

Table 7 DNA damage in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and (-)-epigallocatechin-gallate

| Sampling time (h) | Substance | EGCG (μM) | No. of slides | % Migrated DNA | | Tail Length | | Olive Tail Moment | |
|-------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------|----------------|------------|-------------|------------|-------------------|------------|
| | | | | Mean | \pm S.D. | Mean | \pm S.D. | Mean | \pm S.D. |
| 1 | Control (1%saline) | 0 | 4 | 4.26 | \pm 0.96 | 4.49 | \pm 1.37 | 0.35 | \pm 0.08 |
| | | | | 10.70 | \pm 3.11 | 19.40 | \pm 3.90 | 1.66 | \pm 0.67 |
| | | | | 15.50 | \pm 7.19 | 29.06 | \pm 7.68 | 3.14 | \pm 1.81 |
| | Sodium nitrite 5 mg/mL | 200 | 4 | 23.84 | \pm 3.26 | 37.48 | \pm 3.43 | 5.28 | \pm 1.03 |
| | | | | 400 | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | Positive control 4NQO 2 μM | 0 | 4 | 42.94 | \pm 7.94 | 43.51 | \pm 5.46 | 12.74 | \pm 3.80 |
| | | | | | | | | | |

EGCG: (-)-epigallocatechin-gallate
 4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

a: $p \leq 0.05$, Dunnett test

b: $p \leq 0.01$, Dunnett test

d: $p \leq 0.01$, Aspin-Welch t-test

e: $p \leq 0.001$, Aspin-Welch t-test

Table 8 DNA damage in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and (-)-epigallocatechin-gallate

| Sampling time (h) | Substance | Sodium nitrite (mg/mL) | No. of slides | % Migrated DNA | | Tail Length | | Olive Tail Moment | | Cytotoxicity % |
|-------------------|---------------------|------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| | | | | Mean | ± S.D. | Mean | ± S.D. | Mean | ± S.D. | |
| 1 | Control (1% saline) | 0 | 4 | 4.39 | ± 0.57 | 5.85 | ± 1.42 | 0.37 | ± 0.04 | 0.00 |
| | | 0.039 | 4 | 7.62 | ± 1.58 | 14.22 | ^b ± 2.32 | 0.87 | ± 0.24 | 59.70 |
| | | 0.078 | 4 | 7.35 | ± 1.56 | 12.44 | ^b ± 2.97 | 0.75 | ± 0.16 | 62.70 |
| | | 0.156 | 4 | 8.06 | ^a ± 1.33 | 15.84 | ^b ± 3.65 | 1.02 | ± 0.19 | 66.60 |
| | | 0.313 | 4 | 8.55 | ^a ± 0.96 | 19.31 | ^b ± 2.05 | 1.22 | ^a ± 0.07 | 68.50 |
| | | 0.625 | 4 | 11.96 | ^b ± 1.96 | 24.13 | ^b ± 1.28 | 2.00 | ^b ± 0.58 | 70.20 |
| | | 1.25 | 4 | 14.34 | ^b ± 1.48 | 28.44 | ^b ± 1.56 | 2.60 | ^b ± 0.24 | 67.90 |
| | | 2.5 | 4 | 13.75 | ^b ± 2.24 | 27.37 | ^b ± 1.38 | 2.45 | ^b ± 0.28 | 61.80 |
| | | 5 | 4 | 23.97 | ^b ± 2.60 | 38.64 | ^b ± 3.60 | 5.43 | ^b ± 0.93 | 63.50 |
| | | 4NQO 1.5 μM | 4 | 19.71 | ^d ± 3.87 | 31.33 | ^e ± 4.35 | 4.02 | ^d ± 1.11 | / |
| | EGCG 400 μM | 4 | 11.96 | ^b ± 1.96 | 24.13 | ^b ± 1.28 | 2.00 | ^b ± 0.58 | 70.20 | |

EGCG: (-)-epigallocatechin-gallate

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

a: $p \leq 0.05$, Dunnett test

b: $p \leq 0.01$, Dunnett test

d: $p \leq 0.01$, Aspin-Welch t-test

e: $p \leq 0.001$, Aspin-Welch t-test

Table 9 DNA damage in CHI cells after 1h treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide

| Sampling time (h) | Substance | Dose (μ M) | No. of slides | % Migrated DNA | | Tail Length | | Olive Tail Moment | | Cytotoxicity % |
|-------------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|--------|-------------|--------|-------------------|--------|----------------|
| | | | | Mean | ± S.D. | Mean | ± S.D. | Mean | ± S.D. | |
| 1 | Control (1%DMSO) | 0 | 4 | 5.55 | ± 1.20 | 5.46 | ± 2.16 | 0.47 | ± 0.20 | 0.00 |
| | | 1 | 4 | 19.01 | ± 3.00 | 32.02 | ± 2.65 | 3.95 | ± 0.90 | -0.70 |
| | | 1.5 | 4 | 25.86 | ± 3.50 | 34.82 | ± 4.24 | 5.83 | ± 1.23 | -6.58 |
| | 4NQO | 2 | 4 | 38.28 | ± 3.36 | 39.74 | ± 2.17 | 9.77 | ± 1.78 | -12.86 |

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

c: $p \leq 0.001$, Dunnett test

Table 10 DNA damage in CHL cells after 1h treatment with sodium dodecyl sulfate

| Sampling time (h) | Substance | Dose (mg/ml) | No. of slides | % Migrated DNA | | Tail Length | | Olive Tail Moment | | Cytotoxicity % |
|-------------------|--------------------|--------------|---------------|----------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| | | | | Mean | ± S.D. | Mean | ± S.D. | Mean | ± S.D. | |
| 1 | Control (1%saline) | 0 | 4 | 4.90 | ± 0.28 | 6.16 | ± 1.43 | 0.41 | ± 0.06 | 0.00 |
| | | 0.1 | 4 | 5.39 | ± 1.26 | 4.68 | ± 0.33 | 0.45 | ± 0.14 | -1.49 |
| | | 0.14 | 4 | 5.19 | ± 1.44 | 4.98 | ± 1.17 | 0.47 | ± 0.25 | 0.41 |
| | SDS | 0.2 | 4 | 4.07 | ± 1.26 | 4.85 | ± 1.77 | 0.33 | ± 0.10 | 60.95 |
| | | 1.5 μM | 4 | 27.48 | ^e ± 2.92 | 38.38 | ^e ± 3.66 | 6.56 | ^d ± 1.14 | |
| | | 4NQO | 4 | 27.48 | ^e ± 2.92 | 38.38 | ^e ± 3.66 | 6.56 | ^d ± 1.14 | |

