

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10393

研究課題名(和文) 臍帯血バイオマーカーによる胎児期の環境曝露因子の効果的な推定方法の確立

研究課題名(英文) An effective method for estimating environmental exposure factors during the fetal stage using cord blood biomarkers

研究代表者

當房 浩一 (Toubou, Hirokazu)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10741027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：3歳時のASQ-3スクリーニング陽性群では、出生時の臍帯血中の脳障害マーカー(pNfH、MMP-9、TIMP-1)、炎症性サイトカインIL-6が高い傾向があり、DNA酸化損傷マーカーは低かった。IL-6とDNA酸化損傷マーカーとの相関性はなかった。これらの臍帯血バイオマーカーと関連する環境要因の重回帰分析を試み、脳障害マーカーに影響を及ぼすいくつかの予測因子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期および周産期の環境要因に関する明確なエビデンスは少ない。本研究では、臍帯血バイオマーカーデータベースの構築により、神経発達症の発症および増悪の要因となりうる予測因子の候補を見出した。更なる検証の余地はあるが、臍帯血バイオマーカーによる神経発達症の発症予測の可能性が示唆され、本研究成果は神経発達症のメカニズムを考えるうえで有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of neurological developmental disorders in infants appears to be on the rise, and while many theories catch the public's attention, there is insufficient evidence on the environmental factors contributing to this crisis. The aim of this study was to analyze a cord blood biomarker dataset linked to datasets from a birth cohort survey to determine environmental factors associated with neurodevelopmental disorders during pregnancy and the perinatal period. The group below the cut-off values of the Ages and Stages Questionnaire, third edition at age 3 years tended to have higher levels of pNfH, MMP-9, TIMP-1 and IL-6 in cord blood at birth and lower levels of DNA oxidative damage marker than the control group. An association between oxidative stress and inflammation has also been reported, although, there was no correlation between IL-6 and DNA oxidative damage marker. We performed multiple regression analyses and identified several predictors affecting these markers.

研究分野：衛生学および公衆衛生学

キーワード：バイオマーカー 臍帯血 神経発達症 環境曝露 生活習慣

1. 研究開始当初の背景

- (1) 自閉スペクトラム症 (ASD) 注意欠如多動症 (ADHD) 知的発達症 (ID) 限局性学習症 (SLD) 等の総称である神経発達症が近年増加し、大きな社会問題の一つとなっている。その背景に、社会的認知の高まりと診断技術の進歩があるが、これらを考慮しても神経発達症の増加は明らかである。他の国でも増加の一途をたどっており、この問題は精神医学的、予防医学的、医療経済学的、そして社会・教育学的にも、全世界において解決すべき喫緊の課題である。
- (2) 神経発達症の原因は、遺伝医学的な側面と胎児期および周産期の脳障害の両面が関与しているとされている。近年、遺伝医学的研究技術の進歩から、遺伝的要因が明らかにされつつあるが、胎児期および周産期の環境要因に関する明確なエビデンスは少ない。
- (3) また、感染症などの周産期ストレスが自閉症を発症する報告があり (Zerbo et al. *JAMA Pediatr.* 2017; Hornig et al. *Mol Psychiatry.* 2018)、臍帯血または小児期の末梢血中の炎症関連マーカーと自閉症の関連も報告される (Driscoll et al. *Brain Behav Immun.* 2018; Raghavan et al. *J Autism Dev Disord.* 2019)。しかし、妊娠期または周産期のどのタイミングで、どのような曝露がリスクとなりうるのか不明であり、科学的知見の蓄積が必要不可欠である。
- (4) 申請者らは、子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) に伴い、独自に臍帯血を保存後、227名の臍帯血バイオマーカーデータベースを構築し、1歳半健診時における神経発達症スクリーニング検査 (M-CHAT) で評価した。その結果、神経発達症と脳障害バイオマーカーとの有意な関連はみられなかったが、臍帯血中の炎症性サイトカイン (IL-17A など) の関与を見出した。近年、臍帯血の炎症関連マーカーと自閉症の関連についても報告されており (Driscoll et al. *Brain Behav Immun.* 2018; Raghavan et al. *J Autism Dev Disord.* 2019)、神経発達症の中間アウトカムとして、臍帯血バイオマーカーが有用であることが示唆された。しかしながら、具体的にどのような環境要因が炎症を惹起し、健康影響を及ぼすのかについては明らかにできていなかった。一方で、1歳半健診時における有意語出現と脳障害バイオマーカーとの関連が見出されたことから、本出生コホートの発達状況について慎重にフォローアップすることとした。

