

学会賞受賞論文

(業績賞)

BHC および関連有機塩素化合物の代謝に関する研究

栗原 紀夫

京都大学放射性同位元素総合センター

Studies on Metabolism of BHC Isomers and Related
Organochlorine Compounds

Norio KURIHARA

Radioisotope Research Center, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Metabolic experiments of lindane and related compounds are reviewed. Lindane and other BHC isomers produced 2,4,6-trichlorophenol as the major oxidative metabolite by rat liver microsomes. A mechanism was shown to be direct oxygenation of the cyclohexane ring followed by dehydrochlorinations. Microsomes from rat liver and housefly abdomen effectively metabolized lindane to (36/45)- and (346/5)-pentachlorocyclohexene and (36/45)-hexachlorocyclohexene in addition to 2,4,6-trichlorophenol. A reaction mechanism was proposed which includes electrophilic attack by an activated oxygen to chlorine or hydrogen. Microsomes metabolized isomers of tetra-, penta-, and hexachlorocyclohexene to tetrachlorocyclohexenol isomers, 2,4,5-trichlorophenol and 2,3,4,6-tetrachlorophenol, respectively. The (346/5)-isomer of pentachlorocyclohexene also gave an abundant amount of pentachlorocyclohexenol isomer. These oxidative reactions were shown to proceed mainly via ene-like hydroxylation accompanied by double bond migration. Reductive dechlorination of lindane and related polychlorocyclohexenes under anaerobic condition was found using microsomes and NADPH. 1,2,4-Trichlorobenzene was produced abundantly from (36/45)-hexachlorocyclohexene in this condition. Correlations of this biochemical reductive dechlorination with electrochemical reduction were illustrated. 4-Chloro-, 2,4-dichloro-, 3,4-dichloro-, 2,3,5-trichloro- and 2,4,5-trichlorophenylmercapturic acids were identified as the main mercapturic acid metabolites of lindane. Their formation from (346/5)-tetra-, (346/5)-penta-, (36/45)-penta-, and (36/45)-hexachlorocyclohexene was proposed based on *in vitro* experiments using rat liver soluble fraction and glutathione. A mechanism was proposed which includes substitution by glutathione of allylic chlorine with or without double bond migration. All these findings elucidated the *in vivo* metabolic pathways of lindane degradation in the rat and in the housefly.

はじめに

BHC はわが国では 1970 年に製造中止となった。殺虫剤として少なくとも 20 年以上、農業用家庭用に広く使われたものが消え去るには、それなりの社会的理由があったわけであるが、だからといってそのまま忘れてしまふには、BHC はあまりにも多くの問題をわれわれに残していた。自然科学的な意味で、BHC についてわれわれが知らないことが多すぎたといってよい。BHC の

研究をその後も 10 年あまり続けてきた理由である。

また有機塩素系と呼ばれるような農薬は今後現われな
いかもわからないが、炭素塩素結合を持つ薬剤は現在も用
いられている。こういった薬剤についての予備知識のためにも、BHC は良いモデルとして好個の研究対象といえる。

本稿では BHC についてのわれわれの研究のうち、おもに代謝に関して述べることにする。

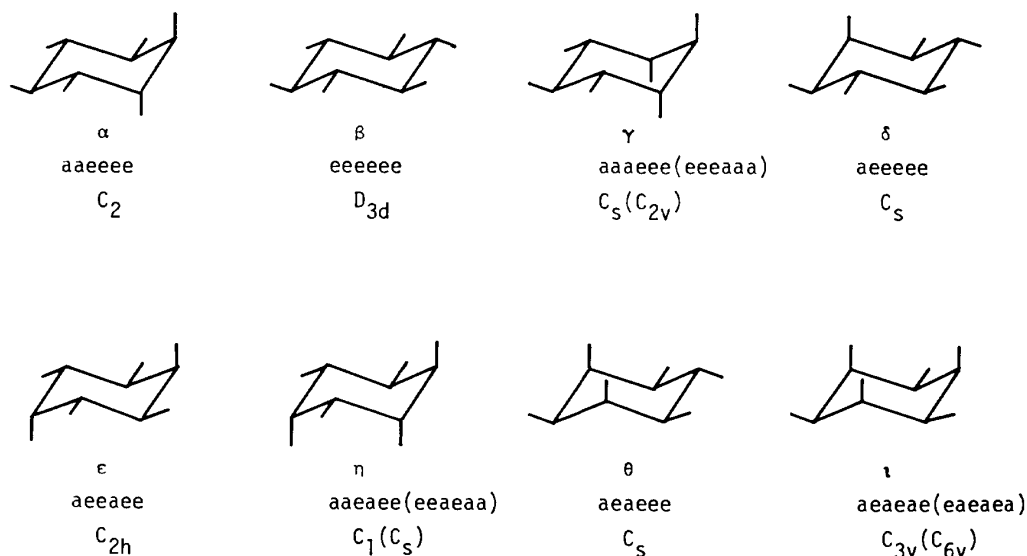


Fig. 1 Structures of BHC isomers (stable chair forms).

実験事実と主要な問題点

研究をはじめた当時、BHC の代謝に関して報告されていたおもな事柄は次の諸点であった。これらはすべて、 γ -BHC (以下リンデン) に関するものである。なお、立体異性体の構造を Fig. 1 に示す。

- (1) 代謝の第1段階は脱塩化水素であり、生ずるものはまず (36/45)-pentachlorocyclohexene (以下 PCCHE) である (イエバエ)¹⁾。
- (2) グルタチオン (以下 GSH) 抱合体がいくつか生ずる (イエバエ)²⁾。
- (3) メルカプツール酸 (以下 MA) と、2,3,5-および、2,4,5-トリクロロフェノール (以下 TCP) が生ずる (ラット)³⁾。

これらを総合して考え、昆虫でも哺乳動物でも類似の代謝経路をたどると仮定すれば——トランス脱塩化水素により、(36/45)-PCCHE、ついでさらに同じ反応が進み 1,2,4-トリクロロベンゼン (以下 TCB) までいったん代謝され、ついでこれが酸化されて対応するフェノールである 2,3,5- と 2,4,5-TCP となる。一方 PCCHE は、GSH 抱合も受け抱合体が脱塩化水素することにより S-dichlorophenyl-glutathione になる (哺乳類では対応する MA になる)。——こういった経路 (Fig. 2) が容易に想定でき、また有機化学的にもきわめて納得しやすい反応ばかりで説明できることになる。

一見、問題はあまり複雑でないように思われた。しかしマウスで BHC 異性体のオートラジオグラフィを行なった際の排泄尿を分析して見ると、今まで報告されて

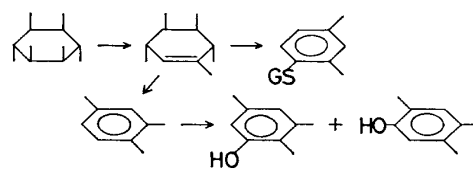


Fig. 2 Formerly proposed pathways of lindane metabolism.

