

# 食餌試料からのダイオキシン類の魚類への蓄積

松原英隆<sup>1</sup>・中牟田啓子<sup>1</sup>・木下誠<sup>1</sup>

Accumulation of PCDDs/PCDFs through FOOD to Fish

Hidetaka MATUBARA, Keiko NAKAMUTA, Makoto KINOSHITA

## 要 旨

ダイオキシンの種類による魚類への蓄積性の違いを明らかにするためフライアッシュより抽出したダイオキシン類を食餌試料を通して鯉に与え、魚体内に蓄積するダイオキシン類について調べた。

フライアッシュ抽出液を与えた4ひきの鯉およびコントロールの2ひきの鯉についてダイオキシン類のHR-GC/MS分析を行ったところ、フライアッシュ抽出液のクロマトグラムにはダイオキシン類と推察される多くのピークが検出された。しかし、フライアッシュ抽出液を与えた鯉の可食部のクロマトグラムでは、TEFを有するダイオキシン類が主なピークとして検出され、その他のダイオキシン類のピークは小さかった。また、コントロールとして用いた鯉からは、ダイオキシン類はあまり検出されなかった。

さらに定量分析の結果、TEFの大きな、毒性が強いダイオキシン類ほど鯉の体内に蓄積しやすいことが明らかとなった。

**Key Words :** ダイオキシン類 Dioxins, フライアッシュ Fly Ash, 鯉 Carp, 高分解能-ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー, HR-GC/MS

## I はじめに

ダイオキシン類の中には低濃度でも強い急性毒性を示すものがあること<sup>1)</sup>や発ガン性を示すものがあること<sup>2)</sup>が動物実験で明らかにされている。また、最近では、内分泌攪乱作用の疑いも議論されている。

現在のところ、2,3,7,8-TCDD等の毒性の強いダイオキシンの環境中の濃度は非常に低濃度であり野生生物や人体への影響は明らかになってはいないが、ダイオキシン類は非常に安定な化合物であるため、発ガン性や内分泌攪乱作用を考えた場合には、その蓄積性を考慮する必要がある。生物の中で最も高濃度にダイオキシン類を蓄積しているものの一つが魚類であるが、人類は魚類を食することから、ダイオキシン類の魚類への蓄積は、魚類への影響と同時に人類への影響も憂慮しなければならない問題である。

従来、農薬等の魚類への影響はLD<sub>50</sub>等に見られるように、化合物の水中濃度で評価されてきた。しかし、化学物質の蓄積性を考慮する場合には、食餌試料を通して

の取り込みが最も重要だと考えられる<sup>3)</sup>。

ダイオキシンの種類による魚類への蓄積量の違いを明らかにするため、フライアッシュより抽出したダイオキシン類を食餌試料を通して鯉に与え、魚体内に蓄積するダイオキシン類について調べた。

## II 実験方法

### 1. ダイオキシン類の鯉への投与

ダイオキシン類は、100 gのフライアッシュを塩酸処理した後トルエンでソックスレー抽出し、抽出液はダイオキシン分析の前処理と同じ操作で精製した。ダイオキシン類は溶媒を留去した後0.5 mlのエタノール溶液とした。このエタノール溶液をダイオキシン抽出液とし後の実験に用いた。マイクロシリンジを用い、浮上性粒状食餌試料(φ3~4 mm)1個に対してダイオキシン抽出液5 μlを注入しダイオキシン添加試料を調整した。

実験には6匹の鯉を用い、そのうちの4匹にダイオキシン添加試料を与え、2匹にはコントロールとして通常の餌を与えた。鯉は、通常それぞれのグループ毎にろ過器とエアレーション装置を装着した容量150 lの2台の

1. 福岡市保健環境研究所 環境科学課

水槽で飼育したが、ダイオキシンを与える時は、4匹の鯉それぞれを個別に20 lの水槽に隔離し、1日に1回、1匹の鯉に対して2個のダイオキシン添加試料を与えた。鯉がダイオキシン添加試料を摂取したことを確認した後、150 lの水槽にもどした。4ひきの鯉にはダイオキシン添加試料を5日間連続して与え、その後は通常の食餌試料のみを与えた。ダイオキシン類の投与を停止してから1週間経過後、ダイオキシン類を与えた鯉4匹とコントロールの鯉2匹を処理し。体長と体重を測定した後可食部を採取し分析試料とした。

