

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24年6月15日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21592565

研究課題名（和文）ナノ粒子キャリアによる口腔癌センチネルリンパ節転移イメージングの基礎的研究

研究課題名（英文）Sentinel lymph node metastasis imaging by using nanoparticle carriers in an animal study

研究代表者 土持 眞 (TSUCHIMOCHI MAKOTO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：20095186

研究成果の概要（和文）：

最近、小型のガンマカメラを用いるセンチネルリンパ節生検の手法が試みられている。しかし、手術室でセンチネルリンパ節への RI 集積を画像として確認できる反面、ガンマカメラが術野を被ってしまう。色素を用いた方法では解剖学的構造の中でセンチネルリンパ節を確認できるがタイミングの問題や深部の判定に難がある。私たちは複合イメージングプローブを用いてセンチネルリンパ節のマッピングを小型半導体ガンマカメラで行い、リンパ節生検は近赤外蛍光によって解剖学的構造を確認しながら検出をするという新しい手法の可能性を検討した。この目的で基礎的および動物実験を行った。PAMAM 修飾シリカナノ粒子表面に ^{99m}Tc と ICG を結合させたナノ粒子（粒子径分布 30 nm）の複合イメージングプローブを作製した。TLC, thin layer chromatography とイメージングプレート（IP, FLA-2000, Fuji Film Co. Tokyo）を用いて近赤外蛍光と RI を検討した。近赤外蛍光は PDE システム（Hamamatsu Photonics Co, Japan）を使用して画像を検討した。本ナノ粒子キャリア溶解液 100-500 ppb の 0.1 ml（約 7.4 MBq）をラット 6 匹の舌粘膜下に注射して頸部リンパ節を検索した。ガンマカメラ撮像後に頸部を開創して蛍光イメージングで描出した。TLC においてシリカナノ粒子溶解液のスポットを IP と蛍光で確認できた。ラットのリンパ節に RI 集積と蛍光が認められた。集積と蛍光の程度、ウェルカウンターの放射線測定結果は関連していた。透過型電顕によりシリカナノ粒子がリンパ節内に存在することを認めた。ナノ粒子による RI と近赤外蛍光の複合プローブを用いた新しいセンチネルリンパ節生検の可能性が示唆された。また、本ナノ粒子キャリアを用いて転移細胞へのターゲットとイメージングへの方向性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We propose a new approach using multimodality imaging to facilitate sentinel node biopsy examinations, in which radioactive and near infrared (NIR) fluorescent nanoparticles can depict deep situated sentinel nodes and fluorescent nodes, as well as simultaneously visualize anatomical configurations in the field of interest. For this reason we have developed polyamidoamine (PAMAM) coated silica nanoparticles loaded with technetium-99m (Tc-99m) and ICG. To test the feasibility and utility of this dual-modality imaging system we conducted animal studies. The mean diameter of PAMAM coated silica nanoparticles was 30-50 nm as evaluated by images of transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. The distribution of the particle size was measured by a laser scattering particle size analyzer (SALD-7100, Shimadzu, Japan). The peak of the distribution was 30 nm in ethanol solution. The combined labeling with both Tc-99m and ICG-Sulfo-OSu was verified by thin layer chromatography, TLC, before each experiment. 0.1 ml of the nanoparticle solution (7.4 MBq, except for one rat; with 3.7 MBq, and 1 micro-gramm ICG) was submucosally injected in the tongue of six male Wister rats. Lymphoscintigraphy

(sequential static images, every 5 minutes) was performed for 6 rats for one hour immediately after injection. Scintigraphic images showed an increased accumulation of Tc-99m in the neck with a markedly increased uptake at the injection site. Single increased nodal uptake was seen in 4 of 6 rats in the final static images. After completion of lymphoscintigraphy, animals were euthanized. As skin incision was made and 19 lymph nodes were identified in the dissected necks of 6 rats. After lymph node excision, contact-radiography was performed which revealed 3 markedly increased uptake nodes and 3 weak uptake nodes. NIR fluorescence imaging was performed on all dissected necks. The PDE system (Hamamatsu Photonics Co, Japan) provided clear fluorescence images of lymph nodes in the neck with anatomical configurations real time. The intensity of fluorescence was arbitrarily evaluated and 6 lymph nodes were weak to strong, (+) ~ (+++), and other lymph nodes were evaluated as having no fluorescence. Increased radioactive nodes coincided with fluorescent nodes. Radioactivity of 15 excised lymph nodes in 4 rats was assayed with a gamma-well counter. The radioactivity comparison revealed a large difference between the high fluorescence intensity group (4 lymph nodes, mean %; 0.109±0.067) and the low or no fluorescence intensity group (8 lymph nodes, mean %; 0.001±0.000). (p < 0.05). TEM revealed that small black granules were localized and dispersed within the cytoplasm of macrophages in lymph nodes. The appearance of small spherical granules was restricted to macrophages but not other lymphatic cells. Although further studies are needed to determine the appropriate sensitivity and safety of this dual imaging nanoparticles, the results may promise for a better target nodes detection by the dual modality method in sentinel node biopsy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：RI, センチネルリンパ節, ナノ粒子, 複合イメージング, 近赤外蛍光, 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

現在センチネルリンパ節バイオプシーが悪性黒色腫や乳癌の治療に組み込まれている。微少転移を判定することによる患者への恩恵は非常に大きい。口腔癌にも導入されN0症例のリンパ節転移を微少転移のレベルで判定して、90数パーセントの accuracy を達成している。それによって30%から50%に及ぶ、結果的に不必要である頸部廓清術を回避することができ、Quality of life の改善ができる。しかし、この方法ではリンパ節転移の判定はセンチネルリンパ節の摘出後に病理組織検査（免疫組織学的検査、お

よび PCR) を行って始めて判定することができる。私達のアプローチは分子イメージングの手法で、生検時に直接に転移の有無を判定することにある。

現在、医学における分子イメージングの分野は爆発的な進歩、そして臨床導入の期待が最も大きい分野の一つである。形態のイメージング進歩から分子レベルの分布が臨床レベルで可能になりつつある。このことは特に癌の診断、より個々の病態に適した治療法が選択できるようになる(Weissleder, R., Molecular imaging in cancer, Science 312, 1168, 2006)。アプローチとして光イメージ

ングと RI イメージングがある。前者は分子イメージングの新しい手法で、小動物を使用した Quantum dots イメージングに成功して注目を集めているがその近赤外線領域発光は数 mm から 1 cm 内で、臨床における使用は限られてしまう。その点、RI イメージングは目的にあった透過性を示す。イメージングのナノキャリアーとしては Polymeric or metal nanoparticle, liposome, micelle, quantum dot, dendrimers, など多くのものが研究されている (Torchilin, V. P., Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. AAPS Journal. 2007; 9(2): E128)。

このような背景の中で RI イメージングの目標はより微少な転移を特異的に画像化することである。私達は家兎と Tc-99m phytate を用いた実験結果から、微少なセンチネルリンパ節をとらえるには高い target/background 集積比が望まれることを明らかにした。また、転移腫瘍細胞に対する特異性については腫瘍細胞に対する抗体の使用が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は分子イメージングの手法を使用した口腔癌センチネルリンパ節微少転移の直接イメージングの可能性を基礎的に検討することである。現在センチネルリンパ節バイオプシーでは術野の局所放射線量を測定して単にセンチネルリンパ節を探すのみで、転移しているかどうかは摘出した後の病理検査を待たなければならない。目的が達成できれば、病理検査を待たずにセンチネルリンパ節バイオプシー時に微少なリンパ節転移の判定が可能となり、適正な治療方法の選択が迅速に可能となる。また、画像のガイドによるラジオアイソトープガイド手術 (Radioguided surgery) の実現化にもつながる。私たちは新しいナノ粒子テクノロジーを用いて直接にリンパ節の転移細胞を画像化することを提案し、基礎的な実験を実施し、実現化を図る。

3. 研究の方法

(1) ポリマーグラフト化による生体親和性シリカナノ粒子の Tc-99m 標識

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) によるシリカナノ粒子ポリマーグラフト化を行い、Tc-99m 標識抗体結合のための官能基改変と最適条件 (グラフト重合率) を探る。

Ruriko Yokoyama, Norio Tsubokawa, Makoto Tsuchimochi, et. Al. Preparation and

properties of biocompatible polymer-grafted silica nanoparticle European Polymer Journal 42 (2006) 3221-3229

オートラジオグラフィ: イメージングプレートを用いた autoradiography, オートラジオグラフィではフルオロ・イメージアナライザー FLA2000 (富士写真フイルム社) と高精細イメージングプレート (IP) BAS-SR2040 (富士写真フイルム社) を用いて施行。

RI 集積量の定量測定: 定量測定ではオートウェルガンマシステム ARC-370M (アロカ) 使用 (2) Tc-99m 標識シリカナノ粒子への近赤外蛍光色素の結合, アミノ基への ICG 結合

(3) シリカナノ粒子径, および粒子分布の観察

(4) 走査型電子顕微鏡, 透過型電子顕微鏡によるシリカナノ粒子の観察

(5) Tc-99m 標識近赤外蛍光シリカナノ粒子を用いたラットにおけるセンチネルリンパ節複合イメージング

(6) 小型半導体ガンマカメラによるセンチネルリンパ節検出感度の測定

(7) 走査型電子顕微鏡, 透過型電子顕微鏡によるセンチネルリンパ節内シリカナノ粒子局在の観察

(8) Tc-99m 標識近赤外蛍光色素結合シリカナノ粒子のターゲット化準備

使用培養癌細胞; ヒト乳癌細胞 HER2 発現 (SK-BR3, BT474, MDA-MB231 など)

HER2/ErbB2 (D8F12) XPTM Rabbit mAb

4. 研究成果

ナノ粒子表面にデンドリマーのポリアミドアミン (PAMAM) を付与して、Tc-99m と近赤外蛍光の ICG とによるイメージングを可能にした。使用した粒子はレーザ回折式粒度分布測定により 30nm 径をピークとする 50nm 以下の分布を示した。走査型電顕および透過型電顕によりその粒子を観察してほぼ同大の粒子であることを確認した。また使用した粒子濃度は 100 から 500ppb であった。粒子への RI 付着の確認は TLC 展開後の contact radiography (radioluminography) と、近赤外蛍光の付与は浜松フォトニクス近赤外蛍光検出器および LAS4000 により確認した。複合イメージング粒子を用いた 6 匹のラット舌部のセンチネルリンパ節イメージングを試みた。RI 量は約 0.33mCi/100 μ l を舌に注入し、シンチレーションカメラと小型半導体 γ カメラにて集積を認めた。その後頸部を解剖して浜松フォトニクス近赤外蛍光検出器等でリンパ節の近赤外蛍光を認めた。摘出リンパ節の重さは 1.5mg から 25mg であり、imaging plate と浜松フォトニクス近赤外蛍光検出器

および LAS4000 により同一リンパ節が RI と近赤外蛍光を示すことが確認できた。また、well counter にて放射能測定を実施した。集積と蛍光の程度、ウェルカウンターによる放射線測定結果は関連していた。比較的放射線量とナノ粒子キャリアの濃度で近赤外蛍光と RI のセンチネルリンパ節画像化が達成できた。両イメージングによる検出感度を一致させるには濃度設定などのより詳細な検討が必要と考えられた。センチネルリンパ節生検においてナノ粒子を用いた RI と近赤外蛍光の dual イメージングの可能性が示唆された。本ナノ粒子キャリアを用いて転移細胞へのターゲットとイメージングへの方向性が示された。2011 年 9 月に米国サンジェゴで開催された世界分子イメージング会議においてその成果の一部を発表した。ポスター発表 832 演題中 256 演題がポスター賞の候補に選ばれ、日本からは 10 演題が候補に上がった。私達のポスター発表も候補になったが残念ながら賞からもれた。しかし、研究は世界の上位レベルであることが確認された。成果は国際誌に投稿準備中である。

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 Tsuchimochi M, Hayama K. Intraoperative gamma cameras for radioguided surgery: Technical characteristics, performance parameters, and clinical applications. *Phys Med*. 2012 Jun 4. [Epub ahead of print] PMID: 22672926 [PubMed - as supplied by publisher] 査読有
doi.org/10.1016/j.ejmp.2012.05.002

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tsuchimochi M, Hayama K, Kameta A, Yamaguchi H, Toyama M, Sasagawa I, Tsubokawa N. Dual-modality Imaging Using Radionuclide and Near-infrared Fluorescence Nanoparticles for Sentinel Lymph Node Biopsy: An Animal Study. 2011 World Molecular Imaging Congress (2011.9.9, San Diego, CA, USA)
- ② 土持 眞, 羽山和秀, 亀田綾子, 外山三智雄, 笹川一郎, 坪川紀夫. 小型半導体ガンマカメラと複合イメージングプローブを用いたセンチネルリンパ節生検の可能性. 第 65 回日本口腔科学会学術集会 (2011.4.21, 東京)
- ③ 土持 眞, 羽山和秀, 亀田綾子, 諏江美樹子. 核医学と近赤外蛍光の複合イメージ

ングナノ粒子によるセンチネルリンパ節生検の可能性. 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 (2011.1.18, 熊本)

- ④ Tsuchimochi M, Hayama K, Kameta A, Toyama M, Sasagawa I, Tsubokawa N. Sentinel node imaging of radioactive and near infrared fluorescent nanocarriers; an animal study. The 7th International Sentinel Node Society Meeting (2010.11.20, 横浜)
- ⑤ 土持 眞, 羽山和秀, 亀田綾子, 外山三智雄, 笹川一郎, 坪川紀夫. ^{99m}Tc と近赤外蛍光の dual イメージングナノ粒子キャリアによるセンチネルリンパ節生検の試み. 第 12 回 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会学術集会 (2010.11.17, 横浜)
- ⑥ 土持 眞, 羽山和秀, 亀田綾子, 外山三智雄, 笹川一郎, 坪川紀夫. ナノ粒子を用いた ^{99m}Tc と近赤外蛍光の複合イメージングによるセンチネルリンパ節生検の可能性. 第 50 回日本核医学会学術総会 (2010.11.11-13, 大宮)
- ⑦ 土持 眞. 歯科領域の核医学, 小型半導体ガンマカメラによるセンチネルリンパ節バイオプシー. 第 857 回放射線診療研究会 (2010.9.13, 東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ngt.ndu.ac.jp/guide/kouza/dental12.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土持 眞 (TSUCHIMOCHI MAKOTO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：20095186

(2) 連携研究者

坪川 紀夫 (TSUBOKAWA NORIO)

新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：20018675

羽山 和秀 (HAYAMA KAZUHIDE)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号：60120713

亀田綾子 (KAMETA AYAKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師
研究者番号：00328866

諏江美樹子 (SUE MIKIKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教
研究者番号：60339471

(3)研究協力者

笹川 一郎 (SASAGAWA ICHIRO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：00095134

吉江 紀夫 (YOSHIE SUMIO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号：30095278