

## 慢性腎臓病患者への減塩と RAS 抑制薬は、メラトニン分泌を増加させる

大橋 温<sup>1</sup>, 安田 日出夫<sup>1</sup>, 磯部 伸介<sup>1</sup>, 石垣 さやか<sup>2</sup>

<sup>1</sup>浜松医科大学第一内科, <sup>2</sup>浜松医科大学大学院

### 概要

**(背景)** 慢性腎臓病 (CKD) の発症, 進展を抑制する有効な手段に乏しい。我々は, 腎臓内レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の活性化が腎臓障害に関与することや, 腎臓障害が腎臓内 RAS 活性化を生じること, 腎臓内 RAS 活性の日内変動異常が, 血圧の日内変動異常をきたして腎臓障害に関係すること, 食塩負荷が, 血圧の上昇とは独立して, 腎臓内 RAS 活性の亢進により腎臓障害を惹起することを明らかとしてきた。

松果体から分泌されるメラトニンは, 日内変動の形成のみならず, 抗酸化能, 内皮障害の是正効果や交感神経抑制効果を有し, メラトニンの減少は, 高血圧, 心血管疾患, 脳卒中や CKD などの臓器障害や認知機能障害などの発症, 進展に関与する。更に, メラトニン分泌は腎臓障害の進行により減少していく。我々も, CKD 患者でメラトニンの主要な代謝産物の 6-sulfatoxymelatonin (aMT6s) の尿中排泄, 腎臓障害マーカーの尿中アルブミン排泄や, 腎臓内 RAS 活性のサロゲートマーカーの尿中アンジオテンシノーゲン (AGT) 排泄を昼間と夜間に区分し, 夜間のメラトニン分泌の亢進が, 腎臓障害や腎臓内 RAS 活性を抑制していることを提唱した。

しかし, 塩分摂取とメラトニン分泌及び腎臓障害の関係は不明であった。そのため, 本研究では, CKD 患者ではメラトニン分泌が抑制されているが, 減塩によりメラトニン分泌抑制が回復するか, あるいは塩分負荷がメラトニン分泌をより抑制させるかを明らかにすることを研究目的とした。

**(方法)** 浜松医科大学附属病院に腎生検目的で入院となった RAS 抑制薬を内服していない CKD 患者を対象とした。

実験方法は, 塩分一日 10 g 食を 3 日摂取させ下記項目を評価。その後, 塩分一日 6 g 食に変更し, 3 日摂取させた後, 同様の項目を評価。

#### <検討項目>

- (1) 血圧: 自由行動下自動血圧計を使用し, 30 分毎に 24 時間血圧を測定。昼間, 及び夜間の区別は, 患者の自己申告による行動記録票に基づいて定義。
- (2) 尿中メラトニン代謝物 (尿中 aMT6s): 昼間 (6 時~21 時) の蓄尿と夜間 (21 時~翌朝 6 時) の蓄尿から各々採尿し, ELISA 法で測定。またその排泄率として, 単位時間あたりの尿中 aMT6s/hr を採用。
- (3) 血漿 (全身性) RAS: 血漿 AngII: 6 時 (夜間), 21 時 (昼間) に採血し, RIA 法で測定。
- (4) 腎臓内 RAS 活性: 尿中 AGT: 蓄尿を昼間 (6 時~21 時) と夜間 (21 時~翌朝 6 時) に分けて施行し, 各々から採尿し, ELISA 法で測定。
- (5) 腎臓障害: 尿中アルブミン・尿蛋白排泄: 昼間と夜間の蓄尿から各々採尿し測定。また 6 時 (夜間), 21 時 (昼間) に採血し, 血清クレアチニン (sCr)・推算糸球体濾過値 (eGFR) で腎機能を評価。

**(結果)** 症例数は 32 例 (男性 12 例/女性 20 例), 平均年齢: 50.3±15.7 歳, eGFR: 63.7±21.1 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> であった。

塩分 10 g 食と塩分 6 g 食の各種パラメーターの比較では, 昼間, 夜間ともに尿中アルブミン・タンパク・AGT・aMT6s 排泄に有意差を認めなかった。有意差は認めなかったが, 尿中 aMT6s 排泄は塩分 10 g 食に比較し塩分 6 g 食で増加する

