

単一ネフロンあたりの塩分排泄量の推算と腎臓病診療への臨床応用

坪井 伸夫

東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科

概要 背景・目的:慢性腎臓病(CKD)の疾患転帰は患者により異なるが、診断時の腎機能と尿蛋白排泄量以外の腎予後予測因子は確立されていない。CKDの進行は、食事内容を含む多くの要因によっても影響されるため、患者自身による自己管理の成果が適切に反映される指標の確立が望まれる。腎臓は食塩の体外への排泄の大部分を担っており、過剰な食塩摂取は高血圧とCKDの発症及び進展に寄与することが知られる。最近、我々は腎臓病患者の総ネフロン数を推定する方法を開発した(Sasaki T, Tsuboi N et al. Sci Rep, 2019)。個人のネフロン数が少ないほど、各ネフロンへの塩分負荷は高まることが想定され、ネフロンあたりの塩分排泄量は、尿中の総塩分排泄量よりもCKDの進行を正確に予測できると考えられる。本研究計画では、尿中の塩分排泄と総ネフロン数から単一ネフロンあたりの尿中食塩排泄量(SNUSE)を推算し、その臨床的意義を検討することを目的とした。報告会では、進行性腎機能低下を呈する代表的な疾患であるIgA腎症(IgAN)と診断された患者を対象とし、SNSUEとCKD患者の特徴である夜間高血圧との関係を検討した結果について報告する。

方法: 2010年から2017年に生検診断されたIgAN患者を対象とした。腎皮質体積は非造影CTデータから推定し、腎生検標本の体積糸球体密度を掛けあわせて総ネフロン数を推算した。SNSUEは、1日の総尿中食塩排泄量を両方の腎臓の総ネフロン数で除して計算した。自由行動下血圧測定(ABPM)による日中高血圧と夜間高血圧の関係を横断的に検討した。

結果:対象は178人(平均42.5歳, 60%男性, eGFR 60.4 mL/min/1.73 m²)。総ネフロン数は平均610,000/腎臓, 単一ネフロンGFR(SNGFR)は平均46.2 nL/分, 単一ネフロン塩分排泄(SNUSE)は中央値5.7 μg/日であった。夜間高血圧症は、総ネフロン数の低値と関連していた。日中高血圧または夜間高血圧の有無によって尿中の総塩分排泄量の差は認めなかったが、SNUSEは夜間高血圧の患者でより高値であった。日中高血圧または夜間高血圧の有無によりSNGFRに差は認めなかった。SNEUEの増加は、レニン-アンジオテンシン阻害剤で治療された夜間高血圧患者群では認められなかった。

結論: IgAN患者の夜間高血圧と単一ネフロンあたりの食塩排泄の代償的増加との関連が示唆された。各患者の食塩摂取量の個別化と最適化へ向けた啓蒙と応用へ向け、個人の総ネフロン数に基づくSNUSEの概念は臨床的に有用と考えられた。得られた結果を広く一般化するために、IgAN以外の慢性腎疾患患者についても追加検討していく予定である。

1. 研究背景と目的

様々な病因によって発症する腎疾患の進行から維持透析を必要とする患者は全世界中で年々増加傾向にあり、医療経済上も大きな問題となっている。腎疾患診断例の一部が緩徐に進行性を示すが、末期腎不全に至る可能性の高い患者群のリスクトリアージにおいて、腎機能と蛋

白尿排泄以外の因子の意義は十分に確立していない。多因子により規定され、食生活習慣の影響が強いと考えられる慢性腎疾患の進行において、患者自身の自己管理による成果がより反映され易い指標が必要と考えられる。申請者は腎臓の3次元画像イメージと腎生検組織を用いてヒトの総ネフロン数とSNGFRを概算する方法を開発した

(Sasaki T, Tsuboi N et al. Sci Rep. 2019)。我々はこの方法を用いて、様々な腎疾患患者の総ネフロン数とSNGFRを計測し、各々の疾患に特徴的な病態や長期疾患予後などとの関連について解析し報告した(Sasaki T, Tsuboi N et al. Kidney Med 2020, Okabayashi Y, Tsuboi N et al. Kidney Int Reports 2020, Marumoto H, Tsuboi N et al. Kidney 360 2021)。近年、高食塩摂取は心血管イベント発症の独立したリスク因子となることが大規模な疫学研究から明らかにされている(Neal B et al. New Engl J Med. 2021)。塩分排泄の殆どを担う腎臓の慢性機能障害である慢性腎臓病の病態にも塩分過剰摂取が病状の悪化に寄与することが知られている。我々の施設からの既報では、腎機能障害が進行した例ほど食塩摂取増加に伴う蛋白尿が増加することが示されており、ネフロン数減少状態では過剰な食塩摂取に対する感受性が増し、腎組織障害がより顕性化しやすいことが示唆されている(Suzuki H et al. Clin Nephrol 2009)。すなわち、個人のネフロン数が低いほど高食塩食負荷のリスクは高くなると考えられ、ネフロン数あたりの塩分排泄量は、従来の総尿中塩分排泄量と比較しても実際の腎不全発症リスクとして反映されやすいと考えられる。

本研究課題の目的:生検診断がなされた慢性進行性腎疾患患者を対象として総ネフロン数と総塩分排泄量から単一ネフロンあたりの尿中塩分排泄量(Single-nephron urinary salt excretion; SNUSE)を推算し、長期腎予後を含む臨床所見との関連について検討する。

2. 研究方法

対象症例:施設にてCTデジタルデータが得られる2007年から2020年に腎生検を施行した慢性緩徐進行性腎疾患症例を対象とする。生検例の約3分の1の例で外来での24時間蓄尿検査が定期実施されており、塩分排泄量(摂取量)の概算データと総糸球体濾過率の実測データの入手が可能である。塩分排泄量の評価は生検診断後6ヶ月間の3回以上の測定による時間平均値を用いる。

形態計測法:解析ソフト(ITK-SNAP)を用いて非造影CTデータから腎臓の三次元立体像を構築し腎実質体積(PV)を計測する。PVから以下に示す我々の既報により確立された回帰式を用いて腎皮質体積(CV)を推算する(Sasaki T, Tsuboi N et al. Sci Rep, 2019)。

$$\text{Estimated CV (cm}^3\text{)} = -1.3 (\text{intercept}) + 0.71 \times \text{PV (cm}^3\text{)}$$

解析ソフト(WinROOF)で計測した平面糸球体密度と糸球体総断面積から体積糸球体密度を算出する。両腎皮質体積と体積糸球体密度から総ネフロン数(/両腎)を算出する。SNUSEは外来時間平均塩分排泄(g/日)を総ネフロン数(/両腎)で除して個人内の総ネフロン数の平均値として算出する。

統計学的解析方法:対象症例のSNUSEと関連する臨床所見の検討には、横断的に、総腎濾過機能、蛋白尿排泄量、年齢、性別、体格、高血圧症の有無等の交絡となりうる臨床所見を組み合わせた複数の重回帰分析モデルで検証する。腎アウトカムはeGFR40%減少又は末期腎不全発症による腎代替治療導入とする。SNUSEと交絡する可能性のある臨床所見および既知予後規定因子として、上記所見に加えて、治療介入の有無等を含めたCoxハザードモデルによるSNUSEによる腎不全発症リスク予測を行う。以下に2021年度に実施された本研究のプレリミナリデータを提示する。尚、研究成果は日本腎臓学会総会、米国腎臓学会総会にて報告した。

3. 研究題目「IgA腎症患者における夜間高血圧とネフロン数との関連」

3.1 方法:

研究デザイン:横断研究

対象:腎生検を目的とした入院中に24時間蓄尿と自由行動下血圧測定(ABPM)が施行されたIgA腎症患者¹

暴露:日中高血圧、夜間高血圧²

評価項目:各臨床因子、総ネフロン数およびネフロン関連因子³

¹入院食の塩分は6g/日

²日中高血圧:ABPMによる平均血圧 $\geq 135/85$ mmHg、夜間高血圧:ABPMによる平均血圧 $\geq 120/70$ mmHg (JSH 2019, 米国高血圧ガイドライン 2017)

³単一ネフロンGFR、単一ネフロンあたりの塩分排泄量

ネフロン数計測の方法を図1に示す。

Estimation of functional glomeruli per kidney :

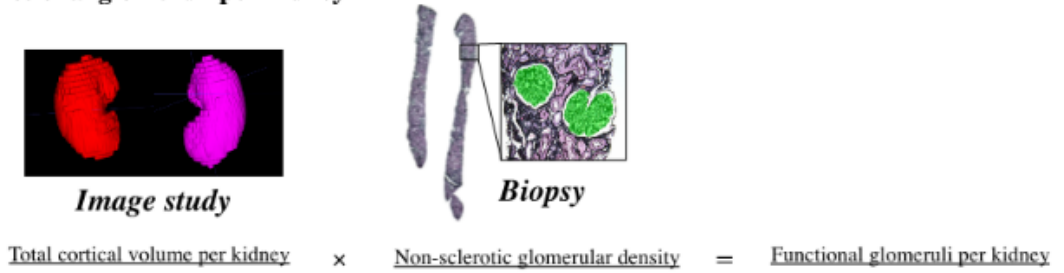


図1 総ネフロン数の推計

解析ソフト(ITK-SNAP)を用いて非造影 CT データから腎臓の三次元立体像を構築し腎実質体積(PV)を計測する。PV から以下に示す我々の既報により確立された回帰式を用いて腎皮質体積(CV)を推算した(Sasaki T, Tsuboi N et al. Sci Rep, 2019)。解析ソフト(WinROOF)で計測した平面糸球体密度と糸球体総断面積から体積糸球体密度を算出する。

両腎皮質体積と体積糸球体密度から総ネフロン数(/両腎)を算出する。SNUSE は外来時間平均塩分排泄(g/日)を総ネフロン数(/両腎)で除して個人内の総ネフロンの平均値として算出した。

3. 2 結果:

図2 に患者選択の過程を示す。248 例の IgA 腎症患者より除外項目に該当する例を除外し、178 例を対象とした。

対象患者の臨床病理学的所見を表1 に示す。平均年齢 42.5 歳、男性が 60%であった。生検時高血圧を示したのは 17%、生検時にレニン・アンジオテンシン (RAS) 系阻害薬による治療を内服していた例は 46%であった。eGFR は 60.4 mL/min/1.73 m²、尿蛋白排出は 0.83 g/日、尿中塩分排泄は 6.7 g/日であった。非全節性硬化糸球体数 (ネフロン数) は 61 万個/腎、単一ネフロンあたりの GFR (SNGFR) は 46.2 nL/min、単位ネフロンあたりの塩分排泄 (SNUSE) は 5.7 μg/日であった。

対象を日中高血圧の有無、夜間高血圧の有無で群分けし、臨床病理組織計測所見を比較した結果を表2 に示す。夜間高血圧を呈した群では呈さなかった群と比して、降圧薬内服率が高く、Oxford 国際分類 T1+2 病変を呈する尿細管間質病変の進行例を高率に認めた。

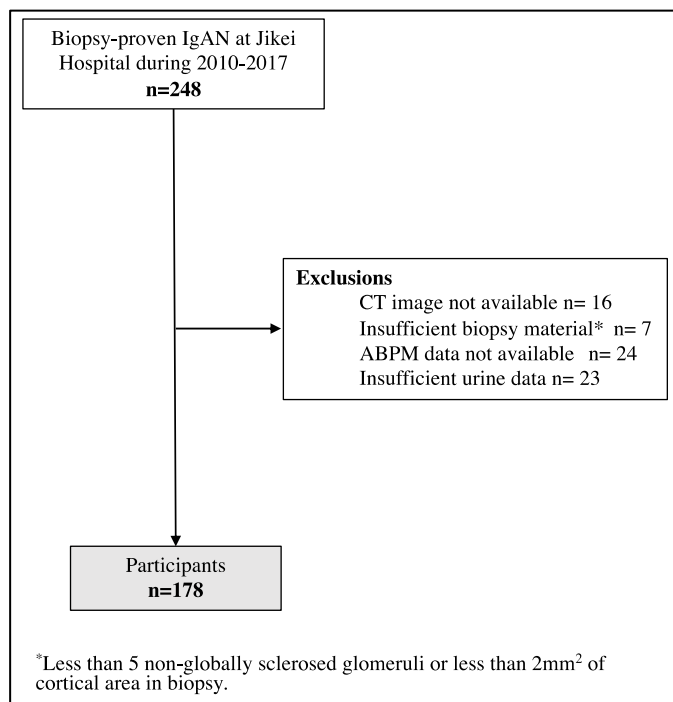


図2 患者選択

表1 対象患者の臨床病理学的所見

Variables	N=178
Clinical	
Age, years	42.5 ± 14.2
Gender, male (%)	106 (60)
BMI, kg/m ²	22.9 ± 14.2
Hypertension, n (%)	31 (17)
Anti-hypertensives, n (%), 0 / 1 / 2 / 3 or more	90 (51) / 40 (23) / 34 (19) / 14 (8)
RAS inhibitors, n (%)	82 (46)
eGFR, mL/min/1.73m ²	60.4 ± 24.3
CKD, n (%) G1 / G2 / G3a / G3b / G4, 5	17 (10) / 79 (44) / 28 (16) / 28 (16) / 24 (13) / 2 (1)
Urinary protein excretion, g/day	0.83 [0.44, 1.39]
Urinary salt excretion, g/day	6.7 [4.6, 9.2]
ABP findings	
All day ABP, mmHg	121 ± 16 / 77 ± 10
Daytime ABP, mmHg	123 ± 16 / 78 ± 10
Nighttime ABP, mmHg	113 ± 18 / 70 ± 11
Nighttime/Daytime ratio	0.90 ± 0.07
Nighttime/Daytime ratio >0.9 (non-dippers), n (%)	87 (49)
Histopathology and morphometry	
Oxford, M1 / E1 / S1 / T1+2 / C1+2, n (%)	84 (47) / 20 (11) / 165 (93) / 45 (25) / 67 (35)
Mean glomerular volume, × 10 ⁶ μ ³	28.8 ± 13.2
Globally-sclerotic glomeruli, × 10 ⁴ / per kidney	14.1 [6.6, 29.9]
Non-sclerotic glomeruli, × 10 ⁴ / per kidney	62.1 [35.1, 92.9]
Single-nephron GFR, nl / min	46.2 [43.1, 66.3]
Single-nephron SE, μg / day	5.7 [3.3, 9.5]

表2 日中、夜間高血圧有無別の臨床背景の比較

Variables	Daytime HT		p	Nighttime HT		p
	No (n=121)	Yes (n=57)		No (n=87)	Yes (n=91)	
Age, years	40.8 ± 13.6	46.2 ± 14.7	0.02	38.0 ± 12.4	46.9 ± 14.4	<0.001
Gender, male (%)	63 (52.1)	43 (75.4)	0.003	39 (44.8)	67 (73.6)	<0.001
BMI, kg/m ²	22.2 ± 3.5	24.3 ± 4.0	<0.001	22.1 ± 4.0	23.7 ± 3.4	0.003
Anti-hypertensives, n (%)	55 (45.5)	34 (59.6)	0.11	32 (36.8)	57 (62.6)	0.001
RAS inhibitors, n (%)	53 (43.8)	25 (43.9)	1.00	32 (36.8)	46 (50.5)	0.07
eGFR, mL/min/1.73m ²	64.7 ± 24.3	51.3 ± 21.8	0.001	69.9 ± 22.4	51.3 ± 22.6	<0.001
Urinary protein excretion, g/day	0.7 [0.4, 1.1]	1.2 [0.8, 2.2]	<0.001	0.6 [0.4, 1.1]	1.0 [0.6, 1.8]	<0.001
Urinary salt excretion, g/day	6.1 [4.6, 9.2]	6.4 [4.3, 8.9]	0.84	6.8 [4.6, 9.2]	6.3 [4.5, 9.1]	0.90
Oxford classification, n (%)						
M1	55 (45.5)	29 (50.9)	0.52	40 (46.0)	44 (48.4)	0.77
E1	9 (7.4)	11 (19.3)	0.04	10 (11.5)	10 (11.0)	1.00
S1	113 (93.4)	52 (91.2)	0.76	81 (93.1)	84 (92.3)	1.00
T1+2	26 (21.5)	19 (33.3)	0.10	14 (16.1)	31 (34.1)	0.006
C1+2	43 (35.5)	24 (42.1)	0.41	35 (40.2)	32 (35.2)	0.54
Mean glomerular volume, X10 ⁶ μ ³	26.8 ± 10.3	33.1 ± 17.1	0.003	25.5 ± 10.2	31.9 ± 14.9	0.001
Globally-sclerotic glomeruli, × 10 ⁴ / per kidney	11.9 [5.5, 28.9]	18.2 [8.0, 30.8]	0.25	11.4 [4.6, 26.4]	16.0 [8.2, 31.8]	0.06
Non-sclerotic glomeruli, × 10 ⁴ / per kidney	63.7 [36.8, 97.2]	52.1 [27.4, 87.0]	0.10	76.4 [50.4, 105.6]	46.7 [27.6, 85.1]	0.001

日中・夜間高血圧有無でのネフロン数*の比較を図3に示す。日中高血圧の有無別の比較では、非全節性硬化糸球体数(ネフロン数)には差は認めなかった。一方で、夜間高血圧の有無別の比較では、非全節性硬化糸球体数(ネフロン数)が少なかった。

日中・夜間高血圧有無でのSNGFRの比較を図4に示す。日中高血圧の有無別の比較、夜間高血圧の有無

別の比較のいずれにおいてもSNGFRには差は認めなかった。

日中高血圧有無での塩分排泄の比較を図5に示す。総塩分排泄、単一ネフロン塩分排泄のいずれにおいても差を認めなかった。

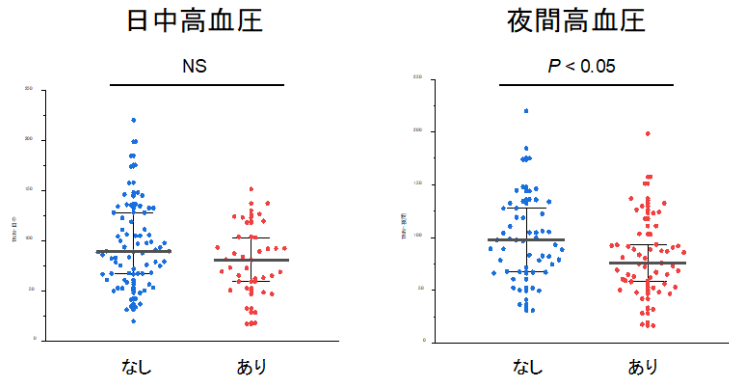


図3 日中・夜間高血圧有無でのネフロン数*の比較

*非硬化系球体数

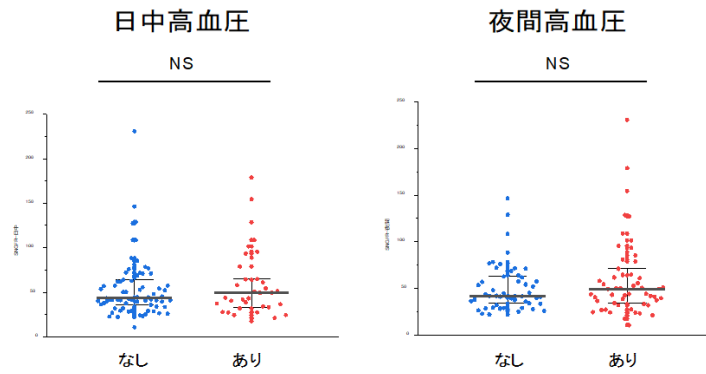


図4 日中・夜間高血圧有無でのSNGFRの比較

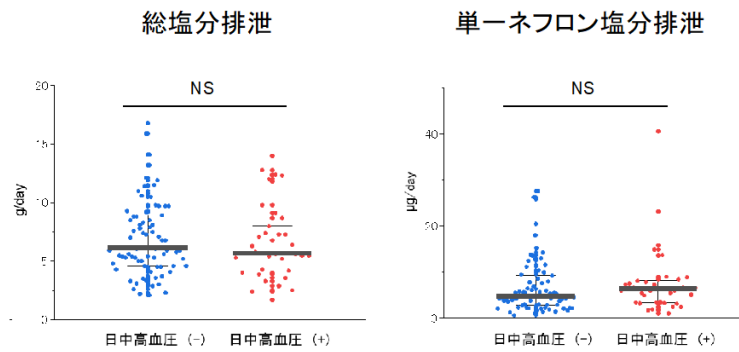


図5 日中高血圧有無での塩分排泄

日中高血圧有無での塩分排泄の比較を図6に示す。総塩分排泄には差を認めなかった一方で、単一ネフロン塩分排泄は夜間高血圧例で多かった。

夜間高血圧及びレニン・アンジオテンシン系阻害薬治療有無での塩分排泄の比較を図7に示す。総塩分排

泄は夜間高血圧及びRAS系阻害薬治療有無で差は認めなかった。一方で、単一ネフロン塩分排泄は、RAS系阻害薬非内服群でのみ夜間高血圧例に多く、RAS系阻害薬内服群では夜間高血圧の有無による差は認めなかった。

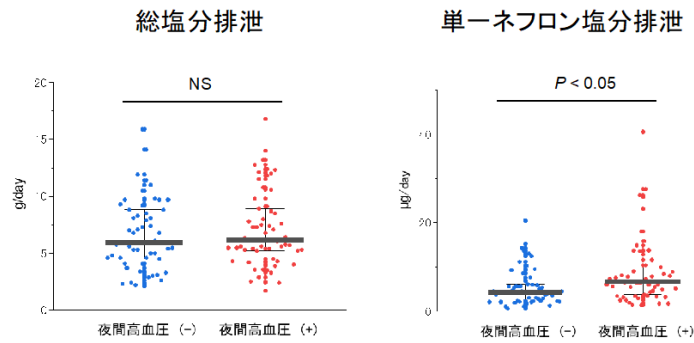


図 6 夜間高血圧有無での塩分排泄

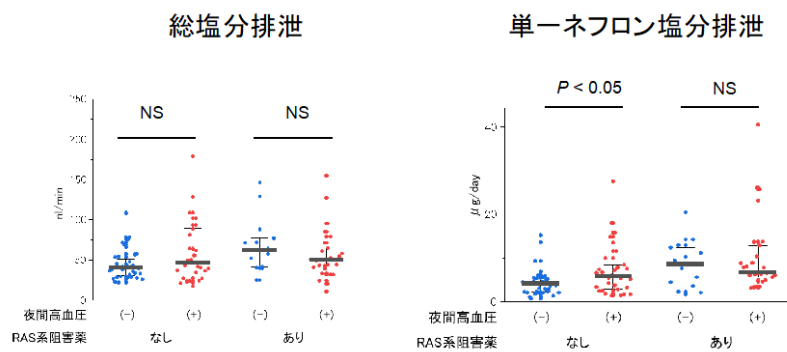


図 7 夜間高血圧及びレニン・アンジオテンシン系阻害薬治療有無での塩分排泄の比較

3.3 結果のまとめ

- 生検診断の得られた IgA 腎症の検討において、ABPM による夜間高血圧と低ネフロン数との関連が示された。
- 日中および夜間高血圧の有無での比較で、総塩分排泄量に差は認めなかったが、夜間高血圧例では単一ネフロンあたりの塩分排泄量が多かった。
- 日中および夜間高血圧の有無での比較で、SNGFR に差は認めなかった。
- 夜間高血圧例における単一ネフロンあたりの塩分排泄の増加は、RA 系阻害薬の存在下で認められなかった。

4. 考察

CKD 患者で高頻度に認められる食塩感受性高血圧を呈する例では、夜間降圧障害 (Non-dipper 型血圧変動異常) と腎塩分排泄障害が関連することが示されている (Fukuda M, et al. *Kidney Int*, 2004)。低ネフロンと塩分排泄障害、塩分感受性高血圧との関連が示唆されているが、臨床的にネフロン数を計測する方法がなく未だ検証されていない (Zandi-Nejad K, et al. *Hypertension*, 2006)。本研究により、生検診断時の夜間降圧障害と単一ネフロンあたり塩分排泄の機能性代償との関連が示唆された。

一方で、本研究の限界として、針生検標本によるサンプリングバイアスの可能性があること、横断研究であり夜間降圧障害とネフロン数の因果関係に言及できないこと、日本人 IgA 腎症患者のみの検討であり、結果を慢性腎疾患患者に一般化できないことなどが挙げられる。

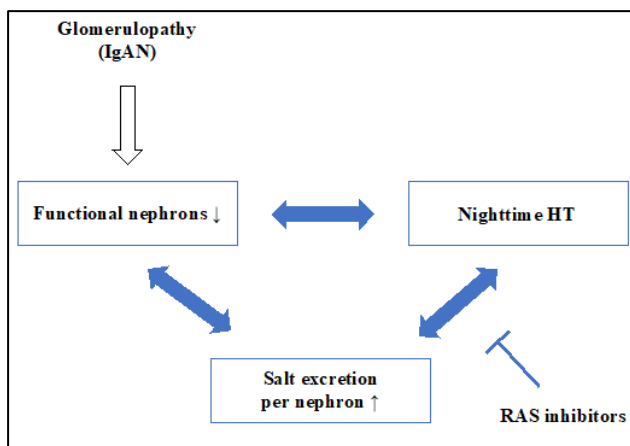


図8 本研究結果のコンセプトシエーマ

糸球体疾患 (IgAN) の進行に伴う機能ネフロン数の減少は夜間高血圧の発症および単一ネフロンあたりの塩分排泄 (SNUSE) の増加と関連する。RAS 阻害薬による治療は夜間高血圧の低下および SNUSE の減少をもたらす、腎障害の進展阻止に寄与する可能性が示唆された。

5. 結語

夜間高血圧を呈する IgA 腎症患者では、総機能ネフロン数が夜間正常血圧例よりも少なく、機能的代償により単一ネフロンあたりの尿中塩分排泄量が増加していることが示唆された。

6. 今後の展望

新規手法を用いてネフロン数を計測し、単一ネフロン指標としての SNUSE の臨床的意義に関する検討をおこなった。現在までの研究成果では IgA 腎症患者の解析にとどまっており、今後は結果をより一般化すべく、他の腎疾患例においても追加検討していく予定である。また、多くが緩徐進行性を示す慢性腎疾患の長期予後に与える影響についても解析していく予定である。

7. 文献

1. Sasaki T, Tsuboi N, Kanzaki G, Haruhara K, Okabayashi Y, Koike K, Kobayashi A, Yamamoto I, Ogura M, Hoy WE, Bertram JF, Shimizu A, Yokoo T. Biopsy-based estimation of total nephron number in Japanese living kidney donors. *Clin Exp Nephrol*. 2019 May;23(5):629-637.
2. Sasaki T, Tsuboi N, Okabayashi Y, Haruhara K, Kanzaki G, Koike K, Kobayashi A, Yamamoto I, Takahashi S, Ninomiya T, Shimizu A, Rule AD, Bertram JF, Yokoo T. Estimation of nephron number in living humans by combining unenhanced computed tomography with biopsy-based stereology. *Sci Rep*. 2019 Oct 7;9(1):14400.
3. Suzuki T, Miyazaki Y, Shimizu A, Ito Y, Okonogi H, Ogura M, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T. Sodium-sensitive variability of the antiproteinuric efficacy of RAS inhibitors in outpatients with IgA nephropathy. *Clin Nephrol*. 2009 Oct;72(4):274-85.
4. Tsuboi N, Sasaki T, Okabayashi Y, Haruhara K, Kanzaki G, Yokoo T. Assessment of nephron number and single-nephron glomerular filtration rate in a clinical setting. *Hypertens Res*. 2021 Jun;44(6):605-617.
5. Marumoto H, Tsuboi N, D'Agati VD, Sasaki T, Okabayashi Y, Haruhara K, Kanzaki G, Koike K, Shimizu A, Kawamura T, Rule AD, Bertram JF, Yokoo T. Total Nephron Number and Single-Nephron Parameters in Patients with IgA Nephropathy. *Kidney360*. 2021 Mar 10;2(5):828-841.
6. Sasaki T, Tsuboi N, Marumoto H, Okabayashi Y, Haruhara K, Kanzaki G, Koike K, Ogura M, Ninomiya T, Yokoo T. Nephron Number and Time to Remission in Steroid-Sensitive Minimal Change Disease. *Kidney Med*. 2020 Aug 1;2(5):559-568.e1.
7. Okabayashi Y, Tsuboi N, Sasaki T, Haruhara K, Kanzaki G, Koike K, Shimizu A, D'Agati VD, Yokoo T. Single-Nephron GFR in Patients With Obesity-Related Glomerulopathy. *Kidney Int Rep*. 2020 May 23;5(8):1218-1227.

Estimation of Single-Nephron Salt Excretion and Application to Clinical Nephrology

Nobuo Tsuboi

Division of Nephrology and Hypertension, The Jikei University School of Medicine

Summary

Background/Aim: Kidney outcomes vary among patients with chronic kidney disease (CKD), but predictive factors for disease progression other than kidney function and proteinuria levels at diagnosis have not been established. Since the progression of CKD is defined by multiple factors including eating habits, it is desired to establish the indices that may better reflect the results of self-management by the patients. The kidney is responsible for most of the salt excretion, and it is known that excessive salt intake contributes to the blood pressure abnormalities and progression of CKD. We have recently developed a method for estimating the total number of nephrons in clinical settings (Sasaki T, Tsuboi N et al. Sci Rep. 2019). It is highly considered that the lower the number of nephrons in an individual, the higher the salt load to each nephron. Thus, we assumed that the amount of salt excreted per nephron may better predict the progression of CKD than total amount of urinary salt excretion. This study project aimed to examine the clinical significance of single-nephron urinary salt excretion (SNUSE), which was estimated based on the combined estimation of daily urinary salt excretion and total number of nephrons. Here, we report the results of analyses on the relationship between SNUSE and abnormality in blood pressure variabilities, which is one of the characteristics of CKD patients.

Methods: This study included biopsy-proven patients with IgA nephropathy (IgAN) diagnosed from 2010 to 2017. Kidney cortex volume was estimated from non-enhanced CT data and multiplied by volumetric glomerular density on kidney biopsy specimens to estimate the total number of nephrons. SNUSE was calculated by dividing the total daily urinary salt excretion by the total number of nephrons in both kidneys. The relationship between daytime and nighttime hypertension by ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) was cross-sectionally investigated.

Results: The subjects were 178 IgAN patients (mean 42.5 years, 60% male, eGFR 60.4 mL/min/1.73 m²). The total nephron number was estimated as mean 610,000/kidney, single-nephron GFR (SNGFR) was mean 46.2 nL/min, and single-nephron salt excretion (SNUSE) was median 5.7 µg/day. Patients with nighttime hypertension was associated with fewer number of nephrons. There was no difference in total salt excretion among the patients with and without daytime or nighttime hypertension, but SNUSE was higher in patients with nighttime hypertension. There was no difference in SNGFR among patients with and without daytime hypertension or nighttime hypertension. An increase in SNEUE was not observed in sub-group with nighttime hypertension treated with renin-angiotensin inhibitors.

Conclusion: These results suggest that the nighttime hypertension in IgAN patients associates with the compensatory increase in single-nephron salt excretion. The concept of SNUSE based on the individual number

of nephrons may be applied to optimize the salt intake for each patient. In order to generalize present results, we are planning to further analyze patients with kidney diseases other than IgAN.