

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591427

研究課題名（和文） 蛍光変調検出法によるがんの高感度センチネルリンパ節生検法

研究課題名（英文） Highly sensitive detection of sentinel lymph node by fluorescence tomography based on acousto-optic modulation imaging

研究代表者

甘利 正和（AMARI MASAKAZU）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50400312

研究成果の概要：

超音波蛍光変調検出法の実用化を目的として、模擬生体における有用性の評価並びに装置の最適化を進めた。模擬生体、食肉を用いた検討である程度の深度にある蛍光色素の検出に成功し、我々が開発した蛍光断層画像計測装置を生体に応用すべく素子をリニアアレイ化したプローブを用い、模擬生体の20-30mmの深さにある蛍光色素を検出することに成功した。この結果から、生体においても従来の検出法を上回る深度の蛍光色素を検出できる可能性が強く示唆された。リニアアレイ型トランスデューサの各素子への信号の位相制御による集束化および走査の検討を行い液体散乱媒質中に蛍光体検出にも成功した。以上により装置開発における新たな課題が出てきたが、本研究は実用化に向けて着実に前進した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な機能を持つナノ粒子が作製され、多様な医療応用が試みられている。我々はこれまで機能性ナノ粒子の作製から、単粒子イメージング、外科治療への応用を目指して装置開発を行い、単粒子蛍光イメージングが可能な三次元リアルタイム共焦点顕微鏡システムの開発に取り組み in vivo 粒子イメージングを可能としてきた。

悪性腫瘍に対する外科治療の基本は完全な切除である。従来の悪性腫瘍に対する手術は、腫瘍病巣に正常組織をある程度つけた状態で切除することで完全な切除を目指している。しかし、悪性腫瘍は CT、MRI、エコーなどの従来の画像診断では同定できない顕微鏡レベルの浸潤が周囲に拡がり、肉眼的に切除し得たと判断しても、しばしば病理診断で断端陽性となり得る。このように従来の画像診断で切除範囲を決定するには限界があり、近年求められている外科手術の個別化遂行のために、手間と時間をかけても迅速病理診断を行うことが必要である。手術の段階で病理診断に匹敵する画像検出法があれば手術時間の短縮だけでなく、病理医の負担を軽減させることもできる。そのためには腫瘍病変を微細なレベル（顕微鏡レベル）まで可視化する必要がある。ほとんどの腫瘍は体表より深部に存在しているため、蛍光法は有力な腫瘍マーキング法の1つである。しかしながら、従来の蛍光計測法は最も蛍光の強い量子ドットを用いた場合でも深部方向の計測限界が1cm程度と浅く、臨床応用を阻むひとつの要因であった。生体に蛍光計測を行うに当たり、病巣は必ずしも計測表面に存在するわけではなく、多くの場合体表からは同定できない隠れた病変の探索に用いられることが想定されるため、深部に存在する蛍光色素を検出する新たな技術が必要である。

## 2. 研究の目的

がん手術におけるセンチネルリンパ節生検法は、個々の病期に合わせて無駄なリンパ節郭清を省略できることから、今後がん手術の主流になると考えられる。現在、センチネルリンパ節生検は RI（ラジオアイソトープ）法と色素法が一般的である。しかし、「RI法は体外診断が可能であるが、放射線障害防止法で使用施設が制限される」、「色素法は簡便

で直視下に観察できるが、体外診断できない」などの欠点がある。これらの欠点を補い、がん手術を行う全ての施設で使用可能な、高感度なセンチネルリンパ節生検法が求められている。

我々は、RIを用いず、しかも RI法・色素法に比べて高感度かつ体外からのセンチネルリンパ節生検を可能とする高感度な蛍光計測法の開発を目的として研究を行った。従来の蛍光計測法では深さ1cmに存在する蛍光色素の検出が技術的に限界であり、こうした限界を打破すべく、超音波蛍光変調検出法の実用化を目的として、模擬生体における本方法の有用性の評価並びに装置の最適化を進めた。

## 3. 研究の方法

本研究では、超音波変調蛍光検出法の開発に取り組み、水槽に高散乱媒質であるイントラリピッドと蛍光標的を入れた模擬生体を用い、その深部にある蛍光色素の検出実験を行った。また実用化に向けた装置の改良として、圧電素子を多数配列したリニアアレイ型トランスデューサの評価を行った。

## 【超音波蛍光変調検出法の検証】

模擬生体（点滴用脂肪製剤；イントラリピッド）や食肉（ブタ肉）を用いて、超音波蛍光変調検出法で、ある程度の深度にある蛍光色素の検出力を検証した。

## 【プローブの開発】

蛍光断層画像計測装置を生体に応用すべく、素子をリニアアレイ化したプローブを開発した。

## 【リニアアレイ化プローブを用いた超音波蛍光変調検出法の検証】

模擬生体の深部にある蛍光色素の検出を試み、シングルプローブ機械式スキャンと同様に、模擬生体中20-30mmの深さにある蛍光色素が検出可能かを検証した。

## 4. 研究成果

超音波蛍光変調検出法の実用化を目的として、模擬生体における本方法の有用性の評価並びに装置の最適化を進めている。まず模擬生体、食肉を用いた検討である程度の深度にある蛍光色素の検出に成功した。しかし生体に用いるにはより簡便に使用できるプローブの開発が必要であり、我々が開発した蛍

光断層画像計測装置を生体に応用すべくリニアアレイ型トランスデューサを試作し、各素子への信号の位相制御による集束化および走査のシミュレーションを行い、リニアアレイ型プローブを用いて、模擬生体の深部にある蛍光色素の検出を試みた。その結果、シングルプローブ機械式スキャンと同様、20-30mmの深さにある蛍光色素を検出することに成功した。

これまで超音波タグ蛍光イメージング装置によりアガロース生体模擬試料を用いて画像計測に成功し、生体の光散乱係数に近い光散乱媒体中で3cmの深さにある蛍光色素の検出に成功した。またリニアアレイ型トランスデューサを用いて2次元断層画像計測を行った結果、ほぼ蛍光体サイズと同程度の蛍光変調信号のピークを確認することができた。

量子ドットを用いた鏡視下に蛍光検出法の検討では、よりヒトに近い大型動物であるブタをモデルとして量子ドットを用いた腹腔内センチネルリンパ節検出に成功した。量子ドット（蛍光波長700nm）は懸濁液を原液で200 $\mu$ lとパテントブルーバイオレット1%液200 $\mu$ lの混合液を胃漿膜下に注射し、633nmのレーザー光で光励起しつつ高感度CCDカメラに700nmを中心としたバンドパスフィルターを組み合わせた装置で画像計測し、従来から行われる色素法との比較で、量子ドットは色素法を上回る検出率を得た。更に多方向存在するセンチネルリンパ節の検出を可能とする多色での検出にも成功した。

本研究では超音波変調蛍光検出法の開発に取り組み、水槽に高散乱媒質であるイントラリピッドと蛍光標的を入れた模擬生体を用い、その深部にある蛍光色素の検出実験を行った。また実用化に向けた装置の改良として、圧電素子を多数配列したリニアアレイ型トランスデューサの評価を行った。また近年外科治療に内視鏡が導入され、胸腔内腹腔内の手術に広く用いられるようになった。最近ではがんの手術にも用いられるようになり、センチネルリンパ節生検の検討と相まって蛍光検出法の応用に対する期待が大きい。

現在、超音波素子のアレイ化など実用化に向けた装置の改良と、生体に安全に使用する蛍光プローブの開発に取り組んでいる。蛍光ポリスチレンビーズのシリカコーティング化に取り組み、この粒子を用いてラット鼠径リンパ節を体表から検出することに成功した。本方法は生体におけるセンチネルリン

パ節の検出に有用なだけでなく、蛍光色素でマーキングした腫瘍組織の検出にも大きく貢献し、腫瘍を完全に切除し得る精密な外科手術法を確立する上で欠かせない蛍光粒子として期待できる。

これらの結果から、生体においても従来の検出法を上回る深度の蛍光色素を検出できる可能性が強く示唆された。以上により本研究を推進する過程で装置開発における新たな課題が出てきたが実用化に向けて着実に前進した。

## 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 1 件)

1. Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Takeda M and Enomoto M, Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Applied Physics Letter*, 89, 1811022, 2006. 査読：有

[学会発表] (計 2 件)

1. Takeda M, Sakurai Y, Kobayashi Y, Cong L, Hikage M, Amari M, Ishida T, Gonda K, Ohuchi N. Nanosized Silver-Iodide Beads as Novel X-ray Contrast Media for Cancer Detection. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 37-37, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 22-24, 2008, Kurashiki, Japan.
2. Kawai M, Takeda M, Ishida T, Suzuki A, Amari M, Ohuchi N. Interstitial Nano-particle Tracking and Analysis of the Movements in the Human Tumor Xenografts in Mice. *Breast Cancer*, 15, Supplement 1, 33-33, 2008, The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, September 24, 2008, Kurashiki, Japan.

[図書] (計 1 件)

1. 武田元博、小林芳男、小林正樹、櫻井遊、甘利正和、石田孝宣、鈴木昭彦、大内憲明。機能性ナノ粒子による生体イメージ

ンダーがん診療への応用ー。ナノメディ  
シン ナノテクの医療応用、宇理須恒雄  
編、オーム社、pp. 64-74、2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

甘利 正和 (AMARI MASAKAZU)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50400312

### (2) 研究分担者

武田 元博 (TAKEDA MOTOHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10333808

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

### (3) 連携研究者

なし