

# 食餌試料を通したダイオキシン類(PCDDs/PCDFs)の魚類への蓄積性について

福岡市保健環境研究所 松原 英隆, 中牟田啓子, 福嶋かおる  
横浜国立大学工学部 浦野 紘平

## 1. はじめに

ダイオキシン類の中には低濃度でも強い毒性を示すものがあり、また、内分泌攪乱作用の疑いも議論されている。このため、WHOでは、1~4pgTEQ/Kg·dという他の化学物質では類のない非常に小さな耐用摂取量(TDI)を推奨している<sup>1)</sup>。ダイオキシン類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確には分かっていないが、ダイオキシン類は非常に安定な化合物であり、脂溶性であるため、生物への蓄積性が毒性と大きく係わっていると考えられる。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り、魚類へのダイオキシン類の蓄積は、魚類への影響と同時にこれを食物として摂取する人へも影響することになる。

Kuehlらはフライアッシュを水中に投入してコイを飼育したところ毒性等価係数が定められているPCDDs/PCDFsが特異的にコイに蓄積することを報告している<sup>2),3)</sup>。ただし、この場合にはPCDDs/PCDFsは鰓から取り込まれるため、摂取量と体内蓄積量に関する定量的な検討はなされていない。

一方、ダイオキシン類は非常に水への溶解度が小さい化合物であることから、魚類への蓄積性を考える場合には餌を通しての取り込みが最も重要であると考えられる。例えば、BattermanらはPCDDs/PCDFsの魚類への蓄積量は鰓よりも餌を通しての割合が高いこ

とを報告<sup>4)</sup>している。ただし Battermanらは魚類としてオンタリオ湖のLake Troutを用い、PCDDs/PCDFsを摂取したSmelt(ワカサギの一種)を餌として与えているため、Smeltがダイオキシン類を摂取した時点で既に個々のダイオキシン類の蓄積量に違いが生じていることが予想される。したがって、この方法で個々のダイオキシン類の蓄積性を比較することはできない。

本研究では、都市ごみ焼却施設のフライアッシュから抽出したPCDDs/PCDFsを含む餌を直接コイに与え、可食部と内臓に蓄積したPCDDs/PCDFsを定量し、これらの化合物のコイの体内への蓄積性について調べた。

## 2. 実験方法

### 2. 1 ダイオキシン類のコイへの投与

ダイオキシン類は、都市ごみ焼却施設から採取した100g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て得た。この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、溶媒をほとんど留去した後、0.5mlのエタノール溶液とした。この抽出液のPCDDs/PCDFsの分析結果を図1に示す。フライアッシュ抽出液のクロマトグラム(図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。この抽出液5μlを、マイクロシリンジを用いて浮上性粒状食餌試料(Φ3~4mm)1個ずつに注入し、ダイオキシン類添加試料を調製した。

