

分担研究報告書

低残留性である2,4,6-三塩素置換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 准教授

本年度は、低残留性 PCB である 2,4,6-三塩素置換型 PCB (246 型 PCB) の 1 つの 2,4,6,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB168)につき、ラット肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。肝 Ms は、未処理、phenobarbital (PB)前処理および 3-methylcholanthrene (MC)前処理ラット肝より調製した。37°Cで 60 分間反応したところ、未処理 Ms および MC 前処理 Ms では、代謝物は全く生成されなかった。一方、PB 前処理 Ms でのみ、代謝物が 1 種類(以下 M1 とする)生成された。PCB168 の検量線を用いて M1 を定量したところ、その生成活性は 9.58 nmol/hr/mg protein であった。次に、GC-MS で M1(メチル誘導体)の分子量を調べた結果、388 であり、PCB168 より 30 大きいことが明らかになった。この結果から、M1 は一水酸化(OH)体であることが示唆された。さらに、予想代謝物として 3-MeO-PCB168 を別途合成し、GC-MS において M1(メチル誘導体)と比較したところ、分子量および保持時間が完全に一致した。以上の結果から、①PCB168 は、2,4,6-三塩素置換ベンゼン側の *meta* 位 (3 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 体の生成され易さを他の 246 型 PCB と比較すると、PCB168 > PCB155 > PCB182 > PCB154 であることが明らかになった。

A. 研究目的

PCB類は一般に高残留性であるといわれるが、ヒト組織中で高濃度残留しているものは、共通して2,4,5-三塩素置換あるいは2,3,4,5-四塩素置換ベンゼンを有している(以下、245型および2345型と略する)。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)が多いこと、さらに、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、PCB182、PCB188、PCB155、等の246型PCBはヒト組織からほとんど検出されていない。当研究室ではこれまでに、2345型でかつ246型でもある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、他のheptaCB (PCB180、PCB183、PCB187)に比べ、10～50倍もの高い活性でM1を生成することも明らかにした。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。

これらの結果は、低残留性のPCBは塩素数が6～7個と多くても、塩素置換位置が2,4,5位から2,4,6位に変わっただけで、非常に代謝され易くなることを示唆している。本研究では、この点をさらに確かめるため、246型PCBの1つである2,3',4,4',5',6-六塩素化ビフェニル(PCB168)のラット肝Msによる代謝を調べた。

B. 研究方法

① PCB168 合成 : 3,4,5-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60mgで純度は99.5%(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(10×250mm i.d.、5µm、GL Sciences製);移動相、acetonitrile;流速、4mL/min;検出波長、254nm。② 予想代謝物 3-MeO-PCB168の合成: 3,4,5-trichloroaniline および 2,4,6-trichloroanisole を合成原料とし、以下、PCB168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(80mg/kg体重×3日間)および3-methylcholanthrene (MC)前処理群(20mg/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 PCB168 代謝: 40µM PCB168をNADPH生成系(0.33mM NADP、5mM glucose-6-phosphate、glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit)、6mM MgCl₂、ラット肝 Ms (1mg protein)および100mM HEPES 緩衝液(pH 7.4)とともに合計1.0mLとして、37°Cで60分間インキュベート後、反応液にchloroform-methanol (2:1) 1mLとn-hexane 3mL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-ECD(Agilent製);カラム、DB-1フューズドキャピラリーカラム(30m×0.25mm i.d.、0.25µmフィルム厚、J&W Scientific製);キャリアーガス、高純度N₂(6.5mL/min);カラム温度、210°C;注入口温度、270°C;検出器温度、350°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(30m×0.25mm i.d.、0.25µmフィルム厚、J&W Scientific製);キャリアーガス、He(1mL/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: PCB168を、NADPH存在下、好氣的にラット肝Msとともに、37°C、60分間反応した。Fig. 1にGC-ECDにおけるクロマトグラムを示した。PB前処理Msでは、PCB168(保持時間6.07min)に続き、1つの代謝物ピーク(以下M1とした)が保持時間9.86minに検出された。しかしながら、未処理およびMC前処理MsではM1は全く生成されなかった。