いなかった 2,4,6-TCP が大量に生じていた⁴⁾。このほかに 2,4-ジクロロフェノール (DCP) が存在していた。これらは GC-RD や MF で確かめたものである。ほぼ同時期にラット⁵⁾ やウサギ⁶⁾ でも実験結果が報告され、ここでも 2,4,6-TCP の重要性が示された。このほかに、テトラクロロフェノール (TeCP) の、とくに 2,3,4,6- 異性体も見いだされた。

一方、発表の時期は後になるが、ラット尿中の MA を詳しく調べると、実にさまざまなホモログや異性体がリンデン代謝物として存在することがわかった⁷⁾。適当な誘導体としてキャピラリー GC かけるとおのおのをきれいに分離することができる (Fig. 3)。

さらに、イエバエでのリンデン代謝物の検索を行なうと、ここでも 2,4,6-TCP が存在し、さらに (346/5)-PCCHE や (36/45)-hexachlorocyclohexene (HCCHE) も発見された⁸⁾。後者は、ほぼ同じ頃 Chadwick らによりラット代謝物の一つとして同定された⁹⁾。

また、イエバエでは Reed や Forgash により、トリ、テトラ、ペンタクロロベンゼン (おのおの TCB, TeCB, PeCB) が同定された¹⁰⁾。

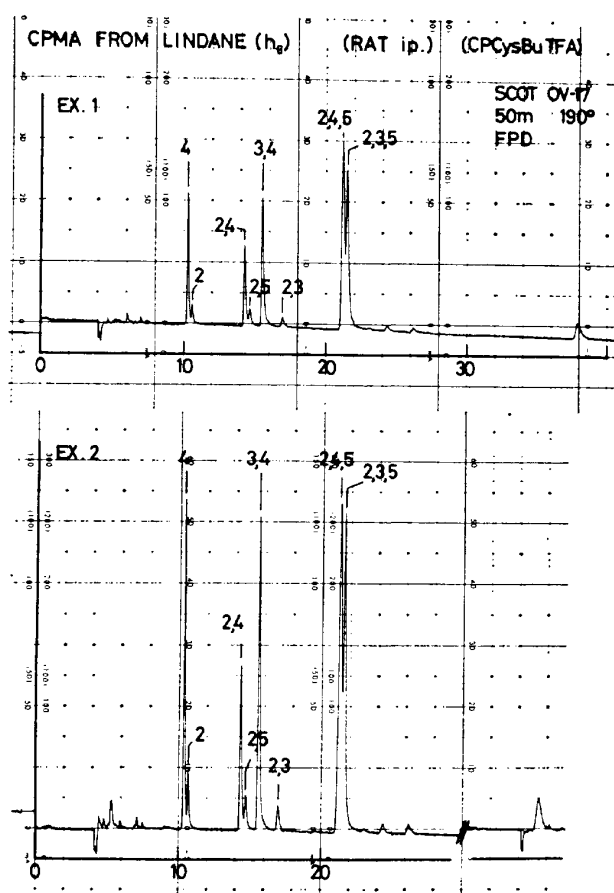


Fig. 3 Gas chromatograms of *N*-trifluoroacetyl-S-chlorophenyl-cysteine *n*-butyl ester mixture prepared from mercapturic acids in the rat urine. Lindane was administered intraperitoneally once, and the urine was collected for 48 hr. (Glass capillary SCOT OV-17, 50 m, 190°, fpd.)

以上のように主に *in vivo* で得られた結果を見ると、先に述べたような単純な経路では、とてもリンデン代謝を説明できないことがわかる。これらの事実から浮かび上がるいくつかの重要な問題点を挙げてみると次のようなものがある。

- (1) HCCHE はいかなる反応によって生ずるのか？
触媒するものは何か？
- (2) TeCP の生成経路はどうか？ TeCB からか？
TeCB の前駆体は何か？
- (3) 2,4,6-TCP はいかなる経路で生ずるのか？ 先に述べた 2,4,5-異性体ならたとえば 1,2,4-TCB の酸化を考えればよく、1,2,4-TCB は PCCHE から生じやすい異性体である。では 1,3,5-TCB が 2,4,6-TCP の前駆体か？ しかしこの TCB の生成は考え難い。

(4) 多種類の MA (したがって GSH 抱合体) の生成経路はいかなるものか？ ことに monochlorophenylMA の前駆体は何か？ また di- や tri-chlorophenylMA はそれぞれ、PCCHE や HCCHE から生ずると考えてよいのか？

等々である。他にももちろん問題は多いが、それらの大部分は上の問いの枠組の中に含まれると考えてよい。

以下、研究を進めた順序とは必ずしも一致しないが、上の設問の順に、その答を見いだして行なった過程をたどってゆくこととする。なお、以下の代謝研究においては哺乳動物と昆虫との間で共通の事柄が多いので両者を同時に記してゆく。

HCCHE 生成の反応について

リンデンの重水素体が非常に強力な殺虫力同位体効果を示し、通常のリンデンと比べて数倍～25 倍以上という値を示した^{11,12)}ことはまことに興味深い事実である。その原因を探ると、イエバエにおける代謝解毒の反応速度が、両化合物間で大きく異なる、いわゆる反応速度同位体効果が最も効いていることが判明した。すなわちリンデンが代謝される第 1 段階で同位体効果があるため、重水素体は代謝分解 (したがって解毒) されにくく、通常のリンデンより少量で虫を死に至らしめると考えられる。

