

2, 2', 4, 4'-Tetrachlorobiphenylの水酸化体およびメチルスルホン代謝物のラットにおける組織残留性

原口, 浩一
第一薬科大学物理分析学教室

増田, 義人
第一薬科大学物理分析学教室

加藤, 善久
静岡県立大学薬学部薬剤学教室

木村, 良平
静岡県立大学薬学部薬剤学教室

<https://doi.org/10.15017/7323434>

出版情報：福岡医学雑誌. 86 (5), pp.163-168, 1995-05-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



2, 2', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl の水酸化体およびメチルスルホン代謝物のラットにおける組織残留性

第一薬科大学物理分析学教室

原 口 浩 一・増 田 義 人

静岡県立大学薬学部薬剤学教室

加 藤 善 久・木 村 良 平

Tissue Retention of Hydroxy and Methylsulfonyl Metabolites of 2, 2', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl in Rats

Koichi HARAGUCHI and Yoshito MASUDA

Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815

Yoshihisa KATO and Ryohei KIMURA

School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Shizuoka 422

Abstract Previously, we have identified a large number of methylsulfonyl metabolites in tissues of mink treated with Clophen A50. Most of them were found to be derived from CBs with a 2, 5-dichlorophenyl or a 2, 3, 6-trichlorophenyl ring. It is further necessary to investigate if CBs with a 2, 4-dichlorophenyl ring could be biotransformed to the sulfur-containing metabolites in animals.

In the present study, 2, 2', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) was administered i.p. to rats, and liver, lung, kidney, adipose tissue and blood were analyzed for the unchanged CB and its metabolites. Both hydroxy and methylsulfonyl metabolites were detected in all tissues analyzed. Major metabolites were identified as 3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCB and 6-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCB. Total level of the four metabolites was estimated to be 1.5 µg/g wet weight in the liver, corresponding to similar level of the unchanged CB. The concentration ratios of 3-OH- to 5-OH-TCB and 5-MeSO₂- to 6-MeSO₂-TCB were about 2:3 and 2:1, respectively, in liver and kidney. These results indicate that CBs with a 2, 4-dichlorophenyl ring can provide both hydroxy and methylsulfonyl metabolites that are retainable in tissues of rats.

はじめに

ポリ塩化ビフェニル (PCB) の含硫代謝物の一つであるメチルスルホン体は体内残留性が高く、人間を含む多くの哺乳動物の組織から検出、定量されている³⁾⁹⁾。PCB 汚染の深刻なバルト海のアザラシの場合、約 30 種の PCB-メチルスルホン体が残留 PCB の約 1/20 の濃度で脂肪組織に残留している¹⁰⁾ ほか、肝臓や肺組織には特定の構造を有するメチルスルホンが PCB とほぼ同レベルで選択的に蓄積していることが明らかになっている¹¹⁾。最近、当教室で PCB 混合物 (Clophen A 50) をミンクに投与したあとの組織内残

留成分を分析したところ、野生動物中の組成と類似したメチルスルホン代謝物を確認し、それらは 2, 5-dichlorophenyl または 2, 3, 6-trichlorophenyl 骨格を有する PCB に由来していることを明らかにした。また、2, 2', 4, 5, 5'-pentaCB をラットに投与すると、生体内で 3-および 4-MeSO₂ 体が生成し、組織中に蓄積する¹⁵⁾。そのうち 3-MeSO₂ 体は強力なフェノバルビタール型の肝ミクロゾーム薬物代謝酵素誘導作用を示し、また芳香族炭化水素水酸化酵素活性を投与量 0.5 µmol/kg で有意に上昇させることが分かった¹⁵⁾¹⁶⁾。こうして 2, 5-ジクロロフェニル基を有する PCB の酵素誘導作用には残留するメチルスルホン代謝物が深く関与して

いることが示唆された。

一方、4位に塩素置換したPCBは一般に代謝速度が遅く、そのような異性体から含硫代謝物の生成、体内分布に関する報告は少ない。水谷¹⁶⁾は2, 2', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (2, 2', 4, 4'-TCB)のマウスにおける糞中代謝物として2種のメチルチオ体と2種のメチルスルホン体を同定し、メチルスルホン体のみを肝臓で検出している。またDarnerudら⁷⁾は3, 3', 4, 4'-TCBを投与した妊娠マウスの胎児にメチルスルホン体が残留するのを確認している。PCBの水酸化体については糞中代謝物として多くの報告¹⁷⁾があるものの、体内分布については十分に検討されていない。しかし最近、3, 4-dichlorophenyl基を有する異性体から生じる水酸化代謝物が血液に残留しやすいことがわかり、それらの残留構造と毒性との関連性が注目されている⁴⁾⁵⁾¹⁸⁾。

本研究では4位塩素置換を有する異性体の代謝研究の一環として、2, 2', 4, 4'-TCB投与ラットの体内残留成分の検索を行い、代謝物の組織残留性について検討した。

実験方法

1. 材料

動物はWistar系雄性ラット(体重約180g)を用い、屠殺前約18時間絶食させた。投与物質はパナセート810に溶解し、342 $\mu\text{mol/kg}$ を腹腔内に1回投与した。投与96時間後に肝臓、腎臓、肺、脂肪組織、血液を取りだし、分析試料とした。

2. 試薬

2, 2', 4, 4'-TCBはUllman反応¹³⁾により合成し、その構造は¹H-NMRおよびEI-GC-MSにより決定した。3-MeO-2, 2', 4, 4'-TCBは2, 4-dichloroanilineと2, 6-dichloroanisoleからCadogan coupling反応⁶⁾にて合成し、5-MeO-2, 2', 4, 4'-TCBは2, 4-dichloroanilineと2, 4-dichloroanisoleを用いて同反応により合成した。5-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCBの合成は既報⁹⁾に従い、6-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCBは2, 4-dichloroanilineと3, 5-dichlorothioanisoleのCadogan反応、つづいて酸化反応によって合成した。内標準物質は3-MeSO₂-4-Me-2', 3', 4', 5', 5'-pentaCBを用いた。溶媒は残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

3. 試料の精製

1) 抽出

既報¹⁾に準じて試料の精製を行った。肝臓、腎臓、肺

組織それぞれ約1gを内標準物質220 ngを含むアセトン：ヘキサン(1:1)混液30 mlに加え、ポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA)で2回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水、ろ過した。抽出液をヘキサン溶液とし、それに約30 mlのリン酸水溶液(0.1 M H₃PO₄, 0.9% NaCl)を加えて振り混ぜ、ヘキサン層を取りだし、濃縮して残渣(脂肪分)を秤量した。血液はその約1 mlを内標準物質を含む1 M KOH/エタノール(7:3)溶液4 mlに加え、50~60°Cで約1時間加温した。その後、6 M 塩酸1 mlで酸性としたあと、ヘキサン：tert-ブチルメチルエーテル(9:1)の混液5 mlで3回抽出した後、濃縮して脂肪分を秤量した。脂肪組織は肝臓などと同様にホモジナイザーで処理した後、濃縮し、そのまま脂肪量を測定した。

2) ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)

Bio Beads S-X 3 (200~400 mesh, バイオラッド)約50 gをヘキサン：ジクロロメタン(1:1)混液に加え、一晚膨潤させたものをカラム管(SR 25/45, ファルマシア)に充填し、送液ポンプ(LC-6 A, 島津)から流速4 ml/minで同溶媒を流した。各抽出物は同溶媒約1.5 mlに溶かした液を2 mlのループを取付けたサンプルインジェクタ(7725, レオダイン)でカラムに導入し、約140~180 mlの分画をフラクションコレクタ(FCV-100 B, SCL-6 A, 島津)で分取した。分画した液は濃縮後、ヘキサン溶液としGC/MSおよびGC/ECD分析の試料とした。

4. 定性、定量

1) ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)

代謝物の同定は日本電子JMS-AX 505質量分析計-JMA-DA 5000装置を用いて、EIモードで測定した。GCカラムにはDB-5 (30 m×0.25 mm 内径, J&W Scientific Inc)を用い、スプリットレスで70°C(2 min)から220°Cへ20°C/minで、つづいて280°Cへ3°C/minで昇温し、30分間一定に保った。メチルスルホン代謝物の定性は合成した代謝物のGC保持時間およびマススペクトルより行った。水酸化体についてはGPCによる溶出液をヘキサン溶液(約5 ml)とし、1 M KOH/エタノール(7:3)溶液2 mlで抽出した。分離した水層に6 M 塩酸1 mlを加えて酸性にし、ヘキサン：tert-ブチルメチルエーテル(9:1)10 mlで2回抽出した。この液を濃縮し、ジアゾメタンのエーテル溶液(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineとNaOH水溶液との反応により調製)を加え、1時間放置した後、GC/MSを測定し、スペクトルおよびGC保

