

悪性神経膠腫に対するインドシアニングリーン(ICG)を用いた 術中蛍光診断法の確立と治療法の開発

藤田医科大学 医学部 脳神経外科
准教授 武藤 淳

(共同研究者)

藤田医科大学 医学部 脳神経外科	講座教授 廣瀬 雄一
藤田医科大学 医学部 がん医療研究センター	教授 佐谷 秀行
大阪大学大学院 理学研究科	准教授 樺山 一哉

はじめに

脳腫瘍は腫瘍組織と正常脳組織との境界が不明瞭なことがしばしばある。悪性脳腫瘍は外科手術により可能な限り摘出し、化学療法、放射線療法を行うことにより、生命予後を延長することが示されている。摘出すればするほど生命予後（全生存期間）は延長するが、手術による正常部分の損傷で機能障害をきたす可能性が高くなる。患者の生命予後と機能予後の両者を高めるため、脳腫瘍と正常組織を術中に判別し得る新しい手技や技術の開発は急務である。

近年ジアグノグリーン®（Indocyanine green 以下ICG 第一三共株式会社）を使用した、脳腫瘍手術における術中蛍光造影の方法が報告された。⁽³⁾不明瞭な腫瘍の診断と摘出を補助する方法の一つに「術中蛍光診断 (photodynamic diagnosis ,PDD)」がある。腫瘍細胞に取り込まれた試薬を術中の近赤外線照射により励起して、蛍光発光する腫瘍組織を摘出する方法である。悪性脳腫瘍であるグリオーマに対しては5-アミノレブリン酸(5-aminolvalulinic acid, 5-ALA)が用いられるが、費用、管理、必要機器などの実用的問題がある。

脳神経外科領域では、脳血管手術中の血流観察方法としてICGを用いた術中蛍光診断が日常的に行われている。市中病院の脳神経外科で扱う疾患は圧倒的に血管障害と外傷疾患が多く、手術用顕微鏡には脳血流観察目的でICG用の蛍光装置が導入されている。ゆえに、ICG蛍光造影を脳腫瘍に使用することができれば汎用性が高く実用的である。

ICGは分子量775の水溶性色素でそれ自体は発光しないが、静脈投与すると生体内で血漿蛋白 (Beta-Lipoprotein) と結合し、近赤外線照射により励起され発光する⁽¹⁾。760nm-780nmの近赤外線を照射すると、血管内のICG試薬が励起され、800nm-850nmの波長の近赤外域蛍光を放出する。表面より約10mm深部の病変、血管、リンパ管など生体深部構造を励起、発光させ可視化が可能である。

上述した脳腫瘍に対する術中蛍光診断は、現在保険適用である1回 25mgの静注投与に対して、手術24時間前に5.0mg/kgを静脈注射投与し、腫瘍に残存するICGを近赤外線照射

下で観察する方法である。“Second Window ICG technique (SWIG)” と呼ばれ、腫瘍細胞の存在を術中に確認可能である⁽⁵⁾。ICGのsecond window効果は、EPR効果(Enhanced permeability and retention effect)を利用したもので、ガン特有の血管構造を利用した高分子のdrug delivery systemを応用したものである。そのメカニズムは、EPR効果により腫瘍による血管構造の破綻やリンパドレナージシステムの損傷などによって血管透過性が増大し、静脈投与24時間後のがん組織にICGが集積するというものである⁽⁵⁾。動物実験では、Madajewskiらが7.5mg/kgを手術24時間前に投与することで様々な悪性腫瘍に集積し、残存腫瘍を摘出できることをマウスの脇腹モデルで報告した。⁽⁴⁾ 肝臓癌、肺癌、頭頸部癌でも腫瘍の取り込みが報告されている。一方、脳腫瘍細胞のICG取込みに関する基礎研究はHuglandらによりラットと脳腫瘍患者で報告されている。⁽²⁾ しかし、脳腫瘍に関する報告はUniversity of PennsylvaniaのLeeらのチームからのみであり、再現性は未だ示されていない。またVisionsense社の外視鏡のみを使用した経験で、ごく一般的な顕微鏡による近赤外線照射使用の報告はされていない。また、報告はアメリカ人患者のdataであるために、日本人に至適な投与量、投与のタイミングなどの検討が必要である。正常脳組織と腫瘍組織をリアルタイムかつ肉眼的に識別可能な術中蛍光診断はより一層注目されており、安価かつ簡便で、確実に腫瘍細胞を標識する蛍光発光物質が求められている。本研究では、至適な投与量、観察時期を脳脊髄腫瘍型別に、特に悪性神経膠腫に対するprotocolを決定することを目的とした。

