

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670765

研究課題名(和文)共焦点内視鏡とスペクトロスコープによるHybrid消化管神経叢診断システムの確立

研究課題名(英文)Development of intra-operative intestinal ganglion cell detection system for Hirschsprung's disease and allied disorder using probe type confocal laser endomicroscopy

研究代表者

家入 里志 (Ieiri, Satoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：00363359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒルシュスプルング病の腸管を用いて神経ネットワークの観察を行い、病変部、移行部、無神経節部の診断における有用性について検討した。ヒルシュスプルング病腸管において、従来の診断法である病理所見と対比してCLEによる神経ネットワークの評価を行い、高い精度で診断可能である事が示された。CLEは術中迅速病理に比べて短時間で広範囲に連続性をもって観察することが可能であり、将来の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In preceding studies, we identified that some fluorescent agents cloud visualization of the myenteric plexus (MP) with confocal laser endomicroscopy (CLE). In this study, we evaluated the technical feasibility of MP visualization using probe-based CLE (pCLE) with cresyl violet (CV), which has been used clinically for chromoendoscopy. We tested the feasibility of CV-assisted visualization of MP in human surgical specimens of Hirschsprung's disease, wherein the tissue dying and pCLE observation were performed from the serosal side. In the human study, rate of MP visualization by pCLE was evaluated as the primary outcome. We also evaluated the sensitivity and specificity of MP visualization by pCLE, using pathological presence/absence of MP as the gold standard. This study demonstrated the technical feasibility of visualizing the MP in real time by CV-assisted pCLE.

研究分野：小児外科

キーワード：機能性消化管疾患 ヒルシュスプルング病 共焦点型内視鏡 神経節細胞 筋間神経叢 ヒルシュスプルング病類縁疾患

1. 研究開始当初の背景

共焦点顕微鏡の技術を応用した共焦点内視鏡(Confocal Laser Endomicroscopy: CLE)では生体標本の病理診断に近いミクロのレベルの観察が可能になり、内視鏡による消化管疾患診断能の飛躍的な向上が期待されている。特に近年は粘膜下層内部にこの共焦点型内視鏡を挿入することにより生体内において固有筋層など消化管深層の組織学的解析が可能であることが示されている。アクリフラビンを用いることで神経叢を構成する細胞群に選択的に取り込まれ、粘膜下層および平滑筋層内にネットワークを形成するグリア細胞や神経節細胞が明瞭に観察されることが示されている。

ヒルシュスプルング病およびヒルシュスプルング病類縁疾患の初期治療や根治手術にあたっては、現在手術標本採取による術中迅速病理診断により人工肛門造設部位や切除腸管の範囲の決定が行われているが、このHybrid 診断法が可能になれば、非侵襲的であり、診断の迅速化、内視鏡による診断能の飛躍的な向上が得られ不適切な人工肛門造設や切除範囲の決定による再手術を減らすことが可能となる。

2. 研究の目的

ヒルシュスプルング病およびヒルシュスプルング病類縁疾患は消化管壁内神経叢の数的質的異常を伴う機能性腸閉塞を呈する疾患である。本研究ではこの疾患の初期治療や根治手術にあたって、従来行われていた標本採取による術中病理迅速診断から共焦点内視鏡による管腔内からの Submucosal Endoscopy 法と腹腔鏡下にスペクトロスコープを用いて体腔内からの観察を組み合わせ、生体におけるリアルタイムに消化管壁内神経叢の観察同時に行い、人工肛門造設部位や切除腸管の範囲の決定する in Vivo Imaging による低侵襲消化管壁内神経叢リアルタイム診断システムを構築するものである。このシステムの確立により不適切な人工肛門造設や切除範囲の決定による再手術や合併症を最小限に防ぎ、手術回数の軽減と適切な治療の標準化を目的として本研究を開始した。

3. 研究の方法

今回の研究開発に用いる共焦点型内視鏡とスペクトロスコープでは平滑筋層細胞の観察ができるため、生体標本の病理診断と同等レベルの観察が可能になると考えられる。将来的には切除標本を必要としない機能性消化管疾患の病理診断が可能であると期待している。対象疾患を小児外科を代表する機能性消化管疾患であるヒルシュスプルング病とその類縁疾患とし、まず疾患動物モデルを用いて摘出標本と生体内で診断システムを確立し、病理学的検討も合わせて行いその整合性と妥当性を検証する。その次のステップ

