

Fig. 3 Effects of combined treatment with NaNO<sub>2</sub> and catechol on bacterial mutagenicity. TA100 and WP2uvrA/pKM101 were simultaneously treated with NaNO<sub>2</sub> and catechol.

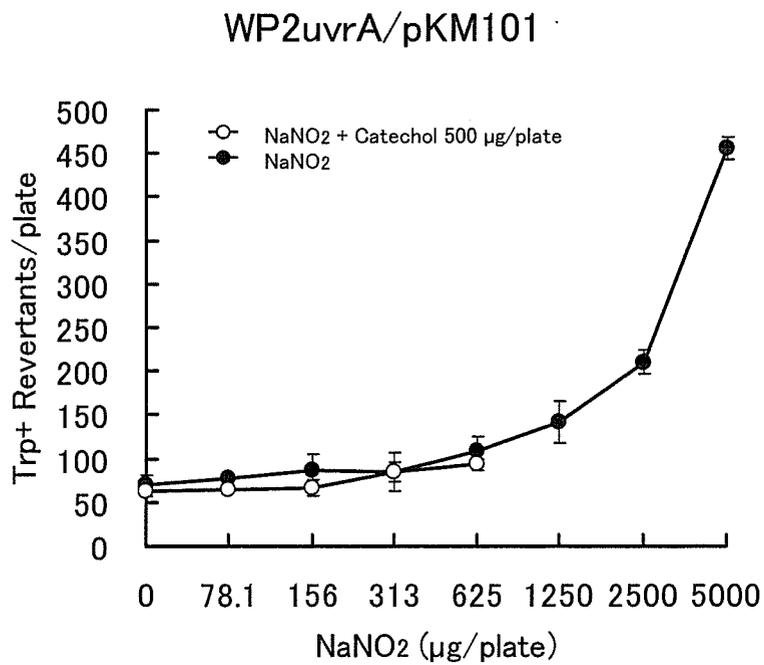
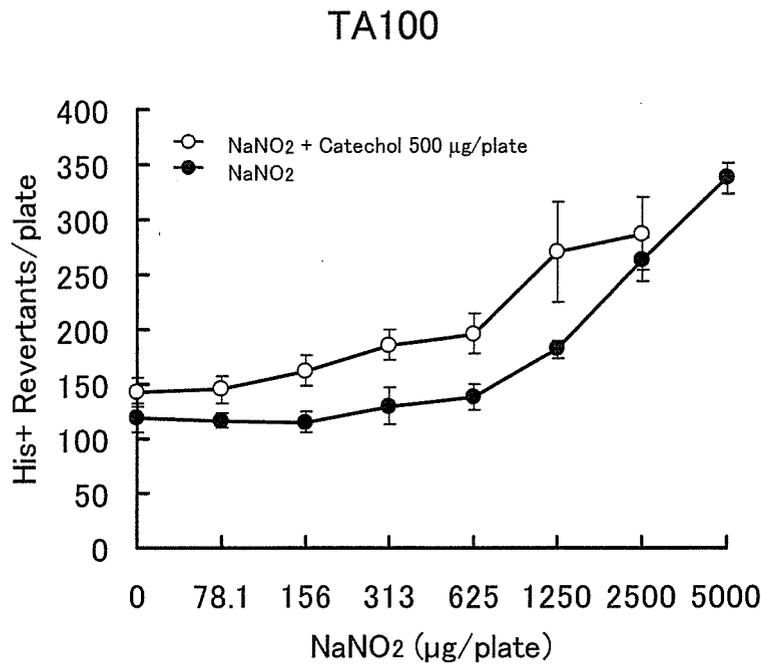


Fig. 4 Effects of combined treatment with NaNO<sub>2</sub> and catechol on bacterial mutagenicity. TA100 and WP2uvrA/pKM101 were simultaneously treated with NaNO<sub>2</sub> and catechol in pH 6.0 buffer.

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)  
総合研究報告書

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

近年、老化や種々の疾病の予防効果を有するとして抗酸化能を有する物質が注目されている。しかしながら、種々のフェノール性抗酸化物質と亜硝酸ナトリウムの併用投与はラット前胃発がんを促進することが報告されている。本研究では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煙草煙等に含まれるカテコールの併用投与によるラット前胃発がん促進機構の解明を *in vitro* および *in vivo* 試験系で行い、亜硝酸ナトリウムから酸性条件下において生成する一酸化窒素がカテコールを一電子酸化することを明らかにした。さらに、その過程で生成するラジカル種を検出し、ラット前胃発がん促進機構にこれらの活性酸素種および活性窒素種が関与することを明らかにした。また、*in vivo* における活性窒素種生成を明らかにするためにタンパク質中に生成されるニトロチロシンおよびニトロトリプトファンの高感度定量法を開発した。さらに、活性窒素種と発がんとの関わりを明らかにする目的で、DNA 中に生成するニトログアニンの高感度定量法を開発し、活性窒素種によって惹起される DNA 損傷の評価法を確立した。

A. 研究目的

近年、茶葉に含まれるカテキン類のように、植物等に含まれる抗酸化物質の作用が注目を集めている。活性酸素種 (ROS) は動脈硬化、心疾患、老化や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかになっており、ROS を消去する抗酸化物質の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。このような理由から、従来抗

酸化物質は安全であり、生物にとって有用なものであると信じられてきた。しかし、強力な抗酸化物質であり、酸化防止剤として使用されていた **butylated hydroxyanisole (BHA)** がラット前胃に扁平上皮癌を誘発することが報告された<sup>1)</sup>。その後の研究において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 ( $\text{NaNO}_2$ ) と種々のフェノール性抗酸化物質の併用投与によ

りラット前胃における発がんが促進される<sup>2,4)</sup>ことが明らかとなり、抗酸化剤の安全性についてさらなる詳細な研究が要求されている。

本研究では  $\text{NaNO}_2$  と煙草煙やコーヒーに含まれる抗酸化剤である catechol の併用投与によるラット前胃発がん促進機構について、酸性条件下にある胃内において  $\text{NaNO}_2$  から生成する一酸化窒素 (NO) に着目し、その機序の解明を行った。

また、これらの研究結果において、生体内における NO を始めとする活性窒素種 (RNS) の生成が発がん促進機構に関与することが示唆されたことから、生体内での RNS 生成を明らかにする手法として、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) によるタンパク質中のチロシン (Tyr) およびトリプトファン (Trp) のニトロ化物質の高感度定量法の構築を試みた。さらに、RNS と発がんとの関わりを明らかにする目的で、近年注目されている DNA 中ニトログアニン ( $\text{NO}_2\text{Gua}$ ) の高感度定量法を構築し、RNS が引き起こす DNA 損傷の評価法の構築を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. catechol, $\text{NaNO}_2$ 併用投与によるラット前胃発がん促進機構の解明

#### B-1-1. *in vitro* 実験

酸性条件下において  $\text{NaNO}_2$  から生成する NO を想定し、NO 発生剤である 1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminoethyl)-3-methyl-1-triazene (NOC-7) を用いて、catechol と NO の反応機構を検討した。

