

3) データ・センター

イー・ピー・エス株式会社

管理責任者；廣崎真史、担当責任者；永妻光義、担当；加藤由佳、栄養士；勝又千春、統計解析部；山田剛久

5) Independent Study Monitoring Committee

杏林大学

学長 長澤俊彦

昭和大学藤が丘病院内科

客員教授 越川昭三

東急病院

病院長 酒井紀

滋賀医科大学

名誉教授 繁田幸男

オブザーバー

東京大学大学院医学系研究科

教授 大橋靖雄

B. 研究方法

1. 対象

選択基準：

1) 2型糖尿病症例、仮登録時、65歳未満、糖尿病罹病期間（推定）5年以上の症例。ただし、仮登録時65歳以上70歳未満の2型糖尿病症例も、糖尿病発生年齢（推定）が60歳未満で、かつ2)～5)の項目を満たし、除外基準に抵触しない場合は、仮登録可とする。

2) 糖尿病性腎症第3期（10 g/day 未満の持続性蛋白尿 1 g/day 以上の蛋白尿あるいは、少なくとも1回の24時間尿でAER 200 μ g/min 以上を有し、かつ酵素法でsCr 2.0 mg/dl 未満）の症例。Jaffe法にてsCr 2.0 mg/dl 以上の症例に関しては、酵素法で測定してから仮登録する。

3) 糖尿病性網膜症（SDR 以上）を有す

る症例。（ただし、腎生検で腎症が診断されている症例では、糖尿病罹病期間5年未満あるいは網膜症を有さなくても仮登録可とする）

4) 蛋白摂取量として、通常の糖尿病食を指示されている症例（原則として、1.2 g/kg/day 以上、体重はideal BW(身長²X22)を用いる)。

5) 同意で文書が得られた症例。

除外基準：

1) 1型糖尿病症例。

2) 他の腎疾患が疑われる症例。

3) 尿路感染症、心不全、重篤な肝障害を有する症例。

4) ACE阻害薬あるいはアンジオテンシンII受容体拮抗薬を使用している症例

（ただし、同意の下に3カ月以上のwash out 後、観察期に入る予定であれば仮登録可）。

5) 治験薬（市販前）服用中の症例。

6) 既に蛋白制限食の指導を受けている症例（feasibility study で0.8 g/kg/day の指導を受けた症例を含む、ただし、同意の下に観察期まで3カ月以上通常蛋白食の指導を受ける予定であれば仮登録可）。

7) 体重が標準体重の80%未満の症例。

8) 他、担当医が不相当と診断した症例。

2. 方法

倫理委員会の承認を得た後、選択基準を満たした症例を登録する。前観察期（3ヶ月）は現行の食事（蛋白摂取量 1.2 g/kg/day 以上）を指導し、この間に通常蛋白食群（蛋白摂取量 1.2 g/kg/day 以上）と蛋白制限食（蛋白摂取量 0.8 g/kg/day）の2群に振り分けを行う。観察期の5年間に、主要解析項目として、Ccrの低下

速度、及び $1/Cr$ の傾き、血清 Cr が前値の倍になる症例の頻度、SF-36 日本語版を用いた QOL を評価する。さらに、副解析項目として、GFR の低下速度、AER あるいは尿蛋白量、及び Ccr の絶対値あるいは変化率を両群で比較検討する。ただし、毎年症例の中間解析を行い、試験の続行・中止についても検討する。

C. 研究結果

1) 観察期登録患者

上記の-2 および-1 ヶ月を終了した全観察期 128 症例は、データ・センターにて、年齢、性別、血清 Cr 及び Ccr、高血圧の頻度、HbA1c、そして尿蛋白量に関して 2 群間で有意差のないように、通常蛋白食 A 群(1.2 g/kg/day)と蛋白制限食 B 群(0.8 g/kg/day)の 2 群に振り分けている。観察期の患者数は、2004 年 12 月現在 105 症例であり、本登録後中止症例が 51 症例(A 群 ; 19 例、B 群 ; 32 例)、進行中の登録症例 35 症例(A 群 ; 18 例、B 群 ; 17 例)、観察期終了症例 30 例 (A 群 ; 21 例、B 群 9 例) である。

3) 患者 QOL

QOL 評価を観察期 0 ヶ月および、以後 1 年毎に評価を行い、本研究遂行に関する資料を蓄積している。

4) 観察期における主要及び副項目の解析
観察期症例数の観察期間は、図 1 に示すように蛋白制限食群平均 40.89 ヶ月 (1~60 ヶ月)、通常蛋白食群 37.71 ヶ月 (2~60 ヶ月) であった。本年度も主要解析項目・副解析項目に関する解析を行ない、Independent Study Monitoring Committee 会議にて報告した。

5) 観察期における食事蛋白摂取量

食事調査からの蛋白摂取量は両群間で明らかな有意差を認めなかった (図 2)。尿中尿素窒素排泄量から算出した蛋白摂取量にも差が認められる傾向となり (図 2)、特に観察期 30 ヶ月以降は明らかな差となってきた。

6) 中間解析結果

①患者背景

性別、年齢、身長、体重、血清 Cr、Ccr、尿蛋白量、HbA1c、高血圧の頻度に蛋白制限食群と通常蛋白食群間には差はなかった。

②指示蛋白量の遵守状況

食事調査からの蛋白摂取量は、 $P < 0.001$ にてすべての観察期間で蛋白制限食群と通常蛋白食群間で差がみられた。観察期間の尿中尿素窒素排泄量から算出した蛋白摂取量も、両群間で $P < 0.087$ と差がみられる傾向であった。

③解析項目

Ccr の傾き、 $1/\text{血清 Cr}$ の傾き、血清 Cr の倍化日数に、蛋白制限食群と通常蛋白食群間に差はなかった。しかし、尿蛋白及びアルブミン排泄量には、観察期 30 ヶ月以降に差がみられる傾向にあった。

7) Independent Study Monitoring Committee 会議議事録

本研究のような「長期に亘る蛋白摂取量の糖尿病性腎症に対する効果」を検討している臨床研究は、日本のみならず世界的に見てもなく、高く評価できる。しかし、未だ蛋白摂取量の量群間の差が十分にはみられておらず、さらに食事指導を強化するよう勧告を受けた。さらに、目標期間の 5 年間を目指し観察を継続すべきであるとの指導を受けた。

D. 考察

なし

中間解析の結果、Ccr の低下速度、及び $1/Cr$ の傾き、血清 Cr が前値の倍になる症例の頻度、Ccr の絶対値あるいは変化率には両群間に差がみられていないが、AER あるいは尿蛋白量には、観察期 30 ヶ月以降に両群間で差がみられ、観察を目標の 5 年間に亘り継続する必要がある。

Independent Study Monitoring

Committee からも、未だ世界においてもエビデンスのない分野であり、本臨床研究を目標期間である 5 年間継続するよう進言された。食事調査から算出した蛋白摂取量は、すべての観察期で両群に差が認められ、蛋白制限群(0.8 g/kg/day)と通常蛋白食群(1.2 g/kg/day)の 2 群に分けられていた。また、尿中尿素窒素排泄量から算出した蛋白摂取量に関しても両群間に少ないながら差がみられた。今後、本研究の目的である食事蛋白摂取量を蛋白制限群(0.8 g/kg/day)と通常蛋白群(1.2 g/kg/day)の 2 群に層別するため、栄養士による食事指導を少なくとも 1 ヶ月に 1 回のペースで継続していくこと、さらに本年度、新たに導入したデジタルカメラによる写真撮影によって、食事指導をより一層徹底するとともに、蛋白摂取量の結果と食事の雛形を各施設に送付することとした。

