

# 工業地域河口に生息しているカキ (*Crassostrea gigas*) のトリクロロ酢酸による汚染

後藤政幸

## Trichloroacetic Acid Pollution in Oysters (*Crassostrea gigas*) at the Industrial Sea Areas

Masayuki GOTOH

Biomonitoring using oysters was done to assess environmental pollution due to trichloroacetic acid (TCA). The data in 2001, in oysters from the Koe River and the Ariho River at the industrial sea areas, TCA was detected at 97 and 40 ng/g in the average, but trichloroethanol (TCE) was not detected. TCA concentrations in 2004 were at 175 and 59 ng/g, respectively. And, TCE was not detected. This data shows a TCA concentration increase of about 48–80% over a three year period. This result may be caused by the bioconcentration and/or biometabolism in oysters. If the bioconcentration has increased, the environmental biomonitoring of TCA using oysters should be one means to facilitate obtaining data on water pollution due to TCA.

キーワード：トリクロロ酢酸、カキ (*Crassostrea gigas*)、環境汚染、生物学的モニタリング、GC-MS

### 緒 言

近年、生物を利用した環境汚染のモニタリングが検討されているが、なかでも化学物質による水質汚染のモニタリングの指標生物として局地特性が反映される理由から貝類を用いる方法がいくつか報告されている<sup>1,2)</sup>。著者は先に、商工業地域に生息しているアサリ (*Tapes japonica*) がトリクロロ酢酸 (TCA) に汚染されていることを見だし、アサリによるTCAの水系環境汚染モニタリングの有効性について報告した<sup>3)</sup>。さらに、同時期に採取したカキ (*Crassostrea gigas*) 中にアサリより高濃度のTCAが検出されたことから、カキもTCA汚染のモニタリング指標生物として有効であると推察した<sup>4)</sup>。

本研究では、先の報告<sup>4)</sup> (1997年；後藤政幸) と同地点で2001年と2004年にカキを採取し

て継続的にTCA汚染のモニタリングを行いその動向を把握した。

## 実験方法

### 1. 試料

2001年8月と2004年7～8月期間中のそれぞれ5回にわたり、山口県内の工業地域流域2河川の河口 (Fig. 1) において、カキ (*Crassostrea gigas*) を採取した。採取した試料は採取後冷凍して実験室に搬送し直ちに分析を行った。カキは殻の長さが約70mm、むき身の重量が約2gのものを実験に供した。また採取した試料は、採取から実験に供する間に体内中のトリクロロエチレン等が代謝されてTCAが生成される可能性<sup>3)</sup>を懸念して、搬入後は速やかにガスクロマトグラフ(GC)およびガスクロマトグラフ-質量分析計(GC/MS)による分析を行った。

### 2. カキ中のTCAおよびトリクロロエタノール (TCE) の分析方法

本実験におけるTCAおよびTCEの分析法は以下のとおりである。カキは殻内の肉部と体液を合わせて日本精機製エース・ホモジナイザーAM-3を用い、15,000回転/分で5分間細切し、ホモジネート約5gを50ml共栓付遠沈管に入れ精確に秤量した。精製水5ml、濃塩酸(和光純薬製特級)2mlおよび内標準品1,3-ジブロモプロパン(Aldrich製)5 $\mu$ l/l含有ジエチルエーテル(和光純薬製残留農薬試験用)10mlを加え、振幅40mm、300回転/分で10分間振盪後、1800 $\times$ gで5分間遠心分離(久保田製KN-70)した。エーテル層2mlを3-メチル-1-p-トリルトリアゼン(Aldrich製)約10mgの入っている10ml共栓付試験管に速やかに取り、室温で10分間放置してTCAをメチル化した。n-ヘキサン(和光純薬製残留農薬試験用)1mlを加え試験溶液とし、2 $\mu$ lについてGC分析を行った。カキ中のTCAおよびTCEの定量下限値はそれぞれ2ng/gとした。

