

ビスフェノールA (BPA) がイエバエの性比に及ぼす影響

泉 七江, 佐二木順子

Effects of bisphenol A (BPA) on sex ratio of a housefly

Nanae IZUMI and Junko SAJIKI

Summary

The effects of bisphenol A (BPA) on life-cycle characteristics of *Musca domestica* were examined. Opposite results ($P < 0.001$) were observed in sex ratio between control and BPA-treated (female > male for control and male > female for BPA treated). There was no difference in percentage of pupation between the groups. There was a significant negative correlation ($P < 0.01$) between descendant of generations and percentage of emergence of a housefly. The results suggested that BPA could bring disorders in an endocrine function of a housefly.

I はじめに

近年、ダイオキシンやPCBなど環境中に存在する化学物質の内分泌攪乱作用が問題視されるようになってきている¹⁾。内分泌攪乱作用は生殖系、免疫系、脳神経系へと多岐にわたるが、主たる作用は生殖異常を引き起こすことである²⁾。またこの作用は、長期にわたる低濃度の暴露で発現するという点で、これまでの発ガン作用や変異原性などと異なる。そのため、作用の効果判定には多くの困難が伴う。とりわけ、多世代にわたる内分泌攪乱作用の効果判定に寿命の長い脊椎動物を使用することには限界がある。その点、無脊椎動物は寿命が短いため、多世代にわたる毒物の影響を調べる系としては適している。

著者らは、飼育が比較的簡単であり、雌雄差の判定が容易、確立された系がある等の理由からイエバエが多世代にわたる化学物質の生殖作用への影響を調べる指標となりうるのではと考え、代表的な内分泌攪乱物質の一つであり、環境中への溶出が数多く報告されているビスフェノールA (BPA) の効果判定を試みた。

BPAは、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として生産されている(平成6年時点で26万トン)。ポリカーボネート樹脂は硬度、透明性が高いため乳児用ほ乳瓶、食器、OA機器等に、熱硬化性であるエポキシ樹脂はスチール缶やアルミ缶の内面塗装や歯科用材料に使用されている。BPAは、また塩ビ製プラスチックの添加剤としても広汎に用いられている。

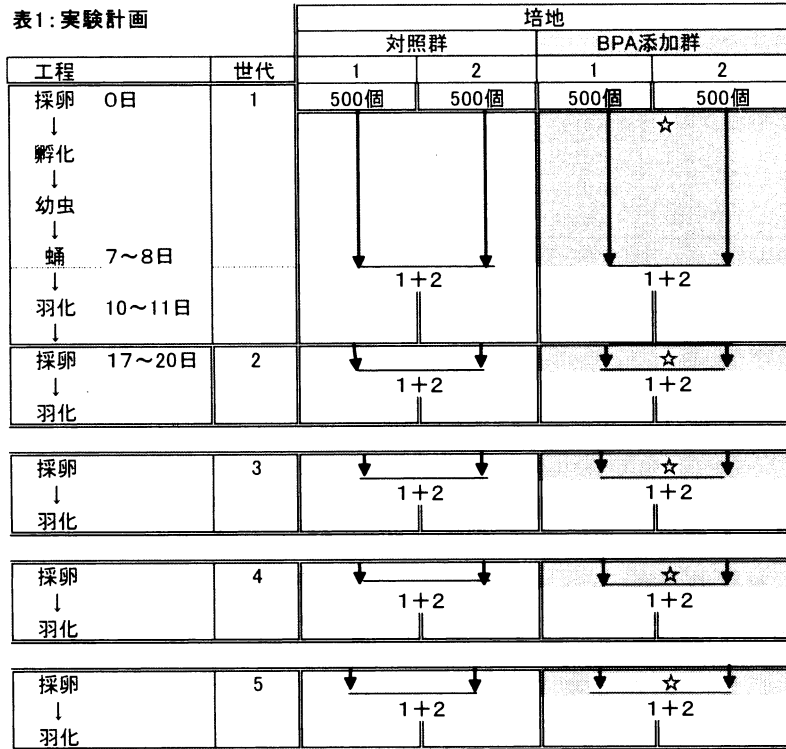
無脊椎動物を用いたBPAの内分泌攪乱作用についてはこれまで2、3の報告³⁾がなされている。線虫を用いた実験では、BPAやBPAの代謝産物が致死や繁殖に影響を与え⁴⁾、ユスリカで行った実験では、羽化の時間や脱皮の遅延が認められている⁵⁾。