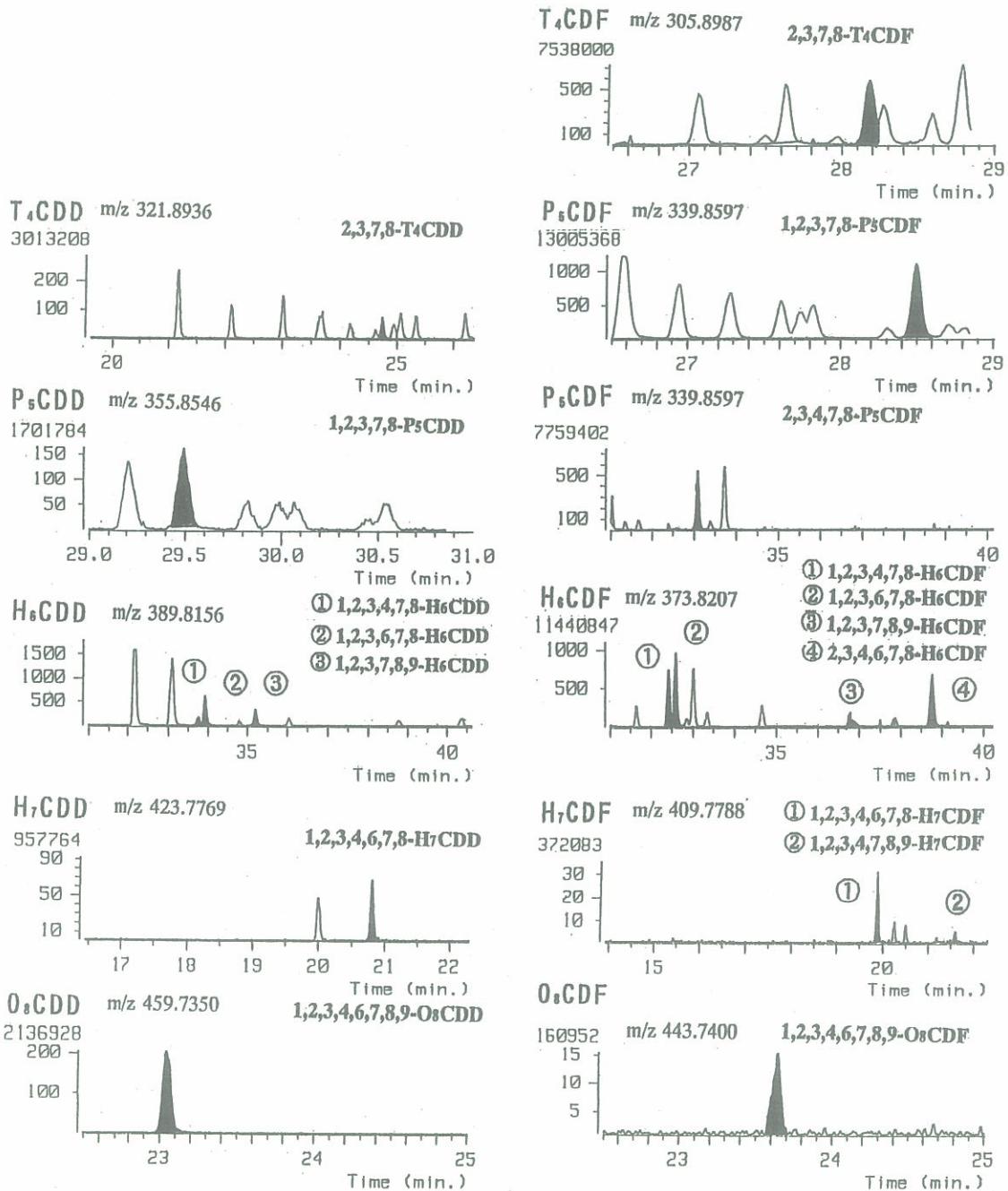


図1 フライアッシュ中のPCDDs/PCDFsの高分解能GC/MS分析結果

実験には6匹のコイを用い、そのうちの4匹にダイオキシン類添加試料を与え、2匹にはコントロールとしてダイオキシン類を含まない餌を与えた。実験に用いたコイの特徴を表1に示す。コイは黒コイで、ほぼ同じ大きさであった。暴露群とコントロール群をそれぞれろ過器とエアレーション装置を装着した容量150Lの2つの水槽で飼育したが、ダイオキシン類を与える時は、4匹のコイそれぞれを個別に20Lの水槽に隔離し、1日に1回、1匹のコイに対して2個のダイオキシン添加試料を与えた。コイがダイオキシン添加試料を摂取したことを確認した後、150Lの水槽にもどした。4匹のコイにはダイオキシン添加試料を5日間連続して与え、その後は通常の餌のみを与えた。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コイ4匹とコントロールのコイ2匹について、それぞれ体長と体重を測定した後に可食部と内臓を採取し、分析試料とした。

## 2. 2 ダイオキシン類の分析

コイの可食部あるいは内臓に50mlの水を加え、10分間ホモジナイズしてスラリー状の試料とし、精製水50mlで容器の壁を洗いながら300ml容量の三角フラスコに移した。これに

