

食品由来抗酸化物質の安全性・有効性評価に関する研究 (その1)

酸化ストレスバイオマーカーとしての8-OHdG 測定の検討

伊藤貴美子・浅田茉美・角南幸穂・田中まなみ・田中萌子・村上恵梨・柳谷有美・若場祐子・村田真理子*

*三重大学医学部

Evaluation of the safety and effectiveness of food origin antioxidants (1st report) : analysis of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress

K. ITO, M. ASADA, S. SUNAMI, M. TANAKA, M. TANAKA, E. MURAKAMI, Y. YANAGITANI, Y. WAKABA, M. MURATA

1. はじめに

好気性生物は、酸素を利用してその生命活動を維持しているが、生体内に取り込まれた酸素のうち数%は活性酸素と呼ばれる、より反応性に富む不安定な酸素種に変わる。活性酸素の多くはミトコンドリアでATPが産生される際に生じるが、その他にも生体内の様々な代謝過程や、ある種の病態において生成することが知られている。また活性酸素は種々の化学物質や紫外線、放射線などの外因性因子によっても生成する。一方、生体内には生成した活性酸素に対するさまざまな防御機構も存在している。例えば、**superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase**などの抗酸化酵素やグルタチオン、ビタミンC、ビタミンEなどの抗酸化物質が生体内に広く分布しており、活性酸素から生体を保護している。また、活性酸素は、病原微生物による感染を防いだり、細胞内シグナル伝達物質の役割を担ったりするなど生体にとって必要な働きもあることが明らかになっている。したがって、活性酸素は生体内でその生成と消去がバランス良く保たれていることが望ましく、何らかの要因でそのバランスが崩れると、生体に悪影響を及ぼすと考えられる。特に活性酸素が増加すると、酸化ストレスとして生体成分(核酸、蛋白質、脂質など)が攻撃を受けるため、発癌や動脈硬化症、神経変性疾患などの原因となり、更には老化にも関連することが示唆されている。

近年、高齢化の進展や健康意識の高まりから、健康効果を謳う多種多様な食品やサプリメントが注目を集めている。とりわけ、野菜や果物を十分に摂取する食事が、がんや心臓病のリスクを下げることから、これらに含まれるビタミンやポリフェノールなどの抗酸化物質が疾

病予防に有効であると期待されている。しかしながら、食品由来抗酸化物質であるβ-カロテンを喫煙者に大量投与した疫学介入研究では肺がんの有意な増加が認められ、過量の抗酸化物質による健康障害の可能性が明らかになった¹⁾。最近の疫学研究でも、抗酸化物質は消化器系がんの死亡率を増加させると報告されている²⁾。先に述べたように、生体内における活性酸素の代謝は、種々の内因性、外因性要因が複雑に相互作用しながらバランスを保っていることから、単一の抗酸化物質を多量に摂取することによりこのバランスが崩れ、生体に有害な作用を及ぼす可能性がある。これまで食品の抗酸化成分に関する研究はその有効性を示すものが大半で、安全性についての基礎研究はほとんど行われていないことから、今後、食品(成分)の疾病予防作用を効果的に利用するためには、種々の抗酸化物質の安全性についても十分に検討することが極めて重要である。

生体内の酸化ストレスは、8-OHdG(8-hydroxydeoxyguanosine)の尿中や血液中の動態を把握することにより有効に評価できると期待されている。DNA塩基の一つで

