

## マウスにおける 2,5,2',5'-Tetrachlorobiphenyl の代謝に及ぼすフェノバルビタールの影響

水谷 民雄

### Effects of Phenobarbital on the Metabolism of 2,5,2',5'-Tetrachlorobiphenyl in Mice

TAMIO MIZUTANI

Effects of phenobarbital (PB), a potent inducer of microsomal drug-metabolizing enzymes, on the levels of metabolites of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) were studied in mice.

Pretreatment of mice with PB (100 mg/day/kg body weight) for 3 days before administration of a single dose of 2,5,2',5'-TCB (8 mg/mouse) resulted in 40 and 60% decreases of unchanged TCB in feces and whole-body tissues, respectively.

The fecal excretion of methylthio-2,5,2',5'-TCB's, which did not show any accumulation in tissues, was increased about 3 times the control value, whereas no alteration of the levels of methylsulfonyl-2,5,2',5'-TCB's were observed in both feces and tissues.

This marked increase in the level of methylthio-TCB's is suggestive of the participation of microsomal drug-metabolizing enzymes in the formation of these metabolites.

PB-pretreatment also resulted in a 40% increase in the fecal excretion of 3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB.

#### I 緒 言

塩化ビフェニル (PCB) は、すでに1930年代からいわゆる塩素痤瘡、肝障害などをひきおこす職業性の有害物質として知られていた。

近年のPCBの毒性学的研究は、1968年にわが国において油症 (いわゆるカネミライスオイル中毒) とよばれるPCBの経口摂取による亜急性中毒症が集団発生したことを契機として始められた。また、1970年以降はPCBによる世界的な規模での環境汚染の実態が明らかにされたことから、その毒性学的研究は広い研究者の関心をよぶところとなった。

ところで、PCBの代謝研究はその毒性発現機構を解明するうえで重要な意義をもっている。最近、いくつかのPCB異性体についてラット、ウサギ、サルなどにおける代謝研究が行なわれているが、いずれの場合も主要な代謝産物は母化合物のヒドロキシ体であると報告されている<sup>1)</sup>。著者ら<sup>2)</sup>はさきに 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl (TCB) のマウスにおける代謝につい

て研究し、新代謝物として 3- および 4-methylthio-2,5,2',5'-TCB および 3- および 4-methylsulfonyl-2,5,2',5'-TCB を同定した。ここに見出された代謝様式は、PCB異性体についてはもちろん、芳香族ハロゲン化合物一般についてみてもその例がなく、これら代謝物の生成機構の解明はきわめて興味深い課題である。

今回は、この代謝機構を解明する試みの一部として、肝ミクロゾーム薬物代謝酵素の誘導剤であるフェノバルビタール (PB) がマウスにおける 2,5,2',5'-TCB の代謝に及ぼす影響について検討した。

#### II 実験方法

##### 1. 化合物の合成

2,5,2',5'-TCB は 2,5-dichloriodobenzene から Ullmann 反応の変法<sup>3)</sup>によって合成した。

3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB および 4-hydroxy-2,5,2',5'-TCB は 2,5-dichloroaniline と 2,5-dichloroanisole から Gardner ら<sup>4)</sup>の方法に準じて合成した。

##### 2. 実験動物および薬物の投与

体重約 20g の dd 系雌マウスを用い、PB 投与群と対照群それぞれ 4 匹ずつとした。

PB 投与群には PB 1 日量 100mg/kg を水溶液として腹腔内に 3 日間連続投与し、4 日目に 2,5,2',5'-TCB 8mg を大豆油 0.2ml に溶解して腹腔内に投与した。

対照群は 3 日間 PB 投与群と同一条件で飼育したのち、4 日目に 2,5,2',5'-TCB 8mg を大豆油 0.2ml に溶解して腹腔内に投与した。

### 3. 試料の採取

2,5,2',5'-TCB 投与後毎日、6 日間にわたって糞を採取した。糞は 4 匹分を合して分析に供した。

2,5,2',5'-TCB 投与後 6 日目にマウスを屠殺し、全身を分析に供した。

### 4. 糞中代謝物の抽出・分離・定量

デシケーター中で五酸化りんを用いて乾燥した糞を乳鉢で粉碎したのち、ソックスレー抽出装置を用いてベンゼンで抽出した。

ベンゼン抽出溶液を Kuderna-Danish 濃縮装置を用いて 10ml に濃縮、その 2ml をフェノール性代謝物の定量に、また、残りの 8ml を中性代謝物の定量に用いた。

#### (1) フェノール性代謝物の分離・定量

上記の糞抽出ベンゼン溶液 2ml に乾燥空気を吹きつけ、ほとんど完全にベンゼンを除去したのち、残留物をメタノール 10ml に溶解する。このメタノール溶液に常法に従って調製したジアゾメタンのエーテル溶液を過剰に加え、室温で 30 分放置する。反応液を水で希釈したのち n-ヘキサンで抽出した。n-ヘキサン溶液は乾燥、濃縮したのち、Holden ら<sup>5)</sup>の方法に準じてシリカゲルドライカラムクロマトグラフィーを行ない、n-ヘキサンによる溶出液 20ml を採取した。この溶出液を n-ヘキサンで適当に希釈してガスクロマトグラフに注入した。

代謝物の定量は、3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB 標品のベンゼン溶液について試料溶液と同様の操作を行ない、ピーク高法で作成した絶対検量線にもとづいて行なった。

#### (2) 中性代謝物の分離・定量

前記の糞抽出ベンゼン溶液 8ml に乾燥空気を吹きつけ、ほとんど完全にベンゼンを除去する。残留物に 1N-KOH (70% エタノール溶液) 15ml を加え 1 時間加熱、還流したのち、反応液を水で希釈し、n-ヘキサンで抽出する。n-ヘキサン溶液は乾燥、濃縮したのち、さきに報告した方法<sup>2)</sup>に従ってシリカゲルドライカラムクロマトグラフィーを行ない、それぞれ未変化体、メチルチオ体、およびメチルスルフォニル体を

含む 3 つのフラクションに分画した。

メチルチオ体を含むフラクションは次項に示す方法によって酸化を行ない対応するメチルスルフォニル体に変換したのち、また、その他のフラクションは直接に、それぞれガスクロマトグラフィーに供し、各成分の定量を行なった。

### 5. メチルチオ体含有フラクションの酸化反応

前項におけるシリカゲルドライカラムクロマトグラフィーで得たメチルチオ体含有フラクションを共栓試験管にとり、乾燥空気を吹きつけて溶媒をほとんど完全に除去する。酢酸 3ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1ml を加え、ゆるやかに栓をして水浴上で 70°, 1 時間、ときどき振りまぜながら加熱する。反応液を水で希釈し、n-ヘキサンで抽出する。n-ヘキサン溶液を 5% NaHSO<sub>3</sub> 溶液で洗浄、乾燥したのちガスクロマトグラフィーに供した。

### 6. 体組織中代謝物の抽出・分離・定量

マウスの屍体をナス形フラスコに入れ、1N-KOH (50% エタノール溶液) 50ml を加え、還流冷却器を付して体組織が完全に溶解するまで 1.5~2 時間加熱、還流する。分解溶液に水 50ml を加えたのち n-ヘキサンで抽出する。n-ヘキサン溶液を水で洗浄、乾燥したのち濃縮し、4-(2) 項に記した方法で 3 つのフラクションに分画した。それぞれのフラクションをガスクロマトグラフィーに供し、各成分の定量を行なった。

### 7. ガスクロマトグラフィー

装置は島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-3AE を使用した。

分離カラムは 2% OV-1/Chromosorb W AW-DMCS を充填したガラスカラム (0.3cm×150cm) を用い、カラム温度: 180°, キャリアーガス: N<sub>2</sub>(0.8kg/cm<sup>2</sup>), 検出器: ECD の条件で分析を行なった。

## Ⅲ 結果および考察

### 代謝物の同定

Fig. 1 に PB 投与群マウスから得た糞抽出物の各フラクションのガスクロマトグラムを示した。

中性代謝物の各フラクションに認められたピークは前報<sup>2)</sup>で報告した 2,5,2',5'-TCB 単独投与の場合とまったく同一であり、それぞれの保持時間から未変化の 2,5,2',5'-TCB, 3- および 4-methylthio-2,5,2',5'-TCB, および 3- および 4-methylsulfonyl-2,5,2',5'-TCB と同定された。

