総 説

REVIEW ARTICLE

ICG-Lipo の化学的・生物学的特性

菅波 晃子¹, 豊田 太郎^{1,2}, 岡崎 茂俊³, 林 秀樹⁴,
岡本 芳晴⁵, 田村 裕¹

¹ 千葉大学大学院 医学研究院 生命情報科学

² 東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 相関基礎科学系

³ 浜松医科大学 メディカルフォトンクス研究センター

⁴ 千葉大学 フロンティア医工学センター

⁵ 鳥取大学 農学部共同獣医学科 臨床獣医学

(平成 26 年 3 月 3 日受理, 平成 26 年 4 月 25 日掲載決定)

Chemical and Biological Properties of ICG-Lipo

Akiko Suganami¹, Taro Toyota^{1,2}, Shigetoshi Okazaki³, Hideki Hayashi⁴,
Yoshiharu Okamoto⁵, Yutaka Tamura¹

¹Department Bioinformatics, Graduate School of Medicine, Chiba University

²Department of Basic Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

³Medical Photonics Research Center, Hamamatsu University School of Medicine

⁴Center for Frontier Medical Engineering

⁵Department of Veterinary Clinical Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University

(Received March 3, 2014, Accepted April 25, 2014)

要 旨

ICG-Lipo は、インドシアニンググリーン (ICG) の基本骨格にアルキル鎖またはリン脂質を修飾した ICG 誘導体を脂質二重膜に組み込んだリポソーム製剤であり、ICG が有する近赤外蛍光特性によるセンチネルリンパ節の非侵襲性同定法と光吸収特性による腫瘍組織の光線力学温熱療法を可能にするものである。本稿では、生体外部からの光のアプローチを切り替えることで、非侵襲的な同定と治療を可能にする新規リポソーム製剤に関して解説する。

キーワード：インドシアニンググリーン, 非侵襲性, 生体イメージング, 光線力学温熱療法

Abstract

We have designed and synthesized a novel near-infrared (NIR) photoactivating probe, designated by ICG-Lipo, in which an indocyanine green (ICG) fluorophore is covalently tagged with alkyl chains or a phospholipid moiety to incorporate into liposome bilayers. Our results indicate that ICG-Lipo is a useful NIR-fluorescence probe for noninvasive *in vivo* bioimaging, especially for the sentinel lymph node and for photodynamic thermal therapy.

Key words : ICG, liposome, noninvasive, bioimaging, photodynamic thermal therapy

1. 緒言

インドシアニングリーン (ICG) は、暗緑青色の水溶性化合物であり、生体内に於いて、血漿タンパク質と速やかに結合した後、肝実質細胞に取り込まれ胆汁に排泄される。

現在、ICG が有する近赤外蛍光特性 (波長 770 nm での励起、波長 840 nm での検出) を利用した悪性黒色腫や乳癌等のセンチネルリンパ節同定用薬と光吸収特性 (波長 800 nm での吸収) を利用した肝・循環機能検査薬が、診断に利用されている。

特に、ICG が有する近赤外蛍光特性の波長領域が、ヘモグロビンと水の吸収が弱いために生体組織に深く浸透する「生体の窓」とも呼ばれる 600 ~ 950 nm の波長領域に含まれていることから、生体医用光学の分野に於いて、パルスオキシメータや光干渉断層画像などの非侵襲性生体診断に関する研究開発が盛んに行われている。

我々は、これまでに、ICG が有する近赤外蛍光特性によるセンチネルリンパ節の非侵襲性同定法と光吸収特性による腫瘍組織の光線力学温熱療法を可能にするリポソーム製剤として、ICG の基本骨格にアルキル鎖またはリン脂質を修飾した ICG 誘導体を脂質二重膜に組み込んだ ICG-Lipo を開発すると共に、ICG-Lipo を近赤外線診断治療装置と併用することによって、非侵襲性医療システムとしての非侵襲性同定法ならび光線力学温熱療法を構築してきた (Fig.1)。

