

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461938

研究課題名(和文) 早期胃癌に対する新しい蛍光腹腔鏡システムを用いたセンチネルリンパ節同定法の確立

研究課題名(英文) A novel laparoscopic near infrared fluorescence imaging and spectrum system for detection of the early gastric cancer

研究代表者

海老原 裕磨 (Ebihara, Yuma)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50632981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、早期胃癌に対しわれわれが新規に開発した蛍光腹腔鏡システムを用いた術中センチネルリンパ節同定法を確立することである。当科と千歳科学技術大学の共同研究により蛍光腹腔鏡システムを開発し、平成27年より段階的臨床応用を行っている。本システムの特徴は、蛍光イメージングと同時に蛍光スペクトルをリアルタイムに検出可能であり、低濃度ならびに深部信号測定の問題を解決し得る世界初の技術である。

研究成果の概要(英文)：Near-infrared fluorescence image-guided laparoscopic surgery (FIGLS) introduces a revolutionary new approach to address this basic challenge in minimally invasive surgery. However, current FIGLS systems have some limitations, the infrared rays cannot detect for thick tissue and be visualized with low concentrations of the fluorescent agent. We established a novel laparoscopic fluorescence imaging and spectrum system for overcome the limitations.

研究分野：胃癌、腹腔鏡手術、センチネルリンパ節

キーワード：蛍光内視鏡 胃癌 センチネルリンパ節

1. 研究開始当初の背景

現在、胃癌に対する外科治療としてセンチネルリンパ節の転移有無を指標としてリンパ節郭清を個別に縮小ないし省略し、それに伴って切除範囲を最小限にするセンチネルナビゲーション手術が期待されている。しかし現在、早期胃癌に対するセンチネルリンパ節診断の感度がインドシアニングリーン (ICG: indocyanine green) 単独では 85.4%と一般的に実用化の指標となる感度 90-95%以上を超えていないこと、また偽陰性の割合が 46.4%と高いことが問題点としてあげられ臨床応用が進んでいない現状がある。

2. 研究の目的

早期胃癌に対し新規蛍光腹腔鏡システムを用いた術中 ICG を使用したより精度の高いセンチネルリンパ節診断法を確立することである。

3. 研究の方法

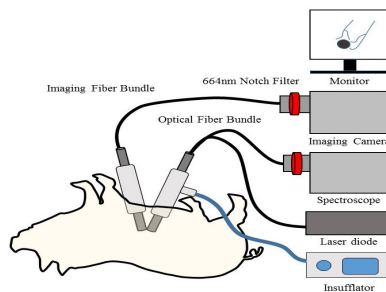
(1) システムの導入

センチネルリンパ節同定につき ICG 至適濃度、投与量ならびに投与方法を確立する。

新規蛍光腹腔鏡システム

本研究で使用した新規蛍光腹腔鏡システムを図 1 に示す。可視画像および蛍光画像の撮像に CCD カメラを使用。蛍光スペクトルの検出には分光器を使用した。また、ICG の励起光には半導体レーザー (パナソニック、日本) を使用した。励起光はコリメートレンズで並行光とし、パスフィルターを用いてピークをカット、全体に均一なパワーの励起光が照射されるようにした。励起光の照射パワーは全て 2mW とした。蛍光スペクトルはオプティカルファイバー (東京特殊電線、日本) から蛍光を取得し、ノッチフィルターを通して分光器にて蛍光スペクトルを検出。イメージング光はイメージングファイバ (東京特殊電線、日本) から蛍光画像を取得。取り込んだ光をアクロマティックレンズにて色収差を防ぎ、コールドミラーを用い可視光と蛍光にそれぞれ分割し、可視光撮像を行った。蛍光はコールドミラーを通過後、アクロマティックレンズで再度集光させ、ノッチフィルターにて励起光をカット後に蛍光画像として撮像した。

図 1. 新規蛍光腹腔鏡システム



ICG 蛍光色素調整

ICG 77.6  $\mu\text{g}$  (100nmol) と 20% Human serum Albumin 33.5  $\mu\text{L}$  (100nmol) を混合し、全量を sterile な生理食塩水にて 10ml とし使用した。これで ICG と HSA とがモル比 1:1 で混合され、ICG の濃度を 10  $\mu\text{M}$  に調製できる。この濃度は、この蛍光診断用に最適化されたものであり、これより高い濃度では quenching 現象が起こり、蛍光は著明に減弱する。また、ICG はリン酸バッファーや生理食塩水中では、色素同士が重合を起こしており、あらかじめアルブミンにて吸収させておくことで、蛍光の増強および注入部位からリンパ系への移行が期待できる。また、臨床応用へのスムーズな移行を鑑み、ICG と HAS の測定限界濃度ならびに深部限界距離測定を豚胃臓器を用い Ex Vivo にて行った。

動物実験

動物実験は豚胃臓器を用いた Ex Vivo の動物実験を 2 回と動物実験施設にて In Vivo の動物実験を 4 回施行した。Ex Vivo の動物実験では、東京芝浦臓器株式会社の豚胃臓器を使用。Ex Vivo では胃前壁に ICG を直接漿膜下へ注射し、注入部位が分かるようにピンを付けた (図 2)。In Vivo では、腹腔鏡下にトロッカーから内視鏡用局注針を腹腔内に挿入し、胃壁漿膜下層に ICG を局注した。新規蛍光腹腔鏡システムを用いてリンパ管及びセンチネルリンパ節を流れる ICG の観察を行った。

図 2. 豚胃臓器 (Ex Vivo)



(2) 臨床導入 (UMIN000019097)

ICG を胃漿膜下腫瘍近傍 4 か所に投与する。総投与量は、通常肝機能検査に用いる用量 (0.5 mg/kg) を超えない用量とする。投与後、近赤外線イメージングシステム: Photodynamic Eye (以下 PDE)、Hyper Eye Medical System (以下 HEMS) または D-light P system を用いて術野の観察を行い、蛍光を観察する。開腹手術では、HEMS を使用。機器不具合や別の手術で使用しているときは PDE を使用。腹腔鏡手術では、D-light P system を使用。PDE、HEMS、D-light P system を用いて術野の観察とリンパ流の同定を行い、摘出した領域リンパ節を手術野外で新規蛍光腹腔鏡システムを用いて ICG の取り込みを測定する。測定した後のリンパ節は通常の手術と同様に病理組織検査へ提出する。

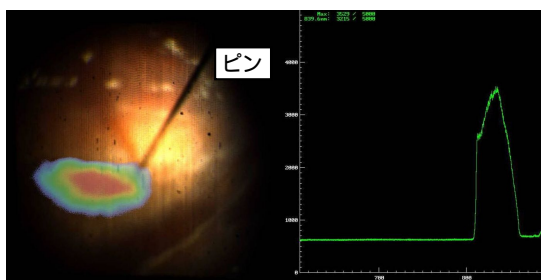
主要評価項目を「センチネルリンパ節の偽陰性率を評価」とし、ICG を術中に局所投与した際、リンパ流の観察ならびに蛍光を発するリンパ節の観察を行い、蛍光を発するセンチネルリンパ節の候補リンパ節も含めて切除予定とされていたリンパ節を郭清する。術野外でセンチネルリンパ節の候補リンパ節に含まれる各リンパ節の蛍光スペクトラムを測定する。発光しているリンパ節をセンチネルリンパ節と定義して、転移の有無を病理診断する。

#### 4. 研究成果

##### (1)新規腹腔鏡システム導入

リンパ節に流れた ICG のリアルタイム近赤外蛍光スペクトルと可視光画像・近赤外蛍光画像の合成画像を図 3 に示す。イメージング画像(図中左側)の赤色部分がリンパ管及びリンパ節に流れた ICG からの近赤外蛍光を表示したものである。センチネルリンパ節の近赤外蛍光スペクトルも同時取得が可能であった(図中右側)。また、画像処理システムを実装し、近赤外蛍光画像と白色画像を合成してモニターすることで、リアルタイムに ICG の近赤外蛍光画像を観測・保存が可能となった。センチネルリンパ節に流れた ICG の近赤外蛍光スペクトルと合成画像を同時に観測・保存も可能であった。本システムにて白色光照射をした状態においても ICG の微弱な近赤外蛍光画像及び蛍光スペクトルをリアルタイムで取得でき、センチネルリンパ節を検出できることを確認した。

図3.リンパ管に流れた ICG の近赤外蛍光画像とスペクトル

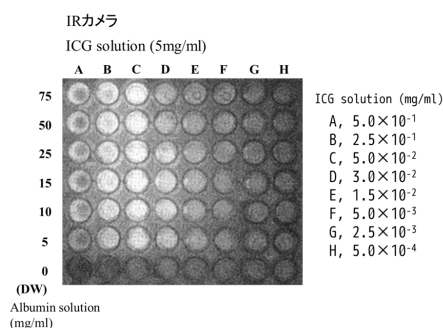


##### (2) ICG 蛍光同定の限界濃度と深部信号測定

96well プレートに ICG 濃度( $5 \times 10^{-1}$ - $5 \times 10^{-4}$  mg/ml)とウシアルブミン(75-0 mg/ml)で調整した試料を用いて蛍光画像とスペクトル測定を施行した。ICG 濃度  $5 \times 10^{-2}$  mg/ml にて最大蛍光強度を認め、 $3 \times 10^{-2}$  mg/ml 以下の濃度では視覚的に蛍光を認識することは不可能であった。一方、スペクトル測定では  $5 \times 10^{-3}$  mg/ml まで蛍光強度測定が可能であった(図 4)。また、深部信号測定では一般的な蛍光認識の限界とされている深さ 10mm 以上においてもスペクトル計測が可能であった(図 5)。

図 4. ICG 濃度と蛍光画像・スペクトル測定

##### 蛍光画像



##### 蛍光スペクトル

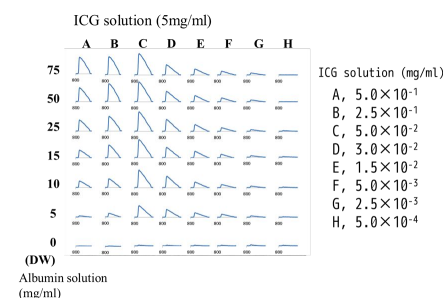
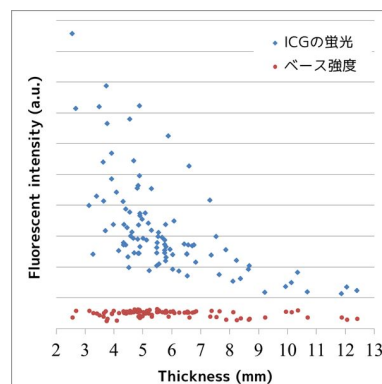


図 5. ICG 蛍光と深部信号測定



##### (3)臨床導入

本動物実験の結果をもとに平成 27 年度より北海道大学病院において自主臨床研究(UMIN000019275)を行っており、胃癌切除検体にてセンチネルリンパ節検出ならびに ICG 蛍光スペクトルと可視光画像と近赤外蛍光画像が確認できている。現在、胃癌切除標本におけるセンチネルリンパ節診断精度の検討中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

海老原 裕磨、佐藤 暢人、松村 祥幸、蔵前 太

郎、村上 壮一、田本 英司、倉島 庸、中村 透、松本 謙、土川 貴裕、田中 栄一、七戸 俊明、平野 聡、白銀 玲、李 黎明、蛍光スペクトル測定を付加した近赤外線腹腔鏡システムの研究開発、日本内視鏡外科学会、2013年11月28日 2013年11月30日、福岡国際会議場（福岡市）  
白銀玲、齋藤琢磨、海老原裕磨、李黎明、ICG近赤外蛍光画像と近赤外蛍光スペクトルによるセンチネルリンパ節診断、2013年6月7日 2013年6月8日、旭川グランドホテル（旭川市）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計2件)

名称：「腹腔鏡を用いた検査方法及び検査装置」  
発明者：海老原裕磨、李黎明、東京特殊電線  
利権者：同上  
種類：内視鏡  
番号：特願 2014-54047  
出願年月日：2014年3月17日  
国内外の別： 国内

名称：「腹腔鏡」  
発明者：海老原裕磨、李黎明、東京特殊電線  
利権者：同上  
種類：内視鏡  
番号：特願 2013-41538  
出願年月日：2013年3月4日  
国内外の別： 国内

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

海老原 裕磨 (EBIHARA YUMA)  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号：50632981

(2)研究分担者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)  
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50322813

田中 栄一 (TANAKA EIICHI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・

客員研究員

研究者番号：60374279

七戸 俊明 (SHICHINOHE TOSHIAKI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・

准教授

研究者番号：70374353

(3)連携研究者

なし( )

研究者番号：