傾向を認めた。

eGFR 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> 未満患者でのサブ解析では、昼間の尿中 aMT6s 排泄率は塩分 10 g 食では塩分 6 g 食に比較し有意に低値 (p=0.023)、夜間でも、尿中 aMT6s 排泄率は、塩分 6 g 食に比較し塩分 10 g 食で低下する傾向を認めた。(p=0.082)

次に、各々の食事で尿中 aMT6s 排泄率との相関を検討すると、塩分 10 g 食では、昼間と夜間ともに、尿中 aMT6s 排泄率は、尿中アルブミン・タンパク排泄率と有意な負の相関を認めたが、尿中 AGT 排泄率、血圧、腎機能、AngII との間に有意な相関を認めなかった。その一方で、塩分 6 g 食では、尿中 aMT6s 排泄率はどのマーカーとも有意な相関を認めなかった。

最後に、尿中 aMT6s 排泄率は、塩分 10 g 食で、年齢、性別、BMI で補正した後も、夜間の尿中アルブミン排泄率や昼間の尿中タンパク排泄率との間の有意な負の相関は持続した。一方、年齢、性別、BMI で補正した後、昼間の尿中アルブミン排泄率や夜間の尿タンパク排泄率との間の有意な関係は消失したが負の相関傾向は持続した。一方で、尿中 aMT6s 排泄率は、塩分 6 g 食では、昼間も夜間も有意な相関を認めなかった。

**(結論)** 塩分負荷は、メラトニンの減少を介し、腎臓内 RAS 活性とは独立して腎臓障害を惹起させる可能性がある。

**(今後の予定)** 塩分 10 g/日の摂取を徹底した状態で、症例の蓄積を進めていく。

正塩分食、高塩分食、及び減塩食下で飼育した CKD モデル動物を使って、塩分摂取、メラトニン分泌と腎臓障害の関係の関係を明らかにする。更にはさまざまな腎臓障害の程度と、腎臓内 RAS 活性、及びメラトニンの関係も検討していく。

## 1. 背景

慢性腎臓病 (CKD) は、心血管疾患や末期腎不全の危険因子であること、CKD 患者数が現在我が国で 1,300 万人以上存在する国民病であること、今後も更なる患者数の増加が予想されることから、CKD に対する有効な治療法の確立が急務である。しかし、現時点ではその発症、進展を抑制する有効な手段に乏しい。

高血圧は、CKD の発症・進展に最も大きく関与する因子のひとつであるが、血圧の絶対値とは独立して、血圧の日内変動が、心血管疾患の発症ばかりでなく CKD の発症・進展に大きく関係することが知られるようになった。レニン-アンジオテンシン系 (RAS) には、血圧上昇や体液量制御に関わる全身性 (血漿) RAS と、それとは独立した組織固有の RAS が、心臓、腎臓、脳などの全身諸臓器に存在する。我々は、腎臓内 RAS の活性化が腎臓障害に関与することや、腎臓障害が腎臓内 RAS 活性化を生じることが明らかにしてきた。更に我々は、腎臓内 RAS 活性の日内変動異常が、血圧の日内変動異常をきたして腎臓障害に関係することも明らかとしてきた。我々はまた、食塩負荷が、血圧の上昇とは独立して、腎臓内 RAS 活性の亢進により腎臓障害を惹起することを明らかとした。逆に、減塩が腎臓内 RAS 活性化を抑制することで腎臓障害を改善することも明らかとなってきた。

光刺激は、網膜から視交叉上核、上頸神経節を介して松果体に入力され、松果体からメラトニン分泌が抑制されることで日内変動が形成されるため、メラトニンは日内変動を形成する中心的な役割を呈する。更にメラトニンは、日内変動の形成のみならず、フリーラジカルの除去などによる抗酸化能、一酸化窒素合成刺激や分解抑制を通じた内皮障害の是正効果や交感神経抑制効果を有し、メラトニンの減少は、高血圧、心血管疾患、脳卒中や CKD などの臓器障害や認知機能障害などの発症、進展に関与することが知られている。更に、メラトニン分泌が腎臓障害の進行により有意に減少していくことが報告されている。我々も、CKD 患者でメラトニンの主要な代謝産物である 6-sulfatoxymelatonin (aMT6s) の尿中排泄を、6 時から 21 時までの昼間と、21 時から 6 時までの夜間に区分し、同じく昼間と夜間に区分した腎臓障害マーカーである尿中アルブミン排泄や、腎臓内 RAS 活性のサロゲートマーカーである尿中アンジオテンシノーゲン (AGT) 排泄との相関を検討すると、昼間の尿中 aMT6s と尿中アルブミン排泄や尿中 AGT 排泄の間に相関を認めないが、夜間には、尿中 aMT6s と尿中アルブミン排泄や尿中 AGT 排泄の間に負の相関を認め、夜間のメラトニン分泌の亢進が、腎臓障害や腎臓内 RAS 活性を抑制していることを提唱した。しかしながら、塩分摂取とメラトニン分泌及び腎臓障害の関

