

〔研究ノート〕

# 慢性腎臓病モデルラットの骨密度維持に対する 食餌アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物 投与の有効性評価に関する基礎的研究

間野琴子・宮内智美・春宮 覚・海老沢秀道

A Basic Study of the Efficacy Assessments of the Dietary L-Arginine and  
Soy Isoflavone Extracted on the Maintenance of Bone Mineral Density in  
Chronic Kidney Disease (CKD) Model Rats

Kotoko MANO, Tomomi MIYAUCHI,  
Satoru HARUMIYA and Hidemichi EBISAWA

The present study was carried out to determine whether dietary isoflavone and arginine could preserve the renal function and prevent renal injury and bone mineral density loss in the chronic kidney disease model rat.

We orally administered 360 mg/kg BW of adenine suspended in methylcellulose to ten-week-old male Wistar rats for six days to generate a chronic kidney disease (CKD) model. As a control, methylcellulose alone was administered to another group of rats (Intact).

The rats received 15 g/day of either the control diet (group CA) or the experimental diet supplemented with isoflavone (group IF) or L-Arginine (group Arg) or isoflavone plus L-Arginine simultaneously (group IFA) for 10 weeks.

Group CA still showed the symptoms of chronic kidney disease, such as renal swelling, a decreased CCr, elevated BUN and increased urinary NAG activity compared to the Intact rats that had not received adenine treatment.

The results were as follows: Compared with group CA, 1) Group IF showed a higher femoral cancellous-BMD, but no improvement in the renal function estimated by the CCr and BUN or the renal injury levels estimated by the urinary protein excretion and urinary NAG activity. 2) Group Arg showed a higher CCr, lower BUN and lower urinary protein excretion; however, the femoral cancellous-BMD did not increase. 3) Group IFA showed a lower urinary protein excretion level and urinary NAG activity and higher femoral cancellous-BMD.

These results suggest that isoflavone and arginine are effective dietary agents for suppressing renal failure and maintaining the BMD in a rat model of chronic kidney disease.

*Key words:* chronic kidney disease model rat (慢性腎臓病モデルラット), isoflavone extracted (イソフラボン抽出物), L-Arginine (アルギニン), renal function (腎機能), bone mineral density (骨密度)

## 目 的

腎臓は体液の恒常性維持に関わる臓器で、カルシウム、リンを含めた電解質の血中レベルを維持している。また、ビタミンDの活性化も行っている<sup>1)</sup>。そのため慢性腎不全状態に陥ってこれらの機能が慢性的に低下すると、血液中電解質異常とともに骨代謝異常も現れ、骨密度の低下をも引き起こす。慢性腎不全に由来する骨代謝異常を Renal osteodystrophy (ROD, 腎性骨異常栄養症), 全身的なミネラル代謝異常を Chronic kidney disease-Mineral and bone disorder (CKD-MBD) とよび、慢性腎不全患者が増加し続けている我が国における重要な疾患となっている。腎性骨異常栄養症の治療あるいは抑制のためには、腎臓病が重症化する前の病態進行抑制による腎機能維持・回復とともに骨吸収抑制による骨密度低下阻止のための方策が有効である。しかし、腎臓病発症時における腎機能の維持および骨代謝正常化を目的とした食事条件については、ほとんど研究されていない。

イソフラボンは、豆類に多く含まれている抗酸化活性を示すポリフェノールである。大豆に高濃度に含有されているダイゼインやゲニステインは弱いエストロゲン活性を持っており<sup>2)</sup>、閉経後女性<sup>3)</sup>および卵巣摘出ラットの骨密度低下抑制<sup>4), 5)</sup>に有効なことが繰り返し確認されている。一方腎障害との関係では、脂質異常症<sup>6)</sup>あるいは糖尿病ラットの腎障害を抑制するとの報告があり<sup>7)</sup>、腎臓病に対する食餌イソフラボンの有効性が示唆されている。

