性周期の時期別にみた 尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 量の比較†

吉 田 吏 江*¹ 小 川 康 恭*¹ 松 本 由 紀*² 毛 利 一 平*³

女性の健康状態を研究するには女性ホルモンの分泌状態を変数として加えることが重要であるといわれている。発がんを考えた場合も女性ホルモンには促進作用があるのでその影響を考慮する必要がある。体内酸化的ストレスマーカー尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) は発がんリスクの指標としてよく使われているが、先行研究においては女性の性周期を変数として扱った研究はまだない。そこで、尿中 8-OH-dG 量の増減には女性ホルモン量に関係しているか否かを研究することは、女性において増加しているがんの予防対策にとって重要であるばかりではなく産業現場における女性の発がん要因曝露によるがん罹患を予防するためにも重要な課題と考えられる。本研究では、女性において性周期の時期毎に尿中 8-OH-dG 量の平均値を算出し、その値に変化があるか否かを検討した。対象は某会社事務職員 205 人で、定期健康診断日の朝、事前配布の質問票を回収すると共に聞き取りを行い基本情報を得、尿試料を入手した。その後、尿中 8-OH-dG, エストロジェン (E2), コチニン, クレアチニンを測定した。解析対象は、女性で、性周期の情報があり、喫煙経験がなく、ホルモン作用のある薬を服用中でない者 93 人 (平均年齢 34.4 歳, 22~56 歳) であった。体内 E2 濃度が高い黄体期と低い月経期においては尿中 E2 量も同様の関係を示したが、尿中 8-OH-dG 量を比べたところ、黄体期では $4.1 \pm 0.6 \mu\text{g/g creatinine}$, 月経期では $3.0 \pm 0.4 \mu\text{g/g creatinine}$ であり、統計学的には有意でなかったが黄体期で酸化的ストレスレベルが高いことが疑われた。

キーワード: 性周期, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 女性労働者, 酸化的ストレス, 尿

1 緒言

最近、米国国立科学アカデミー¹⁾は、代謝や内分泌状態の性差が環境要因に対する生体反応の違いを引き起こし多くの疾病リスクにも性差が現れることを示唆しており、提言 6 で両性が罹患する全疾患の研究で性差をモニターし、その際、曝露、感受性、代謝、生理学的周期、免疫反応を変数としてコントロールすることを推奨している。また WHO²⁾では中毒作用で何らかの性差がある場合には必ず報告すると共に分析するべきだとしている。実際、現在までは内的要因・外的 (環境) 要因による酸化的ストレスの増減を調べた分子疫学的研究では、男性を対象にした研究が多かったので、今後は性差による影響を評価する研究を積極的に行うことが必要といえる。その際、女性ホルモンの分泌状態を考慮することが重要である。

内因性発がん因子である女性ホルモン、すなわちエストロジェン (E2) への長期間に及ぶ曝露は、乳房などいくつかの組織における発がんを誘発すると考えられている^{3, 4)}。一つの可能性として、体内で E2 が CYP1A1 や CYP1B1 により代謝されて生じたカテコールエストロジェンがさらに酸化され、オルト-キノン体になる過程

で活性酸素が発生し、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) が生成され、この 8-OH-dG が突然変異を誘発しているということが考えられる⁵⁻¹¹⁾。さらに最近では女性特有のものを除く一部がんの罹患率に男女差が指摘されている¹²⁻¹⁵⁾。

女性において、体内酸化的ストレスマーカーとしての尿中 8-OH-dG 量と発がんの関係を調べた先行研究¹⁶⁾、喫煙と尿中 8-OH-dG 量を調べた先行研究¹⁷⁾、または健康人の標準的な尿中 8-OH-dG 量を調べた先行研究¹⁸⁾があるが、いずれの研究においても性周期を調整変数として扱っていないためか十分に男女差を論ずる研究にはなっていない。産業現場においてはアスベスト、シリカ、クロム、PM2.5、多環芳香族等の曝露により尿中 8-OH-dG 量が増加することが報告されているが¹⁹⁾、唯一ベンゼン曝露労働者で女性労働者の方が男性より増加量が多いことが報告されている²⁰⁾。

発がんリスクの指標として有用性が高いと考えられている尿中 8-OH-dG 量の増減に女性ホルモン量に関係しているか否かを研究することは、女性の健康増進、特に女性において増加している乳がんや肺がんの罹患^{21,22)}ばかりではなく産業現場における発がん要因曝露によるがん罹患の予防に役立つ重要な課題である。体内 E2 濃度は女性の性周期に応じて変化するため²³⁾、本研究では、性周期の時期毎に尿中 8-OH-dG 量の平均値を算出し、その値に変化があるか否かを検討した。その際、性周期分類の妥当性を尿中 E2 量で検証した。

2 方法

某会社事務職員の健康診断時に、研究の趣旨を説明し

† 原稿受付 2007 年 11 月 15 日

† 原稿受理 2008 年 10 月 15 日

*1 労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ。

*2 北里大学大学院医療系研究科

*3 労働安全衛生総合研究所人間工学・リスク管理研究グループ。

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 健康障害予防研究グループ 吉田吏江

yoshida@h.jniosh.go.jp

E-mail: editbd@s.jniosh.go.jp

インフォームドコンセントを得た男女 205 人から、事前配布の質問票と採尿時の聞き取りにより、性別、年齢、身長、体重、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣、薬の使用状況、起床後の排尿回数、採尿前の喫煙状況、採尿前夜の飲酒状況、採尿前の朝食の有無、採尿前日から採尿前までの薬の服用状況、性周期の時期（表 1）などの情報を得た。喫煙の状況は、尿中コチニン量を定量することによって検証した。そのうち、女性で、性周期の情報が有り、喫煙経験がなく、ホルモン作用のある薬を服用中でない者 99 人（平均年齢 34.7 歳、22～56 歳）を解析対象とした。

対象者の尿は、午前中に紫外線の影響を最小限にして紙コップに採取し、一部は尿中コチニンとクレアチニン測定用とし、残りを 1.5 ml の遮光性チューブに分取し即時に凍結した。それらの尿は 8-OH-dG、および尿中 E2 を測定するまで -80°C で保存した。

尿中 8-OH-dG 量は HPLC-ECD を用い、2 段階分離法（葛西法）²⁴⁾ で定量した。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、8-hydroxy-2'-guanosine (8-OH-G) を含む希釈液と混ぜ、 4°C の暗所に 2 時間静置した後、遠心分離（13,000 rpm、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 HPLC で、8-OH-G をマーカーとして 8-OH-dG 含有画分を分取し、さらに第 2 段階の HPLC にてその画分から微量な尿中の 8-OH-dG を完全に単離し測定を行った。

尿中の E2 は、pH を 5～8 に調整後、 β -グルクロニダーゼにより加水分解し、エーテル抽出を行い、RIA 法にて定量した。

また、クレアチニンは酵素により過酸化水素を介してキノン色素を生成させ（ピュアオート S CRE-L、第一化学薬品）分光光度計にて定量し²⁵⁾、尿中の 8-OH-dG 量及び E2 量をこのクレアチニン量で補正した。尿中コチニンは、川野ら²⁶⁾の方法に従って GC-MS 法にて定量した。すなわち、尿の前処理として、Extrelut カラム（メルク社製 Extrelut 充填剤 3 g）を用いて 15 分放置し、ジクロルメタンとイソプロピルエーテル混液で抽出後、GP5000（島津製作所）を用いて測定した。

対象者の性周期は、月経期、卵胞期、黄体期、閉経、および妊娠中の 5 時期に分類した。この分類を用いて尿中 E2 の濃度を比較すると共に、血中 E2 濃度が相対的に低い月経期、および血中 E2 濃度が相対的に高い黄体期の尿中 8-OH-dG 量を比較した。その際、統計解析ソフト SAS（version 8.0; SAS Institute Inc., Cary, NC）を用いた。

なお本研究は独立行政法人産業医学総合研究所の研究倫理委員会の承認を得て行われた。

3 結果

対象者 99 人中、尿中 E2 量及び尿中 8-OH-dG 量のデータが揃っていた者は 93 人（平均年齢 34.4 歳、22～56 歳）であった。月経期 15 人、卵胞期 35 人、黄体期 28

