

健常者の DNA 損傷とその作用因子に関する研究

山内 博¹⁾、網中雅仁¹⁾、吉田勝美¹⁾、世良耕一郎²⁾

¹⁾ 聖マリアンナ医科大学 予防医学教室
神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

²⁾ 岩手医科大学 サイクロトンセンター
岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

従来、有害物質曝露からの健康影響の評価は、原因物質が判明している場合においても、生体試料中の有害物質の同定・定量を先行し、その後、曝露物質に対する健康影響が健診により評価される。一般的に曝露量と健康影響の関係には量 反応関係が成立しないケースが多々あり、DNA 損傷からの健康影響、特に発癌性は個体差が存在する。このような発癌性物質曝露からの生体影響に関する健康影響スクリーニング法では、新しい評価法の導入も検討すべき時代にあると考える。従来の手法とは逆に、被検者への曝露量を算出するより、最初に DNA 損傷の有無を評価し、もし問題ある結果が生じた場合、因果関係が予測される原因物質を科学的に検索すべきと考える。このような新しい視点での取り組みは、従来の手法に比較して経済的で合理的な側面を持っている。

有害物質曝露による健康影響の評価に関して、酸化ストレスによる DNA 損傷は、8-ヒドロキシデオキシグアニン (8-OHdG) の動態を把握することにより有効な評価が期待されている。8-OHdG を用いた健康影響スクリーニング法を導入した場合、まず、問題となる対象者に対して、DNA 損傷の有無を最初に検討し、その後、必要に応じて原因の解明と健康診断を実施すべきと考える。8-OHdG による健康影響スクリーニング法が急速に実用化される傾向にあるが、一方、分析法、曝露物質、検査試料、量 反応・影響関係、正常値、交絡因子など様々な問題が未解決であり、この分野における応用研究の充実が必要と考える。

本研究は、8-OHdG を用いた健康影響スクリーニング法、このうち、尿中 8-OHdG の有効性を検証するとともに、DNA 損傷の作用原因の解明を試みた。

2 対象者と方法

2.1 対象者

対象者 248 名は全国 6 地域から性別と年齢を調整し選択、同意を得て尿と血液を採取した。対象者の構成については、20~29 歳、30~39 歳、40~49 歳、50~59 歳、60~69 歳代において年齢階級別に均等となるように選別した。男性 128 名、女性 120 名である。事前調査で問診・血液検査を実施して不適格と診断された者は、本調査対象者から除外した。

2.2 測定項目

検査項目は表 1 に示したごとく 33 種類で、尿中 8-OHdG、尿中金属濃度 (As、Cr、Ni、Al、Pb、Mg、Hg、Cu、Zn)、血清ビタミン類総トコフェロール類 (total VitE)、レチノール (Ret)、カロチン (Caro) 濃度、血清脂質血清脂肪酸 4 分画 (EPA、DHA、DHLa、AA) 濃度、血清過酸化脂質 (LPO) 濃度、血清グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) 濃度等を測定した。

2.3 測定方法

尿中 8-OHdG は ELISA 法、尿中 Al、Cr、Cu、Hg、Mg、Ni、Pb、Zn は PIXE (Particle Induced X-ray Emission) 法、As は超低温捕集 - 還元気化 - 原子吸光法、そして、測定値はそれぞれ尿中クレアチニン濃度で補正した。

血清中 GSHPx 測定は Peglia and Valentine 法、血清中 LPO 測定は八木蛍光法、血清中カロチノイド類は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、血清中 EPA、DHA、DHLa、AA はガスクロマトグラフィー法をそれぞれ用いた。

