

令和元年5月17日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09182

研究課題名(和文) 呼気硫化水素を用いた慢性閉塞性肺疾患(COPD)増悪予測の検討

研究課題名(英文) exhaled nitric oxide as a novel biomarker for predicting exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

齋藤 純平(Saito, Junpei)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50332929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リアルタイム呼気硫化水素(eH2S)測定システムを新規開発し特許を申請した。その後、57名の対象にeH2S測定を2回行いバラつきを検討したところ、再現性のある値が得ることが分かった。次に、健康者、COPD患者、喘息患者にeH2S測定を行ったところ、COPD、喘息患者では健康者よりも有意にeH2S濃度が高かった( $p < 0.05$ )。更に、COPD患者では、COPD重症度と正の相関傾向を、喀痰好中球および喀痰H2Sとは有意な正の相関を、一秒率、一秒量%予測値とは有意な負の相関を認めた。以上より、eH2SはCOPDにおける好中球性気道炎症および気流閉塞を反映する指標として利用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで好中球性気道炎症を検出する有用なバイオマーカーはなかった。我々は呼気中硫化水素(exhaled hydrogen sulfide: eH2S)が好中球性気道炎症の簡便かつ鋭敏で非侵襲的な指標となりうることを世界で初めて見出した。本研究結果からは、難治性喘息や慢性閉塞性疾患(COPD)を代表とする好中球性気道疾患のみならず肺炎等の好中球性炎症をきたす呼吸器疾患全般における予後や疾患活動性の指標としてもeH2Sが利用できる可能性を示唆しており、今後の日常診療への応用が大いに期待される結果であった。

研究成果の概要(英文)：We developed a new exhaled hydrogen sulfide (eH2S) measurement system and applied for a patent on this. Then, eH2S were measured twice in 57 subjects to evaluate whether obtained eH2S levels are reproducible. The coefficient of variation of eH2S levels was  $2.90 \pm 2.32\%$ , indicating eH2S levels measured by this system were reproducible. Next, eH2S levels were also measured in healthy, COPD and asthmatic subjects. The eH2S levels in subjects with asthma and COPD were significantly higher than those in healthy subjects. In addition, there was a trend correlation between eH2S and COPD severities. Furthermore, significant positive correlations can be seen between eH2S and sputum neutrophils as well as sputum H2S, and significant negative correlation can also be seen between eH2S and FEV1/FVC as well as FEV1 %predicted. Taking these results into consideration, eH2S may provide useful information on predicting not only neutrophilic airway inflammation but also airflow obstruction in COPD.

研究分野：臨床呼吸器病学

キーワード：呼気硫化水素 慢性閉塞性肺疾患 気管支喘息 呼気ガス分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic obstructive pulmonary disease; COPD) は、喫煙や有毒ガス・粒子に暴露されることで気道にマクロファージ・好中球・リンパ球を主体とした炎症が生じ、慢性進行性の気流閉塞をきたす疾患である。近年、COPD 患者数は増加の一途をたどっており、それと並行して死亡者数も増加している。その COPD 死亡率に影響を与える因子として急性増悪がある。現時点で、急性増悪を早期に予測する指標はない。これまで我々は、健常者および COPD 患者で喀痰・血清硫化水素 (Hydrogen sulfide:  $H_2S$ ) 濃度を測定したところ、喀痰  $H_2S$  は COPD の安定期・増悪期ともに健常者に比して上昇するが、血清  $H_2S$  は安定期で上昇するものの増悪期では安定期と比べて有意に低下することを発見した。この結果から、血清・喀痰  $H_2S$  値の変化が急性増悪の予測指標として有用である可能性が示唆された。しかし、必ずしも血清・喀痰のペア検体を毎回採取することは容易でないこと (特に喀痰) 測定自体に時間を要し迅速性に欠けることから、より簡便かつ迅速な測定法が望まれている。

### 2. 研究の目的

(1) 簡便かつ非侵襲的でリアルタイムに  $H_2S$  濃度を測定する手段としての呼気  $H_2S$  (e $H_2S$ ) 濃度測定が可能かどうかを検証した。

(2) COPD 患者においてリアルタイムに測定した e $H_2S$  濃度が COPD の診断および管理、増悪予測に有用か否かについて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 専用呼気回収バッグの硫化水素吸着性の検討

未使用の専用呼気バッグ (1L-Tedlar reservoir bag) を開封し、 $H_2S$  フリーガスを注入して専用測定器 (IS-4170) で  $H_2S$  濃度を測定する。次に、 $H_2S$  フリーガスを用いてバッグ内を 5 回または 10 回洗浄した後、再度  $H_2S$  フリーガスを注入して専用測定器にて  $H_2S$  濃度を測定する。

