

## 分担研究報告書

### 2,2',3,3',4,4',5-七塩素化ビフェニル(PCB170)の動物肝マイクロゾームによる代謝

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

PCB170 は、PCB153、PCB180 および PCB138 とともに高残留性の PCB 異性体として知られている。本研究では、PCB170 が代謝されるか否かについて、ラット、モルモットおよびヒト肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べた。その結果、ラットおよびヒト肝 Ms では、代謝物は全く生成されなかった。一方、モルモット肝 Ms では、phenobarbital 前処理の場合のみ、代謝物が極微量検出された。以上の結果から、PCB170 は非常に代謝されにくいことが明らかになった。また、既報を総合すると、PCB170 代謝物の化学構造は、5'-OH 体であり、モルモット肝での生成には CYP2B18 が関与していることが示唆された。

#### A. 研究目的

2,2',4,4',5,5'-hexachlorobi-phenyl (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptachloro-biphenyl (PCB180) および 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB138)は、ヒト血液中や肝臓中に高濃度検出されるPCB異性体である<sup>1-3)</sup>。このような高残留性PCB異性体は、いずれも共通して、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している。戸高ら<sup>4)</sup>は1968年のカネミ油症発生以来35年後の油症患者血液中のPCB異性体を調べ、その結果、油症患者および健常者のいずれも、上記のPCB異性体が最も多いこと、しかも油症患者で健常者の1.6~2.2倍多いことを報告した。また、本研究のPCB170はヒト血液中において5番目に多いPCB異性体で、しかも健常者の2.5倍の高濃度であることも報告した。これらの結果から、PCB170が難代謝性であることが示唆されたが、その代謝については全く報告がなかった。そこで本研究では、PCB170の代謝について、ラット、モルモットおよびヒト肝マイクロゾーム(Ms)を用いて調べた。また、代謝に関与するチトクロムP450 (CYP) 分子種を明らかにするため、代表的なCYP誘導剤で前処理した動物でも同様に検討した。

#### B. 研究方法

PCB170 合成 : 2,3,4-trichloroaniline および 1,2,3,4-tetrachlorobenzene を tetrachloroethylene に溶解し、isopentyl nitrite を添加後、100 で 24 時間反応させた。反応液を chloroform で抽出後、アルミナカラムおよびシリカゲルカラムにかけ、最終的に分取用 HPLC で精製した。PCB170 のピークを分取し濃縮したところ、白色結晶が得られた。GC-MS の結果、分子量 392 であることを確認した。収量は 47.3mg (収率 4.7%) で純度は 98.0%であった。以下、これを用いて、代謝研究を行った。

動物肝 Ms の調製 : Wistar 系雄性ラット(体重約 220g)および Hartley 系モルモット(体重約 320g)を用いた。動物肝 Ms は、未処理、phenobarbital (PB)および 3-methylcholanthrene (MC) 前処理のラットとモルモットから調製した。PB および MC はそれぞれ 80 および 20 mg/kg/day の用量で 3 日間腹腔内投与した。最終投与後翌日に屠殺し、直ちに肝を摘出した。

ヒト肝 Ms : 白人男性 10 名から調製されたものを BD Gentest 社より購入した。

代謝物の定量 : 肝 Ms を 40  $\mu$ M PCB170、NADPH 生成系、100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)、MgCl<sub>2</sub> とともに、好氣的に 37 で 1 時間インキュベートした後、chloroform-methanol (2:1,

v/v)および *n*-hexane で抽出し、さらに diazomethane でメチル化後、GC-ECD および GC-MS に供した。PCB170 代謝物の定量は PCB170 の検量線を用いて行った。

(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

まず、ラット肝MsによるPCB170の代謝を調べた。Fig. 1に、代謝物(メチル化体)のGC-ECDクロマトグラムを示した。未処理Ms、PB前処理MsおよびMC前処理Msでは、未変化体であるPCB170以外に、代謝物は全く検出されなかった。一方、モルモットの場合、未処理Ms およびMC前処理Msでは全く代謝物ピークが生成されなかったが、PB前処理Msでは保持時間25.5 minに微量の代謝物M-1が19.8 pmol/hr/mg proteinの活性で検出された(Fig. 2)。なお、ヒト肝でも同様に検討したが、代謝物は全く生成されなかった。

次に、M-1の化学構造を明らかにするため、2,3,4-Trichloroanisole および 1,2,3,4-Tetrachloroanilineを原料とし、Cadoganの方法により、予想代謝物5'-CH<sub>3</sub>O-PCB170の合成を試みた。その結果、5'-CH<sub>3</sub>O-PCB170あるいは副産物2'-CH<sub>3</sub>O-PCB189と思われる分子量422の合成品S-1を1種類得ることができた。GC-MSの結果、S-1は422[M]<sup>+</sup>に加え、[M-50]<sup>+</sup>の大きなフラグメントイオンを示した。これまでの報告<sup>5)</sup>によると、この[M-50]<sup>+</sup>のイオンは、MeO基がオルト位、すなわち2(2')位あるいは6(6')位に置換されていることを示している。結局、S-1は2'-CH<sub>3</sub>O-PCB189であり、当初の目的の5'-CH<sub>3</sub>O-PCB170ではなかった。以上のことから、GC-ECDにおけるM-1の保持時間を5'-CH<sub>3</sub>O-

PCB170と比較するには至らなかった。

### D. 考察

PCB170 は非常に代謝されにくいと予想されたが、今回用いたラット肝 Ms およびヒト肝 Ms では全く代謝されなかった。ただ、PB 前処理モルモットでのみ、5'-OH 体と思われる代謝物が極微量生成された(Fig. 3)。この結果から、PCB170 は難代謝性であるものの、PB 誘導性のモルモット CYP2B18<sup>6)</sup>により代謝されうることが示唆された。これらの結果から、PCB170 を含め高残留性の PCB 異性体は、非常に代謝されにくいことが改めて示唆された。

### E. 結論

PCB170は、PB前処理モルモット肝Msでのみ、5'-OH体と思われる代謝物へと代謝された。ただし、微量代謝物の同定は今後の課題である。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. O. Kimura, K. Haraguchi, C. Ohta, N. Koga, Y. Kato, and T. Endo, Uptake of aristolochic acid I into Caco-2 cells by monocarboxylic acid transporters. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(9), 1475-1479 (2014).
2. Y. Kato, K. Haraguchi, M. Onishi, S. Ikushiro, T. Endo, C. Ohta, N. Koga, S. Yamada and M. Degawa, 3,3',4,4'-Tetrachlorobipheny-mediated decrease of serum thyroxine level in C57BL/6 and DBA/2 mice occurs mainly through enhanced accumulation of thyroxine in the liver. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(3), 504-509 (2014).
3. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, O. Kimura, and N. Koga, Distribution and

excretion of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. *Chemosphere*, **118**, 5-11 (2015).

## 2. 学会発表

1. 山本健太、緒方 瞳、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、木村 治、加藤善久、古賀信幸、Kaempferol tetramethylether のラット肝ミクロゾームによる代謝. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (酪農学園大学、江別市) 平成 26 年 5 月 30 日 ~ 6 月 1 日
2. C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, N. Koga, The participation of rat CYP3A enzymes in the metabolism of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101). *Organohalogen Compounds*, **76**, 466-469 (2014). 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Melia Castella Hotel, Madrid, Spain) 平成 26 年 8 月 31 日 ~ 9 月 5 日
3. 西村恵理、太田千穂、山本健太、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 のラットにおける *in vivo* 代謝. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー (つくば国際会議場、つくば市) 平成 26 年 9 月 19, 20 日
4. 緒方 瞳、太田千穂、山本健太、加藤善久、原口浩一、木村 治、遠藤哲也、古賀信幸、トリメチル化された apigenin と genistein 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支部会 (熊本県立大、熊本市) 平成 26 年 10 月 11, 12 日
5. 太田千穂、西村恵理、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸、海洋生物由来の Tetrabromo-1,4-dimethoxybenzene (TDB) の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本薬学会第 135 年会 (神戸学院大学等、神戸市) 平成 27 年 3 月 25 ~ 28 日
6. 久我歩佳、木下真璃伽、藤井由希子、櫻田

司、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、遠藤哲也、メチルトリクロサンのマウス代謝活性化と乳汁分泌. 日本薬学会第 135 年会 (神戸学院大学等、神戸市) 平成 27 年 3 月 25 ~ 28 日

7. 小柳侑平、河野龍海、高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、松原 大、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、海藻で生産される臭素化ビフェノール類の機能性評価. 日本薬学会第 135 年会 (神戸学院大学等、神戸市) 平成 27 年 3 月 25 ~ 28 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 参考文献

- 1) A. Sjödin, L. Hagmar, E. Klasson-Wehler, J. Björk and Å. Bergman, *Environ. Health Perspect.*, **108**(11), 1035-1041 (2000).
- 2) D. M. Guvenius, P. Hassanzadeh, Å. Bergman and K. Norèn, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 2264-2269 (2002).
- 3) 古賀信幸, 太田千穂, 油症研究 (古江増隆, 赤峰昭文, 佐藤伸一, 山田英之, 吉村健清 編) 九州大学出版会, pp. 200-218 (2010).
- 4) T. Todaka, T. Hori, H. Hirakawa, J. Kajiwara, D. Yasutake, D. Onozuka, T. Iida and M. Furue, *Chemosphere*, **74**(7), 902-909 (2009).
- 5) M. Th. M. Tulp, K. Olie and O. Hutzinger, *Biomed. Mass Spectr.*, **4**, 310-316 (1977).
- 6) N. Koga, T. Kanamaru, N. Kikuichi, N. Oishi, S. Kato and H. Yoshimura, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 898-903 (1998).

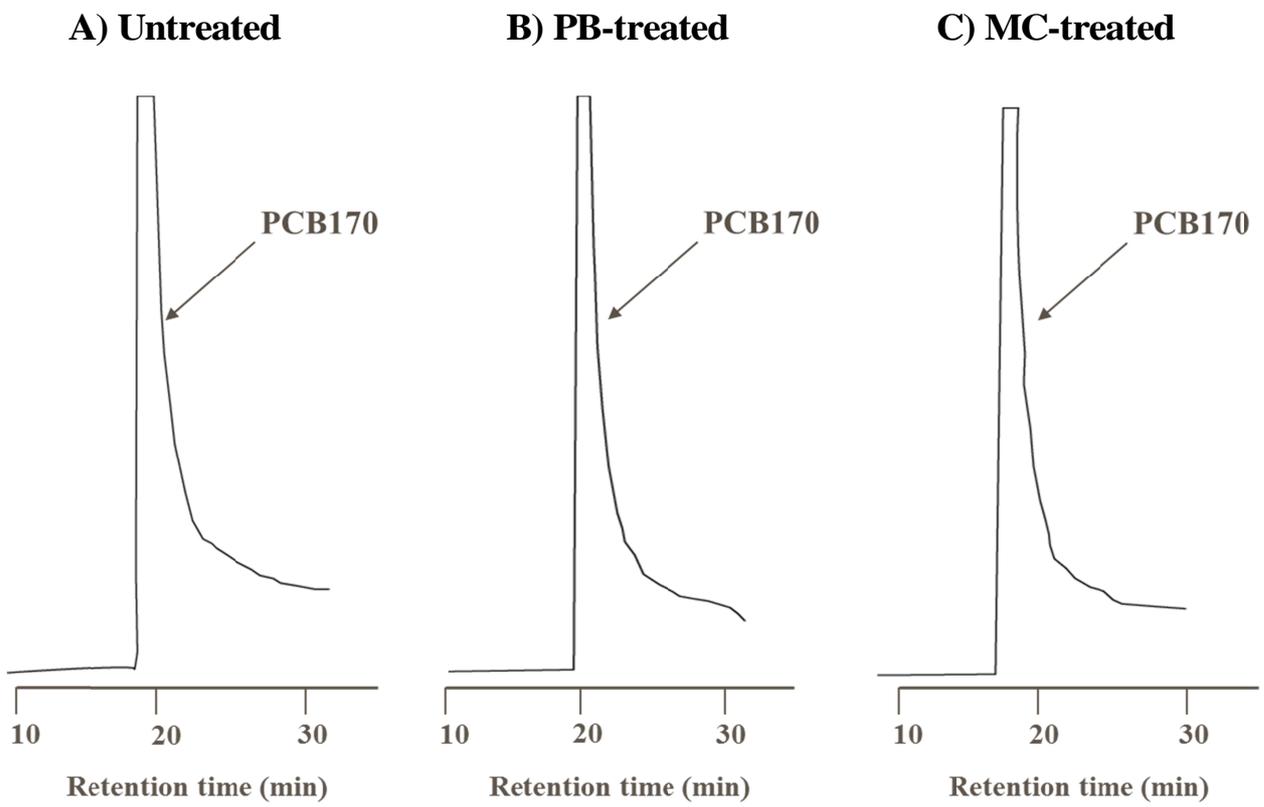


Fig. 1 ラット肝ミクロゾームによる PCB170 の代謝

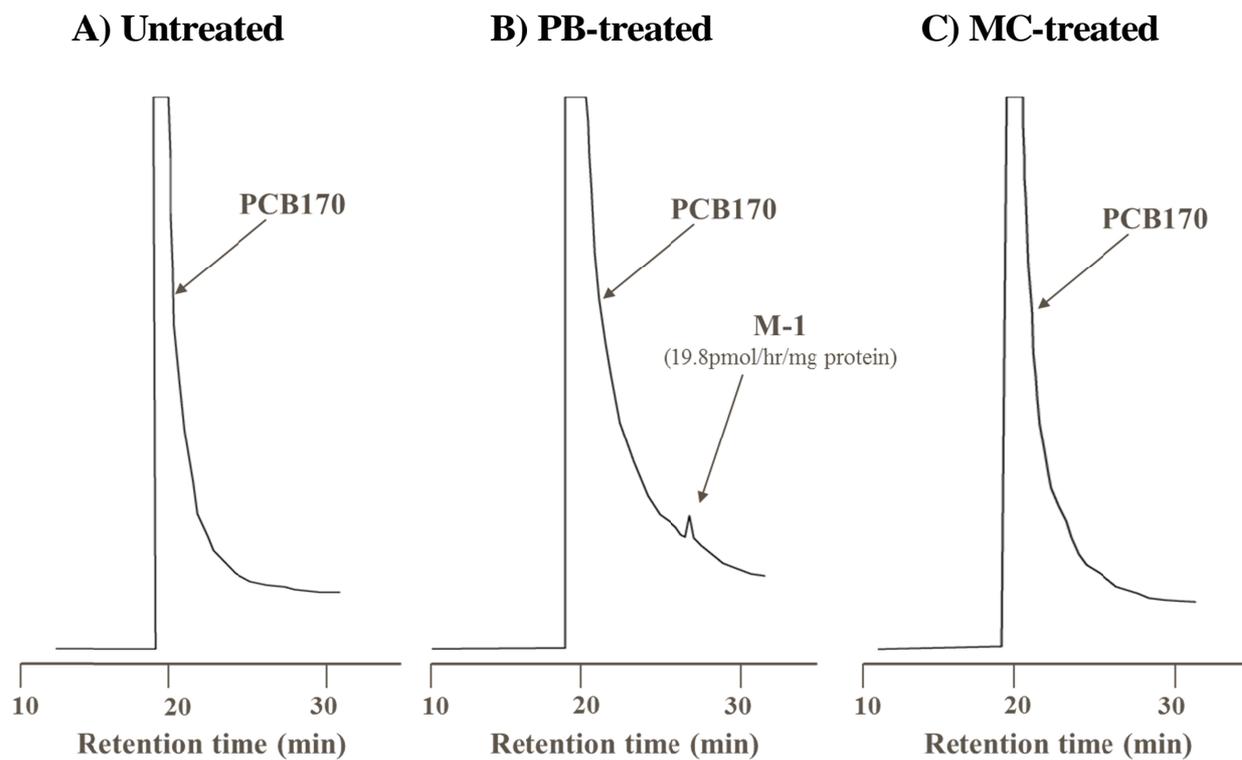


Fig. 2 モルモット肝ミクロゾームによる PCB170 の代謝

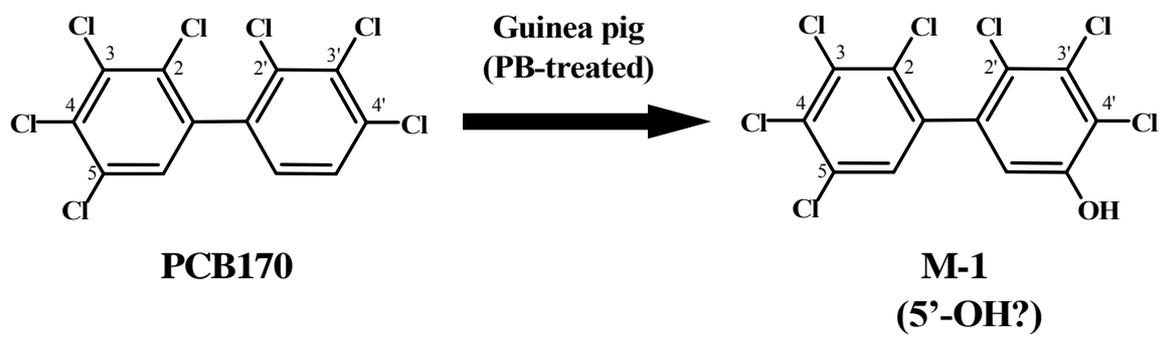


Fig. 3 PCB170 の予想代謝経路