そうなると、イエバエでのリンデン代謝の第 1 段階は C-H 結合開裂を伴うものであることが予想された。もちろん、この中には以前から考えられていた脱塩化水素反応もその一つと数えられよう。後に述べる酸素挿入による水酸基生成の反応も存在するであろう。しかし脱水素反応もあってよい。——と調べて検索すると実際にイエバエ *in vitro* 代謝物中に、(36/45)-HCCHE のあることが GC-MS で証明されたのである⁸⁾。

この反応は *in vitro* ではミクロゾーム、NADPH、酸素の存在下でおこり、CO や SKF-525A によって阻害される。したがって cytochrome P-450 依存であると考えた⁸⁾。

生体での酸素の活性化モデルについて考察した Ha-

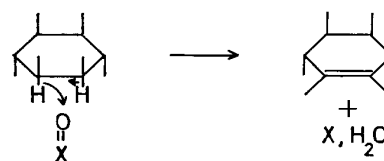


Fig. 4 *cis*-Dehydrogenation of lindane by an activated oxygen species.

milton 論文¹³⁾によれば、活性酸素によって親電子的に水素引きがおこり、結果的に *cis*-脱水素が起こる。その機構も提示されている。たぶん、上の反応もこのようにして起こっているのであろう (Fig. 4). (36/45)-HCCHE という、リンデンの *cis*-脱水素化物が生じていることは、これを裏付けている。Chadwick ら⁹⁾ もラットでの HCCHE 生成について Hamilton 論文を引用している。

Tetrachlorophenol の生成と ene-like 反応

HCCHE が存在すれば、この生体酸化で tetrachlorophenol (TeCP) は容易に生ずるはずである。Table 1 に示すようにラット肝 *in vitro* の実験でもこれは示される¹⁴⁾。ところでその機構はどんなものであろうか？

通常、ミクロゾームでの酸化は親電子的酸素によるから、いわゆる ene-like 反応によって酸素が二重結合に導入されると考えられる。HCCHE の場合、必ずいったん gem-chlorohydrin が生ずるから、これは直ちにケトンになり、脱塩化水素やエノール化を経て、2,3,4,6-TeCP の生ずる経路が容易に説明できる (Fig. 5)。

これがたんなる推測でないことは、BTC 異性体を用いた *in vitro* 実験で確かめられた。この実験にはラット肝ミクロゾームとイエバエ腹部ミクロゾームを用いているが、結果に微妙な差異はあるものの、以下の議論の大筋にはあまり影響がない。

BTC をミクロゾーム、NADPH、O₂ で代謝させると tetrachlorocyclohexenol (TCCOL) が生ずる。各 BTC 異性体から生ずる TCCOL 同士を比べると一致するものが出て来るのであるが、その立体構造の関係を調べることで反応機構の裏付けが得られるのである¹⁴⁾。

たとえば (36/45) と (345/6)-BTC から共通の代謝物 TCCOL が得られるが、このうち一つは次のようなルート (Fig. 6) で調製された化合物 (1) と一致し、その構造が決まった。反応経過も、まぎれなく決まる (Fig. 7)。

同様に (34/56)-BTC と (346/5)-BTC とからも共通の TCCOL (2) が生じ、一方 (346/5)-BTC は別の TCCOL (3) を生ずるが、これは (35/46)-BTC から生ずる TCCOL の一つのもの (3) と一致するのである。この説明も Fig. 7 のような経過が最もよくあてはまる。五つの BTC 異性体からの生成物はことごとく上と同様

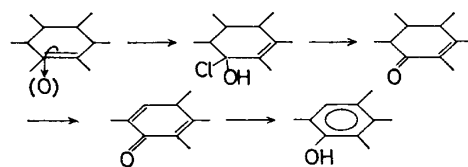


Fig. 5 2,3,4,6-Tetrachlorophenol formation from hexachlorocyclohexene isomers.

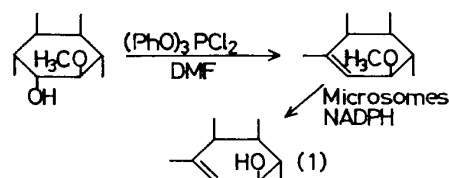


Fig. 6 Preparation of an isomer of tetrachlorocyclohexenol.

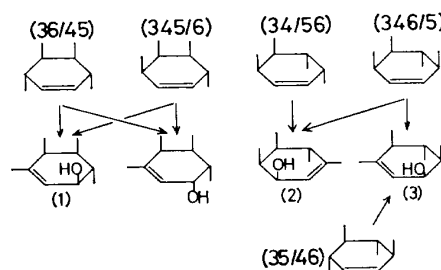


Fig. 7 Examples of tetrachlorocyclohexenol formation from tetrachlorocyclohexene (BTC) isomers.

Table 1 *In vitro* metabolism of hexachlorocyclohexene by rat liver microsomes (Reproduced after modification from Ref. 14).^{a)}

Substrate	Metabolized HCCHE	1,2,4-TCB	1,2,3,4-TeCB	PeCB	2,3,4,6-TeCP	Others ^{b)}
(36/45)	69.4	24.0	3.4	2.0	10.5	9.9+
(35/46)	74.2	0.6	28.0	11.6	13.6	4.1
(346/5)	77.8	—	9.0	9.0	26.8	1.9
(34/56)	76.2	1.2	1.0	41.0	16.1	4.7

^{a)} Values are averages of two or three experiments ($\times 10^{-10}$ mol). The initial amount of the substrate was 8×10^{-9} mol and the incubation time was 30 min.

^{b)} Other metabolites include 1,2,4,5 (and 1,2,3,5)-TeCB, 2,4,6-TCP, 2,3,5- (and 2,4,5)-TCP, and 2,3,4,5-TeCP. The symbol (+) means the production of pentachlorocyclohexenol.

Table 2 *In vitro* metabolism of pentachlorocyclohexene isomers by rat liver microsomes (Reproduced after modification from Ref. 14).^{a)}

Substrate	Metabolized PCCHE	1,2,4-TCB	2,4,5-TCP	PCCOL	Others ^{b)}
(36/45)	52.1	6.8	20.6	+(1)	4.0
(35/46)	71.6	1.7	24.4	+(1)	2.2
(356/4)	70.8	0.6	37.6	+(2)	1.3
(346/5)	72.6	3.3	6.0	+(2)	3.4
(34/56)	74.4	1.6	17.7	+(2)	3.6

^{a)} Values are averages of two or three experiments ($\times 10^{-10}$ mol). The initial amount of the substrate was 8×10^{-9} mol and the incubation time was 30 min.

^{b)} Other metabolites include 1,2,4,5- (1,2,3,5-)TeCB, 1,2,3,4-TeCB and 2,4,6-TCP. Number in parentheses show the number of PCCOL isomers. The decreasing order of the PCCOL production rate of the PCCHE isomers is (346/5) $\gg$ (36/45) $\geq$ (356/4) $\geq$ (35/46) $\geq$ (34/56).

の反応機構で説明できたのである。なおこの反応は epoxide を経ても、進行しそうに思えるが、いくつか対応する epoxide を同じ系で代謝させても TCCOL は得られず、結局上に説明したように活性酸素が二重結合を攻撃すると同時に、二重結合が移動し、あるいは水素や塩素のシフトがおこり水酸基が直接導入されたような形になる、という機構が正しい。

HCCHE から TeCP への経路が決まると、まったく同様に PCCHE から TCP への経路も考えられる。*In vitro* の実験 (Table 2) 結果は上述の議論とほぼ同様に説明できる¹⁴⁾。ただし TCP のうち最重要な 2,4,6-TCP の生成は後述のように主に別の経路による。

この表で Table 1 と異なる点は各 PCCHE から、pentachlorocyclohexenol (PCCOL) が生じていることである。二重結合への酸素の求電子の攻撃が起こる場合、その vinyl 位に水素が結合している場合は、ちょうど BTC の場合と同じく alcohol の状態でとどまり PCCOL になると考えられるのである。Vinyl-塩素の根元の炭素を攻撃した場合には、HCCHE の反応と同様にケトンを経て、2,4,5-TCP になるのだと考えられる (Fig. 5 参照)。なお、Table 1 の (36/45)-HCCHE からの PCCOL 生成はまったく別の機構で、なんらかの求核性酸素、たぶん superoxide anion radical による allyl 位塩素の置換によるものであろう。

さて PCCHE からの PCCOL 生成量を見ると面白いことがわかる。PCCOL の合成標品を持っていなかったので概略の相対値での議論である。

(346/5)-PCCHE と (356/4)-PCCHE とは、vinyl 位の塩素の位置のみが異なり、四つの塩素の立体構造はまったく同一という異性体の 1 対である。この代謝物の 2,4,5-TCP と PCCOL (同一構造ではないが) の量を

Substrate	Metabolites	
	2,4,5-TCP (mole)	PCCOL ^{a)}
(346/5)-PCCHE	6.0×10^{-10}	26
(356/4)-PCCHE	37.6×10^{-10}	1

(346/5)-BTC

:

(346/5)-PCCHE

:

(356/4)-PCCHE

Fig. 8 Production of 2,4,5-trichlorophenol and pentachlorocyclohexenol from (346/5)- and (356/4)-pentachlorocyclohexene (PCCHE) (Reproduced with permission from Ref. 14).

^{a)} Relative peak area on *glc*-ecd.

比べると Fig. 8 のようになり歴然とした差が見られる。これを立体構造の同じ BTC と比べると、その原因が推察できる。つまり、この構造への酸素の ene-like 反応攻撃は、すべて axial 塩素に隣接する炭素の位置に起こっているのである。酵素の立体的要請がこのような位置選択的攻撃を惹き起しているとししかいえないが、とにかくその結果が Fig. 8 のような代謝物分布を惹き起しているのである。

ここまで述べてきた HCCHE と PCCHE の代謝実験はほとんどラット肝ミクロゾームによる実験である。

BTC の項で記したようにイエバエ腹部 ミクロゾームによる反応も大筋では同様であるが代謝物分布が異なり、その酸化酵素の立体的要請が異なることを思わせる。これは PCCHE の酸化においても見られることであり、たとえば (35/46)-PCCHE からの PCCOL 生成は、イエバエではかなりの量に達するが、ラットでは非常にわずかである等の事実がわかっている。

ただ、イエバエでも (34/6)-PCCHE や、(36/45)-PCCHE が *in vivo* 代謝物として存在し、これらを *in vitro* で代謝させると 2,4,5-TCP が生じてくることから、上述の PCCHE の ene-like 酸化が重要な代謝経路の一つであることは間違いないであろう。

もう一つ付け加えるならば、イエバエではすでに TCB や TeCB の生成¹⁰⁾ が報告されている。PeCB の生成も見いだされている^{10,14)}。PeCB についてはラットでの生成も認められ、これはおそらく HCCHE を経て脱水素と脱塩化水素により生ずるのであろう。TeCB や HCCHE や PCCHE から生成しうるから、あるいはイエバエではこのような脱塩化水素の経路がかなり重要なかもしれない。

2,4,6-TCP の生成

哺乳動物 *in vivo* で 2,4,6-TCP が重要な代謝物として生成するという報告がいくつか現われ⁴⁻⁶⁾、またイエバエでもその生成が確認されて以来、その生成経路は大いに問題になったが、酸化的代謝であることは容易に予想された。そして Chadwick ら⁹⁾ により、たしかに肝

ミクロゾーム、NADPH の存在下、好氣的条件下で、リンデンから 2,4,6-TCP が好収率で生ずることも明らかとなった。同条件で (36/45)-HCCHE や (36/45)-PCCHE も生ずる。イエバエでもほぼ同じことがいえる。ところが、このような HCCHE や PCCHE は、それぞれ 2,3,4,6-TeCP や 2,4,5-TCP の良い前駆体とはなっても、2,4,6-TCP の主要な前駆体ではないことが Table 1, 2 を見てもはっきりわかる。したがって BHC から別のルートを経ることを考えなければならない。

In vitro での 2,4,6-TCP 生成や、*in vivo* での代謝物を見ても、この反応は BHC の異性体にかかわりなく主要なものようである。この点 HCCHE やそれに伴う TeCP などの生成が、リンデン特有であったのと大きい違いである。つまり、2,4,6-TCP の生成反応は少

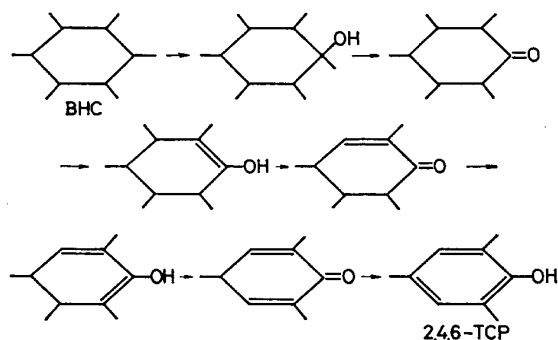


Fig. 9 2,4,6-Trichlorophenol formation from BHC isomers.

