

Table 3 *In vitro* comet assay – Effect of pre-treatment with sodium nitrite on EGCG

1st treatment Sodium nitrite (mg/ml)	2nd treatment EGCG (μ M)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment	
		Mean	\pm S.D.	Mean	\pm S.D.	Mean	\pm S.D.
0	0	4.19	\pm 0.84	8.00	\pm 0.52	0.53	\pm 0.26
1.25	100	4.24	\pm 0.92	8.35	\pm 1.26	0.40	\pm 0.08
2.5	100	5.15	\pm 0.33	9.78	\pm 0.67	0.50	\pm 0.06
5	100	5.54	\pm 0.79	12.00 [*]	\pm 3.21	0.69	\pm 0.14
0	100	5.26	\pm 0.65	11.47 ^a	\pm 2.06	0.54	\pm 0.10

One hour later Sodium nitrite treatment, CHL cells were rinsed twice with PBS and treated with EGCG for one hour. 200 cells were scored from each dose.

^a: $p < 0.05$ Aspin-Welch t-test

^{*}: $P < 0.05$ Dunnett

Table 4 Reverse mutation test (-S9 mix) (pH7.4)

Test substance : Sodium nitrite + EGCG

EGCG Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	No. of revertant colonies/plate			
	TA100		WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
	Pure water	Sodium nitrite 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Pure water	Sodium nitrite 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$
Solvent control (Pure water)	114	499	84	205
	105	453	95	212
	108	445	91	241
	(109 \pm 5)	(466 \pm 29)	(90 \pm 6)	(219 \pm 19)
39.1	117	466	98	212
	121	447	102	228
	115	439	95	235
	(118 \pm 3)	(451 \pm 14)	(98 \pm 4)	(225 \pm 12)
78.1	119	432	106	228
	131	442	115	235
	122	432	101	231
	(124 \pm 6)	(435 \pm 6)	(107 \pm 7)	(231 \pm 4)
156	109	412	127	251
	118	408	136	265
	133	431	110	221
	(120 \pm 12)	(417 \pm 12)	(124 \pm 13)	(246 \pm 22)
313	121	464	103	214
	117	416	100	184
	126	433	113	179
	(121 \pm 5)	(438 \pm 24)	(105 \pm 7)	(192 \pm 19)
625	108	445	95	205
	124	401	85	219
	113	379	112	241
	(115 \pm 8)	(408 \pm 34)	(97 \pm 14)	(222 \pm 18)
1250	119	318 *	108	212 *
	99	314 *	106	194 *
	109	353 *	85	187 *
	(109 \pm 10)	(328 \pm 21)	(100 \pm 13)	(198 \pm 13)
2500	109 *	0 *	57 *	94 *
	124 *	0 *	74 *	86 *
	98 *	0 *	55 *	90 *
	(110 \pm 13)	(0 \pm 0)	(62 \pm 10)	(90 \pm 4)
Positive control	AF-2		AF-2	
$\mu\text{g}/\text{plate}$	0.01		0.01	
Revertants/plate	498		1191	
	496		1151	
	501		1093	
	(498 \pm 3)		(1145 \pm 49)	

() : Mean \pm SD

* : Toxicity to the tester strains was observed.

Table 5 Reverse mutation test (-S9 mix) (pH6.0)

Test substance : Sodium nitrite + EGCG

EGCG Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	No. of revertant colonies/plate			
	TA100		WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
	Pure water	Sodium nitrite 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	Pure water	Sodium nitrite 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$
Solvent control (Pure water)	120	458	66	368
	124	497	81	373
	156	445	88	399
	(133 \pm 20)	(467 \pm 27)	(78 \pm 11)	(380 \pm 17)
39.1	113	469	67	264
	118	429	83	295
	101	407	73	275
	(111 \pm 9)	(435 \pm 31)	(74 \pm 8)	(278 \pm 16)
78.1	130	452	80	244
	131	420	82	220
	107	375	77	242
	(123 \pm 14)	(416 \pm 39)	(80 \pm 3)	(235 \pm 13)
156	106	455	77	247
	143	426	78	247
	136	422	91	268
	(128 \pm 20)	(434 \pm 18)	(82 \pm 8)	(254 \pm 12)
313	131	446	88	265
	123	475	87	266
	122	496	89	232
	(125 \pm 5)	(472 \pm 25)	(88 \pm 1)	(254 \pm 19)
625	121	460	82	256
	137	431	74	236
	128	377	87	205
	(129 \pm 8)	(423 \pm 42)	(81 \pm 7)	(232 \pm 26)
1250	117	385	87	281
	152	421	72	318
	108	388	58	309
	(126 \pm 23)	(398 \pm 20)	(72 \pm 15)	(303 \pm 19)
2500	100 *	247 *	54 *	178 *
	110 *	260 *	51 *	208 *
	89 *	252 *	40 *	151 *
	(100 \pm 11)	(253 \pm 7)	(48 \pm 7)	(179 \pm 29)
Negative control (Pure water) (pH7.4)	127	521	61	190
	125	463	85	218
	132	410	74	199
	(128 \pm 4)	(465 \pm 56)	(73 \pm 12)	(202 \pm 14)
Positive control	AF-2		AF-2	
$\mu\text{g}/\text{plate}$	0.01		0.01	
Revertants/plate	439		757	
	422		869	
	445		857	
	(435 \pm 12)		(828 \pm 61)	

(): Mean \pm SD

*: Toxicity to the tester strains was observed.

