Organochlorine Pesticide Residues in Laboratory Animal Foods

Fujio SEKIGUCHI, Haruka MORITA, Takeshi AKIMOTO
and Yasuo OSHIMA

*Research Institute, Daiichi Seiyaku Co. Ltd.,
2810, Minamifunabori-cho, Edogawa-ku, Tokyo, Japan*

(Received for publication: July 2, 1974)

The organochlorine pesticide residue in diet for laboratory animals was quantitatively determined by gas chromatography with acetone and n-hexane extracts. The total level in the diet for mice and rats was 0.243 ppm when determined in June, 1970 and 0.044 ppm in June, 1973. Of the pesticides detected in the diet, α -BHC level greatly varied depending upon years, being 0.081 to 0.141 ppm in June, 1970 and 0.009 ppm in June, 1971, while β - and γ -BHC levels showed little changes. The pp' DDT level was much lower in 1973 than in from 1970 to 1972. No or only little aldrin and endrin were detected throughout the period of investigation (1970-1973). Similar results were obtained also with the diet for dogs, rabbits, monkeys and chicks. The level of total organochlorine pesticide was detected higher in wheat bran (0.317 ppm) and fish meal (0.103 ppm) than in other ingredients of the animal diet (0.004-0.027 ppm).—Exp. Animals, 24, (1) 13—18, 1975

実験動物用固型飼料中における農薬 (BHC, DDT, ドリン剤) の残留について

関口富士男, 森田 遥, 秋元 健, 大島 康夫

第一製薬株式会社研究所

戦後、開発された有機塩素系農薬 (BHC, DDT, アルドリン, ディルドリンおよびエンドリン) は、そのすぐれた病害虫防除効果により、農産物増収の面で多大の貢献をしてきた[5, 18]。しかし、これらの農薬は、土壤中での残留期間が非常に長いので環境を汚染し、作物を通して動物体内に取り込まれやすい性質がある。また、体内ではきわめて分解され難く、脂肪組織などに蓄積される[14]。

DDT が使用されはじめて数年後の1948年に人体中のDDT 蓄積性が指摘されて以来[19]、野生動物から人間にいたる多くの動物種について、体内における農薬の残留調査例が報告されている[19]。これと平行して農産物および畜産物などの食品中の残留農薬についても数多くの報告がなされてきた[2, 11, 15]。現在では諸外国において、これら農薬の使用にはきびしい規制措置がとら

れ、わが国でも DDT および BHC の販売および使用の禁止、ドリン系農薬の使用規制措置がとられている。

しかし、土壤中の農薬は10年という長期間を経てもなお、かなり残留し作物への移行が続くという実験報告があり[14]、このことは上記の農薬が使用禁止になった現在でも、自然界を汚染した農薬が食物を通じて、動物体内へ移行蓄積されている可能性をうらずけるものである。

農薬の毒性に関する動物実験は、多くの研究者により急性、亜急性または慢性毒性[1, 7, 8, 12] および代謝[3, 10, 13, 14] についてなされているが、いずれも飼料中の農薬残留量に比べれば、きわめて大量の農薬を強制投与した実験であり、作物中に含まれる程度の微量農薬の長期摂取を考慮した報告はみられない。

市販されている実験動物用固型飼料の原料は、小麦、

フスマ、トウモロコシ、大豆、ルーサンミール、脱脂粉乳、魚粉などが主として使用されているが、これらの原料中の残留農薬が実験動物に移行、蓄積されている濃度、あるいはこのような動物による各種の長期実験に及ぼす影響などについて解明されねばならない。そこで、われわれはこれらの諸点を考慮し、まず各種実験動物用固型飼料中の有機塩素系農薬残留量について調査をこころみた。すなわち、マウス・ラット用固型飼料（4カ年間）、ウサギ・モルモット用、イヌ用、サル用各固型飼料、幼雛用飼料（1カ年間）および原料中の農薬残留量をいずれもガスクロマトグラフィーにより定量したので、その成績を報告する。

材料および方法

1. 実験材料

- 1) 実験動物用固型飼料：1970年6月から1973年6月までの4カ年間に市販されたマウス・ラット用固型飼料と、1973年に市販されたウサギ・モルモット用固型飼料（3社）、イヌ用固型飼料（3社）、サル用飼料（1社）および初生雛用配合飼料（1社）である。
- 2) 固型飼料用各種原料：1973年7月に入手した小麦粉、トウモロコシ、大豆粕、魚粉、フスマ、脱脂糠、脱脂粉乳およびイーストの8原料である。

2. 測定方法

- 1) ガスクロマトグラフィー
機 種：Shimadzu GC-4APFE (ECD. ^3H)
カラム： $\phi 3\text{mm} \times 1.1\text{m}$, $\times 2.3\text{m}$

充填剤：1.5% Silicone OV-17+1.95% Silicone DC. QF-1

カラム温度：190°C

検出器温度：210°C

2) 試薬

- (1) 溶媒：市販の残留農薬分析用溶媒をそのまま使用
- (2) カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム：Floridin 社製フロリジール
- (3) 硫酸ナトリウム（無水）：試薬特級品
- (4) 標準有機塩素系農薬：東京化成工業KKの標準品

3) 実験操作[2, 4, 9, 17]

細砕した飼料 100g に、ベンゼン 100ml を加えて軽くゆり動かした後、アセトン 100ml を加えて10分間激しく振盪して脂肪を抽出した。抽出溶媒をグラスフィルターでろ過し、再び残渣に溶媒を加え、上記と同様の操作を3回くり返した後、ろ過溶媒を合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、ときどき振盪混合させながら約1時間放置してろ過、ついで Kuderna-Danish 型濃縮器を用いて、ろ過溶媒を20ml に濃縮した。ガラスカラムに活性化したフロリジールをn-ヘキサンで充填し、その上に無水硫酸ナトリウムを加え、これに上記の濃縮液を正確に 5ml 注加後、最初に6%エチルエーテル含有 n-ヘキサンを100ml、ついで15%エチルエーテル含有 n-ヘキサン 100ml で溶出した。溶出液を 5ml に濃縮して、ガスクロマトグラフィー用検液とした。

定量は、BHC については内部標準物質による方法

Fig. 1 Gas chromatograms of organochlorine pesticides in laboratory animal diets.

デイルドリン, エンドリンおよび DDT については波高法による絶対検量線法に従った。

4) ガスクロマトグラムおよび回収率

固型飼料中より抽出した有機塩素系農薬についてのガスクロマトグラフィーの結果を, Fig. 1 に例示した。また固型飼料中に各種有機塩素系農薬をそれぞれ 0.05ppm 添加した後, 本法による回収実験の結果を示した。

Table 1 Recovery rate from diets supplemented with organochlorine pesticide.

Pesticide	Recovery rate (%)
α -BHC	88.9
β -BHC	70.5
γ -BHC	84.3
pp'-DDT	78.4
Aldrin	96.2
Dieldrin	95.0
Endrin	90.5

回収実験では, β -BHC の回収率が70.5%とやや低い値を示したが, その他の農薬については, ほぼ80%以上の回収率を得た。

食品中の有機塩素系農薬残留量の測定法については多数の報告があるが, ECD (Electron Capture Detector) を使用する本法が, 農薬の分離定量に適するものとされている[4,9,17]。すなわち, この実験の回収結果より本法は固型飼料中の残留農薬の定量に充分供しうることが確認されたので, 以後の実験には本法による分析法を採用した。

成 績

1. マウス・ラット用固型飼料中の有機塩素系農薬の残留量

固型飼料メーカー 2 社から, 1970年 6 月より1973年 6 月までの 4 年間に市販されたマウス・ラット用固型飼料中の有機塩素系農薬の残留量を定量した結果を Table 2 および Fig. 2,3 に示した。

A 社製固型飼料中の総農薬残留量は, 1970年 6 月に 0.243ppm であったものが, 年々減少傾向を示し, 1972年 6 月には 0.124ppm で約 $\frac{1}{2}$ に減少した。さらに1973年 6 月には 0.044ppm で, 1970年度に比較して 3 カ年間で約 $\frac{1}{6}$ に減少した。例数は少ないが B 社製品でも, ほぼ同様の傾向を示した。

BHC異性体については, α -BHCは1970年 6 月に0.081 ppmであったものが, 1 年後には 0.009ppm と, かなり激減した。しかし β -BHC および γ -BHC は, 1970年からの 3 カ年間でほとんど減少していなかった。

pp'-DDT については, 1970年 6 月に 0.091ppm であったものが 7 年後には 0.040ppm となり, 以後しだいに減少傾向を示した。

デイルドリンは, 1970年から1973年までの間 0.038~0.008ppm の範囲で, 製造年度により多少の変動はみられるが, ほとんど減少傾向を示さなかった。

エンドリンは, ほとんど検出されず, またアルドリンは, まったく検出されなかった。

2. イヌ, ウサギ・モルモット, サル, 幼雛用飼料中の有機塩素系農薬の残留量

1972年から1973年に市販された各種動物用飼料中の有

Table 2 Organochlorine pesticide residue in the diets for mice and rats purchased between June 1970 and June 1973.