反応中で生成するラジカル種の検出には電子スピン共鳴 (ESR) 法を使用し、直接

またはスピントラッピング剤として 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) を用いた間接法により ROS の検出を行った。RNS の検出には dihydrorhodamine を用いて、蛍光光度法による測定を行った<sup>5,6)</sup>。

#### B-1-2. *in vivo* 実験

6週齢の雄 F344 ラットに 0.8% の catechol を混餌で、0.2% の  $\text{NaNO}_2$  を飲水で投与し、投与後 12, 24 時間、1 週および 2 週間後に屠殺し、前胃の病理組織学的検索および免疫組織化学的染色法によるニトロチロシン ( $\text{NO}_2\text{Tyr}$ )、*i*NOS の検出を行った。さらに、投与後 12 時間および 2 週間で採取した前胃粘膜組織を用い、液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (LC-ECD) による DNA 中 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 量を測定した<sup>7)</sup>。

## B-2. $\text{NO}_2\text{Tyr}$ 分析法の構築

サロゲートとして  $^{13}\text{C}_9\text{-Tyr}$  をニトロ化して得られた  $^{13}\text{C}_9\text{-NO}_2\text{Tyr}$  を用いた。測定装置には、Alliance HT model 2795 liquid chromatography system (Waters 社製) および Micromass Quattro Ultima mass spectrometry system (Micromass 社製) を、カラムには SHISEIDO 製 CAPCEL PAK C18 MG II (2.0 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) を用いた。移動相は溶離液 A: 0.01 % 酢酸と溶離液 B: アセトニトリルの混液を流速 0.2 mL/min で送液した。分析カラムを A/B=97/3 で安定させた後、グラジエントで Tyr および  $\text{NO}_2\text{Tyr}$  を溶出させた。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で検出を行い、モニタリングイオンとして Tyr は 182→136 *m/z*,  $\text{NO}_2\text{Tyr}$

は 227→181  $m/z$  を設定した。

構築した分析法の有用性を検討するため、5週齢の雄の B6C3F1 マウスに RNS 生成が知られる<sup>8-11)</sup>毒性量のアセトアミノフェン (APAP, 300 mg/kg) を腹腔内投与し、投与後 2, 4 および 8 時間後における肝組織中に生成する NO<sub>2</sub>Tyr の測定に本法を適用した。さらに、免疫組織化学的染色法による測定結果と比較した。

### B-3. ニトロトリプトファン (NO<sub>2</sub>Trp) 分析法の構築

分析用標準品およびサロゲートとして用いる安定同位体はそれぞれ Trp および <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Trp のニトロ化によって得た。装置には、Aliance HT model 2795 liquid chromatography system (Waters 社製) および Micromass Quattro Ultima mass spectrometry system (Micromass 社製) を、カラムには SHISEIDO 製 CAPCEL PAK C18 MG II (2.0 x 150 mm, 5 μm) を用いた。移動相は溶離液 A : 0.005 % 酢酸と溶離液 B : アセトニトリルの混液を流速 0.2 mL/min で送液した。分析カラムを A/B=90/10 で平衡化させ、グラジエントで Trp および NO<sub>2</sub>Trp 異性体を溶出させた。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で検出を行い、モニタリングイオンとして、Trp は 205→188  $m/z$ 、2-NO<sub>2</sub>Trp は 250→130  $m/z$ 、4-NO<sub>2</sub>Trp は 250→159  $m/z$ 、6-NO<sub>2</sub>Trp は 250→233  $m/z$  を設定した。

構築した分析法を用いて、NO<sub>2</sub>Tyr 同様、APAP 投与後のマウス肝組織中 NO<sub>2</sub>Trp の測定を行った。

### B-4. NO<sub>2</sub>Gua 分析法の構築

NO<sub>2</sub>Gua の測定には Agilent 社製 LC-MSD 1100series を使用した。NO<sub>2</sub>Gua は極性が高く、夾雑物質との分離を行うため、6-methoxy-2-naphthyl glyoxal (MTNG) による誘導体化を行い、NO<sub>2</sub>Gua の極性を低下させた。さらに、カラムスイッチングシステムを採用することでオンラインでの精製と濃縮を検討した。

イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法を採用しネガティブイオンモードで検出した。さらに、本分析法と従来から用いられている LC-UV-ECD による 8-OHdG 測定法を併用し、一つの DNA 試料から NO<sub>2</sub>Gua と 8-OHdG の 2 種の修飾塩基の測定を可能とする評価法の確立を試みた。

本評価法を、*in vitro* でペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) を反応させた仔牛胸腺 DNA 中に生成される 2 種の修飾塩基の測定に適用した。

### B-5. 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. catechol, NaNO<sub>2</sub> 併用投与によるラット前胃発がん促進機構の解明

#### C-1-1. *in vitro* 実験

ESR 法によるラジカル種の検出を行った結果、catechol は NO によって一電子酸化されセミキノンラジカルを生成することを確認した。また、DMPO を用いた測定では、本反応系においてヒドロキシラジカル (·OH) が生成することを確認した。さらに、

DHRによるRNSの測定ではONOO<sup>-</sup>の生成が示唆されたことから、catecholとNOの反応はFig.1に示すようなラジカル反応を引き起こすことが示唆された。

### C-1-2. *in vivo* 実験

0.2% NaNO<sub>2</sub>と0.8% catecholを併用投与後12時間と2週間のラット前胃粘膜DNAの8-OHdG値をFig.2に示す。8-OHdG値はどちらの時間においても併用投与群において対照群に比べ有意な上昇がみられた。Table 1には0.2% NaNO<sub>2</sub>と0.8% catecholを投与後2週間までのラット前胃の病理組織学的検索の結果を示す。併用投与群は、投与開始12時間後で中程度の粘膜下織への細胞浸潤および浮腫が観察された(Fig. 3-a)。24時間では表皮の過形成が、1週および2週では潰瘍およびびらん性病変と炎症性細胞の浸潤が認められた(Fig. 3-b)。一方、他の群においては変化が認められなかった(Fig. 3-c, d)。さらに免疫組織化学的染色法によるNO<sub>2</sub>Tyrの検出では、併用投与群においてのみ、投与後4時間から粘膜上皮にNO<sub>2</sub>Tyr陽性細胞の存在が認められた(Fig. 4)。一方、iNOSは併用投与群の2週目においてわずかに認められた程度であった(Fig. 5)。

### C-2. NO<sub>2</sub>Tyr分析法の構築

移動相の酢酸濃度のピーク強度に及ぼす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。本条件で標準品を測定した結果、TyrおよびNO<sub>2</sub>Tyr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

NO<sub>2</sub>Tyr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0.1~50 μMで、NO<sub>2</sub>Tyrは0.5~1000 nMの範囲で良好な直線性(相関係数0.999以上)が得られた。

マウス肝臓からの抽出液にTyr標準溶液25, 50 μM NO<sub>2</sub>Tyr標準溶液100または200 nMを添加し、添加回試験を行った結果、TyrおよびNO<sub>2</sub>Tyrの各濃度において92%以上の良好な回収率が得られた。

APAP 300 mg/kgを投与したマウス肝組織中のTyrおよびNO<sub>2</sub>Tyrの測定を行った結果をTable 2に示す。Tyr, NO<sub>2</sub>Tyr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APAPの投与後4時間で最大値となった。実試料のクロマトグラムをFig. 6に示す。

免疫組織化学的染色法によるNO<sub>2</sub>Tyrの検出では、対照群では小葉中心性にNO<sub>2</sub>Tyr陽性細胞がわずかに観察された。一方、APAP投与群では、投与後2時間で小葉中心性のNO<sub>2</sub>Tyr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色された(Fig. 7)。

### C-3. NO<sub>2</sub>Trp分析法の構築

NO<sub>2</sub>Trpの分析用標準品を合成した結果、2-, 4-および6-NO<sub>2</sub>Trpが得られた。これらの3種の異性体の同時分析法を構築するため、安定同位体についても同様に<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-2, 4および6-NO<sub>2</sub>Trpを合成した。

移動相は酢酸0.005%を最適とした。本条件におけるTrp, 2-, 4-および6-NO<sub>2</sub>Trpの定量限界(S/N=10)はそれぞれ4.0, 3.0,

10 および 4.0 nM で、検出下限値 (S/N = 3) は 1.2, 1.0, 3.5 および 1.2 nM であった。また、サロゲート物質を用いた検量線範囲は、全ての物質において定量限界値から 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。Trp, 2-, 4- および 6-NO<sub>2</sub>Trp それぞれの平均保持時間は 7.27 (R.S.D. = 0.49%, n = 5), 9.15 (R.S.D. = 0.39%, n = 5), 14.97 分 (R.S.D. = 0.59%, n = 5) および 12.94 (R.S.D. = 0.34%, n = 5) であった。さらに、ピーク面積の R.S.D. はそれぞれ 2.4, 2.0, 1.4 および 1.7% であり、良好な感度および再現性が得られた。

マウス肝組織におけるタンパク質の消化液を用いて添加回収試験を行った結果、ブランク値は Trp が 85.4 ± 0.2 nM で NO<sub>2</sub>Trp は全ての異性体において検出限界以下であった。Trp, 2-, 4- および 6-NO<sub>2</sub>Trp それぞれの標準溶液の添加濃度を低濃度は 250, 25, 50 および 25 nM とし、高濃度は 500, 100, 200 および 100 nM とし回収率を算出した結果、すべてにおいて 96~103% の範囲であり、良好な回収率が得られた。

本法を用いて APAP を投与したマウス肝組織におけるタンパク質中 NO<sub>2</sub>Trp の測定を行った結果、対象群においては、NO<sub>2</sub>Trp 異性体はすべて検出限界以下であったが、APAP 投与後 8 時間では 4- および 6-NO<sub>2</sub>Trp を検出した。対象群、APAP 投与後 2, 4 および 8 時間後における 2-, 4- および 6-NO<sub>2</sub>Trp の測定結果を Table 3 に示す。2-NO<sub>2</sub>Trp はすべての試料において検出限界以下であったが、4- および 6-NO<sub>2</sub>Trp は APAP 投与群においてそれぞれ 9.03-12.60 および 26.9-32.7 μmol/mol of Trp の範囲で検出された。さらに、6-NO<sub>2</sub>Trp は APAP 投

与後 8 時間群においてすべての試料から検出された。実試料のクロマトグラムを Fig. 8 に示す。

#### C-4. NO<sub>2</sub>Gua 分析法の構築

MTNG による NO<sub>2</sub>Gua の誘導体化は、100 μL の NO<sub>2</sub>Gua 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するという簡便な操作で最適な誘導体化条件が得られた。さらに、誘導体の安定性は室温で 10 時間後においても、常に一定のピーク面積 (> 95%) を示した。

測定条件を種々検討した結果、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 NO<sub>2</sub>Gua-MTNG の検出を行った。

本分析条件における NO<sub>2</sub>Gua 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 ~ 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、NO<sub>2</sub>Gua 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、良好な感度および再現性が得られた。

DNA 試料に 25 および 50 nM の NO<sub>2</sub>Gua 標準品を添加した際の回収率 (value ± R.S.D.%, n = 5) は 99.4 ± 0.53% および 99.8 ± 0.94% であった。

*in vitro* 実験系において DNA と ONOO<sup>-</sup> を反応させ、DNA 中に生成する NO<sub>2</sub>Gua および 8-OHdG を本評価法により測定した結果を Fig. 9 に示す。対照群において、NO<sub>2</sub>Gua は検出されなかったが、8-OHdG

は  $10.1 \pm 2.15 \text{ mol}/10^5 \text{ mol dG}$  で検出された。しかしながら、ONOO<sup>-</sup>の濃度依存的に NO<sub>2</sub>Gua および 8-OHdG の生成量は増加し、50 および 100 μM の ONOO<sup>-</sup> を添加した際には NO<sub>2</sub>Gua は  $22.9 \pm 8.74$  および  $30.1 \pm 5.00 \text{ mol}/10^5 \text{ mol dG}$ 、8-OHdG は  $23.7 \pm 2.45$  および  $31.5 \pm 0.44 \text{ mol}/10^5 \text{ mol dG}$  とほぼ同程度の生成が認められた。実試料のクロマトグラムを Fig. 10 に示す。

## D. 考察

### D-1. catechol, NaNO<sub>2</sub> 併用投与によるラット前胃発がん促進機構の解明

*in vitro* の実験系では、catechol と NO の反応により・OH、セミキノラジカルおよび ONOO<sup>-</sup> が生成することを確認したことから、Fig. 1 に示すような反応機構を提唱した。さらに、*in vivo* では NaNO<sub>2</sub>、catechol 単独投与群において、ラット前胃粘膜 DNA 中の 8-OHdG 値および病理組織に変化は見られなかったのに対し、併用投与群では大きな変化が見られた。併用投与開始 2 週目における病理組織では潰瘍およびびらん性病変の周囲に炎症性細胞の浸潤が観察された。このことから 2 週目における 8-OHdG 値の異常な上昇はこれらの細胞によって誘導される ROS に起因する可能性も考えられた。しかし、投与開始 12 時間において、組織障害に先立って 8-OHdG 値の上昇が見られたことは、併用群における組織障害は catechol と NaNO<sub>2</sub> の反応により生じる酸化的ストレスが関与しているものと考えられる。さらに、免疫組織化学的染色法において iNOS は併用投与後 2 週目にわずかに観察される程度であったのに対し、粘膜上皮における NO<sub>2</sub>Tyr 陽性細胞は併用投与後 12

時間から観察された。これらの結果は我々の示した *in vitro* の結果を強く支持するものと考えられる。

本実験結果から catechol、NaNO<sub>2</sub> 併用投与によりラット前胃において Fig. 5 に示す反応が生じ、生成する ONOO<sup>-</sup> によって DNA の酸化的損傷および種々の病変が生じたと考えられる。

### D-2. NO<sub>2</sub>Tyr 分析法の構築

構築した分析法を用いて、APAP 投与によって生成するマウス肝組織中の NO<sub>2</sub>Tyr を検出した結果、その値は投与後 4 時間で最大となり、8 時間では低下が見られた。一方、免疫化学的染色法による検出結果においても、4 時間で最大となり、8 時間では過度の炎症により細胞の壊死が生じていることを確認した。このことから、本分析法による測定結果は、これらの病変を反映するものであり、優れた評価法であることを確認した。

### D-3. NO<sub>2</sub>Trp 分析法の構築

構築した分析法を NO<sub>2</sub>Tyr 分析法と同様に APAP を投与したマウス肝組織中の NO<sub>2</sub>Trp 測定に適用した結果、APAP 投与群において 4-および 6-NO<sub>2</sub>Trp が検出された。しかしながら、その生成量は極微量であることから、生体内活性窒素種生成の指標としては NO<sub>2</sub>Tyr の方が有用であると考えられた。しかしながら、近年、NO<sub>2</sub>Trp の生理作用についての報告がなされていることから、これらの機構解明に有用であると考えられる。

### D-4. RNS による DNA 損傷評価法の構築

本評価法を *in vitro* において ONOO<sup>-</sup> を反応させた仔牛胸腺 DNA 中の修飾塩基の測定へ適用した結果、高濃度の ONOO<sup>-</sup> を反応させた時、8-OHdG と NO<sub>2</sub>Gua がほぼ同程度で生成することを確認した。このことから、活性窒素種によって引き起こされる DNA 損傷を評価するにはニトロ化と酸化の両方を評価する必要があることを確認した。本分析法は一つの DNA 試料からこれら二つの修飾塩基量を評価することが可能な、極めて有用な手段であり、今後 *in vivo* 試料への適用も期待される。

#### E. 結論

本研究では、抗酸化物質 catechol と NaNO<sub>2</sub> の併用投与によるラット前胃発がん促進機構の解明を行い、胃内酸性条件下において NaNO<sub>2</sub> から産生する NO が引き起こす catechol の酸化反応と、その過程で生成する ROS および RNS が関与することを明らかにした。すでに ROS 生成は、種々の発がん機構への関与することが知られている。一方、RNS についても発がん機構に関与が疑われており、本研究結果はそれを示唆するものであった。これらのことから、生体内の RNS 生成の評価法が必要と考え、NO<sub>2</sub>Tyr および NO<sub>2</sub>Trp 分析法を構築した結果、*in vivo* 試料中の測定も可能な分析法を構築した。これらの分析法は、生体内 RNS の評価法としてだけでなく、RNS が関与するさまざまな生理機能の解明に有用であると考えられる。また、DNA 損傷の評価法についても、RNS と発がんとの直接的な関わりを解明するのに極めて有用な手段になると考えられる。

本研究で明らかとなった catechol と NO

の反応による ROS および RNS の生成と、それによる *in vivo* における組織障害は極めて重要であり、抗酸化物質の安全性についてさらに研究を進めていく必要がある。また、RNS と発がんとの関わりを解明するにあたり、構築した 3 種のニトロ化分子の検出法は極めて有用な手段になると考えられる。

#### F. 研究発表

##### F-1. 学会発表

- 1) 石井雄二, 梅村隆志, 西川秋佳, 神吉けい太, 黒岩有一, 中澤裕之, 広瀬雅雄. カテコール, 亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット前胃発癌機構の解明. 第 21 回 日本毒性病理学会 (2004 年 1 月・静岡)
- 2) 石井雄二, 岡野圭太, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之. フェノール性化合物と NO の反応による酸化的 DNA 損傷機構. フィジカルファーマフォーラム 2005 (2005 年 3 月・静岡)
- 3) 石井雄二, 梅村隆志, 西川秋佳, 神吉けい太, 黒岩有一, 中澤裕之, 広瀬雅雄. アセトアミノフェン誘発マウス肝障害におけるカテコールの増強効果. 第 125 年会 日本薬学会 (2005 年 3 月・東京)
- 4) Yuji Ishii, Rie Ito, Koichi Inoue, Koichi Saito and Hiroyuki Nakazawa. The novel free radical trapping reagent for determination of specific nitric oxide by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. PITTCON 2005 (2005 年 3 月・Orland)
- 5) 石井雄二, 大柄敦資, 梅村隆志, 西川

秋佳, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, 活性窒素種によるDNA損傷評価法の構築. 第28回日本フリーラジカル学会学集会 (2006年5月・三重)

- 6) Yuji Ishii, Atsushi Ogara, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa, Masao Hirose, Hiroyuki Nakazawa, Estimation of oxidative DNA damage induced by reactive nitrogen species 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006年6月・Kyoto)
- 7) 石井雄二, 梅村隆志, 岡野圭太, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 西川秋佳, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, カテコール亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット前胃発がん機構の解明. 日本食品化学学会 第12回 総会・学術大会 (2006年6月・名古屋)
- 8) 石井雄二, 大柄敦資, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 梅村隆志, 西川秋佳, 斉藤貢一, 広瀬雅雄, 中澤裕之, 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による生体中ニトロトリプトファンの高感度分析法. 第50回日本薬学会関東支部大会 (2006年10月・新潟)

#### F-2. 発表論文

- 1) Ishii Y., Umemura T., Kanki K., Kuroiwa Y., Nisikawa 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., Nisikawa 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.*, 41, 1325-1331 (2006)
- 3) Ishii Y., Ogara A., Okamura T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43, 1737-1743 (2007)
- 4) Ishii Y., Ogara A., Katsumata T., Umemura T., Nishikawa A., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Hirose M., Nakazawa H.: Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissues by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 150-159 (2007)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 【参考文献】

- 1) Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T.: Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats, *J Natl Cancer Inst.*, 70(2), 343-352 (1983)
- 2) Kawabe M., Takaba K., Yoshida Y., Hirose M.: Effects of combined treatment with phenolic compounds and sodium nitrite on two-stage carcinogenesis and cell proliferation in the rat stomach, *Jpn. J. Cancer. Res.*, 85, 17-25 (1994)
- 3) Hirose M., Kurata Y., Tsuda H., Fukushima S., and Ito N.: Catechol strongly enhances rat stomach carcinogenesis: a possible new environmental stomach carcinogen, *Jpn. J. Cancer. Res.*, 78, 1144-1149 (1987)
- 4) Hirose M., Tanaka H., Takahashi S., Futakuchi M., Fukushima S., and Ito N.: Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in combination in a rat multiorgan carcinogenesis model, *Cancer Res.*, 53, 32-37 (1993)
- 5) Neil W. K., James A. R., Harry I., Joseph S. B.: Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free radic. Biol. Med.*, 16, 149-156 (1994)
- 6) Benoit P., Andre M. C., Suzanne K. B., Sophie B., Rosalie L., Jean-Paul J. G.: In vitro generation of peroxynitrite by 2- and 4-hydroxyestrogens in the presence of nitric oxide, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 547-554 (2001)
- 7) Nakae D., Mizumoto Y., Kobayashi E., Noguchi O., Konishi Y.: Improved genomic / nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amount of rat liver tissue, *Cancer Lett.*, 97, 233-239 (1995)
- 8) Boiteux S., Radicella J.P., Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie.* 8, 159-167 (1999)
- 9) Audebert M., Radicella J.P., Dizdaroglu M., Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res.* 28, 2672-2678 (2000)
- 10) Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P., Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 349, 431-434 (1991)
- 11) Hinson J.A., Pike S.L., Pumford N.R., Mayeux P.R., Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 604-607 (1998)

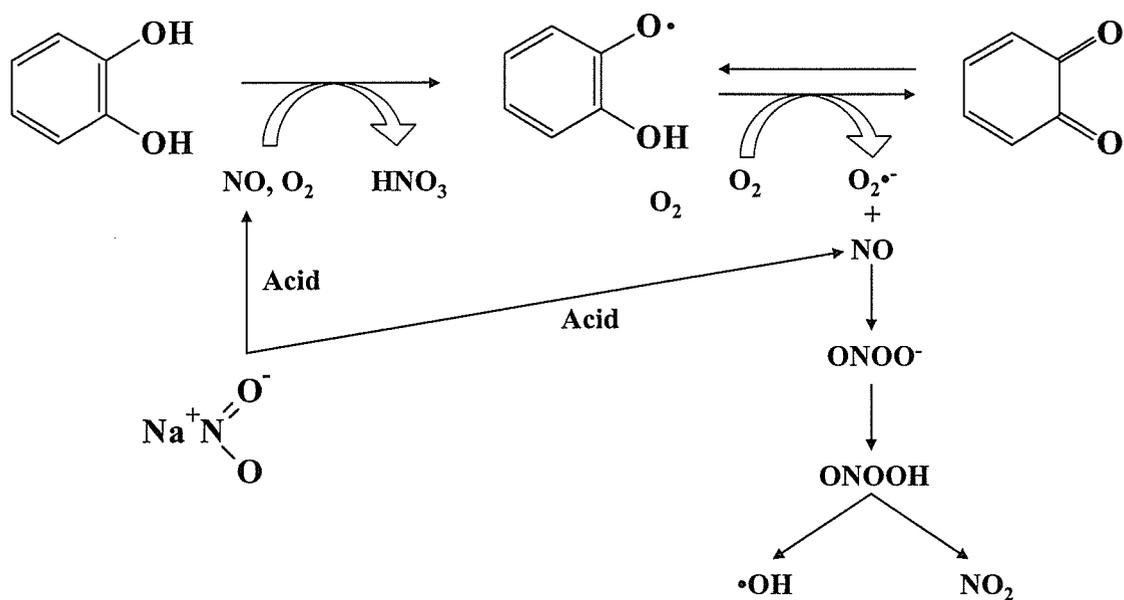


Fig. 1 Proposed pathways from the reaction of catechol with  $\text{NaNO}_2$  to generating  $\cdot\text{OH}$  by way of  $\text{ONOO}^-$ .

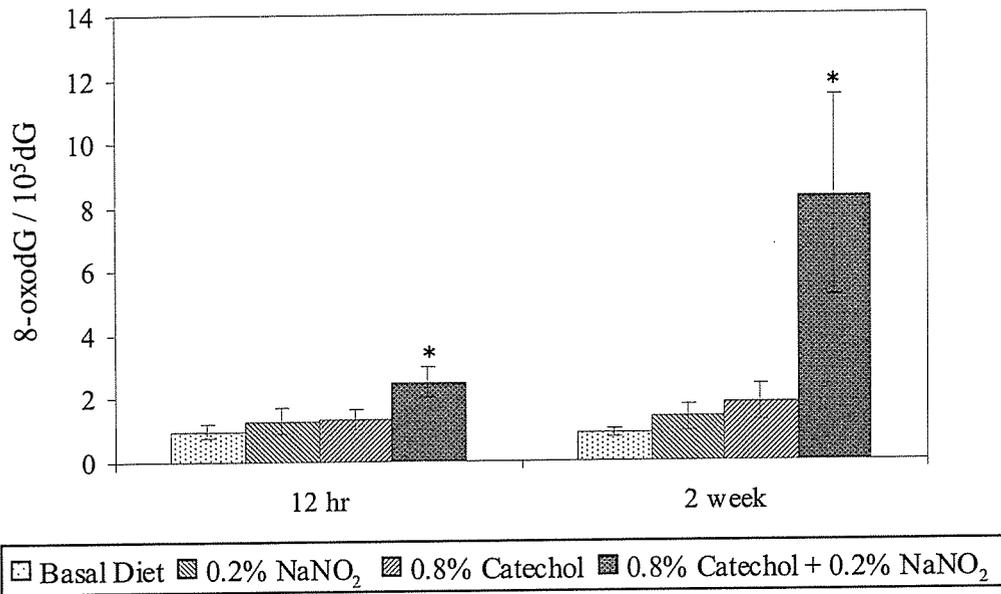


Fig. 2 Changes of 8-oxodG levels in forestomach epithelium of rats given 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water, 0.8% catechol in the diet, or 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hr and 2 weeks. Values are means  $\pm$  SD of data for 5 samples collected from a total of 15 rats. \*: Significantly different (P<0.01) from the control group.

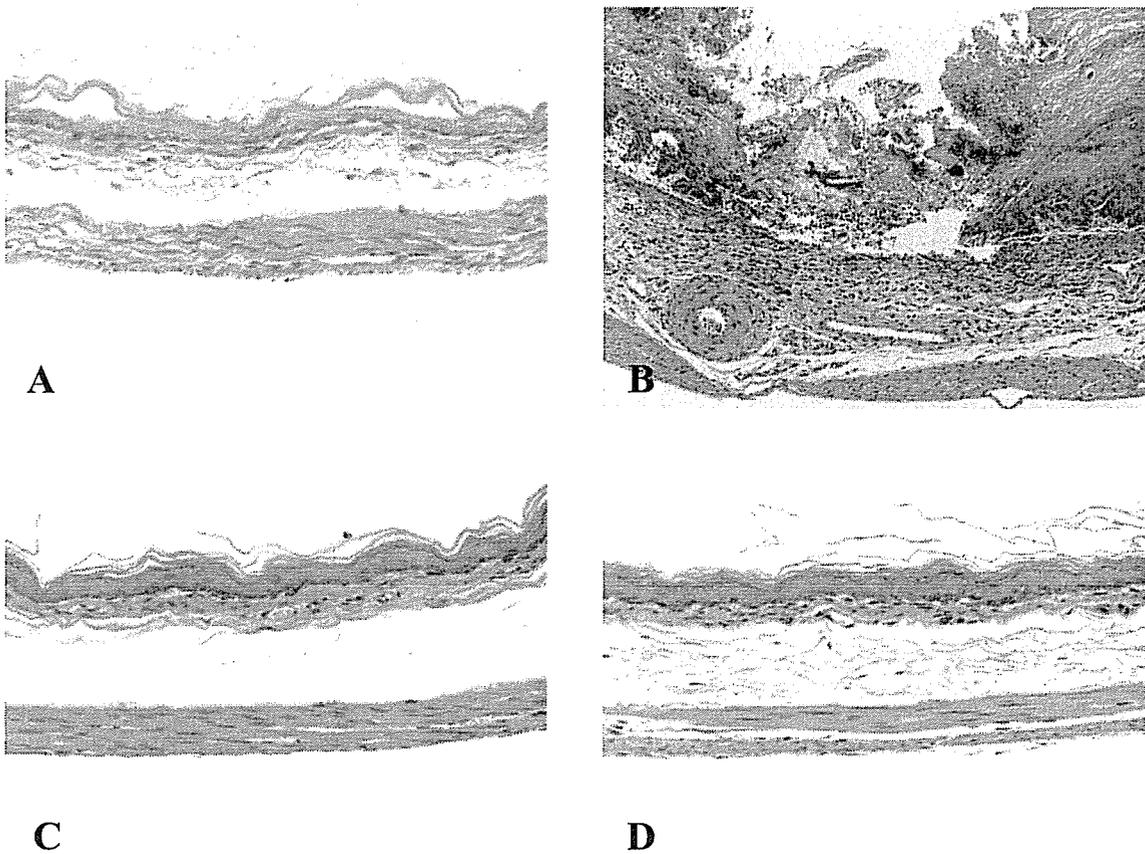


Fig. 3 Forestomach of a male rat co-treated with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hr (A) or 2 weeks (B). (C) Forestomach of a male rat treated with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water for 2 weeks. (D) Forestomach of a male rat treated with 0.8% catechol in the diet for 2 weeks.

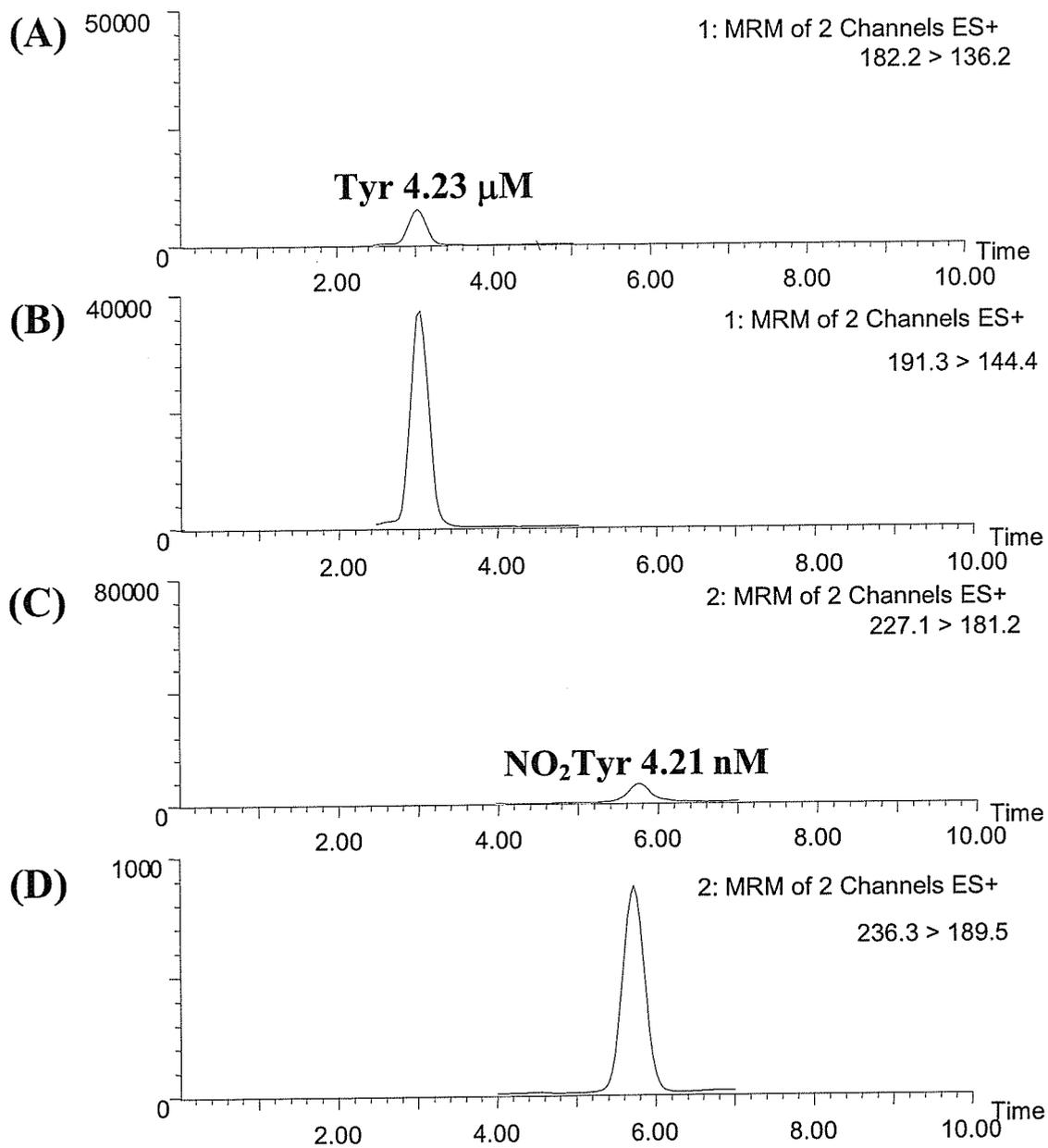


Fig. 4 MRM chromatograms of a mouse liver protein sample containing Tyr (A), 5  $\mu$ M [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]-Tyr (B), NO<sub>2</sub>Tyr (C) and 5 nM [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]-NO<sub>2</sub>Tyr (D).

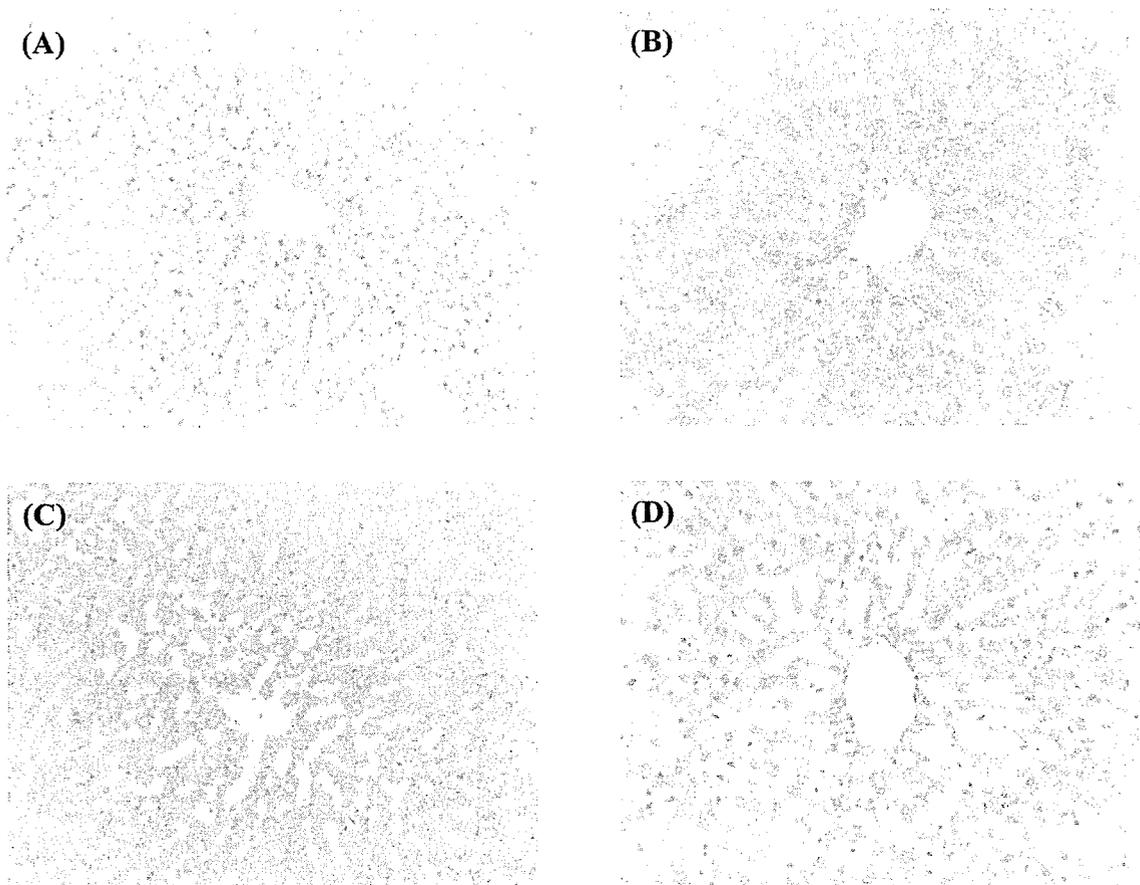


Fig. 5 Immunohistochemical staining of liver sections for NO<sub>2</sub>Tyr protein adducts in controls and 2, 4 and 8 hr after 300 mg/kg of APAP.

(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,  $\times 360$ .

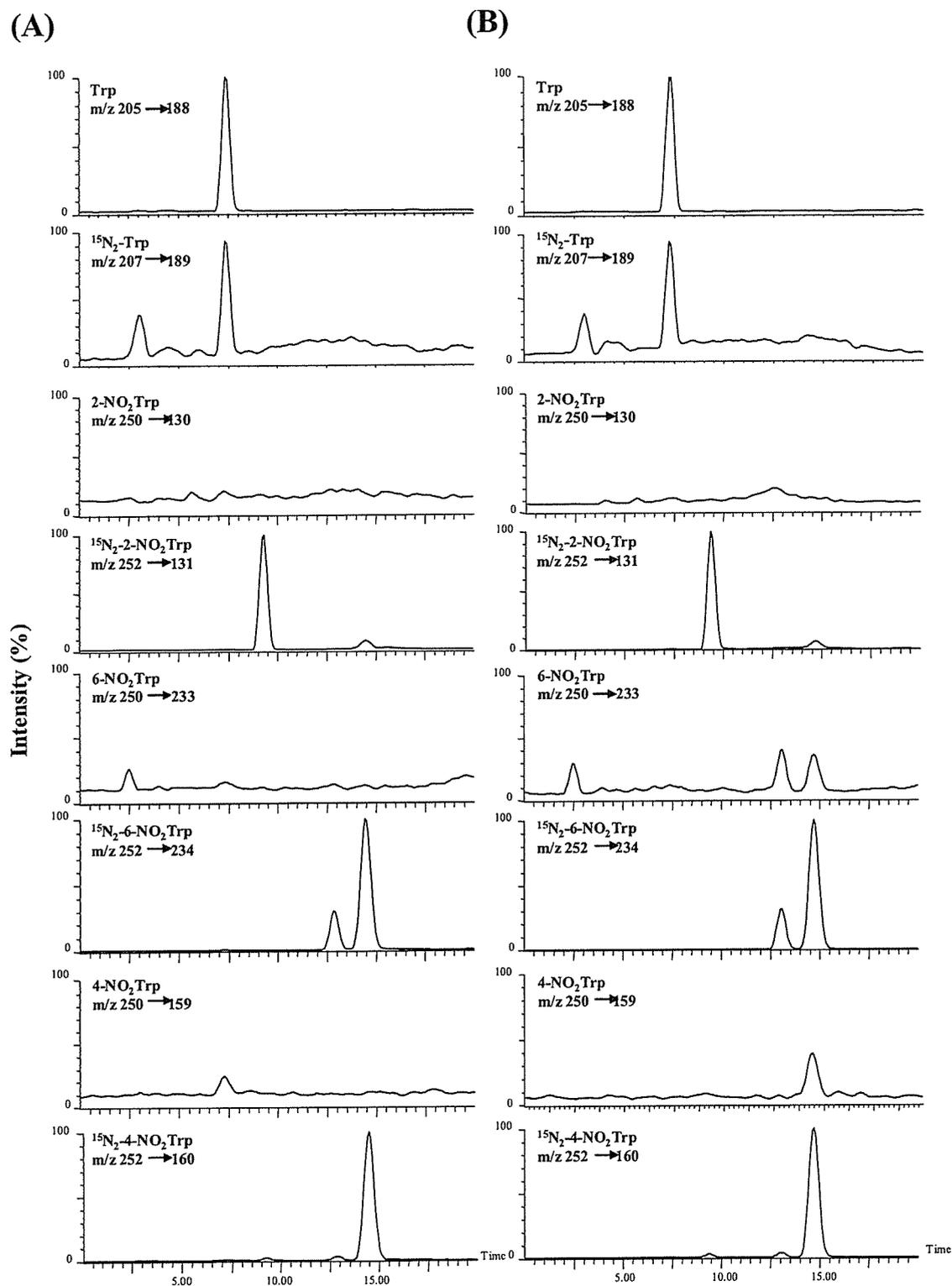


Fig. 6 MRM chromatograms of the mouse livers protein sample containing surrogate standards. (A) Liver from a saline treated mouse. (B) Liver from mouse administrated 300 mg/kg APAP for 8 hr after treatment.

