

分担研究報告書

2,2',3,4',4,5,6'-七塩素化ビフェニル(PCB182)のラット、モルモットおよびヒト肝ミ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

PCB182 は、その構造から非常に代謝されにくいことが示唆されたが、その代謝について全く報告がなかった。本研究では、PCB182 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ミクロゾーム(Ms)を用いて調べた。その結果、ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms はいずれも 1 種類の代謝物 M-1(3'-OH 体)を生成した。また、その活性の強さは、ラット(PB 前処理) > モルモット(PB 前処理) > モルモット(未処理、MC 前処理) > ヒトの順であった。特に、PB 前処理ラット肝 Ms により、他の七塩素化ビフェニル(PCB187、PCB183、PCB180)と比べ、10~50 倍高い活性で代謝された。以上の結果から、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB182 は、非常に代謝され易いことが明らかになった。また、代謝酵素として PB 誘導性の CYP2B 酵素(ラット CYP2B1, モルモット CYP2B18)およびヒトでは CYP2B6 の関与が示唆された。

A. 研究目的

2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB180) および 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB138)は、ヒト血液中や肝臓中で特に高濃度検出されるPCB異性体である¹⁻³⁾。これらは、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。実際に、2009年Todakaら⁴⁾は油症発生以来35年後の油症患者血液中のPCB異性体を調べた結果、油症患者および健常者のいずれでも、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。

本研究の 2,2',3,4',4,5,6'-heptachlorobiphenyl (PCB182)は、GC-MSによるPCB異性体の一斉分析(長さ60mのDB-5カラム使用)の際、PCB187と保持時間が全く同じPCBとして知られている⁵⁾。PCB182は、2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンと2,4,6-三塩素置換ベンゼンから成ることから、難代謝性であると思われるが、その代謝については全く報告がない。ただし、PCB182がヒト組織中から検出されたとの報

告はないことから、比較的代謝されやすいのかもしれない。そこで本研究では、PCB182の代謝について、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム(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誘導剤前処理動物でも同様に検討した。

B. 研究方法

PCB182 合成 : 2,4,6-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。PCB182 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 13.8 mg で純度は 97.4%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 μ M PCB182、NADPH 生成系、100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)、MgCl₂ とともに、好氣的に 37 °C 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。PCB182 代謝物の定量は PCB182 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、セボフルランで麻酔後、頸動脈からの脱血により死亡させた。

C. 研究結果

CB182 を、NADPH 存在下、好氣的にラット、モルモットあるいはヒト肝 Ms とともに、37 °C、60 min 反応させた。Fig. 1 には、ラット肝 Ms により生成された CB182 代謝物(メチル誘導体)のガスクロマトグラムを示す。未処理 Ms と PB 前処理 Ms の場合、1 種類の代謝物(以下、M-1 とする)が保持時間 19.50 min に検出された。また、モルモットの場合には、未処理、PB 前処理および MC 前処理のいずれの Ms でも M-1 のみが、さらにヒト肝 Ms でも同様に、M-1 のみが生成された(データ未掲載)。

次に、動物肝 Ms およびヒト肝 Ms により生成された M-1 の定量を行った(Table 1)。M-1 の定量は CB182 の検量線を用いて行った。その結果、ラットの場合、M-1 は未処理肝 Ms では痕跡程度しか生成されなかったが、PB 前処理 Ms では 1,370 pmol/hr/mg protein へと顕著に増加した。なお、MC 前処理 Ms では M-1

は全く生成されなかった。次に、モルモットの場合、未処理 Ms でも比較的高い M-1 生成活性を有しており、その活性は 18.7 pmol/hr/mg protein であった。また、PB 前処理 Ms により、有意ではないものの 1.4 倍に増加した。なお、MC 前処理 Ms では未処理 Ms と同程度の活性を示した。一方、ヒト肝 Ms の M-1 生成活性は未処理モルモット肝 Ms の 76%程度と低かった。

次に、M-1の化学構造を決定するため、PB 前処理ラット肝Msを用いて100倍のスケール(100 ml)で代謝反応を行い、生成された代謝物を抽出後メチル化し、これをGC-MSに供した。その結果、M-1のメチル誘導体は、分子量422であり、CB182の分子量より m/z 30多かった。この結果から、M-1はOH体であることが明らかとなった(Table 2)。さらに、M-1のメチル誘導体では、フラグメントイオン $[M^+-15]$ (m/z 407)に加え、 $[M^+-43]$ (m/z 379)が比較的多く検出された。この結果から、M-1はメタ位、すなわち3(3')位あるいは5(5')位に、OH基を有することが推察された。次に、M-1のメチル誘導体のGCにおける保持時間とマススペクトルを、合成標品と比較したところ、3'-MeO-CB182とほぼ一致した。

D. 考察

CB182のin vitro代謝を調べた結果、ラット、モルモットおよびヒト肝により、CB182の代謝物が1種類生成され、GC-MSでの検討結果、3'-OH体であることが明らかになった。Fig. 2に肝MsによるCB182の推定代謝経路を示す。また、その生成量はラット(PB前処理) >> モルモット(PB前処理) > モルモット(未処理、MC前処理) > ヒト > ラット(未処理、MC前処理)の順であること、さらに、その生成はPB前処理ラットにおいて特に顕著に増加することも明らかになった。今回、CB182の主代謝物3'-OH体の生成活性は、PB前処理ラット肝Msで、約1,370 pmol/min/mg proteinであったが、この活性の強さは2,4,5-三塩素置換ベンゼンを有す

る CB180 の主代謝物 3'-OH-CB180 の生成活性 73 pmol/min/mg protein (PB 前処理モルモット肝 Ms)⁶⁾に比べ、19 倍も高かった。当初、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB182 は、水酸化されにくいと考えられたが、予想に反して、2,4,5-三塩素置換ベンゼンを有するものより、はるかに水酸化されやすいことが明らかになった。

今回、CB182 代謝が PB 前処理で促進されることから、PCB 代謝酵素⁷⁾として、ラット CYP2B1 およびモルモット CYP2B18 が主に関与していることが示唆された。一方、PCB 代謝に関与するヒト CYP 分子種としては、これまでに、CYP2B6 および CYP2A6 が報告されている。CYP2B6 は、CB153 の 3-水酸化や 2,2',3,4',5,5'-hexaCB (CB146)の 3'-水酸化を、また CYP2A6 は 2,2',5,5'-tetraCB (CB72)⁸⁾や 2,2',4,5,5'-pentaCB (CB101)⁹⁾の 4-水酸化を触媒する。CB182 代謝では、3'-水酸化が進行したことから、ヒト肝では CYP2B6 の関与が大きいと考えられるが、この点は今後の課題である。

E. 結論

PCB182は、ラット、モルモットおよびヒト肝Msにより、容易に3'-OH体へと代謝された。また、この代謝にはPB誘導性のCYP2B酵素が強く関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. O. Kimura, Y. Fujii, K. Haraguchi, C. Ohta, N. Koga, Y. Kato and T. Endo, Effect of quercetin on the uptake and efflux of aristolochic acid I from Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 883-889 (2016).
2. T. Shimada, K. Kakimoto, S. Takenaka, N. Koga, S. Uehara, N. Murayama, H. Yamazaki,

D. Kim, F. P. Guengerich and M. Komori, Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 1899-1909 (2016).

2. 学会発表

1. 太田千穂, 山本健太, 藤井由紀子, 原口浩一, 木村 治, 遠藤哲也, 加藤善久, 古賀信幸, Gossypetin hexamethylether の動物肝ミクロゾームによる代謝. 第70回日本栄養・食糧学会大会(武庫川女子大学、西宮市)平成28年5月13~15日
2. C. Ohta, Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, O. Kimura, T. Endo, N. Koga, Metabolism of 2,2',3,4,4',5,6'-heptachlorobiphenyl (CB182) by rat, guinea pig and human liver microsomes. 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Firenze, Italy) 平成28年8月28日~9月2日
3. Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, O. Kimura, T. Endo, C. Ohta, N. Koga, K. Harada, A. Koizumi, The levels and trends of POPs and perfluorinated carboxylic acids in fish and marine mammals from Japanese coastal waters. 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Firenze, Italy) 平成28年8月28日~9月2日
4. Y. Kato, K. Haraguchi, A. Fujii, Y. Fujii, O. Kimura, C. Ohta, T. Endo, N. Koga, S. Yamada, M. Degawa, Induction of hepatic T₄ transporters by polychlorinated biphenyl in rats. 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Firenze, Italy) 平成28年8月28日~9月2日
5. N. Koga, C. Ohta, K. Haraguchi, Y. Kato, T. Endo, O. Kimura, Distribution and excretion of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl

- (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. The 9th International PCB Workshop (Kobe, Japan) 平成 28 年 10 月 9 ~ 13 日
6. 山本健太, 太田千穂, 木村 治, 遠藤哲也, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 古賀信幸, 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone (KTM)の主代謝物 5-脱メチル化体のラット肝マイクロゾームによる代謝. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会(大分大学教育学部、大分市) 平成 28 年 10 月 22, 23 日
 7. 太田千穂, 原口浩一, 藤井由希子, 加藤善久, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, CB182の動物およびヒト肝マイクロゾームによる代謝. 日本薬学会第 137 年会(東北大学、仙台市) 平成 29 年 3 月 24 ~ 27 日
 8. 木村 治, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 太田千穂, 古賀信幸, 遠藤哲也, Caco-2 細胞におけるペルフルオロオクタン酸の取り込み. 日本薬学会第 137 年会(東北大学、仙台市) 平成 29 年 3 月 24 ~ 27 日
 9. 藤井由希子, 久我歩佳, 木下真璃伽, 加藤善久, 太田千穂, 古賀信幸, 木村 治, 遠藤哲也, 原口浩一, 抗菌剤トリクロサンの腸内細菌叢への影響評価. 日本薬学会第 137 年会(東北大学、仙台市) 平成 29 年 3 月 24 ~ 27 日
- 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) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人, 高分解能ガスクロマトグラフ/低分解能質量分析計による全 PCB 異性体の分析. 福岡医誌, **90**, 192-201 (1999).
 - 6) 太田千穂, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 木村 治, 古賀信幸, 2,2',3,4,4',5,5'-七塩素化ビフェニル(CB180)の動物肝マイクロゾームによる代謝. 福岡医誌, **106**, 176-183 (2015).
 - 7) 古賀信幸, 太田千穂, 高残留性 PCB の代謝と代謝物の毒性. 古江増隆, 赤峰昭文, 山田英之, 吉村健清編: 油症研究 - 治療と研究の最前線 -, pp. 200-218, 九州大学出版会 (2010).
 - 8) T. Shimada, K. Kakimoto, S. Takenaka, N. Koga, S. Uehara, N. Murayama, H. Yamazaki, D. Kim, F. P. Guengerich and M. Komori, Roles of human CYP2A6 and monkey CYP2A24 and 2A26 cytochrome P450 enzymes in the oxidation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. Drug Metab. Dispos., **44**, 1899-1909 (2016).
 - 9) SrJE McGraw and DP Waller, Specific human CYP450 isoform metabolism of a pentachlorobiphenyl (PCB-IUPAC#101). Biochem Biophys Res Commun **344**, 129-133 (2006).

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.