

FRAS4を用いた簡便な酸化ストレス測定法

高野(宮本)清子¹⁾ 高田礼子²⁾ 岩立有加¹⁾ 鶴見麻依¹⁾
寺中彩葉¹⁾ 鳥居佳介¹⁾ 戸谷忠雄³⁾ 神山宣彦⁴⁾
網中雅仁²⁾ 山内博¹⁾

1) 北里大学 医療衛生学部 公衆衛生学

2) 聖マリアンナ医大 予防医学

3) (独) 労働安全衛生総合研究所

4) 東洋大学 経済学部

I. 酸化ストレスとは

酸化ストレスとは、生体内で発生する過剰な活性酸素種やフリーラジカルによる酸化的損傷である。

活性酸素種やフリーラジカルは特異なものではなく、日常の生体反応で見られるものであり、生体の持つ抗酸化力や食物等に含まれる抗酸化物質により通常は消去される。しかし、放射線、紫外線、喫煙、有害化学物質などにより、生体が持つ抗酸化力を超えて過剰にこれらの物質が産生されると、核酸、タンパク質、脂質などを攻撃し、不可逆的な反応を引き起こす。例えば、活性酸素種等はDNAを酸化修飾し、様々なDNA付加体を生成する。これによりDNA複製が正しく行われず、遺伝子の突然変異を起こすことがある。遺伝子の変異は発癌の誘因の一つと言われている。中でも特に酸化されやすいグアニン残基からは8-OHdG (8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン)が生成される。これはDNA付加体の中でも生成量が多く、DNAの酸化的損傷マーカーとして発癌などのバイオマーカーとして用いられている¹⁾。

この他にも、脂質は活性酸素種やフリーラジカ

ルにより過酸化脂質となり、血管内皮細胞を障害し、動脈硬化を引き起こしたり血栓をつくりやすくしたりする。その結果、心筋梗塞や脳梗塞といった循環器系疾患を引き起こす原因であると言われている。さらに活性酸素種が過剰な状態が続くことで老化が促進されるとも言われている。

酸化ストレスの強弱(酸化ストレス度)は、「生体にどれだけ酸化的障害を起こす可能性があるか」を活性酸素種やフリーラジカルの濃度により測定することが可能である。しかし、これらの物質は、反応性が高く寿命が短いため生体から精製・分離して測定することは困難であった。さらに、ESR(電子スピン共鳴吸収測定装置)等、測定に必要な機器は大型で高価なものであり、測定に時間がかかるという欠点があった。

イタリアの科学者Dr.Carratelliらは、臨床の現場でも使用可能な、簡便でしかも正確な活性酸素・フリーラジカル自動分析装置(Free Radical Analytical System, FRAS4)を開発した。この装置を用いることで、特別な技術者がいなくても臨床の現場でも、短時間で測定することが可能となった²⁾。

《Key words》酸化ストレス、FRAS4、d-ROMs、BAP、8-OHdG

別刷請求宛先: 山内 博

〒228-8555 相模原市北里1-15-1 北里大学 医療衛生学部 公衆衛生学

Reprint Requests to Hiroshi Yamauchi, Department of Public Health, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555 Japan

II. FRAS4の特徴

FRAS4を用いて酸化ストレスの指標として、d-ROMs 値 (DIACRON - Reactive Oxygen Metabolites, 酸化ストレス度) と BAP 値 (Biological Antioxidant Potential, 抗酸化力) の2種類を測定することができる。

血液中の活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシド群は酢酸酸性化で鉄イオンが触媒となって、アルコキシルラジカル (RO \cdot) とペルオキシラジカル (ROO \cdot) のフリーラジカルに変換される。これらがクロモゲン (N, N ジエチルパラフェニレンジアミン) を酸化し赤紫色に呈色する状態を505nm の吸光度変化として測定したものが d-ROMs 値である。この吸光度変化は血中のヒドロペルオキシド、つまり、活性酸素・フリーラジカルの量に比例する。単位は開発者名から、U.CARR. と名付けられた。1U.CARR. は、0.08mg/100ml H $_2$ O $_2$ に相当する。

一方、試薬中のチオシアン酸塩により酸化され赤く呈色した鉄イオンを、血液中の抗酸化物質が還元し脱色する状態を505nm の吸光度変化を測定したものが BAP 値である。5 分間の測定時間

における吸光度変化は還元された鉄イオン濃度、つまり、鉄イオンを還元した抗酸化物質の量に比例する。血液中の内因性・外因性すべての抗酸化物質を包括的に測定することができる。単位は還元された鉄イオンの濃度 (μ M) で表わされる。

酸化ストレス度を評価するためには、生体内の酸化ストレス状態とそれに対する生体の持つ抗酸化力のバランスを考えることが必要である。FRAS4を用いて、d-ROMs 値、BAP 値の両方を同時に測定することは、酸化ストレス状態を明確に把握できる指標であるといえる。

FRAS4を用いて酸化ストレスを検証した以下のような報告がある (表1)。

FRAS4は、主に臨床向けに開発されたが、その簡便性と再現性の良さから様々な分野で使用されている。

III. FRAS4を使った測定

以下に、FRAS4を用いた d-ROMs 値、BAP 値の測定手順を述べる。

測定には、全血又は、血清 (血漿) を用いることができる。ここでは、血清を用いた測定法について記載する。

表1 FRAS4を用いた報告

| 分類 | 研究対象 | 研究機関 | |
|-------|---------------|--------------|--------------------|
| 疾患 | 冠動脈疾患 | 産業医科大学 | 山下ら ³⁾ |
| | 急性感音難聴 | 日本鋼管病院 | 伊藤ら ⁴⁾ |
| | 糖尿病患者への薬剤投与 | 東京都職員互助会三楽病院 | 萩原ら ⁵⁾ |
| | メニエール病 | 日野市立病院 | 五島ら ⁶⁾ |
| | 突発性難聴 | 岩手医科大学 | 菊池ら ⁷⁾ |
| | 高血圧高脂血症 | 昭和大学 | 富田ら ⁸⁾ |
| 侵襲 | 腹腔鏡下手術と開腹手術 | 大阪市立大学 | 土屋ら ⁹⁾ |
| 未病 | 生活習慣病 | 浜松医大 | 永田ら ¹⁰⁾ |
| | 酸化ストレスと生活習慣 | 九州大学 | 畑山ら ¹¹⁾ |
| 運動 | 心肺運動負荷試験 | 埼玉県立大学 | 丸岡ら ¹²⁾ |
| 機能性食品 | 黒ウコンによる肝障害の予防 | 名古屋市立大学 | 山本ら ¹³⁾ |

d-ROMs 値を測定するには、10 μ l の血清と pH4.8 酢酸緩衝液を混合する。次にこの反応液をクロモゲン試薬入りキュベットに移し、よく混合した後 37°C で 1 分間保温する。その後、光度計により 505nm の吸光度の減少を測定し、変化率から血清中ヒドロペルオキシド濃度を計算する。

BAP 値を測定するには、チオシアン酸誘導体を含む試薬と鉄イオンを含む試薬を混合し、505nm の吸光度を測定する。この混合液に 10 μ l の血清を加え、37°C で 5 分間保温した後、再び吸光度を測定する。5 分間の吸光度の変化から酸化された鉄イオン濃度を計算する。

FRAS4 を用いた測定では、反応試薬は必要量が使いつくすのキュベットやエッペンドルフチューブに分注されており測定手順が簡略化されている。両方の測定は 15 分足らずで終了する。FRAS4 以外には特に機器を必要としないように設計されている。

一方、測定する上で注意すべき点もある。安定した測定データを得るためには何よりも 10 μ L の血清を正確に測り取らなければならない。さらに、血清調整時には血球の混入や溶血に注意が必要である。測定原理上、抗凝固剤には EDTA は使用できない。また、乳び血清ではデータが正しく測定できない。

IV. 実験例

筆者らはこの FRAS4 を使い、アスベストやヒ素を投与した実験動物における生体反応を検討した。

第一に、アスベストの一種であるクリソタイルをラットに一回腹腔内投与しその生体影響を測定した。図 1 に d-ROMs 値、図 2 に BAP 値の変化を示した (文献 14) より抜粋)。クリソタイルを投与した群は投与前に比べ d-ROMs 値が経時的に上昇した。投与後 180 日目においては、投与前と比べて有意に上昇していた ($p < 0.001$)。一方、BAP 値は漸減傾向を示し、投与後 90、180 日目において、投与前と比べて有意に減少していた ($p < 0.001$)。このことから、クリソタイル投与による酸化ストレスの増加、さらに、抗酸化力の減

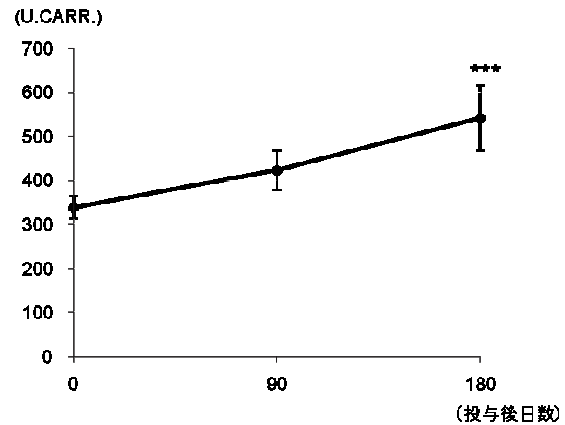


図 1 クリソタイル一回腹腔内投与による d-ROMs 値の経時的变化 (投与前との比較 *** ; $p < 0.001$)

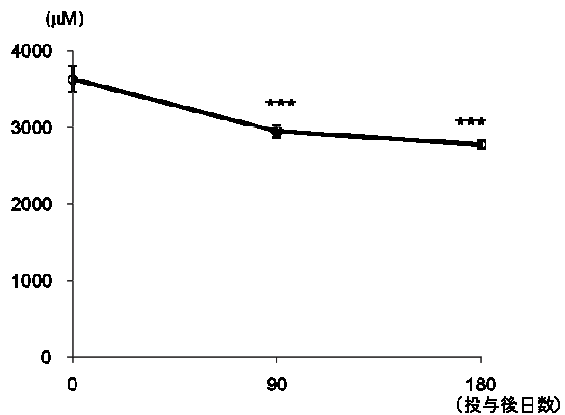


図 2 クリソタイル一回腹腔内投与による BAP 値の経時的变化 (投与前との比較 *** ; $p < 0.001$)

少という二つの傾向が認められた。このように、投与物質の影響を、生体に対するストレスと生体防御の抗酸化力の二つの面から観察することができる。

第二に、三酸化ヒ素をハムスターに一回経口投与した時の d-ROMs 値の変化を図 3 に示した (文献 15) より抜粋)。投与後 1 日目ではあまり変化はないが、投与後 5 日目から有意に値は上昇し、投与後 10 日目においても酸化ストレスの高い状態が確認された。このハムスターの尿を用いて酸化的 DNA 損傷マーカーの一つである 8-OHdG を測定した (図 4)。尿中 8-OHdG 濃度は投与後 7 日

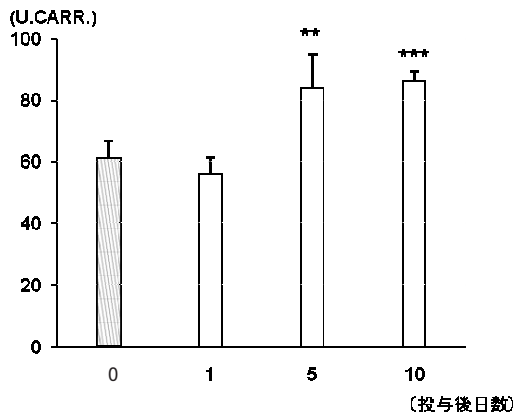


図3 三酸化ヒ素一回経口投与による d-ROMs 値の経時的変化 (投与前との比較 ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$)

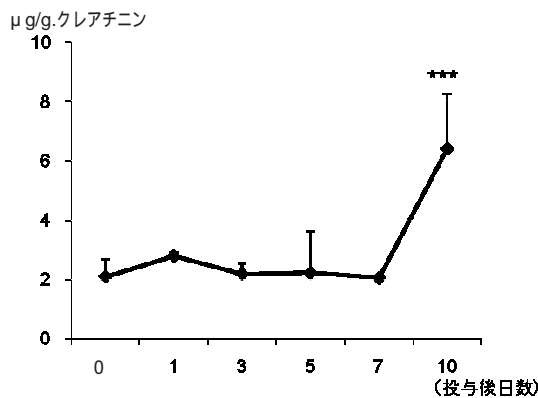


図4 三酸化ヒ素一回経口投与による尿中 8-OHdG 濃度の経時的変化 (投与前との比較 *** ; $p < 0.001$)

目までは投与前とほぼ同等の値を示し、投与後10日目には有意に増加した。

以上より、d-ROMs 値は薬物投与における生体内の酸化ストレスをすばやくとらえることができると思われる。その変化は、既存の酸化ストレスマーカーである8-OHdGと同様な変化を示した。

V. おわりに

尿中8-OHdG濃度等すでに確立された酸化ストレスマーカーは多数あるが、d-ROMs 値とBAP 値を測定することは、一つ一つの物質の変

化を細かく見るのではなく、個体全体の酸化ストレスをバランスとしてとらえることができる。個体の経時的変化を追跡することで酸化ストレスのバランスが悪化に向かっているのか、回復に向かっているのかという予後に対する一つに指標になりうると思われる。一方、個体全体を包括的に測定するため、様々な因子により影響を受けやすいことを考慮しなければならない。これらの因子には、動物に対するストレス、採血などの実験手技、加齢に伴う体調変化等があげられる。経時的に酸化ストレスを観察する時には、ほかの因子の影響を最大限に排除するよう心掛けなければならない。

FRAS4を用いて d-ROMs 値、BAP 値を測定することは生体内で起こっている酸化ストレスを「侵襲」と「防御」の両面から考察できることが示唆された。臨床の場合においてわずかな血液で測定可能という点においては患者の負担を軽減するものであると言える。

さらには再現性がよく、安定した値が得られることから臨床の場面だけでなく、動物を用いた研究にも有効な手段であると思われる。しかも、ごく少量の血漿から測定できるので、動物をと殺することなく同一個体でその変化を追跡することも利点の一つである。

活性酸素種の引きおこす酸化ストレスは、様々な疾患を発症するリスクを上昇させるものであり、生体内での酸化ストレス度を迅速に評価することに意義がある。確立されたキットを用いて比較的簡単な手順で測定可能なFRAS4を用いた測定法は、疾患の早期発見や実際の疾患の予後を推測するのみならず、酸化的損傷のメカニズムを研究するなどの多領域にわたって使用されていくものと思われる。

文献

- 1) 河井一明、葛西宏：酸化ストレスによる8-OH-dGの生成と修復酵素の応答. Environ Mutagen Res 26: 143-148, 2004
- 2) Alberti A, Bolognini L, et al: The redical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine: a possible indicator of

- oxidative stress in biological samples. Res Chem Intermed 26: 253-267, 2000
- 3) 山下和仁、亀崎文彦、他：酸化ストレスマーカーである D-ROMs は、高感度 CRP と関連する. Circulation Journal 70 : 1231, 2006
 - 4) 伊藤まり、相馬啓子、他：急性感音難聴症例における酸化ストレス度の検討. 耳鼻臨床 101 : 743-748, 2008
 - 5) 萩原康二、川畑麗、他：糖尿病患者へのロスバスタチン (Ros) 投与による酸化ストレス・抗酸化能に及ぼす影響. 糖尿病 51 : S-359, 2008
 - 6) 五島史行、井出里香、他：酸化ストレスとメニエール病、良性発作性頭位めまい症との関連. Equilibrium Res 68 : 9-13, 2009
 - 7) 菊池淳、大塚尚志、他：突発性難聴における酸化ストレスの検討. Audiology Japan 52 : 106-111, 2009
 - 8) 富田由里、岩井信市、他：高血圧高脂血症自然発症ラットにおける酸化ストレスの影響. 日本薬理学雑誌 133 : 16P, 2009
 - 9) Tsuchiya M, Sato E F, et al: Open abdominal surgery increases intraoperative oxidative stress: Can it be prevented? Anesth Analg 107: 1946-1952, 2008
 - 10) 永田勝太郎、長谷川拓也、他：生活習慣病と酸化ストレス防御系. 心身医学 48 : 177-183, 2008
 - 11) 畑山知子、長野真弓、他：健常成人の酸化ストレスおよび抗酸化力と生活習慣および血液指標との関連. 日本未病システム学会雑誌 14 : 6-11, 2008
 - 12) 丸岡弘、小牧宏一、他：心肺運動負荷試験が酸化ストレス度に及ぼす影響について. 日本臨床生理学会雑誌 35 : 283-288, 2005
 - 13) 山本肇、松島裕樹、他：黒ウコンのマウスにおける四塩化炭素 CCl_4 に誘起される急性肝障害モデルに対する予防効果. 医学と生物学 153 : 114-121, 2009
 - 14) 高野 (宮本) 清子、高田礼子、他：ラット腹腔内投与したクリソタイルとその焼成品の酸化ストレスの比較. 日本衛生学雑誌 64 : 616, 2009
 - 15) 鶴見麻依、鳥居佳介、他：無機ヒ素のメチル化に対するスルフォラファンの効果. 産業衛生学雑誌 51 : 507, 2009