係は明らかではなかった。

## 2. 目的

以上の背景から、1) CKD 患者ではメラトニン分泌が抑制されているが、腎臓障害軽減効果が広く認められている減塩によりメラトニン分泌抑制が回復するか、あるいは塩分負荷がメラトニン分泌をより抑制させるか、2) メラトニン分泌が腎臓障害に関与しているか、及び 3)メラトニン分泌が腎臓内 RAS 活性に関与しているかを明らかにすること研究目的とした。

## 3. 実験方法

### <対象>

- ・浜松医科大学附属病院に腎生検目的で入院となった CKD 患者を対象とした。
- ・RAS 抑制薬を内服している患者は除外した。

### <実験方法>

- ・塩分 10g/日の通常食を 3 日摂取させ下記項目を評価した。その後、塩分 6g/日の減塩食に変更し、3 日摂取させた後、同様の項目を評価した。

### <検討項目>

- (1) 血圧: 自由行動下自動血圧計を使用し、30分毎に24時間血圧を測定した。昼間、夜間の区別は、測定された24時間自由行動下血圧のデータを、患者の自己申告による行動記録票に基づく起床時、就寝時によって定義した。
- (2) 尿中メラトニン代謝物(尿中 aMT6s): 昼間(6時~21時)の蓄尿と夜間(21時~翌朝6時)の蓄尿から各々採尿し、ELISA法で測定した。またその排泄率として、昼間6時~21時の15時間、夜間21時~翌朝6時の9時間で除した単位時間あたりの尿中 aMT6s/hr を採用した。
- (3) 血漿(全身性)RAS: 血漿 AngII: 6時、21時に採血し、RIA法で測定した。21時の採血を昼間、6時の採血を、夜間を反映するデータとした。
- (4) 腎臓内 RAS 活性: 尿中 AGT: 蓄尿を昼間(6時~21時)と夜間(21時~翌朝6時)に分けて施行し、各々から採尿し、ELISA法で測定した。
- (5) 腎臓障害: 尿中アルブミン・尿蛋白排泄: 昼間と夜間の蓄尿から各々採尿し測定した。また6時、21時に採

血し、血清クレアチニン(sCr)・推算糸球体濾過値(eGFR)で腎機能を評価した。

## 4. 結果

### <患者背景>

症例数は 32 例(男性 12 例/女性 20 例)、平均年齢: 50.3±15.7 歳、体格指数(BMI): 22.1±2.9 kg/m<sup>2</sup>, sCr: 0.93±0.30 mg/dl, eGFR: 63.7±21.1 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, (CKD stage: 1; 4 名, 2; 12 名, 3a; 8 名, 3b; 8 名), CKD の原因疾患: IgA 腎症; 19 名(59.3%), 巣状分節性糸球体硬化症; 3 名(9.4%), 膜性腎症; 2 名(6.3%), その他; 8 名(25.0%)であった。

### <塩分 10g 食と塩分 6g 食の各種パラメーターの比較> (Table 1)

塩分 10 g 食時の体重は 57.9±10.3 kg, BMI は 22.0±3.0 kg/m<sup>2</sup>, 塩分 6 g 食時の体重は 57.8±10.4 kg, BMI は 21.0±4.7 kg/m<sup>2</sup> で、塩分摂取による有意差を認めなかった。(体重: p=0.35, BMI: p=0.34)

昼間では、塩分 10 g 食に比較し塩分 6 g 食で、傍糸球体装置への灌流圧低下を反映して循環 RAS(血漿 AngII)が有意に高値を示した。また減塩による血管内ボリュームの低下による腎機能の有意な低下を sCr において認めた。しかし、蓄尿から計算する一日塩分摂取量に臨床的な大きな差がなかったため(塩分 10 g 食: 実測塩分摂取量: 7.52 g/day, 塩分 6 g 食: 実測塩分摂取量: 5.28 g/day), 尿中アルブミン・タンパク・AGT 排泄に有意差を認めなかった。更に、尿中 aMT6s 排泄も塩分 10 g 食に比較し塩分 6 g 食で増加する傾向を認めたものの有意な変化ではなかった。

夜間では昼間と同様に、血漿 AngII が塩分 10 g 食に比較して塩分 6 g 食で高値となる傾向を認め、sCr の上昇と eGFR の有意な低下を認めた。尿中アルブミン・タンパク・AGT・aMT6s 排泄に有意差を認めなかった。

今回の検討では、腎生検を目的とし、通常塩分食が臨床上問題とならない患者を対象としたため、eGFR: 63.7±21.1 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>と患者の腎機能は保持されていた。そのため、eGFR 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>未満は 16 名と少なく、16 名は全例 CKD stage 3 であった。更に狭義の腎機能低下者とされる CKD stage 3b 未満は 8 名と少数で、全

Table 1. 塩分 10 g 食と塩分 6 g 食の各種パラメーターの比較

	10g	6g	p値
昼間収縮期血圧 (mmHg)	120.9±15.7	119.9±15.1	0.30
夜間収縮期血圧 (mmHg)	112.8±14.6	111.7±12.8	0.36
昼間拡張期血圧 (mmHg)	73.1±8.7	73.1±8.7	0.96
夜間拡張期血圧 (mmHg)	67.0±8.1	66.8±9.1	0.74
昼間sCr (mg/dl)	0.93±0.30	0.98±0.33	0.027
夜間sCr (mg/dl)	0.90±0.30	0.94±0.32	<0.01
昼間eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	60.8±18.2	58.1±18.6	0.057
夜間eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	64.1±19.3	61.4±18.8	<0.01
昼間AngII (pg/mL)	8.9±3.1	11.0±3.8	<0.01
夜間AngII (pg/mL)	8.9±3.4	10.1±3.8	0.082
昼間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)	2.57±0.34	2.54±0.39	0.56
夜間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)	2.35±0.34	2.35±0.43	0.87
昼間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)	2.87±0.27	2.84±0.32	0.41
夜間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)	2.65±0.27	2.64±0.32	0.69
昼間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)	1.97±0.43	1.96±0.51	0.88
夜間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)	1.69±0.42	1.70±0.47	0.82
昼間Log尿中aMT6s (ng/hr)	4.39±0.28	4.46±0.35	0.21
夜間Log尿中aMT6s (ng/hr)	5.20±0.42	5.24±0.40	0.34

例 3b であった。よって、結果に与える腎機能の影響への詳細な検討を行っていないが、eGFR60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>未満の患者に限定すると、昼間の尿中 aMT6s 排泄率は塩分 6 g 食で 4.45±0.31 ng/hr、塩分 10 g 食 4.30±0.21 ng/hr と、塩分 10 g 食では塩分 6 g 食に比較し有意に低値であった (p=0.023)。また夜間でも、尿中 aMT6s 排泄率は、塩分 6g 食で 5.16±0.33 ng/hr、塩分 10 g 食で 5.06±0.34 ng/hr と、塩分 10 g 食で低下する傾向を認めた。(p=0.082)

#### <尿中 aMT6s 排泄率との相関> (Table 2)

次に、各々の食事における尿中 aMT6s 排泄率との相関を検討した。

塩分 10 g 食では、昼間の尿中 aMT6s 排泄率は、尿中アルブミン・タンパク排泄率と有意な負の相関を認めたが、尿中 AGT 排泄率、血圧、腎機能、AngII との間に有意な相関を認めなかった。

塩分 10 g 食の夜間は、昼間と同様な結果を認めた。

その一方で、塩分 6 g 食では、尿中 aMT6s 排泄率は、

尿中 AGT 排泄率、血圧、腎機能、AngII ばかりでなく、尿中 Alb・タンパク排泄率とも有意な相関を認めなかった。

#### <尿中 aMT6s 排泄率の単回帰、及び重回帰分析> (Table 3)

塩分 10 g 食で、単回帰分析において、尿中 aMT6s 排泄率は昼間と夜間の尿中アルブミン・タンパク排泄率と有意な負の相関を認めた。これは、年齢、性別、BMI で補正した後も、夜間の尿中アルブミン排泄率や昼間の尿中タンパク排泄率との間の有意な負の相関は持続した。一方、年齢、性別、BMI で補正した後、尿中 aMT6s 排泄率の昼間の尿中アルブミン排泄率や夜間の尿タンパク排泄率との間の有意な関係は消失してしまったものの、負の相関傾向は持続した (Table 3A)。

