

論文の内容の要旨

論文題目 膵液を特異的に標識する新規蛍光プローブの開発と膵液漏診断への応用

氏名 山下 俊

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いる。本邦では年間 11,000 件以上の膵手術が施行されており、画像診断の進歩に伴い胆膵疾患の診断能が向上した結果、手術件数は世界的に増加している。しかし、手術技術が発達した今日でも、膵切除後には膵液漏が高率(10-50%)に発生する。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 1-7.8%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。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されているが、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ことも多い。また、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受けやすく、アミラーゼの分泌と必ずしも相関していない。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医療費の縮減に寄与すると期待される。

膵液を特異的に蛍光標識するために、2 種類の蛍光プローブを利用した。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)と 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)である。両者ともにヒドロキシメチルローダミングリーン(hydroxymethyl rhodamine green: HMRG)という構造を有し、これは約 490nm の波長の光で励起され、約 520nm の波長の蛍光を発するという性質を持つ。gPhe-HMRG はキモトリプシンの存在下でのみ加水分解を受け発光する。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。従って、膵離断面における膵液漏の診断のために、gPhe-HMRG 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)。gGlu-HMRG プローブは膵液中に含まれる γ グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -glutamyltranspeptidase: GGT)により加水分解を受け発光する。

両プローブを利用し、膵切除術で得られる体外サンプルのプロテアーゼ活性を評価した。膵切除手術(18件)施行後 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、各検体のアミラーゼ濃度を測定するとともに、前述 2 種プローブ(キモトリプシンプローブ・gGlu-HMRG プローブ)を混入・攪拌し、5 分・15 分・30 分と経過した段階での蛍光強度(arbitrary unit: a.u.)を測定した。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中央値 0.30 (0.03-0.59) a.u.に達した。これは、腸瘻チューブ廃液の蛍光強度中央値 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中央値 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、中央値 0.59 (0.14-1.23) a.u.に達した。これは、gGlu-HMRG プロ

ープ使用時の膵管チューブ廃液検体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であった。これらの結果から、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考えられた。gGlu-HMRG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するため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。廃液ドレーン検体の実験結果を踏まえて、膵離断面における膵液漏出部位の同定ための実験ではキモトリプシンプローブのみを用いて行った。膵頭十二指腸切除術29例、膵分節切除術1例の計30例で、摘出した検体の膵離断面に濾紙を10秒間貼付した後、膵離断面が転写された濾紙にキモトリプシンプローブを噴霧し、1, 3, 5分後の主膵管部における蛍光強度を測定した。また全例で膵管チューブが留置されたため、術後1日目の膵液を回収しアミラーゼ濃度を測定した。術後経過を全例で調査し、膵離断面の蛍光パターンと膵液漏の有無・程度などを比較検討した。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記録した。キモトリプシンプローブ噴霧後5分での主膵管部の蛍光強度は、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濃度と有意に正の相関を示した($p=0.664$, $P<0.001$)。一方、膵離断面の蛍光パターンは3種類に分類され、主膵管部のみに蛍光を認めるタイプ(duct type, 16例)、主膵管部とその周囲の膵離断面全体的に蛍光を認めるタイプ(diffuse type, 7例)、蛍光を認めないタイプ(negative type, 7例)である。前2者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.)。主膵管部蛍光陽性となった23例(duct or diffuse type)と、陰性となった7例(negative type)

に関する、患者背景因子と術後経過を比較したところ、膵癌と膵管内乳頭粘液性腫瘍の頻度は、蛍光陽性群で陰性群より有意に低かった(23人中8人 v.s. 7人中7人, $P=0.003$)。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、陽性群の方が陰性群より有意に高値であった。術後膵液漏(ISGPF分類で grade B 以上)に関しては、陽性群でのみ発生した(23人中13人 v.s. 7人中0人, $P=0.008$)。膵離断面における主膵管部蛍光強度は、術後1日目の膵管チューブ廃液のアミラーゼ値と有意な正の相関関係を示し、キモトリプシンプローブによる膵液の特異的な標識能が確かめられた。更にプローブ噴霧後、非常に迅速に膵液漏出部位が可視化されるため、手術中に同部位をすぐに閉鎖することも可能と考えられた。また、膵空腸吻合を行った後の ISGPF grade B 以上の膵液漏発生を膵離断面の蛍光の有無で予測できる可能性も示唆された。術中に膵液漏発生のリスクが高度と判断されれば、より安全性の高い吻合方法を選択したり、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の留置を割愛したり、という方針決定の根拠になることも期待された。今後は、本プローブの安全性を確認し、*in vivo* セッティングの前向き試験により有用性の再評価を行っていく必要がある。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向上していくことが期待される。