

## 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 ウサギ肝ミクロゾームによる代謝

<sup>1)</sup>中村学園大学栄養科学部 食品衛生学研究室

<sup>2)</sup>第一薬科大学 健康化学教室

<sup>3)</sup>徳島文理大学香川薬学部 薬物動態学講座

<sup>4)</sup>北海道医療大学薬学部 衛生薬学講座

太田 千穂<sup>1)</sup>, 原口 浩一<sup>2)</sup>, 加藤 善久<sup>3)</sup>,  
遠藤 哲也<sup>4)</sup>, 古賀 信幸<sup>1)</sup>

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

Chiho OHTA<sup>1)</sup>, Koichi HARAGUCHI<sup>2)</sup>, Yoshihisa KATO<sup>3)</sup>, Tetsuya ENDO<sup>4)</sup> and Nobuyuki KOGA<sup>1)</sup>

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

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

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

<sup>4)</sup>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 <sup>1</sup>H-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<sup>21)</sup>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<sup>33)</sup>。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 (MeSO<sub>2</sub>) 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<sup>20)</sup>。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<sup>1)12)13)16)~18)</sup>。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<sup>25)</sup>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<sup>36)29)</sup>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<sup>19)</sup>。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 CYP2B1<sup>12)</sup>、ラット CYP2B2<sup>12)</sup>、モルモット CYP2B18<sup>16)</sup> およびハムスター P450HPB-1<sup>18)</sup> が 3-水酸化反応を、また、ハムスター CYP2A8<sup>17)</sup> 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<sup>5)</sup>。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<sup>11)17)19)</sup>に従い、合成した。3-OH-CB52 は CB52 (200 mg/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<sup>8)</sup>。

#### (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 3.0~4.5 kg) 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<sup>36)</sup>。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<sup>18)16)</sup>に準じて精製した。すなわち、PB 前処理ウサギ肝 (110 g 湿重量) から肝 Ms を調製し、これをコール酸で可溶化後、 $\omega$ -aminooctyl-Sepharose 4B カラム, hydroxyapatite, DEAE-Biogel 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 10.3 nmol/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<sup>2)</sup>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<sup>16)~18)</sup>。

## 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<sup>19)</sup>に準じて行った。すなわち、40  $\mu$ M 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 (0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate (G-6-P), G-6-P 脱水素酵素 1 unit), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 牛血清アルブミン (0.8 mg/ml) およびウサギ肝 Ms (1 mg protein) を、100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1 ml 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) 1 ml および n-hexane 4 ml 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 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.33  $\mu$ m 膜厚, J&W Scientific 製) ; オープン温度, 200°C ; 注入口温度, 250°C ; 検出器温度, 250°C ; キャリヤーガス, N<sub>2</sub> (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 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.33  $\mu$ m 膜厚, J&W Scientific 製) ; オープン温度, 210°C ; 注入口温度, 250°C ; 検出器温度, 280°C ; キャリヤーガス, 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  $\mu$ 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<sub>2</sub>, PB 前処理ウサギ肝 Ms (500 mg protein) とともに 100 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 mm i.d.  $\times$  250 mm, YMC 製) ; プレカラム, ODS プレカラム (20 mm i.d.  $\times$  50 mm, YMC 製) ; 流速, 5 ml/min ; 溶離液, methanol-H<sub>2</sub>O (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 <sup>1</sup>H-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<sup>+</sup>+4), 352 (100, M<sup>+</sup>+2), 350 (80, M<sup>+</sup>), 335 (45, M<sup>+</sup>-15), 307 (30, M<sup>+</sup>-43), 292 (30, M<sup>+</sup>-58), 272 (36, M<sup>+</sup>-78).

<sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  (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 Hz, 6'-H), 7.523 (1H, dd, J=2.52 Hz, 8.57 Hz, 4'-H), 7.593 (1H,

d, J=8.57 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 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<sup>23)</sup>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 Sato<sup>28)</sup>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 Laemmli<sup>22)</sup>の方法により, また, ウェスタンブロットは Guengerich ら<sup>7)</sup>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<sup>18)</sup>.

<sup>1</sup>H-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*<sub>6</sub> 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 分, 7.07 分, 7.37 分および 12.77 分に観察された. 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<sup>19)</sup>. 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

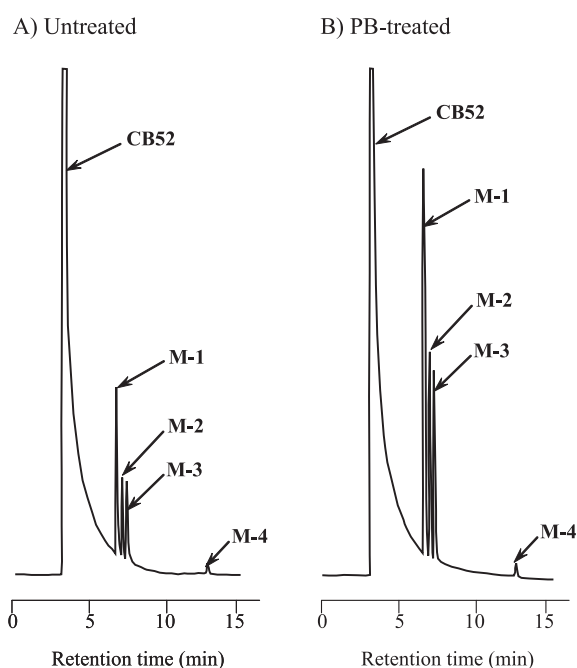
TMS 誘導体は保持時間が、他 3 者よりずっと長かった。

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。

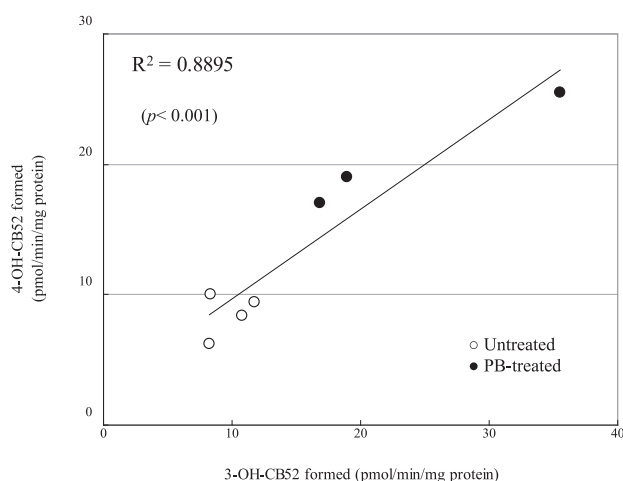
一方、PB 前処理ウサギ肝 Ms では、M-1 の生

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 <sup>19)</sup>	None	4	N.D.	N.D.
	PB	4	324.0 ± 15.4	N.D.
Hamster <sup>19)</sup>	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 <sup>19)</sup>	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、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

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  $^1\text{H-NMR}$  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  $^1\text{H-NMR}$  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

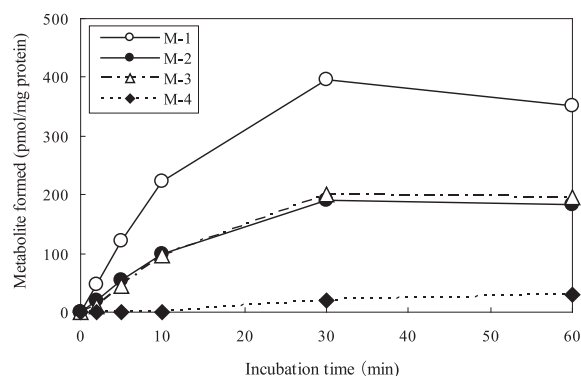


Fig. 3 Time course of CB52 metabolism by liver microsomes of PB-treated rabbits.

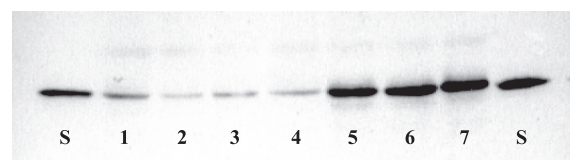
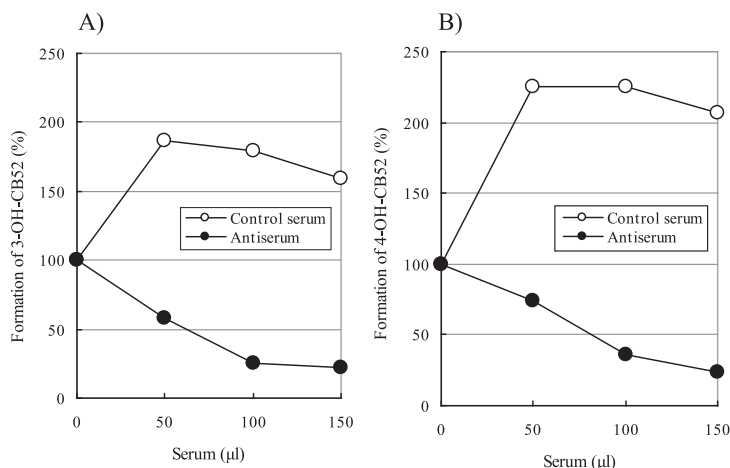


Fig. 4 Immunoblot of rabbit liver microsomes with anti-serum against CYP2B4. Lanes S contain purified rabbit CYP2B4 (1  $\mu\text{g}$  protein). Lanes 1-4 and 5-7 contain liver microsomes (10  $\mu\text{g}$  protein each) from four untreated and three PB-treated rabbits, respectively.

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 <sup>2)</sup>	(rabbit)	MEFS	LLLLL	AFLAG	LLLLL	F
CYP2B1 <sup>37)</sup>	(rat)	MEPS	I LLLL	ALLVG	FLLLL	V
P450HPB-1 <sup>18)</sup>	(hamster)	MEPS	TLLLL	TLLLS	FLVLL	V
CYP2B18 <sup>26)</sup>	(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



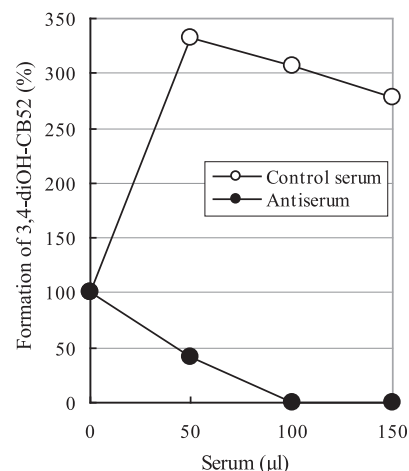
**Fig. 5** Effect of antiserum against CYP2B4 on the formation of 3-OH- and 4-OH-metabolites from CB52 with liver microsomes of PB-treated rabbits. Open and closed circles indicated control serum and antiserum raised against CYP2B4, respectively. Each point represents the mean of duplicate determinations.

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、CYP2B4<sup>2)</sup> 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-ポリアクリルア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 体の生成比はいずれの群でもほぼ 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<sup>30)31)</sup>。もう 1 つは、代謝中

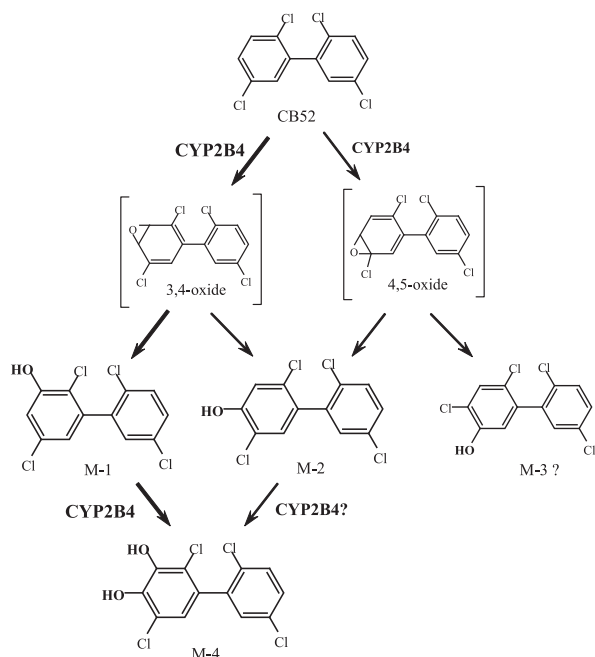


Fig. 7 Postulated metabolic pathways of CB52 in rabbit liver.

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)<sup>35)</sup>や3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB126)<sup>15)</sup>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<sup>3)4)</sup>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-MeSO<sub>2</sub>体と4-MeSO<sub>2</sub>体の両方が検出されている<sup>14)10)</sup>。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CYP2B1<sup>12)</sup>およびCYP2B2<sup>12)</sup>、モルモットCYP2B18<sup>16)</sup>およびハムスターP450HPB-1<sup>18)</sup>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CYP2A8<sup>17)</sup>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<sup>24)</sup>。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<sup>27)</sup>。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<sup>36)</sup>。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<sup>34)</sup>。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<sup>9)</sup>。さらに最近では、PCBのdiOH体が女性ホ



ルモン様作用<sup>6)</sup>を示したり、細胞毒性<sup>32)</sup>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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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) 埴岡伸光, 佐伯和枝エレナ, 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, 古江増隆 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, 太岡樹子, 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ゾームによる代謝. 福岡医誌 96 : 232-240, 2005.
  - 28) Omura T and Sato R : The carbon monoxide-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. Contami. 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)