Table 3 Oxidation of four stereoisomers of pentachlorocyclohexanol with chromic acid in aqueous acetic acid.¹⁴⁾

Starting compound	M.P.	Primarily oxidized intermediate	Yield of
Pentachloro-cyclohexanol		Pentachloro-cyclohexanone	2,4,6-TCP
	76°		33.6%
	128°		90.3%
	108°		50.7%
	120°		41.7%

なくとも第1段階において立体構造とあまり関係なく起こるものでなくてはならない。

酸化代謝の主要な反応様式の一つに、脂肪族 C-H 結合への酸素挿入反応がある。この広く知られた反応を BHC に適用して考えてみると、Fig. 9 のような過程を経て、必然的に 2,4,6-TCP が生ずるのではないかと考えられた。ケトン位の水素がプロトンとして離脱しやすいことを思えば脱塩化水素の方向が図のようになることは容易にうなずける。

これを証明するためモデル化学反応を行なった。手持ちのいくつかの pentachlorocyclohexanol をクロム酸酸化して Fig. 9 にあるケトンを得ようとした (Table 3)。しかし反応結果はすべて 2,4,6-TCP 生成ということになった。生じたケトンが反応条件の中で自発的脱塩化水素を起こしたのであろう。とにかく間接的にでも上のルートの証明はできたと考える。のちに、Stein ら¹⁶⁾ は水懸濁液中の BHC の酸素酸化により 2,4,6-TCP の圧倒的生成を実験的に示し、同様に上記と同じ機構を提出した。この実験において副生成物として 2,4-異性体をはじめとするジクロロフェノールも多量に生じているが、この反応には酸素が不要であることが示されてい

る。

多種類のメルカプトール酸の生成 (Table 4)

ラットにおいてリンデンから 2,4-dichlorophenyl-MA が主に生ずると考えられていた時期があり、これはリンデンが 1 分子トランス脱塩化水素して (36/45)-PCCHE を生じ、これがグルタチオン (GSH) 抱合して行くと考えれば容易に説明できた。しかし既述のようにリンデンを与えたラットの尿中には非常に多種類の MA が見いだされ⁷⁾、その生成経路の説明は一筋縄ではできない。一方、ラット肝上清には GSH トランスフェラーゼが含まれているが、この画分によってリンデンを代謝させようとしても、ほとんど GSH 抱合体は生じない (この点イエバエ上清画分とは異なる。イエバエでは上清と GSH だけでリンデンから GSH 抱合体が、かなり容易に生ずる)。したがってラットでは、GSH 抱合の前になんらかの前段階が存在するに違いない。この前段階の反応をつかさどるものはミクロゾームの酸化酵素系であろうと考えた。

ラット肝ミクロゾーム酸化酵素系で生ずるリンデンの中間代謝物には (36/45)-HCCHE や (36/45)-PCCHE

Table 4 Composition of the chlorophenylmercapturic acids formed from lindane and related compounds *in vivo*^{a)} (Reproduced with permission from Ref. 7).

Substrate	Dose (μ mol)	CPMA ^{b)}			DCPMA ^{c)}				TCPMA ^{d)}	
		2-	3-	4-	2,3-	2,4-	2,5-	3,4-	2,3,5-	2,4,5-
Lindane	34.4 (BR) ^{e)}	t ^{f)}	t	15	4	9	6	33	17	16
	17.2 (AR) ^{g)}	t	t	10	t	9	2	36	21	23
(36/45)-HCCHE	34.6 (BR)	t	0 ^{h)}	3	4	16	5	24	22	26
	17.3 (O) ⁱ⁾	t	0	t	t	12	t	36	24	28
(36/45)-PCCHE	10.4 (O)	t	0	0	t	14	1	34	25	27
	39.2 (BR)	0	0	t	0	97	2	0	t	t
(346/5)-PCCHE	39.2 (O)	0	0	t	0	95	3	0	t	t
	11.8 (BR)	0	0	20	0	7	16	57	t	t
(346/5)-BTC	5.5 (AR)	t	0	1	0	8	6	85	0	0
	1.0 (AR)	0	0	t	0	20	24	56	t	t
(346/5)-BTC	45.4 (AR)	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	4.5 (AR)	0	0	100	0	0	0	0	0	0

^{a)} Intraperitoneally administered to rat. Percentages in the mercapturic acid fraction are shown. The standard error in the *glc* determination was estimated as less than 5% of each value.

^{b)} CPMA: Chlorophenyl-mercapturic acid.

^{c)} DCPMA: Dichlorophenyl-mercapturic acid.

^{d)} TCPMA: Trichlorophenyl-mercapturic acid.

^{e)} BR: Administered as an emulsion in Ringer's solution made from benzene solution.

^{f)} t: Trace amount; less than 1%.

^{g)} AR: Administered as an emulsion in Ringer's solution made from acetone solution.

^{h)} 0: Not detectable.

ⁱ⁾ O: Administered as an olive oil solution.

があり、最近報告されているところによるとわずかながら (346/5)-PCCHE もある¹⁷⁾。後者はイエバエでは以前に報告したもので⁸⁾、ちょうど *cis*-脱水素と同様の機構で塩素の引き抜きがおこり、ついでプロトンが取れるのであろう。

いずれにせよ、これら中間代謝物はあらためてラットに与えると Table 4 のように、それぞれが特徴のある MA を生じたのである。これを見るとリンデンから生ずる MA のほとんどのものが説明できそうである。ただし、monochloro 体である 4-chlorophenylMA の生成のみは説明困難である。(346/5)-PCCHE という微量中間代謝物からわずかに低収率でしか生じないからである。しかし、これも (346/5)-BTC なる中間代謝物を考えればうまく説明できる。実際このものは *in vivo* で 4-Cl-phenylMA を圧倒的に与えている (Table 4)。

ここまでの段階で二つの疑問が生ずる。上記中間代謝物の MA 生成が *in vitro* の系でも再現できて化学的にうまく説明できるかということと、(346/5)-BTC なる中間代謝物は本当に存在しうるのかという問いである。

肝上清に GSH を加えた *in vitro* 反応で、上に挙げた中間代謝物を代謝させると生成する抱合体は Table 5 のようになり、(36/45)-HCCHE 以外はだいたい *in vivo* の結果と類似している (GSH 抱合体が MA に変換される過程は生体内で当然起こっている)。

In vitro の GSH 抱合体生成物は化学的に見てごく自然である。S_N2 または S_N2' 的な GSH の攻撃により allyl 位の塩素が除去され、いったん中間的な抱合体ができる。これから脱塩化水素を繰り返せば Table 5 に掲げた生成物が生ずることは自然に説明できる (Fig.

