

尿試料の反復凍結解凍による体内酸化的ストレスレベル指標 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OH-dG)の安定性[†]

松 本 由 紀^{*1} 小 川 康 恭^{*1,2} 吉 田 吏 江^{*2} 大 場 謙 一^{*3}

我々は、尿試料への反復凍結解凍負荷が 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) の安定性へ及ぼす影響を検討した。使用保存試料は 102 試料（男 85 名，女 17 名，年齢 22 歳～79 歳）であった。尿中 8-OH-dG 濃度の測定は HPLC による二段階分離法にて測定した。初回凍結解凍尿と 2 回目凍結解凍尿の比較では（n=82），尿中 8-OH-dG 濃度はそれぞれ 5.4 ± 2.8 ng/ml, 5.2 ± 2.8 ng/ml であり対比較で有意な差は認められなかった。回帰分析では，x を初回凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度，y を 2 回目凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度とすると， $y = 0.97x - 0.04$ ($R^2 = 0.91$, $p < 0.01$) であった。次に，初回凍結解凍尿と 3 回目凍結解凍尿の比較では（n=20），尿中 8-OH-dG 濃度はそれぞれ 5.9 ± 5.0 ng/ml, 6.2 ± 5.1 ng/ml であり，これも対比較で有意な差は認められなかった。回帰分析では，x を初回凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度，y を 3 回目凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度とすると， $y = 1.0x + 0.29$ ($R^2 = 0.96$, $p < 0.01$) であった。本研究結果より，尿中 8-OH-dG 測定においては保存尿試料の反復凍結解凍は 3 回までであれば値が安定であることが示された。

キーワード: 酸化的ストレス，8-ハイドロキシ-2'-デオキシグアノシン，尿，高速液体クロマトグラフィー，電気化学検出器，凍結解凍

1 はじめに

体内における酸化的ストレスレベルの指標として酸化の核酸損傷マーカーである尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) 量が広く用いられている。この尿中 8-OH-dG 量は、職場における化学物質曝露による酸化的ストレスレベルの指標としても有効であり、実際にアスベスト使用労働者ではクレアチニン量で補正した尿中 8-OH-dG 排泄量と曝露期間に有意な相関が認められた¹⁾など、労働者における酸化的ストレスレベルの評価指標として広く用いられている²⁻⁷⁾。

これまで我々は尿中 8-OH-dG 量の指標としての信頼性を試料保存の面から検討してきた。そして温度による安定性に関しては、24 時間以内であれば常温 (25℃) にて保存可能であることを報告した⁸⁾。また経年保存による安定性を検討した結果、-80℃にて 800 日以内の凍結保存であれば保存可能であることも報告した⁸⁾。今回は、過去において測定に用いた後凍結保存されている尿試料や、今後得られる少量の尿試料の有効活用の可能性を探るため、一度解凍し測定した尿試料を再度、更には再々度凍結解凍を繰り返して尿中 8-OH-dG 量が変化しないかを検討した。

2 対象と方法

1) サンプルサイズ

本研究目的に必要なサンプルサイズを算出した。母平均の差を検定する為に必要なサンプルサイズは、母分散未知の片側検定 ($\mu > \mu_0$) の場合

$$n \approx \left(\frac{Z_{\alpha} - Z_{1-\beta}}{\Delta_0} \right)^2 + \frac{Z_{\alpha}^2}{2}$$

となる⁹⁾。ここで Δ_0 は、 $|\mu - \mu_0|/\sigma \geq \Delta_0$ となるように設定した値であり、有意水準 α ，検出力 $1 - \beta$ で帰無仮説を棄却したいときの最小の基準化した差である。我々の研究室における測定下限値が最大で 1.0 ng/ml，8-OH-dG 標準液の 10 回測定の標準偏差は最大で 1.3 ng/ml である。そこで， $|\mu - \mu_0| = 1.0$ ， $\sigma = 1.3$ とすると， $\Delta_0 = |1.0|/1.3 = 0.77$ となるので， $1 - \beta = 0.80$ ， $\alpha = 0.05$ のもとでは，上記式より求まる必要なサンプルサイズは， $n \geq 13$ である。

2) 使用試料

使用試料は旧（独）産業医学総合研究所倫理委員会から承認を得ている研究において尿中 8-OH-dG 値を酸化的ストレスレベル評価の指標として使うことに納得して同意書に署名した者 102 名の保存試料である。初回解凍と 2 回目凍結解凍との比較に 82 試料（男性 22 歳～79 歳；喫煙者 28 人，非喫煙者 40 人，女性 36 歳～74 歳；喫煙者 1 名，非喫煙者 13 名），初回解凍と 3 回目凍結解凍との比較には尿量が確保できた 20 試料（男性 25 歳～74 歳；喫煙者 4 名，非喫煙者 16 名）を用いた。

3) 方法

(1) 試料採取方法及び保存方法

当該事業所または病院において尿を紙コップに採取し，1.5 ml の遮光性チューブに分取密封し，8-OH-dG 濃度を測定するまで -80℃で冷凍保存した。1 回目の測定のために解凍し，尿を分取した後直ちに密封の上再凍結をし，2 回目の試料とした。その一部は同様にもう 1 度凍結解凍を繰り返して 3 回目の試料を得た。

[†] 原稿受付 2009 年 01 月 14 日

[†] 原稿受理 2009 年 07 月 23 日

*1 労働安全衛生総合研究所北里大学連携大学院。

*2 労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

*3 北里大学医療衛生学部健康科学科衛生管理学

連絡先：〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所 小川康恭^{*1,2}

E-mail: ogawa@h.jniosh.go.jp

(2) 分析方法

解凍後の尿試料は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による二段階分離法 (葛西法) にて 8-OH-dG 量を測定した¹⁰⁾。以下に測定方法を簡略に記す。

解凍した尿をリボヌクレオシドである

8-hydroxyguanosine (8-OH-G) を含む希釈液と混ぜ、4℃の暗所に2時間静置した後、遠心分離(13,000rpm, 5分間)を行い、その上澄み液を測定試料とした。この試料を第一段階の4級アンモニウム基が結合したポリスチレン系樹脂 (硫酸型) を用いた陰イオン交換カラム

(MCI GEL CA08F, 7 μm, 1.5×150 mm) で、8-OH-G をマーカーとして 8-OH-dG 含有画分を分取した。移動相は、0.3 mM 硫酸と2% アセトニトリルの溶液である。さらに第二段階は逆相カラム (Shiseido, Capcell Pak C18, 5 μm, 4.6 × 250 mm) にてその画分を分離した。

移動相は、10 mM リン酸バッファー (pH 6.7), 5% メタノールそして保存試薬として MB 試薬 (100 μl/l) の溶液である。そして、微量な尿中の 8-OH-dG を完全に単離し、電気化学的検出器 Coulochem II

electrochemical detector (ESA) にて、ガードセル

(No.5020, 400 mV) と分析セル (No.5011, E1= 170 mV; E2= 350 mV) を用いて測定した。各尿試料は3回分析を行い、その平均をその試料の値とした。定量下限値は最大 1.0 ng/ml で、標準偏差 (SD) は 8-OH-dG 標準試料 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ng/ml を各 10 回測定した時、10.0 ng/ml の時が 1.3 ng/ml (CV=0.14) で最大であった。

4) 統計解析

統計解析は、SPSS 12.0J を用いて対比較には対応のある T 検定、更には相関分析、回帰分析を行った。

3 結 果

初回凍結解凍尿と2回目凍結解凍尿との比較(2回目比較)及び初回凍結解凍尿と3回目凍結解凍尿との比較(3回目比較)を表1に示す。2回目比較における尿中 8-OH-dG 濃度は、初回解凍時が、平均値±標準偏差は 5.4 ± 2.8 ng/ml (0.82 ~ 16.5 ng/ml), CV 値は 0.52 で、2回目解凍時が、平均値±標準偏差 5.2 ± 2.8 ng/ml (0.76 ~ 16.4 ng/ml), CV 値 0.54 であった。また3回目比較においては、初回解凍時、平均値±標準偏差 5.9 ± 5.0 ng/ml (0.89 ~ 18.1 ng/ml), CV 値 0.84 で、3回目解凍時が、平均値±標準偏差 6.2 ± 5.1 ng/ml (0.98 ~ 18.0 ng/ml), CV 値 0.82 であった。解凍回数による平均尿中 8-OH-dG 濃度及びそのばらつきを CV 値でみると凍結解凍履歴による変化は認められなかった。

図1 (a, b) は、2回目比較及び3回目比較における対応する尿中 8-OH-dG 濃度の差のヒストグラムである。

どちらも一峰性で対称な分布となった。2回目比較において、初回凍結解凍尿及び2回目凍結解凍尿の 8-OH-dG 濃度の対比較では有意な差は認められなかった ($p = 0.96$)。両者の間には正の相関があり、相関係数 0.95 であった。また回帰分析では、 x を初回凍結解凍尿中

8-OH-dG 濃度、 y を2回目凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度とすると、 $y = 0.97x - 0.04$ ($R^2 = 0.91$, $p < 0.01$) であった (図2(a))。3回目比較においても、初回凍結解凍尿及び3回目凍結解凍尿の 8-OH-dG 濃度の対比較では有意な差は認められなかった ($p = 0.07$)。両者の間には正の相関があり、相関係数 0.98 であった。また回帰分析では、 x を初回凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度、 y を3回目凍結解凍尿中 8-OH-dG 濃度とすると、 $y = 1.0x + 0.29$ ($R^2 = 0.96$, $p < 0.01$) であった (図2(b))。

表1 尿中 8-OH-dG 濃度の比較

初回凍結解凍尿と2回目凍結解凍尿の比較 (n=82)			
	1回目	2回目	差(2回目-1回目)
8-OH-dG*	5.4 ± 2.8	5.2 ± 2.8	-0.16 ± 0.85
初回凍結解凍尿と3回目凍結解凍尿の比較 (n=20)			
	1回目	3回目	差(3回目-1回目)
8-OH-dG*	5.9 ± 5.0	6.2 ± 5.1	0.33 ± 0.97

