コイ及びテラピアにおける p,p' -DDT の取り込みと体内運命

内田 直行, 武蔵 達也, 勝浦 洋, 安斎 寛, 西出 英一

(1987 年 9 月 11 日受理)

Uptake and Fate of p,p' -DDT in Carp and TilapiaNaoyuki Uchida,*¹ Tatuya Musashi,*² Hiroshi Katuura,*³
Hiroshi Anzai,*¹ and Eiichi Nishide*¹

Uptake and fate of p,p' -DDT (DDT) in carp *Cyprinus carpio* and tilapia *Oreochromis niloticus* were investigated by exposure to approximately 0.4 ng/ml of DDT solution for 10 weeks in the flow-through aquarium and by the determinations of DDT, p,p' -DDE (DDE), p,p' -DDD (DDD) and p,p' -DDT-OH (DDT-OH) in the whole bodies with GC-FID.

The concentration of DDT in carp gradually increased with the exposure time, while that of DDE rapidly increased, but DDD and DDT-OH were not detectable. The bioconcentration factor (BCF) of DDT in carp at 10-week exposure was about 5,000, on the other hand, that of DDT+DDE was about 22,000. In tilapia, DDT concentration rapidly increased with exposure time, but no DDT metabolites were detected except a very small amount of DDD through the experiment. The BCF of DDT in tilapia at 10-week was about 23,000, roughly corresponding to that of DDT+DDE in carp.

These results suggest that carp and tilapia show no difference in the uptake of DDT, but a significant difference of fate in their whole bodies.

DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl)ethane) およびその代謝産物は現在なお世界各地の環境中、特に水生生物に検出され、¹⁻⁵⁾ 今だに環境中に残留することが認められている。また、一部地方においては引き続き使用されている。⁶⁾

環境中に残留する DDT およびその代謝物はそこに棲息する魚類に慢性毒性的な影響を与える⁸⁻¹⁰⁾ばかりでなく、食物連鎖などによりヒトを含めた陸上動物にも各種の慢性毒性的影響を与える可能性を示唆する報告が近年しだいに多くなっている。

DDT はガンのプロモータであることが明らかにされ、^{11,12)} また、マクロファージの食食性の阻害¹³⁾および免疫能の低下¹⁴⁾などを引き起こし、その代謝産物である DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl)ethylene) は特異的に血小板の凝集阻害¹⁵⁾および鳥類の卵殻の成熟阻害¹⁶⁾を惹起することが報告されている。また、DDE では弱い¹⁷⁾が DDT およびその代謝物である DDD (1,1-dichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl)ethane) および DDT-

OH (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl)-2-hydroxy ethane) は強い細胞間結合阻害を示す。¹⁷⁾

この様に、DDT 自体の毒性に加えて、薬物代謝の結果生成される代謝産物それぞれに、親物質に見られなかった特有の毒性が発現することが明らかにされてきたことから、DDT の生体への影響を考えると、環境中で DDT の動態を把握することは重要な問題と考えられる。

魚類における DDT の動態は、自然環境中より採取した試料に DDT, DDE および DDD が検出されることから、魚体内に取り込めた DDT はこれらのものに変換するものと考えられている。しかし、DDT の代謝経路を系統的に検討された魚種は比較的少く、フナ *Carassius auratus*,^{18,19)} キャットフィッシュ *Heteropneustes fossilis*,²⁰⁾ ニジマス *Salmo gairdneri*,^{21,22)} カワマス *Salvelinus fontinalis*,²³⁻²⁵⁾ カダヤシ *Gambusia affinis*,²⁶⁾ アブラツノザメ *Squalus acanthias*²⁷⁾ などであり、日本の主要養殖魚であるコイ *Cyprinus carpio* およびテラピア

*¹ 日本大学農獣医学部水産学科 (Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma, Setagaya, Tokyo 154, Japan).

*² 岩手県栽培漁業センター (Iwate Prefectural Marine Culture, Suezaki, Oofunatoshi, Iwate 022, Japan).

*³ 財団法人化学検査協会 (Chemicals Inspection and Testing Institute, Japan, Higashimukoujima, Sumida, Tokyo 131, Japan).

