

博士論文

薬物送達効率化に向けた腫瘍血管における粒子噴出現象
の汎用性の探究

五十嵐 一紀

博士論文

論文題目

薬物送達の効率化に向けた腫瘍血管における粒子噴出現象
の汎用性の探究

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教員：山嵜 達也 教授

五十嵐 一紀

目次

1. 要旨	p. 6
2. 本論文で用いた略語一覧	p. 8
3. はじめに（研究の背景）	p. 9
3.1 がん治療と薬剤送達	p. 9
3.2 腫瘍血管における粒子噴出現象	p. 10
4. 本研究の目的	p. 17
5. ポリマーナノ粒子の粒子径が噴出現象に及ぼす影響の検証	p. 18
5.1 目的	p. 18
5.2 方法	p. 18
5.2.1 粒子の準備と合成、性質評価	p. 18
5.2.2 腫瘍モデルマウスの準備と噴出現象の観察	p. 20
5.2.3 粒子噴出現象の同定と解析	p. 23
5.3 結果	p. 25
5.3.1 準備、合成した粒子の性質	p. 25
5.3.2 BxPC3 肝癌におけるポリマーナノ粒子の噴出について	p. 27
5.4 考察	p. 30
6. デキストラン非存在下、正常免疫マウスを用いた同所移植乳癌モデルにおい	

て、ポリマーナノ粒子の粒子径が噴出現象に及ぼす影響の検証	p. 30
6.1 目的	p. 30
6.2 方法	p. 31
6.2.1. PIC micelle を用いたデキストラン非存在条件下での検証	p. 31
6.2.2. 4T1 同所移植乳癌正常免疫マウスモデルを用いた検証	p. 32
6.3 結果	p. 35
6.3.1 PIC micelle の性質	p. 35
6.3.2 デキストラン非存在下におけるポリマーナノ粒子の噴出について	p. 37
6.3.3 正常免疫マウスを用いた 4T1 同所移植乳癌モデルにおけるポリマー ナノ粒子の噴出について	p. 39
6.4 考察	p. 43
7. 数値モデルによる噴出孔の大きさの推定	p. 44
7.1 目的	p. 44
7.2 方法	p. 44
7.3 結果	p. 55
7.4 考察	p. 66
8. 302 nm より大きい粒子と腫瘍血管における粒子噴出現象	p. 66

8.1	目的	p. 66
8.2	方法	p. 67
8.2.1	粒子の準備・合成	p. 67
8.2.2	粒子の性質評価	p. 67
8.2.3	粒子噴出現象の観察・解析	p. 68
8.3	結果	p. 69
8.3.1	粒子の性質評価	p. 69
8.3.2	PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアと粒子噴出現象	p. 72
8.4	考察	p. 73
9.	抗体と腫瘍血管における粒子噴出現象	p. 74
9.1	目的	p. 74
9.2	方法	p. 74
9.2.1	蛍光標識抗体の合成	p. 74
9.2.2	粒子の性質評価	p. 74
9.2.3	粒子噴出現象の観察・解析	p. 75
9.3	結果	p. 75
9.3.1	粒子の性質評価	p. 75
9.3.2	抗体薬の噴出現象	p. 77

9.4 考察	p. 80
10. 結論	p. 80
11. 謝辞	p. 83
12. 引用文献	p. 84

1. 要旨

薬剤送達（ドラッグデリバリー）は有効な薬剤を開発する上で重要な要素の一つである。特に腫瘍に対する薬剤送達については盛んに研究が行われ、腫瘍血管に特異的な内皮細胞間隙からの漏出や細胞内小胞を介した輸送などさまざまな送達経路が指摘されている。その中で新たな薬剤送達経路として期待されているのが、近年発見された腫瘍血管の一部が爆発するようにして薬剤が噴出する動的な現象である。この現象は直径 100 nm 以下のナノ粒子及び高分子を送達する経路として有用であるとこれまで報告されてきたが、本研究では、その適応範囲がさらに広く、302 nm のポリマーナノ粒子の輸送が可能であることを明らかにした。またナノ粒子や高分子に限らず、抗体も本現象によって腫瘍血管を透過していることが確認された。数理モデルを用いて本現象をシミュレーションしたところ、血管壁に孔が開くというシンプルなモデルで周囲の粒子の局所濃度の推移を説明することが可能であり、この孔は概して 620 nm 以上の値を取ることが推定された。また噴出現象が生じる位置としては、単位血管表面積当たりの頻度では明らかな偏りを認めなかった一方、単位体積当たりの血管表面積が相対的に広がる細血管において、噴出頻度が高いという傾向がみられた。以上の結果から、この腫瘍血管における噴出現象が、これまでより汎用性が高く、100～302 nm のポリマーナノ粒子、また異なる種類の粒子である抗体にも適応可能な血管透過経路である

ことが明らかとなった。これは本現象が今後の薬剤設計の幅を広げる可能性を期待させる結果であった。

2. 本論文で用いた略語一覧

EPR : enhanced permeation and retention

DACHPt/m : ダハプラチン内包ナノミセル

FITC : フルオレセインイソチオシアネート

DNFB : 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene

PICsome : ポリイオンコンプレックス型ベシクル

PIC micelle : ポリイオンコンプレックス型ミセル

PEG : ポリエチレングリコール

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

CHOL : コレステロール

mPEG2000-DSPE : N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DMTMM : 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride

DLS : dynamic light scattering (動的光散乱法)

ROI : region of interest (関心領域)

3. はじめに（研究の背景）

3.1 がん治療と薬剤送達

がんの発症数は世界的にも増加の一途を辿っており、毎年 1800 万人以上が新たにがんと診断されている[1]。さまざまな治療法が開発される中で、特に薬物療法において欠かせない要素として腫瘍への薬剤送達（ドラッグデリバリー）が研究されてきた[2]。効率的な薬剤送達を実現する上で注目されてきたのが enhanced permeation and retention (EPR)効果である。腫瘍を栄養する血管は内皮細胞や基底膜を欠くことが多いため透過性が高く、また腫瘍内のリンパ管は細胞浸潤によって閉塞していることが多いため有効な排出経路となり得ない。EPR 効果は、この 2 つの特徴が合わさることによって、血管内に投与された薬物が腫瘍へと集積しやすくなる現象である[3]。

この EPR 効果を効率的に活用しようと多くの薬剤が研究される中で、粒子の大きさ及び表面電荷と言った性質の重要性が広く知られるようになった。粒子径として概ね 5 nm 以上、200 nm 以下が理想的とされており、これは 5 nm 未満では腎尿細管で濾過されて排出されてしまうこと、200 nm より大きくては肝臓及び脾臓で捕捉されやすくなることによる。また表面電荷ないしゼータ電位が負または中性であることが重要とされており、これは負電荷を帯び、血中に多く存在する赤血球及びアルブミンとの相互作用による凝集を避けることができるためである

[4]。これらの条件を踏まえつつさまざまなナノ薬剤が開発され、一部は実臨床でも用いられている。しかしながら、その恩恵を享受できる患者は依然として限られており、腫瘍への薬物送達の更なる効率化が望まれる現状がある[5]。

3.2 腫瘍血管における粒子噴出現象

これまで主に想定されてきた、古典的 EPR 効果による薬物送達は、既に存在する血管内皮細胞間隙を介して濃度勾配によって数時間から数日かけて生じる緩徐なものであった。これに対し、近年、当研究グループより腫瘍血管から局所的に噴出するようにして数分という短時間でナノ粒子が透過する現象が報告され、新たな薬物送達の方法として活用できるのではないかと注目されている[6]。古典的 EPR 効果、局所的噴出現象それぞれの代表的な画像を図 1 に示す。

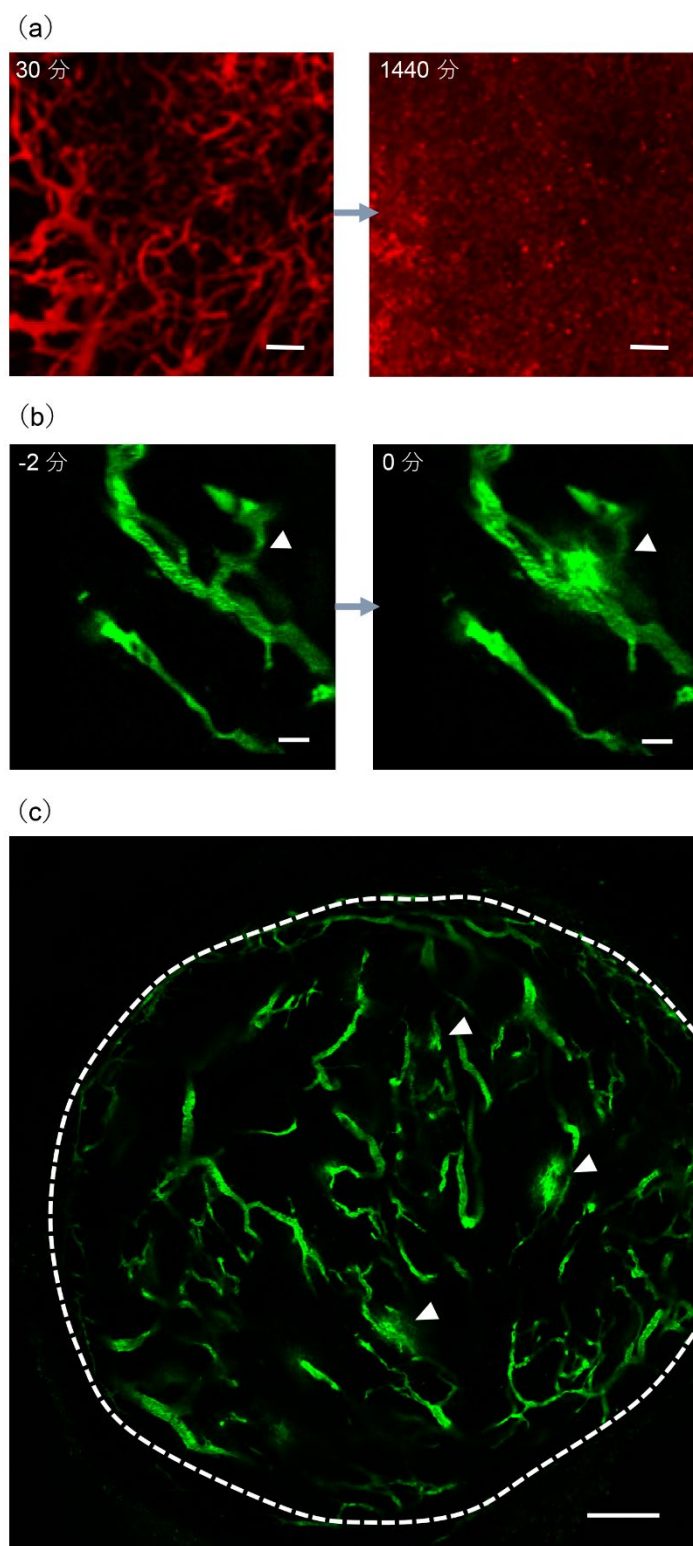


図 1：古典的 EPR 効果、局所的噴出現象それぞれの代表的な画像（BxPC3 膵癌）

(a) 古典的 EPR 効果による定常状態の血管内皮細胞間隙を介した緩徐な粒子の腫瘍集積の経時的変化。赤：AlexaFluor647-DACHPt/m。スケールバー 50 μ m。

