

令和 5 年 3 月 19 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究
 研究期間：2018～2019
 課題番号：18K16344
 研究課題名（和文）新しい蛍光イメージングによる癌・神経・尿管の術中ナビゲーションと術中診断法の開発

研究課題名（英文）Development of intraoperative diagnosis and navigation method of cancer, nerve, and urinary tract using a new fluorescence imaging

研究代表者
 河口 義邦（Kawaguchi, Yoshikuni）
 東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00597726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：（1）膵臓腫瘍、神経、尿管の蛍光イメージング：新しい蛍光イメージング機器を試作しヒトによる臨床試験を施行。安全性を確認、膵内分泌腫瘍、血管の蛍光観察が可能であった。尿の蛍光は観察されたが、尿管や神経に関する症例が限られ尿管や神経の蛍光は確認できなかった。ラットを用いて実験を継続中である。

（2）ミクロ蛍光イメージングによる癌の蛍光観察：1000倍に拡大可能な共焦点レーザー顕微内視鏡を用いて、手術検体、術中観察を行った。大腸癌肝転移の観察にて90%以上で癌部と非癌部の判別が可能であり、胆管癌では癌部と非癌部の判別感度は60%、特異度は80%であった。現在AIによる本イメージング診断を研究中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術後の短期・長期成績を向上させるため手術損傷の回避は必須である。近年普及しつつあるインドシアニンググリーンを用いた蛍光イメージングは胆道排泄のため膵腫瘍、尿管、神経の蛍光観察は不可能であった。それらを描出できる新しい蛍光イメージングは尿管や神経の損傷に起因する合併症を予防し手術時間の短縮、安全性の向上に寄与する可能性がある。癌の手術において術中癌診断は病理医による迅速診断が唯一の方法であった。癌のミクロ蛍光イメージングと術野観察、手術検体観察は術中癌診断にかかる時間を短縮し病理医の負担を軽減する可能性があり、診断精度が確立した際の手術時間の短縮、医療経済の改善がもたらされる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：(1) Fluorescence imaging of pancreas tumor, nerve, and urinal tract. We developed a new fluorescence imaging system and conducted an IRB-approved clinical trial in human. We conformed the safety of the new technique and visualized pancreatic neuroendocrine tumor and vessels as fluorescence. Fluorescence of urine was visualized. However, we did not confirm fluorescence of urinal tract and nerve because surgery of urinal tract and never was limited. We're conducting an experiment using rat models.

(2) Micro fluorescence imaging of cancer. We conducted another IRB-approved clinical trial using a confocal laser endomicroscopy. In more than 90% of surgical specimens, cancerous tissues were differentiated from non-cancerous tissues using this technique. For bile duct cancer, the sensitivity for identifying malignancy was about 60% and the specificity was 80%. We're conducting a research about AI diagnosis.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：蛍光イメージング 手術 癌の蛍光 神経の蛍光 尿管の蛍光 検体の蛍光観察 術中ナビゲーション 術中診断

1. 研究開始当初の背景

肝臓や膵臓の悪性腫瘍に対する外科治療の安全性の向上や術後の予後の改善を達成するには、革新的な診断あるいは治療技術の開発が必要不可欠である。申請者は ICG を蛍光源として用いたイメージング (ICG 蛍光法) により、肝臓腫瘍の同定 (Kawaguchi Y, et al. J Surg Oncol. 2015; Kawaguchi Y, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2013)、胆管の同定 (Kawaguchi Y, et al. Dig Dis Sci. 2014; J Am Coll Surg. 2015)、肝血流の評価 (Kawaguchi Y, et al. J Hepatol. 2013; Kawaguchi Y, et al. Liver Transpl. 2013)、肝区域の同定 (Kawaguchi Y, et al. Br J Surg. 2017; Kawaguchi Y, et al. J Surg Oncol. 2017) といった手術における有用性を報告してきた。ICG は静注後に肝臓に取り込まれ 100%胆汁に排泄されるという特性があるため、手術野でのマクロな肝臓腫瘍の同定や血管、胆管の蛍光イメージングに応用可能である点で優れている。しかし、膵臓腫瘍の同定や手術中の損傷に注意すべき脈管である神経、尿管を蛍光にて描出することは不可能であった。また蛍光イメージングによるミクロレベルの術中診断・評価を行うことも不可能であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は ICG とは異なる 2 種類の保険承認済みの薬品 (メチレンブルー、フルオレセイン) を蛍光源とした新しい蛍光イメージングの開発と術中診断法の確立である。つまり、メチレンブルーを蛍光源として利用した新しい蛍光イメージングを開発し、ICG 蛍光法では不可能であった膵臓腫瘍、神経、尿管を蛍光イメージングとして描出すること、そしてフルオレセインを蛍光源として利用したミクロ画像の蛍光イメージングによる術中診断法の確立を目的とする。研究項目としては、(1)メチレンブルーを蛍光源として用いた蛍光イメージングの開発：膵臓腫瘍、神経、尿管の蛍光イメージング、(2)フルオレセインを蛍光源として用いたミクロ蛍光イメージングによる術中診断法の確立の 2 点を設定する。

(1)メチレンブルーを蛍光源として用いた蛍光イメージングの開発：膵臓腫瘍、神経、尿管の蛍光イメージング

メチレンブルーは中毒性メトヘモグロビン血症の治療薬として昔から使用されている薬剤であり、国内保険承認されている。メチレンブルーは 670nm 前後の波長の近赤外光を照射すると蛍光を呈する特徴がある。メチレンブルーにより神経の蛍光イメージングが可能となる原理は以下の通りである。神経組織は筋肉組織に比べ酸素貯蓄率が高く、メチレンブルーの酸化が他の組織よりも神経において高度に行われることで神経のみ蛍光として描出されると考えられている (緒方ら、前期日本消化器外科学会教育集会、2007 年)。そのため、膵癌が浸潤することの多い、膵頭神経叢の蛍光による描出や膵臓の神経内分泌腫瘍の蛍光による描出が期待される。また、メチレンブルーは 100%腎排泄のため尿管が蛍光として描出されることが予想される。これらについての報告はみられていない。

(2) フルオレセインを蛍光源として用いたミクロ蛍光イメージングによる術中診断法の確立

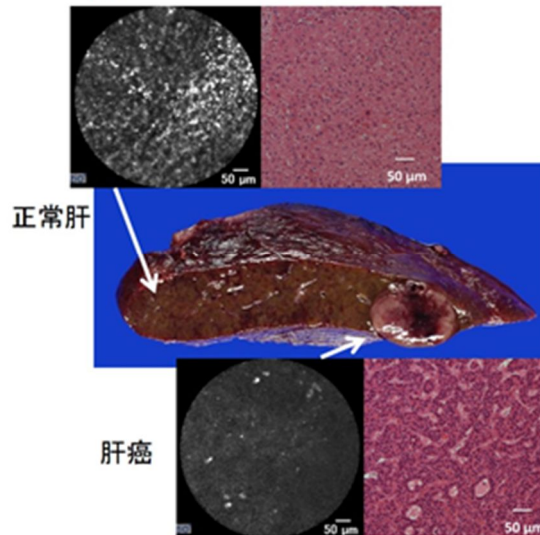
申請者はフルオレセインを蛍光源として用いたミクロ蛍光イメージング (図 1) (Cellvizio、共焦点レーザー顕微内視鏡) による肝臓悪性腫瘍の術中診断能について世界で初めて報告を行った (Maki H, Kawaguchi Y [double first author], et al. J Surg Oncol 2017)。本イメージングを用いることで肝臓において癌部は弱い蛍光かつ不正な構造として描出され、非癌部は強い蛍光かつ規則

正しい構造として描出され、それぞれの識別が可能であった（図 2）。術中に癌の診断をリアルタイムに行うことが可能となる可能性があり、また切除検体の境界における腫瘍の進展の有無の評価にも応用可能であることが期待される。共焦点レーザー顕微内視鏡イメージングは内科領域で内視鏡との併用における有用性が報告されつつあるが外科領域での応用に関する報告はほぼみられない。フルオレセインも国内保険承認された薬剤であり、眼科領域で検査薬として使用されている。

図1.



図2.



3. 研究の方法

(1)メチレンブルーを蛍光源として用いた蛍光イメージングの開発：膵臓腫瘍、神経、尿管の蛍光イメージング

ICGを蛍光源とした赤外観察カメラの製造メーカーである浜松ホトニクス株式会社（日本）と共同でメチレンブルーを蛍光源とした赤外観察カメラの試作を行った。唾液、エタノール、蒸留水と溶媒によらず蛍光観察可能なことが確認された。本試作機にて膵臓検体での蛍光観察が可能であることも確認した。保険承認されたメチレンブルーの適応外使用となることから東京大学での倫理審査（審査番号：P2016013）、臨床研究保険の加入手続きを終了し、手術中に術野での観察を開始可能となった状況である。

実際の手順

1%メチレンブルー（2mg/2ml）を生理食塩水で希釈し、1mg/kgになるよう調整して静脈投与もしくは直接散布する。メチレンブルーを蛍光源とした赤外観察カメラの試作器を用いて腹腔内、手術検体を観察する。対象は20歳以上の肝腫瘍、胆道系悪性腫瘍、胆管切除を要する他の悪性疾患、胆道良性疾患、膵疾患、生体肝移植術の適応となる各種疾患としている。評価項目は可視光にて視認できた腫瘍、神経、脈管、胆管を基準として、本法にて視認できた部位数、人数と設定して臨床研究計画をたて東京大学において倫理承認されている。

今後の展望

開腹手術用の赤外観察カメラの試作に成功した。本研究とともに同時進行で腹腔鏡手術用赤外観察カメラの試作にも着手し有用性について開腹手術と同様の項目の評価をすすめていきたい。

(2) フルオレセインを蛍光源として用いたマイクロ蛍光イメージングによる術中診断法の確立

保険承認されたフルオレセインの適応外使用が可能となるよう、東京大学での倫理審査（審査番号：P2016019）により研究計画が承認され、臨床研究保険の加入手続きを終了した。手術中に術野、検体での観察を行いデータ集積している状況である。特に着目しているのは、肝臓腫瘍の悪性度診断、胆嚢腫瘍の良悪性の診断、胆管癌における進展度診断、膵癌の範囲同定である。あわせて質量分析を用いて肝臓検体にてマイクロ蛍光画像が得られる原理についても薬学部と共同研究を進行させている。

実際の手順

フルオレセイン250-500mg/5mLを静脈注射。もしくは10倍に希釈し直接散布する。先述の共焦点レーザー顕微内視鏡（図1）を用いて手術検体と腹腔内を観察する。対象は20歳以上の肝胆膵領域（胆管癌、肝癌、膵癌、転移性肝腫瘍、膵嚢胞性疾患、神経内分泌腫瘍、十二指腸癌などの腫瘍切除）を予定している患者とする。評価項目は共焦点レーザー顕微内視鏡診断と病理組織学的診断を比較し、その診断能を評価することと設定して臨床研究計画をたて東京大学において倫理承認されている。

今後の展望

手術検体での観察を行いマイクロ蛍光イメージングの知見を蓄積してきた。今後術野でリアルタイムにマイクロレベルでの診断に応用すべく腹腔内での観察に向けて準備をすすめている。

4. 研究成果

(1)メチレンブルーを蛍光源として用いた蛍光イメージングの開発：膵臓腫瘍、神経、尿管の蛍光イメージング

メチレンブルーを蛍光源とした開発した開腹用試作器を用いてヒトによる臨床試験（審査番号：P2016013-(1)、東京大学）を行った。同観察により安全性と膵内分泌腫瘍や血管の蛍光観察が可能であることが確認した。また尿とメチレンブルーを混ぜることで尿そのものの蛍光イメージングが観察されることも確認した。これらの研究成果につき英文誌に報告をおこなった（Fukuda K, Kawaguchi Y, et al. Safety and usefulness of fluorescence imaging using methylene blue as a fluorophore in a Japanese population with hepatobiliary and pancreatic diseases: A phase I study. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2022 Dec 2. doi: 10.1002/jhbp.1293. Online ahead of print. PMID: 36458409）。一方、術野内で尿管が蛍光を呈することと神経の蛍光は確認できなかった。神経と尿管に関しては、報告者の所属が肝胆膵外科であることから神経や尿管を観察するための適切な症例が少ないことによる影響もあった。そのため神経と尿管に関してラットによる実験を経て、臨床試験を行う予定である。

(2) フルオレセインを蛍光源として用いたマイクロ蛍光イメージングによる術中診断法の確立

肝腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、膵腫瘍に関して検討を行った。大腸癌肝転移症21人、34手術標本の検討では90%以上で癌部と非癌部の判別が可能であった。蛍光強度は非癌部に比べ癌部で有意に低い結果であり、100-1000倍に拡大した形態的な特徴に加え、蛍光強度の差異にても癌の識別が可能と考えた。胆管癌症例23人の検討では胆管癌に特徴的なthick dark bandsを認める部分

を癌と判別することで癌部と非癌部の判別を試みた。感度はおよそ60%、特異度がおよそ80%という結果であり、本イメージングの特徴に習熟することが感度・特異度の改善に必要と考えられた。これらの結果につき国内学会で報告を行った（高尾幹也、河口義邦 他、共焦点レーザー顕微内視鏡を用いた転移性肝癌切除検体における術中診断への応用、第118回外科学会 2018；河口義邦 他、外科手術における新しい術中診断modality 共焦点レーザー顕微内視鏡による胆管腫瘍・肝腫瘍の存在と範囲診断、第120回日本外科学会 定期学術集会 2020）。また同研究内容の一部を和文誌に報告した（河口義邦 他、共焦点内視鏡によるオプティカルパイクイオプシーは肝胆膵腫瘍の鑑別診断に有用か 臨床雑誌外科 Vol.84 No.12 2022）。今後はAIによる本イメージングの診断サポートを行うべく研究をさらにすすめている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuda Kaito, Kawaguchi Yoshikuni, Abe Satoru, Kobayashi Yuta, Maki Harufumi, Akamatsu Nobuhisa, Kaneko Junichi, Arita Junichi, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Safety and usefulness of fluorescence imaging using methylene blue as a fluorophore in a Japanese population with hepatobiliary and pancreatic diseases: A phase I study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1293	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河口 義邦、松村 優、高尾 幹也、真木 治文、長谷川 潔	4. 巻 84
2. 論文標題 特集 手術に役立つ蛍光法のすべて IV. 肝胆膵 3. 共焦点内視鏡によるオプティカルバイオプシーは肝胆膵腫瘍の鑑別診断に有用か	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 外科	6. 最初と最後の頁 1282 ~ 1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15106/j_geka84_1282	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高尾幹也、河口義邦、松村優、風見由祐、谷本芽弘理、赤松延久、有田淳一、金子順一、阪本良弘、國土典宏、長谷川潔
2. 発表標題 共焦点レーザー顕微内視鏡を用いた転移性肝癌切除検体における術中診断への応用
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河口 義邦、松村 優、高尾 幹也、風見 由祐、谷本 芽弘理、真木 治文、田中 麻理子、牛久 哲男、石沢 武彰、赤松 延久、金子 順一、有田 淳一、國土 典宏、長谷川 潔
2. 発表標題 外科手術における新しい術中診断modality 共焦点レーザー顕微内視鏡による胆管腫瘍・肝腫瘍の存在と範囲診断
3. 学会等名 第120回日本外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松村 優 (Matsumura Masaru)		
研究協力者	高尾 幹也 (Takao Mikiya)		
研究協力者	風見 由祐 (Kazami Yusuke)		
研究協力者	阿部 学 (Abe Satoru)		
研究協力者	谷本 芽弘理 (Tanimoto Meguri)		
研究協力者	真木 治文 (Maki Harufumi)		
研究協力者	福田 開人 (Fukuda Kaito)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長谷川 潔 (Hasegawa Kiyoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関