

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

原口，浩一
第一薬科大学物理分析学教室

黒木，広明
第一薬科大学物理分析学教室

斎藤，秀美
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

他

<https://doi.org/10.15017/7332368>

出版情報：福岡医学雑誌. 84 (5), pp.243-247, 1993-05-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



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—

第一薬科大学物理分析学教室

原 口 浩 一・黒 木 広 明

斎 藤 秀 美・増 田 義 人

ストックホルム大学

Åke BERGMAN

PCB Methylsulfone Accumulated in Muscle
of Mink Dosed with PCB (Clophen A50)Koichi HARAGUCHI, Hiroaki KUROKI,
Hidemi SAITO and Yoshito MASUDA*Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka 815, Japan*

Åke BERGMAN

*Environmental Chemistry, Wallenberg Laboratory, Stockholm University,
S-106 91 Stockholm, Sweden*

Abstract The structural requirements of the parent PCBs for the formation of the retained PCB methylsulfones (MeSO₂-CBs) were investigated in mink (*Mustela vison*) exposed to PCB (Clophen A50). Muscle was analyzed for the MeSO₂-CBs, which were determined by comparison of synthesized reference compounds. Major unmetabolized CBs such as 2, 4, 5, 2', 4'-pentaCB, 2, 4, 5, 2', 3', 4'-hexaCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexaCB and 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-heptaCB were determined in high concentrations in the mink muscle. All these PCBs are substituted in the 2, 4, 5-positions of at least one of the phenyl rings. On the other hand, CBs with free meta/para-positions were readily metabolized. Thus, at least 25 MeSO₂-CBs were detected at concentration of 16 µg/g in extracted lipids from the muscle, corresponding to one tenth of PCB levels. Most of the methyl sulfone metabolites were 3- and 4-MeSO₂-CB isomers of PCBs known to be rapidly metabolized, e. g. 2, 4, 2', 5'-tetraCB, 2, 3, 6, 4'-tetraCB, 2, 5, 3', 4'-tetraCB, 2, 4, 5, 2', 5'-pentaCB, 2, 3, 4, 2', 5'-pentaCB, 2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB, 2, 3, 6, 2', 4', 5'-hexaCB and 2, 3, 6, 2', 3', 4'-hexaCB. 3-MeSO₂-2, 5, 2', 5'-tetraCB and 3-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 5'-pentaCB were also found to be retained in the muscle, but their isomeric 4-MeSO₂-CBs were not detected. Both the 3- and 4-MeSO₂-2, 5, 6, 2', 4', 5'-hexaCB isomers were identified in the muscle extracts while no MeSO₂-CB metabolite originating from 2, 3, 2', 4', 5'-pentaCB were detected in the muscle. These results show the PCBs with at least one phenyl ring with 2, 5-dichloro- and 2, 3, 6-trichloro-substitution are strongly favored and may be considered a criterion for the formation of MeSO₂-CBs accumulated in mink muscle. These observations are in accordance with MeSO₂-CBs detected also in other mammals.

は じ め に

油症の原因物質の一つとして知られる polychlorinated biphenyl (PCB) は世界的な環境汚染物質である。近年、北海やバルト海では哺乳動物の固体数の減

少が著しく、この主な原因は PCB 汚染によるとされている⁹⁾。1976 年、アザラシの脂肪組織から PCB の他に高濃度の PCB メチルスルホン (MeSO₂-CB) が検出されて以来¹²⁾、この含硫代謝物の残留性が注目されてきた。PCB の代謝様式は水酸化反応と含硫黄代謝反

応に大別されるが、メルカプツール酸経路¹⁾、腸肝循環によって生成する MeSO₂-CB は高い脂溶性を示し、ある特定の組織に選択的に取り込まれ、長期にわたって貯留することが知られている³⁾⁷⁾。以前、当教室では油症患者の組織から MeSO₂-CB を検出し、これが環境中にも広く分布していることを明らかにした¹⁰⁾。最近では、北欧のアザラシ、カワウソ、ミンク、カナダの北極グマの体内に、多数の MeSO₂-CB が高濃度で蓄積していることから、その構造を推定した⁴⁾⁵⁾⁸⁾が、この代謝物の由来については十分な情報が得られていない。本研究では生体内に残留している MeSO₂-CB の構造とその母化合物との関係を明確にするために Clophen A50 (ドイツの PCB 製品) をミンクに投与し、筋肉組織に残留する PCB および MeSO₂-CB の定性、定量を試み、両者を比較した。

実験方法

1 材料

雌ミンク (*Mustela vison*) 10 匹に Clophen A50 を毎日 2 mg 餌に混ぜて 3 カ月間投与し、投与後 5 日目に屠殺した。筋肉組織を摘出し、各ミンクからそれぞれ 3 g を取り、合わせて 30 g を分析試料とした。

2 試薬

PCB および MeSO₂-CB の標準物質は従来の方法⁹⁾¹⁰⁾で合成した。内標準物質には PCB 分析のために 2,3,4,5,3',4',5'-heptaCB を、MeSO₂-CB 分析のために 3-SO₂CH₃-4-CH₃-5,2',3',4',5'-pentaCB (いずれも合成)を用いた。溶媒はすべて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 分離、精製法

試料の前処理は前報²⁾¹¹⁾と同様に行った。組織 (30 g) を細切りにし、アセトン：ヘキサン (1:4) 50 ml を加え、Ultra-Turrax homogenizor (model 18/10, Janke & Kunkel, IKA-Werk) でホモジナイズし、3 回抽出を繰り返した。抽出液を濃縮した後、脂肪量を測定し、内標準物質 3-SO₂CH₃-4-CH₃-5,2',3',4',5'-pentaCB を脂肪ベースで 1 ppm になるように加えた後、ヘキサンを加えて 100 ml とした。次にフェノール性代謝物や酸性物質を除去するために水酸化カリウム (0.5 M, 5 ml) およびエタノール (95%, 2 ml) の水溶液を加えて振盪し、アルカリ溶液を分離した。次にこのヘキサン溶液に無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 3 ml を加えて 3 回抽出することにより、PCB (ヘキサン層) と MeSO₂-CB (DMSO 層) を分離した。ヘキサン溶液には内標準として 2,3,4,5,3',4',5'-

heptaCB を加え、そのまま ECD/GC で分析した。一方、DMSO 抽出液は同量の水で希釈した後、メチル-tert-ブチルエーテル：ヘキサン (1:9, 15 ml) で 3 回抽出した。この抽出液は一度濃縮乾固した後、残渣に濃硫酸 5 ml を加えて溶かし、これを同量の氷水で希釈して、再びヘキサン 10 ml で 3 回抽出した。さらにこの抽出液をアルミナカラム (aluminium oxide, 中性, 活性 I, メルク社) 5 g に添加し、まず 8% ジクロロメタン (DCM) 60 ml で洗浄したあと、DCM 50 ml で目的物を溶出した。この液を GC/MS および GC/ECD 分析の試料とした。

4 定性、定量法

PCB の定性、定量は従来の方法に従った²⁾。MeSO₂-CB の定性は Finnigan 4500 GC/MS (Incos 2400 Data System) を用いて負イオン化化学イオンモード (メタンガス) で行った。分析に用いたカラムは Ultra-2 (50 m x 0.2 mm I. D. Hewlett Packard, USA) で、注入はスプリットレス方式で行い、カラム温度は 70°C (2 min) から 230°C まで 30°C/min で昇温し、つづいて 230°C から 290°C まで 4°C/min で昇温し一定に保った。キャリアガスはヘリウムを用いた。各ピークの構造は先に合成した標準物質の内標準物質に対する相対保持時間およびマススペクトルとの比較から推定した。

MeSO₂-CB の定量は ⁶³Ni 電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (島津 GC-14A, Chromatopac C-R3A) を用い、カラムは DB-5 (60 m x 0.25 mm I. D. J & W Scientific Inc, USA) を用いた。カラムの温度条件は GC/MS と同様であった。検出器温度 310°C, 注入口温度 230°C。定量はそれぞれ同定した MeSO₂-CB 成分のピーク面積を合計し、内標準物質に対する面積比から計算した。MeSO₂-CB 成分の相対量は各ピークの全ピーク面積に対する割合 (%) として表し、Clophen A50 中の成分量は Schultz ら¹⁵⁾の文献値を参考にした。

結果と考察

1 筋肉組織中の PCB

筋肉組織中に残留する主な PCB 異性体は 2,4,5,2',4'-pentaCB, 2,4,5,2',3',4'-hexaCB, 2,4,5,2',4',5'-hexaCB, 2,3,4,5,2',4',5'-heptaCB, 2,3,4,5,2',3',4'-heptaCB など、少なくとも 2,4,5 および 4'-位が塩素化されたビフェニル骨格をもつ異性体であった。一方、Clophen A50 の主成分のうち 2,3,6,2',5'-pentaCB, 2,4,5,2',5'-pentaCB, 2,3,4,2',5'-pentaCB, 2,3,6,3',4'-pentaCB, 2,5,3',4'-tetraCB,

