

博士論文

多価不飽和脂肪酸摂取による慢性腎不全抑制機構の解明

2023年 3月

城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 博士後期課程

栄養生理学講座

村松 弘樹

博士論文

多価不飽和脂肪酸摂取による慢性腎不全抑制機構の解明

本論文は城西大学大学院薬学研究科薬科学専攻博士論文
(甲)である

2023年 3月

城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 博士後期課程
栄養生理学講座

村松 弘樹

目次

緒言	1
第 1 章 慢性腎不全ラットの腎機能に対する多価不飽和脂肪酸摂取による影響.....	3
第 1 節 実験方法	4
1-1. 実験動物	4
1-2. 慢性腎不全モデルラットの作製方法.....	5
1-3. 腎機能評価.....	5
1-4. サンプルング.....	5
1-5. 腎臓重量測定	5
1-6. 腎臓組織ホモジナイズ.....	6
1-7. 腎臓及び血漿中の脂肪酸組成	6
1-8. GC による脂肪酸分析の設定	7
1-9. エイコサノイド及び遊離脂肪酸の抽出	7
1-10. タンパク定量	8
1-11. LC/MS/MS 定量方法	8
1-12. 標本作成法.....	8
1-13. Hematoxylin-Eosin (HE) 染色.....	8
1-14. Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色	9
1-15. 腎臓中サイトカインの測定	9
1-16. 酸化ストレス評価	10
1-17. 統計処理	11
第 2 節 結果および考察	12
2-1. 腎機能評価.....	12
2-2. 血漿中および腎臓中の脂肪酸組成.....	15
2-3. 組織学的変化	18
2-4. 酸化ストレス評価	20
2-5. 腎臓中サイトカインの測定	24
2-6. 腎臓中脂質メディエーターの定量.....	27
第 3 節 小括.....	36

第2章 慢性腎不全の腎臓中酸化ストレスと線維化に対する多価不飽和脂肪酸の効果.. 39

第1節 実験方法	41
1-1. 実験動物	41
1-2. 腎機能評価	41
1-3. サンプルング	41
1-4. 組織学的評価	41
1-5. 血漿、腎臓中の脂肪酸組成	43
1-6. エイコサノイド及び遊離脂肪酸の抽出および LC/MS/MS 定量方法	43
1-7. 酸化ストレス評価	43
1-8. 腎臓中尿毒症物質の定量方法	43
1-9. サイトカインの測定	44
1-10. 尿中尿毒症物質の測定	44
1-11. 遺伝子解析	44
1-12. 電気泳動、ウエスタンブロット	47
1-13. 統計処理	49
第2節 結果及び考察	50
2-1. 腎機能評価	50
2-2. 血漿、および腎臓中の脂肪酸組成	53
2-3. 組織学的評価	56
2-4. 酸化ストレス評価	58
2-5. 尿毒症物質の蓄積による影響	61
2-6. 腎不全処置 4 週間後の腎臓中の炎症や線維化への影響	63
2-7. 尿中の尿毒症関連物質の測定	68
2-8. ERK 活性評価	71
2-9. 腎臓中脂質メディエーターの定量	72
第3節 小括	82

第3章 慢性腎不全の腎足細胞や近位尿管再吸収能に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果 85 |

第1節 実験方法	87
1-1. 実験動物とサンプルング	87

1-2. 腎糸球体上の足細胞の観察.....	87
1-3. 遺伝子発現量の評価	87
1-4. 電気泳動及び Western Blot.....	89
1-5. Megalin 免疫染色.....	89
1-6. 細胞実験	90
1-7. 統計処理	92
第2節 結果及び考察	93
2-1. 腎糸球体足細胞の観察.....	93
2-2. 腎糸球体足細胞関連遺伝子発現への影響	95
2-3. 近位尿細管における megalin 発現及び megalin mRNA 発現への影響	98
2-4. アルブミン再吸収試験	101
第3節 小括.....	102
総括	105
利益相反	113
謝辞	114
参考文献.....	115

緒言

腎臓は背中側の腰の少し上に位置し、左右に 1 個ずつある。腎臓1個の大きさは、大人のこぶし程でその重さは約 150 g である。1 つの腎臓の中にはネフロンという基本単位が約 80 ~120 万個存在し、糸球体と尿細管から構成されている。糸球体は細動脈が糸玉状に形成されており、この糸球体が腎動脈へ流れてきた血液を濾過し、老廃物を尿中に排泄する役割がある。他にも、体内の水分量や体液中に含まれる Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} などの電解質のバランスを調整、血圧の維持、体内 pH を一定に保つ役割ももつ。

腎機能の低下は、体内の余分な電解質や水分量の排泄が行えなくなり、血液量が増加し血圧が上がる。血圧が上がることで腎臓への負担が増し、腎機能がさらに低下していく。腎疾患の進行は、糸球体濾過速度の変化によって評価され、3 ヶ月以上にわたって、尿中アルブミン排泄量が増加、および糸球体濾過速度が $60 \text{ mL} / \text{min} / 1.73 \text{ m}^2$ 未満の状態にあると慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD) と診断される。CKD の原因には、糖尿病、高血圧、肥満などの生活習慣病の合併症があり、糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症は、日本における一般的な腎不全の原因として知られている[1]。慢性腎不全は、前述したような各種の腎疾患によって長期にわたり腎機能が低下している病態の総称である。慢性腎不全の治療には原疾患の治療が重要である一方で、各種腎疾患がある程度進行した場合に共通して認められる「進行性腎障害」を抑えることも非常に重要とされている。現在の医療技術では、腎臓を再生させることはできないため、治療のため腎臓移植もしくは人工透析を受けることとなる。しかし、腎臓移植を受けられる患者数には限りがあるため、患者の多くは人工透析を受ける。人工透析は週に数回通院し、厳格な食事制限が必要となる。そのため、日常生活に支障が生じ、日常生活動作 (Activity of daily living, ADL) の低下につながる。日本では、欧米諸国と比較して、人工透析を受ける患者数が年々増加傾向にある。2018 年の透析患者数は 33 万人を超えており、この患者数増加により医療費が 1 兆円を超え、この医療費の増加が社会問題につながっている[2]。このような現状を踏まえ、慢性腎不全の進行を遅延させる手法の確立が重要となる。

脂肪酸は、日常摂取する栄養素の一つである。生体内ではエネルギー源としてだけでなく、受容体やその他の結合タンパク質を介して様々な生体反応に関与している。脂肪酸の中でも多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) は生体内で生合成される量が少なく、必須脂肪酸と呼ばれ食事から摂取する必要がある。PUFA は摂取不足により生体機能に異常をきたすことが明らかになっている[3]。PUFA は、主に細胞の脂質二重膜に存在し、細胞膜に傷害やストレスなどの刺激が加わると、ホスホリパーゼ A_2 により細胞膜から細胞質に遊離し、細胞質中の脂肪酸代謝酵素によって代謝される。

ω6 系 PUFA の一つであるアラキドン酸 (arachidonic acid, ARA) は、腎臓の生理的な機能の発達・維持に関与している。シクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase, COX) やリポキシゲナーゼ (Lipoxygenase, LOX)、シトクロム P450 (Cytochrome P450, CYP) などの代謝酵素によりエイコサノイドと呼ばれる脂質メディエーターが産生される。ARA から生成されるエイコサノイドにはプロスタグランジン類 (Prostaglandin, PGs) やロイコトリエン類 (leukotriene, LTs)、リポキシン類 (lipoxin, LXs) などが存在する。PGs は腎臓の血流や体内の水分量、Na⁺ バランスの恒常性の調節をする役割があり、腎機能の維持に重要である[4]。そのため、COX 阻害作用を持つ非ステロイド系抗炎症薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) による PGs 量の減少は副作用として腎障害を発生させる[5]。さらに、炎症時には ARA 由来の PGs や LTs などのエイコサノイドの過剰な産生が起き、細胞浮腫や好中球を活性化させ炎症を増加させる。同時に抗炎症作用を持つ LXs 類を生成し、炎症性及び抗炎症性のエイコサノイドの相互作用により組織の炎症反応を調節している[6]。先行研究において、健常ラットへ ARA を長期的に経口投与した結果、ARA 由来のエイコサノイドは増加するものの、腎臓での酸化ストレスや、炎症性サイトカインの産生は増加しなかったと報告されている[7]。これらの報告から、食事による ARA の摂取は腎機能の維持に働くことが考えられた。そのため、慢性腎不全のような腎障害時においても、ARA の摂取は腎臓に対し保護的に働くのではないかと考えられた。

ARA 由来のエイコサノイドを産生する酵素は、ω3 系 PUFA のドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) やエイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) を基質として、抗炎症性の高いプロテクチン D (Protectin D, PD) やレゾルビン E (Resolvin E, RvE) などの代謝物を産生する。また、PD やレゾルビン D (Resolvin D, RvD)、RvE などの ω3 系 PUFA 由来のドコサノイド及びエイコサノイドがメタボリックシンドロームに伴う尿中アルブミン排泄量の増加や糸球体硬化病変の増加に対して抑制効果を示したこと[8]や、虚血性急性腎不全モデルラットの腎機能低下や虚血によるラットの死亡率増加に対して PD が抑制効果を示したことが報告されている[9]。そのため、慢性腎不全に対しても、DHA による保護効果が期待されるのではないかと考えられた。しかし、慢性腎不全に対する ARA や DHA 摂取による腎臓への効果を検討した報告はなく、ARA と DHA の効果を直接比較、または同時摂取による効果の検証を行った報告もない。

以上のことから、ARA の腎機能維持作用や、DHA の抗炎症・腎保護作用により、慢性腎不全における腎障害を抑制し、慢性腎不全の進行を抑えるのではないかと考えた。そこで本研究では、5/6 腎摘出型慢性腎不全モデルラットを用いて、ARA や DHA を含む食餌の摂取が慢性腎不全の進行へどう影響を及ぼすか検討した。

第 1 章 慢性腎不全ラットの腎機能に対する多価不飽和脂肪酸摂取による影響

前述したように、近年の日本では透析患者が増加の一途をたどり、医療費の高騰が社会問題となっている。しかし、慢性腎不全に対する特効薬や回復させるための治療方法がないため、一度機能が低下した腎臓を元の状態に回復させることは、現在の医療では困難であり、治療法の開発が必要となっている。

PUFA は生体内で生合成される量が少なく、摂取不足により生体機能に異常をきたす。そのため、必須脂肪酸に分類され摂取する必要がある。ω6 系 PUFA に分類される ARA は卵や豚レバーなどに多く含まれ、腎臓の生理的機能の維持や発達に関わる。ω3 系 PUFA に分類される DHA や EPA は鮭や鯖などの青魚に多く含まれ、抗炎症作用を持ち、糖尿病性腎症や急性腎不全の発症抑制に関わる[8,9]。そのため、これらの PUFA を含む食事の摂取により、慢性腎不全の進行をも抑制できるのではないかと考えた。

そこで、5/6 腎摘出型慢性腎不全モデルラットを作製し、実験を行った。本慢性腎不全モデルは、作製後から腎機能が徐々に低下し、進行性腎障害の観察が可能である。ラットには ARA や DHA を含む食餌を摂取させ、それぞれの脂肪酸による腎機能への影響を評価した。腎機能の評価には、糸球体濾過速度を評価するためのクレアチニンクリアランス (Creatinine clearance, C_{cr}) 値や尿中アルブミン排泄量を検査することが一般的であり、慢性腎不全への進行につれ、 C_{cr} 値は低下、尿中アルブミン排泄量は増加することが知られている。そのため、本実験でもラットの腎機能評価にこれらの 2 項目の評価を行った。

体内における活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の過剰産生は酸化ストレスを発生させることが知られている。さらに、酸化ストレスは糸球体濾過量の低下や尿中アルブミン排泄の増加に関与し、腎機能低下を引き起こすことが報告されている[10]。しかし、本研究で作製する慢性腎不全モデルラットにおける酸化ストレスが腎機能の低下に関与しているかは不明である。そのため、5/6 腎摘出型慢性腎不全モデルラットの腎機能と酸化ストレスとの関係を明らかにすることが必要である。さらに、腎機能の低下には炎症の亢進が関与することが報告されている[11]。そのため、腎臓の炎症に関わる炎症性サイトカインの関与や、炎症・組織損傷による腎臓の病理所見を観察するなどの組織学的評価を行った。

本章では、5/6 腎摘出型慢性腎不全モデルラットへの ARA 及び DHA を含む餌の摂取が、慢性腎不全モデルラットの腎機能や酸化ストレス、炎症に対してどう影響するのか検討した。

第 1 節 実験方法

1-1. 実験動物

動物の飼育及び管理は城西大学動物実験管理委員会の承認された後(H28006号)、城西大学動物実験規定、日本生理学動物実験指針に基づいて行った。Sprague Dawley ラット(雄性、6週齢)は三協ラボサービス(東京、日本)から購入した。ラットは、室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ に調節され、12時間ごとに(on, off 時間: 7:00 - 19:00)を設定した部屋で飼育した。飼料と水はラットに自由摂食、摂水させた。1週間馴化飼育後に無作為に正常(Sham)群(n=8)と腎不全(CRF)群に分けた。CRF群はさらに対照(Control)群(n=7)、ARA群(n=6)、DHA群(n=6)、ARA+DHA群(n=6)の4群に分け、計5群とした。実験飼料はSham群とCRFのControl群にControl食を摂取させ、CRF-ARA群にはARA食、CRF-DHA群にはDHA食、CRF-ARA+DHA群にはARA+DHA食を摂取させた。各群の飼料に含まれる脂肪酸組成をTable 1に示した。飼料はAIN-76Aを基に脂肪酸組成を改変し、 ω -6 PUFA: ω -3 比を2:1、PUFA:1 価不飽和脂肪酸:飽和脂肪酸比を1:1:1に調整した。

Table 1. 飼料中の脂肪酸組成

(%)	Sham	CRF			
	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
C16:0	27.6	27.6	27.2	27.3	28.1
C18:0	4.2	4.2	4.6	4.4	4.8
C18:1	31.5	31.5	29.8	29.9	28.8
C18:2 ω -6	22.3	22.3	17.7	21.7	16.4
C18:3 ω -3	11.3	11.3	11.6	6.2	5.8
C20:4 ω -6	0.0	0.0	4.1	0.2	4.0
C20:5 ω -3	0.0	0.0	0.0	0.8	0.8
C22:6 ω -3	0.0	0.0	0.0	4.0	4.0
SFA	33.1	33.1	34.2	33.4	35.6
MUFA	31.9	31.9	30.3	31.3	30.2
PUFA	34.0	34.0	34.6	33.8	32.7
ω -6/ ω -3	1.98	1.98	1.91	2.01	2.01

C16:0, palmitic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2 ω -6, linoleic acid; C18:3 ω -3, α -linolenic acid; C20:4 ω -6, arachidonic acid; C20:5 ω -3, eicosapentaenoic acid; C22:6 ω -3, docosahexaenoic acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; ω -6/ ω -3, ratio of ω -6 and ω -3. 総脂肪酸中の重量%を示す。

1-2. 慢性腎不全モデルラットの作製方法

4 週間各群に各食餌を摂取後、高山らの方法に従って 5/6 腎摘除型慢性腎不全モデルを作成した[12]。具体的には、CRF 群の 25 匹を 0.5 mg/mL メデトミジン(日本全薬工業株式会社、福島、日本)・5 mg/mL/ミダゾラム(サンド株式会社、山形、日本)・2.5 mg/mL ブトルフアノール(Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本)を混合した三種混合麻酔下で左側腹部を切開し、左腎両端 2/3 を切除した。2 週間の回復期間後、三種混合麻酔下で右側腹部を切開し、腎動静脈、尿管を結紮後、右腎全てを摘出した。対照食群の Sham-Control 群には腎部分摘除処置以外を同様に施した。全てのラットは飼育ケージにて 16 週間飼育した。右腎切除前(腎不全処置 0 週目)、および経過観察期(4、8、及び 12 週)において 24 時間代謝ケージに収容した。

1-3. 腎機能評価

腎機能評価には尿中アルブミン排泄量の測定とクレアチニンクリアランス(C_{cr})値を算出した。 C_{cr} 値の算出は、血漿中クレアチニン値(P_{Cr} , mg/dL)、尿中クレアチニン値(U_{Cr} , mg/dL)、尿量(V , mL/min)、体重(kg b.w.)から次式を用いて算出した。

$$C_{cr} = \frac{U_{Cr} \times V}{P_{Cr} \times b.w.}$$

1-4. サンプルング

ラットをラット代謝ケージ(SN-781、株式会社シナノ製作所、埼玉、日本)に収容し、24 時間糞と尿を分離採取した。尿は浮遊物を遠心除去し、一部を尿中アルブミン、尿中クレアチニン測定に供した。24 時間代謝ケージに収容後、小動物用イソフルラン麻酔器(SN-487-IT、株式会社シナノ製作所)により、イソフルラン(ファイザー株式会社、東京、日本)で吸入麻酔を施し、血液を採取した。血液は遠心分離後、血漿を得て尿と共に検査依頼した(オリエンタル酵母株式会社、東京、日本)。腎不全処置の 16 週間後、イソフルラン(ファイザー株式会社)麻酔下で開腹した。腹部下大静脈より採血後、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、腎臓周囲脂肪、副睾丸周囲脂肪をそれぞれ採取した。

1-5. 腎臓重量測定

腎不全モデル作成後、再度実験食を摂取させ、16 週間後に Sham-Control 群は両腎、CRF-Control, ARA, DHA, ARA+DHA 群は腎不全処置後の残存 1/6 の腎臓を回収し、腎周りの脂肪や腎皮膜を除去後、腎重量を測定し、-80°C にて保存した。

1-6. 腎臓組織ホモジナイズ

腎臓を各用途で使用するため、冷凍保存した腎臓に、腎臓重量の4倍量の等張リン酸緩衝液(PBS、日水製薬株式会社、東京、日本)を加え、ホモジナイザー(ホモジナイザー攪拌装置、東京、日本)を用いて、氷冷しながらホモジナイズを行った。その後、各用途に分注作業を行い、-80°C 下で保存した。

1-7. 腎臓及び血漿中の脂肪酸組成

実験飼料が腎臓中に反映されているか調べるために、ホモジネート 10 µL に 0.005% (2,6-Di-tert-butyl-p-crespl, BHT, 東京化成工業株式会社、東京、日本)/メタノール(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本)を 2 mL、内部標準物質(Tricosanoic acid, TCA)を 100 µL 加え、-30°C で 20 分以上冷凍保存した。可変式連続分注器(MODEL 8100, ニチリョー、埼玉、日本)を用いて塩化アセチル(富士フィルム和光純薬株式会社)50 µL を氷中で添加した後、98°C アルミブロック恒温機(ドライサーモユニット DTU – 2C、タイテック株式会社、埼玉、日本)で 1 時間加温し反応を促進させた。1 時間後、アルミブロック恒温機から氷中に移し熱を冷まして反応を停止させた後、0.5 M 水酸化ナトリウム(富士フィルム和光純薬株式会社)/10%塩化ナトリウム(富士フィルム和光純薬株式会社)を 5 mL、オクタン(富士フィルム和光純薬株式会社)600 µL を順番に加え、手で 3 分間振とうさせた。その後、遠心機(High speed micro centrifuge, Hitachi, 東京、日本)を用いて遠心分離(950 x g, 10 min, 20°C)後、上清を vial (vial insert 250 µL glass with paymer feet, Agilent Technologies, CA, USA)に移し替えた。その後、ガスクロマトグラフィー(gas chromatography, GC)を用いて腎臓ホモジネート中の脂肪酸組成を測定した。

実験飼料摂取が血漿中に反映されているか調べるために、冷凍保存した血漿 50 µL に 0.005%BHT/メタノールを 2 mL、内部標準物質(Tricosanoic acid, TCA)を 100 µL 加え、-30°C で 20 分以上冷凍保存した。可変式連続分注器(MODEL 8100)を用いて塩化アセチル 100 µL を氷中で添加した後、98°C アルミブロック恒温機(ドライサーモユニット DTU – 2C、タイテック株式会社、埼玉、日本)で 1 時間加温し反応を促進させた。1 時間後、アルミブロック恒温機から氷中に移し熱を冷まして反応を停止させた後、0.5 M 水酸化ナトリウム/10%塩化ナトリウムを 5 mL、オクタン 600 µL を順番に加え、手で 3 分間振とうさせた。その後、遠心機(High speed micro centrifuge, Hitachi)を用いて遠心分離(950 x g, 10 min, 20°C)後、上清を vial (vial insert 250 µL glass with paymer feet, Agilent Technologies)に移し替えた。その後、GC を用いて血漿中の脂肪酸組成を測定した。

1-8. GC による脂肪酸分析の設定

脂肪酸組成を炭素数、二重結合の数と位置などの違いによって分離するため、オートサンプラー(AOC-20i、株式会社島津製作所、京都、日本)付きのガスクロマトグラフ(GC-2010、株式会社島津製作所)を用いた。脂肪酸は炭素数の順番に、同じ炭素数であれば二重結合数の少ないものから順に計測される。ガスクロマトグラフへの試料注入量は 1.0 - 2.0 μL とし、試料注入はスプリット比 10.0 のスプリット法で行った。気化室(SPL)の温度は 300°C に設定した。キャリアーガスは窒素 30 cm/sec を使用した。カラムにはキャピラリーカラム(DB-1、30 m \times 0.50 mm、膜厚 3 μm 、Agilent Technologies)を使用した。検出器は水素炎イオン化検出器(FID)を用い、温度は 300°C に設定した。カラムオープン温度は初期温度 100°C を 4 分間保持した後、15°C/min で 200°C まで昇温し、5 分間保持し、2.5°C/min で 260°C まで昇温し、10 分間保持した。1 試料あたりのランタイムは 49.5 分に設定した。

1-9. エイコサノイド及び遊離脂肪酸の抽出

腎臓中のエイコサノイドを測定するために、ホモジネート 100 μL にメタノール 400 μL 加え混合させた後-30°C で 30 min 以上冷凍後、遠心分離(8,400 \times g, 15 min, 4°C)し、上清をサンプルとした。前処理として、ダイアフラム式真空ポンプ(Neuberger D 79112 Freiburg, KNF JAPAN, 東京、日本)に固相抽出用カラム(Sep-Pak Vac RC 500 mg C18 Cartridges, Waters, Reykjavik, Iceland)を装着し、カラム内をメタノール 30 mL、mQ 20 mL を用いて洗浄した。空の試験管に 10%コーティング剤(Surfail siliconizing fluid, Thermo scientific, MA, USA)を加え、試験管内の表面を塗装し 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid- *d*8(5-HETE-*d*8) (フナコシ株式会社、東京、日本), prostaglandin E_2 -*d*4(PGE $_2$ -*d*4) (フナコシ株式会社), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ -*d*4(PGF $_{2\alpha}$ -*d*4) (フナコシ株式会社)を 50 μL ずつ加え混合させた後、0.1 M 塩酸(富士フィルム和光純薬株式会社)300 μL 、mQ 8 mL、サンプルを加え再度混合させた。混合させたサンプルを洗浄したカラムに流し込み、mQ 20 mL、*n*-ヘキサン(富士フィルム和光純薬株式会社) 20 mL の順に洗浄作業を行った。洗浄後、ギ酸メチル(東京化成工業株式会社) 10 mL をカラムに加え、ギ酸メチルに溶解したサンプルを空の抽出用試験管に回収した。回収したサンプルに窒素吹付け式試験管濃縮装置(東京理科器械株式会社、東京、日本)を用いて室温で濃縮した後、アセトニトリル(富士フィルム和光純薬株式会社)/メタノール 300 μL を加え、溶解したサンプルを vial に移し替えた。その後、液体クロマト質量分析計(LC/MS/MS)を用いて腎臓中のエイコサノイドと遊離脂肪酸を測定した。

1-10. タンパク定量

冷凍保存したホモジネート 10 μ L に 0.1 M 水酸化ナトリウムを 90 μ L 加え、10 倍希釈した。Veriti Thermal Cycler(Thermo Scientific, MA, USA)を用いて 1 時間の加温処理後、Pierce™ BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific K.K.、東京、日本)を説明書の方法に従い、タンパク定量を行った。

1-11. LC/MS/MS 定量方法

LC/MS/MS システムは、システムコントローラー(SCL-40; 株式会社島津製作所)、ポンプ(LC-40D XS; 島津製作所)、オートサンプラー(SIL-40C XS; 株式会社島津製作所)、カラムオープン(CTO-40C; 株式会社島津製作所)、検出器(SPD-40; 株式会社島津製作所)、解析用ソフトウェア(LabSolutions; 株式会社島津製作所)、LCMS-8050(株式会社島津製作所)からなる。カラムは、Kinetex® 2.6 μ m C8 150 \times 2.1 mm (Phenomenex, CA, USA)を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相は、アセトニトリルと 0.1%ギ酸(富士フイルム和光純薬株式会社)水溶液を用い、10:90 の割合で流した。その後 5 分間で 25:75 に、再度 5 分間で 35:65 に、10 分間で 75:25 に、8 分間で 98:2 に、2 分間で 10:90 に割合を変化させ、最終割合で 2 分流出した。流速は 0.4 mL/min とした。なお、injection volume は 5.0 μ L に設定し、脂質メディエーターのイオン化は、electro spray ionization (ESI)法を用いた。Multiple Reaction Monitoring(MRM)の設定条件は LC/MS/MS メソッドパッケージ【脂質メディエーター】Version3. 225-24872B. Jan. 2019(株式会社島津製作所)を参考にした。また、ネブライザガス流量は 2.5 L/min、ドライガスおよびヒーティングガス流量は 10 L/min とし、インターフェイス温度は 270°C、DL 温度は 250°C、ヒートブロック温度は 400°C とした。CID ガス圧は 230 kPa とした。定量は脂質メディエーターと内部標準物質のピーク面積比に基づいて定量した。

1-12. 標本作成法

慢性腎不全モデルラットの臓器回収後、腎臓を 10%中性ホルマリン(サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本)で固定し、パラフィンブロックを作成した。これをマイクローム(サクラファインテックジャパン株式会社)を用いて厚さ 3 μ m に薄切し、組織標本を作成した。

1-13. Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

HE 染色にて、腎臓の全体像を観察した。薄切した腎臓切片を脱パラフィン後、マイヤー・ヘマトキシリン液(2 倍法)(武蔵化学株式会社、東京、日本)に 4 分間浸して核を染色した。水道水で余分なヘマトキシリン液を落とし、1%塩酸アルコールで数秒間分別をした。分別後は

水道水で 15 分間色出しし、1%エオシン Y 液(武蔵化学株式会社)2 分間浸して細胞質を染色した。その後、脱水、透徹を行いEUKITT(コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)で封入し、オールインワン蛍光顕微鏡(BZ-X700、KEYENCE、大阪、日本)で腎臓切片の全体像を撮影した。ラット 1 匹あたり 50 個の糸球体を無作為に選び、糸球体の内径面積/外径面積を算出し、糸球体の大きさを評価した。

1-14. Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色

PAS 染色は腎臓組織中のグリコーゲン、糖脂質、糖蛋白などの多糖類を染色し、糸球体内の病変を観察した。腎臓切片の脱パラフィン後、1%過ヨウ素酸(武蔵化学株式会社)に 5 分間浸して、細胞中の多糖類などに含まれるグリコール基を酸化させた。水道水で 3 分間余分な過ヨウ素酸を洗浄した後、コールド・シッフ試薬(武蔵化学株式会社)に 30 秒間浸し、生じたアルデヒドにシッフ試薬を作用させて染色した。その後、水道水で 5 分間洗浄し、マイヤー・ヘマトキシリン液に 30 秒間浸して核を染色し、水道水で 15 分間色出した後、脱水、透徹を行い EUKITT で封入し、オールインワン蛍光顕微鏡で糸球体を観察し、撮影した。ラット 1 匹あたり 50 個の糸球体を無作為に選び、糸球体硬化度の評価点数をつけた。糸球体硬化度の評価点数の基準として、糸球体硬化範囲が糸球体 1 個の全体のうち 30%未満を+1、30~70%を+2、70%以上を+3 とした。

1-15. 腎臓中サイトカインの測定

サイトカインは炎症性サイトカインの1種であるインターロイキン(Interleukin, IL)-6 や腫瘍壊死因子(Tumor necrosis factor, TNF) α と抗炎症性サイトカインのトランスフォーミング増殖因子(Transforming growth factor, TGF) β_1 をそれぞれ腎臓中から測定するために、冷凍保存したホモジネート 233 μ L に RIPA buffer(Cell Signaling Technology, MA, USA) 1167 μ L を加え、氷中で 5 分間超音波処理を行い、遠心分離(1,600 \times g, 10 min, 4°C)後、上清を採取した。腎不全処置 16 週間後の腎臓中 IL-6 量を IL-6 ELISA kit(HEA079Ra, Cloud-Clone-Corp, TX, USA)、TNF α 量を TNF α ELISA kit(SEA133Mi, Cloud-Clone-Corp)、及び TGF β_1 量を TGF β_1 ELISA kit(SEA124Ra, Cloud-Clone-Corp)を用いて測定した。

1-16. 酸化ストレス評価

腎臓中の酸化ストレスの指標として ROS 量を測定するために、冷凍保存したホモジネート 100 μL に 0.005%BHT/PBS を 650 μL 、1 mM 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich, MO, USA)/0.005%BHT/PBS を 250 μL 加え、混合し 37°C で 15 分間加温し、反応を促進させた。その後、遠心分離 (10,100 x g, 10 min, 4°C) を行い、上清を取り除いた。残った沈殿物に 0.005%BHT/PBS 1 mL 加え、超音波処理機 (US CREANER USK-4K, アズワン株式会社, 大阪, 日本) で 5 分間、氷中で処理し、サンプルとした。処理後、蛍光用 96 well マイクロプレート (Microplate 96 well black, Greiner, Germany) に各サンプル 200 μL を 3 well に添加し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (Ex 494 nm, Em 520 nm) を各 well で測定した。また、DCF を標品とし、標準曲線を作成した。その標準曲線を用いて、測定した蛍光強度から DCF 生成量を算出後、先に示した方法でタンパク定量し、測定補正を行った。

腎臓中の酸化ストレスの指標としてペルオキシナイトライト (peroxynitrate, ONOO^-) を測定するために、冷凍保存したホモジネート 100 μL に 0.005%BHT/PBS を 650 μL 、1 mM 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Cayman Chemical Company, MI, USA)/0.005%BHT/PBS を 250 μL 加え、混合し 37°C で 15 分間加温し、反応を促進させた。その後、遠心分離 (10,100 x g, 10 min, 4°C) し、上清を取り除いた。残った沈殿物に 0.005%BHT/PBS 1 mL 加え、超音波処理機 (US CREANER USK-4K) で 5 分間、氷中で処理し、サンプルとした。処理後、蛍光用 96 well マイクロプレート (Micro plate 96 well black) に各サンプル 200 μL を 3 well に添加し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (Ex 494 nm, Em 520 nm) を各 well で測定した。また、DCF を標品とし、標準曲線を作成した。その標準曲線を用いて、測定した蛍光強度から DCF 生成量を算出後、先に示した方法でタンパク定量し、測定補正を行った。

腎臓組織中の酸化ストレスの指標として腎臓中の過酸化脂質 (lipid peroxides, LPO) 量を測定するために、冷凍保存されたホモジナイズに RIPA buffer 250 μL を加え、氷中で 15 秒間超音波処理を行い、遠心分離 (1,600 x g, 10 min, 4°C) 後、上清を採取し、TBARS assay kit (Cayman Chemical Company) を用いて臓器回収時の腎臓中 LPO の測定を行った。腎不全モデル作製 4 週間後に採血した血液中の過酸化脂質量を測定するために、血液を遠心分離 (1,000 x g, 10 min, 4°C) し、上清を回収し、TBARS assay kit を用いて血漿中の LPO 量を測定した。

1-17. 統計処理

測定データは平均値 ± 標準誤差で示した。群間の比較は一元配置分散分析で検定後、Tukey's Honest Significant Difference 検定を用いて群間比較を行った。検定の有意水準は 5%とした。統計処理には JMP (JMP for MAC 16.0.0, SAS institute Japan 株式会社, 東京, 日本)を用いた。相関は Pearson Correlation Coefficient により評価した。

第 2 節 結果および考察

2-1. 腎機能評価

腎不全処置 16 週間後のラットの体重と腎重量を Figure 1 に示す。ラットの体重は 5 群間で有意な差は認められなかった (Figure 1A)。腎重量の測定では、Sham-Control 群は両腎の重量、CRF-Control, ARA, DHA, ARA+DHA 群は残存 1/6 腎臓の重量を測定した。Sham-Control 群と比べ、CRF-Control, ARA, DHA, ARA+DHA 群にて有意な腎重量の減少が認められた (Figure 1B)。CRF 群は 5/6 の腎臓を外科的に摘出处置したにもかかわらず、残存腎重量が 1/6 ではないことから、腎不全処置後に腎臓が肥大したと考えられる。また、腎摘出後の腎重量の増加はすでに報告されている [12]。

Figure 2 には、腎機能の指標であり、糸球体濾過量を示す C_{cr} 値と尿中アルブミン排泄量を測定し、慢性腎不全モデルラットの腎機能の評価した結果を示す。数値は、右腎摘出前 (0 weeks) から 4, 8, 12 weeks 時の経時変化を示す。また、本慢性腎不全モデルでは腎不全処置後から C_{cr} 値が有意に低下し、腎機能の低下が確認されている [12]。本研究においても同様に、右腎摘出前 (0 weeks) から、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で有意な C_{cr} 値の低下を示した (Figure 2A)。しかし、各食餌の摂取による影響は認められなかった。そのため、本慢性腎不全モデルでは C_{cr} 値の低下抑制効果に PUFA の種類はほとんど影響がないことが考えられる。

腎機能に障害があると、血液中のタンパク質が尿中に漏出する。そのため、タンパク質の 1 種であるアルブミンの尿中への排泄量を測定することで、腎機能を検査することが可能である。本慢性腎不全モデルでは、腎不全処置 4 週間後から経時的に 24 時間の尿中アルブミン排泄量が増加することが報告されている [12]。この報告と同様に、本研究においても CRF-Control 群の尿中アルブミン排泄量は腎不全処置 4 週間後から徐々に増加し、12 週目まで増加は続いた (Figure 2B)。また、Sham-Control 群の尿中アルブミン排泄量に関しても、文献と同様に 12 週間ほとんど変化は認められなかった (Figure 2A)。そのため、本研究で作製した慢性腎不全モデルラットは参考文献の動物モデルと同条件であることが示された。また、本慢性腎不全モデルに対して ARA や DHA を摂取させた実験は本研究が初めてである。結果として、CRF-ARA 群や DHA 群、ARA+DHA 群では CRF-Control 群と比較して、尿中アルブミン排泄量の増加が有意に抑制した (Figure 2B)。特に CRF-ARA+DHA 群では約 75% 有意に抑制した。このことから、慢性腎不全モデルラットへの ARA や DHA を含む食餌の摂取が尿中アルブミンの排泄を抑制し、腎機能低下の抑制効果を示すことを発見した。また、ARA や DHA の摂取により慢性腎不全の進行を抑える可能性が示された。

