

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462009

研究課題名(和文) 蛍光計測技術を用いた消化器がんに対する革新的内視鏡下手術システム

研究課題名(英文) An innovative new endoscopic surgical system using fluorescent measurement technology for gastroenterological operation

研究代表者

亀井 尚 (KAMEI, TAKASHI)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10436115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究は蛍光シグナルを高感度に検出する新規の内視鏡外科システムを開発することであり、3年間の研究期間に以下の成果を得た。

1. 蛍光プローブとして新規の有機系蛍光プローブを開発し、その特性を解析した。量子ドットやICGよりもシグナルは強度で持続性も高いことを明らかにした。2. 蛍光プローブの消化管クリップへの担持に成功した。3. 消化器手術に応用可能な蛍光内視鏡システムを作成、改良した。4. 作成した機器、クリップを用いて、ブタモデルで管腔外から蛍光消化管クリップの検出に成功した。5. 新規プローブの生体組織での動態とシグナル特性を解析した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was development of a new fluorescent endoscopic surgical system and we had the study results as below.

1. We created an original organic fluorescent probe and analyzed the property of this particle. This probe had advantages in fluorescent signal intensity and degradation time compared with quantum dot or ICG. 2. We developed an original gastrointestinal endoscopic clip with the new fluorescent probe. 3. We developed an original fluorescent endoscopic surgical system and refined the conditions for human application in the future. 4. We successfully detected the fluorescent signal of the clips from outside of the gastrointestinal tract in pig model using our original surgical system. 5. We performed analysis of the fluorescent property and dynamics of the original fluorescent particle in living tissues.

研究分野：消化器外科

キーワード：蛍光プロ ブ 蛍光内視鏡手術 蛍光クリップ リアルタイムナビゲーション

1. 研究開始当初の背景

内視鏡下手術は、その低侵襲性、術後回復の早さと速やかな社会復帰、整容性などの利点があり、今日では広く行われている手術となってきた。反面、術野視覚が2次元で、全体像を把握することが苦手なこと、対象臓器を直接触れることができないことなどの欠点があり、手術手技の獲得に専門的修練を必要とする。さらに、従来の開腹手術では起こり得ない手術合併症が問題ともなっている。これらの欠点を補完する手術システムとして、新たな生体情報を術中リアルタイムに術者に提供可能なシステムを構築すれば、安全で合理的な内視鏡手術が行われるようになる。一方、蛍光計測技術は医療分野への応用が始まったばかりで、その方向性が模索されている段階であった。

私共は蛍光イメージングを内視鏡手術に付加することを着想し、さまざまな新規の生体情報を蛍光シグナルで提供できる内視鏡手術システムを試作した。

私共はこれまでに生体微弱光計測の技術を背景として、蛍光の体外診断装置の開発、小型動物を用いた蛍光検出実験を行ってきた(Nakajima M, et al. *Cancer Sci*, 2005)。また、培養細胞やマウスにおいてナノ蛍光粒子である量子ドットを用い、ナノレベルの超微細蛍光計測システムの開発を行い、*in vivo* でリアルタイムに観察することに成功している(Tada H, et al. *Cancer Res*, 2007, Kawai M, et al. *Breast Cancer Res*, 2009)。さらに、蛍光計測によるセンチネルリンパ節の同定にも成功し、(Hikage M, et al. *Nanotechnology*)リンパ節内に取り込まれた蛍光プローブの存在不均一性と転移開始部位の推定などに、一定の成果を上げてきていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の蛍光計測技術を基に、触診によらない腫瘍の存在部位の同定、脈管(胆管、胸管など)走行の確認と副損傷の回避、センチネルリンパ節の描出と合理的切除範囲の決定、などを術中リアルタイムに蛍光シグナルとして得ることで、詳細な生体情報を提供する内視鏡外科手術システムを構築することである。この新規蛍光ナビゲーション内視鏡下手術が実現されることで、より緻密で安全な内視鏡手術が可能となり、外科医療への貢献は大きい。

3. 研究の方法

(1) 蛍光検出可能な腹腔鏡の作成
 蛍光検出機器として、高出力レーザー励起および高感度蛍光検出装置を組み込んだ鏡視下手術用硬性鏡を試作しているが、これ

を臨床応用可能なレベルまで改良を行う

(2) 新規蛍光プローブの作成
 蛍光プローブとして、従来使用されてきた量子ドットはCdSeを内包しており、重金属の毒性が臨床応用における問題となる。そこで、有機系物質を用い、本研究の使用に耐えうる蛍光プローブを作成、その物質の蛍光シグナルの特性(強度、滞留時間、組織透過性など)と生体内の動態の解析を行う。

(3) 蛍光消化管クリップの開発
 管腔外から認識可能な蛍光物質を担持させた消化管クリップを新規に開発し、その蛍光特性を明らかにする。従来の量子ドットのみならず、新規に開発した有機系蛍光プローブを用いた蛍光クリップも試作する。実際に、ブタ胸腔内、腹腔内で消化管外からの蛍光検出が可能な検討とその特性の解析を行う。また、消化液などの影響をどれだけ受けるか等の検討も伏せて行う。

