

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591531
 研究課題名（和文） 蛍光粒状体と分光腹腔鏡を用いた新しいセンチネルリンパ節検索法の開発
 研究課題名（英文） Near infrared imaging of indocyanine green for sentinel lymph node navigation using nano-sized particle

研究代表者
 林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)
 千葉大学・フロンティアメディカル工学研究開発センター・教授
 研究者番号：20312960

研究成果の概要：

腫瘍が最初に転移をおこすリンパ節をセンチネルリンパ節と呼ぶが、消化器癌に対する腹腔鏡下手術においてもこのようなリンパ節を簡便かつ確実に検索可能な方法を、蛍光色素であるインドシアニングリーン（ICG）を用いて検討した。ICGの光学的特性に合わせた腹腔鏡システムを試作、さらにICGがセンチネルリンパ節を超えて拡散することを抑制するため、リポソームを用いた粒状化を行い、これらの有用性を動物実験モデルを用いて確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：胃十二指腸外科学、センチネルリンパ節

1. 研究開始当初の背景

腫瘍から最初にリンパ流を受けるリンパ節（センチネルリンパ節、以下SN）に転移が存在しなければ領域リンパ節に転移はないとするSN理論が消化器癌領域においても検証がなされ、その臨床的有用性が示されてきた。SNを同定する方法として、RIコロイドを用いる方法と色素を用いる方法とがあるが、いずれも長所・短所を有しており、消化器癌において精度の高いSN同定を行うには両者を併用する煩雑な方法が必要とされていた。RIコロイド法は直径数百ナノ

メートルのコロイド粒子がリンパ節内の網内系細胞に貪食されることを利用したものでコロイド粒子にラベルされた放射性同位元素の放射線カウントを計測することにより高感度でかつ定量的に評価が可能である。放射線を利用していることから臓器深部の集積部位の同定が可能であり、コロイド粒子が一定時間リンパ節に滞留することから手術前日の投与も可能である。一方、色素法は比較的簡便で、RI管理区域や特殊な検出器などを必要とせず、腫瘍からSNへ向かうリンパ管の経路も同時に認識される利点がある。しかしながら投与後数分～数十分の内に

二次リンパ節へ流出してしまうため、短時間のうちに判定を行う必要があることや、近年広く行われるようになってきた腹腔鏡手術においてはビデオプロセッサの光学的特性から視認が困難となることもあることが明らかになってきた。そこで近赤外の蛍光を発する性質のあるインドシアニングリーン（ICG）という色素が注目された。赤外線カメラを使用することにより肉眼視よりもはるかに高感度で検出可能であり、また近赤外光が組織を透過するため、臓器表面下のリンパ流路や集積部位まで認識可能となるからである。草野らの報告により消化器癌のSNナビゲーションにも有用である可能性が示されたが、色素であることには変わりはなく、短時間のうちに拡散してしまうため、検索に時間を要する腹腔鏡手術には不向きであった。SNナビゲーションを必要とする消化器癌の多くは早期癌であり腹腔鏡手術の対象となる。腹腔鏡観察下にも比較的簡便に施行でき、高感度に検出可能なSN検出法の開発が研究開始当初に期待されていた。

2. 研究の目的

本研究における最終目標は、ICGの近赤外蛍光を利用し、腹腔鏡観察下にも施行可能なSNナビゲーション法を開発することである。そこで本研究の目的を、①ICGの近赤外蛍光検出に使用可能な分光腹腔鏡の開発、②色素であるICGをRI法で使用されるコロイド粒子と同程度の径に粒子化すること、の2つとした。①は研究分担者の中口らがこれまで肌の色調解析などに対して行ってきた分光解析理論を現行の腹腔鏡システムに組み込むことで可能となると考えられ、また、②は分担研究者の上川らが開発してきた多孔性の酸化チタンナノ粒子により実現可能と推測された。

3. 研究の方法

ICGは第一三共株式会社製ジアグノグリーン®注を用い、溶解液は製品に添付のものを使用した。

ICGの分光特性解析には日本分光株式会社製FP-6600を使用し、分光画像取得には朝日分光株式会社製分光光源LAX-102あるいは米国THORLABS社製レーザー光源S1FC780あるいは朝日分光株式会社製LED光源IFL-50/50IR-780、及びワテック株式会社製高感度モノクロカメラWAT-902H2ULTIMATEを使用した。分光腹腔鏡の作成には、オリンパス社製光源装置CLV-S20、ライトガイドA3294、光学視管WA5005A、株式会社フローベル製小型分離超高感度EM-CCDアナログカメラADT-40Sおよび米

国THORLABS社製バンドパスフィルターを使用した。

チタンナノ粒子作成は上川らの方法（Journal of Materials Research 18(4) 797-803, 2003）により行った。また、ICGリポソームは凍結融解法を用いて作成した。すなわち、10nmol/Lの卵黄レシチンリポソーム分散液を $3.25\sim 3.25\times 10^{-4}$ mmolに調整したICG溶液と混合、これを液体窒素中で凍結し50°Cの温浴で溶解させる操作を10回繰り返した後、メンブレン整形器を用いて粒径200nmに調整した。

生体内動物解析に際して、マウスは8週齢オスのddY（日本SLC）、ラットは8週齢オスのSD（日本SLC）、ブタは3-4ヶ月齢去勢オスの家畜ブタ（高杉実験動物）を使用した。

4. 研究成果

(1) ICGの光学的特性の解析

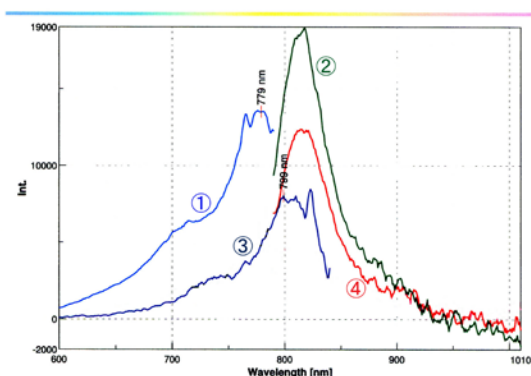


図1 ICGの蛍光スペクトル解析

①蒸留水で溶解したICGの励起スペクトル（計測蛍光波長=804nm）②蒸留水で溶解したICGの蛍光スペクトル（励起波長=780nm）③ヒト血清で溶解したICGの励起スペクトル（計測蛍光波長=850nm）④ヒト血清で溶解したICGの蛍光スペクトル（励起波長=780nm）

まずICGの生体内動物を観察する装置の光学特性設定をするため、ICGの蛍光スペクトルの計測を行った（図1）。蛍光強度は820nm付近で最大となったが、蛍光励起波長に関しては、水溶液中で計測すると780nm付近で、ヒト血清中で計測すると800nm付近で最大となり、血清の有無により蛍光励起特性が異なることが明らかとなった。生体内における特性は血清中の計測データに近いものと推察されるが、蛍光波長と蛍光励起波長が近接するため、この後の視認性の試験においては蛍光励起に780nmの光源を使用し、800nmの長波長透過フィルターを用いて観察を行うこととした。

引き続き図2に示す解析装置を用い、ICGの視認性の解析を行った。ICGを蒸留水またはヒト血清を用いて $2.5\sim 2.5\times 10^{-4}$ mg/mlに段階希釈し濾紙上に滴下、視認性を

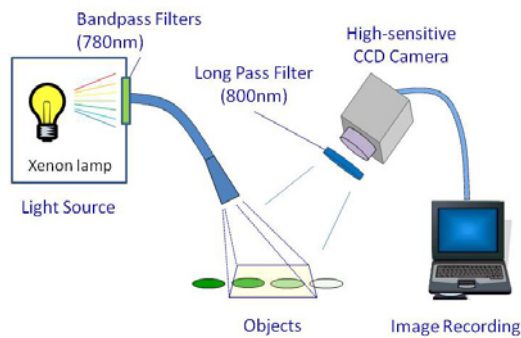


図2 ICGの視認性の解析装置の構成

検討した。室内光観察下においては $2.5 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ が視認可能な限界の濃度であったが、蛍光観察下においては $2.5 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ が限界濃度であり、蛍光観察により約 100 倍の検出感度の増感が可能になるものと考えられた (図 3)。基本的に溶液中の ICG の濃度の上昇とともに観察される蛍光強度も増したが、一定の濃度を超えると逆に蛍光強度が減弱する (quenching 現象) が確認された。また、生体中においては $2.5 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ が観察に最良の条件であることが明らかとなった。

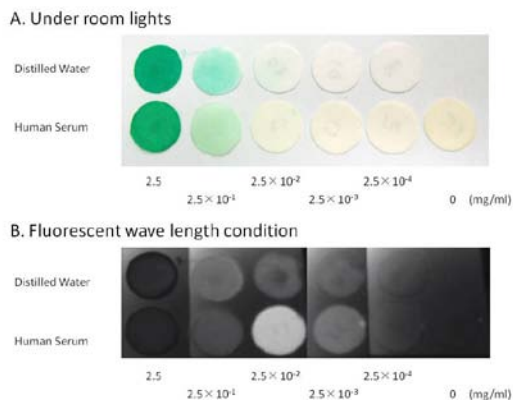


図3 通常光及び蛍光による ICG の観察

室内光 (A) 及び近赤外光 (780nm) (B) 照射下に ICG 溶液の観察を行なった。ICG 5 mg/ml を蒸留水 (各パネル上段) または 5g/dl ヒト血清アルブミン溶液 (同下段) にて段階希釈、濾紙に滴下し、通常のカメラ (A) あるいは 図 2 に示す可視化装置 (B) にて撮影を行なった。

(2) 分光腹腔鏡の作成

上記 ICG の分光特性解析結果に基づき蛍光観察用分光腹腔鏡を試作した (図 4)。通常観察と蛍光観察を同一の装置で可能とするため、切替え式の高感度 EM-CCD カメラを使用した。光源に関しては市販されている腹腔鏡光源の分光特性を解析したところ、赤外カットフィルターが装着されているものの 750nm 付近まで近赤外光の出力が確認されたため、これをそのまま使用することとした。また、ICG 溶液 $2.5 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ を全身麻酔下の家畜ブタの胃壁に局注、その動態を分光

腹腔鏡にて観察を行った (図 5)。その結果通常観察では視認の難しいリンパ管が明瞭に描出可能であることが明らかとなった。



図4 蛍光観察分光腹腔鏡の構成

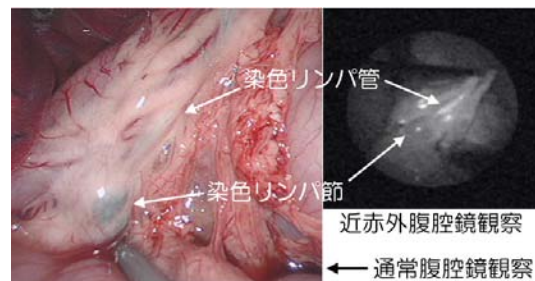


図5 ブタの胃を用いたセンチネルリンパ節同定のシミュレーション

全身麻酔下の家畜ブタに内視鏡を用いて 0.025mg の ICG を胃粘膜下に投与。10 分後に通常内視鏡 (左) 及び近赤外内視鏡 (右) にて撮影。

(3) ICG の粒状化

上川らの方法により作成した粒径数十ナノメートルのチタンナノ粒子溶液を ICG と混合し、濾紙上滴下による視認性の確認を行ったところ、ほぼ図 3 と同様のレベルの蛍光が確認された (データ示さず)。そこでこれを全身麻酔下のラット足底に局注しその生体内動態を観察したところ、ICG 溶液と同様に短時間のうちに二次リンパ節への流出が観察された (データ示さず)。遊離した ICG 分子によるものと判断し、ICG チタンナノ粒子混合液から透析により遊離 ICG 分子を除去し、再び濾紙上滴下にて視認性の確認をしたところ、いずれの濃度において

も蛍光がほとんど観察されなかった（データ示さず）。チタンナノ粒子にはICG分子がほとんど吸着されないか、チタニア粒子自身にICGの蛍光励起特性を減衰させる性質があるかのいずれかであると考えられたため、他の手段による粒状化を試みることにした。

ICGは血液中のタンパクと結合し蛍光励起特性を得るとされているが、文献的には特にリポタンパクが特に重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Yoneya S. et al, *Ophthalmology and Visual Science*, 39, 1286-90, 1998)。そこでリポタンパクの重要な構成成分であるリン脂質に注目した。卵黄由来のリン脂質とICG溶液を混合し蛍光観察を行ったところ図6に示すような蛍光励起が可能であることが明らかになった。

ICG conc. ($\mu\text{mol/L}$)	3.2×10^2	3.2×10^3	3.2×10^4	3.2×10^5
ICG alone	31	47	79	35
ICG liposome	45	188	150	78

図6 ICGリポソームの蛍光観察結果

近赤外光 (780nm) 照射下に $3.2 \times 10^2 \sim 10^5 \text{ mmol/L}$ のICG溶液 (上段) あるいはICGリポソーム溶液の観察を図2に示す可視化装置を用いて行った。尚、数値はImageJを用いた信号強度を示す。

そこでこのICG-リポソーム混合溶液から凍結融解法を用いてICG内包化リポソームを作成し、メンブレン整形器を用いて粒径200nmに整形、全身麻酔下のマウス足底あるいは家畜ブタ胃壁に局注したところ、膝窩リンパ節に滞留し、二次リンパ節へは流出しない生体内動体が観察された (図7)。

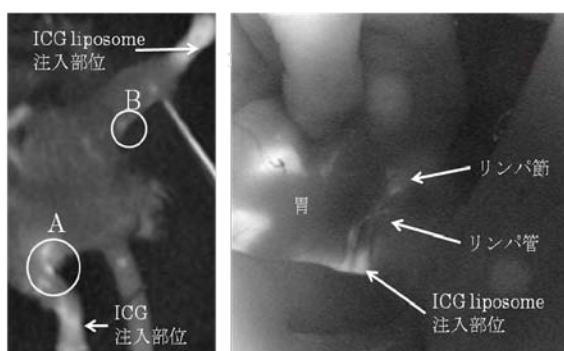


図7 マウス (左) または家畜ブタ (右) を用いたICGリポソームの動体解析

(左) ICG溶液を局注した側の膝窩リンパ節は二次リンパ節への流出が観察されるが、ICGリポソームを投与した側の膝窩リンパ節には二次リンパ節への流出が観察されない (右)。ブタの胃壁に投与されたICGリポソームの動態、胃小弯のリンパ節への集積が見られるがそれ以遠への流出は見られない。

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2件)

- ① 林秀樹, 蛍光色素を用いた生体イメージング, 画像電子学会誌, 38, 2009, 査読無, 掲載予定.
- ② 林秀樹, 川平洋, 武藤頼彦, 落合武徳, センチネルリンパ節生検応用の拡大 (2) 腹腔鏡下手術への応用, 臨床消化器内科, 22, 1107-1115, 2007, 査読無.

[学会発表] (計4件)

- ① Hideki Hayashi, Takeshi Koishi, Suguru Ushiki, Toshiya Nakaguchi, Norimichi Tsumura, Yoichi Miyake, Development of a projector-based augmented reality technique for laparoscopic surgery, 11th World congress of endoscopic surgery, 2008年9月, 横浜.
- ② 林秀樹, 武藤頼彦, 川平洋, 中口俊哉, 津村徳道, 大須賀敏明, 織田成人, 三宅洋一, 蛍光色素を用いた消化器癌に対するリンパ節ナビゲーションの基礎的検討, 第24回日本医工学治療学会, 2008年4月, 幕張.
- ③ H. Hayashi, Y. Miyake, N. Tsumura, T. Nakaguchi, Y. Mutoh, H. Kawahira, M. Uesato, T. Akai, H. Matsubara, Near infrared imaging of indocyanine green for sentinel lymph node navigation -fundamental analysis and porcine model-, 5th International Sentinel Node Congress, 2008年2月, シドニー.
- ④ 林秀樹, 武藤頼彦, 川平洋, 中口俊哉, 津村徳道, 三宅洋一, インドシアニンググリーンの光学的特性について, 第9回Sentinel Node Navigation Surgery研究会, 2007年11月, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)
千葉大学・フロンティアメディカル工学研究
開発センター・教授
研究者番号: 20312960

(2) 研究分担者

上川 直文 (UEKAWA NAOFUMI)
千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60282448

中口 俊哉 (NAKAGUCHI TOSHIYA)
千葉大学・大学院融合科学研究科・助教
研究者番号：20361412

上原 知也 (UEHARA ATOMOYA)
千葉大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：10323403

荒野 泰 (ARANO YASUSHI)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：90151167

島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：20292691

大須賀 敏明 (OOSUGA TOSHIAKI)
千葉大学・フロンティアメディカル工学研究
開発センター・准教授
研究者番号：80223816

(3) 研究協力者

豊田太郎 (TOYOTA TAROU)
千葉大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：80422377

藤戸寛迪 (FUJITO HIROMICHI)
千葉大学・大学院融合科学研究科・大学院生