

## 過重労働下における体内代謝産物のメタボローム解析と ACS患者との比較検討

柴田 正行<sup>1)</sup>, 並木 淳郎<sup>1)</sup>, 吉竹功央<sup>1)</sup>, 酒井孝志郎<sup>1)</sup>  
山口 薫<sup>1)</sup>, 大沼 善正<sup>1)</sup>, 渡邊 則和<sup>1)</sup>, 近藤 武志<sup>1)</sup>  
木村 緑<sup>2)</sup>, 宮下みゆき<sup>2)</sup>, 宮澤瑠里子<sup>2)</sup>, 杉本 昌弘<sup>3)</sup>  
佐藤 譲<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>独立行政法人労働者健康安全機構関東労災病院循環器内科

<sup>2)</sup>独立行政法人労働者健康安全機構関東労災病院健康診断部

<sup>3)</sup>東京医科大学低侵襲医療開発総合センター

<sup>4)</sup>独立行政法人労働者健康安全機構関東労災病院

(2019年2月27日受付)

**要旨:**【目的】長時間労働によるストレスを定量的に評価する方法は画一化しておらず、また、それによる心血管イベントを予測するマーカーも明らかではない。今回、メタボローム解析手法を用い、その可能性を評価した。

【方法】対象は当院職員で、月に残業時間が80時間を越えた職員(Overwork:OW)、同一職員で45時間以内の時(Normal work:NW)、当院に搬送された急性冠症候群を発症した患者(Acute coronary syndrome:ACS)、また健康診断を受診した健常人(Healthy control:HC)を対照として登録した。各群でメタボローム解析(血漿、尿と唾液)と職業性ストレス、抑うつ傾向の評価を行った。

【結果】登録した職員は男性7人(平均年齢 $34.3 \pm 8.5$ 、医師5人、事務職員2人)。OW時で職業性ストレス、抑うつ傾向が高くなる傾向となった。ACS群は9人(平均年齢 $49.3 \pm 7.2$ )、HC群は11人(平均年齢 $55.4 \pm 6.0$ )が登録され、両群で職業性ストレス、抑うつ傾向に有意な差は認めなかった。メタボローム解析では、主成分分析、クラスター解析からNW、OW、ACS、HC、各群で類似したパターンを示した。血漿中でACS群とHC群で有意差を認めたのは、Arachidic acid, Lauric Acid等の脂肪酸とcis-Aconic acid, DL-malic acidの有機酸であり、これらはACS群で高値であった( $p < 0.05$ )。有意差はないものの、Arachidic acid, Linoleic acidなどはNW時に比べてOW時に高くなる傾向にあった。

【結論】ACS群では炎症に関係する脂肪酸の上昇を認め、これらはOW時にも高くなる傾向にあった。長時間労働によって、炎症反応が亢進され、ACS発症に関与している可能性が示唆された。今後、ACS群の中でも特に、職業性ストレスの高い症例と比較、検討する必要がある。

(日職災医誌, 67:406—415, 2019)

### —キーワード—

長時間労働, 急性冠症候群, メタボローム解析

### 1. はじめに

長時間労働による心臓・脳血管疾患発症の危険性については、これまでに数々の報告がなされており<sup>1)~3)</sup>、その予防・対策に先進国は日々施策を講じている。長時間労働が健康障害を起こす機序として、仕事時間の増加から、

仕事負荷を増加させる事、また仕事以外の時間の減少から、疲労回復時間を減少させる事で、仕事負荷/疲労回復のバランスを仕事負荷に傾かせ、健康問題を起こすと考えられる<sup>4)</sup>。この過程に、心理的負担、仕事の密度、夜勤、睡眠不足などの修飾因子と個人の動脈硬化素因、危険因子が付加され、時にそれは脳・心臓疾患として発症し、

その労働者と家族を路頭に迷わせる結果となる。

わが国では、長時間労働を是正するため 2000 年初めから長時間労働者への産業医の面接が義務化、さらには罰則こそないものの、その後には中小企業まで適応を拡大し、過重労働対策にとどまらず、産業保健において様々な施策を行ってきた。さらに 2014 年に長時間労働削減推進本部を設置、各企業への指導強化、国民への情報発信などを行い、その実態把握と改善に力を入れている。2018 年には働き方改革関連法案が国会で成立、長時間労働の是正に向け、高度プロフェッショナル技術者など例外を除き、残業時間の上限を決定した。

このような流れの中で、労働者の長時間労働は正と同時に必須、かつ重要な課題として、長時間労働による生体反応の変化、心理状態の変化を的確に評価・把握することが挙げられる。表面的に健康障害として現れる前に、生体内で起きている変化(悪循環に向かっている変化)が評価可能となれば、早期から治療介入が可能となるのである。労働者の過労あるいはストレスの評価は問診、質問票を用いた心理面からの評価が中心となっているが、その客観的な解釈、あるいは実際の生体内での変化を捉えることは一つの手法では難しい。心理面以外のアプローチ法としては、疲労マーカーとしてアミラーゼ活性などの自律神経系指標<sup>5)</sup>、ストレスマーカーとしてカテコールアミン、コルチゾール、DHEA-S<sup>6)</sup>、酸化ストレスである 8-OHdG<sup>7)</sup>などが挙げられるものの、定量化、指標化に関し、確証が得られたマーカーは明らかではなかった。近年ではメタボローム解析を用いた新しい手法により、慢性疲労状態でアミノ酸代謝とオルニチンやシトルリンなど、肝機能との相関が考えられる物質の変化が認められるといった報告や<sup>8)9)</sup>、さらに慢性疲労状態と筋痛性脳脊髄炎ではヘムや核酸経路の物質の変化といった代謝系の指標が新たに報告されている<sup>10)</sup>。

