

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08702
研究課題名（和文）胃癌に対する新規腹腔鏡用蛍光スペクトル測定システムを用いた術中転移診断法の確立
研究課題名（英文）A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system for photodynamic diagnosis of gastric cancer
研究代表者
海老原 裕磨（Ebihara, Yuma）
北海道大学・大学病院・特任教授
研究者番号：50632981
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、早期胃癌に対し新規に開発した新規蛍光腹腔鏡システム（LumifinderTM）を用いた術中センチネルリンパ節同定法を確立することである。センチネルリンパ節同定の問題点として組織の厚さによる蛍光拡散が挙げられる。そこで本器機を用いて深部組織における微弱蛍光測定結果につき論文報告した。微弱なICG蛍光信号の観察は、蛍光スペクトル測定を行うことでより臨床においても感度の高い局在診断が可能であった。また、LumifinderTMが医療機器として薬事承認された（30500BZX00031000）。現在、本器機を用いて腹腔鏡下手術において胃癌センチネルリンパ節診断の検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形癌に対するセンチネルリンパ節の転移有無を指標として、リンパ節郭清の縮小ないし省略が可能となり、外科治療のさらなる個別化、低侵襲化が期待できる。本研究にて使用している新規蛍光腹腔鏡システム（LumifinderTM）にて蛍光強度を測定することにより、精度の高い蛍光測定が可能となる。正確なセンチネルリンパ節同定により、手術時間の短縮、術後在院日数の短縮、術後患者のQOLの向上が期待できる。さらに蛍光測定法によるセンチネルリンパ節同定は早期胃癌だけではなく各固形癌が対象となり、その意義は大きい。また、蛍光強度と病理学的因子の検討を行い、癌局在診断につき検討を予定している。

研究成果の概要（英文）：Sentinel lymph node biopsy (SLNB) for early gastric cancer is common, and many studies have reported its usefulness with indocyanine green (ICG). However, in the case of sentinel lymph node (SNs) identification using ICG, it is difficult to accurately identify the fluorescence signal of SNs through the tissue because of the weakening of the signal due to the intervening tissue thickness. The use of a novel fluorescence spectrum measurement system (Lumifinder(tm)) can measure a much weaker ICG fluorescence signal and is expected to overcome the problems of SNs identification using ICG. Lumifinder(tm) may overcome the problem of SLNB using ICG for gastric cancer.

研究分野：光イメージング

キーワード：胃癌 腹腔鏡手術 光線力学的術中リンパ節診断 蛍光スペクトル測定

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は急速な高齢化社会を迎え、高齢者の癌患者数も増加すると考えられ、新たな癌治療が模索されています。また、腹腔鏡手術や臓器温存手術といった低侵襲手術が、今後の癌治療において重要な分野の一つと考えられています。さらに胃癌に対する低侵襲外科治療として、センチネルリンパ節の転移有無を指標としてリンパ節郭清を個別に縮小ないし省略し、それに伴って切除範囲を最小限にするセンチネルナビゲーション手術が低侵襲外科治療として期待されています。しかし現在、胃癌に対するセンチネルリンパ節診断の感度がインドシアニングリーン (ICG: indocyanine green) 単独では 85.4%と、一般的に実用化の指標となる感度 90-95%以上を超えていないこと、また偽陰性の割合が 46.4%と高いことが問題点として挙げられ、臨床応用が進んでいない。この問題点に対し、われわれはシステム制御、画像処理、スペクトル解析の研究による高度な組み込みソフトウェアと近赤外線ファイバーバンドルを用いた新規蛍光測定システムを開発しました (特願 2012-16928、特願 2013-041538、特願 2014-054047)。さらに低侵襲性を考慮し、腹腔鏡用のプローブの開発も行いました。本研究で使用する蛍光スペクトル測定法を用いた新規腹腔鏡システムは、蛍光画像と蛍光スペクトルを同時にモニターすることにより、より正確な蛍光診断が可能となり、腹腔鏡用プローブと組み合わせることで、低侵襲手術のもとでリンパ節 (腫瘍) の同定・転移診断が可能になります。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛍光スペクトル測定法を用いた新規蛍光測定システムを用いた光線力学的転移リンパ節 (腫瘍) 診断法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) ICG 蛍光同定の限界濃度測定

96well プレートに ICG 濃度 (5×10^{-1} - 5×10^{-4} mg/ml) とウシアルブミン (75-0 mg/ml) で調整した試料を用いて蛍光画像と蛍光スペクトル測定を施行した。ウシ血清アルブミン (BSA) 粉末は、富士フイルム和光純薬 (大阪) から購入。新規蛍光測定システムと蛍光カメラシステム (浜松フオートニクス) を用い 10mm 離れた場所から励起光を照射した。

(2) ICG 蛍光同定の組織厚測定

クリップの前面部に BSA 標識 ICG (5.0×10^{-2} mg/mL ; ex vivo ICG 検出性試験で最も高輝度) を塗布した内視鏡クリップ (model HX-610-135 オリンパスメディカルシステム) を用いた。新規蛍光測定システムならびに蛍光カメラシステムにて胃壁粘膜表面の蛍光クリップを 10cm 離れた位置から測定した。

(3) 腫瘍モデルを用いた蛍光検出に関する検討

silicon 樹脂 (コニシ株式会社) を用いて擬似腫瘍を作製した。2.0mL の silicon 樹脂を用いて 20mm の円形の擬似腫瘍を作成した。濃度調整した ICG (5.0×10^{-2} mg/mL) 1.0 mL を擬似腫瘍に速やかに混和した。陰性コントロールも同様に調製したが、ICG 溶液ではなく FBS を 1.0mL 合わせ、組織密度の異なる (高密度と低密度の) 市販の発泡ポリウレタンスポンジを介して新規蛍光測定システムを用いてスペクトル測定を行った。

(4) 腹腔鏡下手術における ICG 同定についての検証

全身麻酔下に 12 mm ポートを 5 か所配置し、ICG 蛍光クリップ (ゼオクリップ FS、ゼオンメディカル) を腫瘍近傍に 2 か所クリッピングし、新規蛍光測定システムと腹腔鏡用プローブを用いて蛍光強度測定を行った。

4. 研究成果

われわれが以前より開発してきた蛍光スペクトル測定法を用いた新規蛍光測定システム (図 1) (Lumifinder™)・腹腔鏡用のプローブ (図 2) が薬事承認された (30500BZX00031000)。

図 1. Lumifinder™



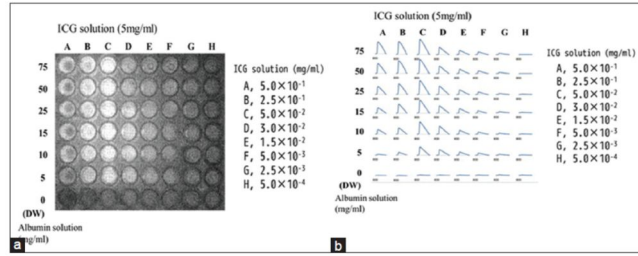
図 2. 腹腔鏡用プローブ



(1) ICG 蛍光同定の限界濃度測定

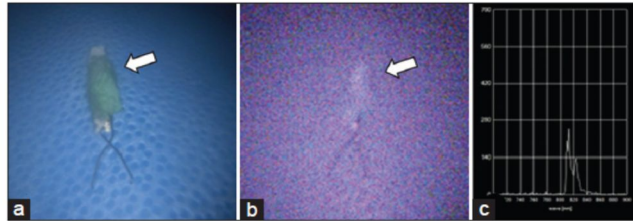
ICG 濃度 $5 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ にて最大蛍光強度を認め、 $3 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ 以下の濃度では視覚的に蛍光を認識することは不可能であった。一方、新規蛍光測定システムを用いたスペクトル測定では $5 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ まで蛍光強度検出が可能であった (図 3)。

図 3. ICG 濃度測定



ICG にてコーティング (濃度 $5 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$) したクリップの近赤外画像。クリップに ICG を塗布。(a) 白色光画像。(b) 蛍光画像。(c) スペクトル測定。矢印は ICG を塗布した部分 (図 4)。

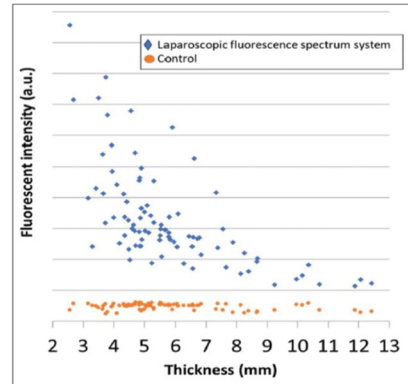
図 4. ICG 蛍光クリップ



(2) ICG 蛍光同定の組織厚測定

胃を用いたインドシアニングリーンの検出試験。インドシアニンググリーン (829nm) のスペクトルは、腹腔鏡下近赤外蛍光スペクトルシステムでは胃壁の深さ 13mm まで同定できたが、近赤外カメラシステムでは胃壁の厚さに関係なく同定できなかった。ネガティブコントロール: 非蛍光コーティングクリップ (図 5)。一般的な蛍光認識の限界とされている深さ 10mm 以上においてもスペクトル計測が可能であった。

図 5. ICG 検出試験



(3) 腫瘍モデルを用いた蛍光検出に関する検討

silicon 樹脂と FBS のみ (ネガティブコントロール) または FBS で最適濃度に希釈した ICG ($5.0 \times 10^{-2} \text{mg/mL}$) と混合した疑似腫瘍の比較。FBS のみを混合した腫瘍モデルは蛍光スペクトル測定されなかったが、ICG を混合した腫瘍モデルは近赤外波長にて蛍光強度を示した (図 6)。疑似腫瘍を用いた検証では (A) 高密度と低密度のスポンジ。(B) ICG を混ぜた疑似腫瘍をビニール袋に入れ、スポンジで覆ってスペクトル測定を行った (図 7)。蛍光強度は、低密度のスポンジが高密度のスポンジより有意に高かった (図 8)。

図 6. ICG 疑似腫瘍

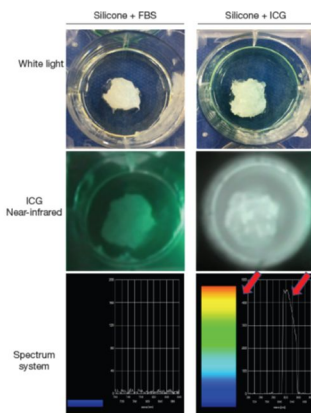


図 7. 組織密度の検証

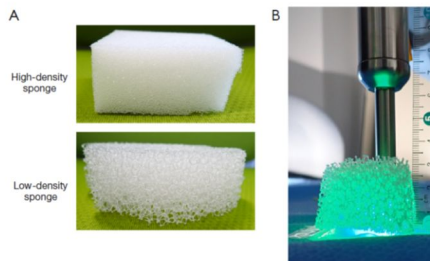
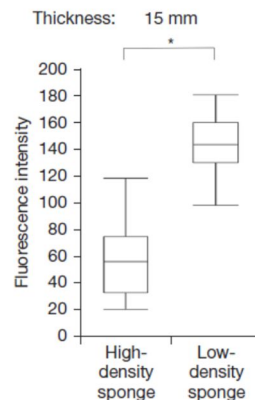


図 8. 蛍光強度測定



(4) 腹腔鏡下手術における ICG 同定についての検証
新規蛍光測定腹腔鏡システム (Lumifinder™) を用いて ICG 蛍光クリップ (ゼオクリップ FS、ゼオンメディカル) の漿膜側からの蛍光スペクトル測定が可能であった。図 9 : 術前の ICG 蛍光クリップ、図 10 : Lumifinder™ を用いた腹腔鏡下 ICG 蛍光測定中の術野風景。

図 9. ICG 蛍光クリップ

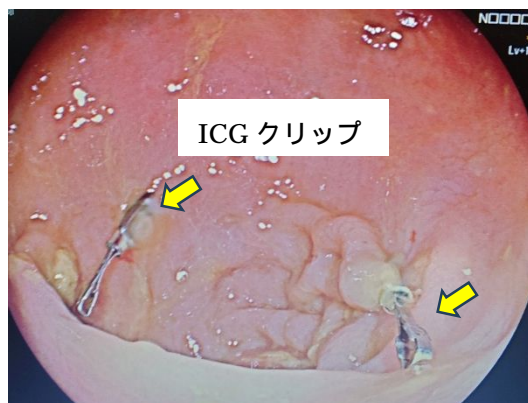


図 10. 腹腔鏡手術



引用文献

- (1) Ebihara Y, Li L, Noji T, Kurashima Y, Murakami S, Shichinohe T, Hirano S. A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system with indocyanine green fluorescence overcomes limitations of near-infrared fluorescence image-guided surgery. *J Minim Access Surg.* 2022 Jan-Mar;18(1):125-128. doi: 10.4103/jmas.JMAS_165_20. PMID: 35017402; PMCID: PMC8830575.
- (2) Chiba R, Ebihara Y, Shiiya H, Ujiie H, Fujiwara-Kuroda A, Kaga K, Li L, Wakasa S, Hirano S, Kato T. A novel system for analyzing indocyanine green (ICG) fluorescence spectra enables deeper lung tumor localization during thoracoscopic surgery. *J Thorac Dis.* 2022 Aug;14(8):2943-2952. doi: 10.21037/jtd-22-244. PMID: 36071764; PMCID: PMC9442536.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ebihara Yuma, Li Liming, Noji Takehiro, Kurashima Yo, Murakami Soichi, Shichinohe Toshiaki, Hirano Satoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system with indocyanine green fluorescence overcomes limitations of near-infrared fluorescence image-guided surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Minimal Access Surgery	6. 最初と最後の頁 125 ~ 128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/jmas.JMAS_165_20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Ryohei, Ebihara Yuma, Shiiya Haruhiko, Ujiie Hideki, Fujiwara-Kuroda Aki, Kaga Kichizo, Li Liming, Wakasa Satoru, Hirano Satoshi, Kato Tatsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 A novel system for analyzing indocyanine green (ICG) fluorescence spectra enables deeper lung tumor localization during thoracoscopic surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 2943 ~ 2952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd-22-244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ebihara Yuma, Kato Hiroaki, Narita Yoshiaki, Abe Masaru, Kubota Reiko, Hirano Satoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Detection of sentinel lymph node with a novel near-infrared fluorescence spectrum system and indocyanine green fluorescence in patients with early breast cancer: First clinical experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 103061 ~ 103061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2022.103061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito Takahiro, Ebihara Yuma, Li Liming, Shirosaki Tomoya, Iijima Hiroaki, Tanaka Kimitaka, Nakanishi Yoshitsugu, Asano Toshimichi, Noji Takehiro, Kurashima Yo, Murakami Soichi, Nakamura Toru, Tsuchikawa Takahiro, Okamura Keisuke, Shichinohe Toshiaki, Hirano Satoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system for photodynamic diagnosis of peritoneal dissemination in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 102157 ~ 102157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2020.102157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千葉龍平、加藤達哉、海老原裕磨、氏家秀樹、山崎雅久、野村俊介、武藤潤、藤原晶、加賀基知三
2. 発表標題 胸腔鏡用蛍光スペクトル測定システムを用いた深部肺腫瘍同定法
3. 学会等名 第41回日本レーザー医学会北海道地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤弘明、海老原裕磨、本橋雄介、久保田玲子、阿部大、成田吉明、平野聡
2. 発表標題 インドシアニンググリーンと近赤外線イメージングシステムを用いた乳癌センチネルリンパ節同定
3. 学会等名 第41回日本レーザー医学会北海道地方会
4. 発表年 2022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	平野 聡 (Hirano Satoshi) (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	七戸 俊明 (Shichinohe Toshiaki) (70374353)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	野路 武寛 (Noji Takehiro) (10739296)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田中 公貴 (Tanaka Kimitaka) (10758642)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	李 黎明 (Li Liming) (70316298)	公立千歳科学技術大学・理工学部・客員教授 (20106)	

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