

研究課題名

In silico 解析及び *in vitro* 代謝試験によるヒトチトクローム P450 2A6 を介した 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl の代謝能評価

共同研究者名

平川 周作 (代表、福岡県保健環境研究所)
堀 就英 (分担、福岡県保健環境研究所)
岩田 久人 (拠点構成員、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
野見山 桂 (拠点構成員、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
水川 葉月 (拠点構成員、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究目的

本共同研究プロジェクトでは、ヒトの薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) 2A6 分子種を介した 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) 代謝の特徴について、*in silico* 解析及び *in vitro* 代謝試験を統合して調査することを目的とした。

福岡県を含む西日本地域において、1968 年に米ぬか油への polychlorinated biphenyls (PCBs) やダイオキシン類の混入による油症事件が発生した。これらの化学物質は、現在でも油症患者の体内に高濃度に残留していること、また、一般人と比較して PCB 異性体のなかでも CB118 が低く、2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (CB156) が高いという特徴的な蓄積パターンを示すことが明らかになっている。この特徴的な PCB 異性体の蓄積パターンは、体内で誘導された CYP によって一部の PCB 異性体が優先的に代謝されたためと考えられているが、どのような種類の CYP 分子種がどのような代謝産物を生成するのかなど、詳細は明らかになっていない。

2021 年度の LaMer 共同研究において、ヒト CYP2A6 と CB118 を *in vitro* 系で反応させ代謝試験を実施した結果、脱塩素反応を伴った 4 塩素化体の水酸化 PCB の生成が確認された。しかし、標準品として測定した異性体と一致しなかったため同定することができなかった。また、これまでの共

同研究で実施した CB118-CYP2A6 のドッキング様式のシミュレーションから代謝標的部位を解析することにより、未同定異性体の候補として 6 種の水酸化 PCB 異性体 (4'-OH-CB67、5'-OH-CB67、3-OH-CB70、2'-OH-CB74、5-OH-CB77、6-OH-CB77) を推定した。推定した水酸化 PCB 異性体は、これまでに CB118 の代謝を介した生成は報告されていないが、本研究の進展により CB118 の代謝に関して新たな知見が得られる可能性がある。

2021 年度に実施したヒト CYP2A6 と CB118 の *in vitro* 代謝試験で検出された水酸化 PCB 異性体は未同定であったこと、また、*in vitro* 代謝試験における緩衝液の条件によって代謝活性が異なることも報告されているため、2022 年度の共同研究では、CB118 とヒト CYP2A6 組換え酵素による *in vitro* 代謝試験に使用する緩衝液及び NADPH regenerating system を変えて再試験を実施し、生成された水酸化 PCB を測定するとともに実験操作に改良を加え回収率の向上を試みた。

研究内容

【CB118 と CYP2A6 を用いた *in vitro* 代謝試験と水酸化 PCB の測定】

ヒト CYP2A6 組換え酵素 (Human CYP2A6 + P450 Reductase + Cytochrome b₅, Corning) 及び CB118 (AccuStandard Inc.) を用いて *in vitro* 系で代謝試験を実施し、生成した水酸化 PCB を測定するための前処理を行った。測定は化学汚染・毒性解析部門の水川准教授のもとでガスクロマトグラフ二重収束型高分解能質量分析装置 (HRGC-HRMS) により実施した。

In vitro 代謝試験の反応条件を以下に示す。10 mL ガラス試験管を準備し、1 mL 系で Mix PCB バッファー (100 mM リン酸バッファー pH 7.4、5 mM MgCl₂)、0.31 μM CB118 異性体、100 nM CYP2A6 を混合し、37°C で 5 分間プレインキュベートした。続いて、RapidStart™ NADPH regenerating system (Sekisui XenoTech) を加えて代謝反応を開始させ、37°C で 180 分間インキュベートした。代謝反応は氷冷メタノールを 1 mL 添加することで停止させた。CB118-CYP2A6 の代謝試験は 3 併行で実施し、NADPH regenerating system を添加しない系をコントロールとして用いた。2021 年度からの変更点として、Tris-HCl バッファー (pH 7.5) をリン酸バッファー (pH 7.4)

に NADPH Regenerating System Solution A and B (CORNING) を RapidStart™ NADPH regenerating system (Sekisui XenoTech) とし、代謝反応溶液の条件を変えて実施した。