10N水酸化カリウム溶液20ml、メタノール80mlおよび100μl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。

内部標準溶としては、炭素が<sup>13</sup>Cでラベルされた17種類の毒性等価係数（TEF）の定められたPCDDs/PCDFsを用いた。なお、4~7塩素置換体については5μg/L、8塩素置換体については10μg/Lのトルエン溶液とした。

スラリーは500ml容量の分液ロートに移し、50ml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300ml容量の分液ロートに移した後、100ml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°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、300ml容量の分液ロートを用い、10ml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。3回繰り返すことによってヘキサンを完全に回収した。ヘキサン抽出液を併せて10g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°C以下で20mlまで濃縮した。以下、常法<sup>5)</sup>に従って、硫酸処理、シリカゲルカラムクリー

表1 実験に用いたコイの特徴

Sample	Body length (cm)	Body weight (g)	Weight of edible part (g)	Weight of internals (g)
Control Carp1	13.0	57.9	24.8	6.6
Control Carp2	13.0	60.1	24.2	8.7
Test Carp1	12.5	59.8	27.0	4.5
Test Carp2	12.5	58.8	25.8	4.9
Test Carp3	13.0	58.7	21.0	7.5
Test Carp4	12.0	47.6	20.2	5.8

ンアップ、アルミナカラム分画を行った。試料は、最終的に  $20\mu\text{g}/\text{L}$  のノナン溶液として高分解能GC/MSで定量した。ダイオキシンの分析条件を表2に示す。分離定量分析はTEFが定められている2,3,7,8塩素置換PCDDs/PCDFs異性体についてのみ行った。

### 3. 結果および考察

ダイオキシン類を与えたコイの可食部に含まれるPCDDs/PCDFsの高分解能GC/MSクロマトグラムを図2に示す。図2のクロマトグラムを図1と比較すると、フライアッシュを与えたコイの可食部のクロマトグラムにはTEFが定められたPCDDs/PCDFsのピーク（黒塗りで示す）が相対的に非常に大きく検出され、その他のPCDDs/PCDFsのピークは小さいことが分かる。例えば、4塩素化の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（図1）では、比較的小さなピークとして検出されたが、ダイオキシン抽出液を与えたコイの可食部のクロマトグラム（図2）では、最も大きなピークとして検出され、その他のT<sub>4</sub>CDDのピークはほとんど検出されなかった。また、ダイオキシン抽出液を与えたコイの内臓を分析した結果（図3）も可食部の場合と同様で2,3,7,8置換体以外のPCDDs/PCDFsはあまり検出されなかった。

したがって、餌を通してコイの体内に蓄積されるPCDDs/PCDFsはTEFが定められたものが多く、その他のPCDDs/PCDFsは蓄積しにくいことが明らかとなった。<sup>6)</sup>このように、TEFが定められていない2,3,7,8置換体以外のPCDDs/PCDFsが魚体に蓄積しにくいのは、Sijmらが報告<sup>6)</sup>しているようにこれらのPCDDs/PCDFsが代謝されやすいためと推察される。

コントロールの2匹のコイとダイオキシン抽出液を与えた4匹のコイの可食部および内臓に含まれる2,3,7,8塩素置換PCDDs/PCDFsの定量結果をそれぞれ表3、表4に示す。コントロールの2匹のコイからのPCDDs/PCDFsの検出量はダイオキシン類抽出液を投与した4匹のコイに比較すると非常に少なかった。また、それぞれのPCDDs/PCDFsについて、ダイオキシン類抽出液を投与した4匹のコイの間の差は少なかった。例えば、定量値の比で比較した場合に最も大きな差が認められたのは、可食部の分析における1,2,3,7,8,9-H<sub>6</sub>CDFのコイ1とコイ2であったが、それでも両者の比は2.4であった。すなわち、コイの個体差によるPCDDs/PCDFsの蓄積量の差は可食部、内臓のいづれにおいても少なく、それぞれの異性体の蓄積量はほぼ一定であることが分かった。

コイに投与したPCDDs/PCDFsのうち、

表2 PCDDs/PCDFs分析のクロマトグラム条件

Target compounds	PCDDs and PCDFs having four to six chlorines
Column name	SP-2331, 0.32mm i.d.×60m, 0.2μ m of film thickness
Column temperature	100°C, 1.5min.-(20°C/min.)-180°C-(3°C/min.)-260°C, 25min.
Target compounds	PCDDs and PCDFs having seven and eight chlorines
Column name	DB-17, 0.32mm i.d.×30m, 0.15μ m of film thickness
Column temperature	100°C, 20.min.-(20°C/min.)-200°C-(5°C/min.)-280°C, 2.0min.

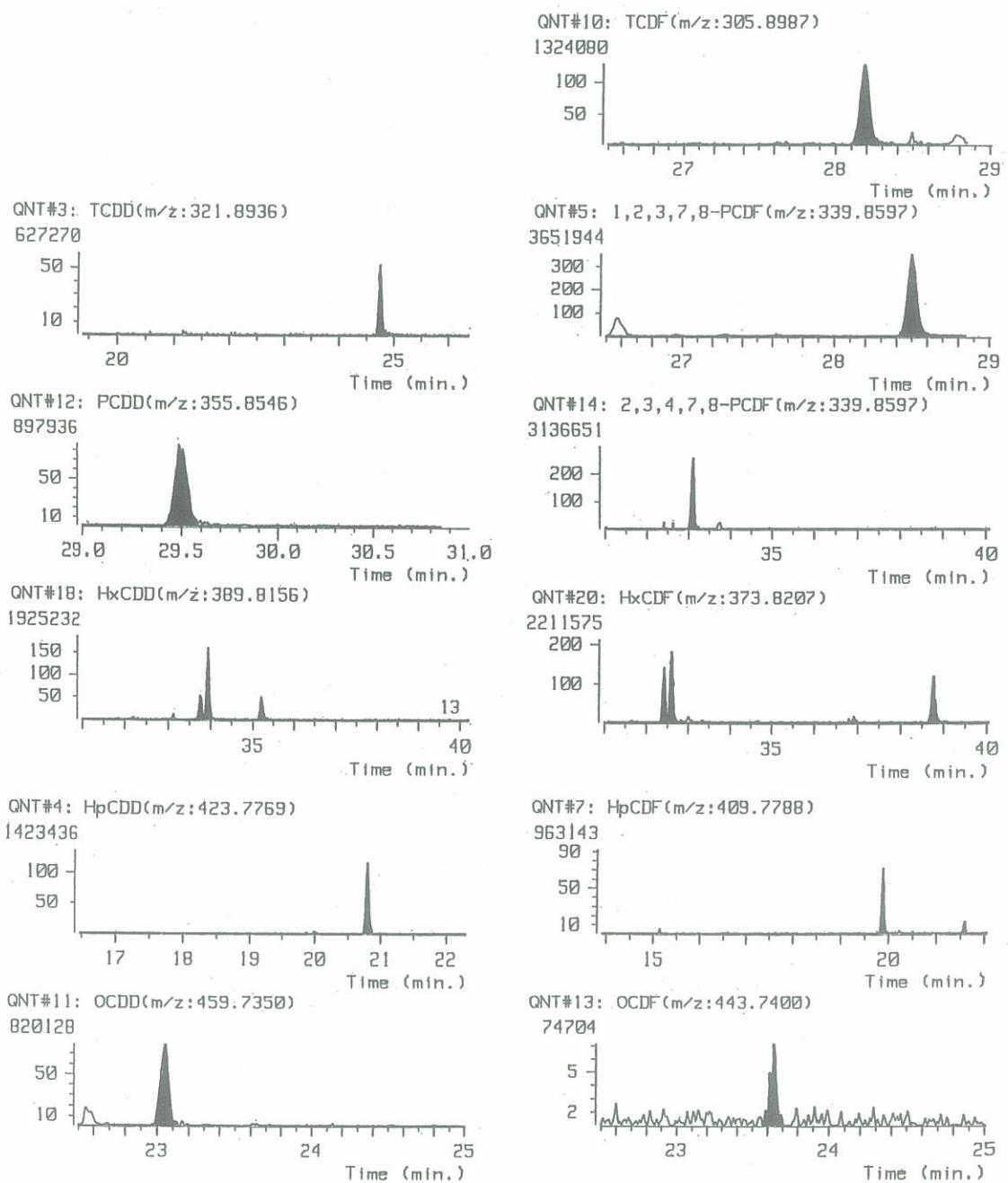


図2 コイの可食部中のPCDDs/PCDFsの高分解能GC/MS分析結果

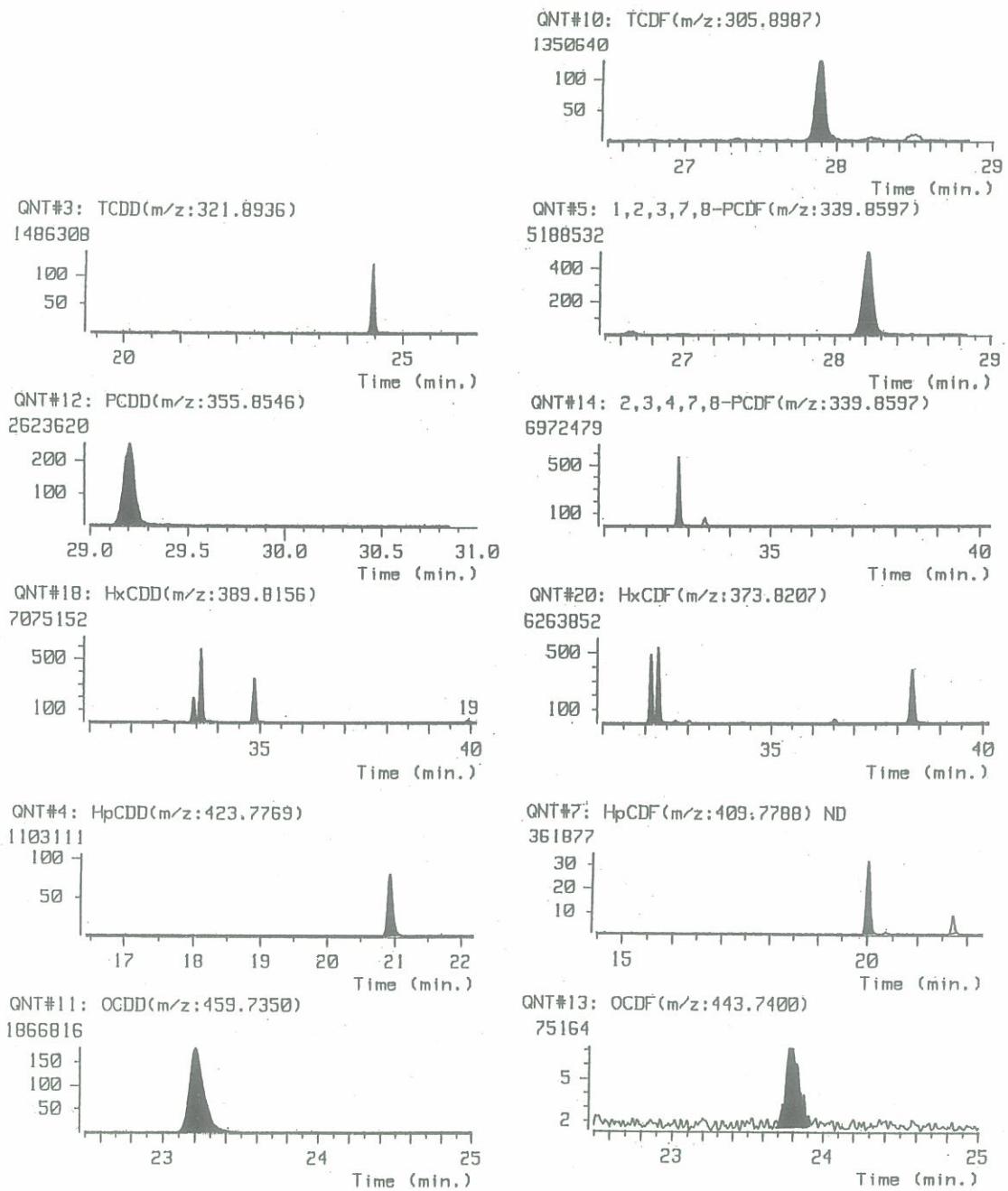


図3 コイの内臓中のPCDDs/PCDFsの高分解能GC/MS分析結果

表3 コイの可食部のPCDDs/PCDFsの定量結果 (pg)

Isomer of PCDDs/Fs	Control carp 1	Control carp 2	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	11.6	9.24	361	262	193	261
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	0.8	2.6	130	86.5	69.5	83.1
1,2,3,4,7,8,9-H <sub>7</sub> CDF	0.5	< 0.5	21.0	14.4	10.4	17.3
