

原著

アデニン誘発性慢性腎臓病モデルラットにおける 血漿アルブミンの酸化還元状態の評価

中村博範*¹ 三宅沙知*¹

要 約

慢性腎臓病（CKD）の患者では酸化型アルブミンの比率が増加し、還元型アルブミンの比率が減少することが報告されている。しかし、その原因はまだ分かっていない。一方、CKDモデルラットでの検討はなく、CKDモデルラットをこの研究に応用できるかは不明である。そこで、本研究では、アデニン誘発性CKDモデルラットを作製し、腎機能とアルブミンの酸化還元状態との関係について調べた。Wistar系雄性ラットを3群に分け、以下の条件にて28日間飼育した。通常群（ST群）は標準飼料を自由に与え、アデニン群（AD群）はアデニンを0.25%添加した飼料を自由に与えた。また、ペアフィーディング群（PF群）はAD群の摂取量に合わせて標準飼料を与えた。最終日に24時間尿を採取したあと、一晩絶食させ、血液と臓器を採取した。AD群は、ST群、PF群と比較して、血漿クレアチニンと尿素窒素は有意に高く、クレアチニンクリアランスと血中ヘモグロビンは有意に低かった。したがって、AD群では腎機能の有意な低下が認められた。また、AD群は、PF群と比較して、酸化型アルブミンの比率の有意な増加と、還元型アルブミンの比率の有意な低下が認められた。これらの結果は、CKDモデルラットでのアルブミンの酸化還元状態の変化はCKD患者と同じであることを示した。

1. 緒言

アルブミンは、肝臓で合成される分子量約66kDaの単純たんぱく質で、血漿たんぱく質の50～60%を占めている¹⁾。また、アルブミンは血管内のみならず存在するのではなく、細胞間質にも多く存在し、全アルブミンのうち30～40%が血管内に、60～70%が細胞間質に存在する。血管内のアルブミンは細胞間質へと移行し、リンパ系を介して血管内に戻ることによって平衡が保たれている²⁾。

アルブミンは、血漿膠質浸透圧の維持や脂肪酸などの物質運搬、さらには各組織へのアミノ酸の供給源としての役割を持つ。また、細胞外の酸化還元緩衝作用において重要な役割を担っている^{1,3)}。

アルブミンのN末端から34番目のシステイン残基（チオール基）は高次構造の形成には関与せず遊離した状態で存在する（遊離SH基）。このアルブミンの遊離SH基（アルブミン-SH）は、細胞外の総SH

基の約8割を占めており^{1,2)}、シスチン（CSSC）などのジスルフィド化合物とのSH-SS交換反応によって、細胞外の遊離システイン（CSH）濃度を維持し（アルブミン-SH+CSSC→アルブミン-S-SC+CSH）⁴⁾、細胞外の酸化還元平衡の維持に寄与している。アルブミンのうち、遊離SH基を持つものを還元型アルブミンと呼び、一方、遊離SH基が修飾されたものをまとめて酸化型アルブミンと呼ぶ。後者の大部分は、遊離SH基にシステインなどがS-S結合で可逆的に結合したものであるが、ごく一部は不可逆的に酸化されるもの（-SOH, -SO₂H, -SO₃H）が含まれる^{1,5)}。健常人では、還元型アルブミンの比率は約75%で、酸化型アルブミンの比率は約25%と報告されている^{1,5)}。一方、慢性腎臓病（CKD: chronic kidney disease）の患者では還元型アルブミンの比率が低下し、酸化型アルブミンの比率が増加することが報告されている^{3,6)}。しかし、CKDで、なぜ血漿アル

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科
（連絡先）中村博範 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
E-mail: hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

ブミンの酸化還元状態が変化するのか、その根本的な原因についてはよく分かっていない。また、この原因の解明においては、CKDモデルラットでの検討が必要となると考えられるが、これまでにCKDモデルラットで血漿アルブミンの酸化還元状態は評価されておらず、この研究に応用できるかは不明である。

そこで、本研究では、アデニン誘発性CKDモデルラットを作製し、腎機能と血漿アルブミンの酸化還元状態との関係について調べた。

2. 方法

2.1 実験動物

実験動物として、日本クレア株式会社から6週齢のWistar系雄性ラットを18匹購入し実験に使用した。

なお、本実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認(20-003)を得て行った。

2.2 飼料の作製

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社のMF粉末飼料を用いて作製した。標準飼料は、MF粉末飼料と純水を6対4で合わせ、ペレット状に成型して70°Cで恒量となるまで(約10時間)乾燥させ作製した。一方のアデニン添加飼料は、MF粉末飼料にアデニン(富士フィルム和光純薬株式会社)を0.25%添加して標準飼料と同様に成型し乾燥させ作製した。

2.3 実験飼育

実験は、代謝ケージでの尿の採取や終了時の採血とその処理のことを考慮して、1回にラットを6匹購入し、開始時期を1週ずつずらして3回に分けて行った。購入した6週齢のラットを1匹ずつ個別ケージに移し、標準飼料で1週間予備飼育したあと、体重が均等になるように標準群(ST群)、アデニン群(AD群)、ペアフィーディング群(PF群)の3群(各群2匹)に分けた。ST群は、標準飼料を自由摂食させ、AD群は0.25%アデニン添加飼料を自由摂食させた。また、PF群は、AD群の前日の摂取量(2匹の平均)と同量の標準飼料を与えた。水は自由に摂取させた。

実験飼育期間は、28日間とし、その間の摂食量及び飲水量は、毎日、定時(18時)に測定し記録した。また、体重は、実験飼育開始時を含め、1週毎に測定した。

飼育環境は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル12時間(明期8:00-20:00)であった。

2.4 24時間尿の採取

28日目にラットを代謝ケージに移し、24時間尿を採取した。尿は、トルエンを1mL加えた容器に回収し、尿量を測定したあと、測定まで冷凍保存した。

2.5 血液及び臓器の採取

24時間尿を採取したあと一晩絶食(15時間)させ、血液と臓器を採取した。採血はイソフルラン麻酔下にて開腹し、注射器を用いて下大静脈から行った。血液の一部は、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、血糖値の測定に用い、残りの血液はEDTA-2Na入りのベノジェクトII真空採血管(テルモ株式会社)に加え、氷中で冷却したのち遠心分離(3000回転、10分)して血漿を分離した。血漿の一部は測定に使用し、残りはマイクロテストチューブに移し -30°C 以下で冷凍保存した。臓器は、肝臓、腎臓、心臓、副腎を採取し、湿重量を測定した。

2.6 血中成分の測定

ヘマトクリット値は、ヘマトクリット管(EDTA・2K、東京硝子器械株式会社)に血液を採取し、ヘマトクリット遠心機(KUBOTAヘマトクリット遠心機3220)で遠心分離(12000回転、5分)して、血球成分の割合を測定した。ヘモグロビン濃度は、ヘモグロビンB-テストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社)を使用して測定した。

血糖値は、採血直後にニプロフリースタイルフリーダムライト(ニプロ株式会社)を用いて測定した。

アルブミン濃度は、BCG法(色素結合法)⁷⁾を用いて測定し、総たんぱく質濃度は、Lowry法⁸⁾で測定した。

クレアチニン濃度は、血漿をリンタンングステン酸溶液で除たんぱく処理し、上清をJaffe法⁹⁾で測定した。尿素窒素濃度は、血漿をトリクロロ酢酸溶液で除たんぱく処理し、上清をジアセチルモノオキシム-チオセミカルバジド法(DAMO-TSC法)¹⁰⁾により測定した。

遊離脂肪酸濃度は、ラボアッセイTMNEFA(富士フィルム和光純薬株式会社)を使用して測定し、トリグリセリド濃度は、ラボアッセイTMトリグリセライド(富士フィルム和光純薬株式会社)を使用して測定した。

脂質過酸化物は、山崎らの方法¹¹⁾を用いてチオバルビツール酸法(TBA法)で測定した。標準液には1,1,3,3-tetraethoxypropaneを使用し、マロンジアルデヒド(MDA)に換算しTBA反応物質(TBARS)量を求めた。

総チオール濃度は、チオール基の比色定量試薬であるDTNB(株式会社同仁化学研究所)を使用したEllman法¹²⁾で測定した。

2.7 尿中成分の測定

クレアチニンは、尿を希釈してJaffe法で測定した。また、尿素窒素は、尿を希釈してDAMO-TSC法で測定した。

アルブミンは、高感度の測定キット（レビスアルブミンELISAキット、富士フイルム和光純薬株式会社）を使用して測定した。

硫酸は、硫酸と塩化バリウムとの反応で生じる硫酸バリウムを測定する比濁法¹³⁾にて測定した。

尿中排泄量は、それぞれの尿中濃度に尿量（mL/日）を掛けて算出した。

2.8 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によるアルブミンの酸化還元状態の評価

還元型アルブミンと酸化型アルブミンの比率の評価は、還元型アルブミンのSH基を20kDaのポリエチレングリコールマレイミド（PEG-Mal, フナコシ株式会社）で修飾（PEG化）し分子量を高め、SDS-PAGEで酸化型アルブミンと分離する方法を用いて行った。

採血直後に遠心分離して得た血漿10 μ Lと1mM PEG-Mal溶液（PBS, pH7.4）40 μ Lをマイクロテストチューブに加えて混和し、15分室温で放置してPEGylation（PEG化）を行った。その後、純水40 μ Lとエタノール10 μ Lを加え、冷蔵庫（4 $^{\circ}$ C）に1時間放置した。その試料を遠心分離（10000回転、5分）して不溶性たんぱく質を除き、マイクロテストチューブに上清5 μ Lとサンプルバッファー（SDS, メルカプトエタノールを含む）120 μ Lを合わせ、湯浴中で5分間加温した。電気泳動用のサンプルは、測定まで冷凍保存した。

SDS-PAGEは、分離ゲルに7.5% ミニプロテイン TGXTM プレキャストゲル（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）を使用した。ウェルに、各サンプルと分子量マーカー（プレジジョンPlusブルースタンダード, バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）を10 μ Lずつ入れて150Vで電気泳動を行った。ゲルは、純水で洗浄したのちCBB溶液（Bio-Safe CBB G-250ステイン, バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）で染色し、純水で脱色し

たあと、デジタルカメラで撮影した。

バンドの画像解析は、Istvan Lazar JrとIstvan Lazarによって開発されたGelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com.) を使用して行い、還元型アルブミンと酸化型アルブミンのバンドピークの面積からそれぞれの比率を評価した。

2.9 統計分析

統計分析は、統計解析ソフトRのRコマンド（Rcmdrパッケージ）を用いて行った。数値は、平均値 \pm 標準誤差で示し、3群間の比較は、一元配置分散分析（ANOVA）により有意差を確認したのち、Tukey法で多重比較を行った。相関関係は、ピアソンの積率相関関係を用いて分析した。いずれの統計処理も、有意水準は5%未満（ $p < 0.05$ ）とした。

3. 結果

3.1 体重, 摂食量, 飲水量

表1に実験飼育における開始時体重及び終了時体重, 総摂食量, 総飲水量を示した。開始時体重と比較して、いずれの群も終了時体重は有意に高値であった。また、終了時体重は、ST群と比較して、AD群, PF群は有意に低値であった。

飼育期間中の総摂食量は、ST群と比較して、AD群, PF群は有意に低値であった。また、総飲水量は、ST群, PF群と比較してAD群は有意に高値であった。

3.2 臓器重量

表2に臓器重量（g/kg体重）を示した。肝臓は、ST群と比較して、AD群, PF群では有意に低値であった。腎臓と心臓は、ST群, PF群と比較してAD群では有意に高値であった。副腎は、ST群と比較してAD群は有意に高値であった。

図1にPF群とAD群の腎臓の写真を示した。AD群では、色は白っぽくなり、そして肥大していた。

3.3 血中成分

表3に血中成分の測定結果を示した。ヘマトクリット値とヘモグロビン濃度は、ST群, PF群と比較して

表1 体重及び総摂食量, 総飲水量

		ST	AD	PF
開始時体重	(g)	216 \pm 5	215 \pm 5	219 \pm 5
終了時体重	(g)	371 \pm 3 ^a #	325 \pm 14 ^b #	316 \pm 7 ^b #
総摂食量	(g/28日)	735 \pm 17 ^a	606 \pm 32 ^b	606 \pm 23 ^b
総飲水量	(mL/28日)	845 \pm 12 ^a	1855 \pm 60 ^b	805 \pm 35 ^a

値は、各群6匹の平均値 \pm 標準誤差を示す。

a, b 異なる文字を有する群間に有意差あり ($p < 0.05$)

開始時体重と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

表2 臓器重量

		ST	AD	PF
肝臓	(g/kg体重)	34.5 ± 0.39 ^a	30.1 ± 0.50 ^b	30.1 ± 0.60 ^b
腎臓	(g/kg体重)	7.09 ± 0.25 ^a	17.1 ± 0.49 ^b	6.92 ± 0.10 ^a
心臓	(g/kg体重)	2.86 ± 0.06 ^a	3.52 ± 0.12 ^b	2.89 ± 0.03 ^a
副腎	(g/kg体重)	0.20 ± 0.01 ^{ab}	0.27 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.01 ^b

値は、各群6匹の平均値±標準誤差を示す。

a, b 異なる文字を有する群間に有意差あり (p<0.05)

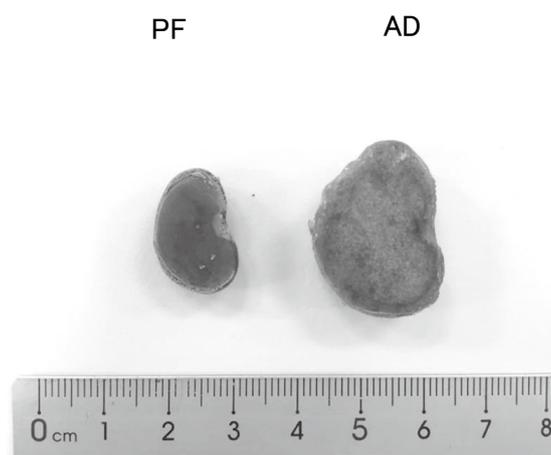


図1 腎臓の大きさの比較

表3 血中成分

		ST	AD	PF
ヘマトクリット	(%)	43 ± 0.5 ^a	38.2 ± 0.6 ^b	44.6 ± 0.6 ^a
ヘモグロビン	(g/dL)	16.2 ± 0.1 ^a	14.5 ± 0.2 ^b	17.1 ± 0.4 ^a
血糖値	(mg/dL)	111 ± 6	107 ± 5	105 ± 5
アルブミン	(g/dL)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.0	3.7 ± 0.1
総たんぱく質	(g/dL)	6.1 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.2
クレアチニン	(mg/dL)	0.78 ± 0.02 ^a	1.24 ± 0.12 ^b	0.63 ± 0.02 ^a
尿素窒素	(mg/dL)	14.9 ± 1.2 ^a	71.0 ± 12.0 ^b	15.6 ± 0.7 ^a
遊離脂肪酸	(mEq/L)	40.5 ± 1.4	43.7 ± 3.4	48.1 ± 2.7
トリグリセリド	(mg/dL)	190 ± 20 ^a	104 ± 16 ^b	116 ± 12 ^b
脂質過酸化物	(μmol/L)	8.25 ± 0.51	8.39 ± 0.36	8.25 ± 0.53
総チオール量	(mmol/L)	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.05

値は、各群6匹の平均値±標準誤差を示す。

a, b 異なる文字を有する群間に有意差あり (p<0.05)

AD群は有意に低値であった。一方、クレアチニンと尿素窒素濃度は、ST群、PF群と比較してAD群は有意に高値であった。トリグリセリドは、ST群と比較してAD群、PF群は有意に低値であった。

血糖値、アルブミン、総たんぱく質、遊離脂肪酸、脂質過酸化物質、総チオール (SH) 量については、いずれも3群間に有意な差はなかった。

3.4 尿中成分

表4に尿量及び尿中排泄量の測定結果を示した。尿量は、ST群、PF群と比較してAD群は有意に高値であった。クレアチニンと尿素窒素排泄量は、3群間に有意な差はなかったが、ST群と比較してAD群、PF群では低い傾向にあった。アルブミン排泄量は、ST群、PF群と比較してAD群は有意に高値であった。硫酸排泄量は、3群間に有意な差はなかったが、PF群と比較して、ST群とAD群は高い傾向にあった。

表5にクレアチニークリアランス (CCr) を示した。CCr (mL/分) は、尿中クレアチニン濃度 (mg/dL) に尿量 (mL/分) を掛け、血中クレアチニン濃度 (mg/dL) で割って算出した。また、CCr (mL/分/kg) は体重で補正し算出した。CCrは、ST群、PF群と比較してAD群は有意に低値であった。

3.5 アルブミンの酸化還元状態の評価

まず、標準試薬のウシ血清アルブミン (BSA: グロブリン不含-HG, 富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて検討した結果を図2に示した。

BSAの場合、未処理のもの (図2-②) は、バンドが1つ確認され、約65kDaであった。PEG化処理した場合 (図2-③) は、バンドが2つ確認され、それぞれ約110kDaと約65kDaであった。また、バンドのピーク面積から、還元型アルブミンと酸化型アルブミンの比率を求め、本実験で使用したウシ血清アルブミンの場合は、還元型アルブミンは48%、酸化型アルブミンは52%であった。一方、BSA溶液のチオール濃度 (Ellman法, 412nmでのTNBの分子吸光係数を14150として算出) とBSA濃度 (紫外吸収法, ウシ血清アルブミンの分子量を66000とし、280nmにおける分子吸光係数を43890として算出) から求めた還元型アルブミンの比率は、47%であった。

図3に、ラットの血漿での結果を示す。PEG化処理しない場合 (図3-①) は、65kDaに濃いバンドが確認された。また、PEG化処理した場合 (図3-②)、65kDaのバンドは薄くなり、110kDaに濃いバンドが確認された。ラットの血漿のグロブリン画分 (硫酸沈殿) を同様に処理した場合 (図3-③)、複数のバンドが確認されたが、いずれも薄いバンドであった。

図4に、各群の電気泳動の例を示した。また、表6に血漿アルブミンの酸化還元状態の結果を示した。還元型アルブミンの比率は、PF群と比較して、AD群では有意に低値であった。一方、酸化型アルブミンは、PF群と比較してAD群では有意に高値であ

表4 尿量及び尿中排泄量

		ST	AD	PF
尿量	(mL/日)	13.9 ± 1.0 ^a	55.8 ± 3.9 ^b	11.5 ± 1.0 ^a
クレアチニン	(mg/日)	23.3 ± 1.3	17.8 ± 2.1	18.7 ± 0.9
尿素窒素	(mg/日)	397 ± 29	334 ± 26	344 ± 10
アルブミン	(mg/日)	0.9 ± 0.3 ^a	3.8 ± 1.2 ^b	0.4 ± 0.1 ^a
硫酸	(μmol/日)	454 ± 37	470 ± 35	422 ± 21

値は、各群6匹の平均値±標準誤差を示す。
a, b 異なる文字を有する群間に有意差あり (p<0.05)

表5 クレアチニークリアランス (CCr)

		ST	AD	PF
CCr	(mL/分)	2.08 ± 0.15 ^a	1.08 ± 0.19 ^b	2.07 ± 0.08 ^a
CCr	(mL/分/kg体重)	5.93 ± 0.46 ^a	3.45 ± 0.54 ^b	6.85 ± 0.26 ^a

値は、各群6匹の平均値±標準誤差を示す。
a, b 異なる文字を有する群間に有意差あり (p<0.05)

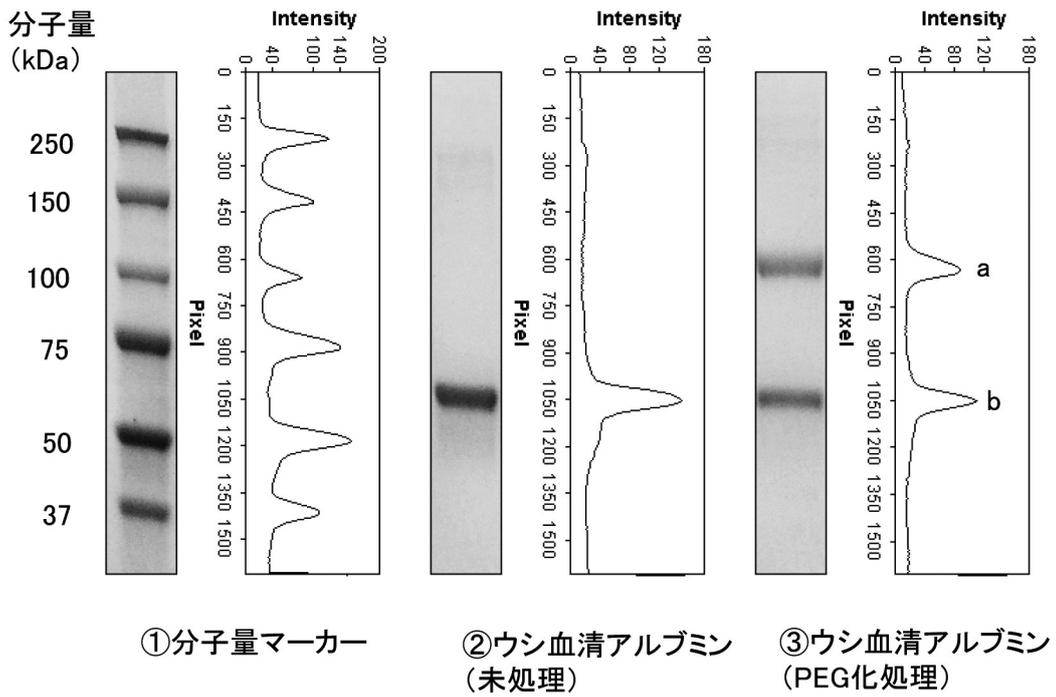


図2 電気泳動 (SDS-PAGE) による還元型アルブミンと酸化型アルブミンの分離 (ウシ血清アルブミン)

a: 還元型アルブミン (PEG化アルブミン)
b: 酸化型アルブミン

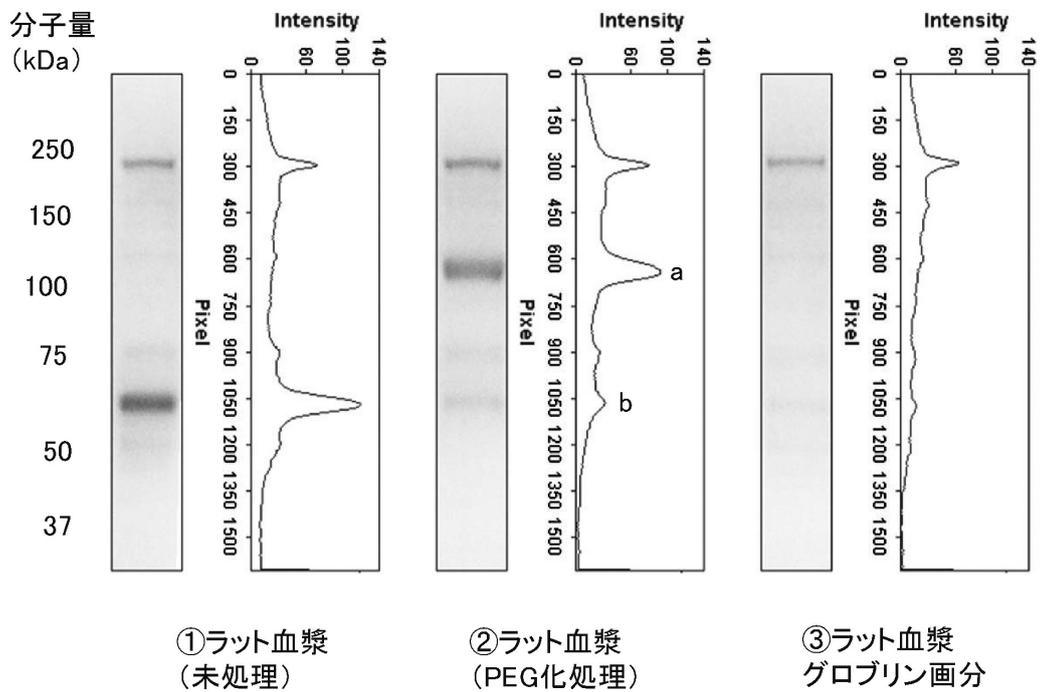


図3 電気泳動 (SDS-PAGE) による還元型アルブミンと酸化型アルブミンの分離 (ラット血漿)

a: 還元型アルブミン (PEG化アルブミン)
b: 酸化型アルブミン

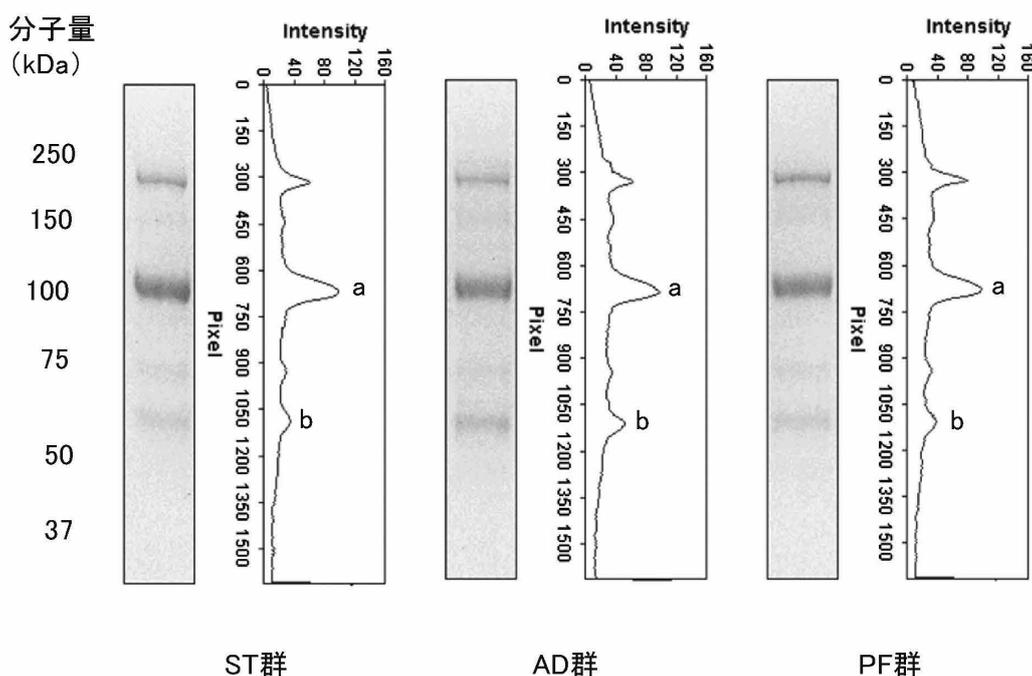


図4 電気泳動 (SDS-PAGE) によるラット血漿アルブミンの酸化還元状態の評価

a:還元型アルブミン (PEG化アルブミン)
b:酸化型アルブミン

表6 血漿アルブミンの酸化還元状態

	ST	AD	PF
還元型アルブミン (%)	69.0 ± 1.5 a b	65.9 ± 1.3 b	71.7 ± 0.5 a
酸化型アルブミン (%)	31.0 ± 1.5 a b	34.1 ± 1.3 b	28.3 ± 0.5 a
還元型アルブミン (mmol/L) *	0.38 ± 0.01 a b	0.35 ± 0.01 b	0.40 ± 0.01 a
酸化型アルブミン (mmol/L) *	0.17 ± 0.01 a b	0.18 ± 0.01 b	0.16 ± 0.00 a

値は、各群6匹の平均値±標準誤差を示す。

a, b 異なる文字を有する群間に有意差あり (p<0.05)

* アルブミンの分子量を66000とし、還元型及び酸化型アルブミンの比率 (%) をかけて算出した。

た。AD群とPF群はST群との有意な差はなかった。

表7に、腎機能パラメータと還元型及び酸化型アルブミンとの相関性を示した。すべての項目にて、有意な相関が認められた。

4. 考察

4.1 CKDモデルラットの栄養状態と腎機能

アデニン誘発性CKDモデルラットは、腎不全モデルラットとして1986年に横澤らによって報告された¹⁴⁾。このモデルラットは外科手術を必要とせずで作製できることから腎臓病の研究に広く用いられている。

通常、このモデルラットは0.75%アデニン添加飼料を用いて作製されるが、この条件では、原因はよく分かっていないが摂食量の急激な減少とそれに伴う体重減少が生じることが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。また、血漿アルブミン濃度も有意に低下することが報告されている¹⁸⁾。そこで、本研究では、アデニン添加量を減らした0.25%アデニン添加飼料を用いて、アデニン誘発性CKDモデルラットを作製することとした。AD群は、ST群と比較して、総摂食量はおおよそ82%、終了時体重はおおよそ88%と有意に低かった。しかし、開始時体重と比較して、終了時体重はおよ

表7 腎機能パラメーターと還元型及び酸化型アルブミンの相関性

	還元型アルブミン (%)	酸化型アルブミン (%)
クレアチニン (mg/dL)	-0.664 *	0.664 *
尿素窒素 (mg/dL)	-0.647 *	0.647 *
ヘモグロビン (g/dL)	0.611 *	-0.611 *
CCr (mL/分)	0.661 *	-0.661 *
CCr (mL/分/kg)	0.723 *	-0.723 *

数値は、全群18匹での相関係数 (r) を示す

* 有意な相関あり (p<0.05)

そ150%となり、有意な体重増加が認められた。また、終了時体重はPF群と有意な差はなかった。したがって、0.25%アデニン添加飼料では、標準飼料と比較して摂食量は減少するものの、0.75%アデニン添加飼料を用いた実験で報告されているような摂食量の急減な減少や体重減少はないと考えられた。また、AD群では、血漿アルブミン濃度も維持されていたことから、栄養状態は維持できていたと考えられる。

次に、アデニンの腎臓への影響について、AD群の腎臓重量は、ST群、PF群の2倍以上となり、また、腎臓の白色化が観察された。アデニン誘発性CKDモデルラットにおいては、ヒトCKDと同じように腎臓の間質性炎症性浸潤と結晶性尿細管間質沈着物を伴って肥大することが報告されている¹⁹⁾。したがって、AD群で観察された肥大は妥当な結果と考えられる。また、AD群では、ヘマトクリット値とヘモグロビン濃度がST群とPF群と比較して有意に低値となり、一方で、血漿クレアチニンと尿素窒素は他群と比較して有意に高値となった。さらに、AD群では、尿量が他群と比較して有意に高値であり、また尿中アルブミン排泄量についても他群と比較して有意に高値であった。したがって、AD群では、赤血球合成の低下による貧血、糸球体の濾過機能の低下による血漿クレアチニン、尿素窒素の上昇、尿濃縮力障害による多尿、尿中アルブミン排泄の増加など明らかな腎機能の低下が認められた。AD群のCCrは他群の約50%だったことから、腎機能はおよそ半分低下していたと考えられた。

4.2 電気泳動 (SDS-PAGE) によるアルブミンの酸化還元状態の評価

本研究では、血漿中の還元型アルブミンと酸化型アルブミンを電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、その比率を評価した。一般に還元型アルブミンと酸化型アルブミンの評価は、高速液体クロマトグラフィーで行われる。しかし、分析装置が非常に高価であるため、容易に測定することはできない。また、

還元型アルブミンが酸化されやすく、検体の保存が難しいという課題がある。そこで、これらの問題に対応するため、電気泳動装置を使用した方法を検討した。

還元型アルブミンの遊離SH基をポリエチレングリコールマレイミド (PEG-Mal) でPEG化処理し、遊離SH基の酸化を防ぐとともに、分子量を高めることで、SDS-PAGEでの酸化型アルブミンとの分離が可能になると考えた。遊離SH基とマレイミド基との反応は、pH範囲6.5~7.5で特異的に行われ、非可逆性の安定なチオエーテル結合が形成される。また、この結合は、サンプルバッファー中の2-メルカプトエタノールにも安定である。

標準試薬のBSAを用いた検討において、PEG化処理によって110kDaと65kDaの2つバンドが確認され、110kDaのバンドが還元型アルブミンと判断した。本実験で使用したPEG-Malは20kDaであったことから、85kDa付近でバンドが検出されると考えたが、PEG化アルブミンの移動度は低いと考えられた。

分離されたそれぞれのバンドのピーク面積から求めたBSAの還元型アルブミンと酸化型アルブミンの比率は、48%と52%であった。また、同じBSA溶液を用いて、遊離SH基濃度 (Ellman法) とアルブミン濃度 (紫外吸光度法) を測定し、還元型アルブミンの比率を算出すると47%となり、電気泳動の結果とはほぼ一致した。したがって、電気泳動による還元型アルブミンと酸化型アルブミンの分離は、アルブミンの酸化還元状態の評価に応用できると判断した。なお、標準試薬のBSAの酸化還元状態は、ウシ血清の保存方法やアルブミンの精製方法によって異なると考えられるが、多くの場合は酸化されていると考えられる。

次に、ラット血漿を用いて検討を行った。ラット血漿をPEG化処理してSDS-PAGEを行い、BSAと同様に110kDaでバンドを確認した。アルブミンのアミノ酸組成は動物により少しずつ異なるが、ヒト、

ウシ、ラットはいずれもシステインを35個含むことは共通している。また、35個のシステイン残基のうち34個がS-S結合による高次構造の形成に使われ、残り1つが遊離SH基として存在する。一方、マウスは若干異なり、システインを36個含む。マウス血漿をPEG化処理してSDS-PAGEを行うと65kDaのアルブミンのバンドが消失し、110kDaと145kDaでバンドが検出された。そのため、マウスのアルブミンは遊離SH基が2つ存在すると考えられる。したがって、本実験では、ヒトのアルブミンに近いラットを実験動物として使用した。

血漿には、アルブミン以外のたんぱく質も含まれる。そこで、硫酸沈殿でグロブリン画分を調製し、アルブミン以外のたんぱく質が存在するかを確認した。その結果、120kDaと65kDaに、わずかにバンドが検出された。120kDaのたんぱく質は不明であるが、65kDaのバンドは、免疫グロブリンのH鎖と推察される。したがって、本法での還元型アルブミンと酸化型アルブミンのバンドには、それぞれアルブミン以外のたんぱく質が含まれると考えられた。しかし、血漿中の約60%をアルブミンが占め、またアルブミン以外のたんぱく質濃度に差がないことから、評価においては影響しないと判断した。

なお、測定においては、血漿を冷凍保存すると酸化型アルブミンの比率が増加するため、採血直後に血漿をPEG化処理した。また、フィブリノーゲンのA α 鎖が60.5kDa（ヒトA α 鎖は67kDa）とアルブミンに近いので、血漿をPEG化処理したのち、フィブリノーゲンをエタノール沈殿で除くこととした。

4.3 アデニン誘発性CKDモデルラットの血漿アルブミンの酸化還元状態

ラット血漿のアルブミンの酸化還元状態は、AD群は、PF群と比較して、還元型アルブミンの比率が有意に低く、酸化型アルブミンの比率が有意に高かった。その差は、平均で5.8%であった。また、腎機能パラメーターと還元型及び酸化型アルブミンの間には有意な相関が認められ、血漿アルブミンの酸化還元状態が腎機能に影響されることが分かった。これまでヒトにおいては、CKDと血漿アルブミンの酸化還元状態との関係について報告がある^{3,6)}が、ラットでの報告はなく、ラットにおいてもヒトと同様に腎機能の影響を受けることが明らかとなった。

CKDにおいて、酸化型アルブミンがなぜ増加するのかについては、様々な要因が考えられる。

酸化型アルブミンの比率の増加は、たんぱく質摂取や摂食制限によって生じることがラットを用いた実験で示されている²⁰⁾。栄養状態が低下した場合には、アルブミン合成が低下し、一方で、アルブミン

の分解も低下するため、血中にアルブミンが長期間留まり、酸化されると考えられる。しかし、本実験においては、PF群はAD群と摂食量を同じにしていたため、CKDでは摂食以外の原因が考えられる。

還元型アルブミンの酸化型アルブミンへの酸化は、ジスルフィド化合物との間でのSH/SS交換反応によって生じる。したがって、血漿中にシスチンなどのジスルフィド化合物が増加した場合に、酸化型アルブミンが増加することになる。

AD群では、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度が有意に低下していたことから、赤血球合成が低下していたと考えられる。これは、アデニン誘発性CKDモデルラットにおいても、エリスロポエチンが低下することが示されており^{15,21)}、腎機能の低下によって造血機能が低下すると考えられる。一方で、CKDにおいては、赤血球の寿命が短縮することから^{22,23)}、赤血球の分解も亢進していたと考えられる。赤血球には、抗酸化物質のグルタチオンが血漿と比較して高濃度に存在している²⁴⁾。グルタチオンは、赤血球内でグルタミン酸、システイン、グリシンから合成されるトリペプチドである。したがって、腎機能の低下にともなう赤血球の合成低下によって、グルタチオン合成へのシステインの利用が低下していたと考えられる。また、赤血球の分解の亢進によって、グルタチオンからの内因性のシステインの供給が起きたと考えられる。これらのシステインが血中に滞ることによって、シスチンへと自動酸化され、それが還元型アルブミンの酸化を引き起こしている可能性がある。尿中の硫酸は、含硫アミノ酸であるメチオニンとシステインの最終代謝産物である²⁵⁾。AD群とPF群を比較した場合、有意な差はないがAD群が高い傾向にあることから、未利用のシステインの分解が起きていたと考えられ、CKDにおいてはシステイン代謝に異常がある可能性がある。今後、血漿アルブミンの酸化還元状態と腎性貧血との関係について、アデニン誘発性CKDラットを用いてさらに明らかとしていきたい。

5. 結論

0.25%アデニン添加飼料でアデニン誘発性CKDモデルラットを作製し、腎機能と血漿アルブミンの酸化還元状態の関係を評価した。CKDモデルラットでは、腎機能の有意な低下が認められ、また、還元型アルブミンの比率が有意に低く、酸化型アルブミンの比率が有意に高かった。したがって、CKDモデルラットにおいてもCKD患者と同様に血漿アルブミンの酸化還元状態が腎機能の影響を受けることが分かった。

利益相反

利益相反に相当する事項はありません。

謝 辞

本研究を行うにあたって、ご協力いただきました川崎医療福祉大学臨床栄養学科の西優紀氏、曳野優美氏、高山育華氏、笠原萌々華氏、雨嶋夢氏、篠原雄太郎氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 山田尚之, 窪田和幸, 河上麻美, 鈴木榮一郎: アルブミンの化学構造と機能および翻訳後修飾による変化. 栄養評価と治療, 24(2), 110-115, 2007.
- 2) 渡邊博志, 今福匡司, 丸山徹: 酸化ストレス関連疾患における酸化型・還元型アルブミンモニタリングと臨床的有用性. 日本プロテオーム学会誌, 4(1), 9-17, 2019.
- 3) 寺脇博之, 松山幸枝, 恵良聖一, 細谷龍男: アルブミン酸化還元比を指標として評価した腎不全の病態. 日本透析医学会雑誌, 43(3), 264-267, 2010.
- 4) Turell L, Radi R and Alvarez B: The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 244-253, 2013.
- 5) 安村敏: アルブミンの最新情報. 日本集中治療医学会雑誌, 24(6), 613-617, 2017.
- 6) 鈴木祥史, 青木優子, 松山幸枝, 長谷川弘, 篠原佳彦, 橋本隆男, 恵良聖一, 副島昭典: 腎機能障害による血漿アルブミンの還元化率の低下とその機序—保存期腎不全例と維持血液透析例の比較. 日本腎臓病学会誌, 50(4), 513-520, 2008.
- 7) Doumas BT, Watson WA and Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*, 31(1), 87-96, 1971.
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951.
- 9) Bonsnes RW and Taussky HH: On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 158, 581-591, 1945.
- 10) Rahmatullah M and Boyde TR: Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinization. *Clinica Chimica Acta*, 107, 3-9, 1980.
- 11) 山崎晴一朗: 過酸化脂質. 臨床化学, 1(1), 52-63, 1971.
- 12) Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77, 1959.
- 13) Lundquist P, Mårtensson J, Sörbo B and Ohman S: Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clinical Chemistry*, 26(8), 1178-1181, 1980.
- 14) Yokozawa T, Zheng PD, Oura H and Koizumi F: Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron*, 44, 230-234, 1986.
- 15) Vázquez-Méndez E, Gutiérrez-Mercado Y, Mendieta-Condado E, Gálvez-Gastélum FJ, Esquivel-Solís H, Sánchez-Toscano Y, Morales-Martínez C, Canales-Aguirre AA and Márquez-Aguirre AL: Recombinant erythropoietin provides protection against renal fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease. *Mediators of Inflammation*, 2020, ID8937657, 2020, <https://doi.org/10.1155/2020/8937657>.
- 16) 横澤隆子, 大浦彦吉, 中川眸, 福田裕子: アデニン投与がラットの体内代謝系に与える影響について. 日本農芸化学会誌, 55(9), 811-816, 1981.
- 17) Ali BH, Al-Salam S, Al Za'abi M, Waly MI, Ramkumar A, Beegam S, Al-Lawati I, Adham SA and Nemmar A: New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: comparison with rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68, 384-393, 2013.
- 18) Yokozawa T, Yasui T, Ishii S and Oura H: Decrease in the level of albumin mRNA with progression of renal failure in rats. 日本腎臓病学会誌, 36(4), 317-321, 1994.
- 19) Diwan V, Brown L and Gobe GC: Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)*, 23(1), 5-11, 2018.
- 20) Kuwahata M, Hasegawa M, Kobayashi Y, Wada Y and Kido Y: An oxidized/reduced state of plasma albumin reflects malnutrition due to an insufficient diet in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 60(1), 70-75, 2017.

- 21) Rahman A, Yamazaki D, Sufiun A, Kitada K, Hitomi H, Nakano D and Nishiyama A : A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents. *PLoS One*, 13(2), e0192531, 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192531>.
- 22) Ly J, Marticorena R and Donnelly S : Red blood cell survival in chronic renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*, 44(4), 715-719, 2004.
- 23) Li JH, Luo JF, Jiang Y, Ma YJ, Ji YQ, Zhu GL, Zhou C, Chu HW and Zhang HD : Red blood cell lifespan shortening in patients with early-stage chronic kidney disease. *Kidney and Blood Pressure Research*, 44(5), 1158-1165, 2019.
- 24) 谷口直之, 近藤宇史, 石川智久 : グルタチオンのトランスポート. 膜, 12(4), 180-190, 1987.
- 25) Nakamura H, Kajikawa R and Ubuka T : A study on the estimation of sulfur-containing amino acid metabolism by the determination of urinary sulfate and taurine. *Amino Acids*, 23, 427-431, 2002.

(2021年5月31日受理)

Redox State of Plasma Albumin in Rats with Adenine-induced Chronic Kidney Disease

Hironori NAKAMURA and Sachi MIYAKE

(Accepted May 31, 2021)

Key words : albumin, redox state, chronic kidney disease (CKD), rat

Abstract

Patients diagnosed with chronic kidney disease (CKD) have increased ratios of oxidized albumin and decreased ratios of reduced albumin, however, the cause for which remains unclear. In addition, it is also unclear whether the CKD rat model can be applied to this study. Therefore, we investigated the relationship between renal function and the redox state of albumin in rats with adenine-induced CKD. Male Wistar rats were divided into three groups and maintained for 28 days. The standard (ST) group was fed a standard diet, the adenine (AD) group was fed a diet supplemented with 0.25% adenine, and the pair-feeding (PF) group was fed a standard diet to match the intake of the AD group. Plasma creatinine and urea nitrogen levels were significantly higher, and creatinine clearance and blood hemoglobin were significantly lower in the AD group than in the ST and PF groups. There was a significant decrease in renal function in the AD group. Additionally, the ratio of oxidized albumin increased significantly, whereas the ratio of reduced albumin decreased significantly in the AD group compared to those in the PF group. These results showed that the changes in the redox state of albumin in the rat model of CKD were similar to those in patients with CKD.

Correspondence to : Hironori NAKAMURA

Department of Clinical Nutrition
Faculty of Health Science and Technology
Kawasaki University of Medical Welfare
288 Matsushima, Kurashiki, 701-0193, Japan
E-mail : hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.31, No.1, 2021 139–149)