E. 結論

「糖尿病性腎症に対する蛋白制限食の効果」に関する多施設共同研究は円滑に推移しているが、より一層、食事指導の強化を行い、観察期間計 5 年を目指す。加えて、栄養指導及の徹底化を図る。

G. 研究発表

図 1. 通常蛋白食群および蛋白制限食群の
観察期間経過

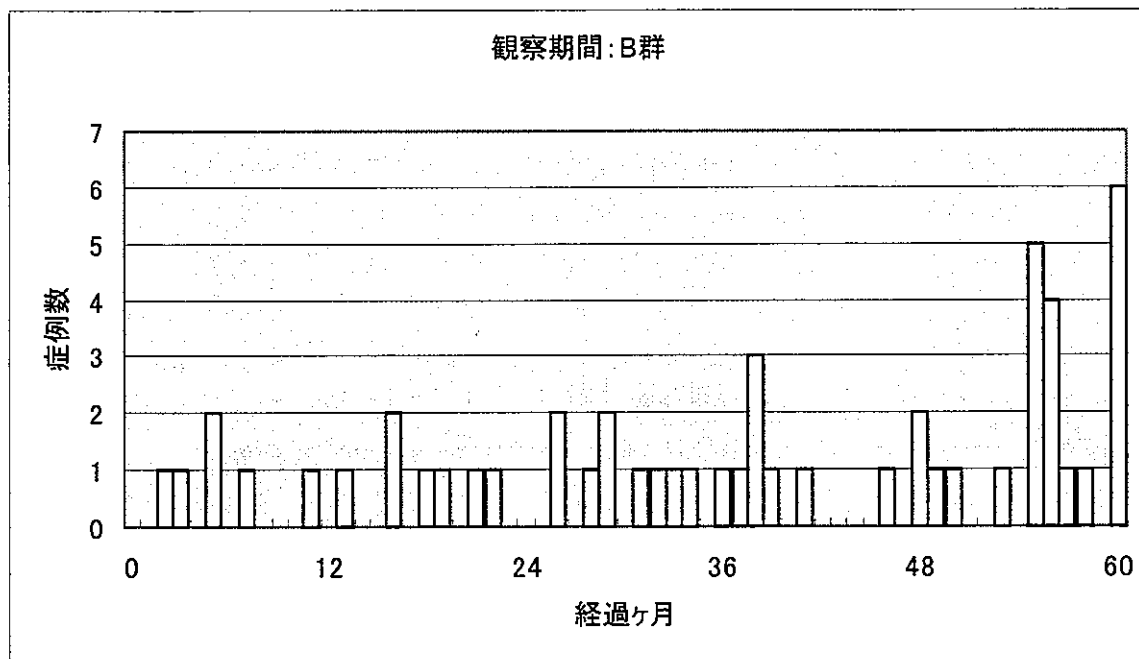
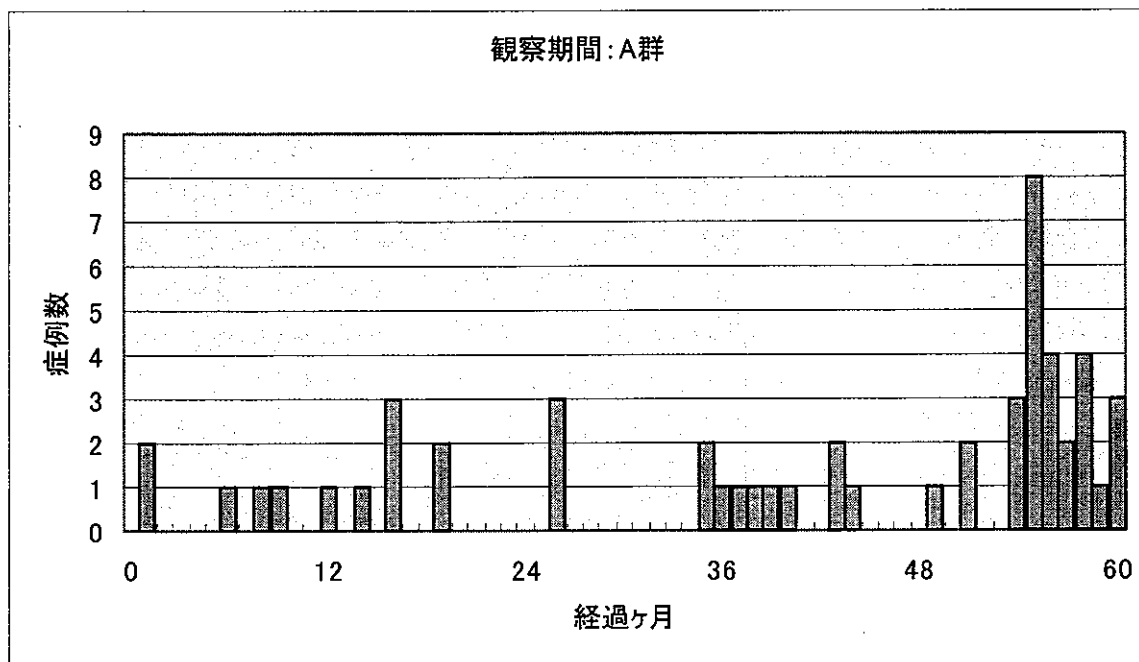
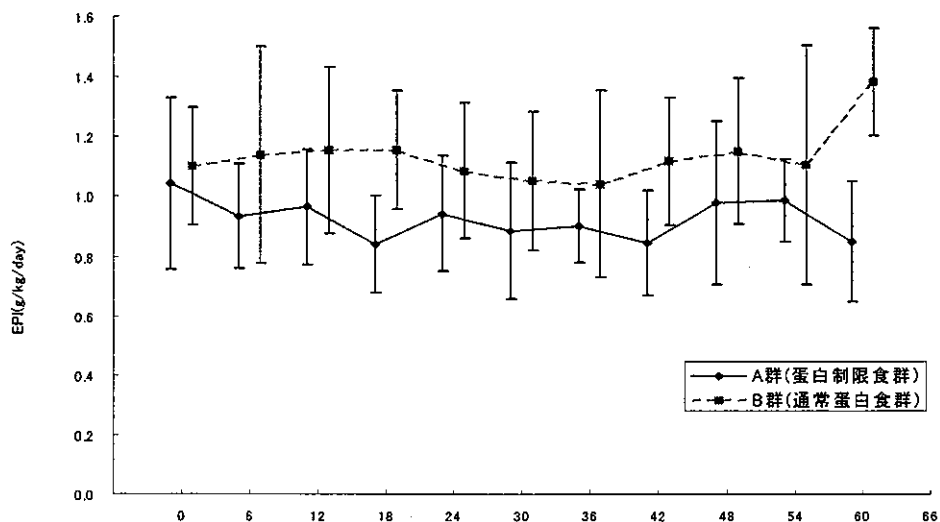
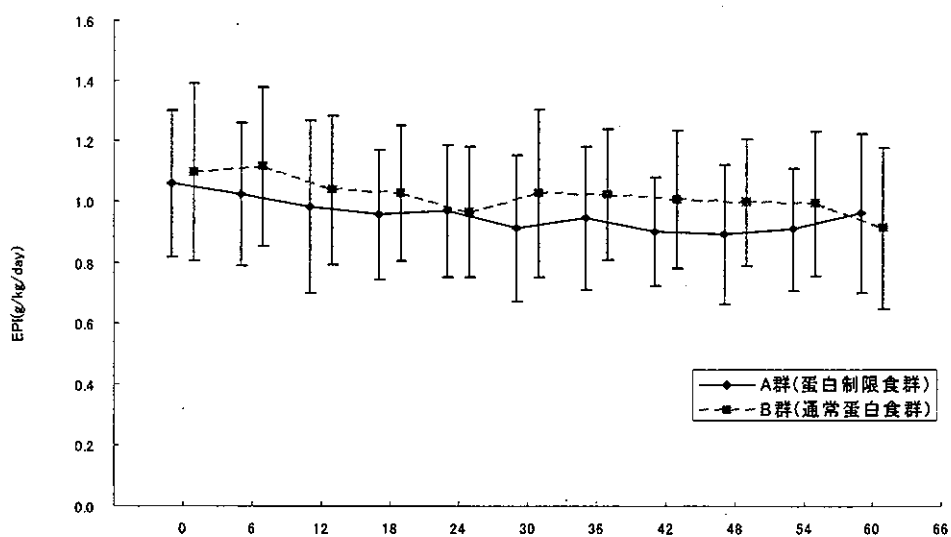


