

## 食塩摂取による腸管内アミノ酸代謝の違いが体液量調節に及ぼす影響に関する研究

谷田部 淳一, 谷田部 緑, 市原 淳弘

東京女子医科大学医学部

**概要【背景と目的】** アミノ酸代謝の個人差と生活習慣病の発症・維持機構との関連に注目が集まっている。我々はこれまでに、体内アミノ酸動態は、食塩摂取量や食塩感受性の有無に影響されうる可能性を示した。今回、ヒトとげっ歯類との間に見られる体内アミノ酸動態の違いから特にリジン代謝に重点を置き、腸内におけるアミノ酸プロファイルの違いに着目した。

**【方法】** 健常成人と Wistar-Kyoto ラット(WKY)に対して食塩負荷を行い、尿中アミノ酸排泄量と血漿中アミノ酸濃度の比較を行った。また、WKY と高血圧自然発症ラット(SHR)においては、糞便中アミノ酸濃度の検討を行った。さらに、WKY と SHR に対し、リジンの経口投与実験を行った。

**【結果】** 健常成人に対する食塩負荷は、尿中アミノ酸排泄を増加させた。一方で、血漿中 leucine, asparagine, lysine, methionine, histidine, phenylalanine, 1-methyl- histidine, tryptophan 濃度は有意に低下した。WKY ラットにおいてはヒトと同じように、食塩付加によって多くの尿中アミノ酸排泄は有意に増加した。同様に、多くの血漿中アミノ酸濃度は有意に低下した。しかし、尿中 lysine 排泄は食塩付加により約3倍に増加したにもかかわらず、血漿中 lysine 濃度は有意に約2割上昇した。また、血漿中 lysine 濃度は、SHR よりも WKY で有意に高いことが示された。その原因として、SHR ラットの糞便中 lysine 濃度に、WKY のそれよりも低い傾向があることが考えられた。経口 lysine 付加により、SHR と WKY の両者で有意な糞便中リジン濃度の上昇が見られた。Lysine 付加によって有意な血圧の変化は見られなかったが、1日尿量は lysine 付加をした SHR で有意に増加した。

**【考察】** 本研究では、血圧が正常な WKY や健常成人と比較して、高血圧を示す SHR において有意な血漿中 lysine 濃度と糞便中 lysine 濃度の低下が見られたことをはじめて示した。げっ歯類は一般に食塩抵抗性であるが、リジン代謝の違いがその一因である可能性を考える。Lysine は、5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) 受容体に作用し血圧を低下させるとの報告がある。腸管細菌叢での lysine 産生や吸収の違いが、食塩抵抗性や高血圧の有無に関与している可能性がある。

**【結論】** 過剰な食塩摂取による高血圧の発症・維持において、生体内アミノ酸調節が大きな影響を与えている可能性が示唆された。本研究を推進することにより、食塩摂取の有害作用を小さくするアミノ酸サプリメントの処方や摂取法、さらには過剰な食塩摂取に抵抗性の高い腸内細菌叢の調節法を明らかにすることができる可能性がある。

### 1. 背景

アミノ酸代謝の個人差と生活習慣病の発症・維持機構との関連に注目が集まっている。我々はこれまでに、Dahl 食塩感受性ラットの 24 時間尿中アミノ酸排泄量を検討した結果、アラニン、ヒドロキシプロリン、3-メチルヒスチジン排泄量と食塩感受性との間に有意な相関が認められるこ

とを示した(公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団, 平成 24 年度研究助成: 投稿準備中)。体内アミノ酸動態は、食塩摂取量や食塩感受性の有無に影響されうる。一方で、職域に設定されたアミノ酸コホートにおける予備的検討から、血中リジン濃度と血圧の間に有意な相関がある可能性が示唆された。今回われわれは、ヒトとげっ歯類との間に

