

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670951

研究課題名(和文) 膣内環境を正常化するための薬用活性炭膣内洗浄療法の基礎研究

研究課題名(英文) A preliminary study of an ecological treatment for Bacterial Vaginosis by activated charcoal vaginal washing

研究代表者

富永 國比古 (Tominaga, Kunihiko)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50254032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：「活性炭膣内洗浄療法」が膣内細菌叢の正常化に有用であるか、膣内細菌の変化を、リアルタイムPCR法による、抽出DNA  $\mu$ lあたりの標的遺伝子のコピー数16S rDNAによって定量的に観察し、多変量解析の結果有意な説明変数は認められなかった。細菌性膣症の原因菌の一つと言われてきた Bacteroides属が、細菌性膣症の症例において不検出、これは、定説を覆すもので、追加研究として、健康女性のボランティア26名のBacteroides属の検索を行った。結果、健康女性の96%は、Bacteroides属を保有しなかった。また、患者の26%においてはLactobacillus属が検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：The difference of therapeutic effect of the both group (activated charcoal vs. metronidazole) was not statistically significant ( $P=0.241$ , Fisher's exact test). Results from multiple logistic regression analysis showed there were no significant independent prognostic factors for the effect of treatment ( $p>0.05$ ). Bacteroides species which has long been acknowledged as a predominant species of BV, was not identified at all. The absence of Lactobacillus species was observed in the 26% of the subjects. In the additional survey for healthy volunteers showed that 96% of the subjects were without Bacteroides species in the vagina.

研究分野：産婦人科学

キーワード：細菌性膣症 活性炭洗浄法 乳酸菌 バクテロイデス

## 1. 研究開始当初の背景

正常の腔内においては、*Lactobacillus* 属が優位の細菌叢を形成して、腔内を酸性に保ち、また、過酸化水素を産生することによって有害菌を排除して、腔内の生態系を正常に維持する重要な働きを担っていると考えられている。ところが、何らかの原因で、*Lactobacillus* 属が減少し、他の細菌、即ち、*Bacteroides* 属、*Mobiluncus* 属、*Peptostreptococcus* 属、*Gardnerella vaginalis* 属、*Mycoplasma hominis* 属などが過剰に増殖する病態が臨床的に観察されている。これが、細菌性陰症 (Bacterial Vaginosis) である。2000 年には有病率 21.4% であったが、現在では生殖年齢女性のほぼ 30% にも達している。このように、今日、細菌性陰症は、生殖年齢の女性にとってありふれた感染症になりつつある。

細菌性陰症の治療については、これまでは、抗生物質が唯一の治療の手段として用いられてきた。しかしながら、抗生物質は、正常な腔内細菌叢にダメージを与える可能性がある。そのために、原因菌の特定とその根絶という治療モデルが成り立たないことは明白である。そこで、われわれは、抗生物質を用いないプロバイオティクスによる治療法の研究を続けてきた。すなわち、エコロジカルなシステムとしての腔内細菌叢を崩壊させない活性炭腔内洗浄療法による治療を提案してきたのである。

(Kunihiko Tominaga, Shigehiro Sato Masayuki Hayashi: Activated charcoal as an effective treatment for bacterial vaginosis, Personalized Medicine Universe 1 (2012) 54-57)

洗浄に用いる活性炭とは、石炭や、ヤシ殻などの炭素物質を原料として高温でガスや薬品と反応させて作られる微細孔 (直径 10 ~ 200 ) を持つ炭素である。この微細孔は、炭素内部に網目状に構成されており、その微

細孔の壁が大きい表面積 (30 ~ 2500m<sup>2</sup>/g) となりその表面に種々の物質を吸着する。微生物学の領域では、例えば、*Esherichia coli* の 0-157 ベロ毒素を吸着することなどが報告されている。

## 2. 研究の目的

この研究の目的は、活性炭腔内洗浄療法が腔内細菌叢の正常化のために有用であるか否かを、従来の抗生物質の治療と比較することによって明らかにすることにある。活性炭腔内洗浄療法の有効性に関しては、すでに述べたように Tominaga らの報告がある。

## 3. 研究の方法

1) 細菌性陰症に対して、薬用活性炭による腔内洗浄療法が有効かどうか、婦人科外来でインフォームドコンセントが得られた細菌性陰症患者 30 名を対象とした臨床研究を試みた。

2) single blind randomized 法により、対象を二群に割り付け、一方には薬用活性炭による腔内洗浄を 10 日間、他方にはメトロニダゾール錠 (当初予定していたクロマイ錠錠から変更) を腔内に 10 日間投与した。編入基準を満たさなかった例や途中脱落例が多く、15 名が解析の対象として残った。15 名の内訳は、メトロニダゾール 7 名、腔内洗浄 8 名である。腔内洗浄は、薬用活性炭 (有限会社・健歩社製) に蒸留水に加え 10% の水溶液とし、これを浸み込ませたタンポンを作成、外来で腔内に挿入、8 時間後に抜去。連日 10 日間、同様の処置を施行。