として臨床検体を用いるが、そのプロトコルとしてはヒルシュスプルングの根治術の際にはまずスペクトロスコープにより腹腔内からの観察で神経節細胞とそのネットワークを可視化してマーキングしたのち、経肛門的に引き出された腸管の粘膜下層内に共焦点型内視鏡を挿入し切除範囲の決定を行う。ヒルシュスプルング病類縁疾患においてはスペクトロスコープにより腹腔内観察で神経節細胞の多寡を確認し、人工肛門造設部位からさらに共焦点内視鏡の挿入観察で摘出標本を必要としないリアルタイム仮想病理診断を確立することとした。

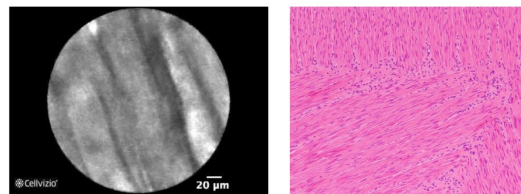
最終的にはヒトヒルシュスプルング病摘出標本を用いて検討を行った。

ヒルシュスプルング病根治術を受けた患者 11 人を対象とした。病型の内訳は rectosigmoid type 10 例、total colonic aganglionosis 1 例で、年齢は 1 ヶ月～13 ヶ月(平均 5.1 ヶ月)であった。切除検体にクレシールバイオレット色素を漿膜下に局所注射し漿膜側より CLE を当てて観察した。観察した部位の病理組織標本を作製し、それぞれ 3 段階で評価した。CLE グレード 0: 染色不良、グレード 1: 神経叢あり、グレード 2: 神経叢なし、病理組織グレード 0: 標本作製不良、グレード 1: 神経叢あり、グレード 2: 神経叢なし。

4. 研究成果

CLE 観察において正常部では梯子状の神経叢が明瞭に確認できるのに対して無神経節部では全く神経叢が確認されず、その差は明らかであった。また rectosigmoid type の全例において、移行部もしくは無神経節部で太い神経線維束を認めた(図 1)

5ヵ月, 男児
ヒルシュスプルング病(RS型)



(図 1) H 病患者における CLE および組織所見

CLE グレードと病理グレードを対比すると、11 例で 78 検体の検討を行い、感度 83%、特異度 95%、陽性的中率 94%、陰性的中率 87%、正診率 90%であった。CLE で神経叢なし、病理で神経叢ありと診断された 6 検体はいずれも移行部であり病理においても神経叢はまばらであった。(表 1)

11 症例 (78 検体)		CLE 結果		統計	
Patho-positive	Patho-negative	CLE-positive	CLE-negative	正診率: 85.9%	感度: 77.8%
28	3	8	39	特異度: 92.9%	陽性的中率: 90.3%
				陰性的中率: 83.0%	

表 1

ヒルシスプルング病腸管において、従来の診断法である病理所見と対比してCLEによる神経ネットワークの評価を行い、高い精度で診断可能である事が示された。CLEは術中迅速病理に比べて短時間で広範囲に連続性をもって観察することが可能であり、将来の臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計62件)

1. leiri S(Corresponding Author), Obata S, Jimbo T, 他4名:Laparoscopic intra-gastric surgery for gastric tumor to preserve cardia function under augmented reality navigation system -the first application for child case-. J Laparoendosc Adv Surg Tech B: Videoscopy, 25(1), 2016 (査読有り)
2. Obata S, leiri S(Corresponding Author, 2番目), Jimbo T, 他3名: Feasibility of Single-incision Laparoscopic Percutaneous Extraperitoneal Closure for Inguinal Hernia by Inexperienced Pediatric Surgeons; Single incision versus multi incision Randomized trial for 2 years. J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 26(3):218-221,2016 (査読有り) doi.org/10.1089/lap.2015.0110
3. Tomikawa M, Uemura M, leiri S(8番目), 他5名: Evaluation of the 10-Year History of a 2-Day Standardized Laparoscopic Surgical Skills Training Program at Kyushu University. Surg Today. 46(6):750-756, 2016 (査読有り) DOI: 10.1007/s00595-015-1227-y
4. Kawamura K(1番目), Kobayashi Y(3番目), leiri S (4番目), 他3名: Design parameter evaluation based on human operation for tip mechanism of forceps manipulator using surgical robot simulation. Advanced Robotics, Online, 14 Jan2016 476-488 (査読なし) <http://dx.doi.org/10.1080/01691864.2015.1129361>
5. Koreeda Y, Kobayashi Y, leiri S (4番目), 他3名: Virtually transparent surgical instruments in endoscopic surgery with augmentation of obscured regions. Int J Comput Assist Radiol Surg. 2016, 1927-36 (査読有り) doi:10.1007/s11548-016-1384-5
6. Uemura M, Jannin P, leiri S(8番目), 他6名: Procedural surgical skill assessment in laparoscopic training environments. Int J Comput Assist Radiol Surg. 11(4):543-552, 2016 (査読有り)
7. Yamada W, Kaji T, leiri S(Corresponding Author, 11番目), 他8名: Ghrelin improves intestinal mucosal atrophy during parenteral nutrition: An experimental study. J Pediatr Surg. 51:2039-2043, 2016 (査読有り) doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.09.035
8. Onishi S, Kaji T, leiri S(Corresponding Author, 8番目), 他5名: Long-term outcome of bowel function for 110 consecutive cases of Hirschsprung's disease: Comparison of the abdominal approach with transanal approach over 30 years in a single institution: Is the transanal approach truly beneficial for bowel function? J Pediatr Surg. 51: 2010-2014, 2016 (査読有り) <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.09.029>
9. Kaji T, Onishi S, leiri S(Corresponding Author, 8番目), 他6名: Changing profile of safe techniques for insertion a central venous catheter in pediatric patients - Improvement in outcomes with the experience of 500 insertions in a single institution. J Pediatr Surg. 51: 2044-2047, 2016 (査読有り) doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.037
10. Kawano T, Kaji T, leiri S(Corresponding Author, 8番目), 他5名: Efficacy of ethanol locks to reduce the incidence of catheter-related bloodstream infections for home parenteral nutrition pediatric patients. Comparison of therapeutic treatment with prophylactic treatment- Pediatr Surg Int. 32(9):863-7, 2016 (査読有り) 863-867 doi:10.1007/s00383-016-3933-y
11. Onishi S, Kaji T, leiri S(Corresponding Author, 14番目), 他11名: The administration of ghrelin improved hepatocellular injury following parenteral feeding in a rat model of short bowel syndrome. Pediatr Surg Int. 32:1165-1171, 2016 (査読有り) doi:10.1007/s00383-016-3975-1
12. Nakamura H, Kawano T, leiri S(8番

- 目),他5名:Anicteric survival with the native liver after redo Kasai. Long-term follow-up. A first report. *J Pediatr Surg.* 51: 2109-2112, 2016 (査読有り) doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.09.049
13. Suzuhigashi M, Kaji T, leiri S(Corresponding Author, 8 番目),他5名:Abdominal wall regenerative medicine for a large defect using tissue engineering: An experimental study. *Pediatr Surg Int.* 32(10):959-65, 2016 (査読有り) doi:10.1007/s00383-016-3949-3
 14. leiri S(Corresponding Author), Miyoshi K, Nagata K,他4名:Current clinical features in diagnosis and treatment for immaturity of ganglia in Japan: analysis from 10-year nationwide survey. *Pediatr Surg Int.*31(10)949-54,2015(査読有) doi:10.1007/s00383-015-3774-0
 15. leiri S(Corresponding Author), Jimbo T, Obata S (4 番目), 他7名:The effect of forceps manipulation for expert pediatric surgeons using an endoscopic pseudo-viewpoint alternating system: the phenomenon of economical slow and fast performance in endoscopic surgery. *Pediatr Surg Int.*, 31(10):971-976, 2015 (査読有り) doi:10.1007/s00383-015-3777-x
 16. Souzaki R, Kinoshita Y, leiri S(3 番目), 他7名:Three-dimensional liver model based on preoperative CT images as a tool to assist in surgical planning for hepatoblastoma in a child. *Pediatr Surg Int.* 31(6):593-596, 2015 (査読有り) doi:10.1007/s00383-015-3709-9
 17. Budianto IR, Obata S, leiri S(8 番目), 他6名:Reevaluation of acetylcholinesterase staining for the diagnosis of Hirschsprung disease and allied disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 60(5):606-12, 2015 (査読有り) doi: 10.1097/MPG.0000000000000664
 18. Obata S, leiri S(2 番目 Corresponding Author), Uemura M, 他6名:An endoscopic surgical skill validation system for pediatric surgeons using a model of congenital diaphragmatic hernia repair. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 25(9):775-81, 2015 (査読有り) <https://doi.org/10.1089/lap.2014.0259>
 19. Uemura M, leiri S(6 番目), Ohuchida K,他7名:Objective assessment of the suture ligature method for the laparoscopic intestinal anastomosis model using a new computerized system, *Surg Endosc*,29(2):444-52,2015(査読有り) doi:10.1007/s00464-014-3681-9
 20. Kobayashi Y(1 番目), Uemura M(8 番目), leiri S(9 番目),他9名, Development of a robotic system with six degrees of freedom robotic tool manipulators for single port surgery, *Int J Med Robot.* 11(2):p235-246, 2015 (査読有り) DOI: 10.1002/rcs.1600
 21. Koreeda Y, Kobayashi Y(5 番目), leiri S(8 番目), 他7名:Development and Testing of an Endoscopic Pseudo-Viewpoint Alternating System, *Int J Comput Assist Radiol Surg.* 10(5):619-628,2015 (査読有り) doi:10.1007/s11548-014-1083-z
 22. 家入里志、小幡聡、植村宗則,他4名:特集 知っておきたい脾臓の話題 手術ナビゲーションシステム-腹腔鏡下脾臓摘出術に対する augmented reality(拡張現実)技術を用いたナビゲーション手術 小児外科, 47(4)377-82, 2015(査読なし)
 23. 家入里志(1 番目)、小幡 聡、神保教広、他3名:ロボット手術リレー連載(第5回) 小児外科領域 日本コンピュータ外科学会雑誌, 17(1)5-9, 2015 (査読なし) <http://doi.org/10.5759/jscas.17.5>
 24. Uemura M, Tomikawa M, leiri S(7 番目), 他6名:Analysis of hand motion differentiates expert and novice surgeons, *Journal of Surgical Research*, 2014 188(1):8-13(査読有り) <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.12.009>
 25. Uemura M, Tomikawa M, leiri S(8 番目), 他7名:Significance of metacognitive skills in laparoscopic surgery assessed by essential task simulation. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2014 23(3):165-172 (査読有り)doi.org/10.3109/13645706.2013.867273
 26. Taguchi T, Kobayashi H, leiri S(13 番目), 他10名:Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B (IND-B) in Japan: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int.* 30(8):815-22, 2015

- 4 (査読有り) doi:10.1007/s00383-014-3542-6
27. Kobayashi Y(1 番目), Uemura M(7 番目), leiri S(8 番目), 他 9 名:Preliminary in vivo evaluation of a needle insertion manipulator for central venous catheterization ROBOMECH Journal, November 2014, 1:18 (査読有り) DOI: 10.1186/s40648-014-0018-3
 28. 家入里志、橋爪 誠, 特集:ロボット手術とハイブリッド手術室「ロボット手術のトレーニング」消化器外科, 37(1) 15-22, 2014 (査読なし)
 29. 家入里志、橋爪 誠, ロボット手術リレー連載(第 1 回) 本邦におけるロボット手術の導入と今後の展望 日本コンピュータ外科学会雑誌, 15(4) 319-322, 2014 30. (査読なし) <http://doi.org/10.5759/jscas.15.319>
- [学会発表](計 35 件)
1. leiri S, Strategy of surgical intervention for pediatric solid tumor, The 40th World Congress of the International College of Surgeons, 2016, 10, 25, Kyoto International Conference Center, (Kyotoshi, Kyoto)
 2. leiri S, Kobayashi Y: Development of blind area visualization system in magnified field of view using an augmented reality in pediatric endosurgery ~Amazing See-Through Needle Driver~, The 24th International Congress of the EAES, 2016.6.15, Amsterdam(Netherlands)
 3. leiri S:EXPERT PANEL: Education in Minimally Invasive Surgery "Your Pediatric Surgery Fellow is counting on you" Ped Surgery Training in Asia/Australia - The 25th Annual Congress of International Pediatric Endosurgery Group (IPEG2016) 2016.5.27, Hilton Fukuoka Sea Hawk (fukuokashi, fukuoka)
 4. leiri S, Souzaki R, Obata S, Jimbo T, Uemura M, Hashizume M, Taguchi T:Evolution of Techniques and Education in Neonatal and Pediatric MIS:Development of Innovative Pediatric Surgical Devices, The 24th Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons, MIS Key note Lecture, 2016.5.25, Hilton Fukuoka Sea Hawk(fukuokashi, fukuoka)
 5. leiri S:Minimally Invasive Pediatric Surgery-Development of training model, robot, and image-guided surgery-, Symposium:Evolution of Techniques and Education in Neonatal and Pediatric MIS, 2015.10.16, Buenos Aires(Argentina)
 6. leiri S, Nishio Y, Obata S, Souzaki R, Kobayashi Y, Fujie G, Hashizume M, Taguchi T: Development of blind area visualization system in magnified field of view using an augmented reality in pediatric endosurgery ~Amazing See-Through Needle Driver~, The 23rd International Congress of the EAES, Technology Symposium, 2015.6.3, Bucharest(Romania)
 7. leiri S, Nagata K, Obata S, Jimbo T, Souzaki R, Miyata J, Taguchi T: Changing profile of Operative procedure: from Open Z-shaped anastomosis (modified Duhamel) to Lap-Assisted TAEPT: -200 cases of over half century single-institute experience- The 48th Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2015.5.18. Jeju (South Korea)
 8. leiri S, Obata S, Souzaki R, Kobayashi Y, Fujie MG, Hashizume M, Taguchi T, Development of blind area visualization system in magnified field of view using an augmented reality in pediatric endosurgery ~Amazing See-Through Needle Driver~, Society of American Gastrointestinal Endoscopic Surgeons(SAGES) 2015, 2015.04.16. Nashville, TN, (U.S.A.)
 9. leiri S, Obata S, Jimbo T, Souzaki R, Hashizume M, Taguchi T:Laparoscopic intra-gastric surgery for gastric tumor to preserve cardia function under augmented reality navigation system-the first application for child case- " The 24th Annual Congress of International Pediatric Endosurgery Group (IPEG2015), 2015.04.16. Nashville, TN (U.S.A.)
 10. leiri S, Nishio Y, Obata S, Souzaki R, Kobayashi Y, Fujie MG, Hashizume M, Taguchi T, Development of blind area visualization system in magnified field of view using an augmented reality in pediatric endosurgery ~Amazing See-Through Needle Driver~, International Pediatric E

ndosurgery Group (IPEG2014),2014.
07.26. Edinburgh(Scotland)

11. Jeiri S, Obata S, Jinbo T, Souzaki R, Uemura M, Ishii H, Kobayashi Y, Matsuoka N, Katayama T, Takanishi A, Fujie M, Hashizume M, Taguchi T: Minimally Invasive Pediatric Surgery-Development of training model and image-guided surgery-Computer Assisted Radiology and Surgery (CARS2014) 28th International Congress and Exhibition,2014.06.26. Fukuoka International Convention Center, (Fukuokashi, fukuoka)

〔図書〕(計2件)

1. Jeiri S, Kaji T, Taguchi T: Chapter 43 Anorectal Prolapse: pp273-276 Operative General Surgery in Neonates and Infants Springer, Tokyo, 2016 (査読なし)
2. 家入里志、田口智章、監修:公益社団法人 日本小児外科学会、編集:国立研究開発法人 国立成育医療センター 小児慢性特定疾病情報センター 小児慢性特定疾病 診断の手引き 731:ヒルシュスプルング病(Hirschsprung)及び類縁疾患:ヒルシュスプルング病(Hirschsprung)病 診断と治療社、2015.7 (査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: SUTURE TECHNIQUE EVALUATION APPARATUS, RECORDING MEDIUM STORING PROGRAM FOR SUTURE TECHNIQUE EVALUATION APPARATUS, AND SUTURE SIMULATOR SYSTEM

発明の名称: 縫合手技評価装置、縫合手技評価装置用プログラム

発明者: 片山 勉, 松岡紀之、植村宗則,
橋爪 誠、神保教広、小幡 聡、家入里志、田口智章

権利者: 株式会社京都科学
国立大学法人九州大学

米国出願番号: 14/743,884

基礎出願番号: 特願 2014-126006

国内外の別: 米国

取得状況(計1件)

名称: 画像内遮蔽領域の画像補完システム、画像処理装置及びそのプログラム

発明者: 藤江正克, 小林 洋, 川村和也,

瀬能洸冬、西尾祐也,

橋爪 誠, 家入里志, 豊田和孝

権利者: 学校法人早稲田大学,
国立大学法人九州大学

種類:

番号: W02013141155 A1

取得年月日: 2013年9月26日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家入 里志 (IEIRI Satoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 00363359

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI Tomoaki)

九州大学・医学研究科・教授

研究者番号: 20197247

黒田 達夫 (KURODA Tatsuo)

慶應義塾大学・医学部教授

研究者番号: 60170130

下島 直樹 (SHIMOJIMA Naoki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 30317151

炭山 和毅 (SUMIYAMA Kazuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90385328

藤ヶ崎 純子 (FUJIGASAKI Junko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号: 60312021

宮田 潤子 (MIYATA Junko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 20380412

三好 きな (MIYOSHI Kina)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号: 20621709

小幡 聡 (OBATA Satoshi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 30710975

神保 教広 (JIMBO Takahiro)

九州大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 10650559