Table 6 Reverse mutation test (-S9 mix) (pH5.0)

Test substance : Sodium nitrite + EGCG

EGCG Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	No. of revertant colonies/plate	
	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
	Pure water	Sodium nitrite 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$
Solvent control (Pure water)	81	871
	77	866
	70	962
	(76 \pm 6)	(900 \pm 54)
39.1	68	997
	50	929
	73	904
	(64 \pm 12)	(943 \pm 48)
78.1	84	992
	73	998
	78	972
	(78 \pm 6)	(987 \pm 14)
156	79	918
	73	928
	83	1031
	(78 \pm 5)	(959 \pm 63)
313	76	1130
	73	1203
	80	1175
	(76 \pm 4)	(1169 \pm 37)
625	66	1052
	68	1097
	68	1102
	(67 \pm 1)	(1084 \pm 28)
1250	64	597 *
	46	574 *
	38	541 *
	(49 \pm 13)	(571 \pm 28)
2500	44 *	143 *
	46 *	142 *
	31 *	179 *
	(40 \pm 8)	(155 \pm 21)
Solvent control (Pure water) (pH7.4)	71	
	77	
	77	
	(75 \pm 3)	
Positive control	AF-2	
$\mu\text{g}/\text{plate}$	0.01	
Revertants/plate	1027	
	1034	
	991	
	(1017 \pm 23)	

() : Mean \pm SD

* : Toxicity to the tester strains was observed.

Table 7 *In vitro* comet assay - Sodium nitrite + EC

Sodium nitrite (mg/ml)	EC (μ M)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment		Cell viability %
		Mean	\pm S.D.	Mean	\pm S.D.	Mean	\pm S.D.	
0	0	5.18	\pm 0.42	15.94	\pm 3.31	0.61	\pm 0.07	100
0	100	7.08	\pm 1.58	16.81	\pm 4.73	0.71	\pm 0.19	101
1.25	100	5.20	\pm 1.51	15.52	\pm 1.76	0.56	\pm 0.18	75
2.5	100	5.51	\pm 0.62	16.06	\pm 2.37	0.57	\pm 0.07	67
5	100	7.12	\pm 0.76	18.07	\pm 6.84	0.78	\pm 0.11	71

200 cells were scored from each dose.

Table 8 *In vitro* comet assay - Sodium nitrite + ECG

Sodium nitrite (mg/ml)	ECG (μ M)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment		Cell viability %
		Mean \pm S.D.	S.D.	Mean \pm S.D.	S.D.	Mean \pm S.D.	S.D.	
0	0	6.61 \pm 1.69	5.08	17.64 \pm 5.08	0.72 \pm 0.18	100		
0	100	6.07 \pm 1.30	4.90	16.68 \pm 4.90	0.70 \pm 0.20	102		
1.25	100	5.08 \pm 0.52	2.28	16.24 \pm 2.28	0.58 \pm 0.04	76		
2.5	100	6.54 \pm 1.79	2.01	17.14 \pm 2.01	0.79 \pm 0.20	73		
5	100	6.40 \pm 1.07	1.73	17.99 \pm 1.73	0.77 \pm 0.19	60		

200 cells were scored from each dose.

Table 9 *In vitro* comet assay - Sodium nitrite + EGC

Sodium nitrite (mg/ml)	EGC (µM)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment		Cell viability %
		Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	Mean	± S.D.	
0	0	4.75	± 0.86	11.61	± 1.85	0.54	± 0.17	100
0	100	8.65 ^{aaa}	± 0.62	23.76 ^{aa}	± 3.12	1.19 ^{aa}	± 0.16	104
1.25	100	24.48 ^{***}	± 2.15	41.76 ^{***}	± 2.98	6.02 ^{***}	± 0.77	73
2.5	100	31.01 ^{***}	± 5.33	46.65 ^{***}	± 5.23	7.75 ^{***}	± 1.45	66
5	100	30.66 ^{***}	± 1.51	48.18 ^{***}	± 2.21	8.30 ^{***}	± 0.50	57

200 cells were scored from each dose.

^{aa}: p<0.01 Aspin-Welch t-test

^{aaa}: p<0.001 Aspin-Welch t-test

^{***}: P<0.001 Dunnett

Table 10 Mutagenicity of NaNO₂, ascorbic acid, and catechol in TA100 and WP2uvrA/pKM101

Chemical	Dose (µg/plate)	TA100		WP2uvrA/pKM101	
		His ⁺ revertants/plate (Mean ± SD)	Induced revertants	Trp ⁺ revertants/plate (Mean ± SD)	Induced revertants
NaNO ₂	0	139 ± 5	0	65 ± 16	0
	78	147 ± 10	8	73 ± 7	8
	156	140 ± 18	1	84 ± 4	19
	313	173 ± 6	34	80 ± 13	15
	625	212 ± 20	73	91 ± 12	26
	1250	275 ± 22	136	113 ± 4	48
	2500	414 ± 30	275	122 ± 7	57
	5000	574 ± 12	435	220 ± 24	155
Ascorbic acid	0	122 ± 11	0	94 ± 5	0
	78	115 ± 8	-7	102 ± 5	8
	156	119 ± 7	-3	103 ± 21	9
	313	125 ± 11	3	114 ± 1	20
	625	144 ± 9	22	120 ± 8	26
	1250	151 ± 6	29	103 ± 9	9
	2500	150 ± 10	28	125 ± 8	31
	5000	183 ± 33	61	128 ± 12	34
Catechol	0	122 ± 11	0	94 ± 5	0
	250	169 ± 6	47	110 ± 13	16
	500	162 ± 12	40	107 ± 11	13
	1000	130 ± 19	8	113 ± 11	19
	2000	Toxic	-	Toxic	-

Triplicate plates were used for each dose.

The assays were conducted in the absence of metabolic activation.