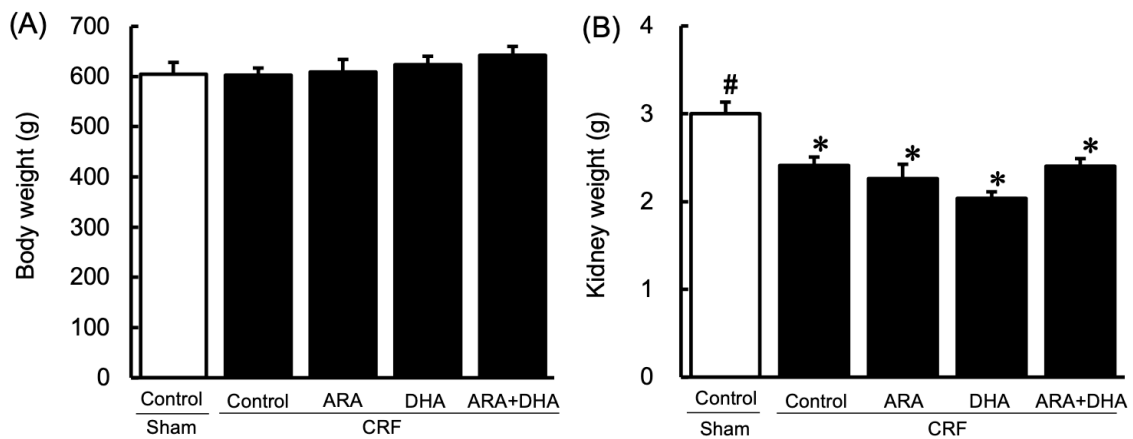


Figure 1. Body weight and kidney weight at 16 weeks after nephrectomy. (A) body weight; (B) kidney weight. The value in Sham-Control group represents two kidneys; the value in all other groups is the remaining kidney nephrectomy of the five sixth of the kidneys. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

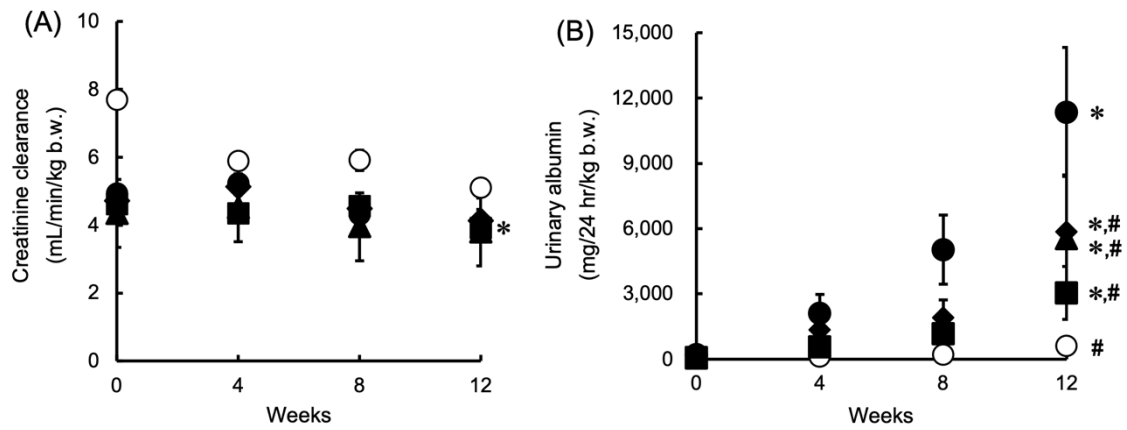


Figure 2. Changes in renal parameters after nephrectomy. (A) creatinine clearance (B) urinary albumin excretion. Symbols: Sham-Control (○), CRF-Control (●), CRF-ARA (◆), CRF-DHA (▲), and CRF-ARA+DHA (■). Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-2. 血漿中および腎臓中の脂肪酸組成

食餌中の脂肪酸は、摂取直後から血漿中に移行される。血漿中へ移行後、腎臓中に反映されるためには約1ヶ月要する。また、1ヶ月間摂取した脂肪酸が腎臓中へ反映された後も、4ヶ月間脂肪酸組成が維持されていることが報告されている[13]。そのため、本研究では腎不全モデルの腎不全処置開始の4週間前から各食餌を摂取させ、実験を行った。各食餌の摂取により各食餌中の脂肪酸がラットの体内に反映しているか確認するために、GCを用いて、血漿中及び腎臓中の脂肪酸組成を評価した。Table 2は腎不全処置16週間後の血漿中の脂肪酸組成を示す。血漿中の主な脂肪酸は、パルミチン酸(C16:0)、パルミトレイン酸(C16:1)、ステアリン酸(C18:0)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2 ω -6)、ステアリン酸(C20:0)、ARA、エイコサペンタエン酸(C20:5 ω -3)、ベヘン酸(C22:0)、DHAであった。Sham-Control群とCRF-Control群の血漿中の脂肪酸組成を比較したものの、両群間で差は得られなかった。このことから、血漿中の脂肪酸組成は腎不全処置による影響を受けなかった。ARA群やARA+DHA群が摂取したARAの食餌中にはARAを含有させる代わりにリノール酸の含量を減らしている。そのため、CRF-ARA群やARA+DHA群の血漿中のリノール酸量は、CRF-Control群と比較して、有意に減少し、ARA量が増加した。血漿中のDHA量についても、CRF-DHA群やARA+DHA群では、CRF-Control群と比較して増加を示した。以上のことから、血漿中のARAまたはDHA量の増加は、各群による特定の食餌の摂取が反映したものであった。

Table 3は腎不全処置16週間後の腎臓中の脂肪酸組成を示す。腎臓中の主な脂肪酸は、カプリル酸(C8:0)、カプリン酸(C10:0)、ラウリン酸(C12:0)、ミリスチン酸(C14:0)、パルミチン酸(C16:0)、パルミトレイン酸(C16:1)、ステアリン酸(C18:0)、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2 ω -6)、 α -リノレン酸(C18:3 ω -3)、ARA、ベヘン酸(C22:0)、ドコサン酸(C24:0)、DHAであった。血漿中の脂肪酸組成と同様に、Sham-Control群とCRF-Control群とでは腎臓中の脂肪酸組成に差が得られなかったため、腎不全による影響を受けなかったことが考えられた。また、腎臓中のリノール酸量も血漿中と同様に、CRF-Control群と比較して、ARA群やARA+DHA群にて有意に減少し、ARA量が増加した。DHA量においても、CRF-Control群と比較してDHA群で増加した。以上のことから、1ヶ月前の食餌摂取により、各脂肪酸がラットの体内に取り込まれ腎臓中へ反映されたことが示された。

Table 2. 血漿中の脂肪酸組成

(%)	Sham	CRF			
	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
C16:0	26.3 ± 1.9	27.8 ± 0.9	23.7 ± 4.1	27.9 ± 0.7	27.7 ± 0.3
C16:1	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1
C18:0	10.4 ± 1.0	11.5 ± 0.5	11.2 ± 0.8	12.0 ± 0.8	9.7 ± 0.3
C18:1	21.0 ± 1.8 ^a	18.2 ± 1.4 ^{a,b}	16.0 ± 1.1 ^{a,b}	15.3 ± 0.6 ^b	13.1 ± 0.4 ^b
C18:2ω-6	10.7 ± 0.9 ^{b,c}	12.5 ± 0.3 ^{a,b}	8.4 ± 0.6 ^c	13.7 ± 0.3 ^a	8.6 ± 0.3 ^c
C20:0	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
C20:4ω-6	26.5 ± 5.8	25.3 ± 1.9	36.3 ± 3.0	22.7 ± 1.4	34.2 ± 0.7
C20:5ω-3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2
C22:0	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
C22:6ω-3	3.2 ± 0.3 ^b	3.4 ± 0.7 ^b	2.4 ± 0.5 ^b	7.6 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.4 ^a
ω-6/ω-3	12.2 ± 6.2 ^a	5.0 ± 1.0 ^b	10.1 ± 2.2 ^a	3.1 ± 0.3 ^b	5.7 ± 0.4 ^b

C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2ω-6, linoleic acid; C20:0, arachidic acid; C20:4ω-6, arachidonic acid; C20:5ω-3, eicosapentaenoic acid; C22:0, docosanoic acid; C22:6ω-3, docosahexaenoic acid; ω-6/ω-3, ratio of ω-6 and ω-3. Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-d}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 3. 腎臓中の脂肪酸組成

(%)	Sham	CRF			
	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
C8:0	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
C10:0	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C12:0	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
C14:0	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2
C16:0	26.0 ± 0.8	27.7 ± 0.3	27.6 ± 0.4	27.3 ± 0.4	28.2 ± 0.9
C16:1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.3	2.4 ± 0.6
C18:0	16.9 ± 0.7	16.5 ± 0.7	16.9 ± 0.7	17.0 ± 0.6	15.6 ± 1.3
C18:1	15.6 ± 1.2	16.3 ± 1.3	16.5 ± 1.4	14.4 ± 1.4	16.1 ± 3.2
C18:2 ω -6	8.0 ± 0.3 ^b	8.3 ± 0.2 ^b	5.2 ± 0.3 ^c	9.7 ± 0.2 ^a	6.1 ± 0.2 ^c
C18:3 ω -3	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C20:0	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2
C20:4 ω -6	18.9 ± 1.3	17.9 ± 1.1	22.3 ± 1.3	17.0 ± 1.0	19.6 ± 2.3
C22:0	2.5 ± 0.3 ^{a,b}	2.7 ± 0.2 ^{a,b}	1.8 ± 0.1 ^b	3.5 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.3 ^b
C24:0	3.1 ± 0.3	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.7 ± 0.3
C22:6 ω -3	2.7 ± 0.3 ^{b,c}	3.2 ± 0.2 ^{a,b,c}	2.2 ± 0.2 ^c	4.2 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.5 ^{a,b}
ω -6/ ω -3	8.0 ± 0.8 ^{a,b}	6.7 ± 0.3 ^{b,c}	8.9 ± 0.2 ^a	6.1 ± 0.2 ^c	6.0 ± 0.3 ^c

C8:0, caprylic acid; C10:0, capric acid, C12:0, lauric acid; C14:0, myristic acid, C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2 ω -6, linoleic acid; C20:0, arachidic acid; C20:4 ω -6, arachidonic acid; C22:0, docosanoic acid; C24:0, lignoceric acid; C22:6 ω -3, docosahexaenoic acid; ω -6/ ω -3, ratio of ω -6 and ω -3. Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-d}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

2-3. 組織学的変化

腎臓切片を染色し、腎臓の病理評価を行った結果を Figure 3 に示す。一般的に、腎臓の病的染色では H&E 染色や PAS 染色が使用される。そこで、本研究では H&E 染色にて腎糸球体や尿細管の状態観察や糸球体の肥大化を評価するために、糸球体の内径面積/外径面積比を算出した。内径面積は糸球体だけの面積、外径面積は糸球体+ボーマン嚢の面積を示し、この比の値が大きくなると、糸球体肥大を発生している可能性が考えられる。結果として、腎不全処置 16 週間後の CRF-Control, ARA, DHA, ARA+DHA 群のいずれも Sham-Control 群と比較して、糸球体や尿細管の病理所見は確認されず、糸球体の内径面積/外径面積比も変化は認められなかった (Figure 3A, C)。PAS 染色による糸球体硬化度のスコアを評価した結果、Sham-Control 群と比較して、腎不全処置 16 週間後の CRF-Control, ARA, DHA, ARA+DHA 群の間に有意な変化は認められなかった (Figure 3B, D)。腎臓の組織が損傷を受けると、糸球体肥大や糸球体硬化、尿細管損傷などの病的所見が増加し、尿中アルブミン排泄の発生につながる。しかし、本研究における腎不全処置 16 週間後のラットの腎臓では、病的所見は観察されず、各食餌摂取による影響も認められなかった。

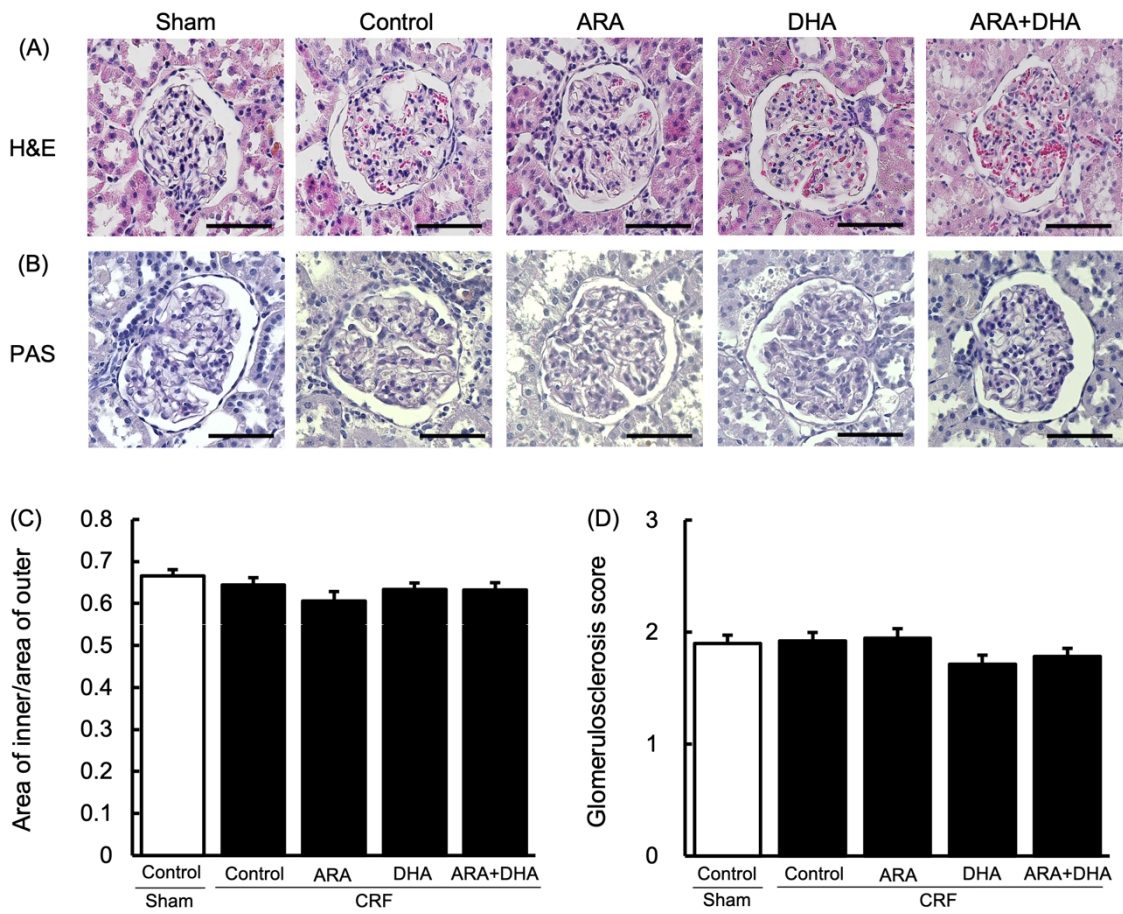


Figure 3. Histological Evaluation by H&E and PAS staining at 16 weeks after nephrectomy. Image of coronal sections of glomeruli from (A) H&E; (B) PAS staining. (C) the ratio of area of inner / area of outer from H&E staining; (D) glomerular sclerosis level was evaluated. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). Scale bar: 50 μ m.

2-4. 酸化ストレス評価

慢性腎不全モデルラットの腎臓に対する酸化ストレスの影響を評価するために、腎臓中の ROS 量や ONOO⁻量、LPO 量の結果を Figure 4 に示す。腎不全処置 16 週間後の腎臓中 ROS 量や ONOO⁻量は、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群では変化は認められなかった (Figure 4A,B)。しかし、CRF-DHA 群と CRF-ARA+DHA 群では Sham-Control 群や CRF-Control 群と比較して、腎臓中 ROS 量と ONOO⁻量が有意に減少した。これらの結果から、DHA を含む食餌の摂取は、腎臓中の酸化ストレスを抑制することが明らかとなった。また、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で腎不全処置 16 週間後の腎臓中 ROS 量や ONOO⁻量に差が認められなかった理由として、活性酸素の反応性のしやすさが原因として考えられる。活性酸素は反応性が高く、非常に不安定な物質であり、体内のタンパク質や脂質などと反応し、酸化生成物を産生する [14]。そのため、腎不全処置 16 週間後の腎臓では、すでに産生した ROS が体内で反応し、酸化生成物が生成されたことにより、CRF-Control 群の腎臓中 ROS 量の増加が認められなかったことが考えられた。また、腎不全処置 16 週間後の LPO 量においても、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群では増加は認められなかった (Figure 5A)。LPO は活性酸素が細胞膜中の不飽和脂肪酸と反応し、脂質が酸化され、生成した酸化生成物であり、ROS と同様に反応性が高く、酸化力が強い物質として知られている [15]。そのため、腎不全処置 16 週間後では活性酸素の反応が既に進んでしまった状態である可能性が考えられた。そこで、腎不全処置後の 16 週目よりも早い段階である腎不全処置 4 週間目の血漿中の酸化ストレスの影響を評価した。その結果、腎不全処置 4 週間後の血漿中 LPO 量は Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群で有意な LPO 量の増加を示した (Figure 5C)。一方で CRF-Control 群と比較して、CRF-ARA+DHA 群において有意な LPO 量の減少が認められた。また、腎不全処置 16 週間後の血漿中 LPO 量においては、腎不全処置による影響や各食餌摂取による影響は認められなかった (Figure 5B)。以上のことから、本研究における 5/6 腎摘出型の慢性腎不全モデルラットでは腎臓中および血漿中の酸化ストレスは腎不全処置後に増加したものの、16 週の長期的な飼育経過とともに反応し、分解された可能性が考えられた。相関による評価では、腎不全処置 4 週間後の血漿中過酸化脂質量と C_{cr} 値との間に有意な負の相関関係 (Figure 6A)、尿中アルブミン排泄量との間に有意な正の相関関係が認められた (Figure 6C)。これらの結果から、腎不全処置後は直ちに血漿中の酸化ストレスを増加させ、腎機能を低下させることが考えられた。しかし、腎不全処置 4 週間後における腎臓への ROS や LPO による影響については不明である。今後、腎不全処置 4 週間後の腎臓中酸化ストレスや腎機能との関係性を評価する必要がある。

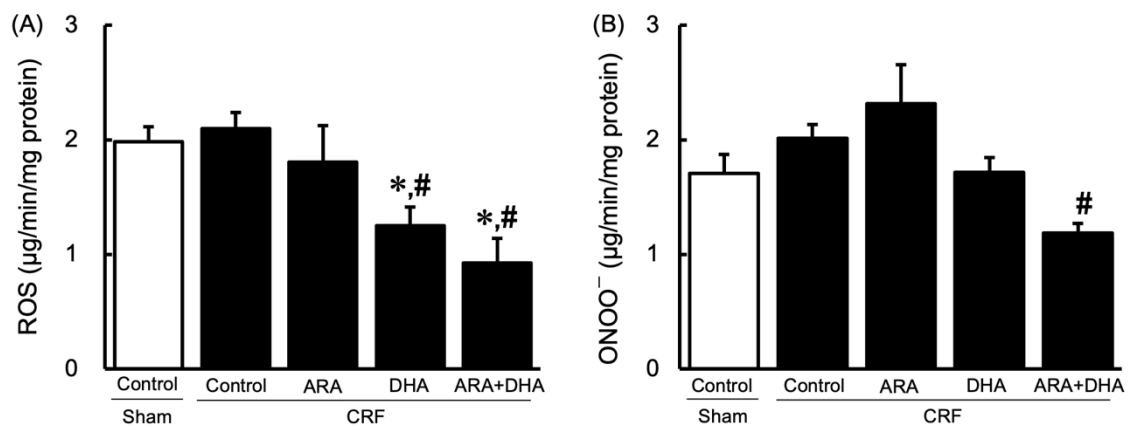


Figure 4. ROS and ONOO⁻ in kidney at 16 weeks after nephrectomy. (A) ROS; (B) ONOO⁻. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

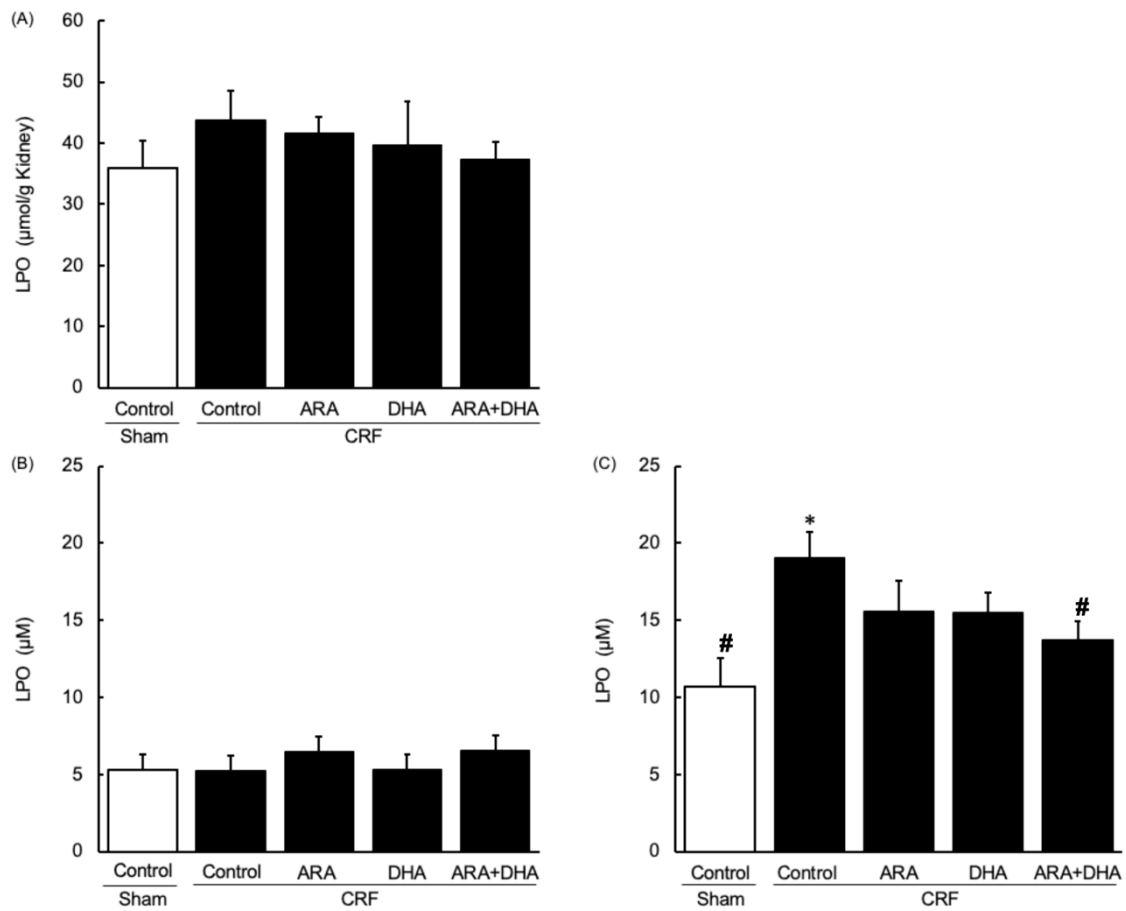


Figure 5. LPO levels in kidney and plasma at 4 and 16 weeks after nephrectomy. (A) in the kidney at 16 weeks; (B) in plasma at 16 weeks; (C) in plasma at 4 weeks. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

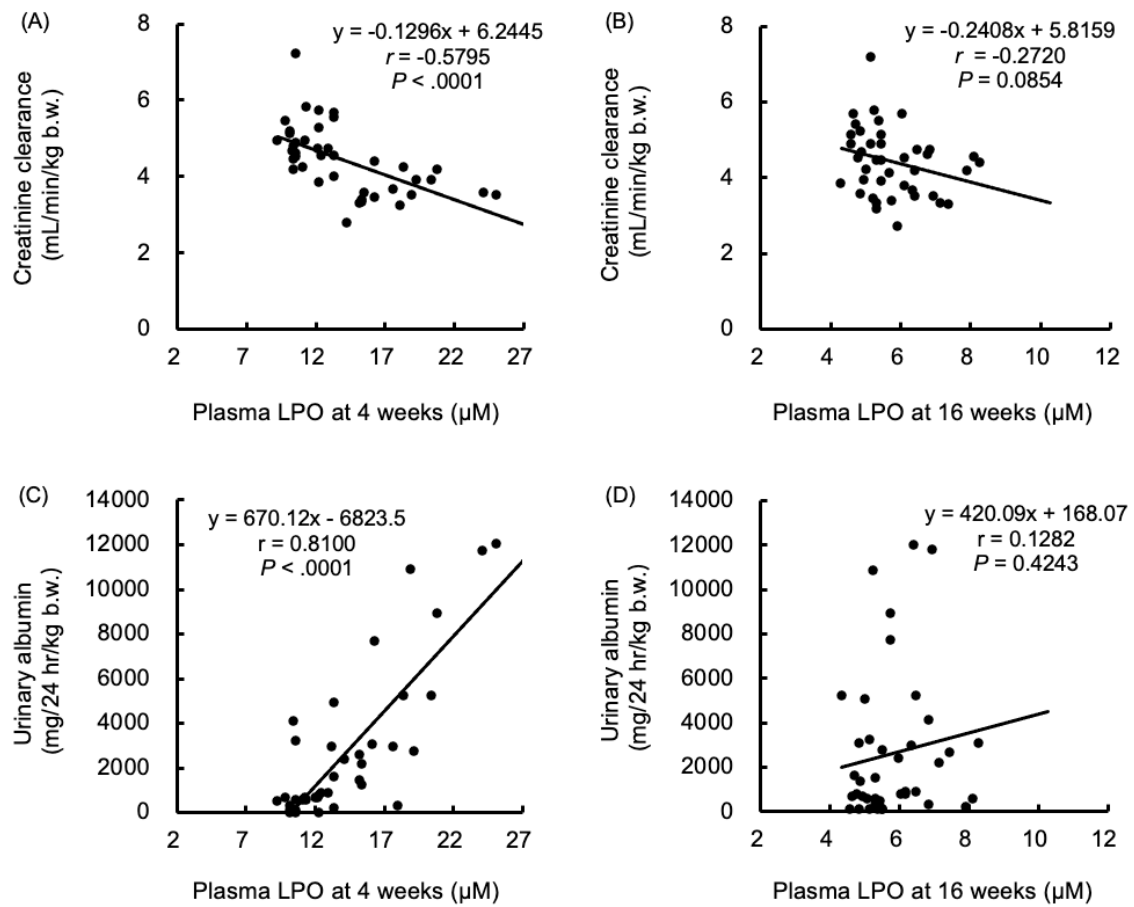


Figure 6. Correlations between C_{cr} and LPO in plasma (A) at 4 weeks or (B) at 16 weeks. The negative correlation between C_{cr} and LPO in plasma at 4 weeks ($P < .0001$). Correlations between urinary albumin at 12 weeks and LPO in plasma (C) at 4 weeks or (D) at 16 weeks. The positive correlation between urinary albumin at 12 weeks and LPO in plasma at 4 weeks ($P < .0001$). P value by Pearson's correlation coefficient.

2-5. 腎臓中サイトカインの測定

Figure 7 に、腎臓中の炎症性サイトカインの IL-6 と TNF- α 、抗炎症性サイトカインの TGF- β_1 量の結果を示す。腎不全処置 16 週間後の腎臓中 IL-6 量は 5 群間で有意な差は認められなかった (Figure 7A)。腎臓中の TNF- α 量は、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で有意な増加が認められた。しかし、CRF-Control 群に対し、DHA 群では減少傾向にあったものの、有意差は認められなかった (Figure 7B)。炎症の亢進は、腎機能を低下させることが報告されている [11]。相関による評価では、腎臓中の TNF- α 量は C_{cr} 値と有意な負の相関関係が認められ、腎臓中の TNF- α 量の増加が腎機能を低下させる可能性が考えられた (Figure 8B)。腎臓中の TGF- β_1 量は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で有意な増加が認められた (Figure 7C)。しかし、CRF-Control 群と比較して、ARA 群や DHA 群、ARA+DHA 群において有意に抑制された (Figure 7C)。相関による評価では、腎臓中の TGF- β_1 量は尿中アルブミン排泄量と有意な正の相関関係が認められた (Figure 8F)。TGF- β_1 は抗炎症性サイトカインである一方で、組織の線維化を誘導することが報告されている [16]。そのため、本研究では ARA や DHA を含む食餌の摂取が慢性腎不全における腎臓組織の線維化を抑制させる可能性が考えられた。

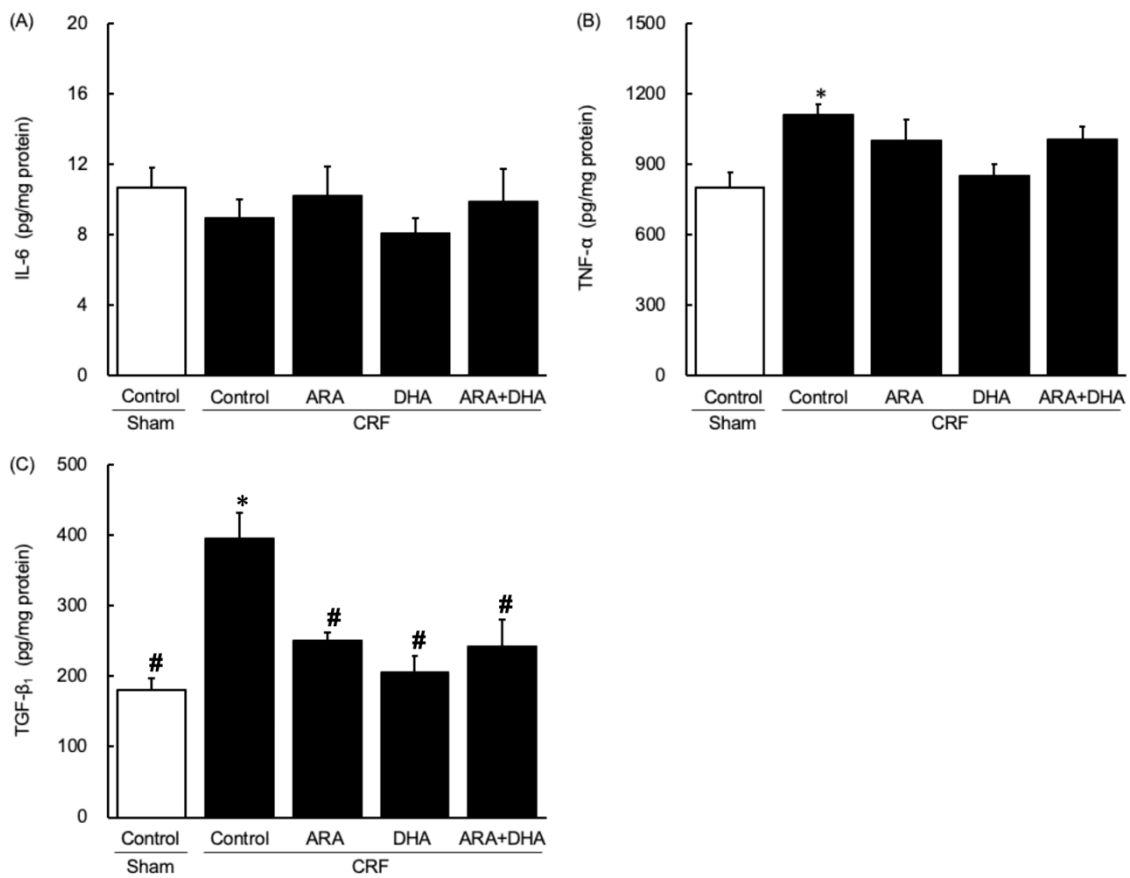


Figure 7. Cytokine levels in the kidney at 16 weeks after nephrectomy. (A) IL-6; (B) TNF- α and (C) TGF- β_1 . Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

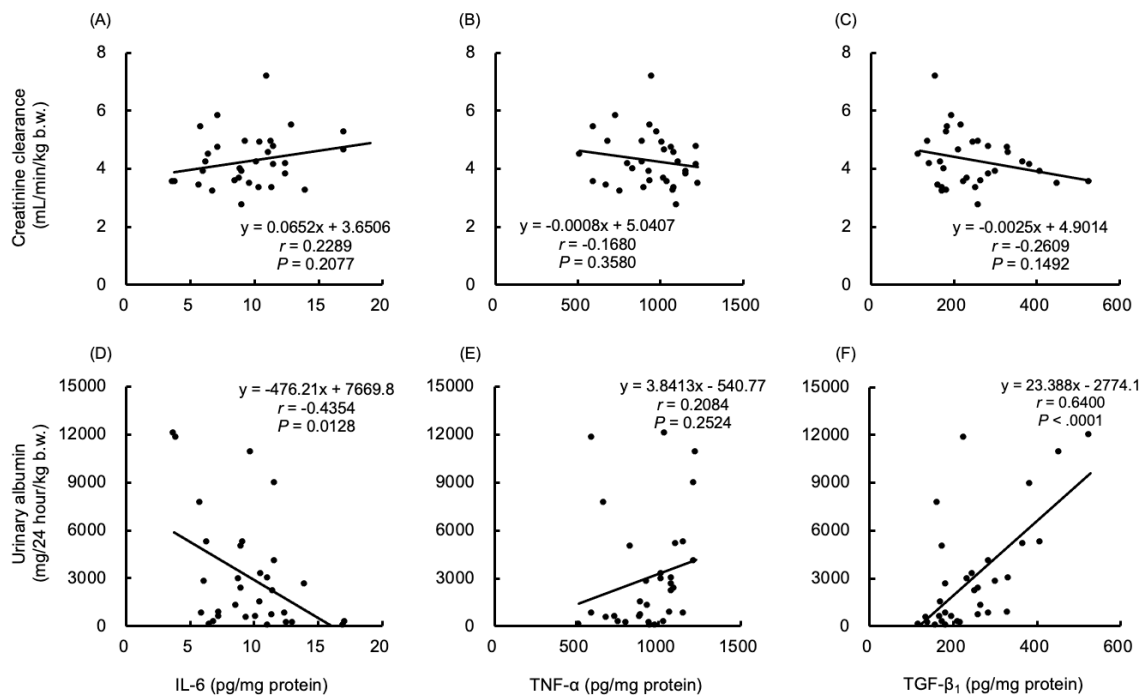


Figure 8. Correlations between C_{cr} and (A) IL-6; (B) TNF- α , or (C) TGF- β_1 . Correlations between urinary albumin and (D) IL-6; (E) TNF- α , or (F) TGF- β_1 . The positive correlation between C_{cr} and (A) IL-6 ($P < .0001$). The negative correlation between C_{cr} and (B) TNF- α , or (C) TGF- β_1 ($P < .0001$). The positive correlation between urinary albumin at 12 weeks and (F) TGF- β_1 ($P < .0001$). P value by Pearson's correlation coefficient.

