ikke er tilrettelagt med udgangspunkt i de observationer af skadelige effekter af BPA i lave doser på udvikling af nervesystem eller adfærd, der er fundet i tidligere begrænsede forsøg, såsom effekter på visse aspekter af indlæring og hukommelse (avoidance learning, schedule-controlled behaviour and impulsiveness), angst-relateret adfærd og kønsspecifik adfærd. Som følge af dette kan studiet ikke afklare usikkerheden mht. sådanne effekter på udviklingen af nervesystemet.

Alt i alt, er det DTU Fødevareinstituttets vurdering, at studiet ikke afklarer eller ændrer på usikkerheden ved BPA's effekter på udviklingen af nervesystemet eller adfærden hos gnavere ved lav dosering med BPA.

Referencer

Adriani, W., Seta, D. D., Dessi-Fulgheri, F., Farabollini, F., and Laviola, G. (2003). Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 111, 395-401.

Braun J.M., Yolton K, Dietrich K.N., Hornung R., Xiaoyun Ye, Calafat A.M., Lanphear B.P.(2009), Prenatal Bisphenol A Exposure and Early Childhood Behavior. *Environmental Health Perspectives*, Online 6 Oktober 2009 (EPub).

Carr, R.L., Bertasi, F.R., Betancourt, A.M., Bowers, S.D., Gandy, B.S., Ryan, P.L., and Willard, S.T. (2003) Effect of neonatal rat bisphenol A exposure on performance in the Morris water maze. *J Tox Environ Health Part A*. 66, 2077-2088.

EU-RAR (2008). Updated risk assessment of 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol-A)
Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P (2007). Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm Behav*. 2007 Sep;52(3):307-16. Epub 2007 May 22.

Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y., and Yoshikawa, Y. (2004). Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 112, 1159-64.

OECD (2007) OECD Test Guideline 426 Developmental neurotoxicity study.

Ryan, B.C., and Vandenberg, J.G. (2006). Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Hormones and Behav*. 50, 85-93.

Ryan B.C., Hotchkiss A.K., Crofton K.M., Gray L.E. (2009). In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility and anatomy of Female LE Rats. *Tox Sci Advanced*, October 28, 2009 (epub).