



Title	近赤外線カメラを使用した術中胸管造影の研究
Author(s)	芦立, 嘉智
Description	配架番号 : 2260
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12386号
Issue Date	2016-09-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12386
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63366
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshitomo_Ashitate.pdf



学位論文

近赤外線カメラを使用した術中胸管造影の研究

(Studies on near-infrared fluorescence
imaging of thoracic duct in real time)

2016 年 9 月

北海道大学

芦立嘉智

学位論文

近赤外線カメラを使用した術中胸管造影の研究

(Studies on near-infrared fluorescence
imaging of thoracic duct in real time)

2016 年 9 月

北海道大学

芦立嘉智

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
緒言	2
略語表	7
実験方法	8
実験結果	17
考察	26
総括および結論	28
謝辞	30
引用文献	31

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Yoshitomo Ashitate, Eiichi Tanaka, Alan Stockdale, Hak Soo Choi, John V. Frangioni

Near-infrared fluorescence imaging of thoracic duct anatomy and function in open surgery and video-assisted thoracic surgery

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 142 • 31-38, (2011)

本研究の一部は下記の学会に発表した.

1. Yoshitomo Ashitate, Hak Soo Choi, Rita Laurence, Alan Stockdale, John V. Frangioni

Simultaneous Assessment of the Biliary Tract and Arterial Anatomy in Real-Time using Dual-Channel NIR Fluorescence Imaging

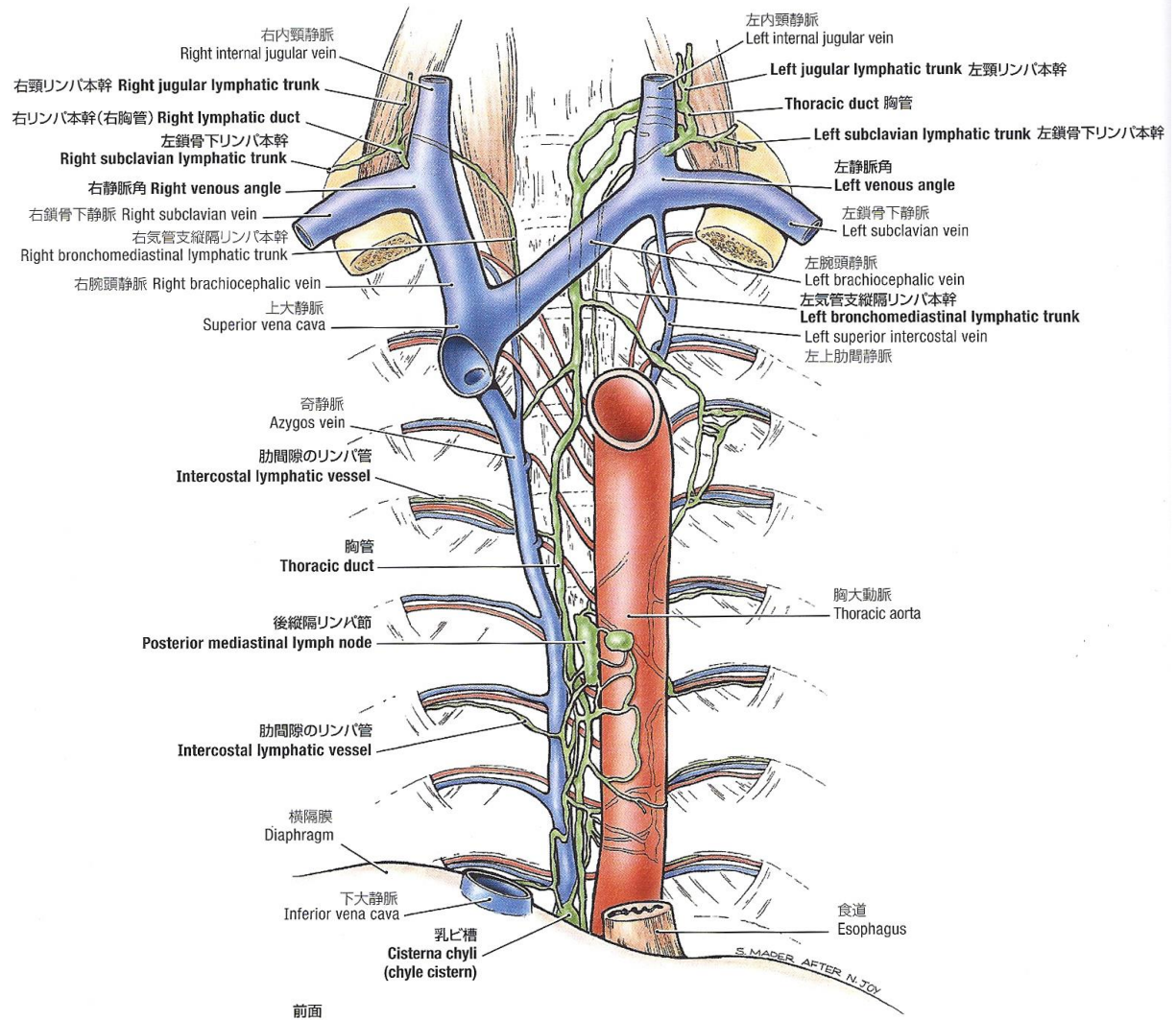
World Molecular Imaging Congress 2010

September 8-11, 2010, Kyoto, Japan

緒言

リンパ系は、リンパ器官（リンパ節、リンパ管、胸管など）からなるシステムで、リンパ液の生成及び、組織から循環系への移動に関わる。リンパ液は毛細血管から動脈圧により滲出した血漿成分が細胞間隙の組織液となったものである。ほとんど（80～90%程度）の細胞間質液は膠質浸透圧によって血管内に戻るが、全体の10～20%程度の細胞間質液はリンパ管に流れ込む。毛細リンパ管は集合しつつ次第に太くなり右の上半身からのリンパ液は右リンパ本管に、左上半身および体腔、下半身の部位からのリンパ液は左リンパ本管に集まる。腹部消化器からのリンパ液の殆どは腸リンパ本幹に流れ込み、骨盤内および下肢からのリンパ液が流れる腰リンパ本幹と合流し、乳び槽を形成する。乳び槽に集められたリンパ液は胸腔内を通り、左頸部を上行し、左内頸静脈と左鎖骨下静脈の合流部（左静脈角）から静脈内に注ぎこむ。この胸腔内の左リンパ本幹を胸管という。（図1A, 図1B）

(A)



(B)

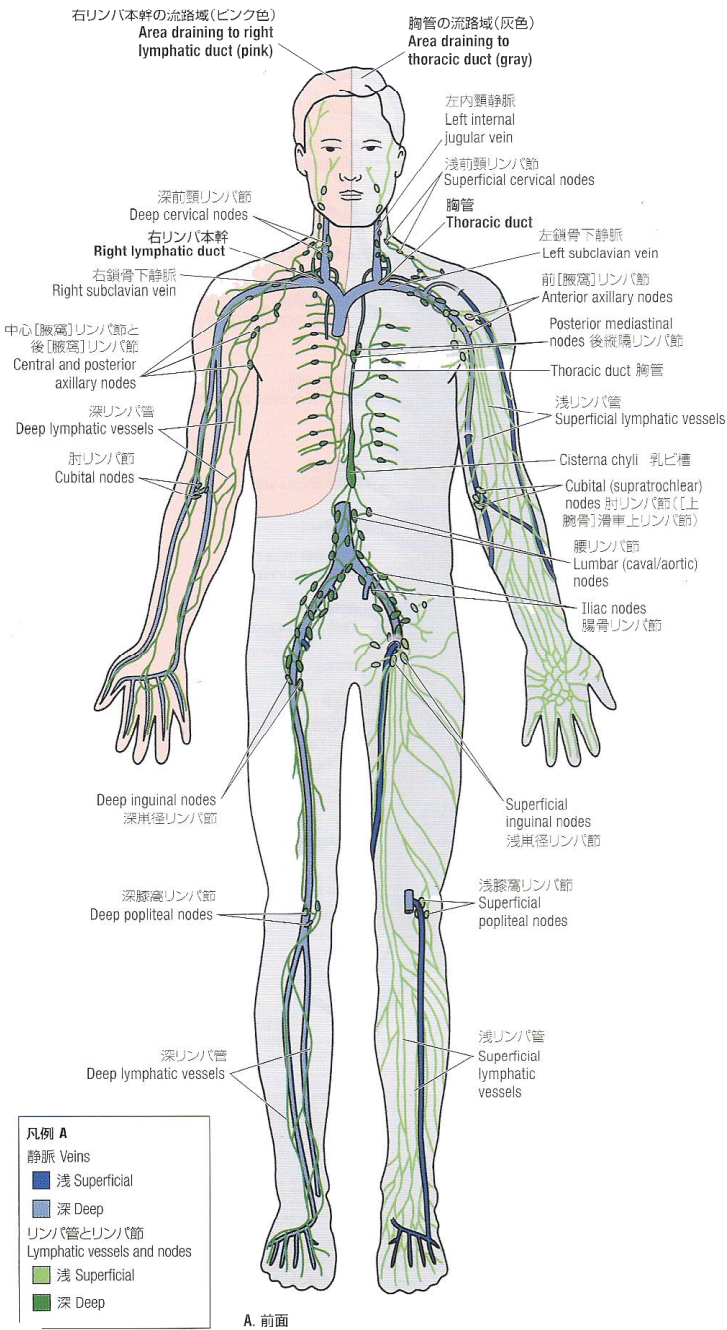


図 1A, B 胸管のシェーマ

(出典：坂井 建雄 監訳 医学書院 グラント解剖学図譜 第7版 原著：Anne M. R. Agur, Arthur F. Dalley Grant's Atlas of Anatomy Thirteenth Edition)