#### GC分析条件

装置：日立製GC263-50、カラム：ガラス製2m $\times$ 3.25mm $\phi$ 5%シリコンOV-17 ガスクロムQ100/120メッシュ、検出器：電子捕獲型検出器(ECD)<sup>63</sup>Ni、キャリアガス：窒素40ml/min、注入口温度：180 $^{\circ}$ C、オープン温度：110 $^{\circ}$ C、検出器温度：180 $^{\circ}$ C、試料注入量：2 $\mu$ l。

さらに検出されたTCAの定性を確認するためGC/MS分析を行った。

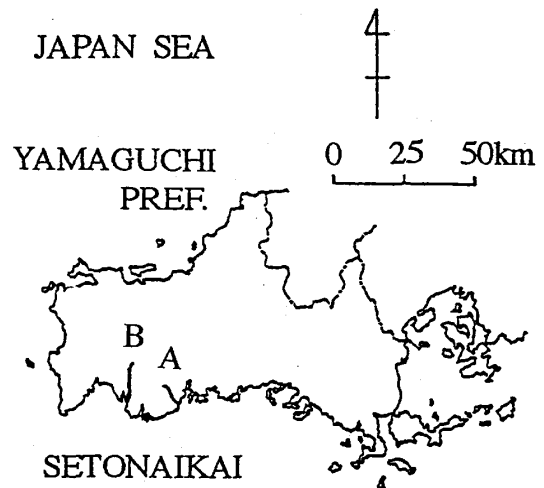


Fig. 1 Location of sampling sites.  
A: the Koe River and B: the Ariho River.

### GC/MS分析条件

装置：ヒューレッド・パッカー製 HP6890 Series MSD、カラム：DB-1701 60m×0.25mm ID×0.25μm DF、キャリアガス：ヘリウム 1.0ml/min 15.6psi at 35℃、注入モード：pulsed splitless (pulse 40.0psi 1.70min)、注入口温度：260℃、カラム温度：35℃ (2.0min)→20℃/min→260℃ (10.0min)、インタフェース温度：260℃、イオン源温度：160℃、イオン化法：EI70eV、測定モード：scanまたはSIM、EM電圧：Tuneに対して+400V (scan) または+1000V (SIM)、スキャンレンジ：35~350amu、スキャンスピード：1 s/scan、SIM測定イオン：59・117・119amu、注入方法：HP6890 Series Autosampler、試料注入量：1μl。

### 結果および考察

カキにTCAおよびTCEをそれぞれ300ng/g添加した時のガスクロマトグラムをFig. 2(A)、またカキ中に検出されたTCAのガスクロマトグラム例を(B)に示した。GCで検出されたカキ中のTCAはGC/MSで確認した。カキ試験溶液のGC/MS分析の結果をFig. 3、4に示した。Fig. 3はscan測定モードによる保持時間8~10分間のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

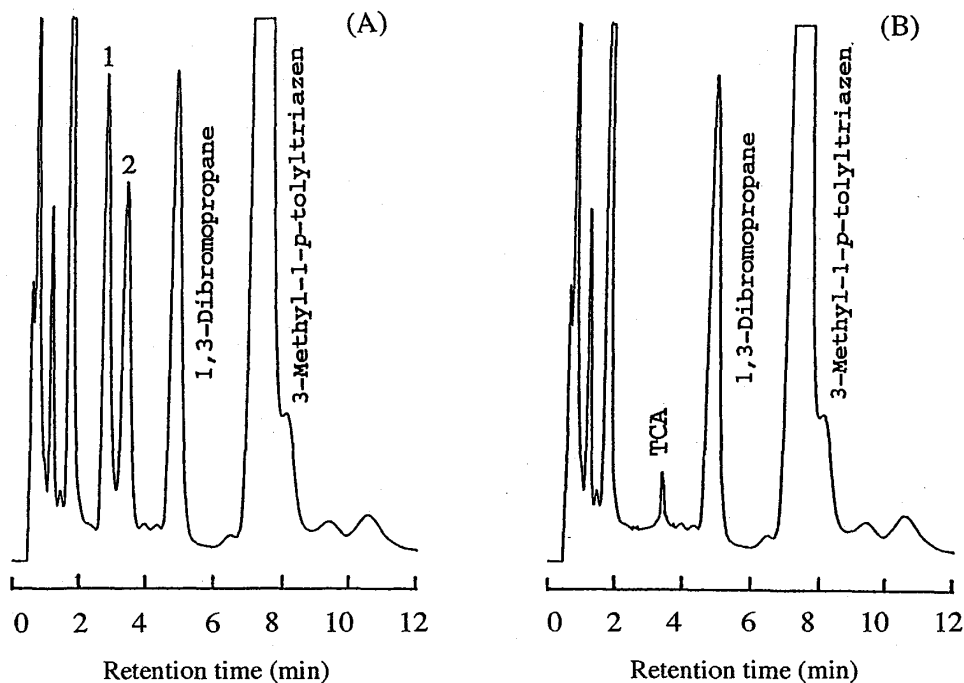


Fig. 2 Gas chromatogram of TCE (1) and TCA (2) standards added in oyster (A). Gas chromatogram of TCA in oyster sample (B).