(b) 局所的な粒子噴出現象による短時間で急激に開く孔を介した動的な粒子の腫瘍への透過の経時的変化。緑：FITC-デキストラン。スケールバー 20 μ m。(c) 粒子噴出現象を認めた腫瘍の全体像。白色点線は腫瘍辺縁、白色矢印は噴出箇所。スケールバー 200 μ m。

当研究グループからの報告では、この噴出現象は、ナノ粒子の静脈投与から 10 時間以上に渡り断続的に生じ [6]、ヒト臍癌（同所・異所移植）、ヒト膠芽腫（異所移植）、ヒト線維肉腫（異所移植）モデルマウスにおいて発生することが確認されている [6,7]。またその他の文献においてマウス乳癌（同所・異所移植）、マウス悪性黒色腫（同所移植）、ヒト前立腺癌（異所移植）モデルマウスでも報告が存在する [8,9]。通常、悪性腫瘍以外の血管において噴出現象は生じないことが報告されており [6,8]、その他の文献も全て悪性腫瘍での噴出現象に限って検討したものである [7,9]。

一方、当方で渉猟し得た範囲では、唯一、IV型アレルギーである接触性皮膚炎モデルマウスの耳介皮膚の正常血管にて、類似した現象が認められている。アレルギーである 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) をマウス皮膚に塗布しておき、6 日後にその所属リンパ節から T 細胞を回収、別のマウスに対してこの T 細胞を静注し、耳介皮膚に DNFB を塗布して観察したものである。静注した蛍光デキストランが局所的に 5 分間程度の短期間、噴出する様子が観察されており、全く同じ現象であると断定はできないが、腫瘍血管における噴出現象と似た外観を呈している [10]。I 型アレルギーであるアナフィラキシーのモデルマウスの耳介皮膚血管、臍臓虚血後再灌流モデルマウスの臍臓内の血管、電気パルスによって細胞膜に孔をあける電気穿孔法をかけた正常マウスの背部皮膚血管などでも血中蛍

光粒子の血管外漏出の促進は認められるが、局所的ではなく、少なくとも数十 μm の範囲に、数分ではなくより長時間に渡って生じており、今回の噴出現象とは異なる特徴を有する [10,11,12]。総じて、生理的条件下の正常血管において腫瘍血管における粒子噴出のような局所的で動的な現象の報告は渉猟し得ず、本現象が、特殊な条件下を除き、腫瘍特異的であると考えて良いのではないかと思われる。

腫瘍血管で噴出が生じる場所については、はっきりとした理由は分かっていないが、血管径が 10 μm 未満の毛細血管において噴出の頻度が高く、また腫瘍の中心より 1000~1500 μm と距離のある辺縁部で好発しているという報告がある [8]。

本現象で輸送できることが確認されている粒子は、直径 100 nm 以下の複数のナノ粒子や高分子である。プラチナ系抗がん剤を核としたポリマーナノ粒子で、臨床試験が進行中のダハプラチン内包ミセル（直径 30 nm と 70 nm）[6,7]、既に臨床において抗がん剤として用いられているドキソルビシン内包リポソーム（直径 90 nm）[6]、研究目的に自作されたりポソーム（直径 109 nm）[8]、重合多糖類の一種であり臨床的には代用血漿としても用いられているデキストラン（直径 13 nm）[9,10]など、いずれも概して直径 100 nm 以下であり、より大きな粒子についてはこれまでのところ検証がなされていない。またリポソームの噴出箇所にお

いて、量子ドット（直径 10~20 nm）やウシ血清アルブミン（直径 7 nm）と言った弱い負電荷を帯び、血中滞留性が良いことからトレーサーとして頻用される粒子の噴出を認めなかったとの報告もあり、この現象に何らかの粒子選択性がある可能性も考えられている[8]。

この現象は生体内蛍光共焦点顕微鏡のリアルタイムに腫瘍血管を観察できると言う特徴を生かして捉えられたものであり、その動的な性質から、現時点において他の手法で観察することが困難である。このため、その全容は未だ解明されておらず、噴出が生じる原理についても不明点が多い。一部の噴出箇所において好中球やマクロファージがナノ粒子・高分子と共に局在することが報告されているが、好中球やマクロファージを認めない噴出も数多く存在し、全てを説明するには至っていない[8,9]。DNFB 塗布IV型アレルギーモデルにおいても、静注した T 細胞が局所に遊走していることが想定されるが、具体的な検証はなされておらず、実際のところは不明である[10]。

この現象を促進する薬剤としては、TGF- β 阻害薬及びクロロキンが報告されている[7]。TGF- β 阻害薬は血管内皮細胞を支える周皮細胞の増生を抑制し、血管透過性を高めることが知られている非臨床薬である[13]。クロロキンは抗マラリア薬として開発された臨床薬であり、近年 vessel normalization を通じてナノ粒子の腫瘍集積を高めることが報告されている[14,15]。Vessel normalization とは、悪性

腫瘍における高い間質圧によって不完全で脆弱な腫瘍血管が押しつぶされて血流が途絶している状況に対して、間質圧を低減し血管構造を正常化する薬剤を用いることで、有効な血流域を拡大して EPR 効果を高める手法である。この際、血管構造を完全に正常化してしまうと粒子透過性も低下してしまうため、血流が再開する程度の耐久性は確保しつつも、血管内皮細胞間隙が保たれる程度の薬剤量を用いることが肝要とされている[16]。TGF- β 阻害薬を事前に静注した腫瘍モデルマウスにおいて噴出回数の増加が認められた一方、クロロキンでは回数は不変ながら噴出の範囲の拡大が報告されており、適切な薬剤の前投与によって腫瘍血管を下準備すれば、本現象を促進することができると考えられる[7]。現在まで、本現象を抑制する方法として示唆されているのは、前述の原理を踏まえた抗 Ly6G 抗体の腹腔内投与による好中球除去だが、皮下移植マウス乳癌への静注リポソームの集積量が減ると言う結果はあるものの噴出回数や頻度を検証してはおらず、実際に噴出現象を抑制しての結果とも考えられるが、厳密には明らかでない[8]。

EPR 効果の定義では、あくまで透過性が高い腫瘍血管が想定されているのであって、この透過性が時間的に変化するものであるかどうかは言及されていないため、この粒子噴出現象も厳密には EPR 効果という概念に内包されるとも考えられる。従って、これまでなされてきた研究における薬剤の腫瘍集積量の検証では、想定されていた古典的 EPR 効果によるものに加え、偶発的に発生した粒子噴出現

象による送達の総和を見ていたものと思われる。前述の通り、本現象の原理は一部を除き未だ解明されておらず、これを抑制する方法も限られるため、薬剤の腫瘍集積における本現象と古典的 EPR 効果の寄与度を正確に検証することは難しい。抗 Ly6G 抗体による好中球除去がどの程度噴出頻度を低減しているのか不明な為あくまで参考ではあるが、除去グループにおいては非除去グループに比べて 86%好中球が少なく、静注リポソーム（直径 109 nm）の皮下移植マウス乳癌への集積量が 24 時間後に 14%ほど低かったという報告がある[8]。これを踏まえると、同条件下では、噴出現象による薬剤送達は古典的 EPR 効果に比べると、腫瘍集積への寄与が相対的に低いものと推察される。

現在開発が進むナノ薬剤は直径 100 nm 以下に限らず幅広い粒径を持つ[17]。これを踏まえ、腫瘍血管における粒子噴出現象と言う新たな切り口からの薬剤送達の効率化を目指すべく、どのような粒子がこの現象によって輸送され得るのか、これまで研究されてきた範囲を超えて検証すると共に、噴出の局在について解析し、これまでの報告と比較検討した。

4. 本研究の目的

本研究では、腫瘍血管における噴出現象を利用できる粒子の条件について解明し、噴出箇所に傾向が無いか検証することで、本現象が腫瘍への薬剤送達に及ぼ

す影響を適切に評価し、これを活用した薬剤設計を可能とすること、また腫瘍微小環境の理解を深めることを目的とした。

5. ポリマーナノ粒子の粒子径が噴出現象に及ぼす影響の検証

5.1 目的

腫瘍へのドラッグデリバリーを目的とした薬剤の多くはポリマーナノ粒子である[18-20]。ポリマーナノ粒子は合成及び設計が比較的簡便で生体親和性が高く[21]、内容物の放出を細かく制御でき[22]、腫瘍の造影・治療いずれにも用いることが可能であり[23,24]、表面抗原の導入によってより選択的な送達を実現できる[25-27]ため、頻用されている。今回、腫瘍血管における粒子の噴出現象に関して種々のポリマーナノ粒子がどのような挙動を示すのか検証することで、本現象の理解と活用に役立てることを目的として実験を行った。

5.2 方法

今回我々は噴出の基準となるようフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識デキストランを用意、これと別の蛍光色素で標識したポリマーナノ粒子を同じ腫瘍に同時に投与し、基準となるデキストランの挙動と比較する形で解析を行った。

5.2.1 粒子の準備と合成、性質評価

FITC 標識 500 kDa デキストランに加え、代表的なポリマーナノ粒子として、本現象の報告でこれまで用いられてきた Alexa Fluor 647 標識ダハプラチン内包ナノミセル (DACHPt/m) [6,7]、臨床的に使われているリポソームと類似した粒子として DiD 標識 PEG 化リポソーム (DOPC/CHOL/mPEG2000-DSPE 50:45:5 mol/mol)、サイズ可変性の高い sulfo-Cy5 標識ポリイオンコンプレックス型ベシクル (PICsome) を準備した。具体的には、デキストランは Sigma-Aldrich 社より、リポソームは FormuMax 社より購入した。DACHPt/m は既に報告されている手順に従い、粒子径が既報[6,7]で用いられた 30 nm と 70 nm の中間の 59 nm となるよう合成した[28,29]。PICsome は既に報告されている手順に従い合成した[30-32]。

続いて、それぞれの粒子について、動的光散乱法 (DLS) と電気泳動光散乱法を用いて Z-average diameter (粒子径)、多分散指数、ゼータ電位を測定した。デキストラン、DACHPt/m、PICsome はポリマー濃度 1 mg/ml、リポソームは脂質濃度が 3.5 mg/ml となるよう、それぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、25°C下で測定した。測定機器には $\lambda = 532$ nm のダイオードレーザーを備えた Zetasizer Nano-ZS を用いた。デキストランは動的光散乱法による粒子測定ができないため、粘度を用いた測定法により算出された粒子径を引用した[33]。血中滞留性についてはそれぞれ過去の報告を引用した[28,30,34,35]。

