

第 43 回日本小児感染症学会教育講演

酸化ストレスの生体マーカー

塚原 宏 一*

要旨 感染性、炎症性、アレルギー性疾患など、多くの小児疾患において“酸化ストレス”は病態生理を構成する主たる要因の一つである。各疾患は急速進行性でも慢性遷延性でも、重度の組織・臓器障害をきたす危険性を伴うが、これを治療する有効な手段としてレドックス制御薬が期待されている。本稿では、臨床応用できる酸化ストレスマーカー、酸化ストレス亢進と一酸化窒素 (NO) 生成異常や血管内皮機能不全との関係、酸化ストレスマーカーの小児科臨床領域における今後の方向性について説明する。

はじめに

感染性、炎症性、アレルギー性疾患はいうに及ばず、血管性、代謝性、外傷性、変性疾患においても“酸化ストレス”は病態生理を構成する主たる要因の一つである。各疾患は急速進行性でも、慢性遷延性でも組織・臓器を廃絶に導く危険性を伴うが、これを治療する有効な手段としてレドックスの制御 (抗酸化療法) は重要である。一方、病状悪化を抑えながら組織・臓器を保護し再生させるためには、“血管内皮機能”を保持することも必要である^{1,2)}。

I. 酸化ストレスマーカー

酸化ストレスを適切に制御するためには、患者の酸化ストレス環境を低侵襲的に簡便に評価する手段を確立することが必須である^{1,2)}。図 1 は、一酸化窒素 (nitric oxide : NO) を中心に酸化ストレスの代表的マーカーを表している。NO は酸素下でヘモグロビンにより硝酸イオン (NO_3^-) まで酸

化される。 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ は NO 産生の指標である。NO の一部はチオール (R-SH) により保持され安定化する。一方、酸化的環境では NO は酸素やスーパーオキシド (O_2^-) と反応し、酸化性の強い NO_2 、ペロキシナイトライト (ONOO^-) を生成する。これらの窒素酸化物は核酸、アミノ酸、脂質を酸化的に修飾し、8-OHdG、ニトロチロシン (N-Tyr)、acrolein-lysine (ACR) などを生成するが、これらは組織から切り出されて血中を循環し、尿中に排泄される。それらの体液中濃度は酸化ストレスマーカーとして臨床応用できる。

なお、ヘモグロビン中の 2 価鉄は NO により 3 価鉄に酸化されメトヘモグロビン (MetHb) が生成されるので、MetHb も NO 生成のマーカーとして利用できる。血液ガス検査で同様に計測される CoHb は、CO 生成 (すなわち heme oxygenase : HO 活性) のマーカーになる²⁾。

NO は主に NO 合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) により生成されるが、体内では NO 合成基質の L-アルギニンに構造が類似した asymmet-

Key words : 一酸化窒素, 血管内皮機能, 酸化ストレス, 生体マーカー, レドックス制御

* 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学
〔〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1〕