2-6. 腎臓中脂質メディエーターの定量

先行研究では、健康ラットにARAを長期投与させた結果、腎臓中にARA由来の代謝物が増加し、腎機能維持に関与した可能性が報告されている[7]。しかし、慢性腎不全ラットの腎臓中の代謝物を評価した報告はなく、網羅的に評価した研究は本研究が初めてである。Table 4-6には、LC/MS/MSにより測定した腎臓中のARA・DHA・EPA由来の脂質酸化代謝物の定量結果を示す。ARA由来の代謝物であるPGE₂量はSham-Control群と比較してCRF-Control群において減少傾向にあった。対して、ARA群ではこの減少を抑制する傾向が示された。PGE₂は急性腎不全時のリノール酸の過剰摂取により増加することが報告されている[9]。本研究においても、慢性腎不全の状態では、ARAの摂取によってPGE₂量が増加する可能性が示された。また、ARA+DHA群ではCRF-Control群よりもARA量が増加したものの、ARA群より低値を示した。この理由として、ARAとDHAの競合作用が考えられる。PGE₂はARAからCOXによって生合成される。しかし、DHAの関連代謝物も同じくCOXから産生される代謝物が存在する[8,9]。そのため、ARA+DHA群では、COXがARAとDHAと競合することでARA群よりもPGE₂の産生量が減少したことが考えられた。PGsの中でも、PGE₂やPGD₂は腎血流量を調整し、腎臓の生理的機能の維持に働くことが報告されている[4]。そのため、これらの代謝物は、本研究において、慢性腎不全時の腎機能維持に働いた可能性が考えられる。一方で、ARAは炎症を引き起こす物質としても知られている。その中で、腎臓中のTXB₂量がSham-Control群と比較して、CRF-Control群において顕著に増加した。さらに、TXB₂量の増加は、ARA群においても確認された。しかし、腎臓中のTXB₂量とC_{cr}($r = -0.0601, P = 0.7441$)や尿中アルブミン排泄量($r = 0.0461, P = 0.802$)などの腎機能、腎臓中の酸化ストレス(ROS; $r = -0.0377, P = 0.8378$)や炎症性サイトカイン(TNF- α ; $r = -0.2862, P = 0.1123$)との相関性は認められなかった。以上のことから、慢性腎不全の状態では、炎症に関わる代謝物に由来するARAを摂取しても、腎機能を悪化させるわけではない可能性が考えられた。腎不全処置16週間後における腎臓中DHA、EPA由来の代謝物は、Sham-Control群と比較して、CRF-Control群にて減少することが確認された。対して、DHA群ではDHA及びEPA由来の代謝物の減少が抑制された。先行研究では、DHAを経口投与することにより、DHA由来の10,17-DiHDHA(別名プロテクチンD1:PD1)が虚血性急性腎不全や糖尿病性腎症の発症を抑制する効果が報告されている[8,9]。PD1は血管内皮細胞や組織の保護作用に働くことが報告されている[17]。また、腎臓中の炎症性サイトカイン産生を低下させることも報告されている[18]。しかし、腎不全処置16週間後の腎臓中ではPD1はほとんど検出されなかった。このことから、本研究における腎機能低下の抑制効果にPD1は関与していない可能性が考えられた。EPAの代謝物である18-HEPEは心不全マウスに投与することで、慢性の炎症及び線維化による心臓の組織学的変化を抑制したことが報告されている[19]。腎不全処置16週間後の腎臓中18-HEPE量はSham-Control群と比較して、CRF-Control群にて顕著な減少が確認された。対して、DHA群ではこの減少を

抑制したことが確認された。しかし、腎機能(尿中アルブミン排泄量; $r = -0.0237$, $P = 0.8978$)や腎臓中の酸化ストレス(ROS; $r = -0.1042$, $P = 0.5705$)や炎症性サイトカイン(TNF- α ; $r = -0.3473$, $P = 0.0514$ 、TGF- β_1 ; $r = -0.3379$, $P = 0.0586$)とは相関性が認められなかった。このことから、腎不全処置 16 週間後の腎臓中では EPA の代謝物においても関与していない可能性が考えられた。脂質メディエーターは急性の炎症反応において産生量に変化する[20]。組織学的評価でも、PUFA の摂取による影響が認められなかったことから、腎不全処置 16 週間後の腎臓では炎症反応が収束している段階であり、脂質メディエーターの産生や腎機能、炎症との関係性について確認できなかったと考えられた。

Table 4. ARA metabolites levels in the kidney

Category	Metabolites	Sham		CRF			
		Control	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
ARA	tetranor-PGFM	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
ARA	tetranor-PGEM	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02
ARA	tetranor-PGDM	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.03 ^b	0.13 ± 0.03 ^b	0.08 ± 0.01 ^{a,b}	0.05 ± 0.01 ^a
ARA	tetranor-PGJM	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	tetranor-PGAM	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.12 ± 0.05	0.10 ± 0.02	0.04 ± 0.00
ARA	20-hydroxy-PGF2α or 19-hydroxy-PGF2α	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	20-hydroxy-PGE2	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
ARA	18-carboxy-dinor-LTB4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF1β	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01
ARA	2,3-dinor-8-iso-PGF2α	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	2,3-dinor-TXB2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF1α	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.01
ARA	2,3-dinor-11β-PGF2α	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	6-keto-PGF1α	0.49 ± 0.15	0.48 ± 0.09	1.18 ± 0.33	1.18 ± 0.33	0.77 ± 0.38	0.43 ± 0.19
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGD2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
ARA	20-carboxy-LTB4	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.02
ARA	20-hydroxy-LTB4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	11-dehydro-2,3-dinor-TXB2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGE2	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF1α	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.03
ARA	iPF2α-IV	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.02
ARA	8-iso-15(R)-PGF2α	0.31 ± 0.07	0.16 ± 0.02	0.29 ± 0.05	0.29 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.17 ± 0.03
ARA	8-iso-PGF2α	0.38 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.49 ± 0.14	0.49 ± 0.14	0.40 ± 0.07	0.27 ± 0.10
ARA	TXB2	1.55 ± 0.27	1.13 ± 0.19	1.77 ± 0.55	1.77 ± 0.55	1.03 ± 0.30	0.97 ± 0.36

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 4. Continue

Category	Metabolites	Sham		CRF				
		Control	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA	
ARA	11 β -PGF2 α	0.17 \pm 0.06	0.14 \pm 0.03	0.24 \pm 0.10	0.10 \pm 0.05	0.10 \pm 0.05	0.10 \pm 0.05	
ARA	5-IPF2 α -VI	0.92 \pm 0.11	0.50 \pm 0.07	0.93 \pm 0.17	0.63 \pm 0.08	0.48 \pm 0.15	0.48 \pm 0.15	
ARA	8-iso-15-keto-PGF2 α	1.54 \pm 0.37	0.55 \pm 0.19	1.69 \pm 0.46	1.26 \pm 0.21	1.03 \pm 0.52	1.03 \pm 0.52	
ARA	PGF2 α	1.15 \pm 0.10	0.69 \pm 0.11	1.40 \pm 0.27	0.67 \pm 0.21	0.64 \pm 0.18	0.64 \pm 0.18	
ARA	8-iso-13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	8-iso-PGE2	11.96 \pm 2.55	4.70 \pm 1.29	14.19 \pm 3.27	12.00 \pm 2.84	8.51 \pm 3.17	8.51 \pm 3.17	
ARA	PGE2	9.45 \pm 2.19	3.86 \pm 1.19	12.72 \pm 2.79	10.45 \pm 2.91	6.86 \pm 3.33	6.86 \pm 3.33	
ARA	11-dehydro-TXB2	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	
ARA	15-keto-PGF2 α	0.49 \pm 0.12	0.19 \pm 0.05	0.48 \pm 0.14	0.31 \pm 0.05	0.35 \pm 0.17	0.35 \pm 0.17	
ARA	11 β -PGE2	0.83 \pm 0.31 ^{a,b}	0.95 \pm 0.28 ^{a,b}	3.30 \pm 0.81 ^a	1.75 \pm 1.21 ^{a,b}	0.51 \pm 0.14 ^b	0.51 \pm 0.14 ^b	
ARA	5S,14R-LXB4	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	PGK 2.00	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	
ARA	PGD2	3.63 \pm 0.52	2.33 \pm 0.31	5.23 \pm 1.63	2.95 \pm 1.01	1.86 \pm 0.44	1.86 \pm 0.44	
ARA	15-keto-PGF1 α	0.03 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.03 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	11 β -13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	
ARA	15-keto-PGE2	0.70 \pm 0.18	0.28 \pm 0.09	1.13 \pm 0.32	0.91 \pm 0.25	0.61 \pm 0.27	0.61 \pm 0.27	
ARA	13,14-dihydro-PGF1 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	14,15-LTC4	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α	1.26 \pm 0.26	0.60 \pm 0.18	1.49 \pm 0.31	1.11 \pm 0.18	0.81 \pm 0.34	0.81 \pm 0.34	
ARA	5S,6R-LXA4	1.61 \pm 0.16 ^{a,b}	0.74 \pm 0.16 ^b	1.86 \pm 0.33 ^a	1.58 \pm 0.23 ^{a,b}	1.15 \pm 0.38 ^{a,b}	1.15 \pm 0.38 ^{a,b}	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGE2	0.46 \pm 0.07	0.52 \pm 0.13	0.66 \pm 0.13	0.48 \pm 0.14	0.37 \pm 0.14	0.37 \pm 0.14	
ARA	5S,6S-LXA4	0.64 \pm 0.08 ^a	0.13 \pm 0.04 ^b	0.63 \pm 0.15 ^a	0.34 \pm 0.07 ^{a,b}	0.24 \pm 0.08 ^b	0.24 \pm 0.08 ^b	
ARA	14,15-LTE4	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGD2	0.07 \pm 0.07	0.02 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.06 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	

Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 4. Continue

Category	Metabolites	Sham		CRF			
		Control		Control	ARA	DHA	ARA+DHA
ARA	LTC4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	11-trans-LTC4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTD4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTE4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTF4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	8-iso-PGA2	0.06 ± 0.03		0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.07	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.03
ARA	11-trans-LTD4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	PGA2	0.24 ± 0.03 ^a		0.13 ± 0.03 ^{a,b}	0.20 ± 0.05 ^{a,b}	0.17 ± 0.04 ^{a,b}	0.06 ± 0.02 ^b
ARA	PGJ2	0.26 ± 0.03 ^a		0.16 ± 0.04 ^{a,b}	0.23 ± 0.05 ^a	0.21 ± 0.05 ^{a,b}	0.07 ± 0.02 ^b
ARA	11-trans-LTE4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	PGB2	0.01 ± 0.00		0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	8,12-iso-iPF2 α -VI-1,5-lactone	0.14 ± 0.03 ^a		0.11 ± 0.03 ^{a,b}	0.02 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.02 ^{a,b}	0.04 ± 0.02 ^b
ARA	8,15-DiHETE	0.59 ± 0.10		0.41 ± 0.04	0.85 ± 0.15	0.68 ± 0.08	0.62 ± 0.28
ARA	6-trans-LTB4	0.55 ± 0.09		0.31 ± 0.03	0.56 ± 0.09	0.46 ± 0.10	0.43 ± 0.12
ARA	5,15-DiHETE	2.34 ± 0.27 ^{a,b}		1.71 ± 0.17 ^b	3.49 ± 0.60 ^a	2.39 ± 0.48 ^{a,b}	2.10 ± 0.43 ^{a,b}
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGA2	0.56 ± 0.22		0.18 ± 0.07	0.39 ± 0.11	0.45 ± 0.10	0.62 ± 0.51
ARA	LTB4	0.58 ± 0.09		0.31 ± 0.03	0.61 ± 0.10	0.47 ± 0.08	0.45 ± 0.15
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGJ2	0.58 ± 0.08		0.37 ± 0.07	0.80 ± 0.14	0.52 ± 0.10	0.46 ± 0.14
ARA	12-keto-LTB4	0.16 ± 0.02 ^{a,b}		0.09 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.06 ^a	0.22 ± 0.05 ^{a,b}	0.14 ± 0.03 ^{a,b}
ARA	tetranor-12-HETE	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	N-acetyl-LTE4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTB3	0.00 ± 0.00		0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	14,15-DHET	4.12 ± 1.57		7.53 ± 3.54	2.64 ± 0.57	1.47 ± 0.21	1.26 ± 0.40
ARA	12-HHT	2.07 ± 0.30		1.22 ± 0.17	2.51 ± 0.50	1.65 ± 0.34	1.61 ± 0.67

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 4. Continue

Category	Metabolites	Sham		CRF				
		Control	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA	
ARA	11,12-DHET	5.27 ± 1.73	2.98 ± 0.83	3.43 ± 0.82	1.85 ± 0.36	1.84 ± 0.94		
ARA	8,9-DHET	0.93 ± 0.29	0.55 ± 0.14	0.63 ± 0.11	0.33 ± 0.05	0.42 ± 0.16		
ARA	20-carboxy-ARA	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01		
ARA	5,6-DHET	0.98 ± 0.14 ^{a,b}	1.06 ± 0.17 ^a	0.44 ± 0.17 ^{b,c}	0.29 ± 0.08 ^c	0.24 ± 0.08 ^c		
ARA	19-HETE	0.08 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
ARA	15-deoxy-delta-12,14-PGJ2	0.17 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.02		
ARA	20-HETE	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01		
ARA	18-HETE	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.12 ± 0.05	0.35 ± 0.08	0.02 ± 0.02		
ARA	17-HETE	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
ARA	16-HETE	0.63 ± 0.09	0.35 ± 0.03	0.67 ± 0.09	0.35 ± 0.05	0.37 ± 0.09		
ARA	15-HETE	21.55 ± 1.85 ^{a,b}	13.00 ± 1.15 ^c	26.25 ± 2.40 ^a	14.87 ± 2.75 ^{b,c}	16.63 ± 1.73 ^{b,c}		
ARA	11-HETE	25.88 ± 2.40 ^{a,b}	16.08 ± 1.08 ^c	30.47 ± 2.72 ^a	16.76 ± 3.26 ^{b,c}	18.34 ± 1.80 ^{b,c}		
ARA	8-HETE	4.84 ± 0.36 ^{a,b}	3.02 ± 0.25 ^c	5.95 ± 0.54 ^a	3.16 ± 0.55 ^{b,c}	3.49 ± 0.41 ^{b,c}		
ARA	15-KETE	6.87 ± 0.55 ^a	4.00 ± 0.78 ^a	11.46 ± 1.50 ^b	6.38 ± 1.51 ^a	6.57 ± 0.73 ^a		
ARA	15-HpETE	0.99 ± 0.27 ^a	0.67 ± 0.28 ^a	2.86 ± 0.36 ^b	1.12 ± 0.51 ^a	1.48 ± 0.35 ^{a,b}		
ARA	12-HETE	12.19 ± 1.23 ^{a,b}	7.74 ± 0.48 ^{b,c}	14.85 ± 1.18 ^a	7.62 ± 1.59 ^c	9.06 ± 0.67 ^{b,c}		
ARA	9-HETE	1.25 ± 0.12 ^{a,b}	0.72 ± 0.06 ^c	1.48 ± 0.13 ^a	0.76 ± 0.17 ^c	0.87 ± 0.06 ^{b,c}		
ARA	5-HETE	8.15 ± 0.42 ^a	5.96 ± 0.61 ^a	13.65 ± 1.18 ^b	6.74 ± 1.48 ^a	7.62 ± 0.61 ^a		
ARA	12-HpETE	0.33 ± 0.09	0.30 ± 0.14	0.35 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.20 ± 0.05		
ARA	12-KETE	0.39 ± 0.09 ^{a,b}	0.33 ± 0.14 ^{a,b}	0.70 ± 0.06 ^a	0.26 ± 0.09 ^b	0.41 ± 0.08 ^{a,b}		
ARA	5,6-DHET-lactone	0.22 ± 0.05 ^a	0.26 ± 0.07 ^a	0.68 ± 0.15 ^b	0.34 ± 0.07 ^{a,b}	0.41 ± 0.08 ^{a,b}		
ARA	5-HpETE	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.03 ^{a,b}		
ARA	14,15-EET	0.41 ± 0.08	0.46 ± 0.12	0.44 ± 0.08	0.24 ± 0.04	0.17 ± 0.03		
ARA	5-KETE	3.06 ± 0.18 ^a	1.95 ± 0.41 ^a	5.59 ± 0.66 ^b	2.91 ± 0.67 ^a	3.05 ± 0.35 ^a		

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test (P < 0.01).

Table 4. Continue

Category	Metabolites	Sham		CRF			
		Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA	ARA+DHA
ARA	11,12-EET	0.12 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
ARA	8,9-EET	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
ARA	5,6-EET	0.11 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.10 ^b	0.19 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.03 ^a
ARA	ARA	6.29 ± 1.90	5.92 ± 0.82	7.98 ± 1.10	3.47 ± 0.62	3.77 ± 0.44	3.77 ± 0.44

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 5. DHA metabolites levels in the kidney

Category	Metabolites	Sham		CRF			
		Control	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
DHA	Resolvin D3	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01
DHA	Resolvin D2	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.09 ± 0.05	0.04 ± 0.02
DHA	Resolvin D1	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01
DHA	Resolvin D4	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
DHA	Maresin1	0.01 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00 ^{a,b}	0.02 ± 0.01 ^{a,b}	0.02 ± 0.01 ^{a,b}	0.04 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^{a,b}
DHA	10,17-DiHDHA(别名: PD1)	0.43 ± 0.08 ^{a,b}	0.22 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.04 ^b	0.29 ± 0.04 ^b	0.73 ± 0.15 ^a	0.36 ± 0.06 ^b
DHA	Resolvin D5	0.26 ± 0.04 ^{a,b}	0.16 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.05 ^b	0.16 ± 0.05 ^b	0.42 ± 0.10 ^a	0.21 ± 0.06 ^{a,b}
DHA	7,17-hydroxy-DPA	0.11 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^{a,b}	0.09 ± 0.01 ^{a,b}	0.09 ± 0.01 ^{a,b}	0.09 ± 0.02 ^{a,b}	0.03 ± 0.02 ^b
DHA	19,20-DiHDPA	0.26 ± 0.08	0.35 ± 0.14	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.25 ± 0.05	0.11 ± 0.04
DHA	20-HDHA	1.39 ± 0.26	0.80 ± 0.07	0.88 ± 0.10	0.88 ± 0.10	1.67 ± 0.31	1.05 ± 0.09
DHA	16-HDHA	4.28 ± 0.75 ^{a,b}	2.75 ± 0.21 ^b	2.86 ± 0.24 ^b	2.86 ± 0.24 ^b	5.47 ± 0.97 ^a	3.52 ± 0.17
DHA	17-HDHA	0.63 ± 0.10 ^{a,b}	0.42 ± 0.03 ^b	0.44 ± 0.04 ^b	0.44 ± 0.04 ^b	0.80 ± 0.13 ^a	0.51 ± 0.05 ^{a,b}
DHA	13-HDHA	2.20 ± 0.42 ^{a,b}	1.51 ± 0.09 ^b	1.44 ± 0.11 ^b	1.44 ± 0.11 ^b	2.67 ± 0.38 ^a	1.82 ± 0.10 ^{a,b}
DHA	10-HDHA	1.22 ± 0.21	0.79 ± 0.05	0.84 ± 0.04	0.84 ± 0.04	1.51 ± 0.25	1.13 ± 0.13
DHA	14-HDHA	0.87 ± 0.15	0.67 ± 0.06	0.62 ± 0.08	0.62 ± 0.08	1.18 ± 0.22	0.85 ± 0.07
DHA	11-HDHA	1.06 ± 0.18	0.71 ± 0.05	0.89 ± 0.06	0.89 ± 0.06	1.37 ± 0.29	1.09 ± 0.09
DHA	7-HDHA	0.39 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.45 ± 0.08	0.30 ± 0.02
DHA	8-HDHA	0.49 ± 0.11	0.35 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.54 ± 0.10	0.44 ± 0.06
DHA	17-HpDHA	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	4-HDHA	1.17 ± 0.21	0.92 ± 0.12	1.28 ± 0.10	1.28 ± 0.10	1.74 ± 0.34	1.52 ± 0.19
DHA	19,20-EpDPA	0.37 ± 0.12	0.56 ± 0.19	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.06	0.24 ± 0.03
DHA	16,17-EpDPA	0.06 ± 0.02	0.19 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
DHA	DHA	8.27 ± 3.78	8.11 ± 1.61	4.19 ± 0.77	4.19 ± 0.77	4.67 ± 1.17	5.17 ± 1.22

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test (P < 0.01).

Table 6. EPA metabolites levels in the kidney

Category	Metabolites	Sham		CRF			
		Control	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
EPA	delta17-6-keto-PGF1 α	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
EPA	Resolvin E1	0.09 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.15 \pm 0.04	0.20 \pm 0.05	0.12 \pm 0.06	0.12 \pm 0.06
EPA	8-iso-PGF3 α	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
EPA	TXB3	0.18 \pm 0.07	0.09 \pm 0.02	0.24 \pm 0.05	0.20 \pm 0.03	0.19 \pm 0.11	0.19 \pm 0.11
EPA	PGF3 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	11-dehydro-TXB3	0.02 \pm 0.02	0.03 \pm 0.03	0.15 \pm 0.13	0.02 \pm 0.02	0.08 \pm 0.05	0.08 \pm 0.05
EPA	PGE3	0.43 \pm 0.07	0.28 \pm 0.09	0.26 \pm 0.06	0.64 \pm 0.21	0.18 \pm 0.05	0.18 \pm 0.05
EPA	PGD3	1.46 \pm 0.24 ^{a,b}	0.64 \pm 0.08 ^b	0.86 \pm 0.07 ^b	2.21 \pm 0.45 ^a	0.77 \pm 0.17 ^b	0.77 \pm 0.17 ^b
EPA	LXA5	0.11 \pm 0.03 ^{a,b}	0.06 \pm 0.02 ^b	0.05 \pm 0.01 ^b	0.20 \pm 0.05 ^a	0.07 \pm 0.04 ^{a,b}	0.07 \pm 0.04 ^{a,b}
EPA	LTB5	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02
EPA	17,18-DIHETE	0.60 \pm 0.15	0.69 \pm 0.28	0.22 \pm 0.03	0.66 \pm 0.12	0.22 \pm 0.09	0.22 \pm 0.09
EPA	14,15-DIHETE	0.33 \pm 0.11	0.49 \pm 0.24	0.04 \pm 0.03	0.33 \pm 0.06	0.08 \pm 0.04	0.08 \pm 0.04
EPA	5,6-DIHETE	0.14 \pm 0.02 ^a	0.15 \pm 0.02 ^a	0.11 \pm 0.03 ^{a,b}	0.14 \pm 0.02 ^{a,b}	0.05 \pm 0.02 ^b	0.05 \pm 0.02 ^b
EPA	18-HEPE	1.88 \pm 0.17 ^a	1.22 \pm 0.10 ^a	1.08 \pm 0.11 ^a	2.85 \pm 0.46 ^b	1.10 \pm 0.15 ^a	1.10 \pm 0.15 ^a
EPA	15-HEPE	1.16 \pm 0.11 ^a	0.62 \pm 0.02 ^b	0.47 \pm 0.06 ^b	1.22 \pm 0.29 ^a	0.46 \pm 0.08 ^b	0.46 \pm 0.08 ^b
EPA	11-HEPE	0.58 \pm 0.07 ^a	0.34 \pm 0.02 ^{a,b}	0.27 \pm 0.04 ^{a,b}	0.61 \pm 0.18 ^a	0.19 \pm 0.03 ^b	0.19 \pm 0.03 ^b
EPA	8-HEPE	0.12 \pm 0.01 ^a	0.05 \pm 0.00 ^b	0.03 \pm 0.01 ^b	0.11 \pm 0.02 ^a	0.03 \pm 0.01 ^b	0.03 \pm 0.01 ^b
EPA	9-HEPE	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
EPA	12-HEPE	1.52 \pm 0.16 ^{a,b}	0.90 \pm 0.05 ^{b,c}	0.71 \pm 0.09 ^c	1.87 \pm 0.30 ^a	0.75 \pm 0.09 ^c	0.75 \pm 0.09 ^c
EPA	5-HEPE	0.87 \pm 0.08 ^{a,b}	0.59 \pm 0.06 ^b	0.52 \pm 0.07 ^b	1.33 \pm 0.23 ^a	0.55 \pm 0.08 ^b	0.55 \pm 0.08 ^b
EPA	15-HpEPE	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
EPA	12-HpEPE	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
EPA	5-HpEPE	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	17,18-EpETE	0.06 \pm 0.04	0.13 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	0.04 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	14,15-EpETE	0.08 \pm 0.02 ^{a,b}	0.17 \pm 0.05 ^a	0.04 \pm 0.01 ^b	0.12 \pm 0.02 ^{a,b}	0.03 \pm 0.01 ^b	0.03 \pm 0.01 ^b
EPA	EPA	1.76 \pm 0.59	1.85 \pm 0.31	0.98 \pm 0.14	1.73 \pm 0.34	0.90 \pm 0.15	0.90 \pm 0.15

Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

第3節 小括

慢性腎不全とは、各種の腎疾患によって長期にわたり腎機能が低下している病態の総称である。慢性腎不全の治療には原疾患の治療が重要である一方で、各種腎疾患がある程度進行した場合に共通して認められる「進行性腎障害」を抑えることも非常に重要とされている。進行性腎障害の機序については、糸球体高血圧による糸球体障害や、蛋白尿、慢性低酸素状態による尿細管間質障害などが存在し、本研究で使用した慢性腎不全モデルにもこの進行性腎障害が顕著に確認できる[12]。そのため、慢性腎不全の病態メカニズムを解明する研究には本慢性腎不全モデルがよく用いられている。そのため、本研究でもこの5/6腎摘除型の慢性腎不全ラットを使用した。DHAは抗炎症作用や急性腎障害の発症抑制、慢性腎不全の原疾患として知られる糖尿病性腎症の発症抑制効果をもつとして報告されている[8,9]。しかし、進行性腎障害に対するDHAの効果については知られていない。そこで、本研究では進行性腎障害による慢性腎不全の進行に対するDHA摂取の効果を評価した。さらに、ARAは腎臓の機能を維持・発達させる作用があるとして知られている。その一方で、リノール酸の摂取は急性腎障害の発症率を増加させ、致死率を100%に上昇させたことが報告されており[9]、ARAの作用は健康時と病態時とで異なることが示されている。しかし、これまで慢性腎不全に対するARAの効果を検証した報告はない。さらに、慢性腎不全の進行に対するDHAとARAの作用をそれぞれ比較、または同時に摂取による作用を調べた研究はない。そこで、本章では、慢性腎不全の進行に対するDHAの効果、またはDHAとARAを同時摂取させた時の腎機能や腎臓への影響を評価した。

慢性腎不全ラットへのARAやDHAを含む食餌の摂取が腎機能に対しどう影響するのか検討したのは、本研究が初めてである。Sham-Control群と同様に慢性腎不全ラットにおいても血漿や腎臓中に摂取した脂肪酸が反映されたことを示した。体に反映された脂肪酸は肝臓において代謝され、脂質メディエーターを産生し、機能を発揮する[12]。ARAの代謝物であるPGD₂やPGE₂は腎臓の生理的機能の維持に、DHAの代謝物は腎臓組織の保護作用や腎症の発症抑制に重要である。本研究では、腎不全処置により腎臓中で代謝物量が減少することが明らかとなった。対して、ARAやDHAを含む食餌の摂取が、代謝物量の減少を抑制させた。しかし、腎不全処置16週間後の腎臓中代謝物量と腎機能との間に相関性は認められなかった。前述したように、脂質メディエーターは急性の炎症反応において産生量が変化する[20]。そのため、腎不全処置16週間後である比較的慢性状態の腎臓では炎症反応が収束している段階であり、脂質メディエーターと腎機能との関係性については確認できなかったと考えられた。

先行研究では、本研究に使用した慢性腎不全モデルラットの腎機能の指標として尿中アルブミン排泄量や C_{cr} 値の評価が使用され、腎障害の程度を調べることが行われている[12]。先行研究における慢性腎不全ラットの C_{cr} 値では、5/6 の腎臓を摘出し、12 週間後において有意な C_{cr} 値の低下が示されている[12]。尿中アルブミン排泄量は、5/6 の腎臓を摘出直後から 12 週間かけて著しい増加の一途をたどったことが示されている。同様に、本研究でも腎不全処置 12 週間後において顕著な C_{cr} 値の低下が認められた。尿中アルブミン排泄量は腎不全処置後から増加し、12 週間後まで、顕著に増加したことが認められた。これらのことから、先行研究と同様に本研究で使用した慢性腎不全モデルラットは、12 週間かけて進行的に腎機能が低下したことが認められた。この腎機能低下に対して、ARA と DHA を含む餌を摂取することで、尿中アルブミン排泄量の増加を軽減し、慢性腎不全の進行を抑制させる作用があることが本研究で初めて明らかとなった。

腎臓の炎症は炎症性サイトカインが関与し、尿中アルブミン排泄の発生に寄与することが報告されている[11]。そのため、本研究では腎不全ラットにおける腎臓中の炎症性・抗炎症性サイトカインを評価し、腎機能との関係性を評価した。その結果、腎不全処置 16 週間後の腎臓中では TNF- α や TGF- β_1 量が増加し、これらの増加が腎機能低下に関与する可能性が示唆された。特に、TGF- β_1 は抗炎症性サイトカインとして知られる一方で、腎臓では組織の線維化を促進させ、尿中アルブミン排泄を引き起こす原因の一つとして知られている[16,17]。本研究では、ARA や DHA を含む食餌の摂取により、腎不全処置 16 週間後の腎臓中 TGF- β_1 量の増加を抑制したため、本研究では ARA や DHA を含む食餌の摂取により腎臓の線維化を抑制し、腎機能低下の抑制に関与する可能性が考えられた。また、本慢性腎不全モデルでは、腎機能低下に伴う糸球体肥大や糸球体硬化、尿細管の拡張が観察されており、これらの組織異常が尿中アルブミン排泄量の増加及び、腎機能の低下と関与することが報告されている[12]。しかし、本研究では上記のような組織異常が確認されなかった。そのため、本研究では組織異常を引き起こす炎症や他の因子が直接、腎機能低下に関与する可能性が考えられた。

酸化ストレスは腎機能を低下させることが報告されている。そこで、本研究では慢性腎不全ラットの腎機能低下の原因について調べるため、腎臓中酸化ストレスを評価し、酸化ストレスと腎機能との関係性を評価した。その結果、腎不全処置 16 週間後の腎臓中では酸化ストレスの増加が認められなかった。しかし、DHA や ARA と DHA を両方含まれる食餌の摂取によって腎臓中の酸化ストレスを抑制させることが明らかとなった。腎不全処置後の腎臓中 ROS 量が増加しなかった理由について、酸化ストレスの指標である ROS は、反応性が高く、非常に不安定な物質であり、体内のタンパク質や脂質などと反応し、酸化生成物を産生する[15]。

そのため、腎不全処置 16 週間後の腎臓では、すでに発生した ROS が体内で反応し、酸化生成物が生成されたことにより、CRF-Control 群の腎臓中 ROS 量の増加が認められなかったことが考えられた。そこで、腎不全処置 4 週間後に採取した血漿中から酸化ストレスの指標である LPO 量を評価した。LPO は活性酸素と脂質が反応してできた生成物である。腎不全処置 4 週間後における慢性腎不全モデルの血漿中 LPO 量は顕著な増加が認められ、この増加と尿中アルブミン排泄量との間に有意な正の相関関係が認められた。このことから、腎不全処置後は直ちに血漿中の酸化ストレスが増加し、この増加が腎機能の低下につながることや、腎不全処置 4 週間後では腎臓においても酸化ストレスが増加し、腎機能低下と関係する可能性が考えられた。しかし、腎不全処置 4 週間後の腎臓は回収しておらず、腎臓での作用は不明である。そのため、腎不全処置 4 週間後の腎臓中酸化ストレス、腎機能との関係を調べるためにはさらなる実験が必要である。

第 2 章

慢性腎不全の腎臓中酸化ストレスと線維化に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

第 1 章では、腎不全処置後に尿中アルブミン排泄量が 12 週間かけて徐々に増加し、ARA または DHA を含む食餌によって軽減されることを明らかにした。さらに、ARA と DHA の摂取は腎不全による血漿中の LPO 量の増加を抑制し、腎不全処置 4 週間後の慢性腎不全モデルラットの腎機能低下の抑制に関与していることが示唆された。しかし、腎不全処置 4 週間後の腎臓への影響は直接検討しておらず、ARA や DHA の作用は不明なままとなっていた。

ROS の過剰産生は酸化ストレスを発生し、慢性腎臓病の進行につながるということが報告されている[21]。ROS は、呼吸によって体内に取り込まれた酸素の一部が通常よりも活性化された状態になったものであり、ヒトを含めた哺乳類では取り込んだ酸素の 1~3%が ROS に変換されると推測されている。生体内での主な ROS 発生源はミトコンドリアであり、生体内の約 95%の酸素を消費する。抗酸化防御能の低下により、体内での活性酸素量と抗酸化能とのバランスが崩れることで、ROS の過剰産生を引き起こし、酸化ストレスを生じる[26]。腎機能低下状態は、抗酸化酵素の活性や抗酸化物質の血中濃度が低下し、酸化ストレス亢進状態であることが報告されている[10]。また腎不全障害では、尿毒症物質が ROS の過剰産生に関与することも報告されている[22]。尿毒症物質とは、尿毒症を引き起こす物質の総称であり、腎機能が正常の場合、尿毒症物質は腎臓から尿中へ排泄され体内への蓄積を防いでいる。しかし、腎機能低下状態では、尿毒症物質の排泄が困難となり、生体内に蓄積する。尿毒症物質の中で代表的な物質として知られているインドキシル硫酸(indoxyl sulfate, IS)は糸球体メサンギウム細胞や近位尿細管細胞に蓄積し、NAD(P)H oxidase を活性化することで、ROS を増加させる。他にも、IS をはじめとする各尿毒症物質が体内に蓄積することで、ROS 産生が亢進し、近位尿細管細胞、糸球体メサンギウム細胞および糸球体足細胞の障害により CKD を悪化させることが報告されている[22]。さらに IS は酸化ストレスを発生させるだけでなく、腎線維化を増加させ、腎不全を促進させる物質としても知られている。IS による ROS の過剰産生は線維化促進に関わる TGF- β_1 や α -平滑筋アクチン(α -smooth muscle actin, α -SMA)の発現を増加させ、腎臓の間質線維化や糸球体硬化を発生させることが報告されている[23]。また、IS は健常者に比べ、腎不全患者の血清中で顕著に増加することが報告されている[23]。そのため、本病態モデルにおいても、IS の蓄積による ROS の過剰産生が酸化ストレスを引き起こし、慢性腎不全の進行を促している可能性が考えられた。しかし、本病態モデルラットにおける IS の蓄積や酸化ストレス状態、腎線維化との関連は不明である。さらに ARA 及び、DHA 摂取による、腎不全処置後 4 週間における腎臓の酸化ストレスおよ

び腎線維化にどのような影響があるかはわかっていない。そこで、5/6 腎摘出ラットに ARA および DHA を摂取させ、腎不全処置 4 週間後に腎臓を回収し、IS 量、腎臓の酸化ストレスおよび腎臓の線維化に及ぼす影響を検討した。

第 1 節 実験方法

1-1. 実験動物

動物の飼育及び管理は城西大学動物実験管理委員会の承認された後(H31076号)、城西大学動物実験規定、日本生理学動物実験指針に基づいて行った。Sprague Dawley ラット(雄性、6週齢)は三協ラボサービス(東京、日本)から購入した。ラットは、室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ に調節され、12時間ごとに(on、off 時間: 7:00 - 19:00)を設定した部屋で飼育した。飼料と水はラットに自由摂食、摂水させた。1週間馴化飼育後に無作為に正常(Sham)群($n = 7$)と腎不全(CRF)群に分けた。CRF 群はさらに対照(Control)群($n = 7$)、ARA 群($n = 7$)、DHA 群($n = 7$)、ARA+DHA 群($n = 7$)の4群に分け、計5群で各実験飼料を与えた。実験飼料や腎不全処置の方法は第1章と同様のものを使用した。飼育ケージにて4週間観察を行った。右腎切除前(腎不全処置0週目)、および腎不全処置4週間後において24時間代謝ケージに収容した。

