

小児の脳障害に対する酸化ストレスのバイオマーカー： ヒ素曝露を中心に

山内 博¹⁾ 福田 美穂²⁾
網中 雅仁¹⁾ 吉田 勝美¹⁾

1) 聖マリアンナ医科大学予防医学

2) 聖マリアンナ医科大学小児科

Biomarker of oxidative stress to children with brain damage: mainly the arsenic exposure

Hiroshi Yamauchi¹⁾ Miho Fukuda²⁾
Masahito Aminaka¹⁾ Katsumi Yoshida¹⁾

1) Department of Preventive Medicine, St. Marianna University School of Medicine

2) Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine

要約

酸化 DNA 損傷のバイオマーカーとして 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) が注目されている。尿中 8-OHdG の測定は、生体内で発生している酸化 DNA 損傷の全身的な影響を一括的に評価する特徴がある。酸化 DNA 損傷の限局を調べる場合、被検者の臓器・組織 DNA 中 8-OHdG を HPLC-ECD 法による測定で評価が可能である。小児健常者の尿中 8-OHdG 濃度は成人に比較してやや高値の傾向がある。無機ヒ素曝露による酸化 DNA 損傷の動態は小児急性ヒ素中毒患者の尿中 8-OHdG を測定した結果、DNA 損傷が顕在化する時期はヒ素曝露後から 10 日目、そして、正常値に回復するには半年以上の時間を要することが明らかとなった。無機ヒ素曝露と脳障害の関係を解明する目的で行った研究から、妊娠動物に無機ヒ素を曝露しても母獣の脳にヒ素は取り込まれず影響も生じない。一方、胎仔の脳組織にヒ素は取り込まれ、このヒ素により顕著な酸化 DNA 損傷やアポトーシスの発生が確認された。酸化 DNA 損傷は脳 DNA 中 8-OHdG の測定により定量的に評価が可能である。

尿中 8-OHdG のバイオマーカーとしての役割に、一般的な脳疾患患者において病気に関連する酸化ストレスの度合いを数量的に把握する手段の一つになる可能性も種々の研究から明らかになり始めた。

Abstract

8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) is expected of the biomarker of the oxidative DNA damage. The determination of 8-OHdG in urine has the characteristic that evaluates the influence of the oxidative DNA damage that occurs *in vivo* to the batch. When the organ where the oxidative DNA

別刷請求宛先：山内 博

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

Reprint Requests to Hiroshi Yamauchi, Department of Preventive Medicine, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511 Japan

damage occurs is clarified, 8-OHdG of the tissues in subject by the HPLC-ECD method is measured. 8-OHdG concentrations in urine of the healthy children have some tendencies to high values compared with the adults. The following results was clarified to the dynamics of the oxidative DNA damage by the inorganic arsenic exposure by the determination of 8-OHdG in urine of the patients with acute arsenic poisoning. After the tenth, DNA damage was actualized from the exposure of the arsenic, and time more than half a year was necessary to recover to normal values. To clarify the relation between the inorganic arsenic exposure and the brain damage, the research was executed. The arsenic did not move to the brain of the pregnancy in rats when the inorganic arsenic was exposed. On the other hand, the arsenic was taken into the fetal brain, and this arsenic observed the occurrence of a remarkable oxidative DNA damage and apoptosis. The oxidative DNA damage can be quantitatively evaluated by the determination of 8-OHdG in brain with DNA.

It is thought that there is a determination of 8-OHdG in urine in one of the function of the biomarker, and they become tool to understand the percentage of the oxidative stress that influences the sickness in a general patient with brain disease quantitatively.

《Key words》 8-hydroxydeoxyguanosine, oxidative DNA damage, brain damage, arsenic, children

I. はじめに

有害化学物質による健康障害は公害病や環境性中毒、食品汚染など様々な状況において小児と成人に広く発生した。脳血液関門が未成熟な胎児や乳児、幼児への有害物質曝露による中枢神経障害は成人に比較して特異的な問題と理解される。過去の小児における中枢神経障害の事例として、メチル水銀による胎児性水俣病が有名である¹⁾。ヒ素の食品汚染が原因で発生した森永ドライミルク事件では11000名の乳児が亜急性ヒ素中毒となり、100名が死亡、そして、数年後に中枢神経障害の後遺症も認められ、今日でも継続的な救済が続けられている^{2,3)}。一方、米国の古い建物では鉛塗料が内装に長い期間使用され、それらの住居に暮らした幼児は劣化した鉛塗料から生成した小片(パイカ)を口にしたことから多くの鉛中毒患者が発生し、その中に軽度な脳障害が発生したとの報告がある⁴⁾。他方、一般環境における公害型の高濃度有害物質曝露からの健康障害に対して胎児期に低濃度であるがダイオキシンやPCB、内分泌攪乱物質などの有害化学物質の曝露を受けると将来の健康影響が憎悪するとの推論もある。

近年、酸化・窒化ストレスが原因で発生するDNA損傷のバイオマーカーとして8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)が注目されている。8-OHdGはDNA内において修復酵素系

で切り出された後、生体内で代謝されることなく血液を経て尿中に排泄されるため酸化的DNA損傷のバイオマーカーになると考えられている^{5~8)}。脳障害に関する研究はアルツハイマー病^{9~11)}やパーキンソン病患者¹²⁾で酸化的ストレスと8-OHdGについての研究がある。小児の脳障害の受傷機転は低酸素、虚血、炎症などが原因となる。小児の脳障害と酸化的ストレスの関係に注目した研究は最近急速に開始され始めたが^{8,13~19)}、今後の研究課題と考えられる。

本報では小児の脳障害患者と急性ヒ素中毒患者に対する酸化的ストレスの影響を8-OHdGで評価した結果、また、妊娠動物を用いたヒ素曝露による脳障害を8-OHdGにより評価した研究成果を基に関連領域を含めて概要を紹介する。

II. 尿中8-OHdGの測定法

8-OHdGの測定法は高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器(HPLC-ECD)法²⁰⁾とELISA法⁶⁾がある。ヒト尿中8-OHdG濃度はHPLC-ECD法での測定値はELISA法に比較して低い値になる傾向が報告されている。これはELISA法では8-OHdGの抱合体を全て測定し、これに対して、HPLC-ECD法ではグアニンおよびその代謝物を個々に測定することによる違いと理解される。Kasaiら⁵⁾によると、測定値に違いがある

が同一の検体で比較すると十分な関連性が認められると報告されている。このような背景から、ELISA 法と HPLC-ECD 法の活用はそれぞれの研究目的により選択すべきと考える。

尿中8-OHdG 測定ではその8-OHdG がどの標的臓器・組織から誘導されたものかを判定することは出来ないが、酸化了的 DNA 損傷による全身的な影響として一括的に評価可能とする特徴がある。白血球中8-OHdG の測定も尿と同様である。一方、有害物質曝露による酸化了的 DNA 損傷の限局を調べる場合、考えられる標的臓器・組織を重点的に測定することは効果的である。対象となる検体に DNA、臓器、組織があり、測定法は HPLC-ECD 法が有効である。

III. 小児と成人健常者の尿中8-OHdG 濃度

小児と成人健常者における尿中8-OHdG 濃度に関する研究は少なく、筆者らは ELISA 法を用いて正常値を検討した (表1)。従来、健常者の尿中8-OHdG 濃度を性差と年齢を十分に考慮した研究は存在しなかった。20歳以上の成人健常者248名の平均値は15.4±5.6ng/mg cr.で、性差と年齢差は認めなかった。0歳から15歳の小児健常者51名の平均値は18.9±8.50ng/mg cr.で、成人の値に対してやや高値の傾向であった。小児における年齢差による尿中8-OHdG 濃度を比較する

表 1 Concentrations of 8-OHdG in urine in the less than one year old healthy children (n=19), three year old healthy children (n=30), all children (n=51) and 248 adult healthy subjects.

	尿中8-OHdG ng/mg creatinine	
	平均値	標準偏差
小児健常者 (n=51)	18.9***	8.50
1歳未満乳児 (n=19)	16.9***	7.74
3歳健常児 (n=30)	19.2***	5.44
成人健常者 (n=248)	15.4	5.60

***, $p < 0.001$ versus 248 adult healthy subjects.

と、1歳未満乳児 (n=19) が16.9±7.74ng/mg cr、3歳健常児 (n=30) が19.2±5.44ng/mg cr.で両群に差異を認めなかった。Drury ら⁸⁾の報告では、HPLC 法により測定した新生児の生理的な尿中8-OHdG 濃度の変化を観察した結果、尿中8-OHdG 濃度は生後しばらくして成長曲線を描くかのように上昇し、生後1ヶ月ころに安定してくる傾向がある。すなわち、新生児期と小児の値を比較しても大きな差は認められていない。これまでの研究から、尿中8-OHdG 濃度は尿中クレアチニンの補正により性差や年齢などの生理的な変動を抑制する効果があるが、実測値の重要性は常に持つ必要があると考える。

IV. 小児急性ヒ素中毒患者における尿中8-OHdG の動態

無機ヒ素は肝臓中で s-アデノシルメチオニンがメチル基のドナーとなりモノメチル化ヒ素、ジメチル化ヒ素に代謝され、このメチル化は体内で恒常的に行われている DNA のメチル化と共通するものである。このために無機ヒ素の過剰摂取は DNA のメチル化を混乱させると推測されている。無機ヒ素による酸化了的 DNA 損傷の発生は急性と慢性ヒ素中毒患者の尿中8-OHdG により確認されている。無機ヒ素曝露と酸化了的 DNA 損傷の関係には、無機ヒ素の多量曝露でも尿中8-OHdG 濃度に変化がない患者が存在し、逆に、少量曝露でも尿中8-OHdG 濃度の上昇するケースがあり、すなわち、無機ヒ素による酸化了的 DNA 損傷には個体差が存在する。この知見の延長線上には、無機ヒ素曝露後の尿中8-OHdG 濃度が減少しない被検者は、将来の発がん性に対するハイリスク群としての認識が持てると考えている。

筆者の経験では⁷⁾、16名の小児急性ヒ素中毒患者における尿中8-OHdG 濃度の結果から、成人に比較してやや感受性が高い印象を認めている (図1)。1歳から12歳までの小児間の値では、ヒ素摂取量に対しての尿中8-OHdG 濃度は低年齢者にやや高い傾向が認められた。ヒ素摂取後の尿中8-OHdG 濃度のピークは16名共に10と30日目のどちらかであり、ヒ素曝露後直ちに尿中8-OHdG

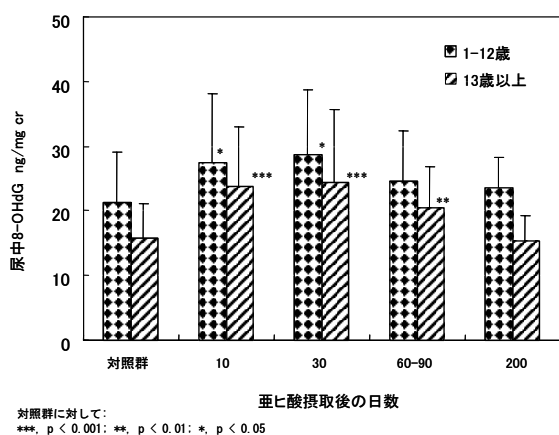


図1 急性砒素中毒による三酸化砒素の摂取後、16名の子供と36名の成人患者の尿中8-OHdG濃度の経時的変化。対照値は51名の子供と248名の成人健康被験者の値である。

の上昇は認められていない。この小児患者群の尿中ヒ素濃度はヒ素摂取後1-2ヵ月目に正常値範囲に回復したが、一方、尿中8-OHdG濃度の回復は遅く、おおよそ半年を経過した時点において正常値範囲に接近した。この回復のパターンは小児と成人に共通していた。

V. 小児中枢神経疾患の尿中8-OHdG濃度

脳障害と8-OHdGとの関係についてはアルツハイマー病患者における酸化ストレスの作用についての研究がある。アルツハイマー病患者の脳脊髄液(CSF)またはCSF-DNA中8-OHdG濃度を測定した結果、8-OHdGの上昇傾向が複数の研究で確認されている^{9,10,12)}。アルツハイマー病以外の疾病におけるCSF中8-OHdGに関する研究も期待されている。これに対して、小児脳障害に関する研究は僅かである^{8,13-19)}。筆者らは小児脳障害患者36名における病態と酸化ストレスとの関係を尿中8-OHdGにより検討した経験がある(図2)。けいれん重積患者の尿中8-OHdG濃度は健康者群に比較して数倍に上昇する傾向を認めたが、測定値の範囲が大きく統計学的な有意差が示されていない。これに対して、低酸素性虚

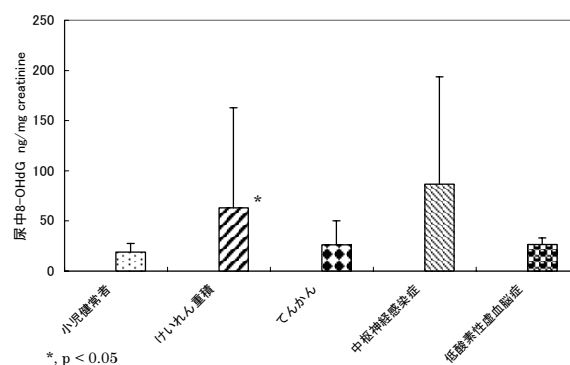


図2 健康な子供とてんかん、けいれん重積、中枢神経感染症、HIE患者の尿中8-OHdG濃度。

血性脳症と中枢神経感染症の尿中8-OHdG濃度は上昇傾向にあり、統計学的な有意差が認められている。潜因性てんかんの患者の尿中8-OHdG濃度に明らかな変化は認められていない。近年、脳細胞障害機構の研究から、脳虚血・再還流障害は酸化ストレス、フリーラジカルによる作用機序が注目されている²¹⁾。けいれん重積では興奮性グルタミン酸の大量放出により脳細胞障害が生じると考えられている。てんかんの発症の作用機序として興奮性アミノ酸レセプター過剰刺激によるフリーラジカル発生が示唆されている²²⁾。

ELISA法による尿中8-OHdG検査所要時間は30名で約6時間と比較的迅速に行うことができ、臨床現場においても患者の病態の把握に速やかに対応できるというメリットがあると考えている。

VI. 妊娠動物でのヒ素曝露と仔の脳障害

脳血管閉塞が未成熟な時期の無機ヒ素曝露は中枢神経障害に発展することは、乳児の亜急性ヒ素中毒で明らかである(森永ヒ素ミルク事件)。従来、妊娠動物を用いた無機ヒ素化合物による催奇性試験は多くの研究者により実施され、結果として無脳症、脳露出症など脳障害が報告されている²³⁻²⁵⁾。これらの実験で用いられた高濃度なヒ素投与量は母獣に極めて高い付加を与えたものである。これに対して、和歌山毒物カレー事件における妊婦の事例のように軽度から中程度の急性ヒ素

中毒を発生する曝露量での動物モデルは存在していない。

この問題に対して、妊娠ラットに LD50 の 1/4 に相当 (中程度の急性ヒ素中毒) する三酸化ヒ素を一回経口投与し、仔の脳障害について検討を試みた。哺乳動物ではヒ素化合物は胎盤を通過するために、胎仔に移行し全身に分布される。この実験の特徴的な結果の一つとして、胎仔の脳中ヒ素濃度と化学形態は、母獣の結果と大きく異なる現象が認められた。まず、母獣の脳に投与したヒ素は取り込まれないが、一方、仔の脳中には投与ヒ素の代謝物であるジメチル化ヒ素 (DMA) が約 4-5 倍の高値で取り込まれた。この現象は脳血液関門の相違と理解された。この時点の仔の脳組織には顕著なアポトーシス細胞の検出が確認され、しかし、母獣の脳組織に異常は認められなかった²⁶⁾。さらに、仔の脳 DNA 中 8-OHdG を HPLC-ECD 法で測定した結果、図 3 に示したごとくヒ素化合物による酸化的 DNA 損傷としての 8-OHdG が顕著に上昇していた。この実験において、胎仔の脳中ヒ素濃度は 20~30 ng/g wt. と低濃度に関わらず組織障害が発生した事実は興味深いものであった。すなわち、胎仔と母獣の脳組織へのヒ素の取り込みパターンは異なり、そして、アポトーシス細胞と 8-OHdG の過剰生成の結果

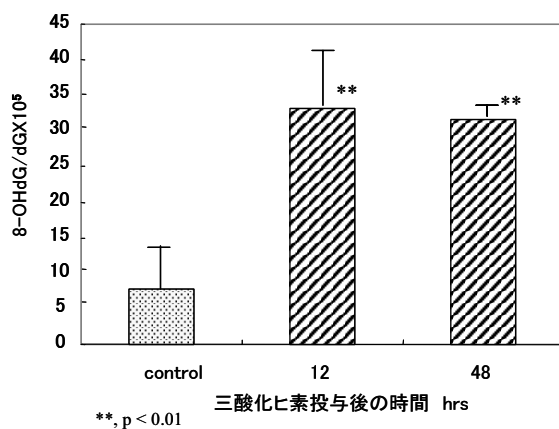


図 3 Concentrations of 8-OHdG in brains of fetuses after a single oral administration of arsenic trioxide in pregnancy rats.

は関連していた。胎仔の脳に出現したアポトーシス細胞と 8-OHdG の過剰生成は、脳中 DMA の存在と思われる。Yamanaka ら^{27, 28)} は生体内に過剰な DMA が存在した場合、DMA のさらなるメチル化により生成するトリメチルアルシンによるラジカル反応が原因で DNA 損傷を発生させると推測している。

従来、脳組織中の酸化的 DNA 損傷の実態を把握することは難しい作業であったが、脳 DNA 中 8-OHdG 測定は広範囲な研究に応用が可能な手法であると考ええる。さらに、8-OHdG や 8-ニトログアニンの免疫染色法の併用も研究成果の向上に寄与すると考える。

文献

- 1) Matsumoto H, Koya G, et al: Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. *J Neuropathol Exp Neurol* 24: 563-574, 1965
- 2) Hamamoto E, Morita T, et al: Study on the properties of dry milk suitable for demand bottle feeding--growth, protein metabolism and loading of renal solutes in healthy infants fed by demand bottle feeding for long terms with 15 percent simple diluted milk, "Daiya G Morinaga Dry Milk" *Nippon Shonika Gakkai Zasshi* 73: 332-341, 1969
- 3) Yamashita N, Doi M, et al: Recent observations of Kyoto children poisoned by arsenic tainted "Morinaga Dry Milk". *Jap J Hyg* 27: 336-399, 1972
- 4) Johnston MV, Goldstein GW: Selective vulnerability of the developing brain to lead. *Curr Opin Neurol* 11: 689-693, 1998
- 5) Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, et al: Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and

- smoking. *Jpn J Cancer Res* 92: 9-15, 2001
- 6) Saito S, Yamauchi H, et al: Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) by using ELIZA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107: 39-44, 2000
 - 7) Yamauchi H, Aminaka Y, et al: Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 291-296, 2004
 - 8) Drury JA, Jeffers G, et al: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in infants and children. *Free Radic Res* 28: 423-428, 1998
 - 9) Lovell MA, Gabbita SP, et al: Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* 72: 771-776, 1999
 - 10) Lovell MA, Markesbery WR: Ratio of 8-hydroxyguanine in intact DNA to free 8-hydroxyguanine is increased in Alzheimer disease ventricular cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 58: 392-396, 2001
 - 11) Markesbery WR, Carney JM: Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9: 133-146, 1999
 - 12) Kikuchi A, Takeda A, et al: Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 9: 244-248, 2002
 - 13) Tsukahara H, Haruta T, et al: Oxidative stress in childhood meningitis: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentration in cerebrospinal fluid. *Redox Rep* 5: 295-298, 2000
 - 14) Matsubasa T, Uchino T, et al: Oxidative stress in very low birth weight infants as measured by urinary 8-OHdG. *Free Radic Res* 36: 189-193, 2002
 - 15) Yao D, Kuwajima M, et al: Pathologic mechanisms of influenza encephalitis with an abnormal expression of inflammatory cytokines and accumulation of miniplasmin. *J Med Invest* 50: 1-8, 2003
 - 16) Huleihel M, Golan H, et al: Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. *Reprod Biol Endocrinol* 22: 17-21, 2004
 - 17) Wunderlich MT, Wallesch CW, et al: Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 227: 49-53, 2004
 - 18) Zhao J, Liu XJ, et al: DNA damage in healthy term neonate. *Early Hum Dev* 77: 89-98, 2004
 - 19) Friel JK, Friesen RW, et al: Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr Res* 56: 878-882, 2004
 - 20) Bogdanov MB, Beal MF, et al: A carbon column-based liquid chromatography electrochemical approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measurements in urine and other biologic matrices: a one-year evaluation of methods. *Free Radic Biol Med* 27: 647-666, 1999
 - 21) Rajasekaran K: Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 263-272, 2005
 - 22) Hamed SA, Abdellah MM, et al: Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J Pharmacol Sci* 96: 465-473, 2004
 - 23) Hood RD, Bishop SL: Teratogenic effects of sodium arsenate in mice. *Arch. Environ. Health* 24: 62-65, 1972
 - 24) Hood RD, Thicker GT, et al: Prenatal

- effects of oral versus intraperitoneal sodium arsenate in mice. *J Environ Pathol Toxicol* 1: 857-864, 1978
- 25) Hood RD, Harrison WP, et al: Evaluation of arsenic metabolites for prenatal effects in the hamster. *Bull Environ Contam Toxicol* 29: 679-687, 1982
- 26) 仁藤裕子、坂部貢、他：急性ヒ素中毒の妊娠ラットの胎仔における脳障害の研究. *Biomed Res Trace Elements* 11: 68-74, 2000
- 27) Yamanaka K, Okada S: Induction of lung-specific DNA damage by methylarsenics via the production of free radicals. In "Arsenic in the Environment. Part II: Human health and ecosystem effects", ed. by J. O. Nriagu. John Wiley & Sons, Inc, New York, 1994, pp143-157
- 28) Yamanaka K, Okada S: Possible involvement of methylarsenics metabolically produced from inorganic arsenics in arsenic carcinogenesis. *Biomed Res Trace Elements* 10: 139-140, 1999