

ELISA法による尿中8-OHdG測定 - Ureaseおよびethanol沈殿処理の検討 -

川崎医科大学自然科学教室¹⁾

川崎医科大学医用中毒学教室²⁾

川崎医科大学公衆衛生学教室³⁾

渡辺洋子¹⁾・富田正文²⁾・奥山敏子²⁾・勝山博信³⁾・日h 和夫¹⁾

(平成22年10月14日受理)

Measurement of urinary levels of 8-OHdG by ELISA
following urease treatment and ethanol precipitation.

Yoko WATANABE¹⁾, Masafumi TOMITA²⁾, Toshiko OKUYAMA³⁾,

Hironobu KATSUYAMA³⁾, Kazuo HIDAKA¹⁾

¹⁾ *Department of Natural Sciences, Kawasaki Medical School,*

²⁾ *Department of Medical Toxicology, Kawasaki Medical School,*

³⁾ *Department of Public Health, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan*

(Received on October 14, 2010)

概 要

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は, DNAの酸化損傷により生成され尿中に排泄される酸化ストレスマーカーである。尿中8-OHdG測定には, 特殊な機器を必要とせず操作の簡便なELISA法が用いられることが多いが, HPLCやLC/MS/MS法に比べ高値を示すことが指摘されている。われわれはELISA測定の前処理としてurease処理とethanol沈殿処理(urease+EtOH沈殿処理)を組み合わせることにより, ELISA反応に及ぼす非特異的な物質の影響を減少させることができた。その測定値はHPLC値に近い値となり, 回収率は99%であった。ヒト尿についてこの方法で得られた値は, HPLC値に比べやや高値であったが(urease+EtOH沈殿処理の後ELISA, 5.70 ± 1.34 vs. HPLC, 3.44 ± 0.78 ng/ml, mean \pm SE), 両者の相関は良好であった。また, 前処理をしたELISA法によってストレス負荷マウスの尿で8-OHdGの排泄が増加していることを示した。以上の結果はELISA法にurease+EtOH沈殿処理を組み合わせることで, 正確性の高い測定値が得られることを示しており, 今後臨床面への応用が期待される。

キーワード: 8-OHdG, 酸化ストレスマーカー, 尿, ELISA法, ストレス

Abstract

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is a marker of oxidative DNA damage that is excreted in urine. An ELISA method is often used for urinary 8-OHdG analysis, although the 8-OHdG level has been overestimated in comparison to HPLC or LC/MS/MS methods. In the present study,

the urinary level of 8-OHdG was measured by the ELISA method following urease treatment and ethanol precipitation (urease+EtOH pretreatment) of urine. This pretreatment of urine reduced the effects of non-specific substances on the ELISA, and lowered the overestimation of the urinary 8-OHdG level. The recovery of the added standard 8-OHdG was 99%. The mean 8-OHdG level of human urine measured by the ELISA with the pretreatment was slightly higher than that measured by HPLC (ELISA, 5.70 ± 1.34 vs. HPLC, 3.44 ± 0.78 ng/ml, mean \pm SE), but a good correlation was obtained between the ELISA and HPLC methods for the 8-OHdG values. In addition, this ELISA method was applied to mouse urine and the 8-OHdG excretion in urine increased when the mice were subjected to water-immersion restraint stress. The ELISA method with the urease+EtOH pretreatment of urine improved the accuracy of the urinary 8-OHdG values, and therefore is considered to be useful for clinical research as well.

Key words: 8-OHdG, oxidative stress marker, urine, ELISA method, stress

1. はじめに

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は、DNAを構成するdeoxyguanosineが活性酸素によって酸化され生成する物質で尿中に排泄される。8-OHdGは体内の酸化と抗酸化状態のバランスを示す酸化ストレスマーカーとして注目され、癌など様々な疾患で増加することが報告されている¹⁾。また、身体的・心理的ストレスや生活習慣は酸化損傷を介して様々な疾病の原因となり²⁾、尿中8-OHdGの測定はますます必要性が増加している。

尿8-OHdGの測定法としては、HPLC、LC/MS/MSおよびELISA法が知られている。HPLCやLC/MS/MSは測定に技術と時間を要し装置も高価であるが、信頼性の高い測定値が得られるとされている³⁾。一方、ELISA法は高価な機器を必要とせず、操作法が簡便で一度に多くの検体を処理できるため、尿中8-OHdGのELISA法による測定が多く報告されるようになってきている。しかし、ELISA法ではHPLCやLC/MS/MS法に比べ4倍以上の高い値になることが指摘されており^{3,4)}、その原因のひとつにELISAで用いられている抗体が、8-OHdGと部分的に類似した構造をもつ物質と交差反応することがあげられている。なかでも尿に多く存在する尿素の

影響が大きいことが指摘されている⁵⁾。

今回、われわれはELISA法で信頼性の高い測定値を得るために、尿試料から尿素を除去する前処理を検討した。その結果、urease処理後 ethanol (EtOH) 沈殿処理を行った尿試料で ELISA測定を行うことでHPLC値に近い値となり、良好な結果を得ることができた。このELISA法をマウス尿中8-OHdGの測定に応用し、ストレス負荷マウスの尿では8-OHdGの排泄が増加していることを示した。

2. 方法

1) ヒト尿試料

ヒト尿はスポット尿を採取し分注して -20°C で保存し、分析に際してどの試料も凍結融解が一度になるようにした。尿は融解後 4°C 、 $5,000 \times \text{g}$ で10分間遠心して上清を以下の分析に用いた。

2) 尿の前処理

Urease処理をおもに検討した。Urease処理は尿 $100 \mu\text{l}$ にurease (ナタ豆由来, 和光純薬) 25unitsを加えて 37°C で15分間インキュベートした。その後さらにEtOH沈殿による除タンパク処理 (EtOH沈殿処理) または限外ろ過処理を行った。EtOH沈殿処理は、urease処理後の

尿100 μ lにEtOH 900 μ l（最終濃度90%）を加え、4 $^{\circ}$ Cで30分間放置したのち15,000 \times gで20分遠心した。上清を遠心エバポレートし、残渣をPBSに溶解してELISAに用いた。限外ろ過処理にはSUPRECTM-02（分画分子量30,000，宝酒造）を使用し、ろ液をELISAに使用した。他方，urease処理を行わない方法として，8-OHdG前処理キット（エムシー研究所，東京）でマニュアルに従って処理した。

3) ELISA法による8-OHdG測定

8-OHdG ELISAキットはNew 8-OHdG Check（日本老化制御研究所，静岡県袋井市）を用いた。第一抗体反応は37 $^{\circ}$ C，1hrまたは4 $^{\circ}$ C，overnight（ON）で行った。その他の操作はメーカーの使用説明書に従った。

4) HPLC法による8-OHdG測定

Kasaiら⁶⁾の方法（OHG研究所，北九州市）で測定した。すなわち，尿試料を陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したのち，C18カラムを用いたHPLCにより分離溶出してECD（electrochemical detector）で検出した。

5) マウス尿試料

ICRマウスを用い，実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認のもとに行った。マウスはコントロール群とストレス群に分け，ストレス群はTakagiらの方法⁷⁾に従って水浸拘束を6時間行い，その後の19時間尿を採取した。コントロール群は無処置マウスの19時間尿を採取した。マウス尿は4 $^{\circ}$ C，5,000 \times gで10分間遠心しその上清を用いた。

6) 尿クレアチニン測定

尿中クレアチニンはJaffe反応で測定した。

3. 結果および考察

図1にELISA法における第一抗体反応温度と尿試料の前処理の影響を示した。前処理なしで第一抗体反応を37 $^{\circ}$ C，1hrで行ったときと4 $^{\circ}$ C，ONで行ったときを比較検討したところ，4 $^{\circ}$ C，

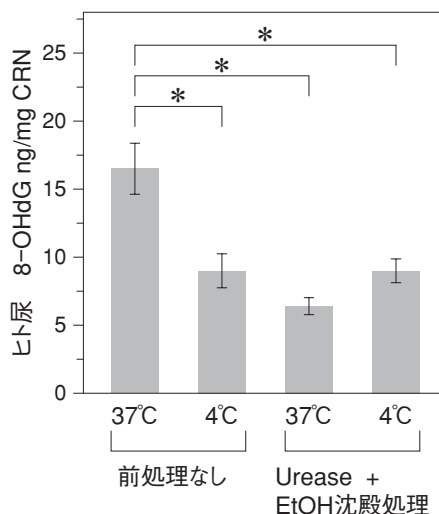


図1 第一抗体反応温度と尿前処理の影響
Mean \pm SE, *p < 0.01

ONで得られる8-OHdG値が有意に低値を示した。これはEvansら⁴⁾によって得られた結果と同じで，ELISAで第一抗体と交差反応する非特異的な物質の影響が4 $^{\circ}$ Cでは抑えられたためと考えられた。ELISA法では，哺乳動物尿に多く含まれる尿素が第一抗体と交差反応を示す主な物質であることがわかっている⁵⁾。そこで，尿中の尿素を除去する前処理について尿試料をureaseとインキュベートする方法を検討した。Urease処理後にEtOH沈殿処理を行うと，回収率は99%と良好であり，8-OHdG値は前処理なしで測定した値の約1/2に減少し，少なくとも尿素の影響は排除されているものと思われた（表1）。Urease処理のみでEtOH沈殿による除タンパク処理を行わないときは，回収率は85%だったが⁸⁾，8-OHdG値が前処理なしの場合に比べて1.7倍高値になっており，ureaseの残留が8-OHdG値に影響する可能性が考えられた。Songら⁵⁾は，少量のurease（尿200 μ lに対してurease 3.25units）を使用し，EtOH処理は行わずにELISA測定して8-OHdG値が低下すること

