

〈特集：酸化ストレス〉

## d-ROMSテストによる酸化ストレス総合評価

関 泰一

### Evaluation of total oxidative stress by d-ROMs testing

Yasuhiro Seki

**Summary** Oxidative stress, i.e., an imbalance between the production and the elimination of oxidant species. The evaluation of oxidative stress in either healthy patients or in those who undergo specific and/or antioxidant treatments due to oxidative stress-related diseases is a key point in all performable strategies designed to prevent tissue damage and to monitor pharmacotherapy, respectively. However, free radicals are extremely reactive and have a very short half life. For that reason, conventional laboratory tests are unfortunately unable to monitor the oxidative stress level in routine lab work. After an experimental phase of research and studies, almost ten years ago a new test entered the clinical routine and was successfully adopted in Italy and other countries. An Italian chemist and researcher, Mauro Carratelli, developed the d-ROMs (Diacron-Reactive Oxygen Metabolites) test that provides a measure for the oxidative stress of blood samples by evaluating the level of reactive oxygen metabolites (mainly hydroperoxides). It proved to be a reliable and effective tool for readily evaluating oxidative stress in both humans and animals.

The d-ROMs test is conducted using a specially designed photometer as well as FRAS (Free Radical Analytical System) and FREE (Free Radical Elective Evaluator), many kinds of automatic Multiple Analyzers.

**Key words:** Oxidative stress, Oxidant species, d-ROMs test, Hydroperoxides, Free Radical Elective Evaluator, Multiple Analyzer

#### I. はじめに

酸化ストレスとは「生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化状態に傾き、生体が酸化的障害を起こすこと」である。そこで

「酸化ストレス総合評価」のためには、第一に体内で産生される過剰なフリーラジカルのレベルを正確に測定しなくてはならない。

しかし、実際にはフリーラジカルは酸化ストレスの原因となる化学物質種の中のほんの一部

ウイスマー研究所/株式会社ウイスマー  
〒113-0033 東京都文京区本郷3-3-12、  
ケイズビルディング7階

Wismerll Company Ltd.,  
K's Bld. 7F, 3-3-12 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-003,  
Japan

にすぎない。酸化ストレスは、過酸化水素や次亜塩素酸などの他の化学物質からも誘発される。これらの化学物質はフリーラジカルではない。そのため、酸化ストレスの原因となる全ての化学物質はラジカルも非ラジカル物質も、大きくは活性酸素種に分類される。これを基礎に考えると、「酸化ストレスの総合的評価」を行うには、活性酸素種の総合的レベルを測定する必要がある。

この目的のためにイタリアの化学者Mauro Carratelliは12年間の研究の結果、12年前にd-ROMsテスト（Diacron社 Reactive Oxygen Metabolite：活性酸素代謝物テスト）を開発した。

近年、活性酸素・フリーラジカルと老化や疾患との関係が明白になり、これらが関与しない病態は存在しないとまで言われている。しかし、活性酸素・フリーラジカルは短い寿命と高い反応性のため、生体内の状態を測定するのがきわめて困難であった。

d-ROMsテストにより、簡便・短時間・高い再現性でルーチンワークでの酸化ストレス総合評価が可能となり、日本に導入された7年前より国内でも生理的・臨床的研究が進み国内論文の数も50を越えている。本稿では酸化ストレス総合評価を行うd-ROMsテストについて概説する。

## II. d-ROMsテストの測定対象物質

d-ROMsテストは、生体内の活性酸素やフリー

ラジカルを直接計測するのではなく、それらにより生じた血中の主にヒドロペルオキシド（ROOH、酸化ストレス度のマーカー）濃度を呈色反応で計測し、生体内の酸化ストレス度の状態を総合的に評価するものである。

ヒドロペルオキシドは、生理的に重要で多様な有機分子（例：タンパク質、アミノ酸、ペプチド、グルコシド、脂質、ヌクレオチド、など）が酸化されることで産生される比較的安定した化学物質である。ヒドロペルオキシドは、特別な条件下で（例、金属イオンが存在する）、フリーラジカルを産生する。

このような特性があるため、ヒドロペルオキシドは、酸化的損傷が生体内で存在することの“証”という酸化的損傷の“マーカー”であるだけでなく、組織損傷の“増幅因子”（この物質がさらにフリーラジカルを産生する）としてもみなすことができる。

