

2021 年度日本助産学会研究助成金（奨励研究助成）研究報告書

妊婦におけるレストレスレッグス症候群とビタミンD 欠乏症との関連

江藤宏美（長崎大学生命医科学域）

分担研究者：宮崎 あすか

I. はじめに (研究目的含む)

レストレスレッグス症候群 (restless legs syndrome: RLS) は下肢を中心とする動かしたい衝動感に通常、下肢のむずむず感や灼熱感などの異常知覚を伴う神経感覚運動障害である [1]. 妊婦の RLS の有病率は同じ地域・人種の非妊婦と比較して 2-3 倍と高率であり [2], メタ・アナリシスでの有病率は 22 (95%信頼区間: 17-26)%と報告されている [3]. 妊産婦の RLS の多くは妊娠中に発症し, 出産とともに消失する [2]. RLS を合併する妊婦では妊娠高血圧症候群や周産期うつ病の合併が多いと報告されており [4], 妊娠経過や分娩アウトカムへの影響が問題となる. 妊娠中に RLS を発症した症例では, 出産直後に症状が消失するものの, 長期的には慢性の RLS に移行するリスクが高まる [5].

RLS とビタミン D 欠乏状態についてみると, 2020 年に公表されたメタ・アナリシスでは, RLS 群の血清 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] 濃度は非 RLS 群と比較して低値である [6]. また, ビタミン D 欠乏者は RLS 患者で多いとの報告が集積されつつある [7-16]. さらに, ビタミン D 欠乏者に対する補充療法により RLS 症状は軽減することも報告されている [17-20]. ビタミン D の活性型への変換酵素の発現が脳内で認められ, その受容体も確認されていること, さらにモノアミンの合成酵素発現や分化にも関わっていることより, 脳機能におけるビタミン D の重要性が認識されてきている [21-23]. 但し, 1 件のみ報告されている RLS 患者へのビタミン D 補充療法の randomized controlled trial では有効性が証明されておらず [24], さらなる臨床研究が必要とされている.

ビタミン D 欠乏状態の評価には血清 25(OH)D 濃度が用いられるが, その結果は測定方法と対象者に留意して判断される必要がある. 現在, リガンド結合法を用いた測定が広く行われているが, 液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) 法と比較するとリガンド結合法での結果はバイアスが大きいことがあり, 使用する測定キットによりバイアスに大きな違いがある [25,26]. また, 妊婦を対象とする場合, 循環血漿量は妊娠経過とともに増加し妊娠末期には非妊娠時と比較して 1150 ml (48%)増加することを反映して[37], 血清 25(OH)D 濃度は非妊婦と比較すると低値となる. 妊婦の血清 25(OH)D は測定限界を下回る症例もあり, 欠乏状態の評価には注意が必要である.

RLS に影響する血清 25(OH)D レベルは現在のところ明らかにされていない. ビタミン D 欠乏状態の cut-off 値は国や団体により違いがあるが, 25(OH)D < 20 ng/mL を欠乏状態, < 10-12 ng/mL を高度な欠乏としていることが多い [27]. 設定は骨代謝を指標として設定されたものであり, RLS の病態を考慮する際には見直しが必要と思われる. その際には前述の測定法にも十分に留意して RLS の病態に影響するレベルを検討することが必要である. ビタミン D 補充療法の有効性についてもこの問題とともに検討される必要がある.

妊婦における RLS 患者を対象とした研究はこれまで 2 件報告されており、いずれもビタミン D 欠乏状態は RLS と関連しており [9,11], ビタミン D 欠乏状態は RLS の独立した予測因子であった [11]. 但し, ビタミン D 欠乏状態の cut-off 値は血清 25(OH)D 濃度 < 10 ng/mL と < 20 ng/mL と統一した基準が用いられていなかった. また, いずれも 25(OH)D の測定方法が明記されていなかった. 本研究では, 妊産婦の RLS とビタミン D 欠乏状態との関連を評価するために, 血清 25(OH)D 濃度はリガンド結合法と LC-MS/MS の 2 つの方法で実施した. リガンド法では測定感度以下となっている検体においても, LC-MS/MS で血中濃度を明確にした. また, RLS と関連する 25(OH)D 濃度の cut-off 値の設定を試み, 非妊婦の cut-off 値の推定も行った.

II . 研究方法

1. 研究デザイン

妊娠末期の妊婦の RLS スクリーニングと血液生化学検査結果, 分娩前後の RLS 重症度評価し, RLS との関連性を見出す量的横断研究である.

2. 対象者

A 県内にある妊婦健康診査から分娩までのケアを実施している産科医療施設で, 研究協力に同意を得られた 1 施設で実施した. 施設の責任者へ文書と口頭にて研究の説明を行い, 同意を得た.

対象の組み入れ基準は, RLS の症状が妊娠末期に向けて出現及び増悪することから, 妊婦健康診査を受診する妊娠末期 (妊娠 36 週頃) の妊婦とした. また, 選定基準として単胎であり重篤な合併症がなく正常な妊娠経過であること, および, 日本語が理解でき質問票に回答可能な妊婦とした.

3. 研究方法

妊娠末期の採血が実施される妊娠 36 週頃の妊婦健康診査を受ける妊婦をリクルートした. 事前に, 妊婦健康診査時に研究協力施設の産科医より対象者へ研究についての趣旨および協力内容を説明していただいた. 口頭及び文書にて研究について説明を行い, 同意を取得した. 同意を取得した妊婦には自記式質問票を用いて, 年齢, 婚姻状況, 既往歴, 現病歴, 喫煙状況, RLS の家族歴, 分娩予定日を含む対象者の属性を確認し, RLS 症状, 不眠症状と主観的な睡眠の質を調査した. また, 通常の妊婦健診の採血に加えて研究調査のために 15 mL の全血を採取した. 分娩アウトカムは診療録及び分娩録より収集した.

1) 調査内容

(1) 質問票調査

① Cambridge-Hopkins 質問票 13 日本語版 (CH-RLSq13) Short Form version 2.1

RLS のスクリーニングは Cambridge-Hopkins questionnaire short form 13 日本語版 ver. 2.16 を用いた [28,29]. 本質問表で動きたい衝動感もしくは異常知覚を有する対象者全員に日本睡眠学会認定医 (H.K) が電話でインタビューを行い, International Classification of Sleep Disorders 第 3 版 (ICSD-3) の診断基準に基づいて診断した [30]. 但し, ICSD-3 では RLS の診断に睡眠障害や機能障害の併存が必須であるが, 本研究ではこの項目は含めずに診断した. インタビューでは RLS 症状を初めて自覚した時期も確認した. RLS の重症度は International Restless Legs Syndrome Study Group Rating Scale (IRLS) 日本語版 ver. 2.2 を用いて評価した [31]. 過去 1 週間における RLS 症状を評価し, 総合得点は 0-40 点となり, 軽症 (1-10), 中等症 (11-20), 重症 (21-30), 最重症 (30-40) と判定した. IRLS は産褥期にも回答を依頼し, 出産後の症状を確認した.

② ピッツバーグ睡眠質問票日本語版 (Pittsburgh sleep quality index, Japanese version : PSQI-J)

主観的な睡眠の質は Pittsburgh sleep quality index (PSQI) 日本語版を用いて評価した [32,33]. 本質問票は 7 つの下位尺度 (睡眠の質, 睡眠潜時, 睡眠時間, 睡眠効率, 睡眠の妨げ, 睡眠薬の服用, 日中の問題) で構成されている. 各下位尺度は 0, 1, 2, 3 点と 4 段階でスコアリングされ, 総得点は 0 から 21 点を取り, 得点が高いほど睡眠が障害されていると判断する. 病的水準を示すカットオフ得点は 6 点とされている. 各下位尺度 2 点以上の者の割合, 総得点 6 点以上の割合を算出した. 今回は就床時刻, 起床時刻, 入眠潜時については平日 (勤務日) と休日 (非勤務日) に分けて質問した. 時刻・時間情報より床上時間 (time in bed : TIB), 総睡眠時間 (total sleep time : TST), 及び睡眠効率を算出した.

③ 不眠重症度質問票日本語版 (Insomnia Severity Index, Japanese version : ISI-J)

不眠重症度は Insomnia Severity Index (ISI) を用いて評価した [34,35]. 7 項目の合計得点 (0 から 28 点) が高くなるほど不眠の重症度が高いと判断する. 病的水準を示すカットオフ得点は 10 点とされているが, < 8 を臨床的には有意な不眠なしと判定するため, ISI 総得点 ≥ 8 , 及び ≥ 10 の者の割合を算出した. また, 不眠症状の中で入眠困難, 睡眠維持困難, 早朝覚醒が中等度以上の者の割合も算出した.

(2) 血液生化学検査

本研究のために 15 mL の全血を 10 mL チューブと 5 mL チューブに採取した. 血清は遠心分離後に 2 本に分注して 1 本は -20 °C で冷凍保存し外部検査機関 SRL に輸送した. 外部検査機関ではアルブミン, Ca, P, Fe, フェリチン, 葉酸, intact parathyroid hormone (PTH), 25(OH)D, 1,25(OH)₂ ビタミン D を測定した. 血清 25(OH)D 濃度はリガンド結合法の一つである化学発光酵素免疫測定 (chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA) 法により測定した. 血清葉酸濃度は CLEIA 法により, また, 血清 intact PTH 濃度は電気化学発光免疫測定法 (electrochemiluminescence immunoassay) により測定した. Hemoglobin 値は医療機関での検査結果を

用いた。もう1本の保存血清はLC-MS/MS法での25(OH)D測定のために-80°Cに保存し北陸大学へ搬送した。

血清25(OH)D濃度を用いたビタミンD欠乏状態の評価には < 10 ng/mL と < 20 ng/mL の2つの cut-off 値が設定されており [27], それぞれの cut-off 値でのビタミンD欠乏者の割合を算出した。また, 血清葉酸濃度は欠乏状態の指標として < 3 ng/mL と < 6 ng/mL が使用されており [36-38], それぞれの cut-off 値での葉酸欠乏者の割合を算出した。

① CLEIA法を用いた血清25(OH)Dの分析

CLEIA法による25(OH)Dの測定はLumipulse® 25-OH Vitamin D (Fujirebio Inc. Tokyo, Japan)を用いて行った。本法の定量限界は3.491 ng/mLであり, < 4 ng/mLを下回ると< 4 ng/mLと報告される。CLEIA法での25(OH)Dの測定結果が< 4 ng/mLの場合は3.9 ng/mLとして統計処理を行った。LC-MS/MSによる基準測定法により値付けされた試料との相関係数は0.991で, 回帰式は $y = 1.03x - 1.31$ であった [39]。Vitamin D Standardization Program (VDSP)の一環として実施された単一施設における各アッセイ系の評価では, 本アッセイ系は% CVのmean ± SDは $1.91 \pm 1.0\%$ と最も良好な結果で, mean % biasは $-3.72 \pm 6.8\%$ との結果であった [25]。いずれの結果も血清総25(OH)D測定のroutine laboratoryとしての変動性とバイアスの要件である $CV \leq 10\%$ と $mean \% bias \leq |\pm 5\%|$ [40,41]を十分に満たす結果であった。

②LC-MS/MSを用いた血清25(OH)Dの分析

LC-MS/MS法を用いた25(OH)Dの測定は北陸大学・機器分析施設において行った。25(OH)D₂と25(OH)D₃をそれぞれ測定し, 両者の和を25(OH)Dとした。前処理としてメタノール硫酸亜鉛溶液で除タンパク後にOasis® PRiME HLB (Waters Corp, MA, US)を用いて固相抽出 (solid-phase extraction)を行った。LC-MS/MSシステムは高速液体クロマトグラフィーNexera X2を連結した質量分析計LCMS-8045 (SHIMADZU Corp, Kyoto, Japan)を用いた。25(OH)D₂と25(OH)D₃は, 逆相カラムクロマトグラフィーShim-pack Velox SP-C18 (SHIMADZU Corp)で分画し, エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization)後に多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring)を行い測定した。25(OH)D₂と25(OH)D₃の検量用試料 calibrator および重水素化内部標準用試料 deuterated internal standard はCertiMass™ Reference Standard (IsoSciences, PA, US)を用いた。25(OH)D₂と25(OH)D₃の血清中濃度測定における精度管理用試料 quality control はClinCal® Serum Calibrator Set (RECIPE, München, Germany)を用いた (Supplementary Note S1)。本測定系の% CVは3.2%で, mean % biasは2.8%で, mean % bias < |5%|の測定が83.3%を占めていた。Routine laboratoryとしては十分な assay performance であり, reference laboratoryとしての基準である $CV \leq 5\%$ を満たしており mean % bias $\leq |\pm 1.7\%|$ [40,41]に近い正確度であった。

2) 分析方法

統計処理はR ver. 4.1.2及びEZR ver. 1.55 [42]を用いて行った。正規性が認められる連続変

数は平均±SD で、正規性が認められなかったため中央値 (interquartile range: IQR) で示した。有意確率は 0.05 とした。連続変数の RLS 群と非 RLS 群との 2 群間の比較は、正規性が認められた場合は unpaired *t*-test を行い、正規性が認められない場合は Mann-Whitney *U* test を行った。正規性が認められない対応のある 2 群間の比較は Wilcoxon signed rank test を行った。正規性が認められない 3 群以上の比較は Kruskal-Wallis test を行い、post-hoc test は Bonferroni 法を用いた。名義変数の独立性の検定は Fisher の正確確率検定を行った。

LC-MS/MS 法と CLEIA 法による血清 25(OH)D 濃度の線形性の評価は Passing Bablock 回帰 [43]を用い、傾きと切片を求め、それぞれ 95%信頼区間 (confidence interval: CI) を算出した。固定誤差と比例誤差の評価は Bland-Altman plot で確認した。RLS 診断における血清 25-OHD と葉酸濃度の有用性を評価するためのカットオフ値を求めるために、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線と Classification and Regression Tree (CART [44]) アルゴリズムを用いて検討した。25(OH)D と葉酸低値であることが RLS の予測因子となるかについてはロジスティック回帰分析を用いて、年齢を調整して検討した。

4. 倫理的配慮

本研究は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会より承認を得て実施した (許可番号 20080605)。本研究はヘルシンキ宣言及び人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従い実施した。対象者への配慮として、研究の意義、目的、方法について文書および口頭にて十分な説明を行い、同意が得られた場合には同意書へのサインを得た。研究への参加は自由意思に基づくものであり、調査に同意した後でも不利益を受けることなく随時撤回が可能であること、個人情報保護に注意を払うことを説明し、データは対応表を用いて管理した。また、調査用紙は施錠できるキャビネットに保管し、研究終了後 5 年間の保存の後、以降復元できないよう安全に破棄することを説明した。採血は、妊婦健康診査時の血液検査に合わせて実施し、採取する血液量は本研究を行うために最低限必要となる量のみとした。

III. 結果

205 人から同意を取得した。1 人は採血が実施されず、また、1 人は LC-MS/MS 法のための検体採取ができていなかった。2 つの方法での 25(OH)D 測定ができた 203 人を解析対象とした。対象者の平均年齢(±SD)は 32.0 ± 4.6 歳で、初産婦が 53.7%を占めていた (Table 1)。解析対象者の 35 人 (17.2%) が RLS と診断された。RLS の発症は妊娠前が 19 人 (54.3%)、今回の妊娠中からが 14 人 (40.0%)、2 人は不明であった。LC-MS/MS 法による血清 25(OH)D 濃度 < 10 ng/mL の妊婦は 17.7%であったが、< 20 ng/mL では 79.8%と殆どの被験者が含まれていた。採血した月により血清 25(OH)D 濃度は有意差が認められ、1 月から 3 月にかけての結果は他の時期と比較すると有意に低値であった (Supplementary Table S1)。

未回答の 1 人を除いた過去 1 週間の IRLS の中央値 (IQR) は 13.0 (7.5, 19.8) 点で、0 点、

軽症, 中等症, 及び重症と判定された者はそれぞれ 1 人 (2.9%), 10 人 (29.4%), 16 人 (47.1%), 及び 7 人 (20.6%) であった. 出産直後の IRLS の中央値 (IQR) は 1 (0, 5) と有意に低下した ($P < 0.001$) 妊娠中と出産後に IRLS が取得できた 28 人の出産後の IRLS は, 13 人 (46.4%) で 0 と症状は完全に消失しており (妊娠前からの 9 人, 妊娠中発症の 4 人), 軽症, 中等症, 重症の者はそれぞれ 10 人 (35.7%), 4 人 (14.3%), 1 人 (3.6%) であった. 妊娠中に発症した 11 人中 10 人 (90.9%) は軽症か全く症状が消失していた. 妊娠前からの 16 人では 13 人 (81.2%) が軽症か全く症状が消失していた (Figure 1).

RLS 群と非 RLS 群との比較

RLS 群と非 RLS 群とを比較すると, 血清 25(OH)D 濃度は RLS 群で低値であり, CLEIA 法の測定結果は LC-MS/MS 法での結果と比較して低値であった ($P < 0.001$). 血清 1,25(OH)₂D 濃度は RLS 群で低値となる傾向が認められたが統計学的に有意差を認めなかった. RLS 群ではビタミン D 低値であることを反映して, 血清 intact PTH 濃度は RLS 群では高値であった. ビタミン D 欠乏者の割合は LC-MS/MS 法での測定結果では RLS 群で高率であったが, CLEIA 法ではほとんどの対象者が欠乏状態に含まれており両群間で有意差が認められなかった. 血清葉酸濃度も RLS 群では低値であり, 血清葉酸濃度 $6 < \text{ng/mL}$ 未満の欠乏者は RLS 群で高率であった. 血清フェリチン濃度は妊婦では著しく低値である者が殆どを占めており, 両群間で有意差を認めなかった (Table 1). 非 RLS 群と比較して RLS 群では主観的な睡眠の質は低下しており, ISI スコアも高値であり, 入眠困難を訴える者が多かった (Table 2). 分娩アウトカムでは両群間で有意な違いは認めなかった.

ビタミン D 欠乏と葉酸欠乏における被験者背景, 検査結果, 睡眠問題, 及び, 分娩アウトカム

LC-MS/MS 法による血清 25(OH)D 濃度 $< 10 \text{ ng/mL}$ と $\geq 10 \text{ ng/mL}$ の 2 群に分割して比較すると, $\geq 10 \text{ ng/mL}$ 群と比較して $< 10 \text{ ng/mL}$ 群では血清葉酸濃度が低値であった. 主観的な睡眠の質や分娩パラメータでは両群間で有意な違いを認めなかった. 同様に血清葉酸濃度 $< 6 \text{ ng/mL}$ と $\geq 6 \text{ ng/mL}$ の 2 群に分割して比較すると, $\geq 6 \text{ ng/mL}$ 群と比較して $< 6 \text{ ng/mL}$ 群では年齢はやや若年だが, 経産婦が多く, 血清 25(OH)D 濃度は低値であった. 主観的な睡眠の質では PSQI の入眠潜時が長くなる傾向が認められたが, 明らかな入眠困難者が多いわけではなかった. 分娩パラメータでは両群間で有意な違いを認めなかった.

