

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10776

研究課題名(和文) ナノ粒子と近赤外線蛍光イメージングを用いた小型肺腫瘍局在診断法の開発

研究課題名(英文) Nanoparticle enabled near-infrared fluorescence guided small lung tumor localization

研究代表者

和田 啓伸 (Hironobu, Wada)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90514604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ICGを含有するナノ粒子であるLP-ICG-C18を静脈内投与することで、ヒト肺癌細胞株を用いて作成した皮下腫瘍および肺腫瘍に選択的に集積することを確認した。

ヌードマウス皮下腫瘍モデルにLP-ICG-C18を静脈内投与し、経時的にin-vivo蛍光発光イメージングを用いて蛍光を観察し、48時間後にSignal-to-background ratio(SBR)が最大(SBR:1.5)となることを確認した。続いて、ヌードマウス肺腫瘍モデルを作成し、静脈内投与48時間後に犠牲死させ、肺腫瘍と背景肺の蛍光を観察し、LP-ICG-C18は選択的に肺腫瘍に集積(SBR=2.0)することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、静脈内投与されたナノ粒子が腫瘍に集積する特性と、インドシアニングリーンの蛍光を利用して、近赤外線蛍光イメージングを呼吸器外科手術における小型肺悪性腫瘍の局在診断に応用することである。千葉大学で開発されたLP-ICG-C18は静脈内投与によりヒト肺癌細胞株より作成された皮下腫瘍、肺腫瘍に選択的に集積し、蛍光をとらえることが可能であった。安全性や実用性についてまだ問題点は残るが、今後の臨床応用に期待の持てる結果であった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that intravenously administered liposomal nanoparticle, LP-ICG-C18 that encapsulates indocyanine green, accumulated selectively in subcutaneous and lung tumors created using a human lung cancer cell line. LP-ICG-C18 was intravenously administered into a nude mouse subcutaneous tumor model. The fluorescence was observed periodically using an in vivo fluorescence imaging device. The signal-to-background ratio was proven to be a maximum 48 hours after administration (SBR=1.5). Furthermore, LP-ICG-C18 was administered into a nude mouse lung tumor model. LP-ICG-C18 selectively accumulated into the lung tumors with SBR of 2.0.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：インドシアニンググリーン 近赤外線イメージング ナノ粒子 EPR効果

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーとはナノスケール(10⁻⁹m)の物質を産業の発展に生かす技術であるが、医療においても重要な役割を果たしている。直径 30nm~200nm のナノ粒子は、経静脈的に投与されると、全身を巡って腫瘍や炎症部位に到達し、腫瘍血管や炎症病変の血管から漏出して腫瘍間質や炎症病変に留まることが知られており、この現象は **Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)** と呼ばれている。この効果を利用して、抗癌剤や抗真菌剤を内包したナノ粒子が開発され、すでに臨床応用されている。

一方で、近年では近赤外線蛍光イメージングが各臓器の外科手術に応用されつつある。近赤外線は 700nm~900nm の波長を持つ光を指すが、生体内で吸収されにくく透過性が良好なため、生体内での蛍光イメージングに適している。代表的な蛍光物質のひとつに **インドシアニンググリーン(Indocyanine green; ICG)** があり、特定の光で励起されると近赤外線光を発することが知られている。この性質を利用して近赤外線蛍光術中イメージングとして、乳腺や消化管におけるセンチネルリンパ節の同定、肝臓や腎臓における腫瘍の局在診断、血管吻合部の血流評価、および脳動脈瘤の同定などに応用されている。しかしながら、経静脈的に投与された ICG の半減期は 3-5 分でありすぐに代謝・分解されてしまう、腫瘍への特異性が低い、などの欠点も指摘されている。そこで、近年では ICG を組み込んだ様々なナノ粒子が開発され、安定した構造および EPR 効果により腫瘍への選択的集積、ひいては術中の近赤外線蛍光イメージングへの応用が期待されている。

呼吸器外科領域において、近年、画像診断の進歩とともに小型悪性病変が早期に発見される機会が増えた結果、病変が小さく、手術中に病変の局在を同定できないことがしばしば問題となる。そこで ICG を経気管支的ないしは経皮的に腫瘍近傍に局所注入し、近赤外線蛍光イメージングにより ICG から発する近赤外線を検出して、小型腫瘍の局在を術中に同定する試みが報告されている。しかしながら、これらの方法では術前に「**ICG を腫瘍近傍に局所注入する**」ための一連の手技が必要とされ、少なからず患者に負担を強いることとなる。そこで、術前の一連の手技を省き、単純に経静脈的投与のみで、「**ICG を腫瘍に集積させる**」ことで、腫瘍に取り込まれた ICG を近赤外線蛍光イメージングにより捉え、腫瘍の局在を同定する新しい手法の開発に期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、liposome に indocyanine green (ICG) を組み込んだナノ粒子を経静脈的に投与し腫瘍に集積させ、ナノ粒子に組み込まれた ICG が発する蛍光を検出して小型肺腫瘍の局在同定を行う。ナノ粒子と近赤外線蛍光イメージングを組み合わせた手術支援システムの開発を目的とする。

3. 研究の方法

[1] ヌードマウス皮下腫瘍モデルの作成および LP-ICG-C18 の体内動態の確認

- 1) ヒト肺癌細胞株 (A549; ヒト肺腺癌) を培養・継代し、癌細胞を細胞外基質である Matrigel に混入し、癌細胞 5.0×10⁶ 個/Matrigel 100 μL に調整する。
- 2) 調整した癌細胞をマウスの背部皮下に注入する。
- 3) 腫瘍が直径 5 mm を超えたところで尾静脈より 100 μM に調整した LP-ICG-C18 を 100 μL ずつ投与する。
- 4) LP-ICG-C18 静脈内投与後 1 日、3 日、5 日、7 日、10 日、14 日に in-vivo 発光・蛍光イメージング (IVIS lumina II) により皮下腫瘍の蛍光強度および、皮下腫瘍と background (背筋群) の蛍光強度比を算出し、経時的変化を測定する。
- 5) 上記の各タイミングでマウスを犠牲死させ、皮下腫瘍、肺、肝臓、腎臓、大腸、小腸、心臓、脾臓、筋肉を摘出し、in-vivo 発光・蛍光イメージング (IVIS lumina II) により各臓器の蛍光強度を測定する。さらに皮下腫瘍-肺蛍光強度比が最も大きくなるタイミングを確認する。

[2] ヌードマウス肺癌モデル(腺癌)の作成 [Ann Thorac Surg, 2014]

- 1) ヒト肺癌細胞株 (A549; 腺癌) を培養・継代し、癌細胞を細胞外基質である Matrigel に混入し、癌細胞 1.0×10⁶ 個/Matrigel 50 μL に調整する。
- 2) サージカルルーペを使用し 23G 金属カテーテルをヌードマウスの気管支内に挿入留置し、先に作成した癌細胞懸濁液 50 μL を気管支内に散布する (右胸)。
- 3) 定期的に小動物用 CT スキャンで腫瘍形成の有無をフォローする。
- 4) 2 週間~4 週間で孤立した肺腫瘍が形成されることを確認する。

[3] ヌードマウス肺癌モデルにおける LP-ICG-C18 の体内動態の検討

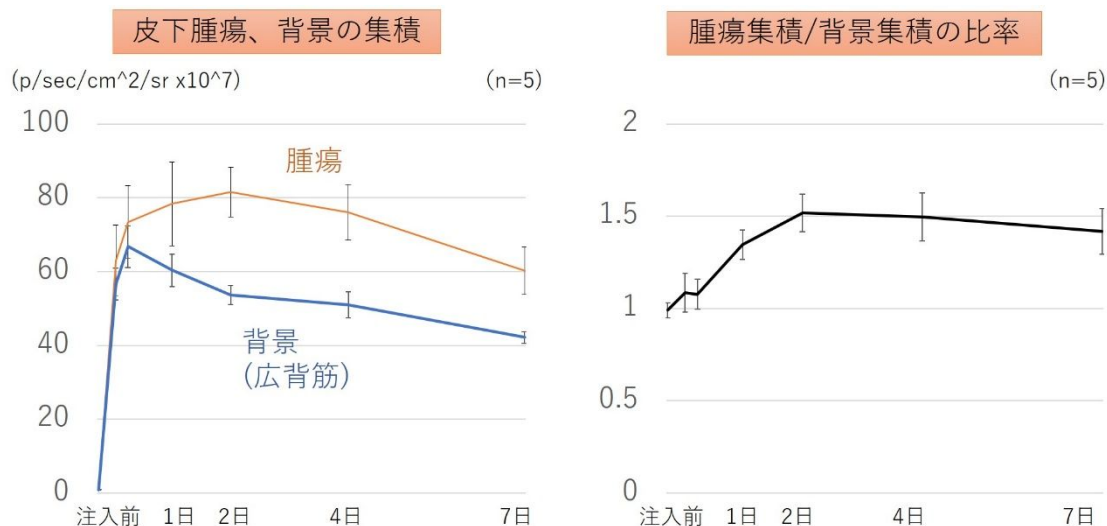
- 1) 作成したヌードマウス肺癌モデルに 100 μM に調整した LP-ICG-C18 を 100 μL ずつ尾静脈から静脈投与する。
- 2) LP-ICG-C18 静脈内投与後、上記 で求めた、腫瘍-肺蛍光強度比が最大になる至適タイミン

- グで、頸椎脱臼によりマウスを犠牲死させる。
- 3) まず両側開胸した状態で、in-vivo 発光・蛍光イメージング (IVIS lumina II) により蛍光強度を測定する。さらに肺腫瘍および肺を摘出し、同様に評価する。
 - 4) 摘出した肺および腫瘍組織は病理学的解析のため、二分割して、半分は凍結保存、残り半分はホルマリンで固定する。
 - 5) IVIS lumina II により計測された蛍光強度を用いて、肺腫瘍と肺組織の蛍光強度比を算出する。

4. 研究成果

ICG を含有するナノ粒子である LP-ICG-C18 を静脈内投与することで、ヒト肺癌細胞株を用いて作成した皮下腫瘍および肺腫瘍に選択的に集積することを確認した。

ヌードマウス皮下腫瘍モデルに LP-ICG-C18 を静脈内投与し、経時的に in-vivo 蛍光発光イメージングを用いて蛍光を観察し、48 時間後に Signal-to-background ratio (SBR) が最大 (SBR:1.5) となることを確認した (下図)。続いて、ヌードマウス肺腫瘍モデルを作成し、静脈内投与 48 時間後に犠牲死させ、肺腫瘍と背景肺の蛍光を観察し、LP-ICG-C18 は選択的に肺腫瘍に集積 (SBR=2.0) することを確認した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特記事項なし。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅波 晃子 (SUGANAMI Akiko) (10527922)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	吉野 一郎 (YOSHINO Ichiro) (40281547)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	