アルギニンはタンパク質合成に利用される他、成長ホルモンの分泌誘導、創傷治癒促進、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の基質となって一酸化窒素 (NO) 合成促進など多くの生理機能を有している<sup>8)</sup>。NO は血管の拡張作用を持ち、腎臓における循環調節に大きな役割を持っている。腎傷害と NO の関係については充分研究されており、腎不全ではアルギニンからの NO 産生が低下すること<sup>9)</sup>および NO の基質としてのアルギニン投与は糸球体内血圧を低下して腎障害の進展を抑制することなどが報告されてい

る<sup>10)</sup>。また骨代謝との関係でも、エストロゲン受容体の骨代謝調節機能は NO を介していることおよびニトログリセリンのような NO 供与体が骨形成を促進することが知られている<sup>11)</sup>。

本研究は、慢性腎臓病患者の骨密度低下抑制のための食事条件を明らかにすることを目的として、慢性腎臓病モデルラットの腎障害抑制および骨密度改善に対する食餌イソフラボン抽出物およびアルギニンの併用投与の有効性評価を試みた。

## 実験方法

### 慢性腎臓病モデルラットの作成

アデニン経口投与により慢性腎臓病モデルラットを作成できることが報告されている<sup>12)</sup>。アデニン誘導性慢性腎臓病モデルラットは、尿細管機能低下によるリン、カルシウム排泄促進およびその他の腎不全病態像を示し、また骨代謝異常も発症する。その一方で、障害の程度にもよるが、アデニン投与の中止によって成長速度、腎重量、血清尿素窒素濃度 (BUN) の回復も可能である<sup>12)</sup>。そこで本研究におけるアデニン投与量は、他研究者の報告値および予備実験での体重減少の程度や死亡率などを考慮し、体重 1 kg 当たり 360 mg と決定した。投与方法は、2% メチルセルロース水溶液にアデニン結晶を懸濁し、ゾンデを用いて 1 日 1 回、6 日間胃内投与した。

これらの他に、アデニンの代わりに 2% メチルセルロースのみ胃内投与する条件を設け、アデニン投与条件に対する対照 (Intact 群) とした。

### 実験動物

実験動物は、10 週齢のウィスター系雄ラットを用いた。10 日間の馴化後 5 群に分けた。このうち 4 群には、上記「慢性腎臓病モデルラットの作成」で述べたとおり、アデニンを 360 mg/kg BW 胃内投与し、残り 1 群にはアデニンを投与しなかった。アデニン投与期間中は 20% カゼインタンパク質食 (20CA) を、アデニン投与期間後は、下記に示した実験食を投与した。

Table 1. Compositions of experimental diet

Ingredients	Intact/CA	IF	Arg	IFA
Isoflavone extracted	0.0	2.0	0.0	2.0
L-Arginine	0.0	0.0	12.0	12.0
Casein	220.0	220.0	220.0	220.0
$\alpha$ -Corn starch	406.7	405.3	398.7	397.3
Sucrose	203.3	202.7	199.3	198.7
Cellulose powder	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture	50.0	50.0	50.0	50.0
Vitamin mixture	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0
Total amounts (g)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

Isoflavone content of the isoflavone extracted (soyafllavone HG): 50%

### 実験食と飼育条件

実験食としてコントロール食（20% カゼインタンパク質食，20CA，CA 群，n=6），0.10% イソフラボン抽出物（IF）添加食（20CA+0.10% IF 抽出物，IF 群，n=6），1.0% アルギニン（Arg）添加食（20CA+1.0% Arg，Arg 群，n=6）あるいはイソフラボン抽出物とアルギニン併用食（20CA+0.10% IF+1.0% Arg，IFA 群，n=5）を作成し，1 日 15 g の制限条件で 10 週間投与した。

本研究で用いたコントロール食は，AIN76 の組成を基本に，食餌制限が多用される老化研究のために考案されたもので，1 日当たり 10 g の制限条件でもビタミンおよびミネラルの必要量は満たしている。またこのコントロール食を生生涯にわたって投与したとき，ラットは十分な成長および平均的な生存日数を示すことを繰り返し確認している。

水は，水道水を自由に与えた。ラットの体重は，1 回／週の頻度で測定した。食べ残した実験食は後日乾燥重量を測定し，残食量を計算した。実験食の組成を Table 1. に示した。