フェノール性代謝物は直接ガスクロマトグラフィーに供するとカラム内で分解する傾向が認められたのでジアゾメタンによって対応するメチルエーテルとした

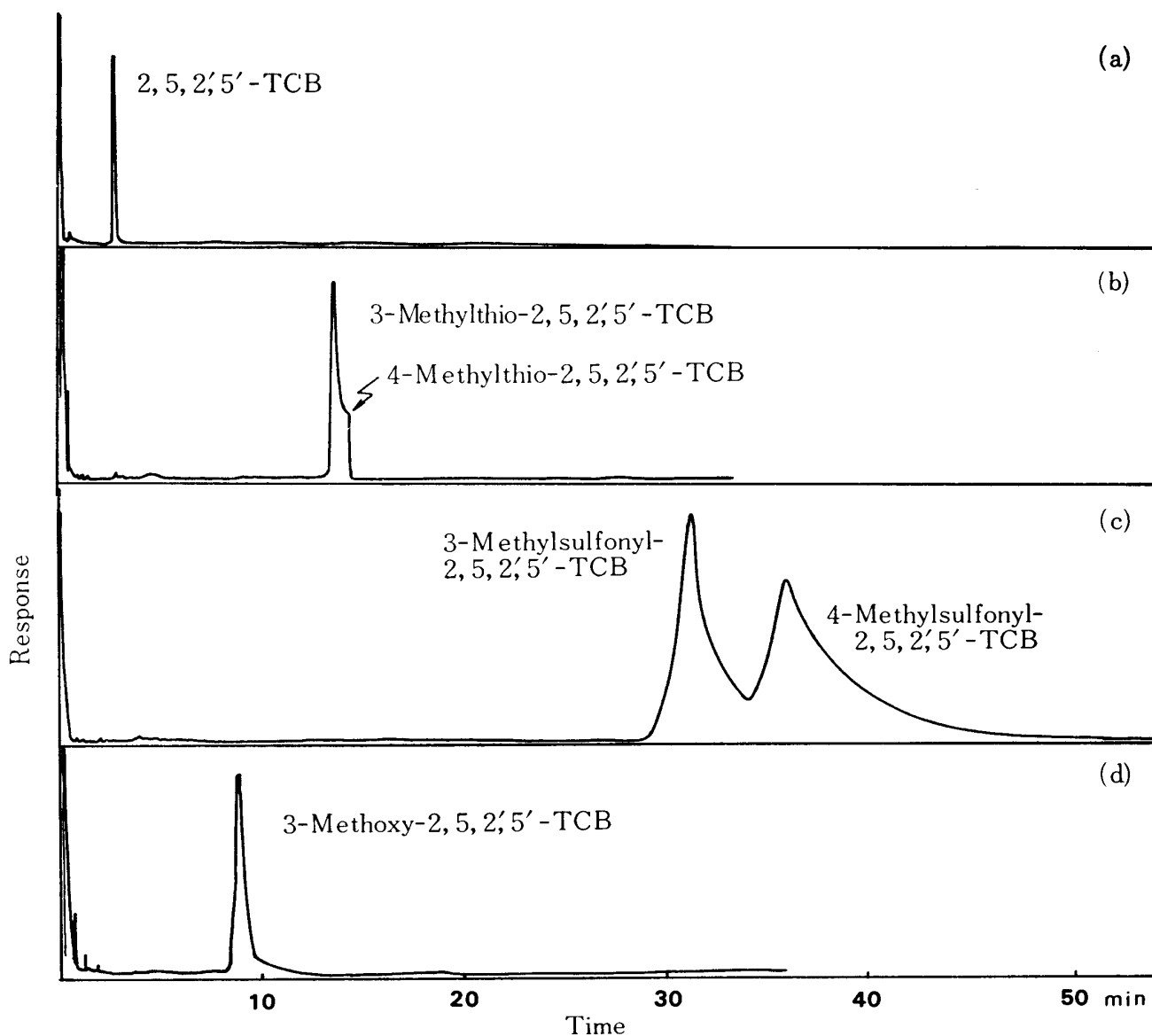


Fig. 1. Gas Chromatograms of the Fecal Matabolites Fractionated by Dry Column Chromatography: (a) neutral fraction 1; (b) neutral fraction 2; (c) neutral fraction 3; (d) phenolic fraction treated with diazomethane. Conditions: column, 2% OV-1 on Chromosorb W, 0.3cm×150cm; column temp., 180°; carrier gas, N<sub>2</sub>, 0.8 kg/cm<sup>2</sup>

のちに分析を行なった。クロマトグラム上にはPB投与群, 対照群ともに 3-hydroxy-2,5,2',5'-TCB のメチルエーテルと一致するピークのみを認め, 4-hydroxy-2,5,2',5'-TCB のメチルエーテルと一致するピークは認められなかった。ただし, 今回の分析条件のもとでは 3-ヒドロキシ体メチルエーテルと 4-ヒドロキシ体メチルエーテルの保持時間がきわめて近接しているため, その存在比によっては両者のピークが完全分離しない可能性もあり, 上記の結果から 4-ヒドロキシ体の生成を完全に否定することはできないものと考え

る。なお, 2,5,2',5'-TCB のフェノール性代謝物に関し

ては, Gardner ら<sup>4)</sup> がウサギ尿中に 3-ヒドロキシ体および 4-ヒドロキシ体を見出しているが, 吉村ら<sup>6)</sup> はラット糞中には 3-ヒドロキシ体のみが存在し, 4-ヒドロキシ体は見出せなかったと報告している。

未変化体について

Fig. 2 に未変化体の糞中排せつ量の経日的な変化と 6 日間の累積排せつ率を示した。

Table 1 には 2,5,2',5'-TCB 投与後 6 日目における未変化体, メチルチオ体, およびメチルスルフォニル体の体内残留量の測定結果を示した。

未変化体の体内残留量の投与量に対する比率は対照群が 18.9% に対して PB 投与群では 7.7% となってい

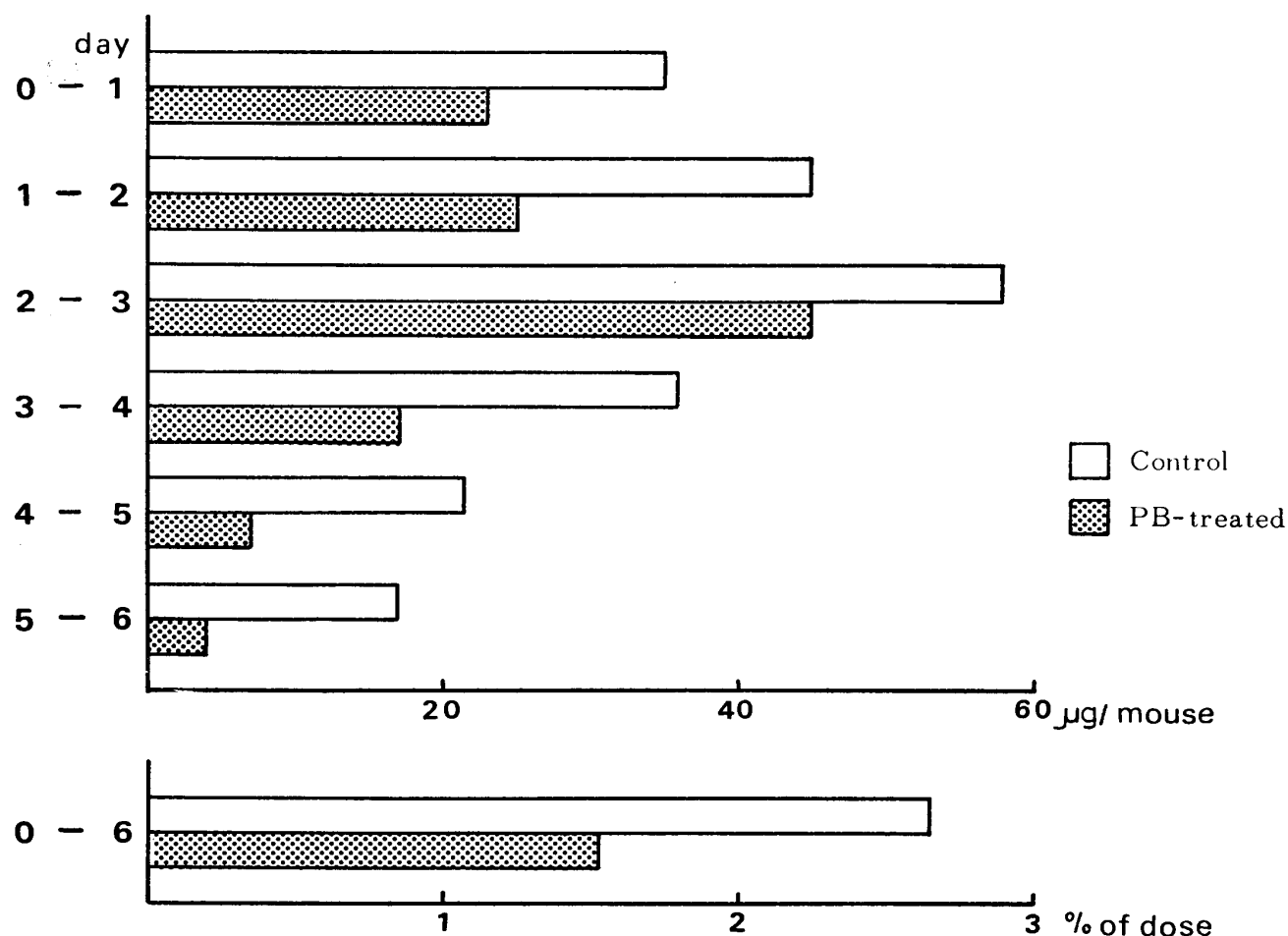


Fig. 2. Daily and Cumulative Excretion of Unchanged 2,5,2',5'-TCB in Mice Feces.

