

産経新聞社賞

光が導く安全な手術：
蛍光イメージングを用いた肝胆膵手術の開発

公益財団法人 がん研究会 有明病院
消化器外科 副医長

石沢 武彰

1. 緒言

解剖学の教科書には、余計な脂肪が取り除かれ、血管が赤や青で色分けされた精緻なイラストが掲載されている。これらの解剖図のように、脂肪や結合組織を透かして重要な生体構造を認識できるようになれば、どれほど安全に手術ができるようになるだろうか。これが本研究のモチベーションである。

上記の目標を遂げるためには二つのアプローチが成立し得る。一つは、対象となる構造に造影剤を分布させ、外部から観察することである。もう一つの方法は、対象を覆う脂肪や結合組織を透明化してしまうことである。外科医が肉眼で生体構造を確認できる点で後者の透明化法は魅力的であるが、毒性や作用時間の面で解決すべき課題が多く、まだ基礎研究の段階である。一方、前者のアプローチは既に実臨床に導入されている。例えば、血管や管腔臓器に造影剤を注入して手術中にX線撮影を行えば、他の生体構造を透過して対象物の解剖を描出することができる。しかし、X線造影は医療従事者や患者の被曝を伴うばかりでなく、造影剤のX線像のみがTVモニターに投影されるので、術者が対象物と周囲臓器との立体的な位置関係を理解しにくい、という解決し難い問題がある。そこで、X線造影に変わる技術として近年臨床応用が進められているのが、蛍光物質を用いた術中イメージング法である。血液や水による吸収を受けにくい近赤外領域の波長を用いることにより、5-10mmまでの深さであれば、脂肪や結合組織の奥から発せられる蛍光シグナルを捉えて生体構造をリアルタイムに映し出すことができる。

現在、臨床で患者に投与できる蛍光プローブは数種類に限られており、その代表的な薬剤がindocyanine green (ICG)である。ICGは、もともと肝機能および心拍出量測定のための検査薬として50年近く臨床使用されてきた。一方ICGには、近赤外光により励起されると約840nmをピークとする蛍光を発する、という性質も知られていた[1]。1990年代には、この蛍光特性を利用したイメージング法(ICG蛍光法)が眼底の血管造影に臨床応用され、今世紀に入ると冠動脈バイパス術中の血流評価や乳癌センチネルリンパ節の検索にも応用されるようになった。しかし消化器外科領域では、ICGが肝機能測定試薬として広く認知されていたためか、術中蛍光イメージングへの応用はなかなか進められなかった。

筆者はICGの蛍光特性に着目し、まず肝胆道手術で必要となる胆管の描出(蛍光胆道造影法)に取り組み[2]、2008年には世界に先駆けて腹腔鏡下胆嚢摘出術に臨床応用を果たした[3]。本技術の初報は1例のみのビデオ報告であったにも関わらず、最も普及している外科手術の一つである腹腔鏡下胆嚢摘術の安全性を向上させる技術として国際的にも注目された[4, 5]。また、蛍光胆道造影法を開発する過程で、術前投与されたICGが肝臓およびその周囲の組織に集積することを発見し、この現象を利用した肝臓の蛍光イメージング法を確立した[6, 7]。現在、癌特異的な蛍光プローブが盛んに開発されているが、実臨床で蛍光ガイド下に癌の切除を行う手技は極めて少ない。本法は将来の蛍光ガイド下癌手術のモデルとして基礎研究者からも参照されている[8, 9]。さらに、筆者はICG蛍光法を応用した肝区域同定法[10, 11]や肝機能評価法[12]も開発し、積極的に臨床応用してきた。一方、致命的な術後合併症の誘因となり得る瘻液漏(瘻切除断端から瘻液が漏出すること)を手術中に蛍光イメージングで描出し、瘻液漏発生率低減を目指す技術の開発も進めてきた。瘻液の描出にはICGではなく新規蛍光プローブ(キモトリプシンプローブ[13])を用いる必要がある。これまでに、患者体外サンプル[13]と動物モデルを[14]用いた検討を経て、本技術の有効性を検証してき

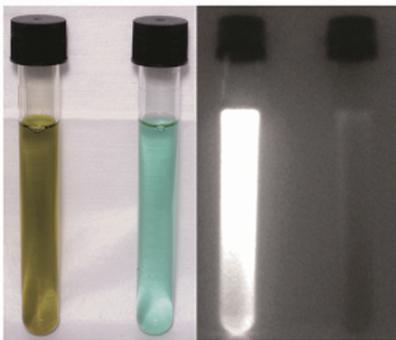
た。現在、本剤を患者体腔内に散布して瘳液漏の蛍光イメージングを行うための非臨床安全性試験を遂行している。

2014年から2015年にかけて、肝胆瘳手術の安全性・確実性向上を目指して取り組んできた一連の研究が一定の成果を上げた。本論文ではこれらの技術の詳細と今後の展開について詳述したい。

2. ICG を用いた蛍光胆道造影の開発と臨床応用

筆者は、ICG と結合してが蛍光特性を発揮させるリポプロテインが血液だけでなく胆汁中にも含まれていること [15] に注目し、ICG を蛍光プローブとして用いた胆道造影法 (蛍光胆道造影) を開発してきた (図1)。まず、肝機能検査で用いる濃度の100倍に希釈した ICG (0.025mg/mL) を胆管内に直接注入した後に近赤外光を照射することで、手術中に肝外胆管の蛍光像を得ることができることを確認、2007年には開腹肝切除や胆嚢摘出術に臨床応用した [2] (次頁 図2)。

図1 ICG 蛍光法の原理



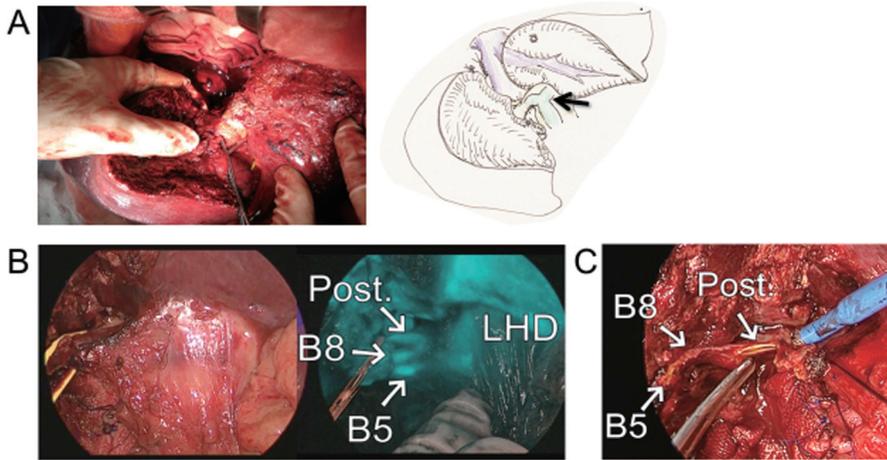
生理食塩水で0.025mg/mL に調整した ICG (左図の右スピッツ) と、それに胆汁を混じたもの (左スピッツ)。

近赤外光 (760nm) を照射すると、胆汁を混ぜたサンプルのみ蛍光を呈した (右図)。

次に ICG の胆汁排泄性、すなわち静脈投与後に 100% 胆汁中に排泄される性質にも着目し、術前に 2.5mg の ICG を静注するだけで術中に蛍光胆道造影を行う手法を開発、2008年には世界に先駆けて腹腔鏡下胆嚢摘出術への応用を果たした [3] (次頁 図3)。腹腔鏡下胆嚢摘出術は世界中で広く行われている外科手術であるが、手術中に胆管解剖を誤認し胆道損傷をきたすリスクが1% 以下の頻度とはいえ依然存在する。ICG 静注による蛍光胆道造影は胆管に直接操作を加えることなく胆管解剖を描出できるという潜在的な利点を有するため、腹腔鏡下胆嚢摘出術の安全性を向上させる技術として期待されており、有効性評価のための国際多施設研究が遂行されている。自験例における後続研究では、腹腔鏡下胆嚢摘出術52症例において、蛍光胆道造影法により8例で胆管解剖の異常が描出され、胆道損傷を回避するために有効であったと考えられた [16]。さらに対象を108例に拡大し、結合組織の剥離前に蛍光胆道造影で胆嚢管合流部を同定するための因子を解析したところ、胆嚢管を同定できた80症例 (74%) では ICG の静注から蛍光胆道造影までの時間が有意に長いことが明らかになった

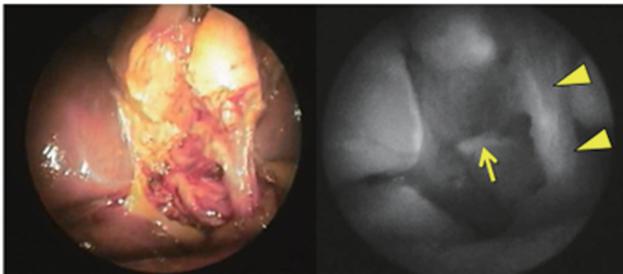
(中央値 [範囲] ; 90 [15-165] 分 vs. 47 [21-205] 分, $P < 0.01$) [17]。ICG は静注後数分から数時間胆汁排泄され、かつ低濃度で十分高感度に蛍光像を描出できる。従って、静注からの時間をなるべく長く確保し、肝臓や背景組織からの ICG の消失を促すことが良好な胆管 -

図2 ICG 胆管内投与による蛍光胆道造影法



- A) 開腹右肝切除の術中写真(左)とシェーマ(右)。胆管切除の段階で、左右胆管合流部(矢印)を同定し、左肝管を損傷することなく右肝管を切離する必要があるが、肉眼では胆管解剖の把握は困難である。
- B) 胆管内に希釈した ICG (0.025mg/mL) を注入して蛍光胆道造影を行うと(右)、肉眼(左)では同定できない右肝管の分枝(B5, B8, Post.)と左肝管(LHD)が描出された。
- C) 右肝管を切離すると、蛍光胆道造影で描出された順番に右肝管の分枝が出現した。

図3 ICG 静注による蛍光胆道造影法

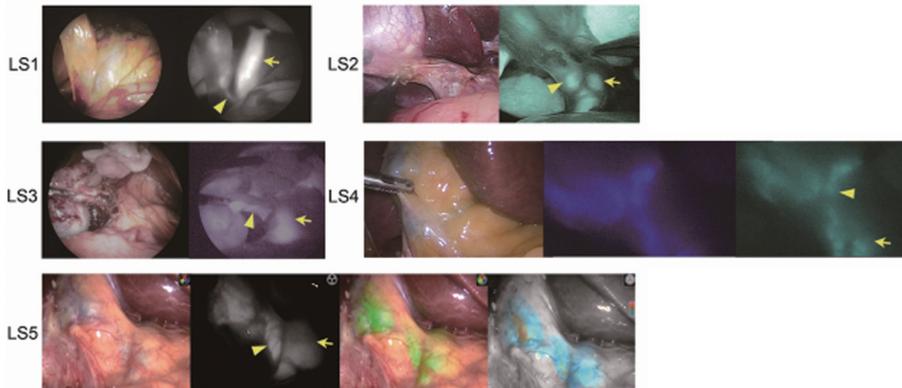


術前に ICG 2.5mg を静注し、腹腔鏡下胆嚢摘出術の術中に赤外観察装置の試作機を用いて蛍光胆道造影を施行した。蛍光像(右)では胆嚢管(矢頭)の背側を走行する後区域肝管(矢印)が描出されているが、カラー像(左)では同定困難である。

背景コントラストを得るために重要な要素であると考えられた。

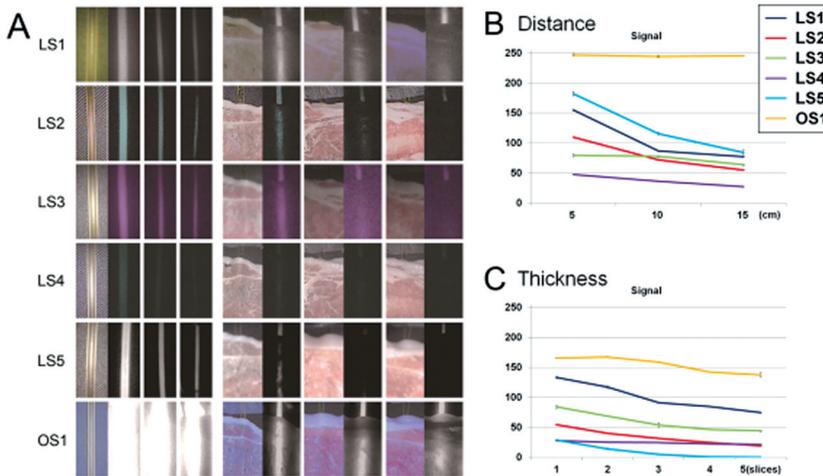
2011年に初めて米国で市販機が導入されて以来、蛍光胆道造影法は腹腔鏡手術およびロボット手術で臨床使用が進められている。現在、本邦でも4-5種類の腹腔鏡手術用赤外観察装置が臨床使用できるようになった(図4)。しかし、蛍光胆道造影サンプルを用いて各装置の性能を評価したところ、カラー像の画質だけでなく蛍光シグナルの描出能にも差異を認め、しかも蛍光描出能は開腹手術用装置よりも大きく劣ることが明らかになった[17](図5)。実臨床において蛍光イメージングを有効に利用するためには、ICGの投与方法だけでなく装置の選択も重要な因子になり得る。

図4 各種の腹腔鏡用赤外観察装置を用いた蛍光胆道造影法(胆嚢摘出術)



