

肥満学生におけるカルボニルストレスの意義と生活習慣生体情報マーカーの模索

川俣彰裕¹⁾³⁾, 森 建文^{1)2)3)4)*}, 米城淑美⁴⁾, 三井栄子¹⁾,
長谷川洋子¹⁾, 太田美智¹⁾, 伊藤めぐみ¹⁾, 佐藤洋美¹⁾,
滝口純子¹⁾, 伊藤貞嘉⁴⁾, 飛田 渉¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

1) 東北大学保健管理センター, 2) 東北大学高等教育開発推進センター,
3) 東北大学情報科学研究科, 4) 東北大学大学院医学系研究科

はじめに

近年, 我が国において肥満が問題となっている。これは肥満の存在にわずかな血圧や血清脂質, 血糖の上昇があると糖尿病や高血圧と同等に脳卒中や心筋梗塞といった心血管病発症リスクの増加が明らかになったためである¹⁾。そのため, 肥満(内臓脂肪), 高血圧, 高脂血症ならびに耐糖能異常が重複している病態はメタボリックシンドロームと定義されるようになり, 特定健診等で診断するようになった。

肥満度を表す指標として我が国においてはBMI (Body Mass Index) が用いられている。身長と体重から簡便に算出され, 日本人では22が標準, 25以上が肥満とされている²⁾。近年, 国民の平均BMIが増加し, 肥満人口が増加している。本学の学生でも2008年度は実に10%以上の学生がBMI25以上の肥満学生に該当している³⁾。若年者の肥満は将来の高血圧や糖尿病などの生活習慣病発症のリスクを増加させることが報告されており⁴⁾, 本学の学生にもその脅威がせまっている。

一方, 高血圧は心血管病の強い危険因子であるが⁵⁾, この病態は肥満やメタボリックシンドロームでしばしば認められる。近年, 日本高血圧学会のガイドラインで至適血圧という概念が導入された。これは将来を考慮した適正な血圧という意味であり, 若年者においては高齢者よりも低い値で定義されている⁵⁾。しかしながら本学における学生健診を見ると, 多くの学生がこの至適血圧を超えている。

また慢性腎臓病が近年定義されたが, この疾患の存在もまたメタボリックシンドロームと同様に心血管病発症リスクの増加が明らかにされている^{6,7)}。慢性腎臓病は腎臓の機能を表す糸球体濾過量が $60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 未満であるか, 尿異常・画像所見・血液・組織により腎障害が明らかである期間が3ヵ月以上続く場合と定義されている。オランダで行われた試験によると高血圧や糖尿病を指摘されていない一般人でもわずかな蛋白尿(アルブミン尿)の存在は心血管病の危険を増大させることが報告された⁸⁾。日本人も例外ではなく, 岩手県大迫町で行われた大迫研究において, 腎機能の低下は心血管病発症リスクの増加のみならず全死亡率をも高め, さらに尿蛋白の存在がこの危険性をより高めることが報告された⁹⁾。本学の学生において, 尿中アルブミン排泄量はBMI30以上の肥満学生で明らかに増加していた¹⁰⁾。これらは本学の学生においても慢性腎臓病が潜在している可能性があることを意味する。

酸化ストレスマーカーもまた心血管病の危険因子あるが, 本学の学生でもBMI30以上の肥満学生では尿中の酸化ストレスマーカーが高値であることが明らかになった¹⁰⁾。肥満や高血圧などの生活習慣病では酸化ストレスの亢進の関与が報告されている⁴⁾。さらに, 酸化ストレスと食塩感受性高血圧との関連がヒトや動物の研究から明らかになっている¹¹⁾。

糖尿病や高血圧, 慢性腎臓病ではカルボニル物質および酸化ストレスの亢進が知られている¹²⁾。カルボニル物

*) 連絡先: 〒980-8576 宮城県仙台市青葉区川内41 東北大学保健管理センター tmori2i@mail.tains.tohoku.ac.jp

質は糖の代謝産物として体内で産生されるだけでなく、食品中にも含まれ、その摂取は体内のカルボニル物質の上昇と臓器障害に関与することが報告されている¹³⁾。

そこで我々は若年者の肥満においてカルボニルストレスおよび酸化ストレスの上昇が食塩感受性高血圧に関与していると仮説を立てた。この仮説を検証するために本学の学生健診で回収した尿から尿中のカルボニルストレスマーカーであるメチルグリオキサール(MGO)排泄量を測定し、以前我々が測定し、報告した新入生の尿中ナトリウム(Na)、アルブミンおよびチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)排泄量ならびにBMIおよび血圧との関連を検討した¹⁰⁾。

