

7世代に及ぶビスフェノール A (BPA) 暴露が引き起こす イエバエの発育異常

茂野 誠一、泉 七江、柳堀 朗子、佐二木順子

Developmental abnormalities of the housefly by bisphenol A exposure for seven generations

Seiichi Shigeno, Nanae Izumi, Ryoko Yanagibori and Junko Sajiki

Summary

The effect of bisphenol A (BPA) on the lifecycle endpoint of the housefly, *Musca domestica*, was examined by adding it to growth medium at the concentration of 100 μ g/kg. BPA exposure was repeated at egg and larval stages for seven generations. Results of the BPA exposed group compared with the control are summarized as follows;

1. Numbers of both third instar larvae and pupae decreased significantly in all generations, except the first and the fourth generations.
2. Emergence success decreased significantly and was delayed by 24h.
3. Although the difference in the ratio of female to male flies in the BPA and control groups was not statistically significant, negative correlation ($p=0.02$) was detected between the number of generations and percentages of female flies. This suggests that BPA exposure for many generations could affect the sex ratio of descendants.
4. According to statistical analysis, both pupal weight and length increased significantly ($p<0.01$). Pupal weight appeared to decrease as generation number increased.

These results support our previous data that BPA could bring disorders in both the development and growth of houseflies.

キーワード：ビスフェノール A、イエバエ、発育、7世代

Key Word: bisphenol A, housefly, development, growth, seven generations

はじめに

ビスフェノール A (BPA) は、エストラジオールの 1/10,000 と弱いながらも細胞や動物でエストロゲン作用が確認され、安全性に疑問が投げかけられている物質である。本物質は、ポリカーボネート製の硬質プラスチック食器、エポキシ樹脂、歯科材料、不燃繊維などの原材料として現在でも広範囲で使用されている¹⁾。今日でも、食品缶詰のコーティング剤からかなりの濃度の BPA が食品中に溶出していることが明らかで、ヒトを含む動物への影響が懸念されている²⁾。

本物質をはじめとするいわゆる内分泌攪乱化学物質は、その影響が多世代にわたり現れるため、これまでの毒理学に用いられてきた 2-3 世代の慢性毒性試験からのリスク評価では不十分である。また、環境中に存在するこれら化学物質の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、多世代にわたる影響を調べる系としては適しており、すでに様々な化学物質について無脊椎動物を使用した実験系の確立に関する実験が試みられている³⁻⁴⁾。なかでも、水生の無脊椎動物を用いたバイオアッセイ系に関する研究は多く、様々な動物種について報告されている⁵⁻⁶⁾。しかし、陸上の無脊椎動物についての研究は数少ない。

著者らは、飼育、取り扱い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を実験動物に選定し、多世代にわたる BPA の生殖

作用への影響を調べてきた。イエバエのライフサイクルにホルモン攪乱作用が疑われているビスフェノール A (BPA) を卵、および幼虫期の 2 回、1-1000ng/ml 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、性比の変化など一定の結果を得、すでに報告した⁷⁻⁹⁾。今回は、BPA のイエバエに対する影響を再確認し、多世代にわたる新たな環境ホルモンの評価法を確立する目的で、これまで変化が観察された最低濃度 (100ng/g) の BPA をイエバエの 7 世代にわたり曝露させた。また、本研究ではこれまでの試験で観察できなかった 3 令幼虫への影響も調べた。

実験材料

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) であった。飼育室の温度は 25 ± 1 °C、湿度は平均約 50%、光は 12 L : 12 D (明:暗) を保持した。飲み水は上水を 15 分沸騰放置した後、三角コルベンに挿入したキムワイプを通して与えた。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、作成方法は以前報告したとおりである⁷⁾。フスマ {精製フスマ: 日清製粉(株)}、昆虫飼料 {実験動物飼料・昆虫用: オリエンタル酵母工業(株)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。なお、今回は、発生するカビを防止するため、フスマは

オートクレーブ処理の上使用した。作成方法はドライイーストを0.05%に溶解した水75mLと昆虫飼料20gをガラススポット（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（和光純薬工業 >95%）原液（27000 μ g/L 0.5%メタノール；高速液体クロマトグラフィーによる測定値）を最終濃度100ならびに1000 μ g/Lになるように水で希釈し添加した。

