

研究題名：臍帯血研究

前向きコホート研究による臍帯血中微量物質濃度（重金属、サイトカイン、トリプトファン他）と妊婦の生活習慣、流産傾向、出産時の状態、子供の成長発達、神経精神発達、行動、アレルギー疾患との関連調査

主任研究者：浦島充佳 東京慈恵会医科大学

研究代表者：

小児科代表：衛藤義勝 東京慈恵会医科大学 小児科学講座 主任教授

産婦人科代表：田中忠夫 東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座 主任教授

重金属測定：千葉百子 順天堂大学医学部 衛生学教室 助教授

柏病院代表：久保政勝 慈恵柏病院 院長

第三病院代表：池谷美樹 東京慈恵会医科大学附属第三病院 産科

新橋病院代表：林 良寛 東京慈恵会医科大学母子センター NICU

オーククリニックフォーミズ代表：森本 紀 院長

葛飾赤十字産院代表：布山裕一

佐渡総合病院代表：岡崎 実 佐渡総合病院 小児科医長*

本研究は、母子医療に関わるデータリソースを作成することが目的であり、上記研究代表者はあくまで代表者であって、それ以外の研究者に対してデータの利用を阻止するものではない。

寺本知史 慈恵医大柏病院 小児科

作間未織 慈恵第三病院 小児科 研修医・大学院

研究目的

妊娠中の生活習慣

臍帯血中の微量元素

その後の小児成長発達に関して時系列で調査
大規模疫学研究のデータリソースを構築する。

妊娠中の生活習慣と その後の小児成長発達に関してはアンケート調査

母体および臍帯血中の微量元素に関しては、

- ・ 重金属濃度（鉛、水銀、砒素、アルミニウム、カドミウム等）
- ・ トリプトファン/キヌレイン濃度および Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)
発現に影響し得るサイトカイン類を測定する。

上記 ， において背景が異なるので、順番に解説する。

- ・ 重金属濃度（鉛、水銀、砒素、あるミニウム、カドミウム他）測定に関する研究背景

A．環境汚染ヘルス・ハザードに関する海外での取り組み

1997年4月クリントン大統領は以下のような声明を発表した。

「私は子供に安心して食事をあげられるようにしたい。今度の法律では子供の安全を第一に考えています。子供は単に大人を小さくしただけではありません。子供は日々成長し、体重当りでみると大人より多く呼吸し、多く食べ、多く水を飲みます。各臓器は未熟で、毒による影響は大人よりはるかに大きいと考えるべきです。子供達は自分で考え自分達を守る術を知りません。そのため化学物質の子供への影響の大きさは従来の体重当りの換算ではとても正確に評価できません。よって新しい基準は厳しいものとなっています。もしも食品に使用される農薬が子供を危険にさらす可能性があるのであれば、これを使用するべきではありません。よって信頼できるデータがない場合には基準値の10分の1以下とします」。

この声明によってアメリカ政府は1996年立法化された食品品質保護法をより強固なものに改正した。

化学物質の環境上適正な管理は「環境と開発に関する国際会議＝地球サミット」に

おける合意を受けて、経済協力開発機構(OECD)は1996年に加盟各国が環境汚染物質排泄移動登録(PRTR)の導入に取り組むべきであるとの勧告を採択した。他の先進国に遅れて日本でも平成十一年七月“特定化学物質の環境への排出量の把握等および管理の改善の促進に関する法律”が公布された。これはあくまで事業者による化学物質の自主的な管理の改善(ISO14000 etc.)を促進するものであり、健康や自然に被害を及ぼす化学物質を特定してこれを制御するというものではない。勿論日本でも化学物質を規制する法律は既に存在するが、子供の特殊性を考慮した法律を施行しているアメリカとは異なる。胎児の環境物質による暴露がその後の成長発達等にどのように影響するかを疫学的調査により究明し、科学的根拠に基づいた政策に結びつけることが重要である。

B．環境汚染物質の摂取経路とヘルス・ハザード

雨は大気汚染物質の代表である硫酸化物や窒素酸化物を取り込んで酸性雨となる。この酸性雨は土壌やゴミの堆積物に存在する鉛、水銀、アルミニウム、カドミウムなどをイオンとして溶かしだして井戸水、川や海に少しずつ流しだす⁽¹⁾。

水銀は土壌や水中の微生物によってメチル水銀に変換されるが、これが酸性雨などにより海に溶け出して特に寿命の長いカジキマグロ、鮫などで濃縮され、これらの魚を食べることによって慢性的に水銀に暴露されることになる。メチル水銀は脂溶性であり、脳血管関門や胎盤を通過し、母乳中にも含まれる。慢性に水銀を取った場合共同運動や視力の障害がでる可能性がある^(2,3)。最近アメリカ食品薬品局(FDA)は先に挙げた魚をとる頻度を週に1回以下、妊婦および授乳中の女性においては月に1回以下にするように勧告している。日本人は魚介類を好んで摂取する民族でありながら、体内重金属濃度のデータが急性中毒を除いてほとんどないのが現状である。

かつて鉛はガソリンに含まれており、車の排ガスとして大気中に撒布され、子供や妊婦も含めこれを知らず知らずのうちに摂取していた。また昔は仕上がりがよいということでペンキに鉛が含まれ(主に西欧)、小さい子供は壁を触って舐めるため、どうしても血中鉛濃度が高かった。日本においても水道管に鉛が含まれることが指摘されているが、体内にどれくらい取り込まれ蓄積されているかは調査されていない。特に子供における慢性鉛中毒は子供のIQを低下させ⁽⁴⁾、思春期の非行を増やすことが報告されている⁽⁵⁾。ダイオキシンについても同様である⁽⁶⁾。

カドミウムも排水などに含まれ土壌に染み込み、その土壌で育った野菜や穀物はカドミウムに汚染されることになる。カドミウムはバッテリーやコンピューターなどのハイテク製品製造過程で使われ、骨の脱灰を促進する。少量に長期間暴露は骨粗鬆症の原因となりえることが最近わかってきた。砒素は除草剤、殺虫剤、ペンキにも含まれており知らず知らず暴露されている可能性がある。そして魚介類摂取が小児(2 - 10歳)における砒素血中濃度上昇のおよそ8割貢献しているとFDAは勧告している⁽⁷⁾。砒素はDNA傷害性を有し⁽⁸⁾。砒素が染色体異常、小児白血病、皮膚癌の発生につながるとの報告があった^(9,10)。さらに少人数を対象としたcross sectional studyではあるが、砒素血中濃度が高いと小児IQを低下させる傾向があることも報告されている⁽¹¹⁾。アルミニウムによる痴呆症は透析患者で問題視されるようになったが、ジュース、鍋、釜など私達の身の周りにも多く存在する。しかし、アルミニウムの胎児、小児への影響に関する調査報告はほとんど見当たらない。

しかしながら、小児成長発達に対するこれらの重金属濃度を同時解析した報告はない。多くの血中濃度はお互い相関関係にあることが予想され、最も影響力の強い因子を決定するためには1つの検体で全ての濃度を測定して、多重解析するべきである。

C．母親に蓄積された重金属の胎児への移行

重金属血中濃度やダイオキシン濃度は年齢が上がるにつれ、その濃度も上昇し⁽¹²⁾、そしてこれらの母体血中重金属濃度は妊娠初期よりも後期の方が低い傾向にあり、出産回数を重ねることによってより下がる傾向がある⁽¹³⁾。妊娠中重金属濃度およびダイオキシン高値は出生時体重減少と相関する⁽¹⁴⁾。日本では年間10gの割合で出生時体重が減少している。この減少は合併症妊娠の増加では説明できない^(15,16)。これらを考え合わせると、母親が妊娠までに蓄積した重金属やダイオキシン類、その他の化学物質が妊娠中胎児に移行し、臓器形成期にある胎児の方がこれらの毒素に対して高い感受性を示すことから、出生後の成長発達にも影響することが考えられる。

