

2,2',5,5'-四塩素化ビフェニル (CB52) のウサギ肝 ミクロゾームによる代謝

太田, 千穂

中村学園大学栄養科学部食品衛生学研究室

原口, 浩一

第一薬科大学健康化学教室

加藤, 善久

徳島文理大学香川薬学部薬物動態学講座

遠藤, 哲也

北海道医療大学薬学部衛生薬学講座

他

<https://doi.org/10.15017/14915>

出版情報：福岡醫學雑誌. 100 (5), pp.200-209, 2009-05-25. 福岡医学会

バージョン：

権利関係：



2,2',5,5'-四塩素化ビフェニル (CB52) の ウサギ肝ミクロソームによる代謝

¹⁾中村学園大学栄養科学部 食品衛生学研究室

²⁾第一薬科大学 健康化学教室

³⁾徳島文理大学香川薬学部 薬物動態学講座

⁴⁾北海道医療大学薬学部 衛生薬学講座

太田千穂¹⁾, 原口浩一²⁾, 加藤善久³⁾,
遠藤哲也⁴⁾, 古賀信幸¹⁾

Metabolism of 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (CB52) by Rabbit Liver Microsomes

Chiho OHTA¹⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Yoshihisa KATO³⁾, Tetsuya ENDO⁴⁾ and Nobuyuki KOGA¹⁾

¹⁾Faculty of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University,
5-7-1, Befu, Johnan-ku, Fukuoka 814-0198

²⁾Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1
Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511

³⁾Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri
University, 1314-1, Shido, Sanuki, Kagawa 769-2193

⁴⁾Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences
University of Hokkaido, 1757, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293

Abstract Our preceding studies have reported that 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (tetraCB)(CB52) is mainly metabolized to 3-hydroxy (OH)-metabolite by phenobarbital (PB)-inducible cytochrome P450 (P450) isoforms such as CYP2B1 and CYP2B18. In this study, the metabolism of CB52 by liver microsomes of untreated and PB-treated rabbits was investigated. Rabbit liver microsomes produced mainly 3-OH- and 4-OH-metabolites (M-1 and M-2) at an equal extent and two other metabolites (M-3 and M-4) and also that phenobarbital (PB) treatment accelerated the formation of all these metabolites. M-3 was assumed to OH-tetraCB by GC-MS. Another metabolite, M-4, was determined to 3,4-diOH-CB52 by GC-MS and ¹H-NMR. Addition of antiserum against CYP2B4, a constitutive and PB-inducible rabbit P450 isoform, to a microsomal incubation system resulted in almost complete inhibition of the formation of 3-OH-, 4-OH- and 3,4-diOH-metabolites. These results suggest that CYP2B4 plays an important role in CB52 metabolism in rabbit liver.

はじめに

PCB はカネミ油症の原因物質である²¹⁾とともに世界的な環境汚染物質としても有名である。PCB は脂溶性が高いことから、経口摂取後、極めて高い効率で小腸から吸収される。PCB のうち、置換塩素数が 4 個以下の PCB は、肝小胞体に局在するチトクロム P450 (P450) によって容易に代謝され、代謝物として主に胆汁を介して糞中に

排泄されるが、塩素数が 5 個以上になると代謝されにくくなり、肝、脂肪組織および血液中に残留することになる³³⁾。PCB 代謝物の主なものは、一水酸化 (OH) 体であるが、2 次代謝物として、二水酸化 (diOH) 体、メチルスルホン (MeSO₂) 体および親 PCB から塩素が 1 個脱離した OH 体などが見つかっている²⁰⁾。また、これらの代謝物の生成には、3 つの P450 サブファミリーに属する P450 (CYP1A, CYP2A および CYP2B) が関

与することが明らかになっている^{1)12)13)16)~18)}。このうち、CYP1AおよびCYP2AはPCB異性体のうち主に3, 4, 5位に塩素置換されたものを、一方、CYP2Bに属するP450は2, 5位に塩素置換されたものをよく代謝し、OH体を生成する。

2, 2', 5, 5'-四塩素化ビフェニル(tetraCB)(CB52)は、カネミ油症原因油であるカネクロール400の主成分の一つ²⁵⁾で、フェノバルビタール(PB)型の肝酵素誘導能を有するPCB異性体の原型³⁶⁾²⁹⁾といえるものである。当研究室では、ラット、モルモットおよびハムスター肝ミクロゾーム(Ms)を用いてCB52の代謝を調べた結果、いずれの動物でも3-OH体が主代謝物であること、また、この生成はPB前処理で顕著に増加することを明らかにした¹⁹⁾。さらに、CB52代謝に関与するP450分子種についても検討を加え、ラットCYP2B1¹²⁾、ラットCYP2B2¹²⁾、モルモットCYP2B18¹⁶⁾およびハムスターP450HPB-1¹⁸⁾が3-水酸化反応を、また、ハムスターCYP2A8¹⁷⁾が4-水酸化反応をそれぞれ触媒することを明らかにした。

一方、Gardnerらは、CB52を投与したウサギ尿中から3-OH体に加え、4-OH体およびtrans-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy体を検出している⁵⁾。この報告は、PCB代謝において中間体として3,4-epoxide体の存在を示唆した最初の報告である。また、この事実は、ウサギが他の実験動物と異なるPCB代謝酵素系を有することを示唆している。そこで、本研究ではウサギ肝MsによるCB52の代謝を調べるとともに、代謝に関与するP450分子種を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB52および代謝物

CB52および4-OH-CB52は既報¹¹⁾¹⁷⁾¹⁹⁾に従い、合成した。3-OH-CB52はCB52(200mg/kg)をラット腹腔内に1回投与し、得られた糞より精製した⁸⁾。

(2) 動物の薬物処理および肝Msの調製

7匹の雄性日本白色種ウサギ(体重3.0~4.5kg)を用いた。このうち4匹を未処理群、3匹をPB処理群に分け、PB処理群には飲料水として

0.1% (w/v) PB水溶液を6日間自由に摂取させた。pentobarbitalによる麻酔下、ウサギ肝を摘出し、常法により肝Msを調製した³⁶⁾。なお、動物の取り扱いは、「中村学園大学における実験動物のための指針」を遵守し、行った。

(3) ウサギ肝P450(CYP2B4)抗血清の調製

まず、PB前処理ウサギ肝Msより、1種類のP450(CYP2B4)を既報¹⁸⁾¹⁶⁾に準じて精製した。すなわち、PB前処理ウサギ肝(110g湿重量)から肝Msを調製し、これをコール酸で可溶化後、 ω -aminoctyl-Sepharose 4Bカラム、hydroxyapatite、DEAE-Bio gel A agarose、CM-Sephadex C-50の各カラムを用いて精製し、1種類のP450分子種を得た。この精製標品は比含量10.3nmol/mg protein、収量1.6%であった。さらにN-末端アミノ酸20個の配列を調べたところ、既報²⁾のCYP2B4と一致した。以下、抗血清を得るために、精製したCYP2B4をRibi adjuvant(RIBI ImmunoChem Research Inc., USA)に懸濁し、3匹のモルモット背中皮下に注射した。5週間後、モルモットの頸動脈より全血を採取し、血清分離剤(栄研製)により、抗血清を得た^{16)~18)}。

2. ウサギ肝Msによる代謝

ウサギ肝MsによるCB52の代謝は既報¹⁹⁾に準じて行った。すなわち、40μM CB52あるいはそのOH代謝物(3-OHあるいは4-OH体)をNADPH生成系(0.33mM NADP, 5mM glucose-6-phosphate(G-6-P), G-6-P脱水素酵素1unit), 6mM MgCl₂, 牛血清アルブミン(0.8mg/ml)およびウサギ肝Ms(1mg protein)を、100mM HEPES緩衝液(pH7.4)とともに合計1mlとして、37°Cで20分間インキュベート後、代謝物をchloroform-methanol(2:1)1mlおよびn-hexane4mlで3回ずつ抽出した。抽出液は濃縮乾固し、N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamideによるトリメチルシリル(TMS)化あるいはdiazomethaneによるメチル化後、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー(GC-ECD)、あるいは質量分析計付GC(GC-MS)に付した。代謝物の定量は、M-3を除き、それぞれCB52代謝物の検量線を用いてGC-ECDにより行った。GC-ECDの条件は次の通りである。分析機器、

ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製)；カラム, DB-1 fused silica キャピラリーカラム ($15\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$, $0.33\text{ }\mu\text{m}$ 膜厚, J&W Scientific 製)；オーブン温度, 200°C ；注入口温度, 250°C ；検出器温度, 250°C ；キャリアーガス, N_2 (1 ml/min)。

一方, 代謝物の分子量は, 質量分析器付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いて, EI モードで測定した。GC-MS 分析条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica キャピラリーカラム ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$, $0.33\text{ }\mu\text{m}$ 膜厚, J&W Scientific 製)；オーブン温度, 210°C ；注入口温度, 250°C ；検出器温度, 280°C ；キャリアーガス, He (1 ml/min)。

3. 3,4-diOH-CB52 の分離精製

500 ml の大容量の反応液, すなわち, $40\text{ }\mu\text{M}$ 3-OH-CB52 を基質として用い, 前述のように, 牛血清アルブミン (0.8 mg/ml), NADPH 生成系, 6 mM MgCl_2 , PB 前処理ウサギ肝 Ms (500 mg protein) とともに $100\text{ mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)}$ で, 37°C , 1 時間インキュベーションを行った。その後, 100 ml の chloroform-methanol (2 : 1) と 400 ml の n-hexane を加えて 2 回抽出し, さらに diazomethane でメチル化後, HPLC により M-4 を分離精製した。HPLC 条件は次の通りである。カラム, ODS カラム ($20\text{ mm i.d.} \times 250\text{ mm}$, YMC 製)；プレカラム, ODS プレカラム ($20\text{ mm i.d.} \times 50\text{ mm}$, YMC 製)；流速, 5 ml/min ；溶離液, methanol-H₂O (9 : 1)。M-4 のメチル誘導体は保持時間 25.9 min に溶出され, 最終的に, 収量は 1.5 mg であった。M-4 のメチル誘導体の化学構造は GC-MS および ¹H-NMR により, 3,4-dimethoxy (diMeO)-CB52 であると決定された。

MS spectrum ; m/z (relative abundance, %) : 354 (60, $M^+ + 4$), 352 (100, $M^+ + 2$), 350 (80, M^+), 335 (45, $M^+ - 15$), 307 (30, $M^+ - 43$), 292 (30, $M^+ - 58$), 272 (36, $M^+ - 78$)。

¹H-NMR δ (ppm) : 3.954 (3H, s, 3 or 4-MeO), 3.983 (3H, s, 4 or 3-MeO), 7.255 (1H, s, 6-H), 7.430 (1H, d, $J=2.52\text{ Hz}$, 6'-H), 7.523 (1H, dd, $J=2.52\text{ Hz}$, 8.57 Hz , 4'-H), 7.593 (1H,

d, $J=8.57\text{ Hz}$, 3'-H).

4. 抗 CYP2B4 抗血清の添加による代謝阻害

モルモットで調製した抗 CYP2B4 抗血清を $100\text{ mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)}$ 中でウサギ肝 Ms とともに, 30°C で 30 分間インキュベート後, CB52 および NADPH 生成系を添加して反応をスタートし, さらに 37°C で 20 分間インキュベートした。反応液は, 上記と同様に有機溶媒で抽出し, GC-ECD に付した。

5. その他

ウサギ肝 Ms のタンパク質の定量は, Lowry ら²³⁾の方法を用いて行った。なお, 標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。P450 含量は Omura と Sato²⁸⁾ の方法により測定した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli²²⁾ の方法により, また, ウェスタンプロットは Guengerich ら⁷⁾ の方法により行った。ウサギ肝 Ms 中 CYP2B4 タンパクの免疫染色は Konica immunostaining キット (生化学工業) を用いて行った。N-末端アミノ酸の測定は, Model 473A gas phase sequencer (Applied Biosystems, USA) を用いてエドマン分解法により行った¹⁸⁾。

¹H-NMR スペクトルの測定は, 500 MHz JEOL GSX-500 spectrometer (日本電子製) により行った。試料は acetone-*d*₆ に溶解し, また, 内部標準物質として tetramethylsilane を用いた。

実験結果

1. ウサギ肝 Ms による CB52 の代謝

Fig. 1 には, ウサギ肝 Ms により生成された CB52 代謝物の TMS 誘導体のガスクロマトグラムを示す。代謝物と思われる 4 種類のピーク (M-1, M-2, M-3 および M-4) が, それぞれ保持時間 6.75 min , 7.07 min , 7.37 min および 12.77 min に観察された。標品の保持時間との比較から, M-1 および M-2 は, これまでに報告している 3-OH-CB52 および 4-OH-CB52 の TMS 誘導体であることが明らかとなった¹⁹⁾。なお, 両 OH 体以外に, 新たに 2 つの代謝物ピーク (M-3 および M-4) が観察された。M-3 の TMS 誘導体は, M-2 のすぐ後ろに検出されたのに対し, M-4 の

TMS誘導体は保持時間が、他3者よりずっと長かった。

次に、M-1とM-2につき、それぞれ標品のTMS誘導体の検量線から定量を試み、既報の実験動物の結果と比較した。Table 1に示すように、未処理ウサギ肝Msにより、M-1とM-2が1.1:1でほぼ同程度生成された。未処理ウサギ肝Msでの代謝パターンおよび代謝活性の強さは、ハムスターとよく似ていた。

一方、PB前処理ウサギ肝Msでは、M-1の生

成が未処理ウサギ肝Msの2.4倍に、また、M-2の生成も未処理ウサギ肝の2.4倍に増加した。このようなPB前処理によるM-1(3-OH体)の顕著な増加はラット、ハムスターおよびモルモットのいずれとも共通していたが、M-2(4-OH体)の増加に関しては、ハムスターと類似していた。

さらに、M-1とM-2の生成量の相関関係を調べた。その結果、Fig. 2のように、両代謝物の生成量は非常によく相関しており、相関係数は0.889で有意であった。この結果から、3-OH体および4-OH体は同一のP450分子種によって生

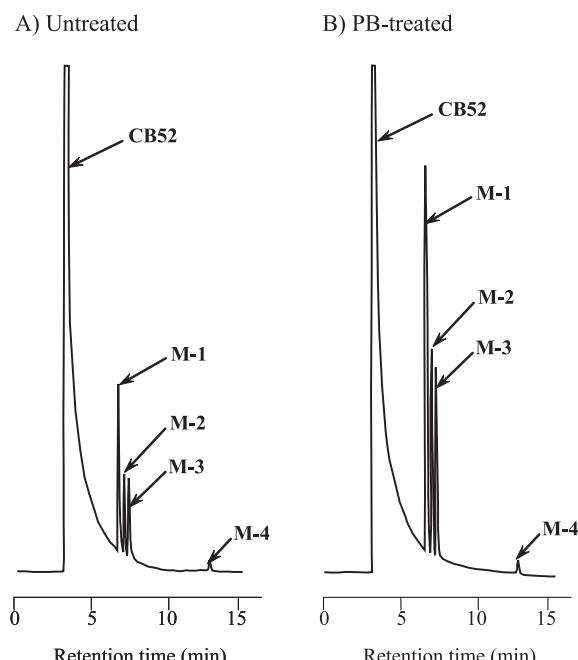


Fig. 1 Gas chromatograms of the trimethylsilylated derivatives of CB52 metabolites formed by liver microsomes of untreated (A) and PB-treated (B) rabbits.

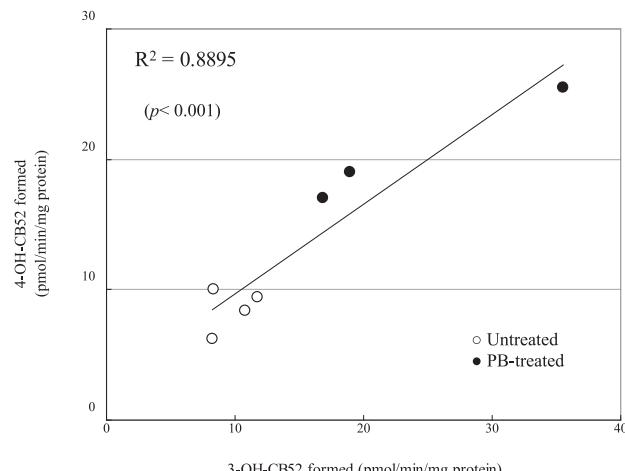


Fig. 2 Correlation of 3-OH- and 4-OH-CB52 formed by liver microsomes of untreated and PB-treated rabbits.

Table 1 Metabolism of CB52 by liver microsomes of untreated and PB-treated rabbits, rats, hamsters and guinea pigs

Animal	Treatment	No.	Metabolite formed (pmol/min/mg protein)	
			3-OH	4-OH
Rabbit	None	4	9.8 ± 1.7(100)	8.5 ± 1.7(100)
	PB	3	23.8 ± 10.2(243)	20.5 ± 4.4(241)
Rat ¹⁹⁾	None	4	N.D.	N.D.
	PB	4	324.0 ± 15.4	N.D.
Hamster ¹⁹⁾	None	4	6.3 ± 0.5(100)	5.6 ± 0.3(100)
	PB	4	20.1 ± 0.2(319)	11.1 ± 0.3(198)
Guinea pig ¹⁹⁾	None	4	8.4 ± 0.9(100)	N.D.
	PB	4	19.3 ± 2.2(230)	1.1 ± 0.1

N.D., not detected.

Each value represents the mean ± S.D. of three or four animals and those in parentheses are the relative ratio to the control.

Data in rats, hamsters and guinea pigs were cited from the reference (19).

成されていることが示唆された。

2. CB52 代謝物生成の経時的変化

M-1 および M-2 とともに生成された M-3 と M-4 が代謝物であるかどうかを確認するために、インキュベーション時間を 60 分間まで延ばして、これらの代謝物の経時的な増減を調べた。Fig. 3 に示すように、インキュベーション時間 10 分後までは M-1, M-2 および M-3 は、いずれもほぼ直線的に増加したが、M-1 については 30 分後から、わずかに減少が見られた。一方、M-4 は 10 分の遅れで増加し始め、その後 60 分間わずかずつであるが増加した。これらの結果から、M-3 と M-4 はいずれも CB52 代謝物であることが示唆された。

3. M-3 と M-4 の化学構造

M-3 および M-4 の分子量を調べるために、これらを diazomethane でメチル化後、GC-MS にかけた。その結果、M-3 のメチル誘導体は分子量 320 で、塩素 4 個を含む同位体ピークが観察されたことから、methoxy (MeO)-tetraCB であることが判明した（データ未掲載）。一方、M-4 のメ

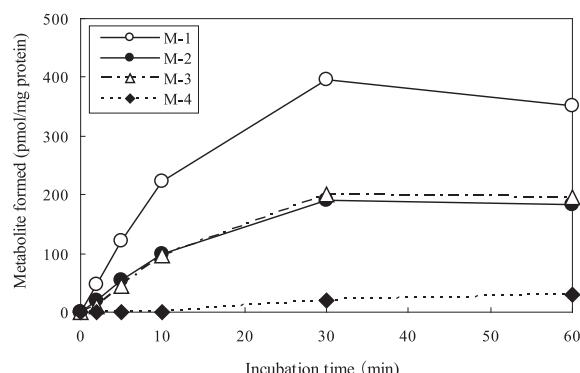


Fig. 3 Time course of CB52 metabolism by liver microsomes of PB-treated rabbits.

Table 2 N-Terminal amino acid sequence of a rabbit P450 purified in this study

P450	Animal	Amino acid residue					
		1	5	10	15	20	
This study	(rabbit)	MEFS	LLLLL	AFLAG	LLLLL	F	
CYP2B4 ²⁾	(rabbit)	MEFS	LLLLL	AFLAG	LLLLL	F	
CYP2B1 ³⁷⁾	(rat)	MEPS	I LLLL	ALLVG	FLLLL	V	
P450HPB-1 ¹⁸⁾	(hamster)	MEPS	TLLLL	TLLLS	FLVLL	V	
CYP2B18 ²⁶⁾	(guinea pig)	MELS	LLLFL	ALLLG	LLLLL	F	

The abbreviations used are as follows : M, methionine ; E, glutamic acid ; F, phenylalanine ; P, proline ; S, serine ; L, leucine ; I, isoleucine ; A, alanine ; G, glycine ; T, threonine ; V, valine

チル誘導体は、分子量 350 であり、同様に塩素 4 個を含む同位体ピークが観察されたことから、diMeO-tetraCB であることが明らかになった（実験方法 3. 参照）。

次に、M-4 の¹H-NMR を測定するため、3-OH-CB52 を基質として 500 ml の反応液を用いてインキュベーションを行った。M-4 を有機溶媒で抽出後、HPLC で分離精製した。このメチル誘導体につき¹H-NMR を測定した結果、実験方法 3. に示すように、3-MeO および 4-MeO 基に由来する 2 本の singlet と 6 位プロトン由来の singlet が、それぞれ 3.95 ppm, 3.98 ppm および 7.26 ppm に検出された。また、2,5-二塩素置換された芳香環の 3 つのプロトンに由来するシグナルが、7.43 ppm (doublet), 7.52 ppm (doublet) および 7.59 ppm (singlet) に検出された。以上の結果から、最終的に、M-4 は 3,4-diOH-CB52 であることが明らかとなった。

4. ウサギ CYP2B4 の精製

PB 前処理ウサギ肝 Ms より、P450 分子種の精製を試みた。最終的に、比含量 10.3 nmol/mg protein で、見かけの分子量 50,000 の P450 分子

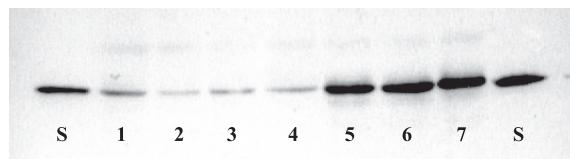


Fig. 4 Immunoblot of rabbit liver microsomes with anti-serum against CYP2B4. Lanes S contain purified rabbit CYP2B4 (1 μg protein). Lanes 1-4 and 5-7 contain liver microsomes (10 μg protein each) from four untreated and three PB-treated rabbits, respectively.

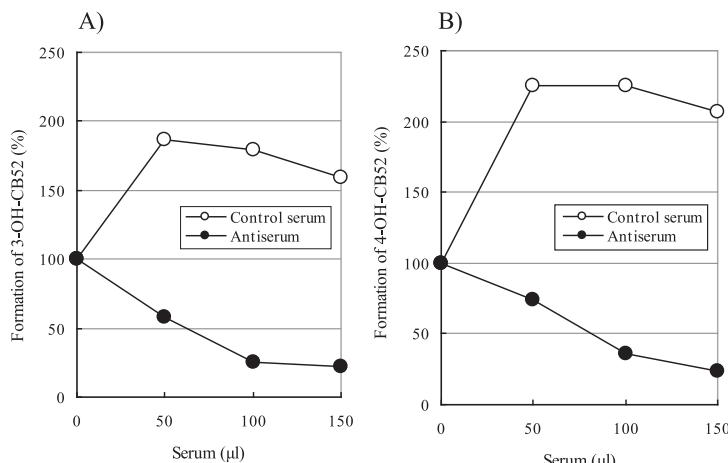


Fig. 5 Effect of antiserum against CYP2B4 on the formation of 3-OH- and 4-OH-metabolites from CB52 with liver microsomes of PB-treated rabbits. Open and closed circles indicated control serum and antiserum raised against CYP2B4, respectively. Each point represents the mean of duplicate determinations.

種1種類を得ることができた。本P450のN-末端アミノ酸20個を調べたところ、Table 2に示すように、これまでに報告されたPB誘導性P450のうち、CYP2B4²⁾と完全に一致したことから、以下、本P450をCYP2B4とした。

本P450に対する抗血清をモルモットで作製後、これを用いて未処理およびPB前処理ウサギ肝Ms中のCYP2B4の検出を試みた。ウサギ肝MsをSDS-ポリアクリラミド電気泳動およびウェスタンブロット後、免疫染色したところ、Fig. 4に示すように、未処理ウサギにおいて、CYP2B4タンパクと分子量が一致するタンパクバンドが1本検出された。また、PB前処理ウサギでは同じタンパクバンドが著しく増加していた。これらの事実から、これまでの報告のように、CYP2B4が常在型であり、かつPB誘導性であることが確認された。さらに、PB前処理によるCYP2B4タンパクの増加が、Table 1に示したM-1(3-OH体)およびM-2(4-OH体)の生成活性の増加とよく相関していることから、両代謝物の生成にCYP2B4が関与していることが示唆された。

5. 抗CYP2B4抗血清添加によるCB52代謝阻害

CB52代謝におけるCYP2B4の関与の程度を明らかにするため、抗CYP2B4抗血清を用いて代謝阻害を試みた。その結果、Fig. 5に示すように、PB前処理MsによるM-1(3-OH体)およびM-2(4-OH体)の生成は抗血清150 μlの添加で、

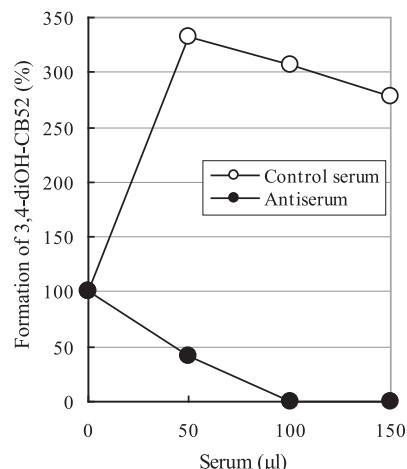


Fig. 6 Effect of antiserum against CYP2B4 on the formation of 3,4-diOH-CB52 from 3-OH-CB52 with liver microsomes of PB-treated rabbits. Open and closed circles indicated control serum and antiserum raised against CYP2B4, respectively. Each point represents the mean of duplicate determinations.

いずれも約90%が阻害された。また、M-3とM-4の生成も、定量的ではないものの、本抗血清の添加により強く阻害された（データ未掲載）。

次に、3-OH-CB52から3,4-diOH-CB52への2次代謝に及ぼす抗CYP2B4抗血清の添加効果を調べた。基質として3-OH体を用い、PB前処理Msによる代謝を調べた。その結果、Fig. 6に示すように、抗血清100 μlの添加により、3,4-diOH体の生成は完全に阻害された。この結果から、CYP2B4が3-OH体から3,4-diOH体への酸化反応にも、大きく関与していることが示唆された。

考 察

ウサギ肝MsによるCB52の代謝を調べたところ、ウサギ肝は、他の動物とかなり異なる代謝パターンを有することが明らかとなった。すなわち、代謝物として3種類のOH体と3,4-diOH体が生成されたが、主代謝物の3-OH体と4-OH体の生成比はいづれの群でもほぼ1:1であった。これまでに、PCBの水酸化機構として次の2つの経路が考えられている。1つはベンゼン環のC-H結合に酸素原子が挿入される経路（直接水酸化）で、Prestonらは、ラットにおけるCB52の3-水酸化反応が、PB誘導性P450による直接水酸化で進行していることを示した³⁰⁾³¹⁾。もう1つは、代謝中

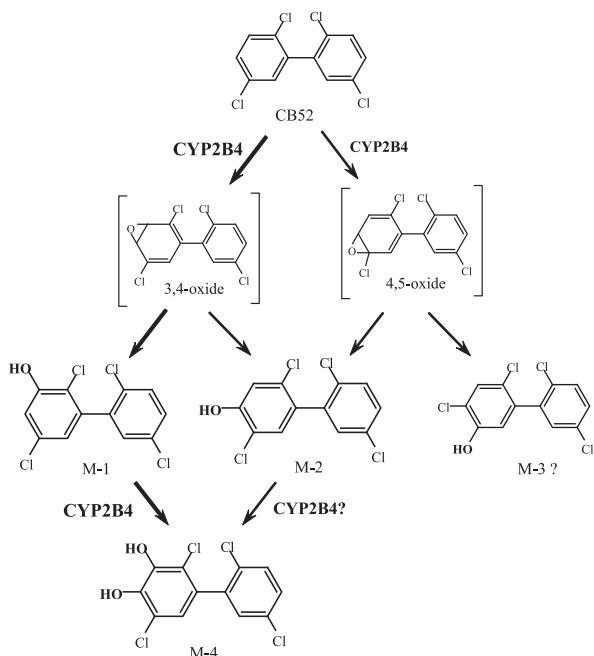


Fig. 7 Postulated metabolic pathways of CB52 in rabbit liver.

間体の3,4-あるいは4,5-epoxide体を経由し、さらに塩素原子のNIH転位を伴って進行する経路で、MC誘導性P450が主に関与している。コプラナーPCBの3,3',4,4'-tetraCB(CB77)³⁵⁾や3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl(CB126)¹⁵⁾などの4-水酸化反応がこの経路で進行しているといわれている。一方、Forgueら³⁴⁾はCB52の3,4-epoxide体の単離に成功し、さらにこれが開裂すると、3-OH体および4-OH体へと変換することを報告した。今回のウサギの場合、どの経路であるか明確ではないが、3-OH体と4-OH体がほぼ同程度生成される事実から、代謝中間体として3,4-epoxide体を経由していると考えられる。また、CB52と関連した2,5-二塩素置換ベンゼンを有するPCB代謝物を調べると、ほ乳動物組織中で必ず3-MeSO₂体と4-MeSO₂体の両方が検出されている¹⁴⁾¹⁰⁾。これらのことから、ウサギ肝におけるCB52代謝は、中間体として3,4-epoxide体を経由していると思われる。Fig. 7にウサギ肝におけるCB52の推定代謝経路を示す。

今回、3-OH体および4-OH体以外に、もう1つ別のOH体(M-3)が生成された。現在のところ、分子量以外は不明であるが、GCの保持時間が3-OH体と4-OH体より長いことから、5位の塩素原子が4位に転位した代謝物かもしれない。そうであれば、M-3は5-OH-2,2',4,5'-tetraCB

であると考えられるが、この点は今後の課題である。

CYP2B4 抗血清を用いた代謝阻害実験により、CYP2B4が3-OH体、4-OH体、3,4-diOH体およびM-3の生成すべてに関与することが明らかとなかった。当研究室の一連の研究では、CYP2Bサブファミリーに属する、ラットCYP2B1¹²⁾およびCYP2B2¹²⁾、モルモットCYP2B18¹⁶⁾およびハムスターP450HPB-1¹⁸⁾は3-水酸化反応のみを触媒した。一方、4-水酸化反応を触媒するのはハムスターCYP2A8¹⁷⁾だけであったが、最近、McGrawとWallerにより、2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl(CB101)の4-水酸化酵素として、ヒトCYP2A6が報告された²⁴⁾。これらの事実は、CYP2B4が他の動物P450酵素と異なる水酸化機構を有すること、さらにウサギ肝においてCYP2B4が最も重要なCB52代謝酵素であることを示している。

最近、我々はCB101の3'-あるいは4'-OH体から3',4'-diOH体への代謝をラット、ハムスターおよびモルモット肝Msを用いて調べ、その結果、親CB101から3'-あるいは4'-OH体を経由して最終的に3',4'-diOH体が生成されることを明らかにした²⁷⁾。このことは、親PCBからdiOH体への代謝過程で、3位および4位へ2度連続して直接水酸化が起こることを示唆している。本研究でも3-OH-CB52を用いて3,4-diOH体への代謝を調べたところ、比較的容易に3,4-diOH体が生成され、さらにCYP2B4が大きく関与していた(Fig. 6)。これらを考え合わせると、CYP2B4の場合には、3,4-epoxide体を経由する経路と直接水酸化の両方の経路で3,4-diOH体を生成しているかもしれない。

CB52の毒性は、CB77、CB126および3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl(CB168)などのコプラナーPCBに比べはるかに弱い³⁶⁾。そのため、毒性等価係数は設定されていない。しかしながら、代謝的に毒性が増強される例がいくつか報告されている。Stadnickiらは培養細胞の増殖に及ぼす影響を調べ、CB52の3,4-epoxide体がCB52より強い阻害活性を示した³⁴⁾。また、Haraguchiらはラットにおいて4-メチルチオ(MeS)-CB52が親CB52に比べ体重増加をより強く抑制したり、肝薬物代謝酵素をより強く誘導することを報告した⁹⁾。さらに最近では、PCBのdiOH体が女性ホ

ルモン様作用⁶⁾を示したり、細胞毒性³²⁾を有することが報告されている。今後は、CB52 代謝物の 3,4-diOH 体の毒性評価も重要な研究課題の 1 つとなろう。

総 括

1. ウサギ肝 Ms による CB52 の代謝を調べた結果、これまでに報告されたラット、モルモットおよびハムスターと異なり、3-OH 体と 4-OH がほぼ同程度で生成された。これらの生成は PB 前処理により、いずれも未処理の 2.4 倍に増加した。なお、これら以外に 2 つの代謝物が生成され、1 つは OH-tetraCB であること、もう 1 つは 3,4-diOH-CB52 であることが明らかになった。
2. モルモットから調製された CYP2B4 抗血清を用いてウサギ肝 Ms を免疫染色したところ、CYP2B4 は常在型であり、PB 誘導性であることが確認された。PB 前処理による CYP2B4 タンパクの増加は、主代謝物の 3-OH 体および 4-OH 体の増加とよく一致していた。
3. CYP2B4 抗血清を用いて、CB52 の代謝阻害を試みたところ、3-OH 体と 4-OH 体の生成は抗血清 100 μl の添加で、いずれも 90% 前後が強く阻害された。また、3-OH-CB52 から 3,4-diOH 体への代謝に及ぼす添加効果を調べたところ、抗血清 100 μl の添加で、3,4-diOH 体の生成は完全に阻害された。
4. 以上の結果から、ウサギ肝 CYP2B4 は、CB52 代謝のすべての経路で大きく関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費（食品の安心・安全確保推進研究事業）および日本学術振興会科学的研究費補助金（基盤研究(B)、No. 20404006 原口浩一；基盤研究(C)、No. 20510070 加藤善久）に一部負うものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y : Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212 : 455-460, 1995.
- 2) Black SD, Tarr GE and Coon MJ : Structural features of isozyme 2 of liver microsomal cytochrome P-450. Identification of a highly conserved cysteine-containing peptide. *J. Biol. Chem.* 257 : 14616-14619, 1982.
- 3) Forgue ST and Allen JR : Identification of an arene oxide metabolite of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl by gas chromatography-mass spectroscopy. *Chem.-Biol. Interact.* 40 : 233-245, 1982.
- 4) Forgue ST, Preston BD, Hargraves WA, Reich IL and Allen JR : Direct evidence that an arene oxide is a metabolic intermediate of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91 : 475-483, 1979.
- 5) Gardner AM, Chen JT, Roach JA and Ragelis EP : Polychlorinated biphenyls : Hydroxylated urinary metabolites of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl identified in rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55 : 1377-1384, 1973.
- 6) Garner CE, Jefferson WN, Burka LT, Matthews HB and Newbold RR : In vitro estrogenicity of the catechol metabolites of selected polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154 : 188-197, 1999.
- 7) Guengerich FP, Wang P and Davidson NK : Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 21 : 1698-1706, 1982.
- 8) 塙岡伸光、佐伯和枝エレーナ、石田忠三、古賀信幸、吉村英敏 : 2,5,2',5'-Tetrachlorobiphenyl とその主代謝物 3-hydroxy-2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl のラットに対する毒性評価. *福岡医誌* 82 : 191-196, 1991.
- 9) Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y, Koga N, Kuroki J, Hokama Y and Yoshimura H : Toxicological evaluation of sulfur-containing metabolites of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chemosphere* 14 : 1755-1762, 1985.
- 10) Haraguchi K, Kato Y, Koga N and Degawa M : Species differences in the tissue distribution of catechol and methylsulphonyl metabolites of 2,4,5,2',5'-penta- and 2,3,4,2',3',6'-hexachlorobiphenyls in rats, mice, hamsters and guinea pigs. *Xenobiotica* 35 : 85-96, 2005.
- 11) Hutzinger O, Safe S and Zitko V : Polychlorinated biphenyls : Synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull. Environ. Contamin. Tox-*

- icol. 6 : 209-219, 1971.
- 12) Ishida C, Koga N, Hanioka H, Saeki HK and Yoshimura H : Metabolism in vitro of 3,4,3',4'-and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14 : 276-284, 1991.
- 13) Kaminsky LS, Kennedy MW, Adams SM and Guengerich FP : Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry*, 20 : 7379-7384, 1981.
- 14) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Masuda Y and Kimura R : Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem. Biol. Interact.* 95 : 257-268, 1995.
- 15) Koga N, Beppu M and Yoshimura H : Metabolism in vivo of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 13 : 497-506, 1990.
- 16) Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S and Yoshimura H : Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 60 : 898-903, 1998.
- 17) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225 : 685-688, 1996.
- 18) Koga N, Kikuichi-Nishimura N, Hara T, Harada N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K and Yoshimura H : Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 312 : 464-470, 1995.
- 19) Koga N, Kikuichi-Nishimura N and Yoshimura H : Effect of cytochrome P450 inducers on liver microsomal metabolism of tetrachlorobiphenyls in rats, guinea pigs and hamsters. *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 705-710, 1995.
- 20) 古賀信幸, 吉村英敏 : PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江增隆編 : 油症研究—30年の歩み—, pp93-110, 九州大学出版会 福岡, 2000.
- 21) Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J and Yamaguchi A : Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 1 : 119-128, 1972.
- 22) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1971.
- 23) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 24) McGraw JE Sr and Waller DP : Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 : 129-133, 2006.
- 25) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 : 高分解能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による全PCB異性体の分析. *福岡医誌* 90 : 192-201, 1999.
- 26) Oguri K, Kaneko H, Tanimoto Y, Yamada H and Yoshimura H : A constitutive form of guinea pig liver cytochrome P450 closely related to phenobarbital inducible P450b (e). *Arch. Biochem. Biophys.* 287 : 105-111, 1991.
- 27) 太田千穂, 奈岡樹子, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',4,5,5'-五塩素化ビフェニル(CB101)のラット, ハムスターおよびモルモット肝ミクロソームによる代謝. *福岡医誌* 96 : 232-240, 2005.
- 28) Omura T and Sato R : The carbon monooxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239 : 2370-2378, 1964.
- 29) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM and Levin W : Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. A study of structure-activity relationships. *J. Biol. Chem.* 258 : 5967-5976, 1983.
- 30) Preston BD and Allen JR : 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl : Isolation and identification of metabolites generated by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 8 : 197-204, 1980.
- 31) Preston BD, Miller JA and Miller EC : Non-arene oxide aromatic ring hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl as the major metabolic pathway catalyzed by phenobarbital-induced rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 258 : 8304-8311, 1983.
- 32) Sadeghi-Aliabadi H, Chan K, Lehmler HJ, Robertson LW and O'Brien PJ : Molecular cytotoxic mechanisms of catecholic polychlorinated biphenyl metabolites in isolated rat hepatocytes. *Chem.-Biol. Interact.* 167 : 184-192, 2007.
- 33) Safe S : Polyhalogenated aromatics : uptake,

- disposition and metabolism. In Kimbrough RD and Jensen AA (ed) : Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. pp. 131-159, Elsevier Science Publishers Amsterdam, 1989.
- 34) Stadnicki SS and Allen JR : Toxicity of 2,2',5, 5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites, 2,2',5, 5'-tetrachlorobiphenyl-3,4-oxide and 2,2',5, 5'-tetrachlorobiphenyl-4-ol to cultured cells in vitro. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23 : 788-796, 1979.
- 35) Yoshimura H, Yonemoto Y, Yamada H, Koga N, Oguri K and Saeki S : Metabolism in vivo of 3,4, 3',4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. Xenobiotica 17 : 897-910, 1987.
- 36) Yoshimura H, Yoshihara S, Ozawa N and Miki M : Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats. Ann. N. Y. Acad. Sci. 320 : 179-192, 1979.
- 37) Yuan PM, Ryan DE, Levin W and Shively JE : Identification and localization of amino acid substitutions between two phenobarbital-inducible rat hepatic microsomal cytochromes P-450 by micro sequence analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 1169-1173, 1983.

(Received for publication March 25, 2009)