Oreochromis niloticus に関する報告は見られない。

本研究では、この2魚種における DDT 代謝を明らかにすることを目的として、低濃度の DDT 分散液に両者を暴露し、魚体内の DDT およびその初期代謝産物である DDE, DDD および DDT-OH の挙動を追跡することにより、DDT の取り込みおよび体内運命を検討した。

実験材料及び方法

試料 コイおよびテラピアは三京水産株式会社（東京都）より購入し、それぞれ、0.5% および 1% の塩化ナトリウム水溶液中で $25 \pm 1^\circ\text{C}$ および $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で1週間飼育した。その後、両魚種共に脱塩素水約 105 l/日の流水下、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ にて約4ヶ月間の予備飼育を行った。このうち健康な 10 尾ずつを選び実験に供した。実験に供したコイおよびテラピアの平均体重は、それぞれ、44.1 g および 44.4 g であり、平均体長は共に 14.0 cm であった。

試薬 DDT, DDE, DDD および DDT-OH は和光純薬工業株式会社製の残留農薬試験用農薬標準品を用いた。*n*-ヘキサンは同社製の 1 級あるいは特級品を硫酸-硝酸混合液（硫酸：硝酸：水=58:25:17）でニトロ化後、水洗、蒸留およびモレキュラシーブ 13X によるカラムクロマトグラフィーにより精製したものを、ベンゼンは同社製の残留農薬試験用を使用した。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルには同社製の C-200 を塩酸処理することにより混在する金属類を除去し、十分に水洗後、メチルアルコールおよびジエチルエーテルにて順次洗浄し、風乾後、 110°C 、24 時間の活性化を行い、シリカゲル重量の 5% に相当する水を加え、平衡化したものを用いた。

実験方法 本実験に使用した流水式実験装置の概略は Fig. 1 に示したとおりである。硬化ヒマシ油（HCO-20, 日光ケミカルズ株式会社製）および *N,N*-ジメチルホルムアミドを助剤として水に分散した 200 ng/ml の DDT 溶液（硬化ヒマシ油：4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *N,N*-ジメチルホルムアミド：4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ）を保存ビンに入れ、毛細管により 0.38 ml/min の流速で希釈槽に注入した。これに活性炭を用いて脱塩素した水道水を 37.5 ml/min で流入し、約 100 倍に希釈後、 $59 \times 28 \times 36$ cm のガラス製実験水槽に送った。排水はサイフォンにより行い、アンバーライト-XAD-2（ローム・アンド・ハース社製）および活性炭カラムを通し、残留する DDT を除去した後に排水した。

実験水槽中 DDT 濃度の測定 水槽水中の DDT 濃度は Fig. 2 に示す方法により測定した。

水槽水 100 ml を分液ロートに取り、塩化ナトリウムによる塩析後、*n*-ヘキサンで2回振とう抽出を行い、無水硫酸ナトリウムにより脱水、ろ過後、減圧下、ロータ

Fig. 1. Flow-through aquarium system.

Two hundred ng/ml of DDT solution suspended with hydrocastor oil and *N,N*-dimethylformamide as a carrier was stocked in toxicant supply. The DDT solution was supplied to diluter at a flow rate of 0.38 ml/min through capillary tube. This toxicant was diluted with one hundred times volume of tap water dechlorinated with activated charcoal. The diluted DDT solution was supplied to test tank ($59 \times 28 \times 36$ cm) including 10 fishes and maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Waste test water was discharged after elimination of remaining DDT through Amberlite-XAD-2 and activated charcoal column.

(1): tap water, (2): activated charcoal, (3): water supply, (4): toxicant supply, (5): capillary tube, (6): diluter, (7): test tank, (8): siphon tube, (9): overflow, (10): Amberlite-XAD-2 column, (11): activated charcoal column.

Test water (100 ml)

Add 30 g of NaCl and 30 ml of *n*-hexane
Shake for 10 min

Aqueous layer

Add 30 ml of *n*-hexane
Shake for 10 min

n-Hexane layer

Aqueous layer

Filtrate through anhydrous sodium sulfate
Concentrate under reduced pressure
Clean up with a silica gel column

DDT fraction

Concentrate under reduced pressure
Fill up to 10 ml

GC analysis

Fig. 2. Determination procedure of DDT in test water.

リーエバポレータにより濃縮した。これを *n*-ヘキサンで平衡化したシリカゲルカラム（シリカゲル 1.8×10 cm に無水硫酸ナトリウムを 3 cm 重層）に付し、*n*-ヘキサン 100 ml で DDT を溶出した。溶出画分を集め、濃縮、定

GC analysis

Fig. 3. Determination procedure of DDT, DDE, DDD and DDT-OH in the whole fish.

容し、3% シリコン OV-17/ガスクロム Q (100/120) ガラスカラム (0.3×100 cm) を用い、ECD ガスクロマトグラフ (GC-ECD: 島津 GC-7A) により定量した。なお、カラム温度: 200°C, 試料注入口および検出器温度: 250°C, キャリヤガス: N₂, 50 ml/min にて定量した。

この分析条件下における試料添加法 (2 ng/ml) による回収率は 98.5 および 92.7% であった。また、DDT を加えない飼育水からは DDT はまったく検出されなかった。

魚体中 DDT 及び代謝物濃度の測定 実験開始後 1 週間ごとに 1 尾を取り上げ、即殺後、水道水により表面を十分に洗浄し、Fig. 3 の方法に従って分析した。全魚体を解剖鉢によりできる限り細切、均一にし、そのうち 10 g をガラス製乳鉢に取り、これに石英砂および無水硫酸ナトリウムを加え、十分にすりつぶした。この摩砕物を分液ロートに移し、*n*-ヘキサンにより振とう抽出を行った。抽出液は吸引ろ過により集め、濃縮後、前述したシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、100 ml の *n*-ヘキサン、60 ml の 20% ベンゼン含有 *n*-ヘキサンおよび 80 ml の 30% ベンゼン含有 *n*-ヘキサンで順次溶出し、DDT+DDE, DDD および DDT-OH, それぞれを分画した。各画分は濃縮後定容とし、3% シリコン OV-

Fig. 4. DDT concentration in the exposure water.

Eluent with 100 ml of *n*-hexane from silica gel column described in Fig. 2 was analyzed with GC-ECD equipped with 3% of OV-17 on Gaschrom-Q (100/120) glass column (0.3×100 cm) under following conditions. Column temperature: 200°C, Carrier gas: (N₂) 50 ml/min. Sample injection and detector temperature: 250°C. Panel A: carp, panel B: tilapia.

17/ガスクロム-Q (100/120) ガラスカラム (0.3×200 cm) を用い、水素炎イオン化検出器を装備したガスクロマトグラフ (GC-FID, 島津 GC-7A) により定量した。なお、測定条件はカラム温度: 240°C, 試料入口および検出器温度: 260°C, キャリヤガス: N₂, 40 ml/min (ただし、DDT-OH の場合のカラム温度は 225°C) である。

本分析法の試料添加法 (10 µg/g) による DDT, DDE, DDD および DDT-OH の回収率はコイで、それぞれ、73.9 および 69.5%, 111 および 101%, 97.2 および 91.6%, 69.8 および 65.8% であり、テラピアでは、それぞれ、75.3 および 70.9%, 113 および 103%, 99.3 および 93.7%, 72.5 および 68.3% であった。また、本分析法において DDT 暴露前の両実験魚にはいずれの成分も検出されなかった。

実験結果及び考察

実験開始以後、10 週まで 1 週目ごとの実験魚取り上げ直前に水槽中の試験水採取し、DDT 濃度を分析した。その結果は Fig. 4 に示したように、両魚種の水槽水共に 1 週目で約 0.4 ng/ml に達し、その後、濃度の著しい変動はみられなかった。暴露期間中の平均水槽水中 DDT 濃度はコイで 0.36 ng/ml, テラピアで 0.40 ng/ml であった。この濃度は設定濃度 2 ng/ml の 1/5 である。実験水槽流入口の試験水 DDT 濃度はほぼ設定濃度 (1.9~2.1 ng/ml) を保持し、実験期間中、両魚種の水槽水分析のいずれにおいても DDE は検出されなかった。なお、確認のため、5 および 10 週目においてシリカゲ

Fig. 5. Concentration of DDT and its metabolites in the carp exposed to DDT solution.

DDT+DDE, DDD and DDT-OH fractions were eluted from silica gel column described in Fig. 3 with 100 ml of n-hexane, 60 ml of 20% benzene/n-hexane and 80 ml of 30% benzene/n-hexane, respectively. The fractions were analyzed with GC-FID equipped with 3% of silicone OV-17 on Gaschrom-Q (100/120) glass column (0.3×200 cm) under following conditions. Column temperature: 240°C, sample injection and detector temperature: 260°C, carrier gas: (N₂) 40 ml/min.

