

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500011

研究課題名(和文)慢性腎臓病における栄養代謝障害への腸管透過性亢進の関与

研究課題名(英文)The association of intestinal permeability with malnutrition in chronic kidney disease

研究代表者

熊谷 裕通(KUMAGAI, Hiromichi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：40183313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)におこる栄養障害の主因は、炎症であるが、それに腸管の透過性亢進や腸内細菌叢の変化が関与しているか否か調べた。腸管透過性の評価法では、分子量4000の蛍光デキストリンを用いると、CKDラットの腸管透過性を評価できた。CKDラットでは、腎機能が著しく悪化すると、腸管透過性が亢進したが、体内の炎症は、これより早期に悪化しており、腸管透過性の亢進が炎症反応を引き起こすという仮説は否定された。CKDモデルラットにビフィズス菌と難消化性デンプンを投与すると、炎症と腎機能の改善が見られたが、その理由は明らかでなかった。

研究成果の概要(英文)：The protein energy malnutrition in chronic kidney disease (CKD) is caused by inflammation, and it may be associated with increased intestinal permeability. The present study investigated the method for evaluating the intestinal permeability and the effect of prebiotics and probiotics on the intestinal permeability and inflammation in CKD rats. The results showed that the intestinal permeability can be examined using 4kD FITC-dextrin. Although the intestinal permeability increased with the progression of renal failure, the inflammation increased earlier than the intestinal permeability, suggesting the inflammation preceded the increased intestinal permeability. The administration of prebiotics and probiotics improved inflammation and renal function although the reason remained to be investigated.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：慢性腎臓病 栄養障害 腸管透過性 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者にはたんぱく質エネルギー栄養障害(PEM)が高頻度に見られる。慢性腎臓病患者の PEM は、予後に悪影響を及ぼすことが知られており、その対策は急務である。慢性腎臓病患者の PEM の原因には、食事制限なども関与するが、最大の原因は全身的な起こる微小な炎症反応であることが示され、また、そのような炎症は動脈硬化とも関連し、慢性腎臓病患者の最大の死因である心血管障害の一因となっていることが示されてきた(MIA 症候群, malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome)。さらに、炎症は、終末糖化産物(Advanced Glycation End Products, AGE)の産生を促進し、慢性腎臓病患者の合併症の発症にも関係していることが示唆されている。

慢性腎臓病患者において栄養障害や動脈硬化などをきたす全身的な微小な炎症は、糖尿病などの原疾患、慢性腎臓病に伴う合併症、感染症、尿毒症物質やさまざまな代謝物質の蓄積等によって生じることが示されてきた。

しかし、これまでに慢性腎臓病患者に生じる炎症に腸管の透過性亢進や腸内細菌叢の変化が関与しているか否かについてはほとんど検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、慢性腎臓病・糖尿病腎症の動物モデルおよび慢性腎臓病患者を対象として、腸管透過性異常が慢性腎臓病の炎症や合併症などにどのような機序で、どのような影響を及ぼしているのかを明らかにしようとした。そのために以下の検討を行った。

### (1) 腸管透過性の評価法の検討

腸管透過性の検討法として、血中エンドトキシン濃度の測定、腸内細菌由来 DNA 断片の測定のほか、経口投与した緑色蛍光タンパク質組換え大腸菌や FITC-dextran の血中への移行量、腸管粘膜の ZO-1 や occludin の遺伝子発現の減少などで評価できる可能性があり、それらの妥当性を調べた。

### (2) Synbiotics 投与が腸管透過性や炎症に及ぼす効果の検討

CKD における慢性炎症の原因には、腸管透過性の上昇に伴う endotoxin の体内流入や、インドキシル硫酸 (IS) や p-クレシル硫酸 (PCS) などといった尿毒素の貯留が考えられる。しかし、これらの要因と、炎症および腎機能の低下との関連についての詳細は明らかになっていない。CKD への probiotics や prebiotics の投与は、腸内環境や炎症等に対して改善効果を示すことが明らかにされているので、probiotics と prebiotics とを同時に投与する synbiotics は、さらなる改善効果が期待できる。そこで、probiotics としてビフィズス菌を、prebiotics としてレジスタントスターチを用い、CKD モデルラットに対するこれらの同時投与が、腸管透過性の上昇や尿毒素の貯留、炎症や腎機能にどのよう

な影響を及ぼすか検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸管透過性の評価法の検討

#### 血中エンドトキシン濃度の測定

新規に開発された Recombinant LAL Assay を用いて、血液透析患者 80 名の血中エンドトキシン濃度を測定するとともに、炎症反応や栄養状態との関連を調べた。

#### グラム陰性菌の血中ゲノム測定

慢性腎臓病患者において、ヒトの腸内細菌叢を構成するグラム陰性菌の血中ゲノムを測定し、エンドトキシンが腸管に由来するものかどうかを検討した。74 名の血液透析患者より無菌的に採血を行い、DNA を抽出した。抽出した DNA より、腸管から血中に移行しやすい *Escherichia coli* と、腸内細菌叢に特に多く存在する *Bacteroides fragilis* のゲノムを検出するか否かを検討した。また、それらと炎症反応や栄養状態との関連を調べた。

#### 緑色蛍光タンパク質組換え大腸菌の血中移行量測定

CKD モデルラットに、遺伝子組み換えにより緑色蛍光タンパク質(GFP)が組み込まれた大腸菌を投与し、血中および腸間膜リンパ節への移行を調べた。

#### FITC-デキストランの血中移行量測定

CKD モデルラットに、4kD の FITC-デキストランを経口投与し、血中への移行量を測定した。また、その移行量と腎機能、炎症反応、栄養状態との関連を調べた。

#### 近位結腸粘膜における tight junction 蛋白質の発現

CKD モデルラットの近位結腸粘膜における ZO-1 や occludin の遺伝子発現を調べ、正常ラットと比較した。

### (2) Synbiotics 投与が腸管透過性や炎症に及ぼす効果の検討

9 週齢の雄性 Wistar ラットに 5/6 腎摘を施し、CKD を作成した。半数にはビフィズス菌 (probiotics) の経口投与および食餌へのレジスタントスターチ (prebiotics) の添加を行った。残りの半数には生理食塩水を経口投与し、普通食を与えた。観察開始後 13 週目に、24 時間蓄尿を行った後、GFP 組換え大腸菌または FITC-dextran を経口投与し、4 時間後に採血・解剖を行った。腸管透過性は、血液および腸間膜リンパ節 (MLN) からの GFP 組換え大腸菌の検出、および FITC-dextran の血中への移行量の測定により評価した。血中の尿毒素として、IS および PCS 濃度を測定した。炎症は、血中 TNF $\alpha$  type1 受容体濃度の測定により評価し、腎機能はクレアチニンクリアランス (Ccr) で評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 腸管透過性の評価法の検討

#### 血中エンドトキシン濃度の測定

Recombinant LAL Assay による血液透析患

者の血漿エンドトキシン濃度は、透析前が  $17.2 \pm 5.5$  EU/ml、透析後が  $13.6 \pm 7.5$  EU/ml となり、透析によって有意に減少した ( $p < 0.001$ )。ダイアライザーの種類による有意差はみられず、透析患者と健常者との間にも有意差は見られなかった。透析前エンドトキシン濃度は、BMI  $18 \text{ kg/m}^2$  未満の患者において BMI  $18 \sim 22 \text{ kg/m}^2$  の患者に比し有意に高値であったが ( $p < 0.01$ )、血清アルブミン値や炎症指標である CRP、IL-6、MCP-1、EN-RAGE にはそのような関連は見られなかった。

#### グラム陰性菌の血中ゲノム測定

血液透析患者において、E.coli の DNA は、いずれの検体からも検出されなかった。B.fragilis の DNA は、74 名のうち 21 名の血液において検出された。患者を B.fragilis が検出された群と検出されなかった群とに分け、エンドトキシン濃度、IL-6、MCP-1、EN-RAGE、BMI、GNRI、CRP、Alb、透析歴との関連を検討したが、いずれも二群間での有意差はみられなかった。以上の結果から、血液透析患者では、腸管から血中へ B.fragilis の移行が生じている可能性があったが、その臨床的意義は不明であった。

#### 緑色蛍光タンパク質組換え大腸菌の血中移行量測定

解剖 4 時間前に経口投与した GFP 組換え大腸菌は、CKD ラットにおいても、血液および腸管膜リンパ節中から real time PCR によって検出されなかった。

#### FITC-dextran の血中移行量測定

解剖 4 時間前に経口投与した 4kD FITC-dextran は、正常ラットでは血中にほとんど移行しなかったのに対し、CKD ラットでは腎機能が悪化した個体ほど血中への移行が多く認められた。また、炎症のマーカーである TNF $\alpha$  type1 受容体血中濃度も、腎機能が悪化した個体ほど血中濃度が高く、FITC-dextran の血中濃度と TNF $\alpha$  type1 受容体の血中濃度の間には、有意な正の相関が見られた ( $r = 0.89$ ,  $p < 0.001$ )。

#### 近位結腸粘膜における tight junction 蛋白質の発現

CKD ラットでは、正常ラットに比し、occludin の遺伝子発現が有意に低下していたが、ZO-1 にはそのような傾向は見られなかった。Occludin、ZO-1 はいずれも血中 FITC-dextran 濃度との有意な相関は示さなかった。

以上の結果から、CKD における腸管透過性の検討には、4kDFITC-dextran の血中濃度を測定することが適当であることが明らかとなった。

#### (2) Synbiotics 投与が腸管透過性や炎症に及ぼす効果の検討

CKD 群では、コントロール群に比し Ccr の有意な低下を示した。CKD に synbiotics を投与した CKD+syn 群では、CKD 群と比較して血中尿素窒素の上昇が有意に緩和され、Ccr

にも改善傾向がみられた (図 1)。

炎症指標の血中 TNF type1 受容体濃度は、CKD 群で有意に高く、CKD+syn 群で有意に低下した (図 2)。また、血中 TNF type1 受容体濃度は Ccr と有意な正の相関を示した (図 3)。

図 1 3 群間での腎機能(Ccr)の比較

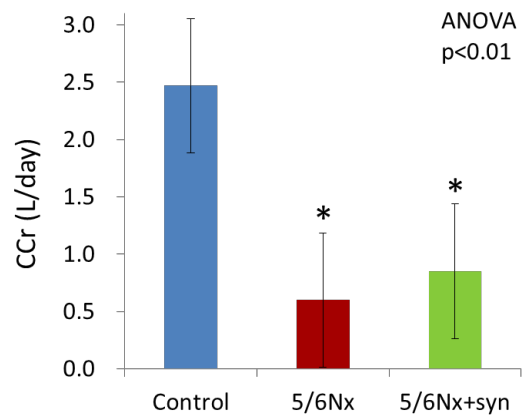


図 2 3 群間での血中 TNF type1 受容体濃度の比較

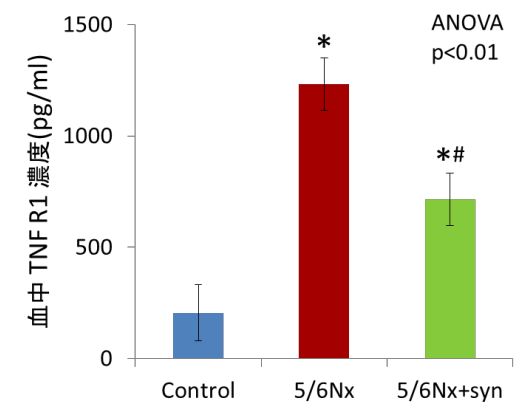
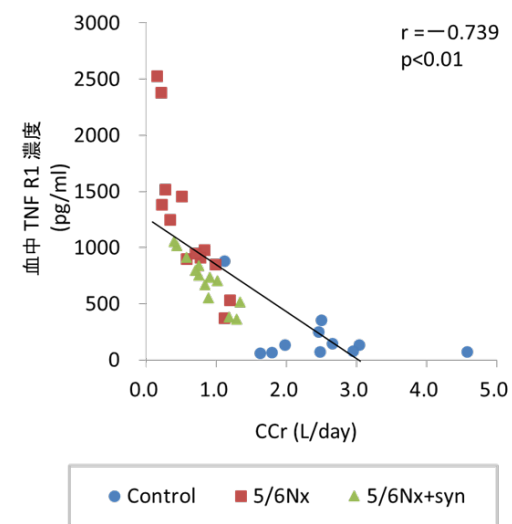


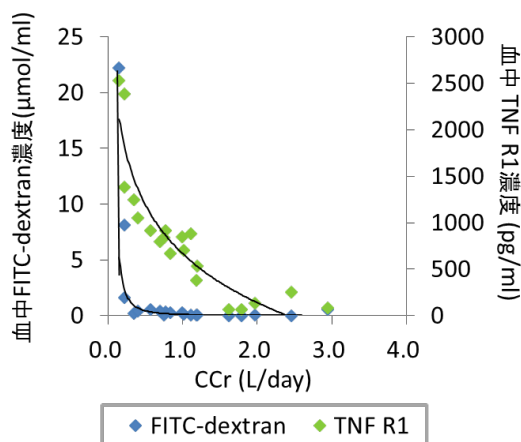
図 3 腎機能と炎症反応との関連



腸管透過性の評価は、GFP で標識した GFP 組換え大腸菌あるいは FITC-dextran 溶液を解剖 4 時間前に経口投与し、その体内への移行を調べることににより評価した。本研究では血液に加え、腸管を通過した細菌が移行しやすい腸間膜リンパ節への移行を調査したが、3 群のどのラットからも GFP 組換え大腸菌は検出されなかった。一方、FITC-dextran に関しては、血液中への移行が確認され、CKD 群で高い傾向が見られた。血中 FITC-dextran 濃度は、尿蛋白、血中尿素窒素、血中 MCP-1 濃度と有意な正の相関を示し、血中 FITC-dextran 濃度の対数変換値はクレアチニンクリアランスの対数変換値と有意な負の相関を示した。これらのことより、FITC-dextran の血中への移行によって示される腸管透過性の上昇と、腎機能の低下、炎症との間には関連があることが明らかとなった。

血中 FITC-dextran 濃度および血中 TNF type1 受容体濃度と Ccr との間には、図 4 の関係が見られた。

図 4 血中 FITC-dextran 濃度および血中 TNF type1 受容体濃度と Ccr との関係



この図から、CKD では、腎機能の低下に伴い、まずは炎症マーカーの上昇が起き、さらに腎機能が低下していくと腸管透過性の亢進が起きてくるものと推定された。このことから、CKD においては、腸管透過性の亢進がエンドトキシンや細菌の血中への流入を促進するというよりは、何らかの原因で生じた体内の炎症が、結果として腸管透過性の亢進を引き起こす可能性が高いと思われた。CKD ラットで何故炎症が生じたかについて、尿毒素（インドキシル硫酸やパラクレジル硫酸）との関連を調べたが、その関連は明らかとならなかった。

本研究の限界として、FITC-dextran の測定感度の問題が挙げられる。今回の実験で FITC-dextran の透過性は、腎機能がかなり低下するまでが亢進していなかった。このことは腎不全の早期にはエンドトキシンの流入がないことを示唆している。しかし、本研究で用いた FITC-dextran の測定法で、感度が十分でなかったとすると、腎不全の早期にエン

ドトキシンの流入がないとは断定できず、腸管透過性の亢進が炎症を惹起したことも否定できない可能性が残った。

以上をまとめると、CKD モデルラットに対する長期的な synbiotics の投与は、腎機能の低下、体内での炎症を抑制することが明らかとなった。また CKD における腎機能の低下、炎症は、腸管透過性の上昇より先行して起こり、synbiotics による腎機能の低下および炎症の抑制効果も腸管透過性の上昇抑制を介したのではないことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Kojo G, Yoshida T, Ohkawa S, Odamaki M, Kato A, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H: Association of serum total testosterone concentration with skeletal muscle mass in men under hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 46, 985-991 (2014). 査読有
2. Fukasawa H, Ishigaki S, Kinoshita-Katahashi N, Niwa H, Yasuda H, Kumagai H, Furuya R.: Plasma levels of fibroblast growth factor-23 are associated with muscle mass in hemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)*. 19, 784-790 (2014). 査読有
3. Kato A, Takita T, Kumagai H: Relationship between arterial stiffening and skeletal muscle atrophy in hemodialysis patients: a gender comparative study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 5, 247-249 (2014). 査読有
4. Fukasawa H, Ishigaki S, Kinoshita-Katahashi N, Yasuda H, Kumagai H, Furuya R.: Plasma levels of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) are associated with muscle and fat mass in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Nutr J*. 27, 13:48 (2014). 査読有
5. Yoshida T, Sakuma K., Kumagai H: Nutritional and taste characteristics of low-potassium lettuce developed for patients with chronic kidney diseases. *Hong Kong J Nephrol*. 16, 42-45 (2014). 査読有
6. Ishigaki S, Fukasawa H, Kinoshita-Katahashi N, Yasuda H, Kumagai H, Furuya R.: Caffeine intoxication successfully treated by hemoperfusion and hemodialysis. *Intern Med*. 53, 2745-2747 (2014). 査読有
7. Yoshida T, Kumagai H, Kohsaka T, Ikegaya N.: Protective effects of relaxin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron Exp Nephrol*. 128, 9-20 (2014). 査読有
8. Fukasawa H, Kaneko M, Niwa H, Matsuyama T, Yasuda H, Kumagai H, Furuya R.: Circulating 20S proteasome is independently associated with abdominal muscle mass in hemodialysis patients. *PLoS One*. 10:e0121352 (2015). 査読有
9. Tsumuraya Y, Hirayama T, Tozuka E, Furuta W, Utsugi S, Tsuchiya A, Hishida A., Kumagai H: Impact of hyperuricaemia on the chronic

kidney disease-associated risk factors in a community-based population. *Nephrology* (Carlton). 20: 399-404 (2015). 査読有  
10.熊谷裕通: 透析患者における Protein-energy wasting の評価と対策 *日本透析医学会雑誌*, 29, 424-429 (2014) 査読有  
11.熊谷裕通: 新たな「日本人の食事摂取基準(2015年版)」を理解し、活用する【2】慢性腎臓病(CKD)の重症化予防とエネルギー・栄養素, *日本栄養士会雑誌*, 57, 809-811 (2014). 査読無

〔学会発表〕(計17件)

1.熊谷裕通、吉田卓矢: 透析患者の栄養障害に対する新たなアプローチ透析患者におけるたんぱく質エネルギー消費状態の評価と対策 特に muscle wasting について, 第59回日本透析医学会学術集会・総会(神戸)2014年6月13-15日  
2.佐久間梢、深澤洋敬、吉田卓矢、熊谷裕通: 血液透析患者における筋肉量と血中プロテアソーム濃度の関係性, 第17回日本病態栄養学会年次学術集会(大阪)2014年1月11, 12日.  
3.吉田卓矢、柿澤幸花、服部加世子、長谷川亜季、熊谷裕通: 慢性腎臓病モデルラットにおける分岐鎖アミノ酸摂取と運動負荷による筋タンパク代謝への相乗効果, 第4回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会(福岡)2014年3月29, 30日.  
4.小田巻真理、兒山左弓、吉田卓矢、熊谷裕通、田北貴子、古橋三義、丸山行孝、加藤明彦: 血液(HD)透析患者のサルコペニアにおける Myostatin (MST) 関連物質の関与, 腎臓病と栄養・代謝・食事フォーラム2014(東京)2014年3月29日.  
5.深澤洋敬、丹羽弘喜、片橋尚子、石垣さやか、佐久間梢、熊谷裕通、古谷隆一: 血液透析患者における Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)と筋肉脂肪面積との関連性の検討, 第59回日本透析医学会学術集会・総会(神戸)2014年6月13-15日  
6.古谷隆一、深澤洋敬、石垣さやか、片橋尚子、丹羽弘喜、熊谷裕通: S100A12 (EN-RAGE)は透析患者の血管石灰化に関与する, 第59回日本透析医学会学術集会・総会(神戸)2014年6月13-15日  
7.古谷隆一、深澤洋敬、石垣さやか、片橋尚子、丹羽弘喜、熊谷裕通: 血管石灰化と Receptor for advanced glycation end-products (RAGE)の関係, 第57回日本腎臓学会学術総会(横浜)2014年7月4-6日  
8.服部加世子、吉田卓矢、熊谷裕通: 慢性腎不全における脂肪萎縮と zinc  $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG)との関連, 腎と栄養代謝の集い(京都)2014年12月20日.  
9.深澤洋敬、丹羽弘喜、片橋尚子、石垣さやか、熊谷裕通、古谷隆一: 血液透析患者における Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)と筋肉脂肪面積との関

連性の検討, 第57回日本腎臓学会学術総会(横浜)2014年7月4-6日  
10.熊谷裕通: 透析と栄養～最近の知見と動向について～, 第9回血液浄化安全対策セミナー(静岡)2015年1月18日  
11.熊谷裕通: 生活習慣病発症ならびに重症化予防を目的とした食事のあり方 慢性腎臓病(CKD)の重症化予防を目的とした食事のあり方, 第36回日本臨床栄養協会総会・第13回大連合大会(東京)2015年10月4日.  
12.服部加世子、吉田卓矢、熊谷裕通: 慢性腎臓病における脂肪萎縮と Zinc  $\alpha$ 2-glycoprotein との関連, 腎臓病と栄養・代謝・食事フォーラム2015(東京)2015年3月28日  
13.服部加世子、吉田卓矢、熊谷裕通: 慢性腎不全における脂肪萎縮と Zinc  $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG)との関連, 第58回日本腎臓学会学術総会(名古屋)2015年6月5-7日  
14.深澤洋敬、金子真以、丹羽弘喜、松山貴司、片橋尚子、熊谷裕通、古谷隆一: 血液透析患者における血漿プロテアソーム濃度と筋肉脂肪面積との関連性についての検討, 第60回日本透析医学会(横浜)2015年6月26-28日  
15.深澤洋敬、金子真以、丹羽弘喜、松山貴司、片橋尚子、熊谷裕通、古谷隆一: 血液透析患者における血漿プロテアソーム濃度と栄養状態との関連性についての検討, 第58回日本腎臓学会学術総会(名古屋)2015年6月5-7日  
16.Yoshida T, Kakizawa S, Totsuka Y, Kumagai H: The combination of walking exercise and branched chain amino acid recovered response of protein synthesis in low protein diet fed chronic kidney disease model rats, *Kidney Week 2015* (San Diego, USA) 5-8 November 2015.  
17.熊谷裕通、吉田卓矢: CKD に対する低たんぱく食事療法はどこへ行くのか?, 第19回腎と栄養代謝研究会 in 京都(京都)2016年12月17日

〔図書〕(計3件)

1.熊谷裕通: 日本人の食事摂取基準(2015年版)菱田 明、佐々木 敏 監修, 第一出版, 東京, 2014年, pp. 397-440.  
2.熊谷裕通: いまさら訊けない! 透析患者検査値のみかた, 考えかた pH/重炭酸イオン加藤明彦 編, 中外医学社, 東京, 2014年, pp. 38-42.  
3.熊谷裕通: CKD・透析患者の食事療法と運動療法—CKD・透析患者におけるサルコペニア、フレイル, 中尾俊之 編, 医薬ジャーナル社, 東京, 2016年, pp. 199-204

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

熊谷 裕通 (KUMAGAI Hiromichi)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号: 40183313