

筑波大学

博士(医学)学位論文

関節リウマチモデルマウスにおける
インドシアニンググリーン内包ナノ粒子(ICG ラクトソーム)
を用いた近赤外蛍光イメージング

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

大 西 信 三

目次

第 1 章 研究の背景

- 1-1 関節リウマチの特徴・・・・・・・・・・・・・・・・・・ p.5
- 1-2 関節リウマチの画像診断・・・・・・・・・・・・・・・・ p.5
- 1-3 近赤外蛍光イメージングとインドシアニンググリーン・・・・・・・・ p.6
- 1-4 インドシアニンググリーン内包ナノ粒子 (ICG ラクトソーム) ・・・・ p.7

第 2 章 研究の仮説と目的

- 2-1 仮説・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ p.9
- 2-2 目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ p.9

第 3 章 対象

- 3-1 実験動物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ p.10
- 3-2 使用機器と材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ p.11

第 4 章 RA モデルマウスにおける近赤外蛍光イメージング (実験 1)

4-1 方法

- 1) 関節炎スコアによる肉眼的評価・・・・・・・・・・・・・・・・ p.13
- 2) 関節炎の病理学的評価・・・・・・・・・・・・・・・・ p.14
- 3) IVIS Spectrum による画像撮影・・・・・・・・・・・・・・・・ p.14
- 4) 蛍光強度比の算出・・・・・・・・・・・・・・・・ p.14
- 5) 蛍光強度比の統計学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・ p.15
- 6) 組織連続切除による蛍光部位の特定・・・・・・・・ p.15

4-2 結果

- 1) 関節炎スコア・・・・・・・・・・・・・・・・ p.16
- 2) 病理組織学的評価・・・・・・・・・・・・・・・・ p.16
- 3) IVIS Spectrum による画像・・・・・・・・・・・・・・・・ p.17
- 4) 蛍光強度比と統計学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・ p.17
- 5) 組織連続切除による蛍光部位の特定・・・・・・・・ p.18

4-3 考察

- 1) 先行研究と研究の新規性・・・・・・・・・・・・・・・・ p.19
- 2) 関節炎スコア・病理組織学的評価・・・・・・・・ p.20
- 3) IVIS Spectrum 画像・蛍光強度比・・・・・・・・ p.20

4) 蛍光部位の特定 p.21

5) ICG 単独のイメージングとの比較 p.22

第 5 章 ICG ラクトソームを用いた早期関節炎の検出 (実験 2)

5-1 方法

1) IVIS Spectrum による画像評価 p.23

2) 蛍光強度比の算出と統計学的解析 p.23

3) 蛍光強度比と病理学的評価 p.23

5-2 結果

1) 関節炎スコアの算出 p.24

2) IVIS Spectrum による画像 p.24

3) 蛍光強度比と統計学的解析 p.25

4) 病理組織学的評価：滑膜炎スコア p.25

5-3 考察 p.27

第 6 章 本研究の限界と今後の展望 p.29

第 7 章 結論 p.32

第 8 章 図表 ····· p.33

引用文献 ····· p.56

謝辞 ····· p.62

第 1 章 研究の背景

1-1 関節リウマチの特徴

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) は慢性、進行性の全身性自己免疫疾患で、関節滑膜組織の炎症が骨・軟骨の破壊、変形を引き起こし、QOL (Quality of Life) を低下させる[1][2]。

罹患患者は北米・北欧人口の 0.5 - 1.0 %、日本においては有病率 0.3 %、発生率 0.04 - 0.09 %とされ、女性の罹患は男性の 3 倍ほどであり[3]、その発症年齢は 20 - 60 歳と活動性の高い時期である。発症から 2 年の間に関節破壊がみられるとされ[4][5]、早期の診断・治療によりこれを防ぐことが、長期的な予後を改善するために重要である[6]-[9]。

1-2 関節リウマチの画像診断

RA の診断に関して感度・特異度ともに十分といえるものはなく[10]、採血検査における RF や抗 CCP 抗体等のマーカー、手のこわばりや関節の腫脹・疼痛といった臨床症状の評価に加えて画像検査が行われる。現在さまざまな画像検査が診断補助や疾患活動性の評価を目的として行われており、単純 X 線写真、超音波検査、CT、MRI、PET、SPECT 等が挙げられる。

単純 X 線写真は簡便であり、広く利用されているが、変形の所見がみられた際にはすでに病期が進行しており、初期の骨びらんや滑膜炎をとらえることは困難である[11][12]。超音波検査は初期滑膜炎を検出可能であるが、検者の技量によるところが大きい。MRI は超音波検査よりも早期関節炎発見に優れるとされ [13][14]、PET・SPECT は放射性標識を介して骨代謝および滑膜の増生を明らかにすることができる[15][16]。しかしこれらの画像検査には、造影剤・放射性医薬品による副作用、費用、検査に必要な時間、専門医による検査・読影の必要性、多関節の同時検査が困難、といった欠点が存在する。

1-3 近赤外蛍光イメージングとインドシアニンググリーン

新しい画像評価の方法として、ナノ粒子と光を使用した蛍光イメージングの報告[17][18]が散見される。これらは、径 10~200 nm のナノ粒子が増殖の速い腫瘍組織の間質腔に透過性が異常に亢進した毛細血管より漏出・蓄積する現象である、EPR (enhanced permeability and retention) 効果を利用している(図 1) [19]-[22]。この EPR 効果によって漏出・蓄積するナノ粒子を蛍光標識し、光を照射することによってイメージングが行われている。

700~1000 nm の近赤外線は、生体における水・ヘモグロビン・メラニンなどによる吸収が少なく、生体透過性が良好で、近赤外蛍光を発する薬剤を生体

内投与したのち表面から可視化できるという特徴がある[23]。インドシアニングリーン（indocyanine green : ICG）は血中では励起波長を 800 nm 付近に持ち、近赤外線を照射すると 800～850 nm の蛍光波長を発する[24]。現在 ICG を用いた近赤外蛍光イメージングが保険適応となっており、各種癌のセンチネルリンパ節の同定、冠動脈バイパスのグラフト・脳脊髄動静脈奇形・肝動脈・皮弁などの血管評価、胆管造影[25][26]、脊髄腫瘍の局在評価[27]-[29]などの術中診断として臨床使用されている。一方、静注後 2 秒以内にその 98 %が血漿中のタンパク質と結合し、15 分以内に投与量の 95 %以上が肝臓に集積・代謝されるため[30][31]、撮像のタイミングが難しく、造影検査のように注入後継続しての動画観察は可能だが、撮像タイミングを決定した静止画での画像化は困難であった。

1-4 インドシアニンググリーン内包ナノ粒子（ICG ラクトソーム）

京都大学と島津製作所の共同研究により開発された「ラクトソーム」は、親水性の poly-sarcosine と疎水性の poly-L-lactic acid からなる、乳酸系両親媒性ポリペプチド高分子ミセル（PS-PLLA）である[32]。このラクトソームに乳酸基で ICG 標識した「ICG ラクトソーム」（図 2）は径 35 nm のナノ粒子で、生体分解性であるため安全性が高い[33][34]。ナノ粒子は細網内皮系

(Reticuloendothelial System : RES) に認識されにくく、腎排出されにくいという特徴を持ち[35]、さらに腫瘍組織ではリンパ系が未発達となっているため、ICG ラクトソームは血管内に長時間滞留する。加えて EPR 効果により腫瘍組織の血管透過性の亢進した毛細血管から漏出・蓄積することで、選択的に集積し、腫瘍の画像化が可能となっている [36]。

第2章 研究の仮説と目的

2-1 仮説

RA の関節炎の画像診断において、初期の関節炎を捉えることができ、短時間で、検者に専門的技能が必要のない、簡易で安全な方法があれば診断が容易になる。これは早期治療開始に寄与し、結果として関節破壊の防止につながり、QOL の改善が得られると考えた。そこで、蛍光イメージングの可能性のあるインドシアニンググリーンに着目し、その効果を高める ICG ラクトソームを用いることで、RA 関節炎の早期診断が可能であるとの仮説をたてた。

2-2 目的

本研究の目的は、RA モデルマウスの関節炎において①ICG ラクトソームを用いた近赤外蛍光イメージングが可能であるかを検討すること、②ICG ラクトソームを用いた近赤外蛍光イメージングが早期関節炎を検出可能であるかを検討することである。

第 3 章 対象

本研究における動物実験は筑波大学動物実験取扱規程に従い、筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

3-1 実験動物

本研究の実験では RA モデルマウスとして SKG / Jcl マウス (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) の雌を合計 45 匹使用し、筑波大学生命科学動物資源センター内で飼育・管理した。

SKG / Jcl マウスはヒト関節リウマチと酷似した免疫性関節炎を発症する。常染色体劣性遺伝で、ZAP-70 遺伝子の点突然変異を有し、一般的な環境では生後 2 ヶ月頃より関節腫脹 (雌>雄) をきたす。関節腫脹は前足指骨間関節に左右対称性に始まり、その後手関節、足関節に及ぶが、手足関節から始まる個体や、同時に始まる個体もある。雌の方が若干進行が早く重症度が高い傾向がある。免疫学的には血清中に IgM 型 RF、抗 II 型コラーゲン抗体、結核菌 HSP70 と反応する抗体を持ち、加齢に伴い免疫グロブリン糖鎖異常をきたす[37]。SPF (Specific Pathogen Free) 環境下においては関節炎の発症が抑制され自然発症しにくい特徴を持つため、自然免疫を抗原非特異的に活性化すると慢性関節炎が同期して全例に惹起される[38]。

関節炎は過去の文献に従い[39] mannan 20 mg (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) を腹腔投与し発症させた。

実験中の麻酔は Pentobarbital Sodium (Somnopentyl, Kyoritsu Seiyaku Co., Tokyo, Japan) を 5 倍希釈し、1.0 ~ 1.2 ml / body 腹腔内投与、もしくは Isoflurane (Escain, Pfizer Japan Inc., Tokyo, JAPAN) 吸入による全身麻酔で行った。検体採取時は Pentobarbital Sodium 1.5 ml を腹腔内投与し安楽死させた。

3-2 使用機器と材料

ICG、ICG ラクトソームの関節炎部位への集積を確認するため、蛍光 in vivo イメージング装置は Xenogen IVIS Spectrum (Living Image® Version 4.3.1, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) を励起波長 : 745 nm、蛍光波長 : 840 nm で使用し画像撮影を行った (図 3)。

実験では光感受性物質として Indocyanine green (Diagnogreen、DAIICHI SANKYO Co., Tokyo, Japan)、ICG-Lactosome (SHIMADZU Co., Kyoto, Japan) を用いた。

通常のマウス用の飼料には蛍光物質が含まれるため、SKG / Jcl マウスの飼料として、実験の 2 週間前より蛍光物質の含まれない ivid #2 (ORIENTAL YEAST

CO., LTD, TOKYO, JAPAN) を用いた。

統計学的検討の統計ソフトウェアはSPSS Statistics 21 (IBM Co., Armonk, New York, USA) を用いた。

第4章

RA モデルマウスにおける 近赤外蛍光イメージング（実験 1）

4-1 方法

SKG/Jcl マウスを用いて、ICG、ICG ラクトソームとも次の 2 群を設定した。

- ・ 関節炎群（4 匹 8 肢）：8 週齢の時点で mannan 20 mg を腹腔内投与して関節炎を誘発し、14 週齢まで飼育した。
- ・ control 群（4 匹 8 肢）：14 週齢まで飼育した。

ICG ラクトソーム（ICG 2 nmol / mg 内包）は生理食塩水に溶解し 2.0 mg / 0.1 ml / body、ICG はそれと等 mol（4.0 nmol）の ICG を 30G 針を用いて尾静脈投与し、次の 1) ~ 5) の評価を行った。

1) 関節炎スコアによる肉眼的評価

過去の文献[61]に従い、ICG ラクトソーム投与群の肉眼的関節炎スコアを測定した。手指・足趾は指間骨関節の腫脹がみられたら 0.1 点、手関節・足関節はくびれの消失やアキレス腱付着部がまるみを帯びたものを 0.5 点、凸になったものを 1.0 点とした。

2) 関節炎の病理学的評価

実験終了後、マウスを安楽死させ両後肢を切断し、10%ホルマリンにて固定した。脱灰処理後、足関節正中矢状断の切片を作製し、①Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色、②Safranin O 染色、③Toluidine Blue 染色を行った。各染色の切片は光学顕微鏡 (BX51、OLYMPUS Co., Tokyo, JAPAN) を用いて病理組織学的観察を行った。

3) IVIS Spectrum による画像評価

ICG、ICG ラクトソームの関節炎部位への集積を確認するため、蛍光 in vivo イメージング装置 (IVIS Spectrum) を励起波長 : 745 nm、蛍光波長 : 840 nm で使用し画像撮影を行った。ICG は尾静注直後・10・30・60・90・120 分・24 時間後、ICG ラクトソームは尾静注直後・3・6・12・24・48 時間後で行った。また ICG ラクトソーム投与群において、投与 24 時間後の control 群と関節炎群の同時撮影を行った。

4) 蛍光強度比の算出

足関節に径 3.5 mm の関心領域 ROI (Region Of Interest) を設定し、蛍光強度を測定した。各画像撮影時間の ROI 値を、ICG ラクトソーム未投与時の ROI

値で除して蛍光強度比を算出した（図 4）。

5) 蛍光強度比の統計学的解析

各画像撮影時間での control 群と関節炎群の蛍光強度比を Mann-Whitney's U-test で、関節炎群内での蛍光強度比を Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて検定した($p < 0.05$)。

