

環境汚染物質(一特に臭素化ベンゼンについて一) の生態系への影響

第 3 報

臭素化ベンゼンの代謝産物並びに排泄経過

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

萩 野 泰 夫

(昭和59年2月28日受稿)

Key words: 臭素化ベンゼン,
代謝産物,
排泄経過

結 言

臭素化ベンゼン(以下プロモ化ベンゼン)は、特定化学物質に指定されたポリ塩化ビフェニール(PCB)、ポリ塩化ナフタレン(PCN)、ヘキサクロルベンゼン(HCB)等塩素系化合物の製造禁止に伴い代用品として広く使用されている。即ち、現在、主にモノ、ジプロモベンゼン(年間生産量約0.1t)、トリ、テトラ、ヘキサプロモベンゼン(同70t)等が溶剤、染料、難燃剤その他生産量の多いデカプロモジフェニルエーテル(同10t)、2,4,6-トリプロモフェノール(2-メチル-2,3-ジプロモプロピル)エーテル(33t)等の高分子プロモ化ベンゼンの中間体原料として工業的に広く使用されている^{1,2)}。

近年、Arkansas州とNew Jersey州の臭素工場周辺におけるプロモベンゼン類、プロモトルエン類、ポリ塩化ビフェニール類、ポリ臭化ビフェニルオキサイド類の環境汚染(水、土壌、大気、生物、人の毛髪)が問題³⁾となった。我が国においても、工場付近以外の一般環境調査(底質において、ヘキサプロモベンゼン等が検出されている^{1,2)}。我々は先に塩素系⁴⁾及び臭素系炭化水素⁵⁾の魚類への移行性を調べた結果、脂溶性の高い物質ほど^{6,7)}、即ち塩素系より臭素系化合物の蓄積性が高かった。また、プロモ化合

物の毒性に関し、ラット肝ミトコンドリアの呼吸系に対する作用を調べた結果、in vitroで呼吸酸化的磷酸化阻害を示すことが明らかとなった⁸⁾。本報ではプロモ化ベンゼンの生体内運命、特に代謝と排泄性を明らかにする目的で、プロモ化ベンゼン投与動物の尿中、糞中排泄物についての分析を行ったので、その結果について報告する。

材 料 と 方 法

試薬類:モノ、0-, m-, p-ジ、1,3,5-トリ、1,2,4,5-テトラ及びヘキサプロモベンゼンは東京化成KK製のものを、ペンタプロモベンゼンは長野県公害研より提供されたものを、溶媒類は残留農薬分析用のものを、その他の試薬類は市販の試薬特級を用いた。

実験動物:実験動物には ddY 系雄性マウス(4週令、体重約20g)、ドンリュウ系雄性ラット(体重約200g)及び雄性家兎(同1.5kg)を用いた。

投与方法:各供試物質をオリーブ油に溶解し、マウスは経口投与、ラットと家兎では腹腔内投与した。

試料の採集:1回投与した後、経時的に糞及び尿をアセトンで洗って採集した。

試料の調製及び分析方法:試料中の測定物質

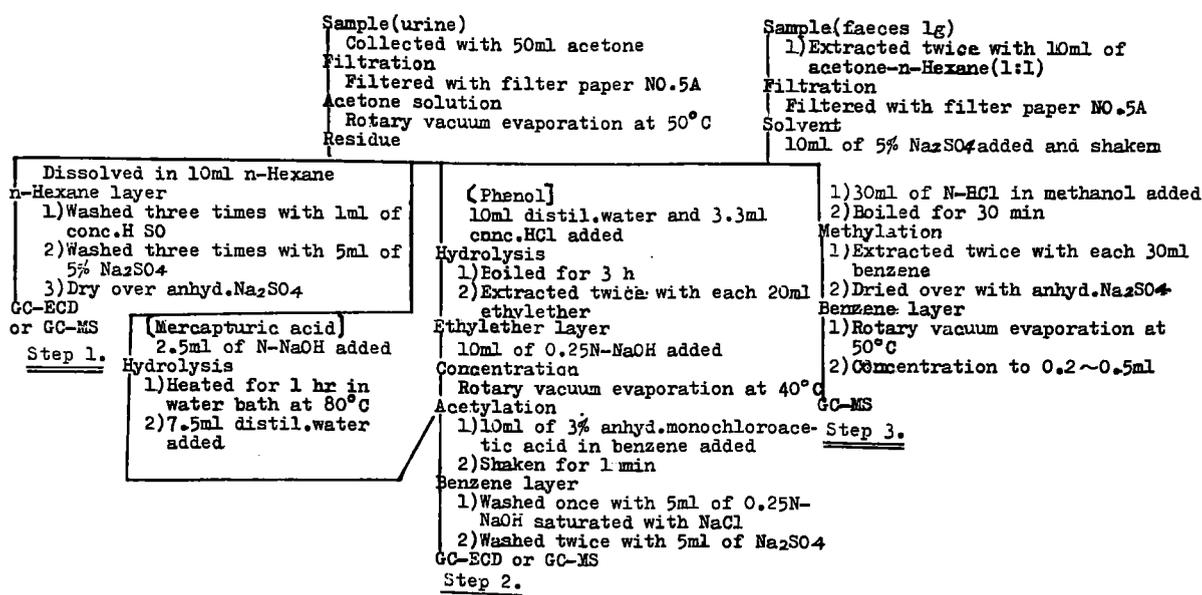


図1. Analytical procedure of brominated benzenes and related compounds

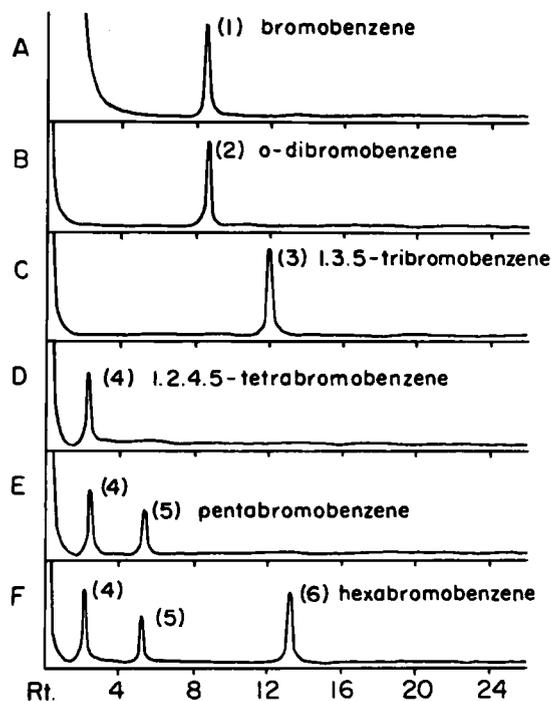


図2. Gas chromatograms of urinary brominated benzenes
Dose : 0.2~1mg/mouse(see the legend for Table 1.) GC, Shimadzu 6AM equipped with detector(A : FID, B~F : ECD, condition : column(A : 3mm×3m, B, C : 3mm×2m, D~F : 3mm×1m) glass column packed with liquid phase (A : 5% Bentone 34+5% DIDP, B, C : 5% SP 1000+1% Bentone 34,

D~F, 1.5% OV-1) on Gaschrom Q(80/100 mesh), column temp. : (A : 130°C, B : 140°C, C : 150°C, D~F : 200°C), carrier gas : N₂(60 ml/min)

Brominated benzenes administrated are bromobenzene(A), o-dibromobenzene(B), 1,3,5-tribromobenzene(C), 1,2,4,5-tetrabromobenzene(D), pentabromobenzene(E) and hexabromobenzene(F)

は、図1に示す如く①未代謝物のプロモ化ベンゼンはn-ヘキサンで抽出した。②代謝産物(I)のうちフェノール体(グルクロン酸、エーテル硫酸抱合体)はHClで、また、メルカプツール酸抱合体はNaOHでそれぞれ加水分解し、モノクロルアセチル化したもの。③代謝産物(II)のうちチオフェニル酢酸とメルカプツール酸をメチル化したものの三通りの手順で行った。

結 果

1. GC-ECD, GC-MSによる測定法の検討

1) プロモ化ベンゼン

未代謝プロモ化ベンゼン(モノ~ヘキサ)測定用の試験液は尿、糞からの溶媒抽出液を硫酸洗浄の操作のみにより調整した。GC-ECDクロマトグラムは図2に示す如く良好であり、満足すべきクリーンアップ効果が得られている。以下、本法は排泄物中の未代謝プロモ化ベンゼンの定量に用いた。なお、GC-MS(TIM)フロマ

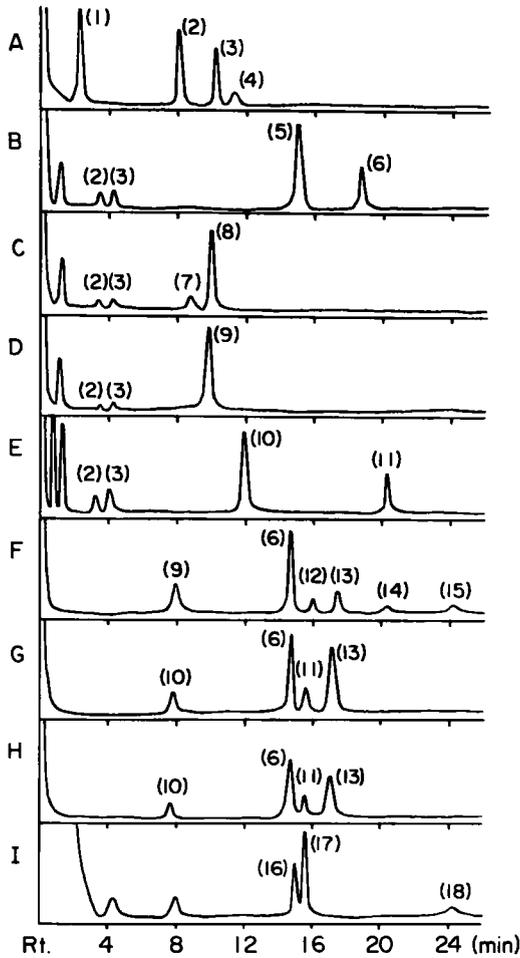


図3. Gas chromatograms of urinary monochloroacetylated compounds

Dose: 0.2~1mg/mouse(see the legend for Table 1.) GC, Shimadzu 6AM equipped with detector(A~H: Ni⁶³ ECD, I: FID) condition: column, 3mm×1m glass column packed with liquid phase(A~H: 2% DEGS +0.5% H₃PO₄, I: 3% OV-1) on Gaschrom Q(80/100 mesh), injector and detector temp.: 200°C, column temp.(A: 140°C, B~E: 150°C, F~H: 160°C, I: 110°→260°C, 6°C/min), carrier gas, N₂(60ml/min)

Brominated benzenes administrated are bromobenzene(A) o-dibromobenzene(B) m-dibromobenzene(C) p-dibromobenzene(D) 1,3,5-tribromobenzene(E) 1,2,4,5-tetrabromobenzene(F) pentabromobenzene(G) hexabromobenzene(H) and nitrobenzene(I)

(1): phenol, (2): o-bromophenol, (3): m-bromophenol, (4): p-bromophenol, (5): 2,3-dibromophenol, (6): 3,4-dibromophenol, (7): 2,6-dibromophenol, (8): 2,4-dibromophenol, (9): 2,5-dibromophenol, (10): 3,5-dibromophenol, (11): 2,4,6-tribromophenol, (12): 2,3,6-tribromophenol, (13): 2,3,4-tribromophenol,

(14): 2,4,5-tribromophenol,(15): 2,3,5,6-tetra-bromophenol,(16): m-nitrophenol,(17): p-nitrophenol, (18): p-aminophenol

トグラムにおいて、図2に対応する保持時間に溶出するピークからは図4(A~F)の如くマススペクトルが得られそれぞれの化合物であることが同定された。

2)代謝産物(I)の方法(水解物のGC)

プロモフェノール(抱合体)

プロモフェノール(グルクロン酸及びエーテル硫酸抱合体)測定用の試験液は尿の濃縮液にHClを加えて加水分解しプロモフェノールとした。これをモノクロルアセチル化し測定した結果は図3に示す如くGC-ECDクロマトグラムが得られた。以下、本法は排泄物中のプロモフェノール抱合体の定量に用いた。なお、GC-MS(TIM)クロマトグラムにおいて、図3に対応する保持時間に溶出する代表的ピークからは図4(J~Q)の如くマススペクトルが得られそれぞれの化合物であることが同定された。

メルカプツール酸抱合体

プロモフェニルメルカプツール酸はHClで加水分解するとM⁺=376が認められ、Br○S-○Brと同定された。加水分解物が反応して2量体を生成しており、これを定量することは疑問であった。水解液をN-NaOH溶液に変えて加水分解するとM⁺=189が認められ、Br○SHと同定された。このプロモチオフェノールの生成は80°C湯浴中で加水分解すると1時間で平衡に達した。本法は91±5%の回収率が得られ、以下、排泄物中のプロモフェニルメルカプツール酸の定量に用いた。

その他に、N-NaOH水解物をモノクロルアセチル化し、このアセチル化物を測定したGC-MS(TIM)クロマトグラムに現われる大きなピークのマススペクトルは図4(G~I)に示す如く、フェノール、P-クレゾール、3,5-キシレノールと同定された。これらの排泄量はプロモ化ベンゼン投与によって増加しなかった。

3)代謝産物(II)・(SCH₃体,プロモフェニルメルカプツール酸,プロモチオフェニル酢酸)の方法(メチルエステル化法によるGC-MS)

代謝産物(I)の測定法は尿をNaOHで加水分

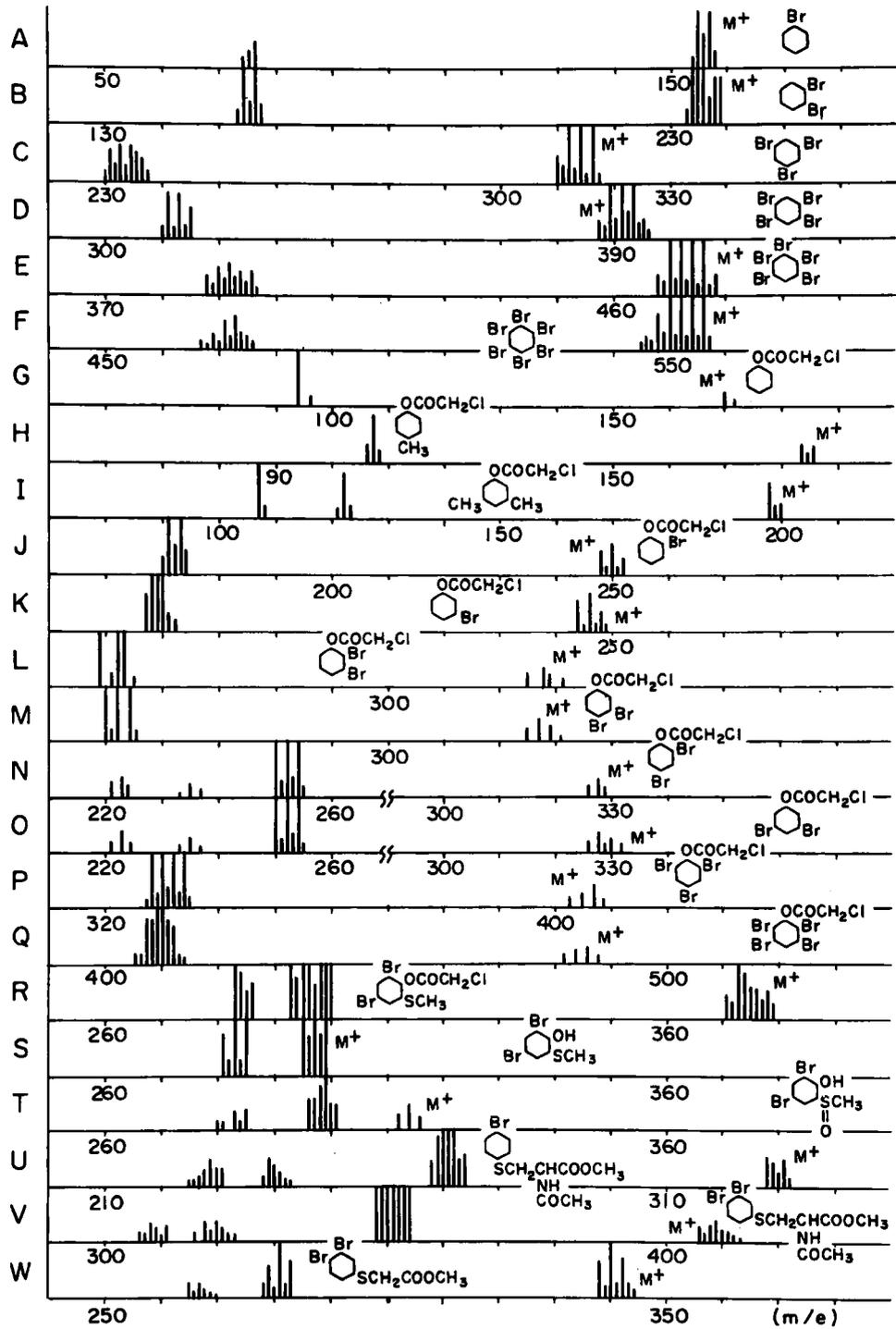


図4. GC-MS spectra of urinary metabolites collected during 5 day dosing. GC/MS, Shimadzu LKB-9000; condition: ionizing energy, 70 eV; accel volt., 3.0kV; column, 3mm×2m glass column packed with 1.5% OV-1 on Gaschrom Q(80/100); injection temp., 280°C; column temp., 80→250°C(5°C/min); carrier gas, He(30ml/min)

表1. Metabolic fate of brominated benzenes in animals of three species after single oral administration

Compound	Excrement	Mouse	Rat	Rabbit
Bromobenzene 1mg/mouse, 10 mg/rat or ra bbit, duration 4 days	4-bromophenylmercapturic acid(U)	35.9	34.9	37.5
	o-bromophenol(J)	12.1	2.6	3.1
	m-bromophenol(K)	8.8	19.2	23.2
	p-bromophenol	3.1	13.1	6.2
	bromobenzene(A)	*0.6 (0.5)	*1.2 (1.2)	*0.8 (0.7)
o-dibromoben zene 1mg/mouse, 10 mg/rat or ra bbit, duration 4 days	3,4-dibromophenylmercapturic acid(V)	23.0	34.0	32.0
	3,4-dibromothiophenylacetic acid(W)	3.5	4.8	5.2
	2,3-dibromophenol(L)	30.7	16.9	12.1
	3,4-dibromophenol(M)	14.3	32.5	27.5
	o-bromophenol(J)	0.7	N.D.	N.D.
	m-bromophenol(K)	0.3	0.7	0.9
	p-bromophenol	0.2	0.7	0.4
	o-dibromobenzene(B)	*1.0 (0.9)	*1.0 (0.8)	*1.4 (1.2)
m-dibromoben zene 1mg/mouse, dur ation 4 days	2,4-dibromophenol(N)	30.3	37.0	
	2,6-dibromophenol	4.6	N.D.	
	m-bromophenol	0.6	1.5	
	o-bromophenol	0.6	1.0	
p-dibromoben zene 1mg/mouse, dur ation 4 days	2,5-dibromophenol	23.2	39.0	
	m-bromophenol	0.6	1.0	
	o-bromophenol	0.2	0.3	
1,3,5-tribromo benzene 1mg/mouse, 10 mg/rat or ra bbit, duration 5 days	3,5-dibromophenylmercapturic acid	0.4	6.9	7.2
	3,5-dibromothiophenylacetic acid	3.7	5.2	4.4
	2-hydroxy-3,5-dibromothiophenyl- 1-methyl(R,S)	14.0	18.6	22.7
	2-hydroxy-3,5-dibromothiophenyl- 1,1-methyloxide(T)	6.9	8.8	9.1
	2,4,6-tribromophenol(P)	13.1	13.5	14.5
	3,5-dibromophenol(O)	17.9	11.0	6.4
	o-bromophenol	4.2	N.D.	N.D.
	m-bromophenol	3.1	2.2	2.4
	p-bromophenol	1.5	1.2	0.9
	1,3,5-tribromobenzene(C)	*14.8 (6.9)	*13.7 (5.5)	*10.3 (8.1)
	1,2,4,5-tetra bromobenzene 0.2mg/mouse, 2mg/rat or ra bbit, duration 15 days	2,3,5,6-tetrabromophenol(Q)	5.2	N.D.
2,3,5-tribromophenol		8.6	9.4	
2,3,6-tribromophenol		3.8	20.4	
2,4,5-tribromophenol		Tr	N.D.	
2,5-dibromophenol		1.9	4.4	
3,4-dibromophenol		8.8	5.4	
1,2,4,5-tetrabromobenzene(D)		*52.7 (25.7)	*40.4 (19.6)	*45.1 (44.6)
pentabromoben zene 0.2mg/mouse, 2mg/rat or ra bbit, duration 15 days		2,3,4-tribromophenol	10.1	14.3
2,4,6-tribromophenol(P)	1.1	24.3		
3,4-dibromophenol	2.0	5.7		
3,5-dibromophenol(O)	1.0	4.8		
1,2,3,5-tetrabromobenzene	*44.1 (21.2)	*20.3 (9.6)	*25.7 (25.4)	
pentabromobenzene(E)	*12.1 (4.8)	*5.6 (2.2)	*6.0 (5.9)	
Hexabromoben zene 0.2mg/mouse, 2mg/rat or ra bbit, duration 15 days	2,3,4-tribromophenol	6.6		
	2,4,6-tribromophenol(P)	1.2		
	3,4-dibromophenol	2.2		
	3,5-dibromophenol(O)	1.1		
	1,2,3,5-tetrabromobenzene	*3.4 (1.6)	*3.3 (1.7)	*3.7 (3.6)
	pentabromobenzene(E)	*23.4 (11.5)	*21.5 (10.6)	*25.6 (25.3)
hexabromobenzene(F)	*40.2 (27.6)	*42.1 (28.9)	*44.0 (43.5)	

Figures indicate the percentages of the dose in urine

* : Value in urine and faeces

The figures in brackets indicate the value in faeces

N.D. : not detected

Tr : trace

表2. Time course of excretion in urine of monobromobenzene metabolites.