○: DDT, ●: DDE, △: DDD, ▲: DDT-OH.

ルカラムより, さらに DDD および DDT-OH を溶出させ分析した結果, 両者共にまったく検出されず, 実験期間中, DDT は水槽中にて DDE, DDD および DDT-OH に変化することなく存在していたと考えられる。これらのことから, 試験水中の DDT 濃度が設定濃度の 1/5 に低下した原因としては, 水槽内の汚物および魚などへの吸着, 魚への急速な取り込み, あるいは気散などが推測される。

この濃度の DDT に暴露したコイおよびテラピアを 1 週間ごとに取り上げ, 魚体中に残留する DDT, DDE, DDD および DDT-OH を分析した結果は Fig. 5 および 6 に示した。

コイ魚体中には暴露後 1 週目で DDT が検出されるようになり, 同時に DDE も検出された。その後, DDT はゆるやかに増加し, 10 週目で約 2 µg/g に達した。DDE は DDT に比べ急激に増加し, 10 週目で約 6 µg/g に達した。一方, DDD および DDT-OH は実験期間中まったく検出されなかった (Fig. 5)。

実験期間中水槽水中に DDE がまったく検出されなかったことから, コイ魚体中に検出された DDE は水槽中で DDT が DDE に変化し, それを取り込んだためでなく, 取り込まれた DDT が非常に速やかに DDE に変化したためと考えられる。また, DDT のコイによる取り込み速度を DDT のみで判断するとかなりゆるやかで, 5 週目よりほぼ平衡状態に達しており, 10 週目における

Fig. 6. Concentration of DDT and its metabolites in the tilapia exposed to DDT solution.

Experiment conditions are as described in the legend to Fig. 5.

○: DDT, ●: DDE, △: DDD, ▲: DDT-OH.

生物濃縮係数 (BCF) は約 5000 であった。しかし, 代謝産物である DDE を合せて考えると, その取り込みはほぼ直線的に増加していると思われ, その速度は約 0.7 µg/g/週と見積られる。これはテラピアの DDT の取り込み速度に近似している。DDT+DDE の取り込み量は 10 週目で約 8 µg/g に達し, その BCF は約 22,000 となり, さらに増加する傾向にあった。

一方, テラピアにおける DDT の取り込みおよびその代謝物の挙動はコイと比べて顕著に異なっていた。DDT は 1 週目より検出され, その濃度は暴露期間に従い急激に増加し, 10 週目で約 9 µg/g に達した。また, コイにおいて 1 週目より検出された DDE はテラピアでは実験期間中まったく検出されなかった。これに反し, コイにおいてまったく検出されなかった DDD が僅かに検出され, 非常にゆるやかに増加し, 10 週目で約 0.4 µg/g に達した。前述したごとく, 水槽水中には DDD がまったく検出されなかったことから, この DDD はテラピア魚体中で DDT より変化したものと考えられる。テラピアにおける DDT の 10 週目の BCF はコイの DDT+DDE の場合とほぼ等しく, 約 23,000 であり, さらに増加傾向にあった (Fig. 6)。

コイ²⁸⁾あるいは他魚種における多くの報告²⁹⁾と同様, 本実験においてもテラピアは非常に速かに水中より DDT を取り込んだ。一方, コイは DDT のみで追跡した場合, テラピアに比べ, かなり遅い速度の取り込みを示したが, その代謝産物である DDE を併せて考えると, テラピアとほとんど同様な速度で取り込むことが判った。これは DDT の取り込み速度を比較検討する場