5.2.2 腫瘍モデルマウスの準備と噴出現象の観察

BxPC3 ヒト膵癌細胞をそれぞれ American Type Culture Collection より入手し、RPMI-1640 (10% FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン) を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。BxPC3 を 5 週齢メス BALB/c nu/nu マウスの右側背部皮下に 1×10^6 接種し、 $>100 \text{ mm}^3$ に達するまで 3 週間生育させた。続いて新たに 5 週齢メス BALB/c nu/nu マウスの背部皮下に埋め込んだチタン製のチャンバー[36]に腫瘍片を移植し、2 週間生育した後に観察を行った。

2%イソフルランの持続吸入で全身麻酔をかけたマウスを 37°Cの電動ヒートステージ上に固定し、20×/0.75 CFI Plan Apo Lambda 対物レンズを備えた ECLIPSE Ni-E Nikon A1R 正立共焦点顕微鏡でチャンバー内の腫瘍をそのまま撮影した。 $\lambda = 480 \text{ nm}$ 、 640 nm のレーザーをそれぞれ 5~7% (1.5 mW 未満)、20% (2 mW 未満) で、励起光の検出には 500-550 nm、662-737 nm のフィルターを用いた。固定した撮像範囲では腫瘍の大きさに対して極めて狭い範囲しか撮影できないため、電動ステージと顕微鏡の自動位置調整機能を用いることで、XY 方向に 3×3 、Z 方向に $5 \mu\text{m}$ 間隔で 9 枚の範囲を、1 シークエンス約 2 分で繰り返し撮影した。

撮影開始 3 分後より、尾静脈から各サンプル 100 μl (デキストラン 1.0 mg/ml、DACHPt/m ポリマー濃度 2.1 mg/ml、リポソーム 脂質濃度 17.6 mg/ml、PICsome ポリマー濃度 1.0 mg/ml) を 30 秒間 (2 サンプル同時投与に

つき合計 60 秒間) で投与し、以降 1 時間、持続的に観察を行った。観察時の機器及びマウスのセットアップを図 2 に示す。

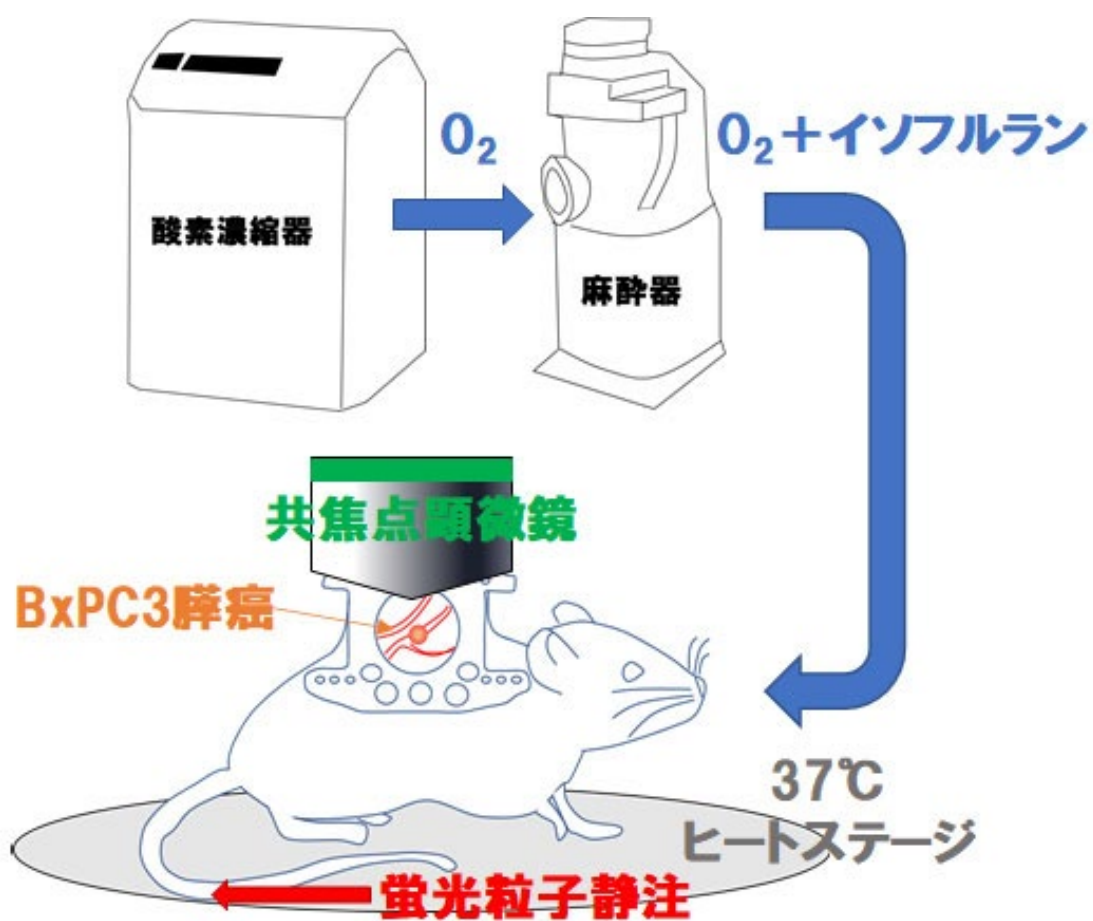


図 2：背部皮下チャンバーを用いた BxPC3 腫瘍モデルマウスを全身麻酔下に共焦点顕微鏡下で観察した際のセットアップ

5.2.3 粒子噴出現象の同定と解析

腫瘍血管における噴出箇所の同定は既報に従って半自動的に行った[6,7]。具体的には、画像編集ソフトウェア NIS-Elements を用いて画像の整列を行い、画像編集ソフトウェア ImageJ に取り込んだ。続いて、連続する画像フレームにおける差分を抽出し、閾値フィルター（ImageJ の default 設定：IsoData アルゴリズム[37]の亜型。）を適応することで画像を二値化し、噴出箇所候補のリスクを作成した（図 3）。このリストに挙げられた各候補について目視で確認し、噴出箇所を同定した。各噴出について、その位置及び開始時刻を記録した。噴出箇所の血管径はそれぞれ NIS-Elements で測定、記録した。腫瘍体積は Z スタック 9 枚分についてそれぞれ NIS-Elements で二次元的に測定し、スライス厚の $50\ \mu\text{m}$ を乗算することで算出した。腫瘍内の血管の総体積および総表面積は IMARIS を用いて測定した。平均血管径は、すべての血管を円柱と見なした上で、 r を血管の半径、 L を血管長とすると、総体積 $= \pi r^2 L$ 、総表面積 $= 2r \pi L$ につき、求めたい平均血管径 $2r$ は「総体積 \div 総表面積 $\times 4$ 」となることを用いて概算した。統計分析は解析ソフトウェア jamovi を用いて行った[38,39]。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と定義した。

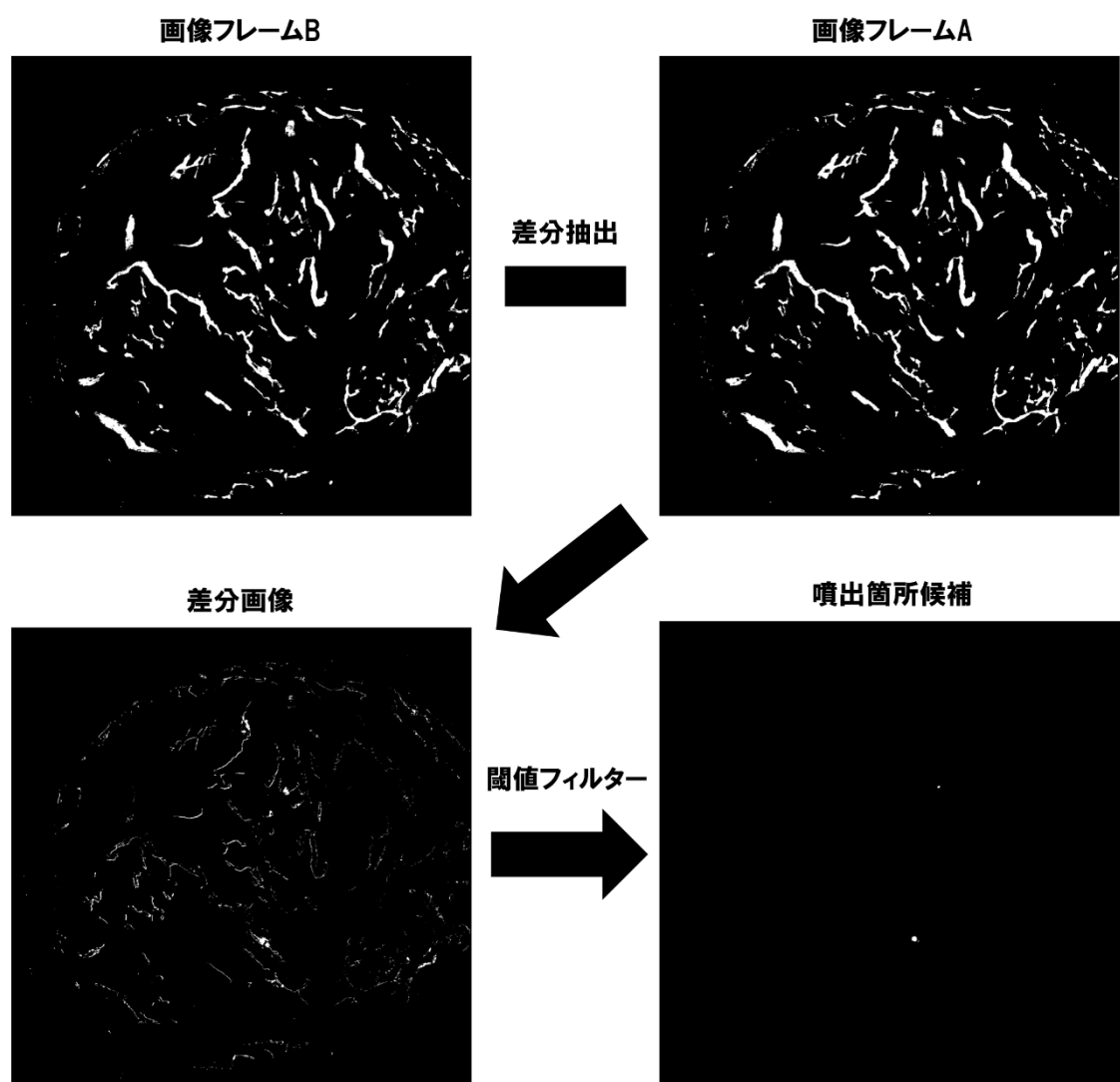


図 3：腫瘍血管における噴出箇所の同定方法

連続した画像フレーム A、B の差分を抽出し、閾値フィルターをかけることで外れ値を除外、噴出箇所候補を自動的に選出した。

5.3 結果

5.3.1 準備、合成した粒子の性質

準備、合成した粒子の性質一覧を**表 1**に示す。

表 1：本実験で用いた粒子とその性質一覧

粒子名	粒子径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)	血中半減期(時間)	引用文献
FITC-500 kDa デキストラン	32 [†]	N.A.	-8.4 ± 0.5 b)	5 [‡]	[†] 33, [‡] 34
Alexa Fluor 647- ダハプラチン内 包ナノミセル (DACHPt/m)	59 ± 0.4 ^{a)}	0.065 ± 0.007 ^{a)}	-1.3 ± 0.04 ^{b)}	15 [§]	[§] 28
DiD-PEG 化リ ポソーム	96 ± 0.3 ^{a)}	0.038 ± 0.007 ^{a)}	-6.6 ± 0.2 b)	5	35
Sulfo-Cy5-ポリ イオンコンプレ ックス型ベシク ル (PICsome)	302 ± 4.5 a)	0.058 ± 0.012 ^{a)}	-5.6 ± 1.2 b)	4.5 [¶]	[¶] 30

a) 動的光散乱法にて測定した Z-average diameter ± 標準誤差 (n=3)

b) 電気泳動光散乱法にて測定したゼータ電位 ± 標準誤差 (n=5)