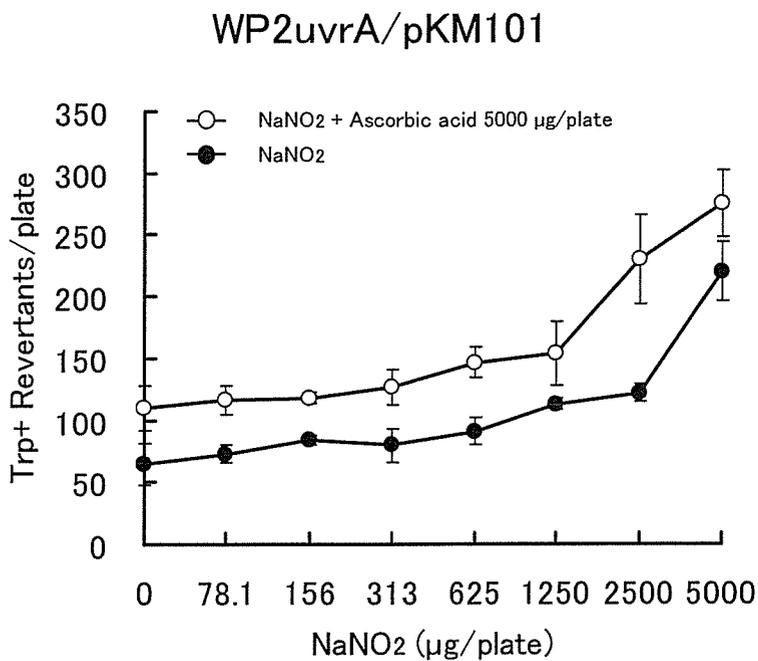
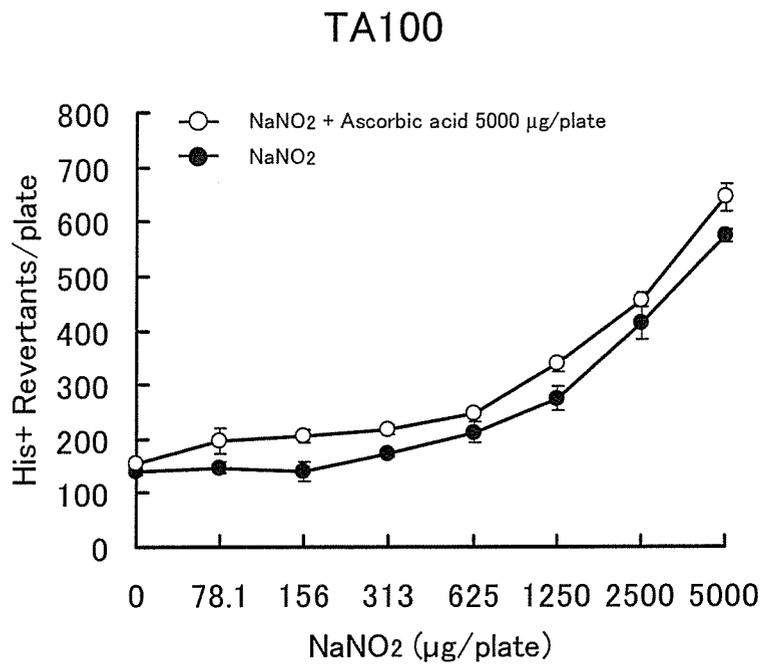
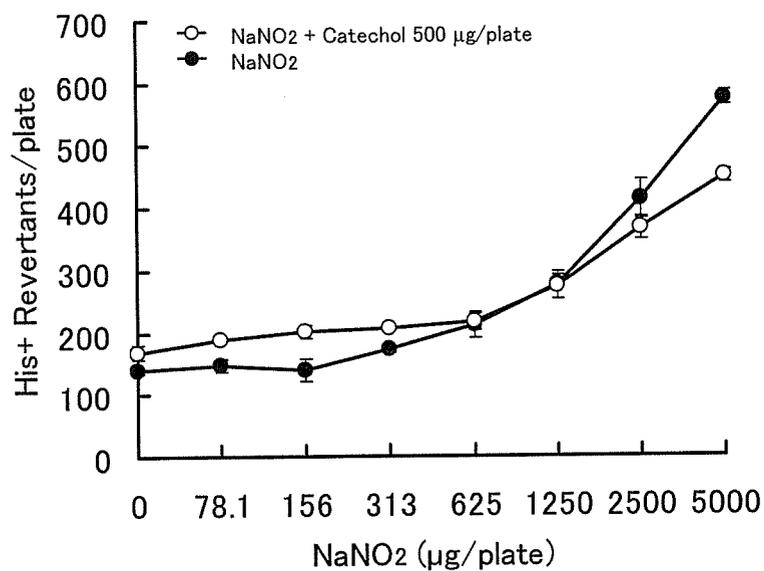


Fig. 1 Additive effects of combined treatment with NaNO₂ and ascorbic acid on bacterial mutagenicity. TA100 and WP2uvrA/pKM101 were simultaneously treated with NaNO₂ and ascorbic acid.

TA100



WP2uvrA/pKM101

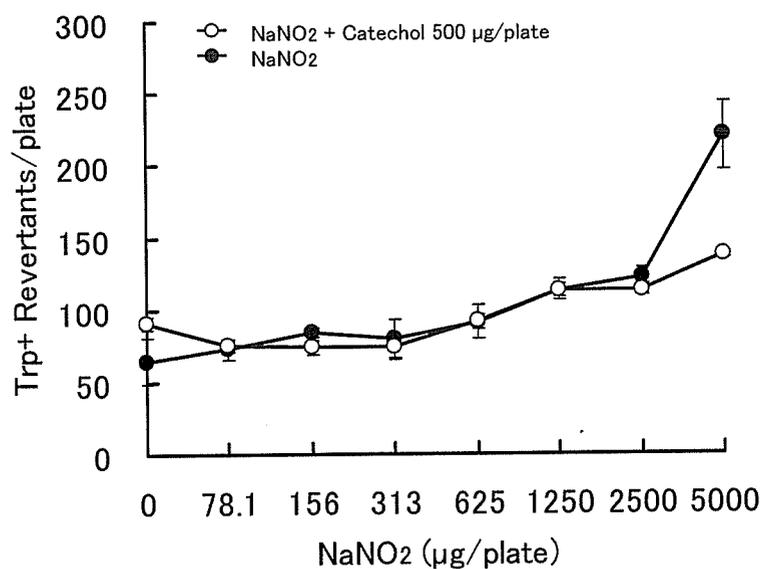


Fig. 2 Effects of combined treatment with NaNO₂ and catechol on bacterial mutagenicity. TA100 and WP2uvrA/pKM101 were simultaneously treated with NaNO₂ and catechol.

Table 11 Mutagenicity of NaNO₂, ascorbic acid, and catechol in TA100 and WP2uvrA/pKM101 in pH 6.0 buffer

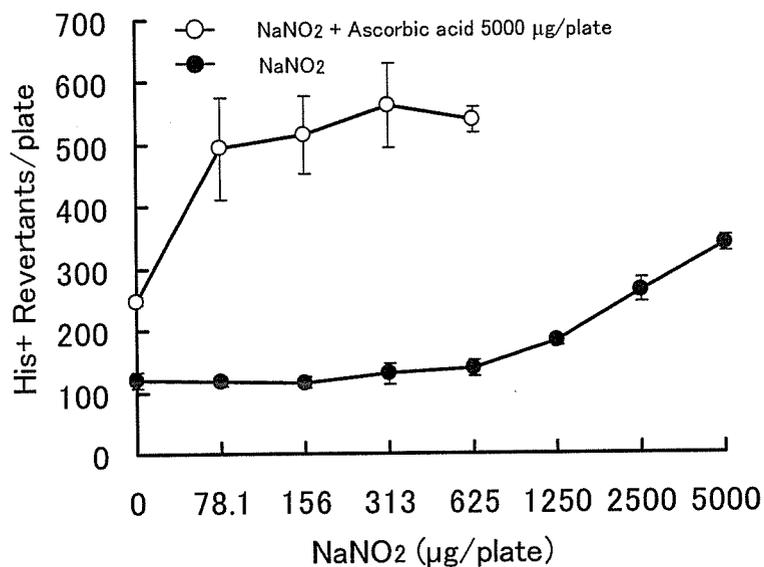
Chemical	Dose (µg/plate)	TA100		WP2uvrA/pKM101	
		His ⁺ revertants/plate (Mean ± SD)	Induced revertants	Trp ⁺ revertants/plate (Mean ± SD)	Induced revertants
NaNO ₂	0	119 ± 13	0	69 ± 11	0
	78	116 ± 7	-3	78 ± 2	9
	156	115 ± 9	-4	86 ± 19	17
	313	130 ± 17	11	85 ± 22	16
	625	138 ± 12	19	109 ± 17	40
	1250	182 ± 8	63	141 ± 23	72
	2500	264 ± 20	145	210 ± 14	141
	5000	338 ± 14	219	456 ± 13	387
Ascorbic acid	0	108 ± 9	0	73 ± 3	0
	78	100 ± 10	-8	80 ± 13	7
	156	111 ± 9	3	81 ± 13	8
	313	121 ± 14	13	75 ± 5	2
	625	120 ± 7	12	83 ± 7	10
	1250	196 ± 11	88	108 ± 16	35
	2500	223 ± 4	115	90 ± 15	17
	5000	191 ± 8 *	83	130 ± 10	57
Catechol	0	125 ± 6	0	62 ± 5	0
	250	142 ± 6	17	65 ± 5	3
	500	140 ± 8	15	71 ± 2	9
	1000	144 ± 22	19	69 ± 12	7
	2000	143 ± 12	18	65 ± 4	3

Triplicate plates were used for each dose.

The assays were conducted in the absence of metabolic activation.

*: cytotoxicity

TA100



WP2uvrA/pKM101

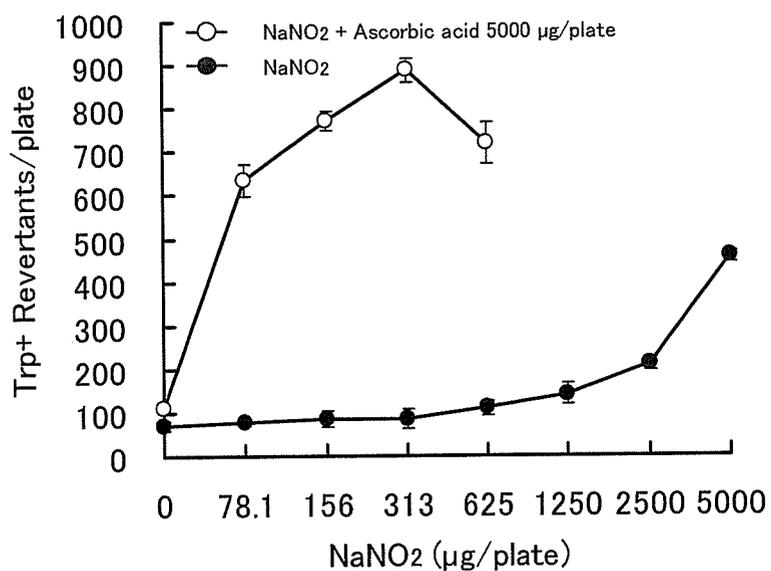


Fig. 3 Synergistic effects of combined treatment with NaNO₂ and ascorbic acid on bacterial mutagenicity. TA100 and WP2uvrA/pKM101 were simultaneously treated with NaNO₂ and ascorbic acid in pH 6.0 buffer.