## III. d-ROMsテストによるヒドロペルオキシド（ROOH）の測定原理

d-ROMsテストは“in vivo”で生じている現象を“in vitro”で再現することに基づいている。pH4.8の酸性緩衝液（R<sub>2</sub>試薬）で血液を希釈すると、虚血でマイクロアシドーシスが生じると同じように、トランスフェリンから鉄イオンが放出され、それが遊離イオンとして、血中のヒドロペルオキシド（ROOH）が分解され、フリーラジカル（RO<sup>•</sup>：アルコキシルラジカル、

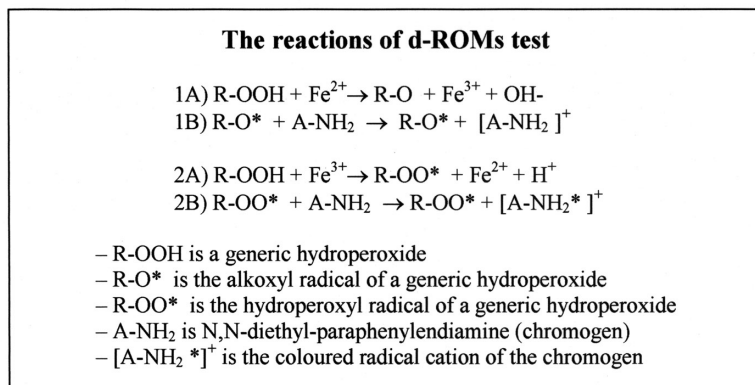


図1 d-ROMsテストの化学反応

ROO<sup>•</sup>（ペルオキシラジカル）を産生する。

無色の呈色液クロモゲン（R<sub>1</sub>試薬、芳香族アミンN,N-ジエチルパラフェニレンジアミン）をこの溶液に加えると、新たに産生された非常に反応性の高いフリーラジカル（RO<sup>•</sup>ならびにROO<sup>•</sup>）が、芳香族アミンの呈色液から電子を引き抜き、呈色液は有色のラジカル陽イオンとなる（図1、図2）。

この形成されたラジカル陽イオンは比較的安定しており、発色を利用して光度計で測定することが可能である。

先に示したようにクロモゲンはもともと無色であるが、電子を放出すると、無色から次第に

濃いピンクへと変化する。そのピンク色の濃度（ラジカル陽イオンの濃度に比例）を光度計を備えた専用機器のFRAS（Free Radical Analytical System）や（Free Radical Elective Evaluator）で測定する（505 nmの吸光度の変化量を計算、 $\Delta_{abs}/min$ ）。それにより、フリーラジカルの濃度を評価することで、血液サンプル内に当初存在していたヒドロペルオキシドの濃度を割り出す。

