

膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症 CF)の膵外分泌機能(共同研究)

研究報告者 成瀬 達 みよし市民病院 院長

共同研究者

星野三生子（みよし市民病院小児科）

伊藤 治，濱田広幸，柴田時宗（みよし市民病院消化器科）

近藤志保，中莖みゆき（名古屋大学大学院健康栄養医学）

石黒 洋，山本明子（名古屋大学総合保健体育科学センター）

藤木理代，北川元二（名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科）

吉村邦彦（日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科）

下瀬川徹，正宗 淳（東北大学病院消化器内科），CF 登録制度のメンバー

【研究要旨】

便中エラスターゼは被験者の負担がないため、乳幼児でも測定可能な膵外分泌機能検査である。欧米では膵嚢胞線維症(CF)の膵外分泌不全(PI)の診断に用いられている。本法により日本人のCF患者の膵外分泌機能を評価するため、1～6歳の健常な保育園児110名とCF患者16名における便中エラスターゼをELISA法により測定した。健常児の便中エラスターゼの中央値は556 $\mu\text{g/g}$ (最大値784～最小値174)、平均値は532 $\mu\text{g/g}$ 、平均値-2SDの値は207 $\mu\text{g/g}$ であった。欧米人と同じ基準値(>200 $\mu\text{g/g}$)で異常低値を示した健常児は1名のみであった。PI患者11名の便中エラスターゼ(中央値25 $\mu\text{g/g}$ ：範囲16～75)が全て基準値以下であり、膵外分泌能が保持された5名のPS患者は全て基準値以上(804 $\mu\text{g/g}$ ：239～852)であった。便中エラスターゼはCFに伴う膵外分泌不全の早期診断に有用である。

A. 研究目的

膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症 CF)は cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)と命名されたクロライドイオンチャンネルの遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である¹⁾。CFTR 遺伝子変異によりCFTRの機能が障害されると、粘稠な分泌液のため消化管をはじめ膵臓の導管や気管支の閉塞が閉塞する。その結果、胎便性イレウス、膵外分泌不全による消化吸収障害と栄養障害となり、気道では反復する慢性気管支炎、細気管支炎や副鼻腔炎がおきる。肺感染症による呼吸不全のため、わが国の患者の平均生存期間は約19年である²⁾。

CFの診断には膵外分泌機能の評価が必要である。CFは膵外分泌不全の有無により Pancreatic Insufficient(PI)と Pancreatic sufficient(PS)に分類される。一般にPIの患者はPSに

比べチャンネル機能が著しく低下(1%未満)するCFTR 遺伝子変異を伴っており、生命予後も不良である^{3~5)}。わが国のCFの診断基準では、膵外分泌不全は、大量頻回の悪臭を伴う脂肪便を伴うか、またはPFD試験(BT-PABA試験)における尿中PABA排泄率や便中キモトリプシン活性の低下があることをもって診断することとなっている⁶⁾。しかし、便中キモトリプシン活性は検査試薬の販売が中止となった。また、PFD試験では検査薬を内服後、6時間にわたり蓄尿する必要があるため6歳以下の幼児に施行することは容易ではない。

膵腺房細胞から分泌されるエラスターゼは比較的安定な酵素である。消化管内で完全に分解されることはなく便中に排泄される⁷⁾。従って、便中のエラスターゼの濃度は膵外分泌機能を反映する⁸⁾。日本人の健常人および慢性膵炎や自己免疫性膵炎により高度の膵外分泌機能低

下(セクレチン試験において液量, 最高重炭酸塩濃度および総アミラーゼ排出量が低下)を有する患者における便中エラスターゼ試験の感度は, 基準値を $>200 \mu\text{g/g}$ と設定すると, 72.2%, 特異度は90.2%である⁹⁾. 本法では, 軽度ないしは中等度の膵外分泌障害の診断はできないが, 高度の膵外分泌障害の診断には有用である.

便中エラスターゼの測定は被験者の負担が全くない. 乳幼児でも測定が可能であるので, 欧米では CF の膵外分泌不全の診断に用いられている^{10,11)}. しかし, 日本人の幼児の便中エラスターゼ濃度については限られた情報しかなく⁹⁾, 欧米や成人の基準値をそのまま用いて良いかは不明である. そこで平成24年度には, みよし市の保護者の同意のもとに健康な幼児の便を採取してエラスターゼ濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法^{9,12)}により測定し, 小児における基準値を検討した¹³⁾. 平成25年度は膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症 CF)登録制度¹⁴⁾の主治医の協力を得て, CF 患者の便中エラスターゼ濃度を測定し, その有用性について検討を行った.