#### (2) 呼出流速と呼出圧および e $H_2S$ 濃度との関連

ノーズクリップをせずにマウスピースをくわえ、専用の呼気回収器に向かって呼出圧を 15cm $H_2O$  と一定にし、呼出流速が 35ml/s、70ml/s、300ml/s となるように呼出して、専用のバッグに呼気を回収する。その際、上気道由来の解剖学的死腔量を除去するために、最初の 250ml 以上の呼気 (それぞれの流速では 8 秒、4 秒、1 秒間) を捨て、その後の 5-10 秒間の呼気をバッグに回収する。回収した呼気は専用測定器に接続して e $H_2S$  濃度を測定する。

#### (3) リアルタイム呼気硫化水素濃度システムの開発と得られた e $H_2S$ 濃度の再現性の検討

上記 (1) および (2) にて得られた結果 (後述) から専用の呼気バッグに回収して測定することは、バッグ内での  $H_2S$  の吸着や分解の影響、呼気圧・呼気流速依存性の e $H_2S$  濃度変化の影響が無視できず、正確な測定ができないことが分かったため、一定圧・一定流量の呼気を直接  $H_2S$  測定器に吹き込むことでリアルタイムに e $H_2S$  濃度を測定する機器を新たに開発し、特許申請を行った。そして、健常者・喘息患者・COPD 患者合わせて 57 名に対して、本測定システムを用いて e $H_2S$  濃度測定を 2 回行い、再現性の検討を行った。

#### (4) 健常者および COPD 患者における e $H_2S$ 濃度の検討

健常者、COPD 患者に対して、以下の測定を行った。

##### リアルタイム e $H_2S$ 濃度測定

呼出圧 15mmHg、呼出流速 50ml/s にて 8~10 秒間呼出し e $H_2S$  濃度を測定する。これを 2~3 回繰り返し、測定誤差が  $\pm 10\%$  以内の値の平均値を e $H_2S$  濃度測定値として採用した。

##### 呼吸機能検査

専用の呼吸機能測定器 (CESTAC 11; Chest MI, Japan) を用いて、熟練した技師が 3 回測定を行い、その最良値を採用した。

##### 採血

生化学検査用スピッツに約 5ml の血液採取を行った。その後、遠心分離して得られた血清を 1ml ずつに分けて -80 の冷凍庫に保存した。そのうち 1ml は同量 sulfide antioxidant buffer を加えてから  $H_2S$  測定用として -80 の冷凍庫に保存した (後にイオン電極法を用いた血清  $H_2S$  濃度を測定する際に酸化して  $H_2S$  濃度が低下しないため (Saito J et al JACI 2013))。

##### 誘発喀痰検査

自然喀出痰または 5%の高張食塩水を 15 分間吸入することで得られた誘発痰を処理した。処理方法については Gold standard (Pizzichini E, et al. Am J Respir Crit Care Med 1996) に従って行った。得られた喀痰上清は、血清と同じように同量の sulfide antioxidant buffer を加えてから -80 の冷凍庫に入れて  $H_2S$  濃度測定用として保存した。同時に、細胞成分に関しては細胞分画のカウントを行った。

##### 血清および喀痰 $H_2S$ 濃度測定

上述の で得られた血清・喀痰上清は、まとめてイオン電極法により  $H_2S$  濃度測定を行った。測定方法に関しては、既報告に準じて行った (Saito J et al. Thorax 2014)。

##### CAT (COPD assessment test) 質問票

上記質問票を外來受診ごとに記入してもらう。

### 4. 研究成果

#### (1) 専用呼気回収バッグの硫化水素吸着の影響

未使用のバッグ内では 15ppb 程度の  $H_2S$  が検出されることが分かった。そして、 $H_2S$  フリーガスをういて 5 回、10 回と洗浄すると洗浄回数に応じてバッグ内の  $H_2S$  濃度が有意に低下することが分かった (図 1)。

(2) 呼出流速、呼出圧と  $eH_2S$  濃度の関係

解剖学的死腔分 (約 250ml) を除いた分の呼気をバッグに回収して  $eH_2S$  濃度を測定すると、一定呼気圧のもとでは呼気流速依存性に  $eH_2S$  濃度が低下することが分かった (図 2)。