#### IV. 測定手順

d-ROMsテストの一般的な測定手順は、以下の如く簡便である。

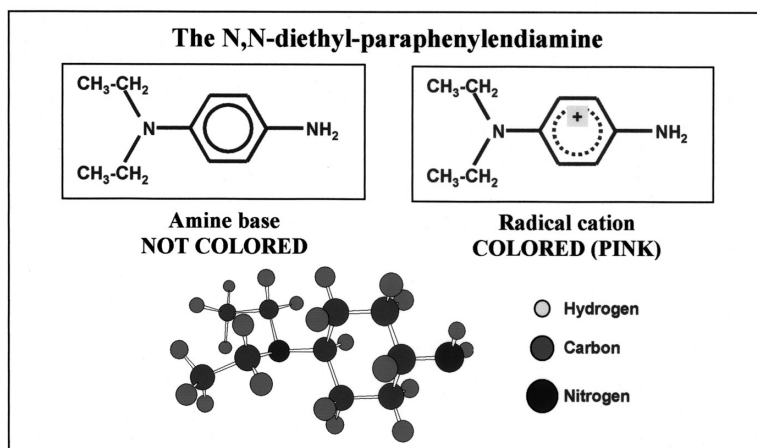


図2 R<sub>1</sub>試薬、d-ROMsテストの呈色液クロモゲン（左上が反応前で無色、右上が反応後でピンク色になる）

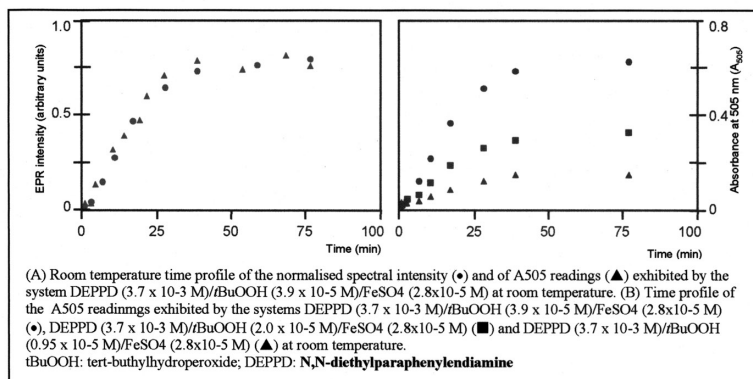


図3 電子スピン共鳴(ESR)スペクトル法によるd-ROMsテストの妥当性を示した確定的エビデンス：N,N-ジエチルパラフェニレンジアミンのラジカル陽イオン（ESRスペクトルの発生源）が、光度計測定法による505 nmでの吸光度変化の原因となっている。

- 1) 少量の血清（血漿）検体10または20 $\mu$ lをpH4.8の酸性緩衝液（R2試薬）に入れ混合。
- 2) 無色の芳香族アミン水溶液（R1試薬：呈色液クロモゲン、図2）を添加し混合。
- 3) 光度計に入れる。FRASやFREEの専用機器では5分後に結果が表示され、自動印刷される。同様に生化学自動分析機でもd-ROMsテストを行うことが可能である<sup>3)</sup>。

### V. d-ROMsテストの妥当性

d-ROMsテストが血中ヒドロペルオキシド濃度を効果的かつ信頼性の高い測定であることを示すエビデンスは、Albertiらが、“in vitro”でのラジカル種を測定する“golden standard”と広く認められているESR（電子スピン共鳴スペクトル法）を用いてd-ROMsテストの妥当性を検証したことでItalian National Council of Reaserch（イタリア学術会議：CNR）により1997年に示されている。（図3）

この2つの分析法を比較することで、ESR（電子スピン共鳴スペクトル法）でフラットセルを測定した結果が、その後、同じ反応を光度計で測定した結果と完全に重なることが示された。

### VI. d-ROMsテストの測定単位と正常範囲

約5000人の健康なイタリア人被験者の血清サンプルでd-ROMsテストを行い、505 nmでの1分あたりの吸光度変化（ $\Delta A_{505min}$ ）を測定したところ、正規分布に似た分布をしていることが示された。（図4）。

この結果をもとに、d-ROMsテストの“正常”集団における規準範囲が設定されている。

当然の事ながら、適切に広範な測定結果が得られるようにするため、 $\Delta A_{505min}$ 値を分析器では自動的に補正指数（ $\sim 10.000$ ）を乗じて、検査の測定単位を得ている。この値は、U. CARR（ユニット・カール）と言う単位で表される。これはCARRATELLI UNITSとも呼ばれ、d-ROMsテストの発明者である化学者Mauro CARRATELLIにちなんだものである。この単位での、正常範囲は、200～300 U. CARR Uとなっている（表1）。

1 U. CARRは0.08 mg/dLの過酸化水素水に相

表1 臨床的に健康な成人被験者のd-ROMsテスト測定結果

Series	Intervals (CARR U)	Intervals (mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /dL)	Frequencies (n)	Cumulative (%)
-				
1	200-210	16.00-16.80	29	0.6
2	211-220	16.88-17.60	89	2.6
3	221-230	17.68-18.40	193	6.8
4	231-240	18.48-19.20	244	12.2
5	241-250	19.28-20.00	342	19.7
6	251-260	20.08-20.80	547	31.8
7	261-270	20.88-21.60	659	46.3
8	271-280	21.68-22.40	731	62.3
9	281-290	22.48-23.20	654	76.7
10	291-300	23.28-24.00	491	87.5
11	300-310	24.08-24.80	256	93.1
12	311-320	24.88-25.00	162	96.7
13	321-330	25.68-25.40	80	98.5
14	331-340	25.48-27.20	57	99.7
15	341-350	27.28-28.00	13	100.0
Total			4547	100.0

表2 d-ROMsテストの結果による酸化ストレス総合評価

ROM level		Oxidative stress
(CARR U)	(mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /dL)	(Severity)
300-320	24.08-25.60	ボーダーライン
321-340	25.68-27.20	軽度の酸化ストレス
341-400	27.28-32.00	中程度の酸化ストレス
401-500	32.08-40.00	強度の酸化ストレス
>500	>40.00	かなり強度な酸化ストレス
正常範囲: 200-300 CARR U		
1 CARR U is equivalent to 0.08 mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /dL		

