

2, 2', 3, 4', 5, 5'-六塩素化ビフェニル(CB146)のin vitro代謝の動物種差

太田, 千穂
中村学園大学栄養科学部食品衛生学研究室

原口, 浩一
第一薬科大学分析化学教室

加藤, 善久
徳島文理大学香川薬学部薬物動態学講座

遠藤, 哲也
北海道医療大学薬学部衛生薬学講座

他

<https://doi.org/10.15017/26707>

出版情報：福岡醫學雑誌. 104 (4), pp.161-169, 2013-04-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



2,2',3,4',5,5'-六塩素化ビフェニル(CB146)の *in vitro* 代謝の動物種差

¹⁾中村学園大学栄養科学部 食品衛生学研究室

²⁾第一薬科大学 分析化学教室

³⁾徳島文理大学香川薬学部 薬物動態学講座

⁴⁾北海道医療大学薬学部 衛生薬学講座

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

Species Difference in the Metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5'-Hexachlorobiphenyl (CB146) by Animal and Human Liver Microsomes

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

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

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

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

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

Abstract The *in vitro* metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (CB146) was examined using liver microsomes of rats, guinea pigs, hamsters and human. Untreated animal livers produced one metabolite (M-2) in rats, three metabolites (M-1, M-2 and M-3) in guinea pigs and no metabolite in hamsters. Pretreatment of phenobarbital (PB) resulted in a marked increase of M-1 in three animals and of M-2 in guinea pigs. In contrast, pretreatment of 3-methylcholanthrene showed a significant increase of M-3 in guinea pigs and a decrease of M-2 in rats. Human liver microsomes prepared from nine Caucasians mainly formed M-2 and M-3 at a ratio of 2 : 1 and two individuals also formed one more metabolite M-1. The formation of M-1 was significantly correlated with CYP2B6 activity. By comparison of the GC-MS data of three metabolites with synthesized authentic samples, M-1 and M-2 were determined to be 3'-hydroxy (OH)-CB146 and 4-OH-CB146, respectively. However, M-3 is unclear at present except the fact that it is OH-hexaCB. These results suggest that 3'-OH-CB146 is formed by PB-inducible cytochrome P450 (CYP2B enzymes) in animal and human livers and 4-OH-CB146 is a major metabolite in rat and human liver.

Key words : CB146 · Metabolism · Cytochrome P450 · Rat · Human

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は周知の通り、世界的な環境汚染物質の1つである。PCBは

脂溶性が極めて高いことから、生体内に取り込まれた後、脂肪組織や肝へ蓄積されるが、現在、PCB異性体として、2,2',4,4',5,5'-hexachlor-

Corresponding author : Nobuyuki KOGA

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

Tel : +81-92-851-5415

E-mail : nobuyuki@nakamura-u.ac.jp

obiphenyl (hexaCB) (CB153), 2,2',3,4,4',5'-hexaCB (CB138), 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (CB180), 2,2',3,3',4,4',5'-heptaCB (CB170) および 2,3,3',4,4',5'-hexaCB (CB156) が、哺乳動物の血液、脂肪組織および肝から高濃度で検出されている。これらはいずれも置換塩素数が6個以上で、2,4,5-三塩素置換ベンゼンあるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するものばかりである^{1)~7)}。また、血液中からはPCB異性体だけではなく、PCB代謝物の4-hydroxy (OH)-2,2',3,4',5,5',6-heptaCB (CB187), 4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexaCB (CB146), 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (CB107) および 3-OH-CB153 なども比較的高濃度で検出されている^{1)~6)}。PCB異性体のうち、置換塩素数が5個以下のものやメタ-パラ位に水素が置換されたものは、肝小胞体に局在するチトクロムP450 (P450) により、比較的容易に水酸化され、胆汁を介して糞中へと排泄される⁸⁾⁹⁾。しかしながら、前述のような代謝物の場合、依然高い脂溶性を維持しているため長期にわたり残留しているものと思われる。

