

博士論文

術後瘝液漏の安全かつ効率的な管理を目指した
ベッドサイド診断技術の開発

渡邊 元己

所属：肝胆膵外科
指導教員名：長谷川 潔
申請者名：渡邊 元己

目次	頁
1. 要旨	4
2. 序文	5
2.1 膵切除後の合併症としての膵液漏	
2.2 POPF の発生リスクと術後管理の問題点	
2.3 PD 後のドレーン管理	
2.4 膵液及びドレーン排液中のアミラーゼ濃度と蛋白分解酵素活性	
2.5 研究の目的	
3. 方法	12
3.1 対象	
3.2 手術手技、術後管理	
3.3 サンプル採取	
3.4 膵酵素活性測定	
3.4.1 膵液およびドレーン排液中のキモトリプシン活性	
3.4.2 膵液およびドレーン排液中のアミラーゼ濃度	
3.5 可搬式小型蛍光測定器の検証・有用性の検討	
3.6 統計学的解析	
4. 結果	27
4.1 キモトリプシンの測定意義の検討	
4.1.1 膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の術後推移、日内変動、摂食の影響	
4.1.2 膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の相関	
4.1.3 ドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の相関	
4.1.4 膵液中およびドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性、アミラーゼ濃度と CR-POPF との関連	
4.2 可搬式小型蛍光測定器の検証	
5. 考察	59
6. 引用文献	66
7. 謝辞	72

略語一覽表

PD, pancreaticoduodenectomy (胰頭十二指腸切除)

POPF, postoperative pancreatic fistula (術後胰液漏)

ISGPF, International Study Group of Pancreatic Fistula

CR-POPF, clinically relevant postoperative pancreatic fistula

BMI, body mass index

HMRG, hydroxymethyl rhodamine green

gPhe-HMRG, glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green

AU, arbitrary units

ROC, receiver operating characteristic

AUC, area under curve

IPMN, Intraductal papillary mucinous neoplasm (胰管內乳頭粘液腫瘍)

MPD, main pancreatic duct (主胰管)

1. 要旨

膵切除後の膵液漏は致死的な合併症に進展し得る重篤な合併症である。本研究では、膵頭十二指腸切除術後に分泌される膵液のキモトリプシン活性を独自の蛍光プローブを用いて測定することにより、ドレーン排液中のアミラーゼ濃度に基づく従来基準よりも迅速かつ正確に重症膵液漏のリスクを評価できる可能性が示された。今後、可搬式小型蛍光測定器を用いて体液中の膵酵素活性を患者のベッドサイドで計測できれば、ドレーンの処置（抜去可能か否か、など）を回診時に判断することが可能となり、安全かつ効率よく膵切除の周術期管理を実施できると期待される。

2. 序文

2.1 膵切除後の合併症としての膵液漏

膵頭十二指腸切除(pancreaticoduodenectomy; PD)は、膵頭部の疾患に対して行われる術式であり、National Clinical Databaseによると、日本国内では2011～2017年に約15,000件/行われている¹。PDは消化器外科領域の中で難易度の高いものの一つとされ、Morbidityは40-60%で起こるとされる²⁻⁵。Mortalityは、1970-1980年代には25-30%と報告されるも、最近では周術期管理が発展し、1-7%とされる²⁻⁹。特に、術後膵液漏(postoperative pancreatic fistula; POPF)は14-40%^{3,4,10,11}の頻度で起こり、POPF及びそのドレナージ不良に付随する膿瘍・出血はMortalityの最大の原因となりうる^{12,13}。術後致命的な出血を起こす機序としては、膵液が腹腔内へ漏れ、その中に含まれる蛋白分解酵素による組織障害によって、露出した動脈壁や動脈処理断端に作用し、腹腔内出血を起こすとされる¹³⁻¹⁵。

2005年にInternational Study Group of Pancreatic Fistula (ISGPF)がPOPFを、「術後3日目以降にドレーン排液アミラーゼ値が、血清アミラーゼ正常値上限の3倍以上」と定義し¹⁶、重症度に応じてGrade A, B, Cと分類した。具体的には、POPFの定義を満たすのみで、臨床的に問題とならないものがGrade A、3週間以上のドレーン留置を必要とし、感染兆候があり、末梢・中心静脈栄養や抗菌薬投与、ソマトスタチンアナログの使用や低侵襲なドレナージが必要となるものをGrade B、再手術や敗血症、死亡に至ったものをGrade Cと定めた。2016年にはこの定義が改定され、Grade AはBiochemical leakへ代わり、Biochemical leakage, Grade B, Grade Cと分類され、広く用いられている(表1)¹⁷。したがって、POPFの重症化を防ぐためには、

術後経過で臨床的に何らかの介入が必要となる **Grade B/C** 膵液漏、即ち **Clinically relevant postoperative pancreatic fistula (CR-POPF)**を予測し、適切に術後管理を行う必要がある。

表 1. POPF に対する ISGPF 分類

Grading	2005 年 (初版)	2016 年 (改訂版)
Biochemical leak	定義なし	術後 3 日目以降にドレーン排液アミラーゼ値 > 血清アミラーゼ正常値上限の 3 倍
Grade A	術後 3 日目以降にドレーン排液アミラーゼ値 > 血清アミラーゼ正常値上限の 3 倍	定義なし
Grade B	Grade A かつ下記のいずれか <ul style="list-style-type: none"> ・ 3 週間をこえるドレーン留置あり ・ ドレーンの位置調整 ・ 感染兆候 ・ 入院期間延長や再入院 ・ 絶食、静脈栄養、抗生剤、ソマトスタチンアナログ投与 	Biochemical leak かつ下記のいずれか <ul style="list-style-type: none"> ・ 3 週間をこえるドレーン留置あり ・ POPF に関する術後管理の変更の必要性あり (ドレーンの位置調整、抗生剤、輸血、絶食、経腸栄養、静脈栄養、ソマトスタチンアナログ投与) ・ 経皮的、内視鏡的ドレナージを施行 ・ 出血に対する血管塞栓術施行
Grade C	Grade B かつ下記のいずれか <ul style="list-style-type: none"> ・ 経皮ドレナージ ・ 再手術 ・ 敗血症 ・ 死亡 	臓器不全を伴わない感染あり Grade B かつ下記のいずれか <ul style="list-style-type: none"> ・ 再手術 ・ 臓器不全 ・ 死亡

POPF, postoperative pancreatic fistula; ISGPF, International Study Group of Pancreatic Fistula

2.2 POPF の発生リスクと術後管理の問題点

POPF 発生もしくはその重症化因子としては、男性¹⁸⁻²⁰、Body mass index (BMI)²¹⁻²³、糖尿病²⁴、soft pancreas²⁵⁻²⁷、細い主膵管径^{18, 26}、手術時間^{25, 26}、出血量^{25, 26, 28, 29}、ドレーン留置期間^{30, 31}、ドレーン排液培養陽性³²、術後膵炎³³等々様々なリスクが報告され、POPF 発生を防ぐ方法として、手術手技的には、膵液が腸液と混ざらないようにする膵胃吻合^{34, 35}を施行することや膵外分泌抑制作用を有するソマトスタチンアナログ投与¹⁵を提唱する報告もあるが、完全に POPF を防ぐ方法は未だ確立されていない。

POPF は術中に留置された腹腔ドレーンの排液を検査することで診断され、その管理を適切に行うことで POPF から CR-POPF へ進行することを防ぐことが可能となるが、近年、No drain や早期ドレーン抜去は肝切除のみならず、膵頭十二指腸切除においても、感染を防止し、術後合併症を減らす点で有用とされる^{3, 31, 36, 37}。しかし、ある Randomized clinical trial では、No drain policy が Mortality をあげる結果となった³⁸。POPF の重症化リスクを厳密に評価し、ドレーンを早期抜去すべきか、それとも留置を継続すべきか、という適切な術後ドレーン管理を行うことが肝心である。

2.3 PD 術後のドレーン管理

消化酵素の一種である膵液に関して、その分泌は日内変動・摂食による影響を受けるとされる。一般的には、昼間に上昇し、夜間に低下、また食後は分泌が増えると考えられる^{39, 40}。一方、膵液分泌と膵液に含まれる蛋白分解酵素の活性は相関すると報告したものもあれば、相関しないとする報告

もある⁴¹⁻⁴⁴。この膵液が術後に腹腔内に漏れ出て、腹水と混在した排液を腹腔ドレーンが体外へ導くこととなる。ドレーン留置が長期に及ぶと、逆行性感染に起因する腹腔内感染を来し、POPFの重症化へと導く可能性もあり、ドレーンは不要であれば早期抜去が望まれる^{3, 31, 36, 37}。一方、ドレーン早期抜去は膵液の混じった腹水を腹腔内に閉じ込め、感染から腹腔内膿瘍形成を来すこともあり、ドレーンの抜去可否を適切に判断できる基準が求められる。

PD後のドレーン抜去の基準として、ドレーン排液アミラーゼ濃度を用いた基準が良く用いられている。代表的なものとして、術後1日目のドレーン排液アミラーゼ濃度が5000 U/L以下の場合、抜去しても良いとするものである³¹。しかし、ドレーン早期抜去に伴い、腹腔内に膵液が混在した排液が体外へ出されずに貯留し、Mortalityに直結する重症合併症を来すリスクを考慮し、ドレーン抜去は慎重にならざるを得ない。明らかに腹腔ドレーンを抜去しても問題ない(CR-POPFを起こす可能性の低い)患者を術後早期に同定出来れば、有用であると考ええる。

2.4 膵液及びドレーン排液中のアミラーゼ濃度と蛋白分解酵素活性

POPF診断の基準であるアミラーゼは本来ブドウ糖切断酵素であり、動脈壁を破綻させ、致死的な出血を起こすような組織障害性はないため、膵機能の指標に過ぎない。ドレーン排液中のアミラーゼ濃度が必ずしもPOPFの重症化の予測とならなかった報告もある^{21, 45-47}。真にPOPFの重症化に関連するのは、膵液中に含まれ、組織障害性を持つ蛋白分解酵素であると我々は考えた。特に、キモトリプシンは膵液に含まれる特異な蛋白分解酵素の一つであり、その活性を蛍光強度として検出するキモトリプシンプローブを我々は開発

し、膣液が可視化できることと、膣液中のキモトリプシン蛍光活性が術後 CR-POPF に関連がある可能性を報告した⁴⁸⁻⁵¹。しかしながら、既報ではキモトリプシンプローブを用いてキモトリプシン蛍光活性を測定する場合、膣液に対してはその蛍光活性が測定可能だったが、ドレーン排液に対しては、高アミラーゼ濃度の排液であっても、腹水中の活性阻害因子の影響か、キモトリプシン蛍光活性は測定出来なかった⁴⁸。ただし、既報で検索した膣液は 15 検体、腹部ドレーン排液は 46 検体のみであり、再検証が必要と考えられる。そもそもドレーン排液は、ドレーンの留置場所及び有効かどうかで、POPF を必ずしも反映するとは限らず、POPF が関連する組織障害を見るために膣液を評価の方が適切かもしれない。それゆえ、膣液中のキモトリプシンの蛍光強度の CR-POPF に対する測定意義と、現行の、膣液中及びドレーン排液中のアミラー濃度を指標とした因子との比較検証が必要である。

更に、キモトリプシン蛍光強度測定の問題点は、マイクロプレートリーダーという大型の機器が必要であり、測定時間を有する点が挙げられる⁴⁸。キモトリプシンの蛍光強度が CR-POPF の予測因子となり、かつ患者ベッドサイドでキモトリプシン蛍光強度が迅速に得られれば、ドレーン抜去の可否が即座に判断でき、実臨床に有用であるため、その迅速測定系の開発が求められる。

2.5 研究の目的

キモトリプシンプローブは、もともと患者体腔内で膣液漏出部位を可視化するために開発され⁴⁸、動物モデルでの非臨床 proof of concept 確認⁴⁹を経て現在 first-in-human 試験を計画

している。今回は本プローブを患者体外で術後排液中の膵酵素活性を測定する目的で用い、CR-POPFを迅速に予測するために用いることができるか前向きに検証した。更に、キモトリプシン蛍光活性測定用に開発された可搬式小型蛍光測定器の検証・有用性を検討した。

3. 方法

3.1 対象

良悪性疾患問わず、当院で2018年9月から2019年12月に連続的に膵頭十二指腸切除を施行した患者52名を対象とした。本研究は研究課題名「体外サンプルと摘出標本を用いた、膵液・胆汁、および膵癌、胆管癌、肝腫瘍を特異的に標識する新規蛍光プローブの開発」として、院内研究倫理委員会承認された [2957-(15)]。かつ、UMIN Clinical Trials Registry (registration number: UMIN000003654; <http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm>)にも登録されている。ヘルシンキ宣言に則って研究を行い、術前に全患者からインフォームドコンセントを得た。

3.2 手術手技、術後管理

検体(膵頭十二指腸)を摘出後、Child変法にて再建した(図1)^{28,48}。膵空腸吻合は合成非吸収性モノフィラメント縫合糸(ポリプロピレン)を用いたKakita法⁵²あるいはBlumgart変法⁵³で行った(図2)。膵管空腸吻合は合成吸収性モノフィラメント縫合糸(ポリジオキサノン、ポリグリコネート)を用いて行った(図3)。主膵管径に関わらず、膵液漏を防ぐ目的で^{54,55}、膵管空腸吻合部を介して軟質ポリ塩化ビニル製の膵管チューブを留置して体外へ導き、一部の膵液は腸内へ、他は体外へと排出される内外瘻チューブとした。再建後はシリコーンゴム製の腹部ドレーンを膵空腸吻合部周囲及びWinslow孔に留置した。これらは皮膚と非吸収性縫合糸(医療用絹縫合糸)で固定され、閉鎖式低圧持続吸引バッグに接続した。術後、これらの排液バック