以上、(1)(2)の結果からは、バッグに呼気を回収して  $H_2S$  濃度を測ることは、バッグ内の  $H_2S$  吸着や分解、呼気圧・呼気流速などの影響を受けるため正確な測定ができないことが分かった。そこで、一定圧・一定流量の呼気を直接  $H_2S$  測定器に吹き込むことでリアルタイムに  $eH_2S$  濃度を測定する機器を新たに開発し特許申請を行った。

(3) リアルタイム呼気硫化水素濃度システムの開発と得られた  $eH_2S$  濃度の再現性の検討

57 人の対象 (健康者 12 人、喘息患者 32 人、COPD 患者 13 人) に対して、呼出圧 15mmHg、呼出流速 50ml/s で  $eH_2S$  濃度を 2 回測定し、その平均値および差を用いて Bland-Altman plot を作成し、Coefficient of variation (CV) を求めたところ、CV は  $2.9 \pm 2.32\%$  であり  $\pm 10$ ppb 程度の誤差で  $eH_2S$  濃度を測定できることが分かった (図 3)。

(4) 健康者および COPD 患者における  $eH_2S$  濃度の検討

健康者 11 名、COPD 患者 45 名に対して  $eH_2S$  濃度を比較したところ、COPD 患者 ( $107.8 \pm 30.13$ ppb) では健康者 ( $78.3 \pm 9.91$ ppb) と比べて有意に  $eH_2S$  濃度が高値であった ( $p < 0.001$ ) (図 4)。

(5) COPD 患者における  $eH_2S$  濃度と COPD 関連指標との関係

COPD 関連指標との関係では、 $eH_2S$  は COPD 重症度と正の相関傾向を認めた ( $r = 0.25$ ,  $p = 0.08$ ) (図 5)。また、 $eH_2S$  は喀痰  $H_2S$  ( $r = 0.59$ ,  $p = 0.01$ ) (図 6) および喀痰好中球 ( $r = 0.80$ ,  $p < 0.001$ ) (図 7) と有意な正の相関を認め、一秒率 ( $FEV_1/FVC$ ) ( $r = -0.31$ ,  $p = 0.02$ ) (図 8) および一秒量 ( $FEV_1$ ) % 予測値 ( $r = -0.30$ ,  $p = 0.02$ ) (図 9) とは有意な負の相関を認めた。残念ながら、 $eH_2S$  は血清  $H_2S$  および CAT スコアとは有意な相関関係はなかった。

以上の結果から、今回新規で開発したリアルタイム  $eH_2S$  測定システムは、COPD などの好中球性気道炎症および気流閉塞を来す疾患の簡便かつ鋭敏で非侵襲的な指標として反映する指標として利用できる可能性が示唆された。