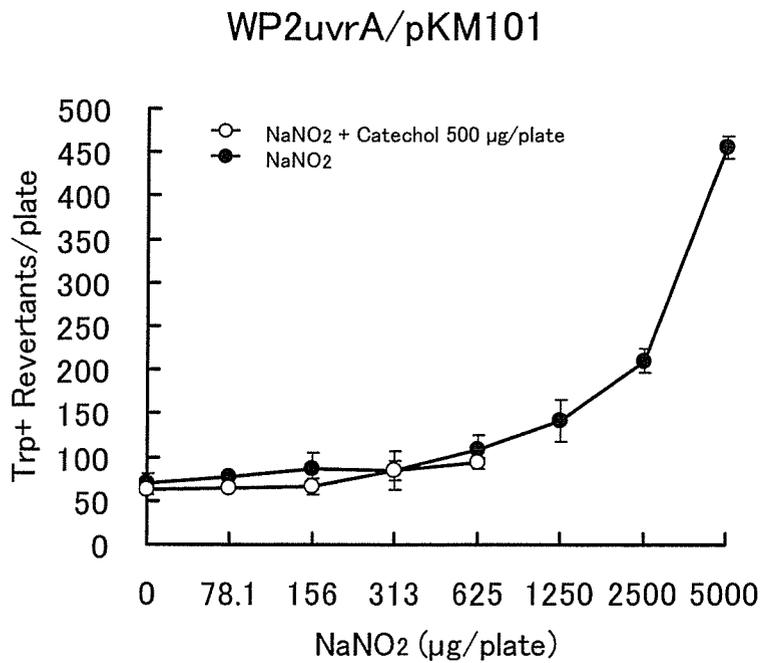
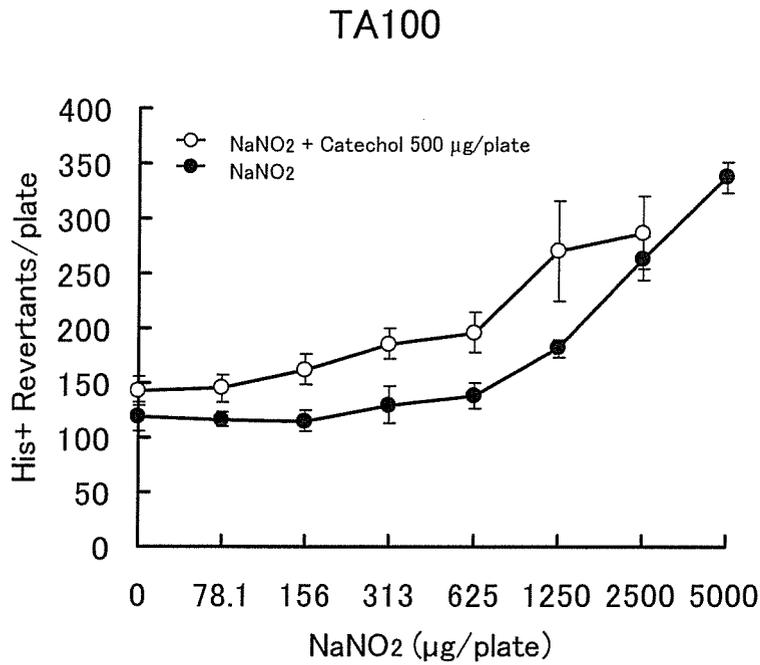


Fig. 4 Effects of combined treatment with NaNO₂ and catechol on bacterial mutagenicity. TA100 and WP2uvrA/pKM101 were simultaneously treated with NaNO₂ and catechol in pH 6.0 buffer.

平成 18 年度 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	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学	薬品分析化学教室
	石井 雄二	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

平成 16 年度の本研究事業において、亜硝酸ナトリウムとカテコールあるいはアスコルビン酸の併用投与によるラット前胃発がん促進機構には、活性酸素種だけでなく活性窒素種が関与することを明らかにした。平成 18 年度は活性窒素種の発がん促進機構への関与を明らかにするため、活性窒素種による DNA 損傷評価法を検討した。更に、活性窒素種によるタンパク質中ニトロ化物質としてニトロトリプトファンの高感度分析法を構築した。

活性窒素種による DNA 損傷評価法として、液体クロマトグラフィー/質量分析法によるニトログアニンの分析法を構築し、液体クロマトグラフィー/電気化学検出器による 8-ヒドロキシデオキシグアニシンの分析法と組み合わせることで、DNA のニトロ化および酸化の両方の評価法を確立した。本評価法を *in vitro* 試料へ適用した結果、活性窒素種によって DNA の酸化およびニトロ化が生じることを明らかにした。一方、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるニトロトリプトファンの分析法では、*in vitro* におけるタンパク質中ニトロトリプトファン生成を確認し、3 種のニトロトリプロファン異性体の同時分析法を確立した。更に、活性窒素種生成の知られる毒性量のアセトアミノフェンを投与したマウス肝組織の分析に本法を応用した結果、アセトアミノフェン投与群においてニトロトリプトファンが生成することを明らかにした。

A. 研究目的

平成 16 年度の本研究事業において亜硝酸ナトリウムとカテコールあるいはアスコルビン酸の併用投与によるラット前胃発がん促進機構には、活性酸素種 (ROS) だけでなく活性窒素種 (RNS) によって引き起

こされる酸化ストレスが関与することを明らかにした^{1,2)}。ROS および RNS は生体内において極めて不安定であり、それらの生成を直接的に確認することは困難であることから、DNA の酸化により生成する 8-ヒドロキシデオキシグアニシン (8-OHdG) や

タンパク質のニトロ化により生成するニトロチロシン等を検出することにより、その存在を確認した。

平成 18 年度では、RNS の発がんへの関与に着目し、DNA 中に生成すると考えられるグアニンのニトロ化物質である 8-ニトログアニン (NO_2Gua) の液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) による分析法を構築した。また、RNS はニトロ化だけでなく強力な酸化力を有することが知られていることから、一つの DNA 試料からグアニンの酸化とニトロ化の両方を検出可能な評価法の構築を試みた。一方、平成 17 年度において、RNS 生成のバイオマーカーとして知られるタンパク質中ニトロチロシンの高感度かつ高精度な分析法を検討した。しかし近年、チロシンと同様に芳香族アミノ酸であるトリプトファンもまたニトロ化されることが報告され³⁾、ニトロトリプトファン (NO_2Trp) の生成は抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼの活性を低下させることが明らかとなっている^{4,5)}。そこで、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による NO_2Trp の高感度かつ高精度な分析法を開発した。更に、本法を *in vitro* および *in vivo* 試料の分析に適用し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

