

主論文の要旨

**Measurement of fasting breath hydrogen
concentration as a simple diagnostic method for
pancreatic exocrine insufficiency**

〔 膵外分泌機能不全の簡易診断法としての空腹時呼気水素濃度測定 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：石上 雅敏 准教授)

植月 康太

【背景】

膵外分泌不全 (pancreatic exocrine insufficiency; PEI) は、膵疾患例の予後に悪影響を与える。膵酵素補充療法 (pancreatic enzyme replacement therapy; PERT) は、PEI 患者の生命予後を改善するが、高価な内服薬を長期間内服することが必要であるため膵疾患例全例に施行することは難しく、適切な PEI の拾い上げが求められる。PEI 診断法は多数あるが、煩雑な検査が多く実臨床で施行されることは非常に少ない。

一方で、人体において水素は腸内細菌の嫌気性代謝によってのみ発生し、その 14% が呼気中に排出される。そのため、呼気水素試験 (breath hydrogen test; BHT) は腸内細菌叢の間接的評価法として報告されている。PEI は腸内細菌叢に変化を来すため、膵疾患への応用が期待されている。しかし、現状では少数例の糖負荷試験で BHT と膵疾患の関連が報告されているのみであり、簡便に測定できる空腹時呼気水素濃度 (fasting breath hydrogen concentration; FBHC) と膵外分泌機能についての検討はなされていない。

【目的】

本研究の目的は、FBHC と膵外分泌機能の関連と、その両者を結びつけるであろう腸内細菌叢の変化を解明することにより、FBHC 測定が PEI 拾い上げ検査として応用可能かを検討することとした。

【対象】

この研究は、2019 年 4 月から 2020 年 6 月の間に研究に参加することに同意した 20 歳以上の入院症例を前向きに収集した。対象を膵癌 (pancreatic carcinoma; PC)、慢性膵炎 (chronic pancreatitis; CP)、その他の膵疾患、正常膵に分類した。PC は手術または EUS-FNA (EUS guided fine needle aspiration) により病理組織学的に膵管癌と診断された症例、CP は M-ANNHEIM 基準に準拠した。正常膵は、膵疾患以外で入院し、各種画像検査、血液検査で膵疾患が否定された症例とした。

本研究は、ヘルシンキ宣言およびその後の改訂で定められた倫理基準に従い、名古屋大学医学部附属病院倫理審査委員会の承認を得て、被験者に研究内容の説明を行い、書面による同意を得て実施した。

【方法】

膵機能検査

膵外分泌能検査として、BT-PABA 試験を、膵内分泌機能検査として 24 時間尿 C ペプチド排泄 (CPR) 検査を施行した。膵機能検査は、呼気水素採取の前後 1 週間以内に非絶食条件にて施行した。両検査は、異なる日に 3 回測定し、その平均値を用いた。既報にのっとり BT-PABA 試験は PABA 排泄率 73.4%未満を膵外分泌能低下、CPR は 29.2 μ g/day 未満を膵内分泌低下とした。

呼気ガス分析

呼吸試験前日は病院食を摂取、21 時以降は絶食とし水のみ許可とした。呼吸試験当日は早朝 7 時に、十分な歯磨き後、2 回の深呼吸後 15 秒息止めを行い、終末呼吸を採取した。入院後の喫煙、飲酒、過度な運動、間食は許可しなかった。回収した呼吸ガス分析にはセンサガスクロマトグラフ (NISSHA エフアイエス社 : SGHA) を用いた。測定結果の解析には専用のデータ解析ソフト「SGC Analyzing Software」を使用した。水素、一酸化炭素、メタンが測定可能であり、測定対象濃度は各々 1.0-100ppm であった。方法はローマコンセンサスカンファレンス、2017 年北米コンセンサスに準じた。

腸内細菌叢解析 (16S rRNA 遺伝子解析)

入院中に採取した糞便を急速凍結し保存した。DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて糞便から DNA を分離し、ユニバーサルプライマー (forward: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' and reverse: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3') を用いて細菌の 16S rRNA の V3-4 領域をターゲットにして増幅した。PCR 産物をプールし、シーケンスライブラリを構築し、Illumina MiSeq シーケンサーを用いてシーケンスを行った。Pair-End Read は、MiSeq Reagent Kit v3 を用いて、2×300 リード、600 サイクルで調製した (Illumina, San Diego, CA, USA)。16S rRNA 遺伝子配列データの解析は、USEARCH 6.1、Microbial Ecology (QIIME 1.9.1)、Greengenes v.13_8 を用いて行った。腸内細菌の群間比較には、LEfSe (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) をデフォルト設定で使用した。