より排液アミラーゼ値を測定し、膵液漏の発生の有無を判断し、採血所見・バイタルサイン・画像所見によって重症化の有無を調べ、抜去の可否を判断した。膵液漏発生を認めなければ、ドレーンは早期に抜去し、膵液漏発生を認める場合は、適切に膵液が体外へ排出されるように管理を行った。ドレーンアミラーゼ値が高値にも関わらず、排液量が少量である場合は、ドレーンをカットし、徐々に抜いた²¹。術後 14 日以降に、膵液漏がなく、全身状態が良好であれば、膵管チューブは抜去した。

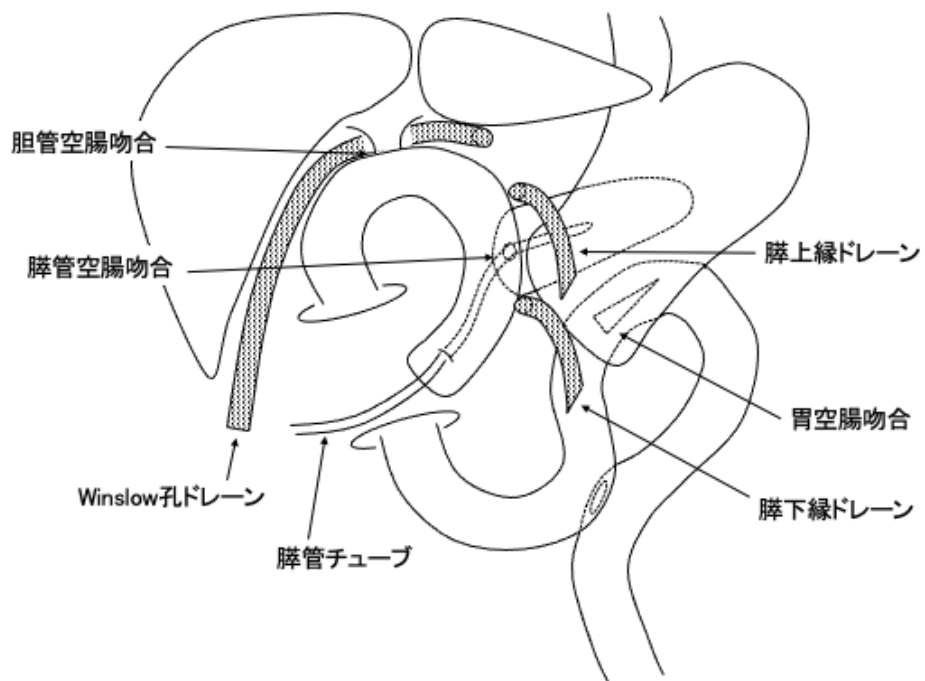


図 1 膵頭十二指腸切除術後の再建図

ドレーンは膵空腸吻合部周囲に 2 本、Winslow 孔に 1 本留置した。膵管径に関わらず、膵管空腸吻合部を介して膵管チューブを留置した。

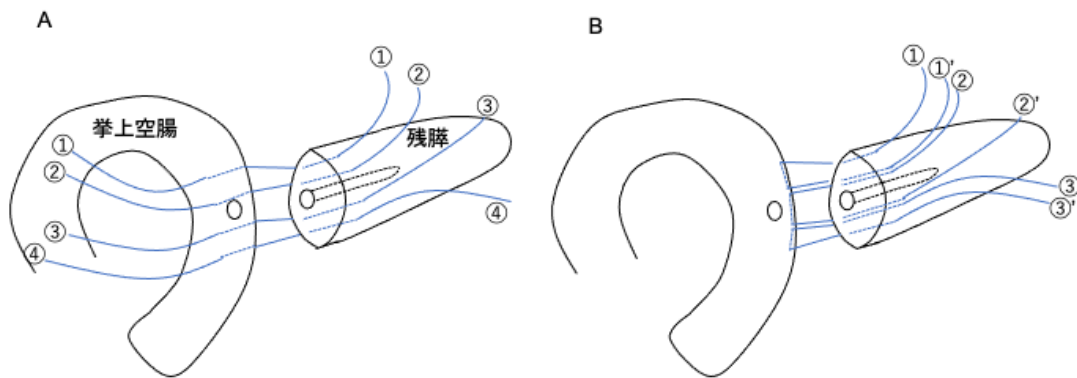


図2 膵空腸吻合

Kakita 法(A)では、同じ番号の縫合糸を結紮し、膵実質と空腸を密着させた。Blumgart 変法(B)では、①と①'を更に空腸漿膜筋層に運針し、縫合糸を結紮することで膵実質と空腸を密着させた。

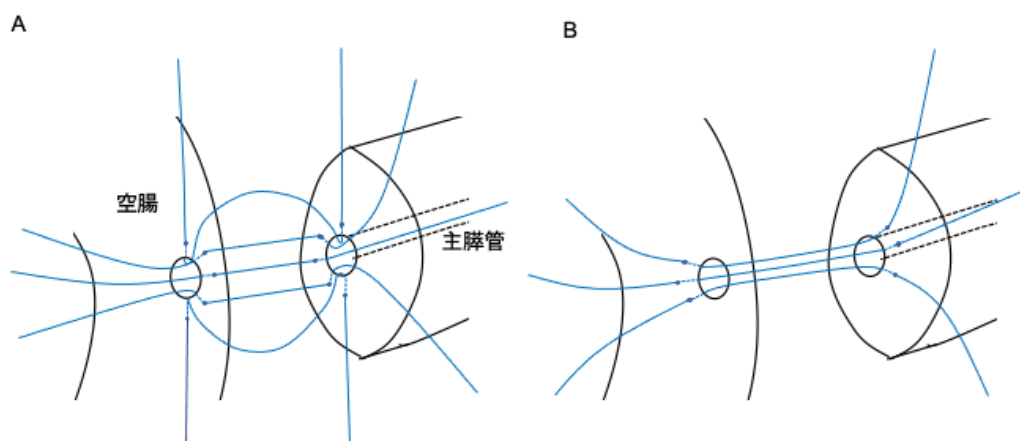


図3 膵管空腸吻合

後壁側(A)を運針後に結紮し、前壁側(B)を運針し、結紮し、膵管空腸吻合とした。

3.3 サンプル採取

術後 1, 3, 5, 7, 14 日の朝(7 時)・夕(17 時)に、膵管チューブへ接続された排液バックより、膵液を採取した。術後 7 日, 14 日は食事による膵酵素分泌への影響を調べるために朝夕食前の排液採取後に排液バック中の膵液を破棄した後の朝夕食後 1 時間(9 時・19 時)にも膵液を採取した。術後 1, 3, 5, 7, 14 日の朝に、腹腔内へ留置したドレーンに接続された排液バックからそれぞれ排液を採取し、ドレーンがカット(排液バックから外され、短く切られる)あるいは抜去されるまで、サンプル採取を継続した。膵管チューブとドレーンにそれぞれ接続された排液バックは常温で患者近傍に置いてあるため、検体採取は常温で行った。ただし、膵液・ドレーン排液に含まれている酵素の失活・変性を防ぐために、検体採取後、一部をアミラーゼ濃度測定に提出した残りの検体は速やかに-80 度に冷凍保存した。膵液及びドレーン排液バックは毎日午前 12 時に破棄され、更新された。更に、術後 7 日、14 日の食後の膵液採取をする際は、食前の膵液の混入を防ぐために、食前の膵液を採取後に膵管チューブの排液バックを破棄した。

3.4 膵酵素活性測定

3.4.1 膵液およびドレーン排液のキモトリプシン活性

キモトリプシン蛍光活性測定には、研究室で開発したキモトリプシンプローブ⁴⁸を用いた。即ち、ヒト体内で膵臓でのみ合成されるキモトリプシンはグルタルルフェニルアラニンを加水分解することと、hydroxymethyl rhodamine green(HMRG)が約 490nm の波長の青色

光で励起され、約 520nm の緑色蛍光を発する性質を利用して、 **glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green(gPhe-HMRG)**がキモトリプシン存在下で加水分解を受けて、**HMGR** が分離し、速やかに蛍光を呈する機序を用いた。なお、膵液中でキモトリプシンは前駆体キモトリプシノーゲンとして存在するため、これをキモトリプシンに活性化させるために **trypsin** を添加した(図 4)。

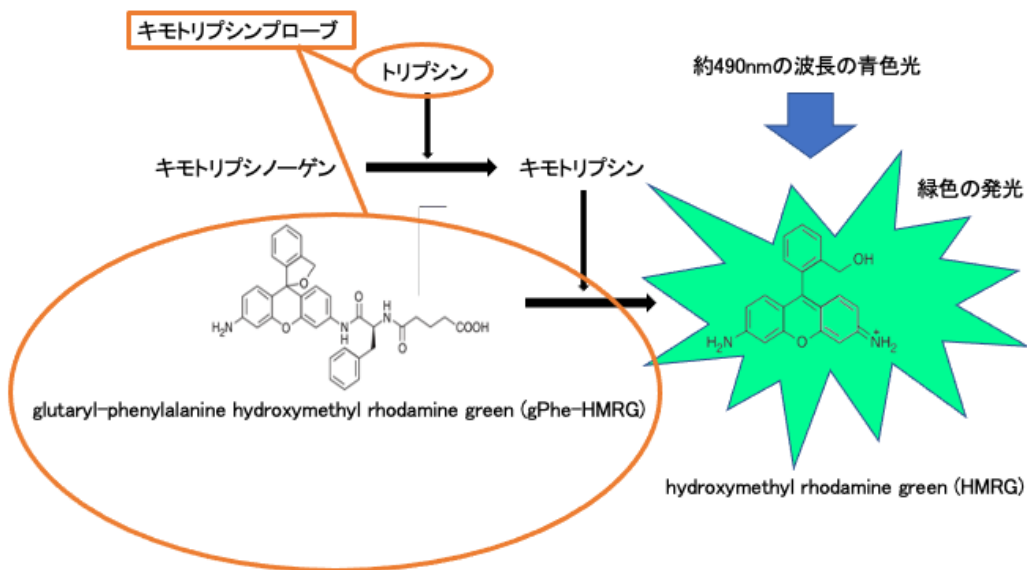


図4 キモトリプシンプローブ (trypsin 添加 gPhe-HMRG) の蛍光機序

膵臓から分泌されたキモトリプシノーゲンがトリプシンで活性化され、キモトリプシンとなる。glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green (gPhe-HMRG)がキモトリプシン存在下で加水分解を受けて、hydroxymethyl rhodamine green(HMRG)が分離し、蛍光活性を有する。gPhe-HMRG と少量のトリプシンを混注したものをキモトリプシンプローブとした。

採取後に速やかに-80°Cに冷凍された腭液とドレーン排液の検体は、キモトリプシン蛍光活性測定まで保存され、キモトリプシン蛍光活性測定時に解凍した。20μL の腭液及びドレーン排液検体にキモトリプシンプローブ 180μL (1.1 μmol/L gPhe-HMRG with 20 mg/mL trypsin)を添加し、マイクロプレートリーダー (EnVision 2103 Multilabel Reader; PerkinElmer)を用いて、蛍光強度を測定した (excitation/emission wavelengths of 485/535 nm, incubated at 37 °C)。

今回の実験では、キモトリプシン蛍光活性をベッドサイドで迅速に測定するための可搬式小型蛍光測定器開発を目的としていたため、既報の 30 分⁴⁸よりも短時間で測定可能な方法を追求した。α-キモトリプシン試薬(C4129; Sigma-Aldrich, Germany)を用いた前実験により、α-キモトリプシンの蛍光活性は反応後 5-20 分でプラトーに達し、キモトリプシン濃度は、プローブ反応から 5 分間までの蛍光活性の増加率と一次関数的な関係があることが判明していたため(図 5)、キモトリプシンの蛍光活性(AU: arbitrary units)の大きさは以下の式で示す「蛍光活性の増加率」を採用した。

蛍光活性の増加率 (AU/min)

$$= \frac{5 \text{ 分後のキモトリプシン蛍光活性} - \text{プローブ反応直後のキモトリプシン蛍光活性}}{5}$$

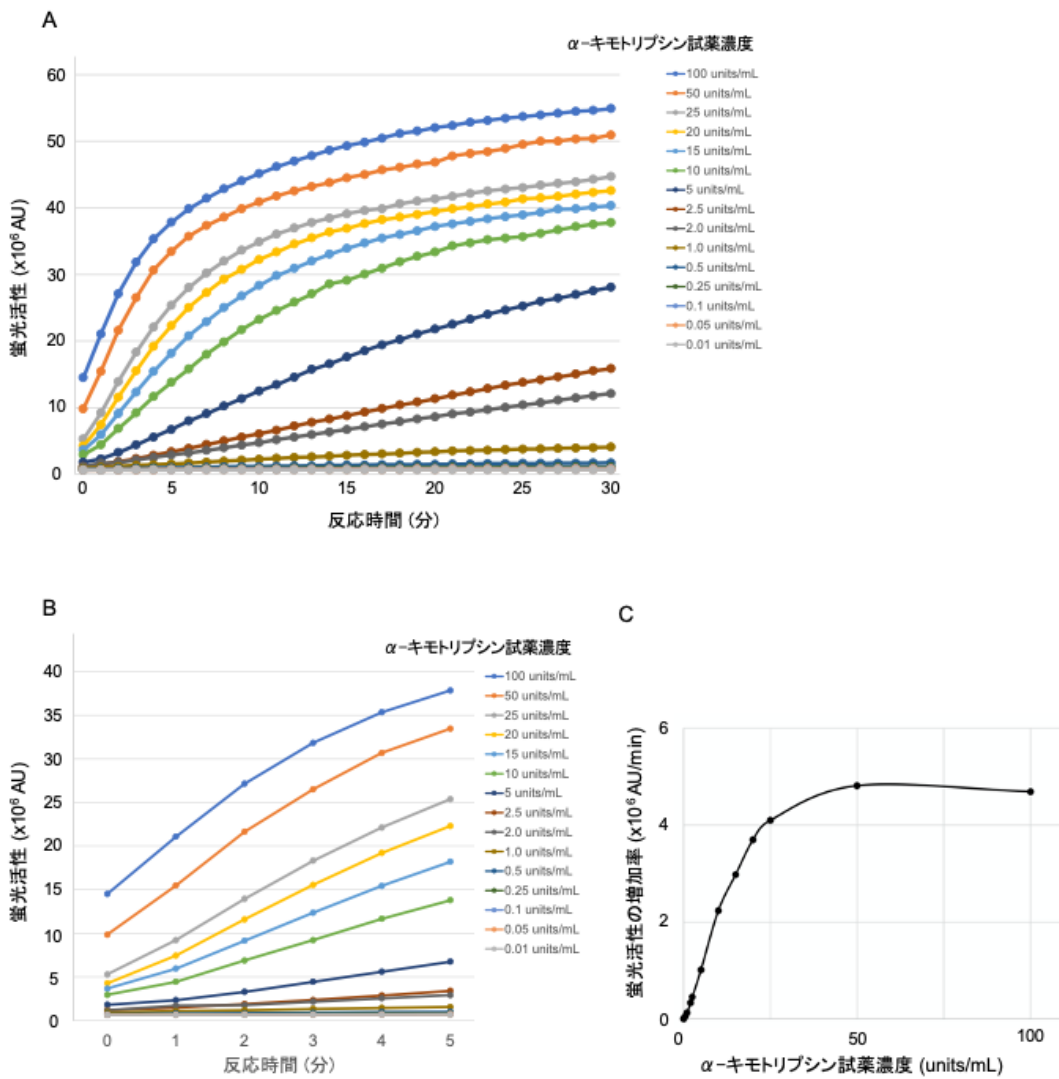


図5 α -キモトリプシン試薬を用いてマイクロプレートリーダーでキモトリプシン蛍光活性測定

(A) α -キモトリプシンの蛍光活性は反応後 5-20 分でプラトーに達した。

(B) α -キモトリプシン濃度が大きくなるにつれ、蛍光活性の増加率(傾き)は大きくなった。

(C) α -キモトリプシン濃度がおよそ 50 units/mL までは、蛍光活性は一次関数的に増大するが、それ以上の濃度となると、蛍光活性の増加率はプラトーに達した。

