

## 日本医療研究開発機構 臨床研究・治験推進研究事業 事後評価報告書

公開

### I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 手術中に膵液漏を抽出する蛍光イメージング技術の開発  
(英語)

研究開発実施期間: 令和3年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 石沢 武彰  
(英語) ISHIZAWA, Takeaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 大阪公立大学 大学院医学研究科 肝胆膵外科学 教授  
(英語) Professor of the department of Hepatobiliary-Pancreatic Surgery,  
Graduate School of Medicine, Osaka Metropolitan University

### II 研究開発の概要

・本技術の目標は、本来無色透明である膵液を膵酵素活性に基づいて手術中に蛍光標識することである。本技術により、膵液の漏出部位を同定・閉鎖することが可能になると同時に、術後の重症膵液漏発生のリスクに基づいて適切に膵閉鎖・吻合法を選択し、ドレーン管理することができると期待される。

・研究者らは、新規に合成した glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green [gPhe-HMRG] に trypsin を添加すると、手術中に膵断端を転写した濾紙上で膵液漏出部位を描出し膵液漏発生のリスクが予測できることを見出した (Br J Surg 2013;100:1220-8)。また、本剤 (キモトリプシンプローブ) をブタ体腔内で膵断端に散布すると膵液漏出部位がリアルタイムに描出できることを明らかにした (Gastroenterology 2015;149:1334-6)。

・「微量 (2mL 以下) の薬剤を診断目的で体腔内に散布する」という技術の前例がほぼ皆無であり、当初は診断薬として製造販売する可能性を含めて規制当局と協議を重ねたが、最終的には医薬品として開発すべきという見解が示され、規程の非臨床安全性試験を完了した。2020 年には PMDA 対面助言を受審し、治験薬としてのキモトリプシンプローブの安全性試験の充足性と、第 I 相試験のデザイン (膵体尾部切除を受ける患者 6 名の体腔内に治験薬を散布し、安全性を確認する) の妥当性について確認が得られた。

・2021 年度から、本事業の支援を得て、開発計画に着手した。当初は、2023 年度に第 I 相試験を完了し、同時に撮像システムの開発と製剤化を進める計画であった。研究開始後、共同開発企業が添加物として用いる trypsin の管理について規制当局の見解を確認したところ、「製造販売承認申請をする場合、trypsin は原薬としての品質管理が必要である」との結果であった。従って、早期の臨床導入を目指すために、本研究で実施する医師主導試験においても trypsin を治験グレードでなく GMP 下で製剤化する方針とし、第 I 相試験の開始予定を 2024 年度に延期、そのための治験薬製造工程を進めた (gPhe-HMRG の製造・分析法確立、原薬 HMRG の GMP 製造、添加物

trypsin の feasibility study など)。キモトリプシンプローブを蛍光描出するための内視鏡装置については、共同開発企業と連携して 2021 年度に基本設計と仕様決定を行い、2022 年度内に試験機が完成した。また、キモトリプシンプローブを用いる場合、手術室で gPhe-HMRG と添加物 trypsin を「シリンジ内で混合することなく」対象物に散布する必要があるが、これを可能にする剤型開発を共同開発企業と進めた。

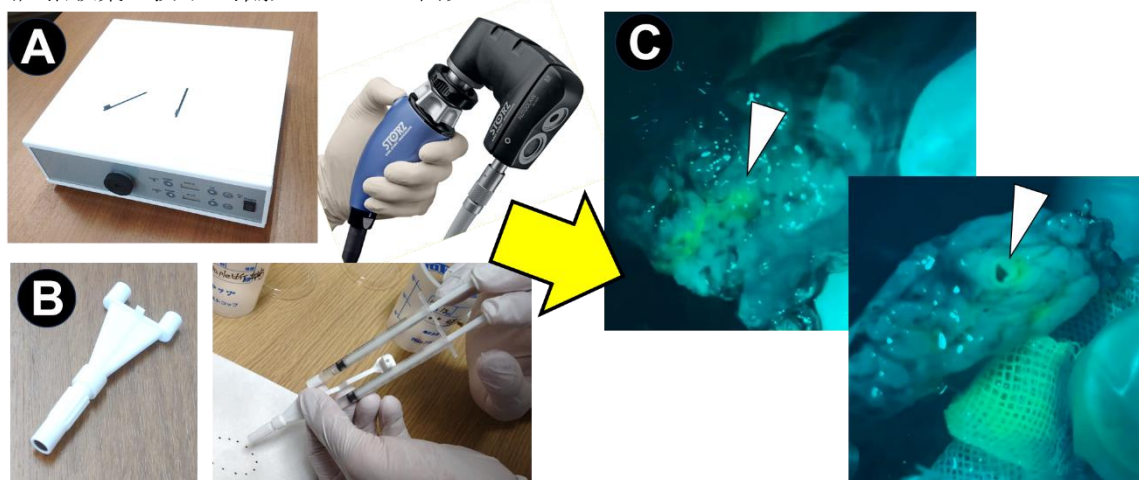
・第 I 相試験（安全性試験）の実施準備と並行して、キモトリプシンプローブの膵液漏診断における有効性を推定するための臨床研究を推進した。膵頭十二指腸切除術 52 例において、術後に採取される膵液にキモトリプシンプローブを作用させて蛍光値を測定したところ、従来法（体液のアミラーゼ濃度の測定）よりも正確に有症状膵液漏（35%に発生）の発生を予測できる可能性が示され、論文報告した（Pancreatology 2024;24:169-77）。また、万一、添加物 trypsin の調達あるいは GMP 製造に解決不能の問題が生じた場合に備え、単剤で膵液を特異的に蛍光標識し得る蛍光プローブの探索も進めた。計 411 種のプロテアーゼ/ホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ検出用プローブを術後患者から採取した膵液や腹水に網羅的に作用させた結果、唯一 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase（ENPP）1 で加水分解を受ける化合物が候補プローブとして同定された（HPB 2025;27:150-8。 特許出願中）。

・添加物 trypsin の GMP 製造に伴い遅延した開発計画を回復すべく、共同研究企業が別用途で開発する蛍光試薬が膵液を標識できる可能性について探索を行った。結果、眼疾患の診断用途で開発を先行する蛍光試薬「X」が、trypsin 添加下において、当初の gPhe-HMRG と同等以上の膵液標識能を持つことが全く新規に見出された。「X」は眼疾患診断用途で投与することを想定した安全性試験を完了し、GMP 製造も確立している。したがって、治験薬を gPhe-HMRG から「X」に変更することで、膵液漏蛍光イメージング技術をより早期に臨床導入できると推定された。上記の変更の可能性を AMED に中間報告（2023 年 8 月 4 日）、予備検討の結果に基づいて「X」を中心に開発する方針を PSPO 会議（2023 年 11 月 22 日）にて提案。開発方針変更の了解が得られ、本事業の委託期間内の目標を「trypsin 添加『X』を対象とした第 I 相臨床試験の実施に必要な準備を最大限行うこと」に再設定することとなった。

・2024 年度は、10 月 30 日に「trypsin 添加『X』」を膵液漏検出目的で腹腔内投与する第 I 相試験を実施するための非臨床安全性試験の充足性について PMDA 対面助言を受審。その回答に基づき、本研究計画の最終期間内に 8 項目の安全性試験と製剤開発をほぼ完了した。

・さらに、膵体尾部切除 10 例の切除標本において、膵断端に trypsin 添加「X」を散布、これまでに構築した励起光源とカメラシステムを用いて膵液の漏出をリアルタイムに描出できることを確認した（図）。

（図） 治験薬の投与・撮影システムの開発



A: 治験薬励起用 490nmLED と、カラー撮影用の白色光源を搭載した装置本体（左）および外視鏡（右）

B: trypsin と「X」を同時に散布できるシリンジアダプター

C: 患者膵断端で、主膵管断端（矢頭）から流出する膵液（緑色蛍光）がリアルタイムに描出された  
（2 名の異なる症例。肉眼観察を模するためスマートフォンで撮影）

・本事業の結果、治験薬（trypsin 添加「X」）を対象とした第 I 相臨床試験を実施するうえで、PMDA と合意形成した非臨床試験のうち残るものは 1 項目（反復投与毒性試験）のみとなった。今後は、企業主導で 2026 年度前半に上記試験を完遂する計画としている。これまでに実施した遺伝毒性試験や一般毒性試験においても毒性の懸念は認められていない。治験薬製造工程については、まず「X」に関してすでに実機試作を進めており、2025 年度内に治験薬の製造が完了する。Trypsin は、治験薬製造のための原薬入手が可能であることが確認され、現在、製剤製造委託施設にて治験薬の製造法を開発している。これらの工程をふまえ、2026 年度後半に国内第 I 相臨床試験を開始する計画である。

・今回、膵液標識能が見出された蛍光プローブ「X」は、癌組織で高発現する酵素と反応し、単独で術中癌診断用プローブとして活用できる可能性がある。特に膵臓癌や胆管癌は、手術中にその進展範囲を正確に同定することが難しく、もし「X」がこれらの癌を描出できれば根治性の向上に結び付く。腹水や単純、膵液中の癌細胞を高感度に検出する技術にもつながる可能性がある。現在、「X」を膵液蛍光標識および癌標識に応用することを目的とした新たな研究契約を、共同開発企業と締結している。

・単剤で膵液を蛍光標識し得る ENPP1 標識プローブについては、膵液イメージングの際に trypsin を添加することが製剤製造上あるいは臨床的に問題となった場合に備え、並行して開発を継続する計画である（PCT 各国移行手続き中）。

・撮像装置に関しては、現在臨床で広く普及している indocyanine green (ICG) の近赤外蛍光イメージングと、HMRG の蛍光とを同時に描出し得る dual imaging system の開発を、研究代表者が国内企業と共同で進展させている。

・そのほかの副次的な成果としては、患者の膵断端から膵液が漏出するパターンの検討に基づいて、より少ない運針で膵全体を閉鎖できる膵手術用の縫合糸をデザインし（Glob Health Med 2022;4:225-9）、企業と共同して上市を果たした。

The objective of this technology is to enable intraoperative fluorescent labeling of pancreatic juice - which is normally colorless and transparent—based on pancreatic enzyme activity. This would allow for the identification and closure of pancreatic leakage sites and facilitate appropriate selection of closure techniques and postoperative drain management according to the risk of clinically relevant postoperative pancreatic fistula. The researchers discovered that the novel probe glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green (gPhe-HMRG), when activated by trypsin, can visualize leakage sites on filter paper impressions of pancreatic transection margins during surgery, thus predicting the risk of leakage (Br J Surg 2013;100:1220–8). Furthermore, the probe enabled real-time visualization of leakage in a porcine intraperitoneal model (Gastroenterology 2015;149:1334–6). Since there was virtually no precedent for diagnostic agents sprayed intraperitoneally in small volumes (<2 mL), extensive consultation with regulatory authorities was conducted. Ultimately, the agent was deemed a pharmaceutical requiring standard non-clinical safety evaluations, which were completed. In 2020, the team received advice from the PMDA confirming the adequacy of the safety data and the design of a Phase I trial involving six patients undergoing distal pancreatectomy.

With support from this project starting in FY2021, the development plan was initiated. While the initial goal was to complete the Phase I trial by FY2023, regulatory review of trypsin (used as an additive) concluded that it must be manufactured and quality-controlled as an active pharmaceutical ingredient (API) if the product is to be approved. As a result, trypsin was also formulated under GMP, and the start of the Phase I trial was postponed to FY2024. Preparations included the establishment of gPhe-HMRG synthesis and analysis protocols, GMP production of the HMRG active ingredient, and feasibility studies for trypsin. The design and specifications of the endoscopic imaging system for visualizing the probe were finalized in FY2021 in collaboration with the industry partner, and a prototype was completed in FY2022. A formulation was also developed to allow separate application of gPhe-HMRG and trypsin without mixing in the syringe. In parallel with preparations for the safety trial, a clinical study was conducted to estimate the probe's diagnostic efficacy. In 52 patients

undergoing pancreaticoduodenectomy, fluorescence values in postoperative pancreatic juice samples reacted with the probe were more accurate than traditional amylase-based methods in predicting CR-POPF (35% incidence) (Pancreatology 2024;24:169–77). As a backup strategy, a screening of 411 enzyme-targeted probes using clinical pancreatic juice and ascitic fluid identified a candidate compound hydrolyzed by ENPP1 (HPB 2025;27:150–8; patent pending).

To mitigate delays caused by GMP production of trypsin, an alternative fluorescent probe "X" (originally developed for ophthalmologic diagnostics) was explored. It was found to have equivalent or superior pancreatic juice labeling ability in the presence of trypsin. "X" had already passed safety testing and had established GMP production. This prompted a shift in the clinical development focus from gPhe-HMRG to "X", as reported to AMED in August 2023 and proposed at the PSPO meeting in November 2023. The revised project goal was set as completing preparations for a Phase I trial using trypsin-activated "X". In FY2024, a PMDA consultation was held on October 30 to confirm the sufficiency of preclinical safety data for intraperitoneal administration of trypsin-activated "X" in a Phase I trial. Based on their feedback, eight safety studies and formulation development were nearly completed by the project's final phase. Additionally, in resected specimens from 10 distal pancreatectomy cases, the application of trypsin-activated "X" to the transection margin enabled real-time visualization of pancreatic juice leakage using the previously developed excitation and camera system.

As a result of this project, only one non-clinical study - repeat-dose toxicity testing - remains to be completed for regulatory clearance of the Phase I clinical trial using the investigational agent (trypsin-activated "X"). The remaining study is scheduled for completion in the first half of FY2026 under industry sponsorship. No safety concerns have been identified in previous genotoxicity or general toxicity studies. The manufacturing process for the investigational drug has progressed, with prototype production of "X" already underway, aiming for completion within FY2025. The availability of GMP-grade trypsin has been confirmed, and formulation development is currently ongoing at a contracted facility. Based on these preparations, the domestic Phase I trial is scheduled to begin in the second half of FY2026.

ここまでを総括報告として AMED のホームページに掲載