In vitro 代謝試験後の反応液について、生成した水酸化 PCB を測定するため以下のとおり前処理を実施した。試験管の代謝試験反応液に HCl (1+1) を 2 mL、2-propanol を 1 mL、回収率算出用に ¹³C ラベルした水酸化 PCB をクリーンアップスパイクとして添加混合し、50% methyl tert-butyl ether (MTBE)/hexane を 2 mL 加えて攪拌、30 分間静置し、遠心分離により分離した有機層を分取した (2 回繰り返す)。抽出液に 5% NaCl を 2 mL 加え、2~3 回天地逆転により混合し 30 分間静置した後、上層の MTBE/hexane 層をナスフラスコに移し (MTBE/hexane を 4 mL 再添加して繰り返す)、ロータリーエバポレーターを用いて hexane に転溶して 3 mL とした。転溶後の hexane に 1 M KOH (50% ethanol/water) を 3 mL 加えて 1 分間攪拌、アルカリ性であることを確認し、遠心分離により有機層と KOH 層に分配して 30 分間静置後、KOH 層を 50 mL 遠沈管に分取した (2 回繰り返す)。KOH 層に濃硫酸を加えて pH 2 以下とし、50% MTBE/hexane を 6 mL 加えて 1 分間攪拌、30 分間静置して遠心分離を実施、硫酸ナトリウムを通して上層の有機層を分取し (2 回繰り返す)、ロータリーエバポレーターを用いて hexane に転溶して 1 mL とした。転溶後溶液を 3 g の 5% 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako-gel S-1) によりクリーンアップし、100 mL の 50% dichloromethane (DCM)/hexane で流出させ、ロータリーエバポレーター及び窒素気流下で再度 1 mL まで濃縮した。次に、濃縮した試験液に methanol を 250 μL、DCM を 150 μL、trimethylsilyldiazomethane を 150 μL 加え、一晩静置して水酸化 PCBs を CH₃O-PCBs に誘導体化した。誘導体化後の溶液を窒素濃縮後、3 g の活性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako-gel S-1) を用いてクリーンアップし、140 mL の 10% DCM/hexane により CH₃O-PCBs を流出させた。流出液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、¹³C ラベルした PCB をシリンジスパイクとして添加し、窒素気流下で 100 μL まで濃縮したものを最終溶液として HRGC-HRMS により測定した。回収率の改善を目的とした前処理作業の変更

点として、液液分配における静置時間の確保、窒素濃縮からロータリーエバポレーター減圧濃縮への一部変更及び hexane への転溶、活性シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおける流出溶液の全回収を行った。

研究成果

CB118 とヒト CYP2A6 の *in vitro* 代謝試験の結果について、4 塩素化体の水酸化 PCB のクロマトグラムを 2021 年度の結果と並べて Fig. 1 に示した。2021 年度と同様の代謝物の生成を示すピークが検出され、代謝試験に用いる試薬を変更した 2022 年度の再試験においてもヒト CYP2A6 によって CB118 が 4 塩素化体の水酸化 PCB に代謝されることを確認できた。また、2021 年度に実施した代謝試験における ¹³C ラベルした 3~6 塩素化体水酸化 PCB 異性体の 4 サンプルの平均回収率は 38、37、34、34%であったが、2022 年度の実験操作の変更により平均回収率は 99、69、75、75%に改善した。また、ドッキング様式のシミュレーション結果から代謝に関与すると考えられる数値情報を新たに獲得し、候補となる異性体の絞り込みを行う予定であったが、出張日程が限られたことから *in silico* 解析まで行うことができなかった。

今後の課題

2022 年度までの共同研究により、CB118 の代謝としてヒト CYP2A6 による脱塩素反応を伴った 4 塩素化体の水酸化 PCB が生成されることが確認された。しかし、CB118-CYP2A6 の *in silico* 解析から CB118 の代謝標的部位を予測することで今回生成された水酸化 PCB 異性体の候補を推測しているものの、異性体の絞り込みはできていない。今後、CB118-CYP2A6 のドッキング様式をより詳細に解析することで代謝に関与すると考えられる数値情報を新たに獲得し、異性体の絞り込みを行いたい。CB118 は油症患者において特徴的に低い組成を示す異性体であり優先的に代謝されると考えられていることから、その代謝経路の詳細は PCB の体内挙動の把握において極めて重要である。一連の研究を通して、油症患者における PCB やダイオキシン類の代謝・排泄に関連した治療に寄与していきたい。

