



Title	十二指腸液中のメタボローム解析に基づいた膵胆道疾患の診断に関する研究
Author(s)	岸, 法磨
Description	配架番号 : 2824
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15890号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15890
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92032
Type	doctoral thesis
File Information	KISHI_Kazuma.pdf



学位論文

十二指腸液中のメタボローム解析に基づいた膵胆道
疾患の診断に関する研究

(Metabolomics of duodenal juice for diagnosis of
pancreaticobiliary diseases)

2024年3月

北海道大学

岸 法磨

学位論文

十二指腸液中のメタボローム解析に基づいた膵胆道
疾患の診断に関する研究

(Metabolomics of duodenal juice for diagnosis of
pancreaticobiliary diseases)

2024年3月

北海道大学

岸 法磨

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	5 頁
方法	7 頁
結果	11 頁
考察	26 頁
結論	29 頁
謝辞	30 頁
利益相反	31 頁
引用文献	32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Kazuma Kishi, Masaki Kuwatani, Yuki Ohnishi, Yasuhiro Kumaki,
Hiroyuki Kumeta, Hajime Hirata, Yunosuke Takishin, Ryutaro Furukawa,
Kosuke Nagai, Hiroki Yonemura, Shunichiro Nozawa, Ryo Sugiura,
Kazumichi Kawakubo, Tomoyasu Aizawa and Naoya Sakamoto
Metabolomics of Duodenal juice for Biliary Tract Cancer Diagnosis.

Cancers (Basel). 15(17):4370, 2023.

本研究は以下の学会に発表した。

・岸 法磨、栗谷 将城、小田 総一郎、白鳥 翔也、野澤 俊一郎、
米村 洋輝、杉浦 諒、川久保 和道、坂本 直哉

十二指腸液中のメタボローム解析による胆道良悪性疾患の鑑別

第 59 回日本胆道学会学術集会, 2023 年 9 月 14- 9 月 15 日・札幌

・ Kazuma Kishi, Masaki Kuwatani, Yuki Ohnishi, Yasuhiro Kumaki,
Hiroyuki Kumeta, Hajime Hirata, Yunosuke Takishin, Ryutaro Furukawa,
Kosuke Nagai, Hiroki Yonemura, Shunichiro Nozawa, Ryo Sugiura,
Kazumichi Kawakubo, Tomoyasu Aizawa, Naoya Sakamoto.

Metabolomics of duodenal juice for differentiating pancreatic cancer from
benign disease.

55th European Pancreatic Club (EPC) meeting, 2023 年 6 月 28- 7 月 1 日・

アルプバッハ

要旨

【背景と目的】

膵臓癌・胆道癌は5年生存率がそれぞれ10%以下、30%以下と極めて予後不良な疾患である。これは、早期の診断法が確立されておらず、患者の多くが進行した状態で診断されるためであり、新たな補助診断ツールが求められる。診断法には、内視鏡的逆行性胆管膵管造影法（ERCP）を用いた膵管や胆道狭窄部の鉗子生検、ブラシ擦過細胞診、膵液・胆汁の細胞診があるが、いずれも感度や正診率は高くはないのが現状である。また、ERCPには膵炎などの有害事象のリスクがあるが、胆汁や膵液を含む十二指腸液は安全に採取可能である。近年、血液や胆汁などを用いてゲノム、プロテオーム、メタボロームを解析し、バイオマーカーを探るマルチオミックスの研究が進められている。その中でメタボロームは遺伝子産物の最も下流に位置し、メタボロームの変化が疾患によって生じた体内の変化を鋭敏に反映している可能性があり、解析対象数もマルチオミックスの中では少なく比較的解析しやすいとされる。そこで本研究では、安全に採取可能な十二指腸液中のメタボロームを解析し、膵胆道疾患の新たな診断法開発に向けて、良悪性疾患間の違いを明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

2021年10月から2023年1月までの間、当院において膵胆道病変が疑われ、上部消化管内視鏡検査・超音波内視鏡検査(EUS)・ERCP・EUSガイド下穿刺検査(EUS-FNA)のいずれかによる診療を受けた163例を対象とした。サンプルである十二指腸液は、上記検査の際に側孔を有するカテーテル(PR-130Q)を用いて Vater 乳頭部近傍の十二指腸管腔より採取した。その後800MHzの核磁気共鳴装置にて測定を行った。本研究では外科的切除標本（非切除例ではERCP時の病理学的診断、もしくは6ヶ月以上の臨床経過）による悪性診断を基準とした。得られたスペクトルを解析してメタボロームの同定を行い、良悪性疾患間にて比較を行なった。

【結果】

163例の内、胆道疾患群は67例、膵臓疾患群は102例であった（6例が両疾患群間で重複）。その全てで十二指腸液中のメタボローム解析が可能であった。

胆道疾患群：全67例の内、悪性疾患群が33例、良性疾患群が34例であった。悪性疾患群の年齢中央値は73歳、性別は男性21例、女性12例であった。悪性疾患の内訳は胆管癌26例、胆嚢癌5例、Vater乳頭部癌が2例であった。腫瘍マーカーである血清CA19-9の中央値は101.3 U/mLであった。良性疾患群の年齢中央値は64.5歳、性別は男性13例、女性21例であった。良性疾患の内訳は胆道結石16例、胆嚢ポリープ7例、画像検査上で異常なし6例、胆

膵腺筋腫症 3 例, IgG4 関連疾患 1 例, 慢性胆嚢炎が 1 例であった。腫瘍マーカーである血清 CA19-9 の中央値は 17.5 U/mL であった。

膵臓疾患群：全 102 例の内, 悪性疾患群が 49 例, 良性疾患群が 53 例であった。悪性疾患群の年齢中央値は 72 歳, 性別は男性 29 例, 女性 20 例であった。悪性疾患の内訳は膵管癌 46 例, IPMC 2 例, 転移性膵腫瘍が 1 例であった。腫瘍マーカーである血清 CA19-9 の中央値は 128 U/mL であった。良性疾患群の年齢中央値は 66 歳, 性別は男性 23 例, 女性 30 例であった。良性疾患の内訳は IPMN 20 例, 膵嚢胞 10 例, 急性/慢性膵炎 7 例, 神経内分泌腫瘍 (NET G1) 7 例, 画像検査上で異常なし 6 例, IgG4 関連疾患が 3 例であった。腫瘍マーカーである血清 CA19-9 の中央値は 13.45 U/mL であった。

検出されたメタボロームの数は全体で平均 23 種類であった。その内, 胆道疾患, 膵臓疾患ともに悪性群で有意に acetone 濃度が高かった {平均濃度(膵臓疾患群)：悪性 0.038mM vs 良性 0.016mM, $P<0.05$; 平均濃度(胆道疾患群)：悪性 0.0347mM vs 良性 0.0166mM, $P<0.05$ }。膵癌診断の ROC 曲線解析においては, 十二指腸液 acetone 濃度(感度:0.851, 特異度:0.776)は血清 CA19-9 値(感度:0.709, 特異度:0.722)と同等以上の成績であった (AUC:0.847 vs 0.733, $P=0.0757$)。また, 胆道癌診断の ROC 曲線解析においては, 十二指腸液 acetone 濃度(感度:0.697, 特異度:0.733)は血清 CA19-9 値(感度:0.941, 特異度:0.485)と同等の成績であった (AUC:0.733 vs 0.691, $P=0.697$)。

【考察】

十二指腸液中のメタボローム解析は施行可能, かつ有用であった。主要評価項目である膵胆道疾患における十二指腸液中メタボロームの違いに関しては, acetone 濃度において, 有意に悪性群で高い結果であり, 膵胆道疾患の悪性診断における補助的診断ツールになり得ることが実証された。

ケトン体 (acetone や 3-hydroxybutyrate など) は, 生物学的防御反応として腫瘍増殖を抑制し, 癌悪液質を改善することが報告されているが, その役割は明確ではなく, いまだ議論されている段階である。血清メタボロミクスに関する他の報告では, 膵臓癌や前立腺癌患者の血清中には, 健常者よりも acetone が多く含まれていることが示されている。一般的に, 正常細胞はグルコース飢餓時にケトン体を代謝燃料として利用するが, 多くの腫瘍細胞はミトコンドリア機能障害やケトン体分解酵素の欠乏によりケトン体を非効率的に利用することが示されている。以上により, 悪性疾患患者ではケトン体がより豊富に存在すると推測され, 今回の結果とも矛盾はしないと考えられた。

【結論】

十二指腸液のメタボロミクスは, 膵胆道疾患における悪性・良性の鑑別診断法として実施可能であり, かつ有用である。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AUC	Area under the concentration-time curve
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CT	Computed tomography
ERCP	Endoscopic retrograde cholangiopancreatography
EUS	Endoscopic ultrasonography
EUS-FNA	Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
IPMC.	Intraductal papillary mucinous carcinoma
IPMN	Intraductal papillary mucinous neoplasm
MRCP	Magnetic resonance cholangiopancreatography
MRI	Magnetic resonance imaging
MS	Mass spectrometry
NET	Neuroendocrine tumor
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
OPLS-DA	Orthogonal partial least squares-discriminant analysis
ROC	Receiver operating characteristic
TSP	Trimethylsilyl propanoic acid
UICC	Union for International Cancer Control
VIP	Variable importance for prediction

緒言

膵臓癌・胆道癌は5年生存率がそれぞれ10%以下、30%以下と極めて予後不良な疾患である (Mizrahi et al.,2020; Rebecca et al.,2019; Valle et al.,2021) . これは各種の癌の診断効率が飛躍的に向上している現代においても、早期の診断法が確立されておらず、患者の多くが進行した状態で診断されるためである (Endo et al.,2008; Siegel et al.,2019) . 現在, CA19-9 のような血清腫瘍マーカーは, バイオマーカーとして一般的に用いられており (Steinberg et al.,1990; Perkins et al.,2003) , 膵癌・胆道癌における血液腫瘍マーカーの検出感度は70~80%・69%と報告されているが, その多くを切除不能な進行癌が占めているのが現状である (膵癌診療ガイドライン., 2019; 胆道診療ガイドライン., 2019). さらに, 血清腫瘍マーカーは, 他の癌腫や良性疾患でも上昇するとされている. 内視鏡的逆行性胆道膵管造影 (ERCP) は, 生検による膵胆道疾患の病理診断が可能である (図 1) が, 検出感度は30-70%と診断には不十分である (Navaneethan et al.,2015; Hatfield et al.,1976; Kameya et al.,1981; Burnett et al.,2013). また, 内視鏡の進歩にもかかわらず, 膵炎などの ERCP に関連する有害事象の割合は10-12%と高く (Siiki et al.,2012; Kapral et al.,2012) , 慎重な検査の適応が求められる. したがって, より安全で簡便な診断方法が必要である.

