

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08924

研究課題名（和文）胆道閉鎖症における肝門部微小胆管の二光子レーザー顕微鏡による観察研究

研究課題名（英文）Observational Study of Bile Ducts in Biliary Atresia using Two-Photon Laser Scanning Microscopy.

研究代表者

井上 幹大（Inoue, Mikihiro）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：30422835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：組織深部が観察可能な多光子レーザー顕微鏡（Multi-photon laser scanning microscopy: TPLSM）の技術を利用することにより、肝門部胆管の切離レベルをテーラーメイド化することで、術後成績を向上させる可能性があるのではないかと考え本研究を開始した。今回、研究の第一段階として切除した索状胆管組織の肝門部側断端の観察を行い、その診断精度は術後の切除胆管のH&E病理組織と比較して、同等であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症において葛西手術後に黄疸が消失し長期の自己肝生存を得られるかを左右する因子の1つに肝門部の胆管切離レベルにおける胆管の太さがあり、胆管の開存状況は個人差がある。また切除胆管の病理組織所見では、わずかな切離レベルの違いによって胆管の太さが異なる場合や、胆管が消失している場合がある。そこで、葛西手術の際、術中にリアルタイムで切離した胆管の肝臓側断端から深部の胆管径の評価をおこなうことができれば、必要に応じて追加切除することによって患者ごとに最適な切離レベルでの肝門部空腸吻合が可能となり、手術成績向上につながる可能性があるのではないかと考えた

研究成果の概要（英文）：We initiated this study with the hypothesis that utilizing the technology of Multi-photon Laser Scanning Microscopy (MPLSM), which allows observation of deep tissue structures, could potentially improve postoperative outcomes by tailoring the level of resection of the hepatic hilar bile ducts. In the first phase of this research, we examined the transected hepatic hilar side of the removed segmental bile ducts and found that the diagnostic accuracy was comparable to the histopathological tissue examination of the resected bile ducts after surgery using H&E staining.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 多光子レーザー顕微鏡 生体蛍光染色

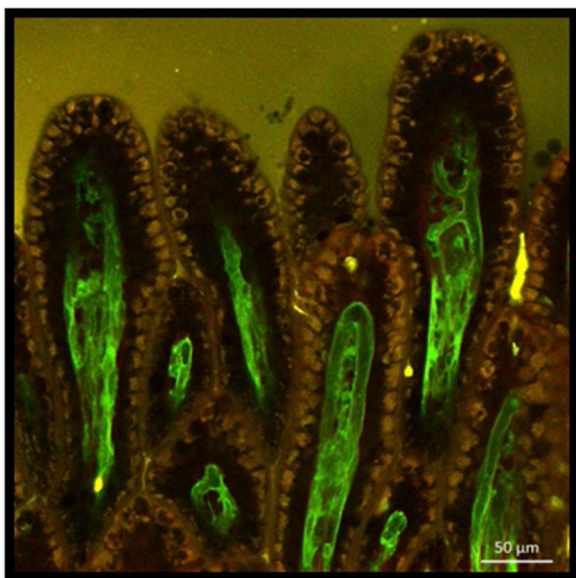
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症に対する肝門部空腸吻合術後(葛西手術)の術後成績は、日本胆道閉鎖研究会における報告では、黄疸消失率 61.7%、術後 20 年の自己肝生存率 43.0%と報告されている[1]。手術時点での肝門部における微細胆管径は、術後の黄疸消失や自己肝生存率に多大な影響を与える。

我々の施設では、多光子レーザー発生装置(Chameleon RX)と共焦点レーザー顕微鏡 FV1000 (Olympus)を基本として、二光子用に特殊なレンズとプリズムを組み込んだ装置と光の波長を圧縮できるチャープという補助装置を合体させたシステムをセットアップしている (multi-photon laser scanning microscopy: MPLSM)。このシステムと各種の蛍光色素や GFP 融合蛋白質遺伝子改変動物(GFP マウス)を用いて、現在までに bacterial translocation モデル(LPS 腹腔内投与)や、潰瘍性大腸炎モデル(DSS による腸炎) 壊死性腸炎モデル(低酸素暴露+LPS 投与+高浸透圧ミルク投与)を作成し、それぞれのモデルにおいて生体観察を実現可能としてきた。また新生児コントロールマウスにおいても、小腸・大腸壁内における腸管表面(漿膜面)から粘膜までを一括で生きたまま観察可能とする手法を世界で初めて開発した。この手法により、新生児モデルマウスにおいても、小腸の粘膜や粘膜下層の微小循環(絨毛の微小循環まで)を観察できるようになっている(図1) [2-4]。

図 1



また、蛍光発色のない組織を MPLSM で観察するためには、生体でも利用可能な安全な蛍光染色法の確立が必要となるが、三重大学産学官連携講座の溝口らは、食用の天然色素であるクルクミンを局所散布することで、生体内部の蛍光組織観察が可能となることを発見した。この手法と MPLSM を組み合わせることにより術中の診断・治療戦略に応用可能な新規生体蛍光観察手法 (curcumin vital staining-assisted intravital fluorescent observation method (CVS-IFOM)) を開発した。

2. 研究の目的

新規生体蛍光観察手法である CVS-IFOM を胆道閉鎖症に対する初回手術時の肝門部胆管切除時に用いることにより、肝門部胆管の切離レベルを患児によってテーラーメイド化することで術後成績を向上できる可能性があるのではないかと考え本研究を開始した。

3. 研究の方法

当施設で肝門部空腸吻合術を施行した胆道閉鎖症例 2 例を対象とした。術中に肝門部で切除した索状胆管組織に対して、速やかに 10%クルクミン染色液を散布し、約 3~5 分間の蛍光染色を行った。染色後、標本の肝門部側断端にスライドガラスを置き(図 2)、スライドガラスに乗せた水を浸液として MPLSM による断端から深部にかけての観察を行った。観察後、

切除胆管を病理組織検査に提出し、永久標本の所見と比較した。図2

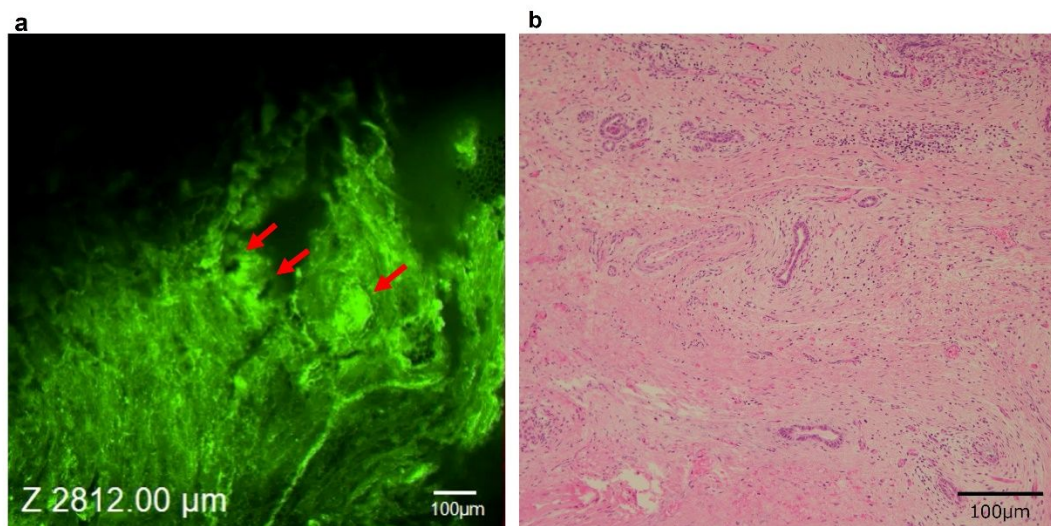
さらに、観察した胆管の所見と術後経過との関連性についても評価を行った。



4. 研究成果

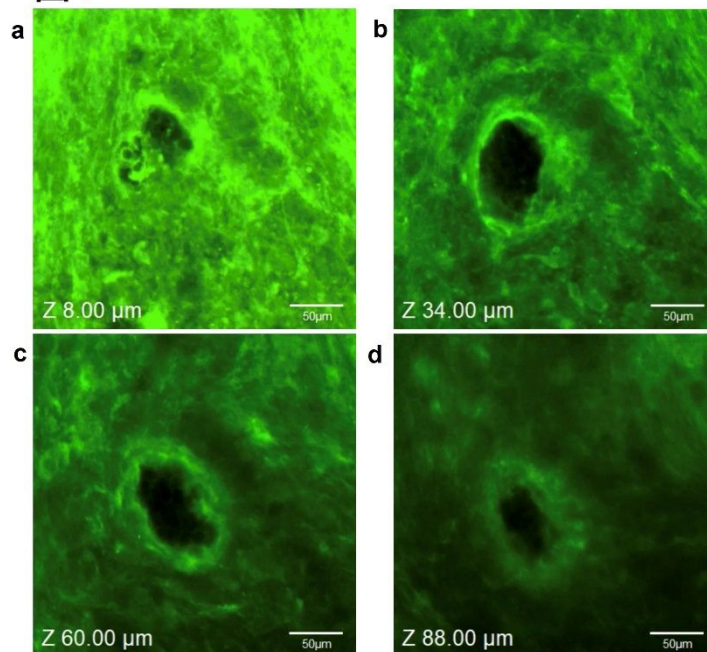
症例1の病型は , b1, で、生後40日目に葛西手術を施行した。MPLSMによる観察では、肝門部側断端の右側において多くの微細な胆管を認め(図3a) 最も深いもので約80 μm の深さまで胆管の連続性を観察することができた(図4 a-d)。

図3



左側はごく少数の微細な胆管を認めたが内腔の開存は確認できなかった。永久標本における断端の所見はMPLSMによる観察所見と同様で、胆管内径は最大で $120 \times 10 \mu\text{m}$ だった(図3b)。術後は順調に減黄し、術後7か月時に胆管炎を発症したものの速やかに改善した。術後11ヶ月現在、血液検査で軽度の肝胆道系酵素を認めるものの黄疸なく経過している。

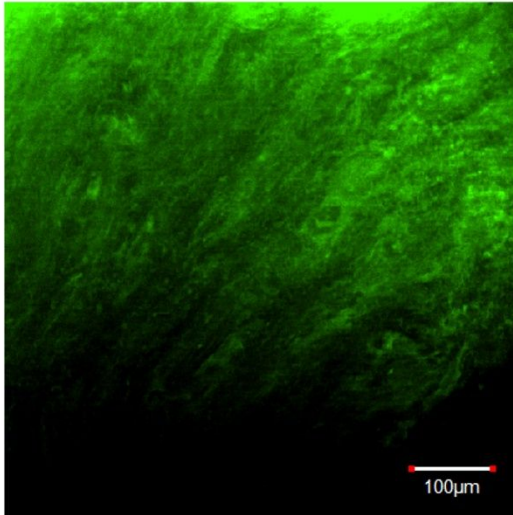
図4



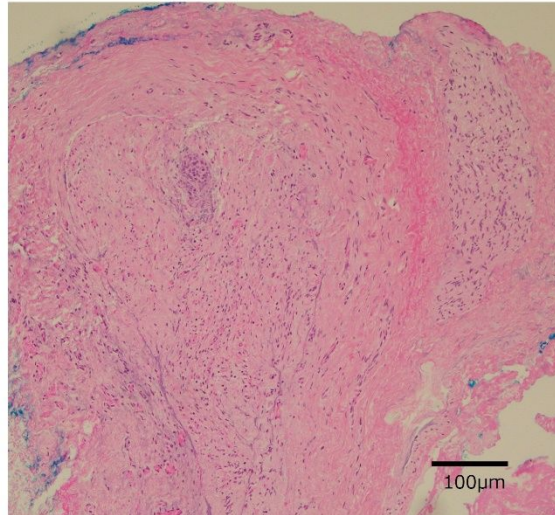
症例2の病型は , b1, μ で生後68日目に葛西手術を施行した。MPLSMによる観察では肝門部側断端の胆管開存を確認できなかった(図5a)。永久標本においてもMPLSMと同様に胆管の開存は確認できなかった(図5b)。術後は黄疸が消失することなく経過し、術後3ヶ月時に2回目の胆管炎

を発症した後から両葉にわたる数珠状の肝内胆管拡張を認めるようになったため、左右の経皮経肝胆管ドレナージ術を施行した。しかし、ドレナージを中断すると胆管炎が再燃するため、術後9ヶ月現在、ドレナージを継続しながら肝移植を待機中である。

図5
a



b



術中に TPLSM の技術を用いて観察できるデバイスの確立やクルクミンを腹腔内散布することの安全性の確認、より深部まで観察できるプロトコルの作成、など臨床応用へ向けた課題は多いが、術中にリアルタイムで生体組織深部を観察できる利点を最大限に活用するために課題の解決を目指していきたい。

文献

1. 日本胆道閉鎖症研究会・胆道閉鎖症全国登録事務局：胆道閉鎖症全国登録 2020 年集計結果 . 日小外会誌 58 : 201-207, 2022
2. Tanaka K, Koike Y, Shimura T, et al: In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. PLoS One 9: e111888, 2014
3. Koike Y, Uchida K, Tanaka K, et al: Dynamic pathology for circulating free DNA in a dextran sodium sulfate colitis mouse model. Pediatr Surg Int 30: 1199-1206, 2014
4. Koike Y, Li B, Chen Y, et al. Live Imaging of Fetal Intra-abdominal Organs Using Two-Photon Laser-Scanning Microscopy. Methods Mol Biol 1752: 63-69, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 井上幹大
2. 発表標題 胆道閉鎖症における二光子レーザー顕微鏡を用いた肝門部胆管の観察と有用性の検討
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上幹大
2. 発表標題 胆道閉鎖症における肝門部胆管の二光子レーザー顕微鏡による観察研究
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
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
研究分担者	小池 勇樹 (Koike Yuhki) (10555551)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	内田 恵一 (Uchida Keiichi) (30293781)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

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
研究分担者	松下 航平 (Matsushita Kohei) (70750777)	三重大学・医学系研究科・助教 (14101)	
研究分担者	溝口 明 (Mizoguchi Akira) (90181916)	三重大学・医学系研究科・産学官連携講座教授 (14101)	

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