

表 3-2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

検体の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数(%)	増殖率(%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)	
300	100	1	0	0	0	0	1	0	94.5	100	0	0	0	
	100	1	3	0	0	0	3	0		100	0	1	1	
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	0	1	1	
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0.5)	(0.5)		
400	100	8	10	0	1	0	12	0	54.5	100	0	0	0	
	100	15	24	3	0	0	26	0		100	0	1	1	
	200	23	34	3	1	0	38	0		200	0	1	1	
		(11.5)	(17.0)	(1.5)	(0.5)	(0)	(19.0)**	(0)		(0)	(0.5)	(0.5)		
500 #	--	--	--	--	--	--	--	--	21.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)		
陽性対照	100	15	66	0	0	0	69	0		100	1	0	1	
10	100	11	75	2	0	0	75	0		100	0	0	0	
	200	26	141	2	0	0	144	0		200	1	0	1	
		(13.0)	(70.5)	(1.0)	(0)	(0)	(72.0)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)		

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

要 約

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の 0（被験物質の媒体である局方オリブ油のみ投与）、30、120、500 および 1000 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の SD シェラットに、交配開始 2 週間前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、その反復投与毒性および生殖発生毒性を調べた。また、雄については対照群および 1000 mg/kg 群の各 12 匹からそれぞれ 5 匹を選別し、雌についてはサテライト群として別に 1 群 5 匹の対照群および 1000 mg/kg 群を設け、投与終了後 14 日間観察を継続し、毒性の回復性についても検討した。

1. 反復投与毒性

1000 mg/kg 群で雄に投与期間中の体重増加量の低値が認められた。血液学検査では、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の低値並びに網状赤血球数の高値が認められた。血液生化学検査では、500 mg/kg 群の雄に総コレステロール濃度およびカルシウム濃度、1000 mg/kg 群の雌雄に総コレステロール濃度、雌に ALT 活性およびカルシウム濃度のいずれも高値が認められた。器官重量では、500 mg/kg 群の雌雄に肝臓相対重量、雌に肝臓絶対重量、雄に腎臓の絶対重量および相対重量、1000 mg/kg 群の雌雄に肝臓相対重量、雌に肝臓絶対重量、雄に腎臓相対重量のいずれも高値が認められた。病理組織学検査では、500 および 1000mg/kg 群の雌雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、雄に腎臓の近位尿細管の好塩基化が認められた。一般状態、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、摂餌量および尿検査において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

回復群においては、雄雌とも各検査指標に投与による影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の性周期（雌）、交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に変化は認められなかった。児動物に対しても、総出産児数、新生児数、性比、出生率、体重、形態および哺育 4 日生存率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 500 mg/kg 以上の群で肝臓に対する影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、最高用量群においても影響が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

目 的

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）をラットに反復経口投与し、本物質の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質であるビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）（CAS No. 32492-61-8）は、水に不溶な無色透明液体で、試験には、三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）から提供されたロット番号 L3-6S004-A（純度 99%以上）のものを冷暗所（2～6℃）、密栓下で保管し、使用した。用いた被験物質は投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）は水のほか油にも溶けにくいですが、食物油には懸濁可能であったことから、投与液はオリーブ油（局方、ロット番号 BH17、宮澤薬品株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。調製した投与液は、1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。投与液中の被験物質は、冷所遮光下で少なくとも 7 日間は安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後 7 日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

2. 動物および飼育条件

動物は、SD 系 [CrI : CD(SD)] ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター（神奈川県厚木市下古沢 795）から 8 週齢のものを搬入（雄 68 匹、雌 80 匹）し、12 日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については 10 日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重分布の中央値に近い雄は 60 匹、雌は 70 匹を選び、10 週齢で試験に用いた。1 群の動物数は雌雄各 12 匹とし、雌についてはさらに対照群と最高用量群の回復群として各 5 匹からなる 2 群のサテライト群を設け、無作為抽出法により群分けを行った。なお、雌の回