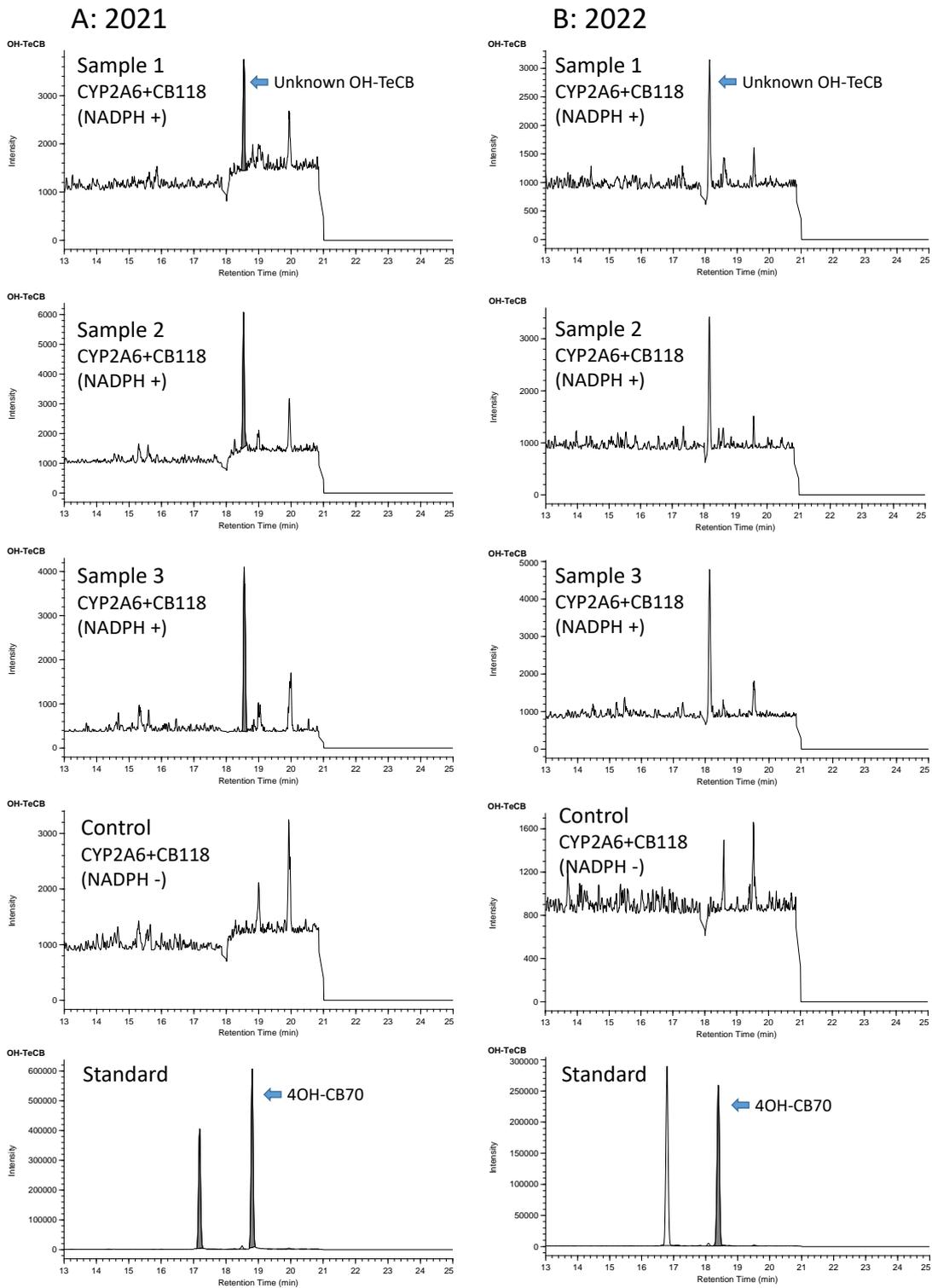


Fig. 1 HRGC/HRMS analyses of hydroxylated TetraCB metabolites of CB118 by human CYP2A6 performed in 2021 (A) and 2022 (B)