現在、鳥取大学農学部共同獣医学科・岡本芳晴教授を中心として、獣医領域に於ける ICG-Lipo と近赤外線診断治療装置を併用した非侵襲性医療システムに関する臨床試験を平成 25 年 9 月より実施しており、ICG-Lipo による薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) を用いた診断法・治療法の開発に取り組むと共に、医薬品ならび医療機器承認に向けての取り組みを行っている。

2. 目的

我々は、患者 (ヒト、コンパニオンアニマル等) に安全・安心な医療技術として、ナノテクノロジーによる高機能性材料と光技術による医療機器の開発を通して非侵襲性医療システムの構築を目指している。

具体的には、ICG の基本骨格にアルキル鎖またはリン脂質を修飾した ICG 誘導体を脂質二重膜に組み込んだリポソーム製剤として ICG-Lipo を開発すると共に、ICG-Lipo による DDS と近赤外線診断治療装置を併用することにより、乳癌の早期発見を可能にする非侵襲性同定法、外科手術が不可能な症例に対する非侵襲性治療法、末期がん患者に対する質の高い緩和医療の創出に取り組んでいる。

既に、医薬品としての ICG-Lipo に DDS と、医療機器としての近赤外線診断治療装置を併用した非侵襲性医療システムとして、非侵襲性同定法ならび光線力学温熱療法を構築した (Fig.1)。コンパニオンアニマルを対象とした獣医領域での診断・治療を実施し、本システムの有効性を検討中であり、ヒトの医学領域へのトランスレーショナル・リサーチとして非侵襲性医療システムの構築に貢献したいと考えている。

Fig.1 The use of ICG-Lipo as an optical imager and an optical sensitizer for Photo Dynamic Therapy (PDT) and Photo Thermal Therapy (PTT). NIR: Near Infrared Fluorescence. (Ref. 2: Bioorg Med Chem Lett. 2012 Dec 15;22(24):7481-5.)

3. 対象と方法

3.1 ICG 誘導体の合成法

ICG 誘導体は、ICG を基本骨格として、炭素数の異なるアルキル鎖を修飾した ICG-Cn ($n = 4, 6, 8, 10, 18$) と、リン脂質を修飾した ICG-DOPE (DOPE: 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) を化学合成した (Fig.2)。化学合成に関する詳細は、文献 1, 2 を参照されたい。

3.2 ICG 誘導体の物性評価

ICG 誘導体が有する蛍光特性は、蛍光光度分光計 (FP-6600; JASCO, Japan) によって測定した。

3.3 ICG-Lipo の調整法

ICG-Lipo は、主成分の DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、副成分の PEG (Polyethylene glycol) 結合リン脂質・コレステロールにより構成されるリポソーム膜に ICG 誘導体である ICG-Cn を組み込んだ ICG-Cn-Lipo と ICG-DOPE を組み込んだ ICG-DOPE-Lipo を構築した。

ICG-Lipo の粒子径は、センチネルリンパ節同定用が 200 nm 以上、EPR 効果による腫瘍組織特異的集積・繫留用が 100 ~ 200 nm になるように、LiposoFast-Stabilizer (Avestin Inc., Ottawa, Canada) によって調整した。

3.4 ICG-Lipo の化学的特性の評価

ICG-Lipo の吸光スペクトルと蛍光スペクトルは、紫外・可視吸光光度計 (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) と蛍光光度分光計 (FP-6600; JASCO, Japan) により、それぞれ測定した。

ICG-Lipo の粒子径・安定性は、動的光散乱型粒度分布計 (UPA-UT151; NIKKISO, Tokyo, Japan) によって評価した。

3.5 ICG-Lipo の生物学的特性の評価

ICG-Lipo のセンチネルリンパ節への集積と繫留は、雌マウス (KSN) のフットパットへ投与後の鼠径部リンパ節を、また、EPR 効果による腫瘍組織への特異的集積と繫留に関しては、雌マウス (BALB/c Slc (nu/nu)) の静脈内へ投与後の腫瘍組織を Noninvasive Fluorescence Imaging System (IVIS Lumina II; Caliper, MA, USA), an In-Vivo MS FX PRO imaging system (Carestream Health, New York, USA) により、それぞれ測定した。

ICG-Lipo の毒性評価は、雄ラット (CrI:CD(SD)) を用い

での単回投与毒性試験（経口投与および静脈内投与）によって評価した。

4. 結果

4.1 ICG-Lipo の化学的特性

4.1.1 ICG 誘導体と ICG-Lipo の構造

ICG 誘導体は、ICG の基本骨格にアルキル鎖またはリン脂質を修飾することにより、リポソームの膜部分と疎水性相互作用による親和性を有するように分子設計した。

したがって、Fig.1 に示すように、ICG 誘導体は、アルキル鎖またはリン脂質の部分を通して、リポソームを構成する脂質二重層の外膜と内膜に組み込まれることによって、ICG-Lipo を形成していると推測される^{1,2)}。

リポソームを構成する主成分である DOPC と ICG 誘導体との親和性を検討したところ、ICG-Cn は、最大で約 5 mol% ICG-Cn (ICG-Cn/DOPC molar ratio of 0.05) であった。一方、ICG-DOPE は、最大で約 25 mol% ICG-DOPE (ICG-DOPE/DOPC molar ratio of 0.25) であった。

この結果より、ICG-DOPE をリポソーム膜に組み込んだ ICG-DOPE-Lipo は、ICG-Cn をリポソーム膜に組み込んだ ICG-Cn-Lipo と比較して、約 5 倍量の ICG 骨格（近赤外蛍光特性や光吸収特性を有する）をリポソームに担持することが可能であると推測される。

4.1.2 ICG-Lipo の吸光度・蛍光強度

アルキル鎖長が異なる ICG 誘導体 (ICG-Cn : n = 4, 6,

Fig.2 Synthesis of ICG-Cn (n=4, 6, 8, 10, 18) and ICG-DOPE (DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). (i) 1,4-butane sultone, (ii) glutacon-aldehyde dianil hydrogen chloride salt, (iii) $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{I}$ (n=4, 6, 8, 10, 18), 2-butanone, (iv) 3-bromo-1-propionic acid, MeCN, (v) pyridine, (vi) NHS, DCC, CHCl_3 , MeCN, and (vii) 1,2-dioleoyl-3-glycero-sn-phosphoethanolamine, Et_3N , CHCl_3 . (Ref. 1: Bioorg Med Chem. 2014 Jan 15;22(2):721-7., Ref. 2: Bioorg Med Chem Lett. 2012 Dec 15;22(24):7481-5.)

8, 10, 18) を含有する ICG-Lipo の蛍光強度を比較したところ, Fig.3 に示すように, アルキル鎖が長くなるほど蛍光強度が増加した¹⁾.

Fig.3 Emission spectra of liposome dispersion including ICG-Cn. (Ref. 1: Bioorg Med Chem. 2014 Jan 15;22(2):721-7.)

また, ICG-Lipo の蛍光特性を, ICG 水溶液 (単に, ICG を生理食塩水に溶解したもの) や LP-ICG (ICG をリポソームに埋包したもの) と比較したところ, ICG-Lipo は, ICG 水溶液や LP-ICG よりも吸光度 (Fig.4(a)) および蛍光強度 (Fig.4(b),(c)) に於いて優れた特性を有していることが判明した¹⁾.

これらの結果を踏まえて, センチネルリンパ節特異的集積性・繫留性に関しては, ICG-C18-Lipo を用いて, その化学的・生物学的特性を検討することとした.

また, 腫瘍組織特異的集積性・繫留性に関しては, 光線力学温熱療法効果を考慮し, 効率的に ICG 骨格を腫瘍組織に集積させることが可能な ICG-DOPE-Lipo を用いることとした.