10)。

In vivo での結果が *in vitro* のそれと異なる (36/45)-HCCHE の説明がここで要求される。的確なことは不明であるが (36/45)-HCCHE がその状態で GSH 抱合を受けないことは確実であり、その理由をこの化合物の高い疎水性に求めることができよう。オクタノール/水の分配係数を尺度としてその疎水性を測定してみると log *P* にして 4.34 であり、これは母化合物であるリンデンの log *P* 値 3.72 よりはるかに高い^{18,19)}。肝ミクロゾームは *in vivo* では肝小胞体に当たり、この部位には疎水性の高いものの親和性が非常に強い。したがってリンデンから (36/45)-HCCHE がこの部位で生じたとき、HCCHE のかなりの部分がそのまま留まり、さらにそこで次の反応を受けるのではないかと考えられる。たとえば、酸化的脱塩化水素や、還元的脱塩素 (後述参照) などである。このような変換ののち、疎水性が小さくなると小胞体を離れ、細胞質部位へ移動して GSH 抱合を受ける——このように考えれば *in vivo* と *in vitro* における (36/45)-HCCHE 代謝の違いが一応説明できるのである。

もう一つの疑問“(346/5)-BTC は中間代謝物として存在しうるか”に関しては肯定的な答が出ている。通常の好氣的条件で *in vitro* の代謝では BTC は生じないが嫌氣的条件でミクロゾーム、NADPH により、リンデンからこの BTC が生ずるのである^{9,15)}。(346/5)-BTC は、後に初代培養ラット肝細胞でも生じることがわかったので、この脱塩素反応は *in vivo* においても起こっていると考えて、そう無理がないであろう。

この反応は NADPH の電子が P-450 を経て基質に

Table 5 Formation of *S*-chlorophenyl-glutathione from polychlorocyclohexenes by rat liver soluble fraction (reproduced after a modification from Ref. 7).^{a)}

Substrate	No. of experiments	Metabolites (sum=100)						
		4-CPG	2,4-DCPG	2,5-DCPG	2,6-DCPG	3,4-DCPG	2,4,6-TCPG	Others
(35/46)-BTC	2	100	—	—	—	—	—	—
(346/5)-BTC	2	100	—	—	—	—	—	—
(36/45)-BTC	2	100	—	—	—	—	—	—
(36/45)-PCCHE	10	—	95	—	3	3	—	—
(35/46)-PCCHE	4	—	67	—	—	33	—	—
(356/4)-PCCHE	1	—	44	2	20	34	—	—
(346/5)-PCCHE	4	—	14	13	—	73	—	—
(34/56)-PCCHE	5	—	33	60	2	5	—	—
(36/45)-HCCHE	4	—	—	—	—	—	卅	卅

^{a)} Average values of several experiments. CPG, DCPG, and TCPG are abbreviations for *S*-chlorophenyl-glutathione, *S*-dichlorophenyl-glutathione and *S*-trichlorophenyl-glutathione, respectively.

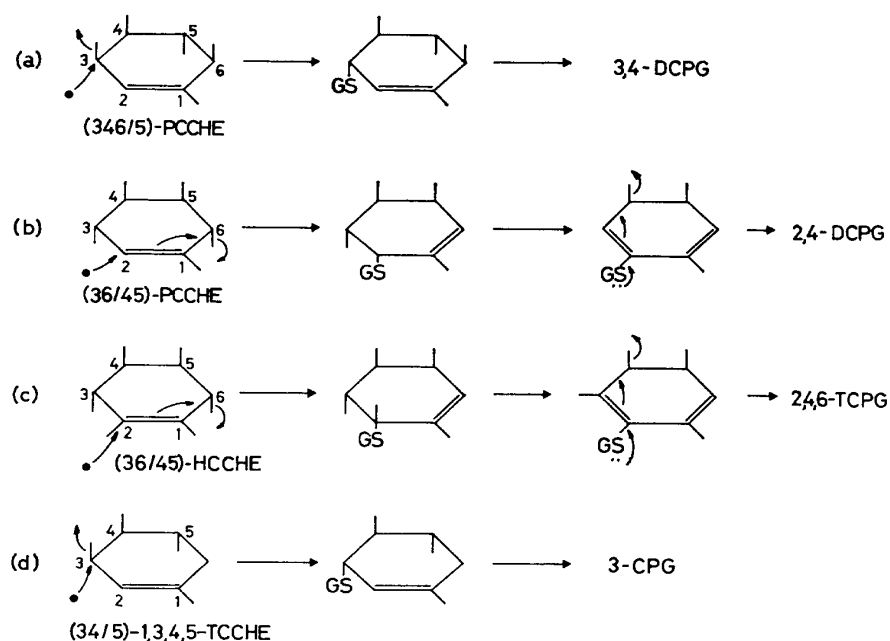


Fig. 10 Stereochemical pathways for glutathione conjugation with various polychlorocyclohexenes. CPG, DCPG and TCPG represent *S*-chloro-, *S*-dichloro- and *S*-trichlorophenyl-glutathione, respectively. TCCHHE: tetrachlorocyclohexene. Closed circles show the attacking glutathione molecules (Reproduced with permission from Ref. 7).

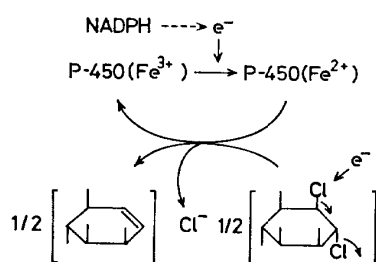


Fig. 11 Reductive dechlorination of lindane by a cytochrome P-450 dependent reaction.

