哺乳動物における pentachlorophenol (PCP) の代謝

田代重毅, 笹本忠夫^{*1}, 相川高利^{*2}, 徳永清吾^{*3}, 谷口栄二, 江藤守総
(九州大学農学部農芸化学科)

昭和 44 年 9 月 16 日 受 理

Metabolism of Pentachlorophenol in Mammals

By Shigeki TASHIRO, Tadao SASAMOTO, Takatoshi AIKAWA, Seigo TOKUNAGA,
Eiji TANIGUCHI and Morifusa ETO

Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Fukuoka

Sodium salt of ^{14}C -labeled pentachlorophenol (PCP) was synthesized and administered to some mammals. In the urine of rabbit administered orally with PCP-Na, considerable amounts of a strong acid metabolite and a little amount of chloranil, which was characterized by thin-layer chromatography, were discovered besides free PCP. The acid metabolite (A-1) was isolated and characterized as pentachlorophenyl β -glucuronide. It decomposed to give PCP by heating or by the condition to take mass spectrum. It was easily hydrolyzed with diluted hydrochloric acid (0.1%) to give PCP, glucuronic acid and glucuronolactone. The transformation of glucuronic acid to the lactone took place in the condition of acid hydrolysis of A-1. A-1 was also hydrolyzed by the action of β -glucosidase without the production of the lactone. A-1 was a major metabolite in the excreta of rat administered subcutaneously. The production of chloranil was observed in the internal organs of mouse two hours after intraperitoneal administration.

(Received September 16, 1969)

緒 論

Pentachlorophenol (PCP) およびその塩は殺菌、殺虫および殺草作用を有し、おそらく、今日、最も多様な目的に使われている pesticide であろう⁽¹⁾。殺菌剤としては植物保護に用いられるほか、木材、皮革、塗料、紙、プラスチック、織物などの処理に使われ、殺虫剤としては、シロアリ、キクイムシ類の防除に使用されている。また、住血吸虫の中間宿主である巻貝の防除にも使われる。わが国では除草剤として多量に使われ、水田のイヌビエ防除に卓効を示している。このように PCP が種々の有害生物に対し非選択的に毒性を示すのは、多くの生物に共通して生命の維持に不可欠な基本的代謝機構である酸化的リン酸化の uncoupler として作用するた

めであろう⁽²⁾。したがって対象有害生物以外の生物に対しても有害であり、とくに魚介類に対しては相当に高い毒性を有している⁽³⁾。しかし、哺乳動物に対しては比較的毒性が低い⁽⁴⁾。これは、後者の代謝機構(解毒、排泄)によるものと考えられるが、Deichmann ら⁽⁵⁾および Bettes ら⁽⁶⁾は、家兎では尿に遊離の PCP として未変化のまま排泄され PCP の抱合体は見出されないと報告しており、また、分解物も検出していない。

著者らは PCP の哺乳動物による代謝産物を見出そうとして本研究に着手し、PCP の大部分はそのまま尿中に排泄されるけれども、なお相当量のグルクロン酸抱合体が生成していることを確認し、さらに、わずかながらクロラニルの生成を認めたので報告する。

実験方法

PCP- ^{14}C (U) の合成 RCC 製ベンゼン- ^{14}C (U) に少量の塩化鉄を加え、乾燥塩素ガスを導入した。反応の

*¹ 現在, クミアイ化学工業株式会社化学研究所

*² 現在, ファーイーストケミカルサービス社

*³ 現在, 福岡県警察本部犯罪科学研究所

進行に伴い浴温を上げ, 5 時間を要して最後に 250°C とした。冷後生成物をクロロホルムで抽出し, 水で洗浄, 乾燥, 濃縮して融点 222°C のヘキサクロルベンゼンを得た。これに 2.5 当量のカセイカリ・エチレングリコール溶液を加え 160~170°C で 7 時間かきまぜた後, 塩酸酸性にして生じた沈澱を水で洗浄して融点 173°C の無色結晶を得た。これは濾紙クロマトグラフ的に単一で, PCP 標準品と一致した。これに当量のカセイソーダ水溶液を加え, 濃縮して得られる結晶をエタノールより再結晶して, PCP のナトリウム塩を得た。収率, 33.2%。

ジクロルマレイン酸 フルフルールを濃塩酸中, 二酸化マンガんで処理して得られる mucochloric acid⁽⁷⁾ をさらに硝酸酸化⁽⁸⁾ して得た。mp 137~139°C。

PCP の投与法と代謝物質試料の調製

家兎: 体重 2 kg の雌に PCP-¹⁴C ナトリウム塩を初日 100 mg, 翌日 120 mg それぞれ水溶液として胃管を用いて経口投与した後, 1 週間にわたり採取した尿を塩酸酸性とし食塩を飽和してエーテルで繰り返し抽出した。

マウス: 24 g の雌に PCP-¹⁴C ナトリウム塩 2 mg を水溶液とし腹腔内注射し, 2 時間後に肝, 腸, 脾, 腎の各器官を摘出してアルコール中でホモジナイズして 3 回繰り返し抽出した。

ラット: 177 g の雄に連続 5 日間にわたり毎日 10 mg 宛 PCP-¹⁴C ナトリウム塩の水溶液を皮下注射し, 6 日目までの排泄物(糞尿混合物)を集め, アルコール中でホモジナイズし, 3 回抽出した。

これら試料の適当量を液体シンチレーター用測定瓶に入れ, 溶媒を除去してシンチレーター用溶媒(トルエン 500 ml, アルコール 250 ml, 水 5 ml, 2,5-diphenyloxazole (PPO) 1 g, 1,4-di-[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (POPOPO) 25 g の混合液)を加え, 神戸工業製液体シンチレーションカウンター GSL 150 により放射能を測定した。

酸性代謝物質 A-1 の単離 精製した PCP のエーテル溶液を市販固型飼料に吸収(100 mg/100 g)させ, 風乾後体重約 2 kg の家兎 3 頭に 30 日間にわたり自由摂取させて総量 10 g の PCP を投与した。別に PCP を与えていない家兎の尿を集め対照とした。尿を塩酸で酸性とし食塩を飽和後, 酢酸エチルで抽出, 次いで強酸性物質を 5% 重炭酸ソーダ水に転溶し, これを再び塩酸酸性とし食塩を飽和して酢酸エチルで抽出した。抽出液を芒硝で乾燥後濃縮してシリカゲルカラムクロマトグラフに付

し Beilstein 法によりハロゲンが検出されたエーテル溶出部分を集め, 濃縮して得られる粗結晶をアセトンおよびエーテルより再結晶した。これを酸性代謝物質 A-1 とした。

酸性代謝物質 A-1 の加水分解

酸による加水分解: A-1 200 mg に 0.1% 塩酸 25 ml を加え, 沸騰水浴中で 2 時間半加熱後, 冷却してエーテルで抽出, 濃縮して生ずる結晶をベンゼンより再結晶した。

β -グルコシダーゼによる加水分解: pH 5.25 の 0.1 M 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液 4 ml に β -グルコシダーゼ (Sigma Chemical Co.) 10 mg を溶かし A-1 (20 mg) のアセトン溶液 0.5 ml を加え, 24 時間 37°C に保った後, エーテル可溶性区分と水溶性区分とに分けた。

その他の方法

カラムクロマトグラフ: Mallinckrodt 製硅胶を用い, ヘキサン, ベンゼン, エーテル, メタノールの順に溶出した。場合により各順番前後の混合溶媒も用いた。また, 酸性代謝物質 A-1 の分離に際しては, ヘキサンを省略した。

薄層クロマトグラフ: Merck 製シリカゲル G を用いた。また, 東京化成製のスポットフィルム・シリカゲルも用いた。クロラニルの発色には tetrabase のエーテル溶液 (100 mg/10 ml) を用い, PCP にはあらかじめ濃硝酸をスプレーして加熱した後, tetrabase をスプレーした。酸性物質についてはメチルレッド 1% 水溶液を用い, ¹⁴C-標識化合物はオートラジオグラフにより検出した。