胸管損傷は胸部外科，頸部外科領域の手術において稀に発生する重症合併症である¹⁻³。頸部外科領域では，胸管損傷は頸部のリンパ節郭清の際に起こりうるが，頻度は1-2.5%程度と報告されている⁴⁻⁶。また胸部外科領域，特に食道癌の手術では胸管損傷の頻度は0.8-3%程度と報告されている⁷⁻⁹。胸管損傷に対しては，保存的治療も試みられているが多くの場合無効であり外科的治療が必要となる¹。胸管損傷を外科的に治療する際には，損傷部位の正確な同定が必要となるが，損傷部位のみならず胸管そのものの同定すら困難な場合が多い¹⁰。胸管を描出する方法としてリンパ管造影やリンパシンチグラフィがあるが，これらを用いたとしても損傷部位の正確な同定は困難である¹¹⁻¹³。術中，脂肪乳剤を経口投与することによって胸管損傷部を同定する手法も報告されているが，必ずしも有用ではない¹⁴。このため，胸管および損傷部位を術中に正確に描出する新たな手法が必要とされており，この開発を研究テーマとした。

近年，医療現場において各種イメージング技術が応用されている。中でも，近赤外線蛍光イメージングは，生体内での影響を比較的受け難い700-900nmの波長の光（近赤外線）と，近赤外線によって励起される蛍光物質を利用した画像診断技術である¹⁵。本法は放射線を使用せず安全であり，また，比較的小型のイメージングシステムと経静脈的あるいは局所注射による蛍光物質投与のみを必要とするため，簡便な手技として様々な領域の手術に応用されている。イメージングシステムは，北海道大学大学院消化器外科学分野 II と共同研究先であるフランジオーニ研究所で使用している近赤外線蛍光イメージングシステム

(Fluorescence-Assisted Resection and Exploration: FLARE) が使用可能である。これまで，このイメージングシステムとインドシアニンググリーン

(indocyanine green: ICG) を用いたセンチネルリンパ節生検 (Sentinel lymph node biopsy: SLNB)¹⁶，血管造影¹⁷，胆道造影^{18,19}，尿路造影²⁰等において，近赤外線イメージングの有用性などが報告されてきた。

しかし，これまでに近赤外線イメージングを用いた胸管描出方法は報告されていないため，同手法の確立のためには，薬剤の投与経路・描出条件などを設定する必要がある。Unno ら²¹は，ヒト足背に ICG を皮下注射することで下腿から

鼠径部までのリンパ管を描出することが可能であることを示した．この結果から，ICG などの蛍光物質を下肢に皮下注射することで上記リンパ経路を通じ胸管も描出可能であると予測した．

本研究は，ヒトとほぼ同様の解剖をもつブタを用いて、既存の蛍光物質による近赤外線イメージングによって術中に胸管を描出する手技を確立し，将来のヒトにおける臨床応用の可能性を探索することを目的として行った．

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

CW800-CA: IRDye 800CW carboxylate

FBS : Fetal bovine serum

FDA: Food and Drug Administration

FI: fluorescence intensity

FLARE: Fluorescence Assisted Resection and Exploration

HD: hydrodynamic diameter

HSA: human serum albumin

HSA800: IRDye 800CW conjugated with human serum albumin

ICG: indocyanine green

ICG-HSA: indocyanine green absorbed to human serum albumin

MB: methylene blue

m-FLARE: Minimally Invasive Fluorescence Assisted Resection and
Exploration

NIR: near-infrared

SBR: signal-to-background ratio

SLNB: sentinel lymph node biopsy

実験方法

蛍光物質

近赤外線蛍光イメージングは、生体内での影響を比較的受け難い 700-900nm の波長（近赤外線領域）の光と、近赤外線によって励起される蛍光物質を利用した画像診断技術である。したがって、近赤外蛍光イメージングには、イメージングシステムと ICG やメチレンブルー（MB）といった蛍光物質が必要である。これまで様々な蛍光物質の研究開発が行われてきたが、現在ヒトでの臨床使用可能な蛍光物質は ICG と MB のみである。ICG は heptamethine 骨格を有し、この heptamethine 骨格の長さが蛍光波長を規定している。ICG はスルホン酸基を 2 個有するが、heptamethine 骨格の片側に偏在しているため、水溶液中では疎水性の部分が結合して二量体を形成しやすいことが知られている。その結果、光により励起されたエネルギーは、蛍光を発するよりも隣の分子へ移動することに消費されてしまうため、蛍光が弱くなる現象がみられ、これをクエンチング効果と呼ぶ。LI-COR 社 (Lincoln, NE, USA) が開発・販売している CW800 は heptamethine 骨格にスルホン酸基を 4 個付加することで水溶性を高め、ICG に見られるクエンチング効果を弱めた蛍光物質である。同社は CW800 に水溶性のカルボン酸基を追加したことで水溶性を高め、クエンチング効果を弱くした上で蛍光強度が高められている薬剤である CW800CA および CW800NHS の二つの蛍光物質を開発・販売している。また CW800NHS は、CW800 にエステル基を付加することで他の分子と共有結合することを可能にした蛍光物質である。この性質を利用して大西ら²²はヒト血清アルブミン（HSA）1 分子あたり平均 3 個の CW800 が共有結合した新規蛍光物質（HSA800）を作成した。さらに、この HSA800 は ICG よりも高い蛍光強度を示し、ブタの下腿に皮下注射した場合、速やかに鼠径部へ向かうリンパ流とともに鼠径リンパ節が描出されることも証明した²²。これらの先行研究の結果、HSA800 は近赤外線イメージングを用いた胸管造影において最も有用な蛍光物質であると予想されたため、本研究に用いることとした。大西ら²²はまた、ICG と HSA を 1 : 1 で混合した ICG-HSA を作成している。HSA800, ICG-HSA, ICG を比較すると、蛍光強度は ICG, ICG-HSA, HSA800 の順に高くなった。ICG と HSA は

いずれも CW800 とは異なり臨床で利用可能な薬剤である。実際に乳癌のセンチネルリンパ節生検の臨床研究では ICG-HSA が使用されている¹⁶。過去の動物実験では、ICG-HSA の蛍光強度は HSA800 よりは劣るものの、今後の臨床応用を考慮し本研究でも使用することとした。

従って、本研究では ①HSA800, ②ICG (Akorn 社(Lake Forest, IL, USA)から購入), ③CW800CA (LI-COR 社から購入), ④ICG-HSA の4種類の蛍光物質を用いた。

蛍光物質の光学特性を 50 mmol の HEPES を加えたウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) を用いて計測した²³。分配係数 (logD) の計算には MarvinSketch 5. 2. 1 (ChemAxon, Budapest, Hungary)を使用した。

動物モデル

全ての動物実験は、Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) 認定施設である Beth Israel Deaconess Medical Center において施行した。同時に北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。まず、小動物 (ラット) を用いて前述の4種類の蛍光物質を評価し、ヒトの解剖により近い動物としてブタを用いた実験に応用可能な蛍光物質の選択を行った。続いて、ラットのデータをもとにブタを用いた場合の適切な蛍光物質の投与量、投与方法を検討した。

ラットは Taconic Farms (Germantown, NY, USA) から購入した平均体重 300g の16匹の雄の Sprague-Dawley rats を使用した。ブタは E. M. Parsons and Sons (Hadley, MA, USA) から購入した平均体重 36. 1kg の8頭のメスの Yorkshire Pig を用いた。

ラットを用いた解析

ラットを用いて前述の4種類の蛍光物質を評価し、ブタの実験に応用可能な蛍光物質の選択を行った。

ラットの全身麻酔方法は 65mg/kg の pentobarbital の腹腔内投与を用い、実験中は気管切開にて気道を確保し、人工呼吸器により換気を行った。上腹部を小開腹して腸間膜リンパ節を引き出し、濃度 $10\mu\text{mol/L}$ の蛍光物質を $50\mu\text{L}$ (計 $1.5\mu\text{g/kg}$) 注射した。その後、右開胸を行い、近赤外線蛍光イメージングシステム (Fluorescence-Assisted Resection and Exploration: FLARE) を用いて胸管を観察した。胸管の蛍光強度を定量的に評価するために、蛍光物質を注射した後、3, 5, 10, 15 分後の胸管の蛍光シグナル強度 (fluorescence intensity : FI) を計測した。

