

〔研究ノート〕

# 慢性腎臓病発症初期ラットの腎障害抑制および骨密度維持に対する大豆イソフラボン抽出物あるいはアルギニンの有効性評価に関する基礎研究

間野琴子・宮内智美・岡田亜紀子・稲葉未央・櫻井裕美  
佐藤光絵・新妻実可子・藤田安世・海老沢秀道

A Basic Study of the Efficacy of Dietary Soy Isoflavone Extract and L-Arginine on the Renal Failure and Bone Mineral Density in Relatively Early Stage of Chronic Kidney Disease (CKD) Model Rats

Kotoko MANO, Tomomi MIYAUCHI, Akiko OKADA,  
Mio INABA, Hiromi SAKURAI, Mitsue SATO,  
Mikako NIITSUMA, Yasuyo FUJITA and Hidemichi EBISAWA

The objective of the present study was to elucidate the efficacy of soybean isoflavones extracted from hypocotyl and L-Arginine on the renal function, bone mineral density, and bone strength of adult model rats in the relatively early stage of chronic kidney disease (CKD).

Based on our previous study, 360 mg/kg body weight of adenine suspended in a 2% methyl cellulose solution was administered intragastrically for six days to generate CKD model rats. For the intact/control condition, a 2% methyl cellulose solution was administered to the rats for six days. After the administration of adenine, 32 rats were randomly divided into four groups, and each group was fed a diet containing 20% casein protein (20CA, as a control, Group CA), 20CA+0.20% soy isoflavone extract (Group IF), 20CA+1.0% L-Arginine (Group Arg), and 20CA+0.20% soy isoflavone extract and 1.0% L-Arginine (IFA) at 15 g/day for 25 days, respectively. Intact rats were also fed the control diet as in group CA.

Group CA had apparent renal failure, indicated by swelling of the kidneys, a decrease in creatinine clearance (CCr), increased BUN and proteinuria and lower hematocrit, as well as bone loss estimated by a lower bone weight, femoral-BMD and bone strength than the intact control group. These results showed that adenine administration results in the development of CKD and bone loss under the conditions used in the present study.

The results were as follows: Compared with group CA, 1) group IF showed a significantly higher cancellous BMD in the femur, but no significant differences were observed in the cortical BMD, bone strength, kidney weight, CCr, urinary protein excretion or urinary NAG activity. 2) group Arg showed no significant differences in any parameters related to the renal function, BMD or bone strength. 3) group IFA showed significantly lower values for proteinuria, higher values for the urinary NAG activity and higher values for the femoral cancellous BMD. However, there were no significant differences observed in the kidney weight, CCr, bone weight or cortical BMD.

Based on these results, we concluded that the dietary soy isoflavone extract and L-Arginine

maintained the bone BMD, albeit to a limited extent, and suppressed the renal failure of the rats in the early stage of CKD under the conditions used in the present study.

*Key words: chronic kidney disease model rat (慢性腎臓病モデルラット), soy isoflavone-extract (大豆イソフラボン抽出物), L-Arginine (アルギニン), BMD (骨密度), bone strength (骨強度)*

## 目 的

我が国における慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD) 患者は増加し続けており、平成 18 年の推計では 600 万人を超えている<sup>1)</sup>。また人工透析患者数は 26.4 万人、腎不全による死亡者数は年間 2.1 万人と推計されており、CKD 発症リスク低下のための食事および生活改善の開発は、CKD の治療法確立とともに、緊急を要する課題である。CKD 発症によって現れる血液中電解質異常、骨代謝異常あるいは骨格筋萎縮などは、食事および生活改善による進行抑制が可能と考えられる。しかしながらこれら領域の研究は充分行われているとはいえ、CKD 治療に有効な食事条件の検索は緊急課題である。

イソフラボンは、抗酸化活性を示すポリフェノールの一種である。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。これらはまた、コレステロール合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の特異的阻害因子としても知られている。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<sup>7)</sup>の腎障害を抑制するとの報告があり、腎臓病に対するイソフラボンの有効性が示唆されている。

一方アルギニンは、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) 合成を促進するなど多くの生理機能を有している<sup>8)</sup>。NO は特に血管拡張作用を持ち、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、腎不全では血管内皮細胞に存在する一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 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>。一方、誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) から生成される NO は炎症作用の促進と関わっている。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>。このように大豆イソフラボン抽出物とアルギニンは、共に腎機能および骨代謝と深く関わっており、腎臓病の発症と病態進行およびそれに伴う骨代謝異常の改善に有効な食事性因子である可能性が示されている。

これまでに我々は、CKD モデルラットに大豆イソフラボン抽出物あるいはアルギニンを 10 週間投与し、腎臓病の進行およびそれに伴う骨密度低下に対する影響を観察した<sup>12)</sup>。その結果、食餌への大豆イソフラボン抽出物添加が CKD モデルラットの大腿骨海綿骨骨密度の増加に有効なこと、およびアルギニンが CKD モデルラットの腎機能および腎障害抑制に有効なことを示す結果を得ている。しかしながら、CKD 発症初期の腎臓および大腿骨に対する大豆イソフラボン抽出物およびアルギニン短期投与の有効性についてはほとんど不明である。

本研究は、CKD 発症初期における大豆イソフラボン抽出物およびアルギニン短期投与が CKD 発症後の腎機能低下および骨密度低下を抑制するか否かを明らかにすることを目的とした。

## 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>13)</sup>。アデニン誘導性 CKD モデルは、尿細管機能低下によるリンおよびカルシウム排泄促進およびその他の腎不全病

Table 1. Compositions of experimental diet

Ingredients	Intact/CA	IF	Arg	IFA
		g		
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	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

\*: Isoflavone extracted from soybean hypocotyl (Soyaflavone HG, Isoflavone content: 50%, gifted from Fuji Oil Co. LTD, Osaka).

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、腎臓重量、血清 BUN の回復も可能である<sup>13)</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、9 週齢のウィスター系雄ラット 40 匹を用いた。8 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 の割合で胃内投与し、残り 1 群にはアデニンを投与しなかった (Intact 群)。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。

#### 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=8), 0.20% イソフラボ

ン抽出物 (IF) 添加食 (20CA+0.20%IF, IF 群, n=8), 1.0% アルギニン (Arg) 添加食 (20CA+1.0%Arg, Arg 群, n=8) あるいはイソフラボン抽出物とアルギニン併用食 (20CA+0.20%IF+1.0%Arg, IFA 群, n=8) を作成し、1 日 15 g の制限条件で投与した。

なお、本研究で用いたコントロール食は、AIN76 の組成を基本に、食事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。

実験食期間は、CKD 発症初期の腎臓および大腿骨に対する影響を観察するため、25 日間とした。骨代謝に対する食事因子の影響を観察した研究の多くが 12 週間程度の飼育期間を設けていることと比べると本研究におけるこの 25 日間は短期実験であるが、アデニン誘導性 CKD モデルラットを用いた先行研究の内最も実験期間が短い 4 週間とほぼ同じである<sup>14)</sup>。実験食期間中に CA 群 2 匹, IF 群, Arg 群および IFA 群でそれぞれ 1 匹が死亡した。

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 時間尿を採取し、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取し、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

### a. 腎障害および腎機能評価項目

本研究では、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、クレアチニンクリアランスを測定した。腎糸球体毛細血管が障害され、血清タンパク質の透過性が亢進すると、尿中タンパク質排泄量は増加する。また、尿中 NAG は、近位尿細管からの逸脱酵素で、感度の高い腎障害判定指標として臨床の現場でも用いられている。以上の理由から本研究では、腎糸球体および尿細管傷害の程度を推定する目的で、実験食期終了時に採尿し、72 時間蓄尿中の総タンパク質排泄量および新鮮尿中の NAG 活性を測定した。

### b. 骨代謝評価項目

左大腿骨を用いて、X 線 CT (La Theta, 日立アロカメディカル(株)) による大腿骨構造解析およびアルコール乾燥法による大腿骨乾燥重量を測定した。また、機械的強度測定装置 (島津精密万能試験機, RZ-SX 500 N, (株)島津製作所) により、右大腿骨を用いて、骨破断強度 (骨の強さ) および最大点ストローク (骨折するまでの “しなり”) を測定した。

### c. 血液生化学検査および臓器重量

栄養アセスメントおよび特定臓器肥大の有無を判定するために、血液生化学検査およびいくつかの臓器重量を測定した。

## 統計処理

測定値は、平均値±標準偏差として表記した。

CA 群と IF 群, Arg 群, IFA 群間の有意差検定は, Tukey の多重比較検定により行った。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。

## 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)。

## 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、全てのラットの摂食量は減少した。しかし、実験食期間の第 7 日目以降ラットは与えた 15 g の飼料のほぼ全てを摂取し、この期間の 1 日当たり平均摂食量は CA 群, IF 群, Arg 群および IFA 群でそれぞれ  $13.8 \pm 1.2$  g,  $13.7 \pm 1.0$  g,  $13.9 \pm 1.0$  g および  $12.7 \pm 0.9$  g だった。Intact 群のラットは実験食期間を通して与えた飼料を全て摂取した。

ラットの体重変化は、Figure 1. に示した。

アデニンの胃内投与によってラットの体重は全て減少したが、アデニン投与終了後 3 日目以降は増加に転じ、ラットの体重はそれ以降実験食期間終了時まで増加傾向を維持した。

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、正常に成長した。

### 血液生化学検査および臓器重量

血液分析の結果を Table 2. に示した。

血清アルブミン値, ALT, AST, およびカルシウム濃度は、Intact 群を含めて全ての群で正常範囲の値を示し、明らかな肝機能障害および低カルシウム血症は観察されなかった。

イソフラボン HMG-CoA 還元酵素の特異的阻害剤である<sup>15)</sup>。大豆イソフラボン抽出物を摂取した IF 群と IFA 群における血清総コレステロール濃

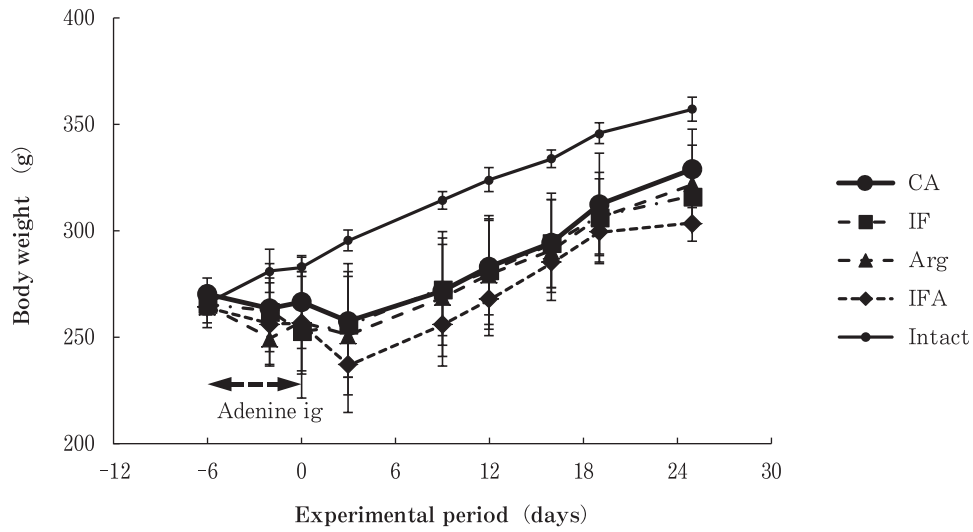


Figure 1. Effects of dietary soy isoflavone extract and L-Arginine on body weights in male CKD model rats after adenine administered intragastrically

Table 2. Effects of dietary soy isoflavone extract and L-Arginine on blood parameters in male CKD model rats

		ALB	ALT	AST	T-chol
	n	g/100 ml	karmen	karmen	mg/100 ml
CA	6	3.46±0.11	17.4± 2.0	62.1±11.6	114±16
IF	7	3.38±0.20 <sup>ns</sup>	14.9± 4.0 <sup>ns</sup>	63.5±13.9 <sup>ns</sup>	79±14*
Arg	7	3.58±0.34 <sup>ns</sup>	19.9± 4.0 <sup>ns</sup>	65.9±10.1 <sup>ns</sup>	122±26 <sup>ns</sup>
IFA	7	3.39±0.19 <sup>ns</sup>	15.8± 1.5 <sup>ns</sup>	57.4± 6.9 <sup>ns</sup>	70±15*
Intact	8	3.59±0.19	25.5±12.4	68.1±13.6	77±10 <sup>a</sup>
		Calcium	Phosphate	Hematocrit	
	n	mg/100 ml	mg/100 ml	%	
CA	6	10.3±0.3	11.7±2.8	39±2	
IF	7	10.5±0.4 <sup>ns</sup>	11.4±1.4 <sup>ns</sup>	41±2 <sup>ns</sup>	
Arg	7	10.5±0.2 <sup>ns</sup>	13.6±4.9 <sup>ns</sup>	39±3 <sup>ns</sup>	
IFA	7	10.4±0.3 <sup>ns</sup>	10.2±1.9 <sup>ns</sup>	38±2 <sup>ns</sup>	
Intact	8	10.1±0.3	13.1±1.8	50±1 <sup>a</sup>	

ALB: Serum albumin. ALT: Serum alanine amino-transferase activity.

AST: Serum aspartate amino-transferase activity.

T-chol: Serum total cholesterol concentration.

\*: Significant difference from group CA at  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup>: Significant difference between Intact and CA at  $p < 0.05$ .

<sup>ns</sup>: Not significantly different.

Table 3. Effects of dietary soy isoflavone extract and L-Arginine on organ weights in male CKD model rats

		Liver	Heart	Testis <sup>1</sup>	Kidney <sup>1</sup>
	n	g/kg BW			
CA	6	32.8±2.0	2.91±0.17	8.76±0.61	10.0±2.1
IF	7	33.6±2.7 <sup>ns</sup>	3.22±0.34 <sup>ns</sup>	8.98±0.75 <sup>ns</sup>	10.2±1.9 <sup>ns</sup>
Arg	7	32.0±6.5 <sup>ns</sup>	3.09±0.27 <sup>ns</sup>	9.16±0.32 <sup>ns</sup>	9.0±1.3 <sup>ns</sup>
IFA	7	31.9±2.6 <sup>ns</sup>	2.99±0.22 <sup>ns</sup>	9.27±0.38 <sup>ns</sup>	10.2±1.6 <sup>ns</sup>
Intact	8	33.2±1.9	2.94±0.21	8.38±0.49	2.8±0.2 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>: The right testicle and right kidney was evaluated from each rat.

\*: Significant difference from group CA at p<0.05.

<sup>a</sup>: Significant difference between Intact and CA at p<0.05.

ns: Not significantly different.

度はCA群に比べていずれも有意な低値を示し、腎臓病モデルラットに対する短期投与条件でも、大豆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。

腎障害は造血機能低下の原因となる。正常な腎臓を持つIntact群に比べてCA群のヘマトクリット値は有意な低値を示し、本研究で用いたアデニン投与レベルでも造血機能は低下するものと考えられた。一方CA群のヘマトクリット値は、アルギニン経口投与が腎臓病患者の貧血状態を改善するという報告があるが<sup>16)</sup>、Arg群あるいはIFA群との間に有意差は観察されず、本研究で用いた食餌条件はCKD発症初期ラットのヘマトクリット値を改善しなかった。

#### 臓器重量

実験食期終了後、ラットを屠殺して腎臓およびその他の臓器重量を測定し、その結果をTable 3.に示した。

肝臓、心臓および睾丸重量は、CA群とIntact群間およびCA群とIF群、Arg群あるいはIFA群との間に有意差は観察されず、これら臓器重量は

CKD発症および大豆イソフラボン抽出物およびアルギニン投与の影響を受けなかった。

一方、腎重量は、Intact群に比べてCA群はおよそ3倍の明らかな高値を示し、アデニン投与によって明らかな腎肥大が観察された。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も、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。一方、CA群の腎重量、外観および色調はIF群、Arg群、IFA群のそれらと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による正常化は認められなかった。

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、食餌への大豆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、血液生化学検査値、肝臓、心臓および睾丸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大豆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。

Table 4. Effects of dietary soy isoflavone extract and L-Arginine on the renal function and proximal tubule injury in male CKD model rats

		Proteinuria	BUN	CCr	NAG
	n	mg/day	mg/100 ml	ml/min	mU/day
CA	6	85.3±14.7	27.9±11.2	0.53±0.21	119±46
IF	7	73.0±13.2 <sup>ns</sup>	31.9± 8.7 <sup>ns</sup>	0.42±0.11 <sup>ns</sup>	90±46 <sup>ns</sup>
Arg	7	70.7±16.0 <sup>ns</sup>	28.0± 9.0 <sup>ns</sup>	0.46±0.13 <sup>ns</sup>	83±38 <sup>ns</sup>
IFA	7	57.8±11.7*	31.9± 8.7 <sup>ns</sup>	0.44±0.09 <sup>ns</sup>	250±82*
Intact	8	65.3±12.8 <sup>a</sup>	8.7± 1.0 <sup>a</sup>	1.41±0.23 <sup>a</sup>	149±52

Proteinuria: Urinary protein excretion. BUN: Blood urea nitrogen.

CCr: Creatinine clearance. NAG: N-acetyl D-glucosaminidase activity in urine.

\*: Significant difference from group CA at  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup>: Significant difference between Intact and CA at  $p < 0.05$ .

<sup>ns</sup>: Not significantly different.

#### 腎機能と腎障害

腎臓の血液濾過機能を評価するために、尿中クレアチニン排泄量と血清クレアチニン濃度とから計算されたクレアチンクリアランス (CCr) および血清尿素窒素濃度 (BUN) を、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、その結果を Table 4. に示した。アルギニンは、一酸化窒素 (NO) の供与体である<sup>9)</sup>。NO は、血管拡張因子<sup>17)</sup>あるいは起炎物質<sup>18)</sup>としての作用を持ち、腎糸球体における血液濾過機能あるいは腎障害と関係している。

正常な腎臓を持っている Intact 群の CCr および BUN は、それぞれ  $1.41 \pm 0.23$  ml/min および  $8.7 \pm 1.0$  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  $0.53 \pm 0.21$  ml/min の異常低値および  $27.9 \pm 11.2$  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明らかに低下し、本研究におけるラットは慢性腎臓病状態を呈していた。一方、CA 群の CCr および BUN に比べて IF 群、Arg 群および IFA 群のこれらの値は有意な

相違を示さず、食餌への大豆イソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加は CKD モデルラットの糸球体濾過機能を改善しなかった。

尿中タンパク質排泄量は、正常な腎臓を持っている Intact 群に比べて CA 群は有意な高値を示した。CA 群の尿中タンパク質排泄量に比べて、IF 群および Arg 群に有意差は観察されなかったが、IFA 群の尿中タンパク質排泄量は有意な低値を示した。尿中 NAG 活性は、正常な腎臓を持っている Intact 群では  $149 \pm 52$  mU/day の正常値を示した。一方 CA 群の尿中 NAG 活性は、 $119 \pm 46$  mU/day の正常値を示し、IF 群あるいは Arg 群の値と有意差を示さなかった。しかし予期せぬ事に、IFA 群の尿中 NAG 活性は  $250 \pm 82$  mU/day と他の群より明らかに高い異常値を示した。

以上示したように本研究条件では、これまでの研究結果<sup>12)</sup>と異なり、アルギニンによる腎機能維持および腎障害抑制効果を確認することができなかった。この理由は不明だが、大豆イソフラボン抽出物およびアルギニンは、腎障害からの回復プロセスに対しては有効であるが病態の進行抑制に対しては効果を持たないことを示しているのかもしれない。

Table 5. Effects of dietary soy isoflavone extract and L-Arginine on the femoral weight, BMD, bone-strength and arcuation degree in male CKD model rats

		Dry-weight	Cortical BMD	Cancellous BMD	Bone strength	Arcuation degree
	n	mg	mg/cm <sup>3</sup>	mg/cm <sup>3</sup>	N	cm
CA	6	827±66	1038±0.17	352± 6	122± 7	1.00±0.16
IF	7	803±47 <sup>ns</sup>	1048±0.34 <sup>ns</sup>	384±16*	114± 7 <sup>ns</sup>	0.93±0.14 <sup>ns</sup>
Arg	7	827±38 <sup>ns</sup>	1037±0.27 <sup>ns</sup>	360±23 <sup>ns</sup>	112±12 <sup>ns</sup>	0.96±0.07 <sup>ns</sup>
IFA	7	764±49 <sup>ns</sup>	1043±0.22 <sup>ns</sup>	376±18 <sup>ns</sup>	106±13*	0.92±0.15 <sup>ns</sup>
Intact	8	893±30 <sup>a</sup>	1081±0.21 <sup>a</sup>	379±12 <sup>a</sup>	131± 8	0.86±0.07 <sup>a</sup>

Right femurs were used.

\*: Significant difference from group CA at p<0.05.

a: Significant difference between Intact and CA at p<0.05.

<sup>ns</sup>: Not significantly different.

#### 大腿骨乾燥重量, 大腿骨骨密度, 大腿骨骨強度

慢性腎臓病は、病態の進行に伴ったミネラル代謝異常を発症し<sup>19)</sup>, 骨量および骨密度低下の原因となる。イソフラボンは、エストロゲン受容体に結合可能で、閉経後骨密度減少に対する抑制効果がヒトおよび閉経後モデル動物を用いた研究で充分証明されている<sup>20, 21)</sup>。アルギニンは、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) および一酸化窒素 (NO) シグナル系を介して骨形成を促進することが、in vitro 研究で報告されている<sup>22)</sup>。ラット大腿骨の乾燥重量, 骨密度, 骨強度および最大点ストロークを測定し, その結果を Table 5. に示した。

大腿骨乾燥重量は、Intact 群に比べて CA 群は有意な低値を示し, CKD 発症に伴う骨量減少が観察された。しかし CA 群に比べて, IF 群, Arg 群および IFA 群の大腿骨乾燥重量はいずれも有意な相違を示さず, 食餌へ的大豆イソフラボン抽出物あるいはアルギニン添加は CKD 発症に伴う大腿骨重量減少を抑制しなかった。

大腿骨皮質骨骨密度および海綿骨骨密度は, Intact 群に比べて CA 群はいずれも有意な低値を示した。この結果は, 大腿骨乾燥重量で示された所

見と一致し, CA 群のラットでは CKD 発症後に骨密度低下を伴う骨量減少が起こることが示された。

大豆イソフラボン抽出物あるいはアルギニンの骨密度に対する影響は, 皮質骨と海綿骨とで異なった。すなわち主に骨の強度維持と関係している皮質骨の骨密度は CA 群と IF 群, Arg 群あるいは IFA 群との間に有意差は観察されず, 大豆イソフラボン抽出物およびアルギニン共に皮質骨骨密度に影響しなかった。しかし, 皮質骨よりも代謝速度が速い海綿骨の骨密度は, CA 群に比べて IF 群は有意な高値を示し, 25 日間の短期投与でも, 大豆イソフラボン抽出物は CKD モデルラットの海綿骨骨密度低下を抑制する結果が得られた。一方, アルギニン単独投与条件の Arg 群ではこのような骨密度低下に対する抑制効果は観察されなかった。

#### 骨強度および最大点ストローク

骨の折れにくさあるいは強さは, 骨構造と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。そこで大腿骨に曲げ試験を行い, 骨が破断するまでの骨強度と最大点ストロークを測定し, 骨が破断するまでの力の大きさ (N)



と撓み (cm) を測定した。

CA 群の骨強度は Intact 群に比べて有意な差を示さず、本研究条件は大腿骨の破断強度に影響しなかった。さらに、CA 群の骨強度に比べて、IFA 群は有意な低値、IF 群および Arg 群は低値傾向を示し、食餌への大豆イソフラボン抽出物およびアルギニン添加は CKD モデルラットの骨強度を増加しなかった。一方骨の撓み具合を示す最大点ストロークは、Intact 群に比べて CA 群は有意な高値を示した。すなわち CKD モデルラットの大腿骨は、折れやすく曲がりやすくなっている。しかし CA 群と他の群との間に有意差は認められず、骨強度同様に大豆イソフラボン抽出物およびアルギニン共に大腿骨の撓みやすさを改善しなかった。

アルギニンは、前述したように、NO 産生調節を介した骨量の維持や骨形成の促進あるいは IGF-1 のシグナル調節を介した骨コラーゲン合成の促進など多くの骨代謝調節作用が報告されている<sup>22, 23)</sup>。しかし本研究では、以上述べてきたように大豆イソフラボン抽出物は CKD 発症初期ラットの大腿骨海綿骨骨密度の低下を抑制したが、アルギニンは大豆イソフラボン抽出物との併用条件下においてさえも骨密度および骨強度に有意な利的効果を示さなかった。この理由は、大腿骨骨髓液中のアルギニン濃度が上昇していないことを推測させるが、全く不明である。食餌へのアルギニン添加量や飼育期間について検討する必要がある。

## 引用文献

- (1) 今後の腎疾患対策のあり方について、厚生労働省、平成 20 年 3 月。
- (2) Richard J. Miksicek: Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity: *PSEBM*, 208: 44-50, 1995.
- (3) Kyoko Taku, Melissa K. Melby, Mindy S. Kurzer, Shoichi Mizuno, Shaw Watanabe and Yoshiko Ishimi: 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) Masayoshi Yamaguchi: 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) Sandra R. Teixeira, Kelly A. Tappenden, LeaAnn Carson, Richard Jones, Mukund Prabhudesai, William P. Marshall and John W. Erdman 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・アミノ酸の栄養学: 講談社サイエンティフィック, 2007.
- (9) Chris Baylis: Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease: *Am J Physiol Renal Physiol*, 294: F1-F9, 2008.
- (10) Roland C. Blantz, Aihua Deng, Mark Lortie, Karen Munger, Volker Vallon, Francis B. Gabbai and Scott C. Thomson: The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration: *Kidney Int*, 61: 782-785, 2002.
- (11) Sunil J. Wimalawansa: Nitric oxide and bone: *Ann NY Acad Sci*, 1192: 391-403, 2010.
- (12) 間野琴子, 宮内智美, 春宮 寛, 海老沢秀道: 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: *学苑・生活科学紀要*, 866; 47-55, 2012.
- (13) 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.
- (14) Navid Shobeiri, Michael A. Adams and Rachel M. Holden: Vascular calcification in animal models of CKD: A review: *Am J Nephrol*, 31: 471-481, 2010.
- (15) Jang Hoon Sung, Sung-Joon Lee, Kwan Hwa Park and Tae Wha Moon: Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase *in vitro*: *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 428-432, 2004.
- (16) Takahisa Tarumoto, Shigehiko Imagawa, Makoto Kobayashi, Aki Hirayama, Kei-ya Ozawa and Toshiro Nagasawa: L-arginine administration reverses anemia associated with renal disease: *Int J Hematol*, 86: 126-129, 2007.
- (17) Marcela Herrera and Jeffrey L. Garvin: Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney: *Hypertension*, 45: 1062-1067, 2005.
- (18) Matthew B. Grisham, David Jourdain and David A. Wink: Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation: *Am J Physiol*, 276: G315-321, 1999.
- (19) 塚本雄介: 腎性骨異常栄養症からCKD-MBDへ—その疾患概念—: *Clinical Calcium*, 19: 479-484, 2009.
- (20) Elena Ricci, Sonia Cipriani, Francesca Chiaffarino, Matteo Malvezzi and Fabio Parazzini: Soy isoflavones and bone mineral density in perimenopausal and postmenopausal western women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials: *J Women's Health (Larchmt)*, 19: 1609-1617, 2010.
- (21) Yoshiko Ishimi: Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice: *J Nutr*, 140: 1373S-1376S, 2010.
- (22) Chevalley T, Rizzoli R, Manen D, Caverzasio J and Bonjour JP: Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells: *Bone*, 23: 103-109, 1998.
- (23) Carmelo E. Fiore, Pietra Pennisi, Vincenza Maria Cutuli, Agata Prato, Rossella Messina and Giuseppe Clementi: L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporin A-treated rats: *Eur J Pharmacol*, 408: 323-326, 2000.
- (まの ことこ 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)  
(おかだ あきこ 相模女子大学栄養科学部, 平成20年度生活機構研究科生活科学研究専攻修了生)  
(いなば みお 平成23年度管理栄養学科卒業生)  
(さくらい ひろみ 平成23年度管理栄養学科卒業生)  
(さとう みつえ 平成23年度管理栄養学科卒業生)  
(にいつま みかこ 平成23年度健康デザイン学科卒業生)  
(ふじた やすよ 平成23年度管理栄養学科卒業生)  
(えびさわ ひでみち 管理栄養学科)