

## 平成28年度第2段階生物試験(ビスフェノールA)の検証結果について(概要版案)

## 1. 平成28年度に実施した試験結果について

第2段階生物試験としての適用に向けて、ビスフェノールA(CAS No. 80-05-7、4,4'-(プロパン-2,2-ジイル)ジフェノール又は4,4'-イソプロピリデンジフェノール)について、メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

メダカ(*Oryzias latipes*)を用い、28、93、330、1,000、3,700  $\mu\text{g/L}$ (実測値)のばく露濃度で試験(全ばく露期間:19週間)を行った。基本的にはテストガイドラインが規定する条件の下で実施され、平均水温のみ有効性基準の範囲をわずかに超えていたが、試験結果には影響しなかったと考えられる。

## (1) F0世代(ばく露期間:4週間)

雌の全長、雌雄の体重、雌の生殖腺体指数、雄の二次性徴、間性又は性転換に有意な変化は認められなかった。

雄の肝臓中ビテロゲニン濃度は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、28  $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

1,000  $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、総産卵数、受精卵数の統計学的に有意な低値が認められ、雌の肝臓体指数の統計学的に有意な高値が認められた。

3,700  $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、生存率(13~16週齢)、受精率、雄の全長、雄の生殖腺体指数の統計学的に有意な低値が認められ、雄の肝臓体指数、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められた。

## (2) F1世代(ばく露期間:16週間)

ふ化率、生存率(2週齢)、雄の全長(9週齢、12~15週齢)、雄の体重(9週齢)、雌の体重(12~15週齢)、雌の肝臓体指数(9週齢、12~15週齢)に統計学的に有意な変化は認められなかった。

28  $\mu\text{g/L}$ 、93  $\mu\text{g/L}$ 、1,000  $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、雄の全長の統計学的に有意な高値が認められた。

雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(12~15週齢)は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、28  $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

雌の肝臓中ビテロゲニン濃度(9週齢)は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、93  $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

330  $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、ふ化日数の統計学的に有意な高値が認められた。

雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(9週齢)は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、330  $\mu\text{g/L}$

以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

1,000  $\mu\text{g/L}$  以上のばく露群において、総産卵数、受精卵数の統計学的に有意な低値が認められ、雄の生殖腺体指数(9週齢)、雄の体重(12~15週齢)、雌の生殖腺体指数(12~15週齢)の統計学的に有意な高値が認められた。

3,700  $\mu\text{g/L}$  のばく露群において、生存率(4週齢、9週齢、12~15週齢)、受精率、雌の全長(9週齢、12~15週齢)、雌の体重(9週齢)、雌の生殖腺体指数(9週齢)、雄の二次性徴(9週齢、12~15週齢)の統計学的に有意な低値が認められ、雄の肝臓体指数(9週齢、12~15週齢)、雄の生殖腺体指数(12~15週齢)、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度(12~15週齢)、間性又は性転換(9週齢、12~15週齢)の統計学的に有意な高値が認められた。

### (3) F2世代(ばく露期間：2週間)

ふ化率、ふ化日数、ふ化後生存率、生存率(2週齢)に統計学的に有意な変化は認められなかった。

## 2. 試験結果のまとめ

ビスフェノール A については、既存知見(別紙参照)及び試験管内試験の結果(平成 20 年度に実施したメダカエストロゲン受容体  $\alpha$  レポータージーン試験の結果として  $\text{EC}_{50}$  値は、 $2.2 \times 10^{-7} \text{M}$  で、 $17\beta$  エストラジオールに対する相対活性比は、0.0008 であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。

今回の試験結果において、死亡が認められなかった濃度範囲(1,000  $\mu\text{g/L}$  以下)において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

また、1,000  $\mu\text{g/L}$  以上のばく露群において総産卵数及び受精卵数の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。

なお、過年度に第 1 段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、4,670  $\mu\text{g/L}$  のばく露群において総産卵数、受精率の統計学的に有意な低値が認められていた(参考資料 3-1 参照)。

以上により、第 2 段階生物試験としての「メダカ拡張 1 世代繁殖試験(MEOGRT: OECD TG240)」の適用性に関する知見が得られた。

また、この試験結果から、ビスフェノール A はメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、1,000  $\mu\text{g/L}$  が得られた。

メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度 1,000  $\mu\text{g/L}$  は、平成 26 年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度 0.28  $\mu\text{g/L}$  の約 3,570 倍であった。

また、メダカの繁殖に対する有害性が示唆されなかったばく露濃度 330  $\mu\text{g/L}$  は、平

成 26 年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度  $0.28 \mu\text{g/L}$  の約 1,180 倍であった。

(別添)

## メダカ拡張1世代繁殖試験結果(MEOGRT: OECD TG240)

## ビスフェノールA

実施機関：国立環境研究所

## 1. F0世代

表 1-A 試験結果

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	試験個体数		生存個体数		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	12	12	10	11	36.0 $\pm$ 1.8	35.0 $\pm$ 1.2	413 $\pm$ 70	444 $\pm$ 39
28	6	6	6	6	35.7 $\pm$ 1.4	34.9 $\pm$ 1.3	413 $\pm$ 68	460 $\pm$ 37
93	6	6	6	6	34.6 $\pm$ 1.0	35.1 $\pm$ 0.9	373 $\pm$ 32	445 $\pm$ 39
330	6	6	6	6	35.4 $\pm$ 1.3	35.5 $\pm$ 2.0	390 $\pm$ 46	461 $\pm$ 87
1,000	6	6	6	6	36.2 $\pm$ 1.7	34.4 $\pm$ 2.0	430 $\pm$ 53	449 $\pm$ 74
3,700	6	6	6	6	33.9 $\pm$ 1.5 *	35.3 $\pm$ 0.9	373 $\pm$ 70	470 $\pm$ 47

表 1-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	総産卵数	受精卵数	受精率	生殖腺体指数 (%)	
	(eggs/day/pair)	(eggs/day/pair)	(%)	雄	雌
対照区	28.8 $\pm$ 7.7	27.8 $\pm$ 8.2	95.8 $\pm$ 6.2	1.1 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 1.8
28	33.8 $\pm$ 3.0	33.3 $\pm$ 2.8	98.4 $\pm$ 2.0	0.9 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 1.0
93	29.5 $\pm$ 7.6	28.5 $\pm$ 8.4	95.8 $\pm$ 6.3	1.2 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 1.0
330	26.2 $\pm$ 9.2	25.4 $\pm$ 9.5	95.9 $\pm$ 3.0	0.9 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 1.0
1,000	20.9 $\pm$ 9.9 *	20.0 $\pm$ 9.9 *	96.2 $\pm$ 6.1	1.2 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 1.8
3,700	20.1 $\pm$ 9.2 *	18.4 $\pm$ 8.9 *	89.5 $\pm$ 6.6 *	0.6 $\pm$ 0.2 *	7.3 $\pm$ 1.3

表 1-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	1.8 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 1.0	8.17 $\pm$ 8.74	527 $\pm$ 239	106 $\pm$ 16	NA
28	2.2 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 0.9	99.2 $\pm$ 94.9 *	550 $\pm$ 286	117 $\pm$ 14	NA
93	1.8 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.6	2,660 $\pm$ 3,760 *	548 $\pm$ 122	102 $\pm$ 17	NA
330	1.8 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.7	9,990 $\pm$ 5,850 *	612 $\pm$ 501	102 $\pm$ 8	NA
1,000	2.1 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 0.9 *	12,800 $\pm$ 5,420 *	703 $\pm$ 319	121 $\pm$ 12	NA
3,700	3.9 $\pm$ 1.3 *	5.7 $\pm$ 1.2 *	4,950 $\pm$ 3,240 *	1,910 $\pm$ 1,050 *	106 $\pm$ 12	NA

## 2. 1. F1世代(胚、仔魚、亜成体期)

表 2-A 試験結果

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	ふ化後生存率 (%) (12日目)
対照区	99 ± 2	6.4 ± 0.2	100 ± 0
28	95 ± NA	7.1 ± NA	100 ± NA
93	98 ± 4	6.7 ± 0.4	100 ± 0
330	100 ± 0	7.2 ± 0.3 *	100 ± 0
1,000	89 ± 4	7.2 ± 0.1 *	100 ± 0
3,700	98 ± 3	7.6 ± 0.3 *	100 ± 0

NA: 途中でプールされたため標準偏差算出不可

表 2-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	生存率 (%)		全長(mm)(9週齢)		体重(mg)(9週齢)	
	(4週目)	(9週目)	雄	雌	雄	雌
対照区	100 ± 0	97 ± 8	27.7 ± 0.6	28.3 ± 1.1	218 ± 17	267 ± 43
28	100 ± 0	100 ± 0	27.5 ± 0.5	28.1 ± 0.7	204 ± 16	254 ± 20
93	100 ± 0	99 ± 3	27.5 ± 0.2	28.3 ± 0.8	207 ± 13	262 ± 23
330	100 ± 0	100 ± 0	27.3 ± 0.8	27.9 ± 0.5	188 ± 19	241 ± 22
1,000	100 ± 0	100 ± 0	27.9 ± 1.0	28.0 ± 1.7	207 ± 21	233 ± 45
3,700	97 ± 4 *	97 ± 4	27.0 ± 1.1	26.6 ± 1.0 *	213 ± 29	208 ± 20 *

表 2-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	肝臓体指数 (%)		ピテロゲニン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	2.1 ± 0.4	4.4 ± 0.7	4.37 ± 9.71	309 ± 363	70 ± 22	NA
28	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.4	0.83 ± 0.19	284 ± 307	98 ± 6	NA
93	2.4 ± 0.3	4.7 ± 0.5	7.84 ± 12.5	755 ± 191 *	91 ± 8	NA
330	2.1 ± 0.7	4.9 ± 0.4	17.9 ± 18.8 *	841 ± 161 *	85 ± 5	NA
1,000	2.3 ± 0.4	4.2 ± 0.4	332 ± 284 *	1,090 ± 490 *	85 ± 7	NA
3,700	4.1 ± 0.5 *	4.3 ± 0.5	3,020 ± 640 *	3,400 ± 250 *	0 ± 0 *	NA

表 2-D 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	生殖腺体指数 (%)	
	雄	雌
対照区	0.8 $\pm$ 0.2	9.7 $\pm$ 1.3
28	0.9 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.4
93	1.0 $\pm$ 0.2	10 $\pm$ 3
330	0.9 $\pm$ 0.1	10 $\pm$ 1
1,000	1.0 $\pm$ 0.2 *	6.5 $\pm$ 2.2
3,700	2.9 $\pm$ 2.0 *	4.3 $\pm$ 0.9 *

## 2. 2. F1世代(成熟個体)

表 2-E 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	生存率 (%)		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	<u>100</u>	<u>100</u>	31.6 $\pm$ 1.3	32.3 $\pm$ 1.2	331 $\pm$ 42	425 $\pm$ 46
28	<u>100</u>	<u>100</u>	33.1 $\pm$ 1.5 *	32.5 $\pm$ 1.6	348 $\pm$ 42	406 $\pm$ 44
93	<u>100</u>	<u>100</u>	32.7 $\pm$ 1.5 *	31.9 $\pm$ 1.0	364 $\pm$ 47	421 $\pm$ 35
330	<u>100</u>	<u>100</u>	32.4 $\pm$ 1.2	32.2 $\pm$ 1.0	345 $\pm$ 34	417 $\pm$ 40
1,000	<u>100</u>	<u>100</u>	33.8 $\pm$ 1.3 *	31.6 $\pm$ 1.1	401 $\pm$ 45 *	440 $\pm$ 58
3,700	<u>90 (9/10)</u>	<u>90 (9/10)</u>	31.9 $\pm$ 1.3	31.4 $\pm$ 1.4 *	436 $\pm$ 41 *	421 $\pm$ 46

ペアリング失敗 (XX同士、XY同士のペアが存在) により供試数は10個体ずつであった。

表 2-F 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	総産卵数 (eggs/day/pair)	受精卵数 (eggs/day/pair)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	32.4 $\pm$ 3.6	31.6 $\pm$ 3.7	97.5 $\pm$ 2.7	0.9 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 1.3
28	34.3 $\pm$ 2.7	33.0 $\pm$ 3.4	95.9 $\pm$ 5.5	0.9 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 1.5
93	32.8 $\pm$ 3.1	32.3 $\pm$ 2.8	98.4 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 1
330	33.2 $\pm$ 3.8	32.7 $\pm$ 3.8	98.3 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 1.5
1,000	27.2 $\pm$ 5.8 *	23.5 $\pm$ 11.1 *	81.2 $\pm$ 36.7	0.9 $\pm$ 0.3	14 $\pm$ 8 *
3,700	0.5 $\pm$ 0.8 *	0 $\pm$ 0 *	0.0 $\pm$ 0.0 *	9.0 $\pm$ 5.8 *	9.7 $\pm$ 5.8 *

表 2-G 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	肝臓体指数 (%)		ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	1.8 ± 0.3	4.7 ± 0.7	5.88 ± 5.98	732 ± 399	101 ± 14	NA
28	2.0 ± 1.3	5.1 ± 1.3	187 ± 250 *	558 ± 232	107 ± 18	NA
93	1.9 ± 0.4	5.4 ± 0.8	155 ± 200 *	526 ± 90	96 ± 13	NA
330	2.0 ± 0.5	5.3 ± 0.3	1,000 ± 474 *	568 ± 97	101 ± 14	NA
1,000	1.8 ± 0.6	4.3 ± 1.3	1,100 ± 260 *	624 ± 127	97 ± 15	NA
3,700	3.6 ± 1.3 *	4.1 ± 0.6	5,140 ± 3,470 *	4,680 ± 1,410 *	0 ± 0 *	NA

### 3. F2世代(胚、仔魚期)

表 3-A 試験結果

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	ふ化後生存率 (%)	生存率 (%) (16日目)
対照区	94 ± 5	8.1 ± 0.2	100 ± 0	94 ± 5
28	93 ± 5	8.5 ± 0.4	100 ± 0	95 ± 3
93	96 ± 5	8.0 ± 0.0	100 ± 0	97 ± 4
330	93 ± 7	8.6 ± 0.5 *	100 ± 0	98 ± 3
1,000	92 ± 4	8.2 ± 0.2	100 ± 0	95 ± 5
3,700	NA	NA	NA	NA

結果は平均値±標準偏差.

有意差水準 (\* $p$ <0.05).

ND は未検出 (< 1 ng/mg liver).

(-)は、未測定

NA: not available

二次性徴：乳頭状小突起を有する節板数

有効数字は測定精度を考慮して、

- ・ふ化率・ふ化後生存率・生存率は2桁（ただし1の位までとする）
- ・肝臓体指数および生殖腺体指数は、1未満は1桁、1以上は2桁
- ・それ以外のエンドポイントは3桁（ただし二次性徴は1の位まで、ビテロジェニンは小数点以下2桁までとする）
- ・標準偏差の桁数は平均値の位に合わせる