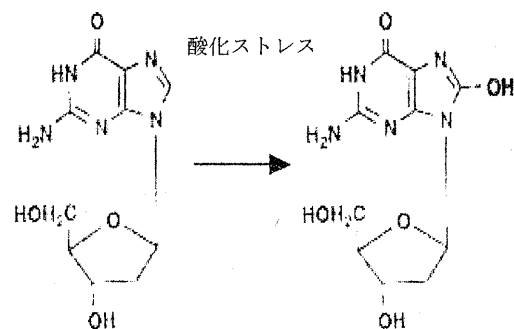


図1. 8-OHdGの化学構造

ある dG (deoxyguanosine) の 8 位が酸化された 8-OHdG (図 1) は変異原性を有しており³⁾、又電気化学検出器 (ECD) 付き HPLC などにより極めて感度良く測定できることなどから⁴⁾、これまでに最もよく研究されてきた DNA の損傷塩基である。特に尿中 8-OHdG の分析は、サンプルの入手が容易であることから、食品由来の抗酸化物質についてヒトでの健康影響を調べる場合に有力な評価系の一つとなりうる。しかしながら、尿中 8-OHdG 分析に関しては、現状では未だ分析方法、正常値、日内・日間・季節変動、交絡因子など未解決の問題が多く残されており、十分な基礎データの蓄積が必要である。そこで本研究では、尿中 8-OHdG を指標とした生体内酸化ストレス評価法の確立を目指して、分析方法 (特にクレアチニン補正について) 及び健常者における個人差、日間変動などを検討した。更に、健常者の 8-OHdG 値に影響を及ぼす要因を明らかにするための基礎資料を得る目的で、生活習慣及び食生活習慣に関する調査をアンケート方式により実施した。

2. 方法

1) 検体採取方法

健常ボランティアに対し、ヘルシンキ宣言に則り、研究の趣旨と方法を説明し、文書にて同意が得られたものを被験者とした。まず予備実験として、7 名 (女性、年齢 19~20 歳) の被験者に対して平成 17 年 7 月にそれぞれ 5 回 (5 日) 早朝尿の採取を依頼し、マイクロチューブ中 (~0.5 μ l x 4 tubes/ sample) で -80 $^{\circ}$ C 保存した。次に、生活習慣と尿中 8-OHdG 値との関連を検討することを目的に、39 名 (女性、年齢 19~22 歳) の被験者に対して、平成 17 年 11 月に 3 回 (3 日) 早朝尿の採取を依頼し、同様に処理し保存した。

2) 尿中 8-OHdG の測定方法

尿中 8-OHdG 値は、葛西らの方法⁵⁾ により定量した (図 2)。すなわち、冷凍保存した尿試料を解凍後、4 $^{\circ}$ C 15000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 47 μ l をオートサンプラー用チューブに入れ、マーカーとして 8-hydroxyguanosine 3 μ l を加えた後、プレカラムを接続した HPLC-ECD に 10 μ l を注入した。尿中 8-OHdG はきわめて微量であるため、紫外線検出器では検出できないが、ECD によって感度よく測定することができる。又、尿中には夾雑物が多いため、紫外線検出器でマーカーを検出後、バルブを切り替えて

8-OHdG を含むフラクションのみ ECD に送ることに より、ECD の汚染を最小限にとどめることができる⁶⁾。測定値は尿中クレアチニン濃度で補正した。

3) 尿中クレアチニンの測定方法

尿中クレアチニン (Cr) の定量は、Jaffé 法と酵素法を検討した。Jaffé 法は、4 $^{\circ}$ C 15000rpm で 5 分間遠心分離した上清 10 μ l に純水 490 μ l を加え (50 倍希釈)、0.04M ピクリン酸 200 μ l、0.75M NaOH 200 μ l と混合したのち 25 $^{\circ}$ C で 15 分放置し、515nm で吸光度測定した。酵素法は、Cr 測定試薬キット (L-タイプワコー CRE・M) を用いた方法を検討した。測定方法の詳細については、結果と考察に記す。

4) 生活習慣調査

日常生活習慣と尿中 8-OHdG 値との関連を検討するため、39 名 (女性、年齢 19~22 歳) の被験者に対して、尿採取期間中にアンケート調査を行った。調査は、健康状態、睡眠時間、ストレス、運動習慣、喫煙、飲酒、肥満、食習慣、食事バランス、野菜/果物/肉等の摂取状況、医薬品やサプリメント摂取の有無など 34 項目について実施した。

3. 結果と考察

1. 尿中クレアチニンの測定方法の検討

各尿試料の 8-OHdG 値は、HPLC-ECD 法による測定値 (μ g/dl) を尿中 Cr 濃度 (mg/dl) で補正して、 μ g/g Cr として算出する。これは、尿中 8-OHdG の濃度が尿量に依存し、尿量は水分摂取、発汗などの影響を受け大きく変動することから、尿の濃さを補正するために行う。尿中 Cr の排泄量は Cr が筋肉量に依存し、単位時間当たりほぼ一定であるため、1 g あたりの Cr の量に換算して表すことができる。したがって、尿中 8-OHdG 値 (μ g/g Cr) を正確に求めるためには、尿中 Cr 濃度の測定精度も極めて重要である。特に尿中に含まれる 8-OHdG 量は極めて微量であることから、Cr 濃度の測定誤差は 8-OHdG 値に大きく影響する可能性がある。