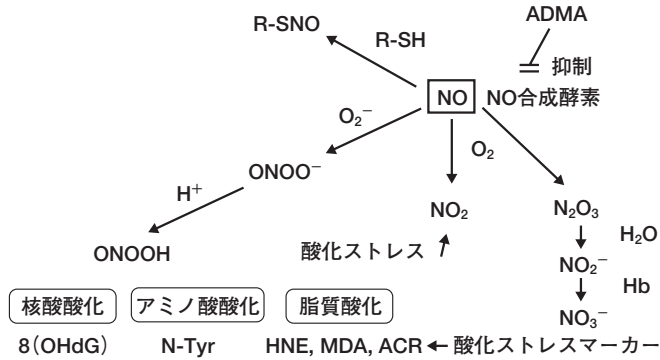


図 1 各種窒素酸化物と酸化ストレスマーカー
ADMA : asymmetrical dimethylarginine

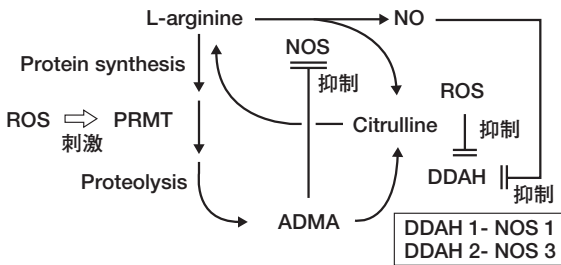


図 2 NO 経路 vs. ADMA 経路

L-arginine/NO synthase (NOS)/NO pathway と protein arginine methyltransferase (PRMT)/asymmetric dimethylarginine (ADMA)/dimethylarginine dimethylaminohydrolyase (DDAAH) pathway とは相互制御関係にある (ADMA は NOS の内因性阻害因子である)。

ric dimethylarginine (ADMA) も生成される (図 2)^{2,3)}。酸化ストレス亢進により ADMA の生成は増加し、かつ、ADMA の dimethylarginine dimethylaminohydrolyase (DDAAH) による分解は低下し、ADMA は増加する。ADMA は酸化ストレス亢進、血管内皮障害の marker であり mediator, amplifier でもある。ADMA 経路はシトルリン (Cit)-アルギニン (Arg) 経路 (肝臓では尿素サイクル) と連関するので、尿素サイクル異常症が NO 生成低下、酸化ストレス負荷を導くことがある^{4,5)}。

II. 小児科領域の酸化ストレスマーカー

図 3 は、酸化ストレスの尿中マーカーの年齢別基準値を示している⁶⁾。筆者らは、健常児より早朝尿を採取し、尿中 8-OHdG, acrolein-lysine, 糖

酸化のマーカーである pentosidine, NO₂⁻/NO₃⁻ を計測した。すべてのマーカーが若年者ほど高値を示し、年齢が長じるにつれて低下していた。小児は“生理的”に酸化ストレスも NO 産生も高いと推定された。

図 4 は、NO 産生と酸化ストレスの関係を示した概念図である。20 代の健常者を中心にすえ、内皮型 NOS が活発で活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) が制御された状態を生理的環境とみなした。一方、年長者は“生理的”に酸化ストレスが亢進し、NO も血管内皮機能も低下する。ある疾患を有する患者の検査データを評価する際の対照群には、同年齢者を選択することが必要である。

III. 酸化ストレスと NO の関係

図 5 に代表的な急速進行性疾患である細菌性髄膜炎患児のデータを示す⁷⁾。細菌性髄膜炎の急性期では脳脊髄液中の acrolein-lysine, HO 活性を示す bilirubin oxidative metabolites (BOM), NO₂⁻ が著しく高いが、抗生剤に抗炎症・抗酸化作用の強いデキサメタゾン (dexamethasone : DEX) を併用することで、臨床所見の改善とともに酸化的環境も軽減した。

筆者らは、川崎病急性期の患者でも同様の知見を得た。すなわち、大量ガンマグロブリン投与が尿中 NO₂⁻/NO₃⁻ 高値を低減させた⁸⁾。さらに、東邦大学の Takatsuki らは、大量ガンマグロブリン投与が尿中イソプロスタノール (脂質酸化のマーカー)

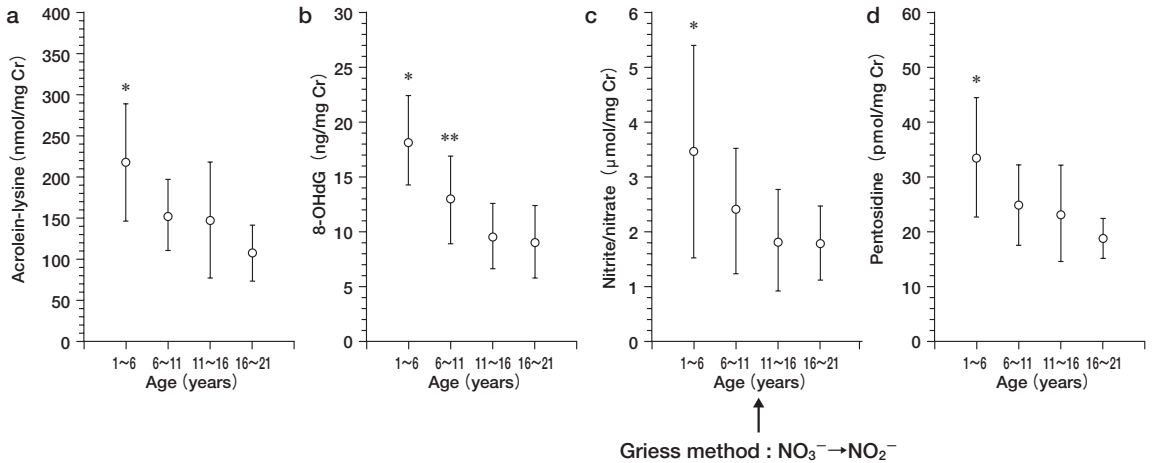


図 3 酸化ストレスマーカーの尿基準値

a : Acrolein-lysine b : 8-OHdG c : Nitric oxide d : Pentosidine
 *. ** 若年者ほど多くの活性酸素, 一酸化窒素を産生する.

高値を低減させることを示した⁹⁾. 以上の結果より, 強力な抗炎症・抗酸化剤の短期大量投与は過剰な NO 産生, 酸化ストレス亢進を制御の方向に向かわすと考えられた (図 6).

最近の検討では, 川崎病急性期の患者は NO 産生亢進に同期して ADMA も増加することがわかった. ADMA の増加は, 活性化された誘導型 NOS の NO 生成を制御するかのようであった. 患者は 12 例 (男/女=9/3) であった. データは平均±SD (範囲) で示すが, 年齢は 2.7±2.9 (0.8~11.1) 歳である. 血清中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol/l}$), ADMA ($\mu\text{mol/l}$) はガンマグロブリン投与前で 52 ± 23 (21~107), 0.69 ± 0.09 (0.60~0.86) ($n=10$), ガンマグロブリン投与直後で 79 ± 37 (30~149), 0.98 ± 0.16 (0.76~1.21) ($n=10$), その約 1 週後で 82 ± 37 (18~135), 0.98 ± 0.19 (0.68~1.29) ($n=10$) であった (ガンマグロブリン投与直後, その約 1 週後の値はそれぞれガンマグロブリン投与前の値よりも有意に高かった). ADMA と $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の比率をみると, それぞれの時点で 0.016 ± 0.008 (0.007~0.034), 0.015 ± 0.007 (0.008~0.031), 0.015 ± 0.009 (0.008~0.038) であり, 各時点で差はなかった. 今回の症例は冠動脈に後遺症を残さなかったが, 血清中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ と ADMA の均衡はおおよそ保たれていた.

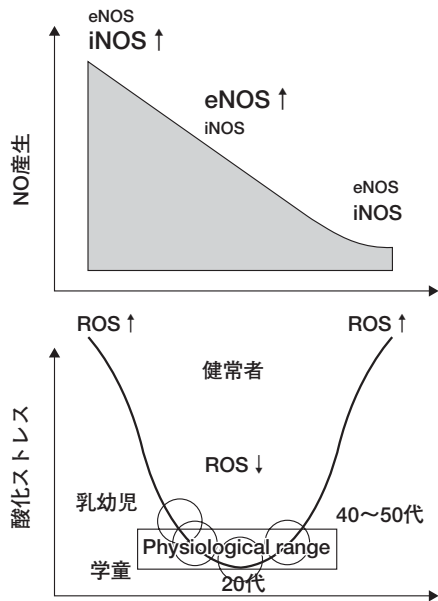


図 4 健康者における NO 産生と酸化ストレスの関係

eNOS : endothelial NOS, iNOS : inducible NOS

症例によっては NO 機能不全を呈するものもあると思われるが, その際に ADMA と $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の比率が高くなるのかどうか, 今後の検討が必要である.

