

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、臍断端から漏出する臍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臍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臍断端から漏出する臍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臍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。ヒトの臍断端の面積と、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、手術中に臍断端から漏出する臍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、臍液中の 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、臍液漏の可視化と術後臍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臍断端に散布することにより臍液漏

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、臍体尾部を授動した後に、臨床で臍切離に用いるのと同じの自動縫合器（ECHELON FLEX™; Ethicon Endo-Surgery）を用いて臍尾部から実質を計 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、ガーゼで清拭した臍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、膵断端への散布直前に trypsin (牛膵臓由来、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)を用いて膵断端を5分間観察し、蛍光強度を測定した。

4) 切除した膵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膵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回の膵離断後に3カ所の膵液漏出部位が、緑カートリッジを用いた2回の膵離断後に5カ所の膵液漏出部位が描出された(図1A)。膵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膵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)。

・切離部位における膵実質の厚さは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。

・自動吻合器による膵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、膵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膵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、腹腔内で膵断端から漏出する膵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分で肉眼的に膵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、膵液漏出部位を同定・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。今回用いたブタ膵断端の厚みは1.2~1.9cmであった。ヒトにおける膵断端の厚みは部位および個体により差が大きいが、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、膵切離直後に加えて、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、國土典宏、他. 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, 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.

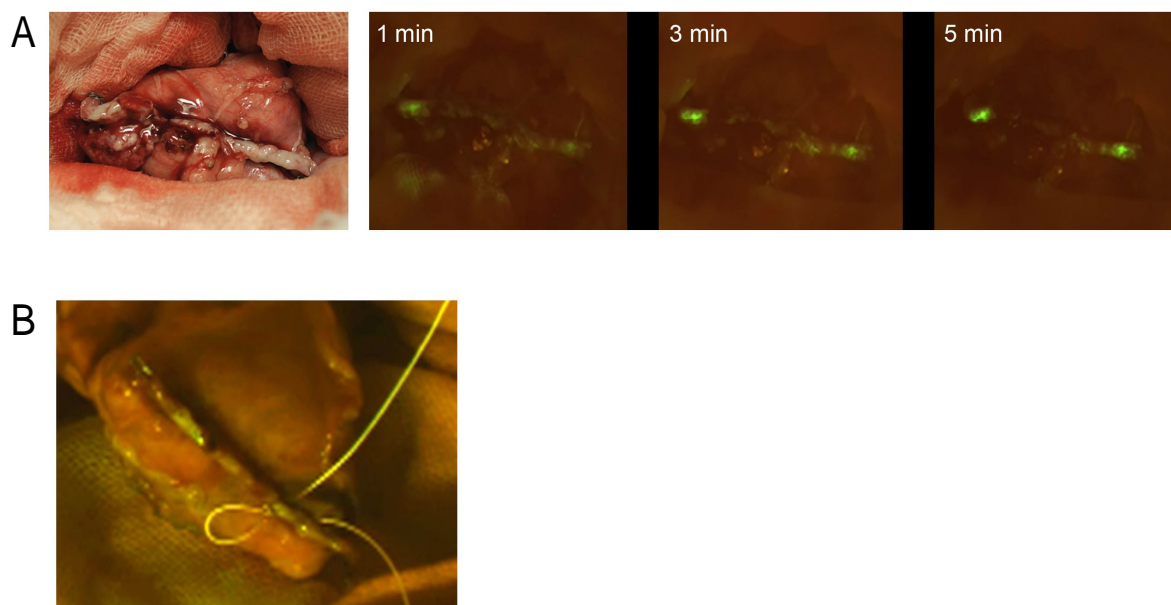
H. 知的財産権の出願・登録情報

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.

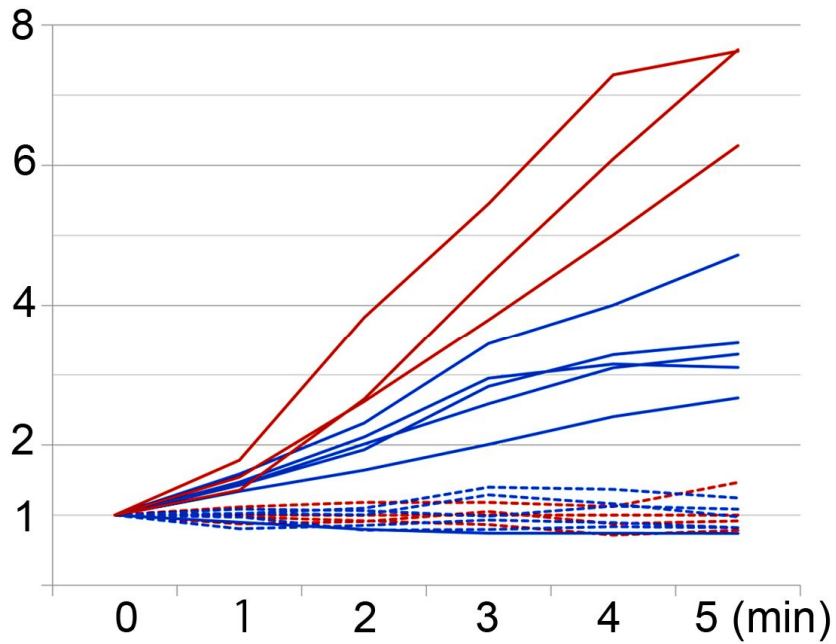
図1 キモトリプシンプローブ散布による膵液漏の術中蛍光イメージング



(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）。

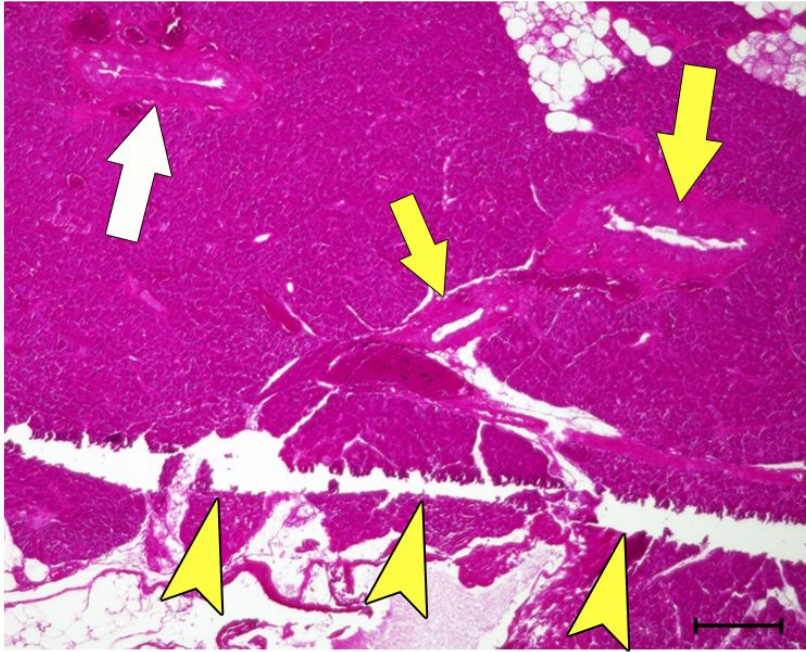
(B) 術者がフィルター装着し肉眼で観察することにより、蛍光イメージングを行いながら膵液漏出部位に縫合などの手術操作を加えることが可能であった。

図2 キモトリプシンプローブ散布後の瞬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 を抜去した瘢痕。目盛りは 300 μ m を示す。