

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：

【実験の部】

1. 試薬

1) PCBの合成と精製

2,4,5-trichloroaniline および 2,4,6-trichloroaniline は東京化成工業(株)より購入した。KI, *N,N*-dimethylformamide, 亜硝酸ナトリウムは和光純薬工業(株)、Cu粉は林純薬工業(株)社製のものをを用いた。また Kieselgel 60 は MERCK より購入した。

2,4,5, 2',4',5'-HCB (PCB153) および 2,4,6,2',4',6'-HCB (PCB155) は 2,4,5- および 2,4,6-trichloroaniline を出発材料とし、常法により対応する iodobenzene とした。即ち、trichloroaniline 0.06 mol に濃塩酸 0.3 mol を加えて一晩攪拌することで塩酸塩とし、亜硝酸ナトリウム 0.07 mol を少量の冷水にて飽和溶液としたものを 30 min かけて滴下後、氷冷下さらに 1 時間攪拌した。これに 0.07 mol の KI 飽和水溶液を滴下することで iodobenzene とした。Iodobenzene は Kieselgel 60 column で精製し、構造は EI-MS にて確認した(収率 65 - 75%)。Iodobenzene の縮合反応は Ullmann らの方法を若干改良¹³⁶⁾して行なった。即ち PCB155 の場合は 50 ml の *N,N*-dimethylformamide に 2,4,6-trichloriodobenzene 0.04 mol を溶解し、活性化した Cu 粉 14 g を入れ、185 °C にて加熱還流を行なった。4 hr 後同量の Cu 粉を追加しさらに 4 hr 還流した。反応溶液は放冷後蒸留水を加え、クロロホルムで抽出した後 Kieselgel 60 column で精製した(収率約 50%)。一方 PCB153 は溶媒を用いず直接 iodobenzene と Cu 粉を加熱攪拌し、反応産物をクロロホルムで抽出、精製した(収率約 55%)。構造は UV, mass および ¹H-NMR スペクトルで確認し、純度はガスクロマトグラフィーにより検定した。機器データは後に示す。

2) PCB代謝物の合成と精製

I) PCB153 予想代謝物の合成 (p. 73) および精製

全ての原料化合物は東京化成工業(株)より購入し、2,4,5-trichloroaniline と対応する phenol を用いて Colbert と Lacy の方法¹³⁷⁾を必要に応じて若干変更して合成した(反応 A - E)。典型的には aniline 1 g を濃塩酸 5 ml と一晩攪拌することで塩酸塩とし、0.4 g の亜硝酸ナトリウム飽和水溶液を滴下、ジアゾ化を行なった。別に phenol 3 g を融点まで加熱することで溶解し、これに氷冷したジアゾニウム塩を 30 min で滴下し、120 - 180 °C にて数時間加熱還流を行なった。放冷後、少量

の蒸留水を加え、クロロホルムにて抽出した。さらに 2N NaOH で逆抽出を行ない、濃塩酸で弱酸性としたのち、再びクロロホルムで抽出した。この有機層を芒硝で一晩脱水し、溶媒を留去した。減圧蒸留によって未反応の phenol を除去し、残渣はクロロホルムに溶解して薄層クロマトグラフィー(TLC)で phenol 体の生成を確認した後 Kieselgel 60 column かプレパラティブ TLC (p-TLC) で精製した。機器データは後に示す。

II) PCB155 予想代謝物の合成 (p. 74) と精製

S-1 以外の化合物は 2,4,6-trichloroaniline と対応する phenol を用いて上記と同様に Colbert と Lacy の方法¹³⁷⁾で合成した(反応 G - I)。S-1 は Cadogan の方法¹³⁸⁾を若干変更して合成した(反応 F)。即ち aniline 0.3 g と 2,4,6-trichlorophenol 1 g の混合物に少量の四塩化炭素を添加、50 °C の水浴上で攪拌溶解し、加熱下 0.15 ml の亜硝酸 *n*-ブチルを滴下し N₂ ガスが発生しなくなるまで攪拌した。放冷後、四塩化炭素を 2 ml 追加しさらに一晩攪拌した。アルカリ抽出以降は上記同様に行なった。同じスケールにて数回行なった反応産物の抽出物を減圧蒸留し、未反応の phenol を除去した後、Kieselgel 60 column に load し *n*-hexane にて副産物を溶出除去した。S-1 は *n*-hexane-CHCl₃ (3:1, v/v) で溶出した。S-1 以外の化合物は全て p-TLC で分離精製を行なった。機器データは後に示す。

III) 合成水酸化体のメチル化

合成したフェノール性化合物は適量のアセトンに溶解し、無水炭酸カリウム共存下ジメチル硫酸を加え 80 °C 2 時間加熱還流することでメチル化を行なった。反応後アセトンを留去し、蒸留水を加えてジメチル硫酸を分解し、メチル化体は *n*-hexane で抽出した。ジメチル硫酸はナカライテスクより購入した。

3) 補酵素および酵素

NADP, NADPH は協和発酵工業(株)、G-6-P はオリエンタル酵母より購入した。G-6-PD, adenosine 2'-phosphate, FMN および還元型 GSH は SIGMA Chemical 社より購入した。

4) 標準タンパク質

タンパク質定量の標準タンパク質としては SIGMA Chemical 社より購入した bovine serum albumin (BSA, Fraction V) を用いた。

5) カラム樹脂

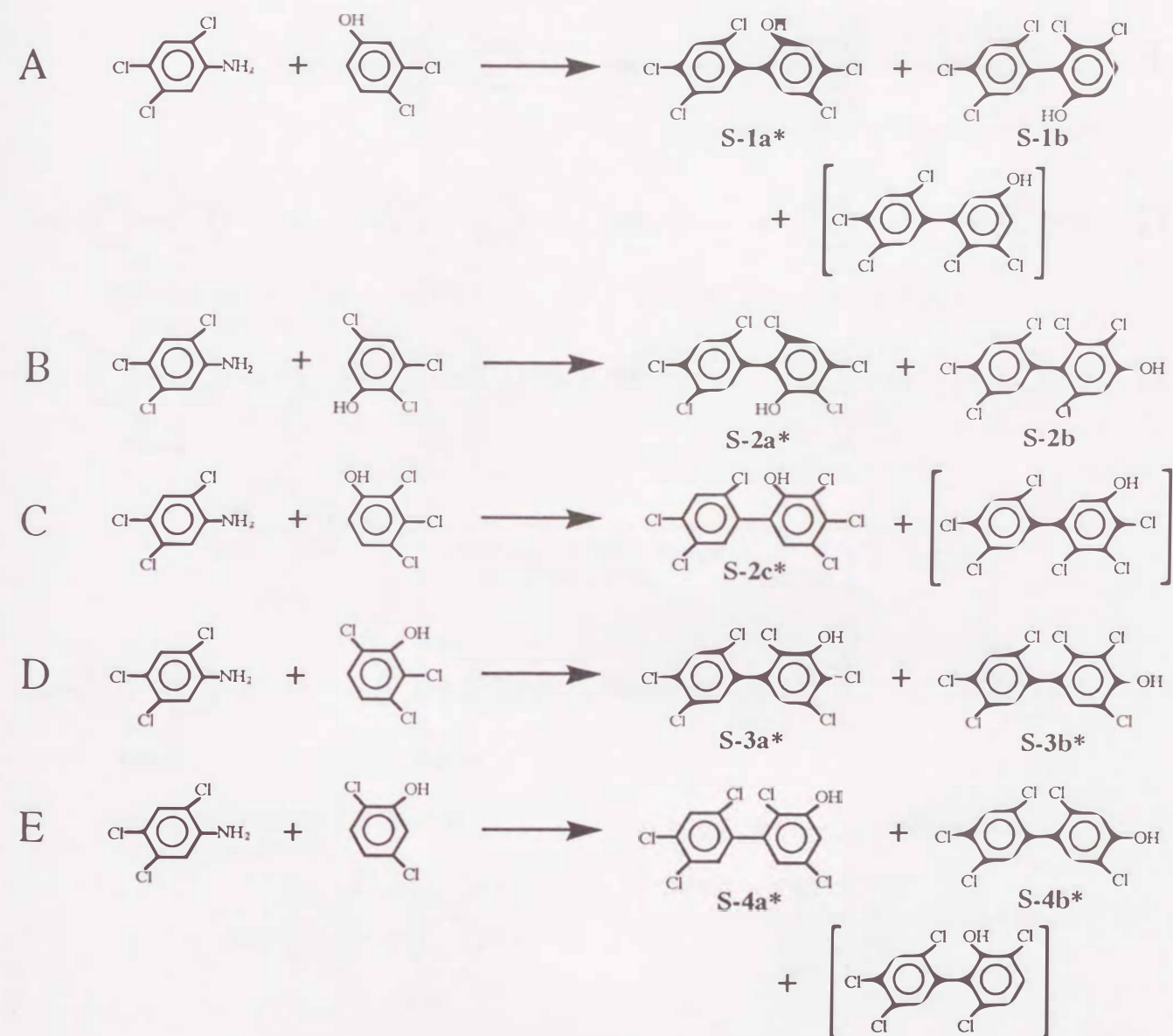
Sepharose 4B、DEAE-Sephacel、CM-Sephadex C-50、2',5'-ADP Sepharose 4B および Protein A Sepharose 4B は Pharmacia Fine Chemicals より、DE-52 は Whatman 社より、Bio-gel HTP は Bio-Rad 社より購入した。また、DEAE-5PW は東ソー (株) より、KB column は高研 (株) よりそれぞれ購入した。ω-Aminoethyl-Sepharose 4B は Nishikawa および Byron の方法¹³⁹⁾に従って合成した。

6) その他

phenobarbital-Na は東京化成工業 (株)、testosterone, フェノール試薬はナカライテスク (株) より、7α-OH, 16α-OH, 6β-OH testosterone, estradiol-17β, 2-OH, 16α-OH estradiol は STERALOIDS 社より、androstenedione は和光純薬工業 (株) より購入した。16β-OH および 2α-OH testosterone は塩野義製薬の中野正行博士より供与されたものを用いた。Benzphetamine hydrochloride は Upjohn Co. の Dr. Stiver より供与されたものを用いた。Ethoxycoumarin, cytochrome c (horse heart), DLPC は SIGMA Chemical 社より Umbelliferone および Sodium Bicinchoninate は同仁化学研究所より購入した。また、Phenyltrimethyl-ammonium hydroxide および N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamide は GL Science Inc. より ヒト コントロールミクロソームおよび CYP2B6 発現系ミクロソーム (比含量 85 pmol/mg protein) は、GENTEST 社のものを第一化学 (株) より購入した。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

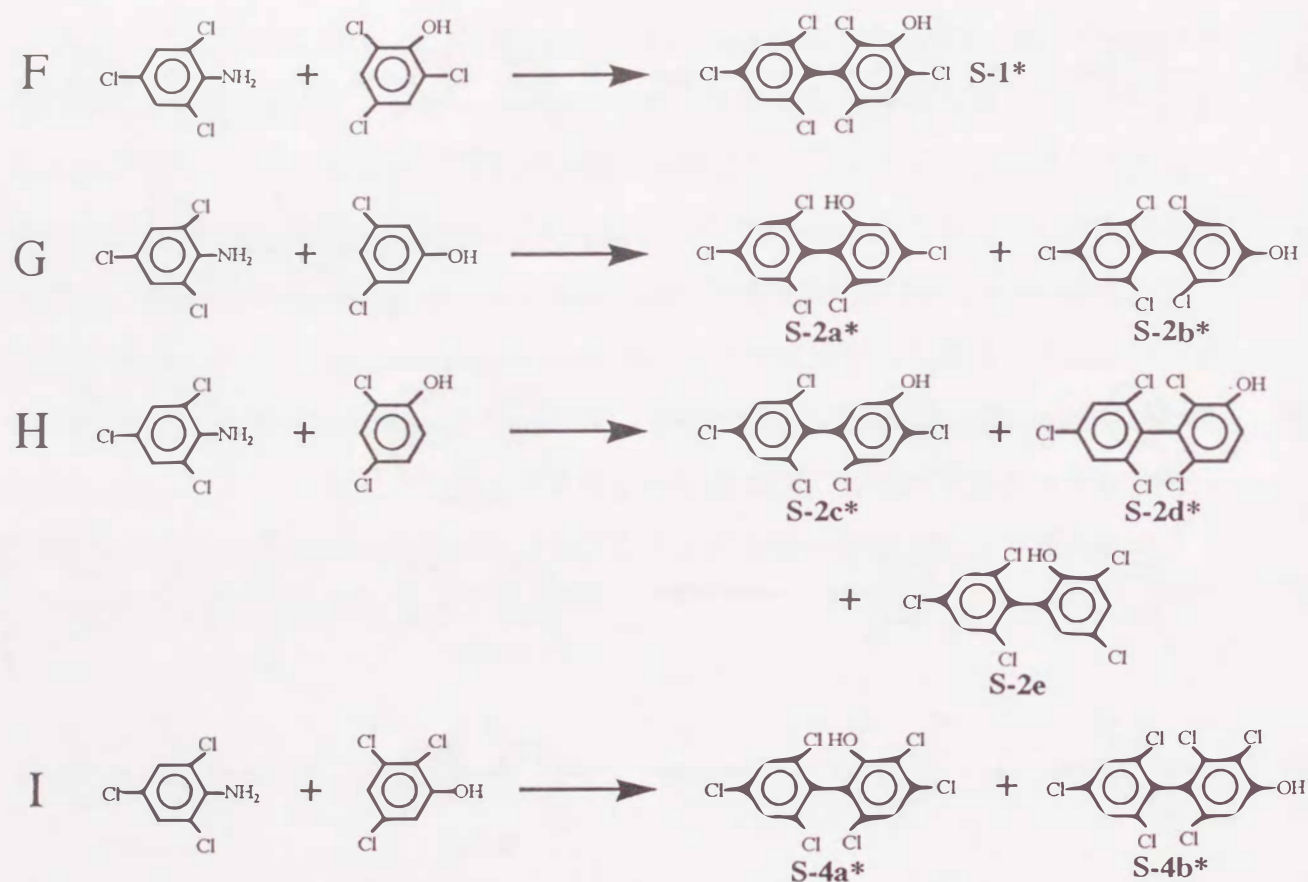
I) PCB153 予想代謝物の合成

* は代謝によって生成する可能性のある化合物を、また [] 内の化合物は単離しなかった化合物を示す。



II) PCB155 予想代謝物の合成

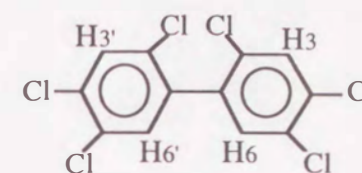
* は代謝によって生成する可能性のある化合物を示す。



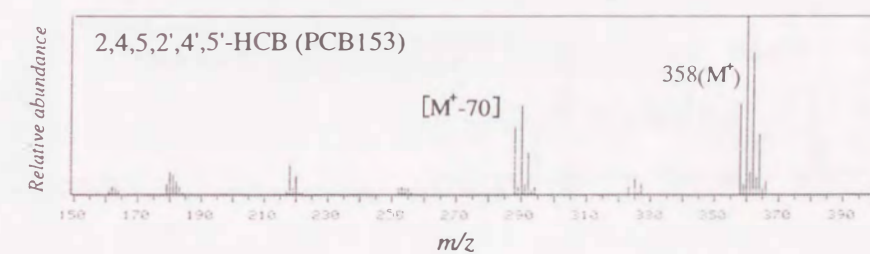
1. PCB153, expected metabolites and byproducts

1) 2,4,5,2',4',5'-HCB (PCB153)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

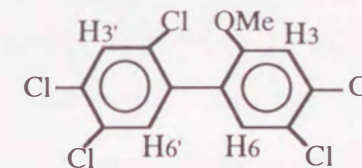


δ (ppm) 7.61 (s, H₃ & H_{3'})
7.35 (s, H₆ & H_{6'})

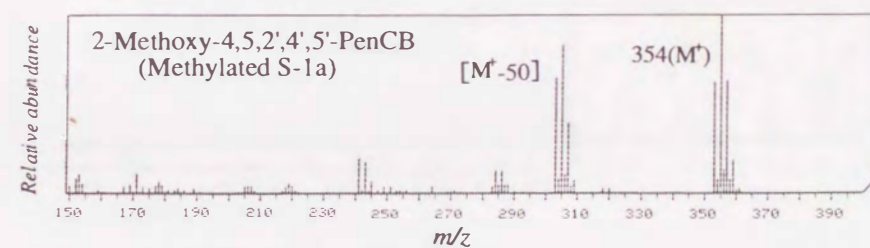


2) 2-methoxy-4,5,2',4',5'-PenCB (Methylated S-1a)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

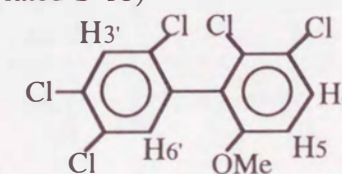


δ (ppm) 7.57 (s, H_{3'})
7.35 (s, H_{6'})
7.24 (s, H₆)
7.05 (s, H₃)
3.78 (s, OCH₃)

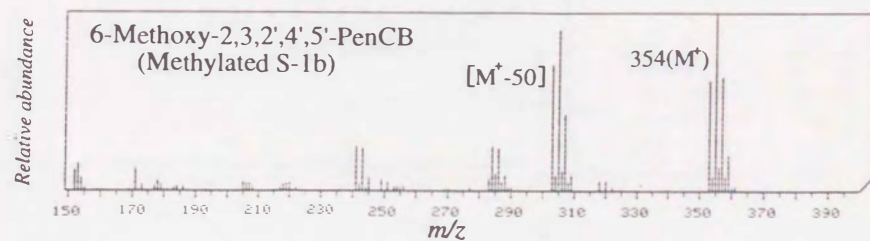


3) 6-methoxy-2,3,2',4',5'-PenCB (Methylated S-1b)

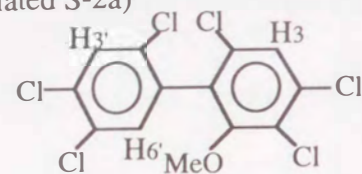
¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)



δ (ppm) 7.60 (s, H_{3'})
7.49 (d, H₄, J=9.24 Hz)
7.29 (s, H_{6'})
6.86 (d, H₅, J=9.24 Hz)
3.75 (s, OCH₃)

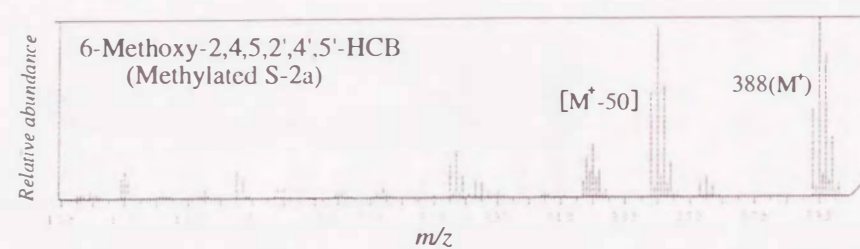


4) 6-methoxy-2,4,5,2',4',5'-HCB
(Methylated S-2a)

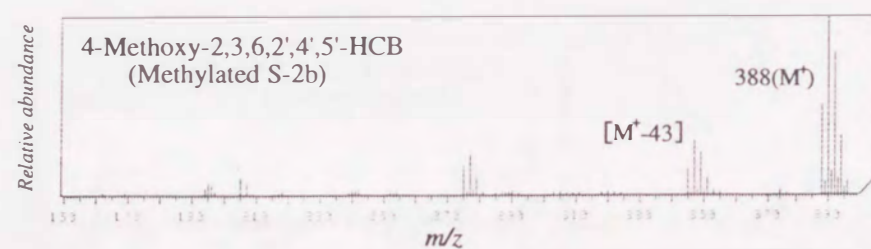
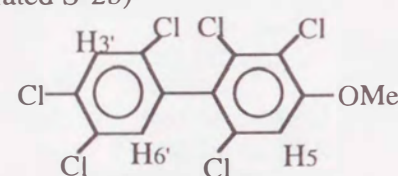


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

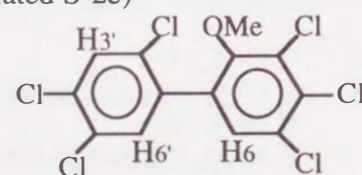
δ (ppm)	7.64 (s, H _{3'})
	7.44 (s, H ₃)
	7.33 (s, H _{6'})
	3.61 (s, OCH ₃)



5) 4-methoxy-2,3,6,2',4',5'-HCB
(Methylated S-2b)

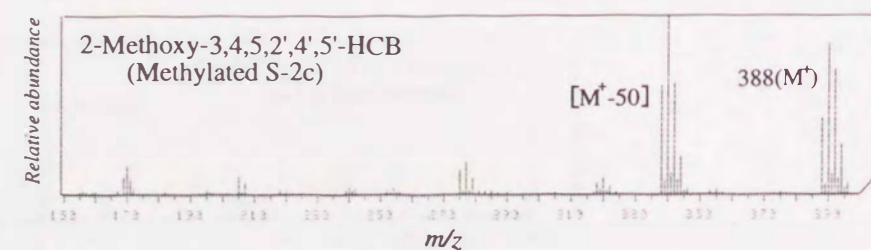


6) 2-methoxy-3,4,5,2',4',5'-HCB
(Methylated S-2c)

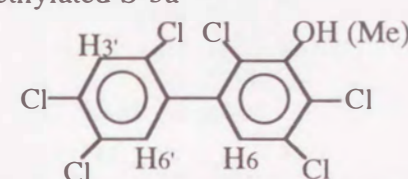


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) (500 MHz, CD₂Cl₂)

δ (ppm)	7.62 (s, H _{3'})	7.65 (s, H _{3'})
	7.42 (s, H _{6'})	7.44 (s, H _{6'})
	7.27 (s, H ₆)	7.30 (s, H ₆)
	3.58 (s, OCH ₃)	3.56 (s, OCH ₃)

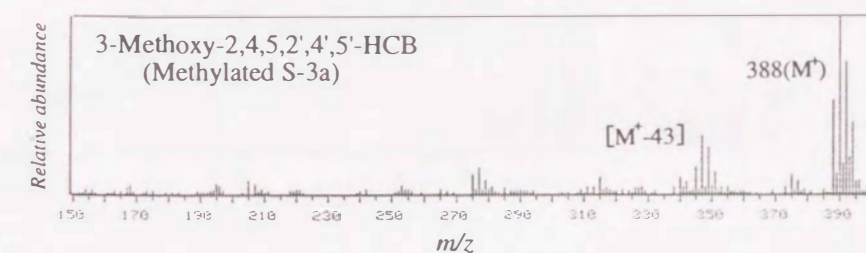


7) 3-hydroxy-2,4,5,2',4',5'-HCB (S-3a)
and Methylated S-3a

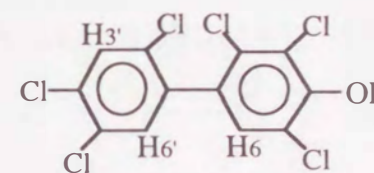


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm)	7.61 (s, H _{3'})	7.61 (s, H _{3'})
	7.35 (s, H _{6'})	7.35 (s, H _{6'})
	7.00 (s, H ₆)	7.17 (s, H ₆)
	6.19 (s, OH)	3.96 (s, OCH ₃)

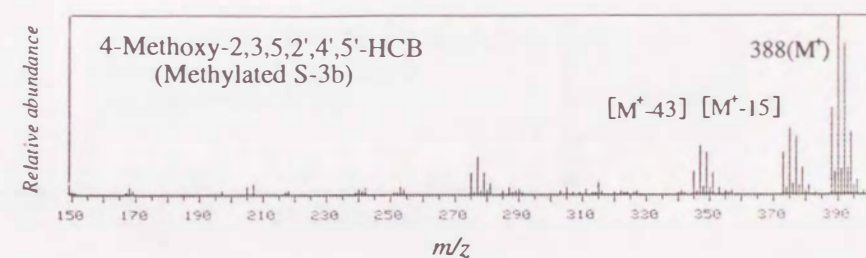


8) 4-hydroxy-2,3,5,2',4',5'-HCB (S-3b)

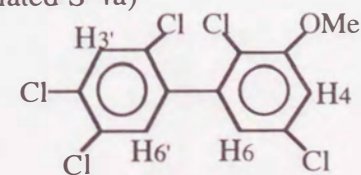


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm)	7.60 (s, H _{3'})
	7.35 (s, H _{6'})
	7.20 (s, H ₆)
	6.16 (s, OH)

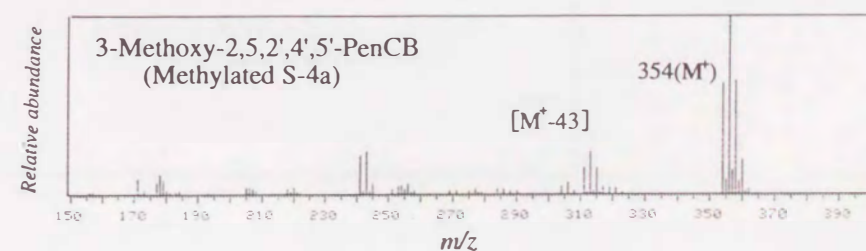


9) 3-methoxy-2,5,2',4',5'-PenCB
(Methylated S-4a)

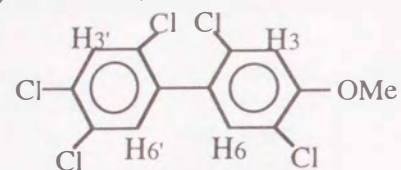


¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂)

δ (ppm)	7.63 (s, H _{3'})
	7.37 (s, H _{6'})
	7.04 (d, H ₆ , J=2.29 Hz)
	6.96 (d, H ₄ , J=2.29 Hz)
	3.94 (s, OCH ₃)

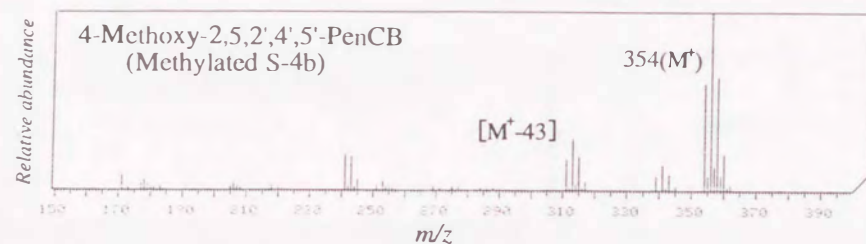


10) 4-methoxy-2,5,2',4',5'-PenCB
(Methylated S-4b)



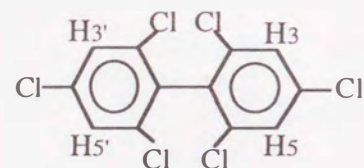
¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂)

δ (ppm) 7.62 (s, H₃)
7.39 (s, H₆)
7.27 (s, H₆)
7.09 (s, H₃)
3.94 (s, OCH₃)



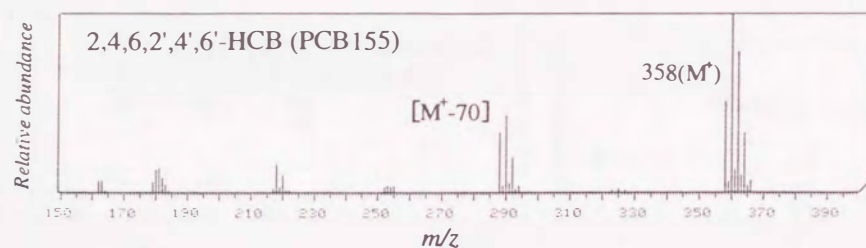
1. PCB155, expected metabolites and byproducts

1) 2,4,6,2',4',6'-HCB (PCB155)

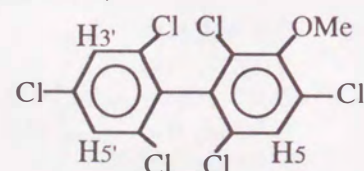


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.47 (s, H₃, H₃' & H₅, H₅')

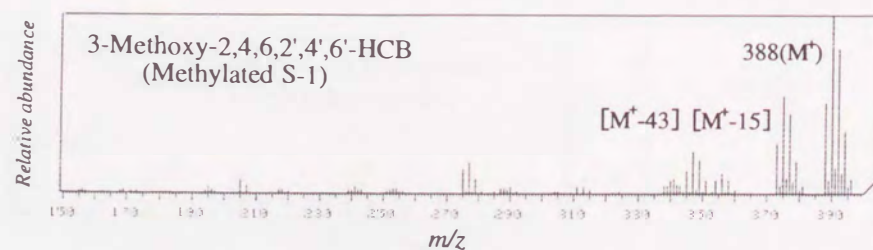


2) 3-methoxy-2,4,6,2',4',6'-HCB
(Methylated S-1)

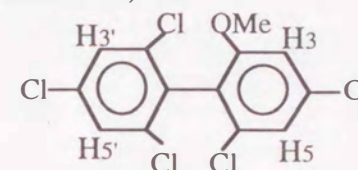


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.50 (s, H₅)
7.47 (s, H₃' & H₅')
3.93 (s, OCH₃)

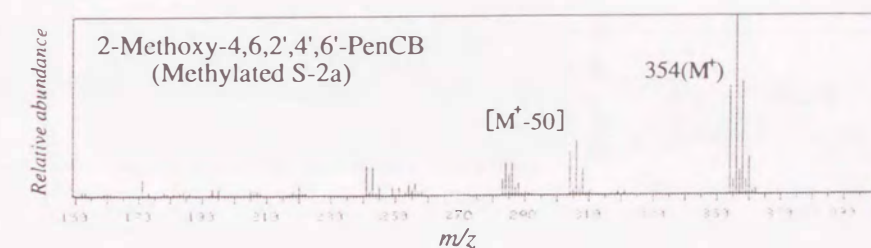


3) 2-methoxy-4,6,2',4',6'-PenCB
(Methylated S-2a)

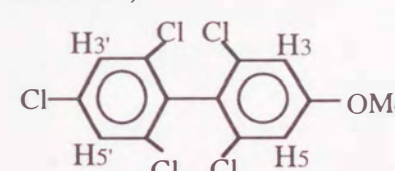


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.43 (s, H₃' & H₅')
7.16 (d, H₅, J=1.81 Hz)
6.91 (d, H₃, J=1.81 Hz)
3.76 (s, OCH₃)

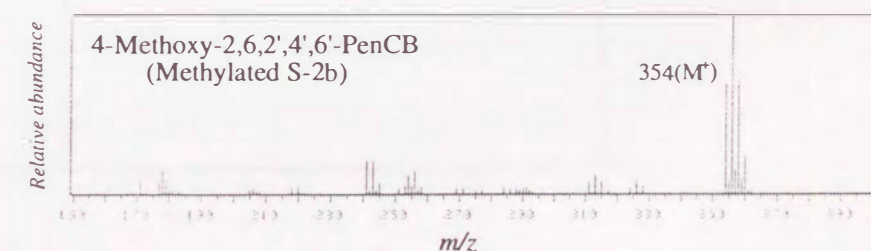


4) 4-methoxy-2,6,2',4',6'-PenCB
(Methylated S-2b)

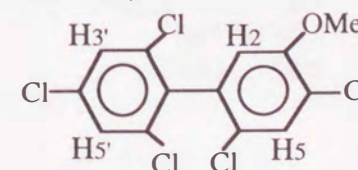


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.45 (s, H₃' & H₅')
7.00 (s, H₃ & H₅)
3.86 (s, OCH₃)

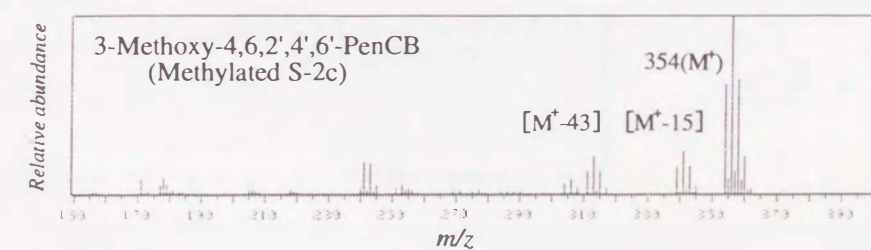


5) 3-methoxy-4,6,2',4',6'-PenCB
(Methylated S-2c)

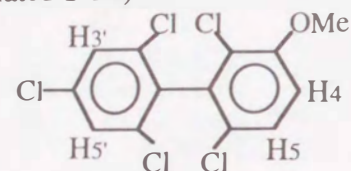


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.53 (s, H₅)
7.45 (s, H₃' & H₅')
6.72 (s, H₂)
3.89 (s, OCH₃)

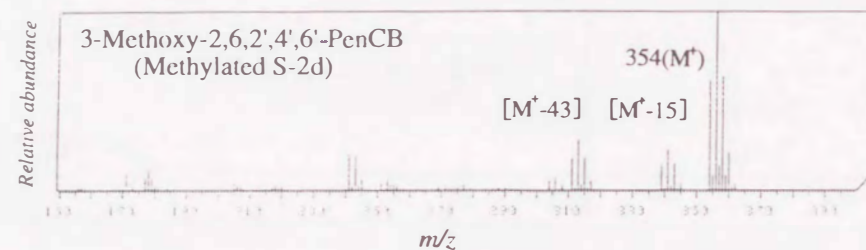


6) 3-methoxy-2,6,2',4',6'-PenCB
(Methylated S-2d)

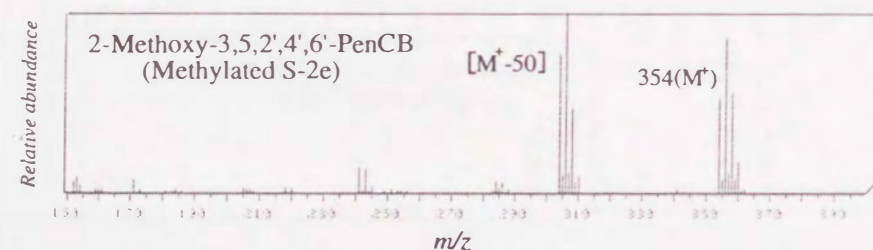
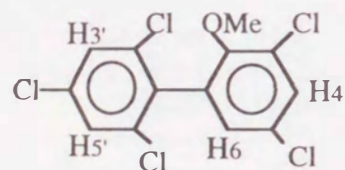


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

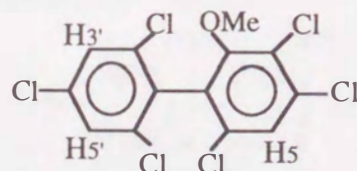
δ (ppm) 7.46 (s, H3' & H5')
7.40 (d, H5, J=8.93 Hz)
6.98 (d, H4, J=8.93 Hz)
3.95 (s, OCH₃)



7) 2-methoxy-3,5,2',4',6'-PenCB
(Methylated S-2e)

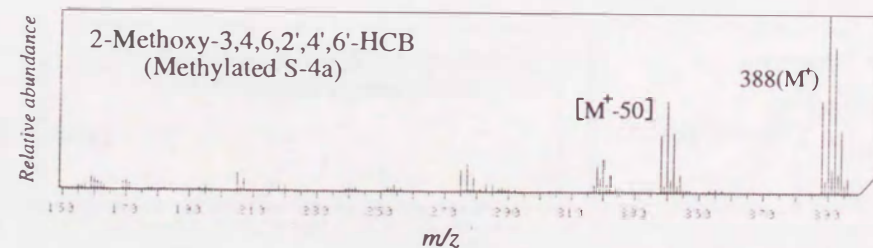


8) 2-methoxy-3,4,6,2',4',6'-HCB
(Methylated S-4a)

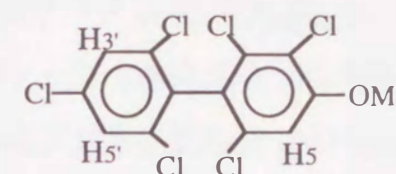


¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.47 (s, H3' & H5')
7.46 (d, H5)
3.67 (s, OCH₃)

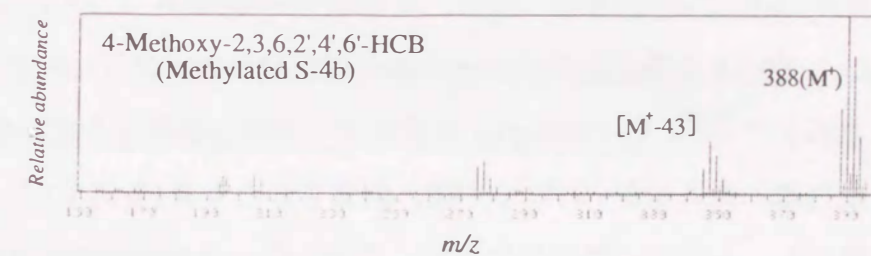


9) 4-methoxy-2,3,6,2',4',6'-HCB
(Methylated S-4b)



¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.46 (s, H3' & H5')
7.03 (d, H5)
3.98 (s, OCH₃)



2. 動物および動物処理

Beagle 犬は Hazelton research animals Inc. (Cumberland, USA) で生産されたものを日本医科学動物資材研究所(株)より購入し、パナファームラボラトリーズ(株)で飼育、馴化の後8ヶ月齢で実験に供した。Phenobarbital 処理は Duignan らの方法⁸⁴⁾に行なった。最終投与後 24 hr で pentobarbital 麻酔下、頸部寫血を行って屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓は適当な大きさに切断したのち、生理食塩水にて洗浄を行い、ドライアイスで急速凍結した後、実験まで -80 °C に保存した。2,4,5,2',4',5'-HCB 処理は上記方法に基づいて phenobarbital 前処理したイヌに 1/4 オンスゼラチンカプセルに充填した HCB を 100 mg/kg 体重あて一回経口投与した。Hartley 系雄性モルモットは日本エスエルシー(株)で生産、飼育されたもの(4週令)をクロダ実験動物(株)より購入し、1週間の馴化の後実験に使用した。Phenobarbital 処理は 80 mg/kg あて5日間連続投与を行なった。PCB 処理はコーンオイルに溶解し、200 mg/kg あて単回腹腔内に投与した。Wistar 系雄性ラットは Charles River Inc. より購入(5週令)し、phenobarbital 処理は 80 mg/kg あて3日間連続腹腔内に投与した。

3. 肝ミクロソームの調製

常法により 0.25 M Sucrose buffer (pH 7.25) を用いて調製し、1.15% KCl で洗浄を行なった。代謝実験に供するミクロソームは 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer - 20% glycerol - 0.1 mM EDTA に懸濁し、使用まで -80 °C に保存した。一方、酵素精製に用いるミクロソームはタンパク濃度 3 mg/ml 程度になるように 0.1 M potassium phosphate (pH 7.25) buffer - 20% glycerol - 1 mM EDTA - 1 mM DTT に懸濁し、可溶化の操作まで水中に保存した。

4. タンパク定量

500 倍以上の希釈を要する高濃度サンプルは Lowry らの方法¹⁴⁰⁾で行ったが、それ以外のサンプルは BCA 法¹⁴¹⁾で行った。BCA 法を行う場合 SH 試薬の妨害が著しいため、既報¹⁴²⁾に従いサンプルをあらかじめヨードアセトアミドで前処理した後測定した。

5. ミクロソームにおける PCB 代謝

代謝活性測定用としては形状の同じ共栓遠沈管に肝ミクロソーム 1 mg タンパク、50 μmol HEPES buffer (pH 7.5)、PCB carrier としての bovine serum albumin 0.8 mg、基質 PCB-DMSO 溶液 20 ~ 40 nmol (16 ~ 32 μl) を入れ、最終容量が 1 ml となるように超純水で希釈し、25 °C 30 min preincubation を行なった後、37 °C でさらに 3 min preincubation を行なった。反応は NADPH 生成系 (NADP 0.5 mM, G-6-P 8 mM, MgCl₂ 6 mM および G-6-PD 0.1 unit/ml) の添加で開始し、30 min incubation 後 1.5 倍容の CHCl₃-MeOH=2:1 で反応を停止した。代謝物分取用としては基本的に上記反応組成と同じであるが、適宜 50 倍から 300 倍のスケールアップを行い、基質濃度および(あるいは) NADPH 生成系の組成を若干変更して行なった。

6. PCB および PCB 代謝物の抽出および定量

反応溶液は反応を停止後、そのまま vortex mixer にて 2 min 攪拌し、ついで 2.5 倍容の n-hexane を加え、数秒間攪拌し、2,500 r.p.m. 5 min 遠心することで得られる有機層を分取することで代謝物および未変化体を回収した。この操作をさらに 2 回繰り返す、ついで水層を n-hexane のみで 2 回抽出し、先の有機層に合わせ未変化体を完全に回収した。得られた有機層は減圧下留去し、少量の n-hexane に再溶解した後、n-hexane で平衡化した Kieselgel 60 column (0.5 g) に apply した。40 倍容の n-hexane で未変化体を溶出し、ついで 80 倍容の n-hexane-CHCl₃=19:1 および 9:1 で順次溶出することにより、代謝物を完全に溶出した。19:1 および 9:1 画分全量の溶媒を完全に留去後、2 hr の硫酸処理を行って定量を妨害する生体成分を大部分除去し、測定用サンプルとした。一方、排泄物からの抽出は以下の様に行なった。尿は 5 倍量のクロロホルムで振盪することにより遊離の代謝物を抽出後、水層に濃塩酸を加えて終濃度 5% として沸騰水浴上で 2 時間加水分解し、放冷後同様にクロロホルムで抱合体由来の代謝物を抽出した。糞は乾燥機で充分乾燥した後細粉とし、ソックスレー抽出器を用いクロロホルムで 10 時間連続抽出を行なった。定量は島津 GC-3BE あるいは Hewlett packard 5890 型ガスクロマトグラフを用い、絶対検量線法によりおこなった。

7. PCB153 代謝物の単離

イヌ肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験における代謝物の単離については既報⁷⁰⁾に記した。一方、モルモット糞中からの代謝物単離は夾雑物が多いためカラムサイズ

を大きくし、典型的には 5 cm x 60 cm の Kieselgel 60 column を使用した。 *n*-Hexane で未変化体を溶出した後、溶出溶媒を *n*-hexane-CHCl₃ (19:1, v/v) に換えることで GM-3 が溶出し、ついで M-2, GM-1, M-3, M-1 の順に溶出する。 GM-2 は M-3 と M-1 の画分に被って溶出してくるので、M-3, M-1 の混入ができるだけ少なくなるよう fractionation に注意した。 また、M-1 は *n*-hexane-CHCl₃ (19:1, v/v) のままで溶出が遅い時は、M-1 のみの溶出となった際に *n*-hexane-CHCl₃ (9:1, v/v) まで極性を上昇させた。 溶出画分は少量ずつ分取し、逐次オンカラムメチル化を行ないながらガスクロマトグラフィーでモニターし、代謝物を分別回収した。 GM-2 画分に混入する M-1 および M-3 はジメチル硫酸でメチル化後、Kieselgel 60 column の *n*-hexane 溶出画分において容易に除去することができた。

8. 酵素活性測定法

1) Cytochrome P450 含量

Omura-Sato 法¹⁴³⁾に従い CO-差スペクトルを測定して行った(ミリモル吸光係数は 91 mM⁻¹cm⁻¹)。

2) NADPH-cytochrome P450 reductase 活性

Omura-Takesue 法¹⁴⁴⁾により還元型 cytochrome c の 550 nm における吸収増加によって測定した(ミリモル吸光係数は 21.1 mM⁻¹cm⁻¹)。 なお、1 unit は 25 °C で 1 分間に 1 μmol の cytochrome c を還元する活性を示す。

3) Cytochrome b₅ 含量

ミクロソームでの含量は Omura-Sato 法¹⁴³⁾に従い NADH で還元し、還元型一酸化型スペクトルの測定により定量した(ミリモル吸光係数は 185 mM⁻¹cm⁻¹)。 一方精製酵素の含量は酸化型の絶対スペクトルを測定し、その Soret 帯の吸光度から求めた。 その際はミリモル吸光係数として 117 mM⁻¹cm⁻¹を用いた¹⁴⁵⁾。

4) Benzphetamine *N*-demethylase 活性

再構成系の反応溶液に 1 mM となるように基質を加え、反応後トリクロル酢酸で反応を停止し、その遠心上清に用時調製した Nash 試薬¹⁴⁶⁾を加えて生成したホルムアルデヒドを測定した。

5) 7-Ethoxycoumarin *O*-deethylase 活性

Greenlee-Poland 法¹⁴⁷⁾を改変して行なった。 基質濃度は 125 μM とし、反応後ト

リクロル酢酸で反応を停止した。 クロロホルム抽出画分を 0.01 N NaOH-1 M NaCl 溶液で逆抽出し、生成した 7-hydroxycoumarin の蛍光を測定した。(λ_{ex} 368 nm, λ_{em} 456 nm)

6) Testosterone hydroxylation/oxidation 活性

Yoshihara らの方法¹⁴⁸⁾に準じて反応を行なった。 分析は HPLC に ODS-80TM カラム(東ソー)を接続し、カラム温度は 45 °C に保って分析した。 溶出溶媒は A 液(水: MeOH: アセトニトリル=62:36:2)、B 液(水: MeOH: アセトニトリル=30:64:6)を用い、リニアグラジエント(0-40 min)によって分離した。 流速は 0.7 ml/min とした。

7) Estradiol-17β hydroxylation 活性

Hrycay らの方法¹⁴⁹⁾を改変して行なった。 反応後酢酸エチルで停止し、遠心後有機層を分取し溶媒留去後、残渣を MeOH に再溶解して試料とした。 分析は Nova-Pak C18 cartridge を装着した HPLC で定量した。 移動相は 30% tetrahydrofuran を使用した。

9. 酵素精製

1) Cytochrome P450

モルモット P450_{GP-1} の精製はすでに当研究室において確立されている方法⁸³⁾を用いて行った。 イヌ P450 の精製は以下のように行った。 即ち肝ミクロソームを 0.8% コール酸で可溶化し、得られた可溶化上清を ω-aminoethyl-Sepharose 4B に付し、0.5% の単一 Emulgen 913 濃度を含む buffer で溶出した。 次に溶出画分を hydroxylapatite (Bio-gel HTP) column に吸着させ、30 mM までの低リン酸濃度で十分洗浄することによって選択的に microsomal epoxide hydrolase (mEH) と 2C subfamily P450 である P450_{DL-3} (CYP2C21) を溶出するできた。 Hydroxylapatite よりリン酸濃度 80 および 180 mM で溶出してくる画分を合わせ、pH 7.7 のリン酸カリウム buffer で平衡化した DEAE-Sepharcel column に apply した。 素通り画分には 3A subfamily P450 である P450_{DL-1} (CYP3A12) が溶出する。 一方、NaCl を用いた 0-100 mM までのリニアグラジエントにより 2B subfamily P450 である P450_{DL-2} (CYP2B11) を溶出した。 このカラム Step で最も注意すべき点はイヌ CYP2B11 の場合は buffer への 0.2% 程度のコール酸添加が必須であるのに対し、モルモット P450_{GP-1} の場合はその必要がない。 イヌ CYP2B11 は

コール酸未添加のまま精製しようとする、このカラム操作でほぼ 100% 失活する。

以上のように部分分離した後、P450_{DL-1} (CYP3A12) は 2 回の KB column (0-0.35 M Sodium phosphate の linear gradient, 50 min) によって、また P450_{DL-2} (CYP2B11) は CM-Sephadex (0-0.2 M KCl の linear gradient) と hydroxylapatite column によって、さらに P450_{DL-3} (CYP2C21) は DEAE-5PW (0-0.25 M Sodium acetate の linear gradient, 55 min) によってそれぞれ電気泳動的に単一にまで精製された。

2) Cytochrome b₅

モルモットの場合は DEAE-Sephacel column において NaCl 濃度 300 mM で溶出される画分を Sephadex G-75 column に付すことで容易に精製される。イヌの場合も同様であるが、Hydroxylapatite column において低リン酸濃度においても CYP2C21 と同時にかなり溶出されてくるので、DEAE-5PW column と、つづく Sephadex G-75 column によっても単一にまで精製される。脱エマルゲンは Bio-gel HTP を用いて行った。

3) NADPH-cytochrome P450 reductase

基本的に Yasukochi & Masters の方法¹⁵⁰⁾に従ったが、2',5'-ADP-Sepharose 4B column からの溶出は Guengerich らの方法¹⁵¹⁾を参考にして行った。

10. N末端アミノ酸配列分析

精製した酵素は全て PVDF 膜 (Immoviron P⁵⁰) にブロットし、Applied Biosystems の 473A 全自動プロテインシーケンサにより分析を行った。

11. 再構成系における PCB 代謝

基本的に以下の組成で行った。

Cytochrome P450	0.1 nmol
NADPH-cytochrome P450 reductase	0.5 unit
(Cytochrome b ₅)	0.1 nmol)
Dilauroylphosphatidylcholine (DLPC)	15 µg
HEPES buffer (pH 7.5)	50 mM
Bovine serum albumine	0.8 mg/ml
PCB (DMSO soln.)	20 µM

NADPH generating system	NADP	0.5 mM
	G-6-P	8 mM
	MgCl ₂	6 mM
	G-6-PD	0.1 unit/ml

final volume 1 ml

但し、P450 として CYP3A12 を用いた場合は DLPC の代わりに phenobarbital 処理モルモット肝ミクロソームより Eberhart と Parkinson の方法¹⁵²⁾に基づいて調製した lipid extract を同量用いて再構成を行った。Preincubation、反応開始、停止および抽出はミクロソームでの代謝実験に準じて行った。反応時間は 20 分間とした。

12. 抗体の調製および精製

抗体の調製は常法に従い、初回は精製酵素 50-150 µg を Freund complete adjuvant と 1:1 の比で混合し、w/o emulsion としてウサギ foot pad に投与した。2 週間後、初回と同量の酵素を Freund incomplete adjuvant と混合し、背部数十ヶ所にブースター投与した。一週間後、耳静脈より採血し、血清を分離後 Protein A Sepharose column にて IgG を精製した。また、上記免疫前に採血したのものから同様の操作を行って preimmune IgG を調製した。IgG は使用まで -20 °C に保存した。

13. 抗体による PCB 代謝活性の阻害

抗体阻害実験はイヌ肝ミクロソームを用いて行った。ミクロソームの代謝実験と同様の組成で行ったが、最初にミクロソームと IgG のみで 25 °C, 30 分間 incubation を行った。以下は全く同様に行った。

14. S H化合物による PCB 代謝活性の阻害

同じくミクロソームの代謝実験と同様に行ったが、反応溶液中に還元型グルタチオンを最終濃度 5 mM になるように添加した。

15. 薄層クロマトグラフィー (TLC, p-TLC)

薄層板は Kieselgel 60G および Wakogel B5-FM を 3 : 1 に混合後、精製水で充分練

合したのちガラス板に塗布して作製し、120 °C 2 hr 活性化して用いた。展開溶媒は特に断らない限り *n*-hexane: ethylacetate : acetic acid = 40:10:1 を使用した。

PCB153 予想代謝物の合成品の内、S-3a と S-3b の分離の際の p-TLC は *n*-hexane: ethylacetate : acetic acid : ammonia soln. = 50 : 50 : 0.02 : 0.02 で行った。スポットは UV ランプ (254 nm) で確認し、フェノール性化合物は Folin-Ciocalteu 試薬での呈色で検出した。

16. ガスクロマトグラフィー (GC)

電子捕獲型イオン化検出器 (ECD) を接続した島津 GC-3BE および Hewlett packard 5890 型ガスクロマトグラフを使用した。カラムは GC-3BE には 3 mm x 2.1 m のガラスカラムに 1.5% silicone OV-17 をコートした chromosorb W (AW-DMCS) を充填したものを装着し、一方 HP 5890 には 0.25 mm x 15 m の DB-1 capillary column を装着した。カラム温度は GC-3BE が 250 °C、HP 5890 は 220 °C に設定した。いずれの機器でもキャリアーガスとして窒素を用い、流速は GC-3BE が 40 ml/min、HP 5890 が 1 ml/min で行った。フェノール性化合物を含む試料の場合は試料を適量の *n*-hexane に溶解し、*N,O*-bis-(trimethylsilyl)acetamide を加え、80 °C 20 min 反応させてシリル化するか、試料を適量の methanol に溶解し 20% phenyltrimethylammonium hydroxide を加えて注入口でメチル化して分析した。

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)

島津 GC-MS QP-1000 を用いた。カラムには 3.3 mm x 1.1 m のガラスカラムに 2% OV-17 をコートした Chromosorb W (AW-DMCS) を充填したものを使用した。カラム温度は 220°C~230°C、キャリアーガスはヘリウムを用い、流速は 35~40 ml/min で行った。またイオン化電圧は 70 eV とした。

18. 分析機器

可視部または紫外部吸光度および吸収スペクトルは、日立ダブルビーム 3210 型分光光度計あるいは日立 U-1100, 200-10 型分光光度計を用いて行った。蛍光測定は、日立 650-10 (S) 型蛍光分光光度計を用いて行った。高速液体クロマトグラフィーは、タンパク質精製には東ソーマルチポンプ CCPM に紫外可視検出器 UV-8010 を接続し

たものを用い、ステロイド代謝活性測定用には日立 L-6200 intelligent pump に L-4200 紫外可視検出器を接続したものを用了。EI-MS スペクトルは JEOL D-300 型を使用し、¹H-NMR スペクトルは JEOL GX-270 (270 MHz) または Varian Unity-500 (500 MHz) 核磁気共鳴装置にてテトラメチルシラン (TMS) を内部標準とし、重クロロホルムまたは重ジクロルメタンを溶媒にして測定した。

19. その他

SDS-polyacrylamide 電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法¹⁵⁾に従い、場合に応じて 9%、10% および 12.5% のゲルを調製して行った。

引用文献

- 1) Kuratsune, M., Yoshimura, H., Matsuzaka, J. and Yamaguchi, A., *Environ. Health Perspect.*, **1**, 119 (1972)
- 2) Hsu, S. -T., Ma, C. -I., Hsu, S., Hsu, K. -H., Wu, S. -S., Hsu, N. -H., Yeh, C. -C. and Wu, S. -B., *Environ. Health Perspect.*, **59**, 5 (1985)
- 3) Nagayama, J., Kuratsune, M. and Masuda, Y., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 9 (1976)
- 4) Kashimoto, T., Miyata, H., Takayama, K. and Ogaki, J., *Fukuoka Acta Medica*, **78**, 325 (1987)
- 5) Miyata, H., Kashimoto, T. and Kunita, N., *J. Food Hyg. Soc.*, **19**, 364 (1978)
- 6) Kunita, N., Hori, S., Obana, H., Otake, T., Nishimura, H., Kashimoto, T. and Ikegami, N., *Environ. Health Perspect.*, **79**, 5 (1985)
- 7) Yoshimura, H., Yoshihara, S., Ozawa, N. and Miki, M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 179 (1979)
- 8) Kannan, N., Tanabe, S., Ono, M. and Tatsukawa, R., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 850 (1989)
- 9) Schwartz, T. R., Tillitt, D. E., Feltz, K. P. and Peterman, P. H., *Chemosphere*, **26**, 1443 (1993)
- 10) Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, An., Watanabe, S. and Tatsukawa, R., *Environ. Pollut.*, **47**, 147 (1987)
- 11) Allen, J. R., Carstens, L. A. and Barsotti, D. A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **30**, 440 (1974)
- 12) Poland, A. and Knutson, J. C., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517 (1982)
- 13) Okey, A. B., Bondy, G. P., Mason, M. E., Kahl, G. F., Eison, H. J., Guenther, T. M. and Nebert, D. W., *J. Biol. Chem.*, **254**, 11636 (1979)
- 14) Poland, A., Glover, E. and Kende, A. S., *J. Biol. Chem.*, **251**, 4936 (1976)
- 15) Burbach, K. M., Poland, A. and Bradfield, C. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8185 (1992)
- 16) Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. and Fujii-Kuriyama, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 246 (1992)
- 17) Johnson, E. F., *Science*, **252**, 924 (1991)
- 18) Safe, S., bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M., Levin, W., Denommw, M. A. and Fujita, T., *Environ. Health Perspect.*, **60**, 47 (1985)
- 19) Pland, A., Greenlee, W. F., Kende, A. S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 214 (1979)
- 20) Yamamoto, H. and Yoshimura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2237 (1973)
- 21) Seymour, J. L., Schmidt, S. P. and Allen, J. R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152** (1976)
- 22) Shimada, T. and Sawabe, Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **70**, 486 (1983)
- 23) Forgue, S.T., Preston, B. D., Hargaves, W. A., Reichand, I. L. and Allen, J.R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 475 (1979)
- 24) Stadnicki, S. S. and Allen, J. R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, **23**, 788 (1979)
- 25) Seegal, R. F., Bush, B. and Shain, W., *Chemosphere*, **23**, 1941 (1991)
- 26) Rickenbacher, U., McKinney, J. D., Oatley, S. J. and Blake, C. C. F., *J. Med. Chem.*, **29**, 641 (1986)
- 27) Brouwer, A. and van den Berg, K. J. , *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **85**, 301 (1986)
- 28) Nishihara, Y. and Utsumi, K., *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3457 (1987)
- 29) Narasimhan, T. R., Kim, H. L. and Safe, S. H., *J. Biochem. Toxicol.*, **6**, 229 (1991)
- 30) Nagayama, J. and Masuda, Y., *Fukuoka Acta Medica.*, **84**, 195 (1993)
- 31) Safe, S., *Chemosphere*, **25**, 61 (1992)
- 32) Ahlborg, U. G., Becking, G. C., Birnbaum, L. S., Brouwer, A., Derks, H. J. G. M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J. C., Liem, A. K. D., Safe, S. H., Schlatter, C., Waern, F., Younes M. and Yrjanheikki, E., *Chemosphere*, **28**, 1049 (1994)
- 33) Bandiera, S., Safe, S. and Okey, A. B., *Chem. -Biol. Interact.*, **39**, 259 (1982)
- 34) van Birgelen, A. P. J. M., van der Kolk, J., Poiger, H., van den Berg, M. and Brouwer, A., *Chemosphere*, **25**, 1239 (1992)
- 35) de Jongh, J., Wondergem, F., Seinen, W. and van den Berg, M., *Chemosphere*, **25**, 1165 (1992)
- 36) van der Kolk, J., van Birgelen, A. P. J. M., Poiger, H. and Schletter, C., *Chemosphere*, **25**, 2023 (1992)
- 37) Jongh, J. D., Bouwman, C., Nieboer, R., Seinen, W. and van den Berg, M., *Chemosphere*, **28**, 1581 (1994)
- 38) Denomme, M. A., Leece, B., Li, A., Towner, R. and Safe, S., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 277

- (1986)
- 39) Ariyoshi, N. Ito, S., Okudaira, A., Mise, M., Matsusue, K., Yamada, H. and Oguri, K., *Fukuoka Acta Medica*, **86**, in press
- 40) Morrissey, R. E., Harris, M. W., Diliberto, J. J. and Birnbaum, L. S., *Toxicol. Lett.*, **60**, 19 (1992)
- 41) Masuda, Y. and Schecter, A., *Chemosphere*, **25**, 1091 (1992)
- 42) Vodcnik, M. J. and Lech, J. J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 293 (1980)
- 43) Tretjak, Z., Sebenik, A. and Jan, J., *Chemosphere*, **23**, 383 (1991)
- 44) Schnellmann, R. G., Putnam, C. W. and Sipes, I. G., *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 3233 (1983)
- 45) Wyss, P. A., Mühlebach, S. and Bickel, M. H., *Drug Metab. Dispos.*, **10**, 657 (1982)
- 46) Richter, E., Schärfer, S. G. and Fichtl, B., *Xenobiotica*, **13**, 337 (1983)
- 47) Keyler, D. E., Goon, D. J. W., Shelver, W. L., Ross, C. A., Nagasawa, H. T., St. Peter, J. V. and Pentel, P. R., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 767 (1994)
- 48) Hutzinger, O., Nash, D. M., Safe, S., DeFreitas, A. S. W., Norstrom, R. J., Wildish, D. J. and Zitko, V., *Science*, **178**, 312 (1972)
- 49) Hutzinger, O., Jamieson, W. D., Safe, S., Paulmann, L. and Ammon, R., *Nature*, **252**, 698 (1974)
- 50) Sundstrom, G., Hutzinger, O. and Safe, S., *Chemosphere*, **4**, 249 (1976)
- 51) Kato, S., McKinney, J. D. and Matthews, H. B., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 389 (1980)
- 52) Miller, M. J., Perry, D., Carter, D. E. and Sipes, I. G., *Fed. Proc.*, **39**, 998 (1980)
- 53) Sipes, I. G., Slocumb, M. L., Perry, D. F. and Carter, D. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **65**, 264 (1982)
- 54) Tomaszewski, J. E., Jerina, D. M. and Daly, J. W., *Biochemistry*, **14**, 2024 (1975)
- 55) Matthews, H. B. and Tuey, D. B., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 377 (1980)
- 56) Duignan, D. B., Sipes, I. G., Ciaccio, P. J. and Halpert, J. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 294 (1988)
- 57) Jansson, B. and Sundstrom, G., *Biomed. Mass Spectrom.*, **1**, 386 (1974)
- 58) Tulp, M. Th. M., Olie, K. and Hutzinger, O., *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 310 (1977)
- 59) Klasson-Wehler, E., Bergman, Å., Brandt, I., Darnerud, P. O. and Wachtmeister, C. A., *Drug Metab. Dispos.*, **17**, 441 (1989)
- 60) Gardner, A. M., Warren, V. L., Chen, Jo-Yun. C. and Mazzola, E. P., *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 116 (1979)
- 61) Daly, J. W., Jerina, D. M. and Witkop, B., *Experientia*, **28**, 1129 (1972)
- 62) Safe, S., Hutzinger, O. and Jones, D., *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 851 (1975)
- 63) Hass, J. R., Jao, L. T., Wilson, N. K. and Matthews, H. B., *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1330 (1977)
- 64) Chen, P. R., McKinney, J. D. and Matthews, H. B., *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 362 (1976)
- 65) Yoshimura, H., Yonemoto, Y., Yamada, H., Koga, N., Oguri, K. and Saeki, S., *Xenobiotica*, **17**, 897 (1987)
- 66) Koga, N., Beppu, M. and Yoshimura, H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 497 (1990)
- 67) Fogue, S. T. and Allen, J. R., *Chem. -Biol. Interact.*, **40**, 233 (1982)
- 68) Matthews, H. B. and Kato, S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 131 (1979)
- 69) Borlakoglu, J. T., Drew, M. G. B., Wilkins, J. P. G. and Dils, R. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1036**, 167 (1990)
- 70) Foulkes, D. M., *Nature*, **221**, 582 (1969)
- 71) Nebert, D. W., Benedict, W. F., Gielen, J. E., Oesch, F. and Daly, J. W., *Mol. Pharmacol.*, **8**, 374 (1972)
- 72) Feung, C., Hamilton, R. H. and Mumma, R. O., *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 373 (1975)
- 73) Ariyoshi, N., Koga, N., Oguri, K. and Yoshimura, H., *Xenobiotica*, **22**, 1275 (1992)
- 74) Preston, B. D., Miller, J. A. and Miller, E. C., *J. Biol. Chem.*, **258**, 8304 (1983)
- 75) Selander, H. G., Jerina, D. M. and Daly, J. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **168**, 309 (1975)
- 76) Billings, R. E. and McMahon, R. E., *Mol. Pharmacol.*, **14**, 145 (1977)
- 77) Schnellmann, R. G., Vickers, A. E. M. and Sipes, I. G., *Rev. Biochem. Toxicol.*, **7**, 247 (1985)
- 78) Goto, M., Hattori, M. and Sugiura, K., *Chemosphere*, **3**, 177 (1975)
- 79) Ariyoshi, N., Yoshimura, H. and Oguri, K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 852 (1993)
- 80) Ariyoshi, N., Shigeto, M., Oguri, K. and Yoshimura, H., *Fukuoka Acta Medica*, **84**, 181 (1993)

- 81) Goldstein, J. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 164 (1979)
- 82) Parkinson, A., Safe, S. H., Robertson, L. W., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M. and Levin, W., *J. Biol. Chem.*, **258**, 5967 (1983)
- 83) Kelley, M., Hantelle, P., Safe, S., Levin, W. and Thomas, P. E., *Mol. Pharmacol.*, **32**, 206 (1987)
- 84) Duignan, D. B., Sipes, I. G., Leonard, T. B. and Halpert, J. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 290 (1987)
- 85) Graves, P. E., Elhag, G. A., Ciaccio, P. J., Bourque, D. P. and Halpert, J. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **281**, 106 (1990)
- 86) Graur, D., Hide, W. A. and Li, W-H., *Nature*, **351**, 649 (1991)
- 87) Koga, N., Beppu, M., Ishida, C. and Yoshimura, H., *Xenobiotica*, **19**, 1307 (1989)
- 88) Macdonald, T. L., *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 11, p.85 (1983)
- 89) Boyd, D. R., *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, vol. 7, New York: Pergamon Press, p. 547 (1984)
- 90) Yoshimura, H. and Yamamoto, H., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 681 (1975)
- 91) Daly, J. W., Guroff, G., Udenfriend, S. and Witkop, B., *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 31 (1968)
- 92) Christou, M., Wilson, N. M. and Jefcoate, C. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**, 519 (1987)
- 93) Yamazoe, Y., Shimada, M., Murayama, N. and Kato, R., *J. Biol. Chem.*, **262**, 7423 (1987)
- 94) Oguri, K., Kaneko, H., Tanimoto, Y., Yamada, H. and Yoshimura, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **287**, 105 (1991)
- 95) Yamada, H., Kaneko, H., Takeuchi, K., Oguri, K. and Yoshimura, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 248 (1992)
- 96) Ohmori, S., Taniguchi, T., Rikihisa, T., Kanakubo, Y. and Kitada, M., *Xenobiotica*, **23**, 419 (1993)
- 97) Tanimoto, Y., Ohkuma, T., Oguri, K. and Yoshimura, H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, 136 (1990)
- 98) Burka, L. T., Plucinski, T. M. and Macdonald, T. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6680 (1983)
- 99) Korzekwa, K., Trager, W., Gouterman, M., Spangler, D. and Loew, G. H., *J. Am. Chem. Soc.*,

- 107**, 4273 (1985)
- 100) Ishida, C., Koga, N., Hanioka, N., Saeki, H. K. and Yoshimura, H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 276 (1991)
- 101) van Ommen, B., Hendricks, W., Bessems, J. G. M., Geesink, G., Müller, F. and Van Bladeren, P. J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **100**, 517 (1989)
- 102) Schuetz, E. G., Wrighton, S. A., Barwick, J. L. and Guzelian, P. S., *J. Biol. Chem.*, **259**, 1999 (1984)
- 103) Waxman, D. J., Dannan, G. A. and Guengerich, F. P., *Biochemistry*, **24**, 4409 (1985)
- 104) Ciaccio, P. and Halpert, J. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**, 284 (1989)
- 105) Nishibe, Y. and Hirata, M., *Xenobiotica*, **23**, 681 (1993)
- 106) Nakamura, T., Nakata, H. and Horie, T., *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, **6** (supplement), 161 (1991)
- 107) Shiraga, T. and Iwasaki, K., *Proceedings of the 21st Symposium on Drug Metabolism and Action*, 147, (1990, Tokushima)
- 108) Waxman, D. J. and Walsh, C., *Biochemistry*, **22**, 4846 (1983)
- 109) Komori, M., Shimada, H., Miura, T. and Kamataki, T., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 235 (1989)
- 110) Ariyoshi, N., Tanaka, M., Ishii, Y. and Oguri, K., *J. Biochem.*, **115**, 985 (1994)
- 111) Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D. W., *DNA Cell Biol.*, **12**, 1 (1993)
- 112) Shiraga, T., Iwasaki, K., Nozaki, K., Tamura, T., Yamazoe, Y., Kato, R. and Takanaka, A., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 22 (1994)
- 113) Wrighton, S. A., Maurel, P., Schuetz, E. G., Watkins, P. B., Young, B. and Guzelian, P. S., *Biochemistry*, **24**, 2171 (1985)
- 114) Ohe, T., Masuno, K. and Hirobe, M., *Proceedings of the 115th meeting of the Pharmaceutical Society of Japan*, vol. 2, p. 289 (1995, Sendai)
- 115) Urano, Y., Higuchi, T. and Hirobe, M., *Proceedings of the 115th meeting of the Pharmaceutical Society of Japan*, vol. 2, p. 127 (1995, Sendai)

- 116) Lau, S. S., Abrams, G. D. and Zannoni, V. G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 703 (1980)
- 117) Morales, N. M. and Matthews, H. B., *Chem. -Biol. Interact.*, **27**, 99 (1979)
- 118) Daubeze, M. and Narbonne, J. F., *Toxicology*, **31**, 315 (1984)
- 119) Tanimoto, Y., Kaneko, H., Ohkuma, T., Oguri, K. and Yoshimura, H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **14**, 161 (1991)
- 120) Omata, Y., Sakamoto, H., Robinson, R. C., Pincus, M. R. and Friedman, F. K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1090 (1994)
- 121) Mise, M., Yamada, H., Miki, T., Sekimizu, K., Oguri, K. and Sagara, Y., Proceedings of the 115th meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, vol. 3, p. 12 (1995, Sendai)
- 122) Tamburini, P. P., White, R. E. and Schenkman, J. B., *J. Biol. Chem.*, **260**, 4007 (1985)
- 123) Gorsky, L. D. and Coon, M. J., *Drug Metab. Dispos.*, **14**, 89 (1985)
- 124) Matsusue, K., Ariyoshi, N., Oguri, K., Koga, N. and Yoshimura, H., Organohalogen Compounds, vol. 21, p.431 (1994)
- 125) Schnellmann, R. G., Volp, R. F., Putnam, C. W. and Sipes, I. G., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3503 (1984)
- 126) Mimura, M., Baba, T., Yamazaki, H., Ohmori, S., Inui, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P. and Shimada, T., *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 1048 (1993)
- 127) Luo, Z., He, Y. and Halpert, J. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **309**, 52 (1994)
- 128) Gotoh, O., *J. Biol. Chem.*, **267**, 83 (1992)
- 129) Uno, T., Yokota, H. and Imai, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 498 (1990)
- 130) Ariyoshi, N., Koga, N., Yoshimura, H. and Oguri, K., *Eur. J. Pharmacol.*, submitted for publication
- 131) Ariyoshi, N., Oguri, K., Koga, N., Yoshimura, H. and Funae, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, submitted for publication
- 132) Norback, D. H., Mack, E., Reddy, G., Britt, J. and Hsia, M. T., *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **32**, 71 (1981)
- 133) Ohmori, S., Shirakawa, C., Motohashi, K., Yoshida, H., Abe, H., Nakamura, T., Horie, T., Kitagawa, H., Asaoka, K., Rikihisa, T., Kanakobo, Y. and Kitada, M., *Mol. Pharmacol.*, **43**, 183

- (1992)
- 134) Mes, J., Arnold, D. L. and Bryce, F., *Chemosphere*, **30**, 789 (1995)
- 135) Vesell, E. S., Passananti, G. T., Greene, F. E. and Page, J. G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **320**, 752 (1979)
- 136) Kornblum, N. and Kendall, D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5782 (1952)
- 137) Colbert, L. C. and Lacy, R. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 270 (1946)
- 138) Cadogan, J. I. G., *J. Chem. Soc.*, 4257 (1962)
- 139) Nishikawa, A. H. and Bailon, P., *Anal. Biochem.*, **64**, 268 (1975)
- 140) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 141) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C., *Anal. Biochem.*, **150**, 76 (1985)
- 142) Hill, H. D. and Straka, J. G., *Anal. Biochem.*, **170**, 203 (1988)
- 143) Omura, T. and Sato, R., *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964)
- 144) Omura, T. and Takesue, S., *J. Biochem.*, **67**, 249 (1970)
- 145) Strittmatter, P. and Velick, S. F., *J. Biol. Chem.*, **221**, 253 (1956)
- 146) Nash, T., *Biochem. J.*, **55**, 416 (1953)
- 147) Greenlee, W. F. and Poland, A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **205**, 596 (1978)
- 148) Yoshihara, S., Nagata, K., Wada, I., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 994 (1982)
- 149) Hrycay, A. G., Gustafsson, J. -A., Ingelman-Sundberg, M. and Ernster, L., *Eur. J. Biochem.*, **61**, 43 (1976)
- 150) Yasukochi, Y. and Masters, B. S. S., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5337 (1976)
- 151) Guengerich, F. P. and Martin, M. V., *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 365 (1980)
- 152) Eberhart, D. C. and Parkinson, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **291**, 231 (1991)
- 153) Laemmli, V. K., *Nature*, **227**, 680 (1970)

【論文リスト】 - LIST OF PUBLICATIONS -

1. 学位論文内容

- 1) Metabolism of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl with liver microsomes of phenobarbital-treated dog: the possible formation of PCB 2,3-arene oxide intermediate, N, Ariyoshi., N, Koga., K, Oguri. and H, Yoshimura, *Xenobiotica*, **22** (11), 1275-1290 (1992)
Ref. number: 73
- 2) Identification of *in vitro* metabolites of 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl from phenobarbital-treated dog liver microsomes, N, Ariyoshi., H, Yoshimura. and K, Oguri., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 852-857 (1993)
Ref. number: 79
- 3) Unique metabolism of 2,4,5, 2',4',5'-hexachlorobiphenyl in guinea pigs; Intermediate character of metabolic reaction between dogs and rabbits, N, Ariyoshi., N, Koga., H, Yoshimura. and K, Oguri., *Eur. J. Pharmacol.*, submitted for publication
Ref. number: 130
- 4) Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6, N, Ariyoshi., K, Oguri., N, Koga., H, Yoshimura. and Y, Funae., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, submitted for publication
Ref. number: 131

2. 学位論文関連

- 1) Studies on PCB toxicity involving 2C subfamily cytochrome P450, N, Ariyoshi., S, Ito., A, Okudaira., M, Mise., K, Matsusue., H, Yamada. and K, Oguri., *Fukuoka Acta Medica*, **86** (5), in press
Ref. number: 39
- 2) Metabolism *in vivo* of 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl in dog and partial characterization of cytochrome P450 isozyme responsible for biotransformation of the congener, N, Ariyoshi., M, Shigeto., K, Oguri. and H, Yoshimura, *Fukuoka Acta Medica*, **84** (5), 181-188 (1993)
Ref. number: 80
- 3) Purification and characterization of dog liver microsomal epoxide hydrolase, N, Ariyoshi., M, Tanaka., Y, Ishii. and K, Oguri., *J. Biochem.*, **115**, 985-990 (1994)
Ref. number: 110

3. その他

- 1) Purification and characterization of two forms of 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran-inducible cytochrome P450 in hamster liver, N, Koga., N, Ariyoshi., H, Nakashima. and H, Yoshimura., *J. Biochem.*, **107**, 826-833 (1990)

- 2) Inducing ability of coplanar PCBs toward bilirubin UDP-glucuronyltransferase of liver microsomes; The remarkable difference between guinea pigs and rats, K. Oguri., Y, Koga., M, Tsuda., N, Ariyoshi., Y, Ishii., H, Yamada. and H, Yoshimura., *Fukuoka Acta Medica*, **84** (5), 175-180 (1993)
- 3) Modification of the gluconeogenesis is not involved in the coplanar PCB toxicity in highly sensitive guinea pigs, K, Oguri., M, Hatsumura., Y, Ishii., Y, Koga., N, Ariyoshi. and H, Yoshimura., *Chemosphere*, **27** (11), 2295-2303 (1993)
- 4) Induction of bilirubin UDP-glucuronyltransferase and CYP4A1 P450 by coplanar PCBs; Different responsiveness of guinea pigs and rats, Y, Koga., M, Tsuda., N, Ariyoshi., Y, Ishii., H, Yamada., K, Oguri., Y, Funae. and H, Yoshimura., *Chemosphere*, **28** (3), 639-645 (1994)
- 5) Involvement of cytochrome b5 in the metabolism of tetrachlorobiphenyl catalyzed by CYP2B1 and CYP1A1, K, Matsusue., N, Ariyoshi., K, Oguri., N, Koga. and H, Yoshimura., *Chemosphere*, submitted
- 6) Induction of a selenium binding protein in rat liver by coplanar polychlorinated biphenyl, Y, Ishii., M, Hatsumura., T, Ishida., N, Ariyoshi. and K, Oguri., *Chemosphere*, submitted
- 7) Effect of a coplanar PCB on lipid metabolism; The remarkable difference between rats and guinea pigs, M, Hatsumura., T, Ishida., Y, Ishii., N, Ariyoshi. and K, Oguri., *Fukuoka Acta Medica*, **86** (5), in press
- 8) Role of cytochrome b5 in oxidative metabolism of polychlorinated biphenyl catalyzed by cytochrome P450, K, Matsusue., N, Ariyoshi., K, Oguri., N, Koga. and H, Yoshimura., *Xenobiotica*, in preparation
- 9) Alteration of peroxisomal enzyme activities in the liver of guinea pigs caused by coplanar PCB, M, Iwasaki., H, Kato., N, Ariyoshi. and K, Oguri., *Fukuoka Acta Medica*, **86** (5), in press
- 10) Coplanar polychlorinated biphenyl induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver, Y, Ishii., M, Hatsumura., T, Ishida., N, Ariyoshi. and K, Oguri., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, submitted
- 11) Highly toxic coplanar PCB126 reduces peroxisomal enzyme activities in the rat, K, Oguri., M, Iwasaki., Tsusaki, S., M, Hamamura., T, Ichiki. and N, Ariyoshi., *Biochem. Pharmacol.*, in preparation

