

## 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 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155)につき、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。まず、ラット肝では phenobarbital (PB)および dexamethazone 前処理でのみ、代謝物 M1 が生成され、代謝活性はそれぞれ 1.256 および 0.105 nmol/hr/mg protein であった。モルモット肝では、M1 は PB 前処理でのみ検出され、その活性は 0.030 nmol/hr/mg protein と低かった。次に、GC-MS の結果、M1 はそのメチル化体が分子量 388 [M<sup>+</sup>]であることから、一水酸化体であると推定された。なお、水酸化の位置は、構造的に *meta* 位(3 位)しかないこと、およびフラグメントイオン 345 [M<sup>+</sup>-43]が比較的多かったことから、3 位と考えられた。以上の結果から、PCB155 は、PCB182 や PCB188 と同様に、代謝され易いこと、M1 の生成活性は、モルモットに比べ、ラットで著しく高いこと、M1 の生成には PB 誘導性の CYP2B 酵素が関与していることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

PCB異性体のうち、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するものは、ヒト血液中や肝臓中で高濃度検出されている。また、Todakaらの報告によると、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)が最も多く、しかも油症患者で健常者の1.6~2.2倍多いという。

一方、当研究室ではこれまでに、PCB182 (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PCB異性体)の代謝を、ラットおよびモルモット肝ミクロゾーム(Ms)を用いて調べ、その結果、いずれの動物肝Msも代謝物M1 (3'-OH体)を生成すること、さらに、phenobarbital (PB)前処理ラットでは、他の七塩素化ビフェニル(PCB187、PCB183、PCB180)に比べ、10~50倍もの高い活性で代謝されることも明らかにした。さらに、PCB188 (2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体)についても検討し、その結果、PCB182と同様に比

較的に容易に3'-OH体へと代謝されることを明らかにしている。このように、2,4,6-三塩素置換ベンゼンを有するPCB異性体はなぜ体内残留性が低いのかという理由の1つは代謝されやすさにあると思われる。本研究では、この点をさらに確かめるため、2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (PCB155)を用い、ラットおよびモルモット肝Msによる代謝を調べた (Fig. 1)。

#### B. 研究方法

PCB155 合成 : Ullmann らの方法で行った。すなわち、*N,N*-dimethylformamide 50 mL に 2,4,6-trichloriodobenzene (0.6 g)を溶解し、活性化銅 14 g を入れて 185 °C で加熱還流を 4 時間行った。さらに活性化銅を同量追加し、さらに 4 時間加熱を続けた。放冷後、反応液に蒸留水を加え chloroform で抽出し、シリカゲル 60 カラムおよび分取用 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、Inertsil ODS-HL カラム (10 × 250 mm i.d., 5 μm, GL

Sciences 製) ; 移動相、acetonitrile ; 流速、4 mL/min ; 検出波長、254 nm。 ラットおよびモルモット肝 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 280g) を各 12 匹用いた。肝 Ms は、未処理、PB 前処理 (80 mg/kg 体重 ×3 日間)、3-methylcholanthrene (MC) 前処理 (20 mg/kg 体重 ×3 日間) あるいは dexamethazone (DEX) 前処理 (100 mg/kg 体重 ×3 日間) した動物から、常法により調製した。 動物肝 Ms による PCB155 代謝 : 40 μM PCB155 を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 動物肝 Ms (1 mg protein) および 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計 1.0 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) 1 mL と n-hexane 3 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。GC-MS の測定条件は次の通りである。分析機器、GCMS-QP2010 (島津製) ; カラム、DB-1 フューズドキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm フィルム厚, J & W Scientific 製) ; キャリアーガス、He (1 mL/min) ; カラム温度、70 °C (1.5min) - 20 °C /min - 230 °C (0.5min) - 4 °C /min - 280 °C (5min) ; 注入口温度、250 °C ; 検出器温度、230 °C。  
(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

ラット肝 Ms により生成された代謝物の化学構造 : PCB155 を、NADPH 存在下、好氣的に動物肝 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 PCB155 代謝物 (メチル化体) の GC-MS による分析結果を示す。PCB155 (保持時間

11.87min) に続き、代謝物ピークが保持時間 13.38min に検出された。また、M1 のメチル化体は、分子量 388 であり、PCB155 の分子量より m/z 30 大きかったことから、一水酸化体 (メチル化体) であることが明らかになった。

次に、M1 のマススペクトルを見たところ、Table 1 のように、フラグメントイオン m/z 348 [M<sup>+</sup>-43] に加え、m/z 373 [M<sup>+</sup>-15] が比較的多く検出された。この結果は、PCB182 の 3'-OH 体 (メチル化体) のマススペクトルとよく似ていた。さらに、水酸化の位置は、構造的に *meta* 位 (3 位) しかないことを考慮すると、M1 は 3-OH 体と推定された。

ラットおよびモルモット肝 Ms による PCB155 代謝活性の比較 : SIM 法により得られたマスプロマトグラムより、M1 の定量を試みた (Table 2)。なお、定量は PCB155 の検量線を用いて行った。まず、ラット肝では PB および DEX 前処理 Ms でのみ、代謝物 M1 が生成されたが、未処理および MC 前処理 Ms では代謝物は全く生成されなかった。M1 の生成活性は PB および DEX 前処理 Ms で、それぞれ 1.256 および 0.105 nmol/hr/mg protein であった。一方、モルモット肝では、M1 は PB 前処理 Ms で最も多く検出されたが、その生成活性はラットに比べ、0.030 nmol/hr/mg protein と低いものであった。なお、M1 は未処理および DEX 前処理 Ms において生成されたが極微量のため定量には至らなかった。

### D. 考察

これまでに Goto らおよび Kato らは、PCB155 をラットの経口投与したところ、ラット糞中に主代謝物として、3-OH 体が排泄されることを報告している。また、Ariyoshi らはイヌ肝 Ms による代謝を調べ、主代謝物の 3-OH 体以外に、4 位の塩素が NIH 転位した代謝物 (例えば、4-OH 体、塩素が 1 個脱離した OH 体、3,4-diOH 体、など) を報告している。

今回、PCB155 代謝をラットおよびモルモット肝 Ms を用いて調べたところ、PCB155 は、

PCB182 や PCB188 と同程度に、代謝され易く、1 種類の代謝物(3-OH 体)に変換されること、3-OH 体の生成には PB 誘導性の CYP2B 酵素の関与していること、CYP2B 酵素の PCB155 代謝活性は、モルモットに比べ、ラットで著しく高いこと、を明らかにした(Fig. 3)。しかしながら、2,4,5-三塩素置換ベンゼンをもつ PCB 異性体に比べ、2,4,6-三塩素置換ベンゼンでは、なぜこのように代謝され易くなるのかという点は不明のままである。

## E. 結論

PCB155は、PB前処理ラット肝Msで、容易に一水酸化体(3-OH体)へと代謝された。一方、モルモット肝Ms(PB前処理)では、ラットの数10分の1しか、3-OH体は生成されなかった。以上のことから、PCB155代謝には大きな種差があること、また、PCB155代謝にはCYP2B酵素が大きく関与していることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 太田千穂, 山本健太, 徳富美沙紀, 加藤善久, 古賀信幸, 3,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (FTM)のラット、モルモットおよびヒト肝マイクロゾームによる代謝. 中村学園研究紀要, **50**, in press (2019).
- 2) 山本健太, 太田千穂, 徳富美沙紀, 古賀信幸, 「柑橘果皮成分 3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone のラット肝マイクロゾームによる代謝. 中村学園研究紀要, **50**, in press (2019).

### 2. 学会発表

- 1) 山本健太, 徳富美沙紀, 太田千穂, 古賀信幸, ATM のヒト肝マイクロゾームによる代謝. 第 72 回日本栄養・食糧学会年会 (岡山コンベンションセンター、岡山県立大学) 平成 30 年 5 月 11~13 日
- 2) C. Ohta, K. Yamamoto, Y. Fujii, K.

Haraguchi, O. Kimura, T. Endo, Y. Kato, N. Koga, In vitro metabolism of 2,2',3,4',5,6,6'-heptachlorobiphenyl (CB188) by rat liver microsomes. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日~9 月 1 日

- 3) K. Haraguchi, Y. Fujii, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, Y. Kato, Human exposure to brominated phenoxy phenols: seaweeds as source of hydroxylated and methoxylated PBDEs in Asia-Pacific. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日~9 月 1 日
- 4) Y. Kato, S. Tamaki, K. Haraguchi, Y. Fujii, O. Kimura, C. Ohta, T. Endo, N. Koga, M. Degawa, Comparative study on Kanechlor-500-mediated decrease in serum thyroxine level between C57BL/6 and its transthyretin-deficient mice. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日~9 月 1 日
- 5) Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, K. H. Harada, A. Koizumi, Edible fish is a source of human dietary exposure; perfluorinated alkyl acids in Pacific cods from North Pacific Ocean. Dioxin 2018 (Krakow, Poland) 平成 30 年 8 月 26 日~9 月 1 日
- 6) 山本健太, 徳富美沙紀, 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, 5,7,4'-Trimethoxyflavanone の動物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(宮崎大・農)平成 30 年 10 月 20, 21 日
- 7) 太田千穂, 山本健太, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村治, 遠藤哲也, 古賀信幸, ラット肝酵素による PCB188 の水酸化代謝. 日本薬学会第 139 回年会(幕張メッセ、千葉)平成 31 年 3 月 20~23 日
- 8) 安藤順平, 永田 滋, 津田侑人, 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, 北太平洋海域諸国における食用魚類を通じた有機フッ素

化合物の摂取量評価. 日本薬学会第 139 回年会 (幕張メッセ、千葉) 平成 31 年 3 月 20~23 日

- 9) 木村 治, 太田千穂, 古賀信幸, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 遠藤哲也, Caco-2 細胞におけるロスバスタチンの膜透過に

及ぼす 5,7-ジメトキシフラボンの影響. 日本薬学会第 139 回年会 (幕張メッセ、千葉) 平成 31 年 3 月 20~23 日

**G. 知的財産権の出願・登録状況**  
なし