B. 研究方法

対象: 健康乳幼児. みよし市天王保育園および明知保育園の1歳から6歳までの園児で, 文書にて保護者の同意を得た健常園児110名(男64名, 女46名)を対象とした. 検体は保育園で毎朝回収後 4°C で保管し, みよし市訪問看護テーションのスタッフが午前中に回収して, 測定まで -20°C で保存した. CF 患者. CF 登録制度の登録主治医20名に調査への同意と便の採取を依頼した. 主治医への依頼書には研究の説明書, 採便容器, 採便方法説明書および検体の返送用封筒を同封した. 患者の匿名性を守るため検体容器には同定番号のみを記載し, 入手情報は採取時の年齢, 性, 身長, 体重とした. 患者が検体を直接みよし市民病院に発送できるように受取人払いクール宅急便としたが, 送り主および住所は主治医とその所属施設とした. CF 患者16名(男性8名, 女性8名)の検体を受領し, 測定まで -20°C で保存した.

Standard Curve of ELISA

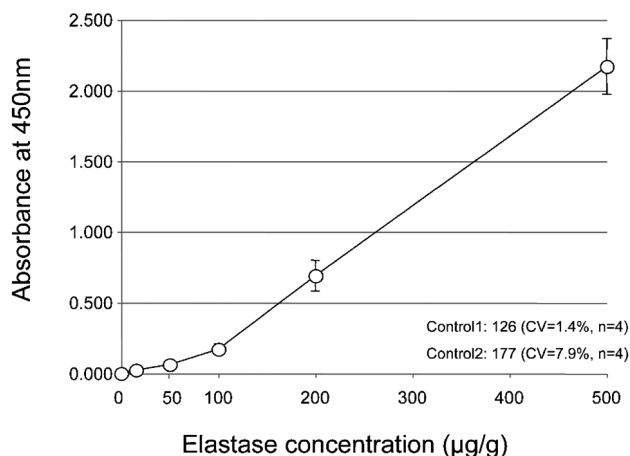


図1 便エラスターゼ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法の標準曲線.

便中エラスターゼの測定には BIOSERV Diagnostics 社の Pancreatic Elastase ELISA キット (SK15)^{9,12)}を用いた. 図1に標準曲線を示す. 標準検体1 ($126 \mu\text{g/g}$)および標準検体2 ($177 \mu\text{g/g}$)の CV はそれぞれ1.4%および7.9% ($n=4$)であった. 測定は対で行い, 結果はその平均値で示した.

(倫理面への配慮)

本研究はみよし市民病院倫理委員会の承認を受けた(2012年8月6日, 24み病第243号). 本研究に協力された保育園長に研究内容を文書および口頭で説明し, 了解を得た. 次に園長から保護者に口頭にて説明を行い, 文書にて同意を示された保護者にのみ, 検体採取を依頼した. CF 患者の本研究への協力は, 主治医が患者の来院時に説明することにより了解を得た. 本調査は通常の排便後に少量の便を採取するだけなので, 身体への影響はない. また治療薬の中断など, 特別の配慮は必要でない. 患者の匿名性を守るため検体容器には番号のみを記載し, 取得情報は採取時の年齢, 性, 身長, 体重とし, 送り主は主治医とした. 測定結果は主治医に通知し, 主治医から患者に報告したので, 提供者の匿名性は守られている.

C. 研究結果

(1) 健康幼児の便中エラスターゼの分布

表1 みよし市の保育園児(1~6歳)の便中エラスターゼ濃度($\mu\text{g/g}$)

| 健康児 | 全体 | 男 | 女 |
|--------|-----|-----|-----|
| N | 110 | 64 | 46 |
| 最大 | 784 | 903 | 853 |
| 中央値 | 556 | 556 | 567 |
| 最小 | 174 | 238 | 174 |
| 平均値 | 532 | 527 | 540 |
| SD | 163 | 155 | 174 |
| 平均-2SD | 207 | 217 | 191 |
| 平均+2SD | 858 | 837 | 889 |

表1にみよし市の保育園児の便中エラスターゼの分布を示す。110名の幼児の中央値は $556\ \mu\text{g/g}$ (最大値784~最小値174)であった。男児($n=64$)の中央値 $556\ \mu\text{g/g}$ は、女児($n=46$)の値 $567\ \mu\text{g/g}$ と差はなかった。幼児全体の平均値は $532\ \mu\text{g/g}$ であり、平均値-2SDの値は $207\ \mu\text{g/g}$ であった。

(2) CF患者の背景

16名のCF患者の平均年齢は14.4歳(中央値:9.1歳, 0.7~37.1歳), 男女比は1:1であった。この内、臨床所見から主治医が膵外分泌不全を疑った患者(PI)は11名(男性5名, 女性6名), 膵外分泌が正常と推定した患者(PS)は5名(男性3名, 女性2名)であった。PI患者の平均年齢9.8歳(中央値:7.2歳, 0.7~25.3歳)は、PS患者の平均年齢24.7歳(中央値:25.5歳, 8.9~37.1歳)より低かった。

(3) CF患者の便中エラスターゼ

図1にCF患者の便中エラスターゼの分布を示す。16名のCF患者の中央値は $21\ \mu\text{g/g}$ (最大値852~最小値16)であった。便中エラスターゼの基準値($200\ \mu\text{g/g}$)により、PI患者とPS患者は明確に区別された。PI患者の便中エラスターゼ(中央値 $25\ \mu\text{g/g}$: 範囲16~75)が全て基準値以下であったのに対し、PS患者は全て基準値以上($804\ \mu\text{g/g}$: 239~852)であった。

(4) CF患者の年齢と便中エラスターゼ

図2は患者の年齢と便中エラスターゼの関係を示す。PI患者の便中エラスターゼは、1歳未満児1名が $75\ \mu\text{g/g}$ であったが、他の患者は全て $25\ \mu\text{g/g}$ 以下であった。PI患者の中で

CF患者の便中エラスターゼ

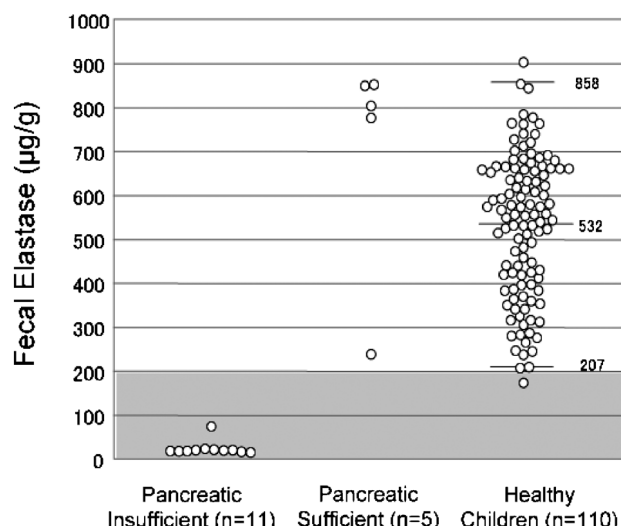


図2 CF患者の便中エラスターゼ濃度。臨床的に膵外分泌不全のある患者(Pancreatic Insufficient)とない患者(Pancreatic Sufficient)の比較。健康児はみよし市の1歳から6歳までの保育園児。基準値($200\ \mu\text{g/g}$)以下の値を膵外分泌不全と診断する。

CF患者の年齢と膵外分泌機能

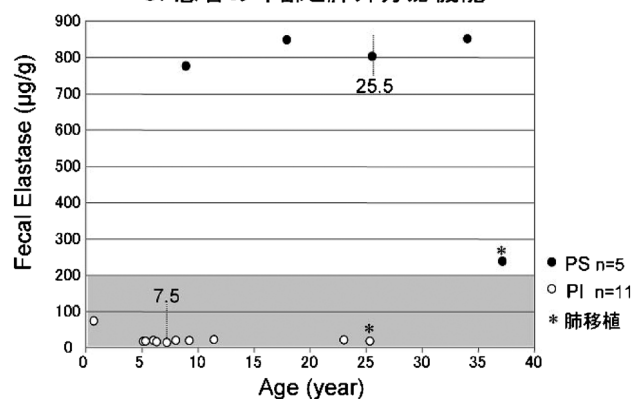


図3 CF患者の年齢と便中エラスターゼ濃度。膵外分泌不全のある患者(○PI)とない患者(●PS)。*肺移植を受けた患者。破線の数字は両群の患者年齢の中央値。便中エラスターゼ $<200\ \mu\text{g/g}$ を膵外分泌不全と診断する。

最年長の患者は肺移植を受けていた。一方、8歳から34歳までのPS患者は健常範囲の値を示した。肺移植を受けた最年長のPS患者は基準値をわずかに越えていた($239\ \mu\text{g/g}$)が、消化酵素の補充療法が必要になっていた。

(5) CF患者の膵外分泌機能とBMI

CF患者のBody Mass Index (BMI)は平均 15.6 ± 2.4 (SD)と低値であった。PI患者(中央値:15.3, 12.8~18.8)とPS患者(中央値:16.6, 12.2~21.2)には有意差はなく、 $\text{BMI} >$

18.5の患者は2例であった。

D. 考察

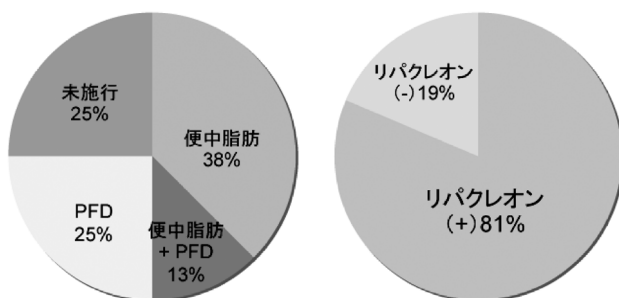
CFを起こすCFTR遺伝子変異は5つのクラスに分類されている¹⁵⁾。クラスI変異では変異によって生じた終止コドンや欠失などにより完全なチャネルタンパク質が合成されないため、上皮膜細胞にCFTRチャネルが発現しない。クラスII変異ではチャネルタンパク質は合成されるが、細胞膜に移行しないためチャネル機能が失われる。クラスIII変異では、チャネルの開閉を調節する部位が変異により機能を発現できず、チャネルの開閉ができない。これらの変異が両アレルに存在すると、CFTR機能は1%以下となりCFを発症する^{4,5,15)}。腓外分泌不全(PI)を伴う古典的CF患者のCFTR遺伝子変異は、クラスI, II, IIIに属することが知られている³⁾。一方、チャネルタンパク質が膜に発現するが、Cl⁻やHCO₃⁻のイオン透過性が悪くなるクラスIV変異や、チャネルタンパク質の発現量が低下するクラスV変異ではCFTR機能が5%程度残存する。このため腓外分泌機能がある程度保たれる(PS)ので、非古典的CFもしくは慢性腓炎や先天性両側精管欠損症などCF関連疾患を伴う^{4,5,15)}。従って、CFの診断において腓外分泌不全の診断は、重症度や予後の判定と治療の選択の為に重要である。

図4は腓囊胞線維症(嚢胞性線維症CF)登録制度¹⁴⁾に登録された患者の腓外分泌能の評価法を示したものである。2013年5月時点で確認された生存患者16例の内、8例が便の検鏡に

て脂肪便が確認されていた。PFD試験による腓外分泌機能の評価は6例(38%)と、未施行4例を含め約60%の症例において定量的評価がされていない現況が明らかとなった。PFD試験では検査薬を内服後、6時間にわたり蓄尿する必要があるため6歳以下の幼児に施行することは容易ではないことも一因であると推定される。

便中エラスターゼでは、軽度ないしは中等度の腓外分泌障害の診断はできない。しかし、高度の腓外分泌不全は確実に診断できるので^{8,9)}、欧米ではCFの腓外分泌不全の診断や経過観察に用いられている^{10,11)}。現在、日本人の健常小児の便中エラスターゼの基準値はない。そこで平成24年度は、みよし市の保育園の協力を得て、3歳から6歳の幼児103名の便中エラスターゼ濃度を測定した¹³⁾。3歳児以上の便中エラスターゼ濃度の中央値(544 μg/g)は日本人の健常成人の値(578 μg/g)に相当していた⁹⁾。身長、体重(図4)、BMIいずれも便中エラスターゼと有意の相関関係を認めなかったため、この年齢層では成人と同等の腓外分泌能があると推定される。平成25年度は1歳児のデータを追加して、110名となった。その中央値は556 μg/g(最大値784~最小値174)であった。幼児全体の平均値は532 μg/gであり、平均値-2SDの値は207 μg/gであった(表1)。これより低い値を示した幼児は2名(174と207 μg/g)であった。検査マニュアルの判定基準では、便中エラスターゼ<100 μg/gが高度の腓外分泌不全、100-200 μg/gは中等度の腓外分泌不全、正常は>200 μg/gとしている。成人や欧米人の基準値(>200 μg/g)を正常の腓外分泌機能の下限とした場合、異常低値を示した幼児は1名であった。従って、日本人乳幼児においても、この基準値(>200 μg/g)は妥当と考えられる。本法は擬陽性が少なく、特異度の高い検査であるが、乳幼児では便の水分含量が多いので見かけ上の低値となることがある。異常低値が観察された場合には1年後に再検して、原因が外分泌不全であるか、それとも希釈効果によるものであるか確認する必要がある。

