

〈特集：酸化ストレス〉

酸化ストレスマーカー8-OHdG

酒居 一雄、越智 大倫、竹内 征夫

An oxidative stress marker: 8-OHdG

Kazuo Sakai, Tairin Ochi and Masao Takeuchi

Summary Accumulated evidence indicates that reactive oxygen species (ROS) are involved in the pathophysiology of the aging process and of various age-related diseases such as diabetes, cancer, hypertension as well as Alzheimer's and Parkinson's disease. ROS are known to cause oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids *in vivo*. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is one of the major forms of DNA damage induced by ROS, and has received increasing attention in recent years. An 8-OHdG ELISA kit has been developed, and has shown good reproducibility (CV of intra-assay variation < 6% and CV of inter-assay variation < 8%). A determination of oxidative stress using 8-OHdG and other oxidative stress markers is expected to contribute to enhancing our understanding of age-related diseases, disease prevention and anti-aging medicine.

Key words: Oxidative stress, Reactive oxygen species, DNA damage, 8-OHdG, ELISA

I. はじめに

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は生体内においてDNA、脂質、蛋白質、酵素などの生体高分子と反応し、その結果脂質過酸化、DNA変異、蛋白質の変性、酵素の失活をもたらす (図1)。酸化ストレスとは、生体内における活性酸素種と抗酸化システムとのバランスとして定義されており、酸化ストレスの上昇はこうした分子レベルの生体酸化損傷を増加させ、様々な疾病や老化亢進につながると考えられている。がん、糖尿病、高血圧、アルツハイマー型認知症、パーキンソン病といった生活習慣病

をはじめとして数多くの疾病において酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。生体内の酸化ストレスを正確に評価し、酸化ストレス低減のための対策を施すことは、病態把握、未病診断、病気予防、老化制御に役立つと期待されている。

II. 8-OHdGの構造

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG/8-oxo-dG: 以下8-OHdG) はDNAを構成する塩基の一つ deoxyguanosine (dG) の8位がヒドロキシル化された構造を持つDNA酸化損傷マーカーである

日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所
〒437-0122 静岡県袋井市春岡710-1

Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Nikken
SEIL Co., Ltd.
Haruoka 710-1, Fukuroi-shi, Shizuoka 437-0122, Japan

(図2)。dGはDNAの4種類の塩基のうち最も酸化還元電位が低いため、活性酸素種による酸化を受けやすいことが知られている。このためdGの主要な酸化生成物である8-OHdGは活性酸素種による生体への影響を鋭敏に反映すると考えられる。現在最も広く用いられている酸化ストレスマーカーの一つであり、尿を使って非侵襲的に生体内酸化ストレスを評価できるほか、血清、末梢血白血球、臓器組織など多様なサンプルを対象に測定可能である。

1984年に葛西ら¹⁾によって報告されて以来、8-OHdGに関する論文数は1,300を超え、生物学的重要性、疾病との関連性が明らかにされつつある²⁾。特に染色体DNA上に発生した8-OHdGはDNA複製時にG⇒T変異を惹起することから、染色体における8-OHdGの増加は発がんリスクの上昇に関連すると考えられている³⁾。染色体DNA上に形成された8-OHdGは修復酵素の作用により

染色体DNAより切り出され細胞外に放出、腎臓を経て尿中に排出される。8-OHdGの由来としてはこのほかミトコンドリアDNA、細胞内ヌクレオチドプールが知られている。8-OHdGは化学的に比較的安定な物質であること、2次代謝などを受けずに尿中に排出されることから、生体内における酸化ストレスを定量的に反映するバイオマーカーとして利用されている。

Ⅲ. 8-OHdG ELISAキット

8-OHdGの測定は従来、主としてHPLC-ECD法によって測定されていたが、名古屋大学の大澤ら⁴⁾は日本老化制御研究所と共同で8-OHdGのELISAキットを開発し、このキットを用いて簡便に8-OHdGを測定できるようになった(図3)。このキットに用いられているモノクローナル抗体(N45.1)⁵⁾はDNA酸化生成物である8-OHdG

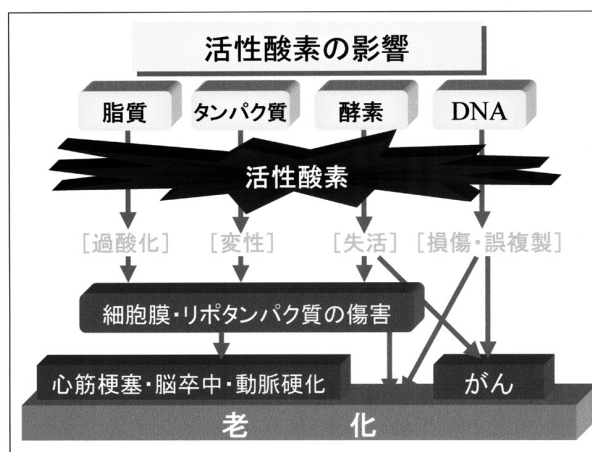


図1 活性酸素による生体への影響

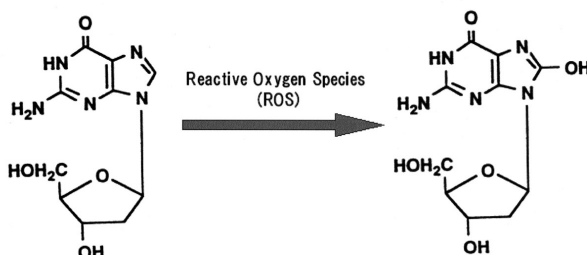


図2 8-OHdGの生成 (葛西 宏：環境変異原研究 10: 83, 1988より引用)

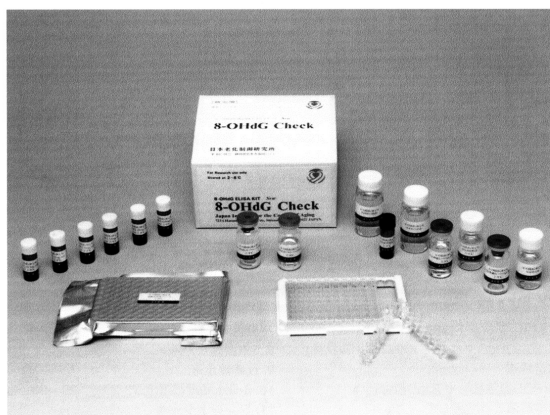


図3 8-OHdG測定用ELISAキット

に対する特異性が高く、類縁物質であるRNA酸化生成物（8-hydroxy-2'-guanosine等）に殆ど反応しない。競合ELISA法であることから、検量線は下りのシグモイド曲線を示す（図4）。同時再現性は、CV 6 %以下、日差再現性は、CV 8 %以下と、それぞれ良好な再現性が得られている。

IV. 尿サンプルへの適用

8-OHdGは尿中濃度が高いこと、非侵襲でのサンプリングが可能であることから、24時間蓄尿を対象とした報告が数多く見られる。体重当たりの1日排出量（ng/24 h/kg）として評価する。スポット尿を対象に測定する場合は、日内変動の影響を抑制するため、生成速度補正またはクレアチニン補正が用いられる。生成速度補正を用いる場合、排尿時に全量を採取し、前回排尿時からの経過時間、排尿液量、濃度から単位時間当たりの生成速度を算出する（単位：ng/h/kg）。採尿間隔6時間以上の早朝第一尿が望ましい。クレアチニン補正を用いる場合には、激しい運動など、尿中クレアチニン濃度への影響因子に注意する。尿サンプルの保存は室温にて3日間、冷蔵にて1週間、凍結条件下で長期保存が可能である。室温～冷蔵の場合は微生物の繁殖に注意する。凍結融解時に不溶物があれば遠心除去してから測定する。喫煙、運動、食事等、生活習慣の影響を受けるため個人差が大きく、継続測定して評価することが好ましい。激しい運動では、半日～1日後に尿中8-OHdGに上昇する。

