

2CサブファミリーP450を介したPCBの毒性作用発現に関する研究

有吉, 範高
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

伊藤, 正一
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

奥平, 章子
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

三瀬, 雅史
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/7318919>

出版情報：福岡医学雑誌. 86 (5), pp.153-162, 1995-05-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



2CサブファミリーP450を介したPCBの 毒性作用発現に関する研究

九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室

有吉 範高・伊藤 正一・奥平 章子・三瀬 雅史

松末 公彦・山田 英之・小栗 一太

Studies on PCB Toxicity Involving 2C Subfamily Cytochrome P450

Noritaka ARIYOSHI, Shouichi ITO, Akiko OKUDAIRA, Masashi MISE,
Kimihiko MATSUSUE, Hideyuki YAMADA and Kazuta OGURI

*Department of Hygienic and Forensic Chemistry, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62, Fukuoka 812-82*

It has been demonstrated that PCB metabolism is mainly catalyzed by 1A and 2B subfamily cytochrome P450s, CYP 1A1/2 and CYP 2B1/2. These studies were conducted mostly with hepatic enzymes in rodents. The 1A and 2B subfamily P 450 s are constitutively expressed little, but markedly induced by xenobiotics such as 3-methylcholanthrene and phenobarbital in rodents. On the other hand, the recent studies showed that cytochrome P450s in human liver are remarkably different from isoform of rodents in constitution and enzyme activities.

In the present study, we first tried to metabolize some PCBs with 2C subfamily cytochrome P450 (CYP 2C) purified from dog liver microsomes. The data suggested that CYP 2C may not be involved in PCB metabolism. Since CYP 2C is the same most abundant enzyme as 3A subfamily P450 in human liver and plays a major role for metabolism of many drugs used clinically, and may also play an important role for metabolism of some steroid hormones, we further studied the inhibition of CYP2C-catalyzed steroid metabolism by typical PCB congeners. CYP 2C-mediated steroid metabolism is greatly inhibited by 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl, but not by 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl. On the contrary, 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl markedly suppressed CYP 2C expression in the dog liver. These results suggest that residual PCBs may affect the current situation of steroid hormones in Yusho patients, and may cause PCB-drug interactions.

緒 言

これまでPCBの代謝研究は主に1Aおよび2BサブファミリーのP450を用いて行われており、それらはほとんどラットなど齧歯類の肝臓より精製されたP450分子種が用いられている¹⁾⁶⁾¹⁹⁾²¹⁾²³⁾²⁴⁾。これら1Aおよび2BサブファミリーのP450はラットにおいては構成的にはほとんど発現していないか、発現していても肝臓の総P450量のわずかな数%を占める程度のマイナーな分子種であり、ある種の化合物の投与によって著しく誘導されるいわゆる薬物代謝型の酵素である⁶⁾⁷⁾⁸⁾。すなわち生体が最初にPCB類に暴露された場

合、それらの代謝に関与する分子種とは考え難い。一方、最近のヒトP450の研究の進展によりヒト肝に存在するP450は分子種組成や触媒活性において、齧歯類とはかなり異なる可能性が示唆されている²²⁾³²⁾³⁹⁾⁵¹⁾。たとえばbenzo(a)pyreneやdimethylbenzo(a)anthraceneの代謝活性化に関わるP450はラットではCYP1A1であるがヒトでは同じ反応をCYP3A4が触媒する⁴¹⁾。代謝活性については、種が異なると別の分子種が触媒するのに対し、酵素誘導剤に対する応答分子種は類似しているため、齧歯類のデータをヒトに外挿するのは困難である。仮にphenobarbital処理によって、ラットとヒトにおいて2B subfamilyのP450

が誘導されるとしても、*in vivo* において同じ代謝活性の亢進が見られるとは限らない。ヒト肝 P 450 は人種差や個体差が大きいものの構成的には 3 A²⁰⁾³⁸⁾、および 2 C⁴⁰⁾サブファミリーの P 450 が主要な分子種であり、これら酵素が臨床応用されている多くの薬物の代謝に関与していることが明らかになりつつある⁵⁾⁹⁾¹¹⁾¹⁴⁾²⁷⁾³⁷⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁷⁾。

2 C サブファミリー P 450 (以下 CYP 2 C) はまた、ステロイドホルモンの代謝に重要な役割を担っていることが知られている³⁾²⁸⁾³¹⁾⁴⁵⁾。油症患者において報告されているホルモン代謝異常の原因の一部は PCB により誘導された 1 A および 2 A サブファミリー P 450 のステロイド代謝活性によると考えられている²⁸⁾⁵⁰⁾が、構成的にステロイド代謝に関与している可能性のある CYP 2 C の発現抑制または PCB 代謝に動員されることによる正常なステロイド代謝活性の減少、さらに PCB の直接作用によるステロイド代謝活性の阻害という機序も否定できない。