6) 組織連続切除による蛍光部位の特定

SKG / Jcl マウス雌 8 週齢 6 匹（12 肢）に mannan 20 mg を投与、関節炎を誘発し、14 週齢（関節炎誘発後 6 週）まで飼育した。その後 ICG ラクトソーム（ICG 2 nmol / mg 内包）を生理食塩水に溶解し 2.0 mg / 0.1 ml / body を 30G 針を用い尾静脈投与した。蛍光部位を特定するため、ICG ラクトソーム投与 24 時間後に、外科的に皮膚切除、筋切除、関節搔爬を段階的に行い、それぞれ IVIS Spectrum で画像を撮像した。加えて ROI 値を測定、蛍光強度比の算出を行い、統計学的検討を Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて検定した($p < 0.05$)。

4-2 結果

1) 関節炎スコア

SKG / Jcl マウスの雌 8 週齢に mannan 20 mg を投与し、14 週齢まで飼育した時点での関節炎スコアを図 5 に、肉眼的所見を図 6 に示す。関節炎群 (4 匹) のスコアの平均は 4.73 ± 0.62 、control 群(4 匹)は 0 で、関節炎群はどの個体も、肉眼的に関節炎発症を確認可能であった。

2) 病理組織学的評価

図 7 に Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色、図 8 に Safranin O 染色、図 9 に Toluidine Blue 染色を示す。

H&E 染色においては control (14 週齢) に比し、関節炎誘発後 2 週 (10 週齢) で滑膜細胞層の肥厚がみられ、関節炎誘発後 4 週 (12 週齢) ・関節炎誘発後 6 週 (14 週齢) では滑膜細胞の肥厚に加えて、炎症細胞の浸潤がみられた。

Safranin O 染色においては、control に比し、関節炎誘発からの時間経過とともに染色濃度が淡くなり、軟骨プロテオグリカンの減少がみられた。

Toluidine Blue 染色においても、control に比し、関節炎誘発からの時間経過とともに染色濃度が淡くなり、軟骨細胞の減少がみられた。

3) IVIS Spectrum による画像

図 11A に ICG における蛍光イメージング画像を、図 11B に ICG ラクトソームの蛍光イメージング画像を示す。ICG においては関節炎群・control 群とも 10 分後以降、肝臓に速やかに集積して足関節に集積なく、24 時間後においては体内からほぼ消失した。ICG ラクトソームでは関節炎群において、3 時間後より足関節の蛍光強度上昇を認めしたが、control 群では上昇を認めなかった。また関節炎群・control 群とも 48 時間後においても全身の蛍光強度上昇を認めた。

図 12 に ICG ラクトソーム投与群における、投与 24 時間後の control 群と関節炎群の肉眼的所見と IVIS Spectrum 同時撮影画像を示す。同時撮影においては control 群では蛍光強度の増強がみられず、関節炎群の足関節にのみ蛍光強度の増強がみられた。

4) 蛍光強度比と統計学的解析

ICG における蛍光強度比の平均 (8 肢) を図 13 に示す。control 群は直後 5.36 (± 0.82) 倍、10 分後 2.51 (± 0.95) 倍、30 分後 2.23 (± 0.73) 倍、90 分後 2.15 (± 0.60) 倍、120 分後 2.01 (± 0.53) 倍、24 時間 1.10 (± 0.04) 倍であった。関節炎群においては直後 9.84 (± 4.41) 倍、10 分後 4.71 (± 2.80) 倍、30 分後 3.68 (± 2.34) 倍、90 分後 3.37 (± 1.92) 倍、120 分後 3.01 (± 1.39)

倍、24 時間 1.04 (±0.11) 倍であった。ICG の蛍光強度比は、両群とも投与直後が最大であったが、その蛍光強度比は 10 倍に満たず、統計学的有意差を認めなかった。

ICG ラクトソームにおける蛍光強度比の平均 (8 肢) を図 14 に示す。control 群は直後 35.59 (±12.83) 倍、3 時間後 31.25 (±10.91) 倍、6 時間後 33.00 (±8.84) 倍、12 時間後 32.10 (±7.83) 倍、24 時間後 32.88 (±6.47) 倍、48 時間後 24.12 (±5.32) 倍であった。関節炎群においては直後 85.62 (±34.48) 倍、3 時間後 99.10 (±23.02) 倍、6 時間後 126.83 (±18.26) 倍、12 時間後 148.10 (±20.87) 倍、24 時間後 161.24 (±29.71) 倍、48 時間後 109.71 (±32.47) 倍であった。ICG ラクトソーム群では、関節炎群の蛍光強度比が最高で 150 倍近くまで上昇したのに対し、control 群は 50 倍未満であった。また control 群に比べて関節炎群の蛍光強度比が、各時間で統計学的に有意に大きかった。関節炎群内での蛍光強度比の比較においては、ICG ラクトソーム投与後 24 時間で蛍光強度比はピークを迎え、その他の時間より統計学的に有意に蛍光強度比が大きかった。

5) 組織連続切除による蛍光部位の特定

図 15 に外科的組織連続切除による蛍光輝度の変化を示す。皮膚・筋の切除

により足関節の蛍光輝度は低下しなかったが、可及的に関節包を切除・搔爬すると足関節の蛍光輝度は低下した。図 16 では下肢の皮膚切除を行った IVIS Spectrum 画像と単純 X 線写真の対比を示す。皮膚切除を行うことにより膝関節の蛍光輝度が上昇している。図 17 に皮膚切除前後と関節包・滑膜切除後の蛍光強度比の平均（12 肢）を示す。皮膚切除前の強度比は 158.85（±20.82）倍、皮膚切除後は 175.01（±21.83）倍、関節包・滑膜切除後は 69.80（±9.77）倍であった。また皮膚切除前・皮膚切除後・滑膜切除後すべて蛍光強度比の間に統計学的有意差を認めた。

4-3 考察

1) 先行研究と研究の新規性

我々のグループは、これまでに蛍光物質に ICG ラクトソームを用いて、乳癌のラットにおける脊椎転移モデル、マウスにおける脛骨転移モデルで近赤外蛍光イメージングが可能であることを確認した（図 20）[40]。

悪性腫瘍においては、新生血管の壁が未成熟で、ナノレベルの粒子が血管外に創出し滞留する ERP 効果があると言われており、分子イメージングや抗がん剤の Drug Delivery System に利用されている[41]。

RA モデルマウスの関節炎においては血管新生、増殖滑膜における血流増加

やマクロファージの活性化による IL-6、IL-1 β 、TNF α 等のサイトカインにより毛細血管の透過性が亢進している[42]-[47]。

ICG やその他の蛍光物質を用いて、CIA (Collagen Induced Arthritis) ラットや *Borrelia* 誘発性の Lyme 関節炎モデルマウスの評価を行った報告はみられるが[48]-[52]、診断の簡易化を目指して、関節炎に対し ICG ラクトソームを用いたものは本研究が初めてである。

2) 関節炎スコア・病理組織学的学所見

RA の病態に最も近い実験動物として SKG / Jcl マウスを選択したが、関節炎誘発後 6 週の時点では、全例関節炎スコアは上昇し、H&E 染色による病理組織学的所見においても強い滑膜炎の所見がみられ、対象動物として適当であると考えられる。

3) IVIS Spectrum 画像・蛍光強度比

直径 > 8 nm のナノ粒子は腎臓基底膜を通過できず、血中に残留する。血中に滞留するナノ粒子は RES (肝臓・脾臓・骨髄)、肝臓のクッパー細胞や肝細胞に取り込まれるが、ナノ粒子の表面電荷と疎水性は、血漿タンパク質による吸着やオプソニン化を促進し、RES の食細胞による認識を高める結果となる[33]。

ICG ラクトソームの径は 35nm であり、ミセル表面を親水性の poly-sarcosine が覆っているため血漿タンパク質による吸着が阻害され、腎臓や肝臓で代謝されにくいと考えられる[35] [53]。マウスにおける ICG ラクトソームの血中半減期は 17.8 時間と報告されている[34]。これらのことから ICG と比較し、ICG ラクトソームの蛍光画像は長期にわたり全身の蛍光輝度が上昇し、その関節炎群においては EPR 効果により血管外に漏出・蓄積したことで蛍光強度比は 24 時間後がピークとなったと考えられる。このことから ICG ラクトソームを用いた画像評価は、投与後 24 時間が最適と考える。しかし RA 以外の関節炎でも同様の結果となるかは、さらに検証が必要である。

4) 蛍光部位の特定

IVIS Spectrum の画像においては、蛍光物質がカメラに近い（遮蔽物が少ない）ほど蛍光強度が上昇する。SKG / Jcl マウスは体毛で覆われており、手指・足趾には固定のテープを貼付しているため、手関節・足関節のみ蛍光輝度が上昇している。体毛ごと皮膚を切除し下肢を露出させると膝関節の蛍光輝度上昇が確認できることから、他の関節炎部位でも実際には ICG ラクトソームが漏出していると考えられる。

足関節において皮膚を切除すると有意に蛍光強度比が上昇するため、皮膚に

は蛍光物質が存在せず、皮膚はそれより深部に存在する蛍光物質を遮蔽していると考えられる。また大腿の筋・骨露出部の蛍光輝度は低く、これらの組織では蛍光物質の漏出はおこっていない。足関節の関節包と滑膜を切除・搔爬することで蛍光輝度が低下、蛍光強度比も有意に低下するため、同部に蛍光物質が局在すると考えられる。

5) ICG 単独のイメージングとの比較

健常者と RA 患者の手において ICG 単独でのイメージングを行い、健全な関節と関節炎を起こした関節を区別可能であったという報告[54]、また MRI と同等の早期関節炎検出能や、治療効果の評価が行えたとの報告がある[54]-[58]。MRI に比し費用が少なく、撮像時間も数秒と短時間で、副作用の起こる可能性のある造影剤を使わず装置も簡単である一方、ROI の測定や専門的判断を要している。

ICG ラクトゾームによるイメージングは、ICG 単独のイメージングと比較すると診断がより簡易で専門的な判断が必要なく、また視覚的にも関節炎部位がクリアで関節炎検出能も上昇させることができると考えられる。

第 5 章

ICG ラクトソームを用いた 早期関節炎の検出（実験 2）

実験 1 において完成した関節炎は描出可能であった。しかし早期治療の開始が関節破壊の防止につながるため、初期の変化を捉えることが重要である。この実験 2 では、ICG ラクトソームを用いた蛍光イメージングが、肉眼的検出より早期に関節炎が観察可能であるかを検討した。

5-1 方法

SKG / Jcl マウスを用い、8 週齢の時点で mannan 20 mg を腹腔内投与して関節炎を誘発後、次の 4 群を設定した。

- ・ 関節炎誘発後 1 週群（10 匹 20 肢）：9 週齢まで飼育した。
- ・ 関節炎誘発後 2 週群（10 匹 20 肢）：10 週齢まで飼育した。
- ・ 関節炎誘発後 6 週群（10 匹 20 肢）：14 週齢まで飼育した。
- ・ 関節炎誘発後 2 年群（3 匹 6 肢）：2 年齢まで飼育した。

ICG ラクトソーム (ICG 2 nmol / mg 内包) を生理食塩水で溶解し、2.0 mg / 0.1ml / body を 30G 針を用い尾静脈投与し、以下の評価を行った。

1) IVIS Spectrum による画像評価

実験 1 と同様に蛍光 in vivo イメージング装置 (IVIS Spectrum) を励起波長 : 745 nm、蛍光波長 : 840 nm で使用し、実験 1 の結果から、蛍光強度が最大となる ICG ラクトソーム投与後 24 時間の画像を撮像した。

2) 蛍光強度比の算出と統計学的解析

実験 1 と同様に足関節に径 3.5 mm の関心領域 ROI を設定し、蛍光強度・蛍光強度比を算出、Mann-Whitney's U-test で統計学的解析を行った。

3) 蛍光強度比と病理組織学的評価

実験 1 と同様に実験終了後、マウスを安楽死させ両後肢を切断し、10 %ホルマリンにて固定した。脱灰処理後、足関節正中矢状断の切片を作製し、H&E 染色を行い光学顕微鏡 BX51 で観察、下記のように関節炎誘発後 1 週と 2 週のマウスにおける足関節の滑膜炎スコアを算出した。

滑膜炎スコアは過去の文献に従い[59]次の 2 つの所見を点数化し、その和を算出した。測定は、距骨と脛骨（足関節）の前方部位の滑膜を対象とした。点数化に関しては①滑膜における滑膜細胞の層が、細胞数 1~2 のものを 0 point、2~4 のものを 1 point、4~9 のものを 2 point、10 以上のものを 3 point、②炎

症細胞の浸潤がないものを **0 point**、軽度のものを **1point**、中程度のものを **2point**、重度でパンススの形成を認めるものを **3point** とした。滑膜炎スコアの平均値を算出し、**Mann-Whitney's U-test** で統計学的解析を行った。

5-2 結果

1) 関節炎スコアの算出

図 21 に関節炎誘発後 1 週 (10 匹)、2 週 (10 匹)、6 週 (10 匹)、2 年 (3 匹) の関節炎スコアの平均値の比較を示す。関節炎発後 1 週の平均は **1.68 ± 0.91**、2 週の平均は **2.96 ± 0.39**、6 週の平均は **4.69 ± 0.54**、2 年の平均は **5.53 ± 0.06** で、各群間に統計学的有意差を認めた。

2) IVIS Spectrum による画像

図 22 に 14 週齢の control、関節炎誘発後 1 週、2 週、6 週、2 年の SKG / Jcl マウスの ICG ラクトソーム投与後 24 時間の IVIS Spectrum 画像と蛍光強度比を示す。関節炎誘発後 1 週・2 週においては、足関節に蛍光輝度の上昇がみられない個体がみられたが、関節炎誘発後 6 週ではすべての個体で蛍光輝度が上昇していた。関節炎誘発後 2 年では足関節蛍光輝度上昇はみられなかった。