2. 研究の目的

本研究は、臍帯血バイオマーカーデータベースの構築による神経発達症のタイプ分類、子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) の全固定データを用いた胎児期および周産期における神経発達症の発症および増悪の要因について探索的解析を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、申請者らが以前に遂行した科学研究費助成事業「周産期微細脳障害による神経発達症の発症予測と予防法の開発 (課題番号 26893103)」に基づいている。本研究では、以下の項目を実施することとした。

(1) 神経発達症と臍帯血バイオマーカーとの関連の評価 (データベース利用)

神経発達症と臍帯血バイオマーカーとの関連を評価した。以前に測定した 227名の臍帯血バイオマーカーデータベースを用いた。臍帯血バイオマーカーは、脳損傷特異的な神経細胞軸索由来のリン酸化ニューロフィラメントタンパク質 (pNF-H)、血液脳関門の破壊と関連するマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9)、MMP-9の内因性制御因子である組織抑制マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (TIMP-1) について解析した。サイトカインはインターロイキン (IL) -2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、インターフェロン (INF-)、腫瘍壊死因子 (TNF) であった。

神経発達症のアウトカム指標は、ASQ-3 (Ages and Stages Questionnaires, Third Edition: 保護者が記入する発達評価ツール) を用いて評価した (Mezawa *Pediatr Int.* 2019)。ASQ-3は5領域 (コミュニケーション、粗大運動、微細運動、問題解決、個人・社会) についての質問項目の回答から得た領域スコア算出しており、3歳時点のカットオフ値以下の症例をスクリーニング陽性とした。対照群は、傾向スコアマッチングにより、各 ASQ-3 スコアの第 4 四分位数に対し、性別、世帯の年間収入、生後 1 か月の話しかけの有無、授乳法を一致させ、対応 2 群で臍帯血バイオマーカーを比較した。

(2) 臍帯血バイオマーカーと環境因子との関連の評価 (データベース利用)

効果的な推定方法として、臍帯血バイオマーカーを中間アウトカムとして、環境因子との関連を評価した。環境要因および交絡要因となりうる因子をエコチル調査 3 歳時全固定データか

ら取得し、データベースを構築し、臍帯血バイオマーカーと環境要因との関連を評価した。

(3) 神経発達症と臍帯血バイオマーカーとの関連の評価（本研究課題において測定）

本研究では、新たな追加測定項目として、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）、DNA 酸化損傷マーカー（8-OHdG）を酵素結合免疫測定法（ELISA）により測定した。サイトカインプロファイルは同一のサイトメトリックビーズアレイ（CBA）キットを使用して測定した。対象者は、無作為に選出した 161 名についてベースライン評価した。

長期の凍結保存では、サイトカインは -80 で 2 年間まで安定であることが示されているが、一部のサイトカインについて、-80 凍結保存期間、凍結融解回数、採血管の種類がその測定結果に影響を及ぼすとの報告がある（de Jager et al., *BMC Immunol.* 2009; Hosnijeh et al., *Biomarkers* 2010; Stervbo et al. *Cytokine* 2020; Chowdhury et al., *Am J Hum Biol* 2024）。本研究では、長期保存後の試料を測定したことから、測定結果の妥当性を評価するため、未凍結融解の臍帯血を使用して測定し、1 歳半健診時に測定した対象者と同一の対象者について結果を比較した。

(4) 8-OHdG の後方視的な評価（本研究課題において測定）

(3)の項目で評価した集団は、ASQ-3 スクリーニング陽性の対象者が限られたため、後方視的に、症例群として ASQ-3 陽性者を選出し症例対照研究を実施した。

4. 研究成果

(1) 神経発達症と臍帯血バイオマーカーとの関連の評価（データベース利用）

傾向スコアマッチングにより、ASQ-3 スコア第 4 四分位数ならびに ASQ-3 陽性群と対照群を比較した。pNfH は個人・社会スコアの陽性群において高い傾向がみられ（図 1）、TIMP-1 は個人・社会スコアの陽性群において有意に高かった（図 2）、MMP-9 および IL-6 は微細運動スコアの陽性群において有意に高かった（図 3、4）。

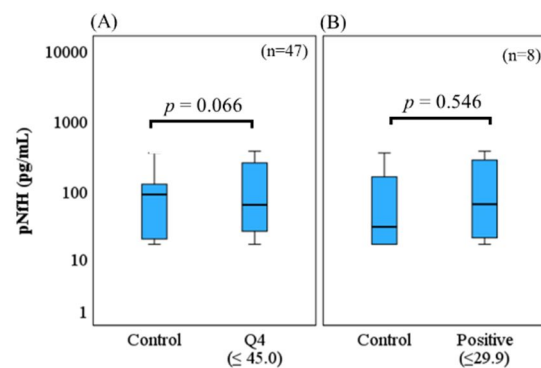


図 1 傾向スコアマッチングによる pNfH の比較
A：第 4 四分位数とその対照群の比較
B：ASQ-3 陽性群とその対照群の比較

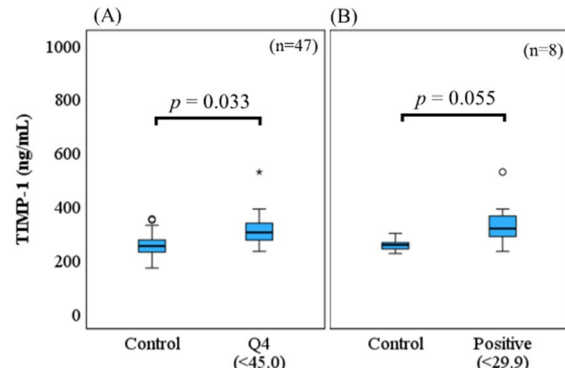


図 2 傾向スコアマッチングによる TIMP-1 の比較
A：第 4 四分位数とその対照群の比較
B：ASQ-3 陽性群とその対照群の比較

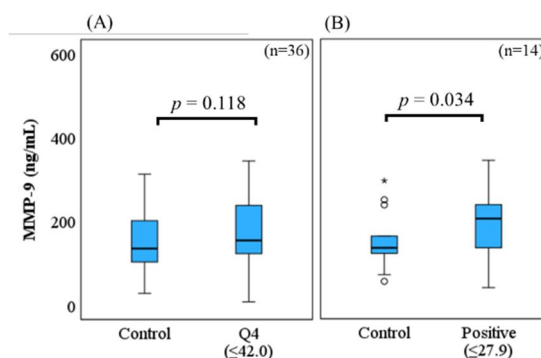


図 3 傾向スコアマッチングによる MMP-9 の比較
A：第 4 四分位数とその対照群の比較
B：ASQ-3 陽性群とその対照群の比較

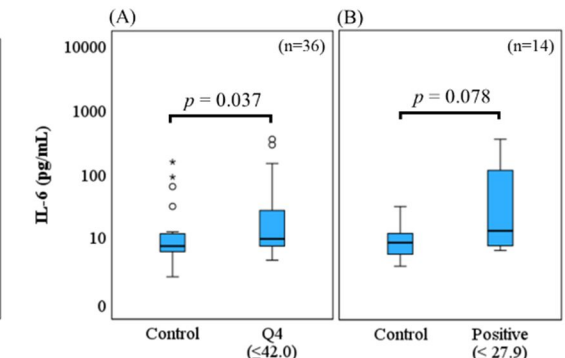


図 4 傾向スコアマッチングによる IL-6 の比較
A：第 4 四分位数とその対照群の比較
B：ASQ-3 陽性群とその対照群の比較

(2) 臍帯血バイオマーカーと環境因子との関連の評価（データベース利用）

個人・社会スコアの間接アウトカムとして、pNfH および TIMP-1 を従属変数とした重回帰分析をした。

対数化 pNfH を従属変数とした重回帰分析の結果、正の予測因子として、妊娠中に使用した薬剤の有無、世帯収入、負の予測因子として、母親の年齢、健康状態スコア、対数化尿中 8-OHdG（8-hydroxy 2 deoxyguanosine）、妊娠期間中の飲酒、切迫早産が得られた。妊娠中に使用

した薬剤は、そのほとんどが頸管熟化剤・陣痛促進剤または子宮収縮抑制剤だった。