D．臍帯血中重金属濃度の報告

周産期の重金属暴露の測定方法として、その他胎便、毛髪、母乳、妊娠中母親の血中濃度を対象とすることもできるが、臍帯血濃度が最も小児の成長発達、神経精神症状と一致する傾向が示されている⁽¹⁷⁾。

	臍帯血中濃度	母体血中濃度	(18)
水銀	28.8 microgram/L	19.4 microgram/L	
鉛	40.9 microgram/L	64.8 microgram/L	
カドミウム*	1.24 microgram/L	1.62 microgram/L	
砒素	7.9 microgram/L	6.8 microgram/L	
アルミニウム	No report	No report	

砒素：妊娠中母親血および臍帯血中の砒素はメチル化されている。解毒機序が働いている可能性がある。9 microgram/l 臍帯血濃度と母体血濃度はほぼ等しい⁽¹⁹⁾。

・母体、臍帯血中のトリプトファン (tryptophan) 、キヌレイン (kynurenine) 濃度および Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)発現に影響し得るサイトカイン類の測定

A . 胎児がアロ抗原でありながら拒絶されないメカニズム

胎児は母親にとって自己抗原(allo-antigen)でありながら、拒絶されることはない。近年、そのメカニズムが明らかにされつつある(Science 1998; 281: 1191)。すなわち、胎盤組織中に強発現する Indoleamine 2,3 dioxygenase(IDO)のトリプトファン(Trp)からキヌレニンへの代謝が、CD4+, CD8+ T cell およびナチュラルキラー (NK) 細胞の増殖を抑制し免疫寛容状態を作り出すのである。このことは、IDO の阻害物質である 1-メチル・トリプトファンを異系間の妊娠マウスに投与し、胎盤周辺の炎症および流産を誘導できたことにより証明された。そのメカニズムとして、B 細胞機能には影響せずにT細胞機能を中心に抑制することによることが実験研究により示された。妊婦の血中トリプトファン濃度は妊娠週数をおうごとに低下する傾向が示されてはいるものの (Obstet Gynecol 1996 Jul;88(1):47-50) その個人差に関して多数の臨床検体によって流早産、切迫流早産との関係は示されていない。

B . 胎盤の IDO の増加の胎児に及ぼす影響

一方、臍帯血中のトリプトファン濃度は母体血より高く、出産後 24 時間以内に低下、初乳にトリプトファンが多いことより生後 5 日程度で回復することが報告されている (Acta Med Okayama 1991 Apr;45(2):101-6)。当然、臍帯血中トリプトファン濃度には個人差が存在することが予想される。しかし、個人差およびその臨床的意義は調査報告されていない。特に、その濃度の個人差はアレルギー疾患の発生とも関係しているかもしれない。トリプトファン濃度が低ければ免疫寛容を誘導しやすく、逆に高ければ免疫反応を惹起することが予想される。

C . トリプトファン代謝の精神活動への影響

更に、トリプトファンはセロトニン代謝に必要であり、トリプトファン低下、セロトニン低下はうつ状態と関係する可能性がある。事実、大腸がん患者において、トリプトファン低下とうつ状態の強い相関が示されている (BJC 2002; 86: 1691)。

このことは、マタニティー・ブルー、小児の行動変化との関係を示唆するが、明確な調査研究は行われていない。

D . Clonal selection theory の検証

極最近、IDO を発現する樹状細胞 (DCs) と IDO を発現しないものが存在することが示された (Science 2002; 297: 1867)。臍帯血中トリプトファン濃度が母親より高いにしても、成人血より低いとすれば、免疫寛容に関与している可能性がある。まずは、臍帯血中の DC 中、IDO 陽性細胞がどの程度存在するか検討し、これらの細胞が特に免疫寛容においてどのような生理的役割を担っているのか検討するべきである。

このメカニズムを知ることにより、難治性自己免疫疾患の治療を解くカギとなるかもしれない。

対象および方法

1. 研究デザイン：前向きコホート研究

2. 対象：

1) 対象とする基準

2) 参加病院の産科外来あるいは母親学級にて研究趣旨と具体的方法を記載した説明書を配布する。内容に納得し同意する場合には同意書を郵送にて臨床研究開発室あてに返信してもらう。つまり研究説明に対して母親が文書で同意したものを対象とする。

3) 除外基準

同意書を返送しなかった場合

(アンケートの郵送のみの場合には、同意書返送を促すよう手紙を送る)

途中で気持ちが変わった場合

途中で死産となったもの

日本語が読み書きできないもの

4) 除外には該当しない特殊例

精神発達遅滞等の病気を合併しても除外基準にはならない

出生後死亡した場合でも、臍帯血が採取できれば除外しない。

何らかの理由で臍帯血を採取できなかった場合でも除外しない。

3. 対象数/研究協力病院/対象の扱い：

1) 対象数 1000人から2000人

2) 研究協力病院(2004年2月現在)

東京慈恵会医科大学付属病院

東京慈恵会医科大学附属第三病院

東京慈恵会医科大学附属柏病院

佐渡総合病院

オーククリニックフォーミズ

葛飾赤十字産院

3) 対象の扱い

産科外来受診または母親学級の際、妊婦に対し、妊娠後半(7ヶ月以降)「研究説明と同意書、妊娠中アンケート、切手付き返信用封筒」を渡しながら研究趣旨を説明をする。同意をとれた対象に関しては、胎盤からの臍帯血採取を行う。

妊婦が研究内容に同意した場合、サイン済み同意書、妊娠中アンケート用紙を臨床研究開発室に郵送する。アンケート内容を産科主治医がみることはない。

アンケート用紙は臨床研究開発室において紙および電子媒体として保存する。

出産時、臍帯血を採取する(ヘパリン管にて10 ml程度)。

新橋：浦島が回収、遠心にて血漿分離凍結保存

柏：寺本が回収、凍結保存

第三：作間が回収、凍結保存

オーククリニックフォーミズ：寺本が回収、凍結保存

葛飾赤十字産院：布山が回収、凍結保存

佐渡：岡崎が回収、凍結保存

臨床研究開発室より、以下のタイミングでアンケート用紙を郵送する。

1ヶ月時 6ヶ月時 1歳時 2歳時 3歳時 4歳時 5歳時 6歳時 7歳時

4. 臍帯血検体提出経路および測定

1) 重金属濃度測定

連結可能型、すなわちID番号のみをラベルして順天堂大学衛生学教室に浦島が運搬する。同教室にて重金属濃度測定を依頼。その際、検体上はIDのみで名前を示さない。

2) 血中トリプトファン、キヌレニン測定

慈恵医大、分子細胞生物研究部に委託する(HPLCを使用)。1回に12検体測定可能。その際、検体上はIDのみで名前を示さない。

3) 血中サイトカイン測定

CD40 ligand, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gamma の濃度を母親および臍帯血においてELISA法で測定する。

5. 結果評価(エンドポイント)

早産、切迫早産の判定に関しては産科医が行う。

小児の成長発達等に関してはアンケート調査で行う。

6 . アンケート調査および集計

7 . 追跡調査打ち切り基準

最初、同意書および妊娠中のアンケートに答えたが、途中より返信が無く、2回アンケートを郵送しても返信がない場合には打ち切りとする。

8 . 統計学的考察と解析計画

1) デザインの特徴と限界

特徴：本研究は前向きコホートであるため、思い出しバイアスの混入が少ない。
また結果測定 of 誤差を防ぐために討議のうえマニュアルを作成する。エンドポイント測定者および参加者には臍帯血中重金属血中濃度の結果を知らせない (double blinding) ことを原則とする。

しかし、測定結果通知希望者 (アンケート用紙自由記載欄にそのように書いているもの) に対しては、成人の基準値を資料として添付し、臍帯血中濃度の安全域が未確立である点を付して通知する。