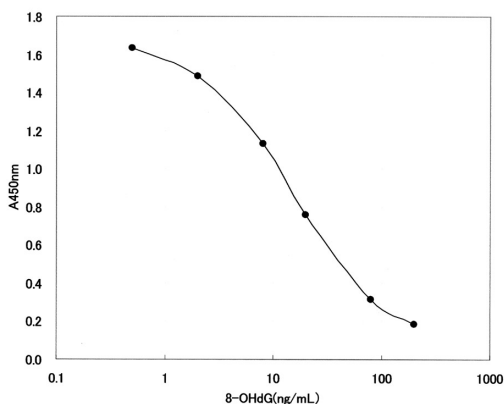


図4 典型的な検量線

一方、急性心筋梗塞では再灌流後4時間後にピークを示し、24時間後には対照レベルに低下することが報告されている。

HPLC-ECD法に比べELISA法による測定値は2倍程度の高値を示す。これはELISA法では遊離8-OHdG、オリゴDNA中の8-OHdG、硫酸抱合体等も検出できる可能性があるのに対し、HPLC法では遊離8-OHdGのみを検出するためと考えられる。現在、英国Leicester大のMS Cookeらを中心に、European Standards Committee of Urinary (DNA) Lesion Analysis (ESCUA) が組織され、ELISA法、HPLC-ECD法、LC-GC/MS法、UPLC-MS/MS法、GC-MS法について8-OHdG測定値の標準化が検討されている。

V. 血清/血漿サンプルへの適用

ELISAキットによる測定では血清中の高分子成分による干渉を受ける場合があるため、血清/血漿サンプルおよび、蛋白質の混入の可能性の高い異常尿の測定時には、前処理として限外濾過による高分子成分の除去を行う必要がある。限外濾過処理により信頼性の高いデータを得ることができる。また、採血時の注意点として、採血後速やかに血球分離を行う必要がある。これは血液中に含まれる白血球の活性化により、活性酸素が生成され、8-OHdGをはじめとする酸化ストレスマーカーの測定値に影響を与える可能性があるためである。ヒト血清の場合には、採血後20分以内に遠心(3,000 rpm・15分・室温)を開始する。血清サンプルは凍結保存可能。ヒト健常者における血清8-OHdG濃度は0.1~0.3 ng/mL。喫煙者における血清8-OHdG濃度は非喫煙者に比べ高値を示すこと、鬱病患者において血清8-OHdG濃度が高値を示すことが報告されている⁹⁾。

VI. 組織サンプル、培養細胞への適用

前処理としてDNA抽出、加水分解処理を行うことで、組織や培養細胞中の8-OHdGを検出可能である。DNAサンプルのELISA法による測定値は、HPLC-ECD法による測定値と高い相関を示すことが報告されている ($r^2 = 0.958$)⁷⁾。

VII. ヒト以外の動物種への適用

8-OHdGをはじめとする酸化ストレスマーカーの多くは、ヒトだけでなくマウス、ラット、ウサギ、イヌなど殆ど全ての動物種に共通した構造を持つことから、疾病モデルを用いた研究にも有用である。例えばDNA酸化物である8-OHdG、脂質酸化物であるヘキサノイルリジン(hexanoyl-lysine: HEL)⁸⁾やイソプラスタン(F₂-isoprostanes)⁹⁾はそれぞれデオキシグアノシン、リノール酸、リン脂質に由来する酸化生成物であり、殆ど全ての動物種において検出可能である。

VIII. おわりに

近年、酸化ストレスを抑制する、機能的食品としての抗酸化物質(食品・サプリメント等)の開発が盛んに行われている。8-OHdGをはじめとする酸化ストレス分析技術の進歩とともに、こうした新たな抗酸化食品の開発により、酸化ストレス研究からアンチエイジング、予防医学への展開が期待される。

参考文献

- 1) Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H, Nishimura S: Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res.*, 12(4): 2127-2136, 1984
- 2) Kasai H: Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative stress. *Foods Food Ingredients J.*, 194: 10-16, 2001
- 3) Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308): 431-434, 1991
- 4) Saito S, Yamaguchi H, Hasui Y, Kurashige J, Ochi H, Yoshida K: Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) by using ELISA. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 107: 39-44, 2000
- 5) Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T: Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab. Invest.*, 76(3): 365-374, 1997
- 6) Michael JF, Gregory EM: Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosomat Med.*, 68: 1-7, 2006
- 7) Evans MD, Cooke MS, Podmore ID, Zheng Q, Herbert KE, Lunec J: Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: Implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259: 374-378, 1999
- 8) Kato Y, Mori Y, Makino Y, Morimitsu Y, Hiroi S, Ishikawa T, Osawa T: Formation of N ϵ -(hexanoyl)lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide. *J. Biol. Chem.*, 274(29): 20406-20414, 1999
- 9) Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ 2nd: Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.*, 184(1): 1-10, 1990