

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16825

研究課題名(和文) 早産リスク評価における、呼気水素ガス測定の有用性の検討

研究課題名(英文) Examination of usefulness of breath hydrogen gas measurement in preterm birth risk assessment.

研究代表者

三浦 広志(Miura, Hiroshi)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80375302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：非妊娠女性5名に飽和水素水を経口投与し、呼気水素濃度と血中水素濃度の両者が相関することが明らかとなった。次に携帯型呼気水素ガス測定器の精度を検証した。食後の妊婦の呼気水素ガスを、携帯型測定器とガスクロマトグラフィー(GC)の両者で経時的に評価した。両者に相関がみられることは確認できたが、比較的高濃度の呼気水素となるとバラつきが見られた。妊婦に乳糖負荷を行い、呼気水素ガス測定を行った。対照群3名は空腹時に比べ乳糖負荷3時間後に呼気水素濃度が上昇していたが、早産となった妊婦の3名中1名は乳糖負荷前後で呼気水素ガス濃度が上昇しない例が含まれており、水素産生能の違いが示唆される結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切迫早産妊婦に乳糖負荷を行い呼気水素ガス測定を行うことで、腸管内の水素産生能の違いから、早産に至る群の呼気水素濃度が低くなる可能性が示唆された。呼気中水素測定は、迅速、非侵襲的、簡便であるため臨床導入が速やかであり、迅速な普及が可能である。本研究によって、妊婦に負担が少ない早産予知のスクリーニングが可能となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of saturated hydrogen water to five non-pregnant women revealed that both breath hydrogen concentration and blood hydrogen concentration were correlated. Next, the accuracy of the portable breath hydrogen gas measuring device was verified. The expired hydrogen gas of pregnant women after eating was evaluated over time by both a portable measuring instrument and gas chromatography (GC). Although it was confirmed that there was a correlation between the two, variations were seen at a relatively high concentration of exhaled hydrogen. A pregnant woman was loaded with lactose, and exhaled hydrogen gas was measured. The exhaled hydrogen concentration increased 3 hours after the lactose load in the control group compared to when fasted, but 1 out of 3 pregnant women who had a preterm birth included a case which the exhaled hydrogen gas concentration did not increase before and after the lactose load. The result suggests a difference in hydrogen production capacity.

研究分野：周産期医学

キーワード：早産予知 呼気水素ガス測定 腸管内細菌

1. 研究開始当初の背景

早産の原因の半数は子宮内感染が原因であり、その経路としては腔から子宮内への上行性感染が主であると考えられている。そのため、これまでの早産予防の研究においては腔内細菌種の同定や細菌性腔症の存在と早産の相関を調べる内容が多くみられる(Nugent ら)。細菌性腔症の加療による早産予防の検証において、早産予防に有用とする報告がある一方、効果がないとする報告もあり見解は定まっていない(Cochrane database, 2013)。

近年、腔内細菌よりも腸管内細菌が早産と関連する可能性が報告された。具体的には、細菌の16S-rRNA 領域を増幅するPCR (T-RFLP法) を用いて、腔分泌物と糞便の細菌叢を切迫早産群と正常妊婦群とで比較すると、糞便中の細菌が2群間には全く異なる分布を示し、特に *Bacteroides* と *Clostridium* の分布に違いが見られた (shiozaki, 2013)。この2属は水素産性能を有する菌属である。

ヒト細胞では水素生成はなされず、大腸内において腸内細菌が難消化性の炭水化物(食物繊維やオリゴ糖など)を発酵し、水素を含むガスが産生される。水素は細胞中のフリーラジカルと結合し、細胞障害を予防する(Ohsawa ら, Nat Med. 2007)。切迫早産や前期破水において酸化ストレスが発症に関与している可能性を指摘する報告がいくつかあり(Woods ら, 2011)、早産モデルマウスに水素水投与を行うと有意に胎仔生存率を向上させ、胎仔脳組織において酸化ストレスが軽減した(小谷ら, 周産期学シンポジウム, 2015)。妊娠ラットへの飽和水素水経口投与により胎盤への水素移行が見られたこと(Mano ら, 2014)から、水素ガスが胎児に直接影響したと考えられる。これは動物実験のみにとどまっており、妊娠女性の水素ガスを評価した研究はまだ無い。

以上の研究報告をふまえると、早産群と非早産群において水素産生菌の分布が異なることに起因して、体内の強力な抗酸化・抗炎症作用を持つ水素量が異なり、ひいては細菌感染などに起因する、子宮内炎症にて発生するフリーラジカルを抑制しきれずに早産するのではないかという仮説の着想に至った。

呼気中水素分析は1961年に測定法が開発されて以来、分析装置も進歩しており、簡便に測定可能であり速やかに結果が得られる。現在では、持ち運び可能な程度に小型化している。呼気中水素測定は、迅速、非侵襲的、簡便であるため臨床導入が速やかであり、妊婦に負担が少ない早産予知のスクリーニングが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、早産群、早産徴候のみ群と対照群に分けた妊娠女性の、腸管内水素細菌数とその水素産生能を調べ、さらに呼気中水素濃度から3群間の体内水素濃度の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)切迫早産妊婦と対照群の便を培養し、水素感知膜にて各水素産生菌コロニーの数と水素産生量を観察する。(2)呼気水素濃度と血中水素濃度が相関することを明らかにする。(3)定期的

に呼気水素濃度測定を施行し、3群間の呼気水素濃度の違いや変化から早産予知可能か明らかにする。

(1) 妊娠22週以降36週未満の、早産徴候があり投薬など加療を要する妊婦（切迫早産群）と、妊娠週数をマッチさせた早産リスクの無い妊婦（対照群）を対象とする。寒天培地を用いて2群の便培養を施行し、培地上に水素感知膜を置く。感知膜は水素に暴露されると、金属光沢から透明に変化する。赤色に染色したろ紙を膜と培地の間に置くことで、水素産生菌コロニーが可視化され水素産生菌コロニーの数をカウントできる。

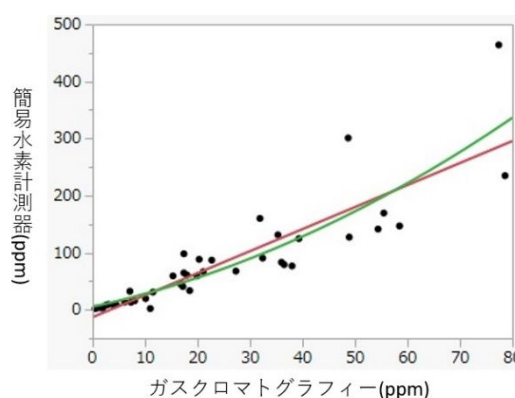
(2) 健常妊婦を対象に、呼気中水素ガスと、血中水素ガス(高速液体クロマトグラフィー使用)を同時期に測定し、関連することを確認する。

(3) 切迫早産群は、実際に早産となる症例(早産群)と、早産徴候のみで早産とならない群（早産徴候のみ群）に帰結する。早産群/早産徴候のみ群/対照群の、腸管内水素産生菌コロニー数および水素産生能の違いを比較して、どのパラメータが早産と関連するかを明らかにする。

4. 研究成果

研究実施計画に沿った内容で、患者の同意を得る方法および同意文書を病院内倫理委員会に諮り承認を得た。妊婦の呼気中と静脈血中水素ガス濃度を、ガスクロマトグラフィー(GC)にて評価した。腸管内に便が少なく発酵が進まない時間帯に、のべ20例の妊婦から呼気を採取し測定したところ、平均11.8ppm(range 1-15)の水素ガスが含まれることが分かった。同時に採血した末梢血中水素ガスは、採取環境(病院内の室内)とほぼ同じで低濃度であるため、検出が困難であった。血中濃度を高めた状態で、呼気と血中の水素ガス濃度を測定し相関を見ることとしたが、妊娠女性に水素負荷することは安全性の問題があるため、同意の得られた非妊娠女性5名に飽和水素水を経口投与して測定した。水素負荷後の呼気水素濃度と血中水素濃度の両者が相関することが分かった。

次に、呼気水素ガスを簡便に評価する方法としての携帯型呼気水素ガス測定器の精度を検証した。食後の妊婦の呼気水素ガスを、携帯型測定器とGCの両方で経時的に評価した。両者に相関がみられることは確認できたが、簡易水素計測器上で比較的高濃度(100ppm以上)の呼気水素となるとバラつきが見られた(右図)。相関係数(R^2)は0.757であったため、正確な濃度評価には適さないものの、おおよその水素濃度を推定できる精度であることがわかった。



上記と並行して、切迫早産妊婦の便培養を行い、水素産生する細菌コロニーの選別を試みた。市販の水素感知膜をディッシュの上に置き、水素感知を試みたが、感知膜が水分により剥離した。

寒天培地に直接触れぬようにする改良を加えたが、多湿環境で剥離する現象が見られた。次に、密閉容器で妊婦の便培養を行い、容器内の水素濃度を GC で測定することとしたが、便提供者がいなかった。さらなる代替案として、妊婦に乳糖負荷(牛乳飲用)を行い、呼気水素ガス測定を行った。対照群 3 名は空腹時に比べ乳糖負荷 3 時間後に呼気水素濃度が上昇していたが、早産となった妊婦の 3 名中 1 名は乳糖負荷前後で呼気水素ガス濃度の不変(上昇しない)例が含まれており、水素産生能の違いが示唆される結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ono N, Kumazawa Y, Iwasawa T, Shirasawa H, Sato W, Miura H, Sato N, Terada Y	4. 巻 46
2. 論文標題 A novel three-dimensional/four-dimensional ultrasound analysis of the effect of the transfer position in in vitro fertilization and embryo transfer on the pregnancy rate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Akita J. Med.	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera, Y., Takahashi, K., Goto, M., Anzai, M., Ono, N., Shirasawa, H., Sato, W.,	4. 巻 12
2. 論文標題 The location of "8"-shaped hatching influences inner cell mass formation in mouse blastocysts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0175150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0175150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi, K., Sato, N., Sugawara, T., Kato, A., Sato, T., Shimizu, D., Tamura, D., Kito, M., Makino, K., Shirasawa, H., Miura, H., Sato, W., Kumazawa, Y., Sato, A., Terada, Y.	4. 巻 147
2. 論文標題 Clinical characteristics of Lynch-like cases collaterally classified by Lynch syndrome identification strategy using universal screening in endometrial cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 388-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2017.08.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三浦広志ら
2. 発表標題 膣内Lactobacillusの減少した妊婦に対するラクトフェリン腸溶錠の効果.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----