

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590582

研究課題名（和文）

心血管マルチバイオマーカーによる過重労働者の心血管リスク進展機序解明に関する研究

研究課題名（英文）

Mechanism analyses of development of cardiovascular lesions in long-time workers by multi-biomarkers.

研究代表者

平井 真理 (HIRAI MAKOTO)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：90242875

研究成果の概要（和文）：

長時間労働により変動する心血管バイオマーカーを検索することを目的に、月間 80 時間以上の時間外労働（以下、長時間労働）者を対象とし、一般生化学検査に加え、アディポネクチン・マトリックスメタロプロテナーゼ-9・小粒子低密度リポ蛋白 SD-LDL・マロンジルデヒド修飾 LDL(MDALDL)・ホモシステイン・高感度-CRP 等を測定した。さらに、同一人で月間時間外労働が 80 時間未満の際に再度同様な項目の測定を行い月間時間外労働 80 時間以上のデータと比較検討した。本研究において、長時間労働者の 77.4% で MDA-LDL が基準値を超え、月間時間外労働 80 時間以上では 80 時間未満時に比し MDA-LDL/LDL は有意な高値を示した。MDA-LDL/LDL が長時間労働後に高値を示したことは長時間労働により動脈硬化巣形成が促進された可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Working long hours increases cardiovascular diseases even in young workers. However, the mechanisms for this have not yet been elucidated. We analyzed biomarkers to clarify the pathobiochemical mechanisms involved in the development of cardiovascular diseases induced by working long hours in Japanese office workers. In office workers who worked over 240 hours a month (> 80 hours of overtime work a month), we measured the following: interleukin-6; matrix metalloproteinase-9; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; adiponectin; small dense low-density lipoprotein (LDL); malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL); total cholesterol; LDL cholesterol; high-density lipoprotein cholesterol; homocysteine; pentraxin 3; and high-sensitivity C-reactive protein. Of the workers, 77.4% had abnormally high MDA-LDL. The same markers were measured again when their working hours were shorter than 240 hours a month. With shorter working hours compared to working hours > 240 hours a month, the ratio of MDA-LDL to LDL significantly decreased. There were no significant changes in other biomarkers between the longer and shorter working hours. These findings suggest that working long hours might accelerate the formation of atherosclerotic lesions. Monitoring the ratio of MDA-LDL to total LDL might provide useful information for the healthcare of workers with long working hours. Lowering oxidized LDL might be of importance and beneficial in preventing cardiovascular events in office workers with long working hours.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：社会医学・健康科学

キーワード：バイオマーカー、心血管、長時間労働、酸化 LDL、MDA-LDL

### 1. 研究開始当初の背景

過重労働はわが国の大きな社会問題であり、世界の先進国でわが国ほど過重労働が多い国は少なく景気の動向から今後過重労働が強化され過重労働に起因する心血管系疾患の増大が懸念されており、その予防戦略や治療戦略の新たな展開が期待されている。一方、心血管系事故は、1) 動脈硬化進展、2) プラーク生成・不安定化・破綻、3) 血栓形成、4) 心筋虚血、5) 心筋壊死、6) 心筋線維化とリモデリング等に深く関係していることが知られている。また、これらの病態生理学的変化の進展とその機序を新たなバイオマーカーにより明らかにすることが可能であることが示唆されている。しかしながら、これまで過重労働が心血管系リスクを増大する病態生理学的機序の解明に病態生化学的手法である新しいバイオマーカーを応用検討した報告はない。

そこで、今回の研究では、従来から臨床に広く用いられてきた総コレステロール・HDLコレステロール・LDLコレステロール・中性脂肪・CBC・尿酸・血糖・HbA1c・血圧・肥満度等に加え、新しいバイオマーカーであるMMP-9・MCP-1・IL-6・TNF- $\alpha$ ・small-dense LDL・MDA-LDL・ホモシステイン・高感度CRP・高分子アディポネクチン・レプチン等を過重労働が認められた月に測定することにより過重労働が心血管疾患あるいは心血管事故を惹起する機序の解明が可能と考えられる。すなわち、MMP に関してはプラークの不安定化因子あるいは予後予測因子としては未だ確立されていないが細胞外基質を分解し平滑筋細胞が中膜から内膜に移動し動脈硬化進展過程で重要な役割を果たしMMP-9がこの過程で重要であることが報告されている。Small-dense LDL に関しては *In vitro* にて酸化を受けやすく高値例は急性心筋梗塞の発症率が正常群の3倍であることが報告されている。ホモシステインに関しては  $5\mu\text{mol/L}$  の上昇で冠動脈疾患発症リスクが1.32倍に増加することが報告されている。MCP-1は、単球・マクロファージ・血管内皮等から産生されるケモカインで、1) 単球等の遊走活性、2) 活性酸素・リゾチーム酵素の産生・放出、3) 炎症性サイトカインの産生誘導、4) 平滑筋細胞の遊走・増殖、5) 心筋細胞のアポトーシス誘導等の機能を有し、動脈硬化の発症進展や左室リモデリング等に深く関与している (Boring L、他、*Nature* 1998)。IL-6等の炎症性サイトカインはその最も上流に位置しその測定の重要