4.1.3 ICG-Lipo の形状と安定性

ICG 誘導体として, ICG-C18 と ICG-DOPE が有するリポソーム膜への親和性を評価したところ, 双方ともほぼ全量が, リポソームに取り込まれていることが判明した^{1,2)}.

次に, センチネルリンパ節同定用に, ICG-C18-Lipo を, 孔径 400 nm のポリカーボネート・フィルターで調整したところ, 平均粒子径が約 235 nm であり, リンパ節への繫留に適した大きさ (約 200 nm 以上) であった¹⁾.

Fig.4 (a) Absorbance spectra and (b) fluorescence emission spectra of ICG solution (blue), LP-ICG (red), and ICG-C18-Lipo (black) respectively. The wavelength of excitation is 771 nm for ICG solution and 773 nm for both LP-ICG and ICG-C18-Lipo. (c) Histogram of average number of photons of ICG solution (blue), LP-ICG (red), and ICG-C18-Lipo (gray) detected by the Noninvasive Fluorescence Imaging system (each NIR-fluorescence image is also shown). (Ref. 1: Bioorg Med Chem. 2014 Jan 15;22(2):721-7.)

Fig.5 (a) Time course of NIR-fluorescence images of mice in which a footpad was injected with 10 μ L of ICG-C18-Lipo. White arrows indicate detection of the NIR-fluorescent spot at the location of the popliteal lymph node. (b) Reference experiment data using ICG aqueous solution and LP-ICG. Not only the popliteal lymph node but also the liver fluoresces after 30 min, and the intensity was maintained over 1h. The enlarged views for the popliteal lymph node of each mouse were attached below the corresponding NIR-fluorescence images. (Ref. 1: Bioorg Med Chem. 2014 Jan 15;22(2):721-7.)

一方、腫瘍組織同定用に、ICG-DOPE-Lipo を、孔径 100 nm のポリカーボネート・フィルターで調整したところ、平均粒子径が約 150 nm であり、EPR 効果による腫瘍組織への特異的な集積・繫留に適した大きさの範囲 (20 ~ 200 nm) であった。

さらに、ICG-DOPE-Lipo の安定性を評価するため、37 度でインキュベートしたところ、1 週間経過しても、ICG-DOPE-Lipo の粒子形状に変化は見られなかった²⁾。

4.2 ICG-Lipo の生物学的特性

4.2.1 ICG-Lipo のセンチネルリンパ節特異的な集積性・繫留性

ICG-Lipo のセンチネルリンパ節特異的な集積性と繫留性に関する評価は、ICG-C18-Lipo を用いて検討したところ、Fig.5 に示すように、フットパットへの投与後、約 45 分でセンチネルリンパ節 (解剖学的に外部から位置を推定) に到達することが観察された。

その後、肝臓 (解剖学的に外部から位置を推定) や他の臓器・部位からの蛍光が観察されなかったことより、ICG-C18-Lipo は、センチネルリンパ節へ特異的に集積・繫留しているものと思われる。

一方、ICG 水溶液と LP-ICG を投与した場合は、双方

とも、センチネルリンパ節と共に肝臓に取り込まれていることが観察された¹⁾。

これらの結果は、ICG (約 2 nm) が、リンパ節 (繫留に適した大きさ約 200 nm 以上) を経由して肝臓に到達したものである。

ちなみに、LP-ICG を生体に投与した際は、リボソーム製剤に埋包した ICG が、生体内圧により漏出し、リンパ節を経由して肝臓に到達したものと推測している。

4.2.2 ICG-Lipo の腫瘍組織特異的な集積性・繫留性

ICG-Lipo の腫瘍組織特異的な集積性と繫留性に関する評価を、ICG-DOPE-Lipo を用いて検討したところ、Fig.6 に示すように、腫瘍組織に特異的に集積し、その後、約 3 週間に渡って繫留していることが判明した²⁾。