3.4.2 膵液およびドレーン排液のアミラーゼ濃度

アミラーゼ(α -アミラーゼ)濃度は、サンプルを採血の生化学用採血管に注入し、検査室に送付し、血液検査の生化学検査と同様の方法で測定した⁵⁶。

3.5 可搬式小型蛍光測定器の検証・有用性の検討

浜松ホトニクス社による試作機である、可搬式小型蛍光測定器(以下、可搬式装置)を用いた。本試作機は、キモトリプシン濃度と蛍光増加速度が一次関数の関係があることを用いて、キモトリプシン蛍光活性を蛍光増加速度(傾き)で見えるものである。搬式装置は80x60x90mm と小型で、USB を介してパーソナルコンピュータに接続し、測定を行った。排液検体 20 μ L とキモトリプシンプローブ溶液 180 μ L を 200 μ L チューブに注入し、発光ダイオードで 480nm の波長の青色光で励起された蛍光を Si フォトダイオードで検出した(図6)。0-250 秒までの間に 1 秒あたり 20 データ (計 5000 データ)を計測し、近似一次直線を引いたその傾きを、キモトリプシン蛍光活性として算出した。マイクロプレートリーダーを用いた測定と比較し、装置は小型で、測定が簡易な特徴があるが、1 検体ずつしか測定できない欠点を有した。

本試作機では、キモトリプシン試薬や臨床検体を用いてマイクロプレートリーダーで測定した蛍光活性と同等の精度を有するかは未検証であった。まず、 α -キモトリプシン試薬(C4129; Sigma-Aldrich, Germany)を用い、様々な濃度に希釈した溶液を作成した。それらの蛍光活性を従来法のマイクロプレートリーダーと可搬式装置を用いて測定し、その精度を検証し

た。その次に、臨床検体を用いて蛍光活性を測定し、上述したマイクロプレートリーダーで測定したキモトリプシン蛍光活性と比較検討し、実用性を検証した。更に、試作機を用いて測定したキモトリプシン蛍光活性が、CR-POPF を予測することが可能かどうか、検証した。



図 6 可搬式装置の測定機序

80x60x90mm と小型で、USB を介してパーソナルコンピュータに接続し、測定を行った。排液検体 20 μ L とキモトリプシンプロブ溶液 180 μ L を 200 μ L チューブに注入し、発光ダイオードで 480nm の波長の青色光で励起された蛍光を Si フォトダイオードで検出した。

3.6 統計学的解析

患者の臨床情報及び、POPF 等合併症含む周術期データは prospective に保存された電子カルテより取り出した。POPF は ISGPF の定義に従って分類した¹⁷。当院では、血清アミラーゼ正常値上限は 132 U/L であるため、術後 3 日目以降にドレーン排液アミラーゼ値が、血清アミラーゼ正常値上限の 3 倍以上である、396 U/L を超える場合、POPF と診断した。術中に術者により膵実質の硬さを soft, hard に分類し⁵⁷、術者が記載した手術記録から soft/hard pancreas の判断を行った。連続変数は中央値(範囲)で示し、Wilcoxon rank sum test を用いて比較した。名義変数は Mann-Whitney *U* test あるいは χ^2 test を用いて比較した。対応する 2 値の比較に対しては、Wilcoxon signed rank test を用いた。多重検定は、Steel-Dwass test を用いた。キモトリプシン蛍光活性の増加率とアミラーゼ濃度の相関は、Spearman rank correlation test を用いて、相関係数(*R*_s)を求めた。P<0.05 を有意水準に設定した。CR-POPF を予測する因子として、既報では定まったカットオフ値の報告がないため、膵液中のキモトリプシン蛍光活性や、膵液アミラーゼ濃度、手術時間に対しては、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて最大の Area under curve (AUC) となる cut off 値を定めた。既報で CR-POPF の予測因子として報告される、BMI (kg/m²) ≥25²¹, main pancreatic duct index (CT 冠状断で、主膵管径を膵体部の短軸径で割ったもの) <0.2²⁸, 手術時出血量 ≥1000^{25,26}、術後 1 日目のドレーン排液中のアミラーゼ濃度 ≥5000 units/L^{3,31} を予測因子の候補に加え、多変量解析には、Logistic regression analysis を用い、単変量解析で P<0.1 の因子を多変量解析に組み入れた。

統計学的な計算には JMP software (Version 14; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)を用いた。

4. 結果

2018年9月から2019年12月までに当科で施行された連続的な膵頭十二指腸切除術52例より、膵液627検体とドレーン排液413検体の全1040検体を採取し(表2)、膵液およびドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度を測定した。18名(34.6%)で術前診断済の糖尿病に対し、インスリンを用いた血糖コントロールを行った(表3)。術中所見で、22名(42.3%)でhard pancreasだった。CR-POPFを18名(34.6%)に認め、全てGrade B POPFであった。16名は、POPFに関するドレナージ不良域が画像上認められたため、ドレーンの位置を、透視下で調整もしくはドレーン交換し、抗生剤を使用した。残りの2名は経皮ドレナージと抗生剤を必要とし、Grade Bと診断された。Clavien-Dindo grade⁵⁸ 3以上の重症合併症を11名(21.2%)に認めるも、術後90日死亡は認めなかった(表4)。

表 2. 術後病日と検体採取数

	術後 1 日目		術後 3 日目		術後 5 日目		術後 7 日目				術後 14 日目			
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	朝食後 1 時間	夕	夕食後 1 時間	朝	朝食後 1 時間	夕	夕食後 1 時間
腓液 (腓管チューブ)	48	49	51	50	51	50	51	36	50	35	48	32	43	32
排液 (腓上縁ドレーン)	50		50		37		21				1			
排液 (腓下縁ドレーン)	47		50		33		19				0			
排液 (Winslow 孔ドレーン)	49		35		17		3				1			
数字は検体数														

表 3. 患者背景

因子	合計 n=52
年齢, 歳	73 (34–85)
性別, 男性, n (%)	34 (65.4)
BMI, kg/m ²	23.0 (14.1–28.9)
糖尿病あり, n (%)	18 (34.6)
血清アルブミン, g/dL	3.9 (2.7–4.8)
疾患	
膵腺癌, n (%)	19 (36.5)
その他	
胆管癌 (%)	13 (25.0)
神経内分泌腫瘍, n (%)	7 (13.5)
IPMN, n (%)	5(9.6)
その他, n (%)	8 (15.4)
MPD index	0.19 (0.04–0.79)

連続データは中央値 (範囲)で表示.

BMI, Body mass index; IPMN, Intraductal papillary mucinous neoplasm (膵管内乳頭粘液腫瘍); MPD, main pancreatic duct (主膵管); AU, arbitrary units

表 4. 周術期情報

因子	合計 n=52
手術成績	
出血量, ml	440 (50–1690)
術中輸血, n (%)	2 (3.8)
手術時間, min	523 (322–920)
Hard pancreas, n (%)	22 (42.3)
膵空腸吻合, Kakita 法, n (%)	37 (71.2)
術後 1 日目の膵液	
膵液量, ml	27 (0-185)
アミラーゼ値, units/L	330000 (5–4012000)
キモトリプシン蛍光活性, AU/min	1.50 x 10 ⁶ (-4955–4.17 x 10 ⁶)
術後 3 日目の膵液	
膵液量, ml	80 (0-320)
アミラーゼ値, units/L	103580 (82–467800)
キモトリプシン蛍光活性, AU	3.16 x 10 ⁶ (-17846–6.68 x 10 ⁶)
術後 1 日目のドレーン排液	
膵上縁, 排液量, ml	45 (0-350)
膵上縁, アミラーゼ値, units/L	1532 (27-28857)
膵下縁, 排液量, ml	75 (0-350)
膵下縁, アミラーゼ値, units/L	1659 (23-30009)
Winslow 孔, 排液量, ml	118 (0-510)
Winslow 孔, アミラーゼ値, units/L	261 (25-8381)
術後 3 日目のドレーン排液	
膵上縁, 排液量, ml	25 (0-345)
膵上縁, アミラーゼ値, units/L	356 (6-15732)
膵下縁, 排液量, ml	22 (0-920)
膵下縁, アミラーゼ値, units/L	538 (12-11965)
Winslow 孔, 排液量, ml	70 (0-750)
Winslow 孔, アミラーゼ値, units/L	69 (11-1727)
食事開始時期 (POD)	4 (2-38)
術後合併症	
ドレーン培養陽性, n (%)	26 (50.0)

Grade B/C 膵液漏, n (%)	18 (34.6)
重症合併症 (Clavien-Dindo $\geq 3a$), n (%)	11 (21.2)
術後 90 日死亡, n (%)	0

連続データは中央値 (範囲)で表示.

BMI, Body mass index; IPMN, Intraductal papillary mucinous neoplasm (膵管内乳頭粘液腫瘍); MPD, main pancreatic duct (主膵管); AU, arbitrary units

表 5 患者背景と周術期情報を術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性で分類

因子	合計 n=52	術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性*		P
		高い (≥3.2 x 10 ⁶ AU/min) (n=24)	弱い (<3.2 x 10 ⁶ AU/min) (n=26)	
年齢, 歳	73 (34-85)	66 (34-85)	77 (54-84)	0.007
性別, 男性, n (%)	34 (65.4)	17 (70.8)	15 (57.7)	0.334
BMI, kg/m ²	23.0 (14.1-28.9)	23.5 (16.0-28.9)	22.8 (17.4-27.7)	0.472
糖尿病あり, n (%)	18 (34.6)	8 (33.3)	9 (34.6)	0.924
血清アルブミン, g/dL	3.9 (2.7-4.8)	4.0 (2.9-4.8)	3.9 (2.7-4.5)	0.198
疾患				0.301
膵腺癌, n (%)	19 (36.5)	5 (20.8)	12 (46.2)	
その他				
胆管癌 (%)	13 (25.0)	7 (29.2)	6 (23.1)	
神経内分泌腫瘍, n (%)	7 (13.5)	5 (20.8)	2 (7.7)	
IPMN, n (%)	5 (9.6)	2 (8.3)	3 (11.5)	
その他, n (%)	8 (15.4)	5 (20.8)	3 (11.5)	
MPD index	0.19 (0.04-0.79) [†]	0.13 (0.04-0.53)	0.26 (0.09-0.77)	0.001
手術成績				
出血量, ml	440 (50-1690)	535 (50-1610)	395 (90-1690)	0.087
術中輸血, n (%)	2 (3.8)	1 (4.2)	1 (3.9)	0.954
手術時間, min	523 (322-920)	574 (325-920)	486 (322-721)	0.051
Hard pancreas, n (%)	22 (42.3)	3 (12.5)	17 (65.4)	< 0.001
膵空腸吻合, Kakita 法, n (%)	37 (71.2)	18 (75.0)	19 (73.1)	0.877
術後 1 日目の膵液				
膵液量, ml	27 (0-185)	30 (10-185)	14 (0-80)	0.021
アミラーゼ値, units/L	330000 (5-4012000)	523000 (5-2458000)	107000 (5-4012000)	0.127
キモトリプシン蛍光活性, AU/min	1.50 x 10 ⁶ (-4955-4.17 x 10 ⁶)	2.20 x 10 ⁶ (3469-4.17 x 10 ⁶)	1.14 x 10 ⁶ (-4955-3.14 x 10 ⁶)	0.014
術後 3 日目の膵液				
膵液量, ml	80 (0-320)	115 (25-320)	55 (0-250)	< 0.001
アミラーゼ値, units/L	103580 (82-467800)	152350 (30400-349800)	75095 (82-467800)	0.025
キモトリプシン蛍光活性, AU	3.16 x 10 ⁶ (-17846-6.68 x 10 ⁶)	3.80 x 10 ⁶ (3.25 x 10 ⁶ -6.68 x 10 ⁶)	1.59 x 10 ⁶ (-17846-3.17 x 10 ⁶)	< 0.001
術後 1 日目のドレーン排液				

膵上縁, 排液量, ml	45 (0-350)	43 (0-350)	50 (0-200)	0.890
膵上縁, アミラーゼ値, units/L	1532 (27-28857)	2894 (136-28857)	710 (27-11107)	0.001
膵下縁, 排液量, ml	75 (0-350)	80 (0-350)	30 (0-270)	0.141
膵下縁, アミラーゼ値, units/L	1659 (23-30009)	3357 (118-30009)	409 (23-14245)	< 0.001
Winslow 孔, 排液量, ml	118 (0-510)	170 (25-510)	43 (0-440)	0.015
Winslow 孔, アミラーゼ値, units/L	261 (25-8381)	321 (64-5216)	172 (25-8381)	0.008
術後 3 日目のドレーン排液				
膵上縁, 排液量, ml	25 (0-345)	25 (0-345)	30 (0-250)	0.579
膵上縁, アミラーゼ値, units/L	356 (6-15732)	802 (29-15732)	115 (6-7611)	0.054
膵下縁, 排液量, ml	22 (0-920)	35 (0-920)	10 (0-450)	0.017
膵下縁, アミラーゼ値, units/L	538 (12-11965)	1169 (36-11965)	410 (12-7307)	0.167
Winslow 孔, 排液量, ml	70 (0-750)	93 (11-420)	60 (0-750)	0.221
Winslow 孔, アミラーゼ値, units/L	69 (11-1727)	88 (11-410)	56 (12-1727)	0.358
食事開始時期 (POD)	4 (2-38)	5 (2-21)	4 (2-38)	0.183
術後合併症				
ドレーン培養陽性, n (%)	26 (50.0)	14 (58.3)	12 (46.2)	0.389
Grade B/C 膵液漏, n (%)	18 (34.6)	14 (58.3)	4 (15.4)	0.002
重症合併症 (Clavien-Dindo $\geq 3a$), n (%)	11 (21.2)	6 (25.0)	5 (19.2)	0.623
術後 90 日死亡, n (%)	0	0	0	

連続データは中央値 (範囲)で表示.

*術後 3 日目の膵液は排液が少なく、採取できなかった 2 名を除く、50 名の患者から採取された。

†術後 3 日目の膵液採取が出来なかった 2 名の MPD index は 0.58, 0.79 であり、キモトリプシンの蛍光活性で分類した右側の 2 群には含まれていない。

BMI, Body mass index; IPMN, Intraductal papillary mucinous neoplasm (膵管内乳頭粘液腫瘍); MPD, main pancreatic duct (主膵管); AU, arbitrary units

4.1 キモトリプシンの測定意義の検討

4.1.1 膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の術後推移、日内変動、摂食の影響

膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の術後病日の推移を図7に示した。

膵液中のキモトリプシン蛍光活性は、術後3日目と比較すると、術後1日目は有意に低値($P=0.002$)で術後14日目は有意に高値($P=0.036$)であった。術後5、7日後の活性は術後3日目と著変なく、全体的に見ると、術後3日目以降に活性が安定する傾向にあった。

膵液中のアミラーゼ濃度は、術後全ての病日において、有意差は認めなかったが、全体的に見ると、術後3日目以降にアミラーゼ濃度が安定する傾向を認めた。

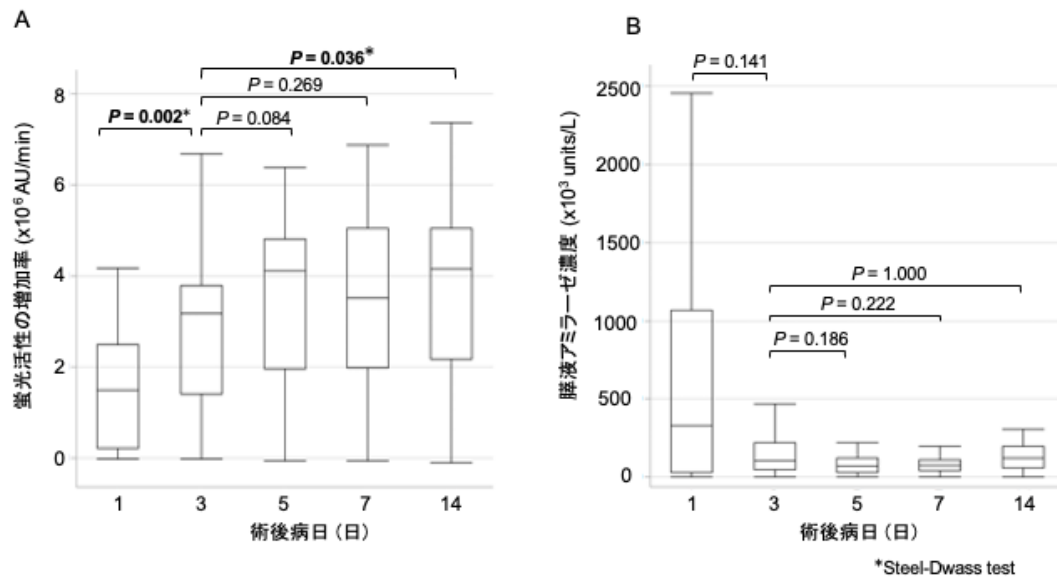


図7 術後病日における唾液中の(A)キモトリプシン蛍光活性、(B)アミラーゼ濃度の推移

(A)術後1日目(n=44、84.6%)、3日目(n=50、96.2%)、5日目(n=49、94.2%)、7日目(n=51、98.1%)、14日目(n=47、90.4%)における唾液中のキモトリプシン蛍光活性は術後3日目以降に安定した(術後1日目 vs. 術後3日目, $P=0.002$)。

(B)術後1日目(n=45、86.5%)、3日目(n=51、98.1%)、5日目(n=50、96.2%)、7日目(n=51、98.1%)、14日目(n=48、92.3%)における唾液中のアミラーゼ濃度は術後3日目以降に安定する傾向にあるが、統計学的有意差は認めなかった(術後1日目 vs. 術後3日目, $P=0.141$)。

膵液中のキモトリプシン蛍光強度とアミラーゼ値の術後病日ごとの推移を「患者ごと」に示したものが図 8 である。対応する 2 値の比較では、キモトリプシンの蛍光活性は術後 3 日と比較し、全ての術後病日で値に有意差を認めた(術後 3 日目 vs. 術後 1, 5, 7, 14 日目, それぞれ $P<0.001$)。アミラーゼ濃度も術後 3 日目 vs. 術後 14 日目以外は、値に有意差を認めた(術後 3 日目 vs. 術後 1, 5, 7 日目, それぞれ $P<0.001$)。

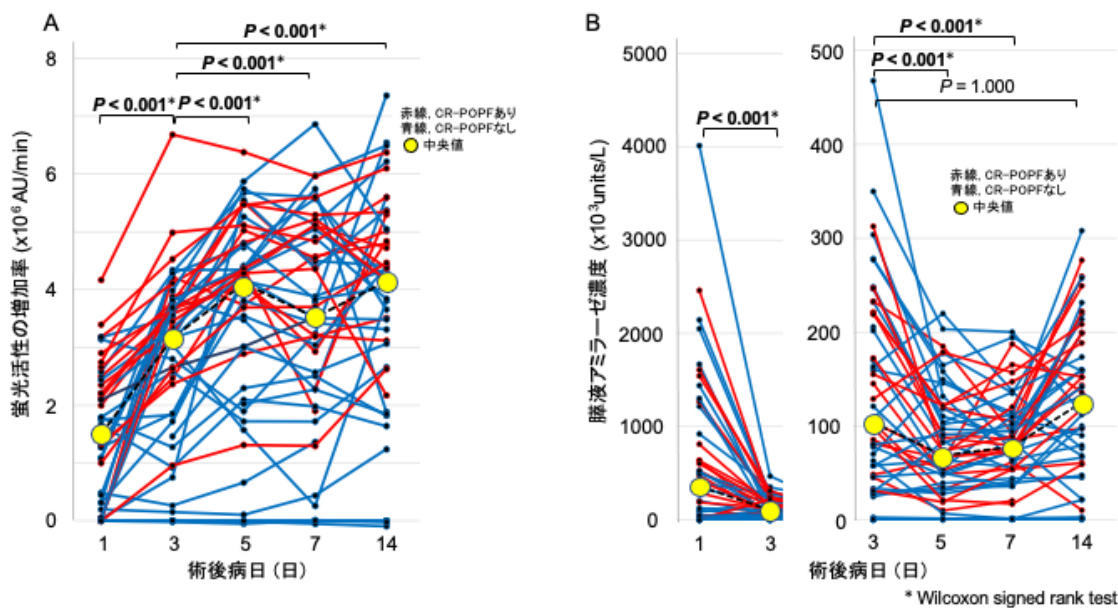


図 8 術後病日における膵液中の(A)キモトリプシン蛍光活性、(B)アミラーゼ濃度の患者ごとの推移

(A)術後 1、3、5、7、14 日目の膵液採取が全て可能だった患者(n=41)のうち、蛍光活性が測定可能であった患者(n=37)の膵液キモトリプシン蛍光活性は、対応する 2 値の比較では、術後 3 日と比較し、全ての術後病日で有意差を認めた(術後 3 日目 vs. 術後 1, 5, 7, 14 日目, それぞれ $P < 0.001$)。

(B) 術後 1、3、5、7、14 日目の膵液採取が全て可能だった患者(n=41)の膵液中のアミラーゼ濃度は術後 3 日目 vs. 術後 14 日目以外は、値に有意差を認めた(術後 3 日目 vs. 術後 1, 5, 7 日目, それぞれ $P < 0.001$)。

CR-POPF を認めた患者・認めなかった患者を、それぞれ赤線・青線で示した。それぞれの術後病日の中央値は黄丸で示した。

膵液中のキモトリプシン及びアミラーゼ分泌の日内変動及び食事の影響に関して、キモトリプシン蛍光強度は術後 1,3,7 日目に朝の方が低い以外に、朝夕や食事前後の変動は認めなかった(図 9,10)。

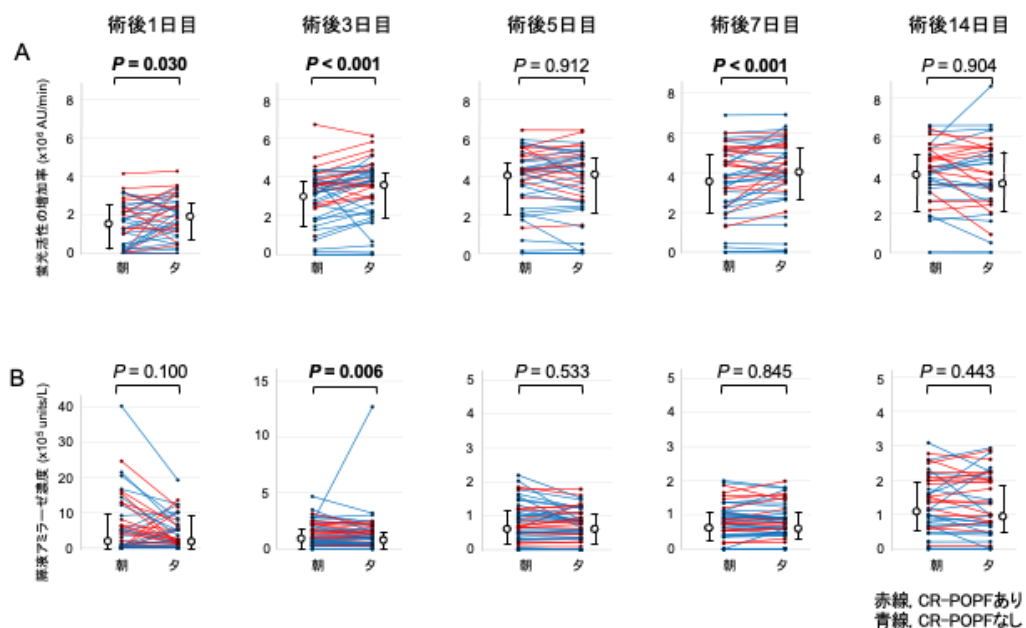


図9 膵液中のキモトリプシン蛍光活性と膵液アミラーゼ濃度の日内変動

キモトリプシン蛍光活性は術後1日目(n=43、82.7%)、3日目(n=49、94.2%)、5日目(n=49、94.2%)、7日目(n=50、96.2%)、14日目(n=39、75.0%)で朝夕ともに採取され、測定可能だった。キモトリプシン蛍光活性は術後1,3,7日目に朝の方が低い以外に、朝夕や食事前後の変動は認めなかった。膵液アミラーゼ濃度は術後1日目(n=45、86.5%)、3日目(n=50、96.2%)、5日目(n=49、94.2%)、7日目(n=50、96.2%)、14日目(n=40、76.9%)で朝夕ともに採取され、測定可能だった。膵液アミラーゼ濃度は術後3日目のみ有意に夕方に低値となった。CR-POPFを認めた患者・認めなかった患者を、それぞれ赤線・青線で示した。白丸とエラーバーは中央値と四分位範囲を示す。

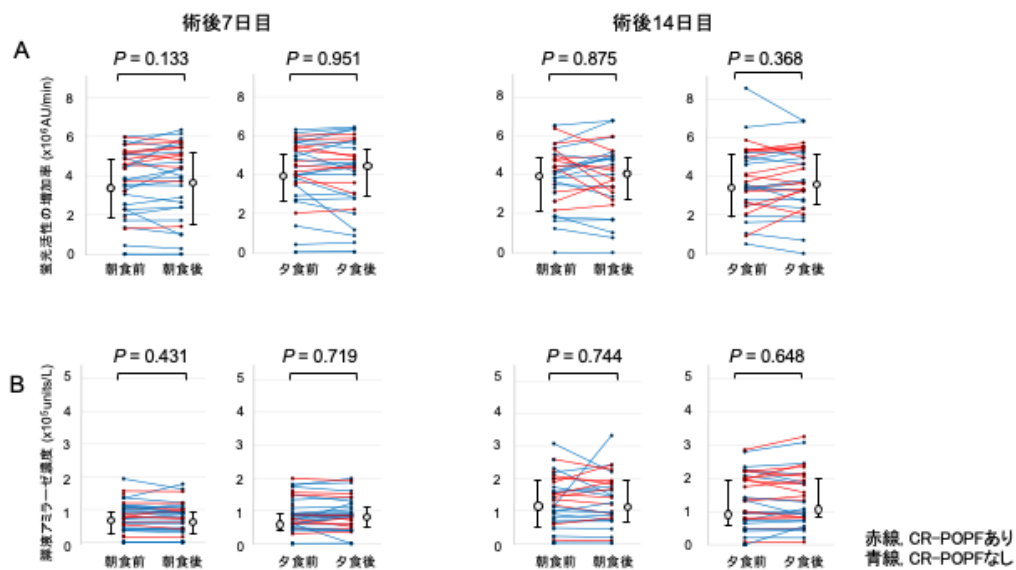


図 10 膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の、摂食から受ける影響

キモトリプシン蛍光活性は、術後 7 日目(朝 n=36、69.2%、夕 n=33、63.5%)、14 日目(朝 n=29、55.8%、夕 n=32、61.5%)に食前後に採取され、測定可能だった。膵液アミラーゼ濃度値は、術後 7 日目(朝 n=37、71.2%、夕 n=34、65.4%)、14 日目(朝 n=29、55.8%、夕 n=32、61.5%)に食前後に採取され、測定可能だった。アミラーゼ値もキモトリプシン蛍光活性も、食事の影響は受けなかった。CR-POPF を認めた患者・認めなかった患者を、それぞれ赤線・青線で示した。白丸とエラーバーは中央値と四分位範囲を示す。

4.1.2 腭液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の相関

腭液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度には、術後 1 日目($R_s=0.607$, $P=0.014$)、3 日目($R_s=0.491$, $P=0.003$)、5 日目($R_s=0.524$, $P<0.001$)、7 日目($R_s=0.608$, $P<0.001$)、14 日目($R_s=0.540$, $P<0.001$)の全ての術後病日において、中程度の正の相関が認められた(図 11)。

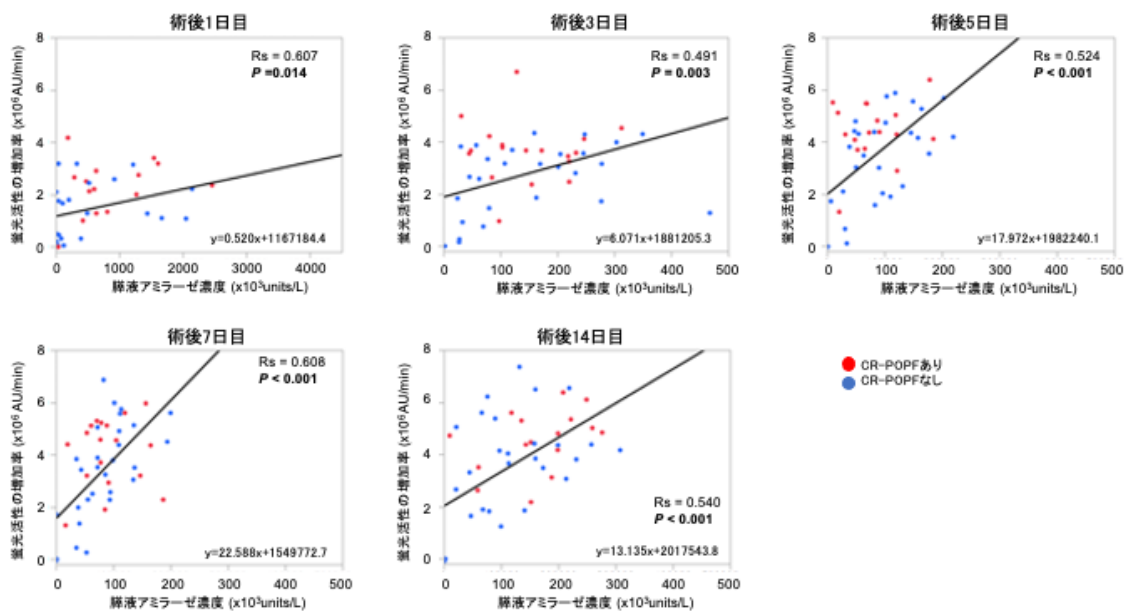


図 11 膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の相関

術後 1 日目(n=44、84.6%)、3 日目(n=50、96.2%)、5 日目(n=49、94.2%)、7 日目(n=51、98.1%)、14 日目(n=47、90.4%)において、膵液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度は正の相関を示した。CR-POPF を認めた患者・認めなかった患者を、それぞれ赤丸・青丸で示した。

4.1.3 ドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の相関

患者 52 名の Winslow 孔ドレーン, 臍上縁ドレーン, 臍下縁ドレーンの術後病日における排液中のアミラーゼ濃度の患者ごとの推移を図 12 に示した。

ドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性(n=402)を測定したが、蛍光活性は低値で排液アミラーゼとの相関も認められず、腹水中のキモトリプシン蛍光活性は本研究の測定法では、既報同様⁴⁸に計測出来なかった。キモトリプシンプローベは、臍液特異的なプローベと思われた(図 13)。

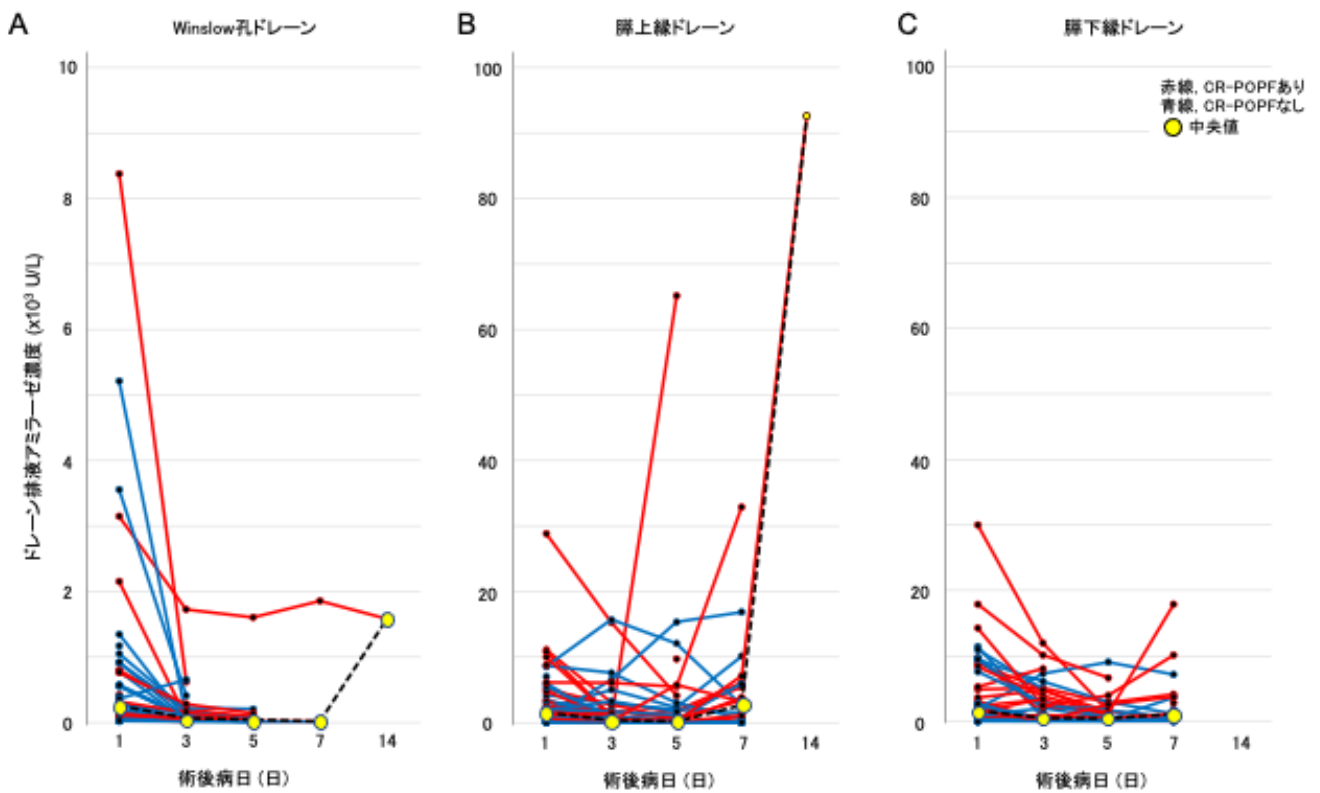


図 12 全患者(n=52)の、術後病日における(A)Winslow 孔(B)臍上縁(C)臍下縁ドレーン排液中のアミラーゼ濃度の患者ごとの推移

術後病日が経過するにつれ、ドレーンは抜去もしくはカットされ、排液アミラーゼ濃度は測定出来なくなるため、折れ線は途切れた。

CR-POPF を認めた患者・認めなかった患者を、それぞれ赤線・青線で示した。それぞれの術後病日の中央値は黄丸で示した。

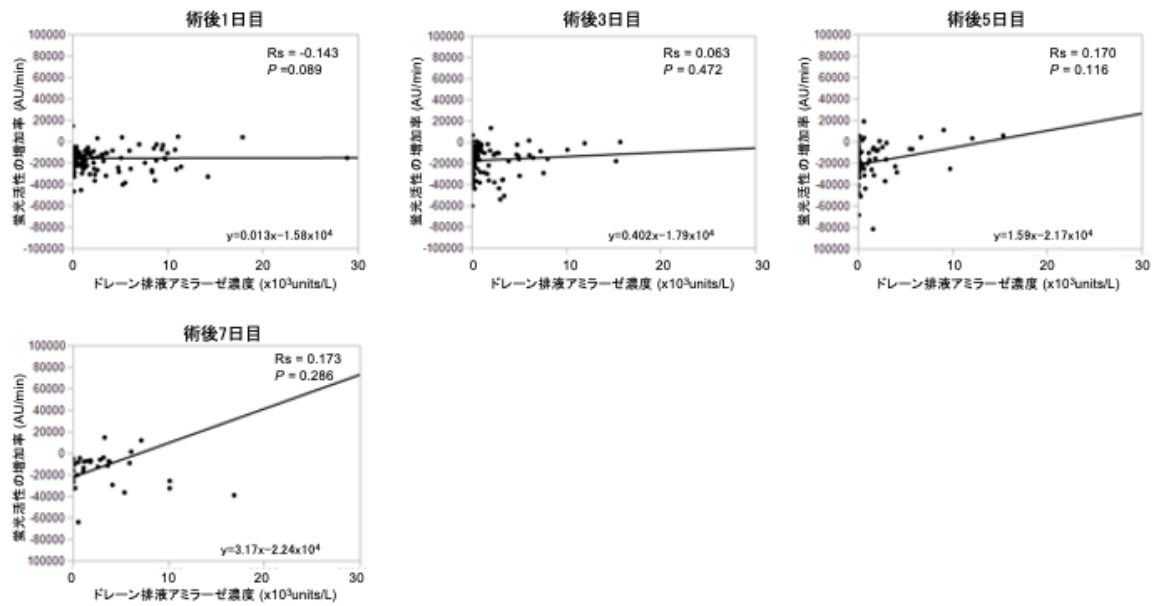


図 13 ドレイン排液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度の相関

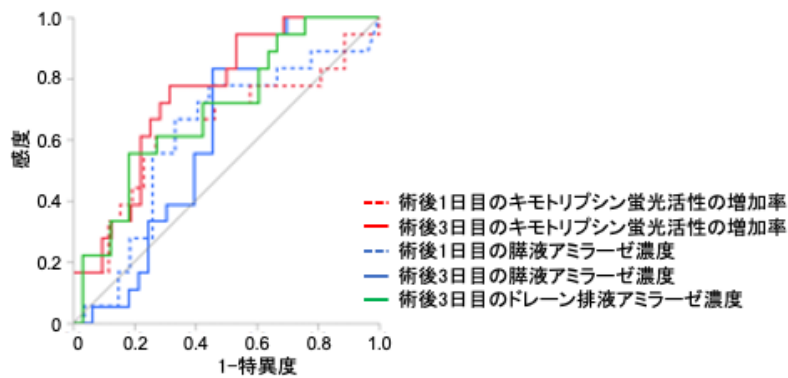
術後 1 日目(n=142)、3 日目(n=133)、5 日目(n=87)、7 日目(n=40)の全ての術後病日において、ドレイン排液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度は相関を認めなかった。術後 14 日目は採取・測定可能なドレイン排液は 2 検体のみだった。

4.1.4 臍液中およびドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性、アミラーゼ濃度と CR-POPF との関連

術後早期に CR-POPF 予測が出来れば、腹腔ドレーンの早期抜去が可能となるため、術後 1-7 日目の臍液中及びドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度と CR-POPF の関連を検証した。

術後 1 日目あるいは 3 日目の臍液中のキモトリプシン蛍光活性の増加率あるいはアミラーゼ濃度、術後 3 日目のドレーン排液中のアミラーゼ濃度、と CR-POPF の関連をそれぞれ ROC 曲線に描き、比較したところ、術後 3 日目の臍液中のキモトリプシン蛍光活性の増加率が AUC 0.752 と最も高くなり、cut off 値を 3.2×10^6 AU/min と設定すると、感度 77.8%、特異度 68.8%となった(図 14)。

術後 5, 7 日目の臍液アミラーゼ濃度・キモトリプシン蛍光活性と CR-POPF の ROC 解析を行うも、術後 3 日目の臍液中のキモトリプシン蛍光活性以上に有用な指標とはならなかった。(図 15)



CR-POPFの予測因子	AUC (95% CI)	SE	P-value
術後3日目のキモトリプシン蛍光活性の増加率	0.7517 (0.5938-0.8625)	0.0693	< 0.001
術後1日目のキモトリプシン蛍光活性の増加率	0.6410 (0.4509-0.7952)	0.0912	0.078
術後1日目の膵液アミラーゼ濃度	0.6152 (0.4321-0.7706)	0.0897	0.633
術後3日目の膵液アミラーゼ濃度	0.6145 (0.4545-0.7530)	0.0784	0.485
術後3日目のドレーン排液アミラーゼ濃度	0.6953 (0.5283-0.8230)	0.0769	0.053

図 14 CR-POPF の予測因子

ROC 曲線を用いた解析では、術後 3 日目のキモトリプシン蛍光活性の増加率で AUC が最大となり、cut off 値を 3.2×10^6 AU/min とした場合、感度 77.8%、特異度 68.8%であった。

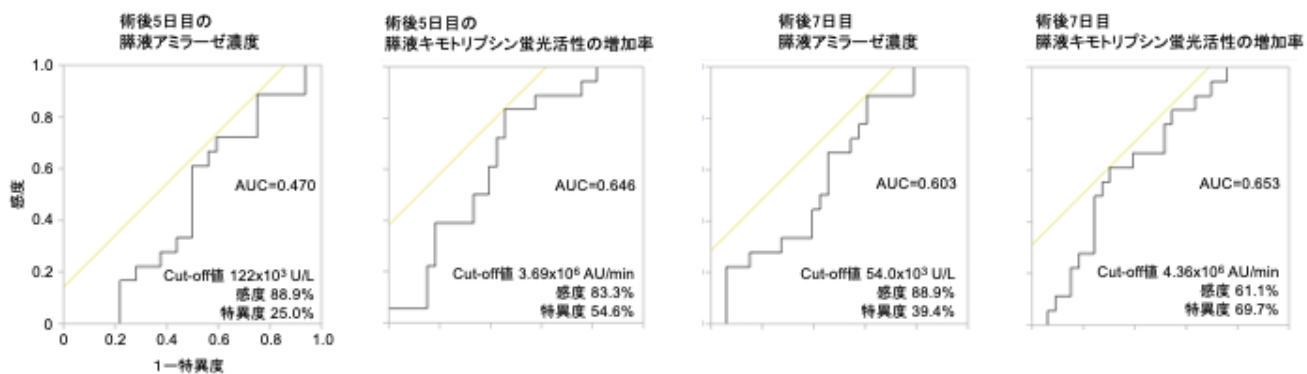


図 15 術後 5、7 日目の膵液アミラーゼ濃度とキモトリプシン蛍光活性と CR-POPF の ROC 解析

術後 3 日目の膵液キモトリプシン蛍光活性以上に CR-POPF 予測に有用な指標とはならなかった。

ROC 解析で求めた、術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性の cut off 値を用いて、患者を膵液中のキモトリプシン蛍光活性の強さで 2 群に分けたところ、膵液中のキモトリプシン蛍光活性が強い群($\geq 3.2 \times 10^6$ AU/min)は、若年($P=0.007$)、MPD index が低い($P=0.001$)、soft pancreas が多い($P<0.001$)、CR-POPF が多い($P=0.002$)傾向にあった(表 5)。

術後病日においてほぼ全患者の膵液採取が可能であった(表 2)が、術後病日で完全に膵液キモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度が測定出来たものは 37 名(71.1%)だった(図 8)。CR-POPF の予測にはこれらの推移より各病日におけるそれぞれ膵液キモトリプシン蛍光活性とアミラーゼ濃度を用いた方が有用であるため、全患者を解析対象とした。

既報の膵液漏予測因子も含んだ、多変量解析を施行した。膵液アミラーゼ濃度、膵液キモトリプシン蛍光活性、手術時間のカットオフ値は、それぞれ CR-POPF の発生有無と ROC 曲線から最大 AUC 値となる、術後 3 日目の膵液アミラーゼ値 80000 units/L、術後 3 日目の膵液キモトリプシン蛍光活性 3.2×10^6 AU/min、手術時間 420 min と定めた。結果、術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性が強い($\geq 3.2 \times 10^6$ AU/min) [Odds ratio (OR) 9.293 (95% confidence interval 1.059-81.540), $P=0.044$]、男性 [OR 15.824 (95% confidence interval 1.031-242.759), $P=0.048$]の 2 因子が独立した CR-POPF の予測因子と同定された (表 6)。

表 6. Grade B/C 膵液漏予測因子に対する単多変量解析

予測因子	n	単変量解析		多変量解析	
		P	P	オッズ比	95% 信頼区間
性別, 男性	34	0.001	0.048	15.824	1.031-242.759
年齢 ≥65	35	0.242			
BMI ≥25 kg/m ²	16	0.029	0.910	1.146	0.109-12.053
糖尿病	18	0.090	0.403	2.637	0.272-25.600
血清アルブミン >3.8 g/dL	36	0.734			
手術出血量 ≥1000 ml	6	0.079	0.962	1.068	0.073-15.607
輸血	2	0.641			
手術時間 ≥420 min	42	0.011	0.994	-	-
術後 3 日目の膵液アミラーゼ値 ≥80000 U/L	31	0.015	0.341	2.581	0.366-18.191
術後 3 日目の膵液キモトリプシン活性が強い (蛍光強度増加率 ≥3.2 x 10 ⁶ AU/min)	24	0.002	0.044	9.293	1.059-81.540
術後 1 日目のドレーン排液アミラーゼ値 ≥5000 U/L	17	0.011	0.256	3.409	0.411-28.297
術後 3 日目のドレーン排液アミラーゼ値 ≥396 U/L	34	0.172			
MPD index ≥0.2	19	0.34			
膵癌	19	0.119			

BMI, Body mass index; AU, arbitrary units; MPD, main pancreatic duct (主膵管)

CR-POPF 予測に関する、感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、術後 3 日目のドレーン排液のアミラーゼ濃度が 3 倍(396 units/L)より大きい場合、77.8%、41.2%、41.2%、77.8% となり、術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性が強い($\geq 3.2 \times 10^6$ AU/min)場合、77.8%、68.8%、58.3%、84.6%となるが、両方を合わせることで、94.4%、38.2%、44.7%、92.9%となった。ドレーン排液アミラーゼ濃度が血清アミラーゼ値正常上限 3 倍(396 units/L)未満の場合(左上方領域の集団)、18 名の内、4 名(22.2%)に CR-POPF を認めた。その 4 名の内、3 名(75.0%)は膵液中のキモトリプシン蛍光活性が高値だった。両方に当てはまらない 14 名(左下方領域の集団)のうち、1 名(7.1%)でのみ、CR-POPF を認めた(図 16)。

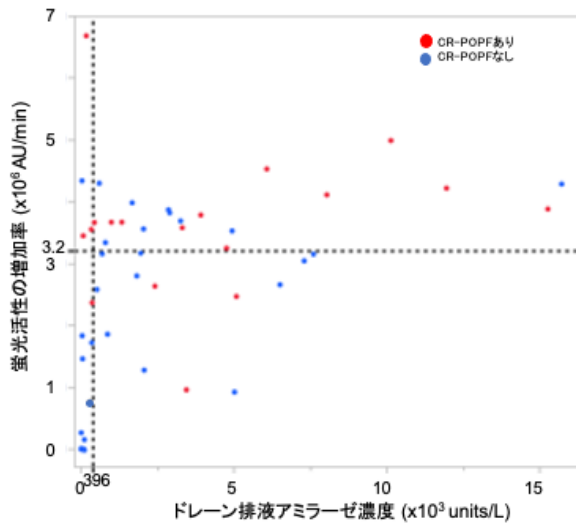


図 16 術後 3 日目の腓液中のキモトリプシン蛍光活性とドレーン排液アミラーゼ濃度の相関

術後 3 日目のドレーン排液のアミラーゼ濃度が 3 倍(396 units/L)より大きい場合、CR-POPF 予測に関する、感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、77.8%、41.2%、41.2%、77.8% となり、術後 3 日目の腓液中のキモトリプシン蛍光活性が強い($\geq 3.2 \times 10^6$ AU/min)場合、77.8%、68.8%、58.3%、84.6%となるが、両方を合わせることで、94.4%、38.2%、44.7%、92.9%となった。CR-POPF を認めた患者・認めなかった患者を、それぞれ赤丸・青丸で示した。

4.2 可搬式小型蛍光測定器の検証

次に、マイクロプレートリーダーより迅速にキモトリプシン蛍光活性が測定可能な可搬式小型蛍光測定器の有用性を検証した。

様々な濃度に希釈した α -キモトリプシンの蛍光活性を、マイクロプレートリーダー及び可搬式装置それぞれで測定し、相関を検証したところ、強い正の相関が得られた($R_s=0.979$, $P<0.001$)(図 17)。

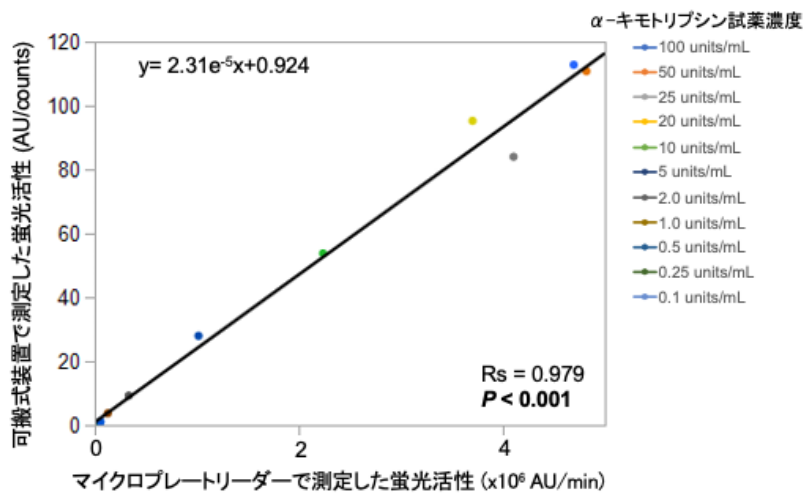


図 17 α -キモトリプシン試薬を用いて、それぞれ可搬式装置とマイクロプレートリーダーで測定した蛍光強度の相関
両者間には強い正の相関を認めた($R_s=0.979$, $P<0.001$)

次に、術後患者からの膵液中のキモトリプシン蛍光活性に関して、従来法のマイクロプレートリーダーで求めた値と、迅速測定器で求めた値でも正の相関($R_s=0.777, P<0.001$)を認めたが、蛍光強度が強くなるにつれて、相関のばらつきが生じた(図 18)。

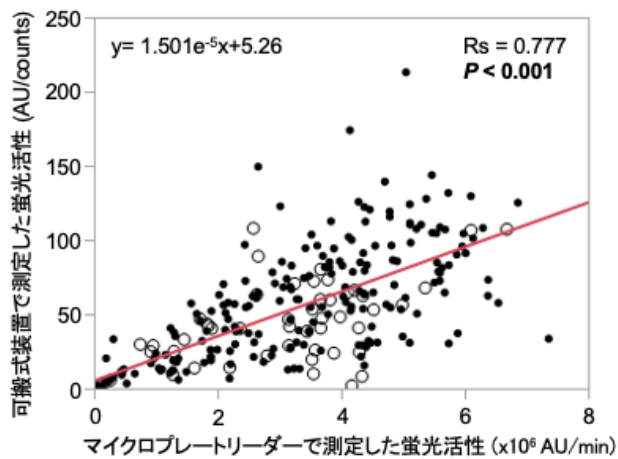


図 18 腭液検体を用いて、それぞれ可搬式装置とマイクロプレートリーダーで測定した蛍光活性の相関

測定可能だった腭液検体(n=290)で、両者間には強い正の相関を認めた($R_s=0.777$, $P<0.001$)。白丸は術後 3 日目の検体を用いた測定結果を示す。

可搬式装置で求めた術後 3 日目の腭液キモトリプシン蛍光活性を用いて、CR-POPF を予測可能か ROC 解析で検証したところ、Cut-off 値を 53 AU/counts と設定した場合、感度 58.8%、特異度 85.7%であった(図 19)。

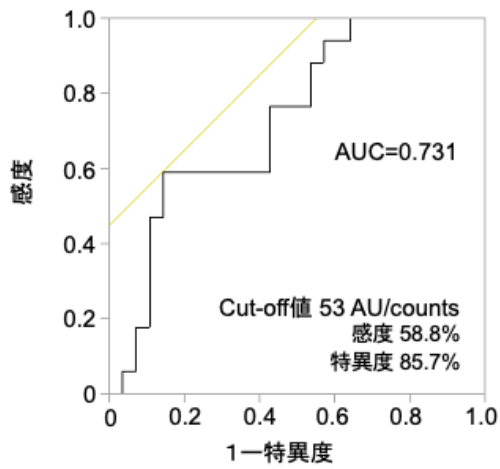


図 19 術後 3 日目の腭液キモトリプシン蛍光活性と CR-POPF の関連

術後 3 日目の腭液キモトリプシン蛍光活性が可搬式装置で測定可能だった患者(n=45, 86.5%)での ROC 解析では、cut off 値を 53 AU/counts としたところ、感度 58.8%、特異度 85.7%となった。

5. 考察

術後早期に CR-POPF 予測が出来れば、腹腔ドレーンの早期抜去が可能となる。本研究では術後 1-7 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性・アミラーゼ濃度と CR-POPF の関連を検証したところ、術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性が最も CR-POPF を予測する上で有用な指標だと判明した。膵頭十二指腸切除後の膵液中のキモトリプシン蛍光活性は術後 3 日以降に安定し、術後 3 日目のキモトリプシン蛍光活性の増加率は、従来報告されてきたドレーン排液アミラーゼ濃度を指標とする因子以上に CR-POPF の予測に有用である可能性が示唆された。この結果は、早期ドレーン抜去^{3,31,36}含む適切な術後ドレーン管理をする上で有用となる。則ち、術後 3 日目の膵液中のキモトリプシン蛍光活性が 3.2×10^6 AU/min 以下、且つドレーン排液アミラーゼ濃度が低値の場合、CR-POPF を呈す可能性が低いため、ドレーン早期抜去が検討できる。更に、キモトリプシン蛍光活性を測定する可搬式装置が有用となる可能性が示唆された。

ドレーン排液のアミラーゼ濃度は POPF の診断及び、その重症化の指標として頻用されている^{17,59}。その測定は、通常の採血検査と同様に生化学検査の一項目として検査室で測定されるが³¹、検査結果が迅速に得られない事と、感染物を院内に広げる可能性など、潜在的な問題が挙げられる。一方、キモトリプシンプローベでの蛍光活性は、酵素活性を迅速に測定できる事、蛍光測定ではアミラーゼ濃度測定で用いる吸光度を利用した比色法よりも、血液などの不純物による色の影響を受けにくい利点がある。更に、無菌である血液

検体と同時に扱う事がないため、院内感染制御の観点からも利点があると考えます。これら
キモトリプシン蛍光測定とアミラーゼ濃度測定方法の比較を表7でまとめた。

表 7 検体に対する 2 つの検査手法の比較

	アミラーゼ濃度	キモトリプシン活性
検査料	○ (安価)	△ (蛍光基質が必要)
侵襲性	○ (排液採取のみ)	○ (排液採取のみ)
手法が適応できない症例	△ (膵管チューブ非留置症例)	△ (膵管チューブ非留置症例)
所要時間	△ (2-4 時間)	○ (5 分)
計算の複雑さ	○ (血液生化学装置)	△ (蛍光活性値から手動で計算*)
*可搬式小型装置を用いた場合は自動計算		

膵頭十二指腸切除のドレーン早期抜去の基準として、現在最も良く提唱されているものに術後1日目のドレーン排液アミラーゼ濃度が5000 units/L以下が挙げられる。この基準を用いてドレーン早期抜去を行ったところ、膵液漏は26.3%から1.8%、術後合併症は61.4%から38.5%まで改善したと報告される³¹。術後1日目のドレーン排液アミラーゼ濃度と膵液漏の関係に関するReviewでは、5000 units/Lは膵液漏予測に対し、特異度は91%と、他のアミラーゼ濃度と比較して高く、ドレーン管理には有用とされる。一方、術後1日目のドレーン排液アミラーゼ濃度が5000 units/L以下であっても、術後3日目までに外科医の観点から抜去せずに管理した場合、38.2%にCR-POPFが生じた報告もある³。本研究では、術後3日目の膵液中のキモトリプシンの蛍光活性は、従来からのドレーン排液アミラーゼ濃度を基準とした指標と、少なくとも同等の精度でCR-POPFが予測できた。これら両者を併用する事で偽陰性を減らせる可能性がある。特に、術後3日目の膵下縁ドレーン排液アミラーゼ濃度は各ドレーンの中で、最もCR-POPFに関連すると考えられるため、その値に留意すべきと考える。

本研究では、膵液中のキモトリプシン蛍光活性は測定可能だったが、ドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性の既報⁴⁸同様測定は出来なかった。原因として、腹水中にはキモトリプシン活性がないか、キモトリプシンプローブが腹水中では有用でなかった可能性を考える。我々と同様に、膵切除後のドレーン排液中のキモトリプシン活性測定を試みたWusterらの報告では、我々と異なる蛍光基質を用いているが、ドレーン排液中のキモトリプシン活性は測定が困難だった。ドレーン排液中にキモトリプシン活性の阻害因子がある

かは不明だが、同じく蛋白分解酵素であるトリプシンには膵液・血清中にトリプシン阻害因子があることを考えると^{60,61}、腹水中にキモトリプシン活性阻害因子があり、活性化されていない可能性は考えられる。マウスを用いた膵液漏モデルでは、組織障害の病理所見を認めなかったという報告もあり⁶²、蛋白分解酵素が腹水中では活性化されないことが原因であるかもしれない。キモトリプシン定量測定する方法は、研究的方法⁶³を除き、標準化されたものはないため、活性化されていない場合に腹水中にその存在を示す手法がない。その他の膵酵素であるトリプシン、リパーゼはPOPFと関連するとする報告もあり^{33,64}、腹水中のこれらの酵素濃度・活性を測定し、キモトリプシン活性との相関を見ることで、腹水中のキモトリプシンの状態が把握可能かもしれない。

本研究では、術後3日目の膵液キモトリプシン蛍光活性が高いことに加えて、男性であることもCR-POPFの予測因子と判明した。既報でも、膵液漏及びCR-POPFの予測因子として、多変量解析で「男性」が報告されている¹⁸⁻²⁰。理由としては、男性と女性は腹腔内の脂肪の分布が異なり⁶⁵、男性の方が膵臓が脂肪化することで膵液漏発生に関連するとの報告や²²、内臓脂肪が多いことで、手術難易度は上がり、その他の膵液漏の予測因子と報告される、手術時間増加^{25,26}にも寄与すると考えられる。

可搬式装置は、キモトリプシン試薬ではマイクロプレートリーダーと同等の測定の精度を認めるものの、生体からの検体を用いると、強い相関はあるものの、蛍光強度が大きくなるにつれ、相関のばらつきが大きくなった。試薬での実験でも、キモトリプシン蛍光活性の増加率がある濃度を超えるとプラトーに達することから、キモトリプシンプローブが

飽和してしまったため、蛍光強度が高くなると測定の精度が下がること、また生体からの検体に含まれるその他の酵素や血球成分などが相関のばらつきの原因として考えられる。

しかし、本研究の結果から、術後3日目のキモトリプシン蛍光活性の増加率の cut off 値が 3.2×10^6 AU/min であることを考慮すると、高い蛍光強度での精度より、 3.2×10^6 AU/min 以下での蛍光強度の精度がドレーン抜去可否の判断を下す上では重要となる。また、検体採取の方法や、測定までの時間で膵酵素が多少なり失活していた可能性も測定精度の低下として考えられる。今後は測定器の検出精度を検証、向上させたのちに、その他の術式を加えた膵切除術を対象に、（凍結せず）実際に患者ベッドサイドで膵酵素活性を評価して CR-POPF の予測能を評価する臨床試験を計画している。

本研究の限界として、膵頭十二指腸切除全例に膵管チューブを入れない施設や、留置しても内外瘻でなく、短くカットしたチューブを完全内瘻チューブとするロストステントとする施設もあり、必ずしも術後3日目の膵液キモトリプシン蛍光活性が評価出来ない事が考えられる^{66,67}。しかし、膵管チューブを留置する利点は、主膵管径が小さく、膵実質が柔らかい(soft pancreas)の患者の POPF 発生を防ぐことであるため^{54,55}、膵管チューブを留置しなかった患者は CR-POPF の可能性が低いかもしれない。それゆえ、キモトリプシン蛍光活性を測定し、CR-POPF を予測する意義がそもそも乏しいと考える。また、本技術では微量の膵液でキモトリプシンの蛍光活性が測定可能なため、術後のみならず、術中に CR-POPF のリスク評価が出来る可能性がある。更に、術中に採取した膵液でアミラーゼ濃度及びキモトリプシン蛍光活性を測定することで、術後1日目から3日目の膵液アミラーゼ

濃度とキモトリプシン蛍光活性の推移が乖離したことが、術後特有の現象か否かを追求することにつながる可能性がある。本研究では、膵液中のキモトリプシン活性が強いことが、CR-POPF の発生リスクであることは示せたが、腹腔内の臓器に組織障害を起し、CR-POPF を直接起こしたかどうかは明らかに出来ていない。マウスを用いた膵液漏モデルでは、組織障害の病理所見を認めなかったという報告もあり⁶²、蛋白分解酵素が直接組織障害を起すかどうか検証が必要となる。更に、残膵膵液中のキモトリプシン蛍光活性が残膵の外分泌機能の指標となるかどうか、検証が必要である。本研究にて、キモトリプシン蛍光活性が CR-POPF の予測に有用であることをふまえると、ドレーン排液中のキモトリプシン蛍光活性が測定出来れば、CR-POPF の予測が可能となることも考えられる。しかし、現行の測定系では、蛋白あるいは酵素活性阻害性物質が混入しているためか、腹水中のキモトリプシン活性を正確に評価することができなかった^{60,61}。現在、これらの腹水併存因子を排除してキモトリプシン活性を評価できる測定系を検討中である。この技術を用いれば、膵液外瘻でない症例でも、腹水中のキモトリプシン活性を測定することで従来法と同等かそれ以上の精度で CR-POPF を迅速に評価できる可能性がある。

キモトリプシンプローブを用いた蛍光測定で膵液中のキモトリプシン活性を測定することにより、膵液漏が関連する重症合併症の発生リスクを患者のベッドサイドで正確に予測できる可能性が示された。今後、可搬式小型蛍光測定器の精度を改良し、対象術式を拡大して本技術の臨床応用の可能性を探求したい。

6. 引用文献

1. Hasegawa H, Takahashi A, Kakeji Y, Ueno H, Eguchi S, Endo I, Sasaki A, Takiguchi S, Takeuchi H, Hashimoto M, Horiguchi A, Masaki T, Marubashi S, Yoshida K, Konno H, Gotoh M, Miyata H, Seto Y. Surgical outcomes of gastroenterological surgery in Japan: Report of the National Clinical Database 2011-2017. *Ann Gastroenterol Surg.* 3: 426-450, 2019.
2. Kimura W, Miyata H, Gotoh M, Hirai I, Kenjo A, Kitagawa Y, Shimada M, Baba H, Tomita N, Nakagoe T, Sugihara K, Mori M. A pancreaticoduodenectomy risk model derived from 8575 cases from a national single-race population (Japanese) using a web-based data entry system: the 30-day and in-hospital mortality rates for pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg.* 259: 773-780, 2014.
3. McMillan MT, Malleo G, Bassi C, Allegrini V, Casetti L, Drebin JA, Esposito A, Landoni L, Lee MK, Pulvirenti A, Roses RE, Salvia R, Vollmer CM, Jr. Multicenter, Prospective Trial of Selective Drain Management for Pancreatoduodenectomy Using Risk Stratification. *Ann Surg.* 265: 1209-1218, 2017.
4. Maggino L, Malleo G, Bassi C, Allegrini V, McMillan MT, Borin A, Chen B, Drebin JA, Ecker BL, Fraker DL, Lee MK, Paiella S, Roses RE, Salvia R, Vollmer CM, Jr. Decoding Grade B Pancreatic Fistula: A Clinical and Economical Analysis and Subclassification Proposal. *Ann Surg.* 269: 1146-1153, 2019.
5. Panni RZ, Panni UY, Liu J, Williams GA, Fields RC, Sanford DE, Hawkins WG, Hammill CW. Re-defining a high volume center for pancreaticoduodenectomy. *HPB (Oxford).* 23: 733-738, 2021.
6. Crist DW, Sitzmann JV, Cameron JL. Improved hospital morbidity, mortality, and survival after the Whipple procedure. *Ann Surg.* 206: 358-365, 1987.
7. Grace PA, Pitt HA, Tompkins RK, DenBesten L, Longmire WP, Jr. Decreased morbidity and mortality after pancreatoduodenectomy. *Am J Surg.* 151: 141-149, 1986.
8. Nassour I, Wang SC, Christie A, Augustine MM, Porembka MR, Yopp AC, Choti MA, Mansour JC, Xie XJ, Polanco PM, Minter RM. Minimally Invasive Versus Open Pancreaticoduodenectomy: A Propensity-matched Study From a National Cohort of Patients. *Ann Surg.* 268: 151-157, 2018.
9. Gleeson EM, Shaikh MF, Shewokis PA, Clarke JR, Meyers WC, Pitt HA, Bowne WB. WHipple-ABACUS, a simple, validated risk score for 30-day mortality after pancreaticoduodenectomy developed using the ACS-NSQIP database. *Surgery.* 160: 1279-1287, 2016.
10. Hackert T, Hinz U, Pausch T, Fesenbeck I, Strobel O, Schneider L, Fritz S, Buchler MW. Postoperative pancreatic fistula: We need to redefine grades B and C. *Surgery.* 159: 872-877, 2016.

11. Takeda Y, Saiura A, Inoue Y, Mise Y, Ishizawa T, Takahashi Y, Ito H. Early Fistulography Can Predict Whether Biochemical Leakage Develops to Clinically Relevant Postoperative Pancreatic Fistula. *World J Surg.* 44: 1252-1259, 2020.
12. Floortje van Oosten A, Smits FJ, van den Heuvel DAF, van Santvoort HC, Molenaar IQ. Diagnosis and management of postpancreatectomy hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *HPB (Oxford).* 21: 953-961, 2019.
13. Wente MN, Veit JA, Bassi C, Dervenis C, Fingerhut A, Gouma DJ, Izbicki JR, Neoptolemos JP, Padbury RT, Sarr MG, Yeo CJ, Buchler MW. Postpancreatectomy hemorrhage (PPH): an International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS) definition. *Surgery.* 142: 20-25, 2007.
14. Tien YW, Lee PH, Yang CY, Ho MC, Chiu YF. Risk factors of massive bleeding related to pancreatic leak after pancreaticoduodenectomy. *J Am Coll Surg.* 201: 554-559, 2005.
15. Li-Ling J, Irving M. Somatostatin and octreotide in the prevention of postoperative pancreatic complications and the treatment of enterocutaneous pancreatic fistulas: a systematic review of randomized controlled trials. *Br J Surg.* 88: 190-199, 2001.
16. Bassi C, Dervenis C, Butturini G, Fingerhut A, Yeo C, Izbicki J, Neoptolemos J, Sarr M, Traverso W, Buchler M, International Study Group on Pancreatic Fistula D. Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. *Surgery.* 138: 8-13, 2005.
17. Bassi C, Marchegiani G, Dervenis C, Sarr M, Abu Hilal M, Adham M, Allen P, Andersson R, Asbun HJ, Besselink MG, Conlon K, Del Chiaro M, Falconi M, Fernandez-Cruz L, Fernandez-Del Castillo C, Fingerhut A, Friess H, Gouma DJ, Hackert T, Izbicki J, Lillemoe KD, Neoptolemos JP, Olah A, Schulick R, Shrikhande SV, Takada T, Takaori K, Traverso W, Vollmer CR, Wolfgang CL, Yeo CJ, Salvia R, Buchler M, International Study Group on Pancreatic S. The 2016 update of the International Study Group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 Years After. *Surgery.* 161: 584-591, 2017.
18. Wada K, Traverso LW. Pancreatic anastomotic leak after the Whipple procedure is reduced using the surgical microscope. *Surgery.* 139: 735-742, 2006.
19. Mungroop TH, Klompmaker S, Wellner UF, Steyerberg EW, Coratti A, D'Hondt M, de Pastena M, Dokmak S, Khatov I, Saint-Marc O, Wittel U, Abu Hilal M, Fuks D, Poves I, Keck T, Boggi U, Besselink MG, European Consortium on Minimally Invasive Pancreatic S. Updated Alternative Fistula Risk Score (ua-FRS) to Include Minimally Invasive Pancreatoduodenectomy: Pan-European Validation. *Ann Surg.* 273: 334-340, 2021.
20. Yamamoto Y, Sakamoto Y, Nara S, Esaki M, Shimada K, Kosuge T. A preoperative predictive scoring system for postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *World J Surg.* 35: 2747-2755, 2011.
21. Yamashita S, Ishizawa T, Ichida A, Kaneko J, Aoki T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Hasegawa K, Kokudo N. Advantages and Disadvantages of Prophylactic Abdominal Drainage in Distal Pancreatectomy. *World J Surg.* 40: 1226-1235, 2016.

