

**活性窒素種が誘起する生体内酸化および
ニトロ化分子の検出に関する研究**

2006

石井雄二

目次

緒言	1
第1章 カテコール、亜硝酸ナトリウム併用投与が誘発するラット前胃 発がん促進過程における一酸化窒素を介した酸化ストレス機構の解明	
第1節 序論	6
第2節 実験の部	7
第3節 結果および考察	11
第4節 小括	21
第2章 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるタンパク質中 ニトロチロシンの高感度分析法の構築と組織試料への応用	
第1節 序論	23
第2節 実験の部	23
第3節 結果および考察	27
第4節 小括	33
第3章 活性窒素種により引き起こされる DNA 損傷の評価法の構築	
第1節 序論	35
第2節 実験の部	36
第3節 結果および考察	40
第4節 小括	46
第4章 総括	48
謝辞	51
参考文献	52

略語一覧

APAP	Acetaminophen	アセトアミノフェン
BSA	Bovine serum albumin	牛血清アルブミン
CAT	Catalase	カタラーゼ
CS	Column switching system	カラムスイッチングシステム
dG	Deoxyguanosine	デオキシグアノシン
DHR	Dihydrorhodamine	ジヒドロローダミン
DMF	<i>N, N'</i> -dimethylformamide	<i>N, N'</i> -ジメチルホルムアミド
DMPO	5, 5-dimethyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide	5, 5-ジメチル-1-ピロリン- <i>N</i> -オキシド
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルフォキシド
DNA	Deoxylibonucleic acid	デオキシリボ核酸
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid	ジエチレントリアミン五酢酸
ECD	Electro chemical detector	電気化学検出器
ESI	Electro spray ionization	エレクトロスプレーイオン化法
ESR	Electron spin resonance	電子スピン共鳴法
GC	Gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	過酸化水素
LC	Liquid chromatography	液体クロマトグラフィー
LOD	Limit of detection	検出限界
LOQ	Limit of quantification	定量限界
MPO	Myeloperoxidase	ミエロペルオキシダーゼ
MRM	Multiple reaction monitoring	マルチプルリアクションモニタリング
MS	Mass spectrometry	質量分析法
MS/MS	Tandem mass spectrometry	タンデム質量分析法
MTNG	6-methoxy-2-naphthyl glyoxal	6-メトキシ-2-ナフチルグリオキサール

NaNO ₂	Sodium nitrite	亜硝酸ナトリウム
NO	Nitric oxide	一酸化窒素
·NO ₂	Nitrogen dioxide	二酸化窒素ラジカル
NO ₂ Gua	8-Nitroguanine	8-ニトログアニン
NOC-7	1-Hydroxy-2-oxo-3-(<i>N</i> -methoxy-3-aminoethyl)-3,4,5-triazene	
NOS	Nitric oxide synthetase	一酸化窒素合成酵素
NO ₂ Trp	Nitrotryptophan	ニトロトリプトファン
NO ₂ Tyr	3-Nitrotyrosine	ニトロチロシン
·O ₂ ⁻	Superoxide	スーパーオキシド
OGG1	8-Oxoguanine DNA-glycosylase	8-オキソグアニングリコシラーゼ
·OH	Hydroxyl radical	ハイドロキシラジカル
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosine	8-ハイドロキシデオキシグアノシン
ONOO ⁻	Peroxynitrite	ペルオキシナイトライト
PDA	Photo diode array	フォトダイオードアレイ
PVDF	Polyvinylidene difluoride	ポリフッ化ビニリデン
RHO	Rhodamine 123	ローダミン 123
ROS	Reactive oxygen species	活性酸素種
RNS	Reactive nitrogen species	活性窒素種
SIM	Selected ion monitoring	選択イオンモニタリング
SOD	Superoxidedismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
SRM	Selected reaction monitoring	セレクトッドリアクションモニタリング
TCA	Trichloroacetic acid	トリクロロ酢酸
Tyr	Tyrosine	チロシン
Trp	Tryptophan	トリプトファン
UV	Ultraviolet absorption spectrophotometer	紫外吸光光度検出器

論文リスト

第 1 章

Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite.

Y. Ishii, T. Umemura, K. Kanki, Y. Kuroiwa, A. Nishikawa, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa and M. Hirose, *Arch. Biochem. Biophys.* **447** (2006) 127-136.

第 2 章

Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen

Y. Ishii, M. Iijima, T. Umemura, A. Nishikawa, Y. Iwasaki, R. Ito, K. Saito, M. Hirose and H. Nakazawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1325-1331.

第 3 章

Development of quantitative analysis of 8-nitroguanine concomitant with 8-hydroxydeoxyguanosine formation by liquid chromatography with mass spectrometry and glyoxal derivatization

Y. Ishii, A. Ogara, T. Umemura, A. Nishikawa, Y. Iwasaki, R. Ito, K. Saito, M. Hirose, and H. Nakazawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (in press)

緒言

生体は常に多くの酸化ストレスを受ける状態にある。酸化ストレスとは生体の内因性あるいは外因性的の原因により生じる活性酸素種(ROS)を生体が処理しきれなくなることによって生じる。我々が呼吸によって得る酸素のおよそ 95%以上は還元され最終的には水となるが、残りの数%はミトコンドリアやミクロソームの電子伝達系などにより、完全には還元されていない ROS となる。この ROS にはスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2^-$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)、一重項酸素やペルオキシラジカルなどがあり、生成したこれら ROS は通常、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)やグルタチオンペルオキシダーゼといった抗酸化酵素や、抗酸化物質とよばれるグルタチオンやチオレドキシンなどの低分子化合物などによって消去される。しかしながら、何らかの要因により、これらの抗酸化系によって ROS を消去しきれなくなった状態を酸化ストレス状態と呼び、過剰な ROS により組織障害や細胞死が生じ、動脈硬化、脳虚血、炎症性疾患やがんといった種々の疾病を引き起こす。中でも ROS によって引き起こされるデオキシリボ核酸(DNA)の損傷は、ROS のなかで最も反応性の高い $\cdot\text{OH}$ が核内で生成することによって引き起こされる。DNA が酸化されると塩基配列中のデオキシグアノシン(dG)の C-8 位やデオキシアデノシンの C-2 位が酸化され、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)や 2-ヒドロキシアデニン^{1, 2)}が生成されることが知られている。特に 8-OHdG は 1983 年に Kasai らによってその存在が明らかにされ³⁾、早くから高速液体クロマトグラフィー-紫外吸光光度検出-電気化学検出器(LC-UV-ECD)による分析法が確立された⁴⁻⁶⁾ことから、その生物学的機能や、様々な発がん機構との関連が明らかとなっている。すなわち、DNA の塩基配列中に生成した 8-OHdG は通常 8-オキシグアニングリコシラーゼ(OGG1)などの修復酵素により修復される^{7, 8)}が、異常な ROS の生成により塩基配列中に残った 8-OHdG は GC:TA トランスバージョンに結びつく変異原性を示し^{9, 10)}、近年ではさまざまな発がん組織において、その生成が報告されている。さらに、近年では尿や血液中の 8-OHdG を測定することで、DNA の酸化的損傷や生体内酸化ストレスの程度の指標としても用いられている¹¹⁻¹⁴⁾。

一方、近年 ROS と同様、一酸化窒素(NO)を代表とする活性窒素種(RNS)についてもその生体内の挙動が注目されている。1980 年 Furchgott らにより、アセチル

コリンによる血管の弛緩作用が、内皮細胞から遊離する弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor : EDRF)による可能性が報告され¹⁵⁾、更に 85~87 年にかけて、Palmer、Ignarro、Murad らにより、ほぼ同時に、EDRF が NO であることが報告された¹⁶⁻¹⁸⁾。NO は窒素原子と酸素原子が 1 原子ずつ結合してできた無機ラジカル分子であり、生体内では NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) の働きにより、L-アルギニンを酸化的に分解して生成される。NOS には 3 つのアイソザイムが存在し、恒常的に発現している内皮型 NOS (eNOS)、神経型 NOS (nNOS)、細菌のリポポリサッカライドや炎症性サイトカインで発現が誘導される誘導型 NOS (iNOS) が知られている。また、生体内で生成した NO は、当初の血管平滑筋弛緩作用にとどまらず、脳での学習や記憶、免疫系での抗腫瘍作用や抗菌作用、抗血小板作用などの生理的反応への関与¹⁹⁻²³⁾、また、虚血や炎症性の組織傷害、高血圧、動脈硬化、エンドトキシンショック等の病態生理への関与についても報告されている²⁴⁻²⁷⁾。さらに、NO は内因性だけでなく、外因性の化学物質によっても生成される。すなわち、狭心症や勃起不全の治療薬として広く知られているニトログリセリンやシルデナフィルは体内で NO を放出することで薬効を示す。また、食肉等の発色剤として広く用いられる食品添加物である亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) は酸性条件下において NO を放出する^{28, 29)}ことから、経口的に摂取すると胃内において NO が生成すると報告されている³⁰⁻³²⁾。さらにアスコルビン酸のような還元物質との反応によっても NO を生成する³³⁾ことから、これらの同時摂取により生体内で NO が生成する。

更に、NO は共存する ROS や金属と反応し、より反応性に富む RNS へと変換される。NO と $\cdot\text{O}_2^-$ は、SOD による $\cdot\text{O}_2^-$ の消去反応よりも 3~4 倍早く反応し、ペルオキシナイトライト (ONOO^-) が生成する³⁴⁾。 ONOO^- は最終的に強力なニトロ化剤である NO_2 と、強力な酸化剤である $\cdot\text{OH}$ を生成することから、生体内で生成すると核酸³⁵⁻³⁷⁾、タンパク質³⁸⁻⁴¹⁾、脂質⁴²⁻⁴⁴⁾などと反応し、生体分子を酸化あるいはニトロ化することで生体分子の構造を変化させ、その機能を低下させる。ニトロ化された生体分子の代表的なものとして、タンパク質ではニトロチロシン (NO_2Tyr) およびニトロトリプトファン (NO_2Trp)、核酸では 8-ニトログアニン (NO_2Gua)、ニトロキサンチン、脂質では 9-ニトロリノレン酸、11-ニトロリノレン酸、5-ニトロ- γ -トコフェロールなどが同定されている。

生体内における主なニトロ反応メカニズムは前述した NO と $\cdot\text{O}_2^-$ の反応によって生成する ONOO $^-$ による経路、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)による亜硝酸イオン(NO_2^-)の酸化反応による経路、および NO の自動酸化による経路が報告されている。これらの反応からはいずれも最終的に二酸化窒素ラジカル($\cdot\text{NO}_2$)が生成され、この $\cdot\text{NO}_2$ が生体分子と直接反応してニトロ化物となる。これらの反応により生成された物質は種々の炎症疾患においてその存在が確認されている。炎症時に誘導される iNOS からは、通常の 1,000 倍近い NO が産生され、同時にマクロファージから多量の $\cdot\text{O}_2^-$ が生成することから、その主なニトロ化経路は ONOO $^-$ に起因すると思われる。さらにこれらのニトロ化物質の生成は、アルツハイマー病などの神経変性疾患、前癌病変・癌組織などで顕著に高まっており、それら組織において $\cdot\text{NO}_2$ を始めとする RNS の産生機構が亢進していることが示唆される。

タンパク質中の NO_2Tyr については、免疫化学染色法や、LC やガスクロマトグラフィー(GC)などの機器分析による定量法が開発されていることから、その生理的機能についても明らかになっている。すなわち、タンパク質やペプチドのチロシン(Tyr)がニトロ化されると、チロシinkinase によるリン酸化が起こらなくなることから、リン酸化シグナルに対して抑制的に作用することなどが報告されている⁴⁵⁾。一方、遊離の NO_2Tyr は細胞内に取り込まれた後、微小管の構成タンパクである α -チューブリンに付加される。この NO_2Tyr はカルボキシペプチダーゼでは除去されず、 NO_2Tyr が付加した α -チューブリンが蓄積し、微小管は不安定となり、上皮細胞の物質透過に対するバリア機能を低下させることが明らかとなっている⁴⁶⁾。これらの NO_2Tyr の作用は、その生成が亢進する炎症性疾患などにおける病態発現に関与すると考えられている。

一方、Tyr 同様タンパク質を構成する芳香族アミノ酸であるトリプトファン(Trp)のニトロ化物質である NO_2Trp は、抗酸化酵素であるヒト-Cu, Zn-SOD が ONOO $^-$ や MPO/ NO_2^- によってニトロ化されると SOD 中に生成し、その酵素活性が低下することが報告されている⁴⁷⁾。しかしながら、その存在は *in vitro* において確認されているだけで、*in vivo*での生成は未だ報告されていない。さらに、その検出方法についても、抗 NO_2Trp 抗体による検出法が報告されているだけで⁴⁸⁾、定量法についての報告はなく、 NO_2Tyr のように、更なる生理的機能を明らかにするためにも、その検出法の開発が望まれている。

また、核酸中のニトロ化物質である NO₂Gua は、近年、種々の感染性の炎症性疾患においてその存在が報告されている⁴⁹⁾。DNA 中に生成した NO₂Gua は非常に不安定で、脱塩基することで脱塩基領域を形成することが知られており⁵⁰⁾、この脱塩基領域は結果として 8-OHdG と同様 GC:TA トランスバージョンを引き起こす。さらに、炎症性疾患におけるニトロ化の主要因である ONOO⁻ は強力なニトロ化剤であると同時に酸化剤でもあることから、DNA 中には変異原性を有する 8-OHdG も同時に生成すると考えられ、これら二種の修飾塩基は炎症から発がんへの機構に関与する重要な因子として注目されている。事実、免疫化学染色法により、種々の炎症性疾患において、8-OHdG と NO₂Gua が同時に検出されている。しかしながら、8-OHdG のように DNA 中に生成した NO₂Gua を定量可能な感度と精度を備えた分析法は未だ開発されていない。

8-OHdG や NO₂Tyr の例からも明らかなように、優れた分析法の構築は、これら修飾物質の新たな生理的機能の解明につながる。*in vivo* 実験において広く用いられている免疫化学染色法は簡便かつ網羅的な検索が可能であり、これらニトロ化合物の生成部位の特定も可能であることから、非常に優れた手段である。しかしながら、その定量性の低さから極微量の変化を捉えることは困難である。一方、近年の目覚ましい分析機器の発展は、簡便な前処理で高感度な測定を可能にしている。中でも、LC や GC の検出器としての質量分析計 (MS) は、測定対象物質の安定同位体をサロゲート物質として用いることで、複雑なマトリックス中においても選択的かつ高精度な測定が可能である。これらの分析機器を RNS により生成するニトロ化物質の測定に適用することで、生体内における極微量の変化を捉えることが可能であり、種々の傷害や疾病への関与の解明につながる。また、極めて反応性の高い RNS は、*in vivo* で直接測定することは困難だが、前述したようなニトロ化合物を定量することで、間接的ではあるが RNS の生成量を評価することが可能であり、生体内における RNS 生成のバイオマーカーとしても有用である。

本論文では、RNS により修飾された生体分子の検出法を用いた、RNS の発がん促進機構への関与の解明と、RNS によって生成するニトロ化および酸化物質の高精度な評価法の構築について記載する。

第 1 章では、電子スピン共鳴法 (ESR) 等を用い、カテコールと NO の反応により生成する ROS、RNS の検出を行い、*in vivo* において RNS によって修飾された生体

分子の検出を行うことで、カテコールと NO の反応が NaNO_2 と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に關与することを証明した。

第 2 章では、タンパク質中 NO_2Tyr のより簡便で高感度かつ高精度な測定法の構築を目的として、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による測定法を構築した。さらに、本法を組織試料へ適用するため、酵素処理による前処理方法を構築し、RNS 生成が知られる肝障害モデルとしてアセトアミノフェン (APAP) を投与したマウス肝組織において、 NO_2Tyr の高感度かつ高精度な検出を達成した。

第 3 章では、炎症を介した発がんに關与すると考えられている、RNS による DNA 損傷の評価法の構築を目的として、液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) による NO_2Gua の分析法を開発した。さらに、8-OHdG 測定法での DNA 前処理法を採用し、LC-UV-ECD による dG および 8-OHdG の測定法を併用することで、一つの DNA 試料から RNS によって生じる DNA の酸化とニトロ化の二つの修飾塩基の評価法を確立した。

第1章 カテコール、亜硝酸ナトリウム併用投与が誘発するラット前胃発がん促進過程における一酸化窒素を介した酸化ストレス機構の解明

第1節 序論

NaNO_2 はハムやソーセージなど食肉の発色剤として広く用いられている⁵¹⁾ほか、野菜や水などから摂取した硝酸イオンが口腔内の微生物により NO_2^- へ還元される⁵²⁾ことが知られていることから、ヒトが日常的に摂取する化合物である。 NO_2^- は魚肉などに含まれる第2級アミンと反応して、強力な発がん物質であるニトロソアミンを生成する⁵³⁾ことが知られているが、それ自体では反復毒性試験および発がん性試験において毒性は認められていない。

一方、カテコールは抗酸化能を有することから酸化防止剤として使われているほか、煙草の煙やコーヒーなどに含まれていることが知られている⁵⁴⁾。そのため、ヒトはこれら二つの物質を同時に摂取する可能性が考えられる。

カテコールと NaNO_2 の併用投与によるラット前胃の発がんは 1990 年 Hirose らによって報告されており⁵⁵⁾、これら併用投与後 4 週間で前胃粘膜に明らかな上皮細胞の過形成および乳頭腫瘍が生じる⁵⁶⁾。また、前胃発がんのイニシエーターである *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine による 2 段階発がんモデルでは、その明らかな増強が観察されている^{57, 58)}。さらに、カテコールだけでなく、抗酸化物質として知られている種々のフェノール性化合物と NaNO_2 の併用投与により、カテコールと同様に前胃発がんが生じることが知られている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。

前胃はヒトには存在しない齧歯類に特異的な臓器であるが、ヒトが日常的に同時に摂取していると考えられる NaNO_2 とカテコールの併用が発がんを促進することは明らかで、その根本的な発がん機構を明らかにする必要がある。また、種々のフェノール性化合物で同様の現象が報告されていることから、本機構の解明は、 NaNO_2 と他のフェノール性化合物との複合反応機構の解明にもつながる。

NaNO_2 は酸性条件下において NO を生成することが知られている^{28,29)}。すなわち、経口的に摂取された NO_2^- は胃内において多量の NO を生成すると考えられる。近年、 NO は RNS の一つとして注目されており、特に好気性条件下において様々なラジカル反応を引き起こし、強力な細胞傷害性を持つ ONOO^- を生成する⁶¹⁻⁶⁴⁾ことから、種々の疾病や発がんなどにも関与すると考えられている。

一方、カテコールは抗酸化能だけでなく、NO を消去する^{65, 66)}ことが知られていることからカテコールと NO は何らかの形で反応し、種々のラジカル種が生成すると考えられる。つまり、NaNO₂ とカテコールを同時に摂取したラットの胃内において、NO とカテコールによるラジカル反応が生じ、その過程で生成するラジカル種が発がんの促進に関与していることが疑われる。

本研究では、ラット前胃発癌機構における NaNO₂ とカテコールの反応メカニズムの解明を目的とし、*in vitro* 実験系では、ESR を用いて NO とカテコールの反応により生じるラジカル種を検出することで、ラジカル反応機構の解明を行った。*in vivo* 実験系では、雄 6 週令の F344 ラットに NaNO₂ とカテコールを併用投与し、*in vitro* の実験結果から生じると考えられた、DNA の酸化的損傷の指標である 8-OHdG の測定、RNS 生成の指標である NO₂Tyr の免疫化学染色法による検出および病理組織学的検索を行った。

第 2 節 実験の部

2-1. 材料及び試薬

NaNO₂、カテコールは和光純薬工業社製(特級)を用いた。ESR による ROS の検出にはスピントラッピング剤として 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) (同仁化学研究所社製)を使用した。ONOO⁻の測定に用いたジヒドロローダミン (DHR)、ローダミン 123 (RHO)、アルカリホスファターゼ、CAT、SOD 及びジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)は Sigma Chemical 社製を用いた。また *in vitro* の全ての実験において NO 発生剤には 1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminoethyl)-3-methyl-1-triazene (NOC-7)を使用した。DNA の抽出に用いたヌクレアーゼ P1 はヤマサ醤油社製を使用し、抗 NO₂Tyr (rabbit polyclonal IgG) 及び抗 iNOS (rabbit PAb) は Transduction 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。

2-2. *in vitro* 実験

2-2-1. ESR 測定条件

Instrument: JEOL 社製 JES-RE1X

Magnetic field:	335.0 ± 5 mT
Power:	9.0 mW
Frequency:	9.456 GHz
Modulation width:	0.063 mT
Gain:	500
Sweep width:	5.0 mT
Sweep time:	0.5 min
Time constant:	0.03 sec.
Temp.:	room temp.

2-2-2. カテコールと NO の反応確認

カテコールに 1.0 mM DTPA を含む 100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) と NO 発生剤である 0.1 mM NOC-7 を加え、カテコールの最終濃度を 0.1 mM とし、室温でインキュベーションした後、60 分まで 15 分間隔でその吸収スペクトルを測定した。紫外可視吸光光度計は SHIMADZU 社製 UV-1600PC を用いた。

2-2-3. セミキノラジカルの検出

カテコールのセミキノラジカルは水中よりも *N,N'*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中で比較的安定であることから、セミキノラジカルの測定には、500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) と DMF の混液を用いた。

100 μ L の 0.1 M カテコールを 1.0 mM DTPA を含む 500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に加え、500 μ L の *N,N'*-ジメチルホルムアミド (DMF) 及び 50 μ L の 10 mM NOC-7 を加えて混合した。この試料を ESR 測定用 200 μ L 扁平石英セルに移し、1 分後に ESR 測定を行った。セミキノラジカルは、塩基性条件下においても生成することが知られている⁶⁷⁾ことから、NOC-7 の溶媒である 10 mM 水酸化ナトリウムとカテコールについて及び対照群として NOC-7 単独についても測定した。また、全ての実験は室温で行った。

2-2-4. カテコールと NO の反応により生成するラジカルの検出と抗酸化酵素の影響

スピントラッピング剤に DMPO を用い、ESR により ROS を検出した。100 μ L の

1.0 mM カテコールを 1.0 mM DTPA 含有の 100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) に添加した後、5 μ L DMPO と 100 μ L の 1.0 mM NOC-7 を加えて混合した。この試料を ESR 測定用 200 μ L 扁平石英セルに移し、1 分後から 60 分まで 10 分間隔で ESR 測定を行った。ラジカル種の生成経路を調べるため、抗酸化酵素の添加による ESR スペクトルの変化を観察した。上述した反応系に 10,000 units/mL CAT および 1,000 units/mL SOD をそれぞれ単独および併用で加えた試料の測定を行った。シグナル高さは標準物質である Mn^{2+} との比で算出した。また全ての実験は室温で行った。

2-2-5. ONOO⁻の測定

ONOO⁻の測定は Kooy ら⁶⁸⁾及び Benoit ら⁶⁹⁾の方法を参考にし、ONOO⁻の生成は RHO の生成量として測定した。DMF に溶解した DHR (28.9 mM) は使用まで -20°C で保存した。1.0 mM DTPA、3.0 mM DHR、100 μ M カテコール及び 0.1 mM NOC-7 を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に加え反応溶液とした。ONOO⁻生成量はインキュベーションの後、マイクロプレートリーダー (Model 550、Bio Rad 社製) を用い、10 分間隔で 60 分まで 490 nm の吸光度測定を行った。検量線は RHO を用いて作成した。また、 $\cdot OH$ の消去剤であるマンニトール (1.0 mM) を添加したものも測定し、NOC-7 のみを添加したものを対照とした。また、測定は全て室温で行った。

2-3. *in vivo* 実験

2-3-1. 動物試料および飼育条件

5 週齢の雄性 F344 ラット 168 匹を日本 SLC 社より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、各群 42 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 $24 \pm 1^{\circ}C$ 、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 匹又は 3 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス社製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。

2-3-2. 動物実験操作

6 週齢の雄性 F344 ラット全 168 匹を対照群、 $NaNO_2$ 飲水投与群、カテコール混餌投与群及び $NaNO_2$ 、カテコール併用投与群の計 4 群に配した。飼料にはオリエン

タル MF 粉末(オリエンタル酵母社製)を用い、カテコール投与群にはカテコールを 0.8%混じて投与した。NaNO₂ 投与群には NaNO₂を 0.2%水道水に混じて投与した。投与は 24 時間の絶食後開始し、投与後 12、24 時間、1 週及び 2 週間後に屠殺し、各群及び時間で 3 匹ずつを病理組織学的検索に用いた。採取した前胃は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。8-OHdG 測定用のサンプル採取は投与後 12 時間及び 2 週間で行い、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℃ で保存した。前胃粘膜は非常に微量であることから、3 匹分を 1 サンプルとして各群及び時間で 5 サンプルずつ採取した。

2-3-3. 8-OHdG 測定

前胃粘膜 DNA 中の 8-OHdG の測定は Nakae ら⁶⁾、Kasai ら⁷⁰⁾および Helbock ら⁷¹⁾の方法を参考にした。DNA は DNA エクストラクター WB キット(和光純薬工業社製)を用いて抽出し、ヌクレアーゼ P1 とアルカリホスファターゼにより消化した。試料は LC-UV-ECD により測定を行った。LC ポンプは Gynkoteck 480(Gynkoteck 社製)を、カラムは ULTRASPHERE ODS (4.6 x 250 mm, 5 µm, BECKMAN COULTER 社製)UV は GILSON 118(GILSON 社製)、ECD は Coulochem II(ESA 社製)を使用した。移動相には 10 mM リン酸一ナトリウム塩/メタノール混液(96:4)を流速 1.0 mL/min を送液し、分析カラムで分離した後 dG を UV 290 nm で、8-OHdG を ECD 300 mV で検出した。8-OHdG 値は 8-OHdG / 10⁵dG 量として算出した。

2-3-4. 免疫化学染色法による NO₂Tyr および iNOS の検出

組織切片は 0.6% H₂O₂ 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 1.0% ヤギ血清を含むリン酸塩緩衝液(pH 7.4)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、1.0 mg/mL の抗 NO₂Tyr(rabbit polyclonal IgG)または抗 iNOS(rabbit PAb)を含む 1.0% 牛血清アルブミン(BSA)を加え、4℃ 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。

2-3-5. 統計学的処理法

8-OHdG 値については Student's *t* 検定及び Welch's *t* 検定を用い、対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

2-4. 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。

第3節 結果および考察

3-1. *in vitro* 実験

3-1-1. カテコールと NO の反応確認

NaNO₂ の摂取により酸性条件下であるラット胃内において多量の NO が生成すると考えられる。*in vitro* 実験系では、カテコールと NO の純粋な反応系を再現するために、NaNO₂ ではなく NO 発生剤である NOC-7 を用いて、NO とカテコールのラジカル反応について検討した。

NO とカテコールの反応性を検討するため、カテコールと NOC-7 による反応溶液の吸収スペクトルの経時変化を紫外可視吸光光度計により測定した。Figure 1 に示すように、1 分で見られたカテコールの 250 nm 付近の極大吸収は経時的に減少し、60 分では 370 nm 付近に新たな吸収が見られた。このことから、カテコールは NO により酸化を受け、高波長側に吸収を持つキノン体へ変化していると考えられる⁷²⁾。

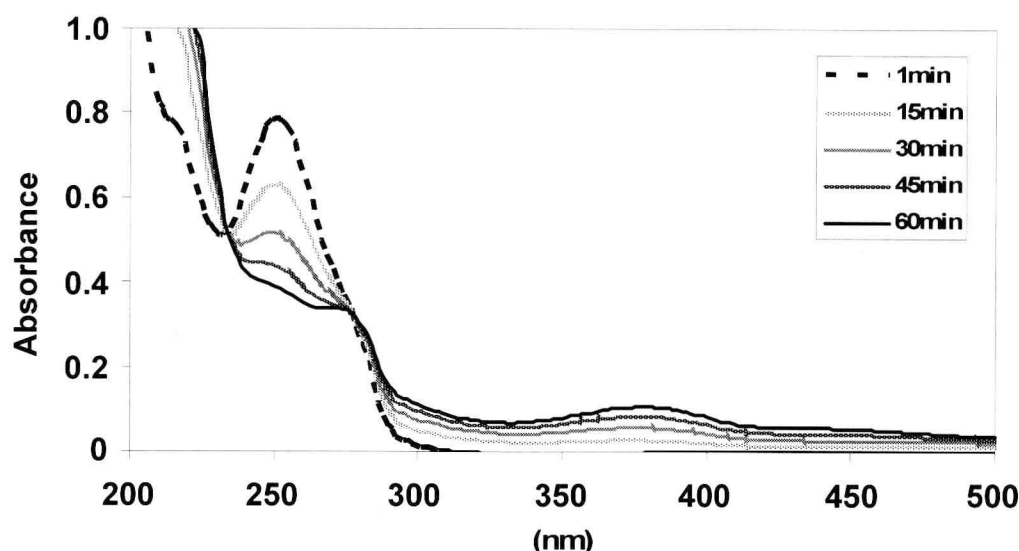


Fig. 1 Changes in absorption spectra of 0.1 mM catechol incubated with 0.1 mM NOC-7 for up to 1 hr at room temperature in 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7.4.

3-1-2. セミキノラジカルの検出

ESR の直接測定法によりカテコールからキノンへの酸化の反応中間体であるセミキノラジカルの検出を試みた。カテコールと NOC-7 を加え混和後 1 分間反応させた後、ESR 測定を行ったところ、Figure 2-A に示すように、カテコールと NO の反応溶液ではカテコールのセミキノラジカルの特異的な ESR スペクトルが見られた²⁵⁾。このことから NO はカテコールを一電子酸化し、セミキノラジカルを生成することが明らかとなった。また、NOC-7 の溶媒である 10 mM 水酸化ナトリウムとカテコールの反応において、わずかにセミキノンと思われるスペクトルが見られた (Fig. 2-B)。これは他のフェノール性化合物が塩基性条件下においてセミキノンが生成することが知られていることから、それに起因すると考えられる。NOC-7 およびカテコール単独でスペクトルは観察されなかった (Fig. 2-C, D)。

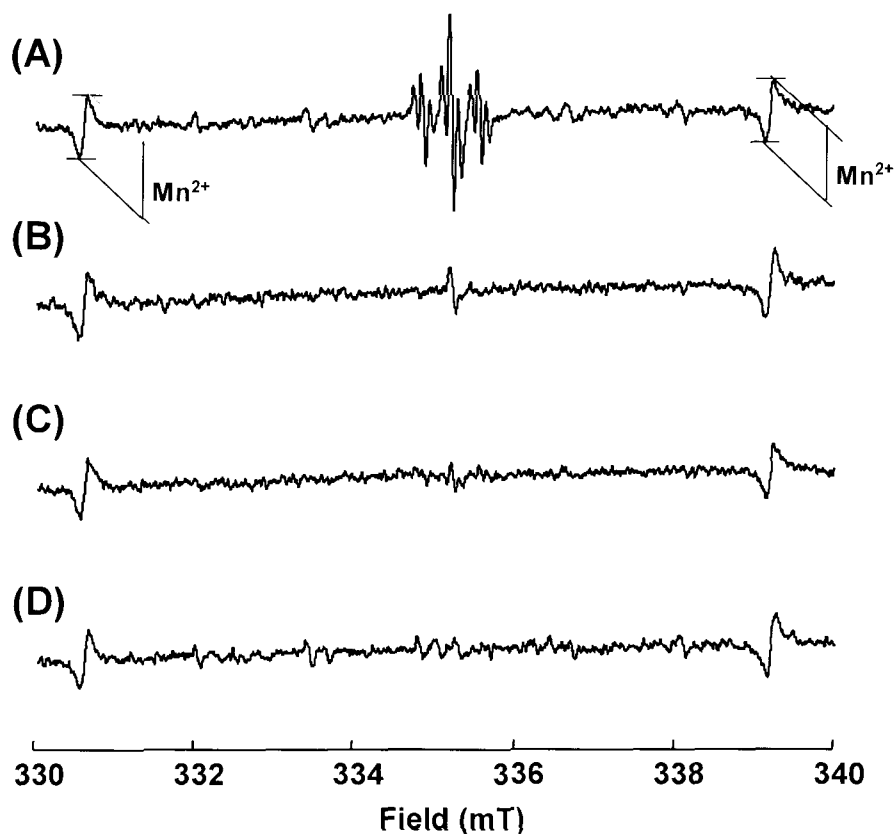


Fig. 2 ESR spectra of semiquinone radicals. Semiquinone radical was generated by the oxidation of 10 mM catechol by 1.0 mM NOC-7 (A). ESR spectra of 10 mM catechol/10 mM NaOH (B), 10 mM Catechol alone (C) and 1.0 mM NOC-7 alone as a control (D) were measured. These reagents were incubated for 1min at room temperature in the mixture of 1 mM DTPA containing 500 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and DMF. Values presented are means \pm SD of five separate experiments.

3-1-3. ラジカル種の検出と抗酸化系酵素の影響

NOによる一電子酸化で生成するセミキノラジカルは極めて不安定であり、キノン体へと酸化される過程において酸素から $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ といったROSを生成する。そこで、スピントラッピング剤としてDMPOを用い、ESRによるROSの検出を行った。 H_2O_2 /水酸化ナトリウム/ジメチルスルフォキシド(DMSO)システムによるDMPOと $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、メチルラジカルによるESRスペクトルをFigure 3-Aに示す⁷³⁾。カテコール、DMPOおよびNOC-7を混合し、10分間のインキュベーションの後、ESR測定を行った結果、Figure 3-Bに示すようにDMPO- $\cdot\text{OH}$ アダクトのスペクトルが観察された。さらに、 $\cdot\text{OH}$ の生成機序を調べるため、抗酸化酵素であるSOD、CATの添

加による ESR スペクトルの変化を測定した。Figure 4 に示すように、 H_2O_2 を代謝する CAT では $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ アダクトのシグナル強度に変化は見られず、 $\cdot\text{O}_2^-$ を H_2O_2 へと代謝する SOD では増加が見られた。このことから、カテコールと NO の反応での $\cdot\text{OH}$ の生成には H_2O_2 を経由していないことが示唆された。

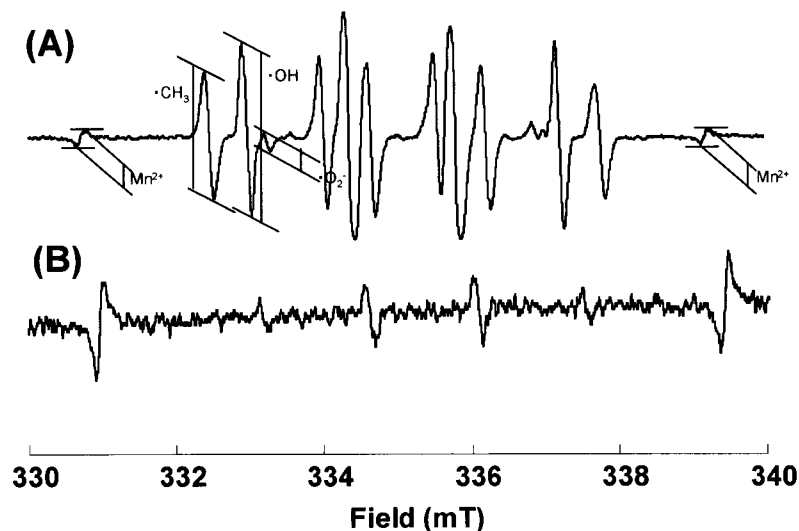


Fig. 3 Typical ESR spectra of DMPO with $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ and $\cdot\text{CH}_3$ using the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$ system (A). ESR spectrum in the reaction of catechol (0.1 mM) incubated with NOC-7 (0.1 mM) at 10 min (B).

