

5/6 腎摘除慢性腎不全モデルラットの血圧, 腎機能 および腎病変に対する長期的運動, 低タンパク食, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬の併用効果

佐々木裕子 金澤雅之 伊藤 修 上月正博

Renoprotective and antihypertensive effect of combination therapy with a low protein diet,
long-term exercise and angiotensin II receptor antagonist in rats with renal ablation

Yuko SASAKI, Masayuki KANAZAWA, Osamu ITO, and Masahiro KOHZUKI

Department of Internal Medicine and Rehabilitation Science, Tohoku University Graduate School
of Medicine, Miyagi, Japan

要 旨

目 的：低タンパク食(LPD)は尿毒症症状を軽減させるが、栄養状態の悪化や筋力低下を招く可能性もある。一方、長期的運動(EX)は栄養状態、筋力を改善させ、腎保護効果を有する可能性が示唆されている。そこで、慢性腎不全モデルラットでLPDとEXとの併用効果を検討し、さらに、腎保護効果を有するアンジオテンシンII受容体拮抗薬(OLS)併用による増強効果を検討した。

方 法：WKYラットに5/6腎摘を行い、5/6腎摘除腎不全モデルを作製し、A)普通食(NPD)群、B)NPD+EX群、C)LPD群、D)LPD+EX群、E)LPD+EX+OLS群、F)Sham群の6群に分け、12週間治療した。2週間毎に収縮期血圧(SBP)、尿蛋白排泄量(UP)を測定し、最終日に断頭採血し、血清クレアチニン(Scr)、血液尿素窒素(BUN)を測定した。また、残存腎のPAS染色、EM染色、免疫染色を行い、糸球体硬化指数(IGS)、相対の間質容積(RIV)、糸球体内ED-1発現細胞数を算出した。

結 果：NPD群に比較して、LPD群のUP、Scr、BUN、IGS、RIV、さらにNPD+EX群のSBP、BUN、IGS、RIVは有意に低値を示した。NPD群に比較して、LPD+EX群の糸球体ED-1発現細胞数は有意に低値を示した。NPD+EX群に比較して、LPD+EX群のUP、BUN、IGS、RIVは各々有意に低値を示した。さらに、LPD+EX+OLS群のUPは他の腎摘群に比較して有意に低値を示し、SBPは他の全群に比較しても最も低値であった。

結 論：LPDとEX単独の腎保護効果と、LPD、EX併用による腎保護効果の増強作用が示唆された。特に、LPD+EXへのOLSの併用はUP減少効果、間質増殖抑制効果を増強し、腎機能の指標であるScr、BUNを増悪させることなく慢性腎不全モデルラットの高血圧を改善させた。

A low-protein diet(LPD) has been prescribed to alleviate uremic symptoms, and to delay the aggravation of chronic renal failure(CRF). However, it has been suggested that LPD treatment causes malnutrition and attenuation of muscle power. On the other hand, it also has been suggested that appropriate long-term exercise training(EX) may lead to improvement of the physical fitness and quality of life(QOL) in patients with CRF. However, there is no definitive conclusion as to whether EX has any renal protective effect or not.

We assessed the effects of combination therapy with LPD and EX. We also assessed the effects of a combination of these therapies and the angiotensin II receptor antagonist, olmesartan(OLS).

Male Wistar-Kyoto rats that were five-sixth-nephrectomized were divided into 6 groups ; 1) normal-protein diet(NPD) ; 2) NPD and EX with treadmill running(1 h/day, 5 days/week for 12 weeks) (NPD+EX) ; 3) LPD ; 4) LPD+EX ; 5) LPD+EX with OLS(10 mg/kg/day for 12 weeks) (LPD+EX+OLS) ; and 6) Sham-operated(S).

Systolic blood pressure(SBP) in the NPD+EX, LPD+EX, LPD+EX+OLS, and S groups was significantly lower than in the NPD group. Moreover, SBP in the LPD+EX+OLS was significantly lower than in all the other groups. LPD, LPD+EX, and LPD+EX+OLS induced a significant decrease in UP, Scr and BUN compared with the NPD group. UP in the LPD+EX, LPD+EX+OLS, and S groups was significantly lower than in the LPD group. The index of glomerular sclerosis(IGS) and relative interstitial volume(RIV) in the NPD+EX, LPD, LPD+EX, LPD+EX+OLS, and S groups were significantly lower than the values in the NPD group. IGS and RIV in the LPD, LPD+EX, LPD+EX+OLS, and S groups were significantly lower than the values in the NPD+EX and LPD groups. Glomerular ED-1 positive cells in the LPD+EX, LPD+EX+OLS, and S groups was significantly fewer than in the NPD groups.

These results indicate that LPD and EX have renoprotective effects, and suggest that the combination therapy with LPD and EX provides greater renoprotective effects than LPD alone. Moreover simultaneous treatment of OLS and LPD+EX provides greater antihypertensive and antiproteinuric effects than treatment with LPD+EX.

Jpn J Nephrol 2006 ; 48 : 4-13.

Key words : renoprotective and antihypertensive effects, low-protein diet, exercise, angiotensin II receptor antagonist, rat

緒言

低タンパク食(low protein diet : LPD)は慢性腎不全の進行を抑制し、腎保護作用を有することが報告されている^{1,2)}。しかしその一方で、LPDは栄養状態を低下させ、筋量の減少や筋機能の減弱を引き起こす危険性が指摘されている^{3,4)}。また、腎機能障害者では、体液異常、貧血、血行動態異常、心機能低下などが生じ、長期間の安静による廃用と相俟って運動耐容能や生活の質(quality of life : QOL)の低下がみられるようになることが少なくない⁵⁾。

一方、近年になり、適度な運動は腎機能障害者において体力やQOLの向上、糖や脂質代謝の改善などのメリットをもたらす可能性があるため、活動を過度に制限すべきではないことが示唆されている⁶⁾。すなわち、運動により筋量、筋機能、栄養状態が改善したり腎が保護される可能性が示唆されている³⁾。しかしながら、運動中に腎血流量や糸球体濾過量が減少し^{7,8)}、それによって腎機能障害が増悪する危険性が示唆されている。したがって、腎機能障害者においては運動が腎に及ぼす影響を考慮しなければならないが、腎機能障害者の体力を増強し、腎を保護する至適運動に関する定説はまだない。また腎不全モデル動物においても、運動が腎保護効果を有するか否かについて検討した成績は少なく、現時点において、運動による腎保護作用の有無についてはまだ一定の結論をみていない。

ところで、慢性腎不全治療においては血圧のコントロールやレニン・アンジオテンシン系の抑制も重要であることが示唆されている⁹⁻¹¹⁾。降圧薬では、アンジオテンシンII(Ang II)受容体拮抗薬(ARB)が慢性腎不全患者や腎不全モデル動物で降圧および腎保護作用を有することが示され¹²⁻¹⁶⁾、汎用されつつある。しかし、LPD, Ang II作用の抑制、血圧コントロールのいずれの単独療法においても、その腎保護効果はなお完璧なものではなく、より強力な治療法の確立が急務となっている。これらは、いずれも異なる作用機序で腎保護作用を発揮する可能性があるため、併用療法による腎保護作用の増強に期待が持たれているが、これらの併用による腎保護効果に関してはまだ十分な検討がなされていない。

そこで、5/6腎摘除慢性腎不全モデルラットを用いて、その血圧、腎機能および腎病変に対するLPDと長期的運動(EX)の併用効果を検討した。さらに、LPDおよびEXにARBを併用することの有用性についても検討した。

対象と方法

1. 5/6腎摘除慢性腎不全モデルラットの作製

雄性Wistar-Kyoto(WKY)ラット(日本チャールズリバー株式会社, 横浜)を用いた。

8週齢のラットをジエチルエーテル(和光純薬株式会社,

仙台)で麻酔し、側腹切開にて右腎を露出した。次いで、右腎の上極側 1/3 および下極側 1/3 を結紮して閉腹した。9 週齢に再びジエチルエーテルで麻酔し、左腎を全摘して閉腹した。偽手術(Sham)群は同週齢に両腎の露出のみを行った。ラットはすべて代謝ケージ(model-ST, 杉山元, 東京)で飼育し、温度(22±2°C)、湿度(55±10%)と明暗時間(12時間サイクル)を一定にした。ラットには普通食(normal protein diet : NPD)としてノーサンラボ MR ストック(タンパク質 18.3 w%, Na 0.18 w%, K 1.13 w%, 日本農産工業株式会社, 横浜)と水道水を自由に与えた。

左腎摘出 1 週間後(10 週齢)に、体重(BW)、尾動脈収縮期血圧(SBP)、尿量および 24 時間尿蛋白排泄量(UP)を測定し、LPD, EX, 薬剤投与開始前の基準値とした。

2. 方法

10 週齢の 5/6 腎摘ラットを無作為に以下の 5 群; A) NPD 群(n=9), B) NPD と EX 併用群(NPD+EX, n=9), C) LPD 群(n=13), D) LPD と EX 併用群(LPD+EX, n=12), E) LPD と EX と olmesartan 併用群(LPD+EX+OLS, n=10)に分けた。これら 5 群に NPD で飼育し OLS 投与および EX を行わない Sham 群(n=10)を加えた計 6 群について、以後 12 週間にわたる治療を行った。また、2 週間毎に BW, SBP, UP を測定した。LPD 治療群の飼料は、治療開始時よりラボ MR プロテイン 12(タンパク質 12.6 w%, Na 0.26 w%, K 0.82 w%, 日本農産工業株式会社, 横浜)に変更した。

3. EX と薬物療法

EX は、ラット用トレッドミル装置(KN-73, 株式会社夏目製作所, 東京)を用いた走行を、傾斜角 0 度、20 m/分の速度で 1 日 60 分間、週に 5 日間の頻度で、12 週間にわたって行った。

OLS(10 mg/kg/day)は、投与直前に 0.5%カルボキシメチルセルロース(carboxymethyl cellulose sodium salt, 和光純薬株式会社, 仙台)に懸濁し、12 週間にわたって連日午前 9 時にゾンデにより強制的に経口投与した。OLS 非投与群には溶媒のみを与えた。

4. 測定

SBP は、ラット用尾動脈非観血的血圧測定装置(UR1000, 株式会社エルクエスト, 東京)を用いて、無麻酔下で覚醒中の一定時刻(13~15 時)に測定した。この方法を用いて測定した SBP は直接法を用いて測定した値と良好な相関関係にある¹⁷⁾。本研究では WKY ラットを使用した。Sham 群の SBP が少し高めに測定された。その点については購入したラットの血圧が元々高めであったため

と考えられ、また、他の論文¹⁸⁾でもこのようなラットを使用していたため、計測者の統一、計測時間の一定化、計測機器など、検査の仕方に問題はないと判断した。

治療開始より 12 週間後にラットを断頭により屠殺し、血液をポリエチレンチューブに採取した。4°C で遠心(3,000 rpm, 15 分間)し、その上清を自動分析器(Synchron Clinical System CX7, Beckman Coulter Inc., USA)を用いて測定し、血清クレアチニン(Scr)、血液尿素窒素濃度(BUN)を求めた。また、同測定器を用いて UP を測定した。

5. 腎の組織学的検討

残存腎を摘出し、その一部を 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬株式会社, 仙台)で固定後、パラフィン包埋した。次いで 3 μm 厚の切片を作製し、periodic acid-Schiff (PAS)染色, Elastica-Masson(EM)染色を行った。

PAS 染色切片を 200 倍の光学顕微鏡(BX51, オリジナル光学工業株式会社, 東京)で観察し、以下のように定性的に糸球体硬化指数(index of glomerular sclerosis : IGS)を算出した¹⁹⁾。すなわち、1 切片当たり 100~150 個の糸球体を観察し、硬化病変を認めないものを Grade 0 とした。また、糸球体全体の 25%未満の硬化巣の存在、または毛細血管係蹄とボーマン嚢に明らかな癒着が存在するものを Grade 1, 25%以上 50%未満の硬化のものを Grade 2, 50%以上 75%未満の硬化のものを Grade 3, 75%以上の硬化のものを Grade 4 とした。次いで、以下の計算式を用いて IGS を算出した。

$$IGS = (1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$$

ここで、N は各 Grade を呈した糸球体の個数である。

次に、EM 染色切片をカラーイメージアナライザー(SP500F, オリジナル光学工業株式会社, 東京)で解析し、糸球体、血管、尿細管を除外した、皮質における間質の割合を計測した。

1 切片当たり 20 カ所について計測し、その平均値を相対の間質容積(relative interstitial volume : RIV)とした。

次に、immunoperoxidase 法²⁰⁾による免疫染色を行い、残存腎を 95%エタノールで固定した。パラフィン包埋し、次いで 2 μm 厚の切片を作製し、スライドガラス(シランコーティングスライド, DAKO・Japan 株式会社, 京都)に固定した。次いで、100%キシレン中でパラフィンを除去した後、純エタノールに浸した。次に、0.1 mol/l リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline : PBS)中で振盪した。次いで、Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 (FITC)-conjugated mouse monoclonal anti-ED-1 anti-

body(ED-1, Serotec Inc., Oxford)を一次抗体として37°Cで60分間反応させた。抗体はPBSで200倍に希釈し、非特異的結合を阻止するために5%ヒツジ血清を加えた。切片1枚につき200 μ lの一次抗体を反応させた後、切片をPBSで洗浄し、次いで二次抗体を37°Cで30分間反応させた。二次抗体には抗マウス ENVISION(DAKO ENVISION™+ System HRP Rabbit, DAKO, Carpinteria, USA)を使用した。

次いで、3,3-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB)液(和光純薬株式会社, 大阪)で発色させた後、水洗しヘマトキシリンにて染色した。染色切片を200倍の光学顕微鏡(BX51, オリパス光学工業株式会社, 東京)で観察し、一切片当たりの糸球体内ED-1発現細胞数の平均値を求め、糸球体内に浸潤したマクロファージの指標とした。

6. 統計解析

結果はすべてmean \pm SEMで示した。BW, SBP, UPの各群間の変動の有意差の有無は、repeated measures analysis of variance(ANOVA)で評価し、差異を認めた場合には個々の平均値間の有意差の有無をBonferroni/Dunn testで評価した。Scr, BUN, RIV, 糸球体ED-1発現細胞数の各群間の変動の有意差の有無はone way ANOVAで評価し、差異を認めた場合には個々の平均値間の有意差の有無をBonferroni/Dunn testで評価した。IGSの各群間の変動の有意差の有無はKruskal-Wallis testで評価し、差異を認めた場合には個々の平均値間の有意差の有無をBonferroni/Dunn testで評価した。p<0.05をもって統計学的に有意の差異とした。統計計算にはSPSS ver. 11.5J(SPSS Japan Inc., 東京)を用いた。

本研究のプロトコールは医学生理学的研究に関する国際指針の勧告の趣旨に沿ったものであり、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得た。

結 果

治療開始前のBW, SBP, UPの値には各腎摘群間に有意差を認めなかった。

12週間の実験期間におけるBWの変化をFig. 1に示す。全群のBWは経時的に増加した。各腎摘群のBWには実験期間を通して有意差を認めなかった。飼料の摂取重量においても群間に有意な差異を認めなかった。

12週間の実験期間におけるSBPの経時変化をFig. 2に示す。NPD群のSBPは12週間にわたって上昇を続け、

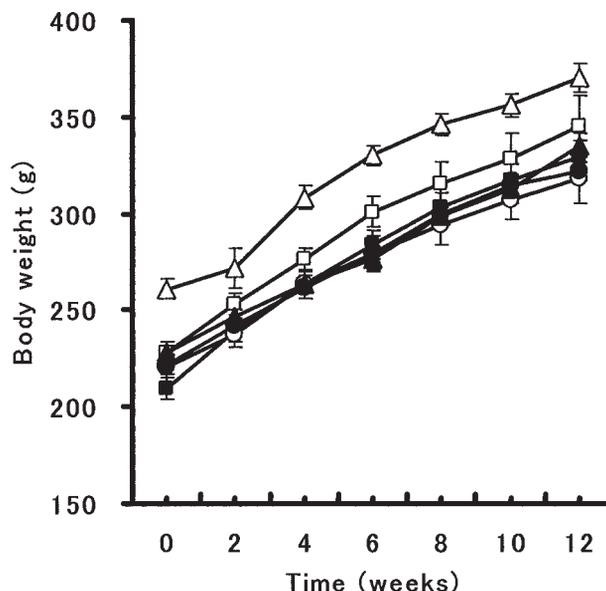


Fig. 1. Body weight (BW) over the 12-week treatment in the Sham (Δ), NPD (normal protein diet) (\square), LPD (low protein diet) (\circ), NPD+EX (normal protein diet and exercise) (\blacksquare), LPD+EX (low protein diet and exercise) (\bullet), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) (\blacktriangle) groups

Values are means \pm SEM.

最終週には204 \pm 8.2 mmHgに達した。

一方、NPD群に比較してNPD+EX群、LPD+EX群、LPD+EX+OLS群、Sham群のSBPは有意に低値を示した(repeated measures ANOVA, p<0.05 vs. NPD+EX; p<0.01 vs. LPD+EX; p<0.001 vs. LPD+EX+OLS, Sham)。また、LPD群のSBPは12週間にわたって有意に上昇した。NPD群とLPD群のSBPには差異を認めなかった。LPD群に比較してLPD+EX群、LPD+EX+OLS群、Sham群のSBPは有意に低値を示した(repeated measures ANOVA, p<0.05 vs. LPD+EX, Sham; p<0.01 vs. LPD+EX+OLS)。一方、LPD群とNPD+EX群のSBPには差異を認めなかった。また、NPD+EX群に比較してLPD+EX+OLS群、Sham群のSBPは有意に低値を示した(repeated measures ANOVA, p<0.05 vs. Sham; p<0.001 vs. LPD+EX+OLS)。LPD+EX+OLS群のSBPはすべての腎摘群のなかでも最低値を示した(repeated measures ANOVA, p<0.01 vs. LPD, p<0.001 vs. NPD, LPD+EX)。

