

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591396

研究課題名（和文） ナノスケール蛍光粒子を用いた新規センチネルリンパ節生検法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel sentinel lymph node biopsy method using fluorescent nano-particles

研究代表者

亀井 尚（KAMEI TAKASHI）

東北大学・病院・講師

研究者番号：10436115

研究成果の概要（和文）：

食道、胃、大腸において QD をトレーサーとして、リアルタイムにセンチネルリンパ節に蛍光シグナルが移行することの確認、蛍光強度は溶液の濃度に比例し、60 分以上の滞留時間があること、腸管、脂肪組織を透過して 1 cm 深度でも検出可能なことを明らかにした。新規の有機系蛍光材料を開発し、トレーサーとして蛍光センチネルリンパ節検出に成功した。摘出リンパ節における蛍光特性を、蛍光顕微鏡で解析し、量子ドットとほぼ同じ特性を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We succeeded in real-time fluorescent imaging of sentinel lymph nodes of various gastrointestinal tracts in pig model using QDs as a tracer. After that, we analyzed fluorescent specificities in varied conditions and revealed the range of a signal detection through fat tissue or other organs. Furthermore, we developed novel organic material nanoparticles as a safety fluorescent probe for sentinel lymph node biopsy (SLNB) with the idea of clinical application. We revealed that these particles were suitable for SLNB and their fluorescent specificities were similar to the QDs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：センチネルリンパ節、ナノ粒子トレーサー、高感度蛍光計測、病理診断

1. 研究開始当初の背景

(1) センチネルリンパ節生検 (SLN

biopsy, SLNB) は当初、乳癌や皮膚癌で行われ、さらに消化器癌への応用が試みられるよう

になっていた。しかし、リンパ流が多方向で複雑な消化器癌においては、リアルタイムのリンパ流の観察が困難なため SLN 同定が難しいこと、真の SLN を 100%に近い確率で検出する感度が低いことから、SLNB が成立しない場合も多いことが認識されつつあった。

(2) 摘出した SLN における癌転移の有無の迅速診断は、摘出組織を薄切しヘマトキシリンエオジン染色を施行したのち顕微鏡で観察されているが、リンパ節組織のごく一部しか観察できないため(径 5mm 程度のリンパ節の場合、1~3 断面を検査したとして全体の体積の 0.01%)、微小転移を見逃してしまう危険がある。また、数種類の免疫染色を組み合わせた多重染色法、RT-PCR で組織内部のがん細胞を検出する手法が試みられていたが、偽陰性も少なくなく、精度が十分でないことが問題となっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、消化器癌手術において真の SLN を 100%同定する高感度なリンパ節生検法の開発と SLN 内部の癌転移部位を高感度・高精度に特定し微小癌転移を見逃さない病理診断法の開発を行うことである。優れたリンパ節トレーサーと検出法および、より確実な病理診断法の開発によって、癌の進行度に応じた細かい治療形態を構築可能である。

3. 研究の方法

(1) 量子ドットをトレーサーとした SLN 検出の詳細な解析

ブタをモデルに胃、大腸、食道などの消化管で量子ドットの投与と SLN の検出について検討する。各組織の特性を踏まえて、蛍光強度と粒子を含む局注液の濃度の関係、リンパ節滞留時間と 2 次リンパ節への移行状況、脂肪組織や脈管を通した深部のリンパ節検出能の評価を行う

(2) 担癌マウスリンパ節転移モデルにおけるセンチネルリンパ節生検 (SLNB) 蛍光法の評価

担癌マウスリンパ節転移モデルにおいて量子ドットをトレーサーとするセンチネルリンパ節生検の検討を行う。

① In vivo での検討

蛍光粒子がリンパ節トレーサーとして様々な転移状態において機能するかを評価する。がんのリンパ節転移はリンパ節の組織構築を破壊するだけでなく、リンパ管の構造・機能にも影響を与えリンパ流を変化させ、SLN の見逃しを生じ、手術における偽陰性の診断原因になると云われている。従来法(色素・RI)にはない感度・精度を持つ量子ドットを用いた SLNB 蛍光法によって、リンパ節転移の進行状況と蛍光粒子の標識との相関関係を解明し、手術における SLN の見逃し発生のメカニズムを精細に解析する。

② 病理組織学的検討

蛍光ナノ粒子である量子ドットは従来法に用いられた色素・RI と異なり病理組織学的にも検討可能である。前述したように量子ドットはリンパ節トレーサーとして用いるとリンパ節転移危険部位である輸入リンパ管流入部を高精度に特定することを明らかにした。様々な転移状態のモデルにおいて量子ドットをトレーサーとする SLNB 蛍光法を施行し、SLN における蛍光粒子の状態を一粒レベルの計測精度で精密解析し、蛍光による危険部位の特定が病理診断能力の向上に寄与するか評価する。また、リンパ節内転移部位・転移容積と蛍光粒子との相関から病理診断において偽陰性が生ずる状況の分析を行う。

(3) 生体へ安全に投与可能な新規蛍光ナノ粒子の開発

SLNB の臨床応用に際して、最大の課題は

トレーサーの安全性である。特に量子ドットは無機物から構成されており、蛍光法の臨床応用を目指すためには有機系の色素材料の開発が必要と考えられる。従来の有機系蛍光粒子を濃縮安定させた新規の蛍光材料を開発する。

①新規蛍光粒子の開発・評価

共同研究企業と協力し、量子ドットに匹敵する蛍光強度・安定性を持つ新規の有機系蛍光粒子の開発を行う。光安定性や蛍光耐久時間、観察可能な時間・日数の検討を行う。また、組織診断にも応用するために、組織標本加工後も蛍光を維持するための粒子コーティング技術・標本加工法の工夫を検討する。

②動物モデル（マウス・ラット・ブタ）および担癌動物モデル（マウス）におけるS L N Bに本有機系蛍光粒子をリンパ節トレーサーとして用い、その検出感度を量子ドットと比較し評価する。

③組織診断での検討

本有機系蛍光粒子により同定されたS L Nの組織診断を共焦点蛍光計測システムを用いて行い、蛍光分布、蛍光特性について量子ドットとの比較を詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) ブタをモデルにし、食道、胃、大腸において量子ドットを局注し、リアルタイムに1次リンパ節にトレーサーが移行することの確認と、少なくとも60分以上の滞留を確認した。腸管、脂肪組織を通しての検討では励起光が到達できる条件なら1cm程度の深部でも検出が可能であった。蛍光強度は溶液の濃度に比例することも確認した。

(2) 使用したモデルはマウス耳介部に移植した悪性黒色腫の頸部リンパ節転移モデルであるが、安定したモデルを構築するのに難渋した。移植細胞数、培養液等の条件設定を行

ったが、安定してリンパ節転移を起こすモデルを構築できず、予定していた量子ドット、有機系蛍光粒子を投与した場合の動向と摘出リンパ節の病理学的検討が、できていない。癌転移モデルとしての本実験系の検討は必須と考えており、継続課題となる。

(3) 生体への応用を念頭に、安全かつ、Q Dの蛍光強度に匹敵する新規の有機系蛍光材料を開発した。この粒子の特性を、蛍光強度・光安定性・蛍光耐久時間について明らかにするとともに、量子ドットと比較検討した。この粒子を用いた蛍光センチネルリンパ節検出にも成功した。蛍光強度は量子ドットをしのぐものではなかったが、我々の目的とするセンチネルリンパ節検出には十分可能な強度であることが分かった。光安定性、退色時間も1時間以内での著しい低下はなく、この実験系に供することは可能である。また、ブタ胃モデルで同様の実験を試みたが、量子ドットと同じ動向でセンチネルリンパ節を検出可能なことを確認した。摘出リンパ節におけるこの粒子の蛍光特性を、蛍光顕微鏡で解析し、量子ドットとほぼ同じ特性を持つことを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

① 権田幸祐、大内憲明 他 がん転移の生体ナノイメージング 生物物理 査読あり 51巻、2011、 82-83

② 権田幸祐 他 ナノイメージングで探る癌転移の仕組み Surgery Frontier 査読無 18巻、2011 50-57

③ Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):e93-e100. Epub 2011 Aug 5. 査読有

④ Kobayashi Y, Nozawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Fabrication and

fluorescence properties of multilayered core-shell particles composed of quantum dot, gadolinium compound, and silica. *J Mater Sci* 47:1852-1859, 2012, DOI 10.1007/s10853-011-5972-z 査読有

⑤ Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Control of shell thickness in silica-coating of Au nanoparticles and their X-ray imaging properties. *J Colloid Interface Sci.*, 358: 329-333, 2011 査読有

⑥ Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of Au-silica core-shell particles by sol-gel process. *Surface Engineering*, 28(2): 129-133, 2012 査読有

⑦ Hikaru Morimoto, Marie Minato, Tomohiko Nakagawa, Masahide Sato, Yoshio Kobayashi, Kohsuke Gonda, Motohiro Takeda, Noriaki Ohuchi, Noboru Suzuki. X-ray imaging of newly-developed gadolinium compound/silica core-shell particles. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 04/2012; 59(3): 650-657. DOI:10.1007/s10971-011-2540-6 査読有

⑧ Gonda K, Miyashita M, Watanabe M, Takahashi Y, Goda H, Okada H, Nakano Y, Tada H, Amari M, Ohuchi N. Development of a quantitative diagnostic method of estrogen receptor expression levels by immunohistochemistry using organic fluorescent material-assembled nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012 426(3):409-14 査読有

⑨ 大内憲明 生体名のイメージングによる血管新生メカニズムの解析 ナノ医工学年報 査読無 5巻、 2012、 211-220

[学会発表] (計5件)

① 亀井尚、日景允 他 先端技術の内視鏡外科への応用 蛍光内視鏡下手術の開発 第23回日本内視鏡外科学会 2010. 10. 18 横浜

② Tomohiko Nakagawa, Kohsuke Gonda, Motohiro Takeda, Takashi Kamei, Yoshio Kobayashi, Hiromitsu Inose, Takuya Nozawa, Hikaru Morimoto and Noriaki Ohuchi

Biodistribution of Novel Silica-Coated Nano-Particles for Fluorescence and CT Imaging in Tumor-Bearing Mice

4th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering December 15-16, 2010

National University of Singapore (NUS), Singapore

③ 亀井尚、大内憲明 QDをトレーサーとした近赤外蛍光内視鏡下手術システムの検討 第25回日本内視鏡外科学会 2012. 12. 6 横浜

④ Tomohiko Nakagawa, Kohsuke Gonda, Yoshio Kobayashi, Takashi Kamei, Liman Cong, Hiromitsu Inose, Ryoko Nagasu and Noriaki Ohuchi

CT Imaging of Tumor with Silica Coated Au Nanoparticle 5th International Symposium on Nanomedicine

March 15-17, 2012 Nagoya University ES Hall 名古屋

⑤ 中川智彦、権田幸祐、亀井尚、叢莉蔓、久保田洋介、大内憲明

金ナノ粒子を用いた腫瘍のCTイメージング ナノ学会第10回大会 2012. 6. 14-16 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 尚 (KAMEI TAKASHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：10436115

(2) 研究分担者

大内 憲明 (OHCHI NORIAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90203710

権田 幸祐 (GONDA KOSUKE)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80375435

谷山 裕亮 (TANIYAMA YUSUKE)
東北大学・病院・助教
研究者番号：00622987