本実験では、イエバエのライフサイクルにBPAを作用させ、卵の蛹化率、蛹の大きさ(重量)、羽化率、性比への影響について調べた。

II 方法

1. 試験動物：実験に使用したイエバエ *Musca domestica* はWHO標準SRS(国立感染症研究所より分与)を使用した。飼育室の温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は平均約50%、光は12h:12h(L:D)を保持した。飲み水は上水を15分沸騰放置した後、三角コルベに挿入したキムワイブを通して与えた。成虫の飼料はブドウ糖とスキムミルク粉末を1:1の割合でシャーレに入れて与えた。
2. 飼育培地：飼育培地の組成、作成方法は感染研の方法に準じた⁶⁾。培地(採卵、孵化培地、幼虫飼育培地)の材料は、フスマ(精製フスマ:日清製粉㈱)、昆虫飼料(実験動物飼料・昆虫用:オリエンタル酵母工業㈱をミキサーで粉末にしたもの)、ドライイーストを使用した。作成方法はドライイースト(0.05%)を溶解した水75mLと昆虫飼料20gをガラスポット(13.5 x 10.0 x 4.0cm, 約1L)で均一になるように攪拌し、その後フスマ45gを加え更に攪拌した。BPA添加群は、BPA原液(27ppm:高速液体クロマトグラフィーによる測定値)を最終濃度1000 $\mu\text{g/L}$ になるように水で希釈し添加した。
3. 実験方法：実験計画は表1に示した手順で行った。羽化7~10日のイエバエに採卵培地へ約3時間産卵させた。対照群、BPA添加群各2組ずつを設け、500個の卵を孵化培地(100mLピーカー入り)に入れた。採卵3~4日後に孵化培地から幼虫飼育培地に移し、採卵7~8日後に蛹の重量、数量を計測した。蛹を羽化ケージに入れ、羽化7~10日後に次代を採卵した。採卵後、成虫の性比並びに羽化していない蛹数を確認した。採卵から次世代までを一世代とし、五世代の継代を行った。3回の繰り返し実験から得られた実験数値について統計処理を行った。
4. 数値の解析：成虫の性比(雌/雄+雌)と蛹化率(蛹数/卵数)に関して、 χ^2 検定と3元配置分散分析法、蛹の重量(蛹総重量/蛹数)に関してはt検定と3元配置分散分析法、羽化率(羽化数/蛹数)に関しては、回帰分析を行った。

表1: 実験計画



* 1世代から5世代までを3回くりかえす。 ☆ : BPA添加時期

III 結果

1. 性比について

各世代での性比については、雌の発生率として3回繰り返しの平均値を表2に示した。対照群の性比は雄より雌の数が多いのに比較し、BPA添加群は雌の発生率が減少した。BPA添加群の雌の発生率は、各世代において有意差が認められなかったが、全世代を集計した場合、対照群との間に0.1%水準で有意差が認められた。雌発生率について3元配置分散分析(実験群間, 世代間, 繰り返し間)を行った結果、実験群間と世代間に1%の危険率で有意差が確認されたが、他の因子間並びに各因子間の交互作用は見られなかった。

表2 雌発生率

世代	対照群		BPA群	
	♀/総数	比率	♀/総数	比率
1	249/478	0.521	254/547	0.464
2	673/1276	0.527	446/909	0.491
2	465/869	0.539	373/782	0.477
4	462/879	0.526	471/967	0.487
5	399/769	0.519	324/771	0.42
全世代	2248/4271	0.526	1868/3976	0.47**

対照群とBPA群との差**(p<0.001)

2. 羽化率について

各世代での羽化率について3回の繰り返し実験をまとめ、表3に示した。BPA添加群の羽化率は5世代と全世代に1%の危険率で有意な差が認められた。BPA添加群の1~4世代の羽化率には有意差は見られなかったが、世代を重ねることにより減少する傾向が見られた。各世代の羽化率を回帰分析した結果(図1)、

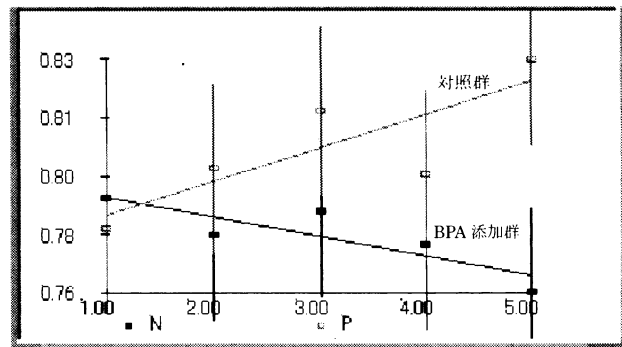
対照群 ($y=0.068x+0.778$) とBPA対照群($y=-0.0033x+0.790$) 間の回帰係数に1%以下の危険率で有意差が認められた。

表3 羽化率

世代	対照群		BPA群	
	羽化数/蛹総数	比率	羽化数/蛹総数	比率
1	505/649	0.778	546/693	0.788
2	1276/1599	0.798	909/1171	0.778
2	869/1063	0.817	782/998	0.788
4	879/1100	0.799	967/1250	0.774
5	764/913	0.837	768/1015	0.757**
全世代	4293/5324	0.806	3972/5127	0.775**

対照群とBPA群との差**(p<0.01)

図1 羽化率の変化



対照群とBPA添加群間差あり(有意差水準1%)
2直線間に平行性否定(有意差水準5%)

3. 蛹の重量について

全世代平均の蛹重量は、対照群0.0195g、BPA添加群0.0196gであった(表4)。各世代の数値もほぼ全世代平均の数値と同じであった。3元配置分散分析の結果、実験群間、世代間、繰り返し実験間に有意な差は認められなかった。

表4：蛹重量

世代	対照群(g)	BPA添加群(g)
1	0.019	0.0188
2	0.0195	0.0193
3	0.02	0.0198
4	0.0192	0.0199
5	0.0202	0.0196
全世代	0.0195	0.0196

4. 蛹化率について

各世代における蛹化率の結果を(表5)に示した。全世代の数値を比較すると、対照群35.6%, BPA添加群35.3%で有意差は認められなかった。しかし、世代間でみると、1, 2, 4, 5世代に1%の危険率で有意差が見られた。2世代目の有意差は逆転していた。分散分析の結果、実験群間、世代間、繰り返し実験間において有意な差は認められなかった。

表5：蛹化率

世代	対照群(%)	BPA添加群(%)
1	23	25.9**
2	53	38.8**
3	35.2	33.1
4	36.4	44.7**
5	30.3	33.7**
全世代	35.6	35.3

対照群とBPA添加群の差**(p<0.01)

IV 考察

WHOでは、内分泌攪乱物質とは、内分泌系の機能を変質させ、それによって無処置の個体やその子孫あるいは集団に有害な影響を引き起こす外因性の化学物質またはその混合物と定義している¹⁾。このような作用は、化学物質の構造がホルモンと類似しているため、ホルモン受容体と擬似結合することにより生じ、低濃度で長期間の暴露により精子数の低下、野生生物の生殖機能障害など生物は重篤な影響を受けるものと考えられている。一般に内分泌攪乱物質のヒトへの影響を調べるためには、なるべくヒトに近い動物を用いるのが常道であるが、寿命の長い動物を用いて多世代に渡る影響を予知することは不可能である。様々な生物がホルモン受容体を有しており、種が異なっても、同じように内分泌攪乱物質の影響を受けるものと考えられる。このような理由から内分泌攪乱物質の検定に寿命の短い無脊椎動物を使用する意義がある。

これまで無脊椎動物を用いたBPAのホルモン作用への影響をみた実験例としては、線虫²⁾、ユスリカ³⁾についての報告がある。線虫を用いた実験では、BPA並びにBPAの代謝産物である4-メチル-2,1-ビス(p-ヒドロキシフェニール)ベンゾ-1エンを使用した生態影響の評価を試みている。その結果、114.1mg/L以上のBPAで体長の変化、受精卵を有する割合及び生涯産仔数への影響が認められたが、この濃度は我々が使用した濃度に比較し約110倍高濃度である。ユスリカを使用した実験では、BPAと17 α -ethinylestradiolを作用させ、発育と繁殖に及ぼす影響⁴⁾及び幼虫の脱皮並びに脱皮構造に及ぼす影響⁵⁾が報告されている。BPA(0.78-750 μ g/L)により、雄、雌の2代目の羽化にのみ5%の危

険率で遅延が見られたが、他の現象(成虫の数、性比、卵産能力)に変化は観察されていない。BPAの濃度をさらに高めると(1000 μ g/L)、ユスリカの脱皮の遅延、幼虫の湿重量に有意な減少が認められている。

今回のBPA(1000 μ g/L)をイエバエに用いた著者らの実験では、BPA添加群と対照群との性比に各世代では有意差が認められなかったが、全世代の数をまとめると両群に0.1%の有意差が認められた。この結果は、各世代に使用したハエの数が少なかったため、各世代での有意差に反映されなかったことを示すものである。全世代をまとめた場合、両群間に危険率で有意差が認められた事実、BPAが性比に影響を与えることを示唆するものであった。イエバエでは雌の雄化が生じたが、このような性の逆転現象は、他の種でも認められている。福堀⁶⁾は、腔腸動物であるヒドラにBPA(1000-4000 μ g/L)を作用させ生殖への影響を調べた結果、精巣を発現する個体の割合及び一個体に発現する精巣数の減少等雄化の抑制を報告している。中村⁷⁾は、1000 μ g/LのBPAで、遺伝的に産み分けられた全雄のアマゴに雌雄同体個体がみられたことを報告している。性の逆転は、BPA以外の内分泌攪乱物質でも認められている。堀口⁸⁾は有機スズ化合物であるトリブチルスズとトリフェニールスズがイボニシの雌を雄化するため、船体の塗料に用いられている有機スズの使用は、軟体動物の個体減少に繋がるという危険性を述べている。

今回、羽化率は、BPAの添加により世代を重ねることにより有意に減少した(P<0.01)。5代目では、BPA添加群の羽化率は対照群より8%低かった。Sohoni, P.⁹⁾は、魚類(ヒメハヤ)を使用した実験で、1世代の孵化率が640 μ g/L以上のBPA濃度で減少することを報告している。魚類(脊椎動物)とイエバエ(無脊椎動物)の種に相違があるものの、彼らの使用量は我々の用いた量と類似しており、BPA(640-1000 μ g/L)で、羽化または孵化に影響を及ぼすものと考えられる。

蛹化率については、1代ではBPA添加群に蛹化率の上昇(p<0.01)がみられたにもかかわらず、2代で数値に逆転現象が見られた。しかし、4, 5代では、1代目と同様BPA群に値の上昇が認められた。2代目の逆転の原因は不明であるが、不測の事故¹⁰⁾が2代目で起こり、3代で修整された可能性が考えられる。今後更なる課題として検証の余地がある。

今回用いたBPAの量は、自然界で検出される濃度に比べると高濃度である。しかし内分泌攪乱物質は特異な用量作用相関を示す可能性が報告されている。Vom Saal¹¹⁾は、合成ホルモン剤の一つであるDESを妊娠マウスに投与し、出産された雄の成熟時に前立腺の重量を測定した。前立腺肥大の反応に至適濃度があり、その濃度より高用量や低用量でむしろ前立腺重量に低下傾向を示すことを報告している。BPAの場合でも、今回影響が認められなかった因子に、より低い濃度で変化が認められる可能性が考えられ、今後、実験を続け確認する必要がある。

V まとめ

今回実験に使用したBPA1000 μ g/Lをイエバエに作用させた結果、以下の事実が明らかになった。

1. 性比に1%以下の危険率で有意な差(雄>雌)が認められた。

即ち、BPA添加群の雄の数が有意に増加した。

2. BPA添加群の羽化率は世代と共に減少する傾向が見られた。以上の結果は、BPAがイエバエの生殖作用に影響を及ぼす可能性を示唆するものであった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、統計解析のご指導を賜りました元 国立感染症研究所 生物統計室長 石田説而博士並びにイエバエを分与して下さった 国立感染症研究所 殺虫殺そ剤室長 富田隆史博士に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 佐二木順子：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）と生殖機能異常一問題点と発症メカニズムー：千葉県医師会雑誌, 51(1), 8-15, (1999)
- 2) 佐二木順子：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）ー今、我々を取り巻く環境で何が起きているのかー：千葉衛研報告, 23, 1-10, (1999)
- 3) 石橋弘志, 松村尚美, 平野将司, 中本貴士, 高良真也, 吉原新一, 有蘭孝司：ビスフェノールA代謝物1-メチル-2,1-ビス(p-ヒドロキシフェニル)ベンチ-1-エンの生態影響評価；フォーラム2003；衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨 p101 (2003)
- 4) Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K.:Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius*;Aquat Toxicol. 55 (1-2), 113-124, (2001)
- 5) Watts,M.M., Pascoe, D.,Carroll, K.:Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*;Exotoxicol Environ Saf. 51(2), 207-215 (2003)
- 6) 湯嶋 健, 釜野静也, 玉木佳男編：昆虫の飼育法：349-353；東京 (1991)
- 7) 井上 達：3. 環境ホルモンとは何か；<http://www.fsinet.or.jp/~K-center/hormone/chap01/inoue.pdf>
- 8) 福堀順敏, 木村 博：ビスフェノールA (BPA) のヒドラ雄性化への影響；http://www.env.go.jp/chemi/end/2002_report/data/pd-5.html,PD-96
- 9) 中村将, 比嘉幹彦, 名古屋博之, 平井俊明：ノニルフェノール, エストロジェンの遺伝的雄のアマゴの性分化に及ぼす影響；http://www.env.go.jp/chemi/end/2002_report/data/pd-5.html,PC-36
- 10) Horiguti,T., Shiraiishi,H., Shimizu,M., Morita,M.:Effect of Triphenyltin chloride and five other organotin compounds the development of imposex in the rock shell, *Thais Clavigera*:Enviro. Pollut., 95(1), (1997)
- 11) Sohoni,P., Tyler,G.R., Hurd,K., Cauter,J., Hetheridge,M., Williams,T., Woods,C., Evans,M., Toy,R., Gargas,M., Sumpter,J.P.: Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead ninnow (*Pimephales promelas*);Environ Sci Technol. 35(4), 2917-2925 (2001)
- 12) Vom Saal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P.,Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjama, V.K., Pamigiani, S., Welshon, W.V:Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses; Proc Natl Acad Sci USA 91 2056-2061 (1997)