## 2. ダイオキシン類の分析

鯉の可食部に50mlの水を加え、10分間ホモジナイズしスラリー状の試料とした。スラリー状の試料は、精製水50 mlで容器の壁を洗いながら300 ml容量の三角フラスコに移した。これに10 N水酸化ナトリウム溶液20 ml、メタノール80 mlおよびTable 2に示す100  $\mu$  lの内部標準混合液溶液を添加し十分に攪拌し一夜静置した。内部標準溶液は、炭素が $^{13}C$ でラベルされたダイオキシン類で、濃度が5  $\mu$  g/lのトルエン溶液とした。

スラリーは500 ml容量の分液ロートに移し、50 mlのヘキサンで10分間振とう抽出した。抽出は3回行った。ヘキサン抽出液を合わせ300 ml容量の分液ロートに移した後、100 mlの2%塩化ナトリウム溶液で緩やかに回しながら3回洗浄した。エマルジョンを多量に含むヘキサン抽出液は-20  $^{\circ}C$ の冷凍庫に一夜静置した後、ヘキサン層を分離した。氷層は溶解させた後、300 ml

容量の分液ロートを用い、10 mlのヘキサンを加えて緩やかに回しながら氷に取り込まれていたヘキサン抽出液を回収した。回収は3回行った。全ヘキサン抽出液は10 gの硫酸ナトリウム(無水物)で脱水した後ロータリーエバポレーターを用い40  $^{\circ}C$ 以下で20 mlまで濃縮した。ヘキサン抽出液は、硫酸層が着色しなくなるまで十分に硫酸洗浄した。ヘキサン層は硫酸層を除いた後水洗し、1.0 gの硫酸ナトリウム(無水物)で脱水後5 mlまで濃縮した。ヘキサン溶液はシリカゲルカラムに付加した。シリカゲルカラムは、内径10 mmのカラムに3 gのシリカゲルをヘキサンを用いて充填した。シリカゲルは使用前に130  $^{\circ}C$  18時間活性化した。

ヘキサン150 mlで展開した。展開溶液は5 mlまで濃縮し、アルミナカラムに付加した。アルミナカラムは、内径10 mmのカラムに10gのアルミナをヘキサンを用いて充填した。アルミナは使用前に130  $^{\circ}C$  18時間活性化した。

ヘキサン溶液は、最初に2% (V/V) ジクロロメタン含有ヘキサン50 mlで展開し、次に、50% (V/V) ジクロロメタン含有ヘキサン200 mlで展開した。後の展開溶液を濃縮乾固後20  $\mu$  lのノナン溶液を加えHR-GC/MS分析用試料とした。

分析機器は日本電子SX-102Aを用い、分解能10,000で分析した。ガスクロマトグラフィー条件はTable 1に、高分解能SIM分析に用いた内部標準物質、精密質量等についてはTable 2に示す。なお、定量分析はTEFが定められているダイオキシンについてのみ行った。

Table 1 Conditions of gas chromatography for PCDDs/Fs analysis

Target compounds	PCDDs and PCDFs having four to six chlorines
Column name	SP - 2331, 0.32 mm i.d. $\times$ 60 m, 0.2 $\mu$ m of film thickness
Column temperature	100 $^{\circ}C$ , 1.5min. - (20 $^{\circ}C$ /min.) - 180 $^{\circ}C$ - (3 $^{\circ}C$ /min.) - 260 $^{\circ}C$ , 25min.
Target compounds	PCDDs and PCDFs having seven and eight chlorines
Column name	DB - 5, 0.32 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.15 $\mu$ m of film thickness
Column temperature	100 $^{\circ}C$ , 1.5min. - (20 $^{\circ}C$ /min.) - 200 $^{\circ}C$ - (5 $^{\circ}C$ /min.) - 280 $^{\circ}C$ , 25min.

## III 結果および考察

Table 3に実験に用いた鯉の特徴を示す。鯉は黒鯉で、ほぼ同じ大きさであった。Fig. 1にフライアッシュから抽出したダイオキシン類のHR-GC/MSクロマトグラムを、Fig. 2に、Fig. 1のダイオキシン類を与えた鯉の可食部に含まれるダイオキシン類のクロマトグラムを示す。フライアッシュには全ての種類のダイオキシン類が含まれていると言われており、フライアッシュ抽出液のクロマトグラム (Fig. 1) にはダイオキシン類と

推察される多くのピークが検出された。ところが、Fig. 2に見られるように、フライアッシュを与えた鯉の可食部のクロマトグラムにはTEFを有するダイオキシン類のピークが相対的に非常に大きく検出され、その他のダイオキシン類のピークは小さかった。例えば、T<sub>4</sub>CDD類のクロマトグラムで、最も強い毒性を有する2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDDは、フライアッシュ抽出液のクロマトグラム (Fig. 1) では、比較的小さなピーク (黒塗りで示す) として検出された。しかし、ダイオキシン抽出液を与えた鯉の可食部の分析チャート (Fig. 2) で検出され

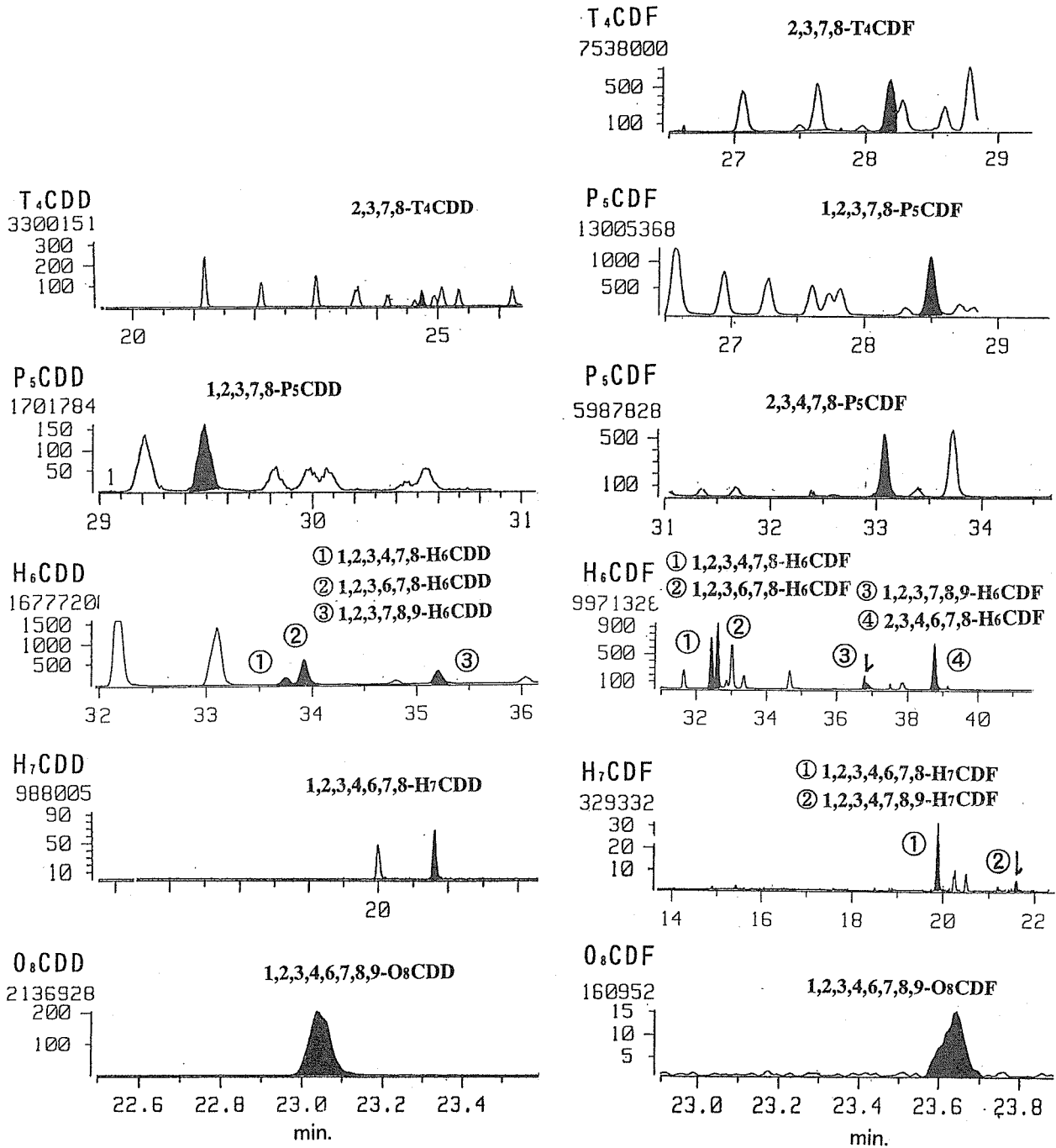


Fig.1 HR-GC/MS chromatograms of PCDDs/Fs extracted from the fly ash.

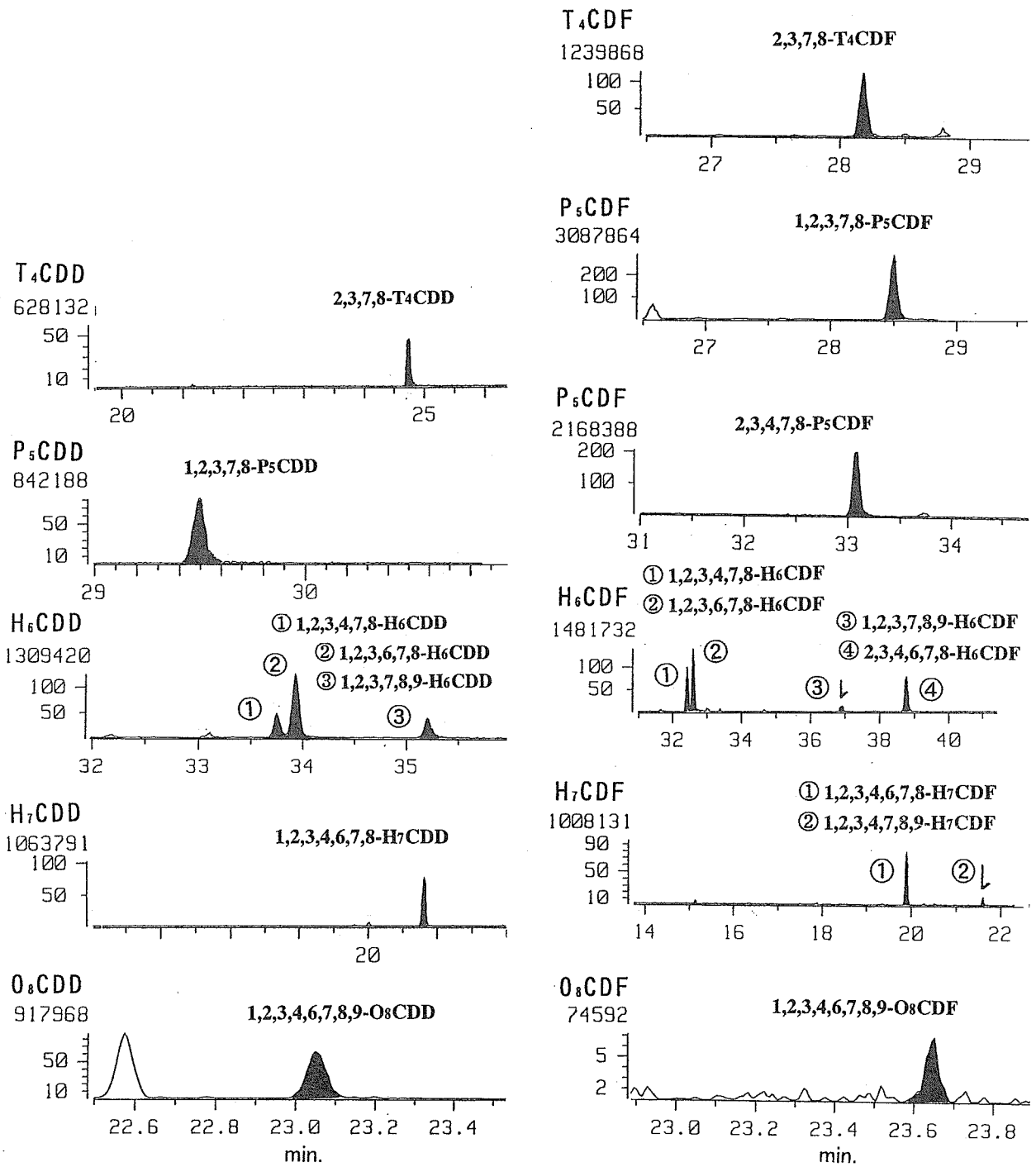


Fig.2 HR-GC/MS chromatograms of PCDDs/Fs extracted from the edible part of carp 1.

Table 2 Precise fragment ion numbers for the analysis of PCDDs/Fs

PCDDs/Fs	Fragment ions for determination	Fragment ions for confirmation
T <sub>4</sub> CDD	321.8936	319.8965
P <sub>3</sub> CDD	355.8546	357.8518
H <sub>6</sub> CDD	389.8156	391.8128
H <sub>7</sub> CDD	423.7769	425.7739
O <sub>8</sub> CDD	459.7350	457.7380
T <sub>4</sub> CDF	305.8987	303.9016
P <sub>3</sub> CDF	339.8597	341.8569
H <sub>6</sub> CDF	373.8207	375.8179
H <sub>7</sub> CDF	409.7788	407.7818
O <sub>8</sub> CDF	443.7400	441.7431
Internal standard	Fragment ions for determination	
<sup>13</sup> C-2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD	333.9338	
<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8-P <sub>3</sub> CDD	369.8919	
<sup>13</sup> C-1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDD	403.8531	
<sup>13</sup> C-1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDD	437.8142	
<sup>13</sup> C-O <sub>8</sub> CDD	471.7753	
<sup>13</sup> C-2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	317.9389	
<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8-P <sub>3</sub> CDF	353.8970	
<sup>13</sup> C-1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDF	387.8582	
<sup>13</sup> C-1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDF	421.8193	
<sup>13</sup> C-O <sub>8</sub> CDF	455.7801	

た4塩素化ダイオキシンは2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDDのみであり、その他の4塩素化ダイオキシンのピークはほとんど検出されなかった。これらの結果から、食餌飼料を通して鯉の体内に蓄積されるダイオキシン類はTEFを有するものが非常に多く、その他のダイオキシン類は蓄積しにくいことが明らかとなった。

Table 4にコントロールの2匹の鯉とダイオキシン抽出液を与えた4匹の鯉の可食部に含まれるダイオキシン類の定量値を示す。鯉1匹あたりに与えたダイオキシン類の量とそれぞれのダイオキシンの蓄積率(%)はTable 5示している。蓄積率(%)は①式で示すものである。

蓄積率(%) = 100 (4匹の鯉の可食部に含まれるダイオキシン量の平均値) / 投与したダイオキシン量 --- ①

コントロールとして用いた2匹の鯉からのダイオキシ

ンの検出量は非常に少なかった。また、Table 4から明らかのように、4匹の鯉へのそれぞれのダイオキシンの蓄積量はあまり差が認められなかった。

ダイオキシンの蓄積率をTEF毎に比較してみると、最も高いTEF (1.0)の2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDDの蓄積率は6.8%、次に高いTEF (0.5)の1,2,3,7,8-P<sub>3</sub>CDDおよび2,3,4,7,8-P<sub>3</sub>CDFの蓄積率はそれぞれ7.2%、5.6%と毒性の強いダイオキシン類の蓄積率は高い値を示した。一方、最も低いTEF (0.001)のO<sub>8</sub>CDDおよびO<sub>8</sub>CDFの蓄積率はそれぞれ0.058%、0.048%、また、次に低いTEF (0.01)の1,2,3,4,6,7,8-H<sub>7</sub>CDD, 1,2,3,4,6,7,8-H<sub>7</sub>CDF, 1,2,3,4,7,8,9-H<sub>7</sub>CDFの蓄積率はそれぞれ0.25%、0.34%、0.33%と低い値を示した。

これらの結果から、一般に、TEFの大きな、毒性が強いダイオキシン類ほど鯉の体内に蓄積しやすく、TEFの小さなダイオキシン類は代謝されやすいことが明らか

Table 3 Characteristics of the carps used experiment

Sample	Body length	Body weight	Weight of edible part
Control Carp 1	13.0 (cm)	57.9 (g)	24.8 (g)
Control Carp 2	13.0	60.1	24.2
Test Carp 1	12.5	59.8	27.0
Test Carp 2	12.5	58.8	25.8
Test Carp 3	13.0	58.7	21.0
Test Carp 4	12.0	47.6	20.2

Table 4 Determination results of PCDDs/Fs in each carp (pg)

Isomer of PCDDs/Fs	Control carp1	Control carp2	Test carp 1	Test carp 2	Test carp 3	Test carp 4
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD	1.3	0.9	80.7	60.8	57.3	56.6
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDD	4.0	2.6	178	129	125	138
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDD	< 0.5	< 0.5	98.6	64.2	57.2	66.2
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDD	< 0.5	< 0.5	270	184	158	184
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDD	< 0.5	< 0.5	77.8	57.4	46.3	56.7
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDD	23.3	18.5	722	523	385	522
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDD	31.7	16.5	180	112	94.9	108
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	5.8	5.0	166	123	95.9	98.1
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDF	4.2	1.5	373	243	205	229
2,3,4,7,8-P <sub>5</sub> CDF	5.1	2.7	408	288	236	270
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDF	2.6	1.0	218	128	117	145
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	2.0	0.9	211	144	126	156
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDF	< 0.5	< 0.5	30.6	15.1	16.8	15.9
2,3,4,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	5.8	< 0.5	231	142	125	151
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDF	1.5	5.1	259	173	139	166
1,2,3,4,7,8,9-H <sub>7</sub> CDF	1.0	< 0.5	41.9	28.8	20.7	34.6
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDF	1.1	4.1	10.1	5.8	6.8	6.9

Table 5 Accumulation of each isomer of PCDDs/Fs (%)

Isomer of PCDDs/Fs	Mean accumulated amounts in four carps (pg)	Total amount fed to the carps (pg)	Accumulation (%)	TEF
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD	63.8	941	6.8	1
1,2,3,7,8-P <sub>3</sub> CDD	142	1980	7.2	0.5
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDD	71.5	1700	4.2	0.1
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDD	199	6660	3.0	0.1
1,2,3,,7,8,9-H <sub>6</sub> CDD	59.5	3600	1.7	0.1
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDD	538	216000	0.25	0.01
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDD	123	216000	0.057	0.001
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	120	4690	2.6	0.1
1,2,3,7,8-P <sub>3</sub> CDF	262	7440	3.5	0.05
2,3,4,7,8-P <sub>3</sub> CDF	300	5350	5.6	0.5
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDF	152	8880	1.7	0.1
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	159	15200	1.0	0.1
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDF	19.6	2240	0.88	0.1
2,3,4,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	162	8800	1.8	0.1
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDF	184	53900	0.34	0.01
1,2,3,4,7,8,9-H <sub>7</sub> CDF	31.5	9570	0.33	0.01
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDF	7.4	15700	0.047	0.001

かとなった。したがって、フライアッシュ抽出液は、H<sub>7</sub>CDD や O<sub>8</sub>CDD を圧倒的に多量に含んでいるにもかかわらず、2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDD、1,2,3,7,8-P<sub>3</sub>CDD、2,3,4,7,8-P<sub>3</sub>CDF といった毒性の強いダイオキシン類が高い割合で鯉に蓄積し、TEQの大部分はこれらの3種のダイオキシン類で占められた。したがって、環境調査等においてダイオキシン類の分析を行う場合には、これらの3種のダイオキシン類については、できるだけ低濃度まで分析する必要があると考えられる。

## 文 献

1) McConnell E.E., Moore J.A., Haseman J.K. and Harris M.W.(1978):The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins in mice and guinea pigs, *Toxicology and applied pharmacology*, 44, 335-356.

2) Kociba R.J. and Cabey O.(1985):Comparative toxicity and biological activity of chlorinated dibenzo-p-dioxins and frans related to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), *Chemosphere*, 14, 649-660.

3) Batterman A.R., Cook P.M., Lodge K.B., Lothenbach D.B. and Butterworth B.C.(1989):Methodology used for laboratory determination of relative contribution of water of water, sediment and food routes of uptake for 2,3,7,8-TCDD bioaccumulation by lake trout in Lake Ontario, *Chemosphere*, 19, 451-458.