LC-MS/MS 法と CLEIA 法による血清 25(OH)D 濃度

Passing Bablock 回帰では, x を LC-MS/MS 法での血清 25(OH)D 濃度, y を CLEIA 法での血清 25(OH)D 濃度とすると, 全症例を用いた場合の 1 次回帰式は $y = -2.37$ (95% CI: -3.01, -1.62) + 0.80 (95% CI: 0.76, 0.85) x であった. CLEIA 法で 25(OH)D $< 4 \text{ ng/mL}$ の 17 サンプルを除外した場合の 1 次回帰式は $y = -2.36$ (95% CI: -2.97, -1.58) + 0.80 (95% CI: 0.76, 0.84) x で

あった (Figure 2). LC-MS/MS 法での結果と比較して, CLEIA 法では 25(OH)D は低値であった. CLEIA 法で 25(OH)D < 4 ng/mL のサンプルを除外した場合の Bland-Altman plot では, LC-MS/MS 法での結果と比較すると, すべてのサンプルで CLEIA 法の結果は低値であり固定誤差の mean (95% CI)は-5.6 (-5.9, -5.2, $P < 0.001$)であった. また, 平均で-43.3%の有意な比例誤差が認められた ($P < 0.001$, Figure 3). この傾向は全サンプルでの評価でも同様の結果であった.

RLS 評価における血清 25(OH)D と葉酸濃度の cut-off 値推定の試み

今回, 妊婦における採血結果において, 血清 25(OH)D と葉酸濃度が低値であることが関係していた. そこで, RLS における問題となる血清 25(OH)D と葉酸濃度の cut-off 値を ROC 曲線, 及び, CART 解析により検討した. ROC 曲線より, LC-MS/MS 法での血清 25(OH)D 濃度のカットオフ値を 12.7 ng/mL とすると, 感度は 0.685, 特異度は 0.629 で, AUC (95% CI) は 0.689 (0.592, 0.786)であった. この値は, 先の Passing Bablock 回帰の結果より CLEIA 法での血清 25(OH)D 濃度では 7.8 ng/mL に相当した. 同様に血清葉酸濃度のカットオフ値を 7.2 ng/mL とすると, 感度は 0.685, 特異度は 0.771 で, AUC (95% CI)は 0.660 (0.565, 0.755)であった (Figure 4).

CART 解析には LC-MS/MS 法での血清 25(OH)D と葉酸濃度とともに, 単変量解析でも有意であり, 臨床上も問題となる不眠症状の一つである入眠困難 (ISI の問 1 a) と中途覚醒 (ISI の問 1b) の点数と年齢でモデルを構築した. 年齢や不眠症状はモデルに作用されず, 血清 25(OH)D と葉酸濃度の importance はそれぞれ 73%と 22%であった. ROC 曲線で求めた血清 25(OH)D 濃度は 8.1 ng/mL と 10.0 ng/mL, 血清葉酸濃度は 6.6 ng/mL を cut-off 値として node が作成された. ROC 曲線で求めた値に近い cut-off 値であった (Figure 5).

ROC 曲線と CART 解析で求めた cut-off 値で 2 群に分割し, 血清 25(OH)D と葉酸濃度が高値であることを reference として, それぞれ低値であることの RLS との関連性を, 年齢で調整したロジスティック回帰分析でも評価した. 血清 25(OH)D 濃度 < 12.7 ng/mL と 血清葉酸濃度 < 7.2 ng/mL であることの OR (95%) CI は, それぞれ 3.37 (1.52, 7.45), 3.95 (1.64, 9.49)であった. 血清 25(OH)D 濃度 < 10 ng/mL と 血清葉酸濃度 < 6.6 ng/mL であることの OR (95%) CI は, それぞれ 3.67 (1.54, 8.73), 4.00 (1.72, 9.32)であった.

IV. 考察

日本人妊婦を対象とした本研究での RLS 有病率は従来と同程度の 17.2%であったものの, 半数以上が妊娠前に RLS 症状が出現していた時期が問診上確認された. これまで妊娠前からの RLS の割合は妊産婦 RLS の 9.9-33%と報告されており [2], 今回の対象者は明らかに高率であった. 今回は妊娠直前だけでなく, 過去に初めて症状を自覚した時期を問診しており, その際に診断基準に合致する状態であれば, そのときを発症として評価した. RLS 症状の変動性を考慮すると [1], 妊娠直前だけでなく, 十分に過去にさかのぼって症状を確

認すると妊婦の RLS の中に、妊娠前からの RLS は多いのかもしれない。

血清 25(OH)D 濃度は RLS を有する妊婦では有意に低値であり、これまでの 2 件の妊婦 RLS についての研究 [9,11]と同様であった。これまで検索した限りにおいて LC-MS/MS を用いた血清 25(OH)D 濃度と RLS との関連性を検討した報告はない。また、ビタミン D 欠乏状態の cut-off 値には 10 ng/mL か 20 ng/mL かが用いられており、RLS におけるビタミン D 欠乏状態の cut-off 値は検討されていなかった。ROC 曲線や CART 解析により求めた cut-off 値は、従来から提唱されているビタミン D 欠乏状態判定基準に概ね一致しており、RLS においても従来の基準を採用することは概ね適切だと考えられた。但し、血清 25(OH)D 濃度の測定結果は、測定法、アッセイ系、及び妊婦かどうかを加味して考慮する必要がある。

LC-MS/MS 法での結果と比較すると、今回使用した CLEIA 法での測定結果は低値となる固定誤差が認められ、濃度が高値となるほど誤差が大きくなる比例誤差も認められた。CLEIA 法での結果が LC-MS/MS 法での結果よりも低値となることには干渉物質の影響を考慮する必要がある。血清サンプル中の干渉物質である遊離ビリルビン、中性脂肪で 3-8%低値となることが報告されている [39]。また、今回のアッセイ系は、リガンド結合法の中では安定した正確なアッセイであるものの、20 ng/mL 未満の検体では低値となる傾向が認められている [25,26]。25(OH)D 低値例が多くを占める妊婦を対象とする場合、今回の CLEIA 法による測定結果は真の値よりも見かけ上低値となり、欠乏状態を過大評価する可能性がある。

妊婦の血清 25(OH)D 濃度は循環血漿量増加に伴い希釈され、非妊婦と比較すると低値となることに注意を要する。循環血漿量は妊娠経過とともに増加し、妊娠末期には非妊娠時と比較して 1150 (95% CI: 1068, 1232) ml 増加し、増加率 (95%CI)は 48% (44.6%, 51.4%)と報告されている [45]。このことは CLEIA 法では測定限界以下の症例が増えていることに影響を及ぼしていた。ROC 曲線と CART 解析から求められる LC-MS/MS 法での RLS と関連する血清 25(OH)D 濃度の cut-off 値は 10-12.7 ng/mL であり、非妊婦の血中濃度 (95%CI) は 14.8-18.8 ng/mL に相当する。先の回帰式に当てはめると、今回用いた CLEIA 法を用いたアッセイ系を用いる際の cut-off 値は妊娠末期で 5.6-7.8 ng/mL、非妊娠期で 9.5-12.7 ng/mL あった。

本研究では血清葉酸濃度がビタミン D と同等に RLS と関連していた。これまで 1970 年代に葉酸欠乏が妊婦を含む RLS 患者において認められ、その補充療法が症状改善に有効であることが報告されていた [46-48]。しかし、近年実施されている血清 25(OH)D と葉酸濃度を同時に測定した研究において、血清葉酸濃度は RLS 患者でコントロール群と比較して有意差を認めないと報告されている [13,49-52]。また、妊婦を対象とした研究でも血清葉酸濃度は有意差を認めないと報告されている [53,54]。但し、妊娠前より出産後にかけて血清葉酸濃度が測定された研究では、フェリチンよりも血清葉酸濃度が妊娠前から出産後にかけて RLS 患者で低値であることが報告されている [55]。一般的に、血清葉酸濃度は摂取状況を反映して変動するため、葉酸欠乏状態の評価には赤血球中濃度が適切である [37]。RLS

における葉酸欠乏状態の評価法，また，その cut-off 値の設定については再検討が必要である。

研究の限界

以下の数点を考慮する必要がある。まず，RLS の病態とビタミン D 欠乏との関連性は，ビタミン D 補充療法により症状軽減が期待できる治療前血中濃度を明らかにして参考とする必要がある。次に，RLS 群が 35 人と少なかったため，関連する諸因子を十分に考慮した多変量解析が実施できなかった。より多数例を対象として，血中ビタミン D 濃度に影響を及ぼす食事や紫外線暴露の影響も含めた検討が必要である [56]。3 番目の問題として，妊婦では葉酸補充をサプリメント等で積極的に行っていることもあり，葉酸を含めたサプリメントの評価が不十分であった。

今後の研究への示唆

妊娠中の RLS 患者では，RLS 症状は出産後に完全に消失するか軽症レベルに軽減するが，今回，出産後に中等症以上の症状が残存していた 5 例中 4 例は血清 25(OH)D 濃度は $10 < \text{ng/mL}$ であった。また，この 5 例全例で血清葉酸濃度は $< 6 \text{ ng/mL}$ であり，今回の妊娠中に RLS を発症し血清 25(OH)D 濃度 16 ng/mL であった 1 例の血清葉酸濃度は 3.4 ng/mL で，この 5 例中でもっとも低値であった。今回症例が少ないため十分な評価は困難であるが，ビタミン D 欠乏と葉酸欠乏は出産後の RLS 症状の持続要因かもしれない。また，妊娠前から両者が十分に補充されていることは，その後の症状安定化に寄与するかもしれない。症状変動性とビタミン D や葉酸欠乏の関与について，また補充療法の有効性についての検討が必要である。

これまで妊娠中の RLS 患者を対象としたビタミン D 補充療法の報告は検索した限りではない。ビタミン D 補充療法が妊婦の RLS 治療手段として有効かどうかについては，今後の検討が必要である。ドパミン作動薬は日本では妊娠時には禁忌であり，妊娠の可能性のある女性や挙児希望者にはドパミン作動薬を他の薬剤へ変更することが必要となる。ドパミン作動薬の漸減・中止のためには，通常行われている鉄欠乏時の鉄補充療法に加えて，ビタミン D や葉酸の積極的補充が有効かもしれない。このことは非妊婦の治療時においても重要であり，ドパミン作動薬の augmentation 予防や対策の一つにもなる可能性がある。鉄，ビタミン D，及び葉酸が適切に補充されることで，ドパミン作動薬は最小用量で治療でき，十分に補充されることでドパミン作動薬の減薬・中止が可能となるかもしれない。

V. まとめ

妊婦においてビタミン D と葉酸欠乏は RLS と関連していた。循環血漿量が増加している妊娠末期の対象者において，RLS と関連する LC-MS/MS 法を用いた血清 25(OH)D 濃度の cut-off 値は $10\text{--}12.7 \text{ ng/mL}$ であり，非妊娠時の推定 cut-off 値は $14.8\text{--}18.8 \text{ ng/mL}$ であった。

ビタミン D 欠乏状態を考慮する際には、測定方法、アッセイ系も考慮した上で、RLS との関連性が検討されることが望まれる。また、葉酸欠乏状態についても、その測定系にも十分に注意した上で RLS の病態における意義を検討する必要がある。

