

ディルドリンの20週間鳥類繁殖毒性試験の結果について

目 的

本試験（20週間投与による鳥類繁殖毒性試験、以下「20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について鳥類に対する長期毒性を確認するため、長時日照明条件により繁殖状態にあるニホンウズラのつがいに、高次捕食動物に対する有害性調査のためにわが国が指定する方法（鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験）で、ディルドリンを飼料に添加し、非繁殖照明条件下で8週間、さらに照明を繁殖状態になるように操作して12週間飼育して計20週間投与し、採取した卵は人工的に孵化させ、生まれた若鳥は被験物質無添加飼料で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。

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（10週齢）を1群12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/時に設定した飼育室で管理した。照明条件については、親鳥では投与開始後8週間は非繁殖状態とするため7時間/日の短時日で、12週以降は17時間/日の長時日で飼育し、若鳥は14時間/日とした。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20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

投与開始9週で長時間日照りに切り替えてから対照群の産卵率が非繁殖状態から概ね正常に回復した投与13週から、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。産卵確認以降の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89日、99日、114日、129日及び139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。また、次の指標を投与13週から20週までの8週間におけるデータから算出した。

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

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

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

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

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

(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繁殖に及ぼす影響を総合的に評価する指標とし、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。

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

$$\text{繁殖抑制率 (\%)} = [(\text{対照群の繁殖能指数} - \text{試験群の繁殖能指数}) / \text{対照群の繁殖能指数}] \times 100$$

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、Dunnnett 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・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 Dunnnett 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。

結果

1) 親鳥に対する一般毒性学的影響

(1) 臨床観察、体重、飼料摂取量（表 1、2）

20ppm群で元気消失、翼下垂、羽毛の逆立ち、痙攣等の症状並びに死亡率の有意な増加が認められた。また、10及び20ppm群の雄の投与期間中体重増加量は有意に低値で、20ppm群の飼料摂取量は投与期間を通じてやや低値を示す傾向にあった。2及び10ppm群に各1羽の死亡が認められたが、被験物質の投与との関連性は認められなかった。

表 1 デイルドリンを20週間投与したウズラ（親鳥）の死亡率

群	性別	羽数	投与	死亡経過																	死亡率(%)						
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20 (週)	雄+雌			
0(対照)	雄	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	雌	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
デイルドリン 0.4ppm	雄	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	雌	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
デイルドリン 2ppm	雄	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	雌	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	8	
デイルドリン 10ppm	雄	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	雌	12		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	
デイルドリン 20ppm	雄	12		0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	33*	25*
	雌	12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	17	

有意差 (*:p≤0.05、** :p≤0.01)

表 2 デイルドリンを20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	8	10	12	14	16	18	20	
0(対照)	110 ± 5 (12)	113 ± 9 (12)	111 ± 11 (12)	115 ± 11 (12)	118 ± 11 (12)	113 ± 9 (12)	120 ± 6 (12)	123 ± 7 (12)	122 ± 8 (12)	122 ± 8 (12)	124 ± 8 (12)	14 ± 5 (12)
デイルドリン 0.4ppm	111 ± 7 (12)	116 ± 5 (12)	111 ± 6 (12)	112 ± 7 (12)	116 ± 9 (12)	114 ± 7 (12)	119 ± 6 (12)	122 ± 6 (12)	122 ± 5 (12)	121 ± 7 (12)	122 ± 10 (12)	11 ± 6 (12)
デイルドリン 2ppm	112 ± 8 (12)	116 ± 9 (12)	112 ± 6 (12)	112 ± 8 (12)	117 ± 11 (12)	116 ± 9 (12)	125 ± 10 (12)	126 ± 9 (12)	124 ± 11 (12)	119 ± 10 (12)	122 ± 10 (12)	11 ± 5 (12)
デイルドリン 10ppm	107 ± 12 (12)	109 ± 11 (12)	108 ± 8 (12)	106 ± 9 (12)	109 ± 11 (12)	109 ± 8 (12)	114 ± 8 (12)	116 ± 9 (12)	114 ± 13 (12)	114 ± 12 (12)	114 ± 14 (12)	7 * ± 6 (12)
デイルドリン 20ppm	111 ± 8 (12)	109 ± 10 (12)	112 ± 8 (12)	108 ± 8 (12)	113 ± 11 (10)	114 ± 7 (9)	121 ± 9 (9)	119 ± 6 (9)	116 ± 7 (9)	114 ± 9 (9)	113 ± 9 (8)	0 ** ± 6 (8)
0(対照)	138 ± 10 (12)	131 ± 10 (12)	123 ± 7 (12)	121 ± 4 (12)	122 ± 5 (12)	130 ± 11 (12)	147 ± 7 (12)	142 ± 10 (12)	144 ± 9 (12)	150 ± 9 (12)	148 ± 9 (12)	10 ± 9 (12)
デイルドリン 0.4ppm	139 ± 12 (12)	133 ± 17 (12)	124 ± 10 (12)	122 ± 10 (12)	125 ± 9 (12)	134 ± 14 (12)	144 ± 13 (12)	145 ± 12 (12)	147 ± 10 (12)	149 ± 11 (12)	149 ± 11 (12)	10 ± 6 (12)
デイルドリン 2ppm	133 ± 5 (12)	132 ± 9 (12)	120 ± 7 (12)	117 ± 4 (12)	119 ± 7 (12)	131 ± 10 (12)	140 ± 14 (12)	142 ± 7 (12)	142 ± 10 (12)	146 ± 9 (11)	148 ± 7 (11)	16 ± 6 (11)
デイルドリン 10ppm	138 ± 8 (12)	140 ± 9 (12)	126 ± 7 (12)	120 ± 8 (12)	123 ± 7 (11)	132 ± 9 (11)	148 ± 6 (11)	144 ± 7 (11)	147 ± 7 (11)	148 ± 8 (11)	152 ± 8 (11)	13 ± 9 (11)
デイルドリン 20ppm	141 ± 6 (12)	138 ± 7 (12)	126 ± 5 (12)	120 ± 6 (12)	119 ± 6 (12)	125 ± 6 (12)	144 ± 8 (12)	143 ± 8 (11)	143 ± 8 (11)	147 ± 8 (10)	148 ± 9 (10)	8 ± 7 (10)

平均値 ± 標準偏差

(n)・羽数

a) 全例死亡

有意差(*:p 0.05, **:p 0.01)

(2) 病理学検査 (表 3、4)

器官重量は、10及び20ppm群の雄で肝臓に絶対重量の高値傾向及び相対重量の有意な高値が認められた。雄の精子の数及び運動性並びに雌の卵巣の最大卵胞径に有意な変化は認められなかった。

表 3 ディルドリンを20週間投与したウズラ（親鳥）の器官重量

性	用量(ppm)	羽数	体重 (g)	脳 (g)	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	精巣 (g)	卵巣 (g)	卵管 (g)	
絶対重量	0(対照)	12	124 ±8	0.76 ±0.05	1.79 ±0.28	42.1 ±9.7	2.89 ±0.64			
	0.4	12	122 ±10	0.73 ±0.05	1.93 ±0.50	36.2 ±9.3	2.92 ±0.45			
	2	12	122 ±10	0.74 ±0.06	1.98 ±0.30	40.8 ±11.0	2.74 ±0.40			
	10	12	114 ±14	0.70 ±0.04	2.09 ±0.39	32.5 ±7.5	2.55 ±0.38			
	20	8	113 ±9	0.76 ±0.05	2.14 ±0.21	35.4 ±15.0	2.48 ±0.64			
	相対重量 ^{a)}	0(対照)	12	124 ±8	0.62 ±0.05	1.45 ±0.23	34.2 ±8.3	2.34 ±0.51		
		0.4	12	122 ±10	0.60 ±0.05	1.57 ±0.34	29.8 ±7.9	2.40 ±0.43		
		2	12	122 ±10	0.61 ±0.07	1.62 ±0.21	33.6 ±9.6	2.27 ±0.44		
		10	12	114 ±14	0.62 ±0.06	1.85 ** ±0.36	28.6 ±6.4	2.25 ±0.30		
		20	8	113 ±9	0.67 ±0.04	1.91 ** ±0.25	31.8 ±14.3	2.18 ±0.43		
絶対重量	0(対照)	12	148 ±9	0.72 ±0.07	4.42 ±0.78	64.8 ±11.7		4.73 ±0.95	15.51 ±2.02	
	0.4	12	149 ±11	0.72 ±0.08	3.70 ±0.39	61.1 ±18.2		4.78 ±1.46	12.72 ±4.62	
	2	11	148 ±7	0.74 ±0.04	4.40 ±1.25	61.0 ±18.9		4.45 ±0.84	14.55 ±2.93	
	10	11	152 ±8	0.77 ±0.04	4.56 ±1.28	64.3 ±17.9		4.20 ±1.14	12.11 ±4.03	
	20	10	148 ±9	0.73 ±0.03	3.94 ±0.57	62.5 ±15.8		4.36 ±1.18	14.71 ±3.11	
相対重量 ^{a)}	0(対照)	12	148 ±9	0.49 ±0.04	2.98 ±0.43	43.9 ±8.6		3.20 ±0.66	10.48 ±1.37	
	0.4	12	149 ±11	0.48 ±0.04	2.48 ±0.21	41.4 ±13.1		3.21 ±0.97	8.56 ±3.12	
	2	11	148 ±7	0.50 ±0.04	2.97 ±0.79	41.2 ±12.1		3.01 ±0.55	9.85 ±1.95	
	10	11	152 ±8	0.51 ±0.04	3.02 ±0.86	42.6 ±12.6		2.78 ±0.80	8.05 ±2.85	
	20	10	148 ±9	0.49 ±0.02	2.66 ±0.39	41.9 ±9.1		2.95 ±0.82	9.97 ±2.30	

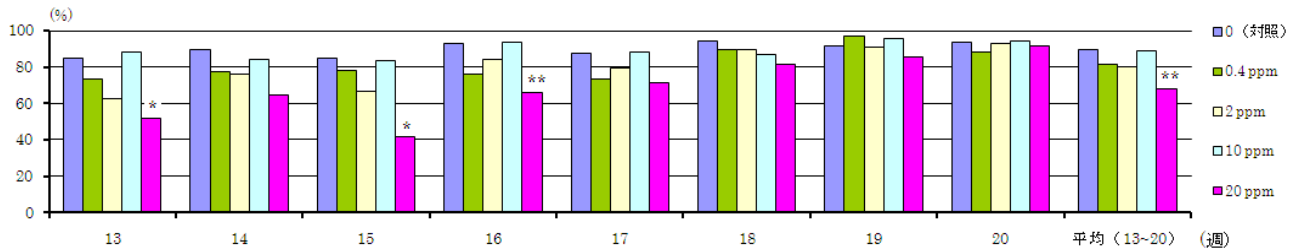
a): 体重100gに対する対体重比
 平均値 ± 標準偏差
 有意差 (**: p < 0.01)

2) 繁殖能に関する指標

(1) 産卵に対する影響 - 産卵率

20ppm群で投与13、15及び16週の産卵率並びに13～20週の8週間の平均産卵率に有意な低下が認められた。

産卵率



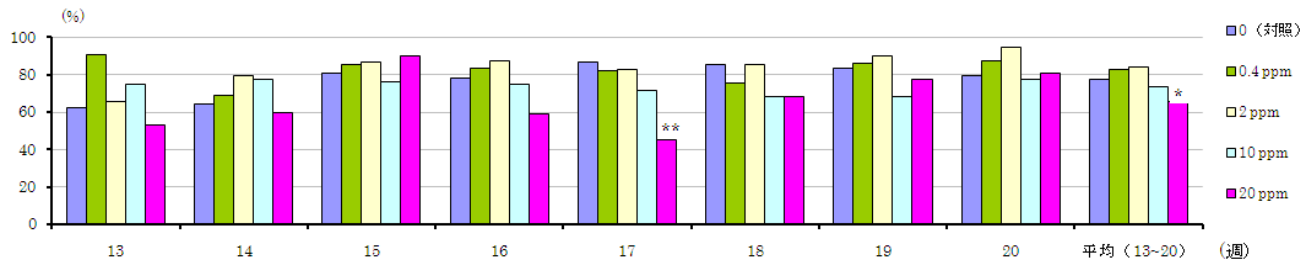
(2) 卵殻質に対する影響 - 卵殻の厚さ、異常卵の発生率

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

20ppm群の投与17週の孵化率及び13~20週の8週間の平均孵化率に有意な低下が認められた。胚の発生率には有意な変化は認められなかった。

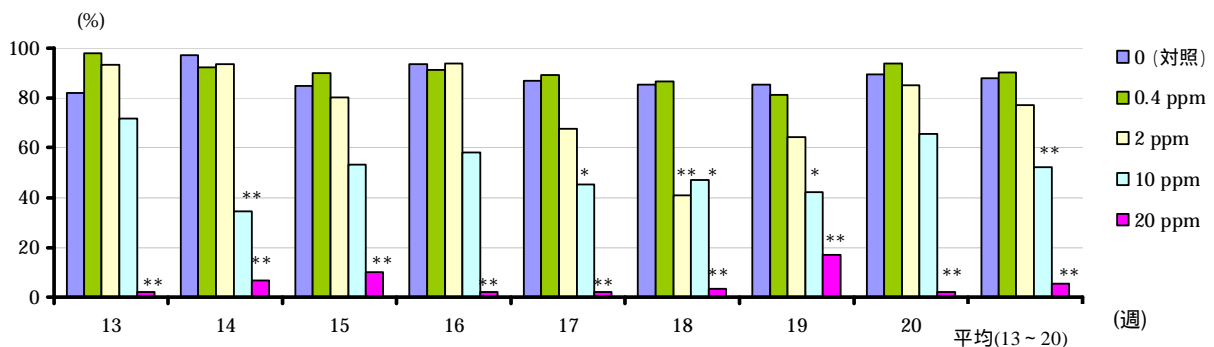
孵化率



(4) 若鳥の生存に対する影響 - 育成率

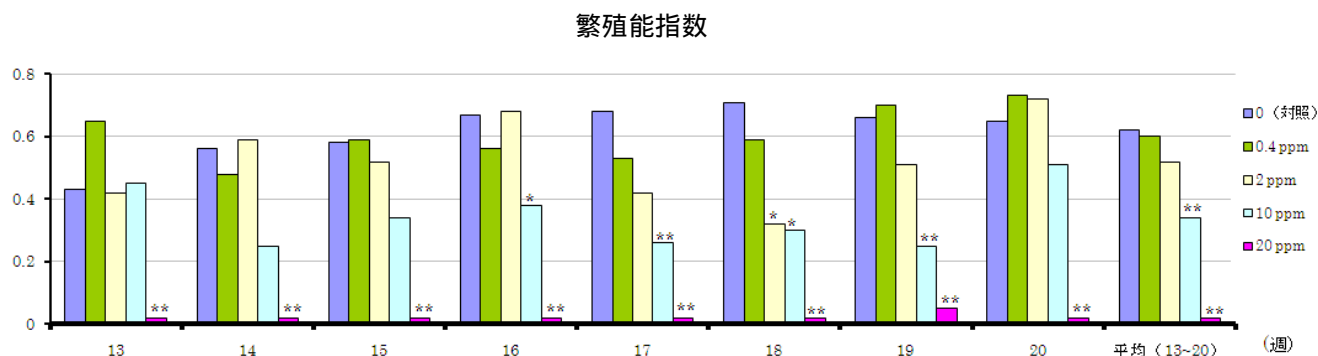
2ppm群で育成率の低下傾向がみられ、投与18週の育成率には有意差が認められた。10ppm群では投与14、17、18及び19週の育成率並びに13~20週の平均育成率に有意な低下が認められた。20ppm群では孵化後短期間の内に雛の大部分が死亡し、投与13~20週の全ての週の育成率並びにその間の平均育成率に有意、かつ顕著な低下が認められた。

育成率



3) 繁殖に対する影響の評価 - 繁殖能指数、繁殖抑制率

親鳥に投与して重篤な毒性が認められない用量においても、若鳥の育成率の明らかな低下が認められ、鳥類の繁殖に対する有害影響が確認された。繁殖抑制率として現すと、2ppm群で16.1%、10ppm群で45.2%、20ppm群で98.6%であった。



繁殖抑制率

群(ppm)	項目	13	14	15	16	17	18	19	20	平均(13-20) (週)
0(対照)	繁殖能指数	0.43	0.56	0.58	0.67	0.68	0.71	0.66	0.65	0.62
0.4	繁殖能指数	0.65	0.48	0.59	0.56	0.53	0.59	0.70	0.73	0.60
	繁殖抑制率(%)	-51.2	14.3	-1.7	16.4	22.1	16.9	-6.1	-12.3	3.2
2	繁殖能指数	0.42	0.59	0.52	0.68	0.42	0.32*	0.51	0.72	0.52
	繁殖抑制率(%)	2.3	-5.4	10.3	-1.5	38.2	54.9	22.7	-10.8	16.1
10	繁殖能指数	0.45	0.25	0.34	0.38*	0.26**	0.30*	0.25**	0.51	0.34**
	繁殖抑制率(%)	-4.7	55.4	41.4	43.3	61.8	57.7	62.1	21.5	45.2
20	繁殖能指数	0.00**	0.04**	0.02**	0.00**	0.00**	0.02**	0.05**	0.00**	0.02**
	繁殖抑制率(%)	100.0	92.9	96.6	100.0	100.0	97.2	92.4	100.0	96.8

有意差(*:p≦0.05、** :p≦0.01)

まとめ

ディルドリンについて20週間鳥類繁殖毒性試験を0.4、2、10、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、

2ppm (0.22mg/kg/日) 群で若鳥の育成率の低下傾向が認められた。

10ppm群で若鳥の育成率の有意な低下が認められた。

20ppm 群では、親鳥に翼下垂や痙攣等の症状及び死亡率の増加が認められ、また有意な産卵率及び孵化率の低下が認められた。さらに、孵化した雛は短期間内に大部分が死亡し、若鳥の生存に対する顕著な影響が認められた。

14日齢まで生存する若鳥の1日当りの生産能力を繁殖能指数とし、これを対照群と比較して繁殖抑制率で現すと、0.4ppm群は抑制率3.2%で繁殖に対する影響は認められなかったが、2ppm群16.1%、10ppm

群45.2%、20ppm群96.8%と飼料中濃度と相関して繁殖能に影響が認められ、20ppm群では、次世代の生産がほとんど認められなかった。

以上の結果より、繁殖に対する無影響濃度（NOEC）は、0.4ppm（0.042mg/kg/日）と結論された。