結 果

<対象方法>

脳脊髄腫瘍を対象に2019年11月より特定臨床研究として研究を行っている(jRCTs041190064)。藤田医科大学IRB (CRB4180003)と社会福祉法人 恩賜財団 済生会支部 済生会横浜市東部病院のIRBの承認(2020056)を得て研究を開始している。2023年8月までに240症例に行った。その中で、Dynamic Contrast Enhanced Perfusion MRI解析を行った100人を対象に解析を行った。詳細は、悪性神経膠腫29人、転移性脳腫瘍29人、下垂体腺腫16人、髄膜腫15人、頭蓋内神経鞘腫11人、の合計100人である。手術24時間前に5.0mg/kgを静脈注射投与し、腫瘍に残存するICGを近赤外線照射下で観察するSecond Window ICGテクニック(SWIG)で悪性神経膠腫15人、転移性脳腫瘍15人を行った。SWIGを改良し、観察1時間以上前に0.5–1.5mg/kgを投与するDelayed Window ICGテクニック(DWIG)を開発した。悪性神経膠腫14人、転移性脳腫瘍14人、下垂体腺腫16人、髄膜腫15人、頭蓋内神経鞘腫11人を行った。使用した近赤外線装置は、顕微鏡はKINEVO microscope (KINEVO 900, Carl Zeiss Meditec AG, Jena Germany) Iridium camera system (VisionSense, Philadelphia, Pennsylvania USA)、内視鏡はCLV-S200IR

(infrared light source) CH-S200-XZ-EA (3 CMOS camera head) (Olympus, Carl Zeiss Co., Ltd., Japan) を使用した。励起光には、805 nmの近赤外線光源を用い、カメラには、820–860 nmのフィルターを使用した。MRI検査は32チャンネルヘッドコイル付き3T MRI装置 (Vantage Titan 3T; キヤノンメディカルシステムズ株式会社) を用いて実施した。造影剤静脈内投与後、脳腫瘍全体をカバーする3D Fast Field Echo Quickシーケンスを用いて行った。造影剤ガドブトロール (Gadovist; Bayer, Osaka, Japan, 0.05mL/kg体重) は、駆動式自動注入器 (ソニックショットGX; ネモト, 日本) により1 mL/sの速度でボラス静注し、その後、生理食塩水30 mLを1 mL/sの速度でボラス静注した。

画像解析は、Image J (NIH Image, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。蛍光発光や造影MRIの輝度を測定は、region of interest (ROI) を5箇所設定し、輝度の測定値の平均値を使用した。蛍光発光値は相対値である、正常脳の発光値を基準として、腫瘍の発光値をSignal to Background Ratio (SBR) と定義した。またMRIもガドリニウム (Gd) 造影にて、正常脳白質の値を基準として、Gd造影の輝度値をRatio of Gadolinium-enhanced T1 Tumor Signal to Normal Brain (T1BR) と定義して、解析を行った。

