

2,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl (CB120) とその予想代謝物の合成

太田千穂¹⁾ 原口浩一²⁾ 加藤善久³⁾
遠藤哲也⁴⁾ 古賀信幸¹⁾

Synthesis of 2,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl (CB120) and the Postulated Hydroxylated Metabolite

Chiho Ohta¹⁾ Koichi Haraguchi²⁾ Yoshihisa Kato³⁾
Tetsuya Endo⁴⁾ Nobuyuki Koga¹⁾
(2009年11月27日受理)

はじめに

Polychlorinated biphenyls (PCBs) は、ビフェニル骨格に1~10個の塩素が置換されたものの総称であり、置換塩素数とその置換位置の違いから理論上209種の異性体が存在するが¹⁾、わが国では1968年に発生したカネミ油症事件の原因物質として有名である。一方、世界的な環境汚染物質としてもよく知られており、ヒト血液から2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (hexaCB) (CB153), 2,2',3,4,4',5'-hexaCB (CB138) および 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (heptaCB) (CB180) などの PCB 異性体とともに、PCB 代謝物の4-hydroxy (OH)-2,2',3,4',5,5',6-heptaCB (CB187), 4-OH-2,2',3,4',5,5'-hexaCB (CB146) および 4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (pentaCB) (CB107) なども高濃度で検出されている²⁻⁵⁾。

2007年、Linderholm らは油症発生から37年経過した油症患者の血液を調べたところ、上記と同様な PCB 異性体および PCB 代謝物を検出するとともに、これまで健常者で全く報告されていない4'-OH-2,3',4,5,5'-pentaCB (CB120) を新たに高濃度検出したと報告した⁶⁾。このような特徴的な血中 PCB 代謝物パターンが、油症患者において事件発生後約40年も経過して観察されることは、PCB 類の毒性発現機構を考える上で極めて興味深い。

生体内で4'-OH-CB120は、Fig. 1に示すような2つの経路により生成されると考えられる。1つの経路は、2,3',4,4',5-pentaCB (CB118) から4',5'-epoxide 生成および NIH 転位を経由して生成される経路である。Haraguchi らはすでに、CB118

投与ラットの血液から主代謝物の4-OH-CB107とともに、ごく微量の4'-OH-CB120を検出している⁷⁾。もう1つの経路は、CB120の4'位に直接水酸化される経路である。しかしながら、CB120の代謝に関しては全く報告がなく、この経路の関与は不明である。

そこで、本研究ではCB120から直接水酸化により4'-OH-CB120が生成されるかどうかを確かめるため、CB120およびその予想代謝物として4'-OH-CB120の合成を試みた。また、得られたCB120を基質とし、ラット肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を試みた。

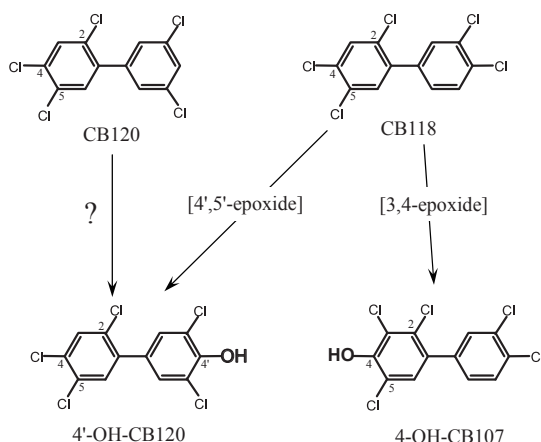


Fig.1 Postulated pathways for the formation of 4'-OH-CB120 in animals.

別刷請求先：古賀信幸，中村学園大学栄養科学部，〒814-0198 福岡市城南區別府5-7-1

E-mail : nobuyuki@nakamura-u.ac.jp

1) 中村学園大学栄養科学部 2) 第一薬科大学 3) 徳島文理大学香川薬学部 4) 北海道医療大学薬学部

実験方法

1. 試薬

合成試薬の3,5-dichloroaniline, 2,6-dichlorophenol および亜硝酸ナトリウムはいずれも特級を和光純薬工業（大阪）から、1,2,4-trichlorobenzene および 2,4,5-trichloroaniline は特級を東京化成工業（東京）から購入した。また、HPLC 用 acetonitrile は関東化学（東京）から購入した。さらに、代謝実験で用いた phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) および glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase はいずれも特級を和光純薬工業（大阪）から、NADP⁺ および G-6-P は生化学用をオリエンタル酵母（東京）から購入した。その他の試薬はできる限り高品質のものをを用いた。

2. CB120の合成

CB120は、Hutzinger の方法⁸⁾ を若干改変して合成した。すなわち、3,5-dichloroaniline 1.14 g (7.036 mmol) を濃塩酸中、室温で攪拌して塩酸塩とし、亜硝酸ナトリウム飽和水溶液を滴下した。これに acetonitrile で溶解した 1,2,4-trichlorobenzene 2.0 g を加えて、110℃で2時間反応させた。その後、chloroform にて抽出し、これをシリカゲル60 (65 g, Merck 製) カラム (内径 26 mm, ベット高 200 mm) にかけて、*n*-hexane で溶出した後、HPLC による精製を行った。CB120の純度は電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー (GC-ECD) および質量分析計付ガスクロマトグラフィー (GC-MS) により調べた。

3. 4'-OH-CB120の合成

4'-OH-CB120は、Hutzinger らの方法⁸⁾ を若干改変して合成した。すなわち、2,4,5-trichloroaniline 0.61 g (3.105 mmol) を濃塩酸中、室温で攪拌して塩酸塩とし、亜硝酸ナトリウム飽和水溶液を滴下した。これに acetonitrile で溶解した 2,6-dichlorophenol 3.0 g を加えて、110℃で2時間反応させた。その後、chloroform にて抽出し、次に2M NaOH で逆抽出を行い、塩酸で酸性とした後、再び chloroform で抽出した。これをシリカゲル60 (65 g, Merck 製) カラム (内径 26 mm, ベット高 200 mm) にかけて、*n*-hexane および chloroform で溶出した後、HPLC に供した。代謝物の純度は GC-ECD および GC-MS により調べた。

4. 機器分析

HPLC は島津製作所製 (ポンプ: LC-10AT, 検出器: SPD-10A) を用いた。HPLC 条件は次の通りである。カラム, ODS-A (250 × 20 mm i.d., 5 μm 粒径, YMC 製); 移動相, acetonitrile; 流速, 4 ml/min; 検出波長, 254 nm。

GC-ECD は Agilent 製の HP5890 Series II ガスクロマトグラフを用いた。GC-ECD の条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica キャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 230℃; 注入口温度, 250℃; 検出器温度, 250℃; キャリアーガス, N₂ (1 ml/min)。

GC-MS は島津製作所製 GCMS-QP2010を用いて、EI モードで行った。分析条件は次の通りである。カラム, DB-1 fused silica キャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 70℃ (1.5 min) - 20℃/min - 230℃ (0.5 min) - 4℃/min - 280℃ (5 min); 注入口温度, 250℃; 検出器温度, 230℃; キャリアーガス, He (1 ml/min)。

¹H-NMR スペクトルの測定は日本電子製の JEOL GSX-500 (500 MHz) を用いて行った。試料は、chloroform-*d* に溶解し、tetramethylsilane を内部標準物質として用いた。

5. CB120のラットにおける代謝

Wistar 系雄性ラット (体重約200 g) を1群4匹として、未処理群、PB および MC 前処理群の3群に分けた。PB-Na 塩は生理食塩水に溶解し80 mg/kg/day の用量で、MC はコーン油に溶解し20 mg/kg/day の用量で3日間腹腔内に投与した。最終投与日の翌日に屠殺して、肝を摘出し、常法⁹⁾ により肝 Ms を調製した。

ラット肝 Ms における CB120 の代謝は既報¹⁰⁾ に準じて行った。すなわち、40 μM CB120 (dimethylsulfoxide に溶解) を、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-P dehydrogenase 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ およびラット肝 Ms (1 mg protein) とともに 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で、合計 1 ml として、37℃で 60 min インキュベートした。その後、chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 1 ml および *n*-hexane 3 ml で CB120 およびその代謝物を 3 回抽出した。抽出液は diazomethane でメチル化後、GC-ECD に供した。

結果および考察

1. CB120 の合成および分離精製

CB120の合成は、3,5-dichloroaniline および1,2,4-trichlorobenzene を原料としたジアゾカップリング法⁸⁾を用いて行った。この方法ではFig. 2に示すように理論的にはCB120以外に、2,3,3',5,5'-pentaCB (CB111) および2,3,3',5',6-pentaCB (CB113) が同時に合成される。まず、反応液をシリカゲル60カラムにかけ *n*-hexane で溶出したところ、PCB 異性体はすべて100~500 mlの *n*-hexane 画分中に溶出された。次に、この画分を濃縮した後、分取用HPLCに付した。その結果、Fig. 3に示すようにPCB 異性体と思われる3種類のピークがそれぞれ保持時間35.2 min, 39.3 min および43.2 minに検出された。そこで、保持時間の早いほうから、それぞれS-1, S-2およびS-3とした。次に、これら画分の分子量をGC-MSで調べたところ、S-1, S-2 およびS-3画分にはそれぞれ1種類, 1種類および3種類のピークが検出され、これらはいずれも分

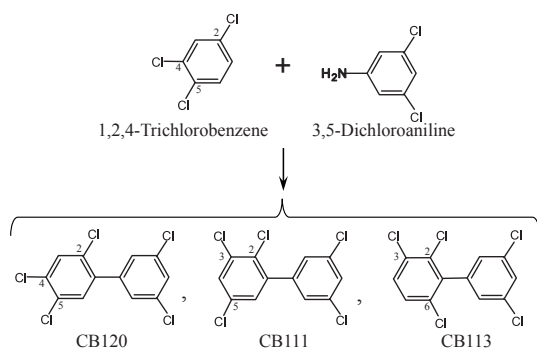


Fig.2 Synthetic procedure of CB120

子量324を有する pentaCB であることが示された。そこで、S-3画分をさらにHPLCにより、2つの画分に分離した。すなわち、S-3のピーク頂上までをS-3a画分、ピーク頂上以降をS-3b画分として分けし (Fig. 3), GC-MSで再度調べたところ、S-3a画分に2種類, またS-3b画分に1種類が存在していた (Table 1)。

さらに、S-1, S-2 および S-3b の¹H-NMR スペクトルを測定したところ、いずれも3', 5'-dichlorobenzene 環に置換された3個の水素原子 (2', 4' および6' 位) および trichlorobenzene 環に置換された2個の水素原子に由来するシグナルが検出された。まず、S-1の7.134 ppm (2H, *J*=1.83Hz, d) のダブルレットはH-2' およびH-6' に、7.439 ppm (1H, *J*=2.01Hz, t) のトリプレットはH-4' に、7.359 ppm (2H, *J*=8.79Hz, d) および 7.455 ppm (2H, *J*=8.79Hz, d) のダブルレットはそれぞれH-4およびH-5に帰属された。これらの結果から、S-1はCB113と推定された。次に、S-2の7.132

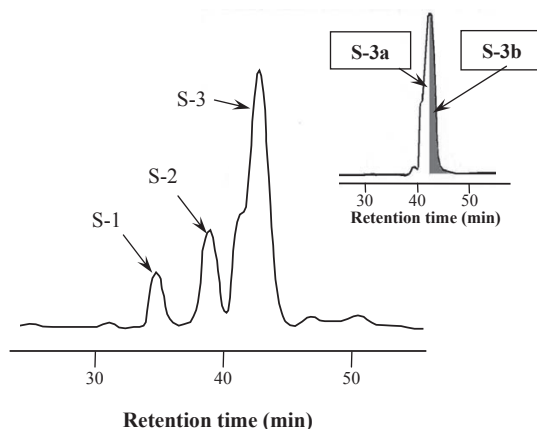


Fig.3 HPLC chromatograms of synthetic CB120 and its by-products

Table 1 Mass spectral data and retention times of S-1, S-2, S-3a and S-3b

Fraction	Molecular weight	Mass fragment ion (%) ^{a)}			Retention time (min)
		[M ⁺]	[M ⁺ -35]	[M ⁺ -70]	
S-1	324	100	6	99	10.80
S-2	324	100	4	85	10.40
S-3a	324	100	4	72	10.36
	324	100	2	80	11.23
S-3b	324	100	3	74	11.34

^{a)} Relative intensity is expressed as percentage of molecular ion.

ppm (2H, $J=1.83\text{Hz}$, d) のダブルレットは H-2' および H-6' に, 7.431 ppm (1H, $J=2.01\text{Hz}$, t) のトリプレットは H-4' に, 7.436 ppm (2H, s) のシングレットは 2つの同等な水素に帰属された。しかしながら, このように 2つの同等な水素を有するものは Fig. 2の3種のどれにも該当しなかった。恐らく, S-2は合成原料の1,2,4-trichlorobenzene に不純物として含まれていた1,2,3-trichlorobenzene が, 3,5-dichloroaniline と反応してできたと考えられる。結局, S-2は3,4,5,3',5'-pentaCBであると考えられる。さらに, S-3bについては, 7.289 ppm (2H, $J=2.01\text{Hz}$, d) のダブルレットは H-2' および H-6' に, 7.419 ppm (1H, $J=2.01\text{Hz}$, t) のトリプレットは H-4' に, 7.412 ppm (1H, s) と7.604 ppm (1H, s) のシングレットは H-3および H-6として帰属された (Fig. 4)。以上の結果から, S-3bが目的の CB120 であることが明らかとなった。そこで, CB120の純度を GC で調べたところ, 96.2%であった。また, 収量は, 4.57 mg で, 収率0.2%であった。なお, S-3a 画分については 2種類の pentaCB が混在

していたため, 今回 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定をしなかったが, もし CB111が存在すれば $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて, H-4および H-6のプロトンが *meta* 位であることから, $J=2\text{Hz}$ でダブルレットになり, CB120と完全に区別できると考えられる。

2. 4'-OH-CB120の合成および分離精製

4'-OH-CB120の合成法として, 2,4,5-trichloroaniline および2,6-dichlorophenol を原料としたジアゾカップリング法⁸⁾を用いた。理論的には3'-OH-2,2',4,4',5-pentaCB (CB99) および4'-OH-CB120が合成される。また, フェノールにおける *ortho-para* 配向性により, 4'-OH-CB120の方が3'-OH-CB99より多く生成されると考えられる。反応液はまず, シリカゲルカラムにかけ, *n*-hexane および chloroform で溶出したところ, PCBのOH体と思われる化合物は *n*-hexane : chloroform (1 : 1) 画分に溶出された。さらに, この画分を濃縮した後, 分取用 HPLC に付した結果, 保持時間18.4 min, 25.1 min および28.4 min に3つのピークが検出された。そこで, 保持時間の早いほうから, それぞれ P-1, P-2および P-3とした (データ未掲載)。

まず, GC-MSを用いて, 得られた P-1, P-2および P-3画分の分子量を調べた。その結果, P-2と P-3画分から, いずれも1本のピークが検出され, 両者とも分子量354を有する mono-methoxy (MeO)-pentaCBであることが判明した (Table 2)。ところで, MeO-PCBのマススペクトルでは経験則があり, フラグメントイオン $[M^+-15]$ が多い場合は, MeO基がビフェニル骨格の *para* 位, すなわち4あるいは4'位に, 一方, フラグメントイオン $[M^+-43]$ が多い場合は, MeO基が *meta* 位, すなわち3 (5) 位あるいは3' (5') 位に置換されていることが知られている^{11,12)}。そこで, P-2および P-3 (メチル誘導体) のマスフラグメンテーションを比較したとこ

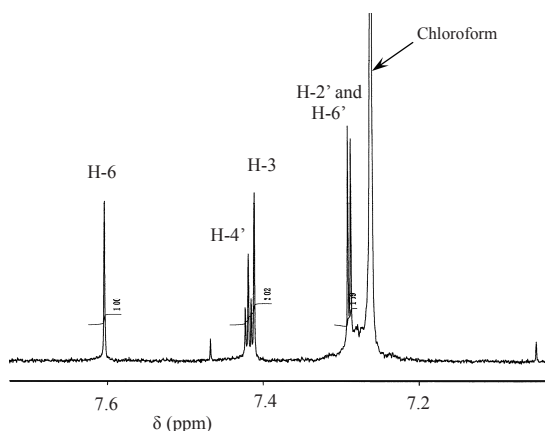


Fig.4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of S-3b.

Table 2 Mass spectra of the methylated P-2 and P-3

Compound	Molecular weight	Mass fragment ion (%) ^{a)}				
		$[M^+]$	$[M^+-15]$	$[M^+-43]$	$[M^+-50]$	$[M^+-115]$
P-2 (3'-MeO-CB99)	354	100	21	42	13	31
P-3 (4'-MeO-CB120)	354	100	78	39	—	33

^{a)} Relative intensity is expressed as percentage of molecular ion.

ろ、P-3はフラグメントイオン $[M^+ - 15]$ が非常に多いことから、P-3が4'-OH-CB120であると考えられた。

次に、P-3の¹H-NMR スペクトルを測定した。5.986 ppm (1H, s) のシングレットはOH基の水素、7.331 ppm (2H, s) のシングレットは対称的な位置にあるH-2'およびH-6'として、7.399 ppm (1H, s) および7.586 ppm (1H, s) のシングレットはお互い *para* 位に位置する2つの水素、すなわちH-3およびH-6として帰属された(データ未記載)。もし3'-OH-CB99であれば、H-5'とH-6'がお互い *ortho* 位に位置するためダブレット ($J=8\text{Hz}$) となるが、これが見られないことから、P-3が4'-OH-CB120であることを支持している。なお、4'-OH-CB120の純度は86.4%、収量は65.14 mg であり、収率は5.9%であった。

3. ラット肝ミクロゾームによるCB120の代謝

合成したCB120を用いてラット肝 Ms による代謝の予備的検討を行った。Fig. 5には、その代謝物のメチル誘導体のガスクロマトグラムを示す。未処理では代謝物らしきピークが全く検出されなかった。しかし、PBおよびMC前処理の場合でのみ、代謝物と思われる2種類のピーク(M-1およびM-2)が、それぞれ保持時間13.05 min および13.49 min に観察された。合成標品の4'-MeO-CB120と比較した結果、M-2のピークとGC保持時間が一致した。この結果から、CB118からだけではなくCB120からも4'-OH-CB120が生成される可能性が示唆された。今回、代謝物の定量には至らなかったが、代謝物の生成量は非常に少ないことから、CB120は代謝されにくいことも示唆された。

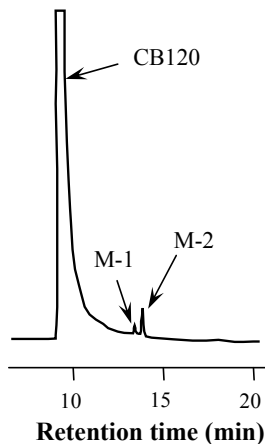


Fig.5 Gas chromatogram of the methylated derivatives of CB120 metabolites formed by liver microsomes of PB-treated rats.

1977年、黒木と増田らは油症患者の血中PCBパターンの特徴として、血中の2,3,3',4,4',5-hexaCB (CB105)とCB118が健常者に比べ著しく低いことを報告している¹³⁾。一方、三村らは油症原因油中のPCB含量を調べ、その結果、CB118は全PCB異性体のうち最も多く7.1~8.8%を占めているが、CB120は全く検出されなかったと報告している¹⁴⁾。これらの結果から、4'-OH-CB120の生成はCB118の寄与がCB120より大きいことが推定されるが、今後、ヒト肝を用いた検討が必要であろう。

総括

1. 2,3',4,5,5'-PentaCB (CB120) の合成を行った。3,5-dichloroaniline および1,2,4-trichlorobenzeneを原料としジアゾカップリング反応後、シリカゲルカラムとHPLCによる分離精製を行い、最終的に純度96.2%のCB120を4.6 mg 得た。

2. CB120の予想代謝物として4'-OH-CB120の合成を試みた。合成原料として2,4,5-trichloroaniline および2,6-dichlorophenolを用いてジアゾカップリング反応を行った結果、理論通り2種類のPCB水酸化体(3'-OH-CB99, 4'-OH-CB120)が生成された。両者のメチル誘導体のGC-MSおよび¹H-NMRの結果より、それぞれ上記化学構造であることが決定された。得られた4'-OH-CB120は純度86.4%で、収量65.1 mg であった。

3. ラット肝 Ms によるCB120の代謝を調べたところ、PBおよびMC前処理ラットの肝 Ms により2種類の代謝物(M-1およびM-2)が生成され、M-2のGC保持時間が4'-OH-CB120のメチル誘導体のそれと一致した。この結果から、ラット肝においてCB120から、4'-OH-CB120が生成されることが示唆された。

謝辞

本研究は厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究)に一部負うものである。ここに記して謝意を表します。また、本研究を実施するにあたりご協力いただきました食品衛生学研究室の諸氏(平川綾香、田實 悠、村田 優)に感謝いたします。

Abstract

Recently, 4'-OH-2,3',4,5,5'-pentaCB (CB120) have been

detected newly in the blood of Yoshio patients 37 years after exposure of Kanechlor 400. In this study, to elucidate the metabolic pathways for the formation of 4'-OH-CB120, we tried to synthesize CB120 and 4'-OH-CB120. Both 3,5-dichloroaniline and 1,2,4-trichlorobenzene were used as starting materials for the synthesis of CB120. The diazo-coupling reaction products were purified by Silica gel 60 column chromatography and the preparative HPLC. CB120 was obtained with 96.2% in purity and 0.2% (4.57 mg) in yield. On the other hand, 4'-OH-CB120 was synthesized in a similar manner as CB120 except using 2,4,5-trichloroaniline and 2,6-dichlorophenol as starting materials. The resultant 4'-OH-CB120 was 86.4% in purity and 5.9% (65.1 mg) in yield. The metabolism of CB120 was examined using rat liver microsomes. Liver microsomes of phenobarbital- and 3-methylcholanthrene-pretreated rats metabolized CB120 to a metabolite having the same retention time as 4'-OH-CB120, suggesting that 4'-OH-CB120 can be formed from CB120 as well as from CB118 in animals.

文 献

- 1) Ballschmitter K, Rappe C, Buser HR. Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PCBs, PCTs, PCNs and PBBs. In Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. Kimbrough R and Jensen AA, eds. Elsevier, 47-69 (1989).
- 2) Bergman Å, Klasson-Wehler E, Kuroki H. Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environmental Health Perspectives* **102**(5), 464-469 (1994).
- 3) Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J, Norstrom RJ. Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environmental Health Perspectives* **108**(7), 611-616(2000).
- 4) Fångström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P, Bergman Å. Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese woman. *Environmental Health Perspectives* **110**(9), 223-228 (2002).
- 5) Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobna B, Trnovec T, Bergman Å, Hertz-Picciotto I. Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in pregnant women from eastern Slovakia. *Environmental Health Perspectives* **115**(1), 20-27 (2007).
- 6) Linderholm L, Masuda Y, Athanasiadou M, Bergman Å. PCB and PCB metabolites in serum from Yusho patients 37 years after the accident. *Organohalogen Compounds* **69**, 2141-2144 (2007).
- 7) Haraguchi K, Kato Y, Kimura R, Masuda Y. Hydroxylation and methylthiolation of mono-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in rat: identification of metabolites with tissue affinity. *Chemical Research in Toxicology* **11**(12), 1508-1515 (1998).
- 8) Hutzinger O, Safe S, Zitko V. Polychlorinated biphenyls: synthesis of some individual chlorobiphenyls. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **6**(3), 209-219 (1971).
- 9) Koga N, Beppu M, Yoshimura H. Metabolism *in vivo* of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolite in rat. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **13**,497-506 (1990).
- 10) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Koga N. *In vitro* metabolism of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs. *Xenobiotica* **35**(4), 319-330 (2005).
- 11) Jansson B, Sundström G. Mass spectrometry of the methyl ethers of isomeric hydroxychlorobiphenyls-potential metabolites of chlorobiphenyls. *Biomedical Mass Spectrometry* **1**, 386-392 (1974).
- 12) Tulp MThM, Olie K, Hutzinger O. Identification of hydroxyhalobiphenyls as their methyl ethers by gas chromatography mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry* **4**(5), 310-316 (1977).
- 13) Kuroki H, Masuda Y. Structures and concentrations of the main components of polychlorinated biphenyls retained in patients with Yusho. *Chemosphere* **6**(8), 469-474 (1977).
- 14) 三村敬介, 田村水穂, 原口浩一, 増田義人, 油症患者母乳及び血液中の全 PCB 異性体の分析. 福岡医誌 **90**, 202-209 (1999).