

環境汚染物質(一特に臭素化ベンゼンについて) の生態系への影響

第 5 報

1.3.5-トリブロモベンゼンの代謝

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

荻 野 泰 夫

(昭和59年2月28日受稿)

Key words: 1.3.5-トリブロモベンゼン,
代謝経路,
脱ブロモ化

結 言

臭素化ベンゼンは各種化学工場において広く使用されている^{1,2)}。臭素化ベンゼンの代謝産物並びに排泄経過を調べた結果、1.3.5-トリブロモベンゼンの主な代謝産物として、ブロモフェノール体、含硫メチル体(-SCH₃, -SOCH₃)、ジブロモフェニルメルカプツール酸、ジプロチオフェニル酢酸が認められたが、特に2.4.6-トリブロモフェノール体の他に脱ブロモ化した3.5-ジブロモフェノール体が多く認められることを明らかにした³⁾。

一方、1.3.5-トリクロルベンゼンの場合は、これがmixed function oxidase system (MFOS)でepoxide化された後、更に2.4.6-トリクロロフェノール体に代謝されるか、あるいはglutathione transferaseにより含硫化合物へと代謝される機構が報告されている⁴⁾。このことに関し、1.3.5-トリブロモベンゼンが脱ブロモ化されて3.5-ジブロモフェノール体を生成することはベンゼン環に置換したクロル元素にみられずブロモ元素でみられる現象であるかどうかは興味深いところである。

本報では、1.3.5-トリブロモベンゼンの含硫化合物への代謝経路と特に脱ブロモ化フェノール体の生成機構を明らかにする目的で、予め薬物代謝酵素誘導剤を前投与したラットに被検物

質を投与した。この際の尿中代謝産物並びにラット肝10,000×g上清液とともに被検物質をインキュベートし代謝産物の分析を行った結果について報告する。

材 料 と 方 法

1. 実験動物

ドンリュウ系雄性ラット(体重200g)を用いた。

2. 被検物質の投与方法

トリブロモベンゼン代謝に及ぼすグルタチオンの効果: オリーブ油に懸濁させたグルタチオン(還元型)50mgをラット腹腔内に投与した後、オリーブ油に溶解した1.3.5-トリブロモベンゼン1mgを腹腔内投与した。

トリブロモベンゼン代謝に及ぼすフェノバルビタールの効果: フェノバルビタール20mgを1日2回、4日間ラット腹腔内投与した後、前記と同様に被検物質を投与した。

3. 採尿法

被検物質をラットに投与した後、経時的に尿をアセントで洗って採取した。

4. 肝ホモジネート10,000×g上清分画の調製

フェノバルビタール投与及び無投与ラット(対照)肝よりガラスホモゲナイザーを用い、0.1M phosphate buffer(PH 7.4)中で10%肝ホモジネートを調製した。10%肝ホモジネートを10,000

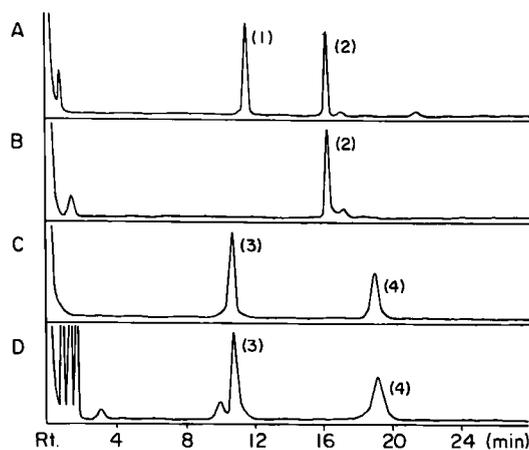


図1 Gas chromatograms of urinary monochloroacetylated compounds
Dose: 1.3.5-tribromobenzene 1mg/rat
GC, Shimadzu 4BM equipped with detector (A,B: FPD, C,D: ECD) condition: column, 3mm×1m column packed with liquid phase (A,B: 3% OV-1, C,D: 2% DEGS+0.5% H₃PO₄) on Gaschrom Q (80/100 mesh), column temp (A,B: 100–250°C, 5 °C/min, C,D: 150°C), carrier gas; N₂ (60 ml/min)
(A), (C): standard, (B), (D): urine
(1): 4-bromothiophenol, (2): 3.5-dibromothiophenol, (3): 3.5-dibromophenol, (4): 2.4.6-tribromophenol