カラー像、蛍光像の特性は機種により大きく異なる。

図5 腹腔鏡用赤外観察装置の胆管サンプル蛍光シグナル検出能



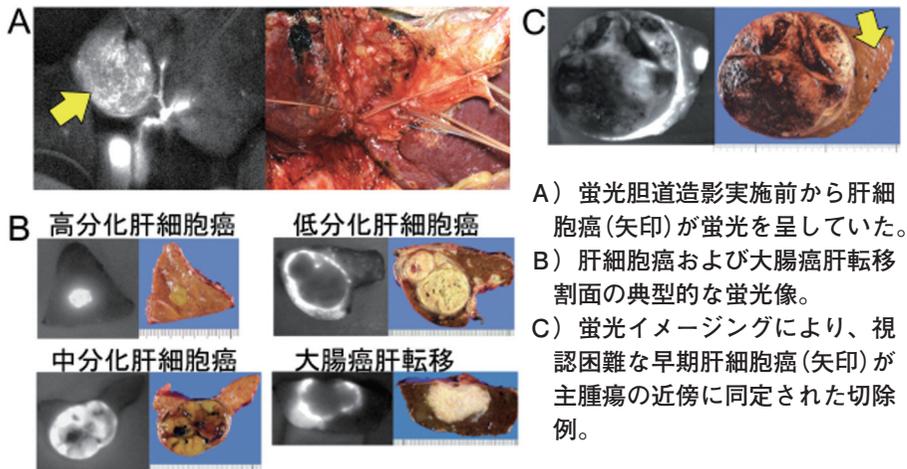
- A) ビニールチューブにヒト胆汁を加えた ICG 溶液 (0.025mg/mL) を注入し、腹腔鏡用赤外観察装置 LS1~5 および開腹用装置 OS1 で蛍光像を撮影。左列は撮影距離を 5, 10, 15cm に変更。右列はサンプルをブタ肉片 1~5 枚で被覆した撮像結果。
- B) 胆管サンプルの蛍光強度は、LS1~5 では観察距離が長くなるに従って低減したが、OS1 では変化しなかった。
- C) 肉片を重ねるごとに胆管サンプルの蛍光強度は減弱するが、OS1 では肉片を 5 枚重ねても肉眼観察が可能な程度の蛍光像が描出された。

3. ICG を用いた肝癌術中診断法の開発と臨床応用

2007 年、蛍光胆道造影法の開発にあたっていた筆者は、蛍光胆道造影のために ICG を術中投与する前から肝腫瘍が蛍光を発することに気づいた(次頁図 6A)。患者は肝機能評価のために手術 2 日前に ICG の静脈内投与 (0.5mg/kg) を受けていた。したがって、筆者は「術前

投与された ICG が何らかの機序で肝腫瘍あるいはその周囲に滞留していたために、手術中に肝腫瘍が蛍光を呈したのではないかと推察し、対象を拡大して肝切除標本の断面を赤外観察装置で撮影して蛍光像を観察した。その結果、分化型の肝細胞癌では癌組織そのものが蛍光を呈したのに対し、低分化肝細胞癌および大腸癌肝転移では腫瘍内部には蛍光を認めず、腫瘍周囲の非癌部肝実質にリング状の蛍光を認めた[6] (図6B)。上記の結果は、腫瘍がそれぞれの蛍光パターンをとるにせよ、術前に静注された ICG を蛍光プローブとして用いて、手術中に肝腫瘍の位置を同定できることを示唆するものであった。実際、対象49症例のうち7例で、従来の肉眼観察および術中超音波検査では同定できなかった肝細胞癌 8結節を蛍光イメージングにより描出し、手術および病理診断の精度向上に応用することができた[6] (図6C)。

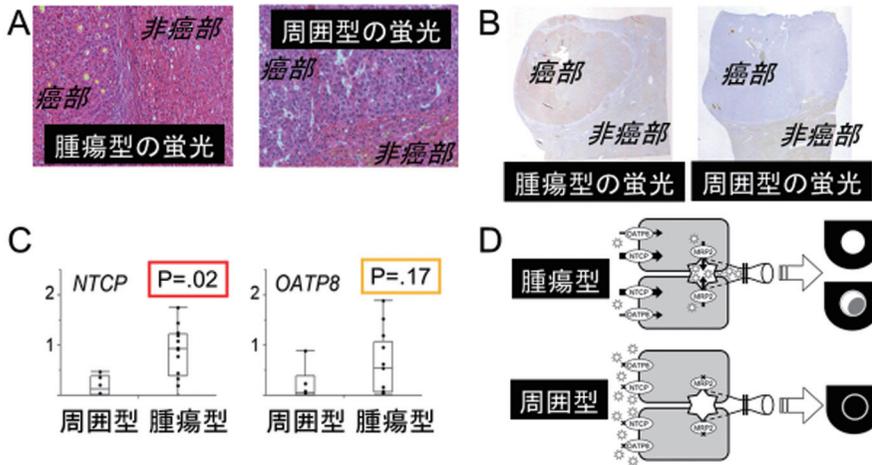
図6 ICG 蛍光法を用いた肝癌診断法：発見の契機



分化度の高い肝細胞癌は肝細胞本来の胆汁産生能を保持していること、ICG が胆汁排泄性であることを考慮すると、静注後の ICG が腫瘍あるいは腫瘍周囲に分布する現象は組織局所の胆汁排泄障害を反映していると推察された[18]。そこで、免疫染色および遺伝子発現解析の手法を応用することで上記の仮説の証明を試みた。すなわち、分化型の肝細胞癌では門脈から肝細胞への ICG 取り込みを行うトランスポーターである NTCP(Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide) および OATP8 (organic aniontransporting polypeptide 8) の発現が、肝細胞よりは低下しているものの維持されている。しかし、発癌に伴う形態的または機能的な変化により癌細胞に取り込まれた ICG が胆汁排泄されず腫瘍組織に集積する。一方、低分化肝細胞癌ではこれらのトランスポーター発現を見ないため、ICG は腫瘍内に取り込まれず、腫瘍の圧排により細胞密度の増した腫瘍周囲の非癌部肝実質に滞留することが示唆された[7] (次頁 図7)。

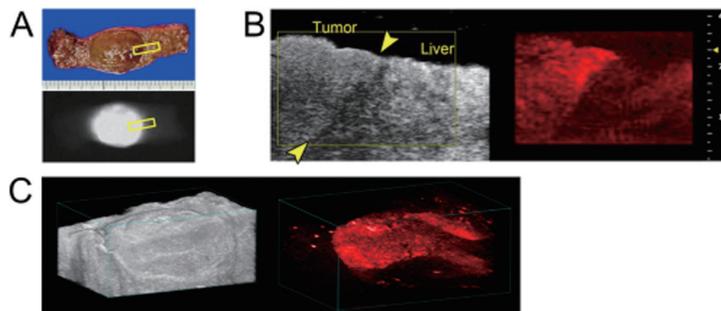
さらに光音響イメージングの技術を応用し、腫瘍内あるいは腫瘍周囲の肝実質に滞留する ICG が発する光音響シグナルを超音波画像に重畳表示し、ICG の分布を3次的に観察することにも成功した[19] (次頁 図8)。この技術は、術中超音波診断の際に肝腫瘍の質的診断を行うために応用できる可能性がある。

図7 ICG 蛍光法で肝細胞癌が蛍光を呈す機序



- A) 癌部に ICG の蛍光を呈す (腫瘍型の蛍光) 高分化肝細胞癌と、癌周囲のリング状の蛍光を呈す (周囲型) 低分化肝細胞癌の蛍光顕微鏡写真。
- B) NTCP に対する免疫組織染色。腫瘍型の蛍光を呈す肝細胞癌では腫瘍組織に染色性を示すが、周囲型の蛍光を発する肝細胞癌では染色を認めない。
- C) Gene set enrichment analysis を用いた癌部/非癌部の遺伝子発現量比。腫瘍型の蛍光を呈す肝細胞癌では NTCP の発現が保たれている。
- D) ICG 集積の機序を示すシエーマ。分化度の高い肝細胞癌では門脈からの ICG 取り込み能が保たれているが、発癌に伴う胆汁排泄障害があるために、ICG が腫瘍組織の内部に滞留する。低分化肝細胞癌では ICG は腫瘍に取り込まれず、周囲の非癌部肝実質にうっ滞すると考えられる。

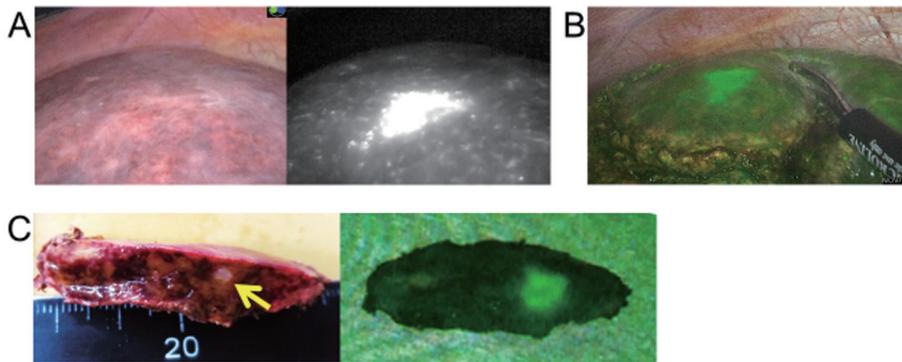
図8 ICG 蛍光法を応用した肝癌の光音響イメージング



- A) 高分化肝細胞癌の切除標本剖面。肉眼像 (上) と ICG 蛍光像 (下)。
- B) 図 A 黄枠部分にプローブを置いた光音響イメージング。励起波長 800nm, gain 50dB の条件で Vevo[®] LAZR を用いて撮影。腫瘍組織に分布する ICG の光音響シグナルが超音波画像と同時に表示されている。
- C) 図 A、B と同一標本の光音響イメージング 3D 画像。

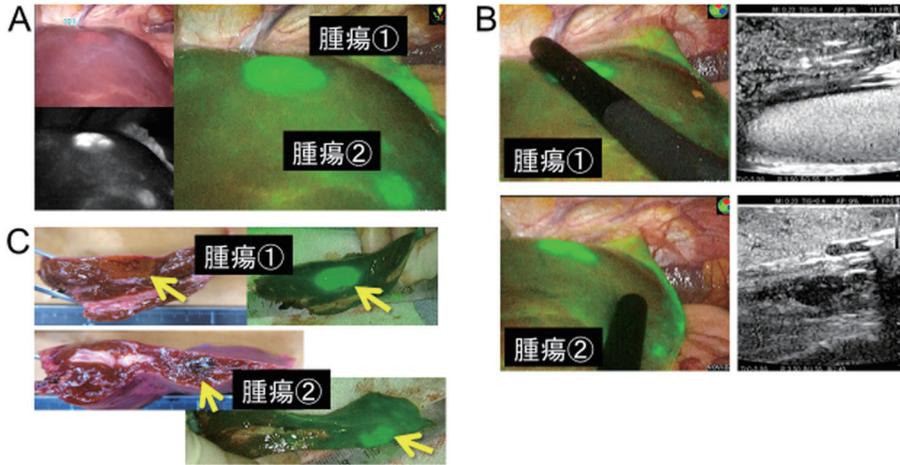
ICG 蛍光法による肝癌の術中診断法は高感度であるが、赤外光が組織を透過する深度が肝表面からおよそ8mm に留まるため、本法を肝切除前の肝表面の観察に用いる場合は適応が浅在性の腫瘍に限定される。しかし、近年普及が進む腹腔鏡下肝切除では、術者が肝表面を触診できないため、腫瘍の位置をリアルタイムに認識する方法として ICG 蛍光法が有用である可能性がある。腹腔鏡下肝切除17例で ICG 蛍光法を用いた結果、肝細胞癌16結節中12結節(75%)、大腸癌肝転移16結節中11結節(69%)が切除前の肝表面に描出された[20]。さらに2014年から、蛍光像を疑似カラー(緑色)表示して通常のカラ像に重畳できる腹腔鏡用赤外観察装置を導入した。これまでに手術を施行した腹腔鏡下肝切除31例では、悪性腫瘍42結節中36結節(86%)が切除前に同定された。このうち2例(3結節)では、術前化学療法により腫瘍が著明に縮小したために、通常のカラ像および超音波検査による観察では腫瘍を同定することができず、ICG 蛍光法を用いることで初めて腫瘍が認識され腹腔鏡下切除が可能であった。本装置を用いたカラ像と蛍光像の重畳表示は、術者が蛍光イメージングを行いながら手術操作を継続できる点で有利であり、切除後直ちに切除標本上で腫瘍の検索と質的診断を行うためにも活用できる(図9, 次頁 図10)。

図9 ICG 蛍光法による肝癌術中診断法の実例：腹腔鏡下 大腸癌肝転移切除



- A) 術前化学療法が著効したため、腫瘍が術中超音波検査やカラ像による観察(左)では認識できず、蛍光像(右)でのみ同定可能だった。もし腫瘍が同定できなければ、微小な病変であるにも関わらず大きく開腹し、肝亜区域切除により腫瘍を blind で切除する必要があった。
- B) 蛍光像を緑色の疑似カラーで通常のカラ像に重畳することにより、蛍光像で腫瘍の位置を確認しながら切離線の決定などの操作を行うことができる。
- C) 切除標本断面でも、蛍光イメージングを併用しないと腫瘍(ϕ 3mm)を同定できなかった。

図10 ICG 蛍光法による肝癌術中診断法の実例：腹腔鏡下 肝細胞癌切除



- A) 術前に指摘されていた腫瘍①はカラー像(左上)でも色調の変化として同定できたが、腫瘍②は蛍光像(左下および右の重畳画像)でのみ描出された。
- B) 腫瘍が肝表面にあるため、術中超音波では質的診断困難であった。2つの腫瘍を含むように肝切除線を拡大し腹腔鏡下に外側区域切除を施行した。
- C) 標本断面にて腫瘍内部に蛍光シグナルを認め、肝細胞癌の蛍光パターンに一致した。病理診断はいずれの腫瘍も中～高分化肝細胞癌であった。

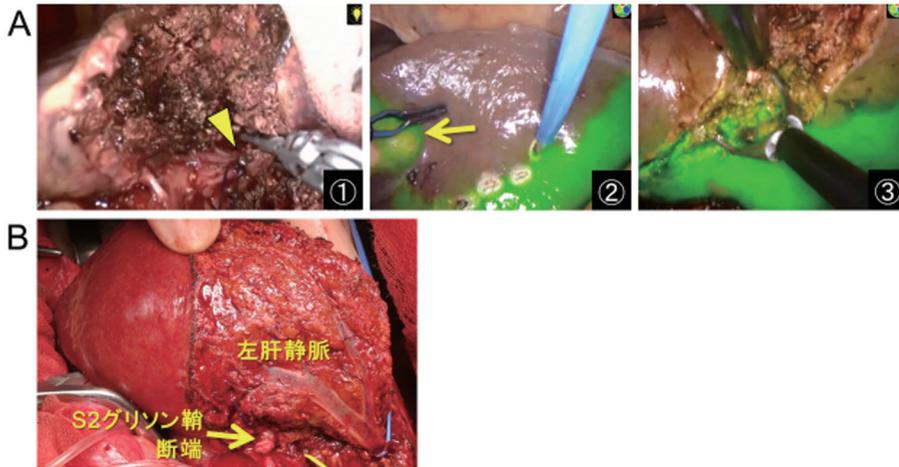
4. ICG を用いた肝区域同定法の開発と臨床応用

肝は外観では2葉にしか区分できないが、肝内は門脈の分布に従って8つの segment(亜区域)から構成されている。肝切除では、解剖学的な境界に沿って各亜区域を正確に切除する技術(系統的切除)[21]が求められる。特に肝細胞癌の治療では、腫瘍が門脈の支配域に沿って進展するため、系統的切除は残肝機能を温存しつつ腫瘍学的な根治性と確保する術式として重要であり、本邦で良好な術後成績を達成するために寄与してきたと考えられている[22]。

従来、肝亜区域を同定するためには、超音波ガイド下に該当する門脈枝を穿刺して青色の色素を注入、肝表に出現する染色域をマーキングしていた(染色法)[21]。しかし染色法には、肝表面の着色が色素注入後1-2分で消失してしまう、再切除肝や硬変肝では染色が不十分なことがある、などの課題があった。青色色素に代えて ICG を注入し蛍光法で肝亜区域を同定する手技[23]も報告されていたが、この原法に従うと体循環に出た ICG により最終的に肝全体が蛍光を発するため、肝亜区域のコントラストが不明瞭であること多かった。

研究者は留学先の Institut Mutualiste Montsouris (Paris)にて、ごく少量の ICG (0.025mg) を門脈枝に注入し、腹腔鏡下手術中に肝亜区域を蛍光標識する方法を開発した[10]。また、切除予定の肝亜区域に流入する門脈枝を閉鎖した後に ICG (1.25~2.5mg) を静注し、対象を非蛍光領域として陰性標識する技術も同時に報告した(図11)。平成28年度から腹腔鏡下肝切除の保険適応が系統的切除に拡大される見通しであり、ICG 蛍光法を用いた亜区域同定法が、腹腔鏡による高難度肝切除の正確性向上に役立つと期待される。

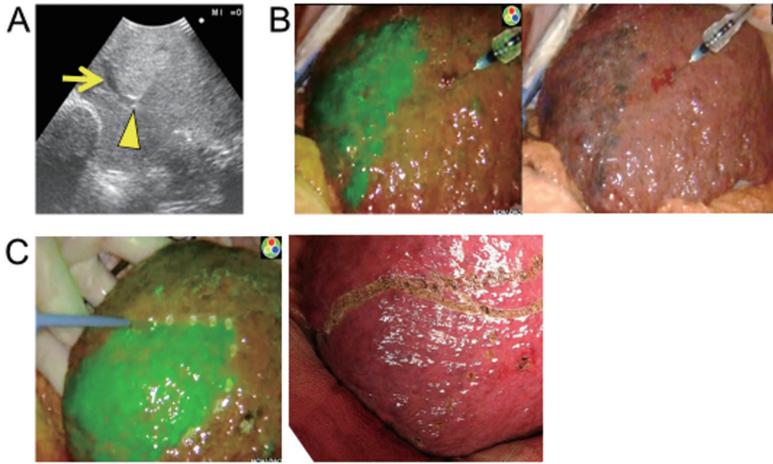
図11 ICG 蛍光法を用いた肝区域同定 (ICG 静注)



- A) 腹腔鏡手術では虚血域として切除肝区域を同定することが多い。
本症例では切除予定である肝 S2 に供血するグリソン鞘 (矢頭) をクランプし、ICG 1.25mg を静注した (①)。蛍光を呈さない虚血域 (S2) と隣接する蛍光領域 (S3) との境界をマーキング (矢印は蛍光法で描出された肝転移、②)。
肝細胞に取り込まれた ICG は数時間留まるので、肝離断中にも肝区域境界を確認することができた (③)。
- B) 蛍光法または染色法を用いることで、亜区域境界を走行する肝静脈を肝離断面に露出し、解剖学的に正確な肝切除を行うことができる (写真は開腹による肝 S2 切除終了後の離断面)。

その後、開腹肝切除で青色色素 (indigocarmine 5mL) に ICG 0.25mg を混ぜた溶液を門脈枝に注入し、蛍光法と従来の染色法による肝区域同定能を比較した。結果、肝亜区域の同定能は正常肝では両者でほぼ同等であり、再肝切除や肝硬変の症例では前者の方が優れていた [11] (次頁 図12)。尿中に排泄される従来の色素と異なり、ICG は肝細胞に取り込まれて数時間留まるため、肝離断中も肝亜区域境界を同定できる点も蛍光法の利点である。

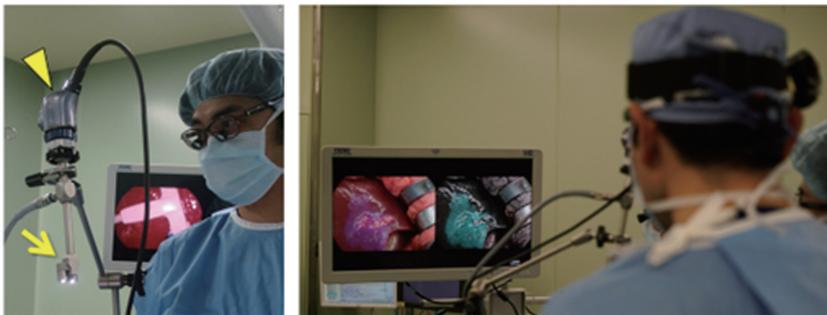
図12 ICG 蛍光法を用いた肝区域同定 (ICG 門脈注入)



- A) 開腹手術中に超音波ガイド下に門脈枝 (矢印) を穿刺し、青色色素に微量 (0.25mg) の ICG を混ぜた溶液を注入。矢頭は針の先端。
- B) 蛍光像 (左) では肝 S7 の一部が明瞭に描出された。溶液注入直後は青色の染色域として肉眼でも確認できる (右)。
- C) 蛍光像をもとに肝亜区域の境界を電気メスでマーキング (左)。青色色素が尿排泄されるため、この時点では染色域は肉眼で同定困難である (右)。

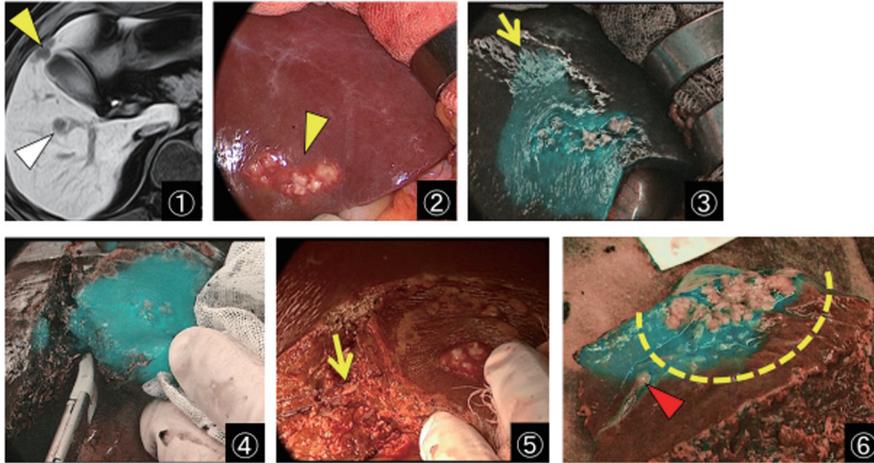
現在筆者は、腹腔鏡手術用の赤外観察装置を開腹手術中に用い (図13)、蛍光像を重畳した高解像度のカラー像に基づいて肝解剖・胆管解剖に沿った肝切除を遂行するために役立っている。図14、15ではその実例を示す。将来、高解像度 (4K または 8K) ・3D、かつ倍率を変更できる小型の撮像装置が開発されれば、開腹手術でも TV モニターあるいはヘッドマウント型ディスプレイに表示された画像と患者情報を元に手術を行う時代が到来するかもしれない (次々頁 図16)。

図13 腹腔鏡用赤外観察装置の開腹手術への応用：観察装置



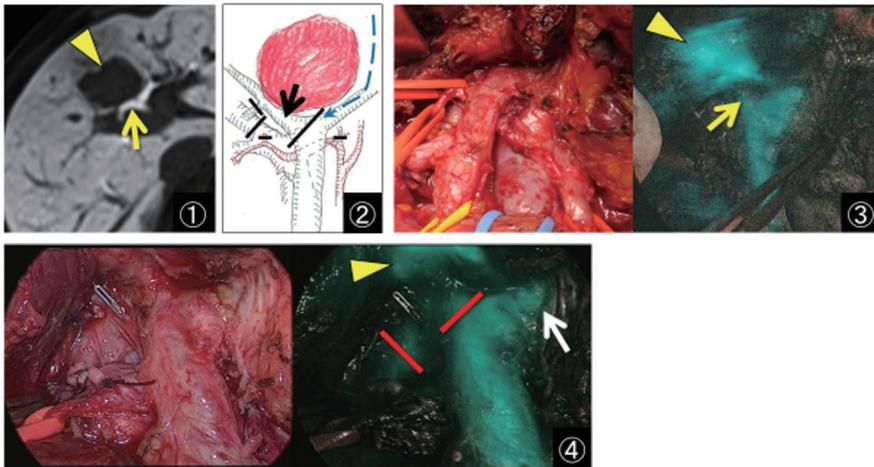
赤外観察に対応した短型硬性鏡 (矢印) を腹腔鏡手術用カメラ (矢頭) に接続することにより、開腹手術中に高精細な蛍光画像を得ることができる。

図14 腹腔鏡用赤外線観察装置の開腹手術への応用：微小な肝転移の検出



①術前CTで肝S4に肝転移が指摘された(黄矢頭)。白矢頭はもう一つの肝転移)。②肉眼観察では腫瘍に特別な所見を認めなかったが、③蛍光イメージングを行うと領域性の蛍光シグナルが描出された。領域性の蛍光シグナルはグリソン鞘根部への癌浸潤に起因する胆汁うっ滞を反映することが多いので[18]、蛍光領域の頂点(矢印)に向けて切除線を拡大した。④蛍光領域の境界に沿って離断し、⑤当該グリソン鞘(矢印)を根部で切離した。⑥切除標本断面では、グリソン鞘根部近傍に腫瘍栓(赤矢頭)を認めた。蛍光イメージングを用いず通常の部分切除(黄色点線)を行った場合、腫瘍栓は取り残された可能性がある。

図15 腹腔鏡用赤外線観察装置の開腹手術への応用：胆管切除を伴う肝切除



①CTで右胆管(矢印)に浸潤し左の肝管にも近接する胆管癌(矢頭)を認めた。
 ②左の胆管を温存し右の胆管(矢印)を切除・再建する肝切除を計画した。
 ③肉眼では胆管の走行を認識できないが、蛍光像では腫瘍(矢頭)と右の胆管(矢印)を含む胆管解剖が明瞭に描出された。④切除予定肝(前区域)の動脈と門脈を切離した後に再度蛍光イメージングを施行。赤線の部位で胆管(右肝管および後区域肝管)を切離すれば、左の胆管(白矢印)を損傷することなく腫瘍(矢頭)を切除できることが確認できた。

図16 次世代の開腹手術用蛍光イメージング装置の概念図



高解像度かつ倍率可変の赤外観察装置が開発されれば、開腹手術でもTVモニターあるいはヘッドマウント型ディスプレイに投影された画像や情報を元に手術を行う時代が来るかもしれない。

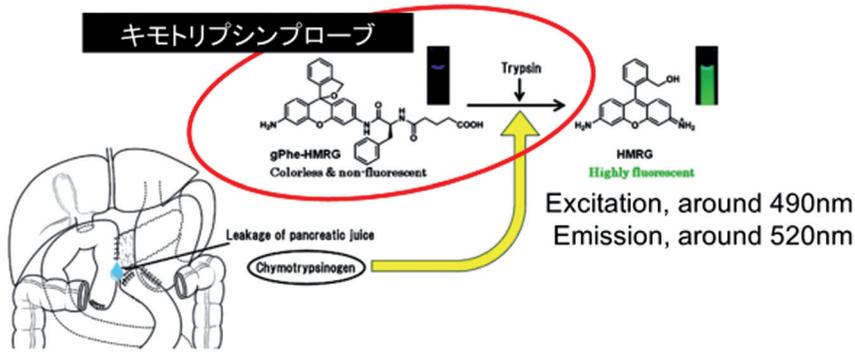
5. キモトリプシンプローブを用いた膵液イメージングの開発

膵切除術は、膵・胆管腫瘍に対する根治療法として確立しており、世界的に増加傾向にある。しかし、膵切除が患者の治療に用いられてから既に100年近く経過し、手術技術が発達した今日でも、膵切除後の膵液漏が高率(10-60%)に発生する。膵液漏は重症感染症の誘因となるほか、膵液蛋白分解酵素の作用により血管断端が破綻して致死的な術後出血をきたす。実際、膵頭十二指腸切除術の死亡率は1-8%と高く、low-volume centerでは15%に達するとの報告もある。

膵液漏の防止が困難である第一の理由は、膵液が無色透明であり、膵液漏の部位や程度を手術中に正しく認識できない点である。また、現状では膵液漏の程度は腹水の amylase 濃度を指標に評価されているが、amylase は糖分解酵素であり、臨床症状を惹起する膵液蛋白分解酵素(または脂肪分解酵素)の代替指標に過ぎず、原理的には後者の濃度または活性で膵液漏の重症度が評価されるべきである。事実、術後ドレーン排液の amylase 濃度と膵液漏の重症度が相関しないことも多々経験される。

上記の問題を解決に導くため、研究者らは膵液蛋白分解酵素(chymotrypsin)による加水分解を受けて速やかに可視領域の蛍光を発する新規化合物、glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green (gPhe-HMRG) を設計・合成した。実際には膵は chymotrypsin の前駆体である chymotrypsinogen を分泌するため、chymotrypsinogen を chymotrypsin に変換するために微量の trypsin を添加した gPhe-HMRG を「キモトリプシンプローブ」として開発した[13]。加水分解によって生じた HMRG は490nm の励起光を照射することにより520nm の波長を発する(図17)。

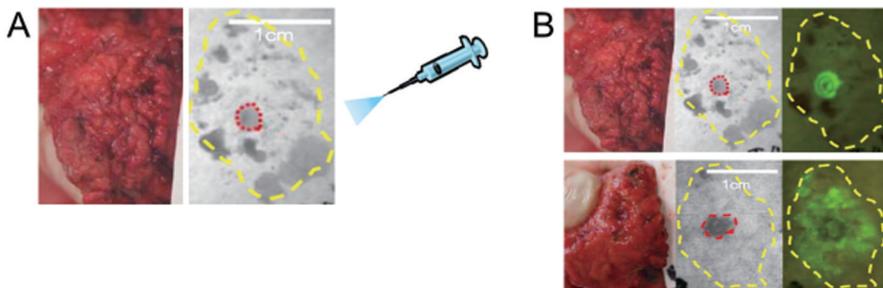
図17 膵液描出用キモトリプシンプローブの構造と組成



キモトリプシンプローブ (trypsin 添加 gPhe-HMRG) は膵液中の chymotrypsin により活性化し、速やかに無色から HMRG の蛍光色 (緑) に変化する。

先行研究では、キモトリプシンプローブが患者体液の中から特異的に膵液を蛍光標識することが確認された。また、膵切除の手術中に濾紙に膵断端を転写してキモトリプシンプローブを散布、体外で蛍光イメージングを行うことにより膵液漏出部位を可視化できること、キモトリプシン活性に基づいた術後膵液漏のリスク評価が可能であることが示された(図18)。

図18 体外サンプルにキモトリプシンプローブを用いた膵液漏のイメージング

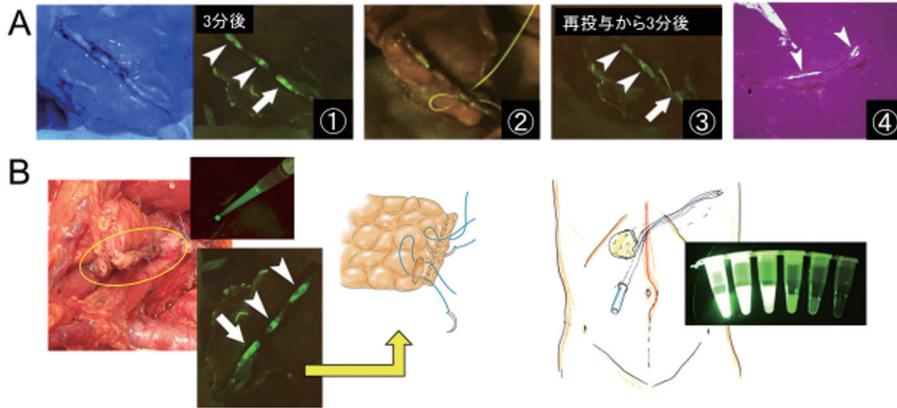


- A) 手術中に膵断端を転写した濾紙にキモトリプシンプローブを噴霧して蛍光イメージングを行った。
- B) プローブ散布後数分で、主膵管断端(上)または膵切離面全体(下)から漏出する膵液が明瞭に描出された。

膵液蛍光イメージングに期待される最大の役割は、キモトリプシンプローブを膵断端に直接散布して膵液漏出部位を手術中に同定することにより、膵液漏出部位を縫合閉鎖することを可能にし、膵液漏発生率低減に寄与することである。本技術をシミュレーションするために、ブタ体腔内で膵断端にキモトリプシンプローブを散布して蛍光イメージングを行い、自動吻合器の stapler 刺入孔や閉鎖不十分な膵管断端から流出する膵液を開腹および腹腔鏡手術中にリアルタイムに描出できることを確認した。適切なフィルター (515nm long pass) を装着することにより、膵液漏の蛍光シグナルを肉眼で確認することができるため、術者は蛍光像を元に容易に膵液漏出部位を縫合閉鎖することができた(次頁 図19)。現在、患者体腔

内で膵液蛍光イメージングを実施することを目標として、キモトリプシンプローブの非臨床安全性試験を遂行している。

図19 体腔内でキモトリプシンプローブを用いた膵液漏のイメージング



- A) ブタを用いた膵体尾部切除モデル：①膵を自動吻合器で切離後、断端にキモトリプシンプローブ (200 μ L) を散布して青色光照射下に肉眼観察すると、stapler 孔から漏出する膵液が3か所同定された (矢頭と矢印)。②蛍光像を確認しながら、膵液漏出部位のうち1か所 (矢印) を縫合閉鎖。③縫合後に再度キモトリプシンプローブ (200 μ L) を散布して蛍光イメージングを実施。閉鎖部位からの漏出がほぼ無くなっていることを確認した。④膵断端の組織標本では、不完全に閉鎖された膵管の分枝 (矢頭) が多数認められた。
- B) 臨床使用のイメージ：膵断端 (円内) にキモトリプシンプローブを散布して蛍光イメージングを行い、膵断端を縫合閉鎖する技術により、膵液漏の発生頻度が減少するか評価するための治験を計画している (左)。蛍光強度、すなわち蛋白分解酵素活性に基づいてドレーン留置の可否を決定するための臨床試験も検討している (右)。

6. まとめと今後の展望

筆者は ICG 蛍光法を用いた胆道造影法、肝癌術中診断法などの技術を開発し、近年は高難度手術にも積極的に臨床応用してきた。本邦では平成28年度から高難度肝胆膵手術に腹腔鏡手術の適応が拡大される見込みである。ICG 蛍光法などの画像修飾技術を活用する上で、TV モニターに基づいて操作を行う腹腔鏡手術は開腹手術よりも原理的に有利であり、開腹手術のように「触診・視診」ができない欠点を補うのみならず、「肉眼では同定できない」生体構造を描出するための技術として、蛍光イメージングの適用が今後ますます拡大すると予想される。同時に、腹腔鏡装置の開発を経て進展した画像処理技術を応用することにより、開腹手術における蛍光イメージングの利便性・有効性も向上すると期待される。蛍光イメージングにおける透過性の限界を解決する手段として、組織透明化技術の発展も待たれる。

キモトリプシンプローブを用いた膵液蛍光イメージングはまだ非臨床安全性試験の段階であるが、蛋白分解酵素活性に基づいて膵液漏を描出する技術は本法以外に開発の報告がない。今後、本技術を膵切除・吻合法や術後管理の改良、膵に特化した医療器機の開発などに応用し、膵液漏発生率の低減に役立てたい。膵切除の安全性が向上し、個々の患者の膵液漏重症

化リスクに応じた効率的な術後管理が行えるようになれば、治療コスト削減や入院期間の短縮を通じて医療経済的にも貢献できる可能性がある。本技術開発上の課題は、類似の投与形態を持つ診断薬の前例がないため安全性試験の項目策定が困難であること、癌診断薬と比べると市場規模が小さく製薬メーカーとの連携が困難であることである。本技術を早期に臨床導入して「安全な手術」の達成に役立てるべく、研究者と製薬メーカー、医療機器メーカーの共同研究体制を構築し開発を進展させたい。

7. 謝 辞

東京山手メディカルセンター 万代恭嗣院長、東京大学肝胆膵外科 國土典宏教授、および がん研有明病院肝胆膵外科 齋浦明夫部長のご指導がなければ、肝胆膵外科の幅広い用途に対し蛍光イメージングの臨床応用を果たすことはできませんでした。心から感謝申し上げます。また、キモトリプシンプローブの設計をご快諾頂き、その後の開発にあたり貴重な助言を賜りました東京大学大学院 薬学系研究科 浦野泰照教授、同医学系研究科 神谷真子講師に感謝致します。

8. 参考文献

1. Landsman ML, Kwant G, Mook GA, et al. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol* 1976;40:575-83.
2. **Ishizawa T**, Tamura S, Masuda K, et al. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green: a biliary road map for safe surgery. *J Am Coll Surg* 2008;208:e1-4.
3. **Ishizawa T**, Bandai Y, Kokudo N. Fluorescent cholangiography using indocyanine green for laparoscopic cholecystectomy: an initial experience. *Arch Surg* 2009;144:381-2.
4. Pertsemliadis D. Fluorescent indocyanine green for imaging of bile ducts during laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 2009;144:978.
5. Agarwal BB. Patient safety in laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 2009;144:979.
6. **Ishizawa T**, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009;115:2491-504.
7. **Ishizawa T**, Masuda K, Kokudo N, et al. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green-fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014;21:440-8.
8. Kokudo N, **Ishizawa T** (Eds.). Fluorescent imaging: treatment of hepatobiliary and pancreatic diseases. Basel, Karger, 2013.
9. Dip FD, **Ishizawa T**, Kokudo N, Rosenthal R (Eds.). Fluorescence imaging for surgeons. Springer International Publishing Switzerland, 2015.
10. **Ishizawa T**, Zuker NB, Kokudo N, Gayet B. Positive and negative staining of hepatic segments by use of fluorescent imaging techniques during laparoscopic hepatectomy. *Arch Surg* 2012;147:393-4.
11. Miyata A, **Ishizawa T**, Kokudo N, et al. Reappraisal of a dye-staining technique for anatomic hepatectomy by the concomitant use of indocyanine green-fluorescence imaging. *J Am Coll*

- Surg 2015;221:e27-36.
12. Kawaguchi Y, **Ishizawa T**, Miyata Y, et al. Portal uptake function in veno-occlusive regions evaluated by real-time fluorescent imaging using indocyanine green. *J Hepatol* 2013;58:247-53.
 13. Yamashita S, Sakabe M (double first authors), **Ishizawa T**, et al. Visualization of the leakage of pancreatic juice using a chymotrypsin-activated fluorescent probe. *Br J Surg* 2013;100:1220-8.
 14. Mori K, **Ishizawa T**, Yamashita S, et al. Intraoperative visualization of pancreatic juice leaking from the pancreatic stump in a swine model. *Gastroenterology* 2015;149:1334-6.
 15. Mullock BM, Shaw LJ, Fitzharris B, et al. Sources of proteins in human bile. *Gut* 1985;26:500-9.
 16. **Ishizawa T**, Bandai Y, Ijichi M, et al. Fluorescent cholangiography illuminating the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy. *British Journal of Surgery* 2010;97:1369-77.
 17. Kono Y, **Ishizawa T**, Tani K, et al. Techniques of fluorescence cholangiography during laparoscopic cholecystectomy for better delineation of the bile duct anatomy. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1005.
 18. Harada N, **Ishizawa T**, Muraoka A, et al. Fluorescence navigation hepatectomy by visualization of localized cholestasis from bile duct tumor infiltration. *J Am Coll Surg* 2010;210:e2-6.
 19. Miyata A, **Ishizawa T**, Kokudo N, et al. Photoacoustic tomography of human hepatic malignancies using intraoperative indocyanine green fluorescence imaging. *PLoS One* 2014;9:e109731.
 20. Kudo H, **Ishizawa T**, Kokudo N, et al. Visualization of subcapsular hepatic malignancy by indocyanine-green fluorescence imaging during laparoscopic hepatectomy. *Surg Endosc* 2014;28:2504-81.
 21. Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S. Ultrasonically guided subsegmentectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1985;161:346-50.
 22. **Ishizawa T**, Hasegawa K, Aoki T, et al. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1908-16.
 23. Aoki T, Yasuda D, Shimizu Y, et al. Image-guided liver mapping using fluorescence navigation system with indocyanine green for anatomical hepatic resection. *World J Surg* 2008;32:1763-7.