実験方法

1. イエバエのBPA曝露実験

羽化7—10日のイエバエをBPA無添加の採卵培地へ約3時間産卵させた。対照群ならびに100 μ g/L BPA添加群各2組ずつの孵化培地（100mLビーカー入り）を設け、250個の卵をそれぞれの培地に入れた。採卵3—4日後に3令幼虫を一匹ずつ摘み上げて数を調べ、新たに作成した幼虫培地に移し替えた。採卵7日、10日後、蛹の数、重量、長径を計測し、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述べ18日を一世代とし、7世代の継代を行った。

2. 数値の解析

統計処理はspss（ver12）を用いた。成虫の性比（雌/雄+雌）に関しては χ^2 検定（Fisher直説法）、蛹化率（蛹数/卵数）に関してはGLM法、蛹化率（蛹数/幼虫数）に関しては χ^2 検定（Fisher直説法）、と二元配置分散分析、蛹の重量（蛹総重量/蛹数）、羽化率（羽化数/蛹数）に関しては2元配置分散分析、世代と雌数の関係については、相関分析を行った。

結果

3令幼虫生存率、雌発生率、蛹化率、羽化率に関する結果はTable 1に、統計処理の結果はTable 2に、蛹の重量、長径についての結果および統計処理の結果をTables 3, 4に示した。

Table 1. Effects of BPA on the growth and development of the housefly

Treatments	Generations	Groups	Number of eggs	Numbers of larvae	Ratios of hatching		Numbers of pupae		Numbers of total pupae		Ratios of pupation		Numbers of emergence	Ratios of emergence		Ratios of female
					per egg	Day 7	Day 10				per egg	per larva		per egg	per pupa	
Control	1	A	250	106	0.424	99	7	106	0.424	1.000			153	0.306	0.640	0.490
		B	250	135	0.540	126	7	133	0.532	0.985						
		Total	500	241	0.482	225	14	239	0.478	0.992						
	2	A	250	113	0.452	98	6	104	0.416	0.920			100	0.200	0.481	0.580
		B	250	113	0.452	99	5	104	0.416	0.920						
		Total	500	226	0.452	197	11	208	0.416	0.920						
	3	A	250	127	0.508	122	1	123	0.492	0.969			146	0.292	0.573	0.452
		B	250	135	0.552	128	4	132	0.528	0.957						
		Total	500	265	0.530	250	5	255	0.510	0.962						
	4	A	250	74	0.296	62	3	65	0.260	0.878			95	0.190	0.597	0.432
		B	250	102	0.408	93	1	94	0.376	0.922						
		Total	500	176	0.352	155	4	159	0.318	0.903						
	5	A	250	92	0.368	76	9	85	0.340	0.924			122	0.244	0.639	0.426
		B	250	119	0.476	91	15	106	0.424	0.891						
		Total	500	211	0.422	167	24	191	0.382	0.905						
	6	A	250	123	0.492	104	4	108	0.432	0.878			135	0.270	0.699	0.474
		B	250	109	0.436	79	6	85	0.340	0.780						
		Total	500	232	0.464	183	10	193	0.386	0.832						
	7	A	250	118	0.472	101	5	106	0.424	0.898			127	0.254	0.658	0.452
		B	250	92	0.368	80	7	87	0.348	0.946						
		Total	500	210	0.420	181	12	193	0.386	0.919						
BPA	1	A	250	130	0.520	110	10	120	0.480	0.923			125	0.250	0.519	0.480
		B	250	132	0.528	105	16	121	0.484	0.917						
		Total	500	262	0.524	215	26	241	0.482	0.920						
	2	A	250	63	0.252	46	8	54	0.216	0.857			82	0.164	0.726	0.537
		B	250	66	0.264	34	25	59	0.236	0.894						
		Total	500	129	0.258	80	33	113	0.226	0.876						
	3	A	250	110	0.440	81	22	103	0.412	0.936			147	0.294	0.746	0.429
		B	250	111	0.444	61	33	94	0.376	0.847						
		Total	500	221	0.442	142	55	197	0.394	0.891						
	4	A	250	93	0.372	48	41	89	0.356	0.957			93	0.186	0.571	0.505
		B	250	84	0.336	49	25	74	0.296	0.881						
		Total	500	177	0.354	97	66	163	0.326	0.921						
	5	A	250	81	0.324	41	22	63	0.252	0.778			90	0.180	0.552	0.378
		B	250	114	0.456	76	24	100	0.400	0.877						
		Total	500	195	0.390	117	46	163	0.326	0.836						
	6	A	250	70	0.280	64	10	74	0.296	1.057			64	0.128	0.448	0.422
		B	250	95	0.380	50	19	69	0.276	0.726						
		Total	500	165	0.330	114	29	143	0.286	0.867						
	7	A	250	76	0.304	43	8	51	0.204	0.671			68	0.136	0.553	0.441
		B	250	97	0.388	47	25	72	0.288	0.742						
		Total	500	173	0.346	90	33	123	0.246	0.711						

