ビフェニル投与により雄ラットの膀胱内に認められた結石の成分分析

大西 誠,* 武 信, 佐川みつ代, 山本静護, 松島泰次郎

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

Analysis of the Components of Biphenyl Induced Urinary Bladder Calculus in Male Rats

Makoto OHNISHI,* Makoto TAKE, Mitsuyo SAGAWA, Seigo YAMAMOTO,
and Taijiro MATSUSHIMA

*Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, 257-0015, Japan*

(Received January 9, 1998)

The components of biphenyl induced urinary bladder calculus in the male rats were studied using HPLC coupled with mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS), IR and inductive coupled plasma (ICP). Two peaks in the calculus components were detected by HPLC and LC-MS/MS. The peaks were identified as 4-hydroxybiphenyl sulfate (4-HBPSC) and 4,4'-dihydroxybiphenyl sulfate (4,4'-DHPSC). 4-HBPSC was accounted for 54.6% and 4,4'-DHPSC was accounted for 1.5% by LC-MS/MS. 4-HBPSC was main component by these results and IR. Inorganic elements of urinary bladder calculus were accounted for 25% by ICP.

Key words — LC-MS/MS ; biphenyl ; calculus ; sulfate ; urinary bladder ; rat

緒 言

ビフェニルの代謝については、ラット、ブタ、ウサギ、モルモットなどの動物を用いて研究されており、GC-MSにより、その主代謝物はビフェニル水酸化体とその抱合体であり、主として尿中へ排泄されることが報告されている。^{1,2)} ビフェニルのラットにおける経口混餌投与した研究では、膀胱に結石の生成が認められており、この結石の成分はタンパクとリン酸塩であることが報告されている。³⁾ しかしながら、その分析手法、定量値の詳細は明確ではない。近年、HPLC-マススペクトロメトリー (LC-MS) のめざましい技術の発展により、従来、GC-MS で分析が困難である化合物の分析が可能になり、⁴⁾ 特に代謝物の抱合体の分析に有用である。⁵⁻⁸⁾ 当研究センターにおいて、ビフェニルをラットに2年間経口混餌投与した結果、雄に膀胱がんが発生し、それらの動物の膀胱に結石の生成が認められ、この主成分は、ビフェニル代謝物の可能性が考えられた。我々はこれらのラット膀胱内に生成した結石の代謝物由来の成分について、HPLC-マススペクトロメトリー/マススペクトロメトリー (LC-

MS/MS), HPLC 及び IR 分析を行い, その他の無機成分については, 誘導結合プラズマ (ICP) による分析を行い, 結石の構成成分について確認したので報告する.

実験方法

1. 試薬 ビフェニル, 4-ヒドロキシビフェニル, 4,4'-ジヒドロキシビフェニルは和光純薬工業(株)製の特級試薬を用いた. ビフェニル水酸化体の硫酸抱合体はこれらのビフェニル水酸化体を原料として, Hoiberg 等の方法⁹⁾により合成した. 合成した 4-ヒドロキシビフェニル硫酸 (4-HBPSC) と 4,4'-ジヒドロキシビフェニル硫酸 (4,4'-DHPSC) は白色粉末で, メタノール, アセトニトリル, 水に可溶であり, IR スペクトルでは, 1100 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} に硫酸基を示す吸収ピークを確認した. また, HPLC の 3 次元クロマトグラムにおいてもこれらの合成物以外のピークはみられなかった. アセトニトリル, 蒸留水は和光純薬工業(株)製の高速度液体クロマトグラフィー用, その他の試薬は和光純薬工業(株)製の特級試薬を使用した.

2. 試料 ビフェニルをラットに 2 年間投与した結果, 雄の 50 例中 43 例に結石がみられ, その内の 5 例 (ラット 1—5) の結石について分析対象試料とした.

3. 実験動物及び投与条件 実験に用いた動物は日本チャールス・リバーより購入した F 344/DuCrj ラットの雄を使用した. ラットは生後 4 週齢で導入し, 各 1 週間の検疫, 馴化を経た後, 実験に供した. 動物は飼育期間を通して, 温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm 10\%$, 明暗サイクル: 12 時間点灯 (8:00—20:00)/12 時間消灯 (20:00—8:00), 換気回数 15—17 回/時の環境下で飼育した. 動物はステンレス製二連ケージ (170 W×294 D×176 H mm) に収容し, ケージ交換は 2 週間毎に実施した. 投与方法は経口投与 (混餌自由摂取とし, 一週間に一度餌を交換) で投与期間は 2 年間 (104 週) とした. ビフェニル添加飼料は, ビフェニルの濃度が 4.5 mg/g になるように粉餌を加え, スパイラルミキサーによって 20 分間混合し, 調製した. なお, ラットは 2 年間の試験で 1 日平均 15 g の摂餌量であり, 1 日当たりのラットのビフェニル摂取推定量は, 68 mg であった.

4. 機器測定条件

4.1. HPLC — HPLC はヒューレットパッカード社 HP-1090, 移動相はアセトニトリル-酢酸アンモニウム水溶液 (5 mM/l) ($3:7$), 流量は 0.3 ml/min , 注入量は $4\text{ }\mu\text{l}$, カラムは東ソー製 TSK-GEL ODS-80TS $2\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ を用いた. また検出器にはフォトダイオードアレイ検出器を用い $200\text{—}450\text{ nm}$ の波長領域において 2 nm 間隔でデータを取り込んだ.

4.2. LC-MS/MS — LC-MS/MS はフィニガン社 TSQ-7000, イオン化法はエレクトロスプレー (ESI), 測定モードはネガティブ, シースガスは 70 psi , キャピラリー温度は 230°C , 印加電圧は 4.5 kV , コリジョンガスはアルゴン, そのガス圧は 2.0 mmTorr とした.

4-HBPSC の定量は, $m/z\ 249$ のイオンピークをプリカーサーイオンとして $m/z\ 169$ のプロダクトイオンを用いる selected reaction monitoring (SRM) 法により実施した. また, 4,4'-DHPSC の定量は, $m/z\ 265$ のイオンピークをプリカーサーイオンとして $m/z\ 185$ のプロダクトイオンを用いる SRM 法により実施した.

4.3. IR — 赤外分光光度計は島津製作所 FTIR-8200 PC, スキャン回数は 20 回, ミラースピードは 2.8 mm/s , 波数分解能は 2 cm^{-1} , 測定は $4000\text{—}400\text{ cm}^{-1}$ とした.

4.4. ICP — ICP は島津製作所 ICPS-1000 IV, 高周波出力は 1.2 kW, ガスはアルゴンガスを、クーラントガス 14 l/min, プラズマガス 1.2 l/min, キャリアガス 0.8 l/min, パージガス 3.5 l/min, 積分時間は 5 秒とした。

5. 分析試料の調製条件

5.1. HPLC, LC-MS/MS 分析試料 — ラット膀胱結石をめのう乳鉢で粉碎し, 0.1 g を秤量し, 50%アセトニトリル水溶液 100 ml でメスアップし, 混合した。その溶液を 10 分間超音波抽出, 攪拌し, 5 μ m のマイレックスフィルターでろ過し, HPLC 移動相で希釈した後に, HPLC, LC-MS/MS に供した。

5.2. IR 分析試料 — 粉碎した結石を KBr によりペレットを調製し, IR に供した。

5.3. ICP 分析試料 — 粉碎した結石 0.05 g に硝酸 3 ml 及び過塩素酸 3 ml を加え, ホットプレート上(約 150℃)で約 100 分間加熱分解した。放冷後, 蒸留水で 50 ml に定容し, ICP に供した。

結果及び考察

1. ラット膀胱結石の成分の検討

1.1. HPLC 及び LC-MS/MS の測定 ビフェニルを投与したラット膀胱に生成した結石は直径が約 2 mm から 10 mm のものが 1 匹のラット膀胱内に 1—5 個の存在が認められた。それらの結石の色は白色, 灰色, 黒色であった。この結石をめのう乳鉢で細かく粉碎し, 50%アセトニトリル水溶液を加え超音波抽出を行い, フィルターろ過した溶液を, フォトダイオードアレイ検出器付の HPLC を用い測定した結果, 2 つのピークが認められた。その 3 次元クロマトグラムを Fig. 1 に示した。保持時間約 2 分に認められたピーク 1 は 260 nm に, 約 5.5 分に認められたピーク 2 は 255 nm に, それぞれ紫外外部吸収のピークが認められた。移

Fig. 1. 3-Dimensional Chromatogram of Components in the Calculus by HPLC Photodiodearray Detector

Fig. 2. Mass Chromatogram and the Mass Spectra of Components in the Calculus by LC-MS/MS

動相のアセトニトリル含量を 30% から 80% として溶出力を上げた状態で、カラム内に残存する可能性のある成分について分析を行ったが、ピーク 2 以後の時間に紫外吸収を持つピークは認められなかった。上記のフィルターろ過した溶液を、LC-MS/MS を用いて測定した結果、ネガティブモードにおいて、HPLC と同様にマスキロマトグラム上に 2 つのピークが認められた (Fig. 2)。約 2 分にみられたピーク 1 のマススペクトルでは m/z 265 にイオンピークがみられた。このピークをプリカーサーイオンとしてマススペクトルを測定したところ、Fig. 2 に示すように m/z 185 にプロダクトイオンピークがみられ、ネガティブモードでイオン化していることから、このプリカーサーイオンピークは物質の分子量を示す $[M-H]^-$ の擬分子イオンであると考えられた。次に、マスキロマトグラム上で約 5.5 分にみられたピーク 2 のマススペクトルを測定すると、 m/z 249 にイオンピークがみられ、このピークをプリカーサーイオンとしてマススペクトルを測定したところ、Fig. 2 に示すように m/z 169 にプロダクトイオンピークがみられ、このプリカーサーイオンピークは物質の分子量を示す $[M-H]^-$ の擬分子イオンであると考えられた。これらのマスキロマトグラムでみられた 2 つのピークのマススペクトルは、

- 1) ネガティブモードでイオン化していること
- 2) 擬分子イオンが m/z 265 と 249 であること
- 3) プリカーサーイオンとプロダクトイオンの質量数の差が硫酸抱合体を示す 80 であることであった。以上のことに加えて、ビフェニルのラット尿中におけるその最終代謝物は、4-ヒドロキシビフェニルと 4,4'-ジヒドロキシビフェニルを主とした抱合体であることが報告されているため、²⁾ 結石のマスキロマトグラムでみられた 2 つのピークは、4-ヒドロキシビフェニルと 4,4'-ジヒドロキシビフェニルの硫酸抱合体であると推定した。

Fig. 3. Mass Chromatogram and the Mass Spectra of Hydroxy Biphenyl Sulfates by LC-MS/MS

1.2. 結石成分の構造の確認 LC-MS/MS のマスキロマトグラムで推定した 2 成分の構造を確認するために、4-ヒドロキシビフェニルと 4,4'-ジヒドロキシビフェニルの硫酸抱合体を合成し,⁹⁾ LC-MS/MS で分析したマスキロマトグラムおよびマススペクトルを Fig. 3 に示した。クロマトグラムでは 4,4'-DHBPSC は約 2 分にピークがみられ、4-HBPSC は約 5.5 分にピークが認められた。またそれぞれのピークのマススペクトルは、4,4'-DHBPSC では m/z 265 をプリカーサーイオンとする m/z 185 にプロダクトイオンピークがみられ、4-HBPSC では m/z 249 をプリカーサーイオンとする m/z 169 にプロダクトイオンピークがみられた。これらのマスキロマトグラムでみられたピークの保持時間及びそれらのマススペクトルは Fig. 2 に示すビフェニルを投与したラット膀胱内結石中の成分が示す保持時間及びマススペクトルと一致した。

以上のことより、ビフェニルを投与して生成したラット膀胱内の結石の成分が、4-HBPSC と 4,4'-DHBPSC であることを確認した。ビフェニルをラットに 2 年間投与して膀胱内に認められた結石の生成は、ビフェニルがラット体内で水酸化され、さらに硫酸抱合体化した成分が尿へ排泄される過程の中で結石を生成したことが推測された (Fig. 4)。なお、文献では,²⁾ ビフェニルをラットに投与するとその代謝物として 4-, 4,4'-, 3,4-, 3-, 2-の水酸化ビフェニルがみられているが、4-HBPSC, 4,4'-DHBPSC のみ結石中に検出されたことについては、これらの代謝物の硫酸抱合体の尿中での溶解度、抱合体の種類 (たとえばグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の存在比率) 等により 4-HBPSC, 4,4'-DHBPSC が他の代謝物に比べ尿中で結晶化しやすく、結石を生成したものと考えられた。

1.3. IR の測定 ラットの膀胱内に見られた結石の 1 つ (ラット 1 の結石) 及び

Fig. 4. Metabolism of Biphenyl in Rats

Fig. 5. Infrared Spectra of 4-HBPSC and Calculus

—, 4-HBPSC; ---, calculus.

4-HBPSC の IR 測定を行い、その結果を Fig. 5 に示した。合成した 4-HBPSC と結石のスペクトルはほぼ一致し、 1100 cm^{-1} と 1200 cm^{-1} に硫酸抱合体の硫酸基を示す特徴的なピークが確認された。

2. ラット膀胱結石成分の定量

2.1. LC-MS/MS における検量線の作成と再現性の検討

構造解析を行ったピークの

Fig. 6. Calibration Curve of Hydroxy Biphenyl Sulfates by LC-MS/MS

定量は、LC-MS/MS を用いて、4-HBPSCと4,4'-DHPSCの1—10 ng/mlの標準溶液を調製し、クロマトグラムのピーク面積を、合成した標準品のそれと比較する絶対検量

線法により行った。検量線をプロットした結果を Fig. 6 に示した。4-HBPSC と 4,4'-DHPSC とともに検量線の相関係数は 0.998 であり、良好な直線関係を示した。したがって、処理した結石成分中のビフェニル水酸化体の硫酸抱合体の定量は、この検量線の濃度範囲に希釈操作を行い、測定した。再現性については、上記で検討した検量線の最低濃度を定量限界として、再現性を測定した結果を Table 1 に示す。n=10 における 4-HBPSC は変動係数が 3.65%、4,4'-DHPSC は 3.49% であり、5 点の検量線と n=5 のサンプルを繰り返し測定するのに問題のない再現性を示した。

Table 1. Reproducibility of Hydroxy Biphenyl Sulfates at Quantitative Limit by LC-MS/MS

Substances	Concentration (ng/ml)	C.V. (%)	n
4-HBPSC	1.0	3.65	10
4,4'-DHPSC	1.0	3.49	10

2.2. 結石中のビフェニル水酸化体の硫酸抱合体の定量 ビフェニルを投与してみられたラット膀胱内結石の量とその結石に含まれる 4-HBPSC と 4,4'-DHPSC の含量について Table 2 に示した。1 匹のラット膀胱内に 156—195 mg の結石が確認された。それらの結石に対して、4-HBPSC は 51—61% (平均 54.6%)、4,4'-DHPSC は 1.4—1.6% (平均 1.5%) 含まれることが確認され、含有率が結石の半分以上をしめるビフェニル水酸化体の硫酸抱合体が尿中に存在し、膀胱内で結晶化し、結石を生成したと考えられた。

Table 2. Percentage of Hydroxy Biphenyl Sulfates in the Calculus by LC-MS/MS

Animal	Calculus (mg)	Percentage of hydroxy biphenyl sulfates in the calculus (%)	
		4-HBPSC	4,4'-DHPSC
Rat1	174	60.6	1.6
Rat2	195	51.0	1.4
Rat3	180	51.1	1.5
Rat4	156	57.5	1.6
Rat5	158	52.9	1.6
	Mean	54.6	1.5

3. 膀胱内結石の ICP 測定

ラットの膀胱内に見られた結石の1つ(ラット1の結石)について、ICPによる無機元素の測定を行った。その結果を Table 3 に示した。結石中の主な元素は K, P, S, Ca で、その他、Mg, Na が認められ、それらの無機元素は合計で約 31% を占めることが確認された。結石中の硫酸抱合体の S 含量%を計算すると約 6% となり、ICP 分析で認められた S はビフェニル水酸化体の硫酸抱合体由来の S であることが示唆された。このことから、測定した結石中の無機元素の総量である 31% から 6% の S を除いた約 25% が結石を構成する無機元素の総量であると考えられた。

Table 3. Percentage of Inorganic Elements of the Calculus by ICP

Inorganic elements	Percentage (%)
K	8.5
P	7.8
S	6.2
Ca	5.9
Mg	1.8
Na	0.56
Total	30.76

結 論

ビフェニルを投与したラット膀胱内に認められた結石には HPLC 及び LC-MS/MS 分析により 2 つの成分が確認された。それらは、ビフェニル水酸化体の硫酸抱合体であり、4-HBPSC が主成分として 54.6%、4,4'-DHPSC が 1.5% 含まれていることが LC-MS/MS により確認された。IR 分析の結果からも、4-HBPSC が主成分であることが確認され、LC-MS/MS の結果と一致した。また ICP の分析より、結石の約 25% が無機元素の成分から構成されていることが確認された。

謝辞 本研究を実施するにあたり、ICP の測定に御協力をしていただいた株式会社島津製作所東京カスタマーサポートセンターの谷口 理氏にお礼申し上げます。

References

- 1) Meyer T., Aarbakke J., Scheline R.R., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 412 (1976).
- 2) Halpaap K., Horning G.M., Horning C.E., *J. Chromatogr.*, **166**, 479 (1978).
- 3) Konishi Y., "Annual Report of the Cancer Research," Ministry of Health and Welfare, 1979, pp.976—977.
- 4) Sakairi M., Kambara H., *Anal. Chem.*, **60**, 774 (1988).
- 5) Yamaguchi J., Kokatsu J., Suwa T., *Biol. Mass Spectrom.*, **21**, 285 (1992).
- 6) Nishikawa M., Nakajima K., Igarashi K., Kusuya F., Fukui M., Tuchihasi H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 121 (1992).
- 7) Nakajima M., Wakabayashi H., Yamato S., Shimada K., *Bunseki Kagaku*, **45**, 517 (1996).
- 8) Bowers D.L., Sanaullah, *J. Chromatogr. B*, **687**, 61 (1996).
- 9) Hoiberg P.C., Mumma O.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4273 (1969).