

令和元年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11354

研究課題名(和文) 共焦点内視鏡によるヒルシュスプルング病の腸管神経可視化システムの確立と臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of confocal laser endomicroscopy for visualization of the enteric nervous system in Hirschsprung's disease.

研究代表者

下島 直樹 (Shimajima, Naoki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：30317151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天的な腸管神経の欠損により生下時から便秘腹満を呈するヒルシュスプルング病を対象として腸管神経可視化の研究を続けてきた。

前半は切除腸管を用いて生体外での神経可視化を試みた。共焦点内視鏡(confocal laser endomicroscopy, 以下CLE)を用いて腸管壁内の構造を観察した。正常部では梯子状の形状をした腸管神経叢が、無神経節腸管では平滑筋線維と太い神経線維束が明瞭に描出された。

後半は生体内観察に着手した。ヒルシュスプルング病の根治手術2症例において切除前の生体内にある腸管でCLEによる腸管神経可視化に挑戦し、世界初のヒルシュスプルング病生体内腸管神経可視化を実現させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を開始した動機は外科医としてより質の高い医療を提供したいという思いである。ヒルシュスプルング病の治療は遠位側の無神経節腸管を切除して正常部を肛門部に吻合することである。切除範囲を選定する方法としてこれまでは術中に腸管の一部を生検して迅速病理診断で判断していた。この病理診断は一部のみで判断せざるを得ないため正確性にかけ、正常部と無神経節部の中間である移行部で吻合してしまい、術後に頑固な便秘症状が遷延する事例が後を絶たない。これに対して光を当てることでより簡便、迅速、低侵襲に腸管神経の範囲を評価可能なCLEによる可視化技術は小児外科の教科書を書き換えるほどのインパクトがある研究である。

研究成果の概要(英文)：Our project has been focusing on the visualization of enteric nervous system by confocal laser endomicroscopy (CLE). The main target disease is Hirschsprung's disease in which distal intestines lack their enteric nervous system, resulting severe constipation since early in life. We examined using resected intestines in the beginning. We confirmed clear and characteristic visualization of ladder-like enteric nervous system, smooth muscles and extrinsic thick nerve bundles. Later, we undertook the in vivo visualization. We achieved the visualization of enteric nervous system for the first time in human in 2 patients with Hirschsprung's disease.

研究分野：小児外科

キーワード：腸管神経 共焦点内視鏡 可視化 ヒルシュスプルング病 腸管運動 術中迅速病理診断 神経叢

1. 研究開始当初の背景

ヒルシウスプルング病は先天的に遠位側腸管の神経が一部欠如することにより、生後早期からの便秘、腹部膨満を主訴とする疾患で根治的には無神経節腸管を切除し、正常腸管を肛門に吻合することが必要である。その切除範囲の決定は従来術中迅速病理診断によってなされていたが正確な診断は容易ではなく、故に移行部(正常部と無神経節腸管との境界部)を肛門に吻合してしまうことで術後に頑固な便秘が遷延してしまう報告が未だに存在し、より正確な診断方法が必要と我々は考えていた。

当時、成人の消化管内視鏡検査時にリアルタイムに生検レベルの倍率で細胞の異形成までもが画像により描出可能となった新しいデバイスとして共焦点内視鏡(confocal laser endomicroscopy, CLE)が臨床応用されるようになっていた。その新技術を腸管神経の可視化に応用し、ヒルシウスプルング病の手術時に、より迅速、簡便で正確な診断に結びつけられるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

CLEを用いた低侵襲消化管壁内神経叢の*in vivo* imaging法を確立し、ヒルシウスプルング病の確定診断と、初期治療や根治手術の際の人工肛門造設部位や切除腸管の範囲を正確に決定するリアルタイム診断システムを構築することを目指す。そのために、(1)腸管切除検体を用いたCLE所見と病理組織所見の比較、(2)実験動物を用いた生体実験におけるCLEの理想的な観察方法の確立を経て、(3)臨床症例への応用を計画する。従来の生検による評価に比べて迅速かつ低侵襲に広範囲での観察が可能になり、より質の高い外科治療が可能となる。

3. 研究の方法

(1)腸管切除検体を用いたCLEと病理組織所見の比較

腸管切除が必要である患者さんに術前に同意を得て、切除検体の一部を研究に使用する。CLEによる観察では蛍光色素を漿膜面より散布もしくは漿膜下に局注し、CLEで漿膜側より筋層間の神経叢を観察する。蛍光色素はその有用性が示されているcresyl violetを用いる(Ohya TR, Gastrointest Endosc 2012)。H病の無神経節部や移行部においては神経線維束についても観察、記録する。CLEによる観察終了後、組織をホルマリン固定。CLEで観察したのと同じように水平断で切片を作成し、HE染色後に検鏡する。CLEの所見との整合性を比較検討する。

(2)実験動物を用いた生体実験におけるCLEの理想的な観察方法

実験動物としてはおよそ生後3ヶ月のメスのブタ(体重25-30キロ)を用いる。実験は全て全身麻酔下に行う。まず、内視鏡的観察を想定した実験として、上部、下部内視鏡下に粘膜を開いて粘膜下層に入り、蛍光色素を散布もしくは局注し、CLE観察を行う。また、腹腔鏡もしくは開腹手術時の観察を想定して、実際に開腹して腸管を体外に出し、蛍光色素を腸管の漿膜側より散布もしくは局注してCLE観察を行う。CLE観察終了後は実験動物を安楽死させた後、CLE観察した腸管を採取し病理所見との対比を行いCLEの有用性を評価する予定である。有用性の評価と共に蛍光色素の生体内使用が全身に与える影響についてもモニタリングする。投与後のバイタルサインの変化や病理学的な異常の出現の有無について評価する。