【結果】

期間中にエントリーされた 80 例のうち、前述した検討項目が解析可能であった 60 例で検討を行った。除外された症例の内訳は入院中に排便を得られなかった 4 例、便検体不良により腸内細菌叢解析ができなかった 8 例、入院後呼吸ガス採取前に抗生剤が開始された 12 例であった。60 症例を、PABA 排泄率 : 73.4% を基準に PEI 群 30 例、非 PEI 群 30 例に群別した。(Table 1)。

PEI 群では、大酒家の割合が有意に高く ($P=0.023$)、血液検査では血清アルブミン値が有意に低かった ($P=0.002$)。膵疾患に特徴的な画像所見については、PEI 群で主膵管狭窄例の割合が有意に高く ($P=0.038$)、非 PEI 群で正常膵例が有意に多い ($P=0.020$) という結果であった。

呼吸ガス分析では、FBHC は、非 PEI 群と比較して PEI 群で有意に高かった (中央値 15.70 (1.4-77.0) ppm vs 2.80 (0.7-28.2) ppm, $P<0.0001$; Figure 1)。FBCC も同様に PEI 群で有意に高く、FBMC では有意差を認めなかった (それぞれ $P=0.001$ 、 $P=0.216$; Table 2)。また、FBHC は PABA 排泄率と負の相関を示し、CPR 値との相関は認めなかった (それぞれ $r = -0.523$ $P<0.001$ 、 $r = -0.067$ $P=0.608$; Figure 2, 3)。

FBHC と PABA 排泄率で ROC 曲線を作成し、FBHC のカットオフ値を決定した (Figure 4)。カットオフ値を 10.7ppm (AUROC: 0.796、95%信頼区間 : 0.678-0.913、 $P<0.001$) に設定

すると、FBHC による PEI 診断の感度は 73.3%、特異度は 83.3%であった。

PABA 排泄率に関連した腸内細菌叢の解析における「門」レベルの PEI 群・非 PEI 群のバクテリアプロポーシオンを Figure 5A に示す。PEI 群は非 PEI 群と比べて Firmicutes 門の占有率が高く、Proteobacteria 門、Verrucomicrobia 門、Fusobacretia 門の占有率が低かった。「属」レベルにおいては、PEI 群で *Blautia* 属、*Faecaribacterium* 属、*Streptococcus* 属の占有率が高く、*Parabacteroides* 属、*Akkermansia* 属の占有率が低かった (Figure 5B)。2 群間で比較すると PEI 群では偏性嫌気性菌である Clostridia 網に属する *Clostridium* 属などの有意な増加を認めた ($P < 0.05$)。また *Lactobacillaceae* 科と *Leptotrichiaceae* 科に属する菌種の有意な増加を認めた (Figure 5C) ($P < 0.05$)。

【考察】

本研究では、PEI 群で FBHC が有意に高く、FBHC と PABA 排泄率は負の相関を示した。FBHC の基準値は明確ではなく、既報では 10ppm~20ppm と一定しない。本検討では FBHC のカットオフ値を 10.7ppm に設定すると、PEI 診断の感度/特異度で良好な結果を得ることができた。

この機序を解明するために FBHC と腸内細菌叢の関連も検討した。既報同様に PC、CP、PEI で増加が報告されている Firmicutes 門、*Clostridium* 属、*Lactobacillaceae* 科が PEI 群で増加していた。Human Microbiome Project に登録されている腸内細菌 343 種のうち約 71%が、H₂ の可逆的な酸化還元反応を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼをコードしているが、PEI 群で有意な増加を認めた Firmicutes 門は、ヒト結腸内細菌叢のヒドロゲナーゼ含有量において 21%と非常に高い割合を占めており、その中でも *Clostridium* 属は典型的な水素生成細菌と報告されており、PEI 群で FBHC が上昇した一因と考えられた。

また、*Clostridium* 属細菌などの水素生成細菌は、未消化物が多い腸内で繁殖すると報告されている。PEI による未消化物の増加が、水素生成細菌を増加させ FBHC を上昇させる機序が考えられた。FBHC は安価で、検査時間が約 1 分、測定時間も 4 分程度と、他検査と比較し非常に短く侵襲性もないため繰り返し施行できる検査である。そのため PERT 適応のスクリーニングのみならず、PERT の効果判定にも利用できると思われる。

【結論】

PEI 患者において、水素生成細菌である *Clostridium* 属の増加による FBHC の上昇が認められた。負荷を用いない FBHC 測定は、簡便な PEI 診断法として応用可能である。