

## 分担研究報告書

### 2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB155のヒト肝チトクロムP450分子種による代謝

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 准教授

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、ヒト肝ミクロゾーム(Ms)およびヒトチトクロム P450 (CYP)分子種による代謝を調べた。まず、ヒト肝 Ms では、ラットやモルモットと同様に、代謝物 M1(3-OH 体)が 1 種類生成され、その生成活性は 0.292 nmol/hr/mg protein であった。次に、4 種類のヒト CYP 分子種(1A2、2A6、2B6、3A4)での検討結果、CYP2B6 のみが M1 を生成し、その活性は 0.702 pmol/hr/pmol であった。以上の結果から、① PCB155 は、ヒト肝 Ms によっても容易に 3-OH 体へと代謝されること、また、□ 今回検討したヒト CYP のうち、CYP2B6 のみが、3-OH 体への強い代謝活性を有していること、が明らかになった。

#### A. 研究目的

PCB異性体のうち、2,4,5-三塩素置換ベンゼン（以下245型とする）あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有するもの、すなわち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)などは高残留性PCBとして知られており、ヒト血液中や肝臓中において高濃度で検出されている。

当研究室ではこれまでに、2,4,6-三塩素置換ベンゼン(以下246型とする)を有する PCB182の代謝を、ラットとモルモット肝ミクロゾーム(Ms)を用いて調べ、①両動物ともに代謝物 3'-OH 体を生成すること、さらに、② phenobarbital (PB)前処理ラット肝Msが、245型のPCB187、PCB183およびPCB180に比べ、10～50倍もの高い代謝活性を示すことを明らかにした。さらに、246型のPCB188の代謝を調べ、PCB182と同様に、容易に3'-OH体へと代謝されることを明らかにした。実際、246型のPCB異性体は6～7塩素化PCBであるにもかかわらず、ヒト組織でほとんど検出されていない。この理由として、非常に代謝されやすいからであろうと考えられる。昨年度はさらに、246 型 の 2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl

(PCB155)を用い、ラットとモルモット肝Msによる代謝を調べた。その結果、①両動物ともに代謝物3-OH体が1種類生成されること、②両動物ともに3-OH体の生成はPB前処理で促進されること、③3-OH体の生成活性はラットではるかに高いこと、が明らかになった。そこで本年度は、ヒト肝MsおよびこれまでにPCB代謝に関与することが報告されている4種類のヒトチトクロム P450 (CYP)、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6およびCYP3A4、を用いて、CB155代謝を調べた。

#### B. 研究方法

① 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。② ヒト肝 Ms およびヒト CYP 分子種: ヒト肝 Ms は 20 人から調製されたものを、ヒト CYP (1A2、2A6、2B6 および 3A4) はヒトリンパ芽球様細胞由来のものを、いずれも BD Gentest 社より購入した。③ ヒト肝 Ms およびヒト CYP による代謝: 40  $\mu$ M 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>、ヒト肝 Ms (0.5 mg protein)あるいは各 CYP 分子種(0.5 mg protein)を 100 mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)あるいは 100 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)とともに合計 0.5 mL として、37°C で 60 min インキュベートした。反応後、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 3 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-ECD で分析した。GC-ECD の測定条件は次の通りである。分析機器、Agilent 7890B (Agilent 製); カラム、DB-1 フェーズドキャピラリーカラム(30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m フィルム厚、J&W Scientific 製); キャリアーガス、N<sub>2</sub> (1 mL/min); カラム温度、210°C; 注入口温度、250°C; 検出器温度、300°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、ラットおよびモルモットの屠殺に際し、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

ヒト肝 Ms による代謝: PCB155 を、NADPH 存在下、好氣的にヒト肝 Ms とともに、37°C、60 min 反応させた。その結果、Fig. 1 に示すように、昨年度ラットおよびモルモット肝 Ms により生成された M1 (3-OH 体) がヒト肝 Ms でも生成され、PCB155 (保持時間 3.81min) に続き、保持時間 5.58min に検出された。

次に、M1 の定量であるが、昨年度は、GC-

ECD が修理不能のため、GC-MS を用いて定量し報告した。今年度は新たに購入した GC-ECD を用いて、ラットおよびモルモット肝 Ms で検討するとともに、ヒト肝 Ms でも検討し比較した (Table 1)。定量は PCB155 の検量線を用いて行った。まず、ラット肝では PB 前処理 Ms のみ、M1 (3-OH 体) が生成され、その活性は 4.662 nmol/hr/mg protein であった。一方、モルモット肝では、M1 (3-OH 体) は PB 前処理 Ms で最も多く生成されたものの、その生成活性は 0.193 nmol/hr/mg protein と低いものであった。ただし、ラットで見られなかった未処理および MC 前処理 Ms によっても、それぞれ 0.056 と 0.060 nmol/hr/mg protein の活性を示した。

一方、ヒト肝 Ms では、ラットおよびモルモットと同様に、M1 (3-OH 体) の生成が見られたが、その生成活性は 0.292 nmol/hr/mg protein であり、PB 前処理モルモットの 1.5 倍であった。

ヒト肝 CYP 分子種による代謝: これまでに PCB 代謝に関与することが報告されている CYP 分子種 4 種類による代謝を調べた。その結果、CYP1A2、CYP2A6 および CYP3A4 では代謝物は全く検出されなかったが、CYP2B6 でのみ M1 (3-OH 体) の生成が確認された。その活性は 0.702 pmol/hr/pmol CYP と高いものであった (Table 2)。

### D. 考察

これまでに PCB155 代謝に関して論文が 2 報出されている。それらによると、PCB155 を経口投与したラットの糞中に 3-OH 体が排泄されること、また、イヌ肝 Ms により、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 (4-OH 体や、塩素が 1 個脱離した OH 体) が生成されることが報告されている。

本研究では、ヒト肝における PCB155 代謝を調べた。その結果、Fig. 2 に示すように、今回初めてヒト肝において、PCB155 が CYP2B6 により、3-OH 体へ代謝されることを明らかにした (Fig. 2)。CYP2B6 の代謝活性もこれまでの PCB 代謝反応のうちで最も高いものであった。

しかしながら、246型 PCB が、構造的に非常に類似した 245型 PCB に比べ、なぜ極めて代謝され易いかといった理由はまだ不明であり、今後の課題である。

## E. 結論

PCB155は、ラットおよびモルモット肝Msと同様に、ヒト肝Msでも、一水酸化体（3-OH体）へと代謝された。また、PCB代謝活性を有することが報告されている4種類のCYP分子種のうち、CYP2B6のみが3-OH体を生成した。以上のことから、ヒト肝におけるPCB155代謝にはCYP2B6が強く関与す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, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',3,4',5,6,6'-七塩素化ビフェニル (CB188)のラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる代謝. 福岡医誌, **110**(2), 83-90 (2019).
- 2) Y. Kato, S. Tamaki, K. Haraguchi, S. Ikushiro, Y. Fujii, C. Ohta, K. Atobe, O. Kimura, T. Endo, N. Koga, S. Yamada, M. Degawa, Kanechlor 500-mediated changes in serum and hepatic thyroxine levels primarily occur in a transthyretin-unrelated manner. *J. Appl. Toxicol.*, **39**, 1701-1709 (2019).
- 3) 山本健太, 太田千穂, 徳富美沙紀, 古賀信幸, 5,7,4'-Trimethoxyflavonoid 類のラット肝ミクロゾームによる代謝—フラボン類とフラバノン類との比較—. 中村学園研究紀要, **52**, in press (2020).
- 4) 太田千穂, 山本健太, 徳富美沙紀, 古賀信幸, レスベラトロールメチル誘導体のラット肝ミクロゾームによる代謝および代謝物の抗酸化活性. 中村学園研究紀要, **52**, in press (2020).

### 2. 学会発表

- 1) 太田千穂, 山本健太, 木村 治, 遠藤哲也, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 古賀信幸, マメ科由来メキシソフラボン類の代謝と抗酸化性. 第73回日本栄養・食糧学会大会(静岡県立大学、静岡)、講演要旨集, p. 321. 令和元年5月17-19日.
- 2) C. Ohta, K. Yamamoto, O. Kimura, T. Endo, Y. Kato, Y. Fujii, K. Haraguchi, N. Koga, Metabolism of luteolin tetramethyl ether with rat liver microsomes. Asian Congress of Nutrition 2019 (Bali, Indonesia) 令和元年8月4~7日
- 3) N. Koga, K. Yamamoto, M. Tokutomi, C. Ohta, In vitro metabolism of 3,5,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone by rat liver microsomes. Asian Congress of Nutrition 2019 (Bali, Indonesia) 令和元年8月4~7日
- 4) Y. Fujii, T. Nakamura, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, K. H. Harada, A. Koizumi, K. Haraguchi, Seafood in lower trophic level is a possible source of human dietary exposure: perfluorinated carboxylic acids in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Japan. Dioxin 2019 (京都国際会議場, 京都) 令和元年8月26~30日
- 5) 山本健太, 徳富美沙紀, 太田千穂, 古賀信幸, 5,7,4'-Trimethoxyflavanone のヒト肝ミクロゾームによる代謝. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会(佐賀大・農) 令和元年10月12,13日
- 6) 太田千穂, 山本健太, 徳富美沙紀, 古賀信幸, 福岡県産香酸かんきつ木酢(キズ)果皮の機能性成分の分析および抗酸化特性. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会(佐賀大・農) 令和元年10月12,13日
- 7) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, PCB155の動物肝ミクロゾームによる代謝. 日本薬学会第140回年会(京都国際会議場、

京都) 令和 2 年 3 月 25～28 日

8) 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 140 回年会 (京都国際会議場、京都) 令和 2 年 3 月 25～28 日

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

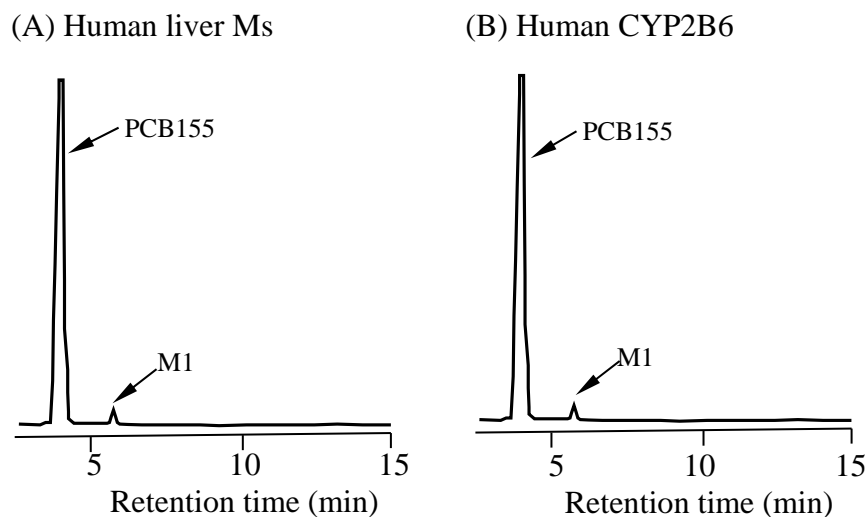


Fig.1 GC-ECD chromatograms of a methylated derivative of PCB155 metabolite produced by human liver Ms (A) and human CYP2B6 (B)

Table 1 Metabolism of PCB155 by liver microsomes of rats, guinea pigs and human

Animal	Treatment	3-OH-PCB155 formed (nmol/hr/mg protein)
Rat	Untreated	N.D.
	PB-treated	4.662 ± 0.201
	MC-treated	N.D.
Guinea pig	Untreated	0.056 ± 0.013
	PB-treated	0.193 ± 0.011
	MC-treated	0.060 ± 0.010
Human		0.292 ± 0.017*

N.D., not detected.

Rat and guinea pig liver microsomes were prepared from untreated, PB-treated and MC-treated animals.

Each value represents mean ± S.D. of four animals.

\*Value represents mean ± S.D. of three determinations.

Table 2 Metabolism of PCB155 by human CYP isoforms

CYP	3-OH-PCB155 formed (pmol/hr/pmol CYP)
1A2	N.D.
2A6	N.D.
2B6	$0.702 \pm 0.024$
3A4	N.D.

N.D., not detected.

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three determinations.

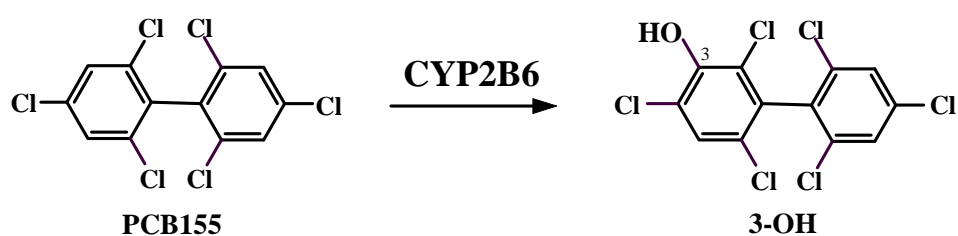


Fig. 2 Postulated metabolic pathway of PCB155 in human liver