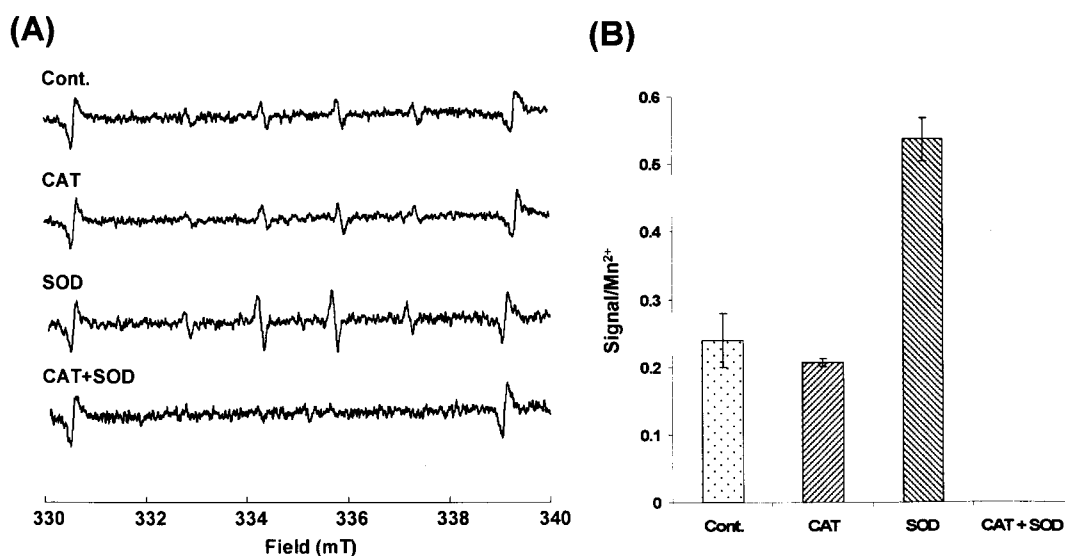


Fig. 4 Changes in $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ spectrum by the addition of 10000 units/mL CAT and/or 1000 units/mL SOD (A). ESR measurement was examined at 10 min after incubation of 0.1 mM catechol with 0.1 mM NOC-7 and/or each enzymes. Changes in signal intensity by the reaction (B). The ordinate indicates the signal height of $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$ relative to the MnO_2 internal marker signal.

3-1-4. ONOO⁻の測定

セミキノラジカルによって生成すると考えられる $\cdot\text{O}_2^-$ は NO が存在するとただちに反応し ONOO⁻を生成する。そこで本反応系においても ONOO⁻の生成が疑われる。ONOO⁻の検出には RNS の蛍光プローブとして知られる DHR を使用し、DHR と RNS の反応生成物である RHO の蛍光強度を測定した。Figure 5 に示すように、DHR に NOC-7 のみを添加した結果、RHO 生成量は 10 分値で最大となった。カテコール／NOC-7 の反応では各時間における RHO 生成量は NOC-7 単独より上回り、その蛍光強度は $\cdot\text{OH}$ の消去剤であるマンニトールの添加でも変化は見られなかった (Fig. 5)。このことから、カテコールと NO の反応において ONOO⁻の生成が明らかとなった。

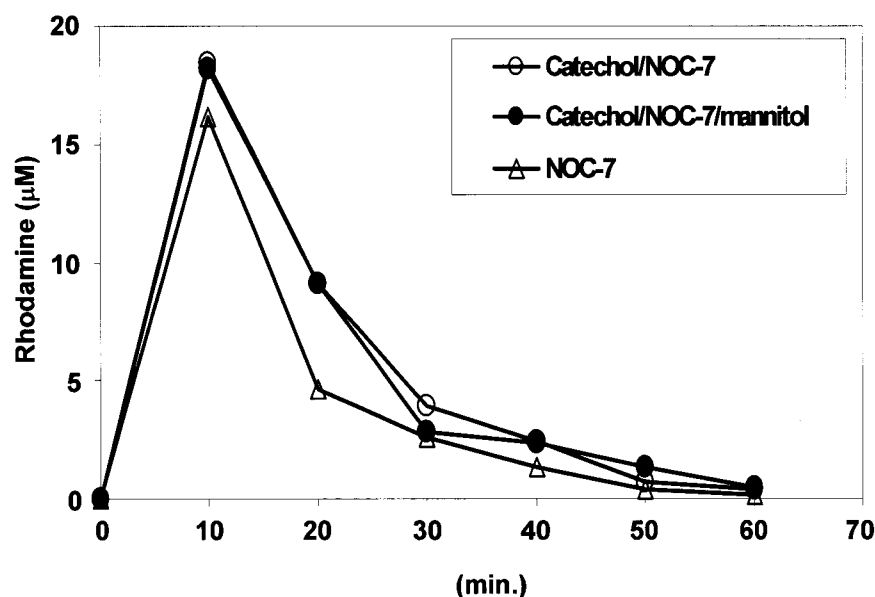


Fig. 5 Time dependent changes of RHO production in the solution of DHR with NOC-7 (0.1 mM) alone, NOC-7/catechol (0.1 mM) and NOC-7/catechol /Mannitol (10 mM) were measured at 10-min intervals for up to 60 min.

3-2. *in vivo* 実験

3-2-1. 病理組織学的検索

Figure 6 および Table 1 には 0.2% NaNO_2 と 0.8% カテコールを投与後 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 24 時間後で中程度の粘膜下織への細胞浸潤、浮腫および粘膜上皮の過形成が観察された。さらに 1 週および 2 週ではびらんや潰瘍性病変およびその周囲に炎症性細

胞の浸潤が認められた。一方、0.2% NaNO_2 および 0.8% カテコールのそれぞれ単独投与群では、投与後 24 時間においてわずかに粘膜下組織への細胞浸潤が観察されただけだった。

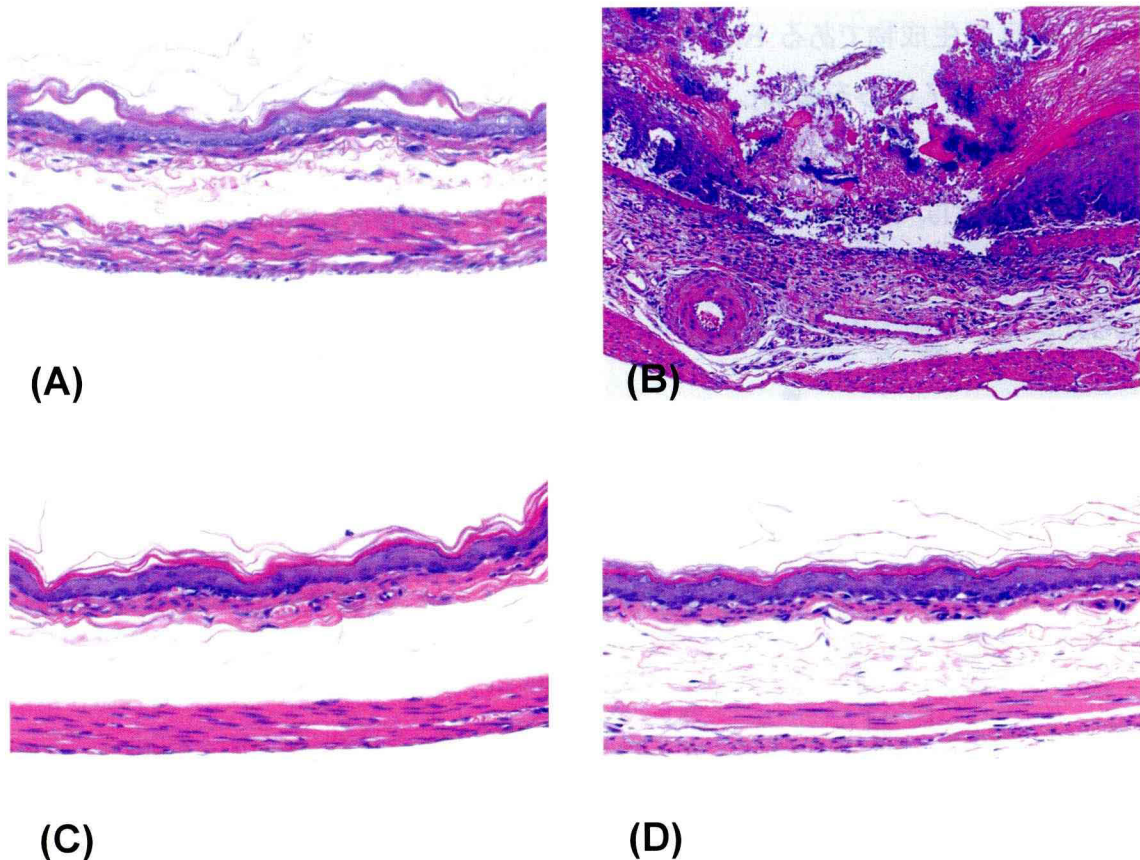


Fig. 6 Forestomachs of male rats co-treated with 0.2% NaNO_2 in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hr (A) or 2 weeks (B). Although there are no obvious alterations at 12 hr, erosion surrounded by severe inflammatory cell infiltration is apparent together with epithelial hyperplasia after 2 weeks. H&E staining at $\times 180$ original magnification. (C) Forestomach of a male rat treated with 0.2% NaNO_2 in the drinking water for 2 weeks. (D) Forestomach of a male rat treated with 0.8% catechol in the diet for 2 weeks. There are no remarkable changes. H&E staining at $\times 180$ original magnification.

Table 1 Histopathological findings of the rat forestomach given 0.2% NaNO₂ in the drinking water, 0.8% catechol in the diet, or 0.2% NaNO₂ in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12, 24 hr, 1 and 2 weeks.

Group	Cont.	0.2% NaNO ₂				0.8% Catechol				0.8% Catechol + 0.2% NaNO ₂			
site/lesion		12hr	24hr	1w	2w	12hr	24hr	1w	2w	12hr	24hr	1w	2w
Epithelium													
hyperplasia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	++	++
erosion/ulcer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++
with inflammatory cell infiltration													
Submucosa													
edema	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	++	±
cell infiltration	—	—	±	—	—	—	±	±	—	—	+	++	±
fibrosis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++

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

3-2-2. 8-OHdG 測定

DNA の酸化的損傷の指標としてラット前胃粘膜 DNA 中の 8-OHdG 生成量を測定した。Figure 7 には得られた定量値から算出した 8-OHdG/ 10^5 dG 値を示す。0.2% NaNO₂ および 0.8% カテコール併用投与群では投与後 12 時間および 2 週間において、対照群に比べ有意な上昇が見られ、12 時間では約 1.5 倍、2 週間では約 8.0 倍であった。一方、0.2% NaNO₂ および 0.8% カテコール単独投与群では変化は見られなかった。併用投与群において種々の病変に先立って 8-OHdG の上昇が見られたことは、DNA 酸化は炎症性細胞から生成する ROS ではなく、外因性の ROS に起因し、種々の病変にはこの外因性の ROS が関与していることが示唆された。

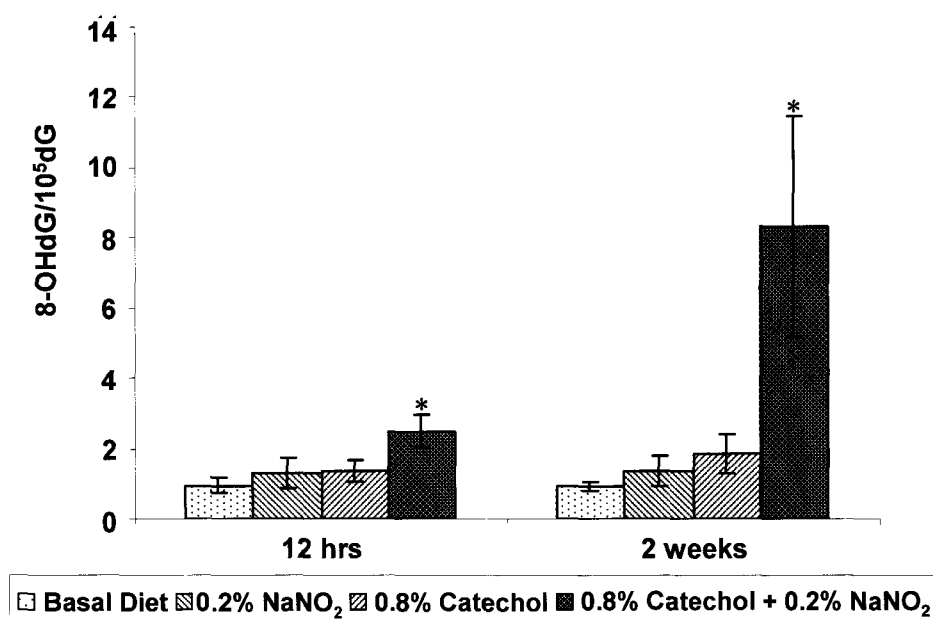


Fig. 7 Changes in 8-OHdG levels in forestomach epithelium of rats given 0.2% NaNO₂ in the drinking water, 0.8% catechol in the diet, or 0.2% NaNO₂ in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hrs or 2 weeks. Values are means \pm S.D. of data for 5 samples collected from a total of 15 rats. *: Significantly different (P<0.01) from the control group.

3-2-3. 免疫化学染色法による NO₂Tyr および iNOS の検出

3-1 の *in vitro* 実験系の結果では、カテコールと NO の反応により最終的に ONOO⁻ が生成することを確認している。ONOO⁻ は強力な酸化およびニトロ化力を有し、細胞傷害性を有することから、前述した前胃粘膜の損傷および DNA の酸化的損傷は ONOO⁻ に起因することが考えられる。生体内での ONOO⁻ 生成を評価と内因性の RNS 生成を確認するため、免疫化学染色法による NO₂Tyr と iNOS の検出を行った。対照群では NO₂Tyr 陽性細胞は観察されなかったのに対し (Fig. 8-(A))、併用投与群では 12 時間から前胃粘膜上皮において NO₂Tyr 陽性細胞が観察され、その強度は経時的に増加した (Fig. 8-(B), (C))。一方、iNOS の検出では、併用投与群の 2 週目において、粘膜下組織における浸潤細胞においてわずかに陽性細胞が検出される程度であった (Fig. 9)。これらのことから、併用投与により前胃粘膜上皮に観察された NO₂Tyr の生成は、炎症細胞による内因性 NO に由来するのではなく、NaNO₂ とカテコールの反応により生成する外因性の ONOO⁻ に起因していると考えられ、これらの結果は、3-1 で示した *in vitro* の結果を強く支持するものであった。

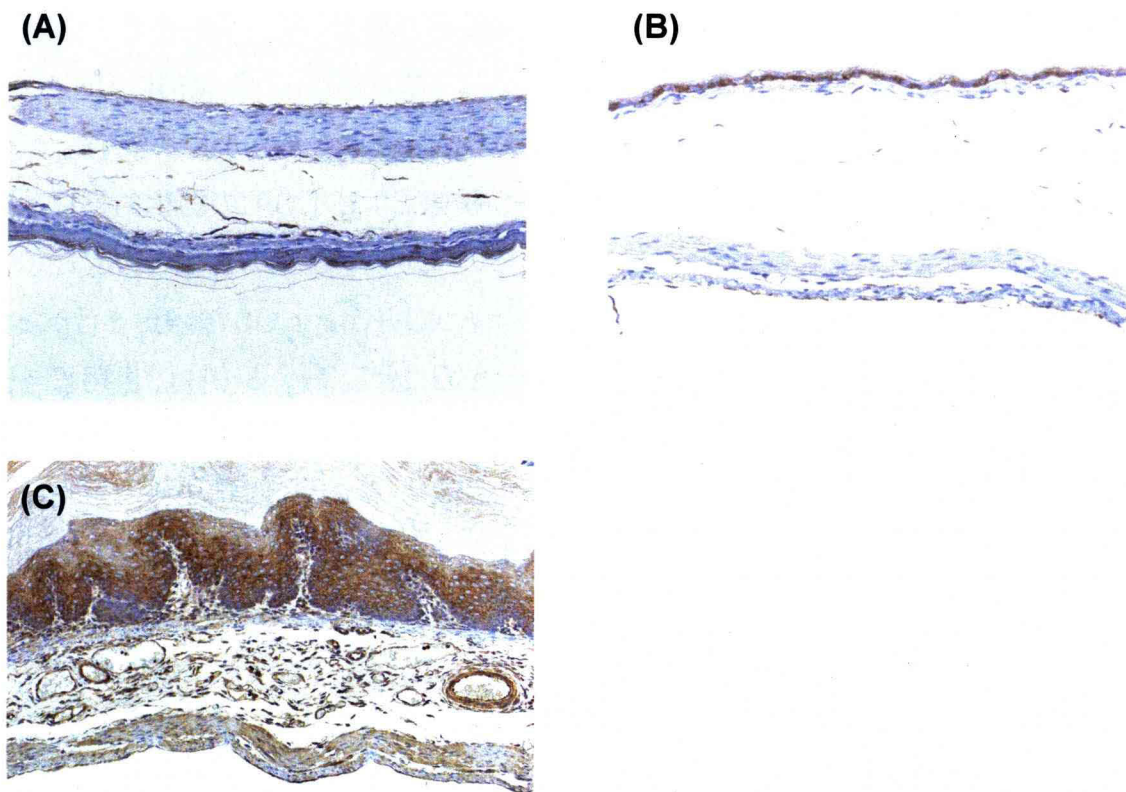


Fig. 8 Forestomachs of male rats no-treated (A) and co-treated with 0.2% NaNO₂ in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 hrs (B) and 2 weeks (C). NO₂Tyr-positive cells were observed all over the epithelium at 12 hrs after the treatment and the increase of intensity was found at 2 weeks. Immunohistostaining for NO₂Tyr at x 180 original magnification.

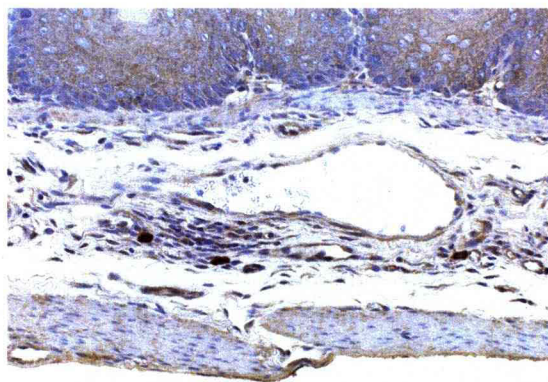


Fig. 9 Forestomach of a male rat co-treated with 0.2% NaNO₂ in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 2 weeks. A few iNOS-positive cells were found at submucosa under ulceration. Immunohistostaining for iNOS at 360x original magnification.

第4節 小括

本研究では、カテコールと NO のラジカル反応機構の解明と、本反応中における RNS 生成とカテコール、NaNO₂ 併用投与によるラット前胃発がん促進機構との関連を明らかにするため、*in vitro* および *in vivo* における実験を行った。

in vitro の実験系では、NaNO₂ が酸性条件下つまり胃内において NO を生成することに着目し、NO とカテコールのラジカル反応について種々検討した結果、カテコールがキノン体へ酸化されることを明らかにした。この反応過程において生成するラジカル種を ESR で検出した結果、セミキノンラジカル及び $\cdot\text{OH}$ の生成が確認された。さらに、蛍光プローブによる検討では ONOO \cdot の生成を確認したことから、NO によるカテコールの一電子酸化で生成したセミキノンラジカルが、キノンへと酸化される際に酸素から $\cdot\text{O}_2$ が生成し、過剰な NO が $\cdot\text{O}_2$ と反応し、ONOO \cdot を経て $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{NO}_2$ が生成するという反応機構を提唱した (Fig.10)。

in vivo における病理組織学的検索の結果、併用投与群では投与後 24 時間から粘膜下組織における細胞浸潤が見られ、2 週目では過形成と、細胞浸潤を伴う潰瘍性病変が観察された。一方、対照群および NaNO₂、カテコールの単独投与群においては全ての時間において変化は見られなかった。前胃粘膜 DNA の 8-OHdG 値は種々の病変に先立って、投与後 12 時間で併用投与群は対象群に対して有意な上昇が見られた。更に 2 週目では対照群に比べ約 8 倍の上昇が見られた。免疫化学染色法による iNOS の検出では、併用投与群の 2 週目においてのみ浸潤細胞にわずかに観察された程度であったのに対し、NO₂Tyr 陽性細胞は併用投与群において、投与後 12 時間から粘膜上皮細胞で観察され、2 週目では粘膜上皮における過形成部位でその存在が認められた。すなわち、8-OHdG や NO₂Tyr の生成は炎症細胞が産生する ROS や iNOS が産生する RNS ではなく、外因性の RNS に起因することを示している。これらの結果から、NaNO₂ とカテコール併用投与によるラット前胃発がん促進機構には、胃内で生じる NO とカテコールの複合反応により生成する RNS が起因することを明らかにした。

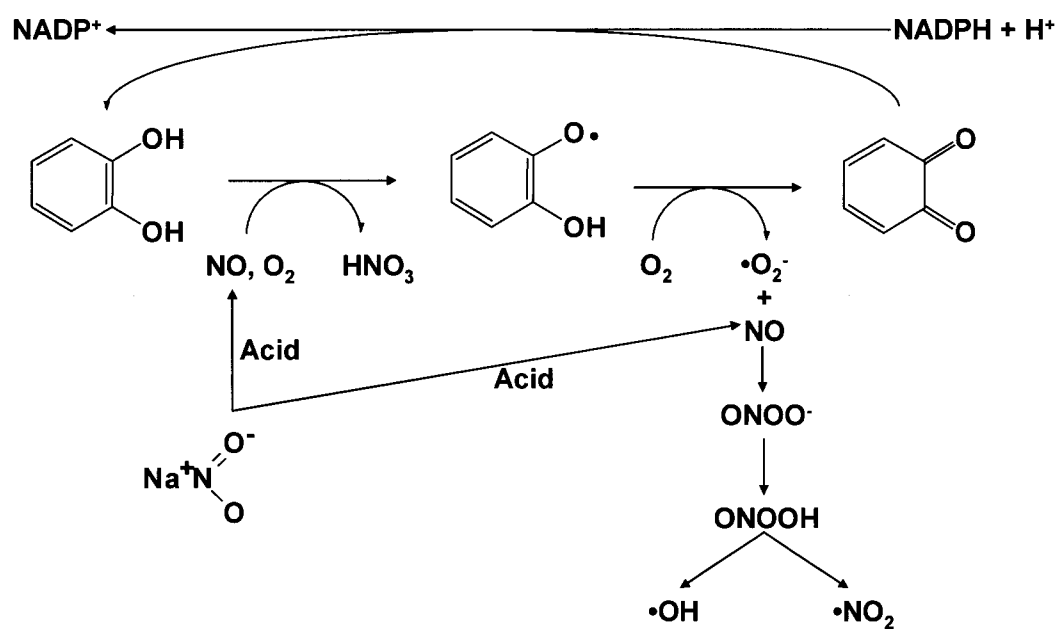


Fig. 10 Proposed pathways for the reaction of catechol with NaNO_2 , generating $\cdot\text{OH}$ by way of $\text{ONOO}\cdot$.

第2章 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるタンパク質中 ニトロチロシンの高感度分析法の構築と組織試料への応用

第1節 序論

NO は血管内皮細胞や、マクロファージ、好中球および血小板等で生成する内因性のラジカル種であり⁷⁴⁾、神経伝達物質⁷⁵⁾や、免疫系における細胞毒性因子として機能することが知られているほか⁷⁶⁾、虚血/再灌流による組織傷害等に関与していると考えられている⁷⁷⁾。

好気性条件下において、NO はただちに $\cdot\text{O}_2$ と反応し、より反応性の高い ONOO^- を生成する (i.e., $6.7 \times 10^9 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁷⁸⁾。 ONOO^- は強力なニトロ化及び酸化力を有することから、生体内において生成した ONOO^- は種々の芳香族化合物をニトロ化する。中でも、芳香族アミノ酸の一つである Tyr は、 ONOO^- と反応にして NO_2Tyr を生成することから、タンパク質中に散在する NO_2Tyr は生体内における RNS 生成の指標になると考えられている⁶⁾。

NO_2Tyr の検出には免疫化学染色法⁸⁰⁻⁸²⁾、GC-MS⁸³⁻⁸⁵⁾ や LC⁸⁶⁻⁹³⁾ といった方法が報告されている。免疫化学染色法は簡便かつ NO_2Tyr が生成し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 GC-MS⁸³⁻⁸⁵⁾、LC-UV⁸⁶⁻⁸⁷⁾、LC-ECD⁸⁸⁻⁹¹⁾ や LC-MS^{92,93)} が報告されているが、固相抽出法などの煩雑な前処理が必要であり、測定精度を低下させる。

本研究では、組織タンパク質中 NO_2Tyr の定量法の構築を目的として、LC-MS/MS を用い、迅速、簡便でありながら、微量の試料にも十分に適用可能な感度と精度を備えた分析法を構築した。さらに、本法の *in vivo* 試料への有用性を確認するため、RNS による肝障害モデルとして知られる APAP^{7-9, 94)} を投与したマウス肝組織におけるタンパク質中 NO_2Tyr の検出に本法および免疫化学染色法を適用し、それぞれの結果を比較した。

第2節 実験の部

2-1. 材料および試薬

Tyr, トリクロロ酢酸 (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。NO₂Tyr、プロテアーゼおよび APAP は Sigma Chemical 社製を使用した。^[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。

2-2. 内標準物質の合成

内標準物質として用いる^[13C₉]-NO₂Tyr は^[13C₉]-Tyr から合成した。すなわち 18.1 mg の^[13C₉]-Tyr を 2.0 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 5.0%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。生成物の確認には SHIMADZU 社製 LC-MS(LCMS-2010A)を用いた。

2-3. 標準溶液の調製

10 mM 塩酸を用い、1.0 mM Tyr および NO₂Tyr 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 NO₂Tyr 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。

2-4. 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、MS/MS 測定にはエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用い、ポジティブイオンモードにより Tyr および NO₂Tyr を検出した。カラムには SHISEIDO 社製 CAPCELL PAK C18 MG II (2.0 x 150 mm, 5 μm)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、グラジエント条件により Tyr および NO₂Tyr を溶出させた。

NO₂Tyr 測定では、precursor ion に m/z 227 ($[M+H]^+$)を、product ion に m/z 181

($[M+H-H_2O-CO]^+$)を設定した。同時に内標準物質である $[^{13}C_9]$ -NO₂Tyr の検出には precursor ion 及び product ion を m/z 236 及び 190 とした。Cone voltage 及び collision energy は 20 V 及び 11 eV を最適とした。全ての試料は 1/100 に希釈した後、測定に用いた。

Tyr 測定では、precursor ion に m/z 182($[M+H]^+$)を、product ion に m/z 136 ($[M+H-H_2O-CO]^+$)を設定した。同時に内標準物質である $[^{13}C_9]$ -Tyr の検出には precursor ion 及び product ion を m/z 191 及び 144 とした。Cone voltage 及び collision energy は 15 V 及び 12 eV を最適とした。全ての試料は 1/10,000 に希釈した後、測定に用いた。

また、どちらの測定においても 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 590 L/h とした。

2-5. 試料調整

本分析法は、組織タンパク質中 NO₂Tyr 及び Tyr の検出を目的としていることから Hensley ら⁹¹⁾の方法を基に、酵素処理によるタンパク質の抽出および消化方法を構築した。試料に 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.5) を加えホモジナイズした後、4°C、3,000 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、10 % TCA 0.5 mL を加え、4°C、14,000 x g で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、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、14,000 x g で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取して 0.45 µm ポリフッ化ビニリデン (PVDF) フィルターを通し、測定用試料とした。

2-6. 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、NO₂Tyr 及び Tyr のブランク値からそれぞれの添加濃度を決定した。添加濃度は NO₂Tyr を 100 及び 200 nM、Tyr を 25 及び 50 µM 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。

2-7. 動物試料および飼育条件

5 週齢の雄性 B6C3F1 マウス 20 匹を日本 SLC 社より購入し、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 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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社製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。

2-8. 動物実験操作

6 週齢の雄性 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、肝臓の左葉はヘマトキシリン&エオジン染色および NO_2Tyr の免疫化学的染色法による病理組織学的検索に用いた。 NO_2Tyr 測定用の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。

2-9. 免疫化学染色法

組織切片は $0.6\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 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 1.0% ヤギ血清を含むリン酸塩緩衝液(pH 7.4)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、 1.0 mg/mL の抗 NO_2Tyr (rabbit polyclonal IgG)を含む 1.0% BSA 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。

2-10. 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。

第3節 結果及び考察

3-1. 測定条件の最適化

Tyr、NO₂Tyr 及びサロゲート物質として用いたそれぞれの安定同位体の化学構造を Figure 11 に示す。MS/MS 測定におけるインターフェイスには ESI を用い、ポジティブイオンモードを採用した。Figure 12 にはそれぞれの MS/MS スペクトルを示す。Tyr、NO₂Tyr、[¹³C₉]-Tyr および [¹³C₉]-NO₂Tyr のモニタリングイオンにはそれぞれ m/z 182 > 136, 227 > 181, 191 > 144 および 236 > 190 を設定した。

LC-MS/MS 測定において、移動相、cone voltage 及び collision energy はその測定感度に大きな影響を及ぼす。これら3種の条件を Tyr 及び NO₂Tyr それぞれの標準品を用いて最適化した。

Cone voltage は selected reaction monitoring (SRM) スペクトルにおいて、それぞれの precursor ion ($[M+H]^+$) である m/z 182 及び 227 のシグナル強度を検討し、15 及び 20 V を最適とした。Collision energy は MS/MS スペクトルにおいて、それぞれの product ion である m/z 136 ($[M+H-H_2O-CO]^+$) 及び 181 ($[M+H-NO_2]^+$) のシグナル強度を検討し、12 及び 11 eV を最適とした。

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/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、移動相に添加する酢酸濃度の検討を行った。酢酸濃度は 0 - 0.1% (v/v) の範囲で検討し、それぞれの濃度における Tyr 及び NO₂Tyr のピーク強度を比較した。Tyr、NO₂Tyr とともに酢酸 0.01% のとき最も強いピーク強度が得られたことから、0.01% 酢酸を最適とした。本条件において Tyr および NO₂Tyr はそれぞれ保持時間 3.0 および 5.7 分に検出された。

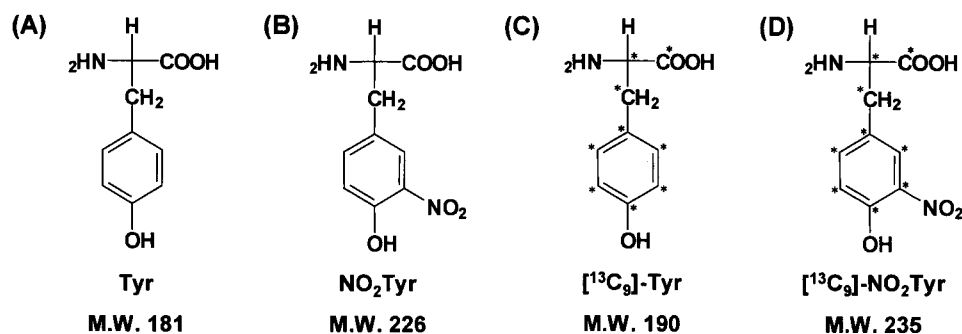


Fig.11 Chemical structures of Tyr (A), NO₂Tyr (B), [¹³C₉]-Tyr (C) and [¹³C₉]-NO₂Tyr (D). Asterisk (*) indicates carbon 13-labeled.

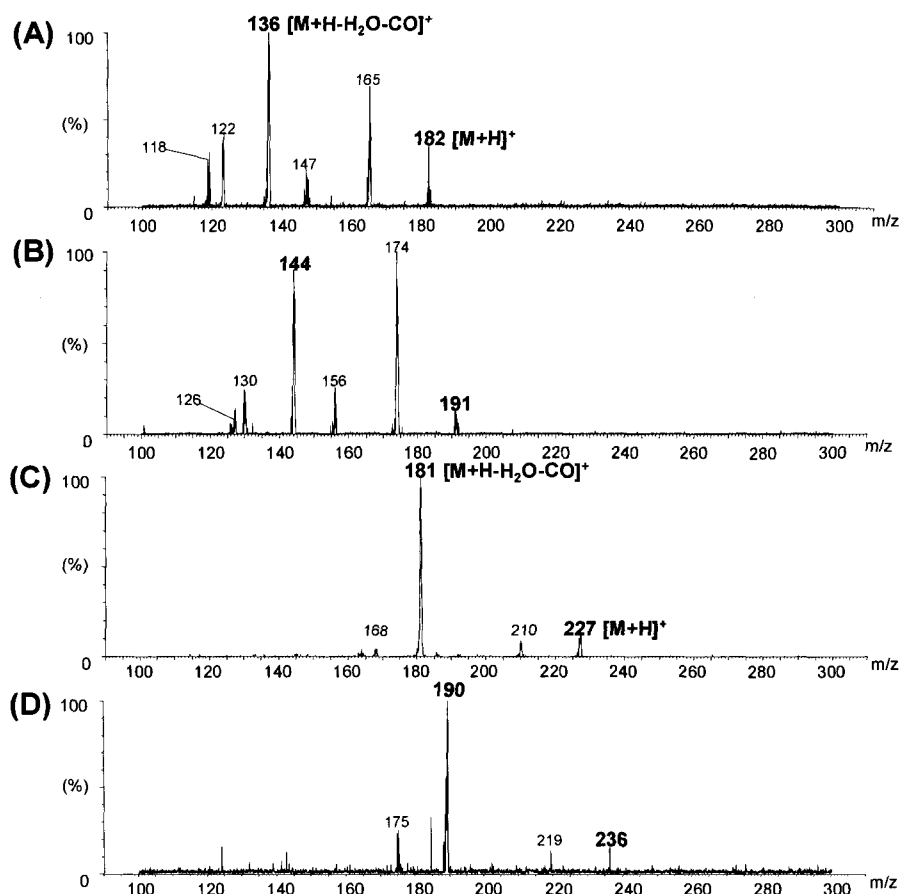


Fig.12 MS/MS spectra of (A) Tyr, (B) [$^{13}\text{C}_9$]-Tyr, (C) NO_2Tyr and (D) [$^{13}\text{C}_9$]- NO_2Tyr .

3-2. 分析法バリデーション

本分析条件における Tyr および NO_2Tyr の定量限界 ($S/N = 10$) は 100 および 0.5 nM で、検出限界 ($S/N = 3$) 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 μM で、 NO_2Tyr 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)。また、Tyr 及び NO_2Tyr それぞれの平均保持時間は 3.02 分 ($R.S.D. = 0.2\%$, $n = 5$) 及び 5.75 分 ($R.S.D. = 0.4\%$, $n = 5$) であった。ピーク面積の $R.S.D.$ はそれぞれ 2.80 及び 1.44% であり、良好な感度及び再現性が得られた。Figure 13 には定量限界値における Tyr、 NO_2Tyr 及びそれぞれのサロゲート物質の multiple reaction monitoring (MRM) クロマトグラムを示す。

Table 3 には、添加回収試験の結果を示す。酵素処理によって消化したマウス肝組織におけるタンパク質中の Tyr および NO_2Tyr のブランク値は、それぞれ 4.2 ± 0.2

μM 及び 14.6 nM であった。添加濃度を Tyr 標準溶液 25 または $50\text{ }\mu\text{M}$ 、 NO_2Tyr 標準溶液 100 または 200 nM とし、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。

これらの結果から、本法は種々の従来法に比べ Tyr 及び NO_2Tyr の簡便かつ迅速な測定が可能であり、*in vivo* 試料の測定においても十分適用が可能な感度と精度を備えていることを確認した。

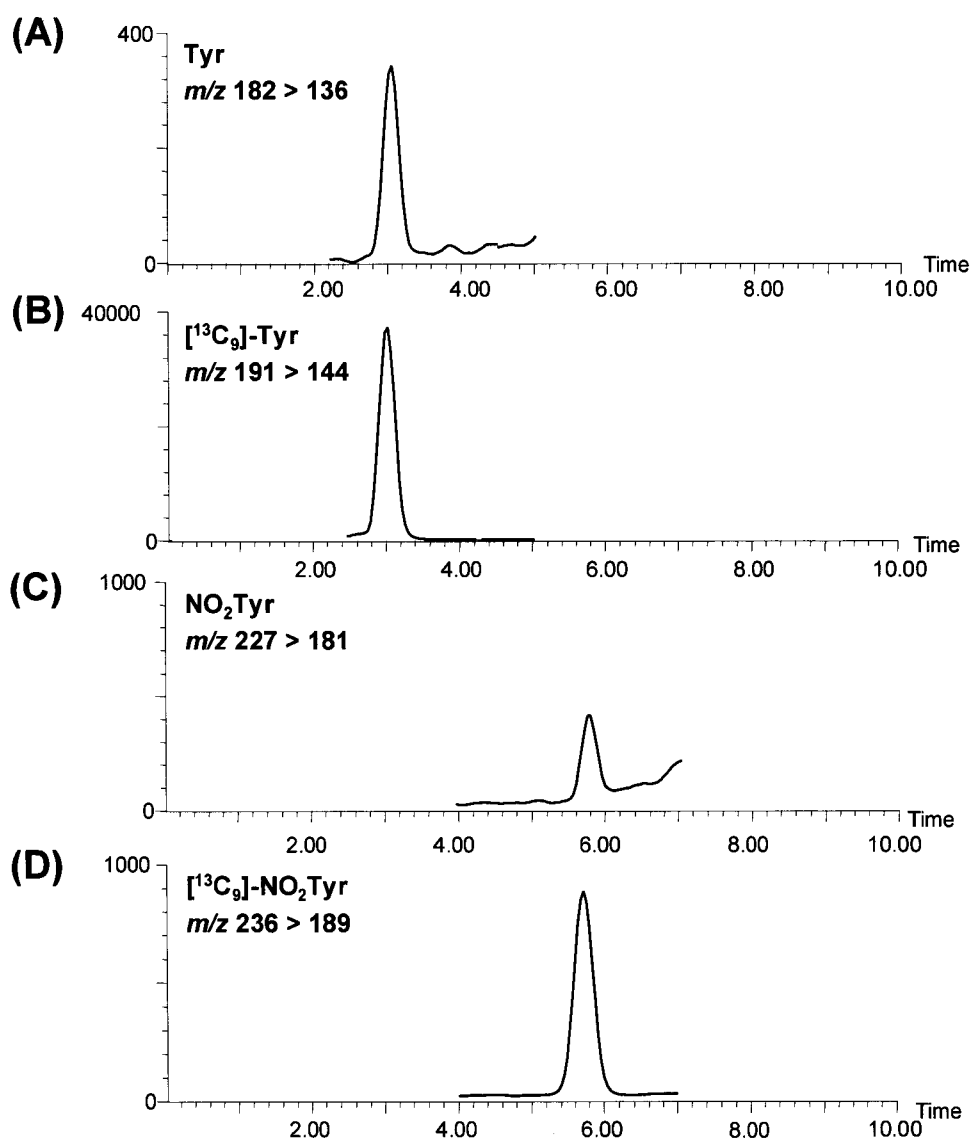


Fig.13 MRM chromatograms of standards of NO_2Tyr , Tyr and surrogate standards at the LOQ levels. (A) 100 nM Tyr, (B) 5.0 mM $[\text{C}_9]$ -Tyr, (C) 0.5 nM NO_2Tyr and (D) 5.0 nM $[\text{C}_9]$ - NO_2Tyr .

Table 2 Validation of LC-MS/MS analysis

	LOD (nM)*	LOQ (nM)**	R.S.D. _{PA} (%)	Correlation coefficient	R.S.D. _{RT} (%)
Tyr	30	100	2.80	0.999 (0.1-50 μ M)	0.19
NO ₂ Tyr	0.1	0.5	1.44	1.000 (0.5-1000 nM)	0.20

* LOD: Limit of detection (S/N = 3)

**LOQ: Limit of quantification (S/N = 10)

Table 3 Recoveries of Tyr and NO₂Tyr in digested mice liver samples (n=5)

	Added (μ M)	Conc. (μ M)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Tyr	25	28.1 \pm 0.7	95.6	4.97
	50	50.2 \pm 2.4	92.1	2.88
	0	4.2 \pm 0.2		
	Added (nM)	Conc. (nM)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
NO ₂ Tyr	100	109.0 \pm 0.7	94.4	0.70
	200	213.6 \pm 9.8	98.9	5.28
	0	14.6 \pm 0.7		

3-3. 生体試料への適用

APAPによって惹起される肝毒性にはROSやRNSが関与すると考えられており、マウス肝臓にNO₂Tyrが生成することが知られている。*in vivo* 試料中のNO₂Tyr測定に対する本分析法の有用性を確認するため、APAPを投与したマウス肝臓中NO₂Tyr測定に適用した。対照群のマウス肝組織におけるタンパク質の標準的なMRMクロマトグラムをFigure 14に示す。また、対象群、APAP投与後2、4及び8時間後におけるTyr及びNO₂Tyrの測定結果をTable 4に示す。Tyr及びNO₂Tyrは全ての試料から検出され、測定値はそれぞれ2.94 - 3.91 μ mol/mg protein及び0.17 - 0.30 pmol/mg proteinの範囲であった。

また、Tyr濃度は対照群とAPAP投与群に差は認められなかったが、NO₂TyrはAPAP投与群の全ての時間において、対照群との間に有意な差が認められた。しかしながら、NO₂TyrはTyrとONOO⁻の反応によって生成することから、NO₂Tyr/Tyr比を算出することで、NO₂Tyr生成量のわずかな変化も正確に評価できると考えられる。それぞれの測定値からNO₂Tyr/Tyr比を算出した結果、対照群は58.2 \pm 5.28 μ mol/mol of Tyrであり、APAP投与後2時間で上昇が見られ、4時間で最大となり(81.6 \pm 6.95 μ mol/mol of Tyr)、8時間ではわずかな減少が見られた。

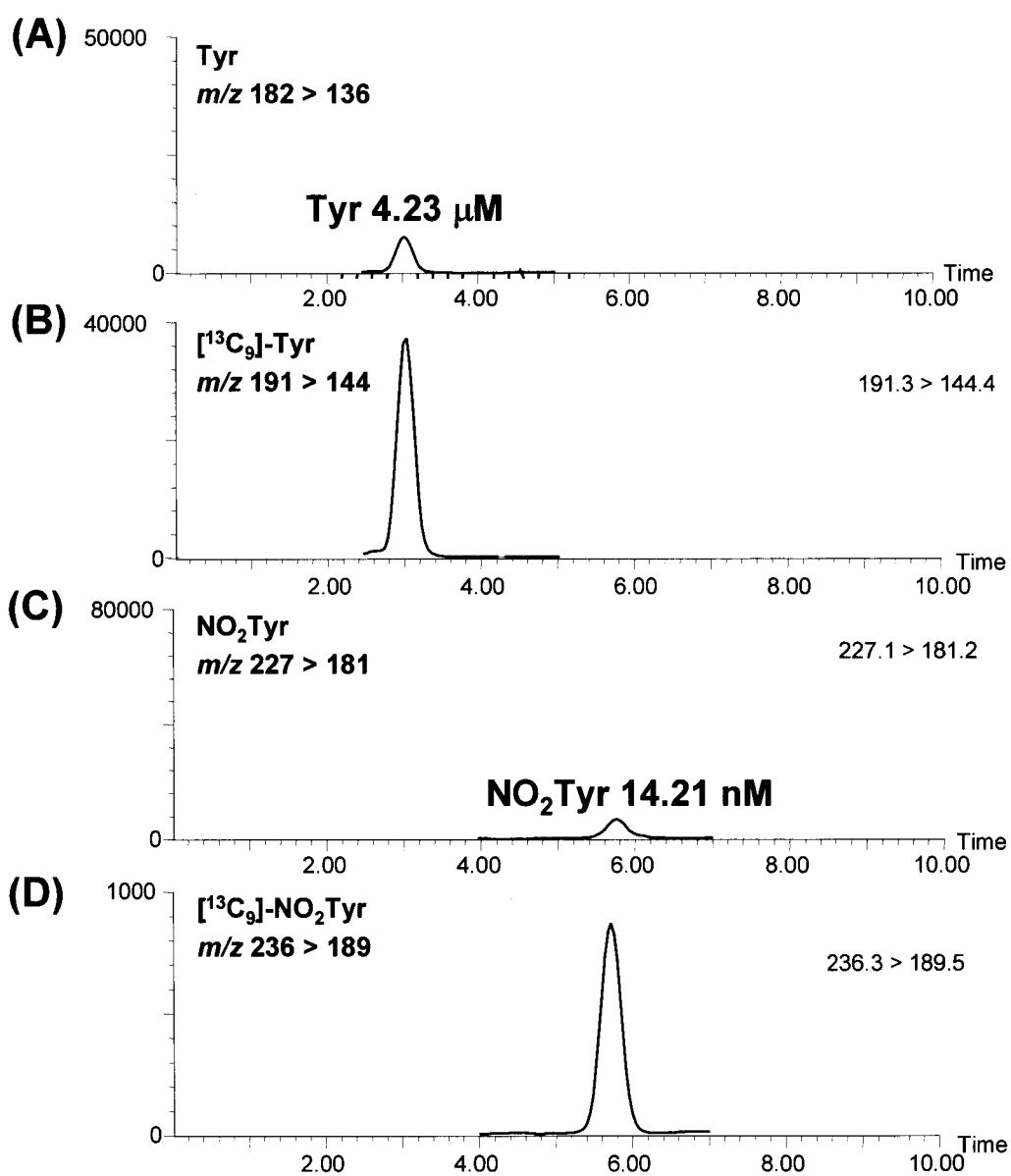


Fig. 14 MRM chromatograms of a mouse liver protein sample containing Tyr (A), 5.0 mM [$^{13}\text{C}_9$]-Tyr (B), NO₂Tyr (C) and 5.0 nM [$^{13}\text{C}_9$]-NO₂Tyr (D).

Table 4 Concentrations of Tyr and NO₂Tyr in mice liver samples

Group	Tyr ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	NO ₂ Tyr ^a (pmol/mg protein)	NO ₂ Tyr/Tyr ($\mu\text{mol}/\text{mol}$)
Blank (Protease only)	2.53 \pm 0.14	ND	ND
Control	3.53 \pm 0.20	0.20 \pm 0.02	58.2 \pm 5.28
APAP 300 mg/kg (i.p.)			
2 hr	3.63 \pm 0.08	0.26 \pm 0.02*	71.7 \pm 4.28*
4 hr	3.43 \pm 0.17	0.28 \pm 0.02*	81.6 \pm 6.95*
8 hr	3.31 \pm 0.39	0.25 \pm 0.02*	75.5 \pm 10.9*

^a N.D. indicates NO₂Tyr concentrations lower than 0.5 nM.

*: Significantly different ($P < 0.01$) from the control group.

3-4. 免疫化学染色法による NO₂Tyr の検出と病理組織所見

APAP 投与による病理組織所見と免疫化学染色法による NO₂Tyr の検出結果の関係を Table 5 に示す。対照群では小葉中心性に NO₂Tyr 陽性細胞がわずかに観察されたのに対し、APAP 投与群では投与後 2 時間で小葉中心性の NO₂Tyr 陽性細胞が強く染まり、同時に空胞変性が認められ、投与後 4 時間では染色強度及び範囲は最大となった (Fig. 15)。8 時間では小葉中心性の肝細胞の壊死が認められたことから、肝細胞障害によって NO₂Tyr 染色強度が減少したことが予想された。

Table 5 Histopathological findings in hepatocyte of the mice administrated 300 mg/kg APAP for 2, 4 and 8 hr after treatment.

Group	Cont.	2 hr	4 hr	8 hr
site/lesion				
Centrilobular area				
vacuolation	—	++	+	±
necrosis	—	—	+	+++
NO ₂ Tyr positive cells	±	++	+++	±
Periportal area				
vacuolation	—	—	+	++
necrosis	—	—	—	±
NO ₂ Tyr positive cells	—	—	—	+

—: no observed, ±: slight, +: mild, ++: moderate, +++: severe

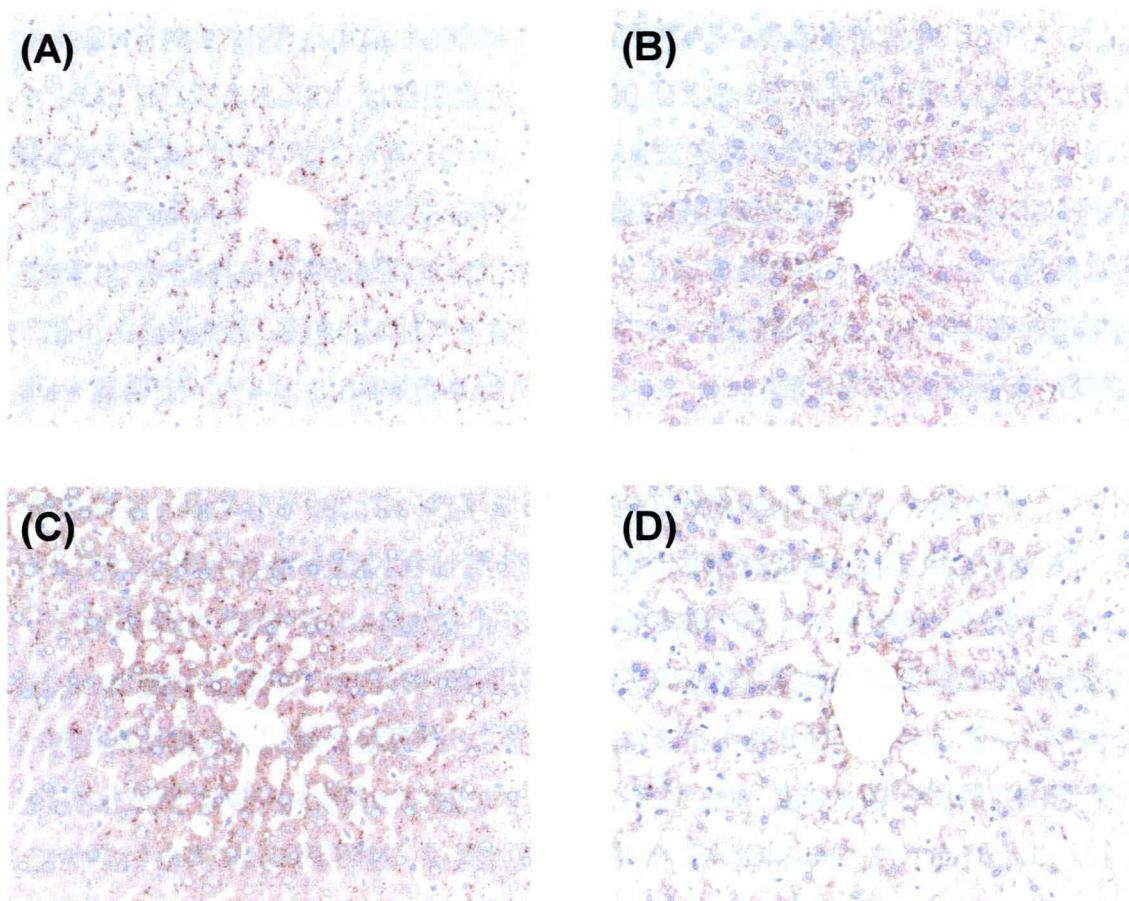


Fig. 15 Immunohistochemical staining of liver sections for NO₂Tyr protein adducts in controls and 2, 4 and 8 hr after 300 mg/kg of APAP. (A) Liver from a saline-treated mouse. Liver from a mouse treated with APAP (300 mg/kg) at 2 hr (B), 4 hr (C) and 8 hr (D). Original magnification, × 360.

第4節 小括

生体内におけるRNS生成の評価法として免疫化学染色法によるNO₂Tyrの検出は簡便であり、その生成部位を特定できることから極めて有用な手段である。しかしながら、その定量性は低く、わずかな生成量の変化を捉えることは極めて困難であることから、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NO₂Tyrの測定法の構築を検討した。

測定物質は、RNSの反応によってタンパク質中に生成するNO₂TyrとTyrを対象とし、その定量値からNO₂Tyr/Tyr値を算出した。質量分析法において精度良く測定するには、それぞれの測定対照物質の安定同位体をサロゲート物質として用いるのが極めて有効であることから、¹³Cでラベル化されたTyrに酢酸中で硝酸を加える

ことでニトロ化し $[^{13}\text{C}_9]$ -NO₂Tyr を合成した。LC-MS/MS による Tyr および NO₂Tyr の測定感度は検出限界が 30 および 0.1 nM、定量限界は 100 および 0.5 nM と、NO₂Tyr については高感度な測定法を構築した。一方 Tyr については、本研究で対象としているタンパク質中には極めて高濃度に存在することから、その測定には十分な感度であった。タンパク質の消化には酸加水分解が多く用いられるが、対象試料中に存在する NO₂ が酸性条件下において Tyr をニトロ化することが懸念されることから、本研究ではプロテアーゼによる酵素処理法を採用し、サロゲート物質を同時に添加することで、前処理過程におけるバラツキを補正した。B6C3F1 マウスから採取した肝組織での添加回収試験の結果、回収率は 92～99% の範囲と良好な結果が得られた。そこで、本法と免疫化学染色法を毒性量 (300 mg/kg) のアセトアミノフェン (APAP) を投与した 6 週令の B6C3F1 マウスの肝組織へ適用した。LC-MS/MS による測定結果では、NO₂Tyr は対照群を含む全ての群から検出され、APAP 投与後 2、4 および 8 時間群では、対照群より有意な上昇が認められた。また、その値は 4 時間が最大であった ($81.6 \pm 6.95 \mu\text{mol/mol of Tyr}$)。一方、免疫化学染色法による検出では、LC-MS/MS の測定結果と同様、対照群においてもわずかではあるが NO₂Tyr 陽性細胞が観察され、投与群においては小葉中心性に NO₂Tyr 陽性細胞の増加が見られた。またその強度は投与後 4 時間で最大となり、8 時間では過度の空胞変性と細胞の壊死が認められた。これらのことから、本法による測定結果は、これらの病変を反映していることが確認され、わずかな NO₂Tyr 生成量の変化も正確に捉えることが可能な極めて優れた分析法であることを確認した。

第3章 活性窒素種により引き起こされる DNA 損傷の評価法の構築

第1節 序論

炎症細胞から生成された ROS は DNA の酸化的損傷を引き起こし、炎症を介した発がんに寄与すると考えられている⁹⁵⁻⁹⁸⁾。グアニンの C-8 位が酸化されて生成する 8-OHdG は、DNA の酸化における主生成物であり⁹⁹⁾、HPLC-UV-ECD による高感度かつ高精度な分析法が開発されていることから、近年では様々な生理機能が明らかになっている¹⁰⁰⁾。8-OHdG の生成は様々ながん組織においてその存在が報告されており、それ自身が GC:TA トランスバージョンに結びつく突然変異性を有している^{9, 10)}。一方、炎症性疾患においては、誘導された iNOS により多量の NO が生成する¹⁰¹⁾。NO はニトロソアミンの生成を介した DNA の断片化やアルキル化のような遺伝毒性への関与に加えて、デオキシリボヌクレオシド及びヌクレオチドの脱アミノ化による直接的な突然変異誘発性を持つことが報告されている^{102, 103)}。さらに NO は $\cdot\text{O}_2^-$ と反応し、より反応性に富む ONOO $^-$ を生成することから、NO が関連した DNA 損傷は脱アミノ化だけでなく、タンパク質と同様 DNA のニトロ化も生じると考えられる^{104, 105)}。事実、ONOO $^-$ は dG と反応して NO₂Gua を生成し、加水分解を受け、遊離塩基となることが知られており⁵⁰⁾、この反応で生成する DNA の脱塩基領域は 8-OHdG と同様に GC:TA トランスバージョンを引き起こす。また、ONOO $^-$ はニトロ化剤であると同時に強力な酸化剤であることから、8-OHdG も同時に生成する可能性が考えられる¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾。これら二つの修飾塩基はそれらの生成原因を探索するための手がかりとなることから、8-OHdG と NO₂Gua の分析法は、炎症を介した DNA 損傷を評価するために必要不可欠である。