3) 蛍光強度比と統計学的解析

図 23 に 14 週齢の control と、8 週齢で関節炎を誘発し、誘発後 1 週・2 週・6 週・2 年の SKG / Jcl マウスの ICG ラクトソーム投与後 24 時間での蛍光強度比の平均を示す。control は実験 1 で得た結果を使用している。関節炎誘発後 1 週 (20 肢) は 73.06 (±57.72) 倍、誘発後 2 週 (20 肢) は 150.41 (±64.17) 倍、誘発後 6 週 (20 肢) は 156.92 (±26.14) 倍、誘発後 2 年 (6 肢) は 73.06 (±57.72) 倍であった。①control、関節炎誘発後 1 週間、誘発後 2 年、②関節炎誘発後 2 週と誘発後 6 週の間には統計学的有意差はみられなかった。また関節炎誘発後 1 週と 2 週の間には有意差がみられた。

4) 病理組織学的評価：滑膜炎スコア

図 24 に代表的な H&E 染色における滑膜炎スコア、図 25 に関節炎誘発後 1 週 (16 肢) と 2 週 (16 肢) の滑膜炎スコア (最大 6 点) の平均値の比較を示す。関節炎誘発後 1 週の平均値は 1.41 (±0.88)、2 週は 3.25 (±64.17) で統計学的有意差を認めた。また関節炎誘発後 2 年(6 肢)では滑膜は消失していた。

5-3 考察

各群の肉眼的な関節炎スコアは、過去の文献に記載された関節炎スコアの推移 [60]と同様であり、評価対象に価することがまず確認された。各群間に有意差が認められたことと、実験 1 の結果 control の関節炎スコアは 0 であったことから、関節炎スコアのみからでは誘発後 1 週で関節炎の判定が可能（肉眼的に診断可能）であることとなる。また病理組織学的評価（滑膜炎スコア）においても誘発後 1 週と 2 週の間には有意差がみられ、control の滑膜炎スコアを 0 と考えると病理組織学的にも 1 週で関節炎の判定が可能であることとなる。

蛍光強度比からは、control と誘発後 1 週に有意差が認められなかったこと、1 週と 2 週の間には有意差が認められたことから、蛍光強度比のみからであれば、関節炎誘発後 2 週で関節炎の判定が可能であるといえる。

本実験において、肉眼的・病理組織学的には関節炎誘発後 1 週で判別可能であったが、蛍光強度比においては誘発後 2 週で判別可能と 1 週遅れた結果となった。しかし蛍光輝度のみ注目してみると control では全例足関節の蛍光輝度上昇がみられないのに対し、誘発後 1 週の画像では蛍光輝度が上昇している個体がみられ、これらの個体は関節炎を発症していると考えられる。母集団の数を増やして解析をすすめる、蛍光強度比や蛍光強度変化率から誘発後 1 週で関節炎を検出できる可能性がある。また誘発後 2 年の観察では、肉眼的な関節の変形が強いにもかかわらず、蛍

光輝度・強度比の上昇は認めず、病理組織学的に滑膜の消失を認めている。これらのことから ICG ラクトソームによる近赤外蛍光イメージングは、早期関節炎の検出に加えて、関節炎の活動性も評価できる可能性があることが示唆された。

第 6 章 本研究の限界と今後の展望

本研究の限界

- 実験 1 において、ICG ラクトソームの局在は外科的組織切除による macro での評価しか行えておらず、実際に滑膜に局在し他の組織に存在しないかどうかの証明は行えていない。PDT をさらに安全に行うためには ICG ラクトソームの存在する境界を明確にすることが必要であり、ナノ粒子の観察が行える電子顕微鏡による蛍光部位組織の評価が必要である。
- 本研究では RA モデルマウスの関節炎に関して評価を行ったが、診断上 RA と、変形性関節症など他の関節炎を鑑別するものではない。ICG ラクトソームは non-targeting probe であるが、RA 滑膜炎に特異的なものとするためには抗原、タンパク分解酵素、リンパ球など RA 滑膜炎に特異的な物質を標的とする active targeting probe の開発が必要である[60]。
- 実験動物における関節炎は進行が早く、早期関節炎の定義が困難である。実験 2 では関節炎誘発後 1 週・2 週での評価を行ったが、さらに早期での検討、母集団の数を増やして蛍光輝度、蛍光強度比、病理組織学的所見（滑膜炎スコア）の対比による評価が必要である。
- ラクトソームの同一個体への第 1 回目の投与に対して、第 2 回目の投与は肝

臓で捕捉され血中から早期に消失することが明らかになっている[61]。これは T 細胞非依存性の B 細胞性免疫反応によって抗ラクトソーム IgM 抗体、抗ラクトソーム IgG3 抗体が産生するためである。このような薬物動態学的変化は他の高分子ミセルにおいてもみられ、ABC 現象 (accelerated blood clearance phenomenon) と呼ばれている。しかし高容量の薬剤投与の場合 B 細胞が活性化されず、免疫寛容が起こるため ABC 現象が抑制される。ラクトソームにおいては、マウスの実験で高容量投与による ABC 現象の抑制が確認され、また毒性もみられていない[34]。本研究ではこの報告を超える高容量投与を行っているが、ICG ラクトソームを複数回投与時の蛍光強度変化や有害事象の検討が必要である。

今後の展望

我々の先行研究は、腫瘍に対し ICG ラクトソームを用いて光線力学療法 (photodynamic therapy : PDT) を行ってきた。PDT は腫瘍親和性光感受性物質が有する①腫瘍組織・新生血管への特異的な集積性 (EPR 効果) と、②特定の波長の光の暴露により光エネルギーを吸収して励起状態に転位し、再度基底状態に戻る事によって生じる一重項酸素やフリーラジカルの細胞破壊効果、の2つを併用し、腫瘍組織を選択的に死滅させる治療法である。ICG に対し使用

される近赤外光は、現在使用されているフォトフリン®やレザフィリン®といったポルフィリン系化合物より長波長帯にあり、生体への深達度が大きい（20～40 mm）、投与後の遮光の必要がない、という利点を持つため体外照射による低侵襲な光線力学療法が可能となる。今後 ICG ラクトソームを用いた PDT による関節炎抑制について研究を進め、近赤外蛍光イメージングと組み合わせ、診断に加えて同時に加療が行えるか検討していきたい。

最終目標は PDT の臨床使用であり、ICG ラクトソームの薬剤としての開発を進め、小関節においては「外来通院にて短時間で行える新加療」、大関節においては「関節鏡と近赤外レーザー焼灼の組み合わせによる滑膜切除効果増強」と、低侵襲に局所の関節炎を加療する方法として発展させ、関節炎による QOL 低下を減少させることに寄与していきたい。

第 7 章 結論

RA モデルマウスにおける ICG ラクトソームを用いた関節炎の近赤外蛍光イメージングについて検討した。ICG ラクトソームは関節炎を発症した足関節に集積し、近赤外蛍光イメージングが可能であることが明らかとなった。また早期関節炎の検出や、関節炎の病勢を反映するのに有用であり、新たな早期診断の手法となる可能性が示唆された。

第 8 章 図表

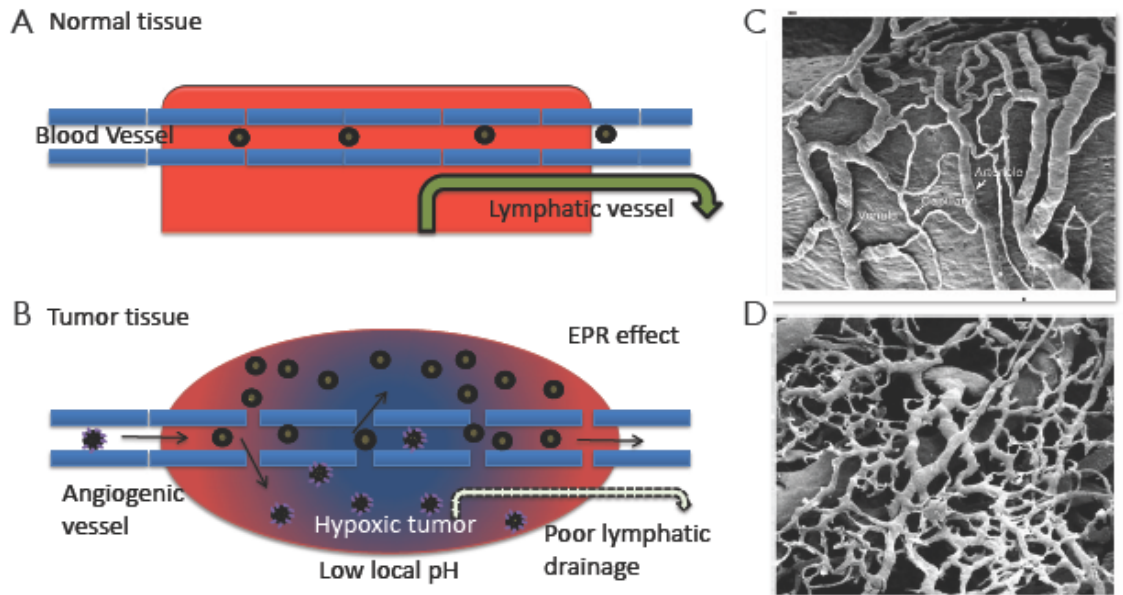


図 1. ナノ粒子の EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果 (文献[22]

から転載)

A : 正常組織のシエーマ B : 腫瘍組織のシエーマ

C : 正常ラットの頸動脈洞の走査型電子顕微鏡画像

D : 腫瘍移植ヌードマウスの走査型電子顕微鏡画像。正常な壁構造ではない微小血管の増生を認める。

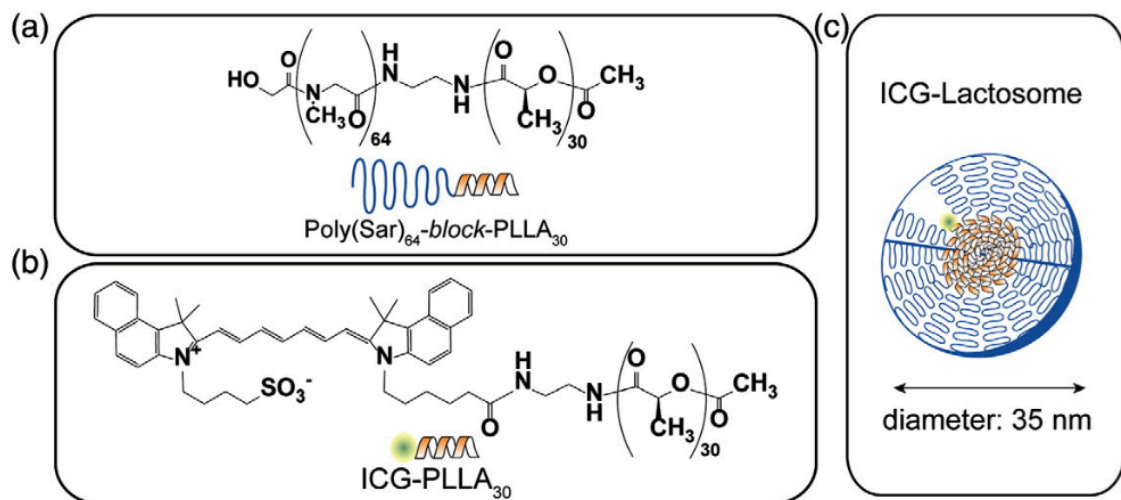


図 2 : ICG ラクトソーム (文献[34]より転載)

(a) poly(Sar)₆₄-block-PLLA₃₀ の化学構造

(b) ICG-PLLA₃₀ の化学構造

(c) 高分子ミセル「ICG ラクトソーム」



図 3. Xenogen IVIS Spectrum (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) とその内部構造

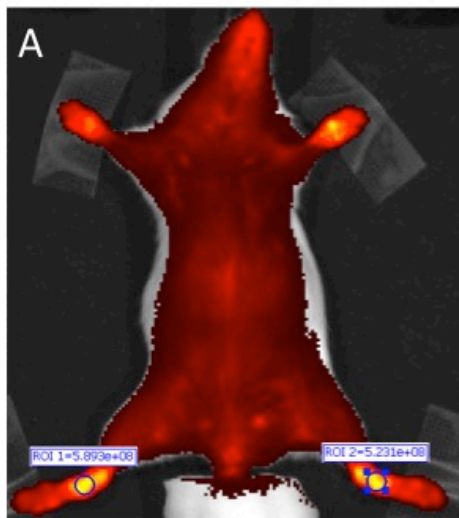


図 4.

A : 足関節における径 3.5 mm の関心領域 ROI (Region Of Interest) 値の測定

B : A の足関節部位拡大画像

	関節炎群				Control群			
	1	2	3	4	5	6	7	8
手指	0.1×0 0.1×3	0 0	0.1×2 0.1×1	0.1×3 0.1×3	0 0	0 0	0 0	0 0
手関節	1 1	1 1	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
足趾	0.1×2 0.1×1	0.1×2 0.1×2	0.1×2 0.1×3	0.1×5 0.1×4	0 0	0 0	0 0	0 0
足関節	1 1	1 1	1 1	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0
計	4.6	4	4.8	5.5	0	0	0	0
平均	4.73				0			

図 5. SKG / Jcl マウス雌、14 週齢での関節炎スコア。関節炎群は 8 週齢で mannann 20 mg を投与し関節炎を誘発した。関節炎群は肉眼的に関節炎を確認可能で、関節炎スコアの上昇がみられた。

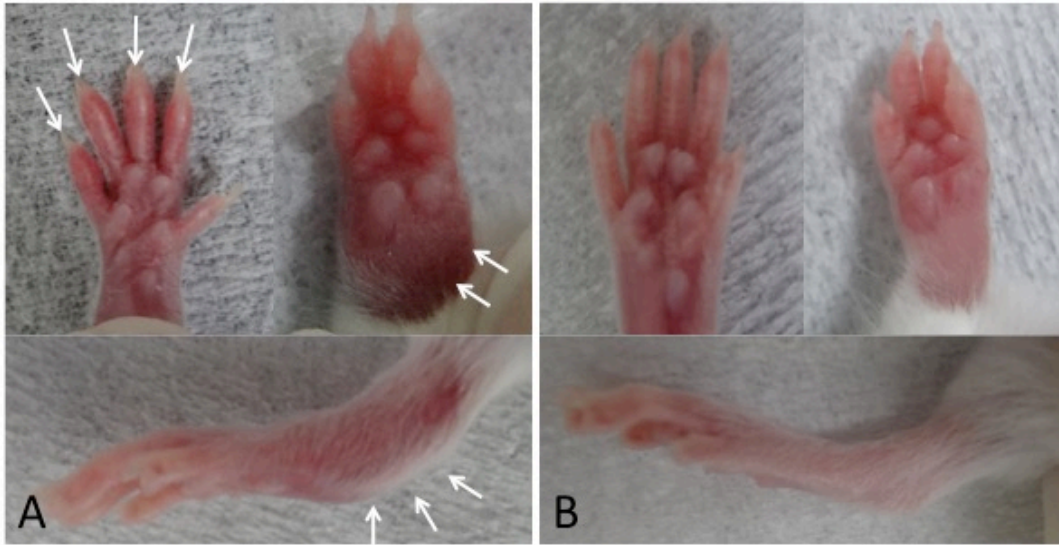


図6. SKG / Jcl マウス雌、14 週齢での肉眼的所見。関節炎群は 8 週齢で mannann 20 mg を投与し関節炎を誘発した。control 群(B)に比較し、関節炎群(A)は関節の腫脹が明らかである。

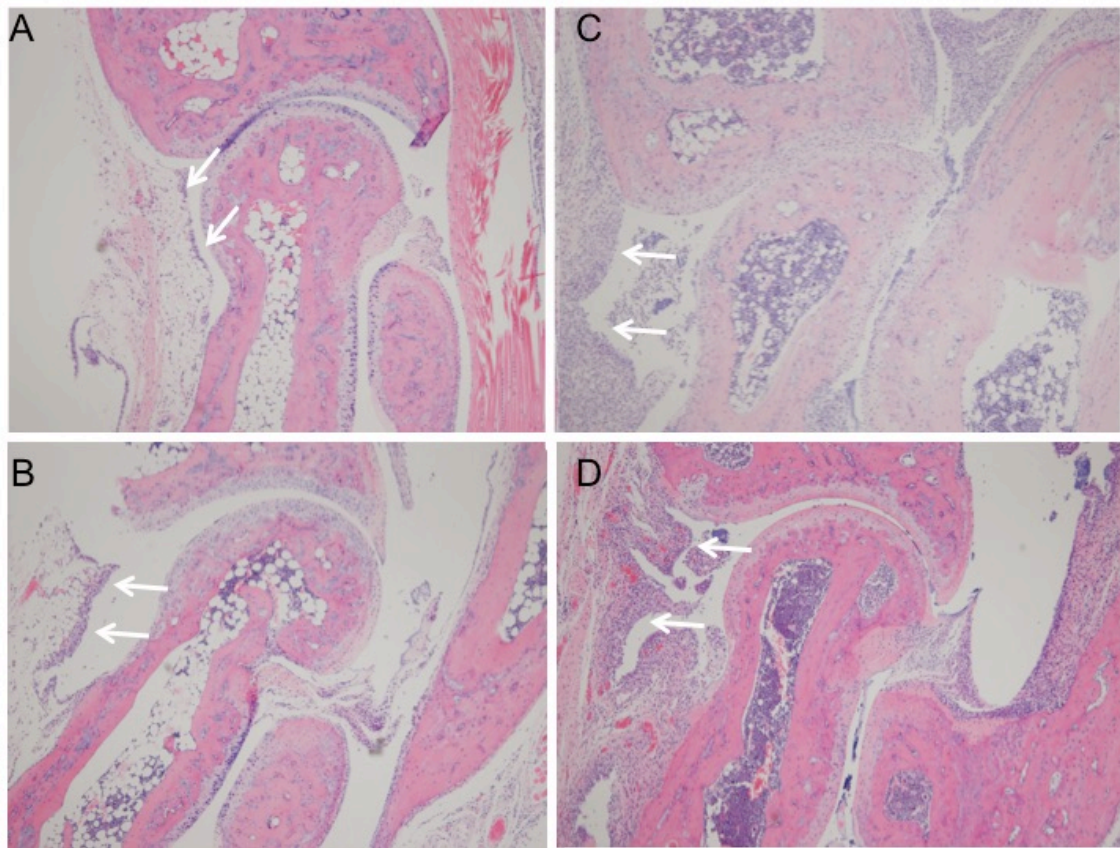


図 7. Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色 (× 40)

A : control (14 週齢)

B : 関節炎誘発後 2 週 (10 週齢)

C : 関節炎誘発後 4 週 (12 週齢)

D : 関節炎誘発後 6 週 (14 週齢)

control に比し、誘発後の経過週数が増すと滑膜細胞層の肥厚と炎症細胞の浸潤 (白矢印) が強くなっている。

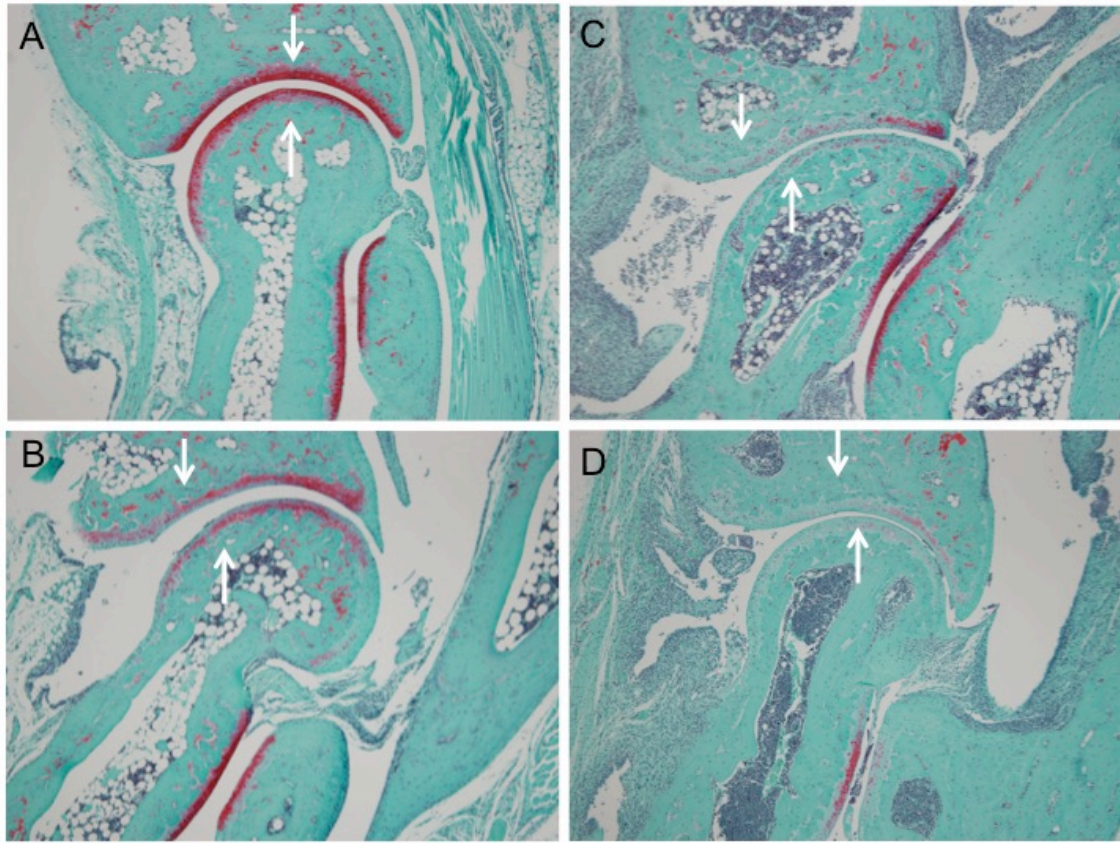


図 8. Safranin O 染色 (× 40)

A : control (14 週齢)

B : 関節炎誘発後 2 週 (10 週齢)

C : 関節炎誘発後 4 週 (12 週齢)

D : 関節炎誘発後 6 週 (14 週齢)

control に比し、誘発後の経過週数が増すと関節面 (白矢印) の染色が減少し、軟骨プロテオグリカンが減少していると考えられる。

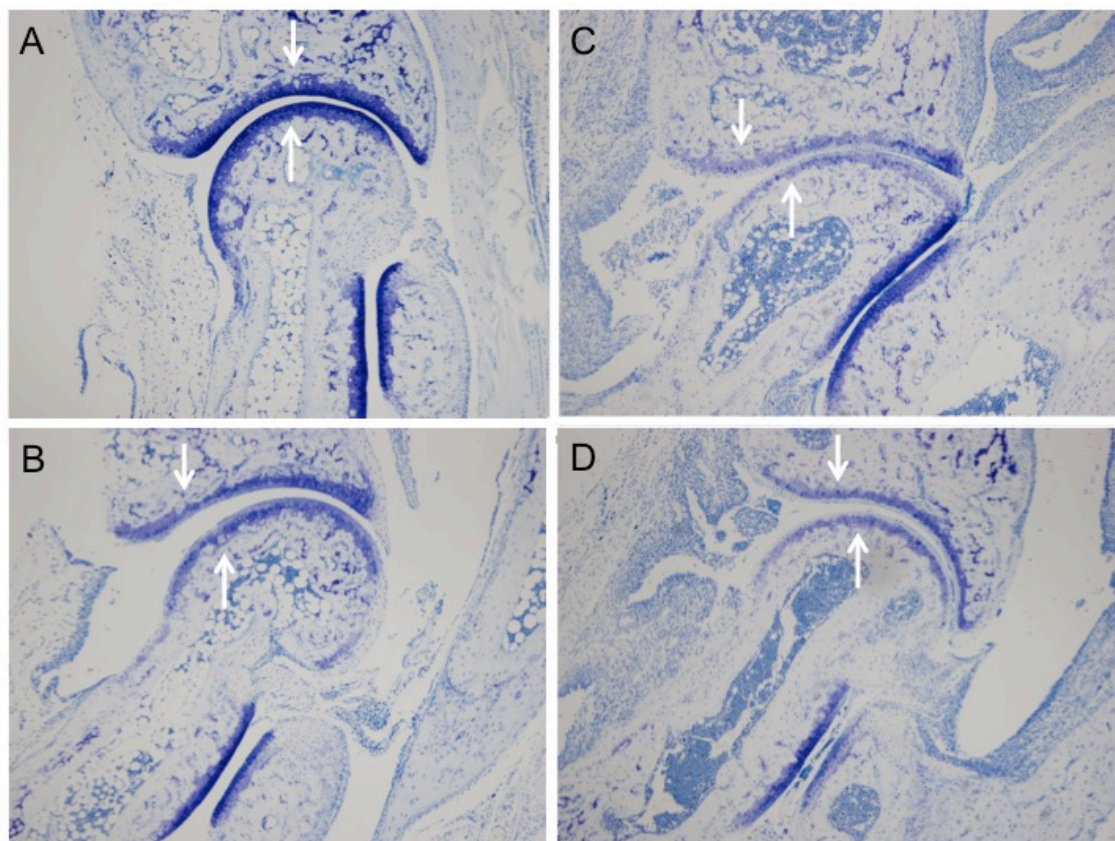


図 9. Toluidine Blue 染色 (× 40)

A : control (14 週齢)

B : 関節炎誘発後 2 週 (10 週齢)

C : 関節炎誘発後 4 週 (12 週齢)

D : 関節炎誘発後 6 週 (14 週齢)

control に比し、誘発後の経過週数が増すと関節面 (白矢印) の染色が減少し、軟骨細胞が減少していると考えられる。

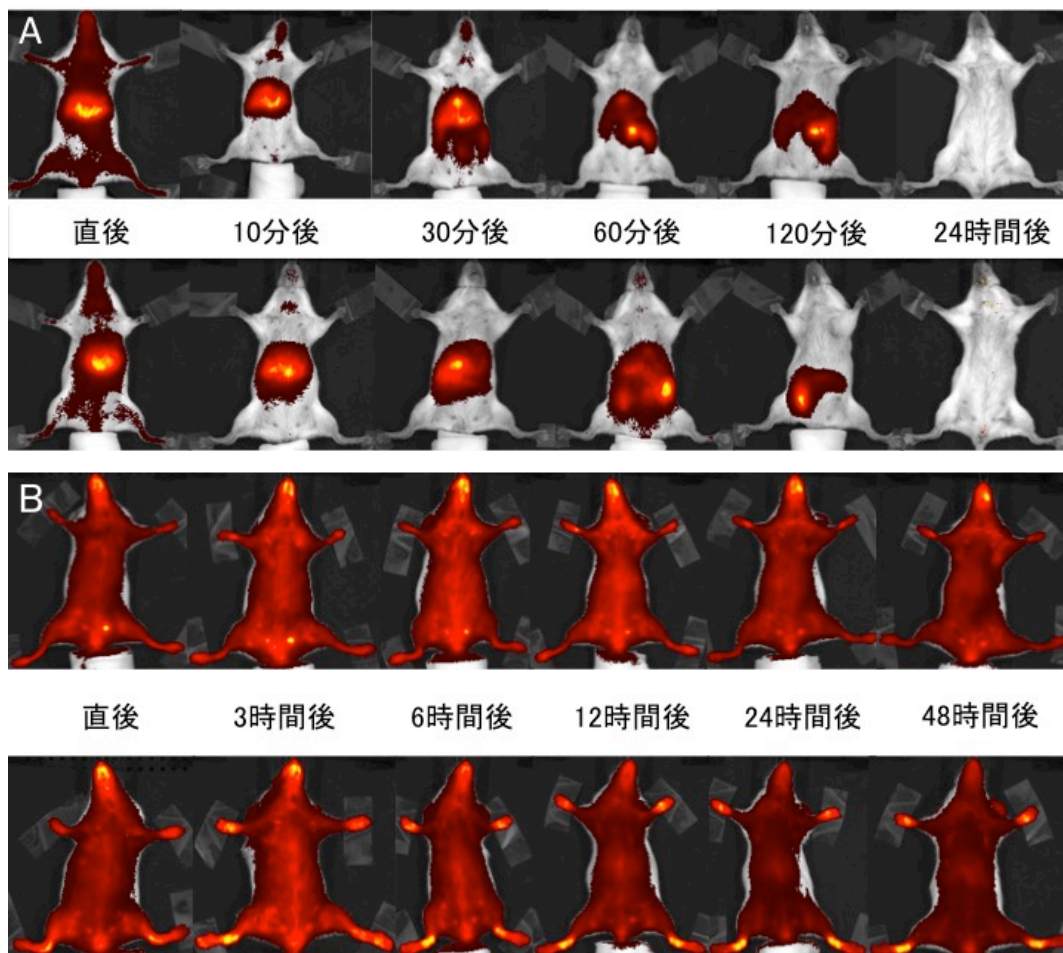


図 11.