Table 1. Contents of 2,5,2',5'-TCB and its Metabolites in Whole-Body Tissues of Mice

Group	% of Dose		
	2,5,2',5'-TCB	3- and 4-methylthio-2,5,2',5'-TCB's	3- and 4-methylsulfonyl-2,5,2',5'-TCB's
Control	18.9±5.9	not detected	0.16±0.02
PB-treated	7.7±2.0	not detected	0.14±0.07

Values are mean  $\pm$  S. E. M. for 4 mice.

る。

一方、未変化体の糞中排せつ量は投与後3日目に極大に達し、以後徐々に減少してゆく。6日間の累積排せつ率は対照群が2.6%に対してPB投与群では1.5%と、約40%の減少を示している。この排せつ率の減少は、PB投与による未変化体の体内残留量の減少を反映したものであると考えられる。

今回の実験においては尿中排せつ物についての検討は行なわなかったが、未変化体、メチルチオ体、およびメチルスルフォニル体については、その小さい極性から判断して尿中排せつはほとんどないものと考えられる。したがって、これらの化合物については、糞中

排せつ率と体内残留率との和をもってその総量の消長を判定するものと考えた。

未変化体の場合、糞中排せつ率と体内残留率の和は、対照群21.5%からPB投与群9.2%へと1/2以下に減少しており、PBの前投与によって2,5,2',5'-TCBの代謝が促進されたことは明らかである。

メチルチオ体について

Fig. 3にメチルチオ体の糞中排せつ量の経日的な変化と6日間の累積排せつ率を示した。なお、メチルチオ体の3位異性体と4位異性体の生成比は対照群、PB投与群ともには6:1と一定していたので糞中排せつ量は両異性体の和をもって示した。

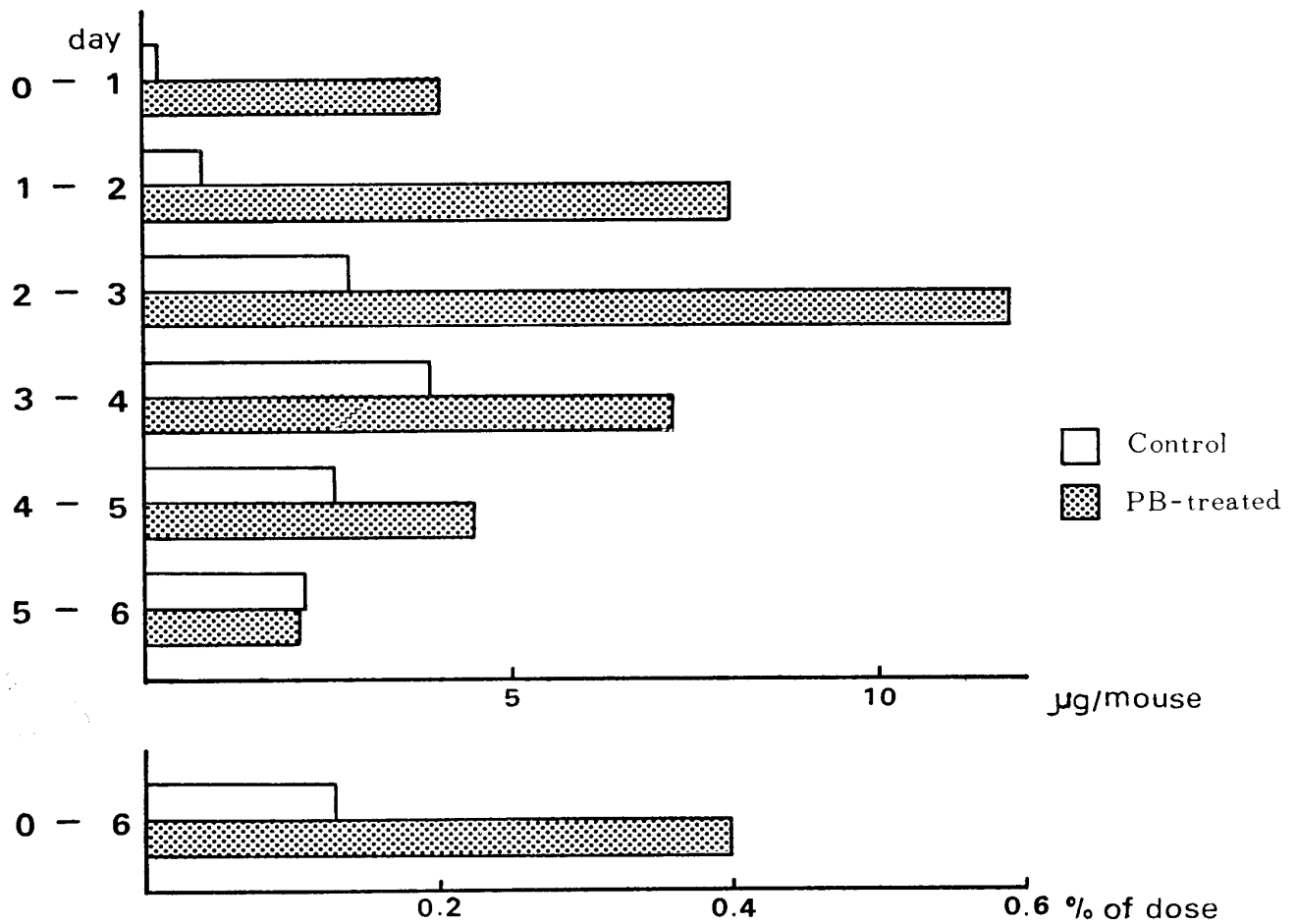


Fig. 3. Daily and Cumulative Excretion of 3- and 4-Methylthio-2,5,2',5'-TCB's in Mice Feces.

メチルチオ体の糞中排せつ量は PB 投与群において顕著に増大し、2,5,2',5'-TCB 投与後 2 日目までの期間をとると、PB 投与群の排せつ量は対照群のそれのおよそ 12 倍に達している。その後、PB 投与群と対照群との排せつ量の差は徐々に小さくなるが、これは PB 前投与による代謝誘導効果が次第に低下することと、初期における PB の誘導効果によって PB 投与群では基質である 2,5,2',5'-TCB の体内濃度が急速に減衰することによるものと考えられる。

6 日間の糞中累積排せつ率は PB 投与群で 0.4%、対照群で 0.13% と比較的微量であり、また、6 日目において体組織への残留はまったく認められなかった (Table 1)。これらのことから、メチルチオ体を生成する代謝経路は、後にのべるヒドロキシ体の生成経路にくらべてきわめて副次的なものであることが明らかとなった。

メチルチオ体の脂溶性は未変化体やメチルスルフォニル体と同程度のものと考えられるので、その体内分布に関してもこれらの化合物と類似の挙動を示すものと予測された。しかし、実際にはメチルチオ体のみは

体組織中への残留がまったく認められず、また、それにもかかわらず糞中には 6 日目においても微量ながら排せつが継続している。これらの事実はメチルチオ体の生成機構と関連づけて説明しうるものと考えられるが、きわめて興味ある点である。

#### メチルスルフォニル体について

Fig. 4 にメチルスルフォニル体の糞中排せつ量の経日的な変化と 6 日間の累積排せつ率を示した。6 日目における体内残留量の測定結果は Table 1 に示した。メチルスルフォニル体における 3 位異性体と 4 位異性体の生成比は対照群、PB 投与群ともに、糞中でほぼ 3 : 1、体組織中で 2 : 1 と一定していた。したがって、メチルスルフォニル体の値はいずれの場合も両異性体の和をもって示した。

メチルスルフォニル体については PB 投与によっても累積排せつ率、体内残留率ともに大きな変化はみられず、両者の総計は対照群 0.25%、PB 投与群 0.22% であった。