P450 による PCB の代謝は、芳香環が直接水酸化される場合と、エポキシド中間体を經由する場合の大きく2つの水酸化機構で進行することが知られている⁸⁾⁹⁾。後者の場合、塩素原子が NIH 転位を伴うことがあり、親 PCB 異性体として数種類が考えられている。例えば、ヒト血中で最も多く検出される 4-OH-CB187 の場合、CB187 と 2,2',3,4,4',5',6-heptaCB (CB183) が考えられる。当研究室では、CB187 のラットとモルモット肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べ、両動物ともに主代謝物ではないが 4-OH-CB187 を生成することを報告した¹⁰⁾。次に、ヒト血中で2番目に多く検出される 4-OH-CB146 の場合、親 PCB 異性体として、CB146, CB138 および CB153 が考えられる (Fig. 1)。CB138 あるいは CB153 からは、それぞれ 4,5-あるいは 3,4-エポキシド中間体を經由し、さらに 4 位の塩素原子が NIH シフトすることによって生成されるが、CB146 からは、4 位の直接水酸化によって生成される。これまで当研究室では、CB138 の in vitro 代謝を、ラット、モルモットおよびハムスター肝 Ms を用いて調べたが、いずれの動物からも 4-OH-CB146 は生成

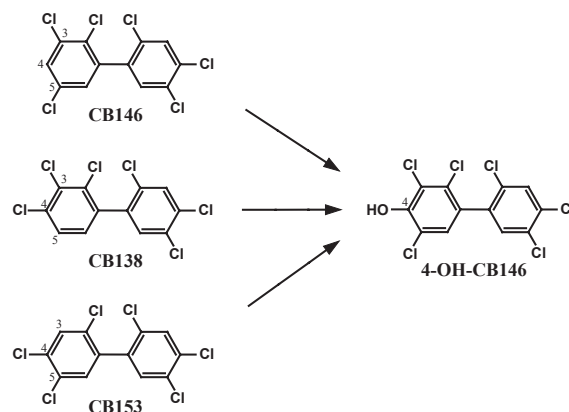


Fig. 1 The postulated parent PCB congeners of 4-OH-CB146

されなかった¹¹⁾。同様に、イヌ肝 Ms¹²⁾ およびモルモット肝 Ms¹³⁾ を用いて CB153 の in vitro 代謝を調べたが、4-OH-CB146 は生成されなかった。一方、CB146 の代謝については全く報告が見あたらない。

そこで本研究では、ラット、モルモット、ハムスターおよびヒト肝 Ms を用いて CB146 の in vitro 代謝における動物種差を調べた。また、代謝に関与する P450 分子種を明らかにするため、代表的な P450 誘導剤として知られている phenobarbital (PB) および 3-methylcholanthrene (MC) で前処理した動物肝 Ms でも同様に検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB146 の合成

CB146 は Cadogan の方法¹⁴⁾で合成した。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 1.0 g および 1,2,4-trichlorobenzene 3.0 g を tetrachloroethylene 10 ml で溶解し、さらに isopentyl nitrite 0.5 ml を加えて、110°C で 24 時間反応させた。反応物はアルミナカラム (100g, Merck) およびシリカゲルカラム (65 g, Merck) で部分精製した後、HPLC にて精製した。HPLC 条件は次の通りである。分取用カラム、ODS カラム (250 × 20 mm i.d., 5 μm, YMC 製); プレカラム、ODS プレカラム (50 × 20 mm i.d., YMC 製); 移動相, acetonitrile; 流速, 4 ml/min; 検出波長, 254 nm. なお、CB146 の化学構造は¹H-NMR および GC-MS により決定した。得られた CB146 の純度は、96.0 %であった。

CB146 : $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm) : 7.162 (1H, d, $J=2.01\text{Hz}$, 4-H), 7.349 (1H, s, 3'-H), 7.558 (1H, d, $J=2.56\text{Hz}$, 6-H), 7.613 (1H, s, 6'-H). MS (EI) m/z (relative intensity, %) : 358 (100) $[\text{M}^+]$, 360 (188) $[\text{M}^+ + 2]$, 362 (153) $[\text{M}^+ + 4]$, 364 (66) $[\text{M}^+ + 6]$, 366 (21) $[\text{M}^+ + 8]$, 323 (28) $[\text{M}^+ - \text{Cl}]$, 288 (74) $[\text{M}^+ - \text{Cl}_2]$.

(2) 代謝物の合成

4-Methoxy (MeO)-CB146 および 3-MeO-CB153 は Hutzinger らの方法¹⁵⁾を若干改変して合成した. すなわち, 2,4,5-trichloroaniline 1.0 g を濃塩酸で塩酸塩とした後, 亜硝酸ナトリウム飽和水溶液を滴下し, これに acetonitrile で溶解した 2,3,6-trichlorophenol (Lancaster, UK) 2.0 g を加えて, 110°C , 2 時間反応させた. その後, chloroform にて抽出し, 次に 2M 水酸化ナトリウムで逆抽出を行い, 濃塩酸で弱酸性とした後, 再び chloroform で抽出した. 抽出物はアルミナカラム (100g, Merck) で部分精製した後, 上記と同様な条件で HPLC を行って 4-OH-CB146 と 3-OH-CB153 を分離精製した. 最後に diazomethane でメチル化し, これを GC-MS に供した.

6-MeO-CB146 は, 既報¹⁰⁾に従い, 合成した. また, 3'-MeO-CB146 および 4'-MeO-2,2',3,3',5,5'-hexaCB (CB133) は Cadogan の方法¹⁴⁾で合成した. すなわち, 2,3,5-trichloroaniline 1.0 g および 2,3,6-trichloroanisole (Lancaster, UK) 2.0 g を tetrachloroethylene 10 ml で溶解し, さらに isopentyl nitrite 0.5 ml を加えて, 110°C で 24 時間反応させた. 反応液は, 蒸発乾固させた後, シリカゲルカラム (65g, Merck) で部分精製し, HPLC にて精製した. 得られた予想化合物の分析は, GC-ECD および GC-MS にて行った.

GC-ECD の条件は次の通りである. 分析機器, ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製); カラム, DB-1 フェーズドシリカキャピラリーカラム ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 230°C ; 注入口温度, 250°C ; 検出器温度, 250°C ; キャリアーガス, N_2 (1 ml/min).

4-MeO-CB146 : MS (EI) m/z (relative intensity) : 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (188) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (149) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (62) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (16) $[\text{M}^+$

$+ 8]$, 373 (44) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (36) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 275 (46) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_2\text{Cl}_2]$.

3-MeO-CB153 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (193) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (147) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (68) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (17) $[\text{M}^+ + 8]$, 373 (7) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (45) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 338 (13) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{Cl}]$, 275 (42) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_2\text{Cl}_2]$.

6-MeO-CB146 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (193) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (156) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (86) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (16) $[\text{M}^+ + 8]$, 338 (134) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{Cl}]$, 318 (29) $[\text{M}^+ - \text{Cl}_2]$, 275 (39) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_2\text{Cl}_2]$.

3'-MeO-CB146 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (198) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (156) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (69) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (17) $[\text{M}^+ + 8]$, 373 (8) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (37) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 338 (12) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{Cl}]$, 275 (37) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_2\text{Cl}_2]$.

4'-MeO-CB133 : MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) $[\text{M}^+]$, 390 (190) $[\text{M}^+ + 2]$, 392 (142) $[\text{M}^+ + 4]$, 394 (63) $[\text{M}^+ + 6]$, 396 (14) $[\text{M}^+ + 8]$, 373 (36) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 345 (33) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_3]$, 275 (40) $[\text{M}^+ - \text{COCH}_2\text{Cl}_2]$.

(3) 実験動物の薬物処理

雄性の Hartley 系モルモット (体重約 280 g), Wistar 系ラット (体重約 260 g) および Golden Syrian 系ハムスター (体重約 90 g) を, それぞれ未処理群, PB 前処理群および MC 前処理群の 3 群に分け, 1 群 4 匹とした. PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し 80 mg/kg/day の用量で, 一方, MC はコーン油に溶解し 20 mg/kg/day の用量で, いずれも 3 日間腹腔内に投与した. 最終投与日の翌日に実験動物を屠殺して, 肝を摘出し, 常法により肝 Ms を調製した. なお, これらの動物実験は中村学園大学の実験動物委員会の承認を得た上で, 「中村学園大学 (含む短期大学部) 動物実験に関する規定」を遵守し実施した.

(4) ヒト肝ミクロゾーム

ヒト肝 Ms は, 白人男性 5 名 (HG32, HG64, HG74, HH74, HH81) および白人女性 4 名 (HH77, HH91, HH101, HK37) から個人別に調製されたものを BD Gentest 社 (Woburn, MA, USA) より購入した. 相関係数を算出するのに必要なヒト肝 Ms 中の各 P450 分子種の酵素活性は, 添付書

類のデータを使用した。

2. 肝 Ms による代謝

動物肝 Ms による CB146 の代謝は既報¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、40 μ M CB146 を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ および動物肝 Ms (1 mg protein) を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1 ml として、37°C で 60 min インキュベート後、代謝物を chloroform-methanol (2:1) 1 ml と n-hexane 3 ml で 3 回ずつ抽出した。ヒト肝 Ms の場合には、スケールをすべて半量とし、同様に行った。抽出液は diazomethane でメチル化後、GC-ECD または GC-MS に付した。代謝物の定量は、CB146 の検量線を用いて行った。

3. その他

肝 Ms のタンパク質の定量は、Lowry らの方法¹⁶⁾に従って行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

合成標品および代謝物の分子量は、GC-MS 2000 (島津製作所製) を用いて、EI モードで測定した。GC-MS 分析条件は次の通りである。カラム、DB-1 フューズドシリカキャピラリーカラム (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 70°C (1.5 min) - 20°C/min - 230°C (0.5 min) - 4°C/min - 280°C

(5 min); 注入口温度, 250°C; キャリヤーガス, He (1 ml/min)。

¹H-NMR スペクトルの測定は日本電子製の JEOL GSX-500 (500 MHz) を用いて行った。試料は、chloroform-*d* に溶解し、tetramethylsilane を内部標準物質として用いた。

実験結果

1. 実験動物肝 Ms による代謝

ラット、モルモットおよびハムスターによる CB146 代謝を調べた。Fig. 2 には、未処理動物肝 Ms により生成された CB146 代謝物 (メチル化体) のガスクロマトグラムを示す。未処理 Ms の場合、ラットで 1 種類の代謝物 (M-2) が保持時間 16.75 min に、また、モルモットで 3 種類の代謝物 (M-1, M-2 および M-3) が保持時間 16.1 min, 16.75 min および 17.23 min に検出された。なお、ハムスターでは代謝物ピークは検出されなかった。

次に、各種動物肝 Ms による CB146 代謝物を定量した (Table 1)。代謝物の定量は CB146 未変化体の検量線を用いて行った。その結果、まず未処理ラット肝 Ms における M-2 の生成活性は 24.2 pmol/hr/mg protein であった。また、未処理モルモット肝 Ms における M-1, M-2 および M-3 の生成活性は、それぞれ 28.2, 1.3 および 4.7 pmol/hr/mg protein であり、M-1 が主代謝物であった。次に、PB 前処理した肝 Ms では、ラットの場合、M-1 が新たに生成され、その生成活性

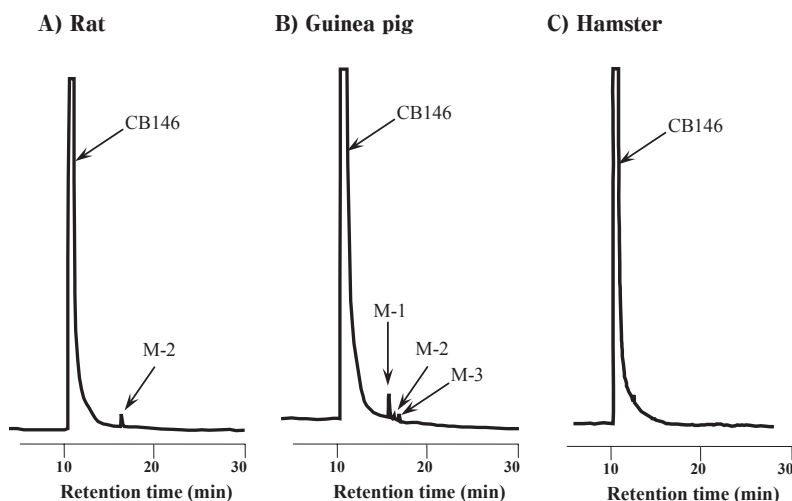


Fig. 2 Gas chromatograms of the methylated derivatives of CB146 Metabolites formed by liver microsomes from rat (A), guinea pig (B) and hamster (C).

Table 1 Effects of P450 inducers on CB146 metabolism by liver microsomes of rats, guinea pigs and hamsters

Treatment	Metabolite formed (pmol/hr/mg protein)		
	M-1	M-2	M-3
Rat			
Untreated	N. D.	24.2 ± 2.3 (1.0)	N. D.
PB-treated	51.7 ± 8.6*	28.0 ± 3.4 (1.2)	N. D.
MC-treated	N. D.	12.7 ± 5.6* (0.5)	N. D.
Guinea pig			
Untreated	28.2 ± 5.4 (1.0)	1.3 ± 1.6 (1.0)	4.7 ± 5.8 (1.0)
PB-treated	117.0 ± 13.2* (4.2)	7.1 ± 1.8* (5.6)	N. D.
MC-treated	26.1 ± 14.6 (0.9)	6.4 ± 5.2 (5.1)	18.2 ± 3.2* (3.9)
Hamster			
Untreated	N. D.	N. D.	N. D.
PB-treated	31.9 ± 5.5*	N. D.	N. D.
MC-treated	N. D.	N. D.	N. D.

N.D., not detected.

Each value represents mean ± S.D. of four animals and those in parentheses are the relative ratio of untreated animals.

*Significantly different from untreated animals ($p < 0.05$).

は 51.7 pmol/hr/mg protein と顕著であった。なお、M-2 は 1.2 倍に増加したに過ぎなかった。モルモットの場合、M-1 および M-2 は、それぞれ未処理の 4.2 倍および 5.2 倍に有意に増加したが、M-3 は全く検出されなかった。ハムスターの場合には、M-1 のみが新たに検出され、その生成活性は 31.9 pmol/hr/mg protein であった。一方、MC 前処理肝 Ms では、ラットの場合、M-2 のみが生成されたが未処理の約 50% に有意に減少した。モルモットの場合、M-2 と M-3 がそれぞれ未処理の 5.1 倍と 3.8 倍に増加したが、M-1 はほとんど変化なかった。また、ハムスターの場合、未処理と同様、代謝物は全く検出されなかった。

2. ヒト肝 Ms による代謝

9 名のヒト肝 Ms による CB146 代謝を個人別に調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、すべてのヒト肝 Ms に共通して、M-2 が最も多く生成された。次いで 1 名を除き、M-3 が生成された。また、男性 2 名 (HG63, HH74) の肝 Ms では、M-2 と M-3 に加え、M-1 の生成も観察された。

さらに、3 種類の代謝物と主要な P450 活性との相関係数を算出したところ、M-1 の生成が総 P450 量および CYP2B6 と有意に相関することが認められた (Table 2)。なお、M-2 および M-3 の生成は、どの P450 分子種とも全く相関は認められなかった。さらに、性差を調べるために、男性 5 名と女性 4 名の平均を比較したところ、M-2 と M-3 の生成活性は、男性ではそれぞれ 8.0 ± 2.3 と 4.2 ± 3.3 pmol/hr/mg protein、女性ではそれぞれ 8.9 ± 1.7 と 4.0 ± 1.0 pmol/hr/mg protein であり、ほとんど違いは認められなかった。

3. 代謝物の化学構造

CB146 代謝物の化学構造を決定するため、100 倍量のスケール (100 ml) で代謝反応を行い、さらに代謝物をメチル化し、これを GC-MS に供した。その結果、M-1、M-2 および M-3 のメチル誘導体は、いずれも分子量 388 を有することから、3 種とも OH 体であることが明らかとなった (Table 3)。また、M-1 (メチル化体) では、フラグメントイオン $[M^+ - 43]$ (m/z 345) が比較的多

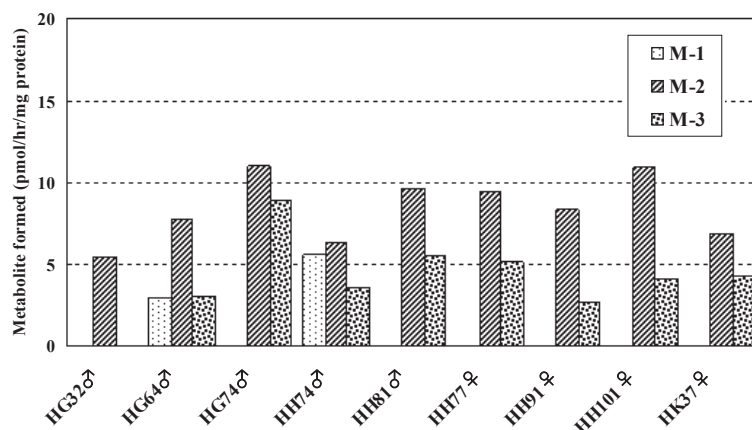


Fig. 3 Metabolism of CB146 by liver microsomes from nine human individuals

Table 2 Correlation coefficient between human P450 activities and three CB146 metabolites