SDS: sodium dodecyl sulfate

4NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide

d: $p \leq 0.01$, Aspin-Welch t-test

e: $p \leq 0.001$, Aspin-Welch t-test

Table 11 Chromosome aberrations in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and EGCG for 3 h (-S9 mix)

| S9 mix | Treatment | | No. of cells scored | Polyploid cells | Gap | No. of cells with structural chromosome aberrations | | | | | | | Mitotic index (%) | Relative mitotic index (%) | | | |
|--------|------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----|---|-----|-----------------|-----|----------------|-----------|-----------|-------------------|----------------------------|-----|-----|---|
| | Sodium nitrite (mg/mL) | EGCG (μ M) | | | | Chromatid type | | Chromosome type | | Fragmen-tation | Others | Total | | | | | |
| | | | | | | ctb | cte | csb | cse | | | +g | | | -g | | |
| - | 0 | 0 (control) | 200 | 2 (1.0) | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 (1.5) | 1 (0.5) | 5.6 | 100 | |
| | | 50 | 200 | 0 (0.0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3.9 | 70 | |
| | | 100 | 200 | 0 (0.0) | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 3.8 | 68 | |
| | | 200 | 200 | 3 (1.5) | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 2.2 | 39 | | |
| | | 400 | Toxic | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 50 | 200 | 4 (2.0) | 1 | 9 | 2 | 0 | 0 | 1 | 12 (6.0) | 11 (5.5) | 3.8 | 68 | | | |
| | 0.5 | 100 | 200 | 2 (1.0) | 3 | 12 | 13 | 0 | 0 | 1 | 26 (13.0) | 23 (11.5) | 2.9 | 52 | | | |
| | | 200 | 100 | 2 (2.0) | 1 | 12 | 15 | 0 | 0 | 1 | 22 (22.0) | 21 (21.0) | 0.6 | 11 | | | |
| | | 400 | Toxic | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | 50 | 200 | 3 (1.5) | 3 | 10 | 23 | 0 | 0 | 7 | 36 (18.0) | 34 (17.0) | 3.0 | 54 | | | |
| | | 100 | 200 | 4 (2.0) | 5 | 14 | 17 | 0 | 0 | 0 | 32 (16.0) | 30 (15.0) | 2.4 | 43 | | | |
| | | 200 | 100 | 0 (0.0) | 3 | 35 | 47 | 0 | 1 | 1 | 61 (61.0) | 60 (60.0) | 1.1 | 20 | | | |
| 5 | 400 | Toxic | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |

ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps

EGCG: (-)-epigallocatechin-gallate

The figures shown in parentheses are percentages.

*** : Significantly different from the concurrent control at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectively.

Table 12 Chromosome aberrations in CHL cells treated with a combination of sodium nitrite and EGCG for 3 h (+S9 mix)

| S9 mix | Treatment | | No. of cells scored | Polyploid cells | Gap | No. of cells with structural chromosome aberrations | | | | | | | Mitotic index (%) | Relative mitotic index (%) | |
|--------|------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----|---|-----|-----------------|-----|--------------|-----------|-----------|-------------------|----------------------------|-----|
| | Sodium nitrite (mg/mL) | EGCG (μ M) | | | | Chromatid type | | Chromosome type | | Fragm-ration | Others | Total | | | |
| | | | | | | ctb | cte | csb | cse | | | +g | | | -g |
| + | 0 | 0 (control) | 200 | 1 (0.5) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 7.0 | 100 |
| | | 50 | 200 | 5 (2.5) | 0 | 5 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 8 (4.0) | 8 (4.0) | 5.5 | 79 |
| | | 100 | 200 | 0 (0.0) | 3 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11 (5.5) | 8 (4.0) | 6.2 | 89 |
| | | 200 | 200 | 1 (0.5) | 1 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (3.5) | 6 (3.0) | 5.3 | 76 |
| | | 400 | 200 | 0 (0.0) | 2 | 28 | 11 | 0 | 0 | 1 | 2 | 39 (19.5) | 37 (18.5) | 6.0 | 86 |
| | | 50 | 200 | 1 (0.5) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 8.8 | 126 |
| | 0.5 | 100 | 200 | 1 (0.5) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 6.6 | 94 |
| | | 200 | 200 | 2 (1.0) | 0 | 3 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 (6.5) | 13 (6.5) | 6.7 | 96 |
| | | 400 | 200 | 2 (1.0) | 1 | 7 | 16 | 5 | 1 | 1 | 2 | 27 (13.5) | 26 (13.0) | 2.0 | 29 |
| | | 50 | 200 | 6 (3.0) | 0 | 10 | 24 | 0 | 0 | 1 | 3 | 30 (15.0) | 30 (15.0) | 5.5 | 79 |
| | | 100 | 200 | 3 (1.5) | 1 | 18 | 34 | 0 | 0 | 0 | 7 | 45 (22.5) | 45 (22.5) | 3.5 | 50 |
| | | 200 | 200 | 6 (3.0) | 2 | 27 | 48 | 0 | 1 | 1 | 3 | 67 (33.5) | 67 (33.5) | 4.2 | 60 |
| 5 | 400 | 200 | 5 (2.5) | 5 | 34 | 37 | 0 | 1 | 1 | 4 | 67 (33.5) | 65 (32.5) | 3.9 | 56 | |

ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange ; +g, including gaps ; -g, excluding gaps

EGCG: (-)-epigallocatechin-gallate

The figures shown in parentheses are percentages.

*, **, *** : Significantly different from the concurrent control at $p \leq 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

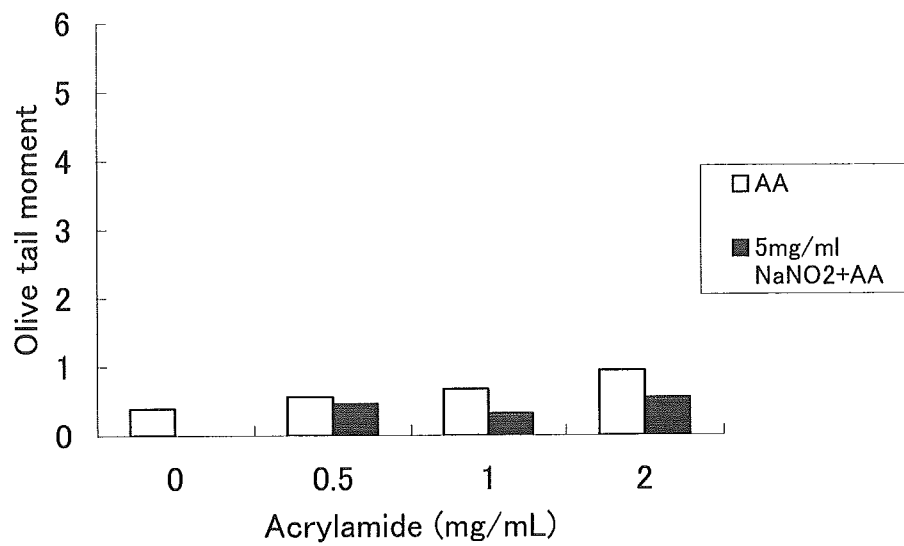


Fig. 1 Lack of synergistic effects of sodium nitrite and acrylamide(AA) on DNA damage in CHL cells

