

TBTO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。）は第一種特定化学物質に指定されているTBTO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25～400ppm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TBTO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TBTO（CAS No. 56-35-9）は、試薬（AccuStandard, Inc.、純度96%）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400ppmとし、以下200、100、50、及び25ppm（公比2）の計5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TBTO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（25、50、100、200及び400ppm）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、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5群（25、50、100、200及び400ppm）の計6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飼料消費量を算出した。

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、33日及び40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。

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

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

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

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

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

5) 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・異常卵の発生率・胚の発生率・孵化率・育成率）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。

結果

1) 親鳥に対する一般毒性学的影響 (表 1)

雄では臨床観察、体重及び病理学検査で、TBTOの投与による明らかな影響は認められなかった。雌では、TBTO投与群で、うずくまり、元気消失、翼下垂等の症状の発現率が対照群と比べて高く、死亡も各群に1~2羽認められた。TBTO投与群の症状の発現や死亡には産卵との関連性がみられ、産卵が長引き、いきむが放卵できない産卵困難な状態の持続下で、あるいはその後衰弱して死亡した。しかしながら、投与濃度の増加と相関して症状や死亡の発現率が増加する傾向は明らかではなかった。器官重量では、卵管重量の明らかな低値が認められ、50ppm以上の群の絶対重量及び25ppm以上の相対重量に有意差が認められた。卵巢重量及び卵巢の最大卵胞径に変化は認められなかった。

表 1 TBTOを6週間投与したウズラ雌親の器官重量

♀	用量 (ppm)	供試羽数	体重 (g)	脳 (g)	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	卵巢 (g)	卵管 (g)
絶対重量	0	12	140 ±7	0.71 ±0.06	4.34 ±0.71	84.6 ±23.9	4.00 ±1.75	12.81 ±4.92
	25	10	145 ±12	0.73 ±0.07	4.41 ±1.11	79.8 ±31.1	4.65 ±2.42	8.82 ±5.44
	50	11	145 ±12	0.72 ±0.06	3.97 ±0.64	74.0 ±20.6	4.49 ±2.13	6.04 ** ±4.45
	100	11	143 ±11	0.67 ±0.04	3.89 ±0.69	94.8 ±31.5	3.97 ±2.56	7.15 * ±4.33
	200	10	141 ±11	0.69 ±0.06	4.27 ±0.78	66.8 ±17.7	4.21 ±2.60	6.15 ** ±3.99
	400	10	154 ±14	0.69 ±0.11	4.46 ±0.84	67.5 ±22.1	5.61 ±1.54	7.51 * ±3.38
	相対重量 ^a	0	12	140 ±7	0.51 ±0.05	3.11 ±0.47	61.2 ±19.5	2.84 ±1.22
25		10	145 ±12	0.51 ±0.05	3.05 ±0.71	55.3 ±21.4	3.20 ±1.57	6.03 ** ±3.58
50		11	145 ±12	0.50 ±0.05	2.75 ±0.40	51.9 ±17.2	3.08 ±1.44	4.16 ** ±3.06
100		11	143 ±11	0.47 ±0.06	2.73 ±0.52	66.0 ±19.3	2.69 ±1.60	4.92 ** ±2.89
200		10	141 ±11	0.49 ±0.04	3.02 ±0.49	47.7 ±13.9	2.94 ±1.70	4.25 ** ±2.54
400		10	154 ±14	0.46 ±0.09	2.93 ±0.61	43.8 ±12.3	3.67 ±1.02	4.94 ** ±2.33

平均値±標準偏差

有意差 (* : p ≤ 0.05, ** : p ≤ 0.01)

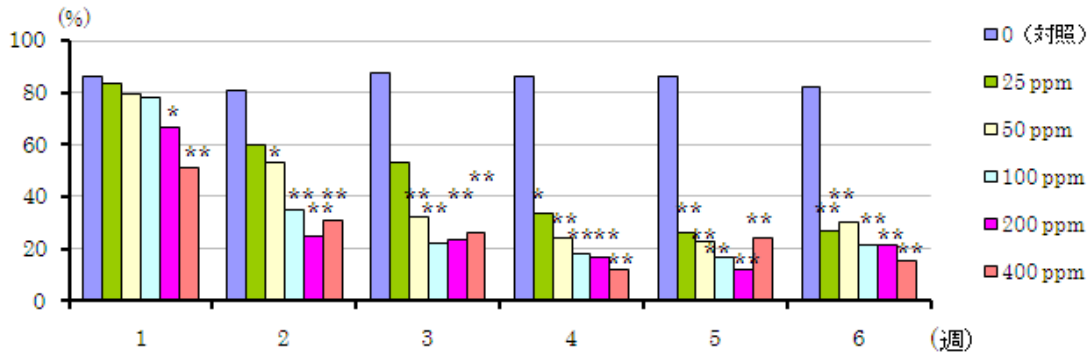
a : 体重 100g あたりの対体重比

2) 繁殖能に関する指標

(1) 産卵に対する影響 — 産卵率

投与濃度に相関した産卵率の明らかな低下が認められ、投与4週以降は全てのTBTO投与群で対照群と比べて有意差が認められ、産卵に対する影響は顕著なものであった。

産卵率

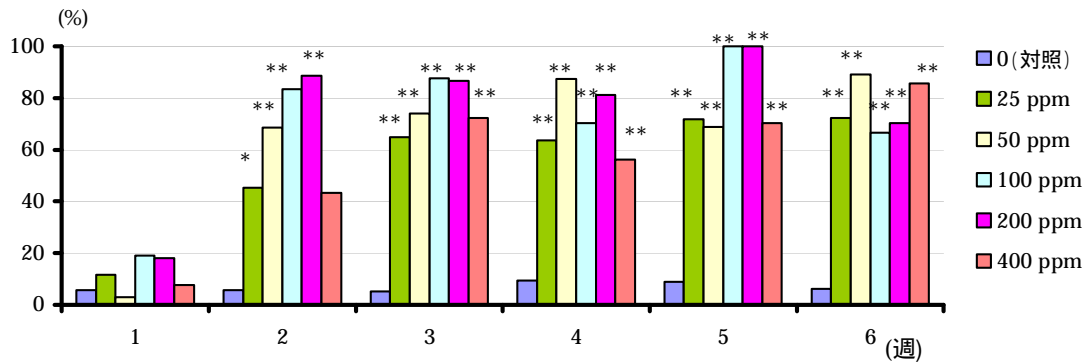


有意差 (* : p 0.05、** : p 0.01)

(2) 卵殻質に対する影響 — 異常卵の発生率

TBTO投与群で、卵殻の厚さが低下し、投与1週からひびのある卵や軟卵等の異常卵が増え、2週以降は40~100%が異常卵となり、放卵時から殻が破れている卵(破卵)も多く認められた。

異常卵の発生率

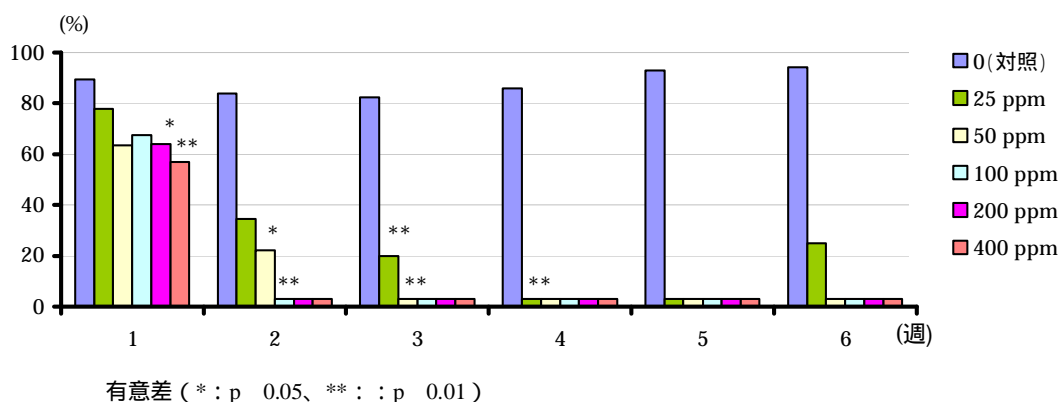


有意差 (* : p 0.05、** : p 0.01)

(3) 胚の発生に対する影響 — 孵化率

TBTO投与群で胚の発生率の低下傾向並びに孵化率の明らかな低下が認められ、100ppm以上の群で投与2週以降、50ppm群で3週以降、25ppm群で4週以降の孵化率は0%であった。

孵化率



まとめ

TBTOに対する6週間鳥類繁殖毒性試験を25、50、100、200及び400ppm濃度の飼料添加により実施し、鳥類の繁殖に対する影響を調べた。その結果、

25ppm (3.0mg/kg/日) 群以上で産卵率及び卵殻質に対する明らかな影響が認められた。

投与4週以降は全てのTBTO投与群の孵化率が0%であった。

これらの結果は、本試験と同じ用量で実施した20週間鳥類繁殖毒性試験の結果と類似したものであった。

追加試験

25～400ppmの濃度範囲で実施したTBTOの6週間鳥類繁殖毒性試験では、最低濃度から繁殖に対する影響が認められ、無影響濃度 (NOEC) を明らかにすることができなかつたため、追加試験としてより低濃度の3、6及び12ppmの計3濃度を設定し、6週間鳥類繁殖毒性試験を実施した。(方法は、前述の「6週間鳥類繁殖毒性試験」と同様、供試ウズラは各群12ペア)。

結果

1) 親鳥に対する一般毒性学的影響 (表 1)

臨床観察、体重、飼料摂取量、剖検所見、精子数及びその運動性並びに卵巣の最大卵胞径に被験物質投与の影響は認められなかつた。器官重量では12ppm群で雌に卵管の絶対重量及び相対重量に共通した有意、かつ明らかな低値が認められた。雄の器官重量には変化は認められなかつた。

表 1 TBTOを6週間投与したウズラ雌親の器官重量

♀	用量 (ppm)	供試羽数	体重 (g)	脳 (g)	肝臓 (g)	脾臓 (mg)	卵巣 (g)	卵管 (g)
絶対重量	0	12	138 ±7	0.77 ±0.04	4.27 ±0.71	62.0 ±23.7	4.26 ±1.19	14.13 ±4.12
	3	12	143 ±10	0.75 ±0.05	4.27 ±0.61	65.3 ±18.4	3.97 ±1.68	13.51 ±5.42
	6	12	146 ±9	0.72 ±0.05	4.35 ±0.73	84.9 ±28.6	4.41 ±1.48	11.56 ±4.73
	12	12	147 ±13	0.74 ±0.06	4.59 ±1.11	67.9 ±25.1	4.34 ±2.16	6.87 ** ±3.36
相対重量 ^a	0	12	138 ±7	0.55 ±0.04	3.11 ±0.57	45.3 ±17.9	3.09 ±0.84	10.22 ±2.92
	3	12	143 ±10	0.53 ±0.04	3.00 ±0.46	46.0 ±13.2	2.76 ±1.12	9.42 ±3.71
	6	12	146 ±9	0.49 ** ±0.03	2.96 ±0.37	57.9 ±19.4	2.98 ±0.84	7.89 ±3.14
	12	12	147 ±13	0.51 ** ±0.05	3.13 ±0.67	46.9 ±19.4	2.93 ±1.44	4.66 ** ±2.17

平均値±標準偏差

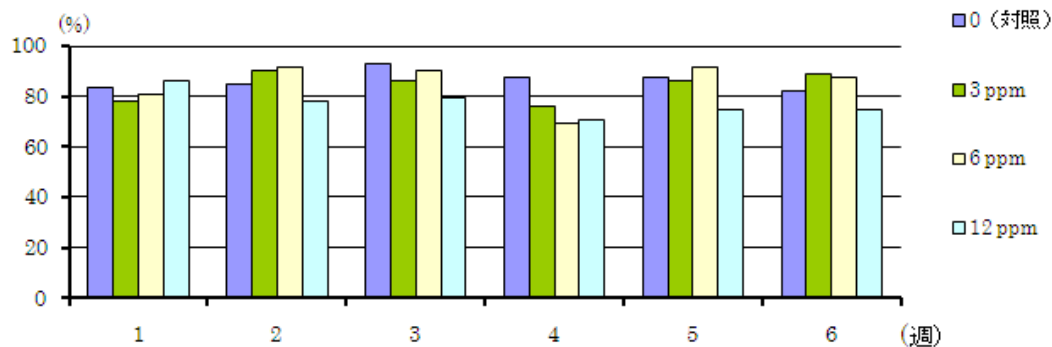
有意差(*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$)

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

12ppm群で産卵率の低下傾向が認められた。統計学的有意差は認められなかった。



(2) 卵殻に対する影響 — 異常卵の発生率

12ppm群で卵殻の厚さの低下傾向及び卵殻にひびのある卵の発現率の増加傾向が認められた。統計学的有意差は認められなかった(表 2)。

表 2 TBTOを6週間投与したウズラ由来の卵殻の厚さ

(mm)

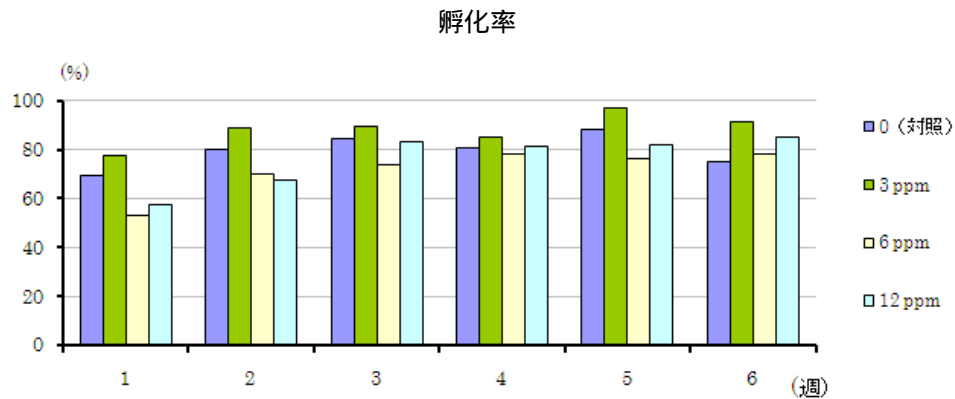
用量(ppm)	投与開始後						
	5	12	19	26	33	40	42 (日)
0(対照)	0.16 ± 0.01 (9)	0.17 ± 0.02 (10)	0.17 ± 0.01 (8)	0.17 ± 0.01 (9)	0.16 ± 0.01 (11)	0.17 ± 0.01 (8)	0.17 ± 0.01 (10)
3	0.15 ± 0.02 (10)	0.17 ± 0.01 (10)	0.17 ± 0.01 (11)	0.16 ± 0.01 (9)	0.16 ± 0.01 (9)	0.16 ± 0.01 (10)	0.16 ± 0.01 (11)
6	0.16 ± 0.01 (9)	0.17 ± 0.01 (10)	0.17 ± 0.02 (8)	0.17 ± 0.01 (10)	0.16 ± 0.01 (10)	0.17 ± 0.01 (10)	0.16 ± 0.01 (12)
12	0.15 ± 0.01 (8)	0.16 ± 0.02 (8)	0.16 ± 0.02 (8)	0.15 * ± 0.01 (8)	0.15 ± 0.02 (12)	0.16 ± 0.02 (10)	0.15 ± 0.02 (10)

平均値 ± 標準偏差(卵数)

有意差(*: p 0.05)

(3) 発生に対する影響 — 孵化率

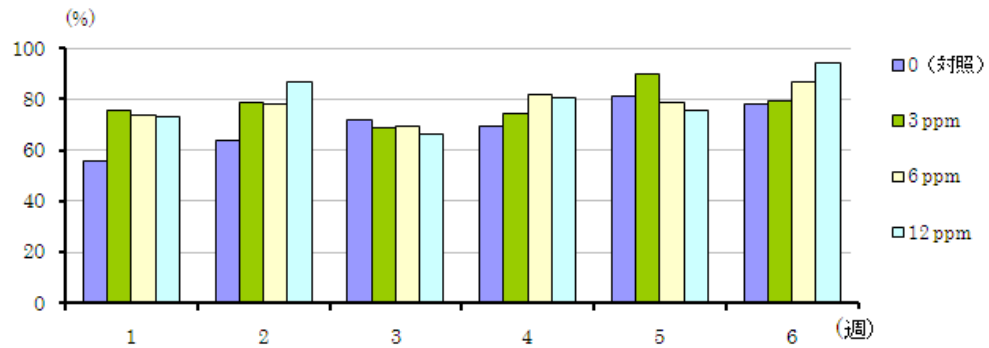
孵化に対する影響は認められなかった。



(4) 若鳥の生存に対する影響 — 育成率

若鳥の生存に対する影響は認められなかった。

育成率



まとめ

TBTOに対する6週間鳥類繁殖毒性試験の追加試験を3、6及び12ppmの用量で実施した。その結果、12ppm (1.4mg/kg/日) 群で産卵、卵殻質及び卵管重量に対する影響が認められ、TBTOの影響が軽度に見られた。

6ppm以下の群では、TBTOの影響は認められなかった。

以上の結果より、無影響濃度 (NOEC) は6ppm (0.71mg/kg/日) と結論された。