

生体試料中ポリ塩化ビフェニル全異性体分析のための前処理法の検討

山口 勝透 久保 溪女* 姉崎 克典 永洞 真一郎 田中 俊逸*

要 約

生体試料中におけるポリ塩化ビフェニル (PCBs) 全異性体分析を高分離能ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計 (HRGC-HRMS) を用いて行うための前処理法について検討した。試料にはトド (*Eumetopias jubatus*) の肝臓を用い、試料からのPCBsの抽出は、凍結乾燥によって水分を除去した後、ジエチルエーテル/ヘキサン (1:2 (v/v)) 混液を用いた室温振とう抽出法によって粗脂肪を得る方法で行った。抽出された粗脂肪にクリーンアップスパイクを添加し、アルカリ (1 mol/L水酸化カリウム/メタノール) 分解-ヘキサン抽出によって粗抽出液とし、多層シリカゲルクロマトグラフ及び高速液体クロマトグラフ (HPLC) によって精製し、試験溶液を得た。クリーンアップスパイクの回収率は一塩素化PCBsと一試料の十塩素化PCBを除いて40~120%の範囲にあり、また、ロックマスの著しい変動も認められなかったことから、今回の前処理法が生体試料中におけるPCBs全異性体分析の前処理法として概ね有用であることが示された。本法によるPCBs全異性体分析の結果、今回分析に供したトド肝臓中の総PCBs濃度は2,700~3,400ng/g-fatであった。また、トド肝臓からは#153が最も高く300~400ng/g-fat検出され、総PCBs濃度の10.6~12.1%を占めていた。この他、#99、#118、#138、#177が100ng/g-fatを超えた濃度で検出され、これら5異性体だけで全体の33.8~35.5%を占め、特定の異性体がトド肝臓中に濃縮していることが確認された。

Key Words: PCBs、生体試料、PCBs全異性体分析、HRGC-HRMS、トド、肝臓

1. はじめに

環境中に放出されたポリ塩化ビフェニル (以下「PCBs」と略す。) は大気や水などの環境媒体を介して生物体内に取り込まれ、生態系の上位に位置する生物に、より高濃度に蓄積されていることが広く知られている¹⁻⁴⁾。海棲哺乳類中のPCBs濃度は高く、例えば、2005年2月に羅臼町相泊で流水に閉じこめられて集団死したシャチ (*Orcinus orca*) の皮下脂肪からは脂肪1gあたり最高で64 µg/gものPCBsが検出された⁵⁾。海棲哺乳類は、厚い皮下脂肪を有すること、代謝酵素の一部が欠落していること⁶⁾、また母乳を通して母親から子へと移行する⁷⁾ ことから、特にPCBs汚染が深刻な野生生物の一群である。これまでの生体試料中におけるPCBsの調査は、主にPCBs全濃度、或いは塩素数毎の同族体濃度、ダイオキシン類様PCBs (以下「DL-PCBs」と略す。) である12異性体の濃度を求めるもののほか、幾つかの主要な異性体のみを分析したものが多し。PCBs全209異性体の個別濃度を調査している例は幾つかあるものの^{8), 9)}、これらは主に魚介類を中心とした

もので、哺乳類を対象としたものは極めて少ないのが現状である。その理由として、陸生及び海棲哺乳類の多くは、国際自然保護連合 (IUCN) 等で保護の対象となっており、試料として入手することが困難であること、また、生体試料のPCBs分析には複数のクリーンアップ操作を組み合わせる必要がある^{10), 11)}、試料の前処理に多大な労力と時間を要すること、などが挙げられる。しかしながら、生体試料におけるPCBs全異性体組成を明らかにすることは、同族体毎の濃度分布だけからは読み取れなかった生体内や生態系におけるPCBsの挙動、そしてその影響等について、より多くの知見が得られると期待されることから重要であると筆者らは考えている。特に北海道及びその周辺海域には数多くの野生生物が生息しており、生体試料中のPCBs全異性体各々の濃度を分析し、その詳細な汚染実態を解明することは、自然環境保全の観点からも重要と考えられる。当センターでは大気試料等を対象としたPCBs全異性体分析法が確立されている^{12), 13)} ことから、本研究ではこれらの手法を生体試料にも適用すべく、生体試料中におけるPCBs全異性体分析のため、試料前処理法の検討を行うとともに、PCBs全異性体分析をトド肝臓試料を用いて試み、その結果、同試料中のPCBs異性体に関する多少の知見が

*北海道大学大学院 環境科学院

得られたので報告する。

2. 方法

2.1 試薬等

DL-PCBs及び他のPCBsの標準溶液はCambridge Isotope Laboratories, Inc. 製及びWellington Laboratories, Inc. 製のものを使用した。

アセトン、ヘキサン、トルエン、ノナン、ジエチルエーテル、メタノールは和光純薬工業株式会社製のダイオキシン類分析用を、水酸化カリウムは関東化学株式会社製の精密分析用を使用した。塩化ナトリウムは関東化学株式会社製の残留農薬試験・PCB試験用を600℃で6時間加熱処理したものを、無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業株式会社製のPCB・フタル酸エステル試験用を用いた。純水は、ADVANTEC社製GS-590及びPWU-200で精製したものをを使用した。