性が指摘されている。また、高感度CRPは古典的危険因子とは独立した予後予測因子であることが大規模臨床試験で報告されている (Ridker PM、他、*N Engl J Med* 2005) が近年注目されIL-6・TNF- $\alpha$ ・高感度CRPが良い指標になることが報告されている。既に、喫煙量とアディポネクチン血中濃度は逆相関すること、レプチン血中濃度はアディポネクチンのそれよりも血管炎症性バイオマーカーと強い相関があること、アディポネクチン血中濃度は左室肥大と逆相関を有し独立した予後予測因子であることを報告してきた (Tamakoshi K、他、*Clin Endocrinol* 2007, Mitsuhashi H、他、*Hypertension* 2007)。このように、心血管マルチバイオマーカーは過重労働に惹起される心血管病変形成あるいは進展の機序解明に有用な情報を提供することから、本研究の成果は過重労働に伴う心血管疾患の予防戦略・リスク層別化・治療戦略に新たな展開をもたらすものと期待できる。

### 2. 研究の目的

近年、過重労働による壮年期の心血管系疾病有病率の増加は大きな社会問題となっている。昨今の経済事情による雇用状況の悪化のしわ寄せによって過重労働の増強が懸念され、今後過重労働による心血管事故の増加が惹起される危険がある。しかしながら、過重労働に起因する心血管疾患発生の病態生理学的機序の詳細は未だ十分解明されていない。一方、心血管系バイオマーカーが動脈硬化進展や粥腫破綻等の病態解明のよい指標となりうることが判明した。そこで、今回の研究では、10項目以上に及ぶ心血管系マルチバイオマーカーを測定して、過重労働が心血管系リスク進展に及ぼす病態生化学的機序を解明することにより過重労働によって惹起される心血管疾患の予防戦略・リスク層別化・治療戦略の新たな展開を創生するための基盤を確立することが目的である。

### 3. 研究の方法

本研究は月80時間以上の過重労働が記録された労働者で本研究のwritten informed consentが得られた者を対象とする。本研究では、従来実施されていた過重労働による健康調査アンケート・メンタルテスト・心電図・血球検査等に加え、心血管系マルチバイオマーカー等を追加測定する。心血管系バイオマーカーとしては、アディポネクチン・レプチン・MMP-9・small-dense LDL・MDA-LDL・

ホモシステイン・IL-6・TNF- $\alpha$ ・高感度 CRP (hs-CRP)・MCP-1・BNP 等であり、一般生化学検査・白血球分画・HbA1c 等も同時に測定し、既存の正常値あるいは非過重労働月の値と比較検討する。測定資料は連結可能匿名化し解析する。

過重労働者の産業医診察を過重労働認定月に実施し、過重労働者から written informed consent を得て、患者基本属性である年齢・性別・身長・体重・BMI・血圧等を測定し心電図を記録する。さらに健康アンケート・メンタルヘルスチェック・採血を実施し、データベースの構築を図る。採血資料に関しては、血清あるいは血漿に分離し-80℃にて凍結保存し測定に備え可及的速やかに測定すると共に連結可能匿名化資料として一部凍結保存を継続する。採血に関しては静脈より採血し、small-dense LDL は血清 1 mL、high-sensitivity CRP はネフェロメトリー法で測定用に血清 0.5mL、酸化 LDL として MDA-LDL は ELISA 法にて測定用に血清 0.3mL、総ホモシステインは HPLC にて測定用に血漿 0.3mL、BNP は CLEIA 法にて測定用に血漿 0.5 mL、ADMA は EIA 法にて測定用に血漿 0.3mL、MMP-9 は EIA 法にて測定用に血漿 0.3mL、MCP-1 は ELISA にて測定用に血清 1 mL、IL-6 は CLEIA 法にて測定用に血漿 0.5mL、高分子アディポネクチン ELISA 法にて測定用に血清 0.3mL、レプチンは RIA2 抗体法にて測定用に血清 0.5mL をそれぞれ分離凍結保存する。一般生化学検査はこれまでどおりの契約業者にて実施し、MMP・MCP-1・small-dense LDL・MDA-LDL・IL-6・ホモシステイン・アディポネクチン・レプチン等の特殊検査項目については SRL 等に依頼し測定精度の確保に努める。