実験 1

B-1. 材料及び試薬

酢酸アンモニウム、塩酸、フェニルグリオキサール、dG-一水和物、DMSO 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。 NO_2Gua と ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$ - NO_2Gua は Tronto Research Chemicals 社製を、DTPA,

仔牛胸 DNA, 8-OHdG 及びアルカリホスファターゼは Sigma Chemical 社製を使用した。6-メトキシ-2-ナフチルグリオキサール (MTNG) は Alfa Aesar 社製を用いた。グリオキサール及びヒドロキシフェニルグリオキサールは Fluka 社より、ヌクレアーゼ P1 はヤマサ醤油社より購入した。また、精製水は Millipore 社製の Milli-Q gradient-A10 EDS ポリリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。

B-2. 標準溶液の調製

精製水を用い、 $50\ \mu\text{M}$ NO_2Gua 溶液を調製した。検量線の作成は最終濃度が 3.0 から 500 nM となるように、サロゲート物質である ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$ - NO_2Gua を最適濃度で添加した後、DNA digestion buffer (20 mM 酢酸緩衝液, pH 4.2/1.0 M トリス-塩酸緩衝液, pH 8.1/3.0 M 酢酸緩衝液, pH 5.1 = 10 : 1 : 1) で調製した。MTNG 溶液 (0.5% w/v) は 5.0 mg の MTNG を 1.0 mL の DMSO に溶解し、 -80°C で保存した。

B-3. MTNG 誘導体化

反応はテストチューブに DNA digestion buffer で調整した $100\ \mu\text{L}$ の NO_2Gua , $10\ \mu\text{L}$ の 2.5 M 塩酸及び DMSO に溶解した $40\ \mu\text{L}$ の MTNG を加え、攪拌後、1.5 時間室温で放置した。反応終了後、反応溶液のうち $100\ \mu\text{L}$ を測定に用いた。

B-4. DNA の消化

消化過程における酸化を防ぐために、Nakae ら⁶⁾の方法を参考に DNA 消化を行った。反応後の 0.5 mL の仔牛胸腺 DNA 溶液に 1.0 mL の 2-プロパノールを加え、 4°C ,

15,000 x g で 10 分間遠心分離を行い、上清を捨てペレット状の DNA を 1.0 mL のエタノールで洗浄した後、再度 4°C, 15,000 x g で 10 分間遠心分離を行った。得られたペレット状の DNA を 0.2 mL の 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8) に溶解し、2,000 units/mL のヌクレアーゼ P1 を 4.0 μ L 添加し 70°C で 15 分間インキュベーションした。さらに、1.0 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 20 μ L 加えた後、1,000 units/mL のアルカリホスファターゼを 4.0 μ L 添加し、37°C で 1.0 時間インキュベーションした後、3.0 M 酢酸緩衝液 (pH 5.1) を 20 μ L 加え、10,000 NMWL フィルターを通し、試料とした。得られた試料のうち 50 μ L は LC-UV-ECD による 8-OHdG 及び dG の測定に、100 μ L には 10 μ L の 2.5 M 塩酸及び 40 μ L の MTNG 溶液を加え 1.5 時間反応させた後、LC-MS による NO₂Gua の測定に供した。

B-5. 測定装置

LC-MS システムはインターフェイスに ESI を装備した Agilent 社製 LC-MSD Spherio Line を用いた。Agilent 社製のポンプは抽出用カラムからの溶出及び分析用カラムでの分離に使用した。SHIMADZU 社製 LC-10AS pump は抽出カラムの安定化、試料の注入及び抽出カラムでの洗浄に使用した。分析用カラムには SHISEIDO 社製の CAPCELL PAK C18 MG II (2.0 x 150 mm, 5 μ m) を、抽出用カラムには GL sciences 社製の Inertsil Ph-3 (4.6 x 50 mm, 5.0 μ m) を用いた。

B-6. NO₂Gua 測定における CS-LC-ESI-MS の条件

CS システムの概要を Figure 1 に示す。Configuration A において、ポンプ C を用いて 0.1% 酢酸アンモニウム/アセトニトリル (8.5 : 1.5) 混液で安定させた抽出用カラムに、100 μ L の試料をオートサンプラーにより注入し、5 分間、抽出用カラムで濃縮および洗浄操作を行った。5 分後、スイッチングバルブを切り替え Configuration B とし、Pump A 及び B を用いてバックフラッシュ法により抽出用カラムから目的物質を抽出し、分析用カラムに再度保持させ、共存物質との分離を行い、MS へ導入した。分析用カラムは 40°C に維持し、ポンプ A 及び B により 0.005% 酢酸アンモニウム/アセトニトリル混液を流速 0.2 mL/min で送液し、グラジエント条件で分離、溶出を行った。グラジエントプログラムを Table 1 に示す。40 分間溶出させた後、スイッチングバルブを Configuration A に戻し、測定は 50 分で終了とした。ESI-MS の測定条件を以下に示す。窒素ガスの温度及び流量は 350°C 及び 12 L/min とし、キャピラリー電圧は 3500 V に設定した。フラグメンター電圧は 150 V を最適とした。測定は SIM のネガティブイオンモードで行い、NO₂Gua 及びサロゲート物質のモニタリングイオンはそれぞれ *m/z* 391 及び 394 ([M-H]⁻) とした。

B-7. dG 及び 8-OHdG の HPLC-UV-ECD による測定

dG 及び 8-OHdG は Nakae ら⁶⁾、Kasai ら⁷⁾および Helbock ら⁸⁾の方法を基に行った。すなわち、カラムには BECKMAN COULTER 社製 ULTRASPHERE ODS (4.6 x 250 mm, 5.0 μ m) を用い、カラム温度は 40°C に維持し、試料注入量を 50 μ L とした。移