人、閉経 15 人で妊娠中の者はいなかった。以後閉経集団は除外した。表 2 に性周期で分類した女性の年齢、尿中コチニン量を示した。月経期と黄体期の女性の年齢（Mean $\pm$ SE）、 31.9 ± 1.8 歳と 32.0 ± 1.1 歳、及び尿中コチニン量（Mean $\pm$ SE）、 $3.2 \pm 0.6 \mu\text{g/g creatinine}$ と $3.5 \pm 0.5 \mu\text{g/g creatinine}$ 、の間にはいずれも有意な差はみられなかった。月経期、卵胞期と黄体期の女性の尿中 E2 の量（Mean $\pm$ SE）を比較すると、月経期 $4.5 \pm 0.3 \text{ mg/g creatinine}$ 、卵胞期 $11.0 \pm 1.6 \text{ mg/g creatinine}$ 、黄体期 $22.0 \pm 5.0 \text{ mg/g creatinine}$ で黄体期が他の 2 時期と比較して有意に高かった（表 3）。また月経期と黄体期の尿中 8-OH-dG 量（Mean $\pm$ SE）を調べたところ、月経期 $3.0 \pm 0.4 \mu\text{g/g creatinine}$ 、黄体期 $4.1 \pm 0.6 \mu\text{g/g creatinine}$ であり、黄体期で高かったが統計学的に有意ではなかった（表 3）。図 1 に各性周期の尿中 E2 量と尿中 8-OH-dG 量との関係を示す。尿中 E2 量、尿中 8-OH-dG 量共に性周期の各時期で重なりがあり特に尿中 8-OH-dG 量では顕著であった。尿中 E2 量と尿中 8-OH-dG 量との間には明瞭な相関関係は認められなかった。

図 1 性周期の時期別に表した尿中 E2 量と尿中 8-OH-dG 量の関係

表 1 性周期時期の分類についての調査聞き取り項目

いずれかに○をつけて下さい。

1. 月経期（月経血が持続する時期）
2. 卵胞期（月経開始前16日以上）
3. 黄体期（月経開始前14-15日間）
4. 閉経

表 2 性周期時期別の年齢および尿中コチニン量

性周期	n	年齢	尿中コチニン量 ($\mu\text{g/g Cre}$)
月経期	15	31.9 $\pm$ 1.8 (24-47)	3.2 $\pm$ 0.6 (0.8-7.0)
卵胞期	35	29.4 $\pm$ 1.1 (22-44)	4.5 $\pm$ 0.7 (0.9-23.2)
黄体期	28	32.0 $\pm$ 1.1 (22-46)	3.5 $\pm$ 0.5 (0.9-11.6)
Mean $\pm$ SE, (Min,Max)			

表 3 性周期時期別の尿中 E2 量および尿中 8-OH-dG 量

性周期	n	尿中E2量(mg/g Cre)	尿中8-OH-dG量($\mu\text{g/g Cre}$)
月経期	15	4.5 $\pm$ 0.3 (2.6-7.2)	3.0 $\pm$ 0.4 (1.4-7.0)
卵胞期	35	11.0 $\pm$ 1.6 (2.0-37.5)	3.2 $\pm$ 0.2 (1.2-6.6)
黄体期	28	22.0 $\pm$ 5.0*	4.1 $\pm$ 0.6 (1.3-16.2)
Mean $\pm$ SE, (Min,Max)			

*: 黄体期が卵胞期及び月経期に対して $p<0.05$ (Tukey)

4 考察

女性の平均血中 E2 濃度は、月経期において相対的に低く、黄体期には高くなることで多くの産婦人科研究から明らかである²³⁾。今回使用した質問票を利用して対象者の性周期を分類した場合に、尿中 E2 量は月経期が一番低く、黄体期が一番高くなり血中 E2 濃度と同様の傾向を示した。しかし、両時期の尿中 E2 量の分布を比較してみると重なりが大きく、今回は以下の理由で、用いた質問票が性周期同定法としては不十分であるため誤分類が起こっていた可能性があると考えた。1；月経不順の有無を聞き取っていないため、卵胞期の長さが月ごとに異なる女性がいた場合には、今回黄体期に分類された女性が実際は卵胞期であったり、またその逆となる可能性がある。2；この質問票は月経周期が 30 日であることが前提となっており、月経期が 30 日より短い場合や長い場合でも上記と同様のことが起こりうる。しかしながら一方では、今回の質問票で一部に性周期の誤分類があった可能性が考えられたにもかかわらず、黄体期の尿中 E2 量が他の時期と比較して集団としては有意に高かったことから分類がある程度までは正確にできていたと考えられる。