回復群については交配を行わなかった。雄の回復群については、投与 42 日に対照群と最高用量群の中から無作為抽出法によりそれぞれ 5 匹を選別し、回復群とした。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 361(334~396)g、雌 235(216~260)g であった。ラットは、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定したバリアシステム動物室(第 1 室)で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W×380D×180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、巣作り材料(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネート製ケージ [265W×426D×200H(mm)] に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料(固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20070470、20070678)および飲料水(孔径 $1 \mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネートケージの場合)により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付、並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は $22.1 \sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 46~60% の範囲で推移(Appendix 4)し、また飼料、巣作り材料(床敷)および飲料水の汚染物質の分析結果(Appendices 5、6、7)は、いずれも当研究所で設定した許容範囲内にあることが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断した。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

本物質の 500、1000 および 2000 mg/kg を雌雄各 1 匹のラットに 3 日間反復経口投与した結果、2000 mg/kg 投与の雄、500 mg/kg 以上投与の雌で体重増加抑制、さらに、2000 mg/kg 投与の雌雄で軽度な自発運動低下が認められた。そこで、1 群雌雄各 4 匹のラットに、本被験物質を 0 (局方オリブ油のみ投与)、50、100、200、500 および 1000

mg/kg/day で 14 日間反復経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、血液学および血液生化学検査、剖検並びに器官重量の測定を行った。その結果、500 mg/kg 以上の群で投与直後の流涎、尿ケトン体の低値傾向、血清総コレステロールおよび肝臓重量の高値傾向、さらに、1000 mg/kg 群で血液プロトロンビン時間の低値傾向およびカルシウムの高値傾向が認められた。

したがって、本試験における投与量については、1000 mg/kg/day を最高用量とし、以下、500、120 および 30 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②被験物質の 30 mg/kg/day 投与群(30 mg/kg 群)、③同 120 mg/kg/day 投与群(120 mg/kg 群)、④同 500 mg/kg/day 投与群(500 mg/kg 群)、⑤同 1000 mg/kg/day 投与群(1000 mg/kg 群)の 5 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 47 日間、1 日 1 回、午前中(9:00~12:35)に投与した。ただし、雌の回復群は、雄と同様に 42 日間投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。なお、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理組織学検査については、各群から無作為抽出法により雌雄各 5 匹を選び、検査の対象とした。

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、投与直後から投与後 1 時間に、動物の生死、外観、行動等について観察した。さらに、朝夕 2 回は、動物の生死や瀕死状態の有無について確認した。また、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

(2) 詳細な臨床観察

投与開始前日およびその後は週 1 回、ケージサイドでの観察に加えて、動物をケージから取り出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド

の性比については χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4, Appendices 10~13)

投与期間において、500 mg/kg 群で投与 8 日以降、1000 mg/kg 群で投与 3 日以降、また、雌のサテライト群で投与 6 日以降、いずれも全例に流涎が認められた。この流涎は、投与直後に口周囲を軽度に濡らす程度の一過性のものであった。回復期間においては、いずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。また、投与期間および回復期間を通じて、いずれの投与群にも死亡は認められなかった。

2) 詳細な臨床観察 (Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

投与期間中および回復期間中とも、各観察項目に有意な変化は認められなかった。

3) 感覚反射機能検査 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に変化は認められなかった。

4) 握力および自発運動量 (Tables 9, 10, Appendices 18, 19)

投与期間中の検査において、被験物質投与各群とも握力および自発運動量に有意な変化は認められなかった。回復期間中の検査においては、雌のサテライト群に後肢の握力および測定開始後 30 分間の自発運動量に有意な低値が認められた。

5) 体重 (Tables 11, 12, Appendices 20, 21)

投与期間中において、1000 mg/kg 群で雄に体重増加量の有意な低値が認められた。各測定時点での体重に有意差は認められなかった。雌では、被験物質投与各群とも交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。回復期間においては、1000 mg/kg 群の雄に体重増加量の有意な高値が認められ、回復傾向が確認された。また、体重増加量の有意な高値は雌のサテライト群にも認められた。

6) 摂餌量 (Tables 13, 14, Appendices 22, 23)

投与期間中および回復期間中、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

500 mg/kg 群の雄の投与 35 日の摂餌量に有意な低値、同群の雌の哺育 0 日の摂餌量および雌のサテライト群の投与 28 日の摂餌量に有意な高値が認められたが、これらはいずれも摂餌量の前後の推移からみて投与との関連性は認められず、被験物質の投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

7) 雄の尿検査 (Table 15, Appendix 24)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

8) 血液学検査 (Tables 16, 17, Appendices 25, 26, 背景データ : Appendices 42, 43)