慢性遷延性炎症疾患ではどうであろうか. 京都

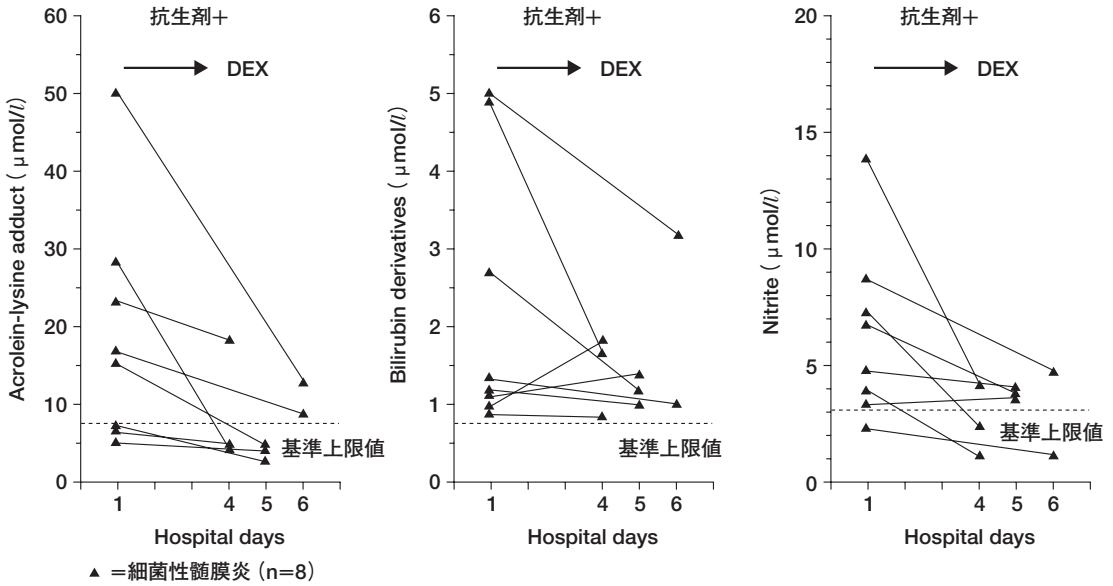


図 5 細菌性髄膜炎患者での脳脊髄液中の酸化ストレスマーカー
細菌性髄膜炎では治療で活性酸素，一酸化窒素の産生が低下する。

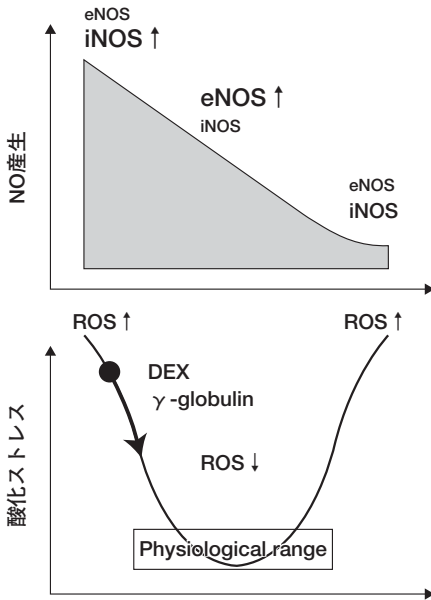


図 6 NO 産生と酸化ストレスの関係—急性炎症疾患 (川崎病, 細菌性髄膜炎)

府立医科大学の Hamaoka らは、川崎病を発症して 10 年以上を経た患者の尿中イソプロスタノイドが高く、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ が低いことを示した。川崎病患者

者では遠隔期でも酸化ストレスが亢進し、NO 生成も血管内皮機能も低下していることが示唆された。Hamaoka らは、冠動脈病変を残した患者に血管内皮保護・抗酸化作用を有するスタチンを 12 カ月投与することで、それらの異常所見が改善することも示した¹⁰⁾。血管内皮保護・抗酸化剤の長期継続投与は NO 機能低下，酸化ストレス亢進を制御の方向に向かわずと考えられた (図 7)。

IV. 酸化ストレスと血管内皮機能不全

筆者らは、“NO 欠乏”の病態学的意義を明らかにする目的で長期 NOS 阻害モデル (ラット) を作製した^{11,12)}。このラットでは、4 週間の非選択的 NOS 阻害薬 L-NAME の経口投与で用量依存性に血圧が上がり、腎機能障害も進んだ。L-NAME で尿中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ も有意に低下したが、NO 合成基質アルギニンの同時大量投与で元に復した。選択的誘導型 NOS 阻害薬 aminoguanidine (AG) の投与では、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ は低下しなかった。尿中 8-OHdG を同時に計測したが、L-NAME で有意に増加しアルギニンの同時投与で元に復した。AG では 8-OHdG は増加しなかった。全ラットを対象に $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ と 8-OHdG の間に有意な負相関

がみられた。

以上の結果より、長期にわたる構成型（主に内皮型）NOS 阻害が血管内皮機能不全，酸化ストレス亢進を導くと考えられた。L-NAME ラットで

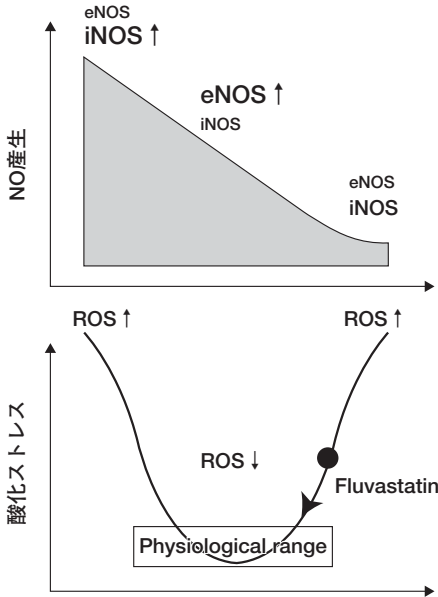


図 7 NO 産生と酸化ストレスの関係—慢性炎症疾患（川崎病）

は，アルギニンの同時投与で NO 産生が増加し酸化ストレスが低下して，酸化的環境から生理的環境に向かうと推定された（図 8）。ところで，4 週間の選択的誘導型 NOS 阻害薬 AG 投与が，骨吸収促進型の骨減少症を導くことも認められた¹³⁾。生理的骨代謝が NO 合成系の調節を受けることを示唆する結果であった。

V. 各種小児疾患における酸化ストレスと NO の関係

慢性期アトピー性皮膚炎患児では対照と比べて有意に尿中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ が低く，8-OHdG が高かった¹⁴⁾。患児が黄色ブドウ球菌感染による膿痂疹と高熱を呈し，皮膚病変が増悪して入院加療を要する事態では，尿中 8-OHdG, acrolein-lysine, BOM は高値を示した。抗生剤などの治療により，皮膚病変が改善するとともに 8-OHdG, acrolein-lysine は低下したが，BOM 高値は持続した。 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ は“基準値レベル”を推移したが，それは疾患の急性増悪に伴い誘導型 NOS 活性が増し，それが元来少なめの構成型由来 NO を補填した結果と推定された¹⁵⁾。

