

平成 29 年 4 月 13 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861011

研究課題名(和文)複合分子イメージングを駆使したセンチネルリンパ節同定検査の確立

研究課題名(英文)Realization of multi-molecular imaging to identify the sentinel lymph node

研究代表者

井上 一雅 (Inoue, Kazumasa)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号：20508105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：術前及び手術中に施行される放射性同位元素と蛍光色素を用いたセンチネルリンパ節の同定検査は、転移陰性例のリンパ節郭清の省略を可能にする有益な技術である。本研究では、小動物SPECT装置および小動物用蛍光イメージング装置を用いて、<sup>99m</sup>Tc-フチン酸コロイドとICGの混合プローブの生体内挙動を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Detection of the sentinel lymph node using a radioisotope and fluorescent dye is a useful technique that allows dissection of the negative lymph node to be omitted. In this study, the in vivo kinetics of the mixed <sup>99m</sup>Tc-phytate and ICG probe was clarified using small animal SPECT and fluorescence imaging systems.

研究分野：核医学

キーワード：センチネルリンパ節 小動物イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

現在、「腫瘍から最初にリンパ流を受けるリンパ節に最初の微小転移が生じる」というセンチネルリンパ節 (Sentinel Lymph Node : SLN) の理論に基づいたリンパ節郭清の最適化による低侵襲手術 (Sentinel Node Navigation Surgery) において、RI 法、色素法による SLN 同定が行われている。近年では、近赤外領域の波長の蛍光を発する ICG を用いた蛍光法と RI 法の併用が多く行われている。しかし、RI 法は術前投与、色素法及び蛍光法は術中投与されるため、投与部位が必ずしも一致せず、異なるリンパ流域が検出する可能性がある。また、ICG は投与後の動きが速く、SLN を見失う可能性もある。これらの問題を解決するためには、RI 法及び蛍光法で同定できる両方の性質を持つプローブが望ましい。

我々の研究室では、RI 法と蛍光法でそれぞれ使用されている  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドと ICG を混合して投与すると、ICG 単独投与と比較して蛍光による SLN 描出が遅くなることを明らかにしている。しかし、この報告では生体内においてこの 2 種類のプローブがどのような相互作用を起こしているのかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究は、ICG と  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドを混合し、蛍光と放射能によって詳細な解析を行い、 $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドと ICG の混合プローブの基礎的検討を目的とした。具体的な検討項目としては、小動物用 SPECT/CT 装置及び小動物用蛍光イメージング装置を用いて、 $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドと ICG の混合プローブ投与と、現在臨床において使用されている  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドと ICG の単独投与における SLN の放射能集積及び蛍光強度を経時的に測定して比較検討を行った。また、フチン酸コロイドと ICG を混合した際の物理化学的性質の変化と投与後の体内の諸因子との反応を想定した基礎的検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 小動物用イメージング装置の基本性能及び小動物イメージングの条件検討

空間分解能測定では、直径 0.7 - 1.2、1.0 - 1.5、1.5-2.0 mm の孔径を有する Jaszczak ファントムに  $^{99m}\text{Tc}$  を封入し、理想的な撮像条件下で得られた画像の半値幅 (Full Width at Half Maximum : FWHM) より評価した。感度測定では、既知放射能の  $^{99m}\text{Tc}$  点線源を視野中心に設置し、単位放射能あたりの計数率 (cps/MBq) を測定した。放射能濃度直線性の検討では、内径 6 mm、長さ 20 mm の円柱容器 8 つからなる直線性ファントムを使用した。各容器に異なる既知の放射能濃度を封入し

て撮像を行い、既知放射能濃度と ROI 内の SPECT 値との相関関係から評価した。小動物 *in vivo* イメージングを想定した SPECT 撮像の至適条件の検討では、再構成画像に対して空間分解能と均一性を指標として検討を行った。さらに、SPECT 撮像再構成の至適条件の検討も上記と同様の方法で行った。

### (2) センチネルリンパ節イメージングにおける部分容積効果の影響及び小動物蛍光イメージング撮像における個体間比較の精度検討

本研究では、*in vivo* イメージングにおいてマウスの膝窩リンパ節を対象とした。マウスのリンパ節は、大きさが約 1 - 2 mm 径、容量が約 1 - 5  $\mu\text{L}$  程度と、マウスの組織の中でも格段に小さい。核医学イメージングにおいて定量性を損なわせる因子の 1 つとして、部分容積効果がある。上述のように、マウス膝窩リンパ節は極めて小さく、高分解能小動物用装置を用いても部分容積効果の影響が大きいことが予想される。そこで、ファントムを用いて微小試料の測定を行い、本研究に対する部分容積効果の低減方法について検討を行った。また、蛍光イメージングにおいては、撮像時のマウスの体位によって励起効率や蛍光効率、生体内での散乱や吸収などが大きく異なる可能性がある。特に、個体間での標的部位への蛍光集積の比較や、同一個体での標的部位への蛍光集積の経時的变化などを検討する場合、検討事象以外は同一条件で行う必要がある。そこで、個体間でのばらつき及びマウスの体位の違いによる蛍光強度の変動を計測して、蛍光イメージングにおける経時的变化を観察可能か検討した。

### (3) フチン酸コロイド及び ICG 混合プローブを用いた小動物イメージングの解析

マウスに  $^{99m}\text{Tc}$  フチン酸コロイドと ICG の混合プローブを投与し、投与後のリンパ節への経時的な  $^{99m}\text{Tc}$  および ICG の取込を観察し、単独投与の場合との違いを検討した。本研究では膝窩リンパ節を SLN とするマウスモデルを用いた。過去に報告されている ICG とフチン酸コロイドの混合プローブでは、マウス頸部リンパ節を対象としていたが、その実験系では、マウスの舌下にプローブを投与する必要があり、実験の再現性を保つことが難しい。一方、膝窩リンパ節モデルでは、マウスの足裏皮下に投与する。極微量投与の設定可能なシリジポンプを用いることで、再現性の良い投与が可能であることを予備実験で確認している。さらに、膝窩リンパ節の場合は、投与部位からリンパ節までの距離が、頸部リンパ節より遙かに長く、リンパ節到達までの時間の差異を検討する場合においても都合が良いと考えられた。膝窩リンパ節の周りには、バックグラウンドとなる組織が存在しない

いことも大きな利点となり得る。そこで、マウスの匹数は各群  $n = 7-9$  とし、データの表記は、平均値だけでなく個々のデータをすべて示してデータのばらつきを明確にした。

#### (4) フチン酸コロイド及び ICG 混合による物理化学的性質の解析

前項で得られた結果の原因を明らかとするため、フチン酸コロイドの粒子径や ICG の蛍光強度などに注目して検討を行った。混合プローブが体内に入った場合、体液中のタンパク質やカルシウムイオンなども影響因子と考えられることから、これらの因子も検討対象とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 小動物用イメージング装置の基本性能及び小動物イメージングの条件検討

理想的な条件下で得られた空間分解能は、0.9 mm (1.0 mm 径 MPC)、1.1 mm (1.4 mm 径 MPC)、1.7 mm (2.5 mm 径 MPC) であった。臨床用の SPECT 装置では、6.0 mm 以上の空間分解能であるため、小動物用装置は高空間分解能を有することが示された。感度測定では、既知放射能の  $^{99m}\text{Tc}$  点線源を視野中心に設置し、単位放射能あたりの計数率 [cps/MBq] を測定した。その結果、738 cps/MBq (1.0 mm 径 MPC)、1481 cps/MBq (1.4 mm 径 MPC)、1548 cps/MBq (2.5 mm 径 MPC) であり、1.0 mm 径 MPC に対する 1.4 mm 径 MPC の感度比は 2.0 倍であった。MPC の感度は開口径の約 2 乗に比例するため、得られた結果は理論的に妥当な数値であった。高分解能型の臨床用 SPECT 装置は、100 cps/MBq 程度であるため約 10 倍の感度を有していた。放射能濃度直線性の検討では、3 種類の MPC すべてにおいて既知放射能濃度 (0.1 - 5.0 MBq/mL) と ROI 内の SPECT 値との間に良好な相関性を示した。これらの結果から、小動物用 SPECT/CT 装置は、良好な画像直線性を有し、臨床用装置と比較して高空間分解能かつ高感度な装置であると示された。

小動物 *in vivo* イメージングを想定した SPECT 撮像の至適条件の検討では、得られる空間分解能及び画像均一性の観点から投影方向数、投影方向数あたりの撮像時間を検討した。その結果、至適投影方向数は 80、投影方向数あたりの撮像時間は 30 秒であった。小動物イメージングでは、経時的な放射性医薬品の体内分布の変化や、動物への麻酔などの影響から、可能な限り撮像時間は短縮することが望ましく、本検討結果は実現可能な条件であることを確認した。OSEM 法をベースとした画像再構成アルゴリズムの至適条件を検討した結果、至適反復画像計算回数 (iteration  $\times$  subset) は 9、平滑化フィルターサイズは 30% であった。

#### (2) センチネルリンパ節イメージングにおける部分容積効果の影響及び小動物蛍光イメージング撮像における個体間比較の精度検討

実験で使用した装置では、内径 3.0 mm 以下の被検体サイズにおいて部分容積効果の影響が顕著であった。しかし、内径 3.0 mm 以下のものに対しても、径が 3.0 mm 程度の ROI を設定することで、部分容積効果によって過小評価されてしまっていたファントムの全放射能を評価することが可能となり、微小試料に対して部分容積効果の影響を低減することができた。微小容量及び微小放射能においても画像直線性は良好であり、部分容積効果の影響もイメージング画像の評価において最小限に抑えられた。また、蛍光イメージングでは同一週齢の ddY マウスを使用し、体勢補正を試みることにより、個体間のばらつきが抑えられ、蛍光強度の変動を最小限に抑えることが可能であり、蛍光イメージングでの経時変化を比較可能であることが示された。

#### (3) フチン酸コロイド及び ICG 混合プローブを用いた小動物イメージングの解析

$^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドと ICG の混合プローブを、それぞれ臨床で用いられている  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイド単独投与および ICG 単独投与と比較した。その結果、RI 法において、 $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドに ICG を混合することによるプローブの SLN 集積に影響はなく、RI 法の長所である SLN での良好な滞留性が示された。すなわち、 $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドと同様の動態を示し、混合による不利な点は認められなかった。蛍光法においては、ICG にフチン酸コロイドを混合することで、ICG 単独投与に比べ SLN の描出に遅れが生じた。また、プローブの流出において蛍光法と RI 法で大きく異なった。混合プローブは決して強い結合ではなく体内では不安定な状態で存在している可能性はあるが、蛍光法の結果より ICG とフチン酸コロイドはお互いに何らかの反応を起こしている可能性が示唆された。

#### (4) フチン酸コロイド及び ICG 混合による物理化学的性質の解析

フチン酸コロイドは時間経過とともに粒子径増大し、ICG、BSA の添加では変化しないがグルコン酸カルシウムによって粒子径は大きく増大した。*In vivo* イメージングでは、タンパク質結合体の強い蛍光のみが検出されていると考えられ、BSA +  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下では、ICG 単独でも ICG とフチン酸コロイドの混合物でも蛍光強度は大きくは変わらなかった。また、ICG とフチン酸コロイドは超遠心分離により、少なくとも一部は共存して

いると考えられたが、これらの結果から、SLN への ICG 蛍光集積の遅延の原因は、フチン酸コロイドとの混合が単に蛍光強度を下げることで、SLN 集積を遅らせているのではなく、一部の ICG がフチン酸コロイドと一緒に移動することによって、移動速度が遅くなることが考えられた。しかし、小動物イメージングにおける放射エネルギーと蛍光での SLN からのプローブの流出程度に違いが見られたことについて明らかになっていない。具体的には、SLN において放射能集積は集積ピーク以降も持続的に SLN に留まっているのに対し、蛍光集積では集積ピーク以降経時的に減少した。この要因は、リンパ管の取り込み機序や SLN 内における貪食細胞（マクロファージ）との相互作用によりフチン酸コロイドと ICG の共存体が同時に取り込まれて排泄時に分解されることで、SLN には  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドだけが滞留し、ICG は流出したのではないかと考えられた。

#### 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 4 件)

(1) Owaki Y, Inoue K, Narita H, Tsuda K, Fukushima M. Characteristic X-ray Imaging for Palliative Therapy Using Strontium-89 Chloride: Understanding the Mechanism of Nuclear Medicine Imaging of Strontium-89 Chloride. Radiological Physics and Technology, 査読有, 印刷中, 2017. Doi:10.1007/s12194-016-0388-8.

(2) Hosokawa S, Inoue K, Kano D, Shimizu F, Koyama K, Nakagami Y, Muramatsu Y, Fukushima M. A simulation study for estimating scatter fraction in whole body  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT. Radiological Physics and Technology, 査読有, 印刷中, 2017. Doi:10.1007/s12194-016-0386-x.

(3) Kitamura H, Kono Y, Ihara K, Aso T, Inoue K, Fukushima M. Estimation of radioactivity in single photon emission computed tomography for sentinel lymph node biopsy in a torso phantom study. Nuclear Medicine Communications, 査読有, 36(6), 646-650, 2015. Doi: 10.1097/MNM.0000000000000294.

(4) Inoue K, Gibbs-Strauss S, Liu F, Lee JH, Xie Y, Ashitate Y, Fujii H, Frangioni JV, Choi HS. Microscopic Validation of Macroscopic In Vivo Images Enabled by Same-Slide Optical and Nuclear Fusion. Journal of Nuclear Medicine, 査読有, 55(11), 1899-1904, 2014.

DOI: 10.2967/jnumed.114.141606

〔学会発表〕(計 29 件)

(1) 藤田新志, 大貫和信, 濱道修正, 井上一雅, 梅田泉, 福土政広, 藤井博史.  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸コロイドとインドシアニングリーン混合プローブによるセンチネルリンパ節イメージング. 第 56 回日本核医学会学術総会, 2016 年 11 月 4 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

(2) 大鷹豊, 砂岡史生, 梶原宏則, 佐藤敬, 井上一雅, 福土政広, 奥山康男. PET/CT におけるデータ収集法の基礎検討 リストモード収集とスタティック収集の比較. 第 36 回日本核医学技術学会総合学術大会, 2016 年 11 月 4 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

(3) 山口正太郎, 我妻慧, 三輪建太, 石井賢二, 井上一雅, 福土政広. BSREM 法によるベイズ型画像再構成のエッジアーチファクトの改善効果. 第 44 回日本放射線技術学会秋季学術大会, 2016 年 10 月 14 日, 大宮ソニックスシティ(埼玉県さいたま市)

(4) 山口正太郎, 井上一雅, 福土政広, 北村秀秋, 光野譲, 井原完有, 麻生智彦. 金属のアーチファクトによる PET/CT 画像への影響. 日本放射線技術学会第 70 回東京支部春期学術大会, 2016 年 5 月 21 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

(5) 細川翔太, 柳沢かおり, 津田啓介, 加納大輔, 根本幸一, 河上一公, 井上一雅, 村松禎久, 福土政広. 骨シンチ診断支援ソフトによる BSI と腫瘍マーカーとの関連性. 第 35 回日本核医学技術学会総合学術大会, 2015 年 11 月 6 日, ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区)

(6) 藤田新志, 井上一雅, 梅田泉, 大貫和信, 濱道修正, 福土政広, 藤井博史. In vivo 小動物 SPECT/CT における微小リンパ節イメージングの最適化. 第 55 回日本核医学会学術総会, 2015 年 11 月 6 日, ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区)

(7) 蒲地雄大, 臺野和広, 今岡達彦, 西村まゆみ, 細木彩夏, 西村由希子, 井上一雅, 福土政広, 島田義也. ラット乳腺における放射線応答の思春期前後と LET による違い, 2015 年 10 月 16 日, 富山大学(富山県富山市)

(8) 森山ひとみ, 西村まゆみ, 臺野和広, 森岡孝満, 今岡達彦, 高畠賢, 井上一雅, 福土政広, 島田 義也. ラット乳がんモデルにおけるがん関連候補遺伝子の発現解析, 日本放射線影響学会ワークショップ, 2015 年 10 月

16日, 富山大学(富山県富山市)

(9) 細川翔太, 井上一雅, 福土政広. PET 待機室で受ける被ばく線量の推定, 第 25 回日本保健科学学会学術集会, 2015 年 9 月 26 日, 首都大学東京(東京都荒川区)

(10) 福土政広, 井上一雅. PET/CT 画像の位置ズレによる定量性の影響, 第 25 回日本保健科学学会学術集会, 2015 年 9 月 26 日, 首都大学東京(東京都荒川区)

(11) 小原祐介, 田中浩基, 櫻井良憲, 福土政広, 井上一雅, 飯本武志. ホウ素中性子捕捉療法治療計画における線量評価精度向上に関する課題, 2015 年 9 月 26 日, 首都大学東京(東京都荒川区)

(12) 細川翔太, 井上一雅, 村松禎久, 福土政広. 粒子反応シミュレータプログラムを用いた FDG-PET 患者の被ばく線量の低減化. 日本保健物理学会第 48 回研究発表会, 2015 年 7 月 2 日, 首都大学東京(東京都荒川区)

(13) 青木沙紀, 三本拓也, 小山和也, 小坂徹, 青山里愛, 遠山尚紀, 小高喜久雄, 津田啓介, 井上一雅, 福土政広. PET-CT 検査における CT と PET 画像の位置ずれによる定量性への影響, 日本保健物理学会第 48 回研究発表会, 2015 年 7 月 2 日, 首都大学東京(東京都荒川区)

(14) 鈴木優太, 井上一雅, 福土政広. NaI(Tl) シンチレータ厚の違いが SPECT 基本性能に及ぼす影響, 日本放射線技術学会第 69 回東京支部春期学術大会, 2015 年 5 月 16 日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(15) 藤田新志, 井上一雅, 福土政広, 梅田泉, 大貫和信, 藤井博史. 小動物用 SPECT/CT 装置を用いた小動物イメージングにおける至適撮像条件の検討, 日本放射線技術学会第 69 回東京支部春期学術大会, 2015 年 5 月 16 日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(16) 川端一広, 井上一雅, 福土政広, 北村秀秋, 光野譲, 井原完有, 麻生智彦. PET/CT 撮影時の体位の違いが体幹部の測定値に与える影響, 日本放射線技術学会第 69 回東京支部春期学術大会, 2015 年 5 月 16 日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(17) 中澤修人, 井上一雅, 福土政広, 吉本光喜, 藤井博史.  $^{11}\text{C}$ -methionine による BPA 集積量の評価に関する検討, 日本放射線技術学会第 69 回東京支部春期学術大会, 2015 年 5 月 16 日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(18) 北村秀秋, 光野譲, 井原完有, 麻生智彦, 井上一雅, 福土政広. センチネルリンパ

節検査におけるモルホロジー演算を用いたアーチファクト低減に関する研究, 第 71 回日本放射線技術学会総会学術大会, 2015 年 4 月 16 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(19) 細川翔太, 井上一雅, 村松禎久, 福土政広. 粒子・重イオン輸送計算コードを用いた PET 収集における散乱フラクションの推定, 第 71 回日本放射線技術学会総会学術大会, 2015 年 4 月 16 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(20) Tsuda K, Koyama K, Takanashi T, Tsushima H, Kurashima S, Aoki S, Inoue K, Fukushi M, Fujii H. A new quantitative correction method for pulmonary nodules on chest FDG-PET. The 4th Annual International ASNMT Conference, 2014 年 11 月 6 日, 大阪国際会議場(大阪府北区)

(21) 井上一雅, 依田隆史, 梅田泉, 大貫和信, 福土政広, 藤井博史. センチネルリンパ節検索マルチモダルプローブ体内動態評価のための小動物 3 次元イメージングシステムの構築, 第 54 回日本核医学会学術総会, 2014 年 11 月 6 日, 大阪国際会議場(大阪府北区)

(22) 青木沙起, 三本拓也, 小山和也, 山口麗美, 小高喜久雄, 幡野和男, 津田啓介, 井上一雅, 福土政広. 4D-PET イメージングにおける位相限局法を用いた呼吸位相範囲の検討. 第 34 回日本核医学技術学会総会学術大会, 2014 年 11 月 6 日, 大阪国際会議場(大阪府北区)

(23) Inoue K, Yoda T, Umeda I, Ohnuki K, Hamamiti S, Tsuda K, Fukushi M, Fujii H. Development of a Three-dimensional Small Animal Imaging System to Estimate Biodistribution of a Multi-modal Probe for Sentinel Lymph Node Mapping. 11th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, 2014 年 8 月 28 日, Cancun Center (Cancun, Mexico)

(24) Tsuda K, Aoki S, Koyama K, Oku Y, Takeda A, Tsushima H, Mitsumoto T, Inoue K, Fukushi M, Fujii H. Experimental evaluation of the usefulness of chest FDG-PET acquisition under the tachypneic condition for pulmonary nodule detection. Society of Nuclear Medicine, 2014 Annual Meeting, 2014 年 6 月 8 日, St. Louis Convention Center (St. Louis, USA)

(25) 井上早紀, 前寺郁彦, 窪岡大, 清水秀雄, 井上一雅, 福土政広, 成田浩人. クエン酸ガリウムシンチグラフィのコリメータ別による最適収集光電ピークの検討, 日本放射線技術学会第 63 回東京部会春季学術大会,

2014年5月17日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(26) 本田理穂子, 前寺郁彦, 窪岡大, 清水秀雄, 井上一雅, 福土政広, 成田浩人.  $^{67}\text{Ga}$  シンチグラフィにおけるコリメータ別最適 photopeak の検討, 日本放射線技術学会第 63 回東京部会春季学術大会, 2014年5月17日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(27) 伊藤希, 窪岡大, 前寺郁彦, 福土政広, 井上一雅, 佐々木徹, 佐藤敬. クロスキャリブレーションの条件の違いが SUV に与える影響, 日本放射線技術学会第 63 回東京部会春季学術大会, 2014年5月17日, 駒沢大学(東京都渋谷区)

(28) 大脇由樹, 井上一雅, 成田浩人, 福土政広. 塩化 Sr-89 注射液イメージングの位置精度の追及. 第 70 回日本放射線技術学会総会学術大会, 日本放射線技術学会第 63 回東京部会春季学術大会, 2014年4月11日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(29) 北村秀秋, 光野譲, 井原完有, 麻生智彦, 井上一雅, 福土政広. RI を使用したセンチネルリンパ節検査における集積放射能の解析に関する研究, 日本放射線技術学会第 63 回東京部会春季学術大会, 2014年4月11日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 一雅 (INOUE, Kazumasa)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号: 220508105