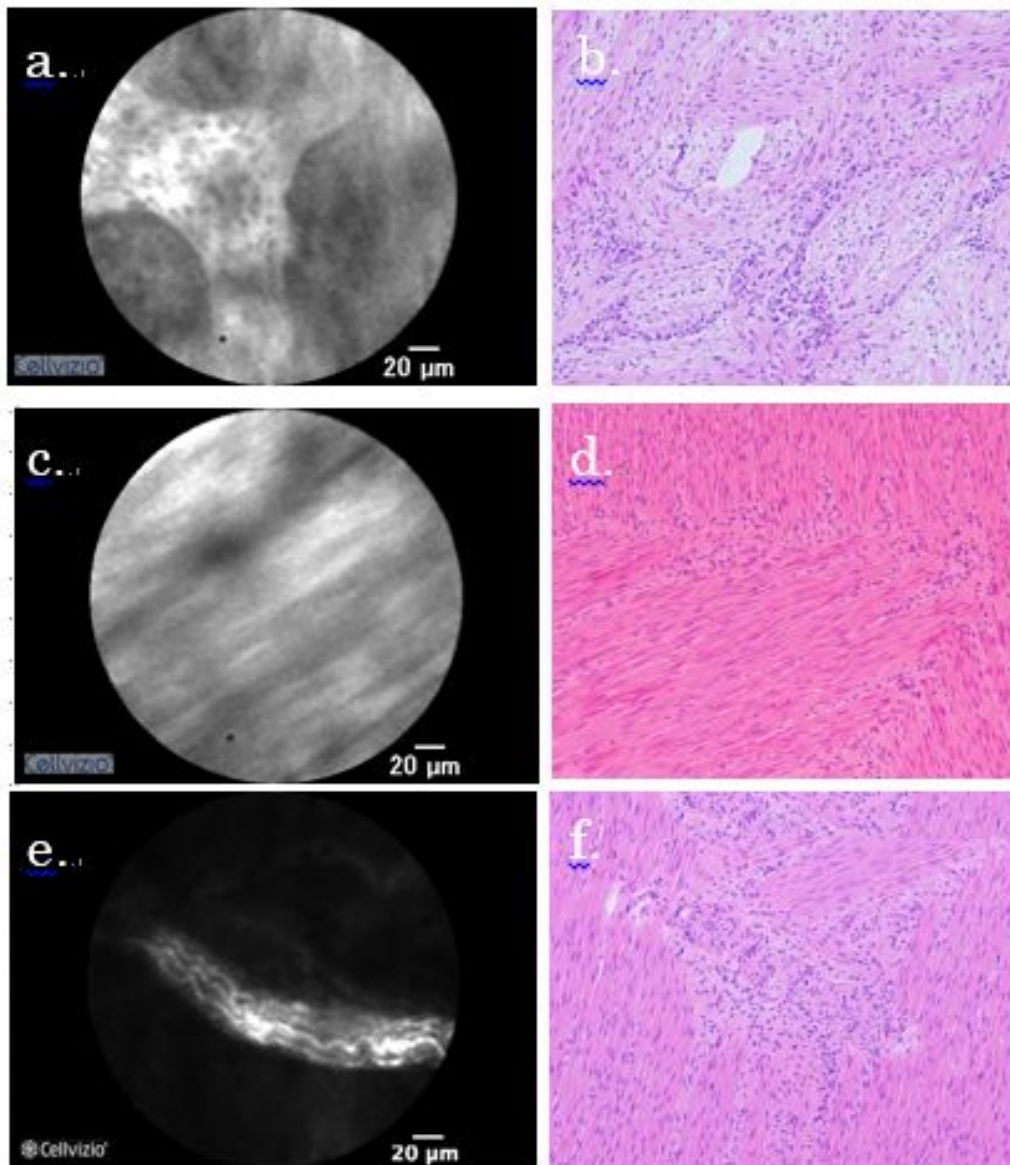
(3)臨床症例への応用

腸管切除を受けることが決まっているヒルシウスプルング病の患者さんを対象として手術中に生体内でのCLE観察を行う。従来の術中迅速病理診断により切除部位を決定した後、腸管切除予定部において蛍光色素を漿膜面より散布もしくは漿膜下に局注し、CLEで漿膜側より筋層間の神経叢を観察する。CLEで観察した部位の病理所見を検討し、CLE所見との整合性について比較検討する。

4. 研究成果

(1)腸管切除検体を用いたCLEと病理組織所見の比較

これまでに38症例(ヒルシウスプルング病患者18症例、その他の腸管神経に異常のないコントロール患者20症例)よりサンプルを収集し、そのうち29症例においてCLEによる観察を行った。ヒルシウスプルング病の無神経節部や移行部においては神経線維束についても観察、記録した。正常部腸管において、神経叢に特徴的な梯子状の構造が確認され、内部には神経節細胞やグリア細胞の核と思われる部分が黒く抜けて見えることが分かった。また無神経節部では平滑筋の線維が描出されるのみで梯子状の神経叢は確認されなかった。一方、内部に波状の線維構造を呈する所見を認め、外来性の太い神経線維束を見ているものと思われた。病理所見では正常腸管において高い精度で神経叢が確認された。またヒルシウスプルング病の無神経節部では太い神経線維束が確認され、CLEにおける腸管神経の可視化は十分臨床応用可能な精度、描出力を持っていることが確信的となった。CLE所見と病理所見の対比を行い統計的な解析をこれまでにヒルシウスプルング病9例、コントロール11例にておこなった。結果はヒルシウスプルング病において正診率、感度、特異度がそれぞれ88.2%、78.6%、95.0%であり、コントロールではそれぞれ92.9%、92.3%、100%と高い精度が確認された。



図．切除腸管を用いた CLE 観察 (a. c. e.) と H-E 染色による病理所見 (b. d. f.)

a. b. 正常部、c. d. e. f. 無神経節部

a. 梯子状の神経叢が描出されている。内部に黒く抜けているのは神経節細胞やグリア細胞の核と思われる。b. a.の観察部位を水平切片にして観察している。多数の神経節細胞が認められ、神経叢を形成しているのが分かる。c. 平滑筋の線維が確認される。d. c.の観察部位を水平切片にして観察している。二層の平滑筋が確認されるが筋層間に神経節細胞や神経叢は認められない。e. 無神経節部の特徴的所見である太い神経線維束が CLE においては内部で波状の線維の束として明瞭に可視化されている。f. e.の観察部位を水平切片にして観察している。中央に波状の太い神経線維束を認める。

(2) 実験動物を用いた生体実験における CLE の理想的な観察方法

共同研究期間である慈恵医科大学にて実験計画の承認の下、2 頭のブタ生体内観察を行った。全身麻酔下に内視鏡を施行し、粘膜下に蛍光色素を局注して CLE 観察を行ったが、神経のネットワーク構造は確認できなかった。また、開腹下にも同様に漿膜側より蛍光色素を局注して観察を行ったがやはり神経のネットワークは確認できなかった。蛍光色素を生体内に局注したが全身の血圧や脈拍に与える影響は特に認めなかった。

(3) 臨床症例への応用

摘出標本における腸管神経可視化データを基に院内の倫理委員会に生体内観察の研究の承認を得て、これまでに 2 例のヒルシュスプルング病患者において CLE によるヒト腸管神経の生体内観察を施行した。実際の治療は従来と同様に術中迅速病理診断により切除範囲を決定し、腸管切除の直前で観察を行った。腸管神経叢の描出は漿膜面からの観察のみでは焦点深度の点から困難であり、漿膜を一部切開して筋層内にプローベを挿入することで神経叢の可視化に成功した。観察後は速やかに腸管を切除し、患者には観察に関連した副作用を認めなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kobayashi M, Sumiyama K, Shimojima N, Ieiri S, Okano H, Kamba S, Fujimura T, Hirobe S, Kuroda T, Takahashi-Fujigasaki J. Technical feasibility of visualizing myenteric plexus using confocal laser endomicroscopy. J Gastroenterol Hepatol. 査読有, 32 巻, 2017 年, 1604-1610 page, DOI 10.1111/jgh. 13754

〔学会発表〕(計4件)

Shimojima N, Kobayashi M, Kamba S, Fujimura T, Ieiri S, Hirobe S, Kuroda T, Fujigasaki J, Sumiyama K., Visualization of human enteric nervous system using confocal endomicroscopy: As an alternative to intraoperative pathological diagnosis for Hirschsprung disease. Development of the Enteric Nervous System: cells, signals, genes and therapy (ENS 2018), 2018

Shimojima N, Kobayashi M, Kamba S, Fujimura T, Ieiri S, Fujigasaki J, Sumiyama K, Hirobe S, Kuroda T., Visualization of human enteric nervous system by confocal endomicroscopy in Hirschsprung's disease: An alternative to intraoperative histopathological diagnosis? PAPS, 2018

Kobayashi M, Shimojima N, Kamba S, Takahashi-Fujigasaki J, Sumiyama K, Enteric nervous system visualization of Hirschsprung's disease using confocal laser endomicroscopy: ex vivo human trial. DDW, 2017

Kobayashi M, Shimojima N, Takahashi-Fujigasaki J, Kamba S, Sumiyama K, Enteric nervous system visualization using confocal laser endomicroscopy. Asian Pacific Digestive Week (APDW2016), 2016

〔図書〕(計1件)

Shimojima N., Springer, Hirschsprung's Disease and the Allied Disorders Status. Quo and Future Prospects of Treatment. Chapter 11 Examinations for Diagnosis. 2019, 292 pages

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：炭山 和毅

ローマ字氏名：SUMIYAMA, Kazuki

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90385328

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。