ICG-Lipo による腫瘍への壊死誘導等に関しては、次項「岡本芳晴：深部腫瘍部に対するインドシアニンググリーン修飾リボソーム (ICG-Lipo) と光を用いた治療成績」において、獣医領域における非侵襲性医療システムによる非侵襲性同定法ならび光線力学温熱療法に関する臨床試験の結果が報告されているので参照されたい。

Fig.6 Time-lapse NIR fluorescence images of mice bearing A549 tumors. (a) 24, (b) 48, and (c) 144 h after intravenous injections of ICG-DOPE-Lipo. Scale bar presents an intensity of fluorescence. (Ref. 2: Bioorg Med Chem Lett. 2012 Dec 15;22(24):7481-5.)

4.2.3 ICG-Lipo の毒性・副作用

ICG-Lipo の毒性・副作用に関する評価を、ICG-C18-Lipo を用いて検討したところ、経口投与群では、Table 1 に示すように、投与後 15 日間の観察期間中、死亡例は認められず、一般状態及び、病理解剖学検査における異常も認められなかった。投与後 2・4 日目に、2000 mg/kg 群の体重が対照群と比較して低かったが、投与後 8 日以降は差がなかった¹⁾。

一方、静脈内投与群でも、Table 2 に示すように、投与後 15 日間の観察期間中、死亡例は認められず、一般状態及び、病理解剖学検査における異常も認められなかった¹⁾。

以上の結果より、ICG-Lipo には、毒性・副作用に関して留意すべき点は無いものと判断した。

5. 考察

ICG を用いた光線力学温熱療法に関しては、鳥取大学

Table1 Single-dose toxicity assay (weight of rats, N=5) by the oral administration of ICG-C18-Lipo. (Ref. 1: Bioorg Med Chem. 2014 Jan 15;22(2):721-7.)

Dose (mg/kg)	0	500	1000	2000
Day 1	202 ± 5	199 ± 5	201 ± 5	201 ± 6
Day 2	235 ± 5	227 ± 5	224 ± 8	214 ± 11 *
Day 4	260 ± 9	248 ± 8	246 ± 10	229 ± 14 *
Day 8	292 ± 12	283 ± 9	287 ± 15	275 ± 12
Day 11	312 ± 12	301 ± 11	307 ± 19	300 ± 14
Day 15	344 ± 17	329 ± 15	337 ± 25	334 ± 18

Values are mean ± S.D.,

Significantly different from control : * P ≤ 0.01

Table2 Single-dose toxicity assay (weight of rats, N=5) by the intravenous administration of ICG-C18-Lipo. (Ref. 1: Bioorg Med Chem. 2014 Jan 15;22(2):721-7.)

Dose (mg/kg)	0	0.5	5	50
Day 1	231 ± 11	233 ± 9	231 ± 11	232 ± 13
Day 2	239 ± 10	239 ± 11	238 ± 13	239 ± 15
Day 4	253 ± 12	252 ± 12	253 ± 14	251 ± 20
Day 8	291 ± 19	284 ± 18	288 ± 19	281 ± 31
Day 11	308 ± 19	301 ± 21	305 ± 23	297 ± 38
Day 15	340 ± 25	329 ± 26	331 ± 25	326 ± 46

Values are mean ± S.D.

農学部共同獣医学科・岡本芳晴教授らによる先駆的な試みがなされている^{3,4)}。

しかしながら、ICG は、生体内に投与後、血漿タンパク質と速やかに結合し、肝実質細胞に取り込まれて胆汁に排泄されてしまうため、センチネルリンパ節や腫瘍組織を長時間に渡って同定することが困難である。

そこで、我々は、ICG の血中半減期を改善すると共に、センチネルリンパ節や腫瘍組織への特異的集積と繫留を可能とするリポソーム製剤 (ICG-Lipo) を開発すると共に、ICG-Lipo が有する化学的・生物学的特性の検討を行った。