現在, 唾液・血液・組織などを用いてゲノム, プロテオーム, メタボロームなどを解析し, バイオマーカーや病気の原因を探るマルチオミックスの研究が進められている. その中でメタボロームは, 遺伝子産物の最も下流に位置しており, メタボロームの変化が疾患によって生じた体内の変化を鋭敏に反映している可能性がある (Saigusa et al.,2021) . また, メタボロミクスは, ゲノミクスやトランスクリプトミクスに比べて解析対象物質が少ないため, 比較的容易にメタボロームを解析できるという利点がある (Davis et al.,2011) . 血液や尿, 胆汁, 膵液などの体液を用いたメタボロミクスの先行研究では, メタボロームが疾患特異的なプロファイルの指標となり得ることが示されている (Gomase et al.,2008; Napoli et al.,2012; Mayerle et al.,2018; Markar et al.,2018) . 血液メタボロミクスに関しては Lenka らは, 膵臓癌患者において 3-hydroxybutyrate や mannose などの代謝物の濃度が有意に高いことを報告している (Lanka et al.,2021) . 胆汁メタボロミクスに関しては, Urman らは valine および formic acid 濃度が胆道癌患者において, acetate と phosphocholine 濃度が膵癌患者において有意に上昇していることを報告している (Jesus et al.,2020) . 膵液のメタボロミクスに関しては, Cortese らは膵臓がん患者において, lactic acid が有意に増加することを報告している (Nina et al.,2020) . し

かしながら内視鏡的逆行性胆管膵管造影 (ERCP) で胆汁や膵液を採取するには、膵炎や胆管炎などの有害事象のリスクがある (Akashi et al.,2002) . 一方、十二指腸液には胆汁と膵液が含まれ、食道胃十二指腸内視鏡検査や超音波内視鏡検査 (EUS) で容易、かつ安全に採取可能である。そこで、本研究では十二指腸液のメタボロミクスに着目した。

十二指腸液の分析では、Kisiel らがメチル化 DNA が膵臓癌の有望な早期診断マーカーになり得ることを報告している (Kisiel et al.,2015) . Matsunaga らは、十二指腸液中のタンパク質マーカーである S100P の濃度を測定し、膵臓癌患者と良性対照疾患患者を感度 85%、特異度 77%で識別できることを報告した (Matsunaga et al.,2017) . しかし、十二指腸液分析の応用はまだ日常臨床には至っておらず、実験的な使用に限られている。

メタボローム解析には、質量分析 (MS) 法と核磁気共鳴 (NMR) 法という 2 つの主要な方法がある。MS 法には、キャピラリー電気泳動-MS, ガスクロマトグラフ-MS, 液体クロマトグラフ-MS がある。MS 法は高感度であるが、単一の手法で広範囲のメタボロームを同定することは困難であり、再現性が低いことに加え、いくつかの前処理工程が必要である。一方、NMR 法は MS 法と比較して感度が劣るものの、単独の方法で広範囲のメタボロームを分析でき、前処理も簡便でデータの再現性が高いため、診断マーカーの同定により有用な方法と考えられている (Dumas et al.,2006) . そこで本研究では、効果的かつ低侵襲な代替診断法として、十二指腸液の NMR 法を用いたメタボローム解析により、膵胆道疾患の新たな診断法開発に向けて、膵胆道疾患において良悪性疾患間でのメタボロームの違いを明らかにすることを目的とした。

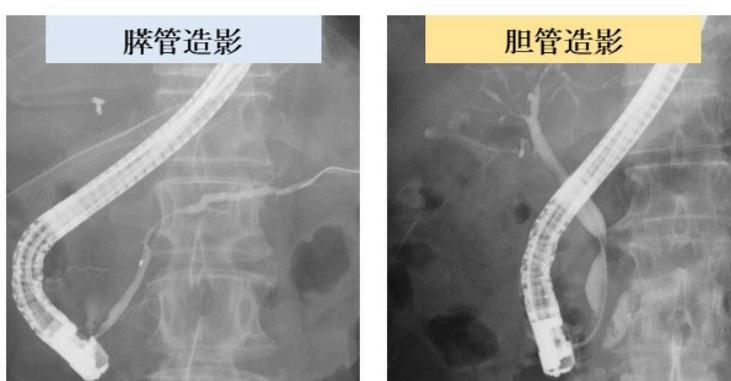


図 1. ERCP における膵管造影および胆管造影

診断だけでなく閉塞に対するドレナージ目的にも行い、処置中に膵液や胆汁を回収することができる。

方法

1. 試験デザイン

単施設による前向き観察研究であり、UMIN 臨床試験登録システムに登録を行った(UMIN000045675).

2. 対象患者

2021 年 10 月から 2023 年 1 月までの間に北海道大学病院消化器内科を受診者し、膵胆道病変が疑われた者を対象とした。適格基準は、1) 膵胆道病変が疑われ（血清肝胆道系酵素・膵酵素上昇、血清腫瘍マーカー(CA19-9, CEA, DUPAN-2, Span-1)上昇や腹部超音波検査, CT, MRI, positron emission tomography(PET)-CT, EUS において膵・胆道に異常を呈する者）、上部消化管内視鏡検査・EUS・ERCP・EUS-FNA のいずれかによる診療を受ける者、2) 本研究への参加について自由意思による文書同意が得られた者、とした。

除外基準は、1) 経口および経鼻内視鏡の挿入が不可能な者、2) 研究担当者が研究対象者として不適当と判断した者、とした。

なお、本研究は「ヘルシンキ宣言 (2013 年 10 月修正版)」及び「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針 (平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」を遵守して実施された。また、あらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会による承認および研究機関の長の許可を得て行われた (自主臨床研究番号: 自 021-0042)。研究担当者は、審査委員会で承認の得られた同意説明文書を研究対象者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、研究対象者の自由意思による同意を文書で取得した。

3. 解析までの work flow

解析までの work flow を図 2 に示す。

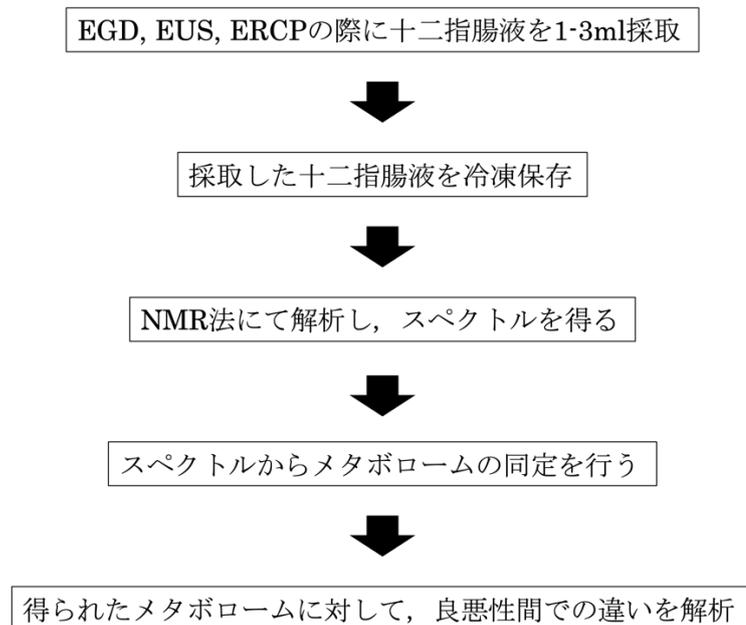


図 2. 本研究の work flow.

3.1. サンプルの回収

EUS, ERCP, EUS-FNA を行う際は、スコープ (ERCP : TJF-260V・オリンパスメディカルシステムズ・東京・日本, EUS および EUS-FNA : UCT-260・オリンパスメディカルシステムズ・東京・日本) を十二指腸下行脚まで挿入し、側孔を有するカテーテル (PR130Q : オリンパス製) を粘膜に軽く押し当て、Vater 乳頭周囲に溜まった十二指腸液を採取した。食物や薬物の混入の影響をできるだけ排除するため、検査前には食事と服薬を中止するよう患者に指示した。さらに、十二指腸液を採取する前に胃の貯留液を吸引してから十二指腸液を採取した。検体は採取後に隣酵素の活性を抑制するために、蛋白分解酵素であるアプロチニンを添加した採血管 (LSI メディエンス株式会社、東京、日本) で保存し、測定まで -30°C で冷凍保存した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定では、ケミカルシフトの標準物質としてトリメチルシリルプロパン酸 (TSP) を用いた。まず、試料を 4°C の水で溶解し、 15000 rpm で 15 分間、 4°C にて遠心分離を行なった。その後、 $700\ \mu\text{L}$ の上清を集め、 $2\ \text{mL}$ チューブ (Eppendorf manufacturing corporate, Enfield, CT, USA) に注意深く移し、再度 4°C , 15000rpm , 15 分間で遠心分離した。その後、その上清 $540\ \mu\text{L}$ を回収し、別の $2\ \text{mL}$ チューブに移し、そこに緩衝液 ($500\ \text{mM NaP}$: $\text{pH } 7.4$, $5\ \text{mM TSP}$, $100\% \text{ D}_2\text{O}$, $0.04\% \text{ NaN}_3$, $10\ \text{mM}$ ギ酸塩) を $60\ \mu\text{L}$ 加えた。そのチューブを再度 4°C , 15000 rpm で 15 分間遠心分離し、最終的

にその上清 550 μL を測定用の 5 mm NMR チューブに注入し、それを NMR 測定に用いた。

3.2. NMR 測定と得られたメタボロームの解析

すべてのスペクトルは NMR スペクトロメーター (Bruker Biospin Advance Neo 800MHz) を用いて取得し、温度は 25°C に設定した。 ^1H 一次元 NOESY 及び Presaturation 法による水溶媒信号の消去を行うパルスシーケンスにより得られたスペクトルは、TopSpin 3.5 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) を用いて位相補正を行った。Chenomx NMR suite を用いて、TSP コントロール領域を標準濃度として、その後スペクトルのケミカルシフト及びカップリングのパターンから各メタボロームの同定と定量を行った。データ解析には SIMCA-P version 17 (Umetrics, Umea, Sweden) を使用し、Orthogonal Projections to Latent Structure-Discriminant Analysis (OPLS-DA) を行い、本研究において良性群と悪性群を最大に分解する判別モデルを作成した。その後、Variable Importance of Projection (VIP) により、判別への寄与要因を検討した。VIP は各変数の判別モデル作成への寄与度を表し、VIP > 1.0 の代謝物を寄与代謝物とした。VIP が大きいほど寄与度が高く、代謝物濃度の解析では、臨床情報に関して盲検化された方法で測定した。

3.3 統計解析

すべての統計解析は、SIMCA-P 17 (Umetrics, Umea, Sweden) およびフリーソフトウェア EZR version 2.8-0 (accessed on 18 February 2023 at <https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>) を用いた。フィッシャーの正確検定を行った上で、 p 値 < 0.05 を統計学的に有意とみなした。2 群間の差の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。また、ROC (Receiver Operating Characteristic) 分析はロジスティック回帰に基づいて行った。

4. 悪性腫瘍/良性疾患の定義

最終診断は、病理専門医による EUS-FNA、鉗子生検検体を用いた病理学的評価、切除標本の病理学的評価に基づいた悪性所見、または 6 ヶ月以上の観察期間中における CT や腹部超音波検査などの画像所見と臨床経過による明らかな増悪とした。良性疾患は病理学的評価および最新のガイドラインに従い、診断記事準を満たしたものを最終診断とした。

5. 評価項目

主要評価項目は膵胆道疾患における良悪性別の十二指腸液中メタボロームとその相違とした。副次評価項目は、疾患別の十二指腸液中メタボロームとその相違とした。

6. 症例設定数

十二指腸液を用いたメタボローム解析に関する先行研究がないことより、当院における年間の EUS-FNA 症例数および解析可能数をもとに、目標症例数を 200 例と設定した。

2018 年：160 例

2019年：169例

2020年：158例

結果

1. 患者背景

設定した期間中、対象となる患者のうち、解析可能な十二指腸液を採取できたのは 163 例であった。それらを胆道疾患群、膵臓疾患群に分類し、胆道疾患群は 67 例、膵臓疾患群は 102 例（6 例が両疾患群間で重複）であった。

1.1. 患者背景（胆道疾患群 67 例）

胆道疾患群の患者背景を表 1 に示す。年齢中央値は 69 歳（範囲 27–96 歳）、男性 34 例（50.5%）、女性 33 例（49.5%）であった。胆道疾患の最終診断の内訳は、悪性疾患は胆管癌 26 例（78.7%）、胆嚢癌 5 例（15.2%）、十二指腸乳頭部癌 2 例（6.1%）であり、良性疾患は胆管結石/胆嚢結石 16 例（47.2%）、胆嚢ポリープ 7 例（20.6%）、画像上異常なし 6 例（17.6%）、胆嚢腺筋腫症 3 例（8.8%）、IgG4 関連硬化性胆管炎 1 例（2.9%）、慢性胆嚢炎 1 例（2.9%）であった。悪性 33 例のうち、The Union for International Cancer Control (UICC) 第 8 版による病期分類では I 期が 3 例（9.2%）、II 期が 9 例（27.2%）、III 期が 12 例（36.4%）、IV 期が 9 例（27.2%）であった。腫瘍マーカーは CA19-9 中央値 53.75 U/ml（範囲 2.1-167959.3 U/ml）であった。

表 1. 患者背景（胆道疾患群）

患者背景	対象患者 67 例
年齢, 中央値 (範囲)	69 歳 (27-96)
性別, n (%)	
男性	34 例 (50.5)
女性	33 例 (49.5)
膵疾患内訳, n (%)	
悪性疾患	
胆管癌	26 例 (78.7)
胆嚢癌	5 例 (15.2)
十二指腸乳頭部癌	2 例 (6.1)
良性疾患	
胆管結石/胆嚢結石	16 例 (47.2)
胆嚢ポリープ	7 例 (20.6)
画像上異常なし	6 例 (17.6)
胆嚢腺筋腫症	3 例 (8.8)
IgG4 関連硬化性胆管炎	1 例 (2.9)
慢性胆嚢炎	1 例 (2.9)
悪性腫瘍における UICC 病期分類, n (%)	
I	3 例 (9.2)
II	9 例 (27.2)
III	12 例 (36.4)
IV	9 例 (27.2)
腫瘍マーカー中央値	
CA19-9, 中央値 (範囲)	53.75 U/mL (2.1-167959.3)

1.2 患者背景（膵臓疾患群 102 例）

膵臓疾患群の患者背景を表 2 に示す。年齢中央値は 70 歳（範囲 27-86 歳）、男性 52 例（51%）、女性 50 例（49%）であった。膵臓疾患の最終診断の内訳は、悪性疾患は膵管癌 46 例（94%）、膵管内乳頭粘液性腺癌（IPMC）2 例（4%）、転移性膵腫瘍 1 例（2%）であり、良性疾患は膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）20 例（37.7%）、膵嚢胞 10 例（18.8%）、急性/慢性膵炎 7 例（13.3%）、神経内分泌腫瘍 7 例（13.3%）、画像上異常なし 6 例（11.3%）、IgG4 関連疾患 3 例（5.6%）であった。悪性 49 例のうち、UICC 第 8 版による病期分類では I 期が 15 例（30.6%）、II 期が 15 例（30.6%）、III 期が 5 例（8.2%）、IV 期が 14 例（30.6%）であった。腫瘍マーカーは CA19-9 中央値 33.5 U/ml（範囲 2.1-32882161 U/ml）であった。

表 2. 患者背景 (膵臓疾患群)

患者背景	対象患者 102 例
年齢, 中央値(範囲)	70 歳 (27–86)
性別, n(%)	
男性	52 例 (51)
女性	50 例 (49)
膵臓疾患内訳, n (%)	
悪性疾患	
膵管癌	46 例 (94)
IPMC	2 例 (4)
転移性膵腫瘍	1 例 (2)
良性疾患	
IPMN	20 例 (37.7)
膵嚢胞	10 例 (18.8)
急性/慢性膵炎	7 例 (13.3)
神経内分泌腫瘍	7 例 (13.3)
画像上異常なし	6 例 (11.3)
IgG4 関連疾患	3 例 (5.6)
悪性腫瘍における UICC 病期分類, n (%)	
I	15 例 (30.6)
II	15 例 (30.6)
III	5 例 (8.2)
IV	14 例 (30.6)
腫瘍マーカー中央値 CA19-9, 中央値 (範囲)	33.5 U/mL (2.1–32882161)

2. 得られた NMR スペクトル

両群のすべての回収十二指腸液サンプルについて良好な NMR スペクトルが得られた。一般的なスペクトルの特徴は類似しており、胆汁酸・コレステロール・脂肪酸・その他の脂質成分領域 (2.5-0.5ppm) に大きなピークが観測された (図 3)。

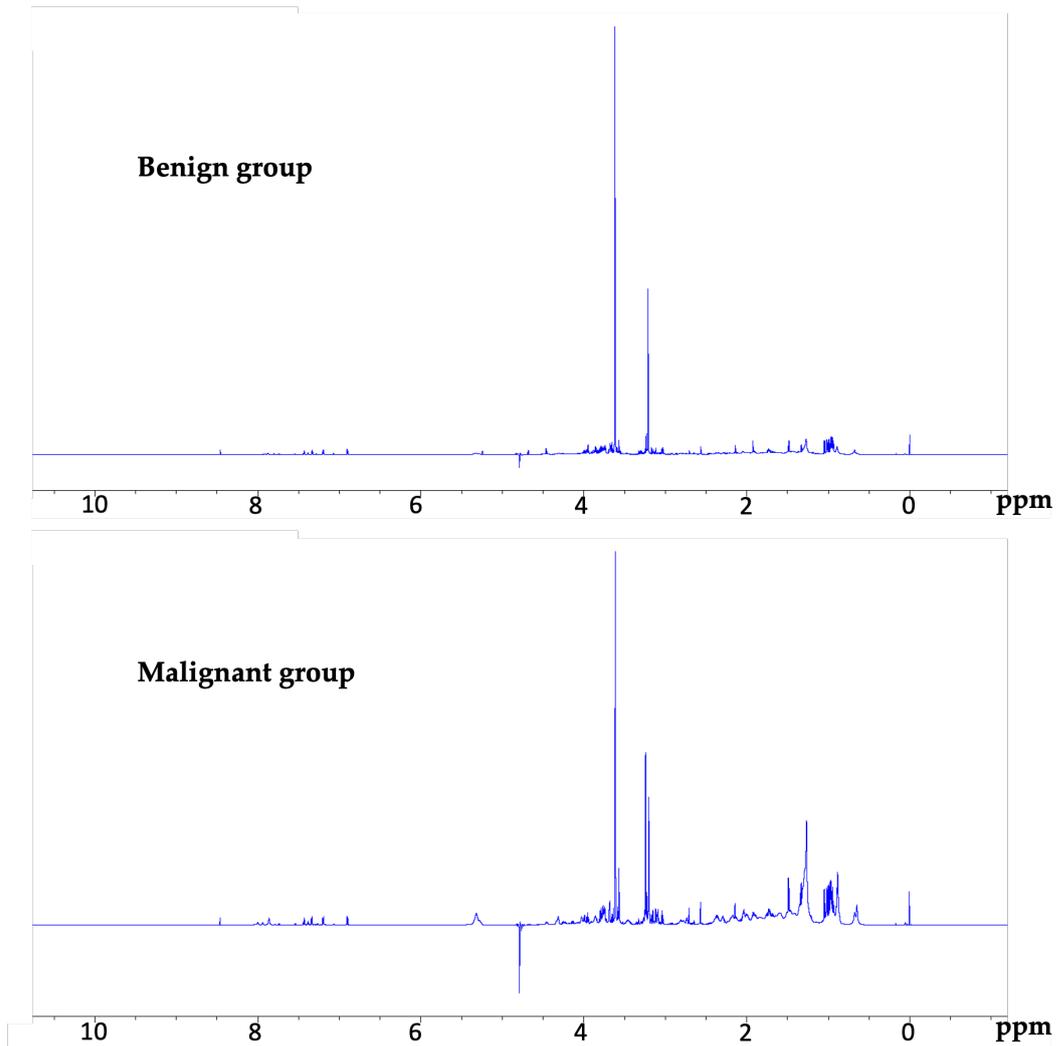


図 3. 良性群 (Benign group)と悪性群 (Malignant group)の NMR スペクトルの例.