DNA あるいは RNA 中の 8-OHdG と NO₂Gua の LC-ECD を用いた同時分析法が既に報告されている¹⁰⁹⁾。NO₂Gua の測定感度は 20 fmol/injection であるが、LC-ECD による NO₂Gua の測定では、亜ジチオン酸ナトリウムなどの還元剤を用いた 8-アミノグアニンへの還元が必要であり^{109, 110)}、それらの反応では反応効率のバラツキから測定精度の低下が生じる。さらに、実試料の測定では選択性の低い ECD において、高極性の 2 物質を分離するために、アフィニティーカラムや固相抽出法による前処理が必要である¹¹¹⁾が、これらの操作はコストがかかることや、回収率の低下やバラツキにより測定精度が低下する。

本研究では、NO₂Gua の極性を低下させることを目的として、種々のグアニン化合物の誘導体化試薬として用いられているグリオキサール試薬による誘導体化法¹¹²⁻¹¹⁶⁾を採用し、サロゲート物質として[¹³C, ¹⁵N₂]-NO₂Gua を用いた LC-MS による高感度かつ高精度な分析法の構築を行った。さらに、カラムスイッチング(CS)法を採用し、オンラインで試料を精製および濃縮することで、DNA の消化過程で使用する高濃度の塩を除去し、イオンサプレッションおよび MS への負担の低減化を試みた。DNA の前処理方法には、既に 8-OHdG の測定において広く用いられている Nakae ら⁶⁾の方法を採用し、得られた試料の一部を LC-MS による NO₂Gua 測定に用い、残りを LC-UV-ECD による dG および 8-OHdG 測定に用いることで、一つの DNA 試料から酸化、ニトロ化両方の DNA 損傷を評価することを可能にした。さらに本法を ONOO⁻を反応させた仔牛胸腺 DNA に適用し、DNA 中に生成するこれら 2 種の修飾塩基の評価を行った。

第 2 節 実験の部

2-1. 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。NO₂Gua と[¹³C, ¹⁵N₂]-NO₂Gua 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 ポリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。

2-2. 標準溶液の調製

精製水を用い、50 μM NO₂Gua を調製した。検量線の作成は最終濃度が 3.0 から 500 μM となるように、サロゲート物質である[¹³C, ¹⁵N₂]-NO₂Gua 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)で調整した。MTNG 溶液(0.5% w/v)は 5.0 mg の MTNG を 1.0 mL の DMSO で溶解し、-80°C で保存した。

2-3. 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 μ L の NO₂Gua、10 μ L の 2.5 M 塩酸及び DMSO に溶解した 40 μ 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 μ L を測定に用いた。

2-4. DNA の消化

消化過程における酸化を防ぐために、Nakae らの方法を参考に DNA 消化を行った⁶⁾。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。

2-5. 測定装置

LC-MS システムはインターフェイスに ESI を備えた Agilent 社製 LC-MSD Sperial 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。

2-6. NO₂Gua 測定における CS-LC-ESI-MS の条件

CS システムの概要を Figure 16 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、分析用カラムで再度保持させ、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 6 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。

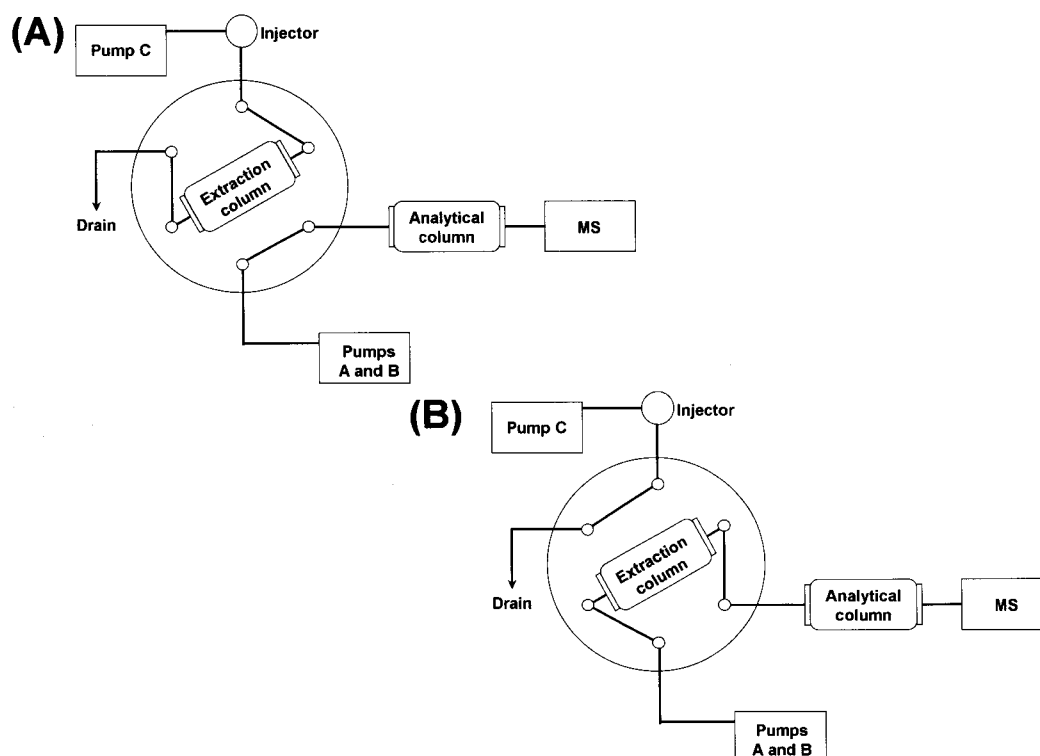


Fig. 16 Schematic of the CS-LC-ESI-MS system.

Table 6 Time program for CS-LC-ESI/MS

Time (min)	Procedure	Column position	Mobile Phase
			Ammonium acetate in water : Acetonitrile (v/v)
0.00	Sample injection	Configuration A	80 : 20
5.00	Column switching	Configuration B	80 : 20
15.00	Start analysis		
25.00			65 : 35
25.01			30 : 70
30.00	Stop analysis		
40.00.		Configuration A	30 : 70
40.01			80 : 20
50.00	Next analysis		80 : 20

2-7. 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⁷⁰⁾および Helbock ら⁷¹⁾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 の送液によりカラムの安定化、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。

2-8. 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。

2-9. 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。

第 3 節 結果及び考察

3-1. 測定条件の最適化

3-1-1. 誘導体化反応の最適化

グリオキサル、フェニルグリオキサル、ハイドロキシフェニルグリオキサル及び MTNG の 4 種のグリオキサル化合物を用い、NO₂Gua に最適な誘導体化試薬を検討した。グリオキサル、フェニルグリオキサル及びハイドロキシフェニルグリオキサルでは 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。MTNG による NO₂Gua の誘導体化反応を Figure 17 に示す。既に報告されているグアニン、8-OHdG、ガンシクロビルなどのグアニン化合物の誘導体化反応においてはリン酸緩衝液 (pH 6.0-7.0) / DMSO 混液^{114,115)}、酢酸緩衝液 (pH 4.0-5.0) / DMSO 混液¹¹⁶⁾および酢酸¹¹⁷⁾などの反応溶媒が用いられている。しかしながら、本実験で採用した DNA 消化方法では、その過程において 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8)、1.0 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) および 3.0 M 酢酸緩衝液 (pH 5.1) といった非常に高濃度の緩衝液を使用する。そこで、誘導体化反応における最適 pH を検討するため、消化過程に用いるそれぞれの緩衝液の濃度を基に、DNA の消化によって得られる試料を想定した DNA digestion buffer (20 mM 酢酸緩衝液, pH 4.8 / 1.0 M トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0 / 3.0 M 酢酸緩衝液, pH 5.1 = 10 : 1 : 1) を作製した。この DNA digestion buffer で希釈した NO₂Gua 標準品を用い、種々の濃度の塩酸を添加することで pH の調整を行い、最適な塩酸濃度を検討した。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. 18)。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。

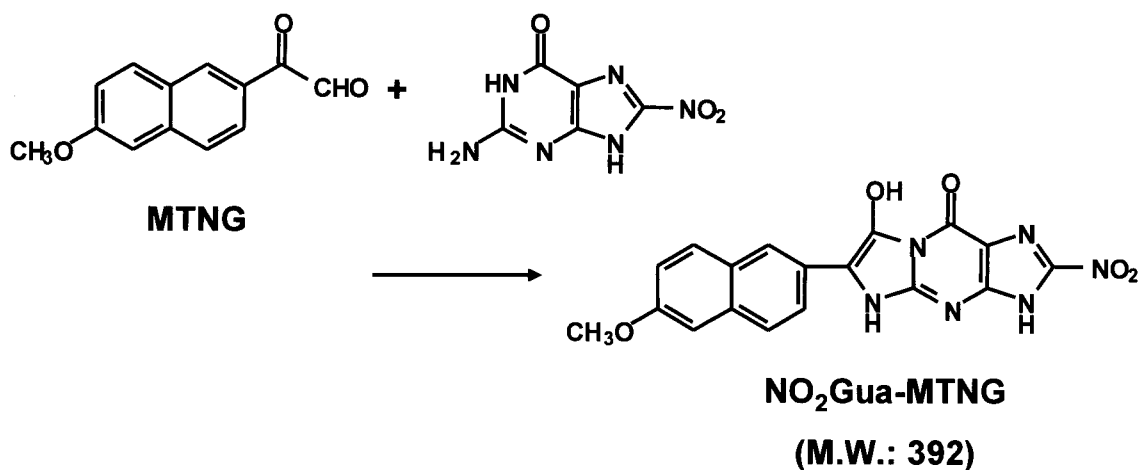


Fig. 17 MTNG derivatization of NO₂Gua.

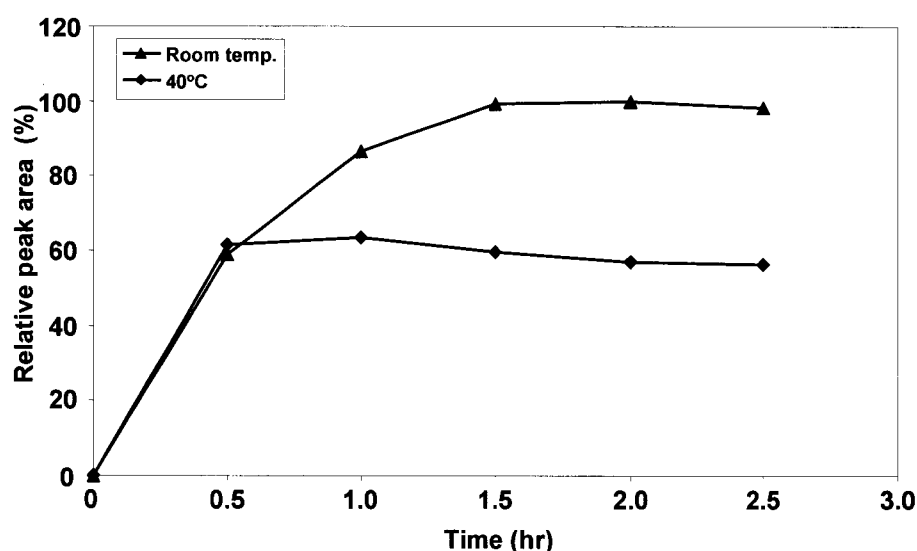


Fig. 18 Effect of reaction temperature and time on the peak area of NO₂Gua. NO₂Gua (100 nM) was incubated with 0.5% MTNG dissolved in DMSO at room temperature or 40°C. The derivatization procedure and the CS-LC-ESI-MS conditions are described in the Materials and Methods.

3-1-2. 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 を使い、ネガティブイオンモードを採用した。MTNG 誘導体化した標準溶液の MS スペクトルを Figure 19 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。

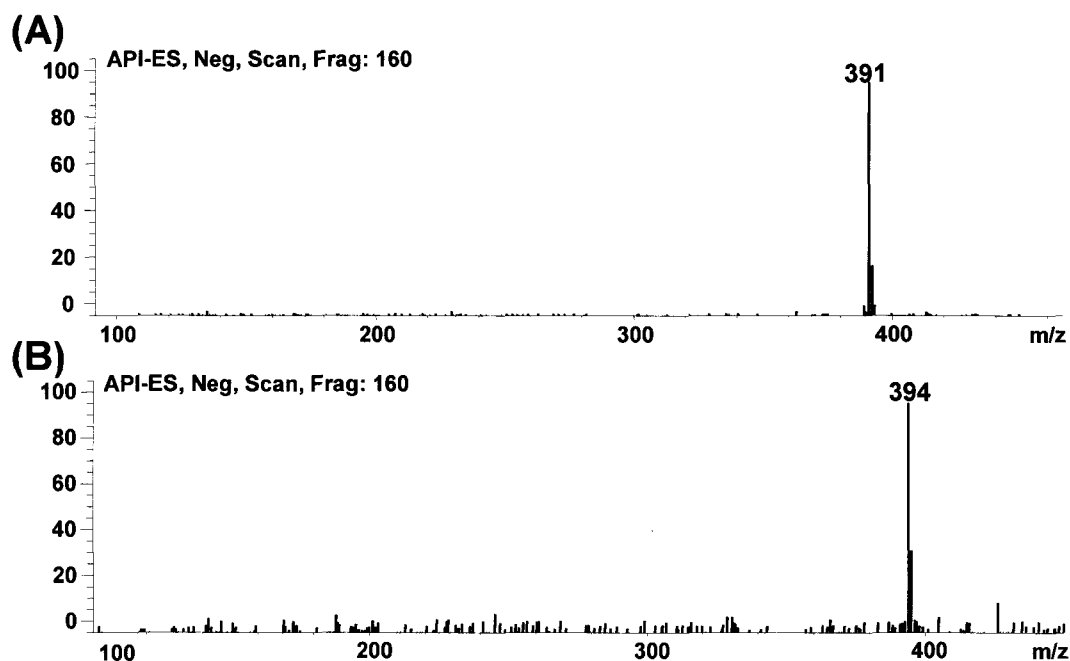


Fig. 19 Mass spectra of NO₂Gua-MTNG (A) and [¹³C, ¹⁵N₂]-NO₂Gua-MTNG (B).

3-2. 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 (Table 7)。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。

Table 8 には添加回収試験の結果を示す。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。

また、5.0 および 25 nM NO₂Gua を添加した際の selected ion monitoring (SIM) クロマトグラムを Figure 20 に示す。

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。

Table 7 Validation of CS-LC-ESI/MS analysis

LOD (nM)	LOQ (nM)	RSD _{PA} (%)	Correlation coefficient	R.S.D. _{RT} (%)
1.0	3.0	0.68	0.999 (3-500 nM)	1.19

Table 8 Recoveries of NO₂Gua in digested calf thymus DNA

Added (nM)	Conc. (nM)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
25	24.8 ± 0.1	99.4	0.53
50	49.9 ± 0.5	99.8	0.94
250	247.9 ± 9.3	99.1	3.76
0	0	—	—

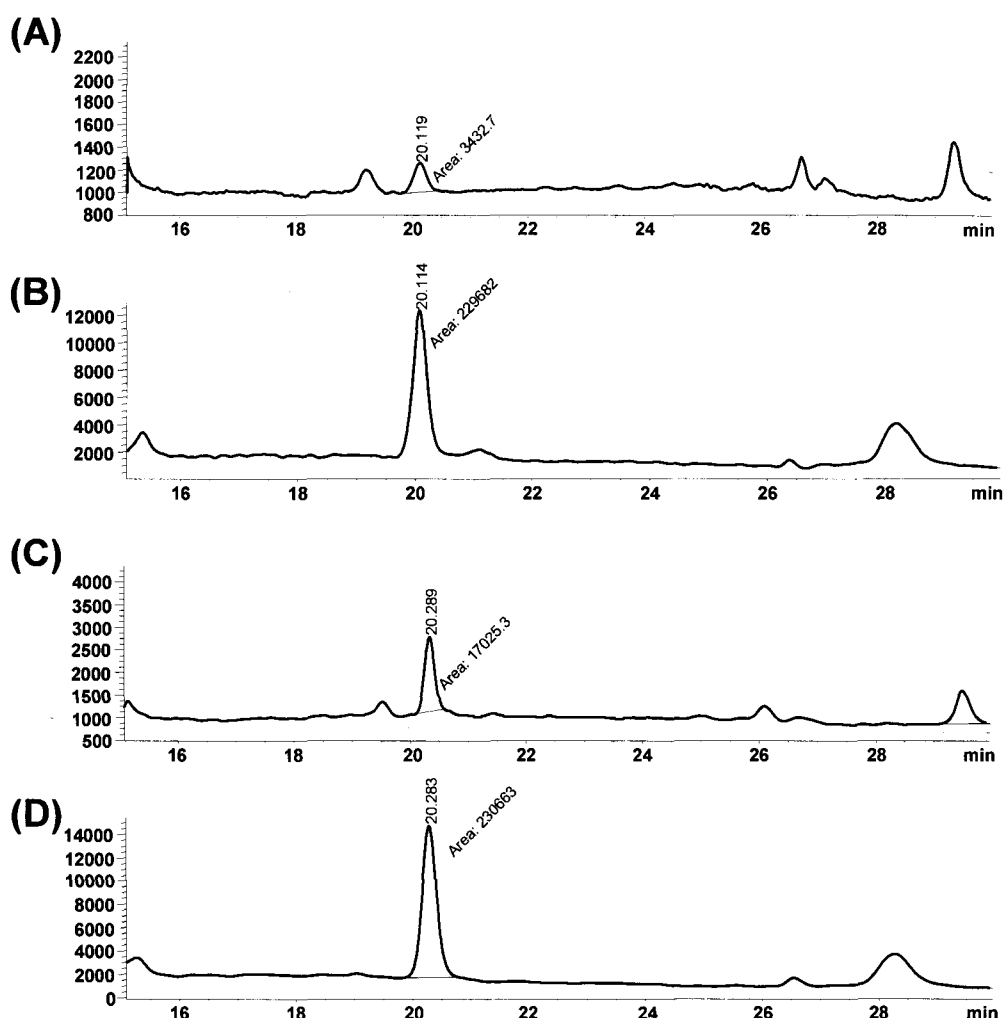


Fig. 20 CS-LC-ESI-MS chromatograms of NO₂Gua and surrogate standard in the recovery test. (A) DNA sample (250 µg/mL) was spiked with 5.0 nM NO₂Gua. (B) Surrogate standard (C) DNA sample (250 µg/mL) was spiked with 25 nM NO₂Gua. (D) Surrogate standard. CS-LC-ESI-MS conditions are described in Materials and Methods.

3-3. 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 21 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 22 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 of 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 μ M 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 of dG、8-OHdG は 23.7 ± 2.45 及び 31.5 ± 0.44 mol/10⁵ mol of dG とほぼ同程度の生成が認められた。これらの結果から、ONOO⁻によって引き起こされる DNA の損傷を評価するためには dG のニトロ化物である NO₂Gua と酸化物である 8-OHdG の 2 つの修飾塩基を評価する必要があることを確認した。さらに、これら二つの修飾塩基を一つの DNA 試料から測定可能な評価法の構築を達成した。

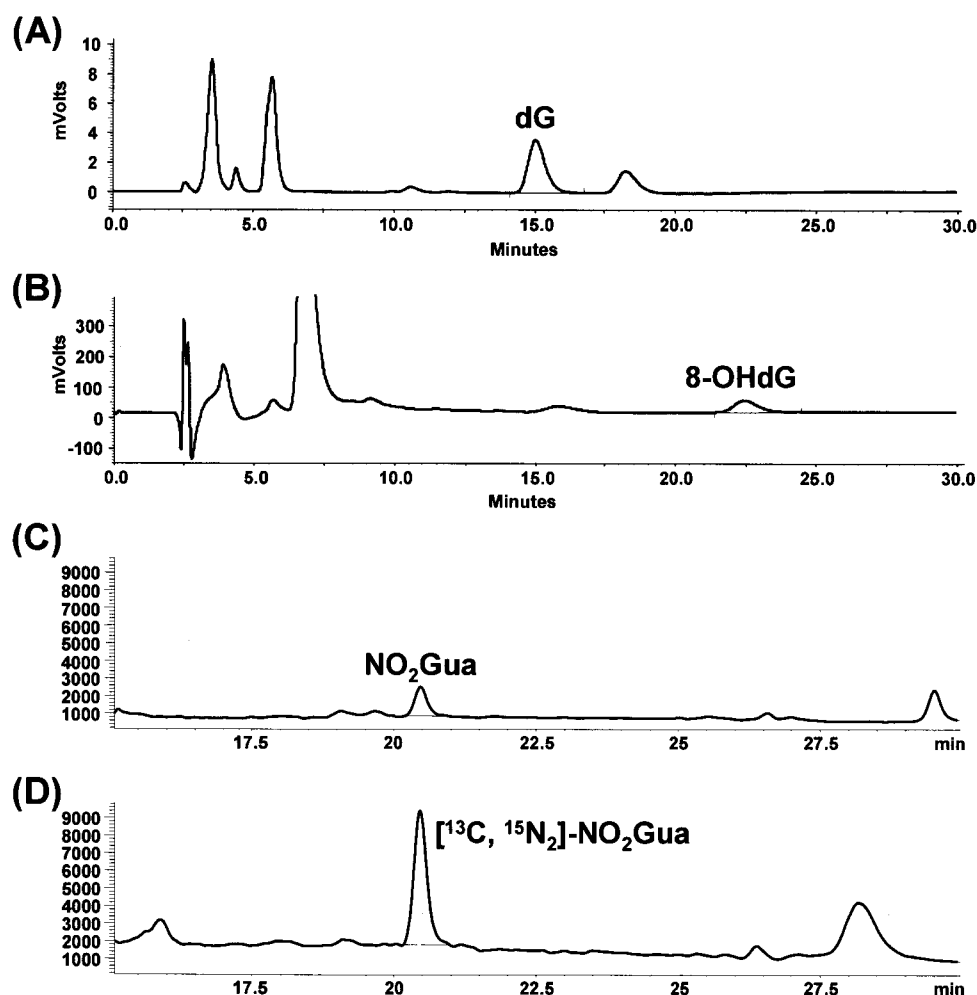


Fig. 21 LC-UV-ECD and CS-LC-ESI-MS chromatograms of calf thymus DNA treated with ONOO⁻. (A) UV (290 nm) chromatogram of dG. (B) ECD (300 mV) chromatogram of 8-OHdG. (C) CS-LC-ESI-MS (SIM 391) chromatogram of NO₂Gua. (D) CS-LC-ESI-MS (SIM 394) chromatogram of [¹³C, ¹⁵N₂]-NO₂Gua as a surrogate standard. Calf thymus DNA (250 μ g/mL) dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with ONOO⁻ at several concentrations for 60 min at 37°C. DNA digestion procedure and LC-UV-ECD conditions are described in the Materials and Methods.

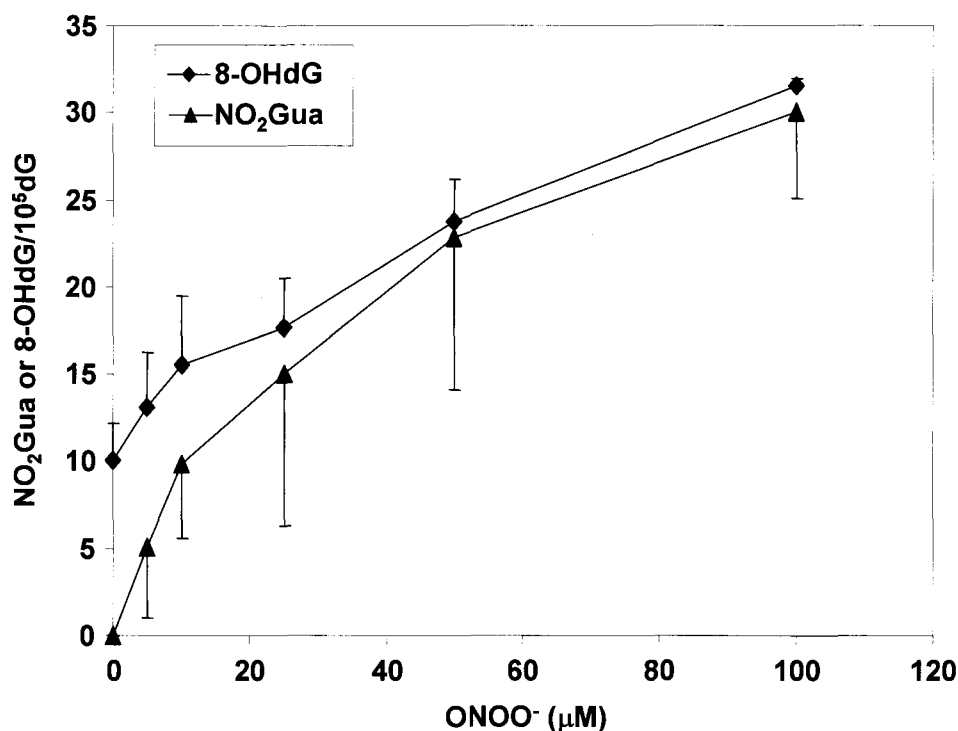


Fig. 22 NO₂Gua and 8-OHdG formation in calf thymus DNA treated with ONOO⁻. Calf thymus DNA (250 μg/mL) dissolved in 1.0 mM DTPA containing sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated with ONOO⁻ at several concentrations for 60 min at 37°C. After DNA digestion, 50 μL portion of the sample was subjected to LC-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 NO₂Gua analysis. The amount of NO₂Gua and 8-OHdG was calculated as NO₂Gua/10⁵dG and 8-OHdG/10⁵dG, respectively. Values are means ± S.D. of three separate experiments.

第4節 小括

本章ではRNSによって引き起こされるDNA損傷の評価法の構築を目的に、DNA中に生成するNO₂Guaと8-OHdGの評価法を構築した。CS-LC-ESI-MSによるNO₂Guaの測定では、グリオキサール誘導体化によりNO₂Gua極性を低下させ、CSシステムを採用することで、オンラインでの試料の精製および濃縮を可能にした。さらに、安定同位体をサロゲート物質として用いることで、高精度な測定法の構築を達成した。その測定感度は検出限界が1.0 nM、定量限界が3.0 nMと良好な結果が得られた。また、すでにDNA中8-OHdGの測定で広く用いられているDNA消化法を採用し、LC-UV-ECDによるdGおよび8-OHdGの測定法を併用することで、一つのDNA試料から、酸化およびニトロ化の二つの修飾塩基の評価を可能にした。

本法を ONOO⁻を反応させた仔牛胸腺 DNA へ適用した結果、ONOO⁻を添加していない対照群では 8-OHdG のみが検出され、NO₂Gua は検出されなかったが、高濃度の ONOO⁻では、8-OHdG と NO₂Gua がほぼ同程度で生成することを明らかにした。これらのことから、ONOO⁻を始めとする RNS による DNA の損傷を評価するには NO₂Gua だけでなく 8-OHdG も評価する必要がある、これらの修飾塩基の評価は RNS が関連する傷害や発がん機構の解明に極めて有用である。

第4章 総括

NO とカテコールの反応によるラジカル反応機構の解明と、NaNO₂ とカテコール併用投与によるラット前胃発がん促進機構への関与の解明では、*in vitro* においてラジカル種の検出と、*in vivo* においてRNSによる酸化およびニトロ化生体分子の検出を行った。

in vitro においてNOとカテコールの反応を検討した結果、カテコールがNOによりキノン体へと酸化される過程において、セミキノラジカル、 $\cdot\text{OH}$ および ONOO \cdot が生成することを明らかにした。さらに *in vivo* における実験では、カテコールとNaNO₂ の併用投与により、投与後2週間でラット前胃においてびらん及び潰瘍性病変が観察された。更に、これらの病変に先立って、併用投与群では投与後12時間で前胃粘膜DNA中8-OHdG値の有意な上昇と、前胃粘膜上皮にNO₂Tyr陽性細胞が検出されたことから、種々の病変やDNAの酸化およびタンパク質のニトロ化は外因性のRNSに起因することを明らかにした。これらの結果は*in vivo*の結果を強く支持するものであり、カテコール、NaNO₂ 併用投与によるラット前胃発がん促進機構にはNOによって引き起こされるラジカル反応と、反応過程において生成するRNSが関与することを明らかにした。NaNO₂ との併用によるラット前胃の発がん促進はカテコールだけでなく、抗酸化物質として知られる種々のフェノール性化合物でも生じることが報告されていることから、本反応機構はそれらの発がん機序の解明にも極めて有用な知見である。

このように、過剰なNO生成は内因性だけでなく外因性であっても、種々の反応を引き起こし、より傷害性の強いONOO \cdot や $\cdot\text{OH}$ を生成する。生体内におけるこれらROS、RNSの生成量を測定することは、種々の疾病の機構解明やその予防につながるが、これらの活性種は極めて反応性が高い。すなわち極めて不安定であることから、*in vivo* においてこれらを測定することは困難である。一方、本実験で採用したDNA修飾物質である8-OHdGの測定や、タンパク質の修飾物質であるNO₂Tyrの検出は、間接的ではあるが生体内におけるROSやRNS生成の評価が可能である。さらに8-OHdGはそれ自体GC:TAトランスバージョンに結びつく変異原性を有していることから、ROSやRNSのバイオマーカーとしてだけでなく、発がんリスクについても同時に評価することができる。このように生体内におけるROS、RNSによる修

飾物質の測定法は、種々の疾病の機構解明やその予防に結びつく。

NO₂Tyr は Tyr の 3 位が RNS によりニトロ化されることで生成することから、既に生体内 NO₂Tyr は RNS 生成の指標になることが知られており、現在までにいくつかの分析法が報告されているが、より簡便で高精度なタンパク中 NO₂Tyr の測定法の構築を行った。すなわち、測定装置には LC-ESI-MS/MS を、サロゲート物質として ¹³C でラベル化された NO₂Tyr を用い、煩雑な前処理操作を排除した。組織タンパクの消化にはプロテアーゼによる酵素処理を採用することで、副生成物の影響を除去した。Tyr および NO₂Tyr の定量限界は 100 および 0.5 nM で、NO₂Tyr については簡便な操作で高感度かつ高精度な測定を達成した。一方、Tyr はタンパク質中に高濃度で存在することから、本法は十分な測定感度を満たしていた。RNS 生成が知られる肝毒性モデルである APAP を投与したマウス肝組織の測定では、NO₂Tyr は対照群を含む全ての試料から検出され、APAP 投与 4 時間で NO₂Tyr/Tyr 値は最大となった。同サンプルを用いて免疫化学染色法による検出についても検討した結果、小葉中心性に NO₂Tyr 陽性細胞が観察され、その染色強度は 4 時間が最大であった。また、投与後 8 時間では NO₂Tyr/Tyr 値の低下が見られたが、組織において NO₂Tyr 陽性細胞が存在する部位で空胞変性が観察されたことから、NO₂Tyr/Tyr 値の低下は細胞の過剰な損傷に由来することを明らかにした。このことから、LC-ESI-MS/MS による検出結果は、APAP 投与による組織病変を反映するものであり、生体内における RNS 生成の評価および RNS によって引き起こされる障害や疾病機序の解明に本法が極めて有用であることを証明した。

さらに、炎症を介した発がんの直接的な要因と考えられる DNA 中 NO₂Gua については、MTNG 誘導体化を用いることで極性を低下させ、CS-LC-ESI-MS による分析法を構築した。CS システムを採用することで、DNA の酵素処理過程に用いる高濃度の塩のオンラインでの除去と試料の濃縮が可能になった。その測定感度は定量限界が 3.0 nM、添加回収試験は 99.4%以上と良好な感度と精度が得られた。DNA 消化法には、DNA 中 8-OHdG 測定に広く用いられている酵素処理法を採用し、従来 8-OHdG を測定していた試料に塩酸および MTNG を添加するという極めて簡便な操作により NO₂Gua の測定を可能にした。さらに、LC-UV-ECD による dG および 8-OHdG 測定法を併用することで、一つの DNA 試料から酸化、ニトロ化両方の修飾物質の評価を可能にした。本法を ONOO⁻を反応させた仔牛胸腺 DNA へ適用した結

果、ONOO⁻の濃度依存的に NO₂Gua および 8-OHdG が生成することを確認し、その濃度は、高濃度の ONOO⁻を反応させた時、ほぼ同程度であった。これらのことから、ONOO⁻による DNA 損傷を評価するには、ニトロ化、酸化の二つの修飾塩基を評価する必要があり、本法は一つの DNA 試料からこれら二つを測定可能であることから、RNS が関連した種々の発がん機構の解明に極めて有用な評価法である。さらに、従来 8-OHdG の生成が起因すると考えられている種々の発がん機構において、RNS の関与についても検討することが可能である。

本論文では、RNS によって誘起される発がん促進機構と、RNS によって生じるタンパクおよび DNA 中ニトロ化生体分子の高感度かつ高精度な分析法の開発について記載した。これらの成果は、RNS による生体内での新たなラジカル反応機構を提唱すると共に、RNS によって修飾された生体分子の有用性を示すものである。さらに、開発したそれら生体分子の分析法は、複雑な前処理操作を排除した汎用性の高い優れた分析法であることから、RNS の新たな生理機能の解明や、RNS によって引き起こされる障害や発がん機構の解明において広く活用し得る知見である。

謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤裕之教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、種々の御助言、御助力をいただきました星薬科大学 薬品分析化学教室 斉藤貢一助教授、伊藤里恵助手、岩崎雄介助手に心から感謝いたします。

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました国立医薬品食品衛生研究所 病理部 広瀬雅雄部長、西川秋佳室長、梅村隆志主任研究官に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御助言を賜りました日本薬科大学 吉村吉博教授に心から感謝申し上げます。

また、本研究にあたり、多大なる御協力を頂きました星薬科大学 薬品分析化学教室 山下真功氏、岡野圭太氏、飯島政芳氏、大柄敦資氏、ならびに多くの御助言と励ましをいただきました薬品分析化学教室 諸先輩方に心から感謝いたします。

本研究に際し、多大なる御強力をいただきました国立医薬品食品衛生研究所 病理部 神吉けい太博士、黒岩有一氏、ならびに多くの御助言と励ましをいただきました諸先生方に心から感謝いたします。

参考文献

- 1) R. Olinski, T. Zastawny, J. Budzbon, J. Skokowski, W. Zegarski, M. Dizdaroglu, DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.* 309 (1992) 193-198.
- 2) K.S. Kasprzak, B.A. Diwan, J.M. Rice, M. Misra, C.W. Riggs, R. Olinski, M. Dizdaroglu, Nickel(II)-mediated oxidative DNA base damage in renal and hepatic chromatin of pregnant rats and their fetuses. Possible relevance to carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 809-815.
- 3) H. Kasai, H. Hayami, Z. Yamaizumi, H. Saito, S. Nishimura, Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 2127-2136.
- 4) M. Nagashima, H. Tsuda, S. Takenoshita, Y. Nagamachi, S. Hirohashi, J. Yokota, H. Kasai, 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Lett.* 90 (1995) 157-162.
- 5) G.M. Laws, S.P. Adams, Measurement of 8-OHdG in DNA by HPLC/ECD: the importance of DNA purity. *Biotechniques* 20 (1996) 36-38.
- 6) D. Nakae, Y. Mizumoto, E. Kobayashi, O. Noguchi, Y. Konishi, Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Lett.* 97 (1995) 233-239.
- 7) S. Boiteux, J.P. Radicella, Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81 (1999) 59-67.
- 8) M. Audebert, J.P. Radicella, M. Dizdaroglu, Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 2672-2678.
- 9) S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman, Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349 (1991) 431-434.
- 10) S.D. Bruner, D.P. Norman, G.L. Verdine, Structural basis for recognition and

repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403 (2000) 859-866.

- 11) T. Yamamoto, K. Hosokawa, T. Tamura, H. Kanno, M. Urabe, H. Honjo, Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels in women with or without gynecologic cancer. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 22 (1996) 359-363.
- 12) A. Matsui, T. Ikeda, K. Enomoto, K. Hosoda, H. Nakashima, K. Omae, M. Watanabe, T. Hibi, M. Kitajima, Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett.* 151 (2000) 87-95.
- 13) D.C. Tarng, T.P. Huang, T.Y. Liu, H.W. Chen, Y.J. Sung, Y.H. Wei, Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney Int.* 58 (2000) 790-799.
- 14) H. Kasai, N. Iwamoto-Tanaka, T. Miyamoto, K. Kawanami, S. Kawanami, R. Kido, M. Ikeda, Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative dna damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (2001) 9-15.
- 15) R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (1980) 373-376.
- 16) R.M. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (1987) 524-526.
- 17) L.J. Ignarro, G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, G Chaudhuri., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84 (1987) 9265-9269.
- 18) F. Murad, S. Waldman, C. Molina, B. Bennett, D. Leitman, Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 249 (1987) 65-76.
- 19) G.A. Bohme, C. Bon, M. Lemaire, M. Reibaud, O. Piot, J.M. Stutzmann, A.

- Doble, J.C. Blanchard, Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993) 9191-9194.
- 20) C.F. Nathan, J.B. Hibbs Jr, Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3 (1991) 65-70.
 - 21) T. Doi, M. Ando, T. Akaike, M. Suga, K. Sato, H. Maeda, Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immun.* 61 (1993) 1980-1989.
 - 22) S.L. James, Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 533-547.
 - 23) B.L. Nguyen, M. Saitoh, J.A. Ware, Interaction of nitric oxide and cGMP with signal transduction in activated platelets. *Am. J. Physiol.* 261 (1991) H1043-1052.
 - 24) S.G. Laychock, M.E. Modica, C.T. Cavanaugh, L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* 129 (1991) 3043-3052.
 - 25) J.P. Tolins, Mechanisms of glucagon-induced renal vasodilation: role of prostaglandins and endothelium-derived relaxing factor. *J. Lab. Clin. Med.* 120 (1992) 941-948.
 - 26) D.A. Geller, A.K. Nussler, M. Di Silvio, C.J. Lowenstein, R.A. Shapiro, S.C. Wang, R.L. Simmons, T.R. Billiar, Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90 (1993) 522-526.
 - 27) C. Szabo, C. Thiernemann, J.R. Vane, Inhibition of the production of nitric oxide and vasodilator prostaglandins attenuates the cardiovascular response to bacterial endotoxin in adrenalectomized rats. *Proc. Biol. Sci.* 253 (1993) 233-238.
 - 28) T. M. Cocks, J. A. Angus, Comparison of relaxation responses of vascular and non-vascular smooth muscle to endothelium-derived relaxing factor

- (EDRF), acidified sodium nitrite (NO) and sodium nitroprusside. *Arch. Pharmacol.* 341 (1990) 364-372.
- 29) A. Samouilov, P. Kuppusamy, and L. Zweier, Evaluation of the Magnitude and Rate of Nitric Oxide Production from Nitrite in Biological Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 357 (1998) 1-7.
 - 30) G. M. Mcknight, L. M. Smith, R. S. Drummond, C. W. Duncan, M. Golden, N. Benjamin, Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* 40 (1997) 211-214.
 - 31) J. O. Lundberg, E. Weitzberg, J. M. Lundberg, K. Alveing, Intragstric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 35 (1994) 1543-1546.
 - 32) K. Iijima, J. Grant, K. McElroy, V. Fyfe, T. Preston, K. E. McColl, Novel machanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastro-oesophageal junction cancers. *Carcinogenesis* 24 (2003) 1951-1960.
 - 33) K. Okazaki, Y. Ishii, Y. Kitamura, S. Maruyama, T. Umemura, M. Miyauchi, M. Yamagishi, T. Imazawa, A. Nishikawa, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, M. Hirose, 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 (2006) 175-182.
 - 34) R.E. Huie, S. Padmaja, The reaction of no with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18 (1993) 195-199.
 - 35) Y. Hattori, C. Nishigori, T. Tanaka, K. Uchida, O. Nikaido, T. Osawa, H. Hiai, S. Imamura, S. Toyokuni, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J. Invest. Dermatol.* 107 (1996) 733-737.
 - 36) H.J. Chen, Y.M. Chen, C.M. Chang, Lipoyl dehydrogenase catalyzes reduction of nitrated DNA and protein adducts using dihydrolipoic acid or ubiquinol as the cofactor. *Chem. Biol. Interact.* 140 (2002) 199-213.
 - 37) J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Peroxynitrite-induced oxidation

and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* 14 (2006) 109-21.

- 38) A. Graham, N. Hogg, B. Kalyanaraman, V. O'Leary, V. Darley-USmar, S. Moncada, Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* 330 (1993)181-185.
- 39) H. Ischiropoulos, AB. al-Mehdi, Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* 364 (1995) 279-282.
- 40) Y. Kato, S. Kawakishi, T. Aoki, K. Itakura, T. Osawa, Oxidative Modification of Tryptophan Residues Exposed to Peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 82-84.
- 41) D. Francescutti, J. Baldwin, L. Lee, B. Mutus, Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein Eng.* 9 (1996) 189-194.
- 42) R. Radi, JS. Beckman, KM. Bush, BA. Freeman, Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288 (1991) 481-487.
- 43) V. M. Darley-USmar, N. Hogg, V. J. O'Leary, M. T. Wilson, S. Moncada, The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* 17 (1992) 9-20.
- 44) H. Rubbo, R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk, BA. Freeman, Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 26066-26075.
- 45) S.K. Kong, M.B. Yim, E.R. Stadtman, P.B. Chock, Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U S A. 93 (1996) 3377-3382.

- 46) J.P. Eiserich, A.G. Estevez, T.V. Bamberg, Y.Z. Ye, P.H. Chumley, J.S. Beckman, B.A. Freeman, Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96 (1999) 6365-6370.
- 47) F. Yamakura, T. Matsumoto, H. Taka, T. Fujimura, K. Murayama, 6-Nitrotryptophan: a specific reaction product of tryptophan residue in human Cu, Zn-SOD treated with peroxynitrite. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527 (2003) 745-749.
- 48) K. Ikeda, B. Yukihiro Hiraoka, H. Iwai, T. Matsumoto, R. Mineki, H. Taka, K. Takamori, H. Ogawa, F. Yamakura, Detection of 6-nitrotryptophan in proteins by Western blot analysis and its application for peroxynitrite-treated PC12 cells. *Nitric Oxide* (inpress).
- 49) S. Kawanishi, Y. Hiraku, Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid. Redox. Signal.* 8 (2006) 1047-1058.
- 50) J.P. Spencer, J.Wong, A. Jenner, O.I. Aruoma, C.E. Cross, B. Halliwell, Base modification and strand breakage in isolated calf thymus DNA and in DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholinocydnnonimine. *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 1152-1158.
- 51) K. Inai, Y. Aoki, S. Tokuoka, Chronic toxicity of sodium nitrite in mice, with reference to its tumorigenicity. *Gann* 70 (1979) 203-208.
- 52) G. Eisenbrand, B. Spiegelhalder, R. Preussmann, Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology* 37 (1980) 227-231.
- 53) Mirvish S. S.: Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31 (1975) 325-351.
- 54) IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 71 (1999) 433-451.
- 55) M. Hirose, S. Fukushima, R. Hasegawa, T. Kato, H. Tanaka, N. Ito, Effects of sodium nitrite and catechol or 3-methoxycatechol in combination on rat

stomach epithelium. *Jpn. J. Cancer Res.* 81 (1990) 857-861.

- 56) Y. Yoshida, M. Hirose, K. Takaba, J. Kimura, N. Ito, Induction and promotion of forestomach tumors by sodium nitrite in combination with ascorbic acid or sodium ascorbate in rats with or without N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine pre-treatment. *Int. J. Cancer* 56 (1994) 124-128.
- 57) M. Hirose, H. Tanaka, S. Takahashi, M. Futakuchi, S. Fukushima, N. Ito, Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in combination in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Res.* 53 (1993) 32-37.
- 58) M. Kawabe, K. Takaba, Y. Yoshida, M. Hirose, 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 (1994) 17-25.
- 59) M. Hirose, S. Fukushima, Y. Kurata, H. Tsuda, M. Tatematsu, N. Ito, Modification of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced forestomach and glandular stomach carcinogenesis by phenolic antioxidants in rats. *Cancer Res.* 48 (1988) 5310-5315.
- 60) R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman, Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4244-4250.
- 61) J. S. Beckman, W. H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271 (1996) C1424-C1437.
- 62) W. A. Pryor, G. L. Squadrito, The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268 (1995) L699-L722.
- 63) C. Ducrocq, B. Blanchard, B. Pignatelli, H. Ohshima, Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1068-1077.
- 64) J-P. Jay-Gerin, C. Ferradini, Are there protective enzymatic pathways to regulate high local nitric oxide (NO) concentrations in cells under stress

conditions? Biochimie 82 (2000) 161-166.

- 65) U. Amparo, M. L.-G. Pilar, M. G. Carmen, P. Jaime, M. Alicia, H. Guadalupe, C, E. Juan. O. Jpse-Enrique, M. Manuel, Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: the influence of antioxidant defenses. Free radical. Biol.Med. 35 (2003) 1373-1381.
- 66) R. de la puerta, ME. Martinez. Dominguez, V. Ruiz-Gutierrez, JA. Flavill, JO. Hoult, Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. Life Sci. 69 (2001) 1213-1222.
- 67) H. Yoshioka, K. Sugiura, R. Kawahara, T. Fujita, M. Makino, M. Kamiya, S. Tsuyumu, Agric. Biol. Chem. 55 (1991) 2717-2723.
- 68) N. W. Kooy, J. R. Royall, H. Ischiropoulos, J. S. Beckman, Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free radical. Biol. Med. 16 (1994) 149-156.
- 69) P. Benoit, M. C. Andre, K.-B. Suzanne, B. Sophie, L. Rosalie, J.-G. Jean-Paul, In vitro generation of peroxynitrite by 2- and 4-hydroxyestrogens in the presence of nitric oxide. Chem. Res. Toxicol. 14 (2001) 547-554.
- 70) H. Kasai, Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. Free Radical. Biol. Med. 33 (2002) 450-456.
- 71) H. J. Helbock, K. B. Beckman, M. K. Shigenaga, P. B. Walter, A. A. Woodall, H. C. Yeo, B. N. Ames, DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 (1998) 288-293.
- 72) K. Hirakawa, S. Oikawa, Y. Hiraku, I. Hirosawa, and S. Kawanishi, Catechol and hydroquinone have different redox properties responsible for their differential DNA-damaging ability. Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 76-82.
- 73) F. Yamaguchi, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, T. Ariga, Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H(2)O(2)/NaOH/DMSO system. J. Agri. Food Chem. 47 (1999) 2544-2548.

- 74) S. Moncada, E.A. Higgs, Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* 21 (1991) 361-374.
- 75) C. Nathan, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB. J.* 6 (1992) 3051-3064.
- 76) H. Ischiropoulos, L. Zhu, J.S. Beckman, Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 298 (1992) 446-451.
- 77) H. Jaeschke, V.B. Schini, A. Farhood, Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci.* 50 (1992) 1797-1804.
- 78) R.E. Huie, S. Padmaja, The reaction of no with superoxide. *Free. Radic. Res. Commun.* 18 (1993) 195-199.
- 79) J.S. Beckman, W.H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271 (1996) C1424-1437.
- 80) T.R. Knight, Y.S. Ho, A. Farhood, H. Jaeschke, Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 3 (2002) 468-475.
- 81) J.A. Hinson, S.L. Michael, S.G. Ault, N.R. Pumford, Western blot analysis for nitrotyrosine protein adducts in livers of saline-treated and acetaminophen-treated mice. *Toxicol. Sci.* 53 (2000) 467-473.
- 82) L.P. James, S.S. McCullough, L.W. Lamps, J.A. Hinson, Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol. Sci.* 2 (2003) 458-467.
- 83) M.T. Frost, B. Halliwell, P. Moore, 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.
- 84) E. Schwedhelm, D. Tsikas, F.M. Gutzki, J.C. Frolich, Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state. *Anal. Biochem.* 276 (1999) 195-203.
- 85) J.R. Crowley, K. Yarasheski, C. Leeuwenburgh, J. Turk, J.W. Heinecke,

- 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.
- 86) M.J. Miller, J.H. Thompson, X.J. Zhang, H. Sadowska-Krowicka, J.L. Kakkis, U.K. Munshi, M. Sandoval, J.L. Rossi, S. Eloby-Childress, J.S. Beckman, Y.Z. Ye, C.P. Rodi, P.T. Manning, M.G. Currie, D.A. Clark, Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 109 (1995) 1475-1483.
- 87) K. Jiao, S. Mandapati, P.L. Skipper, S.R. Tannenbaum, J.S. Wishnok, Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxynitrite. *Anal. Biochem.* 293 (2001) 43-52.
- 88) H. Ishiropoulos, M.F. Beers, S.T. Ohnishi, D. Fisher, S.E. Garner, S.R. Thom. Nitric oxide production and perivascular nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2260-2267.
- 89) H. Kaur, B. Halliwell, 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.
- 90) R. S. Sodum, S. A. Akerkar, E. S. Fiala, Determination of 3-nitrotyrosine by high-pressure liquid chromatography with a dual-mode electrochemical detector. *Anal. Biochem.* 280 (2000) 278-285.
- 91) K. Hensley, M.L. Maidt, Z. Yu, H. Snag, W.R. Markesbery, R.A. Floyd, Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J. Neurosci.* 18 (1998) 8126-8132.
- 92) J.S. Althaus, K.R. Schmidt, S.T. Fountain, M.T. Tseng, R.T. Carroll, P. Galatsis, E.D. Hall. LC-MS/MS detection of peroxynitrite-derived 3-nitrotyrosine in rat microvessels. *Free Radical. Biol. Med.* 29 (2000) 1085-1095.
- 93) D. Thierry, R. Janique, V Jacques, H.S. Richard, Artifactual 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.

- 94) J.A. Hinson, S.L. Pike, N.R. Pumford, P.R. Mayeux, Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 6 (1998) 604-607.
- 95) S. Pinlaor, N. Ma, Y. Hiraku, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripa, P. Sithithawom, S. Kawanishi, Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis* 25 (2004) 1535-1542.
- 96) X. Ding, Y. Hiraku, N. Ma, T. Kato, K. Saito, M. Nagahama, R. Semba, K. Kuribayashi, S. Kawanishi, Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease. *Cancer Sci.* 96 (2005) 157-163.
- 97) P. Chaiyarit, N. Ma, Y. Hiraku, S. Pinlaor, P. Yongvanit, D. Jintakanon, M. Murata, S. Oikawa, S. Kawanishi, Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci.* 96 (2005) 553-559.
- 98) S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Pinlaor, N. Ma, Oxidative and nitrate DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol. Chem.* 387 (2006) 365-372.
- 99) R.A. Flyd, M.S. West, K.L. Eneff, W.E. Hogsett, D.T. Tinger, Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 262 (1988) 266-272.
- 100) D. Nakae, Y. Mizumoto, E. Kobayashi, O. Noguchi, Y. Konishi, Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Lett.* 97 (1995) 233-239.
- 101) P.F. Bove, A. van der Vliet, Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radical. Biol. Med.* 41

(2006) 515-527.

- 102) K. Merchant, H. Chen, T.C. Gonzalez, L.K. Keefer, B.R. Shaw, Deamination of single-stranded DNA cytosine residues in aerobic nitric oxide solution at micromolar total NO exposures. *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 891-896.
- 103) J. Murata, M. Tada, R.D. Iggo, Y. Sawamura, Y. Shinohe, H. Abe, Nitric oxide as a carcinogen: analysis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide. *Mutat. Res.* 379 (1997) 211-218.
- 104) R.E. Huie, S. Padmaja, The reaction of NO with superoxide. *Free Radical. Res. Commun.* 18 (1993) 195-199.
- 105) V. Yermilov, J. Rubio, M. Becchi, M.D. Friesen, B. Pignatelli, H. Ohshima, Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 16 (1995) 2045-2050.
- 106) V. Yermilov, J. Rubio, H. Ohshima, Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS. Lett.* 37 (1995) 207-210.
- 107) V. Yermilov, Y. Yoshie, J. Rubio, H. Ohshima, Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS. Lett.* 399 (1996) 67-70.
- 108) C. Szabo, H. Ohshima, DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1 (1997) 373-385.
- 109) J. Tuo, L. Liu, H. E. Poulsen, A. Weimann, O. Svendsen, S. Loft, Importance of guanine nitration and hydroxylation in DNA in vitro and in vivo. *Free Radical. Biol. Med.* 29 (2000) 147-155.
- 110) Y.S. Hsieh, B.C. Chen, S.J. Shiow, H.C. Wang, J.D. Hsu, C.J. Wang, Formation of 8-nitroguanine in tobacco cigarette smokers and in tobacco smoke-exposed Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.* 140 (2002) 67-80.
- 111) T. Sawa, M. Tatemichi, T. Akaike, A. Barbin, H. Ohshima, Analysis of urinary 8-nitroguanine, a marker of nitrative nucleic acid damage, by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled

- with immunoaffinity purification: association with cigarette smoking. *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 711-720.
- 112) K. Soda, Y. Ohba, K. Zaitzu, Assay of human platelet guanylate cyclase activity by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. *J. Chromatogr. B.* 752 (2001) 55-60.
- 113) Y. Ohba, K. Soda, K. Zaitzu, A sensitive assay of human blood platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase activity by HPLC using fluorescence derivatization and its application to assessment of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 567-569.
- 114) S. Yonekura, M. Iwasaki, M. Kai, Y. Ohkura, Determination of guanine and its nucleosides and nucleotides in human erythrocytes by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization using phenylglyoxal reagent. *J. Chromatogr. B.* 654 (1994) 19-24.
- 115) M. Tsuchie, S. Hara, M. Kimura, M. Fujii, N. Ono, M. Kai, Determination of anti-virus drug, ganciclovir, in human serum by HPLC with precolumn fluorescence derivatization using phenylglyoxal. *Anal. Sci.* 17 (2001) 811-814.
- 116) M. Kai, Y. Ohkura, S. Yonekura, M. Iwasaki, Selective determination of guanine and its nucleosides and nucleotides by reaction with phenylglyoxal as a fluorogenic reagent. *Anal. Chim. Acta.* 207 (1988) 243-249.
- 117) C.E. Vaca, M. Conradi, M. Sievertzon, J. Bergman, Synthesis of fluorescent derivatives of 7-methylguanine through reaction with 2-aryl-substituted malondialdehydes: analysis by HPLC with fluorescence detection. *Chem. Biol. Interact.* 93 (1994) 235-249.