[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
[衛生化学]
[41 (3) 212-219 (1995)]

ポリクロロフェノキシフェノール (プレダイオキシン) 及びそれらの 水中光分解生成物の変異原性試験

小野寺祐夫, 高橋真理子, 小川政彦, 鈴木静夫
東京理科大学薬学部

Mutagenicity of Polychlorophenoxyphenols (Predioxins) and Their Photo-degradation Products in Aqueous Solution

SUKEO ONODERA, MARIKO TAKAHASHI, MASAHICO OGAWA and SHIZUO SUZUKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,
12 Ichigaya-funagawara, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan

(Received October 19, 1994)

Polychlorinated phenoxyphenols (PCPPs), including predioxins and isopredioxins, and their photo-degradation products in aqueous solution were tested for mutagenicity on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains.

Mutagenic effects of Irgasan DP 300 [5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol] as a typical predioxin and PCPPs (chlorophenol dimers) could not be observed on both TA98 and TA100 strains with and without S9 mix, because of their great toxicity to tester strains. No mutagenic effects were also observed for 2-alkylated PCPPs (chloro-2-alkylphenol dimers) on both tester strains. However, some 4-alkylated PCPPs (chloro-4-alkylphenol dimers) were mutagenic on TA100 strain without S9 mix, and great mutagenicity was detected for 4-methylated PCPPs.

PCPPs in aqueous solution were found to be converted to compounds with mutagenicity to TA100 strain without S9 mix, when the solution was subjected to photo-irradiation in the presence of chlorine for 5 h. In addition, a mutagenic effect of 4-methylated PCPPs solution on TA100 strain without S9 mix was shown to be remained about 50% of the original activity, even after treatment with chlorine alone and photo-irradiation in the presence of chlorine for 5 h. However, no mutagenic effects of Irgasan DP300 in aqueous solution were observed after any treatments.

Keywords — polychlorophenoxyphenol ; predioxin ; mutagenicity ; photo-degradation ; chlorination

緒 言

石油・石炭化学工業の工場排水中に存在するフェノール化合物は典型的な水質汚染物質であり、古くからそれらの分析方法、水中挙動及び処理方法に関する研究が行われてきた。しかしながら、水中フェノールの挙動に関したこれまでの論文では中間及び最終変化体についての疑問点がいくつか残されており、^{1,2)} 今後、更に研究を継続し、フェノールに対する水質汚染管理を確立する必要がある。著者らは浄水及び排水処理、特に、塩素処理におけるフェノール

化合物の挙動に興味を持ち、これまでその化学形態の変化と毒性との関連を検討してきた。³⁾ 水中の微量フェノールに対する塩素の作用として、これまで、置換による塩素化フェノール、続いて、酸化による塩素化キノン、さらに、芳香環の開裂による塩素化有機酸及び多価フェノール重合体の生成であることが明らかにされている。^{1,2)} また、このような主反応のほかに副反応として塩素化フェノールの二量体(ポリクロロフェノキシフェノール=PCPPs)の生成が起こること、¹⁾ この二量化はメチル置換フェノール類及びアルキル置換フェノール類と塩素との

Fig. 1. Chemical Structures of Polychlorinated Phenoxyphenols

反応によって、容易に起こることも知られるようになった。^{3,4)}

水中フェノール化合物の塩素処理により生成する PCPPs はそれらのマス・スペクトルの解析から⁵⁾ Fig. 1 に示した化学構造をとると考えられる。これらの PCPPs のうち、2-フェノキシフェノールはプレダイオキシンとも呼ばれ、光又は熱によって容易に塩素化ダイオキシン (PCDDs) に変換される。⁶⁾ かつての工業用クロロフェノールには不純物として数%の PCPPs 及び数百 ppm の PCDDs が含まれていた。⁷⁾ 典型的なプレダイオキシンであるイルガサン DP 300 [5-クロロ-2-(2,4-ジクロロフェノキシ)フェノール] は幅広い抗菌作用を示すところから、わが国で昭和 47 年以来、デオドラント石鹼、薬用石鹼及び消臭剤等として年間 40 トン前後使用されてきた。これら PCPPs は PCDDs と同程度の毒性を示すの

ではないかと疑われているが、⁸⁾ その詳細は明らかでない。また、最近、水中のイルガサン DP 300 は光照射を受けるとその一部が PCDDs に変換⁹⁾ されることも明らかにされた。本研究では、イルガサン DP 300 も含め、各種フェノールの塩素処理により誘導した PCPPs を実験材料とし、これら PCPPs 自体及び水中光分解生成物の遺伝毒性を Ames 試験で検討したので報告する。

実 験

1. 実験材料 実験した各種 PCPPs の名称、出発物質、分子式及び混合組成比を Table I にまとめて示した。イルガサン DP 300 (市販品、純度 99%) 以外の各種 PCPPs は、いずれも既報³⁾ に準じて相当するフェノール化合物水溶液 (1 mmol/l) を次亜塩素酸 Na (4 mmol/l) で処理して合成した。反応混合物のジエチルエーテルによる抽出及びポリアミド 11 F₂₅₄ プレート/クロロホルムを用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離・精製した。TLC で分離・精製した各種の合成 PCPPs は混合物であり、既報³⁾ に準じてガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC-MS) によりそれらの分子式を推定し、水素炎イオン化検出器 (FID)-GC によって組成比を計算した。これら合成 PCPPs 混合物 100 mg を残留農薬分析用メタノール 10 ml に溶かして標準溶液を調整し、使用まで冷暗所に保存した。

TABLE I. Polychlorophenoxyphenols (PCPPs) Tested for Their Mutagenic Effects and Used for Photo-irradiation Studies

Abbreviation of compound tested	Source, or starting material	Formulae	Composition (%)	Abbreviation of compound tested	Source, or starting material	Formulae	Composition (%)
Irgasan DP 300	Commercially	$C_{12}H_7Cl_3O_2$	99	2-Propyl-PCPPs	2-C ₃ H ₇ PhOH	$C_{18}H_{21}ClO_2$ $C_{18}H_{20}Cl_2O_2$ $C_{18}H_{19}Cl_3O_2$	10 34 56
PCPPs	Phenol (PhOH)	$C_{12}H_7Cl_3O_2$ $C_{12}H_6Cl_4O_2$ $C_{12}H_5Cl_5O_2$	3 29 58	4-Propyl-PCPPs	4-C ₃ H ₇ PhOH	$C_{18}H_{20}Cl_2O_2$ $C_{18}H_{19}Cl_3O_2$ $C_{18}H_{18}Cl_4O_2$	40 49 11
2-Methyl-PCPPs	2-CH ₃ PhOH	$C_{14}H_{13}ClO_2$ $C_{14}H_{12}Cl_2O$ $C_{14}H_{11}Cl_3O_2$	19 38 43	4-Butyl-PCPPs	4-C ₄ H ₉ PhOH	$C_{20}H_{25}ClO_2$ $C_{20}H_{24}Cl_2O_2$ $C_{20}H_{23}Cl_3O_2$	3 57 40
4-Methyl-PCPPs	4-CH ₃ PhOH	$C_{14}H_{12}Cl_2O_2$ $C_{14}H_{11}Cl_3O_2$ $C_{14}H_{10}Cl_4O_2$	21 43 36	4-Pentyl-PCPPs	4-C ₅ H ₁₁ PhOH	$C_{22}H_{26}ClO_{12}$ $C_{22}H_{27}Cl_2O_2$ $C_{22}H_{26}Cl_3O_2$	7 44 49
2-Ethyl-PCPPs	2-C ₂ H ₅ PhOH	$C_{16}H_{17}ClO_2$ $C_{16}H_{16}Cl_2O_2$ $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	13 19 68	4-Hexyl-PCPPs	4-C ₆ H ₁₃ PhOH	$C_{24}H_{33}ClO_2$ $C_{24}H_{32}Cl_2O_2$ $C_{24}H_{31}Cl_3O_2$	5 32 63
4-Ethyl-PCPPs	4-C ₂ H ₅ PhOH	$C_{16}H_{16}Cl_2O_2$ $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$ $C_{16}H_{14}Cl_4O_2$	21 41 38	4-Heptyl-PCPPs	4-C ₇ H ₁₅ PhOH	$C_{26}H_{37}ClO_2$ $C_{26}H_{36}Cl_2O_2$ $C_{26}H_{35}Cl_3O_2$	6 30 64

2. 変異原性試験 Table Iに示した各種合成 PCPPs の変異原性はヒスチジン要求の *Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 を用い、矢作¹⁰⁾ のプレインキュベーション法によりラット肝代謝活性化酵素 (S 9 mix の添加及び無添加の系で検討した。S 9 mix は Ames ら¹¹⁾ の方法に従い、ポリ塩化ビフェニル (PCB) を投与したラット (SD 系, 雄性, 6 週齢, 体重 170—230 g) から得た肝ホモジネートを 9000×*g* で 10 分間遠心して、その上清 (S 9-分画) に NADPH-産生系を加えて調製した。

ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて数段階に希釈した各種 PCPPs 試料溶液 0.1 ml, 前培養菌株 0.1 ml, S 9 mix 又はリン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml の混合物を 37°C, 20 分間, 振とう培養した。これに少量のヒスチジン・ビオチンを含む軟寒天 2.0 ml を加えて混合し, 最小グルコース寒天プレートに注ぎ, 37°C で 48 時間培養したのち, プレート上のコロニーをカウントした。各 dose とも 3 枚のプレートを用い, コロニー数/プレートの平均値を計数し, その用量-反応曲線の傾きから変異原性の強弱を判定した。陽性対照としてベンズ [*a*] ピレン (TA 98, + S 9 mix 及び TA 100, + S 9 mix), ニトロフルオレン (TA 98, -S 9 mix) 及びアジ化ナトリウム (TA 100, -S 9 mix) を用い, 使用菌株の特性を検定した。

3. 水中 PCPPs の光分解 リン酸緩衝液 (0.1 mKH₂PO₄/0.05 mNa₂B₄O₇) 100 ml を蒸留水で 10 倍希釈して試験溶液を調製した。また, これに塩素濃度が 20 mg/l となるように次亜塩素酸 Na 溶液 (Nacalai Tesque) を加えて塩素化試験溶液を調製した。次に, 黒布で覆った光化学反応装置 (内容積 1 l)¹²⁾ に各試験溶液を入れ, 20°C, マグネチックスターラーで静かに攪拌しながら各種合成 PCPPs 標準溶液 1 ml を加えて光照射実験を行った。光照射の光源には 365 nm に最大エネルギー波長を持つ 100 W 水銀ランプ [UVL-100 HA, 理工科学産業 (株)] を用い, パイレックスフィルターを装着して 300 nm 以下をカットし, モデル太陽光 (4 mW/cm²/s) とした。¹²⁾ 光照射した溶液の一部 100 ml を採取し, 塩素化試験溶液の場合, 直ちに, 1 M 亜硫酸 Na 溶液を加えて未反応の次亜塩素酸 Na を消去し, ジエチルエーテル (30 ml×2) で残存 PCPPs 及び反応生成物を抽出した。エーテル層に無水硫酸 Na を加えて脱水し, クデルナ・グニッシュ (K・D) 濃縮器, 次いで, 窒素ガスで 0.2 ml まで濃縮し, GC 及び GC-MS 用及び変異原性用の試験溶液とした。尚, 変異原性

試験はこの濃縮液を DMSO 1 ml に溶媒転換し, さらに段階的に DMSO で希釈して行った。

4. GC 及び GC-MS 3 において得られた濃縮試料について下記の条件で GC 及び GC-MS を行い, 未反応 PCPPs 及び光照射生成物の定性及び定量を行った。³⁾

GC 条件——ガスクロマトグラフ; 水素炎イオン化検出器 (FID) 付の島津 GC-6 A, カラム; ガラスカラム (3 mm i.d.×2 m) に 2%OV-1/Uniport-HP (60—80 mesh) を充填したもの, キャリアーガス; He 50 ml/min, 操作温度; 試料注入口及び検出器, 260°C; カラム, 120—260°C (5°C/min)。

GC-MS 条件——GC-MS 装置; 日立 M-003 データ処理装置付の日立 M-80, カラム, 操作温度及びキャリアーガス; GC に同じ, 試料室温度; 250 °C, 加速電子エネルギー; 70 eV, トラップ電流; 70 μ A, マス・スペクトルは電子衝撃 (EI) モードで測定した。

結果 及び 考察

1. イルガサン DP 300 及び関連 PCPPs の変異原性

イルガサン DP 300, 合成 PCPPs 及び合成アルキル化 PCPPs について *Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 を用いた Ames 試験を行い, それらの結果を Table II に示した。三塩素化プレダイオキシンであるイルガサン DP 300 は TA 98 及び TA 100 の各々に対して 1—50 μ g レベルの用量で強い殺菌作用を示したため, いずれの試験系においても変異原性を観察することが出来なかった。なお, 両試験菌に対するイルガサン DP 300 の殺菌作用は肝代謝活性化酵素系 (S 9 mix) の添加によって, 若干, 低下した。一方, フェノールから誘導した四塩素化プレダイオキシン及び五塩素化イソ・プレダイオキシン混合物の合成 PCPPs は TA 98 及び TA 100 に対して 50 μ g レベル以上で殺菌作用を示したため, 試験用量の範囲内で変異原性を観察することが出来なかった。結果を示していないが, イルガサン DP 300 より誘導した五塩素化プレダイオキシンはいずれの試験系においても変異原性を観察することが出来なかった。なお, 両試験菌に対するこれら合成 PCPPs の殺菌作用はイルガサン DP 300 のそれに比べて低下することから, 置換塩素数の増加は試験菌に対する殺菌効果の減少をもたらすものと考えられた。

強い殺菌作用は認められなかったが, 2-メチル-

TABLE II. Mutagenic Effects of Polychlorophenoxyphenols (PCPPs) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with and without S9 Mix

Compound ^{a)} tested	Dose/ plate (μ g)	Mutagenicity ratio ^{b)}				Compound tested	Dose/ plate (μ g)	Mutagenicity ratio			
		TA98		TA100				TA98		TA100	
		−S9	+S9	−S9	+S9			−S9	+S9	−S9	+S9
Irgasan DP 300	1	Tox ^{c)}	0.86	Tox	1.07	2-Propyl-PCPPs	3	1.16	1.23	1.02	1.10
	10	Tox	Tox	Tox	0.50		30	1.08	1.10	1.05	0.97
	50	Tox	Tox	Tox	Tox		300	0.88	1.20	0.79	1.02
PCPPs	1	1.21	1.16	1.20	1.04	4-Propyl-PCPPs	3	1.10	1.15	1.20	1.00
	10	0.88	1.10	1.15	1.20		30	1.05	1.04	1.40	1.20
	50	Tox	0.99	0.72	1.10		300	1.10	1.00	1.60	1.15
2-Methyl-PCPPs	3	0.96	0.89	1.20	1.10	4-Butyl-PCPPs	3	1.24	1.20	1.07	1.13
	30	0.76	0.98	1.00	0.95		30	1.18	1.02	1.05	1.10
	300	0.80	0.93	0.68	1.20		300	0.99	1.20	Tox ^{c)}	1.00
4-Methyl-PCPPs	3	0.88	0.95	1.20	1.12	4-Pentyl-PCPPs	3	1.18	1.20	1.31	1.20
	30	1.20	1.16	2.70	1.15		30	1.04	1.07	1.00	1.15
	300	1.01	1.20	10.50	1.29		300	1.05	1.20	Tox	1.20
2-Ethyl-PCPPs	3	1.25	1.12	1.30	1.28	4-Hexyl-PCPPs	3	1.19	1.30	1.24	1.10
	30	1.05	1.15	1.00	1.14		30	1.22	1.10	1.00	1.08
	300	0.88	1.15	0.92	1.24		300	0.68	1.20	Tox	1.00
4-Ethyl-PCPPs	3	0.87	1.12	0.98	1.00	4-Heptyl-PCPPs	3	1.02	1.20	1.05	1.00
	30	1.20	1.10	1.90	1.20		30	1.22	1.08	1.00	1.15
	300	0.78	1.22	2.73	1.17		300	0.89	1.21	Tox	1.25
Spontaneous (DMSO)	18	25	118	125			18	25	118	125	
2-Nitrofluorene (2.5 μ g)	505	—	—	—			505	—	—	—	
Sodium azide (1 μ g)	—	—	780	—			—	—	780	—	
Benzo[<i>a</i>]pyrene (5 μ g)	—	489	—	763			—	489	—	763	

a) These compounds were tested for mutagenicity in the ranges from 1 μ g to 1000 μ g per plate but no responses were detected, except for 4-methyl-PCPPs, 4-ethyl-PCPPs and 4-propyl-PCPPs.

b) Average of 2 independent testes with 3 plates per dose in each test. Mutagenicity ratio=number of revertants per spontaneous revertants.

c) Toxic effect to the tester strain.

2-エチル-及び2-プロピルフェノールから誘導した2-アルキル化PCPPsは試験した範囲内(0-1000 μ g/プレート)でTA 98及びTA 100に対して変異原性を示さなかった。これに対し、4-メチル-、4-エチル-及び4-プロピルフェノールから誘導した4-アルキル化PCPPsはTA 100(-S9 mix)系において変異原性を示した。しかし、4-ブチル-、4-ペンチル-及び4-ヘキシルフェノールから誘導した4-アルキル化PCPPsはこれらの試験系において変異原性を示さなかった。4-メチル化PCPPs等の変異原性はS9 mixの添加により減少し、肝代謝活性化酵素系で弱変異原性物質に変換されることが示された。したがって、これらの実験結果から、4-アルキル化PCPPsは塩基置換型の直接変異原物質であると考えられる。

4-アルキル化PCPPsのアルキル鎖の長さとこれらの変異原性の強さとの関係をFig. 2に示した。

TA 100(-S9 mix)系における変異原性の強さは、それぞれの試料について得られた用量-反応曲線から最小二乗法により直線回帰式を求め、さらに、試験した試料が塩素置換数の異なる混合物であることを考慮して、平均 μ mol当たりのリバータント数として表現した。Fig. 2にみられるように、4-メチル化PCPPsの変異原性が最も高く(1300 リバータント/ μ mol)、4-エチル化PCPPs(320 リバータント/ μ mol)及び4-プロピル化PCPPs(65 リバータント/ μ mol)の順に弱くなることがわかった。これらの変異原性の強弱が化合物の膜透過性又はDNAとの相互作用のいずれに左右されるかは不明であり、今後の検討課題である。なお、4-メチル化PCPPsの変異原性はジクロロアセトンについて報告されている値と同程度であった。¹³⁾

Fig. 2. Relationship between the Mutagenic Activity of Polychlorinated Phenoxyphenols and the Length of Alkyl Chains at 4-Position on the Aromatic Rings

Mutagenicity assays were conducted at least in duplicate for each sample prepared on a separate day, using TA100 without S9 mix and three plates for each dose. The mutagenic activity of test samples was estimated by least-squares regression analysis of the initial slopes of dose-response curves and was expressed as revertants per mean μmol of the compounds.

2. 水中イルガサン DP300 及び関連 PCPPs の塩素及び光による分解

イルガサン DP 300, フェノールから誘導した PCPPs 及び 4-メチルフェノールから誘導した 4-メチル化 PCPPs 水溶液 (10 mg/l, pH 7 及び 20°C) について, 塩素の共存 (20 mg/l) 及び非共存下でモデル太陽光を用いた光照射実験を行った。これらの光照射液から得られたジエチルエーテル抽出物の FID-GC による分析結果を Fig. 3 に示す。

イルガサン DP 300, 合成 PCPPs 及び 4-メチル化 PCPPs は, 遮光条件下, 塩素無添加の中性水溶液中 (コントロール) で溶解直後に加水分解が認められたが, 5 時間後においても出発物質の 80% 以上が残留し, 比較的安定であった。同じ遮光条件下で塩素を添加すると, イルガサン DP 300 は 30 分後に約 90% の消失となったが, この間, 一部が四及び五塩素化プレダイオキシンに変化し (Fig. 3A), さらにこれら

化合物のエーテル結合の開裂によってクロロフェノールの生成も認められた (Fig. 3B)。フェノール及び 4-メチルフェノールから誘導した合成 PCPPs 及び 4-メチル化 PCPPs は, イルガサン DP 300 と同様, それぞれ, 30 分後に約 70 及び 55% の消失となったが, この間, 一部が更に高塩素化 PCPPs に変化した後, これら化合物の分解に基づくクロロフェノールの生成が認められた。しかし, 合成 PCPPs 及び 4-メチル化 PCPPs は高塩素化 PDPPs も含め, 5 時間後においても, それぞれ, 添加量の 5% 及び 15% の残留が認められた (Fig. 3A)。

塩素の共存しない水溶液に光照射した実験では, イルガサン DP 300, 合成 PCPPs 及び 4-メチル化 PCPPs は, それぞれ, 30 分以内に出発物質の 50% 以上が消失し, 5 時間の照射で, ほぼ 90% 以上の消失が観察された (Fig. 3A)。しかし, これらの実験系ではクロロフェノールの生成は 4-メチル化 PCPPs のみで検出された (Fig. 3B)。一方, 塩素共存下で光照射すると, 出発物質 (Fig. 3A) 及びこれらの分解で生成するクロロフェノールの消失 (Fig. 3B) が速やかに起こることがわかった。

以上の実験結果から, 上水及び下水処理工程にイルガサン DP 300 及びその関連化合物が混入しても塩素の共存下で太陽光により速やかに分解・消失することが考えられる。なお, イルガサン DP 300 水溶液に光照射すると微量の塩素化ダイオキシンが生成すると報告されているが,⁹⁾ この実験で行った水溶液 (pH 7) では検出されなかった。

3. 塩素化及び光分解生成物の変異原性試験

2 で述べた実験結果から, 塩素の存在する水溶液, 光照射のみを行った水溶液及び塩素共存下の光照射水溶液中では, 実験したいずれの塩素化フェノキシフェノールも分解するため, その殺菌作用及び変異原性の消失が予測される。これらの予測を確認するため, 5 時間処理後のエーテル抽出物についてイルガサン DP 300 では TA 98 及び TA 100 を用い, PCPPs 及び 4-メチル化 PCPPs では, Table II の結果から TA 100 を用いた変異原性試験を行った。得られた結果を Table III 及び Fig. 4 に示す。

イルガサン DP 300 の TA 98 及び TA 100 に対する殺菌作用は, GC によるエーテル抽出物の分析結果から予測されたように, 塩素の存在する水溶液, 光照射のみを行った水溶液及び塩素共存下で光照射した水溶液中で速やかに低下した (Table III)。一方, フェノールから誘導した合成 PCPPs の場合, コントロールでは殺菌作用が認められたが, 塩素の存

Fig. 3. Degradation of Polychlorinated Phenoxyphenols (A, 10 mg/l as an Initial Concentration) and Formation of Chlorophenols (B) in Aqueous Solution of pH 7 at 20°C, under Photo-irradiation in the Absence and Presence of Chlorine (20 mg/l)

×, control in the dark; ○, chlorine in the dark; △, photo-irradiation alone; □, photo-irradiation in the presence of chlorine.

Chlorination, photo-irradiation or both reaction products of polychlorinated phenoxyphenols in aqueous solutions (each 100 ml) were extracted with diethyl ether (30 ml × 2). The diethyl ether extracts were dried over anhydrous sodium sulfate powder and then concentrated to 0.2 ml for gas chromatographic analyses with flame ionization detector. The yields were derived from GC peak areas, relative to the area of starting materials.

Fig. 4. Mutagenic Effects on TA100 (–S9 mix) of PCPPs (A) and 3-Methyl-PCPPs (B) after Photo-irradiation in the Absence and Presence of Chlorine in Aqueous Solutions for 5 h at pH 7 and 20°C

×, control in the dark; ○, chlorine in the dark; Δ, photo-irradiation alone; □, photo-irradiation in the presence of chlorine.

Diethyl ether extracts described in Fig.3 were re-dissolved into 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO), with subsequently serial dilutions for their mutagenicity assays. The mutagenicity assays were conducted in the absence of metabolic activation with S9 mix. The plots in this figure show the mean value of three plates for each sample.

TABLE III. Mutagenic Effects of Irgasan DP 300 on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with and without S9 mix, after Photo-irradiation in the Absence and Presence of Chlorine for 5 h at 20°C in Water (pH 7)

Experiments	Dose (μg) per plate	Mutagenicity ratio ^{a)}			
		TA98		TA100	
		–S9	+S9	–S9	+S9
Control in the dark	1	Tox ^{b)}	0.86	Tox	1.07
	10	Tox	Tox	Tox	0.50
	50	Tox	Tox	Tox	Tox
	100	Tox	Tox	Tox	Tox
Chlorine in the dark	1	1.36	0.86	0.53	0.87
	10	Tox	0.55	Tox	0.86
	50	Tox	Tox	Tox	1.00
	100	Tox	Tox	Tox	Tox
Photo-irradiation alone	1	1.07	0.91	0.78	0.75
	10	0.28	0.63	0.35	0.77
	50	Tox	0.91	Tox	1.00
	100	Tox	0.40	Tox	0.91
Photo-irradiation in the presence of chlorine	1	1.00	1.00	1.15	0.87
	10	1.02	0.71	0.31	0.86
	50	Tox	1.06	Tox	0.77
	100	Tox	1.06	Tox	0.86
Spontaneous (DMSO)		16	28	105	113
2-Nitrofluorene	2	388	—	—	—
Sodium azide	1	—	—	838	—
Benzo[a]pyrene	5	—	533	—	722

^{a)} Average of 2 independent tests with 3 plates per dose in each test.

Mutagenicity ratio = number of revertants per spontaneous revertants.

^{b)} Toxic effect to the tester strain.

在する水溶液及び光照射のみを行った水溶液中では TA 100 (−S 9 mix) に対する殺菌作用の低下が認められた (Fig. 4A). しかし、塩素共存下で光照射した水溶液中では、TA 100 (−S 9 mix) に対して変異原性を示す新たな化合物の生成が示唆され、S 9 mix の添加で変異原性が低下した。また、4-メチルフェノールから誘導した合成 4-メチル化 PCPPs は光照射のみを行った水溶液中では TA 100 (−S 9 mix) に対する変異原性が消失したものの、塩素の存在する水溶液及びこれに光照射した水溶液中ではコントロールの変異原性の約 50% が残留する結果を得た (Fig. 4B).

現在のところ、Fig. 4 に示した変異原性物質の新たな生成を説明できるデータを著者らは得ていないが、今後、塩素共存下で光照射した場合の変異原性の経時変化及び生成物の詳しい解析を行う予定である。なお、上水及び下水処理工程で起こるような塩素との反応生成物及び塩素共存下の光分解生成物の安全性評価はこれまでのような化学分析のみの結果だけでは不十分である。したがって、塩素化フェノキシフェノールを含め、水中における有機物と塩素との反応生成物及びそれらの光分解生成物については化学分析とバイオアッセイを組み合わせる方法により今後も更に検討を続ける必要がある。

結 論

塩素処理により水中フェノール化合物から生成する塩素化フェノールの二量体：塩素化フェノキシフェノール (PCPPs=プレダイオキシン及びイソ・

プレダイオキシン) を実験材料にして、それらの変異原性を Ames 試験で検討し、さらに、塩素共存下及び非共存下でモデル太陽光を用いた光照射実験を行った。これらの実験結果から次のような結論を導き得るものと考えられる。

典型的なプレダイオキシンである市販のイルガサン DP 300 及びフェノールから誘導した PCPPs は TA 98 及び TA 100 に対して強い殺菌作用を示し、変異原性を観察することが出来なかった。これに対し、いくつかの低級アルキルフェノールから誘導した 4-アルキル化 PCPPs は TA 100 (−S 9 mix) の系で変異原性を示し、その中で、4-メチル化 PCPPs の変異原性が顕著に高いことがわかった。2-アルキルフェノール及びブチルフェノールを含めた高級アルキルフェノールから誘導した 2- 及び 4-アルキル化 PCPPs はいずれの試験系においても変異原性が認められなかった。

塩素の存在しない水溶液中で光照射するとイルガサン DP 300、合成 PCPPs 及び 4-メチル化 PCPPs の濃度は速やかに低下した。塩素の存在する水溶液中では実験した PCPPs は高塩素化 PCPPs に変換された後、消失する傾向がみられ、さらにこの実験系に光照射することにより分解反応が促進される結果を得た。しかし、塩素共存下で光照射すると、合成 PCPPs 及び合成 4-メチル化 PCPPs から TA 100 に対して変異原性を示す新たな化合物の生成が示唆された。これらの結果は水の安全性を評価するために化学分析とバイオアッセイの組み合わせが重要であることを示す。

引 用 文 献

- 1) S. Onodera, T. Udagawa, M. Tabata, S. Ishikura, S. Suzuki, *J. Chromatogr.*, **287**, 176 (1984).
- 2) S. Onodera, K. Yamada, Y. Yamaji, S. Ishikura, *J. Chromatogr.*, **288**, 91 (1984).
- 3) S. Onodera, M. Takahashi, S. Suzuki, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 20 (1993).
- 4) S. Onodera, M. Ogawa, C. Yamawaki, K. Yamanishi, S. Suzuki, *Chemosphere*, **19**, 675 (1989).
- 5) J.A. Balantine, C.T. Pillinger, *Org. Mass Spectrom.*, **1**, 447 (1968).
- 6) S. Jensen, L. Remberg, *Ambio*, **1**, 62 (1972).
- 7) D. Firestone, J. Ress, N.L. Brown, R.P. Barron, J.N. Damico, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **55**, 85 (1972).
- 8) M. Deinzer, T. Miller, D. Griffin, J. Lamerton, R. Inman, Abstract of Papers, ACS/CJS Chemical Congress, Honolulu, Hawaii, April, 1979 *Envir. Sect.*, p.300.
- 9) 兼俊明夫, 小川 広, 桂 英二, 金島弘恭, *環境化学*, **2**, 515 (1992).
- 10) 矢作多貴江, *蛋白質・核酸・酵素*, **20**, 1178 (1975).
- 11) J. McCann, N.E. Spingarn, J. Kobori, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 972 (1975).
- 12) S. Onodera, K. Yoshimatsu, S. Nakano, H. Saitoh, S. Suzuki, *Eisei Kagaku*, **34**, 389 (1988).
- 13) B. Holmbom, R.H. Voss, R.D. Mortimer, A. Wong, *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 333 (1984).