1 型糖尿病患児では対照と比べて有意に尿中

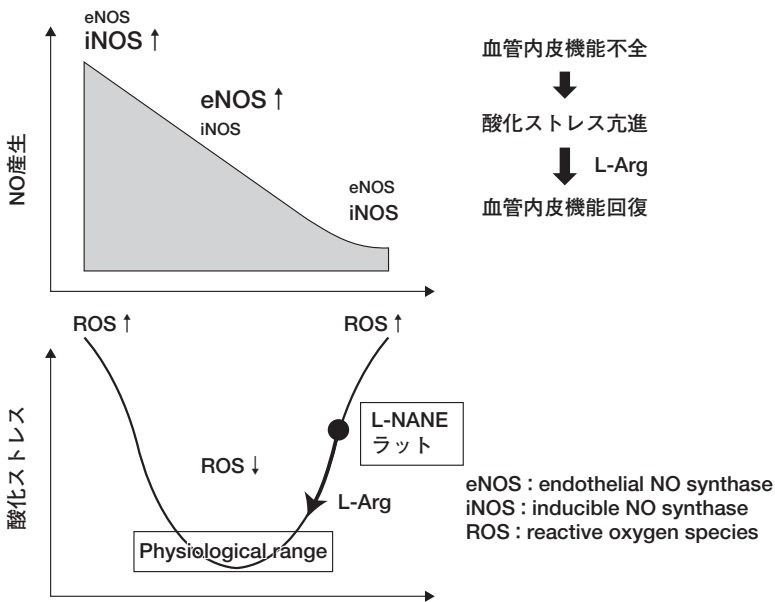


図 8 長期 NO 合成阻害モデルにおける NO 産生と酸化ストレスの関係

eNOS : endothelial NO synthase
iNOS : inducible NO synthase
ROS : reactive oxygen species

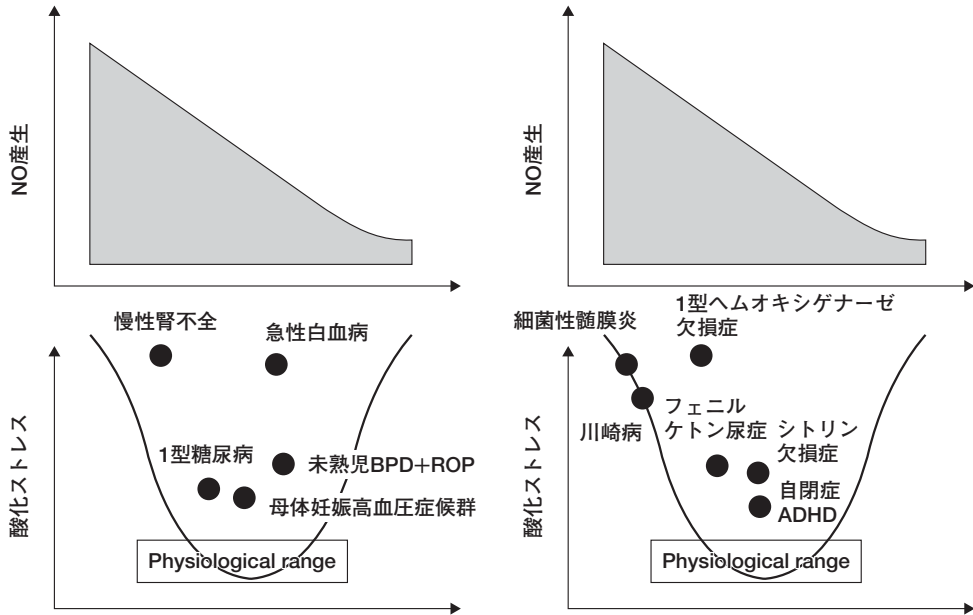


図 9 各種小児疾患における NO 産生と酸化ストレスの関係 (Free Radic Res, 2004 ; Life Sci, 2002, 2004 ; Pediatr Res, 2003 ; Mol Genet Metab, 2009, 2011 ; Redox Rep, 2011 などより引用)

8-OHdG, acrolein-lysine, pentosidine, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ が高値を示したが, その生成に酸化が無関係の糖代謝物の pyrroline には差がなかった. 各マーカーと微小アルブミン尿との間に有意な正相関がみられたが, この結果は酸化ストレスと血管内皮機能低下が密接であることを示すものであった^{16,17}.

筆者らは, 対象をさらに広げて, 尿だけでなく血液・脳脊髄液を用いて酸化ストレスと NO 産生を評価したが, ここでは結果だけを示す¹⁸(図 9). 図 4 は生理的状況, 図 6, 7 はそれぞれ重症の急性, 慢性炎症疾患における酸化ストレス亢進状況の概念図である. 表 1 に筆者らの施設での血清, 脳脊髄液中の酸化ストレスマーカーの高値基準を示した.

VI. 酸化ストレスマーカーの今後の展開

表 2 に, 生体マーカー計測の臨床医学的意義をまとめた. 特に ④, ⑤ は今後の医学研究の目標になると予想される. 今後どのように展開するのであろうか.

一つはマーカーの点数化により疾患の特質を評価し, 重症度を数値化する方向性である (図 10).

複数のマーカーを計測して点数化することで, 疾患の再分類や新病態の発見が進むと予想される. “酸化ストレス”という病態生理の共通場で患者を評価し, (原疾患を超えて) 共通の予防・治療方略を開発することも期待される.

一つはベッドサイド検査である. 酸化ストレスマーカーも “point of care” の指標になる. 8-OHdG については小型迅速検査機器 (ICR-001) を用いて 100 μl で計測できる. 筆者らは, ICR-001 を用いて急性白血病患児での尿中 8-OHdG の異常高値を確認した. 重症インフルエンザ脳症の脳脊髄液中 8-OHdG は 5.5 ng/ml と高値であった (対照は 0.5 ng/ml 未満). 脳脊髄液を用いて脳障害の程度を予測できる可能性が示唆された. ハイドロペルオキシド (脂質酸化のマーカー) については小型迅速検査機器 (FRAS-4) を用いて計測できる. おのおの 10 μl の検体で血液の酸化度 (dROMs), 抗酸化力 (BAP) を計測できる. dROMs/BAP 比は抗酸化予備能の指標になる. 筆者の施設での検討では, 重症炎症疾患で dROMs 高値, BAP 低値, dROMs/BAP 低値が目立っていた. レドックス制御の破綻を示唆する結果であった.

表 1 小児における酸化ストレスマーカーの血清・脳脊髄液基準値

高値：小児対照の平均+1.5 SD 以上
・血清 NOx \geq 67.9 μ mol/l
・血清 ADMA \geq 0.84 μ mol/l (Metabolism, 2008)
・血清 8-OHdG \geq 0.30 ng/ml
・CSF 8-OHdG \geq 3.4 ng/ml (Redox Rep, 2000)
・CSF Acrolein-lysine \geq 7.0 μ mol/l (Life Sci, 2002)

表 2 生体マーカー計測の臨床医学的意義

- ① 非～低侵襲的に検査できるので、小児に適している。
- ② 生体応答の観点より病因・病態を解析できるので、疾患を再分類し、新病態を発見するのに役立つ。
- ③ ヒト患者で継続してモニターできるので、新規の効果的治療法・予防法を開発するのに役立つ。
- ④ モデル動物で同様の生体マーカーを計測できるので、ヒトで治療法・予防法を開発することが容易になる。
- ⑤ 迅速キットが臨床応用されれば、診療の的確な見極めに役立ち、医療経済での費用対効果比を改善できる。

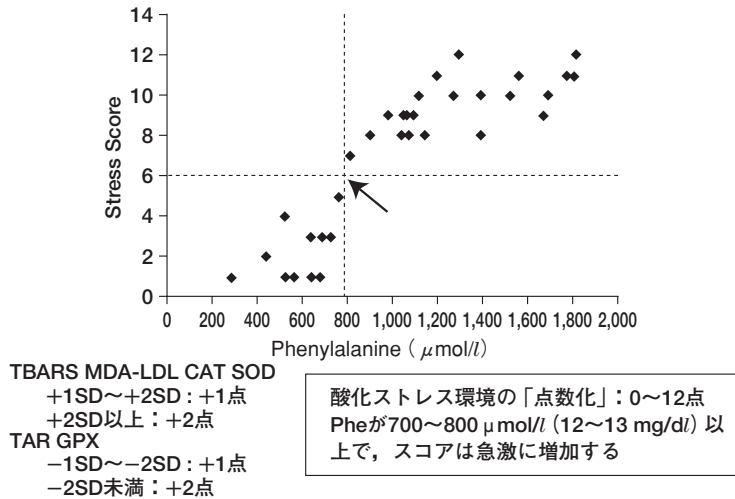


図 10 酸化ストレスマーカーによる点数表示—フェニルケトン尿症
(Sanayama, et al : Mol Genet Metab, 2011 より引用)

Translational research において bedside to bench-bench to bedside の双方向性は重要である。酸化ストレスマーカーの多くはヒト、ラット、マウスに共通することに注目したい。この種の生体マーカーを用いれば、臨床研究で得た知見を動物実験で深めやすく、動物実験で検討された効果的治療法を臨床研究に応用しやすい。実際、筆者の教室では、感染症動物モデルより得られた各種検体にて酸化ストレス度を評価しながら新規薬物療法を開発している。酸化ストレスマーカー計測のこの利点の臨床医学的意義は大きいと考えられる。

謝辞：本研究を推進するにあたり多大なご支

援・ご教授を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学教室の森島恒雄先生、小田慈先生、福井大学医学部小児科学教室の眞弓光文先生、須藤正克先生、米国ニューヨーク州立大学化学科教室の石田孝信先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Tsukahara H : Biomarkers for oxidative stress : Clinical application in pediatric medicine. Curr Med Chem 14 : 339-351, 2007
- 2) 塚原宏一：窒素 (N) と酸素 (O) の化学・生物学。日本臨床高気圧酸素・潜水医学会雑誌 7 : 1-8, 2010
- 3) Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, et al : Determination of asymmetric dimethylarginine, an endoge-

- nous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood. *Metabolism* 57 : 215-220, 2008
- 4) Nagasaka H, Tsukahara H, Yorifuji T, et al : Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects. *Metabolism* 58 : 278-282, 2009
 - 5) Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, et al : Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin-deficiency even during the silent period. *Mol Genet Metab* 97 : 21-26, 2009
 - 6) Tamura S, Tsukahara H, Ueno M, et al : Evaluation of a urinary multi-parameter biomarker set for oxidative stress in children, adolescents and young adults. *Free Radic Res* 40 : 1198-1205, 2006
 - 7) Tsukahara H, Haruta T, Todoroki Y, et al : Oxidant and antioxidant activities in childhood meningitis. *Life Sci* 71 : 2797-2806, 2002
 - 8) Tsukahara H, Kikuchi K, Matsuda M, et al : Endogenous nitric oxide production in Kawasaki disease. *Scand J Clin Lab Invest* 57 : 43-47, 1997
 - 9) Takatsuki S, Ito Y, Takeuchi D, et al : IVIG reduced vascular oxidative stress in patients with Kawasaki disease. *Circ J* 73 : 1315-1318, 2009
 - 10) Hamaoka A, Hamaoka K, Yahata T, et al : Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on continuous post-inflammatory vascular remodeling late after Kawasaki disease. *J Cardiol* 56 : 245-253, 2010
 - 11) Tsukahara H, Imura T, Tsuchida S, et al : Renal functional measurements in young rats with chronic inhibition of nitric oxide synthase. *Acta Paediatr Jpn* 38 : 614-618, 1996
 - 12) Tsukahara H, Hiraoka M, Kobata R, et al : Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion : Measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox Rep* 5 : 23-28, 2000
 - 13) Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, et al : Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol* 270 : E840-845, 1996
 - 14) Omata N, Tsukahara H, Ito S, et al : Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69 : 223-228, 2001
 - 15) Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, et al : Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 72 : 2509-2516, 2003
 - 16) Tsukahara H, Sekine K, Uchiyama M, et al : Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Res* 54 : 419-424, 2003
 - 17) Hata I, Kaji M, Hirano S, et al : Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Int* 48 : 58-61, 2006
 - 18) Tsukahara H : Oxidative stress biomarkers in pediatric medicine : A 2011 update. *Systems Biology of Free Radicals and Anti-Oxidants* (Laher I ed). Springer-Verlag, Germany, 2012 (in press)

Oxidative stress biomarkers

Hirokazu TSUKAHARA

*Department of Pediatrics, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences*

Oxidative stress plays a critical role in infectious, inflammatory, allergic, and other various pediatric diseases. Rapidly progressive or chronic persistent conditions in these diseases might cause destructive changes in tissues and organs of the human body. Therefore, redox modulating agents might be the promising therapeutic tools for oxidative-stress related diseases. This review is intended to describe a list of clinically applicable oxidative stress biomarkers, linkage of enhanced oxidative stress with altered nitric oxide production and endothelial dysfunction syndrome, and future directions of oxidative stress biomarkers in the pediatric clinical field.

* * *