

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860449

研究課題名(和文)尿中酸化ストレスマーカーと循環器疾患発症に関する後ろ向きコホート研究

研究課題名(英文)Urinary oxidative stress marker and ischemic cardiovascular disease: a general population based nested case-control study

研究代表者

長尾 匡則 (NAGAO, MASANORI)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：30621239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは糖尿病や動脈硬化を進展させるといわれています。これらは脳梗塞や心筋梗塞などの原因になりますが、酸化ストレスの高さが脳梗塞等を引き起こすかどうかはわかっていません。そこでこの研究では一般地域住民の方で脳梗塞や心筋梗塞を発症した人とそうでない人を比べて、発症前の尿中に含まれる酸化ストレスマーカーの量が異なるのかを調べました。

その結果、女性では脳梗塞や心筋梗塞を発症した人の方が、発症していない人よりも尿中の酸化ストレスマーカーの量が多いことが分かりました。男性では統計的な差がありませんでした。

この結果より、酸化ストレスが高いと将来脳梗塞などになりやすくなる可能性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is a risk factor of atherosclerosis and diabetes. However, it is unknown whether oxidative stress raises the risk of ischemic cardiovascular diseases. So, we conducted this study to evaluate the relationship of oxidative stress to ischemic cardiovascular disease among general population in Japan.

To accomplish this goal, we made comparison the patient group and control group (which is not patient of ischemic cardiovascular diseases) about their level of urinary oxidative stress marker (these urine samples have been collected prior to the onset of disease).

The results, the oxidative stress marker level of patient group was higher than control group among women, but not men. These results indicated that higher oxidative stress may associated with future onset of ischemic cardiovascular diseases among women. It is unknown that the reason for the difference in the relationship by gender, which is the next theme in this field.

研究分野：疫学 栄養

キーワード：酸化ストレス 8-OHdG 循環器疾患 発症 一般地域住民 コホート研究 nested case-control 24時間蓄尿検査

1. 研究開始当初の背景

スーパーオキシドに代表される活性酸素種や過酸化窒素などの活性窒素種などの酸化ストレスは、血管内皮機能の障害 (Circ J. 2009;73:411-8)、炎症の惹起 (Free Radic Biol Med. 2000;28:1456-62)、平滑筋の増殖・遊走 (Trends Cardiovasc Med 2007;17:48-54)、酸化 LDL の生成 (Methods Mol Biol. 2010;610:403-17) 等によるアテローム性動脈硬化症との関連が示唆されている。アテローム性動脈硬化症は主要な循環器疾患危険因子であるため、酸化ストレスは循環器疾患リスクの増大と関連すると考えられている。ただ、一般住民を対象とした前向き研究で、抗酸化物質と循環器疾患リスクとの関連を示した研究は研究代表者らによる血中 α -トコフェロール濃度と循環器疾患死亡との関連に関する報告等があるが (J Epidemiol. 2012;22: 402-10)、酸化ストレスの指標と虚血性心疾患発症との関連に関する研究は少なく、その結果も一貫していない (Circulation. 2005;112:651-7) (J Am Coll Cardiol. 2006;48:973-9)。

8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (以下 8-OHdG) は DNA を構成するデオキシグアノシンが活性酸素種等により酸化されることで生成する。デオキシグアノシンは DNA の 4 種の塩基の中で最も酸化還元電位が低く酸化を受けやすいが、8-OHdG 自体は比較的安定な物質である。DNA 分子内に生じた 8-OHdG は切り出されて血中に放出され、それ以上代謝されることなく尿中に排泄されるため、DNA の酸化障害のマーカーとして利用可能である (Clin Chim Acta. 2004; 339:1-9)。血中濃度は非常に低いので定量が困難である一方、尿中へは代謝されることなく濃縮されて排泄されるため、測定に供する検体としては血液よりも非侵襲的に採取できる尿の方が適している点が特徴的である。尿中 8-OHdG は室温で 24 時間、 -80°C で 800 日保管したのちでも、保管前後の測定値の相関係数が $r = 0.97$ 以上という高い安定性を持つことが報告されている (J Occup Health. 2008;50:366-72)。これまで 8-OHdG の患者対照研究において脳出血患者の発症 3 日以内の白血球中 8-OHdG は健常人に比べて有意に高く、かつ発症 30 日後の Barthel Index (日常生活動作指標) との有意な負の関連が報告 (J Neurosurg. 2011;115:1184-90) されているが、8-OHdG と循環器疾患の発症との

関連をコホート研究によって明らかにした研究は未だない。

2. 研究の目的

本研究は日本人一般住民を対象として、尿中 8-OHdG 排泄量と虚血性循環器疾患発症との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

対象は CIRCUS (Circulatory Risk in Communities Study) 対象地域である I 町及び C 市で 1996 - 2005 年に循環器健診を受診し、かつ 24 時間畜尿検査を実施した者のうち心筋梗塞・脳卒中・労作性狭心症既往者を除いた男女 3,454 人である。ベースラインは畜尿検査を初めて行った年とし、ベースラインデータはその年の健診結果を用いた。発症の追跡は I 町で 2012 年末、C 市で 2010 年末まで行った。尿検体は畜尿検査時に採取した尿の一部を用いた。心筋梗塞、労作性狭心症、発症 1 時間以内の突然死、脳梗塞を発症した者 (症例群) に対し、性、年齢 (± 2 歳)、受診地域・年、ベースライン時の喫煙習慣有無でマッチングした者 (case:control=1:1) を対照とした。市販 ELISA kit で尿中の 8-OHdG 濃度を測定し、畜尿検査の尿量・時間数から 24 時間あたりの尿中への 8-OHdG 排泄量 (以下、8-OHdG 値) を算出し、対数変換して解析した。

症例群と対照群のベースライン時のデータ比較として、平均値の差の検定には対応のある t-検定、比率の検定にはマクネマー検定を用いた。多変量解析には共分散分析を用い、共変量としてモデル 1 では年齢、モデル 2 では年齢、BMI、飲酒量、モデル 3 ではモデル 2 に加えて高血圧症、糖尿病、脂質異常症の既往の有無を調整した。

本研究は獨協医科大学で倫理審査を受け、承認を得たうえで実施した。

4. 研究成果

11.1 年 (中央値) の追跡期間中に発生した疾病は、心筋梗塞発症 (男性 14 名、女性 4 名)、労作性狭心症発症 (男性 8 名、女性 0 名)、1 時間以内の突然死 (男性 8 名、女性 1 名)、脳梗塞発症 (男性 42 名、女性 17 名) であった。そのうち、性、年齢 (± 2 歳)、居住地域 (I 町か C 市か)、ベースライン時の喫煙習慣の有無でマッチングに成功した男性 62 名 (心筋梗塞 12 名、労作性狭心症 7 名、1

時間以内の突然死 7 名、脳梗塞 36 名)、女性 20 名(心筋梗塞 4 名、1 時間以内の突然死 1 名、脳梗塞 15 名)と、それらとマッチングさせたコントロール 82 名を解析対象とした。解析対象者のベースライン時の特性は表 1 に示した通りである。男性において、症例群と対照群でベースライン時の特性の違いは認められなかった。女性において、症例群では有意に年齢が高くなることが示された(表 1)

A			
男性	症例群	対照群	p値*
人数	62	62	
年齢(歳)	64.5 ± 0.8	64.1 ± 0.8	0.5
BMI (kg/m ²)	23.9 ± 0.4	23.5 ± 0.3	0.053
エタノール摂取(g/日)	22.0 ± 3.4	18.5 ± 2.6	0.4
総コレステロール(mg/dl)	203 ± 4	201 ± 4	0.2
中性脂肪(mg/dl)	169 ± 14	146 ± 12	0.7
HDLコレステロール(mg/dl)	53 ± 2	52 ± 2	0.2
収縮期血圧(mmHg)	142 ± 3	137 ± 2	0.9
拡張期血圧(mmHg)	83 ± 1	80 ± 1	0.11
1町居住者(%)	16 ± 5	16 ± 5	0.10
現在喫煙者(%)	39 ± 6	39 ± 6	
肥満者(BMI 25)(%)	27	27	1.0
高血圧症(%)	69	58	0.2
糖尿病(%)	37	23	0.07
脂質異常症(%)	65	58	0.451

B			
女性	症例群	対照群	p値*
人数	20	20	
年齢(歳)	64.8 ± 1.3	63.4 ± 1.4	<0.001
BMI (kg/m ²)	24.7 ± 0.9	25.1 ± 0.7	0.7
エタノール摂取(g/日)	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.6
総コレステロール(mg/dl)	207 ± 6	210 ± 8	0.8
中性脂肪(mg/dl)	123 ± 11	137 ± 20	0.5
HDLコレステロール(mg/dl)	58 ± 3	55 ± 3	0.8
収縮期血圧(mmHg)	141 ± 4	139 ± 4	0.7
拡張期血圧(mmHg)	81 ± 2	80 ± 2	0.6
1町居住者(%)	35 ± 11	35 ± 11	0.5
現在喫煙者(%)	± 0	± 0	
肥満者(BMI 25)(%)	40	45	0.7
高血圧症(%)	75	70	0.7
糖尿病(%)	15	10	0.6
脂質異常症(%)	55	55	1

