数種淡水魚における p, p' -DDT の初期代謝経路の比較

内田 直行, 小島 浩一, 田中 佳代, 安斎 寛, 西出 英一

(1989 年 2 月 23 日受付)

Comparison of the Initial Metabolic Pathway of p, p' -DDT
in Several Freshwater FishesNaoyuki Uchida,* Kouichi Kojima,* Kayo Tanaka,*
Hiroshi Anzai,* and Eiichi Nishide*

Eleven freshwater fishes were kept in a flow-through aquarium system (FAS) and in a closed aquarium system (CAS) after intraperitoneal injection of p, p' -DDT (DDT). Concentrations of DDT, p, p' -DDE (DDE), p, p' -DDD and p, p' -DDT-OH in the whole body and in the CAS were determined.

Japanese barbel, Japanese dace and char rapidly converted DDT into DDE only, and the Σ DDT in the whole CAS (consisted of fish, aquarium and rearing water) were nearly equal to the original DDT, suggesting only one initial metabolic pathway (IMP) changing rapidly the DDT into DDE. In crucian carp, loach, Japanese sculpin, floating goby and catfish, slight increase of only DDE were observed, and the Σ DDT in their whole CAS almost corresponded to the DDT injected, suggesting only one IMP converting slowly from DDT to DDE. The DDT in grass carp was immediately cleared and only DDE increased without delay, and the Σ DDT in the whole CAS was about 50% of the original DDT. In bluegill, only DDE gradually increased with clearance of DDT, and the Σ DDT in the whole CAS was about 85% of the original DDT. These results suggested that grass carp had IMP converting quickly from DDT to DDE and other metabolites undetermined and that bluegill had a similar pathway, but it was slower. Japanese eel might not have clear IMP, considering the fact that no metabolite was detected and the DDT injected remained completely in the whole CAS.

魚類において 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p -chlorophenyl) ethane (DDT) の代謝経路を検討した例は比較的少なく、キャットフィッシュ *Heteropneustes fossilis*,¹⁾ アブラツノザメ *Squalus acanthias*,²⁾ カワマス *Salvelinus fontinalis*,³⁻⁵⁾ アトランティックサーモン *Salmo salar*,⁶⁾ カダヤシ *Gambusia affinis*,⁷⁾ ニジマス *Salmo gairdneri*,⁸⁾ フナ *Carassius auratus*,^{9,10)} などである。これらにおいても系統的に同一条件下で比較した例は少ない。

著者らは DDT を腹腔内投与したコイ *Cyprinus carpio* およびテラピア *Oreochromis niloticus* を流水式および閉鎖式飼育装置内で飼育し、DDT の初期代謝経路を比較したところ、両者の初期代謝経路は明らかに異なることを見出した。¹¹⁾ これは、魚種により DDT の初期代謝経路が互いに異なる可能性を示し、広く同一条件下で比較する必要があることを示唆している。

本研究では比較的容易に入手できる淡水魚 11 種を選び、前報と同様な方法,¹¹⁾ すなわち、DDT を腹腔内注入

した魚を比較的健康的な条件が保たれる流水式飼育装置内で飼育し、おおまかな DDT 減少と代謝産物の出現を追跡する方法と、低沸点化合物である DDT およびその代謝産物の揮散を防ぎ、系内の DDT の変化が定量的に把握できる閉鎖式飼育装置による実験を併用することにより DDT 初期代謝経路の比較検討を行った。

実験材料および方法

試料および試薬 実験に供した 11 魚種の平均体重および体長を Table 1 に示す。これらはいずれも三京水産株式会社 (東京都) より購入し、前報¹²⁾ と同様に 0.5% 塩化ナトリウム溶液中、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (イワナ *Salvelinus pluvius* の場合、 $10 \pm 1^\circ\text{C}$) で 1 週間薬浴を行った。その後、同温度の流水下で予備飼育し、実験に供した。その他の材料および試薬はことわりのないかぎり前報に準じた。^{11,12)}

実験方法 前報の方法に準拠した。^{11,12)} すなわち、硬

* 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).

Table 1. Body size of fishes used for experiment

Species	Weight* ¹ (g)	Length* ¹ (cm)
Grass carp <i>Ctenopharyngodon idella</i>	9.2± 2.2	9.2±2.0
Japanese barbel <i>Hemibarbus barbus</i>	9.1± 1.6	11.1±0.7
Japanese dace <i>Tribolodon hakonensis</i>	17.3± 8.5	10.7±0.9
Crucian carp <i>Carassius auratus</i>	42.4± 6.9	13.4±0.8
Loach <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	7.8± 1.6	12.7±0.6
Japanese sculpin <i>Cottus japonicus</i>	8.0± 2.1	8.8±0.9
Bluegill <i>Lepomis macrochirus</i>	23.3± 7.3	11.0±0.8
Floating goby <i>Chaenogobius annularis</i>	7.1± 2.3	9.1±0.7
Catfish <i>Silurus asotus</i>	47.8± 7.8	19.2±2.9
Japanese eel <i>Anguilla japonica</i>	48.8±14.8	38.8±4.4
Char <i>Salvelinus pluvius</i>	13.2± 2.4	11.5±0.8

*¹ Mean±S.D.

化ヒマン油および *N,N'*-ジメチルホルムアミドを助剤として分散した DDT 溶液を、魚体重 (g) 当り、100 ng になるように、直腸経由で腹腔内に投与した。これらのうち、流水式飼育装置中で 10 尾/水槽を、閉鎖式飼育装置中で 1 尾/水槽 (ただし、ソウギョ *Ctenopharyngodon idella*, ウグイ *Tribolodon hakonensis*, ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* およびカジカ *Cottus japonicus* は 2 尾/水槽) を飼育した。飼育水温はイワナの 10±1°C を除き、いずれの場合も 20±1°C とした。

魚体中および閉鎖式飼育装置中の DDT, 1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl) ethylene(DDE), 1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl) ethane(DDD) および 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)-2-hydroxyethane (DDT-OH) 濃度は *n*-ヘキサン抽出後、シリカゲルカラムにより分離した DDT+DDE, DDD および DDT-OH 画分を、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 (GLC-ECD: 島津 GC-7A) により定量した。なお、測定条件は、カラム温度: 200°C (ただし、DDT-OH の場合、180°C)、試料注入口および検出器温度: 250°C、キャリアーガス (N_2): 40 ml/min とした。

実験結果および考察

100 ng/g の DDT を腹腔内投与した各魚種を流水式飼育装置内で飼育し、一定期間ごとに 2 尾ずつを取り出して分析した結果を Fig. 1 に示す。なお、2 尾の平均値お

よび一次反応プロットより推測した DDT 減少および代謝産物生成の近似曲線を図中に示した。また、参考のため既報¹¹⁾のコイの結果を併記した。

投与された DDT の減少速度は魚種により非常に異なっており、みかけ上一次反応速度に従うことから、それらの速度定数をおおまかに見積り、Table 2 にまとめた。ソウギョ、ニゴイ *Hemibarbus barbus* およびウキゴリ *Chaenogobius annularis* の減少速度は特に速くウグイ、ブルーギル *Lepomis macrochirus*, イワナ, フナ *Carassius auratus* およびドジョウはコイおよびテラピアの減少速度¹¹⁾と近似した速度であった。また、カジカ、ナマズ *Silurus asotus* およびウナギ *Anguilla japonica* の減少速度はこれらに比べ著しく低かった。

Fig. 1 に示すように DDT の減少に伴い、代謝産物としてウナギ以外では DDE が有意に検出された。それらのうち、ソウギョ、ニゴイ、ウグイおよびイワナにおいてはコイと同様に DDE 濃度は急増し、フナ、ドジョウ、カジカ、ブルーギル、ウキゴリおよびナマズではテラピアと同様に僅かずつ増加する傾向にあった。また、いずれの魚種においても、飼育期間中、DDT-OH はまったく検出されず、DDD はほとんど検出されないか、検出されても無視できる程度であった。

100 ng/g の DDT を投与し、閉鎖式飼育装置中で 1 週間飼育した後の魚体および飼育装置中の DDT およびその代謝産物を分析した結果を Table 3 に示す。実験は各魚種につき 2 回ずつ行った。流水式飼育装置による場合

Fig. 1. Concentrations of DDT and its metabolites in the fishes kept in the flow-through aquarium system.

The DDT solution was intraperitoneally injected into fishes and the fishes except char (at $10 \pm 1^\circ\text{C}$) were kept at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ in the flow-through aquarium system as described in the previous report.¹¹⁾ The concentrations of DDT and its metabolites were determined by the methods described in the previous reports.^{11,12)}

Panel A: grass carp, B: Japanese barbel, C: Japanese dace, D: crucian carp, E: carp (from the previous report.¹¹⁾), F: loach, G: Japanese sculpin, H: bluegill, I: floating goby, J: catfish, K: Japanese eel, L: char.

○: DDT, ●: DDE

と同様に、いずれの魚種においても有意の DDD および DDT-OH は検出されず、DDT および DDE のみが検出された。ただし、ソウギョにおいては DDE のみがウナギにおいては DDT のみが検出された。

ニゴイ、ウグイ、フナ、ドジョウ、カジカ、ウキゴリ、ナマズ、ウナギおよびイワナの Σ DDT は、それぞれ、平均 105.4, 101.0, 100.8, 95.4, 101.3, 94.0, 99.0, 104.7 および 98.6% であり、これら魚類においては投与された DDT のほとんどがここで検出された物質として

回収され、他の代謝産物には変化してないと考えられる。これらのうち、ニゴイ、ウグイおよびイワナの DDT 初期代謝経路は、流水式実験における急激な DDE 増加と閉鎖式実験における高濃度の DDE 検出より、コイ¹¹⁾と同様の変換率の高い DDE への経路のみであると考えられる。フナ、ドジョウ、カジカ、ウキゴリおよびナマズは流水式実験における緩やかな DDE 増加および閉鎖式実験における低濃度の DDE 検出より、変換率の低い DDE への初期代謝経路のみをもつと考えられる。フナ

Table 2. Rate constants of DDT clearance in the fishes

Species	Rate constant* ¹ ($\times 10^{-2}$ /day)
Grass carp	>70.0
Japanese barbel	12.0
Japanese dace	6.4
Crucian carp	1.9
Loach	2.2
Japanese sculpin	0.3
Bluegill	3.0
Floating goby	9.5
Catfish	0.5
Japanese eel	0.7
Char	3.3
Carp* ²	4.2
Tilapia* ²	2.4

*¹ These values were roughly estimated from the slopes on the logarithmic plots of DDT concentration versus rearing time in Fig. 1 according to the equation of a first-order reaction.

*² From a previous report.¹¹⁾

に DDT を経口^{9,10)}あるいは暴露投与¹⁰⁾した場合, 微量の DDD¹⁰⁾と高濃度の DDE^{9,10)}が検出されるとされている。この本研究結果との差異は投与方法の違いに起因しているものと予測されるが, フナの DDT 初期代謝経路は DDE への経路のみ, あるいはこれを主経路とする点については一致する。

ウナギは流水式実験において有意な代謝産物が検出されないこと, 閉鎖式実験において投与した DDT がほとんどそのまま残存することから, 明確な初期代謝経路をもたないと考えられる。

ソウギョおよびブルーギルの Σ DDT は, それぞれ, 平均 51.1 および 86.6% であり, 1-chloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene あるいは bis(p-chlorophenyl) methane などのような, ここで分析した化合物以外のものに一部変化した可能性がある。このうち, ソウギョはその流水式実験における急激な DDT 減少に伴う DDE

Table 3. Distributions of DDT and its metabolites in the whole closed aquarium system at 7 days after intraperitoneal injection of DDT into fishes

Species	Injected DDT (μ g)	Distribution (%) ^{*1}								Σ DDT
		In whole body				In aquarium and rearing water				
		DDT	DDE	DDD	DDT- OH	DDT	DDE	DDD	DDT- OH	
Grass	1.99	— ^{*3}	50.1	—	—	—	1.2	—	—	51.3
carp ^{*2}	2.01	—	48.9	—	—	—	1.9	—	—	50.8
Japanese	0.95	47.4	51.6	—	—	—	—	—	—	99.0
barbel	0.77	32.5	79.2	—	—	—	—	—	—	111.7
Japanese	2.05	40.0	58.5	—	—	—	5.4	—	—	103.9
dace ^{*2}	2.38	43.7	54.2	—	—	—	0.1	—	—	98.0
Crucian	4.56	85.2	12.1	—	—	—	—	—	—	97.3
carp	4.74	86.5	17.8	—	—	—	—	—	—	104.3
Loach ^{*2}	1.84	81.0	12.5	—	—	—	—	—	—	93.5
	1.48	85.8	11.5	—	—	—	—	—	—	97.3
Japanese	2.08	88.0	12.0	—	—	—	—	—	—	100.0
sculpin ^{*2}	1.79	89.9	12.6	—	—	—	—	—	—	102.5
Bluegill	2.54	87.4	—	—	—	—	—	—	—	87.4
	2.31	77.9	7.8	—	—	—	—	—	—	85.7
Floating	0.68	85.3	7.4	—	—	—	—	—	—	92.7
goby	0.63	79.4	15.9	—	—	—	—	—	—	95.3
Catfish	6.20	33.9	16.1	—	—	—	—	—	—	100.0
	5.30	79.1	18.9	—	—	—	—	—	—	98.0
Japanese	2.52	106.0	—	—	—	—	—	—	—	106.0
eel	3.65	103.3	—	—	—	—	—	—	—	103.3
Char	1.75	64.6	32.0	—	—	—	—	—	—	96.6
	1.61	70.2	30.4	—	—	—	—	—	—	100.6
Carp ^{*4}	5.54	60.1	33.8	—	—	—	—	—	—	93.9
	6.17	86.4	15.4	—	—	—	—	—	—	101.8
Tilapia ^{*4}	5.20	84.6	—	3.5	—	5.7	0.2	3.7	—	97.7
	7.10	86.8	—	6.6	—	—	1.0	—	—	94.4

*¹ Calculated as DDT.

*² Two fishes were used for one experiment.

*³ Undetectable.

*⁴ From a previous report.¹¹⁾

の急増と、閉鎖式実験において高濃度の DDE のみが検出され、 Σ DDT が低いことから、その DDT 初期代謝経路として変換率の高い DDE およびここで分析した化合物以外への経路が推測される。また、ブルーギルは流水式実験における DDE の漸増と閉鎖式実験における低濃度の DDE 検出および Σ DDT の値から、変換率の低い DDE および他の未検出化合物への経路が予測される。

DDT の主要な解毒経路として、脱塩酸による DDE への経路と脱塩素による DDD への経路が考えられている。¹⁸⁾シカ¹⁴⁾およびマウス¹⁵⁾などでは DDD への経路が強い。これとは逆に、キャットフィッシュ、¹⁾カワマス、⁸⁻⁹⁾カダヤシ⁷⁾およびフナ^{9,10)}では DDD への経路より DDE への経路が強いことが報告されている。また、アブラツノザメ²⁾ およびニジマス⁹⁾ においては投与された DDT が顕著な変化を受けないことが観察されている。これらの知見と、本研究で得られた結果およびコイおよびテラピアの結果¹¹⁾を考え合わせると、魚類では明確な DDT の解毒経路をもたない種と、DDT 解毒のための初期代謝経路として残留性の低い DDD への経路よりも、むしろ、DDT より残留性の高い DDE への経路が強い種が多いと考えられる。

本研究の結果、魚種により DDT 初期代謝に明瞭な差異が認められた。これは本実験方法が微生物などの他の因子による代謝産物の再取込みなどの影響が少なく、また、系全体の変化を定量的に把握できるために観察されたものと思われる。この差異は先天的あるいは後天的要因に起因しているものと予測されるが、詳細については不明である。これらのことをさらに明確にするためには、今後さらに多くの種および同一種多履歴の魚につい

てこのような同一実験方法による検討を重ねる必要があると考えられる。

文 献

- 1) H. C. Agarwal and B. Gupta: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **29**, 204-209 (1974).
- 2) B. H. Dvorchik and T. H. Maren: *Comp. Gen. Pharmacol.*, **5**, 37-49 (1974).
- 3) G. J. Atchison and H. E. Johnson: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **104**, 782-784 (1975).
- 4) R. F. Addison and M. E. Zinck: *Environ. Qual. Saf. Suppl.*, **3**, 500-506 (1975).
- 5) M. E. Zinck and R. F. Addison: *Can. J. Biochem.*, **53**, 636-639 (1975).
- 6) R. F. Addison, M. E. Zinck, and J. R. Leahy: *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 2073-2076 (1976).
- 7) M. K. K. Pillai, H. C. Agarwal, and D. V. Yadav: *Indian J. Exp. Biol.*, **15**, 40-41 (1977).
- 8) R. F. Addison and D. E. Willis: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 303-315 (1978).
- 9) R. G. Young, L. St. John, and D. J. Lisk: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 351-354 (1971).
- 10) M. M. Rhead and J. M. Perkins: *Water Res.*, **18**, 719-725 (1984).
- 11) 内田直行, 金子雅春, 武蔵達也, 田中佳代, 安斎寛, 西出英一: 日水誌, **54**, 2217-2221 (1988).
- 12) 内田直行, 武蔵達也, 勝浦 洋, 安斎 寛, 西出英一: 日水誌, **54**, 129-133 (1988).
- 13) S. S. A. Zaidi and B. D. Banerjee: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**, 449-455 (1987).
- 14) M. Watson, B. Pharaoh, J. Wyllie, and W. W. Benson: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 316-323 (1975).
- 15) B. Gold and G. Brunk: *Chem.-Biol. Interact.*, **41**, 327-339 (1982).