Cr の測定は、Jaffé 法と酵素法に大別される。まず安価に測定可能なことから Jaffé 法を検討したが、特異性が低く (Cr 以外にピルビン酸、ブドウ糖、ビタミン C などにも反応する)、被験者数が増えると適用が難しいことなどの問題が明らかになった。そこで、次に、Cr 測定試薬キット (L-タイプワコー CRE・M) を用いた酵素法の検討を行った。本キットは自動分析装置用に調製さ

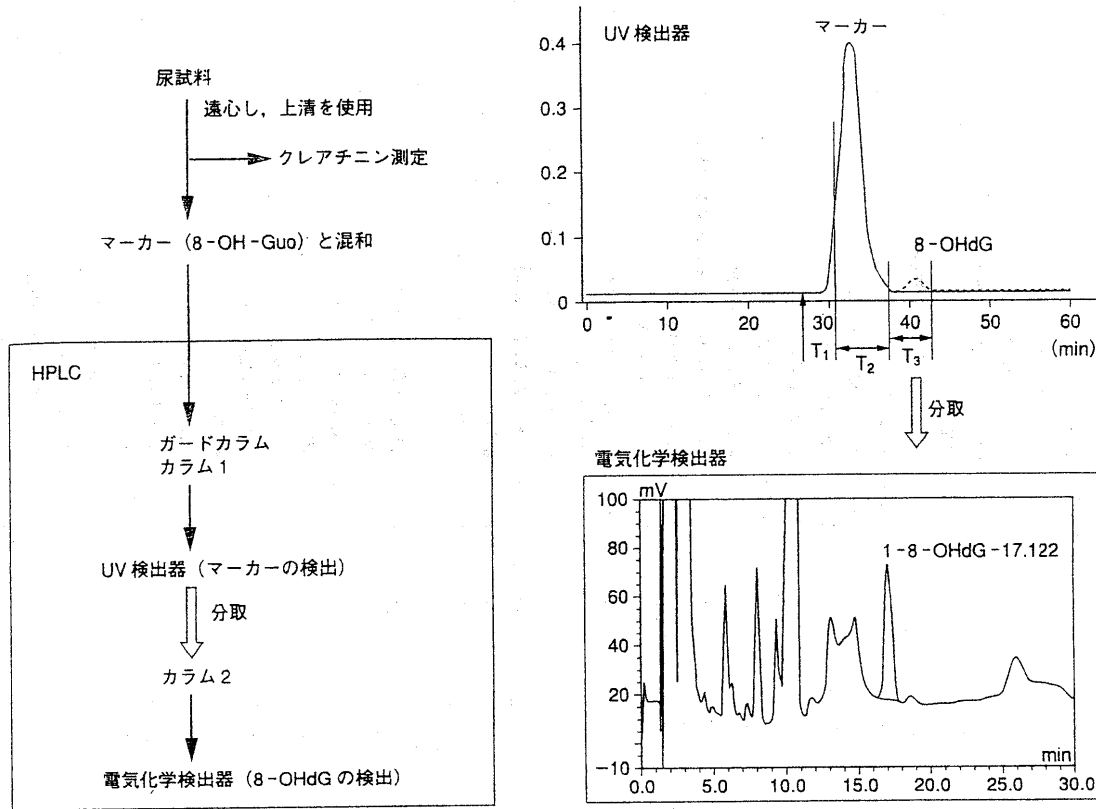


図2. 尿中8-OHdGのHPLC-ECDによる測定方法⁶⁾

れたものであるが、96穴マイクロプレートとプレートリーダーを用いて測定した。本キットの標準操作法は、尿上清3 μl に酵素発色液A 180 μl を加えて37°Cで5分反応させ、595nmの吸光度を測定し盲検とする。次に、酵素発色液Bを60 μl 加え37°Cで5分反応させ、再び吸光度測定し、検量線よりCr濃度を算出する。この操作法により、Cr濃度0~300 mg/dlで極めて良好な検量線が得られたことから、予備実験および平成17年11月に採取した39名の検体についてこの標準操作法でCr濃度を測定した。しかし、全検体の測定終了後、結果を検討したところ、測定者により検量線の傾きが異なることが判明し、更に詳しく追実験を行った結果（紙面の都合上、データは省略する）、原因は酵素発色液Bを加えた後の測定操作に問題があるとの結論に達した。そこで、以後、酵素発色液Bを加える前にマイクロプレートを1分間氷冷し、そのあと氷上で酵素発色液Bをすべて入れ終えた後、37°C10分反応させ、再び吸光度を測定することとした。39名の検体についてはこの方法で再測定した。測定は全てtripletで行った。

2. 尿中8-OHdG値の測定結果

予備実験における7名（女性、年齢19~20歳）の5日の8-OHdGの平均値と標準偏差を図3に、それぞれの日間変動を図4に示した。

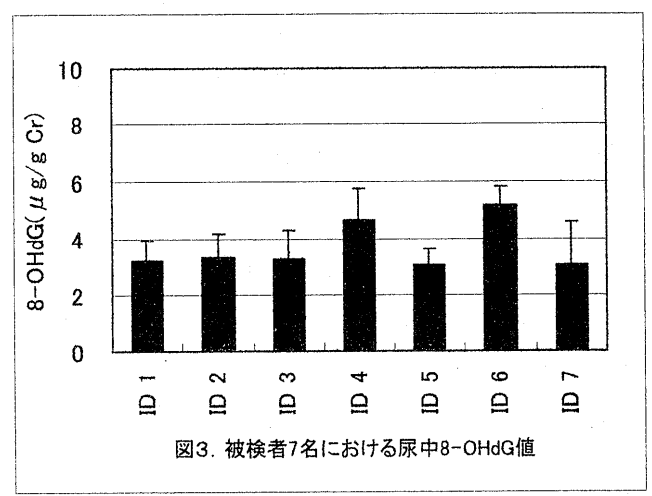


図3. 被検者7名における尿中8-OHdG値

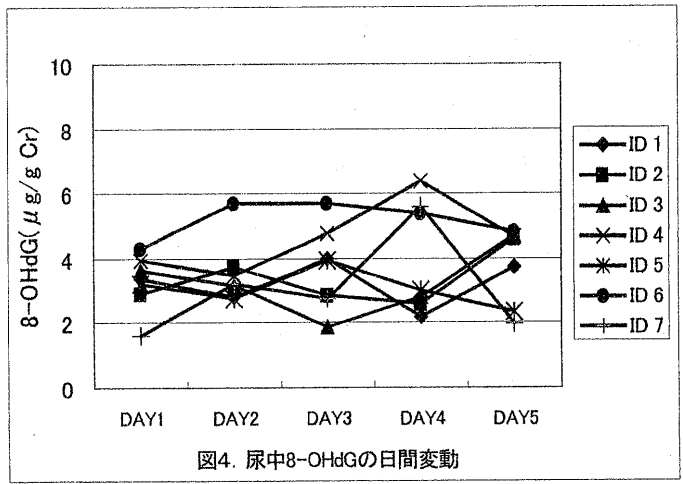


図4. 尿中8-OHdGの日間変動

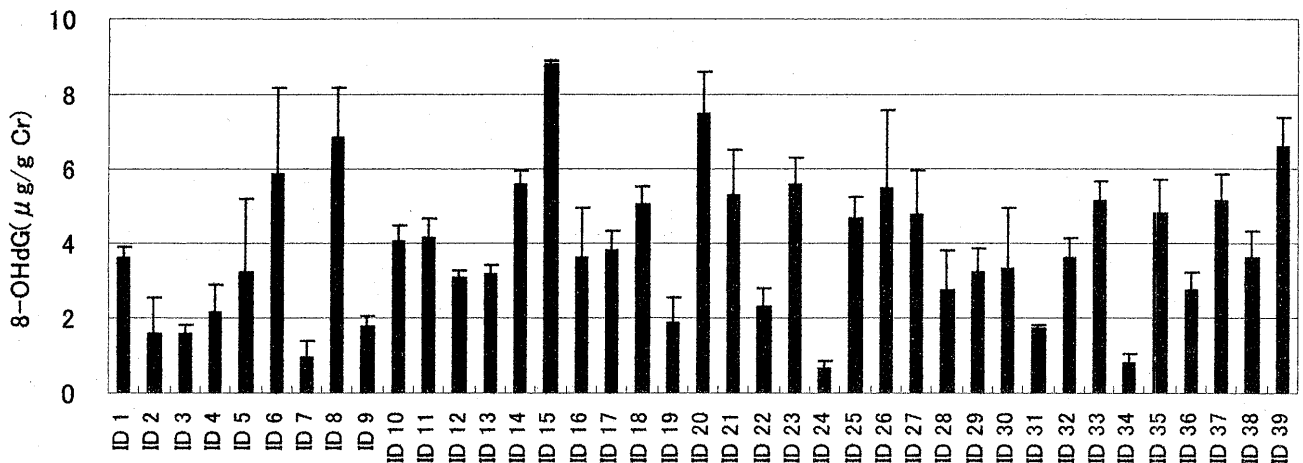


図5. 被検者39名における尿中8-OHdG値

7名の8-OHdGの平均値は3.67 μg/g Crで、最高値6.40 μg/g Cr (ID 4, DAY 4)、最低値1.61 μg/g Cr (ID 7, DAY 1)が観察された。また8-OHdG値は大きく日間変動することが明らかになった。次に、39名(女性、年齢19~22歳)における3日の8-OHdGの平均値と標準偏差を図5に示した。8-OHdGの平均値は3.86 μg/g Crで、最も高値を示したのはID 15の8.77±0.103 μg/g Cr、最も低い値はID 24の0.68±0.193 μg/g Crで10倍以上の個人差がみられた。以上の結果は、これまでに報告されている数値⁷⁾とよく一致した。

おわりに

今回、我々は、尿中8-OHdGを指標とした生体内酸化ストレス評価法の確立を目指して、分析方法及び健常人における個人差、日間変動などを検討した。上述したように、Cr濃度については信頼性の高い測定結果がほぼ得られるようになった。HPLC-ECD法による尿中8-OHdG濃度の測定に関しても、本報では述べなかったが、測定精度の向上を得ている。したがって、今後は、個人差、日内、日間変動などの要因を検討するための基礎となるデータを更に継続して集めていく予定である。今回39名の被験者に対してアンケート調査を行ったが、まだ対象者数が少なく有意な相関を認めていないが、今後データ数を増やし多角的に検討したい。

ヒトを対象とする研究は、培養細胞や実験動物を用いる研究に比べてさまざまな点で大変難しく、明確な結果を得にくいことが多いが、食の安全性・有効性を評価するためには極めて重要であるので、今後はin vitro(試験管内、培養細胞)実験と並行して進めていきたい。

