

(別紙様式第3号) (Format No. 3)

学 位 論 文 要 旨
SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

氏名 Name: 大山 和俊

題目 Title: **Studies on Sex- and Species-Dependent Metabolism of Methoxychlor in Liver**

(肝臓におけるメトキシクロル代謝の性差および種差に関する研究)

DDTの類縁化合物である有機塩素系殺虫剤、メトキシクロル(MXC)はDDTとは異なり易分解性で環境残留性の低い化合物であるが、動物体内で代謝活性化を受け、主にその脱メチル化代謝物によりエストロゲン様作用が誘起されると指摘されており、内分泌機能のかく乱による生殖および発生過程への毒性が疑われている化合物である。本研究では、MXCの動物体内での代謝、特に肝臓での代謝反応における種差、性差に関する調査を行った。まず、雌雄ラット、マウス(雄)、ニホンウズラ(雄)およびニジマス(幼若期)の肝臓スライスを用いた*in vitro*代謝試験を実施し、MXCの代謝物プロファイルについて比較した。雄ラットにおいて、MXCはジ脱メチル体(bis-OH-MXC)のグルクロン酸抱合体およびグルクロン酸/硫酸の二重抱合体へと急速に代謝され、モノ脱メチル体(mono-OH-MXC)のグルクロン酸抱合体は生成されなかった。一方、マウスおよびウズラにおいてはmono-OH-MXCのグルクロン酸抱合体が主要な代謝物であり、グルクロン酸抱合体bis-OH-MXCはマイナーな代謝物であった。また、雌ラットおよびニジマスではmono-およびbis-OH-MXCの各グルクロン酸抱合体が主要代謝物として、ほぼ等量生成された。これらの結果を脱メチル化代謝物の総生成量に対するbis-OH-MXC(その抱合体代謝物を含む)の生成比として比較すると、雄ラットでは95%以上、雌ラットおよびニジマスでは40-50%、マウスおよびウズラでは20%以下がそれぞれbis-OH-MXC(およびその抱合体)として存在した。また、脱メチル化反応により生成されたmono-OH-MXCの光学異性体比について調査したところ、雌雄ラットおよびマウスでは(S)-体(生成比:>75%)が、ウズラおよびニジマスでは(R)-体(生成比:>85%)が、それぞれ優先した。以上の結果より、MXCの代謝過程には反応の立体選択性を含めて種差、性差(ラット)があり、酸化的脱メチル化反応における差がその主要因の一つであると示唆された。なお、雌雄ラットを用いた胆汁排泄試験(*in vivo*代謝試験)を実施し、胆汁中代謝物プロファイルを比較したところ、*in vitro*試験において示されたMXC代謝の酸化的脱メチル化反応に起因するラットでの性差が*in vivo*においても同様に認められることを確認した。さらに、*in vivo*においては酸化的脱メチル化反応に加えて、腸内細菌による還元的脱塩素化反応もMXCの代謝に大きく寄与することが明らかとなった。

次にMXC代謝のラットにおける性差をより理解する目的で、その一次代謝物であるmono-OH-MXC((R)-および(S)-異性体)の代謝反応について肝臓スライス試験系を用い

て検討した。その結果、雄ラットでは、基質の立体性に係り無く bis-OH-MXC (およびその抱合体) の生成割合が 90%以上であるのに対し、雌では (R)-および(S)-体でそれぞれ 81 および 56%であり、MXC 代謝と同様に雄ラットでは雌に比べ bis-OH-MXC の生成割合が高く、さらに雌ラットにおいて脱メチル化反応に明らかな立体選択性 ((R)->(S)-) を示す結果となった。また、(S)-体での代謝物プロファイルは(R)-体に比べ、より MXC の代謝物プロファイルに類似しており、このことはラットにおける MXC の代謝中間体が(S)-mono-OH-MXC であるとの結果とよく一致した。以上の結果より、ラットにおける MXC 代謝の性差は中間代謝物である(S)-mono-OH-MXC の代謝における差が一因であると考えられた。また、脱メチル化反応の立体選択性には性差があり、これが MXC 代謝の性差の発現に関与すると示唆された。

MXC 代謝に関与する酸化的脱メチル化反応のラットでの性差について検討する目的で、雌雄ラットおよび比較の目的で雌雄マウスの肝ミクロソームを用いて MXC および mono-OH-MXC ((R)-および(S)-異性体) の脱メチル化反応の酵素反応速度解析を試みた。Eadie-Hofstee プロットにより MXC の O-脱メチル化反応を解析したところ、いずれの試験動物種においても低および高親和性を有する少なくとも 2 種類のコンポーネントの関与が明らかとなった。一方、mono-OH-MXC についての解析では標準的な 1 酵素モデルに従う結果となった。算出した速度論的パラメーター (K_m および V_{max}) を動物種間で比較すると、雄ラットにおいて、いずれの基質についても親和性および反応速度ともに最も高く (高親和性=低 K_m 値)、従って固有クリアランス ($CL_{int} = V_{max}/K_m$) も最高値となった (例えば、MXC O-脱メチル化反応の CL_{int} は、他動物に比べ 20~37 倍高い値を示した)。また、mono-OH-MXC の脱メチル化反応における立体選択性について、(R)-および(S)-体での CL_{int} および V_{max} 値を動物種間で比較したところ、雌ラットにおいて最も高い立体選択性を示し、その反応性は (R)->(S)-であった。以上の解析結果より、雄ラットにおける MXC 代謝では MXC および mono-OH-MXC とともに O-脱メチル化酵素の効率的な基質となるために、MXC の両方のメチル基が連鎖的に脱メチル化され、bis-OH-MXC にまで急速に代謝されるものと考えられた。一方、雌ラットでは脱メチル化活性 (肝固有クリアランス) が雄に比べ低く、加えてこの反応により、さらに脱メチル化を受けにくい(S)-mono-OH-MXC を立体選択的に生成することから、結果的に(S)-mono-OH-MXC が主要代謝物の一つとして検出されると考えられた。以上の結果より、ラットにおける MXC 代謝の性差は酸化的脱メチル化反応に関与する代謝酵素 (cytochrome P450) の活性の差 (MXC および mono-OH-MXC の脱メチル化反応の CL_{int} の性比 (雄/雌) は 12~27) であることが明らかとなった。なお、マウスにおける反応の性差について同様の解析を行ったが、MXC および mono-OH-MXC の脱メチル化反応における CL_{int} の性比 (雄/雌) は 0.5~1.8 であり、代謝活性にラットほどの顕著な性差は認められなかった。