5.3.2 BxPC3 膵癌におけるポリマーナノ粒子の噴出について

500 kDa デキストラン（直径 32 nm）と DACHPt/m（直径 59 nm）を投与したマウス（ $n=3$ ）では、デキストランの噴出が 56 回、DACHPt/m の噴出が 56 回認められ、56 回全ての位置及び開始時刻が共通（共局在）していた。また 500 kDa デキストランと PEG 化リポソーム（直径 96 nm）を投与したマウス（ $n=3$ ）では、デキストランの噴出が 100 回、リポソームの噴出が 99 回認められ、99/100 回で共局在していた。さらに 500 kDa デキストランと PICsome（直径 302 nm）を投与したマウス（ $n=3$ ）では、デキストランの噴出が 81 回、PICsome の噴出が 81 回認められ、これまた 81 回とも共局在していた。いずれの粒子の組み合わせでも噴出の共局在率に有意差は無かった。またデキストランの単位腫瘍体積当たりの噴出頻度は、DACHPt/m 共投与群で 229.8 ± 100.3 回/時間/ mm^3 、リポソーム共投与群で 334.4 ± 98.3 回/時間/ mm^3 、PICsome 共投与群で 256.9 ± 99.2 回/時間/ mm^3 と、各群間で有意差を認めなかった（図 4）。また単位血管表面積当たりの噴出頻度も、DACHPt/m 共投与群で 4.8 ± 1.0 回/時間/ mm^2 、リポソーム共投与群で 14.6 ± 6.5 回/時間/ mm^2 、PICsome 共投与群で 8.8 ± 2.0 回/時間/ mm^2 と、3 群間で有意差を認めなかった。

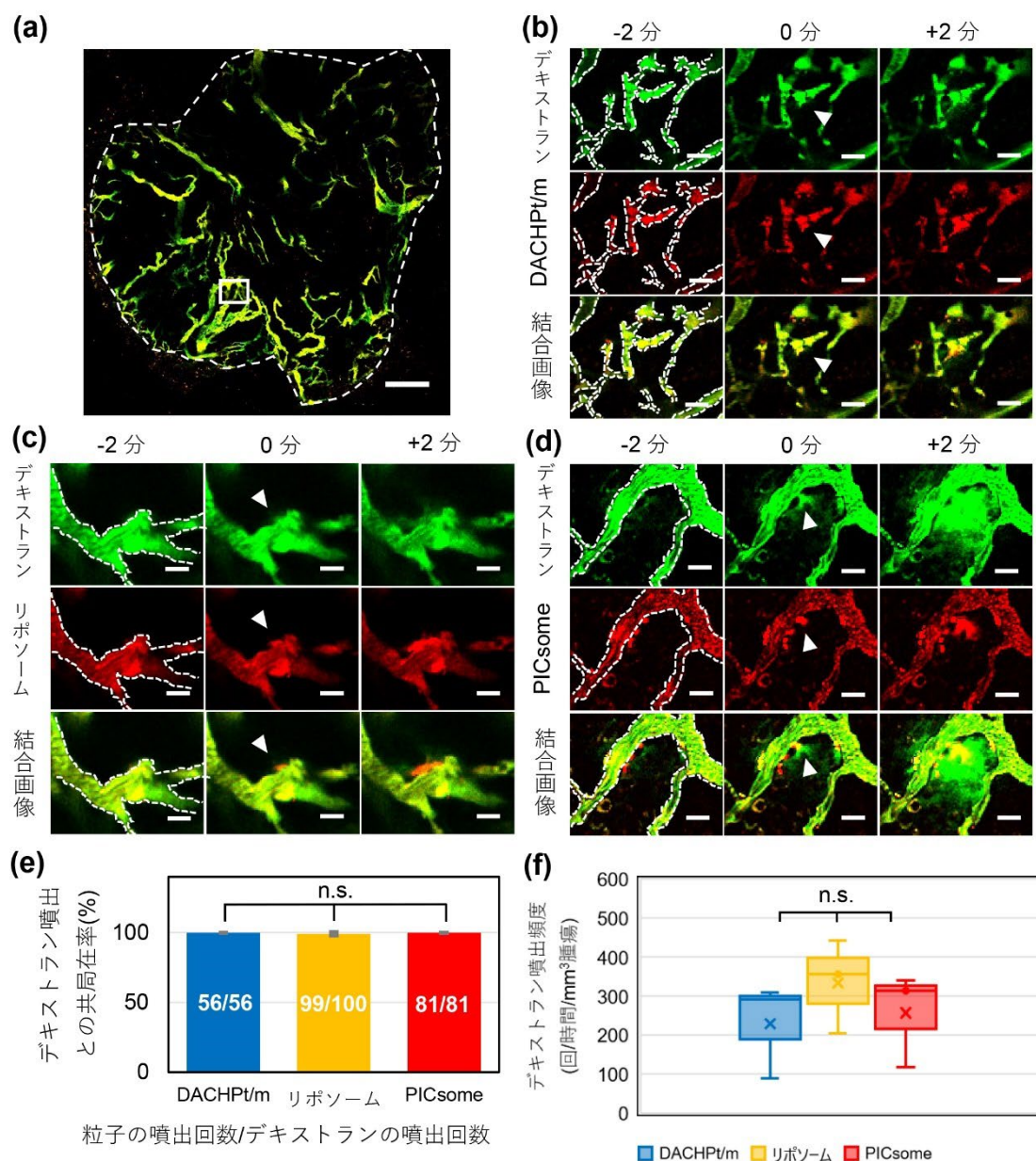


図 4：(a) 共焦点顕微鏡で観察した BxPC3 腫瘍の一例。点線は腫瘍外縁、四角は以下の噴出画像と同等の領域を示す。スケールバー 200 μm 。(b) DACHPt/m、(c) リポソーム、(d) PICsome それぞれとデキストランが同じ位置から同じ時刻より噴出を始めた（共局在した）噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。スケールバー 20 μm 。(e) それぞれの粒子とデキストランの噴出の共局在率

の比較。平均± 標準偏差 ($n = 3$)。1 元配置分散分析 (Fisher の検定) で有意差を認めなかった。(f) それぞれの粒子と共に静注した際のデキストランの噴出頻度 (回/時間/腫瘍体積(mm^3)) の比較 ($n = 3$)。1 元配置分散分析 (Fisher の検定) で有意差を認めなかった。

5.4 考察

今回、BxPC3 ヒト膵癌モデルマウスにおいて、同時に静注したデキストランを基準とした場合、直径 59 nm、96 nm、302 nm のポリマーナノ粒子がほぼすべての噴出において同じ位置から同じ時刻より噴出することが確認された。これまで噴出現象を検証したそれぞれの論文において、デキストラン、DACHPt/m、リポソームが個々に研究対象とされてきた経緯があるが[6-9,17]、外見的特徴から同一の現象として一括りに扱ってきたこれらの現象が、実際に同一の現象であることを今回の結果は示唆するものと考ええる。また同時に、ポリマー粒子の大きさは、直径 59~302 nm の範囲では、腫瘍血管からの噴出について特段影響を及ぼさないことが明らかとなった。一方、本研究では、同時に静注したデキストランの存在が結果に影響を与えている恐れがある。またデータが BxPC3 膵癌に限られていることから、この腫瘍特有の要因、免疫不全マウスを用いたモデルであることなどが影響していることも否定はできないため、検証する必要がある。

6. デキストラン非存在下、正常免疫マウスを用いた同所移植乳癌モデルにおいて、ポリマーナノ粒子の粒子径が噴出現象に及ぼす影響の検証

6.1 目的

これまでの実験で直径 32 nm のデキストラン及び直径 59~302 nm のポリマー

ナノ粒子は概して同じ位置から同じ時刻より噴出することが BxPC3 膵癌モデルマウスにおいて確認されたものの、この実験系の限界として、同時に静注したデキストランの作用、BxPC3 異所移植膵癌特有の要因、免疫不全マウスである影響の関与を否定できなかった。本実験ではデキストランの代わりに同じ粒径のポリマーナノ粒子であるポリイオンコンプレックス型ミセル (PIC micelle)、BxPC3 異所移植免疫不全マウスの代わりに 4T1 同所移植乳癌正常免疫マウスモデルをそれぞれ用いることで、これまでの結果の確度を高めることを目的とした。

6.2 方法

6.2.1 PIC micelle を用いたデキストラン非存在条件下での検証

DyLight488 標識 PIC micelle (直径 32 nm)、sulfo-Cy5 標識 PICsome (直径 302 nm) をそれぞれ既に報告されている手順に従い合成した[13-15]。PIC micelle (10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈してポリマー濃度 1 mg/ml、25°C下) の Z-average diameter、多分散指数、ゼータ電位を、動的光散乱法 (DLS) と電気泳動光散乱法を用いて測定した。測定機器には $\lambda = 532$ nm のダイオードレーザーを備えた Zetasizer Nano-ZS を用いた。血中滞留性については過去の報告を引用した [30]。

5.2.2 腫瘍モデルマウスの準備と噴出現象の観察と同様に BxPC3 膵癌モデルマウスを準備、同じ撮影条件とし、撮影開始 3 分後より、尾静脈から PIC micelle、

PICsome それぞれ 100 μ l (ポリマー濃度 1.0 mg/ml) を 30 秒間 (2 サンプル同時投与につき合計 60 秒間) で投与し、以降 1 時間、持続的に観察を行った。噴出現象の同定と解析は **5.2.3 粒子噴出現象の同定と解析**と同様に行った。

6.2.2 4T1 同所移植乳癌正常免疫マウスモデルを用いた検証

FITC 標識 500 kDa デキストラン (直径 32 nm) を Sigma-Aldrich 社より購入、sulfo-Cy5 標識 PICsome (直径 302 nm) を既に報告されている手順に従い合成した[30-32]。

4T1-luc マウス乳癌細胞を American Type Culture Collection より入手し、RPMI-1640 (10% FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン) を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。4T1-luc を 8 週齢メス BALB/c マウスの左第 3 乳房に 1×10^6 接種し、 $>100 \text{ mm}^3$ に達するまで 7~10 日間生育した後に観察した。

2%イソフルランの持続吸入で全身麻酔をかけたマウスを 37°Cの電動ヒートステージ上に固定し、皮弁ごと腫瘍を露出させ、20 \times /0.75 CFI Plan Apo Lambda 対物レンズを備えた ECLIPSE Ni-E Nikon A1R 正立共焦点顕微鏡で撮影した。 $\lambda = 480 \text{ nm}$ 、 640 nm のレーザーをそれぞれ 5~7% (1.5 mW 未満)、20% (2 mW 未満) で、励起光の検出には 500-550 nm、662-737 nm のフィルターを用いた。固定した撮像範囲では腫瘍の大きさに対して極めて狭い範囲しか撮影できないため、電動ステージと顕微鏡の自動位置調整機能を用いることで、XY 方向に 2×2 、

Z 方向に 5 μm 間隔で 9 枚の範囲を、1 シークエンス約 2 分で繰り返し撮影した。

本実験で固定した皮膚上の腫瘍はチャンバー内腫瘍と比べて安定性が悪い故に、電動ステージを素早く大きく動かすとドリフトが生じやすい。このため、1 シークエンスの時間は同じだけ確保しつつ、XY 方向の撮影範囲を 3×3 より狭い 2×2 とした。

撮影開始 3 分後より、尾静脈から各サンプル 100 μl （デキストラン 1.0 mg/ml、PICsome ポリマー濃度 1.0 mg/ml）を 30 秒間（2 サンプル同時投与につき合計 60 秒間）で投与し、以降 1 時間、持続的に観察を行った。観察時の機器及びマウスのセットアップを図 5 に示す。

噴出現象の同定と解析は 5.2.3 粒子噴出現象の同定と解析と同様に行った。

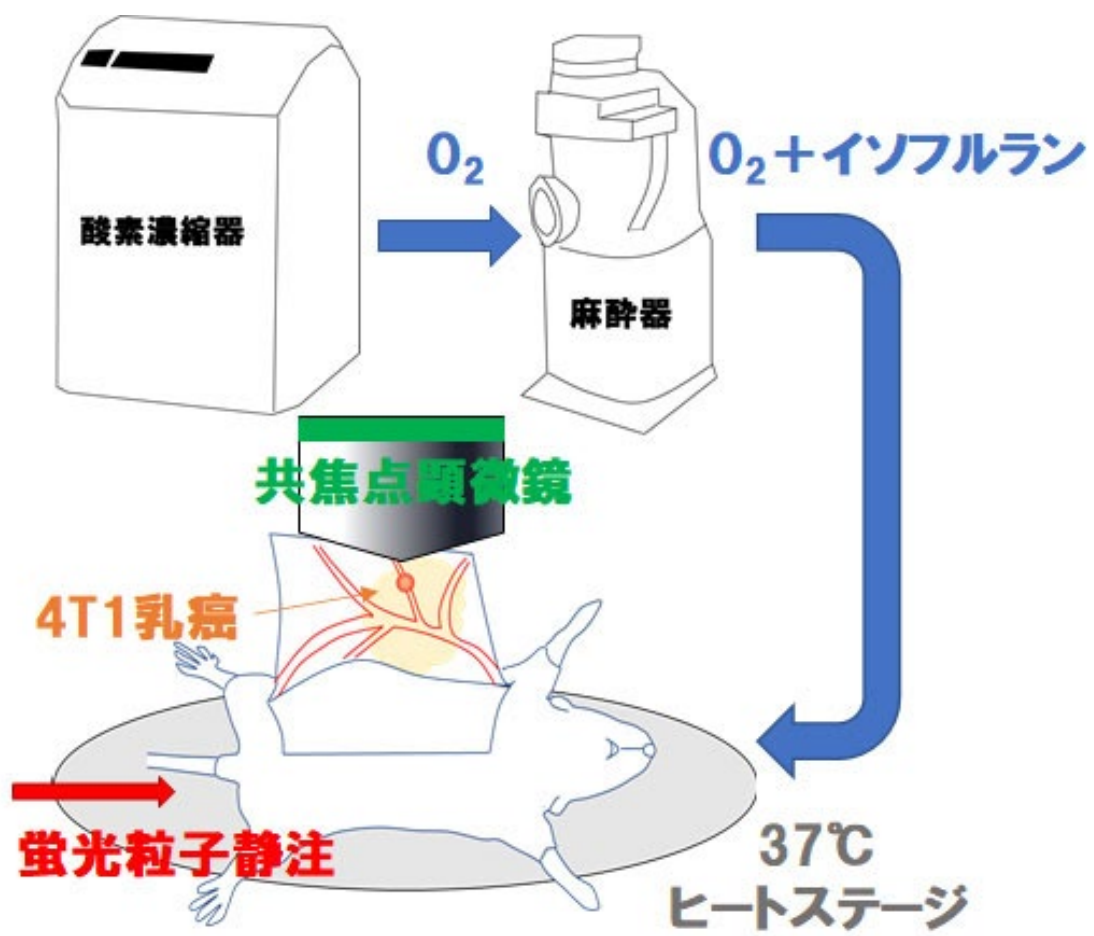


図 5：同所移植 4T1 乳癌モデルマウスを全身麻酔下に共焦点顕微鏡下で観察した際のセットアップ

6.3 結果

6.3.1 PIC micelle の性質

合成した PIC micelle の性質一覧を表 2 に示す。

表 2 : PIC micelle の性質一覧

粒子名	粒子径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)	血中半減期 (時間)	引用文献
DyLight488- PIC micelle	$34 \pm 1.0^{\text{a)}$	$0.054 \pm$ $0.035^{\text{a)}$	-6.8 ± 0.8 $^{\text{b)}$	$4.7^{\dagger\dagger}$	$^{\dagger\dagger}30$

^{a)} 動的光散乱法にて測定した Z-average diameter \pm 標準誤差 ($n=3$)

^{b)} 電気泳動光散乱法にて測定したゼータ電位 \pm 標準誤差 ($n=5$)

6.3.2 デキストラン非存在下におけるポリマーナノ粒子の噴出について

PIC micelle（直径 32 nm）と PICsome（直径 302 nm）を投与したマウス（ $n = 3$ ）では、PIC micelle の噴出が 59 回、PICsome の噴出が 59 回認められ、59 回全ての位置及び開始時刻が共通（共局在）していた。また PICsome の噴出の頻度は、PIC micelle 共投与群で 246.5 ± 150.2 回/時間/ mm^3 、デキストラン共投与群で 256.9 ± 99.2 回/時間/ mm^3 と、有意差を認めなかった（図 6）。

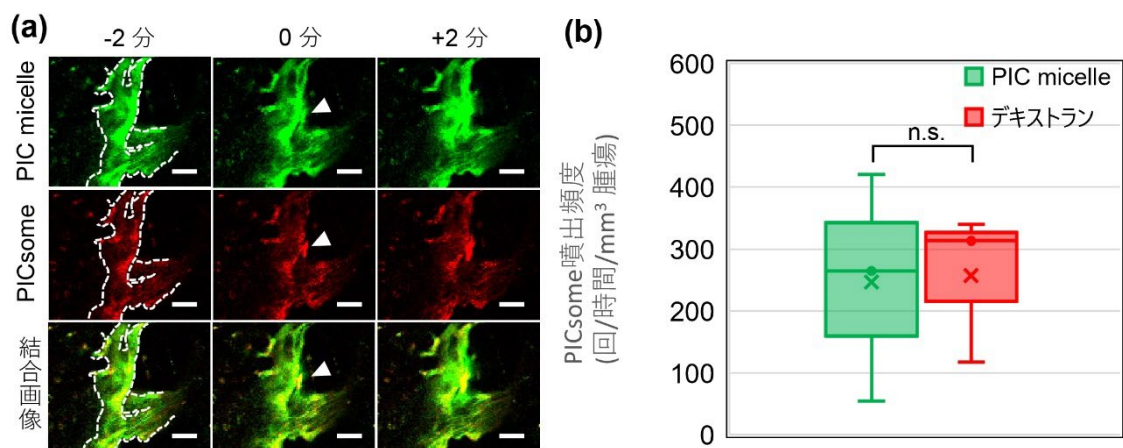


図 6 : (a) PIC micelle と PICsome が同じ位置から同じ時刻より噴出を始めた (共局在した) 噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。スケールバー 20 μ m。 (b) それぞれの粒子と共に静注した際のデキストランの噴出頻度 (回/時間/腫瘍体積(mm^3)) の比較 ($n = 3$)。1 元配置分散分析 (Fisher の検定) で有意差を認めなかった。

6.3.3 正常免疫マウスを用いた 4T1 同所移植乳癌モデルにおけるポリマーナノ粒子の噴出について

500 kDa デキストラン（直径 32 nm）と PICsome（直径 302 nm）を投与した正常免疫を持つ 4T1 同所移植マウス乳癌モデル（ $n=3$ ）では、デキストランの噴出が 15 回、PICsome の噴出が 15 回認められ、15 回全ての位置及び開始時刻が共通（共局在）していた(図 7)。またこの 4T1 モデルマウスにおけるデキストランの噴出の頻度は 95.1 ± 46.8 回/時間/ mm^3 であり、**5.3.2 BxPC3 肝癌におけるポリマーナノ粒子の噴出について**（図 4）において免疫不全マウスを用いた背部皮下移植 BxPC3 ヒト肝癌モデルにデキストランを静注した際の噴出頻度 256.9 ± 99.2 回/時間/ mm^3 と比べて有意に頻度が低かった（ $P=0.030$ ）。加えて 4T1、BxPC3 それぞれにおいて、腫瘍血管の総表面積は $1.1 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ 、 $3.1 \pm 1.0 \text{ mm}^2$ 、平均血管径は $33.8 \pm 7.0 \mu\text{m}$ 、 $19.3 \pm 4.2 \mu\text{m}$ と 4T1 が BxPC3 より有意に血管表面積が小さく（ $P=0.001$ ）、平均血管径が太かった（ $P=0.018$ ）。一方、血管密度（血管の総体積/腫瘍体積）はそれぞれ $17.5 \pm 7.5 \%$ 、 $15.5 \pm 6.0 \%$ 、血管表面積当たりの噴出頻度はそれぞれ 4.7 ± 2.5 回/時間/ mm^2 、 9.4 ± 5.7 回/時間/ mm^2 と 4T1 と BxPC3 の間に有意差を認めなかった。また血管表面積と平均血管径（ $R=-0.52$ 、 $P=0.021$ ）の間に有意な負の相関を認めた(図 8)。

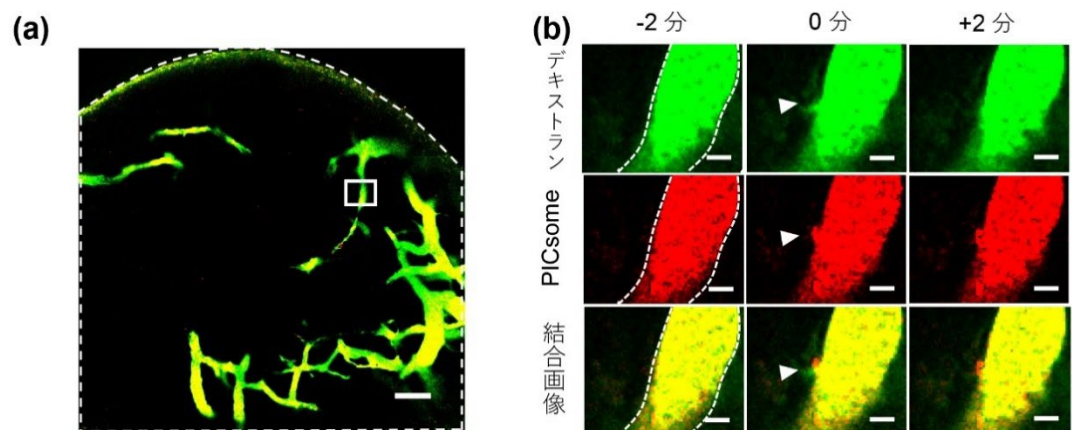


図 7：(a) 共焦点顕微鏡で観察した 4T1 乳癌の一例。点線は腫瘍外縁、四角は以下の噴出画像と同等の領域を示す。スケールバー 100 μm 。(b) PICsome とデキストランが同じ位置から同じ時刻より噴出を始めた（共局在した）噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。スケールバー 20 μm 。

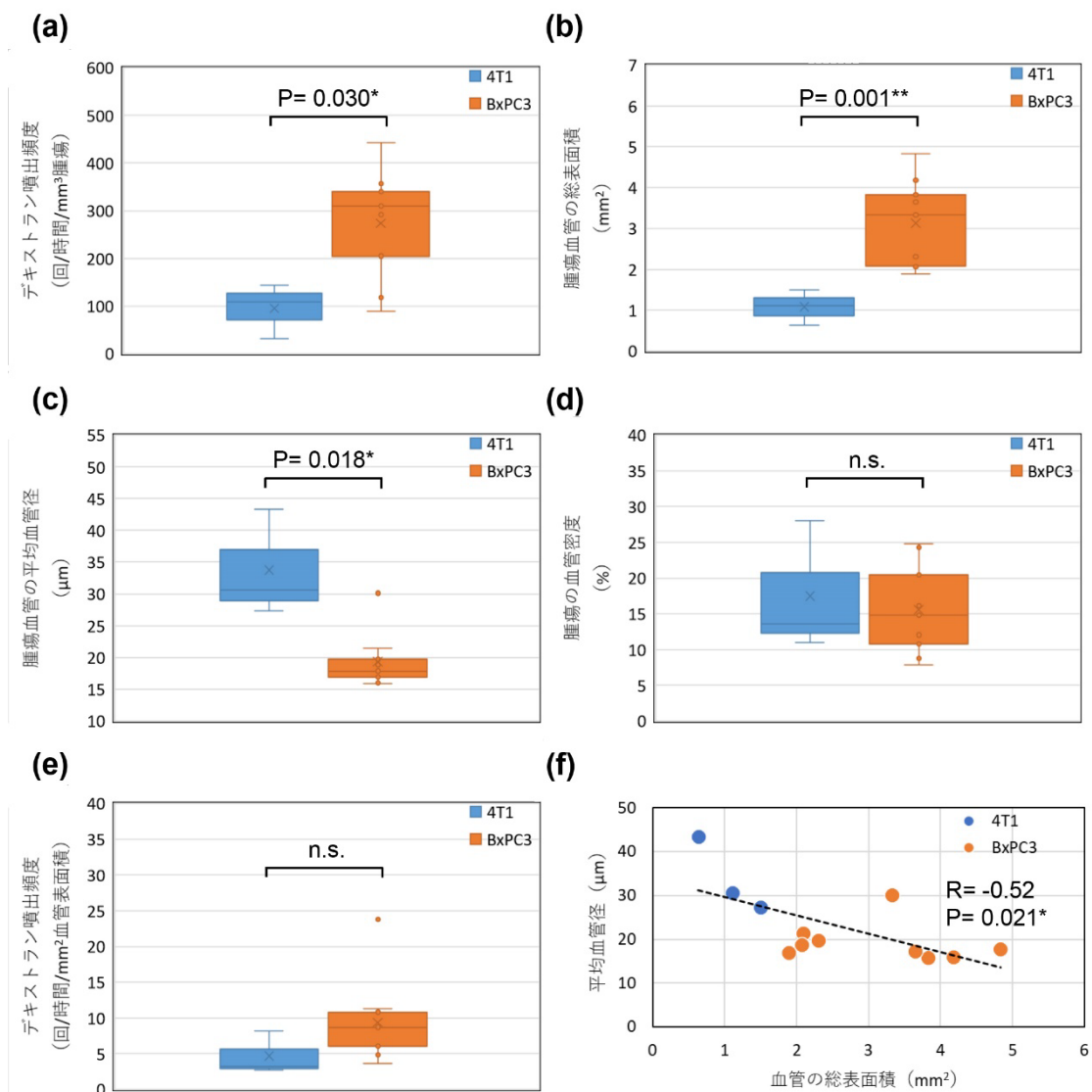


図 8 : (a) 4T1 同所移植乳癌モデルマウス及び背部皮下移植 BxPC3 腺癌モデルマ

ウスにおけるデキストランの噴出頻度 (回/時間/腫瘍体積(mm³)) の比較 (4T1: $n = 3$ 、BxPC3: $n = 9$ 、Student の T 検定)。4T1 では BxPC3 に比べて有意に噴出頻度が低かった ($P=0.030$)。4T1 マウス及び BxPC3 マウスにおける (b) 腫瘍血管の総表面積、(c) 平均血管径、(d) 血管密度 (血管の総体積/腫瘍体積)、(e) 血管表面積当たりのデキストランの噴出頻度 (回/時間/ mm²)の比較。(b)は Welch の検

定、(c)、(e)は Mann-Whitney の U 検定、(d)は Student の T 検定で解析した。

4T1 では BxPC3 に比べて有意に血管表面積が小さく ($P=0.011$)、平均血管径が太かった ($P=0.018$) 一方、血管密度と血管表面積当たりの噴出頻度には有意差を認めなかった。(f) 4T1 マウス及び BxPC3 マウスにおける血管表面積と平均血管径の相関分析 (Kendall の Tau-B 検定)。血管表面積と平均血管径 ($R=-0.52$ 、 $P=0.021$) の間に有意な負の相関を認めた。

6.4 考察

今回、デキストランの代用として同じ直径 32 nm に合成したポリマーナノ粒子の PIC micelle を PICsome と同時に静注した場合も、すべての噴出において同じ位置から同じ時刻より噴出することが確認された。従って、デキストランの存在に関係なく、32~302 nm のポリマー粒子は BxPC3 ヒト膵癌の同じ位置から同じ時刻より噴出することが明らかとなった。

また 4T1 マウス乳癌においても、直径 32 nm のデキストランと直径 302 nm の PICsome はすべての噴出において同じ位置から同じ時刻より噴出することが確認された。つまり、この噴出の性質が免疫不全マウスを用いる背部皮下移植 BxPC3 ヒト膵癌モデル特有のものではなく、正常免疫状態、乳腺腫瘍、マウス由来細胞でも共通したものであることが明らかとなった。

一方、BxPC3 膵癌と比べて 4T1 乳癌では腫瘍体積当たりの噴出頻度が有意に低かった。また 4T1 の方が BxPC3 より太い血管径を呈しており、血管径と血管表面積の間には負の相関を認めた。片や血管表面積当たりの噴出頻度及び血管密度には有意差を認めなかった。総合すると、噴出頻度の高い BxPC3 膵癌の血管の方が未熟で壁が脆いなどと言った血管固有の性質や腫瘍体積当たりの血管が多いと言ったような傾向は指摘できなかったものの、BxPC3 の方が血管表面積の広い細い血管が多いという血管の形状についての差異を認め、同腫瘍の方が噴出頻度が高か

った。これまで細血管、特に直径 5 μm 未満の血管において噴出の頻度が高いと言う報告[8]はあれど、その理由については明らかではなかった。今回の結果はこの過去の報告と一致しており、その理由について、血管表面積との関連を示唆するものであった。

7. 数理モデルによる噴出孔の大きさの推定

7.1 目的

ここまでさまざまな大きさの粒子を用いて腫瘍血管を観察したところ、ほぼすべての噴出において同じ位置から同じ時刻より噴出することが確認された。この結果が流体力学的に血管壁に短時間で急激に開く孔の出現で説明可能か、また可能であればどのような大きさの孔が想定されるのか、腫瘍血管周囲の粒子濃度の推移を推計するために考案された数理モデルを用いたシミュレーション[34,40]にて検証した。

7.2 方法

実際の観察データに region of interest (ROI)を設定（図 9）し、経時的な蛍光強度の変化を測定することで、腫瘍血管における噴出現象によって生じた噴出位置の粒子濃度の変化を計測した。数理モデルに代入する蛍光強度は測定時間内の最大蛍光強度を基準に補正した。この計測の前提条件として、噴出現象により腫瘍

間質へと輸送された粒子が崩壊せず、安定した蛍光強度を示すことを確認する必要があった。このため、腫瘍間質の条件と類似した human plasma-like medium (Thermo Fisher 社) またはウシ胎児血清 (Gibco 社) とそれぞれの粒子を体積比 1:1 (デキストラン 1.0 mg/ml、DACHPt/m ポリマー濃度 2.1 mg/ml、リポソーム脂質濃度 17.6 mg/ml、PICsome ポリマー濃度 1.0 mg/ml) で混和し、DLS 及びプレートリーダーで経時的な Z-average diameter (粒子径)、多分散指数、蛍光強度の推移を測定した。

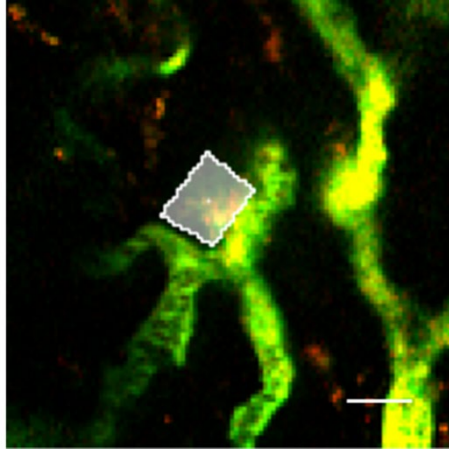


図 9：数理モデルに観察データを代入する目的で噴出箇所に設定した ROI の一例。緑色が FITC-デキストラン、赤色が Alexa Fluor 647-DACHPt/m、スケールバー 20 μm 。

続いて、それぞれの粒子についてランダムに選択した 10 箇所の噴出を用いて蛍光強度の推移から経時的な粒子濃度を測定、補正、平均値を算出した。この経時的な粒子濃度を腫瘍血管壁と粒子の立体的かつ流体力学的な相互作用を表す数理モデル[34,40]に当てはめ、噴出孔の大きさを変数として小さい値から大きい値へと変化させることで、実際の粒子濃度の変化を説明するのに最も適した噴出孔の大きさを求めた。

用いた数理モデルの概要を以下に示す。この数理モデルは腫瘍血管周囲の粒子濃度の推移を推計するために考案されたものであり、その妥当性については過去の報告で検証されている[34,40]。粒子及び腫瘍血管などの荷電状態は考慮されていないが、この数理モデルに荷電条件を加えて行ったシミュレーションでは、粒子が陰性に荷電している場合は、中性や陽性の場合と異なり、粒子の立体的及び流体力学的条件の影響と比較してその表面荷電密度は血管透過性に対して極めて僅かな影響しか及ぼさないと報告されている[41]。本モデルを考案したキプロス大学スティリアノポウロス研究室に計算とシミュレーションを依頼したところ、今回の一連の実験で用いた粒子は全て陰性に荷電していたため、今回の数理モデルにおいて荷電状態は加味しない方針となった。

粒子の輸送（ c_n ：粒子濃度）は間質における輸送を表す以下の等式で示される。

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} + \nabla \cdot (c_n \mathbf{v}^f) = D_n \nabla^2 c_n + Q_{sta}$$

D_n は腫瘍間質におけるさまざまな大きさの粒子の拡散係数、 \mathbf{v}^f は間質液の流速を表し、 Q_{sta} は粒子の腫瘍血管壁を透過しての輸送を表し、スターリングの近似より求められる[42]。本実験で用いられた粒子の D_n は、それぞれの大きさ毎に過去の文献より引用した[43]。 \mathbf{v}^f は間質の透水係数 k_{th} と間質液の圧力勾配に依存し、ダルシーの法則[44]より求められる。

$$\mathbf{v}^f = -k_{th} \nabla p_i \quad (2)$$

ダルシーの法則と連続の方程式 ($\nabla \cdot \mathbf{v}^f = Q$)を合わせることで定常状態の液体輸送モデルが導ける[42]。

$$-k_{th} \nabla^2 p_i = Q \quad (3)$$

Q は血管内から腫瘍・腫瘍周囲の正常組織へと流入する流束からリンパ管より流出する流束を差し引いた値で以下の式で求められる[42]。

$$Q = L_p S_v (p_v - p_i) - L_{pl} S_{vl} (p_i - p_l) \quad (4)$$

L_p は血管の透水係数、 S_v は血管密度、 p_v は血圧、 L_{pl} はリンパ管の透水係数、 S_{vl} はリンパ管密度、 p_l はリンパ圧、 p_i は間質液圧をそれぞれ表す。 Q_{sta} は腫瘍血管壁を透過しての粒子の輸送量を表し、以下の式で求められる[42]。

$$Q_{sta} = P \cdot S_v (C_{iv} - c_n) + L_p S_v (p_v - p_i) (1 - \sigma_f) C_{iv}$$

C_{iv} は粒子の血中濃度を表し、急速静注を表す $C_{iv} = \exp(-(t-t_0)/k_d)$ で求められ

る。 t_0 は静注時刻、 k_d は血中半減期、 σ_f は反射係数を表す。 P は血管透過性を表

し、以下の式で求められる[45]。

$$P = \frac{\gamma H D_0}{L}$$

γ は血管壁の孔が血管表面に占める割合、 H は血管壁の孔を通じた粒子の拡散に

よる透過を妨げる流体力学的・立体的な相互作用、 L は血管壁の厚み、 D_0 は310K

下における自由溶液中の粒子の拡散係数でありアインシュタインの関係式で求め

られる。

$$D_0 = \frac{K_b T}{6\pi\eta r_s}$$

K_b はボルツマン定数、 T は温度、 η は血液の粘度、 r_s は粒子の半径を表す。

血管壁の透水係数 L_p は以下の式で求められる[45]。

$$L_p = \frac{\gamma r_0^2}{8\eta L}$$

r_0 は血管壁の孔の半径を表す。 r_0 の初期値は30 nmとし、 r_0 が噴出孔の半径となる

まで値を増加させることで噴出現象をシミュレートした。

反射係数 σ_f は以下の式で求められる[45]。

$$\sigma_f = 1 - W \tag{9}$$

W は血管壁の孔を通じた粒子の対流による透過を妨げる流体力学的・立体的な相

相互作用を表す。

静電相互作用を無視すると、 H 及び W は以下の式で求められる[45]。

$$H = \frac{6\pi F}{K_t}$$

$$W = \frac{F(2-F)K_s}{2K_t}$$

F は分散係数であり以下の式で求められる[45]。

$$F = (1 - \lambda)^2 \quad (12)$$

λ は粒子の大きさと血管壁の孔の大きさの比である。

係数 K_s と K_t は以下の式で求められる。

$$\left(\frac{K_t}{K_s} \right) = \frac{9}{4} \pi^2 \sqrt{2} (1-\lambda)^{-5/2} \left[1 + \sum_{n=1}^2 \binom{a_n}{b_n} (1-\lambda)^n \right] + \sum_{n=0}^4 \binom{a_{n+3}}{b_{n+3}} \lambda^n$$

このモデルで用いたパラメータを**表 3**に示す。また用いた計算領域及び境界条件

を**図 10**に示す。それぞれ腫瘍内と腫瘍周囲の正常組織内で等式を解いた。正常組

織における血管壁の孔の大きさは直径 7 nm に設定した[34]。

表 3 本モデルで用いたパラメーター一覧

パラメータ	説明	値	引用文献
D_n	粒子の拡散係数	32 nm の粒子では $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ ¹ 、59 nm の粒子 では 7.5×10^{-9} $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ 、96 nm の粒子では 5.5 $\times 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ ¹ 、302 nm の粒子 では 1×10^{-9} $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$	43
k_d	血中半減期	32 nm の粒子では 5 時間、59 nm の 粒子では 15 時 間、96 nm の粒子 では 5 時間、302 nm の粒子では 4.5	29,30,34,35

		時間	
r_o	血管壁の孔の半径	30 nm (初期値)	
L	血管壁の厚み	5×10^{-6} m	46
p_v	血圧	30 mmHg	47
H	血液の粘度	3×10^{-5} mmHg · sec	46
Γ	血管壁の孔が血管 表面に占める割合	5×10^{-4}	34
S_v	血管密度	150 cm^{-1}	40
k_{th}	間質の透水係数	$1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot$ $\text{mmHg}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$	47
a_1	K_t の係数	-73/60	45
a_2	K_t の係数	77.293/50.400	45
a_3	K_t の係数	-22.5083	45
a_4	K_t の係数	-5.617	45
a_5	K_t の係数	-0.3363	45
a_6	K_t の係数	-1.216	45
a_7	K_t の係数	1.647	45

b_1	K_s の係数	7/60	45
b_2	K_s の係数	-2.227/50.400	45
b_3	K_s の係数	4.0180	45
b_4	K_s の係数	-3.9788	45
b_5	K_s の係数	-1.9215	45
b_6	K_s の係数	4.392	45
b_7	K_s の係数	5.006	45

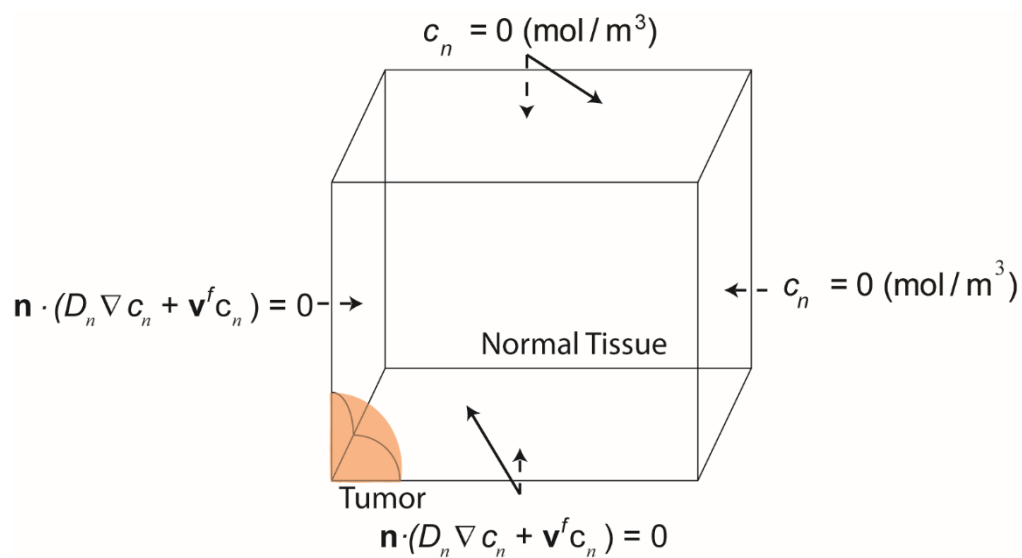


図 10：数理モデルで用いた計算領域及び境界条件。腫瘍を正常組織内に存在する一辺 4 mm の立方体と設定した。対称性を仮定し、全領域の 1/8 について解を求めた。対称面は非流動性に設定、それ以外の境界面では粒子濃度= 0 とした。

7.3 結果

DACHPt/m、リポソーム、PICsome それぞれを human plasma-like medium と混和し、DLS で測定した Z-average diameter（粒子径）及び多分散指数の推移を図 11 に示す。いずれの粒子も本研究における観察時間（1 時間）では安定した粒子径を保持していた。またデキストラン、DACHPt/m、リポソーム、PICsome それぞれをウシ胎児血清と混和し、plate reader で測定した蛍光強度の推移を図 12 に示す。いずれの粒子も本研究における観察時間（1 時間）では安定した蛍光強度を保持していた。