2, 5, 2', 5'-tetraCB などは体内から消失した。これらの構造は meta 位と para 位が共に塩素置換されていない骨格を持っており、体内で速やかに代謝または排泄されたものと思われる。田辺ら¹⁷⁾は Kanechlor をラットに投与した場合、隣接未置換領域を多く含む異性体ほどその生物学的半減期が短いことを明らかにしている。本実験でもそのような傾向が見られ、meta/para 位が未置換の異性体の残留性はきわめて低いことが分かった。

2 筋肉組織中の $\text{MeSO}_2\text{-CB}$

Fig. 1 に筋肉組織から抽出した $\text{MeSO}_2\text{-CB}$ の ECD ガスクロマトグラムを示す。負イオン化 GC/MS による分析の結果、少なくとも 25 種のピークが $\text{MeSO}_2\text{-CB}$ と同定され、合成した標準物質とマススペクトルおよび保持時間を比較することにより 20 種の成分(ピーク番号 1~20)の構造を推定した。主な成分は 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 4'-tetraCB}$, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 4'-tetraCB}$, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB}$, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB}$, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 3', 4'-pentaCB}$, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB}$ などであり、いずれも 2, 5-dichloro または 2, 5, 6-trichlorophenyl 骨格を有する CB の 3-または 4-位に $\text{MeSO}_2\text{-基}$ が導

入された代謝物であった。こうして同じ塩素置換を有する 3- MeSO_2 および 4- MeSO_2 -誘導体が検出されたことは、これらの代謝物が meta/para 隣接未置換領域をもつ PCB に由来することを示唆している。すなわち、このような PCB が 3, 4-エポキシ化を経由して 3-または 4-位でグルタチオン抱合体となり、チオール化、メチルチオ化つづいて酸化といった一連の代謝反応により、 $\text{MeSO}_2\text{-CB}$ に変換されたと考えることができる。このような生成経路は Bakke ら¹⁸⁾により、2, 4', 5-trichlorobiphenyl をモデル化合物としてよく研究されている。また、水谷らはいくつかの 2, 5-dichlorophenyl 骨格を有する PCB をマウスに投与しその糞から 3-および 4- MeSO_2 体を検出している¹⁹⁾。Table 1 に、Clophen A50 中の母化合物の成分量と投与後体内に残留する 3-および 4- MeSO_2 体の相対量 (%) を示す。3- MeSO_2 -体と 4- MeSO_2 -体の生成する割合は各母化合物ごとに異なるが、投与前の Clophen 中の各成分量とそれから代謝、蓄積された $\text{MeSO}_2\text{-CB}$ の量がよく比例していることがわかる。すなわち、少なくとも 2, 5-dichlorophenyl または 2, 5, 6-trichlorophenyl 骨格を有する CB が $\text{MeSO}_2\text{-CB}$ の生成にとって必要な構造であることを示している。ただし、このような

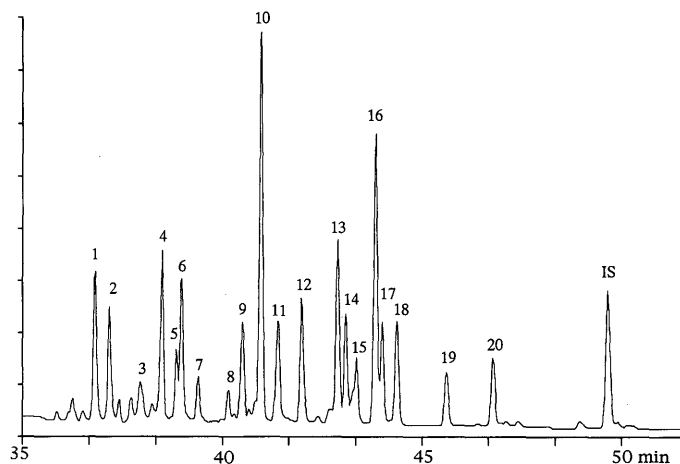


Fig. 1 Gas chromatogram of $\text{MeSO}_2\text{-CB}$ present in mink muscle after treatment with Clophen A50. Structures identified: peak 1, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 5'-tetraCB}$; 2, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 4'-tetraCB}$; 3, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 4'-tetraCB}$; 4, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 4'-tetraCB}$; 5, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 2', 5'-pentaCB}$; 6, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 4'-tetraCB}$; 7, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 2', 4'-pentaCB}$; 8, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 2', 4'-pentaCB}$; 9, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 3', 4'-tetraCB}$; 10, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB}$; 11, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 3', 4'-tetraCB}$; 12, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB}$; 13, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 3', 4'-pentaCB}$; 14, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 3', 4'-pentaCB}$; 15, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 2', 4', 5'-hexaCB}$; 16, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 3', 4'-pentaCB}$; 17, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 2', 3', 4'-pentaCB}$; 18, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 2', 4', 5'-hexaCB}$; 19, 3- $\text{MeSO}_2\text{-2, 5, 6, 2', 3', 4'-hexaCB}$; 20, 4- $\text{MeSO}_2\text{-2, 3, 6, 2', 3', 4'-hexaCB}$. IS, Internal Standard.

Table 1 Relative amount of CBs in Clophen A50 and of MeSO₂-CBs in mink muscle after exposure to this PCB.

Parent CBs	% ¹⁾ in Clophen A50	MeSO ₂ -CB (%) ²⁾ in muscle of mink	
		3-MeSO ₂ -	4-MeSO ₂ -
<u>2, 5-Dichlorinated CBs</u>			
2, 5, 2', 4', 5'-pentaCB	7.7	18.1	2.8
2, 5, 2', 3', 4'-pentaCB	4.2	9.8	4.0
2, 5, 3', 4'-tetraCB	3.8	3.2	3.4
2, 5, 2', 4'-tetraCB	2.0	3.9	1.0
2, 5, 2', 3', 5'-pentaCB	1.5	NA	NA
2, 5, 2', 3', 5', 6'-hexaCB	1.2	NA	NA
2, 5, 2', 3', 4', 5'-hexaCB	1.0	0.1	0.1
<u>2, 3, 6-Trichlorinated CBs</u>			
2, 5, 6, 3', 4'-pentaCB	6.3	4.0	15.4
2, 5, 6, 2', 4', 5'-hexaCB	4.5	1.5	2.9
2, 5, 6, 2', 3', 4'-hexaCB	2.6	1.3	1.9
2, 3, 6, 2', 3', 5'-hexaCB	1.6	NA	NA
2, 3, 6, 2', 4'-pentaCB	0.9	1.1	0.9
2, 3, 6, 4'-tetraCB	0.7	6.3	5.8
<u>2, 5-or 2, 3-Dichlorinated and 2,3,6-trichlorinated CBs</u>			
2, 3, 6, 2', 5'-pentaCB	6.0	2.5	ND
2, 5, 2', 5'-tetraCB	5.5	5.5	ND
2, 5, 5', 6'-tetraCB	2.5	ND	ND
Total amount	46	57.2	38.2

1) ref 15)

2) relative amount (%) according to peak area in Fig. 1

NA=not analyzed, ND=not detected

骨格を2つ有する2,5,2',5'-tetraCBや2,5,6,2',5'-pentaCBからは3-MeSO₂-CBのみが検出された。さらに2,3-dichlorophenyl骨格を有する2,3,2',5'-tetraCBや2,3,2',4',5'-pentaCBから期待されるMeSO₂-CBは検出できなかった。こうしてみるとMeSO₂-CB生成に要求される母化合物の構造はかなり限定されるように思われる。筋肉組織中の残留成分の濃度を比較すると、PCBが180 µg/gであるのに対し、MeSO₂-CBのは16 µg/gであった。このMeSO₂-CBのPCBに対する残留比はアザラシなどの哺乳動物で得られた結果⁹⁾とほぼ一致した。以上の結果を総括すると、PCBのうち少なくとも2,4,5,および4'位が塩素化された異性体、すなわち meta/para 位に隣接未置換領域を持たない異性体は体内に長く滞留する。一方、それ以外の異性体は残留性が低く、速やかに代謝、排泄されるが、そのなかで2,5-または2,5,6-位に塩素

置換を有するPCBは3-または4-MeSO₂-CBとして再び体内に蓄積すると考えられる。Clophen A50はKanechlor 500に相当する製品で、成分の約50%がこのような母化合物から構成され、環境中にも大量に放出されている。いままで分析した自然環境下の哺乳動物の組織中成分はここに示したMeSO₂-CBの残留成分パターン (Fig. 1) と類似した。一方、以前に分析した油症患者の組織中のMeSO₂-CBは、一致する成分もあるが必ずしも類似パターンを示さなかった。これは分析した試料が発症後10年以上経過した時点で死亡した患者の組織であり、また汚染されている環境も異なるためと思われるが、さらにヒトについての調査が必要である。

総 括

Clophen A50 (ドイツのPCB製品) をミンクに餌と

一緒に3ヵ月間(2 mg/day)投与し、投与終了後5日目に筋肉組織を採取し、その中に残留する PCB および MeSO₂-CB の構造およびその濃度を比較した。

1) 筋肉組織中に残留する主な PCB は 2, 4, 5, 2', 3', 4'-hexaCB, 2, 4, 5, 2', 4', 5'-hexaCB, 2, 3, 4, 5, 2', 4', 5'-heptaCB など、少なくとも 2, 4, 5 および 4'-位に塩素置換した PCB であった。一方 Clophen A50 中の主成分のうち、2,5-位または 2,5,6-位に塩素置換した PCB は残留性が低く、体内から速やかに消失した。

2) 筋肉組織中に 25 種以上の MeSO₂-CB を検出し、そのうち少なくとも 20 種の成分は 2,5-dichlorophenyl または 2,5,6-trichlorophenyl 骨格を持つ CB の 3-または 4-位に MeSO₂基が導入された代謝物であることが分かった。筋肉組織中の MeSO₂-CB 濃度は 16 μg/g で残留 PCB 濃度 (180 μg/g) の約 1/10 であった。

3) 2,5-dichlorophenyl または 2,5,6-trichlorophenyl 骨格を有する異性体は Clophen A50 中に約 50%含まれており、各成分の相対量はミンクに投与後、組織に残留する MeSO₂-CB の相対量とほぼ比例した。この MeSO₂-CB の残留成分パターンは自然環境下哺乳動物組織に認められる成分パターンと類似した。

文 献

- 1) Bakke JE, Bergman Å and Larsen GL: Metabolism of 2,4',5-trichlorobiphenyl in the mercapturic acid pathway. *Science*, 217: 645-647, 1982.
- 2) 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.
- 3) Bergman Å, Brandt I and Jansson B: Accumulation of methylsulfonyl derivatives of some bronchial-seeking polychlorinated biphenyls in the respiratory tract of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48: 213-220, 1979.
- 4) Bergma Å, Haraguchi K, Kuroki H, Masuda Y and Olsson M: PCB methyl sulphones in animals from the Baltic region, Organohalogen compounds, 8: 12th International Meeting, Dioxin' 92, Finland, 311-312, 1992.
- 5) Bergman Å, Kuroki H, Haraguchi K and Norstrom, R J: PCB methyl sulfones in mammals from Canadian and Swedish environments. Proc. of the eighteenth annual aquatic toxicity workshop: Sept. 30-Oct. 3, 1991, Ottawa, Ontario. Niimi, AJ and Taylor, MC (eds). Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1863: 259-263, 1992.
- 6) Bergman A and Olsson M: Pathology of Baltic grey seal and ringed seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: Is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finnish Game Research*, 44: 47-62, 1985.
- 7) Brandt I and Bergman Å: PCB methyl sulphones and related compounds: Identification of target cells and tissues different species. *Chemosphere*, 16: 1671-1676, 1987.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Haraguchi K, Kuroki H and Masuda Y: Occurrence and distribution of chlorinated aromatic methylsulfones and sulfoxides in biological samples. *Chemosphere*, 19: 487-492, 1989.
- 11) 原口浩一, 増田義人, Bergman Å and Olsson M: PCB メチルスルホン: バルト海アザラシと油症患者組織における残留成分の比較, 福岡医誌, 82: 269-273, 1991.
- 12) Jensen S and Jansson B: Anthropogenic substances in seal from the Baltic: Methyl sulfone metabolites of PCB and DDE. *Ambio*, 5: 257-260, 1976.
- 13) Mizutani T, Yamamoto K and Tajima K: Sulfur-containing metabolites of chlorobiphenyl isomers, comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 862-866, 1978.
- 14) Preston BD, Miller JA and Miller EC: Reactions of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl-3,4-oxide with methionine, cysteine and glutathione in relation to formation of methylthiomethyl metabolites of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in the rat and mouse. *Chem.-Biol. Interact.* 50: 289-312, 1984.
- 15) Schultz DE, Petrick G and Duinker 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.
- 16) Sundstrom G: Polychlorinated biphenyl II. Synthesis of some tetra- and pentachlorobiphenyls. *Acta Chem. Scand.*, 27: 600-604, 1973.
- 17) Tanabe S, Nakagawa Y and Tatsukawa R: Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 717-726, 1981.