

HBCDの6週間鳥類繁殖毒性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。）は第一種監視化学物質に指定されているHBCDを125ppm以下の低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HBCD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。なお、本試験は125、250、500及び1000ppmの用量（飼料中濃度）で実施したHBCDの6週間鳥類繁殖毒性試験で、繁殖に対する影響が全ての用量群で発現し、無影響濃度を明らかにすることができなかつたため、より低濃度での追加試験として実施するものである。

方 法

1) 被験物質、被験物質添加飼料の調製

被験物質のHBCD（CAS No.3194-55-6）は、試薬（和光純薬工業株式会社、純度100%、異性体構成比 α - : 27%、 β - : 30%、 γ - : 43%）を購入して用いた。被験物質添加飼料は、まず基礎飼料（成鶏用粉末飼料）にHBCD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（5、15、45及び125ppm）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12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（5、15、45及び125ppm）の計5群とした。

3) 観 察

(1) 親鳥

① 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算出した。

② 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 1、3、5及び6週に採取した正常卵は 12℃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。

③ 卵殻厚

投与 4、18、32及び39日に採取した全ての正常卵について、卵殻厚を測定した。

④ 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製作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週における消費量を測定した。

(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。

$$\text{① 産卵率 (\%)} = \text{産卵数} / (\text{雌数} \times \text{日数}) \times 100$$

$$\text{② 正常卵率 (\%)} = \text{正常卵数} / \text{産卵数} \times 100$$

$$\text{③ 胚の生存率 (\%)} = \text{入卵7日発育卵数} / \text{入卵数} \times 100$$

$$\text{④ 孵化率 (\%)} = \text{孵化した卵の数} / \text{入卵数} \times 100$$

$$\text{⑤ 若鳥の育成率 (\%)} = \text{14日齢生存数} / \text{孵化数} \times 100$$

(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、被験物質投与群の対照群に対する繁殖能指数の減少の程度を繁殖能抑制率として評価に用いた。

① 繁殖能指数 (羽／つがい／日) = (産卵率×正常卵率×孵化率×育成率) / 10^8

② 繁殖能抑制率 (%) = (対照群の繁殖能指数 - 試験群の繁殖能指数) / 対照群の繁殖能指数 × 100

4) 統計解析

パラメトリックデータ (体重・飼料摂取量・卵殻の厚さ等) 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、有意差を認められた場合は、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・正常卵率・胚の発生率・孵化率・育成率等) 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 の直接確率法あるいは χ^2 検定を用いた。有意水準は5%以下とした。

結果

1) 親鳥に対する一般毒性学的影響 (表 1、2)

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。

表 1 HBCDを投与したウズラ (親鳥) の飼料摂取量

群 (飼料中濃度)	投与期間(週)					
	1	2	3	4	5	6
0 (対照)	259 ± 31 (12)	261 ± 37 (12)	260 ± 37 (12)	260 ± 32 (12)	264 ± 32 (12)	265 ± 32 (12)
5	244 ± 16 (12)	237 ± 15 (12)	240 ± 17 (12)	233 ± 14 (12)	242 ± 20 (12)	237 * ± 20 (12)
15	258 ± 24 (12)	258 ± 25 (12)	270 ± 25 (12)	251 ± 20 (12)	240 ± 33 (12)	244 ± 29 (11)
45	250 ± 22 (12)	248 ± 18 (12)	255 ± 23 (12)	243 ± 13 (12)	241 ± 18 (12)	237 * ± 14 (12)
125	252 ± 19 (12)	245 ± 23 (12)	262 ± 27 (12)	244 ± 20 (12)	242 ± 28 (12)	235 * ± 22 (11)

平均値 ± 標準偏差

(n) : ペア数

有意差 (*: $p \leq 0.05$)