### 3) 細菌性陰症の診断基準

日本性感染症学会誌 (Vol22, N01. September 2011, p80-83) のガイドラインに、「WHO の細菌性陰症の診断基準」が紹介されており、これを今回の研究で採用した。それによれば、以下に述べる項目のうち少なくとも 3 項目が満たされた場合に、細菌性陰症と診断する。

腔分泌物性状は、薄く均一である。

腔分泌物生食標本で、顆粒状細胞質を有する clue cells が存在する。

腔分泌物に 10% KOH を加えた時に、アミン臭がある。

腔分泌物の pH が 4.5 以上 (5.0 でも可) である。

4) 投与前後の腔内細菌 (全菌数、*Lactobacillus* 属、*Gardnerella vaginalis* 属、及び *Bacteroides* 属) の変化を定量的に観察した。すなわち、リアルタイム PCR 法による、抽出 DNA  $\mu$ l あたりの標的遺伝子のコピー数 (16S rDNA) を明らかにした。

5) 臨床的治療効果の判定は、前述の日本性感染症学会誌に示されたガイドラインに拠った。

6) 統計学的検討は、先ず、両群の治療効果に差があるかどうか、Fishers' exact test によって検討した。

7) 次に、「治療効果」を目的変数とし、「年齢」、「治療法」、「治療前後における *Lactobacillus* 属/全菌数の変化率」、「治療前後における *Gardnerella vaginalis* 属/全菌数の変化率」を説明変数として、多重ロジスティック回帰分析を行った、尚、今回 *Bacteroides* 属は、検出されなかったため、説明変数から除外した。

8) *Bacteroides* 属が細菌性膣症の症例において不検出であった事実は、これまでの定説を覆すものなので、追加研究として、子宮頸部細胞診のため来院した健常女性のボランティア 26 名の *Bacteroides* 属の検索を行った。

#### 4. 研究成果

薬用活性炭による腔内洗浄療法と、メトロニダゾール膣錠による治療群の治療効果に統計学的に差がなかった。(P=0.241) 統計学的に有意な予後因子 (independent prognostic factor) は認められなかった。これまで細菌性膣症の原因菌の一つと言

われてきた *Bacteroides* 属が、全く検出されなかった。すなわち、全検体 36 例 (治療未完遂例も含めて) から 1 例も検出されなかった。

細菌性膣症患者の 26% (15 例中 4 例) においては、腔内細菌叢に *Lactobacillus* 属が検出されなかった。

健常女性の 96% (26 例中 25 例) は、腔内細菌叢に *Bacteroides* 属を保有しないことが分かった。

今回の研究結果から示唆された諸問題を報告しておきたい。二つの治療群において、治療効果に統計的な有意差は見られなかった。これは、薬用活性炭による洗浄療法が、抗生物質による治療に比べて差がないと解釈出来る。今後の更なる研究の蓄積によって、この治療法が細菌性膣症の予防と治療に取り入れられるように期待したい。多重ロジスティック回帰分析で統計学的に有意な変数が検出出来なかった理由は、サンプルサイズが少なかったためと思われる。今後、サンプルサイズを増やして検討を加えたい。これまで、細菌性膣症の原因菌の一つと言われてきた、いわゆる「悪玉菌」の *Bacteroides* 属が、全く検出されなかったことは、何を意味するのであろうか。*Bacteroides* 属はむしろ「善玉菌」で、IgA 抗体産生誘導システムとして腔内に存在している可能性がある。今後の研究が必要であろう。その予備的研究として、健常女性の腔内細菌叢における *Bacteroides* 属の動向を追加研究したが、ほとんどの女性 (96%) において *Bacteroides* 属は検出できなかった。従来、細菌性膣症の病態形成に重要な働きをしているとされてきた *Bacteroides* 属が、細菌性膣症および健常女性の腔内から消滅しつつあることを示しており、その事実の意味するところを、更に探究する必要性が示唆された。

付記)

当初の研究計画に対して、以下の3点について変更を余儀なくされた。

*Bacteroides* 属が細菌性膣症の症例において不検出であったため、追加研究として、健常女性のボランティア26名の *Bacteroides* 属の検索を行い比較した。コントロールとして用いた抗生物質は、クロマイ膣錠からメトロニダゾール膣錠に変更した(クロマイ膣錠が膣内乳酸桿菌にダメージを与えるという事実が明らかにされたため、また、メトロニダゾール膣錠が保険収載薬となったため)

当初、細菌性膣症患者30名を目標として、検体採取を始めたが、最終的に有効なデータとして解析に用いられたのは、メトロニダゾール群7例、薬用活性炭による膣内洗浄療法8例であった。解析から除外した理由は、以下の通りである。

同意書にサインはしたものの、途中で来院しなくなった、検体採取予定日が月経と重なり検体採取不能となった、婦人科的診察に抵抗を感じて定期的に来院できなかった、などである。

#### 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0 件)

〔学会発表〕(計0 件)

〔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:

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 國比古 (Tominaga Kunihiko)

岩手医科大学・医学部微生物学講座・感染症

学免疫学分野・非常勤講師

研究者番号: 50254032