さて、尿中 8-OH-dG 量を上記分類法に基づいた月経期と黄体期の 2 群間で比較したが、この比較は上記の通り女性ホルモンの効果を比較する上では問題はなかったと考えられる。またこの 2 群に属する女性集団は、年齢、職種、そして尿中コチニン量に群間差はなかったため、主要な酸化ストレス要因は 2 群間で調整されていると考えられる。比較の結果は、体内 E2 濃度が高い黄体期において低い月経期より尿中 8-OH-dG 量の平均値は高かった。酸化ストレスレベルは月経期よりも黄体期の方が高いことを示唆していたが統計学的には有意ではなかった。よってこの結果から体内 E2 濃度の変化と体内酸化ストレスレベルとの間の関係を結論付けることは未だできない。要因の調整が不十分だったために尿中 8-OH-dG 量の差が明確とならなかったのかも知れない。また以下のメカニズムが働き酸化ストレスレベルの上昇が抑制されていたのかも知れない。すなわち、黄体期には月経期にはないプロゲステロンの分泌があり、また増加した体内 E2 濃度に対応した生体内での E2 代謝の

誘導が多くなる可能性もあり、E2 の増加と E2 が活性酸素を出すような代謝経路への移行が並行するとは単純に考えられないため、活性酸素を増加させる E2 濃度の範囲がせまく、E2 濃度が高過ぎると抗酸化の機構が生体内でうまく働き、結果として月経期と黄体期の尿中 8-OH-dG 量に大きな差が表れなかったとも考えられる。

喫煙習慣が尿中 8-OHdG 量を増加させることから^{17,18)}、要因調整の問題として喫煙の問題を考える必要がある。質問票による喫煙、喫煙経験なしの分類は集団としては問題はなかったが、喫煙経験なしの集団である対象の中に喫煙者の集団 17 人と同程度のコチニン量(74.9 $\mu\text{g/g creatinine}$ 以上)を示す者が閉経集団に 2 人いた。この原因として喫煙者が非喫煙者として誤分類された可能性、さらには間接喫煙の影響も考えられる。喫煙集団の分類精度向上は今後の課題である。

5 結論

本研究において、質問票より推定された性周期時期は尿中 E2 排泄量と比較してほぼ妥当であることが示された。黄体期において体内酸化的ストレスマーカーである尿中 8-OH-dG 排泄量は増加傾向を示し、統計学的には有意でなかったが黄体期において酸化ストレスレベルが上昇していることが示唆された。今後、性周期時期の分類精度の向上及び尿中 8-OH-dG 排泄量に影響を与える要因の調整の精密化等の検討が必要である。

なお、本研究には日本学術振興会科学研究費補助金(No.19790417)の一部が用いられた。

文 献

- 1) Wizemann, T. M., and Pardue, M. L. (eds.). Exploring the Biological Contributions to Human Health - Does Sex Matter?: National Academy Press, Washington D.C., 2001.
http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=10028&page=R1.
- 2) WHO. Gender, Health and work. World Health Organization, 2004.
- 3) Liehr, J. G., and Jones, J. S. Role of iron in estrogen-induced cancer. *Curr Med Chem.*2001; 8: 839-849.
- 4) Liehr, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?. 2006; *Endocr Rev*, 21: 40-54.
- 5) Hiraku, Y., Yamashita, N., Nishiguchi, M., Kawanishi, S. Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation. *Int J Cancer.* 2001; 92: 333-337.
- 6) Han, X. Liehr, J. G. 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis. *Cancer Research.* 1994; 54: 5515-7.