対数化 TIMP-1 を従属変数とした重回帰分析の結果、正の予測因子として、母の BMI、子宮内発達遅延の有無、カロテノイドの摂取量、負の予測因子として、母の年齢、世帯収入、吸引分娩の有無、出生児の性別が得られた。

8-OHdG は酸化 DNA 損傷マーカーである。酸化ストレスには、重金属曝露や炎症反応も関連することが知られているが、今回の解析では、臍帯血バイオマーカーと重金属曝露 (Pb, Hg, Se, Mn) や喫煙習慣、感染症の有無との関連はみられなかった。

カロテノイドは、野菜に多く含まれ、抗酸化作用を有する。しかしながら、カロテノイドは転写因子としてのレチノール活性を有する栄養素であることから、脳における抗酸化作用や転写因子としての役割など、注意深く検討していく必要がある。

一方、酸化ストレスは、胎盤の血管発達を制御することが知られており、胎盤の 8-OHdG 産生の増加は、子癩前症において報告されている (Aouache et al., *Int J Mol Sci.* 2018 ; Fukushima et al., *Am J Hypertens.* 2011)。Suboptimal Health Status (SHS) との関連も示唆される (Anto et al., *PLoS One.* 2022)。

以上より、本研究成果は神経発達症のメカニズムを考えるうえで有用な知見であると考えられる。更なる検証の余地はあるが、臍帯血バイオマーカーによる神経発達症の発症予測の可能性が示唆され、脳障害、胎盤異常等のメカニズムを考慮し、慎重に解釈していく必要があると考えられた。

(3) 神経発達症と臍帯血バイオマーカーとの関連の評価 (本研究課題において測定)

サイトカインプロファイルにおける長期凍結保存の影響

本研究において測定した凍結試料には、同一の対象者 12 名の臍帯血が含まれた。当該対象者の平成 27 年と令和 5 年に測定した臍帯血サイトカインプロファイルの比較を示した (表 1)

IL-6 は決定係数 R^2 が 0.984 あり長期保存性が良好だった (図 1)。その他のサイトカインは、 R^2 が 0.9 を大きく下回っており、特に IL-17A、INF- γ 、IL-10、IL-2 は、検出下限以下の比率が大幅に増加したため、長期保存性が不良だったと示唆された。本研究の測定結果においては、サイトカインについては IL-6 を解析することとした。