文献

1. Allen RP, Picchietti DL, Garcia-Borreguero D, et al. Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria: updated International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG) consensus criteria--history, rationale, description, and significance. *Sleep medicine*. 2014; 15 (8): 860-873. doi:10.1016/j.sleep.2014.03.025
2. Picchietti DL, Hensley JG, Bainbridge JL, et al. Consensus clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease during pregnancy and lactation. *Sleep Med Rev*. 2015; 22: 64-77. doi:10.1016/j.smrv.2014.10.009
3. Chen SJ, Shi L, Bao YP, et al. Prevalence of restless legs syndrome during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev*. 2018; 40: 43-54. doi:10.1016/j.smrv.2017.10.003
4. Steinweg K, Nippita T, Cistulli PA, Bin YS. Maternal and neonatal outcomes associated with restless legs syndrome in pregnancy: A systematic review. *Sleep Med Rev*. 2020; 54: 101359. doi:10.1016/j.smrv.2020.101359
5. Cesnik E, Casetta I, Turri M, et al. Transient RLS during pregnancy is a risk factor for the chronic idiopathic form. *Neurology*. 2010; 75 (23): 2117-2120. doi:10.1212/WNL.0b013e318200d779
6. Mansourian M, Rafie N, Khorvash F, Hadi A, Arab A. Are serum vitamin D, calcium and phosphorous associated with restless leg syndrome? A systematic review and meta-analysis. *Sleep medicine*. 2020; 75: 326-334. doi:10.1016/j.sleep.2020.08.022
7. Sun S, Liu C, Jia Y, et al. Association Between Migraine Complicated With Restless Legs Syndrome and Vitamin D. *Front Neurol*. 2021; 12: 777721. doi:10.3389/fneur.2021.777721
8. Liu HM, Chu M, Liu CF, Zhang T, Gu P. Analysis of Serum Vitamin D Level and Related Factors in Patients With Restless Legs Syndrome. *Front Neurol*. 2021; 12: 782565. doi:10.3389/fneur.2021.782565
9. Sağlam G, Pektaş G, Karakullukçu S, Pektaş BA, Aykut DS. The relationship between vitamin d deficiency and restless legs syndrome in pregnancy. *Journal of Turkish Sleep Medicine*. 2020; 7 (2): 44-48. doi:10.4274/JTSM.GALENOS.2020.14633
10. Almeneessier AS, Alzahrani M, Alsafi A, Alotaibi R, Olaish AH, BaHammam AS. Prevalence and predictors of restless legs syndrome in non-pregnant Saudi women of childbearing age. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2020; 24 (3): 1107-1113. doi:10.1007/s11325-020-02054-9
11. Almeneessie AS, Alyousefi N, Alzahrani M, et al. Prevalence of restless legs syndrome among pregnant women: A case-control study. *Ann Thorac Med*. 2020; 15 (1): 9-14.

doi:10.4103/atm.ATM_206_19

12. Bener A, Al-Hamaq A, Ağan AF, Öztürk M, Ömer A. The prevalence of restless legs syndrome and comorbid condition among patient with type 2 diabetic mellitus visiting primary healthcare. *J Family Med Prim Care*. 2019; 8 (12): 3814-3820. doi:10.4103/jfmpe.jfmpe_463_19
13. Wali S, Alsafadi S, Abaalkhail B, et al. The Association Between Vitamin D Level and Restless Legs Syndrome: A Population-Based Case-Control Study. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2018; 14 (4): 557-564. doi:10.5664/jcsm.7044
14. Evans AM, Berde T, Karimi L, Ranade P, Shah N, Khubchandani R. Correlates and predictors of paediatric leg pain: a case-control study. *Rheumatology International*. 2018; 38 (7): 1251-1258. doi:10.1007/s00296-018-4056-7
15. Çakır T, Doğan G, Subaşı V, et al. An evaluation of sleep quality and the prevalence of restless leg syndrome in vitamin D deficiency. *Acta Neurol Belg*. 2015; 115 (4): 623-627. doi:10.1007/s13760-015-0474-4
16. Oran M, Unsal C, Albayrak Y, et al. Possible association between vitamin D deficiency and restless legs syndrome. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2014; 10: 953-958. doi:10.2147/ndt.s63599
17. Tutuncu M, Tutuncu M. The effect of vitamin D on restless legs syndrome: prospective self-controlled case study. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2020; 24 (3): 1101-1106. doi:10.1007/s11325-019-01984-3
18. Buratti L, Luconi MP, Viticchi G, Provinciali L, Silvestrini M. Vitamin D supplementation: a useful strategy for restless legs syndrome exacerbation in a patient with Turner syndrome. *Neurol Sci*. 2017; 38 (6): 1135-1136. doi:10.1007/s10072-017-2870-4
19. Wali S, Shukr A, Boudal A, Alsaiani A, Krayem A. The effect of vitamin D supplements on the severity of restless legs syndrome. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2015; 19 (2): 579-583. doi:10.1007/s11325-014-1049-y
20. Prakash S, Bhanvadia RJ, Shah ND. Restless legs syndrome with carbamazepine-induced osteomalacia: causal or casual association. *General hospital psychiatry*. 2010; 32 (2): 228.e221-223. doi:10.1016/j.genhosppsy.2009.03.003
21. Pertile RA, Cui X, Eyles DW. Vitamin D signaling and the differentiation of developing dopamine systems. *Neuroscience*. 2016; 333: 193-203. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.020
22. Cui X, Pertile R, Liu P, Eyles DW. Vitamin D regulates tyrosine hydroxylase expression: N-cadherin a possible mediator. *Neuroscience*. 2015; 304: 90-100. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.048
23. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of chemical neuroanatomy*. 2005; 29 (1): 21-30. doi:10.1016/j.jchemneu.2004.08.006
24. Wali SO, Abaalkhail B, Alhejaili F, Pandi-Perumal SR. Efficacy of vitamin D replacement therapy in

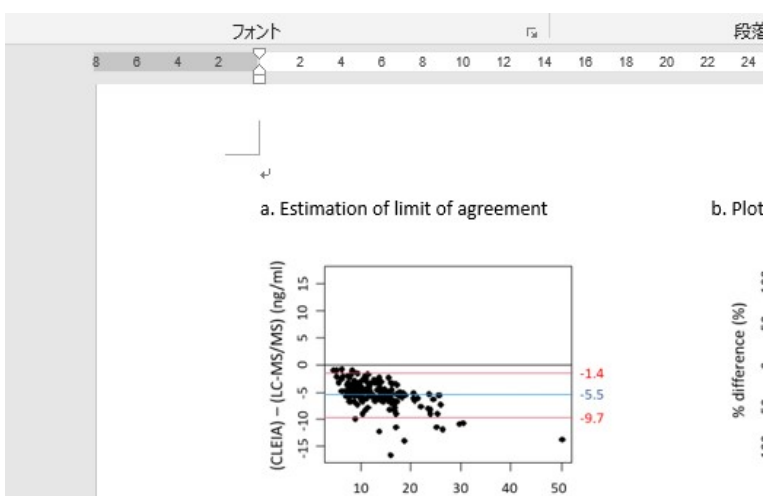
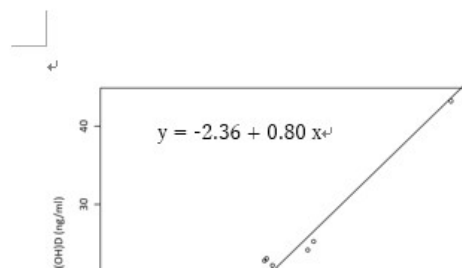
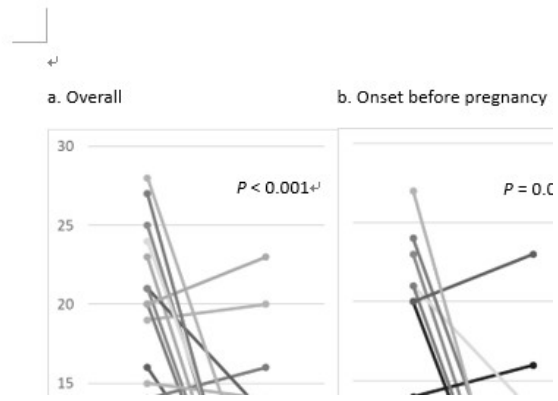
- restless legs syndrome: a randomized control trial. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2019; 23 (2): 595-601. doi:10.1007/s11325-018-1751-2
25. Wise SA, Camara JE, Sempos CT, et al. Vitamin D Standardization Program (VDSP) intralaboratory study for the assessment of 25-hydroxyvitamin D assay variability and bias. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2021; 212: 105917. doi:10.1016/j.jsbmb.2021.105917
 26. Wise SA, Camara JE, Burdette CQ, et al. Interlaboratory comparison of 25-hydroxyvitamin D assays: Vitamin D Standardization Program (VDSP) Intercomparison Study 2 - Part 2 ligand binding assays - impact of 25-hydroxyvitamin D(2) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) on assay performance. *Anal Bioanal Chem*. 2022; 414 (1): 351-366. doi:10.1007/s00216-021-03577-0
 27. Sempos CT, Binkley N. 25-Hydroxyvitamin D assay standardisation and vitamin D guidelines paralysis. *Public Health Nutrition*. 2020; 23 (7): 1153-1164. doi:10.1017/S1368980019005251
 28. Kondo H, Okada M, Eto H, et al. Development of the Japanese version of Cambridge-Hopkins questionnaire short form (CH-RLSq13) version 2.1 for ascertainment of restless legs syndrome. *Jpn J Sleep Medicine*. 2016; 10 (4): 577-584.
 29. Allen RP, Burchell BJ, MacDonald B, Hening WA, Earley CJ. Validation of the self-completed Cambridge-Hopkins questionnaire (CH-RLSq) for ascertainment of restless legs syndrome (RLS) in a population survey. *Sleep medicine*. 2009; 10 (10): 1097-1100. doi:10.1016/j.sleep.2008.10.007
 30. Restless Legs Synndrome. In: *International classification of sleep disorders*, 3rd ed. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine; 2014: 282-291.
 31. Kobayashi M, Kato K, Kagimura T, Inoue Y. Evaluation of reliability and validity of Japanese IRLS ver2.2 in severity evaluation of restless legs syndrome (RLS). *Jpn J Sleep Medicine*. 2013; 7: 100-105.
 32. Doi Y, Minowa M, Uchiyama M, et al. Psychometric assessment of subjective sleep quality using the Japanese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-J) in psychiatric disordered and control subjects. *Psychiatry Res*. 2000; 97 (2-3): 165-172.
 33. Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res*. 1989; 28 (2): 193-213. doi:0165-1781(89)90047-4 [pii]
 34. Munezawa T, Morin CM, Inoue Y, Nedate K. Development of the Japanese Version of the Insomnia Severity Index (ISI-J). *Jpn J Psychiatr Treat*. 2009; 24 (2): 219-225.
 35. Bastien CH, Vallieres A, Morin CM. Validation of the Insomnia Severity Index as an outcome measure for insomnia research. *Sleep medicine*. 2001; 2 (4): 297-307.
 36. Ihara H, Kiuchi S, Watanabe T, Hashizume N. Recent progress in standardization of serum folate and vitamin B12 measurements. *VITAMINS*. 2016; 90 (12): 581-589. doi:10.20632/vso.90.12_581
 37. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. In: *Guideline: Optimal Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations in Women of Reproductive Age for Prevention of Neural*

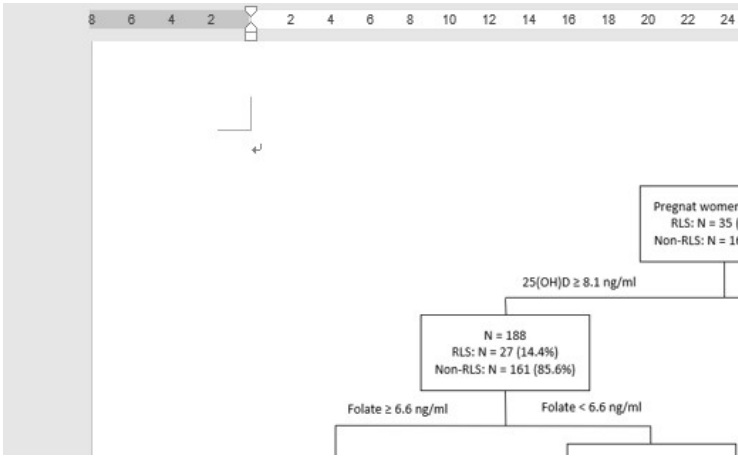
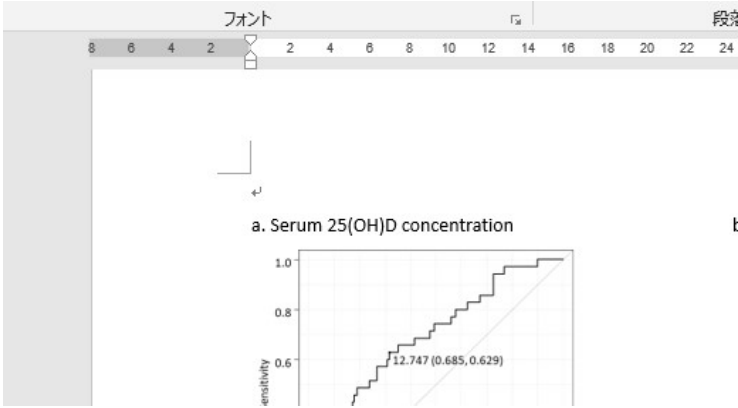
Tube Defects. Geneva: World Health Organization

Copyright © World Health Organization 2015.; 2015.