*平均値±標準偏差。

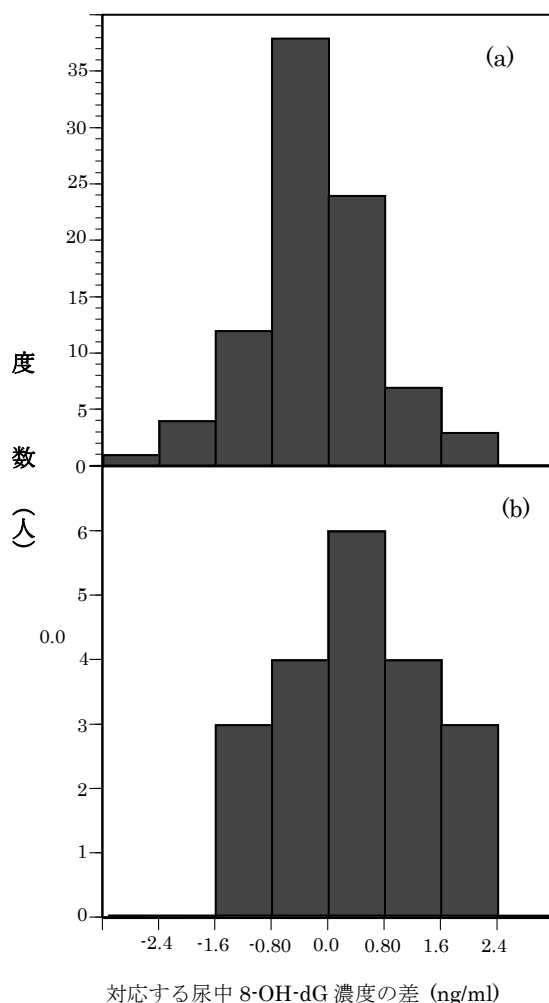


図1 尿中 8-OH-dG 濃度の差のヒストグラム

- (a) 2回目凍結解凍尿-初回凍結解凍尿
(b) 3回目凍結解凍尿-初回凍結解凍尿

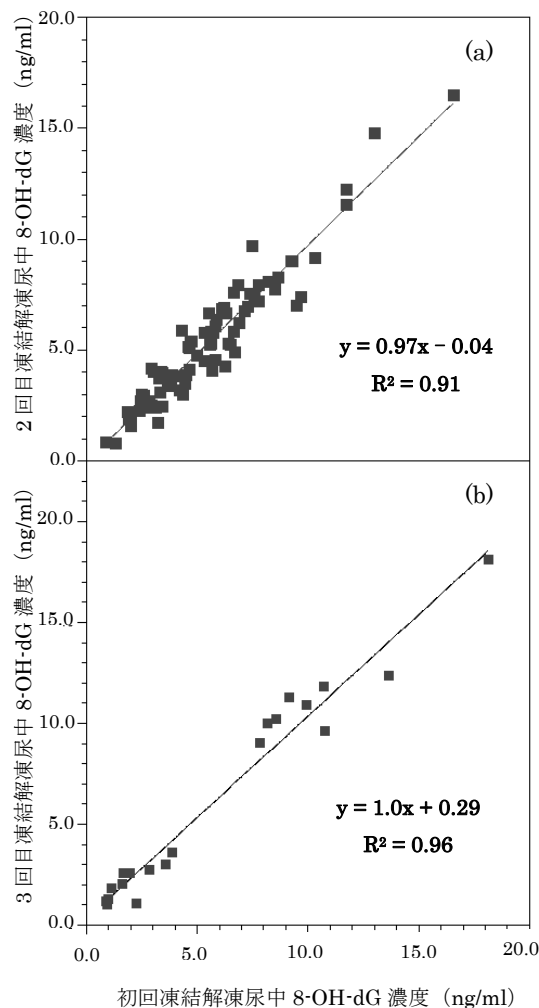


図2 凍結解凍負荷回数による尿中 8-OH-dG 濃度の比較

(a) 初回凍結解凍尿と2回目凍結解凍尿

(b) 初回凍結解凍尿と3回目凍結解凍尿

4 考 察

凍結解凍を異なる回数負荷した尿における 8-OH-dG 濃度間の平均値の対比較, CV 値の比較及び回帰分析の結果より, 尿中 8-OH-dG 量は, 2 回凍結解凍しても, 3 回凍結解凍しても, 初回凍結解凍した尿中の量との間に差は認められなかった。サンプルサイズは, 片側検定において検出力 $1 - \beta = 0.80$ 有意水準 $\alpha = 0.05$ とすると $n \geq 13$ である。2 回目比較では $n=82$, 3 回目比較では $n=20$ であるため必要数を十分に満たしている。尿中 8-OH-dG 量において問題となるのは長期保存による酸化の亢進とそれに伴う 8-OH-dG 量の増加である^{11, 12)}。我々の知る限り, 更なる酸化による尿中 8-OH-dG 量の減少報告はない。よって, 必要なサンプルサイズは片側検定で決定するのが妥当であり, 本研究におけるサンプルサイズは適正であると考えられる。またサンプルサイズが同じ場合, 両側検定よりも片側検定の方がより検出力が高くなるにもかかわらず棄却されなかったということは 8-OH-dG の値に変化が無かったとした判断の信頼性を高めている。

実験手技上解凍時に問題となるのは水分の蒸発による濃度の高まりだが, 本研究においては密封の状態で解凍

状態から室温に戻し液温が安定してから尿試料を採取し, その後すぐ密封して再凍結させている。よって, 基本的には蒸発の問題は無視できると考えられる。またこの考えは, 我々の実験結果からも支持された。

尿中 8-OH-dG 濃度の測定において, 溶媒の蒸発を抑えるよう細心の注意を払えば, 尿試料の凍結解凍を繰り返しても 3 回までは値が変化しないことが分かった。一般的には, 採取尿は一度凍結してから測定に供することが普通に行われているが, 我々の結果より, 少なくとも 8-OH-dG 濃度の測定においてはこの処置が測定結果に影響しないことが実証できたといえる。更に, 一度測定に用いた尿でも凍結保存することにより将来再活用できるので, 試料の節約にもなる。

5 結 論

尿中 8-OH-dG 量の 3 回の凍結解凍による安定性を検討した。その結果, 溶媒の蒸発を抑えるよう細心の注意を払えば, 尿試料の凍結解凍を繰り返しても 3 回までは値が変化しないため, それを測定用の試料として使えることが分かった。

本研究では日本学術振興会科学研究費補助金 (No.13670349), 同補助金 (No.16590495) 及び厚生労働科学研究費補助金食品・化学物質安全総合研究事業「臭素化ダイオキシン類に係る労働現場のリスク評価研究」の一部を用いた。

文 献

- 1) Yoshida R, Ogawa Y, Shioji I, Yu X, Shibata E, Mori I, et al. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and biopyrrins levels among construction workers with asbestos exposure history. *Ind Health* 2001; 39: 186-188.
- 2) Toraason M. 8 Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of workplace exposures. *Biomarkers* 1999; 4: 3-26.
- 3) Tagesson C, Kallberg M, Wingren G. Urinary malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine as potential markers of oxidative stress in industrial art glass workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; 69: 5-13.
- 4) Chuang CY, Lee CC, Chang YK, Sung FC. Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxydeoxyguanosine: influence of taxi driving, smoking and areca chewing. *Chemosphere* 2003; 52: 1163-1171.
- 5) Kuo HW, Chang SF, Wu KY, Wu FY. Chromium (VI) induced oxidative damage to DNA: increase of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine concentrations (8-OHdG) among electroplating workers. *Occup Environ Med* 2003; 60: 590-594.
- 6) Kim JY, Mukherjee S, Ngo LC, Christiani DC. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of

- oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 666-671.
- 7) Liu AL, Lu WQ, Wang ZZ, Chen WH, Lu WH, Yuan J, et al. Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 673-677.
 - 8) Matsumoto Y, Ogawa Y, Yoshida R, Shimamori A, Kasai H, Ohta H. The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), when stored at room temperature. *J Occup Health* 2008; 50: 366-372.
 - 9) 永田靖. サンプルサイズの決め方. 朝倉書店, 東京 ; 2003: 125-126.
 - 10) Kasai H. A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system. *J Radiat Res (Tokyo)* 2003; 44: 185-189.
 - 11) Ravanat JL, Turesky RJ, Gremaud E, Trudel LJ, Stadler RH. Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol* 1995; 8: 1039-1045.
 - 12) Nakajima M, Takeuchi T, Morimoto K. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis* 1996; 17: 787-791.

Stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), when the sample urine undergoes several cycles of freezing and thawing[†]

by

Yuki MATSUMOTO^{*1}, Yasutaka OGAWA^{*1, 2}, Rie YOSHIDA^{*2} and Kenichi OHBA^{*3}

We examined the stability of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) when the sample urine undergoes several cycles of freezing and thawing. One hundred and two frozen samples (85 males and 17 females aged 22-79 years) were used. The concentration of urinary 8-OH-dG was measured by HPLC using two-step separations. We compared the 8-OH-dG level of samples after a second cycle of freezing and thawing with the level of samples after the first cycle (n=82). The mean urinary 8-OH-dG concentration after the first cycle and the concentration after the second cycle were 5.4 ± 2.8 ng/ml and 5.2 ± 2.8 ng/ml, respectively. There was no significant difference by the paired t-test. Regression analysis, with the 8-OH-dG concentration after the second cycle as y and the 8-OH-dG concentration after the first cycle as x yielded $y = 0.97x - 0.04$ ($R^2 = 0.91$, $p < 0.01$). We then compared the 8-OH-dG level of samples after a third cycle with the level after the first cycle (n=20). The mean urinary 8-OH-dG concentration after the first cycle and the concentration after the third cycle were 5.9 ± 5.0 ng/ml and 6.2 ± 5.1 ng/ml, respectively. There was no significant difference by the paired t-test. Regression analysis, with the 8-OH-dG concentration after the third cycle as y and the 8-OH-dG concentration after first cycle as x yielded $y = 1.0x + 0.29$ ($R^2 = 0.96$, $p < 0.01$). We concluded that if the research purpose is the determination of urinary 8-OH-dG, samples can undergo at least three cycles of freezing and thawing without significant change.

Key Words: oxidative stress, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, urine, HPLC-ECD, freezing and thawing

*1 Cooperative Graduate School between National Institute of Occupational Safety and Health and Graduate School of Medical Science, Kitasato University

*2 Mechanism of Health Effect Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health, Japan

*3 Department of Health Administration, School of Allied Health Sciences, Kitasato University