メチルスルフォニル体はメチルチオ体が肝ミクロゾーム酵素系による酸化反応を受けて生成するものと

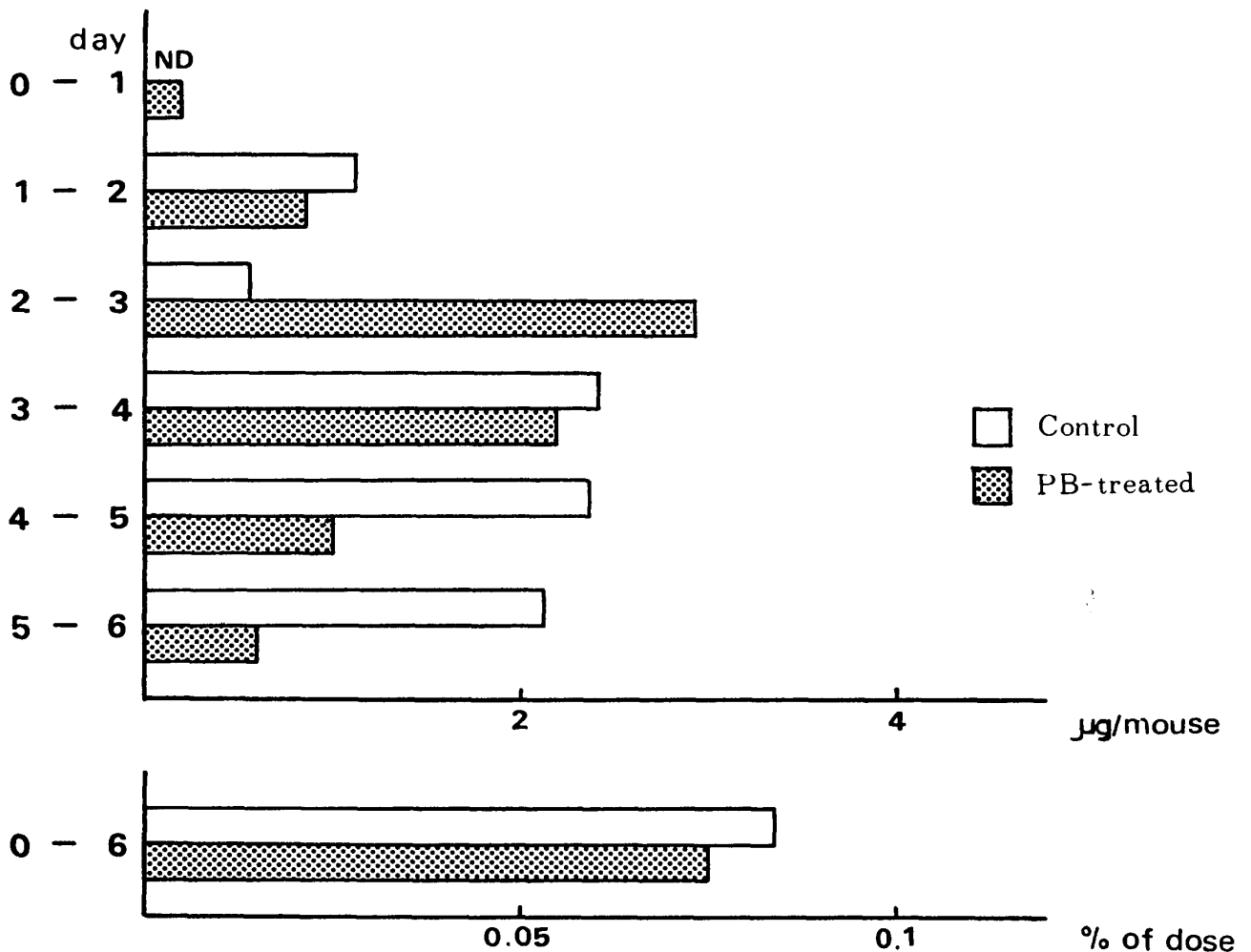


Fig. 4. Daily and Cumulative Excretion of 3- and 4-Methylsulfonyl-2,5,2',5'-TCB's in Mice Feces.

考えられる。しかし、PB投与によっても予期に反してメチルスルフォニル体の生成量が増加しないのは、PBがメチルチオ体の酸化に関与する酵素系に対して誘導的に作用しないか、あるいは、メチルチオ基の酸化に優先して他の代謝反応（たとえば、S-脱メチル化、芳香環水酸化など）を誘導するため、結果的にはメチルスルフォニル体の生成量には影響が及ばないかのいずれかと考えられる。

ヒドロキシ体について

Fig. 5に3-hydroxy-2,5,2',5'-TCBの糞中排せつ量の経日的な変化と6日間の累積排せつ率を示した。

ヒドロキシ体の排せつ量は2,5,2',5'-TCB投与後3日目までは毎日、PB投与群において対照群の3~4倍に増大する。しかし、それ以後の期間は対照群にくらべてむしろ減少する傾向にあり、6日間の累積排せつ率はPB投与群において40%程度増加したにとどまっている。

ヒドロキシ体の体内残留量については、分析法上なお検討すべき点が残されているため、今回は測定を行

なななかった。しかし、PB投与群におけるヒドロキシ体の糞中排せつ量の増大は、未変化体総量の減少とほぼ見合った値となっているところから、ヒドロキシ体はほとんど体内に蓄積されることなく、主として糞中へ排せつされるものと考えられる。

メチルチオ体の生成機構について

著者らは2,5,2',5'-TCBからメチルチオ体が生成する代謝経路における初発反応として、2,5,2',5'-TCBの肝ミクロゾーム薬物代謝酵素による酸化反応で生成する反応性の中間体、2,5,2',5'-TCB-3,4-oxideに対してメチオニン、システイン、あるいはグルタチオンなどのS-原子が求核的な攻撃を行なう機構を想定している<sup>2)</sup>。

今回明らかになったように、肝ミクロゾーム酵素の誘導剤であるPBの前投与によってメチルチオ体の生成量が著増する事実は、上記の機構に間接的な支持を与えるものと考えられる。

(1977年7月29日受理)

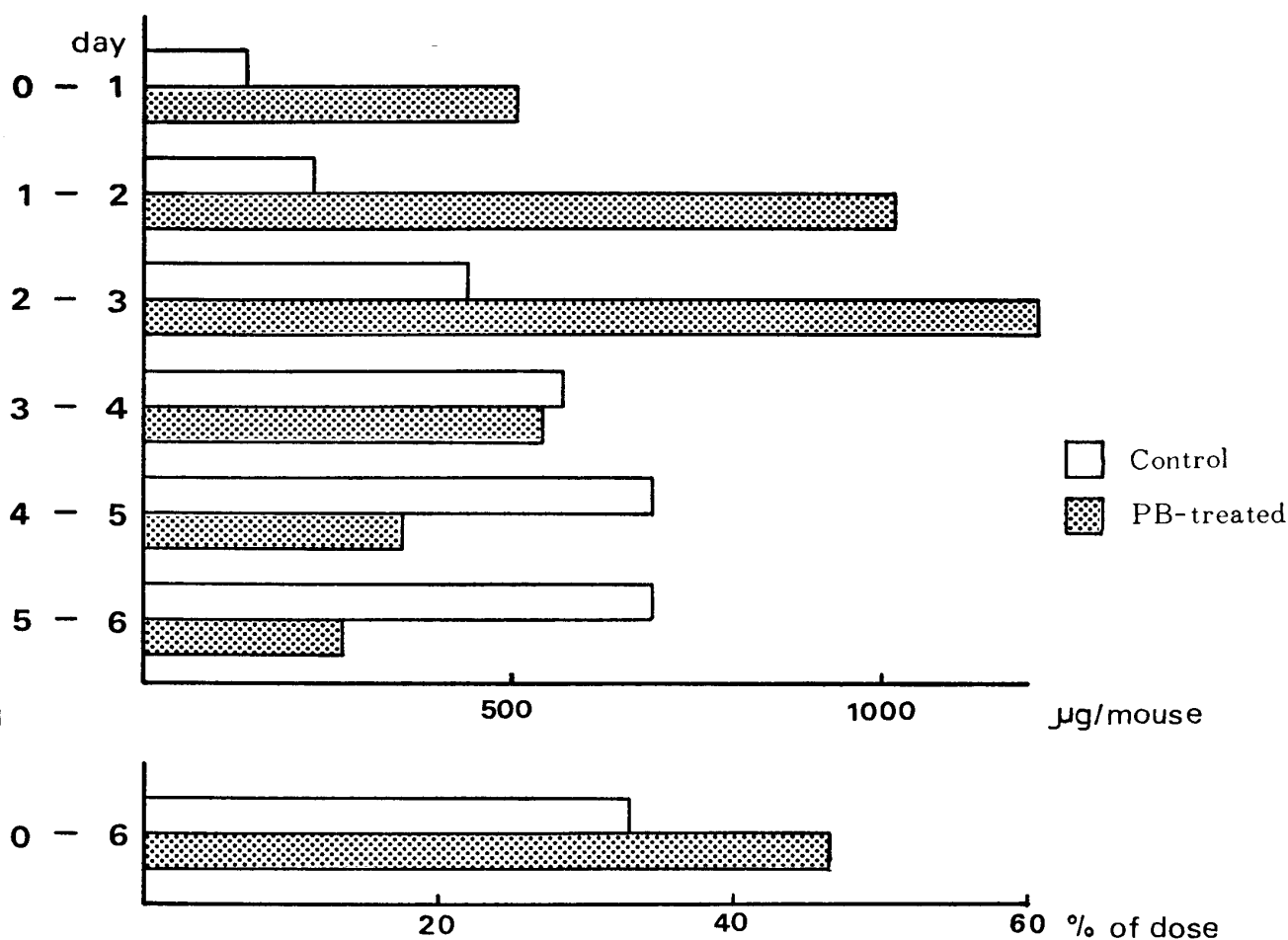


Fig. 5. Daily and Cumulative Excretion of 3-Hydroxy-2,5,2',5'-TCB in Mice Feces

文 献

- 1) G. Sundström, O. Hutzinger; *Chemosphere*, **1976**, 267.
- 2) T. Mio, K. Sumino, T. Mizutani; *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **24**, 1958 (1976).
- 3) N. Kornblum, D. L. Kendall; *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 5782 (1952).
- 4) A. M. Gardner, J. T. Chen, J. A. G. Roach, E. P. Ragelis; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1377 (1973).
- 5) A. V. Holden, K. Marsden; *J. Chromatog.*, **44**, 481 (1969).
- 6) 吉村英敏, 山本弘明, 米沢和明; *福岡医誌*, **66**, 555 (1975).