### 採 尿

実験食期終了前に代謝ケージを用いて 72 時間尿を採集し，クレアチニン，総タンパク質などの測定に用いた。屠殺前日に新鮮尿を採集し，NAG 活性およびクレアチニンの測定に用いた。

### 屠殺条件

実験食期終了後，ペントバルビタール腹腔内投与によりラットを麻酔し，採血屠殺した。

### 測定項目

本研究では，腎障害の程度，腎機能および骨代謝を評価するため，以下の測定項目を設けた。

腎障害の程度を評価する項目として，腎重量および腎臓の外観，尿中タンパク質排泄量と尿中 N-acetyl D-glucosaminidase（NAG）活性を測定した。腎機能を評価する項目として血清クレアチニン濃度，血清尿素窒素濃度（BUN），クレアチニークリアランス（CCr）を測定した。骨代謝を評価する項目として，大腿骨骨密度および構造解析を行った。

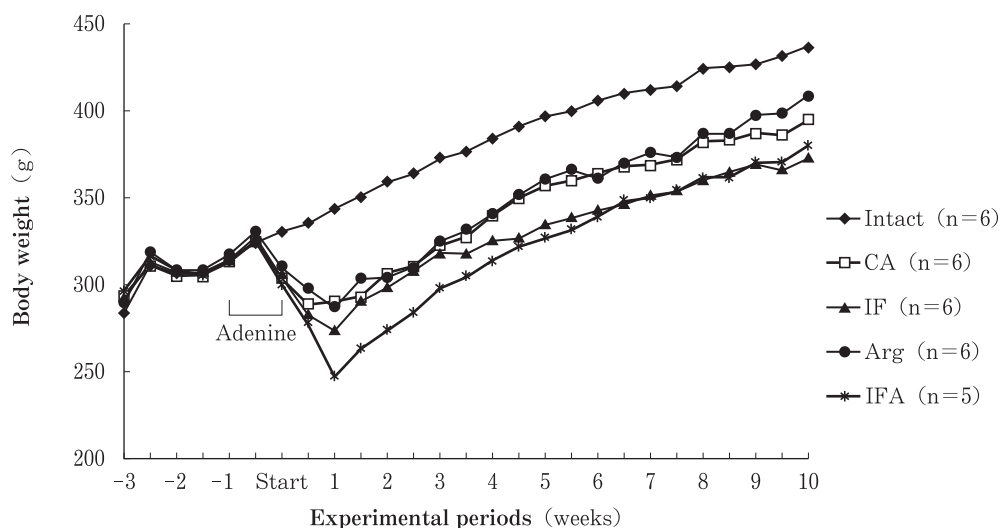
### 統計処理

測定値は，平均値±標準偏差として表記した。

CA 群，IF 群，Arg 群および IFA 群間の有意差検定は，一元配置分散分析後，Student の t-検定を用いて行った。p<0.05 を有意差ありと判定した。Intact 群と CA 群間の有意差検定は Student の t-検定により行った。

### 本実験の審査および許可

本研究は，昭和女子大学動物実験委員会の審査を経て実施された（第 11-01 号，2011 年 5 月 16 日承認）。



**Figure 1. Changes in body weight**

During the adenine period, rats received 360 mg/kg BW of adenine intragastrically for 6 days.

After the adenine period, rats received an experimental diet for 10 weeks.

As a result of the adenine treatment, the body weight of the rats decreased.

The body weight of the rats recovered and increased during the experimental diet period.

