

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08642

研究課題名（和文）ヒルシュスプルング病類縁疾患の新規生体観察手法による高精度術中迅速診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of high-precision intraoperative rapid diagnostic method by new biological observation method for Hirschsprung's disease-related diseases

研究代表者

小池 勇樹 (Koike, Yuhki)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10555551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：当研究のメインテーマであるヒルシュスプルング病類縁疾患における腸管神経叢の生体観察に関しては、該当期間中には新たな症例がみられず、代替として、ヒルシュスプルング病患児3例における腸管神経叢の検討を施行した。粘膜面からの観察においては、粘膜層から粘膜下層までの距離は、漿膜面から筋層までの距離に比べて深く、粘膜下神経の生体観察は、現時点で精細な画像イメージを獲得することは困難であった。一方で筋層間神経叢に関しては、腸管漿膜面からの観察において、腸管を損傷することなく、非常に高解像度のイメージとして獲得可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究では、術中切除標本を用いて新規生体蛍光観察手法による腸管神経叢の観察を実施し、筋層間神経叢を詳細に分析可能であった。現在、手術室に持ち込み可能なレベルの新規多光子レーザー顕微鏡のプロトタイプを作成中であり、2024年末までには完成予定である。これにより世界初のヒルシュスプルング病患児における術中腸管神経叢の顕微鏡レベルの観察を目指している。術中に術野において腸管神経叢の観察と解析が可能となれば、至適切切除ラインが術中に同定できるだけでなく、術後の合併症や排便障害に関しても軽減できる可能性がある。実臨床でも非常に有用な新規診断モダリティになりうると思われる。

研究成果の概要（英文）：As for the main theme of this study, biological observation of the enteric plexus in allied disorders of Hirschsprung disease, no new cases were found during the relevant period, and as an alternative, examination of the enteric plexus in three children with Hirschsprung's disease was conducted.

The distance from the mucosal surface to the submucosal layer is deeper than the distance from the serosal surface to the muscular layer, and it is difficult to obtain a detailed image of the submucosal nerves in vivo at this time. On the other hand, the myenteric plexus can be observed from the serosal surface of the intestinal tract without damaging the intestinal tract, and a very high-resolution image can be obtained.

研究分野：小児外科，先天性消化管疾患

キーワード：Hirschsprung病 腸管神経叢 生体蛍光観察 多光子レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

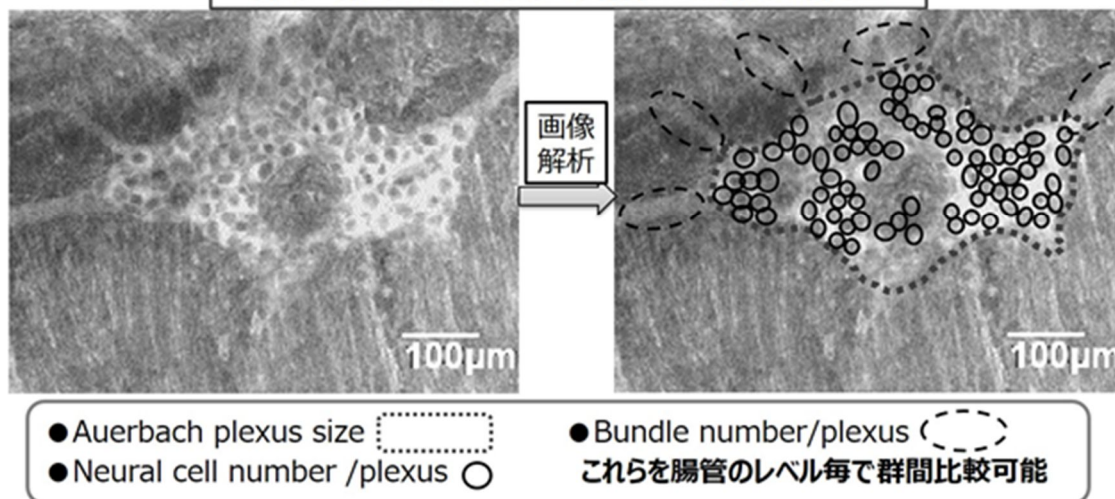
Hirschsprung 病類縁疾患における治療法としては、腸閉塞とならないレベルの腸管において人工肛門を造設し、腸炎発症を予防しつつ、経腸栄養と静脈栄養の併用により、延命を図ることが唯一の手段であるが、この「腸閉塞とならないレベルの腸管」を術中に同定する診断手法が未だ確立されていない。手術の際には、大腸～小腸を含めた複数の箇所での腸管壁の全層生検(すなわち腸管壁の部分切除)を施行することになるが、術中迅速病理診断では、生検を行った腸管において、腸管神経節細胞や腸管神経叢の有無が確認されるのみである。このため、実際の手術においては「およそ腸閉塞とならないであろうレベルの腸管」を術者の判断で決定し、そのレベルの腸管で人工肛門を造設する。すなわち術後に同部位の人工肛門から排便管理が可能かどうかは、術中には予測することができないのが現状である。また術後の切除標本から病理学的に腸管神経叢の大きさや分布などを詳細に精査することで、本来の「腸閉塞とならないレベルの腸管」が、どのレベルであったのかが判明することもあり、術後に人工肛門の再造設を余儀なくされることがある。また初回手術時における誤った部位での人工肛門造設により、術後に致死的な腸炎を繰り返す症例も多く、同疾患のほとんどの症例は、多段階の分割手術を要する。このように医学の発達した現在でも、「腸閉塞とならないレベルの腸管」を術中に同定する診断手法が全く確立されていない状態である。

2. 研究の目的

この研究では、我々が独自に開発した生体染色法(PCT/JP2014/59351)と二光子レーザー顕微鏡(TPLSM)を用いて、腸管漿膜面から腸管神経叢の観察(すなわち腸管の管腔構造を保ったまま腸管を損傷することなく)を行い、術中に Hirschsprung 病類縁疾患の詳細な分類や診断が可能かどうかを検討することを目的としていた。同研究内容については、すでに自施設での倫理審査承認を頂いた上で、同疾患患児における腸管壁内神経の二光子レーザー顕微鏡による観察を行っており、腸管を傷つけることなく腸管の漿膜面より腸管神経系の観察が実現可能であることをすでに実証していた (Figure. 1)。この観察手法により、誤った位置での人工肛門造設を回避できるため、術後発症しうる重症腸炎が予防できるだけでなく、再手術(別の位置で人工肛門再造設など)のリスクを回避できることに繋がり、同疾患の高い致死率の改善に大きく寄与することを意味し、同疾患患児に対して多大なメリットがえられるだけでなく、この難病疾患における「診断かつ治療のブレイクスルー」となりうると思われる。

Figure. 1

Hirschsprung病類縁疾患患児における 新規生体観察手法による腸管神経叢の新規解析方法

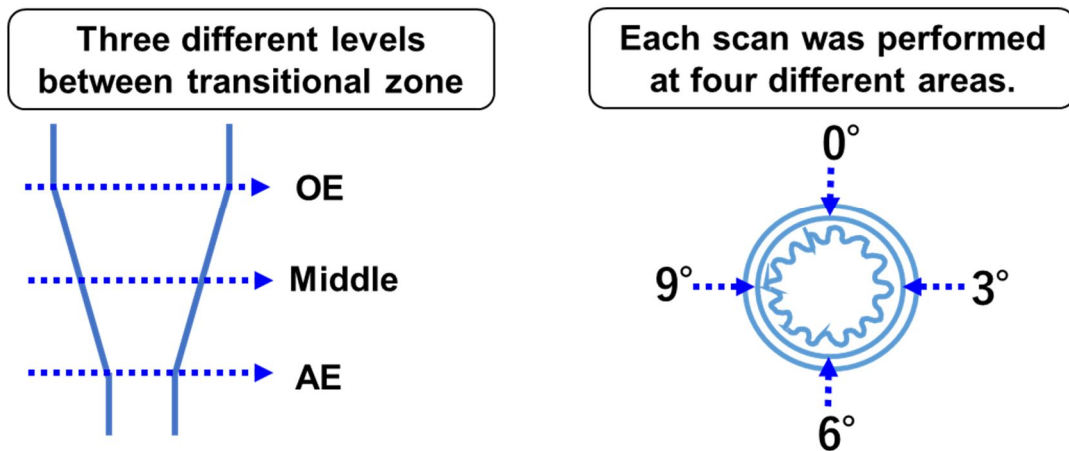


3. 研究の方法

当初、ヒルシュスプルング病類縁疾患患児における切除腸管を用いて、新規生体蛍光観察手法 (curcumin vital staining-assisted intravital fluorescent observation method: CVS-IFOM) による観察を予定していたが、その希少性が故に、研究期間中には新規症例を認めなかった。そのため、代替案として、ヒルシュスプルング病患児 3 例において、同手法を用いて、臨床上で最も重要な術中所見である Transitional zone (腸管神経叢が口側から肛門側に向かって徐々に低形成になっていく領域) における腸管神経叢の詳細な観察と解析を施行する方針とした。まず、Transitional zone を口側断端 (OW), 肛門側断端 (AW), その中間点 (Middle) として 3 つのレベルにわけ、そのそれぞれのレベルにおいて、腸管を時計に見立てて、腸間膜附着側の対側を 0 時、腸間膜附着側を 6 時とし、時計回りに 0 時、3 時、6 時、9 時のトータル 4 ヶ所での観察を施行した (Figure. 2)。観察された腸管神経叢におい

て、そのサイズと腸管神経叢から分枝する神経束 (Bundle) の数を各観察部位で記録し、解析を行った。

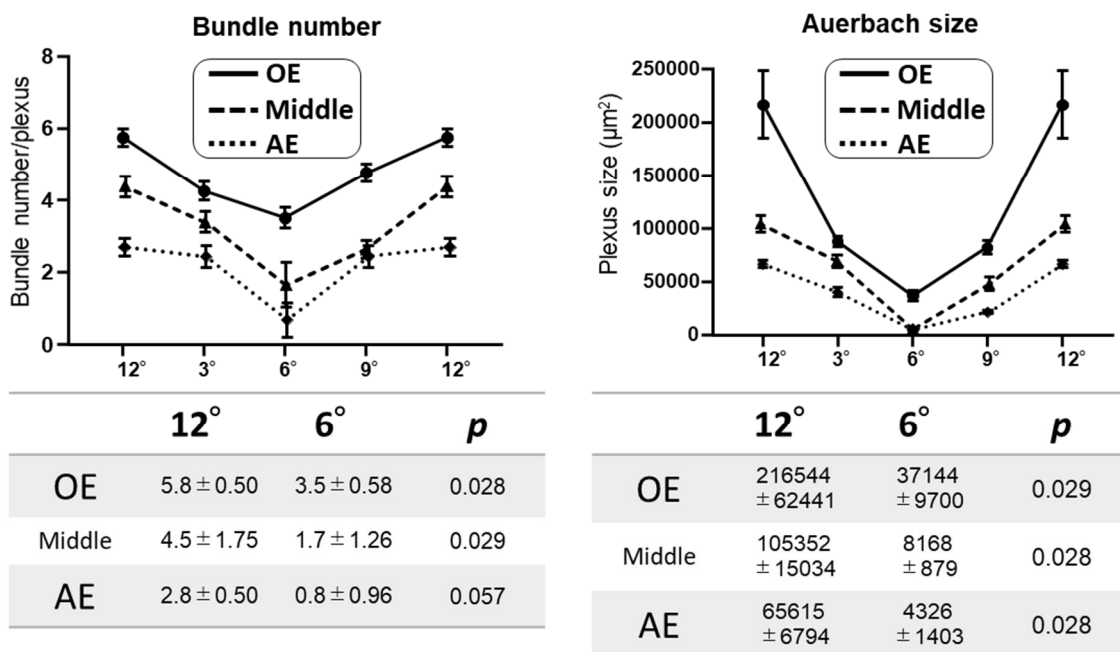
Figure. 2



4. 研究成果

ヒルシュスプルング病の3例における Transitional zone の観察結果を Figure.3 に示す。この結果により、同じ腸管レベルにおいても、腸管神経叢の Bundle number も Auerbach size も腸間膜附着部対側より腸間膜附着側の方が、腸管神経叢が低形成に陥っていることを世界で初めて CVS-IFOM の手法で明らかにした。これは術後標本を病理組織診断に提出することなく、腸管の壁外より CVS-IFOM で観察することで瞬時に得られる情報であり、術中での観察・解析とその結果により至適切除ラインを決定していくという術中判断をする際にも極めて重要な手術所見となりうると考えている。

Figure. 3



このような手法により、術中では切除予定ラインを同等の方法で観察・解析を行い、切除予定ラインにおける腸管神経叢の分布が全周性に問題ないことを確認した上で、無神経節腸管を切除して、全周性に正常な腸管神経叢の分布を有する腸管レベルで肛門に吻合することが可能になることを示唆している。即ち、術中応用の実現に向けて、少なくとも切除腸管においては、この CVS-IFOM の手法は、腸管神経叢の観察だけでなく解析においても応用可能であることを実証した。現在、術中に手術室内の清潔野において観察可能な新規多光子レーザー顕微鏡を開発中であり、近い将来には、ヒルシュスプルング病患児ないしヒルシュスプルング病類縁疾患の患児の手術中に臨床応用可能となる見込みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 小池 勇樹、内田 恵一、井上 幹大、佐藤 友紀、長野 由佳、松下 航平、溝口 明、問山 裕二	4. 巻 54
2. 論文標題 特集 小児外科を取り巻く最新テクノロジー 消化管神経叢の生体蛍光観察	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 989 ~ 993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24479/ps.0000000250	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小池 勇樹、内田 恵一、佐藤 友紀、長野 由佳、松下 航平、溝口 明、問山 裕二
2. 発表標題 小児外科における最先端医療の現状と展望【International】新規生体蛍光観察手法によるヒルシュスプルング病患児における腸管神経叢の非侵襲的観察
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池勇樹
2. 発表標題 ヒルシュスプルング病における術中至適切除ラインの同定に向けた新規生体観察手法による消化管神経叢の検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小池勇樹
2. 発表標題 The novel intravital fluorescent observation method for the enteric neural system in Hirschsprung disease without opening the intestinal wall
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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	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)	
研究 分担者	井上 幹大 (Inoue Mikihiro) (30422835)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	
研究 分担者	松下 航平 (Matsushita Kohei) (70750777)	三重大学・医学部附属病院・助教 (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
---------	---------