投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値並びに網状赤血球数の有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で雄に血小板数の有意な低値、雌に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。投与期間終了時屠殺動物において認められた変化は認められなかった。

9) 血液生化学検査 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28, 背景データ : Appendices 42, 43)

投与期間終了時屠殺動物の検査において、500 mg/kg 以上の群の雄および 1000 mg/kg 群の雌に総コレステロール濃度、さらに 1000 mg/kg 群では雌に ALT 活性およびカルシウム濃度のいずれも有意な高値が認められた。カルシウム濃度の有意な高値は 500 mg/kg の雄にも認められた。なお、被験物質投与各群の雄のクレアチニン濃度は対照群と比べて全般的に低値で有意差が認められたが、用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物の検査においては、1000 mg/kg 群の雄で ALT の有意な高値および血糖の有意な低値が認められた。

10) 剖検 (Tables 20, 21, Appendices 29~30)

投与期間終了時屠殺動物および回復期間終了時屠殺動物とも、被験物質の投与による変化は認められなかった。投与とは無関係な変化としては、胸腺の赤色域が投与期間終了時屠殺動物の対照群の雌の1匹に、腎臓の腎盂拡張（片側性）が回復期間終了時屠殺動物の対照群の雄の1匹に認められた。

11) 器官重量 (Tables 22, 23, Appendices 32~35)

投与期間終了時屠殺動物では、500mg/kg 以上の群で雄に肝臓および腎臓の相対重量、雌に肝臓の絶対重量および相対重量のいずれも有意な高値が認められた。また、500 mg/kg の雄の腎臓の絶対重量も有意な高値を示した。これらの変化に加えて、雌で120 mg/kg 群の副腎相対重量に有意な低値、500 mg/kg 群の脾臓の絶対重量および相対重量に有意な高値、1000 mg/kg 群の甲状腺相対重量に有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で雄に脾臓絶対重量の有意な低値が認められた。投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。

12) 病理組織学検査 (Tables 24~26, Appendices 29~31, Photos 1, 2)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が肝臓および腎臓に認められた。

肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大が500 mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹、1000 mg/kg 群で雄の3匹および雌の5匹に、また、巣状壊死が1000 mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹に認められた。腎臓では、雄で近位尿細管の好塩基化が対照群で1匹、30 mg/kg 群で2匹、120 mg/kg 群で1匹、500 mg/kg 群で3匹および1000 mg/kg 群で5匹に認められ、500 mg/kg 以上の群では変化の重症化が認められた。これら肝臓および腎臓の変化は、回復群では、1000 mg/kg 群で腎臓の近位尿細管の好塩基化が雄の1匹に認められた以外には、認められなかった。また、雌雄の肝臓および雄の腎臓以外の器官には、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。さらに、精子形成サイクル検査においても、各検査ステージに変化は認められなかった。

その他、心臓の心筋変性・線維化、肺の泡沫細胞集簇、肝臓の微小肉芽腫、小葉周辺性肝細胞脂肪変性、腺胃の胃底腺拡張、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細

管上皮の好酸性小体、硝子円柱、孤立性嚢胞および皮質リンパ球浸潤、脾臓の髄外造血および褐色色素沈着、前立腺の間質リンパ球浸潤が対照群と 1000 mg/kg 群または対照群あるいは 1000 mg/kg 群にのみ認められたが、これらはいずれもラットにおける自然発生病変として発現する変化¹⁾であり、また、1000 mg/kg 群における発現率や変化の程度に対照群との差は認められないことから、被験物質の投与とは無関係な変化と判断した。また、剖検で被験物質とは無関係に認められた胸腺の赤色域には出血が、腎盂の拡張（左側）した腎臓には水腎症が観察された。

500 および 1000 mg/kg 群で認められた妊娠不成立の各 1 ペアについて、それぞれ雄(動物番号 039 および 053)の下垂体、精巣、精巣上体、前立腺および精囊等並びに雌(動物番号 544 および 558)の下垂体、卵巣および子宮等に変化は認められず、妊娠不成立の原因となるような所見は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 性周期検査 (Table 27、Appendices 37、38)

被験物質投与各群とも、対照群と比べて平均性周期に有意な変化は認められなかった。一時的に発情前期(I)像や発情後期 I (III)像が認められない、あるいは、発情休止期(V)像が 3 日以上持続するなどの性周期の乱れが生じた個体が、30 mg/kg 群で 2 匹(動物番号 523、529)、120 mg/kg 群で 1 匹(動物番号 541) および 1000 mg/kg 群で 1 匹(動物番号 556) 認められたが、その発現に用量相関性はなく、また、発現率に有意差もなかった。なお、30 mg/kg 群の 1 匹(動物番号 529) および 120 mg/kg 群の 1 匹(動物番号 541) は、性周期検査期間中に 1 性周期のみのデータとなったため、群平均性周期の算出からは除外した。性周期の乱れが生じたそれらの個体は、その後の交配で交尾が確認され、正常な妊娠、分娩および哺育が認められた。

(2) 交尾率および受胎率 (Table 27、Appendix 38)

交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率に有意な変化は認められなかった。いずれの投与群とも交尾不成立は認められず、500 および 1000 mg/kg 群で各 1 例の妊娠不成立が認められた。

(3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 27、Appendix 38)

黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間 (Table 27、Appendix 38)

出産率および妊娠期間に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態 (Table 27、Appendix 38)

分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 28、Appendix 39)

一腹当たりの総出産児数、分娩率、哺育 0 日および 4 日の新生児数および体重、出生率、性比並びに哺育 4 日の生存率に有意な変化は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 形態 (Table 29、30、Appendices 40、41)

外表検査において、30 mg/kg 群で無尾を呈する児動物が 1 匹 (発現率 0.6%) 認められた。内臓検査では、内臓異常を有する児動物は認められなかった。内臓変異については、左臍動脈遺残を呈する児動物が 120 mg/kg 群で 1 匹 (0.6%) および 500 mg/kg 群で 2 匹 (1.2%) 認められた。これらの異常および変異の発現率はいずれも低く、また、用量相関性のない変化であることから、自然発生的範疇のものと判断した。

考 察

1. 反復投与毒性について

被験物質の投与による主な毒性として、雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の血液に対する影響が認められた。

肝臓に対する影響について、500 mg/kg 以上の群で雌雄に肝臓重量に変化が認められ、病理組織学検査では、小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。また、1000mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹に認められた巣状壊死は、自然発生病変りとしても知られているが、1000 mg/kg 群にのみ比較的高い発現率で認められたことから、被験物質の投与に起因する変化と判断された。

血液生化学検査において、500 mg/kg 以上の群の雄および1000 mg/kg 群の雌に認められた総コレステロール濃度並びに1000 mg/kg 群の雌に認められたALT活性のいずれも高値は、被験物質の肝臓に対する影響と関連した変化と考えられる。

腎臓に対する影響について、500 mg/kg 以上の群で雄に腎臓重量の変化が認められた。病理組織学検査では500 mg/kg 以上の群の雄に近位尿細管上皮の再生像と考えられる好塩基化が認められ、本被験物質は尿細管に対する傷害性の影響を有するものと考えられた。

血液に対する影響について、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値並びに網状赤血球数の有意な高値が認められ、被験物質の投与による影響と考えられた。この貧血所見と関連して、出血、網内系組織における赤血球破壊亢進所見、骨髄等における造血細胞の変化など、その発現機序を推定できる変化は認められなかった。

これらの変化に加えて、1000 mg/kg 群では雄に投与期間中の体重増加量の低値が認められた。

500 mg/kg 群の雄および1000 mg/kg 群の雌に認められたカルシウム濃度の高値については、軽度な変化ではあるが、投与量設定試験においても1000 mg/kg 群で雌雄に認められた変化であることから、被験物質投与による何らかの影響と思われる。

なお、500 および1000 mg/kg 群の雌雄に認められた流涎は、投与直後にのみ認められた変化であり、詳細な臨床観察や感覚反射機能検査等で神経毒性を示唆する変化が認められていないことから、被験物質の毒性と関連した変化ではなく、投与液に対する忌

避反応と考えられる。

雌サテライト群の回復期間中の検査で認められた後肢の握力および測定開始後 30 分間の自発運動量の低値について、これらの各個体値は、後肢握力の 1 例(574 g)を除いて、いずれも当研究所の背景データにおける基準値の範囲[後肢握力：162～476(g)、測定開始後 30 分間の自発運動量：6567～19513(カウント/30 分)]内の値であり、後肢握力においては、むしろ対照群の値が高値傾向を示したこと、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、被験物質の投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

血液学検査において、回復群の雄で認められた血小板数の低値については、その個体値は背景データにおける基準値の範囲[98～150($10^4/\mu\text{L}$)]内の値であり、むしろ、対照群の値がやや高値傾向を示したこと、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。回復群の雌で認められた活性化部分トロンボプラスチン時間の延長については、肝臓等に関連するような変化は認められないことから、偶発的変化と思われる。

血液生化学検査において、30 mg/kg 以上の群で雄に認められたクレアチニンの低値については、いずれの投与群ともその個体値は、基準値の範囲[0.30～0.54(mg/dL)]内の値であり、また、用量相関性のない変化であることから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。また、回復群の雄で認められた ALT の高値および血糖の低値については、投与期間終了時の検査では認められておらず、また、その各個体値は、血糖における 1 例 (118 mg/dL) を除いて、いずれも基準値の範囲[ALT：21～59(IU/L)、血糖：131～182(mg/dL)]内の値であることなどから、偶発的変化と判断した。

器官重量において、120 および 500 mg/kg 群の雌で認められた副腎相対重量の低値および脾臓の絶対重量および相対重量の高値については、いずれも用量相関性はなく、被験物質とは無関係な偶発的変化と判断した。また、1000 mg/kg 群の雌で認められた甲状腺相対重量の高値については、関連性のある変化が病理組織学検査において認められていないことから、被験物質の影響とは考え難い。回復群の雄で認められた脾臓絶対重量の低値については、相対重量に変化はなく、投与期間終了時では認められない変化であり、むしろ対照群の値が高値傾向であったことなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

一般状態、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力および自発運動量の測定並びに神経系器官・組織の病理学検査において、被験物質の神経行動毒性を示唆する変化は認められなかった。

以上のような、投与期間中あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化は、回復期間中あるいは回復期間終了時の検査においては回復あるいは回復傾向にあり、可逆的な変化であると判断した。また、遅発的な毒性影響と考えられる変化も認められなかった。

本試験で認められたものと類似した肝臓に対する影響は、当研究所で実施したビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においても認められている²⁾（未発表）。

2. 生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも対照群と比べて有意な変化は認められなかった。また、児動物に対しても、発生に関する各指標において被験物質の投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 500 mg/kg 以上の群で肝臓に対する影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、最高用量群においても影響が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

文 献

- 1) 日本毒性病理学会編、毒性病理組織学、2000。
- 2) 野田篤ら。ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験。（財）畜産生物科学安全研究所 内部資料。

要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、いずれの菌株とも生育阻害が認められなかったため、直接法および代謝活性化法ともに 156～5000 μ g/プレートの範囲（公比 2）で設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害についても、いずれの菌株とも認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

目 的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法 1、2)

1. 被験物質

名 称： ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名： 4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated）

CAS 番号： 37353-75-6

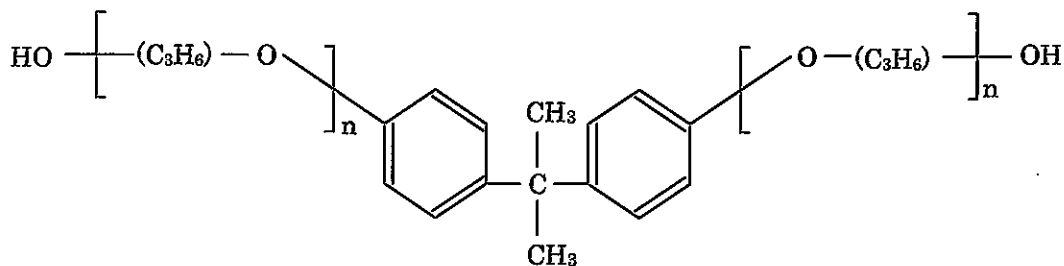
ロット番号： L3-6S005-A

純 度： 99%以上（水分：0.03%）

付加モル分布： 1 モル：0.0%、 2 モル：5.7%、 3 モル：11.4%、 4 モル：22.1%、
5 モル：24.9%、 6 モル：18.1%、 7 モル：10.2%、 8 モル以上：
7.6%（分析日：平成 18 年 10 月 19 日）

示 性 式： $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式：



入 手 先： 三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量： 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等：

化学名 ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 502（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温) 無色透明液体

酸価 0.001 mgKOH/g

指標菌株	直接法 (μg /プレート)	代謝活性化法 (μg /プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2uvrA	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社、98%、ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社、>90%、ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、90%、ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company、98%、ロット番号 07721MZ)

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 5200601) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に、*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company、ロット番号 AASXB) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 DLJ5479) 水溶液、*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP0420) 水溶液を 1/10 容加え、アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために、20~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定し、本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果 (表 1-1、1-2)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、全ての菌株で菌の生育阻害は認められなかった。なお、2000 および 5000 μg /プレートで、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で 2 回行った。

1) 用量設定

用量設定試験の結果から、被験物質の用量は、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、5000 μ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156 μ g/プレートの計 6 用量とした。

2) 実験方法

(1) プレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社、リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (プレート) (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW・2007 年 6 月 5 日製造・2007 年 8 月 10 日購入；ロット番号 ANI730IW・2007 年 9 月 11 日製造・2007 年 11 月 12 日購入) は、Vogel-Bonner E 培地 (0.2 w/v% クエン酸・一水塩、1w/v% リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v% リン酸一アンモニウム、0.066 w/v% 水酸化ナトリウム、0.02 w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5 w/v% およびグルコースを 2 w/v% となるように加え、30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

(2) プレインキュベーション法 (代謝活性化法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 mL に 0.6w/v% 軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地（テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW、ANI730IW）に重層後、37℃で 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す（自然復帰変異体数）。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
 - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
 - (3) 2 回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定する。

結 果

試験を2回実施した結果(表2-1、2-2、3-1、3-2および図1-1、1-2、1-3、2-1、2-2、2-3)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの場合にも認められなかった。なお、2500および5000 μ g/プレートでは、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

陰性対照群では背景データ(添付資料)の範囲内の復帰変異コロニー数が認められた。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ(添付資料)の範囲内またはその近くの陽性値を示すものであった。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液およびS9 mixなどには、雑菌の混入は認められなかった。

結 論

ビスフェノールA-PO付加物(平均付加モル数5モル)について遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下ではビスフェノールA-PO付加物(平均付加モル数5モル)の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ビスフェノールAの変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535または*E. coli* WP2uvrAを用いた復帰突然変異試験^{3,4,5)}で陰性との報告がある。また、CHO細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾および陰性⁷⁾、V-79細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性³⁾との報告がある。

文 献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, **113**, 173-215.
- 2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol.

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の
用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	126	8	14	33	18
20	120	8	13	13	16
50	91	8	25	26	16
100	99	10	26	32	19
200	110	7	22	27	19
500	106	9	20	28	13
1000	109	9	20	26	16
2000 #	117	8	20	25	6
5000 #	77	5	25	35	13
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数 /プレート	808	353	819	282	477

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の
用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	100	7	22	36	9
20	91	9	20	28	9
50	95	9	30	31	13
100	105	7	25	33	7
200	113	11	25	21	8
500	111	5	19	26	10
1000	97	9	16	25	10
2000 #	126	4	24	20	9
5000 #	115	7	20	23	11
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	583	257	596	302	98

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。
2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果〔本試験1回目-直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照	123	3	29	21	6
〔局方精製水〕	127	15	23	25	13
	133	11	24	31	18
	(128 \pm 5)	(10 \pm 6)	(25 \pm 3)	(26 \pm 5)	(12 \pm 6)
156	105	14	30	24	7
	111	5	17	25	10
	118	8	24	33	17
	(111 \pm 7)	(9 \pm 5)	(24 \pm 7)	(27 \pm 5)	(11 \pm 5)
313	115	9	23	15	9
	128	3	16	23	13
	106	11	29	22	18
	(116 \pm 11)	(8 \pm 4)	(23 \pm 7)	(20 \pm 4)	(13 \pm 5)
625	111	12	12	25	5
	112	11	24	31	17
	105	9	20	29	14
	(109 \pm 4)	(11 \pm 2)	(19 \pm 6)	(28 \pm 3)	(12 \pm 6)
1250	101	11	26	24	13
	109	2	18	26	11
	117	10	16	31	16
	(109 \pm 8)	(8 \pm 5)	(20 \pm 5)	(27 \pm 4)	(13 \pm 3)
2500 #	99	10	19	21	13
	114	8	22	25	12
	109	12	21	30	15
	(107 \pm 8)	(10 \pm 2)	(21 \pm 2)	(25 \pm 5)	(13 \pm 2)
5000 #	104	8	19	25	15
	121	6	18	22	17
	103	8	20	25	21
	(109 \pm 10)	(7 \pm 1)	(19 \pm 1)	(24 \pm 2)	(18 \pm 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	848	420	941	382	546
コロニー数	815	444	998	404	640
/プレート	891	404	994	431	426
	(851 \pm 38)	(423 \pm 20)	(978 \pm 32)	(406 \pm 25)	(537 \pm 107)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験1回目-代謝活性化法]