図 2. 食事調査および尿中 UN から算出した蛋白摂取量の経時的推移

食事調査



尿中 UN からの蛋白摂取量



厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省循環器疾患等総合研究事業）

分担研究報告書

「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療」研究

分担研究者	山田 研一	国立病院機構千葉東病院	臨床研究センター
研究協力者	島 正之	兵庫医科大学	公衆衛生学
	松田 利恵子	国立病院機構千葉東病院	臨床研究センター
	宮内 真弓	国立病院機構千葉東病院	栄養管理室長
	山口 喜孝	国立病院機構千葉東病院	臨床研究センター
	多田 純子	国立病院機構千葉東病院	臨床研究センター
	古家 大祐	滋賀医科大学	内科学講座腎臓内科
	羽田 勝計	旭川医科大学	内科学第二
	吉川 隆一	滋賀医科大学	

研究要旨 日本人 2 型糖尿病性顕性腎症に対する、蛋白制限食の有効性について、多施設共同研究によるランダムイズコントロール (RCT) された、5 年間の検証研究がなされた。前観察期 (蛋白摂取 1.2g/kg/day 以上) の 3 ヶ月後、蛋白制限食 (A) 群 (蛋白指示量 ; 0.8g/kg/day) と通常蛋白食 (B) 群 (蛋白指示量 ; 1.2g/kg/day) の 2 群に RCT され、観察期として 5 年間 follow された。本研究では、観察期 24 ヶ月までの症例を対象とした。調査ポイントは、前観察期として -2、-1、0 ヶ月及び観察期として 3、6、12、24 ヶ月目とした。平均を算出し解析した。A 群 : 47 例、B 群 : 46 例であった。栄養調査上、前観察期では A 群と B 群の間で蛋白摂取量に有意差を認めず、観察期では、A 群 (蛋白摂取量 ; 0.92g/kg) は B 群 (蛋白摂取量 ; 1.11g/kg) に比較し、有意に低値であり、食事調査上からは指導が的確に行われたと考えられる。しかし、観察期で蛋白以外の栄養素摂取 (カルシウム、ビタミン B₁) の、また酸化ストレス関連栄養素 (ビタミン E, B₆、カロテン、葉酸) の摂取量が、A 群で B 群のそれらに比較し、有意に低値であり、かつ A 群では食事摂取基準 (正常人) に満たない栄養素 (カルシウム、ビタミン E, B₁, B₆、カロテン) が多かった。これらは糖尿病性顕性腎症の栄養指導法に大きな問題を残し、検討すべき課題となった。また今年度より開始される本研究 (糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療) のプロトコール作成に活かすことが出来た。

A.研究目的

「糖尿病性腎症に対する包括的治療法の確立」を目指し、「糖尿病性腎症に対する蛋白制限食の効果」の多施設共同研究を開

始・継続してきた。

本邦における糖尿病性腎症の食事療法として、蛋白制限食が推奨されてきた。しかし、その有効性については単一施設での報

告のみであり、十分な EBM としての地位は得ていない。今回、日本人 2 型糖尿病性顕性腎症に対する多施設共同研究による、ランダムイズコントロール (RCT) された、5 年間の蛋白制限食の有効性の検証研究がなされた。独立委員会の承認許可のもと、キーオープンとともに中間報告がなされた。

本研究は、本邦で比較的積極的に糖尿病性腎症を診療している施設の医師と栄養士の協力により構成されている。当研究において、そのような施設で実際に蛋白制限食を食事療法として行った場合、蛋白以外の各栄養素摂取量にどのような変化が出現するのか、また、蛋白制限食群と通常蛋白食群との間に、蛋白以外の各栄養素摂取量に違いが認められるのか、また栄養所要量 (現: 食事摂取基準) を満たしているのか、更にその栄養素と臨床検査成績とにどのような関連があるのかを検討した。

今回の検討は、糖尿病性腎症の進展因子の一つと考えられている、「酸化ストレス」に関連する栄養素摂取量の動態を中心に検討した。このような検討により、糖尿病性腎症に対する包括的治療の一環としての、新たな食事療法指導法の確立を目指していくべきと考えられる。また本年度より開始された「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療」のプロトコール作成に活かすべきと考える。

B. 研究方法

1. 対象:

選択基準: ① 2 型糖尿病で、登録時 65 歳未満、5 年以上の糖尿病罹病期間 (推定) を有する。② 糖尿病性腎症第 3 期である。③ 糖尿病性網膜症 (SDR 以上) を有する。(但し、腎生検で腎症が診断されている症例では、糖尿病の罹病期間 5 年未満でもあるいは網膜症を有さなくても良い。) ④ 蛋白摂取量として通常の糖尿病食を指示されている症例 (原則として、1.2g/kg/day 以上、

体重は idealBW (身長²*22)。⑤ 文書同意が得られた症例。

除外基準: ① 1 型糖尿病。② 他の腎疾患が疑われる症例。③ 尿路感染症、心不全、重篤な肝障害を有する症例。④ ACE 阻害剤あるいはアンギオテンシン II 受容体拮抗薬を使用している症例 (但し、同意の下に 3 ヶ月以上の wash out 後、観察期に入る予定であれば仮登録可)。⑤ 治験薬 (市販前) 服用中の症例。⑥ 既に蛋白制限食の指導を受けている症例 (feasibility study で 0.8g/kg/day の指導を受けた症例を含む。但し、同意の下に観察期まで 3 ヶ月以上通常蛋白食の指導を受ける予定であれば仮登録可)。⑦ 体重が標準体重の 80% 未満の症例。⑧ 担当医が不相当と判断した症例。

2. 方法:

蛋白制限食群: 蛋白摂取指示量; 0.8g/kg/day (A 群) と通常蛋白食群: 蛋白摂取指示量; 1.2g/kg/day (B 群) の 2 群にランダム化により割付けする。該当症例を登録し、前観察期 (3 ヶ月) の後、観察期として 24 ヶ月目までを今回の解析対象とした。対象症例数は A 群: 47 例、B 群: 46 例であった。前観察期は、蛋白摂取量 1.2g/kg/day 以上の食事を指導し、この間に 2 群の割付けを行った。観察期の食事について、蛋白摂取指示量は A 群が 0.8g/kg/day、B 群は 1.2g/kg/day である。エネルギー摂取量は、両群ともに前観察期の指示を継続 (但し、A 群では血清脂質に変動が生じないように配慮し、エネルギー不足と担当医が判断した場合は、研究代表者と協議の上、エネルギーを増加することができる)。塩分摂取量は、両群ともに前観察期の指示を継続 (但し、高血圧併発時には適正な指導を行う)。調査ポイントは、前観察期として観察期 2, 1, 0 ヶ月前、観察期として 3, 6, 12, 24 ヶ月目とした。各調査ポイント時に 3 日間の食事調査 (検証の為の食事前後の写真撮影を含む)、24 時間蓄尿、