尿中 aMT6s 排泄率は、塩分 6 g 食では、昼間も夜間も尿中アルブミン・タンパク排泄率との間に単回帰分析、及び年齢、性別、BMI で補正した重回帰分析でも有意な相関を認めなかった (Table 3B)。

Table 2. 尿中 aMT6s 排泄率と各種パラメーターとの相関

	塩分10g食				塩分6g食			
	昼間		夜間		昼間		夜間	
	r	p	r	p	r	p	r	p
体重 (kg)	-0.038	0.85	-0.12	0.54	0.18	0.35	-0.067	0.72
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.038	0.85	-0.18	0.33	0.19	0.33	0.25	0.18
昼間収縮期血圧 (mmHg)	-0.006	0.98			0.11	0.57		
夜間収縮期血圧 (mmHg)			-0.32	0.092			-0.14	0.44
昼間拡張期血圧 (mmHg)	0.012	0.95			0.053	0.78		
夜間拡張期血圧 (mmHg)			-0.18	0.35			-0.050	0.79
昼間sCr (mg/dl)	-0.17	0.38			0.26	0.16		
夜間sCr (mg/dl)			-0.16	0.4			-0.081	0.66
昼間eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	0.26	0.18			0.057	0.76		
夜間eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )			0.34	0.063			0.11	0.57
昼間AngII (pg/mL)	0.31	0.11			0.26	0.16		
夜間AngII (pg/mL)			0.25	0.18			-0.11	0.56
昼間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)	-0.43	0.023			-0.19	0.33		
夜間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)			-0.38	0.045			-0.19	0.30
昼間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)	-0.47	0.012			-0.19	0.33		
夜間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)			-0.37	0.044			-0.096	0.62
昼間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)	-0.22	0.27			-0.21	0.26		
夜間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)			-0.17	0.40			-0.20	0.30

Table 3A. 塩分 10 g 食での尿中 aMT6s 排泄率の各種パラメーターの関連

	塩分10g食															
	昼間				夜間				昼間				夜間			
	R=0.43, p=0.023		R=0.55, p=0.072		R=0.38, p=0.045		R=0.57, p=0.041		R=0.47, p=0.012		R=0.58, p=0.042		R=0.37, p=0.044		R=0.53, p=0.076	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
昼間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)	-0.43	0.023	-0.44	0.020												
夜間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)					-0.38	0.045	-0.43	0.018								
昼間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)									-0.47	0.012	-0.49	0.010				
夜間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)													-0.37	0.044	-0.36	0.045
昼間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)																
夜間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)																
年齢 (歳)			-0.37	0.069			-0.41	0.035			-0.35	0.080			-0.32	0.093
性別			0.060	0.75			0.033	0.85			0.11	0.54			0.15	0.39
BMI			0.088	0.67			-0.048	0.81			0.038	0.85			-0.05	0.81

Table 3B. 塩分 6 g 食での尿中 aMT6s 排泄率の各種パラメーターの関連

	塩分6g食															
	昼間				夜間				昼間				夜間			
	R=0.19, p=0.33		R=0.33, p=0.61		R=0.19, p=0.30		R=0.50, p=0.11		R=0.19, p=0.33		R=0.33, p=0.61		R=0.096, p=0.62		R=0.44, p=0.28	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
昼間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)	-0.19	0.33	-0.20	0.32												
夜間Log尿中Alb/Cr (mg/gCr)					-0.19	0.30	-0.22	0.23								
昼間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)									-0.19	0.33	-0.21	0.31				
夜間Log尿タンパク/Cr (mg/gCr)													-0.096	0.62	-0.19	0.34
昼間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)																
夜間Log尿中AGT/Cr (μg/gCr)																
年齢 (歳)			-0.096	0.65			-0.30	0.11			-0.096	0.65			-0.27	0.19
性別			-0.12	0.55			0.25	0.16			-0.10	0.61			0.24	0.22
BMI			0.18	0.41			0.21	0.27			0.18	0.39			0.21	0.31

## 5. 結論と考察

今回の検討では、(1) 塩分 6 g 食に比較し塩分 10 g 食で尿中メラトニン排泄が減少していること、(2) 塩分 10 g 食では尿中メラトニン排泄が腎臓障害のサロゲートマーカーである尿中アルブミン排泄や尿タンパク排泄と負の相関を示したが、塩分 6 g 食ではそれらの相関を認めなかったこと、(3) 尿中メラトニン排泄と尿中 AGT 排泄との間には相関を認めなかったことを明らかとした。

メラトニンは日内変動を形成するホルモンとして働くばかりでなく、フリーラジカルの除去などによる抗酸化能、一酸化窒素合成刺激や分解抑制を通じた内皮障害の是正効果や交感神経抑制効果を有しており、メラトニンの減少は、高血圧、心血管疾患、脳卒中や CKD などの臓器障害や認知機能障害などの発症、進展に関与する。その一方で、メラトニン分泌は腎臓障害の進行により有意に減少していくことも報告されている。よって、今回の検討で得られた塩分負荷によるメラトニン減少と腎臓障害の関係が、どちらが原因でどちらが結果であるかはっきりしない。しかし、塩分 10 g 食を3日間摂取したところで一度目の評価を行い、その後、塩分 6 g 食に変更し3日後で再評価するという短い間隔での研究であり、この間に腎臓の器質的障害が生じたとは考えにくい。また塩分 10 g 食と塩分 6 g 食で尿中アルブミン排泄や尿タンパク排泄の2群間の有意差がないことも、腎臓障害によりメラトニン分泌が減少したとは積極的に考えにくい。またステージ 1 から 5 までの幅広い腎臓障害を認める CKD 患者を用いた我々の先行研究で、夜間の尿中 aMT6s と尿中アルブミン排泄の間に負の相関を認め、夜間のメラトニン分泌の亢進が腎臓障害を抑制していることを提唱したが、今回の結果をサポートするものである。塩分負荷とメラトニンの関係に酸化ストレスが関与しており、塩分負荷による腎臓障害が外因性のメラトニン投与により改善したとの報告 (Leibowitz A, *et al.* J Pineal Res. 60: 48-54, 2016) があり、我々の考えを支持するものである。

その一方で、我々はかつて、片側腎臓摘出に2回の抗胸腺血清を投与することにより生じる慢性進行性腎炎モデルである抗胸腺血清腎炎に食塩を負荷することで、腎臓障害が更に悪化することを示してきた。更にはこの腎臓障害が RAS 抑制薬では改善するが血管拡張薬では改善

しないことより、RAS 依存性であることも示した。また我々は CKD 患者の臨床研究で、尿中 aMT6s が尿中アルブミン排泄のみならず、尿中 AGT 排泄と負の相関を示すことも明らかとしてきた。これらの事実は、食塩負荷が、腎臓内 RAS 活性化による腎臓障害によりメラトニン分泌の減少をきたす可能性を示唆している。

しかし、今回の研究では塩分 10 g 食での腎臓内 RAS 活性化は塩分 6 g 食でのそれに比較し有意差を認めず、更に尿中 aMT6s 排泄とも明らかな相関を認めなかったため、塩分負荷による腎臓障害を介した腎臓内 RAS 活性化によるメラトニン分泌の減弱は考えにくいと思われる。先行研究との差異が生じた原因としては、今回の研究の腎臓障害が軽微で腎臓内 RAS 活性も軽度であったためかもしれない。

塩分負荷は、メラトニンの減少を介し、腎臓内 RAS 活性とは独立して腎臓障害を惹起させる可能性がある結論付けた。

## 6. 今後の予定

有意な傾向があると判断している尿中 aMT6s 排泄率と昼間の尿中アルブミン排泄率や夜間の尿タンパク排泄率関係や、尿中 aMT6s 排泄が塩分 10 g 食に比較し塩分 6 g 食で増加する傾向に、本当に統計学的に有意差があるかどうかを明らかとするため、今後の更なる症例の蓄積が待たれる。

また塩分 10 g 食の実際の塩分摂取量が 7.52 g/day であり、塩分 6 g 食の実際の塩分摂取量 5.28 g/day との間に臨床的な差異を見出しにくい状態である。そのため、確実に塩分 10 g/日を摂取して頂けるよう指示を徹底していく。

