

厚生労働科学研究委託費

医療技術実用化総合研究事業

臨床研究・治験推進研究事業

手術中に膵液の漏出部位を同定し蛋白分解酵素活性を
評価する蛍光イメージング技術の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 石沢 武彰

平成27 (2015) 年 3月

本報告書は、厚生労働省の医療技術実用化総合研究事業による委託業務として、国立大学法人 東京大学が実施した平成26年度「手術中に膵液の漏出部位を同定し蛋白分解酵素活性を評価する蛍光イメージング技術の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

手術中に膵液の漏出部位を同定し蛋白分解酵素活性を評価する 蛍光イメージング技術の開発 -----	1-10
石沢 武彰	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. キモトリプシンプローブ最適化に関する検討 -----	11-17
浦野 泰照	
2. gPhe-HMRG, HMRGの非臨床安全性試験の実施 -----	18-37
石沢 武彰	
3. 治験開始に向けた体制整備 -----	38-50
石沢 武彰	

III. 学会発表実績 -----	51
-------------------	----

IV. 研究成果の刊行物、別刷 -----	52-
-----------------------	-----

手術中に膵液の漏出部位を同定し蛋白分解酵素活性を
評価する蛍光イメージング技術の開発

業務主任者 石沢 武彰

東京大学医学部附属病院 肝胆膵・人工臓器移植外科 登録研究医

研究要旨：手術中に患者体腔内にキモトリプシンプローブ（trypsin 添加 glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green, gPhe-HMRG）を散布し、膵断端から漏出する膵液を描出する蛍光イメージング技術の開発にあたり、大型動物（ブタ）を用いた検証を経てプローブ条件（gPhe-HMRG 50 μ M に trypsin を 400 μ g/mL の濃度で添加、患者では 1 回 500 μ L を最大 4 回散布）を設定した。上記の投与法を想定し、PMDA 薬事戦略相談を経て非臨床試験の項目を決定、今回の研究期間中に実施した単回投与毒性試験、遺伝毒性試験、hERG 電流に対する安全性薬理試験において gPhe-HMRG の毒性を認めないことを確認した。また、非臨床安全性試験と平行して、1) 膵液漏の発生頻度とリスク因子の再検討、2) 手術室における撮像環境の確立、および 3) gPhe-HMRG 供給体制の整備を行い、臨床試験の骨子を確定させた。今後は、未施行である非臨床試験項目を完了し、規制当局の見解を得ながら治験届けの提出を目標に研究を継続する予定である。

（研究分担者）

國土典宏	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科 教授
山本訓史	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科 助教
浦野泰照	東京大学大学院医学系研究科 生体情報学講座 教授
神谷真子	東京大学大学院医学系研究科 生体情報学講座 助教
齋浦明夫	がん研有明病院 消化器外科 肝胆膵担当部長

A. 研究目的

（背景）

・膵切除術は、膵・胆管腫瘍に対する根治療法として確立している。本邦では年 2 万 5 千件以上[参考文献 1]、米国では年 4 万

件以上の膵手術が施行されており、その数は世界的に増加している。しかし、手術技術が発達した今日でも、膵切除後には膵液漏が高率(10-60%)に発生する。膵液漏は重症感染症の誘因となるほか、膵液の自己消化作用により血管断端が破綻して致死的な術後出血をきたす。実際、膵頭十二指腸切除術の死亡率は 1-8%（本邦 National Clinical Database に基づく手術関連死亡率は 2.8% [1]）と高く、low-volume center では 15%に達するとの報告もある。

・膵液漏の予防が困難であるのは、膵液が無色透明であり、膵液漏の部位や程度を手術中に正しく認識できないからである。また、現状では術後膵液漏は腹腔ドレーン排液の amylase 濃度を指標に診断されているが、原理的には糖分解酵素である

amylase よりも蛋白分解酵素の活性に基づいて評価されるべきである。臨床的にも、排液中の amylase 濃度が膵液漏の重症度を反映しないことが経験される。

・本研究グループでは、蛋白分解酵素活性に基づいて膵液を蛍光標識するための新規化合物、glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green (gPhe-HMRG)を設計・合成した。この gPhe-HMRG に、膵液中の chymotrypsinogen を chymotrypsin に変換するための trypsin を添加したプローブ（キモトリプシンプローブ）を用いることにより、患者体外サンプルにおいて膵液を可視化し、術後膵液漏発生のリスク評価を行い得ることを先行研究で確認した（図 1）[2]。しかし、膵液漏の発生率低減に本技術を役立てるためには、キモトリプシンプローブを患者体腔内で膵断端または膵吻合部に直接散布し、膵液漏出部位を正確に描出することにより、術者が膵液漏を縫合閉鎖したり、膵液漏出部位に効果的にドレーンを留置したりすることを可能にする必要がある。

（目的）

・本研究の目的は、キモトリプシンプローブを患者体腔内で膵断端に散布し、膵液漏出部位を描出する蛍光イメージング技術を開発するにあたり、治験実施に向けて非臨床安全性試験を実施することである。同時に、試薬合成の体制と手術室における撮像環境を整備し、治験計画の骨子を策定する。

B. 研究方法

（概要）

課題解決のため、検討事項を以下に示す 3 つの業務項目に分けて研究を遂行した：

I. キモトリプシンプローブ最適化に関する

検討

II. gPhe-HMRG, HMRG の非臨床安全性試験の実施

III. 治験開始に向けた体制整備

（個別の検討項目）

*詳細は各業務項目の成果報告を参照されたい

I. キモトリプシンプローブ最適化に関する検討

・既に患者体外サンプルを用いた検討[3]で膵液漏の同定能が確認されたキモトリプシンプローブの組成を用いて、体腔内で膵断端から漏出する膵液を描出できることを確認し、治験で想定されるプローブの投与方法を確定することを目的とした。

