

環境中の化学物質曝露による小児生体内酸化ストレスへの影響

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 環境システム学専攻
環境健康システム学分野 086677 森 拓哉 (2010年3月修了)
指導教員 吉永淳 准教授

キーワード：環境中化学物質、多環芳香族炭化水素類、無機ヒ素、受動喫煙、
酸化ストレス、抗酸化物質、小児健康影響

1. はじめに

我々の生活環境中には、極微量でも慢性的な曝露によりヒトに対して影響を及ぼす有害物質が存在する。こうした化学物質による健康影響の一つとして近年、酸化ストレスが注目されている。酸化ストレスとは、生体内で発生する活性酸素種などの反応性が高い分子の増大をいい、これにより生体内分子が損傷し、種々の健康被害（癌や循環器系疾患、自己免疫疾患、アレルギー性疾患など）の病因や増悪因子となることや、あるいは疾患の結果として酸化ストレスが増大するなどの関与が知られている。このため酸化ストレスは生体内における潜在的なダメージと捉えられる。この酸化ストレス要因には、増大因子として生体内の酸素消費反応や免疫反応、放射線、種々の化学物質の曝露などが挙げられる。一方、酸化ストレス抑制因子としては生体内の抗酸化成分の関与が報告されている。

酸化ストレス要因となる化学物質には *in vitro* や動物実験、職業曝露などで多くの報告が挙げられている。しかし一般公衆中化学物質の低レベル曝露と酸化ストレスとの関連についてはいくつか報告があるものの^{2,3,4}、まだ一定の結論を出すだけの十分な研究の蓄積はないと考えられる。特に酸化ストレスには変動要因が多数想定されるため、単一の要因と酸化ストレス間の相関を解析するだけでは関連が他の変動要因に隠れてしまう可能性や偽相関の可能性が大きいままであるが、複数の因子を同時に考慮した研究例は非常に少ない。さらに関連する疾病に壮年期に発症するものが多いためか、小児を対象とした研究も少ない。しかし小児は成人に比べて一般に有害物に対して脆弱であることが知られており、小児においても潜在的なダメージは起こっていると考えられるため、小児の酸化ストレスに関する研究の重要性は高いと考えられる。

こうした背景から本研究では、日本人小児を対象として酸化ストレスと環境中化学物質との関連について調査することとした。酸化ストレスとの関連が疑わしい環境中の化学物質として、日本の一般公衆レベルでも比較的健康リスクが高いとされる無機ヒ素 (iAs)、多環芳香族炭化水素類 (PAHs)、受動喫煙について曝露評価を行い、また体内で抗酸化成分として機能する栄養素摂取量も考慮しつつ、酸化ストレス指標との関連を解析した。

2. 方法

2-1. 対象者とサンプリング

K 県某幼稚園に通う、研究に同意の得られた園児 74 名を調査対象として、2007 年 10 月にサンプリングを行った。サンプリング期間中任意の日に、朝最初のスポット尿を採取してもらい、尿中バイオマーカー測定を行うまで冷凍保存した。この時同時に質問票を回収しており、体重や年齢などの基本情報の他、周囲の喫煙状況についても回答を得た。またサンプリングから 2-4 週間後に、1 日の食事について重量法による食事摂取調査を行った。

なお本研究計画については、小児の代諾者により同意を得ており、東京大学の倫理審査委員会、および共同研究機関である相模女子大学研究倫理委員会の承認を得たものである。

2-2. 化学物質曝露評価

各化学物質の曝露指標として、PAHs はその主要成分である pyrene の代謝産物 1-hydroxypyrene (1-OHP)、iAs は iAs とモノメチルアルソン酸 (MMA) の合計値、受動喫煙はタバコ煙の主要成分である nicotine の代謝産物 cotinine それぞれの尿中濃度を用いることとし、それぞれ Table 1 に示す方法にて測定した。尚、サンプルにスポット尿を用いたため、尿量を creatinine 濃度により補正した。