濾紙クロマトグラフ: 東洋濾紙 No. 50 を使用し, 酸性物質の検出には pH 指示薬を, また, 糖類にはアニン-フタル酸を用いた。

赤外吸収スペクトルは島津 IR-27 G により臭化カリ錠剤について測定した。紫外吸収スペクトルの測定は日立分光光度計 EPU-2 を用いメタノール溶液について行なった。マススペクトルは日本電子質量分析計 JMS-01 SG により 75 eV で測定した。

実験結果

PCP-¹⁴C による代謝物の検索

PCP-¹⁴C を経口投与した場合, 家兎の尿中への放射性物質の排泄は速やかに起こり, 3~4 日でほとんど終る。1 週間分の尿を塩酸酸性とし, 食塩を飽和してエーテル

で抽出される ^{14}C の回収率は投与量の 39.8% であった。

エーテル抽出液を常法により強酸, 弱酸および中性の各区分に分け, 薄層クロマトグラフに付したところ, それぞれ後述する U-1, U-2 あるいは U-3 などが混在していた。しかし, それら以外のオートラジオグラフによるスポットは認められなかった。弱酸区分の主成分は U-2 であり, U-3 は強酸区分に多く存在していた。次に, エーテル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフに付し, ベンゼンで溶出される部分とエーテルで溶出される部分の2分画を得た。それぞれ, さらにシリカゲル薄層クロマトグラフによって, 前者は U-1, U-2 の2成分に分離されたが, 後者では原点に1スポット (U-3) のみが検出された。標準試料と薄層クロマトグラフで比較検討し U-1, U-2 はそれぞれクロラニルおよび PCP と同定された (Table I)。また各スポットを抽出し, 放射能を測定して回収率を算出した。すなわち, PCP は尿中に未変化のまま約 21% が排泄されるほか, わずかながら (0.2%) クロラニルに酸化されて排泄される。その他に極性の高い物質 (U-3) が相当量 (13.2%) 排泄されることがわかった。

U-3 のエーテル溶出液を濃縮すると微量の酸性物質が粗結晶として得られた。上述のように, クロラニルが PCP の代謝物として確認されたので, クロラニルが酸化あるいは加水分解を受けて生成するクロラニル酸およびジクロルマレイン酸⁽⁹⁾を可能な代謝物と想定し, U-3 と濾紙クロマトグラフにより比較したが, いずれとも一致しなかった (Table I)。

Table I. Metabolites in Urine of Rabbit Administered with Pentachlorophenol- ^{14}C

Solvent system*	Chromatography, R_f		
	Thin-layer		Paper
	I	II	III
Metabolites			
U-1	0.50	0.92	—
U-2	0.15	0.58	—
U-3	0.00	0.00	0.84
Known compounds			
Chloranil	0.50	0.92	—
Pentachlorophenol	0.15	0.58	—
Chloranilic acid	0.00	0.04	0.61
Dichloromaleic acid	0.00	0.00	0.93

* Solvent system I, hexane : benzene (5 : 1); II, benzene; III, *n*-butanol (saturated with water) : acetic acid (10 : 1).

次に, PCP- ^{14}C ナトリウム塩をマウスの腹腔内に注射して2時間後に摘出した内臓について検討した。そのアルコール抽出液中の放射能の回収率は投与量の 43% であった。これを芒硝で乾燥して濃縮し, シリカゲルカラムクロマトグラフに付し, 各フラクションの放射能を測定した。ヘキサンによって投与量の 15.9%, ベンゼン 18.2%, その他全部で 8.9% が溶出された。これらを濃縮してシリカゲル薄層クロマトグラフ (展開溶媒; ベンゼン : ヘキサン : メタノール = 2 : 2 : 1) のオートラジオグラフで検すると, ヘキサン溶出フラクションは R_f 0.89 (M-1) と 0.59 (M-2) の2スポットよりなり, ベンゼン溶出物は後者のみのスポットを与えた。M-2 は PCP の標準品と薄層クロマトグラフ的に完全に一致した。エーテル+メタノール溶出部分には PCP より極性の高い物質 (M-3) が検出された。各スポットをアセトンで抽出し, 放射能を測定した結果, 投与した PCP に対する収率は, 未変化の PCP 34%, M-1 5.6%, M-3 2.4% となる。M-1 をクロラニルとともに *cochromatography* に付し, ベンゼンあるいはクロロホルムで展開したところ, オートラジオグラフのスポットと *tetrabase* によるスポットとが一致した。しかし R_f 値は純品より小さく, それぞれ 0.41 と 0.45 で, 混在する不純物のためと考えられた。M-3 は前記 U-3 と同一物と考えられる。

最後に PCP- ^{14}C ナトリウム塩を皮下注射により投与したラットの排泄物をアルコールで抽出した。放射能の回収率は 25.6% であった。アルコール抽出物を薄層クロマトグラフに付し, ブタノール : エタノール : 3*N* アンモニア水 = 4 : 1 : 5 (上層) で展開してオートラジオグラフによって検討したところ, R_f 0.25 および 0.00 の2スポットが認められた。前者が主なスポットであるが, これは前記の U-3 とクロマトグラフ的に一致した。なお, PCP は R_f 0.61 でラット排泄物中には認められなかった。

酸性代謝物 A-1 の単離と同定

上述のように PCP- ^{14}C を投与した家兎の尿中に相当量の未知酸性物質が存在することがわかったので, これの単離と同定を試みた。

無標識 PCP 10g を3頭の家兎に30日を要して経口投与し20lの尿を得た。酢酸エチルを抽出溶媒として常法に従い, 強酸区分 15g を得た。これをカラムクロマトグラフに付し, ベンゼンで十分カラムを洗浄し混在する PCP を除去した後, エーテルによって溶出される

Beilstein テスト陽性部分を集め、濃縮して粗結晶約 500 mg を得た。これをアセトンおよびエーテルで再結晶して純品 A-1 を得た。一方、PCP を投与していない家兎の尿を同様に処理しても、このような Beilstein テスト陽性部分は得られなかったから、A-1 は PCP の代謝産物と考えられる。事実、A-1 はさきに PCP- ^{14}C を用いて見出された代謝物質 U-3 と濾紙クロマトグラフで完全に一致した(展開溶媒: ブタノール: メタノール: 3N アンモニア水=4:1:5, R_f : A-1=0.58, U-3=0.58, PCP=0.87)。

A-1 は無色微粉末状結晶, 155°C で分解と同時に一部昇華する(昇華して得られる物質の融点は 190°C で PCP と一致する)。ベンゼン, 石油エーテルに不溶, エーテルにわずかに溶解し, アセトン, アルコールに可溶である。窒素, イオウ, リンを含まず, ハロゲンを含む。定性試験に対しては, アニスアルデヒド, ナフトレゾルシン, アニリン-フタル酸, 四酢酸鉛, ブロモクレゾールグリーンに陽性, オルシン, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンおよび塩化鉄反応に陰性であった。すなわち糖を含みフェノール性水酸基のない酸性物質であると考えられる。

Fig. 1. Infrared Spectra of an Acid Metabolite (A-1) of Pentachlorophenol Isolated from Urine of Rabbit, its Hydrolyzed Product A-1-1, and Pentachlorophenol in KBr Discs.

Fig. 2. Mass Spectrum of A-1 at 75 eV.

A-1 の赤外線吸収スペクトル (Fig. 1 上) はアルコール性水酸基 ($3400\sim, 1350\text{ cm}^{-1}$), カルボキシル基 ($3400\sim, 1710\text{ cm}^{-1}$) および C-Cl ($720, 790\text{ cm}^{-1}$) の存在を示唆する。マススペクトルは Fig. 2 に示されるように, m/e 264, 266, 268, 270, 272 の各イオンピークが, それぞれ 62:100:64:22:4 の比率で現われている。これは pentachlorophenol $\text{C}_6\text{HOC}_5\text{Cl}_5$ の isotope abundance より理論的に計算される各イオンの存在比率 60:100:67:25:4 に一致している。このことは A-1 がマススペクトル測定のために分解して PCP を生ずるものと考えられる。これらの事実から A-1 は PCP とカルボキシル基を有する糖とから成っていると思われる。なお, A-1 が PCP を含む単なる混合物でないことはクロマトグラフ, 紫外線 (Fig. 3) および赤外線吸収スペクトル (Fig. 1) から明らかである。元素分析値は C, 32.9; H, 2.51% で, pentachlorophenyl glucuronide $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_7\text{Cl}_5$ としての計算値, C, 32.57; H, 2.05% とほぼ一致している。

A-1 を稀塩酸中で加熱すると加水分解して, 結晶 A-1-1 を析出する。A-1-1 は融点 190°C の針状結晶で昇華性があり, エーテルに可溶, 水に難溶でハロゲン含有する。A-1-1 は紫外線吸収スペクトル (Fig. 3) および赤外線吸収スペクトル (Fig. 1) で PCP と完全に一致し, 標準品と混融しても融点降下を示さない。

Fig. 3. Ultra-violet Absorption Spectra of A-1 (5mg), its Hydrolyzed Product A-1-1 (0.4mg), and Pentachlorophenol (0.4mg) in 10 ml of Methanol.

Fig. 4. Paper Chromatogram of the Hydrolyzate of Acid Metabolite A-1 and Related Compounds.

Designations: No. 1 for A-1; No. 2 for an aqueous layer extracted with ether after the hydrolysis of A-1 with 0.1% hydrochloric acid; No. 3 for glucuronic acid; No. 4 for glucuronolactone; No. 5 for glucuronic acid treated with 0.1% hydrochloric acid.

A-1-1 を除いた水層を濾紙クロマトグラフ (ブタノール:酢酸:水=4:1:2) に付すと pH 指示薬では R_f 0.16 のスポットのみが検出され, グルクロン酸と一致した。しかしアニン-フタル酸では, Fig. 4 に示されるようにグルクロン酸の他に R_f 0.38 のスポットが見出され, グルクロノラクトンと一致した。グルクロノラクトンは A-1 の酸加水分解に際し副成したものと思われるが, 事実, グルクロン酸を同様に塩酸性下で加熱するとラクトンが生成した。

さらに A-1 の加水分解は β -グルコシダーゼによっても起こり, PCP とグルクロン酸を生じた。以上により A-1 は pentachlorophenyl- β -glucuronide と決定した。

考 察

徳永⁽¹⁰⁾ は魚体内における PCP- ^{14}C の分布を検討し, PCP が未変化のまま鰓に蓄積することを認めている。一方, Deichmann ら⁽⁶⁾ は家兎に経口投与された PCP のナトリウム塩は速やかに吸収され, 24 時間以内にその 70% が遊離の PCP として尿中に排泄されると報告している。哺乳類では, フェノール類はグルクロン酸あるいは硫酸と抱合して排泄されるのが普通であるが, 彼らは

PCP は抱合体としては排泄されないとし、後に Bettes ら⁽⁶⁾によっても支持されている。他方、小林ら⁽¹¹⁾はアサリ貝で、PCP が硫酸と抱合されることを見出している。

しかし家兎を用いた著者らの実験によると、尿中に遊離の PCP が最も多く排泄されているが、なお相当量の酸性物質が含まれていることが認められた。この酸性物質は単離され、PCP のグルクロン酸抱合体であることが確認された。Bettes ら⁽⁶⁾は尿中の PCP の分析に際し、まず pH 1 で水蒸気蒸留される“遊離 PCP”を定量し、他方、あらかじめ尿を 5N 塩酸で処理しても水蒸気蒸留される PCP 量が増加しないことから抱合体の生成を否定しているが、著者らの実験が示すように、PCP の glucuronide は 0.1% 塩酸と加熱することにより加水分解されるのであるから、Bettes らの“遊離 PCP”には当然抱合体も含まれていたと思われる。さらに PCP を皮下注射したラットの排泄物中には遊離の PCP は見出されず glucuronide が主代謝産物として検出された。それゆえ、PCP が一般のフェノール類とくに異なった代謝方式で排泄されるのではないと考えられる。

一方、少量ながら PCP の酸化生成物であるクロラニルが家兎尿に見出され、さらに、PCP を腹腔内注射したマウスの体内で 2 時間後にはすでにその生成が認められた。クロラニルは PCP を化学的に酸化すると容易に生成するが、その代謝産物として見出されたのは初めてである。また、Lyr は木材腐朽菌による PCP の代謝分解が、ラッカーゼ等により酸化的に起こる⁽¹²⁾として、過酸化水素によるモデル実験を行ない⁽¹³⁾、*p*-および *o*-キノノン類の生成と、その酸化開裂による β -hydroxytrichloromuconic acid および tetrachloromuconic acid の生成を推察している。しかし著者らは哺乳動物での代

謝産物としては環の開裂生成物を見出すことはできなかった。

以上により、PCP の哺乳動物による代謝を Fig. 5 のように提出したい。すなわち、PCP はそのまま尿中に排泄されるほかグルクロン酸抱合によっても解毒排泄され、さらに量的には少ないが酸化も受ける。

要 約

PCP-¹⁴C (U) を合成し、家兎、マウスおよびラットにおける代謝について検討した。家兎に経口投与された PCP は大部分が未変化のまま、相当の部分が強酸性物質として、また少量がクロラニルに代謝されて尿中に排泄される。皮下注射によって PCP ナトリウム塩を投与されたラットの排泄物中には未変化の PCP は認められず、大部分が強酸性物質として検出された。マウスに腹腔内注射によって投与した場合、2 時間で臓器内に少量のクロラニルが認められた。強酸性代謝物は PCP を投与した家兎の尿より単離され、pentachlorophenyl- β -glucuronide と同定された。

本研究の遂行に当り激励いただいた九州大学大島康義名誉教授、原稿を御校閲くださった同農学部前川一之教授、有益な御助言をいただいた同山田芳雄助教授、薬学部辰巳淳助教授、マスマスペクトルの測定をしていただいた薬学部質量分析室の稲津淑子嬢に謝意を表します。

Fig. 5. A proposed Metabolic Pathway of Pentachlorophenol in Mammals.

- (1) A. Bevenue and H. Beckman : *Residue Reviews*, **19**, 83 (1967).
- (2) E. C. Weinbach : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **43**, 393 (1957).
- (3) 板沢靖男, 田村 保 : 水産増殖, **11**, 113 (1963).
- (4) D. S. Dittmer : "Handbook of Toxicology," Vol. V, Saunders Co., 1959, p. 123.
- (5) W. Deichmann, W. Machle, K. V. Kitzmiller and G. Thomas : *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **76**, 104 (1942); *C. A.*, **37**, 461 (1943).
- (6) J. J. Bettes, S. P. James and W. V. Thorpe : *Biochem. J.*, **61**, 611 (1955).
- (7) M. Yanagita : *J. Pharm. Soc. Japan*, **72**, 1383 (1952).
- (8) G. B. Kelly, Jr., C. H. Braithwaite, Jr. and D. Williams : *U. S.* 2,860,145; *C. A.*, **53**, 7996 (1959).
- (9) 寺井富夫, 中山清寿, 吾妻 光, 吉田徳男, 鈴木 巖, 柳沢久雄 : 農薬生産技術, **10**, 1 (1964).
- (10) 徳永清吾 : 科学警察報告, **21**, 126 (1968).
- (11) 小林邦男, 金子 宏, 富山哲夫 : 日本水産学会大会講演, 昭和 42 年 11 月, 大阪.
- (12) H. Lyr : *Phytopathol. Z.*, **47**, 73 (1963).
- (13) H. Lyr : *Holztechnologie*, **3**, 201 (1962).