メタボロームとは代謝物(メタボライト)の総体を指す呼称である。生体内には核酸(DNA)やタンパク質のほかに、糖、有機酸、アミノ酸、ペプチドなど多くの低分子が存在し、これらが代謝物に該当する。細胞の働きを理解するとき、DNA 配列の網羅的解析(ゲノム解析)、mRNA の網羅的発現解析(トランスクリプトーム解析)、タンパク質の網羅的定量解析(プロテオーム解析)に加えて、この代謝物質の網羅的定量解析(メタボローム解析)が重要であると言われている。なぜなら DNA 上の遺伝子レベルでの変化だけでは特定の疾病の発症リスクが予測できても、現在発症の有無は分からないからである。一方、表現型に近いメタボローム解析によって現在発症しているか、あるいはその余地があるかを検知できると考えられ、今までに血中アミノ酸パターンの異常による糖尿病発症、心血管系の発症、がんの罹患状態など、観測可能な代謝物から生体内の状態をモニタリングする研究が数々報告されている<sup>11)~13)</sup>。

以上の背景を踏まえ、本研究は労働者の長時間労働における体液のメタボローム解析を用い、その変化と特徴を明らかにすることが第一の目的である。この結果から、過重労働の初期の変化を評価可能な定量的マーカーの可能性を探る。さらに急性冠症候群を発症した患者と比較・検討を行い、長時間労働による最も重大な合併症である心血管疾患に至る予測因子、関係因子となり得るマーカーの推測が可能であるか評価を行ったので、結果を以下に報告する。

## II. 対象と方法

### 1) 対象

今回の研究では、①として、残業時間の多い当院職員に協力を仰ぎ、個人差による影響を避ける為に、同一者で直近の残業時間が月に 45 時間以内の時(Normal work : NW)と、80 時間以上の時(Overwork : OW)で体内代謝産物の網羅的解析(メタボローム解析)を行った。対象は冠危険因子がない者で、両者の測定は二カ月以上空けて行った。

また、②として、当院を受診した急性冠症候群(Acute Coronary Syndrome : ACS)を発症した 60 歳以下の勤労者に対しても、体内代謝産物のメタボローム解析を行った。ACS 発症による体内変化をより正確に把握する目的で、経皮的冠動脈形成術あるいは薬物加療を行った後の退院時にも測定を行った(post ACS)。この群の対照として、当院の健康診断部を受診する、急性冠症候群と年齢をマッチングさせたコントロール群(Healthy control : HC)を登録した。②の対象者は検査時あるいは入院直近一カ月の残業時間をアンケートにより評価した。

両群の対象者であるが、高血圧、脂質異常症、糖尿病、高尿酸血症については、診断の上、内服加療されている者と定義した。

両群ともに性別による代謝系への影響を考慮して、男性のみを対象とした。

### 2) 方法

朝食前に採血と採尿、唾液の摂取、さらに血圧、脈拍の測定を行った(ACS 群は来院時と退院時の二回、健康診断群は受診時)。採血は血算、血糖と血清採血管及び EDTA-2Na 入りの採血管で行い、血清は遠心分離後に上澄み(血清)を採取、迅速に $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存。EDTA-2Na 入りの採血管は冷却遠心分離させ上澄み(血漿)を採取、 $-80^{\circ}\text{C}$ で冷蔵保存。唾液、尿は採取後に迅速に $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

採血項目は血算(白血球)、尿素窒素(Bun)、クレアチニン(Cr)、尿酸(UA)、総コレステロール(T-Chol)、LDL コレステロール(LDL)、HDL コレステロール(HDL)、中性脂肪(TG)、GOT、GPT、LDH、クレアチンキナーゼ(CK)、血糖(BS)、CRP を測定した。

①、②両群で仕事のストレスは Job Content

表1 登録した職員の特性

	Normal	Overwork	P value
年齢	33.9±7.5		
BMI	21.4±1.6		
収縮期血圧 (mmHg)	114.8±6.4	116±10.2	0.936
拡張期血圧 (mmHg)	74.3±11.9	70.7±7.4	0.420
脈拍 (bpm)	72.5±12.2	73.2±9.4	0.873
白血球 (X10 <sup>3</sup> /μL)	5.38±1.2	5.96±1.9	0.583
Bun (mg/dL)	15.3±2.8	13±1.9	0.139
Cr (mg/dL)	0.90±0.1	0.90±0.1	0.170
UA (mg/dL)	6.6±0.3	6.3±0.8	0.220
T-Chol. (mg/dL)	188.8±13.3	194.2±25.9	0.715
LDL (mg/dL)	117.6±12.1	111.1±15.1	0.721
HDL (mg/dL)	58.9±9.4	63.7±19.5	0.943
TG (mg/dL)	118.6±76.8	140.7±58.5	0.667
GOT (U/L)	21.1±2.8	21.5±2.9	0.886
GPT (U/L)	21.4±6.2	22.8±8.6	0.829
LDH (U/L)	168.8±28.0	165±23.2	0.715
CK (U/L)	128.7±50.9	126.2±35.3	0.740
BS (mg/dL)	102.8±13.0	98.6±11.9	0.582
CRP (mg/dL)	0.042±0.023	0.082±0.144	0.157

Questionnaire-22 (JCQ) 調査票を用いた<sup>14)</sup>. JCQ-22 は Job demand-control model に職場のサポートの尺度が付け加えられた demand-control-support model に基づく調査票である. 仕事の要求度 5 項目, 仕事のコントロール 9 項目, 職場のサポートについては, 上司からのサポート 4 項目, 同僚からのサポート 4 項目からなる. 仕事の要求度が高く, 仕事のコントロールが低いほど, 心理社会的ストレスが高いとされている<sup>15)</sup>. また, これらから求められる, Job demand の値を Job control の値で除したものを Job strain index として, 職業性ストレスの目安とした. また, 抑うつ判定は Self-rating depression scale (SDS) 試験を用い, 40 点以上は抑うつ傾向ありと判断した<sup>16)17)</sup>.

### 3) メタボローム解析

血漿, 唾液と尿は (株) サリバテック社で解析が行われた.

脂肪酸分析に関し, 検体 30μl に対し内部標準物質 (ヘプタデカノイック酸) 0.222μM を含むイソプロパノールを 270μl 添加し, 混合した. 遠心分離後, 上清を取り出し, 減圧乾固させ, クロロホルム:メタノール:水 (1:2:0.5) 混合溶液で再溶解し, 液体クロマトグラフィー・三重四重極質量分析にて分析を行った.

