

R-129-'91

先端技術における化学環境の解明に関する研究(I)

Studies for a Systematic Evaluation of Chemosphere under Highly Advanced Technologies(I)

塩化ジベンゾフランとダイオキシン

Chlorinated Dibenzofurans and Chlorinated Dibenzodioxins

昭和62年度～平成元年度 特別研究報告

Research Report for FY 1987~1989

NIES

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

Research Report from the National Institute for Environmental Studies, Japan, No. 129, 1991

国立環境研究所研究報告 第129号

先端技術における化学環境の解明に関する研究(I)

Studies for a Systematic Evaluation of Chemosphere under Highly Advanced Technologies(I)

塩化ジベンゾフランとダイオキシシン

Chlorinated Dibenzofurans and Chlorinated Dibenzodioxins

昭和62年度～平成元年度 特別研究報告

Research Report for FY 1987~1989

環境庁 国立環境研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「先端技術における化学環境の解明に関する研究」

(期間 昭和62年度～平成3年度)

本研究報告 (I)「塩化ジベンゾフランとダイオキシン」

(研究期間 昭和62年度～平成元年度)

特別研究責任者：松下秀鶴 計測技術部 部長 (昭和62～63年度)

森田昌敏 計測技術部 部長 (平成元年度)

特別研究幹事：森田昌敏・相馬悠子

報告書編集担当：相馬悠子

序

最近の高度先端技術下の社会においては、いろいろな材料が、いろいろな用途に使用されており、それらが生産や使用の過程であるいは廃棄の過程で化学変化を受け有害な物質として環境を汚染することが少なくない。ポリクロロジベンゾフランやポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン(“ダイオキシン”)はこれらの中でも最も毒性の強いものであり、社会的関心の強い物質である。このような非意図的に生成する化学物質については、その生成の機構に不明の点が多く、また汚染物質が極微量であるために、その環境存在量の決定や健康影響の評価には、難しいことが多い。

ポリクロロジベンゾフラン及びポリクロロジベンゾジオキシンの毒性は強く化学構造に依存し、極めて毒性の高い2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンから、ほとんど毒性のないクロロジベンゾジオキシンやフランの異性体にいたるまで各種の異性体と同族体が存在すると言われている。しかしそれら異性体と同族体の環境存在量や毒性については知られていない部分が多く、それらについての科学的知見を集積することがまず重要であった。

国立環境研究所では、水道水中にモノクロロジベンゾフランを極めて微量ながら検出したのを契機として、モノクロロジベンゾフランの各種異性体の生成機構と毒性に関する研究を始めた。この研究はさらに、特別研究「先端技術における化学環境の解明に関する研究」に受け継がれ、毒性の強いテトラクロロジベンゾフランやテトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン等の汚染実態の解明へと進んできた。今回、それらの成果を、ある程度まとめることができたので、ここに公表する次第である。本報告に対して、この問題に関心を持たれる方々からのご意見、ご批判を歓迎したい。

本研究は元所長江上信雄博士の特別のご指導により始まったものであった。江上博士は、所長ご勇退後病に倒れ、昨年10月に逝去された。一周忌にあたる本月、ご冥福をお祈りしつつ、研究がまとめられたことをご報告したい。

平成2年10月

国立環境研究所

所長 小 泉 明

目 次

Abstract	1
研究の意義と概要	3
森田昌敏	
I クロロジベンゾフランとジベンゾ-<i>p</i>-ジオキシンの化学と環境中の挙動	
1 大気粉じん中のポリクロロジベンゾ- <i>p</i> -ジオキシン及びポリクロロジベンゾフラン	9
森田昌敏・伊藤裕康・安原昭夫	
2 母乳及びミルク中のクロロジベンゾ- <i>p</i> -ジオキシン	21
森田昌敏・伊藤裕康・安原昭夫	
3 湖沼底質中のクロロジベンゾ- <i>p</i> -ジオキシン, ジベンゾフランの分析	27
田中 敦・伊藤裕康・相馬光之・森田昌敏	
4 霞ヶ浦における湖水中の多環芳香族化合物濃度とその年変動	39
白石寛明	
5 塩化ビニリデン樹脂の熱分解による芳香族塩素化合物の生成	49
安原昭夫	
6 粘土鉱物表面でのクロロフェノールの反応 —ヒドロキシジベンゾフラン化合物の生成—	65
相馬悠子・相馬光之・伊藤裕康	
7 モノクロロジベンゾフランの合成	75
白石寛明・大槻 晃	
II クロロジベンゾフランの生体内動態と毒性	
1 ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝	
I 生体内における動態	89
遠山千春・平野靖史郎・鈴木和夫	
2 ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝	
II 代謝産物の同定	103
平野靖史郎・遠山千春・三森文行・伊藤裕康・鈴木和夫	
3 3-クロロジベンゾフランの変異原性とその代謝活性化	115
松本 理・安藤 満	

4	ウズラ発育卵でのクロロジベンゾフランの毒性評価	127
	高橋慎司・森田昌敏	
5	3-ニトロジベンゾフランと3-アミノジベンゾフランの変異原性	133
	宇野由利子・植弘崇嗣・安原昭夫・森田昌敏	

Contents

Abstract	1
Outline and Significance of the Study	3
Masatoshi MORITA	
I Chemistry and Environmental Behaviour of Chlorinated Dibenzofurans and Dibenzo-<i>p</i>-dioxins	
1 Chlorinated Dibenzodioxins and Chlorinated Dibenzofurans in Urban Atmospheric Particulate Matter	9
Masatoshi MORITA, Hiroyasu ITO and Akio YASUHARA	
2 Chlorinated Dibenzodioxins in Human Breast Milk and Dried Milk	21
Masatoshi MORITA, Hiroyasu ITO and Akio YASUHARA	
3 Determination of Polychlorinated Dibenzo- <i>p</i> -dioxins and Dibenzofurans in Lake Sediment Samples	27
Atsushi TANAKA, Hiroyasu ITO, Mitsuyuki SOMA and Masatoshi MORITA	
4 Monitoring of the Levels of Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Lake Kasumigaura Water	39
Hiroaki SHIRAISHI	
5 Formation of Chlorinated Aromatic Compounds by Pyrolysis of Poly(vinylidene chloride)	49
Akio YASUHARA	
6 Reactions of Chlorophenols Adsorbed on Clay Minerals — Formation of Hydroxydibenzofurans —	65
Yuko SOMA, Mitsuyuki SOMA and Hiroyasu ITO	
7 Synthesis of Chlorodibenzofuran Isomers	75
Hiroaki SHIRAISHI and Akira OTSUKI	
II Metabolism and Toxicity of Chlorinated Dibenzofurans	
1 Metabolism of 2-Chlorodibenzofuran in the Rat.	
I. Metabolic Behavior and Fate	89
Chiharu TOHYAMA, Seishiro HIRANO and Kazuo T. SUZUKI	

2	Metabolism of 2-Chlorodibenzofuran in the Rat.	
	II. Identification of the Metabolites	103
	Seishiro HIRANO, Chiharu TOHYAMA, Fumiya MITSUMORI, Hiroyasu ITO and Kazuo T. SUZUKI	
3	Mutagenicity of 3-Chlorodibenzofuran and its Metabolic Activation	115
	Michi MATSUMOTO and Mitsuru ANDO	
4	Toxicological Evaluation for Chlorodibenzofuran by Hatching Eggs of the Japanese Quail	127
	Shinji TAKAHASHI and Masatoshi MORITA	
5	Mutagenicity of 3-Nitrodibenzofuran and 3-Aminodibenzofuran	133
	Yuriko UNO, Takashi UEHIRO, Akio YASUHARA and Masatoshi MORITA	

Abstract

This report contains two categories of study: one is the chemistry and environmental levels of chlorinated dibenzofurans and chlorinated dibenzodioxins and the other is on the toxicity of these compounds.

In the former studies, formation of monochloro-dibenzofurans and its derivatives was newly identified in the pyrolysis of vinylidene polymer and in the catalytic dimerization of chlorophenols on clay mineral surface. Trace analytical approach was made on the toxic chlorodibenzofurans and dibenzodioxins in urban atmospheric particulate matter, in sediments and in human breast milk. The concentration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (2,3,7,8-TCDD) in atmospheric particulate matter in Tokyo area showed a seasonal variation, being high in winter and low in summer, with an average concentration of $9.6\text{fg}/\text{m}^3$. The concentration of 2,3,7,8-TCDD in human breast milk was $5.6\text{pg}/\text{g}$ fat in average, indicating that the level was similar to those in European and American countries. The analysis of sediment core samples in Lake Kasumigaura showed that the level of polychlorinated dibenzofurans and dioxins was increased during recent 60-70 years.

The toxicological study was focussed to monochlorodibenzofuran especially 2-chlorodibenzofuran which was identified in supplied water. 2-Chlorodibenzofuran was rapidly metabolized when it was administered to rats intraperitoneally. 86 percent of its radioactivity was detected in urine, gut content and feces within 24 hours. 3-Chlorodibenzofuran was less rapidly metabolized than 2-chloro-isomer and tended to be retained in adipose tissue. Metabolites of 2-chlorodibenzofuran were identified as several hydroxylated compounds. Mutagenicity test using Ames' test indicated that 3-chloro-isomer was moderately and 2-chloro-isomer was weakly mutagenic. Toxicity test using Japanese quail embryo showed the toxicity of these compounds was weak. Amino- and nitro-derivatives of dibenzofuran were strongly mutagenic.

研究の意義と概要

Outline and Significance of the Study

森田昌敏¹

Masatoshi MORITA¹

ポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン類 (Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, PCDD) 及びポリクロロジベンゾフラン類 (Polychlorinated dibenzofurans, PCDF) は、特異な毒性を持つ化合物である。基本骨格の塩素置換数及び塩素置換位置により毒性が大きく異なり、構造活性相関と関連して興味ある研究対象となっている。また、これらの物質の微量暴露により、前者においては、イタリアのセブソの中毒やベトナムでの奇型児との関連が指摘されており、また後者については、カネミ油症等の中毒が発生している。さらには、PCDDの一つである2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンは、強い発ガン性を持つことが証明されてきており、そのリスクの評価と関連して、その発生源と環境存在量の把握が重要な課題となりつつある。

クロロジベンゾジオキシンの発生源としては、2,4,5-トリクロロフェノールとその関連化合物の合成過程が重要であったが、その後の研究により、いろいろな燃焼過程、中でもゴミ焼却炉における発生が無視しがたいことが明らかとなってきている。また、塩素漂白過程での生成についても明らかとなってきている。水道水の塩素滅菌処理においても、ある種のクロロジベンゾフランが生成することが明らかとなり、その毒性評価が必要となっている。

以上のような背景から、クロロジベンゾ-*p*-ジオキシンやクロロジベンゾフランについての研究を所内特別経常研究や特別研究「先端技術における化学環境の解明に関する研究」の中で実施してきた。本報告は、現時点でその成果をとりまとめたものであり、内容的には2部に分かれている。1部はクロロジベンゾジオキシンとクロロジベンゾフランの化学と環境中の挙動に関するものであり、2部はモノクロロジベンゾフラン類の毒性に関するものである。

クロロジベンゾフラン及びクロロジベンゾジオキシンの化学と環境中の挙動に関する研究においては、これらの物質の生成機構と環境汚染レベルに関する研究を中心として行っている。熱反応として、塩化ビニリデン樹脂の熱分解を行った結果、いくつかのモノクロロジベンゾフラン異性体が生成していることが明らかとなった。また粘土鉱物表面において、クロロフェノールから、

1. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

重合によりクロロヒドロキシジベンゾフランが生成する新しい反応も見いだされた。水道水中のモノクロロジベンゾフランの源として、天然に含まれるジベンゾフラン等が考えられた。これを明らかとするために行った湖水中の多環芳香族化合物濃度の年変動に関する調査で、湖水中には約 1 ppt のジベンゾフランが検出されたが、その濃度は低く、他の供給源の寄与に考えざるを得ないという結論となっている。

クロロジベンゾジオキシン及びクロロジベンゾフランの環境残留については、毒性の高いかつ環境残留性の高いと考えられるテトラクロロ体以上の塩素数を持つ異性体、同族体について行った。大気粉じん中のダイオキシンの分析において、我が国で初めて 2,3,7,8-TCDD の検出に成功し、その濃度が平均 9.6 fg/m^3 であることを明らかとした。ポリクロロジベンゾ-p-ジオキシンの湖底質中の分析において、クロロジベンゾジオキシンは表層に分布し、汚染が新しいこと、また 1,3,6,8-TCDD, 1,3,7,9-TCDD, OCDD のような異性体が多く含まれていることが明らかとなった。これらの成分は、農薬又は工業薬品の不純物として環境中に放出されたと推定される。人体汚染として母乳の分析も行った結果、2,3,7,8-TCDD の濃度は平均 5.6 pg/g 脂肪であり、米欧諸国の水準とほぼ同じであることが明らかとなった。同時に行ったドライミルクの分析では、2,3,7,8-TCDD はドライミルクにおいて低く、人体の汚染の方がより高いことをうかがわせる。

クロロジベンゾフランの毒性については、特にモノクロロ体の 3 種の異性体を用いて研究を行った。ラットに 2-クロロジベンゾフランを投与した場合の生体内動態及び毒性に関する研究において、本化合物は 24 時間以内に 86% が尿、腸内容物、糞として検出され、速やかに代謝されることが明らかとなった。3-クロロジベンゾフランは 2-クロロ体よりもやや遅く代謝され、皮下脂肪等に蓄積する傾向が強いことが観察された。また代謝産物についての研究において、2-クロロ-3,7-ジヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-3-ヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-7-ヒドロキシジベンゾフランが同定され、2-クロロジベンゾフランは肝において速やかに代謝され抱合体として排せつされることが明らかとなった。変異原性を調べた研究において、Ames テストで、弱い変異原性を 3-クロロジベンゾフランが持つことが明らかとなった。またニトロ体は、より強い変異原性を持つことも明らかとなった。以上総合的に考えると、モノクロロジベンゾフランは、弱い変異原性を持つが、毒性は全体として弱いのではないかと考えられる。

1 研究組織

本特別研究担当者のうち、本報告の作成には以下に示す研究者が携わった。

特別研究責任者 計測技術部長 松下秀鶴（昭和62～63年度）
 化学環境部長 森田昌敏（平成元年度）

地域環境研究グループ

化学物質健康リスク評価研究チーム 相馬悠子・白石寛明
 有害廃棄物対策研究チーム 安原昭夫
 大気影響評価研究チーム 安藤 満
 都市影響環境評価研究チーム 高橋慎司

化学環境部

計測技術研究室 植弘崇嗣
 計測管理研究室 伊藤裕康
 動態化学研究室 相馬光之・田中 敦
 化学毒性研究室 宇野由利子

環境健康部

病態機構研究室 鈴木和夫・平野靖史郎
 保健指標研究室 遠山千春・三森文行・松本 理

客員研究員

東京水産大学 大槻 晃（平成元年度）

2 研究成果一覧

A 誌上発表

- 1) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki, and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.
- 2) 森田昌敏(1987): ダイオキシンの汚染と毒性, *保健の科学*, **29(4)**, 216p.
- 3) Asada, S., H. Matsushita, M. Morita and Y. Hamada (1987): Determination of chlorodibenzo-dioxins and chlorodibenzofurans discharged from several municipal incinerators in Japan. *Chemosphere*, **16**, 8/9, 1907.
- 4) Miura, T. and Y. Takahashi (1987): The induction by monochlorodibenzofuran isomers of xenobiotic metabolizing systems in cell lines derived from rat and human hepatoma. *Toxicol. Vitro*, **4(3)**, 185-192.
- 5) Morita, M., A. Yasuhara and H. Ito (1987): Isomer specific determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxine and dibenzofurans in incinerator related samples in Japan. *Chemos-*

phere, **16**, 8/9, 1959.

- 6) 森田昌敏(1987): 土壤中のダイオキシン類の浸出特性と分析法. PPM, **3**, 17.
- 7) 森田昌敏(1987): 有害化学物質における最近の知見—ダイオキシン類を中心として. 日本機械学会第600回講習会資料, 21-26.
- 8) Matsumoto, M., M. Ando, Y. Ohta (1988): Mutagenicity of monochlorodibenzofurans detected in the environment. Toxicol. Lett., **40**, 21-28.
- 9) 松本 理・安藤 満・太田庸起子(1988): 一塩化ベンゾフラン4異性体の変異原性. 衛生化学, **34**, 184-187.
- 10) 森田昌敏(1988): ダイオキシン及びその関連物質と発癌. BIOmedica, **3(8)**, 791.
- 11) 森田昌敏(1988): 水中の有機塩素化合物の分析法, 用水と廃水, **30(8)**, 749.
- 12) Yasuhara, A. and M. Morita (1988): Formation of chlorinated aromatic hydrocarbons by thermal decomposition of vinylidene chloride polymer. Environ. Sci. Technol., **22**, 646-650.
- 13) Soma, Y. and M. Soma (1989): Formation of hydroxydebenzo furans from chlorophenols adsorbed on Fe-ion exchanged montmorillonite. Chemosphere, **18**, 1895-1902.
- 14) Hirano, S., C. Tohyama, F. Mitsumori, H. Ito, and K. T. Suzuki(1991): Identification of metabolites of 2-chlorodibenzofuran in the rat. Arch. Environ. Toxicol., **20**, 67-72.
- 15) Yasuhara, A. and M. Morita (1989): Formation of chlorodibenzofurans by decomposition of vinylidene chloride polymer. Chemosphere, **18**, 1737-1740.
- 16) Uno, Y., H. Matsusita, T. Uehiro, A. Yasuhara, and M. Morita (1991): Mutagenicity of 3-nitrodibenzofuran and 3-aminodibenzofuran. Toxicol. Lett. acceptance., **55**, 31-37.

B 口頭発表

- 1) 高橋勇二・三浦 卓(1987): モノクロロジベンゾフランによるラット肝癌細胞の異物代謝系の誘導. 第60回日本生化学会大会, 金沢.
- 2) 高橋勇二・三浦 卓(1987): モノクロロジベンゾフランのラット肝癌細胞への毒性とチトクロームP-450の誘導. 環境科学シンポジウム1987, 東京.
- 3) 遠山千春・平野靖史郎・鈴木和夫(1987): ラットにおける2-クロロジベンゾフランの生体内挙動, 第57回日本衛生学会総会, 東京.
- 4) 相馬悠子・坂口真光・相馬光之(1988): 粘土鉱物上でのクロロフェノールの反応—鉄イオンと水の影響—. 日本化学会第56春季年会, 東京.
- 5) Soma, Y., M. Sakaguchi and M. Soma (1988): Reaction of chlorophenols on montmorillonite and allophane. 6th 9nt. Conf. on Surface & Colloid Sci., 箱根.
- 6) 平野靖史郎・遠山千春・三森文行・鈴木和夫(1988): ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝. 環境科学会1988年会, 東京.

- 7) 松本 理・安藤 満(1988)：一塩化ジベンゾフランの代謝活性化と変異原性. 第58回日本衛生学会総会, 岡山.
- 8) 松本 理・安藤 満・太田庸起子(1988)：一塩化ジベンゾフラン 4 異性体の変異原性. 日本薬学会第108年会, 広島.
- 9) 宇野由利子・松下秀鶴・植弘崇嗣・安原昭夫・森田昌敏(1989)：3-ニトロジベンゾフラン (3-NDBF) と3-アミノジベンゾフラン (3-ADBf) の変異原性. 日本環境変異原学会第18回大会, 東京.
- 10) 宇野由利子(1989)：3-ニトロジベンゾフラン(3-NDBF)と3-アミノジベンゾフラン(3-ADBf) の変異原性. 国立公害研究所所内研究発表会, 筑波.
- 11) 三浦 卓・高橋勇二・局 博一・河田明治・横山栄二(1989)：培養細胞の異物代謝活性誘導能による毒性評価法の開発. 動物実験代替法研究会第3回大会, 横浜.
- 12) 森田昌敏(1989)：塩化ダイオキシンと塩化ジベンゾフランについて. 国立公害研究所所外研究発表会, 筑波.
- 13) 安原昭夫(1989)：塩素系ポリマーの熱分解生成物について. 第4回全国公害研究所交流シンポジウム, 筑波.
- 14) 安原昭夫(1989)：ダイオキシン関連物質の生成機構. 第16回水質汚濁研究協会セミナー, 東京.

用語について

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) の日本語訳は一定しておらず、文部省学術用語審議会編の学術用語集にそった名称はポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンとなるが、“ダイオキシン” “塩化ダイオキシン” “ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン” “ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン” 等の名称が一般に使われていることが多い。

この論文集では、1つの物質名に対しては、例えば2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン、総称としてはクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンを使用した。

文章の中で通称の方が分かりやすいとき“ダイオキシン”とし、又論文集の表題にも通称を使用した。

Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) についても同じようにした。

I クロロジベンゾフランとジベンゾ-*p*-ジオキシンの
化学と環境中の挙動

**Chemistry and Environmental Behaviour
of Chlorinated Dibenzofurans
and Dibenzo-*p*-dioxins**

I-1 大気粉じん中のポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン及び ポリクロロジベンゾフラン

Chlorinated Dibenzodioxins and Chlorinated Dibenzofurans in Urban Atmospheric Particulate Matter

森田昌敏¹・伊藤裕康¹・安原昭夫²

Masatoshi MORITA¹, Hiroyasu ITO¹ and Akio YASUHARA²

要 旨

大気粉じんを東京都内で1年間サンプリングし、その中に含まれるポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (PCDD) 及びポリクロロジベンゾフラン (PCDF) の定量をキャピラリカラムガスクロマトグラフィー・高分解能質量分析法を用いて行った。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) の濃度は冬に高く、夏に低い季節変動を示し、通年での平均濃度は、9.6 fg/m³であった。その他のPCDD類も同様な季節変動を示した。また、PCDF類も同様な季節変動を示し、その濃度はPCDDより、幾分高めであった。大気粉じん中のこれらの物質の異性体パターンは、ゴミ焼却炉のそれと類似しており、起源として燃焼過程が主体であろうと推定された。

Abstract

Urban air particulate matter was collected in Tokyo metropolitan area through one year and analyzed for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) by capillary column gas chromatography/high resolution mass spectrometry. The concentration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was high in winter and low in summer with annual average of 9.6 fg/m³ through year. Other PCDD and PCDF (chlorine 4-8) showed a similar seasonal variation. The concentrations of PCDFs were slightly higher than those of PCDDs. The isomer pattern of these compounds in urban particulate matter was quite similar to that of municipal incinerator source suggesting that the origin was of burning process.

1. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

ポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン類 (PCDD) やポリクロロジベンゾフラン類 (PCDF) は、ゴミ焼却炉等の焼却過程からも生成することが明らかとなっている¹⁾。その結果として、環境大気中にその存在が見いだされている。

1984年に環境庁は、緊急調査として、都市ゴミ焼却と関連して環境大気中のPCDD及びPCDFの検出を行った。その結果は、PCDD及びPCDFが一般環境大気中からも検出されたが最も強毒性の異性体である、2,3,7,8-TCDDは検出されなかった。

その後、分析技術の向上があり、また一方で、“ダイオキシン”類の毒性の評価のためには、異性体の精密な定量が必要であることが明らかとなるに伴って、環境大気中から極微量の“ダイオキシン”類の定量を行うことが必要となってきた。このため環境大気中からの検出を試みることにした。“ダイオキシン”類の蒸気圧は比較的lowく、このため大気中の“ダイオキシン”類は、大気粉じんに含まれて存在しやすいこと、また試料の採取及び保存が容易であることを考慮して、大気粉じんを分析対象とすることとした。また一般環境大気中の“ダイオキシン”濃度が極めて低いことを考慮して、高感度及び高精度の分析手法の開発も行うことにした。

2 分析法の検討

2.1 ガスクロマトグラフ質量分析装置

日本電子製JMS-SX-102質量分析計/Hewlett Packard製5890Jガスクロマトグラフを用いた。またデータ処理システムとしてはJMA-DA 6000を用いて、高分解能SIM測定を、グルーピング法を併用しつつ行った。典型的な装置操作条件は以下のとおりである。

GCカラム	スベルコ SP 2331 (0.25mm ϕ \times 0.1 μ m 厚 \times 30m)
カラム温度	100°C (1 min.) \rightarrow 250°C (10°C/min.)
注入	スプリットレス, 注入口温度 280°C
MS	イオン源 EI, 温度 300°C, イオン化電流 600 μ A
加速電圧	10KV
スリット	主: 4 α : 0.85mm, β : 2.8mm, 分解能約 10,000
イオンマルチプライヤー電圧	2.5KV

2.2 大気粉じん試料のサンプリング及び前処理

大気粉じん試料は、国立公衆衛生院地域環境部長松下及び田辺主任研究企画官の協力を得て、国立公衆衛生院屋上でサンプリングしたものである。ほとんどのハイボリュームサンプラーを用いて24時間で2,000 m³の空気吸引により、あらかじめ加熱処理したパルフレックス®フィルター上に大気粉じんを集めた。集めた大気粉じん試料は、内側に2つ折りした後アルミホイルで包み、-20°Cに保存した後、分析に供した。

大気粉じん試料を含むフィルターを、あらかじめ洗浄した円筒ろ紙につめ、内部標準として ^{13}C -2,3,7,8-TCDD, ^{13}C -2,3,7,8-TCDF, ^{13}C -OCDD, ^{13}C -OCDFを内部標準をして加えソックスレー抽出を行った。トルエン溶媒を用いて、約8時間、200回程度の還流を行った。抽出後、トルエンをエバポレーターで留去し、ヘキサンに転溶した。ヘキサン溶液を分液ロートに移し、濃硫酸と共に振とうし、硫酸層を捨てる。再び硫酸を加えて分配を行い、ヘキサン層を集めて濃縮し、アルミナカラムクロマトグラフを行う。6×200 mmのカラムに、アルミナ3 gを充てんし、ヘキサン50 mlで展開する。ついで、“ダイオキシン”画分をヘキサン/ジクロロメタン(50:50)40 mlとして得る。この画分を濃縮して一定容量(約100 μl)とし、GC/MSに注入した。

3 結果及び考察

3.1 分析法の検討

高分解能GC/MS法において、検出限界を明らかとする実験を行った。GCカラムとしてDB-1及びSP-2331の2本のキャピラリカラムを用い、5つのTCDDについて、その検出下限を調べた。MSの分解能を10,000と設定して実験を行った。各異性体1 pgのSIMクロマトグラムを図1に示す。

2,3,7,8-TCDDについて求めた検出限界は、DB-1を用いた場合で約10 fg, SP-2331を用いた場合約50 fgであった。SP-2331で検出限界が高い理由として、カラムの熱不安定性が考えられる。

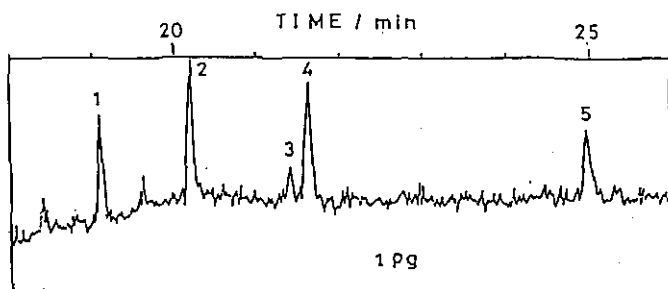


図 1 テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン異性体(1pg)のSIMクロマトグラム

- 1: 1,3,6,8-TCDD
- 2: 1,3,7,8-TCDD
- 3: 2,3,7,8-TCDD
- 4: 1,2,3,4-TCDD
- 5: 1,2,8,9-TCDD

Fig. 1 SIM chromatogram of TCDD isomers(1 pg injection)

- 1: 1,3,6,8-TCDD
- 2: 1,3,7,8-TCDD
- 3: 2,3,7,8-TCDD
- 4: 1,2,3,4-TCDD
- 5: 1,2,8,9-TCDD

PCDD及びPCDFの多数の異性体を分析するためには、多数のSIMチャンネルを用意すると共に、ガスクロマトグラフの保持時間の差を利用して測定を利用することが重要である。このため塩素置換数の違いによりグルーピングを行って分析を行うこととなる。グルーピングを行って測定する場合のクロマトグラフにおける分離状況を知るために、ゴミ焼却炉フライアッシュ抽出物を用いて分析を行った。図2に四塩化から八塩化までのPCDD、PCDFのクロマトグラムを示す。測定のTime Windowのあげ方をうまく設定することにより、1回の注入によって、全塩化物領域の測定が可能であった。なおSP-2331は耐熱性には問題があり、八塩化物の分析は難しく、一方DB-1には、TCDDを始めとする各異性体の分離が十分でないという問題があり、Isomer Specificの分析には両カラムを併用することになるので、実際上は2～3回の注入となる。フライアッシュ抽出物中の2,3,7,8-TCDDの分析はSP-2331を用いて行った。そのクロマトグラムは図5に示される。検出濃度は0.31 ppbに相当した。

3.2 大気粉じん中の塩化“ダイオキシン”及びフラン

2,3,7,8-TCDDの大気粉じん中濃度は、冬に高く、夏に低い季節変動を示し、通年での平均濃度は 9.6 fg/m^3 であった(表1, 図3)。またその他のPCDD同族体及びPCDF同族体の分析値も同様な傾向を示し(図4)、冬は夏の約10倍の濃度であることが明らかとなった。

PCDF同族体とを比較すると、いくぶんPCDDの方が多量である。6～8月の夏場にPCDD濃度が低いことは、①冬に逆転層の生成によって大気中に滞在しやすいこと、②気温が低く、ハイボリュームサンプラーに捕集された物質が逃げにくいこと、③夏期における大気中での紫外線分解の可能性を示している。

PCDD及びPCDFを各同族体、異性体ごとに分析した分析値の例を表2に示す。本試料は1987年5月の採取試料であり、そのサンプル量は $15,000 \text{ m}^3$ の大気に相当する。PCDD同族体、異性体及びPCDFの同族体、異性体パターンは、ゴミ焼却過程で発生するパターンと極めて類似しており(図5)、大気中のPCDD、PCDFの起源が、燃焼のプロセスによるものであることを強く示唆している。強毒性の2,3,7,8-TCDD濃度は、4塩化～8塩化の“ダイオキシン”合計の約 $1/2,000$ であった。

2,3,7,8-TCDDの呼吸による大気からの摂取量は、今回の実験において、約 3 fg/kg/d (年平均)と推定された。この数字は米国環境保護庁(EPA)の発ガンリスクの評価の数字²⁾を用いれば 0.5×10^{-6} に相当する。

また他のPCDD、PCDFによる寄与を考慮すると、図6のようになる。PCDD全体で2,3,7,8-TCDDの約5倍、PCDFを含めると約15倍の効果を示すことになり、全体で 7.7×10^{-5} のリスクと評価される。リスクに大きく寄与している成分は1,2,3,7,8-及び2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフランであり、人体残留性の高い物質である³⁾。発ガンリスク評価にはEPAのモデル計算を用いているが、これについては批判も多く、リスクの評価手法についてはさらに検

討が必要である。また人体汚染を考える上では、他の摂取ルートについても今後検討する必要がある。

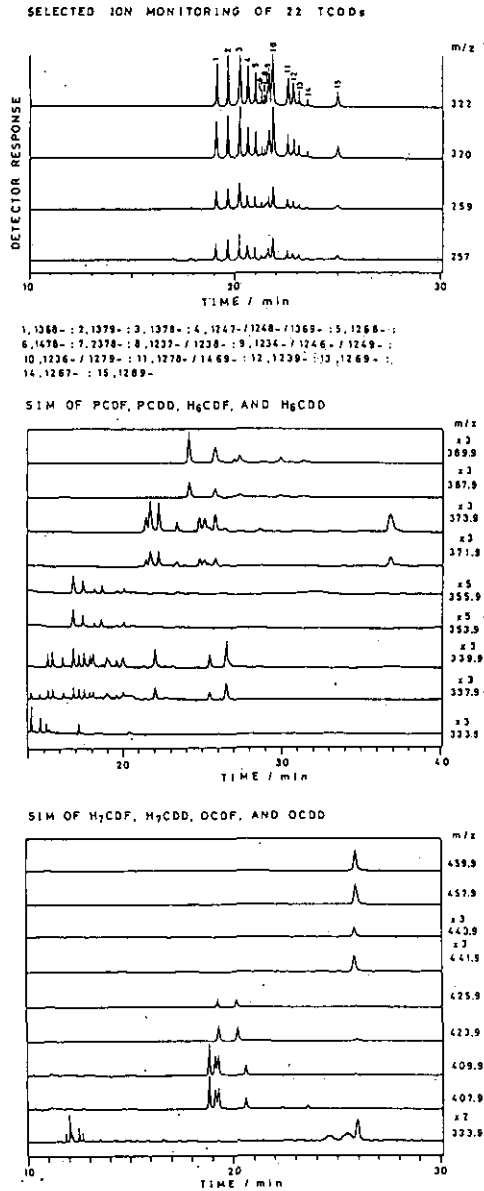


図 2 クロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD, PCDD, H₆CDD, H₇CDD, OCDD), クロロジベンゾフラン (TCDF, PCDF, H₆CDF, H₇CDF, OCDF) 異性体のクロマトグラム

Fig.2 Chromatograms of chlorinated dibenzodioxins (TCDD, PCDD, H₆CDD, H₇CDD, OCDD) and chlorinated dibenzofurans (TCDF, PCDF, H₆CDF, H₇CDF, OCDF)

表 1 大気粉じん中の2,3,7,8-TCDD (1987年)

Table 1 2,3,7,8-TCDD in atmospheric particulate matter

	2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDD/全TCDD
1月	10(fg/m^3)	0.3×10^{-3}
2月	16	0.6
3月	13	0.5
4月	9	0.8
5月	6	0.9
6月	3	0.7
7月	4	0.5
8月	2	0.4
9月	4	0.5
10月	5	0.3
11月	17	0.5
12月	26	0.5
平均	9.6	0.5

Mass Chromatogram of Tetrachlorodibenzodioxins
In urban air particulate matter.

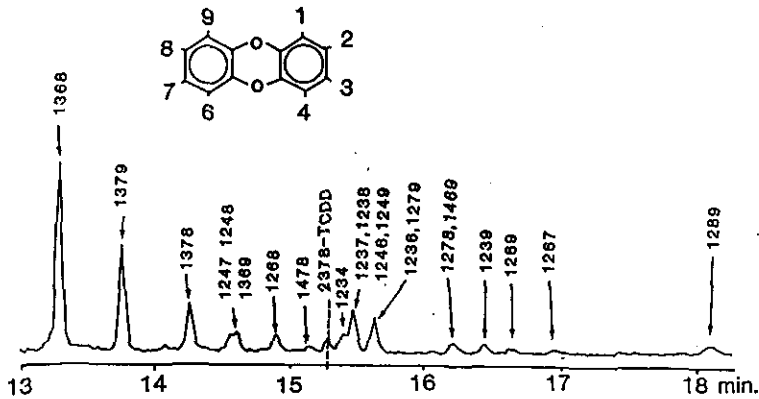


図 3 大気粉じん中のテトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンのクロマトグラム
Fig. 3 Gaschromatogram of TCDD in urban atmospheric particulate matter

大気粉じん中の塩化ダイオキシンと塩化ジベンゾフラン

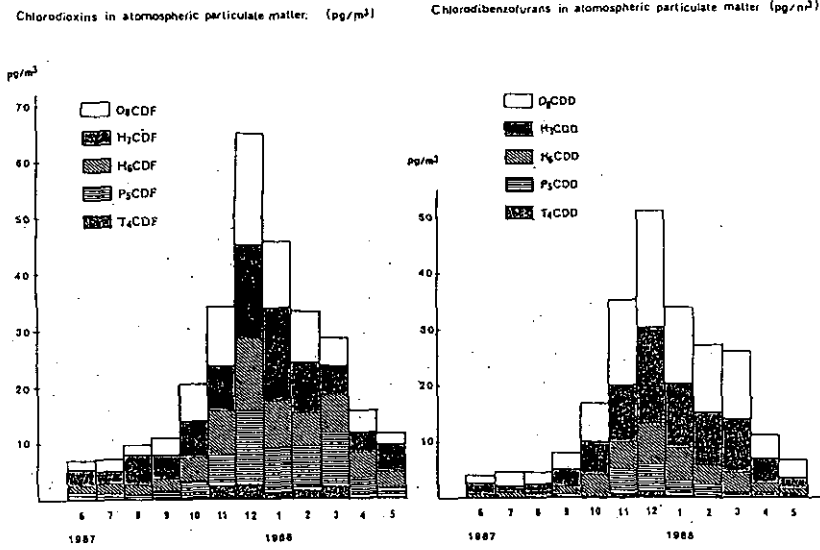


図 4 大気粉じん中のPCDFとPCDDの季節変化
 Fig. 4 Chlorinated dibenzofurans and chlorinated dioxins in atmospheric particulate matter

表 2 大気粉じん中のポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン及びジベンゾフラン
 Table 2 Chlorodibenzodioxins and chlorodibenzofurans in atmospheric particulate matter

(1987年5月, 15,000mg³)

T ₄ CDD	R.T.	濃度(pg)	力価換算係数(EPA-1986)
1368	11'53"	1262	0.01
1379	12'30"	689	〃
1378	13'6"	269	〃
1247	13'22"	294	〃
1248			〃
1369			〃
1268			〃
1478	13'40"	168	〃
2378	14'6"	63	〃
1237	14'12"	63	1
1238	14'24"	378	0.01
1234			〃
1236			〃
1279	14'35"	210	〃
1469	15'12"	105	〃
1278			〃
1239	15'21"	92	〃

表 2 (つづき)
Table 2 (Continued)

T ₄ CDD	R. T.	濃度 (pg)	力価換算係数 (EPA-1986)
1269	15' 32"	126	〃
1267	16' 49"	41	〃
1289	16' 48"	336	〃
T ₄ CDD 合計		4096	
2,3,7,8-TCDD 換算量		103	
P ₅ CDD			
12479,12468	15' 32"	1651	0.002
12368	15' 55"	1264	〃
12478	16' 20"	294	〃
12379	16' 34"	802	〃
12347,12467	17' 8"	588	〃
12378	17' 18"	336	0.2
12369	17' 27"	113	0.002
12489,12467	17' 45"	231	〃
12346,12367	17' 58"	499	〃
12389	18' 23"	336	〃
P ₅ CDD 合計		6114	
2,3,7,8-TCDD 換算量		79	
H ₆ CDD			
124679,124689,123468	19' 1"	6703	0.004
123679,123689	19' 33"	4032	〃
123478	20' 01"	403	0.04
123678		1360	
123469	20' 30"	353	0.004
123789	20' 44"	856	0.04
123467	21' 02"	806	0.004
H ₆ CDD 合計		14513	
2,3,7,8-TCDD 換算量		152	
T ₄ CDF			
1368	12' 15"	139	0.001
1378,1379	12' 21"	126	〃
1347,1468	12' 30"	13	〃
1237,1367	12' 38"	231	〃
1348	12' 48"		〃
1346,1248	13' 7"	231	〃
1247,1268,1478,1369	13' 22"	134	〃
	~26"		
1234,2349	13' 52"	454	〃
1238,1467,2468,1236	14' 0"	651	〃
	~ 4"		

表 2 (つづき)
Table 2 (Continued)

T ₄ CDF	R. T.	濃度 (pg)	力価換算係数 (EPA-1986)
1349	14' 20"	42	0.001
1278	14' 26"	323	〃
1267, 1279	14' 49"	218	〃
1469, 1249, 2368	15' 8"	298	〃
2467	15' 36"	399	〃
1239, 2347	15' 56"	277	〃
1269	16' 20"	382	〃
2378	16' 32"	252	0.1
2348	16' 40"	420	0.001
2346	17' 16"	206	〃
T ₄ CDF 合計		4796	
2,3,7,8-TCDD 換算量		30	
P ₅ CDF			
23479	15' 2"	840	0.001
13479	15' 12"	126	〃
12368, 13479	15' 25"	1827	〃
12478	15' 40"	1016	〃
12479, 13467	15' 50"	1323	〃
12469	16' 4"	1016	〃
23469, 12347	16' 11"	1567	〃
13469	16' 29"	294	〃
12378	16' 37"	1608	0.1
12346, 12379	16' 43"	1045	0.001
12367	17' 0"	960	〃
23468, 12469	17' 11"	1739	〃
13489	17' 50"	210	〃
12369	18' 2"	168	〃
23489	18' 12"	2436	〃
12349	18' 22"	378	〃
12489	18' 36"	378	〃
23478	19' 24"	2016	0.1
12389	19' 32"	168	0.001
23467	19' 44"	5329	〃
P ₅ CDF 合計		24444	
2,3,7,8-TCDD 換算量		384	

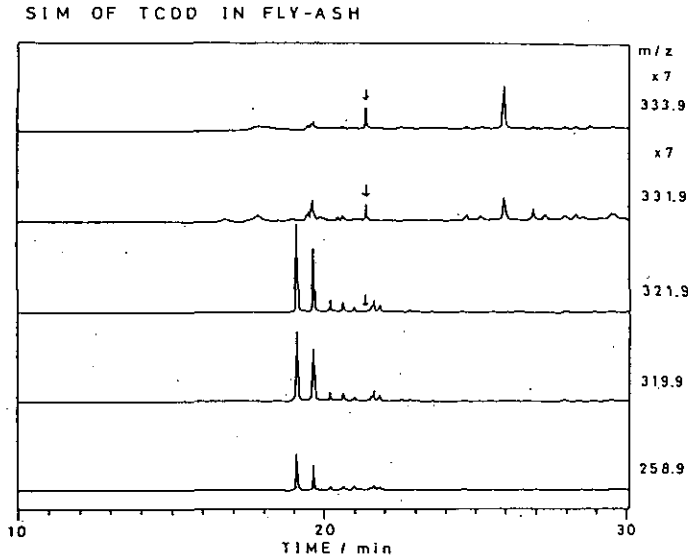


図 5 フライアッシュ中の2,3,7,8-TCDDのクロマトグラム
Fig. 5 Chromatogram of 2,3,7,8-TCDD in fly ash

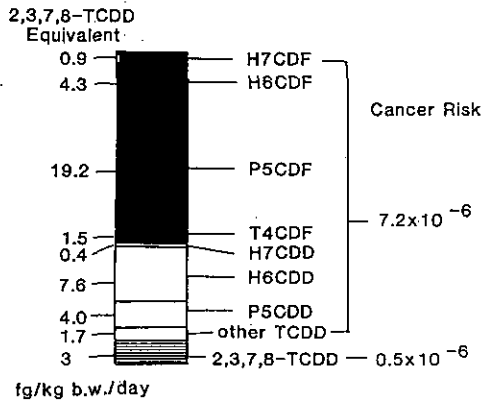


図 6 大気粉じん中の“ダイオキシン”によるガン発生リスクの推定
Fig. 6 Estimated cancer risk exposed to urban air particulate matter

引用文献

- 1) Olie, K., P. L. Vermeuleu and O. Hutsinger (1979) : Chlorodibenzo-*p*-dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in the Netherlands. *Chemosphere*, **6**, 455-459.
- 2) EPA Health assessment document for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. EPA-600/884-014F.

- 3) Schecter, A., J. J. Ryan and T. A. Gasiewicz (1990) : Decrease in human tissue levels of dioxins and dibenzofurans over nine years after exposure in one male patients. Abstract of 10th international meeting on dioxin, Bayreuth FRG, 275-278.

I-2 母乳及びミルク中のクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン

Chlorinated Dibenzodioxins in Human Breast Milk and Dried Milk

森田昌敏¹・伊藤裕康¹・安原昭夫²

Masatoshi MORITA¹, Hiroyasu ITO¹ and Akio YASUHARA²

要旨

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (2,3,7,8-TCDD) 及びオクタクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (OCDD) の母乳中の分析法の開発と分析値の決定を行った。母乳9検体中の2,3,7,8-TCDDの濃度は、平均5.6 pg/g 脂肪であり、またOCDD濃度は平均1,890 pg/g 脂肪であった。またドライミルクについて分析を行った結果、ドライミルクの方が母乳より、2,3,7,8-TCDDの濃度が低い傾向が見られた。

Abstract

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) and octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) were determined in human breast milk by using capillary column gaschromatography / high resolution mass spectrometry. The average level of 2,3,7,8-TCDD and OCDD was 5.6pg/g fat and 1890 pg/g fat respectively. The analysis of dried milk showed lower concentration of 2,3,7,8-TCDD compared with that of human breast milk.

1 はじめに

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (2,3,7,8-TCDD) は強い急性毒性を持つ、催奇型性、発ガン性物質として知られている。発生源として、各種化学物質の合成過程での副成、ゴミ焼却炉での生成などが知られており、また魚貝類等による生物濃縮も知られている。

人間は食物連鎖系の上位にあり、2,3,7,8-TCDDのような蓄積性の物質を生物濃縮しやすいことはよく知られている。人体の2,3,7,8-TCDDの測定については、既にいくつかの報告があるが、いずれもその存在が無視できないレベルにきているのではないかという状況にある。欧米諸国の

-
1. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa, 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa, 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

報告に比較して、我が国の“ダイオキシン”による人体汚染の報告は例が少なく、そのデータの蓄積が必要であった。“ダイオキシン”の人体試料での分析は、試料量の制限や、共存する多量の生体成分及び汚染物質からの妨害などのために、極めて困難な分析である。高分解能GC/質量分析法がこの分析目的に適当であり、同法の開発を待って、母乳試料及びドライミルク試料への適用を行った。

2 分析法

2.1 試料

母乳試料は都内の産院及び奈良県立医科大学より供与していただいた（昭和63年採取）。ドライミルク試料は市販品を用い70gを500mlの水に溶かして使用した。

2.2 試薬及び水

有機溶媒は、和光残留農薬試験用（ヘキサン、エタノール、ジクロロメタン）、スペクトル用（トルエン）を用いた。また硫酸は関東化学 ELS、苛性ソーダは試薬特級、アルミナはメルク社製中性アルミナを用いた。水はミリポア(R)システム（活性炭及びイオン交換樹脂）に蒸留水を通したものをを用いた。分析用の内部標準として、ケンブリッジアイソトープラボ社製¹³C-2,3,7,8-TCDDを用いた。

2.3 装置

高速液体クロマトグラフィーは日本分光製を用い、逆相及びゲルろ過法を併用した。

ガスクロマトグラフ質量分析器（GC/MS）

GC/MS装置としては、日本電子製JMS-DX300/HP5710A、日本電子製JMS-SX102/HP5890J、VG70を用いた。ガスクロマトグラフに用いたカラムは、スベルコSP2331（60mキャピラリカラム）である。

2.4 分析操作

試料として、母乳50ml又はミルク500mlを取り、これに¹³C-2,3,7,8-TCDD、¹³C-OCDDを1pg/mlの濃度に添加する。次に、KOH-エタノール溶液（2M）を等量加え、室温のまま、一夜放置して加水分解を行う。翌朝、同量の水を加えて希釈した後、分液ロートに移し、ヘキサン（同量）により2回抽出する。ヘキサン層を集め、分液ロートに移し、濃硫酸（ヘキサンの半量）と共に振とうする。硫酸層を捨て、新たな硫酸を加えて分配を繰り返す。3回の分配を経た後、ヘキサン層を取り、エバポレーターで濃縮し、その体積を約2mlとする。次にアルミナカラムクロマトグラフにかけた。直径1cm長さ20cmのガラスカラムに中性アルミナ10g（活性度①）を充てんし、ヘキサンを溶媒として展開する。試料をカラムヘッドに乗せ、ヘキサンと共に洗い込

み、次いでヘキサン 150 ml で展開させる。ヘキサン画分は捨て、次いでジクロロメタン/ヘキサン (50:50) 150 ml で溶出させ、その画分をエバポレーターで濃縮し、約 2 ml とした。次にクロロホルムを加えて留去することを繰り返して、クロロホルムに転溶させ、その体積を約 100 μ l とする。この溶液を ODS 高速液体クロマトグラフィーにかける。カラムは、Unisil ODS 4.6mm ϕ \times 25 cm を用い、メタノールを溶媒として、1 ml/min の流速で展開する。“ダイオキシン”画分を集め (1.75~6 ml)、エバポレーターで留去しつつトルエンに転溶し、最終液量を約 100 μ l とする。次いでゲルろ過型高速液体クロマトグラフィーにかける。カラムとして Shodex 800 KF を用い、トルエンで展開する。“ダイオキシン”画分を集め、エバポレーターで濃縮し、100 μ l 以下とし、その容積はマイクロシリンジで測定する。濃縮液を GC/MS にかけて、SIM 検出によりクロマトグラムを得、ピーク高より定量した。

3 結果と考察

日本電子製 JMS-DX300, 日本電子製 JMS-SX102, VG-70S の 3 機種を用いて PCDD の分析の感度を比較した。DX300 は低分解能機であり、これを用いた分析の検出下限は約 1 pg であった。JMS-SX102 を用いて、分解能 10,000 での測定では検出下限はおおむね 100fg, VG-70S はやや悪かったが、ほぼ同程度であった。また JMS-SX102 を用いた場合の検出のダイナミックレンジは約 3 けたであった。また分解能 10,000 での再現性は、やや乏しく、分解能 8,000 程度での測定が、感度面でも有利と考えられた。

PCDD の分析は複雑なプロセスを経て行われるため回収率が低くなるおそれがある。本実験操作により ^{13}C ラベル体の回収率を測定したが、回収率は 54~111 % (平均 73 %) であった。内部標準により補正されるので、この程度の回収率のばらつきは分析値に大きな影響を与えないと考えられた。

母乳及びドライミルクのクロマトグラムの例を図 1 及び図 2 に示す。内部標準とはほぼ同じ保持時間の所に、2,3,7,8-TCDD に相当するピークが現れており、その同位対比も一致することから、2,3,7,8-TCDD として定量することができた。

表 1 に母乳中及びドライミルク製品中のポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (PCDD) の分析値を示す。母乳 9 検体の 2,3,7,8-TCDD の分析値の平均は 5.57 pg/g fat であった。また一方ドライミルク製品中の 2,3,7,8-TCDD の平均値は 1.2 pg/g fat であり、ドライミルクの方が母乳より低い傾向が見られた。OCDD の母乳中の濃度は平均 1,890 pg/g 程度であり 2,3,7,8-TCDD の約 300 倍程度の濃度であった。

今回の実験を通じて、2,3,7,8-TCDD の摂取量の推定が可能となった。乳児が体重の 1/5 量の母乳を毎日摂取するとし、母乳中の乳脂肪量を 3.3 % と仮定すると、1 日当たりの 2,3,7,8-TCDD は平均 37 pg/kg/d となる。また 10 か月の授乳期間中の全摂取量は平均 670 ng となる。

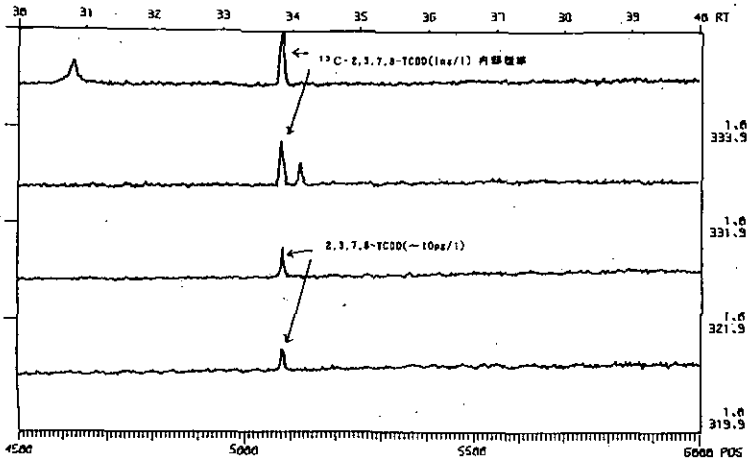


図 1 母乳中の2,3,7,8-TCDDのクロマトグラム
Fig. 1 Chromatogram of 2,3,7,8-TCDD in human mother milk

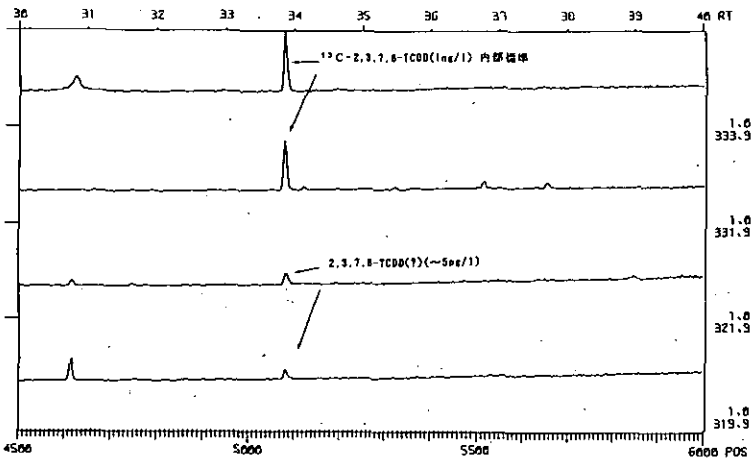


図 2 ドライミルク中の2,3,7,8-TCDDのクロマトグラム
Fig. 2 Chromatogram of 2,3,7,8-TCDD in dried milk

2,3,7,8-TCDDは発ガン性物質であり、その強さは、アフラトキシンの約50倍と考えられている¹⁾。母乳中の2,3,7,8-TCDDの持つ生物学的意味については判断が難しいが、提案されている許容値 (tolerable daily intake) ($1 \sim 10 \text{ pg/kg/d}$)²⁾と比較して考えると、今後とも注意しておく必要のある汚染物質といえよう。

OCDDは毒性が低く (高く見積もっても2,3,7,8-TCDDの1/1,000程度)、その濃度は2,3,7,8-TCDDの300倍程度であるので、その毒性は2,3,7,8-TCDDより相対的に小さいといえ

そうである。

母乳中のPCDDの分析について既にいくつかの報告がある。分析値を並べると表2のようにな

表 1 母乳及びドライミルク中の2,3,7,8-TCDD及びOCDD
Table 1 2,3,7,8-TCDD and OCDD in human breast milk and dried milk

	試料番号	2,3,7,8-TCDD	OCDD
母 乳	1	13.6 pg/g	654
	2	4.6	1130
	3	4.1	1180
	4	4.9	1010
	5	8.7	N.A.
	6	4.5	1060
	7	1.6	1520
	8	5.2	5438
	9	2.9	1240
ドライ ミルク	1	2.2	N.A.*
	2	0.8	N.A.
	3	0.7	N.A.

* not analyzed

表 2 各国の母乳中の2,3,7,8-TCDDの比較
Table 2 2,3,7,8-TCDD in human breast milk

国 名	N	(pg/g fat)	文献
北ベトナム (1984)	9	0	3
南ベトナム (1984)	15	18	3
カナダ (1976)	46	6.4	3
カナダ (1980)	10	10	3
アメリカ (1912~83)	8	7.2	3
アメリカ	42	3.3	4
西独	185	3.0	4
南アフリカ (黒人)	6	1.2	5
南アフリカ (白人)	18	1.7	5
パキスタン	7	3.3	5
南ベトナム (ビンロン)	4	2.8	5
ソ連 (モスクワ)	1	8.7	6
ソ連 (イルクーツク)	4	1.9	6
スウェーデン	4	0.6	7
オランダ	16	ND	8
日本	36	13	9
日本 (本研究)	9	5.7	

る。これらのうち、高分解能GC/MSによって行われた分析は一部であるので、確からしい値がすべてではないが、一応比較の対象とはできるかもしれない。今回得られた脂質当たり5.6 pptの測定値は、既に我が国において報告された値より幾分低く、米国あるいはヨーロッパと同程度である。

謝 辞 本研究の一部は厚生省心身障害研究費「経母乳による有害因子の移行に関する研究」により助成されました。深謝いたします。また、本研究の母乳のサンプリングに当たり、奈良県立医科大学の一条元彦教授、東京大学医学部の川名尚教授にお世話になりました。深謝いたします。

引用文献

- 1) Wogan, G. N., S. Paglialunga and P. M. Newberne (1974): Curcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B, in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **12**, 681-685.
NIH (1982), Curcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Osborne-Mandel rats and B6C3F1 mice. NTP Technical Report Series, No. 201.
- 2) Environmental Health Criteria 88, ICPS WHO (1989), 306 p. なお、厚生省の廃棄物にかかる評価指針としては100 pg/kg/d (昭和59年)。
- 3) Schecter, A. J., J. J. Ryan and J. D. Constable (1986): Chlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran levels in human adipose tissue and milk samples from the north and south of Vietnam. *Chemosphere*, **15**, 1613-1620.
- 4) Schecter, A. J., P. Furst, J. J. Rya, N. C. Furst, H. Meemken, W. Groebel, J. Constable and D. Vu (1989): Polychlorinated dioxin and dibenzofuran levels from human milk from several location in the United States, Germany and Vietnam. *Chemosphere*, **19**, 979-984.
- 5) Schecter, A. J., J. R. Startin, M. Rose, C. Wright, I. Parker, D. Woods and H. Hansen (1990): Chlorinated dioxin and dibenzofuran levels in human milk from Africa, Pakistan, southern Vietnam, the southern U.S. and England. *Chemosphere*, **20**, 919-925.
- 6) Schecter, A. J., P. Furst, C. Furst, W. Grobel, S. Kolenikov, M. Savchenkov, A. Beim, A. Boldonov, E. Trubitsun, B. Vlasov (1990): Levels of dioxins, dibenzofurans and other chlorinated xenobiotics in human milk from the Soviet Union. *Chemosphere*, **20**, 927-934.
- 7) Rappe, C., M. Nygren, G. Lindstorm and M. Hansson (1986): Changes in the levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in human milk from Stockholm. *Chemosphere*, **15**, 1635-1639.
- 8) Van. den Berg, M., F. W. M. van den Wielen and K. Oille (1986): The presence of PCDDs and PCDFs in human breast milk from the Netherlands. *Chemosphere*, **15**, 693-706.
- 9) Ogaki, J., K. Takayama, H. Miyata and T. Kashimoto (1987): Levels of PCDDs, PCDFs in human tissues and several food stuffs in Japan. *Chemosphere*, **16**, 2047-2056.

I-3 湖沼底質中のクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン, ジベンゾフランの分析

Determination of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Dibenzofurans in Lake Sediment Samples

田中 敦¹・伊藤裕康¹・相馬光之¹・森田昌敏¹

Atsushi TANAKA¹, Hiroyasu ITO¹, Mitsuyuki SOMA¹ and Masatoshi MORITA¹

要 旨

底質コア試料中のポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン, ポリクロロジベンゾフランの分析を行った。最も高濃度を示したのはオクタクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンであったが, その濃度は表層で数ng/g程度であった。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンは検出されなかった。そのほかには, 1,3,6,8-, 1,3,7,9-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンの存在が認められ, これらの濃度は下層から表層へ増加していた。堆積速度測定と合わせた結果, 1950~1960年頃から濃度増加が顕著となっていた。

Abstract

Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in lake sediment samples were analysed. Octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) showed the highest concentration, but its level was less than 10 ng/g even at sediment surface. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin was not detected in any samples. Besides OCDD, 1,3,6,8- and 1,3,7,9-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins were prominent. The abundances of those compounds increased since 1950-1960, in conjunction with dating result using ²¹⁰Pb.

1 はじめに

軍用に用いられた枯葉剤中の不純物である2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンが象徴するように, 種々の化学物質を合成する過程で, ポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン(以下, 総称としてPCDD, *n*個の塩素置換体を示す場合Cl_{*n*}DDと表す。), ポリクロロジベンゾフラン(以下, 総称としてPCDF, *n*個の塩素置換体を示す場合Cl_{*n*}DFと表す。PCDD, PCDFを合わせてダイオキシン類と表す。)が生成し, その使用に伴って環境中に放出される¹⁾。さらに, ゴミの燃

1. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

焼に伴ってダイオキシン類が生成することが見いだされ²⁾、大気を通じて広範囲に汚染が拡散するおそれが現実のものとなっている。

そのダイオキシン類がいつから存在するのかというのは一つの問題である。人類の火の使用と共にダイオキシン類が出現したという説³⁾は、その量の多寡を無視すれば事実といえる。しかし、それは、いわばベースライン値であって、存在量がいかに変化してきたかを議論することが重要であろう。古代の人体試料⁴⁾や湖沼底質⁵⁻⁸⁾などで、ダイオキシン類分布の歴史的变化が研究されている。

底質は、環境中に放出されたダイオキシン類のシンクとしての役割を持ち、過去における蓄積量や分解速度、放出量などを求める手掛かりとなる。本研究では、霞ヶ浦湖心底質を取り上げ、底質コアサンプル中のダイオキシン類の分析と鉛直分布の解析を行った。

2 分析方法

2.1 サンプリング

試料は1988年12月23日、霞ヶ浦湖心(水深6m)で、アクリル製コアパイプを取り付けた柱状採泥器を用いて採取した。得られたコアの長さは約40cmであった。採取したコアは直ちに2~3cmごとに切断し、ガラス製シャーレ中で風乾し、分析に供した。

2.2 堆積速度

霞ヶ浦は底質の混合の影響が強く、正しい堆積速度の算定が困難であるが、採取した試料に²¹⁰Pb年代測定法⁹⁾を適用した。底質試料を灰化後、担体に非放射性Pbを加え、²¹⁰Pbを抽出し、電着分離した。測定は、2π-低バックグラウンドガスフローカウンター(Aloka製)により、²¹⁰Pbの娘核種²¹⁰Bi(半減期5d)のβ線を反同時計数した。

2.3 ダイオキシン類

ダイオキシン類の測定は、キャピラリーガスクロマトグラフィー質量分析法(GC/MS)によって行った。7, 8個の塩素置換ダイオキシン類のための低分解能GC/MS測定と、4~7個の塩素置換ダイオキシン類のための高分解能GC/MS測定に分けて行った。

以下のような操作によってダイオキシン類を分離、精製した。底質試料(2.5~5g)を秤取し、トルエンによるソックスレー抽出を15時間以上行う。抽出液の溶媒をエタノールに置き換え、2N KOHで脂肪等をケン化し、ヘキサンと分配する。ヘキサン層を硫酸処理し、濃縮後、デイスポーザブルカラム(Waters製, SEP-PAK アルミナN)を用いたカラムクロマトグラフィーにかける。ダイオキシン類を含むヘキサン/ジクロロメタン画分を最終的に窒素気流下で濃縮し、トルエン溶液として分析検体とした。検体の最終液量は低分解能測定で約200 μl、高分解能測定で約20 μlとした。正確な容量は、マイクロシリンジで測定した。内部標準には、[¹³C]-

2,3,7,8-Cl₄DD, [¹³C]-2,3,7,8-Cl₄DF, [¹³C]- Cl₃DD, [¹³C]- Cl₈DFを用いた。使用した有機溶媒は残留農薬試験用(和光純薬製),あるいはスペクトル分析用(トルエン, ドージン製)を用いた。

使用したGC/MS装置はHewlett Packard社5890Jガスクロマトグラフを付属した二重集束型質量分析計(日本電子製, JMS-SX102)である。低分解能, 高分解能測定ともに, スプリットレスインジェクション, 2段昇温による分離, 電子衝撃法によるイオン化とパーフルオロクロセンをモニターするロックマス方式でのSIM測定を行った。使用したGCカラムと質量分解能は, 低分解能測定:OV-1 (25 m × 0.32 μm i.d.), 分解能1,000, 高分解能測定:SP-2331 (30 m × 0.25 μm i.d.), 分解能8,000であった。表1に対象物質とモニターした質量数, 及び濃度計算に用いた標準物質をまとめた。ピークの同定はフライアッシュ抽出物と文献¹⁰⁾との比較によって行った。リテンションタイムとモニターした2つの質量数でのピーク強度比をピーク判定の基準に用いた。原則として, 置換塩素数から計算される理論的強度比と実測とのずれが, 30%以上のものを棄却した。

表 1 対象物質と測定した質量数及び検量に用いた標準物質の一覧
Table 1 List of object compounds, monitored mass and standard compound used for the determination

object compounds	monitored mass	standard compound
Cl ₄ DFs	303.902* ¹⁾ , 305.899	2,3,7,8-Cl ₄ DF
[¹³ C]-2,3,7,8-Cl ₄ DF	317.939	internal standard
Cl ₄ DDs	319.897*, 321.894	2,3,7,8-Cl ₄ DD
[¹³ C]-2,3,7,8-Cl ₄ DD	333.934	internal standard
Cl ₅ DFs	339.860, 341.857*	2,3,4,7,8-Cl ₅ DF
Cl ₅ DDs	355.855, 357.852*	1,2,3,7,8-Cl ₅ DD
Cl ₆ DFs	373.821, 375.818*	1,2,3,6,7,8-Cl ₆ DF
1,2,3,4,7,8-Cl ₆ DD	389.816, 391.813*	1,2,3,4,7,8-Cl ₆ DD
1,2,3,6,7,8-Cl ₆ DD	ditto	1,2,3,6,7,8-Cl ₆ DD
other Cl ₆ DDs	ditto	1,2,3,7,8,9-Cl ₆ DD
Cl ₇ DFs	407.782, 409.779*	1,2,3,4,6,7,8-Cl ₇ DF
Cl ₇ DDs	423.777, 425.774*	1,2,3,4,6,7,8-Cl ₇ DD
Cl ₈ DF	441.743, 443.740*	Cl ₈ DF
[¹³ C]-Cl ₈ DF	453.783	internal standard
Cl ₈ DD	457.738, 459.735*	Cl ₈ DD
[¹³ C]-Cl ₈ DD	471.775	internal standard

1)*: 強度比チェック用の質量数
1)*: mass for identification only

3 結果と考察

3.1 堆積速度

ダイオキシン類を分析したものと同一コアに²¹⁰Pb年代測定法を適用した。コアの深さが十分でなく、鉱物由来の²¹⁰Pbを推定することができないため、図1には全²¹⁰Pb放射能でプロットしている。横軸は圧密の影響を補正するため積算重量で表している。表層10試料(～2g/cm, 20cm)までは、堆積物の混合の影響で²¹⁰Pb放射能は一定となっている。それより深い部分の減衰部分をもとに回帰すると52mg/cm²yという堆積速度が得られた。これは、コア全体(37cm)の平均堆積速度として3.4mm/yに相当し、平坦部(20cm)で約43年分の底質に相当する。混合の影響に関しては3.3で解析する。

現在までの、霞ヶ浦底質の堆積速度に関する報告は、湖水中の懸濁粒子量、人為的水銀汚染の開始する時期から求めたもの¹¹⁾や示標火山灰層から求めたもの¹²⁾、放射性²¹⁰Pbによるもの¹³⁾など数例ある。第1の方法では、5～15mm/yの堆積速度が得られており、湖心部でのそれは約5mm/yであった¹¹⁾。懸濁粒子量から求める方法は底泥の巻き上げの影響があるため過剰評価を与える可能性がある。また、汚染物質の増加し始めた深さをある年代にあてる方法は、汚染物質が合成有機物質や核分裂生成核種など自然界にないもの場合に有効だが、水銀などの場合、分子

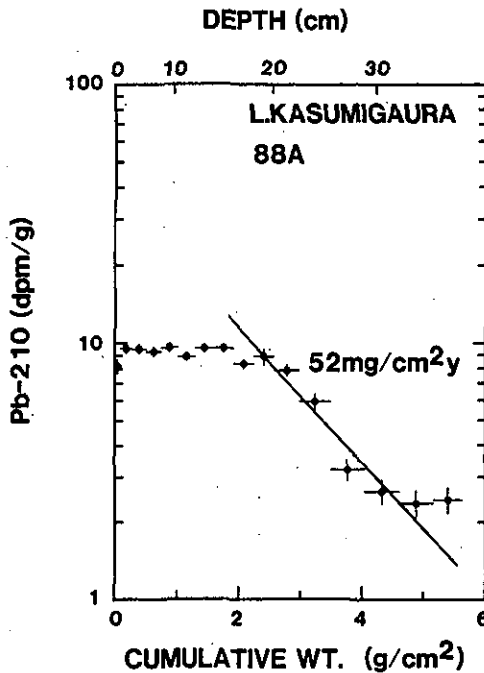


図1 霞ヶ浦底質コア試料の²¹⁰Pbの鉛直分布
 Fig. 1 Vertical profile of ²¹⁰Pb activity in Lake Kasumigaura sediment core samples

種の検出まで行うことが要求される。第2の火山灰層位法は、よい示標テフラがある場合に非常に有効である。霞ヶ浦底質の場合、湖底から2 m以内に浅間山のAsama-A (1783 A.D.)、富士宝永山のHoei (1707 A.D.)、浅間山のAsama-B (1108 A.D.?)がある。その層序と最上位のAsama-Aが現れた深さをもとに堆積速度が計算できる。それによると、今回の採泥点の近辺5点での、Asama-Aテフラの深さとして約50 cm、平均堆積速度として $46.5 \text{ mg/cm}^2\text{y}$ が報告されている¹²⁾。第3の ^{210}Pb 法は本報告と同じ方法であるが、採泥点が流入口に近い高浜入であった。そこでの堆積速度は、 $39 \text{ mg/cm}^2\text{y}$ であり、約25 cmの平坦部が認められた¹³⁾。

以上の3者の結果と今回の結果を合わせると、

$$\text{水銀法} > ^{210}\text{Pb} (\text{湖心, 本法}) \geq \text{火山灰層位法} > ^{210}\text{Pb} (\text{高浜入})$$

となった。高浜入の火山灰層位法での値は $33\sim 65 \text{ g/cm}^2\text{y}$ と変動が大きく、相互の比較は難しい。今回のコアにAsama-Aが含まれていないことや比較的信頼性の高い火山灰法とほぼ一致していることから、大きな誤差はないと考えられる。

3.2 ダイオキシン類

底質中のダイオキシン類の多くは、非常に低濃度のため、どこまで定量可能かの判定が難しい。装置の検出限界(約100 fg)と試料の濃縮率(約100)から、試料中で 0.001 ng/g が検出限界と計算できる。この10倍量 0.01 ng/g を定量下限としてPCDDの分析結果を表2に、PCDFの分析結果を表3にまとめた。深さ方向に濃度が減少する傾向があるため、高濃度のものと同パターンのマスキロマトグラムをもつピークに関しては、2つの質量数での濃度比が±30%以上異なるものでも棄却しなかった場合がある。また、表層の4試料に関しては、2本のコア試料の平均値を示してある。

ダイオキシン類の濃度は Cl_8DD を除いて 1 ng/g 以下であり、その多くは定量下限程度であった。最も毒性の強い2,3,7,8- Cl_4DD 、2,3,7,8- Cl_4DF は、いずれの試料でも検出されなかった。

低濃度のは誤差が大きく、必ずしもきれいな鉛直分布が得られたわけではないが、全体に表層の等濃度部分と下層にかけて濃度減少部分が見られた。なお、試料13は、突出して高い濃度を示すものがあり、操作中での汚染など人為的な要因によるもので試料本来のものではないと考える。

各置換塩素数ごとにPCDD、PCDFの構成率を求めた。このコンジェネアプロフィールは、コアの上層から下層まで系統的な変化は見られないため、コア全体の平均値で図示した(図2)。 Cl_8DD が約60%と大部分を占め、以下 Cl_7DD 、 Cl_4DD 、 Cl_8DF の順となった。一般に都市ゴミなどの燃焼過程で放出されるPCDDは、塩素置換数の多いものほど高濃度であり、PCDFでは、逆に低塩素置換数のものが多くなっている。このうち、低塩素数($\text{Cl}=4\sim 6$)は、気相に存在する割合が多く、その結果、底質などに堆積するものは、低塩素数のPCDF類が減少している。霞ヶ

表 2 底質コア試料中のクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンの分析結果 (ng/g)
 Table 2 Analytical results for PCDDs in sediment core samples (ng/g)

sample	depth (cm)	Cl ₄ DD		Cl ₅ DD			Cl ₆ DD			Cl ₇ DD		Cl ₈ DD	
		1,3,6,8	1,3,7,9	1,2,4,6,8 1,2,4,7,9	1,2,3,6,8	1,2,3,7,9	1,2,3,4,6,8 1,2,4,6,7,9 1,2,4,6,8,9	1,2,3,6,7,9 1,2,3,6,8,9	1,2,3,4,7,8 1,2,3,6,7,8	1,2,3,7,8,9	1,2,3,4,6,7,9	1,2,3,4,6,7,8	
1	0-2	0.37	0.14	0.04	0.08	0.04	0.10	0.05	0.01	0.01	0.93	1.53	5.00
2	2-4	0.32	0.12	0.04	0.05	0.03	0.10	0.05	0.01	0.01	0.97	0.57	5.32
3	4-6	0.43	0.17	0.05	0.07	0.03	0.11	0.06	0.01	0.02	0.93	0.50	5.45
4	6-8	0.37	0.16	0.04	0.07	0.03	0.12	0.06	0.01	0.02	0.86	0.51	5.37
5	8-10	0.33	0.13	0.02	0.03	0.01	0.07	0.04	0.01	0.01	0.84	0.48	5.03
6	10-12	0.42	0.19	0.03	0.04	0.02	0.13	0.04	0.01	0.02	0.90	0.52	5.36
7	12-14	0.33	0.15	0.02	0.03	0.02	0.12	0.05	0.01	0.01	0.91	0.54	5.45
8	14-16	0.34	0.15	0.02	0.03	0.02	0.08	0.04	0.01	0.01	0.89	0.49	5.26
10	18-20	0.18	0.07	0.01	0.01	0.01	0.07	0.04	0.01	<0.01	0.69	0.36	4.07
11	20-23	0.06	0.02	0.01	0.01	<0.01	0.08	0.05	0.01	0.01	0.63	0.31	3.06
12	23-26	0.02	0.01	0.01	0.01	<0.01	0.05	0.02	0.01	<0.01	0.47	0.18	1.77
13	26-29	-	-	-	-	-	0.04	0.01	0.01	0.01	0.28	0.39	1.10
14	29-32	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.24	0.08	0.02	0.02	0.77	0.78	1.24
15	32-35	-	-	0.01	<0.01	<0.01	0.06	0.02	0.01	0.01	0.28	0.19	0.83
16	35-37	-	-	-	-	-	0.10	0.03	0.01	0.01	0.29	0.11	0.84

1): 検出せず

1): Not Detected

表 3 底質コア試料中のクロロジベンゾフランの分析結果 (ng/g)
 Table 3 Analytical results for PCDFs in sediment core samples (ng/g)

sample	depth (cm)	Cl ₄ DF		Cl ₅ DF	Cl ₆ DF			Cl ₇ DF		Cl ₈ DF	
		1,2,3,6 1,2,3,8 1,4,6,7 2,4,6,8	1,2,6,7 1,2,7,9	1,3,4,6,8	1,2,3,4,6,8	1,2,4,6,7,8 1,3,4,6,7,9	1,3,4,6,7,8	1,2,3,4,7,8 1,2,3,4,7,9	1,2,3,4,7,8	1,2,3,4,6,7,9	
1	0-2	0.01	<0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	- ¹⁾	0.06	0.04	0.24
2	2-4	0.01	<0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.05	0.05	0.31
3	4-6	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.05	0.05	0.21
4	6-8	0.01	<0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.07	0.08	0.20
5	8-10	0.02	0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.20
6	10-12	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.04	0.03	0.21
7	12-14	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.19
8	14-16	0.02	0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.18
10	18-20	0.01	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.16
11	20-23	0.01	-	0.01	<0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.14
12	23-26	-	-	<0.01	-	-	0.01	0.01	0.01	0.02	0.07
13	26-29	-	-	-	-	-	<0.01	<0.01	0.01	0.02	0.51
14	29-32	-	-	<0.01	-	-	<0.01	0.01	0.04	0.02	0.20
15	32-35	-	-	<0.01	-	-	0.01	0.01	0.02	0.02	0.17
16	35-37	-	-	<0.01	-	-	<0.01	<0.01	0.01	0.02	0.06

1) : 検出せず
 1) : Not Detected

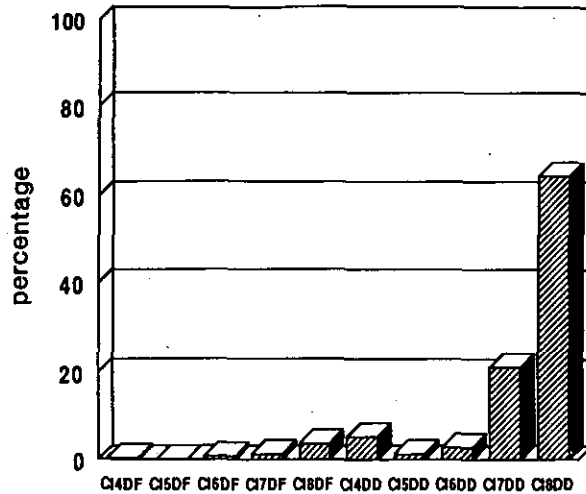


図 2 ダイオキシン類のコンジェナーパターン (全試料平均値)
 Fig. 2 Congener pattern of PCDD and PCDF (average of all samples)

浦底質では、全体に PCDF (特に Cl₇DF) の割合が低いことと、Cl₄DD の割合が高いという傾向になった。Cl₈DD の量が多いことは、燃焼由来の粉じんの寄与に加えて、除草剤として使用されていたペンタクロロフェノールなどの農業由来の寄与とが合わさったためと考えられる。Cl₄DD の場合は、1,3,6,8-Cl₄DD と 1,3,7,9-Cl₄DD の 2 種類のみが定量された。この 2 つの物質は、2,4,6-トリクロロフェノールの 2 量化で生成するため、2,4,6-トリフェノキシ基を持つ化学物質の合成過程の副生成物である可能性が高い。今、霞ヶ浦流域の水系で使用されている除草剤の 1 つ、CNP (4-ニトロフェニル 2,4,6-トリクロロフェニルエーテル) を例に寄与率を計算してみる。霞ヶ浦底質の CNP 濃度は約 30 ng/g であり¹⁴⁾、CNP 中に含まれる Cl₄DD として、140~170 μg/g という報告¹⁵⁾がある。霞ヶ浦底質での Cl₄DD への寄与は、5 pg/g 程度となる。CNP と Cl₄DD の水中からの除去率の差などを考慮していないが、底質中の Cl₄DD (表層で 40~50 pg/g) の 1 割程度 CNP が関与している可能性があり、このような物質が数個あれば Cl₄DD 量をほぼ説明できることになる。

3.3 鉛直分布のパターンと分解速度

底質の鉛直分布を支配するいくつかの因子と、実際の測定項目と合わせて考察する。図 3 に霞ヶ浦底質での主たるダイオキシン類、Cl₈DD, 1,3,6,8-Cl₄DD, 1,3,7,9-Cl₄DD の 3 つを、横軸に表層からの堆積年代をとって示した。これらのパターンは、いわば、底質の混合の結果生じたもので、堆積時の濃度はどのようであったかが重要であろう。

そこで、混合層の厚さ L, 1 次反応に仮定した分解半減期 T, フラックス F の 3 項目が変化し

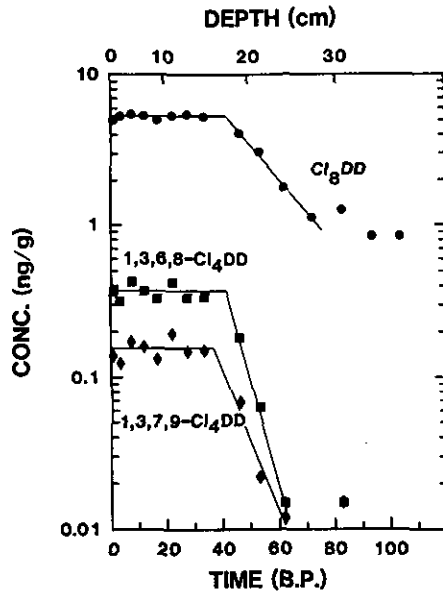


図 3 霞ヶ浦底質コア試料の Cl_8DD 、 $1,3,6,8-Cl_4DD$ 、 $1,3,7,9-Cl_4DD$ の鉛直分布
横軸単位のB.P.は、堆積時からの逆算年代を示す。

Fig. 3 Vertical profiles of Cl_8DD , $1,3,6,8-Cl_4DD$ and $1,3,7,9-Cl_4DD$ in Lake Kasumigaura sediment core samples
The unit of abscissa (B.P.) means elapsed year after deposition.

た場合の鉛直分布のパターンを計算した。ただし、 L は、時間の次元を持つとする（霞ヶ浦では、平坦部の厚さから $L=40$ 年）。ここで、次の5つの場合を図示した（図4）。

- ① 混合がなく、フラックス一定で、分解性もない場合。
 $L=0$, $T=\infty$, $F=CONSTANT$
- ② 混合がなく、フラックス一定で、分解がある場合。
 $L=0$, $T=20$, $F=CONSTANT$
- ③ 混合があり、フラックス一定で、分解がある場合。
 $L=40$, $T=20$, $F=CONSTANT$
- ④ 混合があり、ある時点からフラックスが増加し、分解速度の早い場合。
 $L=40$, $T=20$, F は、60B.P.まで①～③と等しく、以後現在まで直線的に100年で10倍に増加する場合。
- ⑤ 混合があり、ある時点からフラックスが増加し、分解速度の遅い場合。
 $L=40$, $T=100$; F は、60B.P.まで①～③と等しく、以後現在まで直線的に100年で10倍に

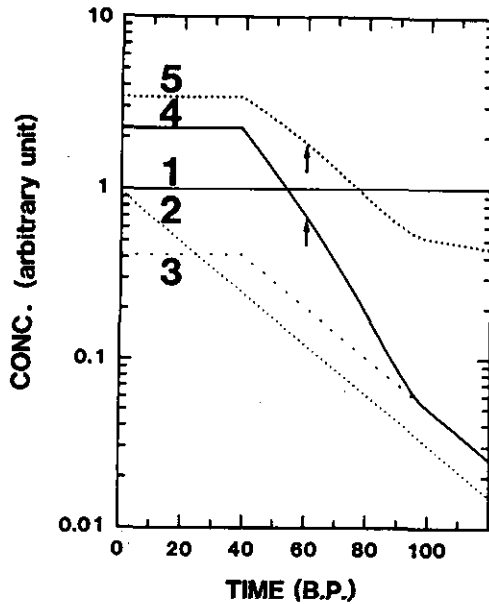


図 4 混合層 (L), 分解半減期 (T), フラックス (F) を変化させたときの鉛直分布のモデル

1. $L=0, T=\infty, F=\text{constant}$
2. $L=0, T=20, F=\text{constant}$
3. $L=40, T=20, F=\text{constant}$
4. $L=40, T=20, F: \text{increase at } 60 \text{ B.P.}$
5. $L=40, T=100, F: \text{increase at } 60 \text{ B.P.}$

矢印はフラックスを変化させ始めた点を示す。

Fig. 4 Vertical profile model calculated by changing in mixing layer depth, half-life and flux

1. $L=0, T=\infty, F=\text{constant}$
2. $L=0, T=20, F=\text{constant}$
3. $L=40, T=20, F=\text{constant}$
4. $L=40, T=20, F: \text{increase at } 60 \text{ B.P.}$
5. $L=40, T=100, F: \text{increase at } 60 \text{ B.P.}$

Arrow indicates the changing point of flux.

増加する場合。

実際に報告されたデータなどと比較すると、①の場合は、霞ヶ浦では無機元素が近い例である¹²⁾。多くの無機汚染元素は深さ方向での増加が少なく、分布のパターンは①に近い形が得られた。②は、分解を解析する上での理想状態で、安定な湖沼底質ではこの形が得られることもある。ここに混合が加わった場合、③のようになる。このとき、平坦部の厚さはLになり、その濃度は、いわゆる新鮮な底質の値よりも低くなる。また、混合層以下の部分の傾きは②に等しくな

る。3.1で ^{210}Pb の直線部分を使って堆積速度を求めたのはこの理由による。④の場合、フラックスの増加が起こった時点よりもしだけ深い部分まで混合の影響が現れ、S字に近い分布を示す。さらに、分解速度が遅い⑤の場合、当然④よりも変化の傾きが緩くなるが、①から②への移行のように、④と⑤の傾きの比が一定になるようなことはない。ダイオキシン類の場合、平坦部の厚さは40年程度で、 ^{210}Pb の結果と一致している。少ないデータから回帰するのは危険だが、混合層以深の変化の傾きは、 Cl_8DD と Cl_4DD で異なるようである。また、 Cl_8DD は、70~80年前でほぼ平坦になっている。これは、⑤の真の減衰項に相当する可能性がある。Hitesは、多くの湖沼底質の分析から、1938年をダイオキシン類が増加する horizon dateと呼んでいる⁸⁾。霞ヶ浦の結果は、底質の混合による悪条件があるが、約40年という混合層を考慮すると、実際には1950~1960年前後に増加が始まっていることとなり、ほぼ上記の説を支持するものとなった。

引用文献

- 1) Young, A. L., H. K. Kang and B. M. Shepard (1983): Chlorinated dioxins as herbicide contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, **17**, 530A-540A.
- 2) Olie, K., P. L. Vermrulen, and O. Hutzinger (1977): Chlorodibenzo-*p*-dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in the Netherlands. *Chemosphere*, **8**, 455-459.
- 3) Bumb, R. R., W. B. Crummett, S. S. Cutie, J. R. Gledhill, R. H. Hummel, R. O. Kagel, L. L. Lamparski, E. V. Luoma, D. L. Miller, T. J. Nestruck, L. A. Shadoff, R. H. Stehl and J. S. Smith (1980): Trace chemistry of fire: A source of chlorinated dioxins. *Science*, **210**, 385-390.
- 4) Ligion, Jr., W. V., B. D. Steven, B. Dorn, R. J. May and M. J. Allison (1989): Chlorodibenzofuran and chlorodibenzo-*p*-dioxin levels in Chilean mummies dated about 2800 year before the present. *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 1286-1290.
- 5) Czuczwa, J. M. and R. A. Hites (1984): Environmental fate of combustion-generated polychlorinated dioxins and furans. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 444-450.
- 6) Czuczwa, J. M. and R. A. Hites (1986): Airborne dioxins and dibenzofurans: sources and fates. *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 195-200.
- 7) Hagenmaier, H., H. Brunner, R. Haag and A. Berchtold (1986): PCDDs and PCDFs in sewage sludge, river and lake sediments from southwest Germany. *Chemosphere*, **15**, 1421-1428.
- 8) Hites, R. A. (1990): Environmental behavior of chlorinated dioxins and furans. *Acc. Chem. Res.*, **23**, 194-201.
- 9) Krishnaswamy, S., D. Lal, J. M. Martin and M. Maybeck (1971): Geochronology of lake sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **11**, 407-414.
- 10) Rappe, C. (1984): Analysis of polychlorinated dioxins and furans. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 78A-90A.
- 11) 浅見輝男・小野美起子・三瓶英敏 (1979) : 霞ヶ浦および流入河川底質の重金属分布 (第1報) . 日本土壤肥科学会誌, **50**, 138-142.
- 12) 井内美郎・横田節哉・小野寺公児・大嶋和雄・木下泰正・斎藤文紀・青木市太郎・斎藤英二 (1984) : 湖沼堆積物の調査技術に関する研究. 昭和58年度環境庁環境保全研究成果集 (I) , 60-1-60-26.

- 13) 松本英二 (1984) : 東京湾および霞ヶ浦における堆積速度 (共同調査結果) . 文部省「環境科学」研究報告集, B217-R16-1, 87-89.
- 14) Ono, H. and J. Nakanishi (1987) : Herbicide, CNP contamination in the Lake Kasumigaura Basin. *Water Res.*, **21**, 669-675.
- 15) Yamagishi, T., T. Miyazaki, K. Akiyama, M. Morita, J. Nakagawa, S. Horii and S. Kaneko (1981) : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in commercial diphenyl ether herbicides, and in freshwater fish collected from the application area. *Chemosphere*, **10**, 1137-1144.

I-4 霞ヶ浦における湖水中の多環芳香族化合物濃度とその年変動

Monitoring of the Levels of Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Lake Kasumigaura Water

白石寛明¹

Hiroaki SHIRAISHI¹

要 旨

多環芳香族化合物、特に水道水中から検出された、フルオレン、ジベンゾフラン、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、及びピレンの存在量の調査を水源である霞ヶ浦の10地点で1986年4月～1987年3月にかけて行った。観測された湖水中のこれら化合物の濃度は極めて低かった。濃度範囲はフルオレン (1.8～0.4 ng/l)、ジベンゾフラン (3.1～0.3 ng/l)、フェナントレン (2.2～0.7 ng/l)、フルオランテン (1.1～0.4 ng/l)、ピレン (0.9～0.3 ng/l) であった。フルオレンとジベンゾフランは水道水中の方が高濃度であり、フェナントレンは同程度、フルオランテンとピレンは原水より水道水の方が低濃度であった。

Abstract

Water samples from 10 locations in Lake Kasumigaura have been analyzed for 6 polynuclear aromatic hydrocarbons by high resolution gas chromatography-mass spectrometry in the selected ion monitoring mode. The results showed the concentration (ng/l) ranges of fluorene, dibenzofuran, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, and pyrene were 1.8～0.4, 3.1～0.3, 2.2～0.7, 1.1～0.4, and 0.9～0.3, respectively. It was found that the levels of fluoranthene and pyrene in tap water were lower than in the lake water, which is the source for tap water. Dibenzofuran and fluorene levels were higher in some tap waters than in the raw waters.

1 はじめに

水道水中に塩化多環芳香族化合物が低濃度ではあるが検出された。水道原水である霞ヶ浦湖水には、塩化多環芳香族化合物が検出されないことから、水道水を供給するための湖水の処理過程で使用される塩素により、これらの有機塩素化合物が生成するものであると考えられた。また多

1. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

環芳香族化合物の濃度自体も湖水中の濃度の方が低いことから、水道管などに使用されているタール系塗料が、多環芳香族化合物の供給源である可能性が指摘された¹⁾。多環芳香族化合物が塩素と反応して塩素化した化合物が生じることはよく知られている^{2,3)}事実であり、塩化多環芳香族化合物が人為的に生成していることは疑いない。しかし、反応の原料となる多環芳香族化合物の起源については、これらが環境中に広く存在する化合物であるため⁴⁾不明な点がある。湖水中の化合物が急速ろ過や活性炭処理などの水処理過程によっては除去されずに蛇口に至り到達している可能性も否定できない。そこで、この点をさらに検討するために、多環芳香族化合物、特に水道水中に検出される、フルオレン、ジベンゾフラン、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、及びピレンの霞ヶ浦の湖水中の濃度の計測を1年にわたって行った。

2 実験

採水地点は図1に示した。地点8に水道水の取水口がある。採水日は、1986年4月9日、5月8日、6月11日、7月9日、8月6日、9月10日、10月9日、11月12日、及び1987年3月4日の9回である。アクリル製コア採水器を用い、表層から2mまでを均一に混合した湖水の一部

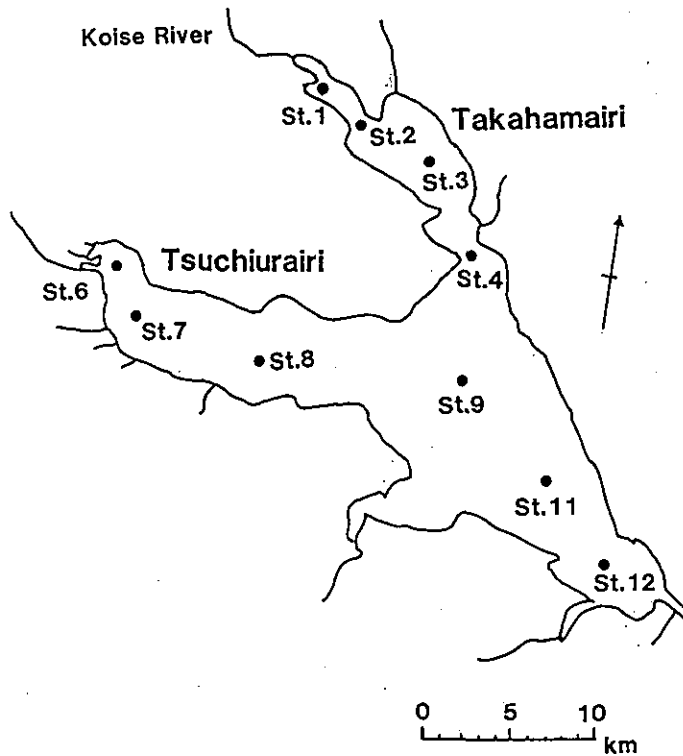


図 1 霞ヶ浦の採水地点
Fig. 1 Sampling points in Lake Kasumigaura

をガラス容器に移し取り、これを研究室に持ち帰り直ちに抽出操作を行った。採水した湖水(1l)はあらかじめ450°Cに加熱し有機物を除去したグラスフィルター(Whatnam GF/C)でろ過後、内部標準として重水素で標識されたピレン-d10を加え、ヘキサン(残留農薬用, 和光)50mlで2回抽出をした。ろ紙上に集められた懸濁物質は、アセトン(残留農薬用, 和光)を25ml用い同様の抽出操作を行った。抽出液はロータリーエバポレーターと窒素気流を用いて0.2mlにまで濃縮した。

定量は、ガスクロマトグラフィー質量分析計(DX-303, 日本電子)を用い、SIM(Selected Ion Monitoring)法で行った。イオン化は電子衝撃法によった。イオン源温度は、200°C、イオン化電圧は70eV、イオン化電流は300 μ Aとした。フルオレン、ジベンゾフラン、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、及びピレンに対して、それぞれm/z166, 168, 178, 178, 202, 及び202のイオンを定量に用いた。ガスクロマトグラフへはスプリットレス法により約2 μ lを注入した。フェーズドシリカキャピラリーカラム(内径0.25mm, 長さ25m, SE-52, ガスクロ工業)を用い、カラム温度は、90°Cで2分間保持したのち、毎分8°Cの速度で200°Cにまで昇温させた。インターフェイス及び注入口温度は250°Cとした。

3 結果と考察

先に報告した水道水中の多環芳香族化合物の濃度範囲はフルオレン(5.8~0.25ng/l)、ジベンゾフラン(56.2~1ng/l)、フェナントレン(1.41~0.45ng/l)、フルオランテン(0.21~0.02ng/l)、ピレン(不検出)であり、どの場合でもジベンゾフランが主成分であった。表1に水道の取水口付近で採水した湖水中の濃度を示した。1986年4月~1987年3月にかけて9回測定を行ったが、観測された湖水中の溶存態の多環芳香族化合物の濃度は極めて低かった。濃度範囲はフルオレン(1.8~0.4ng/l)、ジベンゾフラン(3.1~0.3ng/l)、フェナントレン(2.2~0.7ng/l)、フル

表 1 霞ヶ浦湖水中(地点8)のPAH濃度(ng/l)(1986年4~11月)
Table 1 The Concentration (ng/l) of PAH in Lake Kasumigaura water (St. 8)
(April ~ November 1986)

	フルオレン	DBF	フェナントレン	アントラセン	フルオランテン	ピレン
4/86	1.3	1.7	1.3	0.2	0.7	0.5
5/86	0.8	3.1	1.1	0.1	0.4	0.3
6/86	1.8	2.1	1.8	0.5	0.8	0.9
7/86	0.8	0.7	1.7	0.3	0.9	0.6
8/86	1.4	1.1	2.2	0.4	1.1	0.8
9/86	0.4	0.3	0.7	0.2	0.7	0.4
10/86	0.4	0.3	0.8	0.2	0.9	0.5
11/86	0.8	0.5	1.0	0.2	0.6	0.4
3/87	1.0	1.0	0.6	ND	0.8	0.8

オランテン (1.1~0.4 ng/l), ビレン (0.9~0.3 ng/l) であった。また、水道水の場合のように、すべての試料でジベンゾフランが主成分であるということにはなかった。

これらのデータから見る限り、フルオレンとジベンゾフランは水道水中の方が高濃度であり、フェナントレンは同程度、フルオランテンとピレンは原水より水道水の方が低濃度となっているといえる。ただし、塩素化されていないフルオランテンとピレンだけに着目し、原水から蛇口までの間で、これら化合物は除去されているというのは早計で、塩素との反応生成物である塩化フェナントレンと塩化フルオランテンが、それぞれの無置換体の0.4倍及び0.7~7倍存在していることに注意する必要がある¹⁾。水道水中で濃度が低いのは、フェナントレン、フルオランテンやピレンが塩素と反応しやすいためであると考えられ⁵⁾、測定された以外の物質に形を変えて存在している可能性は残っている。水道水中のフルオレンとジベンゾフランの濃度変動はかなり大きかったが、湖水中の濃度変化はそれほど大きくはなかった。今回の調査では、フルオレンとジベンゾフランに関しては、水道水の最高濃度を上回る濃度を湖水に見いだすことはできなかった。このことから、これらの化合物に関しては湖水以外、例えば、配管中の塗料などを供給源と考える必要があると思われる。

図2~5に、霞ヶ浦全域のこれら化合物の溶存態の濃度を示した。図6には、懸濁態の濃度を示した。また、表2~5に測定日別の化合物間の相関係数と濃度の平均値を示した。1986年5月(図2)には、ジベンゾフランの濃度が河口域で高く、このときには明らかに河川からジベンゾフランの流入があったことが分かる。また、通常見られている(表3~5)ジベンゾフランとフ

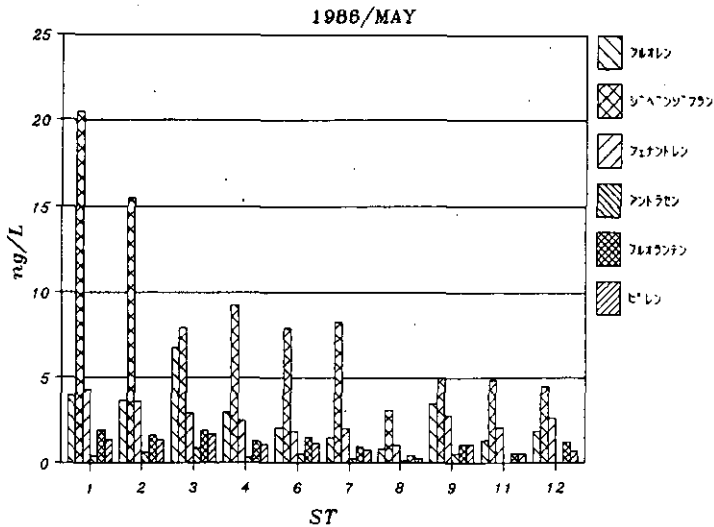


図 2 霞ヶ浦水中の多環芳香族化合物の濃度 (1986年5月, 溶存態)

Fig. 2 The Concentrations of PAHs in Lake Kasumigaura water (Dissolved, May 1986)

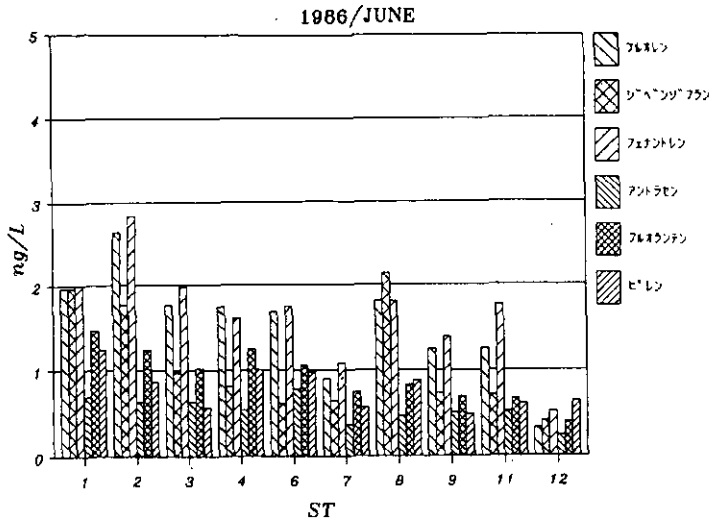


図 3 霞ヶ浦水中の多環芳香族化合物の濃度 (1986年 6月, 溶存態)
 Fig. 3 The Concentrations of PAHs in Lake Kasumigaura water
 (Dissolved, June 1986)

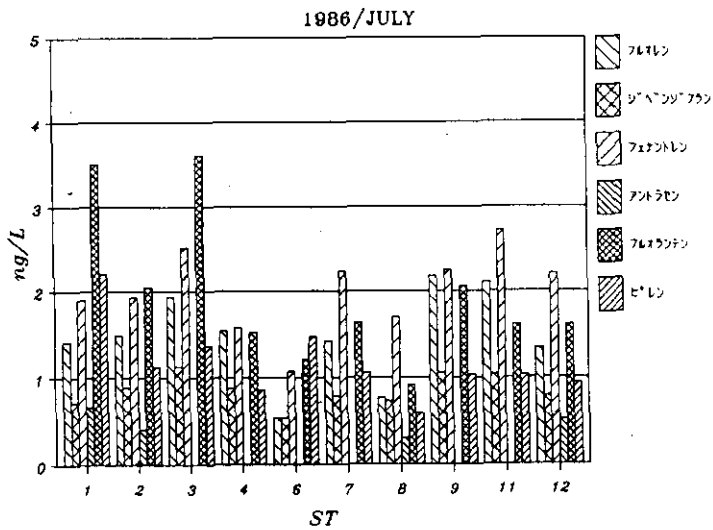


図 4 霞ヶ浦水中の多環芳香族化合物の濃度 (1986年 7月, 溶存態)
 Fig. 4 The Concentrations of PAHs in Lake Kasumigaura water
 (Dissolved, July 1986)

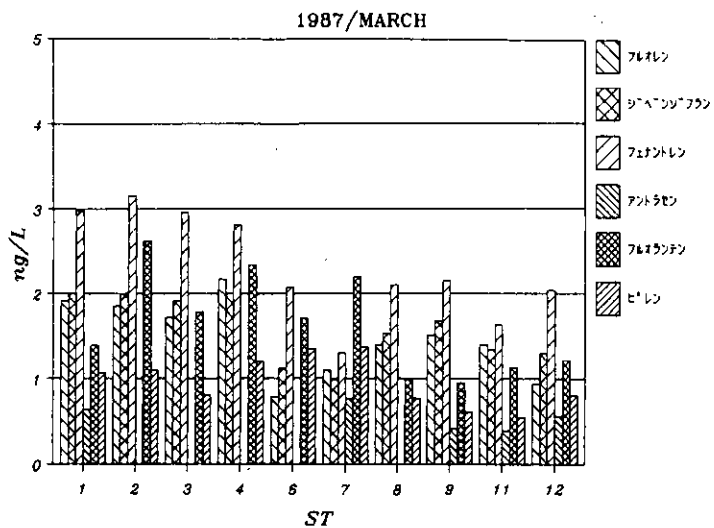


図 5 霞ヶ浦水中の多環芳香族化合物の濃度 (1987年3月, 溶存態)
Fig. 5 The Concentrations of PAHs in Lake Kasumigaura water
(Dissolved, March 1987)

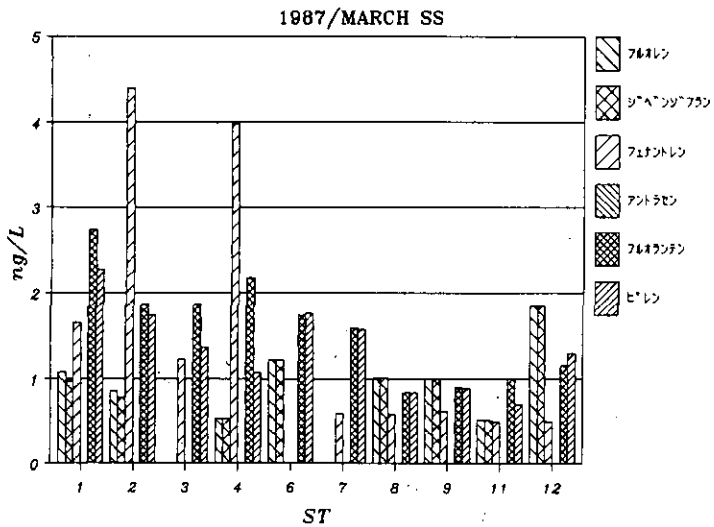


図 6 霞ヶ浦水中の多環芳香族化合物の濃度 (1987年3月, 懸濁態)
Fig. 6 The Concentrations of PAHs in Lake Kasumigaura water
(Suspended solid, March 1987)

表 2 霞ヶ浦湖水中のPAHの相関係数と平均濃度 (1986年5月)
 Table 2 The Correlation matrix and average concentrations of PAHs
 in Lake Kasumigaura water (Dissolved, May 1986)

	フルオレン	DBF	フェナントレン	アントラセン	フルオランテン	ピレン	ng/l
フルオレン	1	.4224	.6499	.8673	.7916	.9099	2.8
DBF		1	.8281	.4208	.7279	.6220	8.6
フェナントレン			1	.4805	.7743	.7239	2.6
アントラセン				1	.7435	.9100	.4
フルオランテン					1	.9251	1.2
ピレン						1	1.0

表 3 霞ヶ浦湖水中のPAHの相関係数と平均濃度 (1986年6月)
 Table 3 The Correlation matrix and average concentrations of PAHs
 in Lake Kasumigaura water (Dissolved, June 1986)

	フルオレン	DBF	フェナントレン	アントラセン	フルオランテン	ピレン	ng/l
フルオレン	1	.7172	.9637	.7650	.8304	.5623	1.5
DBF		1	.6555	.3294	.5637	.5706	1.1
フェナントレン			1	.7472	.7269	.4122	1.7
アントラセン				1	.7754	.5455	.5
フルオランテン					1	.7893	.9
ピレン						1	.7

表 4 霞ヶ浦湖水中のPAHの相関係数と平均濃度 (1986年7月)
 Table 4 The Correlation matrix and average concentrations of PAHs
 in Lake Kasumigaura water (Dissolved, July 1986)

	フルオレン	DBF	フェナントレン	アントラセン	フルオランテン	ピレン	ng/l
フルオレン	1	.9222	.8232	-.2606	.4660	-.0191	1.5
DBF		1	.7973	-.3651	.4091	-.2162	.9
フェナントレン			1	-.0897	.3868	-.0978	2.0
アントラセン				1	.2557	.3727	.2
フルオランテン					1	.7232	2.0
ピレン						1	1.2

フルオレンとの相関が失われている(表2)ことから、この汚染は通常の供給源とは別のジベンゾフランを主体とする汚染であったことが分かる。この月には取水口のある地点8での多環芳香族化合物濃度は全地点中最低であったが、これは偶然であろう。翌月(図3)には、ジベンゾフランの濃度は平均値で8.6 pptから1.1 pptにまで急激に減少しており、湖水中のジベンゾフラン

表 5 霞ヶ浦湖水中の PAH の相関係数と平均濃度 (1987年 3月)
 Table 5 The Correlation matrix and average concentrations of PAHs
 in Lake Kasumigaura water (Dissolved, March 1987)

	フルオレン	DBF	フェナントレン	アントラセン	フルオランテン	ピレン	ng/l
フルオレン	1	.9189	.7415	-.2663	.3539	-.0590	1.5
DBF		1	.9192	-.3909	.2442	-.1437	1.6
フェナントレン			1	-.4946	.3679	.0742	2.3
アントラセン				1	-.2739	-.0248	.3
フルオランテン					1	.7290	1.6
ピレン						1	1.0

濃度は比較的速やかに低下するようである。また、取水口付近で濃度が若干濃度が高いように見えるがごくわずかであった。以後、ジベンゾフランの濃度は平均値で 0.9 ppt (1986年 7月), 1.6 ppt (1987年 3月) となっており、湖水全体に濃度が上昇することはなかった。このことから、5月に見られた汚染は一時的なものであると思われる。

化合物間の相関は、ジベンゾフラン、フルオレンとフェナントレン、ピレンとフルオランテン間で年間を通して比較的よい正の相関が見られた。これらは、分子量の小さいグループと大きいグループ (あるいは三環と四環) の組み合わせになっている。これは、ピレンとフルオランテンは懸濁物質中により多く存在しているが、ジベンゾフラン、フルオレンとフェナントレンなどは溶存態の方が多 (表 6) といった環境中での挙動の相違を反映しているのかもしれない。また、アントラセンとフルオレン間のように、相関がある時期とない時期が極端に変化する組み合わせもあった。これは、組成を異にする様々な汚染源が存在していることを示唆している。

表 7 に、霞ヶ浦湖水中 (溶存態) 及び水道水中の濃度のデータを用いた主成分分析の計算結果 (固有値と固有ベクトル) を示した。使用するデータにより結果も異なってくるが、このデータを用いた場合は、おもに第一主成分は全濃度に関する成分、第二主成分はジベンゾフランとピレンの組成に関する成分、第三主成分はアントラセンの含有量に関する成分と考えられ、第三主成分までで累積寄与率は 89% となる。これによれば、化合物は①ジベンゾフラン、②フルオレンとフェナントレン、③ピレンとフルオランテン、④アントラセンの 4 つに分類されることになる。土壌あるいは大気試料について同様の解析をしている報告⁶⁾があるが、そこでもピレンとフルオランテンは挙動が類似している。図 7 に第一と第二成分のスコアを図示した。水道水は、様々な処理がなされているため、ジベンゾフランが多くピレン、フルオランテンが少ないといった特徴があり湖水とは区別される。また、高浜入の地点 1, 2, 3 では河川からの影響を受けるため、湖心部は異なったスコアを持つことがある。水道取水口のある地点 8 の水質は、測定対象とした化合物から見る限り比較的安定しているようである。

表 6 霞ヶ浦湖水中(懸濁態)のPAH¹⁾の相関(1987年3月)
 Table 6 The Correlation matrix and average concentrations of PAHs
 in Lake Kasumigaura water (Suspended Solid, March 1987)

	フルオレン	DBF	フェナントレン	フルオランテン	ピレン	ng/l
フルオレン	1	.1499	.4239	.0152	.0240	.5
DBF		1	.1398	.0556	-.2322	.8
フェナントレン			1	-.3637	-.6564	.1
フルオランテン				1	.7722	1.3
ピレン					1	1.5

¹⁾アントラセンは妨害物質が存在したため測定していない。

表 7 湖水と水道水データの主成分分析結果(試料数=50)
 Table 7 The Results of principle concontent analysis using
 the concentration of PAH in Lake and tap water (n=50)

主成分	1	2	3	4	5	6
固有値	2.509	1.851	.964	.406	.168	.102
固有ベクトル						
フルオレン	.524	-.321	.191	.027	.618	.450
DBF	.238	-.603	.068	.605	-.401	-.222
フェナントレン	.510	-.238	-.181	-.685	-.191	-.383
アントラセン	.208	-.276	.869	-.108	-.335	.052
フルオランテン	.448	.378	-.411	.145	-.442	-.520
ピレン	.406	.508	-.049	.366	.336	-.573
累積寄与率(%)	41.8	72.7	88.7	95.5	98.3	100

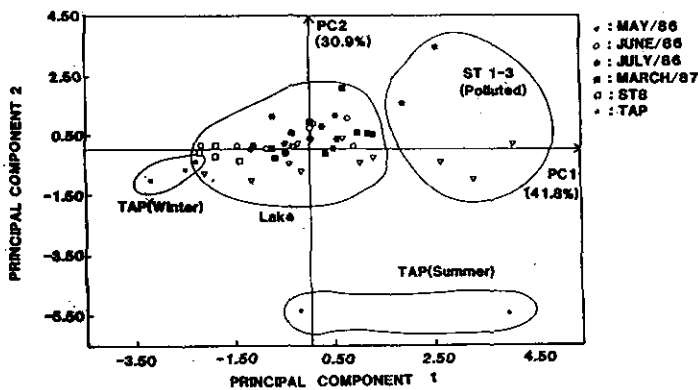


図 7 霞ヶ浦水中の多環芳香族化合物の第一、第二主成分のスコア
 Fig. 7 The First and second principle concontent scores

4 まとめ

今回は霞ヶ浦湖水を中心にジベンゾフラン等の調査を行った。水道原水中のこれら化合物の濃度は非常に低いレベルにあり、しかも季節変化等は観測されず比較的安定しているようである。しかし、河口域は突発的な汚染の影響を受けることがある。高濃度で観測されるときは水道水中のジベンゾフランの起源に関しては、そのような濃度を湖水中に見いだすことはできず、湖水以外に別の供給源を考えるざるを得ない。これを明らかにするには、水道水中の濃度変化の原因を解明する必要があると思われる。

謝 辞 本研究所の霞ヶ浦全域調査グループの皆様には試料採取に際して多くの協力を頂きました。ここに厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.
- 2) Oyler, R. A., D. L. Bodenner, K. J. Liukkonen, R. M. Carlson, H. L. Koppermann, R. Caplr (1978): Determination of aqueous chlorination reaction products of polynuclear aromatic hydrocarbons by reversed phase high performance liquid chromatography-gas chromatography. *Anal. Chem.*, **50**, 837-842.
- 3) Oyler, R. A., R. J. Liukkonen, M. K. Lukasewycz, D. A. Cox, D. A. Peae, R. M. Carlson (1982): Implication of treating water containing polynuclear aromatic hydrocarbons with chlorine: A gas chromatographic-mass spectrometric study. *Environ. Health Pers.*, **46**, 73-86.
- 4) Harrison, R. M., R. Perry and R. A. Wellings (1975): Polynuclear aromatic hydrocarbons in raw, potable and waste waters. *Water Res.*, **9**, 331-346.
- 5) Harrison, R. M., R. Perry and R. A. Wellings (1976): Effect of water chlorination upon levels of some polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, **10**, 1151-1156.
- 6) Vogt, N. B., F. Brakstad, K. Thrane, S. Nordenson, J. Krane, E. Aamot, K. Kolset, K. Esbensen and E. Steinnes (1987): Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and air: Stastical analysis and claddofication by SIMCA method. *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 35-43.

I-5 塩化ビニリデン樹脂の熱分解による芳香族塩素化合物の生成

Formation of Chlorinated Aromatic Compounds by Pyrolysis of Poly (vinylidene chloride)

安原昭夫¹

Akio YASUHARA¹

要 旨

ごみの埋立地や焼却場で塩素系ポリマーが分解するときに、どのような生成物が生じるかを明らかにするために、以下のような熱分解実験を行った。塩化ビニリデン樹脂で作られたラップ材を空気気流中で 500℃で熱分解した。ヘキサンを入れたインピンジャーで捕集された生成物をキャピラリーカラムを使用したGC/MSで分析した結果、クロロベンゼン類、クロロスチレン類、クロロフェノール類、クロロフェニルアセチレン類、クロロナフタレン類 (PCN)、クロロビフェニル類 (PCB)、クロロベンゾフラン類が主要な化合物として検出された。これらの化合物の大半はこの実験で新たに検出されたものである。また、GC/MSによる高感度分析法であるSIM法を使用したところ、4種類のモノクロロジベンゾフランすべてを検出した。2-クロロ体と3-クロロ体は使用したキャピラリーカラムでは完全には分離できなかったが、樹脂1gからのおおよその生成量として、1-クロロ体で0.2μg、2-クロロ体及び3-クロロ体(合計)で2μg、4-クロロ体で0.4μgであった。さらに、200~600℃までの温度で熱分解を行ったところ、200℃でも多くの塩素化芳香族化合物の生成が観察された。600℃での熱分解では、少量の3-クロロジベンゾフランとジクロロジベンゾフランの生成が観察された。

Abstract

Two kinds of food wrapping film made of poly (vinylidene chloride) was decomposed by pyrolysis at 500℃ under air stream and pyrolysis products were trapped into hexane and identified by capillary gas chromatography-mass spectrometry, in order to clarify emission of pyrolysis products from reclaimed land or incinerators. Many chlorinated aromatic compounds and polynuclear aromatic hydrocarbons were detected. Important products were chlorinated benzenes, chlorinated styrenes, chlorinated phenols, chlorinated phenylacetylenes, chlorinated naphthalenes, chlorinated biphenyls, and chlorinated benzofurans. Most of these compounds were newly detected. Four monochlorodibenzofurans were de-

1. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

ected by selected ion monitoring. Although 2-chloro- and 3-chlorodibenzofurans were not separated satisfactorily even with capillary column, rough amounts produced from one gram of poly (vinylidene chloride) were $0.2 \mu\text{g}$ for 1-chlorodibenzofuran, $2 \mu\text{g}$ in total for 2- and 3- chlorodibenzofurans, and $0.4 \mu\text{g}$ for 4-chlorodibenzofuran. Further experiments for pyrolysis were carried out at 200 to 600°C where cryogenic trap was used with solvent trap. It was found that many chlorinated aromatic compounds were produced by pyrolysis even at 200°C. Small amount of 3-chlorodibenzofuran and dichlorodibenzofuran were detected in the pyrolysis at 600°C.

1 はじめに

塩素を含有する物質を燃やしたときに、ポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (PCDD) やポリクロロジベンゾフラン (PCDF) のような、有毒の有機塩素化合物が生成するといわれている¹⁻⁸⁾。特に、PCDFについてはポリクロロビフェニル (PCB) の熱分解で生成することが、多くの研究で分かっている⁹⁻¹⁶⁾。また、塩素原子を含むポリマーも燃焼の際、いろいろな塩素化合物が大気中に放出され、大気汚染の原因の一つになっている。すでに、数人の研究者によって、塩化ビニル樹脂の熱分解が調べられている。Iidaらは、塩化ビニル樹脂を熱分解して、芳香族炭化水素のほかに、ポリクロロベンゼンが生成することを報告している^{17,18)}。山崎らは、塩化ビニル樹脂の熱分解で、大気の塩化水素と共に、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、1,1,1-トリクロロエタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1,2-テトラクロロエタンが発生することを見いだした^{19,20)}。Ahlingらは、塩化ビニル樹脂を燃やしたとき、ジクロロベンゼンからヘキサクロロベンゼンまでのクロロベンゼン類多数が生成することを観察した²¹⁾。しかし、Hawley-Fedderらの研究²²⁾によれば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル樹脂の混合物を800°C以上で燃やしたときの主成分は、アルキルベンゼン、脂肪族炭化水素、多環芳香族炭化水素で、塩素化合物の含量は非常に低いとのことである。

ポリ塩化ビニル樹脂と同じように、広くラップ材として使われているポリマーに塩化ビニリデン樹脂がある。塩化ビニリデン樹脂の熱分解については、塩化ビニル樹脂の場合ほどには研究されていない。平松は塩化ビニリデン樹脂の熱分解で、塩化ビニルができてくることを報告している²³⁾。また、Ballistreriらは、質量分析計に塩化ビニリデン樹脂を直接導入法で挿入し、加熱分解させると、ジクロロエチレン、トリクロロベンゼン、テトラクロロナフタリンが生成することを観測している²⁴⁾。DoughertyとCollazo-Lopez²⁵⁾は、塩化ビニリデン樹脂を1,000°Cで熱分解させて得られた生成物中から、ヘキサクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、ポリクロロスチレン、ポリクロロナフタリン、PCB、多環芳香族炭化水素のクロロ置換体を検出することに成功している。塩化ビニリデン樹脂は広く使われているにもかかわらず、その熱分解についてはあまり知られていない。最近、立川ら²⁶⁾は日本国内の埋立地から、かなりの量のポリクロロベンゼンやPCBが放出されていることを見だし、これらの化合物は塩素原子を含むポリマーが熱で分解する際に生成したのであろうと述べている。塩化ビニリデン樹脂が焼却炉で燃やされたり、

埋立地で熱分解したりするときに、どのような化合物が生成してくるかを調べることは極めて重要なことであり、また学問的にも意義のある研究である。また、環境汚染や人体影響の点から、塩素原子を含むポリマーが埋立地などにおいても、PCBやPCNなどの毒性の高い有機塩素化合物の発生源になり得るということは深刻な問題であり、緊急に調査の必要がある。これらの点にかんがみ、筆者らは塩化ビニリデン樹脂製のラップ材を熱分解させ、生成物の同定を行った。多くの芳香族塩素化合物がかなりの量で生成することが分かった。多くの成分は新しく検出されたものである。

2 実験方法

2.1 実験材料

日本で製造されている食品用ラップ材2種類(サンプルAとB)をサンプルとして使用した。これらの製品の中には、脂肪酸の誘導体と植物油のエポキシドが含まれている。

2.2 熱分解

石英製ポートに秤量したサンプルを入れ、500℃に熱せられた石英管の中に挿入した。この石英管には300 ml/minで空気が通してあり、熱分解は20分間行われた。この空気は純窒素と純酸素から調整されたものである。挿入するとすぐに熱分解が始まり、発生したガスをヘキサン(20 ml)を入れたインピンジャーに通気して、有機成分を吸収させた。このインピンジャーは氷で冷やしてあり、2連にして使用した。装置の概略を図1に示した。サンプルの詳細は表1に示し

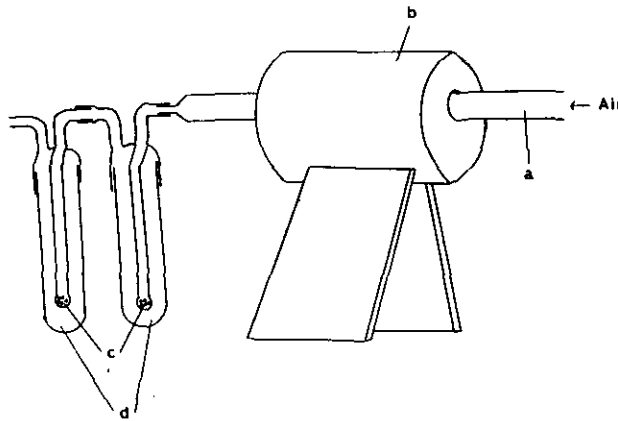


図 1 熱分解装置

a : 石英管 (内径 25mm, 長さ 60cm), b : 電気炉, c : 先端にフィルターが付いたガス導入管, d : 捕集管 (内径 32mm, 高さ 25cm)

Fig. 1 Apparatus for pyrolysis

a : Quartz tube (25mm i.d., 60cm length), b : electric furnace, c : gas inlet tube with a filter at the end, d : trap (32mm i.d., 25cm height)

表 1 熱分解に用いた試料の詳細
Table 1 Details of samples used for pyrolysis

Run	Samples	Weight (g)
1	Polymer A	1.099
2	Polymer A	1.294
3	Polymer A	1.406
4	Polymer A	1.216
5	Polymer A	1.233
6	Polymer A	1.358
7	Polymer B	1.539
8	Polymer B	1.321

た。ヘキサン溶液を合わせて、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレータと窒素ガスの吹きつけにより、注意深く濃縮した。濃縮液はガスクロマトグラフィー (GC) 及びガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) で分析した。比較のため、未使用のラップ材 (A と B) を各々ヘキサンで2日間、ソックスレー法で抽出した。さらに200℃と600℃で熱分解を行った。ただし、生成物は低温トラップで捕集したため、十分な捕集ができなかったため、定量は行わなかった。また窒素ガス中、500℃での熱分解も行った。

2.3 ガスクロマトグラフィー質量分析法

ガスクロマトグラフの操作条件は次のとおりである。

装置	Hewlett Packard 社 5890A ガスクロマトグラフ、システムインストルメンツ社 7000B インテグレータ
カラム	クロスリンク型 SE-54 ヒューズドシリカキャピラリー (内径 0.20mm, 長さ 50m, 膜厚 0.33 μm)
カラム温度	40℃ (5分) ~ 230℃ まで 6℃/min で昇温
注入口温度	250℃; 検出器, FID
検出器温度	250℃
カラムヘッド圧力	138kpa
キャリアーガス (He) の全流量	35 ml/min
注入方式	スプリット注入

質量分析計の操作条件は次のとおりである。

装置	日本電子製 JMS-DX300 質量分析計, Hewlett Packard 社 5870A ガスクロマトグラフ, 日本電子製データ処理システム
----	--

イオン源温度	200℃
イオン源圧力	10 ⁻⁶ torr以下
イオン化電圧	70V
イオン化電流	300μA
加速電圧	3kV
スキャン幅	10~500
スキャン速度	1.4 秒
繰り返し測定時間	2 秒

GC/MSで同定を行い、GCで定量を行った。

2.4 選択イオン検出法 (SIM)

モノクロロジベンゾフランを定量するために選択イオン検出法を用いた。GC/MSの操作条件はほとんど2.3と同じである。カラムはクロスリンク型メチルシリコンヒューズドシリカキャピラリーで、カラム温度は70℃(2分)~250℃まで、8℃/minで昇温。設定質量数はモノクロロジベンゾフランに対して139, 202及び204, 内部標準(2-フロロビフェニル)に対して172を用いた。スイッチング速度は0.1秒、標品の1-, 2-, 3-及び4-クロロジベンゾフランは和光純薬(株)より購入した。4-クロロ体の純度はGCより約70%であった。

3 結果と考察

熱分解を400℃, 500℃, 600℃で行ったときには、石英管中には残渣は何も残らなかったが、200℃あるいは300℃で行ったときは、大量の炭が残った。いずれの場合も熱分解の開始直後に多量の塩化水素ガスが発生した。600℃以下の温度では燃焼は起こらなかった。一方、700℃以上では激しい燃焼が起こり、すすがたくさん生じた。このすすがインピンジャーのフィルターの部分に詰まってしまうために、700℃以上での実験は行わなかった。

サンプルAとBのソックスレー抽出液をガスクロマトグラフィー質量分析法で分析した。質量スペクトルによれば、塩素を含んだ有機物質は全く含まれていなかった。ピークのほとんどは、あまりなじみのない質量スペクトルを示したので、同定には至らなかった。また、バックグラウンドの測定では、GC分析を妨害するような物質はなかった。

熱分解生成物のガスクロマトグラムの一例を図2に示した。同定は標品の質量スペクトルと保持指標を比較する方法で行った。保持指標はVan Den DoolとKratzによって定義された式²⁷⁾で求めた。リファレンスに飽和の炭化水素を用いた。標品が入手できなかった化合物については1,2,3,5-テトラクロロベンゼンの検量線を使って、生成量を推定した。同定と定量計算の結果は表2に示した。

ポリ(塩化ビニリデン)樹脂の熱分解によって、いろいろな塩素化合物が生成したことは最も

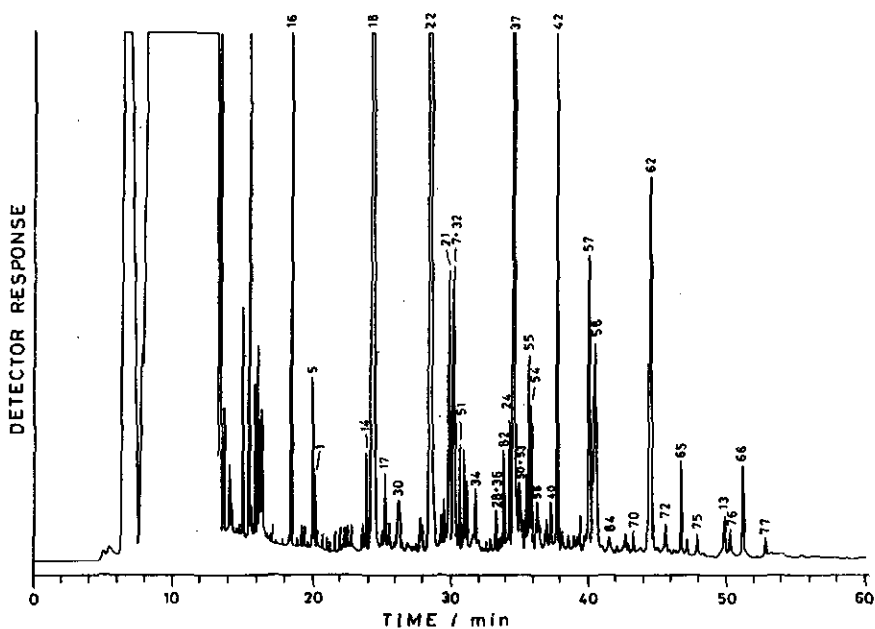


図 2 空気気流中、500°CでポリマーAを熱分解したときの生成物のガスクロマトグラム

ピークの番号は表2の番号と一致している。

Fig. 2 Gas chromatogram of pyrolysis products from polymer A at 500°C under air stream

The number marked at peaks match the numbers in Table 2

表 2 同定された化合物と生成量

Table 2 Compounds identified and their amount formed

No.	Compound	Retention index	Average formation amount ($\mu\text{g/g}$)	
			Run 1 to 6	Run 7 & 8
1	Trichlorobutadiene	906	29.6 (14.2)	11.5
2	Trichlorobutadiene [#]	967	Overlapping No.25	
3	Pentachlorobutadiene [#]	1064	14.0 (10.2)	17.8
4	2,2,3-Trimethyloxetan	802	46.8 (7.21)	49.8
5	Styrene [*]	900	66.3 (30.1)	42.4
6	Phenylacetylene [*]	886	11.7 (6.32)	7.30
7	Naphthalene [*]	1217	235 (89.7)	129
8	Biphenyl ^{**}	1415	52.8 (11.7)	103
9	Methylphenylacetylene [#]	1064	Overlapping No.3	
10	Phenanthrene [*]	1864	Overlapping Nos.64 & 73	
11	Phenol [*]	981	22.6 (6.68)	27.8

表 2 (つづき)
Table 2 (continued)

No.	Compound	Retention index	Average formation amount ($\mu\text{g/g}$)	
			Run 1 to 6	Run 7 & 8
12	Benzaldehyde*	973	5.40 (2.95)	4.77
13	Dibutyl phthalate*	1986	36.2 (7.00)	43.1
14	Benzofuran	1012	75.2 (32.5)	60.6
15	Dibenzofuran*	1573	3.65 (8.94)	ND
16	Chlorobenzene*	859	99.7 (55.9)	30.5
17	o-Dichlorobenzene*	1053	30.1 (19.9)	26.0
18	m-Dichlorobenzene*	1027	1880 (629)	1190
19	p-Dichlorobenzene*	1048	6.83 (4.96)	6.38
20	1,2,3-Trichlorobenzene*	1243	70.8 (20.3)	73.0
21	1,2,4-Trichlorobenzene*	1205	122 (49.5)	109
22	1,3,5-Trichlorobenzene*	1163	2840 (706)	2580
23	1,2,3,4-Tetrachlorobenzene*#	1423	Overlapping No.55	
24	1,2,3,5- & 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene*#	1367	88.0 (27.2)	82.1
25	p-Chlorotoluene*#	967	11.2 (8.67)	6.22
26	Dichlorotoluene	1134	20.1 (11.3)	25.8
27	Dichlorotoluene	1140	19.4 (61.0)	27.1
28	Trichlorotoluene#	1330	Overlapping No.36	
29	Tetrachlorotoluene#	1561	26.2 (8.97)	31.9
30	Chlorostyrene	1083	70.0 (19.9)	77.7
31	Chlorostyrene	1089	12.5 (11.1)	ND
32	Dichlorostyrene#	1217	Overlapping No.7	
33	Dichlorostyrene	1251	50.1 (18.0)	56.1
34	Dichlorostyrene	1272	42.1 (9.66)	43.5
35	Dichlorostyrene	1317	9.58 (10.9)	23.2
36	Dichlorostyrene#	1330	28.6 (9.71)	33.5
37	Trichlorostyrene	1382	1200 (234)	1215
38	Trichlorostyrene#	1415	Overlapping No.8	
39	Trichlorostyrene	1473	35.5 (8.50)	41.8
40	Trichlorostyrene	1487	39.6 (8.55)	44.2
41	Trichlorostyrene	1498	ND	5.40
42	Tetrachlorostyrene	1506	314 (56.5)	355
43	Tetrachlorostyrene	1523	14.1 (4.41)	ND
44	Tetrachlorostyrene#	1544	Overlapping No.68	
45	Tetrachlorostyrene#	1561	Overlapping No.29	
46	Tetrachlorostyrene	1592	ND	17.6
47	o-Chlorophenol*	1002	13.5 (9.52)	11.3
48	2,5-Dichlorophenol*#	1190	68.4 (23.4)	72.8
49	2,6-Dichlorophenol*#	1226	16.4 (22.4)	24.6
50	3,5-Dichlorophenol*#	1397	Overlapping No.53	

表 2 (つづき)
 Table 2 (continued)

No.	Compound	Retention index	Average formation amount ($\mu\text{g/g}$)	
			Run 1 to 6	Run 7 & 8
51	Dichlorophenylacetylene	1234	84.6 (59.1)	81.6
52	Dichlorophenylacetylene [#]	1190	Overlapping No.48	
53	Trichlorophenylacetylene [#]	1397	75.7 (36.8)	82.3
54	1-Chloronaphthalene [*]	1430	47.2 (14.9)	10.3
55	2-Chloronaphthalene ^{**}	1423	126 (35.3)	174
56	Chlorotetrahydronaphthalene	1446	41.2 (8.61)	64.7
57	Dichloronaphthalene	1606	202 (36.5)	226
58	Dichloronaphthalene	1623	224 (69.7)	279
59	Dichloronaphthalene	1647	6.65 (6.88)	ND
60	Dichloronaphthalene	1694	7.78 (7.69)	12.5
61	Trichloronaphthalene [#]	1672	Overlapping No.84	
62	Trichloronaphthalene	1793	306 (44.9)	337
63	Trichloronaphthalene	1801	22.9 (17.7)	25.4
64	Trichloronaphthalene [#]	1864	4.56 (5.74)	12.9
65	Trichloronaphthalene	1880	78.8 (8.37)	85.9
66	Tetrachloronaphthalene	2026	94.5 (9.28)	104
67	Tetrachloronaphthalene [#]	2087	Overlapping No.78	
68	2-Chlorobiphenyl	1544	13.4 (5.05)	15.2
69	2,4- & 2,5-Dichlorobiphenyl [#]	1722	15.6 (2.30)	17.4
70	2,3'-Dichlorobiphenyl	1743	19.4 (2.04)	22.9
71	3,5-Dichlorobiphenyl	1785	6.82 (10.6)	ND
72	3,4- & 3,4'-Dichlorobiphenyl [#]	1838	25.3 (3.20)	30.4
73	2,3,6- & 2,3',6'-Trichlorobiphenyl [#]	1864	Overlapping Nos.10 & 64	
74	2,3,5- & 2',3,5'-Trichlorobiphenyl [#]	1900	16.2 (2.58)	17.9
75	2,3',4- & 2,3',5'-Trichlorobiphenyl [#]	1923	16.8 (1.89)	20.1
76	3,4,5-Trichlorobiphenyl	2002	32.1 (5.05)	34.3
77	2,3',5,5'-Tetrachlorobiphenyl	2073	22.4 (4.45)	21.5
78	2,3',4,5'-Tetrachlorobiphenyl	2087	4.26 (4.15)	3.90
79	2,2',3,5',6-Pentachlorobiphenyl	2136	6.30 (7.30)	4.82
80	Chlorobenzofuran	1184	28.8 (9.04)	29.9
81	Chlorobenzofuran [#]	1226	Overlapping No.49	
82	Dichlorobenzofuran	1350	81.1 (23.0)	61.7
83	Dichlorobenzofuran	1402	34.8 (15.3)	35.6
84	Tetrachlorobenzofuran [#]	1672	16.8 (11.2)	22.4

Formation amount means weight of compound produced by thermal decomposition per one gram of polymer. Value in a parenthesis means standard deviation. Compounds with an asterisk were identified with authentic compounds and their concentrations were corrected by relative sensitivity against 1,2,3,5-tetra-chlorobenzene unless there is a # mark. Compounds without an asterisk or with # mark were tentatively quantified by using a calibration curve of 1,2,3,5-tetra-chlorobenzene. Compounds with # mark overlapped other compounds on chromatogram.

注目すべきことである。脂肪族の塩素化合物としては、質量スペクトルから同定した、3種類のポリクロロブタジエンが見つかった。一方、芳香族の塩素化合物はたくさん見つかった。これらの化合物は次の7つのグループに分けられる。つまり、クロロベンゼン類、クロロスチレン類、クロロフェノール類、クロロフェニルアセチレン類、クロロナフタリン類、クロロフェニル類、クロロベンゾフラン類である。

ポリ塩化ビニリデンの構造から考えて、熱分解の過程で起こる脱塩化水素や環化反応で、これらの化合物が生成するものと思われる。クロロベンゼンやクロロナフタレンのように塩素原子の数が少ない化合物が生成していることから、水素原子やラジカルと塩素原子の交換も起こっていると考えられる。また、Eklundら^{5,8)}の研究によれば、塩化水素と芳香族あるいは脂肪族化合物の間で起こる化学反応によっても、これらの化合物ができることであるので、二次的に生成した可能性もある。クロロフェニルアセチレン類はポリクロロスチレン類から、脱塩化水素あるいは脱水素で容易に生成するようにも思われる。空気の代わりに窒素ガスを使った熱分解では、クロロフェノール類やポリクロロベンゾフラン類が全く生じなかったことから、クロロフェノール類やポリクロロベンゾフラン類は前駆体が酸化されてできるのであろう。

窒素気流中での熱分解では、空気の場合に比べて、生成してくる塩素化合物の量がかなり少ない。芳香族ではない炭化水素類が、種類、量共に多い。GCでのピークの質量スペクトルを検索システムで調べたが、データベース中には類似の質量スペクトルがなかったために、ほとんどのピークは同定できなかった。さらに、炭化水素のピークが塩素化合物のピークに重なっている場合が多く、定量は困難であった。

多くのポリクロロスチレン類が検出されたことは特筆すべきである。実験全部を通してのポリクロロスチレン類の量は、重量で、元のポリマーの0.1%にも達しており、環境への汚染が無視できない可能性がある。オクタクロロスチレン、ヘプタクロロスチレンやヘキサクロロスチレンなどの塩素数の多いポリクロロスチレン類は電解を利用している工場で、副産物として生成することが知られており²⁸⁾、それらの化合物による河川や底質の汚染も既に報告されている^{29,32)}。しかしながら、この実験でも示されたように、熱分解で生成する、低塩素化のポリクロロスチレン類が環境を汚染しているかどうかは、今後調査の必要があろう。

PCBの塩素原子の置換位置はGCの保持データ^{33,34)}や、Kanechlor混合物のGCパターン³⁵⁾を利用して、決定された。これほど多量のPCBが熱分解で生成してくるとは予想されなかった。環境中のPCB汚染の発生源として、従来の化学製品のほかに、塩素原子を含むポリマーの熱分解も可能性の一つとして考慮されなければならないだろう。

ポリ塩化ビニリデン樹脂の熱分解により、多くのポリクロロスチレン類、クロロフェニルアセチレン類、ポリクロロナフタリン類、PCB、ポリクロロベンゾフラン類が生成することがはっきりしたことは、新しい事実である。塩素数が4個以上のポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン類やポリクロロジベンゾフラン類はいずれも検出限界以下であった。塩素原子を全く含まない芳香族

炭化水素がかなり見つかった。そのほかにも、元々樹脂に含まれていた可塑剤や安定剤に由来すると思われる化合物も検出された。

表2からも分かるように、生成物の量が大きくばらついているが、これは熱分解をうまく制御できないためである。しかし、これらの化合物が生成することは、確実である。また、GCのパターンはいずれの実験の場合も極めて似ており、ポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシンとポリクロロジベンゾフランの分析結果を解析する際に使用した³⁶⁾パターン類似率を計算したところ、いずれも0.98以上の値になった。このことより、生成物の組成比は本質的には同じと考えられる。

200℃でさえも、多くの塩素化合物が生成することはたいへん重要なことに思われる。すなわち、ポリ塩化ビニリデン樹脂の包装用フィルムを取り扱う際には、加熱を避ける注意が必要である。図3に200℃での熱分解生成物のガスクロマトグラムを示した。いくつかのピークは元々樹脂に

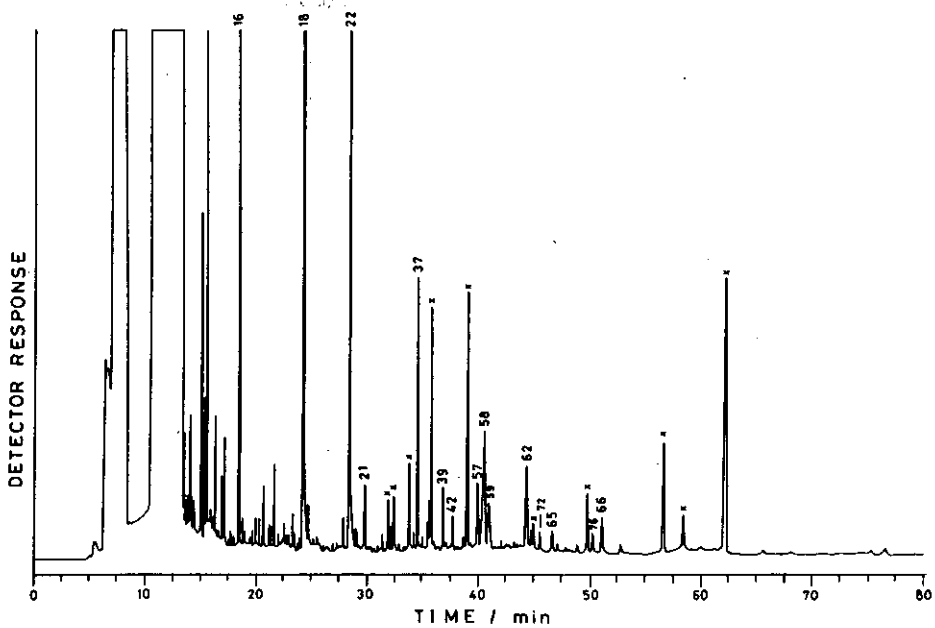


図3 空気気流中、200℃でポリマーAを熱分解したときの生成物のガスクロマトグラム
ピークの番号は表2の番号と一致している。×印のついたピークは塩素原子を含まない化合物である。

Fig. 3 Gas chromatogram of pyrolysis products from polymer A at 200℃ under air stream

The number marked at peaks match the numbers in Table 2 and peaks with a cross mark are due to compounds containing no chlorine atoms

含まれていた化合物によるものである。熱分解生成物の主要成分は、一つの点を除けば、500℃のときとほとんど同じである。一つの点とは、ポリクロロベンゾフランで、200℃では生成しなかった。そのかわり、ベンズアルデヒド、クロロベンズアルデヒド、ベンジルアルコールが検出された。

600℃での熱分解生成物のガスクロマトグラムも500℃の場合とほとんど同じであった。600℃では、質量スペクトルより、3-クロロジベンゾフランとジクロロジベンゾフランの存在が確認された。それらの質量スペクトルを図4に示した。マスキングクロマトグラフィーでは、他のポリクロロジベンゾフランやポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン類は検出できなかった。次に、モノクロロジベンゾフランについては、すべての異性体を入手できたので、空気気流中500℃での熱分解生成物について、選択イオン検出法(SIM)で分析を試みた。そのときのクロマトグラムを図5に示した。2-クロロ体と3-クロロ体は、メチルシリコンあるいは5%フェニルメチルシリコンのヒューズドシリカキャピラリカラムでは十分に分離しなかった。また4-クロロ体は純度がかなり低かったので、生成量の見積りには1-クロロ体の検量線を使用した。半定量値を表3に示した。サンプル番号の3が欠けているのは、SIMのために再濃縮する際、溶液の一部がこぼれたため、測定を行わなかったからである。また、ここで特にモノクロロジベンゾフランをSIMで測定したのは、この研究プロジェクトの目的がモノクロロジベンゾフランについてのものだからである。樹脂1gから生成したモノクロロジベンゾフランは全体でおよそ3.26 μ gであった。特に3-クロロ体が他の異性体よりも多く生成していた。モノクロロジベンゾフランの毒性は2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランの毒性に比べれば、はるかに弱いと推測される。モノクロロジベンゾフランの毒性については、MatsumotoらによるAmesテストの結果が発表されているが³⁷⁾、それによると3-クロロ体が変異原性を持っている。水道水中からの2-クロロジベンゾフランの検出³⁸⁾及び今回の実験から、低塩素化のポリクロロジベンゾフラン類についてさらに研究を進める必要がある。

この実験での熱分解は、炎がない状態で行われたので、生成物のプロフィールが焼却炉のものと異なっても不思議ではない。DoughertyとCollazo-Lopez²⁵⁾の報告では、ポリ塩化ビニリデン樹脂を1,000℃で熱分解すると、ポリクロロピレンあるいはポリクロロフルオランテンが生成するとのことであるが、この実験ではいずれも検出できなかった。

これらの芳香族塩素化合物の生成機構を明らかにするために、さらに詳しい研究が必要である。ポリ塩化ビニリデン樹脂を800℃以上の、炎がある状態で熱分解したり、他の塩素原子を含有するポリマーの熱分解実験を計画中である。生成物を正確に定量するために、また、毒性実験のためにも十分な標品が必要であり、現在、いくつかの標品について合成を進めているところである。

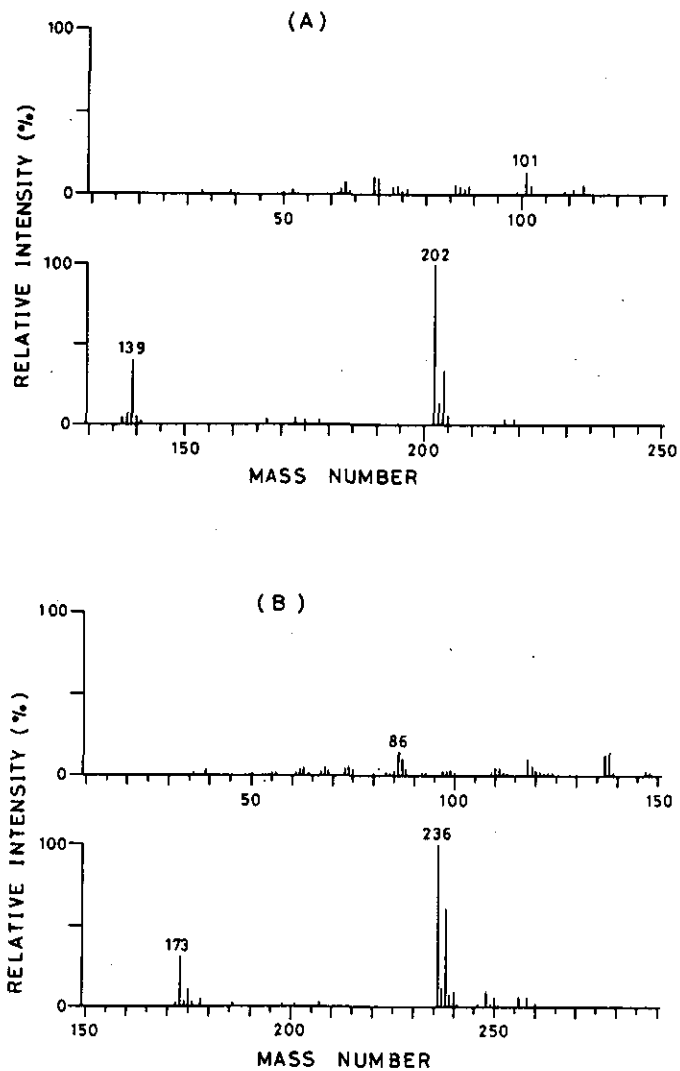


図 4 空気気流中、600°Cでポリマー A を熱分解したときの生成物の質量スペクトル
(A)はクロロジベンゾフラン、(B)はジクロロジベンゾフランに一致している。

Fig. 4 Mass spectra of pyrolysis products from polymer A at 600°C under air stream
(A) and (B) are corresponding to chlorodibenzofuran and dichlorodibenzofuran, respectively

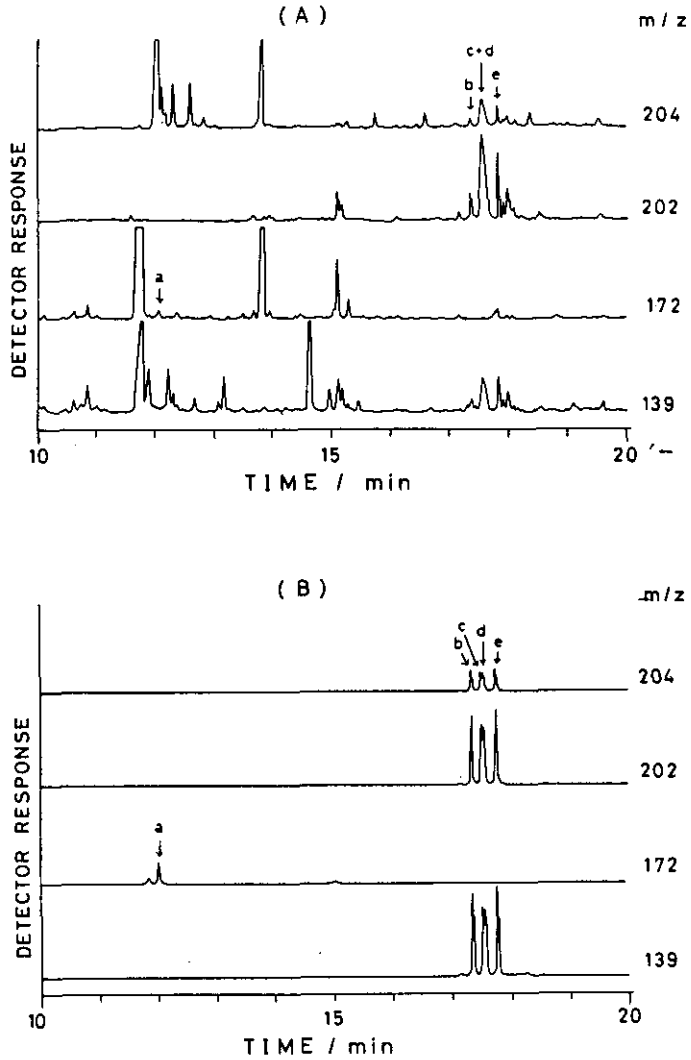


図 5 空気気流中、500℃でポリマー A と B を熱分解したときの生成物中からのクロロジベンゾフラン類の選択イオン検出法による分析

(A) 熱分解生成物 (Run No. 3), (B) 標準溶液 a: 2-フルオロビフェニル (内部標準), b: 1-クロロジベンゾフラン, c: 3-クロロジベンゾフラン, d: 2-クロロジベンゾフラン, e: 4-クロロジベンゾフラン

Fig. 5 Determination of chlorodibenzofurans by selected ion monitoring in pyrolysis products from polymers A and B at 500℃ under air stream

表 3 クロロジベンゾフランの生成量 ($\mu\text{g}/\text{ポリマー } 1\text{g}$)
 Table 3 Amount formed of chlorodibenzofurans from one gram of polymer

Run No.	1-Chloro-	2- & 3-Chloro-	4-Chloro-
1	0.11	1.5	0.26
2	0.43	3.3	0.59
4	0.25	2.3	0.39
5	0.25	2.0	0.39
6	0.24	2.3	0.37
Average	0.26	2.3	0.40
7	0.14	2.3	0.40
8	0.26	2.8	0.51
Average	0.20	2.6	0.46

Data for run No.3 was rejected because the sample was missing during concentrating process.

引用文献

- 1) Buser, H. R. (1979): Formation of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) from the pyrolysis of chlorobenzenes. *Chemosphere*, **8**, 415-424.
- 2) Bumb, R. R., W. B. Crumett, S. S. Cutie, J. R. Gledhill, R. H. Hummel, R. O. Kagel, L. L. Lamparski, E. V. Luoma, D. L. Miller, T. J. Nestrick, L. A. Shadoff, R. H. Stehl and J. S. Woods (1980): Trace chemistries of fire: a source of chlorinated dioxins. *Science*, **210**, 385-390.
- 3) Choudhry, G. G., K. Olie and O. Hutzinger (1982): Mechanisms in the thermal formation of chlorinated compounds including polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *In: Chlorinated dioxins and related compounds. Impact on the environment*, Hutzinger, O., R. W. Frei, E. Merian and F. Pocchiari (eds.), Pergamon Press, Oxford, England, 275-301.
- 4) Trenholm, A., P. Gorman, B. Smith and D. Oberacker (1984): Emission test results from a hazardous waste incineration. *In: Incineration and treatment of hazardous waste. Proceeding of the ninth annual research symposium*, PB 84-234525, 160-170.
- 5) Eklund, G., J. R. Pedersen and B. Stromberg (1986): Phenol and HCL at 550°C yield a large variety of chlorinated toxic compounds. *Nature*, **320**, 155-156.
- 6) Eklund, G., J. R. Pedersen and B. Stromberg (1987): Formation of chlorinated organic compounds during combustion of propane in the presence of HCL. *Chemosphere*, **16**, 161-166.
- 7) Marklund, S., C. Rappe and M. Tysklind (1987): Identification of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in exhausts from cars run on leaded gasoline. *Chamosphere*, **16**, 29-36.
- 8) Graham, J. L., D. L. Hall and B. Dellinger (1986): Laboratory investigation of thermal degradation of a mixture of hazardous organic compounds I. *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 703-710.
- 9) Morita, M., J. Nakagawa and C. Rappe (1978): Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) formation from PCB mixture by heat and oxygen. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 665-670.
- 10) Buser, H. R., H. P. Bosshardt and C. Rappe (1978) Formation of polychlorinated dibenzofurans from

- the pyrolysis of PCBs. *Chemosphere*, **7**, 109-119.
- 11) Buser, H. R., H. P. Bosshardt, C. Rappe and R. Lindahl (1978): Identification of polychlorinated dibenzofuran isomers in fly ash and PCB pyrolysis. *Chemosphere*, **7**, 419-429.
 - 12) Buser, H. R. and C. Rappe (1979): Formation of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from the pyrolysis of individual PCB isomers. *Chemosphere*, **8**, 157-174.
 - 13) Ahling, B. and A. Lindskog (1982): Emission of chlorinated organic substances from combustion. In: Chlorinated dioxins and related compounds. Impact on the environment, O. Hutzinger, R. W. Frei, E. Merian and F. Pocchiari (eds.), Pergamon Press, Oxford, England, 215-225.
 - 14) Hutzinger, O., G. G. Choudhry, B. G. Chittim and L. E. Johnston (1985): Formation of polychlorinated dibenzofurans and dioxins during combustion, electrical equipment fires and PCB incineration. *Environ. Health Perspect.*, **60**, 3-9.
 - 15) Buser, H. R. (1985): Formation occurrence and analysis of polychlorinated dibenzofurans and related compounds. *Environ. Health Perspect.*, **60**, 259-267.
 - 16) Passivirta, J., R. Herzschuh, T. Humppi, E. Kantolohi, J. Knuutinen, M. Lahtipera, R. Laitinen, J. Salovaara, J. Tarhanen and L. Virkki (1985): Pyrolysis products of PCBs. *Environ. Health Perspect.*, **60**, 269-278.
 - 17) Iida, T., M. Nakanishi and K. Goto (1974): Poly (vinyl chloride) I. Evolution of aromatics on pyrolysis of poly (vinyl chloride) and its mechanism. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **12**, 737-749.
 - 18) Iida, T., M. Nakanishi and K. Goto (1975): Poly (vinyl chloride). II. Pyrolysis of chlorinated polybutadienes as model compounds for poly (vinyl chloride). *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **13**, 1381-1392.
 - 19) 山崎富夫・辻正彦・奥野年秀・新谷幸三 (1976) : ポリ塩化ビニルの熱処理に関する研究. I. 熱分解生成物について. 兵庫県公害研究所研究報告, 第8号, 26-31.
 - 20) 山崎富夫・辻正彦・奥野年秀・新谷幸三 (1976) : ポリ塩化ビニルの熱処理に関する研究. II. 酸化分解生成物について. 兵庫県公害研究所研究報告, 第8号, 32-36.
 - 21) Ahling, B., A. Bjorseth and G. Lunde (1978): Formation of chlorinated hydrocarbons during combustion of poly (vinyl chloride). *Chemosphere*, **7**, 799-806.
 - 22) Hawley-Fedder, R. A., M. L. Parsons and F. W. Karasek (1987): Identification of organic compounds produced during combustion of a polymer mixture. *J. Chromatogr.*, **387**, 207-221.
 - 23) 平松勤司 (1967) : 質量分析による高分子材料の熱分解生成物に関する研究. III. ポリアクリロニトリル及びポリビニリデンクロリドの熱分解生成物の質量分析. 質量分析, **15**, 17-28.
 - 24) Ballistreri, A., S. Foti, P. Maravigna, G. Montaudo and E. Scamporrino (1981): Mechanism of thermal decomposition of poly (vinylidene chloride). *Polymer*, **22**, 131-132.
 - 25) Dougherty, R. C. and H. Collazo-Lopez (1987): Reduction of organochlorine emission from municipal and hazardous waste incinerators. *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 602-604.
 - 26) 山口之彦・河野公栄・立川 涼 (1987) : 一般廃棄物の埋立処分地におけるハロゲン化芳香族炭化水素化合物. 日本農芸化学会昭和62年度大会 (東京) 講演要旨集, 284.
 - 27) Van Den Dool, H. and P. D. Kratz (1963): A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **11**, 463-471.
 - 28) Kaminsky, R. and R. A. Hites (1984): Octachlorostyrene in Lake Ontario: sources and fates. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 275-279.
 - 29) Kuehl, D. W., H. L. Kopperman, G. D. Veith and G. E. Glass (1976): Isolation and identification of polychlorinated styrenes in Great Lakes fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 127-132.

- 30) Reichel, W. L., R. M. Prouty and M. L. Gay (1977): Identification of polychlorinated styrene compounds in heron tissues by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**, 60-62.
- 31) Ofstad, E. B., G. Lunde, K. Martinsen and B. Rygg (1978): Chlorinated aromatic hydrocarbons in fish from an area polluted by industrial effluents. *Sci. Total Environ.*, **10**, 219-230.
- 32) Ramdahl, T., G. E. Carlberg and P. Kolsaker (1986): Analysis of chlorinated styrenes in environmental samples using negative ion chemical ionizing mass spectrometry. *Sci. Total Environ.*, **48**, 147-155.
- 33) Mullin, M. D., C. M. Pochini, S. McCrindle, M. Romkes, S. H. Safe and L. M. Safe (1984): High-resolution PCB analysis: synthesis and chromatographic properties of all 209 PCB congeners. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 468-476.
- 34) Onuska, F. I. and K.A. Terry (1986): Characterization and determination of PCB isomers by high resolution gas chromatography and HRGC/mass spectrometry. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commn.*, **9**, 671-675.
- 35) Tanabe, S., A. Subramanian, H. Hidaka and R. Tatsukawa (1986): Transfer rates and pattern of PCB isomers and congeners and p,p'-DDE from mother to egg in adelic penguin (*pygoscelis adeliae*). *Chemosphere*, **15**, 343-351.
- 36) Yasuhara, A., H. Ito and M. Morita (1987): Isomer-specific determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in incinerator-related environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 971-979.
- 37) Matsumoto, M., M. Ando and Y. Ohta (1988): Mutagenicity of monochlorodibenzofurans detected in the environment. *Toxicol. Lett.*, **40**, 21-28.
- 38) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.

I-6

粘土鉱物表面でのクロロフェノールの反応
—ヒドロキシジベンゾフラン化合物の生成*—

Reactions of Chlorophenols Adsorbed on Clay Minerals
—Formation of Hydroxydibenzofurans*—

相馬悠子¹・相馬光之²・伊藤裕康²

Yuko SOMA¹, Mitsuyuki SOMA² and Hiroyasu ITO²

要旨

クロロフェノールを粘土鉱物のアロフェン, Naイオン交換モンモリロナイトとFe(III)イオン交換モンモリロナイトに室温で気相から吸着させ, その吸着反応生成物をGC/MSで調べた。Fe-モンモリロナイトから抽出した吸着生成物にはクロロビフェニルジオール, ヒドロキシジフェニルエーテルのほかに, クロロヒドロキシジベンゾフランが確認された。

Abstract

Chlorophenols were adsorbed from gas phase on allophane, Na- and Fe(III)-ion exchanged montmorillonites at room temperature and the reaction on clay surfaces was followed by GC/MS analysis of extracts of the adsorbates. Besides chlorinated biphenyldiols and hydroxydiphenyl ethers, chlorinated hydroxydibenzofurans were formed on Fe(III)-montmorillonite.

1 はじめに

ポリクロロフェノール (PCP) には, 合成過程で生成する不純物としてポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン (PCDD) やポリクロロジベンゾフラン (PCDF) が含まれることがある。またクロロフェノールから熱や光により, PCDDやPCDFを生成する反応があることは知られており¹⁻³⁾, これは他の有機塩素化合物と同じように焼却炉の中でPCDDやPCDFが生成する可能性があるということに社会的注目を集めた^{1,4)}。

1. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

* 本論文は, Chemosphere, 18, 1895-1902(1989)に発表された内容を和文に改めたものである。

生産、使用された有機塩素化合物は最終的に底質や土壌に取り込まれることが多いので、自然環境の中で、土壌や土壌構成物質により PCDD や PCDF が生成されるような可能性があるかどうかを調べることは重要である。土壌中では有機物質の分解の大部分は土壌微生物による働きであるとされているが、簡単な分子から、より複雑な分子の合成反応、二量化反応や重合反応がどのように起こるか、例えば自然環境条件下でクロロフェノールから PCDD や PCDF が土壌中で化学的反応により生成するかどうか、の報告はいまだなされていない。

これまでに我々は遷移金属イオン（例えば Fe^{3+} や Cu^{2+} ）で交換した粘土鉱物モンモリロナイト（スメクタイト）が芳香族化合物を酸化する反応を調べてきた。この反応で粘土鉱物層間の遷移金属イオンの還元に伴い、層間に吸着した芳香族化合物分子がラジカルを生成し、このラジカルが中間体となって二量化や重合反応が起こるといふ反応機構が明らかになった⁵⁻¹¹）。またこの反応では、置換ベンゼン分子の置換基の数や位置により特徴的な反応が起こり、一置換ベンゼンからは、4, 4'位に置換基を持つビフェニル^{9,11}）、ベンゼンからは重合体のポリパラフェニレンが生成される¹⁰）。Boydら(1986)は、3-クロロアニソールやペンタクロロフェノール（PCP）のCu(II)-モンモリロナイトとの69℃の反応で、これらの二量体ができることを報告している¹²）。

フェノールやクレゾールは遷移金属交換モンモリロナイトで容易に酸化反応を起こすが^{13,14}）、他の芳香族化合物と異なるのは酸素の影響が大きいことである。これは酸素存在下でカチオンラジカルのほかにフェノキシラジカルが生成し反応を複雑にするため、キノンやフェノールの二量体、三量体、重合体などの種々の構造を持った生成物が見いだされている。

この論文では土壌の構成成分である粘土鉱物のうち、層状構造を持つモンモリロナイトと非晶質粘土鉱物アロフェンヘクロロフェノールの三異性体（オルト-, パラ-, メタ-）を室温、空气中で吸着させたとき、どのような反応生成物が得られるかをGC/MS（ガスクロ質量分析計）で調べ、生成物が粘土の含水量と共にどのように変化するかを研究した。

2 実験

2.1 試料

使用したクロロフェノールは和光純薬製で、オルト-及びパラ-クロロフェノールはそのまま使用し、メタ-クロロフェノールは真空蒸留により精製した。4,4'-ビフェニルジオール、2,2'-ビフェニルジオール、4-ヒドロキシジフェニルエーテル（構造は図6参照）の四塩化炭素溶液を室温で塩素ガスで塩素化を行い、再結晶してビフェニルジオール、ヒドロキシジフェニルエーテルの塩素化物を得た。これらをGC/MSで確かめたところ、3試料とも塩素が1～3個置換した混合物であったが、粘土鉱物への吸着は混合物のまま使用した。

使用した粘土鉱物のうち、Na-モンモリロナイトはクニミネ工業のクニピアGを洗浄、凍結乾燥したものを使用した。Fe(III)-モンモリロナイトはクニピアGをイオン交換当量の0.003 mol/l硝酸鉄水溶液に分散させイオン交換を行い、遠心分離、1回洗浄後、凍結乾燥したものである。

アロフェンは長野県木曾地方のミソ土を脱鉄、有機物分解等、通常のアロフェン精製法により精製した¹⁵⁾。

2.2 実験方法

ガラス容器の中に約 200 mg の粘土鉱物を入れた容器とクロロフェノールを入れた容器を並べ密封し、室温、空气中で気相からのクロロフェノールの吸着を行った。そのためクロロフェノールの吸着量はそれぞれのクロロフェノールの蒸気圧によって異なってくる。またクロロフェノール吸着中の粘土鉱物の含水量を調節するために、ガラス容器中の粘土やクロロフェノール容器に並べて一定の湿度を与え水蒸気圧を調節する物質を入れた容器を併置した。水蒸気圧を調節する物質として使用したのは、 P_2O_5 、 $CaCl_2$ 飽和水溶液、 Na_2CO_3 飽和水溶液であり、それぞれの水蒸気圧（湿度）は 24.5℃ で 0.00 mmHg (0.0%)、7.08 mmHg (31%)、20.9 mmHg (87%) になる。ガラス容器に Fe-モンモリロナイトとこれら水蒸気圧調節物質の容器のみを入れ、平衡になるまで放置後、100℃ 昇温による重量減少から Fe-モンモリロナイトの含水量を測ったところ、それぞれ 4.6、13.6、16.0 wt% であった。

室温で 42 日間クロロフェノールを吸着させた後、粘土鉱物から吸着物質をアセトンで抽出し、ガスクロマトグラフ、GC/MS により分析定量した。島津製 GC-7A 型ガスクロマトグラフ、FID 検出器、OV-1 タイプのキャピラリカラム (60 m × 0.25 mm φ) を使用した。カラムは 70℃ (4 min) から 250℃ (16 min) まで 8℃/min で昇温し、注入口と検出器は 250℃ に保持した。GC/MS は日本電子製 JMS-DX300 を使用した。

ビフェニルジオール、ヒドロキシジフェニルエーテル、ヒドロキシジベンゾフランの塩素化物（構造は図 1 参照）は異性体の数が非常に多いが、これらの水酸基をメチル化したメチルエーテルのマススペクトルの特徴については Tulp らによって研究されている^{16,17)}。そして分子式は同じであるが OH 基の数が違う構造異性体、例えばジクロロビフェニルジオール（図 1 の 2 B）とジクロロヒドロキシジフェニルエーテル（図 1 の 2 E）、ジクロロヒドロキシジベンゾフラン（図 1 の 2 F）とジクロロジベンゾ-p-ジオキシンはメチル誘導体で区別ができる。しかし異性体、特に置換基の位置が異なる位置異性体の間でのメチル化効率が大きく異なるので、混合物である反応生成物をメチル化したものからの、それぞれの異性体の定量は困難であった。またメチル化していないジクロロビフェニルジオールとジクロロヒドロキシジフェニルエーテルは分子量も同じでマススペクトルにも特徴的の差異が見られないので、これら二量体の生成量は和として定量した。

クロロビフェニルジオールとクロロヒドロキシジフェニルエーテルの吸着はこれらのアセトン溶液をモンモリロナイトに浸み込ませ、溶媒を蒸発させて行った。室温で 36 日間密閉容器に放置後、クロロフェノールの場合と同様にアセトン抽出と GC/MS 分析を行った。

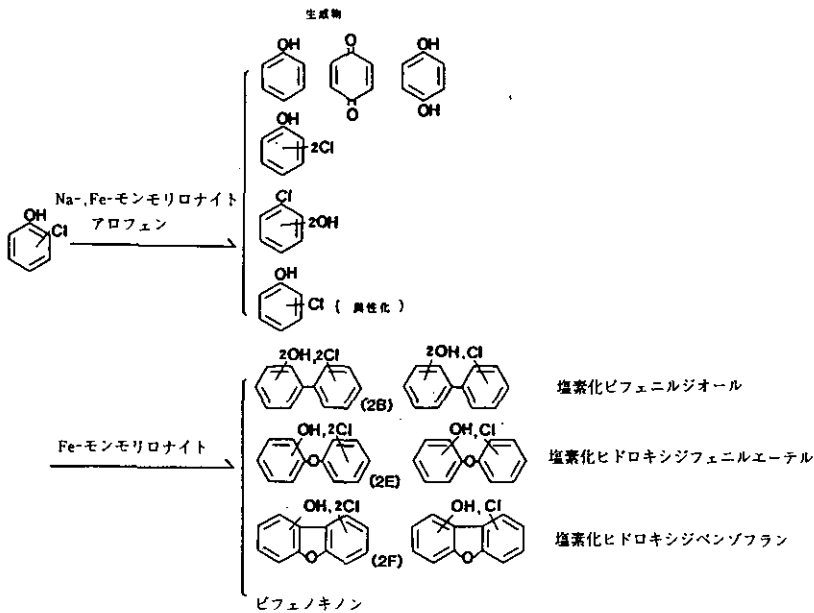


図 1 Na-, Fe-モンモリロナイト, アロフェン表面でのオルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールの吸着反応生成物

Fig.1 Reaction Products obtained from ortho-, meta- and para-chlorophenols adsorbed on Na-, Fe-montmorillonites and allophane

3 結果と考察

アロフェン, Na-, Fe-モンモリロナイト上のクロロフェノールの吸着反応生成物を図 1 に示した。反応生成物のうち脱塩素化, 塩素化, 水酸化反応, 異性化反応の生成物であるベンゼン置換体とキノンは, アロフェン, Na-, Fe-モンモリロナイトのどの粘土鉱物でも生成が確かめられた。Cu(II)-スメクタイトによりクロロフェノールの脱塩素化が容易に進むことは Govindaraj らによっても報告されている²⁰⁾。クロロビフェニルジオール, クロロヒドロキシジフェニルエーテル, クロロヒドロキシジベンゾフランの二量体生成物は Fe-モンモリロナイトでのみ観測された。したがって他の芳香族化合物の場合と同様に, クロロフェノールの二量化には Fe^{3+} イオンのような遷移金属イオンが必要と考えられる^{9,11)}。また三量体の形の生成物も, Fe-モンモリロナイトでは見られた。

図 2 に示したのは Na-モンモリロナイトと Fe-モンモリロナイトでのオルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールの吸着反応生成物に対する反応中の湿度の影響を示したものである。図に示した [クロロフェノールの吸着反応総量] は粘土を抽出して得られたクロロフェノール吸着量と図 1 に示した生成物のうちピフェノキノンを除いた総和である。クロロヒドロキシジベンゾフラン

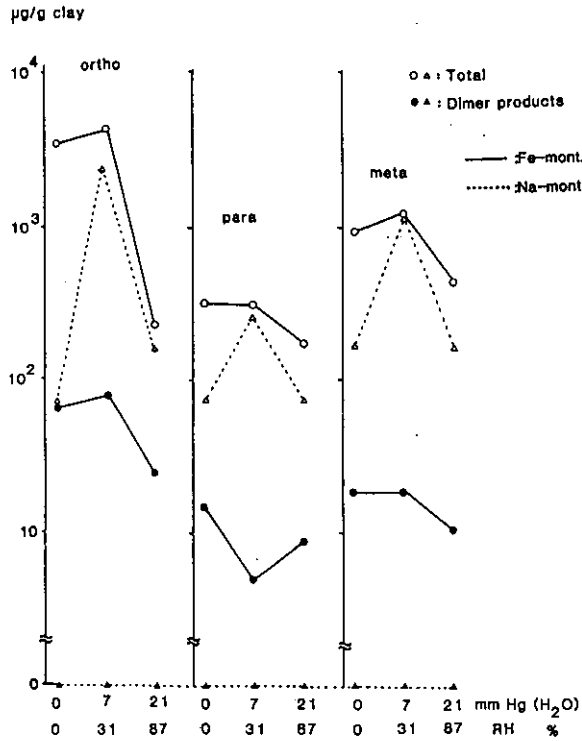


図 2 Fe-とNa-モンモリロナイト表面でのオルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールの吸着反応生成物と反応への水の影響

○△: クロロフェノールの吸着反応総量
●▲: 二量体生成物

Fig. 2 Amounts of ortho-, meta- and para-chlorophenols adsorbed and reacted on Fe- and Na-montmorillonites and the effect of water for the reaction

○△: Total amounts of chlorophenol adsorbed and reacted
●▲: Dimer products

と分子量が同じクロロビフェノキノンが生成されている可能性はあるが、GC分析で250℃の注入口で分解してしまうため¹⁸⁾、分析できず反応総量には加えていない。図2に示すようにクロロフェノールの反応総量はNa-とFe-モンモリロナイトでそれほど変わらないが、二量体生成物はFe-モンモリロナイトでのみ生成されるのが分かる。さらにモンモリロナイトがある程度含水している方がクロロフェノールの吸着量を増大させているのが分かる。しかしアロフェンではクロロフェノールの吸着量は含水量と共に単調に減少するのが見られた。

二量体生成物では、ジクロロビフェニルジオール、ジクロロヒドロキシジフェニルエーテルとジクロロヒドロキシジベンゾフランが主生成物であった。分子量の同じヒドロキシジフェニルエーテルとビフェニルジオール、ヒドロキシジベンゾフランとジフェノキノンが生成物をメチル化してGC/MSにより区別した。図3にはオルト-, パラ-, メタ-クロロフェノールからの二量

体生成物のマスキロマトグラムを示している。それぞれのクロマトグラムの上部は、横軸がガスクロの保持時間、縦軸は total current を示し、下部は $m/e=282, 268, 266$ のイオンの強度を示している。これらのイオンはジメトキシジクロロビフェニル、メトキシジクロロジフェニルエーテル、メトキシジクロロジベンゾフランの分子イオンを示している。これらマスキロマトグラムのイオン強度は正確には反応生成量に比例しないが、それぞれの二量体生成物で数種類の置換基の位置が異なる位置異性体ができているのが認められる。

図4には二量体生成物の分布、(クロロヒドロキシジベンゾフラン)と(クロロビフェニルジオー

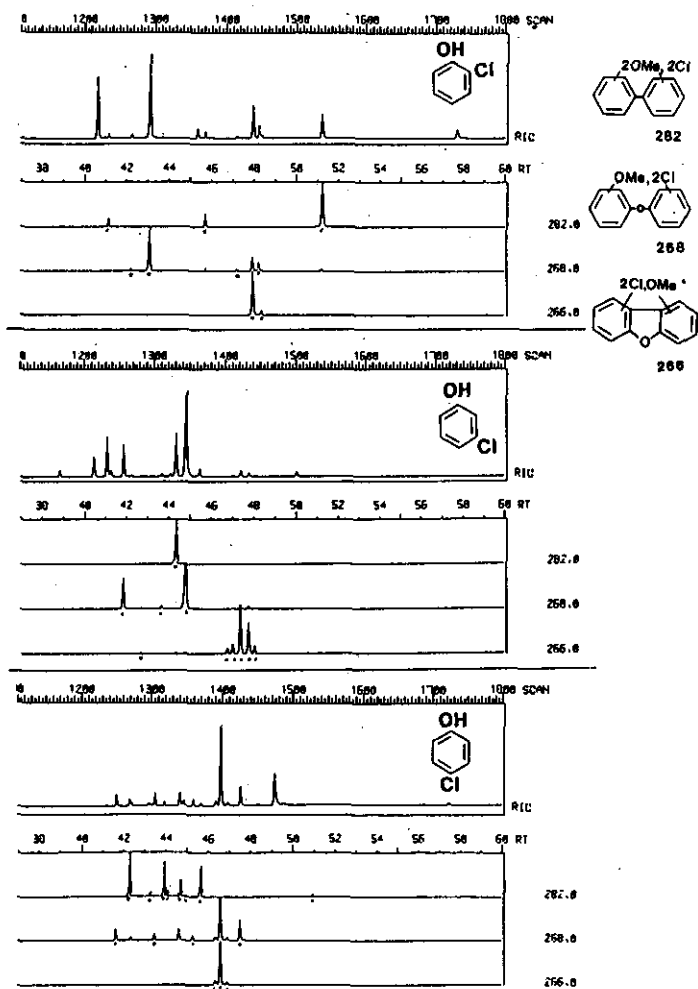


図 3 Fe-モンモリロナイトに吸着したオルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールの二量体生成物 (メチル化物) のマスキロマトグラム

Fig. 3 Mass-chromatograms for dimer products (methylated) formed from ortho-, meta- and para-chlorophenols adsorbed on Fe-montmorillonite

ル) + (クロロヒドロキシジフェニルエーテル) の生成量を示している。オルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールのどの場合でも、乾燥した Fe-モンモリロナイトで生成するクロロヒドロキシジベンゾフランの量はジフェニルジオールとヒドロキシジフェニルエーテルの生成量の約10%であった。またヒドロキシジベンゾフランの生成は湿度に強く依存し、乾燥したモンモリロナイトで反応が進むのが分かる。パラ-クロロフェノールの塩素は反応活性が高く、重合反応やキノンの生成をしたり、オルト-やメタ-クロロフェノールの反応とは異なる生成物が確認された。その結果、図4に示すようにジフェニルジオールとヒドロキシジフェニルエーテル量が少なくなっている。

図5aと5bは、オルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールから生成されたヒドロキシジベンゾフラン量を吸着反応中の湿度に対してプロットした(図4参照)。図5aは Fe-モンモリロナイト重量当たりの生成量を示し、図5bは吸着クロロフェノール量当たりの生成ヒドロキシジベンゾ

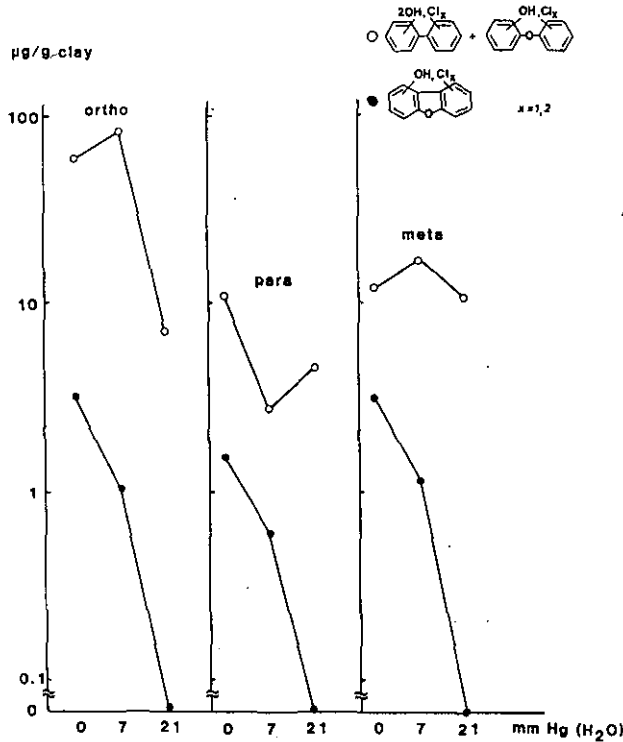


図 4 Fe-モンモリロナイトに吸着したオルト-, メタ-, パラ-クロロフェノールの二量体生成物

● : クロロヒドロキシジベンゾフラン

○ : クロロビフェニルジオールとクロロヒドロキシジフェニルエーテルの和

Fig. 4 Amounts of dimer products, chlorinated-hydroxy-dibenzofurans (●) and sum of chlorinated biphenyldiols and hydroxydiphenyl ethers(○), produced in the adsorption of ortho-, meta-, and para-chlorophenols on Fe-montmorillonite

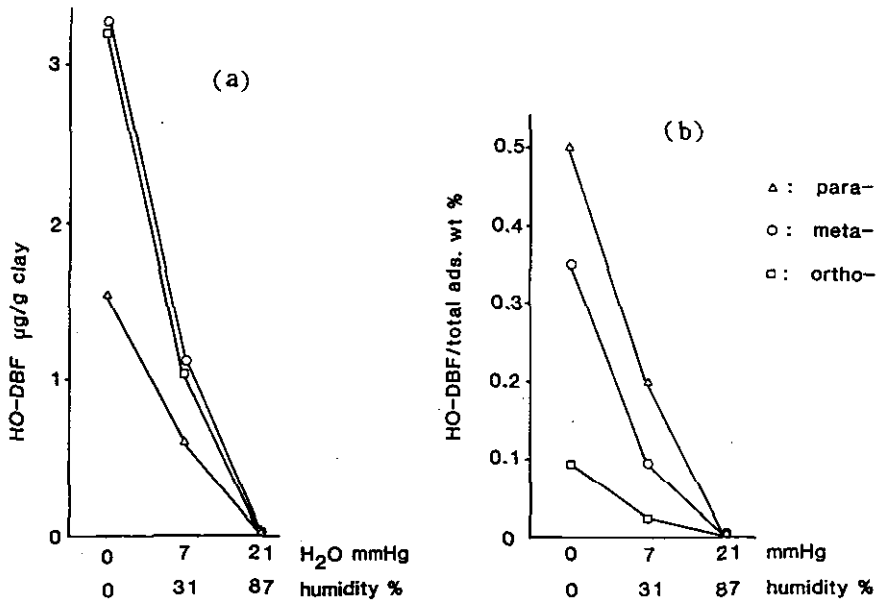


図 5 Fe-モンモリロナイトに吸着したオルト- (□), メタ- (○) パラ- (△) クロロフェノールからのクロロヒドロキシジベンゾフラン (HO-DBF) 生成量と反応容器中の湿度の影響

a : Fe-モンモリロナイト重量当たりのHO-DBF量

b : 吸着クロロフェノール当たりのHO-DBF量

Fig. 5 Chlorinated-hydroxydibenzofurans (HO-DBF) formed from ortho (□), meta (○) and para (△)-chlorophenols on Fe-montmorillonite with the change of relative humidity in the adsorption vessel

a : Amounts of HO-DBF formed per g clay

b : Percentage of HO-DBF in total amount of chlorophenol adsorbed

フランの割合 (%) を示している。乾燥している Fe-モンモリロナイトでは吸着クロロフェノールの 0.1~0.5% がクロロヒドロキシジベンゾフランになっていることが分かる。

Na-と Fe-モンモリロナイト, アロフェンに吸着したクロロビフェニルジオールとヒドロキシジフェニルエーテルの反応を図 6 に示したような実験条件で行った。実験に使用したビフェニルジオールやヒドロキシジフェニルエーテルは限られているので、ヒドロキシジベンゾフランを生成する反応は前述したクロロフェノールの吸着で生成したものとは必ずしも同じでないが、図 6 に示した反応では Fe-モンモリロナイトにクロロ-4-ヒドロキシジベンゾエーテルを吸着させたときのみクロロヒドロキシジベンゾフランの生成が見られた。

これらの実験結果からヒドロキシジベンゾフラン生成の反応機構を考えてみる。ビフェニルジオールとヒドロキシジフェニルエーテルの生成はフェノールやクレゾールの反応の場合と同様にクロロフェノールのカチオンラジカルやフェノキシラジカルを中間体として生成し、モンモリロ

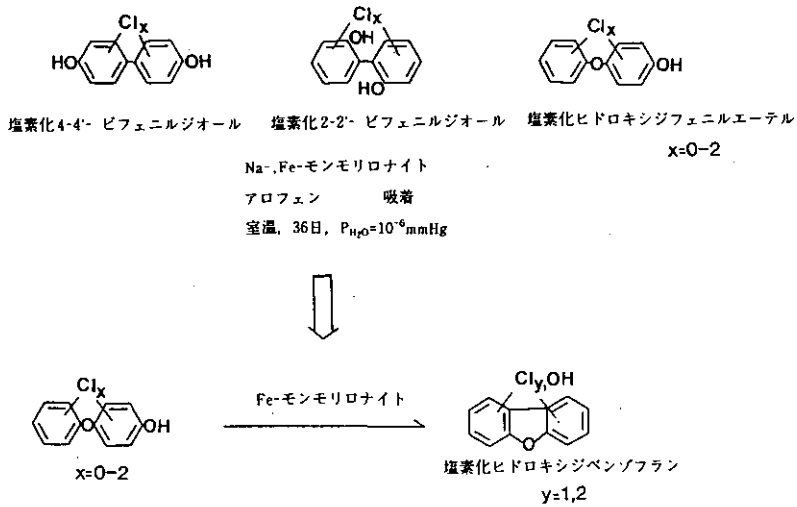


図 6 Na-, Fe-モンモリロナイト, アロフェンへのクロロビフェニルジオール, クロロヒドロキシジフェニルエーテルの吸着
 Fig. 6 Adsorption of chlorinated biphenyldiols and hydroxydiphenyl ether on Na-, Fe-montmorillonites and allophane

ナイト層間の遷移金属イオン, Fe^{3+} は酸化剤として働く。ヒドロキシジベンゾフランはこれらの二量体からの二次反応生成物であると考えられる。その理由として、二量体を直接吸着させたときヒドロキシジフェニルエーテルからヒドロキシジベンゾフランが生成されたこと、ヒドロキシジベンゾフラン生成への水の影響が他の二量体の場合と違うことが挙げられる。モンモリロナイト層間の Fe^{3+} はモンモリロナイト表面の酸性度を強くするが、吸着水は酸性度を下げると考えられる¹⁹⁾。したがって乾燥したFe-モンモリロナイトは表面酸性が強く、酸によって進むジフェニルエーテルからジベンゾフランへの反応が促進されるのであろう。

引用文献

- 1) Rappe C. (1982) : Chloro compounds containing oxygen. In : The Handbook of Environmental Chemistry, vol.3 Part A, Hutzinger O. (ed.), Springer-Verlag, 157-180.
- 2) Rappe C. and S. Marklund (1978) : Formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDs) and dibenzofurans (PCDFs) by burning or heating chlorophenates. Chemosphere, 7, 269-281.
- 3) Crosby D. G. and A. S. Wong (1976) : Photochemical generation of chlorinated dioxins. Chemosphere, 5, 327-332.
- 4) Buser H. R. and H.-P. Bosshardt and C. Rappe (1978) : Identification of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin isomers found in fly ash. Chemosphere, 7, 165-172.
- 5) Mortland M. M. and T. J. Pinnavaia (1971) : Formation of copper (II) arene complexes on the interlamellar surfaces of montmorillonite. Nature, 229, 75-77.
- 6) Pinnavaia T. J. and M. M. Mortland (1971) : Interlamellar metal complexes on layer silicates. I. cop-

- per (II)-arene complexes on montmorillonite. *J. Phys. Chem.*, **75**, 3957-3962.
- 7) Pinnavaia T. J., P. L. Hall, S. S. Cady and M. M. Mortland (1974) : Aromatic radical cation formation on the intracrystal surfaces of transition metal layer lattice silicates. *J. Phys. Chem.*, **78**, 994-999.
 - 8) Rupert J. P. (1973) : Electron spin resonance spectra of interlamellar copper (II)-arene complexes on montmorillonite. *J. Phys. Chem.*, **77**, 784-790.
 - 9) Fenn D. B., M. M. Mortland and T. J. Pinnavaia (1973) : The chemisorption of anisole on Cu(II) hectorite. *Clays Clay Miner.*, **21**, 315-322.
 - 10) Soma Y., M. Soma and I. Harada (1984) : The reaction of aromatic molecules in the interlayer of transition-metal ion-exchanged montmorillonite studied by resonance raman spectroscopy. 1. benzen and p-phenylenes. *J. Phys. Chem.*, **88**, 3034-3038.
 - 11) Soma Y., M. Soma and I. Harada (1985) : Reactions of aromatic molecules in the interlayer of transition-metal ion-exchanged montmorillonite studied by resonance Raman spectroscopy. 2. monosubstituted benzenes and 4,4'-disubstituted biphenyls. *J. Phys. Chem.*, **89**, 738-742.
 - 12) Boyd S. A. and M. M. Mortland (1986) : Radical formation and polymerization of chlorophenols and chloroanisole on copper (II)-smectite. *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 1056-1058.
 - 13) Sawhney L., R. K. Kozloski, P. J. Isaacson and M. P. N. Gent (1984) : Polymerization of 2,6-dimethylphenol on smectite surfaces. *Clays Clay Miner.*, **32**, 108-114.
 - 14) Soma Y., M. Soma and I. Harada (1986) : The oxidative polymerization of aromatic molecules in the interlayer of montmorillonites studied by resonance Raman spectroscopy. *J. Contaminant Hydrology*, **1**, 95-106.
 - 15) 浅見輝男・北岸確三・木立正嗣・渡辺裕著 : 土壤成分のサンプリング (講談社サイエンティフィック) 講談社
 - 16) Tulp M. Th. M., K. Olie and O. Hutzinger (1977) : Identification of hydroxyhalobiphenyls as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 310-316.
 - 17) Tulp M. Th. M. and O. Hutzinger (1978) : Identification of hydroxylated chlorodibenzo-*p*-dioxins, chlorodibenzofurans chlorodiphenyl ethers and chloronaphthalenes as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.*, **5**, 224-230.
 - 18) Meyer C. M., P. W. O'Keefe, R. G. Briggs and D. R. Hilker (1986) : Differences in the chromatographic and mass spectral properties of 3,3',5,5'-tetrachlorodiphenylquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **13**, 47-51.
 - 19) Theng B. K. G. (1982) : Clay-activated organic reactions. *In* : Development in Sedimentology, Vol.35. Van Olphen H. and F. Vaniale(eds.), Elsevier, 197-238.
 - 20) Govindaraj N., M. M. Mortland and S. A. Boyd (1987) : Single electron transfer mechanism of oxidative dechlorination of 4-chloroanisole on copper (II)-smectite. *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 1119-1123.

I-7

モノクロロジベンゾフランの合成
Synthesis of Chlorodibenzofuran Isomers

白石寛明¹・大槻 晃²

Hiroaki SHIRAISHI¹ and Akira OTSUKI²

要 旨

モノクロロジベンゾフランの四種の異性体 (1-, 2-, 3-, 4-クロロジベンゾフラン) の合成を行った。3-クロロジベンゾフランを除き *o*-アミノジフェニルエーテルのジアゾ化に伴う環化反応を用いた。3-クロロ体は、ジベンゾフランをニトロ化後、ニトロ基を還元しアミノ基としたのち、これをジアゾ化、塩化銅で塩素化した。立体障害のため、*o*-アミノジフェニルエーテル誘導体から 1-クロロジベンゾフランへの閉環反応の収率は極めて悪かった。また、4-クロロジベンゾフランへの閉環反応では、無置換のジベンゾフランがかなり生成した。これは、塩素の結合した炭素上でも、閉環反応が競争的に起こったためである。

Abstract

Four isomers of monochloro-dibenzofuran were synthesized. 1-Chlorodibenzofuran, 2-chlorodibenzofuran and 4-chlorodibenzofuran were prepared by intramolecular ring closure reaction of diazonium salts of chlorodiphenylethers. 3-Chlorodibenzofuran was prepared from 3-dibenzofurandiazonium salt. Yield of 1-chlorodibenzofuran was very poor. This may be due to steric effect. A considerable amount of dibenzofuran was formed as by-product of 4-chlorodibenzofuran.

1 はじめに

ジベンゾフランとそのアルキル置換体は、コールタールから得られるアントラセンオイル中に見いだされ¹⁾、その化学的研究は、1930~1940年代に、Gilmann ら²⁾により詳細に検討されている。ジベンゾフラン骨格は現在では、図1のように番号が付されているが、初期の報告では番号が異なるので注意が必要である。1,2,3,4,6,7,8,9位の水素は様々な官能基で置換することが

-
1. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 平成元年度 国立環境研究所客員研究員 (東京水産大学 〒108 東京都港区港南4丁目5番7号)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present Address : Tokyo University
of Fishery, Kounan 4-5-7, Minato, Tokyo 108 Japan.

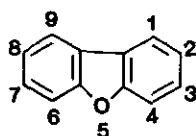


図 1 クロロジベンゾフランの構造
Fig.1 Structure of PCDF

可能で、様々な誘導体が工業的に合成されていると同時に、自然界でも純生物的に生成されている。環境問題を引き起こしたジベンゾフランの塩素置換体は全部で、モノクロロジベンゾフランからオクタクロロジベンゾフランまで合わせて、135種存在する。塩素数別の異性体の内訳はモノクロロ体4種、ジクロロ体16種、トリクロロ体28種、テトラクロロ体38種、ペンタクロロ体28種、ヘキサクロロ体16種、ヘプタクロロ体4種、オクタクロロ体1種である。これらの異性体は、化学的、物理的特性と共に生物に対する毒性も大いに異なると考えられる。このため、環境中での挙動やそれに与える影響を検討するためには、当然のことながら高純度、あるいは少なくとも組成既知の標準品が必要となる。このような複雑な塩素化合物の代表例であるポリクロロビフェニル (PCB: 209の異性体) の場合には、すべての異性体の合成が既になされており³⁾、現在では、かなりのPCBの異性体が購入可能である。また、これにより、かつて市販されていたPCBの組成が解明され、市販のPCBが異性体別の標準としてある程度使用可能となってきている。また同様に複雑な混合物である、ポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン (PCDD: 75の異性体) の場合でも、その合成に関する研究が進み、PCB同様、価格の問題を別にすればすべての異性体の購入が可能となりつつある (例えば、Paracel Laboratories Ltd., Canada)。

一方、ポリクロロジベンゾフランの異性体の合成法に関する研究は、この化合物がPCBの不純物と指摘されたことが契機となりいくつかのグループにより進められてきたが、PCBやダイオキシンに比較してその進展は遅い。バイルシュタイン有機化学全書 (括弧内は補遺版を示す) には、1979年までの信頼できる化学的研究が総括されているが、ジベンゾフランの塩素置換体は、2-, 3-, 2,6-, 2,7-, 2,8-, (以上 III/IV 版, 1930~1959); 2,3-, 2,4-, 2,8-, 3,7-, 1,2,4-, 2,3,8-, 2,4,6-, 1,2,3,4-, 2,3,6,8-, 2,3,7,8-, 2,4,6,8-, 1,2,4,7,8-, 1,3,4,7,8-, 1,2,4,6,8,9-, 2,3,4,6,7,8-, 1,2,3,4,6,7,8,9- (以上 V 版, 1960~1979) の合計 20 種の異性体しか登録されていない。最も簡単なモノ置換体である 4-クロロ体と 1-クロロ体の合成についても、その合成が最近になって報告されたばかりであるが、化合物が単離、精製はされていない^{4,5)}。ジベンゾフラン標準品は、その需要が PCB, PCDD に比べ少ないためか、意外に入手が困難であるのが実状である。

本報告は、毒性試験等に試薬を比較的少量に供給するために行ったモノクロロジベンゾフランの合成に関するものであるが、はじめにジベンゾフラン合成法を概説することにする。

2 ジベンゾフラン合成法

ジベンゾフランの化学的な特性に関しては Coffey⁶⁾, Sargent と Stransky⁷⁾ の総説がある。初期の研究については Parham⁸⁾ の総説やバイルシュタイン有機化学全書が便利である。ジベンゾフランの骨格は、通常以下のようにして合成される。

1) 2,2'-ジヒドロキシビフェニルの脱水, あるいは 2-ハロ-2'-ヒドロキシビフェニルの脱ハロゲン酸により合成できる。この脱水反応はニトロ基が水酸基あるいはハロゲンのオルト位またはパラ位にあるとアルカリ条件下で容易に反応する^{9,10)}。2,3,2'-トリヒドロキシビフェニルと塩化亜鉛の反応では 4-ヒドロキシジベンゾフランを生ずる¹¹⁾。例外もあり, 2,2',3,3',6,6'-ヘキサメトキシビフェニルからは 1,2,8,9-と 1,4,8,9-テトラヒドロキシジベンゾフランが生ずるが, 2,2',3-トリヒドロキシと 2,2',3,3'-テトラヒドロキシビフェニルからは酸性条件下でジベンゾフランを生成しないという¹²⁾。

2) 2,2'-ジアミノビフェニルより得られるビスジアゾニウム塩の分解によっても合成できるが, フェナゾンが容易に副成する⁶⁾。

3) *o*-アミノビフェニルエーテルをジアゾ化¹³⁾, あるいは, 特殊な場合には硫酸と加熱する¹⁴⁾と分子内閉環しジベンゾフランが生成する。

4) フェノール¹⁵⁾, ジフェニルエーテル, クロロフェノール¹⁶⁾の熱分解反応でも生成するが収率が非常に悪い。しかし, この反応は, フェノールを含む廃棄物の焼却過程でも起こり得るため環境的には重要な意味を持つ。

ジベンゾフランそのものは, フェノールを酸化鉛の存在下で蒸留することにより 17~20% の収率で得られる¹⁷⁾。この方法はジベンゾフランの古典的合成法であるが, アセナフテンや他の蛍光物質が副成する¹⁸⁾。2,2'-ヒドロキシビフェニルの熱的な脱水反応を用いれば, ジベンゾフランが 95% 以上の収率が得られる¹⁹⁾。*o*-フェニルフェノールを, Pd/C 触媒下, 400℃ (あるいは 500℃) で脱水素するとジベンゾフランを生成する²⁰⁾。そのほか, ニトロベンゼンをベンゼン中で熱分解するとフェニル-, ジフェニル-, トリフェニルジベンゾフランとともに少量のジベンゾフランを得ることができる²¹⁾。

クロロジベンゾフランの合成は, その毒性が知られる⁴¹⁾以前より, 主に化学的な興味からなされてきた。例えば, Gilman²⁾は, 四塩化炭素中でジベンゾフランの塩素化により, 38% の収率で 2,8-ジクロロジベンゾフランを得ている。2-クロロ体はエタノール中, 60℃ で反応させることにより合成された。当然のことながら, ジベンゾフランの塩素化生成物中には, 多くの多塩素化ジベンゾフランが存在することが指摘されている^{22,23)}。2-クロロ, 3-クロロ, 2,8-ジクロロ, 及び 3,8-ジクロロジベンゾフランの合成²⁴⁾のほか, 2-クロロ, 3-クロロ, 及び, 2,8-ジクロロ体の多段階合成法が検討されている²⁵⁾。3,4,5,6-テトラクロロベンゼン-2-ジアゾ-1-オキシドのクロロベンゼン中, 130℃での 1,3-環状付加反応では, 1,2,3,4-テトラクロロジベンゾフランが生成する²⁶⁾。

クロロジベンゾフラン異性体の選択的合成法の検討は、環境問題の視点から1970年以降になって再開されたが、主に用いられた合成法は、①無置換ジベンゾフランの直接塩素化²⁷⁾、②塩化ジフェニルエーテルの光分解²⁸⁻³⁰⁾、③置換2,2'-ジヒドロキシビフェニルとその誘導体の環化³¹⁾、④Ullman 反応³²⁾、⑤オクタクロロジベンゾフランの光分解³³⁾、⑥PCB 異性体^{34,35)} あるいはクロロベンゼン³⁴⁾の熱的酸化による環化反応、⑦*o*-フェノキシアニリンのジアゾ化による環化反応などである^{27,31)}。ところが、これらの反応生成物は、一般に複雑な混合物であり、クロマトグラフや再結晶などによる精製を何段階も必要とすることが多い。このため最終的な収率はあまり良いとはいえず、数%であることも珍しくない。この内、合成中間体として塩素化ジフェニルエーテル誘導体を用いると比較的良好な収率でクロロジベンゾフランが得られる場合が多いとされる。さらに、⑧クロロジフェニルエーテルを二酢酸パラジウムを用いメタンスルホン酸存在下に酢酸中で酸化すると、30~80%の収率でクロロジベンゾフランを合成できることが報告されて^{36,37)}いる。Kuroki ら³⁸⁾は、⑦と⑧の方法で51種の異性体を合成単離し、その融点、プロトン NMR、ガスクロマトグラフにおける保持時間を報告している。Hale ら³⁹⁾は、110種のクロロジベンゾフラン異性体を合成、購入、あるいは他の機関から譲り受け、そのガスクロマトグラフにおける保持時間と構造の関係を報告している。現在のところ、この報告が最も多くの標準品を使用していると思われるが、ガスクロマトグラフのデータしか報告されていない。表1に、現在までに報告された異性体の一覧表を示した。モノクロロ体の合成は、意外に困難な(あるいは、あまり重要視されていない)ためか、1-, 4-クロロ置換体は、いまだに満足できる純度では得られ

表 1 合成が報告されたポリクロロジベンゾフランの一覧表
Table 1 The List of synthesized PCDF

No	Congener	Registry No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	84761-86-4		b			x		x			
2	2	51230-49-0	A	A	A		A		x			A
3	3	25074-67-3	A	a						x		
4	4	74992-96-4		a						x		
5	12	64126-85-8								x		
6	13	94538-00-8								x		
7	14	94538-01-9								x		
8	16	74992-97-5								x		
9	17	94538-02-0								x		
10	18	81638-37-1								x		
11	19	70648-14-5								x		
12	23	64126-86-9	A	B						x		A
13	24	24478-74-8	A							x		
14	26	60390-27-4	A	A						x		
15	27	74992-98-6	A	A						x		
16	28	5409-83-6	A	A	A					x		A

表 1 (つづき)
Table (Continued)

No	Congener	Registry No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
17	34	94570-83-9							x			
18	36	74918-40-4							x			
19	37	58802-21-4	A						x	A		
20	46	64560-13-0							x			
21	123	83636-47-9					A		x			
22	124	24478-73-7	A				A		x			
23	126	64560-15-2							x			
24	127	83704-37-4							x			
25	128	83704-34-1							x			
26	129	83704-38-5										
27	134	82911-61-3							x			
28	136	83704-39-6		A					x			
29	137	64560-16-3							x			
30	138	76621-12-0		A					x			
31	139	83704-40-9							x			
32	146	82911-60-2							x			
33	147	83704-41-0							x			
34	148	64560-14-1							x			
35	149	70648-13-4							x			
36	234	57117-34-7		A					x			
37	236	57117-33-6							x			
38	237	58802-17-8					A		x			
39	238	57117-32-5	A	A			A		x	A		A
40	239	58802-18-9					a		x			
41	246	58802-14-5	A				A		x			
42	247	83704-42-1							x			
43	248	54589-71-8				A			x			
44	249	82911-59-9							x			
45	346	83704-43-2							x			
46	347	83704-44-3							x			
47	348	83704-45-4		A					x			
48	349	83704-46-5							x			
49	1234	24478-72-6	A			A			x		x	
50	1236	83704-21-6							x		x	
51	1237	83704-22-7				A			x		x	
52	1238	62615-08-1				A			x		x	
53	1239	83704-23-8							x		x	
54	1246	71998-73-7							x		x	
55	1247	83719-40-8							x		x	
56	1248	64126-87-0		A	A				x		x	
57	1249	83704-24-9							x		x	
58	1267	83704-25-0				A			x		x	
59	1268	83710-07-0							x		x	

表 1 (つづき)
Table (Continued)

No	Congener	Registry No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
60	1269	70648-18-9							x		x	
61	1278	58802-20-3			A	A			x		x	
62	1279	83704-26-1			A				x		x	
63	1289	70648-22-5							x		x	
64	1346	83704-27-2							x		x	
65	1347	70648-16-7							x		x	
66	1348	92341-04-3							x		x	
67	1349	83704-28-3							x		x	
68	1367	57117-36-9			A			x	x		x	
69	1368	71998-72-6			A				x		x	
70	1369	83690-98-6							x		x	
71	1378	57117-35-8							x		x	
72	1379	64560-17-4			A				x		x	
73	1467	66794-59-0			A				x		x	
74	1468	71998-72-6							x		x	
75	1469	70648-19-0							x		x	
76	1478	83704-28-4							x		x	
77	2346	83704-30-7		A	A				x		x	
78	2347	83704-31-8			A				x		x	
79	2348	83704-32-9		A	A				x		x	
80	2349	83704-33-0							x		x	
81	2367	57117-39-2			A			x	x		x	
82	2368	57117-37-0	A		A	A		x	x		x	
83	2378	51207-31-9	A		A	A		x	x	A	x	
84	2467	57117-38-1			A				x		x	
85	2468	58802-19-0	A		A			x	x		x	
86	3467	57117-40-5						x	x		x	
87	12346	83704-47-6			A				x			
88	12347	83704-48-7							x			
89	12348	67517-48-0		A	A			x	x			
90	12349	83704-49-8										
91	12367	57117-42-7			A			x	x			
92	12368	83704-51-2										
93	12369	83704-52-3							x			
94	12378	57117-41-6		A	A			x	x			
95	12379	83704-53-4										
96	12389	83704-54-5							x			
97	12467	58802-15-6			A				x			
98	12468	69698-57-3			A			x				
99	12469	70648-24-7							x			
100	12478	58802-15-6	A		A	A		x	x			
101	12479	71998-74-8			A				x			
102	12489	70648-23-6						x	x			

表 1 (つづき)
 Table (Continued)

No	Congener	Registry No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
103	13467	83704-36-3			A				x			
104	13468	83704-55-6										
105	13469	70648-15-6										
106	13478	58802-16-7	A		A	A		x	x			
107	13479	70648-20-3						x	x			
108	13489	70872-82-1						x				
109	23467	57117-43-8			A			x	x			
110	23468	67481-22-5			A			x	x			
111	23469	83704-35-2							x			
112	23478	57117-31-4		A	A			x	x			
113	23479	70648-21-4							x			
114	23489	69433-00-7			A				x			
115	123467	79060-60-9			A			x	x			
116	123468	69698-60-8			A			x	x			
117	123469	91538-83-9			A							
118	123478	70648-26-9			A			A	x			
119	123479	91538-84-0			A				x			
120	123489	92341-07-6	A									
121	123678	57117-44-9		A	A			x				
122	123679	92341-06-5										
123	123689	75198-38-8			A			x	x			
124	123789	72918-21-9										
125	124678	67562-40-7		A	A			x				
126	124679	75627-02-0			A							
127	124689	69698-59-5			A			x		A		
128	134678	71998-75-9			A							
129	134679	92341-05-4										
130	234678	60851-34-5	A	A	A			x	x	A		
131	1234678	67562-39-4			A			x	x			
132	1234679	70648-25-8						x	x			
133	1234689	69698-58-4			A			x	x			
134	1234789	55673-89-7			A			x	x			
135	12346789	1010-77-1	A						x			

Purity

A : >95%, a : 95%~90%, B : 90%~50%, b : <50%, x : unknown.

1 : Beilstein Handbook of Organic Chemistry, system No.2370, 2 : Safe and Safe⁵⁾
 3 : Kuroki *et al*³⁸⁾, 4 : Gray *et al*²⁷⁾, 5 : Tashiro and Yoshida⁴⁾, 6 : Rappe *et al*⁴¹⁾,
 7 : Ha le *et al*³⁹⁾, 8 : Norstorm *et al*²⁹⁾, 9 : Mazer *et al*⁴²⁾, 10 : Choudhy *et al*²⁸⁾.

ていない。どの報告でも最終的な収量は数100 mg から数 μ g であり、99%以上の純度のあるものは極めて少ない。

3 モノクロロジベンゾフランの合成

各異性体は以下に示す経路(図2)で合成を行った。3-クロロジベンゾフランを除き *o*-アミノジフェニルエーテルのジアゾ化に伴う環化反応を用いた。3-クロロ体は、ジベンゾフランをニトロ化後、ニトロ基を還元しアミノ基としたのち、これをジアゾ化、塩化銅で塩素化した¹⁷⁾。2-クロロ体は、ジベンゾフランの直接塩素化でも容易に合成できるが、この反応からは、毒性の強い2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランなどが生成することが知られている。これは、実験者に危険があると同時に、最終生成物に不純物として混入すると、毒性試験に使用する試薬としては問題が生じる可能性があると考えられたため、直接塩素化はあえて採用しなかった。

4 実験

4.1 2-クロロジベンゾフランの合成

4.1.1 4-クロロ-2'-ニトロジフェニルエーテルの合成

p-クロロフェノール155 gを加熱溶解し、60-90℃でかくはん下に、水酸化カリウム68 gを30分かけて加えた。これに *o*-ニトロベンゼンを加え128-130℃に6時間加熱した。60℃まで冷却後、ベンゼン400 mlを加えたのち、未反応のフェノールを5%水酸化ナトリウム水溶液により3回(300, 200, 100 ml)抽出除去した。ベンゼン層を3回(300 ml)水洗後、硫酸ナトリウムで乾燥後減圧濃縮すると、224 gの粗生成物が得られた。これをそのまま次の反応に用いた。

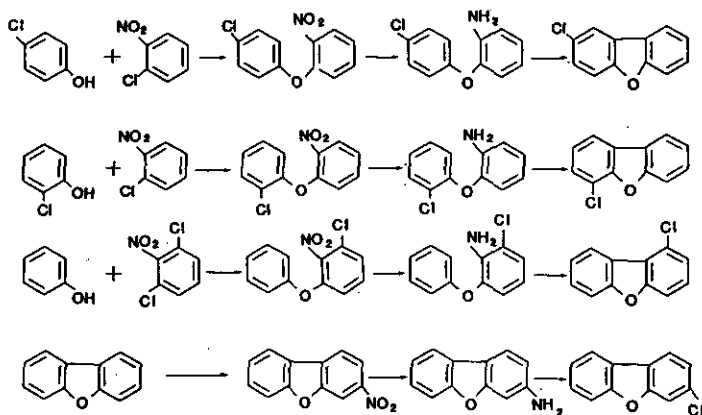


図 2 モノクロロジベンゾフランの合成法

Fig. 2 The Synthetic scheme of chlorodibenzofuran isomers

4.1.2 2-アミノ-4'-クロロジフェニルエーテルの合成

上記の粗生成物 114g を 99.5% エタノール 210 ml に溶解し、濃塩酸 420 ml を加える。この溶液にかくはん下、塩化第一スズ（二水塩）442g を少量ずつ、1.5時間かけて加えた。発熱し液温は約 50℃ となるが、さらに 1 時間 50~55℃ に加熱した。放冷後、ベンゼン 400 ml と水 600 ml を加え、水酸化ナトリウムにて pH を 9 とし、かくはん抽出した。ろ過後、ベンゼン層を 2 回水洗（300 ml）し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮すると、89g の粗生成物を得た。

4.1.3 2-クロロジベンゾフラン

上記粗生成物 89g を、0℃ 以下に冷却した濃硫酸 100g 中にかくはん下 1 時間かけて溶解した。さらに 1 時間後、亜硝酸ナトリウム 31g を水 100 ml に溶かした溶液を 0~3℃ に保ちながら 2 時間かけて滴下した。1 時間 0℃ に保った後、50% 硫酸 500 ml 中へ加え、かくはんしながら 100℃ まで、徐々に（1 時間）加熱した。発泡が終了した後、さらに 3 時間還流した。水蒸気蒸留し、生成した結晶をろ別し、ヘキサン/ベンゼン（300/300 ml）に溶解し、5% 水酸化ナトリウム溶液で不純物を抽出除去し、水洗、硫酸ナトリウムによる乾燥後、溶媒を減圧留去した。生じた結晶をヘキサンで再結晶を 2 回、さらにエタノールで再結晶し、2-クロロジベンゾフランの白色針状結晶（7.2g）を得た。

4.2 4-クロロジベンゾフランの合成

2-クロロジベンゾフランと同様に、2-クロロフェノールと 2-クロロニトロベンゼンより、2-クロロ-2'-ニトロジフェニルエーテルを得た。さらにこれを同様に塩化第一スズにより還元し（50~60℃ で 6 時間）、2-アミノ-2'-クロロジフェニルエーテルを得た。これを同様の操作で、亜硝酸ナトリウムにてジアゾ化、環化したが、3.3g の結晶を得たのみであった。しかも、この結晶には不純物としてジベンゾフランが 30% 程度含まれていたため、逆層液体クロマトグラフィーにより分取した後、ヘキサンにより再結晶し、4-クロロジベンゾフラン（1.0g）を得た。

4.3 1-クロロジベンゾフランの合成

3,5-ジクロロアニリンをニトロ化後、アミノ基を還元し、2,6-ジクロロニトロベンゼンを合成した。これとフェノールを 2-クロロジベンゾフランの合成と同様の操作で反応させ、3-クロロ-2'-ニトロジフェニルエーテルを得た。これを、同様の操作で還元、ジアゾ化による環化を行ったが、収量が甚だしく悪く、300 mg の結晶を得たのみであった。

4.4 3-クロロジベンゾフランの合成

4.4.1 3-ニトロジベンゾフラン

氷酢酸 500 ml にジベンゾフラン 100g を溶解し、発煙硝酸 100 ml を 20~25℃ で 2 時間かけて

滴下した。25~35℃で5時間かくはんした後、氷水2lに注いだ。2時間後、生じた結晶をろ過し水洗した。酢酸及びメタノールで再結晶し、3-ニトロジベンゾフラン65gを得た。

4.4.2 3-アミノジベンゾフラン

3-ニトロジベンゾフラン30gを、エタノール200mlに溶解し、塩酸120mlを加え、スズ(華状)を2時間かけ徐々に加えた。40℃で4時間反応後、水1lを加え、水酸化ナトリウムにて中和後、クロロホルムで3回(500, 300, 200ml)抽出し、ろ過、水洗、硫酸ナトリウムによる乾燥後、溶媒を減圧留去した。80%アルコールにて結晶化後、メタノールにて再結晶して3-アミノジベンゾフラン22gを得た。

4.4.3 3-クロロジベンゾフラン

3-アミノジベンゾフラン10gを濃塩酸5gと水120mlの溶液に懸濁し、0℃に冷却しながら亜硝酸ナトリウムの水溶液(3.8gを10mlの水に溶かした溶液)を滴下しジアゾ化した。14~18℃にて2時間かくはん後、10%塩化第一銅の水溶液240mlを加え、1時間95~98℃に加熱した。これを水蒸気蒸留し、生成した結晶をろ過、エタノールにて2回再結晶し3-クロロジベンゾフラン(3.8g)を得た。

5 結果と考察

合成されたモノクロロジベンゾフランの純度は、FID検出器を装着したキャピラリーガスクロマトグラフィーを用い、そのクロマトグラム上のピーク面積比より求めた。1-, 2-, 3-, 及び4-クロロジベンゾフランの純度は、それぞれ99.6%, 99.9%, 99.1%, 98.8%であった。3-及び4-クロロ体の主な不純物は無置換のジベンゾフランであり、約1%程度含まれていた。

1-クロロジベンゾフランの収率は極めて悪く、十分な量を得ることができなかった。一般に、最終生成物がジベンゾフランの1位に置換基を有する化合物の合成は、*o*-アミノジフェニルエーテル誘導体のジアゾ化による閉環法では成功しないといわれている。今回、少量といえども結晶が得られたのは、例外的である。*o*-アミノジフェニルエーテル誘導体から4-クロロジベンゾフランの閉環反応では、無置換のジベンゾフランがかなり生成した。これは、予想に反し、塩素の結合した炭素上でも、求核反応が競争的に起こったためであると思われる。

今回の実験では、3-クロロジベンゾフランを除き、すべて*o*-アミノジフェニルエーテル誘導体のジアゾ化によって合成を行ったが、この方法は、モノクロロジベンゾフランの標準試料を多量に合成するためには、最善の方法ではなかったように思われる。例えば、収量の悪かった1-及び4-クロロジベンゾフランの合成には、次のような合成経路も考え得る。すなわち、ジベンゾフランをブチルリチウムでリチオ化し、これを*o*-メチルヒドロキシアミンと反応させると4-アミノジベンゾフランを高収率で得ることができる⁴⁰⁾。これをジアゾ化し、塩素で置換すれば、

4-クロロジベンゾフランが得られるし、アセチル化した後、塩素化、さらにアミノ基を還元すれば、1-クロロジベンゾフランとなる。これらの反応については、今後の検討課題としたいが、今回と同様に、分離困難な副生成物が生じる可能性が高い。選択的合成法の開発と共に、精製法の検討も重要である。

謝 辞 困難な合成にもかかわらず、実際に実験をして下さった岩脇利廣氏（ソール研究所、三重）に、ここに深く感謝致します。

引用文献

- 1) Kruber, Ger. Pat. (1930): 491, 594. Chem. Abstr. **24**, 2475.
- 2) Gilman, H. and R. V. Young (1934): Dibenzofuran. II. Metallation. J. Amer. Chem. Soc., **56**, 1412-1414.
- 3) Mullin, M. D., C. M. Pochini, S. McCrindle, M. Romkes, S. H. Safe and L. M. Safe (1984): High-resolution PCB analysis: Synthesis and chromatographic properties of all 209 PCB congeners. Environ. Sci. Technol., **18**, 468-476.
- 4) Tashiro M. and H. Yoshida (1982): Preparation of some chlorodibenzofurans from 1-hydroxy and 2-hydroxydibenzofuran. Heterocycles, **19**, 2339-2343.
- 5) Safe, S. and L. Safe (1984): Synthesis and characterization of twenty-two purified polychlorinated dibenzofuran congeners. J. Agric. Food Chem., **32**, 68-71.
- 6) Coffey, S. (ed.) (1973): Rodd's chemistry of carbon compounds, 2nd ed., Vol. IV A, Elsevier, New York, 194-202.
- 7) Sargent, M. V. and P. O. Stransky (1984): Dibenzofuran., Adv. Heterocycl. Chem., **35**, 1-81.
- 8) Parham, W. E. (1951): Dibenzofuran (Diphenylene oxide). In: Heterocyclic compounds, vol. 2, John Wiley & Sons, New York, 123-144.
- 9) Van Alphen, J. (1932): Ether and ester. IV. The decomposition of acyl derivatives of 3,3',5,5'-tetra-nitro-2,2'-dihydroxybiphenyl into 1,3,6,8-tetra-nitro-diphenylene oxide and its acid anhydride. Red. Trav. Chim., **51**, 715-717.
- 10) Case, E. H. and R. U. Schock (1943): Nitration of certain halobiphenyls. II. Di- and tetra-nitro derivatives of 2,2'-dichlorobiphenyl. J. Am. Chem. Soc., **65**, 2086-2087.
- 11) Pring, B. G. and N. E. Stjernstorm (1968): Complex dibenzofurans XIII. The dehydration of 2,2'-dihydroxybiphenyls. Acta Chem. Scand., **22**, 681-683.
- 12) Forsen and Stjernstorm (1963): Complex dibenzofurans VII. A PMR spectroscopic investigation of the dimethylation and dehydration products of 2,2',3,3',6,6'-hexamethoxybiphenyl. Arkiv. Kemi., **21**, 65-72. CA 59, 9941a.
- 13) McCombie, H., W. G. Macmillan and Scarborough (1931): Substitution products of 2-nitro and 2-acetamidodiphenyl ethers and the corresponding diphenylene oxide. J. Chem. Soc., 529-537.
- 14) Parham, W. E. and R. W. Strassburg (1961): 2,4-Dimethyldibenzofuran. J. Org. Chem., **26**, 4729-4751.
- 15) Delaunis, C. (1968): Effect of the filling rate of a reactor on the vapor tension and the temperature at the beginning of cracking of phenol at high pressures. Ann. Mines Belg., 9-16. CA **69**, 60469u.
- 16) Bell, F. (1936): Pyrolysis of chlorophenols. J. Chem. Soc., 1244.

- 17) Cullinane, N. M. (1930) : Diphenylene oxide series II. J. Chem. Soc., 2267-2269.
- 18) Williams, A. F. (1948) : Purity of diphenylene oxide (dibenzofuran). Nature, **162**, 925.
- 19) Cullinane, N. M. and C. G. Davis (1936) : Synthesis of some heterocyclic compounds. Rec. Trav. Chim., **55**, 881-886.
- 20) Yasui, H., M. Sazumura (1978) : Synthesis of dibenzofuran (diphenylene oxide). Aromatikkusu., **30**, 239-295. CA. 91, 5057(1979).
- 21) Fields, E. K. and S. Meyerson. (1967) : Arylation by aromatic nitro compounds at high temperature. II. Nitrobenzene alone with benzene and benzene-d. J. Am. Chem. Soc., **98**, 3224-3228.
- 22) Clark, F. M. (1939) : Chlorinated diphenylene oxide composition for treating paper in capacitors. U.S. 2,198,473. April 23.
- 23) Cox, J. M., B. A. Wright and W. W. Wright (1965) : Thermal degradation of polyphenylene oxide. J. Appl. Polymer Sci., **9**, 513-522.
- 24) Shibata, S. and Y. Miura (1952) : Antibacterial effect of lichen substances and their related compounds. J. Pharm. Soc. Japan., **72**, 1333-1336.
- 25) Oita, K., R. G. Johnson and H. Gilman (1955) : The chlorination of dibenzofuran and some of its derivatives. J. Org. Chem., **20**, 657-667.
- 26) Huisgen, R., H. Gotthardt and H. O. Bayer (1964) : 1,3-Dipolar additions. X. Thermolyses of aromatic o-diazo-oxides in alkynes and aromatics. Ber.97, 2884-2892. CA. 61. 14619b.
- 27) Gray, A. P., V. M. Dipinto and I. J. Solomon (1976) : Synthesis of specific polychlorinated dibenzofurans. J. Org. Chem., **41**, 2428-2434.
- 28) Choudhry, G. G., G. Sundstrom, F. W. M. Van der Wielen and O. Hutzinger (1977) : Synthesis of chlorinated dibenzofurans by photolysis of chlorinated diphenyl ethers in acetone solution. Chemosphere, **6**, 327-332.
- 29) Norstrom, A., K. Andersson and C. Rappe (1976) : Formation of chlorodibenzofurans by irradiation of chlorinated diphenyl ethers. Chemosphere, **5**, 21-24.
- 30) Norstrom, A., K. Andersson, C. Rappe (1977) : Studies on the formation of chlorodibenzofuranes by irradiation or pyrolysis of chlorinated diphenyl ethers. Chemosphere, **6**, 241-248.
- 31) Kende, A.S., J. J. Wade, D. Ridge and A. Poland (1974) : Requiiospecific synthesis and CMR spectroscopy of toxic polyhalodibenzo-*p*-dioxines and dibenzofurans. Abstr. 167th Nat. Meeting Am. Chem. Soc. Los Angeles, CA. No. ORGN-130 Abstract
- 32) Morita, M., J. Nakagawa, K. Akiyama, S. Miura and N. Isono (1977) : Detailed examination of polychlorinated dibenzofurans in PCB preparations and Kanemi Yusho oil. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **18**, 67-73.
- 33) Buser, H. R. (1976) : Preparation of qualitative standard mixtures of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxines and dibenzofurans by ultraviolet and-irradiation of the octachloro compounds. J. Chromatogr., **129**, 303-307.
- 34) Buser, H. R. (1979) : Formation of polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and dibenzo-*p*-dioxines (PCDDs) from pyrolysis of chlorobenzenes. Chemosphere, **8**, 415-424.
- 35) Buser, H. R. and C. Rappe (1979) : Formation of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from the pyrolysis of individual PCB isomers. Chemosphere, **8**, 157-174.
- 36) Norstrom, A., S. K. Choudhary, P. W. Albro and J. D. Mckinney (1979) : Synthesis of chlorinated dibenzofurans and chlorinated aminodibenzofurans from the corresponding diphenyl ethers and nitrodiphenyl ethers. Chemosphere, **8**, 331-343.
- 37) Gara, A., C-A. Nilsson, K. Andersson and C. Rappe (1979) : Synthesis of higher chlorinated diben-

- zofurans. *Chemosphere*, **8**, 405-414.
- 38) Kuroki, H., K. Haraguchi and Y. Masuda (1984) : Synthesis of polychlorinated dibenzofuran isomers and their gas chromatographic profiles. *Chemosphere*, **13**, 561-573.
 - 39) Hale, M. D., F. D. Hileman, T. Mazar, T. L. Shell, R. W. Noble and J. J. Brooks (1985): Mathematical modeling of temperature programmed capillary gas chromatographic retention indexes for polychlorinated dibenzofurans. *Anal. Chem.*, **57**, 640-648.
 - 40) Willis (1943) : *Iowa State Coll. J. Soc.*, **18**, 98. CA. **38**, 769 (1044)
 - 41) Rappe, C., H. R. Buser, H. Kuroki and Y. Masuda (1979) : Identification of polychlorinated dibenzofurans(PCDFs) retained in patients with yusho. *Chemosphere*, **4**, 259-266.
 - 42) Mazer, T., F. D. Hileman, R. W. Noble and J. J. Brooks (1983) : Synthesis of the 38 tetrachlorodibenzofuran isomers and identification by capillary column gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **55**, 104-110.

II クロロジベンゾフランの生体内動態と毒性

Metabolism and Toxicity of Chlorinated Dibenzofurans

II-1 ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝 I 生体内における動態

Metabolism of 2-Chlorodibenzofuran in the Rat. I. Metabolic Behavior and Fate

遠山千春¹・平野靖史郎¹・鈴木和夫¹

Chiharu TOHYAMA¹, Seishiro HIRANO¹ and Kazuo T. SUZUKI¹

要 旨

2-クロロジベンゾフラン(2-Cl-DBF)の生体内における動態を雄性ウイスター系ラットを用いて検討した。¹⁴Cでラベルした2-Cl-DBFを静脈内に投与したところ、24時間以内に投与量の86%が尿、大腸内容物、及び糞に検出された。約3%は48時間後において皮下脂肪に検出された。経口投与したラットにおいても同様の排せつ傾向が認められた。*in vitro*における実験から80%の2-Cl-DBFが赤血球中に分配されること、残りが血しょう中に存在することが判明した。胆管のカニキュレーション実験から、2-Cl-DBFが腸管循環を受けていることが示唆された。胆汁をスルファターゼとβ-グルクロニダーゼで処理した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて分析したところ、2-Cl-DBFは存在せず、数多くの代謝産物が存在することが明らかとなった。比較のため行った¹⁴C-3-Cl-DBFの生体組織中の分布パターンは2-Cl-DBFと同様であるが、投与後48時間目までを比較すると、3-Cl-DBFよりも2-Cl-DBFのほうが皮下脂肪、血液など体内により多く蓄積する傾向が観察された。今回の結果から、2-Cl-DBFはラットの体内で速やかに代謝され体外に排せつされるが、一部は皮下脂肪に残る傾向があること、また、数多くの代謝産物が存在することが明らかとなった。

Abstract

The disposition of 2-chlorodibenzofuran (2-Cl-DBF) was investigated using male Wistar rats. When [¹⁴C]-2-Cl-DBF was intravenously administered to the rats, about 86% of radioactivity was found in urine, large intestinal contents and feces within 24h. Approximately 3% of 2-Cl-DBF radioactivity was present in the adipose tissue 48 after intravenous administration. A similar excretion pattern of the compound was observed in orally administered rats. In the case of rats treated with [¹⁴C]-3-Cl-DBF, tissue distribution pattern was found similar to that of [¹⁴C]-2-Cl-DBF, but 2-Cl-DBF appeared to

1. 国立環境研究所 環境健康部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

accumulate more in adipose tissues and blood. From experiments *in vitro* approximately 80% of 2-Cl-DBF was found to distribute in red blood cell fraction and the rest in the plasma fraction. A bile cannulation study revealed the involvement of enterohepatic circulation. Analyses of bile specimens, which were subjected to enzymatic hydrolysis by aryl-sulfatase and/or β -glucuronidase, by high performance liquid chromatography showed the presence of various yet unidentified conjugated metabolites.

1 はじめに

ポリクロロジベンゾフラン (PCDF) による広範囲にわたる環境汚染は、これらの化合物が地方自治体の焼却場から放出されて食物連鎖を通じて様々な生物の体内に蓄積をすること¹⁾から、学問的及び行政的な関心のみならず、地球規模の環境汚染として国民が関心を持っている問題である。

PCDF への過剰曝露は、胸腺萎縮をもたらすが、重篤な場合には、これらの化合物に事故により曝露した日本人の集団に発生したように、「油症」を引き起こすことが報告されている。ライスオイルは、PCDF (およそ 5 ppm) のみならず、PCB (およそ 1,000 ppm) にも汚染されていたが、この油症の原因は、PCBではなくPCDFであると考えられている²⁻⁴⁾。最近、茨城県つくば市の上水に微量 (1.4 ppt) の2-クロロジベンゾフラン (2-Cl-DBF) が検出された⁵⁾。この化合物及び塩素化していないジベンゾフランが貯水池には検出されないことから、2-Cl-DBF は、上水道の配管の内側に塗布されている材料と上水中の塩素が反応して生成したものと考えられている。

低塩素化ジベンゾフランや、特にジベンゾフラン環の隣接した位置に水素原子があるジベンゾフラン化合物は、肝臓に蓄積しにくいこと⁶⁻⁸⁾、加えて、肝ガン細胞株において2-Cl-DBFによるアリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼやエトキシレゾルフィンO-ジエチラーゼの誘導は見られなかったこと⁹⁾から、2-Cl-DBFの生体への毒性は高塩素化ジベンゾフランほどには高くはないことが予想される。しかし、Matsumotoら¹⁰⁾は、TA 98及びTA100を用いたAmesテストにおいて4種類のモノクロロジベンゾフラン異性体の変異原性を調べ、このうち、3-Cl-DBFが最も変異原性が高く、2-Cl-DBF及び4-Cl-DBFが弱いながらも変異原性を有することを報告している。薬物代謝酵素の誘導能に関して、2-Cl-DBFを100 mg/kg体重の用量で腹腔内投与したラット肝臓において、アニリンヒドラーゼとアミノピリンジメチラーゼの誘導が認められている¹¹⁾。

PCDFの小動物の臓器や組織への蓄積や排せつに関する報告は数多くなされている¹²⁻¹⁸⁾が、2-Cl-DBFの生体内の挙動と代謝的運命についての報告はほとんど知られていない。この理由の一つは、不純物のない2-Cl-DBF、及びこの放射性標識化合物がないためであった。我々は、今回これらの化合物を用いることにより、¹⁴Cで標識した2-Cl-DBFのラットの臓器中の分布、血液における分配、胆汁中の代謝産物について検討を行い、さらに、比較のため、¹⁴C-3-

CI-DBFのラットの生体内における動態について検討した。

2 方法

試薬の2-CI-DBF、及び3-CI-DBF（純度99%以上）については、国立環境研究所、化学環境部の森田昌敏博士より提供頂いた。[U- ^{14}C] 2-CI-DBF（比活性、146 mCi/g (5.40 GBq/g)）、及び[U- ^{14}C] 3-CI-DBF（比活性、133 mCi/g (4.92 GBq/g)）は生体化学研究所（千葉県印旛郡白井町）より購入した。放射活性は、2-CI-DBFにのみ由来していることを薄層クロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーにより確認した。スルファターゼ（Type H-5）と β -グルクロニダーゼ（Type B-1）はシグマ社より購入した。ツイーン80とポリエチレングリコール300は和光純薬より購入した。その他の試薬は、分析用のものを用いた。

器具と装置について本研究では以下のものを用いた。

逆相カラム（ μ Bondasphere C18, pore size=100Å, particle size=5 μm ,
3.5mm×15cm, プレカラム（C18）, Waters社）

高速液体クロマトグラフ（pump: Model 510, gradient controller: Model 680,
spectrometer: Model 481, Waters社）

液体シンチレーションカウンター（Model 3255, Packard社）

動物については、日本クレアより購入したウイスター系雄性ラット（平均体重200g）を用いた。実験に用いるまで、ラットには市販の飼料並びに蒸留水を自由に摂取させた。臓器、血液、糞は、ソルエン350（Packard社）を用いて可溶化した。これら及び尿と胆汁は、液体シンチレーター（Dimilume 30, Packard社）と良く混和した後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を計数した。臓器及び組織中の放射性2-CI-DBF及び3-CI-DBFの量の計算に際しては、筋肉、皮膚、皮下脂肪、血液の体重に占める割合をそれぞれ50, 16, 11, 8%とみなして計算した¹⁹⁾。

2.1 放射性2-CI-DBFの生体内挙動

実験1：ラット12匹に0.50 mg/mlとなるようにツイーン80水溶液に溶解させた（ツイーン80：水=1：3） ^{14}C -2-CI-DBFをラット1匹当たり、2-CI-DBFとして87.5 μg (12.8 μCi)の投与量となるように、0.175 mlを尾静脈内に投与した。経時的に採尿、採糞し、臓器を採取した。

実験2：ラット3匹をエーテル麻酔下で開腹し、胆管にポリエチレンチューブ（0.25 mmID, 0.61 mmOD）を挿入した。開腹部を縫合した後、ボールマンケージに保定し、1匹当たり0.155 mlの ^{14}C -2-CI-DBF溶液を尾静脈内に投与した（87.5 μg , 12.8 μCi ）。投与後3時間にわたり胆汁を採取した。この間、ラットには1%のグルコースを含む生理食塩水のみを与えた。

実験3：ラット3匹に、 ^{14}C -2-CI-DBFをラット1匹当たり、2-CI-DBFとして92.0 μg (13.4 μCi)の投与量となるように、胃ゾンデを用いて経口投与した。経時的に採尿、採糞し、

臓器を採取した。

実験 4：ラット 2 匹に、実験 2 と同様に胆管にポリエチレンチューブを挿入した後、直ちに、実験 3 と同様に、 ^{14}C -2-CI-DBF をラット 1 匹当たり、2-CI-DBF として $92.0\ \mu\text{g}$ ($13.4\ \mu\text{Ci}$) の投与量となるように胃ゾンダを用いて経口投与した。投与後 3 時間にわたり胆汁を採取した。

2.2 血液における放射性 2-CI-DBF の存在状態

実験 5：（放射性 2-CI-DBF の赤血球と血しょうにおける分布）：無処置のラットから得た血液 $6\ \text{ml}$ に ^{14}C -2-CI-DBF を $60\ \mu\text{l}$ 添加して直ちにかくはんした。かくはん直後（0 分）、並びに、 37°C で 10 分間もしくは 60 分間インキュベートした後、 $5,000\text{g}$ で 3 分間遠心し、赤血球と血しょうを分離した。赤血球と血しょう中の ^{14}C の放射能を液体シンチレーションカウンターで計測した。

実験 6：（放射性 2-CI-DBF の赤血球から血しょうへの移行）：ラットから採取した血液 $3.0\ \text{ml}$ に ^{14}C -2-CI-DBF を $30\ \mu\text{l}$ 添加後、 $0.4\ \text{ml}$ ずつ遠心管に分取した。 37°C で 15 分間インキュベート後、 $5,000\text{g}$ で 3 分間遠心し、血しょうを分離除去した。この赤血球分画に、血液 $400\ \mu\text{l}$ を遠心して得られた血しょうを添加かくはんし、所定の時間 37°C でインキュベート後、遠心操作により、赤血球分画と血しょう分画に分けた。各分画中の ^{14}C を測定し、赤血球分画から血しょう分画への ^{14}C の移行を調べた。

実験 7：（赤血球分画からの放射性 2-CI-DBF の血しょうへの抽出）：血液 $1.2\ \text{ml}$ に ^{14}C -2-CI-DBF $12\ \mu\text{l}$ を加えてかくはん後、 37°C で 10 分間インキュベートした。遠心して血しょうを分離除去し、 ^{14}C の放射能を計測した。この赤血球分画に、あらかじめ分離しておいた血しょう $600\ \mu\text{l}$ を添加してかくはん後、 37°C で 5 分間インキュベートし、遠心操作により血しょうを分離し、 ^{14}C による放射能を計測した。この操作を 5 回繰り返して、赤血球分画からの血しょうへの ^{14}C の移行を検討した。

2.3 胆汁中における放射性 2-CI-DBF の代謝産物の分析（実験 8）

上記 2.1 実験 2 のラットから得た胆汁を用いた。胆汁は無処理、あるいは、下記のように酵素で処理した後、メンブレンフィルター（ $0.45\ \mu\text{m}$ ）でろ過後、高速液体クロマトグラフィーにより分析した。移動相として、 0.1M 酢酸緩衝液（ $\text{pH}\ 3.5$ ）—アセトニトリルを用い、流速 $1.0\ \text{ml}$ 、各分画は、 $0.33\ \text{ml}$ である。

酵素処理の条件は次のとおりである。

1) β -グルクロニダーゼによる処理：胆汁 $50\ \mu\text{l}$ に $34,000\text{U/ml}$ の β -グルクロニダーゼ溶液を $25\ \mu\text{l}$ 、及び 40mM 亜硫酸ナトリウム溶液 $25\ \mu\text{l}$ を加え、 37°C で 18 時間インキュベートした。これらの試薬の希釈溶解には、 0.5M 酢酸緩衝液、 $\text{pH}\ 3.8$ を用いた。

2) アリルスルファターゼによる処理：胆汁 $50\ \mu\text{l}$ に $450\ \text{U/ml}$ のアリルスルファターゼ溶液 $25\ \mu\text{l}$ 、及びサッカリン酸-1,4-ラクトン溶液 $25\ \mu\text{l}$ を加え、 37°C で 18 時間インキュベートした。

これらの試薬の希釈溶解には、0.5M酢酸緩衝液、pH 5.0を用いた。

3) β -グルクロニダーゼ及びアリルスルファターゼによる処理：胆汁50 μ lに16,000 U/mlの β -グルクロニダーゼ及び200 U/mlのアリルスルファターゼの両者混合液50 μ lを加え、37°Cで24時間インキュベートした。

2.4 放射性3-CI-DBFの生体内挙動

実験 9：ラット3匹に0.501 mg/mlとなるようにツイーン 80水溶液に溶解させた（ツイーン 80：水=1：3） 14 C-3-CI-DBFをラット1匹当たり、DBFとして87.7 μ g（11.7 μ Ci）の投与量となるように、0.175 mlを尾静脈内に投与した。経時的に採尿、採糞し、臓器を採取した。

実験 10：ラット3匹に、実験2と同様の方法で、胆管にポリエチレンチューブを挿入した。ラットをポールマンケージに保定し、1匹当たり0.175 mlの 14 C-3-CI-DBF溶液を尾静脈内に投与した（87.7 μ g, 11.7 μ Ci）。投与後3時間にわたり胆汁を採取した。この間、ラットには1%のグルコースを含む生理食塩水のみを与えた。

3 結果

3.1 放射性2-CI-DBFの生体内挙動

2-CI-DBFに由来する 14 Cの臓器、血液、排せつ物中における含量の経時変化を表1に示す。静注後5時間までに、投与量の約50%が大腸内容物、尿及び糞に検出された。24時間までに、尿と糞にそれぞれ投与量の40%が検出された。投与後48時間までには、これらの排せつ物、及び小腸と大腸の内容物に計85%が観察された。胆汁中への放射エネルギーを測定すると、静注後3時間までに投与量の約60%が排せつされ、胆汁への排せつ量はこの頃までにプラトーに達することが判明した（図1）。これらのことから、2-CI-DBFは胆汁に排せつされた後、いわゆる腸肝循環により再吸収されていることが推測された。

48時間目では、脂肪組織と血液に投与量のそれぞれ約3%と0.8%の2-CI-DBFに由来する 14 Cが存在していた。

経口投与では、72時間目までに糞と尿にそれぞれ62.4 \pm 3.1%、34.4 \pm 1.6%（平均 \pm 標準偏差）が排せつされた（表2）。胆管にカニューレを挿入した場合には、糞中へ排せつされる割合は、経口投与後48時間で平均13.5%であり、経口摂取の場合に2-CI-DBFは、比較的速やかに消化管から吸収されることが明らかとなった。

3.2 血液中における2-CI-DBFの存在状態

血液中において 14 C-2-CI-DBFが赤血球と血しょうにどのような割合で配分されるかを *in vitro* の系で調べた。表3に示すように、血液と混合後60分にわたって調べたところ、混合直後から 14 C-2-CI-DBFの約80%は赤血球に配分されることが示された（実験5）。

表 1 2-クロロジベンゾフランを静脈内投与したラットにおける¹⁴C-2-クロロジベンゾフラン由来の放射能の組織中の分布^a

Table 1 Tissue distribution of ¹⁴C-2-chlorodibenzofuran-derived radioactivity in rats^a

Tissue	Time after administration			
	30 min	5 h	24 h	48 h
Adipose tissue	13.2 ± 3.5	9.65 ± 4.38	3.87 ± 0.54	2.87 ± 1.96
Adrenal gland	0.03 ± 0.01	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.003
Cerebellum	0.08 ± 0.03	0.004 ± 0.001	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.001
Cerebrum	0.35 ± 0.18	0.02 ± 0.01	0.005 ± 0.002	0.006 ± 0.004
Heart	0.19 ± 0.04	0.10 ± 0.12	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Kidney	1.82 ± 0.35	0.67 ± 0.25	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.05
Large intestine	0.33 ± 0.06	2.64 ± 3.12	0.18 ± 0.09	0.10 ± 0.11
Large intestine contents(LIC)	0.11 ± 0.02	33.7 ± 2.2	7.88 ± 5.66	5.88 ± 8.22
Liver	10.6 ± 1.2	2.79 ± 0.34	1.04 ± 0.15	0.76 ± 0.19
Lung	0.22 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Muscle	10.8 ± 3.5	2.42 ± 1.55	0.72 ± 0.17	0.73 ± 0.52
Pancreas	0.23 ± 0.07	0.08 ± 0.06	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Skin	23.8 ± 3.5	5.08 ± 0.57	0.67 ± 0.18	0.60 ± 0.46
Small intestine	6.48 ± 2.61	1.99 ± 0.37	0.24 ± 0.11	0.13 ± 0.10
Small intestine contents	12.1 ± 3.1	15.5 ± 1.3	1.70 ± 0.38	1.23 ± 1.29
Spleen	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Stomach	0.28 ± 0.08	0.08 ± 0.07	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.02
Testis	0.38 ± 0.11	0.09 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.02
Thymus	0.22 ± 0.11	0.01 ± 0.00	0.005 ± 0.002	0.004 ± 0.002
Whole blood	4.98 ± 0.29	1.97 ± 0.37	0.67 ± 0.22	0.81 ± 0.47
Feces ^b (F)	— ^c — ^c	5.54 ± 9.59	40.6 ± 7.0	38.5 ± 11.2
Urine ^b	0.43 ^d —	10.9 ± 9.5	38.3 ± 2.6	40.5 ± 4.5
LIC+F ^b	0.11 ± 0.02	39.2 ± 10.6	48.3 ± 1.5	44.4 ± 3.1
Sum total	86.6 ± 3.8	93.4 ± 12.7	96.1 ± 4.0	92.4 ± 1.6

a. ラットに¹⁴C-2-Cl-DBFを1匹当たり、87.5 μ g (12.8 μ Ci)の投与量で尾静脈から注入した。単位は投与量に対する各組織に含まれる¹⁴C-2-Cl-DBFの百分率である。数値は、ラット3匹の平均値と標準偏差である。

b. ¹⁴C-2-Cl-DBFの放射能の累積量を示す。

c. 観察期間中には、糞の排せつはなかった。

d. 尿は、2匹のラットの膀胱から採取した。

a. Rats were intravenously injected with ¹⁴C-2-chlorodibenzofuran at a dose of 87.5 μ g DBF/rat (12.8 μ Ci/rat). The unit is expressed as a percentage of total dose per each organ or tissue, and values are mean \pm SD for 3 rats.

b. Values indicate cumulative excreted amounts of ¹⁴C-2-chlorodibenzofuran-derived radioactivity.

c. No feces were excreted during the observation period.

d. Urine was collected from the bladder of two rats.

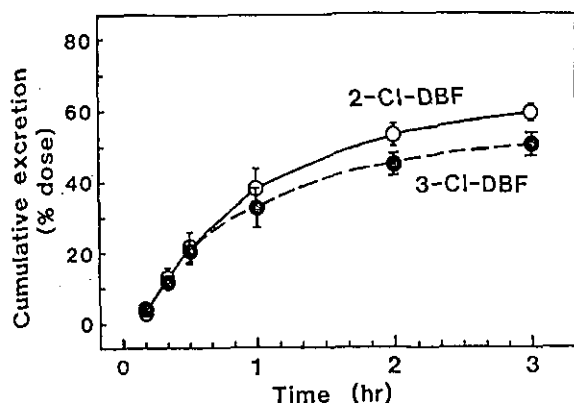


図 1 ^{14}C -2-クロロジベンゾフラン, 又は ^{14}C -3-クロロジベンゾフランを静脈内投与したラットにおける ^{14}C 由来の放射能の胆汁中への累積排せつ量

Fig. 1 Cumulative excreted amounts of radioactivity of ^{14}C in the bile from rats treated with either ^{14}C -2-chlorodibenzofuran or ^{14}C -3-chlorodibenzofuran. Points and bars indicate mean \pm SD for 3 to 4 rats.

表 2 2-クロロジベンゾフランを経口投与したラットにおける ^{14}C -2-クロロジベンゾフラン由来の放射能の排せつ量^a

Table 2 Excreted amounts of ^{14}C -2-chlorodibenzofuran-derived radioactivity in rats^a

Tissue	Time after administration			Cumulative amounts ^b
	24 h	48 h	72 h	
Urine	28.2 \pm 1.6	5.7 \pm 1.9	0.5 \pm 0.1	34.4 \pm 1.6
Feces	45.5 \pm 5.2	14.2 \pm 3.2	2.6 \pm 0.4	62.4 \pm 3.1
Urine + Feces	73.7 \pm 5.9	20.0 \pm 4.6	3.1 \pm 0.4	96.8 \pm 1.8

a. ラット ^{14}C -2-Cl-DBFを1匹当たり, 87.5 μg (12.8 μCi)の投与量で経口投与した。単位は投与量に対する各組織に含まれる ^{14}C -2-Cl-DBFの放射能の累積量を示す。

ト4匹の平均値と標準偏差である。

b. 数値は, 投与後72時間までの ^{14}C -2-Cl-DBFの放射能の累積量を示す。

a. Rats were orally administered with ^{14}C -2-chlorodibenzofuran at a dose of 87.5 μg DBF/rat (12.8 μCi /rat). The unit is expressed as a percentage of total dose per each organ or tissue, and values are mean \pm SD for 4 rats.

b. Values indicate cumulative excreted amounts of ^{14}C -3-chlorodibenzofuran-derived radioactivity up to 72 h after the administrations.

次に、すでに赤血球分画に存在する ^{14}C -2-Cl-DBFが血しょうにどのような割合で移行するかを検討した。血しょうに配分される ^{14}C の配分率は、血しょう添加後、10、30、60分でそれぞれ27.1、24.8、28.6%であった(実験6)。

さらに、すでに赤血球分画に存在する ^{14}C 2-Cl-DBFを血しょうで抽出を繰り返したときにどのような割合で血しょうに移行するかを検討した(実験7)。表4に、その結果を示すが、5回の抽出により、血しょうには常に約20%、赤血球には80%の ^{14}C 2-Cl-DBFが配分されることが判明した。

表 3 赤血球と血しょう中の ^{14}C -2-クロロジベンゾフランの分布
Table 3 Distribution of ^{14}C -2-chlorodibenzofuran in red blood cells and plasma

Incubation time (min)	0	10	60
Red blood cells	77.8	76.3	79.0
Plasma	22.2	23.7	21.0

表 4 赤血球から血しょう中への ^{14}C -2-クロロジベンゾフランの抽出率
Table 4 Extraction of ^{14}C -2-chloro-dibenzofuran from red blood cells to plasma

Extraction times	1	2	3	4	5
Red blood cells (%)	79.2	83.1	80.9	79.9	80.1
Plasma (%)	20.8	16.9	19.1	20.1	19.9

3.3 胆汁中における放射性2-Cl-DBFの代謝産物の分析

図2に高速液体クロマトグラフィーによる胆汁中の ^{14}C -2-Cl-DBFの代謝産物の分離状態を示す。標準品の ^{14}C -2-Cl-DBFは保持時間が24.4分であり、酵素で未処理の胆汁中にも検出されなかった(図2a)。酵素処理をしない未処理の胆汁に比べてアリルスルファターゼ単独処理の場合には、保持時間12~15分で溶出される成分が減り、15~19分、及び21~22分で溶出される成分が相対的に増加することが示された(図2b)。 β -グルクロニダーゼ処理の場合には、相対的には、保持時間が12~13分の成分が減少し、14~15分、21~22分の成分が増加する傾向が観察された(図2c)。さらに、両酵素の同時処理により、溶出パターンは、全体としてはアリルスルファターゼの単独処理の場合に類似しているが、これに加えて、保持時間4分の新たなピークが出現し、21~22分のピークの上昇が観察された(図2d)。

今回用いた溶出条件のほか、緩衝液、イオンペア法、カラムの種類などの条件を変えて試みたが、分離状態は改善されなかった。いずれにしても、2-Cl-DBFのような比較的単純な化合物は、肝臓で速やかに代謝され、胆汁中ではそのままの形では存在せず、硫酸抱合体や β -グルクロン酸抱合体などの代謝物として存在することが明らかとなった。

3.4 放射性 3-Cl-DBF の生体内挙動

3-Cl-DBF に由来する ^{14}C の生体内の臓器、血液、排せつ物中における含量の経時変化を表5に示す。静注後5時間までに、投与量の約64%が大腸内容物、尿及び糞中に検出された。24時間までには、尿と糞中にそれぞれ投与量の28%と51%が検出された。投与後48時間までには、

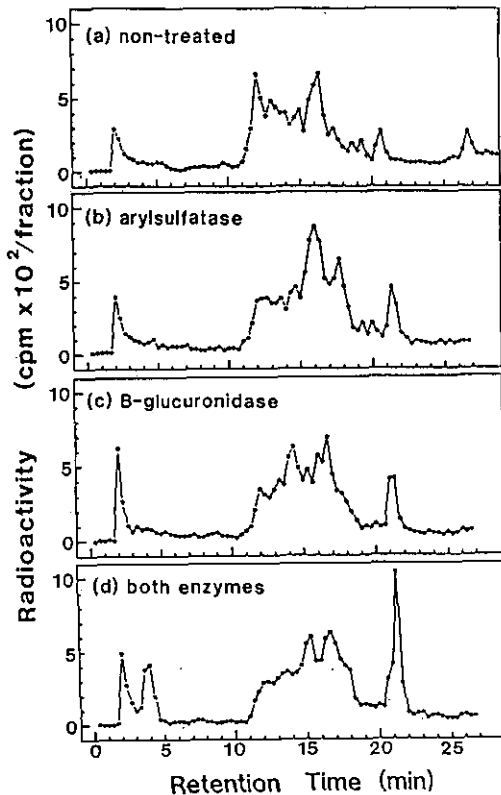


図 2 ^{14}C -2-クロロジベンゾフランを静脈内投与したラットの胆汁中代謝産物の高速液体クロマトグラフィーによる分析 (a) 未処理, (b) アリルスルファターゼ処理, (c) β -グルクロニダーゼ処理, (d) 両酵素による処理

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of bile metabolites from rats intravenously treated with ^{14}C -2-chlorodibenzofuran. Bile specimens were subjected to enzymatic hydrolysis; (a) non-treated control, (b) aryl-sulfatase, (c) β -glucuronidase and (d) both enzymes.

表 5 3-クロロジベンゾフランを静脈内投与したラットにおける¹⁴C-3-クロロジベンゾフラン由来の放射能の組織中の分布^a

Table 5 Tissue distribution of ¹⁴C-3-chlorodibenzofuran-derived radioactivity in rats^a

Tissue	Time after administration			
	30 min	5 h	24 h	48 h
Adipose tissue	11.5 ± 3.7	10.9 ± 1.3	2.43 ± 1.00	0.36 ± 0.08
Adrenal gland	0.016 ± 0.008	0.004 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.000
Cerebellum	0.056 ± 0.016	0.005 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001
Cerebrum	0.23 ± 0.11	0.019 ± 0.002	0.029 ± 0.038	0.009 ± 0.004
Heart	0.14 ± 0.01	0.300 ± 0.006	0.010 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Kidney	5.05 ± 0.58	1.64 ± 0.46	0.14 ± 0.02	0.058 ± 0.005
Large intestine	0.27 ± 0.06	1.89 ± 0.54	0.40 ± 0.17	0.137 ± 0.145
Large intestine contents(LIC)	0.11 ± 0.02	40.6 ± 2.6	3.50 ± 0.55	0.40 ± 0.15
Liver	16.7 ± 1.6	3.60 ± 0.70	1.09 ± 0.11	0.67 ± 0.06
Lung	0.29 ± 0.04	0.076 ± 0.023	0.021 ± 0.002	0.011 ± 0.001
Muscle	9.91 ± 1.55	3.10 ± 1.75	0.66 ± 0.11	0.56 ± 0.08
Pancreas	0.31 ± 0.08	0.038 ± 0.012	0.010 ± 0.003	0.009 ± 0.003
Skin	15.8 ± 4.5	3.87 ± 1.4	0.76 ± 0.31	0.35 ± 0.08
Small intestine	7.78 ± 0.81	1.65 ± 0.15	0.23 ± 0.11	0.079 ± 0.032
Small intestine contents	20.8 ± 4.7	12.9 ± 1.7	1.59 ± 0.66	0.36 ± 0.07
Spleen	0.073 ± 0.014	0.020 ± 0.003	0.009 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Stomach	0.24 ± 0.02	0.049 ± 0.023	0.014 ± 0.001	0.021 ± 0.017
Testis	0.34 ± 0.09	0.068 ± 0.015	0.025 ± 0.011	0.018 ± 0.004
Thymus	0.082 ± 0.025	0.012 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.003 (2)
Whole blood	5.91 ± 0.26	1.37 ± 0.23	0.42 ± 0.07	0.28 ± 0.08
Feces ^b (F)	— ^c — ^c	— ^c — ^c	50.7 ± 2.5	51.1 ± 2.6
Urine ^b	0.77 (1)	23.2 ± 7.8	28.2 ± 14.1	52.2 ± 2.4
LIC + F ^b	0.11 ± 0.02	40.6 ± 2.6	54.2 ± 3.0	51.5 ± 2.4
Sum total	95.8 ± 6.5	105.0 ± 6.8	90.3 ± 9.7	106.7 ± 0.4

a. ラットに¹⁴C-3-Cl-DBFを1匹当たり、87.7 μ g (11.7 μ Ci)の投与量で尾静脈から注入した。単位は投与量に対する各組織中に含まれる¹⁴C-3-Cl-DBFの百分率である。数値は、ラット3匹の平均値と標準偏差である。

b. ¹⁴C-2-Cl-DBFの放射能の累積量を示す。

c. 観察期間中には、糞の排せつはなかった。

a. Rats were intravenously injected with ¹⁴C-3-chlorodibenzofuran at a dose of 87.7 μ g DBF/rat (11.7 μ Ci/rat). The unit is expressed as a percentage of total dose per each organ or tissue, and values are mean \pm SD for 3 rats.

b. Values indicate cumulative excreted amounts of ¹⁴C-3-chlorodibenzofuran-derived radioactivity.

c. No feces were excreted during the observation period.

これらの排せつ物、及び小腸と大腸の内容物中にほとんどすべての放射能が観察された。胆汁への放射能量を測定すると、静注後3時間までに投与量の約51%が排せつされ、胆汁への排せつ量はこのころまでにプラトーに達することが判明した(図1)。これらのことから、3-Cl-DBF、あるいは代謝物は胆汁に排せつされた後、いわゆる腸肝循環により再吸収されていることが推測された。48時間目では、脂肪組織と血液に投与量のそれぞれ0.4%、0.3%の3-Cl-DBFに由来する ^{14}C が存在していた。投与量よりも若干多めの放射能が見かけ上検出されたのは、皮膚、筋肉、血液、皮下脂肪の量の見積りの誤差によると考えられる。

4 考察

つくば市周辺の上水中に極めて微量ながら2-Cl-DBFが検出されたことが契機となり、この化合物の毒性評価のための基礎的データ集積のため、本研究が行われた。これまでも、塩素化が3以上のジベンゾフランについては、その生体内の代謝について多くの研究がなされてきた。クロロジベンゾフランの一般毒性及び発ガン性は、水素原子に塩素が置換している数が4、ないし5の場合に最も高いが、この場合でもジベンゾフラン環の隣接している水素原子の位置、いわゆるvicinal位に塩素原子が置換していないPCDFは、ヒトや実験動物の体内での蓄積性は低く^{7,8)}、これらの毒性もvicinal位に塩素が置換しているPCDFに比べると低いと考えられている。体内におけるPCDFの蓄積量に関しては、1,2,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフランは1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾフランに比べてラットの肝臓における蓄積性が低く¹³⁾、また、PCDF投与5日後のラット肝臓における2,3,4,6,7-ペンタクロロジベンゾフランの蓄積量は、1,2,6,7,8-ペンタクロロジベンゾフランに比べ約60倍高い⁸⁾との報告がある。これらのことから、PCDFの代謝において、ジベンゾフラン環の3又は7位が他の部位の塩素原子に比べ重要であることが推測される。しかし、低塩素化ジベンゾフランにおける塩素原子の置換位置と代謝との関連を調べた研究例はほとんどない。

ラットに経口投与した今回の実験結果から、投与後24時間及び72時間までに、それぞれ投与量の74%、97%の2-Cl-DBFは、尿と糞に排せつされることから、この化合物は比較的速やかに体外に排せつされることが明らかとなった(表2)。血液中では、血しょうと赤血球中にそれぞれ80%と20%というように常に一定の割合で存在することが、*in vitro*の実験から明らかとなった(表3、5)。静脈内投与の実験結果から、2-Cl-DBFは、投与後3時間までに60%が胆汁に排せつされるが、大腸内容物と糞に存在する2-Cl-DBF由来の ^{14}C の量は、5時間後においても39%であること(表1、図1)から、一度胆汁を介して消化管に排せつされた2-Cl-DBFの代謝産物は、小腸で再吸収を受けて腸肝循環がおきていると考えられる。胆汁中には代謝を受けていない2-Cl-DBFは検出されなかった。 β -グルクロニダーゼとアリルスルファターゼによりHPLCの溶出位置が変化したことから、グルクロン酸もしくは硫酸抱合体が含まれることが示されたが(図2)、その抱合体の化学形は複雑であり、また、他の化学形の代謝産物が含まれて

いることが明らかとなった。両酵素で脱抱合後、酢酸エチルで抽出可能な代謝産物の一部は、続報に示されているように、2-Cl-3,7-ジヒドロキシDBF, 2-Cl-3-ヒドロキシDBF, 2-Cl-7-ヒドロキシDBFであることが判明した。

PCDFの中でも最も毒性が高いと考えられている2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランの生体中における半減期は、ラットで2日¹⁴⁾、モルモットで20日¹⁶⁾、サルで8日¹⁵⁾と算出されている。また、2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフランのマウスにおける半減期が2~4日¹⁷⁾、4~6塩素化されたPCDFの混合物のマウスにおける半減期が約2週間¹⁶⁾であるとも報告されている。2-Cl-DBFと3-Cl-DBFの様々な生体組織における蓄積パターンは類似しているが、2-Cl-DBFのほうが、皮下脂肪、血液等への貯留の度合いは、3-Cl-DBFに比べて、投与後48時間目で数倍高めの値を示した(表1, 5)。しかし、全体として、2-Cl-DBFの排せつは早く、経口投与後24時間以内に、投与量の74%が尿と糞に排せつされたが、これは本化合物がvicinal位に水素原子を有する低塩素化物であり、肝臓において速やかに代謝されたためであると考えられる。

Amesテストの結果によると、3-Cl-DBFは、2-Cl-DBFに比べて、強い変異原性を示した。この変異原性はS9による代謝活性化により上昇するため、代謝中間体の寄与が大きいと考えられている。変異原性の強さは低濃度域において、陽性対照のベンゾ[a]ピレンの数10分の1であった¹⁰⁾。体内に蓄積性がある2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンや2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランのような高塩素化合物は、Amesテストでは陰性結果を示す反面、極めて毒性が高いことが知られている。しかし、全体としてみると、2-Cl-DBFの場合は、ラットの体内への蓄積性が低く、直ちに排せつされること、変異原性も低いこと、さらに上水中濃度が極めて低いことから、今回の上水に含まれている濃度の2-Cl-DBFの上水を日常的に摂取しても、健康に影響が現れるとは考えにくい。

謝 辞 本研究を遂行するに当たり、ジベンゾフラン化合物を供与して頂いた森田昌敏博士(化学環境部長)、並びに励ましていただいた村上正孝博士(環境健康部長)に感謝します。

引用文献

- 1) Marklund S., L. O. Kjeller, M. Hansson, C. Rappe, C. Ryan, H. Collazo and R. Dougherty (1986): Determination of PCDDs and PCDFs in incineration samples and pyrolytic products. *In: Chlorinated dioxins and dibenzofurans in perspective.*, Rappe C., G. Choudhary and L. H. Keith (eds.), Lewis Pub Inc., Chelsea, 79-92.
- 2) Nagayama, J., M. Kuratsune and Y. Masuda (1976): Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlor_s and "Yusho Oil." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 9-13.
- 3) Nagayama, J., Y. Masuda and M. Kuratsune (1977): Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'Yusho.' *Food Cosmet Toxicol.*, **15**, 195-198.
- 4) Masuda, Y. and H. Yoshimura (1984): Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with

- Yusho and their toxicological significance: A review. *Am. J. Ind. Med.* **5**, 31-44.
- 5) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.
 - 6) Morita, M. and S. Oishi (1977): Clearance and tissue distribution of polychlorinated dibenzofurans in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 61-66.
 - 7) Rappe, C., H.R. Buser, H. Kuroki and Y. Masuda (1979): Identification of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) retained in patients with Yusho. *Chemosphere*, **8**, 259-266.
 - 8) Yoshihara, S., K. Nagata, H. Yoshimura, H. Kuroki and Y. Masuda (1981): Inductive effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 580-588.
 - 9) Bandiera, S., T. Sawyer, M. Romkes, B. Zmudzka, L. Safe, G. Mason, B. Keys and S. Safe (1984): Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): Effects of structure on binding to the 2,3,7,8-TCDD cytosolic receptor protein, AHH induction and toxicity. *Toxicology*, **32**, 131-144.
 - 10) Matsumoto, M., M. Ando and Y. Ohta (1988): Mutagenicity of monochlorodibenzofurans detected in the environment. *Toxicol. Lett.*, **40**, 21-28.
 - 11) 佐伯清太郎・小沢直記・吉村英敏 (1977): 2-Chloro 及び 1,4,8-Trichlorodibenzofuran の合成とそのマウス成長ならびにラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に及ぼす影響。福岡医誌, **68**, 96-103.
 - 12) Nagayama, J., S. Tokudome and M. Kuratsune (1980): Transfer of polychlorinated dibenzofurans to the fetuses and offsprings of mice. *Food Cosmet Toxicol.*, **18**, 153-157.
 - 13) Kuroki, H., Y. Masuda, S. Yoshihara and H. Yoshimura (1980): Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Food Cosmet Toxicol.*, **18**, 387-392.
 - 14) Birnbaum, L.S., G. M. Decad and H. B. Matthews (1980): Deposition and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 342-352.
 - 15) Birnbaum, L.S., G. M. Decad, H. B. Matthews and E. E. McConnel (1981): Fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the monkey. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 189-196.
 - 16) Decad, G.M., L. S. Birnbaum and H. B. Matthews (1981a): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran tissue distribution and excretion in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 231-240.
 - 17) Decad, G.M., L. S. Birnbaum and H. B. Matthews (1981b): Distribution and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 564-573.
 - 18) Abraham, K., T. Wiesmuller, H. Brunner, R. Krowke, H. Hagenmaier and D. Neubert (1989): Absorption and tissue distribution of various polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in the rat. *Arch. Toxicol.*, **63**, 193-202.
 - 19) Kao, L. R. and L. S. Birnbaum (1986): Disposition of *o*-benzyl-*p*-chlorophenol in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **18**, 441-458.

II-2 ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝 II 代謝産物の同定*

Metabolism of 2-Chlorodibenzofuran in the Rat.

II. Identification of the Metabolites*

平野靖史郎¹・遠山千春¹・三森文行¹・伊藤裕康²・鈴木和夫¹
Seishiro HIRANO¹, Chiharu TOHYAMA¹, Fumiyuki MITSUMORI¹,
Hiroyasu ITO² and Kazuo T. SUZUKI¹

要 旨

2-クロロジベンゾフランのラット肝臓における代謝機構を、胆汁中に排せつされる代謝産物を同定することにより調べた。胆管カニューレーションを施したラットに、¹⁴Cでラベルした2-クロロジベンゾフランを静脈内に投与したところ、6時間以内に投与量の約90%が胆汁と尿中に排せつされた。代謝産物を同定するため、別群のラットに無標識の2-クロロジベンゾフランを経口投与して、24時間分の胆汁を採取した。胆汁をスルファターゼとβ-グルクロニダーゼで処理した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて脱抱合後の3つの代謝産物の分画を分取し、質量分析計並びに核磁気共鳴装置により代謝産物の化学構造を決定した。これらの3つの代謝産物を、2-クロロ-3,7-ジヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-3-ヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-7-ヒドロキシジベンゾフランと同定した。これらの代謝産物は抱合体として胆汁中に排せつされており、2-クロロジベンゾフランは検出されなかった。これらのことは、2-クロロジベンゾフランはラット肝臓において速やかに代謝されることに加え、ジベンゾフラン環の3と7位が代謝上重要な部位であることを示唆している。

Abstract

The hepatic metabolism of 2-chlorodibenzofuran was investigated in the rat. When 2-chloro [¹⁴C] dibenzofuran was intravenously administered to bile duct-cannulated rats,

1. 国立環境研究所 環境健康部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
- * 本論文は、Arch. Environ. Contam. Toxicol. **20**, 67-72 (1991) に発表した内容を和文に改めたものである。

about 90% of radioactivity was excreted in bile and urine within 6 h, the bile being the preferential route. Another group of rats received oral administration of cold 2-chlorodibenzofuran and bile fluid was collected by surgical bile duct cannulation for qualitative analysis. Three hydroxylated metabolites were isolated by high performance liquid chromatography from the bile fluid after hydrolytic digestion with sulfatase and β glucuronidase and were identified by mass and nuclear magnetic resonance spectrometries to be 2-chloro-3,7-dihydroxydibenzofuran, 2-chloro-3-hydroxydibenzofuran and 2-chloro-7-hydroxydibenzofuran, respectively. Analysis of the radioactive bile fluid by thin layer chromatography revealed that there was no detectable amounts of unmetabolized 2-chlorodibenzofuran in the bile fluid and the hydroxylated metabolites were present not as aglycons but as conjugated substances. The results suggest that 2-chlorodibenzofuran is rapidly metabolized in the rat, and the 3 and/or 7 positions play an important role in the metabolism of 2-chlorodibenzofuran.

1 はじめに

1968年、九州地方を中心に肝障害やアクネを主症状とするいわゆるカネミ油症が発生したが、その原因物質はライスオイルに混在していたポリクロロビフェニール (PCB) とポリクロロジベンゾフラン (PCDF) であり、それぞれ1,000 ppmと5 ppm程度含まれていたものと推定されている¹⁾。これらの化合物の中で油症患者の肝臓や脂肪組織中に多く含まれていたのは、ペンタクロロ又はヘキサクロロジベンゾフランであったことより、油症はPCBではなく主としてPCDFにより引き起こされたのではないかとの報告もされている^{2,3)}。油症と同様の惨事が1979年台湾で起こっているが、“rice-bran oil”中のPCBとPCDF濃度は油症のカネミオイル中の濃度より低いものの、PCBがより高塩素化されたものであったと報告されている⁴⁾。一方、PCDFは焼却炉からも大気中に排出されていることが知られており、広域汚染が危惧されている⁵⁾。最近、Shiraishiら⁶⁾は、つくば地区の水道水から濃度が1.4ng/l程度の2-クロロジベンゾフランを検出し、これは水道管に塗布されている錆止めにながら含まれているジベンゾフランが、水道水中の塩素と反応して生成したものではないかと推定している。低塩素化で、かつ、ジベンゾフラン環の隣合った位置に水素原子があるPCDFは肝臓での蓄積率が低いことが知られていることから⁷⁻⁹⁾、2-クロロジベンゾフランの生体への蓄積や影響も小さいものと推定される。Bandieraら¹⁰⁾はヘパトーマにおいて2-クロロジベンゾフランによるアリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼやエトキシレゾルフィン α -ジェチラーゼの誘導は見られなかったと報告している。一方、Matsumotoら¹¹⁾は、TA 98を用いたAmesテストにおいて2-クロロジベンゾフランの変異原性を認めており、佐伯ら¹²⁾は、100 mg/kg体重の用量で腹腔内投与したラット肝臓において、アニリンヒドラーゼとアミノピリンジメチラーゼの誘導が見られたと報告している。

PCDFの小動物の臓器や組織への蓄積や排せつに関する報告は数多くなされているが¹³⁻¹⁹⁾、PCDFの代謝産物を同定した例は少ない。Poigerら²⁰⁾は、ラットにおける2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランの代謝産物のアグリコンとして一及び二水酸化体を検出したと報告している。

Pleussら²¹⁾も、ラットにおけるペンタクロロジベンゾフランの代謝産物として一及び二水酸化体を見出ししている。この2つの研究では、ジベンゾフラン環のエーテル結合の開裂に伴う脱塩素化水酸化反応も、生体内において起こっている可能性があると報告されている。しかし、水酸基の置換位置については明らかにされていない。Veerkampら²²⁾は、2-クロロジベンゾフランと2,8-ジクロロジベンゾフランのラットにおける代謝産物として、一及び二水酸化体を見だしているが、2-クロロジベンゾフランの代謝産物の1つは2-クロロ-8-ヒドロキシジベンゾフランであったと報告している。しかし、この同定は質量スペクトルの解析のみによって行われており、水酸基の導入位置については疑問が残る。

本研究では、ラットの胆汁中に排せつされる2-クロロジベンゾフランの代謝産物の化学構造を明らかにすることにより、2-クロロジベンゾフランのラット肝臓中における代謝機構を推定することを目的とした。

2 方法

試薬の2-クロロジベンゾフラン（純度99%以上）については、国立環境研究所、化学環境部の森田昌敏博士より提供頂いた。[U-¹⁴C] 2-クロロジベンゾフラン（比活性、124 mCi/g(4.59 GBq/g)）は生体化学研究所より購入した。放射活性は、2-クロロジベンゾフランにのみ由来していることを薄層クロマトグラフィーと高速クロマトグラフィーにより確認した。スルファターゼ（Type H-5）と β -グルクロニダーゼ（Type B-1）はSigma社より購入した。ツイーン80とポリエチレングリコール300は和光純薬より購入した。その他の試薬は、分析用のものを用いた。

器具と装置について本研究では以下のものを用いた。

薄層プレート（Kieselgel 60 F254, Merck社）

逆相カラム（ μ Bondasphere C18, pore size=100Å, particle size=5 μ m,

19mm ϕ ×15cm, プレカラム（C18）, Waters社）

ラジオクロマトスキャナー（LB 2723, Berthold社）

高速液体クロマトグラフ（pump: Model 510, gradient controller: Model 680,

spectrometer: Model 481, Waters社）

液体シンチレーションカウンター（Model 3255, Packard社）

質量分析計（JMS-DX300, 日本電子）

核磁気共鳴装置（400MHz, GX-400, 日本電子）

動物については日本クレアより購入したウイスター系雄性ラットを用いた。実験に供するまで、ラットには市販の飼料並びに蒸留水を自由に摂取させた。後述の実験1（定量的実験）では7週齢のラット3匹（平均体重、180g）を、実験2（定性的実験）では11週齢のラット2匹（平均

体重, 285 g) を使用した。

実験 1 : 放射ラベルした 2-クロロジベンゾフランを 0.57 mg/ml となるようにツイーン 80 水溶液に溶解させた (ツイーン 80:水=1:3)。エーテル麻酔下にラットを開腹し胆管にポリエチレンチューブ (0.25 mmID, 0.61 mm OD) を挿入した。開腹部を縫合した後, ラットをボールマニケージに保定し, 0.175 ml の 2-クロロジベンゾフラン溶液を尾静脈内に投与した (100 μ g, 12.4 μ Ci/ラット)。投与後 6 時間にわたり胆汁と尿を採取したが, この間, ラットには 1% のグルコースを含む生理食塩水のみを与えた。

胆汁と尿の一部を液体シンチラント (Dimilume 30, Packard 社) とよく混和した後, 液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を計数した。残りの胆汁は, 図 1 に示した方法を用

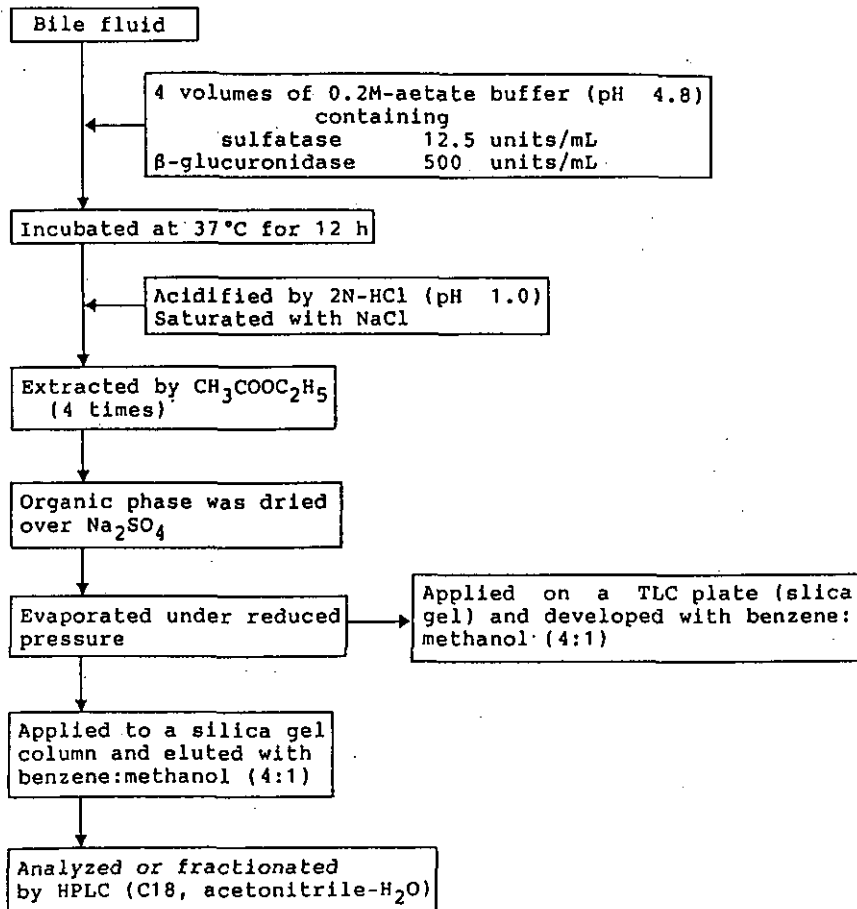


図 1 ラットの胆汁中に排せつされた 2-クロロジベンゾフランの代謝産物の分析方法

Fig. 1 Schematic presentation for the fractionation and analysis of 2-chlorodibenzofuran metabolites in rat bile

いて処理を行った。まず、胆汁を酵素により加水分解し、その後酢酸エチルで抽出した。有機層を乾燥した後、エバポレーターを用いて濃縮し、濃縮物の一部をシリカゲルの薄層にスポットし、混合比4:1のベンゼンとメタノールの混合溶媒で展開した。薄層上の放射活性はラジオクロマトスキャナーで分析した。濃縮物の残りは、同じ混合溶媒を用いてシリカゲル (Kieselgel 60, 70~230 mesh, Merck 社) のカラムクロマト (15mm φ×10cm) を行い、最初の5mlを捨て、次の5mlを採取した。このフラクションに薄層上に展開された代謝産物が含まれていることはあらかじめ確認しておいた。カラムからの溶出液を乾燥させた後、一定量のメタノールに溶解させ、逆相カラムを装着した高速液体クロマトグラフィーにより代謝産物を単一の化合物として分離分取した。各分画に含まれる放射活性を液体シンチレーションカウンターにて計数した。

実験 2: 同定に必要な量の代謝産物を得るため、実験 2 では経口投与を行った。2-クロロジベンゾフランを 20 mg/ml の濃度となるようにポリエチレングリコール 300 に溶解し、1 ml の溶液をラットに経口投与した。その後、実験 1 と同様にラットに胆管カニューレーションを施し、24 時間にわたって胆汁を採取した。採取した胆汁は実験 1 と同様の処理を行い、各代謝産物の分画を分取し、それぞれの化合物の質量並びに核磁気共鳴スペクトルを測定した。

3 結果

3.1 排せつ量の測定

表 1 に胆管カニューレーションを施したラットにおいて、投与後 6 時間までに排せつされた胆汁と尿の容量、並びに胆汁と尿中の放射活性の投与量に対する割合を示した。ラット 1 と 2 では、胆汁に投与量の約 75%、尿に約 15% 排せつされており、静脈内投与した 2-クロロジベンゾフランの約 90% は 6 時間後には排せつされていたことを示している。しかし、胆汁の流れが悪く途中で胆汁の回収ができなくなったラット 3 では、64% が尿に 20% が胆汁中に排せつされていた。

表 1 2-クロロ [¹⁴C] ジベンゾフランを静脈内投与してから 6 時間以内に排せつされた胆汁と尿量、並びに、胆汁と尿に排せつされた放射活性の投与量に対する割合

Table 1 Bile and urine volumes and percentages of radioactivity excreted in each fluid for 6h after an intravenous injection of 2-chloro [¹⁴C] dibenzofuran

	Volume(ml)		Excreted percentage(%)		
	Bile	Urine	Bile	Urine	Total
Rat 1.	7.5	1.1	74	17	91
Rat 2.	5.5	2.3	73	15	88
Rat 3.*	1.4	4.4	20	64	84

*Bile flow of this rat was slow at first and spontaneously stopped during the collection.

3.2 薄層クロマトグラフィーによる放射活性を持つ代謝産物の分析

胆汁に排せつされた代謝産物の酵素的加水分解生成物をまずシリカゲルの薄層により調べた。放射活性を持つ化合物のうち、薄層上をベンゼンとメタノールの混合溶媒で展開されたものは2つあり、それぞれ、S-1とS-2と命名した(図2)。これらの化合物のRf値はそれぞれ0.43と0.56であったが、2-クロロジベンゾフランのRf値は0.68であった。図2は、ここに示した条件では薄層上に展開されない極性のある化合物が、酢酸エチルに抽出されていたことも示している。酵素的加水分解において、酵素量を増やしたり反応時間を長くしても極性物質の量が減少しなかったことより、硫酸あるいはグルクロン酸抱合体以外の代謝産物も胆汁中に存在していたものと考えられる。スルファターゼとβ-グルクロニダーゼ処理をしなかった胆汁では、S-1やS-2に相当するピークが見られなかった。これらのことより次に示す3つの結論を得た。

- (1) 胆汁中には、硫酸又はグルクロン酸抱合を受けた少なくとも2つの代謝産物がある。
- (2) 2-クロロジベンゾフランの未変化体は胆汁中では検出不可能であり、静注した2-クロロジベンゾフランのほとんどは、代謝を受けるものと考えられる。

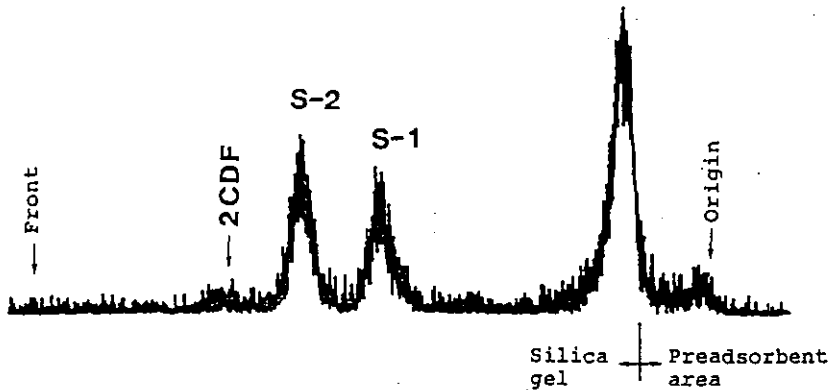


図 2 薄層上に展開された2-クロロジベンゾフランの代謝産物のラジオクロマトグラム

酵素処理した胆汁を酢酸エチルで抽出し、有機層を乾燥、濃縮した後シリカゲルの薄層にスポットした。薄層をベンゼンとメタノールの混合溶媒(4:1)で展開した後、ラジオクロマトスキャナーで分析したところ、S-1とS-2の2つのピークが検出された。2-クロロジベンゾフランはRf値が0.68の位置に展開されることをあらかじめ調べてある。

Fig. 2 Radiochromatogram of the 2-chlorodibenzofuran metabolites separated by TLC

Enzymatically treated bile fluid was extracted in ethyl acetate, applied to a TLC (silica gel) plate and developed with the solvent (benzene:methanol=4:1). The radioactivity on the TLC plate was analyzed by a radiochromatoscanner. Two peaks(S-1 and S-2) were developed on the TLC plate with the solvent. 2-chlorodibenzofuran (2CDF) was developed at Rf level of 0.68.

- (3) 胆汁中にはスルファターゼや β -グルクロニダーゼでは加水分解を受けない極性の高い代謝産物が存在する。

3.3 代謝産物の同定

シリカゲルのカラムより溶出させて得たサンプルを、UV (220 nm) を検出器とした高速液体クロマトグラフィーにより分析した結果を図3に示す。UVの吸収で見える限り、4つの主成分(S-0, S-1, S-2a, S-2b)が観察された。薄層上のS-1とS-2に相当する部分を別々にかき取り、有機溶媒に抽出して高速液体クロマトグラフィーで保持時間を比較したところ、薄層クロマトグ

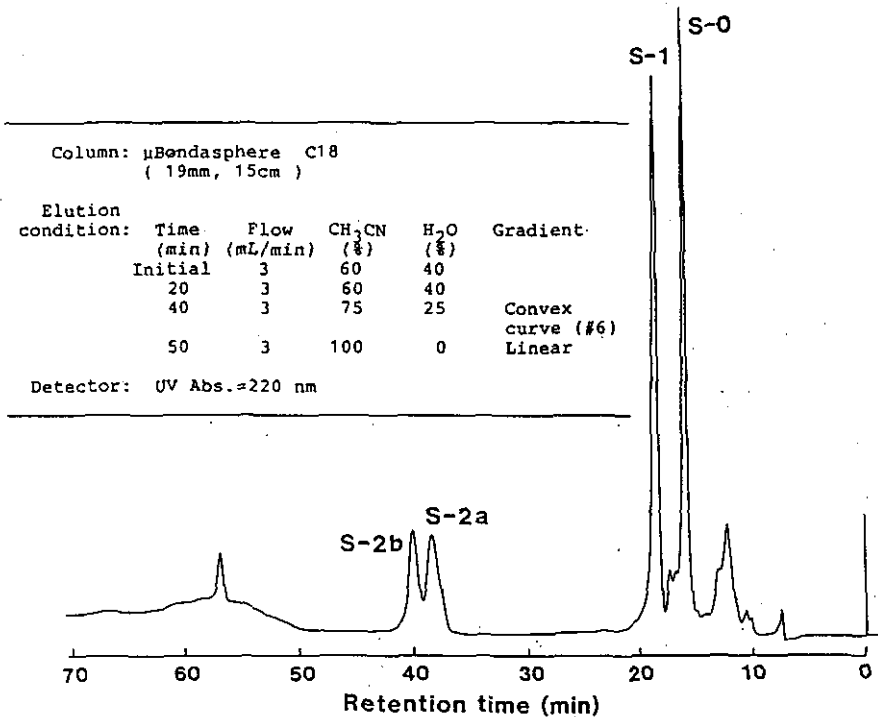


図3 2-クロロジベンゾフランの代謝物の高速液体クロマトグラム

図2においてS-1とS-2に相当する分画をシリカゲルのカラムより溶出させ、その溶出液をさらに高速液体クロマトグラフィーにより分析した。薄層上のS-2のピークは高速液体クロマトグラムではS-1とS-2の2つのピークに分かれている。S-0のピークは、無処理のラット胆汁中からも検出されることを確認してある。

Fig. 3 Elution profile of metabolites of 2-chlorodibenzofuran

The eluate containing S-1 and S-2 (in Fig. 2), was fractionated on a silica gel column and then analyzed by an HPLC apparatus. The peaks S-2 found on the TLC plate was resolved into two peaks (S-2a and S-2b). The peak S-0 was also observed when a sample obtained from untreated animals was examined.

ラム上のS-1は高速液体クロマトグラムでも単一のピークを示し、S-2にはS-2aとS-2bの2成分が含まれていることが分かった。一方、保持時間16分のピーク(S-0)は、無処理のラットの胆汁からも検出されたこと、並びに、実験1で得た放射性の試料を同様に高速液体クロマトグラフィーで分析した結果、S-0には放射活性が認められなかったことより、S-0は2-クロロジベンゾフランの代謝産物ではないことが分かった。

図4の(a)~(c)にS-1, S-2a, S-2bの質量並びに核磁気共鳴スペクトルを示した。質量スペクトルでは、これら3つの化合物の親ピークはすべて基準ピークとして観察された。また、S-1, S-2a, S-2bの分子量が、それぞれ2-クロロジベンゾフランのジヒドロキシ体(S-1)とモノヒドロキシ体(S-2a, S-2b)の分子量に相当することが分かる。核磁気共鳴スペクトルからは、S-1, S-2a, S-2b分子において、ジベンゾフラン環に結合した水素は、それぞれ5, 6, 6原子あることが分かる。2-クロロジベンゾフランの1及び9位がそれぞれ他方のベンゼン環の α 位に当たり強く非遮へい化を受けていることと、デカップリングにより得られたそれぞれの水素原子の相対的位置の情報より、S-1, S-2a, S-2bは2-クロロ-3,7-ジヒドロキシジベンゾフラン、2-

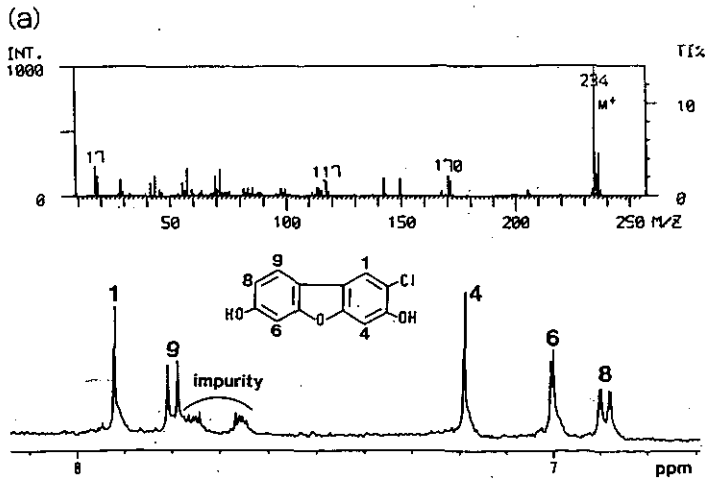


図 4 2-クロロジベンゾフランの代謝物 (S-1(a), S-2a(b), S-2b(c)) の質量並びに核磁気共鳴スペクトル

質量スペクトルは試料直接注入によるE1(electron impact)法により測定した。核磁気共鳴スペクトルはアセトン- d_6 溶媒中で測定し、テトラメチルシランのプロトン共鳴位置を0.00ppmとして化学シフトの相対位置を示してある。図中にジベンゾフラン環に結合したプロトンの帰属を示してある。

Fig. 4 Mass (direct injection, electron impact (EI)) and proton nuclear magnetic resonance spectra of S-1(a), S-2a (b) and S-2b(c)

Chemical shift values in NMR spectra are relative to tetramethylsilane ($\delta = 0.0$) and are shown as ppm (solvent, acetone- d_6).

Structural formula is shown together with assignment of the proton resonance peaks in each panel.

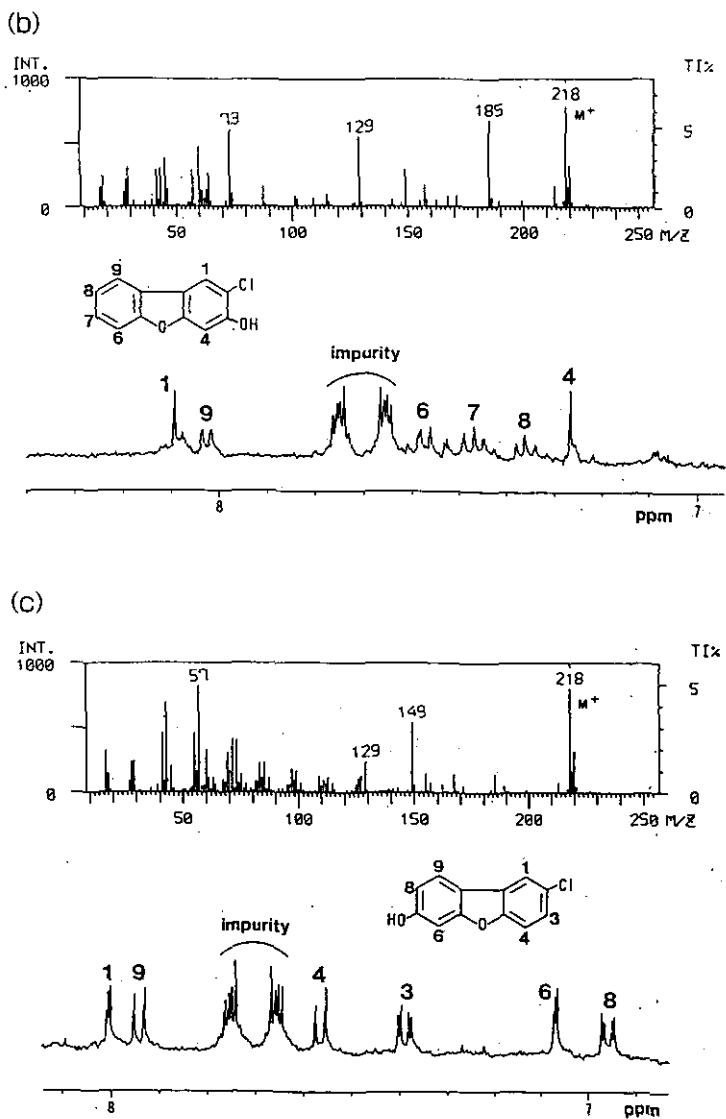


図 4 (つづき)
Fig. 4 (Continued)

クロロ-3-ヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-7-ヒドロキシ-ジベンゾフランであると同定した。

3.4 各代謝産物の収率

S-1, S-2a, S-2bの2-クロロジベンゾフランの投与量に対する回収率を表2に示した。これら3つの代謝産物の収量を合わせても、投与量に対しわずか8.9%であった。

表 2 スルファターゼと β -グルクロニダーゼ処理した胆汁における3種の代謝物の収率Table 2 Yields of hydroxylated metabolites after treatment of bile fluid with sulfatase and β -glucuronidase

Yield(%)			
S-1	S-2a	S-2b	Total
5.0	1.6	2.3	8.9
(± 0.25)	(± 0.37)	(± 0.25)	(± 0.35)

Data are presented as mean (\pm SD) of 3 rats

4 考 察

本研究の主目的は、ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝において、胆汁中に排せつされた代謝産物の化学構造の決定にあった。代謝産物としては、収率は低いものの、2-クロロ-3-7-ジヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-3-ヒドロキシジベンゾフラン、2-クロロ-7-ヒドロキシジベンゾフランの3つの水酸化物の化学構造を決定することができた。ここで注目すべきは、水酸基がジベンゾフラン環の3又は7位、すなわち β 位に導入されていることである。

Veerkampら²²⁾は質量スペクトルのデータのみを用いて、ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝産物として2-クロロ-8-ヒドロキシジベンゾフランを検出したと報告している。本研究で得たサンプル中にも、検出限界以下の8-ヒドロキシ体が存在していた可能性は否定できないが、核磁気共鳴スペクトルによる解析の結果、水酸基の主たる導入位置は3又は7位であることが判明した。

PCDFの同族体において、塩素の置換位置と毒性との関係はよく調べられている。PCDFの4つのbilateral位置に置換した塩素原子は、Ahリセプターへの親和性、アリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼやエトキシレゾルフィンO-ジエチラーゼの誘導に深く関与している^{10,23)}。さらに、vicinal位に塩素原子が置換していないPCDFは、体内での蓄積性が低いことが、ヒト⁸⁾や動物⁹⁾で証明されている。しかし、PCDFにおける塩素原子の置換位置と代謝との関連を調べた研究例は少ない。Kurokiら¹⁴⁾は、1,2,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフランは1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾフランに比べラットの肝臓における蓄積性が低いと報告しているが、このことは、PCDFの代謝において、ジベンゾフラン環の3又は7位が4又は6位に比べ重要であることを示唆している。

Yoshihara⁹⁾らは、PCDF投与5日後のラット肝臓を調べ、2,3,4,6,7-ペンタクロロジベンゾフランが1,2,6,7,8-ペンタクロロジベンゾフランに比べ約60倍蓄積性が高いと報告しているが、このことは3,4又は6,7位が1,2又は8,9位に比べ重要な代謝部位であることを示唆している。この2つの報告例は、3又は7位がPCDFの代謝において重要な役割を担っていることを示

唆しており、本研究結果とよく一致している。

表1は、2-クロロジベンゾフランの排せつ経路は胆汁又は尿であるが、特に排せつ経路の選択性はないと考えられること、並びにこの化合物の代謝が速いことを示している。PCDFのなかでも最も毒性が高いと考えられている2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランの生体における半減期は、ラットで2日¹⁵⁾、モルモットで20日、サルで8日¹⁶⁾と算出されている。また、2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフランのマウスにおける半減期が2～4日¹⁸⁾、4～6塩素化されたPCDFの混合物のマウスにおける半減期が約2週間⁷⁾であるとも報告されている。これらに比べ、本研究において、2-クロロジベンゾフランは6時間に約90%が胆汁又は尿に代謝産物として排せつされているが、これは本化合物がvicinal位に水素原子を有する低塩素化物であり、肝臓において速やかに代謝されたためであると考えられる。

表2に示したように、ここで得られた3つの代謝産物の合計回収率は、投与量のわずか8.9%であるが、脱抱合後の試料に他のアグリコンをクロマトグラムのピークとして認めなかった。したがって、ラットにおける2-クロロジベンゾフランの代謝機構としては、まず、芳香環に酸化又は水酸化反応 (phase I 反応) が起こり、引き続いてグルタチオンによる抱合も含め複雑な phase II の反応が起きるものと推定される。

引用文献

- 1) Nagayama, J., M. Kuratsune and Y. Masuda (1976): Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho Oil". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 9-13.
- 2) Nagayama, J., Y. Masuda and M. Kuratsune (1977): Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'Yusho'. *Food Cosmet. Toxicol.*, **15**, 195-198.
- 3) Masuda, Y. and H. Yoshimura (1984): Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans in patients with Yusho and their toxicological significance: A review. *Am. J. Ind. Med.*, **5**, 31-44.
- 4) Chen, P. H., K. T. Chang and Y. D. Lu (1981): Polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the toxic rice-bran oil that caused PCB poisoning in Taichung. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 489-495.
- 5) Marklund, S., L-O Kjeller, M. Hansson, M. Tysklind, C. Rappe, C. Ryan, H. Collazo and R. Dougherty (1986): Determination of PCDDs and PCDFs in incineration samples and pyrolytic products. *In: Chlorinated dioxins and dibenzofurans in perspective*, Rappe, C., G. Choudhary and L. H. Keith (eds), Lewis Pub Inc, Chelsea, 79-92.
- 6) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.
- 7) Morita, M. and S. Oishi (1977): Clearance and tissue distribution of polychlorinated dibenzofurans in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 61-66.
- 8) Rappe, C., H. R. Buser, H. Kuroki and Y. Masuda (1979): Identification of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) retained in patients with Yusho. *Chemosphere*, **8**, 259-266.
- 9) Yoshihara, S., K. Nagata, H. Yoshimura, H. Kuroki and Y. Masuda (1981): Inductive effect on hepatic enzymes and acute toxicity of individual polychlorinated dibenzofuran congeners in rats. *Tox-*

- icol. Appl. Pharmacol., **59**, 580-588.
- 10) Bandiera, S., T. Sawyer, M. Romkes, B. Zmudzka, L. Safe, G. Mason, B. Keys and S. Safe (1984): Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): Effects of structure on binding to the 2,3,7,8-TCDD cytosolic receptor protein, AHH induction and toxicity. *Toxicology*, **32**, 131-144.
 - 11) Matsumoto, M., M. Ando and Y. Ohta (1988): Mutagenicity of monochlorodibenzofurans detected in the environment. *Toxicol. Lett.*, **40**, 21-28.
 - 12) 佐伯清太郎・小沢直記・吉村英敏 (1977): 2-Chloro 及び 1,4,8-Trichlorodibenzofuran の合成とそのマウス成長並びにラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系に及ぼす影響. *福岡医誌*, **68**, 96-103.
 - 13) Nagayama, J., S. Tokudome and M. Kuratsune (1980): Transfer of polychlorinated dibenzofurans to the fetuses and offsprings of mice. *Food Cosmet. Toxicol.*, **18**, 153-157.
 - 14) Kuroki, H., Y. Masuda, S. Yoshihara and H. Yoshimura (1980): Accumulation of polychlorinated dibenzofurans in the livers of monkeys and rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, **18**, 387-392.
 - 15) Birnbaum, L. S., G. M. Decad and H. B. Matthews (1980): Deposition and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 342-352.
 - 16) Birnbaum, L. S., G. M. Decad, H. B. Matthews and E. E. McConnel (1981): Fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the monkey. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 189-196.
 - 17) Decad, G. M., L. S. Birnbaum and H. B. Matthews (1981a): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran tissue distribution and excretion in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 231-240.
 - 18) Decad, G. M., L. S. Birnbaum, H. B. Matthews (1981b): Distribution and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 564-573.
 - 19) Abraham, K., T. Wiesmüller, H. Brunner, R. Krowke, H. Hagenmaier and D. Neubert (1989): Absorption and tissue distribution of various polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in the rat. *Arch. Toxicol.*, **63**, 193-202.
 - 20) Poiger, H., H. R. Buser and C. Schlatter (1984): The metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the rat. *Chemosphere*, **13**, 351-357.
 - 21) Pluess, N., H. Poiger, C. Schlatter and H. R. Buser (1987): The metabolism of some pentachlorodibenzofurans in the rat. *Xenobiotica*, **17**, 209-216.
 - 22) Veerkamp, W., J. Wever and O. Hutzinger (1981): The metabolism of some chlorinated dibenzofurans by rats. *Chemosphere*, **10**, 397-403.
 - 23) Long, G., J. McKinney and L. Pedersen (1987): Polychlorinated dibenzofuran (PCDF) binding to the Ah receptor(s) and associated enzyme induction. Theoretical model based on molecular parameters. *Quant. Struct. - Act. Relat.*, **6**, 1-7.

II-3 3-クロロジベンゾフランの変異原性とその代謝活性化*

Mutagenicity of 3-Chlorodibenzofuran and its Metabolic Activation*

松本 理¹・安藤 満²

Michi MATSUMOTO¹ and Mitsuru ANDO²

要 旨

モノクロロジベンゾフランの4つの異性体について、サルモネラ菌のTA98, TA100の両株による変異原性試験 (Ames テスト) を、フェノバルビタール及びβ-ナフトフラボンの誘導を受けたラットの肝臓の9,000×g上清画分の存在下及び非存在下で行った。その結果1-クロロジベンゾフラン及び4-クロロジベンゾフランは明らかな変異原性を示さず、2-クロロジベンゾフランはTA98株に対してごく弱い変異原性を示した。3-クロロジベンゾフランはモノクロロジベンゾフランの4つの異性体の中で唯一強い変異原性を示した。この化合物はS9を添加しない条件下でも変異原性を示したが、S9の添加によりさらに活性化された。

そこで、2種の誘導剤を前もって投与したラットより調製した肝臓のS9及び細胞画分を用いて3-クロロジベンゾフランの変異原性における代謝活性化について検討を行った。フェノバルビタール型の誘導剤として1,1-ジクロロ-2,2-ビス(p-クロロフェニル)エチレン (DDE) を、3-メチルコランスレン型の誘導剤としてβ-ナフトフラボン (βNF) を使用した。4群のラット、すなわち非誘導、DDE誘導、βNF誘導及びDDEとβNFによる誘導を受けたラットよりS9、ミクロソーム画分、ミトコンドリア画分及び可溶性画分を調製した。

3-クロロジベンゾフランはTA100株よりTA98株において強く変異原性が認められたので、変異原性試験はサルモネラ菌のTA98株を用いて行った。この化合物はβNF誘導によるミクロソーム画分によって最も強く活性化されたが、ベンゾ [a] ピレンと異なり可溶性画分によってもかなり活性化された。さらに誘導剤を投与されていないラットの肝臓の各画分においても強く活性化を受けた。各画分の芳香族炭化水素水酸化酵素活性

1. 国立環境研究所 環境健康部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Health Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
- * 本論文は、Matsumoto, M., M. Ando and Y. Ohta (1988)により *Toxicol. Lett.*, **40**, 21-28及びMatsumoto, M. and M. Ando(1991)により *Environ. Mol. Mutagen.*, **17**, (in press)に発表された論文の一部をまとめたものである。

(AHH)を測定したところ、必ずしも3-クロロジベンゾフランの代謝活性化の指標とならないことが分かった。

この研究の結果、3-クロロジベンゾフランは3-メチルコランスレン型の誘導剤によって誘導されるチトクロームP-448だけでなく、誘導を受けないラットの肝臓に存在している酵素によっても活性化を受けることが分かった。この結果は3-クロロジベンゾフランの正常な動物に対する毒性発現の危険性を示唆している。

Abstract

The mutagenicity of four isomers of the monochlorodibenzofurans were tested using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The mutagenicity of monochlorodibenzofurans clearly differed with the positions of chlorine substitution on the aromatic ring. 1-Chlorodibenzofuran was not mutagenic. 4-Chlorodibenzofuran was not mutagenic to strain TA98, however, it is equivocal for TA100. 2-Chlorodibenzofuran proved to be weakly mutagenic to TA98, and 3-chlorodibenzofuran was markedly mutagenic to both strains. TA98 was more sensitive to 3-chlorodibenzofuran than TA100. Although it was mutagenic even in the absence of 9,000×g supernatant fraction (S9) of rat liver, it was further activated by the addition of S9.

Metabolic activation of 3-chlorodibenzofuran in mutagenicity was studied using liver S9s and cell fractions which were prepared from rats treated with two inducers. 1,1-Dichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethylene (DDE) was used as an inducer of phenobarbital inducible cytochrome P-450, and β -naphthoflavone (β NF) was used as an inducer of 3-methylcholanthrene inducible cytochrome P-448. S9, microsomal, mitochondrial, and cytosolic fractions were obtained from four groups of rats, that is, untreated, DDE treated, β NF treated, and DDE and β NF treated groups.

The effect of inducers in mutagenicity of 3-chlorodibenzofuran was tested using *S. typhimurium* tester strain TA98. This experiment showed that 3-chlorodibenzofuran was activated most highly by β NF-induced microsomes. However, it was also activated by the cytosolic fraction. Moreover, it was highly activated in rat livers which were not treated with inducers. The activity of aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) of each fraction was measured. AHH did not always become an index of the metabolic activation of 3-chlorodibenzofuran.

This study showed that 3-chlorodibenzofuran is activated not only by cytochrome P-448, which is induced by 3-methylcholanthrene type inducers, but also by the enzymes existing in normal rat liver. This result suggests a risk of manifestation of its toxicity to normal animals.

1 はじめに

ポリクロロジベンゾフラン (PCDFs) はかつて熱媒体として使用されていたポリクロロビフェニル (PCBs) の中に副成物として混入し、PCBsとともに日本や台湾において「油症」を引き起こした原因物質の一つである¹⁻³⁾。またPCDFsはポリクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (PCDDs) の構造類似物質として注目され、PCDDsとともにその環境汚染や毒性について研究が進められて

いる⁴⁻⁶⁾。しかし、塩素数の少ない低塩素化ジベンゾフランについての毒性や代謝に関する研究はごくわずかしかなされていない^{5,7,8)}。

先年、日本の一部の地域において水道水より微量の2-クロロジベンゾフランが検出された⁹⁾。そこで2-クロロジベンゾフランを含むモノクロロジベンゾフランの4つの異性体とジベンゾフランについてサルモネラ菌のTA98とTA100を用いて変異原性試験を行った。さらに4異性体の中で唯一強い変異原性が認められた3-クロロジベンゾフランの代謝活性化について、2種の誘導剤を用いて調製したS9及び細胞成分を用いて検討を行ったので報告する。

2 方法

2.1 S9, ミクロソーム, ミトコンドリア及び可溶性画分の調製

モノクロロジベンゾフランの変異原性試験に使用したS9は、フェノバルビタール60 mg/kg体重を24時間ごとに3回と β -ナフトフラボン80 mg/kg体重を1回腹腔内投与した雄性Sprague-Dawley系ラット(7週齢)の肝臓より調製した。ラットより得た肝臓を生理食塩水でかん流後、0.15M KCl/10 mM Tris-HCl (pH 7.5)を用いてホモジナイズした。ホモジナイズ溶液を900×gで10分遠心後、さらに9,000×gで20分遠心し、上清をS9画分として用いた。用いたS9のタンパク質含量は15.44 mg/ml、チトクロームP-450含量は0.847 nmol/mg S9 proteinであった。

3-クロロジベンゾフランの変異原性に対する薬物代謝酵素系の影響を調べるために、誘導剤の種類を変えて調製したラットの肝臓のS9を用いて、3-クロロジベンゾフランの変異原性の変化を調べた。ラットは10週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。誘導剤には1,1-ジクロロ-2,2-ビス(p-クロロフェニル)エチレン(DDE)と β -ナフトフラボン(β NF)を用いた。供試48時間前にDDE 200 mg/kg体重を投与した群と β NF 80 mg/kg体重を投与した群、その両者を投与した群及び誘導剤非投与群に分け、各々からSprague-Dawley系ラットの場合と同様にS9を調製した。

さらにS9画分を調製した同じ4群のラットの肝臓より調製した可溶性画分、ミクロソーム画分、ミトコンドリア画分が3-クロロジベンゾフランの変異原性に及ぼす影響を調べた。S9画分を調製した際の9,000×g遠心の沈渣を0.15 M KCl/10 mM Tris-HCl (pH 7.5)に再溶解し、9,000×gで20分遠心してミトコンドリア画分を得た。S9画分はさらに105,000×gで60分遠心し、可溶性画分を得た。沈渣は再度0.15 M KCl/10 mM Tris-HCl (pH 7.5)に溶解し、105,000×gで60分遠心してミクロソーム画分を得た。

2.2 変異原性の分析

ジベンゾフラン及び白石ら¹⁰⁾により合成されたモノクロロジベンゾフランの変異原性試験をAmesらの方法^{11,12)}を改良したプレインキュベーション法¹³⁾によって行った。菌株は*S. typhimurium* TA98, TA100の両株を使用した。S9は50 μ l/plateの濃度で使用した。各化合物とも、TA98株

では0.025~10.0 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ で7段階, TA100株では0.05~10.0 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ で7段階の濃度でテストを行った。陽性対照にはベンゾ [a] ピレン5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ と2-ニトロフルオレン2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を用いた。すべての試験は3プレートずつ実施した。

さらにWistar系ラットより調製したS9, 可溶性画分, ミクロソーム及びミトコンドリアの各画分を用いて3-クロロジベンゾフランの変異原性を調べた。変異原性試験は, 上記と同様にブレインキュベーション法により行った。菌株はTA98を使用した。S9は50 $\mu\text{l}/\text{plate}$ の濃度でを使用した。可溶性画分はそのまま, ミクロソーム画分, ミトコンドリア画分は0.15 M KClで希釈して50 $\mu\text{l}/\text{plate}$ で添加した。各画分のタンパク質量をCoomassie blue dye binding法¹⁴⁾により γ -グロブリンを標準物質として測定した。S9画分のタンパク質含量は平均で38.7 mg/mlであった。1プレート当たり添加した各画分のタンパク質量を後出の表3中に示した。3-クロロジベンゾフランの濃度は0.4 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ (80.8 $\mu\text{g}/\text{plate}$)とし, 陽性対照にはベンゾ [a] ピレン5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を用いた。すべての試験は3プレートずつ実施した。変異コロニー数は自然誘発変異数を, さらに3-クロロジベンゾフランによる変異原性試験ではS9や細胞成分を添加しない条件下での変異コロニー数も差し引いたのち, タンパク質量で補正して比較を行った。

2.3 チトクローム P-450 量の測定

Wistar系ラットの肝臓のミクロソーム画分のチトクローム P-450 含量をOmura・Satoの方法¹⁵⁾によって求めた。(吸光係数91 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 測定波長490~450 nm)

2.4 酵素活性の測定

誘導剤の効果を確かめるために, Wistar系ラットより調製したS9及びミクロソーム画分について, 2つの指標酵素活性の測定を行った。芳香族炭化水素水酸化酵素 (AHH) 活性をNebert・Gélboinの方法¹⁶⁾により, またアミノピリン N-脱メチル化酵素 (APDM) 活性をOrreniusの方法¹⁷⁾により測定した。

3 結果

3.1 ジベンゾフランとモノクロロジベンゾフランの変異原性

ジベンゾフラン及び4つのモノクロロジベンゾフラン異性体についての変異原性試験の結果を表1及び表2に示す。S. typhimurium TA98における対照 (DMSO 100 $\mu\text{l}/\text{plate}$) の変異誘発数 (mean \pm SE) は-S9: 35 \pm 2 rev./plate (以下同単位), +S9: 41 \pm 1, TA100における対照の変異誘発数は-S9: 120 \pm 3, +S9: 128 \pm 5であった。

塩素の付いていないジベンゾフランには変異原性は認められず, 1.0 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ 以上の作用量では殺菌作用が観察された。モノクロロジベンゾフランは異性体により変異原性の強さが著しく異なっていた。1-クロロジベンゾフランには明確な変異原性は認められなかった。TA100にお

表 1 サルモネラ菌 TA98 株に対するジベンゾフランとモノクロロジベンゾフランの変異原性^{a23)}Table 1 Mutagenicity of dibenzofuran and monochlorodibenzofurans to *S.typhimurium* TA98^{a23)}

Dose (μ mol/plate)	Dibenzofuran		1-Chlorodibenzofuran		2-Chlorodibenzofuran		3-Chlorodibenzofuran		4-Chlorodibenzofuran	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.025	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05	-	-	-	-	-	-	-	116	-	-
0.1	-	-	-	27	-	-	71	402	-	-
0.4	-	-	19	-	52	-	282	517	-	-
1.6	LE(13) ^c	LE(22)	-	22	64	-	268	876	-	-
4.0	ND ^d	ND	19	24	84	52	391	1645	81	-
10.0	ND	ND	20	17	233	153	761	2370	LE(40)	LE(78)
				-S9	+S9					
Control and positive controls(mean \pm SE)										
DMSO(100 μ l)				35 \pm 2	41 \pm 1					
Benzo-[a]-pyrene(5 μ g)				36 \pm 2	368 \pm 22					
2-Nitrofluorene(2 μ g)				730 \pm 19	437 \pm 52					

a His⁺ revertants/plate. 3プレートの平均値。

b 変異コロニー数が対照値の(平均値 \pm 標準偏差の2倍)の範囲に含まれているもの。

c LE 殺菌作用が認められたもの。()内の数字は1プレート当たりの変異コロニー数を示す。

d ND 未試験。

いて0.4 μ mol/plate, 1.0 μ mol/plateで, 変異コロニー数のわずかな増加が観察されたが, 4.0 μ mol/plate以上では変異コロニー数は減少し, 殺菌作用があると考えられた。TA98においては, 変異コロニー数は増加せず, むしろ自然誘発変異数よりも減少し, やはり弱い殺菌作用があることを示した。4-クロロジベンゾフランは1-クロロジベンゾフランと同様に明確な変異原性を示さなかったが, +S9でTA100の変異コロニー数を自然誘発変異数の1.5倍まで増加させた。この増加は低濃度の場合に観察され, 4.0 μ mol/plate以上では菌の死滅が認められた。TA98では低濃度では対照における自然誘発変異数と差がなく, 4.0 μ mol/plate以上では殺菌作用を示した。

これに対し, 2-クロロジベンゾフランはTA98の変異コロニー数を増加させた。2-クロロジベンゾフランはいわゆる直接変異原で, S9の添加により変異コロニー数は減少した。一方, TA100に対しては2-クロロジベンゾフランは変異原性を示さなかった。

他の3つのモノクロロ体と異なり, 3-クロロジベンゾフランは*S. typhimurium* TA98, TA100の両菌株に対して明確な変異原性を示した。3-クロロジベンゾフランの変異原性はS9を加えない条件下でも強いものであったが, S9を加えることによって代謝活性化を受けその変異原性はさらに増強された。

表 2 サルモネラ菌 TA100 株に対するジベンゾフランとモノクロロジベンゾフランの変異原性^{a23)}

Table 2 Mutagenicity of dibenzofuran and monochlorodibenzofurans to *S.typhimurium* TA100^{a23)}

Dose (μ mol/plate)	Dibenzofuran		1-Chlorodibenzofuran		2-Chlorodibenzofuran		3-Chlorodibenzofuran		4-Chlorodibenzofuran	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.05	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	174	167
0.1	-	-	-	-	-	-	-	219	142	180
0.2	89	-	-	-	-	-	215	384	-	186
0.4	ND ^d	ND	137	165	ND	ND	268	328	144	191
1.0	82	88	142	-	-	-	386	498	-	-
4.0	85	LE(47) ^c	LE(98)	LE(0)	-	-	559	1067	LE(75)	LE(0)
10.0	ND	ND	0	0	-	-	845	1895	LE(78)	LE(0)

	-S9	+S9
Control and positive controls(mean \pm SE)		
CMSO(100 μ l)		120 \pm 3
Benzo-[a]-pyrene(5 μ g)	126 \pm 6	765 \pm 40
2-Nitrofluorene(2 μ g)	686 \pm 34	493 \pm 26

a His⁺ revertants/plate. 3 プレートの平均値。

b 変異コロニー数が対照値の(平均値 \pm 標準偏差の2倍)の範囲に含まれているもの。

c LE 殺菌作用が認められたもの。()内の数字は1プレート当たりの変異コロニー数を示す。

d ND 未試験。

3.2 3-クロロジベンゾフランの変異原性発現における薬物代謝酵素系の影響

DDE, β NF, DDE と β NF の両方で各々薬物代謝酵素の誘導を受けたラット及び対照のラットより調製したS9画分と細胞成分による3-クロロジベンゾフランの変異原性試験の結果を表3に示す。

S9画分のなかでは3-メチルコランスレン型の誘導剤である β NFによる誘導を受けたラットのS9(β NF-S9)の3-クロロジベンゾフランの活性化能が最も高いが、誘導剤を投与されていないラットのS9(None-S9)による変異コロニー数も β NF-S9の65%の値を示している。フェノバルビタール型の誘導剤であるDDE投与ラットのS9(DDE-S9)の活性化能は他のS9に比べて低く、DDEは3-クロロジベンゾフランの解毒酵素系も誘導していると考えられる。同時に行ったベンゾ[a]ピレンの変異原性試験においては、その活性化に対する誘導剤の影響は3-クロロジベンゾフランの場合より大きい。 β NF-S9による活性化が最も大きく、None-S9による変異コロニー数は β NF-S9による変異コロニー数の59%で、DDEと β NFの両方で誘導したS9(DDE + β NF-S9)による変異コロニー数(β NF-S9の70%)よりも少なくなっている。DDE-S9の添加による活性化は β NF-S9の18%とさらに低くなっている。以上の結果より、3-クロロジベン

表 3 ラット肝 S9, 可溶性画分, ミクロソーム画分, ミトコンドリア画分存在下でのサルモネラ菌 TA98株に対するベンゾ[a]ピレンと 3-クロロジベンゾフランの変異原性²⁴⁾

Table 3 Mutagenicity of benzo[a] pyrene and 3-chlorodibenzofuran to *S.typhimurium* TA98 with rat liver S9, cytosol, microsomes, or mitochondria²⁴⁾

Fraction	Inducer	Protein content	Control (DMSO)	Benzo[a]pyrene (5 μg/plate)		3-Chlorodibenzofuran (80.8 μg/plate)	
		mg/plate	His ⁺ rev./plate ^a	His ⁺ rev./plate ^a	His ⁺ rev./mg protein ^b	His ⁺ rev./plate ^a	His ⁺ rev./mg protein ^c
S9	None	1.85	40 ± 2	385 ± 27	186	905 ± 88	361
	DDE	2.17	44 ± 5	170 ± 3	58	558 ± 41	147
	β NF	1.90	45 ± 4	644 ± 79	315	1303 ± 33	559
	DDE + β NF	1.83	44 ± 2	445 ± 29	219	753 ± 34	280
Cytosol	None	1.41	33 ± 4	39 ± 1	4	345 ± 31	82
	DDE	1.47	32 ± 5	58 ± 5	18	300 ± 7	49
	β NF	1.46	35 ± 3	59 ± 3	16	329 ± 4	67
	DDE + β NF	1.29	29 ± 3	77 ± 3	37	324 ± 46	77
Microsomes	None	0.44	37 ± 3	349 ± 12	709	784 ± 84	1252
	DDE	0.46	35 ± 3	115 ± 8	174	288 ± 84	124
	β NF	0.25	33 ± 5	517 ± 34	1936	611 ± 26	1528
	DDE + β NF	0.31	32 ± 5	445 ± 24	1332	509 ± 35	906
Mito- chondria	None	1.45	55 ± 3	334 ± 8	192	650 ± 34	275
	DDE	1.80	38 ± 4	133 ± 7	53	234 ± 10	0
	β NF	2.03	42 ± 3	435 ± 21	194	551 ± 2	154
	DDE + β NF	2.13	40 ± 2	621 ± 22	273	507 ± 7	127

a : 数値は 3 回の平均値 ± 標準誤差で示した。自然誘発変異数 (DMSO, -S9) は 29 ± 2, ベンゾ[a]ピレン, 3-クロロジベンゾフランによる S9 非存在下での変異コロニー数はそれぞれ 29 ± 3, 225 ± 30 であった。

b : 対照値を差し引いたのち, 各画分のタンパク質量で補正した。

c : 対照値及び S9 非存在下での変異コロニー数を差し引いたのち, 各画分のタンパク質量で補正した。

ゾフランは本来肝 S9 に存在する酵素によってもかなり活性化を受け一方、ベンゾ[a]ピレンに比べ活性化の程度は低い、3-メチルコランズレン型の誘導剤によって活性化されることが分かる。

各画分による活性化作用では、ベンゾ[a]ピレンがいずれの群の可溶性画分によってもほとんど活性化されないのに対し、3-クロロジベンゾフランに対しては変異コロニー数の明らかな増加が観察された。誘導剤を投与しないラットの可溶性画分の方が誘導剤を投与したラットの可溶性画分よりも強い活性化を示したが、差は小さく、また誘導剤を投与した各群の間でも互いの差は小さい。

ミクロソーム画分による3-クロロジベンゾフランの代謝活性化は、誘導剤投与群ではベンゾ[a]ピレンと同様にβNF誘導群が最も高く、両誘導剤投与群がこれに続き、DDE誘導群は低い。一方、誘導剤を投与しないラットのミクロソーム画分はベンゾ[a]ピレンの代謝活性化能が低いのに対して3-クロロジベンゾフランの活性化能が比較的強い。さらにミトコンドリア画分の活性化能は可溶性画分と同様に低いと考えられるが、やはり非誘導ラットのミトコンドリア画分が3-クロロジベンゾフランの活性化に関与していることが分かった。

表4にS9及びミクロソーム画分のAHH活性、APDM活性及びミクロソーム画分のチトクロームP-450(広義のP-450)含量を示す。S9のAHH活性とタンパク質1mg当たりの変異コロニー数を比較すると、ベンゾ[a]ピレンについてはほぼ並行していた。一方、3-クロロジベンゾフランでは特に非誘導群のS9(Non-S9)に、AHH活性から予想されるより強い活性化能があるの

表 4 S9とミクロソーム画分の芳香族炭化水素水酸化酵素活性とアミノピリンN-脱メチル化酵素活性及びミクロソームのチトクロームP-450含量に対する誘導剤の影響*²⁴⁾

Table 4 Effects of inducers on AHH and APDM activities of S9 and microsomes and on microsomal cytochrome P-450 content*²⁴⁾

Inducer	None	DDE	βNF	DDE + βNF
AHH (nmol/min/mg protein)				
S9	0.20	0.12	0.76	0.38
Microsomes	0.11	0.11	1.91	0.65
APDM (nmol/min/mg protein)				
S9	3.28	4.42	2.36	3.84
Microsomes	7.44	11.06	4.76	9.96
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)				
Microsomes	0.42	0.61	0.68	1.00

*測定値は3~5匹のラットの肝臓のS9又はミクロソーム画分より求めた。

が認められた。マイクロソーム画分の添加による変異コロニー数とAHH活性を比べると、S9の場合と同様に、非誘導ラットのマイクロソーム画分のAHH活性は低いにもかかわらず3-クロロジベンゾフランの活性化能はAHH活性の高い β NF投与群のマイクロソーム画分とほぼ同じである。このことは、AHH活性はベンゾ[a]ピレンの場合と異なり必ずしも3-クロロジベンゾフランの代謝活性化の指標とならないことを示している。

4 考 察

モノクロロジベンゾフランの4つの異性体についての変異原性試験の結果は、クロロジベンゾフランの変異原性の発現には、芳香環における塩素の置換位置が重要な意味を持つことを示した。4つの異性体の中で唯一強い変異原性を示した3-クロロジベンゾフランは、代謝活性化のためのラット肝S9を加えない条件下でも強い変異原性を示したが、S9を加えることによって活性化を受けその変異原性はさらに増強された。このことは3-クロロジベンゾフランと同時にその代謝物も変異原性を持つことを示している。

今回、異なる誘導剤を投与したラットの肝S9及び細胞成分を用いて、3-クロロジベンゾフランの変異原性をさらに詳しく調べた結果、その活性化はマイクロソーム画分だけでなく他の画分に存在する酵素によっても行われていることが明らかになった。さらに誘導剤を投与していない正常なラットの肝臓に存在する酵素によってもかなり活性化を受けるという現象も観察された。

S9画分による変異原性試験の結果より、3-クロロジベンゾフランはベンゾ[a]ピレンと同様に、チトクロームP-448を誘導する β NF¹⁸⁾による前投与を受けたラットのS9によって強く活性化されることが分かる。チトクロームP-450を誘導するDDE¹⁹⁾を投与したラットのS9の3-クロロジベンゾフランに対する活性化能は弱く、この点についてもベンゾ[a]ピレンと同様の傾向が見られる。しかし、 β NF-S9とDDE-S9による活性化能の差はベンゾ[a]ピレンの場合ほど大きくない。さらに誘導剤を投与しないラットの肝S9によって3-クロロジベンゾフランは比較的強く活性化される。

可溶性画分による活性化はマイクロソーム画分による活性化と比べると少ないが、ベンゾ[a]ピレンが可溶性画分によってほとんど活性化を受けないのに対して、3-クロロジベンゾフランがある程度活性化を受けるのが特徴的である。可溶性画分による活性化については誘導剤の影響はないものと考えられる。

可溶性画分には多くの酸化還元酵素や抱合酵素などの薬物代謝酵素が存在している。その中にはガン原性物質の代謝的活性化や不活性化に関与していると考えられる酵素もあり、またチトクロームP-450と同様にフェノバルビタールや3-メチルコランズレンによって誘導を受ける酵素もある。3-クロロジベンゾフランの可溶性画分による活性化には誘導剤の影響は見られないため、3-クロロジベンゾフランの活性化は誘導酵素によるものではないと考えられる。可溶性画分による3-クロロジベンゾフランの活性化にいずれの酵素が働いているのかについては今後検討して

行く必要がある。

DNA との結合や Ames テストにおいて、可溶性画分による 2-アセチルアミノフルオレンや 3-アミノ-1-メチル-5*H*-ピリド[4,3-*b*]インドール (Trp-P-2) のような変異原物質の活性化や活性化の増強が観察されることが報告されている²⁰⁻²²⁾。これらの化合物の構造は 3-クロロジベンゾフランと類似の骨格を有しており、共通の活性化機構が存在するかもしれない。

マイクロソーム画分による活性化は β NF 誘導ラットと非誘導ラットにおいて強く認められた。この結果は S9 による結果とほぼ一致しており、3-クロロジベンゾフランはマイクロソームにおいて活性化を受ける割合が最も大きいと考えられる。しかし、非誘導ラットのマイクロソーム画分による活性化がかなり強いことは注目すべきであり、またベンゾ[*a*]ピレンの活性化との大きな相違点の一つともなっている。

ミトコンドリア画分による活性化の割合は可溶性画分と同様に高くない。誘導剤を投与したラットにおいてはいずれも活性化の程度は低い。特に DDE を投与したラットで活性化を受けないのは解毒酵素系が誘導されているためと考えられる。非誘導ラットのミトコンドリア画分において 3-クロロジベンゾフランが強く活性化を受ける点はマイクロソーム画分の場合と同様であり、ベンゾ[*a*]ピレンとの大きな違いがみられる。ミトコンドリア画分にはビタミン D₃ の代謝に関する P-450 種が含まれているが、3-クロロジベンゾフランの変異原性の増強が P-450 によるものかどうかは明らかではない。

S9 及びマイクロソーム画分の AHH 活性の測定からは、非誘導群のマイクロソーム画分における AHH 以外の酵素も 3-クロロジベンゾフランの活性化に寄与していることが分かる。

以上の事実より 3-クロロジベンゾフランは β NF や DDE などの薬物によって誘導を受けたラットのマイクロソーム画分によってはベンゾ[*a*]ピレンと同様の代謝を受けるが、可溶性画分においても代謝を受ける可能性があるという点でベンゾ[*a*]ピレンとは異なる、さらに誘導を受けていないラットの肝臓の細胞においては 3-クロロジベンゾフランの代謝活性は局在することなく全般に及んでいると結論することができる。

現在のところ 3-クロロジベンゾフランは変異原性が証明されているだけで発ガン性など強い毒性は不明である。しかし薬物による酵素誘導を受けていない動物においてむしろ強く代謝活性化を受ける可能性がある点が毒性発現に結び付く危険性を示唆している。一方、塩素化芳香族化合物が Ames テストにおいてほとんど変異原性を示さないにもかかわらず 3-クロロジベンゾフランが変異原性を示すことは興味ある事実である。3-クロロジベンゾフランの代謝の機構を探ることによって、変異原性が確認されながら発ガン性が認められないある種の化合物に共通の代謝機構の一部が明らかになることも考えられる。

引用文献

- 1) Miyata, H., A. Nakamura and T. Kashimoto (1976): Separation and detection of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) on Japanese commercial PCBs (Kanechlors) and their heated preparation. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **17**, 227-230.
- 2) Nagayama, J., Y. Masuda and M. Kuratsune (1977): Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patients with 'Yusho'. *Food Cosmet. Toxicol.*, **15**, 195-198.
- 3) Chen, P. H., K. T. Cheng and Y. D. Lu (1981): Polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the toxic rice bran oil that caused PCB poisoning in Taichung. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 489-495.
- 4) Poland, A. and J. C. Knutson (1982): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554.
- 5) Bandiera, S., T. Sawyer, M. Romkes, B. Zumdzka, L. Safe, G. Mason, B. Keys and S. Safe (1984): Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): effects of structure on binding to the 2,3,7,8-TCDD cytosolic receptor protein, AHH induction and toxicity. *Toxicology*, **32**, 131-144.
- 6) Rappe, C., G. Choudhary and L. H. Keith (eds.) (1986): Chlorinated Dioxins and Dibenzofurans in Perspective, Lewis, Michigan, 570p.
- 7) Veerkamp, W., J. Wever and O. Hutzinger (1981): The metabolism of some chlorinated dibenzofurans by rats. *Chemosphere*, **10**, 397-403.
- 8) Shoeny, R. (1982): Mutagenicity testing of chlorinated biphenyls and chlorinated dibenzofurans. *Mutat. Res.*, **101**, 45-56.
- 9) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.
- 10) 白石寛明(1991): モノクロロジベンゾフランの合成. 国立環境研究所研究報告, 第129号, 75-87.
- 11) Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
- 12) Maron, D. M. and B. N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- 13) Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977): Mutagenicities of *N*-nitrosamines on Salmonella. *Mutat. Res.*, **48**, 121-130.
- 14) Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 15) Omura, T. and R. Sato (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385.
- 16) Nebert, D. W. and H. V. Gelboin (1968): Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture I. Assay and properties of induced enzyme. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6242-6249.
- 17) Orrenius, S. (1965): On the mechanism of drug hydroxylation in rat liver microsomes. *J. Cell Biol.*, **26**, 713-723.
- 18) Haugen, D.A., M. J. Coon and D. W. Nebert (1976): Induction of multiple forms of mouse liver cytochrome P-450: Evidence for genetically controlled *de novo* protein synthesis in response to treatment with α -naphthoflavone or phenobarbital. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1817-1827.
- 19) Omura, T. (1985): Induction of microsomal cytochrome P-450 in rat liver by chemical compounds. *Gann Monogr. Cancer Res.*, **30**, 143-156.

- 20) Nemoto, N., S. Kusumi, S. Takayama, M. Nagao and T. Sugimura (1979): Metabolic activation of 3-amino-5H-pyrido[4,3-b]indole, a highly mutagenic principle in tryptophan pyrolysate, by rat liver enzymes. *Chem. -Biol. Interact.*, **27**, 191-198.
- 21) Forster, R., M. H. L. Green, A. Priestley and J. W. Gorrod (1981): Apparent activation of 2-acetylaminofluorene and some aromatic amines by cytosolic preparations. *Mutat. Res.*, **85**, 187-194.
- 22) Saccone, G. T. P., M. W. Pariza (1981): Enhancement of hepatic microsome-mediated bacterial mutagenesis by the rat liver soluble protein fraction. *Mutat. Res.*, **88**, 135-145.
- 23) Matsumoto, M., M. Ando and Y. Ohta (1988): Mutagenicity of monochlorodibenzofurans detected in the environment. *Toxicol. Lett.*, **40**, 21-28.
- 24) Matsumoto, M. and M. Ando (1991): Mutagenicity of 3-chlorodibenzofuran and its metabolic activation. *Environ. Mol. Mutagen.*, **17**, (in press).

II-4 ウズラ発育卵でのクロロジベンゾフランの毒性評価

Toxicological Evaluation for Chlorodibenzofuran by Hatching Eggs of the Japanese Quail

高橋慎司¹・森田昌敏²

Shinji TAKAHASHI¹ and Masatoshi MORITA²

要 旨

環境汚染物質に対する鳥類の感受性の高いことが野外報告例より推察されているが、その実験的証明例は少なく、またOECDガイドライン等による国際統一的な毒性評価法が確立されるまでには至っていない。

今回は、モノクロロジベンゾフランの毒性を評価する手法として、ウズラ発育卵を適用した結果、極めて興味ある知見を得ることができた。すなわち、2-,3-,4-クロロジベンゾフランをウズラ発育卵（発生9日目）に注入した結果、0.1ml/個投与では40% (24/60)、0.2ml/個投与では21% (13/60) がふ化してくることが分かった。これらのことは、環境汚染物質の毒性評価にウズラ発育卵を適用する場合には、毒性物質注入後の胚の生死のみならず、その後のふ化可能性を含めて総合的に検討することが可能であることを示唆している。

Abstract

Through many reports about field surveillance in ecotoxicity, it has been suggested that the avian species have the high sensitivity to toxic chemical substances. However, the toxicological evaluation for pollutants in the avian species has not been established internationally, in spite of many efforts by the OECD Guideline, etc.

In this study, an evaluating method using hatching eggs of the Japanese quail was applied to chlorodibenzofuran isomers. The toxicity of chlorodibenzofuran was evaluated in their hatching rate, as well as their death rate. It was indicated that higher hatchability in control groups was necessary for this evaluation.

-
1. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

OECD(Organization for Economic Co-operation and Development, 経済協力開発機構)では、化学物質の安全性を評価するガイドライン(OECD Guidelines for Testing of Chemicals)を策定し、国際的に標準化した試験法の確立を目指している¹⁾。我が国でも、(財)日本環境協会が主催して残留化合物として問題視された化学物質の生態影響試験を行い、著者らはウズラでのクロルデン及びトリブチル錫オキシド(TBTO)の生態影響評価試験に関する調査結果を報告している(1984年²⁾・1985年³⁾)。しかしながら、鳥類での生態影響試験は、OECDテストガイドラインに疑問点が指摘され今後の改良が必要となっている⁴⁾。

ところで、鳥類は環境の変化に鋭敏に反応し、環境汚染物質に対する感受性もほ乳類より高いことが知られている。各種の野外調査報告例からも農薬、残留化合物等に対する鳥類の感受性の高いことが明らかにされているが⁵⁾、これら化学物質の毒性学的な評価方法は世界的にまだ確立されておらず、国際的な標準化が急務とされている⁶⁾。

最近、鳥類の実験動物としてニホンウズラ(Japanese quail, 以下ウズラと略)が注目されている。国立環境研究所動物実験施設では1980年以来、環境科学研究用実験動物としてのウズラの遺伝的及び微生物的純化を推進し、系統の確立に成功している⁷⁾。

今回は、環境汚染物質として注目されているクロロジベンゾフランの毒性評価について、当施設で開発したウズラの種卵が極めて有効であることが分かったので、その手法を報告する。

2 方法

2.1 ジベンゾフランの調整

今回は、a:2-クロロジベンゾフラン(2-CDF), b:3-クロロジベンゾフラン(3-CDF), c:4-クロロジベンゾフラン(4-CDF)の3種を使用し、まずコーン油でそれぞれ重量比1%に調整した。投与濃度は4段階とし、それぞれ①1%(1,000ppm)区、②0.1%(100ppm)区、③0.01%(10ppm)区、及び④0.001%(1ppm)区とし各々コーン油で希釈し各濃度に設定した。

2.2 供試ウズラ種卵

国立環境研究所動物実験施設で開発したH₂及びL₂系ウズラ並びに(財)日本生物科学研究所由来のWE系ウズラより採卵した受精卵(種卵)を用いた。これらのウズラ種卵は、温度37.8℃・湿度50~60%RHで9日間インキュベートし、胚発生を確認した後、毒性試験に供試した。

2.3 毒性試験法

2.1で調整した3種類のクロロジベンゾフランを、それぞれを①~④の濃度別(1,000, 100, 10, 1ppm)に区分し、第1回目実験(Exp.1)ではウズラ発生卵1個当たり0.1ml, 第2回目実験(Exp.2)では0.2ml/個を以下の手順で投与し、毒性を調査した。

- (1) 発生卵をキャンディングし生存していることを確認後、卵の鈍端部に穴をあける。
- (2) 各濃度のジベンゾフラン溶液を指定量だけ注射器で尿しょう膜中に注入する。
- (3) 注入した穴をセロファンテープでふさぎ、再びインキュベートする。
- (4) 投与の発生卵の生死又はふ化の有無を入卵後20日目に所定の方法で調査する。

なお、一連の操作においてはできる限り無菌的に行い、細菌感染等による非特異的死亡例のないことを確認した。また、対照群として常にコーン油添加群を設定し、毒性評価のための基準とした。

2.4 毒性評価法

今回は毒性評価法として、(1) ウズラのふ化率、(2) ウズラ胚の平均生存日数、及び(3) ふ化ウズラの育成率を用いた。なお、ふ化後の奇形の有無等も併せて調査した。

3 結果と考察

ウズラ発育卵を用いた2-,3-,4-クロロジベンゾフランの毒性試験の結果を表1と表2に示した。Exp.1(投与量0.1ml/個)では、モノクロロジベンゾフラン投与後の翌日(発生10日目)より胚の死亡が認められ、計60個中36個(60%)は発生16日目までに死亡した。しかしながら、残り24個はそれ以降も発育し17日目からふ化してきた。

ふ化率を指標としてクロロジベンゾフランの毒性を評価すると、投与濃度別では、①33%(1,000ppm区:15個中5羽ふ化)=②33%(100ppm区:同5羽ふ化)<③47%(10ppm区:同7羽ふ化)=④47%(1ppm区:同7羽ふ化)の順となり、100ppmを境界にしてふ化率が低下した。なお、対照群(コーン油添加区)のふ化率は80%(5個中4個ふ化)となり、全投与群平均の40%に対して2倍ほど高かった。

これをモノクロロジベンゾフランの異性体別に比較すると、2-CDF(25%)<3-CDF(45%)<4-CDF(50%)のふ化率となり、2-CDFの毒性が3-CDF、4-CDFより2倍ほど高かった。

次に、平均生存率で比較すると①~④の投与濃度別では14.0~15.5日であったが、特に有意な差にはならなかった。また、種類別に比較しても、2-CDF:(14.0±2.7日)<4-CDF:(14.8±2.6日)<3-CDF:(15.0±2.4日)の順となったが、有意性はなかった。

ところで、モノクロロジベンゾフラン投与後にも発育を続けふ化したウズラは、その後も順調に発育し、性成熟に達することが分かった。モノクロロジベンゾフランは代謝を受けやすく、生体内寿命が比較的短いことが知られている。ウズラにおいても初期の毒性が消えた後は、順調に発育したのではないと思われる。また奇形・繁殖障害等の異常は特に認められなかった。

Exp.2では毒性を増加させるために投与量を2倍(0.2ml/個)とした結果、全体のふ化率は22%(13/60)と約半分に低下した。これを濃度別に比較すると①7%(1,000ppm区:1/15)<②20%

表 1 クロロジベンゾフラン投与後のウズラ胚の生死割合
Exp. 1(0.1ml/個投与)
Table 1 Death Rate of Japanese Quail's Embryo after Injection of
Chlorodibenzofuran
Exp. 1(0.1ml/egg Injection)

投与物質	n	投与濃度 (ppm)				計:L/D (ふ化率) [平均生存日数]
		①1000	②100	③10	④1	
a: 2-クロロ ジベンゾフラン	20	L: 1	0	3	1	5/15
	(5)	D: 4	5	2	4	(25%) [14.0±2.7(20)]
b: 3-クロロ ジベンゾフラン	20	L: 1	2	3	3	9/11
	(5)	D: 4	3	2	2	(45%) [15.0±2.4(20)]
c: 4-クロロ ジベンゾフラン	20	L: 3	3	1	3	10/10
	(5)	D: 2	2	4	2	(50%) [14.8±2.6(20)]
計	60	L: 5	5	7	7	24/36
	(15)	D: 10	10	8	8	(33%) (33%) (47%) (47%) (40%) [14.4] [14.0] [14.6] [15.5] [14.6±2.5(60)]
Cont. (コーンオイル)	5	L: 4				4/1
		D: 1				(80%) [15.8±2.7(5)]

L: 入卵後17日目までふ化したウズラ数, D: 入卵後10日目から16日までに死亡したウズラ数

(100ppm区: 3/15)=③20%(10ppm区: 3/15)<④40%(1ppm区: 6/15)の順となり、濃度差の効果が認められた。モノクロロジベンゾフランの異性体間では、ふ化率が2-CDF:20%, 3-CDF:25%, 4-CDF:20%となり差異はなかったが、2-CDFは1,000ppm区でもふ化することが分かった。なお、コーン油のみを0.2ml/個投与した対照群ではふ化率が20%(5個中1羽)となり、Exp.1(0.1ml/個投与, 80%)の1/4に低下した。おそらく、コーン油0.2ml/個は負荷が大きすぎたためと考えられるので、コーン油に溶解して投与する場合には、0.1ml/個以下にすべきであることが分かった。

平均生存日数を指標として比較すると、濃度別では高濃度区が低濃度区より短い傾向があり、また種類別では、2-CDFと3-CDFはほぼ同じものの、4-CDFでは短い傾向が認められた。なおExp.2でも、ふ化後の育成率に特に差異は認められなかった。

表 2 クロロジベンゾフラン投与後のウズラ胚の生死割合
Exp. 2(0.2ml / 個投与)

Table 1 Death Rate of Japanese Quail's Embryo after Injection of
Chlorodibenzofuran
Exp. 2(0.2ml / egg Injection)

投与物質	n	投与濃度 (ppm)				計:L/D (ふ化率) [平均生存日数]
		①1000	②100	③10	④1	
a: 2-クロロ ジベンゾフラン	20	L: 0	1	0	3	4/16
		D: 5	4	5	2	(20%)
	(5)	[14.6]	[12.2]	[15.2]	[14.2]	[14.2±2.5(20)]
b: 3-クロロ ジベンゾフラン	20	L: 0	1	3	1	5/15
		D: 5	4	2	4	(25%)
	(5)	[13.4]	[14.4]	[15.2]	[12.8]	[14.0±2.6(20)]
c: 4-クロロ ジベンゾフラン	20	L: 1	1	0	2	4/16
		D: 4	4	5	3	(20%)
	(5)	[11.6]	[12.2]	[12.2]	[13.6]	[12.4±3.1(20)]
計	60	L: 1	3	3	6	13/47
		D: 14	12	12	9	(7%) (20%) (20%) (40%) (22%)
	(15)	[12.7]	[13.3]	[13.7]	[14.3]	[13.5±2.8(60)]
Cont. (コーンオイル)	5	L: 1				1/4
		D: 4				(20%)
					[13.4±3.2(5)]	

L: 入卵後17日目までふ化したウズラ数, D: 入卵後10日目から16日までに死亡したウズラ数

今回実験に用いたのは近交系由来の卵であるが、これらは近交退化によりふ化率が低下していることが考えられる。そこで、近交系間交雑による雑種化により、供試種卵のふ化率の向上を図ることが重要であると考えられる。

引用文献

- 1) OECD guideline for testing of chemicals (1983): Avian Dietary Toxicity Test. DRAFT 1.8.83.206, 1-9.
- 2) 高橋 弘・高橋慎司(1984): 生体影響評価試験に関する調査研究—鳥類食餌毒性試験. ウズラを用いたクロルデン毒性試験. 日本環境協会昭和58年度報告, 107-123.
- 3) 高橋 弘・高橋慎司(1985): 生体影響評価試験に関する調査研究—鳥類食餌毒性試験. ウズラを用いたトリブチルスズオキシド毒性試験. 日本環境協会昭和59年度報告, 123-150.

- 4) 高橋 弘・高橋慎司(1986): 生体影響評価試験に関する調査研究 — 昭和60年度環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書. 日本環境協会昭和60年度報告, 45-56.
- 5) Symposium on Pathobiology of Environmental Pollutants (1979): Animal Models and Wildlife as Monitors, Univ. of Connecticut, 1977. Animals as monitors of environmental pollutants - Pesticide toxicity, 269-296.
- 6) Cairns, Jr., John, E. P. Smith and O. David (1988): The problem of validating simulation of hazardous exposure in natural systems. Proceeding of the 1988 Summer Computer Simulation Conference, C. C. Barnett and W. M. Holmes. (eds.), The Society for Computer Simulation International, San Diego, 448-454.
- 7) 高橋慎司・清水 明・高橋 弘・水間 豊(1989): ウズラにおけるニューカッスル病ウイルス不活化ワクチンに対する抗体産生能の高及び低系への選抜育種. 国立公害研究所研究報告, 第124号, 7-18.

II-5 3-ニトロジベンゾフランと3-アミノジベンゾフラン の変異原性

Mutagenicity of 3-Nitrodibenzofuran and 3-Aminodibenzofuran

宇野由利子¹・植弘崇嗣¹・安原昭夫²・森田昌敏¹

Yuriko UNO¹, Takashi UEHIRO¹, Akio YASUHARA² and Masatoshi MORITA¹

要 旨

3-ニトロジベンゾフラン (3-NDBF), 3-アミノジベンゾフラン (3-ADBF) の変異原性を調べるために、サルモネラ TA98 と TA100 の 2 株を用いて Ames テストを行った。3-NDBF, 3-ADBF の両物質には強い変異原性が見られた。3-NDBF の変異原性は TA98, TA100 の両株で見られ、S9(-) でも強い変異原性を示すことから、直接変異原であることが分かった。変異原の強さは TA98 においてベンツピレンの約 4.6 倍、TA100 においてその約 2 倍であった。3-ADBF の変異原性は S9(-) では、TA98, TA100 の両株とも見られないのに対し、S9(+) では、両株とも強い変異原性が見られ、代謝活性化と関係があることが分かった。変異原の強さは TA98 においてベンツピレンの約 13.7 倍、TA100 においてその約 5.5 倍であった。3-NDBF では、S9(+), S9(-) の両方で殺菌作用が見られた。

Abstract

Mutagenicities of 3-nitrodibenzofuran and 3-aminodibenzofuran were examined using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. Strong mutagenicity was found in both compounds. Mutagenicity of 3-nitrodibenzofuran has been recognized both in *S. typhimurium* TA98 and TA100. The compound was a direct-mutagen because it was strongly mutagenic even in the absence of S-9 mix. Mutagenic potency of this compound was about 4.6 times stronger in TA98 and twice stronger in TA100 than that of benzo [a] pyrene. 3-Aminodibenzofuran was not mutagenic in both strains TA98 and TA100 in the absence of S-9 mix. But high mutagenicity was found by addition of S-9 mix. This phenomenon suggested

1. 国立環境研究所 化学環境部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Environmental Chemistry Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立環境研究所 地域環境研究グループ 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Regional Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

that the mutagenicity of 3-aminodibenzofuran was related with its metabolism. Mutagenic potency of 3-aminodibenzofuran was more than 13.7 times stronger in TA98 and about 5.5 times stronger in TA100 than that of benzo [a] pyrene. Killing with 3-nitro-dibenzofuran was observed both in the presence and in the absence of S-9 mix.

1 はじめに

多環芳香族炭化水素がニトロ化されてできるニトロアレーンは、有機物の不完全燃焼によってつくられ、自動車排出ガスや大気粒子状物質中にしばしば検出される¹⁻⁸⁾。これらのニトロアレーンの変異原性や発ガン性は多くの研究者達によって調べられている⁹⁻¹³⁾。これらの研究の多くは、モノニトロピレン及びジニトロピレンに関するものである。ジベンゾフランはクレオソートオイルやコールタールの成分であり、我々を取り巻く環境中にしばしば検出されるが、ニトロ化されたジベンゾフランの変異原性に関する報告はまだない。ニトロジベンゾフランは汚染の進んだ大気中や他の環境試料中に存在すると思われる。

ジベンゾフランの塩素化誘導体 (CDF) については毒性学的知見が得られつつある。ポリクロロジベンゾフラン (PCDFs) は日本と台湾の「油症」と関連がある。突然変異原性については陽性の報告はない¹⁵⁻¹⁷⁾。2-クロロジベンゾフランは水道水中から検出され¹⁸⁾、またポリマーの一種であるポリ塩化ビニリデンの熱分解では4種のモノクロロジベンゾフランが生成することが知られている¹⁹⁾。モノクロロジベンゾフランのすべての異性体の変異原性の Ames テストの結果では、3-クロロジベンゾフランに強い変異原性があることが明らかとなっており²⁰⁾、3位が置換されたジベンゾフランの誘導体は、変異原性を持つものと思われる。

3-ニトロジベンゾフラン (3-NDBF) (図1) は、焼いたソーセージ中からすでに検出されているので¹⁴⁾、その変異原性を調べることは重要である。さらに、3-アミノジベンゾフラン (3-ADBF) (図1) は、発ガン性が報告されているが^{21,22)}、変異原性に関する報告はまだない。最近の研究では、マウスの肝臓におけるタンパク質の合成、DNA、RNA への3-ADBFの単一濃度の影響が調査されている²³⁾。そこで我々は、3-NDBFと3-ADBFを合成し、それらの変異原性を Ames テストによって調べた。

2 材料及び方法

ジベンゾフラン (純度98%) は Aldrich 社より入手した。3-NDBFと3-ADBFは、毛海らの方法によりジベンゾフランをニトロ化し²⁴⁾、引き続き Cullinane の方法により還元して各々誘導し²⁵⁾、核磁気共鳴装置 (NMR) と質量分析計 (MS) により確認した。3-NDBFと3-ADBFの純度はそれぞれガスクロマトグラフィー (GC) により98%、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により95%であった。対照にはジメチルスルホキシド (DMSO, 半井化学) を、陽性対照としてベンツピレン (Aldrich)、1-ニトロピレン (Aldrich)、AF2 (和光純薬) を用いた。試料を溶解するための溶媒には DMSO を使用した。

S9 (フェノバルビタール及び5-6ベンゾフラボン誘導) とコファクターは各々キッコマンとオリエンタル酵母より入手した。

変異原性試験はAmesらの方法を改良したブレインキューベーション法により行い²⁶⁾, 菌株は *S.typhimurium* の TA98, TA100 の 2 株を使用した。各化合物は両株とも 0.31~40 μ g/plate の濃度範囲とし, S9 mix 添加による代謝活性化及び S9 mix 無添加の両条件について試験を行った。S9 は 50 μ l/plate の濃度で使用した。試験はそれぞれの濃度につき 2 プレートずつ行い, データは平均値を採用した。陽性対照のベンツピレン 5 μ g/plate は S9 mix 添加, 1-ニトロピレン 0.1 μ g/plate は S9 mix 無添加で使用した。AF2 は TA98 株に対し 0.1 μ g/plate, TA100 株に対し 0.01 μ g/plate 用い, S9 mix 無添加で使用した。

3 結果及び考察

結果は表 1, 2 に示した。ジベンゾフランには変異原性がなく松本らの報告と一致した²⁰⁾。3-NDBF と 3-ADBDF には強い変異原性が見られた。Ashby らによってアミノ基が置換したベンゼン化合物は変異原性を示すと報告されている²⁷⁾。

表 1 サルモネラ TA98 におけるジベンゾフラン, 3-ニトロジベンゾフラン, 3-アミノジベンゾフランの変異原性^{a)}

Table 1 Mutagenicity of dibenzofuran, 3-nitrodibenzofuran, 3-aminodibenzofuran to *S. typhimurium* TA98^{a)}

Dose (μ g/plate)	Dibenzofuran		3-Nitrodibenzofuran		3-Aminodibenzofuran	
	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)	S-9(-)
0.31	33	18	57	113	427	19
0.63	33	20	153	205	854	20
1.25	28	27	494	365	1908	18
2.50	36	24	1270	673	3745	36
5.00	34	15	1630	1025	5133	33
10.00	40	24	2375	1608	*4671	50
20.00	30	18	*1551	2129	*1671	45
40.00	30	10	*868	*1524	*268	90

	S-9(+)	S-9(-)
Control and positive controls		
DMSO(100 μ l)	36	24
Benzo[a]pyrene(5 μ g)	488	
1-Nitropyrene(0.1 μ g)		1438
AF2(0.1 μ g)		465

^{a)}Revertants/plate. Values are means of two plates.

*Lethal effect.

表 2 サルモネラ TA100 におけるジベンゾフラン, 3-ニトロジベンゾフラン, 3-アミノジベンゾフランの変異原性^a
 Table 2 Mutagenicity of dibenzofuran, 3-nitrodibenzofuran, 3-aminodibenzofuran to *S. typhimurium* TA100^a

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Dibenzofuran		3-Nitrodibenzofuran		3-Aminodibenzofuran	
	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)	S-9(-)
0.31	143	120	134	209	281	120
0.63	144	116	170	330	536	103
1.25	127	103	355	519	1453	109
2.50	140	118	904	1038	2991	112
5.00	109	108	1726	1694	4305	118
10.00	163	121	2797	2516	*3236	162
20.00	151	*88	*1364	2780	*145	126
40.00	*98	*61	*30	*1588	*48	148

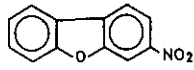
	S-9(+)	S-9(-)
Control and positive controls		
DMSO(100 μl)	138	119
Benzo[<i>a</i>]pyrene(5 μg)	985	
1-Nitropyrene(0.1 μg)		238
AF2(0.01 μg)		689

^aRevertants/plate. Values are means of two plates.

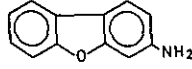
*Lethal effect.

3-NDBF の変異原性は TA98, TA100 の両株に見られた。この結果は, Campbell らと Rosenkranz らによる, TA98, TA100 株を用いた, ほとんどのニトロアレーン類には変異原性があるとの報告と一致した^{28, 29})。3-NDBF は S9(-) でも強い変異原性を示すことから, 直接変異原であることが分かった。3-NDBF の変異原の強さは TA98 においてベンツピレンの約 4.6 倍, TA100 においてその約 2 倍であった。さらに, 3-クロロジベンゾフランの文献値と比べると, TA98 において約 32 倍, TA100 において約 53 倍であった。Ames テストでは, 塩素よりもニトロ, 又はアミノ置換基の方が強い変異原性を示すように思える。3-NDBF と構造が類似している 2-ニトロフルオレン (図 1) の文献値と比較すると, 両化合物とも S9(-) では変異原の強さはほとんど同じである。一方, S9(+)では, 2-ニトロフルオレンの変異原性は減少するが²⁰), 3-NDBF のそれは増加する。このことから, ニトロジベンゾフランが S9 存在下で水酸化又は酸化され, 変異原性が増強されることが分かる。

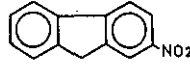
3-ADBDF は S9(-) では, TA98, TA100 の両株に変異原性は見られないのに対し, S9(+)では強い変異原性が見られた。このことから, 3-ADBDF の変異原性の発現には代謝活性が関係していることが分かる。3-ADBDF の変異原の強さは TA98 においてベンツピレンの約 13.7 倍,



3-Nitrobenzofuran



3-Aminobenzofuran



2-Nitrofluorene

図 1 実験に用いた化合物及び2-ニトロフルオレンの構造式

Fig.1 Structures of compounds tested and 2-nitrofluorene

TA100においてその約5.5倍であった。3-NDBF, 3-ADBFともに高濃度のところでは、殺菌作用が観察された。

引用文献

- 1) Xu, X. B., J. P. Nachtman, Z. L. Jin, E. T. Wei and S. M. Rappaport (1982): Isolation and identification of mutagenic nitro-PAH in diesel-exhaust particulates. *Anal. Chim. Acta*, **136**, 163-174.
- 2) Schuetzle, D., T. L. Riley, T. J. Prater, T. M. Harvey and D. F. Hant (1982): Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulates. *Anal. Chem.*, **54**, 265-271.
- 3) Newton, D. L., M. D. Erickson, K. B. Tomer, E. D. Pellizzari, P. Gentry and R. B. Zweidinger (1982): Identification of nitroaromatics in diesel exhaust particulate using gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry and other techniques. *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 206-213.
- 4) Paputa-Peck, M. C., R. S. Marano, D. Schuetzle, T. L. Riley, C. V. Hampton, T. J. Prater, L. M. Skewes, P. H. Ruehle, L. C. Bosch and W. P. Ducan (1983): Determination of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in particulate extracts by capillary column gas chromatography with nitrogen selective detection. *Anal. Chem.*, **55**, 1946-1954.
- 5) Alsberg, T., U. Stenberg, R. Westerholm, M. Strandell, U. Rannug, A. Sundvall, L. Romert, V. Bernson, B. Pettersson, R. Toftgård, B. Franzén, M. Jansson, J. Å. Gustafsson, K. E. Egebäck and G. Tejle (1985): Chemical and biological characterization of organic material from gasoline exhaust particles. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 43-50.
- 6) Gibson, T. L. (1982): Nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne and source particulate matter. *Atmos. Environ.*, **16**, 2037-2040.
- 7) Nielsen, T., B. Seitz and T. Ramdahl (1984): Occurrence of nitro-PAH in the atmosphere in a rural area. *Atmos. Environ.*, **18**, 2159-2165.
- 8) Atkinson, R., J. Arey, B. Zielinska, A. M. Winer and J. N. Pitts Jr. (1987): The formation of nitro-

- polycyclic hydrocarbons and their contribution to the mutagenicity of ambient air. *Environ. Sci. Res.*, **36**, 291-309.
- 9) Rosenkranz, H. S. and R. Mermelstein (1983): Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res.*, **144**, 217-267.
 - 10) Rosenkranz, H. S. (1984): Mutagenic and carcinogenic nitroarenes in deisel emissions : risk identification. *Mutat. Res.*, **140**, 1-6.
 - 11) Ochiai, M., M. Nagao, T. Tahira, F. Ishikawa, K. Hayashi, H. Ohgaki, M. Terada, N. Tsuchida and T. Sugimura (1985): Activation of *k-ras* and oncogenes other than *ras* family in rat fibrosarcomas induced by 1,8-dinitrooyrene. *Cancer Lett.*, **29**, 119-125.
 - 12) Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986): Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.
 - 13) Mōri, H., S. Sugie, N. Yoshimi, T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1987): Genotoxicity of a variety of nitroarenes and other nitro compounds in DNA-repair tests with rat and mouse hepatocytes. *Mutat. Res.*, **190**, 159-167.
 - 14) Larsson, B. K., H. Pyysalo and M. Sauri (1988): Class separation of mutagenic polycyclic organic material in grilled and smoked foods. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, **187**, 546-551.
 - 15) Miyata, H., A. Nakamura and T. Kashimoto (1976): Separation and detection of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) on Jpanese commercial PCBs (Kanechlors) and their heated preparation. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **17**, 227-230.
 - 16) Nagayama, J., Y. Masuda and M. Kuratsune (1977): Determination of polychlorinated dibenzofurans in tissues of patiens with 'Yusho'. *Food Cosmet. Toxicol.*, **15**, 195-198.
 - 17) Chen, P. H., K. T. Chang and Y. D. Lu (1981): Polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in the toxic rice-bran oil that caused PCB poisoning in Taichung. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 489-495.
 - 18) Shiraishi, H., N. H. Pilkington, A. Otsuki and K. Fuwa (1985): Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 585-590.
 - 19) Yasuhara, A. and M. Morita (1989): Formation of chlorodibenzofurans by thermal decomposition of vinylidene chloride polymer. *Chemosphere*, (in press).
 - 20) Matsumoto, M., M. Ando and Y. Ohta (1988): Mutagenicity of monochlorodibenzofurans detected in the environment. *Toxicol. Lett.*, **40**, 21-28.
 - 21) Hackmann, C. (1956): Erzeugung von Blasencarcinomen und Tumoren verschiedener Lokalisation bei Ratten durch Verfütterung von 2-Amino-3-Methoxy-Diphenylenoxyd und 2-Amino-Diphenylenoxyd. *Z. Krebsforsch.*, **61**, 45-54.
 - 22) Clayson, D. B., T. A. Lawson and J. A. S. Pringle (1967): The carcinogenic action of 2-amino-diphenylene oxide and 4-aminodiphenyl on the bladder and liver of the C57 X IF mouse. *Brit. J. Cancer*, **21**, 755-762.
 - 23) Lawson, T. A., K. M. Dawson and D. B. Clayson (1970): Acute changes in nucleic acid and protein synthesis in the mouse bladder epithelium induced by three bladder carcinogens. *Cancer Res.*, **30**, 1586-1592.
 - 24) Keumi, T., H. Yamada, H. Takahashi and H. Kitajima (1982): Regioselective preparation of 2- and 3-nitrodibenzofurans by the direct nitration of dibenzofuran. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 629-630.
 - 25) Cullinane, N. M. (1930): Investigations in the diphenylene oxide series. Part II. *J. Chem. Soc.*, 2267-2269.
 - 26) Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977): Mutagenicities of

- N-nitrosoamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.*, **48**, 121-130.
- 27) Ashby, J. and R. W. Tennant (1988): Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U. S. NCI/NTP. *Mutat. Res.*, **204**, 17-115.
- 28) Campbell, J., G. C. Crumplin, J. V. Garner, R. C. Garner, C. N. Martin and A. Rutter (1981): Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons: potent bacterial mutagens and stimulators of DNA repair synthesis in cultured human cells. *Carcinogenesis*, **2**, 559-565.
- 29) Rosenkranz, H. S., E. C. McCoy, R. Mermelstein and W. T. Speck (1981): A cautionary note on the use of nitroreductasedeficient strains of *Salmonella typhimurium* for the detection of nitroarenes as mutagens in complex mixtures including diesel exhausts. *Mutat. Res.*, **91**, 103-105.

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第1号 陸水域の富栄養化に関する総合研究—霞ヶ浦を対象域として—昭和51年度.(1977)
第2号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究—昭和51/52年度 研究報告.(1978)

(改称)

国立公害研究所研究報告

- ※第3号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus Chironomus (Diptera, Chironomidae). (1978)
(日本産ユスリカ科 Chironomus 属9種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
第4号 スモッグチャンパーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究—昭和52年度 中間報告.(1978)
第5号 芳香族炭化水素-窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究—昭和51, 52年度 研究報告.(1978)
第6号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅱ)—霞ヶ浦を中心として—昭和53年度.(1979)
※第7号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae(Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
※第8号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究—昭和52, 53年度 研究報告.(1979)
第9号 スモッグチャンパーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究—昭和53年度 中間報告.(1979)
第10号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究—昭和51~53年度 特別研究報告.(1979)
※第11号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
第12号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
※第13号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
—第1報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係
—第2報 その一支流に見出された Chironominae亜科の20種について)
※第14号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究—昭和53, 54年度 特別研究報告.(1980)
※第15号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究—昭和54年度 特別研究報告.(1980)
第16号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測.(1980)
※第17号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果—臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究—昭和53, 54年度 特別研究報告.(1980)
※第18号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調整, 分析および保証値)
※第19号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅲ)—霞ヶ浦(西浦)の湖流—昭和53, 54年度.(1981)
※第20号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅳ)—霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響—昭和53, 54年度.(1981)
※第21号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅴ)—霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価—昭和53, 54年度.(1981)
第22号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅵ)—霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量—昭和53, 54年度.(1981)
第23号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅶ)—湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究—昭和53, 54年度.(1981)
第24号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅷ)—富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究—昭和53, 54年度.(1981)
第25号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅸ)—Microcystis (藍藻類)の増殖特性—昭和53, 54年度.(1981)

- 第26号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X)――藻類培養試験法によるAGPの測定――昭和53, 54年度.(1981)
- 第27号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(XI)――研究総括――昭和53, 54年度.(1981)
- 第28号 複合大気汚染の植物影響に関する研究――昭和54, 55年度 特別研究報告.(1981)
- ※第29号 Studies on chironomid midges of the Tama River.(1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
――第3報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科Orthocladiinae 各種の記載と、その分布の下水汚染度との関係について
――第4報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載)
- ※第30号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究――昭和54, 55年度 特別研究報告.(1982)
- ※第31号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究――昭和55年度 特別研究報告.(1981)
- 第32号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究――環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究1)――昭和54年度 特別研究中間報告.(1982)
- ※第33号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究――大気運動と大気拡散過程のシミュレーション――昭和55年度 特別研究報告.(1982)
- ※第34号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究――昭和55年度 特別研究報告.(1982)
- 第35号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究.(1982)
- ※第36号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究――昭和55, 56年度 特別研究報告.(1982)
- ※第37号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究.(1982)
- 第38号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material.(1982)
(環境標準試料「池底質」の調整, 分析及び保証値)
- ※第39号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究――昭和56年度 特別研究報告.(1982)※
- ※第40号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究――昭和56年度 特別研究報告.(1983)
- ※第41号 土壌環境の計測と評価に関する統計学的研究.(1983)
- ※第42号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究.(1983)
- ※第43号 Studies on chironomid midges of the Tama River.(1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthocladiinae recovered from the main stream in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
――第5報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する6月の調査成績とユスリカ亜科に属する15新種等の記録
――第6報 多摩本流より6月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について
――第7報 多摩本流より3月に採集されたユスリカ科の各種について)
- 第44号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究――環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究2)――昭和54年度 特別研究中間報告.(1983)
- ※第45号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究――昭和53～55年度 特別研究総合報告.(1983)
- ※第46号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究――昭和54, 55年度 特別研究報告 第1分冊.(1983)
- ※第47号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究――昭和54, 55年度 特別研究報告 第2分冊.(1983)
- ※第48号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析.(1983)
- 第49号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究――昭和57年度 特別研究報告.(1984)
- ※第50号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(I)――霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価――昭和55～57年度 特別研究報告.(1984)

- ※第51号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅱ)―霞ヶ浦の物質循環とそれを支配する因子―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第52号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅲ)―霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第53号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅳ)―霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化と富栄養化―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第54号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅴ)―霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第55号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅵ)―富栄養化防止対策―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- 第56号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅶ)―湯ヶ湖における富栄養化とその防止対策―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第57号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(Ⅷ)―総括報告―昭和55～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第58号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究―昭和55～57年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第59号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―光化学スモッグチャンパーによるオゾン生成機構の研究―大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究―昭和55～57年度 特別研究報告(第1分冊)。(1984)
- 第60号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―光化学エアロゾル生成機構の研究―昭和55～57年度 特別研究報告(第2分冊)。(1984)
- 第61号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究1)―昭和55～57年度 特別研究報告(第3分冊)。(1984)
- ※第62号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究―昭和56～58年度 特別研究中間報告。(1984)
- ※第63号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究―昭和56年度 特別研究報告。(1984)
- ※第64号 複合大気汚染の植物影響に関する研究―昭和54～56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第65号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants―Part 1. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響―第1分冊)
- ※第66号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants―Part 2. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響―第2分冊)
- ※第67号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究―昭和54～56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第68号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究―昭和56～57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第69号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究。(1984)
- ※第70号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park. (1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
―第1部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究
―第2部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的、生態学的研究)
- ※第71号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析。(1984)
- 第72号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究2)―昭和55～57年度 特別研究報告(第4分冊)。(1985)
- ※第73号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究―昭和55～57年度 特別研究総合報告。(1985)
- ※第74号 都市域及びその周辺部の自然環境に係る環境指標の開発に関する研究。環境指標―その考え方と作成方法―昭和59年度 特別研究報告。(1984)
- 第75号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)
- 第76号 A study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- ※第77号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究―昭和58年度 特別研究報告。(1985)
- 第78号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明。(1985)
- 第79号 Studies on the method for long term environmental monitoring―Research report in 1980-1982. (1985)
(環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)
- ※第80号 海域における赤潮発生モデル化に関する研究―昭和57/58年度 特別研究報告。(1985)

- ※第81号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究—地方公共団体の制度運用を中心として。(1985)
- ※第82号 植物の大気環境浄化機能に関する研究—昭和57~58年度 特別研究報告。(1985)
- 第83号 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
(日本の湖沼のユスリカの研究)
- ※第84号 重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究—昭和57~59年度 特別研究総合報告。(1985)
- 第85号 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
(フリーラジカルの反応速度と分光学的及び熱力学的パラメーターに関する研究)
- 第86号 GC/MSスペクトルの検索システムに関する研究。(1986)
- 第87号 光化学二次汚染物質の分析とその細胞毒性に関する研究—昭和53~58年度 総合報告。(1986)
- ※第88号 都市域及びその周辺の自然環境等に係る環境指標の開発に関する研究Ⅱ。環境指標—応用例とシステム—昭和59年度 特別研究報告。(1986)
- 第89号 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
(LANDSATリモートセンシングによる霞ヶ浦の水質計測)
- ※第90号 ナショナルトラスト運動にみる自然保護にむけての住民意識と行動—知床国立公園内100平方メートル運動と天神崎市民地主運動への参加者の分析を中心として。(1986)
- 第91号 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
(人間による環境資源利用の経済分析—水環境と国立公園地域を対象にして)
- 第92号 アオコの増殖及び分解に関する研究。(1986)
- ※第93号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究(I)—昭和58~59年度 特別研究総合報告第1分冊。(1986)
- ※第94号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究(Ⅱ)—昭和58~59年度 特別研究総合報告第2分冊。(1986)
- ※第95号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(I)—汚濁負荷の発生と流出・流達—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第96号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅱ)—水草帯・河口域・池沼の生態系構造と機能—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第97号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅲ)—水路及び土壌による水質の浄化—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第98号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅳ)—自然浄化機能を活用した処理技術の開発と応用—昭和58~59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第99号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究—昭和56~59年度 特別研究総合報告。(1986)
- ※第100号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究—特定汚染選択的検出法及び高感度分析技術の開発—昭和58~60年度 特別研究報告。(1986)
- 第101号 複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究—昭和57~60年度 特別研究報告。(1986)
- ※第102号 地球規模大気質変動に関する予備的研究。(1986)
- 第103号 環境調和型技術としての電気自動車の評価に関する基礎的研究。(1987)
- ※第104号 Studies on chironomid midges in lakes of the Akan National Park. (1987)
(北海道阿寒国立公園の湖におけるユスリカ相の研究)
- ※第105号 畑地土壌における水分と諸元素の動態。(1987)
- ※第106号 筑波研究学園都市における景観評価と景観体験に関する研究。(1987)
- 第107号 遠隔計測による環境動態の評価手法の開発に関する研究—昭和59~60年度 特別研究報告。(1987)
- 第108号 植物の大気環境浄化機能に関する研究—昭和57~60年度 特別研究総合報告。(1987)
- ※第109号 地域環境評価のための環境情報システムに関する研究。(1987)
- 第110号 海域における赤潮発生のモデル化に関する研究—昭和59~60年度 特別研究総合報告。(1987)
- ※第111号 Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the study of silicate minerals. (1987)
(ケイ酸塩鉱物研究へのX線光電子分光法の応用)
- 第112号 光化学汚染大気中における有機エアロゾルに関する研究—有機エアロゾルの生成と挙動に関する研究—昭和58~61年度 特別研究報告。(1988)
- 第113号 光化学汚染大気中における有機エアロゾルに関する研究—昭和58~61年度 特別研究総合報告。(1988)
- 第114号 水界生態系に及ぼす有害汚染物質の影響評価に関する研究—昭和60~61年度 特別研究報告。(1988)

- ※第115号 複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究—昭和57～61年度 特別研究総合報告。(1988)
- ※第116号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(V)—汚濁負荷の発生と流出・流達—昭和58～61年度 特別研究報告。(1988)
- ※第117号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(VI)—湖沼の生態系構造と自然浄化—昭和60～61年度 特別研究報告。(1988)
- ※第118号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(VII)—自然浄化機能を活用した水路・土壌による浄化と処理技術の開発—昭和60～61年度 特別研究報告。(1988)
- ※第119号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(VIII)—自然浄化システムの評価方法—昭和60～61年度 特別研究報告。(1988)
- ※第120号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(IX) 昭和58～61年度 特別総合研究報告(1988)
- 第121号 Studies on the chironomid midges of lakes in Southren Hokkaido. (1988)
(北海道南部の湖におけるユスリカ相の研究)
- 第122号 擬似ランダム変動CWライダーの開発とフィールド観測への応用。(1989)
- 第123号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究(II)—離島及び山岳地における大気汚染成分濃度とその変動—昭和58～62年度 特別研究報告。(1989)
- 第124号 環境科学研究用に開発したニホンウズラの遺伝学的及び微生物学的特性。(1989)
- 第125号 Chironomidae of Japan: checklist of species recorded, key to males and taxonomic notes. (1989)
(日本及び東アジア産ユスリカ科のカタログと雄成虫の検索表)
- 第126号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究(III)—摩周湖における水試料の代表性と底質中の汚染記録—昭和58～62年度 特別研究報告。(1989)
- 第127号 新潟県六日町における消費用揚水に伴う地盤沈下性状。(1990)

(改称)

国立環境研究所研究報告

- 第128号 Development of an intelligent decision support system for environmental modeling and planning. (1991)
(環境のモデリングと計画のための知的意思決定支援システムの開発)
- 第129号 先端技術における化学環境の解明に関する研究(I)—塩化ジベンゾフランとダイオキシン—昭和62年度～平成元年度 特別研究報告。(1991)

※ 残部なし

Report of Special Research Project of the National Institute for Environmental Studies:

- No. 1* Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura—Progress report in 1976. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants—Progress report in 1976-1977. (1978)

Research Report from the National Institute for Environmental Studies*:

- ※No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system—Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on cultured cells—Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura—Progress report in 1977-1978. (1979)
- ※No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- ※No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants—Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system—Progress report in 1978. (1979)
- No. 10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants—Progress report in 1976-1978. (1979)
- ※No. 11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No. 12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- ※No. 13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- ※No. 14* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem—Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※No. 15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants—Research report in 1979. (1980)
- No. 16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- ※No. 17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes—Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region—Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※No. 18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- ※No. 19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Lake current of Kasumigaura (Nishiura)—1978-1979. (1981)
- ※No. 20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment—1978-1979. (1981)
- ※No. 21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura—1978-1979. (1981)
- No. 22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura—1978-1979. (1981)
- No. 23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Applicability of trophic state indices for lakes—1978-1979. (1981)
- No. 24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources—1978-1979. (1981)
- No. 25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis*—1978-1979. (1981)

* Starting with Report No. 3, the series title was changed.

- No. 26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—
Determination of argal growth potential by algal assay procedure—1978-1979.
(1981)
- No. 27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Summary of
researches—1978-1979. (1981)
- No. 28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Progress report in
1979-1980. (1981)
- ※No. 29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey
and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- ※No. 30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment — Progress
report in 1979-1980. (1982)
- ※No. 31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air
pollutants—Research report in 1980. (1981)
- No. 32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen
oxides system—Progress report in 1979—Research on the photochemical
secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere
(Part 1). (1982)
- ※No. 33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the
coastal region—Simulation of atmospheric motions and diffusion processes —
Progress report in 1980. (1982)
- ※No. 34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental
pollution—Research report in 1980. (1982)
- No. 35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- ※No. 36* Studies on the method for long term environmental monitoring—Progress report
in 1980-1981. (1982)
- ※No. 37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy
—The Evaluation Laboratory of Man-Environment Systems. (1982)
- No. 38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference
material. (1982)
- ※No. 39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental
pollution—Research report in 1981. (1983)
- ※No. 40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air
pollutants—Research report in 1981. (1983)
- ※No. 41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical
condition of soil—with special reference to heavy metals—. (1983)
- ※No. 42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics
of mud transportation. (1983)
- ※No. 43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main
stream in June, with description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from
the main stream in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
- No. 44* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides
system—Progress report in 1979—Research on the photochemical secondary
pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- ※No. 45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Outlines of
special research project—1978-1980. (1983)
- ※No. 46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Research report
in 1979-1980, Part 1. (1983)
- ※No. 47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Research report
in 1979-1980, Part 2. (1983)
- ※No. 48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No. 49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental
pollution—Research report in 1982. (1984)
- ※No. 50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Estimation
of input loading of Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- ※No. 51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—The func-
tion of the ecosystem and significance of sediment in nutrient cycle in Lake
Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- ※No. 52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Enclosure
experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura—1980-

1982. (1984)
- No. 53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Seasonal changes of the biomass of fishes and crustacia in Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- ※No. 54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- No. 55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Measures for eutrophication control—1980-1982. (1984)
- No. 56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Eutrophication in Lake Yunoko—1980-1982. (1984)
- ※No. 57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Summary of researches—1980-1982. (1984)
- ※No. 58* Studies on the method for long term environmental monitoring — Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No. 59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system — Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber—Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds — Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)
- No. 60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Formation mechanisms of photochemical aerosol—Research report in 1980-1982, Part 2. (1984)
- No. 61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system — Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1) — Research report in 1980-1982, Part 3. (1984)
- ※No. 62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems — Progress report in 1980-1983. (1984)
- ※No. 63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment — Progress report in 1981. (1984)
- ※No. 64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Final report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
- ※No. 66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
- ※No. 67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques—Project research report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil—Research report in 1981-1983. (1984)
- ※No. 69 Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji — Basic research report. (1984)
- ※No. 70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※No. 71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No. 72* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere — Research report in 1980-1982, Part 4. (1985)
- ※No. 73* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Final report in 1980-1982. (1985)
- ※No. 74* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality—Environmental indices—Basic notion and formation. (1984)
- No. 75 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
- No. 76 A study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
- ※No. 77* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution—Research report in 1983. (1985)
- No. 78* Study on residents' role in conserving the living environment. (1985)
- No. 79 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report in 1980-1982. (1985)

- ※No. 80* Modeling of red tide blooms in the coastal sea—Research report in 1982-1983. (1985)
- ※No. 81* A studies on effects of implementing environmental impact assessment procedure —With particular reference to implementation by local governments. (1985)
- ※No. 82* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants—Research report in 1982-1983. (1985)
- No. 83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
- ※No. 84* A comprehensive study on the development of assessment techniques for health effects due to environmental heavy metal exposure—Final report in 1982-1984. (1985)
- No. 85 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
- No. 86* A novel retrieval system for identifications of unknown mass spectra. (1986)
- No. 87* Analysis of the photochemical secondary pollutants and their toxicity on cultured cells—Research report in 1978-1983. (1986)
- ※No. 88* A comprehensive study on the development of indices systems for urban and suburban environmental quality II —Environmental indices—Applications and systems. (1986)
- No. 89 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
- ※No. 90* National trust movement in Japanese nature conservation — Trustworthy or illusion? (1986)
- No. 91 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
- No. 92* Studies on the growth and decomposition of water-bloom of Microcystis. (1986)
- ※No. 93* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil(I)—Research report and papers(Part 1) in 1983-1984. (1986)
- ※No. 94* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil(II)—Research report and papers(Part 2) in 1983-1984. (1986)
- ※No. 95* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(I)—Drainage and flowing down of pollutant load— Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 96* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(II)—Structure and function of the ecosystems of littoral zone — Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 97* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(III)—Self-purification in stream and soil—Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 98* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(IV)—Development and application of wastewater treatment technologies utilizing self-purification ability—Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 99* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems—Final report in 1981-1984. (1986)
- ※No. 100* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions—Development of highly sensitive and selective analytical methods for measurement of pollutants in the background regions—Progress report in 1983-1985. (1986)
- No. 101* Experimental studies on the effects of gaseous air pollutants in combination on animals. (1986)
- ※No. 102* A review on studies of the global scale air quality perturbation. (1986)
- No. 103* Technological assessment of electric vehicle from the environmental protection viewpoint. (1987)
- ※No. 104 Studies on chironomid midges in lakes of the Akan National Park. (1987)
Part I. Distribution of chironomid larvae in Lake Akan, Lake Panke and Lake Kussyaro.
Part II. Chironomid midges collected on the shore of lakes in the Akan National Park, Hokkaido(Diptera, Chironomidae)
- ※No. 105* Formulation of the dynamic behavior of water and solites leaching through the field soil. (1987)
- ※No. 106* Appraised landscape and thier environmental value in Tsukuba Science City. (1987)
- No. 107* Studies on remote sensing for spatial and temporal analysis of environment— Research report in 1984-1985. (1987)

- No. 108* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants—Final report in 1982-1985. (1987)
- ※No. 109* Studies on environmental information system for regional environmental evaluation. (1987)
- No. 110* Modeling of red tide blooms in the coastal sea —, Final report in 1984-1985. (1987)
- ※No. 111 Application of X-ray photoelectron spectroscopy to the study of silicate minerals. (1987)
- No. 112* Study on the organic aerosols in the photochemically polluted air — Studies on formation and behavior of organic aerosols — Research report in 1983-1986. (1988)
- No. 113* Study on the organic aerosols in the photochemically Polluted air — Final report in 1983-1986. (1988)
- No. 114* Studies on the assessment of the hazard of chemical substances to aquatic ecosystems — progress report in 1985-1986. (1988)
- ※No. 115* Experimental studies on the effects of gaseous air pollutants in combination on animals — Final report in 1982-1986. (1988)
- ※No. 116* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (V)—Drainage and flowing down of pollutant load— Research report in 1983-1986. (1988)
- ※No. 117* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (VI)—Lake restoration and ecosystems— Research report in 1983-1986. (1988)
- ※No. 118* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (VII)—Use of self-purification in soil and stream, and development of biological waste water treatment technology— Research report in 1985-1986 (1988)
- ※No. 119* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (VIII)—Evaluation methods of self-purification water treatment system — Research report in 1985-1986. (1988)
- ※No. 120* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (IX)—Final report in 1983-1986. (1988)
- No. 121 Studies on the chironomid midges of lakes in Southern Hokkaido. (1988)
- No. 122* Development of pseudo-random modulation CW lidar and its application to field measurements. (1989)
- No. 123* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions (II) — Atmospheric pollutants on the remote island and mountains: concentrations and variations— Research report for FY 1983-1987. (1989)
- No. 124* Studies on the genetic and microbiological characteristics of the Japanese quail exploited for the research of environmental science. (1989)
- No. 125 Chironomidae of Japan: checklist of species recorded, key to males and taxonomic notes. (1989)
- No. 126* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions (III) — Representativeness of water samples and historical change of pollutants in sediment of Lake Mashu— Research report for FY 1983-1987. (1990)
- No. 127* Land subsidence caused by pumping for melting snow in Muika-machi, Niigata Prefecture. (1990)
- No. 128 Development of an intelligent decision support system for environmental modeling and planning. (1991)
- No. 129* Studies for a systematic evaluation of chemosphere under highly advanced technologies (I) — Chlorinated dibenzofurans and chlorinated dibenzodioxins — Research report for FY 1987-1989. (1991)

* in Japanese
 ※ out of stock

編集小委員会

委員長	相馬光之	委員	須賀伸介
委員長代理	高松武次郎	〃	岡本研作
委員	渡邊和夫	〃	鈴木明
〃	中野安則	〃	泉克幸
〃	中根英昭	〃	高村典子
〃	高村健二	〃	井上元苗
〃	松本幸雄	事務局	古田早
〃	兜真徳	〃	松井文

【平成2年10月23日編集小委員会受付】

【平成2年12月3日編集小委員会受理】

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

No. 129

国立環境研究所研究報告 第129号
(R-127-'91)

平成3年3月25日発行

発行 環境庁 国立環境研究所

〒305 茨城県つくば市小野川16番2

印刷 株式会社 イセブ

〒305 茨城県つくば市天久保2-11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies
Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan
March 1991