ブタを用いた解析

ブタの全身麻酔方法は以下の通りである。4.4 mg/kg の Telazol (Fort Dodge Labs, Fort Dodge, IA, USA) を筋肉内注射した後に気管切開を行い、ダブルルーメンの気管チューブで気管内挿管を行った。全身麻酔の維持には 2%イソフルレン (Baxter Healthcare Corp, Deerfield, IL, USA)を用いた。麻酔導入後、外頸静脈に 14 ゲージの中心静脈カテーテルを挿入し、生理食塩水を点滴投与した。蛍光物質は中心静脈カテーテルから投与した。体位は全身麻酔後、左側臥位とし、実験中は心電図、パルスオキシメーター、体温をモニタリングした。続いて、良好な視野を得るために、左側のみの分離肺換気として、右肺を虚脱させた。開胸手術モデルに 6 頭のブタを用い、胸腔鏡手術モデルに 2 頭のブタを用いた。開胸モデルは第 3 から第 6 肋間の中腋窩線付近に 10cm 四方の U 字型の皮弁を作成し、第 3 から第 6 肋骨をそれぞれ 10cm ずつ切除した。胸腔鏡手術モデルは 3 cm の皮膚切開を 3 箇所 (第 5 肋間中腋窩線、第 7 肋間前腋窩線、第 7 肋間後腋窩線上) に置き、これらの創からカメラ、手術用の鉗子を挿入した。いずれのモデルにおいても下肺靱帯を切除し、肺を腹側に圧排することで胸腔内の良好な視野を得た。ラットの解析と同様に、近赤外蛍光イメージングシステムには FLARE システムを用いた。開胸手術モデルには従来の FLARE システム、内視鏡手術モデルには、FLARE システムを内視鏡手術用に改良した m-FLARE システムを用いて胸管を観察した。

ブタにおける至適注射部位の検討

初めにブタにおける至適注射部位の検討を行った。Schach らの報告²⁴により、下肢のリンパ管は大伏在静脈周囲に存在することが明らかされていることから、大伏在静脈の周囲を蛍光物質の注射部位とした。3頭のブタに鼠径部、大腿部（股関節と膝関節の midpoint の大伏在静脈周囲）、下腿部（足関節付近の大伏在静脈周囲）に蛍光物質を皮下注射した。対照群には、鼠径部を皮膚切開し、鼠径部のリンパ節に直接、蛍光物質を注射した。蛍光物質投与前、投与後 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 分後に胸管を観察し、FI を測定した。蛍光物質の注射は 120 分毎に、注射部位を変えて繰り返し行った。また、それぞれのブタに胃管を挿入し、50 g の生クリームを経胃管的に注入し、胸管の色調の変化を FLARE システムのカラー画像で観察した。同様に、1 ml のメチレンブルーを鼠径部リンパ節に直接注入し、色調の変化を観察した。これらは過去に報告された胸管の同定方法であり^{3,25}、この胸管の色調変化による観察と本研究で開発した蛍光物質による胸管造影を比較した。

ブタにおける至適蛍光物質投与量の検討

次に、蛍光物質の適切な投与量を検討した。同一の蛍光物質を異なる投与量で投与し、投与前、投与後 5, 10, 15, 30, 45, 60 分後に胸管を観察し、それぞれの FI を測定した。

胸管損傷/治療モデル

ブタにおいて胸管損傷モデル、および胸管損傷後の治療モデルを作成した。胸管損傷モデルは胸膜を切開して胸管を露出した後、20 ゲージの spinal needle

で胸管を穿刺し作成した．損傷部位を FLARE で確認しつつ，損傷部の頭側と尾側をそれぞれ 3-0 絹糸で結紮して治療モデルとした^{26,27}．

近赤外線蛍光イメージングシステム

① FLARE システム

デュアルチャネル近赤外線蛍光イメージングシステム (Fluorescence-Assisted Resection and Exploration: FLARE) は近赤外領域の2波長 (700nmと800nm) の蛍光画像と白色光画像の計三画像を同時に表示できる術中蛍光イメージングシステムである．機器的特性はすでに報告済みであるが^{26,27}，以下に要点を述べる．同システムは40,000 lxの白色光 (400 - 650 nm) と670 nmの励起光，760 nmの励起光を備え，励起光の線量率はそれぞれ4.0, 11.0 mW / cm²である．専用のソフトウェアにより，直径15 cmの視野 (field of view: FOV) 内のカラーイメージ，700 nm，800 nmの二つの独立した近赤外線イメージ，さらにこれら3つを融合したmergeイメージを同時に表示可能である．融合画像においては，700 nmは赤色，800 nmはライムグリーン色で表現される (図2) ．

(A)



(B)

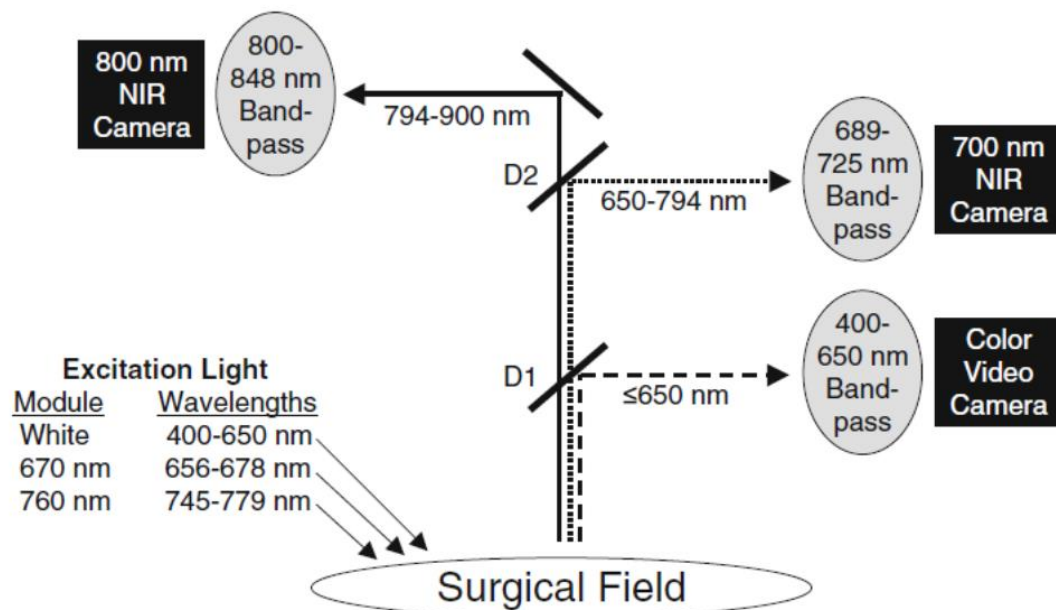


図2 FLARE イメージングシステム

A: FLARE イメージングシステムの全体像.

B: FLARE イメージングシステムの Light path. 文献 16 より引用.

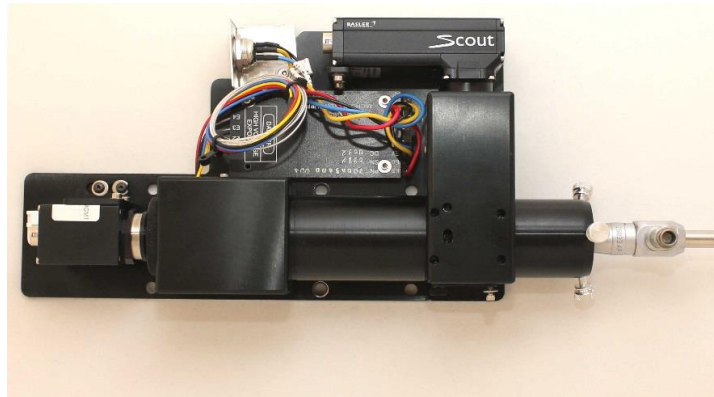
FLARE を用いた臨床試験は、2008 年より Harvard 大学 Beth Israel Deaconess Medical Center および Leiden 大学において、乳癌のセンチネルリンパ節の同定、および乳房再建術の際の血流の確認を目的として行われ、安全性および有効性が確認されている。北海道大学では、2010 年 11 月よりセンチネルリンパ節の同定および、肝機能評価の臨床研究（インドシアニンググリーンと近赤外線イメージングシステムを用いた肝胆膵領域のリンパ流の同定、および同システムの肝胆膵領域手術への応用のための探索的臨床試験）を行った。

② m-FLARE システム

北海道大学と本研究を共同で行ったフランチオーニ研究所では、FLARE システムの技術を応用して内視鏡手術用の近赤外蛍光イメージングシステムである minimally invasive FLARE (m-FLARE)を開発している^{18,20}。同システムは 30,000

1x の白色光 (400 - 650 nm) と 670 nm の励起光, 760 nm の励起光を備え, 励起光の線量率はそれぞれ 6.0, 20.0mW/cm²である. これらの光源はケーブルを通じて内視鏡手術用のスコープ (Karl Storz 社, 10mm 径の直視硬性鏡) に接続している. スコープの eyepiece 部分は FLARE と同様に専用のソフトウェアに接続し, 直径 5cm の視野 (FOV) 内のカラーイメージ, 700 nm, 800 nm の二つの独立した近赤外線イメージ, merge イメージを同時に表示可能である. 本研究では 800nm のみを用いて, 融合画像では FLARE と同様にライムグリーン色で表現した (図 3). m-FLARE システムを用いた過去の研究では, ICG, MB を静脈注射し, 胆管, 肝動脈を同時にかつ異なる波長の近赤外線イメージで描出可能であることが示された¹².