以上の背景から今回、CYP 2 C の PCB 代謝能力、PCB による CYP 2 C の発現およびステロイド代謝活性への影響に関する検討を行った。CYP 2 C は齧歯類より大型の哺乳類として、また薬物の動態、毒性試験に汎用されているイヌより精製し、実験に供した。以下その結果について述べる。

実験方法

1. 実験材料

2, 4, 5, 2', 4', 5'-Hexachlorobiphenyl (HCB) および 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) は当教室で合成したものを用い、2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) および 3, 4, 3', 4'-TCB は中村学園大学の古賀信幸博士より供与されたものを用いた。2 α -および 16 β -hydroxytestosterone は塩野義製薬中野正行博士より供与された。Progesterone および estradiol-17 β 代謝物は STERALOIDS 社より購入した。7-Ethoxycoumarin, glucose-6-phosphate dehydrogenase は Sigma 社製のものを購入し、NADP は協和発酵(株)より、glucose-6-phosphate はオリエンタル酵母工業(株)より得たものを使用した。Sephacel 4 B, DEAE-Sephacel, CM-Sephadex C-50, 2', 5'-ADP-Sephacel, Protein A Sepharose ゲルは Pharmacia Fine Chemical 社より、Biogel HTP は Bio-Rad 社より、また DEAE-5 PW は東ソー(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。

2. 実験動物

Hazelton Research Animals, Inc の雌性 Beagle 犬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)で飼育後、8 カ月齢で phenobarbital を経口投与⁸⁾して、最終投与後 24 hr で屠殺し肝臓を得た。肝臓は適当な大きさに切断し、生理食塩水にて灌流後、凍結して使用まで -80°C に保存した。また、PenCB 処理はコーンオイルに溶解した PenCB をゼラチンカプセルに充填し、1 日目と 3 日目に計 0.1 mg/kg となるように経口投与した。Charles River Japan, Inc の Wistar 系雄性ラットは九動(株)より購入し、常法にしたがって phenobarbital 投与後、屠殺して肝臓を得た。肝臓は同様に使用まで -80°C に保存した。

3. 酵素の精製

イヌ凍結肝臓より常法にしたがいミクロソームを調製し、コール酸で可溶化後 ω -aminooctyl-Sepharose 4 B, hydroxylapatite, DEAE-5 PW の各カラムクロマトグラフィーを用い、ラット CYP 2 C 11 抗体に対する交差反応性を指標に精製を行った。また、cytochrome b₅は ω -aminooctyl-Sepharose 4B, hydroxylapatite, DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 の各カラムで精製した。NADPH-cytochrome P 450 reductase は phenobarbital 処理ラット肝臓より、Yasukochi & Masters の方法⁴⁹⁾を改良して精製した。

4. 抗体の調製および Western blotting

先に報告した方法²⁾にしたがって行った。ただし、調製した抗血清は既報³³⁾にあるように、2 B subfamily の P 450 も認識したため、当教室で別に精製した 2 B subfamily の P 450 である P 450_{GP-1} を用いて免疫沈降を行い、2 C subfamily P 450 に対する特異性を上げた後に使用した。

5. N 末端アミノ酸配列の分析

Applied Biosystems 社 473 A 自動プロテインシーケンサーを用いて分析した。

6. ガスクロマトグラフィー (GLC)

装置は電子捕獲型イオン化検出器 (ECD) 付き島津 GC-3 BE 型ガスクロマトグラフに 3 mm×2.1 m のガラスカラムを取付けたもの、あるいは ECD 付き日立 263-70 型ガスクロマトグラフに 3 mm×1.5 m のガラスカラムを取付けたものを用いた。カラム充填剤は 1.5% OV-17 をコートした Chromosorb W (AW-DMCS) を使用した。キャリアーガスには N₂ を用いた。

7. 再構成実験

反応溶液は全量 1 ml 中に P 450 0.1 nmol,

NADPH - cytochrome P 450 reductase 0.5 unit, dilauroylphosphatidylcholine 15 μ g, potassium phosphate buffer (pH 7.4), bovine serum albumin 0.8 mg, PCB congener 40 μ M, NADPH generating system (NADP 0.5 mM, glucose-6-phosphate 8 mM, $MgCl_2$ 6 mM, glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.1 unit), これに必要な場合は cytochrome b_5 を P 450 と同モル添加した. 37°C 3 min のブレインキュベーションの後, 反応は NADPH 生成系の添加により開始し, 10 min インキュベーションした. 反応停止および抽出は既報⁹⁾にしたがって行った. また, 精製 P 450 活性の positive control として benzphetamine および aminopyrine の *N*-脱メチル化活性²⁹⁾, 7-ethoxycoumarin の *O*-脱エチル化活性¹⁰⁾, aniline の *p*-水酸化活性¹³⁾ を測定した. また, steroid 水酸化, 酸化活性は HPLC を用いて測定した.

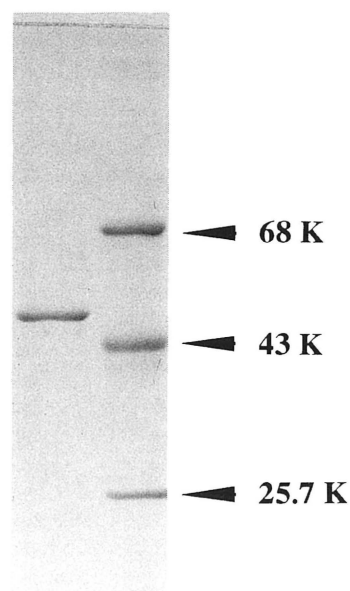
実験結果

1. CYP2C の精製

イヌ肝臓ミクロソームからの精製過程を Table 1 に要約する. 最終精製標品は電気泳動的に単一であり, 分子量は約 48.5 K と見積られた(Figure 1). 精製したタンパク質が確かに 2 C subfamily に属する P 450 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, 本 P 450 はすでに Komori らが未処理雄ビーグル犬より精製した P 450-D 1²⁶⁾ および Shiraga らが phenobarbital 処理雄ビーグル犬より精製した DPB-2⁴²⁾ と *N* 末端アミノ酸配列が完全に一致することを確認した. 著者らは P 450_{DL-3} と命名したが, これは CYP 2 C 21 と呼ばれる分子種に相当する P 450 と考えられた.

Table 2 には精製したイヌの CYP 2 C とヒトの CYP 2 C の *N* 末端アミノ酸配列を比較した結果を示

す. ヒトの CYP 2 C には幾つかの分子種の存在が知られている³⁰⁾ が, 今回使用するイヌの分子種と比較したところ, アミノ酸レベルで約 70 % の高い相同性が認められた²⁶⁾. 以上のことから今回著者らが精製した分子種を用いることによってヒト CYP 2 C において同様の検討を行った場合の予測がある程度可能であるもの



2C std

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified P450_{DL-3} (CYP2C21). Loaded amount of purified enzyme (2C) was 1.4 μ g, and molecular weight marker proteins (std) used were bovine serum albumin, ovalbumin and chymotrypsinogen A.

Table 1 Purification of CYP2C from dog liver microsomes

Step	Total protein (mg)	Total content (nmol)	Specific content (nmol/mg protein)	Yield (%)
Microsomes	4272	3288	0.77	100
Solubilized microsomes	3963	3300	0.83	100
Octylamino-Sepharose	344	1878	5.46	57
Hydroxylapatite	34	345	10.05	10
DEAE-5PW	2.6	40	15.00	1.2

Table 2 Comparison of NH_2 -terminal amino acid sequence of P-450_{DL-3} with human 2 C sub-family P450_s

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
P450 _{DL-3}	Met	Asp	Leu	Phe	Ile	Val	Leu	Val	Ile	X	Leu	Ser	X	Leu	Ile	X	Phe	Phe	Leu	Trp	Asn	Gln	X
CYP 2 C 8	Met	Gln	Pro	Phe	Val	Val	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Ser	Phe	Met	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Trp	Arg	Gln	Ser
CYP 2 C 9	Met	Asp	Ser	Leu	Val	Val	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Arg	Gln	Ser	
CYP 2 C 18	Met	Val	Pro	Ala	Val	Ala	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Ser	Cys	Leu	Phe	Leu	Ile	Ser	Leu	Trp	Arg	Gln	Ser
CYP 2 C 19	Met	Asp	Pro	Phe	Val	Val	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Trp	Arg	Gln	Ser	

The same amino acids residue are shown in boxes.

Table 3 Metabolic activities of purified P450_{DL-3} in reconstituted system

Substrate	reaction	product formed (nmol/min/nmol P-450)	
		-b _s	+b _s
Benzphetamine	<i>N</i> -demethylation	18.0	13.1 (73)
Aminopyrine	<i>N</i> -demethylation	21.5	12.5 (58)
7-Ethoxycoumarin	<i>O</i> -deethylation	1.4	1.1 (78)
Aniline	<i>p</i> -hydroxylation	6.1	4.1 (68)
Testosterone	2 α -hydroxylation	N. D.	N. D.
	16 α -hydroxylation	19.8	—
	17-oxidation	17.3	—
Progesterone	2 α -hydroxylation	N. D.	N. D.
	16 α -hydroxylation	13.8	7.8 (57)
Estradiol-17 β	2-hydroxylation	5.0	2.6 (52)
	16 α -hydroxylation	2.3	0.7 (30)

Figures in parentheses are the % of values in the absence of b_s.

N.D., not detected —, not determined

Table 4 PCB metabolism with purified P450_{DL-3} in reconstituted system

Substrate	IUPAC PCB No.	product formed (nmol/min/nmol P-450)	
		-b _s	+b _s
2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB	153	N. D.	N. D.
2, 5, 2', 5'-TCB	52	N. D.	—
3, 4, 3', 4'-TCB	77	N. D.	—

N. D., not detected —, not determined

と考えた。

2. P450_{DL-3} の代謝活性

精製した酵素が活性を持つものであることを確認するために、ラット肝より精製した NADPH-cytochrome P 450 reductase とイヌ肝より精製した cytochrome b_s の存在下、再構成系で異物代謝活性およびステロイド代謝活性を測定した。その結果を Table 3 に示す。その結果、本 P 450 は異物代謝活性も有するも

の、ステロイド代謝活性がきわめて高く、その活性はテストステロンに対し同様の regioselectivity をもつイヌの 2 B サブファミリー P 450 のそれぞれ 5.4 倍 (16 α -hydroxylation 活性)、18.6 倍 (17-oxidation 活性) であった。

3. 精製 CYP2C による PCB 代謝

つぎに精製 P 450_{DL-3} を用いた再構成系において PCB が代謝されるか否かを検討した。その結果を

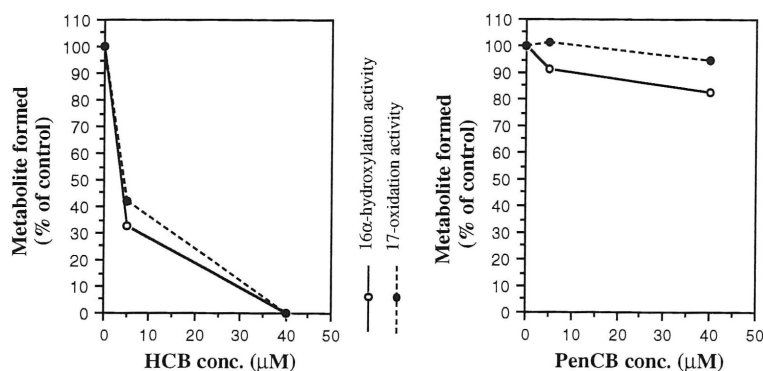


Fig. 2 Inhibition study of CYP2C-catalyzed testosterone metabolism by 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB (left panel) and 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB (right panel)

Table 4 に示す, PCB としては現在油症患者の体内に最も高濃度で検出される 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexachlorobiphenyl (HCB), 易代謝性 non-planar PCB の代表として 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) および coplanar PCB の原型である 3, 4, 3', 4'-TCB を選んで代謝実験を行った。その結果, 今回の分析条件においてはいずれの代謝物も検出されなかった。

4. CYP2C の代謝活性におよぼす PCB の直接作用

つぎに PCB が CYP 2 C の代謝活性にどのような影響をおよぼすかについての検討をテストステロンを基質として *in vitro* 系で検討した。PCB としては前述の 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB と最強の急性毒性を示す coplanar PCB として知られる 3, 4, 5, 3', 4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) を用い, 再構成系においてまずこれら congener と CYP 2 C を 25°C, 30 分間インキュベートしたのち基質を添加して反応を開始した。その結果を figure 2 に示す。Figure に示す通り, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は濃度依存的に CYP 2 C の触媒するテストステロン代謝活性を阻害したのに対し, 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB は若干阻害の傾向を示したものの著しい効果はなかった。2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の CYP 2 C 代謝反応の阻害機構を推定するために, P 450_{DL-3} に本 PCB を添加して基質結合にともなうスペクトル変化が見られるか否かを検討した。その結果を figure 3 に示す。2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の添加により P 450_{DL-3} は 386 nm に山を, 422 nm に谷を有する典型的な Type I 型³⁵⁾の基質結合差スペクトルを与えたのに対し, 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB はいずれのタイプの基質差スペクトルも与えなかった(データ未記載)。以上のことから 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は CYP 2 C の基質結合部位に結合しうることが明らかとなった。

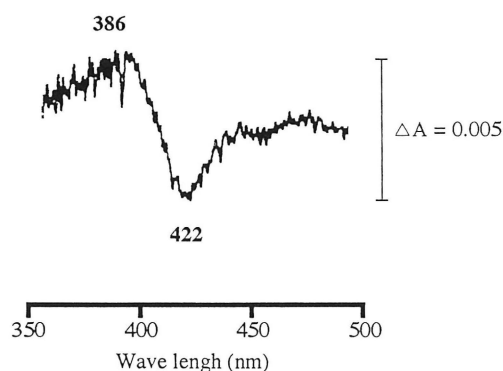


Fig. 3 Substrate difference spectrum of purified CYP2C21 induced by addition of 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB

The amount of enzyme and PCB used were 80 pmol and 1 nmol in a final volume of 220 μl, respectively.

5. CYP2C の発現レベルにおよぼす PCB の効果

常在性の P 450 分子種は, 薬物代謝酵素誘導剤処理時には一般にその発現に変動が認められる。そこで動物を PCB 処理した場合に CYP 2 C の発現にどのような影響がみられるか否かを検討した。検討に先立ち, イヌにおいて CYP2C の発現に性差が見られるか否かを調べた。CYP 2 C はラットでは性差の著しい分子種であるから, イヌでも同様の現象が認められる場合, 検討結果に普遍性が持てないと判断されたためである。なお本 P 450 含量の性差については現在まで明確にされていなかった²⁶⁾⁴²⁾。

未処理の雌雄イヌ肝臓における CYP 2 C の発現レベルは雄で 125 pmol/mg protein, 雌で 100 pmol/mg protein で大差がなく, また雄では未処理肝臓の P 450

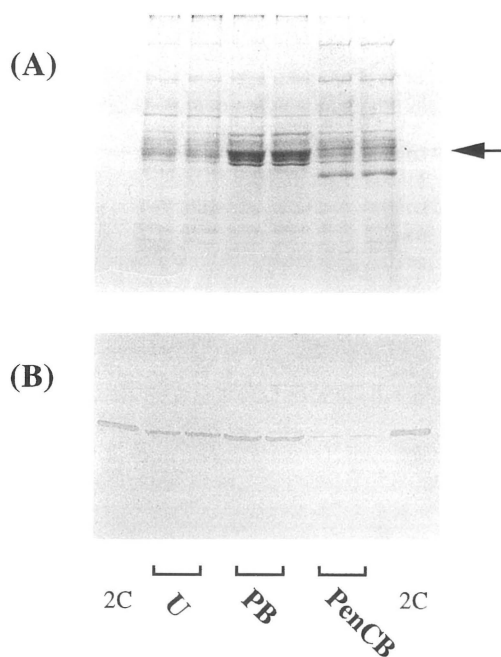


Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and Western blot (B) analysis of liver microsomes of untreated (lane U), phenobarbital-treated (lane PB) and 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB-treated dog (lane PenCB). Each microsomes was applied in the amount of 10 μ g. Lane 2C contained purified CYP2C21 (0.4 μ g). Arrow indicates the position of CYP2C21 protein.

総量の約 14% を占めていた。ただしこの検討では一匹ずつのイヌしか用いることができず、また CYP 2C の比含量は immunoblotting で測定したのに対し、総 P 450 含量は分光学的に求めたものであるもので多少のずれがあるものと推測される。

Figure 4 に未処理、phenobarbital (PB) 処理および PenCB 処理イヌ肝ミクロソームの電気泳動と immunoblotting の結果をならべて示す。今回 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 処理のイヌ肝臓を用意できなかったが、本 PCB が PB type の誘導剤であることが知られている³⁴⁾⁵⁰⁾ ため、PB 処理イヌ肝ミクロソームを用いて代用予測することとした。その結果 PB 処理では誘導の傾向が認められるのに対し PenCB 処理では著しい発現の抑制が認められた。Figure 4 の結果を数値化したデータを Table 5 に示す。Table に示す通り、CYP 2C は PB 処理で約 1.3 倍に増加していたのに対し、PenCB 処理では約 1/8 に低下していた。今回データに

Table 5 Comparison of 2C subfamily P450 content expressed in the liver of dog

Treatment	relative band intensity
untreated	1.00
phenobarbital	1.34
PenCB	0.13

Values represent the mean of two determinations

は示さないが CYP 2B 含量も PenCB 処理によって著しく減少していた。

考 察

イヌより精製した 2C subfamily P 450 は再構成系において今回用いたすべての PCB congener を代謝できなかったことから、本 P 450 は PCB の代謝にほとんど関与しないか、関与してもわずかであるものと考えられた。しかし、P 450 は分子種によっては再構成系で生体内での活性を再現できない場合が知られている¹²⁾¹⁵⁾。したがって、*in vivo* での関与を言及する場合、阻害剤を用いるか、抗体を用いて阻害実験を試みることが不可欠である。前者として sulphaphenazole が知られているが、この化合物はヒトの CYP 2C inhibitor として使用されるものであり、今回用いた P 450_{DL-3} の活性をどの程度選択的かつ強力に阻害するかは明らかになっていない。一方後者は阻害剤に比べはるかに選択性が高いが、実験方法 4 に記したように、今回得られた抗体は CYP 2C のみを選択的に認識するものではなかった。したがって今回は抗体による阻害の検討は行わなかった。今後、CYP 2C に特異性の高い抗体を調製し、再検討する余地があるものと思われる。その理由となった事実、少なくとも今回用いた PCB congener のうち、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は CYP 2C の基質結合部位に結合することが示された点である。ヒトの CYP 2C がステロイド代謝にどれほど寄与しているかは現時点では明確ではない。ヒトの場合 testosterone の主代謝物は 6 β -水酸化体であり、この反応を触媒するヒト P450 は 3A subfamily P 450 である²⁰⁾⁴⁶⁾ が、Kawano らは P 450 human - 2 (CYP2C9) に testosterone 16 β -水酸化活性と 17-酸化活性を見出している²⁰⁾。さらに Jurima らはヒト肝で CYP 2C で触媒される mephenytoin 水酸化活性が、検討したステロイド化合物の中ではとくに cortisone と ethynylestradiol によって強く阻害されることを

見出しており¹⁸⁾、これらのホルモン代謝にも関与している可能性は否定できない。今回 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB はテストステロンの 1/20 の濃度において、その水酸化活性を 60~70% 阻害した。したがって 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB が CYP 2C の基質結合部位を占有し、上記ステロイド代謝活性を阻害する可能性は無視できないと考えられる。また、同活性は最強毒性の PCB と考えられている 3, 4, 5, 3', 4'-PenCB ではほとんど影響されず、これまでに指摘されているように³⁰⁾ 毒性によっては non-planar PCB の毒性の方が高い例があることを強く示唆しているものとして興味深い。

一方、肝臓での CYP 2C 発現におよぼす影響を検討したところ、coplanar PCB は、その発現を顕著に抑制するものと考えられた。また、PenCB 処理肝臓ではみかけの分子量 35 K 付近に著しく誘導されているタンパク質が認められたので (Figure 4 参照)、その本体に興味を持たれる。今回 non-planar PCB でのデータは得られなかったが、phenobarbital 処理の結果から類推して、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 単独では CYP 2C 発現量は上昇傾向を示すものと考えられる。しかし、本 PCB の場合、発現量は増加しても代謝活性は阻害することから、暴露された量や他の要因との関連で毒性は複雑に変化してくるものと推測される。今回 PenCB で見られたような P 450 発現抑制の機序に関しては全く不明であるが、仮に Ah-receptor を介する応答であるとすれば、2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は coplanar PCB の毒性を相乗的に高めるとの報告もある⁴⁾¹⁷⁾²⁵⁾ ことから、coplanar PCB による CYP 2C の発現抑制を高める作用と、自らの代謝活性阻害作用が相俟って CYP 2C の触媒する反応を著しく阻害するものと推察される。結果に記したように PenCB は CYP 2B の発現も抑制していた。ヒトにおいて CYP 2B は構成的にマイナーな分子種であり、その発現量には個人差が大きいことが知られている。その生理的役割は現在のところ不明であるが齧歯類の CYP 2B のように異物代謝活性が強いとは考えられていない。

あらためて重要なことは、CYP 2C は現在臨床応用されている多くの薬物の代謝に関与している点である。すなわち抗不安薬、非ステロイド系抗炎症薬、経口抗糖尿病薬、抗癲癇薬、抗凝血薬などの代謝にヒト CYP 2C が関与することが明らかとなっており、本 P 450 で代謝される薬物はさらに増えるものと予想されている。前述したように 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は現在の油症患者体内に最も高濃度で検出される congener であることから、これら薬物と PCB の間に

CYP 2C を介した PCB-drug 相互作用が起こる危険性が考えられ、今後考慮すべき問題と思われる。

結 語

これまでに多数の PCB 毒性発現機構に関する研究があるが、その多くは TCDD や強毒性の coplanar-PCB を用いて生体の劇的な変化を追跡したものである。これらの成果から得られた機序は油症発症当時の毒性を考察する上では確かに有用なものと考えられるが、すでに四半世紀を経過した現在の患者の毒性に大きく寄与しているとは考え難い。こうした観点から著者らは残留性が高く現在の患者体内に最も高濃度に蓄積されている 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の体内消失に関する研究を行っている。しかし、本 congener は従来蓄積性は高いが毒性は低いと考えられており、軽視されがちであった。最近になって、PCB 毒性研究も様変わりをはじめており、細胞レベルから分子レベル、さらに遺伝子レベルでの研究も行われるようになっていく。当研究室でもすでに着手しているが、その場合は whole body での毒性に関与しているか否かが問題であり、分子レベルの変化だけにとらわれない検討が必要である。また、近年単一 congener での毒性研究が盛んであったが、混合物の毒性は、それぞれの congener が示す毒性の単なる総和では説明がつかない事実が報告されるようになっており、混合物の投与が見直されつつある。事実 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB は混合物として投与した場合、他の congener の毒性を相乗的に高めることなどから、今後毒性学的にも無視できない化合物と思われる。前述したように 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB の毒性作用についてはまだ未知であるが、今回見出された CYP 2C 酵素活性の抑制作用は 2, 4, 5, 2', 4', 5'-HCB 単独での毒性として明確に提示された最初の例であると考えられる。緒言に記したようにヒト肝臓での主要な P 450 分子種としては他には CYP 3A があり、また、含量は少ないが CYP 2D も重要な役割を担っていることから、これら分子種における検討は現在準備中である。極く最近になってヒト P 450 発現系が市販され初めたので、今後はこれらを用いた研究も予定している。

本研究にあたり、Beagle 犬の飼育、薬物処理、屠殺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)の関係諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ariyoshi N, Koga N, Oguri K and Yo-

shimura 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.

2) Ariyoshi N, Tanaka M, Ishii Y and Oguri K: Purification and characterization of dog liver microsomal epoxide hydrolase. *J. Biochem.* 115: 985-990, 1994.

3) Arlotto MP, Trant JM and Estabrook RW: Measurement of steroid hydroxylation reactions by high-performance liquid chromatography as indicator of P 450 identity and function, In Waterman MR and Johnson EF (ed): *Methods Enzymol.* 206 pp. 454-462. Academic Press, Inc San Diego, 1991.

4) Birgelen van APJM, Kolk van der J, Berg van den M and Brouwer A: Interactive effects of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on thyroid hormone, vitamin A, and vitamin K metabolism in the rat. *Chemosphere* 25: 1239-1244, 1992.

5) Chang TKH, Gonzalez FJ and Waxman DJ: Evaluation of triacetyloleandomycin, α -naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochrome P 450. *Arch. Biochem. Biophys.* 311: 437-442, 1994.

6) Christou MC, Wilson NM and Jefcoate CR: Expression and function of three cytochrome P 450 isozymes in rat extrahepatic tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 519-534, 1987.

7) Dannan GA, Guengerich FP, Kaminsky LS and Aust SD: Regulation of cytochrome P 450. *J. Biol. Chem.* 258: 1282-1288, 1983.

8) Duignan DB, Sipes IG, Leonard TB and Halpert JR: Purification and characterization of the dog hepatic cytochrome P 450 isozyme responsible for the metabolism of 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 290-303, 1987.

9) Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-Sparks M, Sullivan T, Kitareewan, S, Raucy JL, Kasker JM and Ghanayem BI: Evidence that CYP 2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 33: 1743-1752, 1994.

10) Greenlee WF and Poland A: An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C 57 BL/6 J and DBA/2 J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 596-605, 1978.

11) Guengerich FP: Characterization of human microsomal cytochrome P 450 enzymes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 241-264, 1989.

12) Halvorson M, Greenway D, Eberhart D, Fitzgerald K and Parkinson A: Reconstitution of testosterone oxidation by purified rat cytochrome P 450 p(3A1). *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 166-180, 1990.

13) Imai Y, Ito A and Sato R: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* 60: 417-428, 1966.

14) Imaoka S, Enomoto K, Oda Y, Asada A, Fujimori M, Shimada T, Fujita S, Guengerich FP and Funae Y: Lidocaine metabolism by human cytochrome P 450s purified from hepatic microsomes: comparison of those with rat hepatic cytochrome P450s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 1385-1391, 1990.

15) Imaoka S, Terano Y and Funae Y: Constitutive testosterone 6 β -hydroxylase in rat liver. *J. Biochem.* 104: 481-487, 1988.

16) Ishida C, Koga N, Hanioka N, Saeki HK and Yoshimura H: Metabolism in vitro of 3, 4, 3', 4'-and 2, 5, 2', 5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P 450. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 276-284, 1991.

17) Jongh de J, Wondergem F, Seinen W and Berg van den M: Toxicokinetic interaction in the liver of the C 57 BL/6 J mouse after administration of a single oral dose of a binary mixture of some PCBs. *Chemosphere* 25: 1165-1170, 1992.

18) Jurima M, Inaba T and Kalow W: Mephenytoin hydroxylase activity in human liver: inhibition by steroids. *Drug Metab. Dispos.* 13: 746-749, 1985.

19) Kaminsky LS, Kennedy MW, Adams SM and Guengerich FP: Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P 450. *Biochemistry* 20: 7379-7384, 1981.

20) Kawano S, Kamataki T, Yasumori T, Yamazoe Y and Kato R: Purification of human liver cytochrome P 450 catalyzing testosterone 6 β -hydroxylation. *J. Biochem.* 102: 493-501, 1987.

21) Kennedy MW, Carpentier NK, Dymerski PP and Laurence S: Metabolism of dichlorobiphenyls by hepatic microsomal cytochrome P 450. *Biochem. Pharmacol.* 30: 577-588, 1981.

22) Kitada M, Kato T, Ohmori S, Kamataki T, Itahashi K, Guengerich FP, Rikihisa T and Kanakubo Y: Immunochemical characterization and toxicological significance of P 450 HFLb purified from human fetal livers. *Biochim. Biophys. Acta* 1117: 301-305, 1992.

23) Koga N, Kikuchi-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 P 450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl in hamster liver. Arch. Biochem. Biophys. in press.

24) Koga N, Nishimura N, Kuroki H, Masuda Y and Yoshimura H: Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P 450 1A1. *Xenobiotica* 24: 775-783, 1994.

25) Kolk van der J, Birgelen van APJM, Poiger H and Schlatter C: Interactions of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a subchronic feeding study in the rat. *Chemosphere* 25: 2023-2027, 1992.

26) Komori M, Shimada H, Miura T and Kamataki T: Interspecies homology of liver microsomal cytochrome P 450. *Biochem. Pharmacol.* 38: 235-240, 1989.

27) Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ and Meyer UA: Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P 450 3 A 4. *Mol. Pharmacol.* 36: 89-96, 1989.

28) Nagata K, Matsunaga T, Buppodom P, Ishimatsu M, Yamato H, Yoshihara S and Yoshimura H: Unique induction of cytochrome P 450 isozymes in rat liver microsomes by treatment with 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and its effect on testosterone metabolism. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8: 948-957, 1985.

29) Nash T: Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421, 1953.

30) Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Fegerelaen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K and Nebert D: The P 450 super family: update on new sequences, gene mapping, accession number, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12: 1-51, 1993.

31) Oguri K, Yamada H and Yoshimura H: Regiochemistry of cytochrome P 450 isozymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 251-279, 1994.

32) Ohgiya N, Yokota H and Yuasa A: Purification and properties of cytochrome P 450 generally acting as a catalyst on benzo (a) pyrene hydroxylation from liver microsomes of untreated rats. *J. Biochem.* 105: 234-238, 1989.

33) Parkinson A and Gemzik B: Production and purification of antibodies against rat liver P 450 enzymes, In Waterman MR and Johnson EF (ed): *Methods Enzymol.* 206 pp. 233-245. Academic Press, Inc San Diego, 1991.

34) Parkinson A, Safe SH, Robertson LW, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM and Levin W: Immunochemical quantitation of cytochrome P 450 isozymes and epoxide hydrolase in liver mi-

croosomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. *J. Biol. Chem.* 258: 5967-5976, 1983.

35) Schenkman JB: Studies on the nature of the Type I and Type II spectral changes in liver microsomes. *Biochemistry* 9: 2081-2091, 1970.

36) Seegal RF, Bush B and Shain W: Neurotoxicology of ortho-substituted polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 23: 1941-1949, 1991.

37) Shah RR: Clinical pharmacokinetics: current requirements and future perspectives from a regulatory point of view. *Xenobiotica* 23: 1159-1193, 1993.

38) Shaw PM, Barnes TS, Cameron D, Engeset J, Melvin WT, Omar G, Petrie JC, Rush WR, Snyder CP, Whiting PH Wolf CR and Burke MD: Purification and characterization of an anticonvulsant-induced human cytochrome P 450 catalysing cyclosporin metabolism. *Biochem. J.* 263: 653-663, 1989.

39) Shimada T and Guengerich FP: Evidence for cytochrome P 450 NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 462-465, 1989.

40) Shimada T, Iwasaki M, Martin MV and Guengerich FP: Human liver microsomal cytochrome P 450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002. *Cancer Res.* 49: 3218-3228, 1989.

41) Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz L, Marnett L J and Guengerich FP: Role of individual human cytochrome P 450 enzymes in the bioactivation of benzo (a) pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo (a) pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 49: 6304-6312, 1989.

42) Shiraga T, Iwasaki K, Nozaki K, Tamura T, Yamazoe Y, Kato R and Takanaka A: Isolation and characterization of four cytochrome P 450 isozymes from untreated and phenobarbital-treated beagle dogs. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 22-28, 1994.

43) Srivastava PK, Yun CH, Beaune PH, Ged C and Guengerich FP: Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P 450 enzymes. *Mol. Pharmacol.* 40: 69-79, 1991.

44) Veronese ME, Mackenzie PI, Doecke CJ, McManis ME, Miners JO and Birkett DJ: Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P 450 2C9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 1112-1118, 1991.

45) Waxman DJ: Rat hepatic P 450 2 A and 2

C subfamily expression using catalytic, immunochemical, and molecular probes, In Waterman MR and Johnson EF (ed): *Methods Enzymol.* 206 pp. 249-267. Academic Press, Inc San Diego, 1991.

46) Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP and Lapenson DP: Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 β -hydroxylase cytochrome P 450 enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 424-436, 1988.

47) Wrighton SA and Stevens JC: The human hepatic cytochrome P 450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 1-21, 1992.

48) Yamazoe Y, Shimada M, Murayama N and Kato R: Suppression of levels of phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P 450 by pituitary hormone. *J. Biol. Chem.* 262: 7423-7428, 1987.

49) Yasukochi Y and Masters BSS: Some

properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P 450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 251: 5337-5344, 1976.

50) Yoshihara S, Nagata K, Wada I, Yoshimura H, Kuroki H and Masuda Y: A unique change of steroid metabolism in rat liver microsomes induced with highly toxic PCB and PCDF. *J. Pharmacobio. Dyn.* 5: 994-1004, 1982.

51) Yun CH, Shimada T and Guengerich FP: Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P 450 2 A 6. *Mol. Pharmacol.* 40: 679-685, 1991.

52) Yun CH, Shimada T and Guengerich FP: Roles of human liver cytochrome P 450 2 C and 3 A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 52: 1868-1874, 1992.

(受付 1995-3-13)