臨床研究ではこれ以上の詳細な検討はなかなか困難である可能性もあり、正塩分食、高塩分食、及び減塩食下で飼育した CKD モデルを使って、頻回のメラトニンの血中濃度測定、もしくは昼間・夜間に分けて蓄尿した尿中 aMT6s の測定を行い、塩分摂取、メラトニン分泌と腎臓障害の関係、更にはそれらへの酸化ストレスの関係を明らかにしていく予定でいる。

更にはさまざまな程度の腎臓障害を惹起し、腎臓障害の程度と、腎臓内 RAS 活性、及びメラトニン排泄の関係を検討していく予定でいる。

## Both Low Salt Diet and Renin-Angiotensin System Blockers Increase Melatonin Secretion

Naro Ohashi, Hideo Yasuda, Shinsuke Isobe, Sayaka Ishigaki

Hamamatsu University School of Medicine

### Summary

**(Background)** Activation of the intrarenal renin-angiotensin system (RAS) plays a critical role in the pathophysiology of chronic kidney disease (CKD) and hypertension. The circadian rhythm of intrarenal RAS activation leads to renal damage and hypertension, which are associated with diurnal blood pressure (BP) variation. In addition, salt loading develops renal damage due to activation of intrarenal RAS, independent of BP elevation.

Melatonin is a hormone regulating the circadian rhythm, and has multiple functions such as anti-oxidant and anti-adrenergic effects and enhancement of nitric oxide bioavailability. We have clarified that nocturnal melatonin concentrations are lower in CKD patients, and that impaired nighttime melatonin secretion may be associated with nighttime intrarenal RAS activation and renal damage in CKD patients.

However, the associations among salt loading, melatonin secretion and renal damage have not been clear. Therefore, this study was performed to clarify whether salt restriction ameliorates melatonin secretion and salt loading suppresses it melatonin secretion more significantly.

**(Methods)** We recruited 32 CKD patients without RAS blockers [12 men and 20 women, age:  $50.3 \pm 15.7$  years and estimated glomerular filtration rate (eGFR)  $63.7 \pm 21.1$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>]. After CKD patients consumed a standard diet (10 g/day of salt), the data were collected. Then, low salt diet (6 g/day of salt) was fed and the data were collected again. Daytime (6:00 am to 9:00 pm) and nighttime (9:00 pm to 6:00 am) urine collection were conducted to evaluate urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin (aMT6s), a main metabolite of melatonin, albumin and protein, and angiotensinogen (AGT), a surrogate marker of intrarenal RAS activation, respectively. We divided the daytime and nighttime for 24-h ambulatory BP monitoring using sleep and waking times. Blood samples were drawn at 9:00 pm and 6:00 am on the following day.

**(Results)** Although no significant differences of urinary aMT6s excretion levels were found between standard and low salt diets, urinary aMT6s excretion levels during low salt diet tended to be increased compared with those during a standard diet. When only the patients whose eGFR was less than 60ml/min/1.73m<sup>2</sup> were analyzed, urinary aMT6s excretion levels during a low salt diet was significantly higher than those during a standard diet in daytime ( $p=0.023$ ) and tended to be increased in nighttime ( $p=0.082$ ).

Urinary aMT6s excretion levels during a standard diet was significantly and negatively correlated with urinary albumin or protein excretion levels in both daytime and nighttime. No significant correlations were found between urinary aMT6s excretion levels and the levels of urinary AGT excretion, blood pressure, renal function, and plasma AngII during a standard diet. On the other hand, there were no significant associations

between urinary aMT6s excretion levels and other parameters during a low salt diet.

Multiple regression analyses revealed that the levels of urinary albumin in nighttime or protein in daytime were significantly and negatively associated with urinary aMT6s levels during a standard diet, when age, gender and BMI were adjusted. On the other hand, no significant associations were observed between urinary aMT6s levels and other parameters in daytime and nighttime during a low salt diet by multiple regression analyses.

**(Conclusions)** It is possible that salt loading induces renal damage via decrease of melatonin secretion independent of intrarenal RAS activation.

**(Perspectives)** We will continue to recruit the patients with careful attention to the amount of salt intake. In addition, we will perform the animal study by using CKD model animals that were fed with normal, high or low salt diet and caused by various degrees of renal damage.