持時間を合成したメトキシ体と比較した。

2) ガスクロマトグラフィー (GC/ECD)

主な代謝物の定量はGPCによる精製後にメチル化を行わずにGC/ECDで定量した。定量値は得られたクロマトグラムの代謝物の内標準物質に対するピーク面積比を求め、代謝物ピークと内標準ピークは同一量で同一面積であると仮定して計算した。

結 果

Fig. 1 に 2, 2', 4, 4'-TCB を投与して 4 日後の肝臓および肺組織の抽出物の GC/ECD を示す。未処理ラットには見られない I, II, III および IV のピークが両組織で確認された。GC/MS 分析 (Fig. 2) の結果, I および II のマススペクトルはそれぞれ質量数 306 の分子イオンを与え, 同位体存在比から 4 塩素化の水酸化体と推定された。両水酸化体の構造を確定するために,

抽出物をジアゾメタンでメチル化した誘導体を合成標準品と比較した。Table 1 に示すように, I, II の誘導体はともに M^+-15 (M^+-CH_3), M^+-43 (M^+-COCH_3) および M^+-113 ($M^+-COCH_2Cl_2$) などのフラグメントイオンを与えることからいずれも 3-MeO 体である¹⁴⁾と予想された。最終的に, 合成した標準品の GC 保持時間との比較によって, I は 3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, II は 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB に相当するピークであると推定した。一方, III, IV のマススペクトルは質量数 368 の分子イオンを与えるため, 4 塩素化のメチルスルホン体と推定した。III は M-35 のイオンが基準ピークとなる特徴的なフラグメントイオンを与えることから, メチルスルホンのオルト位置換体と推定された。こうして合成標品との比較により, III は 6-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCB, IV は 5-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCB と同定された。

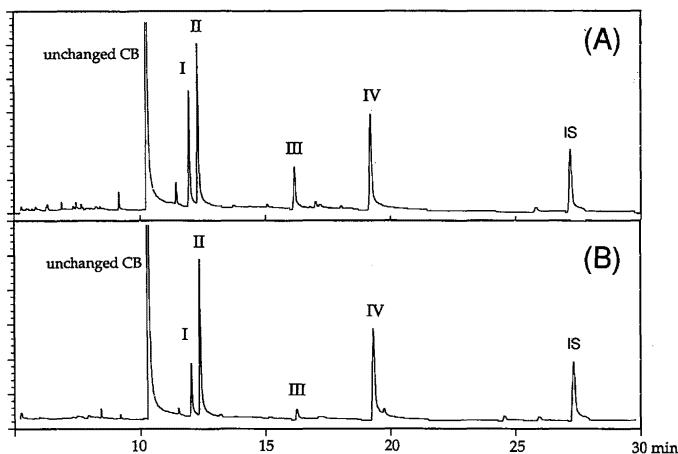


Fig. 1 ECD gas chromatograms of extracts from liver (A) and lung (B) of rats treated with 2, 2', 4, 4'-TCB.

Table 1 Identification of methylated derivative of hydroxy metabolites (I and II) in liver of rats dosed with 2, 2', 4, 4'-TCB.

	GC retention time (relative to IS)	m/e	Relative abundance (%)			
			M	M-15	M-43	M-113
I (methylated)	0.4499	320	78	20	22	10
II (methylated)	0.4772	320	80	15	25	32
3-MeO-2, 2', 4, 4'-TCB	0.4502	320	77	18	28	10
5-MeO-2, 2', 4, 4'-TCB	0.4775	320	80	12	33	35

IS: internal standard, 3-MeSO₂-4-Me-2',3',4',5,5'-pentaCB

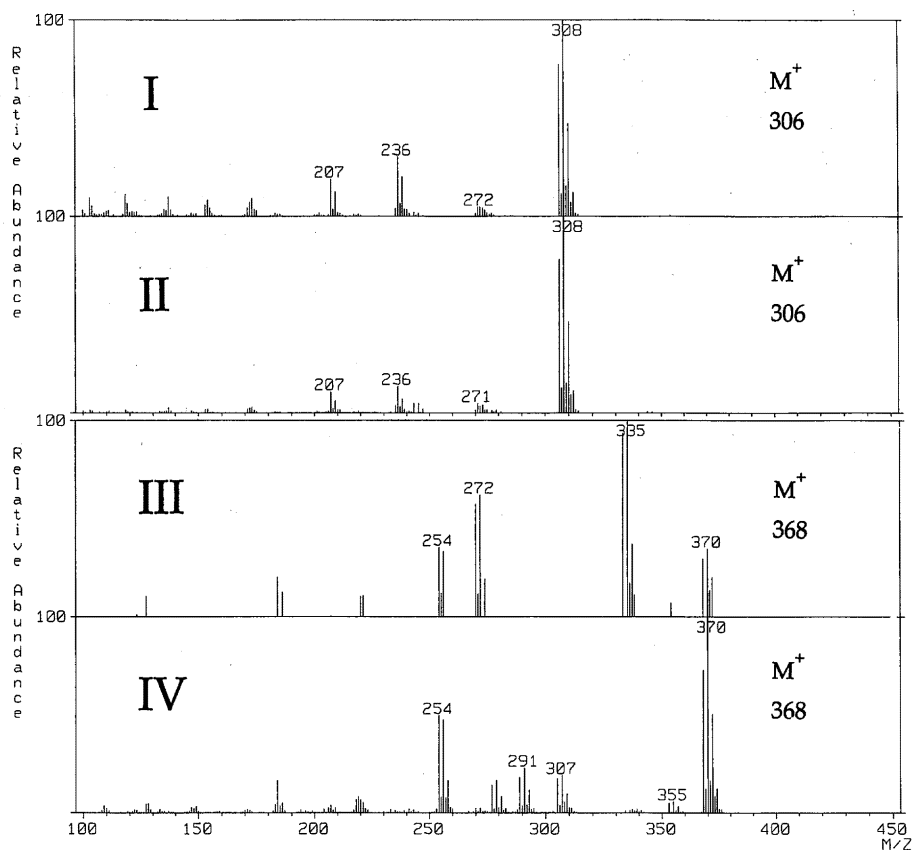


Fig. 2 EI mass spectra of metabolites I, II, III and IV in liver extract.

Table 2 Concentrations ($\mu\text{g/g}$ wet weight) of unchanged CB and its metabolites in tissues of rats treated with 2, 2', 4, 4'-TCB.

compounds	Liver	Lung	Kidney	Adipose
3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB	0.46 ± 0.11	0.12 ± 0.05	0.21 ± 0.09	ND
5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB	0.61 ± 0.23	0.44 ± 0.14	0.33 ± 0.16	ND
ratio (3-OH/5-OH)	0.75	0.27	0.64	—
6-MeSO ₂ -2, 2', 4, 4'-TCB	0.13 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.35 ± 0.13
5-MeSO ₂ -2, 2', 4, 4'-TCB	0.28 ± 0.09	0.37 ± 0.13	0.29 ± 0.10	1.08 ± 0.32
ratio (6-MeSO ₂ /5-MeSO ₂)	0.46	0.03	0.38	0.32
unchanged CB	1.34 ± 0.42	1.30 ± 0.36	1.00 ± 0.33	113 ± 41.7
total metabolites	1.48 ± 0.48	0.94 ± 0.33	0.94 ± 0.39	1.43 ± 0.45
ratio (unchanged CB/metabolites)	0.91	1.38	1.06	79.0

Values are means $\pm$ S. E. for four rats.

同定した4種の代謝物の各組織中の残留濃度をTable 2に示す。肝臓、腎臓および肺組織では水酸化体およびメチルスルホン体がほぼ同レベルで検出され、

代謝物の濃度の合計は未変化体の濃度とほぼ同じであった。一方、脂肪組織には未変化体が $113 \mu\text{g/g}$ の濃度で残留し、その約1/80に相当するメチルスルホン体が

残留した。しかし水酸化体は検出されなかった。血液中には未変化体と同レベルの水酸化体 ($0.08 \mu\text{g/ml}$) およびメチルスルホン体 ($0.06 \mu\text{g/ml}$) が検出されたが、組織中の濃度に比べるとかなり低いことが分かった。代謝物の濃度を異性体別にみると、肝臓および腎臓で 3-OH-と 5-OH-TCB の残留比は約 2:3、一方 5-MeSO₂-と 6-MeSO₂-TCB の残留比は約 2:1 であった。肺組織では 3-OH 体、および 6-MeSO₂ 体の濃度がかなり低かった。

考 察

ノンコプラナー PCB である 2, 5-ジクロロフェニル基を有する PCB 異性体は体内でメチルスルホン体として体内に残留し、多くの野生動物体内からも検出されている。しかし、4 位に塩素置換した PCB から含硫代謝物の生成の有無、体内分布については十分検討されていない。本研究では 2, 4-ジクロロフェニル基を有する PCB がどのような代謝物を与えるかを検索し、その組織内残留性を検討した。その結果、2, 2', 4, 4'-TCB をラットに投与すると水酸化体およびメチルスルホン体の両代謝物が組織から高濃度で検出された。その残留濃度は 2, 3', 4', 5-TCB 投与によって生ずるメチルスルホン代謝物と比較すると、1/5~1/10 の濃度(未発表)であるが、4-位塩素置換の PCB の与える代謝物としては予想以上に高い残留濃度であるように思われる。水谷¹⁹⁾ は 2, 2', 4, 4'-TCB をマウスに投与したとき肝臓にメチルスルホンが残留し、その濃度は未変化体の約 1/80 であると報告しているが、今回のラットによる実験では未変化体の約 1/3 に相当するメチルスルホンの肝臓内分布が認められた。

一方、水酸化体の体内残留性については十分検討されていない。最近の 2, 3', 4', 5-TCB のラット体内動態研究(未発表)では、水酸化代謝物の組織残留性は低い。しかし、本研究で 2, 4-ジクロロフェニル基を有する PCB から代謝される水酸化体はメチルスルホン体と同程度の残留性を有することが明らかとなった。吉村ら²¹⁾²²⁾ はカネクロール 400 の成分の 1 つである 2, 3', 4, 4'-TCB をラットに投与し、フン中代謝物として 3-OH-2, 3', 4, 4'-TCB および 5-OH-2, 3', 4, 4'-TCB を同定している。本研究で検出された水酸化体の構造も同じ置換体であることから、2, 4-ジクロロ置換タイプの PCB はラット体内で共通の代謝過程を経て、分布することが予想される。

最近、Bergman ら²⁾ はアザラシやヒトの血液に PCB 水酸化体が選択的に蓄積していることを明らかに

にし、その構造上の特徴は 4-OH-3, 5-dichloro-または 3-OH-2, 4-dichloro-置換を有すると報告している。このような構造を有する水酸化体は血液中のチロキシン結合タンパク質との相互作用によって毒性を生じることが指摘されている⁴⁵⁾。本実験で同定した 3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB もそのような構造上の特徴を有するが、血液中への選択的な取り込みは見られなかった。しかし、血液中の代謝物は未変化体と同レベルで検出された。

われわれは 2, 5-ジクロロ置換タイプの PCB の与える代謝物のうち、3-MeSO₂ 体はフェノバルビタール型の強力な酵素誘導能を有し、このタイプの PCB の酵素誘導作用に 3-MeSO₂ 体が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。水酸化体については、2, 3', 4, 4'-TCB の代謝物である 5-OH-2, 3', 4, 4'-TCB の急性毒性は母化合物よりもはるかに強いことが山本ら²²⁾ によって報告されている。2, 2', 4, 4'-TCB は PCB 製品中の主成分ではない²⁰⁾ が、水酸化体およびメチルスルホン体が高濃度で組織に残留していることは、このタイプの PCB の毒性発現にこれらの代謝物が関与している可能性がある。

総 括

2, 2', 4, 4'-TCB をラットに腹腔内投与し、その代謝物の組織内分析を行った結果、2 種の水酸化体および 2 種のメチルスルホン体が肝臓、腎臓および肺組織から検出された。その代謝物の構造は GC/MS における合成標準品との比較の結果、3-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-OH-2, 2', 4, 4'-TCB, 5-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCB および 6-MeSO₂-2, 2', 4, 4'-TCB であると推定された。組織のうち肝臓、腎臓および肺では両代謝物が未変化体と同濃度で残留した。肝臓および腎臓では水酸化体は 3-OH:5-OH=2:3、またメチルスルホン体は 5-MeSO₂:6-MeSO₂=2:1 の残留比を示した。肺では 3-OH 体および 6-MeSO₂ 体の濃度は、かなり低かった。一方、脂肪組織中には未変化体濃度の約 1/80 に相当するメチルスルホン体が残留したが、水酸化体は検出されなかった。血液中でも両代謝物が未変化体と同濃度で検出された。本研究の結果、2, 4-ジクロロフェニル骨格を有する PCB の代謝物の組織残留性は高いことが明らかになった。

文 献

- 1) Bergman Å, Athanasiadou M, Bergek S, Haraguchi K, Jensen S and Klasson-Wehler E:

PCB and PCB methyl sulfones in mink treated with PCB and various PCB fractions. *Ambio* 21: 570-576, 1992.

2) Bergman Å, Klasson-Wehler E and Kuroki H: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102: 464-469, 1994.

3) Bergman Å, Norstrom RJ, Haraguchi K, Kuroki H and Beland P: PCB and DDE methyl sulfones in mammals from Canada and Sweden. *Environm. Toxicol. Chem.* 13: 121-128, 1994.

4) Brouwer A, Klasson-Wehler E, Bokdam M, Morse DC and Traag WA: Competitive inhibition of thyroxine binding to transthyretin by monohydroxy metabolites of 3, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chemosphere*, 20: 1257-1262, 1990.

5) Brouwer A, Lans MC, de Haan LHJ, Murk AJ and Morse DC: Formation and toxicological aspects of phenolic metabolites of polychlorobiphenyls (PCBs), and related compounds. *Organohalogen compounds* 20: 465-469, 1994.

6) Cadogan JIG: A convenient new method of aromatic arylation. *J. Chem. Soc.*, 4257-4258, 1962.

7) Darnerud PO, Brandt I, Klasson-Wehler E, Bergman Å, d'Argy R, Dencker L and Sperber GO: 3, 3', 4, 4'-Tetrachloro [¹⁴C] biphenyl in pregnant mice: enrichment of phenol and methyl sulphone metabolites in late gestational fetuses. *Xenobiotica* 16: 295-306, 1986.

8) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Synthesis of PCB methylsulfones: Some differences in mass and proton magnetic resonance spectroscopy, *Chemosphere* 16: 2299-2313, 1987.

9) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Occurrence and distribution of chlorinated aromatic methylsulfones and sulfoxides in biological samples. *Chemosphere*, 19: 487-492, 1989.

10) Haraguchi K, Athanasiadou M, Bergman Å, Hovander L and Jensen S: PCB and PCB methyl sulfones in selected groups of seals from Swedish waters. *Ambio*. 21: 546-549, 1992.

11) Haraguchi K, Bergman Å, Jakobsson E and Masuda Y: Negative ion chemical ionization mass spectrometry in the analysis of polychlorinated biphenyl methylsulphones. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 347: 441-449, 1993.

12) 原口浩一, 黒木広明, 斎藤秀美, 増田義人, Bergman Å: PCB中毒ミンクの体内に残留するメチルスルホン代謝物—その構造と由来について, 福岡医誌, 84, 243-247, 1993.

13) Hutzinger O, Safe S and Zitko V: Polychlorinated biphenyls: synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 209, 1971.

14) Jansson B and Sundstrom G: Mass spectrometry of the methyl ethers of isomeric hydroxybiphenyls -- potential metabolites of chlorobiphenyls. *Biomed. Mass Spectrom.* 1: 386-392, 1974.

15) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Masuda Y and Kimura R: Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats. *Chem.-Biol. Interact.* in press, 1995.

16) Kato Y, Haraguchi K, Kawashima M, Yamada S, Isogai M, Masuda Y and Kimura R: Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners. *Chem.-Biol. Interact.* in press, 1995.

17) Klasson-Wehler E, Bergman Å, Brandt I, Darnerud PO and Wachtmeister CA: 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl: excretion and tissue retention of hydroxylated metabolites in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 17: 441-448, 1989.

18) Klasson-Wehler E: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites. *Organohalogen compounds* 20: 437-440, 1994.

19) Mizutani T: Identification of sulfur-containing metabolites of 2, 4, 2', 4'-tetrachlorobiphenyl in mice. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 20: 219-226, 1978.

20) Schultz DE, Petrick G and Duincker JC: Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 852-859, 1989.

21) Yoshimura H, Yamamoto H and Saeki S: Metabolic studies on polychlorinated biphenyls. II. Metabolic fate of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl in rats. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 21: 2231-2236, 1973.

22) Yamamoto H and Yoshimura H: Metabolic studies on polychlorinated biphenyls. III. Complete structure and acute toxicity of the metabolites of 2, 4, 3', 4'-tetrachlorobiphenyl. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 21: 2237-2242, 1973.

(受付 1995-3-30)