

[原 著]

労働者の生活習慣が生体内酸化ストレスに及ぼす影響

渡邊 晋太郎^{1,2}, 李 云善¹, 川崎 祐也¹, 河井 一明^{1*}¹産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性腫瘍学研究室²ジャパンマリンユナイテッド株式会社 呉事業所

要 旨：近年、様々な疾病の発症要因の1つとして、生体成分の酸化的損傷の関与が知られるようになった。本研究では労働者の生活習慣に加えて、疲労の蓄積が、生体内酸化ストレスマーカーである尿中8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)に与える影響について調査した。その結果、尿中8-OHdG値のアルコール摂取による上昇、間食摂取ならびに調査日前日の睡眠時間確保による低下を明らかにした。また、同一集団で1-2カ月後に再調査したところ、尿中8-OHdG値の低下が観察された。同時に行った生活習慣等に関するアンケート調査の中で、再調査時に変化が見られた項目は、直近1ヵ月勤務負荷の低下であった。疾病予防に向けた生活習慣の改善において、尿中8-OHdGの活用が今後期待される。

キーワード：生活習慣、勤務負荷、睡眠時間、酸化ストレス、8-ヒドロキシデオキシグアノシン。

(2019年7月12日 受付, 2019年11月8日 受理)

はじめに

近年、過重労働に関連した業務上疾病として、脳・心臓疾患や精神疾患が増加しており、それぞれ年間で約250件および500件との報告がある[1]。これら疾患の発症には酸化ストレスの亢進が関与していると示唆されていることから[2-4]、酸化ストレス状態を把握して適切に管理することで、関連疾患の予防への応用が期待される。現在、生体内の酸化ストレスを示す指標としては、DNA塩基が酸化損傷されて生成する8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)がよく知られており、非侵襲的に採取可能な尿を検体として分析した論文数は1,400報を超える[5]。ヒトを対象とした研究では、喫煙、石綿曝露、アルコール摂取、交代勤務従事、長時間労働、精神的ストレス等により尿中8-OHdGが高値を示すこと[6]、適度な運動で低値を示すことなどが知られている[7]。さらに尿中8-OHdGは、冒頭に示した脳・心臓疾患患者[6]や精神疾患患者で高値を示す[8]。本研究では、脳・心臓疾患や精神疾患に関わり

があると考えられる生活習慣要因および、疲労蓄積度に関する質問紙調査を行い、生体内酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdG値との関連を調査した。また、生活習慣と酸化ストレスに関するこれまでの研究のほとんどは横断研究であることから、同一集団において1~2カ月後に再調査を行い、生活習慣や疲労蓄積度、尿中8-OHdG値の変化について検討した。さらに、尿中8-OHdGの測定値を評価するにあたって、尿検体を採取する前の食事の影響が懸念され、特に煮干しやめざしなど魚を乾燥加工した食品に8-OHdGが多く含まれていることが報告されていることから[9]、これらの食品摂取が、尿中8-OHdGの測定値に与える影響についても調べた。

対 象 と 方 法

対象

労働衛生機関職員を対象に研究内容を説明し、同意が得られた者を被験者とした(調査1)。また、調査1の

*対応著者：河井 一明, 産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性腫瘍学, 〒807-8555, 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1, Tel: 093-691-7469, Fax: 093-601-2199, E-mail: kkawai@med.uoeh-u.ac.jp

被験者のうち、1～2ヵ月後に実施した再調査に同意が得られた者を調査2の被験者とした。調査1の被験者は63人、調査2の被験者は36人であった。本研究は、産業医科大学倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号H26-239号)。

質問紙調査

調査1、調査2ともに生活習慣ならびに直近1ヵ月の疲労蓄積度に関する質問紙調査を行った。質問項目は、食習慣、喫煙、運動、飲酒、調査日前日の睡眠時間、直近1ヵ月以内の疲労蓄積に関する自覚症状ならびに勤務状況とした。食習慣に関しては、12項目について質問し(Table 1)、回答を“はい”または“いいえ”の2件法で求めた。喫煙に関しては、現在と過去の喫煙習慣の有無を質問し、現在喫煙者に対しては具体的な喫煙本数と喫煙継続年数の記載を求めた。運動時間、前日睡眠時間、アルコール摂取量に関しては、時間や日本酒換算量の数値範囲を提示し、4件法または3件法で回答を求めた。直近1ヵ月以内の疲労蓄積度に関しては、厚生労働省が公表している疲労蓄積度自己チェックリストを用いた[10]。質問項目は自覚症状と勤務負荷であり、自覚症状は“イライラする”等、計13項目に対して(Table 1)、“ほとんどない”、“時々ある”、“よくある”の3件法で回

