

魚貝類多食者の尿中微量元素濃度と 8-OHdG 濃度の関係について

千葉啓子¹⁾ 網中雅仁²⁾ 山内 博²⁾ 世良耕一郎³⁾

1) 岩手県立大学盛岡短期大学部生活科学科
020 - 0193 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字巣子 152 - 52

2) 聖マリアンナ医科大学予防医学
216 - 8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2 - 16 - 1

3) 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020 - 0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348 - 58

1. はじめに

近年、各種活性酸素種による生体影響を解明するために、生体構成成分である DNA と活性酸素種との反応で生成した物質をマーカーとして測定し、その生体影響を明らかにすることが試みられている。そのなかでも組織および尿中の DNA の酸化的損傷物質である 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の測定が汎用され、8-OHdG と生活習慣病や発癌性との関連が検討されている^{1,2)}。一方、砒素をはじめとする多くの環境化学物質は酸化ストレスを誘発して DNA の酸化的損傷を起こし、組織中で 8-OHdG の生成を増加させることが明らかにされている³⁾。さらに砒素による DNA の酸化的損傷のマーカーとして尿中 8-OHdG を用い、発癌リスクの評価に応用する試みがなされている⁴⁾。今回は環境性砒素暴露による酸化ストレスの誘発を検討する一環として、尿中の砒素および各種元素濃度、8-OHdG 濃度の測定を実施したので報告する。

2. 対象と方法

調査対象は健康調査の対象となることを同意した岩手県南沿岸の漁業従事者男 14 名、女 17 名、計 31 名で、平均年齢は男 58.4 ± 9.8 歳、女 57.8 ± 12.4 歳であり、食生活中に占める魚貝類の摂取割合が高い特徴を有する。対象者にはアンケート調査 (健康状態、生活状況、嗜好など) と問診を実施したのち、尿試料を採取した。なお、一般健常値との比較のため、同研究グループで実施した全国 6 地域 248 名の健常者を対象とした調査結果³⁾を一部用いた。

尿中砒素濃度の定量は前処理として 2ml を 2 N - NaOH とともにホットプレート上で約 100 で 3 時間加熱分解した。途中 30 分毎に攪拌し、均一化している。砒素濃度は超低温捕集 - 還

元気化 - 原子吸光光度法を用い、無機砒素(iAs)、モノメチル化砒素(MA)、ジメチル化砒素(DMA)、トリメチル化砒素(TMA)の4形態の砒素を測定した。また、砒素暴露の指標として iAs とその代謝物である MA、DMA を合算した IMD を検討項目に加えた。

砒素以外の元素は PIXE 分析によった。PIXE 分析のための試料調製は世良の方法⁶⁾により、尿試料を遠心して沈さを除去し、これに内部標準元素として原子吸光用 In 標準液(10 μg/ml)を添加した。十分攪拌した後、試料 50 μl をマイラーフィルムに滴下し、乾燥させたものを PIXE 測定試料とした。PIXE による多元素分析には岩手医科大学サイクロトロンセンター共同利用施設内の装置を用いた。

尿中 8 - OHdG 濃度の測定には ELISA 法を用いた測定キット 8 - OHdG Check[日研フード(株)、静岡]を使用した。測定手順の概略を図 1 に示した。

第 1 抗体反応

St 溶液
尿試料の遠心上清 いずれか 50 μl
Blank
+
1 次抗体 50 μl

37 °C、1 時間 反応

洗 浄 (3 回)
洗浄液 250 μl

第 2 抗体反応

2 次抗体 100 μl

37 °C、1 時間 反応

洗 浄 (3 回)
洗浄液 250 μl

発色反応

発色剤溶液 100 μl

(遮光) 室温、15 分 発色

反応停止

反応停止液 100 μl

吸光度測定

450nm

図 1 尿中 8-OHdG 濃度の測定手順

尿中の砒素および各種元素濃度、8 - OHdG 濃度は測定後、尿中クレアチニンで補正した。

3. 結果と考察

尿中化学形態別砒素濃度

表1の上段には対象者の尿中化学形態別砒素濃度を、下段には全国調査から得られた都市近郊居住者248名の測定値を示した。両群とも尿からは4形態の砒素が検出されたが、魚貝類多食者では都市近郊居住者に比較して全ての形態で高値を示し、有意の差 ($p < 0.001$) が認められた。

魚貝類多食者では陰膳による1日の食事調査結果から日本人の平均値の2倍以上の魚貝類を摂取していることが確認されており⁷⁾、これらに含まれている多量の砒素が尿中に排泄されたものと考えられる。

表1 尿中化学形態別砒素濃度 ($\mu\text{g As/g. cr.}$)

対象	iAs	MA	DMA	IMD	TMA	Total
魚貝類多食者	9.68 ± 5.94***	4.69 ± 4.42***	159 ± 68.0***	173 ± 74.0***	520 ± 332***	693 ± 370***
都市近郊居住者	3.60 ± 3.13	2.01 ± 1.82	40.0 ± 33.9	45.6 ± 36.6	103 ± 103	149 ± 125

平均値 ± 標準偏差

IMD=iAs+MA+DMA

*** $p < 0.001$

尿中8-0HdG濃度

つぎに両群の尿中8-0HdG濃度を表2に示した。全国調査の結果³⁾から、一般人の尿中8-0HdG濃度はほぼ正規分布を示し、性差、年齢差は認められないことが明らかにされている。魚貝類多食者の尿中8-0HdG濃度は $21.3 \pm 6.37 \mu\text{g/g. cr.}$ であり、都市近郊居住者の $15.4 \pm 5.60 \mu\text{g/g. cr.}$ に比較して有意に高い値を示した ($p < 0.001$)。この結果が同対象者の魚貝類多食と関連するか否かについて、尿中に排泄された化学形態別の尿中砒素濃度と尿中8-0HdG濃度の相関関係を検討したが、8-0HdG濃度とiAs、MA、DMA、TMAの各化学形態別砒素濃度との間に相関関係は認められなかった。

表2 尿中8-0HdG濃度 ($\mu\text{g/g. cr.}$)

対象	魚貝類多食者	都市近郊居住者
尿中80HdG濃度	21.3 ± 6.37***	15.4 ± 5.60

平均値 ± 標準偏差

*** $p < 0.001$

尿中元素濃度

PIXEの多元素分析により対象者の尿中元素濃度を測定した。そのうち、これまでの研究で酸化ストレス誘発に関連し、8-0HdGの生成や修復に影響すると考えられている元素類を表3に示した。全国調査では248名の対象者の尿中8-0HdG濃度は、尿中クロム、砒素、ニッケルと高い相関が認められているが、今回は亜鉛濃度とのみ有意な相関関係 ($p < 0.05$) を示した他はいずれの元素とも相関関係は認められなかった。

表3 尿中元素濃度

元 素	濃 度 ($\mu\text{g/g. cr.}$)
Al	5.91 \pm 3.65
Cd	ND
Co	0.02 \pm 0.02
Cr	0.10 \pm 0.06
Cu	0.02 \pm 0.01
Fe	0.35 \pm 0.35
Hg	0.02 \pm 0.03
Mg	31.3 \pm 24.6
Ni	0.02 \pm 0.02
Pb	0.16 \pm 0.12
Sb	ND
Se	0.04 \pm 0.03
Ti	0.10 \pm 0.15
Zn	0.54 \pm 0.38

平均値 \pm 標準偏差

4. まとめ

日常の生活環境中に存在する砒素や他の元素類による酸化ストレスの誘発について検討した。魚貝類多食者の尿中 8 - OHdG 濃度は全国調査結果の都市近郊居住者で示された値に比較して有意に高かった ($p < 0.001$)。この原因として、食事を介して大量に摂取された魚貝類中の砒素の影響が考えられたが、尿中砒素濃度とは相関が認められなかった。また、他の尿中元素類とも殆ど関連が認められなかった。今後、尿中 8 - OHdG 濃度が高値を示した理由について、他の生活要因の検討も含め、検討を継続していきたいと考えている。

本研究は岩手県学術研究振興財団平成 13 年度助成金により実施された。

5. 参考文献

- 1) Erhola M, Toyokuni S, Okada K et al.: Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment, FEBS Lett. 409, 287-91 (1997)
- 2) 葛西 宏: 酸化ストレスのマーカー 8 - OHdG の測定、FFI Journal, 194, 10-16 (2001)
- 3) Yamanaka K, Takabayashi F, Mizoi M et al.: Oral exposure of dimethylarsenic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in mice leads to an increase in 8-Oxo-2'-deoxy-guanosine level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis, Biochem Biophys Res Commun 287, 66-70 (2001)
- 4) 齊藤 秀、山内 博、蓮井ゆり他: ELISA 法による尿中 8 - ヒドロキシデオキシグアノシンの定量法、臨床検査、44, 913-916 (2000)

- 5) 山内 博、木村慎吾、世良耕一郎他：健常者の健康影響モニタリングに関する研究、日衛誌、57, 263 (2002)
- 6) 世良耕一郎、二ツ川章二、畠山智他：無標準定量法の開発 - 第二報、NMCC 共同利用研究成果邦文集、5, 223-248 (1997)
- 7) 千葉啓子、立身政信、佐藤 洋他：海産物中砒素の多量摂取者における砒素暴露とその生体影響に関する研究、日衛誌、55, 178 (2000)