

5/6 腎摘ラットにおける L-Arginine の NO 産生および糸球体組織に対する逆説的用量依存性効果

田中俊彦 中西 健 蓮池由起子 井上 徹
野口光一 高光義博

Paradoxical effect of L-Arginine on nitric oxide(NO) synthesis and histopathological changes in 5/6 nephrectomized SD rats

Toshihiko TANAKA, Takeshi NAKANISHI, Yukiko HASUIKE, Touru INOUE, Kouichi NOGUCHI, and Yoshihiro TAKAMITSU

* Department of Kidney and Dialysis, ** Department of Anatomy and Neuroscience, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

Whether L-Arginine(L-ARG) ameliorates or aggravates renal function and histopathological changes in several models of renal disease remains controversial as L-ARG is the substrate for nitric oxide (NO) synthase as well as the precursor of proline and polyamines which cause renal fibrosis. These ambiguous results might be attributed to differences in the dose and period of L-ARG administration and the animal model used in each observation. Therefore, we tested the dose-dependent effect of L-ARG on mean blood pressure(MBP), 24-hour urinary excretion of protein(UP), NO metabolites($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) and cyclic GMP(cGMP), plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA), glomerular sclerosis index (SI) and % interstitial fibrosis area (%INT) in 5/6 nephrectomized SD rats. These 5/6 nephrectomized SD rats were divided into 4 groups : ① L-ARG 0.2 g/kg/day(0.2 g ARG), ② L-ARG 1 g/kg/day (1g ARG), ③ L-ARG 2 g/kg/day (2 g ARG), ④ No administration of L-ARG (ARG(-)). Compared with ARG(-)MBP, UP and ADMA were significantly decreased and $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, cGMP were significantly increased in the 0.2 g ARG. SI group and %INT were significantly increased in the 2 g ARG group and decreased in the 0.2 gARG group. A small dose of L-ARG ameliorated glomerulosclerosis and interstitial fibrosis while a larger dose did not. SI, %INT and ADMA were inversely correlated with $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$. These data suggested that renal NO synthesis might attenuate glomerulosclerosis and interstitial fibrosis and the rise in ADMA and L-ARG might cause the decrease in NO.

Jpn J Nephrol 1999 ; 41 : 754-763.

Key words : 5/6 nephrectomized rats, L-Arginine, nitric oxide, SI, %INT

緒 言

慢性腎障害における共通の進行促進要因の一つは糸球体硬化であり¹⁾, その進展抑制には一酸化窒素(NO)が重要な役割を果たしていると考えられている²⁾. われわれはすでに糸球体硬化モデルである 5/6 腎摘ラットに対して, NO 供与体となりうる薬剤(ニブラジロール)を用いて,

NO 産生が糸球体硬化の抑制や蛋白尿の減少に関与していることを明らかにした³⁾. 従来, NO 合成酵素の基質である L-アルギニン⁴⁾は NO を上昇させるという推測のもとに, 糸球体硬化をはじめとする種々の腎疾患モデルでの効果が検討されてきたが, Table 1 に示すように, 必ずしも L-アルギニンの尿蛋白, 血圧, 糸球体硬化に対する効果は一定ではない。

その原因として、従来の報告ではラットの種、腎疾患モデルや L-アルギニンの投与量が報告者により異なっているためと考えられる。Ashab ら⁴⁾は、5/6 腎摘 Sprague-Dawley ラットに 0.125% L-アルギニン水を投与することにより尿中 NO 代謝物排泄量の増加とともに尿蛋白、血圧の低下を、Katoh ら⁵⁾は、5/6 腎摘 Munich-Wistar ラットに 1% L-アルギニン水を投与することにより、血圧の低下を報告している。一方、Alvaro らは、Sprague-Dawley ラットに 1% L-アルギニン水を投与することにより尿中 NO 代謝物排泄量が増加するとともに血圧は低下するが、尿蛋白は増加するとし⁶⁾、Narita らは Thy-1 腎炎ラットに対し、1.5% L-アルギニン水を投与することにより尿蛋白は増加するが、血圧は変化しないと報告している⁷⁾。

以上のように、経口的 L-アルギニン投与の腎に対する作用については定見がない。そこで本研究では、L-アルギニンの腎糸球体硬化に対する作用の用量の影響を検討するため、糸球体硬化モデルである 5/6 腎摘ラット⁸⁾において 3 用量の L-アルギニンを負荷し、各群で平均血圧、尿中尿素窒素、尿蛋白、腎機能、尿中 NO 代謝物および cyclic GMP (cGMP)、血中および尿中 L-アルギニンを測定するとともに、糸球体硬化、間質の線維化に対する L-アルギニンの効果を比較検討した。また、同時に NO 合成酵素(NOS)産生を阻害することにより NO 産生量を低下させ、腎不全患者の高血圧に関与すると報告されている⁹⁾ 血中 asymmetrical dimethylarginine (ADMA) 濃度を測定し比較検討を行った。

材料および方法

1. 5/6 腎摘ラットの作成

体重約 180 g、7 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット (チャールスリバー, Tokyo, Japan)において、ペントバルビタール 40 mg/kg (大日本製薬, Osaka, Japan) 麻酔下 (i. p) に、左腎動脈上、中、下枝 3 本のうち、上下枝 2 本に対し、マイクロサージェリー用の持針器を使用し、7-0 針付き絹糸 (血管丸針, 松田医科工業 (株), Tokyo, Japan) にて目標血管を結紮した。さらに 1 週間後、右腎を全摘し 5/6 腎摘ラットを作成した。また、同時に両腎を露出後被膜のみを切開したシャム群 (n=6) を作成した。

2. 実験方法

5/6 腎摘ラット作成 1 週後 4 群に分け、1 群は L-アルギニン非投与群 (n=6, 以下 ARG (-) 群) とし、残りの 3 群に L-アルギニン 0.2 g/kg/day (n=6, 以下 0.2 g ARG 群)、

Table 1. Controversial effects of L-ARG on renal disease

	Model	L-ARG (%)	NO	UP	MBP
Ashab I et al.	5/6 NX SD	0.125	↑↑	↓↓	↓↓
Kato T et al.	5/6 NX MW	I	N/A	N/A	↓
Alvaro A et al.	Diabetic SD	I	↓↓	↓↓	↓
	Control SD	I	↑	↑	↓
Narita I et al.	GN SD	1.5	N/A	↑↑	→

SD : Sprague-Dawley rats, MW : Munich-Wistar rats, GN : glomerulonephritis, N/A : not available, NO : nitric oxide, UP : urine protein, MBP : mean blood pressure, L-ARG : L-arginine. L-ARG was administrated in drinking water.

1 g/kg/day (n=6, 以下 1 g ARG 群), 2 g/kg/day (n=6, 以下 2 g ARG 群) を投与し、12 週間飼育観察した。L-アルギニンは 1 日に摂取させた飼料 14 g (日本クレア社, Osaka, Japan) (CE-2 蛋白 : 25.4% (アミノ酸組成成分中 L-Arg 含量 1.55 g/100 g), Na : 0.26%, K : 1.06%) 中に各々の量を混入した。飲水は tap water にて自由に摂取させ、飼料が完全に摂取されたことを毎日朝 10 時に確認した。また、シャム群においても ARG (-) 群と同様の飼料を摂取させ、12 週間飼育観察した。

3. 検査項目ならびに測定方法

体重、平均血圧を薬剤投与前および投与後 2 週間毎に測定し、同時に 24 時間の採尿を行った。血圧は平均血圧を tail cuff 法 (吉田製作所 UR-5000, Osaka, Japan) により 10 回連続で測定しその最高、最低を除いた近似する 3 回の平均値を用いた。採尿は代謝ゲージに 48 時間慣らした後、次の 24 時間における尿を採取した。採血は実験開始 12 週間後、屠殺時に行った。

尿中蛋白濃度はビューレット法、尿中尿素濃度はウレアーゼ UV 法により、また、血液尿素窒素、血漿クレアチニンを自動分析装置 (Hitachi Model 736, Tokyo, Japan) を用いて測定した。尿中 cGMP 濃度は RIA 法 (Cyclic GMP [¹²⁵I] RIA KIT, Boston, USA) にて測定した。

尿中 NO 代謝物濃度は宮武らの方法¹⁰⁾により anion exchange column (Tosoh TSK-GEL IC-ANION PWXL, Tokyo, Japan) を用いて吸光度計を伴う HPLC 法により測定した。

尿中、血中の L-アルギニン濃度は Patchett らの方法¹¹⁾を一部変更した HPLC 法によった。すなわち ophthalmaldehyde により前処置の後、逆相カラム (Tosoh TSK-gel ODS 80TS, Tokyo, Japan) により抽出し、蛍光検出器を伴う HPLC 法により定量した。 (Hitachi Model 7000,

Tokyo, Japan)。

血中の ADMA 濃度も ophthalaldehyde による前処置を行った後、HPLC 法(Hitachi Model F-1080, Tokyo, Japan)により定量した。本法では L-アルギニン測定用の前処置液中の mercaptoethanol の代わりに acetylcystein を用いた。血漿を ethanol で除蛋白したのち前処置液とともに攪拌し、3 分間の反応後、逆相カラム(Sensyu Kagaku Pegasil ODS, Tokyo, Japan)により分離抽出し定量した。

4. 糸球体濾過量および腎血液量の測定

薬剤投与 12 週後に頸動脈、頸静脈および膀胱にカニューレ(PE50: Beckton Dickinson Co, New Jersey, USA)を挿入した。頸静脈カテーテルより 0.6 W/V% イヌリン(Laevosan-Gesellschaft M. B. H Linz, Austria)および 0.08 W/V% パラアミノ馬尿酸ソーダ(第一製薬, Tokyo, Japan)を生理食塩水と保存血漿を 1:1 で混合した溶液に溶解し、3 ml/hr で 80 分間持続注入した。その間注入開始 40 分後に 0.6 ml 頸動脈カテーテルより採血し、同量を保存血漿により補い、採尿を開始した。次に 40 分間の採尿終了後、頸動脈より採血を行った。血液および尿サンプルは 1M 過塩素酸により除蛋白を行い、以下の測定に供した。血中および尿中イヌリン濃度をアンスロン法¹²⁾により、また、パラアミノ馬尿酸濃度を腎血漿流量測定用試薬キット(石津製薬, Osaka, Japan)を用いて測定し、それぞれのクリアランス値を腎重量で補正し糸球体濾過値および腎血漿流量を求めた。

5. 糸球体硬化指数、間質線維化比率の測定

クリアランス計測のための採血、採尿後脱血屠殺し、残存腎を取り出しホルマリン固定した。固定した腎の 3×10⁻⁶ m 切片を作成、periodic acid Schiff 染色後、糸球体を光学顕微鏡 400 倍にて観察した。糸球体は Raji らの方法¹³⁾に準じ、本実験と関係のない 2 人が別個に同一のプレパラート上の 50 個の糸球体を硬化の程度により、硬化のないものを 0 度、硬化の程度が 25% 以下のものを 1 度、25~50% のものを 2 度、50~75% のものを 3 度、75% 以上のものを 4 度と分類して数値化し、その平均値を糸球体硬化指数(SI)とした。間質の線維化は、腎切片を Masson's trichrome 染色後、腎組織を光学顕微鏡 400 倍にて観察し、画像解析装置(Ibas System, Carl Zeiss Co, Germany)を用いて糸球体、大血管を除く青染した面積を 20 視野において測定し、その平均値を間質線維化面積とし、次に糸球体、大血管を除く間質線維化面積の全面積に対する比を間質線維化比率(%INT)とした。

Table 2. Body weight and daily urine volume before and after 12 weeks treatment

	Body weight (g)		Urine volume (ml/day)	
	Before	After	Before	After
ARG (-)	195 ± 13	337 ± 4	32.4 ± 1.6	30.3 ± 2.1
0.2 g ARG	200 ± 13	349 ± 5	30.7 ± 1.9	24.6 ± 1.4*
1 g ARG	183 ± 12	351 ± 14	33.0 ± 2.4	29.5 ± 2.0
2 g ARG	186 ± 17	354 ± 7	32.1 ± 1.7	35.9 ± 2.1**
SHAM	233 ± 16	352 ± 6	14.7 ± 1.6	21.5 ± 0.7

* significantly different from 5/6 NX (p<0.05),

** significantly different from 0.2 g ARG (p<0.05)

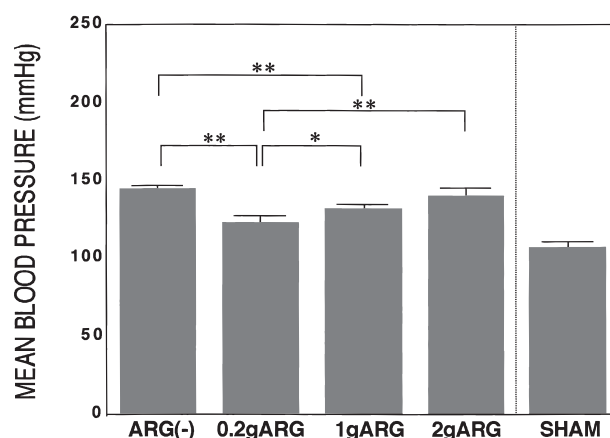


Fig. 1. Effects of L-arginine administration on mean blood pressure in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means ± SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.

* p<0.05, ** p<0.01, significantly different.

6. 統計計算

各群間の比較は Stat View (Ver4.0, Abacus Concepts, Ca, USA)を用い、Bonferroniの方法により多重解析を行い p<0.05 を有意とした。すべての統計は、5/6 腎摘した動物のなかで比較を行い、シャム群を参照値とした。

結 果

1) 体重および尿量の変化

体重は L-アルギニン投与開始 0 週から 12 週まで経時的に増加したが、全群間に有意差はみられなかった。実験開始 12 週後の尿量については、ARG(-)群に比し 0.2 g ARG 群において有意の低下を、2 g ARG 群において有意の増加を認めた (Table 2)。

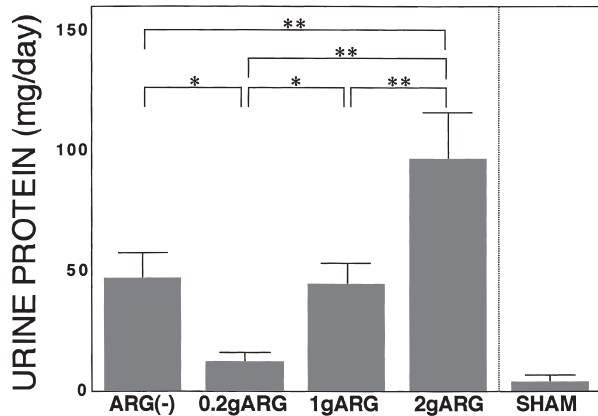


Fig. 2. Effects of L-arginine administration on urine protein in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

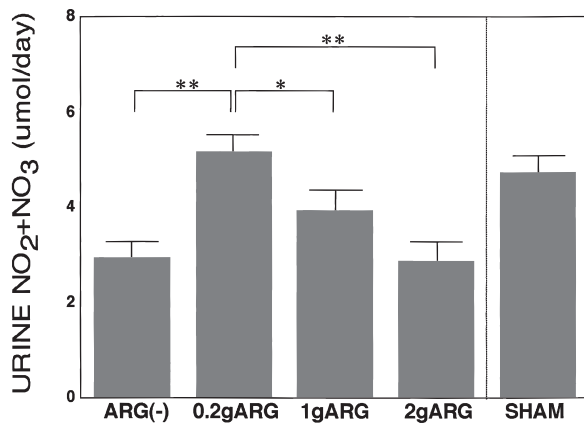


Fig. 4. Effects of L-arginine administration on urine NO₂⁻+NO₃⁻ in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

2) 血圧, 尿蛋白量および尿中尿素窒素排泄量

実験開始 12 週後の平均血圧については, ARG(-)群に比し 0.2 g ARG 群, 1 g ARG 群では血圧は有意に低下したが, 2 g ARG 群では有意な変化はみられなかった (Fig. 1)。

また, 1 日尿蛋白量については, ARG(-)群に比し 0.2 g ARG 群において有意な減少を, 2 g ARG 群では有意な増加を認めた。1 g ARG 群では有意な変化は認めなかった (Fig. 2)。

実験開始 12 週後の 1 日尿中尿素窒素排泄量については, ARG(-)群に比し 2 g ARG 群では有意な増加を認めた

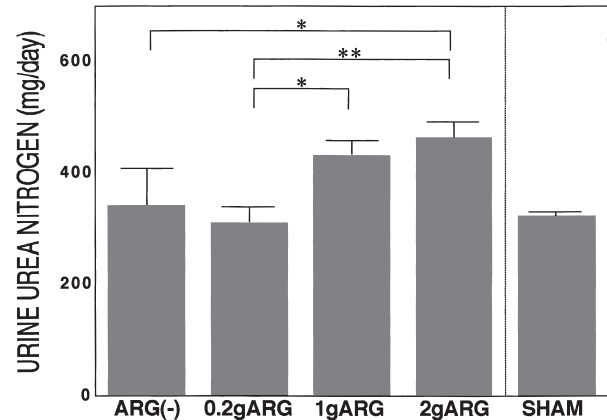


Fig. 3. Effects of L-arginine administration on urine urea nitrogen in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

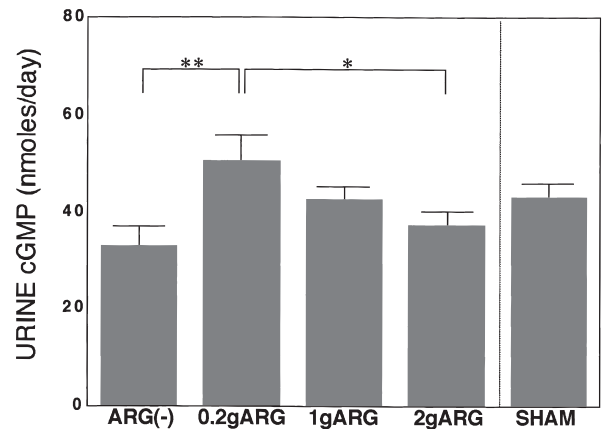


Fig. 5. Effects of L-arginine administration on urine cGMP in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

が, 他の群では有意な差は認めなかった (Fig. 3)。

3) 尿中 NO 代謝物排泄量および cGMP 排泄量

実験開始 12 週後の尿中 NO 代謝物排泄量は, ARG(-)群に比し 0.2 g ARG 群で有意に増加したが 1 g ARG 群, 2 g ARG 群では有意な変化はみられなかった。0.2 g ARG 群との比較では 1 g ARG 群, 2 g ARG 群において各々有意な低下を認めた (Fig. 4)。

実験開始 12 週後の 0.2 g ARG 群の尿中 cGMP 排泄量は, ARG(-)群および 2 g ARG 群と比較して有意な増加を認めた。なお, 0.2 g ARG 群を除く 3 群間に有意差は認

Table 3. Effects of L-arginine on kidney weight and renal function in remnant kidney rats (12 weeks)

	KW	GFR	RPF	BUN	CRN
ARG(-)	1.70±0.08	349±46	1,221±119	38.2±0.9	1.07±0.03
0.2 g ARG	1.58±0.13	510±55*	1,887±159*	31.3±1.9*	0.85±0.06*
1 g ARG	1.85±0.18	337±69**	911±141***	38.7±1.5**	0.97±0.09
2 g ARG	1.98±0.03**	306±61**	852±147***	42.3±3.1***	1.15±0.02***
SHAM	1.27±0.03	714±24	2,527±396	17.8±1.2	0.46±0.02

Abbreviations : KW : kidney weight (g), GFR : glomerular filtration rate (μ l/min/g kidney wt), RPF : renal plasma flow (μ l/min/g kidney wt), BUN : blood urea nitrogen (mg/dl), CRN : creatinine (mg/dl). * significantly different from 5/6 NX ($p < 0.05$), ** significantly different from 0.2 g ARG ($p < 0.05$), *** significantly different from 0.2 g ARG ($p < 0.01$)

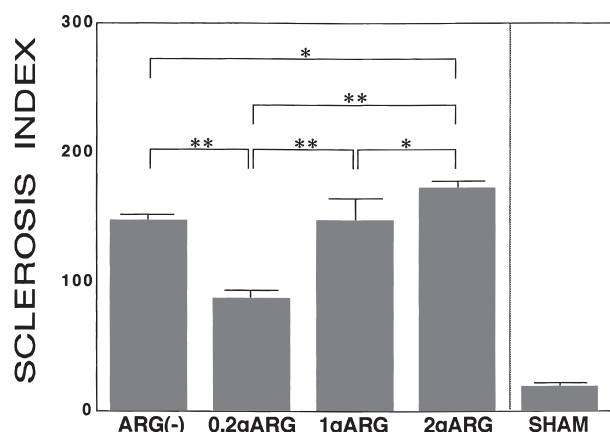


Fig. 6. Effects of L-arginine administration on the sclerosis index in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

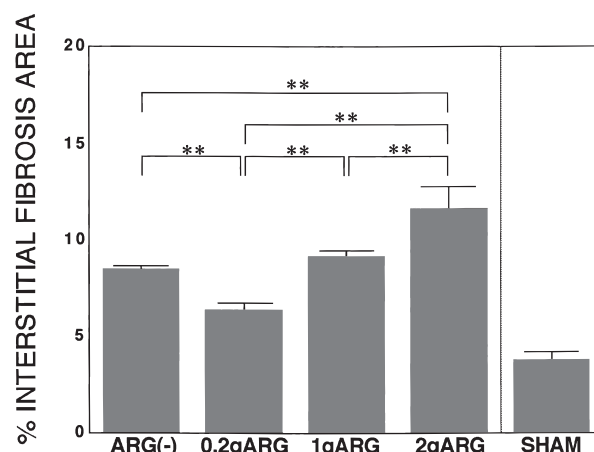


Fig. 7. Effects of L-arginine on %interstitial fibrosis area in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 5,5,5,5 and 5 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively. ** $p < 0.01$, significantly different.

めなかった (Fig. 5)。

4) 腎重量および腎機能

残存腎重量は ARG(-) 群に比し 0.2 g ARG 群で低下傾向がみられたが有意差はなかった。1 g ARG 群, 2 g ARG 群では逆に増加傾向が認められた。0.2 g ARG 群と比較すると 1 g ARG 群, 2 g ARG 群両群で増加し, 特に 2 g ARG 群では有意な増加を認めた。

実験開始 12 週後に測定した糸球体濾過量, 腎血漿流量は ARG(-) 群に比し 0.2 g ARG 群において有意に増加し, 血液尿素窒素, 血漿クレアチニンは有意に低下した。2 g ARG 群では ARG(-) 群に比し糸球体濾過値, 腎血漿流量の低下および血液尿素窒素, 血漿クレアチニンの上昇が認められ 0.2 g ARG 群とは逆の結果を示した (Table 3)。

5) 糸球体硬化指数 (SI) および間質線維化比率 (% INT)

実験開始 12 週後において SI および %INT は ARG(-) 群に比し, 0.2 g ARG 群において有意な減少を認めた。しかし, 1 g ARG 群, 2 g ARG 群両群では増加し, 特に 2 g ARG 群では有意な増加を認めた (Fig. 6, 7)。

6) 血中および尿中の L-アルギニン濃度

薬剤投与 12 週後に測定した血中および尿中の L-アルギニン濃度は ARG(-) 群に比し, 0.2 g ARG 群では有意差はなかったが, 1 g ARG, 2 g ARG 両群では各々有意な増加を認めた (Fig. 8, 9)。

7) 血中 ADMA 濃度

実験開始 12 週後に測定した血中の ADMA 濃度は ARG

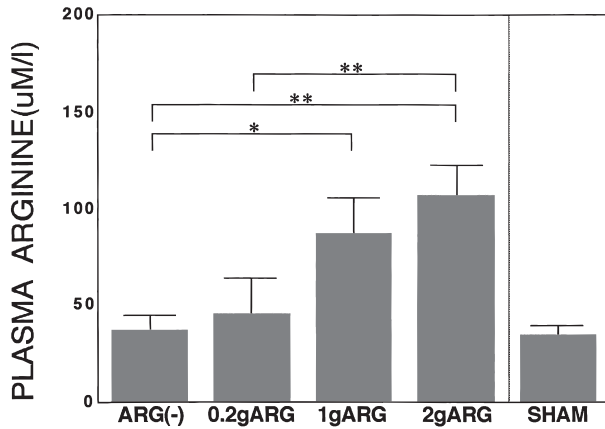


Fig. 8. Serum L-arginine concentration in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

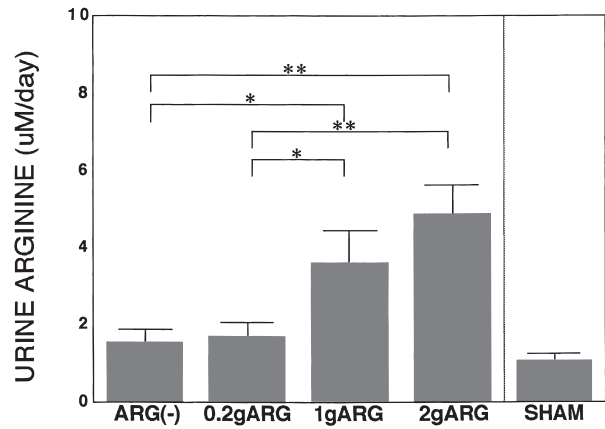


Fig. 9. Effects of L-arginine administration on urine L-arginine in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 2 g ARG, 1 g ARG, and SHAM respectively.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

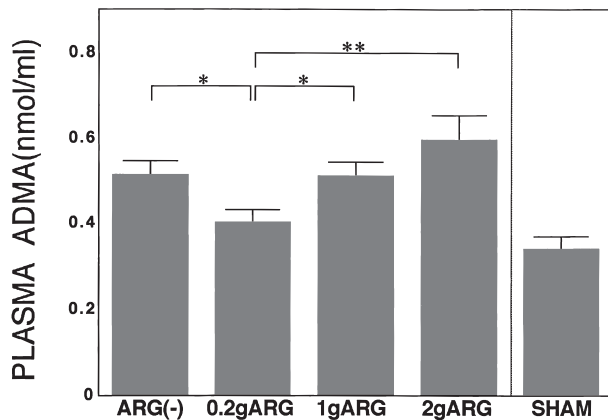


Fig. 10. Effects of L-arginine administration on plasma ADMA in remnant kidney rats (12 weeks)

Values are means \pm SE of 6,6,6,6 and 6 rats in groups 5/6 NX, 0.2 g ARG, 1 g ARG, 2 g ARG, and SHAM respectively.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different.

(一)群に比し、0.2 g ARG 群では有意な低下を認めた。また、0.2 g ARG 群に比し 1 g ARG 群、2 g ARG 群両群では各々有意な増加を認めた (Fig. 10)。

8) シャムラットと 5/6 腎摘ラットの比較

シャム群でも同様の検討を行ったが、従来の報告と同様に 5/6 腎摘群ではシャム群に比し尿中 NO 代謝物の低下、尿蛋白の増加および血圧の上昇を示すとともに、糸球体硬化および間質線維化の促進を認めた^{2,4,5,14)}。

考 察

従来の多くの研究では L-アルギニンは NO 合成の基質とされ、L-アルギニン投与による NO 産生増加が腎に対して保護的に作用するという考えが一般的であったが、Table 1 に示すように腎障害モデルでの種々の L-アルギニンの効果は必ずしも一定ではない。これはラットの種、投与量、腎障害モデルの違いとともに、L-アルギニンが NO 産生以外に多くの代謝系を有するために生じると考えられる。すなわち、L-アルギニンは生体内において核酸および蛋白の主要な成分であるほか、プロリン、ポリアミン、クレアチン、アグマチンなどへの変換や、尿素サイクルの中間体として肝での尿素生成にかかわるなど、生体の物質代謝に重要な役割を果たしており、またその生理活性としては、成長ホルモン、インスリン、グルカゴン、内因性ステロイドなどのホルモン誘導に関与することが知られている¹⁵⁾。そこで本研究では、糸球体硬化モデルである 5/6 腎摘ラットにおいて、3 用量 (0.2, 1, 2 g/kg/day) の L-アルギニンを投与し、各条件下で平均血圧、尿中尿素窒素、尿蛋白、腎機能、尿中 NO 代謝物、尿中 cGMP 排泄量、尿中および血中 L-アルギニン、血中 ADMA とともに糸球体硬化、間質の線維化を測定し、糸球体硬化モデルでの L-アルギニンの用量依存性効果を検討した。

以前の研究の多くは、L-アルギニンの投与法は飲水に溶解し、自由飲水させている。しかしこの投与方法では、各々のラットに投与される L-アルギニンの量に差が生じ

ている可能性があるため、本研究ではラットを一匹ずつ独立したケージで飼育し、1日にラットが確実に摂取できる飼料 14 g 中に 3 用量の L-アルギニンを混入し摂取させることにより、毎日確実に一定量の L-アルギニンをラットに負荷する方法をとった。そして、今回用いた L-アルギニン投与量を他の研究のそれと比較するため 1 日飲水量を 30 ml (予備実験における平均 1 日飲水量) と仮定すると、0.2 g ARG 群、1 g ARG 群、2 g ARG 群は各々 0.12%、0.58%、1.16% L-アルギニン投与に相当すると考えられる。

外因性に負荷された L-アルギニンは尿素サイクルに入ると、アルギナーゼにより分解され尿素を産生し、その後オルニチン、シトルリンへと代謝される。一方、NO を産生する系は NO 合成酵素(NOS)により NO とシトルリンが合成される¹⁵⁾。今回の成績では ARG(-)群に比し 2 g ARG 群で 1 日尿中尿素窒素排泄量は有意に増加し、血液尿素窒素は変化を認めなかった。一方、0.2 g ARG 群では血液尿素窒素は有意に低下し、1 日尿中尿素窒素排泄量は変化を認めなかった。このことより、尿素サイクルを介した L-アルギニンの消費は 0.2 g ARG 群でほとんど認められないのに対して、2 g ARG 群では有意に大であることが示唆された。

今回の検討において 0.2 g ARG 群では、ARG(-)群に比し尿蛋白を低下させるとともに尿中 NO 代謝物および尿中 cGMP を増加させ、糸球体硬化や間質の線維化および腎機能を改善する作用を持ち、逆に 2 g ARG 群では、ARG(-)群に比し尿蛋白が増加し、尿中 NO 代謝物および尿中 cGMP の有意な上昇は認められず、糸球体硬化や間質の線維化および腎機能は悪化することが明らかとなった。

持続的な全身性の血圧の上昇は糸球体高血圧を引き起こし、その結果糸球体硬化を促進させる¹⁶⁾。5/6 腎摘モデルでの L-アルギニン投与時の血圧については低下するとする成績が多く^{2,4,5)}、その機序として L-アルギニン投与により産生された NO が cGMP を増加させ、血管拡張を引き起こすことにより血圧を低下させると考えられている¹⁷⁾。しかし、Albaro らは Sprague-Dawley ラットにおいて 1% L-アルギニン水の投与により血圧の変化はみられなかったとし⁶⁾、また、Narita らも糸球体腎炎誘発後の Sprague-Dawley ラットにおいて、1.5% L-アルギニン水の投与により血圧の変化はみられなかったと報告している⁷⁾。このような成績の差異には実験に供したラットの種、腎疾患モデル、L-アルギニンの投与量、投与期間の違いなど様々な要因が関与していると思われる。同一モデルを用い、同

一観察期間に種々の濃度の L-アルギニンを投与し、血圧を測定し比較検討した成績は本研究が初めてであり、その結果、ARG(-)群に比し 0.2 g ARG 群(0.12% L-アルギニン水投与に相当)、1 g ARG 群(0.58% L-アルギニン水投与に相当)では血圧は低下し、2 g ARG 群(1.16% L-アルギニン水投与に相当)では血圧に変化はみられなかった。また、L-アルギニンを投与した 3 群間においては 0.2 g ARG 群、1 g ARG 群、2 g ARG 群の順に血圧は上昇し、逆に尿中 NO 代謝物排泄量および尿中 cGMP 排泄量は低下した。このことより、L-アルギニン投与量の違いによる NO、cGMP 産生量の相違が血圧に影響していることが示唆された。

糸球体硬化を含む腎実質の障害は、蛋白尿発現の原因の一つとなっている¹⁸⁾。5/6 腎摘ラットにおける L-アルギニン投与群の尿蛋白排泄量および糸球体濾過量、腎血漿流量については Ashab らは 12 週間 0.125% L-アルギニン水を投与した結果、糸球体濾過量は増加し尿蛋白排泄量は低下すると報告している⁴⁾。Reyes らは 6 週間 1% L-アルギニン水を投与した結果、糸球体濾過量、腎血漿流量は増加するが、尿蛋白排泄量は変化しないと報告している¹⁴⁾。われわれの成績では、0.2 g ARG 群(0.12% L-アルギニン水投与に相当)においては糸球体濾過量、腎血漿流量は増加し、一方、尿蛋白排泄量は低下し、Ashab らの報告を支持するものとなったが、2 g ARG 群(1.16% L-アルギニン水投与に相当)では糸球体濾過量、腎血漿流量は減少し尿蛋白排泄量は増加しており、Reyes らの報告と一致しなかった。同じモデルにおいて異なる結果となった理由として実験期間の相違が一因と考えられる。このことより、5/6 腎摘ラットの作成後 1% L-アルギニンを投与し、6 週間と 12 週間での腎組織の障害の程度が異なっている可能性があり、この程度の違いにより尿蛋白排泄量および糸球体濾過量、腎血漿流量の値に相違が生じた可能性を考慮する必要がある。

3 用量の L-アルギニンを用いた腎の組織学的変化では、0.2 g ARG 群(0.12% L-アルギニン水投与に相当)では ARG(-)群に比し糸球体硬化指数、間質線維化比率の低下がみられた。2 g ARG 群(1.16% L-アルギニン水投与に相当)では ARG(-)群に比し、糸球体硬化指数、間質線維化比率は上昇した。そして尿中 NO 代謝物排泄量と糸球体硬化指数および間質線維化比率との間に有意な負の相関関係が認められ(Fig. 11, 12)、NO 産生の増加に伴い糸球体硬化および間質の線維化が抑制されたことが示唆された。

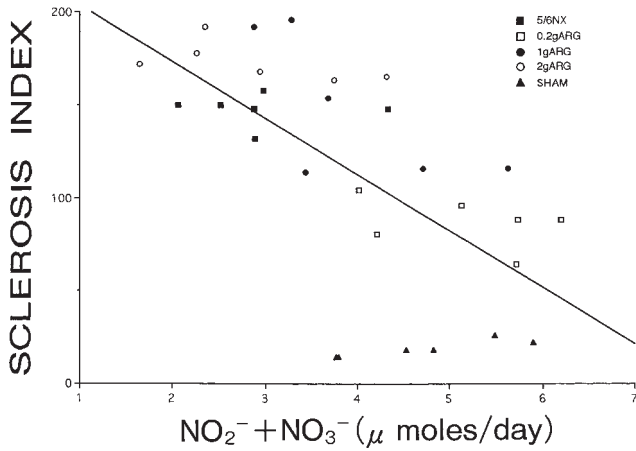


Fig. 11. Relationship between urinary $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ vs sclerosis index in remnant kidney rats (12 weeks)

$$[\text{sclerosis index}] = 233.9 - 30.3 \times [\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-],$$

$$r = -0.64, p < 0.01 \text{ (except SHAM)}$$

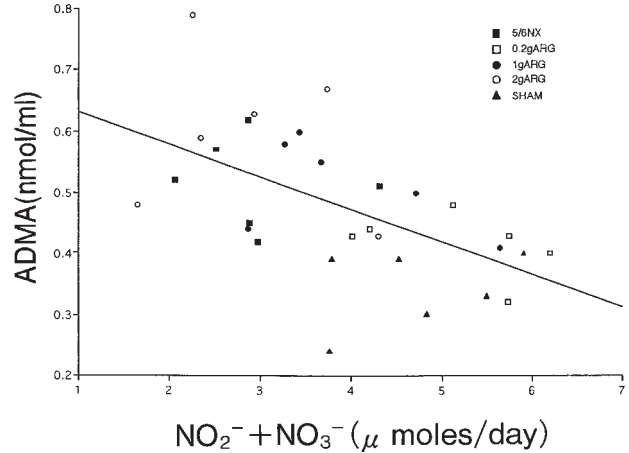


Fig. 13. Relationship between urinary $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ vs plasma ADMA in remnant kidney rats (12 weeks)

$$[\text{ADMA}] = 0.69 - 5.34 \times 10^{-2} [\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-],$$

$$r = -0.56, p < 0.05 \text{ (except SHAM)}$$

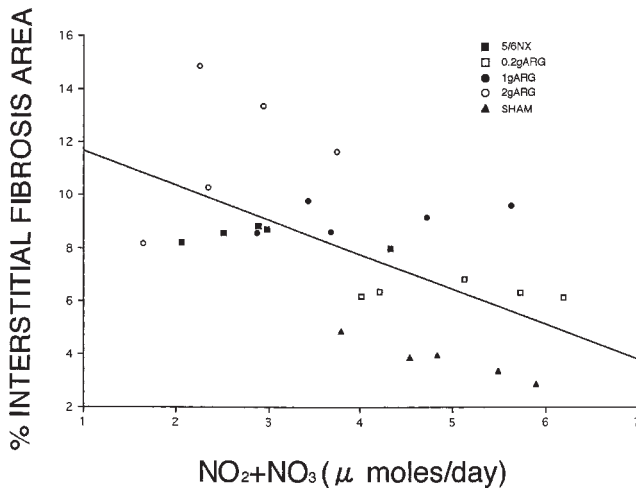


Fig. 12. Relationship between urinary $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ vs %INT in remnant kidney rats (12 weeks)

$$[\% \text{INT}] = 13.1 - 1.32 \times [\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-],$$

$$r = -0.58, p < 0.05 \text{ (except SHAM)}$$

糸球体硬化の進行については、腎障害により機能ネフロンが減少すると糸球体高血圧、糸球体過剰灌流、糸球体肥大、上皮細胞傷害、毛細血管での血栓形成、マクロファージの浸潤などが起こり、これらの変化が細胞増殖や基質の増加を引き起こし、さらに糸球体硬化が進展していくと考えられている。このとき、糸球体硬化に並行して間質の線維化も促進すると考えられている¹⁹⁻²¹⁾。また、L-アルギニンより産生されたNOは糸球体の血行動態に関与し、糸球体内圧を低下させるとともに直接作用としてメサンギウム細胞の増殖抑制²²⁾、血小板の凝集抑制²³⁾、レニン分泌

抑制作用²⁴⁾、マクロファージ浸潤阻止作用²⁵⁾を有し、糸球体硬化および間質の線維化抑制に働くと考えられており、NO産生が糸球体硬化および間質の線維化を抑制するという本研究の結果と一致するものである。

腎において様々な作用を及ぼすNOは、L-アルギニンを基質としてNO合成酵素(NOS)の働きにより生成される²⁶⁾。したがって、NOの合成調節には基質であるL-アルギニンの供給と同時に、NOSの活性が重要な役割を果たしていると考えられている。NOSの活性に関してTodorokiらは*in vitro*の研究で、細胞内における高濃度のL-アルギニンはNOSの活性を抑制すると報告している²⁷⁾。そして今回のわれわれの成績においても、3用量のL-アルギニン投与時の血中および尿中のL-アルギニン量はARG(-)群に比較して0.2gARG群で増加せず、1gARG群、2gARG群では有意な増加を認めるとともに、尿中NO代謝物は0.2gARG群に比し1gARG群、2gARG群で有意な低下を認めた。このことより、5/6腎摘ラットに高用量のL-アルギニンを負荷すると、L-アルギニンそのものがNOS活性を抑制しNO産生を減少させている可能性が示唆された。

また、Vallanceらは慢性腎不全患者の血液中にNOS産生を阻害するADMAの濃度が高いことを報告している⁹⁾。今回のわれわれの成績では、血中ADMA濃度に関してはARG(-)群に比較して0.2gARG群でのみ有意な低下を認めた。なお、今回の検討での血中ADMA濃度はVallanceらのそれより低い値となっているが、これには

慢性維持透析患者と 5/6 腎摘ラットという実験対象の違いが影響しているのかもしれない。そして、尿中 NO 代謝物は ARG(-) 群に比し 0.2 g ARG 群でのみ有意な増加を認めるとともに、尿中 NO 代謝物と血中 ADMA との間に有意な負の相関関係を認めた (Fig. 13)。このことより 5/6 腎摘ラットにおいて、ADMA による NOS 産生を阻害する作用により NO の産生が減少している可能性が示唆された。

L-アルギニン濃度と ADMA の産生に関してはいまだ定説がない。本検討では、血漿 ADMA 濃度は ARG(-) 群に比し 0.2 g ARG 群で有意に低下した。一方、血中および尿中 L-アルギニン濃度は投与量に応じて増加しており、血漿 ADMA 濃度と血中および尿中 L-アルギニン濃度に相関がないことから、ADMA 産生は L-アルギニン濃度に調節されているのではなく、他の因子により代謝調節されている可能性が強く示唆された。しかし、血中 ADMA 濃度の最も重要な規定因子は腎機能であり、2 g ARG 群で血中 ADMA 濃度が 0.2 g ARG 群に比し有意な増加を示していることより、腎機能低下による排泄および代謝障害の可能性も否定できない。

糸球体硬化および間質の線維化の進展には、NO のみならず L-アルギニンの代謝産物であるプロリン、ポリアミンなどの関与が知られているが²⁸⁾、今回の検討では、NO 産生と TGF- β およびこれらの線維化、細胞増殖を促進する物質との関係は明らかではなく、今後の検討課題と思われた。

結 語

今回の検討から、糸球体硬化モデルである 5/6 腎摘ラットにおいて L-アルギニンの平均血圧、尿中尿素窒素、尿蛋白、腎機能とともに糸球体硬化、間質の線維化に及ぼす効果は、低用量では改善させ高用量ではむしろ悪化させることが明らかとなった。これらの効果は L-アルギニンからの NO 産生量と関連しており、NO 産生量は必ずしも L-アルギニン投与量に依存しているわけではなく、L-アルギニンおよび ADMA などによる NO 産生抑制作用が影響していることが示唆された。

文 献

1. Simons JL, Provoost AP, Anderson S, Rennke HG, Troy JL. Modulation of glomerular hypertension defines susceptibility to progressive glomerular injury. *Kidney Int* 1994 ;

- 46 : 396-404.
2. Fujihara CK, Nucci GD, Zatz R. Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Aggravates Glomerular Injury in Rats with Subtotal Nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 1995 ; 5 : 1498-507.
3. Nishihara F. Renal protective effects of nitric oxide in 5/6 nephrectomized rats attenuation of glomerular sclerosis by the β -blocker with an ONO₂ group. *Acta Med Hyogo* 1996 ; 21 : 71-85.
4. Ashab I, Peer G, Blum M, Wollman Y, Chernihovsky T, Hassner A, Schwartz D, Cabili S, Silverberg D, Iaina A. Oral administration of L-Arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production. *Kidney Int* 1995 ; 47 : 1515-21.
5. Katoh T, Takahashi K, Klahr S, Alvalo AR, Badr KF. Dietary supplementation with L-Arginine ameliorates glomerular hypertension in rats with subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 1994 ; 4 : 1690-4.
6. Alvaro AR, Irene E, Karl JK, Klahr S. L-Arginine Administration Prevents Glomerular Hyperfiltration and Decrease Proteinuria in Diabetic Rats. *J Am Soc Nephrol* 1993 ; 4 : 1039-45.
7. Narita I, Border WA, Ketteler MK, Ruoslahti ER, Noble NA. L-arginine may mediate the therapeutic effects of low protein diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 4552-6.
8. Anderson S, Helmut GR, Barry MB. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986 ; 77 : 1993-2000.
9. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Monkada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992 ; 339 : 572-5.
10. Li X, Yuasa H, Hitomi H, Hashimoto M, Fujioka H, Kiyomoto K, Uchida K, Shoji S, Takahashi N, Matsuo U, Miyatake A. Mechanism mediating hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Jap J Nephrol* 1997 ; 39 : 718-27.
11. Patchett ML, Monk CR, Daniel RM, Morgan HW. Determination of agmatine, arginine, citrulline and ornithine by reversed-phase liquid chromatography using automated pre-column derivatization with ophthalaldehyde. *J Chromatogr* 1988 ; 425 : 269-76.
12. Fuhr J, Kaczmarczyk J. Eine einfache Colorimetrische Methode zur Inulinbestimmung für Nieren-Clearance-Untersuchungen bei Stoffwechselfgesunden und Diabetikern. *Klin Wochenschr* 1995 ; 33 : 729-30.
13. Raji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984 ; 26 : 137-43.
14. Reyes AA, Purkerson L, Karl I, Klahr S. Dietary supplementation with L-Arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Am J*

- Kidney Dis 1992 ; 26 : 137-43.
15. Alvaro A, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. *Am Physiol Soc* 1994 : F331-42.
 16. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992 ; 90 : 278-81.
 17. Palmer RMJ, Ashton S, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988 ; 333 : 664-9.
 18. Remuzzi P, Puntorieri S, Alfano M, Macconi D, Abbate M, Bertani T, Remuzzi G. Pathophysiologic implications of proteinuria in a rat model of progressive glomerular injury. *Lab Invest* 1992 ; 67 : 572-9.
 19. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1985 ; 76 : 612-9.
 20. Fries JW, Sandstrom DJ, Meyer TW, Rennke HG. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest* 1989 ; 60 : 205-18.
 21. Floege J, Burns MW, Alpers CE, Yoshimura A, Pritzl P, Gordon K, Seifert A, Bowen-Pope DF, Couser WG, Johnson R. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 1992 ; 41 : 297-309.
 22. Garg UC, Hassid A. Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide generating vasodilators. *Am J Physiol* 1989 ; 257 : F60-6.
 23. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987 ; 92 : 639-46.
 24. Sigmon DH, Carretero OA, Beierwaltes WH, William O. Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release *in vivo*. *Am J Physiol* 1992 ; F256-61.
 25. Benigni A, Zoja C, Corna D. A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression. *Kidney Int* 1993 ; 44 : 440-4.
 26. Tojyo A, Gross SS, Zhang GL, Tisher CC, Schmidt H, Wilcox S, Madsen KM. Immunocytochemical Localization of Distinct Isoforms of Nitric Oxide Synthase in the Juxtaglomerular Apparatus of Normal Rat Kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994 ; 4 : 1438-47.
 27. Todoroki S, Goto S, Urata Y, Komatsu K, Sumikawa K, Ogura T, Matsuda I, Kondo T. High concentration of L-arginine suppresses nitric oxide synthase activity and produces reactive oxygen species in NB9 human neuroblastoma cells. *Mol Med* 1998 ; 4 : 515-24.
 28. Peters H, Noble NA. Angiotensin II and L-arginine in tissue fibrosis : more than blood pressure. *Int Soc Nephrol* 1997 ; 4 : 1481-6.