見られる体内アミノ酸動態の違いから特にリジン代謝に重点を置き、腸内におけるアミノ酸プロファイルの違いに着目した研究を行った。

## 2. 方法

### 動物実験

8週齢の高血圧自然発症ラット(SHR)とその対照であるWistar-Kyotoラット(WKY)に対し、0.28%(通常食塩食)または4%の食塩を添加した餌(高食塩食)を8週間与えた。負荷前、負荷後3日、5日、7日時点において、代謝ケージを用い24時間塩酸蓄尿を施行した。また、糞便の採取を実施した。糞便は、PBSまたは蒸留水中で破砕し、遠心上清を0.25 μmのフィルターにてろ過した。血漿サンプルは、負荷前、負荷後7日目のラットをそれぞれペントバルビタール(50 mcg/kg)の腹腔内注射により麻酔を行い、腹腔動脈からEDTA-2Naを添加した試験管に採血した。その際、急速脱血を行うことにより苦痛なく義死せしめた。2つ目の実験として、8週齢のSHRとWKYに対し、水道水または水道水に溶解した10 g/L濃度のL-リジンの投与を4週間実施した。血圧測定、尿量測定を定期的に行い、食塩付加試験と同様にサンプル調整を実施した。血漿ア

ミノ酸濃度、糞便中アミノ酸濃度はLC/MS/MS法にて測定した。すべての実験計画は、東京女子医科大学動物実験倫理委員会の審査により承認済みである(承認番号15-156)。

### 健常者尿サンプルにおける1日食塩摂取量と血漿アミノ酸濃度の関連解析

本研究の趣旨に書面をもって同意した健常成人23名を対象とした。日常的に摂取している食事(日常食)をコントロールとし、低食塩食(3 g/day)7日間、高食塩食(20 g/day)7日間の試験食摂取を実施した。試験食は管理栄養士がメニュー作成を行い、被験者自らが調理した。それぞれの試験食摂取終了日前日より24時間蓄尿を実施した。終了日には、血圧・脈拍・体重測定、随時尿の採取と採血(血漿・血清各5 ml)を施行した。本試験の実施は、福島県立医科大学倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号:1555)。血漿アミノ酸濃度は、動物実験の場合と同様にLC/MS/MS法にて測定を行った。

## 3. 結果

健常成人に対する食塩負荷は、尿中アミノ酸排泄を増加させた(図1A)。一方で、血漿中 leucine, asparagine,

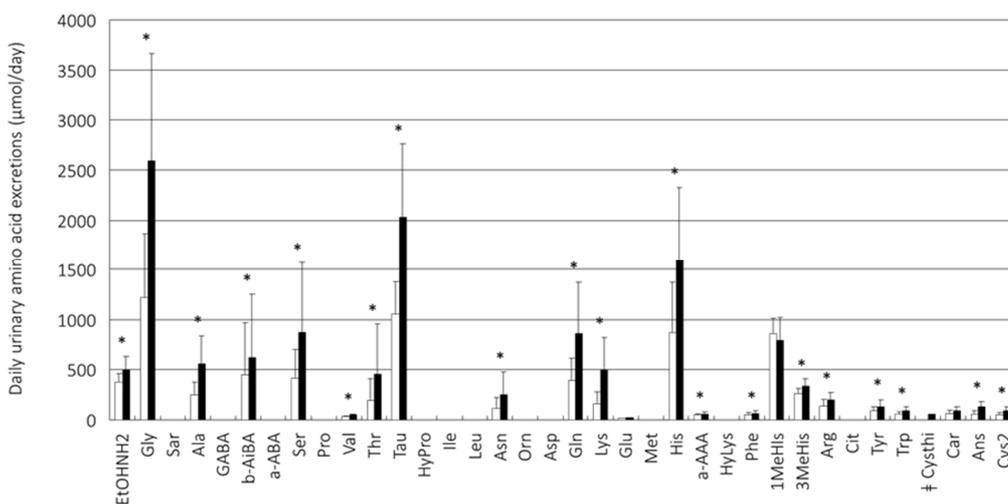


図1A. 健常成人に対する食塩負荷が尿中アミノ酸排泄に与える影響

\*P<0.05, 正常食塩食(白) vs 高食塩食(黒), n=23/group, Unpaired t-test, EtOHNH2:モノエタノールアミン, Gly:グリシン, Sar:サルコシン, Ala:アラニン, GABA:γ-アミノ酪酸, Ser:セリン, Pro:プロリン, Val:バリン, HyPro:ヒドロキシプロリン, Ile:イソロイシン, Leu:ロイシン, Asn:アスパラギン, Orn:オルニチン, Gln:グリシン, Lys:リジン, Glu:グルタミン, Met:メチオニン, Phe:フェニルアラニン, 3MeHis:3-メチルヒスチジン, Arg:アルギニン, Tyr:チロシン, Tau:タウリン, 図1において以下同様(図1BとCはn=5-7/group)