合、その代謝産物も考慮する必要があることを示すものである。

DDT 代謝産物の魚体内挙動は両魚種間で明白に異なり、コイでは DDE がむしろ DDT より多量に検出され、また、暴露時間の経過に伴い、その比率は増大した。しかし、テラピアでは DDE はまったく検出されず、微量の DDD のみが検出された。これは、魚体内に取り込まれた DDT の魚体内における代謝様式の差によるものと考えられる。すなわち、コイ体内では DDT は非常に速かに安定な DDE に変換され、それが体内に蓄積し、他の代謝物、DDD および DDT-OH などにはまったく変化しないか、あるいはこれらのものに変化しても比較的不安定であるため、速やかに次の代謝物に変換した可能性が考えられる。また、テラピアでは DDE にまったく変換せず、僅かに DDD のみに変化し、取り込まれた DDT のほとんどはそのまま残留するか、あるいは本研究で測定した代謝産物に一度変化したとしても、それがさらに速やかに他のものに代謝されたことが予想される。しかし、DDT の蓄積する速度がコイの DDT+DDE の速度とほぼ等しいことから、前者の可能性が強いものと推測される。

しかし、両魚種の DDT 代謝経路をさらに明確にするためには DDD および DDT-OH など魚体内残留期間が短いと予想される不安定中間物質の動態まで定量的に把握する必要がある。

文 献

- 1) 田辺信介, 田中博之, 立川 涼, 中村 泉: 日水誌, **46**, 763-769 (1980).
- 2) D. B. Martin and W. A. Hartman: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 712-717 (1985).
- 3) J. Falandysz: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, **181**, 316-317 (1985).
- 4) J. Falandysz: *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, **181**, 370-374 (1985).
- 5) C. J. Schmitt, J. L. Zajicek, and M. A. Ribick: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 225-260 (1985).
- 6) W. Hanke, G. Gluth, H. Bubel, and R. Mueller: *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **7**, 229-241 (1983).
- 7) S. Mustafa and S. M. Zofair: *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **22**, 155-159 (1985).
- 8) G. Gluth and W. Hanke: *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **9**, 179-188 (1985).
- 9) S. K. Kulrhestha and N. Arora: *J. Environ. Biol.*, **7**, 113-119 (1986).
- 10) J. P. Giesy, J. Newsted, and D. L. Garling: *J. Great. Lakes Res.*, **12**, 82-98 (1986).
- 11) S. Yanagi, M. Sakamoto, and T. Nakano: *Int. J. Cancer*, **37**, 459-464 (1986).
- 12) V. Preat, J. De Gerlache, M. Lans, H. Taper, and M. Roberfroid: *Carcinogenesis (London)*, **7**, 1025-1028 (1986).
- 13) N. E. Kaminski, D. S. Wells, W. C. Dauterman, J. F. Roberts, and F. E. Guthrie: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 474-480 (1986).
- 14) B. D. Banerjee, M. Ramachandran, and Q. Z. Hussain: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**, 433-440 (1986).
- 15) H. F. Krug and J. Berndt: *Blut*, **51**, 19-23 (1985).
- 16) F. G. Burton, M. Marqiss, and S. G. Tullett: *Comp. Biochem. Physiol.*, **85C**, 25-31 (1986).
- 17) J. S. Davidson, I. M. Baumgarten, and E. H. Harley: *Biochim. Biophys. Acta*, **847**, 1-7 (1985).
- 18) R. G. Young, L. St. John, and D. J. Lisk: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 351-354 (1971).
- 19) M. M. Rhead and J. M. Perkins: *Water Res.*, **18**, 719-725 (1984).
- 20) H. C. Agarwal and B. Gupta: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **29**, 204-209 (1974).
- 21) Y. Takarazuka and J. Miyamoto: *J. Pesticide Sci.*, **1**, 261-271 (1976).
- 22) R. F. Addison and D. E. Willis: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 303-315 (1978).
- 23) G. J. Atchison and H. E. Johnson: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **104**, 782-784 (1975).
- 24) R. F. Addison and M. E. Zinck: *Environ. Qual. Saf. Suppl.*, **3**, 500-506 (1975).
- 25) M. E. Zink and R. F. Addison: *Can. J. Biochem.*, **53**, 636-639 (1975).
- 26) M. K. K. Pillai, H. C. Agarwal, and D. V. Yadav: *Indian J. Exp. Biol.*, **15**, 40-41 (1977).
- 27) B. H. Dvorchik and T. H. Maren: *Comp. Gen. Pharmacol.*, **5**, 37-49 (1974).
- 28) T. Shimizu, Y. Hashimoto, and J. Fukami: *J. Pesticide Sci.*, **3**, 311-314 (1978).
- 29) G. D. Veith, D. L. DeFoe, and B. V. Bergstedt: *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 1040-1048 (1979).