

分担研究報告書

2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体の動物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

本年度は、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する PCB 異性体の 1 つである PCB188 につき、ラット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。その結果、フェノバルビタール(PB)前処理ラット肝 Ms でのみ、2 種類の代謝物 M1 および M2 が生成された。GC-MS による分析の結果、両代謝物はいずれも、メチル化体が分子量 422 であることから、一水酸化体であることが明らかとなった。また、主代謝物の M1 は、フラグメントイオン 407 [M⁺-15]が比較的多いことから、4-水酸化体であることが示唆された。さらに、代謝酵素として PB 誘導性の CYP2B 酵素(ラット CYP2B1)の関与が示唆された。今回、GC-ECD の故障(修理不可)のため、正確な定量には至らなかったが、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有する CB188 は、CB182 同様に、比較的代謝され易いことが明らかになった。

A. 研究目的

ヒト血液中や肝臓中で高濃度検出される PCB異性体¹⁻³⁾は、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、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、2,2',4,4',5,5'-hexaCB (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB (PCB180) および 2,2',3,4,4',5'-hexaCB (PCB138)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。一方、我々は昨年度、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 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)を用いて調べた結果、いずれの動物肝Msも1種類の代謝物M-1(3'-OH体)を生成することを明らかにした。さらに、PB前処理ラット肝Msでは、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ることも明らかになった⁴⁾。そこで、本研究では2,4,6-三塩素置換ベンゼンと2,3,5,6-四塩素置換ベンゼンから成る PCB188のラット肝Msによる代謝を調べ、PCB182と比較した(Fig. 1)。

B. 研究方法

PCB188 合成：Hutzinger らの方法で行った。すなわち、2,4,6-trichloroaniline (1g)を濃塩酸 6 ml とともに 2 時間攪拌後、飽和亜硝酸ナトリウムを滴下してジアゾ化した後、これをアセトニトリル 30 ml で溶解した 1,2,4,5-tetrachlorobenzene (2g)中に加えて、110 °C で 2 時間反応させた。反応液は chloroform で抽出後、シリカゲルカラムにかけ、最終的に分取用 HPLC で精製した。HPLC の分析条件は以下の通りである。分析機器、高速液体クロマトグラフ LC-10AT(島津製)；カラム、ODS カラム(250 × 20 mm i.d., 5 μm, YMC 製)；プレカラム、ODS プレカラム (50 × 20 mm i.d., YMC 製)；移動相、acetonitrile；流速、4 ml/min；検出波長、254 nm。
ラット肝 Ms の調製：Wistar 系雄性ラット(体重約 220g)を用いた。ラット肝 Ms は、未処理、フェノバルビタール(PB)前処理 (80 mg/kg 体重×3 日) および 3-メチルコラントレン (MC)前処理 (20 mg/kg 体重×3 日) したラットから、常法により調製した。
PCB188 のラット肝 Ms による代謝：40 μM CB188 を NADPH 生成系(0.33 mM NADP, 5

mM G-6-P、G-6-PD 1.0 unit)、6 mM MgCl₂、ラット肝 Ms (1 mg protein) および 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに合計 0.5 ml として、37 °C で 60 min インキュベート後、反応液に chloroform-methanol (2:1) 0.5 ml と n-hexane 1.5 ml を加えボルテックスで振とう抽出した。抽出は 2 回行い、有機層を合わせて濃縮後、diazomethane でメチル化し、一部を GC-MS に付した。

(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

PCB188 の合成: PCB188 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 であり、同位体ピークから 7 つの塩素が置換されていることを確認した。収量は 3.6 mg で、純度はほぼ 100%であった(データ未掲載)。以下、これを用いて、代謝研究を行った。

PCB188 のラット肝 Ms による代謝: PCB188 を、NADPH 存在下、好氣的にラット肝 Ms とともに、37 °C、60 min 反応させた。Fig. 2 には、PB 前処理ラット肝 Ms により生成された PCB188 代謝物(メチル化体)の GC-MS による分析結果を示す。PCB188(保持時間 13.51min)に続き、代謝物と思われるピークが保持時間 15.35min に検出された。そこで、SIM 法により、m/z 424 で代謝物を検索したところ、上記ピークは一水酸化体(メチル化体)であること、さらに、20 倍に拡大したところ、2 種類存在することが明らかになった。以下、大きなピークを M1、小さなピークを M2 とする。なお、未処理 Ms および MC 前処理 Ms では代謝物は検出されなかった(データ未掲載)。

Table 1 に、M1 および M2 のマススペクトルの結果を示した。M1 のメチル化体は、分子量 422 であり、PCB188 の分子量より m/z 30 大きかった。

この結果から、M1 は一水酸化体であること、さらに、フラグメントイオン m/z 407 [M⁺-15] が比較的多く検出されることが明らかになった。この結果から、M1 はパラ位、すなわち 4 位に水酸基を有することが推察された。M2 については、現在のところ微量なため不明である。

D. 考察

CB188 の in vitro 代謝を調べた結果、PB 前処理ラット肝 Ms でのみ、2 種類の一水酸化体が生成された。Fig. 3 にラット肝 Ms による CB188 の推定代謝経路を示す。

今回、CB182 と同様に、PCB188 も PB 前処理ラット肝 Ms でのみ生成されたことから、PCB 代謝酵素³⁾として、ラット CYP2B1 が主に関与していることが示唆された。なお、PCB の微量分析に用いていた GC-ECD が修理不可になったことから、今回は代謝物の定量には至らなかった。今後は、PCB188 代謝物の定量を試み、PCB182 との比較を行うとともに、ヒト肝 Ms での検討を加えるつもりである。

E. 結論

PCB188 は、PB 前処理ラット肝 Ms でのみ、比較的容易に 2 種類の一水酸化体へと代謝された。また、この代謝には PCB182 と同様に、PB 誘導性の CYP2B 酵素が大き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. 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル(CB182)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. 福岡医誌, **108**(3), 51-57 (2017).
2. O. Kimura, Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato,

- C. Ohta, N. Koga, and T. Endo, Uptake of perfluorooctanoic acid by Caco-2 cells: Involvement of organic anion transporting polypeptides. *Toxicol. Lett.*, **277**, 18-23 (2017).
3. T. Endo, O. Kimura, M. Terasaki, Y. Fujii, K. Haraguchi, C. Ohta, N. Koga, Y. Kato, Growth-related changes in non-essential metals in the liver of star-spotted smooth-hounds (dogfish) *Mustelus manazo* from the northern region of Japan. *Mar. Environ. Res.*, **131**, 156-161 (2017).
4. Y. Kato, A. Fujii, K. Haraguchi, Y. Fujii, K. Atobe, T. Endo, O. Kimura, N. Koga, C. Ohta, S. Yamada, M. Degawa, Possible mechanism for the polychlorinated biphenyl-induced liver-selective accumulation of thyroxin in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **42**(6), 663-669 (2017).

2. 学会発表

1. 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) のラットにおける in vivo 代謝. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会(長崎県立大学、長崎市) 平成 29 年 10 月 28, 29 日
2. 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 BSP の取り込みに及ぼすペルフルオロカルボン酸化合物の影響. 日本薬学会第 138 年会(金沢市)平成 30 年 3 月 25 ~ 28 日
3. 津田侑人, 中村 翼, 碓元貴士, 府高 昌才

輝, 藤井由希子, 加藤善久, 木村 治, 遠藤哲也, 太田千穂, 古賀信幸, 原口浩一, 食用魚類に含まれる残留性長鎖有機フッ素カルボン酸の分析. 日本薬学会第 138 年会(金沢市)平成 30 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, 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).
- 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) 太田千穂, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4,4',5,6'-七塩素化ビフェニル (CB182)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. *福岡医誌*, **108**(3), 51-57 (2017).