A : ICG 投与後の IVIS Spectrum 画像。上段 control、下段関節炎誘発マウス。

両群とも 10 分後以降速やかに肝臓へ集積し、関節・全身への集積はみられず、

24 時間後には体内から消失している。

B : ICG ラクトソーム投与後の IVIS Spectrum 画像。上段 control、下段関節炎

誘発マウス。関節炎群は 3 時間後より足関節の蛍光強度上昇がみられるが、

control 群では上昇がみられない。関節炎・control とも 48 時間後においても全

身の蛍光強度が上昇している。

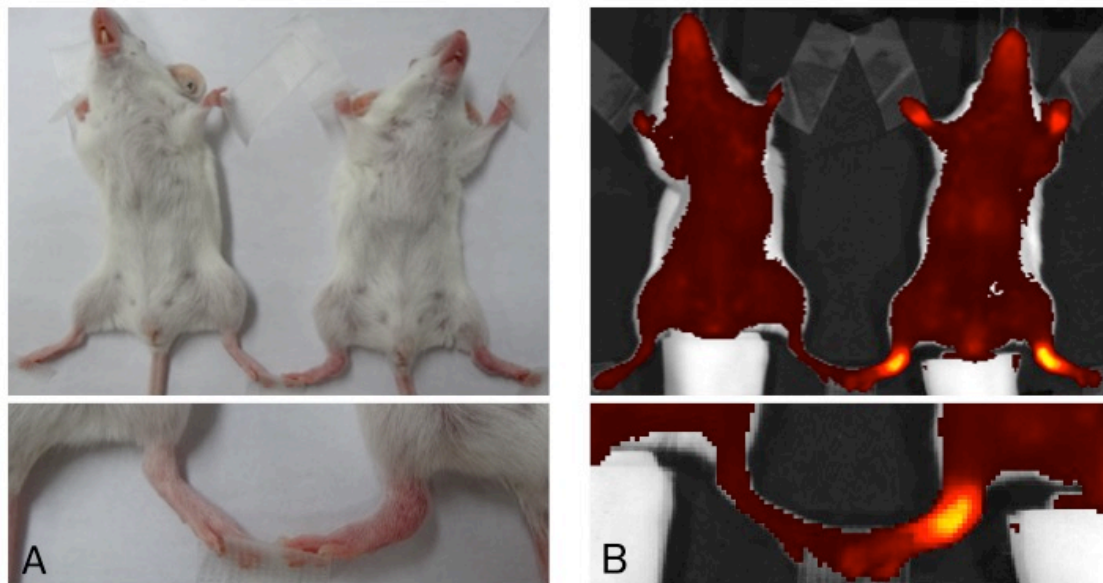


図 12. ICG ラクトソーム投与後 24 時間の肉眼的所見(A)と同時撮影の IVIS Spectrum 画像(B)。A、B とも左が control、右が関節炎誘発マウス。関節炎誘発マウスの足関節に蛍光強度増強がみられるが、control ではみられず、その違いが明瞭となっている。

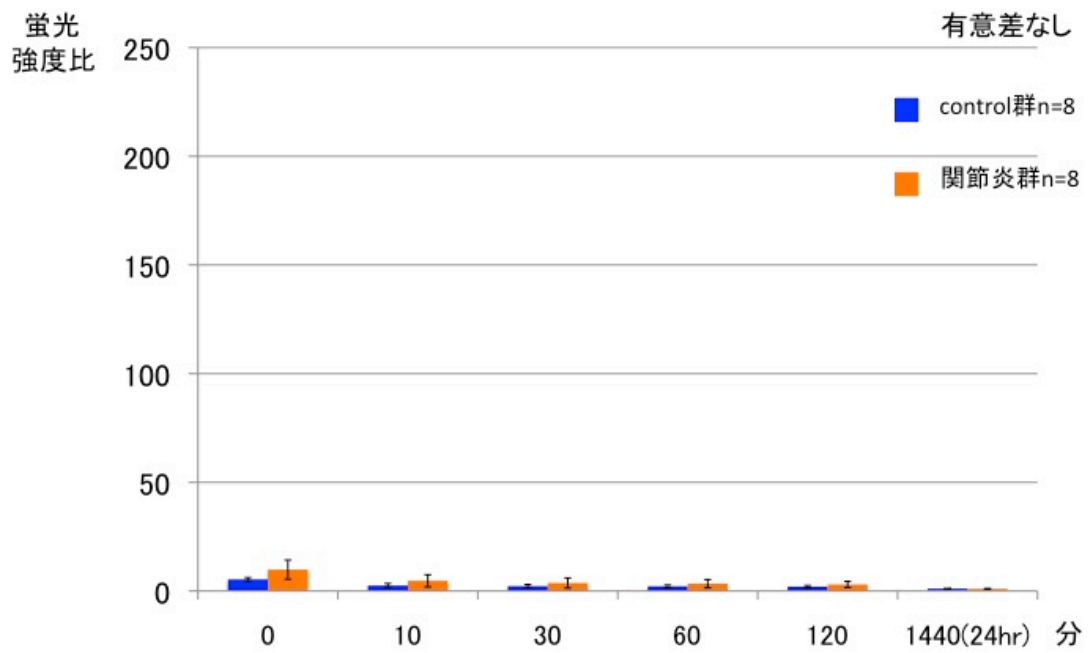


図 13. ICG 投与における control 群と関節炎群の蛍光強度比

蛍光強度比は両群とも投与直後が最大で、10 倍に満たず、統計学的有意差を認めなかった (Mann-Whitney's U-test $P < 0.05$)。

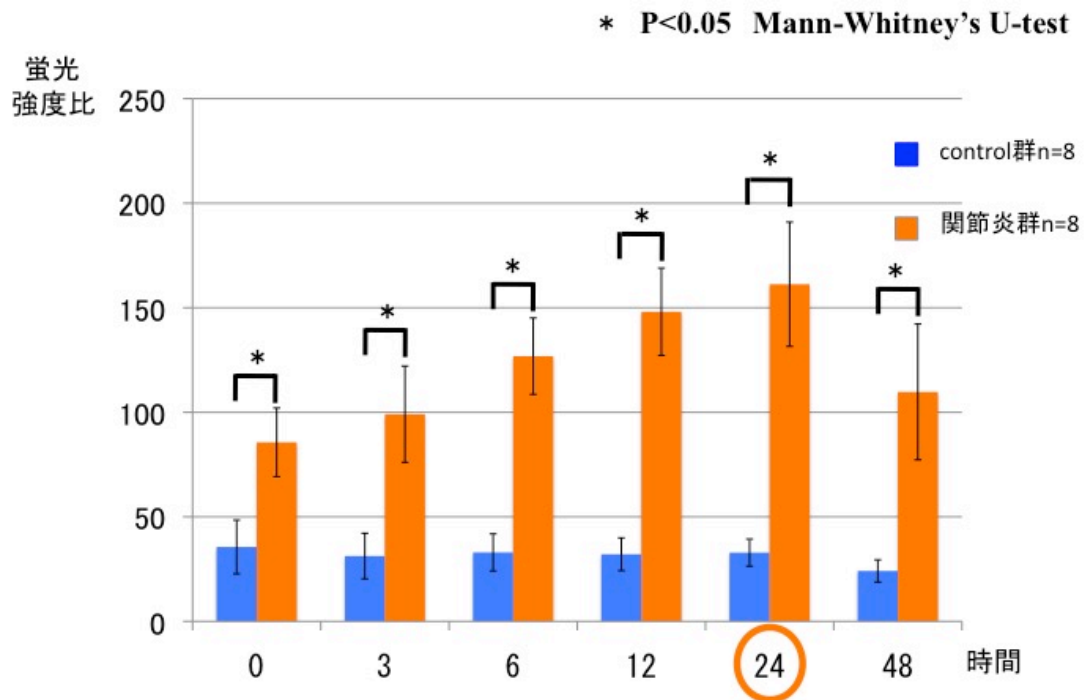


図 14. ICG ラクトソーム投与における control 群と関節炎群の蛍光強度比

関節炎群の蛍光強度比は最高で 150 倍近くまで上昇したが、control 群は 50 倍未満であった。関節炎群の蛍光強度比が、各時間で統計学的に有意に大きかった(Mann-Whitney's U-test $P<0.05$)。関節炎群内での蛍光強度比の比較においては、ICG ラクトソーム投与後 24 時間で蛍光強度比はピークを迎え、その他の時間より統計学的に有意に蛍光強度比が大きかった(Wilcoxon 符号付順位和検定 $P<0.05$)。