Table 2 Results of statistical analysis for data in Table1

	Numbers of larvae	Numbers of pupae		Numbers of total pupae	Numbers of emergence
		Day 7	Day 10		
A(treatment)	**	**	**	**	*
B(generation)	**	**		**	
Interaction (AxB)				*	

	Ratios of hatching		Ratios of pupation		Ratios of emergence		Ratios of female
	per egg	per egg	per larva	per egg	per pupa		
A(treatment)	**	*	**	*			
B(generation)	**		**				*

** p<0.01

* p<0.05

Table 3 Pupal weights at Days 7 and 10 and the statistical analysis

Generation	Pupal weight (g/pupa) ¹⁾			
	Day 7		Day 10	
	Control	BPA	Control	BPA
1	0.0181±0.0010	0.0214±0.0013	0.0124±0.0018	0.0177±0.0001
2	0.0188±0.0003	0.0219±0.0014	0.0133±0.0017	0.0196±0.0002
3	0.0180±0.0004	0.0223±0.0001	0.0109±0.0039	0.0190±0.0001
4	0.0179±0.0008	0.0202±0.0006	0.0147±0.0019	0.0174±0.0012
5	0.0196±0.0005	0.0200±0.0002	0.0146±0.0022	0.0134±0.0015
6	0.0192±0.0002	0.0186±0.0003	0.0127±0.0013	0.0157±0.0003
7	0.0176±0.0006	0.0187±0.0013	0.0138±0.0011	0.0159±0.0012
Total	0.0184±0.0008	0.0194±0.0016	0.0132±0.0027	0.0170±0.0022

1) Mean ± SD of duplicate

Tow-way analysis of variance

	Day 7	Day 10
A(treatment)	**	**
B(generation)	*	
Interaction (AxB)	**	**

** p<0.01

* p<0.05

Table 4 Pupal length at Day 7 and 10, and the statistical analysis

Generation	Pupal length (mm/pupa) ¹⁾			
	Day 7		Day 10	
	Control	BPA	Control	BPA
1	5.43±0.12	5.64±0.11	4.95±0.23	5.75±0.08
2	5.88±0.02	6.12±0.06	5.74±0.30	5.99±0.15
3	5.73±0.01	6.09±0.14	5.02±0.72	5.98±0.07
4	5.72±0.23	6.05±0.00	5.17±0.07	5.73±0.09
5	5.81±0.05	5.98±0.04	5.52±0.11	5.63±0.23
6	5.91±0.14	6.06±0.02	5.10±0.16	6.13±0.25
7	5.67±0.13	5.91±0.21	5.63±0.09	5.84±0.18
total	5.72±0.17	5.98±0.18	5.30±0.39	5.86±0.21

1) Mean ± SD of duplicate

Tow-way analysis of variance

	Day 7 (length)	Day 10 (length)
A(treatment)	**	**
B(generation)	**	
Interaction (AxB)		

** p<0.01

* p<0.05

① 3令幼虫生存率について

BPA添加群の3令幼虫数は1, 4世代を除くすべての世代で対照群に比べ減少した (Table 1)。

② 雌発生率について

各世代での性比については、雌の発生率として総ハエ数に対する雌ハエの比をTable 1に示した。4世代を除くと、BPA添加群は対照群に比べ雌の発生率が少なかったが、両群間の差は有意ではなかった。しかし、BPA添加群で世代と雌数の間に負の相関が認められた (P =

