



**Title:** LC/MS/MS detection of uric acid oxidation metabolites to evaluate reactive oxygen and nitrogen species in vivo with application to pseudo-inflammation

(LC/MS/MS による尿酸酸化代謝物の検出と疑似炎症への応用による生体内活性酸素種および窒素種の評価)

**Authors:** Yuka Yokozawa, Haruki Watanabe, Aya Matsubara, Rina Horinouchi, Sayaka Iida, Yorihiro Yamamoto, Akio Fujisawa

(横澤優花 (東京工科大 バイオニクス専攻), 渡部春輝 (東京工科大 バイオニクス専攻),

松原彩 (東京工科大 バイオニクス専攻), 堀ノ内里奈 (東京工科大 バイオニクス専攻),

飯田沙也加 (東京工科大 助手), 山本順寛 (元東京工科大), 藤沢章雄 (東京工科大 教授))

**Journal:** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition (accepted on 28 Oct 2024)

**掲載年月:** 2025 年 1 月

**研究概要:** 尿酸は水溶性の抗酸化物質であり、活性酸素・窒素種 (Reactive oxygen/nitrogen specie, ROS) に対して高い反応性を示す。我々は現在までに、種々の ROS 特異的な尿酸酸化生成物を同定してきた。尿酸は一重項酸素、次亜塩素酸イオン、ヒドロキシルラジカル、およびパーオキシナイトライトと反応すると、パラバン酸、5-*N*-carboxyimino-6-aminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione, アラントイン、およびトリウレットを生成する。そこで本研究では、これら ROS 特異的な尿酸酸化生成物の微量分析システムを構築し、*in vivo* で生成する ROS の同定を目指した。分析には高感度および高選択性が期待されるタンデム型質量分析計付き HPLC (LC/MS/MS) を用いた。いずれの尿酸酸化生成物も pmol レベルでの高感度分析および定量が可能であること、ヒト血漿中では比較的安定であることが示され、*in vivo* で発生する ROS の同定が可能であることが示唆された。そこで、種々の ROS が発生することが予想される炎症反応に着目した。健康人から採取したヒト血液に、リポポリサッカライド (LPS) を添加して疑似炎症を引き起こし、ROS 特異的な尿酸酸化生成物の変化を観察した。アラントイン、トリウレット、そしてパラバン酸の加水分解生成物であるオキサル尿酸が LPS 添加直後から増加し、ヒドロキシルラジカル、パーオキシナイトライト、および一重項酸素の生成が示唆された。また、5-*N*-carboxyimino-6-aminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione が LPS 添加後 6 時間から増加し、次亜塩素酸イオンの生成も示唆された。

**研究背景:** 活性酸素・窒素種 (Reactive oxygen/nitrogen specie, ROS) が引き起こす酸化ストレスは、老化や種々の疾病の原因と考えられている。したがって *in vivo* で発生する ROS を同定することは臨床的意義が大きい。しかし、ROS は反応性が高く不安定であり、直接検出することは困難である。したがって、生体内基質と ROS との特異的な反応生成物をマーカーとして検出することで、間接的に ROS の同定が可能になると考えた。この場合の生体内基質として、1) 生体内でユビキタスに高濃度で存在し、2) ROS との反応性が高く、3) ROS 特異的な反応生成物を与えることが必要である。このような条件を満たす化合物に尿酸がある。このことに着目して、我々は尿酸の ROS 特異的な反応生成物を同定してきた。そこで、本研究でその微量分析系を構築し、*in vivo* で発生する ROS の同定を目指した。

**研究成果:** 本分析系を用いて、*in vivo* で発生する ROS の同定が可能であることが示唆された。

**社会的・学術的なポイント:** 本研究で開発した分析法を応用することで、種々の疾病で発生している ROS を同定し、新規の抗酸化療法の開発や、原因不明の疾病の発症メカニズムの解明に役立つと考えられる。

**用語解説:**

**HPLC:** 高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography).