

## 分担研究報告書

## 2,4,6-三塩素置換PCB異性体PCB154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 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 2,4,5,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB154)につき、今年度はラット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べ、PCB153 および PCB155 の代謝パターンと比較した。まず、phenobarbital (PB)前処理 Ms により生成される代謝物を GC-MS で調べたところ、2 つの代謝物(M1、M2)の生成が確認された。M1 が主代謝物で、M2 は微量代謝物であった。両代謝物(メチル化体)は、いずれも PCB154 より m/z 30 大きく、分子量 388 であることから、一水酸化(OH)体(メチル化体)であることが明らかになった。次に主代謝物 M1(メチル化体)の GC-MS における保持時間およびマスフラグメンテーションを、別途合成した 3'-MeO-PCB154 と比較したところ、ほぼ完全に一致した。さらに、主代謝物 M1 の生成活性を調べたところ、その活性は PB および dexamethazone (DEX)前処理 Ms で、それぞれ 556 および 62 pmol/hr/mg protein であった。未処理および 3-methylcholanthrene (MC)前処理の場合には、M1 の生成は全く見られなかった。以上の結果から、①PCB154 は、2,4,6-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位が主に水酸化されること、②M1 の生成には PB 誘導性の CYP2B1 が強く関与すること、③3-あるいは 3'-OH 体の生成され易さは、PCB155>>PCB154>PCB153 であることが明らかになった。

## A. 研究目的

周知の通り、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(以下、245型および2345型とする)は、ヒト血液中や肝臓中で高濃度残留している。Todakaらは、油症患者および健常者のいずれでも、特に、2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (PCB153)、2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (PCB180)および2,2',3,4,4',5'-hexaCB (PCB138)が最も多いこと、また、これらは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、当研究室ではこれまでに、2345型で2,4,6-三塩素置換ベンゼン(246型)から成るPCB182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、245型のheptaCB (PCB180、

PCB183、PCB187)に比べ、10~50倍もの高い活性でM1を生成することを明らかにした。さらに、246型のPCB188についても検討し、その結果、PCB182と同様に比較的容易にM1(3'-OH体)へと代謝されることを明らかにした。

ところで、246型のPCB異性体(PCB155、PCB182、PCB188)はヒト組織中からほとんど検出されていない。これらが、なぜ低残留性であるかという大きな理由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、245型と246型の両方の型であるPCB154についてラット肝Msによる代謝パターンを調べ、245型のPCB153および246型のPCB155と比較した(Fig. 1)。

## B. 研究方法

① PCB154 合成 : 2,4,5-trichloroaniline および 1,3,5-trichlorobenzene を、tetrachloroethylene に溶解し、isopentyl nitrite を添加後、110°C 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。HPLC の分析条件は以下の通りである。収量は 140 mg で純度は 95.5% (GC-ECD による)であった。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 予想代謝物 3'-MeO-PCB154 の合成 : 2,4,5-trichloroaniline および 2,4,6-trichloroanisole を合成原料とし、以下、PCB154 合成と同様に行った。③ ラット肝 Ms の調製 : Wistar 系雄性ラット(体重約 220g)を各群 4 匹ずつ合計 16 匹用いた。ラット肝 Ms は、未処理群、PB 前処理群 (80 mg/kg 体重 × 3 日間)、3-methylcholanthrene (MC) 前処理群 (20 mg/kg 体重 × 3 日間) および dexamethazone (DEX)前処理群 (100 mg/kg 体重 × 3 日間) のラットから、常法により調製した。④ 肝 Ms による PCB154 代謝 : 40 μM PCB154 を NADPH 生成系(0.33 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit)、6 mM MgCl<sub>2</sub>、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 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、GC-ECD で代謝物の定量を行った。GC-ECD の測定条件は以下の通りである。分析機器、GC-ECD7890B (Agilent 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、高純度 N<sub>2</sub> (6.5 mL/min) ; カラム温度、210°C ; 注入口温度、250°C ; 検出器温度、300°C。また、一部を分子量測定のため 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 (1.5 min) - 20°C/min - 230°C (0.5 min) - 4°C/min - 280°C (5 min) ; 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: PCB154 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 PCB154 代謝物(メチル化体)の GC-MS による分析結果を示す。PCB154 (保持時間 12.68 min)に続き、2つの代謝物ピークが保持時間 14.33 min および 14.46 min に検出された。主代謝物である後者を M1 とし、前者を M2 とした。両代謝物(メチル化体)は、いずれも分子量 388 であり、PCB154 の分子量より m/z 30 大きいことから、いずれも一水酸化体(メチル化体)であることが明らかになった。

次に、PCB154 代謝物の GC-MS の結果を Table 1 に示す。主代謝物 M1 は、保持時間およびフラグメンテーションが、別途合成した 3'-MeO-PCB154 と、ほぼ完全に一致した。これらの結果から、M1 は 3'-OH 体であると推定された。一方、M2 については、3-OH 体であると考えられるが、現在のところ、不明である。

ラット肝 Ms の PCB154 代謝活性: 4種類のラット肝 Ms による PCB154 代謝活性を Table 2 に示す。なお、主代謝物 M1 につき、PCB154 の検量線を用いて定量した。PB および DEX 前処理 Ms でのみ、M1 が生成され、その生成活性は、それぞれ 556 および 62 pmol/hr/mg protein であった。一方、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。なお、M2 に

についてはPB前処理Msでのみ生成が確認されたが極微量のため定量には至らなかった。

#### D. 考察

今回、ラット肝 Ms を用いて PCB154 代謝を調べたところ、PCB154 は PB および DEX 前処理 Ms により、比較的容易に代謝され、2 種類の一水酸化体 (M1, M2) に変換されることが明らかになった。このうち、主代謝物の M1 は、合成標品との比較により、3'-OH-PCB154 であることが判明した (Fig. 3)。微量代謝物の M2 は、恐らく、3-OH 体と考えられる。これらの結果を、既報の PCB153 および PCB155 の結果と比較すると、M1 の生成量は、PCB155>>PCB154 > PCB153 の順であった (Table 2)。

これらの結果から、PCB154 代謝には、PB 前処理により顕著に誘導されるラット CYP2B1 が関与すること、また、この CYP は 2,4,5-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位よりも 2,4,6-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位に対し、より強い水酸化活性を有していることが示唆された。しかしながら、246 型 PCB 異性体では、なぜ 245 型 PCB 異性体に比べ、10 倍以上も代謝され易くなるのかという点は不明である。なお、PCB153、PCB154 および PCB155 の *ortho* 位における置換塩素数が、それぞれ 2 個、3 個および 4 個であることを考えると、2 つのベンゼン環が回転して、より立体的になった方が CYP2B1 にとっては良い基質になるのかもしれない。

#### E. 結論

PCB154は、PB誘導性のラットCYP2B1により、2種類の一水酸化体 (3'-OH体>>3-OH体) へと代謝されること、また、CYP2B1は、245型PCB異性体よりも、246型PCB異性体の*meta*位をより強く水酸化することが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Y. Fujii, K. Harada, T. Nakamura, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, A. Koizumi and K. Haraguchi, Perfluorinated carboxylic acids in edible clams: A possible exposure source of perfluorooctanoic acid for Japanese population. Environ. Pollut., **263**, in press (2020).
- 2) O. Kimura, Y. Fujii, K. Haraguchi, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga and T. Endo, Effects of perfluoroalkyl carboxylic acids on the uptake of sulfobromophthalein via organic anion transporting polypeptides in human intestinal Caco-2 cells. Biochem. Biophys. Rep., doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100807 (2020).

##### 2. 学会発表

- 1) 太田千穂, 山本健太, 木村 治, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 古賀信幸, Quercetin pentamethylether のラット、モルモットおよびヒト肝酵素による代謝. 第74回日本栄養・食糧学会大会 (東北大学川内北キャンパス、仙台), 講演要旨集 p. 262. 令和2年5月15-17日. (5/17, 3B-07a)
- 2) 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酵素による *in vitro* 代謝および抗酸化特性. 令和2年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会 (崇城大学、熊本) A-13, 令和2年11月28, 29日 (オンライン口演発表) .

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

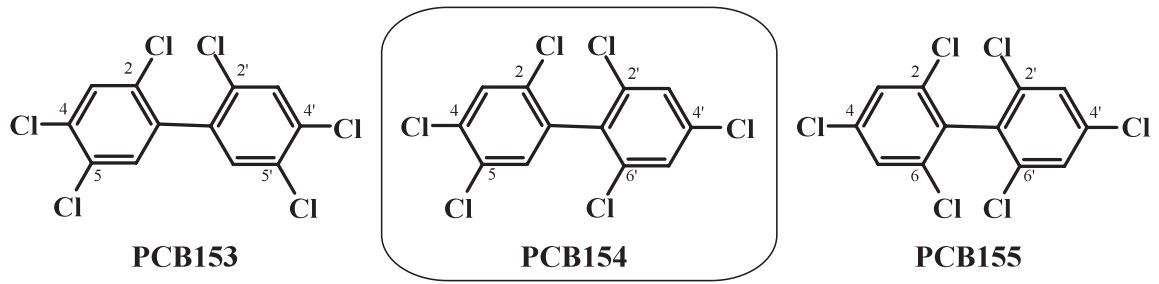
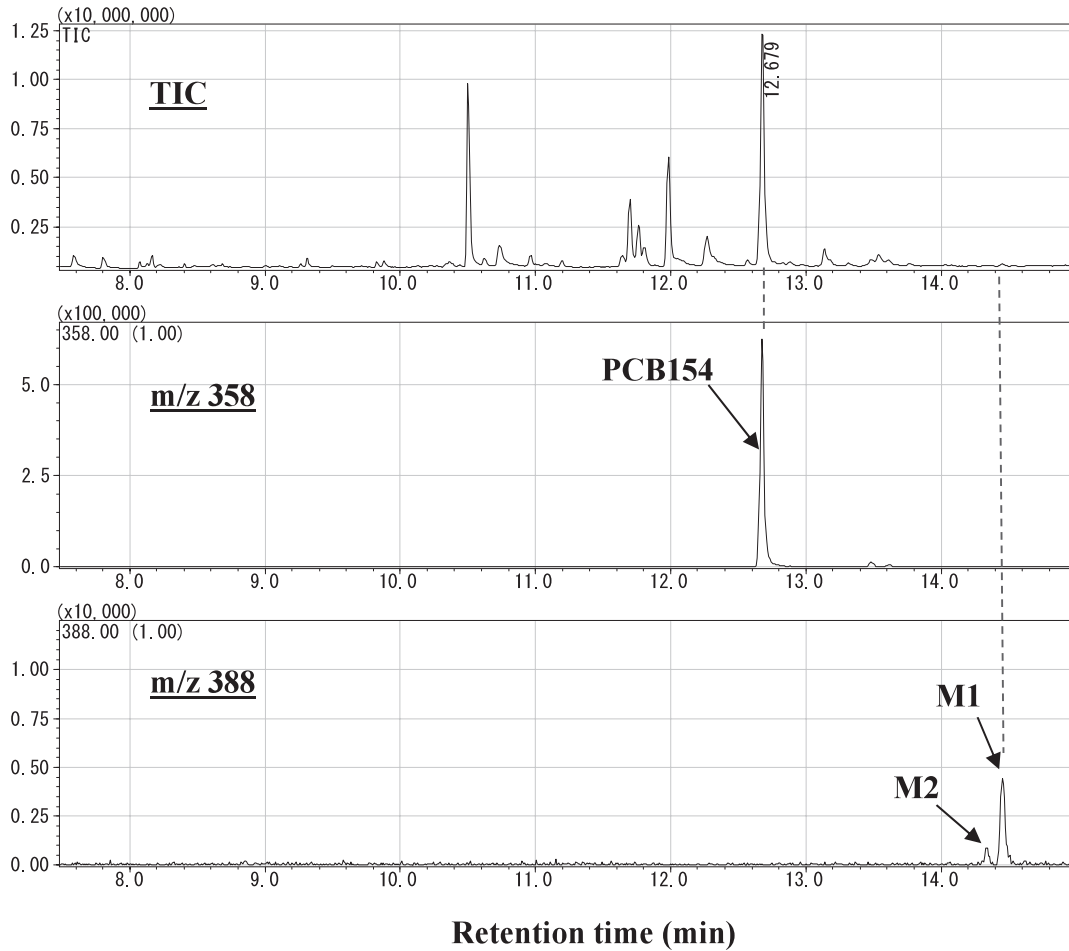


Fig. 1 Chemical structures of PCB153, PCB154 and PCB155

(A) Mass chromatograms



(B) Mass spectra of M1 and M2

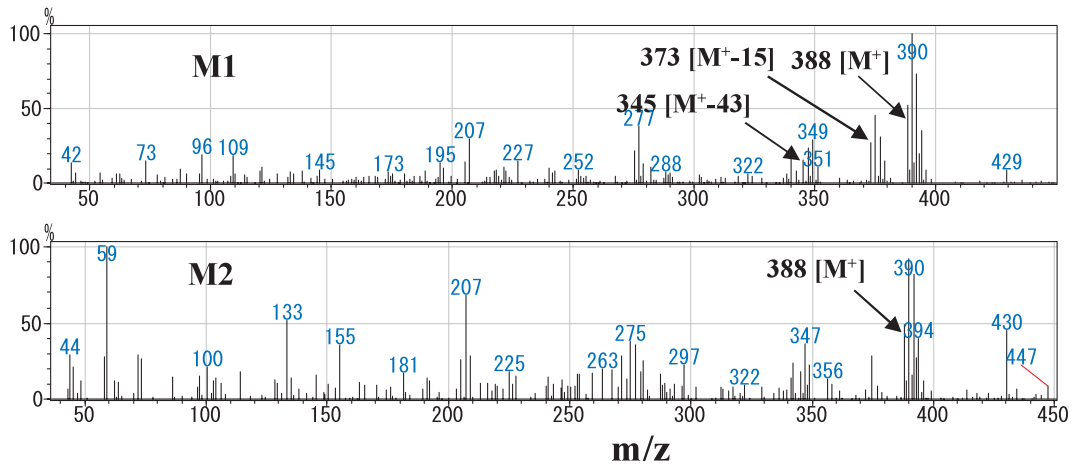


Fig. 2 GC-MS analysis of the methylated derivatives of two PCB154 metabolites formed by liver microsomes of PB-treated rats  
 (A) Mass chromatograms (B) Mass spectra of M1 and M2

Table 1 Mass spectral data and retention times of PCB154 and the methylated derivatives of M1 and M2

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M <sup>+</sup> ]	[M <sup>+</sup> -15]	[M <sup>+</sup> -35]	[M <sup>+</sup> -43]	[M <sup>+</sup> -50]	[M <sup>+</sup> -70]	
PCB154	358	100	-	5	-	-	74	12.68
M2	388	100	13	-	36	-	-	14.33
M1	388	100	53	-	31	-	-	14.46
3'-MeO-PCB154	388	100	51	-	30	-	-	14.46

-, not detected.

Table 2 Metabolism of PCB153, PCB154 and PCB155 by liver microsomes of untreated, PB-treated, MC-treated and DEX-treated rats

Treatment	M1 formed (pmol/hr/mg protein)		
	PCB153	PCB154	PCB155
None	N.D.	N.D.	N.D.
PB-treated	N.D.	556 ± 139	4,662 ± 201
MC-treated	N.D.	N.D.	N.D.
DEX-treated	N.D.	62 ± 23	321 ± 23

N.D., not detected. M1 means 3'-OH-PCB154 and 3-OH-PCB155.

Each value represents the mean ± S.D. of four rats.

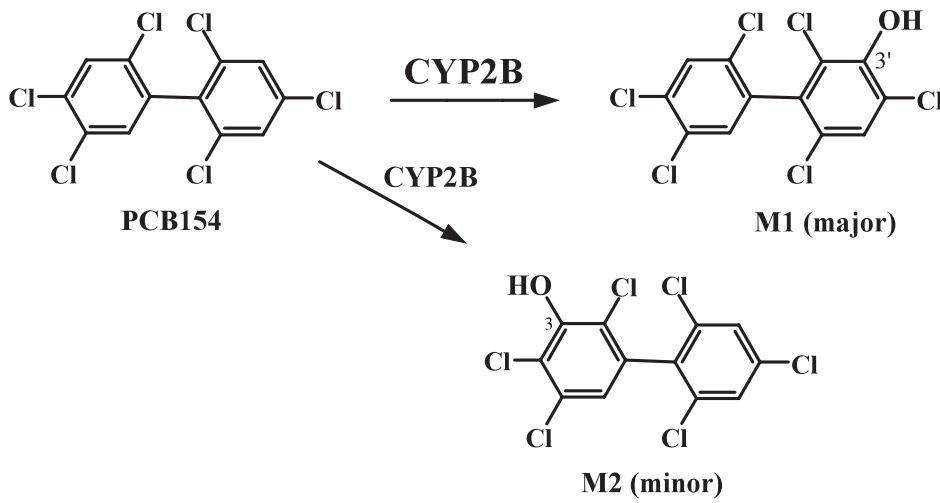


Fig. 3 Postulated metabolic pathways of PCB154 in rat liver