

<化学物質の鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験> (案)

I 適用範囲

ここでは、化学物質の鳥類の繁殖に及ぼす影響に関する試験の標準となるべき方法について規定する。

II 定義

この試験法において使用する用語は、次の例による。

NOEC (無影響濃度) 試験に用いた濃度のうち、統計的に有意な影響を与えない最高の被験物質濃度をいう。

基礎餌料 親に対する繁殖用餌料あるいは幼鳥に対する初期餌料で、それぞれの試験種に適切で、必要な栄養素をすべて含むものをいう。

卵群 一度に孵卵する卵、又は生まれた卵のうち卵殻にひびの入った卵及び卵殻の厚さ測定のために使用する卵を除いた残りのすべての卵をいう。

III 被験物質の物理化学的特性等

試験を実施するためには、被験物質の水への溶解度及び蒸気圧を測定し、餌料中の被験物質を定量するための信頼できる分析方法が必要である。また、被験物質の試験手法に関係する、構造式、純度、水及び光に対する安定性並びに餌料中における安定性に関する情報をできるだけ収集する。

IV 予備試験

あらかじめ被験物質のおおよその毒性を把握するために、OECDテストガイドライン 205で定められた方法に準じて鳥類摂餌毒性試験をする。

V 試験方法

目的

本試験は、親鳥に被験物質を投与し、親鳥の死亡率、産卵数、卵殻にひびの入った卵数、卵殻の厚さ、胚の発生率、孵化率及び若鳥に対する影響を観察することにより、被験物質が鳥類の繁殖に及ぼす毒性を明らかにすることを目的とする。

1 供試生物

1種又は、それ以上の鳥類を用いる。ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) を推奨

するが、例えば、マガモ (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*)、コリンウズラ (*Colinus virginianus*) 等を使用してもよい。これら以外の鳥類を使用する場合には、その種を使う正当性を報告書の中に記載する。鳥は購入するか、当該施設で維持・飼養しているものを使用する。搬入時に検査して、鳥が病気及び傷害をうけていないことを確認する。試験に用いる鳥は、既知の系統の同一集団からのものでなければならない。マガモとコリンウズラは野生種と外見的に同様でなければならない。

2 試験方法

2. 1 試験設備及び機器

(1) 試験設備

適切な試験設備を用い、室内で鳥を飼育することが望ましい。試験設備には、良好な換気、温度、湿度、照明を制御する機構が必要である。人工照明は自動制御でき、可視部のスペクトルが太陽光に近似したものをを用いる。点灯及び消灯時に 15-30 分の照明移行期間を設けることが望ましい (15-30 分かけて、徐々に明るくするあるいは暗くすることが望ましい)。

(2) 装置

次の装置を用いる。

- ・親鳥及び若鳥を飼育するための適切な広さを有する清浄な鳥かごあるいは囲い (以下鳥かご)。きれいな床敷きを用いてもよい。若鳥に対する育雛器は温度制御装置を設けなければならない。
- ・孵卵器は自動的に温度及び湿度を調節でき、転卵装置を有するものが望ましい。
- ・一定の温度及び湿度で卵を保管する装置あるいは設備

2. 2 じゅん化

親鳥を無作為に試験濃度区及び対照区に割り付ける。少なくとも 2 週間、試験濃度区及び対照区の鳥を試験設備及び基礎餌料に慣らす。じゅん化 1 週間の間に共存できない鳥を再配分しなおしてもよい。

じゅん化期間中に雄雌のいずれかの 3% が死ぬか又は衰弱した場合、当該群の鳥を試験に使用してはならない。

2. 3 試験の実施

2. 3. 1 試験条件

(1) 環境条件

親鳥を $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、50~75% の湿度で良好な換気のもとに維持する。表 1 には、これ以外のそれぞれの種に特有の条件を記す。

餌料中に被験物質を入れない点を除き、環境条件は、じゅん化期間も暴露期間も同じである。可能な限り化学物質の使用あるいは薬物の投与を避けるが、使用した場合には記載する。

鳥の行動に著しい影響を与える環境のかく乱を避ける。(環境を著しく乱して、鳥の行動に影響を与えることは極力避けるようにする)

卵と若鳥の環境条件を表2に示す。

表に示された温度と湿度は強制的な通風装置を有する孵卵器を用いる場合の条件である。強制的に通風しない場合は、温度は1.5~2℃、湿度は約10%高くしなければならない。高地ではより高い湿度が必要である。育雛器における温度は床面から2.5~4cmの位置で測定しなければならない。

表1 親鳥のための推奨される条件

種	暴露開始時の齢	齢の範囲	つがい当りの鳥かごの最小床面積(注1)
ウズラ	(注2)	±1/2週	0.15m ²
マガモ	9-12ヶ月	±2週	1m ²
コリンウズラ	20-24週	±1週	0.25m ²

注1 羽数が多くなる場合、床面積はそれに応じて広くする。

注2 ウズラに関しては、この種にみられる変動の幅を小さくするために、使用前に繁殖可能な鳥である事を確認することを推奨する。

表2 卵と若鳥のための推奨される条件

	温度(℃)	湿度(%)	転卵
ウズラ			
貯卵	15-16	55-75	任意
孵卵	37.5	50-70	行う
孵化	37.5	70-75	行わない
若鳥、1週目	35-38	50-75	—
若鳥、2週目	30-32	50-75	—
マガモ			
貯卵	14-16	60-85	任意
孵卵	37.5	60-75	行う
孵化	37.5	75-85	行わない
若鳥、1週目	32-35	60-85	—
若鳥、2週目	28-32	60-85	—
コリンウズラ			
貯卵	15-16	55-75	任意
孵卵	37.5	50-65	行う

孵化	37.5	70-75	行わない
若鳥、1週目	35-38	50-75	—
若鳥、2週目	30-32	50-75	—

(2) 被験物質の投与

試験には少なくとも被験物質の3濃度区が必要である。被験物質の飼料中濃度は、鳥類摂餌毒性試験の結果に基づき定める。最高濃度は LC_{10} (10%の鳥を死亡させたと算定される餌料中の被験物質濃度) の約 1/2 とする。それ以下の濃度区は最高濃度の等比級数的にとる(例えば最高濃度の 1/6 及び 1/36)。推奨する最高濃度は 1000mg/kg である。

被験物質の必要量を含む餌料は、被験物質の必要量と親鳥を飼育するための基礎餌料とを混合することによって調製する。被験物質は、餌料中で均一に分散していなければならない。均一に分散させるために、鳥に対して低毒性の助剤を用いてもよい。助剤は餌料重量の2%を超えてはならない。

助剤を用いる場合、対照区の餌料にも同一助剤を添加しなければならない。水、コーンオイル、あるいは被験物質の毒性を変化させないという明白な証明が得られているその他の助剤を使用することができる。毒性を変化させないという明白な証明のない助剤を用いる場合には、その正当性を報告書の中に記載する。

若鳥の餌料には、被験物質及び助剤を添加してはならない。

表 3 繁殖に係る項目の正常値 (注3)

項目	ウズラ	マガモ	コリンウズラ
産卵数/雌鳥 (10週間)	40-65	28-38	28-38
卵殻にひびのある卵の発生率 (%)	—	0.6-6	0.6-2
発生率 (卵群あたりの生存胚、%)	80-92	85-98	75-90
孵化率 (卵群あたりの孵化した卵、%)	65-80	50-90	50-90
14日間生存した雛鳥の率 (%)	93	94-99	75-90
14日齢の生存数/雌鳥	28-38	16-30	14-25
卵殻の厚さ (mm)	0.19-0.23	0.35-0.39	0.19-0.24

注3 この値は典型的なものであるが、必ずしもすべての試験機関にとって代表的なものではない。対照区の鳥がこれらの値と合致しない場合には、試験のやり方及び条件を検討しなければならない。

(3) 試験操作

鳥を一つがい又は一羽の雄と二羽の雌 (ウズラ及びコリンウズラの場合) 若しくは

一羽の雄と三羽の雌（マガモの場合）よりなる一群を鳥かごで飼育する。適切と考えられる場合には、他の組み合わせも可能である。試験濃度区と対照区の鳥を同一試験条件下で飼育する。一つがいで行う場合、少なくとも12の鳥かごを各試験濃度区及び対照区に用いる。一群の場合、少なくともマガモでは8鳥かご、コリンウズラ及びウズラでは12鳥かごを各試験濃度区及び対照区に用いる。

試験は、被験物質を含む餌料を親鳥に与えることによって始まり、暴露期間中、親鳥に餌料を与えつづける。若鳥に対しては、被験物質及び助剤を含まない餌料を与える。清浄な水を随意に飲めるようにする。

試験を人工的な室内条件下で行う場合、暴露開始後8週間、短日条件下で鳥を飼育する（7～8時間照明/日）。この期間、暗期を光中断すべきではない。それ以降、照明時間を16～18時間照明/日に延長し、鳥を繁殖状態にする。照明時間を延長した後、2～4週で産卵を開始する。