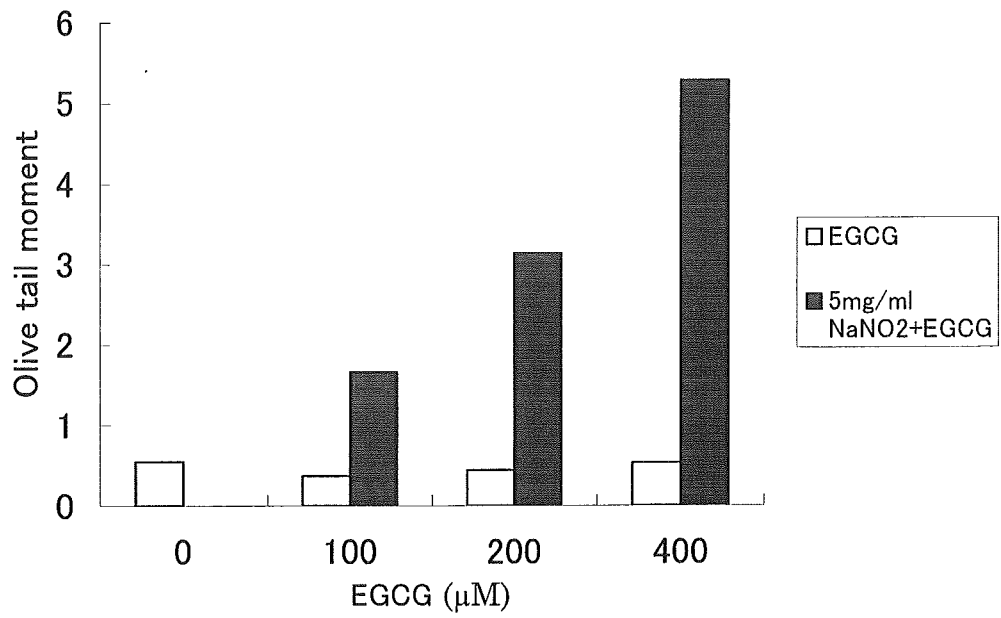


Fig. 2-1 Synergistic effects of sodium nitrite and EGCG on DNA damage in CHL cells

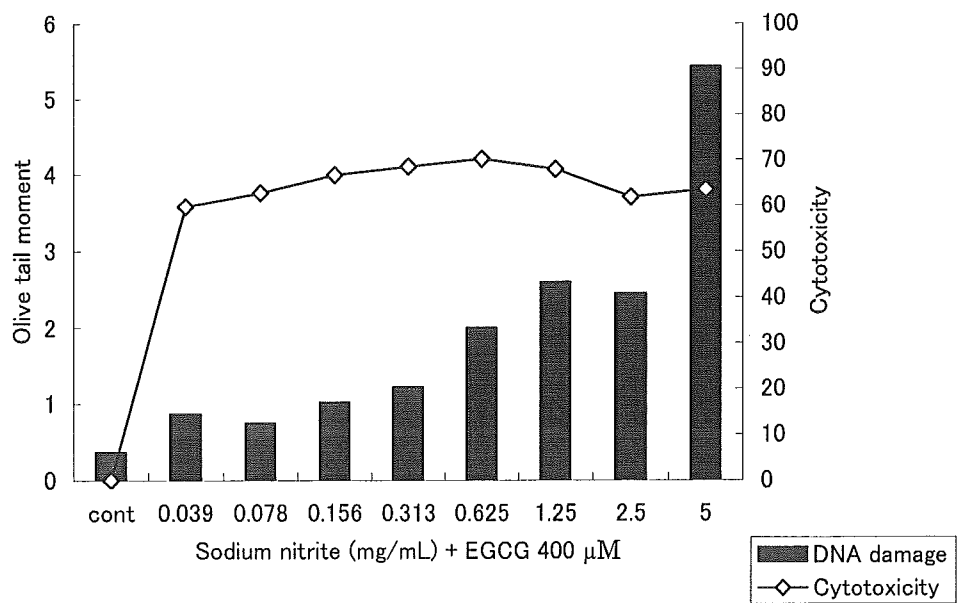


Fig 2-2 Genotoxicity and cytotoxicity of synergic effects of sodium nitrite and EGCG 400 μM

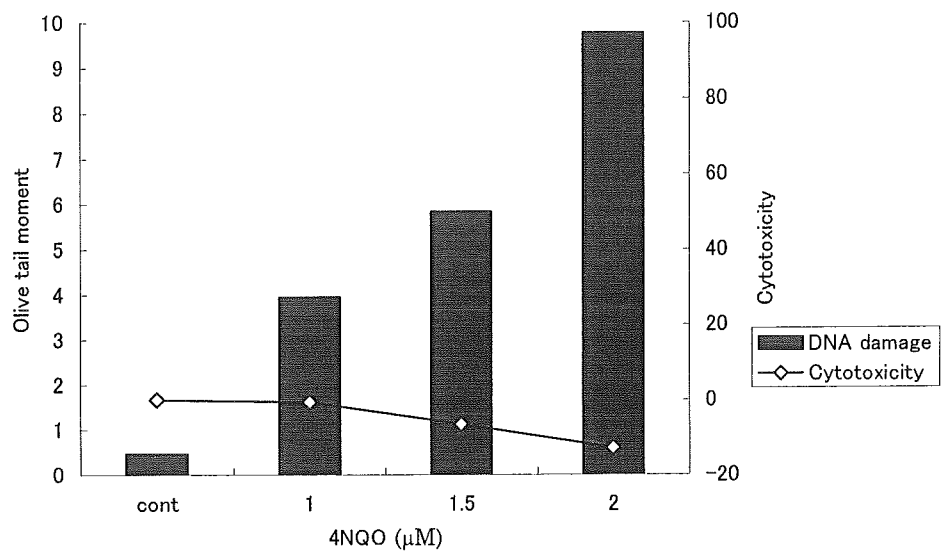


Fig. 3-1 Genotoxicity and cytotoxicity of 4NQO

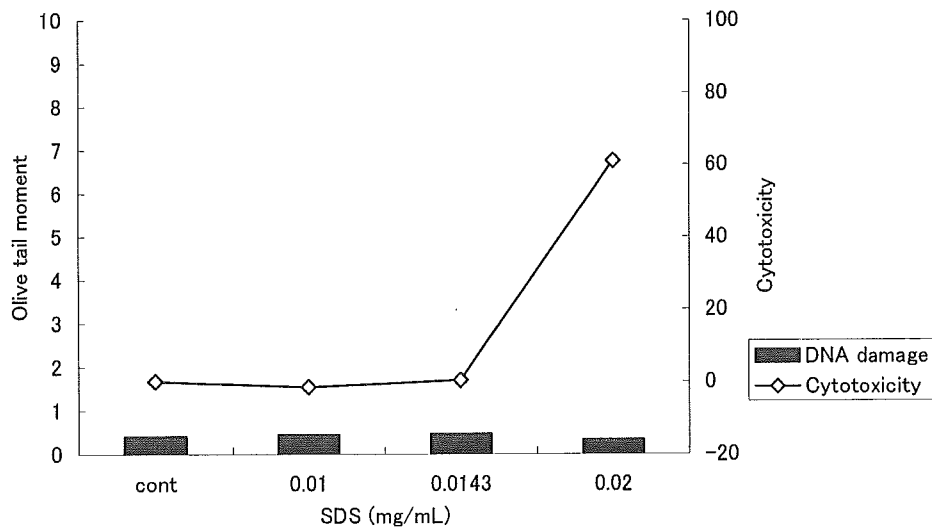


Fig. 3-2 Genotoxicity and cytotoxicity of SDS

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

食品中化学物質の複合反応と反応生成物に関する研究

| | | | |
|-------|-------|-------|----------|
| 分担研究者 | 中澤 裕之 | 星葉科大学 | 薬品分析化学教室 |
| 研究協力者 | 斉藤 貢一 | 星葉科大学 | 薬品分析化学教室 |
| | 伊藤 里恵 | 星葉科大学 | 薬品分析化学教室 |
| | 岩崎 雄介 | 星葉科大学 | 薬品分析化学教室 |
| | 石井 雄二 | 星葉科大学 | 薬品分析化学教室 |

研究要旨

食肉等の発色剤として広く用いられている亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸やカテコール、没食子酸などのフェノール性抗酸化物質をラットに併用投与することで、前胃に強い細胞増殖活性がおきることが知られている。平成 16 年度の我々の研究結果から、これらの障害には酸性条件下における亜硝酸ナトリウムと種々の化合物の反応により生成する活性窒素種が関与することが示唆された。平成 17 年度はこれらの事実を明らかにするため、生体内における活性窒素種による蛋白修飾物質として知られるニトロチロシンの高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による高感度分析法を構築した。さらに本分析法を *in vivo* の試料へ適用するため、アセトアミノフェンを投与したマウス肝臓中のニトロチロシンを、本法および免疫化学的染色法により検出した結果、本法が *in vivo* におけるニトロチロシン測定に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

平成 16 年度の本研究においてカテコールあるいはアスコルビン酸と亜硝酸ナトリウムの併用投与によって引き起こされるラット前胃発がん機構の解明を行った。その結果、亜硝酸ナトリウムが酸性条件下で一酸化窒素を生成し、アスコルビン酸との併用ではその強力な還元作用によって、より多量の NO が生成することを明らかにした¹⁾。またカテコールとの併用では亜硝酸ナトリウムから生成した一酸化窒素がカテコールの一電子酸化を引き起こし、活性酸素種を生成することを明らかにした。さらにカテ

コールと一酸化窒素の反応ではペルオキシナイトライトの生成も示唆された²⁾。これらのことからアスコルビン酸あるいはカテコールが亜硝酸ナトリウムとの併用によって引き起こされるラット前胃における障害には、それぞれその機序は異なるが、活性酸素種による酸化的ストレスとともに一酸化窒素やペルオキシナイトライトといった活性窒素種が関与していると考えられる。

そこで本年度は、*in vivo* におけるこれら活性窒素種の生成を明らかにするため、活性窒素種による生体内修飾物質として知られるニトロチロシン (NTYR) の高感度分析

法を構築した。

NTYR は、一酸化窒素とスーパーオキシドの反応によって生成するペルオキシナイトライトがチロシン (TYR) と反応して生成され、活性窒素種生成の指標としての有用性はすでに数多く報告されている³⁾、その検出には免疫化学的染色法⁴⁻⁶⁾、ガスクロマトグラフィー⁷⁻⁹⁾や高速液体クロマトグラフィーといった方法が報告されている。免疫化学的染色法は簡便かつ NTYR が生成されている局在部位が確認できることから、動物実験において広く用いられているが、その定量性は低い。一方、機器分析による定量はガスクロマトグラフィー/質量分析法⁷⁻⁹⁾、高速液体クロマトグラフィー/紫外可視吸光度検出器¹⁰⁻¹¹⁾、電気化学検出器¹²⁻¹⁵⁾や質量分析法^{16,17)}が報告されている。

そこで本研究では、実験動物の組織中 NTYR の検出を目的として、従来法よりも簡便で、微量の試料でも検出可能な高感度かつ高精度な分析を行うため、LC-MS/MS による分析法を検討した。

さらに、*in vivo* の試料分析への適用を確認するため、活性窒素種の生成が知られるアセトアミノフェン投与によるマウス肝臓中の NTYR を本法および免疫化学的染色法を用いて検出した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

TYR、トリクロロ酢酸、塩酸、硝酸、酢酸および HPLC 用アセトニトリルは和光純薬工業社製を用いた。NTYR、プロテアーゼおよびアセトアミノフェンは Sigma chemical 社製を使用した。L-¹³C₉-TYR は Cambridge Isotope Laboratories 社製を使用した。また、

精製水は Millipore 社製の Milli-Q gradient-A10 EDS ポリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。

B-2. 内標準物質の合成

[¹³C₉]-ニトロチロシンは [¹³C₉]-TYR から合成した。すなわち 18.1 mg の [¹³C₉]-TYR を 2 mL の塩酸に溶解し、50 μL の硝酸を加え室温で 1 時間攪拌した後、水酸化ナトリウム溶液で中和した。反応溶液は SHIMADZU 社製 LC システム (ポンプ: LC-10ADvp, オートサンプラー: SIL-HTC, UV 検出器: SPD-10Avp) を用い分離、精製した。カラムは L-Column (4.6 x 150 mm, 5 μm, 化学物質評価研究機構) を使用し、移動相は 5% メタノール含有 0.05% 酢酸溶液を用い SHIMADZU 社製自動分取装置 (FRC-10A) により分取した。得られた溶液は水酸化ナトリウム溶液で中和した後、ロータリーエバポレーターで乾固した。

B-3. 標準溶液の調製

10 mM 塩酸を用い、1 mM TYR および NTYR を調製した。検量線の作成には 0.1 から 50 μM の TYR および 0.5 から 1000 nM の NTYR を調製し、それぞれの安定同位体を最適濃度で添加して用いた。また、TYR, [¹³C₉]-TYR, NTYR および [¹³C₉]-NTYR の MS スペクトルを Fig. 1 に示す。

B-4. LC-MS/MS 条件

LC-MS/MS は Alliance HT model 2795 liquid chromatography system (Waters 社製) および Micromass Quattro Ultima mass spectrometry system (Micromass 社製) を用いた。カラムには SHISEIDO 製 CAPCELL

PAK C18 MG II (2.0 x 150 mm, 5 μ m) を用いた。移動相は溶液 A : 0.01 %酢酸と溶液 B:アセトニトリルの混液を流速 0.2 mL/min で送液した。カラムを A/B=97/3 で安定させ、グラジエントで TYR, NTYR を溶出させ、MS/MS はエレクトロスプレーイオン化法を用い、ポジティブイオンモードにより TYR および NTYR を検出した。その他の MS/MS 条件は Table. 1 に示す。

B-5. 動物試料及び飼育条件

5 週齢の B6C3F1 マウス雄 20 匹を日本 SLC(株)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、各群 5 匹ずつ 4 群に配した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時間、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は、ポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週 2 回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

B-6. 動物実験操作

6 週齢の雄 B6C3F1 マウス全 20 匹を対照群、アセトアミノフェン投与後 2 時間群、4 時間群、8 時間群の計 4 群に配した。飼料には CRF-1 粉末 (オリエンタル酵母社製) を用い、アセトアミノフェン投与群には 300 mg/kg を腹腔内投与した。投与後各時間において屠殺し、肝臓の左葉はヘマトキシリン&エオジン染色および NTYR 免疫化学的染色法による病理組織学的検索に用いた。NTYR 測定用のサンプルは採取後ただちに液体窒素により凍結し、測定まで -80°C で保存した。

B-7. 試料調製

肝組織の抽出は Hensley ら¹⁵⁾の方法を参考にした。試料に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH6.5) を加えホモジナイズした後、 4°C 、 $3000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を取りタンパク質濃度を算出した。タンパク質濃度を 10 mg/mL に調整した後、0.5%トリクロロ酢酸 0.5 mL を加え、 4°C 、 $14000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿を採取し、2 mg/mL のプロテアーゼを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH6.5) を加え、 50°C で 20 時間インキュベーションした。インキュベーション後、再度 10%トリクロロ酢酸を加え、 4°C 、 $14000 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取して 0.45 μ m PVDF フィルターを通し、測定用試料とした。

B-8. 免疫化学的染色法

組織切片は 0.6%過酸化水素中で 30 分間インキュベーションし、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。次に 1%ヤギ血清を含むリン酸塩緩衝液 (pH7.4) 中 30 分間インキュベーションし、リン酸塩緩衝液で洗った後、1 mg/mL の抗ニトロチロシン (rabbit polyclonal IgG) を含む 1%牛血清アルブミンを加え、 4°C で終夜インキュベーションした。リン酸塩緩衝液で洗った後、Universal Elite ABC kit (PK-6101) を使用して発色を行った。

B-9. 倫理面への配慮

動物実験については、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針に基づいて実施された。

C. 研究結果

C-1. 測定条件の最適化

移動相の酢酸濃度の影響を検討した結果、0.01%酢酸において最大のピーク強度が得られた。また、グラジエントの条件は Fig. 2 に示した。本条件で測定を行った結果、TYR および NTYR はそれぞれ保持時間 3.0 分 (RSD=0.4%, n=5) と 5.7 分 (RSD=0.4%, n=5) に検出された。本分析条件における TYR および NTYR の定量限界 (S/N=10) は 100 および 0.5 nM で、検出下限値 (S/N=3) は 30 および 0.1 nM であった。また、サロゲート物質を用いた検量線範囲は、TYR は 0.1 から 50 μ M で、NTYR は 0.5 から 1000 nM の範囲で良好な直線性 (相関係数 0.999 以上) が得られた (Table 2)。

C-2. 添加回収試験

マウス肝臓からの抽出液に TYR 標準溶液 25, 50 μ M, NTYR 標準溶液 100 または 200 nM を添加し、添加回収試験を行った結果、すべてにおいて 92% 以上の良好な回収率が得られた (Table 3)。

C-3. 生体試料への適用

アセトアミノフェン 300 mg/kg を投与したマウス肝組織中の TYR および NTYR の測定を行った結果を図に示す。TYR, NTYR とともにすべての試料から検出が可能であった。またその値はアセトアミノフェンの投与後 4 時間で最大値となった (Table 4)。また実試料のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

免疫化学的染色法による NTYR の検出では、対照群では小葉中心性に NTYR 陽性細胞がわずかに観察された。それに対し、ア

セトアミノフェン投与群では、投与後 2 時間で小葉中心性の NTYR 陽性細胞が強く染まり、投与後 4 時間において最も強く染まった (Fig. 4)。

D. 考察

in vivo におけるニトロチロシン生成量は極めて微量であり、試料も微量であることから、高感度かつ高精度な分析法が必要である。構築した分析法は NTYR の検出限界 0.1 nM, 定量限界は 0.5 nM と高感度な分析を達成し、マウス肝組織を用いた添加回収試験では 94% 以上と良好な結果が得られた。また、TYR の定量限界は 30 nM, 検出限界は 100 nM, 添加回収試験では 92% 以上と実試料の測定には十分な感度が得られ、NTYR, TYR とともに、高感度かつ高精度な測定が達成された。また、本分析法をアセトアミノフェン 300 mg/kg を腹腔内投与したマウス肝組織に適用した結果、アセトアミノフェン投与後 4 時間で NTYR/TYR (μ mol/mol) 値が最大となり、免疫化学的染色法による NTYR の検出と同様の結果が得られた。

E. 結論

本研究では、生体内における活性窒素種の生成を明らかにすることを目的として、タンパク質の活性窒素種による修飾物質である NTYR の分析法を構築した。

近年、生体内における活性窒素種による酸化ストレスが注目されており、活性窒素種の過剰な生成は結果として DNA の酸化損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが知られている。これらのことから、生体内における活性窒素種の生成量を測定することは、活性窒素種と疾患との関係を明らか

にするのに極めて重要である。

一酸化窒素やペルオキシナイトライトは反応性が高く、不安定なため、生体試料においてそれらを直接測定することは困難であるが、NTYRのような生体内修飾物質を測定することで、間接的ではあるが活性窒素種の生成量を評価することが可能である。また、本研究のように、特定の組織を用いて測定することで、活性窒素種の生成臓器を特定することが可能である。

これらのことから、本分析法は種々の実験動物を用いた研究において極めて重要であり、生体内における活性窒素種と種々の疾患の関係についてもさらに研究を進めていく必要がある。

F. 研究成果

F-1. 学会発表

- 1) Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Keita Okano, Tomononari Yajima, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose Hiroyuki Nakazawa. Quantitation of protein-bound nitrotyrosine by liquid chromatography with mass spectrometry in liver of mice administered acetaminophen. Separation in the BioSciences (SBS) 2005 (2005年9月・Utrecht)
- 2) Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa. A possible involvement of nitric oxide-mediated oxidative stress in the induction of rat forestomach damage and cell proliferation by the combined

treatment with catechol and sodium nitrite. Pacificchem.2005 (2005年12月・Honolulu)

- 3) Yuji Ishii, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Keita Okano, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa. Determination of peroxynitrite-derived nitrotyrosine in mice liver by Liquid chromatography with tandem mass spectrometry. PITTCON 2006 (2006年3月・Orlando)

F-2. 発表論文

- 1) Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nishikawa A., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Hirose M.: Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite, *Arch. Biochem. Biophys.*, 447, 127-135 (2006)
- 2) Ishii Y., Iijima M., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

【参考文献】

- 1) Okazaki K., Ishii Y., Kitamura Y., Maruyama S., Umemura T., Miyauchi M., Yamagishi M., Imazawa T., Nishikawa A., Yoshimura Y., Nakazawa H., Hirose M.: Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: Possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage, *Cancer Sci.*, 97 (3), 175-182 (2006)
- 2) Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nishikawa A., Ito R., Saito K., Nakazawa H., Hirose M.: Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite, *Arch. Biochem. Biophys.*, 447, 127-135 (2006)
- 3) Beckman J.S., Koppenol W.H.: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am. J. Physiol.*, 271 (1996) C1424-1437.
- 4) Knight T.R., Ho Y.S., Farhood A., Jaeschke H.: Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 3 (2002) 468-475.
- 5) Hinson J.A., Michael S.L., Ault S.G., Pumford N.R.: Western blot analysis for nitrotyrosine protein adducts in livers of saline-treated and acetaminophen-treated mice, *Toxicol. Sci.*, 53 (2000) 467-473.
- 6) James L.P., McCullough S.S., Lamps L.W., Hinson J.A.: Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation, *Toxicol. Sci.*, 2 (2003) 458-467.
- 7) Frost M.T., Halliwell B., Moore P.: Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/ mass spectrometry method that avoids nitration artifacts, *Biochem. J.*, 345 (2000) 453-458.
- 8) Schwedhelm E., Tsikas D., Gutzki F.M., Frolich J.C.: Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state, *Anal. Biochem.*, 276 (1999) 195-203.
- 9) Crowley J.R., Yarasheski K., Leeuwenburgh C., Turk J., Heinecke J.W.: Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine, *Anal. Biochem.*, 259 (1998) 127-135.
- 10) Miller M.J., Thompson J.H., Zhang X.J., Sadowska-Krowicka H., Kakkis J.L., Munshi U.K., Sandoval M., Rossi J.L., Eloby-Childress S., Beckman J.S., Ye Y.Z., Rodi C.P., Manning P.T., Currie M.G., Clark D.A.: Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis, *Gastroenterology*, 109 (1995) 1475-1483.
- 11) Jiao K., Mandapati S., Skipper P.L.,

- Tannenbaum S.R., Wishnok J.S.:
Site-selective nitration of tyrosine in
human serum albumin by peroxynitrite,
Anal. Biochem., 293 (2001) 43-52.
- 12) Ischiropoulos H., Beers M.F., Ohnishi S.T.,
Fisher D., Garner S.E., Thom S.R.: Nitric
oxide production and perivascular nitration
in brain after carbon monoxide poisoning
in the rat, *J. Clin. Invest.*, 97 (1996)
2260-2267.
- 13) Kaur H., Halliwell B.: Evidence for nitric
oxide-mediated oxidative damage in
chronic inflammation. Nitrotyrosine in
serum and synovial fluid from rheumatoid
patients, *FEBS Lett.* 350 (1994) 9-12.
- 14) Sodum R. S., Akerkar S. A., Fiala E. S.:
Determination of 3-nitrotyrosine by
high-pressure liquid chromatography with
a dual-mode electrochemical detector, *Anal.
Biochem.*, 280 (2000) 278-285.
- 15) Hensley K., Maidt M.L., Yu Z., Snag H.,
Markesbery W.R., Floyd R.A.:
Electrochemical analysis of protein
nitrotyrosine and dityrosine in the
Alzheimer brain indicates region-specific
accumulation, *J. Neurosci.*, 18 (1998)
8126-8132.
- 16) Althaus J.S., Schmidt K.R., Fountain S.T.,
Tseng M.T., Carroll R.T., Galatsis P., Hall
E.D.: LC-MS/MS detection of
peroxynitrite-derived 3-nitrotyrosine in rat
microvesels, *Free. Radical. Biol. Med.*, 29
(2000) 1085-1095.
- 17) Thierry D., Janique R., Jacques V., Richard
H.S.: Artifacrual nitration controlled
measurement of protein-bound
3-nitro-L-tyrosine in biological fluids and
tissues by isotope dilution liquid
chromatography electrospray ionization
tandem mass spectrometry, *Chem. Res.
Toxicol.*, 15 (2002) 1209-1217.

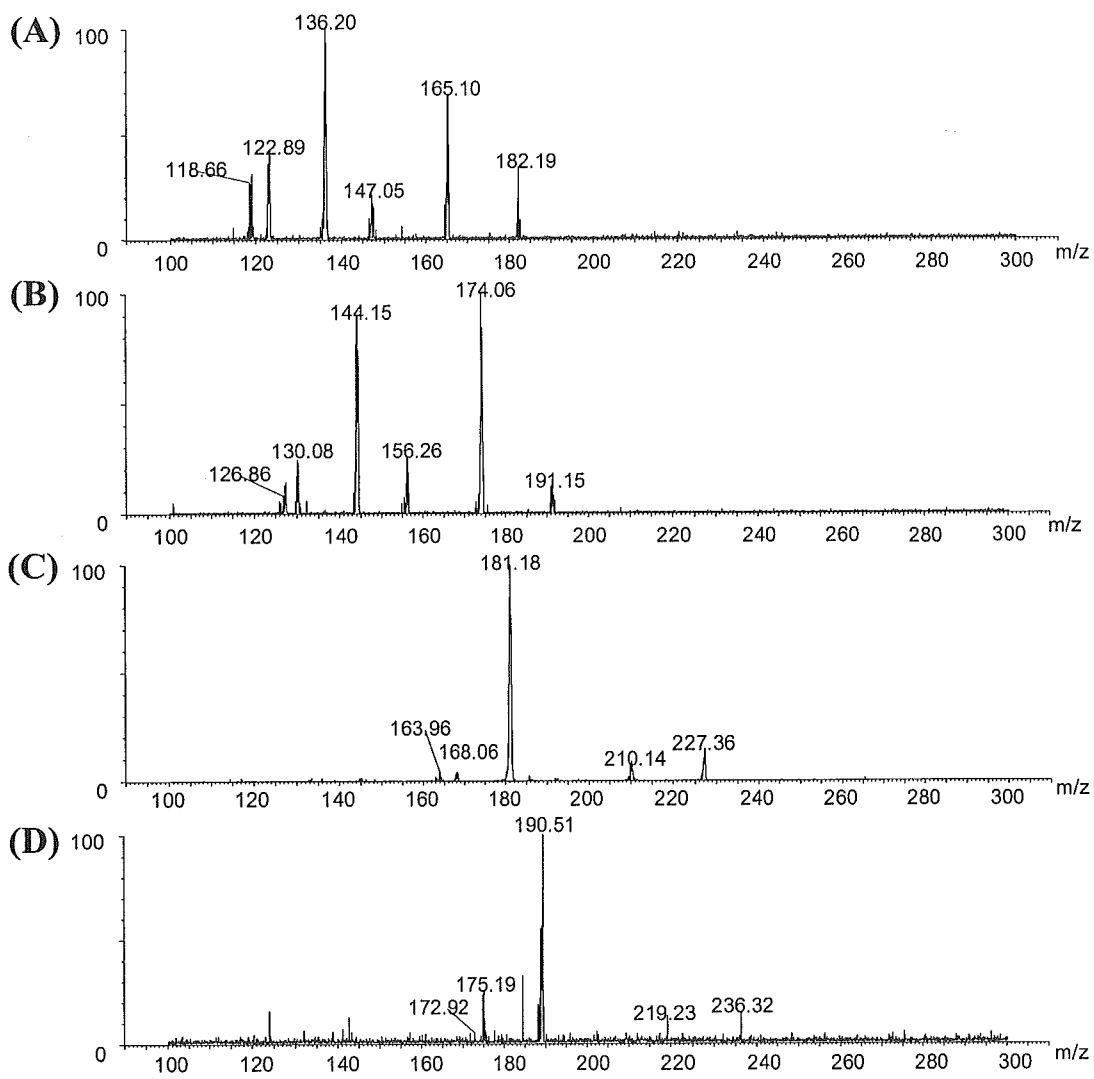


Fig. 1 Product ion spectra of (A) TYR, (B) $[^{13}\text{C}_9]$ -TYR, (C) NTYR and (D) $[^{13}\text{C}_9]$ -NTYR.

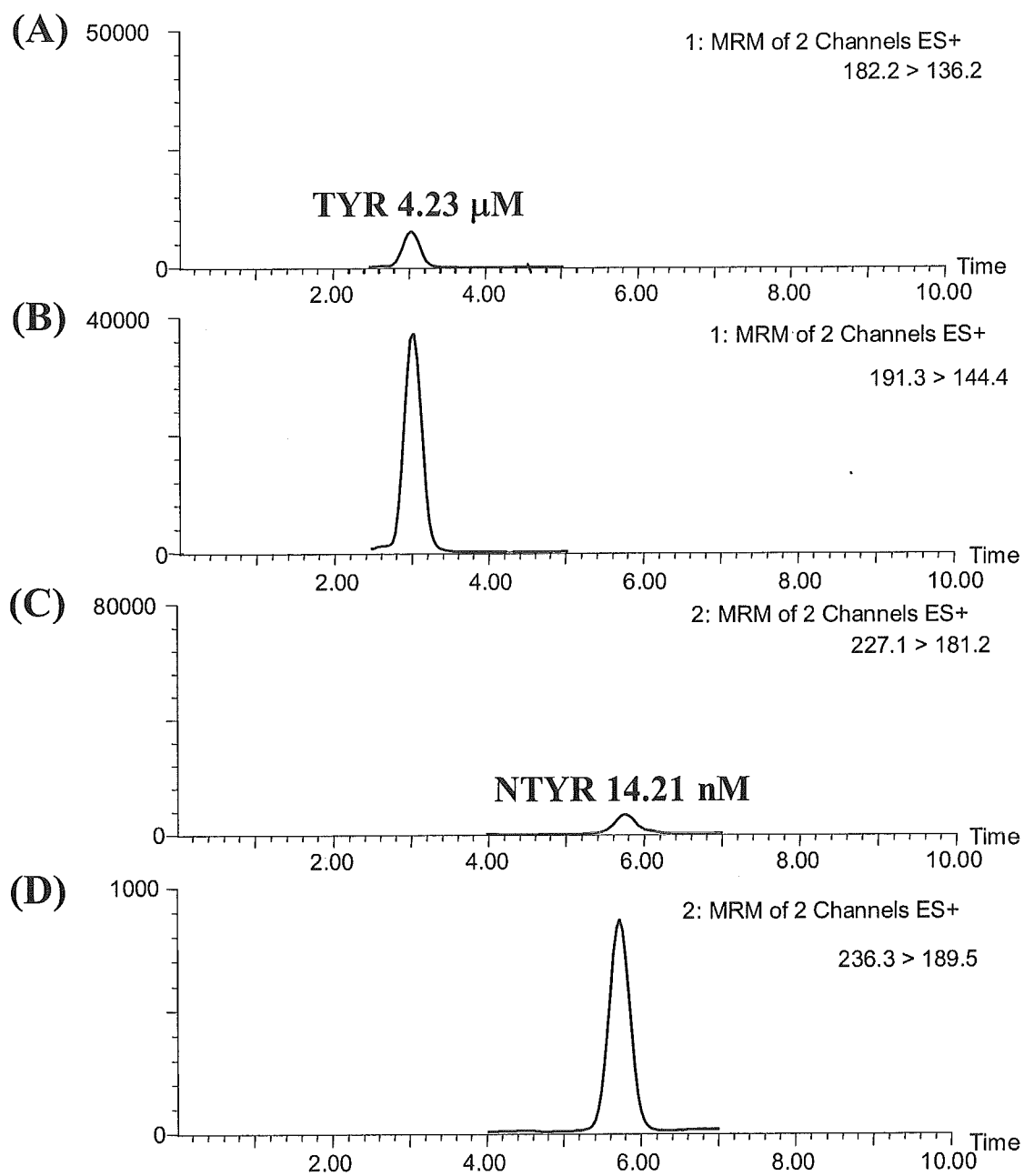


Fig. 2 MRM chromatograms of a mouse liver protein sample containing TYR (A), 5 μ M [$^{13}\text{C}_9$]-TYR (B), NTYR (C) and 5 nM [$^{13}\text{C}_9$]-NTYR (D).

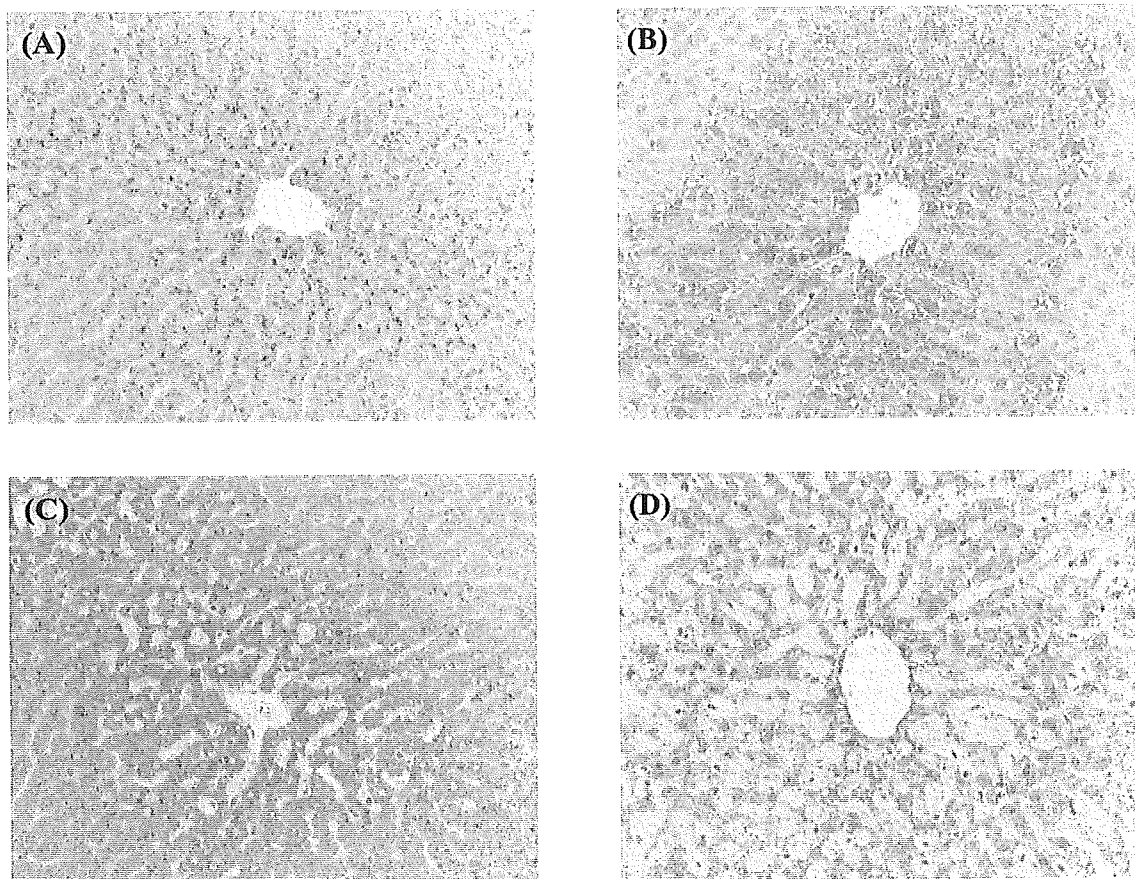


Fig. 3 Immunohistochemical staining of liver sections for NTYR protein adducts in controls and 2, 4 and 8 hr after 300 mg/kg of APAP.

(A) Liver from a saline-treated mouse. Liver from a mouse treated with APAP (300 mg/kg) at 2hr (B), 4hr (C) and 8hr (D). Original magnification, $\times 360$.

Table. 1 LC-MS/MS condition

| Instrument | MS condition |
|---|------------------------------|
| LC system : Waters 2795 | Capillary (kV) : 3.0 |
| MS detector : Micromass Quattro | Source temp. (°C) : 150 |
| Column : SHISEIDO CAPCEL PAK C ₁₈ (150 x 2.0 mm, 5 μm) | Desolvation temp. (°C) : 350 |
| LC condition | Gas flow |
| Mobile phase A : H ₂ O | Desolvation (L/hr) : 590 |
| Mobile phase B : 0.1% Acetic acid | Cone (L/hr) : 200 |
| Mobile phase C : Acetonitrile | Gas : Argon (99.9999%) |
| Gradient : A/B/C | Ionization mode : ES+ |
| = 87/10/3 (0 min) | Inter-channel delay : 0.1 |
| 50/10/40 (4min) | Inter- scan delay : 0.1 |
| 87/10/3 (4.01 min, hold 2 min) | Repeats : 1 |
| 20/10/70 (9 min, hold 2 min) | Span : 0.5 |
| 87/10/3 (15 min, hold 5 min) | |
| Flow rate : 0.2 mL/min | |
| Injection volume : 20 μL | |
| Column temperature : 40°C | |

| | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Cone voltage (V) | Collision energy (eV) |
|------------------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| TYR | 182 | 136 | 15 | 12 |
| ¹³ C ₉ -TYR | 191 | 144 | 15 | 12 |
| NTYR | 227 | 181 | 20 | 11 |
| ¹³ C ₉ -NTYR | 236 | 190 | 20 | 11 |