1-2. 腎機能評価

腎不全処置4週間後における腎機能評価を第1章と同様の方法で行った。

1-3. サンプルング

ラットの尿や血液サンプルの採取は第1章と同様の方法で行った。4週間飼育後、イソフルラン(ファイザー株式会社)麻酔下で開腹した。腹部下大静脈より採血後、肝臓、腎臓、心臓をそれぞれ採取した。

1-4. 組織学的評価

1-4-1. 標本作製

慢性腎不全モデルラットから臓器回収後、第1章と同様の方法で標本作製を行った。

1-4-2. H&E 染色とPAS 染色

H&E 染色とPAS 染色は、第1章と同様の方法で標本作製を行った。

1-4-3. Masson's Trichrome (MT) 染色

腎臓組織の線維化病変を観察するために行った。薄切した腎臓切片を脱パラフィン後、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン(武藤化学株式会社)に 1 分間浸し、核を染色した。水道水で余分なワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液を洗浄した後、0.75%オレンジ G 液(武藤化学株式会社)とマッソン染色液 B(武藤化学株式会社)= 2:1 で調製した染色液に 1 分間浸し、細胞質を染色した。水道水で洗浄後、2.5%リンタングステン酸(武藤化学株式会社)に 30 秒間浸し、媒染後、アニリン青液(武藤化学株式会社)に 3 分間浸し、膠原線維を青く染色した。その後、水道水で 10 分間色出しした後、脱水、透徹を行い EUKITT で封入した。染色像はオールインワン蛍光顕微鏡を用いて撮影し、画像解析ソフト BZ-X Analyzer で腎臓組織 1 枚に対する線維化病変の割合(%)を算出した。

1-4-4. α -平滑筋アクチン(α -SMA) 免疫組織化学染色(免疫染色)

α -SMA 検出には、抗 α -SMA 抗体(1/500; GeneTex, CA, USA)を使用した。薄切切片を脱パラフィン後、10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)で 95°C、1 時間の賦活化を行った。10 分間流水で水洗、0.1%Tween[®] 20(Sigma-Aldrich)と 1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有トリス緩衝生理食塩水(TBST)で洗浄後、TBST で希釈した 5%正常ヤギ血清を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、二次抗体(Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody: EMD Millipore, MA, USA)を室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride(DAB, 武藤化学株式会社)溶液を試料面に滴下し、光学顕微鏡で観察しながら発色させた後、流水水洗をした。対比染色としてヘマトキシリン染色をした。その後、脱水透徹を行い、EUKITT で封入した。染色像はオールインワン蛍光顕微鏡を用いて撮影し、画像解析ソフト BZ-X Analyzer で腎臓組織 1 枚に対する α -SMA 陽性細胞の割合(%)を算出した。

1-4-5. マクロファージ免疫染色

CD86 検出には、抗 CD86 抗体(1/100; Abcam, CA, USA)を使用した。CD163 検出には、抗 CD163 抗体(1/500; Abcam)を使用した。薄切切片を脱パラフィン後、賦活化から撮影まで α -SMA 免疫染色と同様の方法で行った。

1-5. 血漿、腎臓中の脂肪酸組成

腎臓や血漿中の脂肪酸組成の評価方法は、第 1 章と同様の方法で行った。

1-6. エイコサノイド及び遊離脂肪酸の抽出および LC/MS/MS 定量方法

腎臓中の脂質酸化生成物のサンプル処理および測定方法は第 1 章と同様の方法で行った。

1-7. 酸化ストレス評価

ROS や ONOO⁻の測定前のサンプル処理方法や測定方法は第 1 章と同様の方法で行った。過酸化脂質量を測定するために、冷凍保存したホモジネート 100 μ L に 8.1%ドデシル硫酸ナトリウム溶液(SDS, Bio-Rad)を 200 μ L、0.4%チオバルビツール酸(東京化成工業株式会社)/20%酢酸溶液(富士フィルム和光純薬株式会社)を 3 mL、H₂O を 700 μ L 加え、混合し 95°C で 60 分加温し、反応を促進させた。氷中で反応停止後、H₂O を 1 mL、1-ブタノール(富士フィルム和光純薬株式会社):ピリジン(富士フィルム和光純薬株式会社)= 15:1 の混合溶液を 5 mL 加え、5 分間振とうさせ、遠心分離(1,330 x g、20 min、20°C)後、上清を回収し、分光光度計を用いて 532 nm の吸光度を測定した。また、1, 1, 3, 3, テトラメトキシプロパン(東京化成工業株式会社)を標品とし、標準曲線を作成した。その標準曲線を用いて、測定した吸光度から過酸化脂質量を算出した。

1-8. 腎臓中尿毒症物質の定量方法

1-8-1. サンプル処理

冷凍保存したホモジネート 100 μ L に 400 μ L のアセトニトリル(富士フィルム和光純薬株式会社)を加え混合させた後、-30°C で 30 分間冷凍保存した。遠心分離(8,400 x g、10 min、4°C)後、上清をサンプルとしてバイアル(Ambr silanized screw top vial、2 mL)に移し替え、沈殿物は取り除き、上清をサンプルとした。その後、LC/MS/MSを用いて尿毒症物質のインドキシル硫酸(IS)の測定を行った。

1-8-2. LC/MS/MS の測定条件

LC/MS/MS システムは、第 1 章と同様の方法で行った。測定用のカラムは、ReproSil-Pur 120 C18-AQ (2 mm i.d. × 100 mm, 3 μm, Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany) を用いて行った。移動相は 0.1%ギ酸/20%アセトニトリル(移動相 A)と 10 mM 酢酸アンモニウム/80%アセトニトリル(移動相 B)を用い、流速は 0.4 mL/min とした。グラジエントは以下の設定で行った。0-2 min: 10%移動相 B、2.1-12 min: 10-100%移動相 B、12.1-15 min: 100%移動相 B、15.1-18 min: 10%移動相 B。なお、injection volume は 5.0 μL に設定し、化合物のイオン化は、electro spray ionization (ESI) 法を用いた。各化合物の測定条件は Table 7 に記載の通りである。

Table 7. LC/MS/MS settings for IS.

uremic toxin	ion mode	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Q1 Pre Vias (V)	CE (V)	Q3 Pre Vias (V)
IS	negative	212.1	132.0	22.0	22.0	13.0

IS, indoxyl sulfate

1-9. サイトカインの測定

炎症性サイトカインに分類される TNF-α や繊維化促進に関わるサイトカインである TGF-β₁ のサンプル調製及び測定方法は第 1 章と同様の方法で行った。

1-10. 尿中腎毒症物質の測定

腎不全処置 4 週間後の尿サンプルを遠心分離 (500 x g, 5 min, 4°C) 後、上清を採取した。その後、Bio-Plex Pro RBM Kidney Toxicity Assay kit (Bio-rad) を用いて、尿中の clusterin や IL-18, kidney injury molecule-1 (KIM-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), osteopontin などの腎毒症物質を測定した。

1-11. 遺伝子解析

1-11-1. RNA の抽出・定量

腎臓組織に ISOGENII (ニッポンジーン株式会社、東京、日本) を 1 mL 加えてホモジネートし、説明書に従い RNA を回収した。回収した total RNA は Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて吸光度を測定、260 nm の吸光度から RNA 濃度を測定した。また、260 nm/230 nm の吸光度比、260 nm/280 nm の吸光度比から RNA の純度を確認した。

1-11-2. Real time-PCR

回収した RNA 1 μg から QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (QIAGEN、Hilden、DEU) を用いて cDNA を作成した。cDNA をテンプレートとして、primer3 ソフトウェア (Whitehead Institute、MA、USA) を用いて設計した *catalase* や *glutathione peroxidase (gpx)* に特異的なプライマー (Table 8) と QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて real time-PCR (7500 Real Time PCR system、Applied Biosystems) により目的遺伝子を増幅させ、増幅を蛍光強度として観察した。得られた threshold cycle (CT) から各遺伝子の発現量比を $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により算出した。

Table 8. Sequence of specific primers used for real time-PCR

	Forward	Reverse
<i>catalase</i>	5'-TGCTGCCCTTTTCTGTTCCCTT-3'	5'-AAGGTGCTGGGTAGGGAAGT-3'
<i>glutathione peroxidase</i>	5'-TTGACCCCTAACCAAGGATGC-3'	5'-CACCCCTTCTGCGTTGTATT-3'
18s	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'

1-12. 電気泳動、ウエスタンブロット

1-12-1. サンプル調製

腎臓中のタンパク濃度を測定するために、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.)を説明書の方法に従って用い、タンパク定量を行った。測定した各サンプル中のタンパク量が 25 µg となるように精製水で希釈した。調製したサンプルに Sample buffer + (±)-Dithiothreitol (DTT) (調製方法; Table 9)を 1:1 の比率で加え混合し、Veriti Thermal Cycler (Thermo Scientific) を用いて加温処理し、電気泳動にてアプライするサンプルを調製した。

1-12-2. SDS-PAGE

電気泳動ゲルは Table に従い、10%ゲルを調製 (調製方法; Table 9)し、使用した。電気泳動には、ミニプロティアン Tetra セル (Bio-Rad)を使用した。作製した 10%ゲルを装置にセットし、1 × Running buffer を注いだ。調製したサンプルを 10 µL (25 µg/well)アプライしたのち、15V から 75V に変化させながら 2 時間泳動を行った。

1-12-3. Western Blot

電気泳動後の転写には、ミニトランスブロット®セル (Bio-Rad)を使用した。ClearTrans® SP PVDF Membrane, Hydrophobic, 0.2 µm (富士フィルム和光純薬株式会社)をメタノールに 10 秒間浸し、調製した Towbin buffer (調製方法; Table 10)で洗浄した。ゲルの上に PVDF Membrane をのせ、厚さ 0.93 mm の Filter paper で挟み込んだ後、陰極側にゲル、陽極側に PVDF Membrane となるように装置にセットした。装置に Towbin buffer を注ぎ、100V で 1 時間転写を行った。転写後、PVDF Membrane を Ponceau S (調製方法; Table 10)に 5 min 浸し、TBST で洗浄後、転写バンドを確認した。*p*-ERK/ERK 検出には、抗 *p*-ERK 抗体 (1/1000; GeneTex, CA, USA)と抗 ERK 抗体 (1/1000; GeneTex)を使用した。5%BSA/TBST で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体を回収して TBST で 3 回洗浄後、二次抗体 (Dako EnVision+Dual Link System-HRP, Dako North America, CA, USA)を室温で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、ECL™ Western Blotting Analysis (GE Healthcare, Amersham, UK)を反応させ、バンドを可視化した。WSE-6100 LuminoGraphI (ATTO)を用いて、PVDF Membrane を撮影後、バンドのシグナル強度を CS Analyser 4 (ver 3, ATTO)を用いて解析した。

Table 9. Preparation of reagents for SDS-PAGE

	Reagents	Amount
	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	63 mL
10 × Sample buffer (-DTT)	SDS	10 g
	Glycerol	40 mL
	BPB	0.01 g
	H ₂ O	to 100 mL
	DTT	0.03239 g
5 × Sample buffer + DTT	5 × Sample buffer	1.0 mL
	Tris	9.0855 g
0.75 M Tris-HCl (pH 8.8)	pH adjusts with HCl	
	H ₂ O	to 100 mL
	Tris	3.0285 g
0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	pH adjusts with HCl	
	H ₂ O	to 100 mL
	Tris	3.0285 g
12% Amps	Amps	1.0 g
	H ₂ O	to 8.3 mL
10% SDS	SDS	10.0 g
	H ₂ O	to 100 mL
10 × Running buffer	Tris	30.3 g
	Glycine	144 g
	H ₂ O	to 1000 mL
Separating Gel (10%)	30% acrylamide mixture	6.0 mL
	H ₂ O	2.75 mL
	0.75 M Tris-HCl (pH 8.8)	9.0 mL
	10% SDS	180 μL
	12% Amps	50 μL
	TEMED	20 μL
Stacking Gel (3%)	30% acrylamide mixture	0.75 mL
	H ₂ O	2.8 mL
	0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	3.75 mL
	10% SDS	75 μL
	12% Amps	27 μL
	TEMED	12 μL

(±)-Dithiothreitol (DTT, 富士フィルム和光純薬株式会社), 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris; 富士フィルム和光純薬株式会社), Sodium dodesylsulfate (SDS, 富士フィルム和光純薬株式会社), Glycerol (富士フィルム和光純薬株式会社), Bromophenol Blue (BPB; 富士フィルム和光純薬株式会社), Glycine (富士フィルム和光純薬株式会社), 30% acrylamide mixture (富士フィルム和光純薬株式会社), Ammonium persulfate (Amps; Bio-Rad), *N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED, 富士フィルム和光純薬株式会社)

Table 10. Preparation of reagents for Western blotting

	Reagents	Amount
Towbin buffer	Tris	3.03 mL
	Glycine	14.4 g
	Methanol	200 mL
	H ₂ O	to 1000 mL
Ponceau S	Ponceau S, practical grade	0.05 g
	H ₂ O	to 50 mL
	Acetic acid	2.5 mL
TBS (pH 7.0)	Tris	3.03 g
	NaCl	14.4 g
	pH adjusts with HCl	
	H ₂ O	to 1000 mL
TBS-T	TBS	1000 mL
	Tween 20	1 mL
5% BSA/TBST	BSA	2.5 g
	TBST	50 mL

Methanol(富士フィルム和光純薬株式会社), Tris-buffer saline(TBS), NaCl(富士フィルム和光純薬株式会社), Tris-buffer saline + Tween 20(Sigma-Aldrich)(TBST), Albumin Bovine Serum Globulin Free(BSA, 富士フィルム和光純薬株式会社)

1-13. 統計処理

測定データは平均値 ± 標準誤差で示した。群間の比較は一元配置分散分析で検定後、Tukey's Honest Significant Difference 検定を用いて群間比較を行った。検定の有意水準は5%とした。統計処理には JMP(JMP for MAC 16.0.0, SAS institute Japan 株式会社, 東京, 日本)を用いた。相関は Pearson Correlation Coefficient により評価した。

第 2 節 結果及び考察

2-1. 腎機能評価

腎不全処置 4 週間後のラットの体重と腎重量を Figure 10 に示す。ラットの体重は Sham-Control 群と比べ、CRF-Control 群で体重が約 13%有意に減少した(Figure 10A)。各食餌群では、各食餌摂取による影響は認められなかった。腎重量は、Sham-Control 群は両腎の重量、CRF-Control 群, ARA 群, DHA 群, ARA+DHA 群は残存 1/6 腎臓の重量を測定した。結果として、第 1 章での腎重量(Figure 2B)とは異なり、腎不全処置 4 週間後の腎重量は 5 群間での差は見られなかった。理由として、腎不全処置による血圧の上昇により、腎切除部分が肥大したことが考えられる。

Figure 11 には、腎機能評価の結果を示す。評価には C_{cr} 値と尿中アルブミン排泄量を算出した。腎不全処置から 4 週間後の数値を示す。その結果、 C_{cr} 値は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で約 75%有意に低下した(Figure 11A)。しかし、各食餌摂取による影響は認められなかった。この結果は先行研究[12]や第 1 章の結果(Figure 2A)と同様の結果を示した。24 時間の尿中アルブミン排泄量は、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で有意に増加した(Figure 11B)。各食餌群では、第 1 章の尿中アルブミン排泄量(Figure 2B)とは異なり、ARA 群、ARA+DHA 群で増加傾向にあった。そのため、腎不全処置 4 週間後では、ARA の摂取による腎機能維持効果は発揮していない可能性が考えられた。対して、DHA 群では CRF-Control 群と比較して、約 63%尿中アルブミン排泄量が抑制された。そのため、腎不全処置 4 週間後の慢性腎不全ラットでは、DHA を含む食餌の摂取により、尿中アルブミン排泄を抑制し、慢性腎不全の進行を抑えることが明らかとなった。

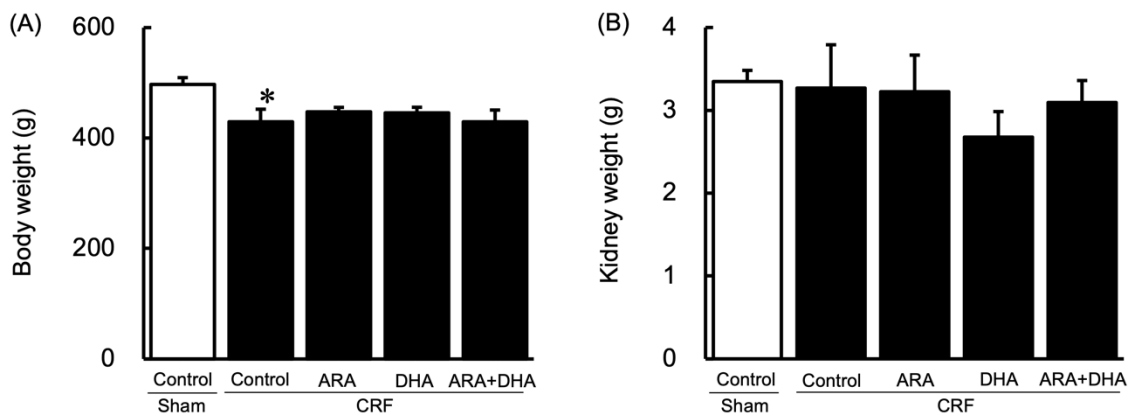


Figure 10. Body weight and kidney weight at 4 weeks after nephrectomy. (A) body weight; (B) kidney weight. The value is Sham-Control group represents two kidneys; the value in all over groups in the remaining kidney nephrectomy of the five sixth of the kidneys. Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 5-7$). *, $P < 0.01$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group).

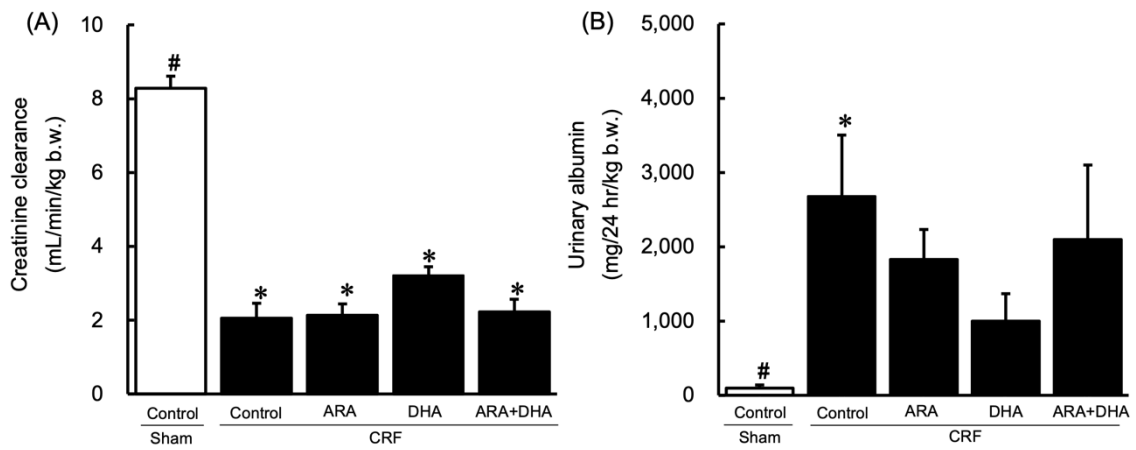


Figure 11. Changes in renal functions. (A) C_{cr} and (B) Urinary albumin excretion levels 4 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 5-7$). *, $P < 0.01$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-2. 血漿、および腎臓中の脂肪酸組成

前述したように、食餌中の脂肪酸は、摂取直後から血漿中に移行される。血漿中へ移行後、腎臓中に反映されるためには約 1 ヶ月要する。また、1 ヶ月間摂取した脂肪酸が腎臓中へ反映された後も、4 ヶ月間脂肪酸組成が維持されていることが報告されている[13]。そこで、本研究における慢性腎不全ラットでも摂取させた脂肪酸が血漿中および腎臓中に反映されたか評価した。Table 11 は腎不全処置 4 週間後における血漿中の脂肪酸組成を示す。血漿中には C14:0 や、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2、 α -リノレン酸 (C18:3)、ARA、C20:5 ω 3、DHA が存在していることが示された。C18:2 量は ARA 群と ARA+DHA 群において有意に低下した。ARA 量は CRF-Control 群と比較して ARA 群と ARA+DHA 群において有意に増加した。DHA 量は CRF-Control 群と比較して DHA 群と ARA+DHA 群において有意に増加した。この結果から、本章においても摂取した特定の脂肪酸が血漿中に反映されたことが示された。

Table 12 は腎不全処置 4 週間後における腎臓中の脂肪酸組成を示す。腎臓中には C14:0 や、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2、ARA、C20:5 ω 3、C24:0、DHA が存在していることが示された。C18:2 量は ARA 群と ARA+DHA 群において有意に低下した。ARA 量は CRF-Control 群と DHA 群において有意に低下した。C20:5 量は DHA 群において有意に増加した。C24:0 量は CRF-Control 群において有意に低下した。DHA 量は DHA 群と ARA+DHA 群において有意に増加した。このことから、1 ヶ月前の食餌摂取により、各脂肪酸がラットの体内に取り込まれ腎臓中へ反映されたことが示された。

Table 11. Fatty acid composition in plasma

(%)	Sham	CRF			
	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
C14:0	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C16:0	28.2 ± 0.9 ^{a,b}	25.0 ± 1.3 ^{a,b}	24.1 ± 0.8 ^b	28.7 ± 1.0 ^a	27.1 ± 1.1 ^{a,b}
C16:1	3.5 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.4	3.5 ± 0.6	2.6 ± 0.4
C18:0	10.5 ± 0.6	11.5 ± 1.0	11.8 ± 0.6	10.3 ± 0.5	11.6 ± 0.9
C18:1	19.0 ± 1.2	18.1 ± 1.1	16.4 ± 0.8	19.2 ± 1.0	5.9 ± 1.2
C18:2 ω -6	14.1 ± 0.4 ^b	17.1 ± 0.7 ^a	10.5 ± 0.5 ^c	16.7 ± 0.6 ^a	9.8 ± 0.7 ^c
C18:3 ω -3	1.8 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.5 ^{a,b}	2.0 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.2 ^{a,b}	0.7 ± 0.2 ^b
C20:4 ω -6	15.6 ± 1.4 ^a	16.2 ± 1.5 ^a	28.2 ± 1.0 ^b	11.3 ± 1.1 ^a	24.4 ± 2.2 ^b
C20:5 ω -3	1.5 ± 0.2 ^{a,b}	2.7 ± 0.6 ^a	0.8 ± 0.4 ^b	2.2 ± 0.2 ^{a,b}	1.3 ± 0.4 ^{a,b}
C22:6 ω -3	1.3 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.3 ^a	1.3 ± 0.2 ^a	3.5 ± 0.3 ^{a,b}	4.3 ± 1.2 ^b
ω -6/ ω -3	4.9 ± 0.6 ^a	5.1 ± 0.4 ^a	10.5 ± 1.4 ^b	3.1 ± 0.1 ^a	4.9 ± 0.7 ^a

C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2 ω -6, linoleic acid; C18:3 ω -3, α -linolenic acid; C20:4 ω -6, arachidonic acid; C20:5 ω -3, eicosapentaenoic acid; C22:6 ω -3, docosahexaenoic acid; ω -6/ ω -3, ratio of ω -6 and ω -3. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 12. Fatty acid composition in kidney

(%)	Sham	CRF			
	Control	Control	ARA	DHA	ARA+DHA
C14:0	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2
C16:0	24.4 ± 1.1	26.4 ± 1.4	24.8 ± 1.0	26.4 ± 1.0	26.8 ± 1.0
C16:1	1.7 ± 0.3	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	2.1 ± 0.4	2.2 ± 0.4
C18:0	16.2 ± 0.8	13.3 ± 1.5	16.1 ± 1.2	14.2 ± 1.1	15.2 ± 1.1
C18:1	11.9 ± 1.5	19.9 ± 2.6	15.9 ± 2.3	16.9 ± 2.4	15.8 ± 2.4
C18:2 ω -6	11.2 ± 0.3 ^a	11.8 ± 0.8 ^a	8.8 ± 0.5 ^b	13.4 ± 0.5 ^a	8.0 ± 0.5 ^b
C20:4 ω -6	25.1 ± 1.9 ^a	15.8 ± 2.5 ^b	22.7 ± 2.4 ^{a,b}	15.0 ± 2.4 ^b	21.3 ± 2.4 ^{a,b}
C20:5 ω -3	0.9 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^a
C24:0	1.8 ± 0.3 ^a	1.4 ± 0.2 ^{a,b}	1.7 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.2 ^{a,b}	1.6 ± 0.2 ^{a,b}
C22:6 ω -3	1.9 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.2 ^a	3.1 ± 0.2 ^b	2.8 ± 0.2 ^b
ω -6/ ω -3	13.4 ± 0.6	11.0 ± 1.1	12.7 ± 0.8	5.3 ± 0.3	7.6 ± 0.2

C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2 ω -6, linoleic acid; C20:4 ω -6, arachidonic acid; C20:5 ω -3, eicosapentaenoic acid; C24:0, lignoceric acid; C22:6 ω -3, docosahexaenoic acid; ω -6/ ω -3, ratio of ω -6 and ω -3. Values are presented as the mean ± SEM (n = 5-7). ^{a,b}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

2-3. 組織学的評価

腎臓切片の病理染色の結果を Figure 12 と Figure 13 に示す。HE 染色による評価では、Sham-Control 群と比べて CRF-Control 群、ARA 群、ARA+DHA 群で組織の空胞化が顕著に観察された (Figure 12B,C,E)。組織の空胞化とは、高血圧の持続により糸球体の輸入細動脈や糸球体毛細血管が損傷を受け破裂した状態を示す [17]。本研究で使用した慢性腎不全モデルラットでは、血圧の上昇及び、血管の肥厚が顕著に確認されている [12]。そのため、本研究における腎不全処置 4 週間後の慢性腎不全ラットにおいても、残存腎臓では健常時より血流量、血圧が増加したことが考えられる。さらにこの血圧の増加が組織の空洞化を発生させ、腎不全処置 4 週間後にて尿中アルブミン排泄量が増加したと考えられた。また、組織学的評価として、糸球体の内径面積/外径面積比の算出を試みたものの、CRF-Control 群、ARA 群、ARA+DHA 群の組織の空胞化・損傷がひどく、算出するための糸球体の数が足りず、数値化での評価が困難であった。DHA 群でも組織の空胞化が観察されたが、CRF-Control 群と比べて空胞化の数は少ない傾向が観察された。腎臓切片の PAS 染色結果では、Sham-Control 群と比べて CRF-Control 群、ARA 群、ARA+DHA 群で尿細管内における硝子円柱やメサンギウム細胞の増殖、メサンギウム基質の沈着などの糸球体病変が顕著に観察された (Figure 13)。硝子円柱はアルブミンが凝固沈殿し形成したものである。そのため、尿中アルブミン濃度の上昇によりアルブミンが凝固沈殿し、糸球体内に硝子円柱が形成、沈着したと考えられた [24]。硝子円柱は腎機能が健常な場合でも認められるが、腎障害時は顕著に観察される。さらに、糸球体が損傷を受けると糸球体内にメサンギウム基質が増加する。硝子円柱やメサンギウム基質の増加は高血圧が原因と知られており、増加した部分において糸球体硬化が発生し、最終的に慢性腎不全に至る [25]。そのため、本研究における尿中アルブミン排泄の原因の一部は血圧が上昇したことにより引き起こされたものだと考えられる。第 1 章での腎不全処置 16 週間後の結果 (Figure 3) と比べると、腎不全処置 4 週間後の腎臓切片では糸球体病変が顕著に確認された。また、この糸球体病変は ARA 群や ARA+DHA 群においても顕著に確認できた。このことから、腎不全処置 4 週間後では腎不全処置 16 週間後の結果 (Figure 3) と比較して、腎臓に血圧による負荷がかかり、組織損傷を引き起こしたのと考えられる。これらの組織異常に対して、DHA 群でも糸球体病変が観察されたものの、CRF-Control 群と比べて糸球体病変数は少ない傾向がみられた。DHA は血圧低下や、血管内皮細胞の保護作用を持つことが報告されている [9]。このことから、DHA の摂取は腎不全処置 4 週間後での血圧負荷を軽減し、組織損傷を防いだことが考えられた。

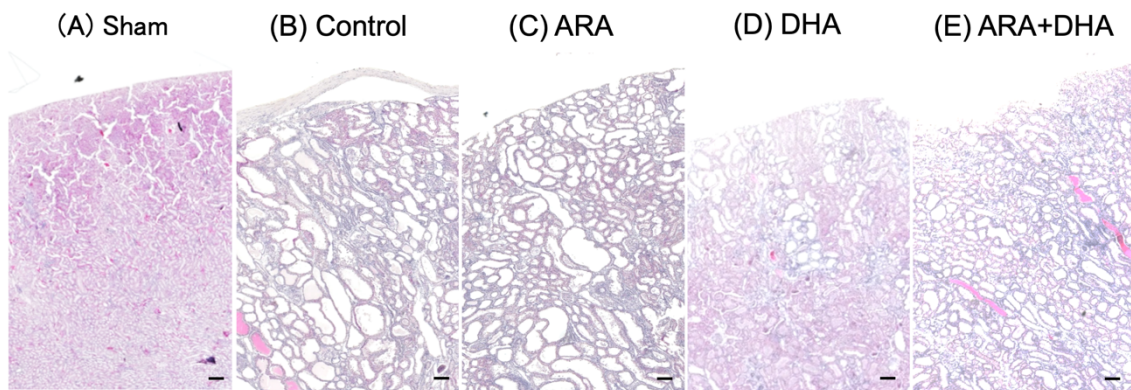


Figure 12. Histological evaluation by Hematoxylin eosin staining of kidney.

Sham-Control (A), CRF-Control (B), ARA (C), DHA (D), and ARA+DHA (E) group (n = 5-7). Scale bar; 50 μ m.

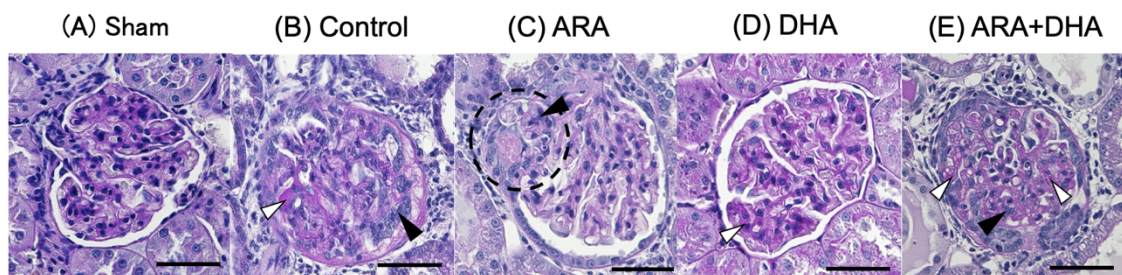


Figure 13. Histological evaluation by Periodic acid schiff staining of kidney.

Sham-Control (A), CRF-Control (B), ARA (C), DHA (D), and ARA+DHA (E) group (n = 5-7). Arrows in black indicates proliferation of mesangial cells. Arrows in white indicates growth of mesangial substrates. Circle indicates damage of glomeruli. Scale bar; 50 μ m.