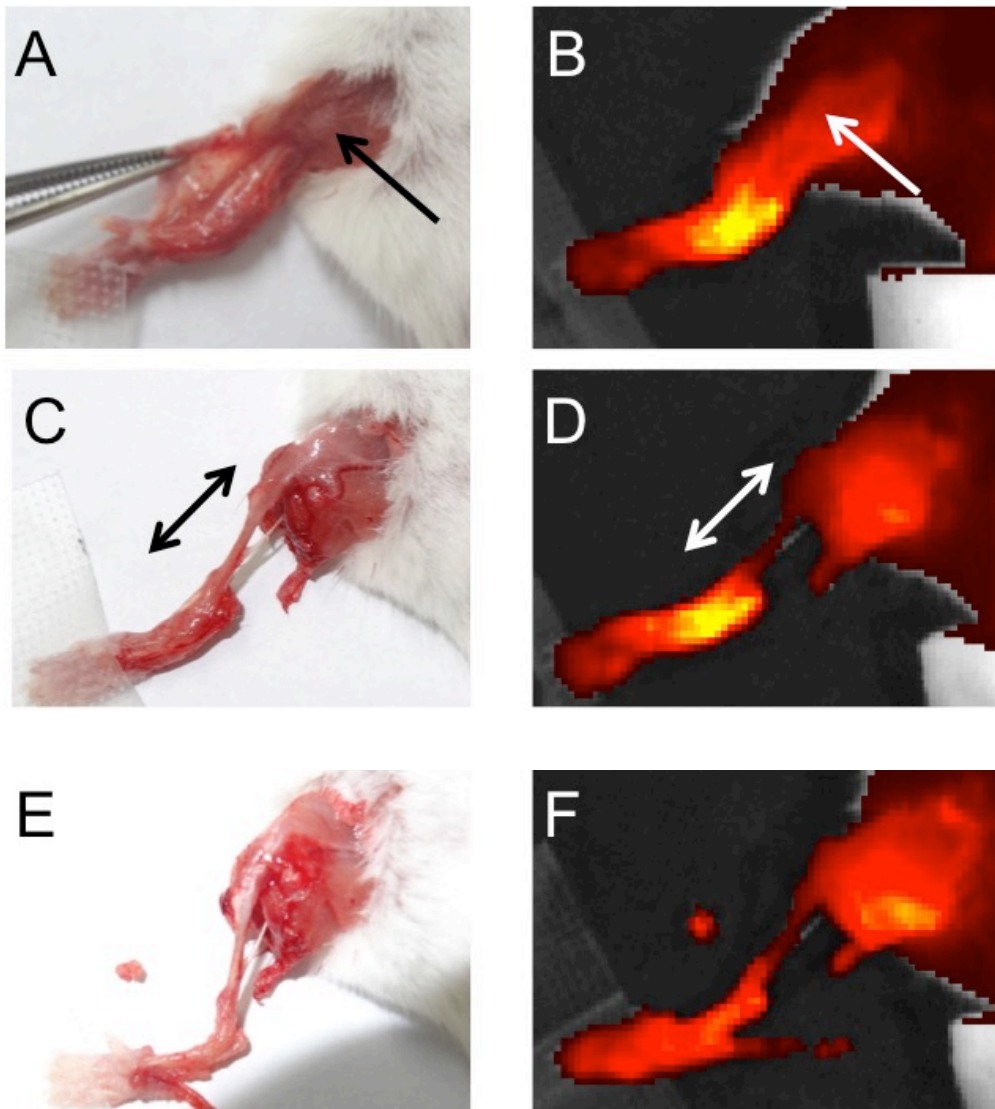


図 15. 外科的組織連続切除における蛍光輝度の変化

A・B：皮膚切除後、矢印は筋露出部筋

C・D：筋切除後、両矢印は骨露出部

E・F：関節包・滑膜切除後

皮膚切除・筋切除による蛍光強度の変化はみられないが関節包・滑膜切除による
 蛍光強度の低下がみられる。

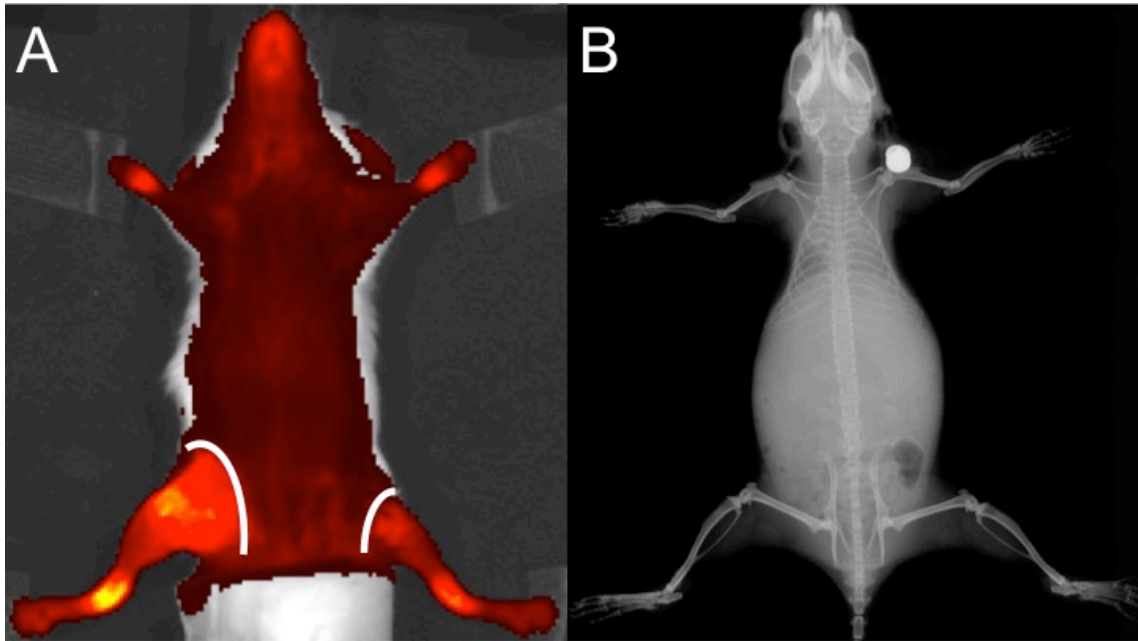


図 16. 下肢皮膚切除による蛍光強度（白線部より遠位の皮膚を切除）

単純 X 線と比較し、膝関節の位置でも蛍光輝度が上昇していると考えられる。

蛍光強度比

* P<0.05 Wilcoxon signed rank test

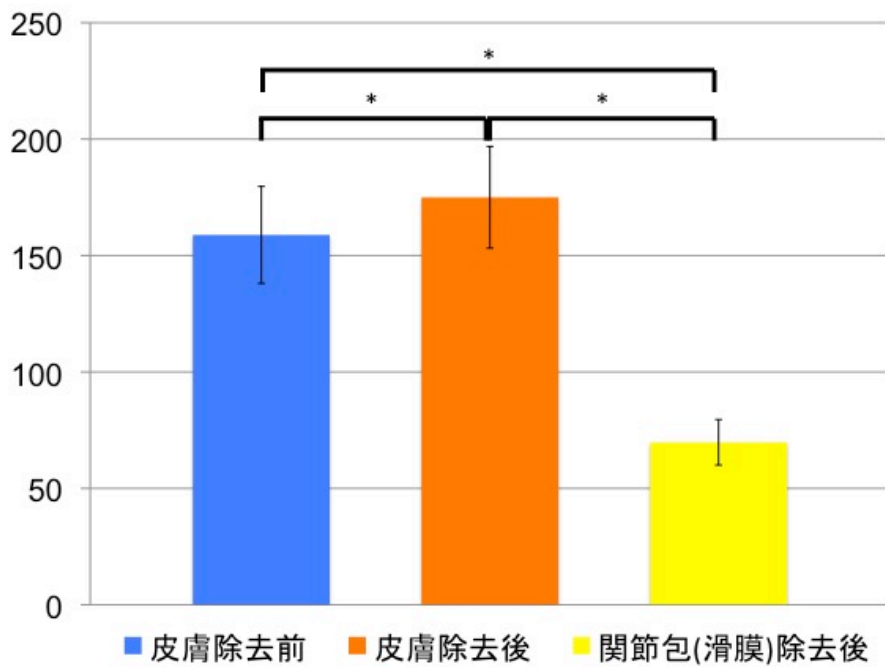


図 19. 組織連続切除時の蛍光強度比 (6 匹 12 肢)

皮膚切除前・皮膚切除後・滑膜切除後すべて蛍光強度比の間に統計学的有意差がみられた(Wilcoxon 符号付順位和検定 P<0.05)。皮膚には蛍光物質が存在せず、皮膚はそれより深部に存在する蛍光物質を遮蔽していると考えられ、蛍光強度比の低下から関節包に蛍光物質が存在すると考えられる。

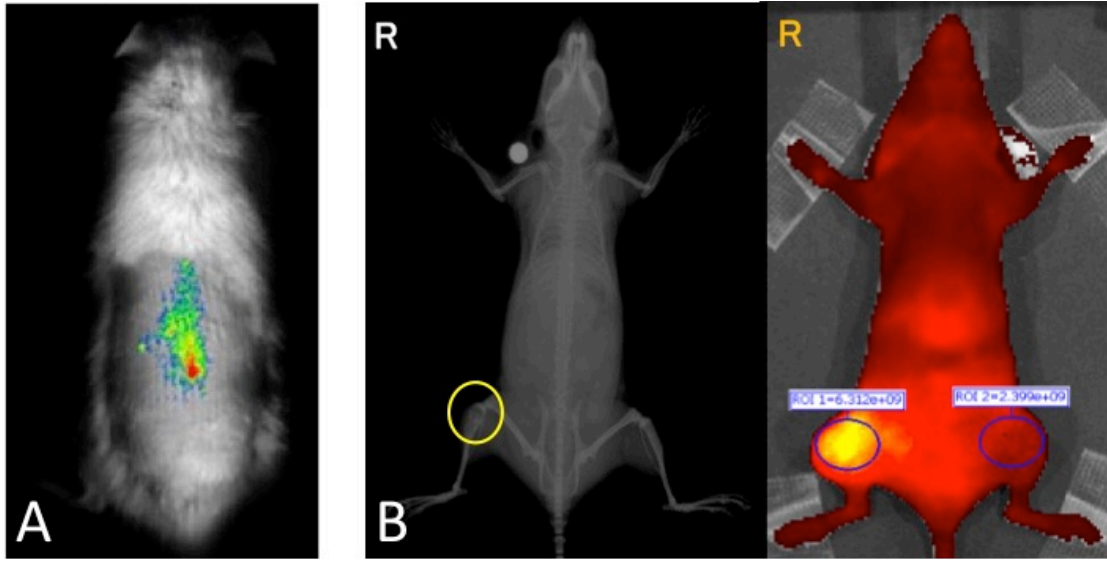


図 20. 先行研究の乳癌骨転移モデルにおける ICG ラクトソームを用いた蛍光イメージング画像

A : ラット乳癌脊椎転移モデル (文献 40 から転載)

B : BALB/c-nu/nu マウス脛骨乳癌転移モデル (共同研究者の塚西敏則博士より提供)

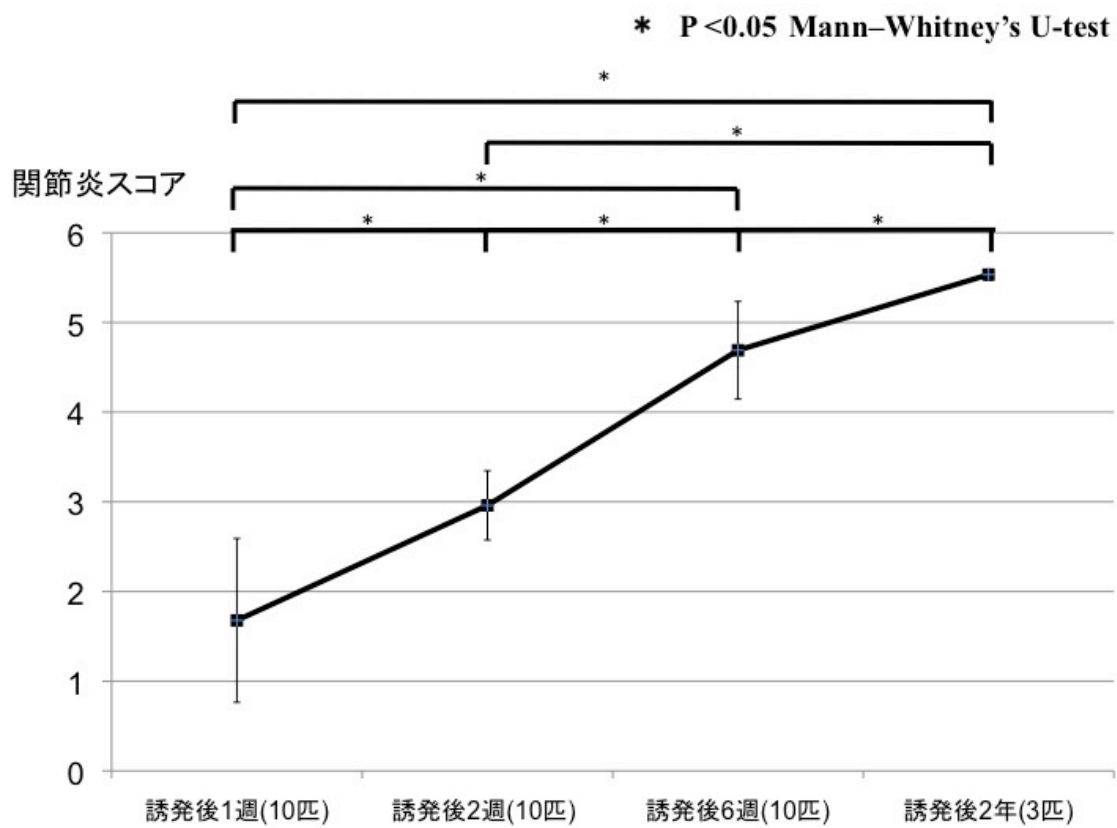
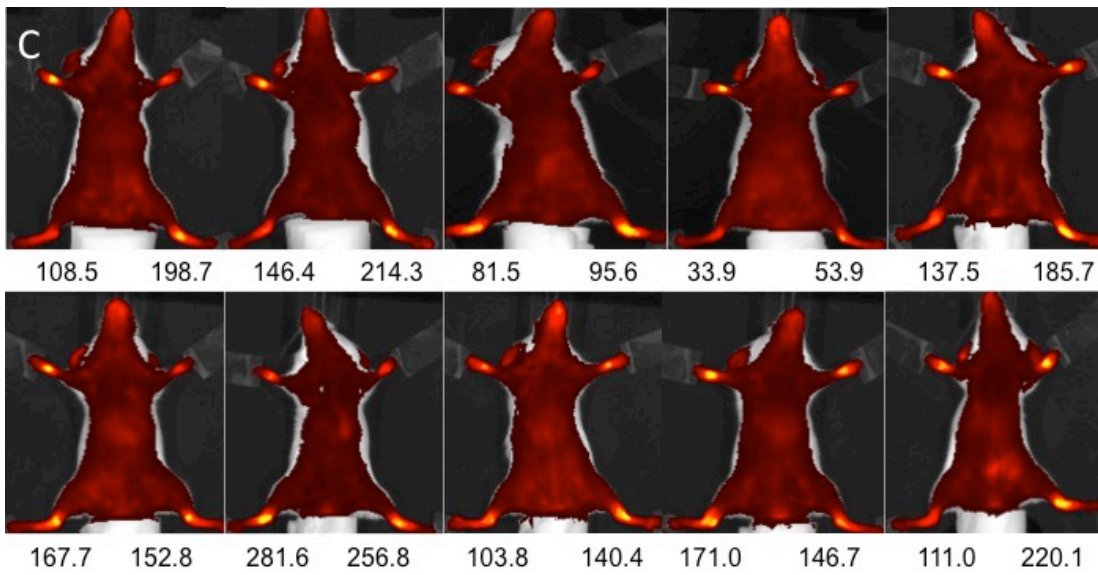
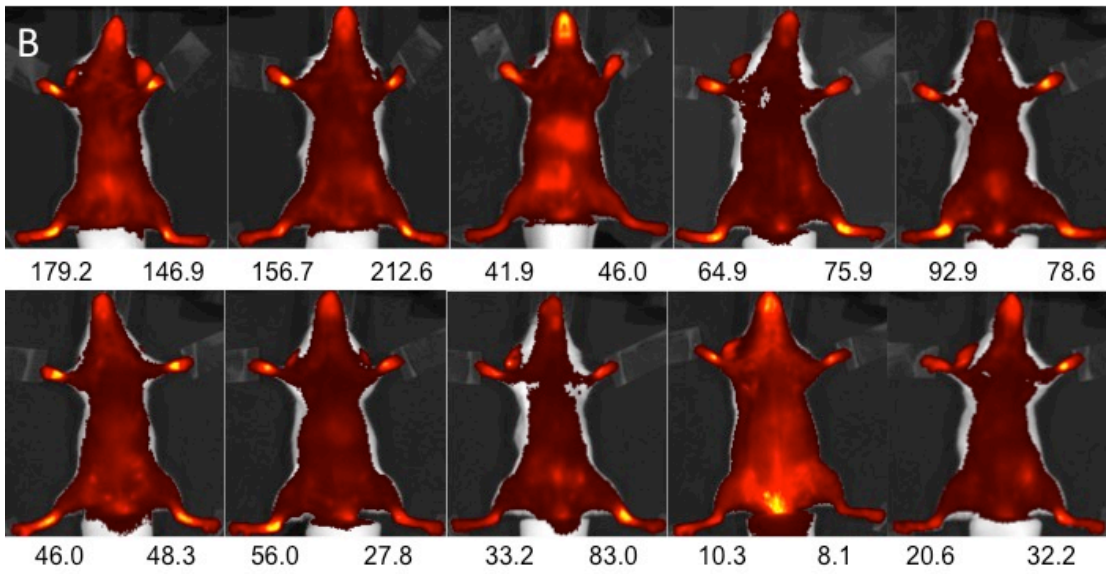
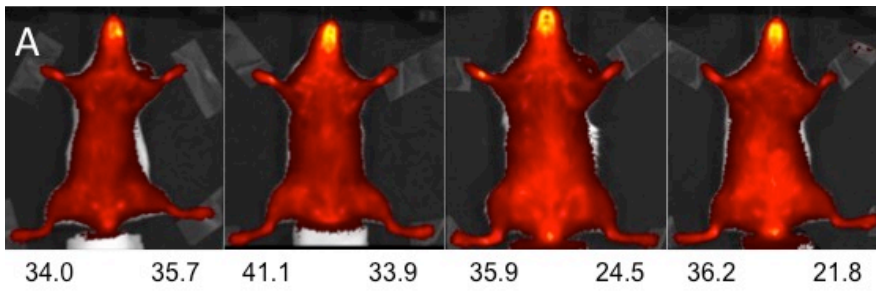


図 21. 関節炎誘発後 1 週、2 週、6 週、2 年における関節炎スコア

本実験での関節炎スコアは過去の SKG/Jcl マウスの関節炎誘発後の推移と同様であった。また各群間に統計学的有意差を認めた。



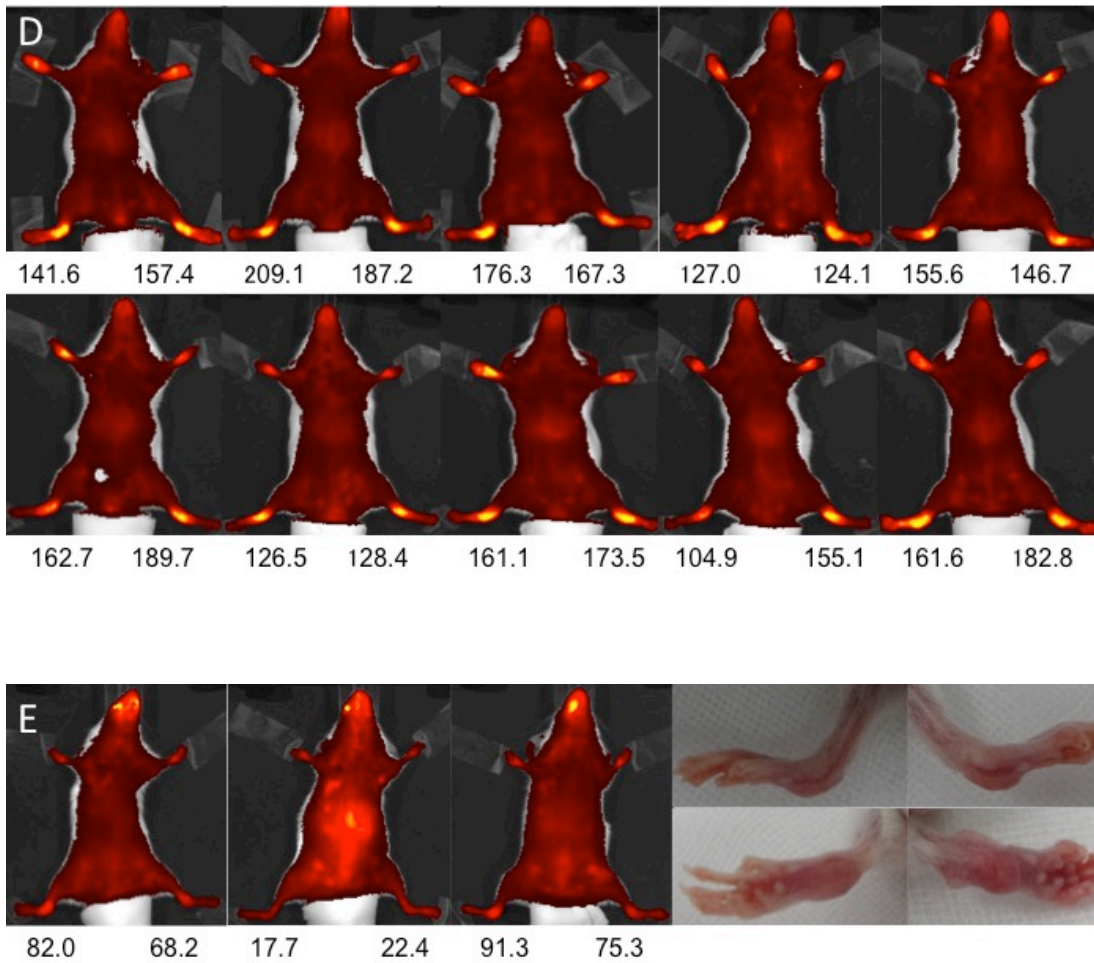


図 22. A : 14 週齢 control、B : 関節炎誘発後 1 週、C : 関節炎誘発後 2 週、D : 関節炎誘発後 6 週、E : 関節炎誘発後 2 年の SKG / Jcl マウスにおける ICG ラクトソーム投与後 24 時間の IVIS Spectrum 画像と蛍光強度比。

A の control では足関節の蛍光輝度上昇は全例みられない。B・C の誘発後 1・2 週においては足関節に蛍光輝度の上昇がみられる個体とみられない個体、片側のみ蛍光輝度上昇がみられる個体が混在している。D の誘発後 6 週では全例で足関節の蛍光輝度が上昇している。E の誘発後 2 年では足関節蛍光輝度上昇は全例みられない。

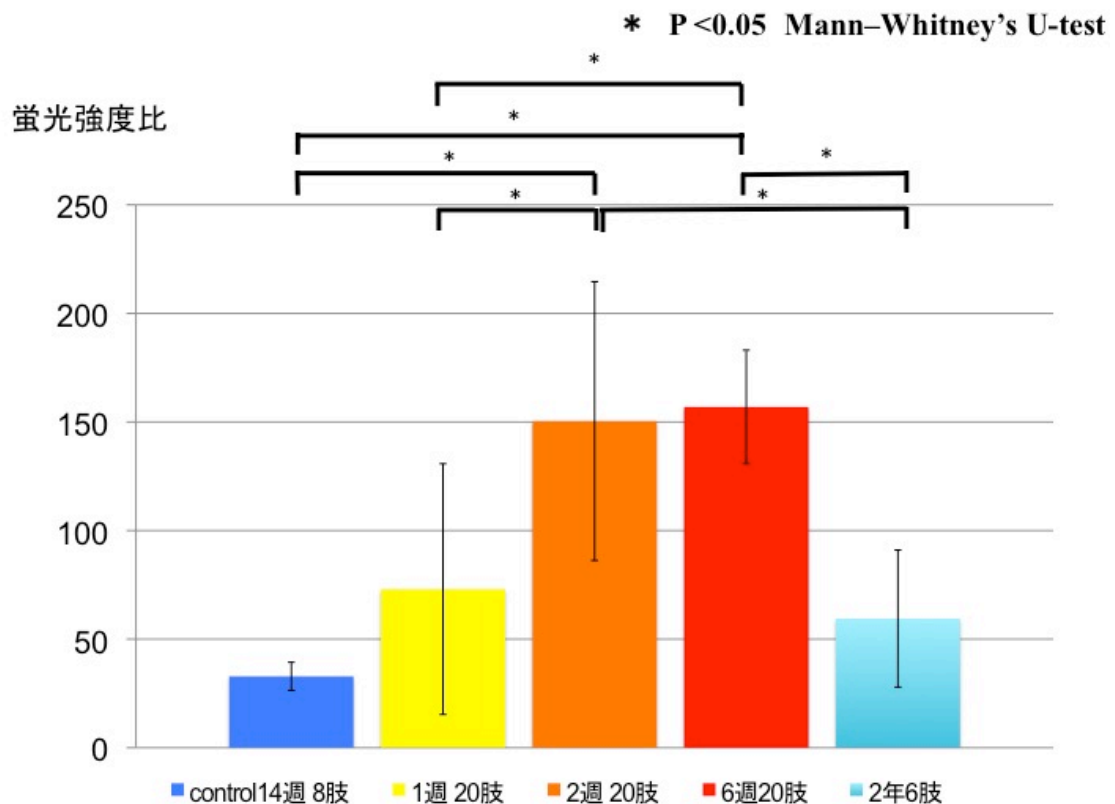


図 23. 14 週齢の control と、8 週齢で関節炎を誘発し、1 週・2 週・6 週・2 年飼育した SKG / Jcl マウスの、ICG ラクトソーム投与後 24 時間での蛍光強度比

- ・ control、関節炎誘発後 1 週間、節炎誘発後 2 年の間に有意差はみられない
- ・ 関節炎誘発後 2 週と 6 週の間に有意差はみられない
- ・ 関節炎誘発後 1 週と 2 週の間には有意差がみられる

これらから関節炎誘発後 2 週で蛍光強度比から関節炎発症が判別可能である。

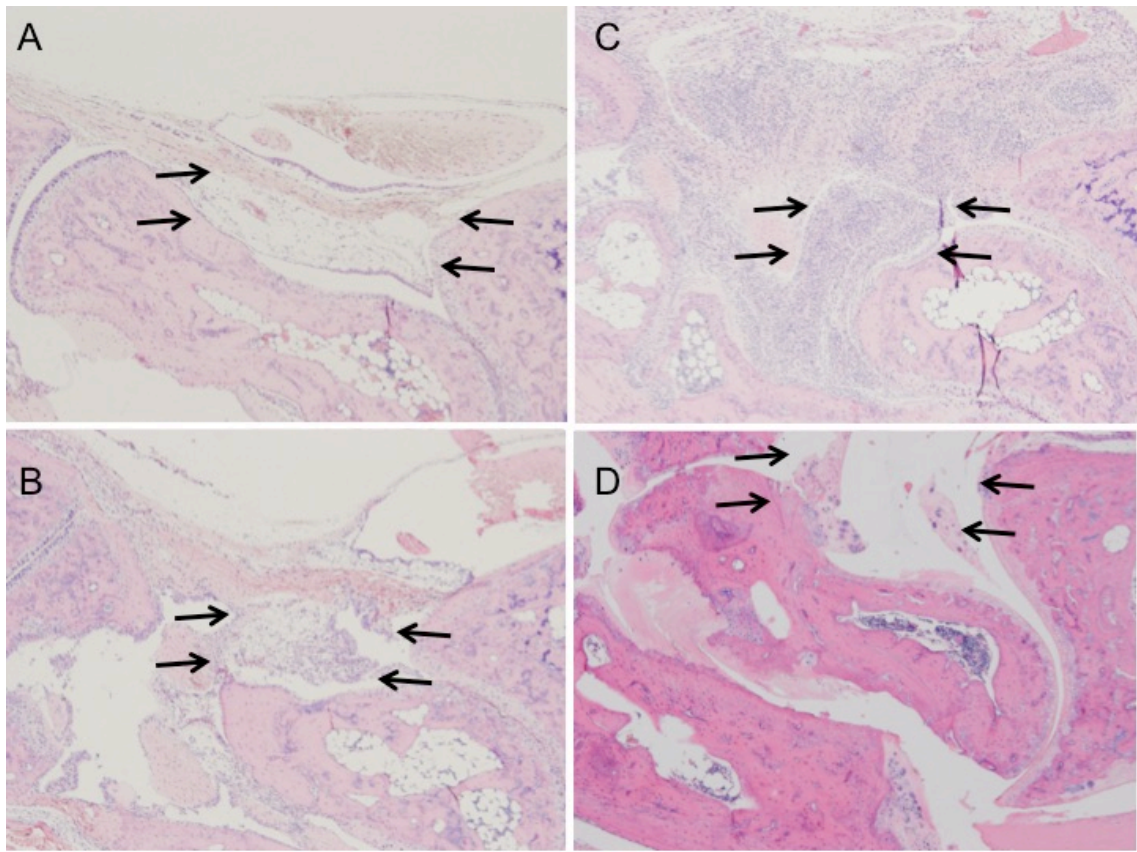


図 24. HE 染色における代表的滑膜炎スコア (× 40 黒矢印間の滑膜で判定)

