

**ビスフェノールAの3世代生殖毒性試験についての  
最終報告書（要約）**

使用動物 : CD (Sprague-Dawley) ラット  
投与方法 : 経口投与 (餌にビスフェノールAを混入)

試験責任者 : Rochelle. W. Tyl, Ph.D.,  
試験機関 : Research Triangle Institute

試験依頼者 : 日米欧のビスフェノールA関係工業グループ  
(代表は米国プラスチック工業会)

最終報告書

発行日 : 2000年10月5日

要約者 : ビスフェノールA安全性5社研究会

試験名 : ビスフェノールAの3世代生殖毒性試験  
CD (Sprague-Dawley) ラットに混餌法で投与

試験責任者 : Rochelle. W. Tyl, Ph.D.,  
試験機関 : Research Triangle Institute  
Research Triangle Park, North Carolina 27709-2194 USA

適合性 : 本試験は米国 EPA の次の基準に適合するよう実施した。  
Toxic Substances Control Act(TSCA)の試験ガイドライン。  
Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances(OPPTS)の  
健康影響試験ガイドライン  
TSCA GLP

試験期間 : 1998年9月28日(動物受入)~2000年1月20日(F3剖検)  
最終報告書  
発行日 : 2000年10月5日

被験物質 : ビスフェノールA (BPA; CAS No. 80-05-7)  
純度 99.9%

試験方法 : 米国EPAのOPPTS Testing Guidelines (870.3800; 1998)の生殖毒性試験  
方法をベースに次を追加した。

用量数は7群(対照群を含む)と多くした。広い用量範囲をカバーするためである。  
2世代でなく3世代について試験した。F3についても成熟まで投与した。

検査項目はエストロゲン作用をより詳しく調べるために次を加えた。

肛門性器間距離、性成熟時期(膺開口、包皮分離)、精巣上体の精子、  
精巣の精子細胞、発情周期、離乳前(生後11~13日)の雄について乳頭、乳輪  
の検査、より広範な肉眼検査と病理組織学的検査

動物 : ラット、CrI:CD(SD)BR

動物数/群 : 雌雄各30匹/群

仔は、出産4日目に一腹10匹に調整し授乳させた。

離乳時に、一腹当たり雌雄各1匹を選び交配用F1とし、他の雌雄各3匹を  
剖検した。F2、F3についても同様とした。

飼料 : Purina Certified Rodent Chow (No. 5002, RMI Feeds, Inc., St. Louis, MO)

投与経路 : 経口投与(餌に混入して投与)

投与量 : 次のとおり設定した。

群番号	動物数		餌中濃度 ppm	目標摂取量 (雌)		目標摂取量 (雄)	
	雌	雄		mg/kg/日		mg/kg/日	
1	30	30	0.00	0.00		0.00	
2	30	30	0.015	0.001		0.0009	
3	30	30	0.3	0.02		0.018	
4	30	30	4.5	0.30		0.27	
5	30	30	75	5		4.5	
6	30	30	750	50		45	
7	30	30	7500	500		450	

2 や 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$  の BPA 投与でも影響が認められたという試験結果が報告されていることから、最も低い用量は 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$  (0.001mg/kg/日) と設定した。また、最も高い用量は確実に全身毒性が現れる用量として 500mg/kg/日を設定した。

目標摂取量は、雌は(体重 300g、摂餌量 20g/日)、雄は(体重 500g、摂餌量 30g/日)として計算した。スポンサーの要求により雌を基準として濃度を調整した。

飼育と投与の期間：

(最終報告書 p20 Text Figure A. BPA Three-Generation Study Design を参照)

F 0 雌雄に約 7 週齢で BPA の投与を始める。

F0 雄は、交配前 10 週間、交配 2 週間、さらに F 1 出生時まで投与し、剖検する。

F0 雌は、交配前 10 週間、交配 2 週間、妊娠 3 週間、授乳 3 週間投与し、剖検する。

生まれた仔 (F 1) は、

生後 4 日に一腹当たり (10 匹以上の場合) 10 匹に調整する。

離乳時に、一腹当たり雌雄各 1 匹を交配用 F 1 とし、他の雌雄各 3 匹は剖検する。

交配用 F 1 は離乳後 10 週間投与し交配する。

そして、雄は F 2 出生時に剖検し、雌は F 2 離乳時に剖検する。

F 2 についても F 1 と同様とする。すなわち、

生後 4 日に一腹当たり (10 匹以上の場合) 10 匹に調整する。

離乳時に、一腹当たり雌雄各 1 匹を交配用 F 2 とし、他の雌雄各 3 匹は剖検する。

交配用 F 2 は離乳後 10 週間投与し交配する。

そして、雄は F 3 出生時に剖検し、雌は F 3 離乳時に剖検する。

F 3 についても F 1, F 2 とほぼ同様とする。すなわち、

生後 4 日に一腹当たり (10 匹以上の場合) 10 匹に調整する。

離乳時に、一腹当たり雌雄各 1 匹を成熟用 F 3 とし、他の雌雄各 3 匹は剖検する。

成熟用 F3 は離乳後約 12 週間投与し成熟させた後、剖検する。

## 検査項目

### (共通)

死亡状況(日に2回)、体重(週一回)、飼料摂取量(週一回)、一般状態(毎日)

### (F1、F2、F3)

出生時、出生4、7、14、21日(離乳日)に生存状況、雌雄の別、体重

肛門性器間距離(出生時のF2とF3のみ)

出生11~13日に雄について乳頭の存在の有無

離乳時剖検した動物については、臓器(脳、脾臓、肝臓、胸腺、精巣、精巣上体、精嚢、卵巣、子宮、膣)の重量測定、肉眼検査

### (F0、交配用F1、交配用F2および成熟用F3の雄)

臓器(精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、下垂体、包皮腺、副腎、脾臓、肝臓、腎臓、凝固腺)の重量、肉眼観察、病理組織学的検査。脳の重量

男性学的検査(生殖器重量、精巣上体精子の数、運動率、形態、一日の精子生産量、一日の精子生産効率)

包皮分離日及びその日の体重

### (F0、交配用F1、交配用F2および成熟用F3の雌)

臓器(卵巣、膣、子宮、子宮頸部、下垂体、副腎、脾臓、肝臓、腎臓)の重量、肉眼観察、病理組織学的検査。脳の重量

卵巣での原始卵胞の数(高用量と対照群のみ)

膣開口日及びその日の体重、

発情周期を知るための膣の細胞診断(交配前3週間と交配期間に実施)

### (繁殖性に関する指数)

交尾率、受胎率、着床率など

生存胎仔率、性比など

## 試験結果

### 7500ppm (約 500mg/kg/日に相当)

すべての世代(F0,F1,F2,F3)の雌雄両性の成熟動物に全身毒性が観察された。体重増加が15%以上減少した。飼料摂取量は時に増加し、時に減少した。飼料摂取効率は時々減少した。

生殖器以外の検査したほとんどの臓器(肝臓、腎臓、副腎、脾臓、下垂体、脳)で絶対重量が減少し、逆に相対重量は増加した。病理組織学的検査では、F0、F1、F2の雌で腎臓尿細管の変質、慢性的な肝臓の炎症などが認められた。

生殖器では、重量、病理検査、機能検査でBPA投与に直接関係する影響は認められなかった。F0、F1及びF2の雌で卵巣の絶対及び相対重量が有意に低下し、F3雌で卵巣の絶対重量が有意に低下した。卵巣での卵胞数はF0雌で有意に増加した。しかし、F1、F2及びF3の雌では影響がなかった。男性学的検査では、どの用量のどの世代でも、次の点を除いてBPA投与による影響は認められなかった。F1雄で精巣上体の精子数が有意に減少した。F3雄で一日の精子生産量が有意に低下した(精子生産効率は低下せず)。

