

を元に検討する。殊に欧米各国があいついでビスフェノールAによる生殖・発生毒性の再評価を進めていることから、これらも参考にして最近の研究報告を独自に精査し、低用量影響の可能性を検討する。

B. 研究方法

- (1) CERHR専門家グループによるビスフェノールAの生殖・発生毒性レビューの2007年中間報告を入手し、試験計画、条件、データの統計処理などの観点から試験の適切さを評価した部分を調査した。
- (2) 関澤は2004年以降に出版されたビスフェノールAの試験報告について、低用量影響を報告していると考えられた報告を抽出し、CERHR専門家グループによる試験報告の適切さ判定を参照して信頼性の高い低用量試験報告の選別を行なった。
- (3) 2007年11月までに新たに公表されたビスフェノールAの哺乳類への影響報告をMEDLINEを用いて調査し低用量影響に関わる報告を入手し詳細について検討した。ついで、(4)2007年12月1日以降2008年11月23日までに新たに公表されたビスフェノールAの影響報告をPubMedで

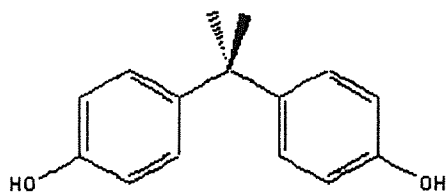


図1 ビスフェノールAの化学構造

CAS番号(80-05-7)を用い英語または日本語で公表された文献に限定して検索した。ヒット文献の原報を収集し内容を検討し

た。また、(5)欧米各国によるビスフェノールA曝露による生殖・発生毒性の再評価の内容を検討した。(6)検討結果を整理してレビュー論文にまとめた。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

- (1) 高次生命系における核内受容体作動性化学物質であるビスフェノールAについては、従来指摘されたエストロゲン受容体経路だけでなくSXR経路他のメカニズムも指摘されている。ビスフェノールAの低用量影響の可能性は数年前より注目され、多くの研究がなされてきた。米国のNational Toxicology Program/米国保健省のCERHRは2000年の専門家グループによる低用量影響レビュー(NTP, 2000)に引き続き2006年から2007年にかけて生殖・発生毒性の検討を行い中間報告を公表した(CERHR, 2007)。
- (2) CERHR専門家グループがビスフェノールAの生殖・発生毒性評価の観点から、適切と判断した試験報告は42報であった(表1)。
- (3) 他方関澤はビスフェノールAについて2004年以降に出版された試験報告を詳細に検討し、筆者が低用量影響を報告していた報告を抽出し影響の種別に表2にまとめ、さらに用量の低い順に結果を整理した。この際に従来指摘されてきた生殖・発生毒性のみに限らず、免疫影響、神経行動影響試験の報告についても検討した。
- (4) 関澤が検討し影響濃度の低い順に整理した試験報告17報のうちCERHRが生

殖・発生毒性評価の観点から適切と判断した試験報告は7報あった。CERHRの判断においては、標準的な試験法が整備されていないという理由から神経行動毒性の報告の適切さは判断されなかった。しかしビスフェノールAの核内受容体作動性の高次系影響については、新たなメカニズムの可能性が指摘されており、より詳細な検討をさらに進める必要があると考えられる。

(5) 次に、2007年12月1日以降2008年11月23日までに新たに公表されたビスフェノールAの影響報告をPubMedでCAS番号(80-05-7)を用い英語及び日本語で公表された文献に限定し検索し156件を得た。ビスフェノールAに関しそれまで英語及び日本語で公表されたPubMed収載文献総数は1213件、うち1112件は2000年1月1日以降の報告で、ほとんどがこの数年間の研究成果であり最近の関心の高さを反映している。

(6) 原報中から低用量(従来のリスク評価で無毒性量とされた5mg/kg/日以下)で影響が見られたとする報告を用量の低いものから順に表1に示した。観察された影響の種別、動物種と系統、投与量と1群の動物数、投与経路と期間、影響の要約、最小影響量、注意点、統計解析法、引用文献を記載した。図2には、低用量影響データを動物種と影響の種別に、影響の観察された最小濃度を要約して示した。

試験の条件、観察内容、統計解析に問題が指摘される場合もあるが、①少なくとも20報(うち19報では最小影響量は200 μ g/kg/日以下、10報では10 μ g/kg/日以下で最も低い影響量は0.2 μ g/kg/日)が

従来よりはるかに低用量での影響の報告であった。②そのうち18報は周産期または胎児期曝露によるもので、主な影響は神経行動毒性影響及び性分化の異常ないしは生殖器における形態学的な影響であった。

(7) いくつかの研究機関や国際機関がビスフェノールAのリスク評価を公表している。年次順にNTP(2001)、SCF(2002)、US EPA(2002)、環境省(2004)、NEDO/産総研(2005)、EFSA(2006)、CERHR(2007)、Canada(2008)、NTP(2008a,b)などであり、またOECDは新たに生殖発生毒性及び神経毒性試験法を見直し、あるいは整備した(OECD 1983, 1997, 2001a,b, 2007)。

(8) EFSA(2006)はSCF(2002)のTDI0.01mg/kg/日を再評価し、ラット3世代試験及びマウス2世代試験のNOAEL 5mg/kg/日に不確実性係数100を適用しTDI0.05mg/kg/日をげっ歯類と人の代謝能力の違いに関する知見(特にヒト乳児の抱合能力)などを基に導いた。