空腹時採血を行った。

3. 観察項目：

1) 栄養摂取量 (5訂食品成分表使用)：エネルギー、蛋白質、塩分、糖質、脂質、ビタミン C、ビタミン E、ビタミン B₁、ビタミン B₆、カロテン、カルシウム、葉酸。

2) 24 時間蓄尿：総蛋白 (TP)、Alb、Na、Ca、Ccr、EPI (UN から算出した蛋白摂取量)。

3) 空腹時採血：Cr、HbA1c、TP、Alb、Lipid (TC、TG、HDL-C)、Apoprotein、Transferrin を測定。

4. 解析方法：

調査ポイント毎に収集したデータから、前観察期及び観察期で、各々平均値を算出した。差の検定は Mann-Whitney 解析、相関関係は Spearman 相関係数を求めて解析を行った。

C. 結果

今回は前観察期 3 ヶ月及び観察期 (蛋白制限食 (A) 群又は通常蛋白食 (B) 群) 24 ヶ月の期間の検討を行った。

食事摂取調査からは、前観察期では、A 群と B 群の食事蛋白摂取量に有意差を認めなかった。観察期の A 群の摂取蛋白量は 0.92g/kg、B 群の摂取蛋白量は 1.11g/kg で、有意差を認め、食事調査上からは、指導が的確に行われたと推察される。

①前観察期と観察期の間の、各群の摂取量の変化について検討した。A 群において、糖質摂取量は前観察期に比して観察期で有意に増加し ($p=0.006$)、カルシウム摂取量は減少した ($p<0.001$)。

②蛋白以外の栄養摂取量について、前観察期、観察期における A 群と B 群間の比較を行った。前観察期ではビタミン B₁ 摂取量が B 群に比較し A 群で有意に低かった ($p=0.008$)。一方、観察期では、蛋白質 ($p<0.001$) 以外、ビタミン E ($p=0.045$)、

B₁ ($p<0.001$)、B₆ ($p=0.007$)、カロテン ($p=0.013$)、カルシウム ($p<0.001$)、葉酸 ($p<0.001$) の各摂取量が、B 群に比較して A 群で有意に低かった。

③各栄養素の摂取量を、栄養所要量 (現：食事摂取基準 (正常人)) から検討すると、図 1 に示すように、蛋白制限食群 (A 群) のカルシウム、ビタミン E、B₁、B₆ 及びカロテンの摂取量は、栄養所要量 (RDA) (現：食事摂取基準) に満たなかった。

D. 考察

今回検討項目としたビタミン B₁ 摂取量は、前観察期でも A 群で低値であった。これは、前観察期 3 ヶ月間、通常蛋白食を指導しても、それ以前に糖尿病性腎症のいわゆる「低蛋白食」を指導されており、その影響があった可能性もある。今回の成績で驚くことに、A 群観察期 (指示蛋白制限 0.8g/kg 施行期) で、栄養調査上、ビタミン E、B₁、B₆、カロテン、葉酸、更にカルシウムの摂取量が、B 群 (蛋白摂取指示量；1.2g/kg) のそれらに比較し、有意に低値であり、かつ食事摂取基準に達していなかったことである。これは、今後の栄養指導法に問題を残したと考えられる。2 年間の平均としての成績であるが、これらの栄養素の長期の低摂取が、通常食を摂取した場合に比べ、生体にどのような影響があるのか、今後の検討が必要であろう。この成果を今年度より開始される「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療」のプロトコール作成に是非活かすべきと考える。

食事調査よりの栄養素摂取研究は重要であるにも関わらず、方法論や解析方法 (交絡因子の関与) にも問題があり、今後の新展開が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Iino, M. Hayashi, T. Kawamura, T. Shiigai, Y. Tomino, K. Yamada, T. Kitajima, T. Ideura, A. Koyama, T. Sugisaki, H. Suzuki, S. Umehara, Y. Kawaguchi, S. Uchida, M. Kuwahara, T. Yamazaki: Renoprotective Effect of Losartan in Comparison to Amlodipine in Patien Patients (JLIGHT) Study. Hypertens Res (2004); 27:21-30

2) Y. Yamaguchi, K. Yamada, T. Suzuki, Y. Wu, K. Kita, S. Takahashi, M. Ichinose, N. Suzuki: Induction of uPA ts with Chronic Kidney Disease and Hypertension—a Report of the Japanese Losartan Therapy Intended For the Global Renal Protection in Hypertensive release in human peripheral blood lymphocytes by [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]-vasopressin (dDAVA).

Am J Physiol Endocrinol Metab (2004); 287:E970-E976

3) T. Terawaki, K. Yoshimura, T. Hasegawa, Y. Matsuyama, T. Negawa, K. Yamada, M. Matsushima, M. Nakayama: Oxidative stress is enhanced in correlation with renal Dysfunction: Examination with the redox state of albumin.

Kidney International (2004); 66:1988-1993

2.学会発表

1) 糖尿病性腎症の治療—糖尿病専門医と腎臓病専門医との連携—

山田研一

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会
2004 年 5 月 東京

2) 糖尿病性腎症における家庭血圧の測定意義と、candesartan (CA) の降圧効果に対する遺伝因子の影響に関する研究

西村元伸、山田研一、その他

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会

2004 年 5 月 東京

3) 糖尿病性腎症進展に対する CXC ケモカインの関与の可能性と臨床的意義

日暮真由美、山田研一、その他

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会
2004 年 5 月 東京

4) 1 型糖尿病膵島移植登録患者の背景および膵島移植の意義

小出信澄、山田研一、その他

第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会
2004 年 5 月 東京

5) 腎疾患ネットワークデータベースによる疫学研究

山田研一

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5 月 栃木

6) 腎移植後糖尿病 (PTDM) 発症の危険因子と糖負荷試験の有用性の検討

西村元伸、山田研一、その他

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5 月 栃木

7) 糖尿病性腎症患者の食事摂取と疾患関連因子の解析

松田利恵子、山田研一、その他

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5 月 栃木

8) ヒト細胞の NADPH oxidase mRNA 発現とアンジオテンシン II (Ang II) による影響の検討

武玉萍、山田研一、その他

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5 月 栃木

9) ヒト培養細胞の NADPH oxidase に対する糖濃度の影響

武玉萍、山田研一、その他

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5 月 栃木

10) 糖尿病性腎症進展に対する CXC ケモカインの関与の可能性と臨床的意義

日暮真由美、山田研一、その他

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5

月 栃木

11) 肥満関連因子の糖尿病性腎症 (DN) の
進展に対する影響に関する検討

小出信澄、山田研一、その他

第 47 回日本腎臓学会学術総会 2004 年 5
月 栃木

12) ヒト末梢リンパ球から、AVP・V₂受容
体依存性に放出するプロテアーゼの同定
と腎移植患者拒絶反応時の末梢リンパ球
同プロテアーゼの意義と病態への関与の
可能性について

山田研一、山口喜孝、武玉萍、鈴木敏和、
喜多和子、高橋俊二、坂本薫、田辺一成、
一瀬正治、鈴木信夫

第 5 回腎不全病態治療研究会 2004 年
11 月 東京

13) 糖尿病性腎症に対する食事蛋白制限
に伴う各栄養素の変化と臨床パラメータ
ーとの関連性

山田研一、島正之、松田利恵子、多田純
子、宮内真弓、古家大祐、永妻光義、加
藤由佳、勝又千春、羽田勝計、吉川隆一
第 16 回日本糖尿病性腎症研究会 2004
年 12 月 東京

14) 糖尿病性早期腎症に対する
candesartan(CA)の効果に影響する因子
の検討

西村元伸、山田研一、その他

第 16 回日本糖尿病性腎症研究会 2004
年 12 月 東京

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）
分担研究報告書

糖尿病性腎症患者の病期進行における血中 AGE の関連性の検討
分担研究者 富野 康日己 順天堂大学 腎臓内科教授

研究要旨 本年度は研究開始年度であり、予備的研究とプロジェクトの立案を行った。予備的研究として、糖尿病性腎症モデルマウスを用いて腎組織での advanced glycation endproducts (AGE) 産生を確認した。また、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体ブロッカー (ARB) である candesartan を用いて、AGE 抑制効果について検討した。その結果、糖尿病性腎症では腎組織で AGE 産生の亢進がみられたが、candesartan は AGE の蛋白発現低下とアルブミン尿を改善させ、糖尿病性腎症の進展を抑制する可能性が示された。今後のプロジェクトとして、ヒト糖尿病性腎症における血中 AGE を測定し、血中 AGE が糖尿病性腎症進展の早期マーカーになりうるか否かについて検討する予定である。

A. 研究目的

糖尿病性腎症は、糖尿病患者の予後決定の重要な因子であり、近年その発症・進展には advanced glycation endproducts (AGE) が関与していることが報告されている。しかし、腎症の進展と血中 AGE 値との相関については十分に検討されていない。本研究では、動物モデルにおける腎組織での AGE 産生を確認し、多くの報告で腎症進展抑制効果を認めているアンジオテンシン II タイプ 1 受容体ブロッカー (ARB) である candesartan を用いて AGE 抑制効果を確認した後、ヒト糖尿病性腎症における血中 AGE を測定し、血中 AGE が糖尿病性腎症進展の早期マーカーになりうるか否かについて検討する。

B. 研究方法

糖尿病モデルマウスである KK/Ta マウスを、(1)6 週齢より 22 週間 candesartan を 4mg/kg/day 飲水投与した早期治療群(n=6)、(2)12 週齢より 16 週間投与した後期治療群(n=6)と、(3)未治療群(n=6) の 3 群に分類した。それぞれの群に対して 28 週齢で糸球体の AGE、receptor for AGE (RAGE) の発現を免疫組織染色および RT-PCR で評価した。また、各群について尿中アルブミン/尿中クレアチニン比 (ACR) と全身血圧を測定し、血糖値は糖負荷試験で評価して比較した。

C. 研究成果

未治療の糖尿病モデルマウスでは、非糖尿病マウスと比較して ACR の有意な上昇が認められた。また、糸球体では AGE 蛋白と RAGE 蛋白の産生亢

進がみられた (図 1-3)。

ACR と全身血圧は、candesartan 投与群で有意な改善が認められたが、糖負荷試験後の血糖値には有意な差はみられなかった。28 週齢での糸球体の AGE 蛋白の発現は、candesartan 早期・後期治療群で未治療群と比較して有意な低下が認められた。RAGE 蛋白および mRNA の発現も candesartan 早期・後期治療群で未治療群と比較して有意な低下が認められた (表 1)。

D. 考察

本研究で用いた KK/Ta マウスは、その検査・組織所見から、ヒトの早期腎症 (II 期) から顕性腎症前期 (III A 期) に相当すると考えられている。今回の予備研究で、この時期から既に糸球体に AGE 蛋白と RAGE 蛋白の産生亢進がみられることが確認された。また、治療によるアルブミン尿の改善に伴って AGE および RAGE の蛋白発現低下が認められたことから、AGE が糖尿病性腎症進展の早期マーカーになりうる可能性が考えられた。近年、AGE 受容体ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いた研究から、蛋白の糖化産物である AGE や RAGE などの AGE 受容体が糖尿病性腎症の発症・進展に関係していると報告されている。しかし、ヒト糖尿病性腎症の進展と AGE の相関については十分に検討されていない。今回の予備的研究の結果をもとに今後、ヒト糖尿病性腎症の各病期における血中 AGE を測定し、腎症進行の程度と血中 AGE

値との相関をみることにより、血中 AGE が糖尿病性腎症進展の早期マーカーになりうるか否かについて検討する予定である。

E. 結論

糖尿病性腎症では腎組織で AGE および RAGE 蛋白の産生亢進がみられ、candesartan は AGE および RAGE の蛋白発現低下を伴い、アルブミン尿を改善し、糖尿病性腎症の進展を抑制する可能性が示された。また、AGE が糖尿病性腎症進展の早期マーカーになりうる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fan Q, Liao J, Kobayashi M, Yamashita M, Gu L, Gohda T, Suzuki Y, Wang LN, Horikoshi S, Tomino Y. Candesartan reduced advanced glycation end-products accumulation and diminished nitro-oxidative stress in type 2 diabetic KK/Ta mice. *Nephrol Dial Transplant* 19:3012-3020, 2004

2. 学会発表

谷本 光生、范 秋霊、王 力寧、金子 滋、伊藤 貴道、萩原 晋二、合田 朋仁、堀越 哲、富野 康日己：自然発症糖尿病モデルマウスにおける candesartan 投与による AGEs および nitro-oxidative stress 抑制効果の検討。第 16 回腎とフリーラジカル研究会 (京都) 2004 年 9 月

	未治療群 (n = 6)	早期治療群 (n = 6)	後期治療群 (n = 6)	非糖尿病マウス (n = 6)
体重 (g)	43.2 ± 1.1	44.6 ± 0.9	43.6 ± 0.8	31.0 ± 0.4
空腹時血糖 (mg/dl)	92.0 ± 9.2	107.7 ± 3.3	104.5 ± 6.4	77.7 ± 2.6
IPGTT 2時間値 (mg/dl)	390.5 ± 61.1	417.8 ± 30.2	353.6 ± 43.2	124.7 ± 11.1
平均血圧 (mmHg)	90.8 ± 3.1	83.1 ± 1.8 *	84.7 ± 1.8 *	91.6 ± 2.3
血清クレアチニン (mg/dl)	0.69 ± 0.11	0.57 ± 0.09	0.55 ± 0.16	0.48 ± 0.06

* P < 0.05 vs. 未治療群

表1

尿中アルブミン/尿中クレアチニン比 (ACR)

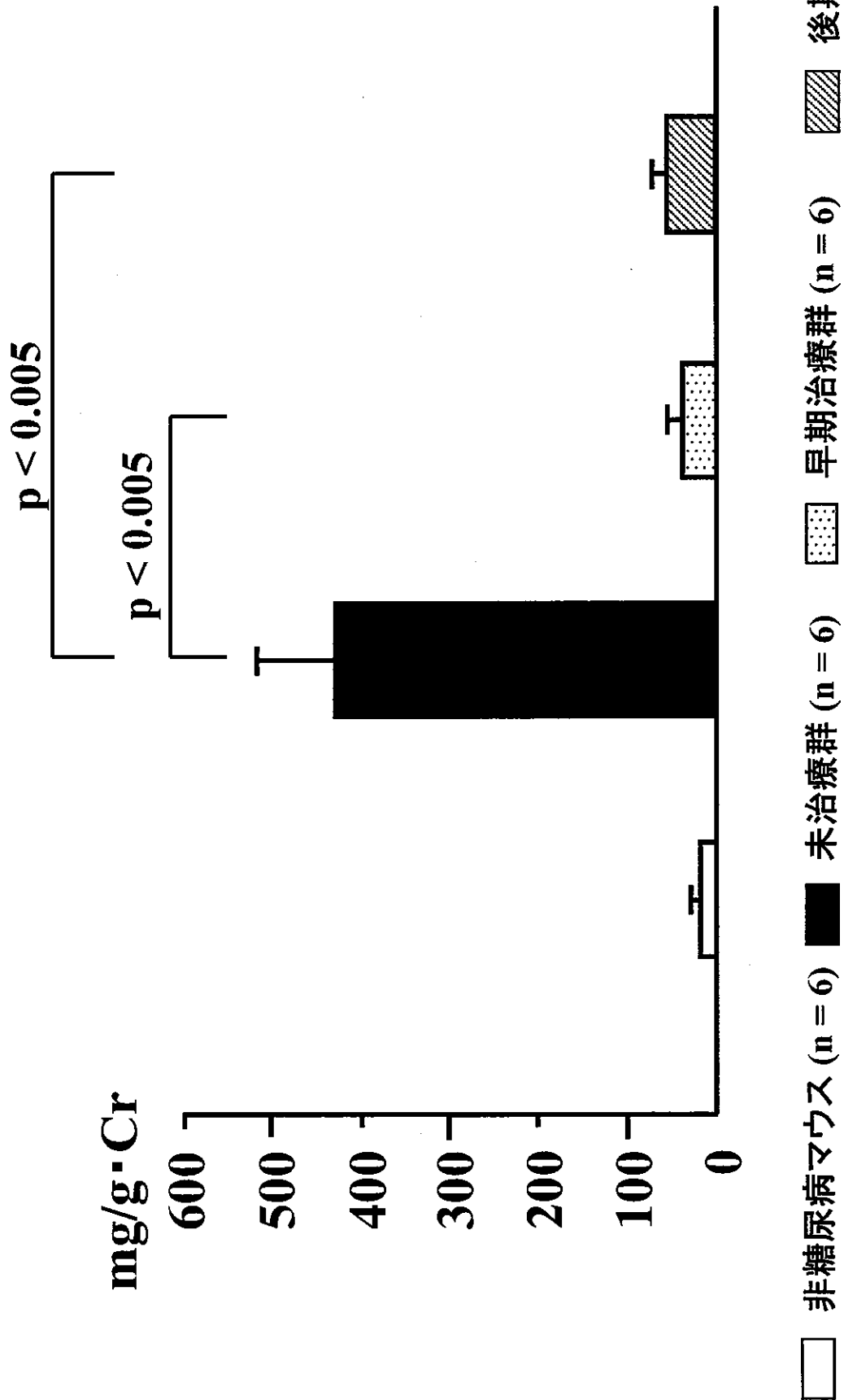
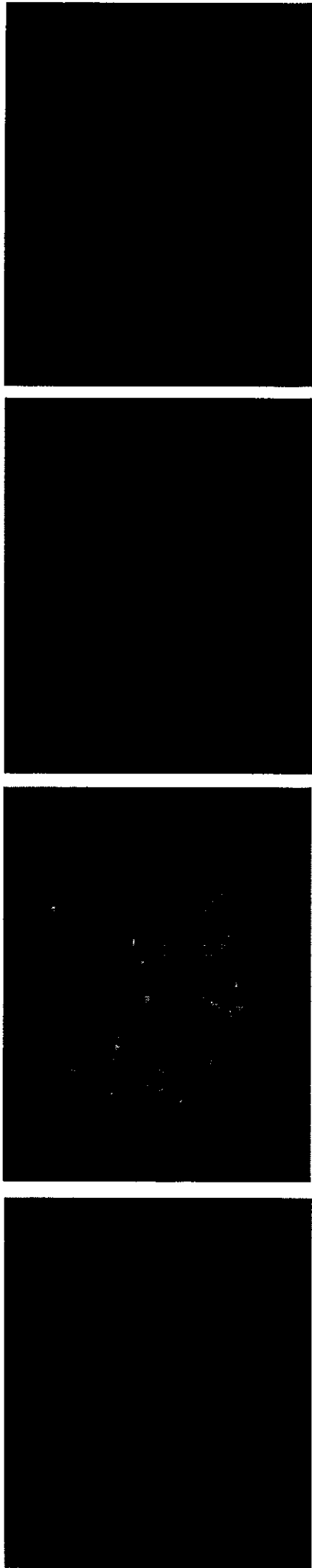


図1



非糖尿病マウス (n = 6)
 未治療群 (n = 6)
 早期治療群 (n = 6)
 後期治療群 (n = 6)

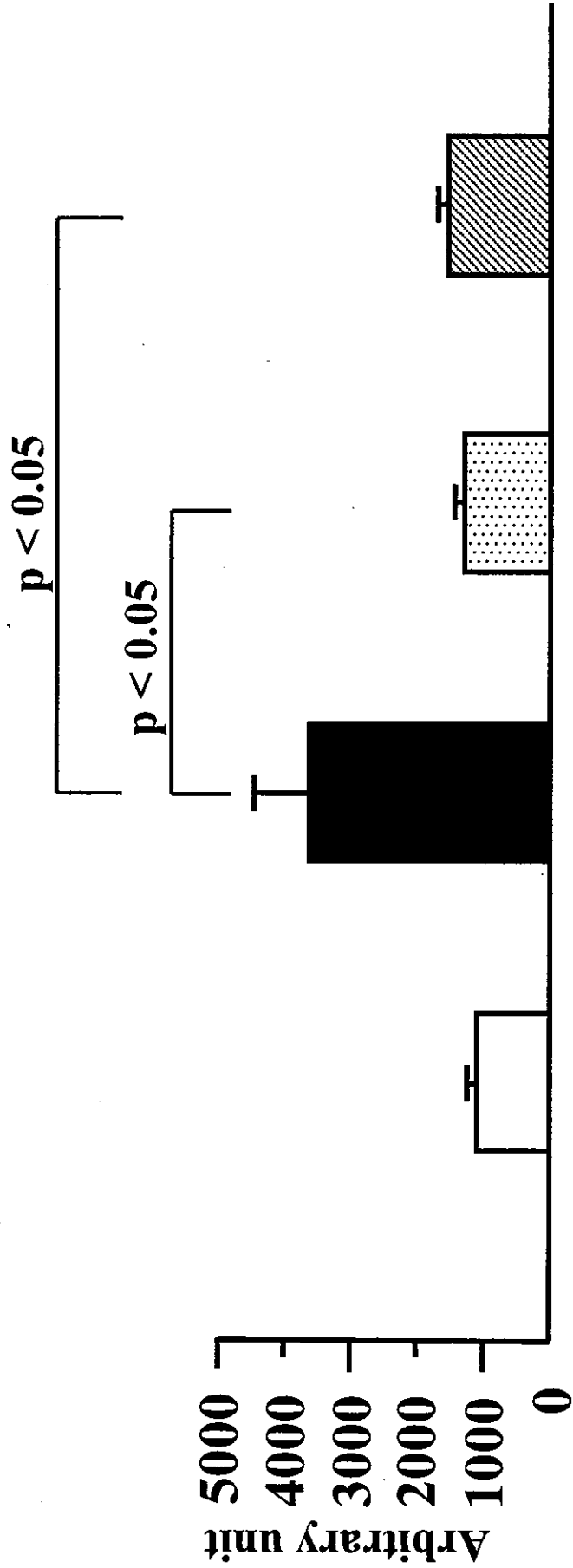


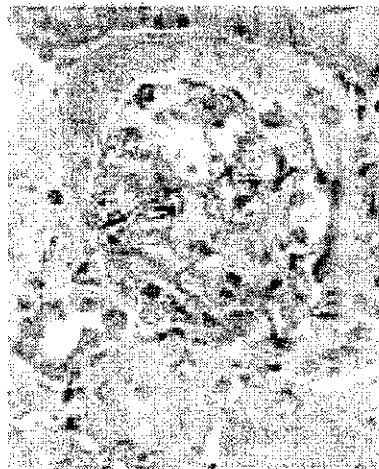
図2



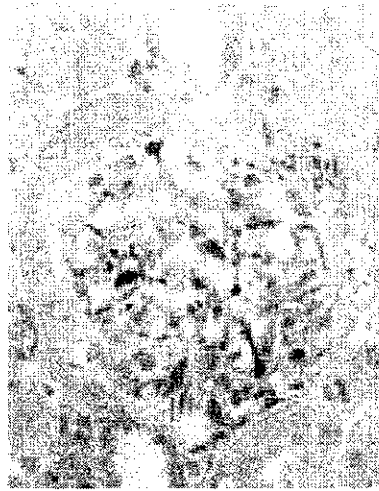
□ 非糖尿病マウス (n = 6)



■ 未治療群 (n = 6)



▤ 早期治療群 (n = 6)



▨ 後期治療群 (n = 6)



← 18 S

← RAGE

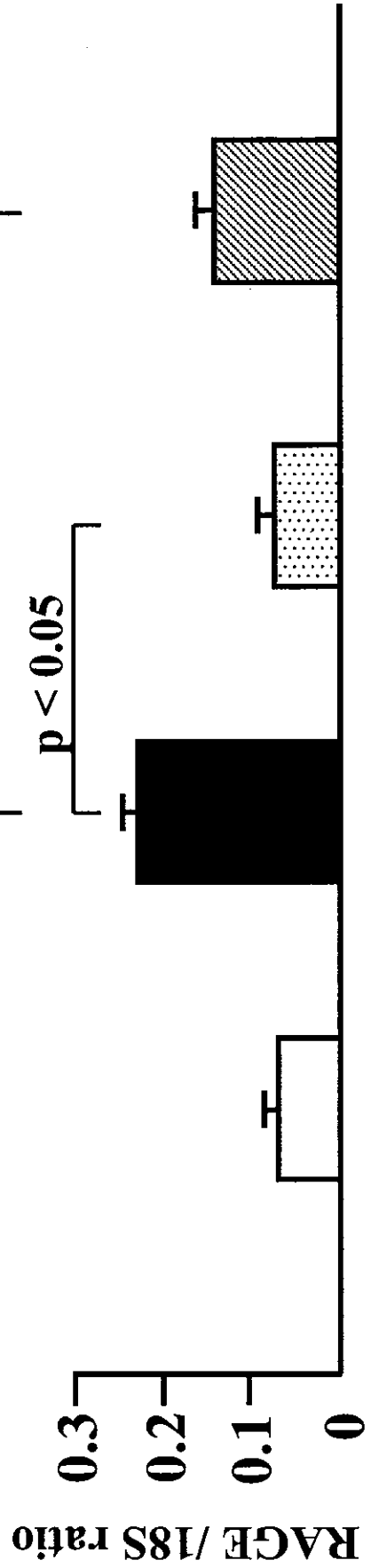


図3

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等統合研究事業）
 分担研究報告書

糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療
 研究課題：糖尿病性腎症新規マーカーのスクリーニング
 分担研究者 羽田 勝計 旭川医科大学内科学第二講座教授

研究要旨：糖尿病性腎症の診断および経過観察のための新規マーカーを同定する目的で、プロテインチップにて尿中蛋白プロファイリングを行なった。その結果、分子量 97 kDa にピークを示す蛋白が新規マーカーとなりえる可能性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病性腎症の診断および経過観察のためのマーカーとしては、現在尿アルブミン排泄量が用いられている。しかし、尿アルブミン排泄量が正常にも拘らず糸球体組織病変が進行している症例も存在することが報告されており、アルブミン以外にマーカーとして用い得る尿蛋白の同定、検査法の確立が望まれる。そこで、本研究は、糖尿病性腎症の新規マーカーとなりえる尿蛋白をスクリーニング、同定することを目的とする。更に新たに同定できたマーカーに関しては、本集約的治療に登録した症例に関しても、その経年経過を観察したい。

B. 研究方法

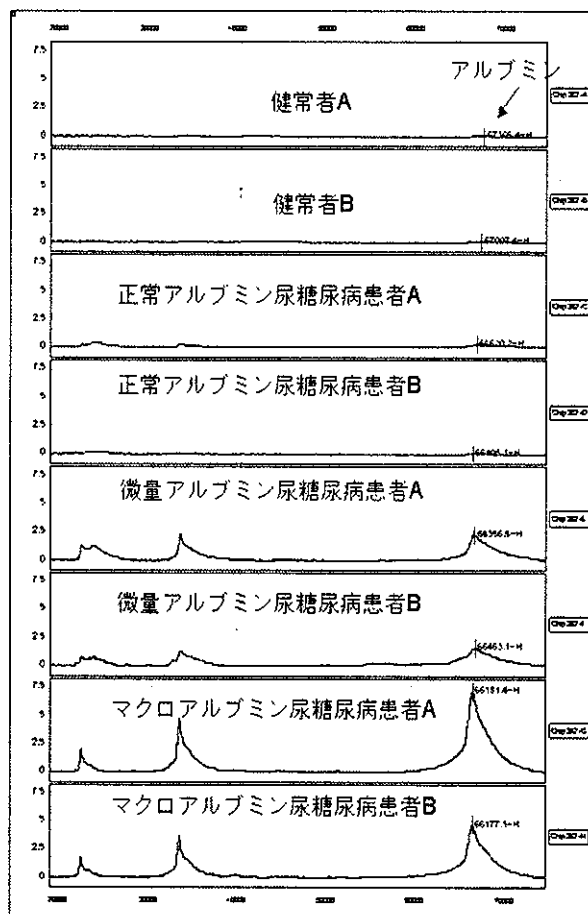
非糖尿病健常者 2 例、正常アルブミン尿 (30 mg/日以下) を呈する 2 型糖尿病患者 2 例、微量アルブミン尿 (30-300 mg/日) を呈する糖尿病患者 2 例、顕性腎症 (300 mg/日以上) を呈する糖尿病患者 2 例から採取した尿を対象として、SELDI プロテインチップ (サイファージェン社) にて尿中蛋白プロファイリングを行なった。尚、これら糖尿病患者からは、文書にて同意を取得している。

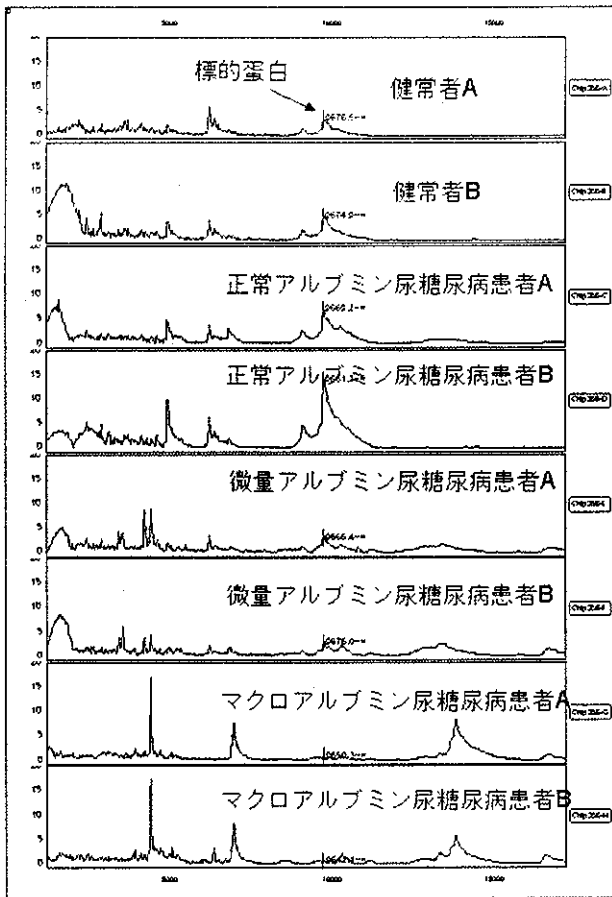
-80℃に保存した 24 時間尿サンプルを氷上にて溶解した後、4℃、7500 g 遠心を行い、その上清を実験に使用した。C16 逆相カラムに類似した H4 プロテインチップ (CIPHERGEN 社) 上に、10%アセトニトリルを含む PBS にて 3 倍希釈した尿サンプル 100 μl をチップに添加後、室温にて 30 分間静置し、10%アセトニトリルを含む PBS 10 μl にて洗浄した。その後、蒸留水にて 1 回洗浄し、0.5%TFA を含む 50%アセトニトリルに溶解した EAM 1 μl を添加しプロテインチップ装置にて解析した。尚、ミオグロビン (17.0 kDa)、GAPDH (35.7 kDa)、アルブミン (66.4 kDa)、β ガラクトシダーゼ (116.4 kDa) を混合した標準蛋白質にて装置のキャリブレーションを実験日ごとに行なった。

C. 研究結果

図 1 に示すように、分子量 66 kDa にピークを示すアルブミンは、健常者及び正常アルブミン尿期の糖尿病患者では認められなかったが、腎症の病期とともに出現、増加した。逆に、図 2 に示すように、正常者に認められた分子量 97 kDa にピークを示す蛋白は、糖尿病性腎症の病期とともに減少し、顕性腎症期にはほぼ消失していた。他にも、アルブミンと同一あるいは異なる挙動を呈するピークが認められた。

図 1.





G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

D. 考察

プロテインチップを用いた尿蛋白の解析は、糖尿病性腎症の新たなマーカーを検出するのに有用であると考えられた。分子量 97kDa にピークを示す尿中蛋白は、健常人及び顕性腎症期でない糖尿病患者群にのみ認められた結果から、①腎保護的な意義を有している、②正常状態における腎ホメオスターシスを維持している蛋白である可能性が示唆された。今後、本手法を用いたスクリーニングを繰り返すと共に、症例数を増やすことで、腎症のマーカーとしての意義がより明確になると考えられる。更に、分子量 97kDa の蛋白の同定を行う予定である。

E. 結論

糖尿病性腎症のマーカーとなりえる尿中蛋白のスクリーニングを行い、分子量 97kDa の蛋白がアルブミンとは異なる腎症のマーカーとなり得る可能性を見出した。

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等総合研究事業）

分担研究報告書

「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療」に関する研究（事務局）
糖尿病性腎症の予後予測因子としての炎症マーカーに関する研究

分担研究者 四方賢一 岡山大学医学部歯学部附属病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科講師

研究要旨：1. 「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療に関する研究」の事務局を担当した。平成16年度に計4回のプログラム検討委員会を招集してプロトコールを作成するとともに、症例を登録するための Web site のプログラムを作成した。2. 糖尿病性腎症の新しい予後予測因子としての炎症マーカーを探索するために、糖尿病患者における炎症性サイトカイン濃度を測定した。その結果、血清 IL-18 濃度が糖尿病性腎症の新しい予後予測因子となる可能性が示された。

A. 研究目的

1. 「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療に関する研究」の事務局を担当し、本研究を円滑に推進することを目的とした。
2. 糖尿病性腎症の新しい予後予測因子としての炎症マーカーを探索することを目的とした。

B. 研究方法

1. 平成16年度8月27日八重洲富士屋ホテル、10月3日パシフィコ横浜、12月4日霞ヶ関ビル33階、平成17年2月18日仙台国際センターにおいて、プロトコール検討委員会を開催して、プロトコールを作成した。
2. 2型糖尿病患者82例（腎症1期：41例、2期：31例、3期：10例）と健常者19例の血清中、尿中 IL-6 および IL-18 濃度、血清中高感度 CRP（hsCRP）を測定して比較するとともに、腎症の指標として尿中アル

ブミン濃度、動脈硬化の指標として ABI、baPWV および内頸動脈の内膜肥厚度（IMT）を測定して相関を検討した（表1）。

C. 研究結果

1. プロトコール検討委員会における検討の結果、本研究のプロトコールを完成して岡山大学医学部歯学部附属病院の倫理審査委員会（IRB）に審査を申請した。シミックアカデミックデータセンターに委託してデータ管理を行うこととし、さらに Web site 上で症例登録を行うシステムを構築した。臨床検査は、SRL で集中測定を行うこととした。また、全国で41の研究協力施設を選定した。さらに、腎症の進行に関連する遺伝子を探索するために、理化学研究所横浜研究所遺伝子多型研究センターの糖尿病性腎症関連遺伝子研究チームとの共同研究で、本研究の症例の遺伝子解析を行うことを検討している。

2. 2型糖尿病患者では、健常人に比較し

て血中 IL-18 濃度の上昇が見られた (図 1)。血清 IL-18 濃度と尿中アルブミン排泄率 (AER) との間に強い相関を認めた (図 2, 表 2)。さらに、血清 IL-18 濃度と baPWV および IMT との間にも正の相関を認めた (図 2)。さらに、血清 IL-18 高値群では 6 カ月後の AER が有意に増加したが、低値群では増加を認めなかった (図 3)。

D. 考察

1. 「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療に関する研究」を円滑に推進する体制が整ったと考えられる。今後は、定期的に全体会議を行いながら症例の登録を速やかに進めていく予定である。

2. 炎症性サイトカインである IL-18 が、動脈硬化のみならず腎症の進展を予測する鋭敏な指標となりうる可能性が示されるとともに、糖尿病性腎症の成因に微小な炎症が関与するという我々の仮説が裏付けられた。「糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療に関する研究」の症例において経時的に血清 IL-18 濃度を測定して、この結果を確認する予定である。また、これ以外の炎症に関連する指標として、MCP-1 や IP-10 などのケモカインや、ICAM-1 などの可溶性接着分子濃度を測定して、腎症との関連を検討する予定である。

E. 結論

糖尿病性腎症の寛解を目指したチーム医療による集約的治療に関する研究の事務局を担当し、プロトコールを作成して治験審査委員会に申請するとともに、研究協力施設の選定、Independent Study Monitoring Committee 委員を選任し、症例を登録するための Web site のプログラムを作成した。

糖尿病性腎症の成因に炎症が関与してお

り、IL-18 は腎症の進展を予測する鋭敏な指標になりうることが示唆された。

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし