

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25305021

研究課題名(和文)スリランカにおける慢性腎臓病の発症、予後に関するコホート調査

研究課題名(英文)Surveys on factors of onset and progression for CKDu in Sri Lanka

研究代表者

原田 浩二 (HARADA, KOUJI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80452340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：南アジアの島国・スリランカでは1990年代より、セイロン島中東部、中北部および周辺地域において、慢性腎不全が急増している。これまでに続いて遺伝的素因を検討し、SLC13A3、KCNJ10、LAMB2の候補遺伝子を示した。バルカン半島腎症の原因とされる腎毒性を有するウマノスズクサ、また農薬曝露の関与について検討するため、尿中アリストロキア酸、ネオニコチノイドの分析方法を検討した。また症例対照研究を行った。結果として、検出できる量のアリストロキア酸は見出されなかった。病理組織の検討も行き、電子顕微鏡観察を行った。腎組織の電子顕微鏡観察は、CKDuの病因における重金属毒性を支持する証拠はなかった。

研究成果の概要(英文)：In Sri Lanka in South Asia, chronic kidney disease has rapidly increased in the eastern part and the northern part of the island of Ceylon since the 1990s. We have investigated possible candidate agents and genetic factors. SLC13A3, KCNJ10 and LAMB2 were found to be possible candidates. Aristolochia has been used as a plant biologics with renal toxicity. In order to investigate the involvement, the urine was assayed for aristolochic acid. As a result, no detectable amount of the aristolochic acid was found. Also neonicotinoid was analyzed to reveal exposure to pesticide, while there was no difference between case and controls. And electron microscopic observations of the histological tissues were performed. The observation of electron microscopic observation of renal tissues showed no evidence supporting the heavy metal toxicity in the pathogenesis of CKDu.

研究分野：衛生学

キーワード：環境衛生学 分析化学 国際保健 慢性腎臓病 疫学

1. 研究開始当初の背景

南アジアの島国・スリランカは経済的には発展途上であるものの、貧困層の対策や教育といった社会開発水準が優れており、人間の安全保障が推進されてきた。しかしながら1990年代より、セイロン島中東部、中北部および周辺地域において、慢性腎臓病が急増してきており、社会問題になっている(Wanigasuriya K.P. et al. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101, pp.1013-1017, 2007)。慢性腎臓病患者への透析治療はスリランカでは普及しておらず、またその医療コストは高く、医療資源の消費が懸念されるのみならず、患者の生活の質の低下も甚だしいものであった。それゆえこの慢性腎臓病の新規発症、病期進行に関わるリスク要因の解明は、スリランカ国民への負担の軽減、経済と国民の健康の調和された発展に不可欠なものである。この慢性腎臓病はスリランカ国内でも東部、中北部の1970年代に入植した乾燥地域で流行している。糖尿病、IgA抗体、自己抗体などを伴わず、中高年に発生している。また地域集積性、家族内で複数例見つかることもあり(Wanigasuriya et al. 2007)、遺伝的素因あるいは家族に共有する要因も強く疑われている。入植地域に多発するため重金属汚染やフッ素など地質学的な特性、遺伝素因などが疑われてきた。研究代表者らはこれまでにこの地域で、遺伝疫学を含んだ包括的な環境疫学を行い、病因の解明を行ってきた。病理的には、血管病変を伴う間質性腎症であったが、しかし、食事および生体試料、環境試料の分析からカドミウムやヒ素あるいはフッ素などによる腎症ではなかった。家族集積性があることを見出した。現在のところ、遺伝要因として有意に相関したSNPが見出された。しかし、遺伝素因によりリスクは異なるが、慢性腎臓病の多発をそのみでは説明できていない。また患者の後ろ向きコホート研究から発症後の病期進行において、血圧管理不良がリスクとなっていた。一方、遺伝疫学調査における対照群の登録、検査において、慢性腎臓病非発症の集団でも43%が高血圧症などの生活習慣病が新たに診断され、除外された。生活習慣病が未診断のまま生活している人口が相当数存在することになり、このことは地域で非感染性疾患のコントロールができていないことを示している。

2. 研究の目的

遺伝素因も関与するが、高血圧を始めとした生活習慣病が潜在的なリスクとなると考えられた。我々は現地の研究機関と共同してコホート調査を実施し、新規発症に関わるリスク要因の解明を行った。また、これまで感染症への偏重から見逃されてきた生活習慣病の実態とその背景因子を評価した。そのため、ライフスタイル、遺伝学の両面から、慢性腎臓病への寄与を検討し、それらの相互作

用から患者の増加の原因を検討した。これまでにスリランカの慢性腎臓病多発地域であるギランドゥルコッテ、メダワッチヤにて健康者約300世帯およそ1500名、慢性腎臓病発症者約300名をコホートとして登録していた。この集団での新規発症、病期進行を追跡調査した。既に明らかにした遺伝素因のほか、食習慣を含めた生活習慣、病歴、現治療を要因として解析を実施した。高血圧症などの生活習慣病に密接に関わる栄養摂取量を評価するため、尿中元素分析を行った。化学分析により栄養素、各種元素を定量した。元素分析では血液、尿などもあわせて評価した。各要因のリスクの大きさを明らかにし、それらを良好に管理することによる慢性腎臓病の予防、進展の阻止の可能性を考察した。

3. 研究の方法

コホートの追跡による新規発症、病期進行の観察 流行地域であるUva地区Girandurukotteと中北部Medawachchiyaにおいて現地調査した。コホートに登録されている健康対照者、慢性腎臓病患者それぞれを追跡した。血清クレアチニン、尿検体について、腎機能、各種元素、有機化合物を評価した。血液試料を利用して感受性遺伝子のタイピングを行った。

組織標本の調査 の調査に平行して、組織標本を収集した。得られた試料の免疫組織化学、電子顕微鏡観察を実施した。

栄養摂取量調査 得られた試料について、化学分析により栄養素、各種元素を評価した。元素分析はICP質量分析法により測定した。

解析とリスク軽減策の検討 以上の調査で得られたコホート調査データを解析した。発症に関わる要因について、生活習慣、病歴、現治療、遺伝素因、栄養量との関係を解析した。明らかとなったリスク要因について、生活習慣、地域医療の面から軽減し、慢性腎臓病の予防の可能性を検討した。

4. 研究成果

遺伝要因の解析では疾患感受性遺伝子をゲノムワイド相関解析データを検討した。関連を見出したSNPがSLC13A3にあり、腎臓に発現するものであった。このSNPはさらに近傍の繰り返し配列のコピー数と連鎖し、このコピー数は遺伝子のプロモータ活性に影響をあたえることを示した。患者、対照で評価したところ、有意に患者で活性スコアが低く、この遺伝子が保護的に働くことが示された。腎障害モデルではマーカー分子として同定されていることも関連付けられた。さらに集団に多いSNPだけでなく、まれな変異の影響を評価するため、16人の全エクソン配列解析を行った。見出された候補変異について症例対照で相関解析を行った。KCNJ10遺伝子にある変異はオッズ比1.7を示した。また先天性ネフローゼ症候群を引き起こす原因遺伝子ラミニンベータ2に新規バリエーション

を見出した。症例群のみにみられ、一部に症例を説明しうると考えられた。このように遺伝素因も単一ではなく、複合的に関わると考えられた。

民族的な遺伝素因も関与するが、高血圧を始めとした生活習慣病が潜在的なリスクとなると考えられた。一般集団において、高血圧症の有病割合が高い。尿中ナトリウム、カリウムを評価し、その背景には塩分摂取量が極めて高く、カリウム摂取が乏しいことが明らかとなった。しかしながら、症例、対照で差は認められず、原因ではなく発症を進める背景となっていると考えられた。

農業従事者に比較的多く発症することから、スリランカの研究者において、農薬曝露が腎障害の要因ではないかと指摘がされており、一部農薬が使用禁止にされるなどの動きがあった。そのため、発症者、健康成人の間で、農薬曝露の尿中バイオマーカーを評価した。一般的にイネ農業従事者で多く使用されるネオニコチノイド系農薬7種について評価した。珪藻土カラム、ジクロロメタン抽出法を開発した。化学分析を LC-MS/MS により行った。アセタミプリドの代謝物、デスメチルアセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、チアメトキサムが検出された。クロチアニジンはスリランカで農薬登録はなく、チアメトキサムから代謝されたものと推定された。これらのネオニコチノイド系農薬濃度はクレアチニン補正した場合、慢性腎臓病患者群で低下し、腎排泄型の薬物であると考えられた。クレアチニン補正を行わない場合、両群で有意な差は認められなかった。また日本人の集団の尿中濃度に比べても低く、スリランカの集団がネオニコチノイド系農薬曝露が高いとは認められなかった。またヒ素曝露が腎障害の要因ではないかと指摘がされていた。これまでに環境中、尿中ヒ素を、発症者、健康成人の間で評価してきたが、毛髪中ヒ素についてもスリランカの複数地域で評価した。ヒ素濃度は日本人などと比較して高くはなく、また地域的な差も有意ではなかった。バルカン半島腎症の原因とされる腎毒性を有する植物でアーユルヴェーダ生薬として用いられることがあるウマノスズクサの関与について検討するため、尿中アリストロキア酸の分析方法を検討した。また症例対照それぞれの検体で曝露評価を行った。結果として、検出できる量のアリストロキア酸は見出されず、対象集団におけるウマノスズクサの利用そのものがまれであることが示された。病理組織の検討も行い、電子顕微鏡観察を行った。腎組織の電子顕微鏡観察は、CKDuの病因における重金属毒性を支持する証拠はなかった。CKDu患者における重金属毒性の欠如を報告する以前のモニタリング結果を支持した。今後の継続的検討を行うため、国際的な研究チームとの研究を計画し、既存試料を用いて、リスク要因の検索についてのプロトコールを作成した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Harada KH, Tanaka K, Sakamoto H, Imanaka M, Niisoe T, Hitomi T, Kobayashi H, Okuda H, Inoue S, Kusakawa K, Oshima M, Watanabe K, Yasojima M, Takasuga T, Koizumi A. Biological Monitoring of Human Exposure to Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretion Kinetics. PLoS One 2016;11:e0146335.

Kabata R, Nanayakkara S, Senevirathna S, Harada KH, Chandrajith R, Hitomi T, Abeysekera T, Takasuga T, Koizumi A. Neonicotinoid concentrations in urine from chronic kidney disease patients in the North Central Region of Sri Lanka. J Occup Health 2016;58:128-33. doi: 10.1539/joh.15-0140-BR

Nanayakkara S, Senevirathna S, Abeysekera T, Chandrajith R, Ratnatunga N, Gunarathne E, Yan J, Hitomi T, Muso E, Komiya T, Harada KH, Liu W, Kobayashi H, Okuda H, Sawatari H, Matsuda F, Yamada R, Watanabe T, Miyataka H, Himeno S, Koizumi A. An Integrative Study of the Genetic, Social and Environmental Determinants of Chronic Kidney Disease Characterized by Tubulointerstitial Damages in the North Central Region of Sri Lanka. J Occup Health 2014;56:28-38. doi: 10.1539/joh.13-0172-OA

Nanayakkara S, Senevirathna S, Parahitiyawa NB, Abeysekera T, Chandrajith R, Ratnatunga N, Hitomi T, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A. Whole-exome sequencing reveals genetic variants associated with chronic kidney disease characterized by tubulointerstitial damages in North Central Region, Sri Lanka. Environ Health Prev Med 2015;20:354-9. doi: 10.1007/s12199-015-0475-1

[学会発表](計 4 件)

原田浩二、Nanayakkara Shanika、小泉昭夫 スリランカ中北部乾燥地域における慢性腎臓病の原因究明
第15回 分子予防環境医学研究会
2016年1月29-30日

加畑理咲子、原田浩二、小泉昭夫
スリランカ中北部州のCKD患者における尿中
ネオニコチノイド濃度の評価
第86回 日本衛生学会総会
2016年5月11-13日

人見敏明、Shanika Nanayakkara、STMLD
Senevirathna、原田浩二、小林果、宮高透喜、
姫野誠一郎、山内博、小泉昭夫
スリランカ農民の慢性腎臓病関連因子の探
索
第54回 近畿産業衛生学会
2014年11月15日

人見敏明、Shanika Nanayakkara、STMLD
Senevirathna、原田浩二、小林果、宮高透喜、
姫野誠一郎、小泉昭夫
スリランカ農民の慢性腎臓病
第53回 近畿産業衛生学会
2013年11月2日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://hes.med.kyoto-u.ac.jp/SriLanka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 浩二 (HARADA KOUJI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80452340

(2) 研究分担者

小泉 昭夫 (KOIZUMI AKIO)

京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：50124574

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者 ()