## 結果と考察

### 摂食量と体重変化

6日間のアデニン投与によって、全てのラットの食餌摂取量は減少した。実験期間の平均摂食量はCA群、IF群、Arg群およびIFA群でそれぞれ $1169 \pm 15$  g,  $1118 \pm 14$  g,  $1191 \pm 10$  g および  $1101 \pm 13$  g だった。摂食量は、いずれの群の間にも、有意差は示されなかった。Intact群の摂食量は $1202 \pm 9$  g だった。

ラットの平均体重は、アデニン投与によって減少した。すなわちアデニン投与開始時の328 g からCA群、IF群、Arg群およびIFA群でそれぞれ36.1 g, 45.0 g, 32.8 g および 51.6 g 減少した。アデニン投与期間終了後体重は回復した。すなわち、アデニン投与終了時に比べて、10週間の実験食期終了時の体重はCA群、IF群、Arg群およびIFA群でそれぞれ97.2 g, 82.9 g, 100.5 g および 93.4 g 増加していた (Figure 1.)。

一方、アデニン非投与条件でCA群と同じ実験食を摂取したIntact群は、実験期間を通して、摂食量の低下や体重の減少は観察されず、正常な成長を示した。

### 臓器重量

実験食期終了後、ラットを屠殺して腎重量を測定した。腎臓およびその他の臓器重量を Table 2. に示した。

コントロール群 (CA群) の腎重量は、アデニン投与を行わなかったIntact群に比べておよそ2倍の明らかな高値を示した。また、色調はIntact群が茶褐色だったのに対してCA群の腎臓は黄褐色を呈し、明らかな虚血状態が認められた。さらに、腎髄質部の縮小と皮質部の肥厚もみられた。このように、本研究条件では、ほかの類似研究同様<sup>13)</sup>に、アデニン胃内投与によって明らかな腎障害状態が観察された。

CA群の腎重量および外観・色調と比べてIF群、Arg群、IFA群のそれらはいずれも明らかな相違を示さず、食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加はこれら異常所見を正常化しなかった。

肝臓および心臓重量は、CA群とIntact群の間に有意差を示さず、アデニン投与によるこれら臓器の肥大あるいは萎縮は認められなかった。またCA群に比べてIF群、Arg群あるいはIFA群のこれら臓器重量は有意差を示さず、食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加は肝臓および心臓

Table 2. Effects of dietary isoflavone extracted and L-Arginine on organ weight in CKD model rats

Group	n	Liver	Kidney <sup>1</sup>	Heart
			g/kg BW	
CA	6	29.4±2.5 <sup>a</sup>	5.9±1.0 <sup>a</sup>	3.2±0.2 <sup>a</sup>
IF	6	31.3±2.9 <sup>a</sup>	6.3±0.6 <sup>a</sup>	3.0±0.2 <sup>a</sup>
Arg	6	25.4±1.7 <sup>a</sup>	5.5±0.4 <sup>a</sup>	3.0±0.1 <sup>a</sup>
IFA	5	29.4±1.0 <sup>a</sup>	5.7±0.6 <sup>a</sup>	3.1±0.4 <sup>a</sup>
Intact	6	31.6±2.2 <sup>ns</sup>	3.0±0.1 <sup>*</sup>	3.3±0.4 <sup>ns</sup>

\*: Significant differences between group CA and group Intact at  $p < 0.05$ .

ns: No significant differences between group CA and group Intact.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, IF, Arg and IFA at  $p < 0.05$ .

1: Right kidney.

重量に影響しなかった。

以上のように、アデニン投与によって腎臓は明らかな腫大および形態的な影響を受けたが、食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加による有意な改善は観察されなかった。また、肝臓および心臓重量は全てのラットで正常範囲の値を維持し、アデニン投与の有無および食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加の影響は観察されなかった。

## 血液分析

血液分析の結果を Table 3. に示した。

血清総タンパク質、アルブミン、カルシウム、総コレステロールおよびトリグリセリド濃度は Intact 群を含めて全ての群で正常範囲の値を示した。肝機能障害の代表的な指標である血清 GOT および GPT 活性を測定した。GOT および GPT 活性は全てのラットで正常範囲の値を示し、本研究条件におけるアデニン投与あるいは食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加は肝障害を引き起こさなかった。

イソフラボンは HMG-CoA 還元酵素の特異的阻害剤である<sup>13)</sup>。血清総コレステロール濃度は、CA 群に比べて IF 群で有意な低値を示し、本研究のような腎臓病モデルラットにおいても、イソフラボン抽出物による血清コレステロール低下作用が確認された。