F1、F2及びF3の生後0日、4日での一腹当たりの全仔数または生存仔数が有意に低下した。これはF0、F1及びF2の子宮重量の低下を伴っていた。これが生殖への唯一の影響であった。交尾率、受胎率、出産率、交尾までの期間、妊娠期間、仔の性比、または、F1、F2、及びF3の離乳前の雄仔の乳頭(または乳輪)残留への影響は認められなかった。仔への唯一の影響は仔の体重低下で、F1、F2及びF3について生後7日から始まっている。各世代とも膈開口(雌)と包皮分離(雄)が統計的に有意に遅れた。肛門性器間距離(出生時にF2とF3について測定)は、F2とF3雄及びF3雌については影響がなかった。F2雌だけが有意に増加した。この差は統計的に有意ではあるが、0.03~0.04mmと、きわめて少ない差である。それゆえ、生物学的あるいは毒性学的な有意性を示すものとは考えなかった。これらの変化(包皮分離、膈開口、肛門性器間距離)は、この変化がみられた動物の生殖機能には影響を与えなかった。生殖機能あるいは仔にみられた毒性は、親動物に明確な毒性を示す用量(7500ppm)でのみ認められ、750ppm以下では認められなかった。

### 750ppm (約 50mg/kg/日に相当)

すべての世代(F0,F1,F2,F3)の親動物に全身毒性が観察された。体重増加量の減少がF0雌では出産前、妊娠中、授乳中に、F1雌では妊娠中と授乳中に、F2雄では剖検前に、認められた。F0雄、F1雄、F2雌、F3雌雄では体重増加量への影響は認められなかった。飼料摂取量と飼料摂取効率には影響なかった。

雄では、すべての世代で肝臓の絶対重量が有意に低下し、F1で下垂体の絶対重量が低下し、F2で腎臓と脾臓の絶対重量が有意に低下した。雌では、どの世代も生殖器以外の臓器の重量には影響が認められなかった。肉眼観察及び病理組織学的検査ではBPA投与に伴う影響は認められなかった。

生殖器重量、病理組織学的検査及び生殖機能は雌雄両性とも影響が認められなかった。生殖、妊娠、及び仔に関する検査項目、肛門性器間距離、あるいは成熟時期に影響は認められなかった。(ただし、肛門性器間距離がF2雌で0.04mm有意に増加し、F1雄で包皮分離日が1.7日遅れた。)

75ppm (約 5mg/kg/日に相当)

各世代とも BPA 投与による影響は認められなかった。

4.5ppm ~ 0.015ppm (約 0.3 ~ 0.001mg/kg/日)

各世代とも BPA 投与による影響は認められなかった。肛門性器間距離が 0.015, 0.3, 4.5ppm の F 2 雌で有意に増加した。(各用量とも 0.03mm だけ対照群より長かった) この距離の増加は、成長への他の影響が認められないので、BPA 投与とは関係なく、生物学的にまたは毒性学的に有意なものではないと考えた。F 2 以外の世代や雄では影響がなかった。

## 考察

### [成熟動物の全身毒性]

750ppm と 7500ppm で全身毒性が認められた。体重と体重増加量が低下している。

7500ppm で多くの臓器の絶対重量が低下し、相対重量が増加している。両方とも剖検時の体重が低かったことが原因である可能性が強い。他の用量群でも臓器の絶対または相対重量に有意差のあるものもあるが、全世代に共通して認められたものや用量相関性の認められたものはない。

### [成熟動物の生殖毒性]

雌についての交尾率、受胎率、出産率、一腹当たりの死亡出生仔数、着床後死亡率には投与に関係する影響は認められなかった。着床数、一腹当たりの全出生仔数と生存出生仔数が 7500ppm の F1,F2,F3 で有意に減少した。

生存出生仔数が低下した原因は明らかでない。雄の生殖機能への影響を示す証拠がないので、雄が原因ではない。卵が子宮に着床してからの死亡率は増加していない。したがって、排卵数が少なかったか、着床しない卵が多かった可能性が考えられる。なお、卵巣重量は低下したが、原始卵胞数は減少していない。

卵巣重量(絶対及び相対重量)は 7500ppm の各世代で低下した。7500ppm では全身毒性が認められる用量である。しかし、7500ppm でも発情周期及び卵巣の卵胞数には影響は認められなかった。交尾までの期間や妊娠期間にも影響はなかった。

雄についての交尾率、授胎率には投与に関係する影響は認められなかった。精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、凝固線の絶対、相対重量に投与に直接関係する影響は認められなかった。750ppm と 7500ppm の雄では体重が低下したために、絶対重量が低下し、相対重量が増加している。

生殖器の肉眼観察及び病理組織学的検査では、雌雄とも投与に関係する影響は認められなかった。

### [仔への毒性]

7500ppm の F 1, F 2, F 3 雌で膈開口日が、それぞれ 2.5, 3.5, 2.5 日遅れた。また、7500ppm の F1,F2,F3 雄で包皮分離が、それぞれ 3.9, 5.8, 3.1 日遅れた。750ppm の F 1 雄についても 1.7 日遅れた。(F2,F3 雄では遅れがない) これは体重増加量の低下に伴う二次的影響によるもので、エストロゲン作用による影響とは考えなかった。

肛門性器間距離(AGD)が F2 の雌で有意に増加した。0.015, 0.3, 4.5, 750ppm でそれぞれ 0.03, 0.03, 0.03, 0.04mm 増加した。75, 7500ppm では増加していない。この増加は、次の理由により生物学的に有意とは考えなかった。

- ・増加量は 0.03~0.04mm で、きわめて少ない。(対照群の AGD は 0.95mm である)
- ・関連する影響がみられない。
- ・雌の AGD を増加させる生物学的メカニズムが BPA に見あたらない。  
(エストロゲン作用では雌の AGD は増加しないとされている)
- ・BPA は in vivo 試験でアンドロゲン作用も抗アンドロゲン作用も認められていない。

#### [エストラジオールとの対比]

17 -エストラジオール (E 2) の 1 世代生殖毒性試験の結果が報告されている。E 2 を 0.5, 2.5, 10, 50ppm 餌に混入して経口投与している。この試験では 10ppm 以上の濃度では仔は生まれていない。これと BPA の試験結果を対比すると次のとおりとなる。

E 2 での影響	E 2 用量	BPA	BPA での影響
発情周期の変化(F0)	0.05ppm	No	
不妊(F0)	10 ppm	No	
膣開口の早まり(F1)	0.05ppm	No	7500ppm で膣開口遅れ
包皮分離の遅れ(F1)	2.5 ppm	Yes	7500ppm で遅れ (体重低下の 2 次的影響)
仔の体重低下(F1 出生時)	0.05ppm	No	
仔の体重低下(F1 4-21 日)	2.5ppm	No	7500ppm で低下
着床数の低下	2.5ppm	No	
一腹数の低下	2.5ppm	Yes	7500ppm で低下
精巣、精巣上体、副生殖腺重量の低下(F1)	2.5ppm	No	
卵巣の絶対/相対重量の低下	2.5ppm	Yes	7500ppm で低下
大きな卵胞数の減少(F1)	2.5ppm	No	
膣粘膜の肥大(F1)	2.5ppm	No	

BPA のエストロゲン様作用の強さはエストラジオールに比べて、in vitro では約 1/15,000、in vivo (皮下投与) で 1/10,000 と報告されている。したがって、E 2 の 0.05ppm での影響が BPA750ppm 以上にできると予想される。しかし、体重増加が明確に低下する 7500ppm でのみ 2 項目 (出生仔数の低下と卵巣重量低下) で影響がみられただけである。750ppm 以下ではエストロゲン様作用は認められなかった。

