

生物学的手法を用いた環境モニタリング手法についての研究 (V)

—メダカ胚発生段階におけるダイオキシン類の生物毒性影響について—

半野勝正 尾田正二* 三谷啓志* 杉山 寛

(* 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻動物生殖システム分野)

1 はじめに

現在、わが国で行われている環境水（公共用水）中の有害化学物質の管理は、分析法が確立している化学物質について環境基準値を設け化学分析により行われており、実際の生態系を利用した管理手法についてはほとんど行なわれていないのが現状である。このような背景から国においても平成 20 年度から水質環境管理に生物学的評価を加えた評価手法：WET（Whole Effluent Toxicity）全排水毒性試験の実施についての検討を始めているところである¹⁾。最近、メダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類がラットやマウスに代わり環境毒性リスク評価のモデル生物として用いられるようになってきている²⁾。特にメダカは、彼らの広温域順応性、耐塩分能力、多産性、透明卵による胚形成過程の易可視化等の研究動物としての利点に加え、最近のゲノム研究により環境影響のモデル動物として有力な動物と見なされるようになってきた³⁾。ダイオキシン類の中で最も毒性の強い 2378T4CDD を曝露した場合の生体への影響については、ゼブラフィッシュ、メダカ等の魚類及び哺乳類で多くの研究がなされている^{4,5)}が、2378T4CDD 以外のダイオキシン類異性体の曝露による生体への影響についての報告は少ない。また、日本の法律では、ダイオキシン類各異性体の濃度に TEF（毒性等価係数）を掛け合わせた数値（TEQ 値；毒性等量）をもってダイオキシン類を規制している。本研究はメダカ胚を利用する環境影響評価法であるので、ダイオキシン類を曝露した場合のメダカ胚に現れる生物影響がダイオキシン類の TEF 値に比例した生物毒性影響が生じるかを確認する必要がある。

2 試験方法

2・1. メダカ卵と各試験液への曝露方法

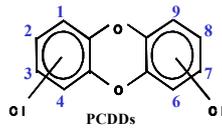
試験魚として東京大学新領域創成科学研究科先

端生命科学専攻動物生殖システム分野（三谷啓志研究室）で飼育されているヒメダカを使用した。親メダカは、水槽の水温が 26-28°C、明期 14h、暗期 10h の明暗サイクルで照明飼育された飼育室において、1 日 3 回、粉末にした餌（Tetramin, Germany）と生きたシュリンプ餌を与え管理・維持を行った。このような飼育環境下にて、ほぼ毎日産卵させ採卵（200-300 卵/日、各 10-15 卵/雌ヒメダカ）を行った。発生段階の識別は岩松改訂版⁶⁾に従った。

採卵したメダカ卵の塊は、手のひらに乗せ、人差し指で力を加減して転がし卵殻に付いている付着糸を除去したのち、約 10⁻⁵%濃度のメチレンブルー水溶液の入ったペトリディッシュに入れ、26-28°C の条件下でインキュベートした。曝露試験には、初期発生で自然に起こりうる発生異常を起こした個体を取り除くために、採卵から 24 時間経過した Stage 17-18 のメダカ初期胚を用いた。

ダイオキシン類曝露試験は、各試験毎に 96 セルプレート 1 枚を使い、96 各セルに試験液を 200µL ずつ注入しメダカ試験卵を 1 個/セルずつ浸せき曝露させ、その後のメダカ胚の発育状況を観察した。コントロールブランクは、DMSO（ジメチルスルホキシド）0.1%水溶液とし各試験液も同様の濃度に調製した。なお、DMSO が 0-0.2% (v/v) の濃度範囲の水溶液では、メダカ胚は正常に発育、孵化することを確認している。メダカ胚の観察は、1 日数回、実体顕微鏡（Olympus TH3, Japan）で、50-100 倍の倍率にて、各試験毎に全ての卵が孵化（孵化後 3 日間生存確認したもの）するまで約 1 ヶ月間行った。なお、本研究で検討したダイオキシン類は、Fig. 1 に示すダイオキシン類 17 種類である。ダイオキシン類は、関東化学㈱のから 5µg/mL (in DMSO) の標準試薬を購入し、蒸留水で希釈後、いずれも 0.1% DMSO (v/v) 水溶液に統一した。

PCDDs	WHO2005TEF
*2378T4CDD	1
*12378P5CDD	1
*123478H6CDD	0.1
*123789H7CDD	0.1
*1234789H7CDD	0.1
*1234678908CDD	0.0003
*1M1CDD	0
*27D2CDD	0
*123T3CDD	0
*124T3CDD	0
Co-PCBs (Non-ortho)	WHO2005TEF
*PCB77 (33'44T4CB)	0.0001
*PCB81 (34'45T4CB)	0.0003
*PCB126 (33'44'SP5CB)	0.1
*PCB169 (33'44'S5H6CB)	0.03
Co-PCBs (Mono-ortho)	WHO2005TEF
PCB105 (23'44P5CB)	0.00003
PCB114 (23'44'SP5CB)	0.00003
PCB118 (23'44'SP5CB)	0.00003
PCB123 (23'44'SP5CB)	0.00003
*PCB156 (23'44'SH6CB)	0.00003
PCB157 (23'44'SH6CB)	0.00003
PCB167 (23'44'SH6CB)	0.00003
*PCB189 (23'44'S5H7CB)	0.00003
Co-PCBs (Di-ortho)	WHO2005TEF
PCB170 (22'33'44'SH7CB)	0
*PCB180 (22'34'45'SH7CB)	0



PCDDs : Polychlorodibenzo-p-dioxins



Co-PCBs : Co-planar Polychlorobiphenyl

Fig.1 ダイオキシン類異性体と TEF 値

(*は本研究で使用した 17 異性体)

2・2. 全 RNA の調製

産卵後採取したメダカ卵は、すぐに約 10~5%濃度のメチレンブルー水溶液に浸せきし、水温 26-28°C の条件下でインキュベートし、24 時間経過後に死亡卵および発育異常の卵を排除し、発育正常な卵のみを試験卵とした (Stage 17-19)。選定された試験卵は、各試験毎に 96 セルプレート 1 枚を使い、試験液 200μL を入れた各セルに 1 卵ずつ浸せきし、一定時間経過後 30-50 卵ずつを取り出し、全 RNA 抽出に供した。すなわち、蒸留水に 3 回浸漬させ胚表面に付着している試験液をよく落とした 30-50 個の試験卵と ISOGEN (NIPPONGENE, Tokyo, Japan) 0.5mL を 1.5mL チューブに移し、ホモジナイザー ペッスル (INA・OPTIKA, Osaka, Japan) で磨り潰した。更に ISOGEN 0.5mL を加え攪拌した後、5 分程室温で静置した。これに、クロロホルム 200μL を入れボルテックスにより攪拌した。3 分間室温で静置した後に 15,000 rpm, 15 分, 4°C で遠心した。遠心後の上澄みを新しいチューブに移し、2-プロパノール 500μL を加え攪拌し 10 分間室温で静置した後に 15,000 rpm, 15 分, 4°C で遠心した。上澄みを捨て 70%の冷エタノール 1mL を加え洗浄し更に 15,000 rpm, 5 分, 4°C で遠心した。上澄みを捨てた後、チューブを上下反転し、10 分間自然乾燥させた。沈殿を R Nase free water 87.5μL に溶解した。抽出後の RNA 溶液に DNase I 2.5μL, RDD buffer

10μL を加え 10 分間室温で静置してゲノム DNA の混入を防いだ。DNase 処理をした全 RNA を RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Japan) を用いて精製した後、14μL の RNase free water に溶解した。抽出した全 RNA は、Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて、OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 比が 2.0 以上で RNA の分解等の問題がないことを確認した後、使用まで -80°C で保存した。全 RNA の収量は、500-1,000ng /μL (30-50 卵) である。

2・3. 1st strand cDNA の合成

抽出した全 RNA を鋳型に ReverTra Ace-N[®] system (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて 1st strand cDNA を合成した。すなわち、全 RNA 1μg に 5×RT Buffer 4μL, dNTP Mixture (各 10mM) 2μL, R Nase Inhibitor (10U/μL)1μL, Oligo(dT)20 (10 pmol/μL) 1μL に抽出した全 RNA 1μL と Rever Tra Ace 1μL を加えて 20μL とした。この反応液をサーマルサイクラー TGRADIENT (Biometra, Göttingen Germany)を用いて 30°C 10 min, 42°C 20min, 99°C 5min, 4°C 5min で反応した。実験の再現性を担保するため、各試料につき繰り返し試験を 2 回行った。

2・4. 定量的リアルタイム PCR

ダイオキシン類及び重金属類に特異的に発現することが知られている遺伝子について、SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa, Otsu, Japan)及び Smart Cyclor[®] II system (Cepheid, CA, USA) を用いて定量的リアルタイム PCR により定量を試みた。すなわち、2×SYBR[®] Premix Ex Taq[™]buffer 12.5μL, 5pmol forward プライマー, 5pmol reverse プライマー, 適宜希釈した 1st strand cDNA 2μL を合わせ、全量が 25μL となるように滅菌水を加えた。検量線作製のため、鋳型 DNA を 10, 100, 1000 および 10,000 倍と段階希釈したものを作製し、Smart Cyclor[®] II system で 95°C 10 秒で初期変性後、95°C 5 秒, 60°C 20 秒のサイクルを 45 サイクル行った。なお、各遺伝子を PCR で増幅する際に用いたプライマー対は、Primer3 program (Rozen and Skaletsky, 2000)により設計した。CYP1A1 (ENSORLG 0000

0014421), the forward primer 5'- TGGTTTTTGG TCTGGGAAAG , the reverse primer 5'- TGAATC ATGATCGCCAAAAA. PCR 終了後, 増幅曲線と融解曲線を調べつつ, 各遺伝子の検量線から定量解析を行った。ハウスキーピング遺伝子として elongation factor-1a (EF-1a) (DDBJ / EMBL / GenBank データベース access- ion number AB020734) を用いた。定量解析は EF-1a の数値をもとに標準化し, 相対定量法で行った。これらの実験は 3 回繰り返して再現性を確かめた。

2・5. 統計処理

メダカ cDNA マイクロアレイ及びリアルタイム PCR による解析結果の統計処理は, 統計解析環境 R の Student's t-test を用いて行った。

3 結果と考察

3・1. ダイオキシン類異性体曝露による孵化率 (%) と形態異常

魚類は, 2378T4CDD と 2378 位に塩素を持つ PCDDs, PCDFs と高塩素化 PCBs 等 (例えば 5, 6, 7 塩素化ビフェニル) を蓄積することが報告されている⁷⁾。曝露試験は, 50~96 個のメダカ試験卵を採取し, ダイオキシン類異性体標準液 200 μ L が入ったマイクロプレートセルに試験卵を 1 つずつ入れ, 曝露後のメダカ胚の発育ステージ, 異常胚・死亡胚等について生育状況を毎日観察することにより行った (n=3)。その結果を Fig.2 に示す。

2378T4CDD (1 μ g/L, 3.1nM) 曝露の場合, 曝露後 2 日間は正常に発達成長するが, その後, ステージ 30 (曝露後 2 日 10 時間) 以降になると静脈内の血流減少が起こる。1 μ g/L 以上の濃度になると, 胸びれ・後脳部分周囲を含む尾内静脈, 眼窩, 卵黄静脈等のあらゆる組織からの出血等の病理学的特徴が顕著になる。引き続き心臓周囲の浮腫が起こり, 卵黄嚢の破壊, 心房の形成不全 (チューブ化: コントロール胚に見られるような S 字のループ状の形状ではなく, 伸びきった糸のような形状の心臓になる), 血流の停止が起こり (ステージ 36 ; 曝露後 5 日), ついには死に至る。

1 μ g/L より低い濃度で曝露した場合は, 見た目

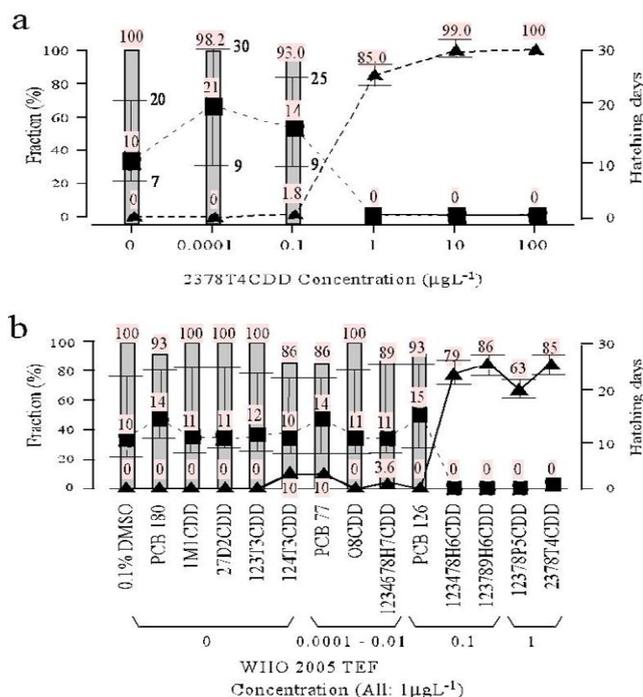


Fig.2 ダイオキシン類異性体を曝露した場合のメダカ胚への生物影響 (a) メダカ胚へ2378T4CDD (1nM) を曝露した場合の濃度依存性(0-100 μ g/L) ▲: 血流阻害率: (%), ■: 孵化日 (中央値), 灰色柱は孵化率(%), エラーバーは標準偏差を示す。 (b) メダカ胚へ他ダイオキシン類異性体 (1nM) を曝露した場合の生物影響 ▲: 血流阻害率: (%), ■: 孵化日 (中央値), 灰色柱は孵化率(%), エラーバーは標準偏差を示す。

では血流に関していずれの異常も見られないが孵化が遅れる傾向が見られた。孵化については, 曝露後 30 日間調査したが, コントロール水の場合, 平均 10 日で孵化するのに対して, 0.0001 μ g/L の場合は 21 日, 0.1 μ g/L の場合は 14 日 (いずれも中央値) とそれぞれ孵化が遅れる結果となった (Fig. 2 (a))。2378T4CDD 以外のダイオキシン類異性体 (濃度 1 μ g/L) を曝露した場合のメダカ胚への影響を Fig. 2 (b) に示す。

TEF (WHO2005TEF) が 1 の異性体 (2378 T4CDD, 12378P5CDD) と 0.1 の異性体 (123789 H6CDD, 123478H6CDD) は, 心房形成不全と静脈・動脈の血流阻害が認められ, 孵化せず死に至る。しかし, PCB126 (TEF=0.1) は, 同じ 1 μ g/L の濃度でも外見上明らかな血流阻害は認められなく, やや遅れは認められるが 93%が孵化した。産卵後 5~48 時間に PCB126 (7.5 μ g/L) に曝露したゼブラフィッシュの胚では, 心臓の心室, 心筋と鰓の発育停滞が認められたという報告がある⁸⁾ TEF が 0.01 (1234678H7CDD), 0.0003

(O8CDD), 0.0001 (PCB77), そして 0 (1 M1CDD, 27D2CDD, 123T3CDD, 124T3CDD, PCB180) の異性体は, それぞれ 1 μ g/L 曝露させた場合は, 顕微鏡観察からは血流阻害, その他の形態異常は認められないが, PCB77, PCB180 等に孵化がやや遅れる傾向は見られた (11~14 日, 中央値)。

3・2. メダカ胚への 2378T4CDD (1mg/L) 曝露による CYP1A1 (CP1A1_ORYLA) の発現誘導量の経時変化

メダカ胚に 2378T4CDD (1 μ g/L) を曝露させた場合の CYP1A1 の発現量の経時変化 (1~120 時間) を Fig.3 に示す。CYP1A1 は, 曝露開始 24 時間後から発現量が著しく増加し, 72 時間後に最大となる, その後減少する。

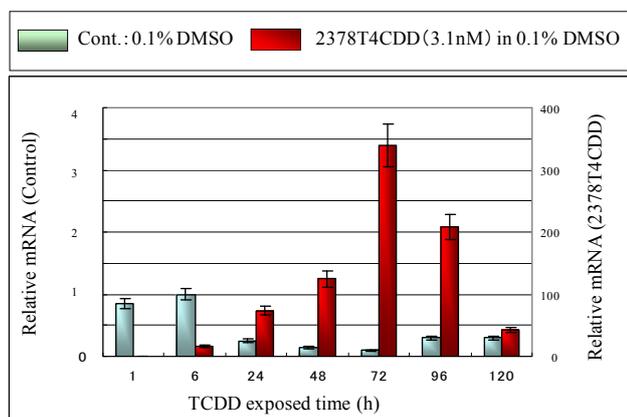


Fig.3 2378T4CDD (1mg/L) 曝露によるメダカ胚における CYP1A1 (CP1A1_ORYLA) の発現誘導量の経時変化

X 軸: 曝露時間 (hour), Y 軸: mRNA 相対発現誘導量 (曝露 6 時間後のコントロールを 1 とする)。(n=4-12, p<0.05)

3・3. メダカ胚へのダイオキシン類異性体曝露による CYP1A1 発現誘導量と WHO2005 TEF 値との関連性

メダカ胚 (St.17) にダイオキシン類各異性体を 6,24,48 時間曝露した場合の CYP1A1 の発現誘導量を Fig.4 に示す。全異性体について, 曝露後 6 時間ではコントロール比 4~10 倍程度の発現比であったが, 毒性等価係数 (TEF) が最も高い 1 の異性体 (2378T4CDD, 12378P5CDD) は, 露後 24 時間及び 48 時間後に著しく発現誘導量が増加する。一方, TEF が 0.1 以下の場合には, 曝露後 24 時間及び 48 時間後になっても発現誘導量の増

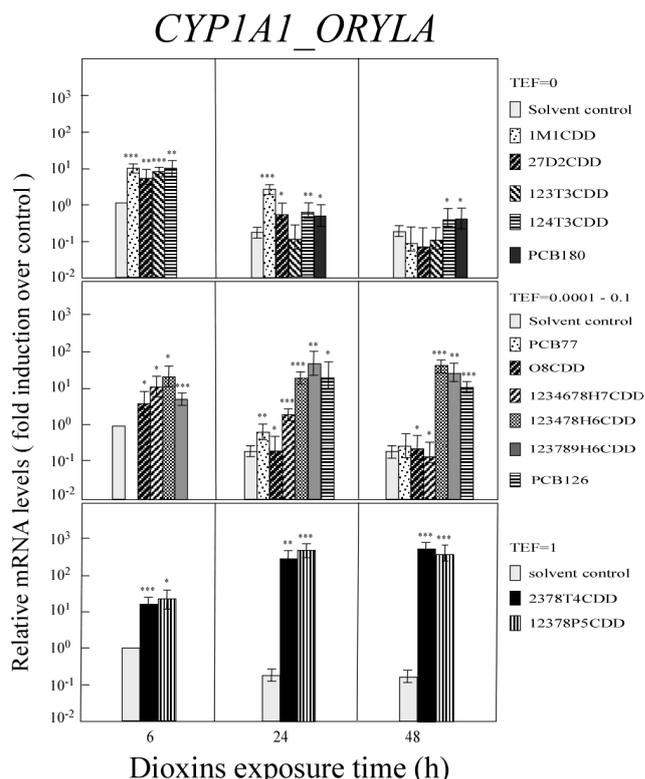


Fig.4 ダイオキシン類異性体曝露によるメダカ胚中 CYP1A1 発現誘導量
X 軸: メダカ胚への曝露時間 (hr), Y 軸: CYP1A1 相対発現量 (曝露 6 時間後のコントロールを 1 とした), TEF 値は WHO2005TEF, (n=4-11, *:p<0.05, **:p<0.01, ***p<0.001)

加は TEF=1 の異性体に比較して少ない。

そこで, メダカ胚 (St.17) にダイオキシン類各異性体を 6・24・48 時間曝露した場合の CYP1A1 の 2378T4CDD 相対発現誘導量を 1 とした場合の他異性体の CYP1A1 相対発現誘導量について調べた

(Table1 (a))。その結果, 24 時間と 48 時間曝露における相対発現量の比は, 哺乳類での TEF (WHO 2005TEF) の比と非常に相関が高いことが判明した (相関係数 Dioxin isomer exposure vs. WHO 2005 TEF, 6hr ; $y = 1.4626x, R^2 = 0.4004$, 24 h ; $y = 1.4769x, R^2 = 0.8484$, 48hr ; $y = 0.9379x, R^2 = 0.9448$)。各異性体間の有意差検定結果 (Student's t-test, p 値) を Table1(b) に示す。48 時間曝露後の CYP1A1 の相対発現誘導量比を統計処理

(Student's t-test) した結果は, 2378T4CDD (1) = 12378P5CDD (1) > 123478H6CDD (0.1) = 123789H6CDD (0.1) = PCB126 (0.1) > PCB77 (0.0001) > O8CDD (0.0003) = PCB180 (0) = 124 T3CDD (0) = 123 T3CDD (0) = 1234789H7CDD (0.1) > 1M1CDD (0) = 27D2CDD (0) (ここで, (

Table1 (a) ダイオキシン類曝露によるメダカ胚における
CYP1A1 相対発現量と TEF (WHO2005TEF) との相関性

Table1-(a)							
Dioxin	*WHO 2005 TEF	**The relative induction of CYP1A1 expression in medaka embryos at 6h exposure	n	**The relative induction of CYP1A1 expression in medaka embryos at 24h exposure	n	**The relative induction of CYP1A1 expression in medaka embryos at 48h exposure	n
2378T4CDD	1	1	5	1	9	1	5
12378P5CDD	1	1.85±0.066	5	1.88±0.071	6	0.84±0.019	5
123478H6CDD	0.1	0.31±0.032	4	0.18±0.085	9	0.27±0.057	5
123789H6CDD	0.1	0.21±0.060	4	0.55±0.039	11	0.26±0.11	7
PCB126	0.1	-	-	0.11±0.013	4	0.10±0.014	4
1234789H7CDD	0.01	0.52±0.12	4	0.023±0.0087	5	0.0008±0.00002	4
O8CDD	0.0003	0.20±0.0034	5	0.0029±0.0007	5	0.0024±0.0016	4
PCB77	0.0001	0	-	0.012±0.0062	5	0.0022±0.0009	5
1M1CDD	0	0.64±0.41	4	0.029±0.014	4	0.0006±0.0002	5
27D2CDD	0	0.28±0.13	4	0.0081±0.0034	4	0.0003±0.00003	5
123T3CDD	0	0.44±0.26	5	0.0014±0.0009	5	0.0009±0.00004	5
124T3CDD	0	0.56±0.21	4	0.0069±0.0007	5	0.0032±0.0012	5
PCB180	0	-	-	0.0078±0.0015	5	0.0039±0.0004	4

(メダカ n=4-11, 各数値は, average±S.D.を表す。)

内は WHO 2005 TEF 値を示す。 = は統計的に有意差が認められないことを示す。)

このように、メダカ胚において、2378 T4CDD 曝露における CYP1A1 の相対発現誘導量(曝露胚/コントロール胚)の比が哺乳類の TEF 値と非常に高い相関を持ち、かつ、生物毒性影響(血流阻害)も TEF 値と非常に高い相関を持つことから、メダカにおいても哺乳類と同等の生体異物代謝経路が存在することが示唆された^{9),10)}。

4 結論

メダカは、発生生物学において実験動物として確立し、発生毒性学で良く使われているモデルである。このモデルを最適な条件で利用するためには、発生段階や毒性発現過程での遺伝子シグナル伝達に関する類似点や相違点を良く理解することが求められる。そのため、各ダイオキシン異性体(1µg/L)に曝露後6・24・48時間のメダカ胚における CYP1A1 の発現量を基にして、メダカ胚における毒性当量値(TEF)を評価した。その結果、メダカ胚に48時間曝露後の結果が哺乳類の TEF 値(WHO2005)と非常に良く一致することを明らかにした。

このように CYP1A1 は、多くの脊椎動物と同様にメダカの成長過程におけるダイオキシン類・多環芳香族炭化水素類の高感度なバイオマーカーとして

有効であることが示唆された。

5 参考文献

- 1) 鎌迫典久:水質管理における新しい生物学的評価法の動向, 日本水環境学会関東支部, 特別講演会(2010)
- 2) Timme-Laragy,A.R., Cockman,C.J., Di Giulio, R.T.: Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **85(4)**,241-250 (2007).
- 3) Kasahara M., Naruse K., Sasaki S.: The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* **447**, 714-719 (2007).
- 4) Walker, M. K., Hufnagle, Jr., L. C., Clayton, M. K., Peterson, R. E.: An egg injection method for assessing early life stage mortality of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **22**. 15-38 (1992).
- 5) Andreasen, E. A., Spitsbergen, J. M., Peterson,R.E.: Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: Effects of Developmental Stage and 2,3,7,8-tetra chloro dibenzo-p-dioxin exposure. *Tox. col. sci.* **68**, 403-419 (2002)
- 6) Iwamatsu, T.: Stages of normal development in the medaka *Oryzias Latipes*. *Mech. Dev.* **121**, 605-618 (2004).
- 7) Evans, M. S., Noguchi, G. E., Rice, c. P.: The biomagnification of poly chlorinated biphenyls, toxaphene, and DDT compounds in a Lake Michigan offshore food web. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**, 87-93 (1991).
- 8) Grimes, A.C., Erwin, K.N., Kirby, M.L. PCB126 Exposure Disrupts ZebraFish

Ventricular and Branchial but Not Early Neural Crest Development. *Toxicol Sci.* **106(1)**, 193-205 (2008).

- 9) Hanno.K., Oda,S., and Mitani,H. : Effects of dioxin isomers on AhRs and CYP1A1 in early developmental stage embryos of Medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, **78**, 830 – 839 (2010).
- 10) 半野勝正, 尾田正二, 三谷啓志, :水中曝露時のメダカ卵中ダイオキシン類濃度の経時変化と AhRs, Ependymin 及び CYP1A の発現について, 第 10 回環境ホルモン学会要旨集, PD-4, p136 (2007).

- 11) Hanno.K., Oda,S., and Mitani,H. Biomarkers for Exposure to Dioxins and Heavy Metals : Gene Expression Analysis in early developmental stage embryos of Medaka (*Oryzias latipes*) using Medaka cDNA microarray. (投稿中) (2010).

6 用語の説明

CYP1A1 : cytochrome P450, 薬物及び異物代謝機能を有する。

リアルタイム PCR : ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅を経時的 (リアルタイム) に測定することで, 増幅率に基づいて鋳型となる DNA を定量する方法。

A study of Environmental Toxic Evaluation Method using early developmental stage embryos of Medaka (*Oryzias latipes*)

Katsumasa HANNO, Shoji ODA, Hiroshi MITANI, Hiroshi SUGIYAMA

Abstract

Early life stages are generally most sensitive to toxic effects. Our knowledge on the action of manmade chemicals on the developing vertebrate embryo is, however, rather limited. We addressed the ecotoxicogenomic response of genes in the medaka (*Oryzias latipes*) embryos in a systematic manner by asking whether distinct chemicals would induce specific transcriptional profiles. We exposed Medaka embryos in the early developmental stage to Dioxins Isomers for 6, 24, 48 hours, respectively and after exposure, the gene expression profiles were analyzed using Quantitative real-time PCR .

Keywords: メダカ medaka (*Oryzias latipes*), 胚 embryo, ダイオキシン類 dioxin ,
リアルタイム PCR Quantitative real-time PCR

Table1 (b) ダイオキシン類曝露によるメダカ胚における CYP1A1 相対発現量と TEF (WHO2005TEF) との相関性 (統計処理結果)

Table1 (b)		(48h exposure)													
WHO2005TEF		2378T4CDD	12378P5CDD	123478H6CDD	123789H6CDD	PCB126	PCB77	O8CDD	PCB180	124T3CDD	123T3CDD	1234789H7CDD	27D2CDD	1M1CDD	
1	2378T4CDD	1	0.086407994	0.000584654	0.000434818	0.000213146	1.18E-07	5.03E-05	3.94E-06	9.85E-06	3.50E-07	7.65E-07	2.65E-07	1.60E-06	
1	12378P5CDD	0.086407994	1	0.000396594	0.00048725	0.00024846	7.34E-09	6.15E-05	2.91E-06	9.19E-06	1.39E-07	4.50E-07	1.21E-07	1.29E-06	
0.1	123478H6CDD	0.000584654	0.000396594	1	0.097383575	0.007878661	2.06E-08	0.000181536	1.04E-05	3.32E-05	3.71E-07	1.20E-06	2.91E-07	3.19E-06	
0.1	123789H6CDD	0.000434818	0.00048725	0.097383575	1	0.084711415	6.10E-07	0.000354175	3.58E-05	9.49E-05	1.75E-06	4.00E-06	1.10E-06	7.71E-06	
0.1	PCB126	0.000213146	0.00024846	0.007878661	0.084711415	1	7.94E-06	0.00098603	0.000185703	0.000421882	9.65E-06	1.72E-05	0.000131268	2.47E-05	
0.0001	PCB77	1.18E-07	7.34E-09	2.06E-08	6.10E-07	7.94E-06	1	0.790327483	0.142252414	0.164809529	0.011617393	0.019473698	0.000632554	0.008445747	
0.0003	O8CDD	5.03E-05	6.15E-05	0.000181536	0.000354175	0.00098603	0.790327483	1	0.344158071	0.321663677	0.357991351	0.312610243	0.066433198	0.123017467	
0	PCB180	3.94E-06	2.91E-06	1.04E-05	3.58E-05	0.000185703	0.142252414	0.344158071	1	0.886122752	0.011484051	0.013141149	0.001428362	0.006169391	
0	124T3CDD	9.85E-06	9.19E-06	3.32E-05	9.49E-05	0.000421882	0.164809529	0.321663677	0.886122752	1	0.016822582	0.017656133	0.002375668	0.007966355	
0	123T3CDD	3.50E-07	1.39E-07	3.71E-07	1.75E-06	9.65E-06	0.011617393	0.357991351	0.011484051	0.016822582	1	0.796664068	0.043995982	0.188586531	
0.01	1234789H7CDD	7.65E-07	4.50E-07	1.20E-06	4.00E-06	1.72E-05	0.019473698	0.312610243	0.013141149	0.017656133	0.796664068	1	0.0953836	0.287627983	
0	27D2CDD	2.65E-07	1.21E-07	2.91E-07	1.10E-06	0.000131268	0.000632554	0.066433198	0.001428362	0.002375668	0.043995982	0.0953836	1	0.682296277	
0	1M1CDD	1.60E-06	1.29E-06	3.19E-06	7.71E-06	2.47E-05	0.008445747	0.123017467	0.006169391	0.007966355	0.188586531	0.287627983	0.682296277	1	

(t 検定 ; ■ ; p>0.05, ■ ; 0.01< p <0.05, others ; p < 0.001)