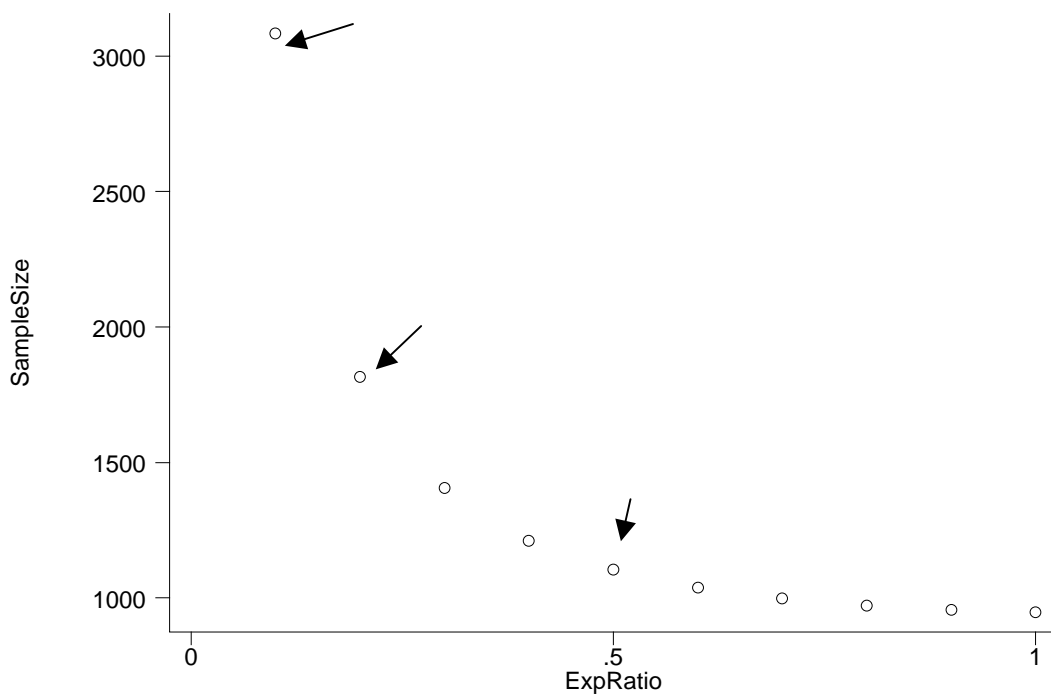
日本全体の傾向をつかむために、都心部 (新橋) 都心部郊外 (狛江、柏、葛飾) 田舎部 (佐渡) を協力病院として選定した。

限界：臍帯血の結果はエンドポイントが短期間で判るものは大きな問題は無いが、長期に観察する必要があるエンドポイントに関しては脱落例が増える可能性がある。対象数をなるべく多くしたいが経済的問題もあるため 2000 を最大とする。

