

2,4,6-三塩素置換型PCB119の動物肝ミクロゾーム(Ms)による代謝研究

研究分担者 太田 千穂 中村学園大学栄養科学部 准教授
研究協力者 古賀 信幸 中村学園大学 名誉教授

本年度は、2,4,6-三塩素置換型 PCB (246 型 PCB)の 1 つである 2,4,6,3',4'-pentachlorobiphenyl (PCB119)につき、ラットおよびヒト肝ミクロゾーム(Ms)による代謝を調べた。ラット肝 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、PB 前処理 Ms では、代謝物が 1 種類(以下 M1 とする)生成されたが、未処理 Ms および MC 前処理 Ms では、代謝物の生成は全く見られなかった。ヒト肝 Ms では、M1 のみ生成された。そこで、GC-MS により M1 (メチル化体)の分子量を調べた結果、354 であり、PCB119 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)体であることが推定された。さらに、予想代謝物として 3-MeO-PCB119 を別途合成し比較したところ、分子量、マスフラグメンテーションおよび保持時間が完全に一致した。さらに、PCB119 の検量線を用いて M1 を定量したところ、その生成活性は、ラット肝 Ms で 1.57 nmol/hr/mg protein、一方、ヒト肝 Ms では 0.22 nmol/hr/mg protein であった。以上の結果から、PCB119 はラットおよびヒト肝において、比較的容易に 3-OH 体へと代謝されること、また、この生成には PB 誘導性で 3 位水酸化を触媒するラット CYP2B1 およびヒト CYP2B6 が強く関与することが示唆された。

A. 研究目的

PCB類のうち、ヒト組織中で高濃度残留しているものは、化学構造的に、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血中PCB濃度を調べ、いずれの場合も 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)が多く残留すること、さらに、油症患者ではこれらが健常者の1.6~2.2倍多いことを報告した。

当研究室ではこれまでに、PCB180の異性体で、245型を246型に換えた化学構造のPCB182について、ラットおよびモルモット肝Msによる代謝を調べたところ、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、高残留性のPCB180に比べ、数10倍の高い活性でM1を

生成することを明らかにした。さらに、PCB187の異性体で246型のPCB188についても検討し、PCB182と同様に比較的容易に3'-OH体へと代謝されることが明らかになった。実際、PCB182、PCB188、等の246型PCBはヒト組織からほとんど検出されていない。

これらの結果は、塩素数が6~7個の高塩素化PCBであっても、塩素置換位置が2,4,6位であれば、易代謝性になることを示している。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',6-五塩素化ビフェニル(PCB119)のラットおよびヒト肝Msによる代謝を調べた。

B. 研究方法

① PCB119 合成 : 3,4-dichloroaniline 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 42 mg で純度は 99.8% (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-PCB119 の合成 : 3,4-dichloroaniline および 2,4,6-trichloroanisole を合成原料とし、以下、PCB119 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 12 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) および 3-methylcholanthrene (MC) 前処理群 (20 mg/kg 体重 × 3 日間) のラットから、常法により調製した。④ ヒト肝 Ms : 白人男性 20 名 (47.9 ± 29.0 歳) の pooled Ms を Corning 社から購入した。⑤ 肝 Ms による代謝 : 40 μM PCB119 を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP、5 mM glucose-6-phosphate、glucose-6-phosphate dehydrogenase 1.0 unit)、6 mM MgCl₂、ラット肝 Ms あるいはヒト肝 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 分間インキュベート後、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-ECD (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 N₂ (6.5 mL/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 (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 (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。(承認番号 動倫 2022-2)

