

2, 3, 3', 4, 4' -五塩素化ビフェニル(CB105)のハムスターにおける代謝

古賀, 信幸
中村学園大学栄養科学部栄養科学科

金丸, 知代
中村学園大学栄養科学部栄養科学科

黒木, 広明
第一薬科大学環境化学教室

原口, 浩一
第一薬科大学健康化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/18757>

出版情報 : 福岡醫學雜誌. 94 (5), pp.174-182, 2003-05-25. 福岡医学会
バージョン :
権利関係 :

2,3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル (CB105) のハムスターにおける代謝

中村学園大学栄養科学部栄養科学科

古賀 信幸, 金丸 知代

第一薬科大学環境化学教室

黒木 広明

第一薬科大学健康化学教室

原口 浩一

静岡県立大学薬学部薬剤学教室

加藤 善久, 木村 良平

Metabolism of 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl in Hamsters

Nobuyuki KOGA¹⁾, Hiroaki KUROKI²⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Tomoyo KANAMARU¹⁾,
Yoshihisa KATO³⁾ and Ryohei KIMURA³⁾

¹⁾ Department 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⁾ School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,
52-1, Yada, Shizuoka 422-8526

Abstract The in vivo metabolism of 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (CB105) was studied in hamsters and the effect of cytochrome P450 inducers, phenobarbital (PB) and 3-methylcholanthrene (MC) on its metabolism was compared to rats. After administration of CB105 intraperitoneally at a dose of 3 mg/body, four metabolites, named M-1, M-2, M-3 and M-4, were detected in 5 days-feces of all groups and the formation ratio of the metabolites M-1 ~ M-4 was 1:39:84:0.2 in untreated hamsters and 1:19:6.7:0.7 in untreated rats. On the basis of the mass spectra of four synthetic authentic compounds and the retention times on DB-1 and MPS50 columns, M-1, M-2, M-3 and M-4 were identified as 4'-hydroxy-2,3,3',4,5'-PenCB, 5'-hydroxy-CB105, 5-hydroxy-CB105 and 4-hydroxy-2,3,3',4',5-PenCB, respectively. The pretreatment of PB and MC resulted in about 2-fold fecal excretion of four metabolites in hamsters and in about 3-fold in rats. Of four metabolites, only M-4 were detected in the serum at 5 days after CB105 administration and the concentration was 0.39 µg/ml of hamster serum and 0.28 µg/ml of rat serum. In hamsters, the concentration of M-4 was increased to 1.8-fold of untreated animals by PB treatment and 2.6-fold by MC treatment. On the other hand, the treatment of rats with PB and MC did not show such an increase of serum M-4. These results suggested that the hamster oxidized 2,3,4-trichloro-substituted benzene ring predominantly rather than 3',4'-dichloro-substituted benzene ring differently from the rat and that M-4 formed in hamster liver distributed to the blood and retained there to a considerable extent in comparison with that formed in rat liver.

はじめに

2,3,3',4,4'-五塩素化ビフェニル (PenCB) (CB 105) はカネミ油症の原因物質である PCB 製品 (Kanechlor 400) の成分の1つであるとともに、油症患者の血清中 PCB 成分のうちで、健常者

よりも濃度が低い成分として知られている。すなわち、黒木と増田は、血清中 PCB 異性体のうち、2,3',4,4',5-PenCB (CB 118) 及び CB 105 が、健常人に比べ油症患者で少ないかあるいは消失していることを報告した¹⁸⁾。この事実は、油症患者において多量摂取された PCB によってチトクロム

P 450 (P 450) が誘導され、さらに誘導された P 450 によって上記 PenCB の代謝が促進されたものと考えられる。

PCB は肝 P 450 を中心とした肝薬物代謝酵素に対し強い誘導作用を有することが報告されている¹⁹⁾²²⁾。また、その誘導様式の違いから、phenobarbital (PB) 型、3-methylcholanthrene (MC) 型および混合型に分類されている。PB 型には、2(2')位あるいは 6(6')位に 1~2 個塩素が置換された PCB 異性体 (mono-ortho-および di-ortho-PCB) が含まれ、また、MC 型には 3,3',4,4'-四塩素化ビフェニル (TCB)、3,3',4,4',5-PenCB および 3,3',4,4',5,5'-六塩素化ビフェニルなどの coplanar PCB 異性体が含まれる。なお、前出の CB 118 と CB 105 は mono-ortho-PCB であるが coplanar PCB の性質も有することから混合型に分類されている¹⁹⁾。

一方、CB 105 の代謝に関する研究は報告がほとんどない。山本らはラットに CB 105 を経口投与し、投与後 8 日間の糞、尿及び組織を調べた結果、全く代謝物は検出されなかったと報告した²⁰⁾。その後、Klasson-Wehler らは、CB 105 を経口投与したマウスとミンクにおける in vivo 代謝を調べ、その結果、いずれの動物においても代謝速度は非常に遅いものの 5 種類の代謝物へと変換されることを明らかにした⁹⁾。それらの構造は 5-水酸化 (OH) 体、5'-OH 体及び 2'-OH 体と、さらに NIH 転位した代謝物の 4-OH-2,3,3',4',5-PenCB 及び 4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB であった。興味あることに、4'-OH 体とともに 4-OH 体が比較的多く生成されており、塩素が 3 個置換している芳香環、すなわち 2,3,4-三塩素置換ベンゼン環の方が 3',4'-二塩素置換ベンゼン環より代謝されやすいという結果であった。最近、原口らは CB 105 を腹腔内に投与したラットの糞中から合計 9 種類の代謝物を検出した⁹⁾。上記 5 種類のうち 2'-OH 体を除く 4 種類の水酸化体、さらに塩素が脱離した代謝物 4-OH-2,3,3',4'-TCB および 4 種類のメチルチオ (MeS) 体、すなわち 5-MeS-、5'-MeS-、6-MeS- および 6'-MeS-CB 105 を新たに報告した。

ハムスターはダイオキシン類などの毒性に対して、最も感受性の低い動物として報告されていること⁹⁾から、代謝能との関連は興味深い。当研究室では、ハムスター肝ミクロゾームを用いて 2,2',5,

5'-および 2,3',4',5-TCB の代謝を調べ、PB 誘導性の HPB-1 (CYP 2 B) および MC 誘導性の CYP1A2 と CYP2A8 が関与することを明らかにした¹¹⁾⁻¹⁴⁾。そこで本研究では、塩素が 1 つ多い CB 105 の in vivo 代謝を調べ、ラットと比較した。また、代謝に関与する P 450 分子種を明らかにするため、代表的な P 450 誘導剤として知られている PB および MC で前処理した動物でも同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB105 の合成

CB105 は Cadogan による方法³⁾で合成した。まず、3,4-dichloroaniline および 1,2,3-trichlorobenzene をテトラクロロエチレンで溶解し、さらに亜硝酸イソペンチルを加えて、110°C で 24 時間反応させた。反応物はアルミナカラム (Merck, ドイツ) で精製したのち、異性体を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。HPLC 条件は次の通りである。カラム, ODS (250×10 mm i.d., 5 μm, 草野科学); 移動相, アセトニトリル-H₂O (9:1); 流速, 2 ml/min; 検出波長, 254 nm. CB 105 の純度は最終的に 99% 以上であった。

CB 105 : MS (EI) m/z (relative intensity) 324 (100) [M⁺], 326 (163) [M⁺+2], 328 (101) [M⁺+4], 330 (33) [M⁺+6], 252 (45) [M⁺-Cl₂].

(2) 代謝物の合成

CB 105 代謝物の合成も Cadogan の方法³⁾で行った。すなわち、3,4-dichloroaniline と 2,3,6-あるいは 2,3,4-trichloroanisole を、または 2,3,4-trichloroaniline と 2,6-あるいは 2,3-dichloroanisole を加えて、110°C, 24 時間反応させた。反応後、CB 105 と同様にアルミナカラムおよび HPLC で精製した。

4-CH₃O (MeO) -2,3,5,3',4'-PenCB : ¹H-NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.52 (1 H, d, J=8.1 Hz, 5'-H), 7.47 (1 H, d, J=2.2 Hz, 2'-H), 7.28 (1 H, s, 6-H), 7.22 (1 H, dd, J=8.3 Hz, 2.0 Hz, 6'-H), 3.95 (3 H, s, 4-MeO); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M⁺], 356 (160) [M⁺+2], 358 (105) [M⁺+

4], 360 (38) [M^{++6}], 339 (62) [M^{+-CH_3}], 311 (29) [M^{+-COCH_3}], 241 (25).

5-MeO-CB 105: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.530 (1 H, d, $J=8.33$ Hz, 5'-H), 7.488 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 2'-H), 7.251 (1 H, dd, $J=8.33$ Hz, 2.02 Hz, 6'-H), 6.774 (1 H, s, 6-H); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (162) [M^{++2}], 358 (83) [M^{++4}], 360 (30) [M^{++6}], 311 (32) [M^{+-COCH_3}].

6-MeO-CB 105: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.622 (1 H, d, $J=8.07$ Hz, 5'-H), 7.423 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 2'-H), 7.159 (1 H, dd, $J=8.07$ Hz, 2.02 Hz, 6'-H), 7.101 (1 H, s, 5-H); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (148) [M^{++2}], 358 (105) [M^{++4}], 360 (37) [M^{++6}], 304 (87) [M^{+-CH_3Cl}], 284 (24) [M^{+-Cl_2}], 241 (31).

4'-MeO-2,3,4,3',5'-PenCB: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.445 (1 H, d, $J=8.33$ Hz, 5-H), 7.325 (2 H, s, 2'-H and 6'-H), 7.147 (1 H, d, $J=8.33$ Hz, 6-H), 3.967 (3 H, s, CH_3); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (162) [M^{++2}], 358 (105) [M^{++4}], 360 (40) [M^{++6}], 339 (65) [M^{+-CH_3}], 311 (30) [M^{+-COCH_3}], 241 (50).

5'-MeO-CB 105: 1H -NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ 7.454 (1 H, d, $J=8.32$ Hz, 5-H), 7.175 (1 H, d, $J=8.32$ Hz, 6-H), 7.086 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 2'-H), 6.845 (1 H, d, $J=2.02$ Hz, 6'-H); MS (EI) m/z (relative intensity) 354 (100) [M^+], 356 (173) [M^{++2}], 358 (100) [M^{++4}], 360 (42) [M^{++6}], 311 (29) [M^{+-COCH_3}], 241 (30).

2. 薬物投与

Golden syrian 系雄性ハムスター (体重約 80 g) および Wistar 系雄性ラット (体重約 170 g) に, P 450 誘導剤として PB (80 mg/kg/day), あるいは MC (20 mg/kg/day) を 3 日間腹腔内に投与した. PB は生理食塩水に, MC はコーン油に溶解した. PB および MC の最終投与日の翌日に, CB 105 を 3 mg/body で腹腔内に投与した.

3. 代謝物の分離

CB 105 投与後 5 日間の糞を採取し, 60°C で 24 時間乾燥し, コーヒーミルで粉碎後, ソックスレー抽出器を用いて, クロロホルムで 14 時間抽出を行った.

一方, 採血は, CB 105 投与後 5 日目にハムスターあるいはラットの頸動脈より行った. 血液を直接, セパクリーン-A (血清分離剤入スピッツ: 栄研機材) に入れて, 血清を分離し, これにつき代謝物の分析を行った. すなわち, 血清 0.5 ml に 0.5 M 硫酸溶液 0.25 ml を添加した後, クロロホルム-メタノール (2:1) 1 ml 及び n-ヘキサン 3 ml による抽出を 2 回行い, これらをジアゾメタンでメチル化後, GC/ECD および GC/MS に供した.

4. 代謝物の分析

代謝物の分析には ECD 付 HP 5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いた. GC/ECD の条件は次の通りである. 3 種類のカラム, すなわち, ① DB-1 fused silica capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製), ② DB-1 fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製) および ③ MSP 50 fused silica capillary column (50 m \times 0.25 mm i.d., 0.1 μ m 膜厚, 東京化成製) を使用した. オープン温度は 200~240°C で, さらに注入口温度は 250°C, 検出器温度は 250°C に固定し, キャリヤーガスとして N_2 (1 ml/min) を用いた.

5. その他の分析機器

(1) GC/MS

マススペクトルの測定は質量分析計付 HP 5980 ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製) を用いて, EI モードで行った. GC/MS は次の 2 通りの条件を用いて行った. ① カラム, DB-1 fused silica capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 190°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). ② カラム, MPS 50 fused silica capillary column (50 m \times 0.25 mm id, 0.1 μ m 膜厚, 東京化成製); オープン温度, 100°C \rightarrow (20°C/min)

→ 200 °C → (5 °C/min) → 280 °C ; キャリアーガス, He gas.

(2) ¹H-NMR

スペクトルの測定は日本電子製の JEOL GSX-500 (500 MHz) を用いて行った。試料は、重クロロホルムに溶解し、テトラメチルシランを内部標準物質として用いた。

実験結果

1. ラット糞中および血中代謝物の検出

まず, CB 105 投与ラットにおける 5 日間の糞中代謝物を調べた。糞のクロロホルム抽出物をメチル化後, GC/ECD (15 m DB-1 カラム) に供した結果, 未処理群において, 未変化体 (7.79 min) 以外に, 代謝物と思われる 3 本のピークがそれぞれ保持時間 11.82 min, 15.85 min および 16.27 min に検出された (Fig. 1 a)。これらを仮に M-1, M-2 および M-3 とする。また, PB 及び MC 前処理群のいずれにおいても未処理群と全く同様に 3 種類のピークが検出された。一方, CB 105 投与後 5 日目の血中代謝物を同じ条件で分析したところ, いずれの群においても未変化体以外に, M-1 と全く同じ保持時間 11.82 min に代謝物と思われる 1 本のピークが検出された。これを以下 M-4 とした (Fig. 1 b)。

2. ハムスター糞中および血中代謝物の検出

次に, 未処理, PB および MC 前処理ハムスターにつき, CB 105 投与後 5 日間の糞中代謝物および 5 日目の血中代謝物を調べた。Fig. 2 に未処理ハムスターから得られた代謝物 (メチル化体) のガスクロマトグラムを示す。Fig. 2 a に示すように, 糞中代謝物として M-2 および M-3 はラットと同様に検出されたが, M-1 はほとんど検出されなかった。一方, 血中代謝物の場合, ラットと同様に, 未変化体とともに M-4 が検出された (Fig. 2 b)。なお, PB および MC 前処理ハムスターの場合にも, 未処理ハムスターと同じ代謝パターンを示した (データ未掲載)。

3. 代謝物の化学構造

GC/MS の結果, M-1~M-4 のメチル誘導体はいずれも分子量 354 を有していたことから, OH 体であることが明らかになった。このうち糞中代

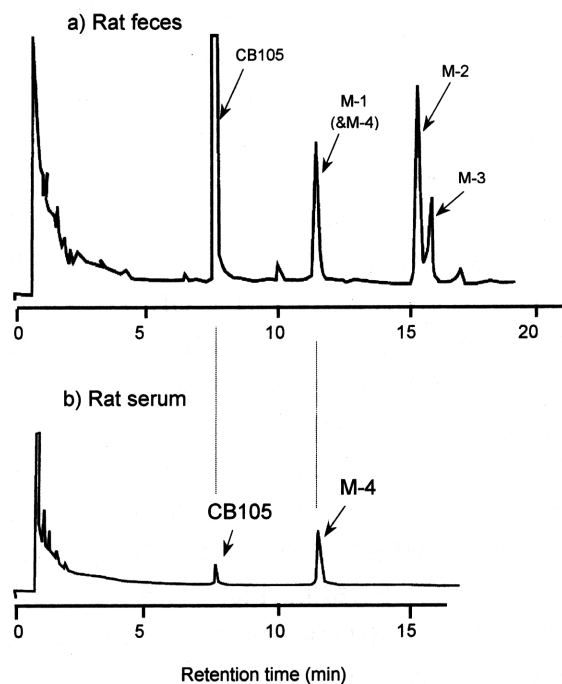


Fig. 1 Gas chromatograms of the methylated derivatives of CB105 metabolites detected in the feces (a) and serum (b) of untreated rats.

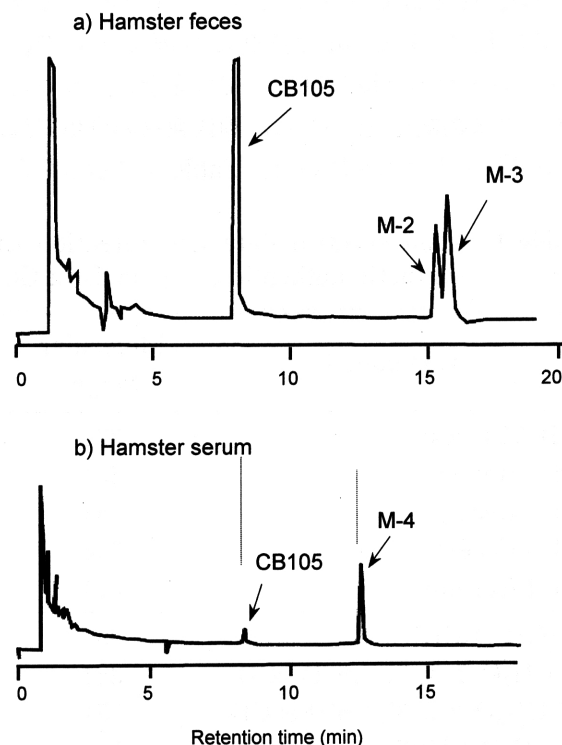


Fig. 2 Gas chromatograms of the methylated derivatives of CB105 metabolites detected in the feces (a) and serum (b) of untreated hamsters.

謝物 M-1 および血中代謝物 M-4 は保持時間がいずれも 11.82 min と全く同じであることから、本当に同一のものであるかを検討した。長さ 15 m の DB-1 カラムを用いた GC/MS の結果から、M-1 および M-4 のマススペクトルはいずれも破片イオン $[M^+-15]$ を示したことから、4 または 4'位の塩素が 5 または 5'位に NIH 転位をしたと思われる 4-OH 体あるいは 4'-OH 体のメチル誘導体であると推定された (Table 1)。そこで、合成標品の 4-MeO-2,3,3',4',5-PenCB と 4'-MeO-2,3,3',4,5'-PenCB を同様の条件で測定したところ、DB-1 (15 m) カラムにおける保持時間およびマススペクトルが全く同じで区別できなかった。次に、長さ 50 m の MPS 50 カラムに換えて両化合物の分離を試みた。その結果、Fig. 3 に示すように、4-MeO 体と 4'-MeO 体をそれぞれ保持時間 29.88 min と 30.12 min に分離することができた。そこで、血中代謝物 M-4 のメチル化体につき、同様の条件で測定したところ、保持時間 29.88 min であった。これらの結果から、M-4 および M-1 はそれぞれ 4-OH-2,3,3',4',5-PenCB および 4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB であることが示唆された。

一方、M-2 および M-3 については、DB-1 カラムでは長さ 15~30 m で良好に分離できたが、MPS 50 カラム (長さ 50 m) では完全に重なった (データ未掲載)。そのため、両代謝物の分析には、以下 DB-1 カラムを用いた。Table 1 に示したよ

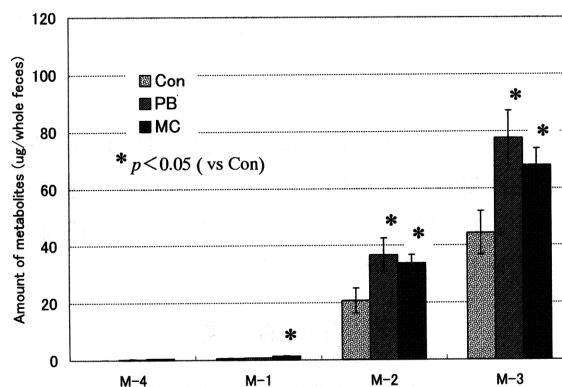


Fig. 4 Effect of P450 inducer on the amount of CB105 metabolites in hamster feces

うに、マススペクトルをみると M-2 および M-3 のいずれにおいても特徴的なイオン $[M^+-43]$ が観察されたことから、5-OH 体あるいは 5'-OH 体のメチル誘導体と推定された。そこで、合成標品とマススペクトルおよび GC における保持時間を比較したところ、M-2 および M-3 はそれぞれ 5'-OH-CB 105 及び 5-OH-CB 105 であることが明らかとなった。

3. 糞中代謝物に及ぼす P 450 誘導剤の影響

Fig. 4 に、ハムスター糞中代謝物の定量結果 ($\mu\text{g}/\text{全糞}$) を示した。M-1 と M-4 の定量には MPS 50 カラム (長さ 50 m) を、また M-2 および M-3 の定量には DB-1 カラム (長さ 30 m) を使用した。まず、未処理ハムスター糞中代謝物を調べたところ、それらの生成比は、M-4 : M-1 : M-2 :

Table 1 Mass spectral data and retention times of the methylated CB105 metabolites and the synthetic authentic compounds in GC/MS

Compound	Molecular weight	Mass spectral data					Retention time (min)
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-70]$	
CB105(feces)	324	100	-	-	-	45	6.41
M-1 (feces)	354	100	62	41	-	-	10.17
M-2 (feces)	354	100	-	44	-	-	14.00
M-3 (feces)	354	100	-	26	-	-	14.45
M-4 (serum)	354	100	55	31	-	-	10.17
2'-CH ₃ O-CB105	354	100	-	-	144	31	8.10
4-CH ₃ O-2,3,3',4',5-PenCB	354	100	62	29	-	-	10.17
4'-CH ₃ O-2,3,3',4,5'-PenCB	354	100	65	30	-	-	10.17
6-CH ₃ O-CB105	354	100	-	-	87	24	10.94
5'-CH ₃ O-CB105	354	100	-	26	-	-	14.01
5-CH ₃ O-CB105	354	100	-	32	-	-	14.46

GC/MS : column (DB-1, 15m) ; oven temp.(190°C).

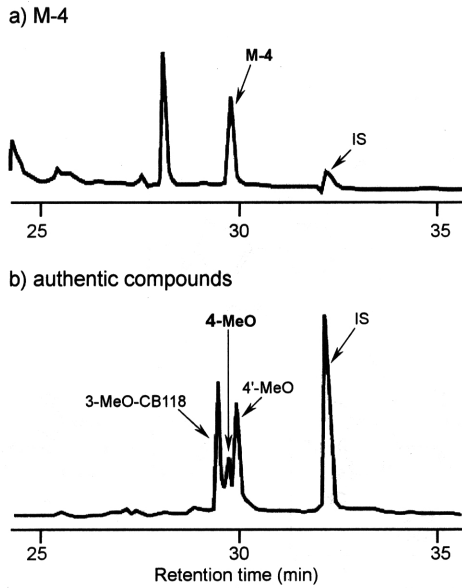


Fig. 3 Gas chromatograms of the methylated M-4 detected in the serum (a) and of three authentic compounds (b)
3'-MeO-2,2',3,4,4',5-hexachlorobiphenyl was used as an internal standard (IS).

M-3 = 0.2 : 1 : 39 : 84 であり、M-4 はほとんど検出されなかった。また、主代謝物は M-2 と M-3 であったが、M-3 の方が M-2 の約 2 倍と多かった。さらに、P 450 誘導剤前処理ハムスターでは、4 種類の代謝物はいずれも PB 前処理で未処理の 1.7 倍前後に、また MC 前処理では 1.5 倍前後というように、ほぼ同じ割合で有意に増加していた。なお、M-4 および M-1 に関しては、PB よりも MC 前処理でより多く増加した。

次に、ラット糞中代謝物の定量結果 (μg/全糞) を Fig. 5 に示した。未処理ラットの糞中代謝物の生成比は M-4 : M-1 : M-2 : M-3 = 0.7 : 1 : 19 : 6.7 であり、M-2 が最も多く生成されていた。また、P 450 誘導剤前処理ラットでは、4 種類の代謝物はいずれもほぼ同じ割合で生成量が増加しており、PB 前処理で未処理の 2 ~ 3 倍、また MC 前処理では約 3 倍であった。ただし、M-4 の生成は MC 前処理で約 7 倍に顕著に増加していた。

4. 血中代謝物に及ぼす P 450 誘導剤の影響

CB 105 投与後 5 日目の血中代謝物を定量し、ラットとハムスターで比較した (Fig. 6)。その結

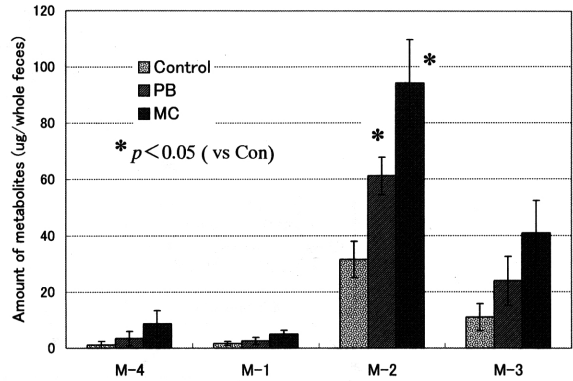


Fig. 5 Effect of P450 inducer on the amount of CB105 metabolites in rat feces

果、ラット血中の M-4 濃度は未処理で 0.28 μg/ml serum であったが、PB 前処理により全く影響を受けなかった。また、MC 前処理でも未処理の約 1.4 倍に過ぎなかった。一方、ハムスター血中の M-4 濃度は未処理で 0.39 μg/ml serum とラットの 1.4 倍と高かったが、さらに PB 前処理により未処理の 1.8 倍に、MC 前処理で 2.6 倍に高くなっていった。

考 察

CB 105 投与ハムスターの糞中および血中代謝物を調べ、代謝パターンをラットと比較した。その結果、両動物においても、糞中から 4 種類の一水酸化体 (M-1~M-4) と血中から M-4 のみが検出された。これらの構造は Klasson-Wehler ら⁸⁾ および原口ら⁵⁾ の報告と一致して、M-1, M-2, M-3 および M-4 はそれぞれ、4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB, 5'-OH-CB 105, 5-OH-CB 105 および 4-OH-2,3,3',4,5'-PenCB であった。以上の結果から、本 PCB の代謝経路として、Fig. 7 に示すよう

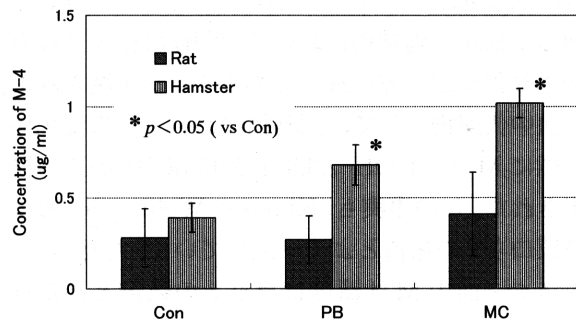


Fig. 6 Effect of P450 inducer on the concentration of M-4 in the serum of rats and hamsters.

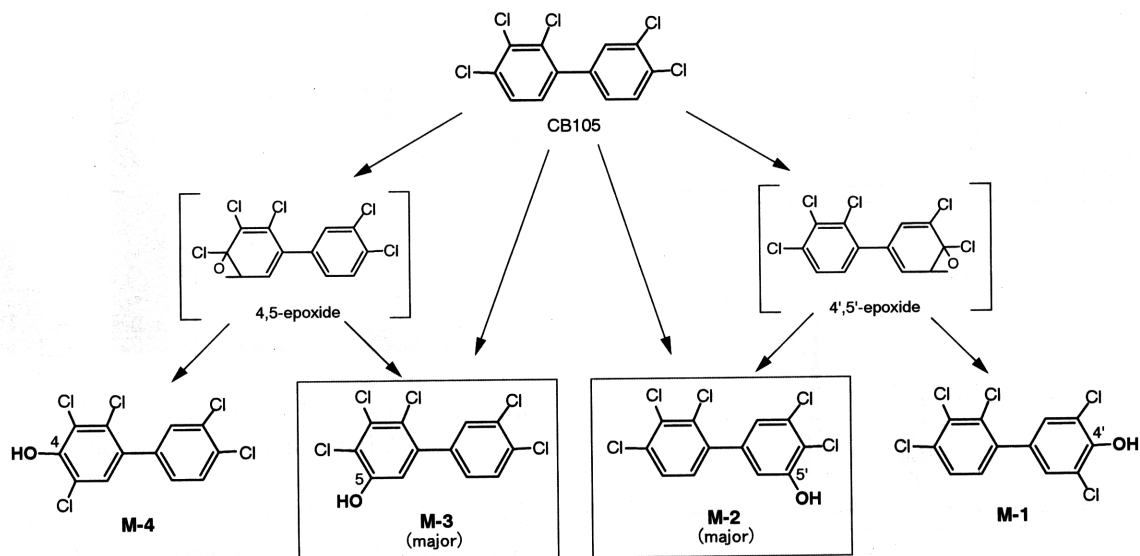


Fig. 7 Postulated metabolic pathways of CB105 in rats and hamsters

に、三塩素置換ベンゼン環の4あるいは5位への酸化および二塩素置換ベンゼン環の4'あるいは5'位への酸化が明らかとなった。主な糞中代謝物は両動物で、M-2 (5'-OH体) および M-3 (5-OH体) であった。M-2 と M-3 の生成量をみると、両動物で大きな種差が観察された。すなわち、ラットでは M-2 の方が M-3 の約3倍であったのに対し、ハムスターでは逆に M-3 の方が M-2 の約2倍であった。一方、M-1 および M-4 は、ハムスターでは糞中から痕跡程度しか検出されなかった。また、PB および MC 前処理により数倍に増加はしたものの、M-2 および M-3 の生成量と比較すると数10分の1であった。以上の結果からラットとは逆に、ハムスターでは3',4'-二塩素置換ベンゼン環よりは、2,3,4-三塩素置換ベンゼン環の方が酸化されやすいことが示唆された。また、M-1 および M-4 の生成はアレノキシド中間体経由した後、NIH 転位したことを示している¹⁰⁾¹⁶⁾²¹⁾が、今回の結果から両動物において中間体経由よりは直接水酸化反応の方が優位であることが示唆された。

血中代謝物として、両動物において、未変化体以外に M-4 (4-OH-2,3,3',4',5-PenCB) のみが検出された。この事実も、Klasson-Wehler ら⁸⁾ および原口ら⁹⁾ の報告とよく一致していた。ただし、ハムスター血中 M-4 濃度はラットの数倍と高かった。また、この値は PB および MC 前処理でそれぞれ約2倍および約3倍に増加した。Brouwer ら¹²⁾⁴⁾ は、4-OH-3,5-二塩素置換の PCB、例え

ば、4-OH-3,3',4',5-TCB 等は血中の甲状腺ホルモン輸送タンパクである transthyretin と高い親和性を有することから、血中によく保持されることを報告している。今回の結果は、生成された M-4 がラットに比べ、より選択的に血中に移行することを意味しており、その原因としてハムスター transthyretin の M-4 に対する親和性がラットより高いのかもしれない。実際、Klasson-Wehler ら⁸⁾ は、M-4 濃度をマウスとミンクで比較し、マウスがミンクの4~5倍高いことを報告している。また、なぜ、M-1 (4'-OH-3',5'-二塩素置換の PCB) よりも、M-4 (4-OH-2,3,5-三塩素置換の PCB) の方が選択的に血中に局在しているかという点は現在のところ、不明である。

原口ら⁹⁾ は、CB 105 投与ラットの血液、肝、肺、腎および脂肪組織中の代謝物を調べたところ、いずれの組織でも M-4 のみを検出し、その濃度は血液>肝=肺>腎>脂肪組織の順であることを報告した。本研究において、ハムスターでは血液と糞しか調べていないが、ハムスターにおいても、ラットと同様に、主代謝物の M-2 と M-3 は糞中へ、M-4 は血液をはじめとした各組織へと分布することが示唆された。

CB 105 代謝に関与する P 450 分子種についての情報を得るために、PB あるいは MC 前処理して代謝パターンの変動を観察した。一般に、MC 型誘導能を有する coplanar PCB は MC 誘導性 P 450 によって、PB 型誘導能を有する mono-あ

るいは di-ortho-PCB は PB 誘導性 P 450 によって代謝される¹⁷⁾. CB 105 は混合型誘導能を有していることから、両方の P 450 によって代謝されると予想されたが、今回予想と一致してハムスターの全代謝物は PB および MC 前処理のいずれでも 1.5~1.7 倍に増加した。これまでの精製 P 450 を用いた PCB 代謝研究¹¹⁾⁻¹³⁾ から、ハムスター肝では PB 誘導性の HPB-1 (CYP 2 B) および MC 誘導性の CYP1A2 と CYP2A8 が関与することが明らかになっているが、CB 105 の場合もこれらの P 450 が有力であろう。一方、ラットにおいても同様に、全代謝物の生成が PB および MC 前処理で 2~3 倍に促進された。この結果から、CB 105 の場合にも、これまでに二塩素化ビフェニル⁷⁾ や TCB⁶⁾⁽¹²⁾⁽¹⁵⁾ で明らかにされている PB 誘導性の CYP2B1 と CYP2B2 および MC 誘導性の CYP1A1 が関与することが示唆された。なお、M-4 および M-1 の生成は MC 前処理で強く促進されたことから、ハムスターでは CYP1A2 と CYP2A8 の関与が、またラットでは CYP1A1 の関与が強く示唆された。

総 括

1. 未処理, PB および MC 前処理のハムスターおよびラットに CB 105 (3 mg/body) を腹腔内に投与し, 糞中および血中代謝物の検出・定量を行った。
2. ハムスターおよびラット糞中代謝物として, 4 種類すなわち, M-1, M-2, M-3 および M-4 が検出された。これらは合成標品との比較により, それぞれ 4'-OH-2,3,3',4,5'-PenCB, 5'-OH-CB 105, 5-OH-CB 105 および 4-OH-2,3,3',4,5'-PenCB であることが明らかとなった。両動物ともに, 主代謝物は M-2 と M-3 であったが, ハムスターでは M-3 が, ラットでは M-2 が多く生成された。また, ラットに比べハムスター糞中では M-1 および M-4 が著しく少なかった。
3. CB 105 代謝に及ぼす P 450 誘導剤の影響を調べたところ, ハムスターの糞中代謝物は PB および MC 前処理により, いずれも 1.5~1.7 倍に増加した。ラットでは同様に 2~3 倍に増加した。
4. ハムスターおよびラット血中代謝物として,

未変化体とともに M-4 が検出された。次に P 450 誘導剤の影響を調べたところ, 血中 M-4 濃度はラットであまり変動しなかったのに対し, ハムスターでは PB 前処理で未処理の 1.8 倍に, また MC 前処理で 2.6 倍に増加した。

以上の結果から, ハムスターではラットとは逆に, 3',4'-二塩素置換ベンゼン環よりは, 2,3,4-三塩素置換ベンゼン環の方が酸化されやすいこと, また, 生成された M-4 はラットに比べ, より選択的に血中に分布することが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究) および科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2), No. 14572119, No. 15510058) に一部負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) Brouwer A, Klasson-Wehler E, Bokdam M, Morse DC and Traag WA: Competitive inhibition of thyroxin binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere* 20: 1257-1262, 1990.
- 2) Brouwer A and van den Berg KJ: Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 85: 301-312, 1986.
- 3) Cadogan JIG: A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.*: 4257-4258, 1962.
- 4) Darnerud PO, Morse D, Klasson-Wehler E and Brouwer A: Binding of a 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) metabolite to fetal transthyretin and effects on fetal thyroid hormone levels in mice. *Toxicology* 106: 105-114, 1996.
- 5) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y: Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rats: identification of metabolites with tissue affinity. *Chem Res Toxicol* 11: 1508-1515, 1998.
- 6) Ishida C, Koga N, Hanioka H, Saeki KE and Yoshimura H: Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyls by rat liver microsomes and highly purified cyto-

- chrome P-450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 276-284, 1991.
- 7) 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.
 - 8) Klasson-Wehler E, Lindberg L, Jonsson CJ and Bergman A: Tissue retention and metabolism of 2,3,4,3',4'-pentachlorobiphenyl in mink and mouse. *Chemosphere* 27: 2397-2412, 1993.
 - 9) Kociba RJ and Cabey O: Comparative toxicology and biologic activity of chlorinated dibenzo-p-dioxins and furans relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Chemosphere* 14: 649-660, 1985.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H: Metabolism of 2,3,4',5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. *Chemosphere* 37: 1985-1904, 1998.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H: Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica* 24: 775-783, 1994.
 - 16) Koga N, Shin'yama A, Ishida C, Hanioka N and Yoshimura H: A new metabolite of 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rat feces. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 3338-3339, 1992.
 - 17) 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-, pp 93-110, 九州大学出版会, 2000.
 - 18) Kuroki H and Masuda Y: Structures and concentrations of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 6: 469-474, 1997.
 - 19) 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.
 - 20) Yamamoto H, Yoshimura H, Fujita M and Yamamoto T: Metabolic and toxicologic evaluation of 2,3,4,3',4'-pentachlorobiphenyl in rats and mice. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 2168-2174, 1976.
 - 21) 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.
 - 22) 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.

(受付 2003-3-31)