

厚生労働科学研究委託費

医療技術実用化総合研究事業

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「手術中に胆汁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)

手術中に腭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	1-11
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	12-18
浦野 泰照	
2 . gPhe-HMRG, HMRGの非臨床安全性試験の実施	19-38
石沢 武彰	
3 . 治験開始に向けた体制整備	39-51
石沢 武彰	

III . 学会発表実績	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。上記の投与方法を想定し、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）

国土典宏	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命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

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

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、全身麻酔下を開腹、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、キモトリブ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

・キモトリブ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 をブタ体腔内で臍断端に散布することにより、臍液漏出部位を明瞭に描出することができた。漏出する臍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。

・臍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。臍液漏出部位では、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、臍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臍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：

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

性基準）

hERG 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）

細菌を用いた復帰突然変異試験（信頼性基準）

ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験（信頼性基準）

ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験

gPhe-HMRG：一般状態、体重測定、病理学的検査（剖検）とも、全例で異常はみられなかった。

HMRG：一般状態、体重測定、病理学的検査（剖検）とも、全例で異常はみられなかった。

hERG 試験細胞を用いた K⁺チャネルへの影響評価

gPhe-HMRG：hERG 電流の抑制率は、4, 40, 400 ng/mL のいずれの濃度においても陰性対照群と比べて有意な差は認められなかった。

HMRG：hERG 電流の抑制率は、4 ng/mL の濃度で陰性対照群と比べて有意な差は認められなかったが、40, 400 ng/mL の濃度では有意差が認められた。

細菌を用いた復帰突然変異試験

gPhe-HMRG：復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

HMRG：代謝活性化存在下の S. typhimurium TA100, 98, TA1537 において復帰変異コロニー数が用量反的に増加し、S. typhimurium TA98, TA1537 では陰性対照の2倍以上の増加を示した。

ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試

験

gPhe-HMRG：染色体の構造異常を有する細胞、数的異常の増加は認められなかった。HMRG：短時間処理法の代謝活性化非存在下において、染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度が6.0%に増加し、陰性対照と比較して統計学的な有意性及び用量反応性も認められた。

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、無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・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、まずブタの開腹下臍部切除において、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 μ M に調整した gPhe-HMRG に trypsin を 400 μ g/mL の濃度で添加）を臍断端に散布することで、臍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。ブタ臍臓の厚みは 1~2cm 程度であり、ブタの臍切除においては 1 回あたり 200 μ L の投与量で臍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。ヒトの臍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 μ 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、臍切離後だけでなく、臍液漏出部位を縫合閉鎖したり、臍管を消化管と吻合したりした後に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 μ 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ほ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膵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膵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。

本技術の対象は膵切除全般であるが、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、膵頭十二指腸切除と膵体尾部切除とでは、膵再建の可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（膵頭十二指腸切除 11% vs. 膵体尾部切除 30%）。また、正常膵（soft pancreas）、肥満、低栄養状態が術後膵液漏および重症合併症発生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、術式をより単純な膵体尾部切

除に限定し、膵の硬さ、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.

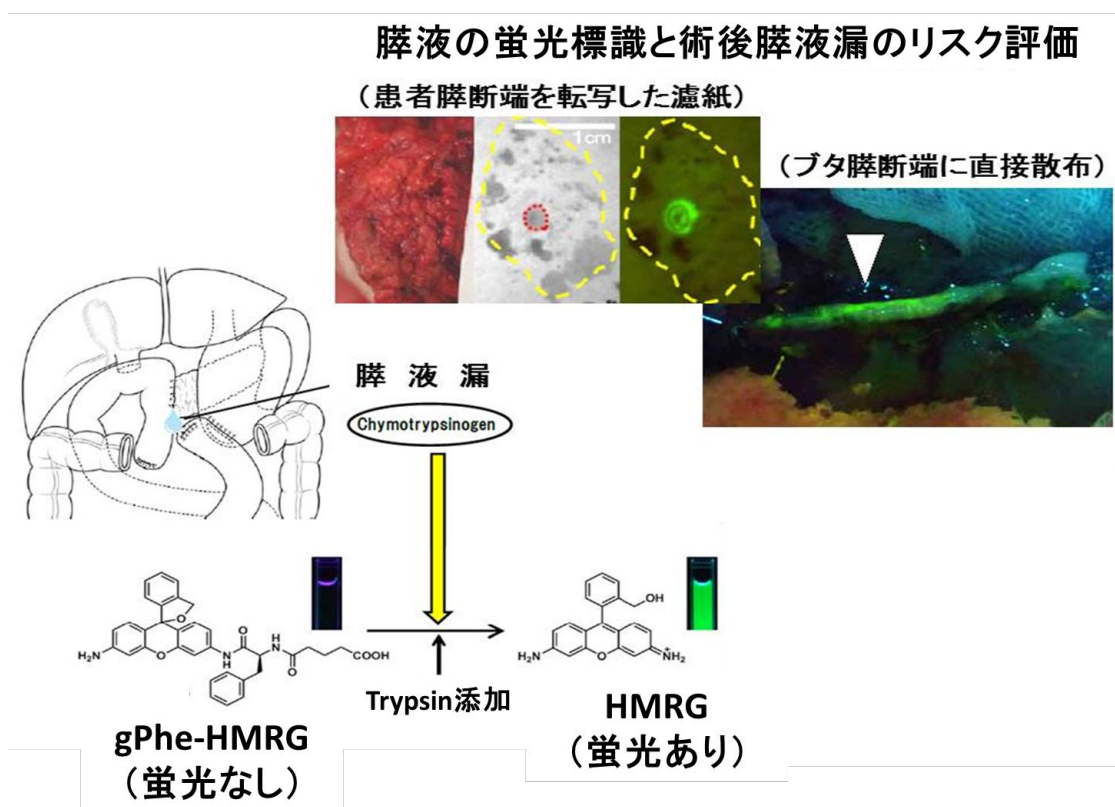
H. 知的財産権の出願・登録情報

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(: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。手術用無影灯を消灯し、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、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.

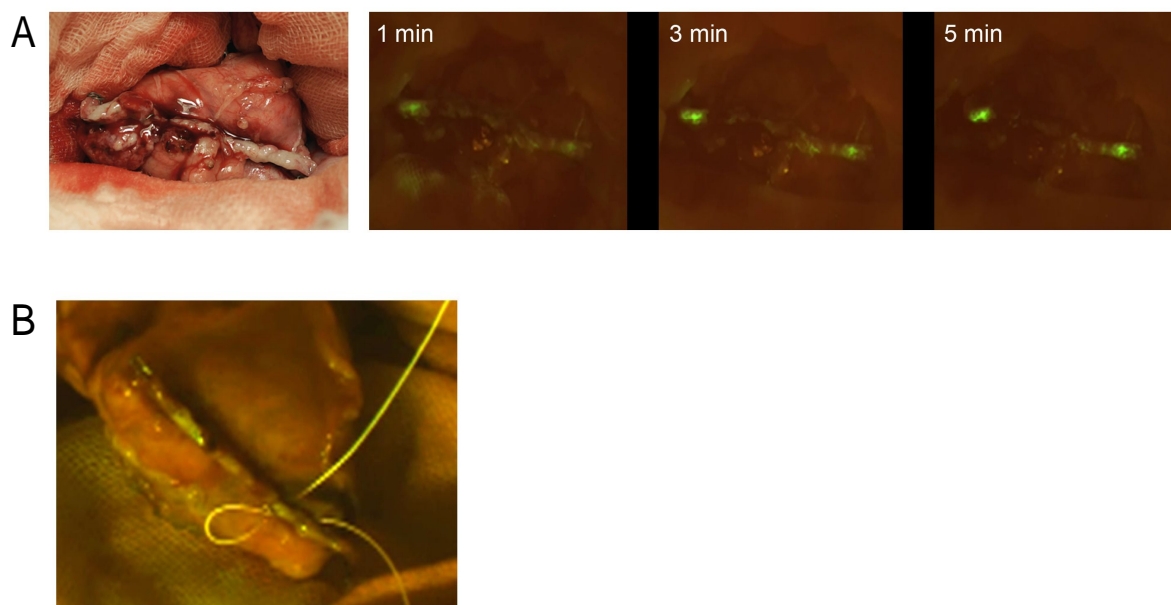
H. 知的財産権の出願・登録情報

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.

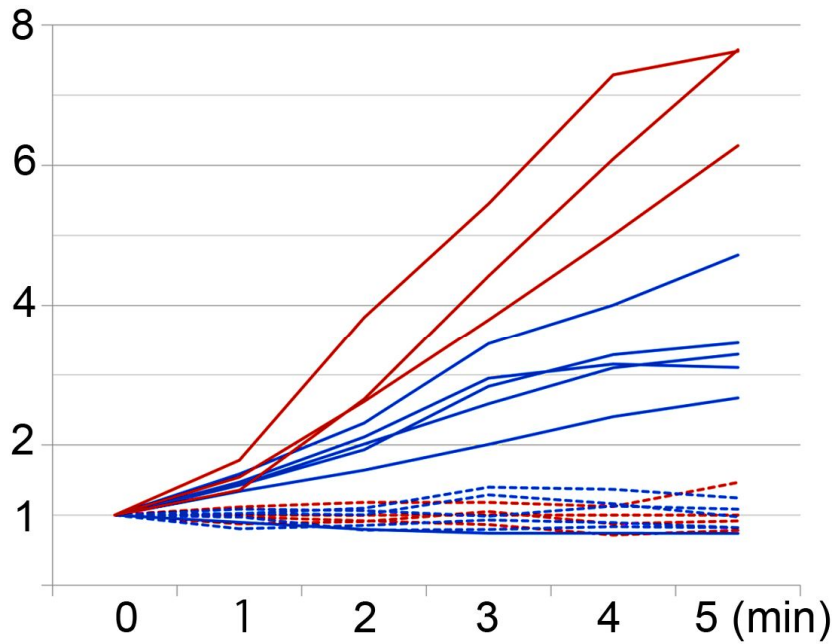
図1 キモトリプシンプローブ散布による膵液漏の術中蛍光イメージング



(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）。

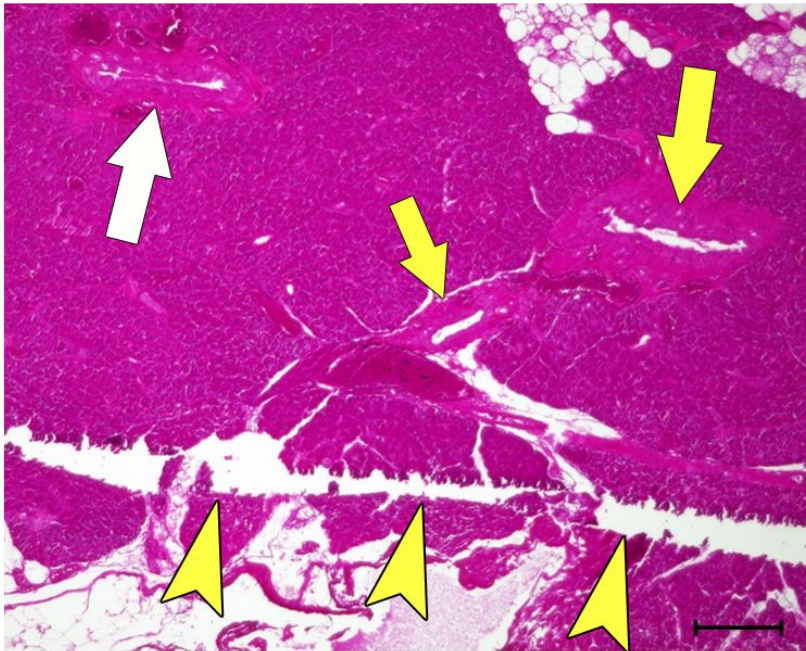
(B) 術者がフィルター装着し肉眼で観察することにより、蛍光イメージングを行いながら膵液漏出部位に縫合などの手術操作を加えることが可能であった。

図2 キモトリプシンプローブ散布後の隣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。

gPhe-HMRG, HMRGの非臨床安全性試験の実施

業務主任者、担当責任者 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：キモトリプシンプローブを構成するgPhe-HMRGと生成物であるHMRGに対し、PMDA薬事戦略相談を経て確定した非臨床安全性試験（ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験、hERG試験細胞を用いたK⁺チャンネルへの影響評価、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験）を実施した。上記試験の範囲内では、gPhe-HMRGに関して毒性は認められなかった。HMRGに関する遺伝毒性の可能性については検討を追加して治験計画の策定に反映させる予定である。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は、手術中に膵断端から漏出する膵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、膵液中の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、膵液漏の可視化と術後膵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、キモトリプシンプローブを患者腹腔内に散布し、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に関する治験および臨床試験を計画するにあたり、gPhe-HMRGおよび生成物たるHMRGの非臨床試験を実施し、安全性を検証することである。

B. 研究方法

gPhe-HMRG及びHMRG（体腔内でgPhe-HMRGがキモトリプシンと反応して生成される蛍光物質）を用いて、以降に記す～の非臨床試験を株式会社シミックバイオリサーチセンター本社（研究所）（所在地：山梨県北杜市小淵沢町10221）にて実施した。なお、非臨床試験の委託先は競争入札により決定した。また、非臨床試験の実施に先立ち、HPLCによる投与液中の被験物質濃度分析法に関して、以下の各バリデーション項目について検討を行い、分析法の妥当性を確認している（分析バリデーション）。

- 1) システム適合性
- 2) 特異性
- 3) 検量線の直線性
- 4) 日内再現性
- 5) 日間再現性
- 6) オートサンプラー内安定性

同様に、投与液中の被験物質の保存安定性についても、非臨床試験に先立って確認を行った（保存安定性試験）。

ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験

験

目的：被験物質をラットに単回腹腔内投与し，その毒性を検討する。

実施基準：

gPhe-HMRG：GLP 基準

HMRG：信頼性基準

媒体：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液

使用動物：

種：ラット

系統：Crl:CD (SD), SPF

種及び系統の選択理由：本系統のラットは毒性試験に多用されており，かつ当該試験施設における背景データが豊富である。

供給源：日本チャールス・リバー株式会社
週齢・性別・数：

5 週齢，雌雄，各 22 匹（受入時）

6 週齢，雌雄，各 20 匹（投与時）

受入時体重範囲：

雄 100～160 g，雌 70～130 g

群分け：

・馴化中に異常がないことを確認した動物を用いて，群分け日の体重及び馴化期間中の体重増加量を指標とし，両指標の分布から外れている個体を順に除き，必要数（雌雄各 20 匹）を選抜した。

・群分け日の体重を基に層別無作為抽出法により，1 群当たり雌雄各 5 匹，4 群に振り分け，各群内において動物番号を無作為に付けた。

群構成、gPhe-HMRG：

投与群	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	投与検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	投与液量 (mL/kg)	動物数	
				雄	雌
対照 (媒体)	0	0	2.2	5	5
低用量	1	0.5	2.2	5	5
中用量	50	25	2	5	5
高用量	100	50	2	5	5

群構成、HMRG：

投与群	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	投与検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	投与液量 (mL/kg)	動物数	
				雄	雌
対照 (媒体)	0	0	2	5	5
低用量	1	0.5	2	5	5
中用量	50	25	2	5	5
高用量	100	50	2	5	5

投与量の設定根拠：

gPhe-HMRG の推定される最大臨床使用量は $60 \mu\text{g}/\text{ヒト}$ (体重 60 kg で換算した場合， $1 \mu\text{g}/\text{kg}$) であることから，推定最大臨床使用量 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) を低用量，その 50 倍の $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ を中用量，100 倍の $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ を高用量に設定した。また，HMRG は gPhe-HMRG の代謝物であることから，gPhe-HMRG の推定最大臨床使用量 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) を HMRG の低用量，その 50 倍の $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ を中用量，100 倍の $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ を高用量に設定した。

投与：

投与経路及び選択理由：腹腔内投与・臨床使用方法として患者体内への散布を想定するため。

投与方法及び選択理由：ディスプレイシリンジ及び注射針を用いて腹腔内投与する。ラットの腹腔内投与として一般的な方法である。

投与回数及び選択理由：急性毒性を検討するため，1 回投与

投与液量：投与当日の体重から投与液量を算出した。

観察，測定及び検査：

基準日：投与日を投与後 0 日とした。

対象動物：全例を対象とした。

一般状態観察：

投与日は投与前及び投与後 6 時間まで頻回，翌日以降は投与後 14 日まで 1 日 1 回以上，

生死及び一般状態を観察した。

体重測定：

投与日（投与前），投与後 1，2，4，7 及び 14 日に測定した。

病理学的検査（剖検）：

投与後 14 日にイソフルラン（エスカイン[®]吸入麻酔液，マイラン製薬株式会社）麻酔下で，腹大動脈から放血安楽死させた後，剖検した。

統計学的処理：

体重について，以下を実施

平均値と標準偏差：Microsoft[®] EXCEL 2003 Windows 版（Version 11）を用いて算出

統計検定：Microsoft Windows 版 SAS[®] 9.1.3 を用いて，対照群と投与群間で検定

Bartlett 法による等分散性の検定（有意水準 5%）

等分散の場合，Dunnett 法による多重比較検定（有意水準両側 5%）

等分散でない場合，Steel 法による多重比較検定（有意水準両側 5%）

なお，一般状態及び剖検所見については統計学的処理を実施しない。

hERG 試験細胞を用いた K⁺チャネルへの影響評価

目的：hERG（human ether-a-go-go related gene）発現 HEK293 細胞を用いて，被験物質の hERG K⁺チャネルに及ぼす影響を検討する。

実施基準：

gPhe-HMRG：GLP 基準

HMRG：信頼性基準

陽性対照物質：

名称：E-4031

分子量：474.44

製造販売元：Sigma-Aldrich Co. LLC.

媒体（陰性対照物質）：

名称：ジメチルスルホキシド（以下，DMSO）

製造販売元：和光純薬工業株式会社

等級：生化学用

群構成及び適用濃度：

群	適用濃度 (ng/mL)	細胞数	細胞番号
1 陰性対照 (DMSO)	0	5	[1101 ~ 1105]
2 低濃度	4	5	[1201 ~ 1205]
3 中濃度	40	5	[1301 ~ 1305]
4 高濃度	400	5	[1401 ~ 1405]
5 陽性対照 (E-4031)	50	5	[1501 ~ 1505]

適用濃度設定の理由：

gPhe-HMRG のヒトへの投与量は 60 µg である。ヒトの体重を 60 kg，血液量を 4.6 L とした場合，gPhe-HMRG の最大血中濃度は 13 ng/mL と考えられる。この 30 倍の濃度の 400 ng/mL を高濃度に設定し，以下，公比 10 で減じた 40 及び 4 ng/mL をそれぞれ中及び低濃度に設定した。陽性対照の濃度は hERG 電流の抑制が確実に認められる濃度として 50 ng/mL を設定した。HMRG は gPhe-HMRG の代謝物であることから，gPhe-HMRG と同様の 30 倍の濃度の 400 ng/mL を高濃度に設定し，以下，公比 10 で減じた 40 及び 4 ng/mL をそれぞれ中及び低濃度に設定した。陽性対照の濃度は hERG 電流の抑制が確実に認められる濃度として 50 ng/mL を設定した。

hERG 電流の測定：

操作方法：ホールセルパッチクランプ法：

測定装置：EPC 8（HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH），電圧固定モード

制御ソフトウェア：pClamp 9（Axon Instruments, Inc.）

細胞：測定用細胞を接着させたカバーガラス

を 35 mm のディッシュに入れ灌流
 灌流液温度：26.0 ± 2.0°C
 灌流速度：120 mL/h
 ガラス電極：硼珪酸ガラス管を用いてプ
 ラーで作製．電極内液を充填し 2～8 MΩ
 のもの
 灌流液及び電極内液組成：

灌流液組成

NaCl	137 mmol/L
KCl	4 mmol/L
CaCl ₂	1.8 mmol/L
MgCl ₂	1 mmol/L
HEPES	10 mmol/L
D(+)- Glucose	10 mmol/L

1 mol/L NaOH で pH 7.4 に調整

電極内液組成

KCl	130 mmol/L
MgCl ₂	1 mmol/L
EGTA	5 mmol/L
ATP(Mg 塩)	5 mmol/L
HEPES	10 mmol/L

1 mol/L NaOH で pH 7.2 に調整

パルスプロトコール：

保持電位：-80 mV

脱分極パルス：-40 mV から +20 mV まで
 20 mV 間隔で 4 ステップ，1.5 秒間

再分極パルス：-50 mV，1.5 秒間

パルスの間隔：15 秒

抑制率の算出：

抑制率(%) =

$$\frac{\text{適用前ピーク値} - \text{適用開始10分後ピーク値}}{\text{適用前のピーク値}} \times 100$$

統計学的処理：

検定対象：抑制率

陰性対照群と被験物質適用群：

Bartlett 法による等分散性の検定を行い，
 等分散ならば Dunnett の多重比較検定を
 行う．等分散でない場合は Steel の多重比
 較検定を行う．有意水準は Bartlett 法では
 5%，その他の検定では両側 5%とし，5%及
 び 1%を分けて表示する。

陰性対照群と陽性対照群：

F 検定による等分散性の検定を行い，等分
 散ならば Student の t 検定を行う．等分散
 でない場合は Aspin-Welch の t 検定を行う．
 有意水準は F 検定では 5%，その他の検定
 では両側 5%とし，5%及び 1%を分けて表
 示する。

細菌を用いた復帰突然変異試験

目的：被験物質の遺伝子突然変異誘発性を，
 塩基対置換型変異株の *S. typhimurium*
 TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレ
 ームシフト型変異株の *S. typhimurium*
 TA98, TA1537 を用いて検討する。

実施基準：信頼性基準

陰性対照物質：

被験物質液の調製に使用した溶媒とした。

陽性対照物質：

細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用され
 ている，下記のものを使用した。

名称：

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
 (以下 AF-2 と略す)

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：Sodium azide (以下 AZI と略す)

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：9-aminoacridine (以下 9AA と略す)

供給元：MP Biomedicals, LLC.

名称：2-aminoanthracene (以下 2AA と略

す)

供給元：和光純薬工業株式会社

溶媒：ジメチルスルホキシド(以下 DMSO と略す)

使用菌株：既知変異誘発物質に対して高い感受性を有し、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されている下記の菌株を使用した。

塩基対置換型変異株；

S. typhimurium TA100, TA1535

入手先：日本バイオアッセイ研究センター
フレームシフト型変異株；

S. typhimurium TA98, TA1537

入手先：日本バイオアッセイ研究センター
塩基対置換型変異株；

E. coli WP2 *uvrA*

入手先：独立行政法人製品評価技術基盤機構
バイオテクノロジー本部，生物遺伝資源部門

群構成：菌株ごとに代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下について実施し、さらに陰性対照，陽性対照を設けた。用量当たりの最少グルコース寒天平板培地は、陰性対照群，被験物質群及び陽性対照群のいずれも3枚とした。なお，同日に他の試験を実施する場合は，陽性対照は共有した。陽性対照の用量は，細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されている，下記の用量とした。

菌 株	代謝活性化 非存在下		代謝活性化 存在下	
	化学物 質名	用量 (µg/plate)	化学物 質名	用量 (µg/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1.0
TA1535	AZI	0.5	2AA	2.0
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2AA	10.0
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80.0	2AA	2.0

用量段階：試験の最高用量は，50 mg/mL 溶液を DMSO で希釈し 4.8 mL とした際に算出される用量とし，用量段階は以下公比 3 の計 7 用量とした。

菌株と被験物質液の処理：菌株と被験物質液の処理方法は，細菌を用いる復帰突然変異試験の定法として用いられる 37°C，20 分間のプレインキュベーション法とした。

無菌試験：被験物質への雑菌の混入，試験操作時の雑菌の混入がないことを確認するため，最高濃度の被験物質液と S9 mix について無菌試験を実施した。

観察及び復帰突然変異コロニー数の計測：復帰変異コロニー数の計測時に，目視で析出の有無を確認した。また，実体顕微鏡を用いて background lawn の生育を観察し，生育阻害の有無を確認した。析出または生育阻害が認められた場合は，その旨を記録した。復帰変異コロニー数の計測は，*S. typhimurium* TA100 及び陽性対照の復帰変異コロニー数はコロニーアナライザー（CA-11D，システムサイエンス株式会社）を用いて計測し，他は用手法で計測した。また，析出によりコロニーアナライザーによる計測が困難である場合，コロニーの径が小さくコロニーアナライザーでは正確な計測が困難である場合は，用手法で計測した。

試験の成立条件：下記の条件を満たしている場合に，試験は成立とした。

1. 陰性対照群及び陽性対照群のコロニー数の平均値が背景データ（添付資料）の変動範囲内であること。変動範囲を外れる場合にあっては，背景データとの比較から偶発的な要因によるものと考えられること。
2. 陽性対照のコロニー数（平均）が陰性対照値（平均）の 2 倍以上を示す。
3. 無菌試験の結果 雑菌による汚染が無い。
4. 計測値に欠落がない。

統計学的処理：統計学的処理は行わない。菌株ごとの被験物質の各用量，陰性及び陽性対

照において計測した最少グルコース寒天平板培地ごとの実数値を表示し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値も併せて表示した。さらに、菌株ごとの被験物質の用量と復帰変異コロニー数の用量反応曲線を図示した。

結果の判定：被験物質液処理の復帰変異コロニー数を陰性対照の復帰変異コロニー数と比較し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照の平均値の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量反応性が認められた場合に陽性と判定した。

ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

目的：被験物質の染色体異常誘発性を、雌チャイニーズハムスター肺由来 CHL/IU 細胞を用いて検討する。

実施基準：信頼性基準

陰性対照物質：被験物質液の調製に使用した溶媒とした。

陽性対照物質：陽性対照は、ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化存在下で汎用されている、下記のものを使用した。

名称：Cyclophosphamide(以下、CP と略す)

供給元：Sigma-Aldrich Inc.

溶媒：ジメチルスルホキシド(以下 DMSO と略す)とした。

使用細胞：自然発生の染色体異常発現率が低く、細胞の安定性及び再現性が良く、染色体が比較的大きく数も少なく(染色体数モード 25 本)、多くの化学物質に対して感受性が高く、ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記の細胞を使用した。

細胞：雌チャイニーズハムスター肺由来

CHL/IU 細胞

購入先：DS ファーマバイオメディカル株式会社

細胞周期：約 15 時間

マイコプラズマ：陰性

染色体数モード：25 本

培養液及び培養細胞：培養液の組成を以下に示す。細胞は 60 mm プレートで培養容器とし、37°C、CO₂ 濃度 5%で培養した。

- ・Eagle の MEM 液体培地 445 mL
- ・ペニシリン (5000 units/mL) 及びストレプトマイシン (5000 µg/mL) 5 mL
- ・牛胎児血清, 非働済 (56°C, 30 分) 50 mL

群構成：試験は、短時間処理法の代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下、連続処理法 24 時間処理により実施した。被験物質処理の用量あたりのプレート数は 3 枚とし、2 枚を標本作製に、1 枚を細胞増殖率の算出に用いた。対照として、すべての処理条件に陰性対照及び短時間処理法の代謝活性化存在下の陽性対照を設けた。陰性対照のプレート数は被験物質処理と同様とし、陽性対照のプレート数は 2 枚とし、標本作製に用いた。

用量段階：

gPhe-HMRG：試験の最高用量は 500 µg/plate とし、用量段階は以下公比の計 5 用量とした。

HMRG：試験の最高用量は本被験物質の 1 mM に相当する 320 µg/plate とし、用量段階は以下公比の計 5 用量とした。

被験物質処理：4×10³ 細胞/mL の細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養後、短時間処理法の代謝活性化非存在下では培養液を 3.0 mL とし、被験物質液 0.03 mL 添加した。短時間処理法の代謝活性化存在下では、培養液を 2.5 mL とし、S9 mix 0.5 mL 及び被験物質液 0.03 mL 添加した。添加後細胞を 6 時間培養し、6 時間後に細胞をダルベッコ

リン酸緩衝液（以下 PBS と略す）で洗浄した後培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養して細胞増殖率を算出した。連続処理法 24 時間処理では、培養液を抜き取らず被験物質液を 0.05 mL 添加し、24 時間培養した後細胞増殖率を算出した。被験物質の析出の有無は、被験物質添加時及び培養終了時に観察した。

細胞増殖率の算出（ホルマザン法）：培養液を取り除き、連続処理法 24 時間処理の場合は PBS で 2 回洗浄し被験物質を取り除いた。生細胞数測定試薬（株式会社同仁化学研究所）を用時に加えた培養液 2 mL をプレートに添加し、炭酸ガス培養器で約 3 時間呈色反応を行った。呈色反応終了後、プレート 1 枚あたり 96 ウェルプレートの 8 ウェルに 0.1 mL ごと分注し、マイクロプレートリーダー（MTP-300 Lab, コロナ電気株式会社、波長 450 nm）で吸光度を測定しホルマザン量を算出した。被験物質処理の細胞増殖率は、陰性対照のホルマザン量を 100% とし、用量あたりのホルマザン量の平均値から算出した。50% 以上の増殖抑制が観察された場合は、細胞増殖率 50% を挟む 2 点間を結ぶ直線から概略の 50% 細胞増殖抑制濃度（IC₅₀）を算出した。

染色体標本の作製：細胞の回収約 2 時間前に、コルセミドを 0.2 µg/mL の濃度で添加した。約 2 時間後 0.1% EDTA 添加 1.25% トリプシン処理で細胞を回収し、1000 rpm で 5 分間遠心して上清を取り除いた。0.075 mol/L 塩化カリウム液を加えて約 10 分低張処理し、カルノア固定液（メタノール 3：酢酸 1）で固定した。固定した細胞をスライドガラス上に滴下し、エアドライ法により空気乾燥した。プレート当たり 2 枚以上の染色体標本作製した。乾燥後、2% ギムザ液で 20 分間染色した。

観察対象：染色体の観察対象は、各処理条件のいずれも用量あたり 200 個の分裂中期細胞の観察が可能な、約 50% の細胞増殖抑制が認められる用量を最高用量とした連続する 3 用量以上とした。50% 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、被験物質液処理用量のうち、最高用量から連続する 3 用量以上を観察対象とした。

染色体観察：染色体の観察は、乱数を用いたコード番号を付した盲検法で行った。また、染色体の観察は短時間処理法を先に、次に連続処理法の順で行った。染色体の構造異常は、1 プレートあたり 100 個、1 用量あたり 200 個の良く広がった分裂中期細胞（染色体数：23～27 本）を倍率 1000 倍の顕微鏡下で観察した。数的異常は、倍率 200 倍の顕微鏡下でプレートあたり 200 個、1 用量あたり 400 個を観察した。染色体異常の分類及び型を以下に示す。構造異常を持つ細胞は、ギャップのみを有する細胞を含めた場合（+gap）と、含めない場合（-gap）に区別して集計した。染色体観察結果の評価は、ギャップのみを有する細胞を含めない染色体異常を有する細胞の出現頻度（-gap）により行った。

染色体異常の分類		異常の型
構造異常	染色体分型異常	染色体分型切断（ctb）、染色体分型交換（cte）
	染色体型異常	染色体型切断（csb）、染色体型交換（cse）
	その他の異常	断片化（frg）、多数の異常（mul）
数的異常（モード数が 38 本以		倍数体（pol）、核内倍加（end）

試験の成立条件：下記の条件を満たしている場合に、試験は成立とする。

- 1) 陰性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が、背景データの陰性対照（添付資料）の変動範囲内にある。

- 2) 陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が、背景データの陰性対照の変動範囲内にある。
- 3) 陽性対照の構造異常を有する細胞の出現頻度が、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
- 4) 被験物質処理において、分裂中期細胞 200 個を観察した用量が 3 用量以上ある。

統計学的処理：被験物質処理及び陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度について、用量ごとに Yates の補正を伴う χ^2 検定を使用し、陰性対照との差の有意性を有意水準片側 5% で解析した。被験物質処理については、用量反応性を Cochran-Armitage trend test (有意水準片側 5%, 陰性対照を含む) で解析した。また、構造異常において陽性と判定された場合は、 D_{20} 値及び TR 値を算出した。

D_{20} 値：20%の細胞に構造異常が出現する濃度 (mg/mL)

$Y = \log X + b$ $Y = aX + b$ (相関係数 r の高い方の式を採用)

$Y =$ 染色体異常を有する細胞の出現頻度 (20%), $X =$ 濃度 (mg/mL)

TR 値：1 mg/mL あたりの染色分体型交換異常の出現頻度

結果の評価：構造異常は、構造異常を有する細胞の出現頻度に統計学的に有意な増加が認められ、かつその増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定した。倍数体は、倍数体の出現頻度が陰性対照に対し統計学的に有意に増加した場合に陽性と判定した。

(動物実験倫理)

・上記の試験は 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、本試験は 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

ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験

gPhe-HMRG :

一般状態観察：観察期間中、全例で異常はみられなかった。

体重測定：対照群及び各被験物質投与群の間で差はみられなかった。

病理学的検査(剖検)：全例で肉眼的異常はみられなかった。

HMRG :

一般状態観察：観察期間中、全例で異常はみられなかった。

体重測定：対照群及び各被験物質投与群の間で差はみられなかった。

病理学的検査(剖検)：全例で肉眼的異常はみられなかった。

hERG 試験細胞を用いた K^+ チャネルへの影響評価

gPhe-HMRG :

hERG 電流の抑制率は、4, 40, 400 ng/mL のいずれの濃度においても陰性対照群と比べて有意な差は認められなかった。

HMRG :

hERG 電流の抑制率は、4 ng/mL の濃度で陰性対照群と比べて有意な差は認められなかったが、40, 400 ng/mL の濃度では有意差が認められた。

細菌を用いた復帰突然変異試験

gPhe-HMRG :

試験は 0.0143 ~ 10.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で実施した。いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった (表 1, 2, 図 1)。

HMRG :

試験は 3.81 ~ 2774 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で実施した。代謝活性化存在下の *S. typhimurium* TA100, 98, TA1537 において復帰変異コロニー数が用量反応的に増加し、*S. typhimurium* TA98, TA1537 では陰性対照の 2 倍以上の増加を示した (表 3, 4, 図 2)。

ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

試験

gPhe-HMRG :

染色体の観察は、短時間処理法では 125 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法 24 時間処理では 62.5 ~ 00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で実施した。いずれの処理条件においても、染色体の構造異常を有する細胞、数的異常の増加は認められなかった (表 5 ~ 7, 図 3)。

HMRG :

染色体の観察は、短時間処理法では 20.0 ~ 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法 24 時間処理では 20.0 及び 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で実施した。短時間処理法の代謝活性化非存在下において、染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度が 6.0% に増加し、陰性対照と比較して統計学的な有意性及び用量反応性も認められた (表 8 ~ 10, 図 4)。

D. 考察

今回の研究では、キモトリプシンプローブを構成する gPhe-HMRG と生成物である HMRG に対し、PMDA 薬事戦略相談を経て確定した非臨床安全性試験のうち ラット

を用いた単回腹腔内投与毒性試験、hERG 試験細胞を用いた K^+ チャネルへの影響評価、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を実施した。、
では gPhe-HMRG と HMRG のいずれにも毒性は観察されなかった。遺伝毒性試験 (、) では、HMRG について用量反応性の復帰変異コロニー増加および染色体構造異常出現率の上昇を認めた。本プローブの投与法が微量 (gPhe-HMRG として最大で約 57.8 μg) を腹腔内に散布し、投与後は十分量の生理食塩水で洗浄できるものであ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、腹腔内組織に残留する HMRG を測定するなどの追加検討を行う予定である。今後は、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を実施して本プローブの安全性を検証し、治験計画の策定につなげたい。

E. 結論

キモトリプシンプローブを構成する gPhe-HMRG と生成物である HMRG に対し、ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験、hERG 試験細胞を用いた K^+ チャネルへの影響評価、細菌を用いた復帰突然変異試験、およびほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を実施した。上記試験の範囲内では、gPhe-HMRG に関して毒性は認められなかった。HMRG に関する遺伝毒性の可能性については検討を追加して治験計画の策定に反映させる予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

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.

表 1 細菌を用いた復帰突然変異試験 (gPhe-HMRG)													
Study period			from March 24, 2015 to March 27, 2015										
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)										
			Base-pair substitution type						Flameshift mutation type				
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (-)	Negative control	-	145	(131)	10	(9)	15	(18)	14	(19)	7	(7)	
		-	130	[14.0]	9	[1.5]	19	[3.1]	22	[4.4]	8	[1.0]	
		-	117		7		21		21		6		
	gPhe-HMRG	0.0143	-	149	(145)	6	(5)	16	(16)	24	(20)	8	(6)
			-	147	[5.3]	5	[0.6]	18	[2.0]	19	[3.2]	7	[2.6]
			-	139		5		14		18		3	
		0.0429	-	126	(122)	9	(8)	17	(17)	25	(22)	6	(7)
			-	113	[7.5]	3	[4.2]	20	[2.5]	17	[4.6]	4	[3.1]
			-	126		11		15		25		10	
		0.129	-	134	(131)	5	(6)	19	(18)	20	(20)	4	(6)
			-	132	[3.1]	5	[1.2]	17	[1.2]	20	[0.6]	6	[2.5]
			-	128		7		19		19		9	
		0.386	-	129	(133)	4	(5)	21	(18)	26	(22)	7	(6)
			-	141	[7.2]	6	[1.2]	21	[4.6]	20	[3.5]	6	[0.6]
			-	128		6		13		20		6	
		1.16	-	95	(115)	7	(6)	20	(19)	23	(21)	11	(8)
			-	113	[21.1]	7	[1.2]	17	[2.1]	17	[3.5]	7	[2.6]
			-	137		5		21		23		6	
		3.47	-	114	(115)	5	(8)	15	(17)	19	(19)	5	(6)
			-	121	[5.6]	10	[2.5]	16	[2.1]	21	[1.5]	7	[1.2]
			-	110		8		19		18		7	
	10.4	-	134	(122)	4	(4)	10	(14)	25	(18)	9	(7)	
		-	117	[10.8]	4	[0.6]	15	[4.0]	13	[6.2]	6	[1.7]	
		-	114		3		18		16		6		
	AF-2	0.01	-	749	(712)	-		93	(95)	-		-	
			-	711	[36.5]	-		88	[8.2]	-		-	
			-	676		-		104		-		-	
0.1	-	-		-		-		433	(481)	-			
	-	-		-		-		493	[43.3]	-			
	-	-		-		-		517		-			
AZI	0.5	-	-		392	(404)	-		-		-		
		-	-		496	[86.6]	-		-		-		
		-	-		324		-		-		-		
9AA	80.0	-	-		-		-		-		486	(499)	
		-	-		-		-		-		455	[51]	
		-	-		-		-		-		555		

Negative control: Dimethylsulfoxide
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine
[]: Standard deviation

表 2 細菌を用いた復帰突然変異試験 (gPhe-HMRG)											
Study period			from March 24, 2015 to March 27, 2015								
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)								
			Base-pair substitution type						Flameshift mutation type		
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>		TA98	TA1537			
Negative control	-	126	(139)	7	(9)	22	(20)	35	(25)	14	(10)
		140	[12.1]	9	[2.5]	22	[4.0]	21	[8.4]	8	[3.2]
		150		12		15		20		9	
gPhe-HMRG	0.0143	147	(143)	6	(5)	16	(17)	36	(28)	8	(6)
		150	[9.1]	6	[1.2]	16	[1.7]	28	[8.0]	5	[1.5]
		133		4		19		20		6	
	0.0429	119	(127)	5	(7)	20	(18)	23	(26)	6	(7)
		133	[7.4]	5	[3.5]	16	[2.0]	25	[3.6]	5	[3.2]
		130		11		18		30		11	
	0.129	119	(126)	7	(8)	23	(19)	20	(21)	9	(9)
		140	[12.1]	7	[1.2]	17	[3.2]	21	[1.0]	6	[2.5]
		119		9		18		22		11	
	0.386	154	(143)	11	(9)	22	(19)	30	(27)	9	(8)
		146	[12.2]	9	[2.0]	17	[2.9]	26	[3.1]	10	[2.1]
		130		7		17		24		6	
	1.16	135	(129)	4	(7)	23	(21)	26	(31)	6	(8)
		136	[11.8]	10	[3.1]	19	[2.1]	29	[6.2]	7	[2.6]
		115		6		20		38		11	
	3.47	111	(126)	5	(6)	15	(15)	28	(25)	8	(7)
		127	[15.0]	6	[0.6]	18	[3.5]	29	[6.7]	6	[1.0]
		141		6		11		17		7	
	10.4	130	(132)	4	(5)	14	(17)	26	(25)	5	(6)
		126	[6.7]	6	[1.2]	21	[3.6]	25	[1.5]	6	[1.5]
139			6		16		23		8		
2AA	0.5	-		-		-		367	(377)	-	
		-		-		-		387	[10.0]	-	
		-		-		-		377		-	
	1.0	981	(1008)	-		-		-		-	
		998	[33.2]	-		-		-		-	
		1045		-		-		-		-	
	2.0	-		341	(355)	-		-		274	(244)
		-		383	[24.5]	-		-		241	[29.1]
		-		340		-		-		216	
	10.0	-		-		715	(753)	-		-	
-			-		823	[60.7]	-		-		
-			-		721		-		-		

Negative control: Dimethylsulfoxide
2AA: 2-Aminoanthracene
[]: Standard deviation

表 3		細菌を用いた復帰突然変異試験 (HMRG)										
Study period		from March 24, 2015 to March 27, 2015										
S9 mix	Compound	Dose (μg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)									
			Base-pair substitution type						Flameshift mutation type			
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
Negative control	-	132	(138)	12	(8)	22	(20)	24	(22)	9	(7)	
		148	[8.5]	6	[3.2]	17	[2.6]	24	[3.5]	5	[2.1]	
		135		7		21		18		6		
HMRG	3.81	145	(146)	11	(10)	19	(20)	24	(22)	3	(6)	
		135	[11.5]	10	[0.6]	19	[1.7]	23	[2.1]	6	[3.0]	
		158		10		22		20		9		
	11.4	141	(140)	7	(12)	22	(19)	18	(21)	7	(6)	
		153	[13.5]	16	[4.5]	17	[2.6]	16	[6.4]	5	[1.0]	
	34.2	126		12		18		28		6		
		143	(136)	11	(9)	23	(21)	16	(19)	9	(9)	
	103	143	[11.5]	9	[2.0]	22	[3.2]	20	[2.6]	11	[2.5]	
		123		7		17		21		6		
	2774	150	(152)	11	(13)	17	(18)	30	(29)	12	(9)	
		163	[10.6]	13	[1.5]	19	[1.2]	34	[5.6]	5	[3.8]	
	925	142		14		17		23		11		
		147	(146)	10*	(10)	17	(22)	36	(32)	8*	(7)	
	0*	308	[1.0]	11*	[1.5]	25	[4.6]	30	[3.8]	5*	[1.5]	
		146		8*		25		29		7*		
	2774	0*	(0)	0*	(0)	13*	(10)	0*	(0)	0*	(0)	
		0*	[0.0]	0*	[0.0]	4*	[5.2]	0*	[0.0]	0*	[0.0]	
0*	0*		0*		13*		0*		0*			
	0*	(0)	0*	(0)	13*	(9)	0*	(0)	0*	(0)		
0*	0*	[0.0]	0*	[0.0]	5*	[4.0]	0*	[0.0]	0*	[0.0]		
	0*		0*		8*		0*		0*			
AF-2	0.01	749	(712)	-		93	(95)	-		-		
		711	[36.5]	-		88	[8.2]	-		-		
		676		-		104		-		-		
0.1	-		-		-		433	(481)	-			
	-		-		-		493	[43.3]	-			
	-		-		-		517		-			
AZI	0.5	-		392	(404)	-		-		-		
		-		496	[86.6]	-		-		-		
		-		324		-		-		-		
9AA	80.0	-		-		-		-		486	(499)	
		-		-		-		-		455	[51]	
		-		-		-		-		555		

Negative control: Dimethylsulfoxide
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine
[]: Standard deviation
*: Growth-inhibition.

表 4 細菌を用いた復帰突然変異試験 (HMRG)													
Study period		from March 24, 2015 to March 27, 2015											
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)										
			Base-pair substitution type						Flameshift mutation type				
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537		
S9 mix (+)	Negative control	-	142	(148)	7	(8)	28	(22)	30	(24)	12	(10)	
		-	149	[5.1]	6	[2.1]	18	[5.5]	22	[5.3]	9	[2.1]	
		-	152		10		19		20		8		
	HMRG	3.81	-	157	(153)	6	(10)	16	(19)	23	(30)	10	(8)
			-	146	[6.4]	12	[3.2]	20	[2.6]	34	[6.4]	9	[2.1]
			-	157		11		21		34		6	
		11.4	-	153	(150)	8	(8)	17	(20)	34	(33)	7	(8)
			-	144	[4.9]	11	[2.5]	19	[3.1]	29	[3.2]	14	[5.1]
			-	152		6		23		35		4	
		34.2	-	164	(157)	10	(10)	21	(19)	46	(45)	6	(8)
			-	143	[12.1]	9	[1.0]	20	[3.2]	49	[4.6]	8	[2.5]
			-	164		11		15		40		11	
		103	-	189	(174)	9	(8)	27	(22)	113	(109)	15	(17)
			-	167	[13.0]	10	[2.1]	21	[5.0]	107	[3.8]	15	[2.9]
			-	166		6		17		106		20	
			-	184	(192)	8*	(7)	17	(17)	332	(291)	34*	(27)
			-	308	[14.7]	3*	[4.0]	18	[1.0]	260	[37.0]	22*	[6.4]
			-	209		11*		16		281		24*	
		2774	-	0*	(0)	0*	(0)	15*	(17)	285*	(273)	22*	(19)
			-	0*	[0.0]	0*	[0.0]	20*	[2.9]	256*	[15.3]	18*	[2.3]
			-	0*		0*		15*		279*		18*	
	-		0*	(0)	0*	(0)	15*	(17)	290*	(318)	21*	(15)	
	-		0*	[0.0]	0*	[0.0]	20*	[2.9]	290*	[47.9]	16*	[6.6]	
	-		0*		0*		15*		373*		8*		
	2AA	0.5	-	-	-	-	-	-	367	(377)	-	-	
			-	-	-	-	-	-	387	[10.0]	-	-	
			-	-	-	-	-	-	377		-	-	
1.0		-	981	(1008)	-	-	-	-	-	-	-	-	
		-	998	[33.2]	-	-	-	-	-	-	-	-	
		-	1045		-	-	-	-	-	-	-	-	
2.0		-	-	-	341	(355)	-	-	-	-	274	(244)	
		-	-	-	383	[24.5]	-	-	-	-	241	[29.1]	
		-	-	-	340		-	-	-	-	216		
10.0		-	-	-	-	-	715	(753)	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	823	[60.7]	-	-	-	-		
	-	-	-	-	-	721		-	-	-	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Negative control: Dimethylsulfoxide
2AA: 2-Aminoanthracene
[]: Standard deviation
*: Growth-inhibition.

短時間処理法				連続処理法24時間処理							
S9 mix (-)		S9 mix (+)		S9 mix (-)		S9 mix (+)		連続処理法24時間処理			
濃度 (μg/mL)	ホルマザン測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)	濃度 (μg/mL)	ホルマザン測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)	濃度 (μg/mL)	ホルマザン測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)
陰性対照	0.861	100	---	陰性対照	0.651	100	---	陰性対照	0.968	100	403
31.3	0.848	98.5		31.3	0.651	100		31.3	0.904	93.4	
62.5	0.802	93.1		62.5	0.633	97.2		62.5	0.930	96.1	
125	0.858	99.7		125	0.667	102		125	0.916	94.6	
250	0.840	97.6		250	0.799	123		250	0.807	83.4	
500	0.771	89.5		500	0.688	106		500	0.338	34.9	

陰性対照: Dimethylsulfoxide

処理時間 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数								合計(%)		数的異常を持つ細胞数				
		観察数	gap	ctb	csb	cte	cse	others	合計	- gap	+ gap	観察数	pol	end	合計 (%)	
6時間 S9 mix (-)	陰性対照	100	100	1	0	1	0	0	0	1			200	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	0			200	1	0	1
	Total	200	1	0	1	0	0	0	1	(0.5)	(1.0)	400	2	0	2	(0.5)
	125	99.7	100	0	2	0	0	0	0	2			200	1	0	1
		100	0	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	1	0	1	(0.3)
	Total	200	0	2	0	0	0	0	2			400	0	0	0	
250	97.6	100	0	1	0	2	0	0	2			200	0	0	0	
		100	0	0	1	0	0	0	1			200	0	0	0	
Total	200	0	1	1	2	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	0	0	0	(0.0)	
500	89.5	100	0	1	0	1	0	2	2			200	3	0	3	
		100	2	0	0	1	0	0	1			200	1	0	1	
Total	200	2	1	0	1	1	0	3	(1.5)	(2.5)	400	4	0	4	(1.0)	
6時間 S9 mix (+)	陰性対照	100	100	0	0	0	1	0	0	1			200	0	0	0
		100	0	2	0	0	0	0	2			200	1	0	1	
	Total	200	0	2	0	1	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	1	0	1	(0.3)
	125	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
		102	100	2	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0
	Total	200	2	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(2.0)	400	0	0	0	(0.0)
	250	100	1	2	0	0	0	0	2			200	1	0	1	
		123	100	1	1	0	0	0	0	1			200	3	0	3
	Total	200	2	3	0	0	0	0	3	(1.5)	(2.5)	400	4	0	4	(1.0)
	500	100	0	0	0	0	0	0	0			200	1	0	1	
		106	100	0	1	0	1	0	0	1			200	2	0	2
	Total	200	0	1	0	1	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	3	0	3	(0.8)
CP	---	100	1	13	0	36	0	0	41			200	1	0	1	
5.0	---	100	0	15	2	34	0	0	41			200	0	0	0	
Total	200	1	28	2	70	0	0	82	(41.0)	(41.5) †	400	1	0	1	(0.3)	

陰性対照: Dimethylsulfoxide
CP: Cyclophosphamide
ctb: 染色分体型切断, csb: 染色体型切断, cte: 染色分体型交換, cse: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加
†: p < 0.05

処理時間 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数								合計(%)		数的異常を持つ細胞数				
		観察数	gap	ctb	csb	cte	cse	others	合計	- gap	+ gap	観察数	pol	end	合計 (%)	
24時間	陰性対照	100	100	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
	Total	200	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	(0.0)	400	0	0	0	(0.0)
	62.5	96.1	100	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
			100	0	2	0	0	0	0	2			200	0	0	0
	Total	200	0	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	0	0	0	(0.0)
	125	94.6	100	0	1	0	1	0	0	1			200	0	0	0
			100	0	1	0	1	0	0	2			200	0	0	0
	Total	200	0	2	0	2	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	0	0	0	(0.0)
	250	83.4	100	1	1	0	1	0	0	2			200	0	0	0
			100	0	2	0	0	0	0	2			200	0	0	0
	Total	200	1	3	0	1	0	0	4	(2.0)	(2.5)	400	0	0	0	(0.0)
500	34.9	100	0	1	0	0	0	0	1			200	3	0	3	
		100	1	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
Total	200	1	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.5)	400	3	0	3	(0.8)	

陰性対照: Dimethylsulfoxide
ctb: 染色分体型切断, csb: 染色体型切断, cte: 染色分体型交換, cse: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加

短時間処理法												連続処理法24時間処理			
S9 mix (-)				S9 mix (+)											
濃度 (µg/mL)	ホルマザン測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (µg/mL)	濃度 (µg/mL)	ホルマザン測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (µg/mL)	濃度 (µg/mL)	ホルマザン測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (µg/mL)				
陰性対照	0.961	100	64.0	陰性対照	0.682	100	115	陰性対照	0.997	100	32.4				
20.0	1.039	108		20.0	0.633	92.8		20.0	0.848	85.1					
40.0	0.962	100		40.0	0.699	102		40.0	0.346	34.7					
80.0	0.252	26.2		80.0	0.679	100		80.0	0.031	3.1					
160	0.028	2.9		160	0.035	5.1		160	0.026	2.6					
320	#	0.027	2.8	320	#	0.024	3.5	320	0.026	2.6					

陰性対照: Dimethylsulfoxide
#: 析出

処理時間 (µg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数									合計 (%)		数的異常を持つ細胞数			
		観察数	gap	ctb	csb	cte	cse	others	合計	- gap	+ gap	観察数	pol	end	合計 (%)	
6 時間 S9 mix (-)	陰性対照	100	100	0	1	1	0	0	0	2			200	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
		Total	200	0	1	1	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	0	0	0
	20.0	108	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
		Total	200	0	1	0	0	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	0	0	0
40.0	100	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
	100	0	0	1	1	0	0	0	2			200	0	0	0	
	Total	200	0	1	1	0	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	0	0	0	(0.0)
80.0	26.2	100	0	2	0	5	0	0	7			200	2	0	2	
	100	0	2	0	4	0	0	5			200	0	0	0		
	Total	200	0	4	0	9	0	0	12	(6.0)	(6.0) †	400	2	0	2	(0.5)
6 時間 S9 mix (+)	陰性対照	100	100	0	1	0	0	0	1			200	0	0	0	
		100	0	1	1	1	0	0	3			200	1	0	1	
		Total	200	0	2	1	1	0	4	(2.0)	(2.0)	400	1	0	1	(0.3)
	20.0	92.8	100	0	3	0	0	0	3			200	1	0	1	
		100	0	0	0	1	1	0	2			200	1	0	1	
		Total	200	0	3	0	1	1	5	(2.5)	(2.5)	400	2	0	2	(0.5)
	40.0	102	100	0	0	0	1	0	1			200	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0			200	1	0	1	
		Total	200	0	0	0	1	0	1	(0.5)	(0.5)	400	1	0	1	(0.3)
	80.0	100	100	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0	
		100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
		Total	200	0	1	0	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	0	0	0	(0.0)
CP 5.0	---	100	1	13	0	36	0	0	41			200	1	0	1	
	Total	200	1	13	0	36	0	0	41	(41.0)	(41.5) †	400	1	0	1	(0.3)

陰性対照: Dimethylsulfoxide
CP: Cyclophosphamide
ctb: 染色分体型切断, csb: 染色体型切断, cte: 染色分体型交換, cse: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加
†: p < 0.05

処理時間 (µg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数									合計 (%)		数的異常を持つ細胞数			
		観察数	gap	ctb	csb	cte	cse	others	合計	- gap	+ gap	観察数	pol	end	合計 (%)	
24 時間	陰性対照	100	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0
		100	0	1	0	1	0	0	2			200	1	0	1	
		Total	200	0	2	0	1	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	1	0	1
	20.0	85.1	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0
		100	1	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
		Total	200	1	2	0	0	0	2	(1.0)	(1.5)	400	0	0	0	(0.0)
40.0	34.7	100	1	3	0	1	0	0	4			200	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	0	1			200	1	0	1		
	Total	200	1	3	0	2	0	0	5	(2.5)	(3.0)	400	1	0	1	(0.3)
80.0	3.1	Tox (no cell)														

陰性対照: Dimethylsulfoxide
ctb: 染色分体型切断, csb: 染色体型切断, cte: 染色分体型交換, cse: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加

図1 細菌を用いた復帰突然変異試験の用量反応曲線 (gPhe-HMRG)

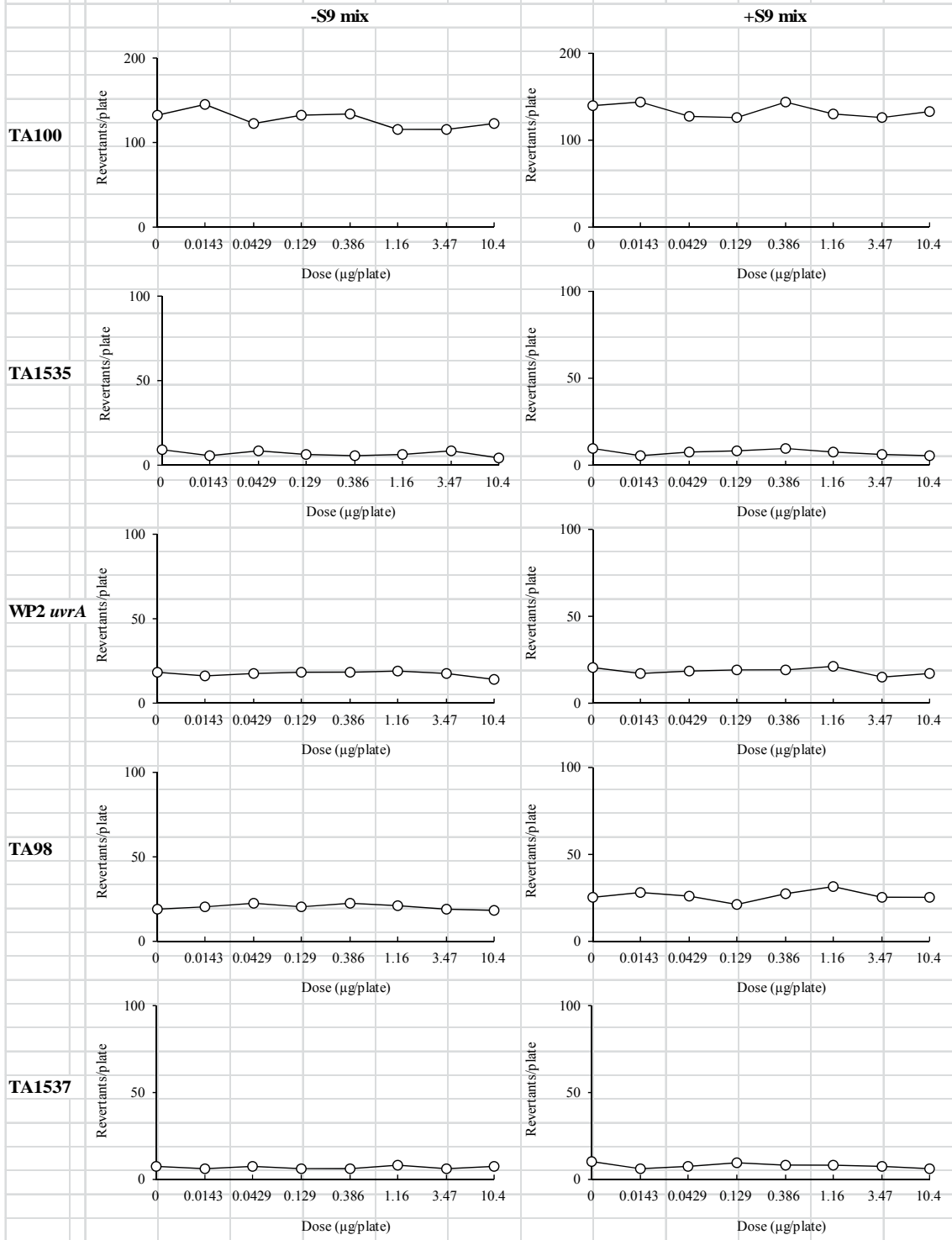


図2 細菌を用いた復帰突然変異試験の用量反応曲線 (HMRG)

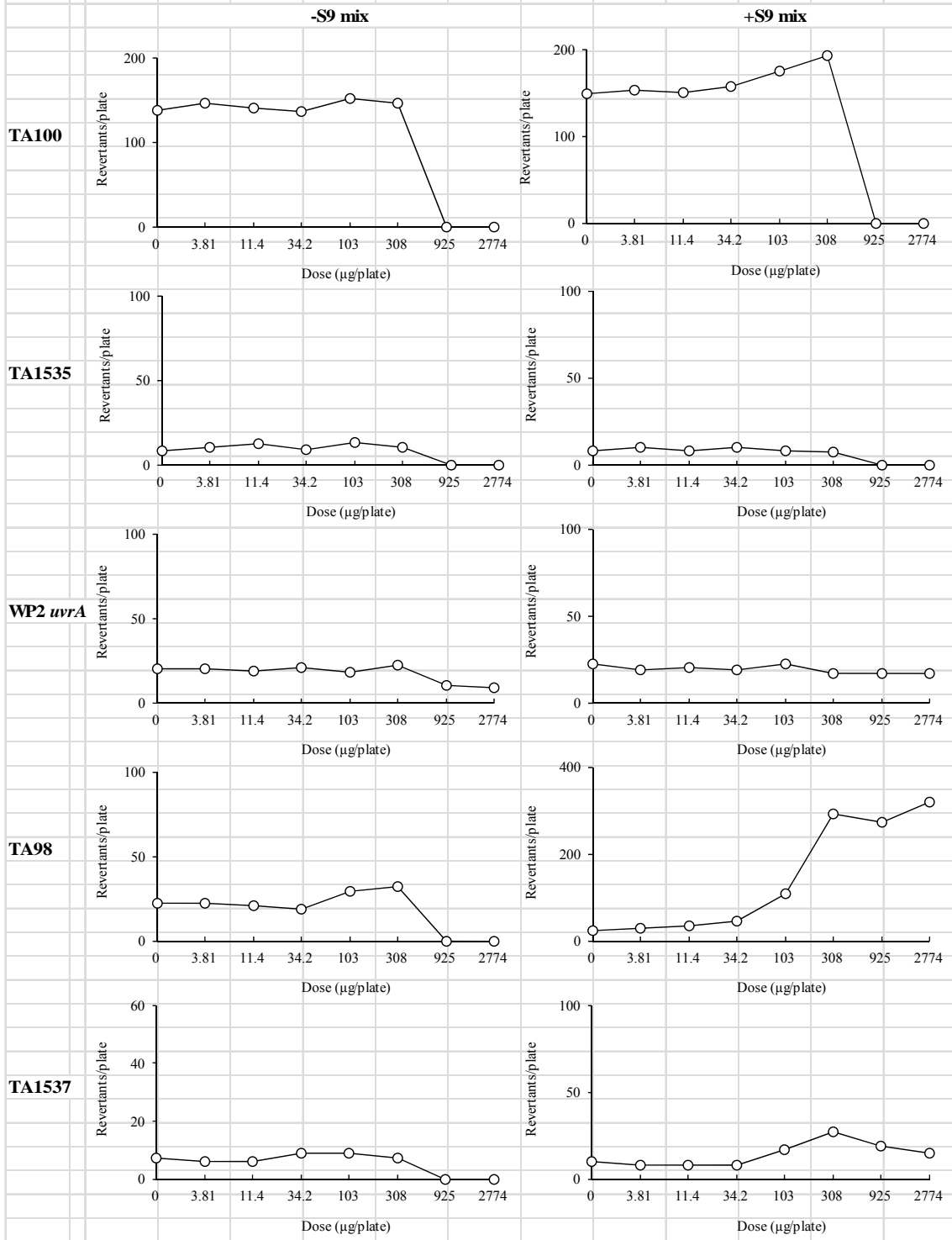


図3 gPhe-HMRG の染色体異常試験

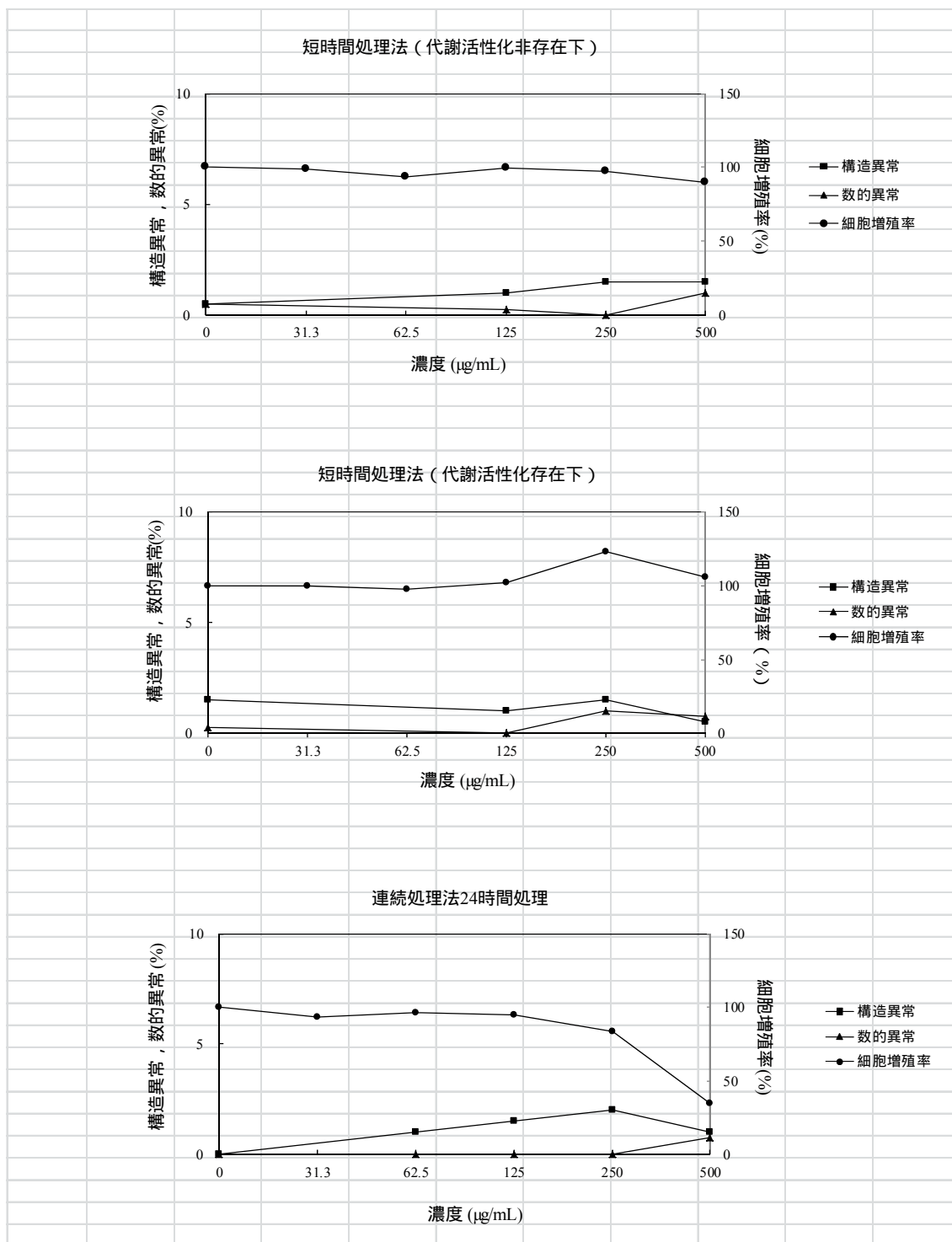
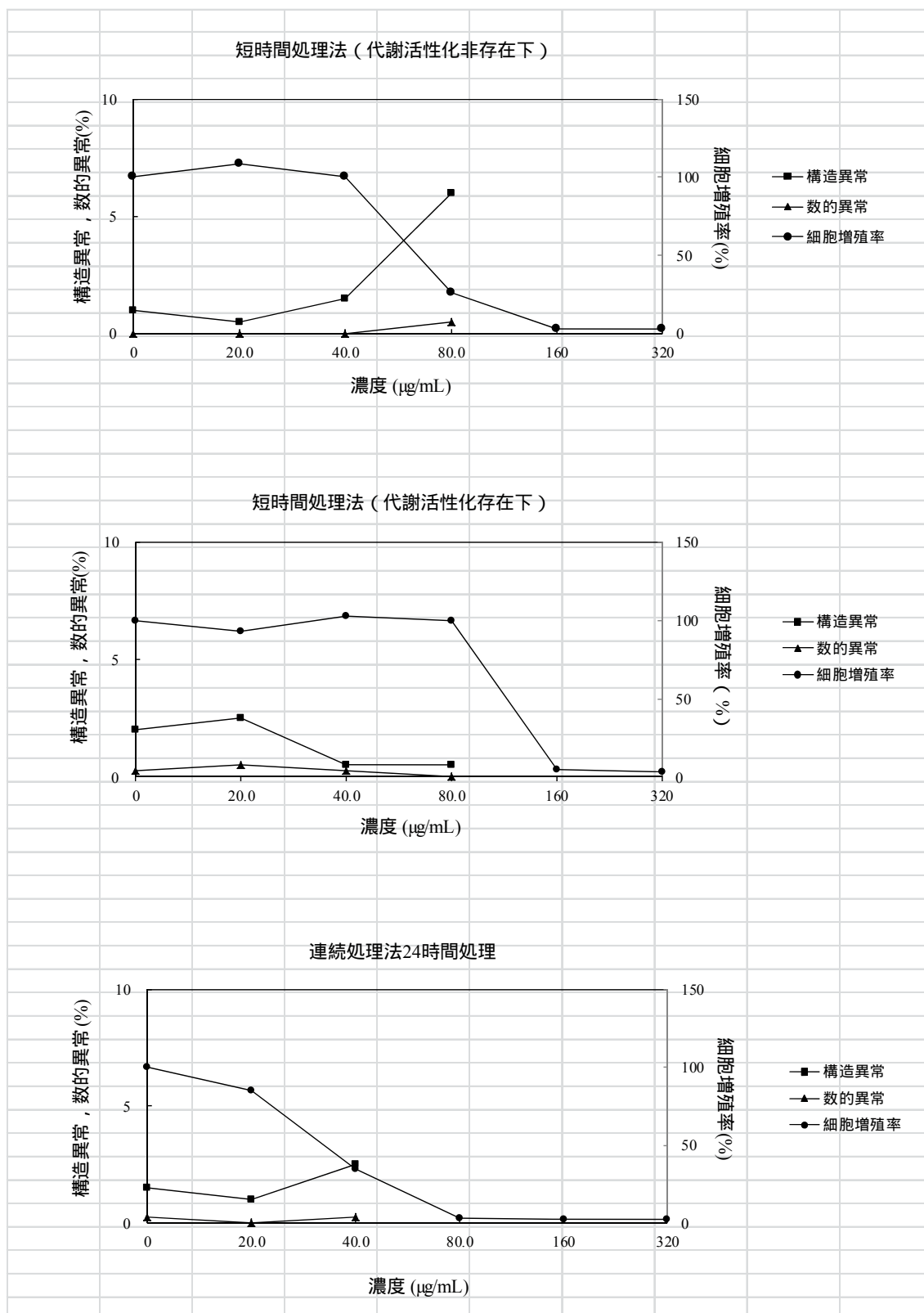


図4 HMRGの染色体異常試験



治験開始に向けた体制整備

業務主任者、担当責任者 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：キモトリプシンプローブの非臨床安全性試験を計画・実施するうえで生じた課題、すなわち 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、の解決を本業務項目の目的とした。1) では、治験の対象として膵切除の術式を膵体尾部切除に設定すべきこと、膵液漏発生頻度に影響する正常膵/硬化膵など因子を考慮して対象を選択する必要があることが示された。2) では、手術室の無影灯を消灯し、すでに市販されている医療用内視鏡装置（自家蛍光モード）の光源を用いることで、HMRG の蛍光と手術操作に必要な背景のイメージが取得可能であることが確認された。3) では gPhe-HMRG の精製方法を改善するとともに治験薬製造のための規格案を作成し、治験レベルのプローブ供給体制を整備することができた。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は、手術中に膵断端から漏出する膵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、膵液中の 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、膵液漏の可視化と術後膵液漏のリスク評価が可能であることを示した[参考文献 1]。

本業務項目の目的は、キモトリプシンプローブの非臨床安全性試験を計画・実施する中で生じた課題、すなわち 1) 過去の膵切除症例における膵液漏の発生頻度とリスク因子を明らかにすること、2) 蛍光イメージング中に手術操作を行うための撮像環境を確立すること、3) gPhe-HMRG の製造工程

を改善しプローブ供給体制を整備すること、を解決し、治験計画の概要確定に役立てることである。

B. 研究方法

1. 膵切除における膵液漏発生率とリスク因子の検証

i) 2012 年 2 月から 2013 年 3 月までに東京大学医学部附属病院で膵切除を行った 62 症例（膵頭十二指腸切除 35 例、膵体尾部切除 27 例）を対象に、術前・術中因子と術後成績との関連を評価した。

ii) 手術を膵体尾部切除に限定し、152 例（2006～2013）について術後膵液漏の発生率と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

i) キモトリプシンプローブの生成物（発光団）である HMRG を PCR チューブに以下の濃度で分注したファントムを作成した：

0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 μM

ii) 手術室において、手術台の上にファントムを設置し、以下の器機および照明を組み合わせた環境でファントムの蛍光像を取得した(図1)。

(撮像システム)

システム A: 薬事承認された医療用内視鏡システム (KARL STORZ)

・光源: D-ライト P 光源システム (ハロゲン) の自家蛍光モード (380-460nm)
・撮像装置: フィルター (515nm long-pass) を装着した VITOM スコープに IMAGE 1 HD カメラヘッドを接続

システム B: システム A の光源を、HMRG 励起用波長に最適化した非医療用防水性ポータブル LED 光源 [BM3100G (RGBBlue) にフィルター (490 nm band-pass) を装着] に変更

システム C: システム B の撮像装置を、暗所撮影に特化した非医療用デジタルカメラ (α7s, SONY) に変更 (515nm long-pass フィルターを装着)

(照明環境)

全消灯: 手術室の天井灯 (蛍光灯)、無影灯を全て消灯

天井灯半点灯: 天井灯を半点灯、無影灯を消灯

天井灯全点灯: 天井灯を全て点灯、無影灯を消灯

無影灯点灯: 天井灯を全て点灯、無影灯を点灯

(撮像方法)

・光源および撮像装置先端を手術台に対し垂直に設置し、15cm, 30cm, 60cm の高さから撮影した。

iii) 蛍光強度の評価

・各画像 (RGB モード) においてファントム内とファントム周囲の背景に region of

interest (ROI) を設定し、0-255 の範囲で計算される蛍光強度の平均値を測定、以下のように signal-to-background (S/B) ratio を計算した:

$$(S/B \text{ ratio}) = (\text{ファントム内の蛍光強度}) / (\text{背景の蛍光強度})$$

・HMRG 撮影用の小型蛍光観察装置 (Discovery, INDEC Systems) でもファントムを撮影し、S/B ratio を上記 ii) の組み合わせで撮影した撮像結果と比較した。

3. gPhe-HMRG 製造工程の整備

i) 品質規格案の設定

・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。

ii) 製造方法の見直し

・現在の製造工程では、凍結乾燥の液量が多く、大量合成に適した方法ではなかった。また、不純物として含まれるトリフルオロ酢酸 (TFA) の除去が困難であった。そのため、結晶化法を検討した。

iii) 出発物質の決定

・骨格を形成する中間体の内結晶として単離が可能で、含量など規格を設定できる化合物を検討した。

(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。

C. 研究結果

1. 膵切除における膵液漏発生率とリスク因子の検証

i) 膵切除 62 症例 (膵頭十二指腸切除 35 例、

膵体尾部切除 27 例)における術後膵液漏発生率に関する検討

・ International Study Group of Pancreatic Fistula (ISGPF)の定義[2]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[3]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)。

ii) 膵体尾部切除 152 例における術後膵液漏発生率とリスク因子に関する検討

・ 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。手術関連死亡なし。

・ 単変量解析の結果および他施設の既報を参照し、術後 3 病日までに得られる臨床データから術後重症合併症(Clavien-Dindo 分類 III 以上)発生のリスク因子を求めるために多変量解析(ロジスティック回帰分析)を行った。今回の検討では、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 (BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (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; $P = 0.020$)が独立予測因子として同定された(表 1)。

2. 手術室における撮像環境の評価

・ 手術台における照度は以下の通り:

全消灯, 0.8 lx

天井灯半点灯, 859 lx

天井灯全点灯, 1,800 lx

無影灯点灯, 45,300 lx

・ システム A によるファントムの撮像結果を図 2 に示す。手術台上 15cm の高さから医療用内視鏡システムを用いて撮影した場合、手術室照明の全消灯下では HMRG 濃度 10.0, 3.0, 1.0 μM のサンプルが TV モニター上で視認できた。天井灯半点灯および全点灯の環境でも HMRG 濃度 3.0 μM までモニター上で視認できたが、無影灯点灯下には HMRG 濃度 10.0 μM のサンプルのみわずかに認識可能であった。システム A を用い、全消灯下に撮影距離を変えて検討を行うと、撮影距離 15cm, 30cm では HMRG 濃度 10.0, 3.0, 1.0 μM のサンプルが TV モニター上で視認できたが、撮影距離 60cm では HMRG 濃度 1.0 μM のサンプルが認識困難となった。

・ 光源を HMRG 励起に最適化したシステム B を用いて、手術台 30cm の高さからファントムを撮影したが、TV モニターにおける各サンプル認識の有無は、システム A を用いた撮像結果よりも一段階劣る結果であった(図 3 左列、中列)。すなわち、全消灯下では HMRG 濃度 10.0 および 3.0 のサンプルが、天井灯半点灯および全点灯の環境では HMRG 濃度 10.0 μM のサンプルのみモニター上で視認可能だった。

・ 撮像装置として暗所撮影に特化したデジ

タルカメラを用いたシステム C を用い、手術台 30cm からファントムを撮影すると、手術室照明全消灯下ではコントロールを除く全てのサンプル (HMRG 濃度 10.0, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1 μM) が画像上で認識可能であった (図 3 右列)。天井灯半点灯、全点灯の環境下では、HMRG 濃度 10.0, 3.0 μM のサンプルが、無影灯点灯下では HMRG 濃度 10 μM のサンプルのみ認識できた。この検討ではカメラの ISO 感度をオート設定として撮影したが、得られた画像はフィルター (515nm long-pass) を用いて肉眼で認識される所見とほぼ一致した。

・システム C を用い、手術室照明全消灯下に ISO 感度を変更し (exposure time, 4ms) 手術台 30cm から撮影した結果を図 4 に示す。ISO 感度 128,000 を越えると、最も薄い HMRG 濃度 (0.1 μM) のサンプルが認識可能となった。HMRG 撮影用の小型蛍光観察装置 (Discovery) を用いても HMRG 濃度 0.1 μM のサンプルが描出可能であったが、exposure time は 75ms を要した。

・各撮像条件における S/B ratio の変化を図 5 に示す。Full color 撮影では視野が明るくなると HMRG の蛍光以外の波長の強度も計測されるため、S/B ratio が必ずしも画像上におけるサンプルの視認性と一致するわけではないが (特に ISO 感度を上げた場合、蛍光強度は上昇するが背景のシグナルも上昇するため S/B ratio はむしろ低下する) 各サンプルの視認性は S/B ratio 2 以上の計測値とほぼ一致した。

3. gPhe-HMRG 製造工程の整備

i) 品質規格案の設定

・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。

ii) 製造方法の見直し

・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 TFA の除去が可能となった。

iii) 出発物質の決定

・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

「膵切除における膵液漏発生率とリスク因子の検証」では、まず今回検討した症例では有症状膵液漏の頻度は膵頭十二指腸切除と膵体尾部切除でほぼ同等であったが、重症合併症 (Clavien-Dindo 分類 grade III 以上) の発生率は後者で 3 倍程度高い傾向にあった。また、膵実質の硬さを hard pancreas と soft pancreas に分類すると、有症状膵液漏の発生率は後者の方が 5 倍程度高率であった。そもそも膵頭十二指腸切除と膵体尾部切除では手術方法・手術侵襲が大きく異なることを考慮すると、キモトリブシンプローブの安全性・有効性を評価する治験では、膵断端の再建が不要で手術手技の統一が図りやすい膵体尾部切除を当初の対象に設定するべきであると考えられた。また、治験の際には対象を正常膵に絞る、または正常膵と硬化膵で層別化する、などの対策が求められる。

また、対象を膵体尾部切除に限定した場合、術前の栄養状態と肥満の有無が重篤な術後合併症発生リスク因子となり得ることが示された。今後、キモトリブシンプローブの有効性を検討する臨床試験を計画する際には、上記 2 点について考慮する必要がある。なお今回の検討では、ISGPF 基準にある術後排液ドレーン中の amylase 濃

度は術後合併症のリスク因子として同定されなかった。Amylase は検査室での計測法が確立されているため、術後膵液漏の診断基準として長く用いられているが、糖分解酵素である amylase 自体が合併症の誘因になるわけではなく、膵液中の蛋白分解酵素の surrogate marker に過ぎないという見解もある[1]。今回開発している蛍光イメージング技術は、膵液中の chymotrypsin 活性を利用して膵液漏を描出するものであり、amylase 値を基準とした従来の膵液漏評価よりも正確な診断法として利用できる可能性がある。

「手術室における撮像環境の評価」では、手術室の照明を全消灯すれば、既に薬事承認済みの医療用内視鏡装置（自家蛍光モード）を用いて、低濃度（ $1.0 \mu\text{M}$ ）の HMRG を、手術操作の支障にならない高さ（ 30cm ）から描出できることが示された。天井灯を点灯すると、背景の明るさは支障なく手術操作を行うことができる程度に改善するが、高濃度の HMRG は描出されなくなった。無影灯を点灯すると、最高濃度の HMRG（ $10 \mu\text{M}$ ）の認識も困難であった。

医療用装置（自家蛍光モード）の光源波長（ $380\text{-}460\text{nm}$ ）は HMRG の励起波長（ 490nm ）よりも短いため、光源の波長を最適化して検討を行ったが、HMRG の視認性は改善されなかった。今回の検討では、手術中に術野で使用することを考慮して、全滅菌可能な水中撮影用・ポータブル光源装置を用いたが、LED の光量がハロゲン光源を用いる医療用撮影装置の光量よりも低いことが原因である可能性がある。

一方、ポータブル LED 光源装置を用いても、撮像装置の感度を向上させる（ISO 感度 $128,000$ 以上）ことで、手術室の照明

を全消灯した環境下で最低濃度（ $0.1 \mu\text{M}$ ）の HMRG を同定し、かつ手術操作に十分な背景を描出し得ることが示された。環境により異なるが、肉眼による暗所観察の感度は ISO $128,000$ 相当と考えられている。肉眼観察で得られる視野を画像に再現し定量評価することは困難であるが、今回の検討で全消灯下にフィルターを装着し肉眼でファントムを観察した所見は、ISO 感度 $128,000$ で撮影された写真と良く一致した。ISO 感度を上げることは、暗所撮影における exposure time を短縮し、手術で求められるブレの少ない画像を提供するために有利である。例えば、HMRG 観察に最適化されたイメージャーを用いて、 $0.1 \mu\text{M}$ の HMRG を描出するには 75ms の exposure time が必要だが、ISO 感度 $128,000$ によるデジタルカメラ撮影の exposure time はわずか 4ms であった。

今回の検討では、S/B ratio が約 2 以上あれば、フィルターを通した肉眼観察または TV モニター上でサンプルを認識できることが示された。蛍光強度の測定方法は異なるが、患者体外サンプルを用いた過去の検討でも、キモトリプシンプローブを用いて膵断端から漏出する膵液が視認され、高率に術後膵液漏を来たした群では、膵液の蛍光の S/B ratio はおよそ 2 以上であった（図 6, [1]）。膵断端においてキモトリプシンプローブと膵液が反応して精製される HMRG の濃度は、膵液漏の有無だけでなく膵液の蛋白分解酵素（chymotrypsin）活性による影響も受けるため、HMRG 濃度に対し撮像装置にどの程度の描出能を持たせることが臨床的に重要であるか、後続研究で明らかにする必要がある。

「gPhe-HMRG 製造工程の整備」では、

gPhe-HMRG の精製方法を見直すことで、高品質の試験物を従来よりも短時間で大量に合成できる方法を見出した。今後、さらに精製効率を向上させ得るか検討を加えたい。また、治験薬を製造するための規格案を作成した。本検討により、治験レベルのプロープ供給体制をつくることができた。

E. 結論

- ・ 今後予定される治験では、膵体尾部切除を対象とすることが望ましい。
- ・ 治験にあたっては、患者選択あるいは層別化の因子として術前の栄養状態や肥満の有無、正常膵/硬化膵の別について考慮する必要がある。
- ・ 本技術に利用する光源として、既に市販されている医療用内視鏡装置を用いることができる。
- ・ フィルターを通した肉眼観察では、手術室の照明を全消灯した環境で低濃度の HMRG を、室内灯照明下（無影灯は消灯）でも高濃度の HMRG を認識可能である。
- ・ 腹腔鏡手術などで膵液の蛍光イメージングを TV モニター上で十分に描出するためには撮像装置の改良が必要である。光源波長の最適化、カメラの感度の大幅な向上により、手術操作に十分な蛍光像が得られる可能性がある。
- ・ gPhe-HMRG の品質規格が確定した。また製造工程の改良が図られ、高品質の試験物を安定的に供給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.

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.
2. 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.
3. 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.

表 1. 膵体尾部切除 152 例における術後合併症のリスク因子

	N	C-D 分類 III 以上の合併症 N (%)	単変量 P†	Odds ratio	95% 信頼区間	多変量 P
性別						
男	77	16 (21)	0.144	2.85	[0.93, 9.83]	0.068
女	75	9 (12)				
年齢 (歳)						
≥65	81	15 (19)	0.462	1.28	[0.41, 4.09]	0.671
<65	71	10 (14)				
病理所見						
Pancreatic cancer	55	14 (25)	0.024	1.57	[0.53, 4.62]	0.407
Others	97	11 (11)				
糖尿病						
Yes	44	11 (25)	0.069	1.57	[0.53, 4.55]	0.415
No	108	14 (13)				
BMI (kg/m ²)						
≥25	22	8 (36)	0.007	3.95	[1.18, 13.5]	0.027
<25	129	17 (13)				
血清 Albumin (g/dL)*						
≤3.8	43	13 (30)	0.004	3.69	[1.23, 11.6]	0.020
>3.8	108	12 (11)				
術中出血量 (g)						
≥1000	18	4 (22)	0.530	2.06	[0.52, 9.89]	0.313
<1000	129	21 (16)				
手術時間 (分)						
≥300	75	15 (20)	0.230	-	-	-
<300	71	9 (13)				
膵切離法						
Clamp crushing	130	20 (15)	0.530	-	-	-
Stapler	22	4 (18)				
術後 1 病日の 排液中 amylase 濃度 (IU/L)						
>4000	112	21 (19)	0.200	2.10	[0.63, 8.74]	0.240
≤4000	40	4 (10)				
術後 1 病日の 排液中 amylase 濃度 (IU/L) *						
≥375	103	20 (19)	0.255	-	-	-
<375	43	5 (12)				
術後 3 病日の 白血球数 (μL)						
≥15000	27	9 (33)	0.009	4.40	[1.31, 15.2]	0.017
<15000	125	16 (13)				

*施設における上限値の 3 倍を基準とした。†Fisher's exact test.

図 1. 手術室における蛍光イメージングの撮影環境

全消灯



天井灯
半点灯



天井灯
全点灯

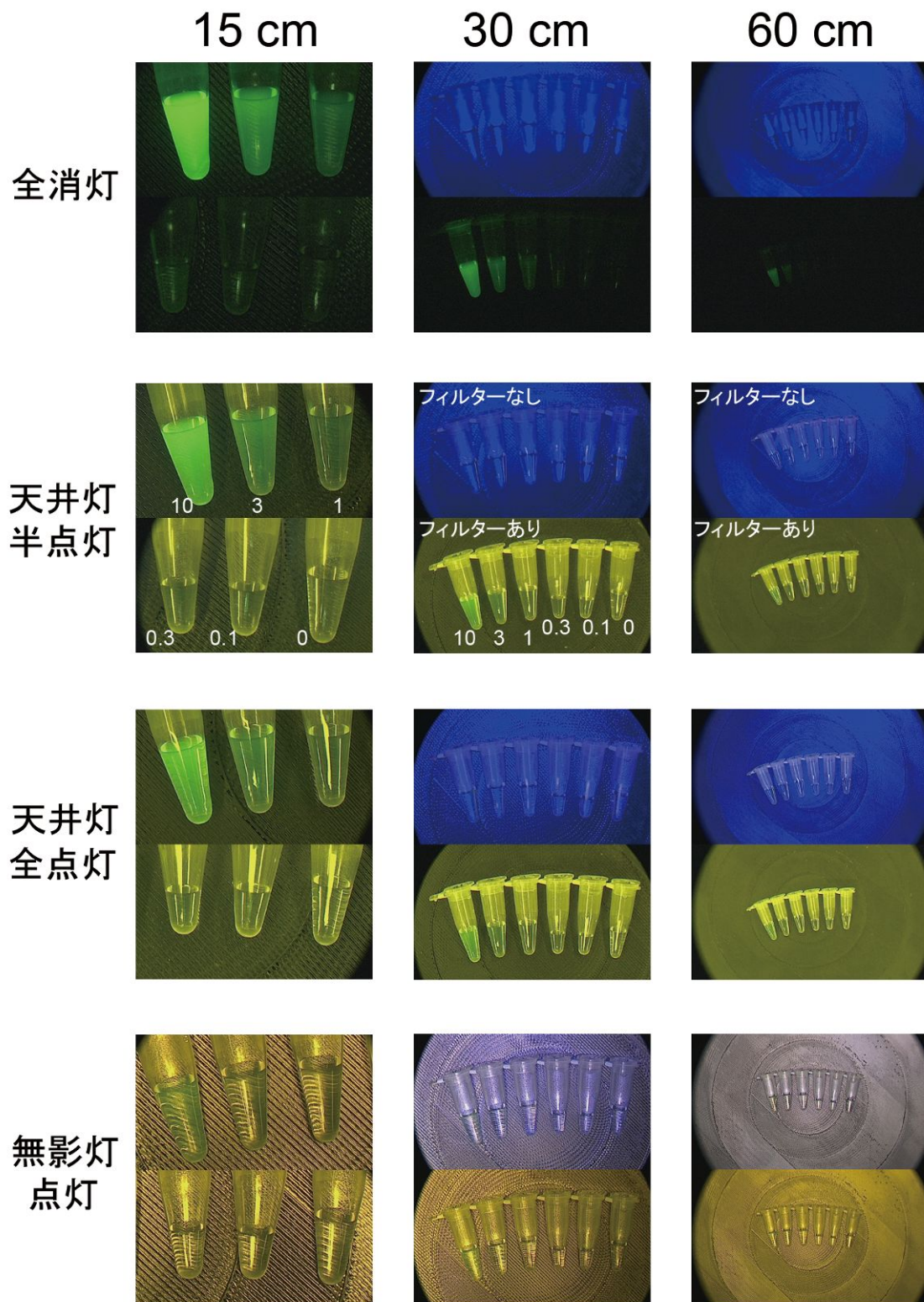


無影灯
点灯



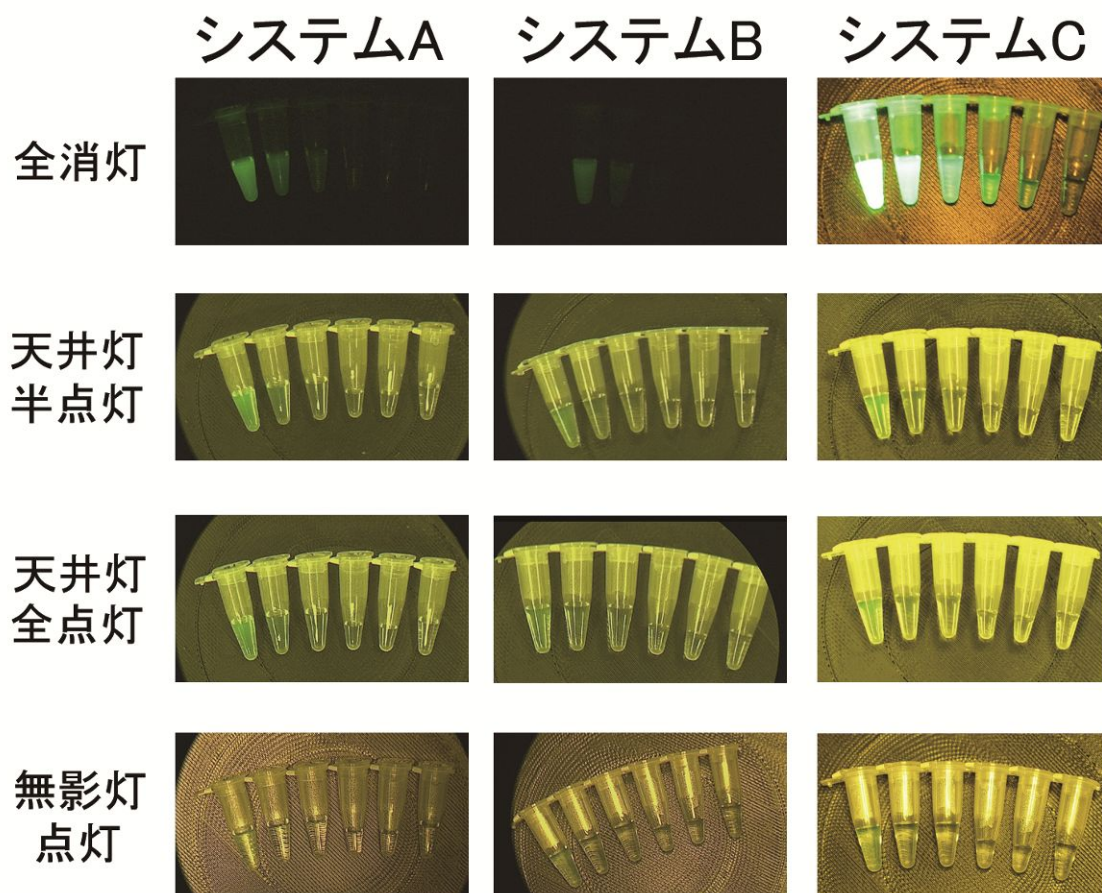
天井灯反転灯の写真ではシステム B (非医療用ポータブル光源) を用いて撮影している。
それ以外の写真ではシステム A (医療用内視鏡装置) を用いている。

図 2. システム A (医療用内視鏡装置 自家蛍光モード) を用いたファントムの撮影



手術台より 15cm, 30cm, 60cm の高さから、4 種類の照明条件で HMRG ファントムの撮影を行った。中/右列上段はフィルター (515nm long-pass) 装着なし、下段は装着あり。天井灯半点灯の図中の数字は HMRG の濃度 (μM)。

図 3. システム A, B, C を用いたファントムの撮影（手術台から 30cm）



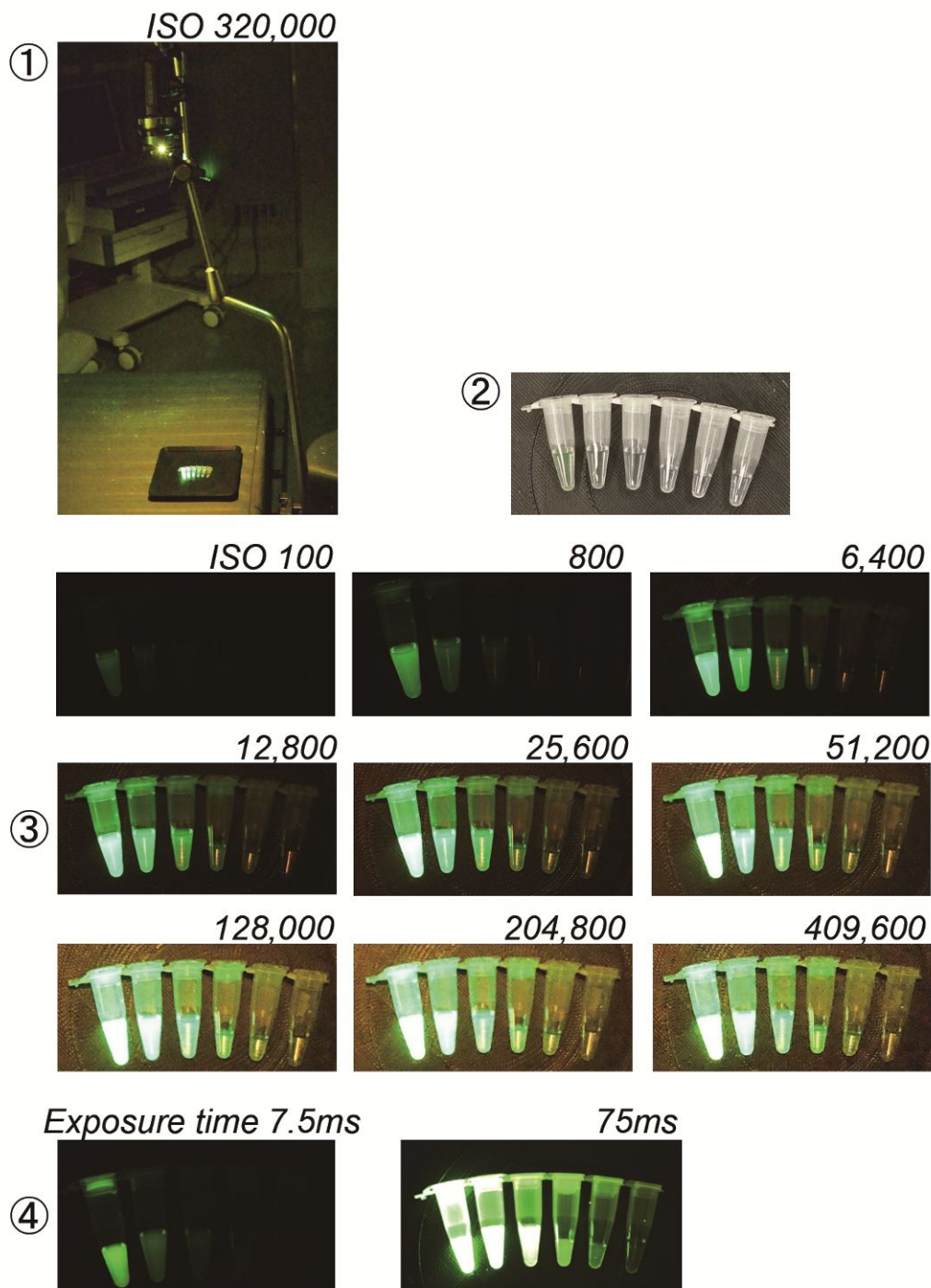
システム A は医療用内視鏡装置にフィルター（515nm long-pass）を装着して撮影。

システム B では、システム A の光源をポータブル LED 光源に変更した。

システム C は、光源としてシステム B と同じ LED 光源を用い、フィルター（515nm long-pass）を装着した暗所撮影用のデジタルカメラで撮影。撮影条件は以下の通り：

全消灯 (exposure time, 4ms; ISO 感度, 128,000) 天井灯半点灯 (6.25ms; ISO 1600)
 天井灯全点灯 (6.25ms, ISO 1600) 无影灯点灯 (6.25ms; ISO 125)

図 4. システム C および Discovery を用いたファントムの撮影（手術台から 30cm）



全消灯下における蛍光観察中の手術室の撮影。肉眼観察に近い（この写真では手術台からの距離は 60cm）。

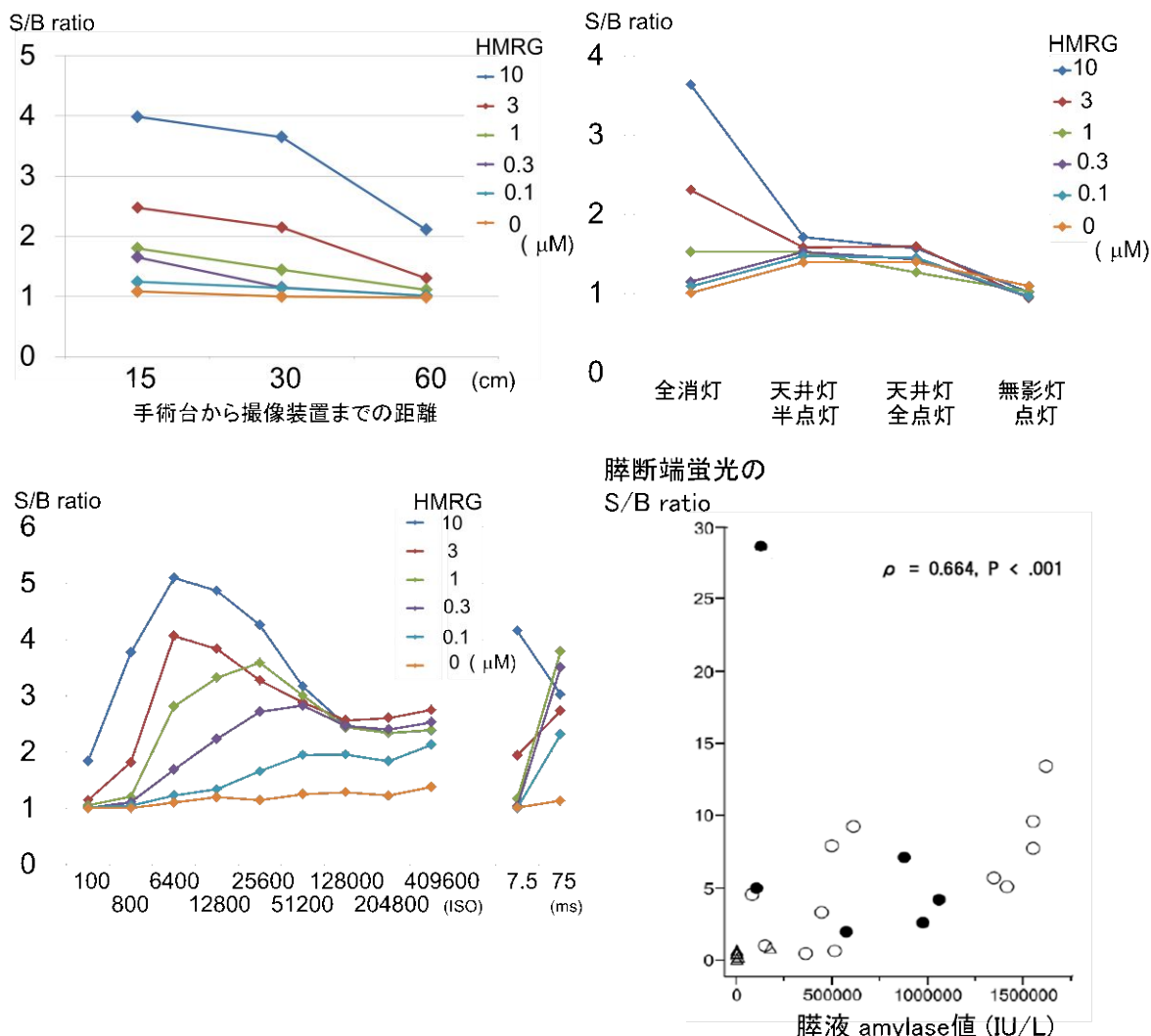
白色光観察によるファントムの撮影。

全消灯下に、システム C のカメラ ISO 感度を変えてファントムを撮影。

Exposure time はすべて 4ms。

HMRG 用小型蛍光観察装置（Discovery）の暗室内にファントムを設置して撮影。

図 5. S/B ratio と撮影環境との関係



手術台からの距離を変え、全消灯下にシステム A を用いてファントムを撮影。
60cm の高さからでも、10 μ M の HMRG サンプルでは S/B ratio は 2 以上であった。

手術室の照明条件を変え、手術台 30cm の高さからシステム A を用いて撮影。
天井灯半点灯より明るい条件では、全てのサンプルで S/B ratio は 2 以下となった。
(、 は図 2 に対応している)

全消灯下に手術台 30cm の高さから、システム C の ISO 感度を変えて撮影
(exposure time, 4ms)。背景が明るくなるため、高濃度のサンプルでは ISO 128,000
以上で S/B ratio が低下するが 2 以上であり、画像上もサンプルの蛍光が認識できる
(図 4 に対応)。右の 7.5ms, 75ms のデータは Discovery による測定結果を外挿している。

膵切除 30 例における、キモトリブシンプローブ散布後の膵断端の蛍光イメージング
により測定された S/B ratio と、術後 1 病日の膵液中 amylase 値との関係 (, 肉眼的
蛍光なし; , 主膵管断端にのみ肉眼的蛍光あり; , 膵断端全体にび漫性に肉眼的蛍
光あり[1])。肉眼的に蛍光が観察されない 7 例の S/B ratio は 2 以下であり、肉眼的蛍光
を同定し得た 23 症例のうち 20 例 (87%) で S/B ratio が 2 以上であった。

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「手術中に胆汁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」

機関名: 国立大学法人 東京大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
膵体尾部切除における予防的腹腔ドレーンの役割と胆汁漏評価法の再検討（口頭，一般演題）	山下俊，石沢武彰，金子順一，赤松延久，青木琢，阪本良弘，菅原寧彦，長谷川潔，國土典宏	第69回日本消化器外科学会総会	2014年7月	国内
肝癌，胆管，胆汁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（口頭，シンポジウム）	石沢武彰、浦野泰照、國土典宏	第69回日本消化器外科学会総会	2014年7月	国内
Application of ICG fluorescence imaging to laparoscopic HPB surgery（口頭）	Ishizawa T, Kokudo N	34th Annual Meeting of the Korean Society of Endoscopic & Laparoscopic Surgeons and 2014 International Symposium.	2014年4月	国外
Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma（口頭）	Ishizawa T	28th International Congress and Exhibition of Computer Assisted Radiology and Surgery.	2014年6月	国外
Update of application of fluorescence in HPB surgery（口頭）	Ishizawa T	6th Annual Worldwide Congress of the Clinical Robotic Surgery Association.	2014年10月	国外
Clinical applications of fluorescence imaging for enhancing safety and therapeutic efficacy of hepatobiliary and pancreatic surgery（口頭）	Ishizawa T, Urano Y, Kokudo N	Photonics West 2015	2015年2月	国外
Application of Fluorescence Imaging in HPB Surgery（口頭）	Ishizawa T, Inoue Y	2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery.	2015年2月	国外
Application of FIGS for Pancreatic Leaks（口頭）	Yamashita S, Ishizawa T, Urano Y, Kokudo N	2nd Annual International Congress of Fluorescent Guided Imaging Surgery.	2015年2月	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Acoustic radiation force impulse imaging of the pancreas for estimation of pathologic fibrosis and risk of postoperative pancreatic fistula.	Harada N, Ishizawa T, Inoue Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tanaka M, Fukayama M, Kokudo N.	Journal of the American College of Surgeons 2014;219:887-894.	Nov. 2014	国外

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。