*連続量には対応のあるt-検定、割合にはマクネマー検定を用いた。

表 1. ベースライン時の対象者特性
A: 男性、B: 女性

症例群と対照群それぞれのベースライン時における 24 時間尿中排泄 8-OHdG 値と、t-検定による単変量解析結果を表 2 に示した。症例群と対照群において、男性ではベースライン時の 24 時間尿中排泄 8-OHdG 値に有意な関連は認められなかったが、女性では有意に症例群の方が高かった(表 2)。

同様に、共分散分析により循環器疾患の危険要因を調整した多変量解析の結果を表 2 に示した。男性において、年齢のみを調整したモデル(model 1)、年齢と BMI と飲酒量を調整したモデル(model 2)、model 2 に加えて脂質異常症、高血圧症、糖尿病の有無をそれぞれ調整したフルモデル(model 3)のいずれのモデルでも、単変量解析と同様に有意な関連は認められなかった。女性では、すべてのモデルで一貫して有意な関連が認められた(表 2)。

A			
男性	症例群	対照群	p値*
人数	62	62	
尿中8-OHdG (ug/24時間)	11.2	10.7	0.50
モデル1			0.46
モデル2			0.49
モデル3			0.81

B			
女性	症例群	対照群	p値*
人数	20	20	
尿中8-OHdG (ug/24時間)	8.8	7.3	0.026
モデル1			0.027
モデル2			0.032
モデル3			0.026

*モデル1:年齢を調整

*モデル2:年齢、BMI、飲酒量を調整

*モデル3:モデル2の変数に加え、高血圧、糖尿病、脂質異常症の既往有無を調整

表 2. 調査群別の 24 時間尿中排泄 8-OHdG
A: 男性、B: 女性

本研究の解析対象となった女性は全員ベースライン時には非喫煙者であった。このことから、女性であることに非喫煙者という属性が交絡している可能性が考えられた。そこで副解析として、男性をベースライン時における喫煙習慣の有無で層別したうえで、症例群と対照群それぞれのベースライン時における 24 時間尿中排泄 8-OHdG 値の差を検定した。男性非喫煙者における 24 時間尿中排泄 8-OHdG 値(標準偏差)は、症例群が 11.8 (5.1)

μg、対照群が 11.0 (6.2) μg、t-検定による p 値が 0.43 であった。同様に、男性喫煙者では症例群が 12.5 (6.1) μg、対照群が 11.7 (3.7) μg、p 値が 0.93 であった。

以上のことから、一般地域住民において、24 時間尿中排泄 8-OHdG 値とその後の虚血性循環器疾患発症との間には、女性において有意な関連が認められ、男性では明確な関連が認められなかった。これは少なくとも女性において、酸化ストレスが高値であることが将来の虚血性循環器疾患発症に影響することを示唆する結果である。この男女の結果が異なる理由や生物学的なメカニズムは不明であるが、少なくとも喫煙習慣の有無による違いではなかった。この原因解明は今後の研究課題である。

<引用文献>

Nagao M, Moriyama Y, Yamagishi K, Iso H, Tamakoshi A. Relation of serum α - and γ -tocopherol levels to cardiovascular disease-related mortality among Japanese men and women. *J Epidemiol.* 2012;22(5):402-10.

Chen YC, Chen CM, Liu JL, Chen ST, Cheng ML, et al. Oxidative markers in spontaneous intracerebral hemorrhage: leukocyte 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as an independent predictor of the 30-day outcome. *J Neurosurg.* 2011 Dec;115(6):1184-90.

Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garganabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol.* 2010;610:403-17.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009 Mar;73(3):411-8.

Matsumoto Y, Ogawa Y, Yoshida R, Shimamori A, Kasai H, et al. The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), when stored at room temperature. *J Occup Health.* 2008;50(4):366-72.

Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 Feb;17(2):48-54.

Wu T, Willett WC, Rifai N, Shai I, Manson JE, et al. Is plasma oxidized low-density lipoprotein, measured with the widely used antibody 4E6, an independent predictor of coronary heart disease among US men and women?. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Sep 5;48(5):973-9.

Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation.* 2005 Aug 2;112(5):651-7.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004 Jan;339(1-2):1-9.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2000 May 15;28(10):1456-62.

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)

〔学会発表〕(計1件)

長尾匡則、他. 尿中 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン排泄量と虚血性循環器疾患発症との関連 (CIRCS) 第 27 回日本疫学会学術総会、2017 年 1 月 26 日、ベルクラシック甲府 (山梨県甲府市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長尾 匡則 (NAGAO MASANORI)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 30621239

(2)研究協力者

武藤 孝司 (MUTO TAKASHI)
梅澤 光政 (UMESAWA MITSUMASA)
山岸 良匡 (YAMAGISHI KAZUMASA)
北村 明彦 (KITAMURA AKIHIKO)
磯 博康 (ISO HIROASU)