NTP(2008a,b)はCERHR(2007)のビスフェノールAの生殖発生毒性に関する包括的なレビューおよび外部コメントを参考にして、ヒトにおける影響発現性の蓋然性につき要約をまとめた。その結果『実験動物では発生毒性につき明確な証拠があり』『ヒトにおける生殖発生毒性の蓋然性については不十分ながら証拠がある』ことから『胎児、乳児及び幼児の脳、行動、前立腺の発達への影響にやや懸念あり』とまとめた。ただし動物で新生児や胎児の生存数と体重の減少、思春期の遅れの明確な証拠とされたデータはいずれも5mg/kg/日以上の高濃度曝露による。他方10 μ g/kg/日以下の『低濃度曝露で見られた神経行動影響、前立腺、乳

腺、尿管の発達、思春期の早期化などの影響についての証拠は『試験条件や再現性の問題から『限定的』とされた。

カナダ政府はポリカーボネート製哺乳瓶の輸入、販売、広告を禁止した。

(9) いくつかの機関による人の曝露濃度の推定結果を表2に要約して示す。

EFSA (2006)は安全側(離乳食中の最高濃度など)に見積もった曝露評価から、3~6ヶ月の乳児は最高13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (平均4~8.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)摂取する可能性があり、成人は平均1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 程度の摂取量になるので、TDIの0.05 $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ に対し摂取は多くても30%以下であるとした。

NTP (2008a,b)は、乳児(0.2~1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)、幼児(1.65~13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$:6~12ヶ月;0.043~14.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$:1.5~6歳)、成人(0.008~1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)の摂取量を種々のデータを総合して推計した。

NEDO/産総研(2005)は尿中の排泄量データからの逆算及び食事での濃度を基に、幼児、子供、成人の摂取量をそれぞれ0.055~0.20, 1.2, 0.028~0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ と推計した。しかし低く推計されたデータの根拠になった研究(Miyamoto & Kotake 2006)では母乳中にビスフェノールAが存在しないとの仮定などの問題が指摘されている。

Schönfelder, G. (2002b)は妊婦の遊離ビスフェノールA血清及び子宮組織の濃度をGC/MSで測定し、2.3 (0.2~9.2)及び3.1 (0.3~18.9) $\mu\text{g}/\text{L}$ と報告している。この値は54~90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を志願者に経口投与した際、81分後に遊離ビスフェノールA血清濃度が2.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以下になったという報告(Völkelら, 2002)と比べると摂取量評価と血中濃度測定値の間に大きな矛盾が見ら

れることになる。

(10) レビュー作成後に入手した文献またはレビューに記さなかった内容のうちリスク評価に関連すると思われる文献の要約を以下にまとめる。

(A) CERHRによるレビューについて、Rhomberg & Goodman (2008)は、証拠の重みをより明確に検討すべきでありエンドポイント毎に用量-反応関係が明確かいくつかの試験において同様な結果が得られているかを的確に記述すべきとした。Willhite (2008)はCERHRが結論としてビスフェノールAの低用量曝露による妊婦や胎児へのリスクを要約する際に用いた形容詞句"Some concern", "minimal concern", "negligible concern"の定義が示されていない点を指摘し、行政や報道の理解に及ぼす影響を問題視した。

(B) Volkelら(2008)は、287人(5-52歳)からの尿474検体についてビスフェノールAの遊離および抱合体を分析(LOD 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ LOQ 1.25 $\mu\text{g}/\text{L}$)した。遊離体中央値はLOQ以下、95%値は0.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、最高値は2.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ であった。ビスフェノールAの総排泄量を欧州食品安全庁(EFSA)のTDI0.05 $\text{mg}/\text{kgbw}/\text{day}$ と比べると中央値で1667, 95%値で500のMargin of Exposureとなつたとしている。Langら(2008)は2003-2004年の米国National Health and Nutrition Examination Surveyによる18-74歳の1455人の尿中ビスフェノールA濃度と疾患リスクの関連を調べた。性、年齢ほかで調整した結果、尿中ビスフェノールA濃度が標準偏差分だけ高い場合に心血管系および糖尿病のオッズ比が1.39高まり、 γ -glutamyl-transferaseの異常値のオッズ比は1.29高ま

るとした。Padmanabhanら(2008)は5.9 (0.5 ~22.4) μ g/Lと報告している。

(C) Nadalら(2000)はビスフェノールAがin vitroで膵臓のホルモン分泌に関わると思われるnon classical membrane bound estrogen receptorを1 nMの濃度で活性化している。

(D) Leranthら(2008)は、卵巣を切除したアフリカミドリサルの背に装着したミニポンプで50 μ g/kg/dayのビスフェノールAおよび estradiol benzoate(EB) を投与した。海馬と皮質のSpine synapse数はEB 投与で対照の2倍程度に増加したがビスフェノールAとの併用でこの効果は消え、またビスフェノールAのみの投与では変化は認められなかった。

(11) レビュー作成ほかに引用した文献のリストを以下に示す。

参考文献

- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R. and Hardy, M.P. (2004): Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, **145**, 592-603.
- Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H. and Elbetieha, A.M. (2003): Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur. J. Oral. Sci.*, **110**, 163-167.
- Arakawa, C., Fujimaki, K., Yoshinaga, J., Imai H, Serizawa S and Shiraishi H.(2004): Daily urinary excretion of bisphenol A. *Environ. Health. Preventive. Med.*, **9**, 22-26.
- Canada (2008): Government of Canada Protects Families With Bisphenol A Regulations *October 17, 2008*, http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/challenge-defi/bisphenol-a_e.html
- CERHR (2007): NTP-CERHR Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A, Center for the Evaluation of Risks to Human Health Reproduction/National Toxicology Program, US Department of Health and Human Services NTP-CERHR-XXXX-00
- Chitra, K.C., Latchoumycandane C. and Mathur, P.P. (2003): Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats, *Toxicology* **185**, 119-127.
- Dekant, W. and Völkel, W. (2008): Human exposure to bisphenol A by biomonitoring : Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology* **228**, 114-134.
- Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A.M., Dessì-Fulgheri, F. and Farabollini, F. (2006): Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Hormones and Behavior* **50**, 301-307.
- Della Seta, D., Minder, I., Dessi-Fulgheri, F. and Farabollini, F. (2005): Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain*

- Res. Bull. **65**, 255-260.
- EFSA (2006): Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005-100, The EFSA Journal **428**, 1-75.
- Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kiguchi, M., Ikka, T., Harazono, A. (2001): Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol*; **15**: 505-523.
- Fujimoto, T., Kubo, K. and Aou, S. (2006): Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats. *Brain Res.*, **1068**, 49-55.
- Funabashi, T., Kawaguchi, M., Furuta, M., Fukushima, A. and Kimura, F. (2004): 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. *Psychoneuroendocrinology*, **29**, 475-485.
- Gupta, C. (2000): Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **224**, 61-68.
- Ho, S., Tang, W., de Frausto, J.B. and Prins, G.S. (2006): Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.*, **66**, 5624-5632.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. (1999): Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, **401**, 763-764.
- Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., Thomas, S., Thomas, B.F., Hassold, T.J. (2003): Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology*, **13**, 546-553.
- IPCS (1999): Concise International Chemical Assessment Document No. 14, Tributyltin oxide, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, ISSN 1020-6167.
- IPCS (2002): Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC /02. 2, pp. 180.
- 環境省 (2004): Initial Environmental Risk Assessment Report vol. 3: bisphenol A, Ministry of the Environment, September 2004, http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02_2_15.pdf
- Kersting, M., Alexy, U., Sichert-Hellert, W., Manz, F. and Schoch, G. (1998): Measured consumption of commercial infant food products in German infants : results from the DONALD study.

- Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **27**, 547-552.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata R. and Aou, S. (2003): Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.*, **45**, 345-356.
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 2008; **300**(11):1303-1310
- Laviola, G., Gioiosa, L., Adriani, W. and Palanza, P. (2005): D-amphetamine-related reinforcing effects are reduced in mice exposed prenatally to estrogenic endocrine disruptors. *Brain Res. Bull.*, **65**, 235-240.
- Leranth C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 **105**(37):14187-91
- Miyamoto K, Kotake M (2006) *Environ Sci*. Estimation of daily bisphenol A intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. 13:15 – 29.
- Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B (2000) Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:11603– 11608.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boehler, M. and Welshons, W.V. (1997): Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative In vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environmental Health Perspectives.*, **105**, 70-76.
- Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Yoshimura, S. and Ono, H., (2002): Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. *Reprod. Toxicol.*, **16**, 123-130.
- NEDO/産総研 (2005): Risk Assessment Report Series Vol. 6, Bisphenol A. pp. 267, Maruzen Co. Ltd., Tokyo. (in Japanese) http://unit.aist.go.jp/riss/crm/index_e.html (English version)
- 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 tranlycypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1159-1164.
- Nishizawa, H., Morita, M., Sugimoto, M., Imanishi, S., Manabe, N. (2005): Effects of in utero exposure to bisphenol A on mRNA expression of arylhydrocarbon

- and retinoid receptors in murine embryos. *J. Reprod. Dev.*; **51**: 315-324.
- NTP (1982): NTP Technical report on the carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rat and B6C3F1 mice (feed study), NTP-80-35 Publ. No. 82-1711
- NTP (2001): NTP Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review Final Report, <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/liason/FinalRptLowDoseFR.html>, pp. 493.
- NTP (2008a): Draft NTP Brief on Bisphenol A (Peer Review Date June 11), 2008, April 14, 2008, National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, US Department of Health and Human Services, pp. 68.
- NTP (2008b): NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A, September 2008 NIH Publication No.08-5994, <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/bisphenol/bisphenol.pdf>
- OECD (1983): OECD Guideline for the testing of chemicals, Test No. 415 one-generation reproduction toxicity study.
- OECD (1997): OECD Guideline for the testing of chemicals, Test No. 424 neurotoxicity study.
- OECD (2001a): OECD Guideline for the testing of chemicals, Test No. 416 for two-generation reproduction toxicity study.
- OECD (2001b): OECD Guideline for the testing of chemicals, Test No. 414 for prenatal developmental toxicity study.
- OECD (2007): OECD Guideline for the testing of chemicals, Developmental Neurotoxicity study
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Cahmbon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. (2003): Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, **423**, (6939) 545-550.
- Palanza, P.L., Howdeshell, K. L., Parmigiani, S. and vom Saal, F.S. (2002): Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 415-422.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K (2008) *J Perinatol*. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? 28:258 – 263.
- Rhomberg LR, Goodman JE. CERHR conclusions would have been strengthened by a more explicit weight-of-evidence analysis *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2008; **83**(3):155-6
- Ryan, B.C. and Vandenberg, J.G., (2006): Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm. Behav.*, **50**, 85-93.

- Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y.M., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi R, Nawata H (2001): Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulose-like tumor cell line KGN, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **289**, 198-204.
- Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Aoki, Y., Yonemoto, J. & Tohyama, C. (2001): Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J. Occup. Health.*, **43**, 185-190.
- SCF (2002): Opinion of the scientific committee on food on bisphenol A, Scientific Committee on Food, SCF/CS/PM/3936 Final 3, May 2002
- Schönfelder, G., Flick, B., Mayr, E., Talsness, C., Paul, M. and Chahoud, I. (2002a): *In utero* exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia*, **4**, 98-102.
- Schönfelder, G. (2002b): Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.*, **110**, A703-A707.
- Sekizawa, J. (2005-2009): Study reports on low-dose effects from fetal exposure to bisphenol A and data books on the evaluation of low-dose effects of bisphenol A, submitted to as a part of reports to the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan for the funding period from 2004 to 2007, Grant #2004-Chem-General-002, and Grant # 2007-Chem.- General-004. (in Japanese) <http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do>
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T., and Suzumori, K. (2005): Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage, *Human Reproduction* **20**, 2325–2329.
- Teeguarden, J.G., Waechter, Jr. J.M., Clewell, III. H.J., Covington, T.R., and Barton, H.A. (2005): Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A : A physiologically based pharmacokinetic approach. *Tox. Sci.*, **85**, 823–838.
- Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A. and vom Saal, F.S. (2005): Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 7014-7019.
- Tyl RW Commentary to the CERHR expert panel report on bisphenol A Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2008 **83**(3):152
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C., Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D. and Waechter, J.M. (2002): Three-generation reproductive

- toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, **68**, 121-146.
- Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Sloan, C.S., Castillo, N.P., Veselica, M.M., Seely, J.C., Dimond, S.S., Van Miller, J.P., Shiotsuka, R.N., Beyer, D., Hentges, S.G. and Waechter, Jr. J.M. (2008): Two-Generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice *Toxicol. Sci.*, **104**(2):362-84.
- US EPA (2008): bisphenol A, Integrated Risk Information System (IRIS), <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N. and Welshons, W.V. (2007): Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.*, **24**, 139-177.
- Vasudevan, N. and Pfaff, D.W. (2008) : Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **29**, 238–257.
- Völkel, W., Colnot T, Csanady, G.A., Filser, J.G. and Dekant, W. (2002): Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 1281-1287.
- Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment *Toxicol Lett.* 2008 Jul 10;179(3):155-62
- vom Saal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer K.A., Nagel S.C., Dhar M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S. and Welshons, W.V. (1997): Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses, *Pros. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 2056-2061.
- vom Saal, F.S., Cooke P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S. Welshons W.V. (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior, *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 239-260.
- vom Saal, F.S. (2007): Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproduct. Toxicol.*, **24**, 131-138.
- Willhite CC The Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR) NTP-CERHR Report. Commentary Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2008;83(3):153-4
- Witorsh, R.J. (2002): Low dose *in utero* effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans; An analytical review of the literature, *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 905-912.
- Yura,S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura,

M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y. and Fujii, S. (2005): Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition, *Cell Metabolism*, **1**, 371-378.

Zsarnovszky, A., Le, H.H., Wang, H.S. Belcher, S.M. (2005): Ontogeny of rapid estrogen-mediated extra-cellular signal-regulated kinase signaling in the rat cerebellar cortex: potent nongenomic agonist and endocrine disrupting activity of the xenoestrogen bisphenol A. *Endocrinology*, **146**, 5388-5396.

D. 考察

- (1) CERHRが適切と判断した報告はビスフェノールAに関しこれまで公表されたすべての文献のうち生殖および発生影響に関するものであった。
- (2) さらに適切と判断した報告は必ずしもすべて低用量に関する報告ではなく、たとえば多世代試験として適切になされ報告されたというものもあった。
- (3) 表2の17報の中でCERHRが適切とは判断した文献に入らなかった報告は最近多く報告のある神経行動影響に関するものであり、生殖および発生影響に分類すら得なかったものがあると考えられる。次に、
- (4) ビスフェノールAの低用量曝露による影響の可能性について多くの試験がなされ、各国や国際機関では健康リスクの蓋然性について関心が寄せられている。
- (5) 人の曝露濃度〈胎児中および血中の遊離体ビスフェノールA濃度〉の評価および影響の生物学的メカニズムについてのより詳しい検討が必要である。

(6) 各国や国際機関では健康リスクの蓋然性について関心が寄せられており、国際的な専門家グループの協力による検討に基づく調和のとれた対策がなされるべきであろう。

E. 結論

- (1) 米国 National Toxicology Program (NTP)のCERHRは2007年に生殖・発生毒性の検討を行ったところ、CERHR専門家グループがビスフェノールAの生殖・発生毒性評価にとり適切と判断した試験報告は42報であった。
- (2) 2003年以降公表の文献のうち、関澤が影響の見られた濃度の低い順に17報について検討結果とCERHRの判断基準により選別された結果を相互参照し現時点でビスフェノールAの低用量影響の蓋然性について検討したうちCERHRが適切と判断した試験報告は6報であった。
- (3) 17報の中でCERHRが適切とは判断した文献に入らなかった報告は最近多く報告のある神経行動影響に関するものだった。子供は成人に比べてUDPGTの発現が5分の1程度であり親化合物により多く暴露する可能性があり、これらの点については影響の性質と試験法の標準化という観点からもさらに検討を進める必要があると考える。OECDはこのために発生神経毒性試験指針を公表しており、今後の研究成果の検討に参考となる。
- (4) 2007年11月末までに新たに公表されたビスフェノールAの文献につき低用量影響の有無を検討したところ12報が該当した。経口投与で最も低い投与濃度は2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/dayであり神経系への影響に関する

るものであった。発生期間中の曝露による epigenetic な影響と考えられる報告も注目された。

(5) 次いで行ったビスフェノールAの低用量曝露による影響については多くの試験報告があり低用量曝露による影響の可能性は否定できないが、試験条件が不適切な場合もあるため、より適切な試験計画に基づいた試験の実施が必要となる。

(6) 経口曝露に限るとこれまで少なくとも20報が従来設定された耐容摂取量より低い濃度の曝露で影響を及ぼしていると報告している。それらのうち18報告はすべて周産期または胎児期曝露による子への影響である。

(7) 影響の種類では17報が発達毒性、3報が生殖毒性に関するものである。また発達毒性のうち9報は行動毒性に関するものであった。

(8) 前記20報のうち10報では用量段階を1しか設定しておらず、用量反応関係は明確でなかった。またいくつかの試験では用いられた1群の動物数が十分ではなかった。試験のデザインとデータの統計的な扱いについてのCERHRの評価では20報中、12報は適切で質が高く、5報は限定的、2報は不適切とされていたが、少なくとも1報については投与用量は再評価されていた。

(9) 証拠の確からしさについては、ビスフェノールAの低用量曝露による影響の可能性は否定できないが、試験条件やデータ解析に不適切な場合もあるため、より適切な試験計画に基づいた試験の実施と、生物学的メカニズムについての検討と人における胎児および血中の濃度の的確な測定が必要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 関澤 純, 土田昭司, 辻川典文, 小池芙美代, 蒲生恵美, 廣瀬弥生 (2008) 食品安全の情報依拠・信頼傾向の分析と適切な教材開発による信頼と理解改善の試み, 日本リスク研究学会研究発表会論文集, 印刷中

2. 関澤 純 (2008) リスクコミュニケーションの検証と展望, 食品衛生研究, 58(11) 7-15

3. 関澤 純 (2008) 食品表示と偽装, 食品成分表 2009, 印刷中

4. Sekizawa J. (2008) Low Dose Effects of Bisphenol A: A Serious Threat to Human Health?, *J. Toxicol. Sci.*, 33(4) 389-403

5. 関澤 純 (2008) 食品安全の効果的なリスクコミュニケーションに向けた質問回答サービス, 日本リスク研究学会誌 18(1), 105-112

2. 学会発表

1. 関澤 純, 山本裕史, 加藤 潤, 永見恵理, 宮入伸一, 武田英二 人尿中インディルビンと関連物質の精密な分析法の検討, 第11回内分泌攪乱化学物質学会 (2008年12月, 東京)

2. 藤川弘安, 関澤 純, 山本裕史, 中野武, 岡田泰史, 室内空気汚染物質による子供と高齢者の暴露評価法の検討, 第17回環境化学討論会 (2008年6月, 神戸)

3. 山本裕史, 中村雄大, 森口茂美, 関澤純 医薬品類の土壌・低質への収着と電気化学的親和性, 第17回環境化学討論会 (2008年6月, 神戸)
4. 関澤純 食品安全から見た安全と安心の葛藤と折り合い, 日本リスク研究学会第21回シンポジウム『新興・再興感染症のリスクに学ぶ』(2008年6月, 東京)
5. 関澤純 食品安全のリスクコミュニケーション改善のために～自治体の働きが大切! 食品安全講習会 (厚生労働省) (2008年5月, 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

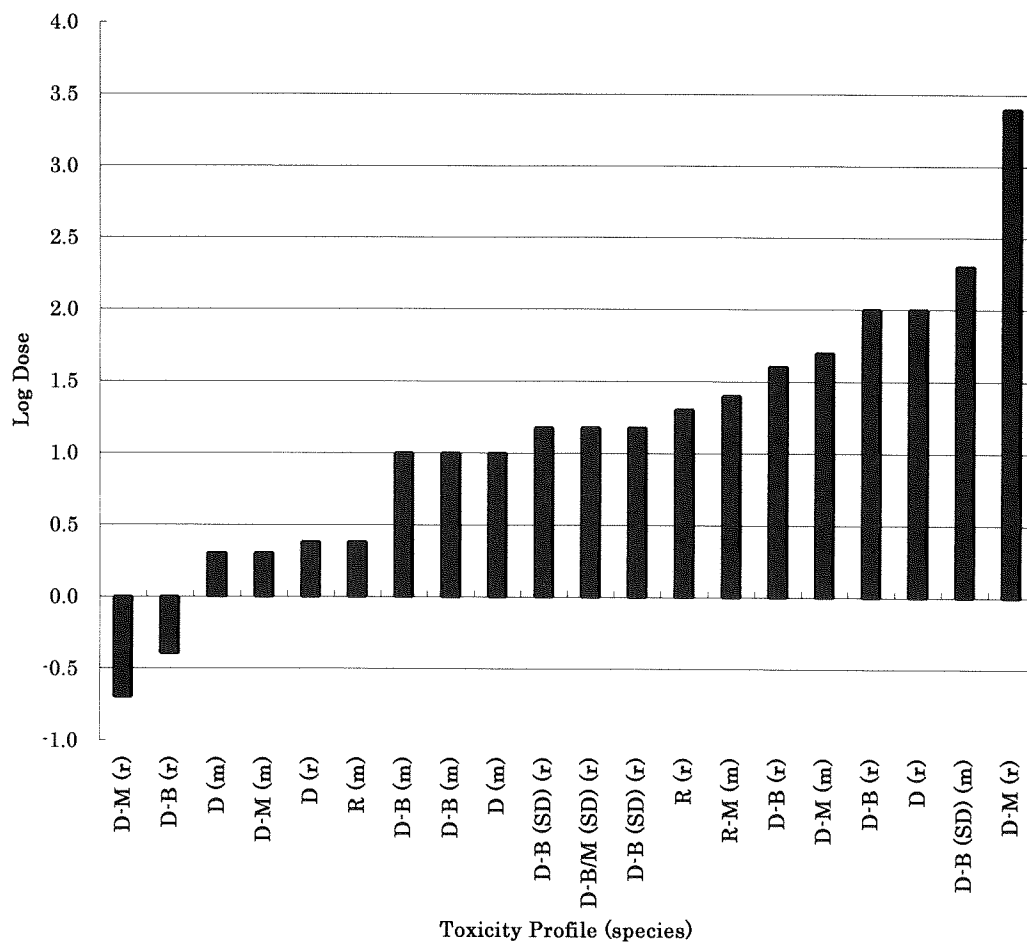


図2 低用量影響の動物種と影響の種別一覧

注：

D: Developmental effects, R: Reproductive effects, M: Morphological, B: Behavioral

SD: Effects on sexual dimorphism

r: rats, m: mice

表 1. 低用量影響報告の要約

Toxicity profile	Animal species	Dose : µg/kg/day, (number/group sex)	Exposure route and period	Observed Effects	LOAEL (NOAEL) µg/kg/day	Note :*2 (comment)	Statistical analysis	Reference
*1	rats	0, 0.2, 2, 20 (4/group)	gavage, PND 45 - 90	Reduced absolute and relative (to body weight) weights of testis and epididymis, increased ventral prostate weights at all dose levels. Decreased sperm motility. Dose dependent decrease of antioxidant enzyme activities,	0.2	Oxidative stress was hypothesized as a factor to cause effects on male reproduction function: L (small group size)	ANOVA with student t-test	Chitra et al., 2003
	D-M							
*2	rats	0, 0.4 (12/group)	gavage, PND 23-30	Juvenile behaviors directed to the object (biting, sniffing, climbing) at lower frequency.		Single dose, Behavioral effects interpreted as consistent with estrogenic mediation: H	ANOVA and Fisher least significant difference test	Della Seta et al., 2006
	D-B	-Dawley, male)		Decreased intromission latency and the lower plasma testosterone level on PND 37 and PND 105.	0.4			
3	mice	0, 2, 20, 200 (25/group)	gavage, GD 11-17	Decrease in absolute seminal vesicle weight at 2 µg/kg/day only.		Exposures at juvenile or adult stage did not induce effects, and significant effects seen only at 2 µg/kg/day only: H	Bartlett's test with ANOVA when homogeneous	Nagao et al., 2002
	D N, female)				2			
4	mice	0, 2, 20 (7/group)	gavage, GD 11-17	Prostate weights 30% higher in 6-month-old males		Soy phytoestrogens in the diet and no positive control, small sample size, no histopathological analysis: H	ANCOVA with body weight as the covariate	Nagel et al., 1997
	D-M female)				2			

5	D	rats (Long Evans, female & male)	0, 2.4, 10, 10 ⁵ , 2x10 ⁵ (Exp#1), 0, 2.4 (Exp#3) (10-12/group)	gavage, PND21 - 35 (Exp#1), PND 21-90 (Exp#3)	Reduced serum 17 β -estradiol level (Exp#1). Reduced seminal vesicle weight and testicular testosterone level (Exp#3).	2.4	Effects observed by exposures at early postnatal days: H	ANOVA with multiple comparisons conducted by Duncan multiple range test	Akingbe mi et al., 2004
6	R	mice (CF-1, female)	0, 2.4 (21/group)	feedings, GD 11-17	Increase in body weight at weaning in pups. A significant decrease in time to first estrous according to intrauterine position. Reduction in pup survival between birth and weaning.	2.4	Single dose: L	Analyzed on a litter basis to control for maternal effects, statistical method not clear	Howdesh ell et al., 1999
7	D-B	mice (CD-1, female)	0, 10 (8/group)	gavage, GD14-18 as fetus and/or GD14- 18	Decreases of the time dams spent for nursing and increases of the time dams spent in the nest for resting.	10	Single dose. Not clear why exposure during fetal development or as a dam only affected maternal nursing behavior, but did not by exposures in both period: H	ANOVA, Holms t-test, and/or Fisher protected least-squared difference test.	Palanza et al., 2002
8	D-B (SD)	mice (CD-1, female)	0,10 (5/sex/group)	gavage, GD 11-18	Decrease in d-amphetamine-inforced conditioned place-preference in females specifically.	10	Single dose. Effect was sexually dimorphic and male was not affected: H	ANOVA (litter treated as block variable), Tukey HSD test.	Laviola et al., 2004
9	D	mice (CD-1, female)	0, 10 (6/group)	gavage, GD 14-18	Increase in the numbers of prostate ducts, volume, and proliferation in prostate regions.	10	Single dose: H (small sample size)	ANOVA, followed by Fisher least-squares mean test	Timms et al., 2005

10	D-B (SD)	rats (Wistar, male and female)	0, 15 (6/group)	drinking water, GD 13 - PND 0	Impairment in sexual differentiation in rearing and struggling behavior.	15	Single dose. Observation in disruption in sexually dimorphic behaviors: I (small sample size and statistical treatment of litter not clear)	ANOVA, Fisher protected least significant difference test, and Mann-Whitney U test.	Fujimoto et al., 2006
11	D-B/M (SD)	rats (Wistar, female)	0, 15, 150 (6 dams/group and 7-8/test group):	drinking water, GD 0 - PND 21	Sexually dimorphic behavior in frequency of rearing and moved distance disappeared and also sexually dimorphic volume of locus ceruleus was reversed by the treatment.	15	Dose method not stated and actual dose not accurately estimated: I doses re-estimated from the above data of the same laboratory, (small sample size and statistical treatment of litters not clear)	Behavior and brain structure data by ANOVA and differences between sexes by Student t-test	Kubo et al., 2003
12	D-B (SD)	rats (Sprague- Dawley, female)	0, 15, 750 (8-9/group)	drinking water, GD11- PND21	Hyperactivity in open field test (at 6 week) and impaired spatial learning/memory in Morris water maze test (at 10 week) in males pups with significant up-regulation of mRNA and protein expression of SRC-1, but not in female pups.	15	Open field test performed with 13-17/group. Number of animals in Morris water maze test not shown	one-way ANOVA for each sex, and Student's t-test between males and females then Fisher's protected least significant difference test for each sex	Xu et al., 2007

13	R	rats (Sprague Dawley, male)	0, 20, 200, 2x10 ³ , 2x10 ⁴ , 2x10 ⁵ (5 or 8/group)	gavage, 13-week old dosed for 6 days	Decrease in daily sperm production/g tissue 24-32% at 20 and above two doses.	20	Short treatment period compared as to sperm production variation: L (small sample size)	Student t-test, ANOVA, and Fisher protected least significant difference test	Sakaue et al., 2001
14	R-M	mice (Swiss, 60-day-old male)	0, 5, 25, 100 (10/group)	gavage, for 30 days	Increase in relative testis weight, and decrease in seminal vesicle weight, testicular sperm counts and daily sperm production. Percentage of pregnant females reduced when mated with treated males	25 (5)	Small sample sizes for fertility assessments, inadequate coverage of spermatogenesis cycle, and inadequacy in statistical analysis: L	Student t-test	Al-Hiyas et al., 2003
15	D-B	rats (Sprague Dawley, female)	0, 40 (17/group)	gavage, GD 0-PND 21	Decrease in licking and grooming of pups.	40		Analysis by general linear model, Duncan multiple range test, and/or Mann-Whitney U test.	Della Seta et al., 2005
16	D-M	mice (CD-1, female)	0, 50 (15/group)	feeding, GD 16-18	Increase in relative prostate weight, and anogenital distance, androgen receptor binding activity at PND 60, and decrease in relative epididymis weight.	50	Single dose. Litter effects not controlled among PND examinations: H	ANOVA	Gupta, 2000
17	D-B	rats (Fisher 344, female)	0, 100 (10 - 11/group)	gavage, GD 3 - PND 20.	Increase in failure of active avoidance, and no increase in locomotion following a challenge with trans-2-phenylcyclopropylamine hydrochloride.	100	Single dose. Irreversible defect in perception of fear-provoking stimuli and monoaminergic pathways in male	Fisher protected least significant difference test	Negishi et al., 2004

