

## *N* -Nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)投与後の組織酸化とDNA中 8-hydroxydeoxiguanosine(8-OHdG)量の変化の関連

高 林 ふみ代・原 田 昇

The Relation between Lipid peroxidation and the amount of 8- hydroxydeoxiguanosine (8- OHdG), after Single Treatment with *N*- Nitrosobis(2- oxopropyl)amine (BOP)

TAKABAYASHI, Fumiyo  
HARADA, Noboru

### 要旨

本実験は、組織の酸化障害の経過と、DNA 酸化障害の指標として近年注目されている DNA 中8- OHdG 量の変化との関連を検討することを目的とした。

BOP 投与によるハムスター膵臓組織酸化障害の経時的変化を、従来から組織酸化指標として用いられている過酸化脂質値 (TBA 値) を用いて測定し、組織 DNA 中の8- OHdG 値の変化と比較した。TBA 値は BOP 投与後上昇し、1時間でピークを示し48時間後までには BOP 投与前の値に回復した。また、8- OHdG 値は TBA 値の変化に遅れ2時間でピークを示し、48時間後までには BOP 投与前の値に回復した。更に、肝臓においても同様の比較をしたところ、TBA 値、8- OHdG 値共に BOP 投与後にごくわずかの上昇の後、共に12時間までに回復した。

これらの結果より、組織の酸化障害の発生と DNA 中8- OHdG 量には関連のあることが明らかになった。

### はじめに

様々な条件により細胞や組織内で oxygen- free- radical が産生されると、引き続きそれらに起因する酸化性の障害が誘発される。これらの酸化性の障害を測定する方法として TBA 値が汎用されている。一方、8- OHdG は DNA の酸化障害を測定する指標として注目されているが、特に発癌物質投与後に上昇することから発癌性との関連が近年研究されている。酸化障害の測定指標が前者は組織内脂質、後者は組織 DNA と異なっているが、どちらも oxygen- free- radical に起因する変化を測定している。しかし、これらの測定値について比較した報告はこれまでになく、今後の発癌性の指標の選択とも関連して重要な問題であるといえる。

そこで今回は、動物実験で標的臓器に酸化障害を招くことが報告されている *N* - ニトロソ化合物の一種で、ハムスター膵癌誘発物質である BOP をハムスターに皮下投与し、経時的に標的臓器である膵臓と、非標的臓器の肝臓を摘出し、それらの組織 TBA 値と DNA 中8- OHdG 値を測定し比較した。

## 実験方法

### 1) 動物

シリアンゴールデンハムスター 6週令 雌性 105匹

### 2) 実験方法

一週間の通常飼育の後、ハムスターは15匹ずつ7群に分けられ BOP を20mg/kg body weight 皮下注射により投与された。その後、0, 1, 2, 6, 12, 24, 48時間後に各実験群の動物をネンブータル麻酔下開腹し、腹部大動脈から脱血屠殺し、生理食塩水で肝臓と膵臓を灌流後摘出した。

各群中5匹を過酸化脂質値測定用とし、10匹を8-OHdG 測定用とした。過酸化脂質値はTBA法により測定し、Lowry法によって求めた組織タンパク質量あたりに換算して求めた。また、DNA中8-OHdG量は、組織からDNAを抽出した後、EC-detectorと組み合わせた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定し、UV-detectorとHPLCによって測定した $10^5$ グアノシン残基当たりの数値に換算して求めた(1)。

また、有意差検定はStudent's *t* testにより、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

## 結果

### 1) 膵臓組織 TBA 値の変化

膵臓における TBA 値の変化を Fig.1(A)に示した。BOP 投与後上昇し1時間に於いてピーク ( $0.541 \pm 0.045$  nmol of malondialdehyde/ mg of protein,  $n = 5$ ) を示した後低下し、24時間で投与前の値 ( $0.455 \pm 0.037$ ,  $n = 10$ ) に回復した。1時間値は、初期値より有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。

### 2) 膵臓 DNA 中8-OHdG 量の変化

膵臓 DNA 中8-OHdG 量の変化を Fig.1(B)に示した。BOP 投与後6時間に最高値を示した後低下し、48時間までに投与前の値に回復した。2時間値 ( $2.488 \pm 0.626$  8-OHdG/105dG,  $n = 7$ ) 及び6時間値 ( $2.586 \pm 0.791$ ,  $n = 10$ ) は、初期値 ( $1.414 \pm 0.212$ ,  $n = 10$ ) より有意に高値であった(ともに  $p < 0.001$ )。

### 3) 肝臓組織 TBA 値の変化

肝臓における TBA 値の変化を Fig.2(A)に示した。BOP 投与後2時間でわずかな上昇 ( $0.377 \pm 0.021$ ,  $n = 5$ ) がみられたものの、6時間で投与前の値 ( $0.36 \pm 0.042$ ,  $n = 10$ ) に回復した。

### 4) 肝臓 DNA 中8-OHdG 量の変化

肝臓 DNA 中8-OHdG 量の変化を Fig.2(B)に示した。BOP 投与後1時間でわずかな上昇 ( $1.352 \pm 0.533$ ,  $n = 3$ ) がみられたが24時間までに投与前の値 ( $0.88 \pm 0.102$ ,  $n = 6$ ) に回復した。

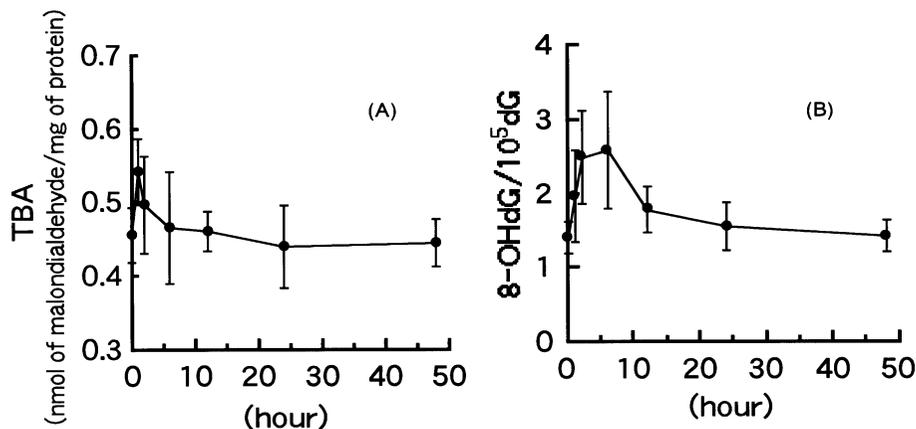


Fig. 1 脾臓のBOP投与後の (A)TBA値、(B)8-OHdG値の経時的変化

TBA値は、投与後1時間でsteady state levelと比較して有意な上昇( $p < 0.01$ )を示し、24時間で回復した。8-OHdGは、投与後2および6時間でsteady state levelと比較して有意な上昇( $p < 0.001$ )を示し、48時間で回復した。

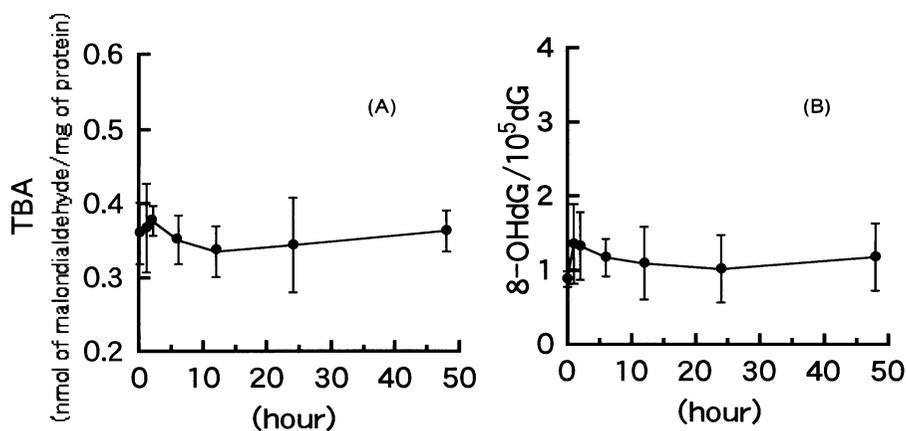


Fig. 2 肝臓のBOP投与後の (A)TBA値、(B)8-OHdG値の経時的変化

TBA値は、投与後2時間でわずかに上昇した。8-OHdGは、投与後1、2時間でわずかに上昇した。

### 考察

8- OHdG は、DNA のデオキシグアノシン残基の C- 8位に - OH の結合したものであり、DNA の酸化障害の指標であるが、oxygen- free- radical を発生する物質あるいは条件によって生成

することが知られている。また、発癌物質投与によって標的組織の DNA 中の 8-OHdG 量が上昇することや 8-OH グアノシンに相対する部分やその付近で DNA の複製ミスが誘発されることが *in vivo*, *in vitro* 両方で示されており、発癌との関係が指摘されている(1-3)。一方、TBA 値は組織の過酸化脂質量を測定したもので、組織酸化指標として汎用されている。これも、oxygen-free-radical を発生する物質あるいは条件によって値が上昇する。

発癌物質である N-ニトロソ化合物は、initiation dose 投与で一過性の標的組織の脂質過酸化を招くことが報告されているが(4)、今回の実験でも BOP による標的臓器(脾臓)の一過性の組織脂質過酸化が示された。更に、脂質過酸化の後に DNA 内 8-OHdG の一過性の上昇も示された。これらの結果は、BOP 投与によって標的組織で oxygen-free-radical の発生があったことを示している。しかし、脂質過酸化と DNA 酸化の上昇には時間的なずれがあり、双方が発生した oxygen-free-radical に単純に反応しているとはいえない。現段階では、例えば SOD (superoxide dismutase) などの oxygen-free-radical 消去系の酵素の処理からオーバーフローしたものが脂質過酸化の原因となり、更に処理に余った oxygen-free-radical が DNA 酸化を招くといった因果関係を結論はできない。さらに、oxygen-free-radical の消去系物質の動態をあわせて調べる必要がある。

また、今回の結果は、組織脂質過酸化を招く物質が同時に、DNA の酸化障害の原因つまり発癌性を有する可能性のあることが示唆され、今後検討の必要な課題であるといえる。

#### 文献

- 1) Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res* 1996; 316:277-85
- 2) Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1986;137:841-6
- 3) Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y. Oral administration of the remnal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis* 1987;8:1959-61
- 4) Chung FL, Xu Y. Increased 8-oxodeoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosoamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 1992;13:1269-72
- 5) Ahotupa M, Bussacchini-Griot V, Bereziat JC, Camus AM, Bartsch H. Rapid oxidative stress induced by N-nitrosamines *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1987;146:1047-1054

[ 1996年10月30日受理 ]