2.4 統計解析

統計解析は相関係数、t 検定、一元配置分散分析法、因子分析 (Varimax 法)、重回帰分析 (Stepwise 法) をそれぞれ行った。

3 結果と考察

3.1 尿中 8-OHdG 濃度

健常者 248 名における尿中 8-OHdG 濃度は表 1 に示したごとく、性差と年齢差は認められなかった。一方、6 地域における測定値の間には統計学的な有意差は認められなかった。他方、生活習慣因子に関する問題のうち、喫煙との関係を解析した。喫煙習慣の有無による尿中 8-OHdG 濃度は、喫煙習慣のない群 (n=152) 15.55 ± 5.38 ng/mg クレアチン、過去は喫煙していたが現在は止めている群 (n=30) 15.03 ± 5.91 ng/mg クレアチン、喫煙本数 1~20 本 / 日の群 (n=56) 15.58 ± 6.02 ng/mg クレアチン、喫煙本数 20 本 / 日以上以上の群 (n=10) 12.60 ± 5.37 ng/mg クレアチンなどの値を示した。統計解析の結果、喫煙習慣による差はみられなかった。

表 1 健常者 248 名における性差、年齢別の尿中 8-OHdG 濃度

尿中 8-OHdG 濃度 ng/mg クレアチン	
性差	
男性 (n=128)	15.2 ± 5.71
女性 (n=120)	15.6 ± 5.49
男女	15.4 ± 5.60
年齢	
20-29 (n=49)	14.0 ± 5.56
30-39 (n=50)	15.6 ± 6.0
40-49 (n=51)	15.6 ± 5.58
50-59 (n=47)	16.4 ± 4.69
60-79 (n=51)	15.3 ± 5.97

平均 \pm 標準偏差

3.2 尿中金属元素と血中ビタミン類、脂質、過酸化脂質、GSHPx 濃度

尿中金属濃度は表 2 に示した。性差別の尿中金属濃度を比較すると、As と Mg は女性の値が男性より高い傾向にあった ($p < 0.01$)。これに対して、Ni、Cr、Al、Hg、Pb、Cu、Zn に性差は認められなかった。

性差別の血中ビタミン、脂質、過酸化脂質、GSHPx 濃度について、ビタミン類ではtotal VitE、Ret は男性が女性よりも有意に高く (p<0.001) -カロチンは女性が男子よりも有意に高い傾向が認められた (P<0.001)。脂質 (EPA,DHA,DHLA,AA) と過酸化脂質 (LPO) は、AA を除いて男性が女性より有意に高い傾向を示した (LPO、p<0.001; EPA、p<0.01、DHLA・DHA、p<0.05)。

3.3 尿中 8-OHdG と尿中金属元素濃度、血中ビタミン類 脂質 過酸化脂質 GSHPx との相関関係

健常者 248 名の尿中 8-OHdG と金属元素、ビタミン類、脂質、過酸化脂質、GSHPx における相関関係を解析した結果、尿中 8-OHdG と金属元素のうちには有意な相関関係を示し (As、Cr、Ni は p<0.01; Al、Pb、Mg は p<0.05) なお、Cu、Hg、Zn には認められなかった。ビタミン、脂質、過酸化脂質、GSHPx との間には、いずれも有意な相関関係は認められなかった。血中脂質のうち EPA とのみ有意な相関が示された (p<0.01)。

表 2 健常者 248 名における 33 項目の性差別の検査値

	Sex	Mean	SD	MIN	MAX		Sex	Mean	SD	MIN	MAX		Sex	Mean	SD	MIN	MAX
8OHdG	All	15.4	5.60	2.47	39.0	Pb	All	0.52	0.41	0.04	3.47	-Caro	All	37.7	24.4	0.38	177
	M	15.2	5.71	2.47	39.0		M	0.51	0.44	0.04	3.47		M	31.5***	18.5	0.38	110
	F	15.6	5.49	2.47	36.7		F	0.53	0.38	0.04	1.69		F	44.3	28.0	0.38	177
Al	All	19.8	21.2	0.60	147	Sb	All	0.82	1.10	0.10	7.21	Lyco	All	0.02	0.03	0.001	0.22
	M	17.4	17.9	0.60	109		M	0.71	0.91	0.10	6.02		M	0.02	0.02	0.001	0.07
	F	22.4	24.1	0.70	147		F	0.94	1.26	0.10	7.21		F	0.03	0.03	0.001	0.22
As(1MD)	All	45.6	36.6	2.30	226	Se	All	0.02	0.03	0.001	0.16	Lut/Zx	All	0.41	0.32	0.01	1.86
	M	39.9	30.3	2.30	142		M	0.02	0.03	0.001	0.11		M	0.39	0.28	0.01	1.28
	F	51.7	41.5	2.30	226		F	0.03	0.03	0.001	0.16		F	0.43	0.35	0.01	1.86
Co	All	0.01	0.02	0.001	0.14	Ti	All	0.10	0.28	0.002	3.77	-Crypt	All	0.30	0.29	0.001	2.48
	M	0.01	0.01	0.001	0.06		M	0.08	0.15	0.002	0.98		M	0.23***	0.17	0.001	0.96
	F	0.01	0.03	0.001	0.14		F	0.13	0.37	0.002	3.77		F	0.39	0.36	0.05	2.48
Cr	All	0.12	0.10	0.001	0.58	Zn	All	0.52	1.02	0.09	15.5	GSHPx	All	315	203	267	370
	M	0.11	0.08	0.001	0.37		M	0.64	0.21	0.10	1.10		M	317	18.8	267	370
	F	0.14	0.11	0.001	0.58		F	0.59	1.45	0.09	15.5		F	312	21.6	268	360
Cu	All	0.17	0.16	0.001	1.01	-toc	All	3.16	6.01	0.30	95.3	SOD	All	2.86	1.17	0.55	13.8
	M	0.16	0.14	0.001	0.64		M	2.88	1.23	0.79	7.36		M	3.09*	1.42	0.55	13.8
	F	0.18	0.18	0.001	1.01		F	3.46	8.55	0.30	95.3		F	2.63	0.76	0.55	4.86
Fe	All	0.18	0.69	0.001	10.6	-toc	All	24.4	8.25	0.33	48.0	LPO	All	4.46	1.57	0.72	13.6
	M	0.18	0.93	0.001	10.6		M	28.4***	7.84	0.33	48.0		M	4.79***	1.74	1.58	13.6
	F	0.18	0.23	0.001	1.71		F	20.1	6.31	0.33	45.3		F	4.13	1.30	0.72	8.66
Hg	All	0.03	0.05	0.001	0.30	-toc	All	0.39	0.40	0.01	2.96	DHLA	All	31.4	11.2	9.70	65.4
	M	0.03	0.05	0.001	0.30		M	0.39	0.39	0.01	2.96		M	32.9*	10.9	9.70	62.3
	F	0.03	0.05	0.001	0.23		F	0.39	0.40	0.01	2.82		F	29.7	11.3	11.6	65.4
Mg	All	25.3	18.0	0.001	160	-toc	All	1.32	1.02	0.008	4.34	AA	All	163	35.3	71.4	275
	M	21.3***	13.4	0.001	90.3		M	1.29	1.00	0.008	4.16		M	166	36.4	74.4	275
	F	29.6	21.0	1.48	160		F	1.37	1.06	0.008	4.34		F	159	33.9	71.4	245
Mn	All	0.02	0.04	0.001	0.35	totalVitE	All	29.3	11.0	4.07	12.9	EPA	All	72.9	43.5	5.70	63.8
	M	0.02	0.03	0.001	0.13		M	32.9***	8.53	6.82	54.5		M	79.8**	45.6	7.70	236
	F	0.02	0.04	0.001	0.35		F	25.3	12.0	4.07	12.9		F	65.5	40.1	5.70	183
Ni	All	0.02	0.03	0.001	0.25	Ret	All	6.54	2.06	2.13	17.3	DHA	All	145	56.6	35.2	352
	M	0.01	0.02	0.001	0.19		M	7.64***	1.96	4.23	17.3		M	152*	60.2	35.2	352
	F	0.02	0.03	0.001	0.25		F	5.38	1.44	2.13	9.60		F	137	51.6	47.2	309

*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001

3.4 因子分析と重回帰分析

尿中 8-OHdG 濃度に影響する生活因子・交絡因子を解明するために、表 3 に示した 16 項目との因子分析を行った。第 1、2、4 因子における尿中 8-OHdG の因子負荷量は低く、これに対して、第 3 因子の因子負荷量は高い傾向が示された。第 3 因子では As、Cr、Mg、Ni、Pb など金属元素の因子負荷量が高く、特に、発癌性金属である As、Cr、Ni が顕著であった。このことから、尿中 8-OHdG の動態には金属元素が強く影響していることが推測された。なお、第 5 因子において Al の因子負荷量も高い傾向が示された。

因子分析により尿中 8-OHdG の動態には金属元素が関係している可能性が示唆されたことから、Al、As、Cr、Mg、Ni、Pb の 6 元素について、変数増減法 (stepwise 法) による重回帰分析を行った (表 4)。尿中 8-OHdG を目的変数に、Al、As、Cr、Mg、Ni、Pb を説明変数にして解析した結果、As と Cr は尿中 8-OHdG に有意

差 ($p < 0.05$) が認められ、そして、Ni ($p = 0.060$) も関連する傾向をみとめた。Mg と Pb については有意な関連はみとめられなかった。

表 3 因子分析

	FACTOR1	FACTOR2	FACTOR3	FACTOR4	FACTOR5	共通性
SEX	-0.0581	-0.7132	0.1709	0.0485	0.0931	0.5523
AGE	0.6990	0.1141	0.1564	0.1275	0.2304	0.5955
8-OHdG	-0.0405	0.1966	0.5444	0.0568	0.4323	0.5267
As	0.5103	-0.1185	0.4516	0.1052	0.1940	0.5271
Cr	0.1092	-0.0398	0.6231	0.3630	-0.0383	0.5350
Ni	0.0981	-0.0187	0.7304	-0.2267	-0.0686	0.5995
Al	0.0607	-0.1049	-0.0129	0.0145	0.8601	0.7549
Hg	-0.0102	0.0258	0.0379	0.5462	0.0359	0.3018
Pb	0.4289	-0.1009	0.4949	0.2028	-0.0934	0.4889
Cu	0.0201	-0.0612	0.1937	0.7063	0.0515	0.5431
Mg	0.1829	-0.3740	0.4961	0.1765	0.0363	0.4519
Zn	-0.0433	-0.0072	-0.0580	0.7226	-0.0713	0.5325
DHA	0.8711	0.1761	0.1498	-0.0581	-0.0162	0.8159
EPA	0.8386	0.2195	0.1826	-0.0888	0.0271	0.7934
VitE	0.2379	0.7523	0.0628	0.0316	-0.0152	0.6277
Ret	0.2630	0.8474	-0.0187	-0.0168	0.0226	0.7884
GSHPX	-0.0119	0.3399	0.3078	0.0831	-0.3188	0.3189
LPO	0.6701	0.1804	-0.1554	-0.1096	-0.1784	0.5495
固有値	3.03	2.25	2.18	1.63	1.18	
因子寄与率	0.17	0.13	0.12	0.09	0.07	
累積寄与率	0.17	0.30	0.42	0.51	0.58	

表 4 重回帰分析

		偏回帰係数	標準誤差			標準回帰係数
		Parameter	Standard	T for H0:	有意検定	Standardized
変数	DF	Estimate	Error	Parameter=0	Prob > T	Estimate
INTERCEP (定常項、切片)	1	11.761772	0.67442904	17.44	0.0001	0.000000
As	1	0.019831	0.009851	2.013	0.0452	0.129571
Cr	1	14.22593	3.633100	3.916	0.0001	0.245748
Ni	1	23.260763	12.348302	1.884	0.0608	0.119088
Al	1	0.029209	0.015807	1.848	0.0658	0.110602

4 まとめ

成人健常者の尿中 8-OHdG 濃度に性差、年齢差、地域差はなく、広い範囲の対象者に対して一応の対応が可能である。

健常者の尿中 8-OHdG の動態と発癌性金属元素（クロム、砒素、ニッケル）との間には強い関係が存在する。この結果は、一般人に対して、発癌性金属元素の曝露量を軽減する必要性の根拠になる。

尿中 8-OHdG 濃度による DNA 損傷評価に際して、有害因子曝露からの量 反応関係、最小影響量、無影響量など様々な問題が未解決であるが、この評価法の有効性から、この領域における研究はさらなる継続的な活動が必要であると考えられた。