12週間にわたるUPの経時変化をFig. 3に示す。NPD群、NPD+EX群のUPは12週間にわたって増加を続けた。一方、NPD群に比較してLPD群、LPD+EX

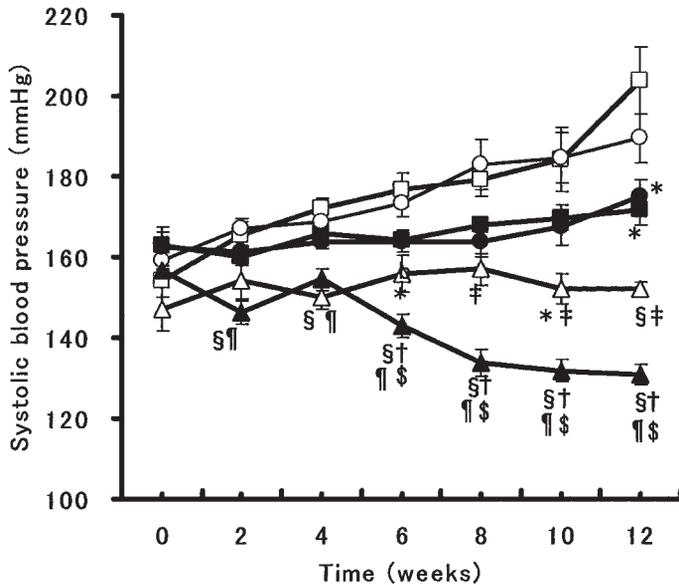


Fig. 2. Sequential for systolic blood pressure (SBP) in the Sham (Δ), NPD (normal protein diet) (\square), LPD (low protein diet) (\circ), NPD+EX (normal protein diet and exercise) (\blacksquare), LPD+EX (low protein diet and exercise) (\bullet), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) (\blacktriangle) groups

Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.01$ vs. NPD, $^{\S}p < 0.001$ vs. NPD, $^{\dagger}p < 0.05$ vs. LPD, $^{\ddagger}p < 0.01$ vs. LPD, $^{\S}p < 0.001$ vs. LPD+EX, $^{\dagger}p < 0.001$ vs. LPD+EX

群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の UP は有意に低値を示した (repeated measures ANOVA, $p < 0.05$ vs. LPD; $p < 0.0001$ vs. LPD+EX, LPD+EX+OLS, Sham)。また, NPD+EX 群に比較して LPD 群, LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の UP は有意に低値を示した (repeated measures ANOVA, $p < 0.05$ vs. LPD; $p < 0.01$ vs. LPD+EX, LPD+EX+OLS, Sham)。さらに, LPD 群に比較して LPD+EX+OLS 群, Sham 群の UP は有意に低値を示した (repeated measures ANOVA, $p < 0.0001$)。LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の UP には有意な差異を認めなかった。

各群の Scr の結果を Fig. 4a に示す。全 6 群の Scr に有意差を認めた (one way ANOVA, $p < 0.001$)。NPD 群に比較して LPD 群, LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の Scr は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.01$ vs. LPD, LPD+EX, LPD+EX+OLS; $p < 0.001$ vs. Sham)。LPD 群, LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の Scr には有意な差異を認めなかった。

各群の BUN の結果を Fig. 4b に示す。全 6 群の BUN に有意差を認めた (one way ANOVA, $p < 0.01$)。NPD 群

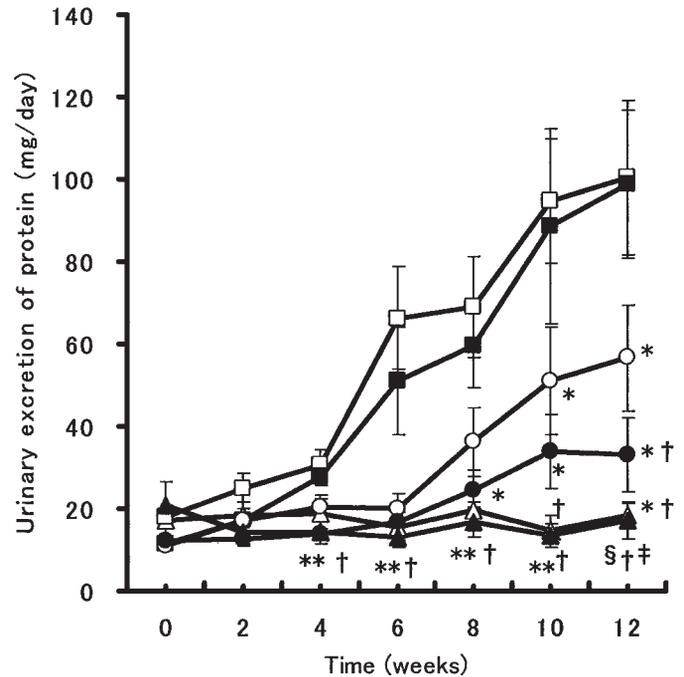


Fig. 3. Urinary excretion of protein (UP) values in the Sham (Δ), NPD (normal protein diet) (\square), LPD (low protein diet) (\circ), NPD+EX (normal protein diet and exercise) (\blacksquare), LPD+EX (low protein diet and exercise) (\bullet), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) (\blacktriangle) groups

Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NPD, ** $p < 0.01$ vs. NPD, $^{\S}p < 0.0001$ vs. NPD, $^{\S}p < 0.01$ vs. LPD, $^{\dagger}p < 0.01$ vs. NPD+EX

に比較して他のすべての群の BUN は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.01$)。さらに, NPD+EX 群に比較して LPD 群, LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群の BUN は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.05$)。LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の BUN には有意な差異を認めなかった。

NPD 群の残存腎組織には巣状, 分節状の糸球体硬化および間質増加所見を認めた。各群の IGS を Fig. 5 に示す。全 6 群の IGS に有意差を認めた (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$)。NPD 群に比較して他のすべての群の IGS は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.05$ vs. NPD+EX; $p < 0.001$ vs. LPD, LPD+EX, LPD+EX+OLS, Sham)。また, NPD+EX 群に比較して LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の IGS は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.01$ vs. LPD; $p < 0.001$ vs. LPD+EX, LPD+EX+OLS, Sham)。さらに, LPD 群に比較して LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の IGS は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.01$

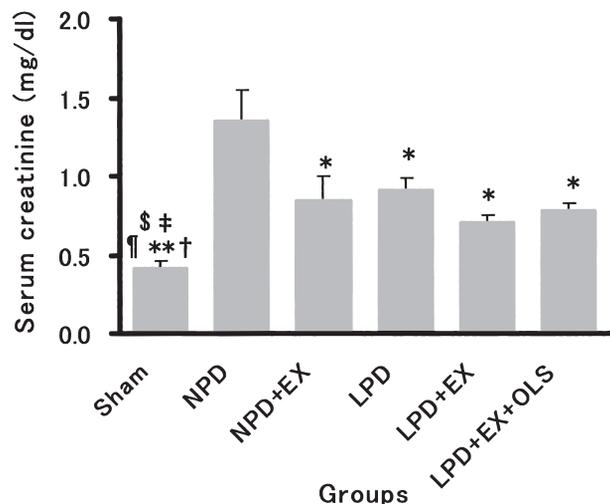


Fig. 4a. Serum creatinine (Scr) in the Sham, NPD (normal protein diet), NPD+EX (normal protein diet and exercise), LPD (low protein diet), LPD+EX (low protein diet and exercise), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) groups at 12 weeks

Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NPD, ** $p < 0.001$ vs. NPD, † $p < 0.01$ vs. LPD, ‡ $p < 0.01$ vs. NPD+EX, § $p < 0.05$ vs. LPD+EX, ¶ $p < 0.05$ vs. LPD+EX+OLS

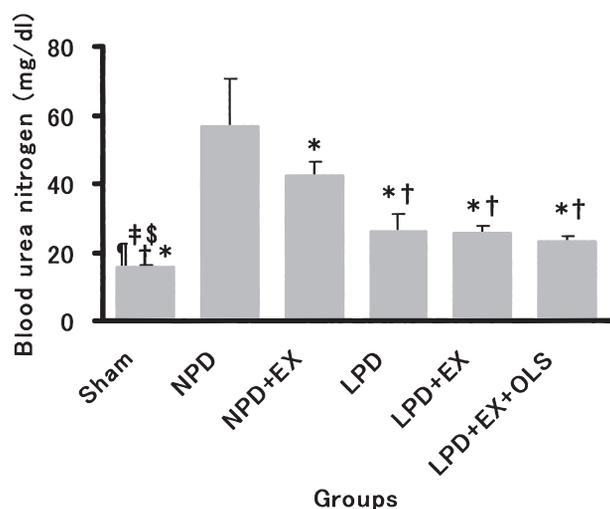


Fig. 4b. Blood urea nitrogen (BUN) in the Sham, NPD (normal protein diet), LPD (low protein diet), NPD+EX (normal protein diet and exercise), LPD+EX (low protein diet and exercise), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) groups at 12 weeks

Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.0001$ vs. NPD, † $p < 0.01$ vs. LPD, ‡ $p < 0.01$ vs. NPD+EX, § $p < 0.01$ vs. LPD+EX, ¶ $p < 0.05$ vs. LPD+EX+OLS

vs. LPD+EX ; $p < 0.001$ vs. LPD+EX+OLS, Sham)。LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の IGS には

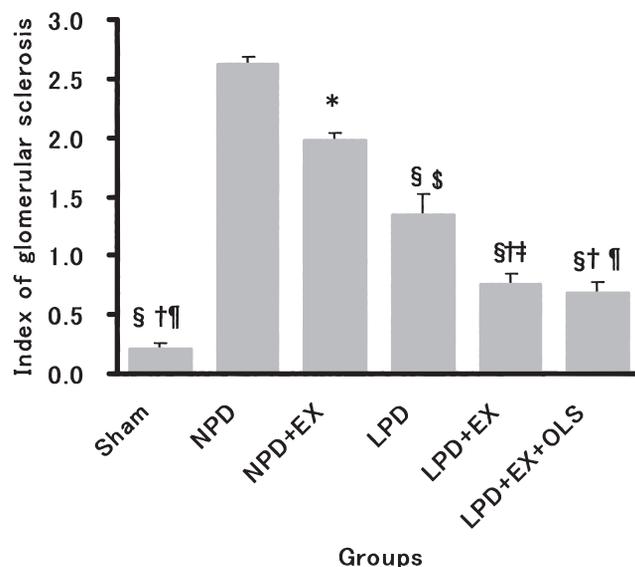


Fig. 5. Index of glomerular sclerosis (IGS) of the renal cortex in the Sham, NPD (normal protein diet), LPD (low protein diet), NPD+EX (normal protein diet and exercise), LPD+EX (low protein diet and exercise), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) groups at 12 weeks

Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, § $p < 0.001$ vs. NPD, † $p < 0.01$ vs. LPD, ¶ $p < 0.0001$ vs. LPD, § $p < 0.01$ vs. NPD+EX, ‡ $p < 0.001$ vs. NPD+EX.

有意な差異を認めなかった。

各群の RIV を Fig. 6 に示す。各群の RIV には有意差を認めた (one way ANOVA, $p < 0.001$)。NPD 群に比較して他のすべての群の RIV は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.0001$)。また, NPD+EX 群に比較して LPD 群, LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の RIV は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.0001$)。さらに, LPD 群に比較して LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の RIV は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.001$ vs. LPD+EX ; $p < 0.0001$ vs. LPD+EX+OLS, Sham)。LPD+EX 群に比較して LPD+EX+OLS 群, Sham 群の RIV は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.01$ vs. LPD+EX+OLS ; $p < 0.0001$ vs. Sham)。LPD+EX+OLS 群に比較して Sham 群の RIV は有意に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.0001$)。

一切片について 100~150 個の糸球体を観察して算出した各群の糸球体内 ED-1 発現細胞数を Fig. 7 に示す。各群の ED-1 発現細胞数には有意差を認めた (one way ANOVA, $p < 0.001$)。NPD 群に比較して LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の ED-1 発現細胞数は有意

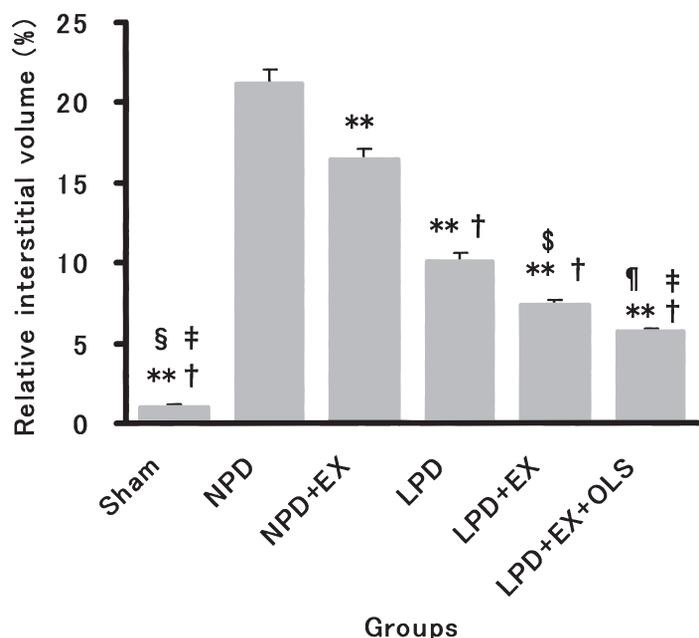


Fig. 6. Relative interstitial volume (RIV) of the renal cortex in the Sham, NPD (normal protein diet), NPD+EX (normal protein diet and exercise), LPD (low protein diet), LPD+EX (low protein diet and exercise), and LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) groups at 12 weeks

Values are expressed as the means \pm SEM. ** $p < 0.0001$ vs. NPD, † $p < 0.0001$ vs. NPD+EX, § $p < 0.001$, ‡ $p < 0.0001$ vs. LPD, ¶ $p < 0.01$, § $p < 0.0001$ vs. LPD+EX

に低値を示した (Bonferroni/Dunn test, $p < 0.05$ vs. LPD+EX; $p < 0.01$ vs. LPD+EX+OLS; $p < 0.001$ vs. Sham)。LPD+EX 群, LPD+EX+OLS 群, Sham 群の ED-1 発現細胞数には有意な差異を認めなかった。

考 察

ラットの腎を部分的に摘除しその mass を減少させると、代償性に残存腎の糸球体内圧の上昇, glomerular capillary flow の増加が生じ, 糸球体が傷害される。その結果, 高血圧, 腎機能障害, UP の増加を認めるようになり, 残存腎組織には慢性進行性腎疾患の多くにみられる focal glomerulosclerosis に類似した所見を認めるようになる²¹⁾。本研究においても, 5/6 腎摘除のみを行った NPD 群に高血圧, 多量の UP, さらに残存腎組織には強い糸球体硬化所見と間質増加所見を認めた。

本研究において, このような腎不全モデルラットに LPD を摂取させたところ, NPD 群に比較して UP, Scr, BUN, IGS, RIV が低値を示したことから, LPD は単独に

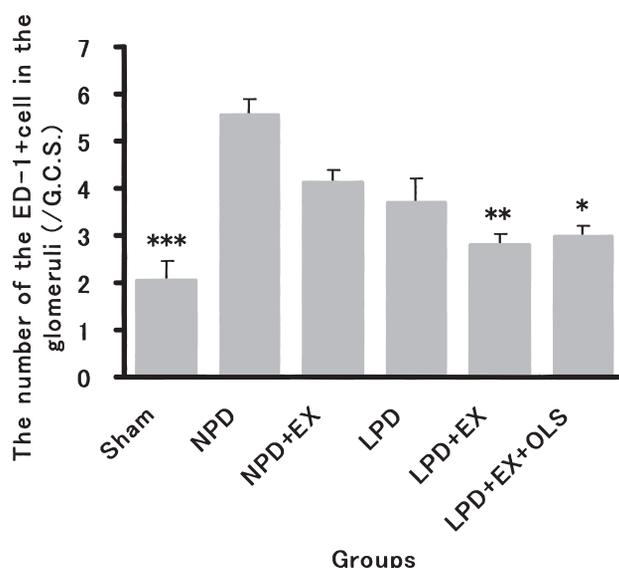


Fig. 7. Glomerular infiltration of the macrophage of the renal cortex. NPD (normal protein diet), LPD (low protein diet), NPD+EX (normal protein diet and exercise), LPD+EX (low protein diet and exercise), LPD+EX+OLS (low protein diet and exercise and olmesartan) groups at 12 weeks

Values are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NPD, ** $p < 0.01$ vs. NPD, *** $p < 0.001$ vs. NPD

よる腎保護作用を有することが示唆された。また, NPD+EX 群では NPD 群に比較して IGS, RIV が低値を示したことから, EX は単独で腎保護作用を有することが示唆された。さらに, LPD+EX 群では LPD 群に比較して IGS と RIV が低値を示し, また, NPD+EX 群に比較して LPD+EX 群の UP, BUN, IGS, RIV が低値を示したことから, LPD と EX の併用による腎保護効果の増強作用が示唆された。さらに, LPD+EX への OLS の併用は LPD+EX 群に比較して UP を減少させ, Scr, BUN を増悪させることなく血圧を低下させた。本研究では, Sham 群と LPD+EX+OLS 群の UP, Scr, BUN, IGS, ED-1 発現細胞数に有意な差異を認めなかった。このことは, 本研究で評価した項目および使用した動物モデルに限定されるかもしれないが, LPD+EX+OLS により Sham 群のレベルに腎が保護されたことを示唆させる。