- 7) Li, Y., Trush, M. A., Yager, J. D. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 1421-7.
- 8) Han, X., Liehr, J. G. Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 2571-4.
- 9) Seacat, A. M., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., and Yager, J. D. ESR identification of free radicals formed from the oxidation of catechol estrogens by Cu²⁺. *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 1997; 347: 45-52.
- 10) Koppenol, W. H. The chemical reactivity of radicals. *In*: K. B. Wallace (ed.), *Free radical toxicology, Target organ toxicology series*, Taylor&Francis, 1997; 3-14.
- 11) Liehr, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev*. 2000; 21: 40-54.
- 12) Zang, E. A., and Wynder, E. L. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88: 183-192.
- 13) Toyooka, S., Tsuda, T., and Gazdar, A. F. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Hum Mutat*. 2003; 21: 229-239.
- 14) Risch, H. A., Howe, G. R., Jain, M., Burch, J. D., Holowaty, E. J., and Miller, A. B. Lung cancer risk for female smokers. *Science*. 1994; 263: 1206-1208.
- 15) Henschke, C. I., Yip, R., and Miettinen, O. S. Women's susceptibility to tobacco carcinogens and survival after diagnosis of lung cancer. *Jama*. 2006; 296: 180-184.
- 16) Tagesson, C., Kallberg, M., Klintenberg, C., and Starkhammar, H. Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Eur J Cancer*. 1995; 31A: 934-940.
- 17) Prieme, H., Loft, S., Klarlund, M., Gronbaek, K., Tonnesen, P., and Poulsen, H. E. Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 347-351.
- 18) Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjonneland, A., Overvad, K., and Poulsen, H. E. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 2241-2247.
- 19) Pilger, A., and Rudiger, H. W. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006; 80: 1-15.
- 20) Liu, L., Zhang, Q., Feng, J., Deng, L., Zeng, N., Yang, A., and Zhang, W. The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat Res*. 1996; 370: 145-150.
- 21) Health and welfare statistics association. *Journal of Health and Welfare Statistics*. 2004; 51: 48-49.
- 22) 国立がんセンターがん対策情報センター. 最新がん統計 : <http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/pub/update.html> (2008.3.17)
- 23) 坂元正一, and 倉知敬一 (eds.). *総合産科婦人科学*. 東京 : 医学書院, 1979:1079.
- 24) 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.
- 25) 安原正善, 山西八郎, and 井山茂. *検査と技術*. 1990; 18: 31-38.
- 26) 川野吉郎, 日吉末広, 杉浦正彦, 丸山昭治, and 玄番昭夫. 血中, 尿中ニコチン, コチニンのガスクロマトグラフィー用マスディテクター (GC/MSD) による検出の試み. (社) 日本衛生検査所協会 関東甲信越支部, 第1回学術論文集; 1989: 18-20.

Levels of Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Female Office Workers Who Are in Their Menstrual or Luteal Phase[†]

by

Rie YOSHIDA^{*1}, Yasutaka OGAWA^{*1}, Yuki MATSUMOTO^{*2} and Ippei MORI^{*3}

The natural hormone 17beta-estradiol (E2) is considered an endogenous cancer risk factor, and one possible mechanism of carcinogenesis involving E2 is through the induction of oxidative stress. E2 is metabolized to two catecholestrogens, 2-OHE2 and 4-OHE2, by CYP1A1 and CYP1B1, respectively. Both metabolites can contribute to metabolic redox cycling, which induces ROS and causes the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG). Since the levels of E2 change in accordance with the menstrual cycle in women, it is important to consider the menstrual cycle when assessing the risk posed to female workers when they are exposed to substances inducing ROS. In the present study, we investigated whether the levels of urinary 8-OH-dG changed during the different phases of the menstrual cycle. The test subjects were all female office workers from the same company. Information on demographic factors, phases of the menstrual cycle, and lifestyle factors were obtained from self-administered questionnaires which were then checked during interviews. Urine specimens were collected in the morning and were used to measure 8-OH-dG, E2, and creatinine levels. The concentrations of 8-OH-dG and E2 were normalized against creatinine content. The test subjects who provided menstrual cycle information (non-smokers who did not take hormone-like medicines) were classified into four groups, depending whether they were in their menstrual phase (n=15), follicular phase (n=35), luteal phase (n=28), or in menopause (n=15). Although the difference was not statistically significant, the urinary 8-OH-dG level of the luteal phase group was higher than that of the menstrual phase group (4.1±0.6 µg/g creatinine and 3.0±0.4µg/g creatinine, respectively). These results suggested that the level of the oxidative state during the luteal phase was higher than that during the menstrual phase.

Key Words: menstrual cycle, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, working women, urine, oxidative stress.

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

*2 Graduate school of Medical science, Kitasato University

*3 Human Engineering and Risk Management Research Group, National Institute of Occupational Safety and Health, Japan