CF患者における腓外分泌機能の評価法



登録CF患者(生存例 n=16) 2013年5月20日

図4 CF登録患者における腓外分泌機能の評価法

本研究は、わが国の CF 患者の膵外分泌機能に関する最初の調査である。16名の CF 患者は、便中エラスターゼの値により PI 患者と PS 患者に明快に分類することができた(図 2)。クラス I, II, III 変異をもつ患者は出生時に膵病変(膵嚢胞線維症)を発症しており、膵外分泌不全を合併する³⁾。今回の結果はこれを裏付けるものであり、0.7歳~11歳の9名の患者が100 $\mu\text{g/g}$ 以下と、高度の膵外分泌不全に相当する値を示した。便中エラスターゼは少量の採便で簡単に膵外分泌不全が診断できるので、乳児期の古典的 CF の診断に有用な検査法であるといえる。

欧米では約25%の CF 患者は膵外分泌不全を伴わない PS 患者である¹⁶⁾。しかし、ほとんどの PS 患者が経過と共に膵外分泌不全を発症することが知られている。今回の調査では、PS 患者は5例(31%)であった。これらの症例では30歳台まで膵外分泌機能は保たれていた(図 3)。しかし、肺移植を受けた最長齢の PS 患者では、便中エラスターゼが239 $\mu\text{g/g}$ と正常の下限値付近まで低下していた。臨床的にも膵外分泌機能の低下に伴う症状があり、膵酵素補充療法が施行されていた。今後、ドルナーゼアルルファやトブラマイシン吸入薬の普及に伴い、CF 患者の予後の改善が期待されている。CFTR チャネル機能が低下は慢性膵炎のリスク因子でもあり、時間の経過と共に膵外分泌機能の低下が進行する例が存在する。便中エラスターゼは、PS 患者における膵外分泌の経過観察にも有用であると思われる。

閉塞性呼吸障害や繰り返す気道感染に伴う咳のため、CF 患者ではエネルギー消費が大きい。膵嚢胞線維症全国疫学調査の二次調査の解析では、ほぼ全例が発育や栄養障害を示していた¹⁷⁾。18歳以上に達した成人10例における BMI の中央値は15.9(13.5~18.5)と9名が BMI < 18.5であった。今回の調査では、PI 患者(中央値:15.3)と PS 患者(中央値:16.6)の BMI には有意差はなかった。BMI > 18.5の患者は2例のみであり、膵外分泌不全の有無にかかわらず、低体重の患者が多かった。BMI は患者の予後と密接に関連しており、BMI の

低い患者は予後不良である。このため間食を含め、頻回の食事摂取が推奨されている¹⁷⁾。特に、PI を伴う CF では、食事の度に消化酵素を補充しないと多量の脂肪便が生じる¹⁾。医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議の結果を受けて高力価の消化酵素薬が承認されたので、少量の内服で十分な消化を得ることが可能になっている¹⁹⁾。今後、便中エラスターゼを測定することにより早期に膵外分泌不全の診断を行い、十分な消化酵素補充療法を行うことにより CF 患者の日常生活の質(QOL)および栄養状態の改善が期待される。

E. 結論

便中エラスターゼを測定することにより、日本人の CF 患者における膵外分泌不全の有無を診断した。欧米人の CF 患者と同じ基準値 > 200 $\mu\text{g/g}$ で、膵外分泌不全のある患者(PI)とない患者(PS)を簡単に鑑別できた。便中エラスターゼは CF に伴う膵外分泌不全の早期診断に有用である。

F. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班。膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻 眞, 成瀬 達編)。アークメディア 2008。
2. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 辻一郎, 栗山進一, 正宗 淳, 菊田和宏, 下瀬川徹。第4回膵嚢胞線維症全国調査 二次調査の解析 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性膵疾患に関する調査研究」平成23年度総括・分担研究報告書 2012: 341-354。
3. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1178-84。
4. Role of CFTR in airway disease. Pilewski JM, Frizzell RA. *Physiol Rev.* 1999; 79 (Suppl 1): S215-55。
5. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related dis-

- eases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 511-26.
6. 成瀬 達. 膵嚢胞線維症の診断基準. 膵嚢胞線維症の診療の手引き (大槻 眞, 成瀬 達編). *アークメディア* 2008: 18-19.
 7. Sziegoleit A, Krause E, Klör HU, Kanacher L, Linder D. Elastase I and chymotrypsin B in pancreatic juice and feces. *Clin Biochem* 1989; 22: 85-9.
 8. Stein J, Jung M, Sziegoleit A, Zeuzem S, Caspary WF, Lembcke B. Immunoreactive elastase I: clinical evaluation of a new noninvasive test of pancreatic function. *Clin Chem* 1996; 42: 222-6.
 9. Naruse S, Ishiguro H, Ko SB, Yoshikawa T, Yamamoto T, Yamamoto A, Futakuchi S, Goto H, Saito Y, Takahashi S. Fecal pancreatic elastase: a reproducible marker for severe exocrine pancreatic insufficiency. *J Gastroenterol*. 2006; 41: 901-8.
 10. Cade A, Walters MP, McGinley N, Firth J, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of fecal pancreatic elastase-1 as a measure of pancreatic exocrine function in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 172-6.
 11. Walkowiak J, Nousia-Arvanitakis S, Agguridaki C, Fotoulaki M, Strzykala K, Balassopoulou A, et al. Longitudinal follow-up of exocrine pancreatic function in pancreatic sufficient cystic fibrosis patients using the fecal elastase-1 test. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 474-8.
 12. Hahn JU, Bochnig S, Kerner W, Koenig H, Sporleder B, Lankisch PG, et al. A new fecal elastase 1 test using polyclonal antibodies for the detection of exocrine pancreatic insufficiency. *Pancreas* 2005; 30: 189-91.
 13. 成瀬 達, 星野三生子, 若月 準, 伊藤 治, 中島 守, 木村 純, 柴田時宗, 近藤志保, 中莖みゆき, 山本明子, 石黒 洋, 藤木理代, 北川元二. 便中エラスターゼによる乳幼児の膵外分泌不全の診断. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「難治性膵疾患に関する調査研究」平成24年度総括・分担研究報告書 2013: 259-263.
 14. 石黒 洋, 山本明子, 中莖みゆき, 成瀬 達, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 正宗 淳, 菊田和宏, 下瀬川 徹, 新井勝大, 泉川公一, 今井博則, 影山さち子, 加藤忠明, 漢人直尚, 慶長直人, 洪 繁, 小島大英, 坂本修, 佐藤陽子, 真田幸弘, 清水直樹, 小路誠一, 相馬義郎, 東馬智子, 藤木理代, 柳元孝介. 膵嚢胞線維症 (嚢胞性線維症 CF) 登録制度. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「難治性膵疾患に関する調査研究」平成24年度総括・分担研究報告書 2013: 225-247.
 15. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Ann Rev Genet* 1995; 29: 777-807.
 16. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008; 153: S4-S14.
 17. Stallings VA, Stark LJ, Robinson KA, Feranchak AP, Quinton H. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. *J Am Diet Assoc*. 2008; 108: 832-9.
 18. 石黒 洋, 成瀬 達, 山本明子, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 菊田和宏, 下瀬川徹. 膵嚢胞線維症患者の栄養障害の実態と治療の現況. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「難治性膵疾患に関する調査研究」平成23年度総括・分担研究報告書 2012: 359-364.
 19. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 正宗 淳, 下瀬川徹. 膵嚢胞線維症の新規および未承認薬の現況. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「難治性膵疾患に関する調査研究」平成24年度総括・分担研究報告書 2013: 248-252.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 成瀬 達, 柴田時宗, 近藤志保, 中莖みゆき, 山本明子, 藤木理代, 北川元二, 石黒 洋. 便中エラスターゼによる小児の膵外分泌不全の診断. 第44回日本膵臓学会大会. 仙台. 2013年7月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし