

## 分担研究報告書

### PCB101代謝に関与する新たなチトクロムP450分子種の解明

研究分担者 古賀 信幸 中村学園大学栄養科学部 教授  
研究協力者 太田 千穂 中村学園大学栄養科学部 講師

**研究要旨** PCB52、PCB101およびPCB149は、phenobarbital (PB)誘導性チトクロムP450(CYP2B)により代謝され、主にmeta位が水酸化される。一方、PBはCYP2B酵素以外にもCYP3A酵素も誘導することが知られている。当研究室では昨年までにPCB149のラット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝がCYP2B酵素だけではなく、CYP3A酵素によっても触媒されることを明らかにした。そこで本研究ではPCB101代謝におけるCYP3A酵素の関与を明らかにするため、CYP3A誘導剤(DEX: dexamethasone)とCYP3A阻害剤(KCZ: ketoconazole)の効果を調べた。PCB101は、主に3'-OH体へと代謝されるが、その他4'-OH体と3',4'-diOH体も生成される。その結果、DEX前処理ラット肝Msでは、3'-OH体が未処理ラット肝Msの18倍に増加し、新たに3',4'-diOH体の生成も見られた。次に、KCZを添加したところ、25 $\mu$ Mで3'-OH体の生成が約40%までに阻害された。以上の結果から、PCB101の3'位水酸化において、ラットCYP2B1だけではなくラットCYP3A1も強く関与することが明らかになった。

#### A. 研究目的

2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (PCB52)、2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (PCB101)、2,2',3,4',5',6-hexachlorobiphenyl (PCB149)、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) および 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 183)はortho位に2個以上の塩素が置換されたPCB異性体である。このうち、PCB52、PCB101およびPCB149などのように、meta-para位に塩素が置換されていないPCB異性体は、塩素数が多いにもかかわらず、比較的容易に代謝される<sup>1-4)</sup>。また、共通してphenobarbital (PB)誘導性チトクロムP450、すなわちCYP2B酵素により、主にmeta位が水酸化される<sup>1-4)</sup>。

これまでPCBの水酸化反応にはCYP1A、CYP2BおよびCYP2A酵素の関与が知られているが<sup>4)</sup>、一方、PBはCYP2B酵素以外にCYP3A酵素も誘導することから<sup>5)</sup>、PCB代謝におけるCYP3A酵素の関与に興味を持たれる。また、CYP3A酵素はヒト肝において最も

含量が多く、薬物代謝の約50%に関与する重要な代謝酵素として知られている。

これまでに、当研究室ではラット肝ミクロゾーム(Ms)によるPCB149代謝を調べ、主代謝物の5-OH体がCYP3A誘導剤のdexamethasone (DEX)前処理により顕著に増加すること、またCYP3A阻害剤のketoconazole (KCZ)添加で5-OH体の生成が強く阻害されることを明らかにした。そこで本年度は、PCB101代謝におけるCYP3A酵素の関与を明らかにするため、PCB149同様に、CYP3A酵素の誘導剤と阻害剤を用いて検討した。

#### B. 研究方法

① 実験動物および薬物処理: Wistar 系雄性ラット(体重約 250g)を用いた。肝 Ms の調製は未処理および DEX 前処理ラットより肝を摘出し、常法により行った。DEX は 100mg/kg (コーン油に溶解)の用量を毎日1回、3日間腹腔内に投与した。最終投与後翌日に屠殺

し、直ちに肝を摘出した。

② **PCB101 代謝活性**: PCB101 を NADPH 存在下、好氣的にラット肝 Ms とともに HEPES 緩衝液(pH 7.4)中で、37°C、20~60 分間インキュベート後、chloroform-methanol (2:1, v/v) および *n*-hexane で抽出し、diazomethane でメチル化後、GC-ECD にて測定した。代謝物の定量は PCB101 の検量線を用いて行った。

③ **代謝阻害実験**: PCB101 代謝の阻害は、CYP3A 阻害剤の ketoconazole (KCZ)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、ラットの屠殺に際しては、苦痛をできるだけ軽減するため、軽くエーテル麻酔後後頭部を強打して気絶させ、頸動脈からの脱血により死亡させた。

### C. 研究結果

PCB101は未処理Msにより3'-OH体と4'-OH体に代謝された(Fig. 1)。次にPCB101の検量線を用いて生成活性を調べたところ、いずれも約2 pmol/min/mg proteinであった。一方、DEX前処理Msでは、3'-OH体は未処理Msの18倍に顕著に増加したが、4'-OH体は未処理Msの6%まで激減した(Fig. 2)。また、未処理Msで見られなかった3',4'-diOH体が、新たに生成された(5.5 pmol/min/mg protein)。

次に、KCZによるPCB101代謝の阻害を試みた結果、DEX前処理Msでは25μM 添加で3'-OH体の生成はKCZ未添加時の約40%までに有意に阻害された(Fig. 3)。また、4'-OH体および3',4'-diOH体の生成は、もともと少なかったのであるが、いずれもDMSOのみの添加で生成が全く見られなくなった。

### D. 考察

今回、DEX 前処理の結果、ラット肝 Ms に

よる PCB101 代謝において、3'-OH 体の顕著な増加と 3',4'-diOH 体の新たな生成が観察された。さらに、これらの活性の増加は、CYP3A1 タンパクの顕著な増加とよく一致していた(未掲載)。また、CYP3A 酵素の特異的な阻害剤 KCZ の添加により、3'-OH 体の生成が強く阻害された。これらの結果から、ラット肝における PCB101 の 3'位水酸化には、ラット CYP2B1 に加えラット CYP3A1 も関与することが示唆された。

### E. 結論

ラット肝においてPCB101は、PCB149と同様に、主にCYP2B1とCYP3A1により代謝されることが明らかになった。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸, 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. 福岡医誌, **104**(4), 161-169 (2013).
- 2) K. Yamamoto, A. Yahada, K. Sasaki, A. Funakoshi-Yoshida, C. Ohta, N. Koga, and H. Ohta, Detection of adulterated Shiikuwasha juice by sensory evaluation, colorimetric value and volatile compounds. Food Sci. Technol. Res., **19**(5), 843-848 (2013).
- 3) Y. Kato, M. Onishi, K. Haraguchi, S. Ikushiro, C. Ohta, N. Koga, T. Endo, S. Yamada and M. Degawa, A possible mechanism for 2,3',4,4',5-pentachloro-biphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. Biol. Pharm. Bull., **36**(10), 1594-1601 (2013).
- 4) O. Kimura, C. Ohta, N. Koga, K. Haraguchi, Y. Kato, and T. Endo, Carrier-mediated uptake of nobiletin, a citrus polymethoxy-



flavonoid, in human intestinal Caco-2 cells.  
*Food Chem.*, **154**, 145-150 (2014).

## 2. 学会発表

- 1) C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, O. Kimura, N. Koga, In vitro metabolism of 2,2',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB99) by rat and guinea pig liver microsomes. *Organohalogen Compounds*, **75**, 1475-1478 (2013). 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Interburgo Hotel, Daegu, Korea) 平成 25 年 8 月 25~30 日
- 2) 西村恵理、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、古賀信幸、海洋生物由来 2,2'-dimethoxy-BB80 のラット肝ミクロゾームによる代謝と抗酸化活性. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー (九大医学部百年講堂、福岡市) 平成 25 年 9 月 13, 14 日
- 3) N. Koga, M. Matsuoka, C. Ohta, Y. Kato, K. Haraguchi, O. Kimura, T. Endo, In vitro metabolism of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxy-flavone by rat liver microsomes. IUNS 20<sup>th</sup> International Congress of Nutrition (Granada, Spain) 平成 25 年 9 月 15-20 日
- 4) C. Ohta, Y. Kato, K. Haraguchi, N. Koga, In vitro metabolism of diosmetin and hesperetin by rat liver microsomes. IUNS 20<sup>th</sup> International Congress of Nutrition (Granada, Spain) 平成 25 年 9 月 15-20 日
- 5) 緒方 瞳、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、木村 修、加藤善久、山本健太、古賀信幸、テトラメトキシフラボノイド類のラット肝ミクロゾームによる代謝. 日本栄養・食糧学会九州沖縄支部会 (九州大学農学部、福岡市) 平成 25 年 10 月 18, 19 日
- 6) 太田千穂、原口浩一、加藤善久、遠藤哲也、古賀信幸、海洋生物由来 tetrabromoveratrole (TBV)の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本薬学会第 134 年会 (熊本大学、熊本市) 平成 26 年 3 月 28~31 日
- 7) 加治佐彰悟、河村忠彦、原 雄一、西村恵理、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、二枚

貝(Spondylus sp.)に検出される臭素化カテコールおよびグアヤコールの濃縮特性. 日本薬学会第 134 年会 (熊本大学、熊本市) 平成 26 年 3 月 28~31 日

- 8) 遠藤哲也、木村 治、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、Caco-2 細胞におけるアリストロキア酸の細胞内取込み機構. 日本薬学会第 134 年会 (熊本大学、熊本市) 平成 26 年 3 月 28~31 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 参考文献

- 1) N. Koga, C. Ohta, K. Haraguchi, M. Matsuoka, Y. Kato, T. Endo, The formation of a catechol metabolite of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101) by liver microsomes from rats, hamsters, guinea pigs and humans. *Organohalogen Compounds*, **69**, 1757-1760 (2007).
- 2) 太田千穂、森岡樹子、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).
- 3) C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, N. Koga, Metabolism of 2,2',3,4',5',6-hexachlorobiphenyl (CB149) by liver microsomes from rats, hamsters, guinea pigs and humans. *Organohalogen Compounds*, **71**, 298-301 (2009).
- 4) 古賀信幸、太田千穂、油症研究Ⅱ－治療と研究の最前線－(古江増隆ら、編). 九州大学出版会, pp. 200-218 (2010).
- 5) H. Kim, D.A. Putt, R.C. Zangar, C.R. Wolf, F.P. Guengerich, R.J. Edwards, P.F. Hollenberg, R.F. Novak, Differential induction of rat hepatic cytochromes P450 3A1, 3A2, 2B1, 2B2, and 2E1 in response to pyridine treatment. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 353-360 (2001).

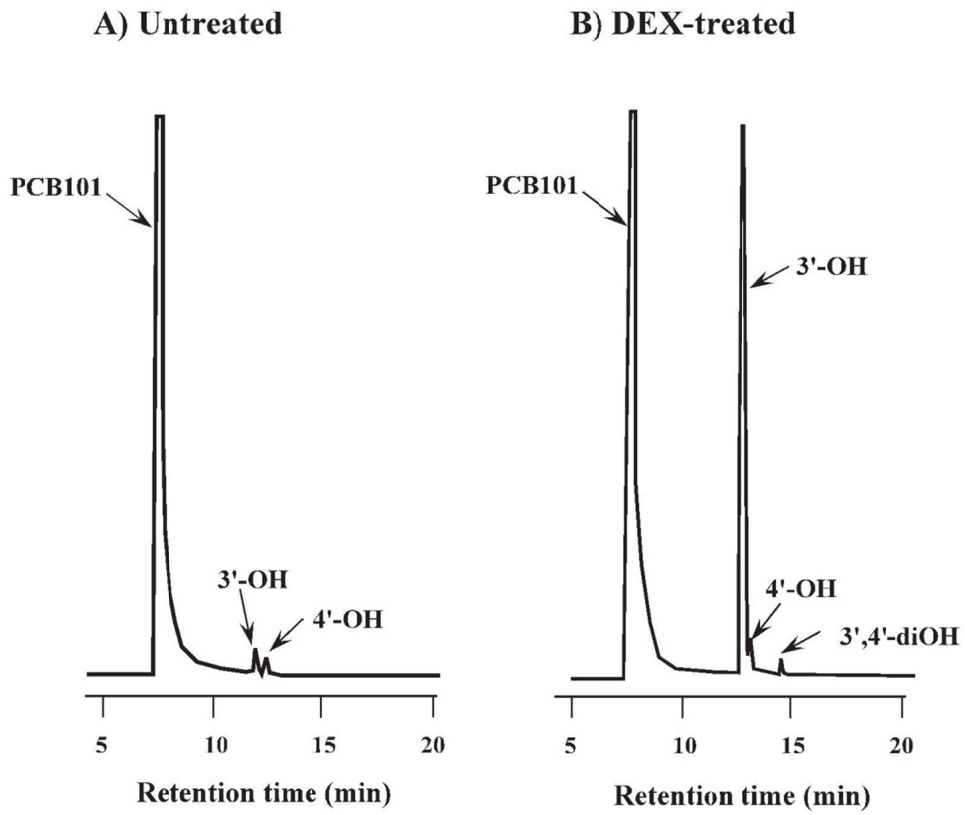


Fig. 1 PCB101 代謝物(メチル化体)の GC-ECD クロマトグラム



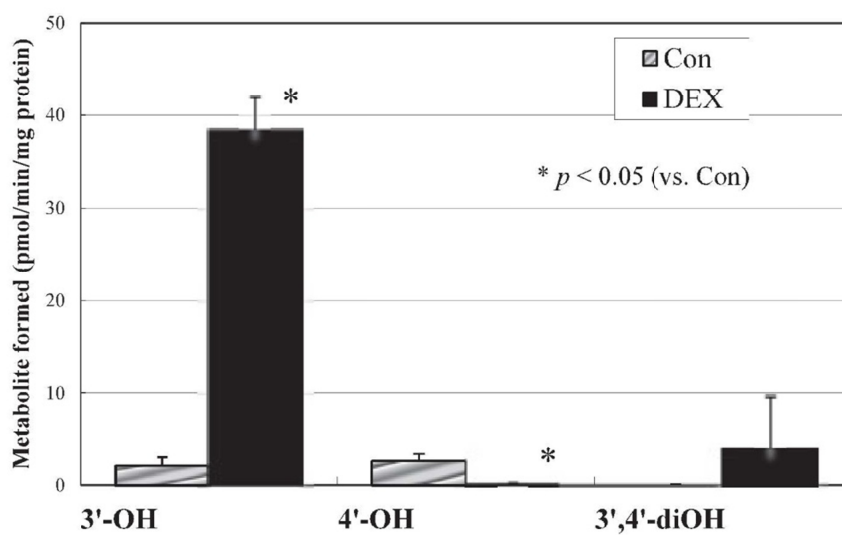


Fig. 2 DEX 前処理ラット肝ミクロゾームによる PCB101 代謝物

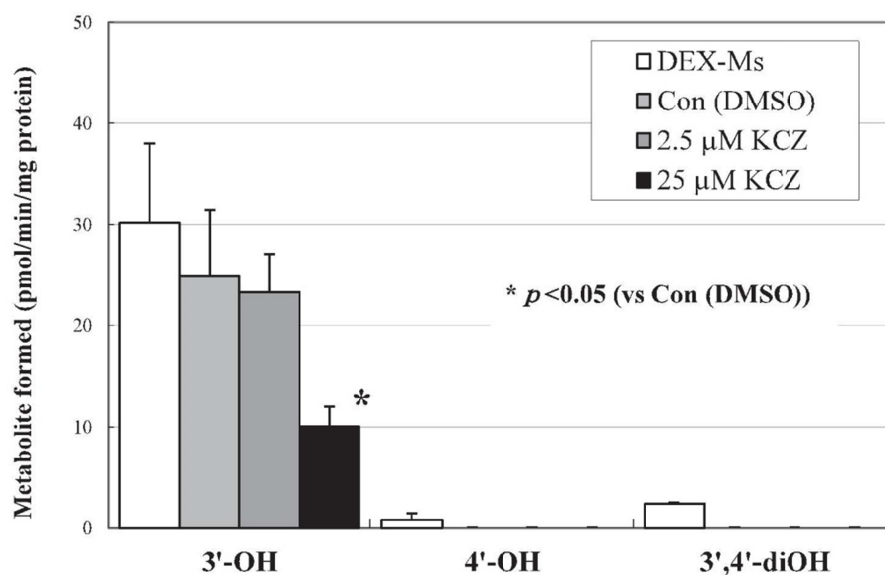


Fig. 3 DEX 前処理ラット肝 Ms による PCB101 代謝物生成に及ぼす KCZ の添加効果