一般的なスペクトルの特徴は両群で類似していた.

3. 代謝物（メタボローム）の検出

代謝物はケミカルシフト及びカップリングのパターンに基づいて同定した（図 4）。十二指腸液サンプルの NMR スペクトルから平均 23 種類の代謝物が検出され、必須アミノ酸（valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, threonine など）、非必須アミノ酸（alanine, tyrosine, asparagine, glutamate など）、ケトン体（acetone, 3-hydroxybutyrate）等を同定することができた。

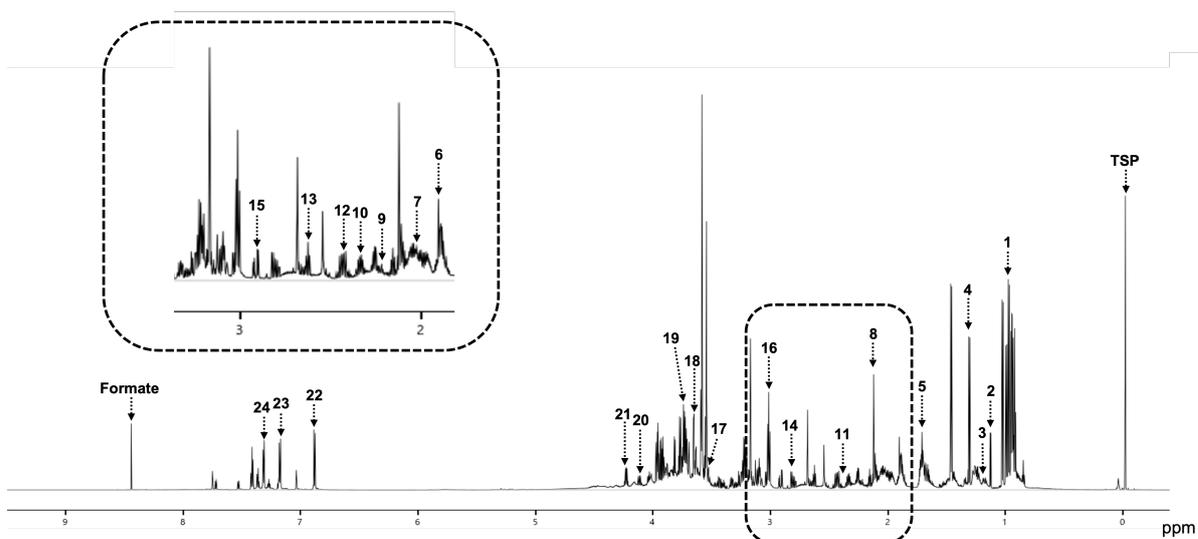


図 4. NMR スペクトルにおける信号帰属の例.

1. Isoleucine ; 2. Propylene glycol ; 3. 3-Hydroxybutyrate ; 4. Lactate ; 5. Leucine ; 6. Acetate ; 7. Valine ; 8. Alanine ; 9. Acetone ; 10. Glutamate ; 11. Pyruvate ; 12. Glutamine ; 13. Methionine ; 14. Aspartate ; 15. Asparagine ; 16. Lysine ; 17. Glycerol ; 18. Ethanol ; 19. Arginine ; 20. プロリン ; 21. Threonine ; 22. Tyrosine ; 23. Tryptophan ; 24. Phenylalanine
TSP : Trimethylsilyl propanoic acid

3.1. 胆道疾患群

同定された代謝物とその平均濃度を表 3 に最高濃度から最低濃度まで順に示した。ロイシンが最高濃度（1.33 mM）、アセトンが最低濃度（0.03 mM）であった。悪性群と良性群で同定された代謝物の種類（必須アミノ酸、非必須アミノ酸、ケトン体）に差はなかった。

表 3. 胆道疾患群における同定したメタボローム.

番号	メタボライト	平均濃度 (mM)
1	Leucine	1.33
2	Alanine	1.11
3	Valine	1.09
4	Isoleucine	0.92
5	Glycerol	0.87
6	Lysine	0.85
7	Phenylalanine	0.73
8	Ethanol	0.68
9	Tyrosine	0.66
10	Arginine	0.63
11	Proline	0.57
12	Threonine	0.53
13	Glutamine	0.52
14	Glutamate	0.42
15	Asparagine	0.33
16	Methionine	0.26
17	Tryptophan	0.25
18	Propylene glycol	0.20
19	Aspartate	0.20
20	Lactate	0.19
21	Acetate	0.19
22	3-Hydroxybutyrate	0.05
23	Pyruvate	0.03
24	Acetone	0.03

3.2. 膵臓疾患群

同定された代謝物とその濃度を表4に最高濃度から最低濃度まで示したが、ロイシンが最高濃度（1.09 mM）、アセトンが最低濃度（0.03 mM）であった。悪性群と良性群で同定された代謝物の種類（必須アミノ酸、非必須アミノ酸、ケトン体）に差はなかった。

表4. 膵臓疾患群における同定したメタボローム。

番号	メタボライト	平均濃度 (mM)
1	Leucine	1.09
2	Glycerol	0.93
3	Alanine	0.91
4	Valine	0.88
5	Ethanol	0.88
6	Lysine	0.85
7	Isoleucine	0.73
8	Arginine	0.59
9	Threonine	0.58
10	Tyrosine	0.55
11	Phenylalanine	0.54
12	Proline	0.52
13	Glutamine	0.49
14	Glutamate	0.45
15	Asparagine	0.42
16	Methionine	0.23
17	Lactate	0.22
18	Propylene glycol	0.21
19	Aspartate	0.21
20	Tryptophan	0.19
21	Acetate	0.17
22	3-Hydroxybutyrate	0.06
23	Pyruvate	0.03
24	Acetone	0.03

4. OPLS-DA による統計分析.

4.1. 胆道疾患群

良性疾患か悪性疾患かの病理学的あるいは臨床的判別に寄与する代謝物の判別分析を OPLS-DA によって評価した (図 5) . さらに, 同定された代謝物の VIP 値から, acetone, 3-hydroxybutyrate, isoleucine, arginine, methionine, phenylalanine, tryptophan, valine が悪性と良性の判別に寄与することが示された (図 6) . これら 8 つの代謝物の良性群と悪性群のそれぞれの濃度を比較すると, acetone だけが悪性群で有意に多く, 他の 7 つの代謝物には有意差は認められなかった (図 7) .

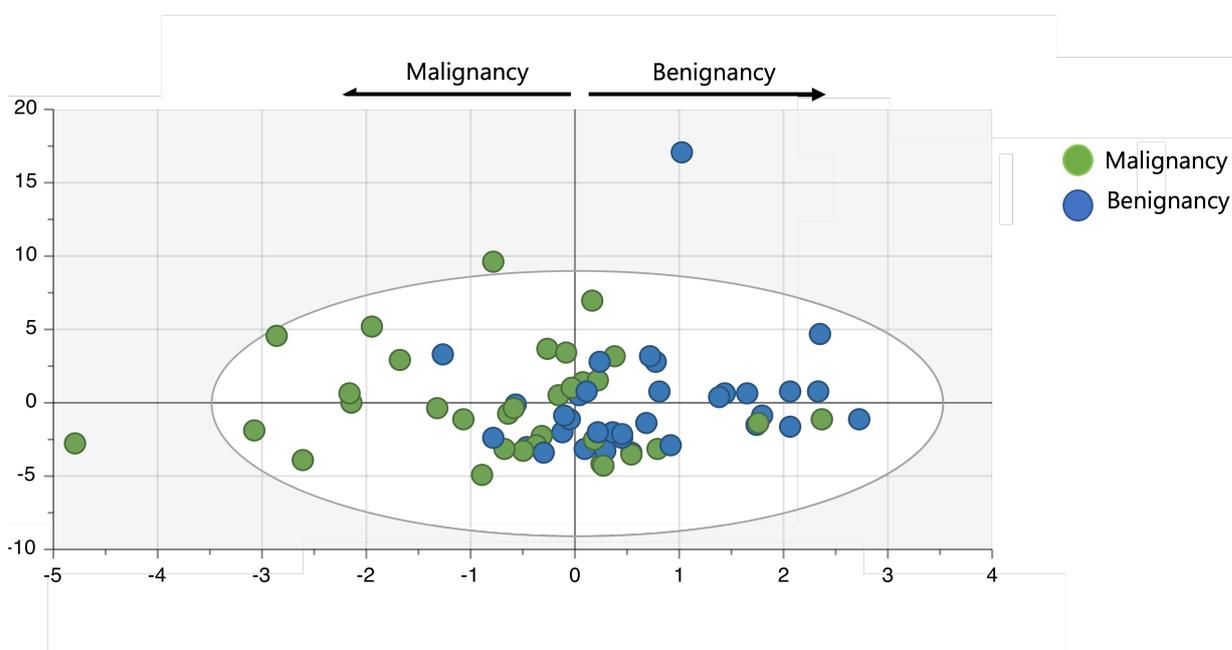


図 5. 胆道疾患群における OPLS-DA.

データには良性, もしくは悪性の情報が与えられ, 統計学的に 2 つのカテゴリに分類されることがわかった.