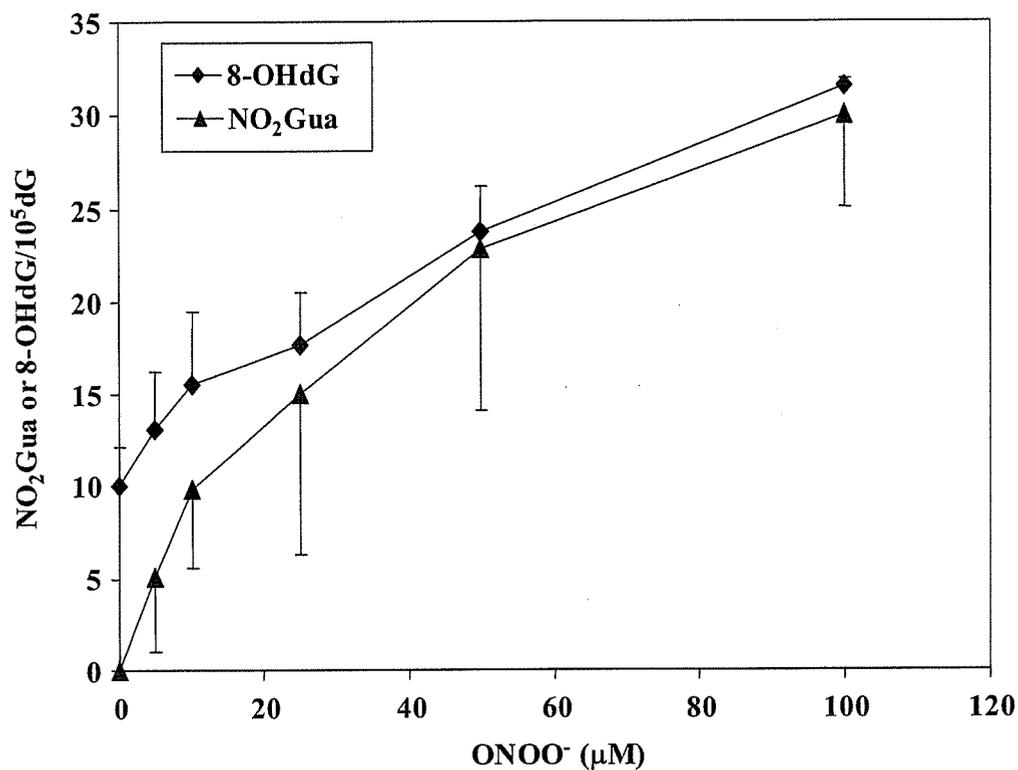


Fig. 7 NO<sub>2</sub>Gua and 8-OHdG formation in calf thymus DNA treated with ONOO<sup>-</sup>. Calf thymus DNA (250 μg/ml) dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with ONOO<sup>-</sup> at several concentrations for 60 min at 37°C. After DNA digestion, 50 μl portion of the sample was subjected to HPLC-UV-ECD for 8-OHdG and dG analysis. One hundred microliter portion of the sample was subjected to CS-LC-ESI/MS after MTNG derivatization for NO<sub>2</sub>Gua analysis. The amount of NO<sub>2</sub>Gua and 8-OHdG was calculated as NO<sub>2</sub>Gua/10<sup>5</sup>dG and 8-OHdG/10<sup>5</sup>dG, respectively. Values are means ± S.D. of three separate experiments.

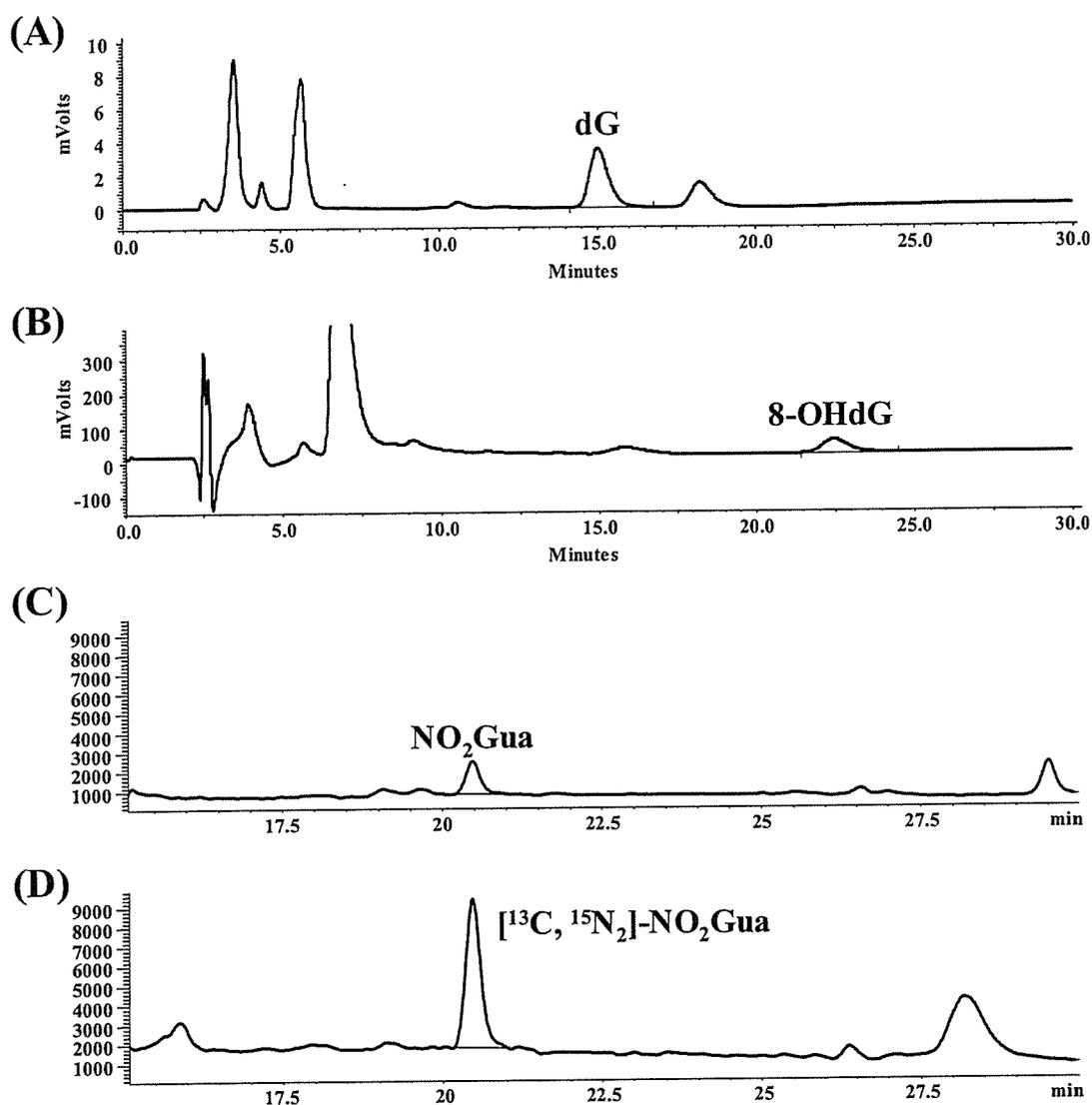


Fig. 8 LC-UV-ECD and CS-LC-ESI/MS chromatograms of calf thymus DNA treated with ONOO<sup>-</sup>. (A) UV (290 nm) chromatogram of dG. (B) ECD (300 mV) chromatogram of 8-OHdG. (C) CS-LC-ESI/MS (SIM 391) chromatogram of NO<sub>2</sub>Gua. (D) CS-LC-ESI/MS (SIM 394) chromatogram of [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-NO<sub>2</sub>Gua as a surrogate standard. Calf thymus DNA (250 μg/ml) dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with ONOO<sup>-</sup> at several concentrations for 60 min at 37°C.

**Table 1 Effect of NaNO<sub>2</sub> and catechol on histopathological findings of the rat forstomach after the treatment.**

Group time	Cont. <sup>a</sup>	0.2% NaNO <sub>2</sub> <sup>b</sup>				0.8% Catechol <sup>f</sup>				0.8% Catechol + 0.2% NaNO <sub>2</sub> <sup>d</sup>			
		12hr	24hr	1w	2w	12hr	24hr	1w	2w	12hr	24hr	1w	2w
site/lesion													
Epithelium													
hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	++	++
erosion/ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
with inflammatory cell infiltration													
Submucosa													
edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	++	±
cell infiltration	-	-	±	-	-	-	±	±	-	±	+	++	±
fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

--: no observed, ±: mild, +: moderate, ++: severe

<sup>a</sup>Basal diet

<sup>b</sup>0.2% NaNO<sub>2</sub> in drinking water

<sup>c</sup>0.8% Catechol in diet

<sup>d</sup>0.8% Catechol in diet and 0.2 % NaNO<sub>2</sub> in drinking water