## 腎機能と腎障害の程度評価

腎臓の血液濾過機能を評価するためにクレアチニンクリアランス (CCr) および血清尿素窒素濃度 (BUN) を測定した。また、腎障害の程度を評価するために尿中タンパク質排泄量および尿中 N-acetyl D-glucosaminidase (NAG) 活性をそれぞれ測定した。

## 血液濾過機能

クレアチニンクリアランスおよび BUN の結果を Table 4. に示した。

正常な腎臓を持っている Intact 群の CCr および BUN は、それぞれ 0.934 ml/min および 16.7 mg/100 ml の正常値を示した。これに対して、アデニンを投与した CA 群の CCr と BUN はそれぞれ 0.396 ml/min の異常低値および 43.1 mg/100 ml の異常高値を示した。このようにアデニン投与によって血液濾過機能は 50% 程度に障害され、本研究におけるラットは軽度の慢性腎臓病状態を呈していた。一方、Arg 群の CCr 値は CA 群より有意な高値を示し、食餌へのアルギニン添加は血液濾過機能を高める結果が得られた。しかし、CA 群に比べて IF 群および IFA 群の CCr 値は有意な高値を示さず、イソフラボン抽出物は単独およびアルギニンとの併用のいずれにおいても、血液濾過機能を高めなかった。

以上のように、食餌へのアルギニン添加は糸球体濾過機能を高める結果をもたらし、慢性腎臓病発症

Table 3. Effects of dietary isoflavone extracted and L-Arginine on blood analyses in CKD model rats

Group	n	TP	ALB	GOT	GPT
		g/100 ml	g/100 ml	U	U
CA	6	8.3±1.1 <sup>a</sup>	4.0±0.1 <sup>a</sup>	60±19 <sup>a</sup>	18±6 <sup>a</sup>
IF	6	8.3±0.7 <sup>a</sup>	4.0±0.3 <sup>a</sup>	56±23 <sup>a</sup>	17±6 <sup>a</sup>
Arg	6	7.4±0.4 <sup>a</sup>	3.9±0.2 <sup>a</sup>	60±10 <sup>a</sup>	15±2 <sup>a</sup>
IFA	5	7.8±0.2 <sup>a</sup>	4.3±0.2 <sup>a</sup>	60±24 <sup>a</sup>	21±8 <sup>a</sup>
Intact	6	8.2±0.7 <sup>ns</sup>	4.3±0.2 <sup>ns</sup>	90±34 <sup>*</sup>	23±11 <sup>a</sup>

Group	n	Calcium	T-chol	TG
		mg/100 ml	mg/100 ml	mg/100 ml
CA	6	10.6±0.4 <sup>a</sup>	107±8 <sup>a</sup>	92±45 <sup>a</sup>
IF	6	10.8±0.3 <sup>a</sup>	80±15 <sup>b</sup>	96±25 <sup>a</sup>
Arg	6	10.4±0.2 <sup>a</sup>	103±16 <sup>a</sup>	69±12 <sup>a</sup>
IFA	5	10.7±0.5 <sup>a</sup>	93±22 <sup>ab</sup>	73±8 <sup>a</sup>
Intact	6	10.3±0.4 <sup>ns</sup>	84±13 <sup>*</sup>	116±43 <sup>ns</sup>

\*: Significant differences between group CA and group Intact at p<0.05.

ns: No significant differences between group CA and group Intact.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, IF, Arg and IFA at p<0.05.

TP: Total protein. ALB: Albumin. T-chol: Total cholesterol. TG: Triglyceride.