offspring: H

	rats	0, 100, 5x10 ⁵ (6/test group)	gavage, GD 6-21	Increase in epithelial cell nuclei, epithelial nuclei with condensed chromatin, and epithelial cells with cavities. Reduced ERβ-positive cells in uterine tissue.	100	Female examined at 4 months of age on the day of estrus: H	Mann-Whitney test	Schönfelder et al., 2002a
18	D (Sprague Dawley, female)	0, 2, 200	gavage, GD 13 - PND 21	Early puberty, and increase in anxiety based on time in open arms of plus maze and in light part of light/dark preference box in female at high dose.	200 (2)	Measurements in the established sexually dimorphic behavioral test: H	ANOVA with post-hoc Student t-test (adequate sample size)	Ryan and Vandenberg, 2006
19	D-B (SD)	(C57BL/6), female	drinking water, GD0-PND2	A loss in sex difference in corticotropin-releasing hormone neurons in the anterior and posterior bed nuclei of the stria terminalis of the stria terminalis.	2.5x10 ³	Single dose. One rat/sex/litter appeared to be examined: L	ANOVA with Fisher protected least significant difference post-hoc test	Funabashi et al., 2004
20	D-M (SD)	rats (Wistar, female)	drinking water, GD0-PND2	A loss in sex difference in corticotropin-releasing hormone neurons in the anterior and posterior bed nuclei of the stria terminalis of the stria terminalis.	1			

*1 D: Developmental effect, M: Morphological effect, B: Behavioral, SD: Change in sexual dimorphism or sexual difference in the effects

*2 CERHR evaluation of utility (adequacy) of studies

with the reasons stated in the "Note" column. H: High L: Low I: Inadequate

表2 いくつかの機関による曝露濃度推定の要約

	Average body weight	CERHR ^a , NTP ^b	EFSA ^c	NEDO/産総研 ^d
		Average	Average	Average
	kg		µg/kg/day	
Breastfed babies		1 ^a	0.1 ^e	
Infants	4.5	1 ^a		
0-4, 0-5 or 0-6 months	6.1 (3 months)		4 = 1.7 ^f + 2.3 ^g	0.055, 0.062 ^{d1}
6-11 or 6-12 months	7.8		8.3 ^g	0.18, 0.20 ^{d1}
1.5 years			5.3 = 4.4 ^h + 0.9 ⁱ	
Children				
1.5-5 or 1-6 years		0.04-0.07 ^a		1.2, 1.2 ^{d2}
Adults		0.026 ^e	1.5 = 1.2 ^h + 0.25 ⁱ	0.19, 0.23 ^{d2}
Female		0.044 ^b		0.034-0.059 ^{d2}
Male		0.057 ^b		0.028-0.049 ^{d2}

a: Estimates from intake data

b: Back calculation from urinary concentrations; NTP (2008)

c: Based on typical simulation scenarios EFSA (2006)

d: Based on typical simulation scenarios NEDO/CRM-AIST (2005)

d1: Estimates from aggregate exposures, male and female

d2: 95-percentile value of back calculation from urinary concentrations

Sources of contamination

e: breast milk, f: epoxy-phenolic coated cans, g: canned powdered infant formulae

h: canned foods + beverages, i: polycarbonate tableware and food containers

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書(平成 19-20 年度)

低用量核内受容体作動性化学物質による前立腺重量や発育などに対する影響
に関する研究

研究分担者 杉村 芳樹 三重大学大学院医学系研究科・腎泌尿器外科学・教授

研究要旨

低用量ビスフェノール A (BPA)曝露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖機構解明に向けて、前立腺の発生母体である泌尿生殖洞に着目し、BPA 経胎盤投与群に特徴的な仔雄マウス泌尿生殖洞の形態組織学的変化と遺伝子発現変化、特に性分化関連遺伝子群の発現変動を解析した。BPA および DES 経胎盤投与ともに仔雄マウス泌尿生殖洞の ER α 発現量を上昇させたが、SF1 の発現誘導は BPA に特徴的であった。SF1 発現は基底上皮に限局していたものの、扁平上皮化は認められなかった。BPA 曝露群の間質では、Ki-67 index と筋線維芽細胞のマーカーであるテネイシン C の占拠率が有意に増加した。BPA 曝露群に特徴的な遺伝子変化として DAX-1、Ad4BP/SF-1、Cyp 群の発現上昇を認め、さらに ERR γ 発現細胞が存在する臓器との関連を見出した。BPA 曝露による性分化関連遺伝子群の発現上昇は ERR γ 発現臓器でのみ認められたことから、前立腺のみならず、ERR γ 発現臓器において不可逆的影響を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

低用量ビスフェノール A (BPA)曝露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖機構解明に向けて、前立腺の発生母体である泌尿生殖洞における特徴的な遺伝子変化を探索した。すなわち、腺管の発生から増殖、細胞分化に至るまで性ステロイドホルモンの支配下にある前立腺では、上皮や間質細胞に存在する性ステロイドホルモン受容体を介した上皮-間質の相互作用により制御されている。我々は、低用量 BPA 曝露による成獣マウス前立腺基底上皮の異常増殖が、

投与直後に起こる体内ホルモンバランスの不均衡と、それに関わる遺伝子レベルでの変化に起因していると考え、BPA 経胎盤投与群に特徴的な仔雄マウス泌尿生殖洞の形態組織学的変化と遺伝子発現変化、特に性分化関連遺伝子群の発現変動に着目した。

B. 研究方法

BPA 経胎盤投与群に特徴的な仔雄マウス泌尿生殖洞の形態組織学的変化と遺伝子発現変化を解析した。すなわち、妊娠 13-16 日目の間、雌 C57BL/6 マウスに対して、ト