(A)



(B)

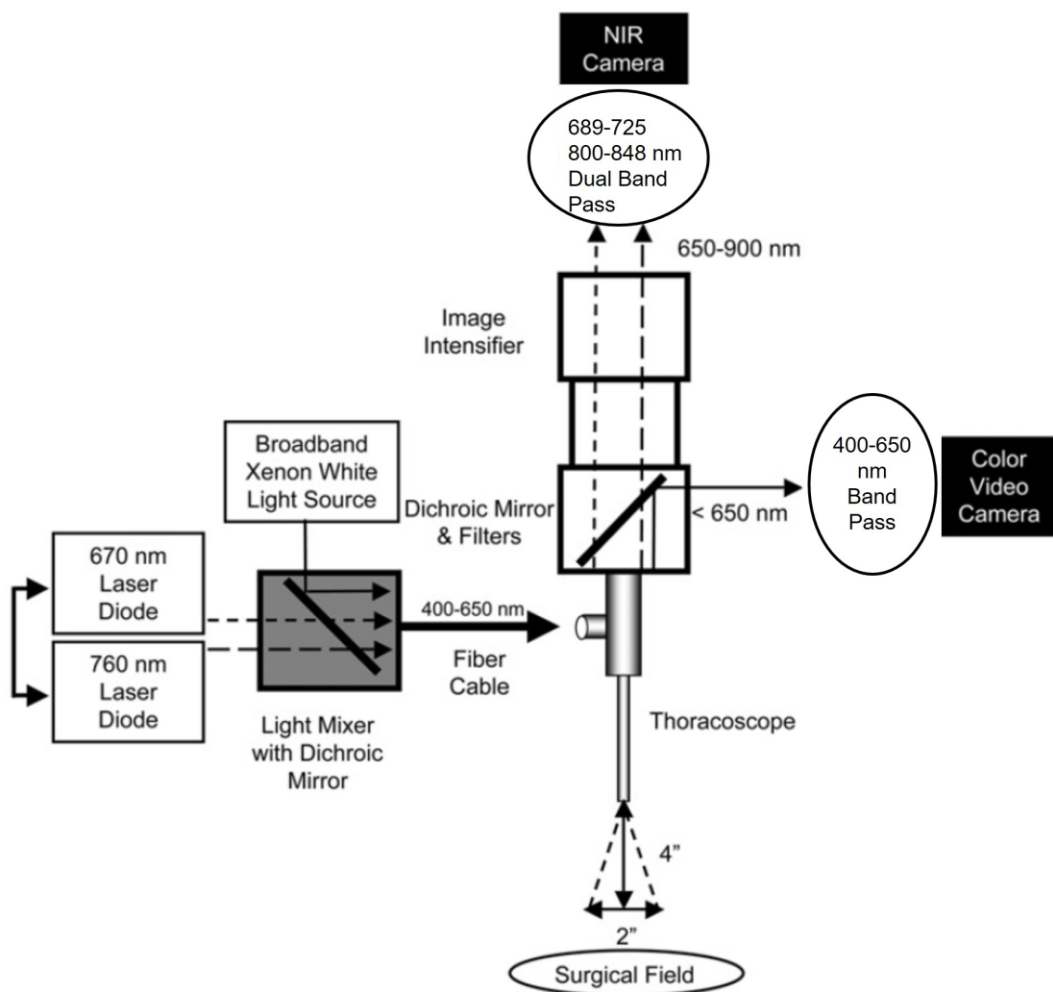


図 3 m-FLARE イメージングシステム

A: m-FLARE イメージングシステムの全体像. 内視鏡手術用のスコープの eyepiece に本体を接続. 白色光, 近赤外線用の光源は接続していない.

B: m-FLARE イメージングシステムの light path.

定量化と統計学的解析

FLARE ソフトウェアを用いて、胸管における関心領域 (region of interest: ROI) の FI を定量化した。本研究においては, signal-to-background ratio (SBR) を評価対象とし ($SBR = FI \text{ of ROI} / FI \text{ of background}$), この際に胸壁を background として用いた。SBR は経時的に測定した。SBR の比較は多群間比較については one-way analysis of variance (ANOVA) を使用した。ANOVA で有意差を認めた場合に複数群間の 2 群の比較を Tukey multiple comparison test を用いて行った。なお, 統計学的な比較を行う場合は, 経時的に測定したすべての時間で SBR を比較した。統計の計算には GraphPad Prism ソフトウェア™ version 4.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) を使用した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結果

蛍光物質の光学特性

ICG, CW800CA, ICG-HSA, HSA800 の光学特性を測定した。光学特性の測定は生体内の環境を想定し、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) 下で行った。測定した光学特性を表 1 に示す。すべての蛍光物質の蛍光スペクトルのピーク (Peak fluorescence) は 800 nm 前後であった。これは、いずれの蛍光物質も上記の近赤外蛍光イメージングシステムの 800 nm のカメラで検出可能であることを示している。

表 1 近赤外線蛍光物質の光学特性 (50 mM HEPES 添加 100%FBS, pH7. 4 に溶解し計測)

蛍光色素	Molecular Weight (Da)	Hydrodynamic diameter (nm)	Peak Absorbance (nm)	Peak Fluorescence (nm)	Quantum yield (%)
ICG	776	1.2	807	822	9.3
CW800CA	1096	1.3	786	800	14.2
ICG-HSA	67000	7.3	800	814	9.4
HSA800	26000	7.4	784	802	12.1

Da: ダルトン

これまでの先行研究の結果から、hydrodynamic diameter (HD) が小さいものはリンパ管内を速やかに移動することが明らかにされている¹⁵。また、量子収率 (quantum yield: QY) は、生体内で蛍光シグナル強度に比例することも知られている事実である²⁸。すなわち、HD が大きいものほど胸管内に長く留まり、QY が大きいものほど強い蛍光シグナル強度を示すことが予想される。ICG の HD は 1.3 nm と小さいため、リンパ節からリンパ管、さらに胸管へ速やかに移動することが予想された。しかし、過去のセンチネルリンパ節生検の研究から²²、ICG 単独

では QY が低いことが明らかであり、胸管描出に用いる場合には蛍光シグナル強度が弱くなることが予想された。ICG は CW800CA・ICG-HSA・HSA800 に比較して QY が低いため、ICG のみを使用した場合には仮に胸管を描出できたとしてもリンパ管内の移動が早いため、早期に蛍光シグナルが消失すること、又、仮に胸管を描出できたとしても蛍光シグナルが弱く、同定が困難である可能性が考えられた。従って、表 1 に示した各種蛍光物質の光学特性から、胸管描出に際しては CW800CA・ICG-HSA・HSA800 が ICG よりも優れた蛍光物質であることが予想された。特に HSA800 は HD、QY とともに ICG より高いため、胸管を長時間、高い蛍光シグナルで描出できると考えた。

ラットでの胸管造影

検討を行った 4 種の蛍光物質を用いた観察結果を図 4 に示す。すべての蛍光物質で胸管を描出することが可能であったが、描出時間、SBR 値に相違が見られた。

HSA800 は ICG と比較し有意差はないものの高い SBR を示し、光学特性から予想された結果と一致した。しかし、CW800-CA および ICG-HSA は注射後 3～5 分で ICG よりも高い SBR を示すものの、15 分間後には SBR の著明な低下をみとめた。一方で ICG、HSA800 は注射後 3 分から 15 分までは高い SBR を維持することが明らかになった。CW800-CA は ICG より高い QY を示し、ICG に相似した HD をもつ蛍光物質であるため、CW800-CA の SBR は ICG と同等またはそれ以上と予想した。しかし、実際には CW800-CA を使用した場合の SBR は早期に低下しており、その理由は不明であった。また、ICG-HSA も同様に ICG よりも早期に SBR が低下していた。さらに、ICG-HSA は ICG より高い HD を示しているにもかかわらず、胸管描出時間は延長しなかった。以上のことから、HD は胸管描出時間に関与しないことが明らかになった。ただし、ICG よりも ICG-HSA の SBR が早期に低下する理由は不明であった。