Table 4. Effects of dietary isoflavone extracted and L-Arginine on renal function in CKD model rats

Group	n	S-Creat	U-Creat	CCr	BUN
		mg/100 ml	mg/day	ml/min	mg/100 ml
CA	6	1.54±0.19 <sup>a</sup>	8.6±1.8 <sup>a</sup>	0.396±0.111 <sup>a</sup>	43.1±7.4 <sup>a</sup>
IF	6	1.44±0.29 <sup>a</sup>	8.7±1.2 <sup>a</sup>	0.433±0.110 <sup>a</sup>	38.1±13.8 <sup>ab</sup>
Arg	6	1.48±0.11 <sup>a</sup>	11.6±1.3 <sup>b</sup>	0.551±0.100 <sup>b</sup>	33.2±4.2 <sup>b</sup>
IFA	5	1.71±0.33 <sup>a</sup>	10.0±1.1 <sup>ab</sup>	0.427±0.138 <sup>a</sup>	49.4±9.2 <sup>a</sup>
Intact	6	1.01±0.17 <sup>*</sup>	13.3±0.8 <sup>*</sup>	0.934±0.163 <sup>*</sup>	16.7±1.4 <sup>*</sup>

\*: Significant differences between group CA and group Intact at p<0.05.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, IF, Arg and IFA at p<0.05.

S-Creat: Serum creatinine concentration. U-Creat: Urinary creatinine excretion.

CCr: Creatinine clearance, calculated from urinary and serum creatinine. BUN: Blood urea-nitrogen.



Table 5. Effects of dietary isoflavone extracted and L-Arginine on improvement of glomerular and proximal tubule injuries in CKD model rats

Group	n	NAG	U-Prot
		U/g Creat	mg/day
CA	6	27.0±6.3 <sup>a</sup>	25.9±6.6 <sup>ab</sup>
IF	6	24.9±4.5 <sup>ab</sup>	33.9±6.8 <sup>b</sup>
Arg	6	20.5±4.3 <sup>ab</sup>	17.4±3.6 <sup>c</sup>
IFA	5	20.4±2.4 <sup>b</sup>	24.0±6.8 <sup>ac</sup>
Intact	6	18.1±4.8 <sup>*</sup>	22.1±3.1 <sup>ns</sup>

\*: Significant differences between group CA and group Intact at  $p < 0.05$ .

ns: No significant differences between group CA and group Intact.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, IF, Arg and IFA at  $p < 0.05$ .

NAG: N-acetyl D-glucosaminidase activity expressed as Unit per one gram of urinary creatinine.

U-Prot: Urinary protein excretion.

時における腎機能低下をアルギニンが抑制する可能性が示された<sup>9), 10)</sup>。しかし、イソフラボン抽出物は、このような糸球体濾過機能改善効果を示さなかった。

#### 糸球体および尿細管障害

尿中タンパク質排泄量および尿中 NAG 活性の結果を Table 5. に示した。

糸球体毛細血管のサイズバリアシステムあるいは糸球体基底膜の陰性荷電が失われると糸球体の血清タンパク質に対する透過性が亢進し、尿中タンパク質排泄量は増加する。すなわち、糸球体傷害によって尿中タンパク質排泄量は増加する。一方 NAG は近位尿細管からの逸脱酵素としての臨床的意義を持っており、近位尿細管傷害により尿中 NAG 活性は上昇する。

尿中 NAG 活性は Intact 群に比べて CA 群で有意な高値を示し、アデニン投与によって腎尿細管傷害が促進されることが確認された。CA 群の NAG 活性に比べて Arg 群および IF 群はいずれも低値傾向を示し、両者を併用した IFA 群では有意な低値となった。以上のように、食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加は慢性腎臓病における尿細管傷害を抑制する結果が得られた。

尿中タンパク質排泄量は、CA 群と Intact 群の間に有意差は観察されなかった。CA 群に比べて

Arg 群の尿中タンパク質排泄量は 67% 低値を示した。しかし、CA 群と IF 群あるいは IFA 群の間に有意差は観察されなかった。

以上のように、CA 群に比べて Arg 群は近位尿細管および腎糸球体傷害を抑制し、慢性腎臓病発症時において食餌アルギニンは、腎傷害の抑制および腎機能維持に有効な可能性が示唆された。この作用機序は不明だが、アルギニンは一酸化窒素合成酵素 (NOS) の基質であることおよび糸球体輸入動脈内皮細胞に NOS が発現していることなどを考え合わせると、NO による糸球体輸入動脈拡張によって血液濾過機能が亢進した可能性が考えられる<sup>10)</sup>。一方、近位尿細管傷害の抑制と食餌アルギニンの関係については、腎臓への血液流入の増加による尿細管への栄養素供給増加および成長ホルモン分泌誘導による修復代謝の亢進などいくつか想像されるが、本研究ではこれらを評価していないため、全く不明である。