試験を屋外条件下で実施する場合、用いる種の各試験地点での自然産卵季節に対応する時期に行わなければならない。産卵が始まる前の少なくとも10週間、被験物質を含む餌料を鳥に与える。

いずれの条件下でも、産卵開始後、少なくとも8週間、なるべくなら10週間試験を続ける。

暴露開始1週間後の餌料中の被験物質濃度は、設定濃度の80%を下回ってはならない。餌料中の被験物質の安定性が十分明らかでない場合には、最初の一週間の間に、最高及び最低試験濃度の被験物質を含む餌料を、混合直後及び餌料を交換した4時間以内に分析する。すべての分析値が設定濃度の80%を超えている場合、新たに分析を行う必要はなく、被験物質濃度を維持するために十分な頻度で供試餌料を取り替えることとする。

一連の分析で、餌料中の被験物質濃度が設定濃度の80%以下である場合、初期濃度を上げるか又は頻繁に餌料を交換することによって、実際の濃度を維持するための調整を行なう。この調整によって設定濃度の80%が保たれていることを確認するために、暴露第2週目にも分析を行なう。

餌料中で被験物質が安定であっても、鳥かご中の餌料を少なくとも1週間に一度交換する。もし、被験物質が餌料を毎日取り替えることでしか安定に投与できない場合は、試験そのものの有効性は保証できない。

産卵開始後は卵を毎日集め、鳥かごに対応する記号をつける。貯卵し、孵化させるために毎週又は隔週で孵卵器に入れる（表2参照）。孵卵器に入れる前に、卵を光にかざし傷を検出する。傷の入った卵は孵化に用いない。6～11日後に孵化用の卵を光にかざし発生が進んでいるかどうかを調べる。

各鳥かごから少なくとも2つの卵を、あらかじめ決めておいたスケジュール（たとえば3番目と10番目の卵又は5、20、35日に集められたすべての卵）に従い集め、卵殻の厚さを測定する。傷の入った卵については数を記録するが、卵殻の厚さは測定しない。卵を割り、洗い、膜をつけたまま乾燥し、周囲の3～4点の卵殻の厚さを測定する。

卵はウズラの場合16日目、マガモの場合23日目、コリンウズラの場合21日目で孵卵条件から孵化条件に移す。孵化はウズラの場合17～18日目、マガモの場合25～27日目、コリンウズラの場合23～24日目までに完了するはずである。

雛鳥をもとの鳥かごに対応するグループとして収容するか、個々に印をつけて収容する。雛鳥を被験物質を含まない適切な餌で14日間飼育する。若鳥のための温度及び湿度を表2に示す。なるべく点灯時及び消灯時に15～30分の移行期間を設けた明暗周期のある条件（例えば14時間一明、10時間一暗）のもとで飼育する。

2. 3. 2 観察

試験期間中、次の項目について観察しなければならない。

- ・死亡及び中毒症状 毎日
- ・親鳥の体重 摂食期間の最初、産卵の開始前、及び試験終了時
- ・若鳥の体重 14日齢
- ・親鳥の摂餌量 試験期間中毎週又は隔週
- ・若鳥の摂餌量 孵化後第1週及び第2週
- ・肉眼的病理検査 全ての親鳥

また、被験物質のある特定の組織への残留量の測定値も用いることができる。

2. 4 試験の有効性

試験を有効なものとするためには、次の条件を満たさなければならない。

- ・対照区における親鳥の死亡率は、試験終了時に10%を超えてはならない。
- ・対照区の親雌鳥あたりの14日齢の若鳥の平均生存数は、ウズラ、マガモ及びコリンウズラにおいて少なくとも各々24、14、12羽でなければならない。
- ・対照区における卵殻の平均の厚さは、ウズラ、マガモ及びコリンウズラにおいて少なくとも各々0.19、**0.34**、0.19mmでなければならない。
- ・試験期間中、被験物質の餌料中濃度が十分に維持されていること（設定濃度の少なくとも80%以上）が明らかでなければならない。

なお、推奨された濃度設定を用い、さらに繁殖への影響が認められない場合、NOEC（無影響濃度）は、試験した最高濃度以上であると報告してもよい。

3 結果の処理

分散分析法などの適切な統計的手法を用いて、試験濃度区のデータを個々に対照区と比較する。

分析対象は、表 3 に示す項目と可能ならば産卵鳥の比率（%）、親鳥の体重及び生存していた 14 日齢の若鳥の体重とする。