

ディルドリンの6週間鳥類繁殖毒性試験・残留分析試験の 結果について

目 的

本試験（繁殖照明条件下6週間投与による鳥類繁殖毒性試験、以下「6週間鳥類繁殖毒性試験」という。）は第一種特定化学物質に指定されているディルドリンを、有害性調査のため国が指定する方法で別途実施した20週間投与による「鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験」（以下「20週間鳥類繁殖毒性試験」という。）と同じ0.4～20ppmの濃度で飼料に添加して長時日照明条件により繁殖状態としたニホンウズラのつがいに6週間投与し、採取した卵は人工的に孵化させ、生まれた若鳥はディルドリン無添加飼料で14日間飼育し、この間に、親鳥の産卵状況、卵殻質、孵化状況及び若鳥の育成状況を観察し、鳥類の繁殖に対する影響を調べ、無影響濃度を明らかにする。また、20週間繁殖毒性試験から採取した生体試料等を含め、投与したウズラの血液、脂肪、卵黄を含む組織中の残留濃度を分析し、残留濃度と暴露（投与）濃度、投与期間及び毒性との関連性について検討する。

方 法

1) 被験物質、被験物質添加飼料の調製

被験物質のディルドリン（CAS No. 60-57-1）は、試薬（関東化学株式会社、純度97.5%）を購入して用いた。投与濃度は、投与濃度設定試験として行った鳥類摂餌毒性試験（OECD TG205）の結果から、化審法試験法に従い最高濃度をLC₁₀値の約1/2である20ppmとし、以下20ppmの1/2の10ppmと2及び0.4ppm（公比5）の計4濃度を設定した。被験物質添加飼料は、まず基礎飼料（成鶏用粉末飼料）にディルドリンを高濃度添加したプレミックス飼料を調製し、次いで試験設定濃度（0.4、2、10及び20ppm）になるように混合攪拌機でプレミックス飼料と基礎飼料を均一に混合して調製した。調製した被験物質添加飼料は分析し、飼料中での均一性及び所定の濃度で調製されていることを確認した。

2) 試験生物、飼育条件

産卵状況の観察により、繁殖状態にあることが確認されたニホンウズラ（9週齢）を1群9ペアとして用いた。ウズラは、温度17～27℃、湿度50～75%、換気回数10回以上/時、照明を親鳥17時間/日、若鳥14時間/日に制御された飼育室で、親鳥は産卵ケージにつがいで収容、若鳥は保温室を有する育雛ケージに群別・週単位で収容し、飼料及び飲料水を自由に摂取させて飼育した。被験物質添加飼料の給与期間は6週間とし、対照群には基礎飼料を同様に給与した。群構成は、対照群並びに被験物質添加飼料4群（0.4、2、10及び20ppm）の計5群とした。

3) 観 察

(1) 親鳥

臨床観察、体重、飼料摂取量

臨床観察は毎日行い、体重は投与開始時及び終了時に測定した。飼料摂取量は、ケージ単位で週ごとに測定した。

産卵確認、貯卵、孵卵、検卵

ケージごとに産卵状況及び正常卵か異常卵（ひびのある卵、軟卵等）かを毎日観察した。投与開始から6週まで毎週採取した正常卵は15 の貯卵庫に保存し、それぞれ1週間分をまとめて孵卵器に移して孵卵し、孵化させた。孵卵開始7日後に検卵器で検卵し、胚の発生を確認した。

卵殻厚

投与5日、12日、19日、26日及び33日に採取した全ての正常卵について卵殻厚を測定した。

病理学検査

投与終了時に解剖し、器官重量（脳、肝臓、脾臓、精巢又は卵巣及び卵管）の測定を行った。さらに、雄については精子を採取してその活動性及び一部の例の精巢について組織切片を作製して精子形成に対する影響を観察した。雌については、卵巣の最大卵胞径を測定した。