(ppm on whole basis)										
Time of purchase	Maker	α -BHC	β -BHC	γ -BHC	Total BHC	pp'-DDT	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Total Pesticides
Jun. 1970	A	0.081	0.006	0.022	0.109	0.091	nd	0.038	0.005	0.243
	B	0.141	0.035	0.040	0.216	0.046	nd	0.046	0.003	0.310
Jun. 1971	A	0.009	0.025	0.041	0.075	0.040	nd	0.039	0.001	0.155
Sep. 1971	A	0.011	0.005	0.044	0.060	0.042	nd	0.013	tr	0.173
Jun. 1972	A	0.009	0.015	0.022	0.046	0.043	nd	0.035	tr	0.124
	B	0.085	0.006	0.005	0.103	0.031	nd	0.044	0.001	0.179
Oct. 1972	A	0.012	0.005	0.018	0.035	0.035	nd	0.013	nd	0.083
Nov. 1972	A	0.008	0.015	0.023	0.046	0.024	nd	0.016	nd	0.086
Feb. 1973	A	0.013	0.023	0.012	0.059	0.012	nd	0.029	nd	0.100
	B	0.003	0.003	0.005	0.011	0.007	nd	0.008	0.001	0.027
Jun. 1973	A	0.010	0.023	0.012	0.059	0.012	nd	0.008	nd	0.044
	B	0.010	0.004	0.032	0.046	0.006	nd	0.021	0.004	0.077

nd: not detected tr: trace

Fig. 2 Changes in pesticide residue in the diets for mice and rats purchased between June 1970 and June 1973.

Fig. 3 Changes in BHC isomers in the diets for mice and rats purchased between June 1970 and June 1973.

Table 3 Organochlorine pesticide residue in diets for different laboratory animals purchased between October 1972 and June 1973.

(ppm on whole basis)										
Diet for	Maker	α-BHC	β-BHC	γ-BHC	Total BHC	pp'-DDT	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Total Pesticides
Dogs	A	0.016	0.007	0.074	0.097	0.041	nd	0.021	0.001	0.160
	B	0.003	0.004	0.021	0.028	0.010	nd	0.003	nd	0.041
	C	0.008	0.010	0.028	0.046	0.010	nd	0.020	0.002	0.078
Rabbits and Guinea-pigs	A	0.006	0.005	0.054	0.065	0.172	nd	0.023	0.002	0.262
	B	0.006	0.005	0.020	0.031	0.022	nd	0.014	0.001	0.068
	C	0.009	0.004	0.018	0.031	0.022	nd	0.008	0.002	0.063
Monkeys		0.030	0.008	0.046	0.084	0.010	nd	0.016	tr	0.110
Chicks		0.003	0.001	0.003	0.007	tr	nd	0.034	nd	0.041

nd: not detected tr: trace

機塩素系農薬の残留量を定量した結果を Table 3 に示した。

ウサギ・モルモット用固型飼料の総農薬残留量については、3社製品比較で、やはりA社製品の0.262ppmが他の2社製品の0.063~0.068ppmに比べて高い値を示した。またA社の飼料中には他の2社製品に比べてpp'-DDTがかなり多く残留していた。

サル用飼料および幼雛用配合飼料については、いずれも総農薬残留量が0.110~0.041ppmで、他の固型飼料とほぼ同程度の値を示した。

3. 原料中の有機塩素系農薬の残留量

実験動物用固型飼料の原料として使用されている小麦粉、トウモロコシ、大豆粕、魚粉、フスマ、脱脂糠、脱脂粉乳およびイーストの8原料について有機塩素系農薬の残留量を定量した結果を Table 4 に示した。

その結果、フスマの総農薬残留量は0.317ppmであり、原料中最高値を示した。ついで魚粉中の総農薬残留量は0.103ppmで、このうちβ-BHCが0.074ppmを

占めていた。また脱脂糠中のpp'-DDT 0.075ppmであり、他の原料に比べ最高値を示した。

一方、固型飼料中の配合割合の多い小麦粉、トウモロコシおよび大豆粕中の総農薬残留量は、いずれも0.019ppm以下であり、BHC、pp'-DDT、デイルドリンおよびエンドリンの各農薬も、0.006ppm以下であった。アルドリンはまったく検出されなかった。

考 察

実験動物用各種固型飼料中の有機塩素系農薬の残留量を定量した結果、BHCが最も多く、ついでpp'-DDT、デイルドリンの順に低減し、エンドリンおよびアルドリンはほとんど検出されなかった。

マウス・ラット用固型飼料中の年次別の総農薬残留量は、1970年に0.243~0.310ppmであったものが、4年後の1973年には0.044~0.077ppmに減少した。これは1969年から1971年にかけて日本および諸外国における有

Table 4 Organochlorine pesticide residue in different ingredients of laboratory animal diets purchased in July 1973.

(ppm on whole basis)									
Ingredient	α -BHC	β -BHC	γ -BHC	Total BHC	pp'-DDT	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Total Pesticides
Wheat flour	0.002	0.001	0.002	0.005	0.003	nd	0.003	nd	0.011
Corn	0.001	0.001	0.002	0.004	nd	nd	nd	nd	0.004
Defatted soy bean	nd	0.004	nd	0.004	0.006	nd	0.006	0.003	0.019
Fish meal	0.002	0.074	0.003	0.079	0.002	nd	0.022	tr	0.103
Wheat bran	0.230	0.035	0.028	0.293	0.019	nd	0.004	0.001	0.317
Defatted rice bran	0.007	0.002	0.003	0.012	0.075	nd	0.006	0.002	0.095
Dried skimmilk	tr	0.003	0.002	0.005	tr	nd	0.022	nd	0.027
Yeast	0.002	0.001	0.002	0.005	0.002	nd	0.004	nd	0.011

nd: not detected tr: trace

機塩素系農薬の使用禁止措置による結果と考えられる。しかし、この種の農薬の自然界汚染の現状から考えると、低濃度での長期残留が推定される。

わが国における固型飼料原料は、その90%以上を諸外国からの輸入に依存しているが、各種原料別配合割合で全体の約60%を占めている小麦粉、トウモロコシおよび大豆粕の農薬残留量は比較的少ない。しかしフスマではBHC、とくに α -BHCの残留量が多かった。これはこの実験に使用したフスマが国内産のものであり、しかもわが国におけるBHCの使用量が外国に比較して、かなり多かったことと関連があると推定される[5]。魚粉では β -BHCの残留量が多い成績が得られたが、これは魚粉が動物性のために β -BHCの生体内蓄積性が高いためであると考えられる。

すなわち今回の調査で、他の農薬に比べてBHC含有量がもっとも多く、その異性体の中でとくに β -BHCおよび γ -BHCの減少傾向がゆるやかなことは、実験動物への蓄積性と考えあわせ、極めて重視すべき問題と考える。

BHCは、異性体によりその性質がかなり異なり、 α -BHCは生物体内であまり毒性を示さないが、 β -BHCは脂肪組織内蓄積性が高く慢性毒性がもっとも強いとされている。また γ -BHCは立体構造がきわめて安定であり急性毒性は非常に強いが、代謝も比較的うけやすいものであるとされている[14]。

DDTおよびデイルドリンはともに減少傾向にあるがとくにDDTはBHCよりも土壌残留期間が長く[11]、また体脂中に食餌中残留濃度の6～14倍蓄積されるという報告がある[14]。

これらのことを考慮すれば、農薬を含有している飼料を、毎日摂餌している実験動物は、当然農薬の体内蓄積が考えられ、このような動物を使用しておこなう長期実

験では、残留農薬による影響、とくに偶発病像との関係、または外見上病的な症状変化を示さないが、これにある外部刺激を与えた時に起る病的な変化など重要な諸問題を解明しなければならない。

要 約

1970年から1973年の間に市販されたマウス・ラット用固型飼料および1973年に市販されたイヌ、ウサギ・モルモット、サル、雑用飼料の有機塩素系農薬(BHC, DDT, アルドリン, デイルドリンおよびエンドリン)の残留量をガスクロマトグラフィー(ECD-GC)により定量してつぎの成績をえた。

(1) マウス・ラット用固型飼料中の総農薬残留量は1970年から1973年に減少傾向を示した。

BHC異性体のうち α -BHC含量の変化は著明だったが、 β -BHCおよび γ -BHC含量はほとんど変化がなかった。デイルドリン、pp'-DDTはわずかであるが減少傾向を示し、アルドリンおよびエンドリンはほとんど検出されなかった。

(2) イヌ、ウサギ・モルモット、サル、雑用各飼料の総農薬残留量はマウス・ラット用固型飼料とほぼ同程度であった。

(3) 各種飼料原料8品目の総農薬残留量は、小麦粉、トウモロコシ、大豆粕、脱脂粉乳に比べ、フスマおよび魚粉が多かった。前者では、 α -BHC、および後者では β -BHCが多く、pp'-DDTは脱脂糠にもっとも多かった。

終りに当り、種々御教示を賜った残留農薬研究所毒性病部長白須泰彦博士、化学第一研究室長保野修身博士ならびに終始、御鞭達下さった第一製薬株式会社研究所長

古賀直文博士に感謝いたします。

なお本報の概要は日本実験動物研究会第8回研究発表会(静岡)で発表した。

文 献

- [1] Deichmann. Wm. B., Keplinger. M., Dressler. I., Sala. F. (1969). Retention of Dieldrin and DDT in the Tissues of Dogs Fed Aldrin and DDT Individually and as a Mixture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14, 205-213.
- [2] 川城巖・二郷俊郎(1965): 食品中残留農薬について, *食品衛生学雑誌*, 6, 182-194
- [3] Menzie. C. M. (1969). Metabolism of Pesticides. U. S. Dept. of Inter., 128
- [4] Minyard. J. P., Jackson. E. R. (1963). Pesticide Residues in Commercial Animal Feeds. *Journal of The A. O. A. C.*, 46
- [5] 日本植物防疫協会編(1970): 農薬要覧
- [6] 西本孝男・上田雅彦・田植栄(1966): 食品中残留農薬の研究(IV), *食品衛生学雑誌*, 7, 152-162
- [7] 大柴恵一・川上兵蔵(1970): 毒性物質と栄養との関係(第1報), *食品衛生学雑誌*, 11, 177-180
- [8] 大柴恵一・川上兵蔵(1970): 毒性物質と栄養との関係(第2報), *食品衛生学雑誌*, 11, 445-448
- [9] *Pesticide Analytical Manual* (1967). U. S. Department of Health. Education and Welfare. Food and Drug Administration, 1.
- [10] Peterson. J. E., Robison. W. H. (1964). Metabolic Products of pp'-DDT in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3, 312.
- [11] 使用禁止等措置後における有機塩素系農薬の土壌残留性およびその農作物におよぼす影響に関する調査研究(1972): 残留農薬研究所
- [12] Thrope. E., Walker. A. I. T. (1973). The Toxicology of Dieldrin. II. Comparative Long-term Oral Toxicity Studies in Mice with Dieldrin, DDT, Phenobarbitone, β -BHC and γ -BHC, *Fd Cosmet. Toxicol.*, 11, 433-442.
- [13] Uchiyama. M. (1973). From the Standpoint of Toxicology. *Modern Media*, 19, 302-310.
- [14] 内山充(1972): 有機塩素剤の動物体内代謝, *バイオテク*, 3, 26-33
- [15] Ueta. M., Taue. S., Nishimoto. T. (1970). Residues of BHC Isomers and Other Organochlorine Pesticides in Fatty Food of Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 11, 256-263.
- [16] Walker. A. I. T., Thrope. E., Stevenson. D. E. (1972). The Toxicology of Dieldrin. II. Long-term Oral Toxicity Studies in Mice. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 11, 413-432.
- [17] Watts. J. O., Klein. A. K. (1963). Determination of Chlorinated Residues by Electron Capture Gas Chromatography. *Journal of The A. O. A. C.*, 45
- [18] 山本亮(1958): 新農薬研究法, 南江堂
- [19] 湯嶋健・桐谷圭治・金沢純(1971) 殺虫剤による生態系の汚染IV, *科学*, 41, 9, 507-519