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

表4 コイの内臓のPCDDs/PCDFsの定量結果 (pg)

Isomer of PCDDs/Fs	Control carp 1	Control carp 2	Test carp 1	Test carp 2	Test carp 3	Test carp 4
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD	1.1	1.3	33.1	29.2	33.7	34.2
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDD	1.3	1.3	111	89.7	105	101
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDD	< 0.5	< 0.5	134	93.3	103	106
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDD	< 0.5	< 0.5	417	277	309	331
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDD	< 0.5	< 0.5	229	140	150	179
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDD	< 1.0	< 1.0	1950	1190	1210	1560
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDD	9.6	9.8	1700	1170	1030	1250
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	1.1	1.3	35.6	38.0	31.9	31.6
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDF	0.6	0.5	116	94.6	105	103
2,3,4,7,8-P <sub>5</sub> CDF	0.8	0.8	221	156	192	193
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDF	< 0.5	< 0.5	221	165	176	170
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	< 0.5	< 0.5	210	161	159	171
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDF	< 0.5	< 0.5	28.9	16.5	18.4	21.9
2,3,4,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	< 0.5	< 0.5	247	176	195	190
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDF	< 1.0	< 1.0	357	213	211	270
1,2,3,4,7,8,9-H <sub>7</sub> CDF	< 1.0	< 1.0	62.6	46.7	46.3	52.3
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDF	< 1.0	< 1.0	54.2	34.2	28.9	37.6

どの程度が可食部あるいは内臓に蓄積したかを相対蓄積率 (RAR) として求めた結果を表5に示す。

ここで相対蓄積率 (Relative Accumulation Ratio : RAR) とは (1) 式で定義した値であ

る。

$$RAR = 100A/F \quad \dots \dots \dots (1)$$

ただし、Aは4匹のコイの可食部あるいは内臓に含まれる各PCDDs/PCDFsの異性体の量の平均値、Fはコイ1匹当たりに与えた各

表5 コイの可食部及び内臓における2,3,7,8置換PCDDs/PCDFsの相対蓄積率(RAR)

