

令和 5 年 11 月 6 日現在

機関番号：82686

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09061

研究課題名（和文）共焦点内視鏡による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）Visualization of human enteric nervous system using confocal endomicroscopy

研究代表者

下島 直樹（Shimajima, Naoki）

地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立小児総合医療センター（臨床研究部）・外科・部長

研究者番号：30317151

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：先天的に腸管神経の異常があり正常な腸管運動が獲得できない疾患（ヒルシュスプルング病やその類縁疾患）に対して、共焦点内視鏡（confocal endomicroscopy, CLE）と腸管神経に親和性の高い蛍光物質の投与を組み合わせることで腸管壁外から腸管壁内の神経を可視化することを目的に本研究を開始した。ヒト腸管切除検体による観察で高い正診率を確認し、2例で手術中の生体内観察にも成功した。一方で蛍光物質を生体内投与することや限定された焦点深度などが臨床応用に向けての課題となり、蛍光物質を必要とせず、焦点深度も可変式の新しいデバイスの開発を目指す必要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヒルシュスプルング病の根治術の際に正常部と無神経節部の境界である移行帯で切除し、術後に便秘を主体とする排便機能障害を認める症例が数多く報告されている。この背景には、術中迅速病理診断の課題である小さな限られた検体から腸管全体の神経分布を予見するという難しさがある。CLEを用いた腸管神経可視化技術が臨床応用可能になると、より正確かつ簡便に神経分布の把握が低侵襲に可能となり、移行帯切除を減らすことが出来るようになる。また、腸管全域に渡り神経が減少しているhypoganglionosisなどのヒルシュスプルング病類縁疾患の診断にも応用することが可能となり、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Hirschsprung's disease is a congenital abnormality of the enteric nervous system (ENS) presenting severe constipation soon after birth due to the lack of ganglion cells in the distal gut. Surgery for Hirschsprung's disease requires an intraoperative histopathological diagnosis to assess the extent of aganglionosis. Confocal laser endomicroscopy (CLE) is a novel endoscopic technique allowing real-time, in vivo analysis of cellular details during ongoing endoscopy. In this study, we evaluated the possibility of a new application of CLE to provide real-time observations of the ENS in patients with Hirschsprung's disease and its allied disorders. So far, we have successfully visualized ENS network using surgically resected intestines with high accuracy, and we performed in vivo visualization in two patients with Hirschsprung's disease and hypoganglionosis, respectively. We also realized new challenges of the use of unpermitted fluorescent dye and the limited focus depth.

研究分野：小児外科

キーワード：腸管神経 可視化 ヒルシュスプルング病 ヒルシュスプルング病類縁疾患 共焦点内視鏡 分光ビデオシステム 近赤外ハイパースペクトラルイメージング

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュ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。また、類縁疾患は腸管神経は存在するものの症状としてはヒルシュスプルング病に類似した難病であり、その治療方針決定には**正確な診断がまず重要**となる。

本研究は科研費としては2016~2018年の基盤C(16K11354)からの継続研究となるが、研究を開始した当時、新しいデバイスとして共焦点内視鏡(confocal laser endomicroscopy, CLE)が成人領域で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することで腸管神経の可視化が可能となり、ヒルシュスプルング病や類縁疾患の手術時に、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。これまで、実験動物を用いた観察から開始し(2017年 Journal of Gastroenterology and Hepatology)、ヒト腸管の切除検体を用いた観察でもCLEによる腸管神経の可視化が高い精度で可能であることを確認してきた。

### 2. 研究の目的

これまでの成果をもとに、CLEを用いた腸管神経の可視化技術を広く**臨床応用可能な形**にし、ヒルシュスプルング病や類縁疾患の診断、治療において腸管神経の分布を正確で非侵襲的にリアルタイム診断可能なものとするを目的とした。

研究途中でCLEによる観察では、蛍光物質の生体内投与を必要とすること、広範囲の観察が困難であることなどが臨床応用にむけての課題となり、それらを解決するための新しい手法を開発することが新たな目的となった。

### 3. 研究の方法

CLEを用いたヒト腸管神経の生体内観察

ヒルシュスプルング病および類縁疾患の手術中に、切除することが決定している腸管の壁内に蛍光物質であるクレシルバイオレットを筋層内に局注し、CLEを用いた生体内でのヒト腸管神経の観察を行った。

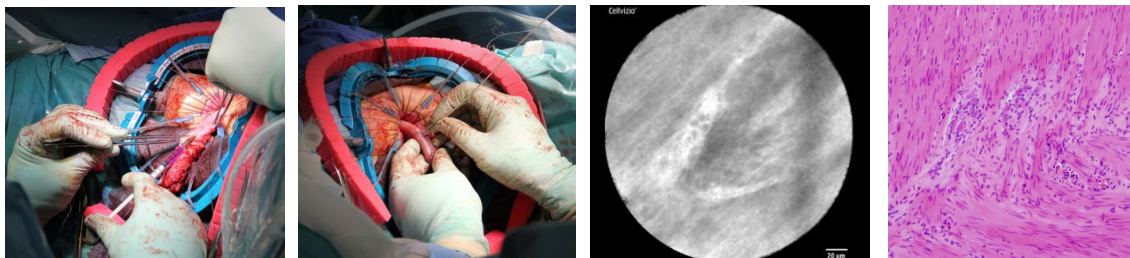
分光ビデオシステムによる腸管神経の観察

低倍率で広範囲に観察ができ、任意の波長で観察可能な分光ビデオシステムを用いて、クレシルバイオレットに代わる蛍光物質として広く臨床応用がなされているインドシアニングリーン(ICG)、フルオロセインなどのほか、アクリフラビン、ニューロトレース、クルクミンなども用いて腸管神経の可視化が可能であるかを観察した。

### 4. 研究成果

CLEを用いたヒト腸管神経の生体内観察

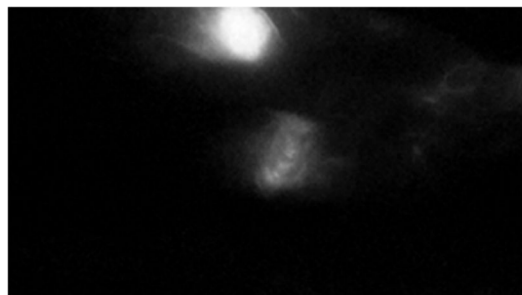
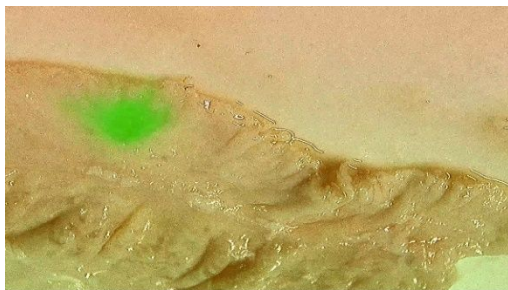
ヒルシュスプルング病および類縁疾患の2例において生体内観察を行った。腸管神経は可視化可能であったが、切除検体に比べてプローベをより深い位置で観察する必要があり、焦点深度の調整が可能なデバイスが望ましいと思われた。また、高倍率での観察のみではなく、低倍率で腸管神経の分布をより俯瞰的に観察できる方が広く臨床応用する上では受け入れられやすいと考えられた。さらに、クレシルバイオレットの生体内投与はPMDAの安全性試験が必要であり、時間的にも資金的にも臨床応用するには困難であると判断し、すでに臨床応用されている蛍光物質による可視化を検討する方向で研究計画を修正することとした。



ヒルシュスプルング病根治術時に施行した生体内でのCLE観察所見

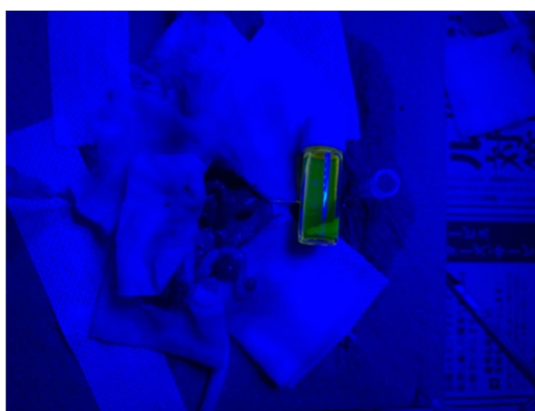
- (左外) 腸管壁内に蛍光色素である Cresyl violet を局注している。
- (左内) CLE プローベで腸管壁内の神経叢を腸管壁外から観察している様子。
- (右内) CLE 所見。神経叢および内部に核の抜ける様子が観察される。
- (右外) 同じ部位の H-E 染色病理標本所見。神経叢と内部に神経節細胞が確認される。

分光ビデオシステムによる腸管神経の観察  
ブタ腸管を用いて、各種蛍光物質を散布、もしくは局注して分光ビデオシステムにより観察をしたが、組織全体が光ってしまい、腸管神経のネットワーク構造を識別するのは困難であった。



#### ICG (780nmLED 励起光) による観察

腸管神経が GFP でラベルされた実験動物 (P0-Cre/CAG-CAT-EGFP マウス) を用いての分光ビデオシステムによる観察も行った。この実験動物は CLE を用いた腸管神経の可視化研究の最初に用いたマウスであり、その時は腸管神経のネットワーク構造が高倍率で可視化可能であった。俯瞰的に腸管全体を腸管外より観察したが、腸管に蛍光物質の発光は確認できなかった。同じ検体を用いて IVIS, GFP 目視確認用 LED ライトによる観察も行ったが、結果は同様に、腸管神経が蛍光を発する様子は確認できなかった。



P0-Cre/CAG-CAT-EGFP マウス腸管の分光ビデオシステムによる観察  
(左)小腸、(右)大腸 ともに腸管では蛍光を確認できず、腸管神経のネットワークは可視化できなかった。小瓶の中の液体はコントロールのフルオロセイン。

以上より研究期間を 1 年間延長して 2022 年度はこれまでとは異なる手法で臨床応用可能な方向性を見出すべく研究を継続し、他研究機関や企業とのコラボレーションを探索した。現在は東京理科大学機械工学科との共同研究として(1)蛍光物質の投与を必要とせず、(2)可変焦点深度のレンズを搭載した近赤外ハイパースペクトラルカメラによる腸管神経可視化の開発に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimojima N, Kobayashi M, Kamba S, Harada A, Hirobe S, Ieiri S, Kuroda T, Sumiyama K.	4. 巻 32(5)
2. 論文標題 Visualization of the human enteric nervous system by confocal laser endomicroscopy in Hirschsprung's disease: An alternative to intraoperative histopathological diagnosis?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurogastroenterol Motil.	6. 最初と最後の頁 e13805.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.13805.	査読の有無 有
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 Harada Atsushi, Shimojima Naoki, Kobayashi Masakuni, Kamba Shunsuke, Hirobe Seiichi, Sumiyama Kazuki	4. 巻 21:118
2. 論文標題 Visualization of the human enteric nervous system by probe confocal laser endomicroscopy: a first real-time observation of Hirschsprung's disease and allied disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Medical Imaging	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12880-021-00648-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 下島直樹
2. 発表標題 腸管神経可視化への挑戦（マウスからヒト生体内観察まで）
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 篤
2. 発表標題 共焦点内視鏡を用いたHirschsprung病およびHirschsprung病類縁疾患の腸管神経叢の術中生体内観察
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimojima N, Kobayashi M, Fujimiura T et al.
2. 発表標題 Visualization of the human enteric nervous system
3. 学会等名 Annual Congress of Korean Surgical Society 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下島直樹
2. 発表標題 ヒルシユスプルング根治術における共焦点内視鏡を用いた腸管神経可視化への挑戦
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

1. 発表者名 Shimojima N, Kobayashi M, Fujimura T, Harada A, Kamba S, Ieiri S, Hirobe S, Okano H, Kuroda T, Sumiyama K
2. 発表標題 Visualization of human enteric nervous system using confocal endomicroscopy: From bench to bedside
3. 学会等名 6th International Symposium on Development of the ENS (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下島直樹, 小林雅邦, 樺俊介, 藤村匠, 原田篤, 家入里志, 田口智章, 廣部誠一, 岡野栄之, 黒田達夫, 炭山和毅
2. 発表標題 ヒルシユスプルング病根治術における共焦点内視鏡を用いた腸管神経可視化への挑戦
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 炭山和毅、小林雅邦、下島直樹
2. 発表標題 消化管神経叢の内視鏡的視覚化の検討
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Naoki Shimojima	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 10
3. 書名 Hirschsprung's disease and the Allied Disorders. Status Quo and Future Prospects of Treatment Chapter 11. Examinations for Diagnosis	

〔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	炭山 和毅 (Sumiyama Kazuki) (90385328)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授  (32651)	
研究分担者	小林 雅邦 (Kobayashi Masakuni) (40570552)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教  (32651)	
研究分担者	原田 篤 (Harada Atsushi) (40839536)	川口医療センター・なし・医員  (82686)	

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
---------	---------