0.020)。

③ 蛹の重量について

BPA添加群の全世代の平均蛹重量は、7日目では対照群0.0184 g、BPA添加群0.0194 g、10日目では対照群0.0132 g、BPA添加群0.0170 gであった (Table 3)。BPA添加群では、世代を重ねるほど蛹重量は減少する傾向にあった。二元配置分散分析の結果、7日目では実験群間、世代間にそれぞれ1%、5%の危険率で有意差が、両要因間に1%の交互作用が、10日目では実験群間に1%の危険率

で有意差が、両要因間に1%の交互作用が認められた。

④ 蛹の長径について

BPA添加群の蛹の全世代の平均長径は7日目、対照群5.72mm、BPA添加群5.98mm、10日目、対照群5.30mm、BPA添加群5.86mmであった（Table 4）。分散分析の結果、7日目の実験群間、世代間に1%の危険率、10日目に実験群間に1%の危険率で有意差が認められた。

⑤ 蛹化率

BPA添加群の総蛹数は1、4世代を除くすべての世代で対照群に比べ減少した。この減少は実験群間、世代間ともに1%の危険率で有意であった。なお、両要因間には5%の危険率で交互作用が認められた。全世代で7日目の蛹数はBPA添加群が対照群に比べ少なかったが、逆に10日目の蛹数は多かった（Table 1）。分散分析の結果、7日目の蛹数の差は実験群間、世代間ともに1%の危険率で、10日目の蛹数は実験群間に1%の危険率で有意であった（Table 2）。

⑥ 羽化率

全世代でBPA群の羽化数は対照群に比べ少なく、差は5%の危険率で有意であった。蛹に対する羽化率についてのGLM分析による有意差は認められなかった（Table 2）が、5世代以降の値はBPA群のほうが対照群に比べ低かった。BPA群では世代を重ねるごとに羽化数が減少する傾向が見られたが、相関は認められなかった（ $P=0.097$ ）。BPA添加群で、羽化開始時間に24時間の遅延が観察された。

考察

欧州食品安全機構（EFSA）は、2007年1月29日にBPAの食品由来暴露に関する見解を発表し、ヒトの耐容一日摂取量（TDI）を0.05mg/kg body weight/dayと設定した。この値は、2002年に暫定的に設定されたTDI値を5倍上回り、BPAがより安全であることを示すものと受け入れられている¹⁰。一方、vom Saalら（2005）¹¹はこれまで出版された多くの研究報告をまとめ、本物質の低濃度影響について新たなリスク評価基準を設ける必要性を説き、関澤ら¹²は、過去5年間のBPAの低用量影響に関する既存の報告をまとめ、BPAの影響がエストロゲン作用では説明できない甲状腺ホルモンや免疫系、神経系の機能にまで及ぶことを述べている。

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亘る影響を予測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ている。水生無脊椎動物の巻貝でエストロゲンやアンドロゲンのレセプターの存在が示唆されている。なお、昆虫などが持つ、エクダイソンなどのホルモンは殺虫剤などの化学物質に影響を受けやすいことが明らかである¹³⁻¹⁵。このような理由から低用量で多世代に亘って影響が現れる内分泌攪乱物質の検定

に、安価で、取り扱いが簡単かつ寿命の短い無脊椎動物を使用し、内分泌攪乱作用の有無を確認する意義がある。その点、イエバエは系が確立しており、遺伝子学的な研究も多く、薬剤抵抗性に関する実験に汎用されている^{16,17}。

イエバエを用いてBPAの多世代にわたる影響を調べた我々のこれまでの研究^{8,9}で、100ng/gの7世代、ならびに1000ng/gの5世代にわたるBPA暴露がハエの雌発生率の低下を引き起こした（0.1%の危険率で有意）。今回の100ng/gの7世代にわたるBPA暴露で有意な雌発生率の低下は認められなかったが、BPA添加群で世代と雌数の間に負の相関が認められた（ $P=0.020$ ）。この結果は、世代が進むとBPAの暴露により雄化が生じる可能性を示すものである。今回、雌発生率の低下が有意でなかった理由としては、今回1群に使用した卵の数（250個）が前回の半数であったため統計的に差が認められなかったことが考えられる。