hr	8	16	24	36	48	60	72	84	96	total
o-bromophenol	4380 (749)	1840 (487)	169 (107)	119 (77.1)	103 (55.1)	76.8 (51.9)	66.0 (47.6)	42.0 (28.4)	23.1 (16.2)	6820
m-bromophenol	3270 (806)	1403 (350)	104 (54.5)	79.2 (49.4)	61.5 (40.7)	48.9 (33.1)	40.6 (29.0)	28.5 (17.9)	19.8 (15.2)	5060
p-bromophenol	915 (482)	383 (104)	26.0 (10.7)	18.8 (7.50)	20.5 (16.9)	11.1 (6.83)	9.70 (6.93)	6.83 (4.51)	6.53 (6.36)	1400
total bromophenol	8570	3630	299	217	183	137	116	77.4	49.3	13300
4-bromothiophenol	9010 (249)	485 (12.5)	56.3 (3.55)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9550

Dose : 1mg/mouse of bromobenzene (10 mice)
 Figures indicates the mean (n mole) of three experiments
 The figures in brackets indicates SD

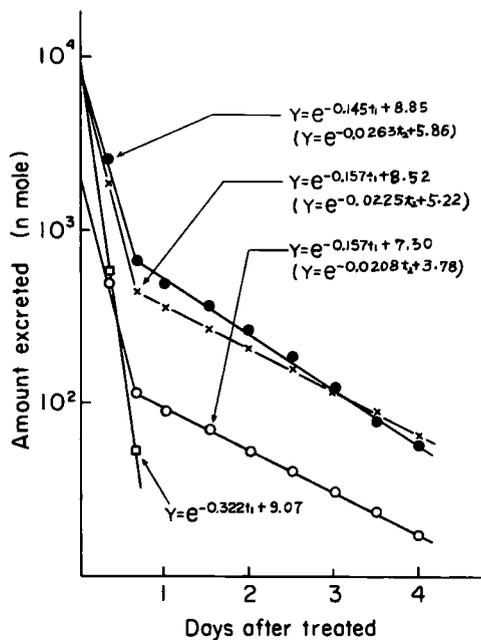


図5. Time course of excretion in urine of monobromobenzene metabolites.

●—● : o-bromophenol, ×—× : m-bromophenol
 ○—○ : p-bromophenol, □—□ : 4-bromothiophenol

解し、プロモチオフェノールとして定量を行った。代謝産物(II)では喜多村ら⁹⁾の方法により尿の濃縮液をメチルエステル化し、このメチルエステル化物を GC-MS で測定した結果は図4 (R

~W) に示す如くマススペクトルが得られ、図中の構造式を持つ SCH_3 体(R~T)、4-, 3,4-プロモフェニルメルカプツール酸(UとV)及び3,4-プロモチオフェニル酢酸(W)と同定された。定量は GC-MS(TIM)とイオン強度より推定した。

2. マウス、ラット、家兎におけるプロモ化ベンゼンの尿中代謝産物とその種差

各プロモ化ベンゼン投与における尿中代謝産物は表1に示す如くであった。なお、主な代謝産物の構造式は各代謝産物(表1)のカッコ内(A~W)が図4 (A~W)と一致しているため、照合すれば判明する。

モノプロモベンゼン投与の場合、マウスでは4-プロモフェニルメルカプツール酸、プロモフェノール (O→m→P) が主であり、未代謝のプロモベンゼンは僅かであった。これに対してラット及び家兎では、特にm-プロモフェノールの割合が大であった。

ジプロモベンゼン投与の場合、マウス、ラット、家兎ともにジプロモフェノール、ジプロモフェニルメルカプツール酸、ジプロモチオフェニル酢酸、プロモフェノール、ジプロモベンゼンの順であった。ジプロモフェノール異性体間の割合は、マウスで2,3→3,4であるのに対し、ラット及び家兎では3,4→2,3であった。

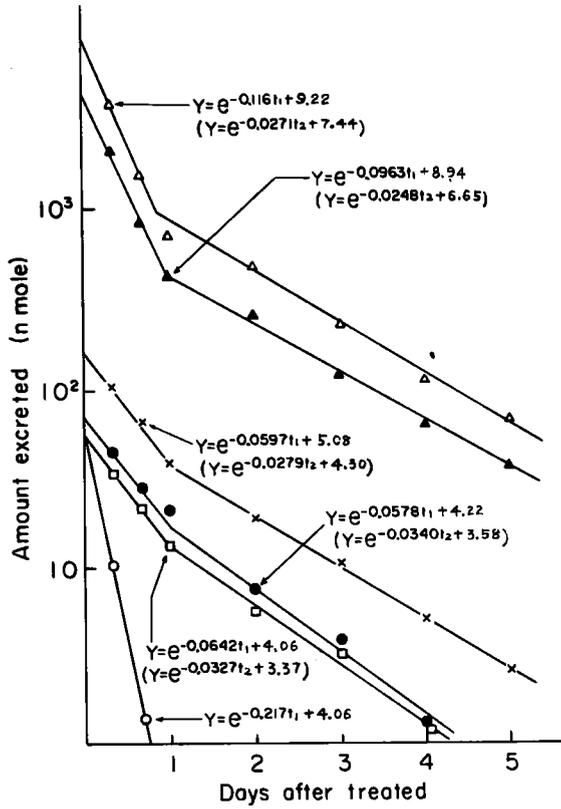


図6. Time course of excretion in urine of o-dibromobenzene metabolites. Dose: single oral administration of 1mg/mouse of o-dibromobenzene. △-△: 2,3-dibromophenol, ▲-▲: 3,4-dibromophenol, ×-×: m-bromophenol, ●-●: o-bromophenol, □-□: p-bromophenol, ○-○: o-dibromobenzene

トリブロモベンゼン投与の場合、動物の種族差が著しい。即ち、マウスでは、-SCH₃体、ジ、トリブロモフェノール、トリブロモベンゼン、モノブロモフェノール、ジブロモフェニルメルカプツール酸、ジブロモチオフェニル酢酸の順であった。しかし、ラットと家兎では、-SCH₃体、トリ、ジブロモフェノール、トリブロモベンゼン、ジブロモフェニルメルカプツール酸、ジブロモチオフェニル酢酸、モノブロモフェノールの順で、これが大半を占めた。

テトラブロモベンゼン投与の場合、マウス、ラット、家兎ともに未代謝物が最も多く、これに次いで代謝産物は、マウスでトリ、ジ、テト

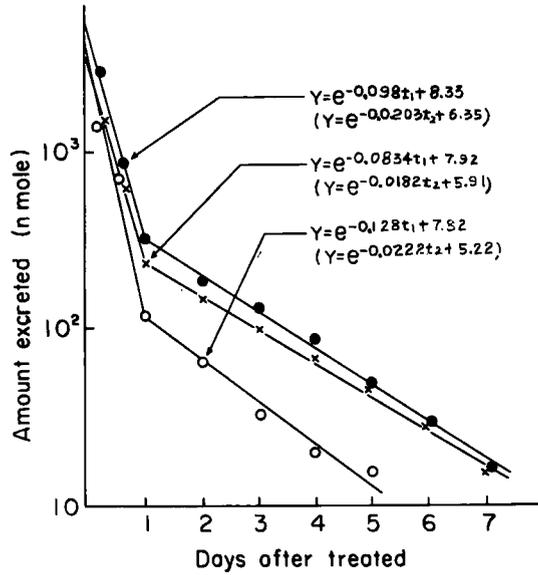


図7. Time course of excretion in urine of 1,3,5-tribromobenzene metabolites. Dose: single oral administration of 1mg/mouse of 1,3,5-tribromobenzene. ●-●: 3,5-dibromophenol, ×-×: 2,4,6-tribromophenol, ○-○: 1,3,5-tribromobenzene

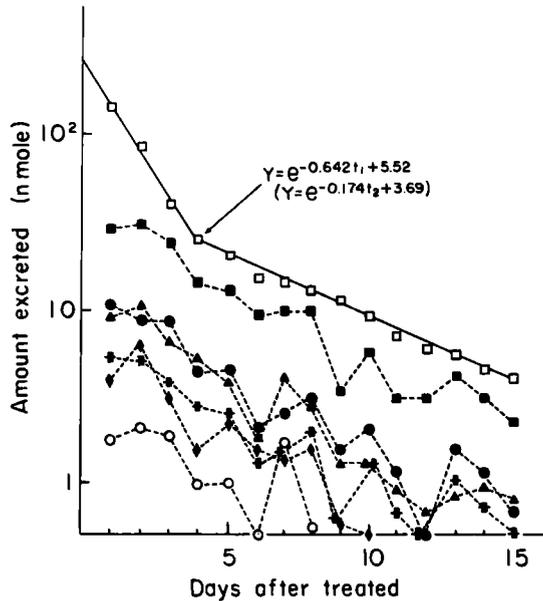


図8. Time course of excretion in urine of 1,2,4,5-tetrabromobenzene metabolites. Dose: single oral administration of 0.2mg/mouse of 1,2,4,5-tetrabromobenzene. □-□: 1,2,4,5-tetrabromobenzene, ■-■: total bromophenol, ○-○: 2,5-dibromophenol, ●-●: 3,4-dibromophenol, ◆-◆: 2,3,6-tribromophenol, ▲-▲: 2,3,5,6-tetrabromophenol

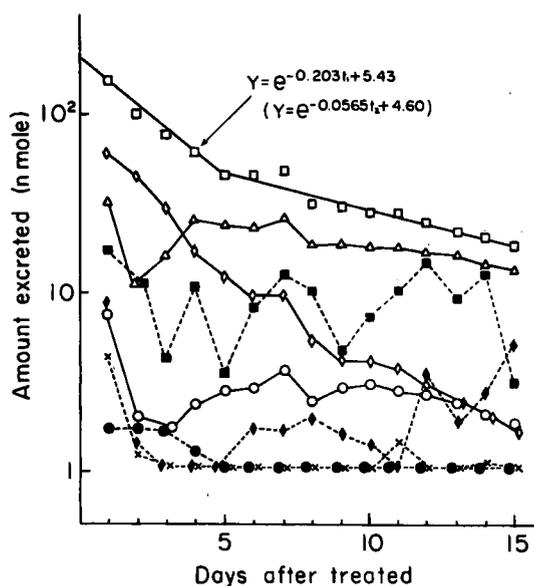


図9. Time course of excretion in urine of hexabromobenzene metabolites.

Dose: single oral administration of 0.2mg/mouse of hexabromobenzene.

□—□: total brominated benzenes, ◇—◇: hexabromobenzene, △—△: pentabromobenzene, ○—○: 1.2.3.5-tetrabromobenzene, ■—■: total brominated phenols, ●—●: 2.5-dibromophenol, ◆—◆: 3.4-dibromophenol, ×—×: 2.4.6-tribromophenol, ▲—▲: 2.3.4-tribromophenol

ラブロモフェノールの順であり、ラットではトリ、ジブロモフェノールの順となり、モノブロモフェノールは検出されなかった。

ペンタプロモベンゼン投与の場合、マウス、ラットともに未代謝物が最も多く、テトラ、ペンタプロモベンゼンの順に多かった。これに次いで代謝産物はマウスでトリプロモフェノール、ジブロモフェノールの順であり、モノプロモフェノールは検出されなかった。

ヘキサプロモベンゼン投与の場合、マウス、ラット、家兎ともに未代謝物が最も多く、ヘキサ、ペンタ、テトラプロモベンゼンの順に多かった。これに次いで代謝産物はマウスでトリプロモフェノール、ジブロモフェノールの順であり、モノプロモフェノールは検出されなかった。

以上の結果より、プロモフェノール体はプロモ数の増加とともに主な代謝産物となった。メルカプツール酸抱合体の排泄量はモノ、ジ、トリプロモベンゼン投与の順に多かった。プロモチオフェニル酢酸はジ、トリプロモベンゼン投与の尿中に多かった。—SCH₃体はトリプロモベンゼン投与の尿中に多かった。未代謝物の排泄量はプロモ数の増加とともに増し、特にテト

表3. Time course of excretion in urine of o-dibromobenzene metabolites.

hr	8	16	24	48	72	96	120	total
o-bromophenol	25.1 (2.96)	15.1 (1.93)	12.1 (0.86)	8.17 (1.32)	3.32 (0.21)	2.66 (0.87)	0.95 (0.20)	68.2
m-bromophenol	54.6 (7.48)	37.1 (3.52)	28.5 (2.17)	18.6 (1.82)	8.11 (1.50)	5.47 (0.50)	2.58 (0.90)	155.9
p-bromophenol	18.4 (4.33)	11.2 (0.71)	8.51 (0.30)	7.28 (1.66)	2.32 (1.42)	1.95 (0.21)	0.79 (0.16)	50.4
total bromophenol	98.1	64.2	49.1	34.0	12.4	10.1	4.32	272.2
2.3-dibromophenol	6251 (183)	2428 (257)	820 (20.3)	247 (18.1)	259 (3.67)	117 (0.16)	46.1 (0.16)	10170
3.4-dibromophenol	2796 (95.3)	1163 (76.1)	444 (28.5)	159 (17.1)	133 (0.78)	54 (10.0)	27.7 (5.8)	4777
total dibromophenol	9047	3591	1264	406	392	171	73.8	15000
total	9145	3655	1310	440	404	181	78.1	15200

Dose: 1mg/mouse of o-dibromobenzene (10 mice)

Figures indicates the mean (n mole) of three experiments

The figures in brackets indicates SD

ラブロモベンゼンからの急激な増加が特徴的であり、マウス、ラットで尿、糞中に約半々の割合で、家兎ではその大半が糞中に排泄された。

3. プロモ化ベンゼンの排泄経過

各プロモ化ベンゼンをマウスに1回経口投与後、尿中排泄経過はモノ、ジプロモベンゼンについて表2、3及び図5、6に示す如くであった。時刻tにおける各代謝産物の尿中排泄量は次式で表わされる。

$$\begin{aligned} \text{一次排泄: } Y &= e^{-K_1 t_1 + a} (\text{二次排泄: } Y \\ &= e^{-K_2 t_2 + b}) \end{aligned}$$

Y: 時刻tにおける尿中排泄量(n mol.)

K_1, K_2 : 一次, 二次排泄定数, hr^{-1} (モノ~トリ) or day^{-1} (テトラ~ヘキサ)

t_1, t_2 : 一次, 二次排泄のhr(モノ~トリ) or day(テトラ~ヘキサ)

従って、図中の回帰式は指数回帰のプログラムを用いて各測定値より求めた。また、モノプロモベンゼン投与後、0-プロモフェノールの尿中排泄量は回帰式(図5)より計算すると223時間後に認められなくなり、96時間から223時間までの総排泄量(T)については回帰式を積分した次の式より求められる。

$$\int_{108}^{223} e^{-0.0263t+5.87} dt = \left[\frac{1}{-0.0263} e^{-0.0263t+5.87} \right]_{108}^{223}$$

$$= 749 \text{ (n mol.)}$$

$$T = 749 \text{ (n mol.)} \div \frac{223\text{hr} - 108\text{hr}}{12\text{hr}} = 78.5 \text{ (n mol.)}$$

投与後、223時間までの総排泄量は96時間までの排泄量6820(n mol.) (表1)に前記の78.5(n mol.)を加算した6899(n mol.)となり、96時間までに総排泄量の98.9%が排泄されていたことになる。

トリ、テトラ、ヘキサプロモベンゼン投与後の尿中排泄経過は図7~9に示す如くであり、回帰式も同様に計算した。

各プロモ化ベンゼンの排泄速度はモノ、ジ、トリプロモベンゼンで速く、代謝されやすいが、テトラ、ヘキサプロモベンゼンでは急激に遅くなり、難代謝性が示された。代謝産物別の排泄速度をみると、モノプロモベンゼン投与では4-プロモチオフェノール、(o->m->P-)プロモフェノールの順であった。ジプロモベンゼ

ン投与ではジプロモベンゼン、(2.3->3.4-)ジプロモフェノール、(P->m->o-)プロモフェノールの順であった。また、トリプロモベンゼン投与では1.3.5-トリプロモベンゼン、3.5-ジプロモフェノール、2.4.6-トリプロモフェノールの順であった。これに対し、テトラ、ヘキサプロモベンゼン投与では代謝産物の不規則な排泄経過と多量の未代謝物の排泄が観察された。

未代謝ヘキサプロモベンゼンの排泄量は排泄経過の初期に著しく多い、また、脱プロモ化したテトラ、ペンタプロモベンゼンは飼育期間中殆んど変化が認められなかった。それ故に、これらの脱プロモ化ベンゼンの排泄物中に占める割合が排泄経過の後期に多くなる。

各プロモ化ベンゼンのマウスにおける半減期は主な排泄物のプロモ化合物より求め表4に示した。即ち、図5~9で明らかのように各プロモ化ベンゼンの排泄経過には一次排泄と二次排泄が認められ、その傾向はモノ、ジ、トリプロモベンゼンにおいて著明であった。しかし、ベンゼン環に置換したプロモ数の増加に伴い、二次排泄は不明確となって半減期も長くなることが認められた。

考 察

1. GC-ECD, GC-MSによる測定法の検討

動物に投与したプロモ化ベンゼンの代謝と排泄性を明らかにする目的で測定法を検討した。

プロモ化ベンゼンは環境試料の測定に用いられている方法²⁾により硫酸洗浄を行い、GC-ECDを用いて測定を行った。プロモフェノール(抱合体)はSmith¹⁰⁾らの方法により尿をHClで加水分解し、メルカプツール酸抱合体ではStekolの方法¹¹⁾によりNaOHで尿を加水分解した。これらの加水分解物はフェノール体の高感度測定に用いられているモノクロルアセチル化法¹²⁾を採用した。以上のプロモ化ベンゼン、プロモフェノール、プロモチオフェノールのECD測定は検出感度とGC-クロマトグラムともに良好であり、長期間使用による検出器(ECD)の汚れも少なかった。代謝産物(II)の同定は喜多村らの方法⁹⁾によって尿をメチルエステル化し、

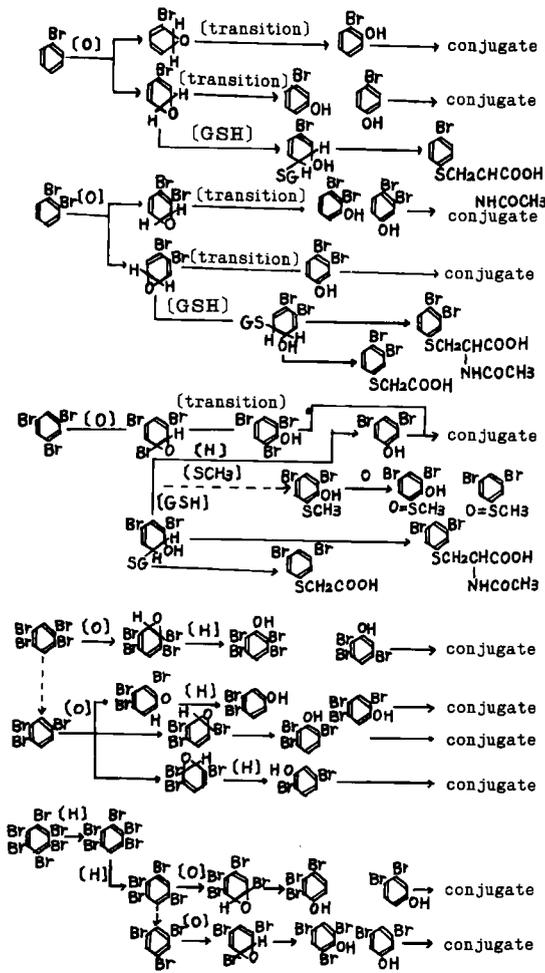


図10. Main metabolic pathways of brominated benzenes

GC-MS を用いて測定した。しかし、夾雑物ピークが多いため投与量を増すか、クリーンアップの対策が必要であると認めたが、排泄量の多いメルカプツール酸、プロモチオフェニル酢酸、 $-SCH_3$ 体の同定は可能であった。本報ではプロモ化ベンゼン、フェノール体の排泄経過を主に調べたが、今後は含硫化合物への代謝を硫黄に選択性のある GC-FPD(S フィルター) を用いての検討が必要である。

2. マウス、ラット、家兎におけるプロモ化ベンゼン 尿中代謝産物とその種差

プロモ化ベンゼン投与動物の尿中代謝産物を GC-MS を用いて検索した結果、同定した代謝産物から図10に示す如く主な代謝経路が考えら

れた。加水分解して、プロモ化フェノールとして測定したが、プロモ化フェノールは主にグルクロン酸及びエーテル硫酸抱合体として排泄されることが報告¹⁰⁾されており、今後、これら化合物の形態別測定が必要であると考えられる。なお、プロモベンゼンをマウスに投与した場合、総プロモフェノールに占めるフリー型は $(10.6 \pm 2.2\%)$ であった。

1) プロモフェノール (抱合体)

モノプロモベンゼン代謝産物のプロモフェノール異性体間比をみると、マウスでは $O \rightarrow m \rightarrow P$ であるのに対し、ラット及び家兎では m -プロモフェノールが多い(表1)。特に、マウスに O -プロモフェノールが多いことはフルオロベンゼン、クロロベンゼン、ヨードベンゼン投与のマウスにおいてもそれぞれ O -ハロゲン化フェノールが多く認められ、同様な結果が得られた。陰イオンに対してハロゲンベンゼンは m -配向性を示すが、 O -, P -配向性のニトロベンゼンをマウスに投与して代謝物のニトロフェノール異性体間比を調べると、 P -ニトロフェノール61.9%, m -ニトロフェノール34.6%, O -ニトロフェノール1.8%の結果が得られた(図3)。プロモベンゼンの代謝は酸化体の2,3-epoxide から O -プロモフェノール, 3,4-epoxide から m -, P -プロモフェノールと4-プロモフェニルメルカプツール酸, 3位を直接水酸化し m -プロモフェノールに¹³⁻¹⁷⁾なる。この生成機構によれば前述の配向性を単純に論ずることはできないが、ラット及び家兎の m -プロモフェノール及びマウスの P -ニトロフェノールが多いことは陰イオンの配向性に一致した。

次に、 O -ジプロモベンゼン代謝産物のジプロモフェノール異性体間比は、マウスで 2,3-ジプロモフェノールが、ラット及び家兎で3,4-ジプロモフェノールが多い。この種差はモノ、ジプロモベンゼンをマウスに投与した場合、他の動物と異なりいずれもプロモ元素に隣接した位置の OH 化が多いことにある。今後この点については検討の必要がある。

次に、1,3,5-トリプロモベンゼン代謝産物のジとトリプロモフェノールの比では、マウスで3,5-ジプロモフェノールが、ラットと家兎

では2,4,6-トリプロモフェノールがそれぞれ多かった。一方、1,3,5-トリクロルベンゼンはmixed function oxidase system (MFOS)でepoxide化され、その後、epoxide hydraseにより2,4,6-トリクロロフェノール体へ、また、glutathione transferaseによりグルタチオン抱合体(3,5-ジプロモチオフェノール)へと代謝され、後者の代謝経路でのみ脱クロル化される機構が報告されている⁹⁾。この機構に比べ、1,3,5-トリプロモベンゼンはepoxide hydraseでも脱プロモ化し、その位置にOH基の入った3,5-ジプロモフェノール体が多く検出されるのがトリクロルベンゼンに比べて異った点であった。この点を確認するため、2,4,6-トリプロモフェノールをマウスに投与すると、2,4,6-トリプロモフェノール体のみが排泄され、脱プロモ化反応が認められなかった。このことはepoxideを生成し、次に還元作用で脱プロモ化される機構を確認する結果となった。ラットと家兎に比べマウスでは含硫化物が僅かに少なく(表1)、それ故に、脱プロモ化したフェノール体が多いことはglutathione transferaseとepoxide hydraseの2経路が競合しているため、後者が強く現われた結果に起因しているとも考えられる。

1,2,4,5-テトラプロモベンゼン代謝物のテトラプロモフェノールとトリプロモフェノールについてはテトラプロモフェノールがマウスに検出されるが、ラットでは検出されず、トリプロモフェノールが多く検出され脱プロモ化が著しかった。

ペンタプロモベンゼン代謝産物のフェノール体はペンタ、テトラプロモフェノールが検出されず、更に脱プロモ化したトリ、ジプロモフェノールが多く検出されること、また、未代謝物のペンタプロモベンゼンより脱プロモ化した1,2,3,5-テトラプロモベンゼンが多く検出された。それ故に、テトラプロモベンゼンより更に脱プロモ化が著しいことになり、還元的に脱プロモ化され、低プロモ化ベンゼンとなってからOH化の過程へ進むと考えられる。

ヘキサプロモベンゼン代謝産物のフェノール体はペンタプロモベンゼンと同様に脱プロモ化したトリ、ジプロモフェノールが検出されるこ

と、また、脱プロモ化したペンタ、テトラプロモベンゼンが検出された。それ故に、ヘキサプロモベンゼンからペンタ、テトラプロモベンゼンへの還元作用が優先し、次に、OH化の過程で更に脱プロモ化されることはペンタプロモベンゼンと同様であると考えられた。なお、ペンタプロモベンゼンより脱プロモ化ベンゼンの生成は少なく、最も代謝されにくい物質であった。

以上の結果により、イオン化傾向の小さいプロモ化ベンゼンのC-Br結合はC-Cl結合に比べて弱く、脱プロモ化が起きやすいことがわかった。なお、PBBの脱プロモ化の報告例¹⁸⁾もある。

2)メルカプツール酸抱合体

モノプロモベンゼン投与はマウス、ラット及び家兎でや、異なるが4-プロモフェニルメルカプツール酸が投与量の34.9~37.5%で主な代謝物であった。0-ジプロモベンゼンでは3,4-ジプロモフェニルメルカプツール酸が投与量の23~34%、また、トリプロモベンゼンでは3,5-ジプロモフェニルメルカプツール酸が6.9~8.4%であり、プロモ数の増加につれメルカプツール酸抱合体は著しい減少が認められた。

3)ジプロモチオフェニル酢酸(Br₂C₆H₃SCH₂COOH)含硫メチル体(Br₂C₆H₃SCH₃等)

0-ジプロモベンゼン投与は3,4-ジプロモチオフェニル酢酸が投与量の3.5~5.2%であった。1,3,5-トリプロモベンゼン投与は3,5-ジプロモチオフェニル酢酸が3.7~5.4%であり、また、含硫メチル体で20.9~31.8%であった。高分子のメルカプツール酸と低分子の含硫メチル体の排泄量の比は逆比例の関係にあり、高分子のトリプロモベンゼンでメルカプツール酸抱合体が少なくなることは立体障害の可能性が考えられる。塩素化ベンゼン化合物ではPCB¹⁹⁾とクロルベンゼン⁹⁾から-SH、-SCH₃、-SOCH₃、-SO₂CH₃体が広く存在することが明らかにされ、トリプロモベンゼンにおいてもこれらが検出されたことはこれ自体が親水性とは言えないので毒性の面から興味あることと考えられる。

4)プロモ化ベンゼン

プロモ化ベンゼンの排泄はプロモ数の増加に伴って多くなり、テトラプロモベンゼンから急

表4. Biological half life (B.H.L.) of brominated compounds excretion in urine after single oral administration of brominated benzenes

Compound	Dose	Duration	Regression equation	B.H.L.	K
Bromobenzene C ₆ H ₅ Br	1.0	0~16 h	$y=e^{-0.149t_1+9.57}$	4.65 h	0.149
		24~96 h	$y=e^{-0.0259t_2+7.59}$	26.8 h	0.0259
o-dibromobenzene C ₆ H ₄ Br ₂	1.0	0~16 h	$y=e^{-0.103t_1+9.77}$	6.70 h	0.103
		24~120 h	$y=e^{-0.210t_2+7.51}$	33.0 h	0.0210
1.3.5-tribromobenzen C ₆ H ₃ Br ₃	1.0	0~24 h	$y=e^{-0.090t_1+9.20}$	7.70 h	0.090
		48~120 h	$y=e^{-0.0137t_2+7.36}$	35.1 h	0.0137
1.2.4.5-tetrabromobenzene C ₆ H ₂ Br ₄	0.2	0~4 d	$y=e^{-0.642t_1+5.52}$	1.1 day	0.642
		5~30 d	$y=e^{-0.174t_2+3.69}$	4.0 day	0.174
Hexabromobenzene C ₆ Br ₆	0.2	0~6 d	$y=e^{-0.203t_1+5.43}$	3.4 day	0.203
		7~30 d	$y=e^{-0.0565t_2+4.60}$	12.2 day	0.0565

Regression equations were calculation from total brominated compounds in urine

Y : Amount excretion in urine (n mole)

K : Excretion coefficient

t₁ : First phase, t₂ : Second phase

激に増加した。マウス、ラットの糞中へプロモ化ベンゼンの全排泄量の約半分が排泄され、家兎では殆んど全量が排泄された。ヘキサプロモベンゼンはマウスに腹腔内投与しても、同様に尿、糞中に排泄され、経口投与に比べて2割多く排泄された。この排泄量の差が吸収量であり、経口投与量の約80%が吸収されていたことになる。mattews²⁰⁾は投与物質が胆汁中(糞中)あるいはジーン臓から(尿中)排泄されるかどうかの分岐点、即ち、臨海分子量は動物により差異があると報告している。本実験より得た結果では未代謝物の排泄に種族差のあることが認められた。

3. プロモ化ベンゼンの排泄経過

主な排泄物から求めた半減期は個々の化合物によって僅かに異なるが、投与物質のベンゼン環に置換したプロモ数の増加に伴って半減期が長くなり、化学構造と溶解度及び代謝速度との関係によって決定されるものと考えられる。化学構造と溶解度との関係についてはプロモ数の増加に伴って、脂溶性(オクタノール/水分係数²¹⁾)が高くなり、血液による組織から主な代謝、排泄臓器への輸送能力が低下するものと思

われる。また、化学構造と代謝についてはベンゼン環上の隣接水素原子が2~3個あればepoxideを経由し、フェノール体及びグルタチオン抱合体のいずれかに代謝されやすく、従って排泄されやすくなる。

尿中排泄物の半減期の求め方は、被検物質の投与後、経過時間に伴う尿中排泄を二つのコンパートメントモデルとして次の二つの指数項の和を持つ式が考えられる。

$$C_p = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} + C_2 \cdot e^{-\lambda_2 t} \dots \dots \dots (1)$$

C_p : 時刻tにおける尿中排泄量(n mole)

C₁, C₂ : 1次, 2次排泄の初期濃度

λ₁, λ₂ : 1次, 2次排泄定数, hr⁻¹

従って、この式の係数、指数は非線形最小二乗法による曲線あてはめのプログラム²²⁾を用いて求められる。プロモベンゼンの尿中総プロモフェノールについて、(1)より求めた(2)式と実験値に基づき1次、2次排泄を個々に指数回帰のプログラムを用いて求めた(3)式を比較してみた。

$$C_p = 20242 \cdot e^{-0.114t} + 545 \cdot e^{-0.0236t} \dots \dots \dots (2)$$

$$C_p = 14263 \cdot e^{-0.149t_1} \dots \dots \dots (3)$$

$$(C_p = 571 \cdot e^{-0.0242t_2})$$

半減期は1次排泄で(2)式(6.1 hr), (3)式(4.65

hr), 2次排泄で(2)式(29.4 hr), (3)式(28.6 hr)と求められ, 1次排泄でや、異なるが, 2次排泄ではよく一致していた。それ故に, 1次と2次排泄の差が著明な被検物質ほど(3)式は近似値となり, 他の被検物質ではほぼ一致した。

主な尿中排泄物の総排泄量から個々の測定値を減算して求めた生物学的半減期(B.H.L.)は表4に示した。なお, 脂溶性と排泄物の半減期はほぼ平行関係が認められた。

結 論

各種プロモ化ベンゼンをマウス, ラット及び家兎に投与し, GC-ECD, GC-MSを用いて排泄物中の代謝産物を検索, 定量し, 代謝産物の同定と排泄物の種族差及び主な排泄物の排泄性を調べ以下の成績を得た。

1) 主な代謝産物としてプロモフェノール体, メルカプツール酸抱合体, プロモチオフェニル酢酸, 含硫メチル体(SCH₃, SOCH₃)等が検出された。特にプロモフェノールの異性体間比は動

物種によって差異が認められた。

2) 投与物質別では, 代謝産物のメルカプツール酸抱合体, プロモチオフェニル酢酸が低プロモ化ベンゼン投与動物に, また, 含硫メチル体がトリプロモベンゼン投与物にそれぞれ多く検出された。未代謝物は高プロモ化ベンゼン投与の排泄物に多く, テトラプロモベンゼンから急激な増加がみられた。排泄物中に脱プロモ化したプロモ化ベンゼン及びプロモ化フェノールが多く, 脱プロモ化は特に酸化還元反応により生じていると考えられ, 今後, in vitroでの酵素反応との関係による確認が必要である。

3) 排泄物中の主な代謝産物及び未代謝物の経時変化より求めた尿中排泄物の半減期はベンゼン環に置換したプロモ数の増加と共に長くなり, 両者の間に平行関係がみられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたって, 御指導, 御稿閲賜った恩師緒方正名教授に心から感謝いたします。

文 献

1. 環境庁保健調査室編, 化学物質と環境, 東京, pp.53-82, 1981.
2. 同上, 同上, 東京, pp.45-79, 1982.
3. Decarlo, V.J.: Studies on brominated chemicals in the environment, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **320**, 678-681, 1979.
4. 緒方正名, 荻野泰夫: 塩素系有機溶剤類の魚体への移行, 日本公衛誌, **24**, 695-699, 1977.
5. 荻野泰夫: 臭素系有機溶剤類の魚体への移行, 岡山医学会誌, **90**, 1451-1456, 1978.
6. 緒方正名, 荻野泰夫: アルキル芳香族及び多環芳香族炭化水素の金魚への移行, 海洋環境保全の基礎的研究, **1**, 48-58, 1978.
7. 荻野泰夫, 谷本浩一, 石田立夫, 緒方正名: ハロゲン系炭化水素及び芳香族炭化水素の魚体への移行, 第38回日本公衆衛生学会講演集, pp.785, 1979.
8. 荻野泰夫: ラット肝ミトコンドリアのエネルギ転換系に対するハロゲン系炭化水素の作用, 岡山医学会誌, **94**, 1045-1050, 1982.
9. 喜多村正次, 住野公昭, 三尾隆彌: クロルベンゼン-メチルスルホン系代謝物の前駆体, 日衛誌, **33**, 215, 1978.
10. Smith, J.R.L. and Shaw, B.A.T.: Mechanisms of mammalian hydroxylation: Some novel metabolites of chlorobenzene, *Xenobiotica*, **2**, 215-226, 1972.
11. Stekol, J.A.: The determination of p-bromophenylmercapturic acid in the urine of the dog, *J. Biol. Chem.* **113**, 279-288, 1963.
12. Robert, J.A. and Agric, J.: Determination of N-methylcarbamate, *Food Chem.* **17**, 888-891, 1969.
13. Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N. and Gillette, J.R.: Protective role of glutathione and

- evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite, *Pharmacology* 11, 151—169, 1974.
14. Reid, W.D., Christie, B., Krishna, G., Mitchell, J.R., Moskowitz, J. and Brodie, B.B.: Bromobenzene metabolism and hepatic necrosis. *Pharmacology* 6, 41—55, 1971.
 15. Reid, W.D., Christie, B., Eichelbaum, M. and Krishna, G.: 3-methylcholanthrene blocks hepatic necrosis induced by administration of bromobenzene and carbon tetrachloride. *Exp. Mol. Pathol* 15, 363—372, 1971.
 16. Zampaglione, N., Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Stripp, B., Hamrick, M. and Gillette, J.R.: Role of detoxifying enzymes in bromobenzene-induced liver necrosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 218—227, 1973.
 17. Serrine, S.L. and Vincent, G.Z.: Bromobenzene metabolism in the rabbit, *Mol. Pharmacol.* 20, 234—235, 1981.
 18. Zitko, V.: The accumulation of polybrominated biphenyls by fish, *Bull. Environ Comtam. Toxicol.* 17, 285—292, 1977.
 19. Jensen, S. and Jansson, B.: Methyl Sulfon metabolites of PCB and DDE, *Ambio.* 5, 257—260, 1976.
 20. Matthews, H.B.: Introduction to Biochemical Toxicology, Blackwell Scientific Publications London. pp.162, 1980.
 21. Hansh, L.A. and Elkins, D.: Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71, 525—616, 1971.
 22. 山岡 清, 谷川原裕介: 薬物速度論入門, 南江堂版, 東京, 1983.

**Studies on the biological toxicity of several
hydrocarbon pollutants of the environment**

Report 3. The metabolites and excretion rates of brominated benzenes

Yasuo OGINO

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director: Prof. M.Ogata)

Metabolites of brominated benzenes in rabbits, rats and mice after a single oral administration were examined with ECD-GC and MS-GC. The major metabolites found in the urine of the three kinds of animals were bromophenol, mercapturic acid, thiophenylacetic acid and sulphuric methylates. A significant increase in mercapturic acid and thiophenylacetic acid was found in urine after administration of low brominated benzenes, whereas remarkable sulphuric methylate excretion was observed after administration of tribromobenzene. Unchanged bromobenzenes were remarkable in the urine of high-brominated benzene-administered animals. Debromination from which debrominated bromobenzenes and bromophenols in excretions result are best ascertained by an enzymatic reaction of the mixed function oxygenase system. The biological half life of each metabolite and unchanged bromobenzene correlated with the number of the substituted aromatic bromine atoms.