Isoform	M-1	M-2	M-3
Total P450	0.747*	-0.378	-0.227
CYP1A2	-0.114	-0.037	0.020
CYP2A6	0.094	0.095	-0.096
CYP2B6	0.974**	-0.358	-0.158
CYP2C8	0.653	0.035	0.153
CYP2C9	0.290	0.252	0.167
CYP2C19	0.329	-0.105	0.475
CYP2D6	0.044	0.132	0.285
CYP2E1	0.587	-0.348	-0.345
CYP3A4	0.514	0.081	0.062

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Table 3 Mass spectral data and retention times of the methylated derivatives of three CB146 metabolites and its synthetic compounds

Compound	Molecular weight	Mass spectral data				Retention time (min) in GC-ECD
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	
M-1	388	100	9	26	10	16.11
M-2	388	100	32	22	-	16.75
M-3	388	100	-	-	-	17.23
6-MeO-CB146	388	100	-	-	134	14.14
3'-MeO-CB146	388	100	8	37	12	16.11
4'-MeO-CB133	388	100	36	33	8	16.27
3-MeO-CB153	388	100	7	45	13	16.67
4-MeO-CB146	388	100	44	36	8	16.75

-, not detected. CB133 (2, 2', 3, 3', 5, 5'-hexaCB); CB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexaCB).

く検出されたのに対し、M-2（メチル化体）ではフラグメントイオン [M^+-15] (m/z 373) が多く検出された。これらの結果から、M-1 はメタ位すなわち 3 (3') 位あるいは 5 (5') 位に、また M-2 はパラ位すなわち 4 位あるいは 4' 位に OH 基を有することが示唆された。また、各代謝物の GC 保持時間およびマススペクトルを、別途合成した標準品と比較したところ、M-1 と M-2 のメチル化体が 3'-MeO-CB146 および 4-MeO-CB146 とほぼ一致したことから、M-1 と M-2 は、それぞれ 3'-OH-CB146 と 4-OH-CB146 であることが示唆された。なお、M-3 については、塩素 6 個の同位体ピークは検出されたものの明確なフラグメントイオンを検出するには至らなかったことから、現在のところ不明である。

考 察

ヒト血液中で 2 番目に多く検出される PCB 代謝物である 4-OH-CB146 の親 PCB 異性体を明らかにするため、ラット、モルモット、ハムスターおよびヒト肝 Ms による CB146 の代謝を調べた。その結果、本代謝物がラット、モルモットおよびヒトで生成されること、また、CB146 の代謝パターンに大きな動物種差があることが明らかとなった。Fig. 4 に動物肝およびヒト肝における CB146 の推定代謝経路を示す。未処理動物肝 Ms での主代謝物は、ラットでは 4-OH-CB146 (M-2)、モルモットでは 3'-OH-CB146 (M-1) であったが、一方、ハムスターでは代謝物が生成されなかった。また、PB 前処理により、ラット、モ

ルモットおよびハムスターのいずれの動物でも共通して、3'-OH-CB146 の生成が著しく促進され、その活性の強さは、モルモット>ラット>ハムスターの順であった。なお、MC 前処理により、4-OH-CB146 の生成が、ラットでは未処理の 50%に激減したのに対し、モルモットでは未処理の数倍に増加した。これまでに、我々はモルモットが、CB153, CB138 および CB187 のような 2,4,5-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体に対し、高い代謝能を有することを報告している¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾。今回、CB146 代謝においても同様に、モルモットにおいて特異的な代謝活性が観察された。

今回、4-OH-CB146 が CB146 の代謝物であることが初めて確認された。驚いたことに、ヒト肝 Ms では、ラット未処理肝 Ms と同様に、主代謝物であった。ヒト血液中において、4-OH-CB146 は、4-OH-CB187 の次に高い濃度で検出されている^{1)~7)}が、今回の結果は、これらの報告をよく支持するものであった。一方、PCB 製品 (60%塩素含量) 中の CB146 含量は、CB153 と CB138 の含量がいずれも 10%前後であるのに対し、1.6%程度と少ないことが報告されている¹⁷⁾。これらの事実を考え合わせると、摂取された CB146 は徐々に生体に濃縮されていき、さらに肝でゆっくり代謝を受け、4-OH-CB146 のみが血液中に局在するようになったものと考えられる。血液中における PCB 代謝物の高残留性は、血中の甲状腺ホルモン輸送タンパクである transthyretin との親和性の強さ¹⁸⁾¹⁹⁾で議論されているが、詳細はよくわかっていない。

これまでに、我々は MC 誘導性のハムスター CYP2A8 が、2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (tetraCB) (CB52)²⁰⁾ や 2,3',4',5-tetraCB (CB70)²¹⁾ の 4-水酸化反応を触媒することを明らかにしている。今回、MC 前処理ハムスター肝 Ms で 4-OH-CB146 が生成されるものと考えられたが、CB187 代謝¹⁰⁾の場合と同様に、全く活性が見られなかった。これらの結果から、CB146 や CB187 のように、3 位および 5 位に塩素置換された PCB 異性体は、CYP2A8 の基質にはならないのかもしれない。

今回、ヒト肝 Ms により、主に 4-OH-CB146 と M-3 が生成された。ヒト肝 P450 については、

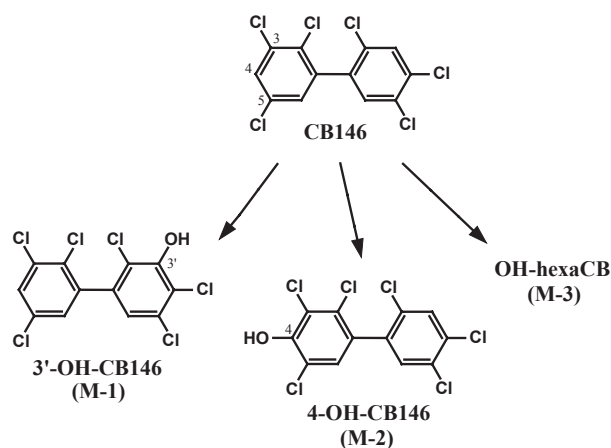


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of CB146 in animal and human

CYP3A4 (CYP3A5 を含む), CYP1A2 および CYP2C9 がそれぞれ総 P450 含量の約 30%, 約 15% および約 15% を占めていること, また他の P450 分子種は 5% 以下であることが知られている^{22)~24)}. そこで, 4-OH-CB146 および M-3 の生成量とヒト肝 P450 活性との相関を調べたが, 有意な相関を示す P450 分子種は全く見あたらなかった. 結局, 両代謝物の生成に参与する P450 分子種の特定には至らなかった. この点は今後の研究課題である.

9名のうち, 男性2名 (HG64, HH74) の肝 Ms に, 3'-OH-CB146 の生成活性が認められた. 当初, ヒトにおける性差ではないかと考えられたが, 提供者の情報 (添付書類) を調べたところ, HG64 と HH74 の死因はそれぞれ脳血管障害および頭蓋内出血であり, 生前, 治療薬として前者は warfarin を, 後者は抗うつ薬 prozac とアンギオテンシン II 受容体拮抗薬 cozaar を使用していたこと, また, この2名の肝 Ms の CYP2B6 活性, すなわち (S) -mephenytoin N-脱メチル化活性が, 他より 2~13 倍高いことが判明した (データ未掲載). これらの事実から, 薬物摂取により CYP2B6 が誘導され, 3'-OH-CB146 の生成が促進されたものと考えられる. このように, 3'-OH-CB146 の生成には, 実験動物およびヒトで共通して, CYP2B 酵素が強く関与することが示唆された.

総 括

1. ラット, モルモット, ハムスターおよびヒト肝 Ms による CB146 代謝を調べた結果, 3 種類の代謝物 (M-1, M-2 および M-3) が生成された. その生成パターンは動物間で大きく異なっていた.
2. GC-MS の結果から, 3 種類の代謝物はいずれも OH 体であり, 合成標品との比較から, M-1 は 3'-OH-CB146, M-2 は 4-OH-CB146 であると推定された. なお, M-3 の正確な構造は現在不明である.
3. 未処理 Ms では, 3'-OH-CB146 は, いずれの実験動物においても, PB 前処理により, その生成が増大した. 4-OH-CB146 は, ラットおよびモルモットの未処理 Ms で生成され, モルモットでのみ PB 前処理により数倍に増

加した. M-3 はモルモットでのみ MC 前処理により, 数倍増加した.

4. 9名から調製されたヒト肝 Ms は, いずれも主代謝物として 4-OH-CB146 を生成した. また, このうち8名は M-3 も生成した. なお, 2名は 3'-OH-CB146 の生成活性も有していた.

以上の結果から, ヒト血中で高濃度検出される 4-OH-CB146 は, CB146 の主要な代謝物であること, また, 3'-OH-CB146 の生成は, PB 誘導性の P450 (CYP2B 酵素) により触媒されることが示唆された.

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業, H24-食品-指定-014 古賀信幸), 日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (B), No.24390049 原口浩一) および日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (C), No. 23510083 加藤善久) の助成を受けたものである. ここに記して謝意を表します.

参 考 文 献

- 1) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H : Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102 : 464-469, 1994.
- 2) Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J and Bergman Å : Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ. Health Perspect.* 108 : 1035-1041, 2000.
- 3) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J and Norström : Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs(OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 108 : 611-616, 2000.
- 4) Fängström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P and Bergman Å : Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ. Health Perspect.* 110 : 895-899, 2002.
- 5) Guvenius DM, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman Å and Noren K : Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated biphenyl ethers, polychlorinated biphenyls,

- polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. Environ. Health Perspect. 111 : 1235-1241, 2003.
- 6) Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobna B, Trnovec T, Bergman Å and Herts-Picciotto I : Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in pregnant women from eastern Slovakia. Environ. Health Perspect. 115 : 20-27, 2007.
 - 7) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwarra J, Iida T, Yoshimura T and Furue M : Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood collected from Yusho patients during medical check-ups performed from 2004 to 2007. Fukuoka Igaku Zasshi 100 : 156-165, 2009.
 - 8) Safe S : Polyhalogenated aromatics : uptake, disposition and metabolism. In Kimbrough RD and Jensen AA (ed) : Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. pp. 131-159, Elsevier, 1989.
 - 9) 古賀信幸, 吉村英敏 : PCB と関連化学物質の代謝並びに代謝物の毒性. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆編 : 油症研究 - 30 年の歩み -, pp 93-110, 九州大学出版会, 2000.
 - 10) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y and Koga N : In vitro metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB187) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. Xenobiotica 35 : 319-330, 2005.
 - 11) 古賀信幸, 金丸知代, 大石奈穂子, 加藤善久, 木村良平, 原口浩一, 増田義人 : 2,4,5,2',3',4'-六塩素化ビフェニルの *in vitro* 代謝における動物種差. 福岡医誌 92 : 167-176, 2001.
 - 12) Ariyoshi N, Koga N, Oguri K and Yoshimura H : 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. Xenobiotica 22 : 1275-1290, 1992.
 - 13) Ariyoshi N, Koga N, Yoshimura H and Oguri K : Metabolism of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) in guinea pig. Xenobiotica 27 : 973-983, 1997.
 - 14) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. J. Chem. Soc. : 4257-4258, 1962.
 - 15) Hutzinger O, Safe S and Zitko V : Polychlorinated biphenyls : Synthesis of some individual chlorobiphenyls. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 6 : 209-219, 1971.
 - 16) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
 - 17) Ballschmiter K, Rappe C and Buser HR : Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs, In Kimbrough RD and Jensen AA (ed) : Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. pp 47-69, Elsevier, 1989.
 - 18) Brouwer A : Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. Biochem. Soc. Trans. 731-737, 1991.
 - 19) Malmberg T, Hoogstraate J, Bergman Å and Klasson-Wehler E : Pharmacokinetics of two major hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites with specific retention in rat blood. Xenobiotica 34 : 581-589, 2004.
 - 20) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Hamster liver cytochrome P450 (CYP2A8) as a 4-hydroxylase for 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl. Biochem. Biophys. Res. Commun. 225 : 685-688, 1996.
 - 21) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K and Yoshimura H : Metabolism of 2, 3', 4', 5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. Chemosphere 37 : 1985-1904, 1998.
 - 22) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP : Inter-individual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals : Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J. Pharmacol. Exp. Ther. 270 : 414-423, 1994.
 - 23) Guengerich FP : Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. Chem.-Biol. Interact. 106 : 161-182, 1997.
 - 24) Guengerich FP : Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS Journal 8 : E101-111, 2006.

(Received for publication March 22, 2013)