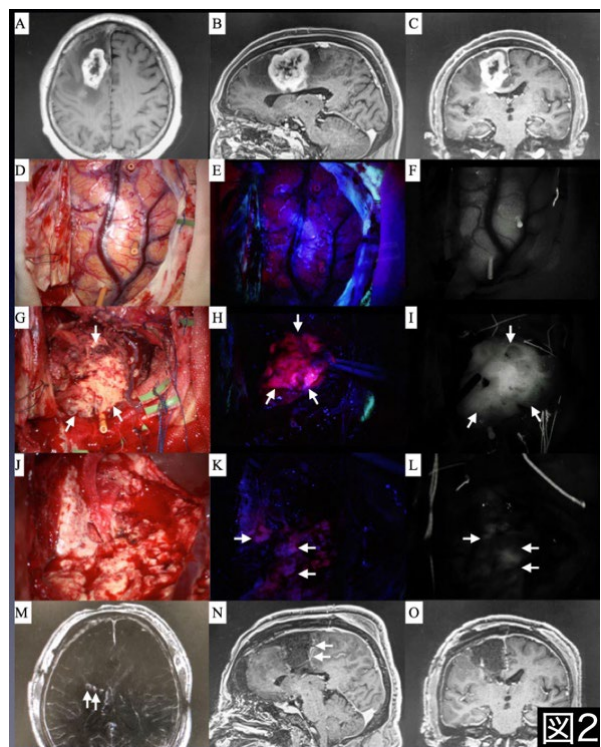
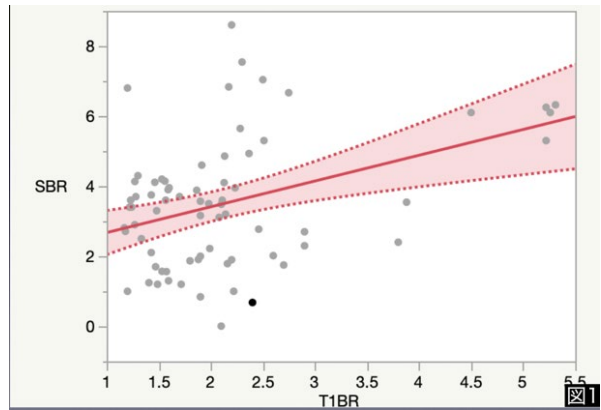
また、Toftsらによって導入された薬物動態モデルを用いて、血管内から血管外への体積移動定数Ktrans (/min)、血管外から血管内へのKep (=Ktrans/Ve) (/min)、血管外細胞外空間の容積Ve (mL/100mL of tissue) および分画血漿量Vp (mL/100mL of tissue) を算出できる。Toftsら 拡張モデル⁽⁶⁾ で提案された2コンパートメント薬物動態モデルは、血管と組織を独立したコンパートメントと見なすことを主張している。この2コンパートメントモデルに基づき、造影剤の組織移行速度定数 (Ktrans)、血管外の細胞外空間の体積比 (Ve)、血管内成分の体積比 (Vp) をパラメータとして、目的部位と参照部位での造影剤濃度の関係から各パラメータを算出した。このDCE perfusion-MRIの2コンパートメント薬物動態モデルに基づいて、perfusion analysis法を用いて、Permeability parameter⁽⁷⁾ を算出することにした。

統計解析はJMP 14.1.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。一変量解析はカテゴリカル変数の比較にはカイ二乗またはフィッシャーの正確検定を、連続変数にはunpaired t検定またはMann-Whitney順位和検定および単回帰分析を適用した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

<結果>

転移性脳腫瘍はSWIGで正常脳実質よりも 3.5 ± 1.5 倍の蛍光であった。一方、DWIGでは 3.3 ± 2.0 倍の蛍光であり、有意差は示せなかった。 $(P=0.13)$ また、悪性神経膠腫では、SWIGでは 2.7 ± 1.5 倍の蛍光であった一方、DWIGでは 4.0 ± 1.7 倍の蛍光で、有意差は示せなかった。 $(P=0.84)$ DWIGで行った、髄膜腫 3.3 ± 2.6 倍、神経鞘腫 4.1 ± 0.9 倍と腫瘍蛍光発光効果を確認した。さらには、100例の腫瘍の蛍光発光SBRは、 3.5 ± 1.8 、MRI T1強調画像のガドリニウム増強腫瘍信号比T1BRは 2.0 ± 1.0 にて比例関係にあることが示された。

(図1) ($P=0.0009$) つまりMRIのガドリニウムの造影強度によりICGの蛍光発光が予想可能であることが示された。具体的として悪性神経膠腫の症例を示す。(図2)術前の造影MRIで右前頭葉にring-enhancedを示す腫瘍を認めた。後端は一次運動野に接していた。(図A) 水平断、B) 矢状断、C) 冠状断)。硬膜を翻転すると、腫瘍は脳表に露出されておらず、正常の脳表が確認できた。(図D) 画像上、腫瘍は、脳表より5mm以深にあるため、5 ALAにてうっすらと脳内の腫瘍を確認でき(図E)、ICGにははっきり蛍光を確認できた。(図F) ICGの820nmの波長は、水やヘモグロビンの波長とずれており、干渉されないため、正常脳や脊髄を透過するという特徴がある。腫瘍を摘出中に、明視野では、(図G)、5 ALAと、(図H白矢印) ICGでも(図I白矢印) 蛍光発光をしっかりと確認できた。腫瘍摘出後に、肉眼的には全摘出をできたように見えたが、(図J) 蛍光で確認すると5 ALAではわずかに発光が見られた。(図K) 腫瘍は脳室周囲まで浸潤しており、摘出により側脳室が開放されている。脳室周囲壁も5 ALAで蛍光発光するために、脳室壁からの発光か、残存腫瘍の発光か分別がつかない。ICGでの蛍光発光を確認しわずかに残存が見られた。(図L) しかし、神経刺激で、運動線維の反応が出たために、これ以上の摘出は、麻痺の悪化を来すために、ここで摘出を終了した。術後MRIにて後端部に一部造影領域を認め、腫瘍の残存を確認した。(図M) 水平断(白矢印)、N) 矢状断(白矢印)、O) 冠状断)



考 察

Dynamic Contrast Enhanced Perfusion MRI解析によって、いくつかのパラメーターを解析したところ、permeabilityを示すKtransとの相関関係が、SBRとKtrans ($P=0.03$) (図3)、T1BRとKtrans ($P=0.012$) (図4)で示された。つまり、ICGが貯留する機構として、脳血管門の透過性 (Permeability) は、MRIのGd増強、ICGの保持、近赤外線による腫瘍

蛍光に寄与する可能性を示した。

要 約

<目的>

インドシアニングリーン (ICG) による脳脊髄腫瘍に対する術中蛍光診断法のプロトコルをそれぞれの病理型に応じて確立した。

<方法>

手術24時間前に5.0mg/kgを静脈注射投与し、腫瘍に残存するICGを近赤線照射下で観察するSecond Window ICGテクニック (SWIG) で悪性神経膠腫15人、転移性脳腫瘍15人を行った。SWIGを改良し、観察1時間以上前に0.5–1.5mg/kgを投与するDelayed Window ICGテクニック (DWIG)

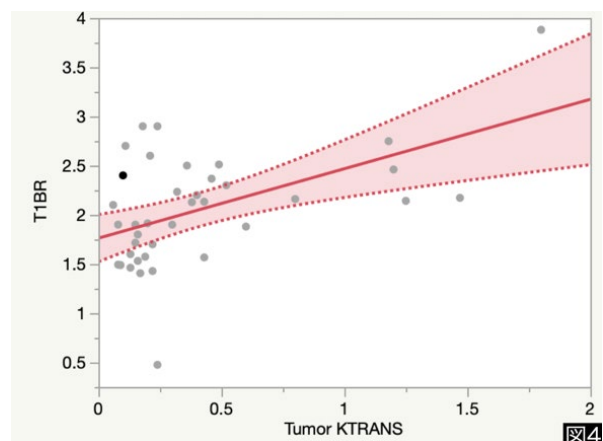
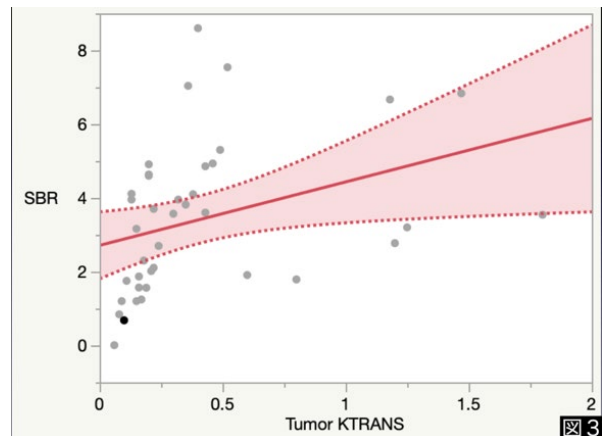
に開発した。悪性神経膠腫14人、転移性脳腫瘍14人、下垂体腺腫16人、髄膜腫15人、頭蓋内神経鞘腫11人を行った。前述したSBRとT1BRを定義して解析を行った。

<結果>

転移性脳腫瘍と悪性神経膠腫にておいてSWIGとDWIGで有意差は示されなかった。つまり、改良した簡便な観察1時間前に0.5-1.5mg/kg投与するDWIGが、手術24時間前に5.0mg/kgの大量投与する方法に蛍光値に差がないことが示され、DWIGで十分であることが示された。また、MRIのガドリニウム の造影強度によりICGの蛍光発光が予想可能であることが示され、MRIでガドリニウムで造影される脳脊髄腫瘍では、ICG術中蛍光造影が有用である可能性が示された。さらに、Dynamic Contrast Enhanced Perfusion MRI解析によって、ICGが貯留する機構として、脳血管門の透過性(Permeability)は、MRIのGd増強、ICGの保持、近赤外線による腫瘍蛍光に寄与する可能性を示した。

<結論>

腫瘍型に応じたICG術中蛍光造影法を、転移性脳腫瘍、悪性神経膠腫、髄膜腫、神経鞘腫、下垂体腺腫などについて確立した。ICGが脳脊髄腫瘍に貯留する原因として、permeabilityが寄与している可能性が示唆された。



謝 辞

本研究にご支援を賜りました公益財団法人大和証券ヘルス財団には、心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大なるご指導、ご支援をいただきました独立行政法人国立病院機構 東京医療センター脳神経外科 峯裕先生、藤田医科大学 脳神経外科 安達一英先生、大場茂生先生、井上辰志先生、上甲眞宏先生、西山悠也先生、藤田医科大学 岡崎医療センター脳神経外科 早川基治先生、放射線診断科 村山和宏先生、病理診断科 山田勢至先生、FNP 齋藤史明様に心より感謝申し上げます。

文 献

1. Benson RC, Kues HA (1978) Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys Med Biol* 23:159-163
2. Haglund MM, Hochman DW, Spence AM, Berger MS (1994) Enhanced optical imaging of rat gliomas and tumor margins. *Neurosurgery* 35:930-940; discussion 940-931
3. Lee JYK, Thawani JP, Pierce J, Zeh R, Martinez-Lage M, Chanin M, Venegas O, Nims S, Learned K, Keating J, Singhal S (2016) Intraoperative Near-Infrared Optical Imaging Can Localize Gadolinium-Enhancing Gliomas During Surgery. *Neurosurgery* 79:856-871
4. Madajewski B, Judy BF, Mouchli A, Kapoor V, Holt D, Wang MD, Nie S, Singhal S (2012) Intraoperative near-infrared imaging of surgical wounds after tumor resections can detect residual disease. *Clin Cancer Res* 18:5741-5751
5. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65:271-284
6. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp MV, Larsson HB, Lee TY, Mayr NA, Parker GJ, Port RE, Taylor J, Weisskoff RM (1999) Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T (1) -weighted MRI of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols. *J Magn Reson Imaging* 10:223-232
7. Tofts PS, Kermode AG (1991) Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med* 17:357-367