当する<sup>3)</sup>。U. CARRは独自の単位であるものの、過酸化水素水の濃度mg/dLに変換するには、0.08を乗じるだけで一般的な化学単位に変換でき、正確な科学的基礎を持つものである。しかし、この“相当する”というのは、正常血清の300 U. CARRの場合に、実際に過酸化水素0.24 mg/dL（7054 $\mu$  mol/L）が血液内に含まれていることを示すものではなく、あくまでも血中のヒドロペルオキシド全部を過酸化水素のみに置き換えた場合の表現であり、この解釈には注意が必要である。

d-ROMsテストの結果によると、表2の如く、異なる程度の酸化ストレスの度合いを表すことが示されている。

最近の結果も含めて、多くの研究結果からは、d-ROMsテストは信頼性が高く、正確で、再現性があり、手動操作であってもRun内分散係数（CV）やRun間CVが許容できる範囲の1～3%であることが示されている。感度の下限は17

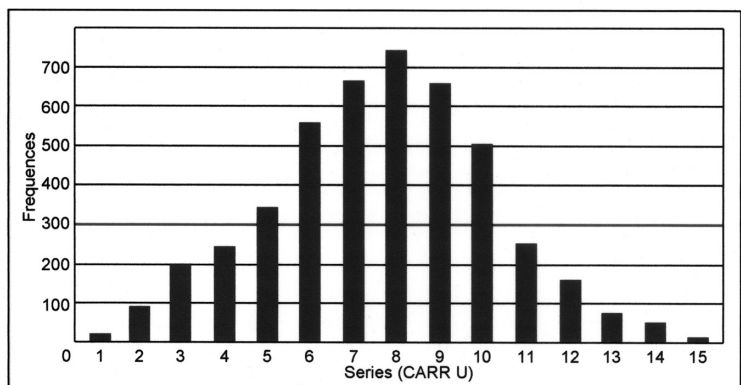


図4 健康な被験者（イタリア、トスカーナ地方）のサンプル（n=4547）のd-ROMsテスト測定結果の分布

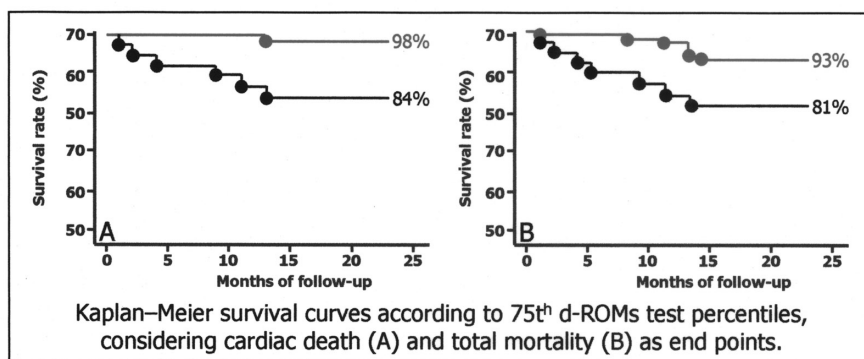


図5 d-ROMsテストの予測性：d-ROMsテスト値が高値の被験者は、d-ROMsテスト値が正常範囲にある被験者と比較して、血管系が原因による死亡率、および全原因死亡率が高い。

CARR Uと推定され、直線性を示す範囲は50～500 U. CARRである。このテスト法は、トリグリセリド（28.2 mmol/Lまで）、ヘモグロビン（0.068 mmol/Lまで）、ビリルビン（171 mmol/Lまで）などにより分析に干渉を受けることは無い。

### Ⅶ. 酸化ストレスの日内変動

測定手順が正しい限り、疾病に罹患していない場合や、その他、重篤な酸化ストレスを誘発させる生理的イベントがない場合には、d-ROMsテストの結果は、1日や1週間、数ヶ月で大きく変動しない。人はそれぞれ特有の“基礎値”あるいは“基準値”を持っており、多少のばらつきはあるもの、一見健康に見える人々での

d-ROMsテスト値が単峰性のガウス分布に似た分布をしているため、“正常範囲”（200～300 U. CARR）がある。これらの知見から、好調と思われる状態の時にd-ROMsテストを受けて、自分の基準値を把握しておき、酸化ストレスを誘発する可能性のある状況に遭遇した際に、この基準値と比較して臨床に生かす事ができる。この場合は、d-ROMsテストの値そのものではなく、先の測定と比較した相対的増加量を検討対象とするのが適切だと言える。