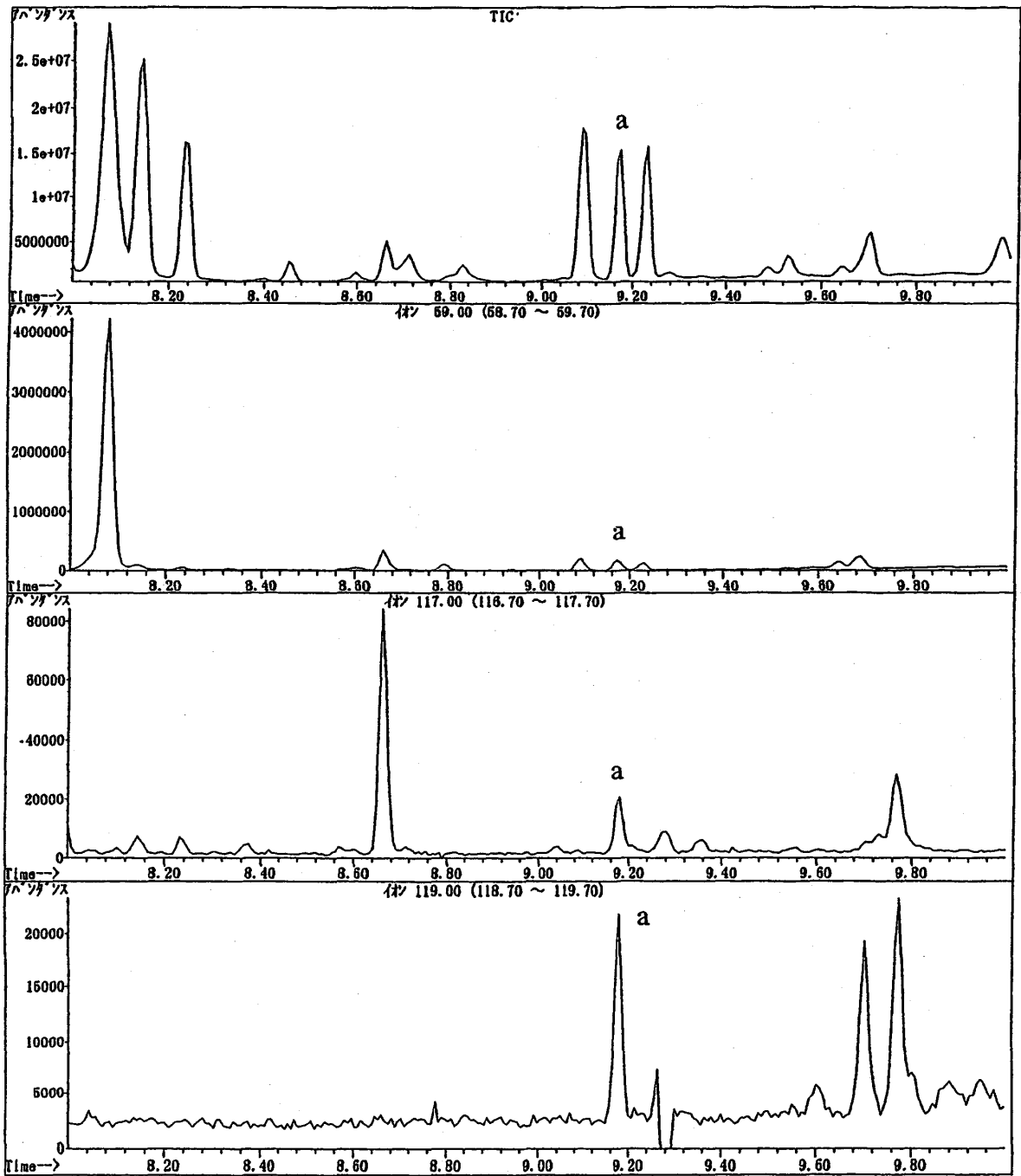


Fig. 3 Total ion chromatogram and three ion chromatograms ( $m/z=59, 117, 119$ ) of the extraction from a oyster sample. analyzed by GC/MS with a scan mode. a: TCA-methyl ester.

とTCAメチルエステルの特徴的なイオンである $m/z$  59、117、119の各イオンクロマトグラムである。本条件では保持時間9.2分にTCAメチルエステルと思われるピーク(a)が認められた。Fig. 4(A)はFig. 3のピーク a のマススペクトルを、(B)はライブラリーサーチから求めた

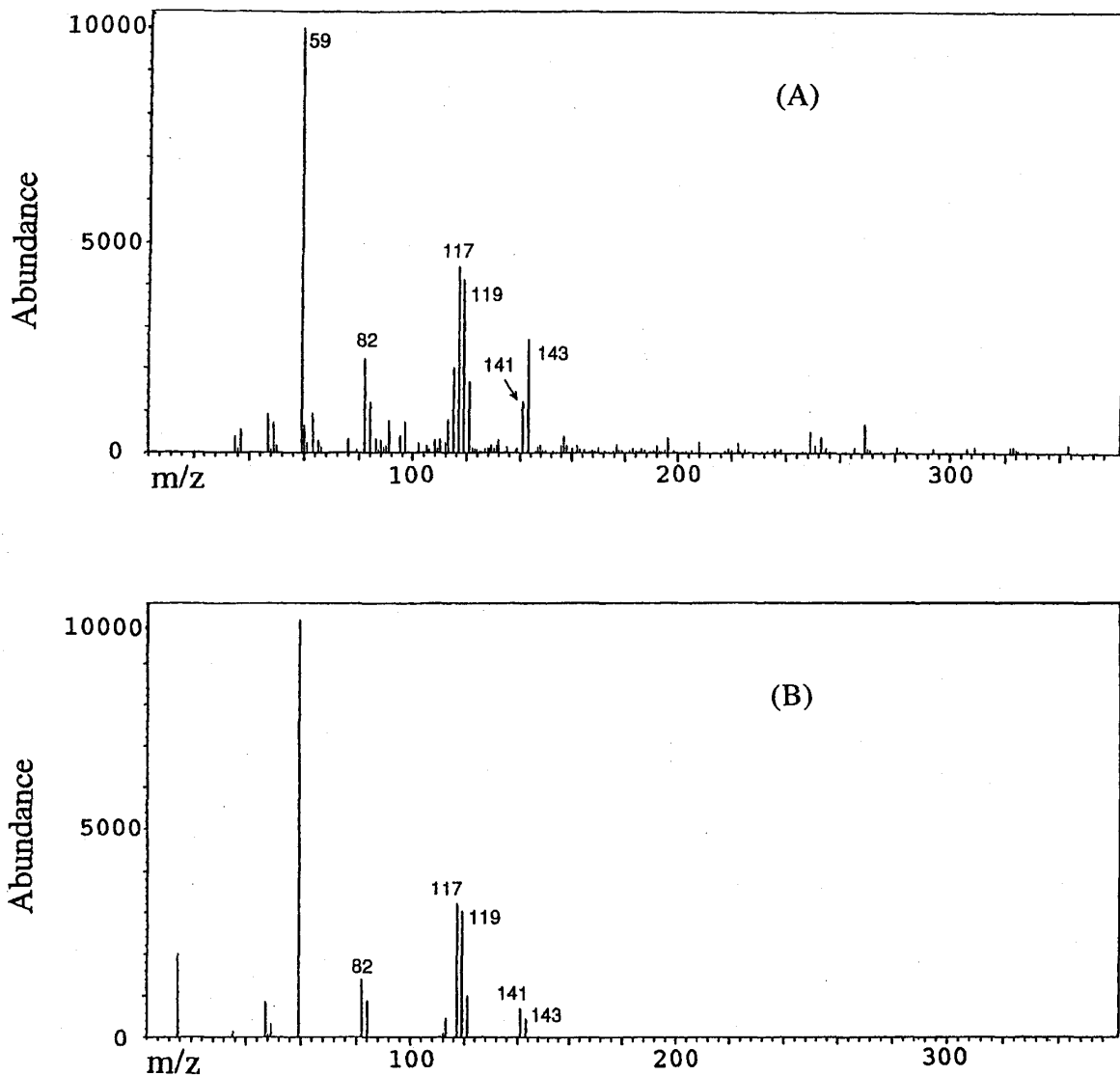


Fig. 4 Mass spectra of TCA-methyl ester in a oyster sample (A) and standard (B).

TCAメチルエステルの標準スペクトルを示したものである。両者は極めて類似しており、カキ試験溶液中のピーク a はTCAメチルエステルであることが確認できた。

GC分析によるカキ中のTCAの測定結果をTable 1に示した。数値は平均値±標準偏差値で表した。河川Aの河口で採取したカキ中のTCA濃度の平均値は、1996年の85ng/gが2001年は97ng/g、2004年は175ng/gと増加した。特に2001年から2004年の3年間に約80%の著しい増加が認められた。河川Bの試料のTCA濃度平均値は、2001年は40ng/g、2004年は59ng/gで約48%増加した。t検定の結果、全て有意 ( $p < 0.01$ ) であった。また、全ての試料においてTCEは検出されなかった。以上の成績から研究地域に生息しているカキにおいて、TCAの生物濃縮が生じている可能性が示唆された。著者は先の研究<sup>4)</sup>においてアサリと共に

**Table 1 The concentrations of TCA (ng/g) in oyster samples<sup>a)</sup> which were sampled at location A and B.**

| Sampling point   | A         | B        |
|------------------|-----------|----------|
| 1996 / Jul.-Aug. | 85 ± 5.2  | no data  |
| 2001 / Aug.      | 97 ± 3.3  | 40 ± 2.7 |
| 2004 / Jul.-Aug. | 175 ± 6.8 | 59 ± 1.9 |

a) Oyster samples were collected on five occasions from July to August 1996, July 2001 and from July to August 2004 at location A and B. Figures indicate the mean ± SD (n=5).

カキをTCA環境汚染のモニタリング指標生物とすることの有効性を推察したが、本研究でそれが認められた。

研究地域における貝類のTCA検出の原因を究明することは重要なことである。TCA含有の理由として次の二つが考えられよう。一つはTCA以外の化学物質が貝類の体内で生物体内代謝 (biometabolism) されてTCAが体内で生成される場合、いま一つはTCAによる水質汚染が発生した結果、貝類が直接的にあるいは食物連鎖の過程でTCAを取り込む場合 (bio-concentration) である。前者の例として、ヒトをはじめ多くの哺乳動物に関して生物体内代謝によりトリクロロエチレンやテトラクロロエチレンからTCAが生成されることが知られている<sup>5-8)</sup>。特に産業保健の分野ではこの機序を利用して、脱油脂洗浄剤であるトリクロロエチレンやテトラクロロエチレンの取扱い作業従事者に対して定期的に尿や血液中のTCAを測定する、いわゆる生物学的モニタリングが実施されている<sup>9)</sup>。後者のTCAによる水質汚染の汚染源としては、上水や排水の塩素処理時の消毒副生成物<sup>10)</sup>、組織切片作製時の脱石灰剤、蛋白質沈殿剤、除草剤、防腐剤等が考えられる。AおよびB地点の河川の流域には多数の工場が存在しており、工場の特定はできないものの消毒副生成物としてTCAを含有した排水の河川への流出は考えられる。特にA地点には工場と病院があり、これらからの排出も考えられなくはない。以上の二つの事柄が貝類のTCA検出の原因として考えられるが、いずれにしてもTCA濃度の経年増加現象は、貝類をTCA汚染のモニタリング生物 (bio-monitoring) として利用するのに有効である。本研究で認められたTCA増加の原因についての究明は次の研究課題としたい。

最近、ラットやマウス等の実験動物におい高濃度TCA投与による肝機能障害等の毒性が

報告されている<sup>11,12)</sup>。このような背景のもと、環境汚染から引き起こされるTCAの食品汚染についてはより一層注意を払う必要がある。本研究の調査地点のカキ中に検出されたTCA濃度は現在のところ低く、これらの貝類を食品として日常的に摂取する限り毒性学的観点から大きな問題は生じないと考える。しかし1996年調査でTCAと同時にテトラクロロエチレンの検出が認められたように<sup>3)</sup>、他の化学物質との複合汚染が生じている場合、現在の毒性データではその安全性を明確に評価することはできない。この点から、さらに詳細な毒性試験やヒトの摂取量調査等のデータの蓄積が求められる。今後は広範なフィールドにおけるTCA汚染モニタリングの継続と汚染源の究明を行う予定である。

## 結 論

1996年、2001年および2004年の7～8月の期間中に工業地域河口2地点に生息しているカキを採取して、TCAおよびTCEをGC法およびGC/MS法で分析した。TCEは全ての試料に検出されなかった。TCAについては1996年、2001年および2004年の試料中の濃度 (平均値) はそれぞれA地点で85ng/g、97ng/gおよび175ng/g、B地点でno data、40ng/gおよび59ng/gであった。TCAの経年的な生物濃縮が認められたことから、TCA水質汚染のモニタリング指標生物としてカキを利用することは有効であると考えた。

## 謝 辞

本研究において多大な協力を賜りました山口大学医学部・システム統御医学系・公衆衛生学芳原達也教授に深謝いたします。

なお、本研究の一部はInternational Chemical Congress of Pacific Basin Societies PACIFICHEM 2005 (Honolulu, HAWAII, Dec. 15-20, 2005) で発表した。

## 文 献

- 1) M.N. Moore. Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells to extracellular signals. *Histochem. J.*, 23, 495-500 (1991)
- 2) 最所和宏、長谷川泰行、佐伯正信、その他. 低沸点有機化合物のムラサキガイ及びヒメダカへの蓄積. 衛化、40(3)、274-278 (1994)
- 3) 後藤政幸. アサリ (*Tapes japonica*) のトリクロロ酢酸による汚染. 山口医学、45(5)、313-324 (1996)
- 4) 後藤政幸. 商工業地域に生息しているアサリ・カキのトリクロロ酢酸による汚染. 宇部

短期大学環境科学研究所報告、12、7-11 (1997)

- 5) Dekant W, Metzler M and Henschler D. Identification of S-1, 2-dichlorovinyl-n-acetyl-cysteine as a urinary metabolite of trichloroethylene: a possible explanation for its nephrocarcinogenicity in male rats. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 2455-2458 (1986)
- 6) Green T and Prout MS. Species differences in response to trichloroethylene: Biotransformation in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 79, 401-411 (1985)
- 7) Hobara T, Kawamoto T and Sakai T. Extrahepatic organs metabolism of inhaled trichloroethylene. *Toxicology*, 41, 289-303 (1986)
- 8) Kawamoto T, Hobara T, Kobayashi H et al.: The metabolism of trichloroethylene and its metabolites in the perfused liver. *J. Toxicol. Sci.*, 12, 87-96 (1987)
- 9) 緒方正名、武田和久 訳 EC委員会編. 工業化学物質のヒトにおける生物学的モニタリング、同文書院、東京、p. 46-60 (1987)
- 10) Minear R.A and Amy G.L. Disinfection by-products in water treatment. Lewis Publishers, Florida, p. 3-9 (1996)
- 11) Larson J.L and Bull R.J. Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 268-277 (1992)
- 12) 渡辺 聡、加藤慈子、河内佐十。トリクロロ酢酸及びトリクロロエチレンによるマウスの脂質過酸化反応と肝障害。衛化、40(5)、440-447 (1994)

後 藤 政 幸 (家政学部健康栄養学科教授)