

高リン食投与がラットの腎臓カルシウム, マグネシウム量及び腎機能に及ぼす影響

岸本三香子, 倉本 周子, 川口真規子
松浦 寿喜, 市川 富夫

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Effects of a high phosphorus diet on calcium, magnesium contents in kidney and kidney function in rats

Mikako Kishimoto, Chikako Kuramoto, Makiko Kawaguchi
Toshiki Matsuura and Tomio Ichikawa

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Womens University, Nishinomiya 663, Japan*

We studied the alteration of kidney function with increased kidney contents of calcium and magnesium in rats fed a high-phosphorus diet. Five-week-old male SD rats were used. The rats were fed a diet with either a control (0.3%) or a high (1.5%) level of phosphorus for 21 days. Body weight gain and food intake were depressed, and kidney calcium and magnesium concentrations increased in rats fed a 1.5% phosphorus diet. The concentrations of magnesium and phosphorus in plasma decreased in rats fed a 1.5% phosphorus diet, but the concentration of calcium was not changed. As indicators of kidney function, plasma urea nitrogen concentration was higher and plasma uric acid concentration was lower than those of rats fed a control diet. TBARS in the kidney tissue of a high phosphorus diet rats was lower than that of rats fed a control diet. DHA was significantly low in fed a high phosphorus diet. These facts with high calcium and magnesium contents in kidney may have relation to reduction of kidney function.

緒言

リン(P)は大多数の食品に豊富に含まれ, 摂取不足を生じることはまずあり得ない. しかしカルシウム(Ca)との摂取比率が重要であり, Ca/Pの比が1~2の範囲にあることが望ましいとされている. 近年私たちの食生活は多様化し加工食品の摂取割合が著しく増加している. これら加工食品には種々の

目的で各種P酸塩が添加されている. 適切な量のCaの摂取が困難である現状では, Pの過剰摂取がいつそう懸念される. ラットを用いた高P食投与実験では, それがCa代謝に影響を及ぼし, 腎石灰化を起こすことがよく知られている¹⁻³⁾. しかし, 腎石灰化の発症メカニズムについては明らかにされていない. また, 腎臓の機能低下を引き起こすことも知られているが, 両者の関係は十分に明らかにさ

れていない。本実験では、ラットに高P食を与え、ラットの各臓器重量、ならびにCa, マグネシウム(Mg)含量, 腎機能への影響を検討し, さらに腎臓の過酸化脂質量と脂肪酸組成との関連を調べた。

実験方法

1. 飼育飼料

実験飼料組成をTable 1に示した。標準飼料はCa:0.5%, P:0.3%, 高P食はCa:0.5%, P:1.5%とした。Pの調整にはリン酸2水素カリウムを用いた。飼料の原料はオリエンタル酵母(株)から購入した。

Table 1. Composition of experimental diet.

(g/100 g diet)

	Control	Hi-P
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0
Sucrose	48.25	42.98
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose	5.0	5.0
Vitamin mix ¹⁾	0.8	0.8
Choline chloride	0.2	0.2
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
CaCO ₃	1.25	1.25
KH ₂ PO ₄	0.7	5.97
Ca (%)	0.5	0.5
P (%)	0.3	1.5

Prepared according to AIN-76 prescription.

¹⁾AIN-76

²⁾AIN-76

2. 実験動物の飼育

4週令SD系雄ラットを日本クレア(株)より購入し, 個別ゲージにて, 室温23±1℃, 湿度55±7%, 12時間ごとの明暗サイクル(8:00am~8:00pm, 8:00pm~8:00am)の環境下で飼育した。標準飼料で1週間予備飼育した後, 各飼料で3週間飼育した。試験期間中の飼料, およびイオン交換水は自由摂取とした。試験期間中の体重は1週間に1度, 飼料摂取量は2~3日に1度測定した。ラットは各群それぞれ12匹用いた。

飼育終了日にネブタール麻酔下のラット腹部大

動脈よりヘパリン処理した注射器で採血して脱血後, 肝臓, 腎臓, 心臓, 肺を摘出した。血漿および各臓器は測定に使用するまで-30℃で冷凍保存した。

実験項目のうち, 腎臓重量(Table 4), 臓器ミネラル含量(Table 5), および過酸化脂質量(Table 6)の測定は, 別に6匹を同様に同期飼育したものを使用した。

3. 血漿Ca, Mg, P濃度および各臓器中Ca, Mg含量の測定

血漿CaはカルシウムC-テストワコー, MgはマグネシウムB-テストワコー, PはホスファC-テストワコー(いずれも和光純薬工業(株))を使用した。臓器の測定では, 各臓器の一定量を550℃の電気炉で15時間灰化し, 1N塩酸で抽出したものを試料とし, Ca含量, Mg含量は原子吸光度法⁴⁾で測定した。カルシウム測定用Ca標準溶液およびマグネシウム測定用Mg標準溶液は, いずれも和光純薬工業(株)市販特級を用いた。

4. 各臓器の過酸化脂質量の測定

各臓器にそれぞれ9倍量の1.15%KCl溶液を加えホモジナイズし, チオバルビツール酸法⁵⁾により過酸化脂質量を測定し, 過酸化脂質量は生成したマロンジアルデヒド(MDA)当量で示した。タンパク量はLowry法⁶⁾により, 標準物質にはウシ血清アルブミンを用いた。

5. 腎脂肪酸分析

Kates法⁷⁾により脂質を抽出し, 塩酸メタノール法でメチルエステル化⁸⁾した後, ガスクロマトグラフ(GC)法により脂肪酸を定量した。GC装置は, キャピラリーカラムHR-SS-10 0.25mm×50m(信和加工(株)製)を装着したGC-14B(島津製作所(株))を用いた。分析温度は, カラム槽温度150~220℃(3℃/min), 気化室温度, 検出器温度とも250℃とした。キャリアガスは窒素, 検出器はFIDとした。標準物質としてMIX ME-37(フナコ社製), DHA(SIGMA社製)を用いた。

6. 腎機能指標の測定

血漿クレアチニン量, 尿素窒素量, 尿酸脱水素酵素量, 尿酸量は, ドライケム法(富士ドライケム5500, 富士フイルム(株))により測定した。

7. 統計解析

表中の数値はすべて平均±標準偏差を示した。有意差の検定は比較すべき数値の等分散性をF-検定により検定後, t-検定により行った。危険率は5%以下を有意とした。

実験結果

1. 動物の成長

Table 2. Body weight gain, food intake and food efficiency.

n=12	Control	Hi-P
Body weight		
Initial (g)	145.1±5.5	145.0±5.0
Final (g)	308.0±21.6	279.4±26.5
Weight gain (g)	162.9±17.7	134.4±22.9
Food intake		
g/d	22.0±1.7	19.1±2.7
g/21d	461.7±35.5	400.7±56.7
Food efficiency		
Body weight gain / food intake	0.35±0.02	0.33±0.02*

Data expressed as mean±SD

* Statistically significant at the P<0.05 level when compared with control.

Table 3. Various organs' weights.

n=12	Control	Hi-P
Kidney	0.78±0.10	1.38±0.34**
Liver	3.18±0.63	3.11±0.20
Heart	0.34±0.03	0.34±0.02
Lung	0.41±0.04	0.40±0.03

Date expressed as mean(g/100g body weight)±SD

** Statistically significant at the P<0.01 level when compared with control.

Table 4. Weight and water contents in kidney.

n=6	Control	Hi-P
Wet weight	2.31±0.18	3.34±0.64**
Dry weight	0.60±0.03	0.80±0.10**
Water	1.72±0.16	2.54±0.54**

Data expressed as mean(g)±SD

** Statistically significant at the P<0.01 level when compared with control.

Table 5. Ca, Mg contents of various organs and concentrations of Ca, Mg, P in plasma.

Ca content		
n=6	Control	Hi-P
Kidney a	0.11±0.07	12.1±5.3**
Liver	42.4±10.3	38.8±5.9
Heart	53.8±5.1	62.7±10.0
Lung	104.0±5.9	113.6±15.6
plasma b	9.30±0.36	8.92±0.61

Mg content		
n=6	Control	Hi-P
Kidney	249.8±16.7	569.3±169.6**
Liver	261.0±0.63	272.5±27.6
Heart	242.5±10.9	267.8±12.8**
Lung	164.6±5.4	170.2±8.2
plasma b	1.67±0.14	1.31±0.16**

P content		
	Control	Hi-P
plasma b	7.08±0.57	5.21±0.54**

Date expressed as mean(µg/g wet tissue)±SD

a Date expressed as mean(mg/g wet tissue)±SD

b Date expressed as mean(mg/dl)±SD, n=12

** Statistically significant at the P<0.01 level when compared with control.

Table 6. TBARS of various organs.

n=6	Control	Hi-P
Kidney	0.72±0.14 (123.4±25.5)	0.55±0.13 (74.0±12.7**)
Liver	0.30±0.06 (74.6±10.4)	0.34±0.06 (81.2±13.0)
Heart	0.46±0.09 (47.3±6.8)	0.49±0.08 (50.9±6.5)
Lung	0.64±0.11 (78.1±13.2)	0.51±0.05 (61.9±3.4)

Date expressed as mean(MDA nmol/mg protein)±SD

() Date expressed as mean(MDA nmol/g wet tissue)±SD

** Statistically significant at the P<0.01 level when compared with control.

Table 7. Fatty acid composition of kidney lipid.

Fatty acid n=6	Control	Hi-P
16:0	22.0±1.2	22.0±0.6
18:0	18.0±0.6	18.3±0.5
18:1(n-7, n-9)	14.1±0.7	14.0±0.5
18:2(n-6)	11.2±1.1	11.6±0.8
20:4(n-6)	32.5±1.4	32.3±1.4
22:6(n-3)	2.2±0.2	1.8±0.1**
Saturated	40.0±0.7	40.3±0.7
Monounsaturate	14.1±0.7	14.0±0.5
Polyunsaturate	45.9±1.3	45.7±1.0
P/S ratio a	1.1±0.1	1.1±0.0
Double bond index b	1.8±0.1	1.8±0.0

Data expressed as mean(%)±SD

** Statistically significant at the P<0.01 level when compared with control.

a P/S ratio: polyunsaturated/saturated ratio

b Double bond index: $\Sigma((\%) \times (\text{the number of double bond})/100)$

高P食投与により、体重および餌摂取量ともに低下傾向を示し、食効率は有意に低下した(Table 2)。

2. 臓器重量

臓器重量は体重100gあたりの重さで示した。腎臓重量は高P食により標準食の約2倍近く増加した。他の臓器には差はみられなかった(Table 3)。腎臓の乾燥重量および水分量は、高P食により増加したが、水分含量の増加の方が大であった(Table 4)。

3. 血漿中ミネラル量および各臓器ミネラル量

血漿Ca, Mg, P量および各臓器のCa, Mg含量をTable 5に示した。高P食投与により血漿Mg濃度およびP濃度は有意に低下した。Ca濃度には差はみられなかった。各臓器中では、Ca, Mgともに高P食投与により腎臓に著しく蓄積した。Caは標準食の約100倍、Mgは2倍量に相当した。また、高P食により心臓にMgが有意に増加した。肝臓、肺には影響はみられなかった。

4. 各臓器の過酸化脂質量

各臓器中の過酸化脂質量をTable 6に示した。高P食による腎臓の過酸化脂質量が有意に低値を示し、他の臓器には差はみられなかった。

Table 8. Indicators of kidney function.

n=12	Control	Hi-P
Creatinine in plasma (mg/dl)	0.4±0.1	0.5±0.1
LDH in plasma(U/I)	239±49	191±67
Urea nitrogen in plasma (mg/dl)	13.2±2.0	19.9±5.4*
Uric acid in plasma (mg/dl)	1.0±0.1	0.7±0.3*

Data expressed as mean ±SD

* Statistically significant at the P<0.05 level when compared with control.

5. 腎脂肪酸組成

腎臓の脂肪酸組成をTable 7に示した。22:6が高P食により有意に低値を示した。他の脂肪酸割合および、高度不飽和脂肪酸割合、不飽和指数には差はみられなかった。

6. 腎機能の指標

腎機能の指標測定結果をTable 8に示した。血漿クレアチニン量および乳酸脱水酵素量は差はみられなかった。尿素窒素量は高P食により有意に高値を示し、尿酸量は低値を示した。

考 察

ラットに高P食を投与することにより、体重増加量および餌摂取量が低下し、成長阻害がみられることはよく知られている⁹⁻¹¹⁾。本実験においても同様の結果を得た。また、腎臓、肝臓、心臓、肺臓器について重量、Ca, Mg含量、および過酸化脂質量を測定した結果では、腎臓に高P食投与による影響がみられ、肝臓、心臓、肺には影響はみられなかった。

高P食投与により腎石灰化を引き起こし、腎石灰化を起こした腎臓の重量は増加することが知られている。本実験でもPレベル1.5%高P食投与により腎重量が増加した。腎重量増加の原因は、腎臓中の水分量、ミネラル量の増加などが考えられる。Ritskes-Hoitingaら¹²⁾は、腎臓中Ca, P量の増加、さらに細胞質量の増加としている。また、松崎ら¹³⁾は、高P食投与により水分量の増加を観察した。腎重量当たりの水分量については差はみられず、また、組織学検討により細胞増生像がみられないことから、腎重量の変化は腎臓中ミネラル量の増

加が腎重量の原因であると報告している。本実験においては、腎臓中のCa量、Mg量を定量した結果、標準食に比べ高P食投与ではCa量は約100倍、Mg量は約2倍含まれており、CaだけでなくMgの沈着もみられた。腎重量の変化は腎臓中のミネラル量ならびに水分量の増加が原因であることが示唆され、腎に石灰化が発症していると考えられる。

腎機能の指標とされている血漿中クレアチニン量および尿素量について、C.Adamsら¹⁴⁾は、食事性Pレベルが血漿クレアチニン濃度に影響を及ぼさないと報告している。また、高P食投与により血漿中尿素量は増加することが報告されている^{13, 15)}。Schaafsmaら¹⁵⁾は、血漿中尿素量と腎臓Ca含量との間に正の相関関係がみられるとしている。本実験でも高P食投与により血漿中尿素窒素量は増加し、クレアチニン量には影響はみられなかった。一方、Sterckら¹⁶⁾は高蛋白食において、血漿中尿素量は増加すると報告している。本実験での尿素窒素量の増加は、高P食投与による飼料摂取量の低下、すなわち蛋白質摂取量の低下が、尿素窒素量に影響を及ぼしているのではなく、高Pの影響によるものと推察される。血漿中ミネラルでは、血漿Ca濃度には影響はみられなかったが、血漿Mg、P濃度は減少した。Pの過剰投与ではMg要求量が高まる¹⁷⁾ことが知られており、高P食投与により血漿Mg量が減少したと考えられる。また、Leeら¹⁸⁾は血漿P量は増加すると報告している。本実験では血漿P量は低下したが、これは本実験で使用したP源であるリン酸2水素カリウムを用いたSchaafsmaら¹⁵⁾の結果と一致し、そこでは腎臓の細尿管でのPの再吸収低下によるものと報告された。以上のように、食事性Pレベルは生体内のCa、Mg、P代謝に大きく影響を及ぼすことは明らかであり、また、本実験でもみられたような腎臓へのミネラル沈着により、腎臓には何らかの機能障害が引き起こされていると考えられる。

腎石灰化は、腎へのリン酸カルシウムの沈着であり、腎臓皮髄境界部に発症することが知られている^{12, 13, 19)}。最も重要なのは食餌中Ca、Mg、P割合であり、低Ca、および高P食において、また、Mg欠乏食²⁰⁾、Ca/Pの摂取比が低値¹⁾においても引き起こされる。また、蛋白質^{21, 22)}、脂質²³⁾、糖質源²⁴⁾の種類、摂取量の差違においても石灰化の発症が報告されている。高P食投与によりAI-Modheferら¹⁹⁾は糸球体の濾過時間の延長による機

能低下を示し、松崎ら¹³⁾は光学顕微鏡による観察を行い、腎糸球体および近位尿細管には形態的な変化はみられなかったとしたが、松崎ら²⁵⁾は近位尿細管の機能低下を示唆している。また、CaやPの代謝には副甲状腺ホルモン(PTH)が関与しており、高P食によりPTHは上昇することが知られている。増山ら²⁶⁾はPTHの作用発現の低下を示している。また、Leeら¹⁸⁾は、PTHは生体脂肪組織の脂肪分解を促進すると報告している。

生体内組織の障害は、過酸化脂質の生成による場合が多く知られている²⁷⁾。我々は、腎組織の過酸化脂質に注目し、脂肪酸組成との関連を検索した。腎ホモジネートの過酸化脂質量は、高P食投与では標準食投与に比べ低値を示した。脂肪酸組成分析では、高P食投与により22:6(DHA)が有意に低値を示した。他の脂肪酸組成には差はみられず、高度不飽和脂肪酸割合、不飽和指数にも差はみられなかったが、二重結合には含まれたメチレン基の数が、1, 2, 3, 4, 5個の不飽和脂肪酸に対する相対的反應速度定数は、1, 2, 4, 6, 8であるという報告がある²⁸⁾。高P食投与により高度不飽和脂肪酸割合、不飽和指数には差はみられなかったが、より過酸化されやすい22:6が有意に低値を示したことが、過酸化脂質量の減少と関連している可能性が推察される。しかし、高P食投与による腎石灰化と過酸化脂質量との関係を明らかにするためには、更にこれに関する研究を進める必要がある。

要約

体重約90gのSD系雄ラットにPレベル0.3% (正常食)と1.5%(高P食)を自由摂取させ3週間飼育した。解剖時に血漿、および各臓器(腎臓、肝臓、心臓、肺)を摘出し、以後の実験に使用した。臓器中Ca、Mg含量、過酸化脂質量、血漿Ca、Mg、P濃度と、腎機能の指標となる血漿中の生化学パラメーターを測定した。さらに腎臓については、過酸化脂質量、脂肪酸組成を調べ、高P食投与時の腎石灰化と腎機能について検討を試みた。

1)高P食投与により飼料摂取量、体重増加量が低下し、成長阻害がみられた。

2)高P食投与により腎重量が増加し、腎臓中Ca、Mg含量および水分量が増加した。血漿Ca濃度は変わらなかったが、Mg、P濃度は低下した。腎機能の指標については、血漿中尿素窒素量が増加し、尿酸量は減少した。

3)腎臓器の過酸化脂質量は高P食投与により低値を示した。また、高P食投与の腎の脂肪酸組成は22:6(DHA)の割合が有意に低値を示した。

文 献

- 1)Hoek, A.C., Lemmens, A.G., Mullink, J.W.M.A. and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **118**, 1210-1216(1988)
- 2)Mars, Y.W.H.M., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *Nutr. Rep. Int.*, **38**, 249-258(1988)
- 3)Woodard, J.C. and Jee, W.S.S., *J. Nutr.*, **114**, 2331-2338(1984)
- 4)小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之, 食品分析ハンドブック, 建帛社, 東京, pp. 281-283(1982)
- 5)村上亜由美, 内田三香子, 松浦寿喜, 市川富夫, 武庫川女子大紀要, **43**, 31-36(1995)
- 6)Lowry.O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
- 7)日本生化学会編, 生化学実験講座3 脂質の化学, 東京, pp12-13(1974)
- 8)日本生化学会編, 生化学実験講座3 脂質の化学, 東京, pp198-199(1974)
- 9)秋本 誠, 鈴木和春, 遠藤幸江, 五島孜郎, 栄養学雑誌, **44**, 79-86(1986)
- 10)鈴木和春, 菅家祐輔, 五島孜郎. 栄養学雑誌, **36**, 77-84(1978)
- 11)松崎広志, 上原万里子, 鈴木和春, 五島孜郎, マグネシウム, **13**, 81-94(1994)
- 12)Ritskes-Hoitinga, J., Lemmens, A.G., Danse, L.H.L.C. and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **119**, 1423-1431(1989)
- 13)松崎広志, 上原万里子, 鈴木和春, 佐藤 茂, 五島孜郎, 栄食誌, **48**, 217-223(1995)
- 14)Adams, C., Ritskes-Hoitinga, J., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *Nutr. Rep. Int.*, **40**, 923-929(1989)
- 15)Schaafsma, G., Duursma, S.A., Visser, W.J. and Dekker, P.R., *Bone*, **6**, 155-163(1985)
- 16)Sterck, J.G.H., Ritskes-Hoitinga, J. and Beynen, A.C., *Br. J. Nutr.*, **67**, 223-233(1992)
- 17)ODell, B.L., Morris, E.R. and Regan, W.O., *J. Nutr.*, **70**, 103-111(1960)
- 18)Lee, N.S., Draper, H.H. and Hadley, M., *J. Nutr.*, **112**, 211-215(1982)
- 19)Al-Modhefer, A.K.J., Atherton, J.C., Garland, H.O., Singh, H.J. and Walker, J., *J. Physiol.*, **380**, 405-414(1986)
- 20)Goulding, A. and Malthus, R.S., *J. Nutr.*, **97**, 353-358(1969)
- 21)Calvo, M.S., Bell, R.R. and Forbes, R.M., *J. Nutr.*, **112**, 1401-1413(1982)
- 22)Stonard, M.D., Samuels, D.M. and Lock, E.A., *Fd. Chem. Toxic.*, **22**, 139-146(1984)
- 23)Kaunitz, H. and Johnson, R.E., *Metabolism*, **25**, 69-77(1976)
- 24)Bergstra, A.E., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **123**, 1320-1327(1993)
- 25)松崎広志, 荒井一禎, 上原万里子, 鈴木和春, 菅家祐輔, 五島孜郎, 栄食誌, **50**, 31-41(1997)
- 26)増山律子, 上原万里子, 鈴木和春, 五島孜郎, 栄養誌, **47**, 267-271(1994)
- 27)八木國夫, 過酸化脂質と疾患, 医学書院, pp133-146(1981)
- 28)Witting, L.A. and Horwitt, M.K., *J. Nutr.*, **82**, 19-25(1964)