答を求めて点数を合算した(範囲：0-39点)。勤務負荷は“時間外労働”等、計7項目に対して(Table 1)、“適当”、“多い”、“非常に多い”の3件法または2件法で回答を求め、点数を合算(範囲：0-15)した。

尿検体採取と尿中8-OHdG値の測定

尿検体は、日中の任意の時間(9:00～18:00)に採取し、1.0 mlのエッペンドルフチューブに移した後、直ちに-20℃で冷凍保存した。測定時に解凍し、3,500 rpmで10分間遠心した後、上清50 μlを等量の希釈液(4%アセトニトリル、120 μg/ml 8-ヒドロキシグアノシン)と混和し、20 μlを紫外線検出器と電気化学検出器を組み合わせたHPLC装置で分析した[11]。8-OHdG濃度の定量は、8-OHdG標準液の検量線を基に行った。尿中8-OHdG値は、クレアチニン補正により尿の濃度の影響を軽減できることが知られているため[12]、8-OHdGの分析時に同時に定量したクレアチニン値を用いて補正し、8-OHdG/creatinine(ng/mg)で示した。この分析法による8-OHdG値の変動係数は7%以内であった。

統計解析

尿中8-OHdG値および質問紙の回答に不足があった者を除外し、統計ソフトEZR(フリーソフト、自治医科大学附属さいたま医療センター管理)を用いて統計解析を行った[13]。Shapiro-Wilk検定を実施したところ、尿中8-OHdG値は、正規分布($P=0.06$)よりも、対数正規分布($P=0.30$)に対する適合度が高かったため、対数変換後の尿中8-OHdG値を統計解析に用いた。調査1の結果については、性別、年齢、食習慣・喫煙状態、間食習慣、野菜摂取習慣、調査日前日の魚乾燥食品摂取が尿中8-OHdG値に与える影響を t 検定、分散分析により調査した。調査日前日の睡眠時間、アルコール摂取量、運動時間、直近1ヵ月の疲労蓄積度に関する自覚症状、勤務負荷は順序尺度であったため、尿中8-OHdG値との相関をスピアマンの順位相関係数を用いて解析した。調査2の結果については、初回と2回目の尿中8-OHdG値をPaired- t 検定で比較し、生活習慣や労働条件等の変化と合わせて検討した。

結 果

調査1の結果

調査1の被験者63人の尿中8-OHdG値は、 4.16 ± 1.79 ng/mg creatinine(平均値±標準偏差値、最低値：1.04、最高値：9.14)であった。

Table 1. The survey questions about lifestyle and fatigue

食生活に関する質問項目

1日3食摂取する、食べるスピードが速い、いつも腹八分目にしている、間食をする習慣がある、揚げ物は1日1食までになっている、魚より肉をよく摂る、野菜を毎食摂る、よく外食をする、塩味が濃いものが好きだ、乳製品をよく摂る、即席麺・菓子を良く摂る、大豆製品をよく摂る

直近1ヵ月の疲労蓄積度に関する質問項目

自覚症状

イライラする、不安だ、落ち着かない、ゆううつだ、よく眠れない、体の調子が悪い、物事に集中できない、することに間違いが多い、仕事で強い眠気に襲われる、やる気が出ない、へとへとだ(運動後を除く)、朝起きた時ぐったりした疲れを感じる、以前と比べて疲れやすい

勤務負荷

1ヵ月の時間外労働、不規則な勤務、出張に伴う負担(頻度・拘束時間・時差)、深夜勤務に伴う負担、休憩・仮眠の時間数及び施設、仕事についての精神的負担、仕事についての身体的負担

Table 2. Demographic factors and urinary 8-OHdG levels

Factors		N	Urinary 8-OHdG ^a (ng/mg creatinine)	p
Sex	Male	15	4.54±1.54	0.074
	Female	44	3.53±1.59	
Age(Year)	50>	48	3.60±1.58	0.124
	50≤	11	4.58±1.62	
Smoking status	Current-smoker	8	3.50±1.51	0.513
	Past-smoker	11	4.38±1.66	
	Non-smoker	42	3.70±1.59	
Snacking habit	Yes	33	3.36±1.64	0.035
	No	29	4.31±1.48	
Vesitable intake habit	Yes	38	3.82±1.65	0.794
	No	24	3.70±1.50	
Dried fish food intake ^b	Yes	8	4.25±1.33	0.439
	No	54	3.71±1.62	

^a: Geometric mean ± geometric standard deviation^b: Within 48 hours before urine sampling

単変量解析

喫煙や食習慣等の背景要因が尿中8-OHdG値に与える影響を調査した結果、間食摂取者は間食非摂取者と比較して尿中8-OHdGの有意な低値を認めた。一方で、性別、年齢、喫煙状態(現在喫煙者の喫煙本数は10-20本/日、ブリンクマン指数は60-300の範囲)、野菜摂取、魚乾燥食品の摂取による有意な差は認められなかった(Table 2)。さらに、アルコール摂取量、調査日前日の睡眠時間、直近1ヵ月疲労蓄積度との関係を調査した結果、アルコール摂取量と尿中8-OHdG値との間に正の相関関係を認めた。これに対して、調査日前日の睡眠時間、運動時間、直近1ヵ月の自覚症状、直近1ヵ月の勤務負荷との間に有意な相関を認めなかった(Table 3)。

重回帰分析

Stepwise法により生活習慣、直近1ヵ月の疲労蓄積度に関する説明変数を選択した上で、尿中8-OHdG値に影響を及ぼす要因を重回帰分析で調査した結果、尿中8-OHdG値はアルコール摂取による上昇、間食摂取と調査日前日の睡眠時間確保による低下を認めた(Table 4)。

調査2の結果

調査2の被検者36人の尿中8-OHdG値は、初回4.35±1.82 ng/mg creatinine(平均値±標準偏差値)、2回目3.75±1.58 ng/mg creatinine(平均値±標準偏差値)であり、2回目採尿時において、初回採尿時に比較して有意な低下を認めた($P=0.016$)。先行研究を踏まえて尿

Table 3. Correlation between lifestyle and fatigue variables and urinary 8-OHdG levels

	Spearman's rank correlation coefficient	p
Previous day sleep time (4-8 h)	-0.17	0.186
Alcohol intake (0-60 g/day)	0.31	0.016
Aerobic exercise time (0-8 h/week)	0.21	0.101
Resistance exercise time (0-5 h/week)	0.09	0.495
Subjective symptoms in the last 1 month (0-27 points)	-0.07	0.597
Work load in the last 1 month (0-11 points)	0.16	0.226

() represents min-max

Table 4. Multiple regression analysis of 8-OHdG against lifestyles

	Regression coefficient estimate	p
Intercept	0.87	<0.001
Snacking habit (Yes)	-0.13	0.013
Alcohol intake per day	0.07	0.01
Previous day sleep time	-0.12	0.015

中8-OHdG値に影響を与えうる要因を検討したところ[6, 7]、初回と2回目の質問紙調査で、喫煙本数(1.8本/日)、アルコール摂取量(中央値: 0 g/週)、運動時間(中央値: 0 時間/週)に、直近1ヵ月の自覚症状(中央値6点)に変化は見られず、初回と2回目で変化が見られた項目は、勤務負荷(中央値が1点から0点へ減少)のみであった。

考 察

調査1において、前日睡眠時間確保による尿中8-OHdG低下が確認された結果は、睡眠が酸化ストレスレベル減少に寄与することを報告した先行研究を支持する[14]。睡眠時間減少は、長時間労働による脳・心臓疾患発症の一要因として指摘されており[15]、今後、長時間労働に起因する健康影響の評価に、尿中8-OHdGの活用が期待される。

また、アルコール摂取による尿中8-OHdG値の上昇

は、アルコール代謝過程での活性酸素種の産生、および抗酸化物質消費による酸化ストレス増大を反映したものと考えられる[16]。

多くの先行研究で、喫煙者の尿中8-OHdGが高値を示すことが報告されており[17-19]、その機序として喫煙による酸化ストレスレベルの上昇が挙げられている[17]。しかし本研究において、喫煙者は、尿中8-OHdG高値を示さなかった。これは、先行研究の喫煙者の1日喫煙本数が平均15.5本(最大40本)、ブリンクマン指数の平均が260(最大1520)であったのに対し、本研究の喫煙者は、1日喫煙本数の平均が2本(最大20本)、ブリンクマン指数の平均が30(最大300)と少なく、有意な尿中8-OHdGの上昇をきたす喫煙レベルではなかったためと考えられる。

間食摂取群で尿中8-OHdG値が低値を示した理由として、間食や間食と同時に摂取した飲料等に、アスコルビン酸[20]やトコフェロール[21]、緑茶ポリフェノール[22]などの抗酸化物質が含まれていた可能性が考えられる。抗酸化物質摂取で白血球中8-OHdG値が低下するとの報告や[21]、緑茶の芳香成分が抗酸化性を示すとの報告があり[23]、適切な間食は酸化ストレス低減に寄与する可能性がある。

また、8-OHdGを含む食品として、丸干しイワシや焼き炒り子等の魚乾燥食品が報告されており[9]、測定値への影響が懸念されたが、それら摂取有無による尿中8-OHdG値の有意差は認められなかった。このことから、通常の生活では、食品由来の8-OHdGが尿中8-OHdG値に与える影響は少ないことが示唆されたが、摂取量との関係について、さらに調査が必要と考える。

調査2で、同一集団に対して2回調査した結果を比較したところ、尿中8-OHdG値は2回目に有意に低下していた。同時に実施した生活習慣等に関する質問紙調査で、変化が見られた項目は、直近1ヵ月の勤務負荷の減少のみであった。勤務負荷の減少が尿中8-OHdGの減少に関与した可能性がある。勤務負荷は、脳・心臓疾患や精神疾患の発症の危険因子と考えられており[15, 24]、因果関係についてさらなる調査が望まれる。

今回の調査では、日中の任意の時間(9:00~18:00)に尿検体の採取を行った。尿中8-OHdGの日内変動については、6時間おきに尿を採取した場合、統計的に有意な変化を認めなかったとの報告があり[25]、任意の時間での尿採取が結果に影響を及ぼした可能性は低い。ただし、今後採取時間を考慮することで食事や喫煙などの影響を最小限にできると考えられる。

本研究で、労働者の生活習慣や勤務負荷が、生体内酸化ストレスに影響を及ぼすことを示した。勤務負荷ス

トレスの客観的・定量的評価指標が必要とされる中で、今後ストレス状態評価に対する尿中8-OHdGの感度ならびに特異度が明らかとなれば、生活習慣や労働環境に起因する疾病の予防に向けた活用が期待される。

謝 辞

本研究の一部は平成29-30年度 産業医科大学産業医学・産業保健重点研究資金、ならびにJSPS KAKENHI JP17H01908の助成を受け、実施した。

利 益 相 反

本論文について申告すべき利益相反関係なし。

引 用 文 献

1. 中央労働災害防止協会編(2018): 脳・心臓疾患及び精神障害等に係る労災補償の支給決定件数の推移。労働衛生のしおり 平成30年度。中央労働災害防止協会, 東京 p22
2. Xuan Y, Gao X, Holleczer B, Brenner H & Schöttker B (2018): Prediction of myocardial infarction, stroke and cardiovascular mortality with urinary biomarkers of oxidative stress: Results from a large cohort study. *Int J Cardiol* 273: 223-229
3. Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK & Sobey CG (2011): Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci (Landmark, ed)* 16: 1733-1745
4. Shafiee M, Ahmadnezhad M, Tayefi M *et al* (2018): Depression and anxiety symptoms are associated with prooxidant-antioxidant balance: A population-based study. *J Affect Disord* 238: 491-498
5. PubMed Central (PMC): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=8-hydroxy+deoxyguanosine+urine> [アクセス日2019年7月7日]
6. Kasai H & Kawai K (2016): 8-hydroxyguanine, an oxidative DNA and RNA modification. *In* *Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine RNA Technologies*. (Jurga S, Erdmann VA & Barciszewski J, *ed*). Springer International Publishing, Cham pp 147-185
7. Hara M, Nishida Y, Shimanoe C *et al* (2016): Intensity-specific effect of physical activity on urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in middle-aged Japanese. *Cancer Sci* 107: 1653-1659

8. Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P & Penninx BW (2015): Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 51: 164-175
 9. Kawai K, Svoboda P & Kasai H (2006): Detection of genotoxic nucleosides 8-hydroxydeoxyguanosine, 8-hydroxyguanosine and free base 8-hydroxyguanine, in fish food products. *Genes and Environment* 28: 120-122
 10. 厚生労働省(2016): 長時間労働者, 高ストレス者の面接指導に関する報告書・意見書作成マニュアル 疲労蓄積度自己チェックリスト. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/roudoukijun/anzeneisei12/manual.html> (アクセス日 2019年7月7日)
 11. Kasai H, Kawai K & Li YS (2008): Analysis of 8-OH-dG and 8-OH-Gua as biomarkers of oxidative stress. *Genes and Environment* 30 (2): 33-40
 12. Barregard L, Møller P, Henriksen T *et al* (2013). Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18: 2377-2391
 13. Kanda Y (2013): Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452-458
 14. 池田昌美, 池田真行(2007): 酸化ストレスと睡眠. *日本薬理学雑誌* 129: 404-407
 15. 産業医の職務Q&A編集委員会編(2014): 過重労働による脳・心臓疾患の認定基準. 産業医の職務Q&A 第10版. 産業医学振興財団, 東京 pp 186-187
 16. Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B & Persidsky Y (2008): Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med* 45: 1542-1550
 17. Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, Miyamoto T, Kato N & Kasai H (2009): Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* 100: 715-721
 18. Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T, Kawanami K, Kawanami S, Kido R & Ikeda M (2001): Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: Effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res* 92: 9-15
 19. Irie M, Tamae K, Iwamoto-Tanaka N & Kasai H (2005): Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* 96: 600-606
 20. Tarng DC, Liu TY & Huang TP (2004): Protective effect of vitamin C on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in peripheral blood lymphocytes of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 66: 820-831
 21. Lee BM, Lee SK & Kim HS (1998): Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, β -carotene and red ginseng). *Cancer Lett* 132: 219-227
 22. Luo H, Tang L, Tang M *et al* (2006): Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis* 27: 262-268
 23. Li YS, Kawasaki Y, Tomita I & Kawai K (2017): Antioxidant properties of green tea aroma in mice. *J Clin Biochem Nutr* 61: 14-17
 24. 堀江正知(2014): 過重労働と健康障害の発生. 過重労働対策・面接指導のQ&A 100. 公益財団法人産業医学振興財団. 東京 pp 10-12
 25. Grew IS, Cejvanovic V, Broedbaek K, Henriksen T, Petersen M, Andersen JT, Jimenez-Solem E, Weimann A & Poulsen HE (2014): Diurnal variation of urinary markers of nucleic acid oxidation. *Scand J Clin Lab Invest* 74: 336-343
-

Workers' Lifestyles and Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as an Oxidative Stress Marker

Sintaroo WATANABE^{1,2}, Yun-Shan LI¹, Yuya KAWASAKI¹, Kazuaki KAWAI¹

¹ *Department of Environmental Oncology Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan*

² *Japan Marine United Corporation Kure Shipyard. Showa-cho, Kure 737-0027, Japan*

Abstract : Oxidative stress in biological components has become recognized as one of the causative factors of various diseases. In this study, we investigated the effects of worker lifestyle and fatigue on the levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a marker of oxidative stress. Our results revealed that urinary 8-OHdG level was increased by alcohol intake and decreased by snack intake and adequate sleep time on the day before the survey. A decrease in urinary 8-OHdG level was also observed in parallel with a decrease in workload. Urinary 8-OHdG monitoring is expected to be useful for disease prevention in the future.

Key words: lifestyle, work load, sleep time, oxidative stress, 8-hydroxydeoxyguanosine.

J UOEH 41 (4) : 431 – 436 (2019)