対象と方法

東北大学の2008年度における入学時健診受診者のうち尿を回収できた2335名(男性1,794名,女性541名,年齢18-29歳)を対象とした。一次健診で回収した早朝第一尿を従来の健診項目である尿蛋白,尿潜血,尿糖および尿ウロビリノーゲンを試験紙で測定したのち尿検体を-80℃で保存した。この尿検体からNa,クレアチニンおよびアルブミン,およびTBARS濃度を測定した。Naは食塩摂取の指標,アルブミンは腎障害の指標,TBARSは酸化ストレスの指標として知られている。また一日の尿中クレアチニン排泄量推定式を後述の上島らの方法を用いて推定した¹⁴⁾。測定したクレアチニン濃度と推定した一日の尿中クレアチニン排泄量を用いて一日の尿中物質排泄量を推定した。特に尿中Na排泄量推定に特化した式も報告されていたため,尿中Na排泄量はこの式を利用した。単位は一日の推定排泄量(/pre.day)で表記した。

- ・24時間尿中クレアチニン排泄量推定式(Pre.Cr)
 $-2.04 \times \text{年齢} + 14.89 \times \text{体重(kg)} + 16.14 \times \text{身長(cm)} - 2244.45$
- ・24時間尿中Na排泄量推定式
 $21.98 \times \{(\text{尿中Na濃度(mEq/L)} / \text{尿中クレアチニン濃度(mg/L)}) \times \text{Pre.Cr}\}^{0.392}$

また回収できた尿検体からBMI30以上の肥満学生と無作為に抽出したBMI30未満の学生合計794名を抽

出し,尿中MGO濃度を中山らの方法¹²⁾に準じ,オーフェニルジアミンによる尿中カルボニル物質の誘導体化により測定した。他の尿中排泄量と同様にクレアチニン濃度と尿中クレアチニン排泄量推定式を用いて尿中MGO排泄量を推定した。

さらに高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて08年度の新入生のうち尿中MGO排泄量が高い学生および低い学生の各10名を対象とし,回収した尿検体にジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)による尿中カルボニル物質を誘導体化して,測定した。

また2009年度の新入生健診時に尿を回収できた2016名を対象として薄層クロマトグラフィ(TLC)を行った。HPLCと同様に尿中カルボニル物質を誘導体化し,展開を行った。得られた画像はソフトウェアのImageJを用いて解析した。

本研究は文部科学省および厚生労働省による【疫学研究に関する倫理指針】(平成19年8月16日改正,同11月1日施行)に基づいて施行し,東北大学医学部倫理委員会の承認を得た。個人情報保護のためデータは連結可能匿名化し,尿の測定および解析者が個人を特定できないようにした。

得られたデータは全て平均値±標準誤差で表した。統計解析にはSigma Plot 11.0を用い,一次元配置分散分析法(one-way ANOVA),Pearsonの相関係数,強制投入法による重回帰分析を行った。それぞれの有意水準は0.05%未満とした。

結果

1. 尿中Na排泄量と収縮期血圧との関係

男子学生において全学生を対象とすると尿中Na排泄量と収縮期血圧に有意な相関は認められなかった。しかしながらBMI30以上の男子学生を対象とするとそれらに有意な正の相関(相関係数:0.32)を認めた(図1)。

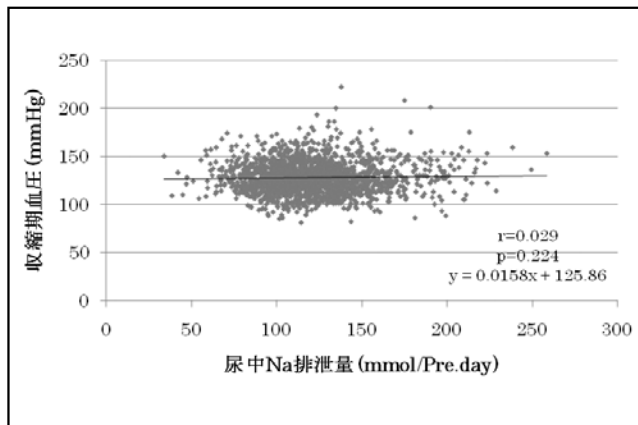
2. 尿中Na, TBARSおよびMGO排泄量の関係

男女とも,尿中Na排泄量と尿中TBARSおよびMGO排泄量との間に有意な正の相関(TBARSとの相関係数 男子:0.48, 女子:0.49, MGOとの相関係

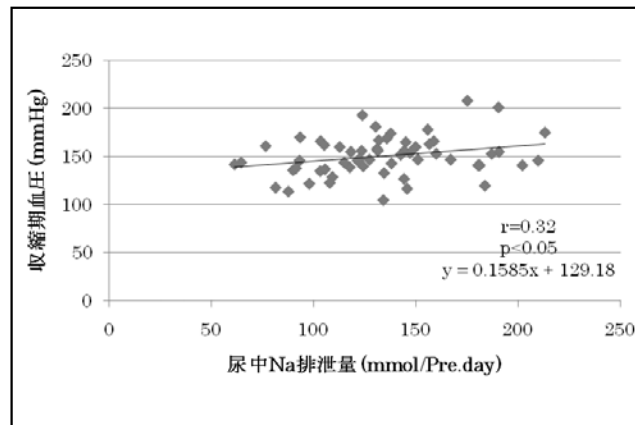
数男子：0.42, 女子：0.46) を認めた (図2)。また、同様に尿中TBARS排泄量と尿中MGO排泄量の間にも有意な正の相関 (男子：0.45, 女子：0.56) を認められた (図3)。

3. BMIとカルボニルストレスマーカー

BMIを4群 (18.5未満, 18.5以上25未満, 25以上30未満, 30以上) に分け評価した。性別に関係なくBMIの上昇に伴い尿中MGO排泄量は増加した (図4)。

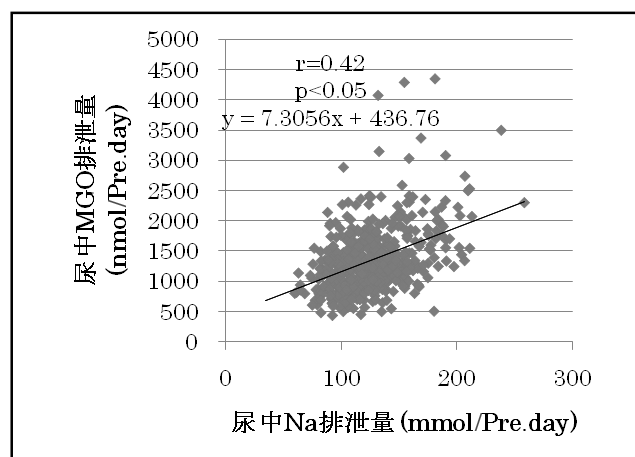
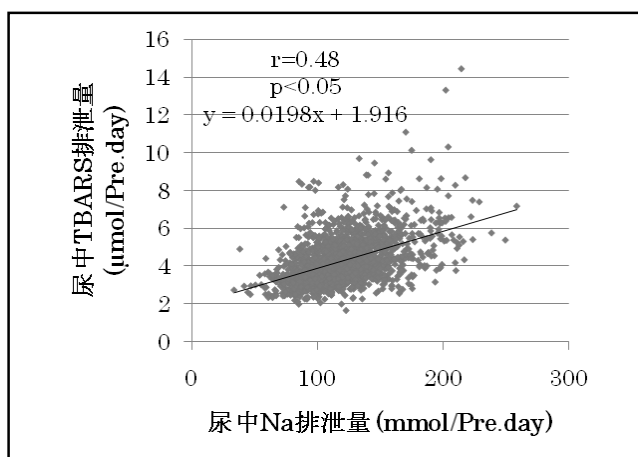


対象者：全男子学生

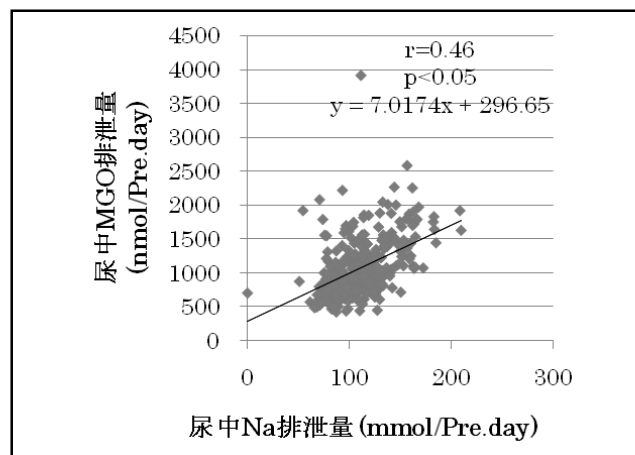
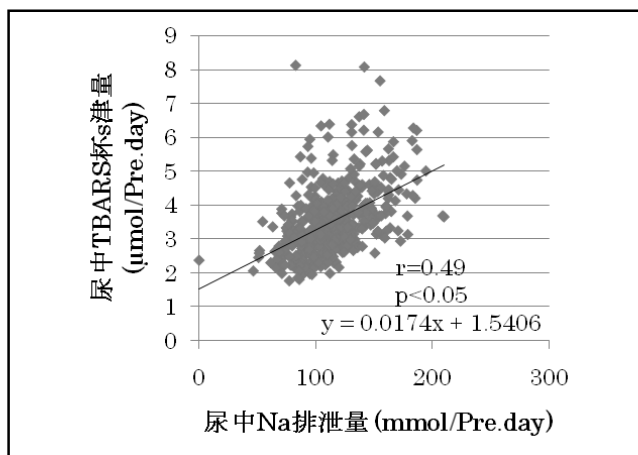


対象者：BMI30以上の男子学生

図1：収縮期血圧と尿中Na排泄量との関係

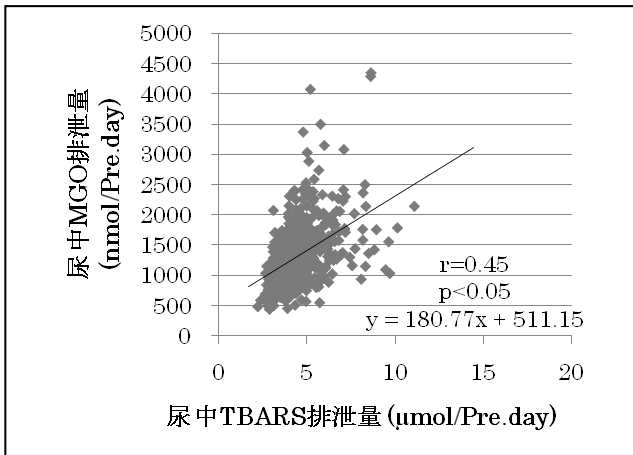


対象者：男子学生

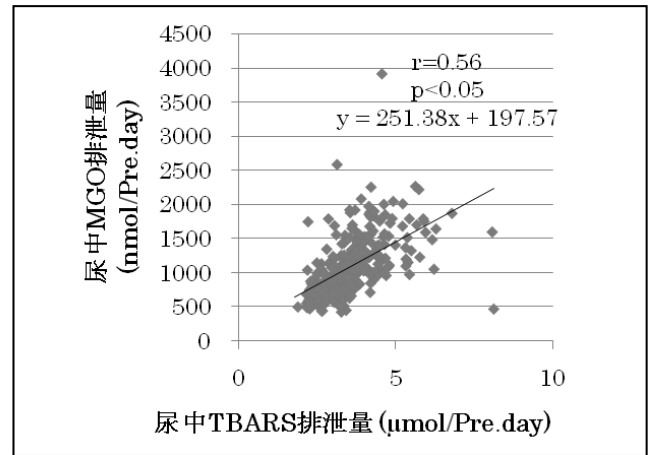


対象者：女子学生

図2：尿中Na排泄量と尿中TBARSおよびMGO排泄量との関係

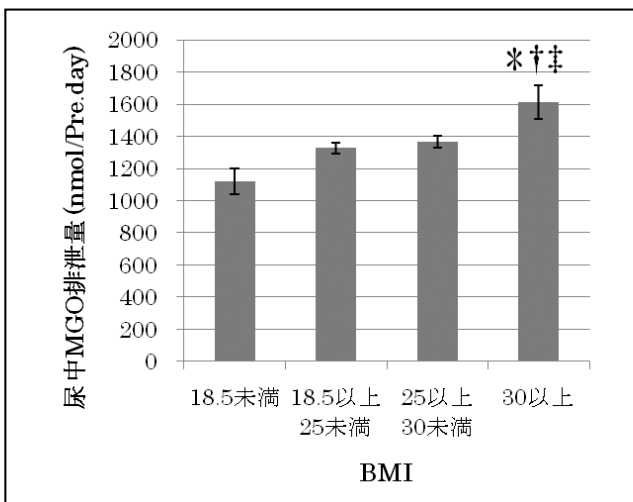


対象者：男子学生

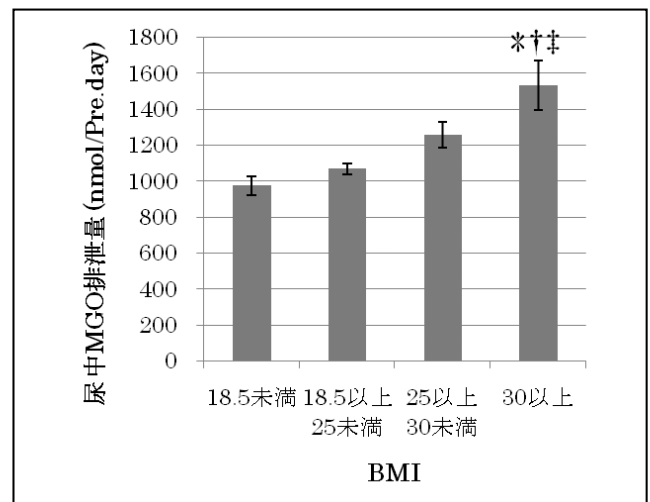


対象者：女子学生

図3：尿中TBARS排泄量と尿中MGO排泄量との関係



対象者：男子学生



対象者：女子学生

*: vs. 18.5未満($p<0.05$)
 †: vs. 18.5以上25未満($p<0.05$)
 ‡: vs. 25以上30未満($p<0.05$)

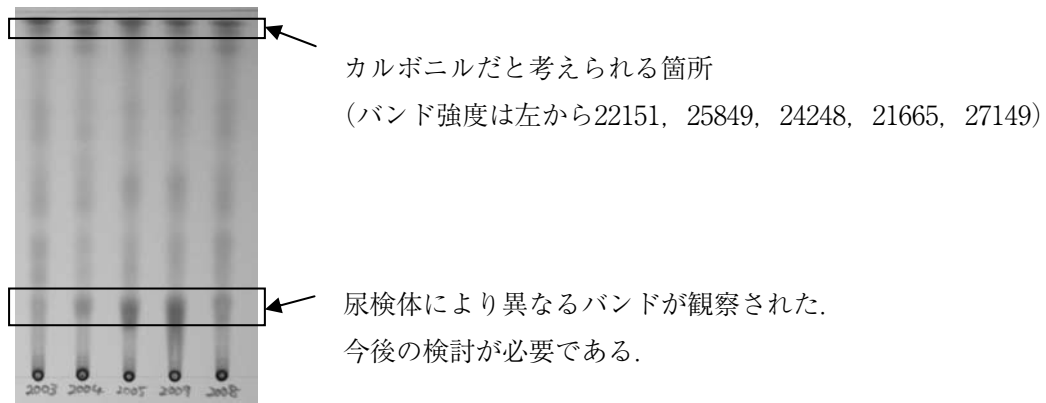
図4：BMIと尿中MGO排泄量との関係

4. 重回帰分析による各パラメータの関係

既報の研究では収縮期血圧はBMIの上昇に伴い上昇していた¹⁰⁾。しかしながら本研究における重回帰分析により、BMIは収縮期血圧の独立した危険因子であることが明らかになった。BMIはまた尿中TBARSおよびMGO排泄量増大の独立した危険因子であった。また尿中Na排泄量も尿中TBARSおよびMGO排泄量増大の独立した危険因子であった。

5. 肥満と新たな尿中カルボニル物質マーカーの開発

尿中カルボニル物質をDNPHで誘導体化しTLCで分離すると図5に示すようなバンドが得られた。矢印で示されているようにカルボニル物質が含まれていると考えられているバンド強度が尿検体ごとに異なっており、また他の検体とは異なるバンドを示していた尿検体もあった。同様にHPLCで分離すると図6に示すように多くのピークが観察され、約8.5分の所にMGO単体と同様のピークが観察された。



BMIは左から23, 16.1, 23.1, 25.6, 31.9の学生

図5：薄層クロマトグラフィによる尿検体の展開画像

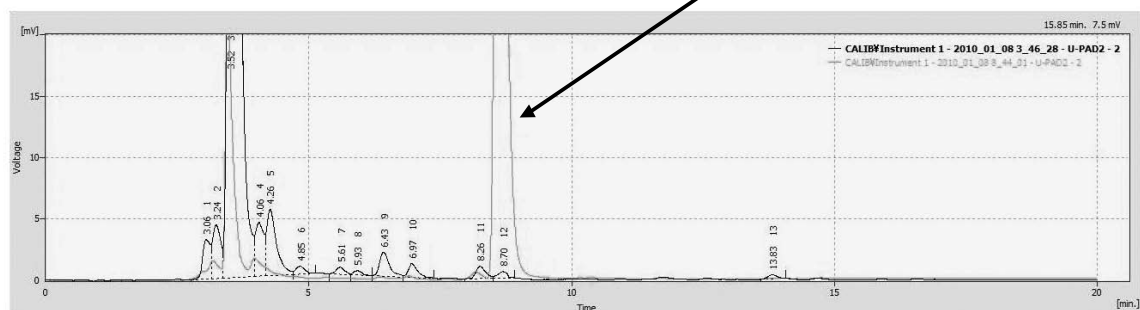
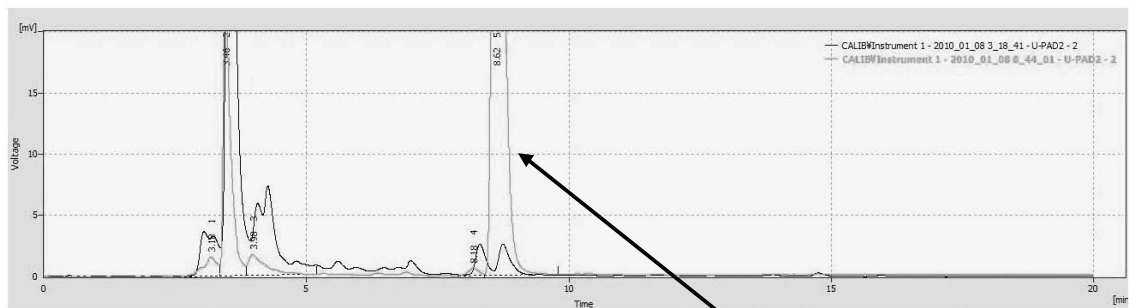


図6：高速液体クロマトグラフィによる尿検体の分析

考察

本研究では肥満学生におけるカルボニルストレスおよび酸化ストレスと高血圧との関連を検討した。糖尿病や高血圧、慢性腎臓病患者でカルボニルストレスの亢進が報告されているが、若年者を対象としたものは今までに報告されていない。したがって若年者の肥満においてカルボニルストレスが亢進している可能性を示した初めての研究となった。また肥満における高血圧と酸化ストレスとの関連については種々の報告があ

るが、学生で検討したものはほとんどない。その上、カルボニルストレスを加えた検討は例がなく、貴重な研究結果となった。

酸化ストレスと食塩感受性高血圧

酸化ストレスと食塩感受性高血圧との関係は多く研究されている^{11,12)}。食塩感受性高血圧ラットモデルの腎臓内では酸化ストレスが亢進しているが、これを抑制すると食塩感受性高血圧が改善することが報告され

ている^{11,12)}。また、高血圧でないラットの腎臓内の酸化ストレスを増やすと血圧は上昇する¹⁵⁾。この時、尿中の酸化ストレスマーカーも増加しており、尿中酸化ストレスの上昇は腎臓内酸化ストレスを反映している可能性が示唆された。

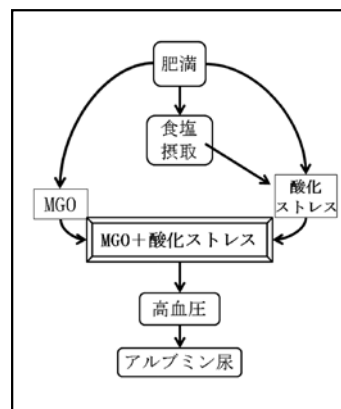
本研究における対象者では尿中の酸化ストレスマーカーと血圧との間に関連がみられた¹⁰⁾。酸化ストレスの高いBMI30以上の肥満学生では食塩摂取と収縮期血圧とに関連があり、BMI30未満では関連がみられなかった。これは肥満学生では食塩摂取が尿中酸化ストレスマーカーの上昇を介して収縮期血圧が上昇することが考えられ、食塩感受性高血圧の潜在が示唆された。これは肥満者で食塩感受性高血圧が多いことと一致する¹⁸⁾。

カルボニルストレスと食塩感受性高血圧

カルボニルストレスと食塩感受性高血圧に関して、ヒトでの報告はないが、我々は以前に動物実験で食塩感受性高血圧とカルボニルストレスの関係を検討している¹⁸⁾。MGOをラットに投与すると食塩感受性の高血圧を呈した。この時、尿中および腎臓内の酸化ストレスは亢進していた¹⁸⁾。これらの動物実験から、カルボニルストレスは食塩感受性高血圧に関与することが示されている。

本研究と同じ対象者における既報の報告ではBMI30以上の学生では尿中アルブミン排泄量が増大していた¹⁰⁾。アルブミン尿は高血圧に関係することが示されており、慢性腎臓病の進行や心血管病の発症の危険因子でもある。

これらをまとめると本研究でも食塩感受性高血圧の潜在が考えられた肥満学生では尿中TBARSおよびMGO排泄の増加が認められ、血圧が上昇していた。このことから動物実験同様、肥満学生では体内MGOの増加によりカルボニルストレスの上昇と酸化ストレスの亢進により食塩感受性高血圧の潜在、さらにアルブミン尿の亢進につながっている可能性が示唆された(図7)。



肥満が体内の酸化ストレスおよびカルボニルストレスを亢進させ、それらが血圧の上昇、さらにアルブミン尿の亢進につながるメカニズムが考えられた。

図7：本研究により想定されたメカニズム

肥満の病態とカルボニルストレス

なぜ肥満では体内のMGOが増加したのであるか。本研究からは肥満において尿中MGO排泄量の増加を特定することはできなかった。しかしながら、尿中TBARSとMGO排泄量はともに食塩摂取量と関連があったことから、過食による可能性が示唆された。加熱食品には多くカルボニル物質が含まれているが、肥満学生では食塩摂取も多かったことから、カルボニル摂取量も多いと予測される。このことから、体内MGOの増加には少なからずカルボニル摂取によるものが含まれると考えられる¹³⁾。しかしながら、BMIは食塩摂取量で補正してもなお尿中MGO排泄量増加の独立した危険因子であった。このことは摂取量のいかに関わらず肥満学生では尿中MGO排泄量の増加があり、体内で産生もしくは排泄の亢進が考えられる。中山らは慢性腎臓病の病期が上がる程、血漿MGO濃度が増加することを報告しているが、この病期には糸球体濾過率が深く関与する¹⁵⁾。肥満では一般に糸球体濾過率の上昇が知られていることから、MGOの体内産生の存在が考えられたが、今後の検討が必要であると考えられた。

肥満ではしばしば血糖を下げるホルモンであるインスリンに対し抵抗性を示すこと(インスリン抵抗性)が報告されている¹⁹⁾。インスリン抵抗性の増大は糖尿病の原因になる。我々はラットを用いた実験でカルボニルストレスがインスリン抵抗性を高めたことを確認

した¹⁸⁾。このインスリン抵抗性は酸化ストレスやカルボニルストレスの抑制剤で改善したことからカルボニルストレスを介した酸化ストレスの上昇が関与していると考えられた。本学の学生ではインスリン抵抗性について検討していないが、加熱食品の過剰摂取が体内カルボニルストレスの増加につながっているとすれば、これらを減らすことにより、将来の糖尿病発症を抑制する可能性が示唆された。

尿中生体情報マーカーの必要性と開発

我々が以前行った検討により¹⁰⁾、本学の肥満学生の一部において、すでに心血管病の危険因子が増えている可能性が明らかになっているが、肥満のみで心血管病の危険を伝えるのは困難である。その証拠に肥満の二次健診受診率は決して高くない³⁾。肥満に高血圧が伴えば心血管病の危険性は言えるかもしれない。しかしながら本学の一次健診では多くの学生を対象とするため、血圧測定の良い環境とは言えない。そのため、一次健診でスクリーニング可能な体内の危険を示唆する生体情報マーカーが必要と考えられる。血液検査ができればおのずと多くの生体情報が得られるが、本学の健診では血液採取は行っていない。尿を採取しているため、尿の生体情報が得られる。尿は血液に比べ侵襲性が少なく、簡便で有用な生体情報マーカーである。

我々は以前に高血圧を伴った糖尿病患者で尿中の酸化ストレスマーカーが降圧治療薬の効果を占い、治療効果を判定できるマーカーになることを報告した²⁰⁾。しかしながら動物実験同様、本学の学生のように若年者で病気をほとんどもたない状態では酸化ストレスマーカーのみで病態を占うことは困難なのかもしれない。このことから、我々はカルボニルストレスに着目し、その検出を行った。液体クロマトグラフィ／質量分析計を用いた尿中MGO濃度の測定はかなり高価な方法であり、本学の一次健診で用いることは困難である。そこで本研究ではカルボニル物質の簡便で安価な方法の開発を行っている。DNPHによりカルボニル物質を誘導体化して薄層クロマトグラフィで検出する方法はかなり安価であり、将来キット化できる可能性がある。学生の間にはバンド強度に差があり、またバンドの出現に個人差があることから、今後の条件検討

と特異的なバンドの検出により、肥満学生における病態の把握と生活指導に用いられると考えられた。

終わりに

若年者の肥満でもカルボニルストレスや酸化ストレスを介し、食塩感受性高血圧に関与している可能性が示された。尿は多くの生体情報を含んでおり、カルボニル物質も含まれている。尿は血液に比べ簡便で侵襲性の少ない生体材料であり、人数の多い集団健診に向いている。今後、多くのカルボニル物質から、生活習慣病や慢性腎臓病、心血管病を予測できるマーカーが発見され、安価で簡便な検査法を開発できることを期待している。

謝辞

本研究の一部は東北大学高等教育開発推進センター「平成21年度高等教育の開発推進に関する調査・研究経費」により研究を行うことができた。ここに深謝致します。

文献

- 1) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会:メタボリックシンドロームの定義と診断基準.日本内科学会雑誌. 94: 794-809. 2005
- 2) 日本糖尿病学会編. 糖尿病治療ガイド2008-2009. 文光堂
- 3) 平成20年度東北大学保健管理センター年報
- 4) Lobstein T, Jackson-Leach R. Estimated burden of paediatric obesity and co-morbidities in Europe. Part 2. Numbers of children with indicators of obesity-related disease. *International journal of pediatric obesity*. 2006; 1 (1):33-41
- 5) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会. 高血圧治療ガイドライン2009年版. 日本高血圧学会
- 6) 日本腎臓学会編, CKD診療ガイド, 東京医学社
- 7) Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough Pa, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW. American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High

- Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and prevention. *Circulation*. 2003; 108 (17) : 2154 – 69
- 8) Hilege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE, Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*. 2002; 106: 1777 – 82
- 9) Nakayama M, Metoki H, Terawaki H, Ohkubo T, Kikuya M, Sato T, Nakayama K, Asayama K, Inoue R, Hasjimoto J, Totsune K, Hoshi H, Ito S, Imai Y. Kidney dysfunction as a risk factor for first symptomatic stroke events in a general Japanese population-the Ohasama study. *Nephrology, dialysis, transplantation*. 2007; 22 (7) : 1910-5
- 10) 川俣彰裕他, 東北大学高等教育開発推進センター紀要. 2009; 4 : 235-243.
- 11) Mori T, Cowley AW Jr, Ito S. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: Physiological Role of Angiotensin II -Induced Oxidative Stress in Renal Medulla. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2006; 1: 2-8
- 12) Nakayama K, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S. Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol*. 2008; 28 (6): 871-8
- 13) Fay LB, Brevard H. Contribution of mass spectrometry to the study of the Maillard reaction in food. *Mass Spectrom Rev*. 2005; 24 (4): 487-507
- 14) Kawano Y, Tsuchihashi T, Matsuura H, Ando K, Fujita T, Ueshima H; Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension. Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (2) Assessment of salt intake in the management of hypertension. *Hypertens Res*. 2007; 30 (10) : 887-93
- 15) Taylor NE, Glocka P, Liang M, Cowley AW, Jr. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. *Hypertension*2006;47 (4): 692-8.
- 16) Makino A, Skelton MM, Zou AP, Roman RJ, Cowley AW, Jr. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension*2002; 39 (2 Pt 2) :667-72.
- 17) Chen J, Gu D, Huang J, Rao DC, Jaquish CE, Hixson JE, Chen CS, Chen J, Lu F, Hu D, Rice T, Kelly TN, Hamm LL, Whelton PK, He J; GenSalt Collaborative Research Group. Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *Lancet*. 2009; 373 (9666) : 829-35
- 18) Guo Q, Mori T, Jiang Y, Hu C, Osaki Y, Yoneki Y, Sun Y, Hosoya T, Kawamata A, Ogawa S, Nakayama M, Miyata T, Ito S. Methylglyoxal contributes to the development of insulin resistance and salt sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J Hypertens*2009;27 (8):1664-71.
- 19) Wasada T, Kasahara T, Wada J, Jimba S, Fujimaki R, Nakagami T, Iwamoto Y. Hepatic steatosis rather than visceral adiposity is more closely associated with insulin resistance in the early stage of obesity. *Metabolism*. 2008; 57 (7) : 980-5
- 20) Ogawa S, Mori T, Nako K, Kato T, Takeuchi K, Ito S. Angiotensin II type 1 receptor blockers reduce urinary oxidative stress markers in hypertensive diabetic nephropathy. *Hypertension*2006 Apr;47 (4) :699-705.