有機酸分析に関し, 検体 20μl に対し内部標準物質 (クエン酸) 4.4μM を含むメタノールを 180μl 添加し, 混合した. 遠心分離後, 上清を取り出し, 減圧乾固させ, 超純水 40μl で再溶解し, 同様に液体クロマトグラフィー・三重四重極質量分析にて分析を行った.

### 4) 統計解析

統計処理は (株) 社会情報サービス社のエクセル統計と GraphPad Prism (ver. 7.0.3 GraphPad Software, Inc) を使用した. 結果は平均値±標準偏差で示した. 同一症例

表2 登録した職員の JCQ-22, SDS 評価結果

JCQ/SDS	Normal	Overwork	P value
Job control	68.9±4.3	68.3±5.0	0.895
Job demand	20.0±4.3	22.7±4.2	0.404
Supervisor support	13.0±2.2	12.1±1.9	0.739
Coworker support	12.9±2.3	12.4±2.1	0.831
Job strain index	0.29±0.075	0.3±0.059	0.180
SDS	35.9±5.9	43.3±7.4	0.073

から採取したマッチしたサンプル間は Wilcoxon matched 検定, それ以外は Mann-Whitney 検定を行い, ともに P<0.05 を有意とした. また主成分分析, クラスタ解析には JMP Pro(ver.14.1.0, SAS Institute Inc.) を使用した.

### 5) 倫理的配慮

研究協力者には研究の趣旨, データの利用法などについて説明を行い, 文書による同意を得た. なお, この研究は関東労災病院の研究倫理審査委員会で承認を得た (承認番号 2017-15).

## III. 結果

### 1) 対象者の特性と JCQ, SDS スコア

①今回登録した残業時間が多かった当院職員は男性医師 5 人, 男性事務職 2 人の計 7 人 (平均年齢 34.3±8.5). 表 1 に NW, OW 時の血液検査データを示す. 各データには有意差は認めなかった. 表 2 には JCQ, SDS のデータを示す. 仕事の要求度, 仕事のコントロール, 職場のサポート, 上司からのサポート, 同僚からのサポートに NW, OW 時で有意差は認めない. さらに, SDS でも有意差は認めなかった. 図 1 には縦軸に SDS, 横軸に Job strain index をプロットした職業性ストレスの評価分類であるが, OW 時では NW 時に比べ, 右上方に推移する傾向にあり, OW 時で職業ストレスが高くなる傾向を認めた.

②ACS 群は男性 9 人 (平均年齢 49.3±7.2), HC 群は男性 11 人 (平均年齢 55.4±6.0) が登録された. 冠危険因子では, 高血圧, 脂質異常症, 喫煙が有意に ACS 群で高かった. さらに収縮期血圧, 拡張期血圧, 中性脂肪, 血糖は ACS 群で有意に高く, 総コレステロール, LDL コレステロール, HDL コレステロールは逆に HC 群で有意に高値であった. 45 時間以上の残業時間に両群で有意差を認めなかった (表 3). JCQ では, 仕事の要求度, 仕事のコントロール, 職場のサポート, 上司からのサポート, 同僚からのサポートに両群で有意差は認めない. さらに, SDS でも有意差は認めなかった (表 4). 図 2 に SDS と Job strain index の関係を示す. 今回の検討では, 両群での明らかな差異は認めない.

### 2) メタボローム解析

図 3 に, 今回同定され, 測定できた全代謝物質の濃度



図1 SDS/Job strain index を用いた職業性ストレス分類 (Normal work vs. Overwork)

表3 登録した急性冠症候群, 健康診断群の特性

	ACS (n=9)	HC (n=11)	P value
年齢	49.3±7.2	55.4±6.0	0.05
BMI	24.6±4.6	24.6±3.4	0.970
高血圧 (%)	11.1	0	0.45
脂質異常症 (%)	11.1	9.1	1.0
糖尿病 (%)	11.1	0	0.45
高尿酸血症 (%)	11.1	0	0.45
喫煙 (%)	88.9	36.4	<0.05
45 時間以上の残業 (%)	11.1	45.5	0.104
収縮期血圧 (mmHg)	153.3±33.3	112.3±13.6	<0.05
拡張期血圧 (mmHg)	108.8±19.2	66.3±9.3	<0.001
脈拍 (bpm)	72.9±24.8	57±8.9	0.063
白血球 (X10 <sup>3</sup> /μL)	9.34±2.2	5.37±1.1	<0.001
Bun (mg/dL)	16.2±4.8	14.3±6.9	0.480
Cr (mg/dL)	0.907±0.13	0.899±0.06	0.869
UA (mg/dL)	6.6±2.6	5.9±1.2	0.396
T-Chol. (mg/dL)	182.2±27.9	215.3±30.1	<0.05
LDL (mg/dL)	109.7±20.7	142.5±25.8	<0.05
HDL (mg/dL)	43.3±11.4	62.8±13.7	<0.05
TG (mg/dL)	283.9±24.5	103.6±34.7	<0.05
GOT (U/L)	37.1±32.4	22.8±7.1	0.168
GPT (U/L)	22.9±13.4	33.1±21.2	0.227
LDH (U/L)	228.2±116.7	176.4±17.3	0.161
CK (U/L)	200±167	121±45.7	0.091
BS (mg/dL)	134.4±26.3	100.6±10.3	<0.05
CRP (mg/dL)	0.637±1.73	0.072±0.12	0.291

パターンを示す。図 3A は主成分分析の Score plots で、1つのプロットが1つのサンプルを示す。測定できた代謝物の濃度パターンが類似している場合プロットの位置が近くなる。ACS 群が突出して図の右側の方 (= 主成分 1 が正の部分) にプロットが広がっており、他の群と違うパターンを示していることがわかる。また分布の広さから個人差も大きい。HC 群や NW 時はオーバーラップす

表4 登録した急性冠症候群, 健康診断群の JCQ-22, SDS 評価結果

JCQ/SDS	ACS	HC	P value
Job control	74.7±47.6	66±12.1	0.139
Job demand	17.8±2.3	20±5.8	0.589
Supervisor support	10.5±4.1	10.3±2.7	1.0
Coworker support	10.5±2.1	10.8±1.5	1.0
Job strain index	0.24±0.039	0.32±0.163	0.216
SDS	41±11.3	38.2±11.3	0.442

る部分が多い。OW 時や Post ACS は下の部分 (= 主成分 2 が負の部分) にプロットが集まっている。これらの症例の濃度パターンが類似していることが観測できる。

クラスター解析 (図 3B) でも同様の傾向がみられる。3 症例の ACS が上部に集まっており、大きく他のクラスターとしては濃度パターンが異なる。他、OW 時と Post-ACS は比較的上部、その他の群が下部に集まっており、おおむね主成分分析と同様の結果であることがわかる。このように、ACS や Overwork の影響は単一物質の変化だけでなく、多変数に影響がでており、代謝全体にその変化が表れていることが観測できる。

図 4 には血漿中で同定され、測定可能であったメタボライトで、ACS 群と HC 群間で統計的な有意差のあった物質に関して絶対濃度を示す。また両群間に NW 時、OW 時も併記する。Arachidic acid (C20:0) 以外の全ての物質で ACS 群では、HC 群に比べて有意に高く、退院時 (post ACS) に濃度が低下していることがわかる。例えば、Adrenic acid (C22:4) では、箱ひげで OW 時と NW 時を比較すると、最大値は NW 時が高いものの、中央値は OW 時が高くなっている。Lauric Acid (C12:0)

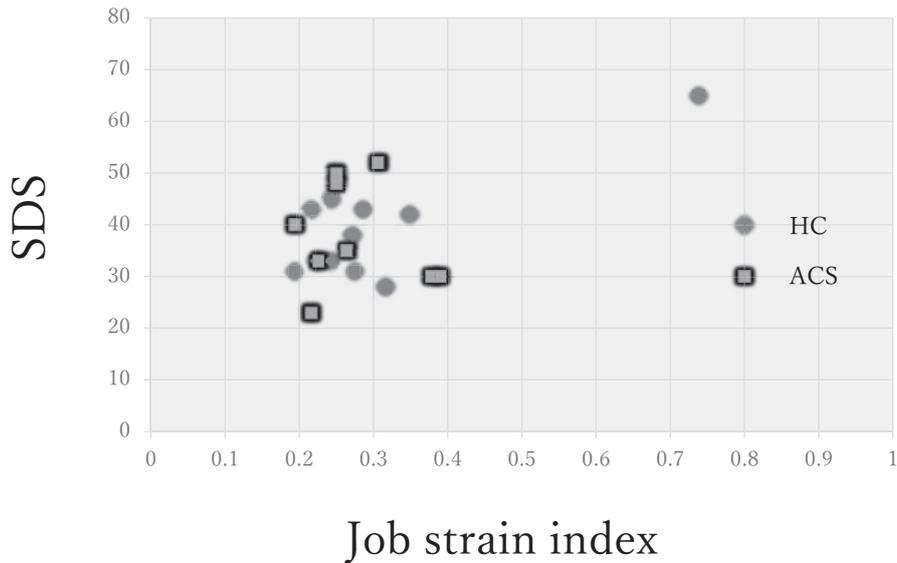


図2 SDS/Job strain index を用いた職業性ストレス分類 (HC vs. ACS)

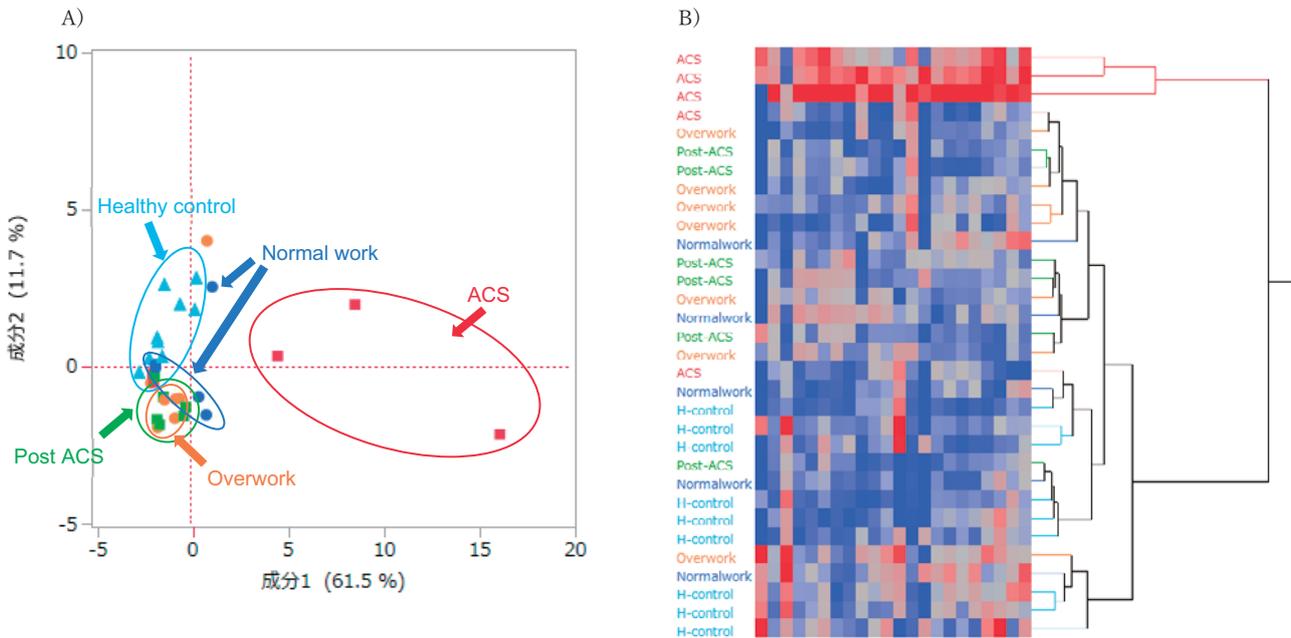


図3 血漿中の代謝物濃度パターンの類似性. A) 主成分分析の Score plots. 1つのプロットは1サンプルを表す. 第一主成分は60.8%, 第2主成分は11.6%の寄与度. B) クラスター解析. 赤色は相対的に濃度が高く, 青色は相対的に濃度が高い. 濃度パターンの類似性が高いものが隣り合うように検体と代謝物の両方を並べている.

も同様に, NW 時よりも OW 時で濃度が高い. このような物質が長時間労働による生体内の変化, あるいは ACS のマーカーである可能性が高いと考えられ, 今後症例数を増やしてこの傾向が汎用的なものかを観測する必要がある. さらに有機酸である cis-Aconic acid, DL-malic acid の ACS 群での有意な上昇を認めたが, NW, OW 時は有意な変化は認めなかった. 図5には血漿中に認め, 唾液と尿検体でも観測可能であった Arachidonic acid (C20:4) と Lauric acid (C12:0) の定量結果を示す. Arachidonic acid (C20:4) は唾液では血漿と同様の動向を示

し, 尿では ACS 群以外は感度以下であった. 興味深いことに Lauric acid (C12:0) は唾液, 尿検体では血漿と逆の動向を示している.

#### IV. 考 察

1型糖尿病や先天性代謝異常のような遺伝子変異が原因となる疾患では上流のゲノム解析が適している一方, 『長時間労働による生体変化』では遺伝的要因より過労によるストレス, 職場でのストレスなどの環境要因が大きく関与しており, メタボローム解析は生体内の現在の状

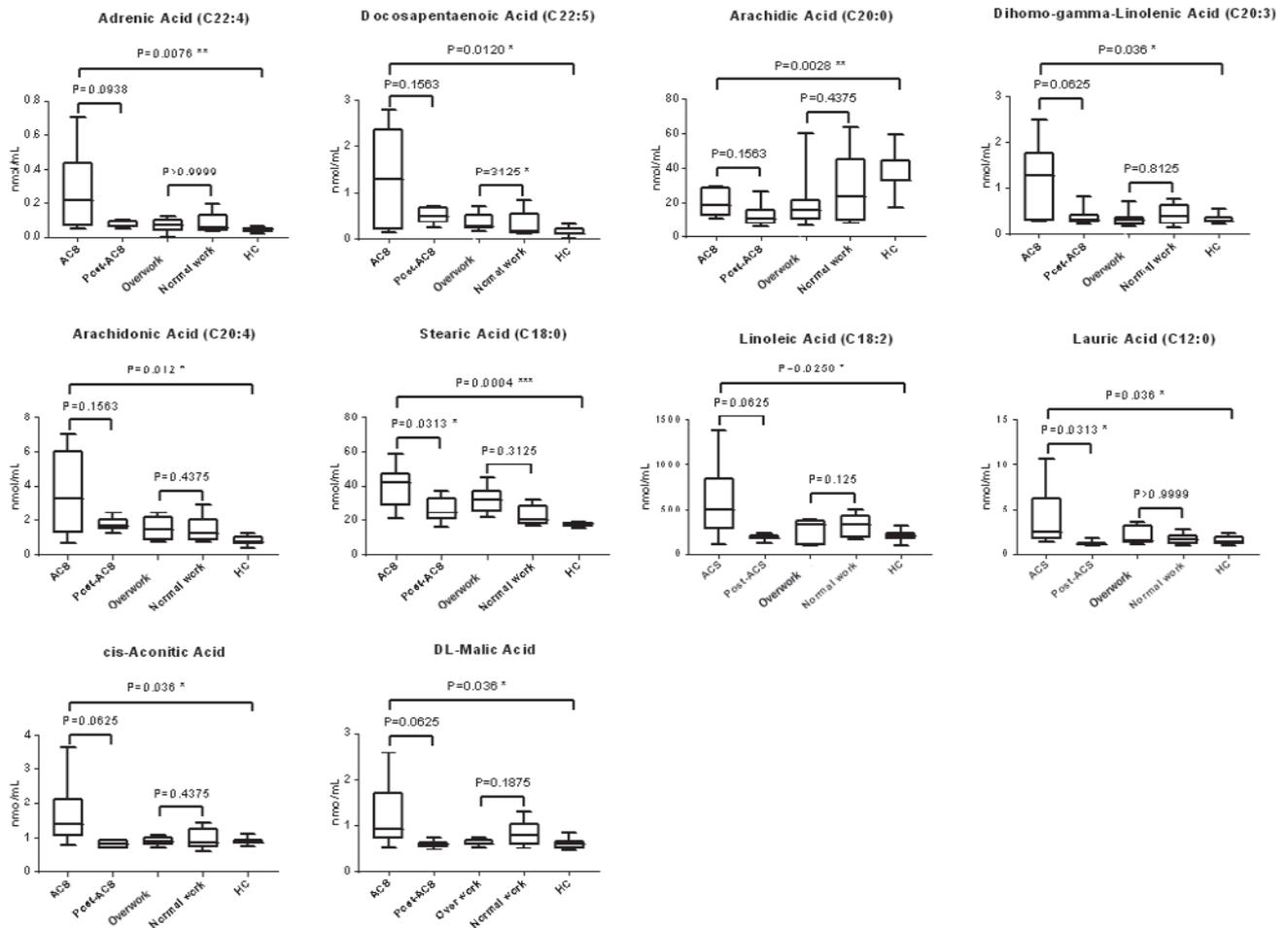


図4 血漿中の代謝物の定量結果 (ACS, post-ACS, Overwork, Normal work, HC 各群の比較)。それぞれのデータは Box-Whisker 形式で示す。ひげは最大値・最小値、箱は4分位を示す。

況を表す、いわば表現型に近い分野であり、遺伝子変異さらには環境要因などの複合的な結果を交えた回答が得られる、という特徴を持つ新しい診断技術といえる。

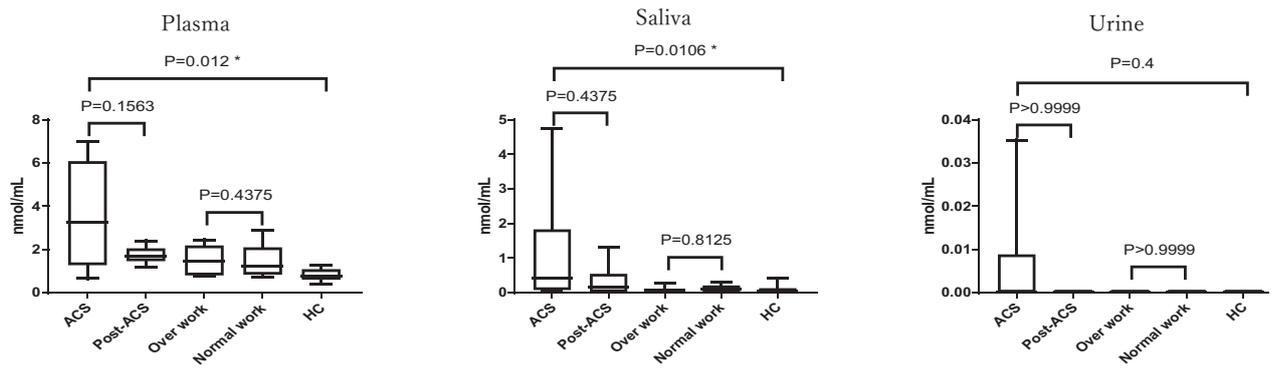
長時間労働による心臓・脳血管疾患発症の危険性については明らかに関連性があり<sup>1)~4)</sup>、交感神経の活性<sup>8)</sup>、血圧と脈拍の上昇<sup>19)</sup>など炎症が活性化され、動脈硬化が惹起、進展することが関与していると考えられている。職業性ストレスと動脈硬化の観点から考察すると、Takaiらは<sup>5)</sup>、567名の勤労者を対象としてJQCモデルによって評価した職業性ストレスと酸化ストレスの臨床指標(尿中過酸化水素、8-OHdG)との関連を報告している。他にも、精神的ストレスを負荷したラットにおいては、動脈硬化危険因子である酸化LDLの受容体であるレクチン様酸化LDL受容体(lectin-like oxidized LDL receptor-1: LOX-1)の発現が上昇することが報告され<sup>20)</sup>、さらにhumanでもLOX-1が冠動脈疾患に関与するという報告がある<sup>21)</sup>。これらは、長時間労働、あるいはそれから誘導される社会心理的、職業性のストレスが動脈硬化と関連することを示唆している。

本研究では、残業時間が多い時、少ない時を比べ血液

データあるいはJQCとSDSのデータ上での明らかな差異は認めなかったが、図1、職業性ストレスの評価分類ではOW群で右上方への偏移を認め、長時間労働による職業性ストレスの負荷が疑われた。また、今回登録したACS群では、高血圧、脂質異常症、喫煙といった冠危険因子はHC群に比べ有意に高く、血圧、中性脂肪と血糖の有意な上昇と、LDL、HDLコレステロールの有意な低下を認めた。両群間で高血圧、脂質異常症、糖尿病の罹患率に差はなく、血圧、血糖は急性期の病態と考え矛盾はないと考えられ、それ以外の高血圧、脂質異常症、喫煙はACS発症のトリガーに関係していると考えられる。ACS群での残業時間、さらにJQC、SDSからは何れもHC群と比べ有意な変化はなく、職業性ストレスの評価分類も明らかな変化は認めなかった。

メタボローム解析の結果、主成分分析とクラスター解析から、ACS群とHC群および、NW、OW時では各群において類似した生体内の代謝パターンが今回明らかとなった。同定可能であった、有意な差を認めた脂肪酸はArachidic acidを除き、ACS群ではHC群に比べ有意に高かった。退院時にはArachidic acidを含め、その何れも

## A) Arachidonic Acid(C20:4)の定量結果



## B) Lauric Acid (C12:0)の定量結果

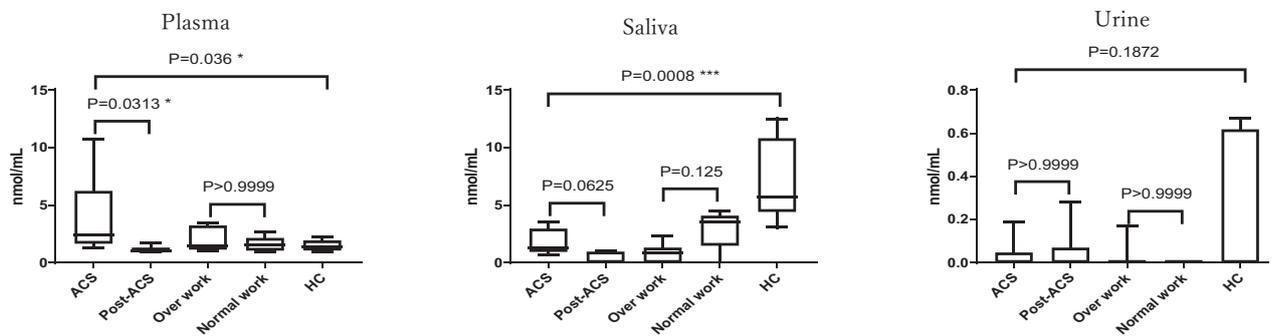


図5 血漿、唾液、尿中の代謝物の定量結果 (ACS, post-ACS, Overwork, Normal work, HC 各群の比較). それぞれのデータは Box-Whisker 形式で示す. ひげは最大値・最小値, 箱は4分位を示す. A) Arachidonic Acid (C20:4) の定量結果, B) Lauric Acid (C12:0) の定量結果

低下する傾向にあった. これらは OW, NW 時では有意差はないものの, Adrenic acid, Docosapentaenoic acid, Arachidonic acid, Stearic acid, Linoleic acid は, NW 時に比べ OW 時に高くなる傾向を認めた.

J. Teulら<sup>22)</sup>は19人のACS患者において, メタボローム解析を用いて脂質のターゲット分析を行い, 21の脂肪酸についてACSでの上昇を認めたことを報告しており, 今回の我々の結果と比較し, Adrenic acid, Lauric acid 以外は同じ結果となっている. 脂肪酸のACSによる上昇は, 心筋細胞のbreak downと虚血による酸素不足に対応した代謝反応から説明できる<sup>23)</sup>. すなわち, 酸素不足が進行するとカテコールアミンが上昇, さらに虚血のストレスはコルチゾールをも上昇させ, これらはインスリン感受性を低下させる. インスリン抵抗性は脂肪組織に働き, インスリンシグナリングを変化させ脂肪分解と脂肪酸の放出が誘導されると考えられる. また, 脂肪酸の機能として, 生体膜の構成成分の他にエネルギー源, ホルモンや細胞内シグナルとして作用するほか, Arachidonic acid, Dihomo-gamma-linolenic acid は $\omega$ -6脂肪酸として動脈硬化の進展・抑制過程に関与しており<sup>24)25)</sup>, さらには脂肪酸の高いレベル自体が, 動脈硬化と関連し,

急性冠症候群のリスクと報告されている<sup>26)</sup>. Lauric acid は抗炎症作用を持つ飽和脂肪酸であり, 動脈硬化に対しては抑制的に働くと考えられる<sup>27)</sup>. このような個々の脂肪酸の作用と今回の結果を考えると, ACSの病態による変化の中で, どれほど長時間労働との関連があるかを評価するためには, ACS群の中からストレスあるいは残業時間の多い患者に絞り, さらに解析を行うことが必要と考える. Arachidonic acid, Lauric acid は尿と唾液でも検出され, Lauric acid は, 唾液では血漿, 尿とは逆にACS群に比べHC群で高値となった. 血漿と唾液での検査データの乖離はよく認められる反応であるが, これに有意差を認めた代謝物が同定できたことは, 血液検体を用いた探索だけでなく, 尿・唾液といった非侵襲に採取できる検体での有用性が考えられ, 将来的に, 医療機関でない場所(職場など)でも定期的な検査が受けられるようになることが期待され, その意義は非常に大きいと考えられた.

有機酸の分析結果からは, ACS群においてTCA回路に関係する代謝物の有意な上昇を認めた. 慢性疲労症候群のより網羅的な解析によりACSと同様, 代謝ネットワーク全体として様々な変化があることが報告され, こ

れらはミトコンドリアに対する高い代謝的なストレスがかかっている可能性を示唆しており、今後は職業性ストレス、抑うつの高い群を抽出するなど、さらに検討する必要がある<sup>28)</sup>。

本研究の限界：長時間労働が脳、心臓疾患のリスクとなるのは明らかであるが、健康障害をきたす原因として、長時間の労働以外にも仕事に対するやりがい、満足度、その質なども影響する。今研究では、それらの評価を行う症例が現段階では不十分である。しかし、その中でもメタボローム解析という新しい診断技術により、単純に残業時間が長い群で、差異を認める代謝物の存在する可能性が示唆されたことは意味があると考えている。今後は対象症例を追加してさらに解析を行っていく必要がある。ACS 群と HC 群では、その登録状況により年齢のマッチングが困難であったが、現在は HC 群の登録を増やしたことにより今後は解消される問題と考えている。

## V. 結 語

今回、我々はメタボローム解析を用いて長時間労働者と急性冠症候群を発症した群でその特徴を明らかにした。要約すると、ACS 群で脂肪酸と有機酸が健康診断群に比較し有意に上昇しており、その一部は残業時間の多い時で上昇傾向を認めた。また、主成分分析とクラスター解析から、ACS 群、健康診断群、残業時間が長い時、少ない時では各々同様の代謝物のパターンを示し、代謝全体にその変化が表れていることが明らかとなった。本研究は前段階であるが、特に有意差を認めた Arachidonic acid を中心に、その下流に存在するエイコサノイド、例えばプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどの代謝経路を中心に詳細な解析を行う必要がある。その中で、長時間労働による過労、ストレスマーカー、特に ACS 発症と関係するマーカーの検索を行っていく予定である。

謝辞：本研究において、協力していただいた患者、健康診断受診者、および当院循環器内科スタッフ、救急室看護師、CRC 職員、また検査室のスタッフに深く感謝するものである。なお、本研究は労働者健康安全機構の助成を受けて行われた。

利益相反：利益相反基準に該当無し

## 文 献

- 1) Sokejima S, Kagamimori S: Working hours as a risk factor for acute myocardial infarction in Japan: case-control study. *BMJ* 317: 775—780, 1998.
- 2) Kivimaki M, Jokela M, Nyberg S, et al: Long working hours and risk of coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis of published and unpublished data for 603838 individuals. *Lancet* 386: 1739—1746, 2015.
- 3) Virtanen M, Heikkila K, Kivimaki M, et al: Long Working Hours and Coronary Heart Disease: A Systematic Review

- and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 176: 586—596, 2012.
- 4) Caruso CC, Bushnell T, Vila B, et al: Long working hours, safety, and health: toward a National Research Agenda. *Am J Ind Med* 49: 930—942, 2007.
- 5) Takai N, Yamaguchi M, Nishikawa Y, et al: Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch Oral Biol* 49: 963—968, 2004.
- 6) Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY: Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 20: 329—335, 1983.
- 7) Jiro T: Associations of job stress indicators with oxidative biomarkers in Japanese men and women. *Int J Environ Res Public Health* 10: 6662—6671, 2013.
- 8) Mizuno K, Tanaka M, Watanabe Y, et al: Mental fatigue-induced decrease in levels of several plasma amino acids. *J Neural Transm* 114: 555—561, 2007.
- 9) Yamano E, Sugimoto M, Kataoka Y, et al: Index markers of chronic fatigue syndrome with dysfunction of TCA and urea cycles. *Sci Rep* 6: 34990, 2016.
- 10) Germain A, Ruppert D, Levine SM, Hanson MR: Prospective Biomarkers from Plasma Metabolomics of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome Implicate Redox Imbalance in Disease Symptomatology. *Metabolites* 8 (4): 90, 2018.
- 11) Wang TJ, Larson MG, Gerszten RE, et al: Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17: 448—453, 2011.
- 12) Kordalewska M, Markuszewski MJ: Metabolomics in cardiovascular diseases. *J Pharm Biomed Anal* 113: 121—136, 2015.
- 13) Sreekumar A, Poisson LM, Chinnaiyan AM, et al: Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457: 910—914, 2009.
- 14) Kawakami N, Kobayashi F, Furui H, et al: Assessment of job stress dimensions based on the job demands-control model of employees of telecommunication and electric power companies in Japan: reliability and validity of the Japanese version of the Job Content Questionnaire. *Int J Behav Med* 2 (4): 358—375, 1995.
- 15) Karasek RA: Job demand, job decision latitude, and mental strain: implications for job redesign. *Adm Sci Quart* 24: 285—308, 1979.
- 16) Inoue N, Otsui K, Takei A, et al: A Simultaneous Evaluation of Occupational Stress and Depression in Patients with Lifestyle-related Diseases. *Intern Med* 55 (9): 1071—1075, 2016.
- 17) 福山和恵, 吉岡隆之, 井上信孝, 他: 生活習慣病症例における、職業性ストレスと精神的ストレスとの関連—過労死予防の観点から—。 *日職業災害医誌* 64: 255—259, 2016.
- 18) Kageyama T, Nishikido N, Kabuto M, et al: Commuting, overtime, and cardiac autonomic activity in Tokyo. *Lancet* 350: 639, 1997.
- 19) Iwasaki K, Sasaki T, Oka T, Hisanaga N: Effect of working hours on biological functions related to cardiovascular system among salesmen in a machinery manufacturing company. *Ind health* 36: 361—367, 1998.
- 20) Andersson IJ, Sankaralingam S, Davidge ST: Restraint stress up-regulates lectin-like oxidized low-density lipopro-

- tein receptor-1 in aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Stress* 13 (5): 454—460, 2010.
- 21) Inoue N, Okamura T, Sawamura T, et al: LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin Chemistry* 56: 550—558, 2010.
- 22) Teul J, Garcia A, Ruperez FJ, et al: Targeted and non-targeted metabolic time trajectory in plasma of patients after acute coronary syndrome. *J Pharmaceut Biomed* 56: 343—351, 2011.
- 23) Sera EA, Mohamed AF, Mohamed ZG, et al: A comparative metabolomics approach reveals early biomarkers for metabolic response to acute myocardial infarction. *Sci Rep* 6: 36359, 2016.
- 24) Zu L, Guo G, Zhou B, Gao W: Relationship between metabolites of arachidonic acid and prognosis in patients with acute coronary syndrome. *Thrombus Res* 144: 192—201, 2016.
- 25) Ouchi S, Miyazaki T, Daida H, et al: Decreased circulating dihomo-gamma-linolenic acid levels are associated with total mortality in patients with acute cardiovascular disease and acute decompensated heart failure. *Lipids in Health and Disease* 16: 150, 2017.
- 26) Dariush M: Free fatty acid, cardiovascular mortality, and cardiometabolic stress. *Eur Heart J* 28: 2699—2700, 2007.
- 27) Intahphuak S, Khonsung P, Panthong A: Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. *Pharmaceutical Biology* 48: 151—157, 2010.
- 28) Nagy-Szakal D, Barupal DK, Lipkin WI, et al: Insights into myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome phenotypes through comprehensive metabolomics. *Sci Rep* 8 (1): 10056, 2018.
- 
- 別刷請求先** 〒211-8510 神奈川県川崎市中原区木月住吉町1-1  
独立行政法人労働者健康安全機構関東労災病院  
循環器内科  
柴田 正行
- Reprint request:**  
Masayuki Shibata  
Department of Cardiovascular Medicine, Kanto Rosai Hospital, 1-1, Kizukisumiyoshi-cho, Nakahara-ku, Kawasaki City, Kanagawa Prefecture, 211-8510, Japan

## Overwork and Acute Coronary Syndrome Patients-Related Changes in Plasma Metabolomics

Masayuki Shibata<sup>1)</sup>, Atsuo Namiki<sup>1)</sup>, Koichi Yoshitake<sup>1)</sup>, Koushiro Sakai<sup>1)</sup>, Kaoru Yamaguchi<sup>1)</sup>,  
Yoshimasa Onuma<sup>1)</sup>, Norikazu Watanabe<sup>1)</sup>, Takeshi Kondo<sup>1)</sup>, Midori Kimura<sup>2)</sup>, Miyuki Miyashita<sup>2)</sup>,  
Ruriko Miyazawa<sup>2)</sup>, Masahiro Sugimoto<sup>3)</sup> and Yuzuru Sato<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Kanto Rosai Hospital

<sup>2)</sup>Health Administration Center, Kanto Rosai Hospital

<sup>3)</sup>Health Promotion and Preemptive Medicine, Research and Development Center for Minimally Invasive Therapies,  
Tokyo Medical University

<sup>4)</sup>Kanto Rosai Hospital

**【Background】** Long working hours have been implicated in the cause of cardiovascular disease, yet the underlying mechanisms are not well understood.

**【Objective】** To discover possible biomarkers to predict a cardiovascular event caused by overwork using metabolome analysis.

**【Methods】** Seven hospital employees (mean age 34.3 yrs) were studied in over time (monthly overtime is 80 hours or over: OW) and in normal work (monthly overtime is less than 45 hours: NW) situations. Moreover, nine acute coronary syndrome (ACS) patients (mean age 49.3 yrs) and age-matched eleven healthy control subjects (mean age 55.4 yrs: HC) were studied. In order to avoid the impact of gender, we enrolled only men. We used liquid chromatography-mass spectrometry to quantify the metabolites in plasma, saliva, and urine samples. Job stress and the depression evaluated using JCQ and SDS.

**【Results】** Job strain index calculated by JCQ and SDS indicated the job stress tended to be higher in OW situation, although those did not differ significantly between ACS and HC groups. We found 10 statistically significant metabolites of increasing ACS compared HC ( $p < 0.05$ ), of which 8 metabolites (e.g., Arachidic acid, Lauric Acid) were from lipid pathway, may be involved in inflammation reaction in vivo. Those fatty acids tended to be higher in OW compared with NW. The other 2 metabolites were organic acids in TCA cycle.

**【Conclusion】** In this preliminary study, we recognized the higher concentration of the fatty acids involving in an inflammation pathway among ACS and overwork. The clinical significance of these changes remains to be determined.

(JJOMT, 67: 406—415, 2019)

### —Key words—

overwork, acute coronary syndrome, metabolome analysis