lysine, methionine, histidine, phenylalanine, 1-methyl histidine, tryptophan 濃度は有意に低下した(図 1B)。WKY ラットにおいては、ヒトと同じように、食塩付加によ

て多くの尿中アミノ酸排泄は有意に増加した(図 1C)。同様に、多くの血漿中アミノ酸濃度は有意に低下した(図 1D)。しかし興味深いことに、尿中 lysine 排泄は食塩付加

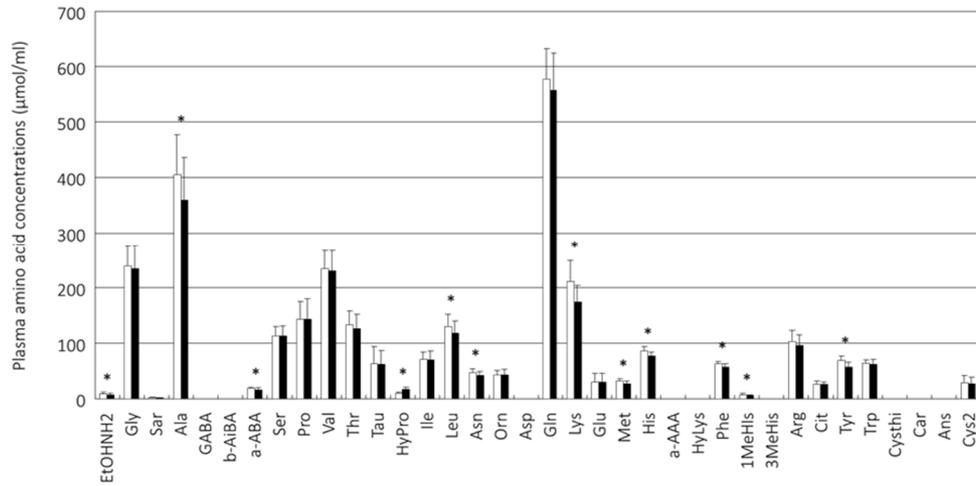


図 1B. 健常成人に対する食塩負荷が血漿中アミノ酸濃度に与える影響

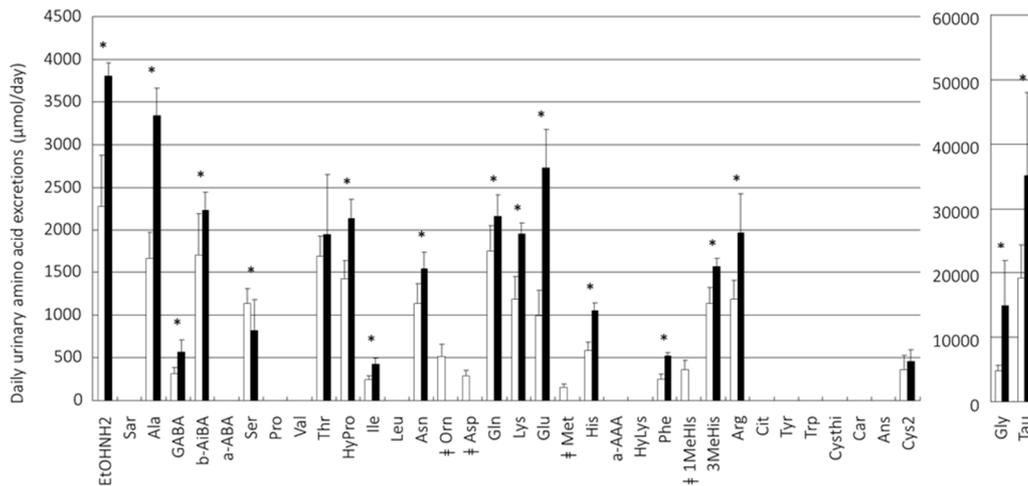


図 1C. WKY ラットに対する食塩負荷が尿中アミノ酸排泄に与える影響

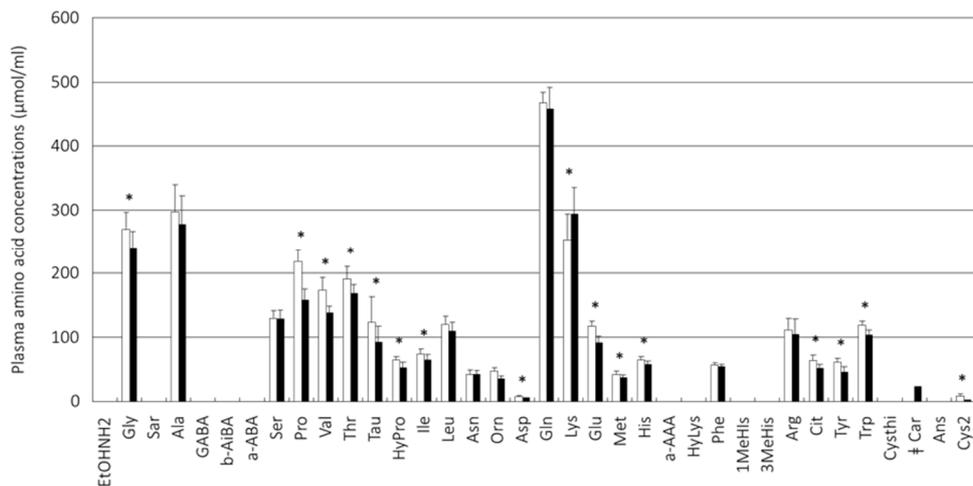


図 1D. WKY ラットに対する食塩負荷が血漿中アミノ酸濃度に与える影響

により約3倍に増加したにもかかわらず、血漿中 lysine 濃度は有意に約2割上昇した(図2)。また、血漿中 lysine 濃度は、食塩付加前において SHR よりも WKY で有意に高いことが示された(図3)。ラットにおいては尿中 lysine 排泄量が増加しているにもかかわらず血漿 lysine 濃度が上昇していることから、その機序が腎での再吸収増加によるものとは考えがたかった。また、食塩付加後の血漿アミノ酸プロフィールからは分枝鎖アミノ酸の上昇が一律には認められず、lysine 単独での上昇であることから、最大のアミノ酸プールである筋肉の分解による動員であるとも考えがたかった。すなわち、ヒトまたは WKY ラットと SHR との違いは腸管における lysine 吸収の違いである可能性を考え、糞便中の lysine 濃度測定を実施した。

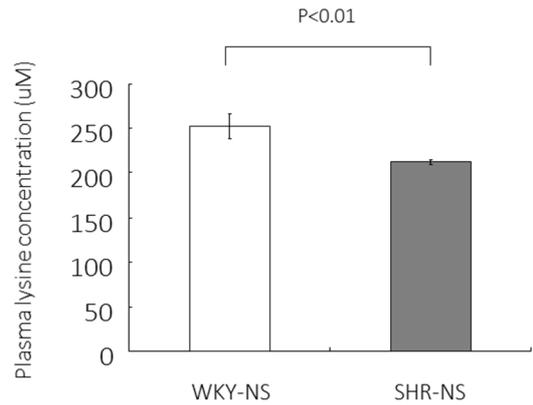


図3. 血漿中 lysine 濃度のラット種による違い, \*P<0.01, One-way ANOVA, N = 7-8 /group

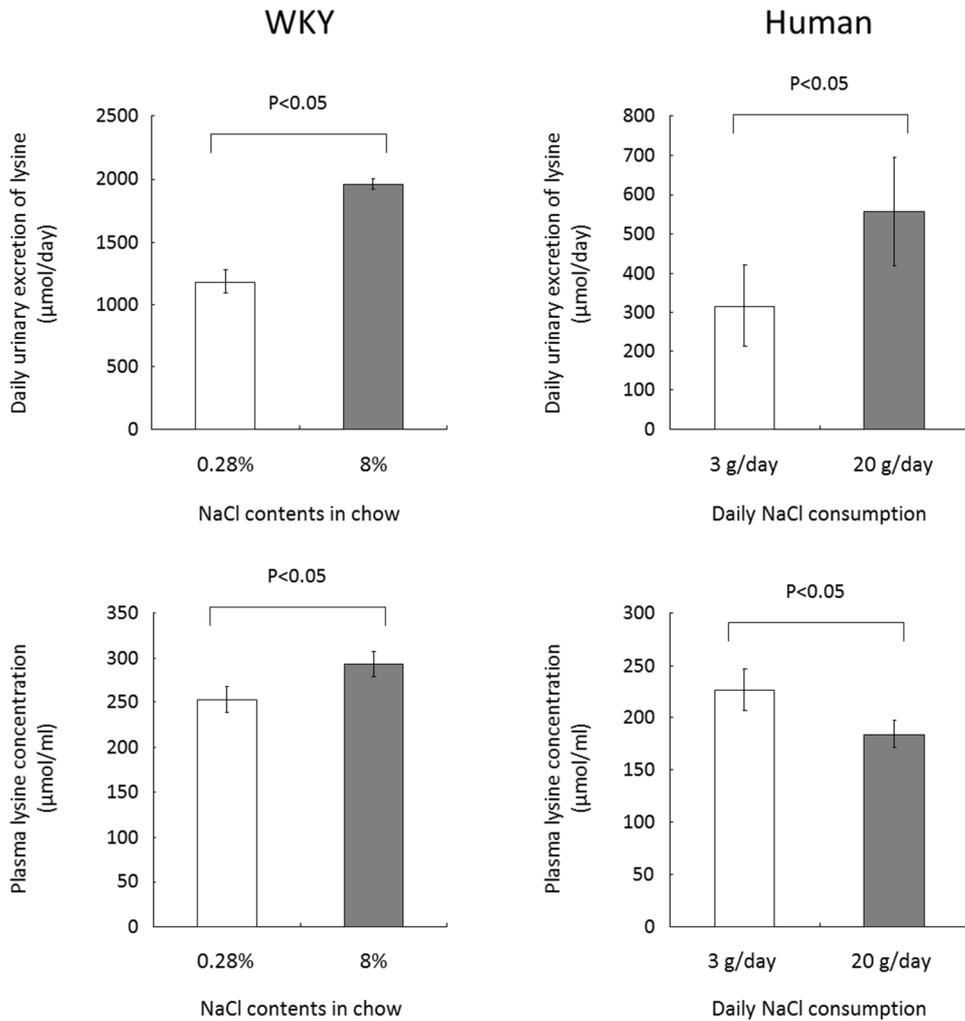


図2. 尿中 lysine 排泄と血漿中 lysine 濃度, 図 1A-D より抜粋して再掲

WKY ラットにおいて、PBS により菌体破壊を抑えた抽出法でも、水を用いた菌体破壊を促進する抽出法でも同じように、WKY の糞便中 lysine 濃度は、SHR のそれよりも高い傾向が認められた(図 4)。

次に、腸管内または糞便中 lysine 濃度の低下を補う方法として、経口 lysine 付加を実施した。SHR ではやはり

lysine 投与前で WKY よりも糞便中リジン濃度の低下が見られたが、lysine 付加によって有意な糞便中リジン濃度の上昇が見られ、そのレベルは lysine 付加前の WKY のそれに匹敵した(図 5)。Lysine 付加によって有意な血圧の変化は見られなかったが、1 日尿量は lysine 付加をした SHR で有意な上昇が見られた(図 6)。

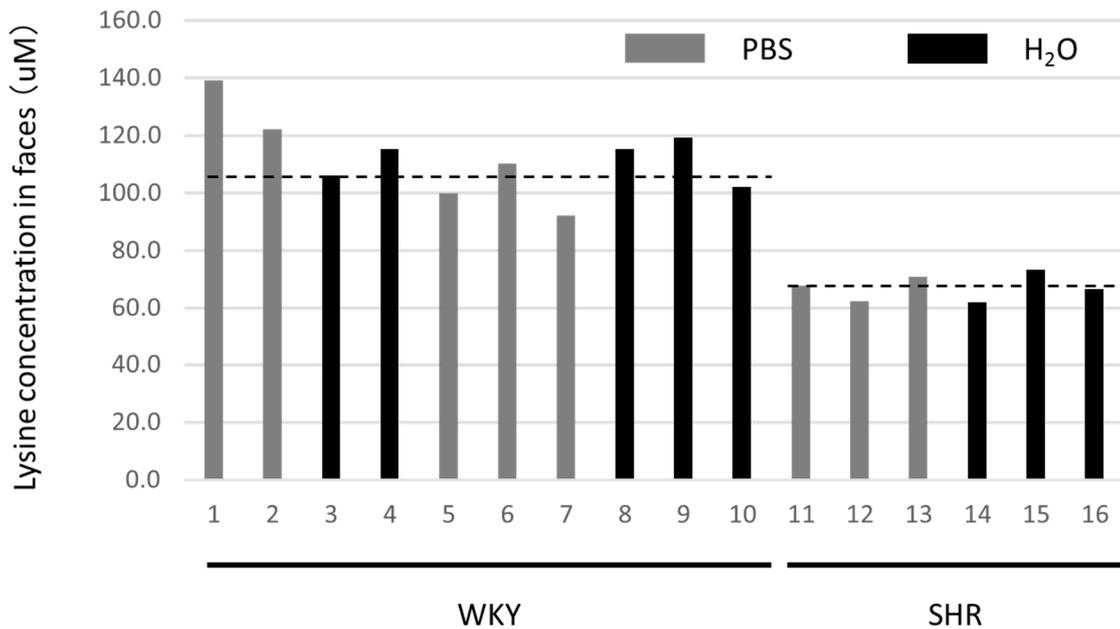


図 4. 糞便中 lysine 濃度のラット種による違い

直腸から S 状結腸までに貯留されている便を全量採取して均質化したのちに糞 0.1g に対して 1 ml の PBS または H<sub>2</sub>O にて抽出処理を行い、LC/MS/MS 法にて濃度を測定

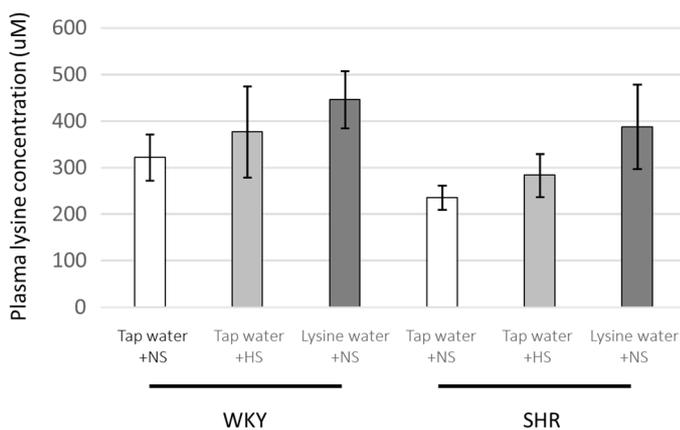


図 5. lysine 水投与後の血漿 lysine 濃度

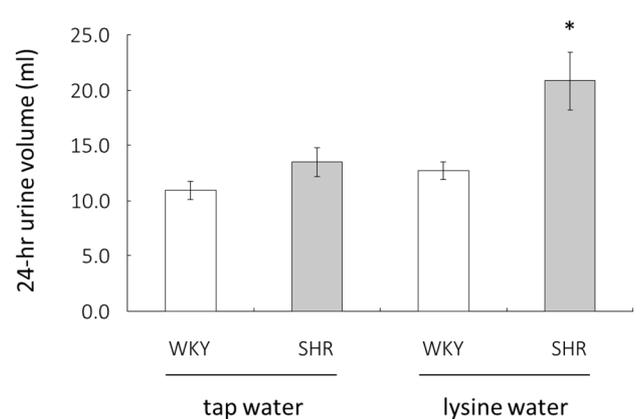


図 6. lysine 水投与後の 24 時間尿量

図 5, 6) L-lysine 10 g/L in tap water, From 8 to 12 weeks-age, (4 weeks), NS: normal salt = 0.28%, HS: high salt = 8%, \*P<0.01 vs others, One-way ANOVA, N = 3-8 /group

#### 4. 考 察

近年、アミノ酸代謝と生活習慣病の関連に関する報告数が増加傾向にある。血中 tryptophan の低下は、心血管病 (CVD) の発症と関連する<sup>(1)</sup>。また血漿 L-arginine 濃度は脂質異常症を含む主要な CVD の危険因子と関連する<sup>(2)</sup>。そのほか、glutamate<sup>(3)</sup>, glycine<sup>(4)</sup>, taurine<sup>(5)</sup>などのアミノ酸代謝と高血圧との関連が示唆されている。本研究の結果は、食塩負荷が生体内のアミノ酸代謝をダイナミックに変化させうることを示しており、食塩の過剰摂取は高血圧や CVD の病態生理に大きく影響する可能性が示唆されるものと考えられる。

本研究では、血圧が正常な WKY や健常ヒトと比較して、高血圧を示す SHR において有意な血漿 lysine 濃度の低下が見られたことをはじめ示した。げっ歯類は一般に食塩抵抗性であるが、リジン代謝の違いがその一因である可能性を考える。リジンは、5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) 受容体に作用するとの報告があり<sup>(6)</sup>、5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介してはアゴニストとして、5-HT<sub>4</sub> などの受容体を介しては部分的アンタゴニストとして血圧低下作用を示す可能性がある<sup>(7)</sup>。一方、リジンの代表的代謝物の中にはピペコリン酸が含まれる。我々のグループでは別の研究テーマとして、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) による降圧機序の解明に取り組んでいる<sup>(8)</sup>。GABA は GABA<sub>A</sub> 受容体と GABA<sub>B</sub> 受容体に作用して降圧効果を示すと考えられているが、ピペコリン酸は GABA 受容体のアゴニストとして働くとの報告がある。ラットで食塩負荷時に増加したリジンは上記に示すようなセロトニン受容体を介する機序のほか、代謝を受けてピペコリン酸として GABA 受容体を介するメカニズムで抗高血圧、食塩抵抗作用を発揮している可能性がある。ラットにおいて食塩負荷後に血漿リジン濃度の上昇とともに血漿ピペコリン酸が増加しているかどうかを今後検討する必要があり、血漿中ピペコリン酸の測定系構築に取り組んでいる。

本研究ではまた、WKY において、食塩付加によって血中に lysine が動員される機序は腸管内におけるアミノ酸代謝の違いである可能性を示した。L-lysine はヒトにおいて体内で合成できない必須アミノ酸であるが、腸内細菌叢を形成する一部の微生物は lysine を産生し、その産生効率はナトリウム濃度に影響される。どの微生物が生体の腸管内で lysine 産生をつかさどっているかは今後検討が必要

である。

最後に、本研究で計画した腸管におけるアミノ酸吸収が食塩付加によりどのような影響を受けるかなど、リジンやリジン代謝物による抗高血圧、食塩抵抗作用の分子生物学的機序を明らかにする取り組みは不十分であった。今後、引き続き詳細な検討を進めていく必要がある。

結論として、過剰な食塩摂取による高血圧の発症・維持において、生体内アミノ酸調節が大きな影響を与えていると考えられる。本研究を推進することにより、食塩摂取の有害作用を小さくするアミノ酸サプリメントの処方や摂取法、さらには過剰な食塩摂取に抵抗性の高い腸内細菌叢の調節法を明らかにすることができる可能性がある。

#### 謝 辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成 27 年度研究助成によって実施された。臨床試験の実施にあたり、23 名の福島県立医科大学医学部学生ボランティアの協力を得た。

#### 参考文献

- 1 Mangge H, Stelzer I, Reininghaus EZ, Weghuber D, Postolache TT, Fuchs D. Disturbed tryptophan metabolism in cardiovascular disease. *Curr Med Chem.* 2014 Jun; 21 (17):1931-7.
- 2 Jeserich M, Münzel T, Just H, Drexler H. Reduced plasma L-arginine in hypercholesterolaemia. *Lancet.* 1992 Feb 29; 339 (8792):561.
- 3 Stamler J, Brown IJ, Daviglus ML, Chan Q, Kesteloot H, Ueshima H, Zhao L, Elliott P; INTERMAP Research Group. Glutamic acid, the main dietary amino acid, and blood pressure: the INTERMAP Study (International Collaborative Study of Macronutrients, Micronutrients and Blood Pressure). *Circulation.* 2009 Jul 21; 120 (3):221-8.
- 4 Stamler JI, Brown IJ, Daviglus ML, Chan Q, Miura K, Okuda N, Ueshima H, Zhao L, Elliott P. Dietary glycine and blood pressure: the International Study on Macro/Micronutrients and Blood Pressure. *Am J Clin Nutr.* 2013 Jul; 98 (1):136-45.
- 5 Fujita T, Ando K, Noda H, Ito Y, Sato Y. Effects of

- increased adrenomedullary activity and taurine in young patients with borderline hypertension. *Circulation*. 1987 Mar; 75 (3):525-32.
- 6 Smriga M, and Torii K. L-Lysine acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100 (26):15370-5.
- 7 Ramage AG, and Villalon CM. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends in pharmacological sciences*. 2008; 29 (9):472-81.
- 8 Takano K, Yatabe MS, Abe A, Suzuki Y, Sanada H, Watanabe T, Kimura J, Yatabe J. Characteristic expressions of GABA receptors and GABA producing/transporting molecules in rat kidney. *PLoS One*. 2014 Sep 4;9(9):e105835

## The Role of Systemic and Gut Amino Acid Metabolism under Excessive Salt Intake to Control Fluid Balance and Kidney Function

Junichi Yatabe, Midori Yatabe, Astuhiro Ichihara

Tokyo Women's Medical University

### Summary

**Background:** Plasma amino acid analysis is starting to be applied for pathophysiological examinations. However, the effects of dietary salt intake on amino acid patterns in urine, plasma or feces and its species differences have not been assessed.

**Methods:** Urine, plasma and fecal amino acids were measured in Wistar-Kyoto rats (WKY), spontaneously hypertensive rats (SHR) and human subjects. Rats were fed normal-salt (NS: 0.3% NaCl) or high-salt (HS: 8% NaCl) chow for 7 days. In a clinical study, 23 healthy volunteers were placed on low-salt (LS: 3 g NaCl /day) then high-salt (HS: 20 g NaCl /day) diet for 7 days each. Oral lysine supplementation test (10 g/L in tap water for 4 weeks) was also performed in rats. Amino acid and metabolite concentrations were measured by LC/MS/MS.

**Results:** Salt loading increased the urinary excretion of most amino acids. In humans, urinary lysine concentration and excretion increased 1.9 and 3.1 folds respectively (both  $P < 0.01$ ) with HS, but its plasma lysine concentration decreased by 18% ( $P < 0.01$ ). In WKY, urinary lysine excretion increased while on HS diet, but its plasma concentration increased by 17% ( $P < 0.01$ ). Basal plasma lysine concentration of WKY was significantly higher than that of SHR. Fecal lysine concentration in SHR tended to be lower than that of SHR. Oral lysine administration to WKY and SHR increased fecal lysine concentration and increased urine volume in SHR without significant change in blood pressure.

**Discussion:** This study revealed for the first time that hypertensive and salt-sensitive strain, SHR, show lower plasma and fecal lysine concentrations compared to its normotensive control, WKY. The increase in plasma lysine in rats in contrast to its decrease in humans may contribute to the relative salt-resistance of rats compared to humans. Since lysine is reported to act on serotonin receptors to lower blood pressure, and some gut bacteria can synthesize lysine, differences in the production and absorption of lysine in the gut may contribute to the development of salt-sensitivity and hypertension.

**Conclusions:** Salt intake affects urine amino acid excretions in rats and human subjects. Lysine dynamics was different between WKY and human subjects, and plasma lysine concentration seem to be inversely related to blood pressure in rats. Further clinical studies are necessary to explore the diagnostic and therapeutic possibility of lysine in the future.