表 2 HBCDを投与したウズラ（親鳥）の投与終了時体重、器官重量等

性別	群 (ppm)	供試羽数	体重 (g)	脳 (g)	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	精巣 (g)		
絶対重量	0	12	115	0.72	1.93	41.9	2.68		
			±8	±0.07	±0.43	±8.0	±0.85		
	5	12	112	0.75	1.82	40.8	2.65		
			±5	±0.04	±0.27	±15.2	±1.03		
	15	12	115	0.74	1.70	40.4	2.64		
			±8	±0.04	±0.42	±12.4	±0.97		
	45	12	116	0.81	1.83	49.7	2.14		
			±13	±0.27	±0.32	±20.2	±1.07		
	125	12	111	0.72	1.73	35.0	2.05		
			±8	±0.04	±0.27	±9.6	±1.11		
相対重量 ^a	0	12	115	0.63	1.68	36.4	2.32		
			±8	±0.07	±0.38	±6.5	±0.72		
	5	12	112	0.68	1.63	36.6	2.39		
			±5	±0.03	±0.20	±13.6	±0.93		
	15	12	115	0.65	1.49	35.1	2.32		
			±8	±0.05	±0.38	±9.6	±0.82		
	45	12	116	0.70	1.59	42.8	1.90		
			±13	±0.22	±0.27	±16.8	±0.94		
	125	12	111	0.65	1.57	31.7	1.86		
			±8	±0.07	±0.26	±8.5	±0.97		
性別	群 (ppm)	供試羽数	体重 (g)	脳 (g)	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	卵巣 (g)	卵管 (g)	最大卵胞径 (mm)
絶対重量	0	12	145	0.71	5.06	69.5	4.25	15.11	16.5
			±10	±0.05	±1.45	±17.4	±1.14	±3.05	±1.3
	5	12	141	0.71	4.48	77.2	3.40	11.44	15.1
			±12	±0.05	±0.54	±25.5	±1.51	±3.80	±3.7
	15	11	145	0.73	5.15	73.4	4.36	14.56	17.2
			±8	±0.06	±1.02	±27.9	±0.75	±3.85	±1.1
	45	12	142	0.73	4.38	87.7	3.96	13.11	17.1
			±10	±0.04	±0.58	±29.2	±1.10	±3.85	±1.6
	125	11	146	0.72	5.12	74.4	4.95	11.61	16.5
			±14	±0.06	±0.87	±19.9	±2.83	±5.36	±3.5
相対重量 ^a	0	12	145	0.49	3.50	48.2	2.93	10.44	
			±10	±0.03	±0.94	±12.4	±0.71	±1.88	
	5	12	141	0.51	3.21	55.3	2.42	8.17	
			±12	±0.06	±0.51	±19.8	±1.05	±2.85	
	15	11	145	0.50	3.55	50.6	3.01	10.05	
			±8	±0.06	±0.64	±18.3	±0.45	±2.55	
	45	12	142	0.52	3.09	61.9	2.81	9.16	
			±10	±0.04	±0.43	±21.1	±0.88	±2.53	
	125	11	146	0.50	3.54	51.1	3.35	7.83	
			±14	±0.04	±0.77	±13.6	±1.78	±3.40	

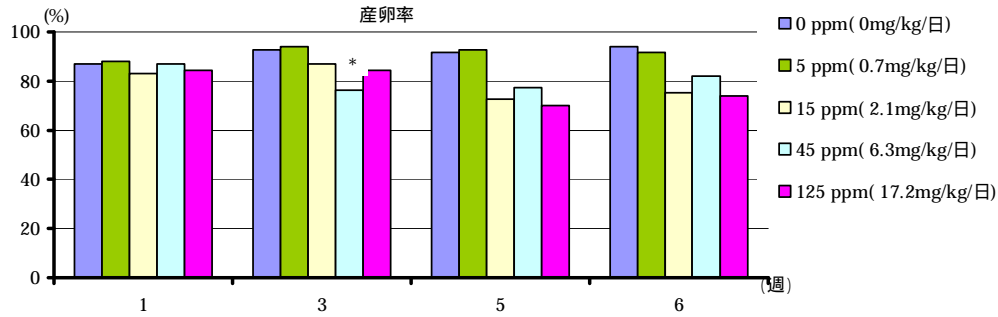
平均値 ± 標準偏差

^a : 体重 100g あたりの対体重比

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。45ppm群の投与3週で産卵率の有意な低下が認められたが、偶発的と思われる変化であった。