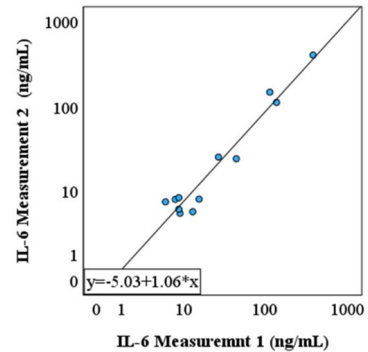


図 5. 長期保存後の IL-6 測定の比較
測定 1 は平成 27 年に、測定 2 は令和 5 年に測定した結果を散布図で示した。

表 1. 長期保存における臍帯血中のサイトカインの安定性の確認

	測定 1 [†]		測定 2 [‡]		p 値	R ²
	Mean±SD	<MDL% [‡]	Mean	<MDL% [‡]		
IL-17A	32.0±29.0	58.3	14.1±2.7	91.7	0.094	0.041
IFN- γ	4.9±1.6	25.0	4.2±2.9	66.7	0.432	0.059
TNF	3.8±1.2	50.0	6.9±4.1	8.3	0.024	0.055
IL-10	5.5±1.8	25.0	6.8±4.2	41.7	0.557	0.001
IL-6	63.8±117.4	0.0	64.7±109.5	0.0	0.380	0.984
IL-4	4.2±1.0	66.7	6.3±3.9	58.3	0.094	0.453
IL-2	3.6±2.0	50.0	4.2±3.4	58.3	0.742	0.046

[†], 測定 1 は平成 27 年に、測定 2 は令和 5 年に測定された。

[‡], MDL は測定項目の検出下限、<MDL% は検出下限以下の比率を示した。

追加測定項目 (GFAP および 8-OHdG、IL-6) の評価 (ベースライン評価)

無作為に抽出した対象者 161 例について、GFAP、8-OHdG、サイトカインプロファイルが得られた。長期保存性を考慮し、比較的安定な 8-OHdG と、サイトカインプロファイルのうち IL-6 のベースラインを評価した。8-OHdG と IL-6 の相関係数は -0.16 ($p=0.84$) であり、2 変量間の相関性はみられなかった (図 6~8)。

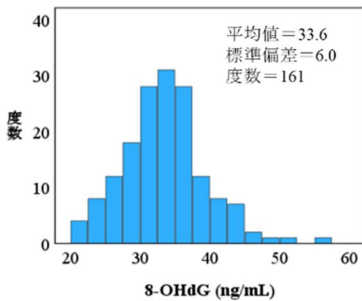


図 6 臍帯血中 8-OHdG の分布

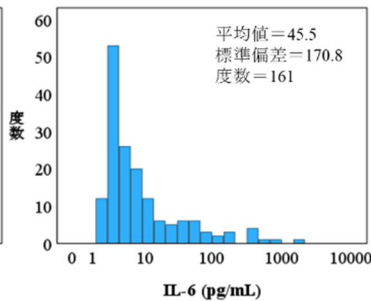


図 7 臍帯血中 IL-6 の分布

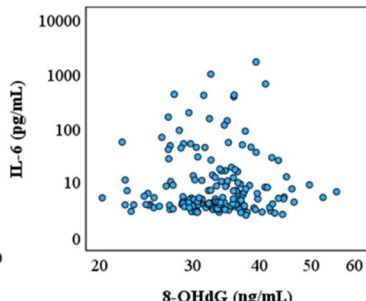


図 8 8-OHdG と IL-6 の散布図

GFAPは161例中1検体のみ検出され、0.55 ng/mLであり、3歳時点におけるASQ-3の5領域のスコアは、すべての領域でスクリーニング陰性だった。GFAP高値は、中枢神経系壊死のバイオマーカーとして、胎児発育不全の比率と関連が報告されている (Yue et al. *J Perinatol.* 2021)。この報告では、臍帯血における濃度の幾何平均値について、脳損傷9例のGFAPは0.194 (非脳損傷90例では0.078) ng/mL、脳損傷8例のIL-6は25.0 (非脳損傷90例2.6) pg/mLだった。検出された1例においてASQ-3スコアが良好であったことはGFAPが神経発達症のバイオマーカーとならない可能性を示唆している。一方、GFAP増加を伴う神経損傷の有病率が小さい可能性、サイトカインと同様にタンパク質が分解により多くの検体でGFAPが検出されなかった可能性があり、本研究とは別に検討が必要である。