図 1: 新しいバッグの洗浄と  $eH_2S$  値

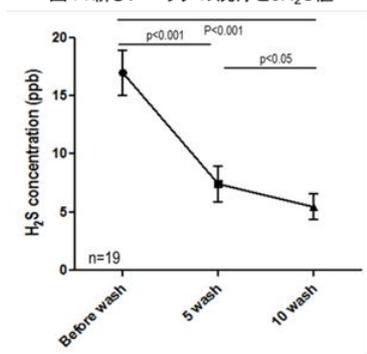


図 2: 呼出圧・呼出流速と  $eH_2S$  値

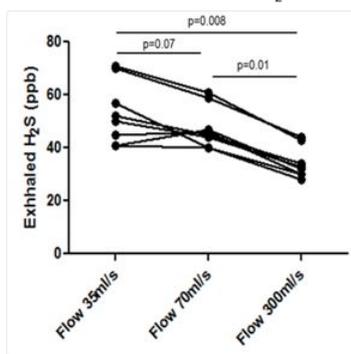


図 3:  $eH_2S$  濃度の 2 回測定による再現性

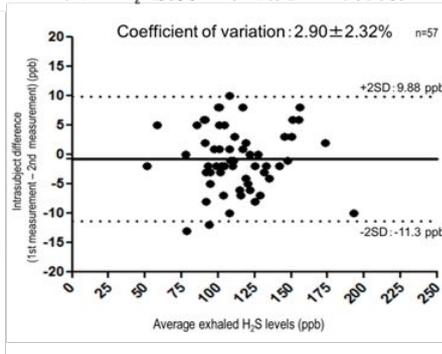


図 4: 健康者および COPD 患者の  $eH_2S$  値

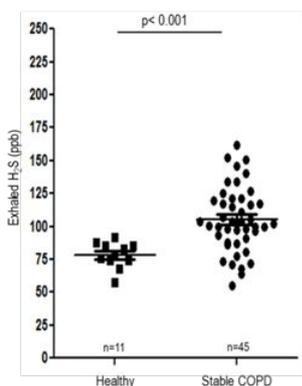


図 5: COPD 重症度と  $eH_2S$  値

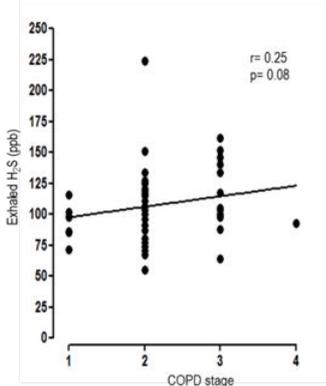


図 6: 喀痰  $H_2S$  値と  $eH_2S$  値との関係

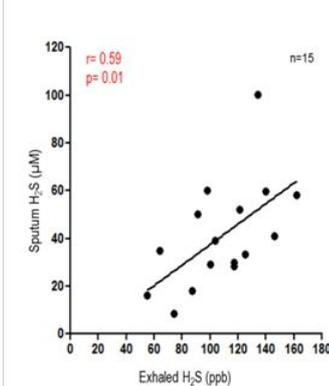


図 7: 喀痰好中球割合と  $eH_2S$  値の関係

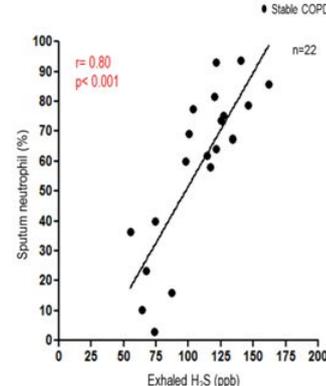


図8: FEV1/FVCとeH<sub>2</sub>S値との関係

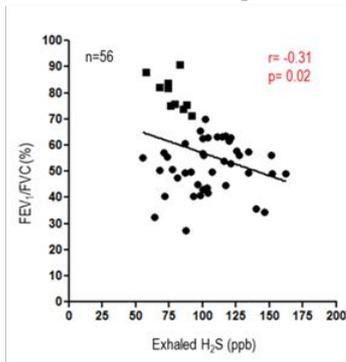
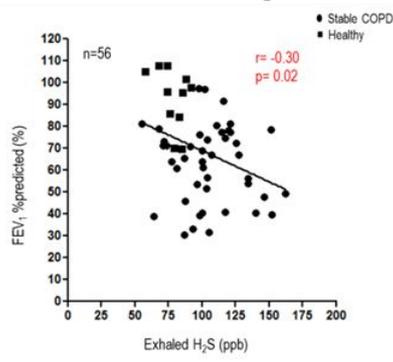


図9: FEV1%予測値とeH<sub>2</sub>S値の関係



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 27 件)

Suzuki Y, [Saito J](#), Kikuchi M, et al. Sputum-to-serum hydrogen sulphide ratio as a novel biomarker of predicting future risks of asthma exacerbation. *Clinical & Experimental Allergy*. 2018; 48: 1155-1163. (査読有)

DOI: 10.1111/cea.13173

齋藤純平. 成人喘息における非 2 型免疫反応を中心としたバイオマーカー、アレルギー、2018; 67: 901-912. (査読無) DOI: 10.15036/arerugi.67.901

齋藤純平、棟方充. 気管支喘息における一酸化窒素と硫化水素測定の意義. *臨床免疫・アレルギー科*, 2015; 64: 474-481. (査読無)

### 〔学会発表〕(計 74 件)

齋藤純平. COPD における硫化水素の役割. 第 59 回日本呼吸器学会学術集会、2019、東京、(シンポジウム).

齋藤純平. 非 2 型炎症反応を中心とした成人喘息におけるバイオマーカー. 第 66 回日本アレルギー学会総会、2017、東京、(招待講演).

Suzuki Y, [Saito J](#), Uematsu M, et al. Clinical application of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) as a marker of asthma management. 2016, London, (Poster discussion).

[Saito J](#). Clinical application of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in asthma. 2016, Sendai (Symposium).

### 〔図書〕(計 2 件)

日本呼吸器学会呼気一酸化窒素 (NO) 測定ハンドブック作成委員会. *メディカルレビュー*、呼気一酸化窒素 (NO) 測定ハンドブック、2018、総ページ数 66.

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況 (計 1 件)

名称: 硫化物ガス濃度測定装置及び硫化物ガス濃度測定方法

発明者: 齋藤純平、ジェイエムエス (株)

権利者: 同上

種類: 特許 (PCT)

番号: PCT/JP2017/013137

出願年: 2017

国内外の別: 国内、国外

### 〔その他〕

特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。