#### 大腿骨骨密度

慢性腎臓病では、病態の進行に伴った電解質異常や骨代謝異常を発症することがある<sup>14)</sup>。腎性骨異常栄養症は、慢性腎不全に伴って発症する骨障害で、リン、カルシウムなどの電解質異常やビタミン D 活性化障害などにより骨密度低下や骨折リスク増大

Table 6. Effects of dietary isoflavone extracted and L-Arginine on femoral bone mineral density and micro-architecture in CKD model rats

Group	n	Cortical-BMD	Cancellous-BMD	Polar moment of inertia
		mg/cm <sup>3</sup>	mg/cm <sup>3</sup>	
CA	6	1124±23 <sup>a</sup>	392±29 <sup>a</sup>	4.50±0.49 <sup>a</sup>
IF	6	1139±5 <sup>a</sup>	430±16 <sup>b</sup>	4.71±0.42 <sup>a</sup>
Arg	6	1131±15 <sup>a</sup>	392±9 <sup>ac</sup>	4.69±0.38 <sup>a</sup>
IFA	5	1127±6 <sup>a</sup>	433±20 <sup>b</sup>	4.69±0.42 <sup>a</sup>
Intact	6	1158±9 <sup>ns</sup>	384±10 <sup>ns</sup>	4.93±0.48 <sup>ns</sup>

\*: Significant differences between group CA and group Intact at p<0.05.

ns: No significant differences between group CA and group Intact.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, IF, Arg and IFA at p<0.05.

BMD: Bone mineral density.

などを引き起こす。エックス線 CT を用いてラット大腿骨の骨密度測定および構造解析を行い、その結果を Table 6. に示した。

皮質骨骨密度および海綿骨骨密度は、Intact 群と CA 群の間に有意差が認められず、本研究ではアデニン投与による大腿骨骨密度の低下は観察されなかった。この理由は、腎障害の程度が軽度で骨密度に影響しなかった可能性および実験食期間中に骨代謝が回復して骨密度が正常化した可能性等様々推測できるが、現時点では不明である。骨の細胞の代謝状態を評価する必要がある、今後の課題である。

海綿骨骨密度は、CA 群に比べて IF 群および IFA 群は有意な高値を示し、食餌へのイソフラボン抽出物添加は慢性腎臓病モデルラットの海綿骨骨密度に対して増加的に作用する可能性が示された。一方、Arg 群の骨密度は、CA 群のそれとほとんど同値を示し、予想に反して有意な高値を示さなかった<sup>11)</sup>。この理由は不明であるが、本研究で用いたアルギニン添加量はこれまでの我々の研究において腎障害を抑制しうる量として設定されたものである。本研究のこの結果は、腎障害抑制に適したアルギニン添加量と骨密度維持に適したアルギニン添加量とは異なることを示しているのかもしれない。重要な研究課題である。

皮質骨骨密度は、本研究条件では、アデニン投与の有無および食餌へのイソフラボン抽出物あるいは

アルギニン添加の有無による有意な影響を受けなかった。

#### 骨構造解析

骨の折れにくさあるいは強さは、骨構造および骨タンパク質によって極めて大きな影響を受け、骨密度だけからでは評価できない。そこで骨の捻り強度を示す指標である二次極モーメントを測定した。

全体的な数値の傾向として、Intact 群に比べて CA 群ではおよそ 10% 低値傾向を示した。CA 群に比べて IF 群、Arg 群および IFA 群は 4% 高値傾向を示した。しかし、いずれも大きな個体差のため有意とはならず、骨構造に対する食餌へのイソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加の利効果は確認されなかった。

#### まとめ

本研究は、食餌イソフラボンおよびアルギニンが慢性腎臓病モデルラットの腎障害を抑制して骨密度を改善するか否かを確かめることを目的に、実施された。

1) ウィスター系雄ラットにアデニンを 360 mg/kg、6 日間連続で経口投与して慢性腎臓病モデルラットを作成した。これらのラットに 20% カゼインタンパク質食 (Control, 20CA)、イソフラボン抽出物添加食、アルギニン添加食あるいはイソフラボン



抽出物とアルギニンを同時に添加した実験食のいずれかを与えた。実験食は、1日15g、10週間、ラットに投与した。コントロール食を摂取したラットは、腎臓の腫大、CCr低下、BUN上昇およびNAG活性上昇など、慢性腎臓病状態を示した。2) 食餌へのイソフラボン抽出物添加は、腎機能および腎障害は改善しなかったが、大腿骨海綿骨骨密度は増加した。3) 食餌へのアルギニン添加によって、CCrの上昇、BUNの低下、尿中タンパク質排泄量の低下が観察され、腎機能および糸球体障害は改善された。しかし、大腿骨骨密度は増加しなかった。4) 食餌へのイソフラボン抽出物およびアルギニンの同時添加は、腎障害を改善し、大腿骨海綿骨骨密度を増加した。

以上のように、食餌へのイソフラボン抽出物およびアルギニン同時添加は、慢性腎臓病モデルラットの腎障害抑制および骨密度維持に有効な結果が示された。

#### 参考文献

- (1) 大地陸男: 生理学テキスト第5版: 文光堂(東京), 2007年.
- (2) Miksicek RJ: Estrogenic flavonoids.: structural requirements for biological activity.: *PSEBM*, 208; 44-50, 1995.
- (3) Taku K, Melby MK, Kurzer MS, Mizuno S, Watanabe S and Ishimi Y: Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women.: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.: *Bone*, 47; 413-423, Epub 2010.
- (4) Yamaguchi M: Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis.: *Yakugaku Zasshi*, 126; 1117-1137, 2006.
- (5) 海老沢秀道, 不破眞佐子, 白石貴子: 骨の構造変化に対する大豆イソフラボン抽出物投与の影響: 学苑生活科学紀要, 770; 15-20, 2004.
- (6) 酒見隆信, 池田裕次, 富吉義幸, 植杉岳彦: 自然発症高脂血症ラットの腎障害進展に及ぼす大豆たん白質と大豆たん白質アルコール抽出物(SPE)の影響: 大豆たん白質研究, 5; 76-80, 2002.
- (7) Teixeira SR, Tappenden KA, Carson L, Jones R, Prabhudesai M, Marshall WP and Erdman JW Jr.: Isolated soy protein consumption reduces urinary albumin excretion and improves the serum lipid profile in men with type 2 diabetes mellitus and nephropathy.: *J Nutr*, 134; 1874-1880, 2004.
- (8) 岸恭一・木戸康博編: タンパク質・アミノ酸の新栄養学: 講談社サイエンティフィク(東京), 2007年.
- (9) Baylis C: Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease.: *Am J Physiol Renal Physiol*, 294; F1-F9, 2008.
- (10) Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB and Thomson SC: The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration.: *Kidney Int*, 61; 782-785, 2002.
- (11) Wimalawansa SJ: Nitric oxide and bone.: *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1192; 391-403, 2010.
- (12) Story DL, Shrader RE, Theriault LL, Lumijarvi DL, Shenoy TS, Savaiano DA, Shaffer RH, Ho CY and Clifford AJ: Effects of dietary protein, adenine, and allopurinol on growth and metabolism of rats.: *J. Nutr*, 107; 1044-1052, 1977.
- (13) Sung JH, Lee SJ, Park KH and Moon TW: Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro.: *Biosci Biotechnol Biochem*, 68; 428-432, 2004.
- (14) 塚本雄介: 腎性骨異常栄養症からCKD-MBDへその疾患概念一: *Clinical Calcium*, 19; 479-484, 2009.

(まの ことこ 大学院生活機構研究科  
生活科学研究専攻生)  
(みやうち ともみ 健康デザイン学科)  
(はるみや さとる 東京医科歯科大学大学院  
医歯学総合研究科)  
(えびさわ ひでみち 管理栄養学科)