有意差 (*: p 0.05)

(2) 卵殻質に対する影響 — 卵殻の厚さ、正常卵率

125ppm群で、卵殻厚の有意な低値が認められた。しかしながら、その変化は軽度なものであった。

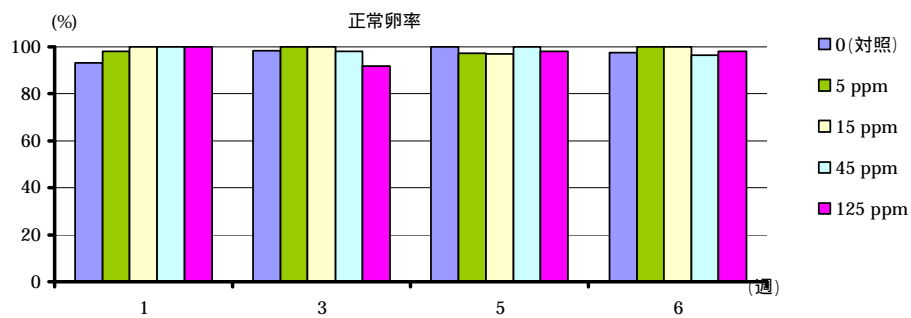
卵殻の厚さ

群(ppm)	卵殻の厚さ (平均値±標準偏差)
0	0.20±0.01 (33) ^a
5	0.20±0.01 (30)
15	0.20±0.01 (31)
45	0.19 ¹⁾ ±0.02 (28)
125	0.19 ²⁾ ±0.02 (27)*
有意差	* : p ≤ 0.05

a : 検査数

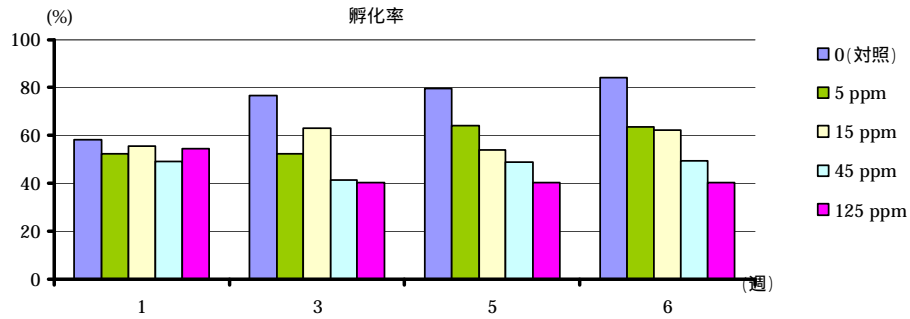
¹⁾ : 0.190、²⁾ : 0.186

異常卵の発生は殆ど認められず、いずれの群も高い正常卵率を示した。



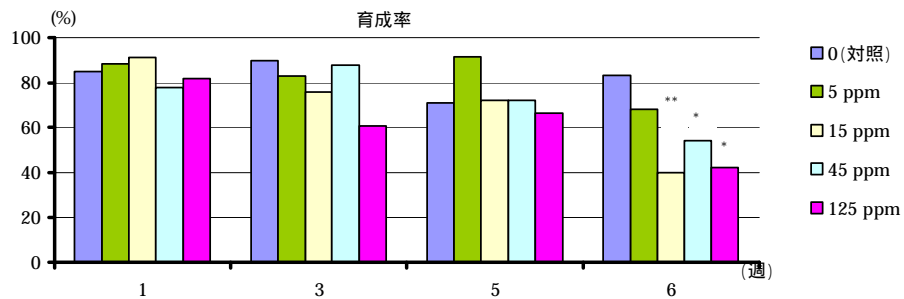
(3) 発生に対する影響 — 孵化率

被験物質投与各群の胚の生存率は対照群と比べてやや低値で、投与3週以降、概ね投与濃度と相関した孵化率の低下傾向が認められたが、有意差は認められなかった。



(4) 若鳥の生存に対する影響 — 育成率

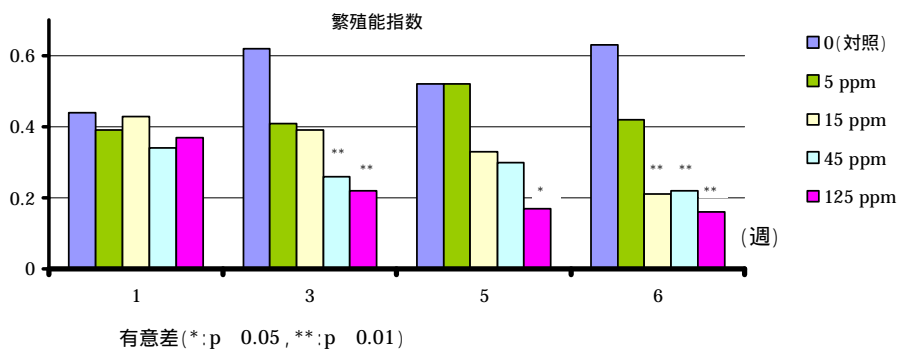
投与6週において、概ね投与濃度と相関した育成率の低下傾向が認められ、15ppm (2.1 mg/kg/日) 以上の群に有意差が認められた。若鳥の体重及び摂餌量には有意な変化は認められなかった。



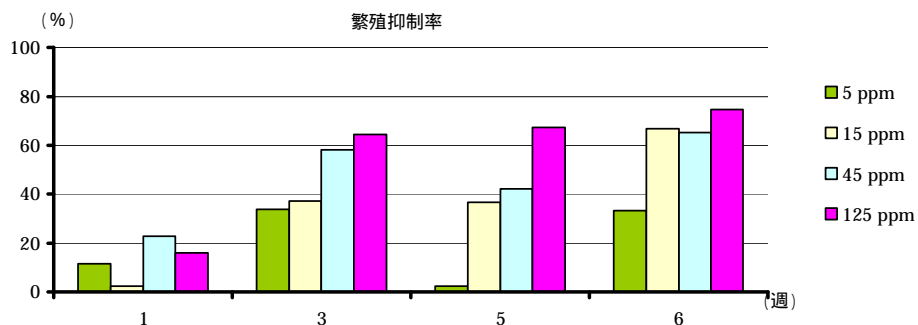
有意差 (*: p 0.05, **: p 0.01)

3) 繁殖に対する影響の評価 — 繁殖能指数、繁殖抑制率

投与3週以降、投与濃度と相関した繁殖能指数の低下が認められ、投与3週は45及び125ppm群、投与5週は125ppm群、投与6週は15、45及び125ppm群に有意差が認められた。繁殖抑制率で見ると、投与1週は明らかな影響は認められなかったが、投与3週以降は5ppm群で0.0~33.9%、15ppm群で36.5~66.7%、45ppm群で42.3~65.1%、125ppm群で64.5~74.6%の抑制で、投与6週では15ppm以上の群で65%を超える抑制であった。



有意差 (*: p 0.05, **: p 0.01)



まとめ

HBCDに対する6週間鳥類繁殖毒性試験（追加試験）を、5、15、45、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、

① 15ppm（2.1mg/kg/日）以上の群で若鳥の育成率の有意な低下が認められ、有意差は認められなかったものの孵化率も投与濃度に相関した低下傾向を示した。

② 繁殖能指数は、15ppm以上の群で有意、かつ、対照群と比べて65%を超える抑制を示した。

以上の結果より、無影響濃度（NOEC）は、5ppm（0.7mg/kg/日）と結論された。