A: 誘発後 1 週。滑膜細胞 2~4 層、炎症細胞浸潤なし、滑膜炎スコア $1 + 0 = 1$ 。

B: 誘発後 2 週。滑膜細胞 4~9 層、炎症細胞浸潤軽度、滑膜炎スコア $2 + 1 = 3$ 。

C: 誘発後 2 週。滑膜細胞 4~9 層、炎症細胞浸潤重度、滑膜炎スコア $2 + 3 = 5$ 。

D: 誘発後 2 年。滑膜消失。

滑膜炎スコア

* $P < 0.05$ Mann-Whitney's U-test

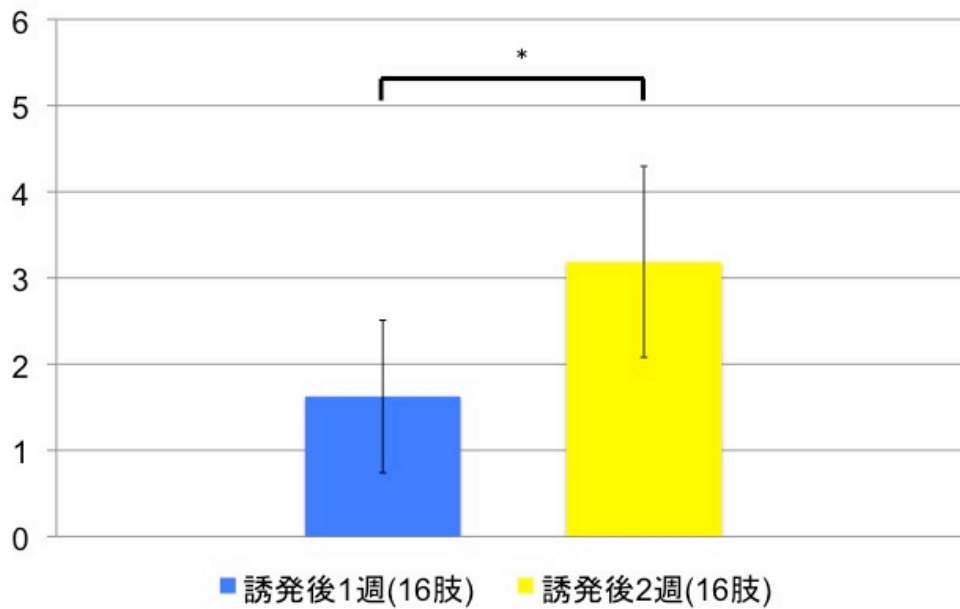


図 25. 関節炎誘発後 1 週と 2 週における滑膜炎スコア

関節炎誘発後 1 週の平均値は 1.41 (±0.88)、2 週は 3.25 (±0.64) で統計学的有意差を認めた。

引用文献

- [1] Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Annals of the rheumatic diseases*. 1993;52 Suppl 1:S39-47.
- [2] Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(3):717-9.
- [3] Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005;4(3):130-6.
- [4] van der Heijde DM, van Riel PL, van Leeuwen MA, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB. Prognostic factors for radiographic damage and physical disability in early rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of 147 patients. *British journal of rheumatology*. 1992;31(8):519-25.
- [5] St Clair EW. Therapy of rheumatoid arthritis: new developments and trends. *Current rheumatology reports*. 1999;1(2):149-56.
- [6] Bejarano V, Quinn M, Conaghan PG, Reece R, Keenan AM, Walker D, et al. Effect of the early use of the anti-tumor necrosis factor adalimumab on the prevention of job loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;59(10):1467-74.
- [7] Kimel M, Cifaldi M, Chen N, Revicki D. Adalimumab plus methotrexate improved SF-36 scores and reduced the effect of rheumatoid arthritis (RA) on work activity for patients with early RA. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(2):206-15.
- [8] Finckh A, Liang MH, van Herckenrode CM, de Pablo P. Long-term impact of early treatment on radiographic progression in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2006;55(6):864-72.
- [9] Schneider M, Kruger K. Rheumatoid arthritis--early diagnosis and disease management. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(27-28):477-84.
- [10] Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(2):357-65.
- [11] Guillemin F, Billot L, Boini S, Gerard N, Odegaard S, Kvien TK. Reproducibility and sensitivity to change of 5 methods for scoring hand radiographic damage in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2005;32(5):778-86.
- [12] Backhaus M, Kamradt T, Sandrock D, Loreck D, Fritz J, Wolf KJ, et al. Arthritis of the finger joints: a comprehensive approach comparing conventional radiography, scintigraphy, ultrasound, and contrast-enhanced

- magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum.* 1999;42(6):1232-45.
- [13] Szkudlarek M, Klarlund M, Narvestad E, Court-Payen M, Strandberg C, Jensen KE, et al. Ultrasonography of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis: a comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography and clinical examination. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R52.
- [14] Terslev L, Torp-Pedersen S, Savnik A, von der Recke P, Qvistgaard E, Danneskiold-Samsoe B, et al. Doppler ultrasound and magnetic resonance imaging of synovial inflammation of the hand in rheumatoid arthritis: a comparative study. *Arthritis Rheum.* 2003;48(9):2434-41.
- [15] Brenner W. 18F-FDG PET in rheumatoid arthritis: there still is a long way to go. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2004;45(6):927-9.
- [16] McQueen FM, Ostergaard M. Established rheumatoid arthritis - new imaging modalities. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(5):841-56.
- [17] Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Michel BA, Gay RE, Gay S, et al. S100A4 (Mts1): is there any relation to the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Autoimmun Rev.* 2006;5(2):129-31.
- [18] Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotechnol.* 2005;23(3):313-20.
- [19] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research.* 1986;46(12 Pt 1): 6387-92.
- [20] Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proceedings of the Japan Academy, Series B.* 2012;88(3):53-71.
- [21] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):71-9.
- [22] Upreti M, Jyoti A, Sethi P. Tumor microenvironment and nanotherapeutics. *Transl Cancer Res.* 2013;2(4):309-19.
- [23] Hansch A, Frey O, Sauner D, Hilger I, Haas M, Malich A, et al. In vivo imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):961-7.
- [24] Baker KJ. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins. *Proceedings of the Society for*

- Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY). 1966;122(4):957-63.
- [25] Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJ, Lowik CW, et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *Journal of surgical oncology*. 2011;104(3):323-32.
- [26] Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, Patila T, Spillmann T, Tuchin VV, et al. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *International journal of biomedical imaging*. 2012;2012:940585.
- [27] Schubert GA, Schmieder K, Seiz-Rosenhagen M, Thome C. ICG videography facilitates interpretation of vascular supply and anatomical landmarks in intramedullary spinal lesions: two case reports. *Spine*. 2011;36(12):E811-3.
- [28] Schubert GA, Barth M, Thome C. The use of indocyanine green videography for intraoperative localization of intradural spinal tumors. *Spine*. 2010;35(6):E212-7.
- [29] 塚西 敏則, 坂根 正孝, 安部 哲哉, 船山 徹, 山崎 正志. インドシアニン グリーン蛍光ナビゲーション(ICG 蛍光法)の脊髄腫瘍への応用と術中高位 診断における有用性についての検討. *Journal of Spine Research*. 2014;5(7):1077-82.
- [30] Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *The Journal of clinical investigation*. 1960;39:592-600.
- [31] Wynne HA, Goudevenos J, Rawlins MD, James OF, Adams PC, Woodhouse KW. Hepatic drug clearance: the effect of age using indocyanine green as a model compound. *British journal of clinical pharmacology*. 1990;30(4):634-7.
- [32] Makino A, Yamahara R, Ozeki E, Kimura S. Preparation of Novel Polymer Assemblies, "Lactosome", Composed of Poly(L-lactic acid) and Poly(sarcosine). *Chemistry Letters*. 2007;36(10):1220-1.
- [33] Shimizu Y, Temma T, Hara I, Yamahara R, Ozeki E, Ono M, et al. Development of novel nanocarrier-based near-infrared optical probes for in vivo tumor imaging. *Journal of fluorescence*. 2012;22(2):719-27.
- [34] Hara E, Makino A, Kurihara K, Sugai M, Shimizu A, Hara I, et al. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(8):4046-52.
- [35] Choi HS, Frangioni JV. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Molecular imaging*. 2010;9(6):291-310.
- [36] Makino A, Kizaka-Kondoh S, Yamahara R, Hara I, Kanzaki T, Ozeki E, et

- al. Near-infrared fluorescence tumor imaging using nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide. *Biomaterials*. 2009;30(28):5156-60.
- [37] Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 2003;426(6965):454-60.
- [38] Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, et al. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med*. 2005;201(6):949-60.
- [39] Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, Maeda S, Teradaira S, Akizuki S, et al. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 2010;207(6):1135-43.
- [40] Funayama T, Sakane M, Abe T, Hara I, Ozeki E, Ochiai N. Intraoperative Near-infrared Fluorescence Imaging with Novel Indocyanine Green-Loaded Nanocarrier for Spinal Metastasis: A Preliminary Animal Study. *The open biomedical engineering journal*. 2012;6:80-4.
- [41] Tsukanishi T, Funayama T, Ozeki E, Hara I, Abe T, Onishi S, et al. Indocyanine Green-lactosome and Near-infrared Light-based Intraoperative Imaging and Photodynamic Therapy for Metastatic Bone Tumors. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 2014;27(4):449-52.
- [42] Choy EHS, Panayi GS. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(12):907-16.
- [43] Johnson WJ, Muirhead KA, Meunier PC, Votta BJ, Schmitt TC, DiMartino MJ, et al. Macrophage activation in rat models of inflammation and arthritis. Systemic activation precedes arthritis induction and progression. *Arthritis Rheum*. 1986;29(9):1122-30.
- [44] Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996;39(1):115-24.
- [45] Levick JR. Permeability of rheumatoid and normal human synovium to specific plasma proteins. *Arthritis Rheum*. 1981;24(12):1550-60.
- [46] Simon J, Surber R, Kleinstaub G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, et al. Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2001;17(2):127-36.
- [47] Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunology letters*. 2006;106(1):8-13.
- [48] Gemeinhardt I, Puls D, Gemeinhardt O, Taupitz M, Wagner S, Schnorr B,

- et al. Near-infrared fluorescence imaging of experimentally collagen-induced arthritis in rats using the nonspecific dye tetrasulfocyanine in comparison with gadolinium-based contrast-enhanced magnetic resonance imaging, histology, and clinical score. *J Biomed Opt.* 2012;17(10):106008.
- [49] Fischer T, Gemeinhardt I, Wagner S, Stieglitz DV, Schnorr J, Hermann KG, et al. Assessment of unspecific near-infrared dyes in laser-induced fluorescence imaging of experimental arthritis. *Acad Radiol.* 2006;13(1):4-13.
- [50] Vollmer S, Gemeinhardt I, Vater A, Schnorr B, Schnorr J, Voigt J, et al. In vivo therapy monitoring of experimental rheumatoid arthritis in rats using near-infrared fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2014;19(3):36011.
- [51] Meier R, Krug C, Golovko D, Boddington S, Piontek G, Rudelius M, et al. Indocyanine green-enhanced imaging of antigen-induced arthritis with an integrated optical imaging/radiography system. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2322-7.
- [52] Ryu JH, Lee A, Chu JU, Koo H, Ko CY, Kim HS, et al. Early diagnosis of arthritis in mice with collagen-induced arthritis, using a fluorogenic matrix metalloproteinase 3-specific polymeric probe. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3824-32.
- [53] Yaseen MA, Yu J, Jung B, Wong MS, Anvari B. Biodistribution of encapsulated indocyanine green in healthy mice. *Molecular pharmaceutics.* 2009;6(5):1321-32.
- [54] Dziekan T, Weissbach C, Voigt J, Ebert B, Macdonald R, Bahner ML, et al. Detection of rheumatoid arthritis by evaluation of normalized variances of fluorescence time correlation functions. *J Biomed Opt.* 2011;16(7):076015.
- [55] Fischer T, Ebert B, Voigt J, Macdonald R, Schneider U, Thomas A, et al. Detection of rheumatoid arthritis using non-specific contrast enhanced fluorescence imaging. *Acad Radiol.* 2010;17(3):375-81.
- [56] Meier R, Thuermel K, Noel PB, Moog P, Sievert M, Ahari C, et al. Synovitis in patients with early inflammatory arthritis monitored with quantitative analysis of dynamic contrast-enhanced optical imaging and MR imaging. *Radiology.* 2014;270(1):176-85.
- [57] Glimm AM, Werner SG, Burmester GR, Backhaus M, Ohrndorf S. Analysis of distribution and severity of inflammation in patients with osteoarthritis compared to rheumatoid arthritis by ICG-enhanced fluorescence optical imaging and musculoskeletal ultrasound: a pilot study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2015.
- [58] Meier R, Thurmel K, Moog P, Noel PB, Ahari C, Sievert M, et al. Detection of synovitis in the hands of patients with rheumatologic disorders:

- diagnostic performance of optical imaging in comparison with magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2489-98.
- [59] Lewis JS, Hembree WC, Furman BD, Tippets L, Cattel D, Huebner JL, et al. Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2011;19(7):864-73.
- [60] Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(1):17-25.
- [61] Hara E, Makino A, Kurihara K, Yamamoto F, Ozeki E, Kimura S. Pharmacokinetic change of nanoparticulate formulation "Lactosome" on multiple administrations. *International immunopharmacology.* 2012;14(3):261-6.

謝辞

本研究と論文作成にあたり、ご指導、ご高閲を賜りました坂根正孝博士(筑波大学医学医療系整形外科准教授、山崎正志教授(筑波大学医学医療系整形外科教授ならびに筑波大学附属病院特区副病院長)に心から感謝いたします。また、実験の指導をして頂いた塚西敏則博士(県北医療センター高萩協同病院整形外科)、ICG ラクトソームを提供いただいた木村俊作博士(京都大学大学院工学研究科材料化学専攻教授)、*in vivo* 蛍光イメージング装置の指導を頂いた三輪佳宏博士(筑波大学医学医療系講師)、共同研究者の小関英一博士(株式会社島津製作所 基盤技術研究所主幹研究員)と原功博士(株式会社島津製作所職員)、および実験助手をして頂いた菅谷久博士(筑波大学医学医療系整形外科講師)、小林美穂子殿(筑波大学附属病院 T-CReDO 中央管理ユニット職員)、助言をいただいた原友紀博士(筑波大学医学医療系整形外科)に深謝いたします。

