

博士論文

腽液を特異的に標識する新規蛍光プローブ
の開発と腽液漏診断への応用

山下俊

目次

	頁
1. 要旨	4
2. 序文	5
2.1 膵切除手術の合併症	
2.2 膵液漏の問題点	
2.3 研究の目的	
3. 方法	8
3.1 新規蛍光プローブ	
3.2 手術手技	
3.3 対象	
3.3.1 実験 1: 2種のプローブを用いたドレーン廃液のプロテアーゼ活性 評価	
3.3.2 実験 2: キモトリプシンプローブの膵離断面における膵液漏出の 評価能	
3.4 統計学的解析	
4. 結果	16
4.1 実験 1: 2種のプローブを用いたドレーン廃液のプロテアーゼ活性評価	

4.2 実験 2: キモトリプシンプローブの腭離断面における腭液漏出の評価能

5. 考察	20
6. 引用文献	24
7. 図	32
8. 表	42
9. 謝辞	43

1. 要旨

膵・胆管腫瘍に対する膵切除は、根治が期待できる唯一の治療法であるが、手技が向上した今日でも合併症の頻度の高い手術である。特に膵液漏は在院死や入院期間の長期化などに直結する重要な合併症である。膵液漏が克服されていない原因は、膵液が無色透明であり膵離断面の細い膵管断端を術中に確認できないことや膵液中のプロテアーゼ活性を迅速に評価する技術が未確立であることが挙げられる。膵切除の安全性を向上させるため、術中に膵液漏の有無を確認する技術の開発が望まれる。膵液中のキモトリプシンを特異的に標識する新規蛍光プローブを作成し、手術で得られた膵液や腸液などの体外サンプルと摘出標本を用い、その標識能を評価した。

2. 序文

2.1 膵切除手術の合併症

本邦では膵癌により年間約 26,000 人が死亡しており、悪性腫瘍の死亡者数としては本邦においても世界全体においても第 5 位である¹⁻⁶。膵癌は診断時点で進行例が多い上に、診断からの経過も早いことが特徴であり、膵癌登録による 5 年生存率は 6%とされている⁷。遠隔転移および広範なリンパ節転移がなく明らかな動脈浸潤を認めない場合、全身状態を考慮し切除可能と判断されれば手術適応となるが、本邦での切除率は約 40%にとどまる。なお手術単独治療の場合、切除後の 5 年生存率は約 15%、中央生存期間は 13 か月程度とされている⁸。集学的治療を駆使して、生存期間延長や Quality of life の維持を図る努力がなれているが、根治療法として確立されているのは、膵切除術のみである。現在、本邦では年間 11,000 件以上⁹、米国では年間 40,000 件以上の膵手術が施行されている^{10, 11}。画像診断の進歩に伴い膵管内乳頭粘液性腫瘍(intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN)や膵神経内分泌腫瘍といった前癌病変や低悪性度腫瘍の診断能が向上した結果、手術件数は世界的に増加傾向である^{12, 13}。しかし、手術技術や器具・周術期の管理手法が発達した今日においても、膵切除後の膵液漏は高率(10-50%)に発生する¹⁴⁻¹⁶。膵液漏は重症感染症の誘因となるほか、膵液の自己消化作用により血管断端が破綻して致命的な術後出血をきたしうる。実際、膵頭十二指腸切除術の死亡率は 1-7.8%といまだに高く^{10, 11},

^{16,17}、low-volume center では15%に達するとの報告もある^{18,19}。

2.2 膵液漏の問題点

膵液漏の予防が困難であるのは、膵液が無色透明であり、膵液漏の有無やその部位を手術中に同定できないからである。膵切除手術で発生する膵離断面には主膵管(main pancreatic duct; MPD)断端だけでなく、微細な分枝膵管の断端も露出し、これらにより膵液の漏出を認めるはずであるが、全てを同定する技術は確立されていない。また、現状では術後膵液漏は腹腔ドレーン廃液のアミラーゼ濃度を指標に診断しているが^{17,20-24}、原理的には糖分解酵素であるアミラーゼよりも蛋白分解酵素の活性に基づいて評価されるべきであり、事実、腹腔ドレーン廃液のアミラーゼ濃度は、臨床的な膵液漏の重症度を反映していないとする報告も散見される^{25,26}。現在のところ、腹腔ドレーン廃液の蛋白分解酵素を迅速に測定し、術後膵液漏の程度の評価を行うという技術は確立されていない。蛋白分解酵素や脂肪分解酵素の代替としてアミラーゼを測定するようになったものと推測されるが、膵プロテアーゼの分泌は、食事や膵疾患など様々なメディエーターによる影響を独立的に受けており、アミラーゼの分泌と必ずしも相関していない²⁷⁻³⁰。

2.3 研究の目的

手術中に膵液漏の有無とその部位を同定するためのイメージング技術を開発すること、膵液中のプロテアーゼ活性をベッドサイドで迅速に評価する技術を開発することは、膵手術の安全性を飛躍的に向上させ、膵・胆管腫瘍の治療成績の向上および合併症に対して投じる医療費の削減にも寄与するものと期待される³¹。

3. 方法

3.1 新規蛍光プローブ

微細な癌細胞の同定を目的として、これまで有用な蛍光プローブが開発されてきた。代表的なものとしては、浦野らが酸性pH感受性蛍光プローブ-がん抗体複合体を報告している³²。これは、ヒト癌遺伝子HER2/neu(c-erbB-2)の遺伝子産物であるHER2蛋白を発現したHER2陽性乳癌細胞に、HER2蛋白に特異的に結合することで抗腫瘍効果を発揮するモノクローナル抗体治療薬のトラスツマブと蛍光分子の複合体を投与した際、蛍光分子が癌細胞内のリソソームに取り込まれるという性質を利用している。この蛍光分子は酸性状態でのみ活性化し蛍光を発するが、Viableな細胞ではリソソーム内が酸性環境であるため、viableな癌細胞を蛍光発光により特異的に標識できた。ただし、Viableな癌細胞への感度の高さや安全性は優れていたものの、癌部位が光るまでに数時間以上を要し、最終的に癌部位が持つ蛍光は微弱であるという欠点があった³²。

その後、より迅速性の高い癌蛍光プローブの開発が求められ、多くの癌細胞の細胞膜で発現が亢進している γ グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -glutamyltranspeptidase: GGT)に着目し、 γ グルタミルヒドロキシメチルローダミングリーン(γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green: gGlu-HMRG)³³プローブが開発された。ヒドロキシメチルローダミングリーン(hydroxymethyl rhodamine

green: HMRG)³⁴という構造は蛍光プラットフォームであり、約490nmの波長の青色光で励起され、約520nmの波長の緑色蛍光を発するという性質を持つ(図1)。GGTにより、 γ グルタミル化合物の γ 位のペプチド結合は加水分解を受け、開環状態のHMRGが分離し発光する(図2a)。従って、gGlu-HMRGプローブはGGTを特異的に発現する癌細胞の標識能を有すると考えられた。またGGT活性を有するviableな細胞に対して、微量のプローブ噴霧により、直径1mm以下の微小癌組織であっても数十秒～数分程度で明確に検出できたと報告されている³³。

一方、膵液中にもGGTの分泌は認められるため³⁵⁻³⁷、gGlu-HMRGプローブを膵液の蛍光可視化に利用した。しかし、GGTは膵液のほかに小腸液を始め体内に幅広く分布しているため、ヒト体内において膵液でのみ合成される加水分解酵素であるキモトリプシンに着目した。キモトリプシンはグルタリルフェニルアラニン化合物を加水分解するため、グルタリルフェニルアラニンヒドロキシメチルローダミングリーン(glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green: gPhe-HMRG)³¹は、キモトリプシンを特異的に標識する蛍光プローブとなり得ると考えられた(図2b)。gPhe-HMRGは新規化合物であるため合成方法を図3に記載した。キモトリプシンはヒトの体内では膵内でのみ合成されるが、通常ヒトの膵液中にはキモトリプシンではなくキモトリプシノゲンとして存在し、十二指腸内のトリプシンの働きによりキモトリプシンに変化する³⁸。このことから、廃液検体

や膵離断面における蛍光強度の評価の際には、gPhe-HMRGプローブを常に少量のトリプシンとともに使用することとした(キモトリプシンプローブ)(図2b)。なお、gPhe-HMRGプローブ自体がトリプシンにより活性化されることはなかった。さらに、様々なキモトリプシン濃度の検体に対し、gPhe-HMRGプローブによる蛍光強度を測定し、蛍光強度上昇の速度を数値化したところ、キモトリプシン活性の定量評価が十分な線形性を持って可能であることが確認できた(図4)。

膵切除術中における膵液漏出と術後の腹腔ドレーン廃液におけるプロテアーゼ活性を迅速に可視化する目的で、gGlu-HMRGプローブとキモトリプシンプローブの2種類の蛍光プローブを利用した。本研究で使用した両プローブはともに、東京大学医学系研究科生体情報学講座の研究室で作成したものである。

3.2 手術手技

膵頭十二指腸切除術(pancreaticoduodenectomy; PD)や膵分節切除術において、尾側残膵より分泌される膵液は完全外瘻として体外に誘導し回収した(図5)。膵実質の柔らかい症例や、肝切除を併施するPDの際には一期的な膵空腸吻合を行わず、二期的膵空腸再建の方針を採用した³⁹。二期再建は、初回手術の約3か月後に膵空腸吻合のみ改めて実施する方法である。膵体尾部切除術における膵実質離断法としては、ペアン鉗子によるクランプクラッシング法を用い、離断途

中に現れる小脈管と主膵管は確実に結紮し切離した⁴⁰。

3.3 対象

本研究は、東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認のもとに行われ(registration number: UMIN000003654; <http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm>)、全患者からインフォームドコンセントを得た。本研究では従来、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科で採用されている標準手術によって提供される摘出標本および体液のみを使用するので、被験者に直接の危害が加わる危険性はないが、匿名化により個人情報を守秘した。原則として被験者に病名を正確に告知しており、それが不能である場合には研究対象から除外した。

3.3.1 実験 1: 2 種のプローブを用いたドレーン廃液のプロテアーゼ活性評価

2010 年 4 月から 2011 年 1 月の間に東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科で行われた連続的な膵切除手術(18 件)の後 1, 3, 7 日目に、膵管チューブ廃液(15 検体)・腹腔ドレーン廃液(46 検体)・腸瘻チューブ廃液(15 検体)を回収し、即座に-80℃で凍結し分析直前まで冷凍保存した。検体の採取は東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科の入院病棟で行い、廃液検体の分析は東京大学医学系研究科生体情報学講座の研究室で行った。各検体の

アミラーゼ濃度を測定するとともに、各検体に gGlu-HMRG プローブとキモトリプシンプローブ(トリプシンを添加した gPhe-HMRG プローブ)を加えた際の蛍光強度 (fluorescence intensity: FI) を測定した。具体的には、各プローブ溶液 180 μ L(1.1 μ mol/L)とドレーン廃液 20 μ L を混ぜ 96-well プレーートの各ウェルに注入した。ドレーン廃液の混注前、混注攪拌後 5 分・15 分・30 分における各ウェルの蛍光強度をマイクロプレートリーダー(SH-8000; Corona, Ibaraki, Japan)を用いて測定した(excitation, 490nm; emission, 520nm)。キモトリプシンプローブに関しては、トリプシンは最終濃度 92 units/mL となるように添加した。加えて、プローブ溶液 180 μ L(1.1 μ mol/L)にリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline; PBS) 20 μ L を混ぜた際の蛍光強度、また純粋な HMRG 溶液 180 μ L(0.55 μ mol/L)に各ドレーン廃液 20 μ L を混ぜた際の蛍光強度も同様の手順で測定した。各種ドレーン廃液検体の蛍光強度は下記の計算式によって算出した。

$$FI(\text{ドレーン廃液}) = \frac{FI(\text{プローブ溶液} + \text{ドレーン廃液}) - FI(\text{プローブ溶液} + \text{PBS})}{FI(\text{純粋な HMRG 溶液} + \text{ドレーン廃液})}$$

3.3.2 実験 2: キモトリプシンプローブの腭離断面における腭液漏出の評価能

実験 1 の結果を踏まえて、腭離断面における腭液漏出部位同定の実験はキモ

トリプシンプローブを用いて行われた。2011年2月から2011年12月の間に東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科で行われた連続的なPDと膵分節切除術で得られる検体を利用した。手術室で摘出した直後の膵切除検体の離断面に関し、MPD断端部の結紮糸のみ解いて分析を行った。この膵離断面に濾紙(Kiriyama Glass, Tokyo, Japan)を10秒間押し当てた。その後、濾紙を膵離断面から剥がし、膵離断面の転写された濾紙にキモトリプシンプローブ(50 μ mol/LのgPhe-HMRGに4637units/mLのトリプシンを添加)を噴霧した。キモトリプシンプローブ噴霧前と、噴霧1分・3分・5分後に蛍光評価試験をMaestroTM画像システム(CRi, Woburn, Massachusetts, USA)を用いて行った(excitation, 445-490nm; emission, 515nm)。MPD断端部の蛍光強度は、以下のような計算式で算出した。regions of interest (ROI)は当該部における0.4mm²と設定した。

FI 平均値 (MPD 断端部の ROIs)

$$FI (MPD) = \frac{\text{FI 平均値 (MPD 断端部の ROIs)}}{\text{FI 平均値 (MPD 断端以外の膵離断面の ROIs)}}$$

摘出直後の膵切除検体の主膵管断端から十分量の膵液を回収するのは技術的に困難であったため、完全外瘻で体外に誘導した膵管チューブの廃液を用いてアミラーゼ値を測定し、検体摘出時のFI (MPD)との相関関係を調べた。なお、

膵管チューブ廃液の回収は術後 1 日目の朝に行っており、経腸栄養や経口摂取は開始されていない環境とした。

前述のごとく、キモトリプシンプローブを濾紙に噴霧し、Maestro™ 画像システムの遮光レンズ(515nm 波長通過)を用いて、肉眼的に蛍光パターンを評価した。蛍光パターンに関しては、MPD 断端部のみに蛍光を認めた場合を Duct type とし、MPD 断端以外の膵実質断端もびまん性に蛍光を認めた場合を Diffuse type とし、膵断端に蛍光を認めない場合を Negative type とした。また、キモトリプシンプローブ噴霧後 1 分で十分良好なコントラストが確認できたため、膵離断面の肉眼的な蛍光評価のタイミングは、噴霧後 1 分と設定した。蛍光パターンと術後経過との関連を、主膵管径の膵実質径に対する比(main pancreatic duct index: MPD index)⁴¹を初めとする、様々な臨床的因子に基づいて検討した。なお、MPD index は術後の膵液漏発生を予測しうる因子として既に報告されているものである⁴¹。

術後膵液漏は、「膵液漏に関する国際的研究グループ(International Study Group of Pancreatic Fistula: ISGPF)」の策定した基準に従って診断した¹⁷。具体的には、術後3日目の腹腔ドレーン廃液のアミラーゼ値が血清アミラーゼ値正常上限の3倍以上であった場合、膵液漏有りと診断した。ISGPF の grading システムも利用しており、grade A は臨床経過に影響を及ぼさない一過性の生化学データ上の膵

液漏と定義し、grade B は抗生剤加療など、通常の臨床経過に微細な変化をもたらす瘝液漏と定義し、grade C は血管内カテーテル治療や開腹手術など、積極的に侵襲性の高い治療を要する瘝液漏と定義している。

3.4 統計学的解析

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 Fisher の正確確率法を用いて比較した。多重比較は Steel Dwass 法を用いて行った。蛍光強度(FIs)とアミラーゼ値との比較は、Spearman rank correlation test を用いて行った。 $P < 0.05$ を有意水準に設定した。統計学的な計算には JMP version 9.0.0(SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)を用いた。

4. 結果

4.1 実験 1: 2 種のプローブを用いたドレーン廃液のプロテアーゼ活性評価

膵離断手術を施行した連続的な 18 人の患者から、完全外瘻とした膵管チューブの膵液廃液(15 検体)、腹腔ドレーン廃液(46 検体)、腸瘻チューブの腸液廃液(15 検体)を回収した(計 76 検体)。図 6 は、各種廃液検体における、2 種のプローブ(gGlu-HMRG プローブとキモトリプシンプローブ)添加後の蛍光強度の経時的变化を示している。

gGlu-HMRG プローブ添加後、膵管チューブ廃液検体の蛍光強度は経時的に増加し、30 分の保温攪拌の後に 0.30 (0.03-0.59) arbitrary units (a.u.)に達した。これは、腸瘻チューブ廃液の蛍光強度 0.76 (0.04-1.25) a.u.より有意に低値であったが($P=0.016$)、腹腔ドレーン廃液の蛍光強度 0.09 (-0.04-0.33) a.u.より有意に高値であった($P<0.001$)。

一方、キモトリプシンプローブの添加後、膵管チューブ廃液検体の蛍光強度も経時的に増大し、30 分の保温攪拌の後に 0.59 (0.14-1.23) a.u.に達した。これは、gGlu-HMRG プローブ使用時の膵管チューブ廃液検体の 30 分の保温攪拌後の蛍光強度より有意に高値であった($P=0.011$)。しかし、gGlu-HMRG プローブとは異なり、キモトリプシンプローブを添加した際の腸瘻チューブ廃液検体や腹腔ド

レーン廃液の 30 分攪拌後の蛍光強度はほとんどゼロに近く、前者が 0.02 (-0.04-0.17) a.u. で後者が 0.001 (-0.01-0.07) a.u. であった。

gGlu-HMRG プローブ添加後 30 分における各種検体の蛍光強度と各検体のアミラーゼ濃度の関係を図 7 に示した。膵液検体・腹腔ドレーン検体・腸瘻検体のいずれにおいても有意な相関関係は認めなかった。また、キモトリプシンプローブ添加後 30 分における各種検体の蛍光強度と各検体のアミラーゼ濃度の関係を図 8 に示した。膵液検体では有意な相関関係を認めず、腹腔ドレーン検体では有意な負の相関関係を認め($\rho=-0.537, P<0.001$)、腸瘻検体では有意な正の相関関係を認めた($\rho=0.688, P=0.005$)。

4.2 実験 2: キモトリプシンプローブの膵離断面における膵液漏出の評価能

膵頭十二指腸切除術 29 例、膵分節切除術 1 例の計 30 例に関し、フレッシュな膵切除検体の膵離断面における膵液の漏出を同定するためにキモトリプシンプローブを用いた。摘出検体の膵離断面を転写した濾紙にキモトリプシンプローブを噴霧した後 5 分での MPD 断端部の蛍光強度(FI(MPD))は、術後 1 日目の膵管チューブ廃液で測定されたアミラーゼ値と有意に正の相関を示した($\rho=0.664, P<0.001$)(図 9)。ただし、他の膵液検体におけるアミラーゼ値よりは相対的に低いアミラーゼ値(129,000 units/L)を示しながら、極めて高い蛍光強度

(28.63 a.u.)を呈する 1 検体を認めた(図 9)。この症例は、**grade C** 膵液漏を示した症例であり、術後腹腔内出血・肝梗塞・肝膿瘍を来し在院死に至った 1 例である。

膵離断面の蛍光パターンは肉眼的に 3 種類に分類された。すなわち、主膵管部のみに蛍光を認めるパターン(duct type, 16 例)、主膵管部とその周囲の膵実質離断面全体に蛍光を認めるパターン(diffuse type, 7 例)、蛍光を認めないパターン(negative type, 7 例)である(図 10)。前 2 者(duct or diffuse type)の主膵管部における蛍光強度中央値は、negative type に比し有意に高値であった(4.77 (0.45-28.63) v.s. 0.44 (0.06-0.91) a.u.; $P<0.001$, 表 1)。

表 1 では、MPD 断端において蛍光陽性となった 23 例(duct or diffuse type)と、陰性となった 7 例(negative type)に関し、患者背景因子と術後経過を比較している。膵癌と IPMN は、蛍光陽性群で陰性群より有意に頻度が低かった(23 人中 8 人 v.s. 7 人中 7 人, $P=0.003$)。MPD index は、蛍光陽性群では蛍光陰性群より有意に低値であった(0.19 (0.10-0.78) v.s. 0.51 (0.34-0.60), $P=0.006$)。術後 1 日目の腹腔ドレーン廃液アミラーゼ値や膵管チューブ廃液アミラーゼ値は、蛍光陽性群の方が蛍光陰性群より有意に高値であった。ISGPF 分類で **grade B** 以上の術後膵液漏発生に関しては、蛍光陽性群でのみ発生した(23 人中 13 人 v.s. 7 人中 0 人, $P=0.008$)。蛍光陽性群の中でも duct type と diffuse type の間で、**grade B** 以上の術

後瘳液漏発生に関しては、発生頻度に有意差を認めなかった($P=0.180$)が、grade C以上の術後瘳液漏(3例)は diffuse type においてのみ認めた($P=0.020$)(図 9)。具体的には、腹腔内膿瘍に対する長期的ドレナージを要した 1 例、術後腹腔内出血に対して血管内カテーテルによる塞栓治療を要した 1 例、術後腹腔内出血を契機に在院死に至った 1 例である。

5. 考察

今回の研究結果から、キモトリプシンプローブの使用により膵液中のプロテアーゼ活性を評価することで、術中膵液漏と術後膵液漏の発生を特異的かつ迅速に予測できる可能性があることが示唆された。実際、実験 1 ではプロテアーゼの一種であるキモトリプシンの活性を検知可能なキモトリプシンプローブが膵液に対し特異的な標識能を有することが確認された。また実験 2 では、切除検体の離断面を転写した濾紙にキモトリプシンプローブを噴霧すると、わずか 1 分後には膵液漏出部位が肉眼的に蛍光可視化されることが確認された。加えて、濾紙における蛍光の有無が膵頭十二指腸切除術や膵分節切除術後における ISGPF grade B 以上の膵液漏発生に關与する可能性が示唆された。

gGlu-HMRG プローブも膵液を迅速に同定できたものの、GGT は小腸液中にも存在し、腸瘻チューブ廃液でも高値を示し、特異度の面でキモトリプシンプローブに劣った(実験 1)。従って、キモトリプシンプローブは膵液の酵素活性をより特異的に標識することが可能であると言えた。

キモトリプシンプローブを用いた膵液漏出部位の同定や術後膵液漏発生の予測という新規技術にはいくつかの利点がある。第一に、本プローブは対象部位にキモトリプシノゲンが存在すれば非常に迅速に活性化されるという点が挙げられ、手術中に膵液漏出部位をすぐに閉鎖することも可能になると考えられ

る。更に、術中に膵液漏発生のリスクが高度と判断されれば、より安全性の高い二期的膵空腸吻合³⁹を選択したり、反対に膵液漏のリスクが極めて低いと考えられれば予防的腹腔ドレーン留置を割愛したり、という方針決定の根拠になることも期待される。第二に、今回の技術は局所的に投与されたプローブとキモトリプシンの間の単純な酵素反応に基づいているため、プローブや酵素の必要量は非常に少なく³³、必要に応じて生理食塩水などで対象組織から十分に洗い流せるものである。これらの試薬の安全性が担保され次第、なるべく早い段階で、*in vivo setting*におけるプローブの有用性評価を行う必要があると考えている。

実験2において、術後1日目早朝の膵液検体のキモトリプシンプローブを用いた際の蛍光強度と各検体のアミラーゼ値との有意な正の相関関係が示された一方、相対的に低いアミラーゼ値でありながら極めて高いキモトリプシン活性を示したり、その逆を示したりする検体も存在した。これらは、ヒトの膵液におけるアミラーゼの産生量が常にプロテアーゼの産生量と平行であるとは限らないという事実に因ると考えられる。以前の報告によれば、膵酵素の分泌には、様々な因子が互いに独立的に影響を及ぼすとされる。例えば、膵疾患や経口摂取、刺激物質・阻害物質の存在、覚醒・睡眠のシグナル、日内変動などの因子である²⁷⁻³⁰。実際、実験1において、各種検体のプロテアーゼプローブを

用いた蛍光強度とアミラーゼ濃度に常に正の相関関係が見出せなかったのは、術後 1, 3, 7 日目の検体が混在しているという要素も多分に関わっているものと考えられる。膵切除手術では、自己消化作用などの組織障害性の観点から、アミラーゼではなくプロテアーゼが膵液漏に関連する重篤な術後合併症を引き起こす原因となっていると考えられるため、術後膵液漏発生の予測や治療に関し、プロテアーゼ活性を測定・管理することがより原理的であると考えられる。

実験 2 において、相対的に低いアミラーゼ値(129000 IU/L)を示しながら極めて高いキモトリプシン活性(28.63 a.u.)を呈した症例は、実際に grade C の術後膵液漏を呈し重篤な経過を辿った。無論、更なる症例の蓄積が必要ではあるが、膵離断面のキモトリプシン活性を指標とすることで、廃液検体のアミラーゼ活性が相対的に低い症例であっても臨床的に意義のある膵液漏を起こし得る症例であると事前に検知できる可能性が示唆された。

本研究の **limitation** は、あくまで切除側検体の膵離断面を転写した濾紙の上にキモトリプシンプローブを噴霧するという方法を採用し、直接的に腹腔内の膵離断面に投与していない点が挙げられる。ただし、これはキモトリプシンプローブが新規の試薬であり、直接的な腹腔内投与は承認されていないからである。もちろん、直接的な膵離断面への噴霧による評価を行う前には、キモトリプシンプローブと gGlu-HMRG プローブの安全性を確認しなければならない。本研究

では濾紙や廃液ドレーンといった体腔外の検体に対し蛍光プローブを使用する手法を採ったが、それでも臨床的に意義のある膵液漏の発生を十分に低減できる可能性を有し、ひいては、在院期間の短縮や合併症に対する医療費の削減にも寄与するものと考えている。

膵液中のキモトリプシン活性を評価することで、膵液漏出部位を迅速に可視化・同定することができ、術後膵液漏の発生を予測することのできる新規蛍光プローブを開発した。本プローブの今後期待される用途としては、術中においては、膵離断面の膵液漏出部位を迅速に同定し閉鎖することや、二期的膵空腸吻合や予防的腹腔ドレーン留置の適応を決定する際の根拠となることなどが挙げられる。術後においては、廃液中のプロテアーゼ活性の測定により臨床的に意義のある膵液漏の有無をベッドサイドで診断し、ドレーン管理の方針決定に利用できる可能性がある。また膵離断に最適化した自動縫合器の開発などにも活用できると考えられる。これらの技術の開発・推進によって、膵切除術の安全性が、今後、一層向上していくことが期待される。

6. 引用文献

1. Wataru K. Prospects for standardization of surgical procedures for carcinoma of the pancreas. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 104: 412-421, 2003.
2. Kleeff J, Michalski C, Friess H, Büchler MW. Pancreatic cancer: from bench to 5-year survival. *Pancreas*. 33: 111-118, 2006.
3. Grace PA, Pitt HA, Longmire WP. Pylorus preserving pancreatoduodenectomy: an overview. *Br J Surg*. 77: 968-974, 1990.
4. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2005. *Ca Cancer J Clin*. 55: 10-30, 2005.
5. Peters JH, Carey LC. Historical review of pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg*. 161: 219-225, 1991.
6. Singh SM, Longmire WP Jr, Reber HA. Surgical palliation for pancreatic cancer. *Ann Surg*. 212: 132-139, 1990.
7. 江川新一, 当間広樹, 大東弘明, 奥坂拓志, 中尾昭公, 羽鳥隆, 真口宏介, 柳澤昭夫, 田中雅夫. 膵癌登録 2007 ダイジェスト. *膵臓*; 23: 105-123, 2008.
8. 日本膵臓学会膵癌診療ガイドライン改定委員会. 科学的根拠に基づく膵癌診療ガイドライン 2009 年版. 金原出版, 2009.

9. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Proceedings of Central Social Insurance Medical Council, 2008.
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/s0514-6.html> [accessed 26 June 2009].
10. Finks JF, Osborne NH, Birkmeyer JD. Trends in hospital volume and operative mortality for high-risk surgery. *N Engl J Med.* 364: 2128-2137, 2011.
11. McPhee JT, Hill JS, Whalen GF, Zayaruzny M, Litwin DE, Sullivan ME, Anderson FA, Tseng JF. Perioperative mortality for pancreatectomy: a national perspective. *Ann Surg.* 246: 246-253, 2007.
12. Augustin T, Vandermeer TJ. Intraductal papillary mucinous neoplasm: a clinicopathologic review. *Surg Clin North Am.* 90: 377-398, 2010.
13. Roeyen G, Chapelle T, Borbath I, Delaunoit T, Demetter P, Demolin G, Hendlisz A, Pattyn P, Pauwels S, Peeters M, Van Cutsemo E, Van Hootegem P, Van Laethem JL, Verslype C, Ysebaert D. The role of surgery and transplantation in neuroendocrine tumours. *Acta Gastroenterol Belg.* 72: 39-43, 2009.
14. Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg.* 226: 248-257, 1997.

15. McKay A, Mackenzie S, Sutherland FR, Bathe OF, Doig C, Dort J, Vollmer CM Jr, Dixon E. Meta-analysis of pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy reconstruction after pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg.* 93: 929-936, 2006.
16. 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.
17. 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 Definition. Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. *Surgery.* 138: 8-13, 2005.
18. Vollmer CM Jr, Sanchez N, Gondek S, McAuliffe J, Kent TS, Christein JD, Callery MP; Pancreatic Surgery Mortality Study Group. A root-cause analysis of mortality following major pancreatectomy. *J Gastrointest Surg.* 16: 89-102, 2012.
19. Birkmeyer JD, Siewers AE, Finlayson EVA, Stukel TA, Lucas FL, Batista I, Welch HG, Wennberg DE. Hospital volume and surgical mortality in the United States. *N Engl J Med.* 346: 1128-1137, 2002.

20. 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.
21. Molinari E, Bassi C, Salvia R, Butturini G, Crippa S, Talamini G, Falconi M, Pederzoli P. Amylase value in drains after pancreatic resection as predictive factor of postoperative pancreatic fistula: results of a prospective study in 137 patients. *Ann Surg.* 246: 281-287, 2007.
22. Kawai M, Kondo S, Yamaue H, Wada K, Sano K, Motoi F, Unno M, Satoi S, Kwon AH, Hatori T, Yamamoto M, Matsumoto J, Murakami Y, Doi R, Ito M, Miyakawa S, Shinchi H, Natsugoe S, Nakagawara H, Ohta T, Takada T. Predictive risk factors for clinically relevant pancreatic fistula analyzed in 1,239 patients with pancreaticoduodenectomy: multicenter data collection as a project study of pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 18: 601-608, 2011.
23. Veillette G, Dominguez I, Ferrone C, Thayer SP, McGrath D, Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. Implications and management of pancreatic fistulas

- following pancreaticoduodenectomy: the Massachusetts General Hospital experience. *Arch Surg.* 143: 476-481, 2008.
24. Balcom JH 4th, Keck T, Warshaw AL, Graeme-Cook F, Fernández-del Castillo C. Prevention of pancreatic fistula with a new synthetic, absorbable sealant: evaluation in a dog model. *J Am Coll Surg.* 195: 490-496, 2002.
25. Shinci H, Wada K, Traverso LW. The usefulness of drain data to identify a clinically relevant pancreatic anastomotic leak after pancreaticoduodenectomy? *J Gastrointest Surg.* 10: 490-498, 2006.
26. Shyr YM, Su CH, Wu CW, Lui WY. Does drainage fluid amylase reflect pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy? *World J Surg.* 27: 606-610, 2003.
27. Wormsley KG, Goldberg DM. The interrelationships of the pancreatic enzymes. *Gut.* 13: 398-412, 1972.
28. Keller J, Laver P. Circadian pancreatic enzyme pattern and relationship between secretory and motor activity in fasting humans. *J Appl Physiol.* 93: 592-600, 2002.
29. 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.

30. Reseland JE, Holm H, Jenssen T, Jacobsen MB, Hanssen LE. Inhibitor-stimulated non-parallel pancreatic secretion in man: hormonal and neural regulation? *Scand J Gastroenterol.* 30: 72-80, 1995.
31. 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.
32. 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.
33. 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 γ -Glutamyltranspeptidase-Activated Fluorescent Probe. *Sci Transl Med.* 3: 110-119, 2011.
34. Sakabe M, Asanuma D, Kamiya M, Iwatate RJ, Hanaoka K, Terai T, Nagano T, Urano Y. Rational design of highly sensitive fluorescence probes for protease and glycosidase based on precisely controlled spirocyclization. *J Am Chem Soc.* 135: 409-414, 2013.

35. Yasuda K, Shiozawa M, Aiso S, Taniguchi S, Yamashita S. Distribution of gamma-glutamyl transpeptidase in human pancreas: immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem.* 38: 339-350, 1990.
36. Beaudoin AR, Grondin G, Laperche Y. Immunocytochemical localization of gamma-glutamyltranspeptidase, GP-2 and amylase in the rat exocrine pancreas: the concept of zymogen granule membrane recycling after exocytosis. *J Histochem Cytochem.* 41: 225-233, 1993.
37. Battistini B, Chailier P, Briere N, Beaudoin AR. Secretion of gamma-glutamyltranspeptidase by the pancreas: evidence for a membrane shedding process during exocytosis. *Life Sci.* 47: 2435-2441, 1990.
38. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci.* 52: 1-17, 2007.
39. Hasegawa K, Kokudo N, Sano K, Seyama Y, Aoki T, Ikeda M, Hashimoto T, Beck Y, Imamura H, Sugawara Y, Makuuchi M. Two-stage pancreatojejunostomy in pancreaticoduodenectomy: a retrospective analysis of short-term results. *Am J Surg.* 196: 3-10, 2008.

40. Konishi T, Hiraishi M, Kubota K, Bandai Y, Makuuchi M, Idezuki Y. Segmental occlusion of the pancreatic duct with prolamine to prevent fistula formation after distal pancreatectomy. *Ann Surg.* 221: 165–170, 1995.
41. 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.

7. 図

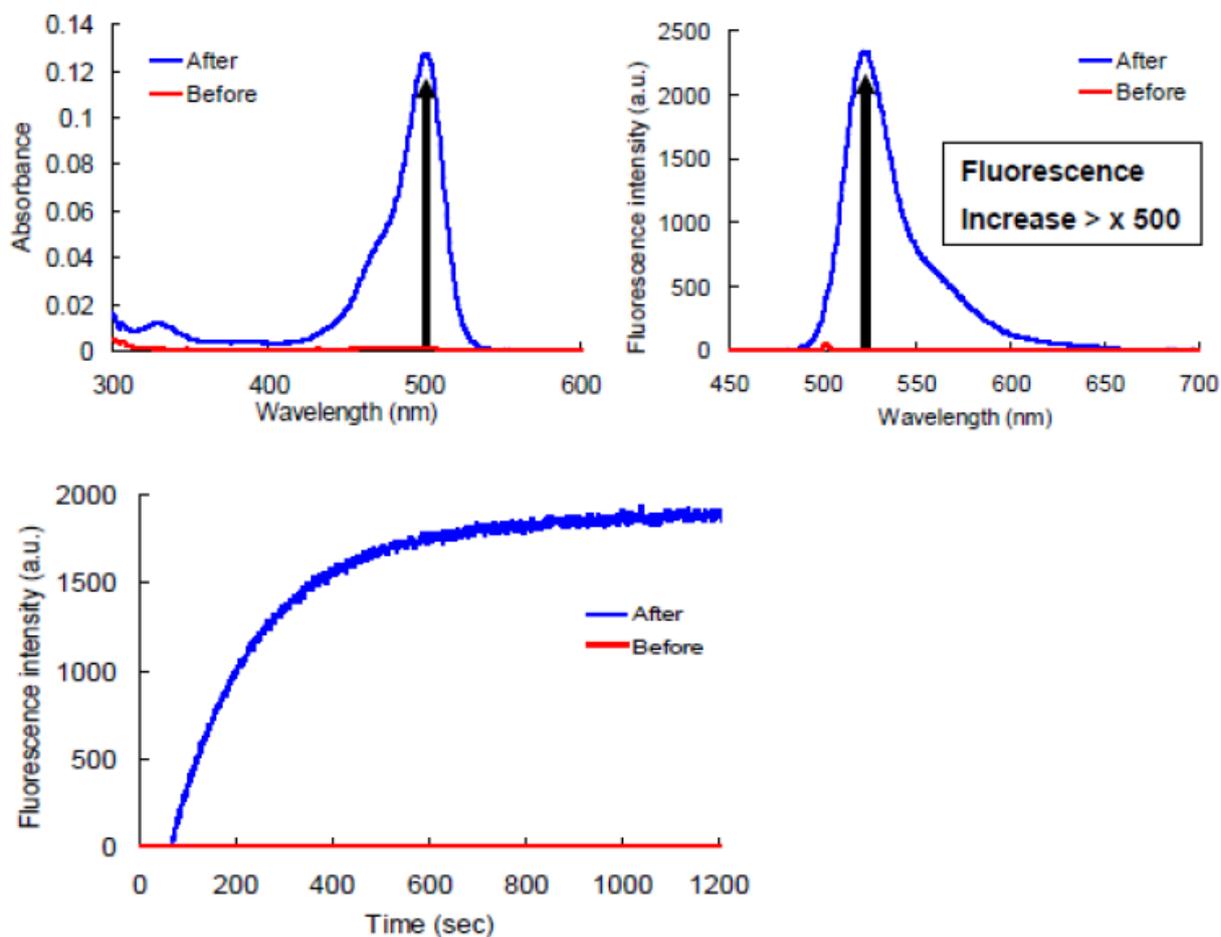


図 1. gPhe-HMRG のキモトリプシン添加による吸収・蛍光スペクトルの変化および蛍光強度の時間変化

gPhe-HMRG を用いて中性リン酸バッファー中でキモトリプシンによるアッセイを行った結果、酵素反応により即時的に吸収および蛍光強度が数百倍ほど上昇しキモトリプシンプローブとして機能することが確認された。実験条件は gPhe-HMRG のジメチルスルホキシド溶液 (2.4 mM) のうち 3 μ L を 3 mL の 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) に溶かし (final probe concentration 2.4 μ M)、キモトリプシン (4.6 units) を加え、37 $^{\circ}$ C で酵素反応を行った。

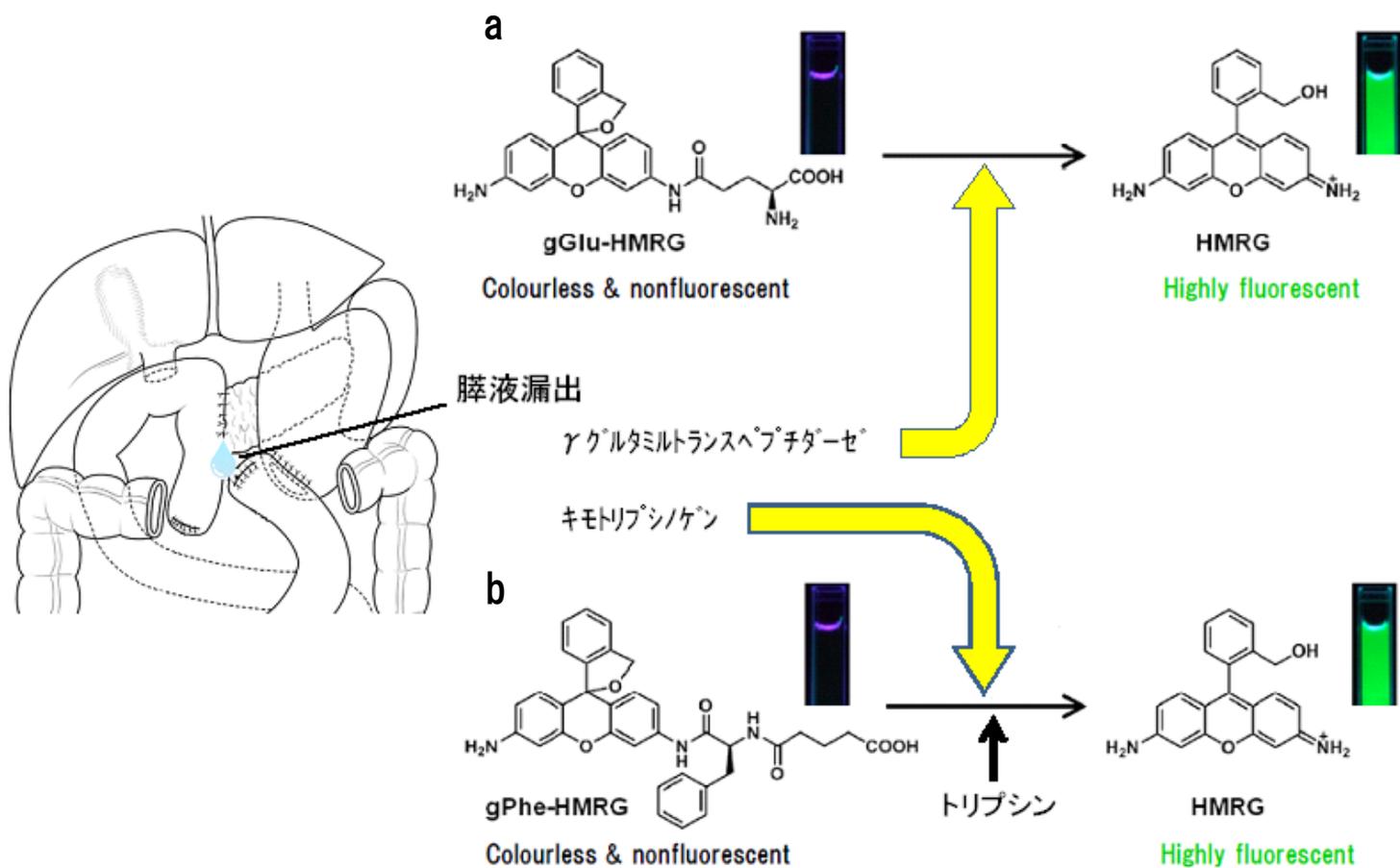


図 2. gGlu-HMRG と gPhe-HMRG の構造式

- 膵液中の γ グルタミルトランスぺプチダーゼが、gGlu-HMRG を加水分解し、HMRG が開環構造となり、蛍光を呈する。
- 膵離断面から漏出した膵液内に含まれるキモトリプシノゲンに対し、トリプシンを添加した gPhe-HMRG を加えることで、加水分解が生じ、HMRG が開環構造となり、蛍光を呈する。

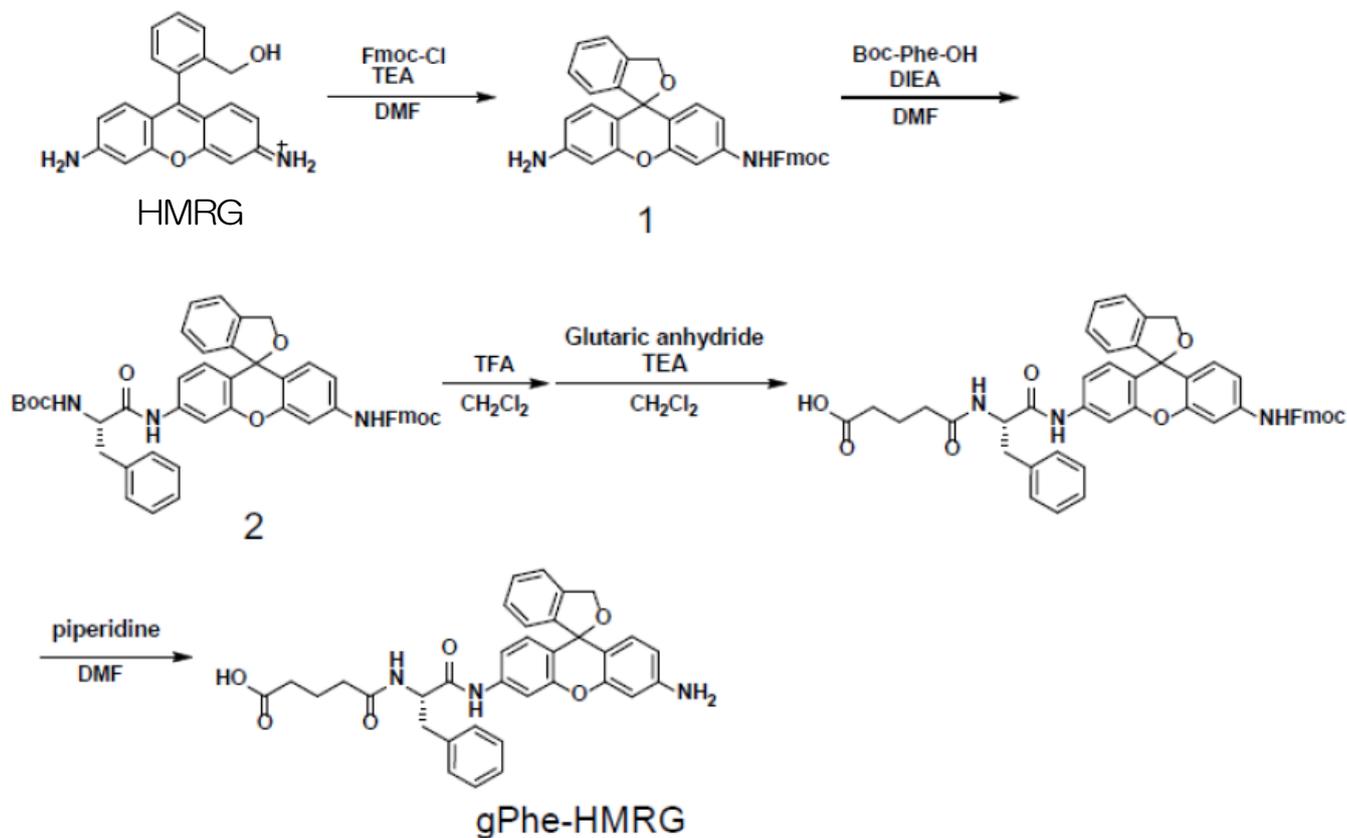


図 3. キモトリプシン活性検出蛍光プローブの合成

HMRG とトリエチルアミン(TEA)をジメチルホルムアミド(DMF)に溶かし、クロロギ酸 9-フルオレニルメチル(Fmoc-Cl)を溶解した DMF を加えた後、溶媒を減圧除去し残渣を精製し、化合物 1 を合成。化合物 1 と N,N-ジイソプロピルアミン(DIEA)を DMF に溶かし、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニン(Boc-Phe-OH)を溶かした DMF を加え、溶媒を減圧除去し残渣を精製し、化合物 2 を合成。化合物 2 をトリフルオロ酢酸/ジクロルメタン溶液に溶解した後、溶媒を減圧除去し得られた個体を、ジクロルメタン及び炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液で抽出した。有機層に硫酸ナトリウムを加えてろ過した後に、溶媒を除去し固体を得た。得られた個体をジクロルメタンに溶解し、グルタル酸無水物と TEA を加えた後、溶媒を減圧除去し、残渣を DMF に溶解し、Boc-Phe-OH を加えた。溶媒を減圧除去後に、ピペリジン/DMF 溶液を加え、溶媒を除去し、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製を行い、gPhe-HMRG を得た。

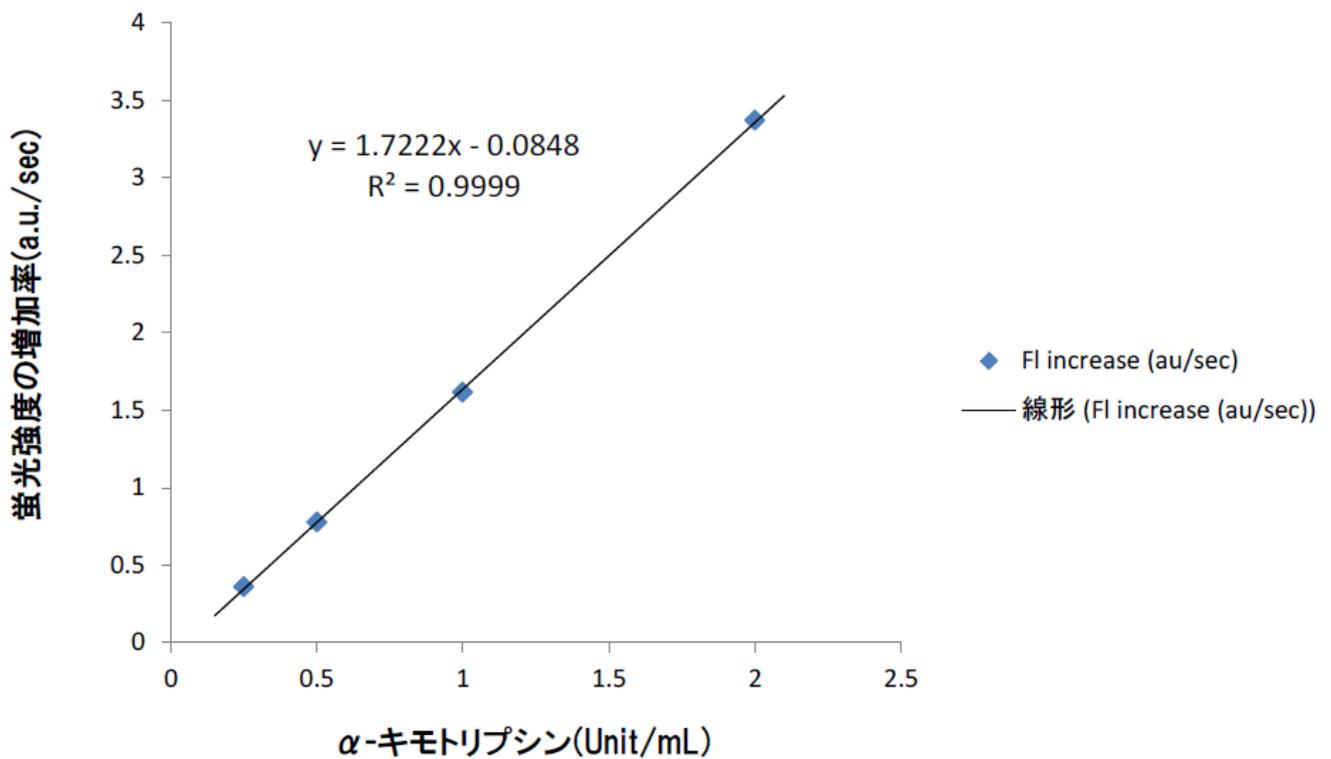


図 4. キモトリプシン濃度と gPhe-HMRG プロープによる蛍光強度増加率の関係

様々なαキモトリプシン濃度において、gPhe-HMRG プロープによる蛍光強度を測定し、蛍光強度上昇の速度を数値化した。gPhe-HMRG プロープを用いることで、キモトリプシン活性を十分な線形性を持って定量可能であることが確認できた。実験条件は、Hitachi FL7000 蛍光光度計を使用し、gPhe-HMRG 濃度は 1μM, αキモトリプシン濃度は 0.25~2.0 unit/mL とし、酵素反応は室温で行った。

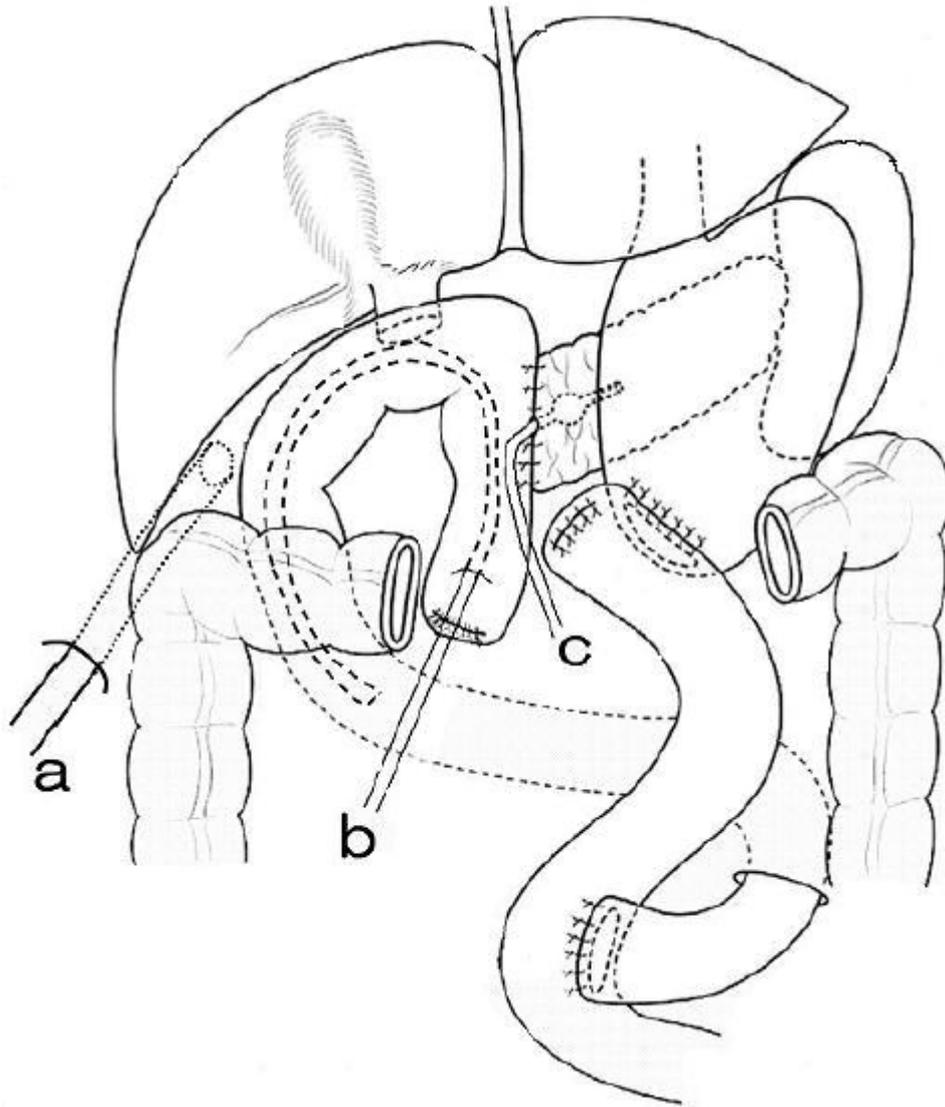


図 5. 膵頭十二指腸切除術後の消化管再建とドレーン留置の模式図

二期的膵空腸吻合を伴う膵頭十二指腸切除術において消化管再建は **double Roux-en-Y** 法で施行した。2 本の空腸ループを準備し、1 本は膵管と胆管の再建に用い、もう 1 本は胃空腸吻合に用いた。閉鎖式吸引ドレーンを胆管空腸吻合部近傍の腹腔内に留置し(a)、挙上空腸内を減圧し胆管炎を防ぐ目的で腸瘻チューブを留置し(b)、完全外瘻の形式で主膵管内に膵液廃液用チューブを留置した(c)。

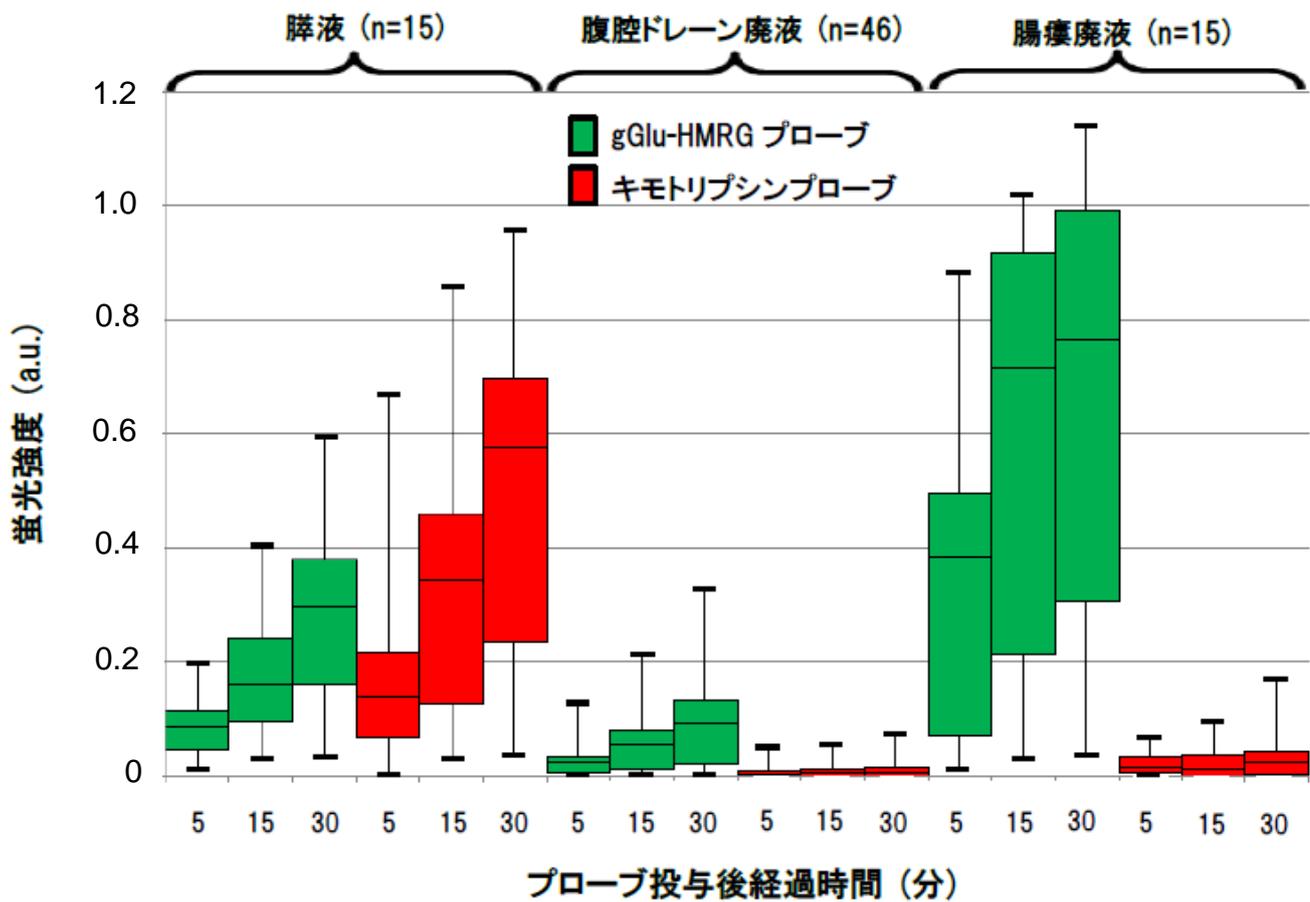


図 6.2 種のプローブを用いた各種廃液検体の蛍光強度の継時的変化
膵液 15 検体、腹腔ドレーン廃液 46 検体、腸瘻廃液 15 検体で蛍光強度を測定。
箱の内部の水平ラインは中央値であり、箱の上辺・下辺は四分位範囲を、エラ
ーバーは範囲を示している。

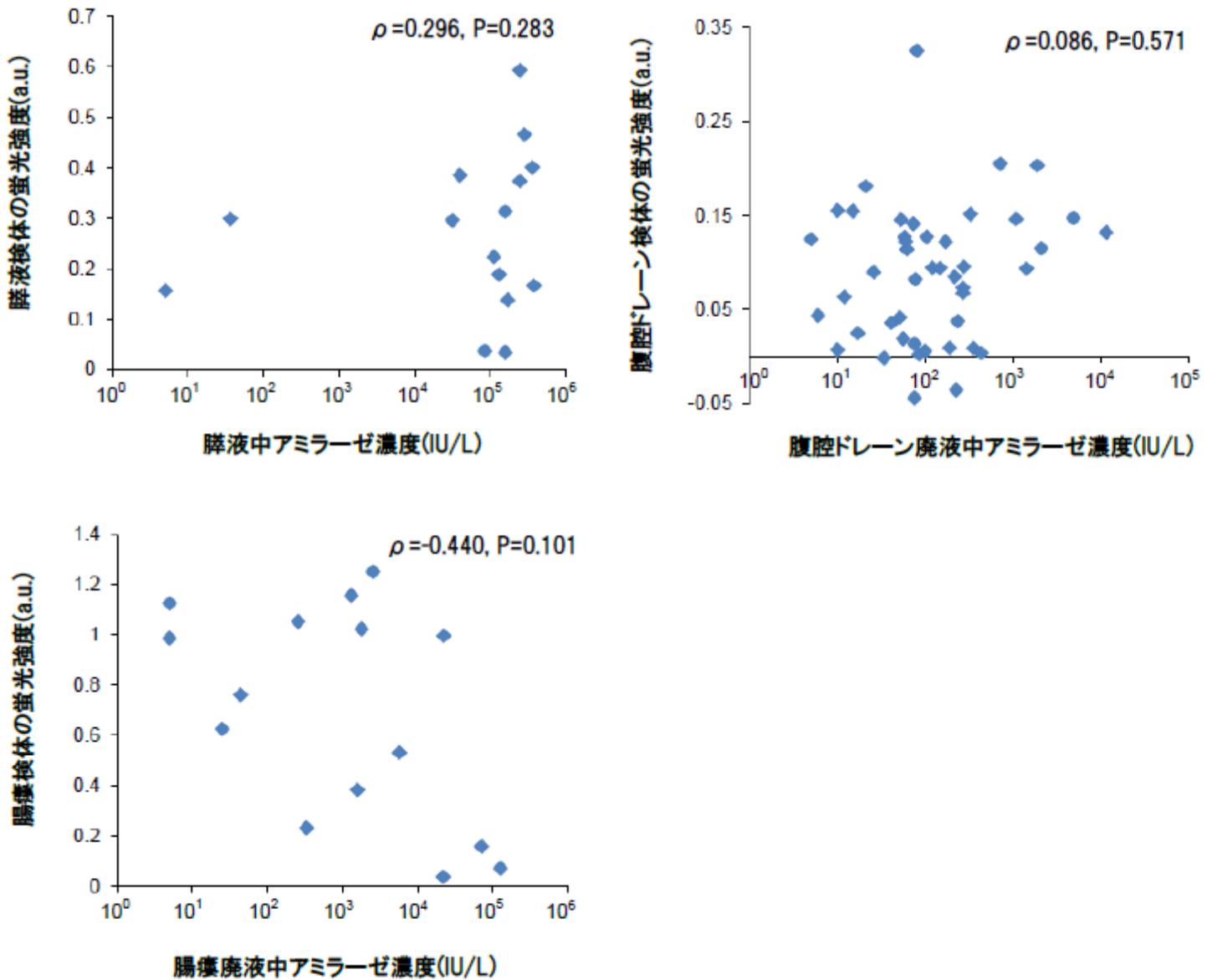


図7. gGlu-HMRG プローブ添加後 30 分における各種検体の蛍光強度と各検体アミラーゼ値との関係

gGlu-HMRG プローブを添加し 30 分の保温攪拌後の各種検体(膵管チューブの膵液廃液[15 検体]、腹腔ドレーン廃液[46 検体]、腸瘻チューブの腸液廃液[15 検体])の蛍光強度を各検体のアミラーゼ値と比較したところ、いずれも有意な相関関係を認めなかった。

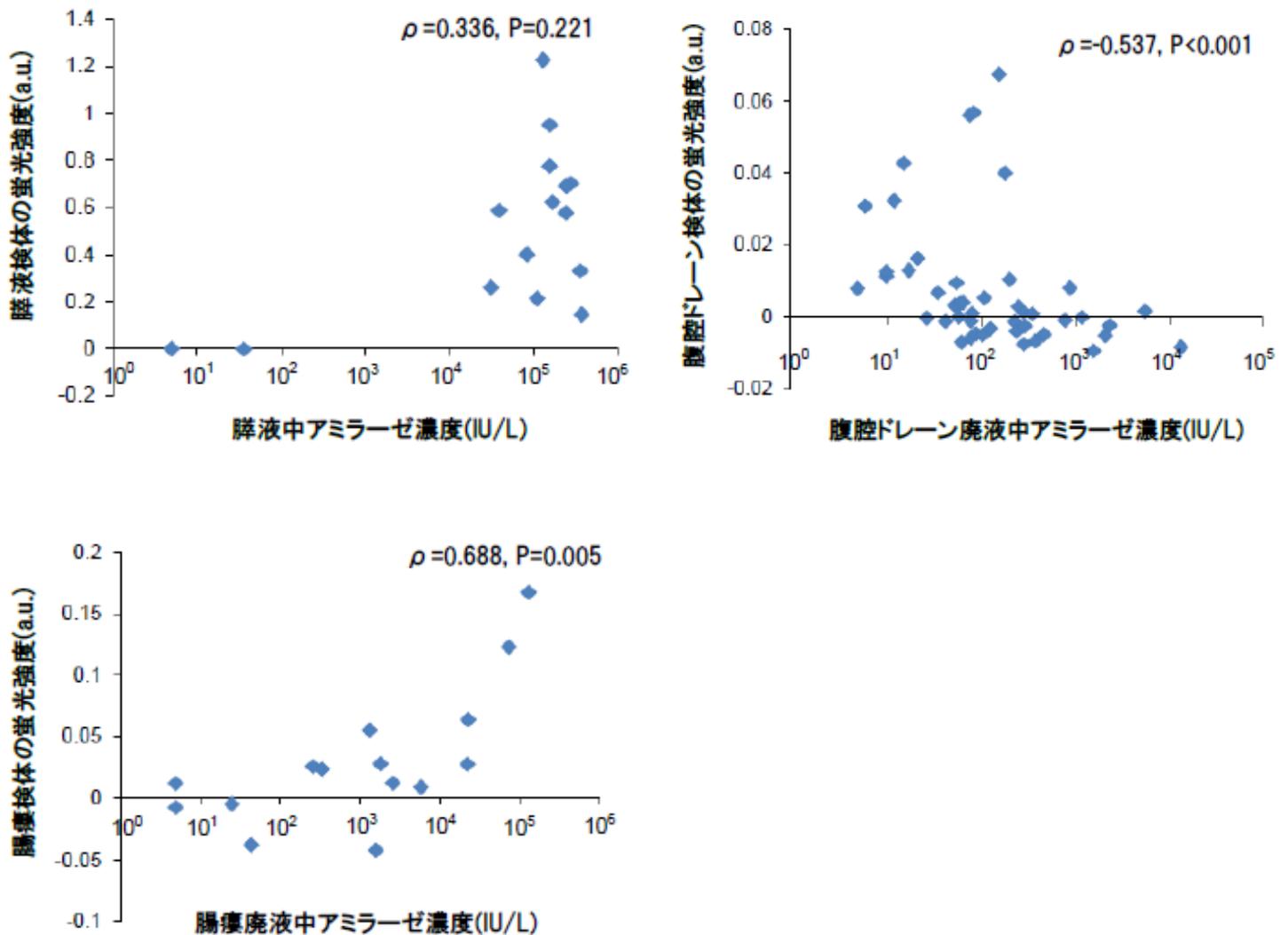


図 8. キモトリプシンプローブ添加後 30 分における各種検体の蛍光強度と各検体アミラーゼ値との関係

キモトリプシンプローブを添加し 30 分の保温攪拌後の各種検体(膵管チューブの膵液廃液[15 検体]、腹腔ドレーン廃液[46 検体]、腸瘻チューブの腸液廃液[15 検体])の蛍光強度を各検体のアミラーゼ値と比較した。膵液検体では有意な相関関係は認めず、腹腔ドレーン検体では有意な負の相関関係を認め($\rho = -0.537, P < 0.001$)、腸瘻検体では有意な正の相関関係を認めた($\rho = 0.688, P = 0.005$)。

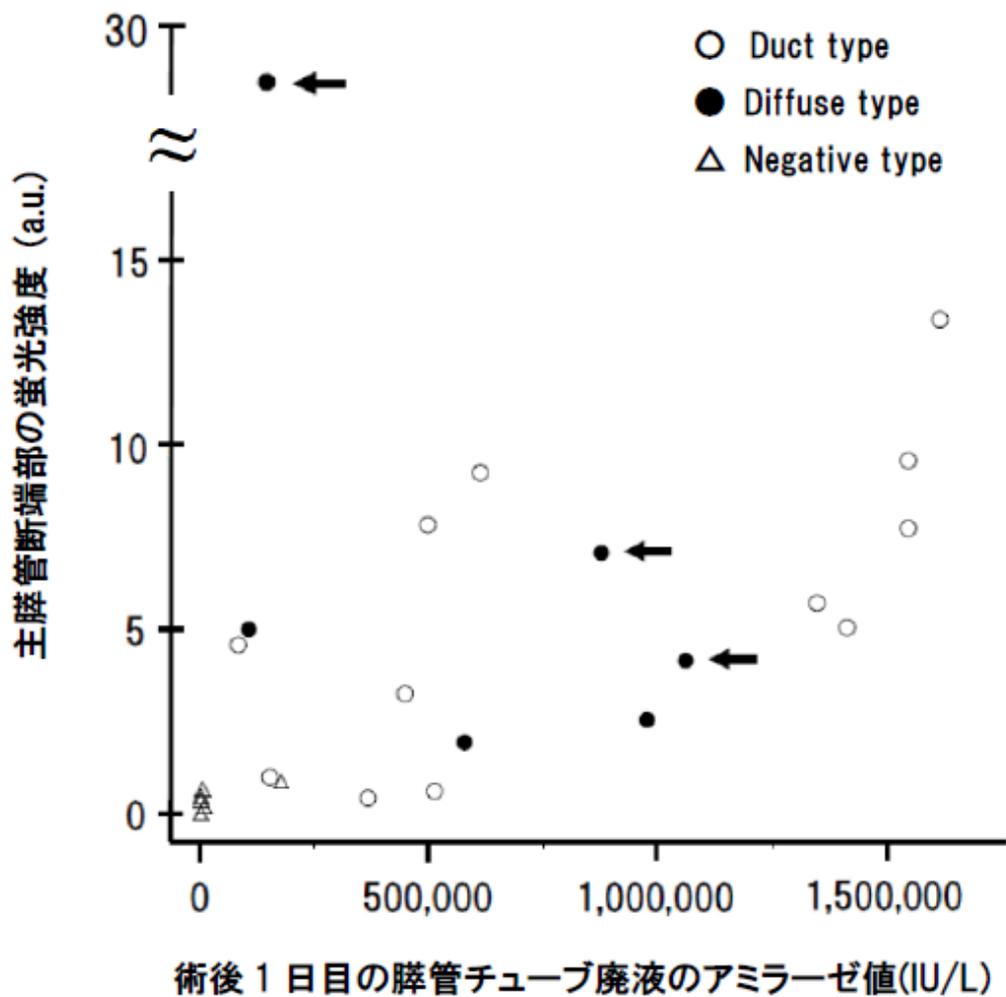


図9. 主膵管断端部の蛍光強度と術後1日目に回収された膵管チューブ廃液のアミラーゼ値との関係

膵離断面の蛍光パターンは肉眼的に以下の3タイプに分類された。主膵管断端にのみ蛍光を認めるタイプ(duct type)、主膵管断端に加え周囲膵実質の蛍光も認めるタイプ(diffuse type)、膵離断面に蛍光を認めないタイプ(negative type)である。矢印はISGPF分類 grade Cの術後膵液漏を呈した症例を示している。手術時に測定された主膵管断端部の蛍光強度と、術後1日目の膵管チューブ廃液から回収された膵液検体のアミラーゼ値には有意に正の相関関係を認めた($\rho=0.664$, $P<0.001$)。

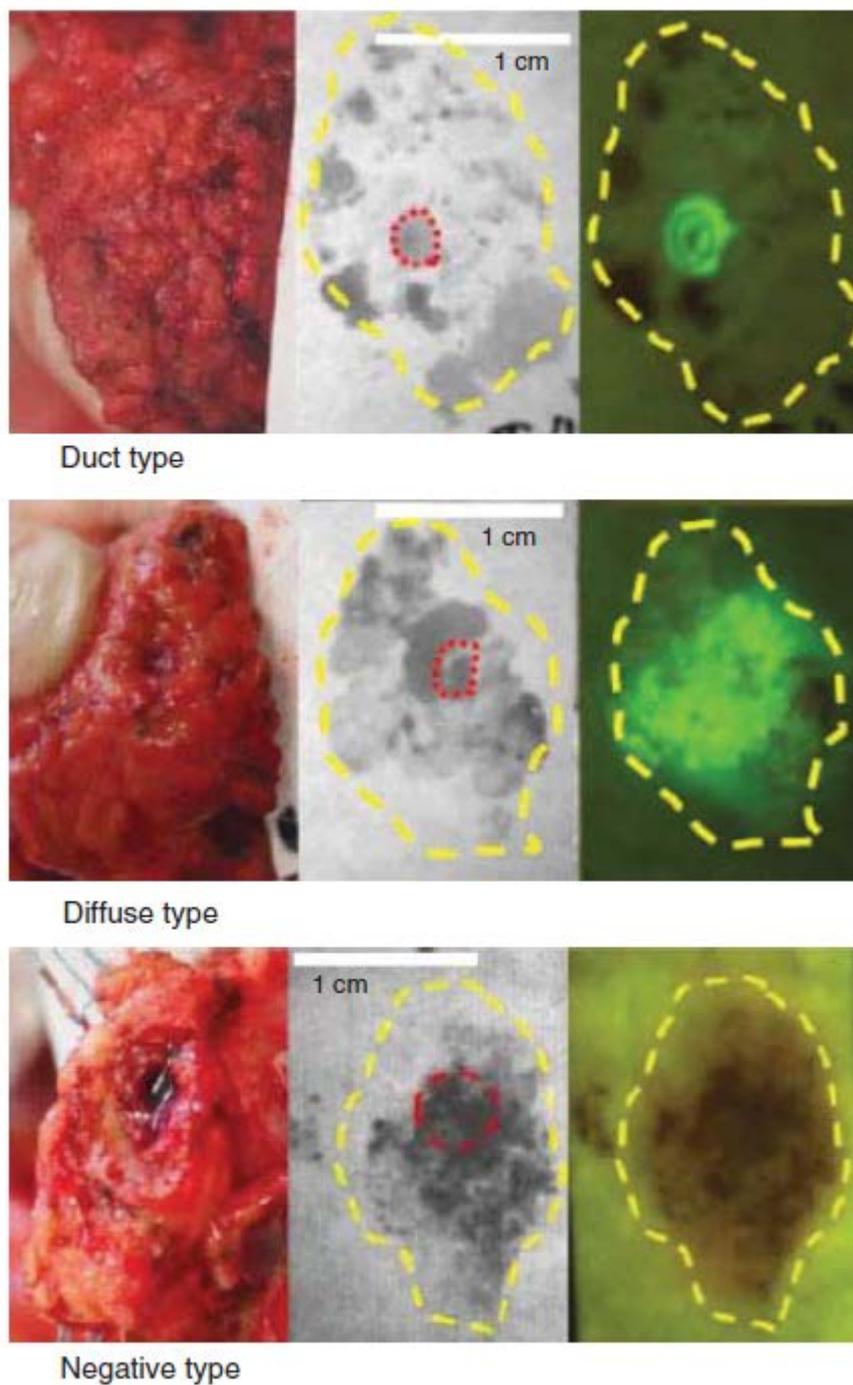


図 10. キモトリプシンプローブによる膵離断面の蛍光パターン評価

左端は、実際の膵離断面の写真で、中央は膵離断面に濾紙を押し付けた後の濾紙の白黒写真で、右端はキモトリプシンプローブを濾紙に噴霧した 1 分後に得られた蛍光写真(MaestroTM 画像システム)である。赤の点線は主膵管断端を示し、黄色の点線は膵離断面を示している。

8. 表

表 1. キモトリプシンプローブ噴霧後、膵離断面蛍光の有無による患者背景と術後経過の比較

	蛍光有り(n=23)	蛍光無し(n=7)	P§
蛍光パターン	Duct or diffuse type	Negative type	
主膵管部の蛍光強度(a.u.)*	4.77 (0.45–28.63)	0.44 (0.06–0.91)	<0.001¶
年齢 (歳)*	68 (45–78)	75 (63–83)	0.095¶
性別 (男性: 女性)	21: 2	5: 2	0.180
病理学的診断			
膵癌あるいは膵管内乳頭粘液性腫瘍	8	7	0.003
その他の腫瘍	15	0	
MPD index*	0.19 (0.10–0.78)	0.51 (0.34–0.60)	0.006¶
術後 1 日目のアミラーゼ濃度 (IU/L)*			
腹腔ドレーン廃液	5946 (48–73262)	72 (35–2464)	<0.001¶
膵管チューブ廃液	580700 (16048–1621000)	2119 (5–174860)	<0.001¶
在院死	1	0	0.575
合併症率†	11	4	0.666
膵液漏‡	13	0	0.008
在院期間(日)*	27 (12–55)	20 (13–29)	0.401¶

*値は中央値で括弧内は範囲である。†膵液漏以外の合併症は、胃内容停滞(5例)・胆管炎(3例)・カテーテル感染(2例)・創傷感染症(2例)・誤嚥性肺炎(1例)・胸水貯留(1例)・後出血(1例)であった。‡膵液漏に関する国際的研究グループの基準による Grade B 以上。
a.u., arbitrary units; MPD, main pancreatic duct. §Fisher の正確確率法(ただし、¶Wilcoxon rank sum test を除く)。

9. 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 國土典宏教授、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 石沢武彰助教に感謝致します。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。