(4) 大動物モデルでの内視鏡下蛍光計測
 大動物モデルとして、ブタを用いて上記蛍光消化管クリップの検出実験を行う。また、新規蛍光プローブを用いて、胃センチネルリンパ節の蛍光計測と動態の解析を行い、検出最適条件を決定する。内視鏡手術における副損傷の多くは脈管の誤認と切離であり、脈管の蛍光検出は重要なポイントとなる。血管、胆管、リンパ管、胸管などの各脈管の蛍光計測と最適条件の決定を行う。

4. 研究成果

(1) 蛍光検出可能な腹腔鏡の作成
 高感度蛍光計測装置を内視鏡手術に用いるため、硬性鏡カメラとバンドパスフィルターが一体化した片手で持つことができる装置を開発した。励起光は可能な限り高出力を出すためにこの装置とは別に設置し、ケーブルで連結した。キセノン、水銀ランプと各種レーザーを検討し励起レーザーを確定した。プローブに最適な励起波長を選択するためのバンドパスフィルターを組み込んでいるが、目的とする蛍光波長をいくつか選択し、多重蛍光シグナルの検出が可能となるように、フィルターを手元で切り替えられる構造を付加した。カメラ部分の総重量は約1.5kgで数時間の手術に応用することが可能と判断した。将来的にはさらに軽量化、コンパクト化して使い勝手を良くしていく必要はある。

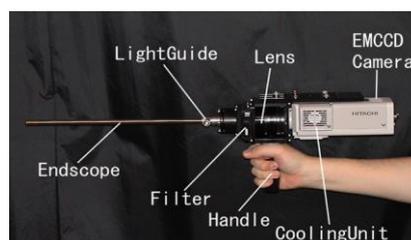


図1 蛍光計測可能な硬性腹腔鏡

(2) 新規蛍光プローブの作成

生体への臨床応用を念頭に、有機系の蛍光プローブを新規に開発した。有機色素を集積させた蛍光ナノ粒子 **Phosphor Integrated dot(PID)**を研究協力者とともに作成、完成させた。PIDは粒子径数十ナノメートルのほぼ均一な粒子として作成され、現在の蛍光計測におけるプローブとしての条件を十分に満たす。励起光 **582nm**で **626nm** ピークの近赤外波長の蛍光シグナルを発することを確認した。近赤外光は可視光ではなく、通常の手術野を汚染することなくシグナル検出が可能であり、研究テーマに好都合である。蛍光特性を解析すると、1粒子あたりの発光強度は量子ドットよりも高く、 $\text{dye} \times 10^2 \sim 10^3$ であることを明らかにした。また、退色時間は120分以上の観察時間でほとんど見られず、その点でも有用な蛍光ナノ粒子である。**Indocyanine green(ICG)**との比較でも、蛍光シグナル強度は高いことを確認した。より明るく、より深い部位でも検出できる、この新規蛍光色素の開発は意義が大きい。本プローブは有機系物質を材料としているため、基本的には生体に毒性を示さない。

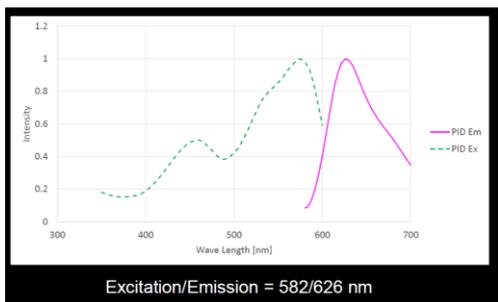


図2 新規有機系蛍光プローブの蛍光特性

(3) 蛍光消化管クリップの開発

消化管内視鏡クリップは、病変位置の確認(マーキング)、止血などの内視鏡治療に用いられている。内視鏡手術では病変に直接接触することができないため、病変部分、位置などの把握はクリップをもってしても困難であった。今回、我々は消化管の管腔外から蛍光シグナルを検出する目的でPIDを担持させたクリップを試作した。クリップは外径 **2mm** のステンレス製のものである。クリップ基部のシース部に蛍光色素PIDの内包を行うことにより内視鏡に挿入可能でファイバーにも影響がないことが確認できた。基礎実験ではこのクリップでも、粒子単独と同様に強い近赤外光蛍光シグナルの検出、連続励起においても退色傾向を示さないことを示した。

図3 蛍光クリップとシグナル検出



(4) 大動物モデルでの内視鏡下蛍光計測
ブタを用いて **in vivo** 実験を行った。消化管蛍光クリップを事前に内腔側から食道、胃、大腸に打って置き、全身麻酔下に腹腔鏡手術手技を用いて蛍光シグナルを観察した。食道では、胸腔鏡下にクリップの蛍光シグナルが観察され、病変部の同定において臨床応用可能であることが判明した。また、大腸でも腹腔鏡下に鉗子による圧排を行うことにより、管腔外から蛍光クリップの同定ができ、病変部確認への応用が現実的であることを明らかにした。腹腔鏡手術の対象となる早期癌では、直接接触することができず、大腸癌原発巣の部位の同定が難しい。点墨や術中大腸ファイバーカメラが行われているが、術野の汚染と病変部の確認は相反する事項で、改善が望まれてきた。蛍光クリップによるマーキングはこの問題を解決し、手術の正確さ、時間短縮、再発防止に大きなメリットをもたらす。一方、胃は壁が厚く、通常の高励起光では、胃内まで届かず、蛍光シグナルも検出できなかった。前壁、後壁によっても励起光が届くかどうかの差もあるため、さらなる検討が必要である。観察時間内では、消化液とPIDの相互作用は見られなかった。PIDは非常に安定した有機系プローブであることが確認された。

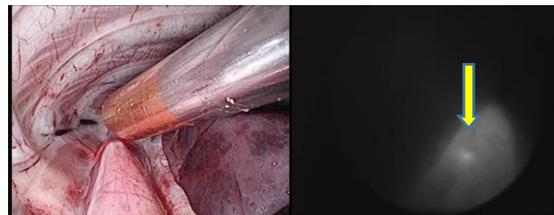


図3 胸腔側からの食道内蛍光クリップの確認(矢印)

ブタの生体組織におけるPIDの動態、蛍光計測をおこなった。ブタ胃前壁にPIDを経口内視鏡を用いて内腔側から局注し、それを腹腔鏡下に蛍光観察した。蛍光は局注こととともにリアルタイムに検出でき、リンパ管網を通して左胃動脈周囲リンパ節に到達することを確認した。これは胃癌のセンチネルリンパ節を術中リアルタイムに同定することが可能であることを意味する。以前に、同様の実験は量子ドットを用いて行ったが、前述する毒性の懸念があり、臨床応用までは至らなかった。また、食道でも同様に実験を行い、中部食道へのPID局注により、胸郭上部の反回神経周囲リンパ節、気管周囲リンパ節に蛍光プローブが到達していく様子が観察された。食道のセンチネルリンパ節は、頭側、尾側に広範なリンパ管網が存在することにより同定が難しいとされるが、本法を応用することにより、より緻密なセンチネルリンパ節の術中同定が可能となる。局注からリンパ節到達まで

の時間は数秒から十数秒程度であった。リンパ節到達後、PIDは強い蛍光シグナルを60分以上保持し、1次リンパ節に滞留した。2次以降のリンパ節への到達は観察できなかったが、ある程度脂肪組織に覆われたリンパ節でも検出は可能であった。一方、検出可能な組織深度は約1cmが限界で、励起光が届く範囲をより深くするための工夫や励起強度の調整が必要であることが明らかとなった。

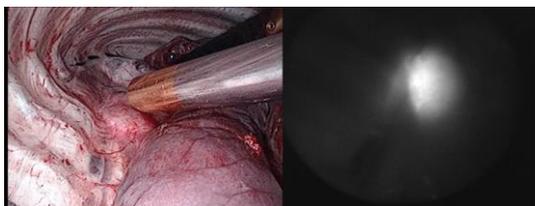


図4 ブタ食道のリンパ流とセンチネルリンパ節の蛍光検出

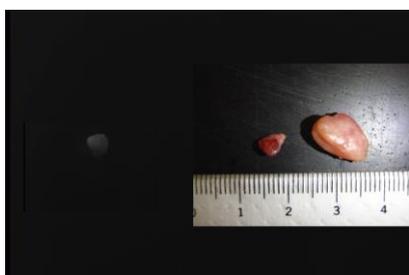


図5 摘出リンパ節の蛍光シグナル
(左がセンチネルリンパ節、右がそれ以外のリンパ節)

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. Gonda K, Hamada Y, Kitamura N, Tada H, Miyashita M, Kamei T, Ishida T, Ohuchi N. Highly sensitive imaging of cancer with functional nanoparticles. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 28: 701-706 (2015). (査読あり)

2. 権田幸佑、中川智彦他

X線CTイメージングへのナノ粒子造影剤の応用

東北大学医学部保健学科紀要 22 巻 2 号 61-66 (2013) (総説・査読無し)

[学会発表] (計2件)

1. 亀井尚、宮田剛、中野徹、阿部薫夫他
胸腔鏡下食道切除術の発展に向けて～手術手技と教育、機器の進歩
第69回日本消化器外科学会シンポジウム

(消化器外科領域における内視鏡下手術のさらなる発展に向けた課題とその克服)

(2014. 7. 16. 郡山・市民文化センター)

2. 亀井尚、権田幸佑、中川智彦他

QDをトレーサーとした近赤外蛍光内視鏡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・パシフィコ横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀井 尚 (TAKASHI KAMEI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10436115

(2)研究分担者

中川智彦 (NAKAGAWA TOMOHIKO)

東北大学・病院・医員

研究者番号: 00646804

権田幸佑 (GONDA KOUSUKE)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80375435

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

手島 仁 (TESHIMA JIN)

東北大学・病院・医員

研究者番号: 90579749

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：