

2, 2', 3, 4', 5', 6-六塩素化ビフェニル (CB149) のラット, ハムスター, モルモットおよびヒトにおける *in vitro* 代謝の比較研究

太田, 千穂
中村学園大学栄養科学部

原口, 浩一
第一薬科大学薬学部

加藤, 善久
徳島文理大学香川薬学部薬物動態学講座

藤井, 由希子
第一薬科大学薬学部

他

<https://doi.org/10.15017/6790832>

出版情報：福岡醫學雑誌. 114 (1), pp.40-50, 2023-03-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



原 著

**2,2',3,4',5',6-六塩素化ビフェニル (CB149) のラット, ハムスター,
モルモットおよびヒトにおける *in vitro* 代謝の比較研究**

¹⁾中村学園大学栄養科学部

²⁾第一薬科大学薬学部

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病院薬学講座

太田千穂¹⁾, 原口浩一²⁾, 加藤善久³⁾, 藤井由希子²⁾, 木村 治⁴⁾, 古賀信幸¹⁾

**Comparative Study on the *in Vitro* Metabolism of 2,2',3,4',5',6-
Hexachlorobiphenyl (CB149) in Rats, Hamsters,
Guinea Pigs and Humans**

Chiho OHTA¹⁾, Koichi HARAGUCHI²⁾, Yoshihisa KATO³⁾, Yukiko FUJII²⁾,
Osamu KIMURA⁴⁾ and Nobuyuki KOGA¹⁾

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

²⁾*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Daiichi University of Pharmacy, 22-1 Tamagawa,
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',6-hexachlorobiphenyl (CB149) was examined using liver microsomes of rats, hamsters, guinea pigs and humans. Three metabolites (M1, M2 and M3) were produced common to animals and humans and M1 was a major metabolite in all microsomes used in this study. Pretreatment of phenobarbital (PB) resulted in the marked increase of M1, M2 and M3 in all animals. In PB-treated animals, M1 production increased 253-, 11- and 2.4-fold of untreated in rats, hamsters and guinea pigs, respectively. Moreover, the order of M1 production was rats >> hamsters > guinea pigs (46 : 5 : 1). In 3-methylcholanthrene-treated animals, M1 production was the same or less than that of untreated animals. GC-MS determined M1, M2 and M3 to be 5-hydroxy (OH)-, 4-OH- and 4,5-diOH-CB149, respectively. Human liver microsomes prepared individually from fifteen Caucasians exhibited quite similar metabolic patterns. However, there was about 6-fold inter-individual variation in the amounts of total metabolites. When the correlation coefficients between the amount of CB149 metabolites generated and the enzymatic activities of CYP isoforms were determined, the production of 5-OH- and 4,5-diOH-CB149 was significantly correlated with both activities of CYP2B6 and CYP3A4, and the production of 4-OH-CB149 was significantly correlated with CYP2A6 activity. So, when we actually investigated the metabolic activity using twelve CYP isoforms, CYP2B6 and CYP2A6 catalyzed the formation of 5-OH- and 4-OH-CB149, respectively.

However, CYP3A4 showed no activity. From these findings, it was suggested that CYP2B and CYP2A enzymes play an important role in CB149 metabolism in animals and humans.

Key words : CB149, metabolism, cytochrome P450, rat, hamster, human

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、カネミ油症の原因物質であるとともに、世界的環境汚染物質としても知られているが、脂溶性が極めて高いことから、ヒトの血液、脂肪組織および肝臓などから、高濃度で検出される。PCB 異性体の中でも、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、すなわち2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (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) などは、ほとんど代謝されないため、ヒト血液中で特に高濃度で検出されている¹⁾⁻³⁾。Todaka らは、日本人の健常者と油症患者の血中 PCB 異性体濃度を調べ、日本人健常者でも上記と全く同様の PCB 異性体が検出されること、さらには油症患者では健常者の3~4倍多く残留していることを報告した⁴⁾。

一方、PCB 異性体のうち、置換塩素数が4個以下のもの、または置換塩素数が5個以上でもビフェニル骨格の *meta-para* 位に隣接する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 (CYP) 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⁵⁾。最近、我々は2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体が、前述の難代謝性 PCB 異性体と比べ、置換塩素数にかかわらず、*meta* (3, 3', 5あるいは5') 位の水酸化を非常に受けやすいことを新たに見出している⁶⁾⁻⁸⁾。

本研究の2,2',3,4',5',6-hexaCB (CB149) は六塩素化 PCB であるが、*meta-para* (5,4) 位に隣接する水素を有することから、代謝されやすく、そのため残留性は低いと考えられる。事実、三村らは油症原因油中の CB149 濃度が総 PCB の0.5~0.7%であるのに対し、油症患者の血液中および

母乳中の CB149 濃度が0.01~0.05 ppb と非常に低いことを報告している⁹⁾¹⁰⁾。また、前出の Todaka らは油症患者および健常者の血液中に、CB149 は全く検出されないと報告している⁴⁾。これらの事実は、CB149 がヒトにおいて、容易に代謝され、排泄されることを示唆している。一方、我々は PCB 混合物のカネクロール 500 をラット、ハムスターおよびモルモットに腹腔内投与し、投与後5日目の肝臓および血液中の CB149 代謝物を調べたところ、ハムスター血液中に、カテコール体の4,5-dihydroxy (diOH)-CB149 が高濃度検出されること、また、モルモット肝臓では特に、CB149 のメチルスルホン体が高濃度検出されることを報告した¹¹⁾¹²⁾。これらの代謝物は、まず CYP により一酸素原子が添加された後、さらに連続して水酸化されたり、あるいはグルタチオン抱合を受けたりして、最終的に生成されることが考えられる。

PCB 代謝に関与する CYP 分子種として3種類のサブファミリーに属するものが報告されている¹³⁾。CYP1A 酵素 (ラット CYP1A1¹⁴⁾) は、コプラナー PCB の *para* (4あるいは4') 位の水酸化を、CYP2B 酵素 (ラット CYP2B1¹⁵⁾, ハムスター CYP2B¹⁶⁾, モルモット CYP2B18¹⁷⁾, ヒト CYP2B6¹⁸⁾⁻²⁰⁾) は *meta* (3, 3', 5あるいは5') 位の水酸化を、さらに CYP2A 酵素 (ハムスター CYP2A8²¹⁾, ヒト CYP2A6²⁰⁾²²⁾²³⁾) は *para* (4あるいは4') 位の水酸化を触媒する。一方、CB149 の代謝酵素に関する報告はほとんどない。

そこで本研究では、ラット、ハムスター、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム (Ms) を用いて、CB149 代謝、特にカテコール体の生成機構について検討を加えた。動物肝 Ms として、未処理 Ms とともに、代表的な CYP 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 を用いた。また、ヒト CYP 分子種についても検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) CB149の合成

CB149はCadoganの方法²⁴⁾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 (100 g, Merck) およびシリカゲルカラム (80 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, CB149の化学構造はGC-MSにより決定した。得られたCB149の純度は, 97.8%であった。

CB149: MS (EI) m/z (relative intensity, %): 358 (100) [M⁺], 360 (181) [M⁺+2], 362 (155) [M⁺+4], 364 (73) [M⁺+6], 366 (15) [M⁺+8], 323 (33) [M⁺-Cl], 288 (85) [M⁺-Cl₂].

(2) 代謝物の合成

5-Methoxy (MeO)-CB149はCadoganの方法²⁴⁾で合成した。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 1.0 g を、2,4,5-trichloroanisole (東京化成) 2.0 g とともに、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。その後、chloroformにて抽出した。抽出物はアルミナカラム (100 g, Merck) およびシリカゲルカラム (80 g, Merck) で部分精製した後、分取用HPLCを行い、5-MeO-CB149を精製した。次に、5-OH-CB149は、5-MeO-CB149を脱メチル化して得た。5-MeO-CB149をdichloromethaneで溶解し、17%三臭化ホウ素 (和光純薬) を加えて密封し、室温で5時間攪拌した。その後、GC-MSにより脱メチル化の確認を行った。

一方、4-OH-CB149の合成はHutzingerらの方法²⁵⁾で行った。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に溶解した2,3,5-trichlorophenol (東京化成) 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 (100 g, 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-CB149を分離精製した。また、GC-MS用標準品4-MeO-CB149は、4-OH-CB149をdiazomethaneでメチル化して得た。

5-MeO-CB149: MS (EI) m/z (relative intensity): 388 (100) [M⁺], 390 (191) [M⁺+2], 392 (158) [M⁺+4], 394 (47) [M⁺+6], 396 (16) [M⁺+8], 373 (7) [M⁺-CH₃], 345 (26) [M⁺-COCH₃], 338 (15) [M⁺-CH₃Cl], 275 (43) [M⁺-COCH₃Cl₂].

4-MeO-CB149: MS (EI) m/z (relative intensity) 388 (100) [M⁺], 390 (188) [M⁺+2], 392 (149) [M⁺+4], 394 (68) [M⁺+6], 396 (16) [M⁺+8], 373 (4) [M⁺-CH₃], 345 (28) [M⁺-COCH₃], 275 (36) [M⁺-COCH₃Cl₂].

4,5-diMeO-CB149の合成は、Haraguchiらの方法¹¹⁾に準じて行った。すなわち、4-aminoveratroleを、isopentyl nitriteを用いて1,2,4-trichlorobenzeneとジアゾカップリングした。次に、veratrole側のベンゼン環の2,3,6位を塩素化するため、得られた三塩素化PCB veratrole体の混合物を、さらに塩酸下で塩素酸ナトリウムを用いて塩素化した。最終的に、上記の分取カラムにより分離精製した。

合成標品および代謝物の分子量は、GC-MS 2000 (島津製作所) を用いて、EIモードで測定した。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 × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 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; キャリアーガス, He (1 mL/min).

(3) 実験動物の薬物処理

雄性のWistar系ラット (体重約260 g), Hartley系モルモット (体重約280 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動物実験研究倫理審査委員会の承認を得た上で、「中村学園大学(含む短期大学部)における実験動物のための指針」を遵守し実施した。

(4) ヒト肝 Ms およびヒト CYP 分子種

ヒト肝 Ms は、白人男性9名(HG32, HG74, HH74, HH81, HG64, HG18, HH37, HH715, HH741) および白人女性6名(HH77, HH91, HH101, HK37, HG3, HG43)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 CYP 分子種の酵素活性は、添付書類のデータを使用した。また、ヒトリンパ芽球様細胞発現系の CYP 分子種10種類(CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) および昆虫バキュロウイルス系の CYP1B1 と CYP3A5 は BD Gentest 社(Woburn, MA, USA)から購入した。

2. 肝 Ms による代謝

動物肝 Ms による CB149 の代謝は既報⁶⁾に準じて行った。すなわち、40 μ M CB149 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 20 分間インキュベート後、代謝物を chloroform-methanol (2:1) 1 mL および *n*-hexane 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て、またインキュベーション時間を 30 分間として、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、CB149 の検量線を用いて行った。

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, 230°C; 注入口温度, 250°C; 検出器温度, 250°C; キャリアーガス, N₂ (1 mL/min)。

3. ヒト CYP 分子種による代謝

40 μ M CB149, NADPH 生成系(0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ およびヒト CYP 分子種(0.5 mg protein) を 100 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.4) とともに合計 0.5 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) 0.5 mL および *n*-hexane 1.5 mL で 3 回ずつ抽出した。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、CB149 の検量線を用いて行った。

4. その他

肝 Ms のタンパク質の定量は、Lowry らの方法²⁶⁾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。

実験結果

1. ラット肝 Ms による代謝と代謝物の化学構造

Fig. 1 には、3 種類のラット肝 Ms により生成された CB149 代謝物(メチル誘導体)の GC-ECD クロマトグラムを示す。未処理ラット肝 Ms では、保持時間 17.18 min に代謝物 M1 が 1 種類のみ検出された。PB 前処理 Ms では、3 種類の代謝物が生成された。特に M1 と M3 (保持時間 19.58 min) は顕著に増加し、さらに、M1 につづき、M2 が微量であるが、保持時間 18.18 min に検出された。MC 前処理 Ms では M1 と M3 が検出された。

次に、CB149 代謝物の化学構造を決定するため、PB 前処理ラット肝 Ms で生成された代謝物(メチル誘導体)を GC-MS に供した。その結果、M1 および M2 のメチル誘導体は、いずれも分子量 388 を有することから、両者とも OH 体であること、また、M3 のメチル誘導体は分子量 418 を有することから、diOH 体であることが示唆された(Table 1)。別途合成した予想代謝物と比較したところ、分子量、マスフラグメンテーションおよび保持時間から、M1, M2 および M3 のメチル誘導体はそれぞれ、5-MeO-CB149, 4-MeO-CB149 および 4,5-diMeO-CB149 とほぼ完全に一致した。以上の結果から、M1 は 5-OH 体、M2 は 4-OH 体、M3 は 4,5-diOH 体であることが明らかになった。

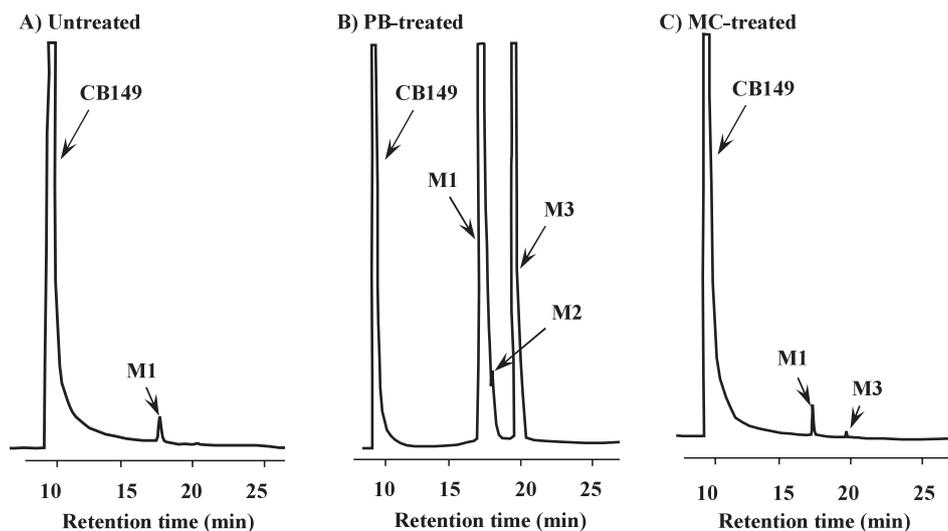


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of the methylated derivatives of CB149 metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B) and MC-treated (C) rats.

Table 1 GC-MS data and retention times of the methylated derivatives of three CB149 metabolites and their synthetic compounds

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -35]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	[M ⁺ -70]	
CB149	358	100	-	32	-	-	74	11.95
M1	388	100	6	-	30	17	-	14.89
M2	388	100	2	-	33	-	-	15.13
M3	418	100	29	-	22	-	-	15.61
5-MeO-CB149	388	100	6	-	30	16	-	14.89
4-MeO-CB149	388	100	4	-	37	-	-	15.13
4,5-diMeO-CB149	418	100	28	-	18	-	-	15.61

-, not detected.

2. 肝 Ms による CB149 代謝の動物種差

ラット、ハムスターおよびモルモット肝 Ms による CB149 代謝を比較した (Table 2). 代謝物の定量は CB149 の検量線を用いて行った. その結果, 未処理肝 Ms では, すべての動物で 5-OH 体の低い生成活性しか示さなかった (6~15 pmol/min/mg protein). 次に, PB 前処理肝 Ms では, ラットの場合, 5-OH 体の生成活性は未処理 Ms の 253 倍に顕著に増加した. また, ハムスターでは 11 倍に, モルモットでは 2.4 倍に増加した. さらに, すべての動物で新たに 4-OH 体および 4,5-diOH 体の生成活性も見られ, 活性の強さはラット ≫ ハムスター > モルモットの順であった.

特に, ラットでの 4,5-diOH 体の生成活性は 452 pmol/min/mg protein と高かった. 一方, MC 前処理肝 Ms では, いずれの動物でも 5-OH 体が生成されたが, その活性は未処理 Ms と同程度か, あるいは減少した. また, ハムスターでは弱いながらも 4-OH 体が生成された.

このように, すべての動物において, PB 前処理により, CB149 代謝が強く促進されたが, 次に, 一次代謝物の 5-OH-CB149 および 4-OH-CB149 を基質として用い, これらから 4,5-diOH-CB149 への生成を比較した (Table 3). 酵素源としてラット肝 Ms を用いた. 未処理 Ms では 5-OH-CB149 からのみ, 低いながらも 4,5-diOH-CB149

Table 2 *In vitro* metabolism of CB149 by liver microsomes of rats, hamsters and guinea pigs and the effects of CYP inducers on CB149 metabolism

Treatment	Metabolite formed (pmol/min/mg protein)		
	5-OH (M1)	4-OH (M2)	4,5-diOH (M3)
Rat			
Untreated	6.3 ± 2.6 (1.0)	N.D.	N.D.
PB-treated	1596 ± 116* (253)	36.3 ± 2.9*	452 ± 166*
MC-treated	10.3 ± 4.2 (1.6)	N.D.	N.D.
Hamster			
Untreated	14.6 ± 1.4 (1.0)	N.D.	N.D.
PB-treated	158 ± 23.1* (10.9)	11.4 ± 2.9*	13.3 ± 4.0*
MC-treated	9.8 ± 4.8 (0.7)	3.3 ± 1.3*	N.D.
Guinea pig			
Untreated	14.5 ± 4.6 (1.0)	N.D.	N.D.
PB-treated	34.6 ± 4.5* (2.4)	1.3 ± 1.1	2.8 ± 1.4*
MC-treated	6.1 ± 1.6* (0.4)	N.D.	N.D.

N.D., not detected.

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

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

Table 3 Production of 4,5-diOH-CB149 from 5-OH- and 4-OH-CB149 by rat liver microsomes

Treatment	4,5-diOH-CB149 formed (pmol/min/mg protein)	
	from 5-OH-CB149	from 4-OH-CB149
Untreated	45.5 ± 11.7 (1.0)	N.D.
PB-treated	2236 ± 216* (49.1)	1125 ± 242*
MC-treated	N.D.	N.D.

N.D., not detected.

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

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

の生成活性が観察された。次に、PB 前処理 Ms では、5-OH-および 4-OH-CB149 を基質にした場合、それぞれ 2,236 および 1,125 pmol/min/mg protein の高い活性を示し、CB149 を基質にした場合に比べ、それぞれ 4.9 倍および 2.5 倍であった。以上の結果より、4,5-diOH-CB149 生成における基質特異性は、5-OH-CB149 > 4-OH-CB149 > CB149 の順となった。なお、MC 前処

理 Ms ではいずれの OH 体からも 4,5-diOH 体は生成されなかった。

3. ヒト肝 Ms による代謝

白人男性 9 名と白人女性 6 名の肝 Ms を用いて、CB149 の代謝を個人別に調べた。反応は 37°C、60 分間行った。CB149 の検量線から、各代謝物を定量した。その結果、Fig. 2 に示すように、す

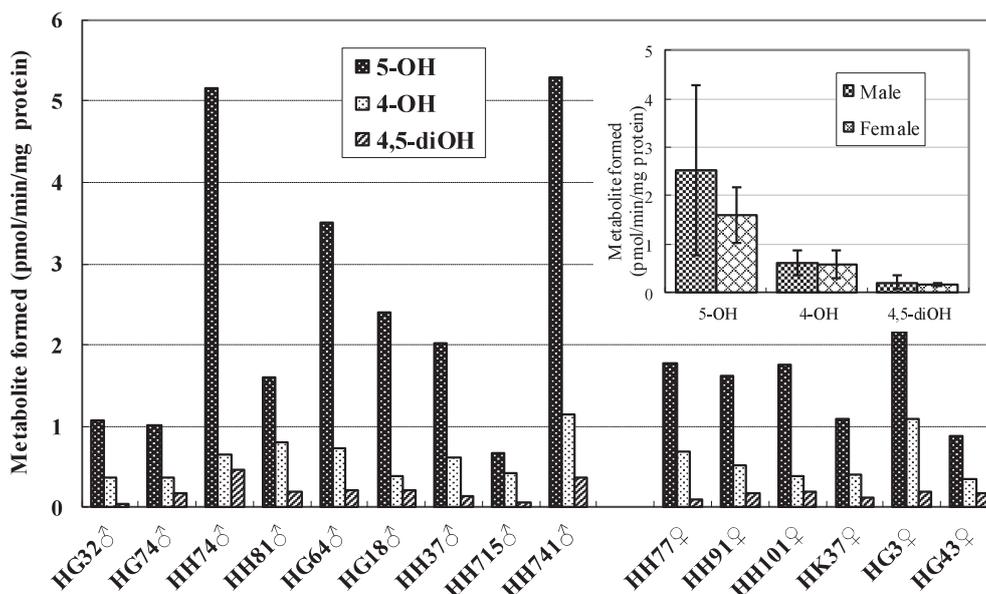


Fig. 2 Metabolism of CB149 by human liver microsomes prepared from fifteen individuals (nine males and six females)

すべてのヒトでよく似た代謝パターンを示した。すなわち、主代謝物は5-OH体であり、次いで4-OH体および4,5-diOH体と続いた。ただし、総代謝物量は個人差が大きく、一番低いHH715(男性)と一番高いHH741(男性)では5.9倍の差があった。さらに、男女別に平均したところ、5-OH体の生成活性は、男女ともに2 pmol/min/mg protein前後であり、前述の未処理動物の3分の1以下と低かった。また、未処理動物では4-OH体および4,5-diOH体が生成されなかったのに対し、ヒトでは両代謝物も生成され、それぞれ0.6および0.2 pmol/min/mg proteinと算出された。なお、3種類の代謝物の生成活性はいずれも男女とも同程度で有意差はなかった。

次に、3種類のCB149代謝物の生成活性とCYP分子種の酵素活性との相関係数を算出した(Table 4)。その結果、5-OH体と4,5-diOH体の生成活性がCYP2B6およびCYP3A4の両活性と有意な正の相関を示すこと、また4-OH体の生成活性が、CYP2A6活性と有意な正の相関を示すことが明らかになった。なお、その他のCYP分子種では有意な相関は全く認められなかった。

4. ヒトCYP分子種による代謝

ヒト肝Msを用いた検討から、CB149代謝には、CYP2B6、CYP2A6およびCYP3A4の関与が強

く示唆された。そこで、12種類のヒトCYP分子種を用いて、CB149代謝を調べた。反応を37°Cで60分間行った結果、Fig. 3に示すように、CYP2B6が5-OH体の高い生成活性を示した(5 pmol/hr/pmol CYP)。また、CYP2A6は弱いながらも、4-OH体の生成活性を示した。しかしながら、CYP2B6による4,5-diOH体の生成は見られなかった。また、期待されたCYP3A4をはじめ、その他のCYP分子種では代謝物の生成は全く見られなかった。

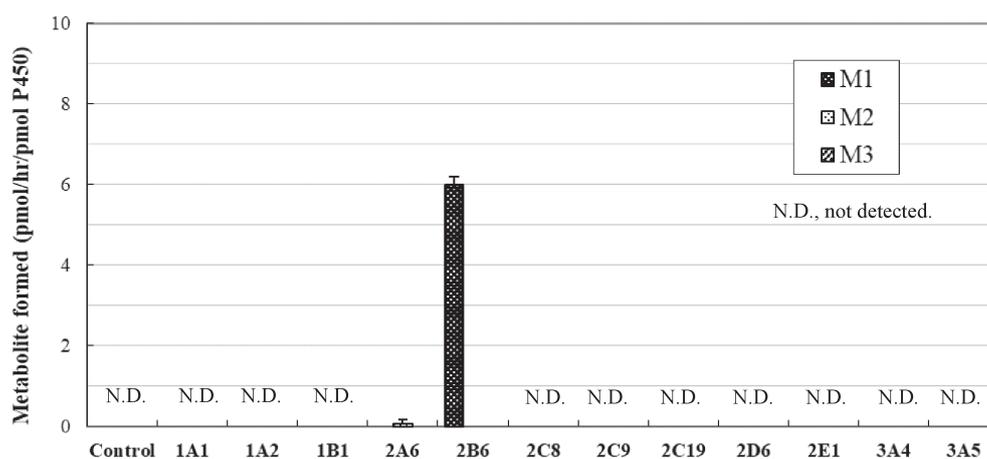
考 察

低残留性PCBであるCB149の*in vitro*代謝について、ラット、モルモット、ハムスターおよびヒト肝Msを用いて比較検討した。また、ヒトCYP分子種を用いて検討した。その結果、すべての動物において、未処理肝Msでは主代謝物として5-OH-CB149のみが同程度生成された。また、PB前処理Msでは、5-OH体の顕著な増加に続き、新たに4,5-diOH-CB149と4-OH-CB149が生成された。特に、5-OH体の生成はラットで未処理Msの253倍、ハムスターでは11倍、さらにモルモットでは2倍に促進された。このときの生成活性を比較すると、ラット(1,596 pmol/min/mg protein)、ハムスター(158 pmol)、モルモット(35 pmol)の順であった。これらの結果は、3種類

Table 4 Correlation coefficient between human liver microsomal CYP activities and three CB149 metabolites produced by human liver microsomes of fifteen individuals

Isoform	M1 (5-OH)	M2 (4-OH)	M3 (4,5-diOH)
Total P450	0.672*	0.270	0.659
CYP1A2	-0.007	-0.093	0.119
CYP2A6	0.577	0.856**	0.531
CYP2B6	0.803**	0.475	0.776**
CYP2C8	0.570	0.483	0.568
CYP2C9	0.489	0.406	0.318
CYP2C19	-0.115	-0.175	0.059
CYP2D6	-0.066	-0.063	-0.108
CYP2E1	0.397	0.309	0.166
CYP3A4	0.714*	0.593	0.841**
CYP4A11	0.017	0.086	-0.088

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

**Fig. 3** Metabolism of CB149 by human CYP isoforms

の CB149 代謝物生成のすべてに、PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していることを示唆している。

MC 前処理 Ms では、ハムスターでのみ、新たな 4-OH-CB149 の生成が見られた。これまでに、我々は MC 前処理ハムスター肝から、MC 誘導性の CYP2A8 を精製し、これが 2,2',5,5'-および 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl (CB52 および CB70) の 4-水酸化反応を特異的に触媒することを報告している¹⁵⁾²¹⁾。本研究の結果は、CB149 代謝における 4-OH 体の生成にも、ハムスター

CYP2A8 が関与していることを示唆している。

本研究では、15 名のヒト肝から個人別に調製された Ms を用い、CB149 代謝物 3 種類の生成活性につき、肝 CYP 活性との相関を調べた。その結果、5-OH 体と 4,5-diOH 体の生成活性が CYP2B6 活性 ((S)-mephenytoin N-demethylase 活性) および CYP3A4 活性 (testosterone 6 β -hydroxylase 活性) と、一方、4-OH 体の生成活性が CYP2A6 活性 (coumarin 7-hydroxylase 活性) と有意な正の相関を示すことが明らかになった。こ

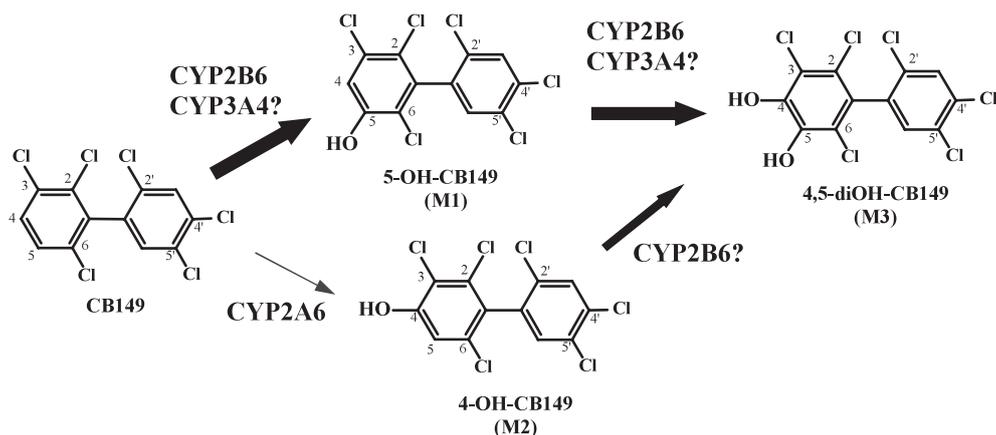


Fig. 4 Postulated metabolic pathways of CB149 in human liver

これらの結果は、ヒト肝でのCB149代謝に、CYP2B6、CYP2A6およびCYP3A4が関与していることを示唆している。また、ヒト肝CYP含量については、CYP3A(3A4および3A5を含む)が総CYP含量の約40%、CYP1A2が約18%、CYP2C(2C8, 2C9, その他を含む)が約25%を占めていること、さらにその他のCYP分子種は5%以下であることが報告されている²⁷⁾²⁸⁾。そこで、12種類のヒトCYP分子種を用いて検討を加えたところ、CYP2B6による5-OH体の生成活性と、弱いながらもCYP2A6による4-OH体の生成活性を確認することができた。しかしながら、ヒト肝においてCYP含量が最も多いCYP3A4ではCB149代謝物が全く生成されなかった。また、CYP2B6による4,5-diOH体の生成も見られなかった。これらの点について、その理由は現在不明である。Fig. 4に、ヒト肝におけるCB149の推定代謝経路を示した。

15名のヒト肝ドナーのうち、高いCB149代謝活性を示した男性3名(HG64, HH74, HH741)について、提供者者の情報を調べたところ、HG64は、死因が頭蓋内出血で、生前にwarfarinを使用していたこと、HH74とHH741は高血圧症で、生前にアンジオテンシンII受容体拮抗薬cozaarおよび抗うつ薬prozacを使用していたことがわかった。さらに、この3名の肝MsのCYP2B6活性が、他より2~13倍高いことも明らかになった。これらの事実から、服薬により誘導されたCYP2B6が、CB149代謝を促進したものと考えられる。

我々は、これまでに*meta-para*位に隣接する

水素を持つ2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl(CB101)について、ラット、ハムスターおよびモルモット肝Msによる代謝を報告している²⁹⁾。その結果、いずれの動物でもCB101の主代謝物は3'-OH体であり、PB前処理により顕著に増加すること、また3'-OH体の生成活性がラット>ハムスター>モルモットの順である点は、本研究のCB149代謝とよく共通していた。一方、CB101代謝において、4'-OH体の生成活性がすべての動物の未処理肝Msで見られること、また、MC前処理で数倍に増加する点は、CB149代謝と全く異なった。さらに、PB前処理Msで生成された代謝物の総量を比較すると、CB101より置換塩素数が1つ多いCB149の方が、ラットでは7倍、ハムスターでは6倍、モルモットでは2倍といずれの動物でも代謝されやすいことが判明した。この理由は現在のところ不明であるが、両PCBの化学構造をみると、CB101は2,5-二塩素置換の*di-ortho*型PCBであるのに対し、CB149は2,3,6-三塩素置換の*tri-ortho*型PCBで、*ortho*位への塩素置換が1つ多い。結果として、CB149における2位の塩素置換がビフェニル環の安定化をもたらし、CYP2B酵素による*meta-para*位の水酸化が促進されたのかもしれない。

総 括

1. ラット、ハムスターおよびモルモット肝MsによるCB149の代謝を調べたところ、すべての動物において、主代謝物は5-OH-CB149であること、次いで4,5-diOH-CB149および

4-OH-CB149 が生成されること、PB 前処理によりこれら 3 種類の代謝物の生成が顕著に促進されること、さらに、それらの生成活性の強さは、ラット ≧ ハムスター ≧ モルモットの順であることが明らかになった。MC 前処理では、いずれの動物肝 Ms でも 5-OH-CB149 の生成は減少したが、ハムスター肝 Ms では、4-OH-CB149 が新たに増加した。

2. 5-OH-CB149 および 4-OH-CB149 を基質として用い、ラット肝 Ms による 4,5-diOH-CB149 の生成を調べた。その結果、基質特異性は、5-OH 体 (2,236 pmol/min/mg protein) > 4-OH 体 (1,125 pmol) > CB149 (452 pmol) の順であった。
3. ヒト肝 Ms (男性 9 名, 女性 6 名) につき、個人別に CB149 代謝を比較したところ、いずれもよく似た代謝パターンを示した。主代謝物として 5-OH-CB149 が生成され、次いで 4,5-diOH-CB149 と 4-OH-CB149 の生成が続いた。また、総代謝物量において、5.9 倍の個人差があったが、各代謝物の生成活性において性差は認められなかった。
4. 前述のヒト肝 Ms につき、CB149 代謝物の生成活性と CYP 分子種に特徴的な酵素活性との相関を調べたところ、5-OH 体および 4,5-diOH 体の生成活性は、CYP2B6 および CYP3A4 の両活性と有意に正の相関を示した。また、4-OH 体の生成活性は、CYP2A6 活性と有意に正の相関を示した。
5. 12 種類のヒト CYP 分子種による CB149 代謝を検討したところ、CYP2B6 は 5-OH-CB149 の高い生成活性を、また、CYP2A6 は 4-OH-CB149 の生成活性を有していた。なお、CYP3A4 を含め、その他の CYP は全く代謝活性を示さなかった。

以上の結果から、CB149 代謝において、ヒトを含むいずれの動物でも、PB 誘導性の CYP2B 酵素が最も重要な代謝酵素であることが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業, 21KA2003 太田千穂) および JSPS 科研費 (JP20K12188 原口

浩一, JP21K12262 藤井由希子) の助成を受けたものです。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J and Nostrum RJ : 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.
- 3) Fångström 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.
- 4) Todaka T, Hori T, Yasutake D, Yoshitomi H, Hirakawa H, Onozuka D, Kajiwara 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.
- 5) 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.
- 6) 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル (CB182) のラット, モルモットおよびヒト肝マイクロゾームによる代謝. *福岡医誌.* 108 : 51-57, 2017.
- 7) 太田千穂, 山本健太, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル (CB188) のラットおよびモルモット肝マイクロゾームによる代謝. *福岡医誌.* 110 : 83-90, 2019.
- 8) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 古賀信幸 : 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル (PCB155) のラット, モルモットおよびヒト肝マイクロゾーム, およびヒトチトクロム P450 による代謝. *福岡医誌.* 112 : 127-135, 2021.
- 9) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 : 高分解能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による全 PCB 異性体の分析. *福岡医誌.* 90 : 192-201, 1999.
- 10) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人 : 油症

- 患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析. 福岡医誌. 90 : 202-209, 1999.
- 11) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R and Masuda Y : Tissue distribution of methylsulfonyl metabolites derived from 2,4,5,2',5'-pentachlorobiphenyl and 2,4,5,2',3',6'-hexachlorobiphenyl in rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 37 : 135-142, 1999.
 - 12) Haraguchi K, Koga N and Kato Y : Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters and guinea pigs. *Drug Metab Dispos.* 33 : 373-380, 2005.
 - 13) 古賀信幸, 太田千穂 : 高残留性 PCB の代謝と代謝物の毒性. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編 : 油症研究Ⅱ—治療と研究の最新線—. pp. 200-218, 九州大学出版会, 2010.
 - 14) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H : Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica.* 24 : 775-783, 1994.
 - 15) 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 : 1895-1904, 1998.
 - 16) Koga N, Kikuichi-Nishimura N, Hara T, Harada N, Ishii Y, Yamada H, Oguri K and Yoshimura H : Purification and characterization of a newly identified isoform of cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. *Arch Biochem Biophys.* 312 : 464-470, 1995.
 - 17) Koga N, Kanamaru T, Kikuichi N, Oishi N, Kato S and Yoshimura H : Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Bull Environ Contam Toxicol.* 60 : 898-903, 1998.
 - 18) Ariyoshi N, Oguri K, Koga N, Yoshimura H and Funae Y : Metabolism of highly persistent PCB congener, 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by human CYP2B6. *Biochem Biophys Res Commun.* 212 : 455-460, 1995.
 - 19) Nagayoshi H, Kakimoto K, Konishi Y, Kajimura K and Nakano T : Determination of the human cytochrome P450 monooxygenase catalyzing the enantioselective oxidation of 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB95) and 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (PCB183). *Environ Sci Pollut Res Int.* 25 : 16420-16426, 2018.
 - 20) Uwimana E, Ruiz P, Li X and Lehmler H-J : Human CYP2A6, CYP2B6 and CYP2E1 atropselectively metabolize polychlorinated biphenyls to hydroxylated metabolites. *Environ Sci Technol.* 53 : 2114-2123, 2019.
 - 21) 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.
 - 22) McGraw SrJE and Waller DP : Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). *Biochem Biophys Res Commun.* 344 : 129-133, 2006.
 - 23) Shimada T, Kakimoto K, Takenaka S, Koga N, Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, Kim D, Guengerich FP and Komori M : Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Drug Metab Dispos.* 44 : 1899-1909, 2016.
 - 24) Cadogan JIG : A convenient new method of aromatic arylation. *J Chem Soc.* : 4257-4258, 1962.
 - 25) Hutzinger O, Safe S and Zitko V : Polychlorinated biphenyls : Synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull Environ Contamin Toxicol.* 6 : 209-219, 1971.
 - 26) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 : 265-275, 1951.
 - 27) 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.
 - 28) Rendic S and Guengerich FP : Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem Res Toxicol.* 28 : 38-42, 2015.
 - 29) 太田千穂, 姿岡樹子, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸 : 2,2',4,5,5'-五塩素化ビフェニル (CB101) のラット, ハムスターおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌. 98 : 236-244, 2007.

(Received for publication March 13, 2023)