ラットを用いた SBR および光学特性の計測の結果からは、HSA800 が胸管描出には最適の蛍光物質であると考えられたが、ICG を用いた解析は薬剤生成が容易であること、今後のヒトでの臨床応用を考慮するとより有利であると判断した。

ラットの解析ではHSA800が最も優れたSBRを示したが、ICGも注射後15分は高いSBRを維持していた。また過去の研究からSBR>2であれば有用な蛍光シグナルが得られることが判明している^{15,22}。以上のことから、ブタを用いた動物実験では蛍光物質としてICGを使用することとした。

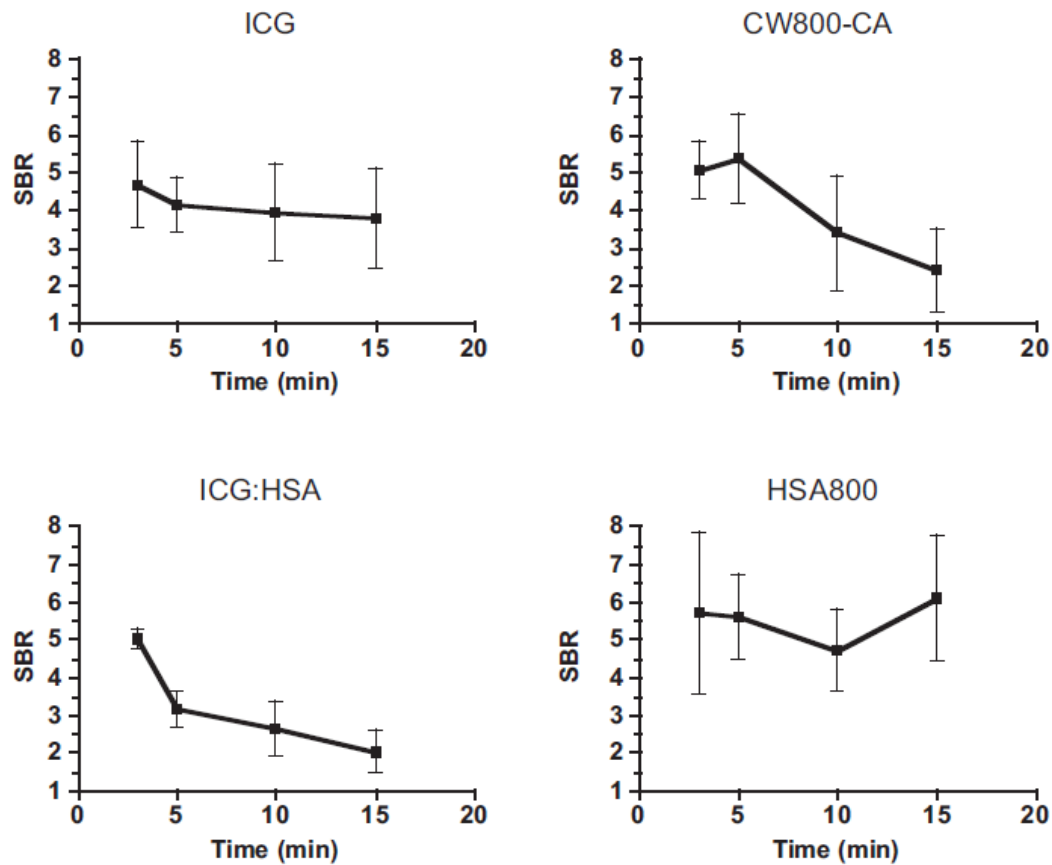


図4 ラットにおける各種蛍光物質で描出された胸管の定量評価

1.5 μ g/kgの各種近赤外線蛍光物質を腸間膜リンパ節に注射 (n=4) し、15分間イメージングをした。注射後、3、5、10、15分後の胸管の蛍光シグナル強度 (fluorescence intensity: FI) をソフトウェアで測定し、signal-to-background ratio (SBR, mean $\pm$ SEM) を計算した。

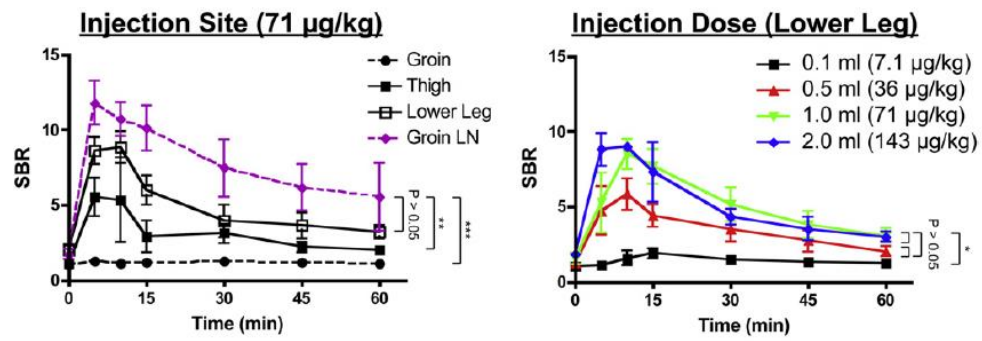
ブタでの胸管造影（開胸手術モデル）

ラットの実験では腸間膜のリンパ節を注射部位として選択したが、臨床応用を考慮し、ブタによる開胸モデルにおける、より適切な注射部位を探索した。予備実験により、ブタの下肢への皮下注射でも胸管が描出されることが明らかになった。至適投与部位を検討するために、鼠径部、大腿部、下腿へ皮下注射した場合のSBRを比較検討した。アメリカのFood and Drug Administration (FDA)により定められたヒトに対するICGの投与濃度は3.2 mmol/Lであることから、ブタへのICE投与量も濃度3.2 mmol/Lを1mL投与する事とした。

図5 Aの左のグラフに示すように鼠径部のリンパ節を露出し直接注射した場合が最も高いSBRを示すことが明らかになったが、臨床応用を考慮した場合、鼠径部のリンパ節へ蛍光物質を直接注射することは侵襲が高く、難易度も高い手技と考えられた。このため、直接、鼠径部のリンパ節へ注射した群を対照群とし、他の注射部位との比較検討に用いることにした。鼠径部、大腿部、下腿部に皮下注射した群を比較した結果、鼠径部へ皮下注射した群は有意に低いSBRを示した。また、大腿、下腿へ皮下注射した群では胸管が明瞭に描出され、注射後60分のSBRも十分な数値（ $SBR > 2$ ）であった（図5 B）。大腿と下腿の皮下注射を比較すると、有意差はないものの下腿へ皮下注射した群の方が高いSBRを示した（図5 A左）。以上の結果から、以後の研究では注射部位を下腿の皮下と決定した。

適切な投与量を設定するために、同濃度（3.2mmol/L）のICGを0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ml注射した群の間でSBRを比較した（図5 A右）。その結果、0.1ml以上投与した場合には $SBR > 2$ を示し、胸管が良好に描出された。さらに、投与量を増やすとSBRも増加する傾向にはあったが、0.1ml以外の3群の間には有意差を認めなかった。臨床応用を考慮すると投与量は最少であることが望ましいため、以後の解析では3.2mmol/LのICGを0.5ml（36 μ g/kg）投与することとした。

(A)



(B)

