

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09483

研究課題名(和文) タンパク結合型ICGを用いたリンパ輸送能の定量的評価

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of lymph transport using autologous albumin bound ICG

研究代表者

山田 潔 (Yamada, Kiyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10319965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：「リンパ浮腫」という手足のむくみにより日常生活に支障をきたす病気があります。リンパの流れを定量化することが予防や早期発見につながりますが、現在のところ最適な方法はありません。本研究では近年広く行われているICG蛍光リンパ管造影法を用いてリンパの流れの定量化を試みました。通常はICGを皮内に投与すると、そのタンパクと結合しやすい特性から長らく投与部位に留まっていますが、あらかじめICGがタンパクと飽和状態まで結合した状態にして投与することでリンパ管からスムーズに排出されることがわかりました。この排出の程度がリンパの流れを反映していると考えられ、今後のリンパ浮腫治療に役立つと思われれます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がん罹患者数が急激に増加してきています。特に女性では乳癌、子宮癌が多くみられ、これらの手術の際にリンパ節郭清を受けると10～30%でリンパ浮腫を発症しています。リンパ輸送能の低下がリンパ浮腫発症のカギとなっていると考えられていますが、リンパ輸送能を客観的に評価する方法は今のところありません。本研究では近年頻用されているICG蛍光リンパ管造影により比較的簡便にリンパ輸送能の近似値を定量的に評価できる可能性があり、これまで困難であったリンパ浮腫の病態解明や重症度、あるいは各種治療法の有効性の評価などができるため、国内で10～15万人以上といわれるリンパ浮腫患者に大変有益であると考えます。

研究成果の概要(英文)：Lymphedema is a common disease which happens after cancer treatment and interferes daily life due to swelling of the limbs. Quantifying lymphatic flow can lead to prevention and early detection, but there is currently no optimal method. In this study, we attempted to quantify lymphatic flow using ICG fluorescence lymphography, which has been widely used in recent years. When ICG is administrated intradermally, it stays at the administration site for a long time due to its tendency to bind to the protein, but by administering ICG in a saturated state with the protein in advance, it can be smoothly administered from the lymphatic vessels. The degree of this excretion is thought to reflect lymphatic flow and may be useful for future treatment of lymphedema.

研究分野：形成外科 リンパ外科 リンパ浮腫

キーワード：リンパ リンパ浮腫 リンパ機能 定量評価 インドシアニングリーン ICG 蛍光リンパ管造影

1. 研究開始当初の背景

近年がん罹患者数が急激に増加してきている。特に女性では1位:乳癌、5位:子宮癌(2013年統計)となっており、これらの手術の際にリンパ節郭清を受けると10~30%でリンパ浮腫を発症するといわれている。しかしながら、リンパ郭清を受けたすべての人がリンパ浮腫を発症しているわけではなく、発症のメカニズムはまだ解明されていない。リンパ輸送能の低下がリンパ浮腫発症のカギとなっていると考えられているが、リンパ輸送能を定量的に評価する方法はほとんど報告されていないことが最大の問題となっている。唯一、リンパシンチグラフィによる“Transport Index^{1,2)}”が用いられることがあるが、使用する核種や注入部位、観察のタイミングにより大幅な変動があり、またスコアリングの基準もあいまいで再現性にすぐれた検査とは言い難い。一方、近年急速に普及しているインドシアニングリーン(以下 ICG)蛍光リンパ管造影は従来のリンパシンチグラフィと比べて放射線被爆なしに高精細でリンパ流の動態評価が可能であり、しかも安価に検査ができることが特徴である。この検査で我々が着目したのは、「リンパ浮腫の四肢に注入した ICG の色素は、健側よりもクリアランスが悪く、長期にわたり残存する」という点である。このクリアランスのスピードを数値化できれば、リンパ輸送能を定量的に評価可能になるのではないかと考え、本研究の着想に至った。ICG 注入部位での蛍光色素のクリアランスを ROI 測定装置で観察することにより、リンパ輸送能を評価・定量可能となれば、これまで困難であったリンパ浮腫の病態解明や病期分類、あるいは各種治療法の効果検証などができるため、国内だけでも10~15万人以上といわれるリンパ浮腫患者に大変有益であると考えた。

2. 研究の目的

当施設では年間で延べ200件以上の ICG 蛍光リンパ管造影検査を行っている。ICG の蒸留水溶解液を趾間部皮内に注射するが、この ICG 色素がリンパ浮腫の患肢では健常側とくらべて非常に長期間残留しており、とくに慢性進行例のリンパ浮腫患肢では3~6ヶ月以上残っていることもあった。このことから、皮内に注入した ICG のクリアランスがリンパの輸送能を反映している可能性がありこれを定量評価できないかと考えた。しかしながら ICG 単体では注入後の蛍光強度が安定せず、そして時間が経過するとリポ蛋白と結合して正確なクリアランスが確認できなくなる(動物実験で確認済み*)点、またクリアランスを測定するためには時系列で2回以上の測定が必要となるが、被験者の負担を軽減するためにはできるだけ測定の間隔は短いほうが望ましく、可能であれば1日のうちに済ませることが重要であるという点を考慮しなければならない。これらの点を解決するためには、あらかじめタンパク(アルブミン)と結合させた ICG を投与することで注入後に他部位への沈着を防ぎ、純粋なリンパのクリアランスを短時間のうちに測定することを目的とした。

* 研究課題/領域番号 15K21182 *in vivo* イメージングを用いたリンパ輸送機能定量的評価法の確立

3. 研究の方法

本研究に必要なプロセスとして以下の3つを行った。

タンパクと結合させる ICG の至適濃度の決定

より短時間でリンパ輸送能のみを評価できるトレーサーとして、あらかじめ研究対象者の血清と ICG とを混和したタンパク結合型 ICG を検査部皮内に注入する必要があるが、タンパクと結合していない ICG 分子が余剰に存在すると、注入部位周囲のタンパクと結合してしまうため、純粋なクリアランスが測定できなくなってしまう。余剰な ICG が存在せず、かつ適度な蛍光強度を持つ最適な混合比率を検討するため、血清に混和する ICG 濃度を 0~0.025mg/dl の間で調整したものの蛍光強度を測定し、プラトーに達する (= ICG 分子に余剰が生じている) ICG 濃度を求める。

クリアランス測定のための同一測定環境の作成

ICG クリアランスの測定のためには、時系列で 2 回以上の ICG 蛍光強度の測定が必要となるが、測定環境を常に一定にする必要がある。臨床においては近赤外観察カメラを使用するが、ICG 励起光源の光量、測定部位に対する光軸の角度と距離、測定部位に対する観察カメラの測定部位に対する視軸の角度と距離、そして測定環境の照度を一定とするため、励起光源とカメラを内蔵した Black Box (浜松ホトニクス社) により測定環境を常に同一とした静止画データを収集する。そして蛍光強度については Windows 用ソフトウェア ROIs (浜松ホトニクス社) を用いて、ICG 注入部位を中心としてソフトウェア画面上で同一範囲の正方形 (実寸で約 1.5x1.5cm に相当) を関心領域として ROI 値 (0-255) を計測する。2 回の測定間隔は 120 分とし、2 回の ROI 値の差を蛍光強度の減衰値 (= ICG クリアランス) とする。

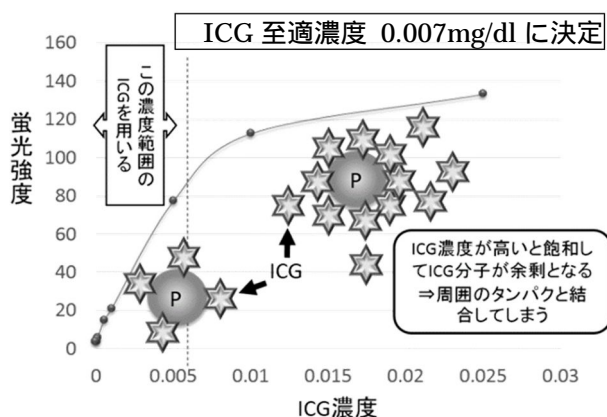
健常者およびリンパ浮腫患者でのデータ収集

研究対象として、健常者と、リンパ浮腫患者を設定する。両グループとも十分なインフォームドコンセントを行い、同意の得られたもののみを対象とする。上記にて定めた研究方法を実施し、ICG クリアランスと、検査による有害事象を解析する。

4. 研究成果

タンパクと結合させる ICG の至適濃度の決定

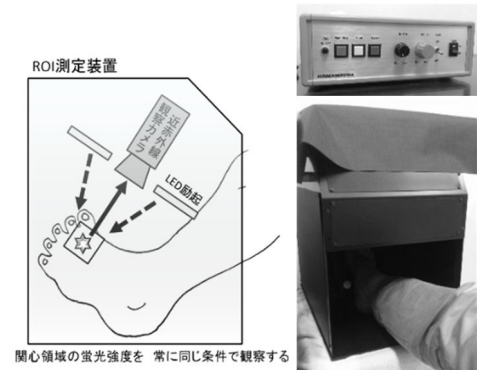
血清と混和させる ICG の濃度と蛍光強度の関係は、ICG が低濃度領域ではリニアな相関であるが、濃度が高くなってくると飽和してタンパクと結合しない余剰な ICG が多く存在してくる。余剰な ICG が存在せず、かつ適度な蛍光強度を持つ最適な混合比率を検討したところ、ICG 濃度が 0.007mg/dl を超えてくると蛍光強度がプラトーに達してくるため、ICG が飽和している (= 余剰な ICG が存



在してくる)状態と考えられた。一方、ICG濃度が0.007mg/dl以下の場合には蛍光強度も低下し、計測のばらつきが大きくなる傾向があった。ICG濃度が0.007mg/dlであればこのトレーサーを体内に投与した場合に周辺のタンパク質と結合することなく、また十分な蛍光強度を有するためスムーズにクリアランスの測定が可能になると考えられた。

クリアランス測定のための同一測定環境の作成

Black BoxによるICG蛍光観察画像の静止画撮影とROIによる蛍光強度の測定は再現性があり、反復して測定した際にもほぼ同じROI値が得られたため、蛍光強度の減衰値(=ICGクリアランス)を正確に測定することができると考えられた。



健常者およびリンパ浮腫患者でのデータ収集

以下の4グループに分けてデータを取集した。

1. HA群: 健常者、血清にてICGを溶解し、濃度を0.007mg/dlに調整(n=3)
2. HS群: 健常者、生理食塩水にてICGを溶解し濃度を0.007mg/dlに調整(n=3)
3. LA群: リンパ浮腫患者、血清にてICGを溶解し、濃度を0.007mg/dlに調整(n=0)
4. LS群: リンパ浮腫患者(ISL期)、生理食塩水にてICGを溶解し、濃度を0.007mg/dlに調整(n=8)

各グループでこれらのトレーサーを第4趾間に0.05ml皮内注射したのち、直後と90分後の2点で蛍光強度を上記の手法にてROI値を測定し、蛍光強度が減衰する変化率をICGクリアランスとして測定した。その結果各群の平均値は、HA群:-14.58、HS群:+8.22、LA群:n.a.、LS群:+7.3であった。

生理食塩水でICGを溶解したグループはトレーサー投与直後から90分にかけて徐々に蛍光強度が増していき、ICGが投与部位のタンパク質と結合しながら次第に拡散していく様子が伺われた。一方、血清で溶解したグループはLA群のデータが収集できなかったが、HA群においてはトレーサー投与直後から経時的に蛍光強度が漸減しており、ICGが周囲のたんぱく質とあまり結合せず、徐々にクリアランスされている傾向が示唆された。

以上の結果により、血清でICGを溶解したトレーサーはICGのクリアランスをより正確にとらえる可能性があるが、被験者から血清を採取しICGの濃度調整が必要であるため簡便性に欠けること、リンパ浮腫患者においてのデータが収集できなかったため、この手法でのリンパ流の障害をどの程度捉えることが可能なのかが未知数であり、今後の課題と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山田潔、木股敬裕、品岡玲
2. 発表標題 Liposuction + LVA整容性と機能性を旨した リンパ浮腫外科治療
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田潔、品岡玲、木股敬裕
2. 発表標題 標準的ICG-LGに基づいたリンパ浮腫外科治療
3. 学会等名 第47回日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田潔、品岡玲、木股敬裕
2. 発表標題 リンパ浮腫に対する減量術 キーポイントは何か？
3. 学会等名 第2回リンパ外科研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田潔
2. 発表標題 リンパ浮腫～早期発見から進行期の治療まで
3. 学会等名 第45回愛媛形成外科研修会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田潔、木股敬裕、品岡玲、越宗靖二郎、松本久美子、三浦佑樹
2. 発表標題 四肢リンパ浮腫に対するリンパ節移植術の向き研究
3. 学会等名 第62回日本形成外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoshi Yamada, Akira Shinaoka, Yoshihiro Kimata
2. 発表標題 Vascular anatomy of lateral thorathic lymph node: A clinical findings from donor site of lymph node transfer
3. 学会等名 10th World Society for Reconstructive Microsurgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田潔、品岡玲、木股敬裕、本田雅子、三宅麻紀、三宅一正、丸濱恵
2. 発表標題 リンパ浮腫のチーム医療と周術期管理
3. 学会等名 第7回日本乳房オンコプラスチックサージャリー学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田潔、木股敬裕、越宗靖二郎、太田智之、林優子、品岡玲
2. 発表標題 LVAに必要なTips
3. 学会等名 第46回日本マイクロサージャリー学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	品岡 玲 (Shinaoka Akira) (90724500)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------