2.2 装置

凍結乾燥器は東京理化工業株式会社製FDU-1200型を、振とう機はタイテック株式会社製SW-2wを使用した。高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」と略す。）は株式会社島津製作所製LC-10ATvpを使用し、カラムはThermo Electron Co. 製Hypercarb（長さ100mm×内径4.6mm、粒子サイズ7μm）を使用した。高分離ガスクロマトグラフ－高分解能質量分析計（以下「HRGC-HRMS」と略す。）はAgilent Technologies, Inc. 製6890シリーズ及び日本電子株式会社製JMS-700Dをそれぞれ使用し、キャピラリーカラムにはSGE Analytical Science Pty. Ltd. 製HT8-PCB（長さ60m×内径0.25mm）を使用した。

2.3 測定試料

分析には、2008年1月下旬に北海道積丹半島周辺海域で定置網（底建網）中に混獲されたトド (*Eumetopias jubatus*) 雄2頭の肝臓試料を用いた。個体の詳細を表1に示す。共に体重は420kg、全長は310cm程度であり、ほぼ同サイズの個体である。試料は、採取後-30℃で冷凍し、抽出操作を行

うまで冷凍庫内で保存した。

2.4 操作

2.4.1 粗脂肪抽出と脂肪含量測定

冷凍保存しておいたトドの肝臓を常温に戻した後、200g程度をステンレス製包丁により細かく切り分け、ホモジナイザーを用いて微粉碎・均質化を行った。試料約5gを秤量し、凍結乾燥器を用いて約16時間凍結乾燥した。これにジエチルエーテル／ヘキサン（1：2（v/v））混液100mLを加え、室温で10分間、300r/min程度で振とう機を用いて振とう抽出した。同混液による振とう抽出操作を合計3回行った。3回目の振とう抽出終了後は残さも含めてテフロン製メンブレンフィルター（孔径：0.5μm）で吸引ろ過を行い、残さはヘキサンで十分に洗浄を行った。ろ液は1、2回目の上澄み液と合わせ、エバポレーターで約200mLまで減圧濃縮し、これに2wt%塩化ナトリウム水溶液100mLを加え、穏やかに水洗した。この操作を合計2回繰り返して、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、エバポレーターで有機溶媒を留去した。これを30℃の乾燥器内で乾燥し、恒量となった抽出物（粗脂肪）の重量を秤量した。抽出に用いた元の試料の重量（湿重量）と抽出物（粗脂肪）の重量から脂肪含量（%）を求めた。

2.4.2 クリーンアップ

2.4.1で得られた抽出物（粗脂肪）にヘキサンを少量加え、約30℃の湯浴で温めながら粗脂肪を十分にヘキサンに溶解させた。この試料液の40%を分取してクリーンアップスパイクを添加し、1mol/Lの水酸化カリウム／メタノール溶液50mLを加え、室温で約16時間スターラーを用いて緩やかに攪拌し、アルカリ分解を行った。この分解液に2%塩化ナトリウム水溶液100mLとヘキサン30mLを加え、10分間振とう抽出した。ヘキサンによる液-液抽出を合計3回繰り返して、ヘキサン層を合わせ、2wt%塩化ナトリウム水溶液100mLによる水洗を2回行った。この水洗操作は、ヘキサン層の状態により適宜増やした。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、「モニタリング調査マニュアル」¹⁰⁾及び「野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査

表1 測定試料

試料名： トド (<i>Eumetopias jubatus</i>)							
個体番号	雌雄	捕獲日	海 域	体重(kg)	体長(cm)	全長(cm)	捕獲方法
101	雄	2008.1.19	積丹半島 周辺	420	260	310	底建網
102	雄	2008.1.29	積丹半島 周辺	420	265	310	底建網

マニュアル」¹¹⁾の方法に準拠して多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作を行った。次にHPLCによってPCBsとポリ塩化ジベンゾパラジオキシン及びポリ塩化ジベンゾフランとを分画した。得られたPCBs画分をエバポレーター及び窒素気流によって穏やかに濃縮を行い、シリンジスパイクを添加して約50 μ Lの試験溶液とした。

HPLC及びHRGC-HRMSの装置条件は既報¹²⁾の方法に従い、PCBs異性体の同定には松村ら¹⁴⁾の報告を参考にした。

3. 結果と考察

3.1 脂肪抽出法の検討結果と脂肪含量測定結果

「野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査マニュアル」¹¹⁾では、脂肪含量測定の際の脂肪抽出法とダイオキシン類分析のための抽出法とが異なる方法で示されており、脂肪含量測定には分析用とは別に抽出操作を行わなくてはならない。そこで、分析用脂肪抽出法であるジエチルエーテル/ヘキサン (1:2 (v/v)) 混液による室温振とう抽出法 (以下「振とう抽出法」と略す。) を用いて脂肪含量測定が可能かを検討するため、振とう抽出法による値と、脂肪含量測定用に示されているジエチルエーテル/ヘキサン (3:1 (v/v)) によるソックスレー抽出法 (以下「ソックスレー抽出法」と略す。) による値との比較を行った。その結果を表2に示す。今回用いたトド肝臓試料では、振とう抽出法はソックスレー抽出法に比べて低めの結果が得られ、平均でソックスレー抽出法の約75%程度であった。生体試料中のPCBs等の分析を行う場合、これらが脂肪中に濃縮し易いことから、脂肪含量は重要な情報のひとつである。今回用いた振とう抽出法はソックスレー抽出法に比べて脂肪含量が低めに見積もられるため、他の文献等と比較を行う場合には注意を要する。また、今回用いたトド肝臓試料の脂肪含量は3~4%程度であり、皮下脂肪部などのより脂肪含量の高い試料でも同様な傾向が見られるのか検討を行う必要があると考えられた。

3.2 PCBs全異性体分析

3.2.1 クリーンアップスパイク回収率と夾雑物の除去

表3にクリーンアップスパイクの回収率を示す。一塩素化体 (¹³C-MoCBs) と十塩素化体 (¹³C-DeCB) の一部を除き殆どの同族体で「野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査マニュアル」¹¹⁾で許容されるダイオキシン類の回収率40~120%の範囲に収まり、良好な結果が得られた。¹³C-MoCBsはいずれの試料でも回収率が非常に悪く、その原因として濃縮過程での気化や多層シリカゲルカラムにおける吸着¹⁵⁾が考えられ、その詳細な原因と¹³C-MoCBsの回収率を改善する方法については今後の検討課題である。また、試料101-2で¹³C-DeCBの回収率が29%と低かったが、

表2 脂肪抽出法比較結果

試料名	トド102♂ 肝臓試料					
	ジエチルエーテル/ ヘキサン(1:2(v/v)) 振とう抽出法			ジエチルエーテル/ ヘキサン(3:1(v/v)) ソックスレー抽出法		
試料番号	A	B	C	D	E	F
湿重量 (g)	5.4	5.2	5.4	5.7	5.8	5.3
乾燥重量 (g)	0.17	0.13	0.19	0.22	0.25	0.21
脂肪含量 (%)	3.2	2.5	3.6	3.9	4.3	4.0
脂肪含量 平均 (%)	3.1			4.1		

試料101-1は65%であり、¹³C-DeCBの回収率が低かった原因及び回収率に差が見られた原因についても今後検討を行う必要がある。

一方、いずれの試料でもロックマスの大きな落ち込みは殆ど認められず、クロマトグラムのベースラインも底辺付近で安定していたことから、夾雑物の除去は効果的に行えたものと考えられた。脂肪含量が3~4%程度の肝臓試料では、今回用いた前処理法が有効であると考えられるが、皮下脂肪部など脂肪含量が特に高い試料を分析対象とする場合への適用性について、更に検討を行う必要があると考えられる。

3.2.2 総PCBs濃度及び各同族体濃度

トド101♂肝臓 (101-1, 101-2) 及びトド102♂肝臓 (102-1, 102-2) における各同族体及びPCBs合計濃度を表4に示す。総PCBs濃度はトド101♂で平均3,200ng/g-fat、トド102♂で平均3,100ng/g-fatであった。この結果は、Leeら¹⁶⁾がアラスカ及びベーリング海のトドについて調査した肝臓中総PCBs濃度 (アラスカのトド♂: 3.2~25 μ g/g、アラスカのトド♀: 0.45~13 μ g/g、ベーリング海のトド♂: 3.2~8.5 μ g/g (いずれも脂肪1gあたりの濃度)) に比べて低いかまたは同程度の傾向にあった。

同族体毎では6塩素化体 (HxCBs) が最も多く、トド101♂及びトド102♂でそれぞれ全体の37%、38%を占めていた。次いで5塩素化体 (PeCBs)、7塩素化体 (HpCBs)、4塩素化体 (TeCBs)、8塩素化体 (OcCBs) の順に濃度が高かった。

表3 クリーンアップスパイク回収率

試料名 試料番号	トド101♂ 肝臓				トド102♂ 肝臓		
	101-1	101-2	平均		102-1	102-2	平均
IUPAC Compound number	回収率(%)	回収率(%)	平均		回収率(%)	回収率(%)	平均
DL-PCBs							
¹³ C-TeCB #81	72	99	86		86	88	87
¹³ C-TeCB #77	74	95	85		84	87	85
¹³ C-PeCB #105	72	99	86		95	90	92
¹³ C-PeCB #114	76	100	88		92	89	91
¹³ C-PeCB #118	71	96	84		93	87	90
¹³ C-PeCB #123	72	98	85		92	88	90
¹³ C-PeCB #126	67	89	78		84	81	82
¹³ C-HxCB #156	77	97	87		90	95	92
¹³ C-HxCB #157	76	94	85		95	98	97
¹³ C-HxCB #167	74	100	87		98	100	99
¹³ C-HxCB #169	63	80	72		75	85	80
¹³ C-HpCB #189	79	94	86		98	85	91
other PCBs							
¹³ C-MoCB #3	0.60	1.1	0.85		1.6	0.60	1.1
¹³ C-DiCB #15	65	78	71		75	77	76
¹³ C-TrCB #28	74	75	74		81	78	80
¹³ C-TeCB #60	110	110	110		110	110	110
¹³ C-PeCB #101	100	110	110		98	98	98
¹³ C-HxCB #141	110	110	110		86	89	88
¹³ C-HpCB #178	110	120	110		100	100	100
¹³ C-OcCB #194	71	83	77		65	61	63
¹³ C-NoCB #208	66	76	71		61	61	61
¹³ C-DeCB #209	65	29	47		56	54	55

表4 トド肝臓試料における各同族体濃度と全PCBs濃度 (ng/g-fat)

試料名 試料番号	トド101♂ 肝臓				トド102♂ 肝臓			
	101-1	101-2	平均	%	102-1	102-2	平均	%
MoCBs	—	—	—	—	—	—	—	—
DiCBs	0.52	0.62	0.57	0.018	7.0	10	8.5	0.28
TrCBs	26	27	27	0.84	47	67	57	1.9
TeCBs	270	250	260	8.3	230	300	270	8.7
PeCBs	1,000	930	970	31	880	1100	990	32
HxCBs	1,200	1,100	1,200	37	1,000	1,300	1,200	38
HpCBs	620	550	590	19	450	570	510	17
OcCBs	78	73	76	2.4	61	76	69	2.2
NoCBs	11	11	11	0.35	12	15	14	0.44
DeCB	3.6	3.5	3.6	0.11	6.8	7.7	7.3	0.24
total PCBs	3,300	3,000	3,200		2,700	3,400	3,100	

3.2.3 PCBs各異性体濃度

トド101♂肝臓 (101-1,101-2) 及びトド102♂肝臓 (102-1, 102-2) 試料中におけるPCBs全異性体濃度の測定結果を表5-1及び表5-2にそれぞれ示す。異性体毎に見てみると#153 (2,2',4,4',5,5' - HxCB) が共に最も濃度が高く、平

均でそれぞれ380ng/g-fat、330ng/g-fatも含まれ、ひとつの異性体だけで総PCBs濃度の約11.9%及び約10.8%を占めていた。そして#99 (2,2',4,4',5-PeCB)、#118 (2,3', 4,4', 5- PeCB)、#138 (2,2',3,4,4',5'-HxCB)、#177 (2,2',3,3', 4,5',6'-HpCB) が単独の異性体で100ng/g-fatを超えた濃

表5-1 トド (101♂) 肝臓試料のPCBs全異性体濃度 (ng/g-fat)

congener	101-1	101-2	平均	congener	101-1	101-2	平均	congener	101-1	101-2	平均
MoCB				#70	1.1	0.9	1.0	#144	8.6	7.6	8.1
#1	—	—		#71	5.1	5.5	5.3	#145	N.D.	N.D.	
#2	—	—		#72	0.2	0.2	0.2	#146	20	18	19
#3	—	—		#73	0.4	0.3	0.3	#147	1.0	0.9	0.9
DiCB				#74	28	26	27	#148	N.D.	N.D.	
#4	N.D.	N.D.		#76	N.D.	N.D.		#150	0.5	0.5	0.5
#5,#8†	N.D.	N.D.		#77	0.3	0.2	0.2	#151	60	55	58
#6	N.D.	N.D.		#78	1.8	1.8	1.8	#152	N.D.	N.D.	
#7	N.D.	N.D.		#79	N.D.	0.2		#153	400	350	380
#9	0.24	0.26	0.25	#80	N.D.	N.D.		#154	7.2	6.5	6.9
#10	N.D.	N.D.		#81	0.9	0.6	0.7	#155	6.5	5.2	5.9
#11	0.29	0.37	0.33	PeCB				#156	6.4	5.0	5.7
#12,#13†	N.D.	N.D.		#82	2.1	1.7	1.9	#157	5.0	3.7	4.4
#14	N.D.	N.D.		#83	2.0	1.8	1.9	#158	26	25	26
#15	N.D.	N.D.		#84	7.6	6.8	7.2	#159	0.3	0.2	0.2
TrCB				#85	86	78	82	#160	0.7	0.2	0.4
#16	0.55	0.51	0.53	#86	1.4	0.6	1.0	#161	2.4	N.D.	
#17	0.08	0.14	0.11	#87,#115†	57	51	54	#162	N.D.	N.D.	
#18	2.8	3.1	3.0	#88	0.12	0.08	0.10	#163,#164†	63	59	61
#19	N.D.	N.D.		#89	0.69	0.61	0.65	#165	0.4	0.4	0.4
#20,#33†	0.47	0.45	0.46	#90	1.6	0.90	1.3	#166	0.6	0.6	0.6
#21	N.D.	N.D.		#91	6.3	6.3	6.3	#167	3.6	2.6	3.1
#22	0.19	N.D.		#92	37	33	35	#168	0.5	0.6	0.5
#23	N.D.	N.D.		#93,#95,#98†	120	110	115	#169	0.4	0.4	0.4
#24	0.07	0.09	0.08	#94	0.33	0.33	0.33	HpCB			
#25	N.D.	N.D.		#96	0.18	0.11	0.15	#170	46	41	44
#26	0.41	0.31	0.36	#97,#117†	8.3	8.0	8.2	#171	15	13	14
#27	0.42	0.41	0.42	#99	190	170	180	#172	8.1	7.8	8.0
#28	15	16	16	#100	1.5	1.2	1.4	#173	0.3	N.D.	
#29	N.D.	N.D.		#101	80	71	76	#174	47	43	45
#30	N.D.	N.D.		#102	0.94	1.2	1.1	#175	3.0	2.8	2.9
#31	0.69	0.66	0.68	#103	1.5	1.3	1.4	#176	7.8	7.0	7.4
#32	0.10	0.14	0.12	#104	N.D.	N.D.		#177	140	120	130
#34	N.D.	N.D.		#105	110	82	96	#178	29	25	27
#35	N.D.	N.D.		#106	N.D.	N.D.		#179	49	45	47
#36	4.6	4.9	4.8	#107,#109†	3.3	2.7	3.0	#180	110	96	103
#37	N.D.	0.09		#108	N.D.	N.D.		#181	0.7	0.8	0.7
#38	0.10	0.09	0.10	#110	75	62	69	#182,#187†	87	78	83
#39	0.08	N.D.		#111	0.37	0.35	0.36	#183	53	45	49
TeCB				#112,#119†	15	13	14	#184	7.2	6.0	6.6
#40	0.9	0.8	0.9	#113	0.56	0.52	0.54	#185	4.8	4.4	4.6
#41	1.5	1.5	1.5	#114	5.2	3.7	4.5	#186	N.D.	N.D.	
#42	0.8	0.8	0.8	#116,#125†	0.75	0.72	0.74	#188	1.1	0.8	1.0
#43	N.D.	0.3		#118	170	140	150	#189	0.2	N.D.	
#44	21	20	21	#120	N.D.	N.D.		#190	3.3	3.4	3.4
#45	0.7	0.6	0.6	#121	1.0	0.94	0.97	#191	1.7	1.6	1.7
#46	0.2	0.2	0.2	#122	N.D.	N.D.		#192	N.D.	N.D.	
#47,#48†	30	28	29	#123	3.2	2.4	2.8	#193	9.4	8.4	8.9
#49	11	10	11	#124	N.D.	N.D.		OcCB			
#50	N.D.	N.D.		#126	0.83	0.63	0.73	#194	4.8	4.8	4.8
#51	N.D.	N.D.		#127	N.D.	N.D.		#195	2.0	1.9	2.0
#52,#69†	94	90	92	HxCB				#196	4.8	3.9	4.4
#53	1.1	1.0	1.1	#128	61	65	63	#197	1.8	1.6	1.7
#54	N.D.	N.D.		#129	0.8	0.8	0.8	#198	N.D.	N.D.	
#55	1.4	1.4	1.4	#130	11	10	10	#199	37	34	36
#56	10	8.2	9.1	#131	0.4	1.4	0.9	#200	1.8	1.6	1.7
#57	N.D.	N.D.		#132	90	87	89	#201	5.8	5.6	5.7
#58	0.1	N.D.		#133	5.9	4.5	5.2	#202	12	11	12
#59	1.4	1.2	1.3	#134	3.9	3.4	3.7	#203	7.1	7.3	7.2
#60	1.7	1.6	1.7	#135	21	18	20	#204	N.D.	N.D.	
#61	N.D.	N.D.		#136	18	17	18	#205	0.4	0.4	0.4
#62	N.D.	N.D.		#137	18	17	18	NoCB			
#63	0.2	0.3	0.3	#138	270	260	260	#206	2.2	2.1	2.2
#64	4.7	4.4	4.6	#139,#149†	110	94	102	#207	2.4	2.2	2.3
#65,#75†	1.6	1.5	1.6	#140	1.7	1.4	1.6	#208	6.7	6.4	6.6
#66	46	43	45	#141	8.9	8.6	8.8	DeCB			
#67	N.D.	N.D.		#142	0.1	N.D.		#209	3.6	3.5	3.6
#68	0.2	0.2	0.2	#143	0.3	0.3	0.3				

1. #番号はPCBのIUPAC numberを示す。3. †を付した異性体はそれぞれ分離不能のため合算値を示す。
 2. 網掛けの異性体はDL-PCBを示す。 4. N.D.は濃度が試料における検出下限未満の濃度であることを示す。

表5-2 トド(102♂)肝臓試料のPCBs全異性体濃度 (ng/g-fat)

congener	102-1	102-2	平均	congener	102-1	102-2	平均	congener	102-1	102-2	平均
MoCB				#70	3.4	4.6	4.0	#144	6.4	7.2	6.8
#1	—	—		#71	5.6	7.6	6.6	#145	N.D.	N.D.	
#2	—	—		#72	0.2	0.3	0.3	#146	25	29	27
#3	—	—		#73	0.5	0.5	0.5	#147	1.2	1.9	1.6
DiCB				#74	22	30	26	#148	11	13	12
#4	N.D.	0.15		#76	N.D.	N.D.		#150	0.6	0.7	0.7
#5,#8†	2.4	3.4	2.9	#77	0.3	0.5	0.4	#151	39	46	43
#6	0.25	0.39	0.3	#78	2.3	2.6	2.5	#152	N.D.	0.1	
#7	N.D.	N.D.		#79	N.D.	N.D.		#153	300	360	330
#9	N.D.	N.D.		#80	N.D.	N.D.		#154	5.9	7.0	6.5
#10	N.D.	N.D.		#81	0.9	1.2	1.0	#155	7.3	8.7	8.0
#11	1.9	2.8	2.4	PeCB				#156	3.6	4.5	4.1
#12,#13†	0.13	N.D.		#82	2.6	3.0	2.8	#157	2.1	2.8	2.5
#14	N.D.	N.D.		#83	2.2	2.5	2.4	#158	21	26	24
#15	2.4	3.1	2.8	#84	8.5	11	9.8	#159	0.1	N.D.	
TrCB				#85	70	86	78	#160	N.D.	2.4	
#16	1.3	1.8	1.6	#86	0.87	1.0	0.9	#161	N.D.	4.8	
#17	1.2	1.7	1.5	#87,#115†	64	78	71	#162	N.D.	N.D.	
#18	4.3	6.0	5.2	#88	0.11	N.D.		#163,#164†	69	81	75
#19	0.10	0.16	0.13	#89	0.62	0.7	0.68	#165	0.3	0.4	0.4
#20,#33†	5.8	8.8	7.3	#90	1.8	2.1	2.0	#166	0.8	0.3	0.5
#21	N.D.	N.D.		#91	9.5	8.0	8.8	#167	2.0	2.4	2.2
#22	3.0	4.3	3.7	#92	33	40	37	#168	1.6	N.D.	
#23	N.D.	N.D.		#93,#95,#98†	61	75	68	#169	0.3	0.3	0.3
#24	0.10	0.12	0.11	#94	0.41	0.5	0.45	HpCB			
#25	0.60	0.93	0.77	#96	0.14	0.2	0.16	#170	26	31	29
#26	1.2	1.9	1.6	#97,#117†	11	13	12	#171	9	11	10
#27	0.50	0.72	0.61	#99	160	190	170	#172	6.4	8.6	7.5
#28	16	22	19	#100	1.4	1.8	1.6	#173	N.D.	N.D.	
#29	0.07	N.D.		#101	86	110	98	#174	33	41	37
#30	N.D.	N.D.		#102	0.95	1.3	1.1	#175	2.2	2.5	2.4
#31	7.4	11	9.2	#103	1.4	1.7	1.6	#176	4.5	5.5	5.0
#32	1.2	1.8	1.5	#104	N.D.	N.D.		#177	140	170	150
#34	N.D.	N.D.		#105	68	85	77	#178	17	22	20
#35	0.13	0.09	0.11	#106	N.D.	N.D.		#179	25	30	28
#36	3.1	3.7	3.4	#107,#109†	3.2	4.1	3.7	#180	70	86	78
#37	N.D.	2.3		#108	N.D.	N.D.		#181	0.4	0.8	0.6
#38	N.D.	0.41		#110	87	110	99	#182,#187†	76	97	87
#39	0.63	N.D.		#111	N.D.	0.6		#183	29	35	32
TeCB				#112,#119†	15	18	17	#184	5.9	7.4	6.7
#40	1.0	1.2	1.1	#113	0.66	0.7	0.69	#185	2.7	3.3	3.0
#41	2.3	3.2	2.8	#114	3.0	3.9	3.5	#186	N.D.	N.D.	
#42	1.7	2.1	1.9	#116,#125†	0.79	0.8	0.80	#188	0.6	0.8	0.7
#43	1.9	0.4	1.2	#118	150	180	170	#189	0.1	0.2	0.2
#44	19	25	22	#120	N.D.	0.1		#190	2.5	3.0	2.8
#45	0.8	1.1	1.0	#121	1.4	1.7	1.6	#191	1.1	1.6	1.4
#46	0.3	0.3	0.3	#122	N.D.	N.D.		#192	N.D.	N.D.	
#47,#48†	29	38	34	#123	2.1	2.9	2.5	#193	5.1	9.3	7.2
#49	12	18	15	#124	0.07	0.1		OcCB			
#50	N.D.	N.D.		#126	1.1	1.4	1.3	#194	5.2	6.2	5.7
#51	0.1	0.2	0.2	#127	N.D.	N.D.		#195	1.9	2.0	2.0
#52,#69†	70	88	79	HxCB				#196	3.6	4.0	3.8
#53	1.0	1.2	1.1	#128	55	66	61	#197	1.1	1.4	1.3
#54	N.D.	N.D.		#129	0.9	1.4	1.2	#198	N.D.	N.D.	
#55	1.2	1.6	1.4	#130	16	20	18	#199	30	38	34
#56	0.7	0.7	0.7	#131	0.5	0.4	0.5	#200	1.4	1.6	1.5
#57	N.D.	N.D.		#132	120	140	130	#201	3.9	4.6	4.3
#58	N.D.	N.D.		#133	5.0	6.0	5.5	#202	9	11	10
#59	1.3	1.7	1.5	#134	4.2	5.0	4.6	#203	5.3	6.7	6.0
#60	7.3	9.6	8.5	#135	19	22	21	#204	N.D.	N.D.	
#61	N.D.	N.D.		#136	12	14	13	#205	0.4	0.6	0.5
#62	N.D.	N.D.		#137	13	16	15	NoCB			
#63	0.4	0.5	0.5	#138	200	250	220	#206	2.8	3.3	3.1
#64	4.8	6.5	5.7	#139,#149†	100	120	110	#207	2.5	3.0	2.8
#65,#75†	1.5	1.8	1.7	#140	1.4	1.8	1.6	#208	7.1	8.7	7.9
#66	39	51	45	#141	10	12	11	DeCB			
#67	N.D.	0.1		#142	0.1	0.1	0.1	#209	6.8	7.7	7.3
#68	0.2	0.3	0.2	#143	0.4	0.4	0.4				