表 1 尿中バイオマーカー測定方法

尿中バイオマーカー	測定方法 (尿前処理→機器分析)
1-OHP (PAHs)	グルクロン酸脱抱合, 固相抽出 → HPLC-FL
iAs+MMA (iAs)	5 倍希釈 → HPLC-HG-ICPMS
cotinine (ETS)	グルクロン酸脱抱合, 液液抽出 → GCMS

2-3. 酸化ストレス評価方法

酸化ストレス指標には活性酸素などによる酸化生成物が用いられる。中でも 8-hydroxy-2-deoxyguanine(8-OHdG)は DNA 塩基であるグアニンの酸化物質で、生成量が豊富かつ化学的に安定なことから、現在最も一般的な指標である。本研究では尿中に排泄される 8-OHdG について、尿試料を遠心ろ過後、HPLC-ECD (カラムスイッチング法) に供して測定し、全身の酸化ストレスを評価した。尚、測定は産業医科大学職業腫瘍学研究室 葛西宏教授により行われ、8-OHdG 濃度は化学物質曝露評価と同様 creatinine 補正を行った。

2-4. その他の酸化ストレス共変量

生体は酸化ストレスに対し、各種ビタミンや酵素による抗酸化能を有している。本研究では生体内の抗酸化酵素 (スーパーオキシドデスムターゼ、グルタチオンパーオキシダーゼなど)の活性中心となる Se, Zn, Mn、ラジカル補足作用をもつ栄養素である Vitamin A, C, E も考慮することとした。Se 摂取レベルについては尿中 Se 濃度から評価し (測定: ICPMS, creatinine 補正)、その他の栄養素摂取量については重量法による食事調査から五訂増補日本食品標準成分表を用いて算出した。

2-5. 統計解析

各データについては度数分布を確認し、対数分布型に近いものについては対数変換した値を統計解析に用いた。統計解析にあたっては SPSS for Windows ver. 12.0 を使用し、2 群の差の検定には t 検定、複数の群間変動については一元配置分散分析 (ANOVA)、二変量の関連性については Pearson の相関分析、多変量の関連性解析には重回帰分析を用いた。

3. 結果および考察

3-1. 化学物質曝露評価

小児の尿中バイオマーカー濃度について Table 1 に示す。いずれも対数正規分布に近い濃度分布と判断し、統計解析時には対数変換を行うこととした。尿中 1-OHP および iAs+MMA

濃度については既往研究と比較しても特別大きな値ではなく、本研究対象者は特に大きな曝露を受けていない一般公衆であると考えられた。なお尿中 1-OHP、iAs+MMA 濃度には性差はなく (1-OHP: $p=0.06$, iAs+MMA: $p=0.64$)、年齢による変動もみられなかったが (ANOVA, 1-OHP: $p=0.06$, iAs+MMA: $p=0.08$)、尿中 iAs+MMA と体重には正の相関がみられた (1-OHP: $r=-0.04$, $p=0.74$, iAs+MMA: $r=-0.43$, $p<0.05$)。この相関は iAs の主要曝露源である食事の体重当たり摂取量が成長に伴って減っていくためと考えられる。尿中 cotinine 濃度については、欧州小児の受動喫煙における調査などと比べても低い値であり、対象小児の受動喫煙レベルは比較的lowであったと考えられる。

またタバコの煙は PAHs の曝露源とされるが、尿中 cotinine と PAHs 間に相関がみられなかった ($r=0.05$, $p=0.66$) ことから、その寄与は小さく、尿中 1-OHP と cotinine 濃度は独立な変数であるとした。

表 2 尿中バイオマーカー濃度

	検出率	GM	GSD
1-OHP [ng/mg cre]	74/74	0.127	1.92
iAs+MMA [ng As/mg cre]	74/74	4.78	1.59
Cotinine [ng/mg cre]	39/74※	0.66	2.28

※<D.L.:1/2xD.L.(0.25 ng/ml urine)として creatinine 補正

3-2. 酸化ストレス評価

小児の尿中 8-OHdG は GM 4.68 ng/mg cre, GSD 1.39 ($n=133$)と先進諸国既往報告と同等の濃度であり、対数分布に近い濃度分布であった。有意な性差はなく ($p=0.58$)、3 歳児がやや高い傾向であったものの、年齢群による有意な濃度の変動はみられなかった (ANOVA, $p=0.06$, Fig.1)。また体重との相関もみられなかった ($r=0.01$, $p=0.99$)。若年層においては、年齢と酸化ストレスとの間に負の関連があることが知られているが⁵⁾、本研究では年齢の幅が小さかったため、関連が見えにくかったものと考えられる。

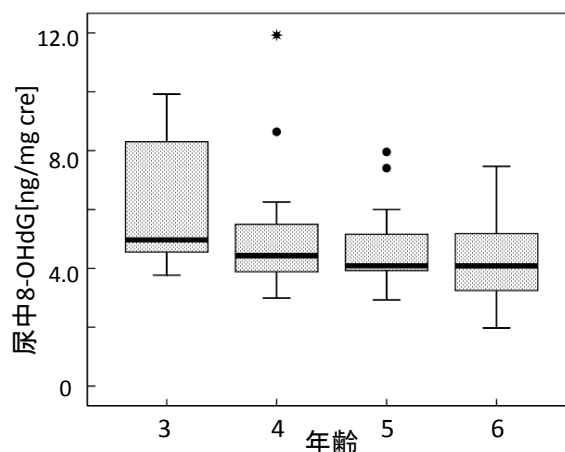


図1 年齢と酸化ストレス

3-3. 酸化ストレス関連因子 (単相関)

尿中 8-OHdG 濃度について、各化学物質曝露指標との相関分析を行ったところ、尿中 1-OHP 濃度との間に有意な正の相関がみられた ($r=0.37$, $p<0.01$, 図 1.)。一方尿中 iAs+MMA 濃度 ($r=0.16$, $p=0.19$) や尿中 cotinine 濃度 ($r=0.13$, $p=0.29$) との間には有意な関連はみられなかった。

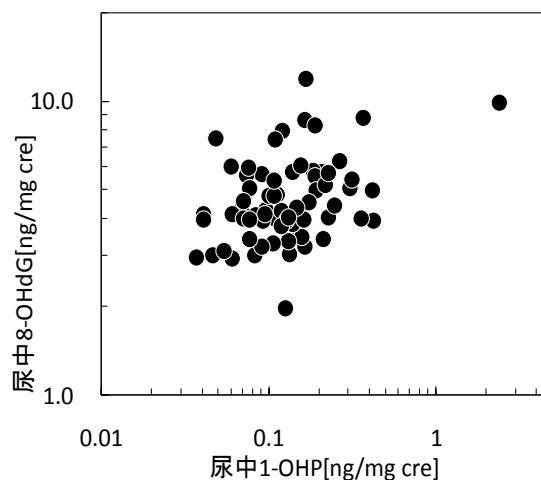


図1. PAHs曝露と酸化ストレス

また尿中 Se 濃度や体重当たりの栄養素摂取量との解析では、尿中 8-OHdG 濃度とレチノール当量 (ビタミンA類) との間に負の相関 ($r=-0.27$, $p<0.05$, 図 3.) がみられた。

3-4. 酸化ストレス関連因子 (重回帰分析)

酸化ストレスは、複数の要因によって変動すると考えられる。このため重回帰分析を用いて複数のパラメータについて同時に解析を行った。従属変数を尿中 8-OHdG 濃度とし、独立変数には尿中 iAs+MMA, 1-OHP, cotinine, Se 濃度、年齢、体重、Zn、Cu、Mn、ビタミンA類 (レチノール当量)、C、E類 (トコフェノール当量) 摂取量を投入し、ステップワイズ法にて解析した。するとレチノール当量 ($\beta=0.40$, $p<0.05$)、年齢 ($r=0.35$, $p<0.01$) が有意な負の関連をもつ変数として、尿中 1-OHP ($\beta=0.21$, $p=0.07$) は有意ではないが正の関連の傾向のある変数として回帰モデル ($r=0.54$) に選択された。

これらの結果から、ビタミンA類 (レチノール当量) は抗酸化分子として酸化ストレスを減ずる方向に寄与していることが確認された。年齢は4群のカテゴリ変数であったため、回帰分析に投入するには最適とはいえないが、既往研究においても酸化ストレスに影響を与える重要なパラメータであることが知られており、成長に伴う①感受性の変化、②外的因子の体重当たり曝露量の変化が影響していると推測される。また尿中 1-OHP と 8-OHdG 濃度の関連については、共変数の影響を制御するとわずかに有意ではなかったものの、なお弱い正の関連の傾向が見えており、PAHs 曝露が酸化ストレスの増大に寄与している可能性が示唆された。PAHs 曝露による酸化ストレスの増大については、職業曝露を対象とした研究で多く報告されている^{6, 7, 8)}。一般公衆レベルの PAHs 曝露については Kim et al.⁹⁾が酸化ストレスとの弱い正の関連を報告するのみであったが、本研究によって再現性が確認されたと考えられる。

4. 結論

小児の酸化ストレスの変動にはビタミンAの栄養状態および年齢が強く寄与しており、酸化ストレスと化学物質曝露との関連を調べる上で、必須の調査項目であることが確認された。そしてこれらの要因を同時に考慮しても、一般公衆レベルでの PAHs 曝露が酸化ストレスの増大に一部寄与していることが示唆された。また同時に酸化ストレスの抑制にビタミンA類の摂取や PAHs 曝露量の低減化が有効である可能性が示唆された。

5. 参考文献

- 1) Loft S. and Poulsen H. E., J. Mol. Med., 74, 297-312, (1996)
- 2) Kimura et al., Pharmacol. Toxicol., 98, 496-502 (2006)
- 3) Chung et al., Toxicol. Appl. Pharmacol, 226, 14-21 (2008)
- 4) Yong et al., J. Occup Health 45, 160-167 (2003)
- 5) Tamura et al., Free radical Research, 40, 1198-1205(2006)
- 6) Nilsson et al., Occup Environ. Med., 61, 692 – 696 (2004)
- 7) Toraason et al., Int. Arch. Occup. Environ. Health, 74, 396 – 404 (2001)
- 8) Zhang et al., Int. Arch. Occup. Environ. Health, 76, 499 – 504 (2003)
- 9) Kim et al., J. Occup. Health, 45, 160-167 (2003)

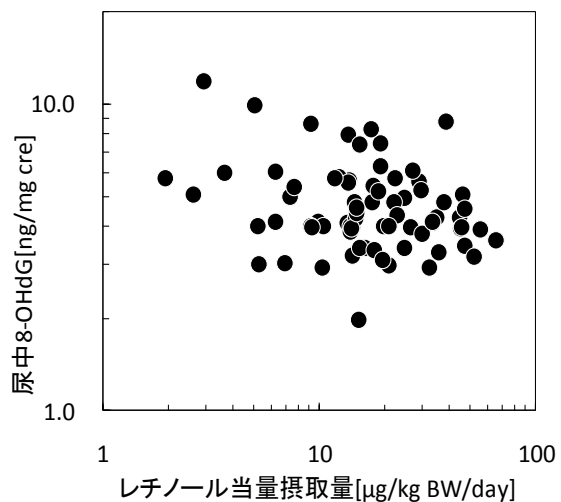


図2. ビタミンA類摂取量と酸化ストレス