22. Gaujoux S, Cortes A, Couvelard A, Noulet S, Clavel L, Rebours V, Levy P, Sauvanet A, Ruszniewski P, Belghiti J. Fatty pancreas and increased body mass index are risk factors of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *Surgery*. 148: 15-23, 2010.
23. Mungroop TH, van Rijssen LB, van Klaveren D, Smits FJ, van Woerden V, Linnemann RJ, de Pastena M, Klompaker S, Marchegiani G, Ecker BL, van Dieren S, Bonsing B, Busch OR, van Dam RM, Erdmann J, van Eijck CH, Gerhards MF, van Goor H, van der Harst E, de Hingh IH, de Jong KP, Kazemier G, Luyer M, Shamali A, Barbaro S, Armstrong T, Takhar A, Hamady Z, Klaase J, Lips DJ, Molenaar IQ, Nieuwenhuijs VB, Rupert C, van Santvoort HC, Scheepers JJ, van der Schelling GP, Bassi C, Vollmer CM, Steyerberg EW, Abu Hilal M, Groot Koerkamp B, Besselink MG, Dutch Pancreatic Cancer G. Alternative Fistula Risk Score for Pancreatoduodenectomy (a-FRS): Design and International External Validation. *Ann Surg*. 269: 937-943, 2019.
24. Chu CK, Mazo AE, Sarmiento JM, Staley CA, Adsay NV, Umpierrez GE, Kooby DA. Impact of diabetes mellitus on perioperative outcomes after resection for pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg*. 210: 463-473, 2010.
25. Pratt WB, Callery MP, Vollmer CM, Jr. Risk prediction for development of pancreatic fistula using the ISGPF classification scheme. *World J Surg*. 32: 419-428, 2008.
26. Callery MP, Pratt WB, Kent TS, Chaikof EL, Vollmer CM, Jr. A prospectively validated clinical risk score accurately predicts pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *J Am Coll Surg*. 216: 1-14, 2013.
27. Frymerman AS, Schuld J, Ziehen P, Kollmar O, Justinger C, Merai M, Richter S, Schilling MK, Moussavian MR. Impact of postoperative pancreatic fistula on surgical outcome--the need for a classification-driven risk management. *J Gastrointest Surg*. 14: 711-718, 2010.
28. Akamatsu N, Sugawara Y, Komagome M, Shin N, Cho N, Ishida T, Ozawa F, Hashimoto D. Risk factors for postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy: the significance of the ratio of the main pancreatic duct to the pancreas body as a predictor of leakage. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 17: 322-328, 2010.
29. Fuks D, Piessen G, Huet E, Tavernier M, Zerbib P, Michot F, Scotte M, Triboulet JP, Mariette C, Chiche L, Salame E, Segol P, Pruvot FR, Mauvais F, Roman H, Verhaeghe P, Regimbeau JM. Life-threatening postoperative pancreatic fistula (grade C) after pancreaticoduodenectomy: incidence, prognosis, and risk factors. *Am J Surg*. 197: 702-709, 2009.
30. Kawai M, Tani M, Terasawa H, Ina S, Hirono S, Nishioka R, Miyazawa M, Uchiyama K, Yamaue H. Early removal of prophylactic drains reduces the risk of intra-abdominal infections in patients with pancreatic head resection: prospective study for 104 consecutive patients. *Ann Surg*. 244: 1-7, 2006.
31. Bassi C, Molinari E, Malleo G, Crippa S, Butturini G, Salvia R, Talamini G, Pederzoli P. Early versus late drain removal after standard pancreatic resections: results of a prospective randomized trial. *Ann Surg*. 252: 207-214, 2010.

32. Smits FJ, Molenaar IQ, Besselink MG, Borel Rinkes IHM, van Eijck CHJ, Busch OR, van Santvoort HC, Dutch Pancreatic Cancer G. Early recognition of clinically relevant postoperative pancreatic fistula: a systematic review. *HPB (Oxford)*. 22: 1-11, 2020.
33. Wuster C, Shi H, Kuhlbrei CM, Biesel EA, Hopt UT, Fichtner-Feigl S, Wittel UA. Pancreatic Inflammation and Proenzyme Activation Are Associated With Clinically Relevant Postoperative Pancreatic Fistulas After Pancreas Resection. *Ann Surg*. 272: 863-870, 2020.
34. Menahem B, Guittet L, Mulliri A, Alves A, Lubrano J. Pancreaticogastrostomy is superior to pancreaticojejunostomy for prevention of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Surg*. 261: 882-887, 2015.
35. Perivoliotis K, Sioka E, Tatsioni A, Stefanidis I, Zintzaras E, Zacharoulis D. Pancreatogastrostomy versus Pancreatojejunostomy: An Up-to-Date Meta-Analysis of RCTs. *Int J Surg Oncol*. 2017: 7526494, 2017.
36. Witzigmann H, Diener MK, Kienkotter S, Rossion I, Bruckner T, Barbel W, Pridohl O, Radulova-Mauersberger O, Lauer H, Knebel P, Ulrich A, Strobel O, Hackert T, Buchler MW. No Need for Routine Drainage After Pancreatic Head Resection: The Dual-Center, Randomized, Controlled PANDRA Trial (ISRCTN04937707). *Ann Surg*. 264: 528-537, 2016.
37. Arita J, Sakamaki K, Saiura A, Konishi M, Sakamoto Y, Hashimoto M, Sano T, Uesaka K, Kokudo N, Yamanaka T, Shimada K. Drain Placement After Uncomplicated Hepatic Resection Increases Severe Postoperative Complication Rate: A Japanese Multi-institutional Randomized Controlled Trial (ND-trial). *Ann Surg*. 273: 224-231, 2021.
38. Van Buren G, 2nd, Bloomston M, Hughes SJ, Winter J, Behrman SW, Zyromski NJ, Vollmer C, Velanovich V, Riall T, Muscarella P, Trevino J, Nakeeb A, Schmidt CM, Behrns K, Ellison EC, Barakat O, Perry KA, Drebin J, House M, Abdel-Misih S, Silberfein EJ, Goldin S, Brown K, Mohammed S, Hodges SE, McElhany A, Issazadeh M, Jo E, Mo Q, Fisher WE. A randomized prospective multicenter trial of pancreaticoduodenectomy with and without routine intraperitoneal drainage. *Ann Surg*. 259: 605-612, 2014.
39. Müller OM, Gerber HB. Circadian changes of the rat pancreas acinar cell. A quantitative morphological investigation. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 112: 12-19, 1985.
40. Itoh Z, Honda R, Hiwatashi K. Biphasic secretory response of exocrine pancreas to feeding. *Am J Physiol*. 238: G332-337, 1980.
41. de Waele B, Lambin A, de Smul A, Kiekens R. Non-parallel secretion of pancreatic enzymes. Effect of parenteral amino acid administration and intestinal reinfusion of bilio-pancreatic juice. *Digestion*. 19: 15-22, 1979.
42. Dagorn JC, Sahel J, Sarles H. Nonparallel secretion of enzymes in human duodenal juice and pure pancreatic juice collected by endoscopic retrograde catheterization of the papilla. *Gastroenterology*. 73: 42-45, 1977.
43. Keller J, Layer P. Circadian pancreatic enzyme pattern and relationship between secretory and motor activity in fasting humans. *J Appl Physiol (1985)*. 93: 592-600, 2002.

44. Wormsley KG, Goldberg DM. The interrelationships of the pancreatic enzymes. *Gut*. 13: 398-412, 1972.
45. Shinchi H, Wada K, Traverso L. The usefulness of drain data to identify a clinically relevant pancreatic anastomotic leak after pancreaticoduodenectomy? *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 10: 490-498, 2006.
46. Gebauer F, Kloth K, Tachezy M, Vashist YK, Cataldegirmen G, Izbicki JR, Bockhorn M. Options and limitations in applying the fistula classification by the International Study Group for Pancreatic Fistula. *Ann Surg*. 256: 130-138, 2012.
47. Moskovic DJ, Hodges SE, Wu MF, Brunnicardi FC, Hilsenbeck SG, Fisher WE. Drain data to predict clinically relevant pancreatic fistula. *HPB (Oxford)*. 12: 472-481, 2010.
48. Yamashita S, Sakabe M, Ishizawa T, Hasegawa K, Urano Y, Kokudo N. Visualization of the leakage of pancreatic juice using a chymotrypsin-activated fluorescent probe. *Br J Surg*. 100: 1220-1228, 2013.
49. Mori K, Ishizawa T, Yamashita S, Kamiya M, Urano Y, Kokudo N. Intraoperative visualization of pancreatic juice leaking from the pancreatic stump in a swine model. *Gastroenterology*. 149: 1334-1336, 2015.
50. Urano Y, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Kamiya M, Nagano T, Watanabe T, Hasegawa A, Choyke PL, Kobayashi H. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat Med*. 15: 104-109, 2009.
51. Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, Ogawa M, Mitsunaga M, Asanuma D, Kamiya M, Young MR, Nagano T, Choyke PL, Kobayashi H. Rapid cancer detection by topically spraying a gamma-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci Transl Med*. 3: 110ra119, 2011.
52. Kakita A, Takahashi T, Yoshida M, Furuta K. A simpler and more reliable technique of pancreatojejunal anastomosis. *Surg Today*. 26: 532-535, 1996.
53. Brennan M. Pancreatojejunostomy. In Blumgart LH, Fong Y, eds. *Surgery of the liver and biliary tract*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1073-1089, 2000.
54. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Ng KK, Yuen WK, Yeung C, Wong J. External drainage of pancreatic duct with a stent to reduce leakage rate of pancreatojejunostomy after pancreaticoduodenectomy: a prospective randomized trial. *Ann Surg*. 246: 425-433; discussion 433-425, 2007.
55. Pessaux P, Sauvanet A, Mariette C, Paye F, Muscari F, Cunha AS, Sastre B, Arnaud JP. External pancreatic duct stent decreases pancreatic fistula rate after pancreaticoduodenectomy: prospective multicenter randomized trial. *Ann Surg*. 253: 879-885, 2011.
56. International Federation of Clinical C, Laboratory M, Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Ferard G, Gella FJ, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kytzia HJ, Lessinger JM, Miller WG, Nagel R, Pauwels J, Schimmel H, Siekmann L, Weidemann G, Yoshida K, Ceriotti F. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. *Clin Chem Lab Med*. 44: 1146-1155, 2006.

57. Sugimoto M, Takahashi S, Kojima M, Kobayashi T, Gotohda N, Konishi M. In Patients with a Soft Pancreas, a Thick Parenchyma, a Small Duct, and Fatty Infiltration Are Significant Risks for Pancreatic Fistula After Pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg.* 21: 846-854, 2017.
58. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, de Santibanes E, Pekolj J, Slankamenac K, Bassi C, Graf R, Vonlanthen R, Padbury R, Cameron JL, Makuuchi M. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg.* 250: 187-196, 2009.
59. Giglio MC, Spalding DR, Giakoustidis A, Zarzavadjian Le Bian A, Jiao LR, Habib NA, Pai M. Meta-analysis of drain amylase content on postoperative day 1 as a predictor of pancreatic fistula following pancreatic resection. *Br J Surg.* 103: 328-336, 2016.
60. Ogawa M. Pancreatic secretory trypsin inhibitor as an acute phase reactant. *Clin Biochem.* 21: 19-25, 1988.
61. Hirota M, Ohmuraya M, Hashimoto D, Suyama K, Sugita H, Ogawa M. Roles of Autophagy and Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor in Trypsinogen Activation in Acute Pancreatitis. *Pancreas.* 49: 493-497, 2020.
62. Uchida Y, Masui T, Nakano K, Yogo A, Sato A, Nagai K, Anazawa T, Takaori K, Tabata Y, Uemoto S. Clinical and experimental studies of intraperitoneal lipolysis and the development of clinically relevant pancreatic fistula after pancreatic surgery. *Br J Surg.* 106: 616-625, 2019.
63. Iwaki K, Ogawa M, Tanaka S, Kosaki G. Radioimmunoassay for human pancreatic chymotrypsin and measurement of serum immunoreactive chymotrypsin contents in various diseases. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 40: 489-496, 1983.
64. Suzuki S, Shimoda M, Shimazaki J, Oshiro Y, Nishida K, Shiihara M, Izumo W, Yamamoto M. Drain Lipase Levels and Decreased Rate of Drain Amylase Levels as Independent Predictors of Pancreatic Fistula with Nomogram After Pancreaticoduodenectomy. *World J Surg.* 45: 1921-1928, 2021.
65. Dixon AK. Abdominal fat assessed by computed tomography: sex difference in distribution. *Clin Radiol.* 34: 189-191, 1983.
66. Xiong JJ, Altaf K, Mukherjee R, Huang W, Hu WM, Li A, Ke NW, Liu XB. Systematic review and meta-analysis of outcomes after intraoperative pancreatic duct stent placement during pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg.* 99: 1050-1061, 2012.
67. Hong S, Wang H, Yang S, Yang K. External stent versus no stent for pancreaticojejunostomy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Gastrointest Surg.* 17: 1516-1525, 2013.

7. 謝辞

本研究において御指導を賜った、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科 長谷川潔教授、東京大学医学系研究科 生体情報学 浦野泰照教授、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科 石沢武彰講師に感謝致します。最後にいつも御支援頂きました、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科教室、東京大学医学系研究科 生体情報学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。