

p,p' -DDT 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 p,p' -DDT 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 1 ~ 125 ppm 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 p,p' -DDT 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 週間鳥類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 p,p' -DDT（CAS No.50-29-3）は、試薬（関東化学株式会社、純度 99.5%）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、並びに p,p' -DDT のウズラへの飼料添加による 6 週間投与で、150 ppm で雄に軽度の毒性を認めた報告（平成 13 年度農薬環境影響基礎調査・環境省内部資料）に基づき、投与濃度は 125 ppm を最高濃度とし、以下 25、5 及び 1 ppm（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 p,p' -DDT 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（1、5、25 及び 125 ppm）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（11 週齢）を 1 群 6 ペアとして用いた。ウズラは、温度 17 ~ 27 °C、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（1、5、25 及び 125 ppm）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

卵の採取開始後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、精巣又は卵巢）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巣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、卵巢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。

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

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

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

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

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

(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樣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。分散が一樣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・育成率・異常卵の発生率）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25ppm投与群を設けて繁殖照明条件下で5日間投与後及び21日間投与後に屠殺し、同様に組織を採取した。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*p,p'*-DDT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や卵も試料とした。分析は、1条件につき雌雄各3羽から試料を採取し、それらを均一に混合して1試料とし、GC/MSで分析した。

結果

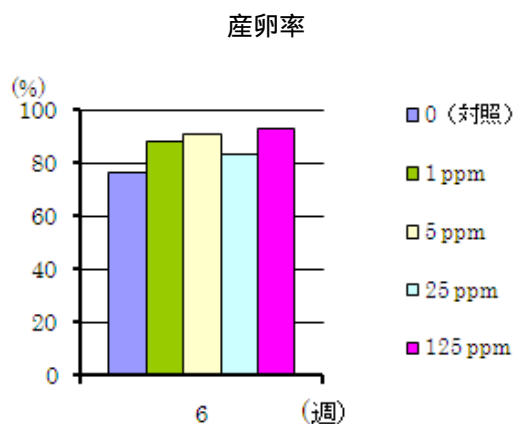
1) 親鳥に対する一般毒性学的影響

臨床観察、体重、飼料摂取量、剖検、器官重量、精子の活動性及び精巢の組織学検査、卵巣の最大卵胞径において、被験物質の投与による有意な変化は認められなかった。

2) 繁殖能に関する指標

(1) 産卵に対する影響 - 産卵率

産卵に被験物質投与による影響は認められなかった。

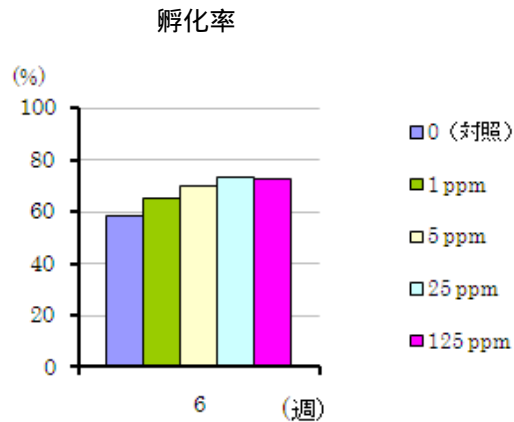


(2) 卵殻質に対する影響 - 卵殻の厚さ、異常卵の発生率

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。

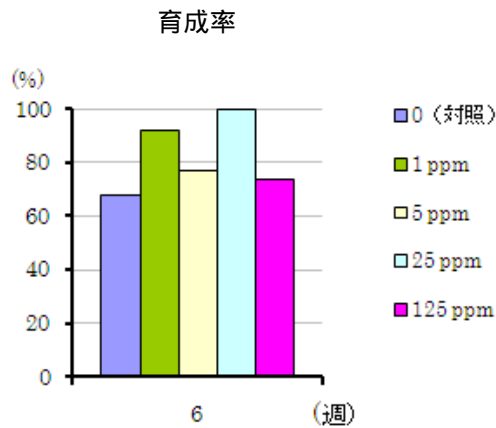
(3) 発生に対する影響 - 孵化率

胚の発生率及び孵化率に被験物質投与による影響は認められなかった。



(4) 若鳥の生存に対する影響 - 育成率

125ppm群で若鳥に中毒症状（振戦）が認められたものの、育成率に有意な変化は認められなかった。



3) 残留分析

(1) 飼料中 p,p' -DDT濃度と体内 p,p' -DDT及びその代謝物残留濃度の相関性

(図 1、2)

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。飼料中濃度を横軸（対数）、組織中残留濃度（DDT、その代謝物）を縦軸（対数）にとると、飼料中濃度が1～25ppmの範囲で濃度の増加に伴い組織中残留濃度は直線的に増加し、一次回帰式（指数近似直線）により現すことができた。125ppmの残留濃度は、その回帰式による理論値をやや下回る傾向にあった。残留物の大部分は投与した *p,p'*-DDTの未変化体で、代謝物は *p,p'*-DDE及び -DDDであった。またごく微量の *o,p'*- 体の存在も確認された。各飼料中濃度群とも脂肪中の残留濃度が最も高く、卵黄、肝臓、筋肉、脳と続き、血清中濃度が最も低かった。雌の血清中濃度は雄に比べてやや高値傾向にあったものの、各組織とも、性による残留濃度の差は明らかでなかった。図1には *p,p'*-DDT、図2には *p,p'*-DDEの残留濃度と飼料中 *p,p'*-DDT濃度との関係を示す。各飼料中濃度とも、6週間鳥類繁殖毒性試験終了時と20週間鳥類繁殖毒性試験終了時の組織内残留濃度に著差は認められなかった。