与えられ還元的に脱塩素を行なうものと考えられ²⁰⁾, 電子親和性の高い塩素化合物だからこそこる反応であると考えてよい (Fig. 11). 類似の還元反応はアミンの *N*-オキシドなどについて報告されている²¹⁾.

電子親和性が高いほど P-450 による還元的脱塩素が起こりやすいことについては, HCCHE, PCCHHE, BTC の各異性体の反応性と, それらの物理化学的性質との相関関係を調べて報告した²⁰⁾. 予想どおり電子親和性が高いほど (ここではポーラログラフの半波電位の絶対値が小さいほど), また疎水性が高いほど反応しやすいことがわかった (Fig. 12).

なお本題から少しそれるが, 嫌気性菌 *Clostridium rectum* によっても BHC および類縁化合物は還元的に

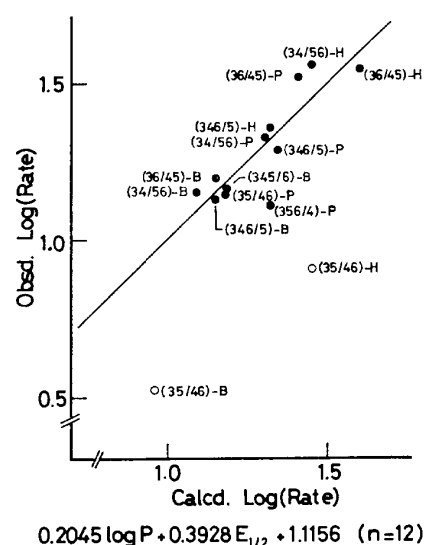


Fig. 12 Observed and calculated $\log(\text{Rate})$ values according to the equation shown here. In the graph, the following symbols and abbreviation are used.

○: compounds not included in the correlation, H: hexachlorocyclohexene, P: pentachlorocyclohexene, B: benzene tetrachloride, i.e. tetrachlorocyclohexene.

In the equation, P and $E_{1/2}$ are partition coefficient and half-wave potential, respectively (Ref. 19).

Table 6 Deuterium isotope effects on the *in vivo* formation of mercapturic acids from a 1 : 1 mixture of normal and hexadeuterated lindane^{a)} (Reproduced with permission from Ref. 23).

Excreted compound	Duration of urine collection (hr)	k_H/k_D
Substrate	0-48 ^{b)}	(0.21 ^{c)})
(lindane)	48-96 ^{d)}	(0.09 ^{c)})
MonoCPMA (mostly ^{e)} 4-)	0-48	1.31±0.17 (4)
DiCPMA (2,4- and 2,5-)	0-48	2.36±0.34 (2)
	48-96	1.50
(mostly ^{f)} 3,4-)	0-48	3.50±0.59 (2)
	48-96	2.38
TriCPMA (2,4,5- and 2,3,5-)	0-48	2.67±0.38 (2)

^{a)} The k_H/k_D values are means and standard deviations with the number of experiments in parentheses or are results of single experiments.

^{b)} The first 48 hr after administration.

^{c)} The ratio of the remaining normal and hexadeuterated lindane.

^{d)} The second 48 hr after administration.

^{e)} 2-Chlorophenylmercapturic acid was included, and the abundance was 4 to 10% of the total Mono-CPMA fraction.

^{f)} 2,3-Dichlorophenylmercapturic acid was included; about 0.5 to 1.5% of this fraction.

脱塩素され、この反応も電気化学的な値と、上に似た関係を与えた²²⁾。

HCCHE のうち、もっとも還元されやすい (36/45) 異性体が、好氣的な条件にもかかわらず *in vitro* 実験において、他異性体に比べて 1,2,4-TCB を最も多量に与えていること (Table 1) もうなずける。脱塩素して生ずる diene は不安定で直ちに脱塩化水素すると考えられるのである。なお、実は (34/56)-HCCHE も上の異性体と同程度に還元されやすい (Fig. 12)。しかし Table 1 で 1,2,4-TCB の生成が少ないのは、たぶんこの異性体が 1,2-*cis* 水素を 2 対持っているため、好氣的条件では脱水素反応が非常に起こりやすく PeCB になる反応が速いのであろう。

MA 生成反応の話に戻る。

重水素標識リンデンをラットに投与し、尿中 MA 画分の生成に及ぼす同位体効果を調べたところ、di- および trichlorophenylMA の生成に対しては、同位体効果の値は 2.4~3.5 と、はっきりと大きい第 1 次同位体効果の存在を示し、これら MA の生成に脱塩化水素や脱水素など C-H 結合切断を含む反応が前段階で律速的に存在することを裏付けた (Table 6)。ところが、4-Cl-phenylMA の生成に対しては同位体効果の値は 1.3 程度で、あまり大きくない。(346/5)-BTC がこの MA の前駆体であるとすれば、BHC→BTC の生成には 1 次同位体効果は見られないからこの経路から生ずる 4-Cl-phenylMA の生成に大きい同位体効果が観察されない

ことは理解できる²³⁾。ただ 1.3 という値は無視できない同位体効果の存在を示すので、(346/5)-PCCHE を経るルートがかなり重要なかもしれない。

おわりに

以上紹介したいくつかの問題点の解明により、BHC ことにリンデンのラットやイエバエでの代謝経路とその反応機構がほとんど明らかとなった。

ラットとイエバエの代謝経路での大きな差異は、GSH 抱合体生成の経路であろう。ラットでは必ずいったん、小胞体で変化を受けてからでないと GSH 抱合を受けないようである。つまり酸化酵素と GSH トランスフェラーゼの連繋が必要なようである (もっとも、最近の報告²⁴⁾によるとミトコンドリアやミクロゾームに GSH トランスフェラーゼがあり、これは脱塩化水素と抱合をとも行なうとのことである)。

一方、イエバエでは上清と GSH だけでリンデンは代謝されるから、*in vivo* でも細胞質内のみで BHC が GSH 抱合体に変換されてゆく経路がかなりウェイトを占めていると見られる。実際イエバエ上清と GSH の存在下で BHC 異性体を代謝させると S-dichlorophenylglutathione 異性体のみが生ずる²⁵⁾。これは古く、Bradbury ら²⁾ がチオフェノール誘導体として推定した結果とよく一致する。たぶん GSH の存在下、トランスフェラーゼはまず脱塩化水素を行ない、ついで抱合反応を行なうのであろう。この反応経路については古くから

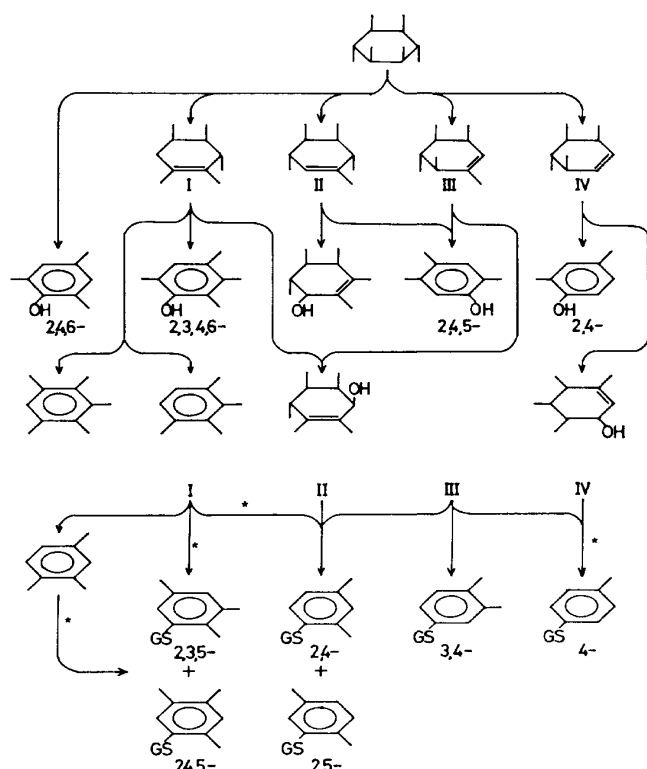


Fig. 13 Pathways of lindane metabolism in the rat. Only major metabolites are shown. In the housefly, all these routes except for those denoted by asterisk are found. Short lines in the formulas represent C-Cl bonds. GS- represents a glutathione moiety.

議論が分かれており、BHC分子に直接求核的にGSHが攻撃する経路が想定されていたし、今もこの考えを支持する人達もあるが、イエバエでGSH抱合代謝が重要なウェイトを占めており、しかも重水素化リンデンが、代謝においても殺虫力においても大きい同位体効果を示すことを見ると、やはりC-H結合が切断される反応が第1段階に来ると考えるのが自然であろう。最後にリンデン代謝経路の概略をFig. 13に示す。

本研究に関し終始強力な指導と支援をいただいた京都大学農学部中島稔名誉教授、藤田稔夫教授に心から御礼申し上げます。本研究の大部分は私が京都大学放射性同位元素総合センターに移ってから行なったものであり、この間センターの教職員の方々に大変お世話になったこと、深く御礼申し上げます。BHC研究には、当時の農薬化学研究室内の諸氏、ことに実光稔、内田又左衛門、木曾真博士らに大いに助力をいただいた。そして本稿で述べた代謝の研究に関しては田中啓司博士の卓抜な

アイディアと巧みで精力的な実験結果がその非常に重要な部分を占めている。これらの方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) J. G. Sternburg & C. W. Kearns: *J. Econ. Entomol.* **49**, 548 (1956)
- 2) F. R. Bradbury & H. Standen: *Nature* **183**, 983 (1959)
- 3) P. L. Grover & P. Sims: *Biochem. J.* **96**, 521 (1965)
- 4) N. Kurihara & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**, 220 (1974)
- 5) R. W. Chadwick & J. J. Freal: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **7**, 137 (1972)
- 6) J. C. Karapally, J. G. Saha & Y. W. Lee: *J. Agric. Food Chem.* **21**, 811 (1973)
- 7) N. Kurihara, K. Tanaka & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **10**, 137 (1979)
- 8) K. Tanaka, N. Kurihara & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **6**, 392 (1976)
- 9) R. W. Chadwick, L. T. Chuang & K. Williams: *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**, 575 (1975)
- 10) W. T. Reed & A. J. Forgash: *J. Agric. Food Chem.* **18**, 475 (1970)
- 11) K. Tanaka, N. Kurihara & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **6**, 386 (1976)
- 12) K. Tanaka, M. Nakajima & N. Kurihara: *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**, 149 (1981)
- 13) G. A. Hamilton: "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation," ed. by O. Hayaishi, Academic Press, New York, Chap. 10, pp. 405-451, 1974
- 14) K. Tanaka, N. Kurihara & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **10**, 79 (1979)
- 15) K. Tanaka, N. Kurihara & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **10**, 96 (1979)
- 16) K. Stein, J. Portig & W. Koransky: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **298**, 115 (1977)
- 17) J. F. Fitzloff, J. Portig & K. Stein: *Xenobiotica*, in press (1981)
- 18) N. Kurihara, M. Uchida, T. Fujita & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **2**, 383 (1973)
- 19) N. Kurihara, K. Yamakawa, T. Fujita & M. Nakajima: *J. Pestic. Sci.* **5**, 93 (1980)
- 20) N. Kurihara, K. Tanaka & M. Nakajima: "Advances in Pesticide Science," ed. by H. Geissbühler, Pergamon, Oxford, Part 3, p. 557, 1979
- 21) M. Sugiura, K. Iwasaki, H. Noguchi & R. Kato: *Life Sci.* **15**, 1433 (1974)
- 22) N. Kurihara, N. Ohisa, M. Nakajima, T. Kakutani & M. Senda: *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1229 (1981)

- 23) N. Kurihara, T. Suzuki & M. Nakajima: *Pestic. Biochem. Physiol.* **14**, 41 (1980)
- 24) J. Portig, P. Kraus, K. Stein, W. Koransky, G. Noack, B. Gross & S. Sodomann: *Xenobiotica* **9**, 353 (1979)
- 25) N. Kurihara: *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* **58**, 390 (1980)

略歴

栗原紀夫

生年月日: 1933年2月16日

最終学歴: 京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻, 1961年3月博士修了

趣味: 音楽鑑賞