Isomer of PCDDs/Fs	Total amount fed to carp (pg)	Mean accumulated		PAR		E+I	WHO TEF for mammalian	WHO TEF for fish
		edible part (pg)	internals (pg)	edible part(E) (%)	internals(I) (%)			
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDD	941	63.8	32.6	6.8	3.5	10	1	1
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDD	1980	142	102	7.2	5.1	12	1	1
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDD	1700	71.5	109	4.2	6.4	11	0.1	0.5
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDD	6660	199	334	3.0	5.0	8.0	0.1	0.01
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDD	3600	59.5	175	1.7	4.9	6.5	0.1	0.01
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDD	108000	269	1480	0.25	1.4	1.6	0.01	0.001
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDD	216000	123	1290	0.057	0.60	0.7	0.0001	—
2,3,7,8-T <sub>4</sub> CDF	4690	120	34.3	2.6	0.73	3.3	0.1	0.05
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDF	7440	262	105	3.5	1.4	4.9	0.05	0.05
2,3,4,7,8-P <sub>5</sub> CDF	5350	300	190	5.6	4	9.2	0.5	0.5
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDF	8880	152	183	1.7	2.1	3.8	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	155200	159	175	1.0	1.2	2.2	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-H <sub>6</sub> CDF	2240	19.6	21.4	0.88	0.96	1.8	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-H <sub>6</sub> CDF	8800	162	202	1.8	2.3	4.1	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-H <sub>7</sub> CDF	27000	92.0	263	0.34	0.97	1.3	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-H <sub>7</sub> CDF	4790	15.7	52.0	0.33	1.1	1.4	0.01	0.01
1,2,3,4,6,7,8,9-O <sub>8</sub> CDF	15700	7.4	38.7	0.047	0.25	0.3	0.0001	0.0001

PCDDs/PCDFsの異性体の量である。また、表5にはほ乳類と魚類に対するWHOのTEFも示した。

可食部に対して、TEFが定められているPCDDs/PCDFsについてTEFとRARとの関係をみてみると、ほ乳類に対するTEFが最も大きい1.0の2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDDと1,2,3,7,8-P<sub>5</sub>CDDでは、RARがそれぞれ6.8%、7.2%で最も高く、次に大きいTEFが0.5の2,3,4,7,8-P<sub>5</sub>CDFのRARは5.6%であり、毒性の強いPCDDs/PCDFsは高い値を示した。一方、TEFが最も小さい0.0001のO<sub>8</sub>CDDおよびO<sub>8</sub>CDFのRARはそれぞれ0.057%、0.047%と低く、また、次にTEFが小さい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RARはそれぞれ0.25%、0.34%、0.33%と低い値を示した。

TEFが定められてた7および8塩素置換体のRARが低いのは、Opperhuizenらが報告<sup>7)</sup>しているように、これらの分子半径が大きく、細胞膜を通過し難いためと考えられる。

また、TEFの定められた6塩素置換PCDDs/PCDFsのRARは4塩素あるいは5塩素置換PCDDs/PCDFsより小さく、7塩素あるいは8塩素置換PCDDs/PCDFsより大きいことから、これらについても分子半径の影響があると推察される。

ここで、ほ乳類や魚類に対する毒性等価係数(TEF)と可食部の相対蓄積率(RAR)との関係を両対数グラフで図示したところ、図4のように正の相関関係があることがわかつ

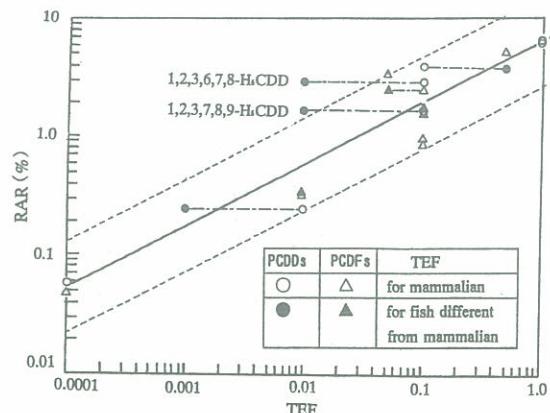


図4 コイの可食部へのPCDDs/PCDFsのRARとTEFの関係(両対数表示)

た。この関係を近似すると(2)式によって表すことができる。

$$\text{RAR} \approx 7 (\text{TEF})^{0.52} \dots \dots \dots \quad (2)$$

TEFが1と5の区切りで定められているためバラツキが大きいが、ほとんどのプロットは(2)式の±2.5倍の幅の範囲内(図4の点線の内側)に入っている。ただし、1,2,3,6,7,8-H<sub>6</sub>CDDと1,2,3,7,8,9-H<sub>6</sub>CDDに対する魚類のTEFがこの範囲からはずれている。これは、魚類に対するこれらの異性体のTEFが小さく見積もられている可能性を示唆している。

一方、内臓は、PCDDs、PCDFsのいづれについても可食部とは異なった傾向がみられた。PCDDsのうち7および8塩素置換体のRARはそれぞれ1.4、0.6と4~6塩素置換体に比較して小さかったが、これは、Opperhuizenら<sup>7)</sup>報告しているように4~6塩素置換体に比較して7および8塩素置換体の分子半径は大きく、分子ふるい効果によって腸の吸収膜を通過し難かったためと考えられる。4~6塩素置換体についてはRARにあまり差が認められないことから、同程度の割合で吸収膜を通過するものと考えられる。PCDFsについては、腸の吸収膜による分子ふるい効果を受けていることが推察されるのは、8塩素置換体のみであった。PCDFsの腸の吸収膜の通過性はその分子半径から推察してPCDDsと同程度以上だと考えられ、同程度以上のRARが予想されたが、実際にはPCDDsよりかなり小さかった(表5)。この結果からPCDFsはPCDDsに比較して酵素分解を受けやすいものと考えられる。ここで、2,3,4,7,8-P<sub>5</sub>CDF(RAR:4.0)は例外で、この酵素分解に対する安定性がTEFの大きさ(0.5)に関連していると推察される。

可食部と内臓に蓄積されたPCDDs/PCDFsの合計値(表5:E+I)をみてみると、魚類に対するTEFが0.5以上のものについては、2,3,7,8-T<sub>4</sub>CDD10%，1,2,3,7,8-P<sub>5</sub>CDD12%，1,2,3,4,7,8-H<sub>6</sub>CDD11%，2,3,4,7,8-P<sub>5</sub>CDF9.2%といずれも高い値を示した。

#### 4.まとめ

餌を通して1日1回5日間連続して都市ゴミ焼却施設からのフライアッシュ抽出液中のダイオキシン類を4匹のコイに与え、その後1週間通常の餌にもどした後、コイの可食部および内臓に含まれるPCDDs/PCDFsを分析して各種のPCDDs/PCDFsの蓄積性を調べた結果、以下のことが明らかとなった。

①毒性等価係数(TEF)の定められていないPCDDs/PCDFsは、TEFの定められている2,3,7,8塩素置換PCDDs/PCDFsに比べて代謝されやすく蓄積しにくいことが明らかとなった。

②2,3,7,8塩素置換PCDDs/PCDFsについては、TEFの大きな、毒性が強い異性体ほどコイの体内に蓄積しやすいことが分かった。

#### 引用文献

- 1) WHO報告書(1995)
- 2) Kuehl D.W., Cook P.M., Batterman A.R. and Lothenbach D.B. (1985) Bioavailability of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin from municipal incinerator fly ash to freshwater fish, *Chemosphere*, 14, 427-437.
- 3) Kuehl D.W., Cook P.M., Batterman

- A.R.and Butterworth B.C.(1987) Isomer dependent bioavailability of polychlorinated dibenzo-p-dioxines and dibenzofurans from municipal incinerator fly ash to carp , *Chemosphere*, **16**, 657 – 666.
- 4) 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, sediment and food routes of uptake for 2,3,7,8 – TCDD bioaccumulation by lake trout in Lake Ontario, *Chemosphere*, **19**, 451 – 458.
- 5) 例えば、ダイオキシン類に係わる底質調査  
暫定マニュアル, 平成10年7月, 環境庁水質保全局水質管理課.
- 6) Sijm D.T.H.M., Wever H. and Opperhuizen A. (1993) Congener – specific biotransformation and bioaccumulation of PCDDs and PCDFs from fly ash in fish, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 1895 – 1907.
- 7) Opperhuizen A., Veide E.W.V.D., Gobas F.A.P.C., Liem D.A.K.and Steen J.M.D.V.D.(1985) Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals, *Chemosphere*, **14**, 1871 – 1896.