2-4. 酸化ストレス評価

第1章と同様に、腎臓の酸化ストレス評価として、腎臓中の ROS 量や ONOO⁻量、LPO 量を測定した結果を Figure 14 に示す。腎不全処置 4 週間後の腎臓中 ROS 量は、Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群と ARA+DHA 群において増加した(Figure 14A)。しかし、この増加に対して、DHA 群では抑制された。ONOO⁻量は Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群において顕著な増加を示した(Figure 14B)。しかし、この増加に対し、各食餌の摂取により抑制された。腎不全処置 4 週間後の腎臓中 LPO 量は 5 群間で変化は認められなかった(Figure 14C)。腎不全処置 4 週間後の腎機能と腎臓中の酸化ストレスの関係を調べるために、相関による評価を行った結果、腎不全処置 4 週間後の腎臓中 ROS 量と C_{cr} 値との間に有意な負の相関関係($r = -0.4633$, $P = 0.0130$)、尿中アルブミン排泄量との間に有意な正の相関関係($r = 0.4019$, $P = 0.0340$)が認められた。このことから、腎臓中における ROS 量の増加が腎機能を低下させることが示された。また、第1章の腎不全処置 16 週間後の腎臓中の ROS 量は ARA+DHA の摂取によって増加を抑制した(Figure 4A)ものの、今回の腎不全処置 4 週間後の腎臓中 ROS 量では、ARA+DHA の摂取でも増加を示したことから、腎不全処置 16 週間後と腎不全処置 4 週間後では、ARA や DHA 摂取による腎臓への作用が異なることが明らかになった。

次に、腎臓中の酸化ストレスの増加が腎機能の低下を促すことが考えられたため、腎臓中で酸化ストレスが増加した理由と、各食餌摂取による抑制効果のメカニズムについて検討した。酸化ストレスは抗酸化能力の低下が原因で、体内の活性酸素量と抗酸化能のバランスが崩れることにより過剰な活性酸素が産生され、酸化ストレスが発生することが報告されている[21]。そこで、腎不全処置 4 週間後の腎臓中の抗酸化酵素の mRNA 発現量を RT-PCR によって評価した。腎不全処置 4 週間後の抗酸化酵素: *catalase* と *gpx* の mRNA 発現量を Figure 15 に示す。両 mRNA とも Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群において有意に低下し、各食餌摂取による影響は認められなかった(Figure 15A,B)。以上のことから、腎不全処置 4 週間後の腎臓中酸化ストレス抑制効果に抗酸化酵素の影響は受けていない可能性が示され、活性酸素と抗酸化酵素とのバランスの乱れとは異なる作用が関係することが考えられた。

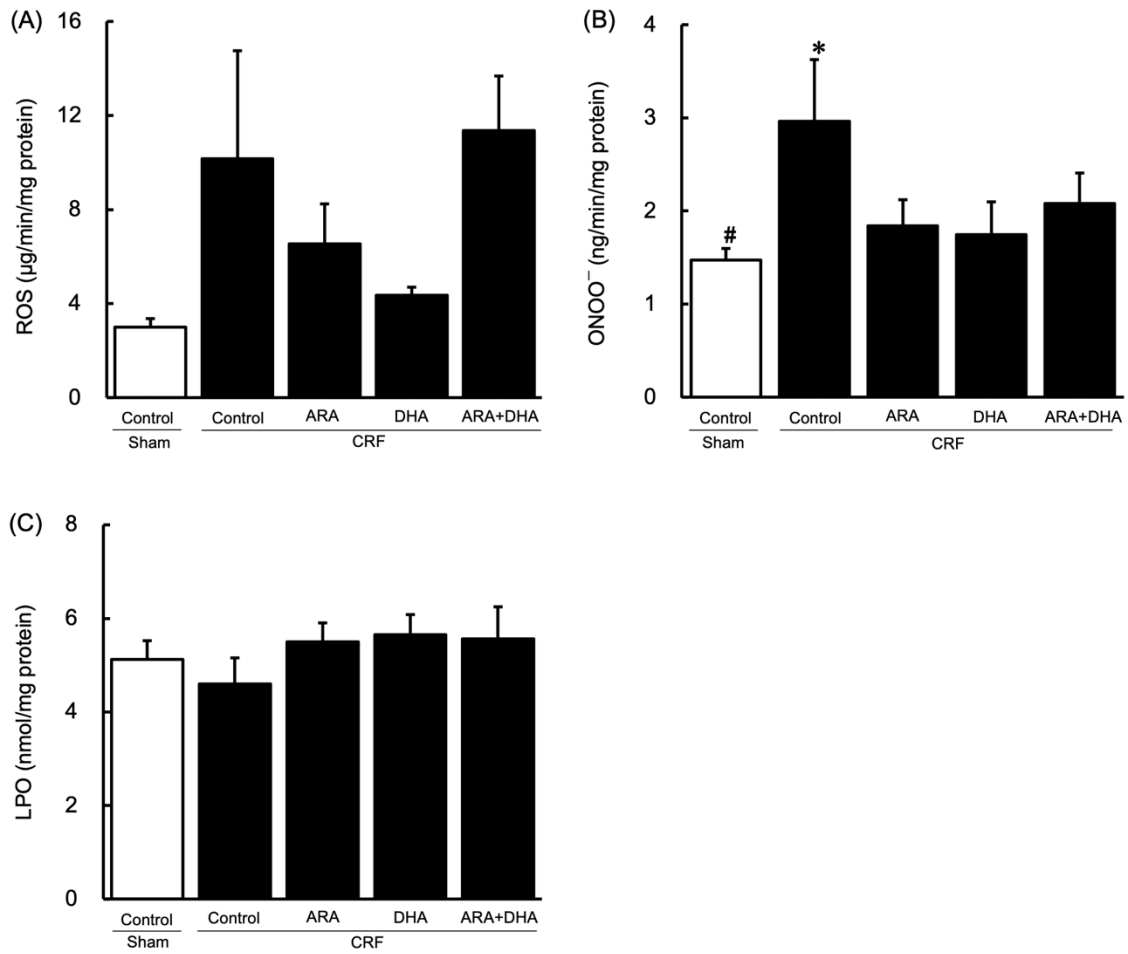


Figure 14. Oxidative stress levels in kidney. (A) ROS, (B) ONOO⁻, and (C) Malondialdehyde levels 4 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

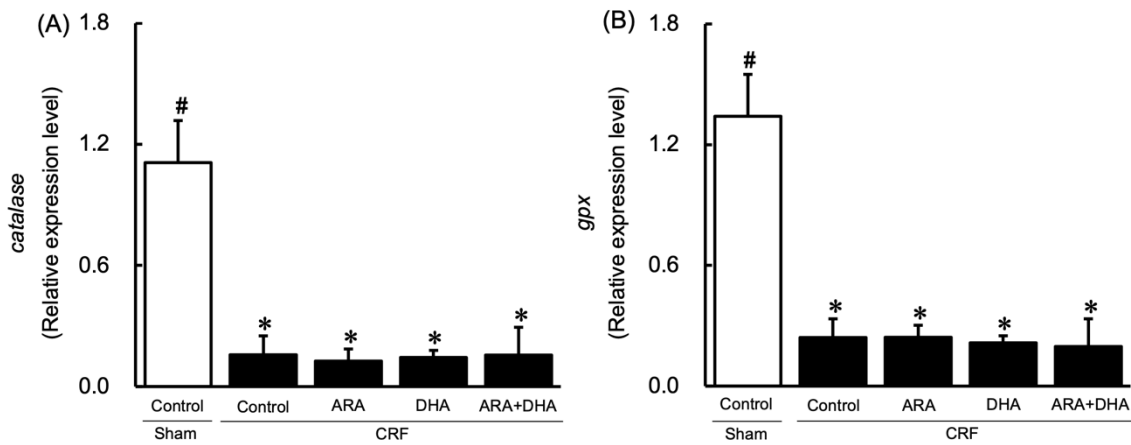


Figure 15. Anti-oxidant enzyme mRNA levels in kidney. (A) *catalase*, (B) *gpx* at 4 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-5. 尿毒症物質の蓄積による影響

慢性腎不全の進行に、尿毒症物質の蓄積が関与することが以前から報告されている[23]。この尿毒症物質の代表的な物質として、IS が挙げられる。IS は通常、食事由来のトリプトファンが腸内細菌によりインドールに変換され、このインドールが小腸から吸収、肝臓内で硫酸抱合され生成される。生成した IS は血液中から近位尿細管を介し、尿中に排泄される。しかし、腎障害時、腎機能低下とともに IS の尿中排泄が困難となり、近位尿細管細胞に IS が蓄積する。近位尿細管細胞に蓄積した IS は NADPH oxidase を活性化させ、過剰な ROS を産生することが報告されている[23]。このことから、本慢性腎不全モデルでの腎不全処置による腎臓中酸化ストレスの原因として、腎臓中の IS の蓄積が考えられた。また、PUFA 摂取による IS 蓄積に対する影響は検討されたことがない。そこで、腎臓中の IS を LC/MS/MS によって定量し、PUFA 摂取による IS 蓄積への影響を評価した。Figure 16 に腎不全処置 4 週間後及び、16 週間後の腎臓中の IS 量を示す。腎不全処置 4 週間後の腎臓中 IS 量は Sham-Control 群と比較して、顕著な増加を示した (Figure 16A)。対して、DHA 群において IS 量増加の抑制を示した。腎不全処置 16 週間後に腎臓中 IS 量においても、Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群において顕著な増加を示し、DHA 群及び ARA+DHA 群で IS 増加の抑制を示した (Figure 16B)。IS はタンパク質結合型の尿毒症毒素であり、クリアランスは低く、血中アルブミンと結合することで体内に蓄積することが知られている[26]。参考資料では、血液透析器を用いた血液透析除去性試験において F40S ダイアライザーの血液側に IS を添加したヒト血清アルブミンを循環させたのち、DHA を注入した結果、DHA が IS と競合し、アルブミンと結合することで、IS の除去率が増加したことが報告されている[26]。このことから、本研究においても慢性腎不全モデルラットに DHA を含む食餌の摂取により、体内の IS と DHA が競合的に結合することで、腎臓への IS 蓄積を抑制した可能性が考えられた。さらに相関による評価では、腎不全処置 4 週間後の腎臓中 IS 量と腎臓中の ROS 量との間に有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.4472$, $P = 0.0170$)。このことから、腎不全処置 4 週間後の腎臓中酸化ストレスの増大は、腎臓中での IS 量の増加が原因であり、DHA の摂取によって IS の蓄積を抑制する可能性が明らかとなった。腎機能との関係については、腎不全処置 4 週間後の腎臓中 IS 量と C_{cr} 値との間に有意な負の相関関係 ($r = -0.6333$, $P = 0.0003$)、尿中アルブミン排泄量との間に有意な正の相関関係 ($r = 0.9052$, $P = <.0001$) が認められたため、腎不全処置 4 週間後の腎機能の低下が腎臓中への IS 蓄積を引き起こし、腎臓中の ROS 量を過剰に産生させる可能性が示唆された。

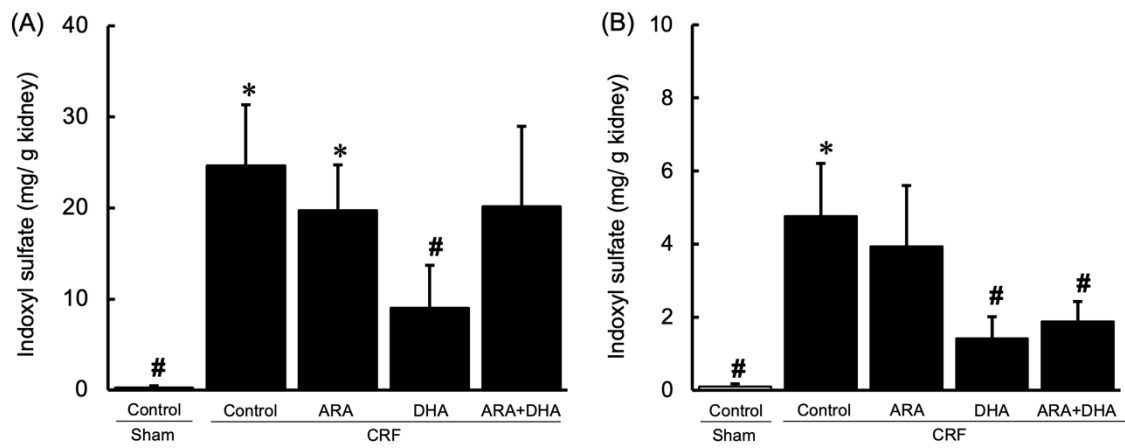


Figure 16. Indoxyl sulfate levels in kidney. (A) at 4 weeks, (B) at 16 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-6. 腎不全処置 4 週間後の腎臓中の炎症や線維化への影響

IS はマクロファージを活性化し、腎臓の線維化や糸球体硬化を引き起こすことが報告されている[23]。マクロファージにはいくつかの種類が存在し、炎症促進期に活性化する M1 マクロファージや炎症消失期に活性化する M2 マクロファージなどに分類される。そこで、本研究では腎臓中の M1 マクロファージ;CD86 と M2 マクロファージ; CD163 の陽性細胞を免疫組織化学染色によって評価した。腎不全処置 4 週間後における CD86 および CD163 の発現は Sham-Control 群と比べ、CRF-Control 群にて有意に増加した(Figure 17A-D)。CD86 の発現増加は DHA 群で減少した。しかし、CD163 の発現は各食餌を与えても変化はなかった。CD86 の活性化は TNF- α の産生を促し、CD163 の活性化は TGF- β_1 の産生を促す[27]。そのため、Figure 18 では腎不全処置 4 週間後の腎臓中 TNF- α 量と TGF- β_1 量を評価した。その結果、腎不全処置 4 週間後では、Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群において腎臓中の TNF- α 量が有意に増加し、各食餌の摂取によって抑制傾向を示した(Figure 18A)。しかし、腎臓中の TGF- β_1 量は 5 群間で変化は認められなかった(Figure 18B)。相関による評価では、CD86 の発現量と TNF- α 量($r = 0.7878$, $P = <.0001$)との間に有意な正の相関関係が認められた。対して、CD163 の発現量と TGF- β_1 量($r = -0.0330$, $P = 0.8871$)との間に相関性は認められなかった。これらの結果から、腎不全処置 4 週間後の腎臓組織では CD163 に比べ CD86 の発現が有意に増加しており、CD86 の活性化による TNF- α 量の産生が腎臓組織における炎症を促進させたと考えられた。

腎臓における TNF- α 量の増加は、 α -SMA の発現量の増加や腎臓の線維化に関与することが報告されている。そこで、Figure 19 では免疫組織化学染色による腎臓組織中の α -SMA 発現や MT 染色による腎臓の線維化を評価した。腎不全処置 4 週間後の CRF-Control 群、ARA 群、ARA+DHA 群では、 α -SMA 発現および腎線維化ともに Sham-Control 群より有意に増加した(Figure 19A-D)。一方で、DHA 群ではこれらの増加を有意に減少した。さらに、酸化ストレスと炎症・線維化との関係性を相関により評価した結果では、ROS と TNF- α ($r = 0.5892$, $P = 0.0010$)、 α -SMA($r = 0.5511$, $P = 0.0029$)、MT($r = 0.6843$, $P = <.0001$)との間に有意な正の相関関係が認められた。炎症と線維化との関係性を相関により評価した結果においても、TNF- α と α -SMA($r = 0.5607$, $P = 0.0024$)、MT($r = 0.5805$, $P = 0.0015$)との間に有意な正の相関関係が認められた。炎症・線維化と腎機能との関係性を相関により評価した結果では、 C_{cr} と CD86($r = -0.7422$, $P = 0.0011$)、TNF- α ($r = -0.6605$, $P = 0.0001$)、 α -SMA($r = -0.7518$, $P = <.0001$)、MT($r = -0.7409$, $P = <.0001$)との間に有意な負の相関

関係、尿中アルブミン排泄量と CD86 ($r = 0.6477$, $P = 0.0011$)、TNF- α ($r = 0.5334$, $P = 0.0035$)、 α -SMA ($r = 0.4427$, $P = 0.0207$)との間に有意な負の相関関係が認められた。これらの結果から、腎不全処置 4 週間後の腎臓では、酸化ストレス増加に伴う炎症・線維化の促進とともに蛋白尿が発生する可能性が示された。さらに、DHA を含む飼料を与えることで、このような腎障害を抑制できる可能性が示唆された。

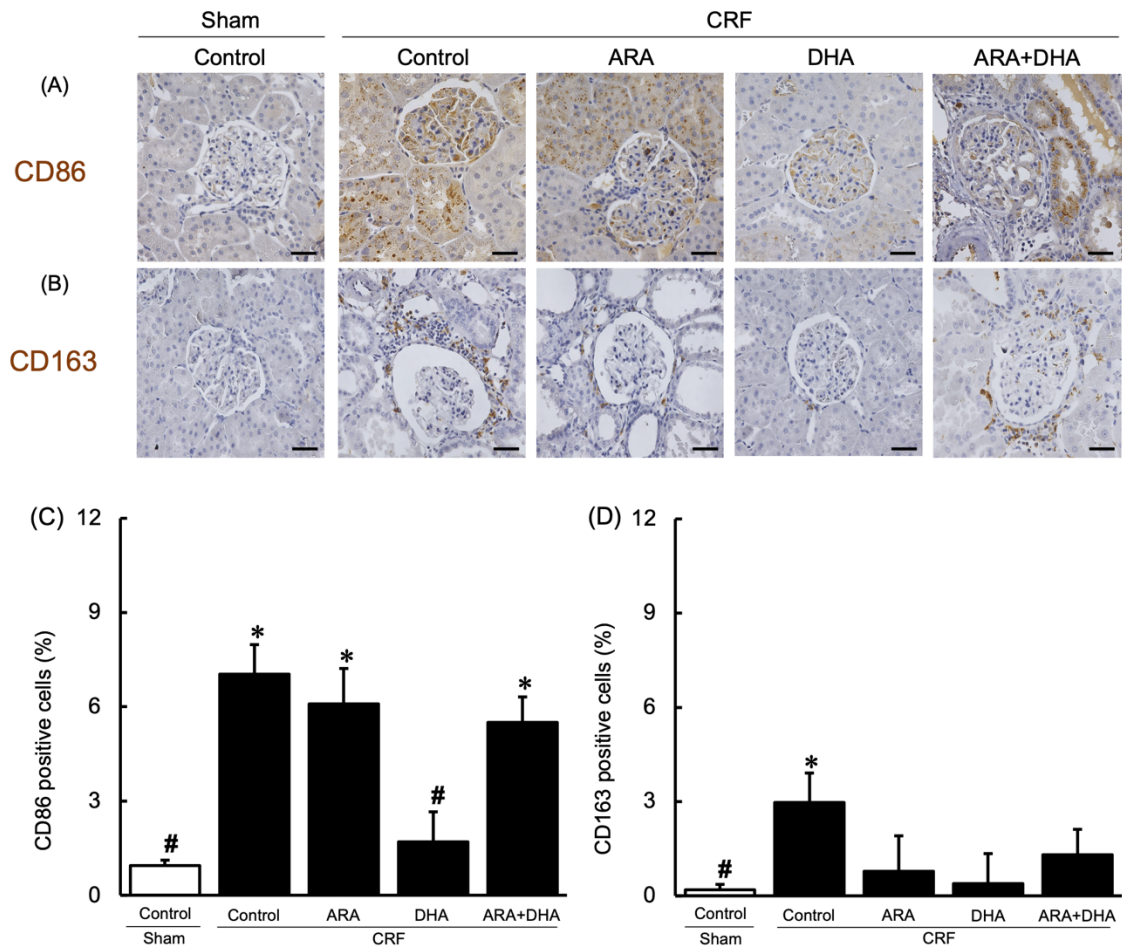


Figure 17. Histological evaluation by CD86 and CD163 staining of kidney at 4 weeks. Image of coronal sections of glomeruli from (A) CD86; (B) CD163; the count of (C) CD86 positive cells (%); (D) CD163 positive cells (%). Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

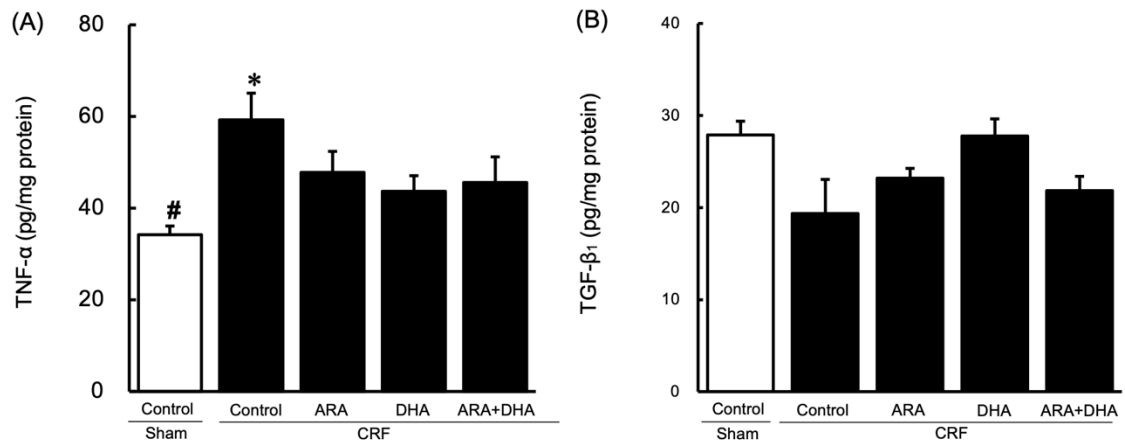


Figure 18. Cytokine levels in kidney at 4 weeks. (A) TNF- α , (B) TGF- β_1 at 4 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

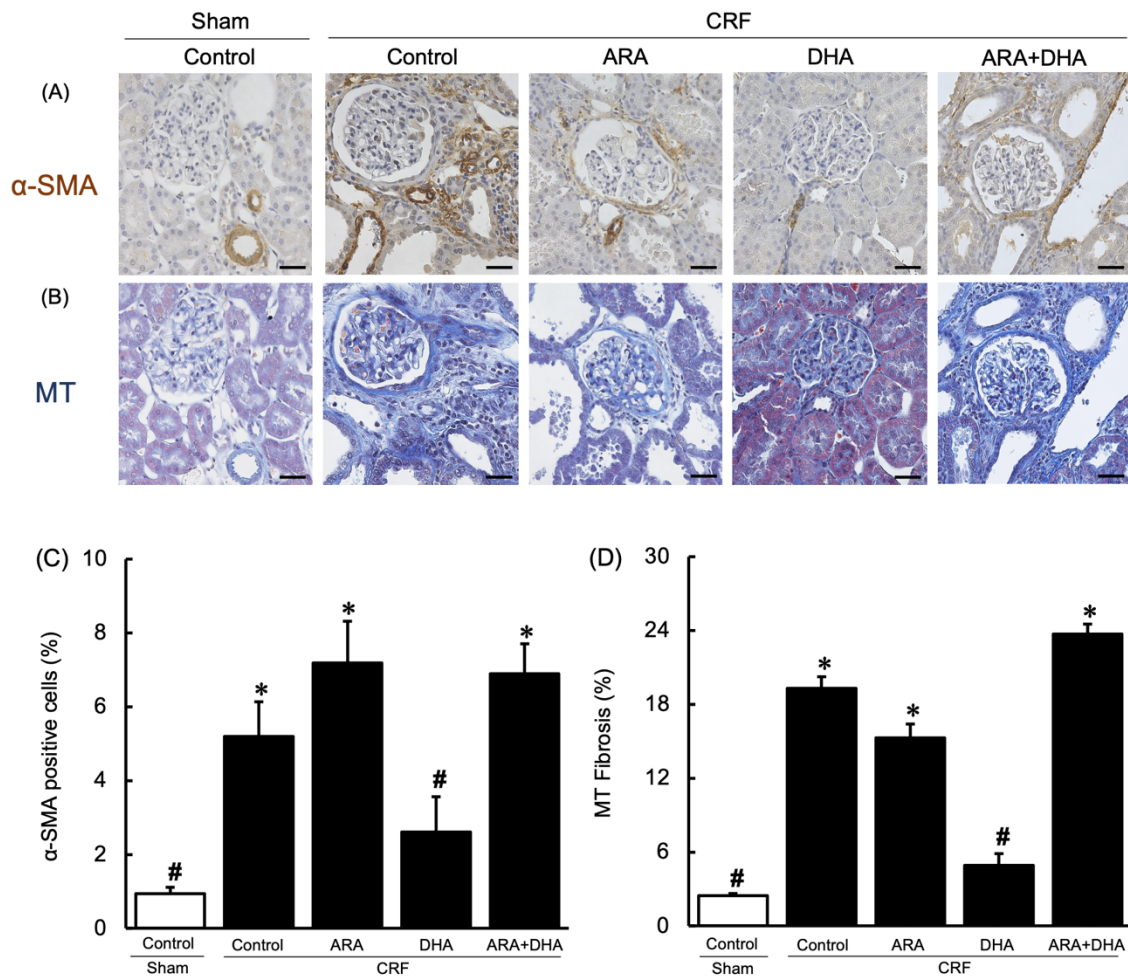


Figure 19. Histological evaluation by α -SMA and MT staining of kidney at 4 weeks. Image of coronal sections of glomeruli from (A) α -SMA; (B) MT staining; the count of (C) α -SMA positive cells (%); (D) Fibrosis (%) by MT staining. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-7. 尿中の腎毒症関連物質の測定

Figure 20 に、尿中の Clusterin や IL-18, KIM-1, MCP-1, Osteopontin などの腎毒症関連バイオマーカーを Bio-Plex を用いて評価した結果を示す。各バイオマーカーは近位尿細管や遠位尿細管、ヘンレループ、集合管などの腎臓組織において障害を受けると尿中へ増加することが知られている[28-32]。Clusterin や osteopontin は Sham-Control 群と比較して、腎不全処置 4 週間後の尿中で有意に増加した(Figure 20A,E)。また、ARA 群や ARA+DHA 群においても有意に増加し、DHA 群ではこの増加に対して抑制傾向が示された。KIM-1 は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群において増加傾向にあったが、有意な差は認められなかった(Figure 20C)。尿中 Clusterin は糸球体障害を主な病変とする糖尿病性腎症の早期発見に有用である可能性が報告されている[28]。腎不全処置 4 週間後の腎臓組織の PAS 染色(Figure 13)や腎臓組織の線維化(Figure 19)において前述したように、本実験の慢性腎不全モデルラットでは、顕著な糸球体損傷が確認されている。そのため、clusterin の尿中排泄が増加したことが考えられる。Osteopontin は糸球体以外の近位尿細管やヘンレループ、遠位尿細管、集合管などの尿細管障害により尿中排泄が増加することが知られている。また、osteopontin は近位尿細管細胞への IS 蓄積による ROS の過剰産生を介した腎臓組織の線維化に関与することが報告されている[23]。相関による評価では、尿中 osteopontin 濃度と腎臓中の IS 量($r = 0.5954, P < .0001$)や ROS 量($r = 0.4838, P = 0.0091$)、 α -SMA($r = 0.7339, P < .0001$)との有意な正の相関関係を示した。対して、尿中 osteopontin 濃度は DHA 群において抑制した。このことから、本実験における腎不全処置 4 週間後における腎臓組織の線維化のメカニズムに osteopontin が関与する可能性が示唆された。IL-18 や MCP-1 は Sham-Control 群と比較して CRF 群において有意に減少し、各食餌摂取による影響は認められなかった(Figure 20B,D)。IL-18 や MCP-1 は、腎障害時において尿細管上皮細胞中に遺伝子とタンパク質の発現が増加するとともに、尿中への排泄が増加するバイオマーカーとして知られている[32]。そのため、慢性腎不全モデルラットの 5/6 の腎臓を摘出することで、元々腎臓中に存在した IL-18 や MCP-1 量の残存量が低下し、尿中への IL-18 濃度や MCP-1 濃度が増加しなかったことが考えられた。尿中の KIM-1 濃度は Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群において増加傾向を示したものの、各食餌による影響は認められなかった。

これらのバイオマーカーは、急性腎障害や進行性腎障害の早期診断に有用かつ、近位尿細管やヘンレループ、遠位尿細管、集合管などの腎障害発生部位を特定することが可能で

あるとされている[28-32]。しかし、近位尿細管障害のマーカーである clusterin や KIM-1 のように腎不全処置後の影響が異なることや、IL-18 や MCP-1 のように 5/6 腎切除型の腎不全処置によって検出が困難になるなど、実験に使用する動物モデルによってバイオマーカーの有用性が異なることが考えられた。

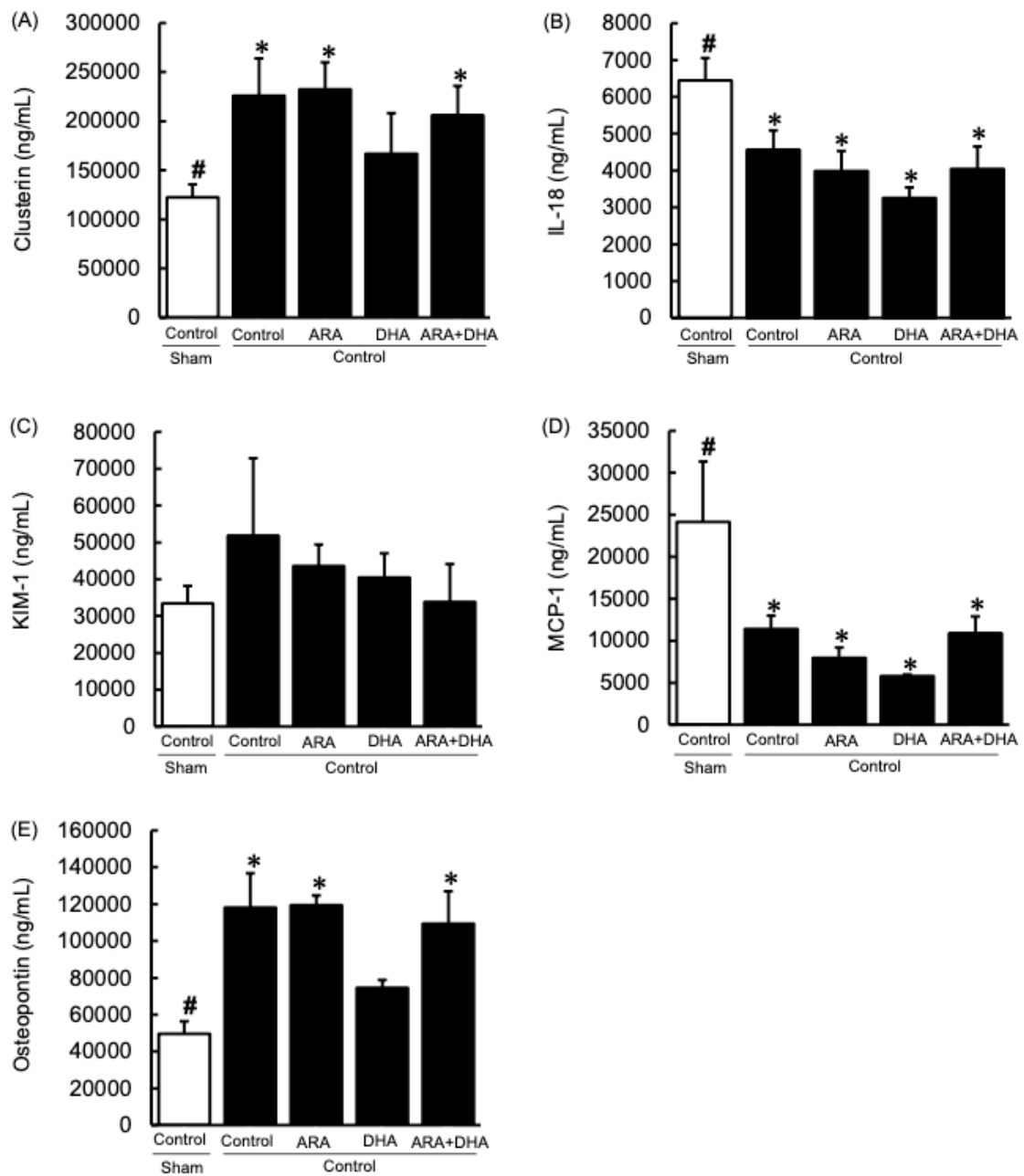


Figure 20. Kidney toxicity levels in urine at 4 weeks after nephrectomy. (A) Clusterin; (B) IL-18; (C) KIM-1; (D) MCP-1 and (E) Osteopontin in urine. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-8. ERK 活性評価

ERK は ROS によって活性化され、 α -SMA の発現を促し腎線維化を引き起こすことが報告されている[33]。そこで、腎臓組織を電気泳動し、ウエスタンブロットによって腎臓中の ERK 活性を評価した結果を Figure 21 に示す。本研究で用いた抗体では、42 kDa と 44 kDa の 2 つのバンドが認められた(Figure 21)。腎臓中の ERK 活性は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群において増加傾向を示した。対して、DHA 群ではこの増加を抑制する傾向にあった。そのため、腎不全処置 4 週間後の慢性腎不全モデルラットにおける腎臓中の ROS 量の増加が ERK の活性化を促し、腎線維化に関与する可能性が考えられた。

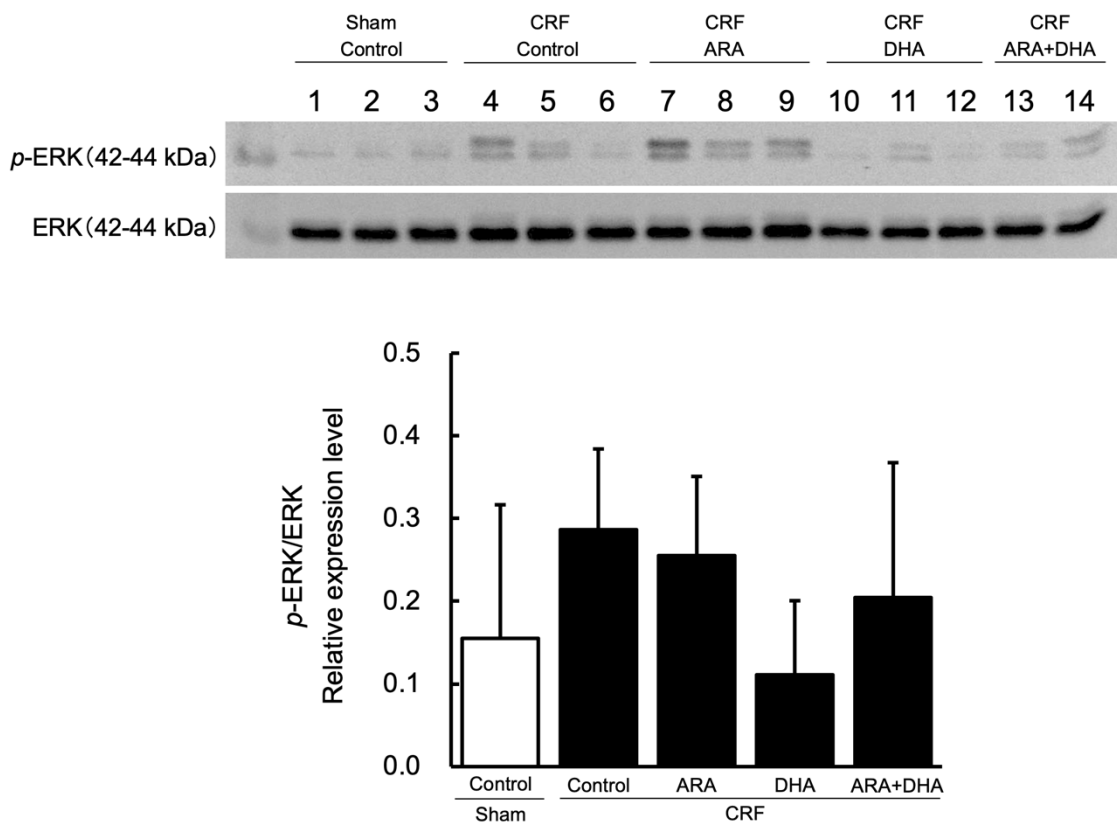


Figure 21. Western blot analysis of *p*-ERK/ERK in kidney at 4 weeks after nephrectomy
Two bands (42-44 kDa) are detected. Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 5-7$).

