

TBTO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TBTO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、TBTO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、週ごとに飼料消費量を算出した。

産卵確認、貯卵、孵卵、検卵

投与開始9週で長時日照明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88日、95日、102日、109日、116日、123日、130日、137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。

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

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

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

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

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

4) 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。分散が一様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1～3）

雄では、臨床観察、体重及び病理学検査でTBTOの投与による変化は認められなかった。雌では、うずくまり、元気消失、翼下垂が全てのTBTO投与群で認められ、200及び400ppm群の発現率には有意差が認められた。また、死亡は全てのTBTO投与群で数例認められ、多くの場合は放卵が困難な状態（いきむが放卵できない）での死亡であったが、被験物質の飼料中濃度と相関して増加する傾向は認められなかった。体重及び飼料摂取量に被験物質投与による明らかな影響は認められなかった。病理学検査では、TBTO投与の死亡例に、破損した卵殻片と思われる白色物や軟卵の滞留、裂傷、出血、変色及び腹腔内の血液凝固塊並びに排泄腔粘膜の脱出などの変化が認められた。器官重量では50ppm以上の群で卵管重量、200ppm以上の群では脾臓重量のいずれも低値が認められた。卵巣の最大卵胞径に有意な変化は認められなかった。

表 1 TBTO20週間投与したウズラ（親鳥）の臨床観察

用量 (ppm)	0(対照)			25			50			100			200			400			
	雄	雌	計	雄	雌	計	雄	雌	計	雄	雌	計	雄	雌	計	雄	雌	計	
症状	羽数	12	12	24	12	12	24	12	12	24	12	12	24	12	12	24	12	12	24
一般状態の変化																			
うずくまり		0	2	2	0	4	4	0	4	4	0	6	6	0	6	6	0	6	6
元気消失		0	0	0	0	3	3	0	1	1	0	4	4	0	7	7*	0	5	5*
翼下垂		0	0	0	0	3	3	0	2	2	0	3	3	0	8	8**	0	6	6*
総排泄腔粘膜の脱出		0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
死亡		0	0	0	0	7	7*	0	7	7*	0	3	3	0	4	4	0	2	2

有意差 (* : p 0.05, ** : p 0.01)

表 2 TBTO20週間投与したウズラ（雌親）の剖検所見

臓器（部位）：所見	群 用量 (ppm) 転帰 羽数	無投与対照		TBTO投与																					
		0				25				50				100				200				400			
		KD	FD	合計	合計	KD	FD	合計	合計	KD	FD	合計	合計	KD	FD	合計	合計	KD	FD	合計	合計				
腹腔	血液凝固塊貯留	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2	0	1	1								
卵管子宮部・ 排泄腔	軟卵/白色物滞留	0	0	1	1	0	3	3	0	2	2	0	0	0	0	0	0								
	出血/変色/裂傷	0	0	2	2	0	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0								
	粘膜脱出	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1								
卵巢	萎縮	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0								

KD：投与期間終了時解剖； FD：投与期間中死亡

表 3 TBTOを20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 ±1.75	12.81 ±4.92
	25	5	152 ±7	0.73 ±0.07	4.52 ±0.75	73.3 ±16.6	4.79 ±2.61	10.82 ±5.01
	50	5	151 ±6	0.7 ±0.07	4.39 ±0.40	72.4 ±19.2	4.26 ±2.35	6.73 ±4.39
	100	9	143 ±12	0.68 ±0.05	3.89 ±0.76	102.1 ±27.9	3.68 ±2.84	5.46 ** ±3.17
	200	8	145 ±13	0.7 ±0.06	4.12 ±0.87	61.5 ±17.3	4.64 ±2.79	7.74 ±4.97
	400	10	156 ±13	0.68 ±0.11	4.31 ±0.80	65 ±23.4	5.77 ±1.92	7.25 * ±3.43
	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		5	152 ±7	0.48 ±0.02	2.99 ±0.60	48 ±9.4	3.14 ±1.64	7.18 ±3.43
50		5	151 ±6	0.47 ±0.05	2.9 ±0.20	48.1 ±14.1	2.84 ±1.62	4.54 * ±3.17
100		9	143 ±12	0.48 ±0.06	2.74 ±0.58	71.2 ±15.5	2.48 ±1.77	3.77 ** ±2.05
200		8	145 ±13	0.48 ±0.04	2.83 ±0.55	42.6 * ±13.2	3.12 ±1.78	5.15 * ±3.07
400		10	156 ±13	0.45 ±0.09	2.78 ±0.50	41.4 * ±12.9	3.72 ±1.25	4.68 ** ±2.33

平均値 ± 標準偏差

有意差 (* : p 0.05, ** : p 0.01)

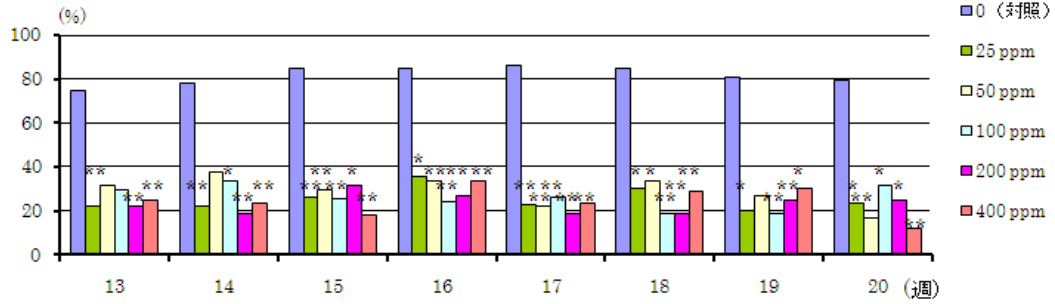
a : 体重 100g あたりの対体重比

2) 繁殖能に関する指標

(1) 産卵に対する影響 — 産卵率

全てのTBTO投与群で、産卵率の明らかな低下が認められた。

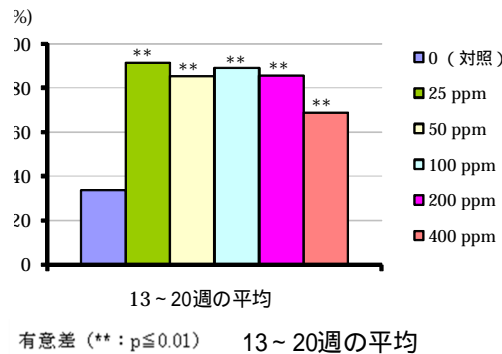
産卵率



(2) 卵殻質に対する影響 — 異常卵の発生率

TBTO投与群の卵はそのほとんどが異常卵（ひびのある卵あるいは軟卵）で、卵殻質に対する顕著な影響が認められた。

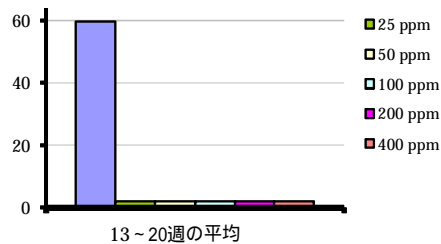
異常卵の発生率



(3) 胚の発生に対する影響 — 孵化率

胚の発生率は対照群の84.1%に対して、TBTO投与群では14.3~35.4%と低値で、孵化率はTBTOの全ての投与群で0%であった。

孵化率



13~20週の平均

まとめ

TBTOについて、20週間鳥類繁殖毒性試験をニホンウズラを用い、25、50、100、200及び400ppmの用量で実施した。その結果、

TBTOの全ての投与群で産卵率の明らかな低下及び卵殻質に対する顕著な影響が認められた。

全てのTBTO投与群で孵化に対する顕著な影響が認められ、孵化率は0%であった。

以上の結果より、最低濃度の25ppm (2.5mg/kg/日) でも繁殖に対する明らかな影響が認められ、無影響濃度 (NOEC) を明らかにすることはできなかった。