×g, 15分間冷却遠心分離し、得られた上清液を代謝試験用酵素液とした。氷冷下で酵素液9mlに0.1% NADH, 0.1% NADPH または0.1% NADH+0.1% NADPH を含む0.1M phosphate buffer (PH 7.4) 1mlを加えた3群と対照に1000ppm 1.3.5-トリブロモベンゼンを含むエタノール溶液10μlをそれぞれ4群に添加した後、37°C, 3~5時間、空気を気相としてインキュベーションした。

5. 分析方法

代謝産物のプロモフェノール体（グルクロン酸、エーテル硫酸抱合体）はHClで、含硫化合物（ジプロモフェニルメルカプツール酸、-SCH₃体、-SOCH₃体）はN-NaOHでそれぞれ加水分解して、プロモフェノールとプロモチオフェノールにしたものをGC-ECD, GC-FPD, また、プロモメルカプツール酸はメチル化したものをGC-MSでそれぞれ、前報³⁾に示す方法に従って測定した。

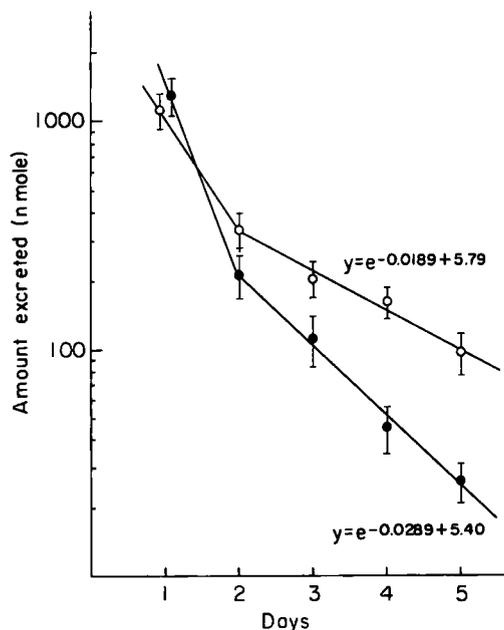


図2 Excretion of total bromophenol in the urine of phenobarbital treated (20mg/rat, i.p. twice a day for 4 days) rats after an intraperitoneal administration of 1.3.5-tribromobenzene 1mg/rat.
○: control, ●: phenobarbital pretreatment
Each point and vertical-bar is the mean ± SD for three experiments (2 rats per group).

6. 試薬類

1.3.5-トリブロモベンゼンは東京化成KK製のもの、NADH, NADPHはペーリンガー社製のもの、フェノバルビタールは10%溶液薬局方の藤永製薬KK製のもの、グルタチオン（還元型）は和光純薬KK製のものを用いた。

結 果

1. GC-ECD, GC-FPDによる測定法の検討

尿中プロモフェノール体と含硫化合物のGC-ECD(FPD)で測定した結果は図1に示す如くであった。特に本報で含硫化合物の測定に用いたFPD(Sフィルター)付きGCは硫黄に選択性があり、良好なGC-クロマトグラムが得られた。

2. 尿中代謝産物の分析

フェノバルビタール前投与群及び対照群にトリブロモベンゼンを投与し、経過日数に伴うプロモフェノール体の尿中排泄量を調べた結果を

表1. Effect of phenobarbital and glutathione on the metabolism of 1.3.5-tribromobenzene.

	metabolites (n mole) /day $m \pm \sigma$				
	3.5-dibromo phenol	2.4.6-tribromophenol	total bromophenol	3.5-dibromothiophenol	total
control	171 ± 35 (18.3)	130 ± 39 (13.9)	301 (32.3)	632 ± 113 (67.7)	933 (100)
phenobarbital	244 ± 64 (15.4)	509 ± 78 (32.2)	753 (47.6)	828 ± 77 (52.4)	1581 (100)
glutathione	132 ± 51 (14.0)	59 ± 15 (6.2)	191 (20.2)	754 ± 90 (79.8)	945 (100)

The numbers in brackets indicate the ratio of each compound to total

表2. Enzymatic conversion of 1.3.5-tribromobenzene to 3.5-dibromophenol and 2.4.6-tribromophenol with rat liver.

incubation time(hr.)	3			5		
	3.5-dibromo phenol	2.4.6-tribromophenol	total	3.5-dibromo phenol	2.4.6-tribromophenol	total
control	0.36 ± 0.05	0.45 ± 0.14	0.81	0.98 ± 0.29	0.58 ± 0.12	1.57
NADH	0.56 ± 0.11	0.51 ± 0.18	1.07	1.22 ± 0.37	0.55 ± 0.083	1.77
NADPH	0.66 ± 0.23	0.32 ± 0.09	0.98	1.98 ± 0.69	0.55 ± 0.14	2.53
NADH+NADPH	1.32 ± 0.37	0.67 ± 0.20	1.99	2.25 ± 0.61	0.72 ± 0.11	2.97
phenobarbital control	1.07 ± 0.32	0.32 ± 0.13	1.39	1.59 ± 0.16	0.62 ± 0.16	2.21
NADH	1.32 ± 0.33	0.40 ± 0.12	1.72	2.12 ± 0.51	0.50 ± 0.10	2.62
NADPH	2.38 ± 0.83	N.D.	2.38	3.17 ± 0.79	N.D.	3.17
NADH+NADPH	3.44 ± 0.86	N.D.	3.44	3.57 ± 1.07	N.D.	3.57

The values are the means ± SD (n mol/mg protein) from three animals
N.D.: nondetectable

図2に示す。プロモフェノール尿中排泄の半減期(24.0 hr, 36.7 hr)は対照群に比べてフェノバルビタール投与群では短くなり、排泄速度の増加(1.5倍)が認められた。なお、図中の式は前報³⁾の方法によった。

フェノバルビタール、グルタチオン各前投与群と対照群にトリプロモベンゼンを投与し、プロモフェノール体と含硫化合物を測定した結果は表1に示す如くであった。尿中代謝産物の量はフェノバルビタール前投与群が対照群に比べて増加したが、グルタチオン投与群では認めら

れなかった。フェノール体に対する含硫化合物の比はグルタチオン投与群(3.49)、対照群(2.10)、フェノバルビタール投与群(1.10)の順に高かった。

3. 10,000×g 肝上清分画接触による代謝産物の分析

フェノバルビタール前投与群と対照群のラット肝10,000×g 上清液にトリプロモベンゼンを添加し、インキュベーションした結果は表2に示す如くであった。総プロモフェノール生成量はいずれの実験系においてもインキュベーショ

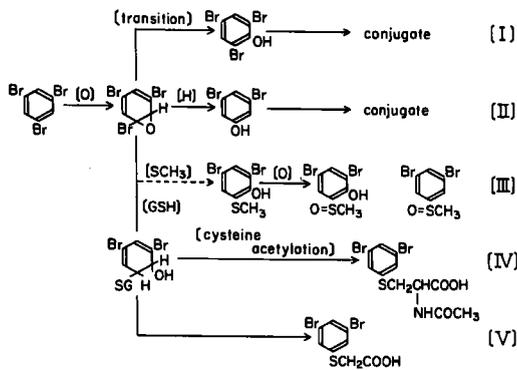


図3. Main metabolic pathways of 1,3,5-tribromobenzene

時間とともに増加し、フェノバルビタール前投与群が対照群に比べて多かった。総プロモフェノールに対する脱プロモ化した3,5-ジプロモフェノールの生成比は投与群が対照群に比べて多く、両群とも NADH に比べて NADPH による増加率が優れていた。

考 察

1,3,5-トリプロモベンゼンの代謝経路については、既に前報³⁾で述べたとおりであり、図3に示す主経路が考えられる。本報ではこれら含硫化合物への代謝経路〔III-V〕と特にプロモフェノール体への代謝経路〔II〕における脱プロモ化の機構について検討を加えた。

人の体内における薬物代謝活性を測定した報告は、アンチピリン等の薬物を投与した後、その血漿中濃度の半減期を正常者と比較し⁵⁾、また、アスピリン投与のラット尿中代謝産物を測定する方法等⁶⁾がある。同様にフェノバルビタール前投与による薬物代謝活性の上昇は尿中総プロモフェノールの測定によって推測することが可能であると考えた。即ち、フェノバルビタール前投与による尿中総プロモフェノールの排泄速度の増加(図2)、及び尿中代謝産物に占める総プロモフェノールの割合の著しい増加(表1)は肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性の上昇を示す。このことは肝10,000×g上清液を用いた *in vitro* の実験系による結果(表2)からも明らかである。即ち、フェノバルビタール前投与による総プロモフェノールの生成量とこれに伴いブ

ロモ基が脱離した位置に OH 基の入った3,5-ジプロモフェノール体の生成量の増加は mixed function oxidase system の P-450 活性が上昇⁶⁻⁹⁾する結果であり、epoxide 化率の向上も示唆された。

グルタチオン前投与ラットにおける尿中代謝産物に占める含硫化合物の割合の増加(表1)については、グルタチオン前投与で glutathione transferase 活性 (GSH) が上昇⁴⁾することにより、含硫化合物への代謝経路〔III, IV, V〕が活性化することを示すものと考えられる。この点に関しては今後の検討が必要である。別の実験では、システイン前投与で代謝経路〔IV〕の促進が観察されている。

結 論

1,3,5-トリプロモベンゼンの代謝経路で、特に脱プロモ化機構に関する検討を行い、以下の成績を得た。

- 1) フェノバルビタール前投与ラットではトリプロモベンゼン代謝産物の尿中排泄速度が増し、含硫化合物に対して脱プロモフェノール体の排泄量が増加した。一方、グルタチオン前投与では含硫化合物の尿中排泄量が増加した。
- 2) ラット肝10,000×g上清液を用いた実験では、フェノバルビタール前投与によって脱プロモフェノール体の生成量が増加し、NADH 及び NADPH の添加により更に促進された。
- 3) 以上の結果より、トリプロモベンゼンの脱プロモ化は含硫化合物への代謝経路と特にプロモ基が脱離した位置に OH 基の入ったジプロモフェノール体への代謝経路により起こることが明らかとなった。

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。実験に関して、環境保健センターの井上豊治専門研究員に御援助して頂いた事に対し、謝辞を申し上げます。

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. 荻野泰夫: 臭素化ベンゼンの代謝産物並びに排泄経過, 岡山医学会誌, 投稿中.
4. 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, **32**, 215, 1978.
5. Kolmodin, B., Azarnoff, D.L. and Sjoqvist, F.: Effect of environmental factors on drug metabolism, Decreased plasma half-life of antipyrine in workers exposed to chlorinated hydrocarbon insecticides, *Clin. Pharmacol. Ther.* **10**, 638—642, 1969.
6. 赤坂 進, 岩上正蔵: アスピリン尿中代謝物による薬物代謝酵素活性測定法の試み, 産業医学, **25**, 399—405, 1983.
7. Ikeda, M., and Ohtsuji, H.: Phenobarbital-induced protection on against toxicity of toluene and benzene in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 30—43, 1971.
8. Gut, I., Halte, K. and Zizkova, L.: Effect of phenobarbital pretreatment on benzene biotransformation in rat, *Arch. Toxicol.* **47**, 13—24, 1981.
9. Lau, S.S. and Zannoni, V.G.: Specific forms of cytochrome p-450 involved in 2,3- and 3,4-epoxidation, *Mole. Pharmacol.* **20**, 234—235, 1981.

**Studies on the biological toxicity several brominated
benzene pollutants of the environment**

Report 5. Metabolism of 1.3.5-tribromobenzene

Yasuo OGINO

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director: Prof. M. Ogata)

The formative mechanism of debrominated compounds was investigated. The excretion rate of tribromobenzene metabolites into the rat urine was enhanced by pretreatment with phenobarbital, and the amount of debrominated bromophenol in urine was greater than that of sulfur containing compounds after phenobarbital pretreatment. on the other hand, sulfur containing compounds were predominant in the urine of rats pretreated with glutathione. Incubation of tribromobenzene with the 10,000 g supernatant of rat liver homogenate from rats pretreated with phenobarbital resulted in an increase in 3.5-dibromophenol. The above effect was accelerated remarkably by NADH and NADPH. These results demonstrate two metabolic pathways in the debromination of tribromobenzene: one to sulfur containing compounds and another to bromophenol bodies.