2-9. 腎臓中脂質メディエーターの定量

5/6 腎摘出ラットの腎不全処置 4 週間後の腎臓における PUFA 代謝物濃度を LC/MS/MS を用いて検討した。ARA 代謝物は正常な腎機能の発達と維持に関与し、DHA 代謝物は抗炎症作用や腎臓の保護に関与することが報告されている[8,9]。ARA、DHA、EPA 代謝物量は腎不全処置により有意に減少したが(Table 13-15)、ARA 代謝物は ARA 群で、DHA および EPA 代謝物は DHA 群で CRF-Control 群より増加した。この結果から慢性腎不全ラットでは健常ラットと比較して脂質代謝物量が有意に減少し、ARA や DHA を含む食餌の摂取によって減少した代謝物が産生されることを明らかにした。 ω -6 PUFA と ω -3 PUFA の代謝物は、それぞれ炎症促進期と炎症収束期に関連することが知られている[20]。そこで、腎不全処置 4 週間後における酸化ストレス、炎症、線維化、腎機能などの腎障害への脂肪酸代謝物の関与を評価した。TXA₂ は TXB₂ の前駆代謝物であり、酸化ストレスにより過剰産生され、血管収縮や血管内皮細胞傷害などの炎症作用があることが報告されている[34]。第 1 章の Table 3 と同様に腎臓中の TXB₂ 量は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群において有意に増加した。この増加は、ARA 群でも確認された。さらに腎不全処置 4 週間後の腎臓中脂質代謝物と腎機能、炎症、腎線維化の各パラメーターとの関係性を相関により評価した結果、腎臓中の TXB₂ 量と Ccr 値($r = 0.005$, $P = -0.517$)や ROS 量($r = 0.467$, $P = 0.0123$)、TNF- α 量($r = 0.684$, $P < .0001$)、 α -SMA($r = 0.481$, $P = 0.011$)などの各パラメーターの値と有意な正の相関関係が認められた。そのため、腎不全処置 4 週間後における腎臓の炎症や線維化について TXB₂ の関与が考えられた。しかし、腎臓中の TXB₂ 量は、CRF-Control 群と比較しても ARA 群や ARA+DHA 群で有意な差は認められなかった。このことから、ARA を含む食餌の摂取は炎症に関わる代謝物の産生を増加させる一方で、直接的に炎症に作用し、腎機能を低下させているわけではないことが考えられた。腎臓では DHA を含む食餌により、PD1 や 20-HDHA、4-HDHA などの DHA 代謝物や EPA 代謝物の Resolvin E、18-HEPE が増加した。DHA 代謝物である PD1 は、抗炎症作用を示す代謝物であり、腎臓疾患を予防する[8,9]。相関による評価では腎不全処置 4 週間後の腎臓中 PD1 と Ccr 値($r = 0.048$, $P = 0.807$)や TNF- α 量($r = -0.114$, $P = 0.562$)との相関性は認められなかったものの線維化マーカー MT($r = -0.420$, $P = 0.029$)とは有意な負の相関関係が認められた。このことから、PD1 は腎臓組織の線維化を抑制させ、腎機能低下を抑える作用を示す可能性が考えられた。また、20-HDHA は Ccr 値($r = 0.448$, $P = 0.017$)と有意な正の相関関係や TNF- α 量($r = -0.538$, $P = 0.003$)、 α -SMA($r = -0.489$, $P = 0.010$)などと負の相関性が認められた。EPA の

代謝物である 18-HEPE は腎臓中の TNF- α 量 ($r = -0.480, P = 0.010$) や MT ($r = -0.532, P = 0.004$) との間に負の相関性が認められた。20-HDHA や 4-HDHA などの代謝物は抗炎症作用に、18-HEPE は圧力過負荷下で心機能を維持する[19]。さらに、心臓の線維化を抑制する作用を持つことが報告されている[19]。以上により、これらの代謝物が腎臓における炎症や線維化、腎機能低下の抑制に関与している可能性が考えられた。しかし、これらの代謝物が本当に慢性腎不全ラットの腎臓中の酸化ストレスや炎症、線維化に効果を発揮するかは不明である。そのため今後、各代謝物による酸化ストレスや炎症、線維化に対する抑制効果についてさらなる研究が必要である。また、慢性腎不全ラットへ ARA や DHA を含む食餌を摂取させ、腎臓中の代謝物を網羅的に測定し、評価した研究は本研究が初めてである。本研究で慢性腎不全ラットでは健常ラットと比較して脂質代謝物量が有意に減少し、ARA や DHA を含む食餌の摂取によって減少した代謝物が産生されることを明らかにした。

Table 13. ARA metabolites levels in the kidney

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy		
		control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
ARA	tetranor-PGFM	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	tetranor-PGEM	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.12	0.37 ± 0.15	0.18 ± 0.10	0.10 ± 0.04
ARA	tetranor-PGDM	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ARA	tetranor-PGJM	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	tetranor-PGAM	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
ARA	20-hydroxy-PGF2α or 19-hydroxy-PGF2α	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
ARA	20-hydroxy-PGE2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	18-carboxy-dinor-LTB4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF1β	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
ARA	2,3-dinor-8-iso-PGF2α	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	2,3-dinor-TXB2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF1α	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	2,3-dinor-11β-PGF2α	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	6-keto-PGF1α	0.45 ± 0.12 ^a	2.58 ± 0.40 ^b	2.18 ± 0.52 ^b	0.65 ± 0.19 ^a	1.30 ± 0.24 ^{a,b}
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGD2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	20-carboxy-LTB4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	20-hydroxy-LTB4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	11-dehydro-2,3-dinor-TXB2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGE2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF1α	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02
ARA	iPF2α-IV	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	8-iso-15(R)-PGF2α	0.07 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b
ARA	8-iso-PGF2α	0.13 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.02 ^b
ARA	TXB2	1.28 ± 0.25 ^a	3.71 ± 0.73 ^b	3.17 ± 0.80 ^{a,b}	0.81 ± 0.19 ^a	2.28 ± 0.51 ^{a,b}

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9).^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 13. Continue

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
ARA	11 β -PGF2 α	0.08 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.01 ^{a,b}	0.04 \pm 0.00 ^{a,b}	0.03 \pm 0.00 ^{a,b}	0.03 \pm 0.02 ^b	
ARA	5-IPF2 α -VI	0.18 \pm 0.04 ^a	0.01 \pm 0.01 ^b	0.05 \pm 0.03 ^b	0.11 \pm 0.04 ^{a,b}	0.06 \pm 0.02 ^b	
ARA	8-iso-15-keto-PGF2 α	0.08 \pm 0.02 ^a	0.04 \pm 0.02 ^{a,b}	0.00 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.01 ^{a,b}	0.03 \pm 0.02 ^{a,b}	
ARA	PGF2 α	0.50 \pm 0.10 ^a	0.18 \pm 0.05 ^b	0.29 \pm 0.09 ^{a,b}	0.15 \pm 0.01 ^b	0.27 \pm 0.10 ^{a,b}	
ARA	8-iso-13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	8-iso-PGE2	0.56 \pm 0.37	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.08 \pm 0.04	0.38 \pm 0.35	
ARA	PGE2	2.21 \pm 0.63	1.23 \pm 0.43	2.58 \pm 0.72	0.83 \pm 0.13	1.56 \pm 0.26	
ARA	11-dehydro-TXB2	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	
ARA	15-keto-PGF2 α	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	
ARA	11 β -PGE2	0.73 \pm 0.14	0.58 \pm 0.08	0.78 \pm 0.21	0.31 \pm 0.05	0.51 \pm 0.10	
ARA	5S,14R-LXB4	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	
ARA	PGK 2.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	PGD2	1.21 \pm 0.20	1.08 \pm 0.29	1.37 \pm 0.20	0.59 \pm 0.20	1.09 \pm 0.43	
ARA	15-keto-PGF1 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	11 β -13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	15-keto-PGE2	0.05 \pm 0.03	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.03 \pm 0.03	
ARA	13,14-dihydro-PGF1 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	14,15-LTC4	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α	0.21 \pm 0.07 ^a	0.05 \pm 0.03 ^b	0.05 \pm 0.01 ^b	0.04 \pm 0.00 ^b	0.05 \pm 0.02 ^b	
ARA	5S,6R-LXA4	0.18 \pm 0.06	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.14 \pm 0.08	0.09 \pm 0.07	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGE2	0.39 \pm 0.10	0.10 \pm 0.03	0.13 \pm 0.05	0.09 \pm 0.03	0.07 \pm 0.04	
ARA	5S,6S-LXA4	0.11 \pm 0.05	0.01 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.04	
ARA	14,15-LTE4	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGD2	0.09 \pm 0.03	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.03	

Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 13. Continue

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
ARA	LTC4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	11-trans-LTC4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTD4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTE4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTF4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	8-iso-PGA2	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
ARA	11-trans-LTD4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	PGA2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ARA	PGJ2	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ARA	11-trans-LTE4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	PGB2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	8,12-iso-iPF2 α -VI-1,5-lactone	0.04 ± 0.01 ^{a,b}	0.00 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.03 ^a	0.04 ± 0.02 ^{a,b}	
ARA	8,15-DiHETE	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	6-trans-LTB4	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
ARA	5,15-DiHETE	0.25 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.03 ^b	0.11 ± 0.01 ^{a,b}	0.16 ± 0.06 ^{a,b}	0.10 ± 0.05 ^b	
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGA2	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ARA	LTB4	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ARA	13,14-dihydro-15-keto-PGJ2	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
ARA	12-keto-LTB4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
ARA	tetranor-12-HETE	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	N-acetyl-LTE4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	LTB3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
ARA	14,15-DHET	3.44 ± 0.37	2.08 ± 0.20	4.88 ± 1.00	3.68 ± 1.24	4.96 ± 1.81	
ARA	12-HHT	0.55 ± 0.11 ^a	0.16 ± 0.02 ^b	0.21 ± 0.11 ^{a,b}	0.29 ± 0.04 ^{a,b}	0.41 ± 0.15 ^{a,b}	

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9).^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 13. Continue

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
ARA	11,12-DHET	4.62 ± 0.66 ^a	1.30 ± 0.23 ^b	3.31 ± 0.63 ^{a,b}	2.74 ± 0.87 ^{a,b}	3.30 ± 0.99 ^{a,b}	
ARA	8,9-DHET	1.00 ± 0.16	0.33 ± 0.06	0.75 ± 0.16	0.66 ± 0.22	0.86 ± 0.27	
ARA	20-carboxy-ARA	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
ARA	5,6-DHET	0.22 ± 0.03 ^{a,b}	0.09 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.05 ^{a,b}	0.17 ± 0.05 ^{a,b}	0.27 ± 0.01 ^b	
ARA	19-HETE	0.05 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.02	
ARA	15-deoxy-delta-12,14-PGJ2	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.06	0.03 ± 0.01	
ARA	20-HETE	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
ARA	18-HETE	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	
ARA	17-HETE	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	
ARA	16-HETE	0.16 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.02 ^{a,b}	0.09 ± 0.01 ^{a,b}	0.08 ± 0.04 ^{a,b}	
ARA	15-HETE	7.31 ± 0.64 ^a	3.01 ± 0.71 ^b	3.75 ± 0.42 ^b	3.52 ± 0.54 ^b	3.40 ± 1.22 ^b	
ARA	11-HETE	7.50 ± 0.73 ^a	6.45 ± 0.44 ^{a,b}	5.84 ± 0.84 ^{a,b}	3.62 ± 0.47 ^b	4.85 ± 1.16 ^{a,b}	
ARA	8-HETE	0.83 ± 0.10 ^a	0.27 ± 0.08 ^b	0.34 ± 0.05 ^b	0.40 ± 0.06 ^b	0.40 ± 0.15 ^b	
ARA	15-KETE	1.24 ± 0.48	0.30 ± 0.17	0.20 ± 0.03	0.36 ± 0.18	0.52 ± 0.35	
ARA	15-HpETE	0.45 ± 0.29	0.10 ± 0.10	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.12 ± 0.11	
ARA	12-HETE	3.81 ± 0.50 ^a	1.73 ± 0.31 ^b	2.39 ± 0.43 ^{a,b}	2.04 ± 0.26 ^{a,b}	2.51 ± 0.78 ^{a,b}	
ARA	9-HETE	0.32 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.04 ^b	0.19 ± 0.03 ^{a,b}	0.15 ± 0.07 ^b	
ARA	5-HETE	6.27 ± 0.42 ^a	2.20 ± 0.66 ^b	2.87 ± 0.47 ^b	3.80 ± 1.07 ^{a,b}	2.50 ± 0.95 ^b	
ARA	12-HpETE	0.09 ± 0.05	0.04 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	
ARA	12-KETE	0.17 ± 0.10	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04	
ARA	5,6-DHET-lactone	0.31 ± 0.02 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	0.50 ± 0.09 ^{a,b}	0.43 ± 0.12 ^b	0.68 ± 0.09 ^{a,b}	
ARA	5-HpETE	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	
ARA	14,15-EET	0.70 ± 0.10	0.65 ± 0.08	0.97 ± 0.18	0.71 ± 0.22	0.68 ± 0.24	
ARA	5-KETE	0.80 ± 0.20	0.23 ± 0.10	0.22 ± 0.05	0.38 ± 0.20	0.37 ± 0.24	

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9).^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test (P < 0.01).

Table 13. Continue

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	ARA	DHA	ARA+DHA	
ARA	11,12-EET	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.34 ± 0.06	0.23 ± 0.07	0.29 ± 0.09	
ARA	8,9-EET	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.34 ± 0.06	0.23 ± 0.07	0.25 ± 0.07	
ARA	5,6-EET	0.31 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.37 ± 0.07	0.25 ± 0.07	0.36 ± 0.09	
ARA	ARA	9.89 ± 0.59 ^a	8.22 ± 0.21 ^{a,b}	7.44 ± 0.33 ^{a,b}	5.78 ± 0.83 ^b	5.67 ± 0.92 ^b	

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test (*P* < 0.01).

Table 14. DHA metabolites levels in the kidney

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
DHA	Resolvin D3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	Resolvin D2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	Resolvin D1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	Resolvin D4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	Maresin1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	10,17-DiHDHA(别名: PD1)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
DHA	Resolvin D5	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
DHA	7,17-hydroxy-DPA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	19,20-DiHDPA	0.24 ± 0.02 ^{a,b}	0.08 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.02 ^{a,b}	0.12 ± 0.02 ^{a,b}	0.32 ± 0.11 ^a	0.26 ± 0.08 ^{a,b}
DHA	20-HDHA	0.42 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.04 ^b	0.16 ± 0.02 ^b	0.16 ± 0.02 ^b	0.49 ± 0.08 ^a	0.28 ± 0.12 ^{a,b}
DHA	16-HDHA	0.70 ± 0.05 ^{a,b}	0.32 ± 0.08 ^{b,c}	0.24 ± 0.03 ^c	0.24 ± 0.03 ^c	0.79 ± 0.08 ^a	0.50 ± 0.20 ^{a,b,c}
DHA	17-HDHA	0.13 ± 0.02 ^{a,b}	0.08 ± 0.01 ^{a,b}	0.06 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	0.18 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.05 ^{a,b}
DHA	13-HDHA	0.52 ± 0.04	0.42 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.53 ± 0.08	0.55 ± 0.15
DHA	10-HDHA	0.21 ± 0.02 ^{a,b}	0.08 ± 0.02 ^{b,c}	0.06 ± 0.02 ^c	0.06 ± 0.02 ^c	0.25 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.07 ^{a,b,c}
DHA	14-HDHA	0.32 ± 0.06	0.18 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.38 ± 0.07	0.39 ± 0.16
DHA	11-HDHA	0.26 ± 0.02 ^{a,b}	0.11 ± 0.03 ^{b,c}	0.08 ± 0.02 ^c	0.08 ± 0.02 ^c	0.31 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.09 ^{a,b,c}
DHA	7-HDHA	0.06 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^{a,b}	0.01 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.02 ^{a,b}
DHA	8-HDHA	0.13 ± 0.02 ^{a,b}	0.06 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.03 ^{a,b}
DHA	17-HpDHA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DHA	4-HDHA	0.93 ± 0.05 ^a	0.28 ± 0.08 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	0.83 ± 0.12 ^a	0.61 ± 0.23 ^{a,b}
DHA	19,20-EpDPA	0.68 ± 0.10 ^a	0.77 ± 0.11 ^{a,b}	0.69 ± 0.13 ^{a,b}	0.69 ± 0.13 ^{a,b}	1.69 ± 0.47 ^b	1.17 ± 0.32 ^{a,b}
DHA	16,17-EpDPA	0.17 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.42 ± 0.14	0.27 ± 0.08
DHA	DHA	12.7 ± 1.11 ^a	13.5 ± 0.95 ^a	7.29 ± 0.62 ^b	7.29 ± 0.62 ^b	17.1 ± 2.18 ^a	11.9 ± 1.56 ^{a,b}

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9).^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test (*P* < 0.01).

Table 15. EPA metabolites levels in the kidney

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
EPA	delta17-6-keto-PGF1 α	0.01 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.03 ^b	0.04 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.02 ^a	0.04 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.01 ^a
EPA	Resolvin E1	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	8-iso-PGF3 α	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
EPA	TXB3	0.01 \pm 0.01 ^a	0.08 \pm 0.03 ^b	0.03 \pm 0.01 ^{a,b}	0.01 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.01 ^{a,b}	0.04 \pm 0.01 ^{a,b}
EPA	PGF3 α	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	11-dehydro-TXB3	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	PGE3	0.08 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02
EPA	PGD3	0.16 \pm 0.03 ^{a,b}	0.12 \pm 0.04 ^{a,b}	0.08 \pm 0.02 ^b	0.34 \pm 0.10 ^a	0.16 \pm 0.08 ^{a,b}	0.16 \pm 0.08 ^{a,b}
EPA	LXA5	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	LTB5	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	17,18-DiHETE	0.49 \pm 0.05 ^{a,b}	0.25 \pm 0.04 ^b	0.33 \pm 0.06 ^b	1.07 \pm 0.31 ^a	0.50 \pm 0.16 ^{a,b}	0.50 \pm 0.16 ^{a,b}
EPA	14,15-DiHETE	0.28 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.05 ^a	0.36 \pm 0.09 ^{a,b}	1.25 \pm 0.44 ^b	0.57 \pm 0.29 ^{a,b}	0.57 \pm 0.29 ^{a,b}
EPA	5,6-DiHETE	0.03 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
EPA	18-HEPE	0.47 \pm 0.07 ^{a,b}	0.22 \pm 0.08 ^b	0.16 \pm 0.03 ^b	0.70 \pm 0.15 ^a	0.23 \pm 0.11 ^b	0.23 \pm 0.11 ^b
EPA	15-HEPE	0.11 \pm 0.03	0.07 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	0.11 \pm 0.04	0.11 \pm 0.04
EPA	11-HEPE	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02
EPA	8-HEPE	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	9-HEPE	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	12-HEPE	0.33 \pm 0.06 ^{a,b}	0.20 \pm 0.05 ^b	0.19 \pm 0.05 ^b	0.60 \pm 0.07 ^a	0.36 \pm 0.13 ^{a,b}	0.36 \pm 0.13 ^{a,b}
EPA	5-HEPE	0.42 \pm 0.04 ^a	0.21 \pm 0.07 ^a	0.19 \pm 0.05 ^a	0.92 \pm 0.16 ^b	0.25 \pm 0.10 ^a	0.25 \pm 0.10 ^a
EPA	15-HpEPE	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	12-HpEPE	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	5-HpEPE	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
EPA	17,18-EpETE	0.15 \pm 0.04 ^a	0.26 \pm 0.05 ^{a,b}	0.29 \pm 0.06 ^{a,b}	0.66 \pm 0.21 ^b	0.23 \pm 0.13 ^{a,b}	0.23 \pm 0.13 ^{a,b}

Values are presented as the mean \pm SEM (n = 6-9). ^{a-c}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

Table 15. Continue

Category	Metabolite	Sham		Nephrectomy			
		control	control	control	ARA	DHA	ARA+DHA
EPA	14,15-EpETE	0.16 ± 0.03 ^a	0.21 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.05 ^{a,b}	0.66 ± 0.20 ^b	0.25 ± 0.12 ^{a,b}	
EPA	EPA	2.36 ± 0.22 ^a	2.76 ± 0.15 ^a	1.63 ± 0.19 ^a	4.43 ± 0.56 ^b	1.74 ± 0.37 ^a	

Values are presented as the mean ± SEM (n = 6-9).^{a,b}, by ANOVA and Tukey HSD test ($P < 0.01$).

第 3 節 小括

第 1 章では、腎不全処置 4 週間後における血漿中酸化ストレスが腎機能低下を促すことが考えられたものの、腎臓中での影響は不明なままであった。そのため、第 2 章では、腎不全処置 4 週間後の腎臓中酸化ストレスと腎機能との関係性を評価した。結果的に、腎不全処置 4 週間後では腎臓中 ROS 量が増大し、腎機能低下につながることを示唆された。特に DHA を含む食餌の摂取により腎臓中の酸化ストレスが抑制されることが示された。酸化ストレスは活性酸素と抗酸化能とのバランスが崩れることによって生じることが知られている。しかし、腎不全処置 4 週間後の腎臓では、抗酸化酵素の mRNA 発現量が腎不全処置により減少したものの、各食餌摂取による改善効果は認められなかった。そのため、DHA の摂取による腎臓中 ROS 量の抑制理由に、活性酸素と抗酸化能のバランスによる影響の関与は低いことが考えられた。ROS が過剰産生する要因として、尿毒症物質の IS の関与が知られている。腎不全処置 4 週間後では腎臓中に IS が増加した一方で、DHA の摂取によりこの増加を減弱させた。IS は、正常な腎機能条件下では腎臓から排泄されることが報告されている[22,23]。しかし、腎機能が低下すると、腎臓に IS が蓄積し、メサンギウム細胞や腎近位尿細管細胞で NADPH オキシダーゼが活性化され、活性酸素が過剰生成されることにより、酸化ストレスを生じ、CKD の進行に関わっている[22,23]。本研究では、DHA の摂取が、腎不全処置後の腎臓中における IS の蓄積を抑制させることが明らかとなった。IS はタンパク質結合型の尿毒症性毒素であり、透析クリアランスが低く、血中アルブミンと結合することで体内に蓄積することが知られている[22,23]。参考資料では、血液透析器を用いた血液透析除去性試験において F40S ダイアライザーの血液側に IS を添加したヒト血清アルブミンを循環させたのち、DHA を注入した結果、DHA が IS と競合し、アルブミンと結合することで、IS の除去率が増加したことが報告されている[26]。このことから、本研究においても慢性腎不全モデルラットに DHA を含む食餌の摂取により、体内の IS と DHA が競合的に結合することで、腎臓への IS 蓄積を抑制し、ROS の過剰産生をも抑制された可能性が考えられた。

IS による ROS 産生の誘導は、炎症や腎臓の線維化の発生につながる[23]。活性化した M2 マクロファージは TGF- β_1 の産生を増加させ、 α -SMA 発現を促進することで、腎臓の線維化を引き起こすことが報告されている[27]。しかし、本研究では腎不全処置後も腎臓中 TGF- β_1 量に変化は認められず、別の経路が存在することが考えられた。M1 マクロファージの活性化は炎症性サイトカインの 1 種である TNF- α の産生を増加させることが報告されている[27]。

IS の近位尿細管細胞への蓄積は、腎臓中の osteopontin 量の増加し、マクロファージを活性化させ、TNF- α 量の増加、 α -SMA の発現を促し、腎線維化を発生させることが知られている[23]。本研究でも腎不全処置 4 週間後に尿中の osteopontin 濃度の増加や M1 マクロファージが活性化、TNF- α 量の増加、 α -SMA 発現増加、腎線維化病変の増加などが顕著に確認され、慢性腎不全ラットの腎機能低下および進行性腎障害を引き起こす原因となる可能性が示唆された。さらに、慢性腎不全ラットへの DHA の摂取は上記の炎症および線維化の作用に対して、抑制効果を示し、DHA の摂取が進行性腎障害を抑制させる可能性が明らかとなった。

ω -6 PUFA と ω -3 PUFA の代謝物は、それぞれ炎症促進期と炎症収束期に関連することが知られている[20]。そこで、腎不全処置 4 週間後における酸化ストレス、炎症、線維化、腎機能などの腎障害への脂肪酸代謝物の関与を評価した。TXA₂ は TXB₂ の前駆代謝物であり、酸化ストレスにより過剰産生され、血管収縮や血管内皮細胞傷害などの炎症作用があることが報告されている[34]。腎不全処置 4 週間後に TXB₂ 濃度が上昇し、ARA の摂取が腎臓の炎症に関与していることを見出した。一方、腎臓では DHA を含む食事により、20-HDHA、4-HDHA などの DHA 代謝物や EPA 代謝物の Resolvin E、18-HEPE が増加することを見出した。DHA 代謝物である PD1 は、抗炎症作用を示す代謝物であり、腎臓疾患を予防する[19]。相関による評価では腎不全処置 4 週間後の腎臓中 PD1 と腎機能や炎症との相関性は認められず、PD1 は関与していない可能性が考えられた。しかし、20-HDHA や 4-HDHA などの代謝物は腎機能や腎臓中の酸化ストレス、炎症、線維化などと負の相関性が認められた。EPA の代謝物である 18-HEPE は圧力過負荷下で心機能を維持する[19]。さらに、心臓の線維化を抑制する作用を持つことが報告されている[19]。本研究においても、腎臓中の 18-HEPE 量と炎症や線維化との間に負の相関性が認められたことから、これらの代謝物が、腎臓における線維化の抑制に関与している可能性が考えられた。また、慢性腎不全ラットへ ARA や DHA を含む食餌を摂取させ、腎臓中の代謝物を網羅的に測定し、評価した研究は本研究が初めてである。慢性腎不全ラットでは健常ラットと比較して脂質代謝物量が有意に減少し、ARA や DHA を含む食餌の摂取によって減少した代謝物が産生されることを明らかにした。しかし、これらの代謝物が本当に慢性腎不全ラットの腎臓中の酸化ストレスや炎症、線維化に効果を発揮するかは不明である。そのため今後、各代謝物による酸化ストレスや炎症、線維化に対する抑制効果についてさらなる研究が必要である。

以上のことから、DHA の摂取は腎不全処置 4 週間後の腎臓組織における IS の蓄積を抑制し、酸化ストレスを介した腎障害を抑制したと考えられる。一方で、ARA の摂取では、腎不

全処置 4 週間後の腎臓において炎症や組織の線維化、尿中アルブミン排泄に対し抑制効果を示さなかった。しかし、第 1 章では ARA を含む食事の摂取により、尿中アルブミン排泄の増加を抑え、慢性腎不全の進行を抑制させたことを示している。そのため、ARA の作用に関しては腎不全処置 16 週間後と腎不全処置 4 週間後における腎臓への影響が異なることを示した。また、尿中アルブミン排泄の原因として、炎症や線維化などの腎障害の発生以外に、糸球体濾過機能や近位尿細管におけるアルブミン再吸収能といった腎臓本来の機能部分が異常をきたし、アルブミンが尿中に漏出することが知られている。前述したように、ARA は腎臓の生理的機能の維持や発達に関わることが報告されている。そのため、ARA の摂取は糸球体濾過やアルブミン再吸収能の異常を抑制し、尿中アルブミン排泄を軽減させた可能性が考えられた。そのため、今後は ARA 摂取による腎臓の生理的機能部分に着目した実験を行う必要がある。

第3章

慢性腎不全における腎足細胞や近位尿細管再吸収能に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

腎臓での尿の生成過程では、腎臓の構成成分である糸球体が、血液中の水分や老廃物を濾過する働きを持つ。糸球体の血管表面には糸球体濾過障壁が存在し、タンパク質の尿中への漏出を防いでいる。糸球体濾過障壁には、糸球体上皮細胞、基底膜と足細胞の3層から構成されており、特に足細胞がタンパク質の漏出を防ぐバリア機能を担うことが知られている。具体的には、足細胞はスリット膜や足突起から成り、糸球体の血管周りを覆うようにして存在している。これらの構造の機能として、足突起と足突起間が密接に絡み合うことで、スリット膜を形成し、血液中から尿中へのタンパク質の漏れを防いでいる[35]。しかし、足細胞が損傷を受けると、足突起の構造を維持するアクチン骨格に異常をきたし、足突起の消失を発生させる。さらに足突起の消失により、スリット膜が形成されず、濾過機能が破綻する。その結果、血液中のアルブミンが尿中へ過剰に漏出する。

アルブミンは、糸球体濾過機能が正常でもごく僅かに糸球体から濾出し、尿中に排泄されることが知られている[36]。アルブミンは生体に必要なタンパク質であるため、腎機能が正常な場合、濾出したアルブミンは近位尿細管にて再吸収され、血液循環に戻される機構が存在する。この機構に重要な受容体として近位尿細管管腔内に発現する megalin が知られている[37]。Megalin は糸球体から漏出したアルブミンと結合し、近位尿細管へ再吸収することで、尿中へのアルブミンの漏出を防いでいる。さらに、megalin は糖尿病性腎症の発症や進展に伴い、近位尿細管から逸脱し、尿中に排泄され、近位尿細管での局在が減少することにより、megalin を介するアルブミン再吸収能が低下し、その結果、尿中にアルブミンが漏出することが報告されている[38]。このことから、糸球体での障害による血中アルブミンの尿中への漏出や近位尿細管での尿中アルブミン再吸収能の低下が尿中アルブミン排泄増加の一般的な原因として知られている。

これまでの研究結果から、ARA や DHA を含む食餌を摂取させた慢性腎不全ラットの腎機能評価では、腎障害の進行に伴い増加する尿中アルブミン排泄量の増加を ARA や DHA の含む食餌の摂取によって抑制することが明らかとなっている。DHA を含む食餌の摂取は、慢性腎不全ラットの腎臓における酸化ストレスや炎症及び組織の線維化を抑制し、腎臓保護効果に重要な役割があることが明らかとなった。しかし、ARA を含む食餌の摂取による影響は

未だ不明なままである。前述したように、ARA には腎臓の生理的機能を維持・発達させる作用があるとして知られている。しかし、腎足細胞や近位尿細管における megalin を介したアルブミン再吸収などの機能に対する ARA や DHA の機能を示す報告はない。そこで、本章では慢性腎不全ラットの腎足細胞損傷や近位尿細管における megalin を介したアルブミン再吸収能低下に対する ARA や DHA を含む食餌の摂取による影響をそれぞれ検討した。一つ目に、腎足細胞損傷に対する評価では、慢性腎不全ラットへの ARA や DHA を含む食餌の摂取後、腎足細胞を電子顕微鏡観察により評価した。近位尿細管におけるアルブミン再吸収能に対する影響に関しては、慢性腎不全ラットへの ARA や DHA の摂取後の腎臓中の megalin 発現を評価したのち、ブタ腎近位尿細管(LLC-PK1)細胞を用いて ARA と DHA で細胞を処理した場合のアルブミン再吸収能への影響について検討した。

第 1 節 実験方法

1-1. 実験動物とサンプリング

実験動物及びサンプルは、第 1 章や第 2 章で使用したラットの腎臓サンプルを用いて、実験を行った。

1-2. 腎糸球体上の足細胞の観察

腎不全処置 4、16 週間後に回収した腎臓を、組織薄切用マイクロームを用いて 3 μm の厚さに薄切した。薄切切片に反射電子シグナル増強剤(TI ブルー)(日新 EM 株式会社、東京、日本)を乗せ、室温で 15 分間染色した。染色後、2 分間精製水に浸し、切片を洗浄した。洗浄した切片の水気を切った後、電界放出形走査電子顕微鏡 JSM-IT800(JEOL 日本電子株式会社、東京、日本)に挿入し、足細胞を観察した。

1-3. 遺伝子発現量の評価

腎不全処置 4、16 週間後の腎臓中の RNA 抽出や定量については、第 2 章と同様の方法で行った。作成した cDNA をテンプレートとして、primer3 ソフトウェア(Whitehead Institute)を用いて設計した *nephrin*、*podocin*、*cd2ap*、 *α -actinin4*、*synaptopodin*、*podocalyxin*、*megalin* に特異的なプライマー(Table 16)と QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit(QIAGEN)を用いて real time-PCR(7500 Real Time PCR system、Applied Biosystems)により目的遺伝子を増幅させ、増幅を蛍光強度として観察した。得られた threshold cycle(CT)から各遺伝子の発現量比を $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により算出した。

Table 16. Sequence of specific primers used for real time-PCR

	Forward	Reverse
<i>nephrin</i>	5'-GTGCTCTTTGCAGTTGGTGG-3'	5'-ATTCCCCTCGGATCCTCACACA-3'
<i>podocin</i>	5'-GCTGTCTGCTACTACCGCAT-3'	5'-TCACTGAGTCCAAGGCAACC-3'
<i>cd2ap</i>	5'-AGAGAAGGCCATGCCGAAGTA-3'	5'-TGCAATCCCAGCACAGTAAG-3'
<i>α-actinine4</i>	5'-AGAGCAAGCAGCAATCCAAT-3'	5'-CAGCTGGTCTTCCAGAGTCC-3'
<i>synaptopodin</i>	5'-AGCAGAGGAAGTGAGGTCCA-3'	5'-GCTGGAGAGGGGAGTAGCTT-3'
<i>podocalyxin</i>	5'-CTAGCAACAGTGGGCAGACA-3'	5'-AGGTTGAGAAAGAGGCGTTGA-3'
<i>megalin</i>	5'-GGTTATGCAGGCCCAACAAGT-3'	5'-GAATCATCGGAGAGGTTCCA-3'
18s	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'

1-4. 電気泳動及び Western Blot

SDS-PAGE に使用する試薬の調製や 10%ゲル作製は第 2 章と同様の方法で行った。

電気泳動後の転写は Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) を用いて、説明書に従い、電気泳動後の転写を行った。転写後、Membrane を Ponceau S に 5 min 浸し、TBST で洗浄後、転写バンドを確認した。DBP 検出には、抗 DBP 抗体 (1/500; Abcam) を使用した。5%BSA/TBST で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体を取り除き、TBST で 3 回洗浄後、二次抗体 (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody: EMD Millipore, MA, USA) を室温で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、ECL™ Western Blotting Analysis (GE Healthcare) を反応させ、バンドを可視化した。WSE-6100 LuminoGraphI (ATTO) を用いて PVDF Membrane を撮影、バンドのシグナル強度を CS Analyzer 4 (ver 3, ATTO) を用いて解析した。

1-5. Megalin 免疫染色

Megalin 検出には、抗 megalin 抗体 (1/50; Abcam) を使用した。薄切切片を脱パラフィン後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で 95°C、1 時間賦活化した。10 分間流水で水洗、TBST で洗浄後、TBST で希釈した 5% 正常ヤギ血清を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、二次抗体 (Anti-IgG, HRP-linked Antibody: EMD Millipore) を室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、DAB (武藤化学株式会社) 溶液を試料面に滴下し、光学顕微鏡で観察しながら発色させた後、流水水洗を行った。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。その後、脱水透徹し、EUKITT で封入した。染色像はオールインワン蛍光顕微鏡を用いて撮影した。

1-6. 細胞実験

1-6-1. 腎尿細管細胞(LLC-PK1)株の培養

LLC-PK1 細胞を、JCRB 細胞バンク(大阪、日本)から購入し、3%ウシ胎児血清(FCS、エムピーバイオジャパン、東京、日本)を含む Medium 199 培地(Sigma Aldrich)で培養した。クリーンベンチ内にて Medium 199 培地で洗浄した。その後 Table 17 に従い調製した 200 μ L の 0.5%Trypsin-EDTA(富士フイルム和光純薬工業株式会社)を添加し、3 分間、5%CO₂ / 95%O₂ 条件下、37°C で反応させた。その後、顕微鏡下で細胞の剥離を確認した後、3%FCS を含む Medium 199 培地を 4 mL 追加した。滅菌電動式ピペットを用いて細胞を収集し、50 mL コニカルチューブに移し、遠心分離(1,000 x g, 10 min, 室温)した。上清を吸引除去し一定量の培地に懸濁させた。細胞数を計算後 4.0 \times 10⁴ cells/mL になるように 3%FCS を含む Medium 199 培地を追加した。

Table 17. Composition of 0.5%Trypsin-EDTA.