38. Lewis CA, Pancharuniti N, Sauberlich HE. Plasma folate adequacy as determined by homocysteine level. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992; 669: 360-362. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb17123.x
39. Kojima T. Development of non-competitive 25-OH Vitamin D assay "Lumipulse 25-OH Vitamin D". *Japanese Journal of Clinical Chemistry*. 2019; 48 (3): 239-244.
40. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta*. 2009; 408 (1-2): 8-13. doi:10.1016/j.cca.2009.06.027
41. Binkley N, Sempos CT, for the Vitamin DSP. Standardizing Vitamin D Assays: The Way Forward. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014; 29 (8): 1709-1714. doi:10.1002/jbmr.2252
42. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013; 48 (3): 452-458. doi:10.1038/bmt.2012.244
43. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983; 21 (11): 709-720. doi:10.1515/cclm.1983.21.11.709
44. Molnar C. Decision Tree. In: *Interpretable Machine Learning, A Guide for Making Black Box Models Explainable, Second Edition*. 2022: <https://christophm.github.io/interpretable-ml-book/>.
45. Aguree S, Gernand AD. Plasma volume expansion across healthy pregnancy: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2019; 19 (1): 508. doi:10.1186/s12884-019-2619-6
46. Botez MI, Lambert B. Folate deficiency and restless-legs syndrome in pregnancy. *N Engl J Med*. 1977; 297 (12): 670. doi:10.1056/nejm197709222971220
47. Botez MI, Fontaine F, Botez T, Bachevalier J. Folate-responsive neurological and mental disorders: report of 16 cases. Neuropsychological correlates of computerized transaxial tomography and radionuclide cisternography in folic acid deficiencies. *Eur Neurol*. 1977; 16 (1-6): 230-246. doi:10.1159/000114904
48. Botez MI, Cadotte M, Beaulieu R, Pichette LP, Pison C. Neurologic disorders responsive to folic acid therapy. *Can Med Assoc J*. 1976; 115 (3): 217-223.
49. Cikrikcioglu MA, Sekin Y, Halac G, et al. Reduced bone resorption and increased bone mineral density in women with restless legs syndrome. *Neurology*. 2016; 86 (13): 1235. doi:10.1212/WNL.0000000000002521
50. Demirci S, Demirci K, Doğru A, İnal EE, Koyuncuoğlu HR, Şahin M. Restless legs syndrome is associated with poor sleep quality and quality of life in patients with ankylosing spondylitis: a

- questionnaire-based study. *Acta Neurologica Belgica*. 2016; 116 (3): 329-336. doi:10.1007/s13760-015-0564-3
51. Minár M, Petřleničová D, Valkovič P. Higher prevalence of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease in multiple sclerosis patients is related to spinal cord lesions. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2017; 12: 54-58. doi:10.1016/j.msard.2016.12.013
 52. Işııkay S, Işııkay N, Per H, Çarman KB, Kocamaz H. Restless leg syndrome in children with celiac disease. *Turk J Pediatr*. 2018; 60 (1): 70-75. doi:10.24953/turkjped.2018.01.010
 53. Tunc T, Karadağ YS, Dogulu F, Inan LE. Predisposing factors of restless legs syndrome in pregnancy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2007; 22 (5): 627-631. doi:10.1002/mds.21291
 54. Sakamoto H, Kato C, Eto H, Kondo H. Prevalence, clinical features, and delivery outcomes of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease among high risk Japanese pregnancies. *Jpn J Nursing and Health Science*. 2016; 2016 (14): 66-72. doi:10.20705/jjnhs.14.3_66
 55. Lee KA, Zaffke ME, Baratte-Beebe K. Restless legs syndrome and sleep disturbance during pregnancy: the role of folate and iron. *J Womens Health Gend Based Med*. 2001; 10 (4): 335-341. doi:10.1089/152460901750269652
 56. Kiely ME, Wagner CL, Roth DE. Vitamin D in pregnancy: Where we are and where we should go. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2020; 201: 105669. doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105669





Font

Table 1. Comparisons of clinical characteristics between F

..	Overall..
N..	203..
Age years, mean ± SD..	32.0 ± 4.9..
BMI* kg/m ² , median (IQR)..	20.9 (19.2, 23.1)..
BMI ≥ 25 kg/m ² , N (%)..	28 (14.1) ..
Primipara, N (%)..	109 (53.7) ..
Smoking, N (%)..	2 (1.0) ..
Gestational diabetes, N (%)..	5 (2.5) ..
50g oral glucose challenge test..	..
1-hr glucose mg/dl, median (IQR)..	121.0 (104.8, 135.0)..
Iron supplementation, N (%)..	73 (36.0) ..
Hemoglobin g/dl, median (IQR)..	11.1 (10.6, 11.7)..
Ferritin ng/ml, median (IQR)..	6.1 (4.8, 8.0)..
Albumin g/dl, median (IQR)..	3.2 (3.0, 3.3)..
eGFR ml/min/1.73m ² , median (IQR)..	118.0 (105.4, 132.5)..
Ca mg/dl, median (IQR)..	8.7 (8.5, 8.9)..
P mg/dl, median (IQR)..	3.5 (3.2, 3.8)..
Fe mg/dl, median (IQR)..	52.0 (38.0, 74.0)..
25(OH)D, LC-MS/MS..	..

Font

Table 2. Comparisons of sleep characteristics between

..	All..
PSQI, median (IQR)..	6.0 (4.0, 8.1)
PSQI > 5, N (%)..	111 (56.3)
C1 : sleep quality ≥ 2, n (%)..	90 (44.6)
C2 : sleep latency ≥ 2 ^a , n (%)..	107 (53.8)
C3 : sleep duration ≥ 2 ^b , n (%)..	66 (32.5)
C4 : sleep efficiency ≥ 2 ^c , n (%)..	26 (12.8)
C5 : sleep disturbance ≥ 2, n (%)..	58 (28.9)
C6 : hypnotic use ≥ 2 ^d , n (%)..	0 (100.0)