

The Mechanism of Metabolic Reaction of Persistent PCB in Animal Species with High Excretion Capacity

有吉, 範高

<https://doi.org/10.11501/3106931>

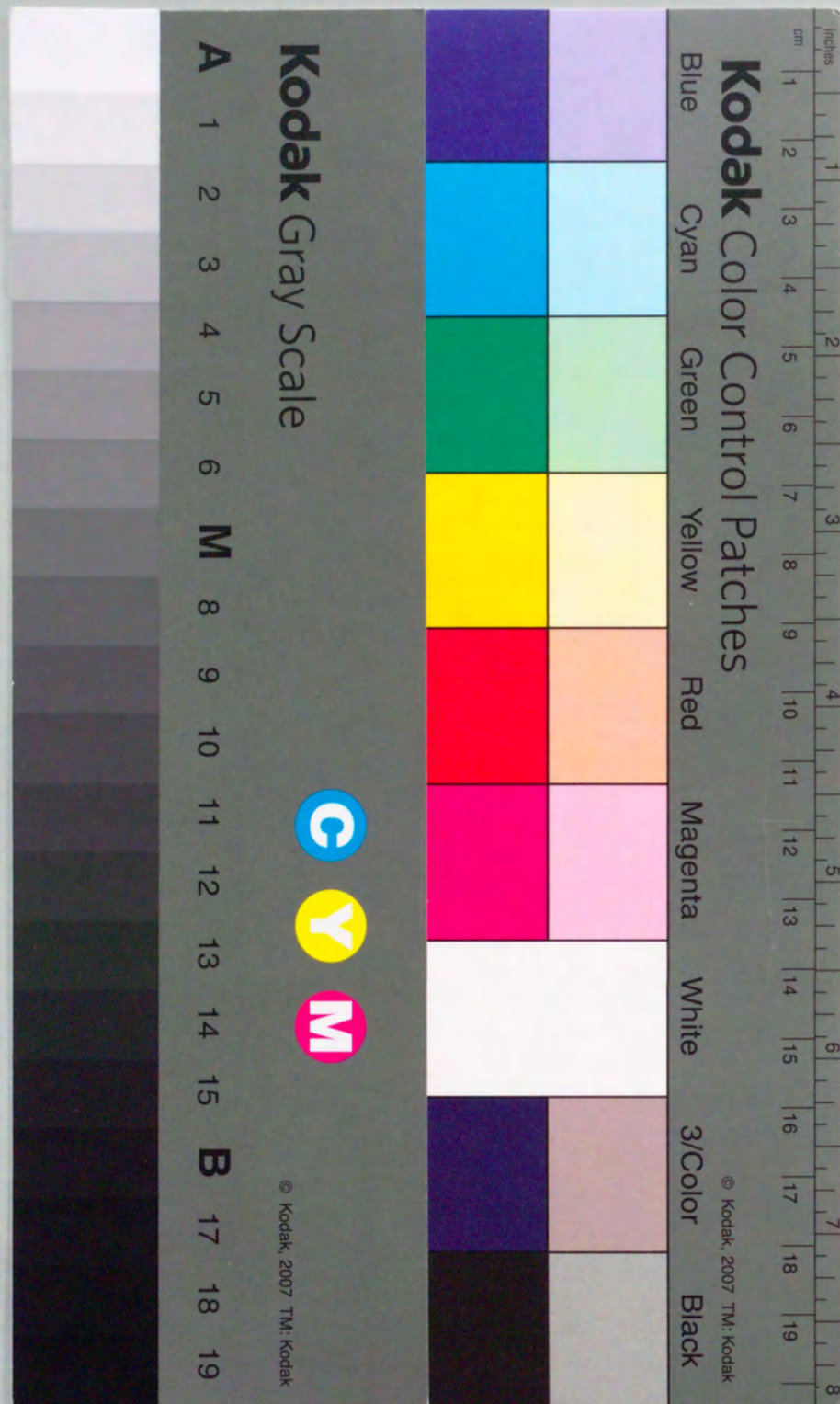
出版情報 : 九州大学, 1995, 博士 (薬学), 論文博士
バージョン :
権利関係 :



難代謝性 PCB の高排泄動物種における
代謝反応機構

1995年

有吉 範高



難代謝性 PCB の高排泄動物種における
代謝反応機構

*The Mechanism of Metabolic Reaction of Persistent PCB in
Animal Species with High Excretion Capacity*

有吉 範高
(1995)

目 次

第 I 章 緒論	1
第 II 章 イヌにおける PCB153 代謝反応機構の解明	7
第 1 節 概要	7
第 2 節 <i>In Vitro</i> 代謝物の同定	8
第 1 項 代謝物の検索および単離	8
第 2 項 M-3 の同定	11
第 3 項 M-1 の同定	12
第 4 項 M-2 の同定	14
第 3 節 <i>In Vitro</i> 代謝物の定量	17
第 4 節 SH 化合物を用いた反応機構の推定	18
第 5 節 <i>In Vivo</i> 代謝物の確認	19
第 6 節 考察	20
第 III 章 イヌにおける PCB155 の代謝反応機構の解明	23
第 1 節 概要	23
第 2 節 代謝物の同定	23
第 3 節 考察	28
第 IV 章 モルモットにおける PCB153 の代謝反応機構の解明	31
第 1 節 概要	31
第 2 節 <i>In Vivo</i> 代謝	31
第 1 項 <i>In Vivo</i> 代謝物の単離	32
第 2 項 モルモット代謝物 M-1, M-2 および M-3 の同定	33
第 3 項 モルモット代謝物 GM-1 の同定	35
第 4 項 GM-2 の推定構造	38
第 5 項 GM-3 の推定構造	39
第 6 項 糞中未変化体および代謝物の定量	41
第 3 節 <i>In Vitro</i> 代謝 - イヌとモルモットの代謝活性の比較 -	42
第 4 節 考察	43
第 V 章 PCB153 代謝に関与する cytochrome P450 分子種	47
第 1 節 概要	47

第2節	Phenobarbital 処理モルモット肝ミクロソーム からの 2B subfamily P450 の精製	48
第3節	再構成系における検討	48
第4節	Phenobarbital 処理イヌ肝ミクロソーム からの主要 P450 分子種の精製	49
第5節	再構成系における検討 II	52
第6節	抗体阻害実験	53
第7節	考察	55
第 VI 章	ヒト 2B subfamily P450 による検討	59
第1節	概要	59
第2節	CYP2B6 発現系における PCB153 代謝	61
第3節	考察	62
第 VII 章	総括	65
謝 辞		69
実験の部		70
1. 試薬		70
1)	PCBの合成と精製	70
2)	PCB 代謝物の合成と精製	70
3)	補酵素および酵素	71
4)	標準タンパク質	71
5)	カラム樹脂	71
6)	その他	72
	合成化合物の機器データ	75
2. 動物および動物処理		82
3. 肝ミクロソームの調製		82
4. タンパク定量		82
5. ミクロソームにおける PCB 代謝		82
6. PCB および PCB 代謝物の抽出および定量		83
7. PCB153 代謝物の単離		83
8. 酵素活性測定法		84
1)	Cytochrome P450 含量	84
2)	NADPH-cytochrome P450 reductase 活性	84
3)	Cytochrome b ₅ 含量	84
4)	Benzphetamine N-demethylase 活性	84

5)	7-Ethoxycoumarin O-deethylase 活性	84
6)	Testosterone hydroxylation/oxidation 活性	85
7)	Estradiol-17 β hydroxylation 活性	85
9. 酵素精製		85
1)	Cytochrome P450	86
2)	Cytochrome b ₅	86
3)	NADPH-cytochrome P450 reductase	86
10. N末端アミノ酸配列分析		86
11. 再構成系における PCB 代謝		86
12. 抗体の調製および精製		87
13. 抗体による PCB 代謝活性の阻害		87
14. SH 化合物による PCB 代謝活性の阻害		87
15. 薄層クロマトグラフィー (TLC, p-TLC)		88
16. ガスクロマトグラフィー (GC)		88
17. ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS)		88
18. 分析機器		88
19. その他		89

引用文献	90
論文リスト	98

本論文においては、次の略号を用いた。

HBB : Hexabromobiphenyl
HCB : Hexachlorobiphenyl
PCB : Polychlorinated biphenyl
PCB15* : 4,4'-Dichlorobiphenyl
PCB77* : 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl
PCB126* : 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl
PCB133* : 2,3,5,2',3',5'-Hexachlorobiphenyl
PCB136* : 2,3,6,2',3',6'-Hexachlorobiphenyl
PCB153* : 2,4,5,2',4',5'-Hexachlorobiphenyl
PCB155* : 2,4,6,2',4',6'-Hexachlorobiphenyl
PCB169* : 3,4,5,3',4',5'-Hexachlorobiphenyl
PCDD : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin
PCDF : Polychlorinated dibenzofuran
PCQ : Polychlorinated quaterphenyl
PenCB : Pentachlorobiphenyl
TCDD : Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
G-6-PD : Glucose-6-phosphate dehydrogenase
P450 : Cytochrome P450
G-6-P : Glucose-6-phosphate
GSH : Reduced form of glutathione
DLPC : Dilauroylphosphatidylcholine
DEAE : Diethylaminoethyl
HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid
PB : Phenobarbital
SDS : Sodium dodecyl sulfate
TMS : Trimethylsilyl
ECD : Electron capture detector
EI-MS : Electron impact-mass spectrometry
GC : Gas chromatography
GC-MS : Gas chromatography-mass spectrometry
HPLC : High performance liquid chromatography
NMR : Nuclear magnetic resonance
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
TLC : Thin layer chromatography
tR : Retention time

* IUPAC の PCB number に基づく

第1章 緒 論

19 世紀後半以降、人類の生活水準の目覚ましい向上を支えてきたものの 1 つとして、おびただしい数の合成化学物質の研究、開発があったことは周知の通りである。そのうち、医薬品や食品添加物は直接人体に摂取される化合物であることから、その安全性および有効性等に関する審査基準が厳しく整備されてきた。一方、人が積極的に摂取するものではない化学物質に対しては、それら規制が立ち遅れ、1974 年になってようやく化学物質審査規制法が制定されるに至っている。本法律の規制対象となる性状を持った化学物質は今や地球規模に拡散し、今後とも数世紀以上に亘って残留し続けるものと懸念される。

Polychlorinated biphenyl (PCB) は polychlorinated dibenzofuran (PCDF) や polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) と共にそうした世界的環境汚染物質として知られている塩素化芳香族炭化水素の一種である。Fig. 1 に示すようにビフェニル環の水素原子が塩素原子に置換されただけの極めて単純な構造であるが、塩素の数と位置により理論上 209 種の congener の存在が可能である。PCB の優れた物性は工業的には実に多くの有用性があり、1929 年に米国で商業ベースの生産が開始されると、産業界で多方面に使用されたが、その物性のため一度環境中に流出すると極めて分解され難く長期に亘って残留し続けることとなった。

国内では 1954 年に生産が開始され 1972 年 6 月に生産中止となるまで約 6 万トンが生産、消費されたが、1930-1975 年における全世界での累積生産量は 100 万トンは下らないと推定されている。生産中止と同時に使用規制、回収等が実施されたが現在も焼却等の廃棄処理がなされず貯蔵されている例も少なくない。PCB 関連化合物による汚染を考える場合、すでに環境中に流出した汚染源だけではなく、種々の発生源、すなわち一般家庭、産業廃棄物の焼却場、製紙工場等からの汚染は現在も進行中であり、近年特に懸念されている。

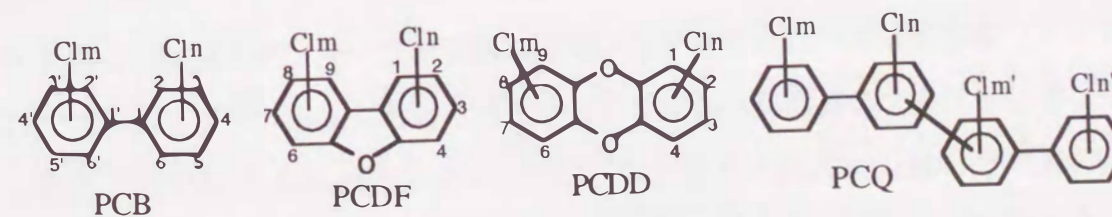


Fig. 1 Structures of PCB, PCDF, PCDD and PCQ

PCB が広く一般の人々にも知られ、その汚染の脅威が社会問題となった契機が 1968 年 (昭和 43 年) に西日本各地に広く発生したカネミ油症事件である¹⁾。さらに 1979 年には台湾中部において Yu-Cheng と呼ばれる同様の食中毒事件が発生し²⁾、この 2 つの事件によって世界的にも PCB 関連化合物の毒性が注目をあびることとなった。両事件はいずれも熱媒体として用いられていた PCB 混合物が食用油を汚染し、それを食した人々の間に起こった中毒事件である。油症は、当初 PCB による亜急性中毒症と考えられたが、その後の分析技術の進歩と精力的な研究によって、原因ライスオイル中には PCB の他に微量ながら PCDF³⁾ や PCDD⁴⁾、また PCB が 2 分子結合した polychlorinated quarterphenyl (PCQ) に至っては PCB と同程度含まれること等が明らかとなった⁵⁾。油症の原因物質としては PCB 単独ではなく、毒性の強さおよび存在量から PCDF が特に大きな寄与を持つものと推定されている⁶⁾。

PCB には前述した通り多数の congener が存在するが、その毒性の強さは様々であり、ビフェニル環の ortho {2(2'), 6(6')} 位に塩素置換を有しない 20 種の平面構造をとり得る (coplanar) PCB の中でも両ベンゼン環に 2 個以上の塩素置換を有す 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl (IUPAC PCB77)、3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (IUPAC PCB126) および 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (IUPAC PCB169) の 3 者は特に高毒性の congener として知られている⁷⁾。中でも 3,4,5,3',4'-PenCB は高毒性の PCDF congener と同等の毒性を持つとされており、市販の PCB 製品にも含まれていることが明らかとなっている⁸⁾⁹⁾。また、環境中にはこれら coplanar PCB は PCDD や PCDF よりはるかに高濃度で存在していることが明らかになりつつあり、生体系への影響が危惧されている¹⁰⁾。

PCB 関連化合物の実験動物に対する主な毒性は、体重増加抑制、胸線や脾臓の萎縮、肝障害等であるが、動物種によってはそれらに加えてヒトと同様な塩素座瘡と呼ばれる皮膚障害、ホルモンバランス異常、免疫機能不全をみる場合もある¹¹⁾¹²⁾。これら毒性の発現機構は複雑であり、動物種によって感受性や標的臓器、病理所見や死に至る経過等が様々であることから、現在まで全ての動物種に適用できる統一的な機構は見出されていない。しかし少なくとも幾つかの毒性は細胞の可溶性画分に局在する Ah receptor と呼ばれる受容体タンパク質への PCB 類の結合が引き金となっているものと考えられている¹³⁾。Ah receptor はもともと最強の人工毒物として知られている 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) が結

合するタンパク質として見出されたものであるが¹⁴⁾、不安定性のためその研究は長年困難を極めていた。しかし最近になって相次いで 2 つのグループから Ah receptor cDNA のクローニングが報告された¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、数多くの研究努力によって Ah receptor-ligand 複合体の作用機序は現在ではおよそ Fig. 2 に示すようなメカニズムと考えられている¹⁷⁾。本質的にはステロイドホルモンレセプターの作用機序と類似しており Ah receptor 応答性の一連の遺伝子群 (Ah gene battery) の 5' 上流域に存在する xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれる cis-acting element に結合して構造遺伝子の転写を促進する。TCDD のレセプター

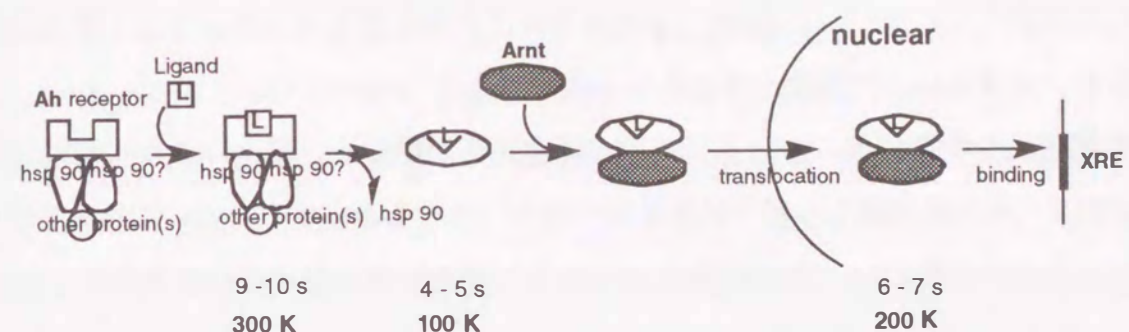


Fig. 2 Proposed mechanism of Ah receptor function

への結合は両ベンゼン環が同一平面上に位置することと、塩素置換位置が 2,3(4),7,8 位であることが重要であり、前述の coplanar PCB はこれら条件を満たすために高い毒性をもつものと解釈される⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。

これまで述べてきた毒性は主に急性毒性であり、PCB 自身すなわち代謝される前の母化合物が持つ毒性であるのに対し、以前から PCB 代謝物あるいは代謝中間体に基づく毒性も無視できないことが示唆されていた。Yoshimura らは 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl とその主代謝物 5-hydroxy 体のマウスにおける LD₅₀ 値を算出したところ代謝物が 5 倍も致死作用が強かった²⁰⁾。Brodie らはハロ置換ベンゼンによる肝壊死の原因をエポキシド中間体と推定しているが、PCB においても同様の活性代謝物が生成し、生体高分子に共有結合する可能性が報告されている²¹⁾²²⁾。その後、エポキシド中間体生成は 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl の 3,4-arene oxide 体の単離によって直接的に証明され、疑う余地のないところとなった²³⁾。これら活性中間体が PCB の変異原性や細胞毒性に関与する可能性は否定できない²⁴⁾。

ビフェニル環の ortho {2(2'), 6(6')} 位に塩素置換を有する congeners (以下 non-planar PCB) は coplanar PCB 様の著しい急性毒性を示さないため毒性発現にあまり関与していないと考えられていたが、最近 non-planar PCB や PCB 代謝物による前述したものとは異なる

毒性の報告が見られるようになり、PCB 毒性研究は新たな展開を見せつつある²⁵⁻³⁰⁾。

近年 PCB 関連化合物の毒性評価を統一しようとする動きがあり、最強の急性毒性を示す 2,3,7,8-TCDD の毒性を 1 とした場合の毒性等価係数 toxic equivalence factors (TEF) が提唱され³¹⁾³²⁾、混合物の場合は TEF を各々の congener の存在濃度に乗じて toxic equivalents (TEQ) を求め、その総和であらわされるようになっており、以前に比べて評価しやすくなった。しかしそのように PCB 混合物のリスクアセスメントを各々の congener の相加的な毒性で評価しようという概念の一方で、2 種あるいはそれ以上の純粋な congener を環境中あるいは人体汚染の濃度比に基づいて mixture とし、その混合物を投与することでより実際の評価を行なおうとする試みが重要と考えられるようになりつつある。

PCB 関連化合物の排泄についてはここでは詳述を避けるが、以上のような毒性や排泄を考える際にその生体内動態の解明は不可欠であり、それを達成するためにこれまで多くの代謝研究がなされてきた。その結果以下のような事実が明らかとなってきた。

- 1) 一般に塩素置換数の少ない PCB の方が代謝されやすく、4 塩素化体以下の低塩素化体は速やかに代謝されるのに対し、5～6 塩素化体になるとその速度はかなり低下する。7 塩素化体以上の高塩素化体になるとほとんど代謝されない。
- 2) 同一塩素数を有する異性体間では、塩素置換位置によって代謝速度が大きく異なる。
- 3) PCB には薬物代謝酵素誘導能を有するものがあるが自らが誘導する酵素によって主に代謝される。
- 4) PCB の代謝能力は動物種により大きく異なる、等である。

本研究の中心となる PCB congener は 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl (HCB) である (Fig. 3)。以降は、近年汎用されつつある

IUPAC の PCB number に基づき PCB 153 と略称する。PCB153 は diortho 塩素置換を有する non-planar PCB であるため Ah receptor への親和性がほとん

どなく³³⁾単独では co-planar PCB 様の急性毒性を示さない。このため、毒性学的には軽視される傾向にあったが、PCB153 を coplanar PCB や TCDD と同時投与することによって

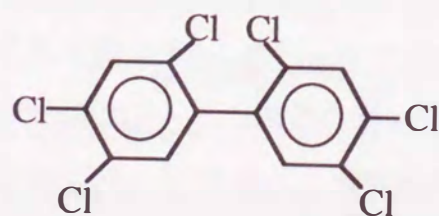


Fig. 3 Structure of 2,4,5,2',4',5'-HCB (PCB153)

coplanar PCB 等の毒性が著しく高まることが明らかにされ³⁴⁻³⁷⁾、その主要なメカニズムは PCB153 が Ah receptor を誘導するためと考えられている³⁸⁾。また、最近著者らはヒトで薬物代謝に主たる役割を担っている 2C subfamily P450 (CYP2C) の活性は PCB153 によって著しく阻害されるのに対し、最強毒性を有する coplanar PCB、3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl ではほとんど影響されないことを見出し報告した³⁹⁾。しかし他方で PCB153 が Ah receptor のアンタゴニストとして作用し、TCDD の示すある種の毒性は軽減されるとの報告もなされており⁴⁰⁾、その毒性学的位置は確定しているとは言い難い。

PCB153 が注目されてきた主な理由は、その蓄積性と環境中レベルの高さによるところが大きく、分布、排泄のモデル化合物としての研究が大部分を占める。PCB153 の高い生体残留性は、脂肪組織への著しい指向性および蓄積性と極めて代謝され難いことに起因する。事実、PCB153 は油症原因となったライスオイル中には主成分ではなかったにもかかわらず、発症より四半世紀以上を経過した現在の油症患者の血液中に最も高濃度で検出される異性体となっている⁴¹⁾。PCB153 は環境中においても極めて難分解性であり、また、母乳を介して胎児に移行することが明らかとなっており⁴²⁾、健常人体内においても最も高濃度に見出される congener の一つであることが報告されている⁴³⁾。

しかしながら、PCB153 は実験動物において極めて難代謝性であることから代謝に関する報告は少ない。ヒトにおいては肝ミクロソームでの検討がなされているが、代謝物の検出には至っていない⁴⁴⁾。上述のごとく PCB153 の人体汚染は油症患者ばかりではなく、健常人にも広く浸透しており、今後も濃縮の危険性と傾向は否めない。毒性に関しても未知数であり、慢性毒性や coplanar PCB との協調毒性等の観点から、環境中からの摂取回避および体内からの排泄促進は重要な課題であると考えられる。

PCB153 の排泄促進については、これまで研究例がなかったわけではない。摂食制限による蓄積部位からの遊離を利用した方法⁴⁵⁾、難吸収性飽和炭化水素スクワランを用いた排泄促進研究⁴⁶⁾、そして PCB153 に特異的な抗体を利用した排泄促進⁴⁷⁾等である。しかしそのいずれも効率的な方法であるとは言えず、また著効があるものでもなかった。こうした背景のもと、本研究は PCB153 を効率よく代謝的に排泄できる動物種において、それがどのような代謝反応機構で可能となったかを明らかにする目的で開始された。第 2 章では他の研究グループで見出され、現在まで PCB153 を効率的に排泄できる唯一の動物種として

知られていたイヌを用いて検討し、第4章ではイヌと同じ反応機構を持つ動物種として本研究で新たに見出したモルモットにおいて検討を行なった。また、前述のように排泄を考える際に代謝の知見は不可欠である。そこで未だ代謝に関する知見がないヒトにおいてPCB153の代謝を明確にする目的で最後にヒトの薬物代謝酵素発現系を用いて検討した。以下、それらの結果について論述する。

第II章 イヌにおける PCB153 代謝反応機構の解明

第1節 概要

緒論に述べたように PCB153 は魚類、鳥類、齧歯類、霊長類等で代謝研究がなされた⁴⁸⁻⁵²⁾が、いずれの実験動物においても極めて難代謝性であり、そのことが PCB153 の高蓄積性に寄与しているものと考えられている。ところが 1982 年に Sipes らによってイヌだけは例外的に PCB153 を速やかに体外へ排泄する能力を持つことが報告された⁵³⁾。

ビフェニル環水酸化のメカニズムは基本的に芳香環水酸化のそれと同様と考えられている。提唱されている数種のメカニズムの中で古くから芳香環水酸化の主要なメカニズムは arene oxide 中間体を経由する反応であると言われてきた。即ち C=C 結合への酸素付加反応により arene oxide (芳香環のエポキシド) 中間体が生成し、ついでそれが転移してフェノール体が生じるというものである。しかし全ての芳香環水酸化反応がこのメカニズムを経てはいない証拠が蓄積され、C-H 結合に活性化された酸素原子が直接挿入され、1 ステップでフェノールを生成する直接水酸化と呼ばれる機構も重要と考えられている⁵⁴⁾。

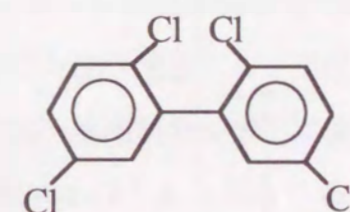
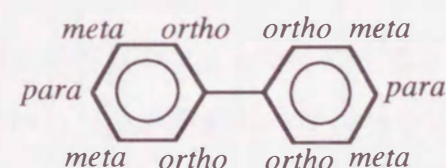


Fig. 4 Structure of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl

一般に PCB の代謝はその構造中に塩素未置換の meta-para 位炭素原子が隣接していると水酸化を受けやすいことが経験的に知られており、たとえばそうした構造を持つ 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl は代謝されやすい congener の代表である (Fig. 4)。Matthews らによれば PCB に meta-para 位隣接塩素未置換炭素がある場合には arene oxide 中間体生成が容易であるため代謝され易く、そうした炭素がない場合にはじめて meta 位の直接水酸化反応が優位になるものと推察している⁵⁵⁾。実際この経験則はヒトを含む多くの動物種で的を得ており、かなりの部分が説明可能である。

Sipes らは PCB153 の構造はそうした meta-para 位の隣接塩素未置換炭素がないことと、塩素置換位置の異なった数種の HCB 異性体の体内消失速度の比較からイヌでは meta 位に

酸素原子を直接導入する能力が他の動物種より著しく高いのではないかと考察している⁵³⁾。

PCB においては第一相反応による二次代謝物や第二相反応による抱合体代謝物の生成は多くないため、Sipes らの推測が正しいと仮定するならばイヌにおいて複数の代謝物は生成しないものと考えられる。それにもかかわらず、Duignan らはイヌ肝ミクロソームを用いた代謝実験において少なくとも 4 種の代謝物が検出されたと報告している⁵⁶⁾。著者はこの矛盾点からイヌにおいては未知の代謝反応機構が関与している可能性があるものと推察した。その仮定を検証するにはなりよりもまずイヌにおける PCB153 の主代謝物の構造決定が必要である。そこで本章ではまずその試みから開始した。

第 2 節 *In Vitro* 代謝物の同定

第 1 項 代謝物の検索および単離

Phenobarbital (以下 PB) 処理イヌ肝ミクロソームを酵素源として、NADPH 生成系の存在下、PCB153 を 37℃ で好氣的にインキュベーションし、反応停止後、有機溶媒で未変化体および代謝物を抽出した (実験の部 6 参照)。総抽出物についてシリル化およびメチル化を行い、電子捕獲型イオン化検出器 (ECD) 付きガスクロマトグラフにおいて代謝物の検出を試みた。Fig. 5 に示すように NADPH 非存在下 (A) ではいずれの誘導体化においても未変化体のピークの他に 1 本のピークが認められた (メチル化体のデータ省略) が、もとの基質溶液には認められないことから基質中の不純物ではなく、有機溶媒によって抽出される生体成分と考えられた。マスマスペクトルを測定した結果も塩素に特徴的な同位体ピークは認められず、PCB に由来するものではないことが明らかであった。NADPH 存在下ではメチル誘導体化 (C) した場合は 2 本、シリル誘導体化 (B) した場合は 3 本の新たなピークが認められた。シリル化した場合に検出される 3 本のピークについて保持時間 (以下 tR) の短い方から M-1, M-2 および M-3 と命名した。後に代謝物を単離したところメチル化した場合は M-2 と M-3 のピークの tR が近く分離しないため混合物ではみかけ上 2 本に見えることが明らかになった。

上記 3 種の代謝物の構造を決定するにあたり、まず各代謝物の単離を試みた。総抽出物

から数本のシリカゲルカラムを用い、溶出溶媒の極性を段階的に変化させることにより 3 種の代謝物をそれぞれ単一にまで精製した。

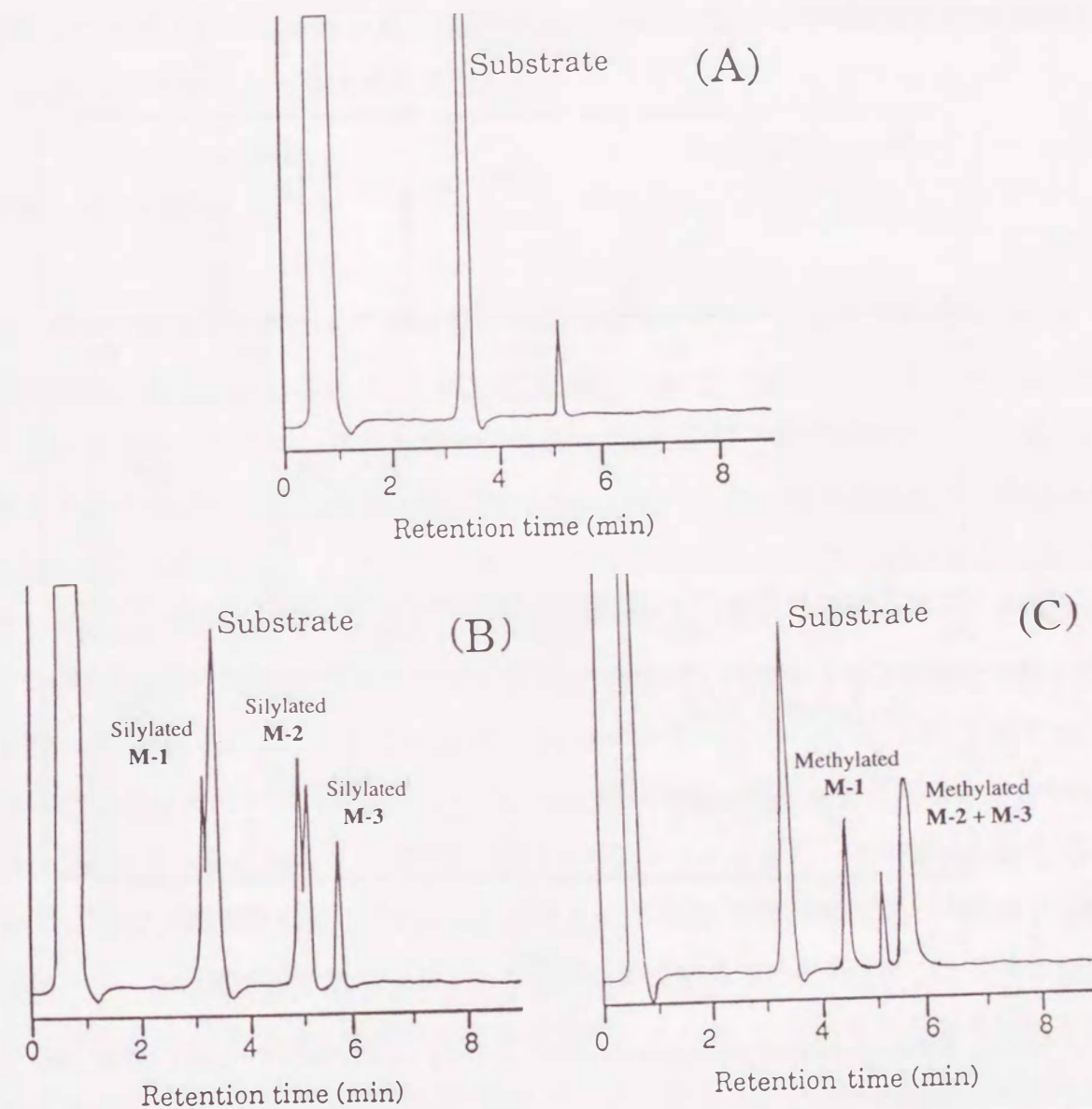


Fig. 5 Gas chromatograms of incomplete (-NADPH, A) and complete (B, C) system of 2,4,5,2',4',5'-HCB metabolism with liver microsomes. A and B: trimethylsilylated derivative C: methylated derivative

Fig. 6 に各代謝物のメチル誘導体の electron-impact マスマスペクトル (EI-MS) を示す。PCB 代謝物の構造決定にあたり、PCB 水酸化体のメチル誘導体のマスマスペクトルは分子量以外に水酸基の置換位置に関してきわめて有益な情報を与えることが知られている⁵⁷⁾⁵⁸⁾。

現在までに例外も見出されてはいるが、一般に *para* (4 or 4') 位に methoxy 基を有するものはメチル基が脱離したと考えられる $[M^+-15]$ が、*ortho* {2(2') or 6(6')} 位に methoxy 基を有するものはメチル基と塩素が脱離したと考えられる $[M^+-50]$ のフラグメントイオンピークの相対強度が大きいのが特徴的であることが見出されている。

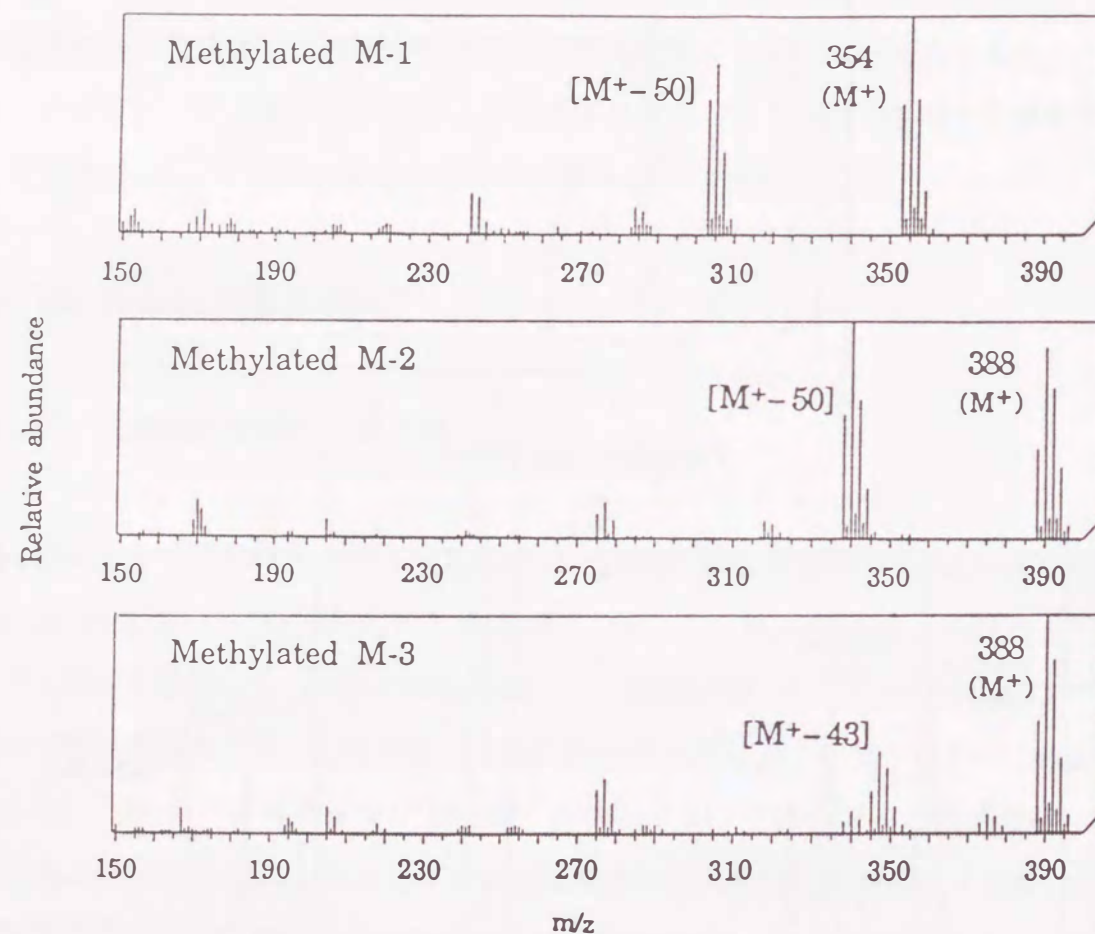


Fig. 6 Electron-impact mass spectra of methylated metabolites formed by dog liver microsomes

M-1 のメチル誘導体は分子イオンピークを m/z 354 に示し、5 塩素化体に特徴的な同位体ピークが観察された。さらに $[M^+-50]$ のフラグメントイオンピークが相対的に高いことから塩素が1つ脱離するとともに *ortho* 位に水酸基が導入された monohydroxy-pentachlorobiphenyl (PenCB) であるものと推定した。M-2 と M-3 についてはいずれもそのメチル化体の分子イオンピークを m/z 388 に示し、6 塩素化体に特徴的な同位体ピークが観察される

ことから母化合物が1つ水酸化された monohydroxy-hexachlorobiphenyl (HCB) であるものと推定した。水酸基の位置に関しては M-2 は $[M^+-50]$ のフラグメントイオンピークから *ortho* 位に、M-3 は前記いずれの特徴的なフラグメントイオンピークが観察されず、 COCH_3 基が脱離したと考えられる $[M^+-43]$ のフラグメントイオンピークが比較的高いことから経験的に *meta* 位に置換しているものと予想した。

第2項 M-3 の同定

前項において M-3 は母化合物の *meta* 位に水酸基が導入された代謝物と考えられたが、この予想代謝物である 3-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB はこれまで PCB153 を代謝できる全ての動物種において見出されている共通代謝物である⁴⁸⁻⁵²⁾ことからイヌでも生成しうるものと考え、まずその合成から試みた(実験の部1の2反応D)。その結果理論通り2種の monohydroxy-HCB が生成した。両者はガスクロマトグラフィー (GC) における *tR*、シリカゲルカラムからの溶出とも極めて近く、分離が困難であったため、薄層クロマトグラフィー (TLC) での分離条件を検討しプレパラティブ TLC (p-TLC) によって分離精製が可能となった(実験の部15参照)。TLC における *Rf* 値の大きい方から S-3a, S-3b と命名し、メチル化体の EI-MS スペクトルを測定したところ、相対強度はあまり大きくないが S-3b には S-3a には認められない $[M^+-15]$ の特徴的なフラグメントイオンピークが認められたことから S-3b は4位に水酸基を有する 4-hydroxy-2,3,5,2',4',5'-HCB と考えられた。後述するがこの化合物はラットの糞中代謝物の一つとして同定されているものである⁵¹⁾。メチル化体のマススペクトルおよび GC の *tR* が一致することから S-3a が M-3 であると考えられた。

Fig. 7A, B に S-3a および S-3b の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。水酸基が置換した芳香環のプロトンの化学シフトから、予想した通り S-3a が予想代謝物 3-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB であることが明らかとなった。Fig. 7C に代謝物 M-3 の芳香環プロトン部分を示したが、これも S-3a のそれと完全に一致した。

以上のことから M-3 は 3-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB であると同定された。

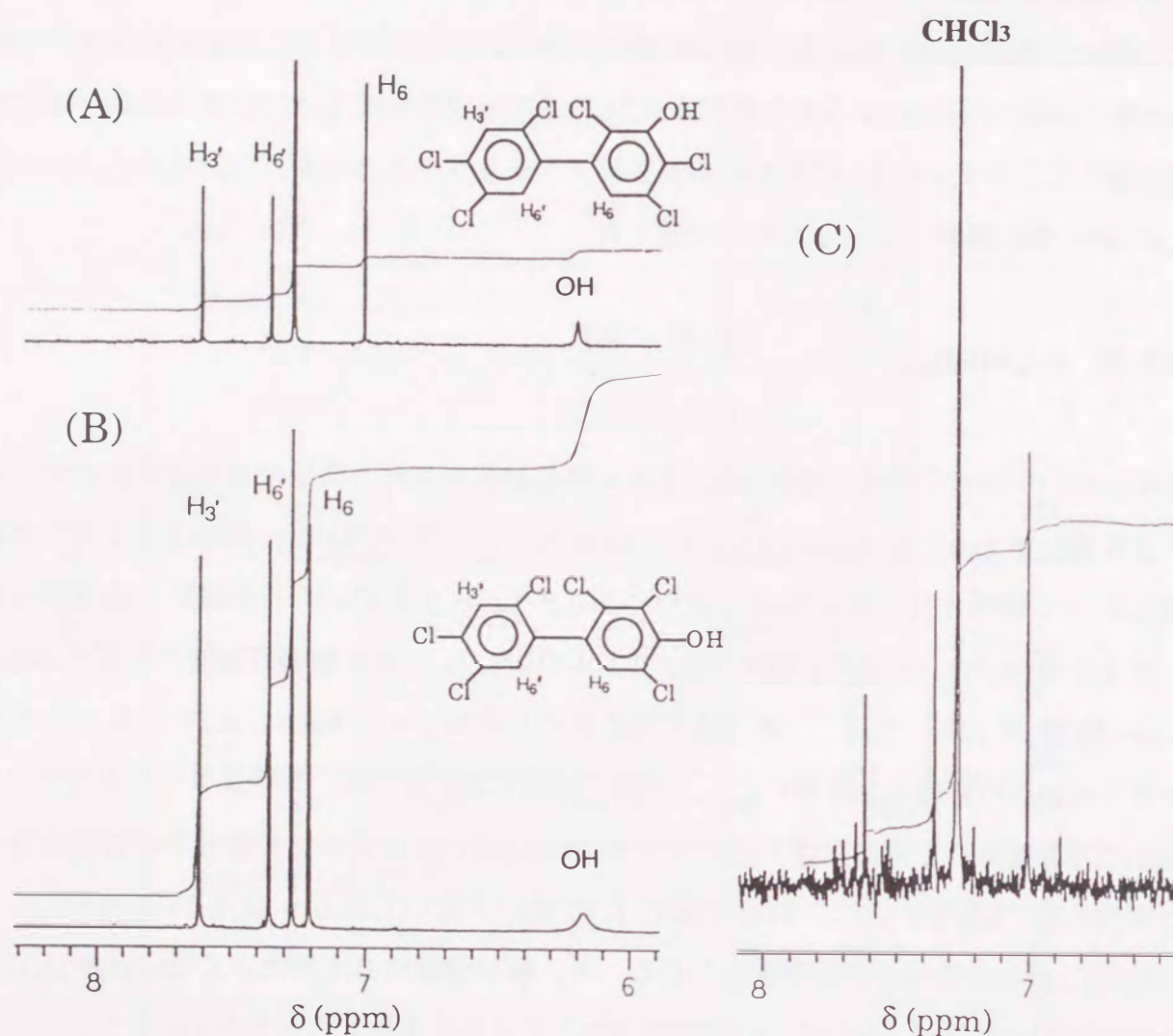


Fig. 7 ^1H -NMR spectra of S-3a (A), S-3b (B) and M-3 (C) without derivatization

第3項 M-1の同定

M-1の構造が第1項の推定通りであると仮定した場合、6 (または 6') 位に水酸基が置換されたとしても塩素原子が脱離する反応が同時におこるとは考え難いことから、2 (または 2') 位の塩素が脱離した位置に水酸基が導入されたと考えるのが妥当と思われる。そこで予想代謝物の合成を試みた (実験の部1の2反応A)。本反応では理論的に3種の化合物が生成可能であるが、単離した2種の化合物に対し、シリカゲルカラムからの溶出順にS-

1a, S-1bと命名し、メチル化後マススペクトルを測定した。両者はGCにおいてtRが異なるもののEI-MSスペクトルにおいては区別がつかず、いずれも $[\text{M}^+-50]$ の特徴的なフラグメントイオンピークを有していた (機器データ参照)。そこで両者の区別のために ^1H -NMRスペクトルを測定した。M-1のメチル化体の芳香環プロトン部分とS-1a, S-1bのメチル化体のスペクトルをFig. 8に並べて示す。

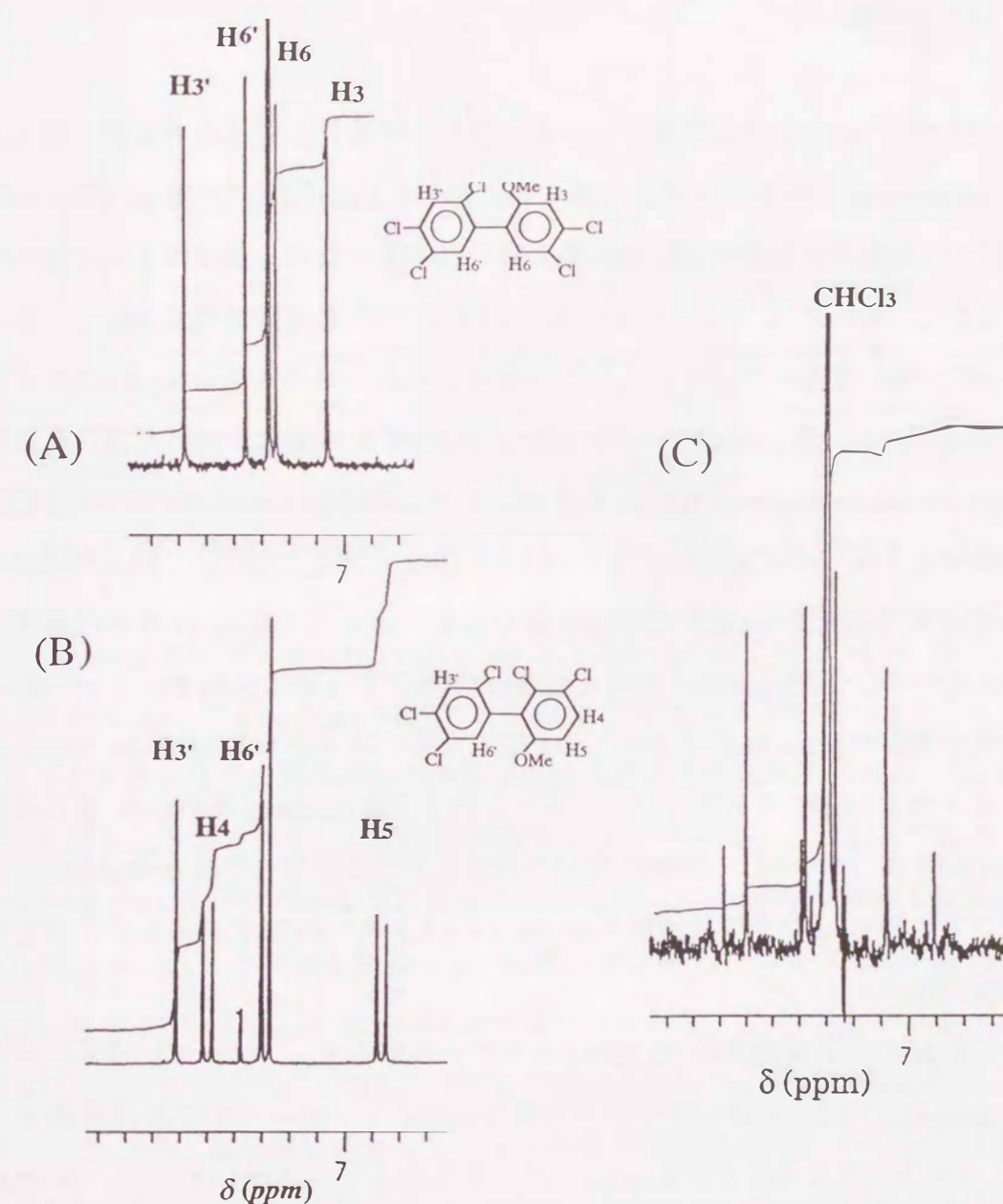


Fig. 8 ^1H -NMR spectra of methylated derivatives of S-1a (A), S-1b (B) and M-1 (C)

この結果、S-1b は PCB153 の代謝においては生成不可能な合成副産物であることが明らかとなった。また、M-1 と S-1a のメチル化体のスペクトルが完全に一致し、データには示さないがメチル化およびシリル化体の GC における tR も S-1a のそれと完全に一致した。

以上のことから M-1 は 2 位の塩素が脱離すると同時にその位置に水酸基が導入された 2-hydroxy-4,5,2',4',5'-PenCB であると同定された。

第4項 M-2 の同定

M-2 は母化合物の *ortho* 位に水酸基が一つ導入された代謝物と考えられるが、第1項に記したように arene oxide 中間体の生成が困難である場合、*meta* 位への水酸基の導入が優位であり *ortho* 位への水酸基直接導入反応の結果と見られる代謝物の生成はほとんど知られていない⁵⁹⁾。しかし、Kato らはラットにおける 2,4,5,2',4',5'-HCB 代謝研究において、ラット糞中から *ortho* 位への水酸基の直接導入反応の成績体と考えられる 6-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB を見出している⁵¹⁾。一方、Gardner らは 2,4,5,2',4',5'-HCB の塩素が全て臭素に置き換わった 2,4,5,2',4',5'-hexabromobiphenyl (HBB) を主成分とする難燃剤 Firemaster BP-6® を経口投与したイヌの糞中より唯一の代謝物として 6-hydroxy-HBB を同定した⁶⁰⁾。以上の知見からイヌでは他の動物種では稀な *ortho* 位の直接水酸化反応によって 6-hydroxy 体を生成する可能性が考えられたため、予想代謝物の合成を試みた(実験の部1の2反応B)。その結果理論通り2種の化合物が生成し TLC において Rf 値の大きいほうから S-2a, S-2b と命名した。両者についてメチル化体のマススペクトルをとったところ methoxy 基が *ortho* 位に置換していることを示唆する [M⁺-50] の特徴的なフラグメントイオンピークは methylated S-2a のみに見られたことから S-2a が予想代謝物 6-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB であるものと考えられた(機器データ参照)。

Fig. 9A に S-2a のメチル化体の ¹H-NMR スペクトルを示す。データには示さないが、シグナルの assign はスピンドカップリングで行なった。Fig. 9B には代謝物 M-2 のメチル化体の ¹H-NMR スペクトルを示したが、意外なことに予想に反して 6-methoxy-2,4,5,2',4',5'-HCB (Methylated S-2a) のものとは明らかに異なっており、最も高磁場側のプロトンのシグナルは溶媒 (CHCl₃) ピークと重なっていた。

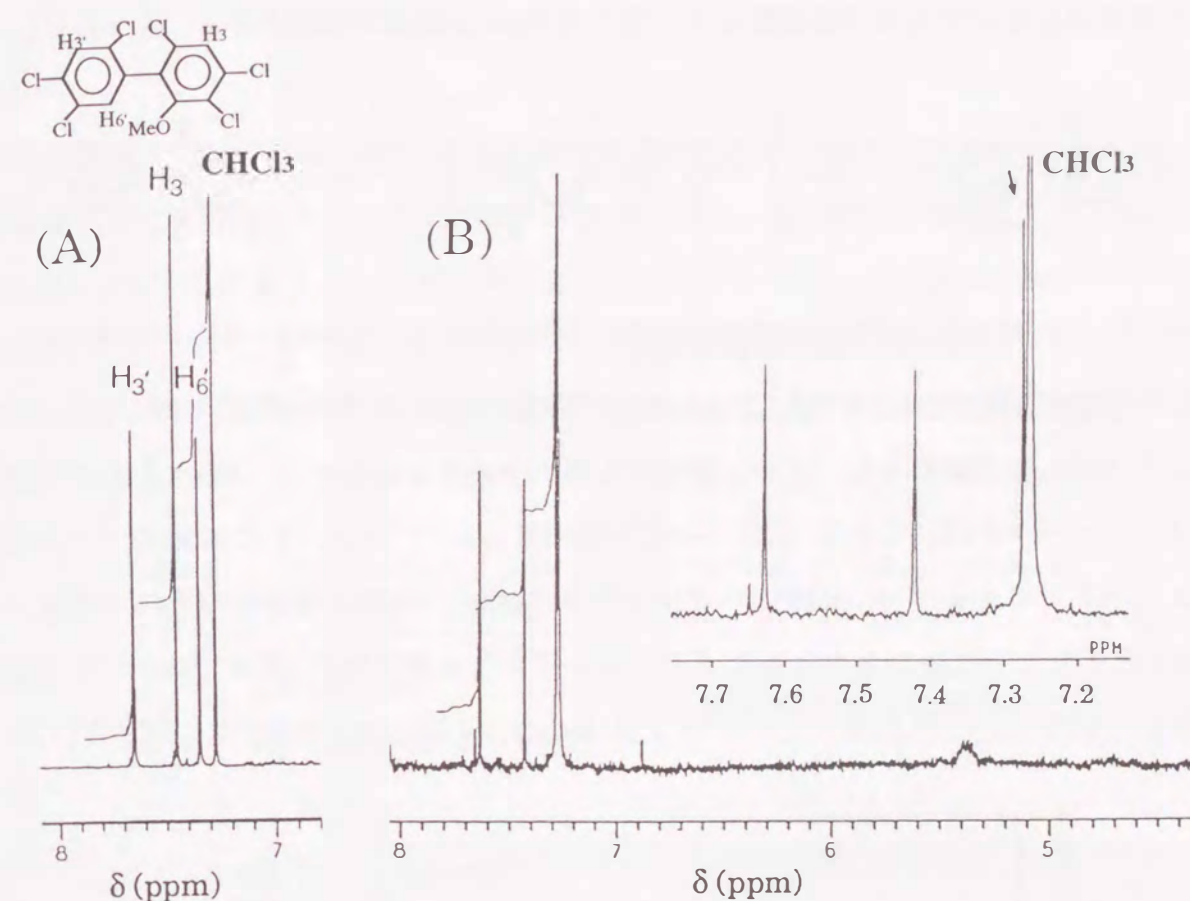


Fig. 9 ¹H-NMR spectra of methylated derivatives of S-2a (A) and M-2 (B)

データには示さないがメチル化およびシリル化後の GC における tR も異なっており、以上のことから M-2 は 6-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB ではないことが明らかとなった。

ところで芳香族炭化水素の代謝物の中には母化合物の置換基の位置が隣に 1,2-shift したものがしばしば見出されており、この現象は最初に NIH の Daley らによって報告されたことから以後 NIH-shift と呼ばれるようになった。この NIH-shift は間接的ではあるが代謝中間体として arene oxide 中間体を経由している強力な証拠の一つとされている⁶¹⁾。PCB の代謝においても 1975 年に Safe らがはじめて証明して以来、多くの PCB congener の代謝において確認されている⁶²⁻⁶⁵⁾。ただし、PCB の場合オキシラン環はほぼ排他的に *meta-para* の位置に生成し⁶⁷⁻⁶⁹⁾、塩素置換のあるビフェニル環では *ortho* 位置への水酸化が抑制される⁶⁹⁾との考察がなされている⁶⁹⁾。事実 PCB の代謝において *ortho-meta* 位置のオキシラン環生成の報告はこれまで全くなされていない。しかし以上のことを踏まえたとしても今回のデータを説明するには Fig. 10 に示すように *ortho-meta* (以下 2,3-) 位の arene oxide 中間体

生成と2位水酸化にともなう塩素原子の3位へのNIH-shiftが予想された。

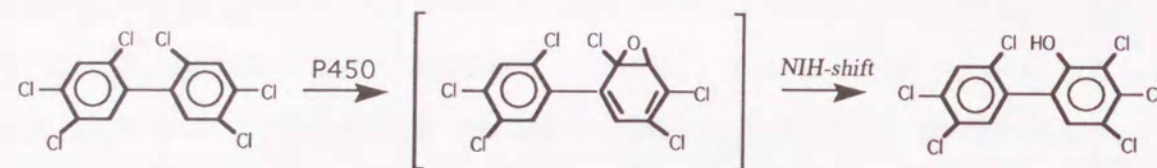


Fig. 10 Postulated metabolic pathway of M-2 formation via 2,3-arene oxide intermediate

そこで予想代謝物 2-hydroxy-3,4,5,2',4',5'-HCB の合成を試みた (実験の部 1 の 2 反応 C)。生成した 2 種の化合物のうち、メチル化体のマススペクトルにおいて $[M^+ - 50]$ のフラグメントイオンピークが認められる S-2c のみを単離精製した。Fig. 11 に S-2c のメチル化体のマススペクトルおよび $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。両者は代謝物のそれら (Fig. 6 & Fig 9B) と完全に一致しており、またメチルおよびシリル誘導体の GC における t_R も完全に一致していた。以上のことから M-2 は 2-hydroxy-3,4,5,2',4',5'-HCB と同定された。

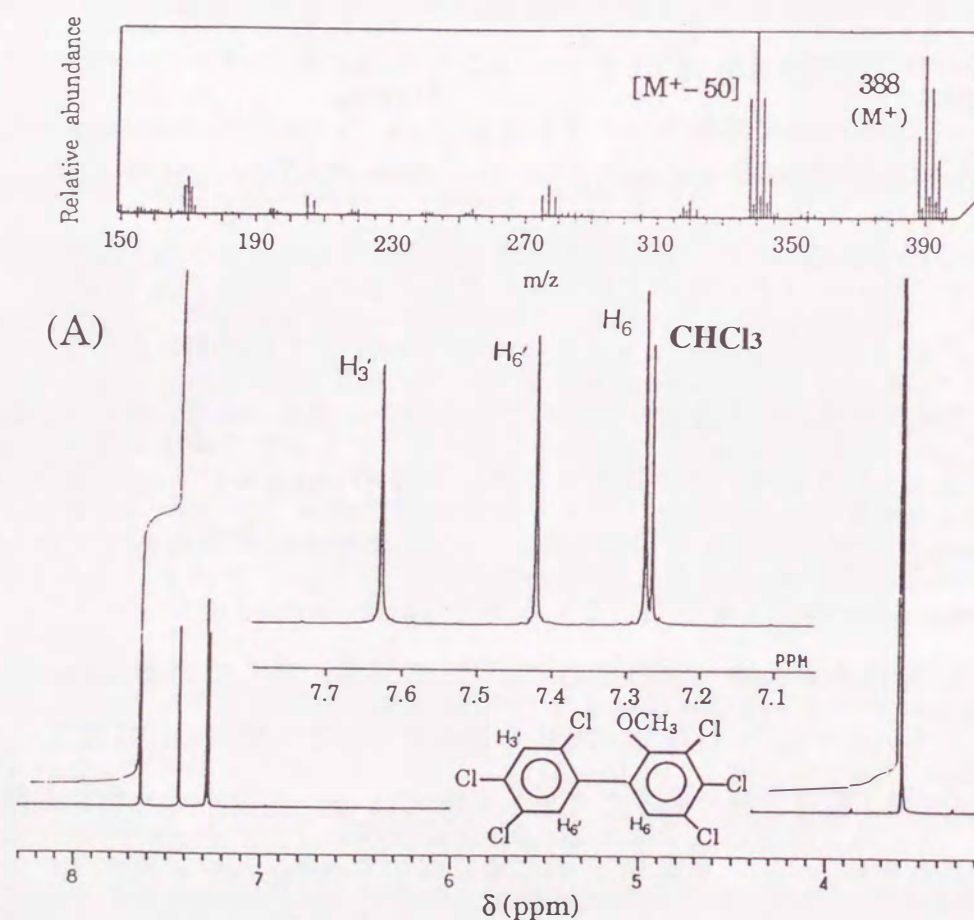


Fig. 11 EI-MS and $^1\text{H-NMR}$ spectrum of methylated derivative of S-2c

第3節 In Vitro 代謝物の定量

第2節においてイヌにおいてはこれまで報告された例のない PCB 2,3-arene oxide 中間体を経由した代謝物が生成することが明らかとなったが、他の動物種でも生成する共通代謝物 3-hydroxy 体も生成する。イヌで本 PCB の排泄が早い理由に 2,3-arene oxide 中間体経由の代謝が関与しているならば、本中間体由来の代謝物量が共通代謝物量を凌駕しているはずである。そこで本節では同定したイヌ肝ミクロソームにおける PCB153 の 3 種の代謝物の定量を行なった。その結果を Table 1 に示す。

Table 1 Determination of three major metabolites of PCB153 produced with liver microsomes of dogs

Metabolites	Metabolite formed (pmol/min/mg protein)
M-1	80.5 $\pm$ 1.50
M-2	41.5 $\pm$ 1.00
M-3	55.5 $\pm$ 2.00

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three determinations.

ところで NIH-shift 成績体である M-2 が 2,3-arene oxide 中間体由来の代謝物であることは疑う余地のないところであるが、他の 2 種の代謝物が 2,3-arene oxide 中間体由来であるかは明らかでない。M-1 は水酸化を受けていると同時に塩素原子が脱離した代謝物であり、このような脱塩素水酸化体の生成は以前から知られていたにもかかわらず、現在もその生成機構については解明されていない。しかし、arene oxide 中間体由来とする説が現時点では有力視されており、脱塩素水酸化代謝物の生成を arene oxide 中間体生成の間接的証拠と考えている研究者は少なくない⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾⁽⁷⁰⁻⁷²⁾。PCB の代謝においても脱塩素水酸化体の生成はしばしば確認されてきたが、興味深いことに脱塩素化を伴う水酸化の位置はこれまで meta あるいは para 位に限られており、今回のように ortho 位への水酸基の導入の例はない⁽⁷³⁾。2,3-arene oxide 中間体生成の証明と同時に ortho 位への脱塩素水酸化成績体が初めて確認されたことは M-1 が 2,3-arene oxide 中間体由来の代謝物である可能性を強く示唆しているも

のと思われる。一方 M-3 のような *meta* 位の monohydroxy 体は同位体効果⁵⁴⁾や合成 arene oxide を用いた検討⁷⁴⁾から arene oxide 中間体由来であるとは考えられておらず、第 1 節に記したように直接水酸化反応により生成するとの考え方が支配的である⁵⁴⁾。M-1 と M-2 はこれまで検討された全ての動物種でイヌのみに検出される代謝物であり、Table 1 の結果、その合計は共通代謝物 M-3 の 2 倍強を占めることが明らかとなった。本節で推察したように M-1 も 2,3-arene oxide 中間体由来の代謝物であるならば、イヌにおいては本中間体の生成能力こそが PCB 153 の体内消失に大きく寄与している可能性が高いと考えられる。

第 4 節 SH 化合物を用いた反応機構の推定

前節において 3 種の代謝物のうち、M-1 および M-2 はいずれも 2,3-arene oxide 中間体由来の代謝物であると仮定して論述してきた。本節ではその仮定を検証するために *in vitro* 反応系への SH 化合物添加の代謝物生成に及ぼす影響を検討した。PCB の生体高分子への結合は種々の SH 試薬添加によって減少することが知られている²²⁾。このことは PCB の生体高分子への結合に反応性の高い代謝中間体が関与しており、この中間体に SH 等の求核置換基が結合するために反応性が消失することを意味している。従って目的の水酸化代謝物が arene oxide 中間体を經由しているならば、SH 試薬の添加によりその生成は低下することが予想される。今回の検討では細胞内での濃度が高く、酵素的および非酵素的に arene oxide に結合可能な還元型グルタチオン (GSH) を用いた。その結果を Table 2 に示す。

Table 2 Inhibitory effect of glutathione on three metabolites formation

Metabolites	Metabolite formed (pmol/min/mg protein)	
	Control	GSH (5 mM)
M-1	85.0 ± 0.50	56.5 ± 2.50 *** (67)
M-2	28.0 ± 2.50	8.00 ± 0.50 *** (28)
M-3	48.5 ± 2.00	36.0 ± 1.00 ** (74)

Each value represents the mean ± S.D. of three determinations, and figure in parenthesis is percentage of control.

, * ; Significantly differnt from control, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively

予想通り NIH-shift 成績体である M-2 は 5 mM の GSH 添加によってその生成活性が著しく低下した。一方、M-3 の生成活性も低下したがその程度は M-2 のそれに比べて大きくなく、M-3 は主に非 arene oxide 中間体経由で生成している可能性が示唆された。しかしながら M-1 については予想外に抑制の程度が小さく、著者の推測とは矛盾する結果であったが、これまで M-1 のような脱塩素水酸化体について同様な検討がなされた例がないため、この解釈には、さらなる検討が必要である。今後、脱塩素水酸化反応機構の解明と共に解決すべき点の一つと考えられる。

第 5 節 *In Vivo* 代謝物の確認

第 2 節においてイヌ肝ミクロソームにおける本 PCB の 3 種の主代謝物を同定し、第 3 節においては *in vitro* 系で 2,3-arene oxide 中間体由来と考えられる 2 種の代謝物の生成量が共通代謝物の生成量を上回ることが明らかとなった。しかし、*in vitro* 代謝の結果が必ずしも常に生体内での代謝を反映しているとは限らない。例えば、今回行なった *in vitro* 代謝実験系ではグルクロン酸抱合など第 2 相反応は無視した系である。そこでここではイヌにおける本 PCB の *in vivo* 代謝を検討した。

PB 前処理を行なったイヌ (8 ヶ月齢、体重 8.0 kg) にゼラチンカプセルに封入した PCB 153 を 100 mg/kg あて一回経口投与し、PCB 投与日から 5 日間の糞および尿を全量採取した。分析の結果、尿中からは遊離、抱合型いずれの代謝物も検出されなかった。一方糞中からは *in vitro* で同定された 3 種の代謝物が検出された。その定量結果を Table 3 に示す。

薬物代謝研究においてはしばしば見られることであるが、*in vitro*, *in vivo* の両系において、得られた代謝物の構造は同じであるが、その生成比は異なっていた。即ち 3 種の代謝物の内 *in vitro* 系では常に M-1 の生成活性が高かったのに対し、*in vivo* 系では M-1 の生成量は最も低く、むしろ M-2 の生成量が多かった。この事実は 2,3-arene oxide 中間体からの転移反応が、両実験系で異なるのか、M-1 が生体内ではさらに代謝を受けるのか、あるいは何らかの理由で生体残留性を獲得して排泄され難いのか等の原因が考えられるが、本検討では明らかにできなかった。しかしながら *in vivo* においても 2,3-arene oxide 中間体由来と考えられる M-1 と M-2 の生成量の合計は、M-3 の量を上回っており、イヌにおいては 2,3-

arene oxide 中間体を生成する能力が、PCB153 の高排泄をもたらしている可能性をさらに支持していた。

Table 3 Excretion of unchanged PCB and three metabolites in feces of the dog

Compounds	Days after administration					Total
	1	2	3	4	5	
PCB153	N.D.	363	64	1.7	4.2	433
M-1	N.D.	950	492	377	190	2009
M-2	N.D.	1654	4350	1929	1850	9783
M-3	N.D.	783	4249	2578	1101	8911

Values represent μmol for unchanged HCB and pmol for metabolites
N.D. ; not detected

第6節 考察

本章ではイヌにおいて PCB 153 の代謝が速い理由を説明するべく、イヌにおける *in vitro*, *in vivo* 代謝実験を施行し、3 種の主代謝物の構造決定と反応機構の推定を行った。その結果興味深いことにイヌにおいては PCB 2,3-arene oxide 中間体という極めて稀な中間体を生成し得る能力があることが明らかとなった。この中間体がこれまでの様々な PCB congener と動物種を用いた数多くの代謝研究でも証明された例がなかったことは、イヌにおける PCB 代謝の特殊性を反映しているものと思われる。Fig. 12 にイヌにおいて推定される PCB 153 の代謝経路を示す。このうち 脱塩素水酸化代謝物 M-1 が確かに 2,3-arene oxide 中間体由来であるか否かの疑問は先送りとなったが、その可能性は否定できず以後は本中間体由来であるとの仮定に基づいて論述する。また、M-3 に関しても今回の検討からは一部 arene oxide 中間体由来である可能性も完全に否定することはできなかった。仮に 2,3-arene oxide 中間体生成反応と *meta* 位への直接水酸基導入反応という全く異なるメカニズムで反応が進行する場合、一般的にはそれぞれの反応を触媒する酵素があるものと考えられている⁶⁷⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾。従ってこの疑問に対する解答はこれら反応を触媒する cytochrome

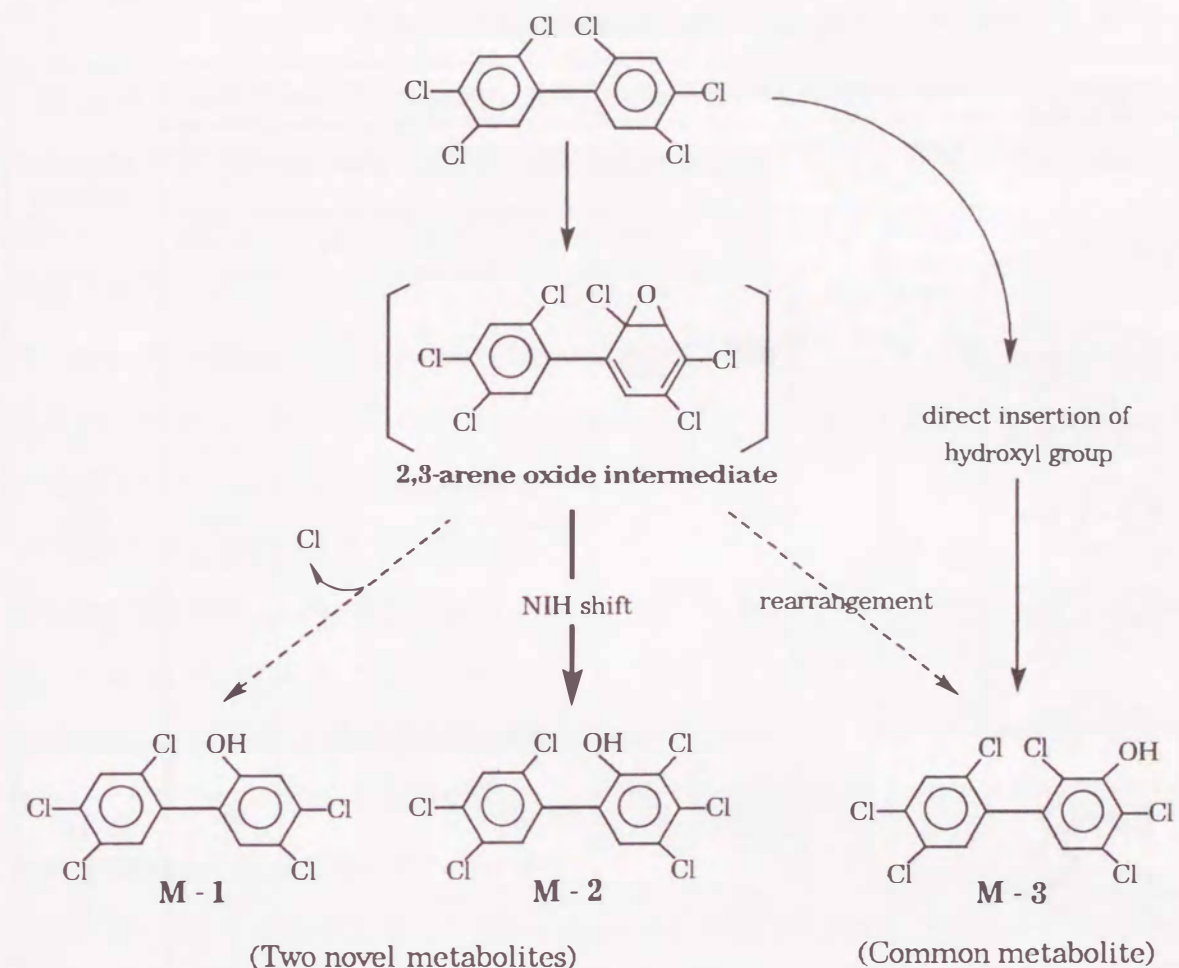


Fig. 12 Proposed metabolic pathway of PCB153 in dogs

P450 の精製によって得られるものと考えられる (第 V 章参照)。

ところで次の Table 4 に示すように PCB 153 の代謝研究は 1972 年の Hutzinger らの研究を皮切りに 10 例程度行われ、幾つかの代謝物が同定されている⁴⁸⁻⁵²⁾。その内、マス、ハトおよびヒト以外の動物種では僅かながら代謝が進行し、それら動物種において 3-hydroxy 体 (今回の検討における M-3) は共通に生成される代謝物である。しかしながら今回イヌで同定した M-1 と M-2 は検討された全ての動物種の中でイヌにしか検出されない新規代謝物であり、共通代謝物 M-3 に対する相対生成活性や *in vivo* 代謝における排泄量から考えても、これら 2 種の代謝物の生成能力こそがイヌでの本 PCB の体内消失の速さに貢献していることは疑う余地のないものと考えられる。

第 III 章 イヌにおける PCB155 代謝反応機構の解明

第 1 節 概要

第 II 章でイヌにおいて PCB153 は新規 2,3-arene oxide 中間体経由で主に代謝されることが排泄の速い理由である可能性を明らかにした。この事実はイヌで本 PCB の排泄が速いことを最初に見出し、その理由として隣接した塩素未置換炭素がない場合の *meta* 位水酸化がイヌでは他の動物種より速いためではないかとする Sipes らの考察とは全く異なっていた。Sipes らがこの考察に至った過程には数種の HCB isomers の排泄速度の比較を行った研究に因るところが大きい。即ちビフェニル環の 4 箇所全ての *meta* 位が塩素で置換されていない 2,4,6,2',4',6'-HCB (PCB155, Fig. 13) のイヌでの排泄速度は、2 箇所の *meta* 位が塩素置換されている PCB 153 より大きく、逆に全ての *meta* 位が塩素置換されている 2,3,5,2',3',5'-HCB (PCB133) の排泄速度は PCB153 に対して著しく小さい⁷⁷⁾。

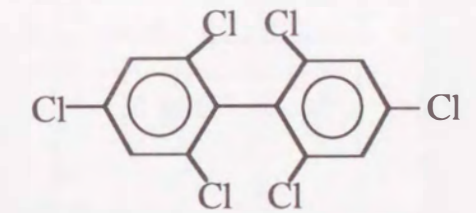


Fig. 13 Structure of 2,4,6,2',4',6'-HCB (PCB155)

仮に第 II 章で著者が見出した 2,3-arene oxide 中間体生成が、PCB155 の代謝においても可能であるならば、その代謝速度は理論的には PCB153 の 2 倍になるはずであり、事実排泄速度は約 2 倍であると報告されている⁷⁷⁾。しかしながら同じイヌであっても PCB153 の代謝で見出した反応機構がそのまま他の congener の代謝に適用できるとは限らない。従って本章では PCB 155 のイヌでの代謝反応機構を明らかにし、2,3-arene oxide 中間体生成がイヌにおいて一般的な反応であるか否かを明確にする試みを行った。

なお、現在までに PCB 155 の代謝はラットのみで検討されており、代謝物としては直接水酸化の成績体とされている 3-hydroxy 体しか同定されていない⁵¹⁾⁷⁸⁾。

第 2 節 代謝物の同定

まず基質となる PCB155 の合成を行った(実験の部 1 の 1 参照)。合成した PCB 155 は融点、UV、mass および ¹H-NMR スペクトルで構造を確認し、純度が 99.8% 以上であることを確認して実験に供した。PCB 153 と同様に PB 処理イヌ肝ミクロソームを用

Table 4 Summary of the metabolites of PCB153

Species	Trout	Pigeon	Rabbit	Mouse	Rat	Monkey	Human	Dog	Authentic compound
Sample	urine feces	urine feces	feces	feces	feces	feces	liver Ms	liver Ms feces	
Ref.	48	48	50	50	51	53	44	this study	
Metabolite									
	None	None	major	only one	0.300%*	7.1%#		M-3	S-3a
			N.D.	N.D.	0.200%	N.I.		N.D.	S-3b
			N.D.	N.D.	0.064%	N.I.		N.D.	S-2a
			N.D.	N.D.	N.D.	N.I.	None	M-2	S-2c
			minor	N.D.	0.098%	N.I.		N.D.	S-4b
			second major	N.D.	0.003%	N.I.		N.D.	S-4a
			N.D.	N.D.	N.D.	N.I.		M-1	S-1a

*; % of the administered dose excreted during the first 7 days.

#; % of the administered dose excreted in 90 days.

None; no metabolite was detected, N.D.; not detected, N.I.; not identified

次章においてはイヌにおける PCB 代謝の特殊性をさらに評価する目的で congener を換えてさらなる検討を行った。

いた *in vitro* 代謝実験系で代謝実験を行い、GC-MS にて代謝物の検索を行った。その結果、少なくとも 4 種の代謝物が生成することが明らかとなった。Fig. 14 に検出された 4 種の代謝物のメチル化体の EI-MS スペクトルを示す。メチル化体のシリカゲルカラムからの溶出順に M-1 ~ M-4 と命名し、以下構造決定を行った。

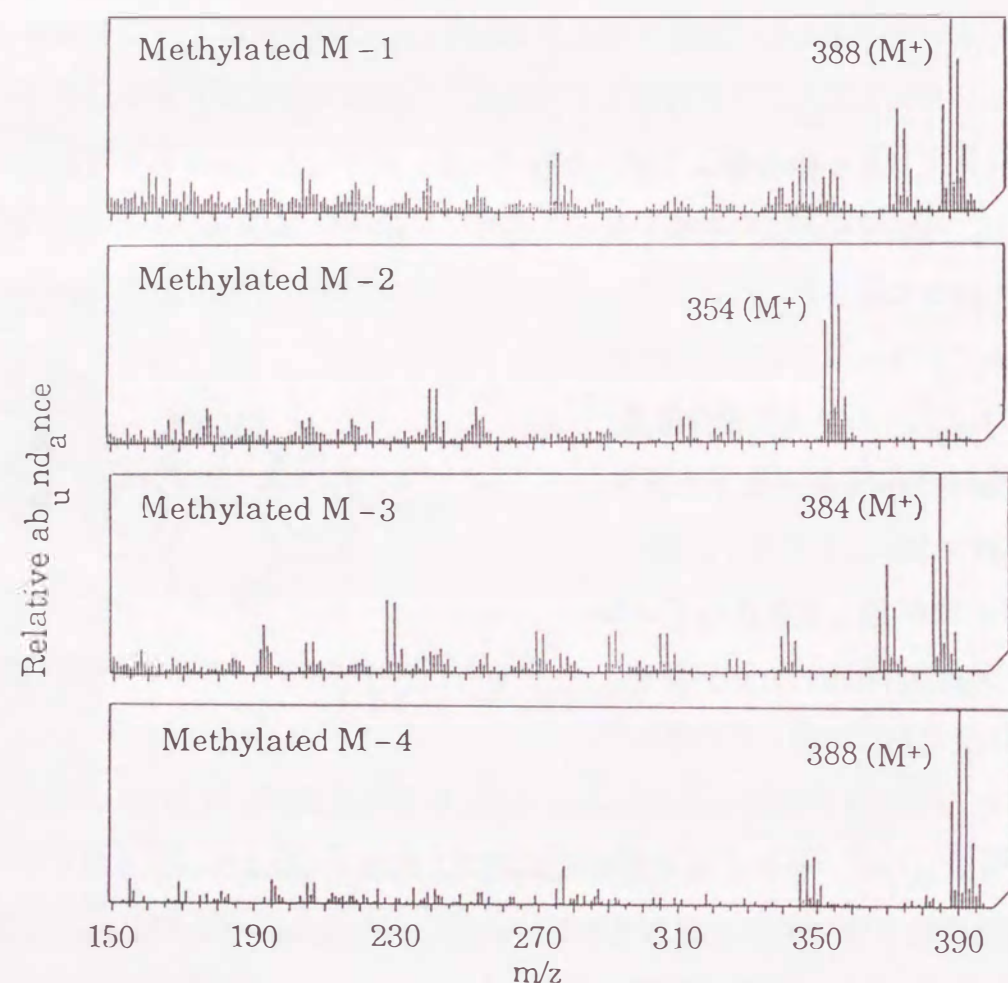


Fig. 14 EI-MS spectra of methylated metabolites of PCB155 formed with liver microsomes of dogs

第 1 節に記したように本 PCB の代謝物としてはラットにおいて唯一 3-hydroxy 体が同定されているのみである。そこでこの代謝物が今回検出された代謝物のいずれかに一致するものと考え、まずこの代謝物の合成から試みた(実験の部 1 の 2 反応 F)。本反応では理論上 1 種の化合物しかできないため、生成した化合物(S-1)を精製し機器分析に供した。その結果メチル化体のマススペクトルおよび GC における *t*R は M-1 のそれと完全に一致しており、M-1 が 3-hydroxy 体であることが明らかとなった(機器データ参照)。本化合物についてはこれまで機器データが報告されていなかったが *para* 位に水酸基が置換していないにも拘わらずメチル化体のマススペクトルにおいて $[M^+-15]$ にか

なり高いフラグメントイオンピークが認められること、さらにメチル化体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて methoxy 基が置換したフェニル環のプロトン(H_5)の化学シフトが低磁場側に移動するといった 2 つの例外的特徴を有しており、経験則と異なるため構造決定には注意を要する⁷⁹⁾。メチル化体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 15 に示す。

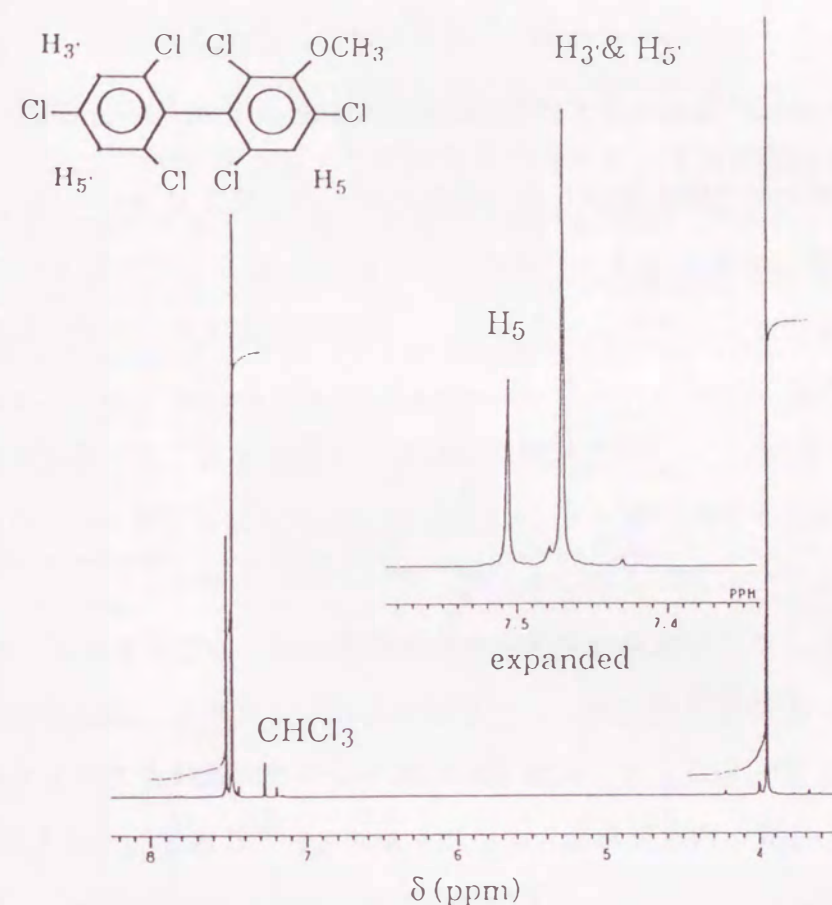


Fig. 15 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 3-methoxy-2,4,6,2',4',6'-HCB

この例外的な化学シフトの妥当性は 1,3,5-trichlorobenzene と 2,4,6-trichloroanisole の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較によって確認された(データ未記載)。

次に M-2 の構造はメチル化体のマススペクトルにおいて、分子イオンピークを m/z 354 に示し 5 塩素化体に特徴的な同位体ピークが認められることから、脱塩素水酸化代謝物であるものと予想された。この代謝物の場合水酸基の導入位置に有益な情報を提供する特徴的なフラグメントイオンピークは全く見出されなかった。ここで第 II 章で記述したように脱塩素水酸化体が arene oxide 中間体経由で生成すると仮定した場合、理論上 Fig. 16 に示す 4 種の脱塩素水酸化体の生成が可能である。

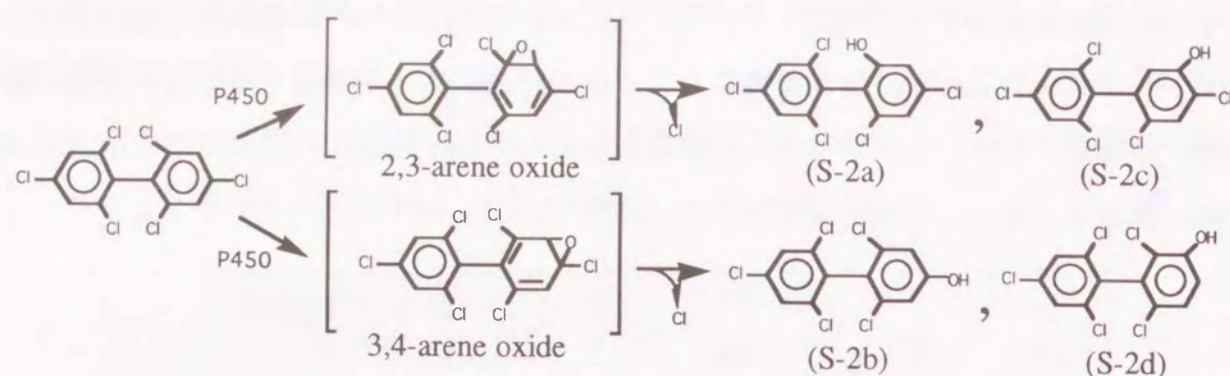


Fig. 16 Postulated pathways of M-2 formation via arene oxide intermediate

そこでこれら全ての化合物を合成した（実験の部1の2反応G,H）。S-2a～S-2dと命名した化合物中唯一S-2bのメチル化体のGCにおけるtRおよびマススペクトル（機器データ参照）がM-2のそれと完全に一致した。詳細な記述は避けるが、S-2bの構造はメチル化体の¹H-NMRスペクトルから4-hydroxy-2,6,2',4',6'-PenCBであることが明らかになった（機器データ参照）。この化合物はpara位に水酸基を有しているにも拘わらず、メチル化体のマススペクトルにおいて[M⁺-15]のフラグメントイオンピークが全く認められない例外であるので注意が必要である⁷⁹⁾。

次にM-4の構造はメチル化体のマススペクトルにおいて、分子イオンピークをm/z 388に示し6塩素化体に特徴的な同位体ピークが認められることから、M-1と同様 monohydroxy-HCB であると考えられるが、PCB 155の場合完全な対称構造であるため、塩素原子の置換していない位置への水酸基導入はどれもM-1と同じ代謝物しか与えない。従ってM-4の構造はNIH-shiftによっていずれかの塩素が隣の炭素にシフトし、移動した塩素がもともと置換していた位置に水酸基が導入された代謝物であると考えられた。この場合、先の代謝物M-2の構造が3,4-arene oxide 中間体由来の脱塩素水酸化代謝物S-2b（Fig. 16 参照）であったことから、M-4の構造は同じ3,4-arene oxide 中間体由来のNIH-shift 体であると考えるのが道理にかなっている。そこで予想代謝物の合成を試みたところ、理論通り2種の化合物が生成しS-4aおよびS-4bと命名した（実験の部1の2反応I）。両者の内S-4bのメチル化体およびシリル化体のGCにおけるtRおよびメチル化体のマススペクトルがM-4のそれと完全に一致した。¹H-NMRスペクトルからS-4bの構造は4-hydroxy-2,3,6,2',4',6'-HCBであり、先に推測した通り3,4-arene oxide 中間体由来のNIH-shift 成績体であることが明らかとなった。なお、この化合物についてもM-2同様para位に水酸基を有しているにも拘わらず、メチル化体のマススペクトルにお

いて[M⁺-15]のフラグメントイオンピークがほとんど認められない例外であった⁷⁹⁾。

最後にM-3の構造であるが、メチル化体のマススペクトルにおいて、分子イオンピークをm/z 384に示し5塩素化体に特徴的な同位体ピークが認められることから、dihydroxy-PenCBであるものと推定された。水酸基の置換位置に関しては[M⁺-15]に比較的高いフラグメントイオンピークが認められるものの、PCB 155の代謝物においては経験則とことごとく反するので、有益な情報であるとは考えられなかった。そこでM-3はM-1あるいはM-2がさらに代謝された2次代謝物であろうと仮定し、これらの合成標品S-1およびS-2bを基質として肝ミクロソームで代謝実験を行った。その結果、いずれの化合物を基質とした場合も速やかに代謝消失し、メチル化およびシリル化体のGCにおけるtRがM-3のそれと同じである1種の主代謝物を与えた。得られた各2次代謝物のメチル化体のマススペクトルおよび¹H-NMRスペクトルをFig. 17に示す。

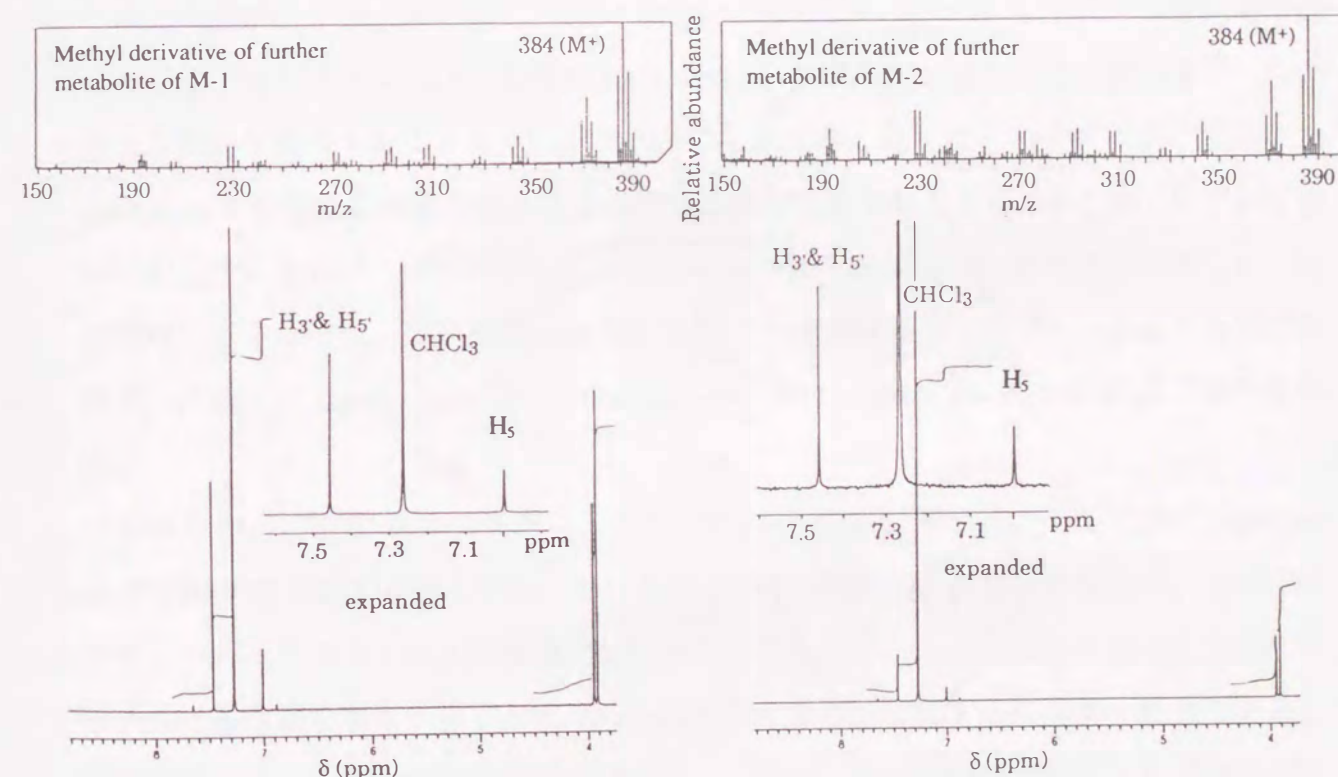


Fig. 17 EI-MS and ¹H-NMR spectra of methylated derivatives of further metabolite of M-1 (left) and M-2 (right)

非常に興味深いことに両者は完全に一致し、M-3がM-1とM-2の共通の2次代謝物であることが明らかとなった。従って両1次代謝物から生成可能であることと¹H-NMRから2つの水酸基は片方の芳香環に置換していると考えられることを考慮するとM-3の構造は必然的に3,4-dihydroxy-2,6,2',4',6'-PenCBであると決定された⁷⁹⁾。

第3節 考察

イヌの PCB 代謝において 2,3-arene oxide 中間体生成が一般的反応であるか否かを評価する目的で PCB155 を用いて代謝物の構造決定を行った。また本論文には記さないが、*in vivo* における M-1 と M-2 の糞中代謝物の定量も行った⁸⁰⁾。M-2 は 3,4-arene oxide 中間体由来の脱塩素水酸化体と考えられるが、その排泄量は M-1 の排泄量には及ばないもののかなり多かった。しかしながら、本章の検討で明らかになったように M-1 および M-2 は比較的速やかに 2 次代謝を受けて M-3 に変換するものと考えられるため、生体内でいずれの 1 次代謝物が優位に生成するかは判断不可能であった。Fig. 18 にイヌにおいて推定される PCB155 の代謝経路を示す。

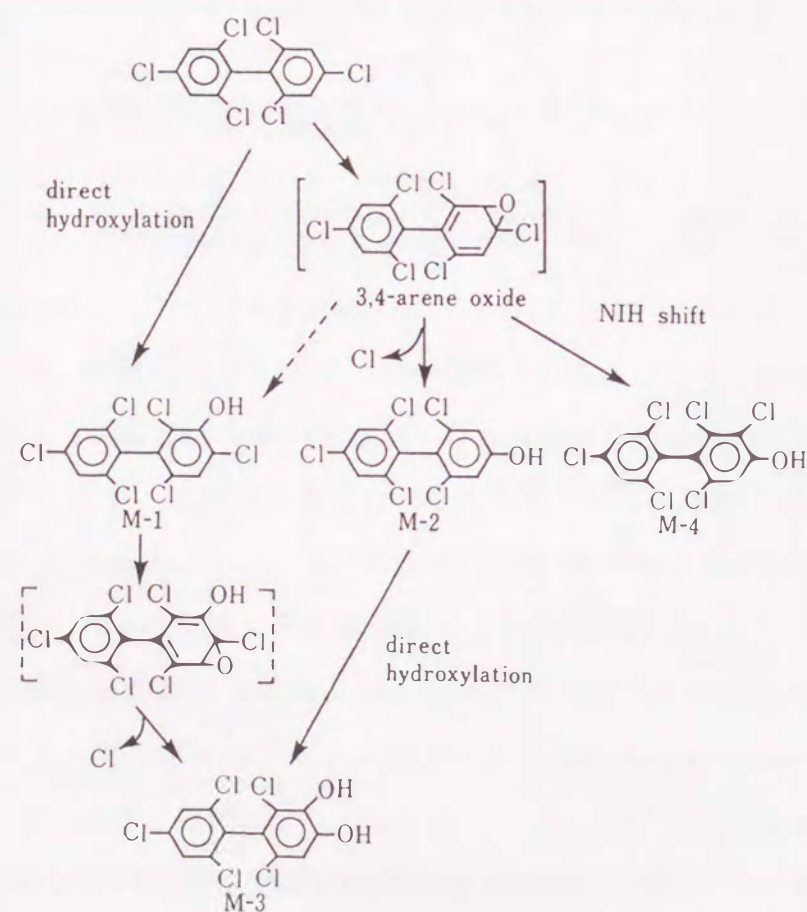


Fig. 18 Proposed metabolic pathway of PCB155 in dogs

M-1 から 2 次代謝物 M-3 への生成過程は 4,5-arene oxide 中間体を経由した反応と推察されるが、この場合 NIH-shift 生成体は検出されなかった。NIH-shift が見られる場合に必ずしも同時に脱塩素水酸化代謝物が得られるとは限らず⁶⁶⁾、逆もまた同じである⁵⁰⁾。

このことこそが脱塩素水酸化反応生成体が arene oxide 中間体由来ではないとする考え方の一つの理由と考えられる。しかし、このように唯一脱塩素水酸化代謝物しか与えない反応系ほど、脱離する塩素と生成物の化学量論的検討が容易であり、そのメカニズム解明に都合の良いモデル実験系と考えられる。

イヌにおける PCB155 の代謝は PCB153 の場合とは明らかに異なっており、2,3-arene oxide 中間体ではなく、3,4-arene oxide 中間体を経由した代謝が起こることが明らかとなった。したがって本検討においてもイヌにおける数種の HCB 排泄速度の差が Sipes らの *meta* 位直接水酸化優位説⁵³⁾のみでは説明が見つからないことが明らかであった。先に述べたように Schnellmann らの検討ではイヌにおける PCB155 の排泄速度は PCB153 の約 2 倍であると報告されているが⁷⁷⁾、著者らのイヌ肝ミクロソームを用いた検討条件では両 PCB の代謝速度は 10 倍以上の開きがあり、PCB155 の方がはるかに代謝され易かった⁸⁰⁾。

以上の点からイヌにおいて 2,3-arene oxide 中間体生成は必ずしも一般的代謝経路ではないこと、またイヌにおける数種の HCB isomers の体内消失速度の差の原因を単一の代謝反応機構で説明することは不可能であることが明確となった。イヌにおける両 PCB congeners の代謝反応機構において共通でしかも特徴的であると考えられる点について強いて言及するならば、イヌにおいては Matthews らが arene oxide 中間体が生成しにくいと推察している条件、即ち *meta-para* 位に隣接する塩素未置換炭素がない場合でも他の動物種と比較して arene oxide 中間体を生成し得る能力に優れているという点に集約される。

第 II 章および第 III 章の結果から、イヌにおいて PCB153 の代謝が早い理由に arene oxide 中間体の生成能力が深く関与していることはほぼ確定したと考えられるが、それではなぜイヌのみでそうした反応機構が可能なのであろうか。この疑問に答えるためにはイヌでその代謝を触媒する cytochrome P450 (以下 P450) に関する知見が不可欠である。緒論に記したように、PCB は自らが誘導した P450 によって代謝されることが知られており、PCB153 が PB type の強力な薬物代謝誘導剤であることも以前から知られていた⁸¹⁻⁸³⁾。

以上のことから PCB153 は自らが誘導する 2B subfamily P450 によって代謝されるであろうことは容易に予想される。この点に関して Sipes のグループの Duignan はイヌの 2B subfamily P450 (CYP2B11) を初めて精製し、PCB153 の代謝に関与することを証明した⁸⁴⁾。しかし、彼らは PCB153 の代謝物を単に極性代謝物として検討しているのみであり、代謝物同定の試みを行っていないため、著者が第 II 章で同定した 3 種の

代謝物と同一であるか否かさえ明確ではない。彼らは続いて CYP2B11 の cDNA のクローニングを行なった⁸⁵⁾が、その一次構造と他の動物種の 2B subfamily P450 の一次構造の比較のみではどの部位が 2,3-arene oxide 中間体生成に関与するか否かの検討を行なう場合、即ち chimera gene の作成や site-directed mutagenesis による変異導入の際の標的が絞り難い。また 2,3-arene oxide 中間体生成による PCB153 の代謝がイヌだけの特殊な反応にすぎない場合、PCB 排泄促進研究としての意義は決して高いものとは言えない。

そこで次章では PCB 2,3-arene oxide 生成反応がイヌ以外の動物種においても見出されるか否かを検討した。

第 IV 章 モルモットにおける PCB153 の代謝反応機構の解明

第 1 節 概要

緒論において述べたように PCB153 の代謝による排泄は現在までに調べられた動物種の中ではイヌで最も早いとされている⁴⁴⁾。第 II 章での結果から、このイヌにおける本 PCB の排泄能力の高さは 2,3-arene oxide 中間体を生成しうるといふ本動物種の特徴的代謝反応機構に起因している可能性が高い。しかし、この PCB 2,3-arene oxide 中間体生成の証拠が本研究で初めて得られたことを考えると、この新規代謝反応機構はおそらく多くの実験動物種で広範に認められる一般的な反応ではない可能性が考えられる。また、同じイヌにおける代謝であるにも拘わらず、前章における PCB155 の代謝では 2,3-arene oxide 中間体生成は認められず、イヌの PCB 代謝に本中間体の生成が必須な訳ではないことも示された。イヌは齧歯類より大型の哺乳動物として前臨床段階における新規薬物の体内動態、毒性試験に古くから汎用されてきた動物種である。それにも拘わらず、薬物代謝に関する知見は意外なまでに少なく P450 についての研究成果もここ数年になってようやく集積され初めた。すなわちイヌはヒトの代謝プロファイルをどの程度再現できるモデルであるかとの評価が最も遅れた動物種の一つであると言っても過言ではない。代謝研究において実験動物での結果をヒトに外挿する場合、当該動物種がヒトとどれほどの代謝的類似性があるかを知らなくては不可欠であり、その目的を達成するためには、多くの動物種を用いた比較生化学的代謝研究が必要である。

そこで本章では PCB153 の代謝における 2,3-arene oxide 中間体生成がイヌだけの特殊な反応機構であるか否か、本中間体生成が PCB153 の代謝消失にどの程度寄与しているかを推察するために、未だ PCB153 の代謝研究が実施されていなかったモルモットを用いて検討を行うことにした。モルモットは分類上は齧歯目とされているが、中間代謝や酵素誘導能など、齧歯類とは明らかに異なる性質を持ち、最近の研究では齧歯目に属していることすら疑問視されており⁸⁶⁾、薬物代謝に関する知見はイヌ同様に乏しいのが現状である。

第 2 節 *In Vivo* 代謝

第1項 In Vivo代謝物の単離

Hartley 系の雄性モルモット (体重 251-300 g) 3 匹に対し PB を前処理し、最終投与後 24 hr でコーンオイルに溶解した PCB 153 を 200 mg/kg あて腹腔内に単回投与した。糞を経日的に採取し、イヌの場合と同様に抽出を行ない、シリカゲルカラムに付した後、溶出溶媒の極性を段階的に変えて溶出することで代謝物を単離した (実験の部 7 参照)。興味深いことにモルモット糞中からは少なくとも 6 種類の代謝物が検出された。Fig. 19 に単離した代謝物のメチル化体の EI-MS スペクトルを示す。

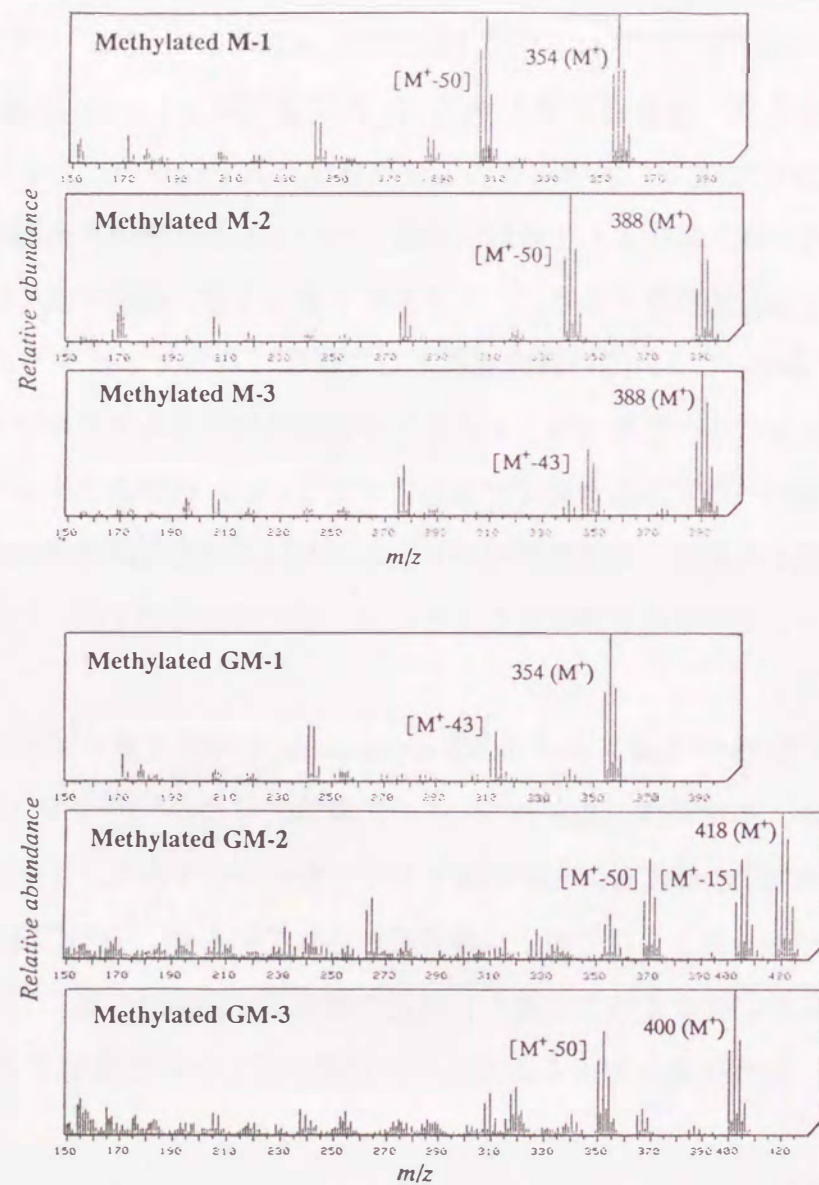


Fig. 19 EI-MS spectra of methylated metabolites isolated from feces of guinea pigs treated with PCB153

生成量の多い 3 種の代謝物はメチルおよびシリル誘導体の GC における tR、メチル化体のマススペクトルがイヌで見出された代謝物と同一であったことからイヌの代謝物の呼称にない、M-1 ~ M-3 と命名し、モルモットにおいてもイヌと同様な代謝反応機構が存在する可能性が強く示唆された。一方、モルモットで新たに見出された代謝物に関してはメチル化体の GC における tR の短い方から GM-1 ~ GM-3 と命名し、以下構造決定を試みた。

第2項 モルモット代謝物 M-1, M-2 および M-3 の同定

3 種の主代謝物はイヌと同一の代謝物と考えられたため $^1\text{H-NMR}$ によって確認を行った。

M-1 のメチル化体の芳香環プロトン部分を Fig. 20 に示す。第 II 章 Fig. 8 と比較すると両者は完全に一致しており、M-1 が *ortho* 位に水酸基が導入された脱塩素水酸化代謝物 2-hydroxy-4,5,2',4',5'-PenCB であることが明らかとなった。

次に M-3 についてはイヌの *in vitro* 代謝物については水酸化体のまま $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定したが、今回糞中代謝物であったため M-3 画分へ混入する夾雑物が多く、メチル化してクリーンアップした。そのため、合成標品も同様にメチル化を行い比較した。その結果を Fig. 21 に示す。

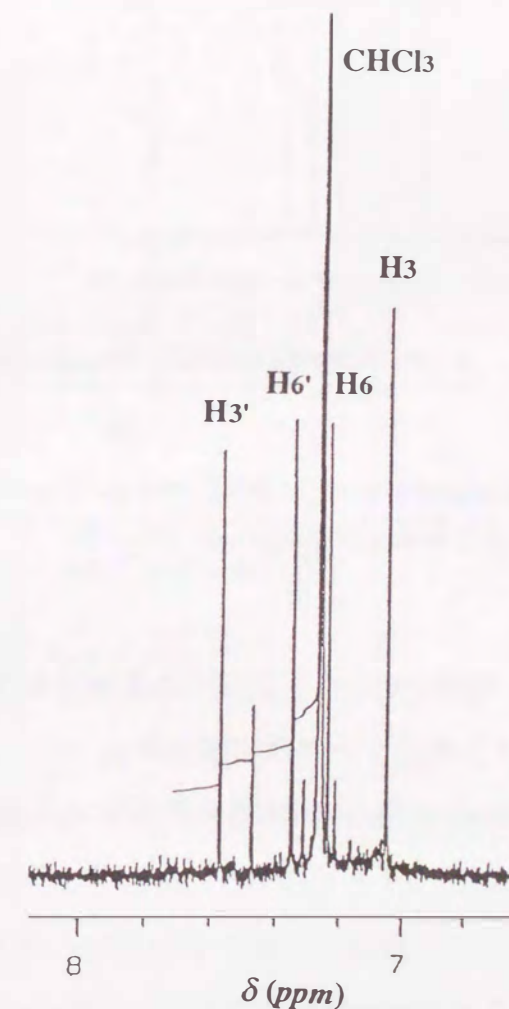


Fig. 20 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of methylated M-1 purified from feces of guinea pigs

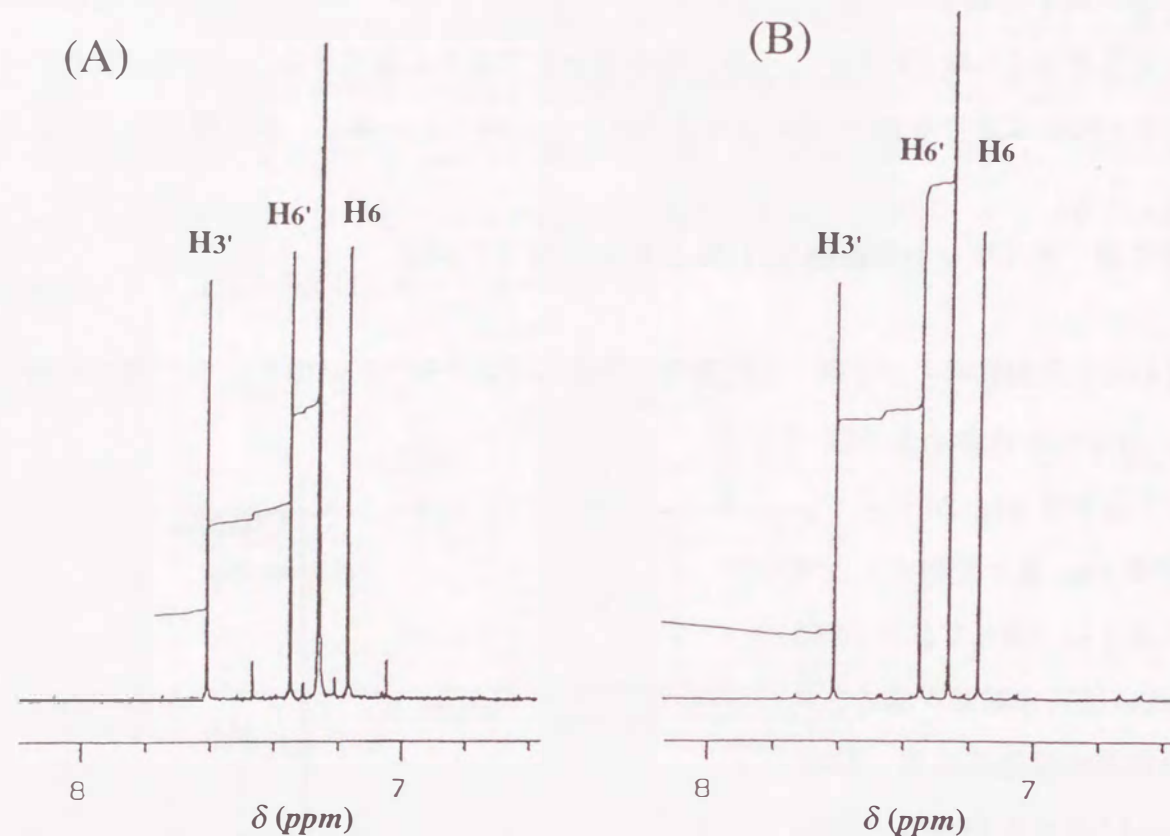


Fig. 21 Comparison of ^1H -NMR spectra of methylated derivative of M-3 of guinea pig (A) and authentic compound (S-3a, B)

その結果、両者は完全に一致しており M-3 もイヌの代謝物と同一であることが確認された(化学シフト等機器データは実験の部)。

つぎに 2,3-arene oxide 中間体由来の NIH-shift 成績体 M-2 について比較を行った。イヌの代謝物 M-2 のメチル化体の ^1H -NMR スペクトルでは、最も高磁場側のプロトンのシグナルは溶媒ピークと重なっており (Fig. 9B)、モルモット M-2 でも同様であった(データ未記載)。そこでより良好なスペクトルを得るため、測定溶媒をクロロホルム- d_1 からジクロロメタン- d_2 に換えて測定し、合わせて合成標品についても測定した。その結果を Fig. 22 に示す。

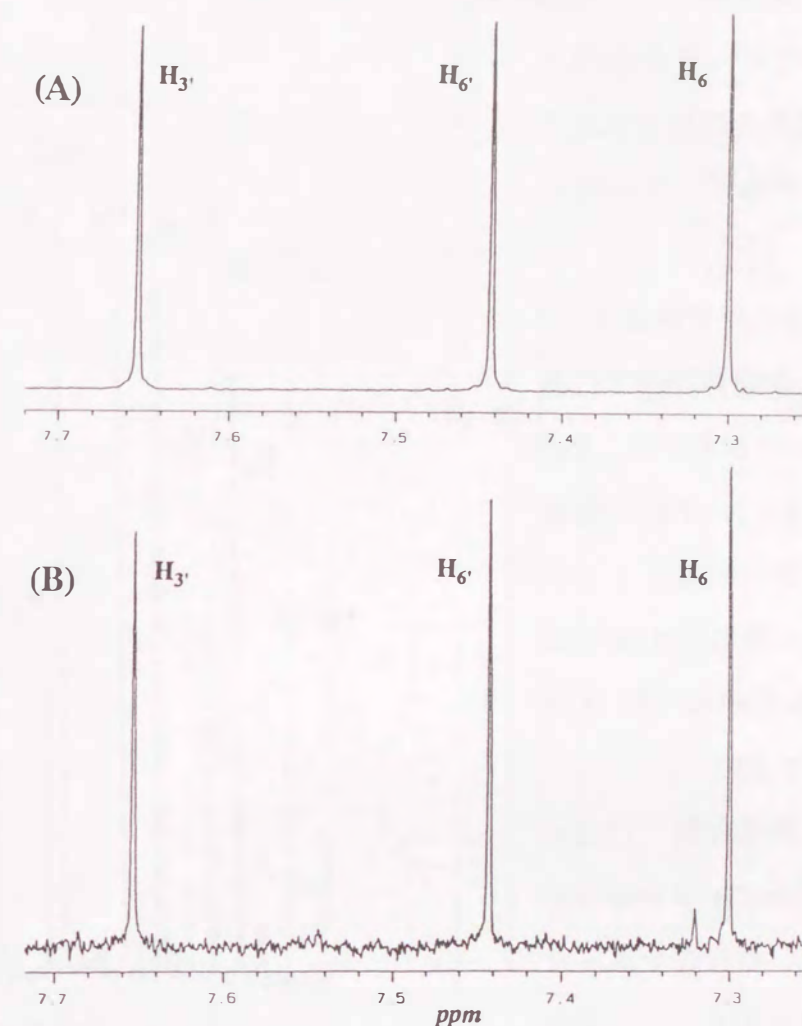


Fig. 22 Comparison of ^1H -NMR spectra of methylated derivative of authentic compound (S-2c, A) and M-2 isolated from feces of guinea pig (B)

以上の結果両者は完全に一致しており、モルモットでも確かにイヌと同様 2,3-arene oxide 中間体が生成していることが実証された。

第3項 モルモット代謝物 GM-1 の同定

GM-1 は先のメチル化体のマススペクトルから脱塩素水酸化代謝物であると考えられる。水酸基の位置については $[\text{M}^+-43]$ に比較的大きなフラグメントイオンピークが検出されることから *meta* 位に置換している可能性が高いと考えられるが、確認の為にメチル化体の ^1H -

NMR スペクトルを測定した (Fig. 23)。

その結果複数のピークが検出され、GM-1 が 2 種類の脱塩素水酸化代謝物の混合物であることが明らかとなった。

ラットおよびウサギでは PCB153 は 3,4-arene oxide 中間体経由で代謝されると考えられており⁵⁰⁾⁵¹⁾、その場合興味深いことにいずれの動物種でも本中間体から生成すると考えられる 2 種類の脱塩素水酸化体が同時に検出されている (第 II 章第 6 節の Table 4 参照)。

そこで、その両化合物 (3-hydroxy-2,5,2',4',5'-PenCB, 4-hydroxy-2,5,2',4',5'-PenCB) の合成を試みた (実験の部 1 の 2 反応 E)。本合成反応では理論上目的とする両化合物の生成が可能である。シリカゲルカラムを用い、メチル誘導体化において GC における tR が

GM-1 と等しい化合物の単離を試みた。単離した化合物はみかけ上単一のピークであるが、シリル誘導体化では明らかに 2 本のピークに分離した。そこでこれら 2 種の化合物を再度シリカゲルカラムにかけ、シリル化体の tR を指標に注意深く分離し、溶出の速い方から S-4a および S-4b と命名した。これらのメチル化体の ¹H-NMR スペクトルを Fig. 24 に示す。本スペクトルから S-4a が 3-hydroxy-2,5,2',4',5'-PenCB であり、一方 S-4b が 4-hydroxy-2,5,2',4',5'-PenCB であることが明らかとなった。

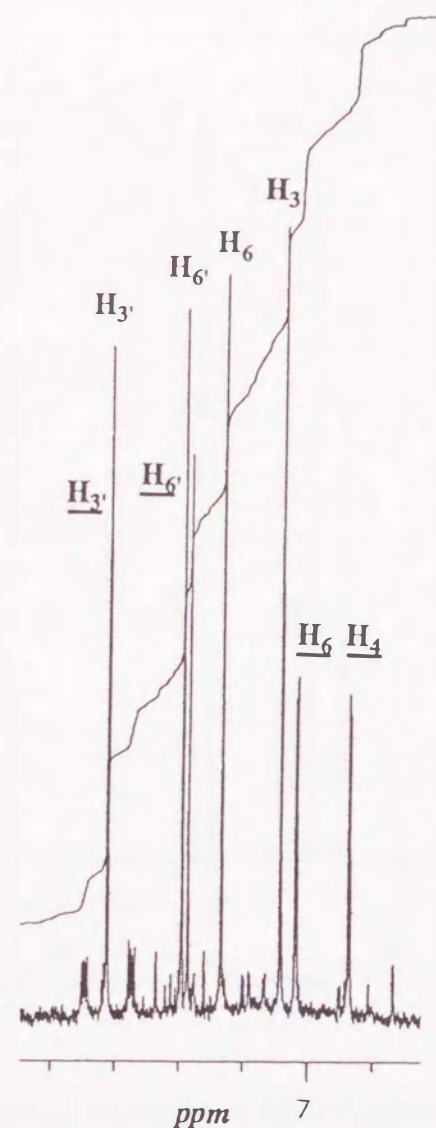


Fig. 23 ¹H-NMR spectrum of methylated GM-1 fractions. Signal assignment were performed by the data of methylated S-4a and S-4b (see Fig. 24).

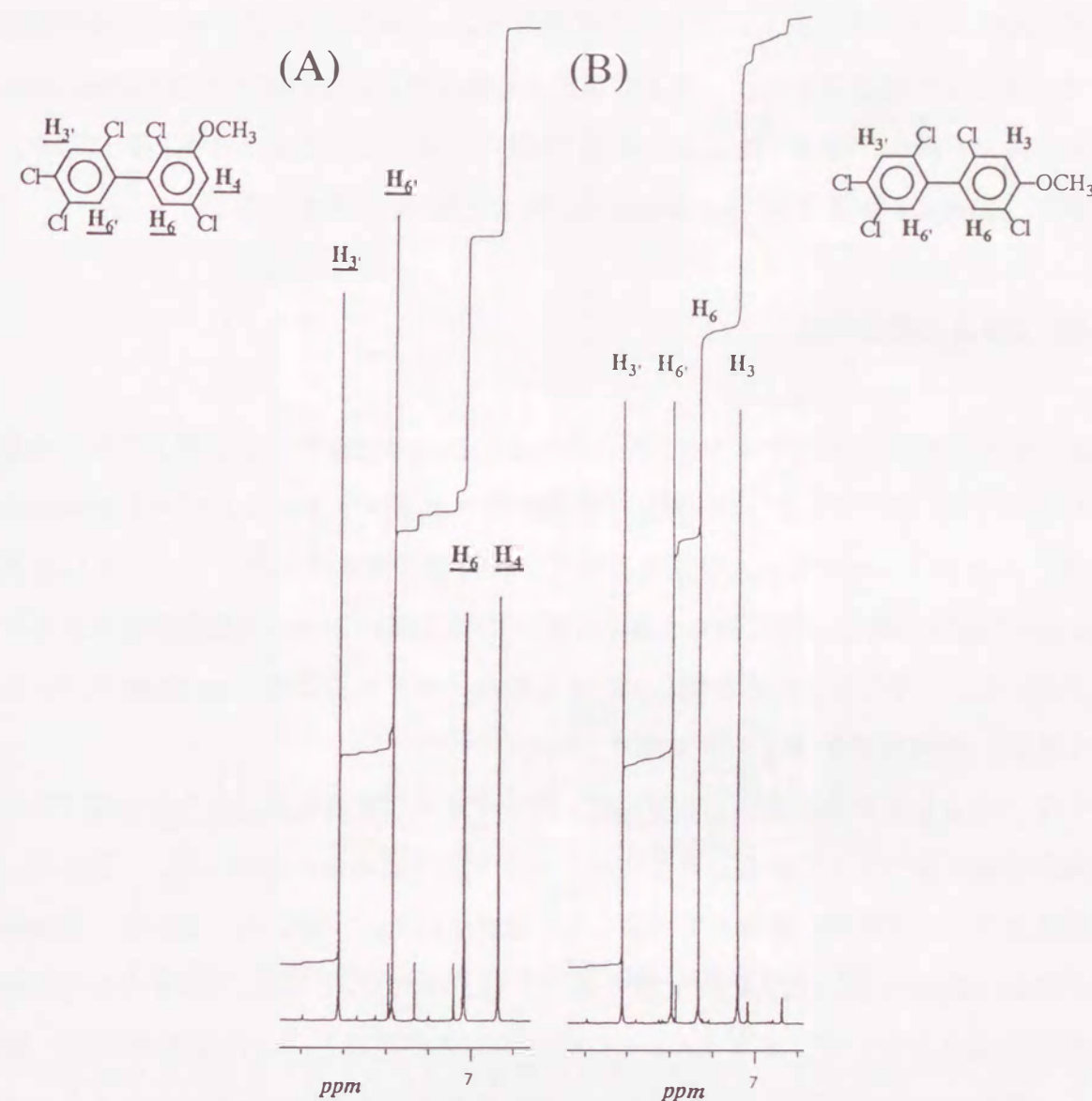


Fig. 24 ¹H-NMR spectra of methylated S-4a (A), S-4b (B), and assignment of the signal

GM-1 のメチル化体の ¹H-NMR スペクトル (Fig. 23) は、予想通り S-4a と S-4b が混在しているスペクトルであることが明らかとなった。本結果に基づいて逆にプロトンのシグナルを assign した結果を Fig. 23 に示している。また、S-4b は 4 位に水酸基を有していることから、経験則に従えばそのメチル化体のマススペクトルにおいて [M⁺-15] に相対的に高い強度のフラグメントイオンピークが認められるはずであるが、この機器データは既報⁵⁰⁾に数値化して記されており、本化合物の場合も例外的に強度が低い。このことは合成化合

物 S-4b のメチル化体のマススペクトルでも確認した (機器データ参照)。 即ち Fig. 19 のメチル化 GM-1 のマススペクトルは 2 種の化合物 S-4a および S-4b のメチル化体の混合物のものであることが確認された。 以上のように GM-1 画分にはいずれも 3,4-arene oxide 中間体由来と考えられる 2 種類の脱塩素水酸化代謝物が混在していることを明らかにした。従って以下 3-hydroxy 体を GM-1a、4-hydroxy 体を GM-1b と改名した。

第 4 項 GM-2 の推定構造

GM-2 は先のメチル化体のマススペクトルから dihydroxy-HCB であると考えられ、水酸基の位置については $[M^+-15]$ と $[M^+-50]$ に特徴的なフラグメントイオンピークが検出されることから *para* 位と *ortho* 位に水酸基を有しているものと推定された。 こうした PCB の dihydroxy 代謝物の場合、稀に例外もあるが同一の芳香環に 2 つの水酸基が導入されていることが多い⁸⁷⁾。 そこでこの点を明らかにするためにメチル誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。 その結果を Fig. 25 に示す。

確かに 2 つのメトキシ基に由来するプロトンのシグナルが認められ、また芳香環プロトン部分は高磁場側にシフトしていると考えられるプロトンは認められなかった。 従って、2 つの水酸基は同一の芳香環に置換しているものと推察された。 以上のことから、当初 GM-2 の構造は 4,6-dihydroxy-2,3,5,2',4',5'-HCB であると推定された。 仮にこのような化合物が代謝過程に生成するならば、まず 3,4-arene oxide 中間体が生成し、4 位塩素が 3 位に NIH-shift すると同時に 4 位が水酸化されたのち、2 次代謝を受けて 6 位が水酸化されたものであると考えられる。 一方、前項で構造決定した GM-1a, GM-1b はいずれも 3,4-arene oxide 中間体由来の脱塩素水酸化代謝物であると考えられた。 従って生体内では 3,4-arene oxide 中間体由来の NIH-shift 体も生成している可能性は否定できない。 そこでこの仮定を検証するために第 II 章で合成単離した 3,4-arene oxide 中間体由来の NIH-shift 体 4-hydroxy-2,3,5,2',4',5'-HCB (S-3b) をモルモット肝ミクロソームで代謝させた。 ところが予想に反し、S-3b はほとんど代謝されず、反応後の抽出物中にはメチル化 GM-2 と同じ tR のピークは検出されなかった (データ未記載)。 このことは生体内で 3,4-arene oxide 中間体か

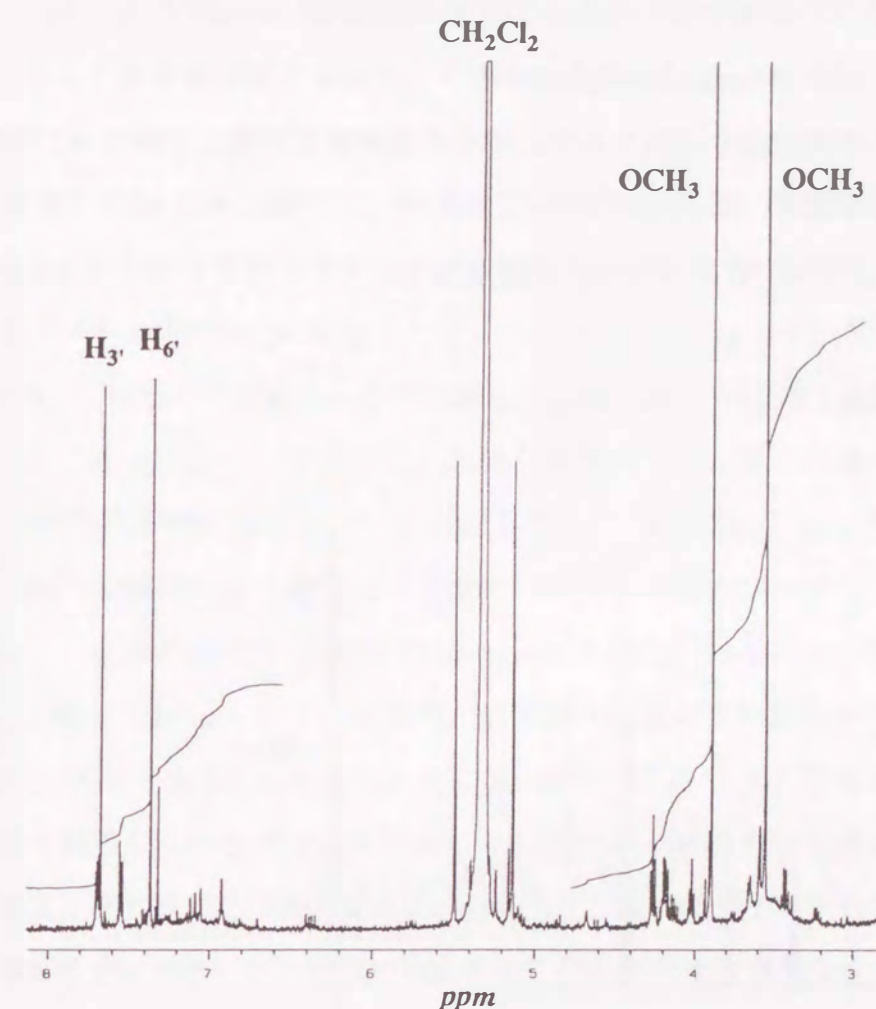


Fig. 25 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of methylated derivative of GM-2

らの NIH-shift 体は生成されていない可能性を示唆しており、この点ウサギにおける報告とよく類似していた⁵⁰⁾。 $[M^+-15]$ のフラグメントイオンピークは *meta* 位に水酸基が置換している場合も出現する例が多いため (機器データ参照)、GM-2 が M-3 の 2 次代謝物である可能性も考えられるがその点の確認は行っていない。

第 5 項 GM-3 の推定構造

GM-3 はシリカゲルカラムを用いた代謝物の単離に際し、まずその溶出挙動に興味を持たれた。 即ち GM-3 は今回単離した 6 種類 (GM-1a, GM-1b は GM-1 として単離) の代謝物

中、最も極性が低く、未変化体である PCB 153 のすぐ後に溶出されてくる。過去当研究室で Beppu らは 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl のラット糞中代謝物を単離する際、代謝物中にやはり極性が低く未変化体と同時に溶出してくる代謝物を見出しており、これが arene oxide 中間体であったことを明らかにしている⁸⁷⁾。そこで今回 GM-3 についてはまず intact のまま EI-MS および ¹H-NMR スペクトルを測定した。その結果を Fig. 26 A および B に示す。

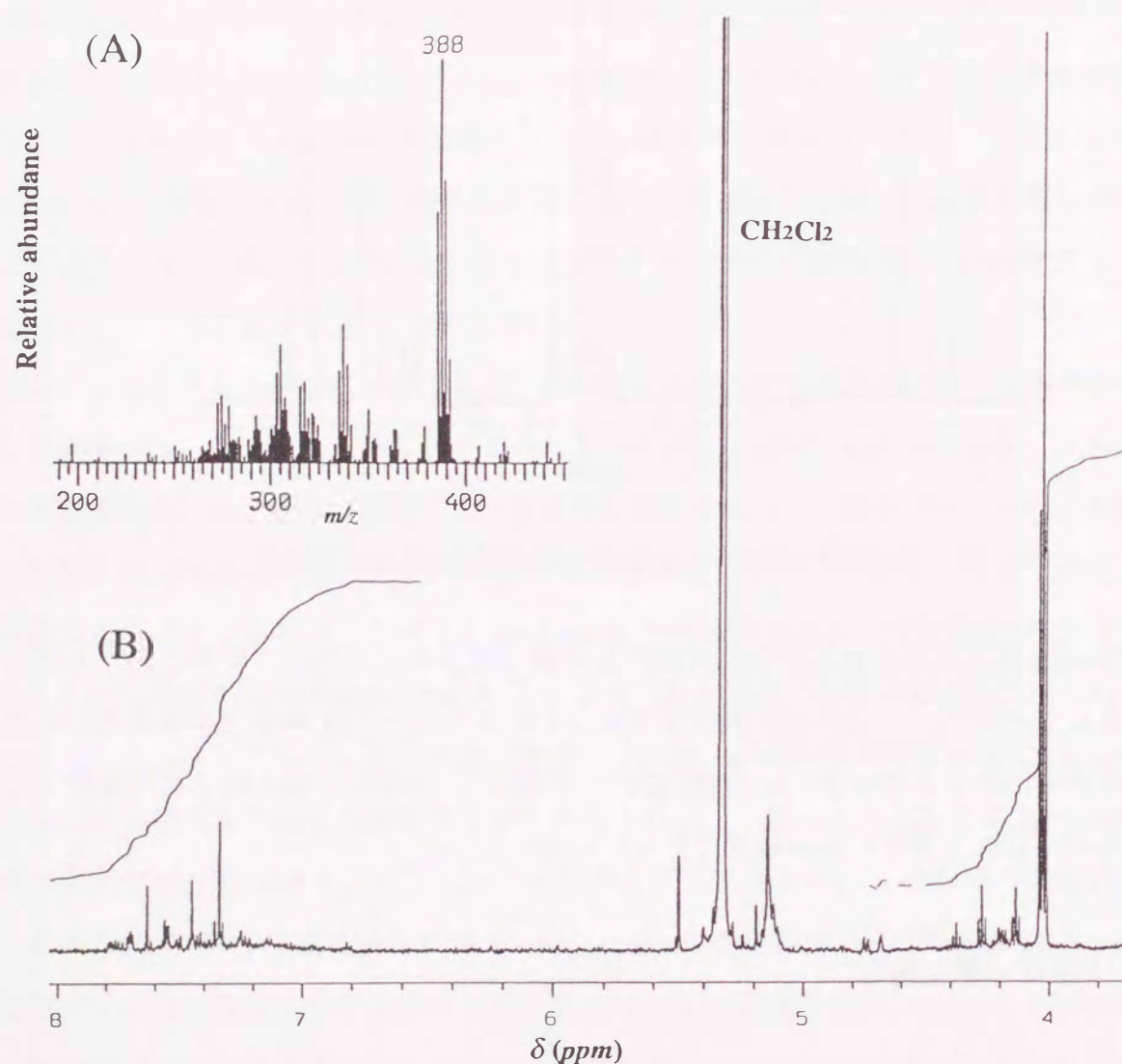


Fig. 26 EI-MS (A) and ¹H-NMR (B) spectra of intact GM-3

intact GM-3 は分子イオンピークを m/z 386 に示し、5 塩素化体に特徴的な同位体ピークが認められた。ところが塩素が 1 つ脱離しているにも拘わらず、¹H-NMR において芳香環のプロトン部分には 3 本の singlet が観察されるのみであった。従って塩素の脱離した位置を含め塩素の置換していない 5 箇所のうち 2 箇所に何らかの官能基が置換しているものと推定されるが、既知の抱合代謝物やメチルスルホン体では説明が不可能であった。一方、構造不明のままメチル化を行ない測定したマスペクトル (Fig. 19 参照) では分子イオンが 14 mass 増加しているのみであり、このことから intact GM-3 の遊離の水酸基は 1 つであったことが明らかとなった。ところで、PCB 代謝物の中には稀に生体内でメチル化された代謝物が検出される例がある。これは生成した 1,2-dihydroxy 体が catechol-O-methyltransferase (COMT) による触媒反応を受け、片方の水酸基がメチル化されたものと考えられている。実際にウサギの PCB153 *in vivo* 代謝物にはそのような代謝物が検出されている⁵⁰⁾。従って intact GM-3 が生体内で片方の水酸基がメチル化された monohydroxy-monomethoxy-PenCB であると仮定すると先の ¹H-NMR およびメチル誘導体化による分子量変化を矛盾なく説明することができる。しかしながら GM-3 の分子量に一致するためにはさらに酸素原子 1 個分だけ必要である。従って以上の機器データの全てを考慮に入れると最後の酸素原子はオキシラン酸素であるものと推定される。以上の結果、水酸基、メトキシ基およびオキシラン環の位置は不明であるが、GM-3 の構造は monohydroxy-monomethoxy-PenCB-oxide であるものと推定された。ただし、arene oxide である場合、そのプロトンは芳香環部分ではなく、高磁場側にシフトするはずであり、従って GM-3 は既報⁸⁷⁾⁸⁸⁾にあるように arene oxide ではなく oxepin 構造⁸⁹⁾をとっている可能性が考えられた。

第 6 項 糞中未変化体および代謝物の定量

PCB153 の投与量および投与経路が異なるため、直接イヌの結果と比較はできないが、モルモットにおける本 PCB の体内動態の情報の 1 つとして投与後一週間に排泄される糞中の未変化体および代謝物量 (M-1 ~ M-3) を測定した。その結果を Table 5 に示す。

Table 5 Excretion of unchanged compound and three major metabolites of PCB153 in feces of phenobarbital-treated guinea pig.

Compounds	Excretion (μmol)							
	Days after administration of PCB153							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
PCB153	90.6	285.7	216.3	291.2	326.6	194.0	145.5	1549.9 (2.214)
M-1	12.2	32.2	17.0	22.3	21.1	14.7	12.8	132.2 (0.189)
M-2	9.7	17.5	14.6	22.8	12.9	8.9	13.8	100.3 (0.143)
M-3	54.3	116.7	93.3	104.3	96.4	56.6	71.9	593.5 (0.848)

Figures in parentheses are % of the dose.

モルモットでは投与一週間後においても代謝物ばかりでなく未変化体の高い排泄量を維持していた。イヌの結果(第II章第5節 Table 3)と比べるとこの未変化体排泄量の高さは、当教室においてすでに 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl のラットでの排泄研究で報告している exsorption⁹⁰⁾によるものとは考え難く、むしろ投与した腹腔から臓器組織中への吸収、分布の遅さと胆汁排泄、および(あるいは)腸管からの再吸収の低さに起因している可能性が考えられる。一方、代謝物では GM-1a, GM-1b, GM-2 および GM-3 を除き、ここで定量した3種の代謝物の合計だけでも測定した期間内では常に未変化体排泄量の40%以上であり、モルモットが本PCBの代謝において優れた動物種である可能性が示唆された。ただし、*in vivo*においてイヌより排泄能力が優れているか否かについては未変化体および代謝物の体内分布の相違も無視できず、少なくとも投与形式を揃えた検討が必要である。

第3節 *In Vitro* 代謝 - イヌとモルモットの代謝活性の比較 -

前節まででPCB153の代謝はモルモットにおいても優れている可能性が示唆されたが、実際にイヌとどれほどの差があるかは明確ではなかった。そこで本節ではイヌおよびモルモットの肝ミクロソームを用い、同じ条件下で代謝実験を行うことで両動物種の代謝活性の比較を行うことにした。

*In vivo*での検討と同様にPB処理したモルモットを屠殺し、常法に従って肝ミクロソ-

ムを調製した。予備的検討においてモルモット肝ミクロソームでPCB153を代謝させたところ、*in vivo*で検出された7種類の代謝物のうち、M-1～M-3の3種のみが定量可能なレベルで生成し、モルモットにおいてもイヌと同様 2,3-arene oxide 中間体を經由した経路が major pathway であり、3,4-arene oxide 中間体を經由する経路は minor pathway であることが明らかであった(データ未記載)。

そこでこれら3種の主代謝物を定量した。その結果を Table 6 に示す。

Table 6 Comparison of activity of three major metabolites formation between PB-treated dogs and guinea pigs

Metabolites	Metabolite formed ($\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	
	Guinea pig	Dog
M-1	4.01 ± 0.28	54.1 ± 7.07 (13.5)
M-2	2.72 ± 0.76	33.9 ± 1.89 (12.5)
M-3	2.69 ± 0.46	29.3 ± 1.85 (10.9)

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three determinations.
Figures in parentheses are the relative ratio to guinea pig's values.

この結果、イヌとモルモットで代謝物によって若干異なるものの、イヌの方がモルモットよりも約10倍代謝活性が高かった。

第4節 考察

本章においてはモルモットがイヌと同様にPCB153を主に 2,3-arene oxide 中間体経路で代謝し得ることが明らかになり、本中間体生成反応が唯一イヌのみに限られた特殊な代謝反応機構ではないことが示された。しかし、*in vivo*代謝の結果からはモルモットでは主経路ではないが、3,4-arene oxide 中間体経路での代謝も行なわれている可能性が示唆された。先にも述べたようにウサギおよびラットではPCB153は主に 3,4-arene oxide 中間体経路で代謝されていると考えられている。しかしながら、両動物種で代謝物の生成比

は異なっており、ウサギにおいては、3,4-arene oxide 中間体は NIH-shift せず、排他的に 2 種類の脱塩素水酸化体に変換しているものと考えられる。興味深いことにウサギにおける chloroacetanilide の代謝においても同様に脱塩素水酸化体は検出されるが、NIH-shift 体は検出されていない⁹¹⁾。一方、ラットでは 3,4-arene oxide 中間体はウサギと大きく異なり、主に NIH-shift 体に転位しており、生成する 2 種類の脱塩素水酸化代謝物の生成比もウサギとは異なっている。また、ウサギには認められていない ortho 位への直接水酸化の結果と考えられる 6-hydroxy 体も比較的多く生成している (第 II 章第 6 節 Table 4 参照)。

モルモットはウサギと同様 3,4-arene oxide 中間体からは 2 種類の脱塩素水酸化体を生成するが、NIH-shift 成績体が検出されないことから、ラットよりもむしろウサギに近い代謝を行なうものと考えられる。また、酸素添加反応後の代謝において、COMT によると考えられるメチル化反応が見られる点ではウサギに最も類似していると考えられる。以上のことから総合的に判断すると、少なくとも PCB153 を基質とした場合、モルモットの比較代謝学的な位置は、イヌに最も近く、ウサギがそれにつぐものと考えられる。またラットともある程度類似している可能性は否定できないが、arene oxide 中間体を生成していないか、仮にしていたとしてもその代謝における寄与は極めて低いと考えられるサルおよびマウスとはかなり離れているものと考えられる。

モルモットにおける本 PCB の体内動態を知る目的で糞中未変化体および代謝物の定量を行ったが、投与後 7 日間における 3 種の主代謝物の排泄量は約 1% 程度であった。この排泄量は一見ラットのもの (第 II 章第 6 節 Table 4) と類似しているように見えるが、ラットでは未処理の動物を用いていること、投与量および投与経路が全く異なることなどから直接の比較はできず、2,3-arene oxide 中間体生成能力がモルモットにおける本 PCB の排泄能力にどの程度寄与しているかは、これらの条件を揃えた検討が必要である。一方ミクロソームを用いた代謝実験においてイヌとモルモットの代謝活性を比較したところ、イヌの活性の方がモルモットのそれより約 10 倍高いことが明らかとなった。ただし、ここで注意を要することは今回用いたミクロソームは薬物 (PB) 前処理した動物種より調製している点である。前処理の目的は、緒論にも記したが PCB は自らが誘導した P450 分子種によって代謝されること、また PCB153 は PB type の誘導剤であることから代謝物の検出を容易にするためである。第 III 章考察に記したようにイヌにおいて PCB153 代謝は 2B subfam-

ily P450 (CYP2B11) で触媒されると報告されている⁸⁴⁾。2B subfamily P450 はラット肝臓ではほとんど発現しておらず、PB 処理によって数百から千倍にまで誘導されることが知られている⁹²⁾⁹³⁾。最近当教室では、モルモット肝臓より 1 種の 2B subfamily P450 (P450_{GP-1}) を精製し報告しているが⁹⁴⁾、興味深い事にイヌとモルモットの 2B subfamily P450 はいずれも未処理肝臓でかなりのレベルで発現しているという共通性がある⁹⁶⁾⁹⁴⁾。厳密に言えば未処理動物肝臓での含量および誘導倍率は両種間で異なっており、未処理モルモット肝臓において P450_{GP-1} の含量は総 P450 の 20% を占めており、PB 処理によって約 1.7 倍に誘導される⁹⁵⁾との報告と未処理時には肝臓の総 P450 の 47% を占めており PB 処理時には約 60% を占めるとの報告がある⁹⁶⁾。一方、未処理イヌ肝臓においては CYP2B11 含量は総 P450 の 33% を占めており、PB 処理によって約 5 倍誘導され、処理時には総 P450 含量の 81% を占めるようになるとの報告⁸⁴⁾と未処理では 23% であり約 10 倍誘導されて 50% となるとの報告がある⁹⁶⁾。以上のことより、未処理動物肝臓においてはイヌよりモルモットのほうが、2B subfamily P450 含量が高い可能性もあり、仮にモルモットで認められた PCB153 の代謝が 2B subfamily P450 (P450_{GP-1}) で触媒されているとした場合、未処理動物肝臓のミクロソームを用いた場合は両動物種の代謝活性の接近あるいは逆転が起こりえる可能性は否定できない。事実、Tanimoto らは 2B subfamily P450 の良い基質と考えられる strychnine の未処理肝ミクロソームを用いた代謝において、モルモットがイヌより代謝活性が高いことを報告している⁹⁷⁾。こうした場合、*in vivo* での排泄力も同様な傾向が認められるものと考えられる。

これまでに述べてきたように脱塩素水酸化体である M-1 と NIH-shift 体である M-2 は共に 2,3-arene oxide 中間体由来であると考えられるが、M-3 については直接水酸化反応の成績体であると想定している (Fig. 12)。しかし、このように反応機構が異なる場合、一般には触媒する P450 分子種が異なると考えられており⁶⁷⁾、仮にそれが正しいならば、2B subfamily P450 で 3 種全ての代謝物が生成するとは考えられない。一方、本章で明らかにした 2,3-arene oxide 中間体経路の代謝と 3,4-arene oxide 中間体経路の代謝が単一の P450 分子種 (P450_{GP-1}) で触媒されていると仮定した場合、モルモットにおける PCB153 の代謝経路は Fig. 27 に示すようであると考えられる。ここで重要な点は arene oxide 中間体のさらに上部に tetrahedral 中間体⁹⁸⁾⁹⁹⁾を想定している点である。Tetrahedral 中間体経由の代謝反応の興味深い点は、本中間体は、2,3-arene oxide や 3,4-arene oxide 中間体への閉環が可能であ

第 V 章 PCB153 代謝に関する cytochrome P450 分子種

第 1 節 概要

前章まででイヌおよびモルモットはいずれも PCB153 を主に 2,3-arene oxide 中間体經由で代謝することが明らかとなった。しかしながら、本 PCB を代謝しうる全ての動物種において検出されており、これまで直接水酸化によって生成すると考えられている 3-hydroxy 体 (M-3) の生成量も多い。イヌにおける PCB153 代謝は 2B subfamily P450 によって触媒されると言われているが、報告されている代謝物が著者の見出した代謝物と同一のものであると確認されていないこと、さらに第 II 章第 3 節および第 IV 章考察で記した様に反応機構の異なる代謝物は異なる P450 分子種によって生成されるのであれば、他の subfamily P450 の関与も完全には否定できない。実際にラットの精製 P450 を用いた研究からは 2B subfamily P450 は直接水酸化反応を触媒する一方、1A subfamily の P450 は arene oxide 生成反応を触媒すると考えられている¹⁰⁰⁾。また、PCB ではないが、hexachlorobenzene の代謝において認められる脱塩素水酸化反応は 3A subfamily P450 で主に触媒されると報告されている¹⁰¹⁾。さらに、ラットにおいてはハロ置換ベンゼンの 2,3-arene oxide 中間体と 3,4-arene oxide 中間体の生成を触媒する P450 が異なることはよく知られた事実である⁶⁹⁾⁸⁸⁾。前章第 3 節において PB 処理イヌ肝ミクロソームにおける 3 種の主代謝物生成活性はモルモットのそれを大きく上回っており、仮にその全てが 2B subfamily P450 によって触媒される場合、それが酵素自体の代謝活性の差によるものか、単にミクロソーム中の P450 含量の差によるものかについての疑問は、精製酵素の活性の比較で解決される。第 II 章第 4 節における SH 化合物を用いた検討結果では、NIH-shift 体 M-2 と meta 位水酸化体 M-3 の生成機構は異なる可能性を述べたが、前節考察で述べた tetrahedral 中間体を考えれば単一の P450 による反応機構でも矛盾なく結果の説明が可能である。したがってモルモットおよびイヌの精製酵素を用いた検討によって、これら代謝反応機構の詳細に迫ることも可能であると考えられる。また逆に複数の P450 分子種が反応に関与している場合、異なる分子種は異なる酵素誘導剤に応答することから、その知見は排泄促進に重要な示唆を与えるものと考えられる。

以上の点から本章ではモルモットおよびイヌ肝臓より数種の P450 分子種を精製し PCB153 の代謝能について検討を行った。

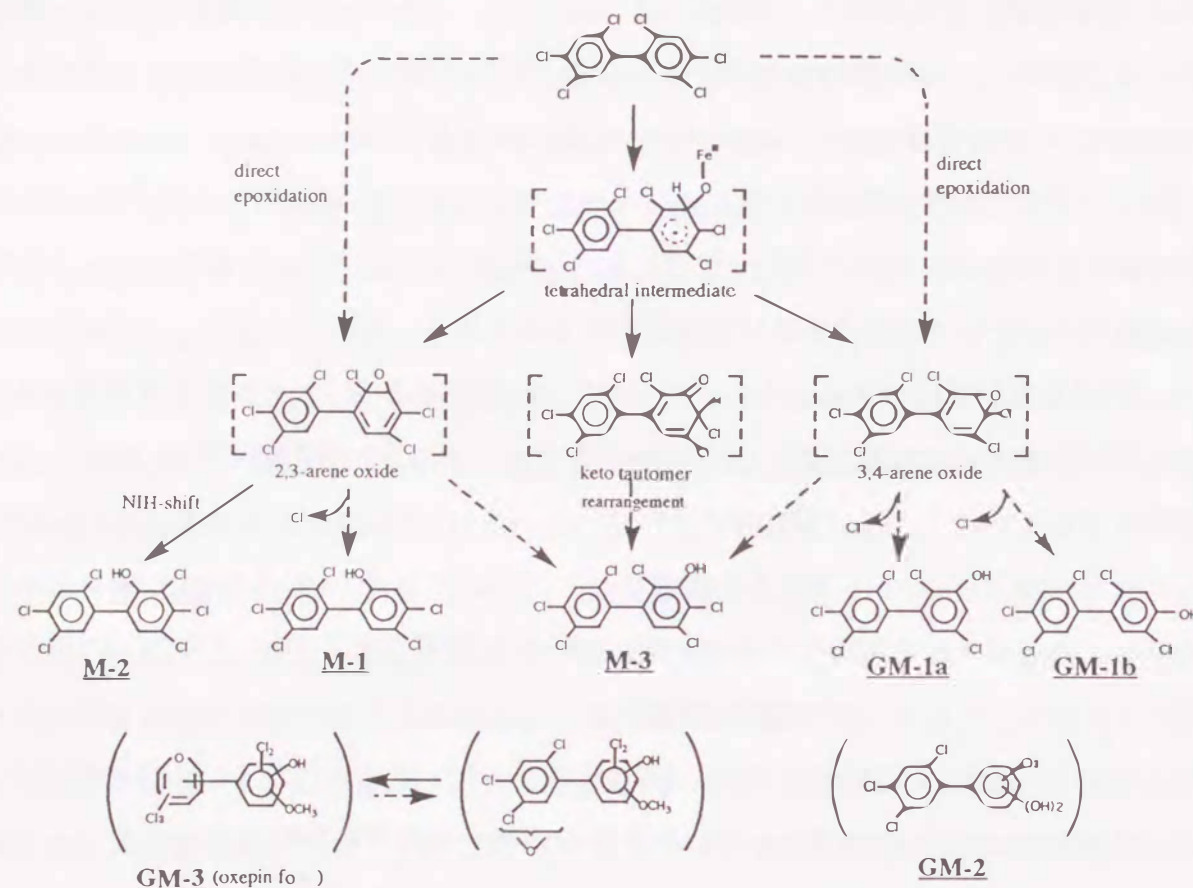


Fig. 27 Proposed metabolic pathways of PCB153 in guinea pigs

ると同時に keto 互変異性体からの meta 位水酸基導入反応もまた、同時に可能である点である。これら 3 方向の反応への向きは酵素の活性中心近傍において、基質の空間的配置の決定を担うアミノ酸残基と P450 分子種間の基質結合部位への基質の配向の違いによって決定されるものと考えられる。即ちイヌの CYP2B11 の内部環境において PCB153 は 2,3-arene oxide 中間体への閉環および keto 体への変換に最適な配向を維持しているのに対し、モルモット P450_{OP-1} の内部環境ではその配向が微妙にずれたために、なお、2,3-arene oxide 中間体への閉環が優位であるが、3,4-arene oxide 中間体への閉環も可能となったと説明できる。以上の考察が正しいならばイヌにおける PCB153 の代謝機構 (Fig. 12) も tetrahedral 中間体に関与していると考えの方がより適切と考えられる。

但し、著者が見出した 3 種の代謝物の生成に関わる P450 分子種が確かに 2B subfamily P450 であるか否かを明確にしている現時点においては、以上の考察は推測にすぎないため次章では PCB153 の代謝に関わる P450 分子種を同定する試みを行った。

第2節 Phenobarbital 処理モルモット肝ミクロソームからの 2B subfamily P450 の精製

先に記述した通り当教室において Oguri らはモルモット肝より 1 種の 2B subfamily P450 (P450_{GP-1}) を精製し報告している⁹⁴⁾。

まず著者は、その方法に基づき、PB 処理モルモット肝臓より P450_{GP-1} を電気泳動的に単一にまで精製した (Fig. 28)。精製酵素の比含量は 15.0 nmol/mg protein であった。

本酵素が確かに P450_{GP-1} であることを確認するため、N末端アミノ酸配列を決定し、分析した 15 番目まで完全に一致することを確認めた (データ未記載)。さらに触媒活性として benzphetamine N-demethylation 活性 (14.4 nmol/min/nmol P450)、7-ethoxycoumarin O-deethylation 活性 (1.4 nmol/min/nmol P450)、testosterone 16 α -hydroxylation (0.4 nmol/min/nmol P450)、16 β -hydroxylation (2.0 nmol/min/nmol P450) および 17-oxidation 活性 (0.7 nmol/min/nmol P450) を測定した。以上の点から精製した酵素が確かに P450_{GP-1} であり、活性のある形で精製されていることが明らかとなった。

第3節 再構成系における検討

P450 は小胞体膜上において P450 に NADPH からの電子を供給する NADPH-cytochrome P450 reductase および、ある場合には cytochrome b₅ と相互作用すること、さらに脂溶性の膜環境に包埋されていることが酸素添加酵素としての機能を発揮するために必要である。そこで精製した P450_{GP-1} の活性を発現させるためにはこれら環境を試験管内で再

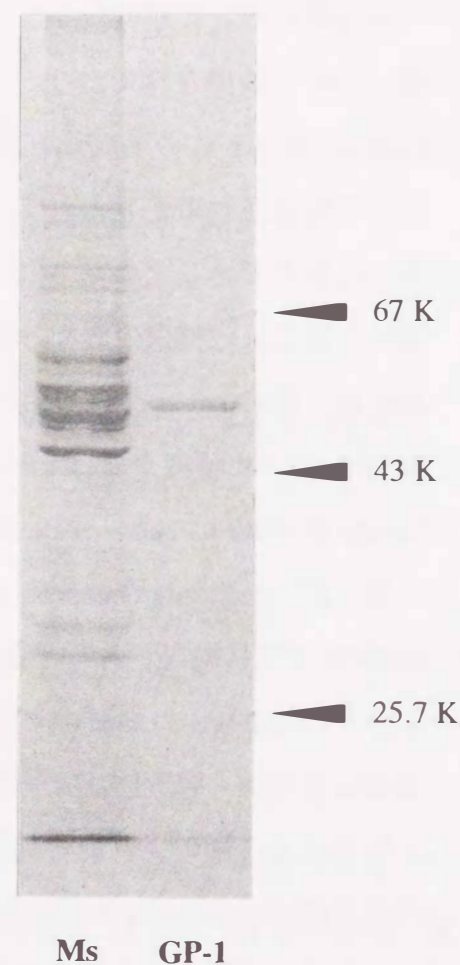


Fig. 28 SDS-PAGE of liver microsomes of PB-treated guinea pig (MS) and purified P450_{GP-1} (GP-1). Loaded amount were 10 μ g (MS) and 1 μ g (GP-1), respectively

現する必要がある。その目的で NADPH-cytochrome P450 reductase を Wistar rat 肝臓より、cytochrome b₅ はモルモット肝臓よりそれぞれ精製した。データには示さないがいずれも電気泳動的に単一であり、精製標品の比活性および比含量は 17 unit/mg および 41 nmol/mg であった。これら酵素を用いて PCB153 代謝活性を測定した。その結果を Table 7 に示す。

Table 7 Quantification of PCB153 metabolites in reconstituted system containing cytochrome P450_{GP-1}

Metabolites	Metabolite formed (pmol/min/nmol P450)
M-1	11.0
M-2	3.56
M-3	5.57

Incubation mixture contained cytochrome b₅ at equimole with P450.

以上のように M-1~M-3 の 3 種の代謝物が生成することが確認されたが、ミクロソームの活性と比較すると予想外に絶対活性の著しい上昇は認められなかった。即ち nmol P450 当りの活性はミクロソームでの活性より上昇したが 2.1 倍から高々 4.5 倍に留まった。また、データには示していないが、cytochrome b₅ を反応系から除いても活性には何ら変化が見られなかった。

第4節 Phenobarbital 処理イヌ肝ミクロソームからの主要 P450 分子種の精製

モルモット P450_{GP-1} を用いた再構成系によって著者が見出した 3 種の代謝物の生成は全て 2B subfamily P450 で触媒されることが明らかになった。しかしながら他の P450 分子種によっても同じ代謝物が生成される可能性は否定できない。Duignan らによるとイヌでの PCB153 代謝活性は PB 処理で 4~5 倍増加すると報告されている⁹⁴⁾。そこで本節では PB 処理によってイヌ肝臓に誘導されてくると考えられる主要な P450 分子種を精製し、同様に検討することにした。イヌの 2B subfamily P450 はすでに幾つかのグループで精製され、PB 処理で 5~10 倍誘導されることが明らかにされている。 3A

Subfamily P450 は齧歯類において合成ステロイド化合物¹⁰²⁾等で誘導される分子種であるが、PB 処理でも誘導されることが明らかにされている¹⁰³⁾。 イヌにおいても誘導されると報告されており¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾、すでに Ciaccio と Nakamura¹⁰⁶⁾、および Shiraga らによって精製が報告されているが、Ciaccio のグループが精製したものは失活しており¹⁰⁴⁾、Shiraga らは単一にまで精製できなかった¹⁰⁷⁾。 Nakamura らは Ciaccio と同じ方法で精製したが、その方法では極めて回収率が悪かった。 一方 2C subfamily P450 はほとんどの実験動物で常在的に肝臓に発現している分子種であるが、齧歯類およびヒトでは複数の isoform が存在しておりラットの CYP2C6 は PB 誘導性の分子種である¹⁰⁸⁾。 イヌからは Komori¹⁰⁹⁾ および Shiraga ら¹⁰⁷⁾によって精製されているが、PB 誘導性か否かは明らかにされていない。 ところでこれまで PCB の代謝研究の多くは 1A および 2B subfamily P450 によって行なわれており、2C および 3A subfamily P450 での検討は皆無である。 しかし先に記したように PCB は自らが誘導する P450 分子種によって代謝されること、PCB153 は PB 型酵素誘導剤であることを考慮すると 2C あるいは 3A subfamily P450 で代謝される可能性も否定できない。 そこで PB 処理イヌ肝臓より 2B、3A、2C subfamily P450 および cytochrome b₅ を精製することにした。 各 P450 分子種はラット CYP2B1、CYP3A2 および CYP2C11 抗体との交差反応性を指標に精製した。

Fig. 29 に精製した 3 種の P450 分子種の電気泳動を示す。 レーン 4 には同じく PB で誘導されると考えられた分子量 47k のタンパク質を精製したものを同時に泳動している。 解析の結果、このタンパク質は microsomal epoxide hydrolase であることが明らかとなった。 この epoxide hydrolase は脂肪族 epoxide や arene oxide の解毒に関与する重要な第 2 相反応の薬物代謝酵素であり、PCB の代謝中間体の解毒にもある程度関与していると考えられるので別に特性評価を行ない、すでに報告した¹¹⁰⁾。 精製した P450 はいずれも電気泳動的に単一であり、P450_{DL-1} (CYP3A12)、P450_{DL-2} (CYP2B11) および P450_{DL-3} (CYP2C21) と命名した。 () 内は Nebert らの命名委員会によって近年推奨されている一次構造に基づいた分類法における名称である¹¹¹⁾。 それぞれの比含量は P450_{DL-1} (12.6 nmol/mg protein)、P450_{DL-2} (14.3 nmol/mg protein) および P450_{DL-3} (15.8 nmol/mg protein) であった。 それぞれの P450 が確かに既報の分子種と同じであるか否かを確認するために N 末端アミノ酸配列を決定した。 その結果を Table 8 に示す。 以上の結果精製した P450 が確かに目的の酵素タンパク質であることが明らかになった。 次にこれら P450 が活性を保ったものであるか否かをそれぞれの代表基質を用いて検討し

た。 その結果を Table 9 に示す。 P450_{DL-2} (CYP2B11) および P450_{DL-3} (CYP2C21) の再構成系では先の P450_{CP-1} 同様リン脂質として DLPC を用いても十分な活性が得られたが、

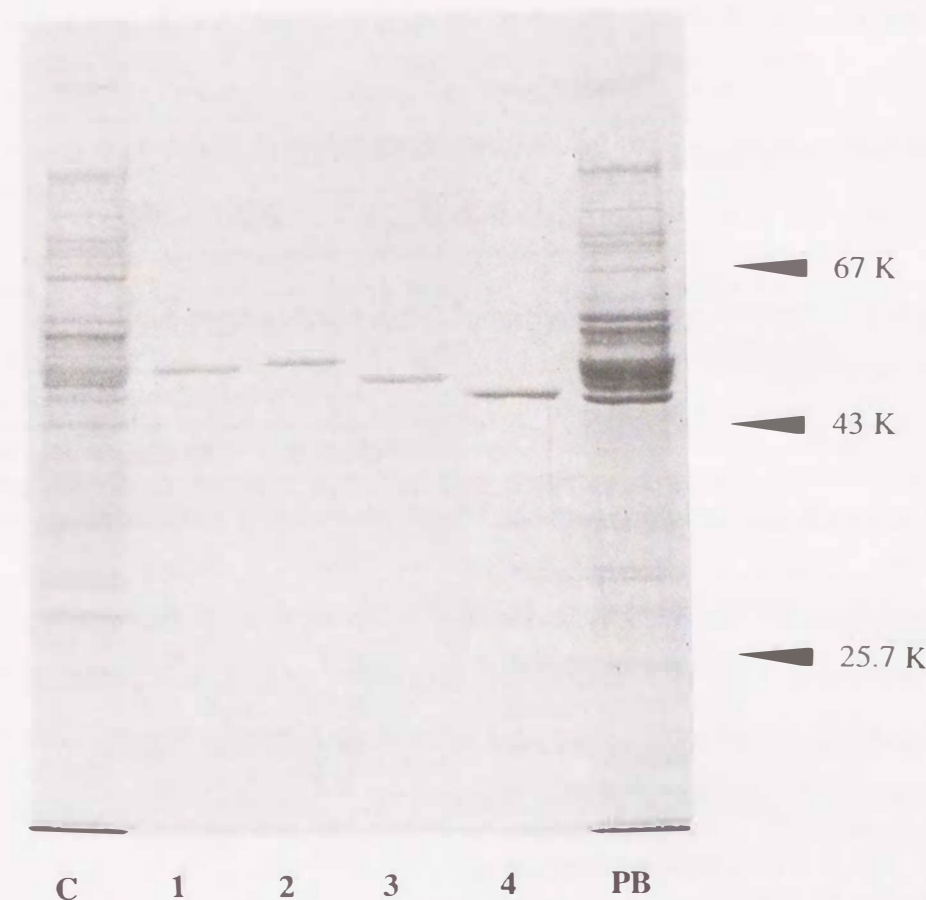


Fig. 29 SDS-PAGE of cytochrome P450s and 47 k protein (lane 4) purified from liver microsomes of dogs treated with PB. Lanes C and PB contained untreated and PB-treated dog liver microsomes (10 µg). Lanes 1-3 contained Purified P450_{DL-1}, P450_{DL-2} and P450_{DL-3} in the amount of 1 µg, respectively.

Table 8 NH₂-terminal amino acid sequences of P450s purified from PB-treated dog

Enzyme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
P450 _{DL-1}	M	D	L	I	P	S	F	S	T	E	T	W	L	L	L	A	I	X	L	X
P450 _{DL-2}	M	E	L	S	V	L	L	L	L	A	L	L	T	G	L	L	L	L	M	A
P450 _{DL-3}	M	D	L	F	I	V	L	V	I	X	L	S	X	L	I	X	F	F	L	W

X, unidentified amino acid residue

P450_{DL-1} (CYP3A12) だけは他の動物種の 3A subfamily P450 と同様 DLPC では十分な活性が得られなかったため、PB 処理モルモット肝ミクロソームより調製した脂質抽出物を用いたところ 3A subfamily P450 の特徴的活性である testosterone 6β 位の水酸化活性を再現することが出来た。 但し、他の動物種の 3A subfamily P450 と異なり cytochrome b₅ の

添加により活性上昇は認められず、この点 Shiraga らの報告¹¹²と一致していた。一方、P450_{DL-3} (CYP2C21) は、本論文には記さないが、予想通り PB 処理で誘導されることを明らかにした³⁹⁾ものの、ラットの PB 誘導性 CYP2C6 と異なり cytochrome b₅ 添加効果¹⁰⁸⁾はなかった。また、Komori らが報告しているように¹⁰⁹⁾イヌの CYP2C にはラット酵素と異なり testosterone の 2 α 位に対する触媒活性は認められなかったが、基質を estradiol に換えると 2 位の水酸化活性が出現することを新たに明らかにした³⁹⁾。

Table 9 Typical enzyme activities of P450s purified from dog liver in reconstituted system.

Substrate	Reaction	Activity (nmol/min/nmol P450)		
		P450 _{DL-1} ^{a)}	P450 _{DL-2}	P450 _{DL-3}
Benzphetamine	N-demethylation	—	17.0	18.0
7-Ethoxycoumarin	O-deethylation	—	1.1	1.4
Testosterone	2 α -hydroxylation	N.D.	N.D.	N.D.
	6 β -hydroxylation	0.7	N.D.	N.D.
	16 α -hydroxylation	N.D.	3.6	19.8
	16 β -hydroxylation	0.2	0.1	N.D.
	17-oxidation	0.2	0.9	17.3
Estradiol-17 β	2-hydroxylation	—	—	5.0
	16 α -hydroxylation	—	—	2.3

a) ; Reconstituted system was constructed by microsomal lipid extract as lipid component.
N.D. ; not detected, — ; not determined

第5節 再構成系における検討 II

3 種の P450 を用いて PCB153 の代謝を検討した。その結果 P450_{DL-1} (CYP3A12) および P450_{DL-3} (CYP2C21) では少なくとも今回測定した条件では M-1 ~ M-3 のいずれの代謝物も検出できなかった。一方 P450_{DL-2} (CYP2B11) を用いた場合 3 種の代謝物が検出され、その生成活性は cytochrome b₅ 添加で顕著に上昇することが明らかとなった。その結果を Table 10 に示す。Duignan らは CYP2B11 の PCB153 代謝活性は cytochrome b₅ 非存在下では、ミクロソームでの代謝活性よりむしろ低く、ラット肝より精製した cytochrome b₅ 添加により約 11 倍上昇すると報告している⁸⁴⁾。彼らの報告と比較すると、著者の測定では M-1 および M-2 の生成活性は彼らと同様にミクロソームの生成活性より低かったが M-3 の生成活性は再構成系の方がやや高いという結果であり、cytochrome b₅

添加によって 3 種の代謝物の生成活性の合計は約 4 倍に上昇するのに留まった。絶対

Table 10 Quantification of PCB153 metabolites in reconstituted system containing cytochrome P450_{DL-2} (CYP2B11)

Metabolites	Metabolite formed (pmol/min/nmol P450)	
	- b ₅	+ b ₅
M-1	19.2 $\pm$ 4.53	82.6 $\pm$ 5.56 (4.3)
M-2	15.5 $\pm$ 8.80	81.3 $\pm$ 6.15 (5.2)
M-3	24.0 $\pm$ 1.18	71.2 $\pm$ 10.6 (3.0)

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three determinations.
Figures in parentheses are fold increase due to addition of cytochrome b₅.

活性を比較すると cytochrome b₅ 非存在下では著者らの活性が約 3 倍高かったが、cytochrome b₅ 存在下における彼らの水溶性代謝物総量の生成活性は 213 $\pm$ 15 pmol/nmol P450/min であるのに対し⁸⁴⁾、著者の測定では M-1 ~ M-3 の生成活性の総量は 235 pmol/nmol P450/min であり、極めて近似していた。以上の事実から彼らが測定していた水溶性代謝物総量の大部分は著者らの同定した 3 種の主代謝物で説明が可能であるものと考えられた。

一方、第 3 節においてモルモット P450_{GP1} の再構成系で定量した M-3 生成活性 (Table 7) をイヌ P450_{DL-2} (CYP2B11) のそれと比較すると イヌ P450 の方がモルモット P450 の活性より、cytochrome b₅ 非存在下で 5.5 倍、存在下で 17 倍高かった。

第6節 抗体阻害実験

第 3 節および前節において著者が見出した 3 種類の代謝物はモルモットにおいてもイヌにおいても 2B subfamily P450 が触媒する酵素反応で生成することが明らかになった。しかし一般に再構成系での活性はミクロソームにおける活性より高いのが普通であり、理論的には精製倍率より高くなければならない。それにも拘わらず、Duignan らおよび著者の定量では cytochrome b₅ 非存在下の再構成系での活性はミクロソームでの活性と同程度であるかむしろ低かった。彼らと著者の再構成系の条件は界面活性剤の有無、P450/b₅ 比および基質濃度などの点で異なっているが、絶対活性のひらきはそれほど大き

くないことから、これら要因の相違によって両研究グループにおける再構成系での活性の低さを説明することはできない。以上のことから、今回行った条件のうち上記以外の要因によって最適な再構成ができなかったと考えるか、あるいは今回は精製しなかった他の P450 分子種が著しく高い活性を有しているものと考えられる。

以上のことを明確にするために抗体阻害実験を行った。抗原は 2B subfamily P450 としては P450_{GP-1} を、3A subfamily P450 としては P450_{DL-1} を、さらに 2C subfamily P450 としては P450_{DL-3} をウサギに免疫し、それぞれ IgG を調製した。3A および 2B subfamily P450 に対して生起した抗体は精製酵素および肝ミクロソームにおいて対応する 1 種類のタンパク質しか認識しなかったが、既報に記したように Anti-P450_{DL-3} (CYP2C21) 抗体のみは 2B subfamily P450 とも免疫交差したため阻害実験には使用できなかった³⁹⁾。

まず Fig. 30 には Anti-P450_{DL-1} (CYP3A) IgG で PB 処理イヌ肝ミクロソームの M-1 ~ M-3 生成活性を阻害した結果を示す。

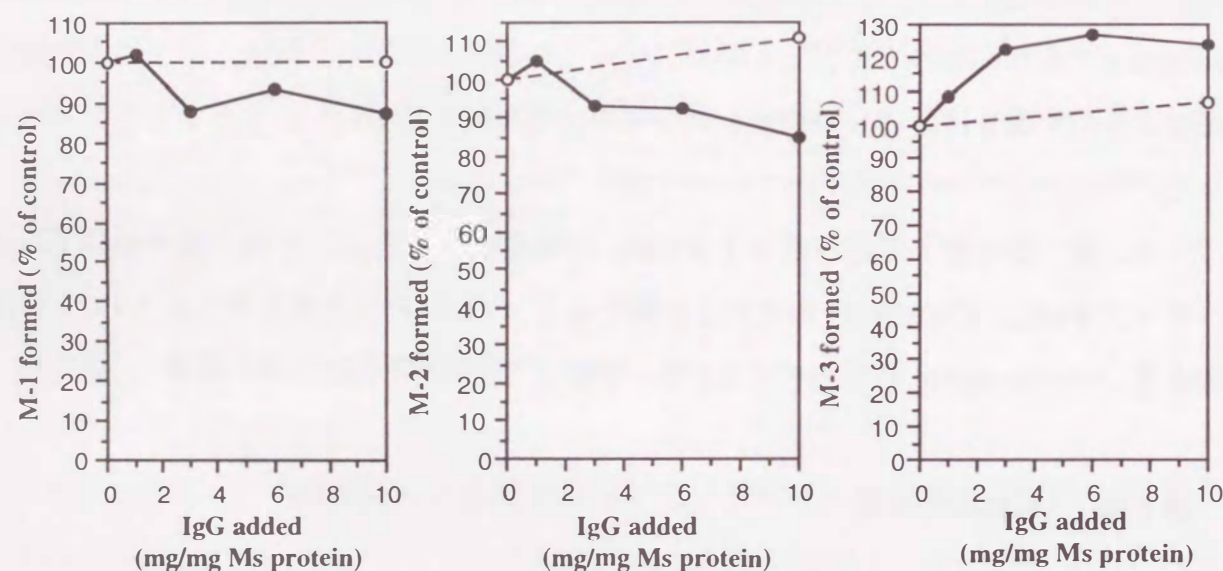


Fig. 30 Effect of anti-CYP3A12 IgG on the formation of three metabolites of PCB153 with liver microsomes of PB-treated dogs. Broken line represents the effect of preimmune IgG

第4節に記したように 3A subfamily P450 は再構成が難しい P450 分子種としてよく知られているため、その薬物代謝における関与を言及するには 3A subfamily P450 抗体を用いた抗体阻害実験か、それが入手できない場合同 P450 の特異的阻害剤として知られている triacetyloleandomycin¹¹³⁾ を用いた阻害実験が必須である。本検討の結果、少なく

ともイヌ肝ミクロソームにおける 3 種の主代謝物の生成には 3A subfamily P450 はほとんど関与していないことが示された。

次に Anti-P450_{GP-1} (CYP2B) 抗体を用いた阻害実験の結果を Fig. 31 に示す。

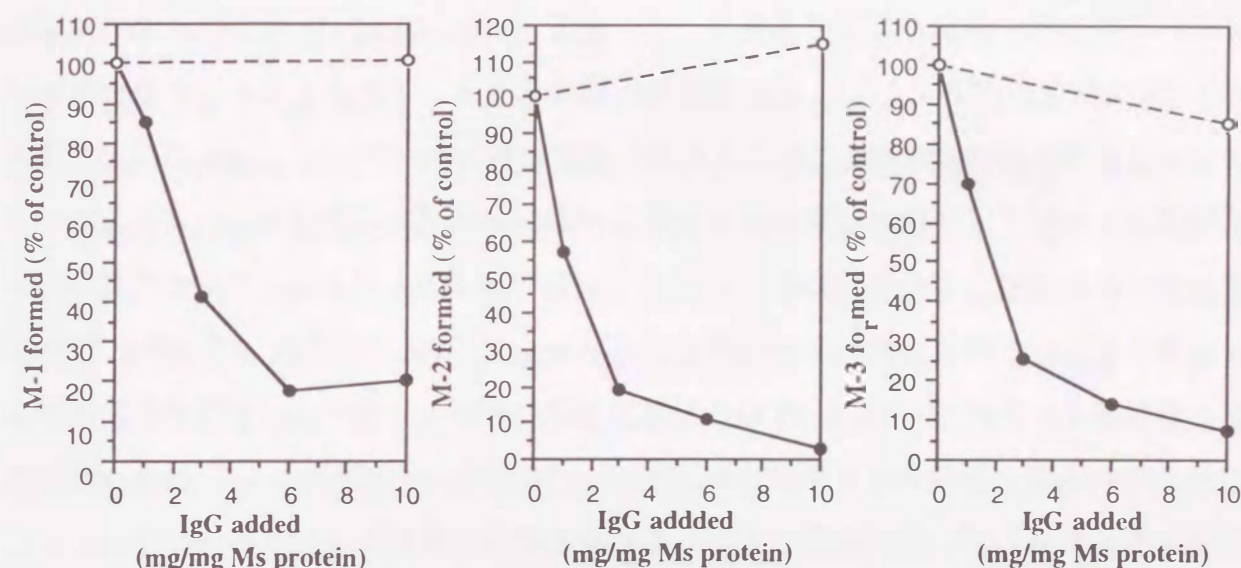


Fig. 31 Effect of anti-P450_{GP-1} IgG on the formation of three metabolites of PCB153 with liver microsomes of PB-treated dogs. Broken line represents the effect of preimmune IgG

イヌ肝ミクロソームにおける M-1 ~ M-3 生成活性は P450_{GP-1} 抗体の添加により濃度依存的に阻害され、最大 85 ~ 100% まで阻害された。以上の結果、ミクロソームでの M-1 ~ M-3 生成活性の大部分はいずれも 2B subfamily P450 で触媒されていることが明確になった。

第7節 考察

本章では著者が見出した PCB153 代謝物の生成に関与する P450 分子種を明らかにする目的でモルモットおよびイヌ肝臓より数種類の P450 分子種を精製し、再構成系およびミクロソームにおける抗体阻害実験を行った。その結果、3 種すべての代謝物の生成に 2B subfamily P450 が関与することが明らかとなった。本検討は、P450 の反応機構について幾つかの重要な示唆を与える。第一に PCB の脱塩素水酸化反応が P450 の触媒する反応によって生成することを明確に示した点である。先にも記したように

PCB の *in vivo* 代謝物にしばしば脱塩素水酸化代謝物が検出されることはかなり以前から知られていたが、その生成機構は未解明のままであった。著者はこの成績体が *in vitro* 代謝によっても生成すること、また NADPH 非存在下では生成しないことから加水分解的な脱塩素化反応ではなく P450 の触媒する反応の成績体であると確信していたが、今回精製 P450 によっても生成することを初めて明らかにすることができた。その反応機構についてはさらに検討が必要であるが、つい最近 Hirobe らは P450 化学モデル系を用いて P450 の新規代謝様式として *ipso* 型置換反応が起こりえることを示し、これが肝ミクロソーム系でも P450 依存性に起こりえることを報告した¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。*ipso* 置換型代謝反応様式とは、例えば一般の O-脱メチル化反応が O-メチル基の水酸化による不安定なヘミアセタールの生成とその後の非酵素的 HCHO 脱離で起こると考えられているのに対し、メトキシ基全体が酸化活性種由来の酸素原子と *ipso* 位 (官能基が置換している位置) で置換され脱離する反応をいう。PCB の脱塩素水酸化反応も一種の *ipso* 型置換反応であると考えられるが、著者と異なり Hirobe のグループでは反応中間体として arene oxide 中間体は考えておらず、他の機構で進行している可能性を推察しているようである。

第二にラットの精製 P450 では、1A subfamily P450 は arene oxide 中間体生成を、2B subfamily P450 は直接水酸化を触媒するという役割分担があると考えられていた¹⁰⁰⁾のに対し、動物種が異なるとそのような分担的説明は必ずしも当てはまらないことが示された点である。

第三に一部重複する可能性は否定できないが、主に生成機構が異なると考えられていた M-2 と M-3 が同一の P450 タンパク質によって生成することから、反応中間体としての tetrahedral 中間体生成の可能性が示唆された点である。即ちイヌおよびモルモットの 2B subfamily P450 はいずれも同一の tetrahedral 中間体を生成する反応を触媒し、このものは P450_{DL-2} (CYP2B11) と P450_{GP-1} の内部環境の相違に従って 2 次中間体である arene oxide あるいは keto 体へ移行、ついで転移あるいは異性化する。P450_{DL-2} 内で 2,3-arene oxide に閉環したものはこの後 SH 化合物によって非酵素的あるいは酵素的にフェノール体への異性化が妨げられ、keto 体に転移したものは SH 化合物の影響はほとんど受けないものと考えられる。精製酵素を用いた検討によってミクロソームで見られたイヌとモルモットの代謝物生成活性の差は、P450_{DL-2} と P450_{GP-1} 自身の活性の差に起因していることが明らかになった。仮に第 III 章で見出した 3,4-arene oxide 中間体経由の反応も、P450_{GP-1} で触媒されると考えた場合、本酵素では P450_{DL-2} との内部環境の差によって

tetrahedral 中間体は 3,4-arene oxide 中間体へも閉環するものと解釈される。このように基質の酵素活性中心に対する配向がずれたと考える場合、両者で主代謝物生成の絶対活性に差がでることはむしろ当然のことであると推察される。

あるいは以下のような考察も可能である。仮に P450_{DL-2} と P450_{GP-1} がいずれも同程度の tetrahedral 中間体生成を触媒しているとしても、それ以降の反応の相違のため両 P450 分子種の活性が異なる可能性が考えられる。たとえば arene oxide 中間体はそのオキシラン環の位置で生体高分子との結合に基づく毒性が異なることが知られている。すなわち bromobenzene においては *ortho-meta* (2,3)-arene oxide は解毒代謝物であるのに対し、*meta-para* (3,4)-arene oxide は肝壊死をもたらす毒性代謝物であると報告されている¹¹⁶⁾。PCB でも、Matthews ら¹¹⁷⁾および Schnellmann ら⁴⁴⁾は、3,4-arene oxide 中間体経由で容易に代謝される 2,3,6,2',3',6'-hexachlorobiphenyl (PCB136) は著しく生体高分子へ結合することを報告している。PCB153 の場合は代謝され難いため、PCB136 と比較した場合、生体高分子への結合はほとんどないと報告されているが⁴⁴⁾¹¹⁷⁾、PCB153 を主に 3,4-arene oxide 中間体経由で代謝すると思われるラットにおいては核タンパク質や DNA に対する結合が証明されているのも事実である¹¹⁸⁾。これらの知見は、モルモット肝においては多量に生成した 3,4-arene oxide 中間体が生体高分子と結合するために極性代謝物の回収が少ない可能性を示唆しているのかもしれない。

以上のように単一の P450 が複数の代謝物を生成しうる機構としては tetrahedral 中間体が介在するという考え方もあるが、基質が結合部位において flip-flop や rotation 等の flexible な挙動をとるため、多数箇所の水酸化が可能であるとする考え方もある。実際単一の中間体からの転位や異性化反応では説明しきれない離れた位置の水酸化を単一の P450 が触媒する例が明らかとなっており¹¹⁹⁾、本研究で見出した代謝物がそうした反応機構で生成している可能性も否定できない。また、両動物種の 2B subfamily P450 の絶対活性の差を必ずしも酵素活性中心への基質の配向の相違や arene oxide 中間体の転位方向の違いで説明する必要はない。より単純に PCB153 の両 P450 に対する親和性が異なる可能性も充分考えられる。

興味深いことにイヌ P450_{DL-2} (CYP2B11) の代謝活性は Duignan らの報告と一致して cytochrome b₅ 添加により増加したのに対し、モルモット P450_{GP-1} の代謝活性は影響されなかった。最近ラット CYP2B1 と cytochrome b₅ の結合には CYP2B1 の Lys-122 および Arg-125 残基が重要であることが示された¹²⁰⁾。一方、当研究室の Mise は今年に入って

モルモット P450_{GP-1} の cDNA cloning に成功した¹²¹⁾。その結果 CYP2B11 と P450_{GP-1} の 122 および 125 番目のアミノ酸残基はいずれも Lys および Arg で保存されていることから CYP2B11 と P450_{GP-1} は cytochrome b₅ との結合活性には大差はないものと推察される。Cytochrome b₅ は P450 に結合すると、P450 タンパク質分子の立体構造変化を誘起することが知られており¹²²⁾、このことが P450 の基質結合部位と基質との相互作用に影響する可能性は大きいものと考えられる。したがって活性増強の認められる CYP2B11 では cytochrome b₅ 結合に伴う conformation 変化が PCB153 の P450 の活性中心における酸素添加反応により適した配向をもたらすのかもしれない。あるいは cytochrome b₅ による P450 触媒活性の増強機構は NADPH 等の電子供与体から P450 への電子伝達の促進と効率化によるところが大きいと考えられているが、P450 分子中の電子の通路となっているアミノ酸残基あるいは高次構造は現在のところ充分には解明されておらず、CYP2B11 と P450_{GP-1} 間で異なるために cytochrome b₅ の効果が違う可能性も考えられる。しかしながら P450 と cytochrome b₅ 間の相互作用は極めてデリケートであり、同一の P450 と b₅ を使用してもなお、再構成系に添加する順序や P450/b₅ 比等で変化することが知られており¹²³⁾ *in vivo* における cytochrome b₅ の関与は当教室の Matsusue らが行ったように cytochrome b₅ に対する抗体を用いた検討が必要である¹²⁴⁾。

以上のようにイヌおよびモルモットでは著者が見出した新規代謝反応は、いずれも 2B subfamily P450 によって触媒されることが明らかとなった。Duignan らは代謝物や反応機構については全く触れていないが、ラットの 2B subfamily P450 の一つ CYP2B1 にやはり PCB153 代謝活性があることを報告している⁸⁴⁾。

精製酵素レベルで PCB153 の代謝が検討されているのはこれら動物種で全てであるが、反応機構は異なると考えられるもののいずれの動物種においても 2B subfamily P450 で代謝される点から、ヒトにおいても 2B subfamily P450 によって本 PCB が代謝される可能性が考えられる。そこで次章ではヒト 2B subfamily P450 を用いて PCB153 の代謝を検討することにした。

第 VI 章 ヒト 2B subfamily P450 による検討

第 1 節 概要

これまで極めて多くの PCB 代謝研究がなされているが、ヒトにおける PCB 代謝研究はほとんど行われておらず、PCB 混合物に暴露された油症患者や工場労働者の血中未変体濃度推移や残留代謝物パターンの研究が大部分を占める。*In vitro* における代謝研究は唯一 Schnellmann らがヒト肝ミクロソームでおこなった PCB15, PCB153 および PCB136 の検討のみである⁴⁴⁾¹²⁵⁾。したがって現在までヒトにおいて精製酵素レベルの研究は皆無であり、ヒトではいずれの subfamily の P450 分子種が PCB の代謝に関与するかは全く明らかとなっていない。Schnellmann らの報告では本研究の主題である PCB153 はヒト肝ミクロソームで全く代謝されなかったとされている⁴⁴⁾。

前章までの検討から、少なくとも現在までに検討された動物種では PCB153 はいずれも 2B subfamily P450 によって代謝されることが明らかとなった。ヒトにおいて 2B subfamily P450 は肝臓に常在的に発現している分子種であると言われているが、その発現量には個人差が激しくまた含量も極めて低い¹²⁶⁾。このことがおそらく Schnellmann らがヒト肝ミクロソームにおいて PCB153 の代謝物検出に成功しなかった理由であろうと推察される。このヒト 2B subfamily P450 (CYP2B6) はこれまでにヒト肝ミクロソームより精製が試みられているものの、現在まで単一の精製標品を得ることは成功していない。しかし、cDNA はすでにクローニングされており、つい最近になって CYP2B6 cDNA をヒト B リンパ芽球様細胞由来の培養細胞系に導入し安定的に発現させた細胞株あるいはそれから調製したミクロソームが市販されるようになった。ヒト P450 発現系は現在のところようやく商品化にこぎ付けた段階であるため、CYP2B6 を除き大量の P450 の発現には成功しておらず、ロットによって含量にかなりのバラツキがあるが、ほとんどのミクロソーム製品の活性はヒト肝ミクロソームで認められる活性に匹敵すると言われている。

前述したように本年になって当研究室の Mise らによってモルモット 2B subfamily P450 である P450_{GP-1} の cDNA がクローニングされ、その結果興味ある事実が明らかになってきた。Fig. 32 は Mise らが各動物種における 2B subfamily P450 のみに着目し、既知の塩基配列から平均距離 (UPGMA) 法に基づいて作成した分子系統樹である。その結果、哺乳類の 2B subfamily P450 は、ヒト CYP2B6、イヌ CYP2B11、ウサギ CYP2B4 お

よびモルモット P450_{GP-1} のような常在的に肝臓に発現している群と ラットやマウス P450

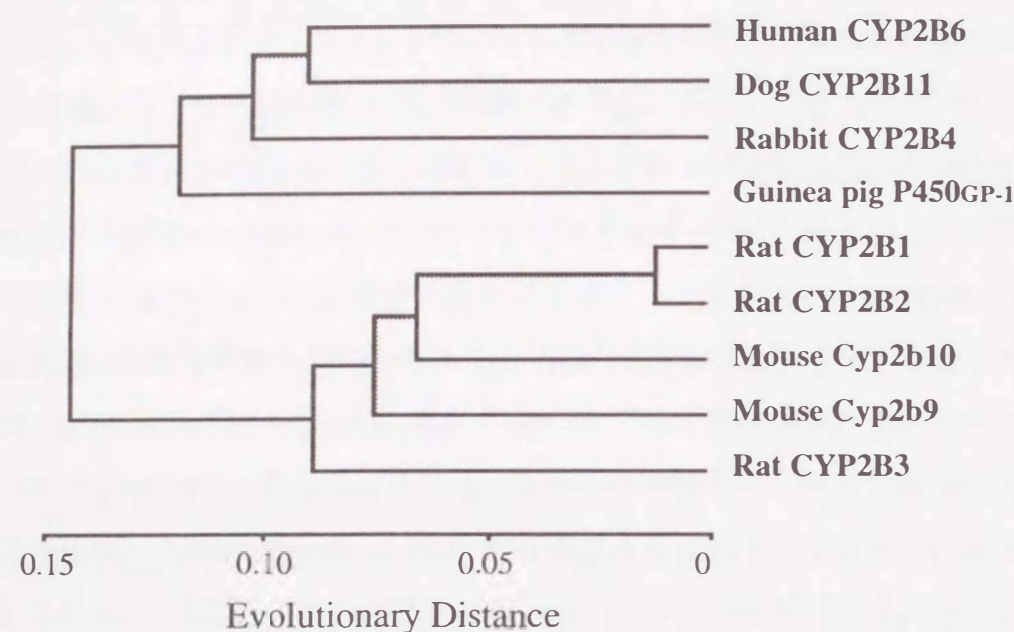


Fig. 32 Phylogenetic tree of the 2B subfamily P450 ¹²¹⁾

のように常在的にはほとんど発現しておらず、PB 型酵素誘導剤で著しく誘導発現する群に分れ、さらに興味深いことにはヒト CYP2B6 はその遺伝子の進化的距離がイヌ CYP2B11 と最も近かった。 Kato らの PCB153 のラットにおける *in vivo* 代謝物の同定結果³¹⁾および Duignan らのラット CYP2B1 による本 PCB の *in vitro* 代謝の検討⁸⁴⁾を合わせて考えると、ラット CYP2B1 は PCB153 を主に 3,4-arene oxide 中間体経由で代謝するものと推測される。一方、イヌ CYP2B11 は 2,3-arene oxide 中間体経由で代謝した。さらにモルモット P450_{GP-1} はイヌ同様に 2,3-arene oxide 中間体経由で代謝するが、*in vivo* 代謝からは 3,4-arene oxide 中間体経由の代謝も僅かながら進行している可能性が示唆された。以上のことを考慮するとモルモット 2B subfamily P450 は進化の距離がイヌ CYP2B11 により近いため、主にイヌ(2,3-arene oxide)型の代謝反応を行うものの、ラット P450 との分岐点により近い距離に位置しているため、僅かながらラット(3,4-arene oxide)型の代謝反応も残しているとの解釈ができる。仮にそのように考えれば、ヒト CYP2B6 はイヌ CYP2B11 と同様、イヌ(2,3-arene oxide)型の代謝反応を行うのではないかと予測が可能である。

以上の背景から、本章ではヒト CYP2B6 発現系を用いて PCB153 が代謝されるか否か、また代謝された場合どのような反応機構によって代謝されるかを明らかにすることを目的とした。

第2節 CYP2B6 発現系における PCB153 代謝

前章までの *in vitro* 代謝では全て control として NADPH 生成系を反応溶液から除いた系を用いていたが、ヒト CYP2B6 発現系は厳密に言うと 1 種の P450 のみを含んでいるわけではなく、cDNA を導入する細胞株 (AHH-1 TK⁺/-) 自身が少量ではあるが、元々 1A subfamily の P450 を含有しているため、この endogenous CYP1A1 による代謝の可能性を排除する必要がある。今回は同細胞株に CYP2B6 cDNA を組み入れるベクターを導入していないものから調製した control microsome を対照として用いた。Fig. 33 にそれらミクロソームで代謝実験を行い、代謝物をメチル誘導体化して分析したガスクロマトグラムを示す。

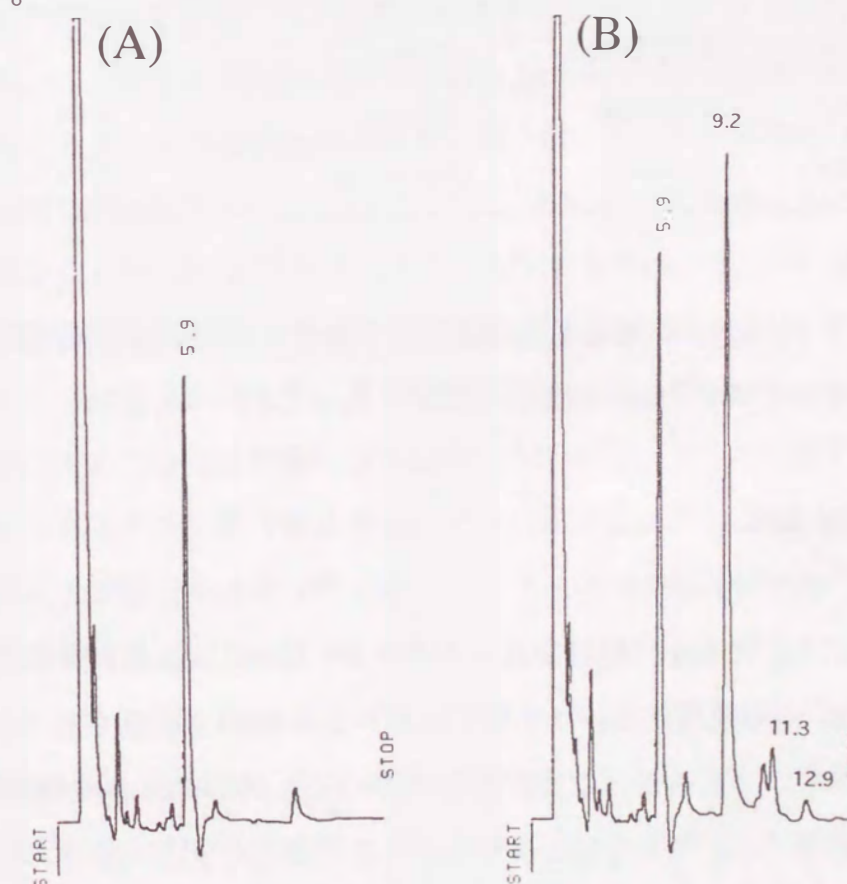


Fig. 33 Gas chromatograms of methylated derivative of fractions extracted from reaction mixture. (A) control microsomes (B) CYP2B6-expressed microsomes Peak at 5.9 min corresponds to unchanged PCB153

この結果より、ヒト CYP2B6 を発現させた細胞のミクロソームでは control ミクロソームに認められないピークが少なくとも 3 本出現した。その内 2 種類は量的に minor であったが、保持時間 9.2 分のピークは圧倒的に多い主代謝物であり、イヌおよびモルモットの M-3 (3-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB) と一致していた。保持時間 11.3 分および 12.9 分の minor なピークは M-1 および M-2 とは異なっており、当初の予想に反しヒト CYP2B6 により生成する代謝物はイヌの代謝物とは大きく異なっていた。

Table 11 に定量可能なレベルで生成した M-3 の定量結果をイヌ P450_{DL-2} (CYP2B11) およびモルモット P450_{GP-1} の cytochrome b₅ 存在下での活性と並べたものを示す (実験に使用した ヒト CYP2B6 発現系ミクロソームは cytochrome b₅ を含有している)。

Table 11 Comparison of M-3 formation among 2B subfamily P450s of the dog, human and guinea pig

Enzyme	Recommended name	Species	Metabolite formed (pmol/min/nmol P450)
P450 _{DL-2}	CYP2B11	Dog	71.2
—	CYP2B6	Human	6.41
P450 _{GP-1}	—	Guinea pig	5.57

その結果ヒト CYP2B6 の M-3 生成活性は、モルモット P450_{GP-1} の活性をやや上回るものの大差はなく、イヌ P450_{DL-2} の約 10% 程度であった。

第 3 節 考察

本章の検討において長年の懸案であったヒト単一 P450 による PCB の代謝に初めて成功した。PCB153 の代謝においてもヒトにおいて本 PCB が代謝されることを明確にした最初の例である。このことはまたヒトにおいても 2B subfamily P450 が PCB153 の代謝を触媒する酵素であることを示していた。本章概要に記したように、ヒトにおいては 2B subfamily P450 は僅かながら常在的に発現していると言われているが、個人差も大

P450 は常在的に発現している主要な P450 分子種の一つである。ヒト肝臓において常在的に発現している主要な P450 分子種は 3A subfamily P450 および 2C subfamily P450 であり、その両方で大部分を占めている³⁹⁾。これら P450 分子種はヒトにおいて多種類の臨床薬物や生体異物の代謝に関与しているが、PCB の代謝に関与しているとの報告はなされていない。しかし、Schnellmann らのヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験や、著者が第 V 章で行なったイヌ 3A および 2C subfamily P450 を用いた検討結果から類推すると、少なくともこれらヒトにおける主要 P450 分子種が PCB153 の代謝に関与しているとは考え難い。従ってヒトにおいては PCB153 の代謝はほぼ排他的に 2B subfamily P450 (CYP2B6) で触媒され、その絶対活性および肝臓における含量の低さがヒトで蓄積性が高い原因の一つであると考えられる。

また、著者の当初の予想とは異なり、CYP2B6 はイヌと同様な 2,3-arene oxide 中間体経路で代謝反応を触媒しているとは考え難い結果であった。このことは例え遺伝子の進化的距離が近くとも、それが必ずしも酵素活性における位置選択性に反映されるとは限らないことを意味している。このことはまたテストステロンの代謝においてもよく表れている。即ちイヌ P450_{DL-2} (CYP2B11) はテストステロンの 16 位の水酸化活性において α 位に対する立体選択性が圧倒的に高いが、ラット CYP2B1 は α 位と β 位水酸化体をほぼ同程度生成する⁹⁶⁾。これに対し、モルモット P450_{GP-1} はイヌ CYP2B11 に近いわけではなく、むしろ β 位を優先的に水酸化する⁹⁴⁾⁹⁶⁾。最近、site-directed mutagenesis を用いた手法においてラット CYP2B1 のテストステロン 16 位水酸化に重要な役割を担うアミノ酸残基が同定され¹²⁷⁾、同様の手法を用いて他の subfamily P450 の基質特異性についても新たな知見が集積され始めてきている。これら基質特異性に関与していると考えられるアミノ酸残基は Gotoh が仮に基質認識部位 (SRS; substrate recognition sites) と命名した部分¹²⁸⁾に集中している。また 2C subfamily P450 では C 末端のアミノ酸残基が基質特異性に大きく寄与していることが報告¹²⁹⁾されており、このことから当教室の Mise もモルモット P450_{GP-1} とイヌ CYP2B11 のみが他の動物種の 2B subfamily P450 より特徴的に長いことからこの C 末端の配列が、これら P450 の基質特異性に関与している可能性を指摘している¹²¹⁾。SRS の中にあってイヌ CYP2B11 とモルモット P450_{GP-1} に共通であり、しかもヒト CYP2B6 やラット CYP2B1 と異なるアミノ酸残基は SRS1 領域中の Gln-109, Val-114, SRS2 領域中の Ser-204, SRS4 領域中の Ile-289, Thr-291, SRS5 領域中の Met-370 のみであり、これらアミノ酸残基を変異導入のターゲット

とすること、さらにC末端の延長ペプチドを欠失またはキメラタンパク質の作出を行うことで、イヌおよびモルモットに特徴的と考えられる 2,3-arene oxide 中間体生成に寄与するアミノ酸残基の特定を行える可能性が考えられる。このことはまた、ヒト CYP2B6 の代謝活性や反応機構の解析においても重要な示唆を与える可能性がある。

第 VII 章 総括

本研究ではヒトを含む多くの動物種でほとんど代謝されず、生体残留性が極めて高い PCB153 の排泄促進研究の一環として、PCB153 の排泄が速いことが知られているイヌを中心に、現在までに研究されていなかったモルモット、さらに代謝物が検出されていなかったヒトにおける PCB153 の代謝について検討した。その結果以下のことを明らかにすることが出来た。

イヌにおいては PCB 代謝反応においてそれまでに例がなかった PCB 2,3-arene oxide 中間体を経由した新規代謝反応を触媒し得ることを証明できた⁷³⁾。また、イヌにおいて同定された 2,3-arene oxide 中間体由来と推定される代謝物は量的にもイヌの高い排泄能力に大きく寄与しているものと考えられた。

一方、イヌではそれまで数種の PCB の排泄速度に関する比較研究は行われていたが、PCB の代謝反応機構に関する知見はほとんどなかったため、イヌの PCB に対する 2,3-arene oxide 中間体生成反応が一般的な反応であるか否かを確かめるため PCB155 を用いて検討したところ PCB155 は 2,3-arene oxide 中間体経由では代謝されずむしろ 3,4-arene oxide 中間体経由で代謝された⁷⁹⁾。

さらに、PCB153 の代謝においてモルモットがイヌと同様の 2,3-arene oxide 中間体経由の代謝を行い得る動物種であることを新たに見出した¹³⁰⁾。In vivo 代謝ではイヌより多種類の代謝物が検出され、構造決定を行った結果 3,4-arene oxide 中間体経由の代謝反応も進行していることが明らかとなった。しかしながらマイクロソームを用いた in vitro 系においてはイヌと同じ 3 種の代謝物が検出されるのみであり、3,4- より 2,3-arene oxide 中間体経由の代謝反応が優位であることが明らかになった。次にモルモットがイヌに匹敵しうる PCB153 の高代謝動物種であるか否かを明らかにする目的で肝マイクロソームを用い、同一条件にて in vitro 代謝物の定量を行った結果、イヌ肝マイクロソームにおける生成活性がモルモットのそれより約 10 倍高いことが明らかとなった。

モルモットおよびイヌで新規 2,3-arene oxide 中間体生成反応を触媒する cytochrome P450 分子種を明らかにする目的でモルモットから 2B subfamily P450 をイヌから 2B、3A および 2C subfamily P450 を精製し、再構成系で PCB153 代謝を検討した。その結果、いずれの動物種においても 2B subfamily P450 が 3 種全ての代謝物生成活性を有することが明らかとなった。イヌ肝ミクロソームを用いて抗体阻害の検討を行ったところ、3 種の代謝物の生成活性の 85 ~ 100% は 2B subfamily P450 に対する抗体で阻害されたことから、少なくともイヌにおいては著者の見出した新規代謝反応は 2B subfamily P450 で触媒されることが明確になった。また、ヒトにおいて異物代謝に重要な役割を担っており、量的にも主要な 2C および 3A subfamily P450 では PCB153 は代謝されないことを明らかにした。さらにこの検討において、これまで生成機構が不明であった PCB の脱塩素水酸化反応成績体の生成が P450 の触媒する酸素添加反応で行われることが初めて証明された。加えて従来直接水酸化反応と arene oxide 中間体生成反応を触媒する P450 分子種は別のものであると考えられてきたが、その両者が同一の P450 分子種で触媒されることを証明することができた。

最後にヒト 2B subfamily P450 である CYP2B6 発現系を用いてヒト単一 P450 による *in vitro* 系での PCB 代謝物検出と定量に初めて成功した。特に PCB153 はこれまで肝ミクロソームを用いた検討で、ヒトでは代謝されないと報告されていたが、著者の検討によりヒトでも代謝され得ることが明確となった¹³¹⁾。このことから PCB153 は動物種によらず 2B subfamily P450 で代謝されることが明確となった。しかしながら、ヒトにおいては CYP2B6 の発現量が極めて低いため、PCB153 はヒトにおいて蓄積性が高いものと考えられた。

本研究結果のヒトでの代謝研究への適用について述べると、本論文において著者はヒトの PCB153 代謝物として一種しか明らかにできなかったが、その代謝物プロファイルは予想に反しイヌとは大きく異なっており、むしろサルにおける *in vivo*⁵²⁾ および *in situ*¹³²⁾ 代謝物の傾向と類似しているものと考えられた。従って、本 PCB の排泄促進研究においては、今後齧歯類やイヌではなく、霊長類で行うことが望ましいと考えられる。サルの 2B subfamily P450 は 1992 年に Ohmori らが *Cynomolgus monkey* (カニクイザル) より精製したのが最初であり、彼らの検討ではヒトと同様に発現レベルは低い (総 P450 含量の約 5%) ものの常在的

に肝臓に発現している分子種であることが明らかとなっている¹³²⁾。しかしヒト CYP2B6 とは異なり個体差が著しい分子種であるとは報告されていない。先のサルにおける *in situ* 代謝研究は Rhesus monkey (アカゲザル) での検討であるが、Ohmori らの検討では新世界サル同士では 2B subfamily P450 の分子量あるいは免疫交差性に大きな差異は認められておらず、実際に代謝パターンはカニクイザルの検討⁵²⁾と矛盾はしていない。つい最近、アカゲザルとヒトにおける血中 PCB の半減期について興味ある知見が報告された¹³⁴⁾。それによると両動物種で 5 塩素化 PCB の排泄速度はほとんど同じであったが、PCB153 など 6 塩素化体以上の PCB の半減期には約 5 倍の開きがあり、サルの方が排泄が速かった。このことは構成的に発現している 2B subfamily P450 の量的な差異だけで説明可能とは考えられず、本検討でモルモット P450_{GP-1} とイヌ P450_{DL-2} に見られたような質的差異があることを示唆している可能性がある。ヒトの CYP2B6 はすでに述べたように現在までに単一まで精製された例がないため、タンパクレベルでの解析が特に遅れている分子種の一つである。従ってサル 2B subfamily P450 との直接的な比較にはもう少し時間を要するものと思われる。

つぎに本研究成果のヒト体内からの PCB153 排泄促進研究への適用について以下考察する。2B subfamily P450 は、これまでも記述しているように PB 型の薬物代謝酵素誘導剤によって誘導されることが知られている。しかしこの誘導率には動物種差があることが知られており、ラットのように常在的に肝臓にほとんど発現していないか、発現していても僅かである場合には PB 処理によって数百~千倍誘導されるのに対し、イヌやモルモットのように常在的に肝総 P450 の 20 ~ 50% 程度を占めるほど多量に発現している動物種では、2~10 倍程度の誘導倍率にすぎない。すなわち現在までの知見では 2B subfamily P450 の肝常在的発現レベルと誘導倍率との間には逆相関の関係があるものと推察される。ヒトの CYP2B6 は発現量の多い個体で肝総 P450 含量の約 1% 程度であると報告されていることから、上記の関係がヒトにおいても当てはまるならば、ヒト CYP2B6 は PB 処理で顕著に誘導発現されるものと予測される。事実サル 2B subfamily P450 は PB 処理によって約 60 倍に誘導されることが明らかにされている¹³³⁾。薬物代謝研究の初期に PB 処理したヒト血漿中における薬物の半減期を検討した例がある¹³⁵⁾が、個人差はあるもののいずれの個体でも PB 処理によって治療薬物の半減期は減少しており、このことはヒトにおいても PB で 2B

subfamily P450 が誘導されることを示唆しているデータかもしれない。PB はよく知られているように、現在でも抗てんかん薬として、特殊な場合には新生児黄疸の治療薬として臨床応用されている比較的安全性の高い薬物の一つである。以上の点からヒトにおいて PCB153 の排泄を促進する目的で PB はある程度有効な薬物であるかもしれない。但し、このように薬物代謝酵素の誘導によって薬毒物の排泄促進を試みる場合、以下の点に充分留意することが必要である。

- 1) 仮に PB で CYP2B6 が誘導されたとして、ヒト CYP2B6 による PCB153 の代謝物は全てが解毒性代謝物であるかどうか。
- 2) CYP2B6 の誘導によって、服用中の薬物あるいは摂取する可能性のある異物の代謝活性化や薬物相互作用が起こらないか否か。

1) に関しては、酵素誘導をかけた為に毒性が上昇する例は多く知られている。今回検出された代謝物に関しては毒性代謝物である可能性は低いと思われるが、反応性の高い代謝中間体が生体高分子と結合して回収されなかった可能性も考えられ、今後検討の必要性がある。一方、2) に関しては CYP2B6 の異物代謝活性が充分評価されていない現在では情報不足であるが、少なくとも 6-aminochrysene 等の一部の発癌物質の代謝活性化に関与していることが報告されている¹²⁶⁾ことから、ヒト CYP2B6 のタンパクレベルでのさらなる評価が待たれる。具体的手段としては、ヒト培養細胞系における充分な毒性評価とサルを用いた排泄促進研究が必要と思われる。

今後 PCB153 をはじめ種々の環境汚染物質の毒性評価とともに排泄促進、あるいは生物・化学的手段による分解等の研究が進展し、さらに環境中からの摂取回避が図れるようになることを期待する。

謝辞

本論文を終わるにあたり、終始懇切な御指導と御督励を賜りました九州大学薬学部衛生化学裁判化学教室の小栗一太教授、山田英之助教授に謹んで感謝の意を表します。また、論文作成に際し、多大の御助言、御提言、御校閲を賜りました中村学園大学食物栄養学科の吉村英敏教授、古賀信幸助教授に深謝いたします。あわせて動物処理にこそよく御協力頂き、本研究の達成に御尽力いただきましたパナファームラボラトリーズ（株）の井出博之会長、三宅敏允社長、井上秀顕氏、および関係諸氏に心より御礼申し上げます。

また、GC-MS 分析に御協力いただきました九州地区麻薬取締官事務所の和田幸子博士、MS、および NMR スペクトルの測定を行っていただきました九州大学薬学部機器分析室の磯部隆一博士、田中彬嗣氏、および添田恭子氏に深謝致します。かさねて貴重な CYP3A2 抗体を御供与下さいました大阪市立大学の船江良彦教授、テストステロン代謝物を供与していただいた塩野義製薬、中野正行博士に深く感謝いたします。さらに本研究に際し、貴重な御意見、御鞭撻、御討論を賜りました第一薬科大学物理分析学教室の増田義人教授、原口浩一講師、環境化学教室の黒木広明助教授に感謝いたします。

さらに本研究を実施するにあたり秀逸なる手腕を発揮していただきました武知めぐみ学士、重藤真千学士、中村智代学士、伊藤正一学士、および渡邊哲夫学士に心より感謝の意を表します。

最後に、終始暖かい御支援を頂きました九州大学薬学部衛生化学裁判化学教室の石井祐次助手、松末公彦修士、神村英利博士ならびに教室諸氏に厚く御礼申し上げます。