次に、PB前処理ラット肝Msにより生成されたM1(メチル化体)の分子量をGC-MSにより測定した。Fig. 2にその結果を示す。M1(メチル化体)は、分子量388を有しており、PCB168の分子量より30大きいことから、一水酸化体(メチル化体)であることが明らかになった。

さらに、M1のGC-MSにおける分析結果を、別途合成した予想代謝物3-MeO-PCB168と比較した(Table 1)。その結果、M1(メチル化体)は、分子量およびGCにおける保持時間が、別途合成した3-MeO-PCB168と、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。なお、今回は、GC-MS機器へのM1の注入量が少なかつたためか、ノイズが多く、正確なフラグメント([M⁺-15]および[M⁺-43])が得られず、比較するには至らなかった。

ラット肝 Ms の PCB168 代謝活性: PCB168の検量線を用いて、M1の定量を試みた。その結果、Table 2に示すように、PB前処理MsのM1生成活性は、9.58nmol/hr/mg proteinであ

った。この値は、これまでに報告した 246 型 PCB のうち、最も高く、PCB168 > PCB155 > PCB182 > PCB154 の順となった。

D. 考察

今回、ラット肝 Ms を用いて PCB168 代謝を調べたところ、PCB168 は PB 前処理 Ms により、容易に代謝され、1 種類の一水酸化体 M1 に変換されることが明らかになった。また、M1 は、合成標品との比較により、3-OH-PCB168 であることが判明した。これらの結果から、PCB168 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 246 型 PCB ではいずれも *meta* (3, 3', 5 あるいは 5') 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 における *meta* 位水酸化活性をみると、PCB154 を 1 とした場合、2~17 倍の差異がある。現在のところ、このような差異が何によるのかは説明できないが、化学構造から考察すると、PCB 骨格の 4 位から 4' 位までを軸として塩素が対照に置換されている場合、CYP2B1 にとってより良い基質になるのかもしれない。

E. 結論

PCB168 は、PB 誘導性のラット CYP2B1 により、1 種類の一水酸化体 (3-OH 体) へと代謝されること、また、これまでに報告した 246 型 PCB のうち、最も水酸化されやすいことが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 太田千穂, 加藤善久, 藤井由希子, 原口浩一, 木村 治, 古賀信幸, 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル(PCB155)のラット, モルモットおよびヒト肝マイクロゾーム, およびヒトチト

クロム P450 による代謝. 福岡医誌 **112**, 127-135 (2021).

- 2) 池田佳乃子, 佐野宏江, 宮内 優, 太田千穂, 古賀信幸, 田中嘉孝, 石井祐次, ダイオキシン低用量曝露母体の肝薬物代謝酵素活性に対するシークワサー由来ポリキシフラボノイド:ノビレチンの *in vitro* 阻害効果. 福岡医誌 **112**, 136-147 (2021).

2. 学会発表

- 1) 太田千穂, 加藤善久, 原口浩一, 藤井由希子, 木村 治, 遠藤哲也, 古賀信幸, 2,2',4,4',6,6'-六塩素化ビフェニル(PCB155)のヒト肝マイクロゾームおよびチトクロム P450 分子種による代謝. 日本薬学会第 141 回年会 (広島), 令和 3 年 3 月 25 -28 日. (新型コロナウイルスのため中止)
- 2) 太田千穂, 出口昌代, 木村 治, 藤井由希子, 原口浩一, 加藤善久, 古賀信幸, Quercetin pentamethylether (QPM)の 5-脱メチル化体の *in vitro* 代謝. 第 75 回日本栄養・食糧学会大会 (東京), 講演要旨集, p. 27. 令和 3 年 7 月 3, 4 日. (オンライン開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

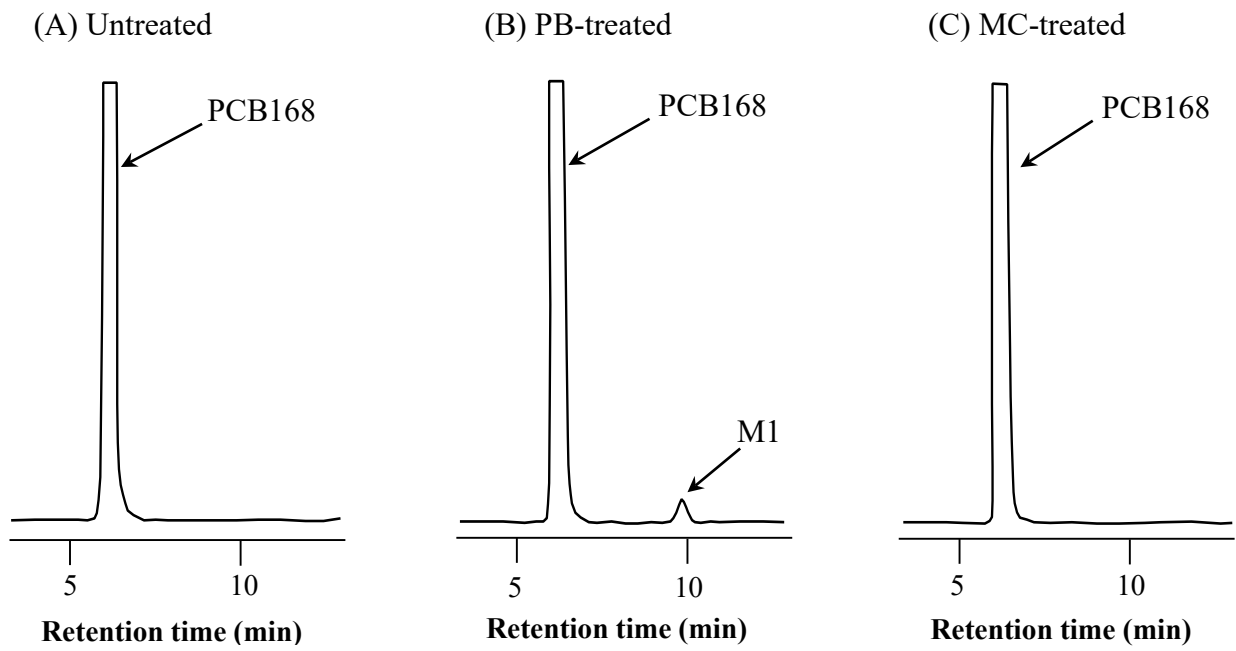
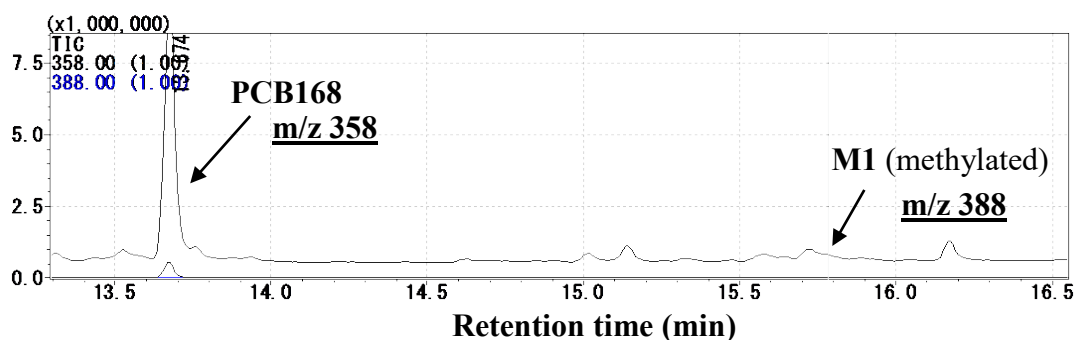


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of PCB168 and its metabolite M1 (the methylated derivative) formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