1. #番号はPCBのIUPAC numberを示す。3. †を付した異性体はそれぞれ分離不能のため合算値を示す。
 2. 網掛けの異性体はDL-PCBを示す。4. N.D.は濃度が試料における検出下限未満の濃度であることを示す。

度で検出された。これら5異性体だけで全体の34.9%及び34.4%を占めていた。また、共に50ng/g-fat以上検出された異性体は、これら5異性体以外では、#52 (2,2',5,5'-TeCB) + #69 (2,3',4,6'-TeCB)、#85 (2,2',3,4,4'-PeCB)、#87 (2,2',3,4,5'-PeCB) + #115 (2,3,4,4',6'-PeCB)、#93 (2,2',3,5,6'-PeCB) + #95 (2,2',3,5',6'-PeCB) + #98 (2,2',3,4',6'-PeCB)、#101 (2,2',4,5,5'-PeCB)、#105 (2,3,3',4,4'-PeCB)、#110 (2,3,3',4',6'-PeCB)、#132 (2,2',3,3',4,6'-HxCB)、#163 (2,3,3',4',5,6'-HxCB) + #164 (2,3,3',4',5',6'-HxCB)、#180 (2,2',3,4,4',5,5'-HpCB)、#182 (2,2',3,4,4',5,6'-HpCB) + #187 (2,2',3,4',5,5',6'-HpCB) の17異性体であり、これらの主要な22異性体だけで全濃度の約64%、約65%をそれぞれ占めていた。特に、ダイオキシン類と同様の強い毒性を持つDL-PCBsである#105及び#118が高濃度で検出されたことは、トドへの免疫機能や生殖機能への影響が懸念される。この様なトド肝臓における異性体の濃縮傾向は、PCBs製品のうち、#110、#101、#118、#138、#95の含有率が高いKC-500及び#153、#180、#149、#138、#187の含有率が高いKC-600¹³⁾の影響を受けているように見える。しかしながら、KC-500、KC-600でも#153の含有割合はそれぞれ5.5%、9.8%¹³⁾に過ぎないことから、これらPCBs製品の影響がそのまま反映されているのではなく、生物体内における代謝等によってある特定の異性体が体内に濃縮していることが示唆された。こうした一部の異性体が生体内に特異的に濃縮することは、田辺ら¹⁷⁾がアザラシの調査を行った結果からも指摘しており、今回分析を行ったトドにおいても同様な傾向が認められた。この様に、各同族体濃度のみでは読み取ることができなかった情報が、PCBs全異性体分析を行うことで得ることが可能であった。

4. まとめ

トドの肝臓試料を用いて、生体試料中のPCBs全異性体分析のための前処理法について検討を行った。この結果、今回適用した前処理法（脂肪抽出－室温アルカリ分解／ヘキサン抽出－多層シリカゲルカラムクロマトグラフ－HPLC分画）が生体試料中のPCBs全異性体分析の方法として概ね有用な前処理法であると考えられた。また、本前処理法を用いたトド肝臓試料中のPCBs全異性体分析の結果、#99、#118、#138、#153及び#177の5異性体だけで全PCBsの約35%を占めていることが明らかとなり、ある特定の異性体がトドの肝臓中に濃縮していることが確認された。この様に、PCBs全異性体分析を行うことで、PCBs同族体の濃度またはPCBs合計濃度だけでは読み取ることができなかった生体内におけるPCBs異性体個々の濃縮傾向を知ることが可能となり、PCBs各異性体の分布や代謝などによる挙動、そして生態系におけるPCBsの動態に

関する多くの情報をもたらしてくれるものと期待される。生体中におけるPCBsの汚染状況やその分布、組成の特徴を明らかにすることは、生態系保全という観点からも重要であり、今後、データの蓄積が必要であると考えられる。

5. 謝 辞

トドの試料を提供していただいた独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所 服部薫氏及び北海道立釧路水産試験場 三橋正基氏に心より感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 山県昇編著「生物濃縮」, 産業図書, 1978
- 2) S. Tanabe, J. K. Sung, D. Y. Choi, N. Baba, M. Kiyota, K. Yoshida, R. Tatsukawa: Persistent Organochlorine Residues in Northern Fur Seal from the Pacific Coast of Japan Since 1971, *Environmental Pollution*, Vol.85, pp.305-314, 1994
- 3) WWFジャパン・プロジェクト報告書「南西諸島における野生生物の有害化学物質調査」, 2008
- 4) S. Corsolini, G. Sara, N. Borghesi, S. Focardi: HCB, p,p'-DDE and PCB Ontogenetic Transfer and Magnification in Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea, *Environmental Science & Technology*, 41, pp.4227-4233, 2007
- 5) N. Kajiwara, T. Kunisue, S. Kamiyama, Y. Ochi, S. Yano, S. Tanabe: Organohalogen and Organotin Compounds in Killer Whales Mass-Stranded in the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan, *Marine Pollution Bulletin*, Vol.52, pp.1066-1076, 2006
- 6) S. Tanabe, S. Watanabe, H. Kan, R. Tatsukawa: Capacity and Mode of PCB Metabolism in Small Cetaceans, *Marine Mammal Science*, 4, pp.103-124, 1986
- 7) 宮崎信之: バイカル湖の生物多様性と環境－バイカルアザラシから地球規模の水汚染を考える－, *地球環境*, Vol.6, No.1, pp.79-86, 2001
- 8) 武志保, 剣持堅志, 難波順子, 門田実: PCB全異性体分析法を用いた魚介類の実態調査, *岡山県環境保健センター年報*, 26, pp.65-72, 2002
- 9) 剣持堅志, 武志保, 難波順子, 吉岡敏行, 西島倫子, 今中雅章: 食品中の有害科学物質等に関する研究－ポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) 全異性体及びポリ塩化ナフタレン類 (PCNs) の同時分析法確立のための基礎的検討－, *岡山県環境保健センター年報*, 26,

- pp.72-81, 2002
- 10) 環境省環境保健部環境安全課「モニタリング調査マニュアル」, 2004
 - 11) 環境省環境保健部環境安全課環境リスク評価室「野生生物のダイオキシン類蓄積状況等調査マニュアル」, 2002
 - 12) 姉崎克典, 山口勝透, 大塚英幸, 岩田理樹: ポリ塩化ビフェニル全コンジェナー分析への迅速抽出法の検討, 北海道環境科学研究センター所報, 31, pp.34-48, 2004
 - 13) 姉崎克典, 山口勝透, 岩田理樹: HT8-PCBキャピラリーカラムを用いたカネクロール中のPCB異性体組成の検討, 北海道環境科学研究センター所報, 34, pp.46-53, 2008
 - 14) 松村千里, 鶴川正寛, 中野武, 江崎達哉, 大橋眞: キャピラリーカラム (HT8-PCB) によるPCB全209異性体の溶出順位, 環境化学, Vol.12, No.4, pp.855-865, 2002
 - 15) 鈴木滋, 菱沼早樹子, 中村朋之, 岩澤理奈, 斎藤善則: 環境中全PCB分析の検討 (2), 宮城県保健環境センター年報, 25, pp.142-144, 2007
 - 16) J. S. Lee, S. Tanabe, H. Umino, R. Tatsukawa, T. R. Loughlin, D. C. Calkins: Persistent Organochlorines in Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*) from the Bulk of Alaska and the Bering Sea, 1976-1981, Marine Pollution Bulletin, Vol.32, No.7, pp.535-544, 1996
 - 17) 田辺信介, 中田晴彦: GC/MSによる生体試料の分析 - アザラシ脂肪中のPCB分析 -, ぶんせき, 9, pp.638-646, 1998

Study of Preparation Method for all PCB Congeners Analysis of Organic Samples

Katsuyuki YAMAGUCHI,
Keiko KUBO*,
Katsunori ANEZAKI,
Shinichiro NAGAHORA,
Shunitz TANAKA*

(* Graduate School of Environmental Science,
Hokkaido University)

Abstract

The sample preparation method for analysis of all PCB congeners in tissues and organs of living things was studied. In this study, liver tissues of male Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*) collected

from offshore of Shakotan peninsula of Hokkaido, Japan, were examined. The homogenized liver tissues were dehydrated by freeze-drying system, and the lipid was extracted by shaking with a mixture of diethyl ether and hexane (1:2 (v/v)) solution at room temperature. After the addition of clean-up spike, the lipid was decomposed by moderate mixing of 1 mol/l KOH/methanol solution under room temperature for about 16 hours, followed by liquid-liquid extraction using hexane solution. The experimental solutions were obtained by multi-layer silica gel column cleanup and HPLC fractionation. The determination of all PCB congeners was performed by HRGC-HRMS with HT8-PCB capillary column (60m×0.25mm (i.d.)), SGE Analytical Science Pty. Ltd.). The recovery rates of clean-up spikes were within 40 - 120 %, without MoCBs and DeCB of some samples, and the variation of lock-mass intensity was very stable. It was indicated that the sample preparing method in this study is expected to be useful to determine several all PCB congeners in tissues and organs of living things.

The total PCBs concentration in liver tissues of Steller Sea Lions ranged from 2,700 to 3,400 ng/g-fat. As a result of all PCB congeners analysis, the dominant congener in liver tissues of Steller Sea Lions was #153, ranged from 300 to 400 ng/g-fat, occupied from 10.6 to 12.1 % of total PCBs concentration. In addition, the congeners of #99, #118, #138 and #177 were detected over 100 ng/g-fat, and these only five congeners accounted for from 33.8 to 37.6 % of total PCBs concentration. Accumulation of the specific PCB congeners was observed in liver tissues of Steller Sea Lions.