・大型動物（実験用ブタ）を用い、全身麻酔下に開腹、膵体尾部を授動した後に自動縫合器を用いて膵実質を離断。ガーゼで清拭した膵離断面にキモトリプシンプローブ（50 μ M に調整した gPhe-HMRG に trypsin を 400 μ g/mL の濃度で添加したもの）200 μ L を散布した（gPhe-HMRG の分子量は 577.64 であるので、プローブ 200 μ L 中に gPhe-HMRG が約 5.8 μ g, trypsin が 80mg 含まれる）。実験用の蛍光イメージャーを術野の上に設置し、HMRG 観察用の条件（excitation, 470 \pm 20nm; emission, 515nm long-pass）で膵断端を 5 分間観察、蛍光強度を測定した。切除した膵組織はホルマリン固定後に H&E 染色し、蛍光イメージングの結果と膵断端の顕微鏡所見を対比させた。

II. gPhe-HMRG, HMRG の非臨床安全性試験の実施

・本技術は、「微量（50 μ M の gPhe-HMRG を最大で 2mL）の診断用蛍光プローブを患

者体腔内に散布する」という、ほぼ前例のない投与形態を採用しているため、試験物を体内医薬品として扱うことの妥当性について、東京都薬務課に確認を求めた（2014年6月5日）。

・上記確認事項については未回答であったが、研究期間を考慮して2014年10月1日にPMDA薬事戦略相談対面助言を受け、キモトリプシンプローブを用いた治験に際して求められる非臨床安全性試験の項目について見解を得た（gPhe-HMRGおよび生成物たるHMRGに対する安全性薬理試験、トキシコキネティクス及び薬物動態試験、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験[非げっ歯類]、遺伝毒性試験、hERG電流に対する安全性薬理試験）。

・2014年10月、11月に非臨床試験を受託している複数社と面談、見積もりを依頼。また積水メディカル株式会社にgPhe-HMRGの製造を委託。厚生労働省監麻課から「体内医薬品として扱うべきとする旨の回答（2015年1月）を待って、1月21日に非臨床試験の入札を実施、落札業者（株式会社シミックバイオリサーチセンター）に試験を委託した。

III. 治験開始に向けた体制整備

1. 臍切除における臍液漏発生率とリスク因子の検証

・治験計画の概要を策定するために、臍切除を行った症例の手術成績をretrospectiveに解析し、術式別、手術因子別の術後臍液漏の発生率と臍液漏のリスク因子について検討した。

2. 手術室における撮像環境の評価

・キモトリプシンプローブの生成物（発光団）であるHMRGを希釈しPCRチューブに分注（0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 μ M）し

たファントムを作成した。手術台の上にファントムを設置し、手術室の照明環境や撮影距離、撮像装置の種類（システムA: 薬事承認された医療用内視鏡システム[自家蛍光モード]に撮影用515nm long-pass フィルターを装着したもの、システムB: 上記の医療用内視鏡システムの光源をHMRG撮影に最適化したLED光源に変更したもの、システムC: 上記の撮像装置を、高ISO感度で暗所撮影が可能な非医療用デジタルカメラに変更したもの）を組み合わせ、イメージングを行い、蛍光強度を測定してsignal-to-background (S/B) ratioを計算した。

3. gPhe-HMRG 製造工程の整備

・治験薬を製造するため、品質試験の規格及び試験方法について検討した。
・出発物質の決定、結晶化法の再検討など、gPhe-HMRGの製造工程を改良した。

（倫理面への配慮）

・臨床データを用いた検討では、臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示、平成20年7月改正）およびヘルシンキ宣言（2013年改訂）を遵守して実施した。
・動物実験に際して、東京大学の指針および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）」を遵守した。
・非臨床安全性試験は、IACUC（Institutional Animal Care and Use Committee, 動物実験委員会）によって承認を受けた。また、試験はAAALAC International（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 国際実験動物管理評価認定協会）の認証を

取得した施設で実施した（認証番号：001182）。

C. 研究結果

I. キモトリブシンプローブ最適化に関する検討

・先行研究と同一の濃度で調整したキモトリブシンプローブ 200 μ L をブタ体腔内で膵断端に散布することにより、膵液漏出部位を明瞭に描出することができた。漏出する膵液が発する蛍光シグナルは、撮像装置のモニターだけでなく、術者がフィルター（515nm long-pass）を装着することにより肉眼でも観察可能であり、蛍光イメージング下に縫合などの外科的処置を加えることが可能であった。

・膵液漏出により蛍光を発する部位と蛍光シグナルが観察されない部位に region of interest (ROI)を設定して蛍光強度を測定した。膵液漏出部位では、キモトリブシンプローブ散布後3分で蛍光強度が散布前の2.0~5.5倍に上昇したのに対し、蛍光シグナルが同定されない部位では散布後5分でも蛍光強度の上昇を認めなかった（散布前の0.7~1.7倍）。

・切除標本の顕微鏡観察では、膵液の蛍光シグナルが同定された部位にほぼ一致して、不完全に閉鎖された膵管断端が観察された。

II. gPhe-HMRG, HMRGの非臨床安全性試験の実施

・今回の検討では、gPhe-HMRG 投与液の分析バリデーションおよび保存安定性試験を実施した。

・さらに gPhe-HMRG と HMRG 対し、下記の項目で安全性試験を実施した：

①ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験（gPhe-HMRG, GLP 基準; HMRG, 信頼

性基準）

②hERG試験細胞を用いたK⁺チャネルへの影響評価（gPhe-HMRG：GLP基準
HMRG：信頼性基準）

③細菌を用いた復帰突然変異試験（信頼性基準）

④ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（信頼性基準）

III. 治験開始に向けた体制整備

1. 膵切除における膵液漏発生率とリスク因子の検証

・膵切除 62 症例（膵頭十二指腸切除 35 例、膵体尾部切除 27 例）の検討では、International Study Group of Pancreatic Fistula (ISGPF)の定義[3]による grade B 以上の膵液漏（有症状で抗生物質投与やドレーン交換などの処置を要す[grade B]、または敗血症や臓器不全を合併し再手術や集中治療を要す[grade C]）の発生頻度は膵頭十二指腸切除で 31%（11 例）、膵体尾部切除で 33%（9 例）であった。Clavien-Dindo 分類[4]における grade III（外科的/内視鏡的/IVR 治療を要する）以上の術後合併症の発生頻度は、膵頭十二指腸切除で 11%（4 例）、膵体尾部切除で 30%（8 例）であった。

・Shear wave velocity (SWV) の計測に基づいて膵実質の硬さを hard pancreas (SWV \geq 1.54 m/s, n = 30) と soft

pancreas (SWV < 1.54 m/s, n = 32) に分けた場合、ISGPF grade B 以上の術後膵液漏の発生率は後者の方が有意に高かった（13% vs. 63%, $P = 0.001$; Fisher's exact test）。

・術式を膵体尾部切除（152 例）に限定し対象期間を拡大して検討を追加すると、ISGPF grade B以上の術後膵液漏の発生率は 64%（97 例）、Clavien-Dindo分類 III

以上の術後合併症発生率は16% (25例)であった。多変量解析の結果、術後重症合併症 (Clavien-Dindo分類 III以上) 発生の独立リスク因子は術後3病日の血中白血球数 $\geq 15000/\mu\text{L}$ (オッズ比 4.40; 95%信頼区間 1.31-15.2; $P=0.017$; likelihood ratio test), 術前body mass index $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (3.95; 1.18-13.5; $P=0.027$), および術前血清アルブミン値 $\leq 3.8 \text{ g/dL}$ (3.69; 1.23-11.6; $P=0.020$)であった。

2. 手術室における撮像環境の評価

・手術室の照明を全消灯し、システム A (医療用内視鏡システム) を用いて観察した場合、濃度 $1.0 \mu\text{M}$ の HMRG が発する蛍光シグナルを TV モニター上で認識することが可能であった。天井灯を点灯しても濃度 $10 \mu\text{M}$ の HMRG が発する蛍光シグナルを認識可能であったが、无影灯を点灯すると蛍光シグナルの認識が不能であった。システム B を用いて光源波長を HMRG に最適化 (490nm) したが、光源の光量が不足しているためか視認性は改善しなかった。手術室照明全消灯下にシステム C を用い、ISO 感度を 128,000 以上に設定 (exposure time: 4ms) すると、 515nm long-pass フィルターを介した肉眼観察の視野と同様、最も薄い濃度 ($0.1 \mu\text{M}$) の HMRG サンプルを認識できた。また、励起光により手術操作に必要な背景の構造も十分に描出された。HMRG 観察に最適化した実験用蛍光観察装置 (Discovery) を用いても HMRG 濃度 $0.1 \mu\text{M}$ のサンプルが描出可能であったが、exposure time は 75ms を要した。HMRG の蛍光シグナル認識の有無を S/B ratio の測定結果と対比させると、およそ S/B ratio 2 以上の場合、蛍光シグナルが認識可能となることが示された。

3. gPhe-HMRG 製造工程の整備

・品質規格について検討し、強熱残分などを追加した。また、精製方法の見直しに関連し、含量測定方法を見直した。

・gPhe-HMRG は、中性条件下で結晶化することがわかった。結晶化法により精製することで、凍結乾燥作業の回避及びトリフルオロ酢酸の除去が可能となった。

・Fmoc-HMRG $\cdot 1/2$ 硫酸は、結晶として単離が可能であり、出発物質として設定可能と考えられた。

D. 考察

今回の研究では、まずブタの開腹下膵部切除において、患者体外サンプルを用いた先行研究で POC が得られた配合と同じ組成のキモトリプシンプローブ ($50\mu\text{M}$ に調整した gPhe-HMRG に trypsin を $400\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加) を膵断端に散布することで、膵液の漏出部位をリアルタイムに描出できることが確認された。ブタ膵臓の厚みは $1\sim 2\text{cm}$ 程度であり、ブタの膵切除においては1回あたり $200\mu\text{L}$ の投与量で膵断端全面にキモトリプシンプローブを散布することができた。ヒトの膵断端の面積には個人差があるが、ブタより2倍程度大きいため、1回あたりの投与量を $500\mu\text{L}$ に設定するのが妥当であると考えられる。また、キモトリプシンプローブの臨床使用に際しては、膵切除後だけでなく、膵液漏出部位を縫合閉鎖したり、膵管を消化管と吻合したりした後も複数回蛍光イメージングを行う可能性がある。以上の点を考慮し、今後の臨床試験で想定されるキモトリプシンプローブの投与量を次のように設定し、非臨床安全性試験を計画することとした:

「 $50\mu\text{M}$ の gPhe-HMRG に trypsin を

400 μ g/mL の濃度で添加して作成したキモトリプシンプローブを、臍断端に 1 回あたり 500 μ L 散布する。蛍光イメージングは同一手術中に最大 4 回施行される可能性があり、その場合のプローブ投与量は計 2mL (gPhe-HMRG 57.8 μ g, trypsin 800 μ g) である」

上記の投与法を前提として PMDA 薬事戦略相談対面助言を受け、キモトリプシンプローブを用いた臨床試験を実施する際に求められる非臨床安全性試験として以下の項目を実施すべきとの見解を得た：

- ・安全性薬理試験
 - ・トキシコキネティクス及び薬物動態試験
 - ・単回投与毒性試験
 - ・反復投与毒性試験 (非げっ歯類)
 - ・遺伝毒性試験
 - ・hERG 電流に対する安全性薬理試験
- * 全て gPhe-HMRG および生成物たる HMRG に対して実施

これらの試験項目のうち、本研究期間では単回投与毒性試験、遺伝毒性試験 (細菌を用いた復帰突然変異試験とは乳類培養細胞を用いた染色体異常試験)、及び hERG 電流に対する安全性薬理試験を実施し、上記試験の範囲内で gPhe-HMRG の安全性を確認した。HMRG については、用量反応性の遺伝毒性を発現する可能性が示唆された。本プローブの投与法が微量 (gPhe-HMRG として最大で約 57.8 μ g) であり、腹腔内散布後に十分量の生理食塩水で洗浄できることを考慮すると、臨床使用に際する遺伝毒性のリスクは極めて低いと予想されるが、今後腹腔内組織に残留する HMRG を測定するなどの評価を加え、治験計画の策定に反映させたい。なお、今回の試験期間中に実施に至

らなかった試験項目、すなわち非げっ歯類を用いた心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験 (テレメトリー検査) と反復投与毒性試験は後続研究で実施する予定である (トキシコキネティクスと薬物動態試験は反復投与毒性試験の中で実施)。

また PMDA 対面助言の中で、trypsin については既に医薬品の添加剤として販売されている実績があり、安全性について既存のデータを収集することが適切であるとの見解を得た。Trypsin のマウスにおける急性毒性としては、静脈内投与における LD50 が 11.1 mg/kg、腹腔内投与における LD50 は 100mg/kg との報告がある。キモトリプシンプローブを用いた臍液蛍光イメージングで腹腔内に散布される trypsin は 1 回あたり 200 μ g、最大 4 回イメージングを行ったとしても計 800 μ g に過ぎず、しかも各回のイメージング後に生理食塩水で臍断端を十分に洗浄するために毒性は極めて小さいと予想されるが、引き続き trypsin の安全性データを検索・収集する。

本技術の対象は臍切除全般であるが、第 I/II 相試験においては術式および患者背景を統一することが望ましい。まず術式に関して、臍頭十二指腸切除と臍体尾部切除とは、臍再建の要否などに関して手術手技が大きく異なる。本研究で実施した retrospective な解析では、術後の重症合併症の発生頻度も両術式の間で大きく異なっていた (臍頭十二指腸切除 11% vs. 臍体尾部切除 30%)。また、正常臍 (soft pancreas)、肥満、低栄養状態が術後臍液漏および重症合併症発生のリスク因子であることが示された。以上から、今後実施する治験では、術式をより単純な臍体尾部切除に限定し、臍の硬さ、肥満の有無、栄養

状態を研究対象選択の因子または送別化因子に加えることが望ましいと考えられる。

本研究費採択の二次評価でも「通常の手術現場の明かりの中で蛍光を検出するのは、困難さが推測される。他方、暗くなれば部位を同定できない。手術中にどのような操作が行われることになるのかイメージがつかみにくい」と指摘されているように、膵液の蛍光シグナルだけでなく手術手技の遂行を可能にする背景の視野が十分に得られることを確認し、治験に向けた手術室の撮像環境を構築することは、本技術の開発における危急の課題であった。今回の研究では、薬事承認を経て市販されている医療用内視鏡システム自家蛍光モードの光源を用い、術者が適切なフィルターを装着することにより、手術室を全消灯した環境でも蛍光シグナルと同時に十分な背景の情報を肉眼的に観察できることが確認された。撮像システムの感度を向上させることにより、腹腔鏡手術においてもTVモニター上で上記の画像を表示できる可能性も示唆された。

さらに、非臨床安全性試験で用いるための試験物を合成する過程でgPhe-HMRGの品質規格確定のための検討が行われた。同時に、試験物の精製過程を見直すことにより、今後予定される臨床試験に際してgPhe-HMRGを安定的に供給できる体制が整備された。

以上の結果を踏まえ、キモトリプシンプローブを用いた膵液の術中蛍光イメージングに関する臨床試験の骨子を添付資料のように設定した。今後は追加の安全性試験項目を完了し、規制当局の助言を受けながら、治験届けの提出を目標に研究を継続したい。

E. 結論

キモトリプシンプローブを用いた膵液の術中蛍光イメージング技術の開発において、臨床使用に際して求められる非臨床試験のうち単回投与毒性試験、遺伝毒性試験、及びhERG電流に対する安全性薬理試験を実施し、試験物であるgPhe-HMRGが重大な毒性を示さないことを確認した。また、プローブ製造行程が改良されるとともに手術室における撮像環境が確立され、本技術を用いた臨床試験を実施する体制が整備された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Harada N, Ishizawa T, Inoue Y, et al. Acoustic radiation force impulse imaging of the pancreas for estimation of pathologic fibrosis and risk of postoperative pancreatic fistula. J Am Coll Surg 2014;219:887-894.

・ Mori K, Ishizawa T, Urano Y, et al. Intraoperative visualization of pancreatic juice leaking from the pancreatic stump in a swine model. (in submission)

2. 学会発表

- ・ 山下俊、石沢武彰、國土典宏、他. 膵体尾部切除における予防的腹腔ドレーンの役割と膵液漏評価法の再検討. 第69回日本消化器外科学会総会 一般演題.
- ・ 石沢武彰、浦野泰照、國土典宏. 肝癌、胆管、膵液漏を描出する術中蛍光イメージングを如何に臨床応用するか. 第69回日本消化器外科学会総会 シンポジウ

ム: 消化器外科における診断・治療のイノベーション。

- Ishizawa T, Kokudo N. Application of ICG fluorescence imaging to laparoscopic HPB surgery. 34th Annual Meeting of the Korean Society of Endoscopic & Laparoscopic Surgeons and 2014 International Symposium. April 24-25, 2014. Seoul, Korea.
- Ishizawa T. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. 28th International Congress and Exhibition of Computer Assisted Radiology and Surgery. June 25-28, 2014. Fukuoka, Japan.
- Ishizawa T. Update of application of fluorescence in HPB surgery. 6th Annual Worldwide Congress of the Clinical Robotic Surgery Association. Oct. 23-25, 2014. San Francisco, US.
- Ishizawa T, Urano Y, et al. Clinical applications of fluorescence imaging for enhancing safety and therapeutic efficacy of hepatobiliary and pancreatic surgery. Photonics West 2015. Feb. 7-12, 2015. San Francisco, US.
- Ishizawa T, Inoue Y. Application of Fluorescence Imaging in HPB Surgery. 2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery. Feb. 14, 2015. Miami, US.
- Yamashita S, Ishizawa T, Urano Y, et al. Application of FIGS for Pancreatic Leaks. 2nd Annual International

Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery. Feb. 14, 2015. Miami, US.

- Urano Y. Cancer Imaging Using Activatable Fluorescence Probes for γ -Glutamyltranspeptidase. 2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery. Feb. 14, 2015. Miami, US.

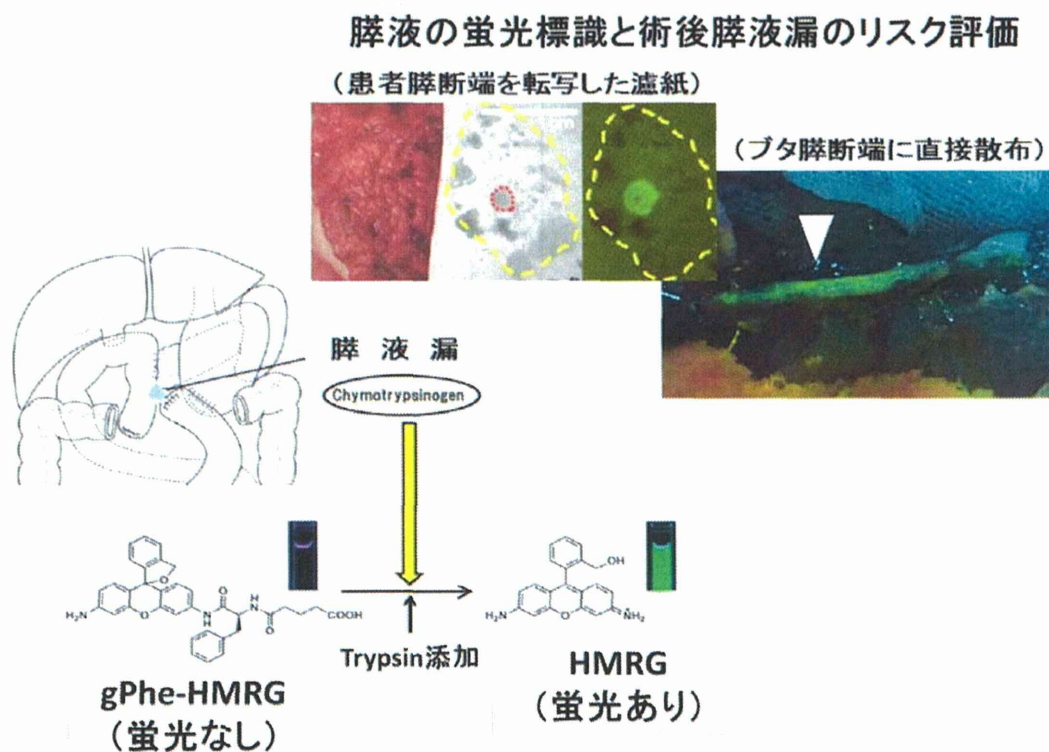
H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得: 高感度膵液漏迅速検出法 (特願 2012-123478)、PCT 移行中。
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

(参考文献)

1. 今野弘之, 若林剛, 宇田川晴司ら. National Clinical Database (消化器外科領域) Annual Report 2011-2012. 日本消化器外科学会雑誌. 2013;46(9):952-963.
2. Yamashita S, Ishizawa T, Urano Y, et al. Visualization of the leakage of pancreatic juice using a chymotrypsin-activated fluorescent probe. Br J Surg 2013;100:1220-1228.
3. Bassi C, Dervenis C, Butturini G, et al.; International Study Group on Pancreatic Fistula Definition. Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. Surgery 2005;138:8-13.
4. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. Ann Surg 2004;240:205-213.

図1 キモトリプシンプローブの化学構造と膵液蛍光イメージングの概略



膵液中に含まれる chymotrypsinogen が、プローブに添加される trypsin により chymotrypsin に変化する。無色透明の gPhe-HMRG が chymotrypsin による加水分解を受けて蛍光物質である HMRG が生成され、反応後数分で緑色の蛍光が観察される。

(添付資料) 治験計画の骨子

【目的】

・膵切除手術中に患者体腔内で膵断端にキモトリプシンプローブを散布し、膵液漏出部位を描出する蛍光イメージング技術の安全性と術後膵液漏の発生率低減効果を検討すること。

【試験デザイン】

・非盲検、単一群、I/II 相試験

【対象患者】

・開腹膵体尾部切除術を受ける患者（高度肥満、術前低栄養状態の患者は除外する可能性がある。背景膵疾患の有無や膵実質の硬さにより層別化する可能性がある）
・予定症例数：検討中

【方法】

膵離断後、以下の手順に従い膵液のイメージングを行い、膵液漏が描出された場合は縫合閉鎖を試み、繰り返し膵液のイメージングを行う。その後、通常の手順に従い閉腹する。

- 1) 自動吻合器またはその他の方法で膵を離断し、離断面を十分に止血、清拭する。
- 2) 手術室で gPhe-HMRG 溶液 (50 μ M) と trypsin 溶液 (0.4 mg/mL) を混和し、キモトリプシンプローブを調製する (イメージング 1 回分として 500 μ L)。
- 3) 膵離断面にキモトリプシンプローブ (500 μ L) を散布する。手術用无影灯を消灯し、医療用内視鏡装置の自家蛍光モードを用いて励起光を照射、フィルター (515 nm long-pass) を通して肉眼および高 ISO 感度を有す撮像装置で膵断端を観察する。
- 4) 膵液漏が同定された場合、膵液漏出部位に針糸をかけて縫合閉鎖を試みる。
- 5) 膵液漏出部位の縫合閉鎖後に、上記 2)、3) と同じ方法で膵離断の蛍光イメージングを行い、膵液漏が閉鎖されたか評価する。

*最大で計 4 回のイメージングを行うこととする。また、各回のイメージング後に、100 mL 以上の生理食塩水を用いて膵離断面を洗浄する

【評価項目】

・主要評価項目：キモトリプシンプローブ投与による副作用発現の有無
・副次的評価項目：ISGPF 分類に基づく術後膵液漏発生率、術後合併症の発生率および重症度、本技術の feasibility (膵液漏の同定率、縫合閉鎖が技術的に可能であった割合、など)、その他の手術短期成績

キモトリプシンプローブ最適化に関する検討

担当責任者 浦野 泰照

東京大学大学院 医学系研究科 生体情報学講座 教授

研究要旨：手術中に患者体腔内にキモトリプシンプローブ（trypsin 添加 glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green, gPhe-HMRG）を散布し、腓断端から漏出する腓液を描出する蛍光イメージング技術の開発にあたり、大型動物（ブタ）を用いてプローブ条件を検討した。既に患者体外サンプルを用いた検討にて十分な腓液描出能を示したプローブ条件（gPhe-HMRG 50 μ M に trypsin を 400 μ g/mL の濃度で添加）と同一の条件で調整した溶液を散布することにより、自動吻合器で閉鎖した腓断端から漏出する腓液を描出できることが確認された。フィルター（515nm long-pass）装着下に術者が肉眼で腓液漏出部位を認識することも可能であり、励起光照射で得られる視野で縫合などの手術操作を遂行することができた。ヒトの腓断端の面積と、1回の手術で複数回のイメージングを行う可能性を考慮し、今後の非臨床試験ではキモトリプシンプローブ（gPhe-HMRG 50 μ M に trypsin 400 μ g/mL 添加）を1回 500 μ L、最大 2mL（イメージング4回分）を腹腔内に散布する投与法を設定することが妥当であると考えられた。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は、手術中に腓断端から漏出する腓液を標識するための蛍光プローブを開発することである。研究者らはこれまでに、腓液中の chymotrypsin と反応して蛍光を呈する化合物、glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green (gPhe-HMRG)を新たに設計・合成し、これに trypsin を添加した「キモトリプシンプローブ」を患者から採取した体外サンプルに散布することにより、腓液漏の可視化と術後腓液漏のリスク評価が可能であることを示した[1]。

本業務項目の目的は、患者体外サンプルを用いた検討で既に臨床的効果が実証されたプローブ条件を用いて、体腔内で本プロ

ーブを腓断端に散布することにより腓液漏を描出し得るか検証することである。

B. 研究方法

- 1) 雌の実験用ブタ 1頭を用い、全身麻酔下に開腹、腓体尾部を授動した後に、臨床で腓切離に用いるのと同じの自動縫合器（ECHELON FLEX™; Ethicon Endo-Surgery）を用いて腓尾部から実質を計4回離断した。自動吻合器に装着する staple には、薄い組織に用いる白カートリッジ（最初2回の離断）と、これより staple 形成厚が大きい緑カートリッジ（最後2回の離断）を用いた。
- 2) 各回の離断後に、ガーゼで清拭した腓離断面にキモトリプシンプローブ 200 μ L を

散布した。キモトリプシンプローブは、PBSで溶解し50 μ Mに調整したgPhe-HMRGに、腓断端への散布直前にtrypsin(牛腓臓由来、T1426 SIGMA)を400 μ g/mLの濃度で添加したものをを用いた。

3) FluorVivo imaging system (Indec, Inc.; excitation, 470 \pm 20nm; emission, 515nm long-pass)を用いて腓断端を5分間観察し、蛍光強度を測定した。

4) 切除した腓組織をホルマリン固定後にH&E染色し、蛍光イメージングの結果と腓断端の顕微鏡所見を対比させた。

(倫理面への配慮)

・動物実験に際して、東京大学の指針および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省)」を遵守した。

C. 研究結果

・キモトリプシンプローブを用いた蛍光イメージングにより、白カートリッジを用いた2回の腓離断後に3カ所の腓液漏出部位が、緑カートリッジを用いた2回の腓離断後に5カ所の腓液漏出部位が描出された

(図1A)。腓液漏出部位は撮像装置のTVモニターだけでなく、術者がフィルター(515nm long-pass)を装着することにより肉眼でも観察可能であり、蛍光イメージング下に腓断端の追加縫合閉鎖などの外科的処置を行うことが可能であった(図1B)。

・切離部位における腓実質の厚さは1.2~1.9cmであった。切除標本を溶解させて自動吻合器のstapleの形状を測定したところ、全て完全なB型に形成されており、形成後のstapleの厚みは白カートリッジで1.075 \pm 0.004mm(平均 \pm 標準偏差)、緑カートリッジで2.182 \pm 0.014mmであった。

・自動吻合器による腓実質閉鎖ラインに蛍光シグナルが観察された上記8カ所と、蛍光シグナルが観察されない部位(1離断あたり3カ所、計12カ所)にROIを設定して蛍光強度を測定した。蛍光シグナルが同定された部位では、キモトリプシンプローブ散布後3分で蛍光強度が散布前の2.0~5.5倍に上昇したのに対し、蛍光シグナルが同定されない部位では散布後5分でも蛍光強度の上昇を認めなかった(散布前の0.7~1.7倍、図2)。

・切除標本の顕微鏡観察では、腓液の蛍光シグナルが同定された部位にほぼ一致して、十分に閉鎖されていない腓管の断端が観察された(図3)。

D. 考察

今回の検討により、既に患者体外サンプルを用いた先行研究において最適化が図られた条件と同一のプローブを用い、腹腔内で腓断端から漏出する腓液を蛍光標識できることが確認された。プローブ散布後3分で肉眼的に腓液漏出部位の確認が可能であり、また励起光照射による視野で十分に縫合などの手術操作を行うこともできることから、今回設定したプローブ条件で得られる蛍光イメージングは、腓液漏出部位を同定・閉鎖するという目的を十分に満たすものであると考えられる。

患者への臨床応用を考慮した場合、キモトリプシンプローブの投与量を調整する必要がある。今回用いたブタ腓断端の厚みは1.2~1.9cmであった。ヒトにおける腓断端の厚みは部位および個体により差が大きい、ブタの2倍程度の断面積を想定し、臨床例では1回当たり500 μ Lのキモトリプシンプローブを準備することが必要であると考えられる。また、腓切離直後に加えて、

膵管の吻合後、あるいは膵液漏出部位の縫合閉鎖後にも1~3回の蛍光イメージングを行うことを想定すると、1症例あたり最大で4回分のキモトリプシンプローブ（用量として最大で2mL）を投与する可能性を考慮して安全性試験を計画する必要がある。

E. 結論

本技術を臨床で用いる際には、キモトリプシンプローブ（gPhe-HMRG 50 μ Mに trypsin 400 μ g/mL添加）を1回 500 μ L、最大4回で2mL腹腔内に投与することを想定して非臨床試験を実施することが妥当である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Mori K, Ishizawa T, Urano Y, et al. Intraoperative visualization of pancreatic juice leaking from the pancreatic stump in a swine model. (in submission)

2. 学会発表

- ・山下俊、石沢武彰、浦野泰照、他. 膵体尾部切除における予防的腹腔ドレーンの役割と膵液漏評価法の再検討. 第69回日本消化器外科学会総会 一般演題.
- ・石沢武彰、浦野泰照、国土典宏、他. 肝臓、胆管、膵液漏を描出する術中蛍光イメージングを如何に臨床応用するか. 第69回日本消化器外科学会総会 シンポジウム: 消化器外科における診断・治療のイノベーション.
- ・Ishizawa T, Urano Y, et al. Application

of ICG fluorescence imaging to laparoscopic HPB surgery. 34th Annual Meeting of the Korean Society of Endoscopic & Laparoscopic Surgeons and 2014 International Symposium. April 24-25, 2014. Seoul, Korea.

- ・Ishizawa T. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. 28th International Congress and Exhibition of Computer Assisted Radiology and Surgery. June 25-28, 2014. Fukuoka, Japan.
- ・Ishizawa T. Update of application of fluorescence in HPB surgery. 6th Annual Worldwide Congress of the Clinical Robotic Surgery Association. Oct. 23-25, 2014. San Francisco, US.
- ・Ishizawa T, Urano Y, et al. Clinical applications of fluorescence imaging for enhancing safety and therapeutic efficacy of hepatobiliary and pancreatic surgery. Photonics West 2015. Feb. 7-12, 2015. San Francisco, US.
- ・Ishizawa T. Application of Fluorescence Imaging in HPB Surgery. 2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery. Feb. 14, 2015. Miami, US.
- ・Yamashita S, Ishizawa T, Urano Y, et al. Application of FIGS for Pancreatic Leaks. 2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery. Feb. 14, 2015. Miami, US.

- Urano Y. Cancer Imaging Using Activatable Fluorescence Probes for γ -Glutamyltranspeptidase. 2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery. Feb. 14, 2015. Miami, US.

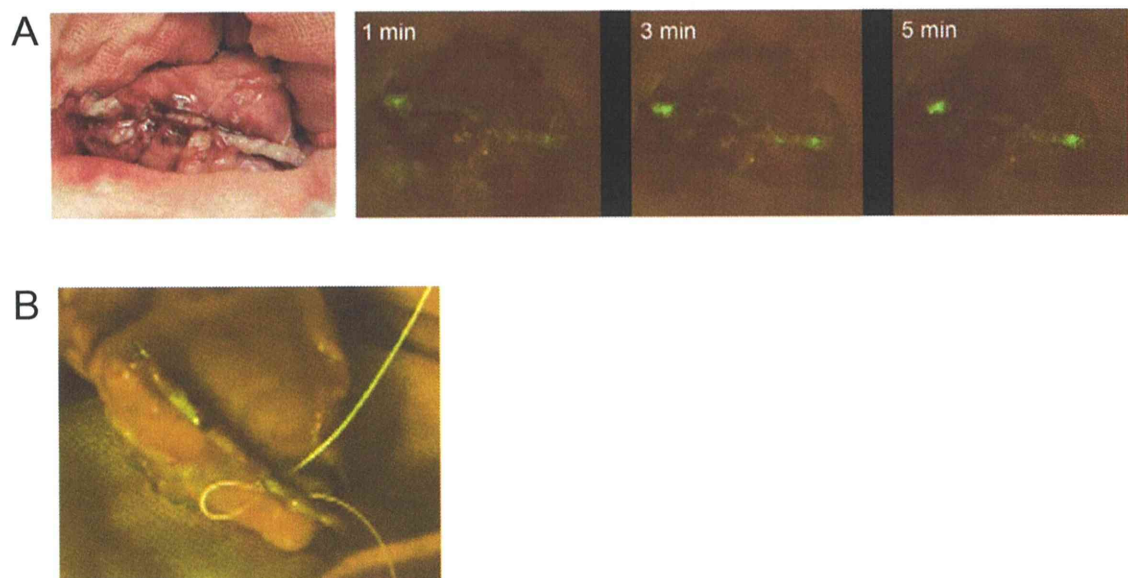
H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得: 高感度膵液漏迅速検出法 (特願 2012-123478) について PCT 移行中。
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

(参考文献)

1. Yamashita S, Ishizawa T, Urano Y, et al. Visualization of the leakage of pancreatic juice using a chymotrypsin-activated fluorescent probe. Br J Surg 2013;100:1220-1228.

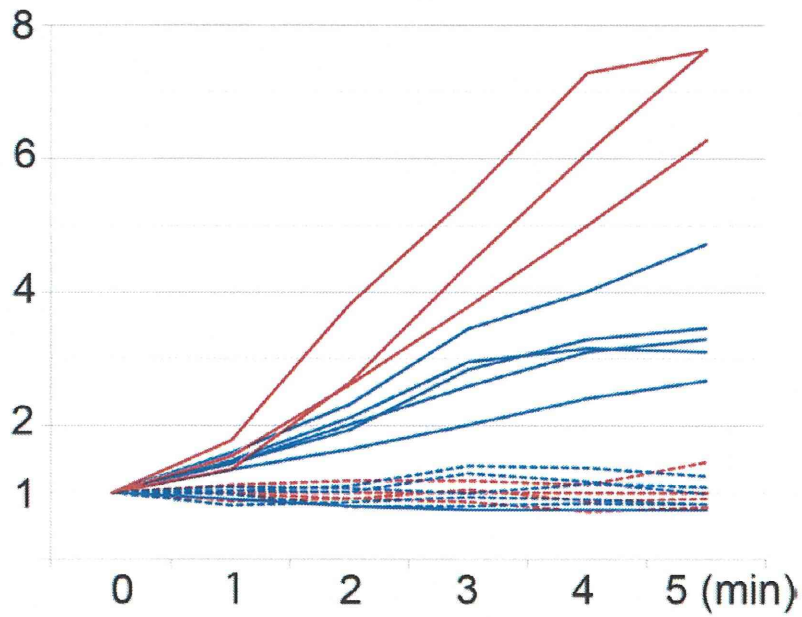
図1 キモトリプシンプローブ散布による膵液漏の術中蛍光イメージング



(A) 自動吻合器で閉鎖した膵断端（左）にキモトリプシンプローブを散布し、励起光照射下に観察すると、3分後から膵液漏出部位（2箇所）が明瞭に描出された（右）。

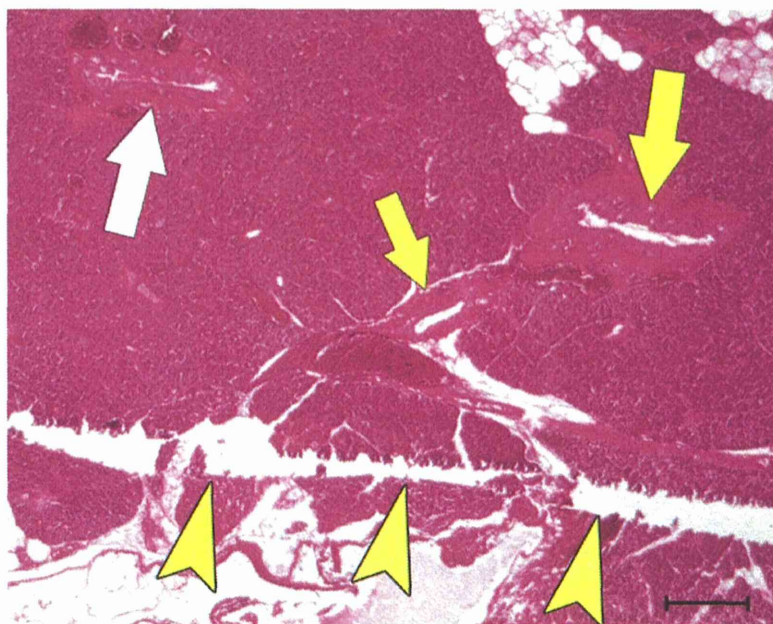
(B) 術者がフィルター装着し肉眼で観察することにより、蛍光イメージングを行いながら膵液漏出部位に縫合などの手術操作を加えることが可能であった。

図2 キモトリプシンプローブ散布後の腓断端における蛍光強度の推移



蛍光シグナルが同定された部位（8箇所）では、キモトリプシンプローブ散布後3分で蛍光強度が散布前の2.0～5.5倍に上昇したのに対し、蛍光シグナルが同定されない部位（12箇所）では散布後5分でも蛍光強度の上昇を認めなかった（散布前の0.7～1.7倍）。

図3 膵断端の顕微鏡観察



膵断端の顕微鏡観察（H&E 染色）では、ほぼ自動吻合器の staple によりほぼ完全に閉鎖された膵管（白矢印）も観察される一方、閉鎖が不十分な膵管断端（黄色矢印）も存在し、蛍光イメージングで観察された膵液漏出の原因になっていると考えられた。黄色矢頭は staple を抜去した癒痕。目盛りは 300 μ m を示す。