動相には 10 mM リン酸ナトリウム/メタノール (96 : 4) 混液を用い、流速 1.0 mL/min で送液してカラムの安定化、分離および溶出を行った。dG の測定に用いた UV 検出器は測定波長を 290 nm に設定し、8-OHdG の測定に用いた Coulochem II 多電極型電気化学検出器はガードセル (Model 5020) の印加電圧を +350 mV、分析用セル (Model 5011) の印加電圧を Channel 1: +150 mV 及び Channel 2: +300 mV に設定し、Channel 2 で 8-OHdG を測定した。

B-8. 添加回収試験

添加回収試験には仔牛胸腺 DNA の消化液を使用し、NO₂Gua のブランク値を測定した。NO₂Gua の添加濃度は 25 及び 50 nM とし、CS-LC-ESI-MS による測定結果から回収率を算出した。

B-9. ONOO⁻により引き起こされる DNA 損傷の評価

1.0 mM の DTPA を含む 100 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて調製した 250 µg/mL の仔牛胸腺 DNA 溶液に、0 から 100 µM の ONOO⁻ を添加し、37°C で 1.0 時間インキュベーションした。DNA の抽出及び消化後、得られた約 200 µL の試料のうち 50 µL は LC-UV-ECD による dG 及び 8-OHdG の測定に、100 µL は MTNG 誘導体化後、CS-LC-ESI-MS による NO₂Gua の測定に供した。

実験 2

B-1. 材料及び試薬

Trp, TCA, 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。プロテアーゼおよび APAP は Sigma chemical 社 (St. Louis, MO) 製を使用した。L-[¹⁵N₂]-Trp は Spectra Stable Isotopes 社製 (Columbia, MO) 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. NO₂Trp 標準品及び安定同位体の合成

分析用標準物質として Trp から NO₂Trp 異性体の合成を行った。5.0 g の Trp を 10 mL の酢酸に溶解し、2.0 mL の硝酸を加えて室温で 1 時間攪拌した後、水酸化ナトリウム溶液で中和した。反応生成物の確認には SHIMADZU 社製 LC-フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) -MS システム (ポンプ : LC-10ADvp, オートサンプラー : SIL-HTC, PDA : SPD-M10Avp PDA detector, LCMS-2010A, Kyoto, Japan) をカラムは SHISEIDO 製 CAPCELL PAK C18 MG (2.0 x 250 mm, 5 µm) を使用し、移動相には 5.0% アセトニトリル含有 0.1% 酢酸溶液を用いた。MS 測定のインターフェイスには ESI を採用し、fragmentor voltage は 120 V に設定して scan 及び selected ion monitoring (SIM) モードで検出した。

反応生成物は、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) を用いて分離、精製した。カラムは SHISEIDO 製 CAPCELL PAK C18 MG (4.6 x 250 mm, 5 µm) を使用し、移動相は 5.0% アセトニトリル含有 0.1% 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。得られた標準品は SHIMADZU 社製 LC-MS (LCMS-2010A) 及び ^1H 核磁気共鳴装置 (NMR) (500 MHz) を用い、それぞれ 2-, 4-および 6- NO_2Trp であることを確認した。

内標準物質として用いる安定同位体についても同様の操作で合成した。すなわち 200 mg の $^{15}\text{N}_2\text{-Trp}$ を 2.0 mL の酢酸に溶解し、50 μL の硝酸を加えて室温で 1 時間攪拌した後、水酸化ナトリウム溶液で中和した。反応生成物は LC を用いて分取、精製した。

B-3. 標準溶液の調製

10 mM 塩酸を用い、1.0 mM Trp, 2-, 4-及び 6- NO_2Trp を調製した。検量線の作成は 4.0 から 1000 nM の Trp および 6- NO_2Trp , 3.0 から 1000 nM の 2- NO_2Trp そして 10 から 1000 nM の 4- NO_2Trp を調製し、サロゲート物質としてそれぞれの安定同位体を最適濃度で添加して用いた。

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、イオン化法には ESI を採用し、ポジティブイオンモードにより Trp および NO_2Trp 異性体を検出した。カラムには SHISEIDO 製 CAPCELL PAK C18 MG (2.0 x 250 mm, 5 μm) を用いた。移動相は溶液 A : 0.005% 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 = 90 : 10 で安定させ、グラジエントで Trp 及び NO_2Trp 異性体を溶出させた。

それぞれの precursor ion, product ion, cone

voltage 及び collision energy を Table 2 に示す。

また、全ての測定において source block temp. 及び desolvation temp. は 150 及び 350°C とし、cone gas 及び desolvation gas 流量は 200 及び 600 L/h とした。

B-5. 試料調製

本分析法は、組織タンパク質中 NO_2Trp 異性体及び Trp の検出を目的としていることから、酵素処理によるタンパク質の抽出および消化方法^{9,10}を採用した。すなわち、肝組織に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) を加えてホモジナイズした後、4°C, 3000 x 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 mL の 0.5% TCA を加え、4°C, 14000 x g で 10 分間遠心分離し、上清を捨てて、沈殿を採取し、2.0 mg/mL のプロテアーゼを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) 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% TCA を加え、4°C, 14000 x g で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取して 0.45 μm PVDF フィルターを通し、測定用試料とした。

B-6. 添加回収試験

添加回収試験にはマウス肝組織におけるタンパク質の消化液を使用し、 NO_2Trp 異性体及び Trp のブランク値からそれぞれの添加濃度を決定した。Trp, 2-, 4-及び 6- NO_2Trp それぞれの添加濃度は低濃度を 250, 25, 50 及び 25 nM, 高濃度を 500, 100, 200 及び 100 nM とし、LC-ESI-MS/MS による測定結果からそれぞれの回収率を算出した。