例えば、あるアスリートのd-ROMsテスト値が220 CARR U（初回測定値）から300 CARR U（第二回測定値）に増加した場合、第二回測定値が“正常範囲内”にあるから問題ないと考えられるのではなく、変化量（+80 U. CARR、基準値から+35%の上昇）は、急激な酸化的ストレス

の存在を疑うのに十分意味のある変化であると考えるべきである。

### VIII. d-ROMs テストと疾病予測

Italian National Council of Research (イタリア学術会議：CNR) (イタリア、ピサ) の研究者が最近行った研究で、d-ROMsテストで24ヶ月にわたってモニターし、d-ROMsテスト値が高値であった患者では、心血管系有病率と死亡率が、同じ期間のd-ROMsテスト値が正常範囲にあった被験者と比較して、優位に高いことが明確に示されている<sup>9)</sup>。(図5)

さらにd-ROMsテストは、C型肝炎ウイルス感染症の治療の結果を正確に予測できるマーカーであることも報告されている<sup>9)</sup>。これらのことを基にすると、d-ROMsテストが、心血管系疾患や肝炎と同様に、酸化ストレスに密接な関係のある他の疾患を予測できる検査法であるという可能性は排除できない。権威ある論文誌Circulationによると、d-ROMsテストは、“アテローム血栓の初回イベントを予測する新しい血漿バイオマーカー”の一つと示されている<sup>9)</sup>。

### IX. おわりに

d-ROMsテストによる酸化ストレス評価について述べてきた。

紙面の関係上、本稿には触れられなかったが、d-ROMsテストと共にBAPテスト<sup>7),8)</sup>と呼ばれる生体内の抗酸化力状態を計測するとより正確な酸化ストレスの総合評価ができるようになる。何故なら、d-ROMs値の低い人が必ずしも抗酸化力が高いと限らないからである<sup>9)</sup>。

d-ROMsテストと共にBAPテストも同時に行うと、伝統的医療など今までは科学的に解明されていなかった治療法が実は酸化・抗酸化バランスに関わっていたということが分かりつつある<sup>10)</sup>。また、心の状態も酸化ストレス・抗酸化力のバランスに影響を与えていることは否定できない。

国内でも生化学自動分析機で同テストを行う施設が増えつつあるが、これは酸化ストレスの臨床研究が一段と進むことを示唆する。

医療費の削減や予防医学が叫ばれて久しいが、疾病の予防を考えると、簡便な酸化ストレス総合評価法がもつ可能性の大きさを確信する。

### References

- 1) Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Carratelli M: The radical cation of N,N-diethyl-para-phenylenediamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.*, 26(3): 253-267, 2000
- 2) Vassalle C, Boni C, Di Cecco P, Ndreu R, Zucchelli GC: Automation and validation of a fast method for the assessment of in vivo oxidative stress levels. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 44(11): 1372-1375, 2006
- 3) Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Maiani G, Morisco F, Caporaso N: Use of N,N-dimethyl-p-phenylene-diamine to evaluate the oxidative status of human plasma. *Free Radic. Res.*, 36(8): 869-873, 2002
- 4) Vassalle C, Boni C, Di Cecco P, Landi P: Elevated hydroperoxide levels as a prognostic predictor of mortality in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Int. J. Cardiol.*, 14: 11. 2005
- 5) Morisco F, Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Marmo R, De Luise G, Tuccillo C, Caporaso N: Oxidative status in chronic hepatitis C: the influence of antiviral therapy and prognostic value of serum hydroperoxide assay. *Free Radic. Res.*, 38(6): 573-580, 2004
- 6) Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL: Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*, 109(Suppl. IV): IV-6-IV-19, 2004
- 7) Dohi K, Satoh K, Ohtaki H, Shioda S, Miyake Y, Shindo M, Aruga T: Elevated plasma levels of bilirubin in patients with neurotrauma reflect its pathophysiological role in free radical scavenging. *In Vivo*, 19(5): 855-860, 2005
- 8) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, Ohtaki H, Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T: Does Edaravone (MCI-186) act as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxid. Redox Signal*, 8: 281-287, 2007
- 9) Iorio EL, Cinquanta L, Pisano R: A diagnostic algorithm to manage oxidative stress. *Australasian J. Cosmet Surg.*, 2(1): 26-30, 2006
- 10) Hirokado Y, Nagata K, Aoyama Y, Kiyama K, Okano K, Hasegawa T: Prohomeostatic effects of acupuncture. *International Congress Series*, 1287: 107-110, 2006