#### 4. 研究成果

31 例において月間 80 時間以上の時間外労働後の検査で基準範囲を逸脱した人数 (%) は、ADI : 3 人 (9.7%)、MMP-9 : 4 人 (12.9%)、SD-LDL : 4 人 (12.9%)、MDA-LDL : 24 人 (77.4%)、HOM : 3 人 (9.7%)、高感度-CRP : 3 人 (9.7%)、総コレステロール : 3 人 (9.7%)、LDL : 6 人 (19.4%)、HDL : 3 人 (9.7%)、HbA1c : 0 人 (0%)、TG : 11 人 (35.5%)、WBC : 2 人 (6.5%) であった。また、これらの項目について、月間時間外労働 80 時間以上と 80 時間未満での同一例 2 回の比較検討では、MDA-LDL および MDA-LDL と LDL との比 (MDA-LDL/LDL) は月間時間外労働 80 時間未満で各々低い傾向 (123.3 $\pm$ 60.0 vs 109.1 $\pm$ 51.9 U/L, p=0.077) と有意な低値 (1.04 $\pm$ 0.41 vs 0.88 $\pm$ 0.37, p=0.021) を示したが他の項目では有意差を認めなかった。

表 1. 測定項目基準値と時間外労働時間が 80 時間を超えた後の基準値逸脱者数・非喫煙者と喫煙者の測定値

	基準値	基準値逸脱人数 (%)
ADI ( $\mu$ g/mL)	$\geq 4.0$	3 (9.7%)
MMP-9 (ng/mL)	38 $\pm$ 15	5 (16.1%)
HOM (nmol/mL)	3.7 - 13.5	3 (9.7%)
hs-CRP (ng/mL)	$\leq 1500$	3 (9.7%)
IL-6 (pg/mL)	$\leq 4.0$	0 (0%)
SD-LDL (mg/dL)	9.5-42.5 (44歳未満男性)	4 (12.9%)
MDA-LDL (U/L)	46-82 (45歳未満男性)	24 (77.4%)
LDL (mg/dL)	< 140	6 (19.4%)

表 2 時間外労働時間 80 時間以上の際の各指標

	時間外労働 $\geq$ 80 時間
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.17 $\pm$ 2.69
SBP (mmHg)	114.48 $\pm$ 10.66
DBP (mmHg)	73.71 $\pm$ 8.47
ADI ( $\mu$ g/mL)	7.34 $\pm$ 3.22
MMP-9 (ng/mL)	48.11 $\pm$ 37.89
HOM (nmol/mL)	9.97 $\pm$ 1.94
hs-CRP (ng/mL)	839.11 $\pm$ 939.86
IL-6 (pg/mL)	1.42 $\pm$ 0.79
SD-LDL (mg/dL)	41.64 $\pm$ 23.90
MDA-LDL (U/L)	123.26 $\pm$ 60.01
LDL (mg/dL)	121.16 $\pm$ 22.96
MDA-LDL/LDL	1.04 $\pm$ 0.41

(mean $\pm$ SD)

表3 時間外労働時間 80 時間未満の際の各指標

	時間外労働<80 時間
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.15±2.69
SBP (mmHg)	109.67±11.19
DBP (mmHg)	67.62±10.43
ADI (μg/ml)	7.17±3.00
MMP-9 (ng/mL)	40.22±22.67
HOM (nmol/mL)	10.08±2.99
hs-CRP (ng/mL)	747.57±14327.84
IL-6 (pg/mL)	1.73±0.81
SD-LDL (mg/dL)	44.01±21.71
MDA-LDL (U/L)	109.11±51.96
LDL (mg/dL)	124.95±29.39
MDA-LDL/LDL	0.88±0.37

(mean±SD)

長時間労働による壮年期の心血管系疾患の増加が問題となっている。しかしながら、長時間労働に起因する心血管疾患発生の機序は十分解明されていない。MMP-9、SD-LDL、HOM は冠動脈疾患発症リスクを増加すること、高感度-CRP および ADI は古典的危険因子とは独立した予後予測因子であること等が報告されている。MDA-LDL は、糖尿病や透析患者で高値を示し、冠動脈硬化症の二次発症等の予測にも有用であること、また、頸動脈内中膜複合体肥厚度が高値のとき、MDA-LDL が高い傾向が報告されている。さらに、酸化 LDL は、動脈硬化巣から漏出したものである可能性も示唆されている。本研究において、長時間労働者の 77.4% で MDA-LDL が基準値を超え、月間時間外労働 80 時間以上では 80 時間未満時に比し MDA-LDL/LDL は有意な高値を示した。

MDA-LDL/LDL が長時間労働後に高値を示したことは長時間労働により動脈硬化巣形成が促進された可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Harata S, Inden Y, Shimano M, Uchikawa T, Mutoh M, Hirai M, Murohara T. Morphological characteristics of the

holter p-waves associated with pulmonary vein pacing. *Europace*. 2010;12:124-129 (査読有り)

(2) Yamada K, Iino S, Isobe S, Kondo T, Izawa H, Inden Y, Yoshikane M, Ikeda N, Hirai M, Sawada K, Murohara T. Relation of plasma catecholamine levels with pulse wave velocity in hypertensive patients compared with normotensive subjects. *Heart Vessels*. 2012 27(5):493-8 (査読有り)

(3) Yamada K, Isobe S, Suzuki S, Kinoshita K, Yokouchi K, Iwata H, Ohshima S, Hirai M, Sawada K, Murohara T. Diagnostic usefulness of the oedema-infarct ratio to differentiate acute from chronic myocardial damage using magnetic resonance imaging. *Eur Radiol*. 2012;22:789-795 (査読有り)

(4) Hirai M. Can acute myocardial infarction sneak out from takotsubo? *Circ J*. 2012;76:305-306 (査読有り)

(5) Watanabe E, Yamashita T, Suzuki S, Saikawa T, Hirai M, Yamazaki T, Ohtsu H, Ogawa S. Statin treatment for patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Int Heart J*. 2011;52:103-106 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 平井真理、玉腰浩司、榎原久孝. 長時間労働者における心血管系バイオマーカーの検討. 第 71 回日本公衆衛生学会総会 2012、10 月 24-26 日. 山口.

(2) 中山奈津紀、平井真理. 循環器疾患患者の在宅運動療法支援に向けた自律神経活動指標の応用に基づく研究. 第 76 回日本循環器病学会. 2012. 03. 16~18. 福岡.

(3) 中山奈津紀、平井真理. 循環器疾患患者の在宅運動療法支援に向けた自律神経活動指標の応用に基づく研究—活動量・活動強度と自律神経活動指標—. 第 77 回日本循環器病学会. 2013. 03. 15~17. 横浜.

(4) 中山奈津紀、平井真理. 循環器疾患患者の在宅運動療法支援に向けた自律神経活動指標の応用に基づく研究 —維持期における日常生活活動量と自律神経—. 第 60 回日本心臓病学会. 2012. 09. 14~16. 金沢.

(5) Nakayama N, Negi K, Watanabe K, Hirai M. Life activities improve heart rate variability in patients with d hypertension and/or heart failure. 2012 Nagoya-Yonsei University Research Exchange Meeting on Health Sciences. 2012. 11. 22~24. Nagoya.

(6) YOSHIDA Naoki, INDEN Yasuya, YAMAMOTO Toshihiko, OHGUCHI Shiou, MIYATA Shinjiro, TAGUCHI Noriko, FUJITA Masaya, YOKOI

Kenichiro, KUMAGAI Soichiro, SHIMANO Masayuki, HIRAI Makoto, MUROHARA Toyoaki. The Predictor of Left Atrial Appendage Dysfunction in Patients with CHADS2 Score of 0. The 77th Annual Scientific Meeting of Japan Circulation Society, 2013.03.15 ~17、Yokohama.

(7) YOSHIDA Naoki, INDEN Yasuya, YAMAMOTO Toshihiko, OHGUCHI Shiou, MIYATA Shinjiro, TAGUCHI Noriko, Fujita Masaya, YOKOI Kenichiro, KUMAGAI Soichiro, SHIMANO Masayuki, HIRAI Makoto, MUROHARA Toyoaki. A New Electrocardiographic Criterion for Differentiating Left from Right Ventricular Outflow Tract-Tachycardia Origin: The V4 R-wave Amplitude Ratio. The 77th Annual Scientific Meeting of Japan Circulation Society, 2013.03.15 ~ 17、Yokohama.

(8) YOSHIDA Naoki, INDEN Yasuya, YAMAMOTO Toshihiko, OHGUCHI Shiou, MIYATA Shinjiro, TAGUCHI Noriko, FUJITA Masaya, YOKOI Kenichiro, KUMAGAI Soichiro, SHIMANO Masayuki, HIRAI Makoto, MUROHARA Toyoaki. The Diagnostic Value of the QWave Amplitude Ratio in Lead aVR for Differentiating the Outflow Tract Ventricular Arrhythmia Origin. The 77th Annual Scientific Meeting of Japan Circulation Society, 2013.03.15 ~ 17、Yokohama.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 眞理 (HIRAI MAKOTO)  
名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授  
研究者番号：90242875

### (2) 研究分担者

玉腰 浩司 (TAMAKOSHI KOJI)  
名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授  
研究者番号：30262900

### (3) 連携研究者

榊原 久孝 (SAKAKIBARA HISATAKA)  
名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授  
研究者番号：80153873