

〈原著〉

大学生の血中酸化ストレスマーカー測定値にみられた性差

新井 智子

Sex differences in levels of oxidative stress biomarkers among Japanese university students

Tomoko Arai

Summary This study aimed to investigate oxidative stress levels in Japanese university students. Since the oxidative stress levels are evaluated by balance between oxidation degree and antioxidant defense capacity, diacron-reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) levels of 119 healthy university students were measured as their biomarkers respectively, using heparin plasma from fingertip blood. Oxidative stress index (OSI) was calculated according to the following formula: $OSI = (d-ROMs/BAP) \times 8.85$.

There was no correlation between d-ROMs and BAP levels in both male and female students. Although there was no significant difference between male and female students in BAP levels, d-ROMs and OSI levels in female students were significantly higher than in male students.

The d-ROMs and the BAP levels appeared to be regulated by different biological mechanism. Furthermore, this study revealed that females had been exposed to both higher oxidation degrees and elevated oxidative stress levels compared with males since their early twenties.

Key words: Oxidative stress, Oxidation degree, Antioxidant defense capacity, Diacron-reactive oxygen metabolites (d-ROMs), Biological antioxidant potential (BAP)

I. 緒言

酸素を利用したエネルギー代謝の副産物として、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) やフリーラジカルが発生する。これらの代謝産物は不安定で高い反応性を有するため、産生が

過剰になると、蛋白質・脂質・核酸等の生体内高分子が酸化されて機能障害に陥るリスクが高まる。こうした酸化ダメージを回避するため、生体には、抗酸化酵素や抗酸化物質によってフリーラジカルやROSを消去・解毒する防御システム (抗酸化能) が備わっている。ROSやフリ

埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科
〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820番地
TEL&FAX: 048-973-4767
E-mail: arai-tomoko@spu.ac.jp

Department of Health Sciences, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, 820 Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama 343-8450, Japan
TEL&FAX: 048-973-4767
E-mail: arai-tomoko@spu.ac.jp

受付日：2018年11月24日

採択日：2018年12月6日

ーラジカルの産生（酸化度）が抗酸化能を上回った状態は「酸化ストレス」と呼ばれ、生活習慣病等の病態形成に関与していることが多数報告されている^{1)~3)}。したがって、酸化ストレスレベルの評価は、酸化度と抗酸化能の両者を測定し、それらの測定値を総合的に判断することが必要となる。

酸化度の測定に関しては、電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) -スピントラッピング法が、フリーラジカルを選択的かつ定量的に検出可能な唯一の測定法とされており、生物ラジカル研究における最も信頼性の高い計測手段と考えられている⁴⁾。これまでに小動物での測定結果が報告されているが、ヒトでは感度の問題から実用化には至っていない。ヒトを対象とした場合には、酸化度評価法として脂質・核酸・蛋白質・糖質等の酸化（代謝）産物を測定する方法、抗酸化能評価法として水素原子の消去活性や金属・ラジカル種の還元能力等を捉える方法があり、各々多様な測定系が存在する。しかし、酸化度と抗酸化能の両者を同一機器で測定可能な方法は少なく、簡便性や再現性の点で問題がある等の理由から広く普及している測定法はなかった。そのような状況の中、試料中の酸化度と抗酸化能のレベルを吸光度変化として捉えることができる酸化度測定試薬diacron-reactive oxygen metabolites (d-ROMs) テスト⁵⁾と抗酸化能測定試薬biological antioxidant potential (BAP) テスト⁶⁾が開発され、生化学用自動分析装置でも測定可能なことから、使用が拡大しつつある。d-ROMsテストについてはESR法と相関性をもつことが示されているほか⁷⁾、両試薬について基礎的な性能に問題はないとする検討結果も報告されている⁸⁾。

生体内の酸化ストレスレベルを知ることは、疾患発症予防の観点からも有用であるが、現時点では、酸化ストレスに直結する検査項目の測定は、一般病院における臨床検査では実施されておらず、ヒトにおける基礎データが十分にあるとは言えない。今後さらに使用が拡大することが見込まれるd-ROMsおよびBAPテストについて、臨床的有用性を評価するうえで、基礎となる健常人におけるデータの蓄積が重要となる。そこで本研究では、年齢的に身体的な成長が完成したばかりで、生活習慣病の病態形成が

なされていないと考えられる健康な大学生の血中酸化ストレスレベルを解析し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

II. 方法と材料

1. 材料

本研究は、ヘルシンキ宣言を順守し、埼玉県立大学倫理審査委員会の承認を得た後、対象者から文章によるインフォームド・コンセントを得て行われた。

医療機関の受診や医薬品および栄養補助食品の服用をしておらず、喫煙習慣のない埼玉県立大学の大学生119名（男子学生26名：年齢 21 ± 0.7 歳, BMI 20.8 ± 1.6 kg/m², 女子学生93名：年齢 21 ± 0.4 歳, BMI 19.5 ± 2.0 kg/m²)を対象とした。

安静状態にある被験者の指頭を、BD マイクロティナ セーフティーランセット（日本ベクトン・ディッキンソン、福島）を用いて穿刺した。指頭血をヘパリンリチウムコーティングの採血管マイクロベットCB300（ザルスタット、東京）に採取し、遠心分離後の血漿を酸化ストレスレベルの測定用試料とした。

2. 酸化ストレスマーカーの測定

酸化度測定試薬d-ROMsテスト、抗酸化能測定試薬BAPテストを使用し、専用のフリーラジカル解析装置であるFREEもしくはFREE Carrio Duo（すべてウイスマー、東京）で、酸化度と抗酸化能の両指標を測定した。

3. 酸化ストレスインデックスの算出

酸化ストレスレベルは、酸化度と抗酸化能のバランスで評価することが必要であり、その指標として酸化度と抗酸化能の比が使用されることが多い。

日本人に関しては、(d-ROMs/BAP) × 8.85をoxidative stress index (OSI) として解析した結果が報告されている⁹⁾。これは、94項目の臨床検査項目に異常を認めず、健康状態・生活習慣問診票で問題のなかった日本人312名（男性148名、女性164名）の健常人を対象としてd-ROMsとBAPを測定し、それらのデータを基に、(d-ROMs/BAP) × 補正係数 = 1となる補正係数を8.85と決定したものである。この計算式で算出したOSIが1より高ければ、日本人の平均値

よりも酸化度が高い状態にあることを意味する。本研究においても、この計算式を使用してOSIを算出し、被験者の酸化ストレスレベルを評価した。

4. 統計解析の手法

本研究で実施したすべての統計解析には、RおよびRコマンドの機能を拡張した統計ソフトウェアEZR¹⁰⁾を使用した。

d-ROMs値とBAP値の相関関係の解析にはSpearmanの順位相関係数を、d-ROMs値・BAP値・OSIにおける男女間の比較解析にはMann-Whitney U検定を使用し、すべて有意水準を $P < 0.05$ とした。

Ⅲ．結果

1. d-ROMs値とBAP値の相関性 (Fig. 1)

男子学生および女子学生のいずれにおいても、d-ROMs値とBAP値との間には有意な相関関係は認められなかった。

2. d-ROMs値の分布 (Fig. 2)

d-ROMs値のmean \pm SDは、男子学生で 277.2 ± 28.5 unit、女子学生で 340.0 ± 64.4 unitであった。

International Observatory of Oxidative Stressによって示された、健常なイタリア人5,000人のデータから算出した臨床評価分類⁹⁾で判定すると、300 unit以下のNormal levelは男子学生21名・

女子学生28名の計49名 (41%)、Border-line levelは男子学生4名・女子学生13名の計17名 (14%)であった。女子学生では、Slightly high level : 14名 (15%)、Moderate high level : 28名 (30%)、High level : 9名 (10%)、Very high level : 2名 (2%)と、半数以上がModerate high以上の高いレベルに該当した。

3. BAP値の分布 (Fig. 3)

BAP値のmean \pm SDは、男子学生で 2340 ± 267 μ mol/L、女子学生で 2231 ± 200 μ mol/Lであった。

d-ROMs値と同様の臨床評価分類⁹⁾で判定すると、2200 μ mol/L以上のNormal levelは男子学生15名・女子学生29名の計44名 (66%)、Border-line levelは男子学生3名・女子学生11名の計14名 (21%)であった。その他、男子学生1名・女子学生6名の計7名 (10%)がSlightly low levelに、男子学生1名・女子学生1名の計2名 (3%)がlow levelに該当し、Very low levelおよびExtremely low levelに該当する学生はいなかった。

4. d-ROMs値・BAP値・OSIの男女間比較 (Fig. 4)

d-ROMs値の中央値と四分位範囲は、男子学生275.5 (259.3 ~ 288.8) unit、女子学生326.0 (293.0 ~ 363.0) unitであり、女子学生の方が男子学生より有意にd-ROMs値が高かった ($P < 0.0001$)。

BAP値の中央値と四分位範囲は、男子学生

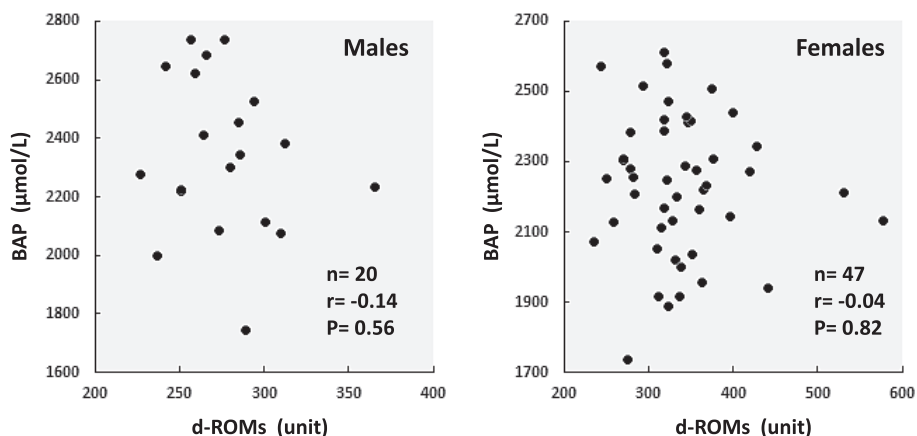


Fig. 1 Correlation between d-ROMs and BAP levels.

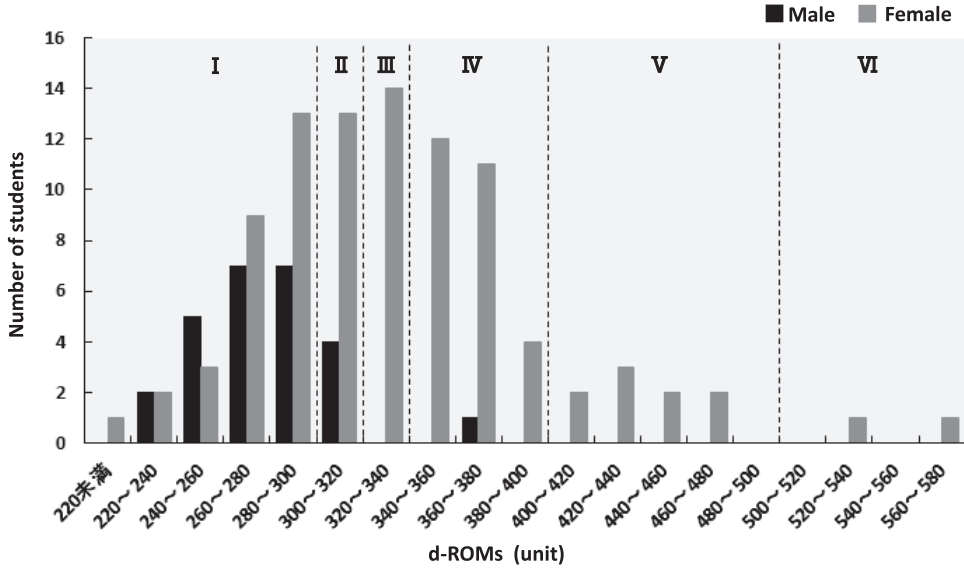


Fig. 2 Frequency distribution of d-ROMs levels by sex.

d-ROMs values obtained from 26 males and 93 females divided into 19 ranges. The 19 ranges were classified into six categories (I ~ VI) according to the clinical significance defined by International Observatory of Oxidative Stress.

I : Normal level, II: border-line level, III: slightly high level, IV: moderate high level, V: high level, VI: very high level.

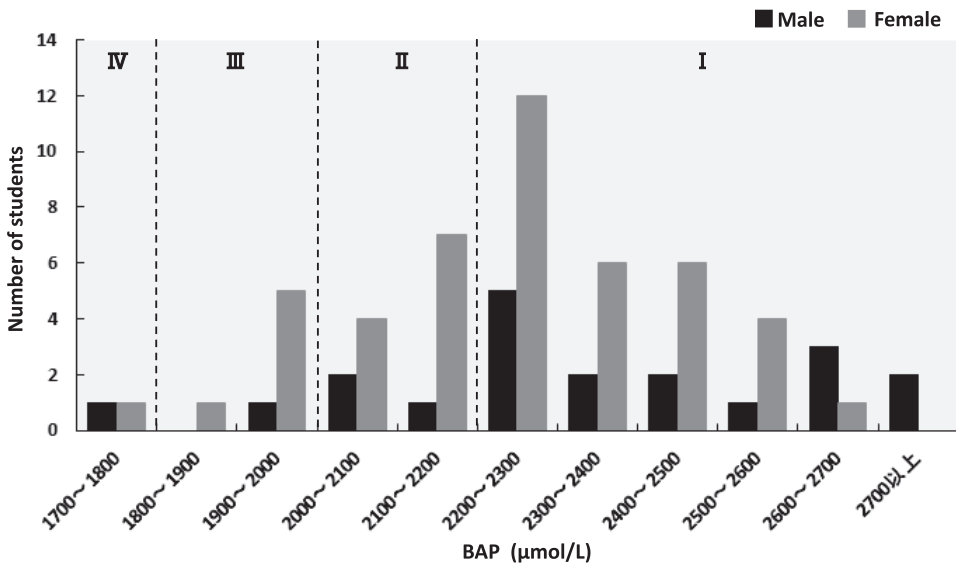


Fig. 3 Frequency distribution of BAP levels by sex.

BAP values obtained from 20 males and 47 females divided into 11 ranges. The 11 ranges were classified into six categories (I ~ VI) according to the clinical significance defined by International Observatory of Oxidative Stress.

None of the study subjects fell within the category of V or VI.

I : Normal level, II: border-line level, III: slightly low level, IV: low level, V: very low level, VI: extremely low level.

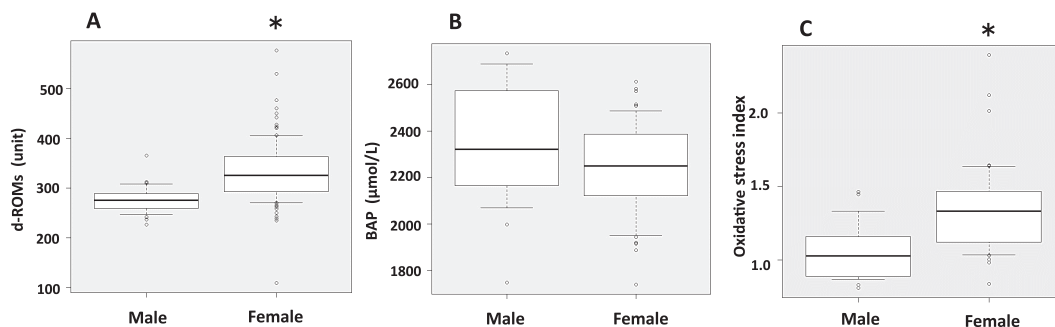


Fig. 4 Box Plots of d-ROMs (A), BAP (B) and OSI (C) levels by sex.

A: The distributions of d-ROMs values obtained from 26 males and 93 females were represented with Box Plots. d-ROMs levels were significantly higher in females than in males (* $P < 0.0001$).

B: The distributions of BAP values obtained from 20 males and 47 females were represented with Box Plots. There was no significant difference between males and females in BAP levels ($P = 0.11$).

C: The oxidative stress index (OSI) was calculated according to the following formula proposed by Fukuda *et al.*: $OSI = (d-ROMs/BAP) \times 8.85$. OSI levels were significantly higher in females than in males (* $P < 0.0001$).

2321 (2192 ~ 2549) $\mu\text{mol/L}$ 、女子学生2249 (2120 ~ 2386) $\mu\text{mol/L}$ であり、男女間で有意差はなかった ($P = 0.11$)。

OSIの中央値と四分位範囲は、男子学生1.03 (0.89 ~ 1.16)、女子学生1.33 (1.12 ~ 1.47) であり、女子学生の方が男子学生より有意にOSIが高かった ($P < 0.0001$)。

Ⅳ．考察

日本人におけるd-ROMs値とBAP値の相関については、216名(年齢 47 ± 11 歳)の健診受診者を対象とした研究で $r = 0.184$, $P < 0.01$ ¹¹⁾、男性29名・女性14名からなる計42名(年齢 27 ± 8.9 歳)の重度の運動および知的障害をもつてんかん患者を対象とした研究で $r = -0.160$, $P = 0.303$ ¹²⁾との報告がある。d-ROMs値とBAP値に相関性がなかった本研究の結果は、酸化度と抗酸化能のバランスが個々人で大きく異なっていることを意味する点で、先行研究の結果と一致すると考える。

酸化度の上昇原因となる活性酸素種は、主としてミトコンドリアの電子伝達系、そのほか、食糸細胞や細胞膜上に存在するNADPHオキシダーゼ複合体ファミリー等によって産生されている。組織傷害力をもつ活性酸素種の産生に対し、生体には、転写因子の制御下でスーパーオ

キシドジスムターゼ・カタラーゼ・グルタチオンペルオキシダーゼ等の抗酸化酵素が発現しているほか、ビリルビンや尿酸等の代謝産物、ビタミンC・Eやカテキン等の食品由来物質等が存在し、多様な抗酸化作用が機能している。したがって、酸化度の指標d-ROMs値と抗酸化能の指標BAP値は、生体内におけるこれら様々な因子の影響を反映した数値であるため、両数値のバランスは個々人で大きく異なるものと考えられる。

d-ROMs値およびBAP値の性差に関して、本研究の結果から、BAP値には有意な性差はないが、d-ROMs値は女子学生で男子学生より有意に高いことが明らかになった。この結果は、日本人のd-ROMs値について、女性が男性より有意に高いとする報告^{8), 11), 13), 14)}と一致している。しかし、これらの報告では対象年齢が各々 37 ± 9 , 47 ± 11 , 48 ± 11 , 59 ± 11 歳であったのに対し、本研究の対象年齢は 21 ± 0.5 歳と若いこと、女子学生のd-ROMs値が男子学生より中央値で51 unit、平均値で57 unitも高かったこと、女子学生の半数以上がSlightly high以上の高いレベルに該当したことから、本研究独自の知見として、女子学生では、20代前半の若年であるにも関わらず、高い酸化度状態を示すケースが少なからず存在するという点が挙げられる。

酸化度と抗酸化能の両者を加味したOSIによ

る酸化ストレスレベルでも、女子学生では男子学生よりも有意に高値であり、女性が男性よりも酸化ストレス亢進状態にあるという点で、41±12歳の656名の日本人を対象とした先行研究の結果と一致した⁹⁾。日本人を対象とした別の研究では、20,30代～80代の各年齢層で女性の酸化ストレスレベルが男性より亢進していることが報告されている¹⁴⁾。本研究とこれらの先行研究の結果を総合して考えると、日本人においては、年齢に関係なく、女性では男性よりも酸化ストレスレベルが高い体内環境にあると考えられる。

酸化ストレスの恒常的な亢進は、これまでの多くの研究から、生活習慣病の発症基盤を形成すると考えられており、そうであれば、男性よりも酸化ストレスレベルの高い日本人女性は、生活習慣病に罹患しやすいことになる。しかし、厚生省が発表している2010年の国民健康・栄養調査結果¹⁵⁾では、女性は、糖尿病・高血圧・脂質異常症の割合が40歳以上のすべての年代で男性よりも低く、平均寿命も男性よりも長いことが報告されている。

酸化ストレスマーカーの値について、女性が男性よりも高値であるとの報告は、海外からもなされている。平均年齢22～23歳の女性73名・男性65名のアスリートに関して、女性ではd-ROMsを含む種々の酸化ストレスマーカーが男性より有意に高値となり、それらの値が血中フェリチン濃度と負の関連性をもつことが報告されている¹⁶⁾。フェリチンは、哺乳動物において、ヒドロキシラジカルの生成に関与する細胞内フリー鉄(Fe²⁺)を酸化して貯蔵する作用をもつことから、酸化ストレスによって誘導される細胞防御因子としての意義が提唱されており¹⁷⁾、血中フェリチン濃度の低値は、フリー鉄由来の酸化ストレスに対する防御力の低下を意味するとも考えられる。確かに、血中フェリチン濃度は、ほぼすべての年代で、女性では男性よりも低値を示している¹⁸⁾。しかし、閉経を迎える55歳以降の女性では、急激にフェリチン濃度が上昇して男性との差が縮小する¹⁹⁾にもかかわらず、d-ROMs値は年齢と共に上昇し¹⁴⁾、フェリチン濃度との相動性が認められないことから、女性における酸化度の高値をフェリチンの低値のみで説明することはできない。

一方、正常月経の健常女性10人(平均年齢31歳)について、月経初日をt1とし、t27まで3日毎に採血して解析した結果、エストラジオールE2濃度のピークとなるt9頃よりd-ROMs値が上昇して、t15頃にピークに達し、t24頃まで有意な上昇を維持するとの報告がある²⁰⁾。この報告は、E2に酸化度上昇作用があることを示唆しているが、男性5377人・女性2958人の健康診断受診者(平均年齢60歳)を対象とした大規模調査の結果からは、閉経女性のd-ROMs値が男性より平均で48 unit高く、閉経後に有意な低下を示さないことが報告されており²¹⁾、女性におけるd-ROMsの高値をE2の作用として説明することも困難である。

女性では30歳代から80歳代に至るまで、男性よりも高いd-ROMs値を示すことや、男女とも年齢と比例してd-ROMs値が上昇することが報告されていること¹⁴⁾を総合して解釈すると、本研究で認められた女子大学生におけるd-ROMsの高値は、外的要因によるものとは考えにくく、年齢に関係なく女性と男性との間に存在する生物学的な差異に起因していると考えられる。さらに、女性の体内では、酸化ストレスの亢進による組織傷害力から身を守る女性固有の生体防御システムが機能していることが推測され、こうしたメカニズムの解明が酸化ストレスによる疾患発症の防御に繋がる可能性も考えられる。

COIに関する記載

COI報告書に記載したとおり、本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

V. 文献

- 1) Finkel T and Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239-247, 2000.
- 2) Witztum JL and Steinberg D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88: 1785-1792, 1991.
- 3) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, and Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114: 1752-1761, 2004.

- 4) 西川武志、久木留大介、山城武司、吉永智昭、荒木栄一：酸化ストレス・炎症マーカー。Diabetes Frontier, 21: 192-196, 2010.
- 5) Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, Cornelli U, De Sanctis MT, Incandela L, Barsotti A, Terranova R, and Nicolaides A: A simple test to monitor oxidative stress. Int Angiol, 18: 127-130, 1999.
- 6) Benzie IF F and Straia JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" : the FRAP assay. Anal Biochem, 239: 70-76, 1996.
- 7) 関泰一: d-ROMsテストによる酸化ストレス総合評価。生物試料分析, 32: 301-306, 2009.
- 8) 野島順三、宮川真由美、児玉麻衣、本木由香里、常岡英弘、市原清志、日野田裕治: 自動分析装置 BM-1650による酸化ストレス度の測定。医学検査, 59: 199-207, 2010.
- 9) Fukuda S, Nojima J, Motoki Y, Yamaguti K, Nakatomi Y, Okawa N, Fujiwara K, Watanabe Y, and Kuratsune H: A potential biomarker for fatigue: oxidative stress and anti-oxidative activity. Biol Psychol, 118: 88-93, 2016.
- 10) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. Bone Marrow Transplant, 48: 452-458, 2013.
- 11) Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, Yasuda T, Kohno M, and Abe Y: Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. Hypertens Res, 34: 1041-1045, 2011.
- 12) Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, Ito E, and Kyotani S: Oxidative stress measurement and prediction of epileptic seizure in children and adults with severe motor and intellectual disabilities. J Clin Med Res, 8: 437-444, 2016.
- 13) 畑山知子、長野真弓、大貫宏一朗: 健常成人の酸化ストレスおよび抗酸化力と生活習慣および血液指標との関連。日未病システム会誌, 14: 6-11, 2008.
- 14) 山門寛: 生活習慣病は活性酸素病。人間ドック, 29: 465-470, 2014.
- 15) 平成22年国民健康・栄養調査報告書。厚生労働省, 平成24年5月。
- 16) Dopsaj V, Martinovic J, Dopsaj M, Steviljevic JK, and Bogavac-Stanojevic N: Gender-specific oxidative stress parameters. Int J Sports Med, 32: 14-19, 2011.
- 17) 折野宏一、渡辺清隆、山本晋二：フェリチンの分子性状および生理学的意義。獣医生化学, 37: 1-10, 2000.
- 18) 山下直博、大庭健三、中野博司、妻鳥昌平: 血清フェリチン、糖化フェリチンおよび非糖化フェリチンの加齢変化。日老医誌, 33: 754-760, 1996.
- 19) Nakano M, Kawanishi Y, Kamohara S, Uchida Y, Shiota M, Inatomi Y, Komori T, Miyazawa K, Gondo K, and Yamasawa I: Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status: a study on 2507 healthy people. Free Radic Biol Med, 35: 826-832, 2003.
- 20) Cornelli U, Belcaro G, Cesarone MR, and Finco A: Analysis of oxidative stress during the menstrual cycle. Reprod Biol Endocrinol, 11: 74, 2013.
- 21) Ishizaka Y, Yamakado M, Toda A, Tani M, and Ishizaka N: Relationship between estimated glomerular filtration rate, albuminuria, and oxidant status in the Japanese population. BMC Nephrol, 14: 191, 2013.