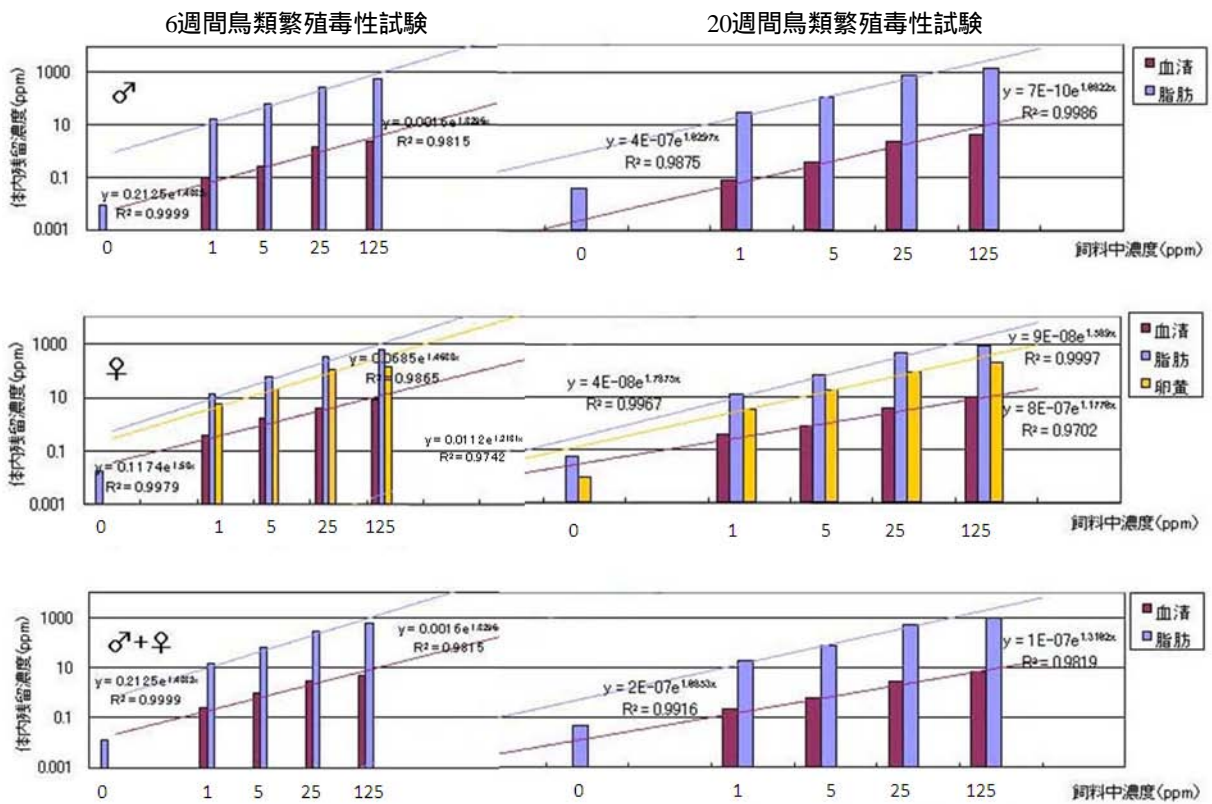


図1 飼料中*p,p'*-DDT濃度と*p,p'*-DDTの6週間投与及び20週間投与したウズラの体内*p,p'*-DDT残留濃度の関係

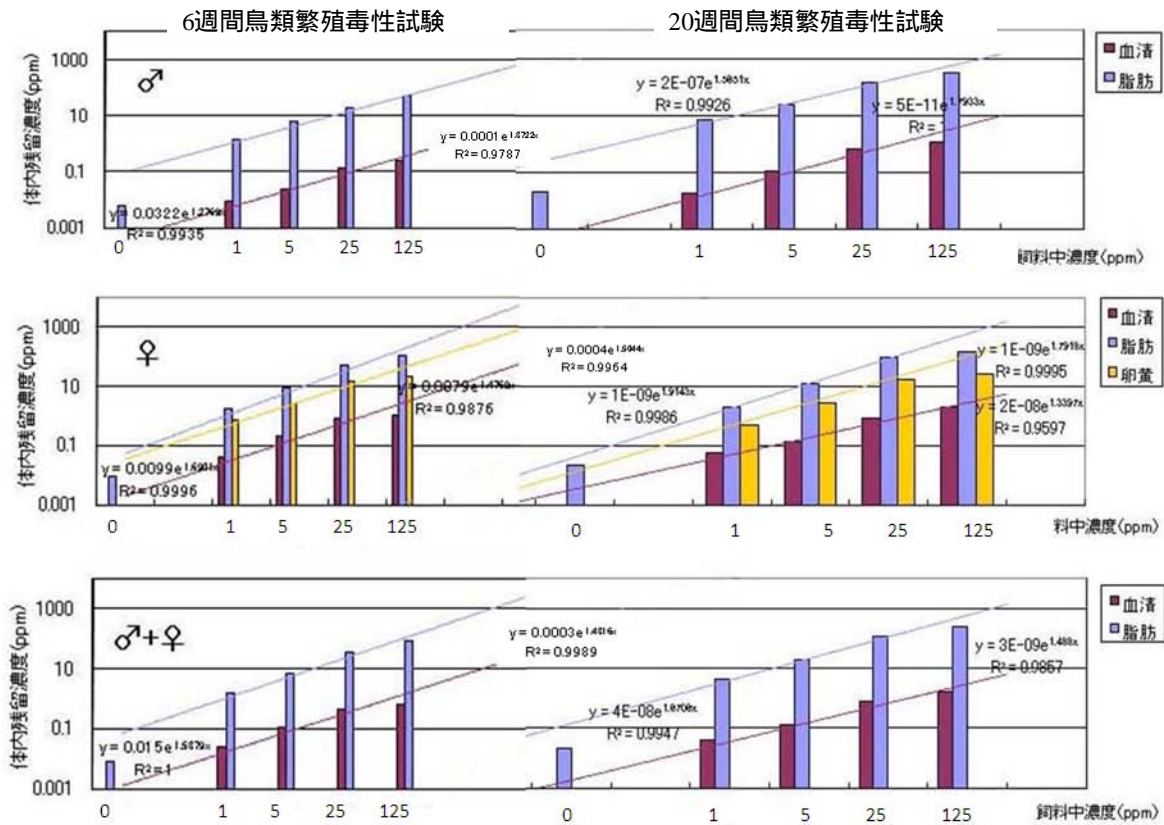


図 2 飼料中 p,p' -DDT濃度と p,p' -DDT6週間投与及び20週間投与したウズラの体内 p,p' -DDE残留濃度の関係

(2) 組織中残留濃度に及ぼす投与期間の影響 (図 3、4)

25ppm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、20日間投与後、6週間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、脂肪及び卵黄中における残留濃度は、未変化体及び代謝物とも、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差は少なかった。投与期間と残留濃度(対数)の関係は、二次回帰式で表すことができた。

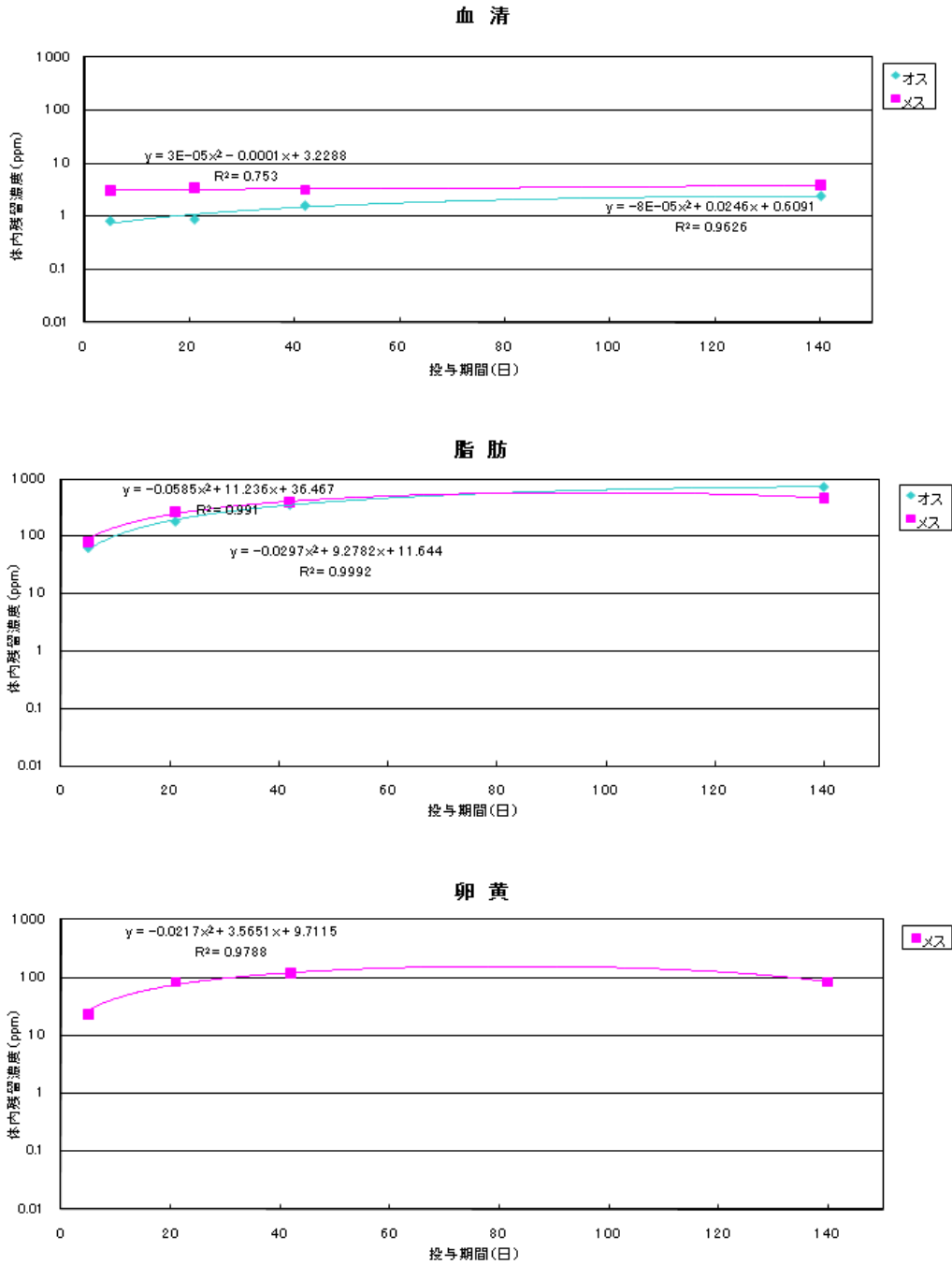
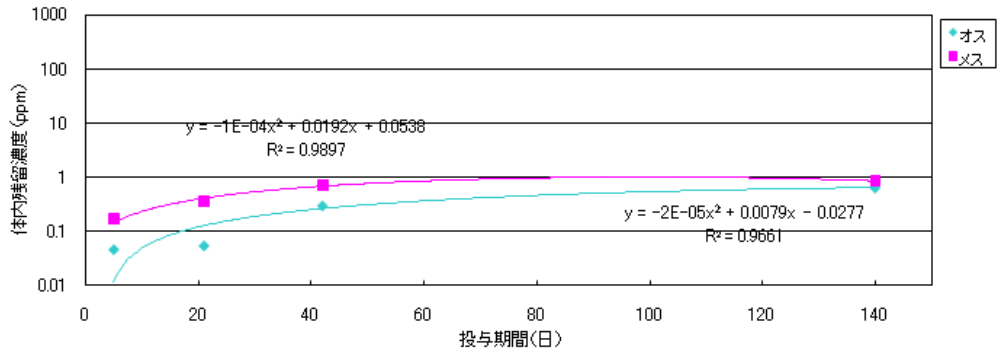
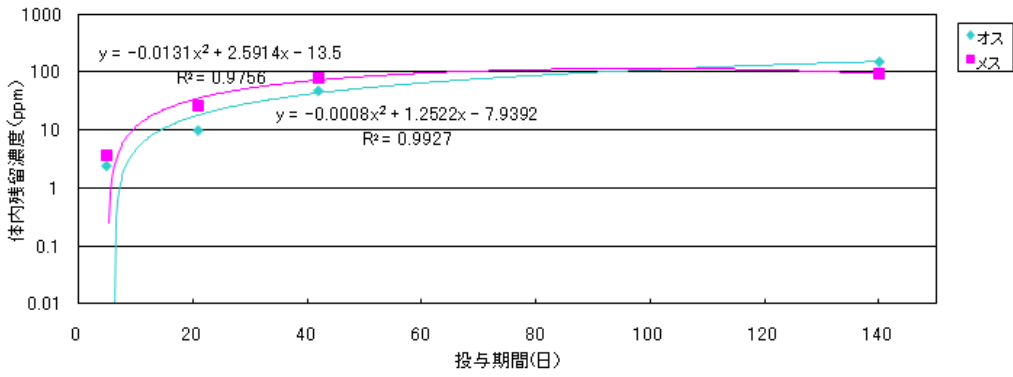


図 3 p,p' -DDT25ppm添加飼料の給与期間とウズラ体内の p,p' -DDT残留濃度の関係

血清



脂肪



卵黄

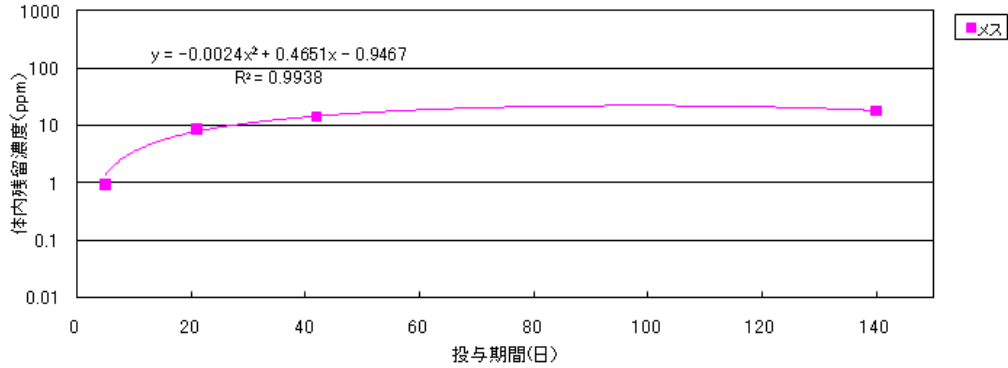


図 4 p,p' -DDT25ppm添加飼料の給与期間とウズラ体内の p,p' -DDE残留濃度の関係

まとめ

p,p'-DDTに対する6週間鳥類繁殖毒性試験を1、5、25及び125ppm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、

最高濃度125ppmで明らかな影響は認められなかった。

p,p'-DDT 摂取による組織中残留濃度は脂肪>卵黄 肝臓>筋肉>脳>血清であり、いずれも飼料中濃度に相関して増加する傾向が認められた。

以上の結果より、繁殖に対する無影響濃度（NOEC）は、125ppm（18mg/kg/日）以下と結論された。

追加試験

125ppm以下の用量で実施した *p,p'*-DDTのウズラを用いた6週間鳥類繁殖毒性試験では、繁殖に対する明らかな影響を検出することができなかった。そこで、対照群及び *p,p'*-DDT 250ppm群の2群で6週間鳥類繁殖毒性試験の追加試験を実施した（方法は前述の試験と同様。供試ウズラは各群9ペア）。

結果

1) 親鳥に対する一般毒性学的影響

250ppm群で、飼料摂取量の低値傾向並びに雄の2羽に振戦・痙攣及び雌の1羽の死亡が認められた。体重、剖検、器官重量、精子の活動性及び精巢の組織学検査、卵巣の最大卵胞径において、被験物質投与による有意な変化は認められなかった。

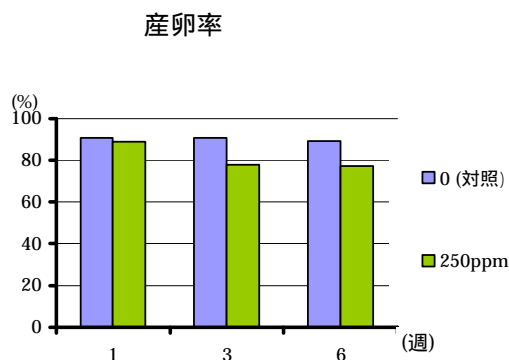
p,p'-DDTを6週間投与したウズラ（親鳥）の臨床観察

	群	0(対照)			<i>p,p'</i> -DDT 250ppm		
		性別	雄	雌	計	雄	雌
症状	羽数	9	9	18	9	9	18
振戦/痙攣		0	0	0	2	0	2
死亡		0	0	0	0	1	1

2) 繁殖能に関する指標

(1) 産卵に対する影響 - 産卵率

被験物質の投与による影響は認められなかった。



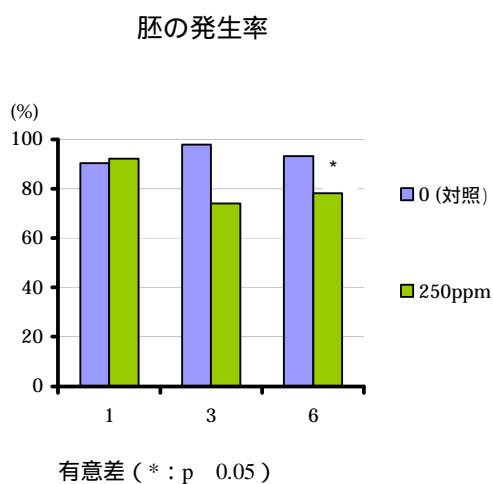
(2) 卵殻質に対する影響 - 卵殻の厚さ、異常卵の発生率

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。

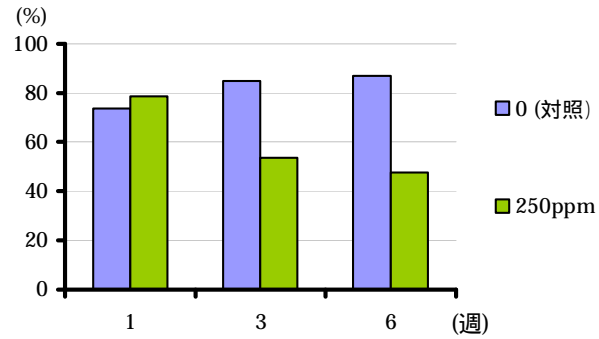
(3) 発生に対する影響 - 胚の発生率、孵化率

投与3及び6週で胚の発生率の軽度な低下傾向が認められ、6週の発生率に有意差が認められた。

孵化率は投与3及び6週で明らかな低下傾向が認められた。



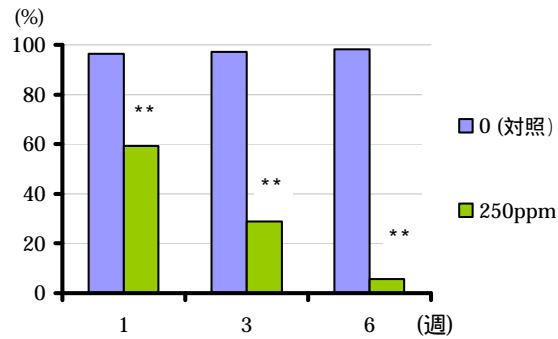
孵化率



(4) 若鳥の生存に対する影響 - 育成率

若鳥に中毒症状（振戦・痙攣）並びに投与1週の卵に由来する若鳥から育成率の有意な低下が認められ、投与の経過とともに変化が顕著となり、投与6週の卵に由来する若鳥は大部分が死亡した。

育成率

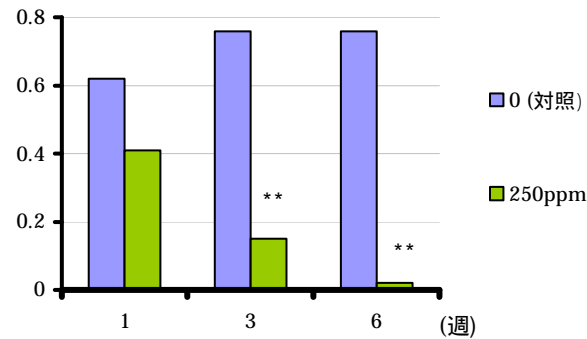


有意差 (** : p 0.01)

3) 繁殖に対する影響の評価 - 繁殖能指数

投与3週から繁殖能指数に有意な差が認められ、投与6週では次世代の生産はほとんど認められなかった。

繁殖能指数



有意差 (** : p 0.01)

まとめ

p,p'-DDTに対する6週間鳥類繁殖毒性試験を250ppm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、250ppm (28mg/kg/日) 群で胚の発生率、孵化率及び若鳥の育成率に対する影響が認められ、特に若鳥の生存に対する影響が顕著で14日齢までにほとんどが死亡した。

追加試験を含めての評価

p,p'-DDTの6週間鳥類繁殖毒性試験における無影響濃度は、125ppm (18mg/kg/日) と推定された。