今回の実験でも、前回の実験結果と同様、孵化数に有意な減少が認められた。この減少は、初代では認められないが、代を重ねる毎に大きくなった。また、BPAは7日目の蛹化率を低下させ、逆に10日目の蛹化率を高めた。BPA群の幼虫に対する蛹の比は対照群に比べ有意に低かった。これらの結果は、BPAが孵化、蛹化に影響を与えるというこれまでの結果を支持し、ハエが7代にわたりBPAの暴露を受けると、影響が増すことを示すものであった。一方、卵数に対する羽化率には有意な低下が観察されたが、蛹数に対する比率には有意差が認められなかった。この結果は、BPAが蛹化までの生育過程に影響を及ぼすが、羽化現象には影響を与えないことを示すものと考えられた。しかし、BPAによる羽化開始時間の遅れが観察された。これは我々のこれまでの結果^{8,9}と同様であり、ユスリカを用いた実験でも羽化、脱皮の遅延という現象が報告されている^{13,18}。以上の結果は、BPAが孵化から羽化に至るまで、イエバエの生態に何らかの影響を及ぼすことを示すものであった。

Muらは、BPA¹⁹や防黴剤のfenarimol²⁰を曝露されたミジンコの発育遅延時に幼若ホルモンの1種（methyl farnesoate）が関与していることを見出しこのような遅延の作用機作として、BPA等の化学物質がこれら昆虫ホルモンの脱皮制御過程に影響を与えたためと考えている。とくに、幼若ホルモンは多くの無脊椎動物で脱皮を遅らせることが明らかである。Dinanらはショウジョウバエの細胞の脱皮ホルモン（エクダイソン）レセプターをBPAが脱皮ホルモンと競合することを報告している²¹。イエバエの生育に及ぼすBPAの作用機序については明らかでないが、BPA暴露イエバエの昆虫ホルモン濃度に変化が生じており^{9,22}、BPAの昆虫ホルモン攪乱作用が関与している可能性が高い。

蛹の重量に関して、前回の実験では1000μg/LBPA暴露で重量に明らかな低下が100μg/LBPA曝露では増加が観察され、前者の重量低下は高濃度化学物質による毒

性であり、後者での重量増加はBPAの内分泌攪乱作用による影響である可能性を報告した。今回の実験でも蛹重量、蛹の長径ともに対照群に比べBPA暴露群の値が大きく、前回の結果を支持した。

低濃度のBPAは水に溶けやすいため、水生無脊椎動物（ミジンコ、ユスリカ、巻貝、ムラサキガイなど）を用いたBPAの影響試験が多くなされている。10%の巻貝に影響を及ぼすBPA濃度（EC₁₀）を調べた最近の研究では、産卵数14.8ng/L、卵のクラッチ形成18ng/Lであり、これは環境汚染濃度以下の低濃度であることが報告されている²³。今回の実験では培地中のBPAの測定は行っていないが、既に報告したとおり培地中に添加した100 µg/LのBPAが経時的に減少し、1時間後には86.8 µg/L、4時間後には31.8 µg/Lとなり、24時間後には全く検出されることが判明している⁹⁾。この結果からBPAの半減期を求めると、4.1時間となる。上述の巻貝を用いた実験で、5 µg/L BPA添加培地中でのBPA半減率は3時間である²³。このことは、水性培地と固形培地中のBPAの半減期はほぼ等しいものと考えられる。今回の実験ではBPAの添加と同時に卵を添加し、4日目に幼虫を新たに作成したBPA添加培地に移し替えたため、卵も幼虫も100 µg/LのBPA暴露は一時的なものであり、継続的に高濃度のBPAに暴露されていないことが推測される。BPAの培地への添加量は動物への暴露量ではない。生物を用いたBPAの暴露実験を行いBPAのリスクを評価する際は、動物への真の暴露量を考慮した上で、結果を判定する必要がある。

まとめ

イエバエの卵ならびに幼虫期に各1回飼育培地に100 µg/Lを添加することによりBPAに暴露させた結果、以下の事実が明らかになった。

1. 3令幼虫数ならびに総蛹数は、対照群に比べBPA添加群の1、4世代を除くすべての世代で有意なレベルで減少した。
2. 羽化数は、全世代で対照群に比べBPA群では有意に少なかった（ $p<0.05$ ）。BPA添加群で、羽化開始時間に24時間の遅延が観察された。
3. 雌の発生率は、対照群に比べBPA添加群で低かったが、両群間の差は有意ではなかった。しかし、BPA添加群で世代と雌数の間に負の相関が認められ（ $P=0.020$ ）、世代を重ねるとBPAによる影響が強く現れることが示唆された。
4. BPA添加群の全世代平均の蛹重量は、対照群に比べBPA添加群で有意な増加が認められた（ $p<0.01$ ）。しかし、BPA添加群では、世代を重ねるほど蛹重量は減少する傾向にあった。蛹の長径平均値についても、対照群に比べBPA添加群は有意なレベルで高かった（ $p<0.01$ ）。
5. 今回の実験結果は、既に報告したイエバエのBPA暴露実験結果を裏付けており、BPAがイエバエの生育ならびに性比に影響を及ぼす可能性を示唆するものであった。

参考文献

1. Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286 (1993).
2. Sajiki J., Miyamoto F., Fukata H., Mori C., Yonekubo J., Hayakawa K., Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food Addit. Contam.*, 24:103-112 (2007)
3. 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
4. 石橋弘志、松村尚美、平野将司、中本貴士、高良真也、吉原新一、有菌孝司：ビスフェノールA代謝物4-メチル-2,4-ビス(p-ヒドロキシフェニル)ペンタ-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).
5. Olmstead A.W., LeBlanc G., Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*, *Environ. Health perspect.* 111:919-924 (2003)
6. Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M., Karkert B., Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9:383-397 (2000).
7. 泉七江、佐二木 順子、ビスフェノールAがイエバエの性比に及ぼす影響、千葉衛研報告、27：14-17 (2003)
8. 泉七江、佐二木 順子、ビスフェノールA (BPA) がイエバエの性比ならびに発育に及ぼす影響—続報—、千葉衛研報告、29：15-24 (2005)
9. Izumi N, Yanagibori R, Shigeno S, Sajiki J. Effects of bisphenol A on the development, growth, and sex ratio of the housefly, *Musca Domestica*. *Environ. Toxicol. Chem.* (in press).
10. European Union Risk Assessment Report. EFSA re-evaluates safety of bisphenol A and sets Tolerable Daily Intake, Parma, Italy (2007).
11. vom Saal F., Hughes C., An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment, *Environ. Health Perspect.* 113:926-933 (2005).
12. 関澤純、ビスフェノールAの低用量影響評価の検討と評価情報データベース作成、厚生労働化学研究費補助金化学物質リスク研究事業（内分泌かく乱化学物質の生体影響メカニズム（低用量効果・複合効果を含む）に関する総合研究、主任研究者：井上達）分担研究平成16年度報告書（2005）。
13. 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.* 54:207-215 (2003).
14. K-Smith A.E., Bell H.A., Edwards J.P., Effects of three vertebrate hormones on the growth, development, and reproduction of the Tomato moth, *Lacanobia Oleracea L.*, *Environ. Toxicol. Chem.* 20:1838-1845 (2001).
 15. Ankley G., Mihaich E., Stahl R. et al ,Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/ androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17:68-87 (1998).
 16. Williamson M.S., Martinez-Torres D., Hick C.A., Devonshire A.L., Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252 : 51-60 (1996).
 17. O'Reilly A.O., Khambay B.P.S., Williamson M.S., Field L.M., Wallace B.A., Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* 396:255-63 (2006).
 18. 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: 113-124 (2001).
 19. Mu X., Rider C.V., Hwang G.S., Hoy H., LeBlanc G.A., Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity ob bisphenol A involves cross talk between signaling pathways, *Environ. Toxicol. Chem.* 24:146-152 (2005).
 20. Mu X., LeBlanc G.A., Environmental antiecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J. Exp. Zool.* 292:287-292 (2002).
 21. Dinan L., Bourne P., Whiting P., Dhadialla T.S., Hutchinson T.H., Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B11 cell in vitro assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2038-2046 (2001).
 22. 佐二木 順子、泉七江、ビスフェノール A (BPA) に暴露されたイエバエ幼虫、蛹中の BPA ならびに昆虫ホルモンの測定：環境ホルモン学会第8回研究発表会、江戸東京博物館、東京、9月27-29日、(2005)
 23. Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Bachmann J., Oetken M., Lutz I., Kloas W., Ternes T.A., Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ Health Perspect* 114: Suppl 1,127-33 (2006).