C. 研究結果

代謝物の化学構造 : PCB119 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 における代謝物のクロマトグラムを示した。PB 前処理 Ms では、PCB119 (保持時間 4.14 min) に続き、1 つの代謝物ピーク (以下 M1 とする) が保持時間 6.48 min に検出されたが、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 (メチル誘導体) の分子量を GC-MS により測定した。Table 1 にその結果を示す。M1 (メチル誘導体) は、分子量 354 を有しており、PCB119 の分子量より 30 大きいことから、水酸化 (OH) 体 (メチル誘導体) であることが明らかになった。さらに、この結果を、別途合成した予想代謝物 3-MeO-PCB119 と比較したところ、M1 (メチル化体) は、分子量、マスフラグメンテーションおよび GC における保持時間が、3-MeO-PCB119 と完全に一致した。これらの結果から、M1 は 3-OH 体であると決定された。

ラット肝 Ms の PCB119 代謝活性 : PCB119 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、1.57 nmol/hr/mg protein であった。この値は、これまでに報告した 246 型 PCB と同様に高いものであり、PCB168 > PCB155 > PCB119 > PCB182 の順となった。

ヒト肝 Ms の PCB119 代謝活性 : ヒト肝 Ms で

も、ラット肝 Ms と同様に、M1 が保持時間 6.48 min に検出された。その生成活性は、0.22 nmol/hr/mg protein であり、ラットの約 14%と低かった。

D. 考察

2006 年の戸高らの報告では、健常者(福岡県)の血中 PCB118 濃度は、PCB153、PCB180、PCB138 に次いで第 4 位であった。また、2004 年の健常者(那珂川町)および 2015 年の健常者(久山町)では PCB187/182 が第 4 位に入り、PCB118 は第 5 位のヒト血中での高濃度を示した。一方、油症患者においては、前述の PCB 異性体はいずれも健常者の 3~5 倍と高濃度検出されるのに対し、PCB118 は半減していることが報告されている。以前から、PCB118 は、摂取した PCB 類により誘導されたシトクロム P450 (CYP)が代謝を促進し、その結果、体外に排泄されたものと考えられている。また、これまでに、ヒト血中に残存する PCB 水酸化体のうち、4-OH-PCB107 が 3 番目に高濃度で検出されているが、PCB118 が親 PCB であろうと考えられている。

今回の PCB119 は、245 型の PCB118 に対応する 246 型 PCB であり、PB 前処理ラット肝 Ms およびヒト肝 Ms により、容易に 3-OH 体に変換されることが明らかになった(Fig. 2)。また、この代謝には、PB 前処理で顕著に誘導されるラット CYP2B1 が関与することが示唆された。さらに、これまで報告した 246 型 PCB の代謝パターンと非常に似ていることから、ヒト CYP2B6 がこの代謝に強く関与していることが示唆された。なお、これらの CYP は、246 型 PCB に対し置換塩素数の多少にかかわらず、メタ位に対する強い水酸化活性を示すことが示唆された。

実際には、ヒト血中において、246 型 PCB はほとんど検出されないが、一連の研究から、いずれの 246 型 PCB も、245 型 PCB に比べ、非常に代謝されやすいことが明らかになってきている。

E. 結論

PCB119 は、他の 246 型 PCB と同様に、ラット肝では PB 誘導性の CYP2B1 により、一方、ヒト肝では CYP2B6 により、比較的容易に、3-OH 体へと代謝される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) Y. Fujii, K. H. Harada, Y. Ito, M. Yoshitake, C. Matsunobu, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga, O. Kimura, T. Endo, A. Koizumi, and K. Haraguchi, Profiles and determinants of dicofol, endosulfans, mirex, and toxaphenes in breast milk samples from 10 prefectures in Japan. *Chemosphere*, 311 (2023) 137002.
- 2) O. Kimura, C. Ohta, N. Koga, Y. Kato, K. Haraguchi, and T. Endo, Effect of 5,7-dimethoxyflavone on the efflux transporter expression and transport function in Caco-2 cells. *J. Pharma. Pharmacol.*, 9(1), 9 (2022).