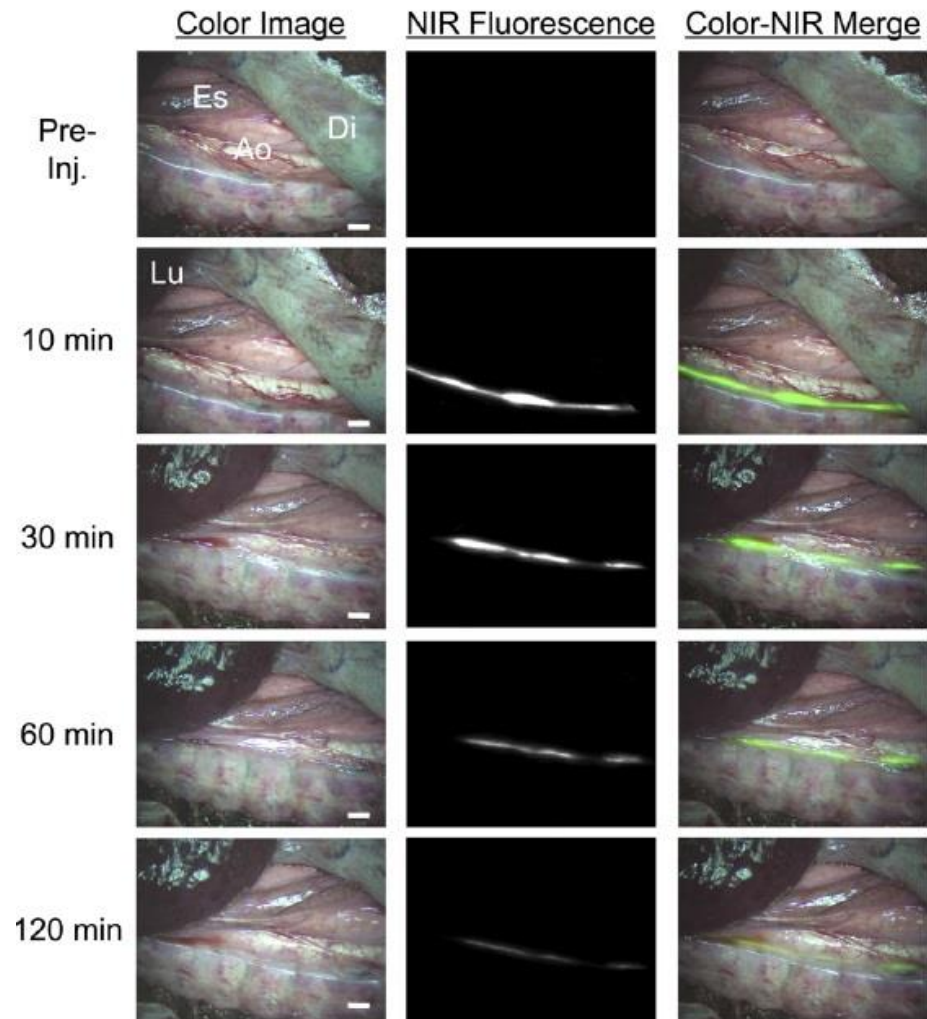


図5 ブタにおける胸管造影（開胸手術モデル）

A: 左のグラフ；異なる注射部位での signal-to-background (SBR, mean $\pm$ SEM) の比較 (n=3) . 鼠径部のリンパ節, 大腿, 下腿, 鼠径部の皮下に 3.2 mmol/L の ICG を 1 ml (71 μ g/kg) 皮下注射後, 60 分間における胸管の SBR の推移を比較した. 右のグラフ；異なる投与量での signal-to-background (SBR mean $\pm$ SEM) の比較 (n=3) . 3.2mmol/L の ICG を 0.1, 0.5, 1.0, 2.0ml (それぞれ 7.1, 36, 71, 143 μ g/kg に相当) と投与量を変えて下腿に皮下注射し, 60 分間観察した. 投与量が 0.5, 1.0, 2.0ml の 3 群の SBR を統計学的に比較した (P>0.05) . また 0.1ml 投与した群と 1.0ml 投与した群も統計学的に比較した. 統計学的な比較は 0 分から 60 分の間に測定したすべての SBR を比較した. *は P<0.05, **は P<0.01 を示す.

B: ブタの開胸手術モデルでの胸管造影. 3.2mmol/L の ICG を 1.0ml 下腿に皮下注射し, 経時的に観察した. 注射前 (pre-inj) から注射後 120 分 (min) まで観察しており, 右からカラーイメージ, 近赤外線蛍光イメージ, merge イメージとなる. merge イメージでラ イムグリーンを使用している. スケールは 1cm. Es;食道, Di;横隔膜, Ao;大動脈

本手法では胸管が描出されるのみならず, 胸管に側副路が存在した場合にも, これを明瞭に描出することができた. また, 胸管損傷モデルでは損傷部位と損傷部位から漏れるリンパ流も明らかに描出できた (図6) .

続いて近赤外線蛍光イメージを観察しながらイメージガイド下に損傷部を同定し, 損傷部位の頭側と尾側の結紮を行った. その結果, 損傷部位からリンパ漏が消失することが確認出来た. このことにより, ICG の皮下注射と近赤外線蛍光イメージを用いることで胸管の損傷部位を同定し修復できること, さらにその修復効果も判定可能であることを証明できた.

管損傷モデルの Color image に示されている通り, 皮下注射した ICG は緑色の薬液であるが, リンパ管, 胸管内を流れる間に希釈されるため, リンパ漏があっても肉眼的に ICG が術野を汚染せず, その後の手術操作に影響を与えないことも証明された.

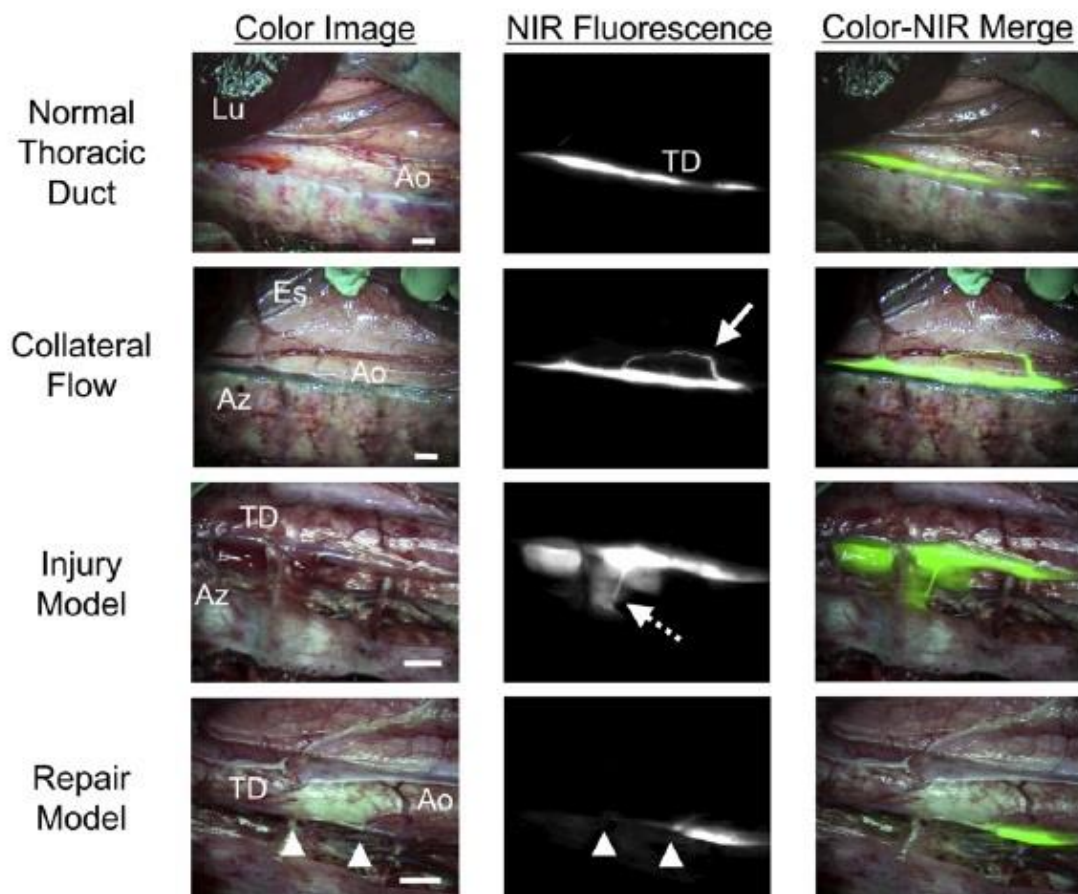


図6 ブタにおける胸管造影（開胸手術における各種モデル）

ブタの胸管イメージング．3.2 mmol/L の ICG を 1ml (36 μ g/kg 相当) の ICG をブタの下腿に皮下注射して 30 分後に観察した．上から正常胸管，胸管の側復路（矢印），損傷モデル（点線矢印が損傷部位），修復モデル（矢頭が二カ所の結紮部位）．左からカラーイメージ，近赤外線蛍光イメージ，merge イメージで，merge イメージにライムグリーンを使用している．スケールは 1cm．Lu;肺，Ao;大動脈，Es;食道，Az;奇静脈，TD;胸管．

なお，生クリームを経口投与した場合，あるいはメチレンブルーを直接鼠径リンパ節に注射した場合のいずれも胸管を明瞭に描出することは出来なかった．

（図 7）

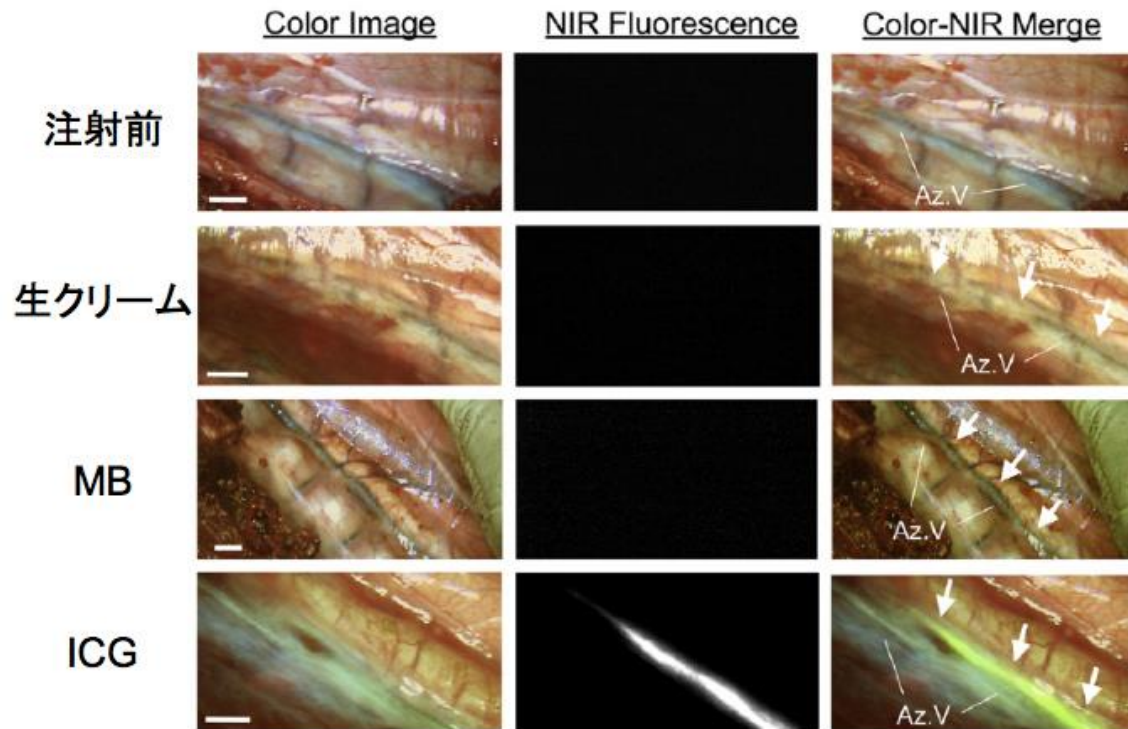


図7 ブタにおける胸管造影（開胸手術における各種手法の比較）

上から，注射前，経口から生クリームを摂取後，メチレンブルーを腸間膜リンパ節に注射した後の観察．3. 2 mmol/L の ICG を 1ml (36 μ g/kg 相当) ブタの下腿に皮下注射して 30 分後の画像．左からカラーイメージ，近赤外線蛍光イメージ，merge イメージで，merge イメージにライムグリーンを使用している．スケールは 1cm. Az; 奇静脈．矢印は胸管を示している．

ブタでの胸管造影（内視鏡手術モデル）

開胸で用意した4種類の条件（正常の胸管，側副路，胸管損傷モデル，修復モデル）を内視鏡手術モデルでも同様に作成した．内視鏡手術モデルでも開胸モデルと同様に胸管および側副路を明瞭に描出することが可能であった．また，胸管損傷モデルにおける損傷部位の同定が容易であり，イメージガイド下に損傷部位を結紮し修復することも可能であった（図8）．

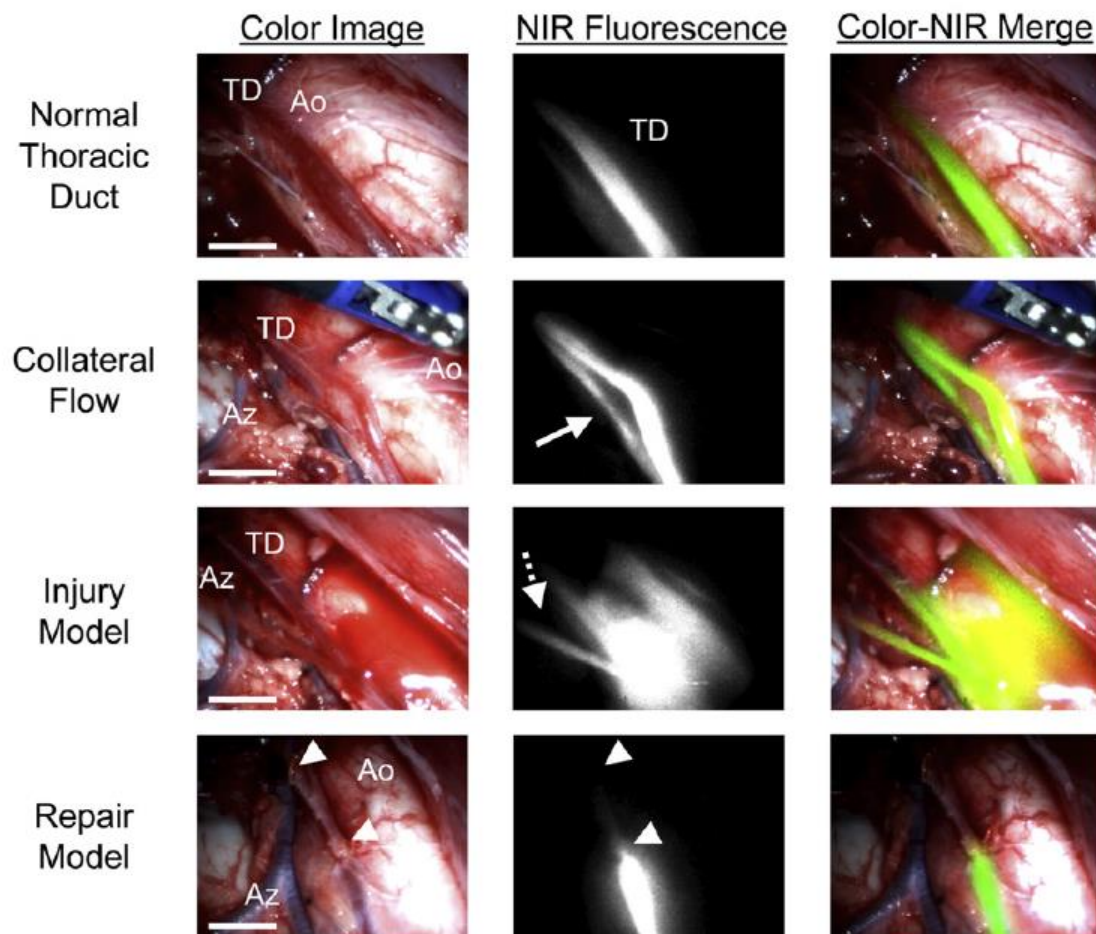


図8 ブタにおける胸管造影（内視鏡手術モデル）．3.2 mmol/LのICGを1ml (36 μ g/kg 相当)ブタの下腿に皮下注射し，30分後にm-FLAREを用いて撮影した．上から正常胸管，胸管の側復路（矢印），損傷モデル（点線矢印が損傷部位），修復モデルとなる（矢頭が二カ所の結紮部位）．左からカラーイメージ，近赤外線蛍光イメージ，mergeイメージで，mergeイメージはライムグリーンを使用している．スケールは1cm．Ao;大動脈，Es;食道，Az;奇静脈，TD;胸管．

考察

本研究では、開胸、胸腔鏡のいずれの手術アプローチでも、近赤外蛍光イメージングシステムと ICG を用いて胸管を描出、同定できることを明らかにした。すなわち、本法は臨床の場面で、手術中に迅速にかつ、リアルタイムに胸管を描出することが可能であることを示している。本手法は従来用いられてきたリンパ管造影、リンパシンチグラフィ、あるいは乳脂肪投与法と比較すると、きわめて優位性が高い。すなわち、リンパ管造影やリンパシンチグラフィは術前の画像検査としては有用であるが、術中にリアルタイムに胸管を同定するのは困難である。しかし、本研究の手法は術中にリアルタイムに胸管を描出できるため、術中損傷の予防や損傷部の同定が可能な点で有用性は極めて高いと言える。また、乳脂肪を経口投与した場合も、胸管やその損傷部位をリアルタイムに同定可能とされているが、本研究でも示したようにその色調変化は常に明瞭とは言えない。一方で近赤外蛍光イメージングシステムを用いると、胸管は常にきわめて明瞭に長時間描出されることが証明された。また、下腿に投与した ICG が胸管の損傷部位から術野に漏出しても、希釈により術野で色素は認識されず、その後の手術操作にも影響を及ぼさないことも、実際の手術中の使用を考えると有用な点の一つである。

今回使用した近赤外蛍光イメージングシステムである FLARE 以外にも SPY²⁹, PDE²⁹ など臨床で使用可能な近赤外線を感知できる医療機器が複数存在し、また、ICG はヒト臨床で利用できる蛍光物質であることから、今回確立した胸管造影手法そのものは、直ちに実際の臨床現場で同様の操作を行うことが可能である。しかし、現時点で得られた方法はブタを使用した場合のものであり、ヒトに使用する際の適切な注射量、注射部位などを検討する必要がある。

ヒトに対する最適な注射部位は明らかになっていないが、乳び胸や下肢リンパ浮腫の診断の際に行うリンパ管造影では第一趾と第二趾の間が使用されている³⁰。Schacht ら²⁴の研究によれば、大腿に比べ下腿や足背にはリンパ管が広く分布しており、皮下脂肪も少ない同部位が最適とされている。リンパ管を描出するにはリンパ管に直接蛍光物質を注入することが望ましいが、技術的には困難である。

一方で、皮下脂肪の少ない下腿や足背の皮下に注射することで、直接リンパ管に注入されなくても、蛍光色素が皮下からリンパ管に移行するため、近赤外線を用いたリンパ管造影には適していると考ええる。本研究の結果でも、下腿への皮下注射で鼠径部や大腿よりも高いSBRを示したことからも、ヒトでの臨床応用の際には下腿への皮下注射が望ましいと考えられる。しかしながら、ヒトとブタでは固体長や下腿長が異なるため、ヒトにおいては蛍光物質が長距離を移動する間に希釈され、その結果、胸管の蛍光シグナル強度が低下する可能性もある。したがって希釈の効果を考慮して投与濃度、投与量を調節する必要がある、さらなる臨床研究が必要と考える。

さらに、ブタとヒトのリンパ系あるいは胸腔内の解剖学的な相違も考慮する必要がある。上述のように腹部消化器からのリンパ液と骨盤内および下肢からのリンパ液が胸管へと流れていくが、胸管に流れるリンパ流のうち下肢からのリンパ流が占める割合も、ブタとヒトでは異なる可能性がある。下腿へ注射した蛍光色素が消化管や骨盤からのリンパ流でどの程度希釈されるかは明らかではない。この点に関してもさらなる臨床研究を要する。

本研究において、既存の蛍光色素である ICG と近赤外蛍光イメージングシステムを用いて、簡便な手法で胸管を明瞭に描出できることを示した。本手法を用いることで胸部外科、頸部外科領域の手術の際の胸管損傷の合併症を予防し、また、胸管損傷時においても、安全に損傷部位を同定・修復が可能になると思われる。ヒトでのさらなる臨床研究は必須であるが、今後、本研究で示された手法が将来的に臨床に応用されていく可能性が高いと思われた。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

- ・下腿に ICG を皮下注射することで，注射後 5 分後には明瞭に近赤外線イメージングを用いて胸管を描出することが可能であった．
- ・一度描出された胸管は注射後 60 分以上描出され続ける．さらに長時間の描出が必要な場合は，同量を追加投与することで再度，胸管の描出が可能であった．
- ・この手法は，開胸手術だけではなく，内視鏡手術にも応用可能であることが明らかになった．

② 新知見の意義

- ・胸部外科，頸部外科領域の手術では胸管損傷（乳び胸）は稀ではあるが，一旦発症すると保存療法では治癒困難な場合もあり，長期入院を強いられる場合や再手術を必要とすることがある．確実な治療法としては，手術的に損傷部位を結紮することであるが，術野において漏出部位が確認できない場合がしばしばある．経口的，あるいは経腸的な脂肪製剤投与による損傷部の同定はしばしば行われているが，描出能が低く確実な方法とは言えない．本研究の手法を用いることによって，胸管の損傷部位を容易にかつ確実に同定できると期待される．また，胸管損傷の可能性を有する手術時に，あらかじめ胸管を描出しておくことで損傷を予防可能であり，たとえ損傷時でも修復が容易になる．
- ・この手法は，手技も簡便で侵襲も少ないため，胸管損傷（乳び胸）に対する標準手術となり得る手法と考える．

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

- ・本研究のデータはブタのデータが中心で，ヒトでのデータは未収集である．ヒトの場合の適切な投与部位，投与量が研究されるべきである．

④ 今後の課題

・近赤外線イメージングデバイスにおいて組織の透過性には限界がある．脂肪の厚い症例，癒着が強く術野に十分な視野がとれない症例でも利用出来るよう，より深部組織の情報を得られるようなデバイスの改良が必要である．

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会をお与えいただき，全般にわたり直接ご指導・ご鞭撻を賜りました，北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 教授 平野 聡先生，助教 野路 武寛先生に深く感謝申し上げます．

また，本研究の遂行にあたり，様々な点でご助言やご協力をいただきました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 教室員一同および事務職員の皆様に厚く御礼を申し上げます．

引用文献

1. Lapp, G.C., Brown, D.H., Gullane, P.J. & McKneally, M. Thoracoscopic management of chylous fistulae. *Am. J. Otolaryngol.* **19**, 257-262 (1998).
2. Wurnig, P.N. *et al.* Thoracoscopic direct clipping of the thoracic duct for chylopericardium and chylothorax. *Ann. Thorac. Surg.* **70**, 1662-1665 (2000).
3. Fahimi, H. *et al.* Current management of postoperative chylothorax. *Ann. Thorac. Surg.* **71**, 448-50; discussion 450-451 (2001).
4. Spiro, J.D., Spiro, R.H. & Strong, E.W. The management of chyle fistula. *Laryngoscope* **100**, 771-774 (1990).
5. Har-El, G., Segal, K. & Sidi, J. Bilateral chylothorax complicating radical neck dissection: report of a case with no concurrent external chylous leakage. *Head Neck Surg.* **7**, 225-230 (1985).
6. Fitz-Hugh, G.S. & Cowgill, R. Chylous fistula. *Arch. Otolaryngol.* **91**, 543-547 (1970).
7. Dougenis, D., Walker, W.S., Cameron, E.W. & Walbaum, P.R. Management of chylothorax complicating extensive esophageal resection. *Surg. Gynecol. Obstet.* **174**, 501-506 (1992).
8. Orringer, M.B., Bluett, M. & Deeb, G.M. Aggressive treatment of chylothorax complicating transhiatal esophagectomy without thoracotomy. *Surgery* **104**, 720-726 (1988).
9. Lam, K.H., Lim, S.T., Wong, J. & Ong, G.B. Chylothorax following resection of the oesophagus. *Br. J. Surg.* **66**, 105-109 (1979).
10. Noel, A.A. *et al.* Treatment of symptomatic primary chylous disorders. *J. Vasc. Surg.* **34**, 785-791 (2001).
11. Sachs, P.B. *et al.* Diagnosis and localization of laceration of the thoracic duct: usefulness of lymphangiography and CT. *AJR. Am. J. Roentgenol.* **157**, 703-705 (1991).
12. Stavngaard, T., Mortensen, J., Brenoe, J. & Svendsen, L.B. Lymphoscintigraphy using technetium-99m human serum albumin in chylothorax. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **50**, 250-252 (2002).
13. Qureshy, A. *et al.* Thoracic duct scintigraphy by orally administered I-123 BMIPP: normal findings and a case report. *Clin. Nucl. Med.* **26**, 847-855 (2001).
14. Nair, S.K., Petko, M. & Hayward, M.P. Aetiology and management of chylothorax in adults. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **32**, 362-369 (2007).
15. Frangioni, J.V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem Biol.* **7**, 626-634 (2003).
16. Troyan, S.L. *et al.* The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 2943-2952 (2009).
17. Matsui, A. *et al.* Quantitative assessment of perfusion and vascular compromise in perforator flaps using a near-infrared fluorescence-guided imaging system. *Plast. Reconstr. Surg.* **124**, 451-460 (2009).

18. Matsui, A. *et al.* Real-time intra-operative near-infrared fluorescence identification of the extrahepatic bile ducts using clinically available contrast agents. *Surgery* **148**, 87-95 (2010).
19. Ashitate, Y. *et al.* Real-time simultaneous near-infrared fluorescence imaging of bile duct and arterial anatomy. *J. Surg. Res.* **176**, 7-13 (2012).
20. Matsui, A. *et al.* Real-time, near-infrared, fluorescence-guided identification of the ureters using methylene blue. *Surgery* **148**, 78-86 (2010).
21. Unno, N. *et al.* Quantitative lymph imaging for assessment of lymph function using indocyanine green fluorescence lymphography. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **36**, 230-236 (2008).
22. Ohnishi, S. *et al.* Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping. *Mol. Imaging* **4**, 172-181 (2005).
23. Choi, H.S. *et al.* Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1300-1303 (2010).
24. Schacht, V., Luedemann, W., Abels, C. & Berens von Rautenfeld, D. Anatomy of the subcutaneous lymph vascular network of the human leg in relation to the great saphenous vein. *Anat. Rec. (Hoboken)* **292**, 87-93 (2009).
25. Enwiller, T.M., Radlinsky, M.G., Mason, D.E. & Roush, J.K. Popliteal and mesenteric lymph node injection with methylene blue for coloration of the thoracic duct in dogs. *Vet. Surg.* **32**, 359-364 (2003).
26. Gioux, S. *et al.* High-power, computer-controlled, light-emitting diode-based light sources for fluorescence imaging and image-guided surgery. *Mol. Imaging* **8**, 156-165 (2009).
27. Gioux, S., Choi, H.S. & Frangioni, J.V. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol. Imaging* **9**, 237-255 (2010).
28. Frangioni, J.V. *et al.* Sentinel lymph node mapping with type-II quantum dots. *Methods Mol. Biol.* **374**, 147-159 (2007).
29. Reuthebuch, O. *et al.* Novadaq SPY: intraoperative quality assessment in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest* **125**, 418-424 (2004).
30. Guermazi, A., Brice, P., Hennequin, C. & Sarfati, E. Lymphography: an old technique retains its usefulness. *Radiographics* **23**, 1541-1558; discussion 1559-60 (2003).