本研究は、食物栄養学専攻・食品学研究室において、平成16年度に開始したものである。平成16年度の卒業演習として積極的に実験を遂行して下さったゼミ生の植村真帆さん、岡英里子さん、和波清香さんに謝意を表したいと思います。

なお、本研究は、(財)慢性疾患・リハビリテーション研究振興財団研究助成金(研究代表者・伊藤)、三重短期大学教育後援会特別研究費、及び平成17年度科学研究費・基盤C(研究代表者・伊藤)(課題番号:17590528)の一部を用いて行ったものです。ここに感謝いたします。

参考文献

- 1) (a) *N Engl J Med.* 330 (1994) 1029-1035.
(b) Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. *N Engl J Med.* 334 (1996) 1150-1155.
- 2) Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. *Lancet* 364 (2004) 1219-1228.
- 3) Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP *Nature* 349 (1991) 431-434.
- 4) (a) Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC, *Free Radic Res Commun.* 1 (1986) 163-172. (b) Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H, *Carcinogenesis* 7 (1986) 1849-1851.
- 5) Kasai H *J. Radiat Res (Tokyo).* 44 (2003) 185-189.
- 6) Kawanishi S, Murata M, *Rinsyokensa* 49 (2005) 153-161.
- 7) Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T, Kawanami K, Kawanami S, Kido R, Ikeda M *Jpn J Cancer Res* 92(2001) 9-15.