

令和元年6月11日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18453

研究課題名(和文) 肺癌に対するICG局所注入と近赤外線レーザーを用いた光温熱治療の開発

研究課題名(英文) Photothermal ablation of lung cancer by low power near-infrared laser and topical injection of ICG.

研究代表者

廣橋 健太郎 (HIROHASHI, kentaro)

高知大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70457406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌に対する新たな低侵襲治療の開発を試みた。低出力近赤外線レーザーと光増感物質であるICGの局所注入を組み合わせた光温熱治療の有効性を動物実験で検証した。ヒト肺癌細胞株で作成したマウス皮下腫瘍モデルを用いた実験では、腫瘍近傍に注入したICGに近赤外線レーザーを照射することにより、すべての皮下腫瘍は著明に縮小した。また、うさぎ肺腫瘍モデルを用いた実験では、対象群である近赤外線レーザー単独群ではほとんど腫瘍は焼灼されず、癌細胞は残存した。一方で、ICG局所注入と近赤外線レーザー照射群では、広範囲に肺腫瘍が焼灼され、大部分の癌細胞が死滅し、本治療法の有効性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肺癌患者の高齢化に伴い、併存症のために標準治療である外科的切除が選択できない症例が増加している。今回、肺癌に対する新たな低侵襲治療の開発を試みた。低出力近赤外線レーザーと光増感物質であるICGの局所注入を組み合わせた光温熱治療の有効性を検証した。ヒト肺癌細胞株で作成したマウス皮下腫瘍モデルを用いた実験では、本治療法により全ての皮下腫瘍は著明に縮小した。また、うさぎ肺腫瘍モデルを用いた実験では、本治療法により、広範囲に肺腫瘍が焼灼され、大部分の癌細胞が死滅し、本治療法の有効性を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a new minimally invasive treatment for lung cancer. The efficacy of photothermal treatment combining low power near-infrared laser and topical injection of ICG which is a photosensitizer was verified by animal experiments. In experiments using a mouse subcutaneous tumor model created with a human lung cancer cell line, all subcutaneous tumors were significantly reduced by topical ICG injection followed by irradiation of near-infrared laser.

Moreover, in the experiment using a rabbit lung tumor model, almost no tumor was cauterized in the near infrared laser alone group which is a control group, and cancer cells remained. On the other hand, in the ICG topical injection and near-infrared laser irradiation group, lung tumors were cauterized extensively, most of the cancer cells were killed, and the efficacy of this treatment could be confirmed.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：光温熱治療 肺癌 近赤外線レーザー ICG

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌患者の高齢化に伴い、併存症のために標準治療である外科的切除が選択できない症例が増加している。原発性肺癌に対する局所治療としては、外科的切除の他に SBRT などの放射線治療や PDT や高出力レーザー治療などの内視鏡的レーザー治療が普及している [1],[2]。本邦では、早期扁平上皮癌に対して PDT が積極的に選択されている。また、進行した原発性肺癌の気管支内浸潤に対して姑息的な高出力レーザー照射が選択されることが多い。しかし、内視鏡的治療は比較的中枢の気管支内悪性腫瘍に対するもので、原発性肺癌のほとんどを占める気管支外の肺実質に存在する病変に対する治療手段として用いることができないためその適応は限定されている。一方で、組織透過性に優れた近赤外線波長領域のレーザー照射と光増感薬剤の局所注入との併用による光温熱治療は、局注部位に対して選択的に光温熱効果を発現させることで合併症のリスクを最小限にすることが期待できる。光感受性物質として、ICG は臨床人体に局所注入および静脈内投与が認められている薬剤である。ICG は一定の濃度条件下で 800nm 付近の近赤外線にて励起され、840nm 付近の蛍光を発し、最近では心血管領域での in-vivo imaging への応用でも知られている。また、同時に光吸収物質であり、近赤外線レーザー光を吸収し発熱効果を得られる [3]。

我々は、肺癌の近傍にインドシアニングリーン(ICG)を注入し、末梢性肺癌に対してはナビゲーション気管支鏡を用いて気管支生検針内に細径光ファイバーを通してレーザー照射を行う光温熱治療の開発を目指す。

これまで、我々は ICG 局所注入と近赤外線レーザー照射を組み合わせた新しい光温熱治療の有効性を検証してきた。基礎実験として、ヒト肺癌細胞株の温熱感受性や細胞傷害について検証し、59°C の高温環境下では 5 分間で肺癌細胞株が死滅することを確認した。また、ICG 濃度・レーザー照射時間と局所の温度上昇との関係性を検証した。その結果、ICG 溶液(0.5g/L)に 808nm レーザーを 250mW の弱い出力で照射すると 1 分後に 20°C 以上の温度上昇が得られることを確認した。

[参考文献]

[1] Simone C et al. Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. Journal of thoracic disease 4:63-75, 2012

[2] Freitag L et al. Interventional endoscopic treatment. Lung cancer 45:235-8, 2004

[3] Holzer W et al. Photostability and thermal stability of indocyanine green. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology 47:155-64, 1998

2. 研究の目的

近年、肺癌患者の高齢化に伴い、併存症のために標準治療である外科的切除が選択できない症例が増加している。本研究はそのような症例に対して、新たな代替治療となり得る低侵襲レーザー治療の開発を目的とする。本治療は、肺癌に対する ICG の局所注入と近赤外線レーザーを併用した新たな低侵襲レーザー治療である。現在肺癌領域で臨床応用されている Photodynamic therapy (PDT) や高出力レーザー治療とは本質的に異なり、中枢気道に発生した肺癌だけでなく、肺実質内の末梢性肺癌に対しても有効な治療を開発するものである。本研究により肺癌に対する新しい低侵襲な治療手段の開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒト肺癌細胞株(NCI-H460)をヌードマウスに移植して作成したマウス皮下腫瘍モデルを用いた in-vivo 実験を行った。ICG 局所注入+レーザー照射群(ICG 群)と生理食塩水局所注入+レーザー照射群(生食群)の 2 群に割り付けた(n=3)。これまでの in-vitro 実験の結果をもとに、注入する ICG の濃度やレーザーの出力・照射時間を決定した。ICG 群では、0.5g/L の ICG を腫瘍に局所注入した。両群のすべての腫瘍に、500mW の出力で 808nm の近赤外線レーザーを 10 分間照射した。治療後 60 日目まで腫瘍面積を計測した。ただし、60 日以内に腫瘍径が 1cm に達したマウスについては、その時点で犠牲させた。

また、極細気管支鏡を用いてウサギ肺に VX2 癌細胞を含む懸濁液を注入し VX2 肺腫瘍モデルを作成した。ICG 局所注入+レーザー照射群(ICG 群)とレーザー照射単独群(Control 群)の 2 群に割り付けた(n=3)。in-vitro 実験の結果とマウス皮下腫瘍モデルの結果をもとに、注入する ICG の濃度やレーザーの出力・照射時間を決定した。ICG 群では、0.5g/L の ICG を腫瘍に局所注入した。すべての腫瘍に、500mW の出力で 808nm のレーザーを 15 分間照射した。腫瘍の焼灼面積や周囲の肺実質や血管への影響を病理学的に評価した。

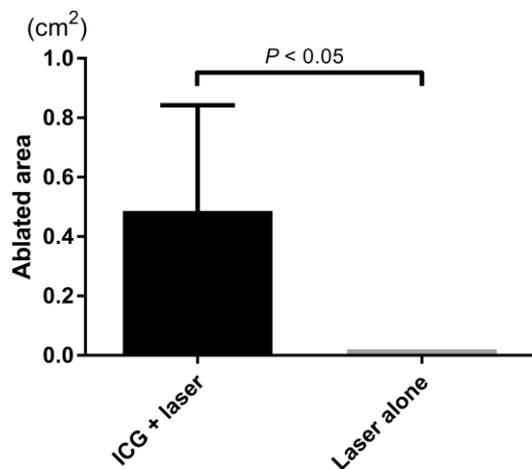
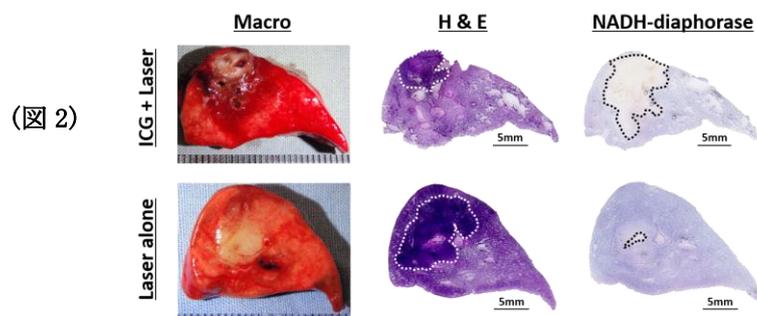
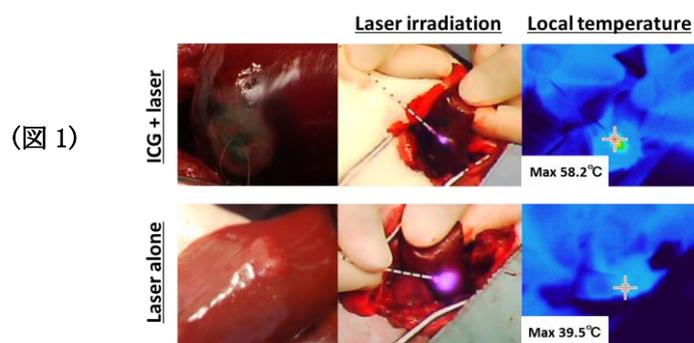
4. 研究成果

ヒト肺癌細胞株を移植して作成したヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いた in-vivo 実験では、生理食塩水局所注入+レーザー照射群(生食群)では 3 匹とも 1 か月以内に腫瘍径が 1cm に到達した。一方で ICG 局所注入+レーザー照射群(ICG 群)では、全てのマウスにおいて腫瘍が縮小し、2 匹において腫瘍が肉眼的に消失した。I 群で肉眼的に腫瘍が消失したマウスのうちの 1 つの個体では、レーザー照射部位に一致して軽度の熱傷を負ったが、自然に熱傷は治癒し最終的にごくわずかに癍痕を残すのみとなった。ヒト肺癌細胞株を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいて、本治療の有効性が確認された。

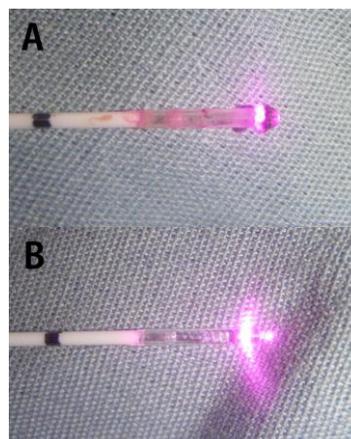
ウサギ VX2 肺腫瘍モデルを用いた in-vivo 実験では、腫瘍表面の温度は、ICG 局所注入+レーザー照射群(ICG 群)では、58℃以上に上昇したのに比べて、レーザー照射単独群(Control 群)では、腫瘍表面の温度は 40℃にも満たなかった(図 1)。結果として、ICG 群では Control 群と比較して有意に広範囲の腫瘍を焼灼することに成功し、本治療法の有効性を確認することができた(ICG 群: $0.49 \pm 0.27 \text{cm}^2$, Control 群: $0.02 \pm 0.002 \text{cm}^2$)(図 2,3)。腫瘍周辺の血管壁は HE 染色や NADH 染色で intact であることを確認した。また、本研究を通して、いくつか本治療法の問題点も浮き彫りとなった。腫瘍辺縁に viable な腫瘍細胞が残存していることが確認された。過去には、不完全な温熱治療は癌細胞の増殖を助長するとの報告があり[4]、今後さらなる改善が必要である。腫瘍辺縁に viable な細胞が残存した要因について以下のように考察した。腫瘍辺縁が接する正常肺実質は、肺胞内に多量の空気を含んでいるため、cooling effect が働き、十分な温度上昇が得られにくい可能性がある。腫瘍辺縁を含めた全ての腫瘍細胞に温熱による障害を与えるためには、腫瘍周辺の正常肺実質にも ICG が注入されることが鍵となると考える。また、別の問題点として、レーザーファイバー先端に炭化した組織が付着することが確認された(図 4)。炭化した組織がファイバーに付着してしまうと、近赤外線レーザー光は付着した炭化組織に大部分を吸収されてしまい、その後は有効な光温熱治療が継続できないことが判明した。これについては、今後注入する ICG 濃度や近赤外線レーザーの出力を調整することで解決可能と考える。

[参考文献]

[4] Kroeze SGC et al. Incomplete thermal ablation stimulates proliferation of residual renal carcinoma cells in a translational murine model. BJU Int 110:E281-286, 2012



(図 3)



(図 4)

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. Kentaro Hirohashi, Takashi Anayama, Hironobu Wada, Tatsuya Kato, Kazumasa Orihashi, Kazuhiro Yasufuku. Photothermal ablation of lung cancer by low power near-infrared laser and topical injection of Indocyanine Green; A preliminary animal study. 18th World Conference on Lung Cancer, 2017
2. 廣橋 健太郎、穴山 貴嗣、宮崎 涼平、岡田 浩晋、久米 基彦、渡橋 和政：当科における気管支内 ICG 投与による区域間同定症例の検討。第 33 回日本呼吸器外科学会総会，2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。