この対象者161例のうち、ASQ-3スコアのデータのある対象者138例のスクリーニング陽性者はコミュニケーション3例、粗大運動3例、微細運動7例、問題解決5例、個人・社会2例 (各々2.2、2.2、5.1、3.6、1.4%) だった。エコチル調査における既存の報告では各々4.0、5.4、8.3、8.3、3.5%との報告があり (Kobayashi *Environ Int.* 2022)、全体的に陽性率が低かった。この規模のサンプルサイズでは、神経発達症の関連の解析できなかったため、後ろ向きにASQ-3陽性群を選び、症例対照研究を実施した。

(4) 8-OHdGの後方視的な評価

本研究では、後ろ向きにASQ-3におけるスクリーニング陽性群を選び、ベースライン評価時の無作為抽出された集団と併せて、症例対照研究を実施した。

傾向スコアマッチングにより、ASQ-3スコア第4四分位数ならびにASQ-3陽性群と対照群を比較したところ、微細運動スコアが有意に低かった (図9)。

この結果は、(2)の評価で得られた、対数化 pNfH を従属変数とした重回帰分析の結果に関連する可能性も考えられたが、臍帯血中の8-OHdGと妊娠中の母親の尿中8-OHdGを比較した結果から、相関性がないことを確認した (図10)。

今後、胎盤異常との関係も踏まえ、これらの関連を精査する予定である。

本研究の結果は、妊娠中の尿中8-OHdGと臍帯血中8-OHdGの測定には、測定方法の違いがあり (それぞれHPLC法とELISA)、ELISAによる測定は、8-hydroxy guanosine、8-hydroxy guanineに各々23%の交差性があるため、結果の開削に注意が必要である。

また、サンプルサイズも小さいため、エコチル全体調査データとの整合性も加味し、慎重に検討する必要があると考えられた。

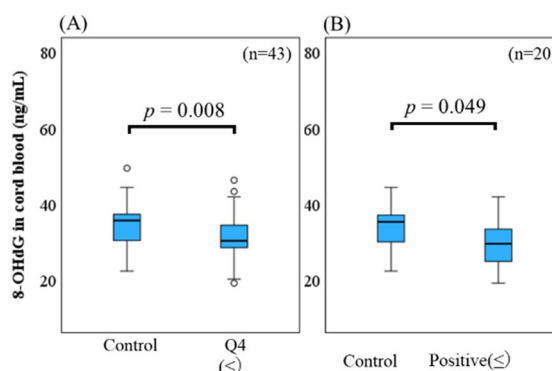


図9 傾向スコアマッチングによる8-OH-dGの比較
A: 第4四分位数とその対照群の比較
B: ASQ陽性群とその対照群の比較

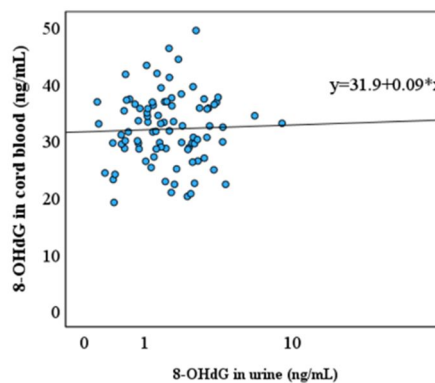


図10 妊娠期尿中8-OHdGと臍帯血8-OHdGの散布図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野見山 哲生 (Nomiya Tetsuo) (70286441)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	塚原 照臣 (Tsukahara Teruomi) (50377652)	信州大学・医学部・教授（特定雇用） (13601)	
研究分担者	元木 倫子 (Motoki Noriko) (70750701)	信州大学・医学部・講師（特定雇用） (13601)	
研究分担者	三澤 由佳 (Misawa Yuka) (10738644)	信州大学・医学部・特任助教 (13601)	
研究分担者	稲葉 雄二 (Inaba Yuji) (30334890)	地方独立行政法人長野県立病院機構 長野県立こども病院 (生命科学研究センター)・生命科学研究センター・生命科学研究センター副センター長 (83607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------