水道水の衛生化学的研究.

次亜塩素酸水溶液によるパラヒドロキシ桂皮酸およびフェルラ酸の分解¹⁾

沢村良二, 小山 隆, 木村由美子, 今村敏子,^{2a)}

外村正治, 佐谷戸安好, 中室克彦^{2b)}

日本大学理工学部薬学科,^{2a)} 国立衛生試験所^{2b)}

Hygienic Chemical Studies on Supplying Water.

Decomposition of *p*-Hydroxycinnamic and Ferulic Acid with Hypochlorite in Water¹⁾

RYOJI SAWAMURA, TAKASHI KOYAMA, YUMIKO KIMURA,

TOSHIKO IMAMURA,^{2a)} MASA HARU TONOMURA,

YASUYOSHI SAYATO and KATSUHIKO NAKAMURO^{2b)}

Pharmaceutical Institute, College of Science and Engineering,

Nihon University^{2a)} and National Institute of Hygienic Science^{2b)}

(Received November 19, 1971)

The present series of work was undertaken to prove that there is no possibility for the presence of either ferulic acid or *p*-hydroxycinnamic acid in purified city water supplied by authorized water works. Both ferulic and *p*-hydroxycinnamic acids consume chlorine and are rapidly decomposed. They consume about 4 moles of hypochlorite for each mole of the substance, and the reaction is completed when the residual chlorine detected in the reaction mixture becomes about 0.1 ppm or less. This test for ferulic and *p*-hydroxycinnamic acids was carried out because some investigators attributed the incidence of a chronic bone disease, the so-called Kaschin-Beck disease, to city water, even if supplied by qualified water works, because of the presence of *p*-hydroxycinnamic (*p*-cumaric) and 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acids, which were reported to have been detected in polluted river water used as a source of city water and which were found to produce changes in the cells of cartilage tissue and salivary glands in young rats.

緒 言

さきに滝沢は“日本におけるカシン・ベック病の研究”
と題する出版物³⁾を刊行して、シベリアおよび満洲にお
ける同病の研究の概要を総括して紹介するとともに、日
本内地のカシン・ベック病様の病変を有する風土病など

について追究した結果を報告している。すなわち、国内
各地の小中学校児童、生徒のうち手の骨端腫大を肉眼的
ならびにX線学的に判定し、数%から数十%の罹患率を
示す地域が全国的に散在し、^{3a)}このような病変を有する
ものが高率に居住する地域を大別すると2種類あって、

1) 日本薬学会第91年会講演, 福岡, 1971年4月.

2) Location: a) 1-8 Surugadai, Chiyoda, Tokyo (東京都千代田区駿河台 1-8); b) 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo (東京都世田谷区上用賀 1-18-1).

3) 滝沢延次郎, “日本におけるカシン・ベック病の研究,” 緒方書店, 東京, 1970 (同書の引用文献には日本病理学会等の講演要旨が多く, 引用文献の内容と本書の内容とが必ずしも一致しない点があり, しかも原著の引用のない部分もあるので, 原著の併記を省略する).

a) e.g. *ibid.*, p. 45; b) *ibid.*, p. 46; c) *ibid.*, p. 48; d) e.g. *ibid.*, p. 50, 51, 52, 53, 59, 60; e) *ibid.*, p. 56, 57, 58; f) *ibid.*, p. 61, 62, 63, 64; g) *ibid.*, p. 73; h) *ibid.*, p. 69, 77; i) *ibid.*, p. 82; j) *ibid.*, p. 78, 79; k) *ibid.*, p. 83; l) *ibid.*, p. 90; m) *ibid.*, p. 92; n) *ibid.*, p. 75, 76, 77.

一つは山間の峡谷、川の合流点や屈曲部など流出土壌の堆積した湿地と、他の一つは以前に湖沼で、それが干拓されて陸地となった地域とが主であることから、これらの土壌の共通点として植物性有機物が堆積しやすいことをあげている。^{3b)} また、これと関連して地下埋没植物性有機物の多い泥炭地でも罹患率が高いことを調査している。^{3c)} これらの有機物汚染のある水では過マンガン酸カリウム消費量は大きい、さらに東京、大阪など大規模な上水道を利用している大都市にも局地的な高率罹患地域があって、水道源水の過マンガン酸カリウム消費量が多いことと関連性があるとしている。^{3d)}

一方、この疾患の病因を追求するために行なわれた動物実験による研究経過では、満洲のカシン・ベック病流行地の井戸水をはじめ、日本内地で人の病変が認められる各地の井戸水、湧水や埋没植物の抽出液などを濃縮してラットに注射すると耳下腺および骨に特定の病理学的所見をみとめ、^{3e)} ヒノキその他の植物の枯葉の抽出液でも動物実験で同様の病理所見をみとめるとしている。^{3f)} さらにリグニンの分解産物として生成する可能性のある各種有機化合物について動物実験を行なったところ、*p*-ヒドロキシ桂皮酸、フェルラ酸（4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸）で病変がみとめられ、アセチルフェルラ酸、フェルラ酸エチル、コリフェリルアルコール（4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮アルコール）、パニリン、*p*-オキシベンズアルデヒドでは陰性であったとしている。^{3g)} また、北海道新篠津村の泥炭の弱酸性抽出成分を分離した画分のうち動物実験で病理所見をみとめるものの IR スペクトルは *p*-ヒドロキシ桂皮酸、フェルラ酸と共通の -OH、-C=C-、-COOH の吸収を有するとし、^{3h)} 同じ構造をもつカフェイン酸、ウムベリフェロン、*o*-および *m*-ヒドロキシ桂皮酸も動物実験の病理所見が陽性であるとしている。³ⁱ⁾ さらに本病流行地の井戸水、水道源水からガスクロマトグラフィーによって *p*-ヒドロキシ桂皮酸、フェルラ酸を検出したとして、^{3j)} 罹患率と水の *p*-ヒドロキシ桂皮酸含量とがほぼ比例することを報告している。^{3k)}

以上のような根拠にもとづいて日本における本疾患がカシン・ベック病と同一疾患であり、原因物質は植物成分の分解によって生ずる飲料水中の *p*-ヒドロキシ桂皮酸およびフェルラ酸であり、^{3l)} 病因物質を含む飲料水は煮沸または活性炭処理による完全な処理で無毒化するが、都市水道の場合には汚染されていない源水を特別の水路で浄水場に流入させることにより本病を防止することができるとの結論^{3m)}を与えている。

滝沢らが病因物質であると指摘した *p*-ヒドロキシ桂皮酸やフェルラ酸は、いずれも α 、 β 不飽和カルボン酸を置換基にもつフェノール系化合物である。一方著者らが、水道水などの水の塩素消毒の際に使用する塩素剤の各種の物質に与える影響について検討して来た結果では、一般にフェノール系化合物は塩素剤によって容易に化学変化を起こす。⁴⁾ したがって、井戸水や湧水の個人使用や小規模で浄水操作を加えない水道水の場合はともかくとして、実際の都市水道の浄水処理過程を全く考慮せず、特に国内の都市水道で必らず行なわれている塩素処理が病因物質に与える影響を検討せずに、都市水道にも病因があると推測していることは疑問である。そこで病因物質であると指摘された *p*-ヒドロキシ桂皮酸（以下 *p*-クマール酸と略称する）および 4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸（以下、フェルラ酸と略称する）の塩素剤による分解過程を追究して、浄水処理をした都市水道にこれらの物質が含まれる可能性があるか否かについて検討したので報告する。

実験方法

1. *p*-クマール酸、フェルラ酸の幾何異性 本実験に用いた *p*-クマール酸およびフェルラ酸はいずれも東京化成工業 K. K. の特級品で、これらの試料をジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、テトラメチルシラン (TMS) を対照として、日本電子 K. K. NMR Instrument JNMC-60 HL により核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを測定した。

2. 次亜塩素酸による *p*-クマール酸、フェルラ酸の UV スペクトルの変化 0.2N リン酸緩衝液 pH 7.0 5 ml, 100 μ M 試料水溶液 2 ml, 水 2 ml を共栓試験管中で混和し、これに次亜塩素酸ナトリウムの希釈液 1 ml を加えてただちに混和した直後に、日立自記分光光度計 EPS-2 により 210—360 m μ の吸収スペクトルを測定した。次亜塩素酸の添加後スペクトル測定を終了するまでの時間は 5 分以内である。また、反応後の残留塩素を求めるためオルトリジン試薬を加え、柴田化学器械工業 K. K. の残留塩素計を用いて比色測定した。

3. *p*-クマール酸、フェルラ酸の塩素消費 紫外線吸収 (UV) スペクトルの変化を測定した前記 2. の実験と全く同一の条件で試料溶液に次亜塩素酸を加えた反応液を調製し、20 分後に残留する有効塩素を測定した。一方、同様の操作で試料溶液のかわりに水を加えたものを調製して有効塩素量を測定し、両者の差を求めて塩素消費量とした。

この場合の有効塩素量の測定は、検液 20 ml にオルト

Fig. 1. Effect of Hypochlorite on the Ultra-violet Spectrum of *p*-Cumaric Acid

20 μ M *p*-cumaric acid in 0.1 N phosphate buffer (pH 7.0)

curve	added chlorine ppm (calculated)	residual chlorine ppm (observed)
a	0	
b	1	<0.05
c	2	<0.05
d	2.5	0.3
e	4	1
f	5	>2

Fig. 2. Effect of Hypochlorite on the Ultra-violet Spectrum of Ferulic Acid

20 μ M ferulic acid in 0.1 N phosphate buffer (pH 7.0)

curve	added chlorine ppm (calculated)	residual chlorine ppm (observed)
a	0	
b	2	<0.05
c	3	<0.05
d	5	<0.05
e	10	>2

Fig. 3. IR Spectrum of Substance from *p*-Cumaric Acid with Hypochlorite Action

The molar ratio of *p*-cumaric acid and hypochlorite was 1:2 in aqueous solution. After 10 minutes of reaction, thiosulfate was added to exclude residual chlorine. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*, and extracted with ethanol. After removing ethanol *in vacuo*, IR spectrum of the residue was measured by KBr-tablet method.

ルを測定してもスペクトルに変化はない。またこれらの反応液に加えた次亜塩素酸と対応する量以上のチオ硫酸ナトリウムを反応後ただちに加えてもスペクトルの波形にはそれ以上の変化はなく、一たん変化したスペクトルがもとの *p*-クマール酸のスペクトルにもどるような現象はみとめられなかった。

フェルラ酸の場合には 290 m μ と 315 m μ の吸収極大の吸光度が次亜塩素酸の添加によって減少し、これらの吸収極大の消失とともに 265 m μ に吸収極大があらわれた。フェルラ酸の場合も *p*-クマール酸の場合と同様に一定量の塩素消費によってスペクトル変化がおこり、それ以上に加えた次亜塩素酸は残留し、また反応後にチオ硫酸ナトリウムを加えてもスペクトルの波形にはそれ以上の変化がおこらない。

3. *p*-クマール酸、フェルラ酸の塩素消費

p-クマール酸、フェルラ酸の反応液中濃度を 20 μ M とし、これに次亜塩素酸を 30 μ M—200 μ M になるように加えて、加えた有効塩素量および反応20分後の残留塩素量を実測した。これらの実測値を *p*-クマール酸、フェルラ酸のそれぞれ 1 mole に対する次亜塩素酸 HOCl の mole 数に換算したものと、添加量と残留量との差から求めた塩素消費量の mole 数とを Table II, Table III に示した。なお参考のために、加えた有効塩素量の実測値を重量濃度 ppm に換算したものを Table II, Table III の左側の欄に示した。*p*-クマール酸 1 mole は次亜塩素酸 3—4 mole を、フェルラ酸 1 mole は次亜塩素酸約 4 mole をそれぞれ消費して、それ以上の次亜塩素酸を加えても消費されずに残留することが明らかである。

4. *p*-クマール酸、フェルラ酸の次亜塩素酸による分解生成物

p-クマール酸とその分解生成物の IR スペクトルを Fig.3 に、フェルラ酸とその分解生成物の IR スペクトルを Fig.4 に示した。分解生成物の IR スペクトルはかなりブロードであるが、これは精製操作を加えていないためとも考えられる。しかし、もとの試料とくらべると次のように明瞭な差異がみとめられる。

p-クマール酸の 1675, 1627, 1444, 1320, 1307, 980 cm⁻¹ の吸収はいずれもシャープで強度も強いが、*p*-クマール酸 1 mole に次亜塩素酸2moleを作用させた分解生成物には、全くあるいはほとんどみとめられず、かわりに分解生成物には 1733, 1061, 1011 cm⁻¹ の *p*-クマール酸には全くみとめられない吸収がある。

また、フェルラ酸の 1694, 1668, 1323, 1113, 972, 946, 806, 753 cm⁻¹ の吸収は、フェルラ酸 1 mole に次亜塩素酸 2 mole を作用させた分解生成物では消失して、

TABLE II Chlorine Consumption of *p*-Cumic Acid

Added chlorine		Residual chlorine	Consumed chlorine
as available chlorine observed ppm	as hypochlorite (HOCl) moles per mole <i>p</i> -cumic acid (A)	as hypochlorite (HOCl) moles per mole <i>p</i> -cumic acid (B)	as hypochlorite (HOCl) moles per mole <i>p</i> -cumic acid (A-B)
2.4	1.69	0.09	1.60
3.2	2.27	0.34	1.93
3.5	2.45	0.24	2.21
6.4	4.50	0.89	3.61
8.5	5.98	3.31	2.67
16.3	11.49	7.57	3.82

20 μ M *p*-cumic acid in 0.1 N phosphate buffer (pH 7.0)

TABLE III. Chlorine Consumption of Ferulic Acid

Added chlorine		Residual chlorine	Consumed chlorine
as available chlorine observed ppm	as hypochlorite (HOCl) moles per mole ferulic acid (A)	as hypochlorite (HOCl) moles per mole ferulic acid (B)	as hypochlorite (HOCl) moles per mole ferulic acid (A-B)
2.5	1.73	0	1.73
5.1	3.57	0.09	3.48
9.3	6.57	2.24	4.33
10.0	7.01	1.62	4.39
12.4	8.70	5.71	2.99
14.3	10.10	5.79	4.31

20 μ M ferulic acid in 0.1 N phosphate buffer (pH 7.0)

Fig. 4. IR Spectra of Substances from Ferulic Acid with Hypochlorite Action

The molar ratio of ferulic acid and hypochlorite was 1:2 and 1:4. The process to prepare the decomposed substance and the method of measuring IR spectra were the same with the description in Fig. 3.

かわりに 1725 cm^{-1} に新しい吸収がみとめられる。さらにフェルラ酸 1 mole に次亜塩素酸 4 mole を作用させた分解生成物では、フェルラ酸の上記の吸収に加えて 1626, 1600, 1507, 1462, 1434, 1380, 1280, 1208, 1176, 1035, 853 cm^{-1} など、ほとんどすべての特徴的な吸収が消失して、かわりにフェルラ酸にはみとめられな

かった 1739, 1246, 1067, 1017, 925, 793 cm^{-1} のややブロードではあるが強度の強い吸収がある。

一方、この実験と同一条件で次亜塩素酸のみを加えただけで全操作を行なった *p*-クマール酸、フェルラ酸の回収実験で得た IR スペクトルは、もとの *p*-クマール酸、フェルラ酸と全く同一であり、上記の IR スペクトルの変化は明らかに次亜塩素酸の作用によって起ったものである。

p-クマール酸の分解生成物の TLC を Fig. 5 に示した。 *p*-クマール酸に相当するスポットは消失して、かわりに少なくとも 6 種類の生成物が存在していると考えられる。 *p*-クマール酸の分解生成物のエタノール溶液を薄層プレートに線状にスポットしたものを、同じ条件で展開し、UV 照射で *p*-クマール酸の展開位置を確認して、その *Rf* 値に相当する部分の分解生成物をかきとりエタノール抽出して再び薄層クロマトグラフィーを行なった結果、 *p*-クマール酸を検出しなかった。

またフェルラ酸の分解生成物は、フェルラ酸 1 mole に対して次亜塩素酸を 2 mole 加えたものも 4 mole 加えたものも、原点の位置に褐色で UV を吸収するスポットが

Fig. 5. Chromatogram of Substances from *p*-Cumaric and Ferulic Acid with Hypochlorite Action

The substances appeared in Fig.3 and Fig.4 were submitted.

thin layer silica gel : soluble starch = 4 : 1
solvent benzene : methanol : acetic acid

360 : 39 : 1

UV = radiation of ultra-violet ray, 2537 Å and 3650 Å

A : absorption of UV ray

F : fluorescence

color = color developed with 0.5% *p*-diazobenzene-sulfonic acid (diazotized sulfanilic acid) in 10% aqueous NaOH solution

OR : orange

P : pink

R : reddish violet

B : pale brown

あるだけで、フェルラ酸に相当するスポット (R_f 0.35, UV 照射により青色蛍光, 呈色反応は赤紫色) はみとめられなかった。

考 察

p-クマール酸, フェルラ酸には *cis*, *trans* の異性体があり, 幾何異性が生理作用に大きな影響をもつ可能性があるが, 滝沢らの報告³⁾では動物実験などに用いた *p*-クマール酸, フェルラ酸や井戸水, 川水などから検出したとするものの幾何異性にふれていない。

著者らがここに報告した実験は強い化学作用のある次亜塩素酸の作用を検討したもので, 幾何異性が大きい影響をもつとは限らないが, 実験条件を明確にする目的で試料の NMR スペクトルを測定し, 実験に使用した材料が *trans* 体であることを明らかにした。

Fig.1 および Fig.2 に示した *p*-クマール酸, フェルラ酸の次亜塩素酸によるスペクトル変化は迅速である。しかもこれにチオ硫酸ナトリウムを添加して残留塩素を除去しても, もとにもどらないことから明らかのように, この変化は一時的なものでなく, 通常の条件では不可逆であると考えられる。またこの変化は Table II, Table III に示したように一定量の塩素消費によって完結する。

p-クマール酸について Fig.1 と Table II とを照合す

ると, *p*-クマール酸 1mole が次亜塩素酸約 2 mole を消費した段階で, *p*-クマール酸の 288 m μ の吸収極大がほぼ完全に消失して吸収極大波長が 270 m μ に移り, 過剰の次亜塩素酸の存在で, さらに 1—2 mole の次亜塩素酸を消費して吸収極大波長が約 265 m μ となるが, それ以上に過剰の次亜塩素酸は残留する。

次に *p*-クマール酸 1 mole に対して次亜塩素酸 2 mole を作用させた分解生成物の IR スペクトル (Fig. 3) および TLC の結果も, *p*-クマール酸が残存していないことを示すものである。しかし *p*-クマール酸から得られた物質は 6 種類以上の混合物で, UV 吸収または蛍光があつてジアゾスルファニル酸試薬で発色するものがあるので, *p*-クマール酸以外のフェノール系化合物が存在するものと思われる。

またフェルラ酸について Fig. 2 と Table III とを照合すると, フェルラ酸 1 mole は次亜塩素酸約 4 mole を消費して 290m μ と 315m μ の吸収極大が消失し, 265m μ に吸収極大を示し, 過剰の次亜塩素酸は残留する。分解生成物の IR スペクトルによれば, フェルラ酸 1 mole に対して次亜塩素酸 4 mole の添加で完全な変化がおこり, 次亜塩素酸 2 mole では分解の中間段階であるとも考えられるので, 吸収スペクトルについての実験結果と符合するようになる。しかし TLC の結果は次亜塩素酸 2 mole でもフェルラ酸のスポットが全く消失し, 次亜塩素酸 4 mole を作用させた生成物と同じく TLC の原点から移動しない褐色物質である。これは作用させた次亜塩素酸の量が異なる二つの生成物の間に, UV 照射で吸収も蛍光もなく, ジアゾスルファニル酸との呈色もない物質の組成に差があるとの推定もでき, あるいは次亜塩素酸の作用で生成した物質に差異はあるが, クロマトグラム像が一致しているとも考えられる。

p-クマール酸, フェルラ酸の分解生成物を得るために行なつたと同様の濃縮, 抽出操作を, 次亜塩素酸を加えないで行なつた回収実験では, 回収物の IR スペクトルがそれぞれ *p*-クマール酸, フェルラ酸と完全に一致しているので, 以上の分解反応は次亜塩素酸の存在がなければ起らないことは明らかである。また次亜塩素酸との接触時間は 10 分間であるから, 反応時間がきわめて短いことも吸収スペクトルの変化を観察した実験と一致する。

以上の知見を総合すると, *p*-クマール酸, フェルラ酸は次亜塩素酸によって速やかに分解され, 有効塩素の残留がみとめられれば分解が完了していることになる。Fig.1, Fig.2, Table II, Table III の実験結果から見て, 分解に必要な有効塩素量は反応液中の試料濃度 20 μ M

で、*p*-クマール酸の場合 2.5—3 ppm, フェルラ酸の場合 5—6 ppm であり、分解終了の指標となる残留塩素量は 0.1 ppm 以下と考えられる。

滝沢らの研究成果^{3k)}によると、動物実験で皮下注射により病毒作用をあらわす最少濃度は 1 μ M で、国内のカシン・ベック病の高率罹患地域の井戸水や水道用源水からガスクロマトグラフィーで検出された *p*-クマール酸の濃度はさらに低いとしているので、本実験の 20 μ M という濃度はカシン・ベック病の発症のおそれありとして問題にされている水中濃度の数十倍から数百倍に及ぶ高濃度である。一方、過マンガン酸カリウム消費量やアンモニア窒素量の多い水を浄水処理する場合の塩素添加量を考えると、数 ppm の添加は決して多い量ではない。したがって、滝沢らが水道源水中に存在するとしている程度の *p*-クマール酸^{3k)} またはフェルラ酸は、きわめて少量の塩素添加によって速やかに分解されることになる。

また上記の実験のほかに、*p*-クマール酸、フェルラ酸の 20 μ M 水溶液を直火 2 時間煮沸したが、UV スペクトルに全く変化がなく、1 mM 水溶液を直火 2 時間煮沸後濃縮した回収物の IR スペクトルおよび TLC は標品と全く一致して、何らの変化をみとめなかった。滝沢らの報告ではフェルラ酸、*p*-クマール酸の合成品の 10mM 溶液を 95°, 30—90 分加熱すると毒性試験が陰性になる³ⁿ⁾ としているので、加熱以外の要因が介在して分解したとの仮定を設けないかぎり、*p*-クマール酸、フェルラ酸の動物実験の判定に誤まりがあったと考えられる。また、

滝沢らは流行地の飲料水や水、土壌、埋没植物、泥炭などの抽出物で動物実験陽性を示すものが、100° 30 分の加熱で病変が著しく減少すると報告^{3e, 3f)} しているので、実際の飲料水中の病因物質は別の易熱性物質であったとも考えられる。*p*-クマール酸、フェルラ酸が病因であることが否定されれば、本研究の意義は失なわれるが、同時に浄水された都市水道が病因になるとの推測も重要な根拠を失なうことになる。

結 論

人の健康に影響を及ぼすのではないかと考えられている量以上の *p*-クマール酸、フェルラ酸が水道源水中に存在しても、浄水処理過程で加えられる通常の塩素注入量で速やかに分解され、0.1 ppm 以下の残留塩素がみとめられれば分解が終了したことの指標になる。したがって塩素注入をして供給される水道水中に *p*-クマール酸およびフェルラ酸が残存する可能性はない。

しかし、これらの物質の次亜塩素酸による分解生成物中には別のフェノール系化合物が存在する可能性があるので、生成物の検索、同定をすることが必要である。

謝辞 本研究は昭和45年度厚生科学研究「水道添加剤の許容量に関する研究」の一部であり、研究費の支給を受けたことを感謝する。また、御指導御助言を賜った主任研究者の東京大学薬学部 浮田忠之進教授をはじめ分担研究者の東京大学薬学部 山田正篤教授、大沢利昭教授、早津彦哉助教授に深く謝意を表する。