まず、ICG の基本骨格にアルキル鎖またはリン脂質の修飾を施すことにより、リポソームの脂質二重膜との親和性を有する ICG 誘導体 (ICG-Cn と ICG-DOPE) を分子設計・化学合成した。

次に、ICG-Cn を脂質二重膜に組み込むことによって構築した ICG-Cn-Lipo は、センチネルリンパ節特異的集積性・繫留性を有するようにリポソームの粒子径を約 235 nm に調整した。

一方、ICG-DOPE を脂質二重膜に組み込むことによって構築した ICG-DOPE-Lipo は、腫瘍組織特異的集積性・繫留性を有するようにリポソームの粒子径を約 150 nm に調整した。

このように、ICG-Lipo は、診断や治療の用途に応じて粒子径を調整することが可能であった。

さらに、ICG-Lipo は、生体への投与に際して、毒性や副作用などは認められなかった。

我々は、これらの結果をもとに、ICG-Lipo による DDS と近赤外線診断治療装置を併用した診断・治療について、コンパニオンアニマルを対象とした獣医領域で、現在、その有効性を実証する実験を行っている。

6. 結論

我が国に於ける非侵襲性医療では、温熱療法機器として国産製「サーモトロン-RF8」(電磁波により患部を加温する方式)と米国製「RHD7500」(遠赤外線により全身を加温する方式)等が稼働している。また、「生体の窓」を考慮したパルスオキシメータや光干渉断層画像などの非侵襲性生体診断に関する研究開発が盛んに行われている。

今回、我々は、医薬品である ICG-Lipo と、医療機器である近赤外線診断治療装置を併用することにより、生体外部からの光のアプローチを切り替えることで、非侵襲性同定法ならび光線力学温熱療法の双方の施術を可能とする非侵襲性医療システムを構築した。

今後、さらに研究開発を推進することにより、患者に安全・安心な医療技術として、ナノテクノロジーを応用した非侵襲性医療システムによる治療法へと発展させたいと考えている。

利益相反の開示

利益相反なし。

参考文献

- 1) T. Toyota, H. Fujito, A. Suganami, T. Ouchi, A. Ooishi, A. Aoki, K. Onoue, Y. Muraki, T. Madono, M. Fujinami, Y. Tamura, H. Hayashi: Near-infrared-fluorescence imaging of lymph nodes by using liposomally formulated indocyanine green derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 22: 721-727, 2014.
- 2) A. Suganami, T. Toyota, S. Okazaki, K. Saito, K. Miyamoto, Y. Akutsu, H. Kawahira, A. Aoki, Y. Muraki, T. Madono, H. Hayashi, H. Matsubara, T. Omatsu, H. Shirasawa, Y. Tamura: Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22: 7481-7485, 2012.
- 3) R. Radzi, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, S. Minami, Y. Okamoto: Morphological study in B16F10 murine melanoma cells after photodynamic hyperthermal therapy with indocyanine green (ICG). *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 465-472, 2012.
- 4) R. Radzi, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, S. Minami, Y. Nakayama, Y. Okamoto: Photodynamic hyperthermal therapy with indocyanine green (ICG) induces apoptosis and cell cycle arrest in B16F10 murine melanoma cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 545-551, 2012.

著者紹介

菅波 晃子 (Akiko Suganami)

千葉大学大学院医学研究院・特任助教

豊田 太郎 (Taro Toyota)

東京大学大学院総合文化研究科・准教授, 千葉大学・客員准教授, 科学技術振興機構・さきがけ研究員

岡崎 茂俊 (Shigetoshi Okazaki)

浜松医科大学メディカルフォトリクス研究センター・特任教授

林 秀樹 (Hideki Hayashi)

千葉大学フロンティア医工学センター・教授

岡本 芳晴 (Yoshiharu Okamoto)

鳥取大学農学部共同獣医学科・教授

田村 裕 (Yutaka Tamura)

千葉大学大学院医学研究院・准教授