β クリプトキサンチン含有みかんジュース摂取による Lipopolysaccharide 誘発急性腎炎の予防効果疋田真彬,^a 本島健人,^a 鎌田純人,^a 吉田哲朗,^a 中舘(田中)佐和子,^b 中舘和彦^{*,a,c}Protective Efficacy of the Ingestion of Mandarin Orange Containing β -Cryptoxanthin on Lipopolysaccharide-induced Acute NephritisMasaaki Hikita,^a Kento Motojima,^a Sumito Kamata,^a Testuro Yoshida,^a
Sawako Tanaka-Nakadate,^b and Kazuhiko Nakadate^{*,a,c}^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Meiji Pharmaceutical University; 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan:^bDepartment of Pharmacology and Toxicology, Dokkyo Medical University School of Medicine; 880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan: and ^cDepartment of Basic Science, Educational and Research Center for Pharmacy, Meiji Pharmaceutical University; 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

(Received November 2, 2015; Accepted January 27, 2016)

β -cryptoxanthin is a common carotenoid pigment found in fruit, especially in Satsuma mandarins and in persimmons. After ingestion, β -cryptoxanthin is distributed to and accumulates in organs, such as the liver, lung, and kidney. Recent studies have reported that because of its antioxidant defense, β -cryptoxanthin performs several important functions in the preservation of human health and in the prevention of several diseases, including cancer and osteoporosis. The present study aims to determine whether β -cryptoxanthin has a protective effect on renal glomeruli during acute nephritis. To develop our acute nephritis mouse model, we induced kidney inflammation in mice using lipopolysaccharide. To analyze pathological changes in the renal glomeruli of these mice, tissue sections of the kidney were analyzed by hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff staining. In mice with acute nephritis, we observed a thickening of the basal membrane in the renal glomeruli. By ultrastructural analysis, abnormalities in the foot cells were also identified. In the β -cryptoxanthin-ingested mice, these pathological changes were decreased. Migration of urinary proteins occurred in mice with acute nephritis, but this was decreased in β -cryptoxanthin-ingested mice, such that it correlated with the blood concentration of β -cryptoxanthin. Furthermore, in β -cryptoxanthin-ingested mice, both the accumulation and activation of inflammatory cells were decreased in the renal glomeruli. These results suggest that β -cryptoxanthin ingestion may produce great improvement in acute nephritis. These findings provide new insights into β -cryptoxanthin and its protective effect, and provide a new target for pharmacological therapy in human disease.

Key words—acute nephritis; renal glomerulus; pathological change; transmission electron microscopy; lipopolysaccharide; β -cryptoxanthine

緒 言

現在日本における慢性腎臓病の患者数は約 1330 万人に上り、実に成人の 8 人に 1 人がなんらかの慢性腎臓病を抱えていることになる。¹⁾ その中で治療を必要とする患者は 600 万人に上ると推定されている。¹⁾ しかし、慢性腎臓病は発症数が多いことに対し、慢性腎臓病の初期から患っていると認知している人は非常に少ない。それは慢性腎臓病が徐々に進行した場合、腎機能が 20% 程度に低下するまで身体の異変を感じる事が少ないからである。そのた

め、定期健康診断などの検査以外で発見されることは非常に稀で、自覚症状がないまま進行することが多い疾患の 1 つである。

慢性腎臓病の原因となる病態には、急性腎炎、慢性腎炎、腎盂腎炎、ネフローゼ症候群、腎障害、尿毒症などがある。²⁾ 腎臓の炎症は、原尿を作る糸球体に細菌の感染が引き金となり炎症が引き起こる腎炎、尿道からの細菌感染が引き金となる腎盂腎炎に大別される。この腎炎などが原因となり、タンパク尿が排出され、その結果、血中タンパク質の減少が引き起こされるネフローゼ症候群を誘発する場合がある。²⁾ さらに腎炎が悪化したときには、腎機能が低下し腎障害となる。腎障害は、急性腎障害と慢性腎障害の 2 種類に大別される。³⁾ 急性腎障害は腎機

^a明治薬科大学薬学部, ^b獨協医科大学薬理学講座, ^c明治薬科大学薬学教育研究センター基礎科学部門

*e-mail: nakadate@my-pharm.ac.jp

能の急激な悪化を引き起こすが、正しい治療を行い、原因を取り除くことができたときには回復可能な疾患である。一方、慢性腎障害は初期症状の自覚が少なく、腎機能が極度に低下してから見つかることが多く、予後が悪い疾患である。そして機能不全に陥ったときには腎機能の回復は見込めず、さらに進行し末期になると、治療法の選択肢が人工透析や腎移植となり、患者の QOL 低下に直結する疾患である。³⁾ 慢性腎障害には様々な原因があるが、腎炎に加え生活習慣病であるメタボリックシンドロームとの関係が近年報告されてきている。⁴⁻⁶⁾ 慢性腎炎や腎障害に陥る前の早期の診断により慢性腎臓病が見つかったときには、適切な治療法と食事療法、十分な睡眠時間を取ることで、定期的に適度な運動をして身体活動を維持すること、そして血圧の管理に心がけ規則正しい生活を送ることにより慢性腎臓病の進行を抑えることが可能となってきた。³⁾ しかし、今なお腎機能が低下してから受診する人が多いことから、腎機能の低下を抑制するためには日々の生活の中で腎炎を予防することが必要であると考えられる。

これまでの研究から、発がん抑制効果、骨粗鬆症の予防効果、抗酸化作用、そして腎臓に作用し尿酸値を低下させる効果などが報告されている物質に β クリプトキサンチンがある。⁷⁻¹³⁾ ヒトの臨床研究においても、閉経後の女性を対象に β クリプトキサンチン摂取により、骨形成マーカーが有意に増加したと報告されている。¹⁴⁾ 抗酸化効果を実証した報告では、 β クリプトキサンチンがフリーラジカル除去能を有し活性酸素を低減させる効果を持つことに加え、体内で一酸化窒素の産生を抑制する作用を有することが報告されている。¹¹⁾ また、 β クリプトキサンチンを多く含有する温州みかんの産地の β クリプトキサンチン摂取が多い人のコホート調査により、生活習慣病のリスク軽減など様々な予防効果が期待されている。^{9,12,15)}

β クリプトキサンチンは、柑橘系の温州みかんを始め、柿、赤ピーマン、パパイア、ビワなどの果皮や果肉に含まれるカロテノイドの 1 つであり、 α -カロテン、 β -カロテン、リコペン、ゼアキサンチン、ルテインとともに、摂取後ヒトの血中に保持される物質である。^{15,16)} β クリプトキサンチンのようなキサントフィルは植物体内では炭素数 12-18 の脂肪酸

と結合したエステル体として存在しているが、ヒトが β クリプトキサンチンを摂取したときには腸管のエステラーゼにより脂肪酸が加水分解され、フリーのキサントフィルとして吸収される。^{17,18)} 腸から吸収された β クリプトキサンチンを始めカロテノイドは肝臓でリポタンパク粒子に取り込まれ、血液循環により様々な臓器へと輸送される。¹⁹⁻²²⁾ そして β クリプトキサンチンは体内組織で再び脂肪酸エステル体となって蓄積されることが明らかとなっている。¹⁷⁾ 他の炭化水素型カロテノイドに対し、 β クリプトキサンチンは水酸基を 1 つ多く有するため、吸収され易く、さらに長期間体内に保持され易いと考えられている。^{12,23)} そして、抗酸化作用など β クリプトキサンチンが持つ作用により、各組織内において発がん抑制効果などを引き起こすと考えられる。しかし酸化ストレスなどにより引き起こされる腎炎に対し、²⁴⁾ β クリプトキサンチンが保護作用を有しているのかはまだ明らかにされていない。

本研究では、急性腎炎のモデルとしてこれまでに数多く報告されている lipopolysaccharide (LPS) 投与に伴う急性腎炎モデルを用い、²⁵⁻²⁸⁾ 腎臓組織で起こる病理組織学的変化を明らかにするとともに、事前に β クリプトキサンチン含有みかんジュースを摂取することでどのような予防効果があるのかについて病理組織学的に検討し、 β クリプトキサンチンが腎の炎症を抑制できるのか検討したものである。本研究は、将来のヒトの慢性腎臓病、特に腎炎の予防効果へとつなげる礎を築くものである。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物 本研究には、日本 SLC 株式会社から購入した雄性的 8 週齢 C57BL/6J マウス 43 匹を使用した。本実験施設に導入後、1 ケージ当たり 2 匹ずつに分け 1 週間飼育環境下に慣らした後、各実験に用いた。各マウスは恒常的室温湿度下（湿度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ ）、12 時間明暗サイクル下で自由な飲食可能環境下で飼育した。本研究は、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals の実験動物指針の下、明治薬科大学実験動物倫理委員会の承認を受けた。また、明治薬科大学実験動物指針に基づき、動物数の削減と動物への苦痛は可能な限り軽減し行った。

2. 飲料水の作製 えひめ飲料から市販されて

Fig. 1. Structural Formula of β -Cryptoxanthin

いる「アシタノカラダみかんジュース」と「POM 愛媛みかん」を自由飲水法により各 11 匹のマウスに 1 週間摂取させた。この 2 つの飲料水には、 β クリプトキサンチン (Fig. 1) がそれぞれ 2.5 mg/100 mL, 0.9 mg/100 mL 含有されている。また β クリプトキサンチンを与えない群には水を与えた。投与期間の毎日定時 (正午) に各ケージで 1 日に摂取された飲水量を計測し、各日における 1 匹あたりの平均飲水量として算出した。

3. LPS 誘発腎炎モデルマウスの作製 これまでの先行報告に従い,²⁵⁾ 総計 33 匹のマウスに LPS (和光純薬工業株式会社, 大阪) を体重 1 kg あたり 1 mg 腹腔内に投与し LPS 誘発腎炎モデルマウスを作製した。腎炎を誘発しない群には同量の生理食塩水を腹腔内に投与した。「アシタノカラダみかんジュース」を事前投与した群を 2.5 mg + LPS 投与群, 「POM 愛媛みかん」を事前投与した群を 0.9 mg + LPS 投与群, β クリプトキサンチンを事前投与していない LPS 単独投与群を LPS 投与群, β クリプトキサンチンを事前投与せず LPS の投与もしていない群を control 群とし、合計 4 群で本研究を行った。

4. 血液検査 LPS 投与 24 時間後, control 群を含め全 43 匹のマウスから採血した。得られた血液を静かに転倒混和した後、室温下で 30 分間静置し血液凝固を確認した。1500 G で 20 分間遠心分離し、血清を別なチューブに取り急速凍結し、血中濃度の計測まで冷凍保存した。各血液中の生化学計測は、日研ザイル株式会社日本老化制御研究所にて、HPLC (D-7000, 日立製作所, 東京) を用いて計測した。本研究において、 β クリプトキサンチン、ビタミン A, ビタミン E (α -tocopherol), 並びに尿素窒素 (blood urea nitrogen; BUN), クレアチニンの血中濃度を計測した。

5. 尿タンパクの検査 LPS 投与 24 時間後の全群のマウス (各群 5 匹) から尿を採取した。採取した尿はチューブに取り急速凍結した後、実験まで

冷凍保存した。各個体から採取した尿を 5 μ L, タンパク質電気泳動ゲルを行い、クマシーブリリアントブルー染色 (Coomassie Brilliant Blue; CBB, Bio-Rad Laboratories, Inc., Philadelphia) を用いて尿タンパク量を可視化した。尿タンパク量の定量化は、Image J software (National Institutes of Health, Maryland) を用いて計測した。また対照として、アルブミン 1 μ g (albumin, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を泳動した。

6. 臓器の摘出と固定 血液並びに尿の採取後、マウスをジエチルエーテル (和光純薬工業株式会社, 大阪) により麻酔し頸椎脱臼した後、腎臓を摘出した。光学顕微鏡による病理解析 (各群 3 匹) として、4%パラフォルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) 中で 2 日間冷蔵庫内で浸漬固定を行った。電子顕微鏡による微細組織解析用 (各群 3 匹) として、1%グルタルアルデヒド, 4%パラフォルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) 中で 2 日間冷蔵庫内で浸漬固定を行った。

7. 光学顕微鏡による病理組織解析 浸漬固定を行った腎臓をリン酸緩衝液で洗浄し、腎臓を半切した。パラフィン病理組織解析のため、腎臓半切部位を脱水系列 (70, 80, 90, 100%のエタノール) に置換した後、レモゾールに置換してパラフィンに包埋した。パラフィンに包埋した腎臓をスライディングミクロトーム (リトラトーム REM-710, 大和光機株式会社, 朝霞) で 5 μ m 厚に薄切した。脱パラフィン処理を行い、hematoxylin-eosin (HE) 染色液、及び過ヨウ素酸シッフ (periodic acid-Schiff; PAS) 染色液を用いて染色した。カバーガラスで封入した後、光学顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, 大阪) で観察し画像を取得し動物病理組織鑑別法に従い解析した。²⁹⁾ さらに Raiji の Sclerosis Index Score を基に、今井が報告した糸球体の病態変化の 4 つの区分 (−; 糸球体に変化が認められない, $\pm$; 軽度のメサンギウムの肥厚が認められる, +; segmental sclerosis, ++; global sclerosis) に従い、各個体 10 個の糸球体を判定し、糸球体硬化度としてそれぞれを 0-3 点とし、その平均点を求め糸球体硬化指数として示した。

8. 免疫組織化学による炎症反応の解析 腎糸球体内の炎症を検討するために、抗 F4/80 抗体 (AbD Serotec, Kidlington) を用いてマクロファー

ジの集積を検討した (各群 3 匹). $5\ \mu\text{m}$ 厚の組織切片を脱パラフィン処理し, クエン酸緩衝液中で 95°C , 20 分間, 抗原賦活化処理を行った. 10% 正常ウマ血清でブロッッキング処理を行い, 1000 倍希釈した抗 F4/80 抗体で 2 時間反応させた. 洗浄後, Alexa-568 が結合した 2 次抗体に反応させた. Hoechst 33342 にて核染色を施し, カバーガラスで封入した後, 蛍光顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, 大阪) で観察し画像を取得した. 炎症反応の程度を明らかにするため, Image J software (National Institutes of Health, Maryland) を用い intensity を計測し, バックグラウンドの intensity の 2 倍以上のマクロファージ細胞を 2 値化処理した後, 各個体 10 個の糸球体内の陽性細胞数を計数した. 糸球体の面積を計測し, 単位面積当たりの陽性マクロファージ数として示した.

9. 電子顕微鏡による腎糸球体内の微細構造変化解析 腎臓内の微細構造変化の解析を行うため, 透過型電子顕微鏡を用いて検討した. 各個体の腎臓を半切し, マクロスライサー (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar) を用いて $1\ \text{mm}$ 厚に薄切した. 2% 四酸化オスミウム (OsO_4) 液で 2 時間浸漬固定した. 洗浄後, 脱水系列 (50, 70, 80, 90, 95, 100% エタノール) で脱水し, プロピレンオキサイドに置換後, エポキシ樹脂に包埋した. 樹脂の硬化後, ウルトラミクロトーム (MT-XL; Research and Manufacturing, Inc., Tucson) で $70\ \text{nm}$ 厚に薄切し, 透過型電子顕微鏡 (JEM-1011, 日本電子株式会社, 東京) で各個体 10 個の糸球体内の微細構造変化を観察し, 病理変化の割合を計測した.

10. データ処理並びに統計解析 各実験から得られたデータは平均 $\pm$ 標準偏差で示し, 群間比較には Analysis of variance (ANOVA) を用い, 危険率 5% 未満を有意とした.

実験結果

1. β クリプトキサンチン経口摂取による血中濃度変化 本研究は, ヒトの急性腎炎予防のため, LPS 投与による急性腎炎モデルマウスを用いて β クリプトキサンチンの予防効果を検討したものである. グラム陰性菌の細胞壁の構成要素の 1 つリポ多糖である LPS は, Toll 様受容体 4 (toll-like receptor 4; TLR4) を介し腎糸球体に炎症を引き起こす

Fig. 2. Blood Concentration of β -Cryptoxanthin, Vitamin A, and α -Tocopherol

(A) Blood concentration of β -cryptoxanthin. (B) Blood concentration of vitamin A. (C) Blood concentration of α -tocopherol. The data are expressed as mean $\pm$ S.E. values.

ことが報告されている.³⁰⁾ みかんに多く含まれる β クリプトキサンチンの摂取方法は, みかんの摂取若しくはみかんジュースとして摂取することが多いことから, 本研究ではみかんジュースを飲水させることとした. まず, β クリプトキサンチンの経口摂取により, 血中濃度にどのように反映されるのか検討した. 1 週間水を飲ませ, β クリプトキサンチンを経口摂取しなかった control 群と LPS 群の両群ともに血中 β クリプトキサンチン濃度は計測限界値以下であった [Fig. 2(A)]. しかし, β クリプトキサンチンを $0.9\ \text{mg}/100\ \text{mL}$ 含有みかんジュースを 1

週間摂取させた結果、血中 β クリプトキサンチン濃度は $0.30 \pm 0.20 \mu\text{g/dL}$ と上昇した [Fig. 2(A), 0.9 mg + LPS 群]。さらに、 β クリプトキサンチンを 2.5 mg/mL 含有みかんジュースを 1 週間摂取させた個体では、血中 β クリプトキサンチン濃度は $1.45 \pm 0.68 \mu\text{g/dL}$ [Fig. 2(A), 2.5 mg + LPS 群] とさらに上昇し、摂取濃度依存的な増加を示した。同様にみかんに含まれる Vitamin A と α -tocopherol (ビタミン E) の血中濃度を計測した。Vitamin A の血中濃度は、 β クリプトキサンチンが 0.9 mg/100 mL 含有みかんジュースを 1 週間投与させた群が最も高く [$51.04 \pm 3.72 \mu\text{g/dL}$: Fig. 2(B), 0.9 mg + LPS 群]、次に 2.5 mg + LPS 群の $30.77 \pm 5.0 \mu\text{g/dL}$ [Fig. 2(B), 2.5 mg + LPS 群] となった。一方、水のみを飲水した 2 群では、control 群の $14.52 \pm 1.52 \mu\text{g/dL}$ 、LPS 群の $12.97 \pm 1.11 \mu\text{g/dL}$ と有意な差は認められなかった [Fig. 2(B)]。また、 α -tocopherol (ビタミン E) の血中濃度は、control 群 $293.17 \pm 13.82 \mu\text{g/dL}$ 、LPS 群 $297.00 \pm 13.27 \mu\text{g/dL}$ 、0.9 mg + LPS 群 $345.40 \pm 14.57 \mu\text{g/dL}$ 、2.5 mg + LPS 群 $337.50 \pm 12.08 \mu\text{g/dL}$ で 4 群間に有意差は認められなかった [Fig. 2(C)]。また、4 群の 1 匹あたりの 1 日平均飲水量は、control 群 $4.8 \pm 0.4 \text{ mL}$ 、LPS 群 $4.9 \pm 0.5 \text{ mL}$ 、0.9 mg + LPS 群 $4.7 \pm 0.6 \text{ mL}$ 、2.5 mg + LPS 群 $4.6 \pm 0.6 \text{ mL}$ で、4 群間に有意差は認められなかったことから、飲水量による影響はないものと考えられた。

2. β クリプトキサンチンによる急性腎炎予防効果の組織学的解析 次に、腎臓内の病理組織変化を光学顕微鏡を用いて解析した。まず、HE 染色像を用いて解析した (Fig. 3)。Control 群の糸球体に構造異常は認められなかった [Fig. 3(A)]。LPS 群では糸球体内にエオジン陽性構造の増加が認められ、糸球体が膨化しボーマン腔が減少していた。0.9 mg + LPS 群では、糸球体内のエオジン陽性構造は増加したままであり、ボーマン腔の領域は回復していた糸球体が増加していたが、その多くはボーマン腔が減少したままであった [Fig. 3(C)]。2.5 mg + LPS 群では、エオジン陽性構造は減少し、ボーマン腔が回復していた [Fig. 3(D)]。また、糸球体周囲に存在する尿細管では 4 群間に差が認められなかった (Fig. 3)。この結果から、 β クリプトキサンチンが LPS に伴う急性腎炎、特に糸球体の病

Fig. 3. HE-stained Renal Glomerulus

All images show hematoxylin-eosin stained tissue sections. (A) Nephric tissue from the control group. (B) Nephric tissue from the LPS group. (C) Nephric tissue from the 0.9 mg + LPS group. (D) Nephric tissue from the 2.5 mg + LPS group. Scale bar in D = $10 \mu\text{m}$.

Fig. 4. PAS-stained Renal Glomerulus

All images show periodic acid-Schiff stained tissue sections. (A) Nephric tissue from the control group. (B) Nephric tissue from the LPS group. (C) Nephric tissue from the 0.9 mg + LPS group. (D) Nephric tissue from the 2.5 mg + LPS group. Scale bar in D = $10 \mu\text{m}$.

理変化を軽減させることが示唆された。次に、糸球体内のどの構成要素なのかを明らかにするため、PAS 染色を用いて病理変化を解析した。PAS 染色は、糸球体内では基底膜の染色に加え、糖タンパク質を染色することから足細胞とメサングウム細胞の

Table 1. Changes in Sclerosis Index and Inflammatory Response

	Sclerosis index	Inflammatory response (number/10000 μm^2)
Control	0.03 $\pm$ 0.16	0.63 $\pm$ 2.33
LPS	2.70 $\pm$ 0.52*	97.36 $\pm$ 64.30*
0.9 mg+LPS	1.93 $\pm$ 0.73*,#	49.24 $\pm$ 40.68*
2.5 mg+LPS	0.63 $\pm$ 0.74#	3.96 $\pm$ 4.65#

The data are expressed as mean $\pm$ S.D. * p <0.05, compared with the control group. # p <0.05, compared with the LPS group.

染色が可能である。PAS 染色を施した control 群の腎糸球体 [Fig. 4(A)] では、基底膜、足細胞、メサンギウム細胞ともに構造異常は認められなかった。しかし LPS 群 [Fig. 4(B)] では、腎糸球体での PAS の染色性が亢進しており、肥厚した膜様の染色性から基底膜の肥厚が引き起こされているものと考えられた。さらに細胞様並びに突起様の PAS の染色性から、足細胞に構造異常が、さらにメサンギウム領域での PAS 陽性構造の増加が認められることから、メサンギウム基質の拡大を伴う構造異常が引き起こされていると推測された。0.9 mg+LPS 群 [Fig. 4(C)] では糸球体内の染色性は LPS 群と同様に強いままであるが、基底膜の肥厚は LPS 群に対しやや減少傾向を呈し、足細胞体及びメサンギウム基質の拡大も減弱傾向を示した。2.5 mg+LPS 群 [Fig. 4(D)] では、糸球体内の PAS 染色性がさらに減弱していたことから、基底膜の肥厚と足細胞体の増殖及びメサンギウム基質の拡大がさらに軽減されていたものと推測された。これら PAS 染色を施した組織を病理組織学的に Sclerosis index として計測した結果 (Table 1), control 群の腎糸球体では硬化がほぼ認められなかったが、LPS 群では、ほぼすべての糸球体が広範囲に硬化していた。0.9 mg+LPS 群では、糸球体全域が硬化している糸球体もある一方、硬化が限局している糸球体が多数認められた。2.5 mg+LPS 群では、さらに硬化の程度は回復し control 群と同等な値を示した。

3. β クリプトキサンチンによる足細胞と基底膜の微細構造変化 光学顕微鏡を用いた病理解析により、LPS 投与により糸球体内基底膜の肥厚と足細胞の異常が引き起こされ、 β クリプトキサンチンの血中濃度依存的に基底膜の肥厚並びに足細胞の形態異常の軽減が明らかとなった。この病理組織の結

果をさらに詳細に検討するため、透過型電子顕微鏡を用いて超微細構造変化を解析した (Fig. 5)。Control 群の腎糸球体における基底膜 [Fig. 5(A), 矢印]、並びに基底膜と接する毛細血管 [Fig. 5(A), 白矢尻] と足細胞の二次突起 [Fig. 5(A), 黒矢尻] に構造異常は認められなかった。一方、炎症反応を誘発した LPS 群の基底膜は肥厚し波状になっていた [Fig. 5(B), 矢印]。さらに毛細血管内皮細胞も肥厚し [Fig. 5(B), 白矢尻]、足細胞の二次突起も肥厚し正常なスリットの形成が損なわれていた [Fig. 5(B), 黒矢尻]。LPS 群の顕著な形態異常に比べ 0.9 mg+LPS 群では形態異常の軽減が認められたが、control 群の基底膜ほどの正常構造までは至っておらず基底膜の多くは肥厚し波状を呈していた [Fig. 5(C), 矢印]。同様に血管内皮細胞 [Fig. 5(C), 白矢尻]、足細胞の二次突起 [Fig. 5(C), 黒矢尻] においても異常構造が多く観察された。2.5 mg+LPS 群では、異常形態を示す基底膜 [Fig. 5(D), 矢印]、毛細血管 [Fig. 5(D), 白矢尻]、足細胞の二次突起 [Fig. 5(D), 黒矢尻] がわずかながら認められたが、多くの糸球体内では control 群と同様の正常構造をしていた。

4. β クリプトキサンチンによるマクロファージ集積への影響 光学顕微鏡下での病理組織解析により、基底膜の肥厚とともに細胞核の集積が確認されたことから、炎症反応を示すマクロファージの集積かどうか、マクロファージを認識する抗 F4/80 抗体を用いて蛍光二重染色法を用いた (Fig. 6)。その結果、control 群の腎糸球体では、マクロファージは認められるが、発現量が少ないことから不活性型マクロファージであると考えられた [Fig. 6(A)]。一方、LPS 群では糸球体内に強染したマクロファージが集積していた [Fig. 6(B)]。0.9 mg+LPS 群では強染したマクロファージは減少傾向を示した [Fig. 6(C)]。さらに 2.5 mg+LPS 群でも強染したマクロファージは減少していた [Fig. 6(D)]。この結果を定量化するため、バックグラウンドの平均 intensity の 2 倍を閾値として、染色されているマクロファージ数を計測し単位面積当たりの陽性細胞数として示した (Table 1)。その結果、control 群の腎糸球体では、強染したマクロファージはほぼ認められなかったが、LPS 群では、糸球体内に強染したマクロファージが集積していること

Fig. 5. Ultrastructural Changes in the Renal Glomerulus

Transmission electron microscopy images of ultrastructural changes. (A) High magnification view of the renal glomerulus from the control group. (B) High magnification view of the renal glomerulus from the LPS group. (C) High magnification view of the renal glomerulus from the 0.9 mg + LPS group. (D) High magnification view of the renal glomerulus from the 2.5 mg + LPS group. Black arrows show the basal membranes. White arrowheads show the endothelial cells. Black arrowheads show the glomerular podocytes. Scale bar in D=200 nm.

Fig. 6. Reduction in the Inflammatory Response by β -Cryptoxanthin Ingestion

(A) Nephric tissue from the control group. (B) Nephric tissue from the LPS group. (C) Nephric tissue from the 0.9 mg + LPS group. (D) Nephric tissue from the 2.5 mg + LPS group. Red color shows the F4/80 immunopositive cells. Blue color shows the cell nuclei. Scale bar in D=10 μ m.

が明らかとなった。0.9 mg + LPS 群及び 2.5 mg + LPS 群では、濃度依存的に増強したマクロファージの集積は減少し、2.5 mg + LPS 群では control 群と有意な差が認められなかった。

5. β クリプトキサンチン投与による尿タンパク漏出の軽減効果 これまでの検討により、病理組織学的に β クリプトキサンチンが急性腎炎を軽減

することを明らかにしたが、腎機能への影響を確認するため、各個体から尿を採取し、尿量の変化と尿中にタンパク質が漏出しているかどうか、さらに血液中の尿素窒素量 (BUN) と血中クレアチニン量を計測した。LPS 投与群の 24 時間に排泄された尿量は、control 群の尿量に比べ 84% に有意に減少していた (Table 2)。0.9 mg + LPS 群、2.5 mg + LPS 群の尿量は増加し、両群とも control 群の尿量と同等に回復していた (Table 2)。尿中タンパク質の漏出を検討した結果、Control 群の尿には、漏出したタンパク質は認められず腎機能は正常であった (Fig. 7 のレーン 2, Table 2)。一方、LPS 群では尿タンパク量が顕著に増加していた (Fig. 7 のレーン 3, Table 2)。この尿中に漏出したタンパク質の分子量はアルブミンの分子量と比較して、分子量の大きいタンパクが漏出していることが明らかになった。

0.9 mg + LPS 群の尿では、LPS 群の尿に比べ漏出した尿タンパク量は減少している個体もあったが、多くの個体では LPS 群と同等の尿タンパク量が認められた (Fig. 7 のレーン 4, Table 2)。2.5 mg + LPS 群の尿では、全個体で顕著に漏出した尿タンパク量は減少しており腎機能の回復が確認された (Fig. 7 のレーン 5, Table 2)。また血液中の尿素窒素量と血中クレアチニン量を計測した結果、血中尿素窒素量は LPS 投与群では、control 群に比べ有意に増加し、0.9 mg + LPS 群、2.5 mg + LPS 群では、濃度依存的に回復していた (Table 2)。さら

Table 2. Changes in Urinary Volume, Proteinuria and Blood Biochemistry

	Urinary volume (mL/d)	Proteinuria	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)
Control	2.53±0.28	10.41±7.38	29.05±8.03	0.12±0.01
LPS	2.18±0.19*	56.40±12.60*	116.56±10.95*	0.43±0.06*
0.9 mg+LPS	2.36±0.25	37.37±6.01* [‡]	95.28±9.67*	0.36±0.08*
2.5 mg+LPS	2.58±0.22 [‡]	14.87±5.55 [‡]	34.80±8.60 [‡]	0.17±0.03 [‡]

The data are expressed as mean±S.D. BUN: blood urea nitrogen, CRE: creatine, * $p<0.05$, compared with the control group. [‡] $p<0.05$, compared with the LPS group.

Fig. 7. Reduction of Proteinuria by β -Cryptoxanthin Administration

Image shows polyacrylamide gel electrophoresis stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1: 1 μ g of albumen. Lane 2: urine from the control group. Lane 3: urine from the LPS group. Lane 4: urine from the 0.9 mg + LPS group. Lane 5: urine from the 2.5 mg + LPS group.

に、血中クレアチニン量も同様に LPS 投与群では、control 群に比べ有意に増加し、0.9 mg + LPS 群、2.5 mg + LPS 群では、濃度依存的に回復が確認された (Table 2)。

考 察

β クリプトキサンチンは環化した炭素鎖末端の一方だけに OH 基を有するカロテノイドである。そのため、キサントフィルであるにもかかわらず、プロビタミン A としての機能に加え、¹²⁾ ビタミン A の効力を有していること、³¹⁾ カロテンバインディングタンパクにも結合能力を持つことが報告されている。³²⁾ 他の炭化水素型カロテノイドに対し、 β クリプトキサンチンはその構造特性により、吸収され易く、さらに長期間体内に保持され易いと考えられている。^{12,23)} 血流により運ばれた β クリプトキサンチンは、各組織内において抗酸化作用などプロビタミン

ン A としての働き以外に、近年では、発がん抑制効果、骨粗鬆症の予防効果、また糖尿病などの生活習慣病の予防効果など、様々な生体内での調節機能が明らかになってきている。⁷⁻¹³⁾

本研究において、 β クリプトキサンチンが 0.9 mg/100 mL、2.5 mg/100 mL 含有されているみかんジュースの飲水によって、濃度依存的に血中濃度が上昇した (Fig. 2)。吸収された β クリプトキサンチンは肝臓、肺などに加え、腎臓組織内に保持されることが報告されている。³³⁾ β クリプトキサンチンが Vitamin A の前駆物質となっているという報告があることから、³⁴⁾ 本研究で認められた腎炎予防効果の結果が少なからず Vitamin A を介している可能性も示唆される。また、これまでの先行報告と本研究で解析した Vitamin 類の血中濃度変化からも、本研究で明らかになった腎炎の予防効果は、 β クリプトキサンチンを中心に Vitamin A など、みかんジュースに含有する他の因子を含め複合的な因子によるものであると示唆される。

慢性腎臓病には様々な病態があるが、急性腎炎、慢性腎炎、腎盂腎炎を含め、それらの多くは腎炎によって起因される。²⁾ それゆえ、慢性腎臓病を予防するためには慢性腎臓病初期に現れる腎炎の予防が必要と考えられる。本研究では、LPS により腎炎を誘発したマウスを用い腎臓組織で起こる病理組織学的変化を明らかにするとともに、腎炎誘発前から β クリプトキサンチン含有みかんジュースを摂取することで、どのような予防効果があるのかについて病理組織学的に検討した。その結果、LPS 投与に伴い腎糸球体内で基底膜の肥厚と足細胞の異常形態、メサンギウム領域の拡大を引き起こすことが明らかになった。さらに、LPS 投与により腎糸球体内に強い炎症反応が認められた。また、LPS 投与個体の尿を電気泳動した結果、高分子量の物質が顕

著に検出されたことから LPS は腎糸球体の濾過機能に影響を与えると示唆された (Fig. 7). 本研究の組織学的解析から, LPS は尿細管には顕著な影響を及ぼしていないことが示唆される. また, 尿細管機能が正常であるため, 低分子量タンパクは尿細管から再吸収されているものと考えられる. このことは, LPS 投与個体の尿において低分子量タンパク質より高分子量のタンパク質が顕著に検出された結果からも示唆される. 一方, LPS による腎炎の誘発前から β クリプトキサンチン含有みかんジュースを摂取した個体では, β クリプトキサンチン血中濃度依存的に基底膜の肥厚, 足細胞の異常形態, メサンギウム領域の拡大, さらに炎症反応のすべての軽減が起こっていた. すなわち β クリプトキサンチン含有みかんジュースの摂取により腎炎の軽減がなされていたものと考えられる. この病態変化は, 電子顕微鏡を用いた超微形態学的解析からも確認された. さらに電気泳動の結果から, 腎炎誘発個体で認められた高分子量の尿タンパク漏出は, β クリプトキサンチン摂取量依存的に軽減した. これら腎糸球体で認められた組織学的異常の軽減は, 生理学的機能と正の相関関係にあると考えられ, β クリプトキサンチンは腎炎に伴う機能不全の改善効果も併せて持つと言える. さらに, この LPS による腎炎の病態変化はマクロファージ細胞の集積が一因であることが示されたが, β クリプトキサンチン含有みかんジュースの事前摂取に伴いマクロファージ細胞の集積が抑制される結果が得られた. LPS による腎炎誘発が, 基底膜の肥厚や足細胞の異常を引き起こした後にマクロファージを集積するのか, マクロファージの集積が基底膜の肥厚や足細胞の異常を引き起こすのか, 若しくは同時に引き起こされるのか, すなわち LPS 投与に伴う腎炎誘発カスケードについては本研究では明らかにすることはできなかったが, 少なくとも β クリプトキサンチンなどのみかんジュース含有成分が腎炎誘発カスケードの上流に作用し, 腎炎で観察されたすべての異常形態を β クリプトキサンチン含有みかんジュースが軽減させる作用を持つことが明らかとなった. そして, β クリプトキサンチン含有みかんジュースの摂取は構造異常を軽減するばかりではなく, 尿タンパクの漏出をも減弱させるという新たな効能を明らかにした.

腎機能の低下は, 慢性腎臓病患者の QOL 低下に直結する重要な疾患である.³⁾ そのため, 慢性腎炎による腎障害に陥る前の早期に発見し, 適切な治療法とともに, 食事療法や十分な睡眠時間の確保, 体力維持のために定期的に適度な運動を実施するなど規則正しい生活を送ることにより慢性腎臓病の進行を抑えることが必要である. しかし, 腎機能が極度に低下しないと体調不良を感じるということが少ないという特性のため, 早期に発見することが難しい疾患である. そのため, 腎機能の低下を抑制する, 又は慢性腎臓病の進行を防ぐために日々の生活の中で腎炎を予防することが必要である. 本研究で新たに明らかとなった β クリプトキサンチン含有みかんジュースの腎炎抑制効果はモデルマウスを用いた報告であるが, 本研究結果は β クリプトキサンチン含有みかんジュースのヒト腎炎の予防効果へとつなげる礎となる研究成果であると考えられる.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Japanese Society of Nephrology. “CDK Shinyo Guide 2012.”: <http://www.jsn.or.jp/guideline/ckd2012.php>, cited 26 November, 2015.
- 2) Zager R. A., *Nephron Clin. Pract.*, **127**, 46–50 (2014).
- 3) Pandya S., Pandya P. S. “Save Your Kidney,” Samarpan Kidney Foundation, Rajkot, 2012.
- 4) Ding W., Cheung W. W., Mak R. H., *World J. Nephrol.*, **4**, 223–229 (2015).
- 5) Kumar P. A., Chitra P. S., Reddy G. B., *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **14**, 273–286 (2013).
- 6) Maric-Bilkan C., *Med. Clin. North Am.*, **97**, 59–74 (2013).
- 7) Tsushima M., Maoka T., Katsuyama M., Kozuka M., Matsuno T., Tokuda H., Nishino H., Iwashima A., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 227–233 (1995).
- 8) Nishino H., Murakoshi M., Ii T., Takemura M., Kuchide M., Kanazawa M., Mou X. Y., Wada S., Masuda M., Ohsaka Y., Yogosawa S., Satomi Y., Jinno K., *Cancer Metastasis Rev.*, **21**, 257–264 (2002).
- 9) New S. A., *Proc. Nutr. Soc.*, **62**, 889–899

- (2003).
- 10) Macdonald H. M., New S. A., Golden M. H., Campbell M. K., Reid D. M., *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 155–165 (2004).
- 11) Murakami A., Nakashima M., Koshiba T., Maoka T., Nishino H., Yano M., Sumida T., Kim O. K., Koshimizu K., Ohigashi H., *Cancer Lett.*, **149**, 115–123 (2000).
- 12) Sugiura M., *Yakugaku Zasshi*, **135**, 67–76 (2015).
- 13) Ni Y., Nagashimada M., Zhan L., Nagata N., Kobori M., Sugiura M., Ogawa K., Kaneko S., Ota T., *Endocrinology*, **156**, 987–999 (2015).
- 14) Granado-Lorencio F., Lagarda M. J., Garcia-López F. J., Sánchez-Siles L. M., Blanco-Navarro I., Alegría A., Pérez-Sacristán B., Garcia-Llatas G., Donoso-Navarro E., Silvestre-Mardomingo R. A., Barberá R., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **24**, 1090–1096 (2014).
- 15) Sugiura M., Kato M., Matsumoto H., Nagao A., Yano M., *J. Health Sci.*, **48**, 350–353 (2002).
- 16) Sugiura M., Matsumoto H., Kato M., Ikoma Y., Yano M., Nagao A., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 196–202 (2004).
- 17) Wingerath T., Stahl W., Sies H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**, 385–390 (1995).
- 18) Breithaupt D. E., Bamedi A., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2064–2070 (2001).
- 19) Tanumihardjo S. A., Furr H. C., Amedée-Manesme O., Olson J. A., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **60**, 307–313 (1990).
- 20) Kaplan L. A., Lau J. M., Stein E. A., *Clin. Physiol. Biochem.*, **8**, 1–10 (1990).
- 21) Schmitz H. H., Poor C. L., Wellman R. B., Erdman J. W. Jr., *J. Nutr.*, **121**, 1613–1621 (1991).
- 22) Stahl W., Schwarz W., Sundquist A. R., Sies H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 173–177 (1992).
- 23) Yano M., Ikoma Y., Sugiura M., *Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci.*, **4**, 13–28 (2005).
- 24) Pedzik A., Paradowski M., Rysz J., *Pol. Merkur. Lek.*, **28**, 56–60 (2010).
- 25) Gao L. N., Cui Y. L., Wang Q. S., Wang S. X., *J. Ethnopharmacol.*, **149**, 772–782 (2013).
- 26) Wang W., Falk S. A., Jittikanont S., Gengaro P. E., Edelstein C. L., Schrier R. W., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **283**, F583–F587 (2002).
- 27) van Meurs M., Kurniati N. F., Wulfert F. M., Asgeirsdottir S. A., de Graaf I. A., Satchell S. C., Mathieson P. W., Jongman R. M., Kümpers P., Zijlstra J. G., Heeringa P., Molema G., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **297**, F272–F281 (2009).
- 28) Ono T., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 449–453 (2012).
- 29) Enomoto M., Hayashi Y., Tanaka S., “Jikken doubutsu no byourisoshiki—sono kensahou to kansatsu no youten,” Soft Science, Tokyo, 1980.
- 30) Wiggins R. C., Njoku N., Sedor J. R., *Kidney Int.*, **37**, 1281–1285 (1990).
- 31) Alberg A., *Toxicology*, **180**, 121–137 (2002).
- 32) Rao M. N., Ghosh P., Lakshman M. R., *J. Biol. Chem.*, **272**, 24455–24460 (1997).
- 33) Sugiura M., Ogawa K., Yano M., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 147–151 (2013).
- 34) Burri B. J., *J. Sci. Food Agric.*, **95**, 1786–1794 (2015).