

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 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591693

研究課題名（和文） 蛍光化リポソームを用いたダブルイメージングによるセンチネルリンパ節診断法の開発

研究課題名（英文） Development of a dual-imaging sentinel lymph node detection method with the use of fluorescent liposome system

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（和文）：X線 CT と近赤外蛍光の両方で認識可能なセンチネルリンパ節トレーサーの開発を目的として、ICG にアルキル鎖を導入した誘導体とリン脂質、油性 X 線造影剤からなるリポソームを作製、マウスに投与したところ、一次リンパ節に蛍光を認めたものの X 線 CT による検出は困難であった。そこでこれを食用増粘剤で凝集し組織マーカーとし、ブタの胃に投与したところ、18 時間後の蛍光観察、X 線 CT の両者において滲むことなく投与部位が確認可能であった。この新しい組織マーカーは一度の投与で術前の手術シミュレーションと術中のナビゲーションの両者を可能にする画期的なものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：A novel fluorescent liposome system was designed to aim at longer retention time in sentinel lymph nodes (SNs) and availability of extracorporeal detection of SNs at the same time. Liposomes were constructed with ICG derivative in which an alkyl chain was introduced, phospholipids and oily radiographic contrast medium, and tested in mouse models. Those showed immediate accumulation into primary lymph nodes and no further diffusion even five hours after injection. However, it was difficult to detect the accumulation with X-ray computed tomograph (CT), because of low maximum content of the contrast medium within the liposome. Thus, those liposomes were made into non-blurring tissue marker, aggregating with polyglycerol-polyricinoleate copolymer to make into giant vesicle clusters. Diffusion of this marker 18 hours after administered into gastric wall of domestic pig was scantling with infrared fluorescent imaging and 3D reconstructed image of X-ray CT. This marker could contribute to realize preoperative simulation and intraoperative navigation for laparoscopic resection of early gastrointestinal cancer with a single administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：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

近年、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，同概念が消化器癌においても成立する可能性が示されている．SN を同定する方法として，従来から放射性同位元素で標識されたコロイド粒子（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・短所を有する．特に消化器癌治療においては精度の高い SN 同定が必須となるため両者を併用する方法がしばしば行なわれるが，手技が煩雑となるなど問題点が多い．

これらの従来法に取って代わるものとして近赤外蛍光色素であるインドシアニンググリーン(ICG)が注目されるようになった．ICG はリンパ系組織に取り込まれやすく，近赤外光が組織透過性を有することから色素法と RI コロイド法の両者の長所をもつものとして，乳癌や皮膚悪性黒色腫など，様々な領域でその有用性が検証されてきた．

ICG は生体中に投与されると組織液中の様々なタンパクと結合し，粒子を形成するとされているが，その詳細は不明であり，リンパ系に取り込まれると長期間滞留するものの，他の色素と同様，短時間の内に広範囲に生体中を拡散してしまう．

このような新しい SN 検出法も複雑なリンパ系を有し，リンパ節の検索に時間を要する消化器系の癌では必ずしもその有用性を明らかにすることができておらず，より生体内での動態が制御しやすく，検出の容易なトレーサーが求められていた．

我々の先行研究である「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出法の開発」（科学研究費補助金・基盤(C)・平成 19-20 年度)において，ICG をリポソーム化することにより生体内での動態制御が比較的容易となることが明らかとなった．しかしながら組織透過性を有する近赤外蛍光を用いても，消化管周囲の厚い脂肪織の中においては検出が依然難しく，体外からも検出が可能な RI コロイドに及ばなかった．

そこでリポソーム中に X 線造影剤を内包することを着想した．リポソームの集積を X 線 CT を用いて明らかにすることができれば体外からその部位のおおよその位置を知ることができる．手術の際は，集積リンパ節が厚い脂肪織の奥にあっても，既に把握できているその部位を切開・剥離することにより容易に探り当てることができるものと考えられる．

このようにリポソームに近赤外蛍光色素

と X 線造影剤の両者を内包化できれば，真に色素法と RI コロイド法の長所を併せ持った新しいセンチネルリンパ節トレーサーとして有用なものとなることが予想された．

2. 研究の目的

そこで本研究においては，消化管悪性腫瘍におけるセンチネルリンパ節ナビゲーションをより効率的・低侵襲に施行可能にする新しいトレーサーの開発を目的として，卵黄由来のレシチンとインドシアニンググリーン色素を用いた蛍光化リポソームを基本骨格として用い，異なる検査モダリティ（蛍光観察と X 線 CT など）により同時に認識可能なものを作成することを最終目標とする．具体的には，投与部位でのトレーサー崩壊を最低限に抑え，安定してリンパ節内に滞留するリポソーム膜構造の検討，効率的な X 線造影剤の内包化手法等の検討を行う．最終的に最適化された条件下で小動物および大動物における動態解析を行い，臨床応用の可能性を検討する．

3. 研究の方法

先行研究において開発された蛍光化リポソームの内水相，あるいは脂質二重膜内に油性あるいは水性の X 線造影剤を担持させ，励起される蛍光強度と X 線検査装置による検出性の最適化をはかる．さらには小動物・大動物を用いた前臨床試験を行ってその有用性を検討した．

4. 研究成果

先行研究において開発された ICG そのものを用いた蛍光化リポソームは，リポソーム中に取り込まれないフリーの ICG の排除が難しく，必ずしも完全な生体内動態制御を達成することができなかった．そこでまず，本研究において，水に不溶なインドシアニング ICG 誘導体を開発，これを利用した蛍光化リポソームを悪性したところ，より蛍光強度が高く，生体内動態制御が容易なトレーサーとすることが可能となった．このトレーサーの内水相および脂質二重膜内に油性の X 線造影剤を噴きさせたところ，実際に蛍光観察と X 線 CT の両者で検出可能なトレーサーの作成が可能であることが確認された．

マウスモデルを用い，長時間経過後にも一次リンパ節にのみ滞留するリポソームの至適粒径を検討したところ，平均粒径 600nm 程度のものが消化管悪性腫瘍に対するセンチネルリンパ節ナビゲーションに最適と考えられた．そこで，平均粒径 600nm に調整し

たデュアルイメージングトレーサーをマウスの足底に投与し、一次リンパ節の観察を行ったところ、蛍光は検出できたものの X 線 CT による検出は困難であった。リンパ節の組織学的解析では、トレーサーはリンパ節の辺縁洞にのみ集積し、集積トレーサーの絶対量が不足したものと考えられた。

この問題を解決するためにはトレーサーにより小さな粒径で一次リンパ節内に滞留する特性を賦与する必要があるものと考えられたが、研究期間内にこれを明らかにすることは難しいと判断、本研究で得られたデュアルイメージングトレーサーを高分子増粘剤中に内包することにより、低拡散性の組織マーカーとして利用する着想を得た。

全身麻酔下の家畜ブタの胃粘膜下に内視鏡を用いてこのデュアルイメージングマーカーを投与した(図1)ところ、18時間後にも拡散することなく、X線CT(図2)及び蛍光(図3)の両方で投与ポイントの検出が可能であった。単一のマーカーで消化器癌手術前の術式シミュレーションから術中の手術ナビゲーションを同時に可能にする画期的なものと考えられた。

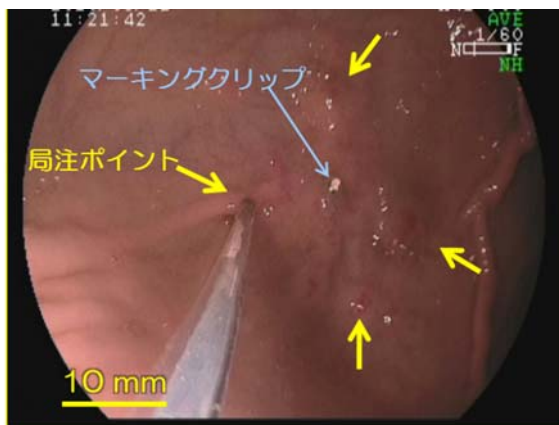


図1 消化管内視鏡を用いて、全身麻酔下の家畜ブタの胃粘膜下層に、半径1cmとなる円周上の4カ所を設定してデュアルイメージングマーカーを各300 μ mずつ局注した。

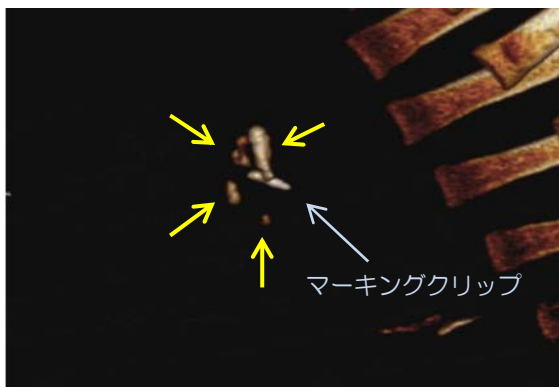


図2 投与直後に撮影したX線CTの3次元再構成画像では、局注点4箇所を明瞭に識別可能であ

った。

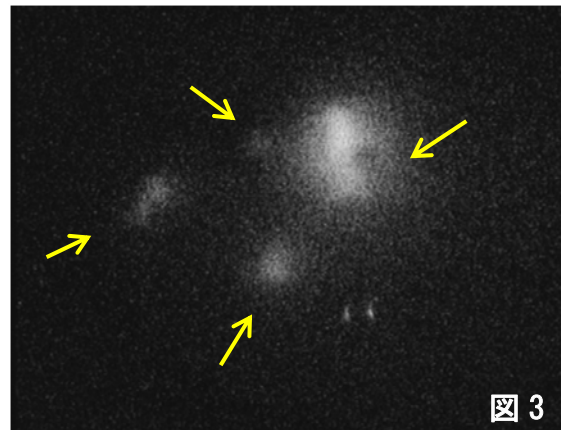


図3 投与18時間後の蛍光腹腔鏡でも、同様に4カ所の局注点が認識可能であった。

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3件)

1. 新しい近赤外蛍光色素を用いた消化管腫瘍に対する手術ナビゲーションの開発. 林秀樹, 田村裕, 豊田太郎, 真殿智行, 大内友貴, 後藤翔一, 松原久裕. 映像情報メディカル, 査読無, 2012, in press.
2. 近赤外蛍光色素を用いた手術ナビゲーション. 林秀樹, 松原久裕, 藤戸寛迪, 川平洋. 画像ラボ21, 査読無, 12-17, 2010.
3. 蛍光色素を用いた生体イメージング. 林秀樹. 画像電子学会誌 38, 査読無, 309-313, 2009.

[学会発表](計8件)

1. 近赤外蛍光プローブを用いた消化管腫瘍に対するナビゲーションサージェリー. 林秀樹, 豊田太郎, 田島航介, 田村裕, 真殿智行, 松原久裕. 日本外科学会. 2012年4月13日(幕張)
2. 低拡散性近赤外蛍光・X線デュアルイメージング組織マーカーの開発. 林秀樹, 豊田太郎, 藤戸寛迪, 田島航介, 田村裕, 真殿智行, 松原久裕. 第24回日本内視鏡外科学会. 2011年12月7日(大阪)
3. ジャイアントベシクル凝集体を用いたX線・近赤外蛍光デュアル組織マーカー. 豊田太郎, 畑山博哉, 林秀樹, 藤浪真紀. 日

本分析化学会第 60 年会. 2011 年 9 月 14 日 (名古屋)

4. Development of a novel fluorescent liposome system targeting sentinel lymph nodes. Hideki Hayashi, Hiromichi Fujito, Yutaka Tamura, Taro Toyota, Tomoyuki Madono, Masanori Fujinami, Hisahiro Matsubara. 2010 年 11 月 19 日 (横浜)
5. センチネルリンパ節ナビゲーションのための蛍光化リポソームの開発. 藤戸寛迪, 林秀樹, 豊田太郎, 藤浪真紀, 真殿智行, 田村裕, 大須賀敏明, 松原久裕. 第 12 回 SNNS 研究会. 2010 年 11 月 17 日 (横浜)
6. 低拡散性蛍光化病巣マーカーの開発. 林秀樹, 川平洋, 夏目俊之, 堀部大輔, 畑山博哉, 豊田太郎, 松原久裕. 第 23 回日本内視鏡外科学会. 2010 年 10 月 19 日 (横浜)
7. 鏡視下の正確な病巣位置確認を容易にする近赤外蛍光組織マーカーの開発. 林秀樹, 畑山博哉, 豊田太郎, 藤浪真紀, 松原久裕. 第 65 回日本消化器外科学会. 2010 年 7 月 14 日 (下関)
8. 内視鏡手術に用いる組織マーカーとしての近赤外蛍光標識型ベシクルの開発. 畑山博哉, 豊田太郎, 林秀樹, 藤浪真紀. 第 70 回分析化学討論会, 2009 年 5 月 16 日 (和歌山)

[産業財産権]

○出願状況 (計 7 件)

1. 名称: リポソーム複合体
発明者: 岡本芳晴, 田村裕, 菅波晃子, 林秀樹, 真殿智行, 松原久裕, 豊田太郎
権利者: 鳥取大学・千葉大学
種類: 特願
番号: 2011-223273
出願年月日: 2011 年 10 月 7 日
2. 名称: 医療用組織マーカー及びその製造方法
発明者: 林秀樹, 畑山博哉, 藤浪真紀, 豊田太郎
権利者: 千葉大学
種類: 特願
番号: 2011-130901
出願年月日: 2011 年 6 月 13 日
国内外の別: 国内

3. 名称: リンパ節イメージング用蛍光プローブ
発明者: 林秀樹, 藤浪真紀, 豊田太郎, 田村裕, 青木陽, 村木裕, 尾上和貴
権利者: 千葉大学
種類: Taiwan Patent Application
番号: 100119156
出願年月日: 2011 年 3 月 31 日
国内外の別: 国外
 4. 名称: リンパ節イメージング用蛍光プローブ
発明者: 林秀樹, 藤浪真紀, 豊田太郎, 田村裕, 青木陽, 村木裕, 尾上和貴
権利者: 千葉大学
種類: PCT
番号: JP2011-003069
出願年月日: 2011 年 3 月 31 日
国内外の別: 国外
 5. 名称: 近赤外線波長特性を利用した非侵襲性医療装置
発明者: 岡本芳晴, 田村裕, 菅波晃子, 豊田太郎, 林秀樹, 真殿智行, 松原久裕
権利者: 鳥取大学・千葉大学
種類: 特願
番号: 2012-103379 号
出願年月日: 2011 年 2 月 15 日
国内外の別: 国内
 6. 名称: NOTES における単チャンネル内視鏡用連続縫合デバイスの開発
発明者: 上里昌也, 林秀樹, 兪文偉, 前佛聡樹, 平田稔
権利者: 千葉大学
種類: 特願
番号: 2011-29267
出願年月日: 2011 年 2 月 15 日
国内外の別: 国内
 7. 国内外の別: 国内名称: リンパ節イメージング用蛍光プローブ
発明者: 林秀樹, 藤浪真紀, 豊田太郎, 田村裕, 青木陽, 村木裕, 尾上和貴
権利者: 千葉大学
種類: 特願
番号: 2010-124252 号
出願年月日: 2010 年 5 月 31 日
国内外の別: 国内
- 取得状況 (計 1 件)
1. 名称: 撮像装置及び撮像システム
発明者: 羽石秀昭, 林秀樹, 藤木裕
権利者: 千葉大学・株式会社アクロラド

種類：特許
番号：第 4449081 号
取得年月日：2010 年 2 月 5 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.cfme.chiba-u.jp/project/kiban.php>

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 (平成 21 年度のみ)

大須賀 敏明 (OHSUGA 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)連携研究者

豊田 太郎 (TOYOTA TAROU)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：80422377

田村裕 (TAMURA YUTAKA)

千葉大学・大学院医学研究院・生命情報科学・准教授

研究者番号：50263174