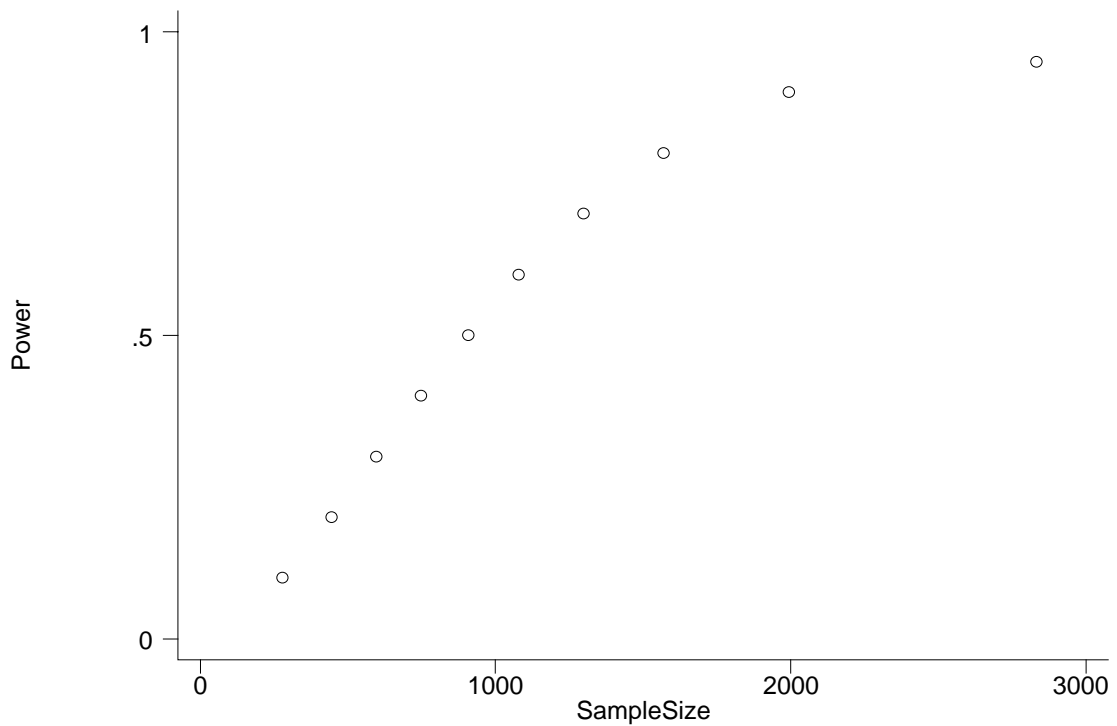
2) 対象数

過去の重金属と成長発達に関する論文では 100 人から 1000 人を対象としている論文がほとんどである。

臍帯血中重金属濃度用量依存的にエンドポイント発生リスクが上昇すればよいが、一定以上の高値をとったときにエンドポイント発生が高くなることも考慮される。対象の半分でカットオフ (ExpRatio=1) し (中央値以上を異常値と考える) エンドポイントの発生が 5% から 10% まで増加したとすると (power: 80%, error: 0.05) 対象数は 948 人必要となる ()。一方、異常値を 1/5 でカットオフすると 1815 人のリクルートが必要となる。例えば重金属濃度 10% をカットオフとした場合、3083 人の対象数を必要とし、必要対象数は急増する。



エンドポイントの発生が重金属高濃度で 10%、低濃度で 5%であると仮定し、次に重金属濃度を 1/4 でカットオフ、alpha=0.05 で固定し、パワーを 95% から 10% まで推移させた際の対象数について調べてみた。



2000 人を超えるとパワーはほとんど変化しなくなる。
 以上より対象数は 1000 から 2000 の間が妥当を思われる。

3) モニターと解析

臨床医学研究所に解析結果を随時集め、半年に1度結果を途中解析する。各エンドポイントのデータがそろったところで統計解析し、結果を研究協力者に報告する。また、簡単かつ判りやすくまとめたものを次のアンケート用紙とともに参加者に送付する。

4) 層化

参加病院毎に層化し、地域性について検討する。

5) 統計学的解析に関する考察

古典的な多変量解析を行いつつ、ニューラルネット、クラスター解析なども適宜加えて検討する。

9. 倫理的事項

1) ヘルシンキ宣言にのっとり、将来の母子健康増進に役立てる目的で科学的エビデンスを収集する。プライバシーの保護には慎重に配慮する。検体を外部に持ち出す際には個人名を用いずに研究用 ID 番号を用いる。電子媒体に関しては、イントラネット、インターネットと接続していないコンピュータに残すのみであり、適宜 CD-ROM に移してカギ付きの引き出しに保存する。

2) 説明と同意書を文書でとる。

3) 慈恵附属施設での研究は慈恵医大の倫理委員会で承認を得る。慈恵医大附属病院以外の医療施設においては、その施設における倫理委員会あるいはそれに相当するものの承認を得る。

予想される結果と意義

- 1．臍帯血重金属およびダイオキシン血中高濃度は出生時体重減少、ソフト神経サインの異常、問題行動リスクの増加、アレルギー疾患増加と相関することが予想される。また、魚介類摂取過多と臍帯血重金属血中高濃度の間に相関が認められれば、妊娠中の魚介類摂取適正量を推薦することができる。また、環境調査とリンクさせて、水に問題があれば、これを改善することもできるであろう。アレルギー疾患の増加、IQ 低下、問題行動は将来的に国益を損ねることになるわけであるが、本研究により社会に具体的データを示し、環境中の改善すべき点が浮き彫りになれば、政策に反映することもできる。しかしながら、魚介類摂取は、不飽和脂肪酸などの良い点も考慮されることから、子供の健康への影響は慎重かつ科学的に解析されなくてはならない。
- 2．妊婦血中トリプトファン高値は、切迫早産、子宮内胎児発育遅延の原因となるかもしれない。一方、極端なトリプトファン低値はマタニティー・ブルーになる可能性もある。臍帯血中のトリプトファン低値は、小児の行動異常に関係するかもしれない。
- 3．臍帯血中のトリプトファン高値は、その後の小児アレルギー疾患（アトピー性皮膚炎、喘息様気管支炎、気管支喘息、食事アレルギー、アレルギー性鼻炎など）発症と関係するかもしれない。

參考論文

- (1) Johnsen DE, et al. Effects of air pollutants and acid rain on human health. Pennsylvania Med 1990.
- (2) McKeown-Eyssen GE, Ruedy J, Neims A: Methyl mercury exposure in northern Quebec II. Neurologic findings in children. Am J Epidemiol 1983;118:470-9.
- (3) McKeown-Eyssen GE, Ruedy J, Neims A: Methyl mercury exposure in northern Quebec II. Neurologic findings in adults. Am J Epidemiol 1983;118:461-9.
- (4) Needleman HL, et al. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. New Eng J Med 1990;33:119-25.
- (5) Baghurst PA, et al. Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. The Port Pirie Cohort Study. New Eng J Med 1992;327:1279-84,1992.
- (6) Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. N Eng J Med 1996;335:783-9,1996.
- (7) Tao SS, Bolger PM. Dietary arsenic intake in the United States: FDA total diet study September 1991-December 1996. Food Addit Contam 1999; 16: 465-72.
- (8) Feng Z, et al. DNA damage in buccal epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in Inner Mongolia, China. Anticancer Res 2001; 21: 51-7.
- (9) Infante-Rivard C, Olson E, Jacques L, Ayotte P. Drinking water contaminants and childhood leukemia. Epidemiology 2001; 12: 13-9.
- (10) Guo H, et al. Using ecological data to estimate a regression model for individual data: the association between arsenic in drinking water and incidence of skin cancer. Environ Res 1998;79:82-93.
- (11) Calderon J, et al. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. Environ Res 2001;85:69-76.

- (12) Bjerregaard P, Hansen JC. Organochlorines and heavy metals in pregnant women from the Disko Bay area in Greenland. *Sci Total Environ* 2000; 17: 195-202.
- (13) Osman K, Akesson A, Berglund M, Bremme K, Schutz A, Ask K, Vahter M. Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clin Biochem* 2000; 33: 131-8.
- (14) Odland JO, Nieboer E, Romanova N, Thomassen Y, Lund E. Blood lead and cadmium and birth weight among sub-arctic and arctic populations of Norway and Russia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 852-60.
- (15) Matsumoto T, Takasaki Y, Takagi S, et al. A downward trend in the birthweight of infants in Fukuoka city over the past decade. *Jpn J Pediatr*. 2001; 104:1012-1018.
- (16) Hioki A. Recent trend of the decrease in mean birthweight of infants in the western provinces of Gifu prefecture. *Jpn J Epidemiol* 1997; 7: 232-237.
- (17) Ramirez GB, Cruz MC, Pagulayan O, Ostrea E, Dalisay C. The Tagum study I: analysis and clinical correlation of mercury in maternal and cord blood, breast milk, meconium, and infants' hair. *Pediatrics* 2000; 106: 774-81.
- (18) Soong YK, et al. Lead, cadmium, arsenic, and mercury levels in maternal and fetal cord blood. *J Formos Med Assoc* 1991;90:59-65.
- (19) Concha G, et al. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol Sci* 1998;44:185-90.