	Reagents	Amount (g)
0.5 %Trypsin-EDTA	NaCl	4.25
	EDTA · 4Na	1.1
	Trypsin	2.5

1-6-2. MTS 試験

培養した LLC-PK1 細胞を 96 well plate に 4.0 \times 10⁴ cells/mL で播種し、3 日後に培地を吸引除去し、新しい Medium199 培地を 100 μ L 添加した。1 日後に IS/DMSO と 1%BSA を含む IS/DMSO を 1000, 100, 10, 1 μ g/mL を調製し、10 μ L/well 添加した。IS/DMSO 及び 1%BSA+IS/DMSO を添加 2 日後にクリーンベンチ内で 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 試薬 (Promega, WI, USA) を 10 μ L/well で分注し、5%CO₂ / 95%O₂ 条件下、37°C で 1、2 時間培養後、マイクロプレートリーダーを用いて、490 nm の吸光度で各 well を測定した。MTS 試薬は生きた細胞により培地に可溶性 formazan 試薬に代謝される。Formazan 試薬は 490 nm に吸収極大を持つ。この吸光度は生細胞数と比較する。これを利用し、Control (IS、1%BSA+IS、及び DMSO 非添加) を 100%とし、LLC-PK1 細胞の生存率を求めた。また、IS はタンパク質結合性の尿毒症物質であり、血液中の約 90%がアルブミンと結合し、代謝されることなく近位尿細管上皮細胞に取り込まれ、尿中へ排泄されることが知られている[22,23]。そのため、BSA とともに IS を細胞に添加することで、IS のみの添加時よりも、LLC-PK1 細胞中に IS が取り込

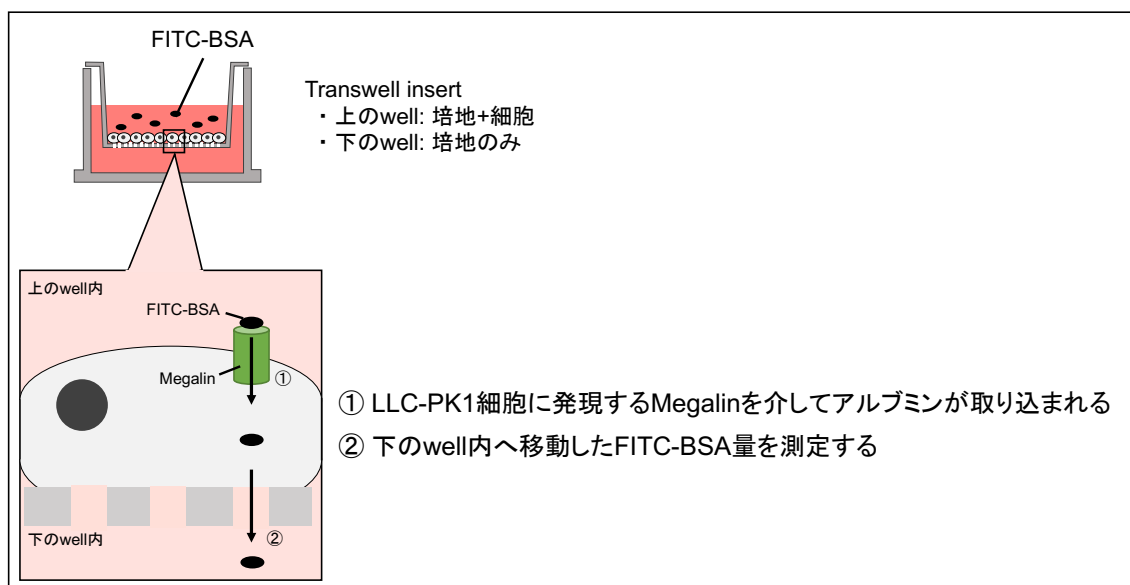
まれやすくなり、IS による LLC-PK1 の細胞障害が生じるのではないかと考えた。そこで、IS 非添加の Control と比較して、IS/DMSO 及び 1%BSA+IS/DMSO を添加した場合の LLC-PK1 細胞の生存率を求めた。

1-6-3. アルブミン取り込み試験

添加する ARA や DHA の希釈には無血清の Medium 199 培地を使用した。濃度が 1 mM となるように Medium 199 培地を用いて調製後、10 μ M, 1 μ M になるように希釈した。

培養した LLC-PK1 細胞を TC-Inserts (SARSTEDT K.K, Munchen, Germany) をセットした 24 well plate に 4.0×10^4 cells/mL で播種し、3 日後に培地を交換した。1 日後に ARA や DHA を 10 μ M, 1 μ M の濃度で 10 μ L/well 添加した。1 日後に IS/DMSO を添加し、その 2 日後にクリーンベンチ内で Albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate protein bovine (FITC-BSA, Sigma-Aldrich)/Medium 199 を 50 μ g/mL の濃度で 50 μ L/well で分注し 5%CO₂/95%O₂ 条件下、37°C で 5, 10, 30, 60, 120 min 培養後、蛍光用 96 well microplate 96 well black (Greiner) に各サンプルを 100 μ L で 3 well に添加し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (Ex 494 nm, Em 520 nm) を各 well で測定した。FITC-BSA の検量線を作成し、その検量線を用いて、測定した蛍光強度から insert を通じ、24 well plate に通過した FITC-BSA の累積透過量を算出した。Transwell の仕組みについては Figure 22 に示した。

Figure 22. How to measure of FITC-BSA.



1-7. 統計処理

測定データは平均値 ± 標準誤差で示した。群間の比較は一元配置分散分析で検定後、Tukey's Honest Significant Difference 検定を用いて群間比較を行った。検定の有意水準は5%とした。統計処理には JMP (JMP for MAC 16.0.0, SAS institute Japan 株式会社)を用いた。

第 2 節 結果及び考察

2-1. 腎糸球体足細胞の観察

腎不全処置 4、16 週間後のラットの糸球体観察結果を Figure 23 に示す。腎不全処置 4 週間後の腎臓組織における糸球体足細胞の足突起が、Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群で損傷及び消失していることが確認された (Figure 23A)。また、各食餌を摂取しても、足細胞損傷や消失に対する抑制効果は確認されなかった。腎不全処置 16 週間後の腎臓組織における糸球体足細胞は、Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群において足突起の消失が確認された (Figure 23B)。慢性腎不全ラットの足細胞の消失理由には、足細胞の構造に重要な因子の異常が考えられる。通常、足細胞は足突起頂部、スリット膜、足突起底部の 3 つの構造から構成され、足細胞のアクチン骨格により制御されていることが知られている [39-41]。足突起の消失は、アクチン骨格のアクチン線維の再構成により引き起こされる。このアクチン線維の再編成の原因については、*nephrin* や *podocin*、*cd2ap*、 *α -actinin-4* といった足細胞関連タンパク質の遺伝子異常が知られており、足突起の消失とともに蛋白尿を発症する [39-41]。ARA や ARA+DHA 群の腎臓組織では足突起の消失が顕著に抑制され、足細胞の構造が維持されていることを確認した。しかし DHA 群では、足突起の肥大や足突起の消失が軽度を確認された。以上のことから、ARA を含む食餌の摂取が、足細胞の足突起の消失を抑制し、足細胞の構造維持作用がある可能性が示唆された。しかし、足突起を消失させた原因については不明である。そのため、足突起の消失に関わる足細胞関連タンパク質の遺伝子発現を評価し、遺伝子発現低下によるアクチン線維の再編成への影響について今後検討する必要があると考えられた。

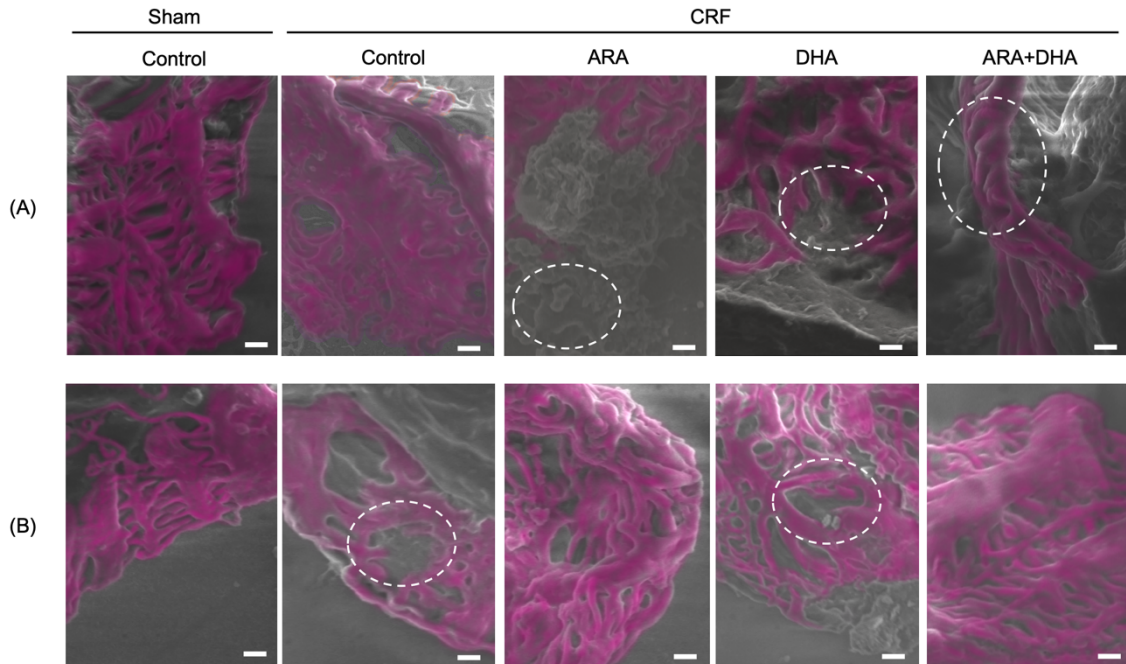


Figure 23. Podocyte SEM observation result at 4 and 16 weeks after nephrectomy. Image of podocyte from (A) 4 weeks; (B) 16 weeks after nephrectomy. White circle indicates damage of podocyte. Scale bar; 0.5 μ m.

2-2. 腎糸球体足細胞関連遺伝子発現への影響

糸球体足細胞を構成する組織にはスリット膜や足突起が存在し、これらの構造が糸球体濾過機能に重要な役割を果たしている。スリット膜の構成因子には Nephtrin や Podocin、CD2AP など、足突起の構成因子には α -actinine-4 や Synaptopodin, Podocalyxin など存在する。これらの因子の異常は、アクチン線維の再編成を引き起こし、足突起の消失を引き起こすことで、足細胞の構造に異常をきたすことが知られている[39-41]。慢性腎不全モデルラットでの腎糸球体足細胞が顕著に損傷していることが、電子顕微鏡にて確認されたため、足細胞の損傷にはこれらの関連因子の遺伝子発現の低下が関与していると考えた。そこで、各糸球体足細胞の関連因子の遺伝子発現に対する影響を RT-qPCR によって評価した。腎不全処置 4 週間後のスリット膜及び足突起関連因子の遺伝子発現量の測定結果を Figure 24, 25 に示す。*nephtrin*, *podocin*, *α -actinine-4*, *synaptopodin*, *podocalyxin* の遺伝子発現量は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群で有意な低下を示した。また、各食餌摂取による影響は認められなかった(Figure 24A-C, 25A-C)。以上の結果から、腎不全処置 4 週間後の腎臓では、足細胞関連タンパク質の遺伝子発現の低下が認められ、アクチン線維の再編成を引き起こし、足突起の消失が顕著に確認できたことが考えられた。腎不全処置 16 週間後のスリット膜及び足突起関連因子の遺伝子発現量の測定結果を Figure 24, 25 に示す。腎不全処置 16 週間後においても、*nephtrin*, *podocin*, *cd2ap*, *α -actinine-4*, *synaptopodin*, *podocalyxin* の遺伝子発現量は Sham-Control 群と比較して、CRF-Control 群にて低下した(Figure 24D-F, 25D-F)。しかし、これらの遺伝子発現量の低下を ARA や ARA+DHA 群にて抑制した。さらに、第 1 章で評価した腎臓中の ARA 量と *α -actinine-4* mRNA 発現量との間に弱い正の相関関係($P = 0.08$)や、*podocin* ($P = 0.056$)が示された。

以上のことから、慢性腎不全状態では、足細胞関連タンパク質の遺伝子発現の低下が認められ、足突起の消失を引き起こしたと考えられた。さらに、ARA を含む食餌の摂取により、足細胞関連タンパク質の遺伝子発現の低下を抑制し、足突起の消失を防いだことが考えられた。よって、慢性腎不全における ARA の摂取は足細胞の構造を維持する作用があることが示唆された。

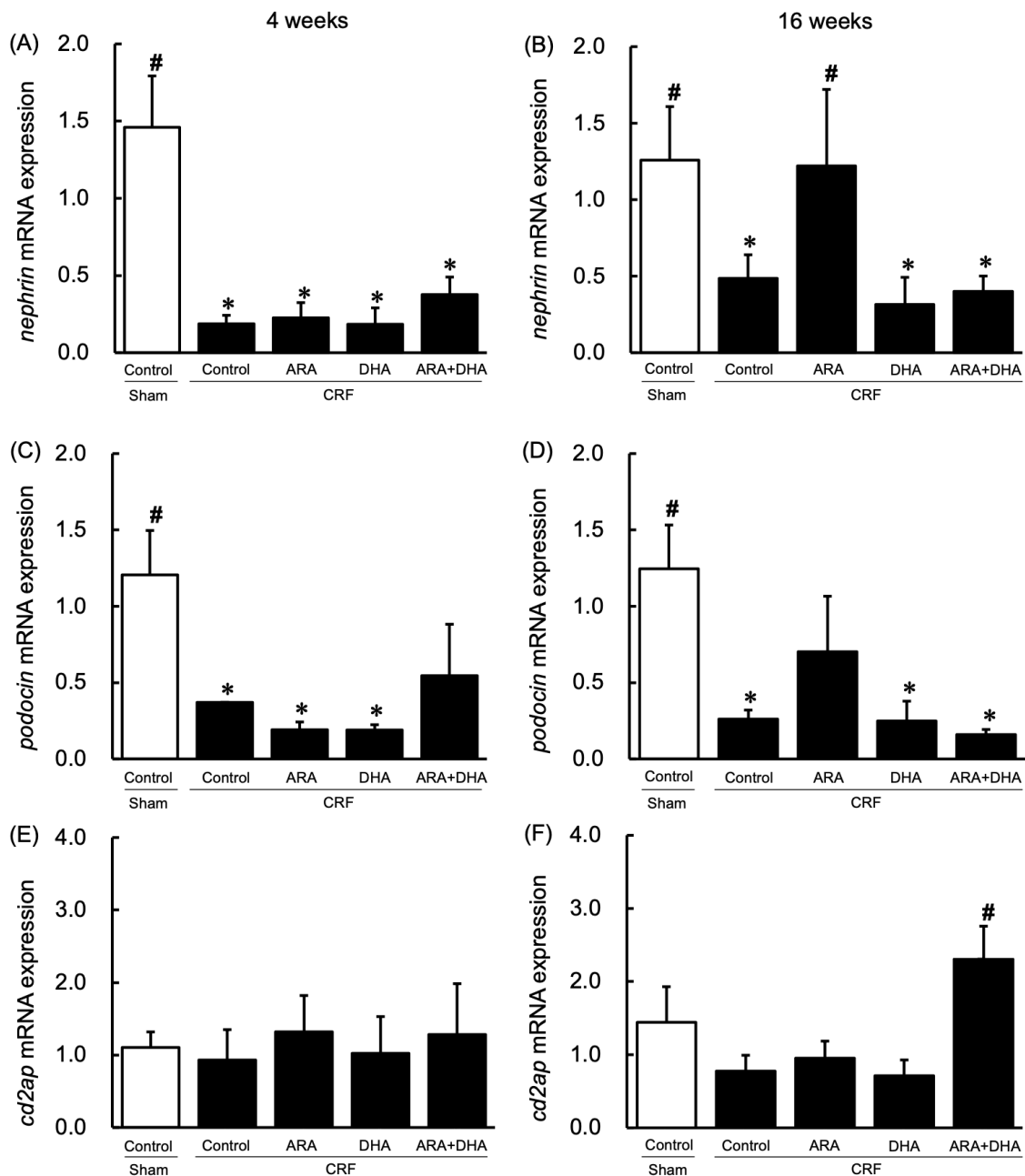


Figure 24. Slit membrane mRNA levels in kidney. (A) nephrin; (C) podocin; (E) cd2ap mRNA levels in kidney at 4 weeks after nephrectomy. (B) nephrin; (D) podocin; (F) cd2ap mRNA levels in kidney at 16 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

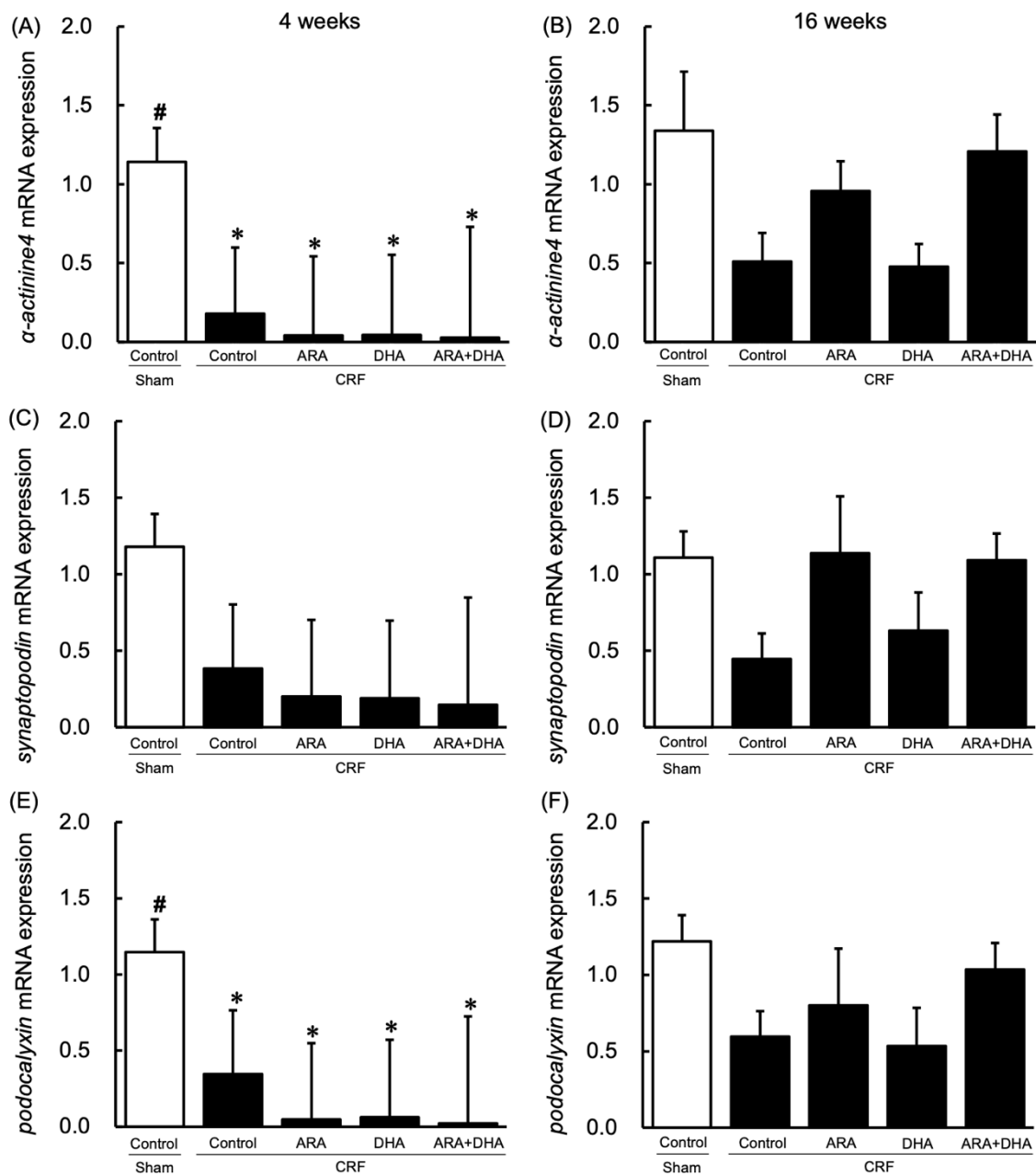


Figure 25. Actin filament mRNA levels in kidney. (A) α -actinin4; (C) synaptopodin; (E) podocalyxin mRNA levels in kidney at 4 weeks after nephrectomy. (B) α -actinin4; (D) synaptopodin; (F) podocalyxin mRNA levels in kidney at 16 weeks after nephrectomy. Values are presented as the mean \pm SEM (n = 5-7). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-3. 近位尿細管における megalin 発現及び megalin mRNA 発現への影響

近位尿細管における megalin の発現を免疫染色によって観察した結果を Figure 26A に示す。腎不全処置 16 週間後における megalin 発現は Sham-Control 群において顕著に確認されたものの、CRF-Control 群では megalin 発現が顕著に減少した (Figure 26)。DHA 群においても megalin の発現が減少していることを確認した。しかし、ARA 群及び ARA+DHA 群では、megalyn 発現が Sham-Control 群と同様に顕著に確認された。腎臓中の megalin 遺伝子発現量を RT-qPCR で測定した結果を Figure 27 に示す。Sham 群と比較して、CRF-Control 群において、megalyn 遺伝子発現量が有意に減少した (Figure 27)。しかし、この megalyn 遺伝子発現量の減少に対し、ARA+DHA 群では有意に増加した。これらの結果から、ARA を含む食餌の摂取は慢性腎不全ラットの腎臓組織における megalyn 発現減少を抑制することが明らかとなった。

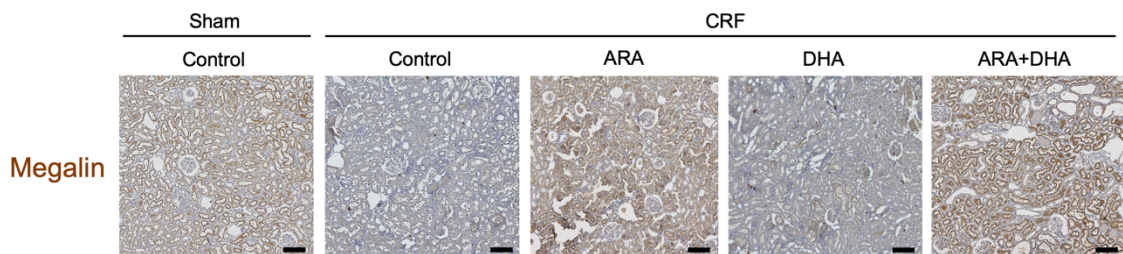


Figure 26. Megalin staining in the kidney at 16 weeks.

Image of coronal sections of glomeruli from megalin staining. Scale bar; 50 μ m.

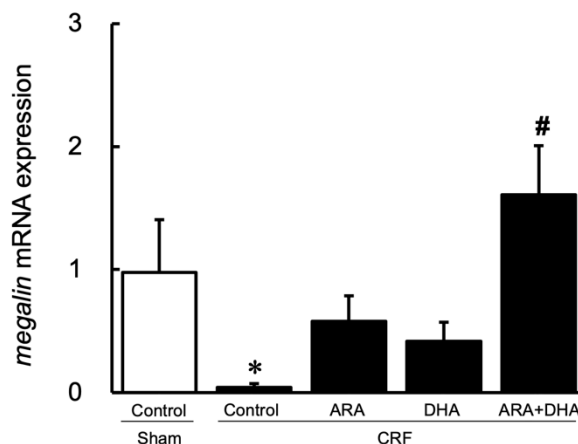


Figure 27. Megalin staining and megalin mRNA in the kidney at 16 weeks.

megalyn mRNA expression levels. Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 5-7$). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-4. 尿中のビタミン D 結合性タンパクの測定

Megalin によって再吸収される物質にはアルブミン以外にもビタミン D 結合タンパク質 (Vitamin D Binding Protein, DBP) があることが報告されている[42]。しかし、腎障害時では megalin による再吸収能が低下し、尿中にアルブミンや DBP が排泄される。そこで、本研究における慢性腎不全ラットの尿中アルブミン排泄と megalin を関連づけるために、腎不全処置 12 週間後の尿サンプルを用いて、電気泳動し、ウエスタンブロットによって尿中の DBP 量を評価した結果を示す。本研究で用いた抗体では、58 kDa のバンドが認められた (Figure 28)。尿中の DBP は Sham-Control 群と比較して CRF-Control 群において有意な増加を示した。対して、ARA+DHA 群ではこの増加を抑制した。前述したように、megalin は近位尿細管に発現し、糸球体で濾過されたアルブミンや DBP を再吸収し、尿中への漏出を防いでいる。第 1 章にて述べた腎不全処置後の尿中アルブミン排泄量の結果と同様に、尿中への DBP の排泄も、ARA+DHA 群において有意に抑制された。これらのことから、慢性腎不全モデルラットにおける尿中アルブミン排泄量や DBP 排泄量の増加は近位尿細管における megalin 発現の減少に関連している可能性が考えられる。

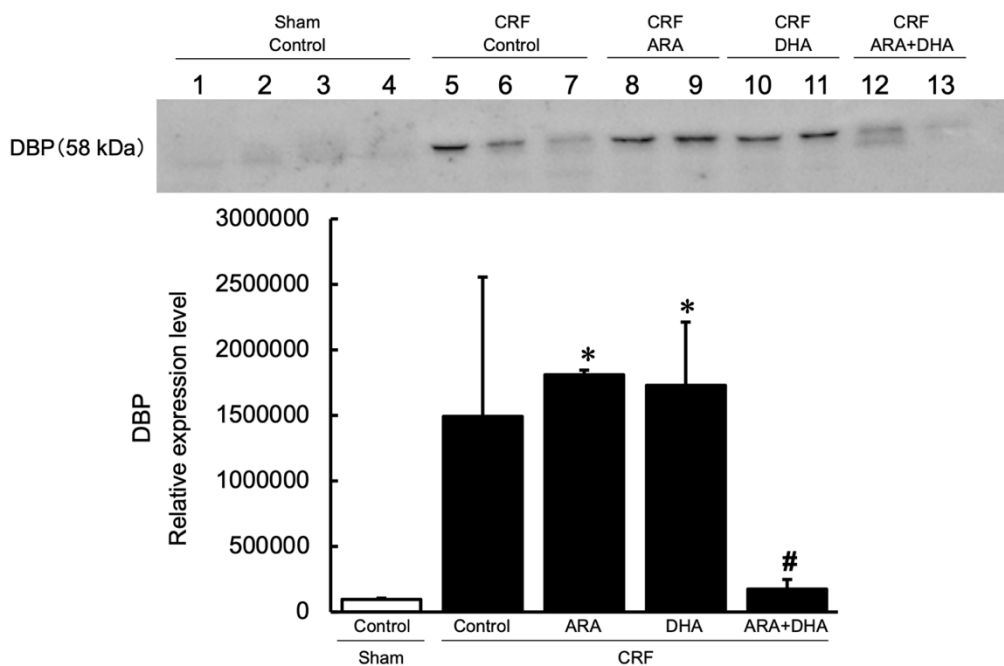


Figure 28. Western blot analysis of DBP in urine at 12 weeks after nephrectomy

Bands (58 kDa) are detected. Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 5-9$). *, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus Sham-Control group). #, $P < 0.05$, by ANOVA and Tukey HSD (versus CRF-Control group).

2-5. MTS 試験

腎臓中 megalin 発現を評価した結果、慢性腎不全ラットでは megalin 発現が減少することが示された。対して、ARA を摂取した慢性腎不全ラットでは、腎臓中の megalin 発現の減少を抑えるだけでなく、発現を促進させた。このことから、ARA の摂取は慢性腎不全における近位尿細管の megalin 発現を促進させ、近位尿細管における megalin を介したアルブミン再吸収を促進させ、尿中アルブミン排泄を軽減させた可能性が考えられた。しかし、実際に ARA の摂取が megalin を介したアルブミン再吸収を促進させるのか不明である。そこで、近位尿細管細胞を用いた *in vitro* 実験により、ARA が実際にアルブミン再吸収能を促進させるのか評価する必要がある。そこで本研究では、ブタ腎近位尿細管(LLC-PK1)細胞を用いてアルブミン再吸収能の評価を検討した。また、LLC-PK1 細胞を慢性腎不全条件下とするために、尿毒症物質の1種であるISを添加処理した。ISはアルブミンとの結合性が高く、体内では蓄積したISのほとんどがアルブミンと結合している[22,23]。そのため、LLC-PK1細胞へのIS取り込みを促すために、1%BSAとISを共に添加処理した。Figure 29にはLLC-PK1細胞に適したIS濃度を決定するため、ISまたは1%BSA+IS添加後の細胞生存率を測定した結果を示す。IS未添加時(Control)と比較して、1000 µg/mLのIS添加で、LLC-PK1も細胞生存率が有意に減少した(Figure 29)。1%BSA+IS添加でも同様に、1000 µg/mLのIS添加で、細胞生存率が有意に減少した。

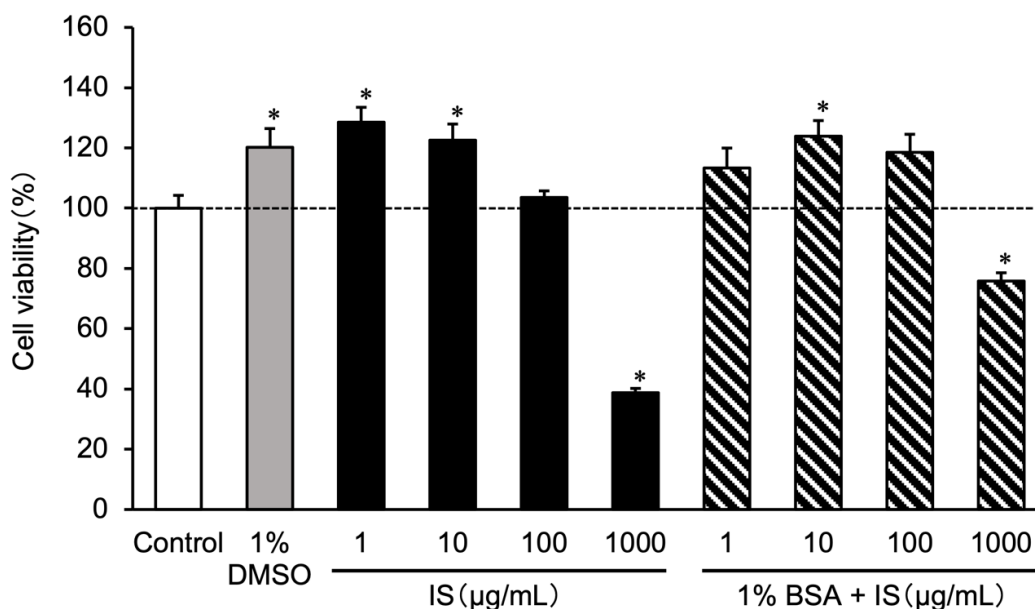


Figure 29. Cell viability test. Values are presented as the mean \pm SEM ($n = 6$). *, $P < 0.05$, by Dunnet test (vs Control). Line (----) indicates 100% of cell viability.

2-4. アルブミン再吸収試験

慢性腎不全モデルラットでは腎近位尿細管の megalin 発現が減少することが確認された (Figure 26)。対して、ARA や ARA+DHA を含む食餌の摂取により、megalin 発現の減少を抑制、及び発現を促すことが確認された。しかし、PUFA の摂取による megalin 発現増加がアルブミン再吸収に及ぼす影響については明らかとなっていない。そこで、transwell insert にて培養した LLC-PK1 細胞を用いて、アルブミン再吸収試験を行った。IS 未添加の Control と比較して、IS 添加で、アルブミン再吸収量が減少した。しかし、IS の濃度依存的ではなく、一番濃度の低い 10 µg/mL の IS 添加によってアルブミン再吸収量が減少した。そのため、本実験では IS 濃度を 10 µg/mL とした。

ARA や DHA 添加によるアルブミン再吸収への影響を評価するために ARA や DHA を添加後、IS を添加後のアルブミン再吸収試験を行った。ARA 及び DHA や IS 未添加の Control と比較して、IS 添加後では、アルブミン再吸収能が減少した。対して、IS 添加前に ARA や DHA を添加することにより、アルブミン再吸収量が増加した。

第 3 節 小括

第 1 章では、ARA と DHA の摂取により腎不全処置 12 週間後における慢性腎不全モデルラットの尿中アルブミン排泄の増加を軽減し、慢性腎不全の進行を抑制する作用を明らかにした。それぞれの作用メカニズムとして、第 2 章では、DHA の摂取により腎不全処置 4 週間後の腎臓中への IS 蓄積を防ぎ、腎臓中の酸化ストレスや炎症、組織の線維化などの腎障害の発生を抑制することで、尿中アルブミン排泄の抑制作用を明らかにした。しかし、ARA 摂取による影響は不明なままであった。そこで、本章では、慢性腎不全ラットへの PUFA 摂取による、糸球体濾過機能に重要な足細胞に対する効果や、近位尿細管におけるアルブミン再吸収能に対する影響を評価した。

足細胞は足突起とスリット膜によって構成されており、腎障害時では、足突起の消失やスリット膜の損傷が引き起こされることが報告されている[39-41]。本研究では、腎不全処置 4、16 週間後の慢性腎不全モデルラットにおいて、足細胞の足突起が消失し、足細胞損傷が生じていることを電子顕微鏡観察から確認された。この足細胞損傷に対し、腎不全処置 4 週間後では ARA や DHA の摂取による影響は認められなかったものの、腎不全処置 16 週間後では、各食餌の摂取、特に ARA を含む食餌の摂取により、足突起の消失を抑制させたことが確認された。前述したように、足突起の消失は足細胞関連タンパク質の遺伝子異常が原因の一つとして知られ、遺伝子異常により、アクチン線維の再編成が引き起こされることが報告されている[39-41]。そのため、足突起の構造維持には足細胞関連タンパク質の遺伝子異常や足細胞内のアクチン骨格が正常に保たれていることが重要であるとされている[39-41]。RT-qPCR による mRNA 発現を評価した結果では、足突起のアクチン骨格のマーカである *α-actinin4* や *synaptopodin* の mRNA 発現量が腎不全処置 4、16 週間後の慢性腎不全ラットで顕著な減少を示したことから、腎不全処置後はアクチン骨格の異常により足突起が損傷を受け、消失したことが示唆された。また、尿中へのアルブミンの漏れには足突起の消失以外にもスリット膜の損傷が直接関与する。そこで、スリット膜の観察も試みたものの、走査型の電子顕微鏡では、スリット膜の観察が非常に困難であった。理由としては、足細胞の 3 層構造(足突起・スリット膜・基底膜)を観察するためには透過型の電子顕微鏡を使用する必要があるためである。そのため、本研究ではスリット膜の構造に重要な *nephrin* や *podocin*、*cd2ap* の mRNA 発現への影響を調べることで、慢性腎不全ラットにおけるスリット膜への影響を評価した。*α-actinin4* や *synaptopodin* と同様に、腎不全処置 4、16 週間後では *nephrin*

や *podocin* の mRNA 発現量が顕著に減少していたため、慢性腎不全モデルラットではスリット膜の損傷も発生していることが考えられた。これらの足突起の消失やスリット膜の損傷に対して、腎不全処置 4 週間後では ARA や DHA 摂取の影響は認められなかったものの、腎不全処置 16 週間後では、各食餌、特に ARA を含む食餌の摂取により、上記の mRNA 発現の減少を抑制し、慢性腎不全進行における足細胞の構造を維持したことが明らかとなった。

Megalin は糸球体から尿細管に排出されたアルブミンを近位尿細管上皮細胞に再吸収し、アルブミンの尿中排泄を防ぐことが知られている[37]。さらに、近位尿細管における megalin の発現は、腎障害によって減少し、再吸収能が低下することで、尿中へアルブミンが漏出することが報告されている[38]。そのため、慢性腎不全モデルラットにおいても、megalin の発現量が低下することが考えられた。一方、病態時における megalin 発現は腎障害の悪化を促すことも報告されている。megalin はアルブミン以外にバンコマイシン、コリスチン、シスプラチンなどの腎毒性薬物と結合し、近位尿細管上皮細胞に取り込むことによって、急性腎障害を発症させることが報告されており[43]、megalin と腎毒性薬剤との結合を阻害する効果のある薬剤により、腎毒性を抑制させることが知られている。他にも、メタボリックシンドロームモデルマウスでは、megalin を介して脂肪酸含有アルブミンが取り込まれることによって腎障害が引き起こし、megalin の発現をノックダウンすることにより腎障害を抑制したことが報告されている[44]。これらの報告から、病態時では megalin の発現量の調節が重要である。しかし、慢性腎不全状態での megalin 発現や PUFA 摂取による影響は不明であった。結果的に、腎不全処置 16 週間後の慢性腎不全モデルラットでは腎臓組織、特に近位尿細管の管腔内において megalin 発現の減少が確認された。さらに、ARA の摂取によって Megalin 発現の減少を抑制することが明らかとなった。Megalin を介したアルブミンの再吸収能を評価するために、transwell を用いてアルブミン取り込み試験を行った。IS による慢性腎不全環境下では、アルブミン取り込み量が低下したものの、ARA を事前添加することで、アルブミン取り込み量の低下を抑制するだけでなく、増加させた。これらのことから、慢性腎不全の状態では、近位尿細管からの megalin 発現の減少により尿中アルブミン排泄を引き起こす原因の一つであることが考えられた。さらに、ARA の摂取によって近位尿細管上皮細胞における megalin 発現を増加させ、アルブミン再吸収能の向上、尿中アルブミン排泄の軽減に作用したと考えられた。