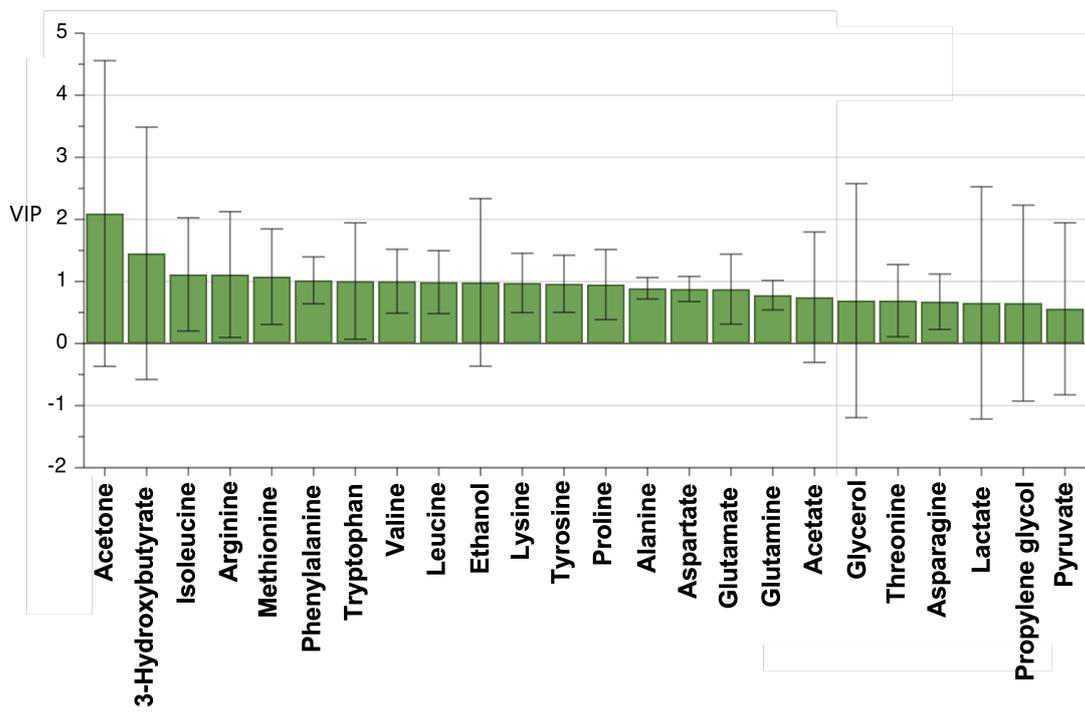


図 6. 胆道疾患群における代謝物の VIP 値.

VIP 値が 1.0 より大きいものは重要な変数を示し, acetone, 3-hydroxybutyrate, isoleucine, arginine, methionine, phenylalanine, tryptophan, valine が抽出された. 各棒および線は 95%信頼区間を含む平均を表す.

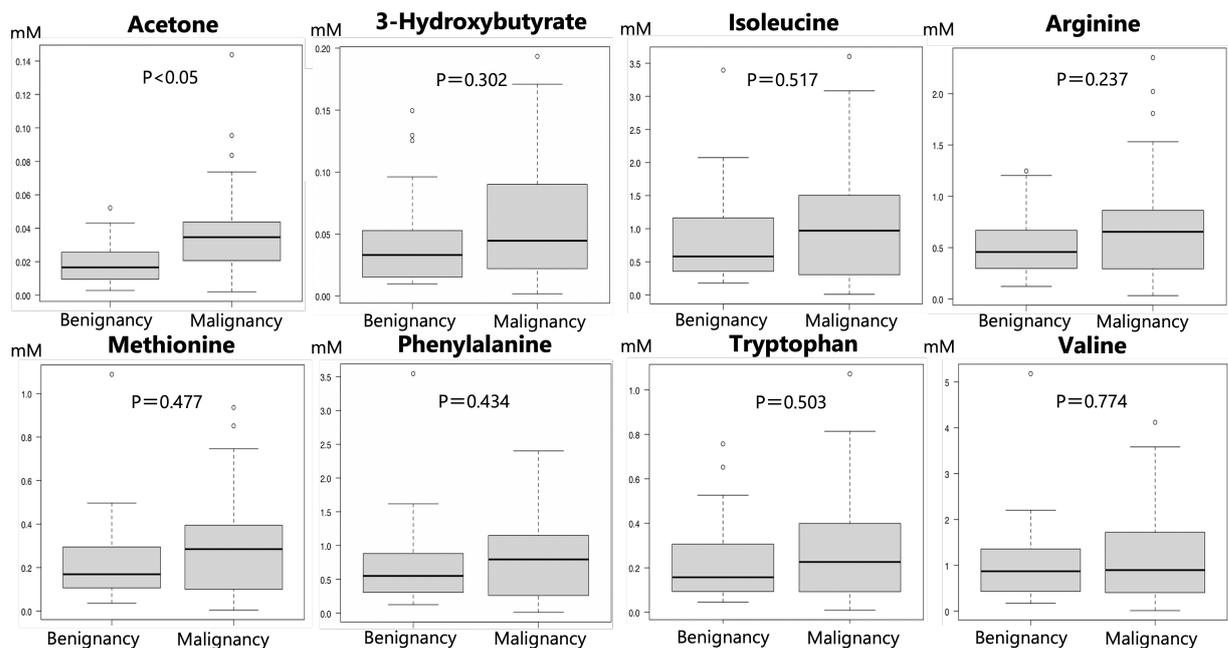


図 7. 胆道疾患群における OPLS-DA における悪性群と良性群の鑑別に寄与した代謝物の濃度.

acetone のみが悪性群で有意に高濃度であった.

4.2. 膵臓疾患群

良性疾患か悪性疾患かの病理学的あるいは臨床的判別に寄与する代謝物の判別分析を OPLS-DA によって評価した (図 8) . さらに, 同定された代謝物の VIP 値から, acetone, 3-hydroxybutyrate, isoleucine, arginine, methionine, phenylalanine, tryptophan, valine が悪性と良性の判別に寄与することが示された (図 9) . これら 8 つの代謝物の良性群と悪性群のそれぞれの濃度を比較すると, acetone だけが悪性群で有意に多く, 他の 7 つの代謝物には有意差は認められなかった (図 10) .

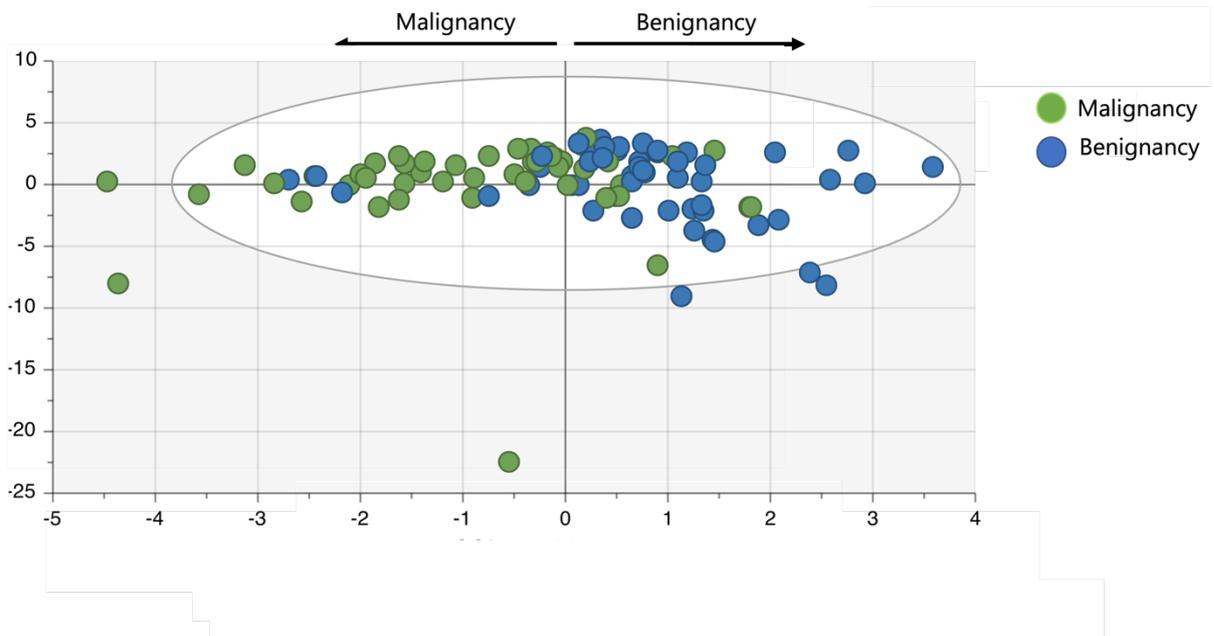


図 8. 膵臓疾患群における OPLS-DA.

データには良性と悪性の情報が与えられ、統計学的に 2 つのカテゴリーに分類されることがわかった。

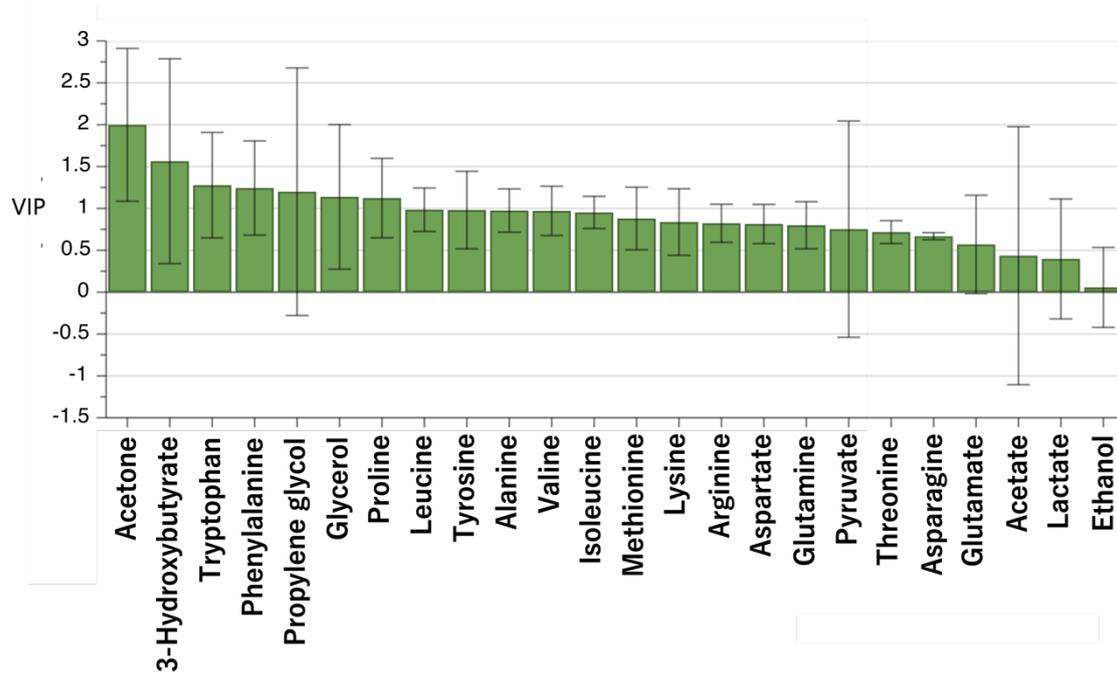


図 9. 膵臓疾患群における代謝物の VIP 値.

VIP 値が 1.0 より大きいものは重要な変数を示し, acetone, 3-hydroxybutyrate, tryptophan, phenylalanine, propylene glycol, glycerol, proline であった. 各棒および線は 95%信頼区間を含む平均を表す.

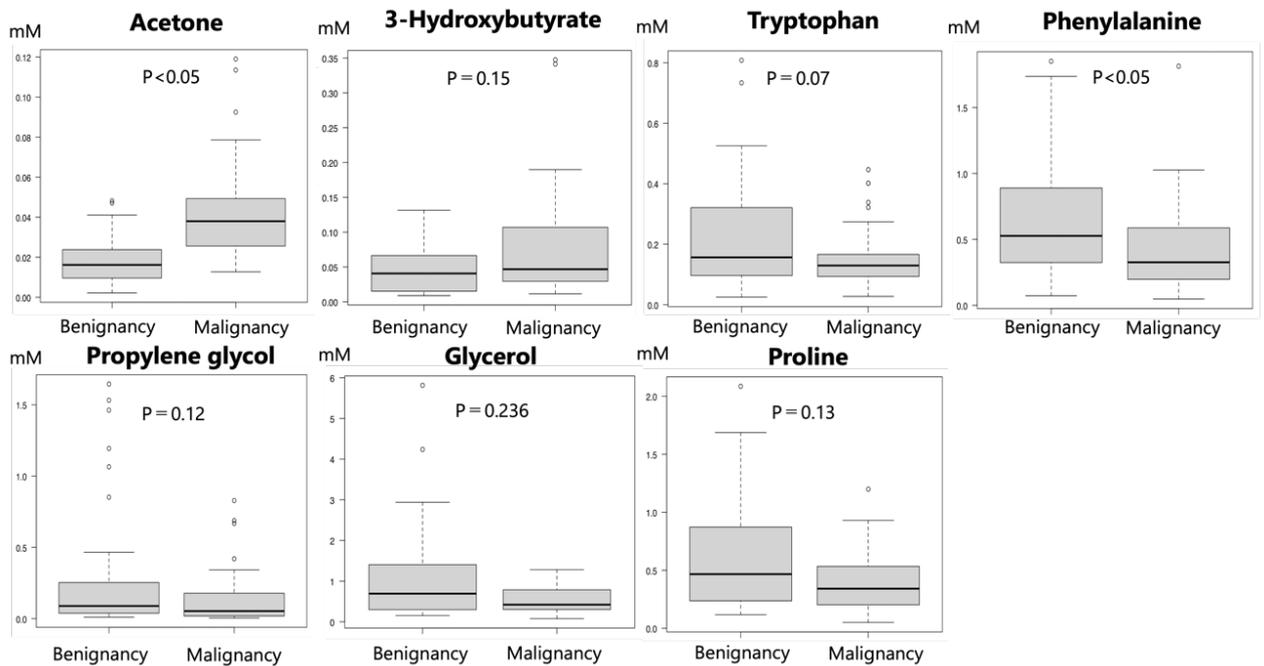


図 10. 膵臓疾患群における OPLS-DA における悪性群と良性群の鑑別に寄与した代謝物の濃度.

acetone が悪性群で, phenylalanine が良性群で有意に高濃度であった。

5. 血清 CA19-9 と acetone の ROC 曲線.

5.1. 胆道疾患群

VIP スコアと代謝物濃度に基づき, acetone の診断能を一般的な血清腫瘍マーカーである CA19-9 の診断能と ROC 曲線解析で比較した. ROC 分析では, acetone と CA19-9 のカットオフ値をそれぞれ 0.024 mM と 193.5 U/mL とした場合, acetone は胆道癌の診断において血清 CA19-9 と同等の成績であった

(ROC 曲線下面積[AUC] : 0.733 vs 0.691, $P = 0.697$) . acetone の最も良好な値における感度と特異度はそれぞれ 69.7%と 73.3%であり, CA19-9 の感度と特異度はそれぞれ 94.1%と 48.5%であった (図 11) .

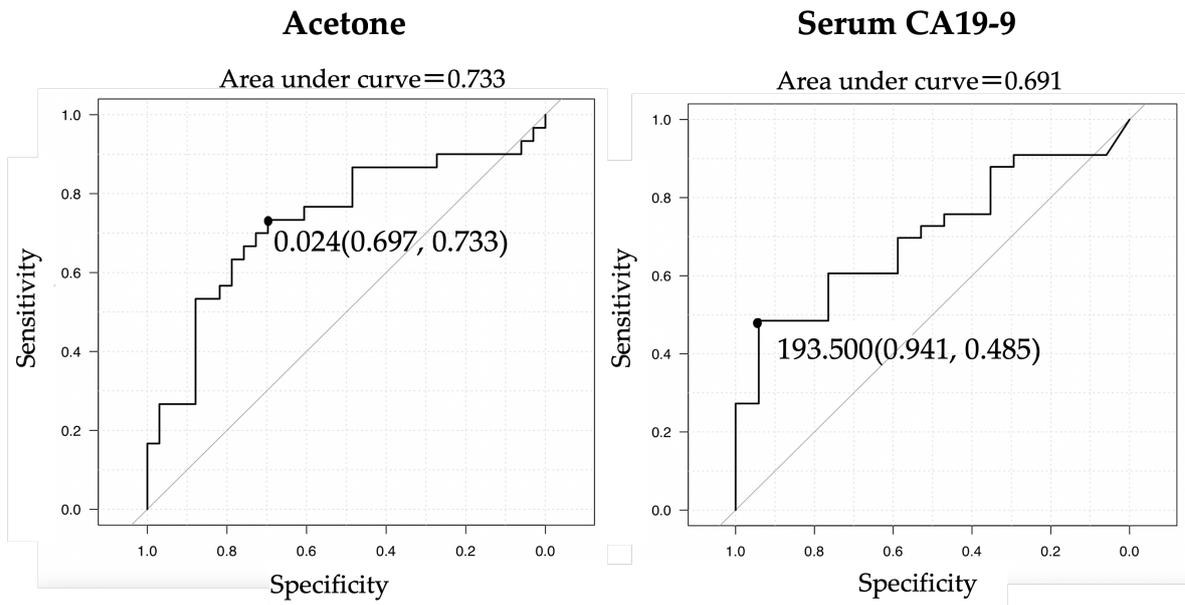


図 11. 胆道疾患群における Acetone と CA19-9 の ROC 曲線.

acetone のカットオフ値を 0.024, CA19-9 のカットオフ値を 193.5 とした場合、胆道癌の診断において acetone は血清 CA19-9 と同等の成績であった (AUC : 0.733 vs 0.691、 $P = 0.697$) .

5.2. 膵臓疾患群

VIP スコアと代謝物濃度に基づき, acetone の診断能を一般的な血清腫瘍マーカーである CA19-9 の診断能と ROC 曲線解析で比較した. ROC 分析では, acetone と CA19-9 のカットオフ値をそれぞれ 0.024 mM と 193.5 U/mL とした場合, acetone は胆道癌の診断において血清 CA19-9 と同等の成績であった

(ROC 曲線下面積[AUC] : 0.847 vs 0.733, $P = 0.0757$) . acetone の最も良好な値における感度と特異度はそれぞれ 69.7%と 73.3%であり, CA19-9 の感度と特異度はそれぞれ 94.1%と 48.5%であった (図 12) .

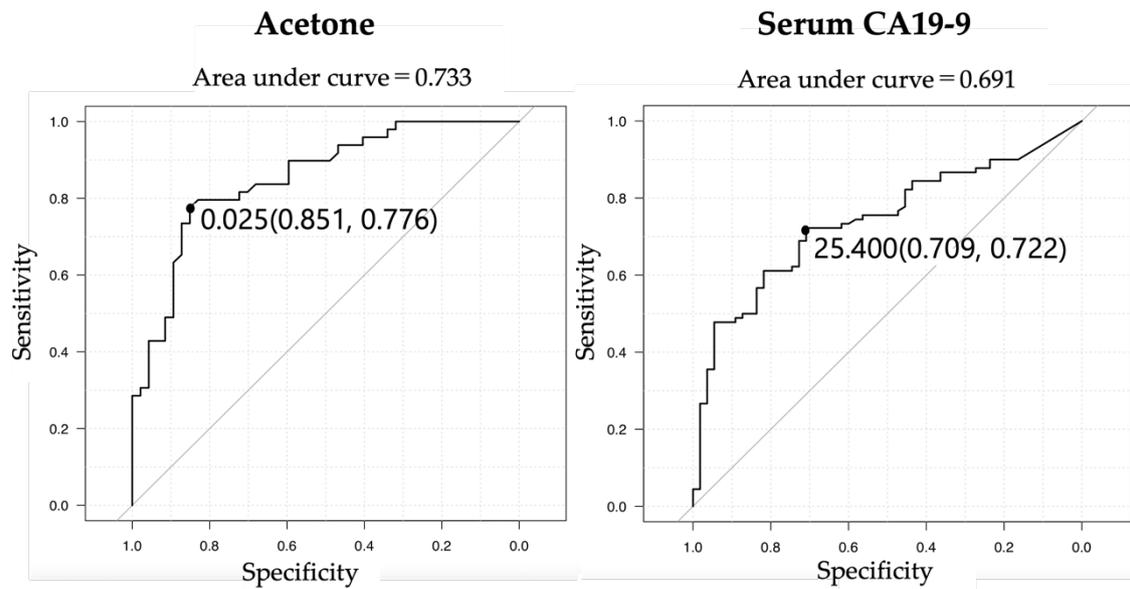


図 12. 膵臓疾患群における Acetone と CA19-9 の ROC 曲線。
 acetone のカットオフ値を 0.025, CA19-9 のカットオフ値を 25.4 とした場合、
 膵癌の診断において acetone は血清 CA19-9 と同等の成績であった (AUC :
 0.847 vs 0.733、P = 0.0757) .

考察

本研究は、膵胆道領域における悪性疾患と良性疾患の鑑別に十二指腸液のメタボロミクスが利用可能であり、かつ有効であることを示した最初の研究である。膵胆道癌診断のためのメタボロミクスに関しては、様々な報告があり、その多くは血液をサンプルとしており、胆汁や膵液をサンプルとしているものは少数である。Jesus らの報告では、肝内胆管癌患者と健常対照者の血清アミノ酸レベルに関して、いくつかの血清アミノ酸プロファイルにおいて差異が認められた (Jesus et al.,2019)。また、胆汁サンプルについては、NMR ベースのメタボロミクスは、胆道癌と良性胆道疾患の鑑別に優れた性能を発揮すると報告されている (He et al.,2010)。一般的に血液を対象としたメタボロミクスでは、癌が存在する場所を特定することが困難な場合が多い。一方、ERCP による直接胆汁採取は、膵炎や胆道炎などの有害事象のリスクが高い (Siiki et al.,2012; Kapral et al.,2012)。したがって、十二指腸液のメタボロミクスは、サンプリングの容易さと安全性の点で大きな利点がある。

本研究では、胆道疾患群・膵臓疾患群ともに acetone 濃度が良性群より悪性群で有意に高いことが示された。ケトン体 (acetone および 3-hydroxybutyrate) は、腫瘍の成長を抑制し、癌悪液質を改善することが報告されていることから、生物学的防御反応に伴う上昇であることが推測される (Shukla et al.,2014; Poff et al.,2014)。血清を対象としたメタボロミクスに関する他の報告では、膵臓癌や前立腺癌患者の血清中には、健常人に比べて acetone が多いことが示されている (Zhang et al.,2012; Oliver et al.,2011; Zhang et al.,2022)。また、前立腺癌では acetone を含むケトン体が腫瘍増殖に重要な役割を果たすことが報告されている。詳細なメカニズムは不明であるが、潜在的な代謝変化が前立腺癌の進行や転移に関与している可能性がある (Zhang et al.,2022)。また、皮膚からの acetone gas 放出が膵癌患者では、健常対照群と比べて増加することが報告されている (Michihito et al.,2021)。

一般的に、正常細胞はグルコース飢餓時にケトン体を代謝燃料として利用するが、多くの腫瘍細胞はミトコンドリア機能障害やケトン体分解酵素の欠乏により、ケトン体を非効率的に利用することが示されている (Chang et al.,2013; Maurer et al.,2011)。その結果、悪性患者ではケトン体がより多く存在すると考えられる。ケトン体のうち、3-hydroxybutyrate は両群間に有意差はなかったが、悪性群で高い傾向がみられ、これも前述の知見と一致する (Shukla et al.,2014)。acetone と 3-hydroxybutyrate の違いは、acetone が 3-

hydroxybutyrate とは異なり、エネルギー代謝に使用されず、直接血中に放出される点である (Moller et al.,2020). さらに、ROC 解析において、十二指腸液中 acetone は血清 CA19-9 に匹敵する良悪性疾患鑑別能を有することが明らかになった. CA19-9 は、ルイス A にシアル酸が付加した糖鎖抗原である. したがって、シアリル-ルイス抗原陰性者の場合 (Etsuko et al.,2012) , 血清 CA19-9 は偽陰性マーカーとなり得る. よって、このような症例では、十二指腸液中アセトン は血清 CA19-9 よりも優れていると考える.

既報によると、胆道癌診断能において、血液メタボロミクスでは、感度 55~95%、特異度は 58~100%であった. 胆汁メタボロミクスでは、NMR ベースのメタボロミクスアプローチを用いた場合、胆道癌診断における感度は 88%、特異度は 81%であったと報告されている (Jesus et al.,2019; He et al.,2010) . 本研究では、acetone のカットオフ値を胆道疾患群において 0.024 mM、膵臓疾患群において 0.025mM とした場合、胆道疾患群で感度は 69.7%、特異度は 73.3%、膵臓疾患群で感度は 85.1%、特異度は 77.6%あり、血液や胆汁のメタボロミクスによる診断と同程度の成績であった.

また、胆汁 NMR メタボロミクスにおいて前処理なしに胆汁を測定しただけでは、デオキシコール酸などの高分子化合物によってスペクトルが不良になる可能性があり、調製時に有機溶媒抽出を行う必要があることが過去に報告されている (Nagana et al.,2011) . 一方、本研究の十二指腸液 NMR メタボロミクスでは、特別な前処理なしで良好なスペクトルを得ることができた. 十二指腸液で良好なスペクトルが得られたのは、十二指腸に胃液、胆汁や膵液が流入し、胆汁中の高分子化合物が希釈され効果に起因することが考えられる. さらに、本研究で検出された acetone は、調製時に有機溶媒抽出を行なった場合には揮発するため、MS 法や前処理を加えた状況では検出できない. よって、本研究のように NMR 法かつ前処理無しで行なったことが、その検出には特に重要であったと考える.

他のメタボロームに関しては、有意ではなかったが、valine, isoleucine, arginine, methionine, tryptophan において、悪性で高い傾向が観察された. valine と isoleucine は分岐鎖アミノ酸に分類され、癌細胞ではアミノトランスフェラーゼの発現が高いため、取り込みが増加する傾向がある (Mayers et al.,2016) . アルギニン は準必須アミノ酸で、ポリアミンや核酸の前駆体であり、蛋白質の合成に必須であるが、癌細胞ではアルギニノコハク酸合成酵素 1 の機能喪失により、arginine が代謝されにくいとされる (Lee et al.,2023) . したがって、arginine は利用されずに癌細胞に蓄積される可能性がある. methionine と phenylalanine は必須アミノ酸であり、癌細胞の増殖と代謝に重要な役割を果たすが (Wanders et al.,2020; Zhang et al.,2013) , 本研究において、胆道悪性

疾患では phenylalanine が高く、膵臓悪性疾患では低いという逆の傾向を示していた。その理由の 1 つとして考えられるのは、膵癌細胞において LAT-1 (Large neutral Amino acid Transporter-1)は高発現していることが報告されており (Yanagisawa et al.,2012) , その LAT-1 によって phenylalanine は輸送され代謝されている可能性が示唆される。

また、癌細胞が生存、増殖、転移するためには、増殖因子を分泌しなければならない。活発に増殖している癌細胞では、通常 tryptophan の代謝が亢進しており、癌細胞が tryptophan の代謝産物であるキヌレニンを分泌することが報告された (Opitz et al.,2011)。これは癌細胞の生存と増殖を可能にする戦略であり、tryptophan のメタボロミクスに反映される可能性がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、良性対照群には健常人が少なかったことである。そのため、悪性腫瘍と健常人との違いは不明である。従って、胆道癌および膵臓癌と健常対照との比較は、今後の大規模研究で評価されるべきである。第二に、十二指腸液メタボロミクスの診断能を、胆汁・血液・尿などのメタボロミクス診断能と直接比較していないことである。これらの違いを正確に評価するためには、同じコホートでの直接比較が必要である。第三に、癌の病期や部位によって代謝産物に違いがあるかどうかについては、サンプル数が小さく早期癌が本研究に含まれていないために検討できていないこと、である。第四に、患者背景の違いによる代謝物の変化を検討することができなかったことである。例えば、胆道ステントの有無、ウルソデオキシコール酸の投与の有無、肝炎ウイルス (例えば HBV や HCV) の有無などである。また、胆道ステントは胆汁の十二指腸への流入を増加させ、その結果、十二指腸液中の代謝が変化する可能性がある。これまでの報告によると、アミノ酸代謝は、ウルソデオキシコール酸の使用と肝炎ウイルスの存在によって変化することが報告されている (Kim et al.,2018; Yang et al.,2023)。しかし、十二指腸液メタボロミクスに関する報告がなく、それらを考慮した適切なサンプルサイズ設定をすることができなかった。第五に、本研究ではアセトンやその他の検出代謝物に関連する代謝経路の解析を実施できていないため、今後の検討課題と考える。

臨床現場においては、十二指腸液のメタボロミクスは、侵襲的な胆汁や膵液の細胞診や、胆管あるいは膵腫瘍の生検が実施困難な場合に、有効な代替診断法となる可能性があり、引き続き重要な研究課題になりうると考える。

結論

本研究で得られた新知見は以下のとおりである。

- ・十二指腸液の NMR 法によるメタボローム解析は実施可能であり、良好なスペクトルが得られる。
- ・膵, 胆道疾患ともに, 悪性疾患群では良性疾患群と比較して十二指腸液中 acetone 濃度が有意に高い。
- ・膵胆道癌の診断能において, 十二指腸液中 acetone は血清 CA19-9 と同等である。
- ・本研究は, 膵胆道疾患において, 十二指腸液中メタボローム解析は良悪性疾患鑑別の補助的診断ツールになり得る知見を示した。
- ・今後の課題としては, 症例数をさらに蓄積してその再現性を確認していくこと, 同一患者の十二指腸液と胆汁や血液, 尿の代謝物を比較し, その関連性を調べること, 癌の病期別によるアセトン濃度を調べ, その関連性を調べることである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

臨床的に意義深い研究テーマを与えていただき、計画から研究方法、論文作成まで、全ての面で多くのご助言、ご指導を賜りました北海道大学病院消化器内科講師 栗谷将城先生に厚くお礼申し上げます。

今回の研究の要となる **NMR** 測定によるメタボロミクスの技術的な指導からデータの集積・解釈についてご指導頂きました北海道大学大学院生命科学院蛋白質科学研究室 相沢智康教授、大西裕季先生に深く感謝申し上げます。

また日々の診療の中、様々な面でご援助いただきました北海道大学病院消化器内科胆膵グループの先生方に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究に協力いただきましたすべての患者さまに、厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究において、開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Akashi R, Kiyozumi T, Tanaka T, Sakurai K, Oda Y and Sagawa K (2002). Mechanism of pancreatitis caused by ERCP. *Gastrointes Endosc* 55, 50-54.

Burnett A, Calvert T and Chokshi R (2013). Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10–y review of the literature. *J. Surg. Res* 184, 304-311.

Chang H, Olson L and Schwartz K (2013). Ketolytic and glycolytic enzymatic expression profiles in malignant gliomas: Implication for ketogenic diet therapy. *Nutr. Metab* 10, 47.

Masato N, Satoshi H, Hideyuki Y, Taku A, Katsuhiko U, Michiaki U, Tomoki E, Masaru K, Keiji S, Kazuaki Shimada, et al (2019). Clinical practice guidelines for the management of biliary tract cancers.

Takushi O, Masashi N, Masahiro Y, Kohei N, Masayuki K, Takao I, Ken K, Manabu K, Atsushi K, Masahiro S, et al (2019). Clinical practice guidelines for the management of pancreatic cancers.

Davis V, Bathe O, Schiller D, Slupsky C and Sawyer M (2011). Metabolomics and surgical oncology: Potential role for small molecule biomarkers. *J Surg Oncol* 103, 451-459.

Dumas M, Maibaum E, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon J, Nicholson J, Stamler J, Elliott P, Chan Q, et al (2006). Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* 78, 2199-2208.

Endo I, Gonen M, Yopp A, Yopp C, Dalal K, Zhou Q, Klimstra D, D'Angelica M, DeMatteo R, Fong Y, et al (2008). Intrahepatic cholangiocarcinoma: Rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann. Surg.* 248, 84-96.

- Etsuko H, Terumi T, Satoshi B and Masato M (2012). Investigation of unexpected serum CA19-9 elevation in Lewis-Negative cancer patients. *Ann Clin Biochem* 49, 266-272.
- Gomase V, Changbhale S, Patil S and Kale K (2008). *Metabolomics. Curr. Drug Metab* 9, 89-98.
- Hatfield A, Smithies A, Wilkins R and Levi A (1976). Assessment of endoscopic retrograde cholangio-pancreatography (ERCP) and pure pancreatic juice cytology in patients with pancreatic disease. *Gut*. 17, 14-21.
- He W, Sung S, Jinho K, Hee G, Jin S, Seok J, Jung L, Hyuk N, Sunmi K, Don H, et al (2010). A new NMR-based metabolomics approach for the diagnosis of biliary tract cancer. *Journal of Hepatology*. 52, 228-233.
- Jesus M, Mercedes I, Ander A, Piotr M, Jordi M, Luis M, Adelaida L, Luis M, Enara A, Cristina A, et al (2019). Serum Metabolites as Diagnostic Biomarkers for Cholangiocarcinoma, Hepatocellular Carcinoma, and Primary Sclerosing Cholangitis. *Hepatology* 70, 547-562.
- Jesus M, Jose M, Iker U, Maria R, Daniel O, Belen G, Ignacio F, Juan C, Federico B, Lucia Z, et al (2020). Pilot Multi-Omics Analysis of Human Bile from Benign and Malignant Biliary Strictures: A Machine-Learning Approach. *Cancers* 12, 1644.
- Kameya S, Kuno N and Kasugai T (1981). The diagnosis of pancreatic cancer by pancreatic juice cytology. *Acta Cytol* 25, 354-360.
- Kapral C, Muhlberger A, Wewalka F, Duller C, Knofach P and Schreiber F (2012). Quality assessment of endoscopic retrograde cholangiopancreatography: results of a running nationwide Austrian benchmarking project after 5 years of implementation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24, 1447-1454.
- Kim D, Seonghae Y, Sang C, Jinho Y, Yoon K, Seung H, Kyung S, Yu I, Jang J, Yong C, et al (2018). Ursodeoxycholic acid improves liver function via phenylalanine/tyrosine pathway and

microbiome remodelling in patients with liver dysfunction. *Scientific Reports* 8, 11874.

Kisiel J, Raimondo M, Taylor W, Yab T, Mahoney D, Sun Z, Middha S, Baheti S, Zou H, Smyrk T, et al (2015). New DNA methylation markers for pancreatic cancer : discovery, tissue validation, and pilot testing in pancreatic juice. *Clin Cancer Res* 21, 4473-4481.

Lee M, Dennis C, Naqvi I, Dailey L, Lorzadeh A, Ye G, Zaytouni T, Adler A, Hitchcock DS and Lin L (2023). Ornithin aminotransferase supports polyamine synthesis in pancreatic cancer. *Nature* 616(7956), 339-347.

Lenka M, Stepan H, Jan S, Lucie H, Vladimir S and Bohus B (2021). Early Detection of Pancreatic Cancer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients Based on ¹H NMR Metabolomics. *J Proteome Res* 20, 1744-1753.

Markar S, Brodie B, Chin S, Romano A, Spalding D and Hanna G (2018). Profile of exhaled-breath volatile organic compounds to diagnose pancreatic cancer. *Br J Surg* 105, 1493-1500.

Matsunaga T, Ohtsuka T, Asano K, Kimura H, Ohuchida K, Kitada H, Ideno N, Mori Y, Tokunaga S, Oda Y, et al (2017). S100P in duodenal fluid is a useful diagnostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 46 , 1288-1295.

Maurer G, Brucker D, Bahr O, Harter P, Hattingen E, Walenta S, Mueller-Klieser W, Steinbach J and Rieger J (2011). Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: A rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer* 11, 315.

Mayerle J, Kalthoff H, Reszka R, Kamlage B, Peter E, Schniewind B, Maldonado S, Pilarsky C, Heidecke C, Schatz P, et al (2018). Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* 67, 128-137.

Mayers J, Torrence M, Danai L, Papagiannakopoulos T, Davidson S, Bauer M, Lau A, Ji B, Dixit P, Hosios A, et al (2016). Tissue of

origin dictated branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers. *Science* 353(6304), 1161-1165.

Michihito T, Kenichi H, Aya K, Masashi M and Yoshika S (2021). Study on human skin gases emanating from pancreatic cancer patients. *Jpn J Clin Ecol* 30, 7-16.

Mizrahi J, Surana R, Valle J and Shroff R (2020). Pancreatic cancer. *Lancet* 395, 2008-2020.

Moller N (2020). Ketone Body, 3-Hydroxybutyrate: Minor Metabolite Major Medical Manifestations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 105, 2884-2892.

Nagana G (2011). NMR spectroscopy for discovery and quantitation of biomarkers of disease in human bile. *Bioanalysis* 3, 1877-1890.

Napoli C, Sperandio N, Lawlor R, Scarpa A, Molinari H and Assfalg M (2012). Urine metabolic signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by (1)h nuclear magnetic resonance: identification, mapping, and evolution. *J Proteome Res* 11, 1274-1283.

Navaneethan U, Njei B, Lourdusamy V, Konjeti R, Vargo J and Parsi M (2015). Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: A systematic review and meta-analysis. *Gastrointest. Endosc* 81, 168-176.

Nina C, Giovanni C, Marialuisa B, Alessandra R, Panteleimon G, Giovanni F, Debora V, Giulia M, Francesca G and Cristine R, (2020). Metabolome of Pancreatic juice Delineates Distinct Clinical Profiles of Pancreatic Cancer and Reveals a Link between Glucose Metabolism and PD-1⁺ Cells. *Cancer Immunol Res* 8(4), 493-505.

Oliver F, Rustem S, Karen K, Aalim M, Andrew M, Francis R, Elijah D, Nicole D, Dina S and Hans J (2011). Feasibility of identifying Pancreatic Cancer Based on serum Metabolomics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, 140-147.

Opitz C, Litzenburger U, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, et al (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197. 203.

Perkins G, Slater E, Sanders G and Prichard J (2003). Serum tumor markers. *Am Fam Physician* 68, 1075–1082.

Poff A, Ari C, Arnold P, Seyfried T and D'Agostino D (2014). Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer. *Int J Cancer* 135, 1711-1720.

Rebecca L, Kimberly D and Ahmedin J (2019). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2019, 69, 7-34.

Saigusa D, Matsukawa N, Hishinuma E and Koshiha S (2021). Identification of biomarkers to diagnose diseases and find adverse drug reactions by metabolomics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 37, 100373.

Shukla S, Gebregiworgis T, Purohit V, Chaika N, Gunda V, Radhakrishnan P, Mehla K, Pipinos II, Powers R, Yu F, et al (2014). Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer Metab* 2, 18.

Siiki A, Tamminen A, Tomminen T and Kuusanmaki P (2012). ERCP procedures in a Finnish community hospital: a retrospective analysis of 1207 cases. *Scandinavian Journal of Surgery* 101, 45-50.

Steinberg W (1990). The clinical utility of the CA19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 85, 350-355.

Valle J, Kelley R, Nervi B, Oh D and Zhu A (2021). Biliary tract cancer. *Lancet* 397, 428-444.

Wanders D, Hobson K and Xiangming J (2020). Methionine Restriction and Cancer Biology. *Nutrients* 12, 684.

Yang J, Dawei W, Yuancheng L, Hongmei W, Qiang H and Ying

W (2023). Metabolomics in viral hepatitis: advances and review. *Front Cell Infect Microbiol* 13, 1189417.

Zhang L, Jin H, Guo X, Yang Z, Zhao L, Tang S, Mo P, Wu K, Nie Y, Pan Y, et al (2012). Distinguishing pancreatic cancer from chronic pancreatitis and healthy individuals by H nuclear magnetic resonance-based metabolomic profile. *Clinical Biochemistry* 45, 1064-1069.

Zhang X, Xu L, Shen J, Cao B and Cheng T (2013). Metabolic signatures of esophageal cancer: NMR-based metabolomics and UHPLC based focused metabolomics of blood serum. *Biochimica Biophys Acta* 1832, 1207-1216.

Zhang X, Binbin X, Hong Z, Jie Ning, Yinjie Zhu, Xiaoguang S, Binrui L, Baijun Dong and Hongchang G (2022). Identification of characteristic metabolic panels for different stages of prostate cancer by ¹H NMR-based metabolomics analysis. *Journal of Translational Medicine* 20, 275.