(2) 若鳥

孵化した雛は14日齢まで飼育し、その間に臨床観察は毎日行い、体重は14日齢時に測定した。飼料摂取量はケージ単位で、孵化後1週及び2週に測定した。

(3) 繁殖能に関する指数

次の指数を週単位で算出し、群ごとの平均値を算出した。

$$\text{産卵率 (\%)} = \text{産卵数} / (\text{雌数} \times \text{日数}) \times 100$$

$$\text{異常卵の発生率 (\%)} = \text{異常卵の数} / \text{産卵数} \times 100$$

$$\text{胚の発生率 (\%)} = \text{入卵7日発育卵数} / \text{卵群} \times 100$$

$$\text{孵化率 (\%)} = \text{孵化した卵の数} / \text{卵群} \times 100$$

$$\text{若鳥の育成率 (\%)} = \text{14日齢生存数} / \text{孵化数} \times 100$$

(4) 繁殖能に及ぼす総合評価

1 つがいの親鳥が1日に生産する若鳥の数を繁殖能指数として評価に用いた。

$$\text{繁殖能指数 (羽 / つがい / 日)} = (\text{産卵率} \times \text{孵化率} \times \text{育成率}) / 10^6$$

4) 統計解析

パラメトリックデータ（体重・飼料摂取量等）については Bartlett の分散検定を行った。その結果各群の分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い、有意差を認めた場合は、Dunnett の多重比較検定を行った。分散が一様でない場合及びノンパラメトリックデータ（産卵率・胚の発生率・孵化率・異常卵の発生率等）については Kruskal-Wallis の順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合は Dunnett 型の多重比較法を用いて検定した。カテゴリカルデータ（死亡率・異常例の発現率等）には Fisher の直接確率法を用いた。有意水準は5%以下とした。

5) 組織中残留分析

投与終了時に屠殺個体（各群9ペア）から血清、脳、肝臓、脂肪及び筋肉を採取し分析した。また、サテライト群として別に2ppm投与群を設けて繁殖照明条件下で5日間投与後及び21日間投与後に屠殺（各9ペア）して組織を採取した。雌については採材至近日の卵の卵黄も試料とした。さらに、別途実施したデイルドリンの20週間鳥類繁殖毒性試験で投与終了時に採取した組織（各9ペア）や卵も試料とした。分析は3羽分を1試料とし、GC/MSで分析した。

結果

1) 親鳥に対する一般毒性学的影響（表 1、2）

10及び20ppm群で、雄に投与期間中体重増加量の有意な低値が認められた。両群の飼料摂取量は投与前半においてやや低値傾向にあった。臨床観察及び病理検査で、被験物質の投与による変化は認められなかった。

表 1 デイルドリンを6週間投与したウズラ（親鳥）の体重

性 群	投与期間(週)				投与期間中 体重増加量
	投与開始時	2	4	6	
0(対照)	119	123	121	121	1
	± 12 (9)	± 12 (9)	± 13 (9)	± 14 (9)	± 6 (9)
デイルドリン 0.4ppm	114	119	117	117	4
	± 7 (9)	± 7 (9)	± 9 (9)	± 7 (9)	± 4 (9)
デイルドリン 2ppm	113	119	115	113	0
	± 7 (9)	± 7 (9)	± 10 (9)	± 8 (9)	± 6 (9)
デイルドリン 10ppm	116	116	111	109 *	-7 *
	± 7 (9)	± 7 (9)	± 7 (9)	± 6 (9)	± 8 (9)
デイルドリン 20ppm	116	115	111	110 *	-6 *
	± 9 (9)	± 8 (9)	± 7 (9)	± 6 (9)	± 6 (9)
0(対照)	137	142	135	137	0
	± 8 (9)	± 8 (9)	± 7 (9)	± 6 (9)	± 4 (9)
デイルドリン 0.4ppm	141	145	139	139	-2
	± 10 (9)	± 9 (9)	± 9 (9)	± 12 (9)	± 11 (9)
デイルドリン 2ppm	136	142	137	135	-1
	± 10 (9)	± 9 (9)	± 9 (9)	± 11 (9)	± 7 (9)
デイルドリン 10ppm	141	143	141	141	0
	± 10 (9)	± 11 (9)	± 7 (9)	± 12 (9)	± 7 (9)
デイルドリン 20ppm	144	143	140	141	-3
	± 7 (9)	± 7 (9)	± 8 (9)	± 5 (9)	± 5 (9)

平均値 ± 標準偏差
(n):羽数
有意差(*:p 0.05)

表 2 デイルドリンを6週間投与したウズラ（親鳥）の飼料摂取量

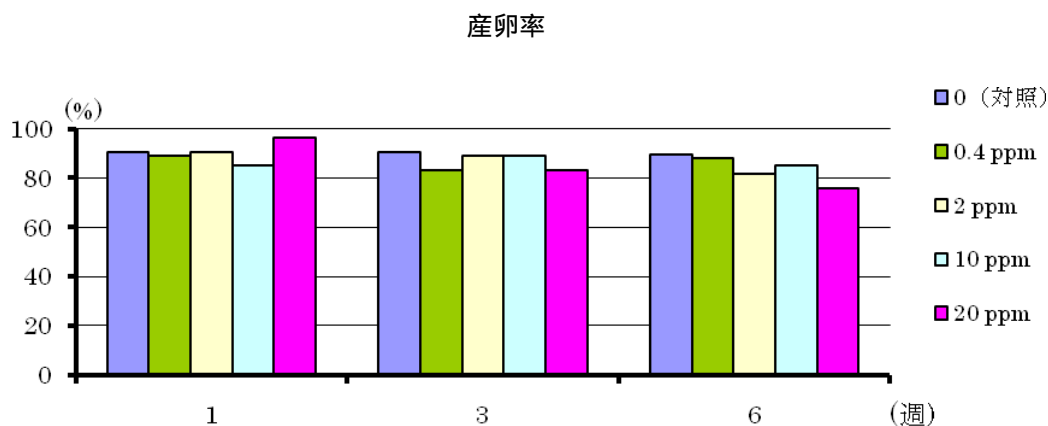
群	投与期間(週)					
	投与開始時	2	3	4	5	6
0(対照)	37	36	27	31	26	28
	± 5 (9)	± 4 (9)	± 5 (9)	± 4 (9)	± 2 (9)	± 2 (9)
デイルドリン 0.4ppm	36	35	27	30	24	28
	± 2 (9)	± 2 (9)	± 5 (9)	± 5 (9)	± 5 (9)	± 3 (9)
デイルドリン 2ppm	34	35	29	29	26	25
	± 2 (9)	± 3 (9)	± 2 (9)	± 5 (9)	± 5 (9)	± 4 (9)
デイルドリン 10ppm	32 *	33	27	32	24	29
	± 4 (9)	± 3 (9)	± 2 (9)	± 4 (9)	± 2 (9)	± 3 (9)
デイルドリン 20ppm	33	33	26	30	27	27
	± 3 (9)	± 5 (9)	± 2 (9)	± 2 (9)	± 2 (9)	± 2 (9)

平均値 ± 標準偏差
(n):ペア数
有意差(*:p 0.05)

2) 繁殖能に関する指標

(1) 産卵に対する影響 - 産卵率

産卵率に有意な変化は認められなかった。

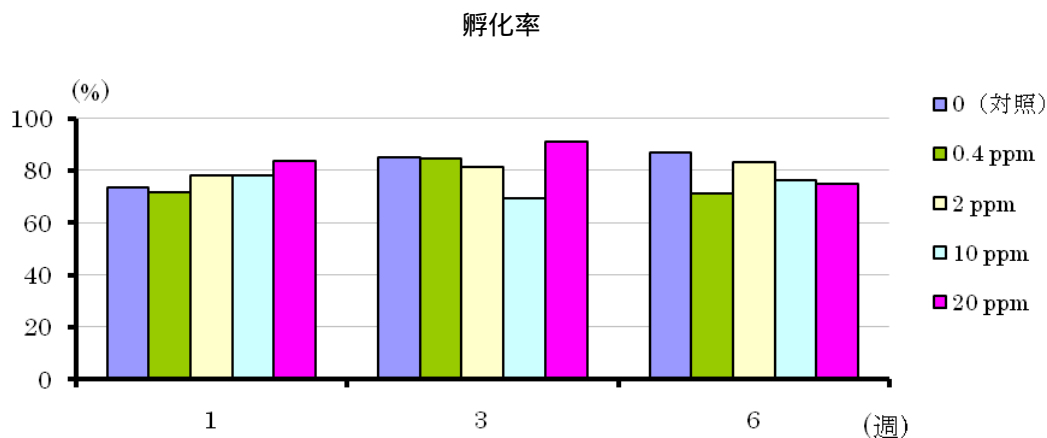


(2) 卵殻質に対する影響 - 卵殻の厚さ、異常卵の発生率

卵殻の厚さ及びひびのある卵や軟卵等の異常卵の発生率に有意な変化は認められなかった。

(3) 発生に対する影響 - 孵化率

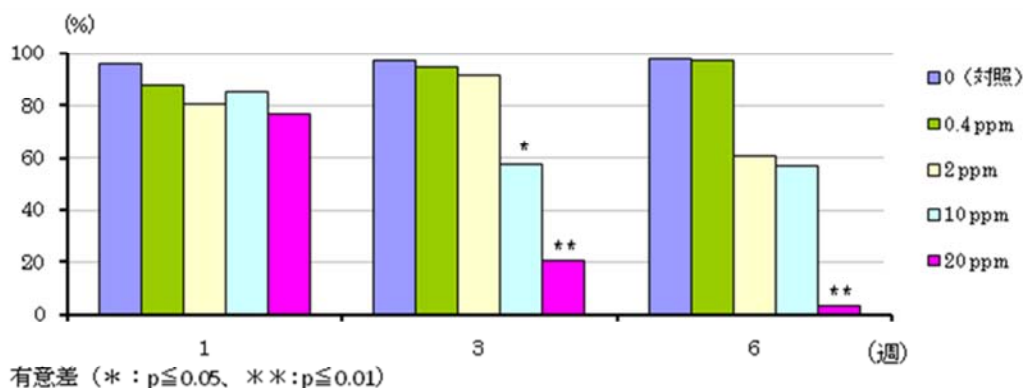
孵化率に有意な変化は認められなかった。



(4) 若鳥の生存性に対する影響 - 育成率、若鳥の体重

2ppm群で投与6週の卵に由来する若鳥の育成率の低下傾向及び14日齢体重の有意な低下が認められた。10ppm群では14日齢体重の有意な低値に加えて、投与3週の育成率に有意な低値が認められた。20ppm群では投与1週の卵に由来する雛から育成率は低値傾向にあり、3週では有意かつ顕著な低値を示し、6週では孵化した雛の全例で死亡した。

育成率



ディルドリン6週間投与とウズラ由来の若鳥の体重及び飼料摂取量

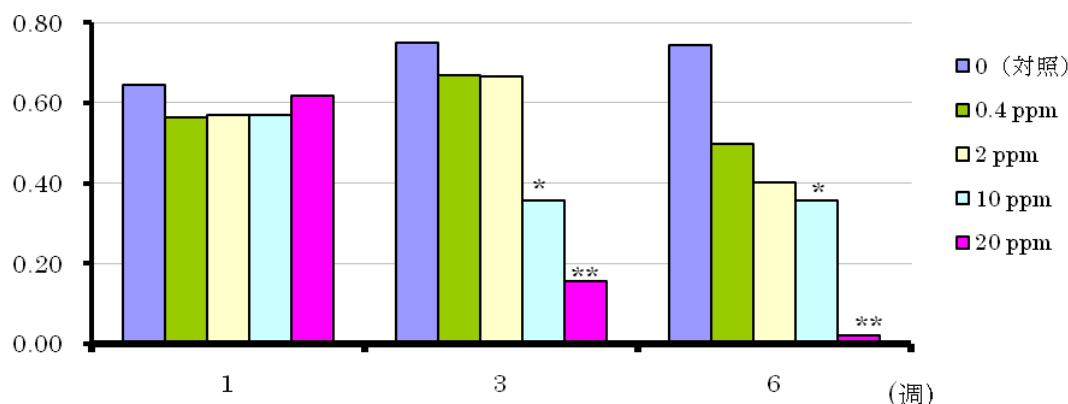
群	項目	項目	投与期間(週)		
			1	3	6
0(対照)	体重(g/羽)	孵化日	6.8±0.4(9)	6.8±0.4(9)	6.9±0.6(9)
		14日齢	33.9±3.2(9)	34.5±2.3(9)	34.7±3.8(9)
	飼料摂取量(g/羽/日)	孵化後1週	2.8	2.7	3.2
		孵化後2週	8.2	7.1	7.5
ディルドリン 0.4ppm	体重(g/羽)	孵化日	6.7±0.6(8)	6.7±0.5(8)	6.7±0.5(7)
		14日齢	34.8±3.9(8)	34.2±2.2(8)	32.3±2.9(7)
	飼料摂取量(g/羽/日)	孵化後1週	3.2	2.7	3.3
		孵化後2週	9.5	7.1	7.5
ディルドリン 2ppm	体重(g/羽)	孵化日	6.5±0.5(9)	6.6±0.4(9)	6.7±0.5(8)
		14日齢	33.1±2.0(9)	31.4±1.7(9)	29.8±4.1(8)*
	飼料摂取量(g/羽/日)	孵化後1週	2.6	2.1	2.1
		孵化後2週	8.6	8.7	7.9
ディルドリン 10ppm	体重(g/羽)	孵化日	6.9±0.5(8)	7.0±0.5(8)	6.7±0.6(9)
		14日齢	31.2±4.0(8)	32.7±3.0(8)	30.2±3.4(8)*
	飼料摂取量(g/羽/日)	孵化後1週	2.2	2.3	2.1
		孵化後2週	7.2	7.9	7.8
ディルドリン 20ppm	体重(g/羽)	孵化日	6.9±0.4(9)	6.8±0.2(8)	6.7±0.3(8)
		14日齢	36.8±2.6(9)	31.7±2.5(5)	-
	飼料摂取量(g/羽/日)	孵化後1週	3.4	2.5	1.1
		孵化後2週	6.4	7.2	-

体重は平均値±標準偏差(ベア数)
有意差(*: $p \leq 0.05$)

3) 繁殖に対する影響の評価 - 繁殖能指数

主に若鳥の育成率の低下による用量相関的な繁殖能指数の低値が認められ、10及び20ppmで有意差が認められた。

繁殖能指数



4) 残留分析

(1) 組織中残留濃度 (図 1)

6週間鳥類繁殖毒性試験終了時屠殺ウズラ及び20週間鳥類繁殖毒性試験終了時屠殺ウズラの分析において、いずれも組織中(血清、筋肉、肝臓、脳、脂肪、卵黄)残留濃度は投与濃度と相関して増加した。各投与濃度群とも、脂肪中の残留濃度が最も高く(飼料中濃度の15~40倍)、卵黄(4~6倍)、肝臓(2~5倍)と続き、筋肉、脳は飼料中濃度以下で、血清が最も低かった。図1に血清、脂肪及び卵黄中濃度と飼料中濃度との関係を示す。

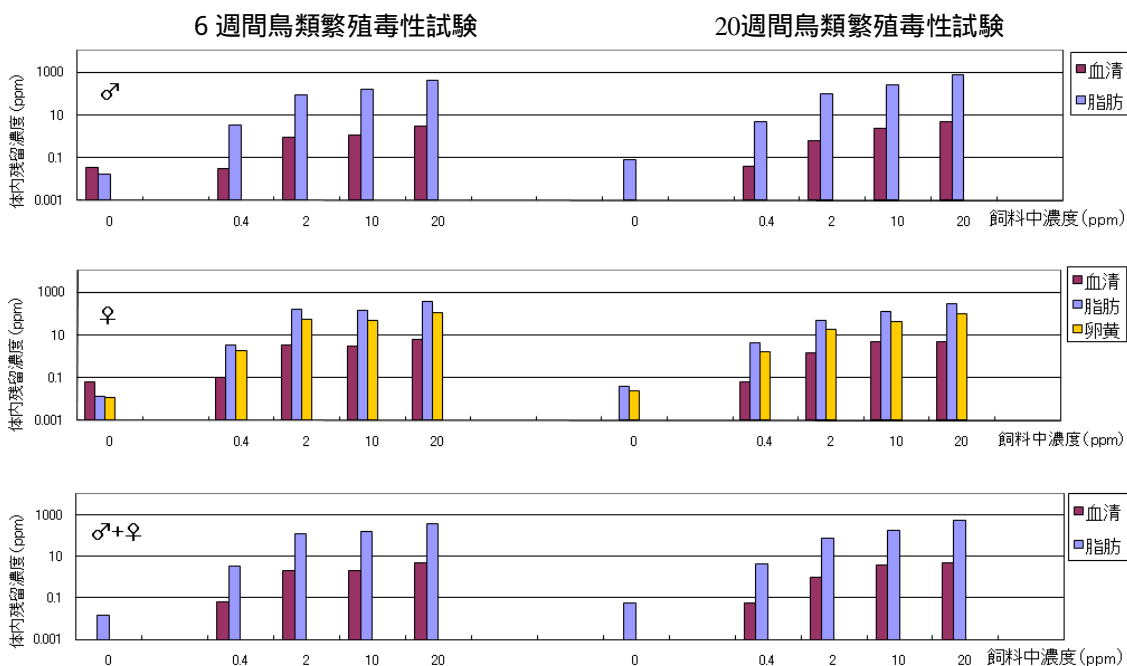


図1 デILDリンを6週間及び20週間投与したウズラの組織内残留濃度

(2) 組織中残留濃度に及ぼす投与期間の影響 (図 2)

2ppm添加飼料について、サテライト群で行った繁殖照明条件下5日間投与後、21日間投与後、6週間鳥類繁殖毒性試験後及び20週間鳥類繁殖毒性試験後において、血液、脳、筋肉、肝臓、脂肪及び卵黄中の残留濃度は、いずれも繁殖照明条件下の5日間投与後、21日間投与後、6週間鳥類繁殖毒性試験後については投与期間と相関しており、投与期間が長いほど残留濃度が高い傾向にあった。しかし、6週間鳥類繁殖毒性試験後と20週間鳥類繁殖毒性試験後の濃度に著しい差は認められなかった。図2に、血清、脂肪及び卵黄中濃度の投与期間による違いを示す。2ppm以上の群の6週間鳥類繁殖毒性試験後と20週間鳥類繁殖毒性試験後の比較においても、残留濃度に著しい差のないことが確認された(図1)。

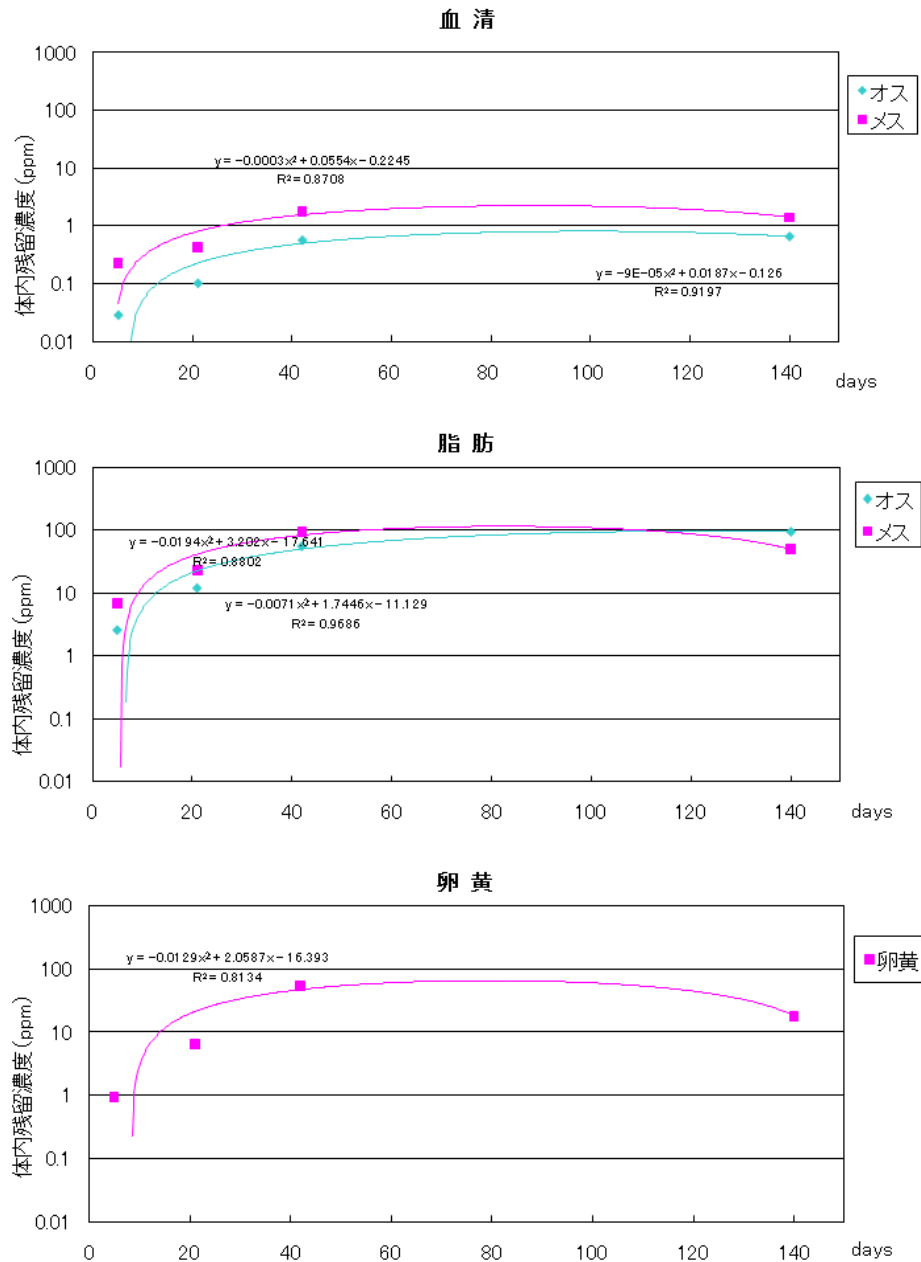


図2 ディルドリン2ppm添加飼料投与期間とウズラ体内の残留濃度の関係

まとめ

ディルドリンに対する6週間鳥類繁殖毒性試験を0.4、2、10 及び 20ppmの用量で実施し、鳥類の繁殖に対する影響を調べた。その結果、

10及び20ppm群で親鳥の体重及び飼料摂取量で低値が認められたが、軽度な変化であった。

2ppm (0.24mg/kg/日) 以上の群で若鳥の生存に対する影響が認められ、20ppmでは次世代の生存はほとんど認められなかった。

組織中残留濃度は飼料中濃度と相関性があり、残留濃度は脂肪中で最も高く、続いて卵黄中濃度が高値であった。

以上の結果より、繁殖に対する無影響濃度 (NOEC) は、0.4ppm (0.047mg/kg/日) と結論された。