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照	108	10	15	29	12
[局方精製水]	83	7	13	37	18
	85	9	23	27	16
	(92 ± 14)	(9 ± 2)	(17 ± 5)	(31 ± 5)	(15 ± 3)
156	111	8	18	30	21
	150	9	21	25	16
	94	5	17	40	15
	(118 ± 29)	(7 ± 2)	(19 ± 2)	(32 ± 8)	(17 ± 3)
313	110	2	23	28	15
	121	10	20	21	23
	110	12	23	35	20
	(114 ± 6)	(8 ± 5)	(22 ± 2)	(28 ± 7)	(19 ± 4)
625	104	9	20	33	13
	124	4	27	25	12
	136	6	25	29	15
	(121 ± 16)	(6 ± 3)	(24 ± 4)	(29 ± 4)	(13 ± 2)
1250	100	7	16	28	14
	122	15	34	31	22
	106	8	30	30	20
	(109 ± 11)	(10 ± 4)	(27 ± 9)	(30 ± 2)	(19 ± 4)
2500 #	107	3	20	34	13
	99	12	31	38	9
	113	8	28	27	16
	(106 ± 7)	(8 ± 5)	(26 ± 6)	(33 ± 6)	(13 ± 4)
5000 #	112	4	24	26	16
	125	8	22	30	12
	114	9	20	24	14
	(117 ± 7)	(7 ± 3)	(22 ± 2)	(27 ± 3)	(14 ± 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	529	281	487	303	131
コロニー数	601	247	530	266	112
/プレート	611	240	489	283	117
	(580 ± 45)	(256 ± 22)	(502 ± 24)	(284 ± 19)	(120 ± 10)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値±標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果 [本試験2回目 - 直接法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	100	9	19	33	4
[局方精製水]	129	13	19	24	9
	118	7	21	25	4
	(116 \pm 15)	(10 \pm 3)	(20 \pm 1)	(27 \pm 5)	(6 \pm 3)
156	101	12	19	29	13
	98	17	18	25	3
	90	7	20	20	6
	(96 \pm 6)	(12 \pm 5)	(19 \pm 1)	(25 \pm 5)	(7 \pm 5)
313	87	15	19	24	12
	97	6	29	24	5
	95	10	12	33	4
	(93 \pm 5)	(10 \pm 5)	(20 \pm 9)	(27 \pm 5)	(7 \pm 4)
625	103	8	17	24	9
	98	9	24	21	12
	107	9	26	20	4
	(103 \pm 5)	(9 \pm 1)	(22 \pm 5)	(22 \pm 2)	(8 \pm 4)
1250	93	8	15	20	9
	100	4	15	18	6
	95	8	23	31	2
	(96 \pm 4)	(7 \pm 2)	(18 \pm 5)	(23 \pm 7)	(6 \pm 4)
2500 #	104	7	11	25	5
	77	5	24	15	3
	83	7	21	19	5
	(88 \pm 14)	(6 \pm 1)	(19 \pm 7)	(20 \pm 5)	(4 \pm 1)
5000 #	113	5	21	14	8
	94	9	20	14	7
	87	6	20	34	3
	(98 \pm 13)	(7 \pm 2)	(20 \pm 1)	(21 \pm 12)	(6 \pm 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	769	445	983	493	777
コロニー数	786	436	998	566	371
/プレート	815	482	993	537	799
	(790 \pm 23)	(454 \pm 24)	(991 \pm 8)	(532 \pm 37)	(649 \pm 241)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン