

## 主論文の要旨

### **Near-infrared indocyanine dye permits real-time characterization of both venous and lymphatic circulation**

近赤外インドシアニン色素は静脈およびリンパ循環の  
リアルタイム解析を可能にする

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
運動・形態外科学講座 手の外科学分野

(指導：平田 仁 教授)

倉橋 俊和

## 【緒言】

微小血管系と間質、リンパ管における水や物質移動の動態を把握、可視化することは、免疫機構や薬物動態の解析、癌治療などの幅広い分野で極めて重要である一方で、その還流経路や調節機構の詳細は未だ解明されていない。近年、非侵襲的に生体を観察するための光イメージング技術の開発が急速に進み、実際の臨床現場でも indocyanine green(ICG) を用いた近赤外蛍光法が広く用いられている。近赤外蛍光は可視光領域よりも吸収係数が低く、また自家蛍光の影響を受けにくいため、バックグラウンドとの高いコントラストを維持しながら深部組織にある蛍光造影剤を効率よく可視化できる。生体内に投与された ICG は速やかに albumin や high-density lipoprotein、low-density lipoprotein 等の血漿蛋白と結合して近赤外蛍光を発する。しかし、血漿蛋白に結合した ICG は約 7-22nm 径の粒子となるため、ICG 蛍光法ではより小さなナノ粒子の動きを描出することができず、物質の移動を部分的にしか把握できない欠点があった。

この問題に対処するため、我々は新規の近赤外蛍光色素、di- $\beta$ -cyclodextrin-binding indocyanine derivative(以下 TK-1)を開発した(Fig.1)。本研究の目的は、第一に TK-1 の光学特性を解析すること、第二に TK-1 と ICG による近赤外蛍光イメージングを用いて、物質の静脈・リンパ還流における粒子径の影響を調査することである。

## 【対象と方法】

### ① TK-1 の光学特性解析

TK-1 の光学特性として、まず phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)中での吸収スペクトルと蛍光スペクトル、および ICG と比較した蛍光量子収率を測定した。次いで、ヒト全血中において 760nm で励起した際の蛍光スペクトルを測定し、TK-1 の濃度と蛍光強度、蛍光波長との関係を調べた。光安定性試験は、0.1 $\mu$ M 濃度の TK-1 溶液を励起波長 760nm で 200 分間持続的に露光し、蛍光強度の経時的変化を記録した。

### ② TK-1 および ICG を用いた近赤外蛍光イメージング

10 週齢、平均体重 350g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。イソフルラン全身麻酔下に背臥位とし、鼠径部から大腿内側まで縦切開を加え、外腹斜筋を避けて大腿静脈および伴走するリンパ管を露出した(Fig.2)。1mM の TK-1 溶液 100 $\mu$ L を、ラット後肢足底へシリンジポンプを用いて皮下注射し、鼠径部で観察される大腿静脈および伴走リンパ管の蛍光を蛍光実体顕微鏡でリアルタイムに観察した。蛍光画像は、TK-1 投与後 5 秒ごとに 120 分間、CCD カメラで撮像した。比較のため、ICG を用いて同様の実験を施行した(各群 n=5)。TK-1 および ICG の動態評価には ImageJ を用い、大腿静脈および伴走リンパ管の蛍光強度を経時的にグラフ化した。

さらに、蛍光色素の静脈への排出の有無を評価するため、投与 10 分後に大腿静脈血を採取してその蛍光強度を測定した(各群 n=5)。

## 【結果】

### ① TK-1 の光学特性解析

Fig.3 に概説されるごとく TK-1 を合成した。TK-1 の分子量は 3,441Da で、3 次元粒子径はソフトウェア解析により最大直径 3nm 未満と算出された。

TK-1 の吸収極大波長は 800nm、蛍光極大波長は 812nm であった。TK-1 の吸収スペクトルは TK-1 濃度が上がってもほぼ同一の形状をしており、TK-1 が PBS 中で分子会合しにくい特性を示した(Fig.4)。TK-1 の蛍光量子収率は 0.048 で、ICG よりもわずかに高かった。

ヒト全血中における 3 次元蛍光スペクトルから、TK-1 は ICG 同様、励起波長 760nm ~780nm において安定した蛍光を発することが示された(Fig.5)。同じくヒト全血中で TK-1 は 200 $\mu$ M まで濃度依存性に蛍光強度を増すが、ICG は 40 $\mu$ M 前後で消光した。また、TK-1 の最大蛍光波長は濃度の上昇に伴い 813nm から 825nm まで徐々にシフトしたが、ICG の最大蛍光波長は大きくシフトした。すなわち、TK-1 が ICG よりも全血中で分子会合しにくい特性を示した(Fig.6)。

光安定性試験では、TK-1 の蛍光強度は ICG よりもより緩徐に減衰した(Fig.7)。

### ② TK-1 および ICG を用いた近赤外蛍光イメージング

TK-1 は大腿静脈とリンパ管の双方を介して排出され、まず大腿静脈が描出されたのち伴走するリンパ管が描出された(Fig. 8a)。一方、ICG はその殆どがリンパ管を介して排出され、大腿静脈は描出されなかった(Fig. 8b)。リンパ管からの排出にも相違を認め、ICG がほぼ一定の速度で排出されるのに対し、TK-1 は投与後 10 分~15 分に大きなピークを呈したのち漸減した(Fig. 9)。

投与 10 分時に採取した大腿静脈血の蛍光強度は、ICG 投与群では殆ど検出されないのに対して TK-1 投与群で有意に高い蛍光強度を呈した( $p < 0.001$ ; Fig. 10)。

## 【考察】

ICG は FDA に認可された安全性の高い近赤外蛍光色素で、従来多くの治療および診断用途に用いられてきたが、いくつかの物理化学的な欠点も有していた。すなわち、第一に ICG は両親媒性であるため、生体の脂質に吸着すると容易には除去できず診断治療の妨げとなりうること、第二に ICG は水溶液中で比較的低い濃度でも分子会合するため、自己消光による蛍光の減弱を生じやすいこと、第三に ICG 蛍光法では ICG-血漿蛋白結合粒子より小さな物質の動きを描出することができず、水や物質移動を部分的にしか把握できないことである。

我々が開発した di- $\beta$ -cyclodextrin-binding indocyanine derivative, TK-1 の注目すべき特徴は、ICG の蛍光特性を模倣するように設計されながら 2 つの環状糖鎖シクロデキストリン分子を有することである。我々の光学実験の結果は、水溶性のシクロデキストリン分子が潜在的に TK-1 を包接することで水溶液中において分子会合することなく微小なナノ粒子として存在でき、結果として高い水溶性と光学的・化学的安定

性を有することを実証した。

さらに興味深い結果として、我々の近赤外蛍光イメージングは TK-1 の静脈・リンパ管を介した動態が ICG とは著しく異なることを示した。TK-1 の三次元構造は水溶液中で 3nm 径未満であり、ICG・血漿蛋白結合粒子の 7-22nm 径より微小であるがゆえに静脈にも還流する。本研究から、間質に在るナノ粒子の静脈、およびリンパ還流が主に粒子径によって異なる制御をうけることが示唆された。TK-1 は従来の ICG では成し得なかった静脈とリンパ還流双方を介した水・物質移動の全容を可視化し、リアルタイムで観察することを可能にする新たな近赤外蛍光イメージングを提供しうる。

#### **【結語】**

新規に開発した近赤外蛍光色素 TK-1 の光学特性と、近赤外蛍光イメージングによる静脈・リンパ還流を調査した。TK-1 は環状糖鎖シクロデキストリンを有することで高い水溶性と光学的・化学的安定性を獲得し、水溶液中で分子会合せず 3nm 径未満のナノ粒子として存在できる。また、従来の ICG では困難であった静脈還流を含めた微小循環全容の可視化を提供しうる。