(A) Mass chromatogram



(B) Mass spectrum of the methylated M1

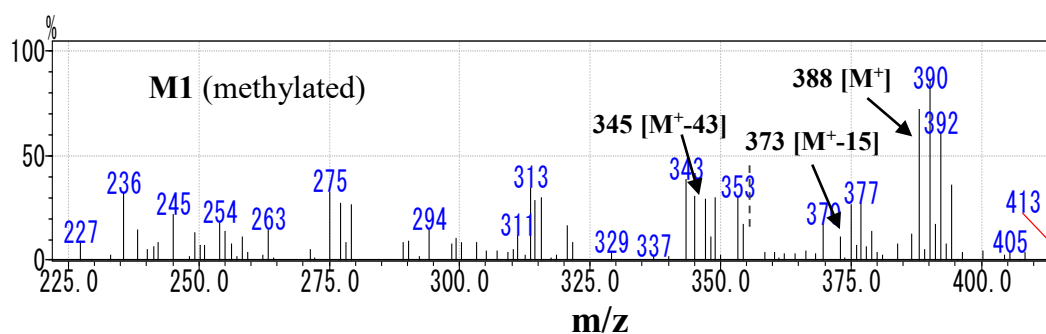


Fig. 2 GC-MS analysis of PCB168 and the methylated derivative of its metabolite M1 formed by liver microsomes of PB-treated rats

Table 1 Mass spectral data and retention times of PCB168 and the methylated derivative of its metabolite M1

Compound	Molecular weight	Mass spectral data (Relative abundance, %)						Retention time (min) in GC-MS
		[M ⁺]	[M ⁺ -15]	[M ⁺ -35]	[M ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	[M ⁺ -70]	
PCB168	358	100	-	5	-	-	74	13.73
M1	388	100	-	-	-	-	-	15.78
3-MeO-PCB168	388	100	51	-	30	-	-	15.78

-, not detected.

Table 2 Comparison of metabolic pattern of PCB168 and other 246-type PCB congeners in liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

PCB	Metabolite	M1 formed (nmol/hr/mg protein)		
		Untreated	PB-treated	MC-treated
PCB168	M1 (3-OH)	N.D.	9.58 ± 2.24	N.D.
PCB155	M1 (3-OH)	N.D.	4.66 ± 0.20	N.D.
PCB154	M1 (3'-OH)	N.D.	0.56 ± 0.14	N.D.
PCB182	M1 (3'-OH)	B.D.	1.37 ± 0.16	N.D.

N.D., not detected. B.D., below detection limit.

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

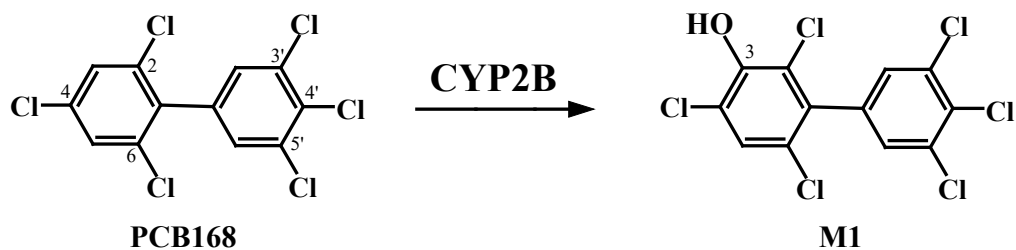
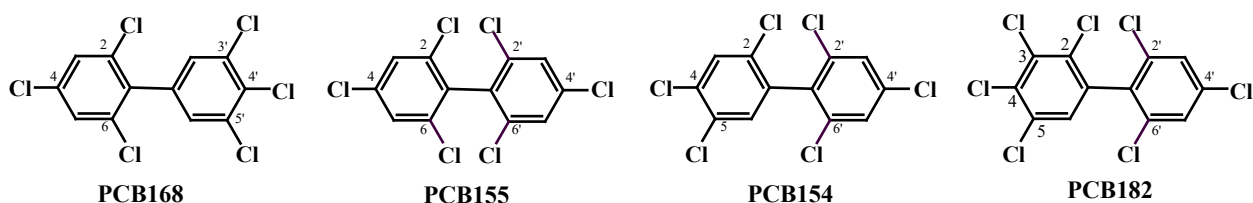


Fig. 3 Postulated metabolic pathways of PCB168 in rat liver