## 結論

- ・ BPA を餌に混入する方法で投与して 3 世代生殖毒性試験を行った。その結果、
- ・ 750, 7500ppm の交配用 F0,F1,F2 及び成熟用 F3 で体重増加量が低下した。
- ・ 7500ppm の F1,F2,F3 は出生 7 日以降体重増加が低下した。
- ・ 出生時に検査した F2,F3 の肛門性器間距離には、各世代に共通した又は用量相関性のある影響は認められなかった。
- ・ 7500ppm の F1,F2,F3 は膣開口及び包皮分離が遅れた。これは体重増加減少による二次的影響と考えられる。(750ppm の F1 雄も同様)
- ・ 生殖行動や受胎に関する検査項目には、(次項を除いて) BPA 投与に関係する影響は認められなかった。
- ・ 7500ppm の F1,F2,F3 で着床数、全出生仔数及び生存出生仔数が有意に低下した。着床後のロスには影響なかった。
- ・ 7500ppm の F1,F2, で卵巣の絶対及び相対重量が有意に低下した。F3 では絶対重量のみ有意に低下した。
- ・ 精巣の重量と病理組織学的所見には、投与に関係する又は用量相関性のある影響は認められなかった。
- ・ 精巣上体での精子数(7500ppm の F1 のみは低下)、精子の運動率や形態には、投与に関係する又は用量相関性のある影響は認められなかった。
- ・ 精巣での均質化抵抗性のある精子細胞の頭部数と一日の精子生産量には、投与に関係する又は用量相関性のある影響は認められなかった。(7500ppm の F3 のみ低下したが、精子生産効率に影響なかった。) 精子生産効率には影響が認められなかった。
- ・ イストラ<sup>®</sup> オールの 1 世代生殖毒性試験結果と比較すると、BPA のエストロゲン様作用による影響といえるのは、7500ppm での卵巣重量の低下と出生仔数の低下のみと少ない。
- ・ 生殖器の重量及び病理学的所見には投与に関係する又は用量相関性のある影響は認められなかった。
- ・ F0,F1,F2 の雌の病理組織学的検査で、腎臓尿細管の変質及び肝臓の慢性的炎症が認められた。(F3 は影響なし)
- ・ 離乳前の雄仔(F1,F2,F3 とともに)で、乳頭又は乳輪の残留の増加は認められなかった。
- ・ 卵巣での原始卵胞数は 7500ppm の F0 で増加したが、F1,F2,F3 では影響が認められなかった。

結論として次のとおりとなる。

成熟動物への全身毒性が 750ppm と 7500ppm で認められた。75ppm 以下では悪影響が認められなかった。したがって、この試験条件下では CD(Sprague-Dawley)ラットに対する NOAEL (無毒性量) は 75ppm(約 5mg/kg/日に相当)となった。

また、750ppm 以下では、BPA 投与に関係する又は用量相関性のある、生殖あるいは仔への毒性が認められなかったため、この試験条件下での CD(Sprague-Dawley)ラットに対する生殖あるいは仔への毒性の NOAEL は、750ppm (約 50mg/kg/日)と結論される。0.001, 0.02, 0.3, 4.5, 75ppm(BPA の投与量は約 0.001, 0.02, 0.3, 5mg/kg/日に相当する)では、成熟動物にも仔にも BPA 投与に関係する影響は認められなかった。

## 要約者の注釈

ビスフェノールAについては、すでに、生殖毒性試験や慢性・発がん性試験を含む各種の安全性試験が実施されている。それらの結果に基づいて、ヒトでの許容摂取量として0.05mg/kg/日が求められている。

しかしながら、内分泌かく乱問題に関連して、ビスフェノールAがエストロゲン作用をもつこと、また、0.002, 0.02mg/kg/日というきわめて低い用量でも影響がみられたという報告が発表されたことから、ビスフェノールAの安全性に関心が集まっている。

そこで、ビスフェノールAの関連工業界として、これらの点を考慮し一層の安全性を確認するために、内分泌かく乱作用を検査するのに最も信頼できるとされているラットを用いた3世代生殖毒性試験を行ったものである。そのため本試験は、エストロゲン作用による影響を検出しやすくするための各種検査項目を追加し、0.001mg/kg/日～500mg/kg/日というきわめて広範囲の7用量群（含む対照群）を用い、3世代について行うという大がかりな試験となった。

本試験の結果は次のとおりである。生殖毒性についての無毒性量は50mg/kg/日である。一般毒性については50mg/kg/日ではわずかな体重増加減などの影響が認められ、無毒性量は5mg/kg/日である。この結果は従来試験結果と矛盾するものではなく、現行の許容摂取量である0.05mg/kg/日の正しさが再確認できたことになる。

また、0.001mg/kg/日、0.02mg/kg/日という低用量でも、ビスフェノールAの投与に関する影響は認められなかった。この点でも現行の許容摂取量を変更する必要のないことが確認できたと考える。