B-7. *in vitro* における NO₂Trp 生成の確認

BSA を 1.0 mM DTPA 含有 100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) に溶解して、最終濃度が 10 mg/mL となるように調整し、0 - 1000 μM の範囲の ONOO⁻ を添加した後、37°C、1 時間インキュベーションした。反応後、0.5 mL の 10% TCA を加え、4°C、14000 x g で 10 分間遠心分離し、沈殿に 2.0 mg/mL のプロテアーゼを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) 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% TCA を加え、4°C、14000 x g で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取して 0.45 μm PVDF フィルターを通し、測定用試料とした。

B-8. 動物試料及び飼育条件

5 週齢の B6C3F1 マウス雄各 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。動物の飼育はバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 ± 1°C、湿度 55 ± 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-9. 動物実験操作

6 週齢の雄 B6C3F1 マウス全 20 匹を対照群、APAP 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、APAP 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、試料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-10. 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

実験 1

C-1. 測定条件の最適化

C-1-1. 誘導体化反応の最適化

グリオキサール、フェニルグリオキサール、ヒドロキシフェニルグリオキサール及び MTNG の 4 種のグリオキサール化合物を用い、NO₂Gua に最適な誘導体化試薬を検討した。グリオキサール、フェニルグリオキサール及びヒドロキシフェニルグリオキサールでは NO₂Gua の極性の大きな改善は見られなかったが、MTNG では良好な改善が得られたことから、本法では MTNG を採用し、誘導体化反応の条件を検討した。その結果、DNA digestion buffer で調整した 100 μL の NO₂Gua 溶液に 10 μL の 2.5 M HCl を添加し、pH 調整を行い、40 μL の MTNG を添加後、室温で 1.5 時間インキュベーションした時、最大のシグナル強度を示した (Fig. 2)。さらに、安定性を検討するため、1.5 時間の誘導体化反応後、室温で保存した試料を 1 時間間隔で 10 時間測定を行った結果、常に一定のピーク面積 (> 95%) を示した。一方、誘導体化反応を 40°C で行った場合、誘導体化効率の低下が見られた。これらの結果から、2.5 M 塩酸による pH 調整および室温で 1.5 時間の反応を最適条件とし

た。

C-1-2. CS-LC-ESI-MS 測定の最適化

MS 測定におけるインターフェイスには ESI を用い、ネガティブイオンモードを採用した。MTNG 誘導体化した化学構造式と標準溶液の MS スペクトルを Figure 3 に示す。NO₂Gua-MTNG 及びサロゲート物質の [¹³C, ¹⁵N₂]-NO₂Gua-MTNG の脱プロトンイオン ([M-H]⁻) である *m/z* 391 及び 394 がそれぞれ最も強いシグナル強度を示したことから、モニタリングイオンをそれぞれ *m/z* 391 及び 394 と設定した。LC-ESI-MS 測定において、移動相および fragmentor voltage はその測定感度に大きな影響を及ぼす。これらの条件を誘導体化した NO₂Gua 標準品を用いて最適化した。

移動相の検討では、移動相中に含まれる酸及び塩濃度が MS におけるイオン化の度合いに大きく影響することから、本実験では、移動相に添加する酢酸アンモニウム濃度の検討を行った。酢酸アンモニウム濃度は 0 - 0.1% (v/v) の範囲で検討し、それぞれの濃度における NO₂Gua-MTNG のピーク強度を比較した結果、0.005% のとき最も強いピーク強度が得られた。

Fragmentor voltage は 100 から 180 V の範囲で検討した結果、150 V で最も強いピーク強度を示した。

これらの結果から移動相は 0.005% 酢酸アンモニウム/アセトニトリル混液、fragmentor voltage は 150 V を最適条件として、LC-ESI-MS による NO₂Gua-MTNG の検出を行った。

C-2. 分析法バリデーション

本分析条件における NO₂Gua の定量限界 (S/N = 10) はそれぞれ 3.0 nM で、検出下限値 (S/N = 3) は 1.0 nM であった。サロゲート物質を用いた検量線範囲は、3.0 nM から 500 nM の範囲で良好な直線性 (相関係数 0.999 以上) が得られた。また、NO₂Gua の平均保持時間は 20.18 (R.S.D. = 1.19, n = 5)、ピーク面積の R.S.D. はそれぞれ 0.68% であり、良好な感度及び再現性が得られた。

DNA 試料に 25 および 50 nM の NO₂Gua 標準品を添加した際の回収率 (value ± R.S.D.%, n = 5) は 99.4 ± 0.53% 及び 99.8 ± 0.94% であった。

これらの結果から、本法は、高感度かつ高精度な NO₂Gua の測定が可能であることを確認した。

C-3. ONOO⁻により引き起こされる DNA 損傷の評価

in vitro 実験系において DNA と ONOO⁻ を反応させ、DNA 中に生成する NO₂Gua 及び 8-OHdG を本評価法により測定した。

CS-LC-ESI-MS による NO₂Gua の測定及び LC-UV-ECD による dG 及び 8-OHdG の標準的なクロマトグラムを Figure 4 に示す。また、様々な濃度の ONOO⁻ を反応させた際の NO₂Gua 及び 8-OHdG 生成量を Figure 5 に示す。

対照群において、NO₂Gua は検出されなかったが、8-OHdG は 10.1 ± 2.15 mol/10⁵ mol dG で検出された。しかしながら、ONOO⁻ の濃度依存的に NO₂Gua 及び 8-OHdG の生成量は増加し、50 及び 100 μM の ONOO⁻ を添加した際には NO₂Gua は 22.9 ± 8.74 及び 30.1 ± 5.00 mol/10⁵ mol dG、8-OHdG は 23.7 ± 2.45 及び 31.5 ± 0.44 mol/10⁵ mol dG とほぼ