表1 尿前処理による回収率と8-OHdG値

前処理	回収率	8-OHdG 値 ¹⁾
Urease 処理	85%	1.7
Urease+EtOH 沈殿処理	99%	0.5
Urease+限外ろ過処理	103%	4.3
8-OHdG 前処理キット ²⁾	29%	0.3

¹⁾ 前処理なしのときの測定値を1としたときの比

²⁾ エムシー研究所製

を示している。われわれもSongら⁵⁾の方法に準拠して少量のureaseで前処理を試みたが、8-OHdG値は前処理なしの場合に比べて1.7倍の高値を示した(表1にデータを示していない)。また、urease処理後限外ろ過を行うと回収率は103%であったが、8-OHdG値は前処理なしの場合の4.3倍と高値になった。限外ろ過膜は分子量分画30,000であり、urease(分子量480,000)除去には十分であるが、限外ろ過膜からELISA測定に影響する物質が溶出している可能性が考えられた。一方、ureaseを用いない尿試料の前処理方法として8-OHdG前処理キットを検討した。これは8-OHdGをC18カラムに吸着、溶出して精製するものであるが、回収率が32%と良好でなく、また操作も煩雑で時間を要した。以上のように尿中8-OHdGのELISA法による測定にはureaseによる尿素の除去が重要であり、さらにurease処理後のEtOH沈殿処理が除タンパク処理として必須であることがわかった。そこで尿の前処理法としてurease+EtOH沈殿処理を行い、第一抗体との反応温度を37℃と4℃で比較検討した(図1)。その結果、前処理を行った場合ELISAの第一抗体反応が37℃でも4℃でも、前処理なし37℃の場合に比較して、8-OHdG値は有意に低値を示した($p < 0.01$)。したがって、尿試料を前処理なしの37℃でELISA法

を行った場合にみられる非特異的物質の影響は、urease+EtOH処理で除去できたものと思われた。

尿中8-OHdG測定では、HPLCやLC/MS/MS法が信頼性の高い測定値を与えるとされている³⁾。Urease+EtOH沈殿処理後ELISA法(37℃)で測定した値とHPLC法による値とを比べると、ELISA法ではHPLC法よりやや高値であったが(図2;ELISA法, 5.70 ± 1.34 vs. HPLC法, 3.44 ± 0.78 ng/ml, mean \pm SE), 有意な差は示さなかった。尿素の他に8-hydroxyguanosineなども第一抗体と交差反応を示すことが知られている^{5,8)}。しかし、urease+EtOH沈殿処理によって、ELISA法(37℃)での測定値はHPLC法による値に近似し、正確性の高い値が得られることがわかった。さらに図3に示すように、この方法によるELISAとHPLC法との測定値は良い相関を示した。

前処理法としてurease+EtOH沈殿処理を用いたELISA法を、マウスに水浸拘束ストレス負荷を与えたときの尿中8-OHdGの測定に応用した。その結果、コントロール群では 45.1 ± 3.5 ng/mg CRNに対し、ストレス負荷マウスでは 63.1 ± 7.0 ng/mg CRNと尿中8-OHdGが有意に増加した(図4)。水浸拘束ストレスは動物のストレスモデルとしてよく使われ、胃粘膜に障害を

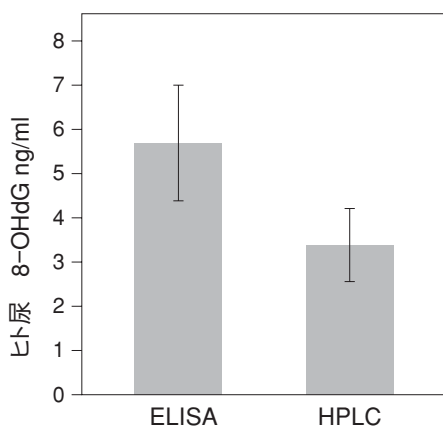


図2 ELISA法とHPLC法による8-OHdG値の比較
ELISA：尿はurease+EtOH沈殿処理を行い、抗体反応37℃で測定した。HPLC：Kasaiら⁹⁾の方法で測定した。Mean±SE

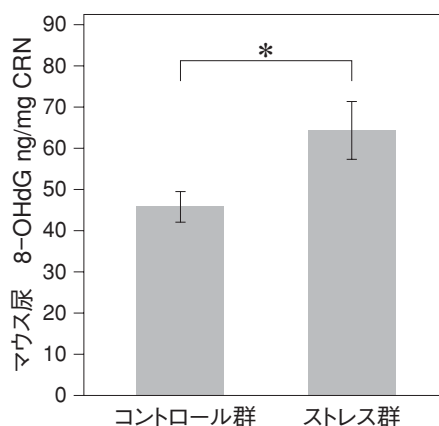


図4 マウス尿中8-OHdGに及ぼすストレスの影響
尿はurease+EtOH沈殿処理を行い、ELISA抗体反応37℃で測定した。Mean±SE, *p<0.05

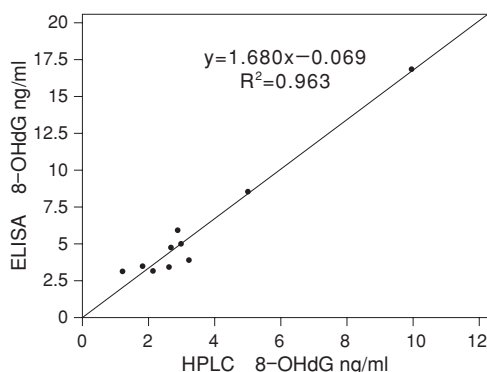


図3 ELISA法とHPLC法による8-OHdG値の相関

もたらしことが知られている⁹⁾。ストレス負荷マウスでの8-OHdG増加は、hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis (HPA系)と免疫系を介して活性酸素種の生産が亢進²⁾した結果であろうと考えられた。なお、マウス尿中8-OHdG値はGuoら¹⁰⁾のHPLC法による値に近いものであった。

4. おわりに

ELISA法で尿8-OHdGを測定するに際し、urease+EtOH沈殿の前処理を行うことでELISA反応における非特異的な物質の影響を低下させることができた。この方法で得られる値は、HPLC法で得られる値よりやや高値であったが、両者の測定値の相関は良好であった。また、本法を応用してストレス負荷マウスで尿中8-OHdGの排泄が増加していることを示した。Urease+EtOH沈殿処理は操作が煩雑でなく、多数の検体を同時に処理することが可能であり、この前処理をELISA法に組み合わせることで、簡便で正確性の高い測定値が得られると思われる。このELISA法による8-OHdGの測定は今後臨床面への応用が期待される。

謝辞

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(課題番号:22590644)の助成を受けた。

文献

- 1) Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT : Urinary 8-OHdG; a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 339 : 1-9, 2004
- 2) 渡辺明治, 新田早美, 木野山真紀 : 心理的ストレスによる酸化ストレス発現のメカニズム。日本病態栄養学会誌10 : 5-23, 2007
- 3) Cooke MS, Barregard L, Mistry V, Potdar N, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, Foksinski M, Svoboda P, Kasai H, Konje JC, Sallsten G, Evans MD, Olinski R: Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biomarkers* 14 : 103-110, 2009
- 4) Evans MD, Singh R, Mistry V, Sandhu K, Farmer PB, Cooke MS : Analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-purine-2'-deoxyribonucleosides by LC-MS/MS and improved ELISA. *Free Radical Research* 42 : 831-840, 2008
- 5) Song M-F, Li Y-S, Ootsuyama Y, Kasai H, Kawai K, Ohta M, Eguchi Y, Yamato H, Matsumoto Y, Yoshida R, Ogawa Y: Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. *Free Radic Biol Med* 47 : 41-46, 2009
- 6) Kasai H, Svoboda P, Yamasaki S, Kawai K : Simultaneous determination of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative stress, and creatinine, a standardization compound, in urine. *Industrial Health* 43 : 333-336, 2005
- 7) Takagi K, Okabe S : The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. *Jpn J Pharmacol* 18 : 9-18, 1968
- 8) 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 : 365-374, 1997
- 9) Tomita M, Okuyama T, Nata M, Katsuyama H, Hidaka K, Watanabe Y, Otsuki T, Moriya F, Ishizu H : Methamphetamine protects against stress-induced gastric mucosal lesions in mice. *Leg Med (Tokyo)* 11 Suppl 1 : S437-439, 2009
- 10) Guo L, Yang JY, Wu CF : Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103:222-227, 2008