以上のことから、ARA の摂取は腎糸球体における足細胞の損傷を抑制し、足細胞の構造を維持することや、近位尿細管における megalin 発現の増加により、尿中アルブミン排泄の原因として考えられる糸球体濾過機能低下やアルブミン再吸収能の低下を防いだものと考え

られる。さらに、DHAの摂取では、足細胞の損傷抑制効果やアルブミン再吸収能の低下抑制効果に影響を与えなかったことが示された。このことから、DHAとARAでは、尿中アルブミン排泄の抑制メカニズムが異なることが明らかとなった。

総括

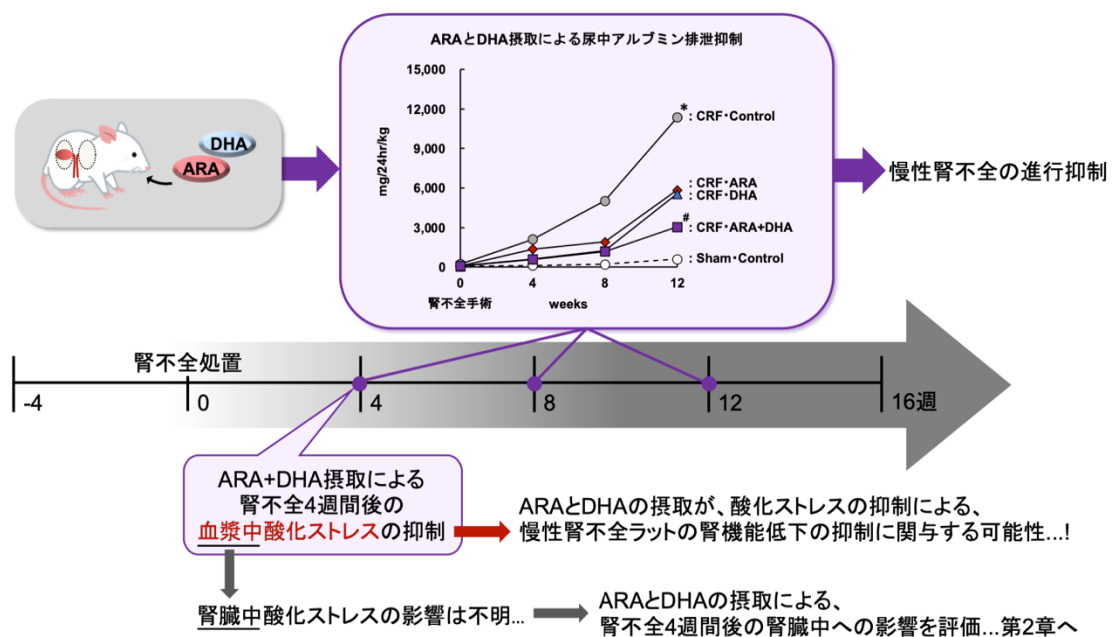
慢性腎不全とは各種の腎疾患によって長期にわたり腎機能が低下している病態の総称である。慢性腎不全の治療には原疾患の治療が重要である一方で、各種腎疾患がある程度進行した場合に共通して認められる「進行性腎障害」を抑えることも非常に重要とされている。近年、日本では欧米諸国と比較して、人工透析を受ける患者数が年々増加傾向にある。患者数増加により医療費が1兆円を超え、この医療費の増加が社会問題につながっている。このような現状を踏まえ、慢性腎不全の進行を遅延させる手法の確立が重要となる。日常摂取する栄養素の一つである脂肪酸は、生体内におけるエネルギー源としてだけでなく、受容体やその他の結合タンパク質を介して様々な生体反応に関与している。脂肪酸の中でもPUFAは必須脂肪酸と呼ばれ、生体反応の機能維持に重要であることが知られている。 ω 6系PUFAのARAは腎臓の生理的機能の維持や発達に関与している。その活性本体はCOXやLOX、CYPなどの代謝酵素によって産生されたエイコサノイドである。ARAから生成されるエイコサノイドの1種であるPGsは腎臓の血流や体内の水分量、 Na^+ バランスの恒常性の調節をする働きがある。 ω 3系PUFAのDHAから産生されるエイコサノイドは高い抗炎症性作用を持ち、メタボリックシンドロームに伴う腎障害進行抑制効果や、虚血性急性腎不全の発症抑制効果を持つことが知られている。しかし、慢性腎不全の進行に対するARAやDHAの摂取の効果を検討した報告はない。そのため、ARAが生理的な腎臓の維持機能により、また、DHAの高い抗炎症作用により慢性腎不全進行を抑制するのではないかと考えた。そこで本研究では、5/6腎摘出型慢性腎不全モデルラットを用いて、異なる種類のPUFAの摂取による慢性腎不全の進行に対する影響を検討した。

第 1 章 慢性腎不全ラットの腎機能に対する多価不飽和脂肪酸摂取による影響

第 1 章では、5/6 腎摘出型慢性腎不全モデルラットを用いて、ARA や DHA の摂取による慢性腎不全の進行に対する影響を評価した。ラットへ摂取させた各食餌中の脂肪酸は、腎不全処置後においても、無処置のラットと同様に血漿や腎臓中に反映されたことが明らかとなった。腎機能評価では、慢性腎不全モデルの作製から 12 週間かけて C_{cr} 値の有意な低下や、尿中アルブミン排泄量の有意な増加が認められ、本慢性腎不全モデルが参考資料と同様に 12 週間かけて進行的に腎機能が低下したことが認められた。さらに、本研究では ARA や DHA を含む食餌の摂取により、慢性腎不全ラットの尿中アルブミン排泄量の増加が顕著に軽減され、腎機能の低下および慢性腎不全の進行を抑制させることを本研究で初めて明らかにした。この尿中アルブミン排泄の抑制理由を調べるために、腎不全処置 16 週間後の腎臓を用いて腎機能低下に関わる炎症性サイトカインの測定や腎臓組織の組織学的評価、酸化ストレスを評価した。腎臓の炎症は炎症性サイトカインが関与し、尿中アルブミン排泄の発生に寄与することが報告されている。本研究では、腎不全処置 16 週間後の腎臓中で $TNF-\alpha$ や $TGF-\beta_1$ 量が増加し、腎機能低下に関与する可能性が示唆された。特に、 $TGF-\beta_1$ は組織の線維化を促進させ、尿中アルブミン排泄を引き起こす原因の一つとして知られている。ARA や DHA を含む食餌の摂取により、腎不全処置 16 週間後の腎臓中 $TGF-\beta_1$ 量の増加が抑制され、腎臓の線維化を抑制し、腎機能低下の抑制する可能性が考えられた。また、本慢性腎不全モデルでは、腎機能低下に伴う糸球体肥大や糸球体硬化、尿細管の拡張が観察されており、これらの組織異常が尿中アルブミン排泄量の増加及び、腎機能の低下と関与することが報告されている。しかし、本研究では上記のような組織異常が確認されなかった。そのため、本研究では組織異常を引き起こす炎症や他の因子が直接、腎機能低下に関与する可能性が考えられた。酸化ストレスは腎機能を低下させることが報告されている。そこで、本研究では慢性腎不全ラットの腎機能低下の原因について調べるため、腎臓中酸化ストレスを評価し、酸化ストレスと腎機能との関係性を評価した。その結果、腎不全処置 16 週間後の腎臓中では酸化ストレスの増加が認められなかった。酸化ストレスの指標である ROS は、反応性が高く、非常に不安定な物質であり、体内のタンパク質や脂質などと反応し、酸化生成物を産生する。そのため、腎不全処置 16 週間後の腎臓では、すでに産生した ROS が体内で反応し、酸化生成物が生成されたことで、腎臓中に ROS 量の増加が認められなかったことが考えられた。そのため、腎不全 16 週間後より早期の段階である腎不全処置 4 週間後における血漿中の酸化ストレスを測定し、腎機能との関係性を評価した。その結果、腎不全処置 4 週間後の

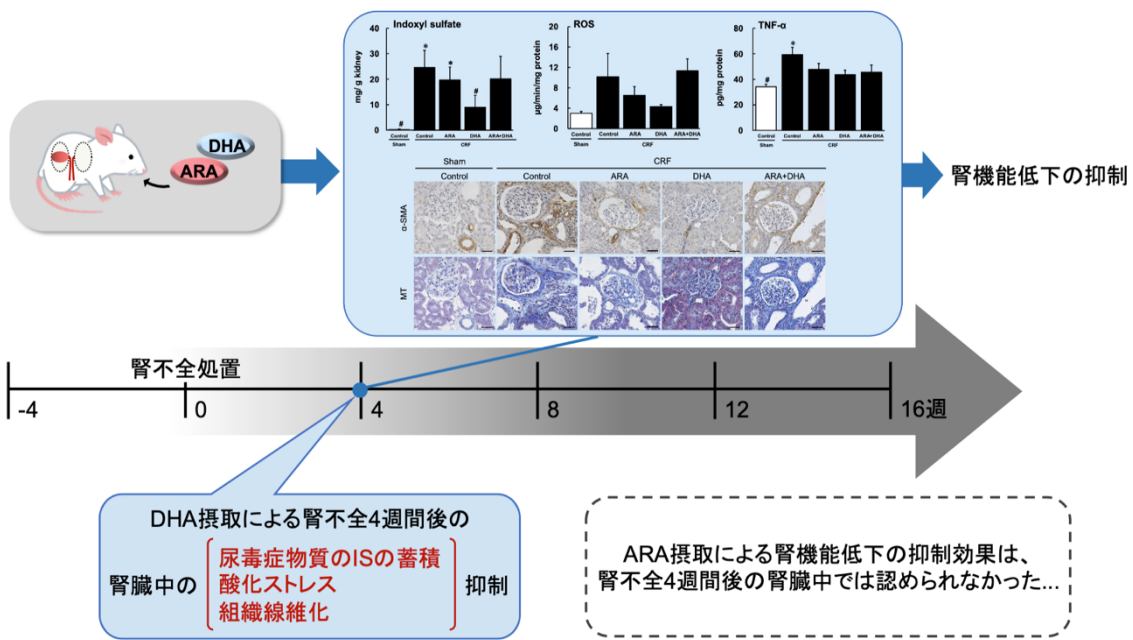
血漿中酸化ストレスの顕著な増加を ARA と DHA を含む食餌の摂取によって抑制された。さらに、血漿中酸化ストレスと腎機能との間に有意な相関性が認められたため、腎不全処置後は直ちに血漿中に酸化ストレスが生じ、腎機能を低下させることや、この増加に対して ARA や DHA を含む食餌の摂取により酸化ストレスを抑制し、腎機能の低下を抑制させる可能性が考えられた。しかし、腎不全処置 4 週間後における腎臓中の酸化ストレスについては不明であり、腎不全処置 4 週間後の腎臓中酸化ストレスと腎機能との関係を調べるためにはさらなる実験が必要である。また、この内容については下記の論文にて報告した。

H. Muramatsu, N. Akimoto, M. Hashimoto, K. Sugibayashi, M. Katakura. Influence of polyunsaturated fatty acid intake on kidney function of rats with chronic renal failure, *Mar. Drugs.*, **19**, 692(2021).



第 2 章 慢性腎不全の腎臓中酸化ストレスと線維化に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

第 1 章では ARA と DHA の摂取が慢性腎不全の進行抑制に重要であることを明らかにした。この抑制効果には、腎機能低下に關与する酸化ストレスの増大を ARA や DHA が含まれる食餌の摂取によって軽減されることが理由の一つであると考えられた。そのため、第 2 章では、ARA と DHA の摂取による腎不全モデル作製 4 週間後の腎臓中酸化ストレスに対する影響を評価した。腎不全処置 4 週間後の腎臓中では、ROS 量が増大し、腎機能低下に寄与することが示された。また、この増大に対し、DHA を含む食餌の摂取によって抑制されることがわかった。この ROS 量の増大の原因及び、DHA の摂取による抑制メカニズムを探るため、腎臓中の *catalase* や *gpx* などの抗酸化酵素の mRNA 発現量を評価した。しかし、腎不全処置 4 週間後の腎臓中では抗酸化酵素の mRNA 発現量が顕著に減少したものの、ARA や DHA を含む食餌の摂取による影響は認められなかった。そのため、腎不全処置 4 週間後における腎臓中 ROS 量の抑制効果に対し、ARA や DHA の摂取による抗酸化酵素への影響はなかったことが考えられた。抗酸化酵素以外に、ROS を増大させる原因因子に尿毒症物質の 1 種である IS が關与していることが知られている。腎機能が低下すると、腎臓に IS が蓄積し、メサングウム細胞や腎近位尿細管細胞で NADPH オキシダーゼが活性化され、活性酸素が過剰生成されることにより、酸化ストレスを生じ、CKD の進行に關わっている。本研究では、DHA の摂取が、腎不全処置後の腎臓中における IS の増加を抑制させることが明らかとなった。また、相関による評価により、腎不全処置 4 週間後の腎臓中の IS 量が ROS 量の増加と關連していることが示された。この腎臓中の IS による ROS の誘導は、炎症や線維化の発生につながる。本研究では、腎臓中における炎症促進に關与する M1 マクロファージの活性化により TNF- α 量を増加させ、腎臓組織の線維化を促した可能性が示された。さらにこの線維化の増加が尿中アルブミン排泄を増加させ、腎機能を低下させたことが考えられた。しかし、DHA を摂取した慢性腎不全モデルラットでは、腎臓中の IS 蓄積及び、ROS 量や線維化の誘導を抑制させたことが明らかとなった。この抑制効果に DHA のどの代謝物が關わるのか調べた結果、DHA 由来の代謝物である PD1 や 20-HDHA、4-HDHA、EPA 由来の代謝物である 18-HEPE が關与する可能性が示された。しかし、これらの代謝物が本当に慢性腎不全ラットの腎臓中の酸化ストレスや炎症、線維化に効果を發揮するかは不明である。そのため今後、各代謝物による酸化ストレスや炎症、線維化に対する抑制効果についてさらなる研究が必要である。

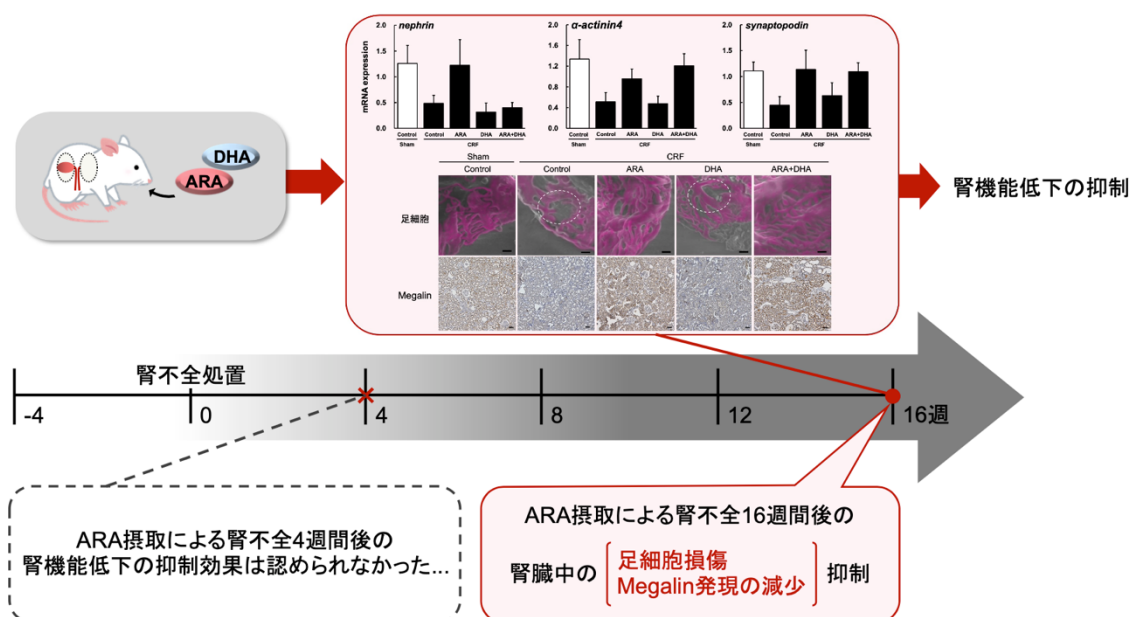


第 3 章 慢性腎不全の腎足細胞や近位尿細管再吸収能に対する多価不飽和脂肪酸摂取の効果

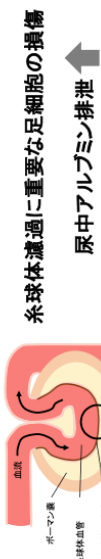
第 1 章では、ARA と DHA の摂取により慢性腎不全モデルラットの尿中アルブミン排泄の増加を軽減し、慢性腎不全の進行を抑制する作用を明らかにした。それぞれの作用メカニズムとして、第 2 章では、DHA の摂取が腎臓中への IS 蓄積を抑制し、腎臓中の酸化ストレスや炎症、腎線維化などの腎障害の発生を抑制することで、尿中アルブミン排泄の抑制作用を明らかにした。しかし、ARA 摂取による影響は不明なままであった。そこで、本章では、慢性腎不全ラットへの ARA や DHA を含む食餌の摂取による、糸球体濾過機能に重要な足細胞に対する効果や、近位尿細管におけるアルブミン再吸収能に対する影響を評価した。足細胞は足突起とスリット膜によって構成されており、腎障害時では、足突起の消失やスリット膜の損傷が引き起こされることが報告されている。本研究では、腎不全処置 4、16 週間後の慢性腎不全モデルラットにおいて、足細胞の足突起が消失し、足細胞損傷が生じていることを電子顕微鏡観察によって確認した。この損傷に対して、腎不全処置 16 週間後では、ARA を含む食餌の摂取により、足突起の消失を抑制させたことがわかった。足突起の消失は足細胞関連タンパク質の遺伝子異常が原因の一つとして知られており、遺伝子異常により、アクチン繊維の再編成が引き起こされることが報告されている。そこで、RT-qPCR を用いて mRNA 発現を評価した結果、足突起のアクチン骨格のマーカーの α -actinin4 や synaptopodin mRNA 発現量が慢性腎不全ラットで顕著な減少を示し、慢性腎不全モデルラットではアクチン骨格の異常により足突起が損傷を受けたことが示唆された。また、尿中へのアルブミン排泄には足突起の消失以外にもスリット膜の損傷が直接関与する。腎不全処置 16 週間後では *nephrin* や *podocin* の mRNA 発現量が顕著に減少していたため、慢性腎不全モデルラットではスリット膜の損傷も発生している可能性が考えられた。これらの足突起の消失やスリット膜の損傷に対して、ARA を含む食餌の摂取により、上記のタンパク質の mRNA 発現の減少を抑制が、慢性腎不全進行における足細胞の構造維持につながる可能性が明らかとなった。近位尿細管におけるアルブミン再吸収能には近位尿細管の管腔内に発現する megalin が関与することが報告されている。本慢性腎不全モデルラットでは腎不全処置 16 週間後の腎臓中の megalin 発現が顕著に減少し、アルブミン再吸収能の低下に関与した可能性が考えられた。この減少に対して、ARA を含む食餌の摂取が近位尿細管における megalin 発現の減少を抑制かつ発現を促進させた。アルブミン再吸収試験として、megalin を発現する LLC-PK1 細胞を介したアルブミン取り込み量を評価した結果、IS による慢性腎不全環境下では、

アルブミン取り込み量が低下したものの、ARA を事前に添加することで、アルブミン取り込み量の低下を抑制するだけでなく、増加させた。これらのことから、慢性腎不全の状態では、近位尿細管からの megalin 発現の減少により尿中アルブミン排泄を引き起こす原因の一つであることが考えられた。さらに、ARA の摂取によって近位尿細管における megalin 発現を増加させ、アルブミン再吸収能の向上、尿中アルブミン排泄の軽減に作用したと考えられた。

以上の結果により、DHA は腎臓中の酸化ストレスや線維化などの腎障害を抑制(第 2 章)し、ARA は腎臓の生理的機能である糸球体濾過やアルブミン再吸収能の低下を抑制(本章)することで尿中アルブミン排泄の増加を抑制し、慢性腎不全の進行を抑えることが明らかとなった。現在の医療では、慢性腎不全に対する治療薬はなく、改善させることが難しいことが現状である。本研究の結果は、慢性腎不全の新しい治療方法として ARA と DHA を含む食事の摂取が有用であることを提供したと考える。この ARA と DHA を含む食事摂取の具体例として、腎障害の早期では DHA を摂取し、腎臓中に発生する酸化ストレスや線維化を抑える。その後、ある程度腎障害が進行した段階で ARA の摂取を追加し、ARA と DHA の併用摂取を継続する。この食事摂取の方法により、腎機能維持効果や慢性腎不全の進行抑制効果を発揮することが考えられる。しかし、本研究では ARA を摂取するタイミングについて明確な時期については不明である。そのため今後、ARA と DHA の摂取時期については臨床試験を実施し厳密に検討する必要がある。

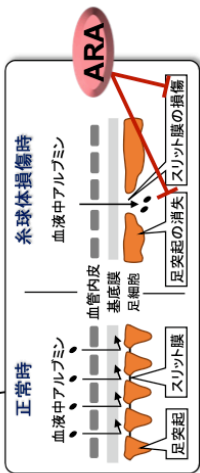


ARA摂取による糸球体足細胞損傷の抑制



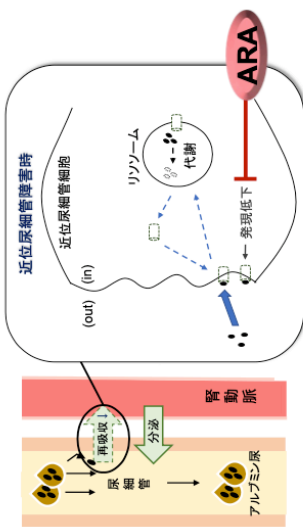
糸球体濾過に重要な足細胞の損傷

尿中アルブミン排泄 ↑



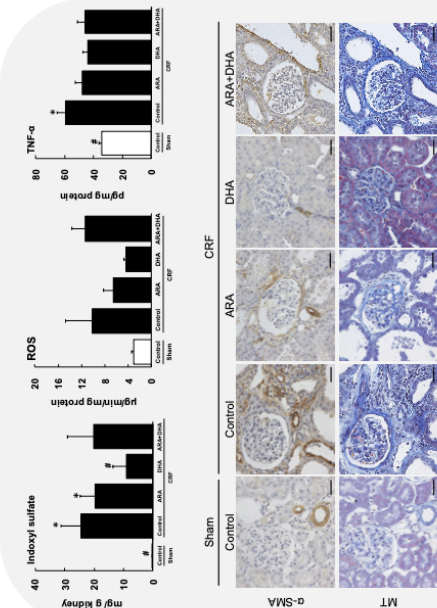
慢性腎不全による足細胞損傷が抑制された

近位尿管アルブミン再吸収能低下の抑制

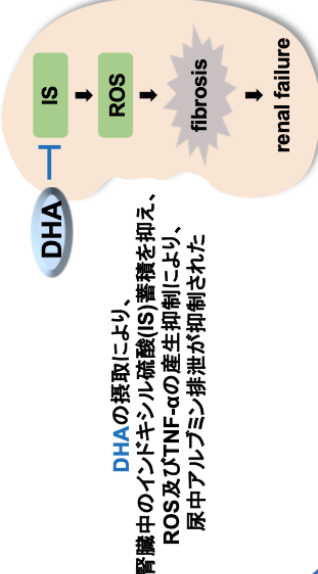


慢性腎不全による近位尿管内megalin発現低下が抑制され、アルブミン再吸収能の低下が抑制された

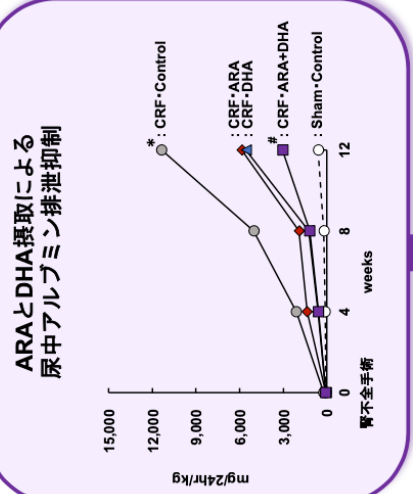
DHA摂取による酸化ストレスや腎線維化を介した腎障害の抑制



ROS: Reactive oxygen species
TNF-α: Tumor necrosis factor-α
α-SMA: α-smooth muscle actin
MT: Masson's trichrome staining



DHAの摂取により、腎臓中のインドキシル硫酸(IS)蓄積を抑え、ROS及びTNF-αの産生抑制により、尿中アルブミン排泄が抑制された



慢性腎不全の進行抑制

利益相反

JPPS KAKENHI (17K1865)、JPPS KAKENHI (JP22K05529)。

謝辞

本研究に際し、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院栄養生理学講座准教授 片倉 賢紀 先生に心から深謝致します。

本研究の遂行に当たり、多くの御助言、御指導を頂きました城西大学大学院機能性食品科学講座教授 古旗 賢二 先生、城西大学大学院臨床薬理学講座教授 木村 光利 先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本論文校閲において適切な御助言、御指導を頂きました城西大学大学院生物薬品科学講座教授 田中 亨 先生、城西大学大学院皮膚生理学講座教授 高木 豊 先生、城西大学大学院生理学講座准教授 大竹 一男 先生に感謝いたします。

本研究実施にあたり、有益な御意見ならびに組織学的評価の御教授を頂きました城西大学薬学部非常勤講師 秋元 尚枝 先生に深く感謝致します。

有益な御意見ならびに本研究に御協力頂きました城西大学薬学部栄養生理学講座助教 矢島 克彦 先生ならびに諸氏に深く感謝致します。

さらに、SEM による腎臓組織中の足細胞観察では、城西大学機器分析センター 富田 惇輝 先生に有益なご助言とご指導を賜りました。

本研究のために犠牲になった多くの動物に感謝の意を込め、追悼の意を表します。

この論文は、多くの方々に支えられたおかげで出来上がったものであると感じており、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力頂きながら、ここにお名前を記す事ができなかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に、温かい励ましをいつもお送り続けてくれた家族に心から感謝します。

皆様ありがとうございました。

参考文献

- [1] 花房 規男, 阿部 雅紀, 常喜 信彦, 星野 純一, 菊地 勘, 後藤 俊介, 神田 英一郎, 谷口 正智, 中 井 滋, 長沼 俊秀, 長谷川 毅, 三浦 健一郎, 和田 篤志, 武本 佳昭. わが国の慢性透析療法の現況, *日本透析医学会雑誌*, **54**, 611-657 (2021)
- [2] A Fukui, T Yokoo, M Nangaku, N Kashihara. New measures against chronic kidney diseases in Japan since 2018, *Clin. Exp. Nephrol.*, **23**, 1263-1271 (2019).
- [3] 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準(2022), *日本食育学会誌*, **10**, 322-326 (2019).
- [4] CM Hao, MD Breyer. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney, *Annu. Rev. Physiol.*, **70**, 357-377 (2008).
- [5] M Musu, G Finco, R Antonucci, E Polati, D Sanna, M Evangelista, D Ribuffo, V Schweiger, V Fanos. Acute nephrotoxicity of NSAID from the foetus to the adult, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, **15**, 1461-1472 (2011).
- [6] JA Chandrasekharana, NS Walia. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation, *J Inflamm Res*, **8**, 181-192 (2015).
- [7] M Katakura, M Hashimoto, T Inoue, AA Mamun, Y Tanabe, M Arita, O Shido. Chronic arachidonic acid administration decreases docosahexaenoic acid-and eicosapentaenoic acid-derived metabolites in kidneys of aged rats, *PLos One*, **10**, e0140884 (2015).
- [8] M Katakura, M Hashimoto, T Inoue, AA Mamun, Y Tanabe, R Iwamoto, M Arita, S Tsuchikura, O Shido. Omega-3 fatty acids protect renal functions by increasing docosahexaenoic acid-derived metabolite levels in SHR.cg-leprcp/NDmcr rats, a metabolic syndrome model, *Molecules*, **19**, 3247-3263 (2014).
- [9] IR Hassan, K Gronert. Acute Changes in Dietary ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids Have a Pronounced Impact on Survival following Ischemic Renal Injury and Formation of Renoprotective Docosahexaenoic Acid-Derived Protectin D1, *J. Immunol.*, **182**, 3223-3232 (2009).

- [10] 柏原 直樹, 長州 一, 佐藤 稔. 酸化ストレス処理機構と腎障害, *日本内科学会雑誌*, **106**, 1473-1480(2017).
- [11] WW Cheung, KH Paik, RH Mak. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease, *Pediatr. Nephrol.*, **25**, 711-724(2010).
- [12] 高山 淳二, 高岡 昌徳, 松村 靖夫. ラットおよびマウスにおける腎機能低下モデルの簡便な作製方法 —急性および慢性腎不全モデル—, *日本薬理学会雑誌*, **131**, 37-42(2008).
- [13] 飯田 千夏, 慢性腎不全による食餌性脂肪酸の体内分布の変化, 城西大学 卒業論文(2018).
- [14] 伊藤 貞嘉. 心腎相関, *日本内科学会雑誌*, **95**, 952-958(2006).
- [15] G Barrera, S Pizzimenti, M Daga, C Dianzani, A Arcaro, GP Cetrangolo, MA Cucci, M Graf, F Gentile. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders, *Antioxidants*, **7**, 102(2018).
- [16] 駒井 俊彦, 岡村 僚久, 山本 一彦, 藤尾 圭志. TGF- β による免疫応答制御, *J. Clin. Immunol.*, **39**, 51-58(2016).
- [17] 伊藤 貞嘉. 高血圧, *日本内科学会雑誌*, **101**, 1286-1293(2012).
- [18] 有田 誠. ω 3 系脂肪酸由来の抗炎症性代謝物の構造と機能, *日本生化学会雑誌*, **80**, 1042-1046(2008).
- [19] 有田 誠. 炎症の収束に関わる脂質メディエーターの代謝と網羅的解析, *日本鼻科学会会誌*, **51**, 60-62(2012).
- [20] CN Serhan, N Chiang, J Dalli, BD Levy. Lipid mediators in the resolution of inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect*, **7**, 1-20(2015).
- [21] XC Ling, LK Kuo. Oxidative stress in chronic kidney disease, *Renal Replacement Therapy*, **4**, 53(2018).
- [22] 丹羽利充. 尿毒素による腎・血管障害と向血栓傾向, *日本血栓止血学会誌*, **26**, 318-322(2015).
- [23] 清水 英寿. 食品タンパク質由来腸内細菌代謝産物が導く慢性腎不全の進行促進メカニズム, *日本農芸化学会誌*, **55**, 203-209(2017).

- [24] 堀田 真希, 山下 美香, 油野 友二, 小郷 正則, 小澤 優. 尿沈渣特集, **66**, 27-50(2017).
- [25] 松尾 清一, 和田 隆志, 湯澤 由紀夫, 佐藤 博, 鈴木 芳樹, 北村 博司. 糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き, 649-725(2014).
- [26] X Tao, S Thijssen, N Levin, P Kotanko, G Handelman. Enhanced Indoxyl Sulfate Dialyzer Clearance with the Use of Binding Competitors, *Blood Purification*, **39**, 323-330(2015).
- [27] X Wang, J Chen, J Xu, J Xie, DCH Harris, G Zheng. The Role of Macrophages in Kidney Fibrosis, *Front. Psychol.*, **12**, 705868(2021).
- [28] CY Wu, HY Yang, HP Chien, MH Tseng, JL Huang. Urinary clusterin - a novel urinary biomarker associated with pediatric lupus renal histopathologic features and renal survival, *Pediatr. Nephrol.*, **33**, 1189-1198(2018).
- [29] WK Han, V Bailly, R Abichandani, R Thadhani, JV Bonventre. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury, *Kidney Int.*, **62**, 237-244(2002).
- [30] HR Jang, M Kim, S Hong, K Lee, MY Park, KE Yang, CJ Lee, J Jeon, KW Lee, JE Lee, JB Park, K Kim, GY Kwon, YG Kim, DJ Kim, W Huh. Early postoperative urinary MCP-1 as a potential biomarker predicting acute rejection in living donor kidney transplantation: a prospective cohort study, *Sci. Rep.*, **11**, 18832(2021).
- [31] B Moszczuk, N Krata, W Rudnicki, B Foroniewicz, D Cysewski, LP Aczek, B Kaleta, K Mucha. Osteopontin - A Potential Biomarker for IgA Nephropathy: Machine Learning Application, *Biomedicines*, **10**, 734(2022).
- [32] 和田 隆志, 横山 仁, 向井 直史, 松島 綱治. 進行性腎線維化にはたす MCP-1-CCR2 の役割と治療戦略への応用, *Inflammation and Regeneration*, **24**, 567-572(2004).
- [33] R Kaomongkolgit, J Manokawinchoke, N Sanchavanakit, P Pavasant, P Sumrejkanchanakij. Fibronectin supports TNF- α -induced osteopontin expression through β 1 integrin and ERK in HN-22 cells, *Arch. Oral Biol.*, **55**, 101-107(2010).

- [34] 東 幸仁, 末田 泰二郎, 吉栖 正生. 高血圧における血管内皮機能と酸化ストレス, *腸内細菌学会誌*, **43**, 47-52(2003).
- [35] P Garg. A Review of Podocyte Biology, *Am J Nephrol*, **47**, 3-13(2018).
- [36] JA Jefferson, SJ Shankland, RH Pichler. Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint, *Kidney Int.*, **74**, 22-36(2008).
- [37] S De, S Kuwahara, A Saito. The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells, *Membranes*, **4**, 333-335(2014).
- [38] Christensen, I Erik, B Henrik. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule, *Am. J. Physiol Renal Physiol.*, **280**, F562-F573(2001).
- [39] 浅沼 克彦, 日高 輝夫, 富野康日己. 腎障害におけるポドサイトの役割, *日本内科学会雑誌*, **101**, 1092-1101(2012).
- [40] 内藤 正吉, 青山 東五, 川島 永子, 翁 千香子, 竹内 和博, 竹内 恵美子, 鎌田 真理子, 竹内 康雄. ポドサイト障害とネフローゼ症候群, *北里医学*, **46**, 1-12(2016).
- [41] 浅沼 克彦, 富野康日己. 腎系球体上皮細胞の細胞特性 I —腎系球体上皮細胞(ポドサイト)におけるアクチン骨格制御—, *日本腎臓学会雑誌*, **50**, 532-539(2008).
- [42] N Toi, M Inaba, E Ishimura, N Tsugawa, Y Imanishi, M Emoto, Y Hirayama, S Nakatani, A Saito, S Yamada. Significance of urinary C-megalin excretion in vitamin D metabolism in pre-dialysis CKD patients, *Sci. Rep.*, **9**, 2207(2019).
- [43] Y Hori, N Aoki, S Kuwahara, M Hosojima, R Kaseda, S Goto, T Iida, S De, H Kabasawa, R Kaneko, H Aoki, Y Tanabe, H Kagamu, I Narita, T Kikuchi, A Saito. Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28**, 1783-1791(2017).
- [44] S Kuwahara, M Hosojima, R Kaneko, H Aoki, D Nakano, T Sasagawa, H Kabasawa, R Kaseda, R Yasukawa, T Ishikawa, A Suzuki, H Sato, S Kageyama, T Tanaka, N Kitamura, I Narita, M Komatsu, A Nishiyama, A Saito. Megalin-mediated tubuloglomerular alterations in high-fat diet-induced kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **27**, 1996-2008(2016).