

【要約】

Characteristic analysis of indocyanine green / tin colloid hybrid tracer for sentinel lymph node navigation

(センチネルリンパ節ナビゲーション
のためのインドシアニンググリーン・ス
ズコロイドハイブリッドトレーサーに
関する特性解析)

千葉大学医学薬学府
先端医学薬学専攻
(主任：林 秀樹 教授)
章 逸汀

【背景】

センチネルリンパ節 (SLN) ナビゲーション手術においては、トレーサーとして色素または放射性 (RI) コロイドが使われるのが一般的であるが、これら両者を併用した方が、どちらか一方のトレーサーを単独で使用した場合よりも SLN の同定効率が高いことが、さまざまな癌種で示されている。これら 2 種類のトレーサーはリンパ系における動態特性が異なるため、2 回に分けて投与されるのが一般的である。特に胃癌においては、現在先進医療で行われているように、原則 2 回の内視鏡下投与が必要となり、術前日にテクネチウム (^{99m}Tc) でラベルしたスズコロイド (SnC) が、術直前もしくは術中にインドシアニンググリーン (ICG) などの色素が投与されている。ICG については他の色素と比較して、近赤外蛍光の利用によってより高感度に検出できる点と、これに対応した腹腔鏡ビデオシステムが比較的安価に導入可能となったことから、広く利用されている背景がある。ここで二つのトレーサーを同時に投与することができれば、術者と患者双方にとって大きな負担軽減となる。ICG と RI コロイドを配合したハイブリッドトレーサーに関してはアルブミンナノコロイドもしくはフィチン酸コロイドを、それぞれ ICG と配合した先行研究例があるが、いずれに関しても従来法を併用した場合と比較して同等かそれ以上の SLN 同定成績が示されている。しかしながら、これまでに ICG と SnC からなるハイブリッドトレーサーの報告はなく、コロイドと ICG を配合した際の物理・化学特性に関する解析も見られない。本研究では二者混合時のコロイド特性と生体内動態を詳細に解析し、SLN 同定トレーサーとしての有用性を検討した。

【実験方法】

本検討で用いた SnC の調整法は、早期胃癌に対する SLN ナビゲーション手術に関する先進医療のプロトコール、および市販されている SnC 調整用キットの添付文書に準拠した。また、ICG を配合した SnC (SnC-ICG) は ICG の最終濃度が $50\ \mu\text{g/ml}$ となるように調製した。生体内における粒子特性の変化を推定するため、物性解析ではヒト血清アルブミンを添加したサンプルについても検討を加えた。

① 粒子径とゼータ電位の解析

サンプル 3 ml を石英セルに入れ、ゼータ電位・粒径測定システム (ELSZ-1000ZS, 大塚電子) を用いた粒子径とゼータ電位の計測を行なった。本装置は、粒子径については動的光散乱法、ゼータ電位に関してはレーザードップラー法に基づいた評価が仕様となっている。

② SnC-ICG の蛍光強度に関する解析

サンプル 3 ml を石英セルに入れ、分光光度計 (FP-6600, 日本分光) を用い、

励起波長 766 nm における 802 nm の蛍光強度について計測を行なった。ICG 蛍光の自己消光特性を踏まえ、50 $\mu\text{g/ml}$ の 1024 倍までの 2 倍希釈を検討対象とした。

③ SnC の ICG 取り込みに関する検討

SnC 中に ICG が取り込まれるか否かを明らかにするため、コロイド分散液の静置観察、および薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた検討を行なった。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ でラベルした SnC ($^{99\text{m}}\text{Tc-SnC}$) またはこれに ICG を配合したもの ($^{99\text{m}}\text{Tc-SnC-ICG}$) を調製後 1 日静置した後、近赤外蛍光観察装置 (HEMS, 瑞穂工業株式会社) を用いた蛍光観察と SPECT/CT を用いた放射活性分布の検討を行った。また TLC はメタノールを溶媒として $^{99\text{m}}\text{Tc-SnC}$ または $^{99\text{m}}\text{Tc-SnC-ICG}$ を 10 cm 展開し、蛍光と放射活性の移動距離について解析した。蛍光移動距離に関しては HEMS 観察像を画像解析ソフト ImageJ (NIH) を用いて滴下点から最大伸展距離までの蛍光強度分布を輝度値に変換して plot 表記させ、放射活性の移動距離については radiochromatogram scanner (Elysia Raytest 社) を用いて評価を行った。

④ SnC-ICG の pH 評価

各調製サンプルについて pH メーター (S2K922, ASONE) を用いて計測を行った。各サンプル共、計測直前で標準液 (pH 6.89) を用いたキャリブレーションを行なった。

⑤ ラットを用いた SnC-ICG の蛍光を指標としたリンパ動態解析

ラット (SD, 10 週齢, メス) の右 foot pad に SnC-ICG または ICG 水溶液を 10 μl 投与し、投与 18 時間後の蛍光集積の状態について HEMS で観察を行なった。観察画像の蛍光集積部位は ImageJ で輝度値に変換し、部位ごとの蛍光強度の比較を行なった。また、蛍光集積の見られるリンパ節を摘出し、凍結切片法で組織標本を薄切し、近赤外蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus, 励起波長 769 nm, 蛍光波長 832 nm) を用いてリンパ節内における組織学的な蛍光集積分布の検討も行なった。

⑥ ラットを用いた SnC-ICG の放射活性を指標としたリンパ動態解析

上記と同様にラット右 foot pad へ $^{99\text{m}}\text{Tc-SnC}$ または $^{99\text{m}}\text{Tc-SnC-ICG}$ 10 μl を投与し、18 時間後の放射活性の分布を SPECT/CT (Trifoil 社) を用いて、蛍光集積の分布を HEMS を用いて確認を行った。また、投与側の膝窩リンパ節とそれより遠位のリンパ節を摘出し、ガンマカウンター (Wiard2, Perkin Elmer 社) を用いたリンパ節ごとの残留放射活性について検討も行なった。

【結果】

① 粒子径とゼータ電位の解析

粒子径については SnC が 450 nm 付近でほぼ単一ピークの粒径特性を示したのに対して SnC-ICG は 100~1000 nm に渡る広範な粒径特性を示した。またゼータ電位については SnC が強い正の荷電特性を示したのに対して、SnC-ICG は正~負までの幅広い電荷特性を示した。これらの結果からスズコロイドに ICG を添加することで粒子形成が不安定化するものと考えられた。一方でヒト血清アルブミンを加えると粒子径は大きくなるものの粒子径もゼータ電位も単一のピークを示すようになり、粒子形成が安定化したものと考えられた。

② SnC-ICG の蛍光強度に関する解析

ICG 水溶液の最大蛍光強度は 16 倍希釈時に得られたのに対して SnC-ICG は 64 倍時に後退し、蛍光強度も大幅に減弱が見られた。一方でアルブミンを添加した SnC-ICG では最大蛍光の希釈倍率は 16 倍に戻り、蛍光強度も ICG 水溶液に近い値まで復帰した。

③ SnC の ICG 取り込みに関する検討

コロイド分散液の静置観察においては、沈殿物にやや強い蛍光が確認された。また、放射活性は沈殿物にのみ確認された。TLC の評価では ICG 水溶液は滴下点に蛍光スポットは確認されず、全量が移動することが確認された。^{99m}Tc-SnC-ICG に関しては、ICG 水溶液と同様の移動が観察されたが、駅高高度は〇〇%に減弱した。一方で放射活性については ^{99m}Tc-SnC は滴下点で不動であったのに対し、^{99m}Tc-SnC-ICG は 8.4%の放射活性の移動が見られた。

④ SnC-ICG の pH 評価

SnC は ICG 添加の有無、^{99m}Tc ラベルの有無関わらず pH 3.5 程度の酸性域の特性を示した。一方でアルブミンを添加したサンプルはすべて pH 6.5 程度の中性域の特性を示した。

⑤ ラットを用いた SnC-ICG の蛍光を指標としたリンパ動態解析

HEMS を用いて投与部位下流の領域リンパ節を確認したところ、膝窩リンパ節と腸骨下リンパ節でのみ蛍光集積が認められた。画像上では膝窩リンパ節の方が強い蛍光が認められ、輝度値比較では SnC-ICG の方が有意に強い蛍光が認められた。また、膝窩リンパ節の蛍光組織観察では ICG 水溶液投与個体では比較的リンパ節全体で蛍光の分布が確認されたが、SnC-ICG 投与個体では特にリンパ節辺縁部に強い蛍光の集積を認めた。

⑥ ラットを用いた SnC-ICG の放射活性を指標としたリンパ動態解析

SPECT/CT 画像上では ^{99m}Tc-SnC は投与部位における残留放射活性が高く、リンパ節における放射活性が確認されなかったのに対して、^{99m}Tc-SnC-ICG では膝窩リンパ節と腸骨下リンパ節で放射活性が確認された。HEMS による

観察では $^{99m}\text{Tc-SnC-ICG}$ が SnC-ICG と同様に膝窩リンパ節と腸骨下リンパ節で蛍光集積が確認され、膝窩リンパ節の方でより強い蛍光が確認された。一方で、ガンマカウンタによる摘出リンパ節の放射活性計測では、どちらの投与群も膝窩リンパ節及び腸骨下リンパ節で放射活性が確認されたが、 $^{99m}\text{Tc-SnC-ICG}$ 投与群では、膝窩リンパ節で他のリンパ節に比べ有意に高い放射活性が得られた。また、投与部位の放射活性の計測から、 $^{99m}\text{Tc-SnC}$ 群では投与量の約 90%の残留が認められたのに対し、 $^{99m}\text{Tc-SnC-ICG}$ 群では投与量の 27%程度の残留に留まっていた。

【結論】

SnC に ICG を配合したハイブリッドトレーサーはその荷電特性により粒子形成の不安定性を呈するが、生体内では血清アルブミンによって安定化され、 ICG や SnC よりもリンパ系への移行性が高く、かつリンパ節集積効率が高くなることが明らかとなった。これらのことから、 $^{99m}\text{Tc-SnC-ICG}$ は新規ハイブリッドトレーサーとして単回投与のみで SLN 同定を行うことが可能であると共に SLN 同定効率改善につながることも予想され、医療従事者と患者の双方の負担の軽減につながる、有用性の高いものと考えられた。