

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17675

研究課題名（和文）新しい蛍光源を組合わせた癌・血管・胆管・神経・尿管の手術用蛍光観察システムの開発

研究課題名（英文）Development of new surgical fluorescence imaging system for visualizing cancer, vessel, bile duct, nerve, and urinary tract

研究代表者

河口 義邦（Kawaguchi, Yoshikuni）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00597726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：メチレンブルーに670nm前後の波長の近赤外光を照射すると蛍光を呈する特徴がある。メチレンブルーを蛍光源とし蛍光画像を描出できる開腹用と腹腔鏡用の試作機を開発した。開腹用の試作機でヒトに対する臨床試験を行い安全性と有効性を英文にて報告した。またメチレンブルーの投与量・タイミングを最適化するため、1%のメチレンブルー溶液を1/10、1/100、1/1000に希釈し、それぞれの濃度による蛍光観察の程度をラットを用いて開腹用、腹腔鏡用の試作機を用いて評価した。それぞれの結果からは1/1000%の濃度による静注が最適であると考えられた。腹腔鏡の試作機を用いたヒトに対する臨床試験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インドシアニングリーンは胆汁排泄されることから胆道の蛍光イメージングとしても応用可能であるが尿管の蛍光描出は不可能であった。メチレンブルーは670nm前後の波長の近赤外光を照射されると蛍光を呈する点を応用し、メチレンブルーを用いた開腹手術・腹腔鏡手術用の蛍光イメージング試作機の作成に成功した。メチレンブルーは尿にも排泄されることから尿管の蛍光イメージングへの応用に向け研究をすすめた。まず開腹用機器では日本人での使用における安全性、試作機によるメチレンブルー蛍光法の有効性について報告を行った。様々な解剖学的構造物を蛍光で描出可能とすることで手術の安全性向上に役立てる意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：Methylene blue emits light when illuminated with near-infrared light at a wavelength of around 670 nm. We developed prototypes for open surgery and laparoscopic surgery that can show fluorescent images using methylene blue as a fluorophore. We conducted a clinical trial on humans using the prototype for open surgery and reported the safety and usefulness of the prototype device in an English journal. In order to optimize the dosage and timing of methylene blue administration, we diluted a 1% methylene blue solution to 1/10, 1/100, and 1/1000 and evaluated the fluorescence intensity at each concentration in rats using the prototypes for open surgery and laparoscopic surgery. The results of each test indicated that the 1/1000% concentration was optimal for intravenous infusion of methylene blue. We are planning to conduct a clinical study on humans using the prototype laparoscopic device.

研究分野：外科、手術、蛍光ナビゲーション

キーワード：外科 手術 蛍光ナビゲーション 安全性向上

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する外科治療の安全性の向上や術後の予後の改善を達成するには、革新的な診断あるいは治療技術の開発が必要不可欠である。申請者はインドシアニンググリーン (ICG) を蛍光源として用いたイメージング (ICG 蛍光法) により、肝臓腫瘍の同定 (Kawaguchi Y, et al. J Surg Oncol. 2015; Kawaguchi Y, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2013) 胆管の同定 (Kawaguchi Y, et al. Dig Dis Sci. 2014; J Am Coll Surg. 2015) 肝血流の評価 (Kawaguchi Y, et al. J Hepatol. 2013; Kawaguchi Y, et al. Liver Transpl. 2013) 肝区域の同定 (Kawaguchi Y, et al. Br J Surg. 2017; Kawaguchi Y, et al. J Surg Oncol. 2017) といった手術における有用性を報告してきた。ICG は静注後に肝臓に取り込まれ 100%胆汁に排泄されるという特性があるため、手術野での肝臓腫瘍の同定や血管、胆管の蛍光イメージングに応用可能である点で優れている。しかし、膵臓腫瘍の同定や手術中の損傷に注意すべき神経、尿管を蛍光にて描出することは不可能であった。近年、拡大手術や腹腔鏡手術の普及で術中損傷のリスクも高まっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は ICG とともに異なる 2 種類の保険承認済みの薬品 (メチレンブルー、フルオレセイン) を蛍光源とした組み合わせ、癌・血管・胆管・神経・尿管を蛍光観察可能としたオールインワンの開腹・腹腔鏡手術用蛍光観察システムの開発である。つまり、ICG により蛍光として描出可能となる肝臓癌、血管に加え、メチレンブルー、フルオレセインを蛍光源として膵臓腫瘍、神経、尿管の蛍光イメージングを実用化し、一つの開腹・腹腔鏡手術用蛍光観察システムに搭載することを目的とする。研究項目手順としては、(1)ラットを用いた動物実験による試薬投与の方法、量、タイミングの最適化、(2)オールインワン開腹・腹腔鏡用蛍光観察システムを用いたヒトによる臨床試験の 2 点を設定する。

### (1) ラットを用いた動物実験による試薬投与の方法、量、タイミングの最適化

メチレンブルーは中毒性メトヘモグロビン血症の治療薬として昔から使用されている薬剤であり、国内保険承認されている。メチレンブルーは 670nm 前後の波長の近赤外光を照射すると蛍光を呈する特徴がある。我々がメチレンブルーを蛍光源として開発した開腹用試作器 (図 1) を用いて行ったヒトによる臨床試験 (審査番号: P2016013-(1)、東京大学) で安全性と膵内分泌腫瘍 (図 2) や血管 (図 3) の蛍光観察が可能であることが確認された。メチレンブルーにより神経の蛍光イメージングが可能となる原理は以下の通りである。神経組織は筋肉組織に比べ酸素貯蓄率が高く、メチレンブルーの酸化が他の組織よりも神経において高度に行われることで神経のみ蛍光として描出されると考えられている (緒方ら、前期日本消化器外科学会教育集会、2007 年)。我々の先行研究では尿とメチレンブルーを混ぜることで尿そのものの蛍光イメージング (図 4) が観察されることは確認されたが、術野内で尿管が蛍光を呈することと神経の蛍光は確認できなかった。

図1



図2



図3

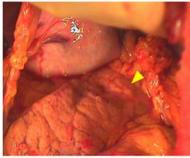
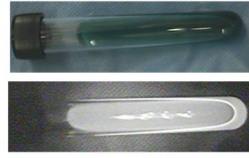


図4



そのため、動物実験という制限のない環境で尿管や神経を露出させた状態で試薬投与の方法、量、タイミングを最適化する必要があると考えた。あわせてフィルターを調整することでフルオレセインを蛍光源として用いた蛍光観察カメラを試作し、開腹用、腹腔鏡用ともに動物実験にてメチレンブルーとフルオレセインを用いた蛍光観察を最適化する。

## (2) オールインワン開腹・腹腔鏡用蛍光観察システムを用いたヒトによる臨床試験

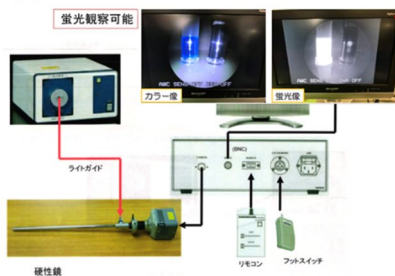
研究項目手順(1)で算出された試薬の投与方法、量、タイミングを用いて開腹・腹腔鏡用蛍光観察カメラを用いて癌、血管、胆管、尿管、神経の蛍光イメージングの描出の可否、描出能をヒトによる臨床試験にて検討する。先述の通りすでにメチレンブルーを蛍光源とした開腹用試作機を用いたヒトでの臨床試験(審査番号:P2016013-(1)、東京大学)にて安全性は確認されている。今後は、新たに試作する癌、血管、胆管、神経、尿管の蛍光描出が可能なオールインワン開腹・腹腔鏡用試作機を用いて蛍光による描出能を評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットを用いた動物実験による試薬投与の方法、量、タイミングの最適化

1. ICG を蛍光源とした赤外観察カメラの製造メーカーである浜松ホトニクス株式会社(日本)と共同でメチレンブルーを蛍光源とした開腹用赤外観察カメラの試作器により先述の通りヒトによる臨床試験を行った。腹腔鏡用赤外観察カメラの試作器(図5)も進んでおり、動物実験を行える準備が整っており、蒸留水とメチレンブルーを混ぜることで腹腔鏡用試作機にも蛍光が観察されることを確認した(図5)。

図5



### 2. 実際の手順

1%メチレンブルー(2mg/2ml)を生理食塩水で希釈し、様々な濃度に調整し静脈投与もしくは直接散布する。メチレンブルーを蛍光源とした赤外観察カメラの開腹・腹腔鏡用試作器(前述、図1、図5)を用いて各組織(神経、肝、胆道、尿管、膵、腸管、血管、リンパ節、脾臓)の蛍光強度を評価する。特に尿管は

開腹にて露出させることで蛍光能を評価する。神経は適切な太さが得られることから座骨神経を剥離露出し蛍光能を評価する。2019年10月19日に倫理承認され(P19-068)実験を開始した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラットを用いた動物実験による試薬投与方法、量、タイミングの最適化

麻酔下にラットを用い、尿管と大腿神経を露出させ、メチレンブルーを静脈投与することで、試薬投与方法、量、タイミングにつき、1%メチレンブルーの1/1000の濃度が開腹試作機、腹腔鏡用試作機ともに最適であると確認した。つまりメチレンブルーによる蛍光は薄くても十分な蛍光が観察されることから、実用化された際の経済的な効果が期待される。先行させたメチレンブルーを用いた開腹用試作機による人における臨床試験の結果に関し、報告をおこなった。同試作機とメチレンブルーを用いた蛍光法の安全性と膵内分泌腫瘍や血管の蛍光観察が可能であることが確認した。また尿とメチレンブルーを混ぜることで尿そのものの蛍光イメージングが観察されることも確認した。これらの研究成果につき英文誌に報告をおこなった (Fukuda K, Kawaguchi Y, et al. Safety and usefulness of fluorescence imaging using methylene blue as a fluorophore in a Japanese population with hepatobiliary and pancreatic diseases: A phase I study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2022 Dec 2. doi: 10.1002/jhbp.1293. Online ahead of print. PMID: 36458409)。2022年4月の第122回日本外科定期学術集会(福田、河口、ほか 新しい蛍光源を用いた蛍光イメージング機器の開発:メチレンブルー蛍光法と肝胆膵領域への応用)、9月の日本蛍光ガイド手術研究会第5回学術集会(福田、河口、ほか メチレンブルー蛍光法による新しい蛍光源を用いた蛍光イメージング機器の開発と肝胆膵領域への応用)にて報告を行った。研究期間がCOVID-19パンデミック下のため、動物実験や新規医療機器の開発に遅れが生じたが、2023年度中に腹腔鏡用の試作機にて臨床試験を開始する予定であり、結果につき後日開示する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fukuda Kaito, Kawaguchi Yoshikuni, Abe Satoru, Kobayashi Yuta, Maki Harufumi, Akamatsu Nobuhisa, Kaneko Junichi, Arita Junichi, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Safety and usefulness of fluorescence imaging using methylene blue as a fluorophore in a Japanese population with hepatobiliary and pancreatic diseases: A phase I study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1293	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 -

〔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 福田 開人, 河口 義邦, 阿部 学, 小林 裕太, 市田 晃彦, 石沢 武彰, 赤松 延久, 金子 順一, 有田 淳一, 長谷川 潔
2. 発表標題 新しい蛍光源を用いた蛍光イメージング機器の開発：メチレンブルー蛍光法と肝胆膵領域への応用
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

1. 発表者名 福田 開人, 河口 義邦, 阿部 学, 小林 裕太, 市田 晃彦, 赤松 延久, 金子 順一, 有田 淳一, 長谷川 潔
2. 発表標題 メチレンブルー蛍光法による新しい蛍光源を用いた蛍光イメージング 機器の開発と肝胆膵領域への応用
3. 学会等名 日本蛍光ガイド手術研究会第5回学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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