慢性腎不全動物モデルにおける LPD の効果に関する報告は少ないが, Schiller ら²²⁾ は, 5/6 腎摘 Sprague-Dawley ラットに 6% または 24% タンパク食を与えて 7 週間観察したところ, 6% タンパク食群の糸球体硬化がより軽度であったと報告している。本研究においても, 5/6 腎摘除 WKY ラットに LPD または NPD を与えて 12 週間にわ

たって比較検討したが、同様に摂取タンパク制限による腎保護効果が観察された。LPD によるこのような腎保護効果の機序については、尿管・糸球体フィードバック機構を介して腎輸入細動脈の収縮が生じ、糸球体高血圧が是正されることなどにより腎が保護される可能性が考えられている²³⁾。

本研究では、タンパク質含有量が 18.3% であるラット用標準飼料を摂取させた場合に比較して、それより少ないタンパク質含有量の飼料を摂取させた場合の効果を検討した。タンパク質含有量 12.6% の飼料による食事療法がいかなる原因による腎機能障害のいかなる病期に好ましい効果を発揮するのか、また、ヒトの場合にどの程度のタンパク質制限に相当するのかについては今後の詳細な検討が必要である。

一方、LPD のデメリットも指摘されている。Castaneda ら²⁴⁾ は、高齢女性に 0.45 g/kg または 0.92 g/kg のタンパク質含有量の食事を 9 週間摂取させ、握力および下肢の筋力を比較したところ、0.92 g/kg 群に比較して 0.45 g/kg 群のそれは低下していた。また、Cupisti ら⁵⁾ も LPD 療法を行った患者では上腕の筋力が低下することを報告している。さらに、LPD により下肢の筋量が減少する危険性も示唆されている⁵⁾。すなわち、LPD による熱量摂取不足、栄養状態の低下は筋量を減少させたり筋機能を減弱させ、ひいては体力を低下させ^{5,25)}、結果として QOL を損なう可能性があることが示唆されている。

Kouidi ら²⁶⁾ は、血液透析患者が歩行、自転車エルゴメーター、ジョギング、水泳またはゲームスポーツを 1 週間に 3 回の頻度で 90 分間ずつ計 6 カ月間にわたって行ったところ、大腿四頭筋の萎縮や最大酸素摂取量、最大運動持続時間が改善することを観察した。Parsons ら²⁷⁾ は、血液透析患者が 1 週間に 3 回の頻度で計 8 週間にわたる自転車エルゴメーターによる運動を行い、QOL が改善したことを報告している。以上より、EX には LPD による筋、体力および QOL におけるデメリットを軽減する効果がある可能性が示唆される。

EX が腎に及ぼす影響に関する報告では、5/6 腎摘モデルラットを用いて検討され、UP の減少や糸球体硬化病変の軽減が観察されている^{28,29)}。また、Bergamschi ら⁷⁾ は EX による糸球体高血圧の軽減を観察した。このことが本研究で用いた 5/6 腎摘 WKY ラットにもあてはまるとすれば、EX により腎の輸出細動脈が拡張し、糸球体高血圧を是正させたことなどにより腎が保護されたのかもしれない。

本研究においては LPD 群と NPD 群の SBP に差異を認めなかった。このことから、LPD による腎保護作用の一部は、non-hemodynamic な機序によるものであると考えられる。また、LPD と EX の腎保護作用のメカニズムが異なっている可能性があるため、両者の併用による相加的な腎保護効果が期待できると考えられる。すなわち、LPD は血圧非依存性の機序で尿蛋白を減少させ腎保護効果を発揮し、EX は血圧依存性の機序で尿蛋白非依存性に腎保護効果を発揮する可能性が考えられる。

現時点までに、ラットを用いて LPD と EX の併用による腎保護効果を検討した成績は本研究以外にはなされていない。臨床成績では LPD と EX の併用効果に関する報告がみられ、Castaneda ら³⁾ は、腎機能障害者に 0.6 g/kg/day のタンパク制限食を摂取させ、機器による上・下肢筋力トレーニングを 12 週間行ったところ、上・下肢筋力の増強、膝屈曲伸展筋力の増加、GFR の増加を観察した。

ARB は、ACE 阻害薬と同様に単独で腎保護効果を示す成績が報告され汎用されている。今回用いた OLS も単独療法で、5/6 腎摘除 spontaneously hypertensive rat (SHR) において UP を減少させ、糸球体硬化抑制作用、間質増殖抑制作用を示した^{15,16)}。

EX と ARB の併用に関する報告は少ないが、Kohzuki ら²⁹⁾ は 5/6 腎摘除 SHR を用いて検討した。その結果、併用により UP 減少効果と糸球体硬化軽減効果、間質障害抑制が増強した。

LPD と ARB の併用効果に関しては Peters ら³⁰⁾ が検討している。特異的抗 Thy-1 抗体を投与した SD ラットを用いて腎の免疫染色を行った結果、6 日間のエナラプリルまたはロサルタンと LPD との併用は、単独療法による糸球体 TGF- β 発現抑制効果および UP 減少効果を増強した。すなわち、LPD と ARB はそれぞれ異なる機序で TGF- β の発現を減弱させる可能性が示唆される報告である。

これら、ARB 単独療法、EX と ARB の併用療法、LPD と ARB の併用療法の効果に関する成績は、実験条件、投薬方法、評価項目などが本研究と異なっているため、単純に本研究の成績と比較することはできないが、いずれも本研究で得られた成績を支持するものであると考えられる。

本研究では、LPD、EX、ARB の併用による腎保護効果について糸球体内 ED-1 発現細胞数を指標として検討した。このような EX、LPD、ARB 併用の腎保護効果に関して免疫染色を行って検討した成績は、今回の成績以外には

報告されていない。本成績からは、LPD+EX、LPD+EX+OLSが糸球体内マクロファージ浸潤を抑制したことから、腎保護効果の一部は糸球体内マクロファージ浸潤抑制効果によるものである可能性が示唆された。

現時点において、LPD、EX、ARBの併用による腎保護効果の増強作用の機序については明らかではないが、以下の可能性を考える。すなわち、LPDは腎の輸入細動脈を拡張させ²³⁾、EXは輸出細動脈を拡張させ¹⁶⁾、さらにARBは輸出細動脈を拡張させるのみならず、TGF- β に対する作用をはじめとするAng IIの作用をも抑制する³⁰⁾。したがって、LPD、EX、ARBを併用することにより、輸入および輸出細動脈の両者は拡張し、それぞれの単独療法の場合に比較してより効果的に糸球体毛細血管圧を低下させ、さらにAng II作用の抑制効果と相俟ってより強い腎保護効果をもたらす可能性が考えられる。LPD+EXおよびOLSがいかなる機序で糸球体内ED-1発現細胞数に影響を及ぼしたか否かについては、今後の詳細な検討が必要である。

結 論

5/6腎摘除慢性腎不全モデルラットにおいて、LPDとEXは単独で腎保護効果を有することが示唆された。さらに、LPDとEXの併用による腎保護効果の増強効果が示唆された。特に、LPD+EXへのOLSの併用はUP減少効果、間質増殖抑制効果を増強し、また、腎機能の指標であるScr、BUNを増悪させることなく慢性腎不全モデルラットの高血圧を改善させた。

本研究の一部は文部科学研究費基盤研究(B)(2)課題番号：16300179によって助成された。

文 献

- Zarazaga A, Garcia-De-Lorenzo L, Garcia-Luna PP, et al. Nutritional support in chronic renal failure: systematic review. *Clin Nutr* 2001; 20(4): 291-299.
- Fouque D, Wang P, Laville M, et al. Low protein diets delay end-stage renal disease in non-diabetic adults with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(12): 1986-1992.
- Castaneda C, Gordon PL, Uhlin KL, et al. Resistance training to counteract the catabolism of a low-protein diet in patients with chronic renal insufficiency. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2001; 135(11): 965-976.
- Kouidi E, Albani M, Natsis K, et al. The effects of exercise

- training on muscle atrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(3): 685-699.
- Cupisti A, Licitra R, Chisari C, et al. Skeletal muscle and nutritional assessment in chronic renal failure patients on a protein-restricted diet. *J Intern Med* 2004; 255(1): 115-124.
- Castaneda C, Grossi L, Dwyer J. Potential benefits of resistance exercise training on nutritional status in renal failure. *J Ren Nutr* 1998; 8(1): 2-10.
- Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, et al. Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29: 169-174.
- Clorius JH, Mandelbaum A, Hupp T, et al. Exercise activates renal dysfunction in hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9(7): 653-661.
- Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, et al. Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int* 1997; 51(6): 1908-1919.
- Cao Z, Cooper ME, Wu LL, Cox AJ, et al. Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension* 2000; 36(4): 561-568.
- Taal MW, Chertow GM, Rennke HG, et al. Mechanisms underlying renoprotection during renin-angiotensin system blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2): F343-355.
- Ots M, Mackenzie HS, Troy JL, et al. Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(2): 224-230.
- Noda M, Matsuo T, Fukuda R, et al. Effect of candesartan cilexetil(TCV-116) in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 56(3): 898-909.
- Cao Z, Burrell LM, Tikkanen I, et al. Vasopeptidase inhibition attenuates the progression of renal injury in subtotal nephrectomized rats. *Kidney Int* 2001; 60(2): 715-721.
- Yoshida K, Xu HL, Kawamura T, et al. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II antagonism in rats with chronic renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40: 533-542.
- Xu HL, Yoshida K, Wu XM, et al. Effects of CS-866, an angiotensin II receptor antagonist, in 5/6 nephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Nephrol* 2001; 43(7): 580-588.
- Borkowski KR, Quinn P. Validation of indirect systolic blood pressure measurement in ether anaesthetised rats. *J Auton Pharmacol* 1983; 3(3): 157-160.
- Irvine RJ, White J, Chan R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997; 38(3): 157-162.
- Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, et al. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int* 1997; 32(5): 691-699.

20. Ootaka T, Saito T, Soma J, et al. Analysis of leukocyte surface antigen on ethanol-fixed paraffin-embedded tissue material. *J Immunol Methods* 1990 ; 131 : 183-193.
21. Griffin KA, Picken MM, Churchill M, et al. Functional and structural correlates of glomerulosclerosis after renal mass reduction in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11(3) : 497-506.
22. Schiller B, Moran J. Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model—an inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 1997 ; 12(3) : 430-437.
23. Bankir L, Kriz W. Adaptation of the kidney to protein intake and to urine concentrating activity : similar consequences in health and CRF. *Kidney Int* 1995 ; 47(1) : 7-24.
24. Castaneda C, Charnley JM, Evans WJ, et al. Elderly women accommodate to a low-protein diet with losses of body cell mass, muscle function, and immune response. *Am J Clin Nutr* 1995 ; 62(1) : 30-39.
25. Kopple JD. Pathophysiology of protein-energy wasting in chronic renal failure. *J Nutr* 1999 ; 129(1S Suppl) : 247S-251 S.
26. Kouidi E, Albani M, Natsis K, et al. The effects of exercise training on muscle atrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998 ; 13(3) : 685-699.
27. Parsons TL, Toffelmire EB, King-VanVlack CE. The effect of an exercise program during hemodialysis on dialysis efficacy, blood pressure and quality of life in end-stage renal disease(ESRD) patients. *Clin Nephrol* 2004 ; 61(4) : 261-274.
28. Wu XM, Kohzuki M, Kamimoto M, et al. Effects of chronic exercise on renal function in 5/6 nephrectomized spontaneously hypertensive rats(SHR). *Jpn J Nephrol* 1999 ; 41(2) : 35-42.
29. Kohzuki M, Kamimoto M, Wu XM, et al. Renal protective effects of chronic exercise and antihypertensive therapy in hypertensive rats with chronic renal failure. *J Hypertens* 2001 ; 19(10) : 1877-1882.
30. Peters H, Border WA, Noble NA. Angiotensin II blockade and low-protein diet produce additive therapeutic effects in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000 ; 57(4) : 1493-1501.