2. 学会発表

- 1) 7,8,3',4'-Tetramethoxyflavone (7834-TMF) 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. 太田千穂、緒方瞳、加藤善久、木村 治、藤井由希子、原口浩一、古賀信幸、第 76 回日本栄養・食糧学会大会、2022 年 6 月 10~12 日、武庫川女子大学(神戸) p281.
- 2) 5,6,7-Trimethoxyflavone (567-TMF) の動物肝およびヒト肝ミクロゾームによる代謝とその代謝物の抗酸化活性. 出口昌代、太田千穂、古賀信幸(中村学園大院・栄養)、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部 2022 年度合同支部大会、2022 年 11 月 19、20 日、鹿児島大学(鹿児島)
- 3) ラット肝およびヒト肝ミクロゾームによる sinensetin の代謝 - 5 位脱メチル化体の生成 - . 杉村果奈、古賀信幸、太田千穂(中村学園大院・栄養)、日本栄養・食

糧学会九州・沖縄支部合同支部大会、
2022年11月19、20日、鹿児島大学（鹿
児島）

- 4) 2,4,6-三塩素置換 PCB 異性体 PCB168 のラ
ット肝ミクロゾームによる代謝. 太田千穂、加
藤善久、藤井由希子、原口浩一、木村 治、
古賀信幸、日本薬学会第 143 年会、令和 5
年 3 月 25～28 日、北海道大学(札幌)
- 5) Caco-2 細胞における排出トランスポータ
ーの発現と輸送能に及ぼす 5,7-ジメトキ
シフラボンの影響. 木村 治、町田拓自、
柳 圭鉉、足達令昂、太田千穂、古賀信幸、
加藤善久、藤井由希子、原口浩一、飯塚
健治、遠藤 泰、日本薬学会第 143 年会、
令和 5 年 3 月 25～28 日、北海道大学（札
幌）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(A) Untreated

(B) PB-treated

(C) MC-treated

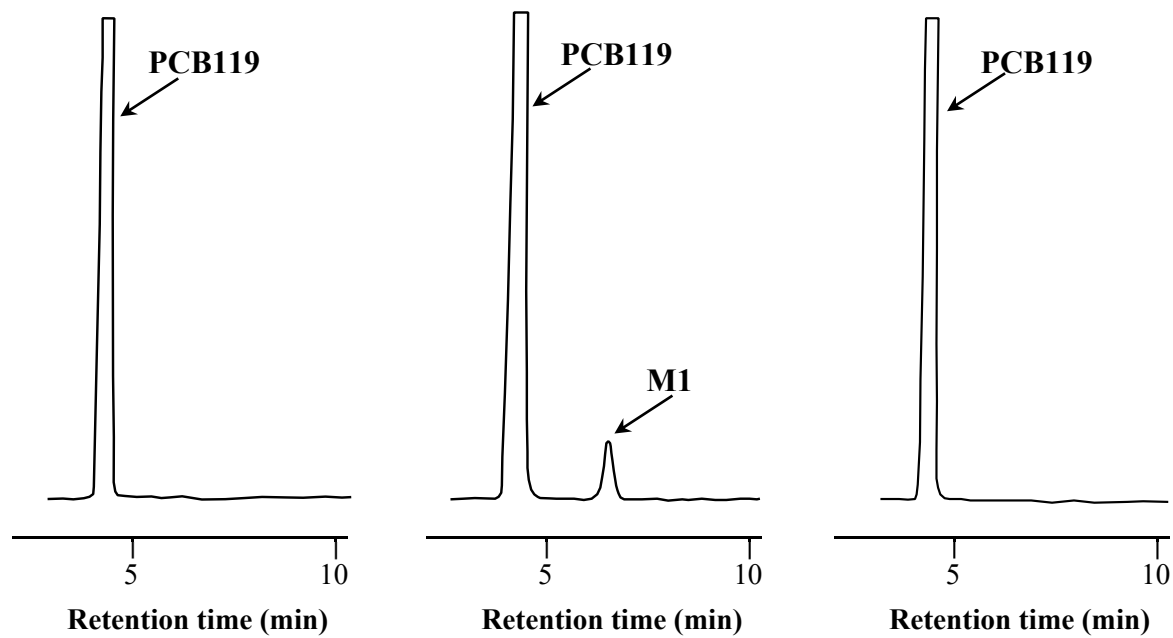


Fig. 1 GC-ECD chromatograms of PCB119 and its metabolite M1 (the methylated derivative) formed by liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

Table 1 Mass spectral data and retention times of PCB119 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 ⁺ -43]	[M ⁺ -50]	[M ⁺ -70]	
PCB119	324	100	-	-	-	79	12.20
M1 (methylated)	354	100	35	45	10	-	14.01
3-MeO-PCB119	354	100	37	45	10	-	14.01

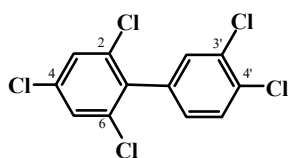
-, not detected.

Table 2 Comparison of metabolic pattern of PCB119 and other 246-type PCB congeners in liver microsomes of untreated, PB-treated and MC-treated rats

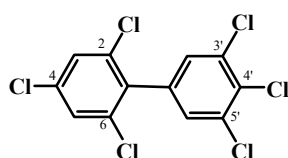
PCB	Metabolite	M1 formed (nmol/hr/mg protein)		
		Untreated	PB-treated	MC-treated
PCB119	M1 (3-OH)	N.D.	1.57 ± 0.23	N.D.
PCB168	M1 (3-OH)	N.D.	9.58 ± 2.24	N.D.
PCB155	M1 (3-OH)	N.D.	4.66 ± 0.20	N.D.
PCB182	M1 (3'-OH)	B.D.	1.37 ± 0.16	N.D.

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

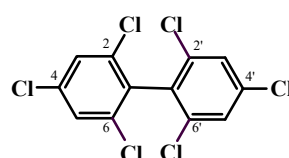
Each value represents the mean ± S.D. of four rats.



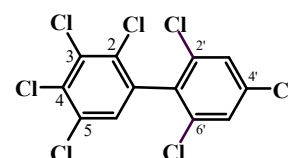
PCB119



PCB168



PCB155



PCB182

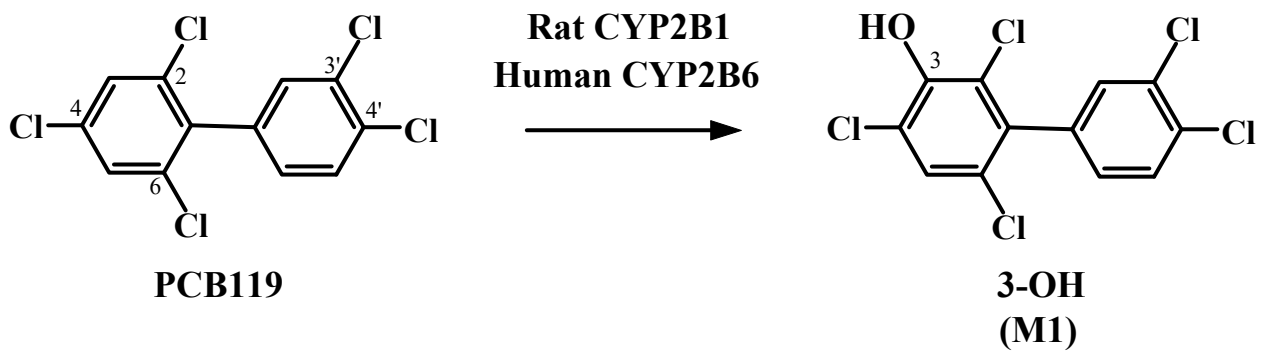


Fig. 2 Postulated metabolic pathway of PCB119 in rat and human liver