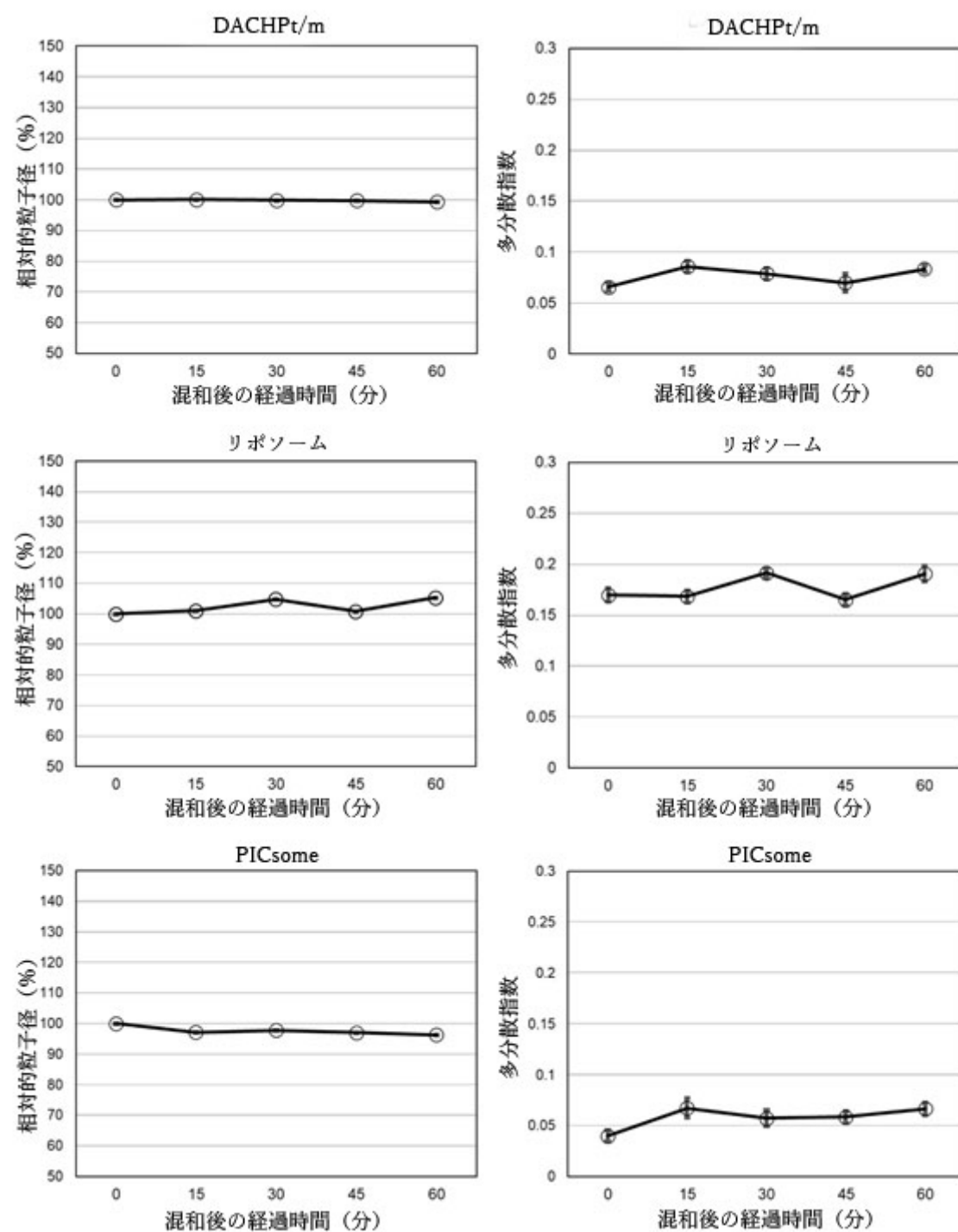


図 10 : DACHPt/m、リポソーム、PICsome を human plasma-like medium と混和した後の経時的な相対的粒子径及び多分散指数の推移。いずれも混和から 1 時間後まで安定している。

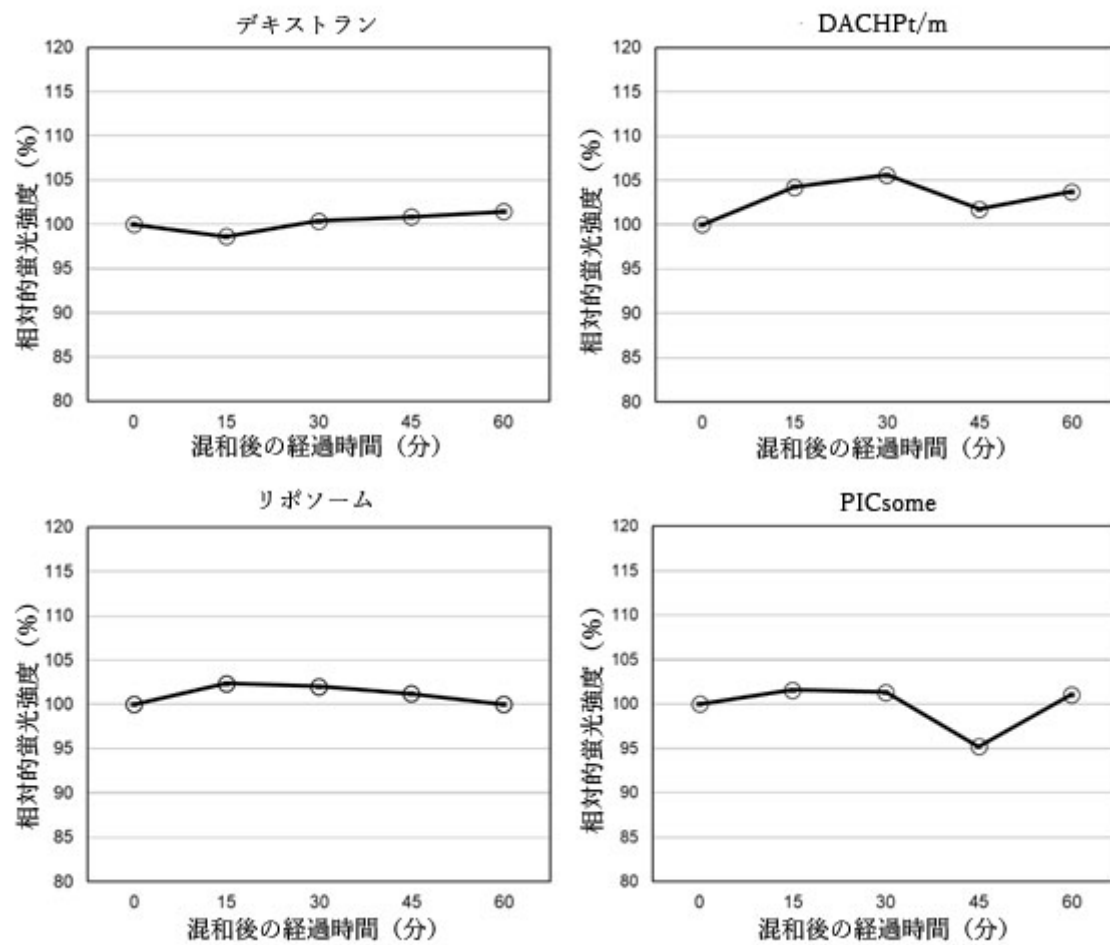


図 11：各粒子をウシ胎児血清と混和した後の経時的な蛍光強度の推移。いずれも混和から 1 時間後まで安定している。

BxPC3 肝癌におけるデキストラン、DACHPt/m、リポソーム、PICsome それぞれの噴出について、数理モデルによるシミュレーションから推定された噴出孔の大きさは 525 nm 以上、570 nm 以上、575 nm 以上、635 nm 以上であった。噴出孔の大きさを変数として小さい値から大きい値に変化させた際の数理モデルとその適合度 (R^2) を図 12、図 13 に示す。実際の噴出画像と適合度が最大となる噴出孔の大きさでの数理モデルによるシミュレーション結果画像を図 14 に示す。噴出孔が十分に大きいと血管壁と粒子の相互作用が限りなく小さくなるため、一定の大きさ以上では適合度がほぼ横ばいとなった。従って、推定された噴出孔の大きさは実験結果を説明し得る最小の大きさと解釈でき、今回は 4 種類のナノ粒子における噴出は概して共局在していることから、噴出孔の大きさはすべて 635 nm 以上であると推定された。

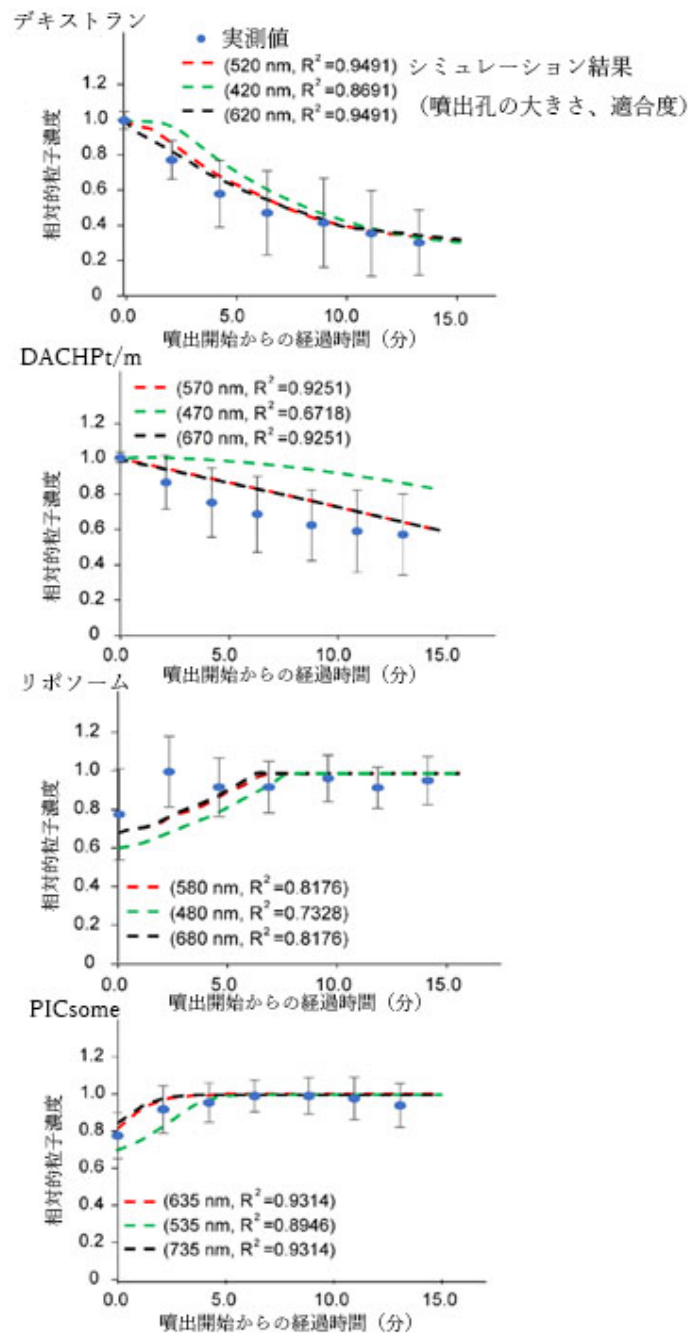


図 12：BxPC3 膵癌における実験データから抽出した相対的粒子濃度 ($n = 10$ 、平均値 \pm 標準偏差) と噴出孔を異なる大きさに設定した場合の数値モデルにより推定される相対的粒子濃度の推移。噴出孔の大きさを変化させることで推定される粒子濃度の推移も変化し、実測値との適合度 (R^2) も変化することが分かる。

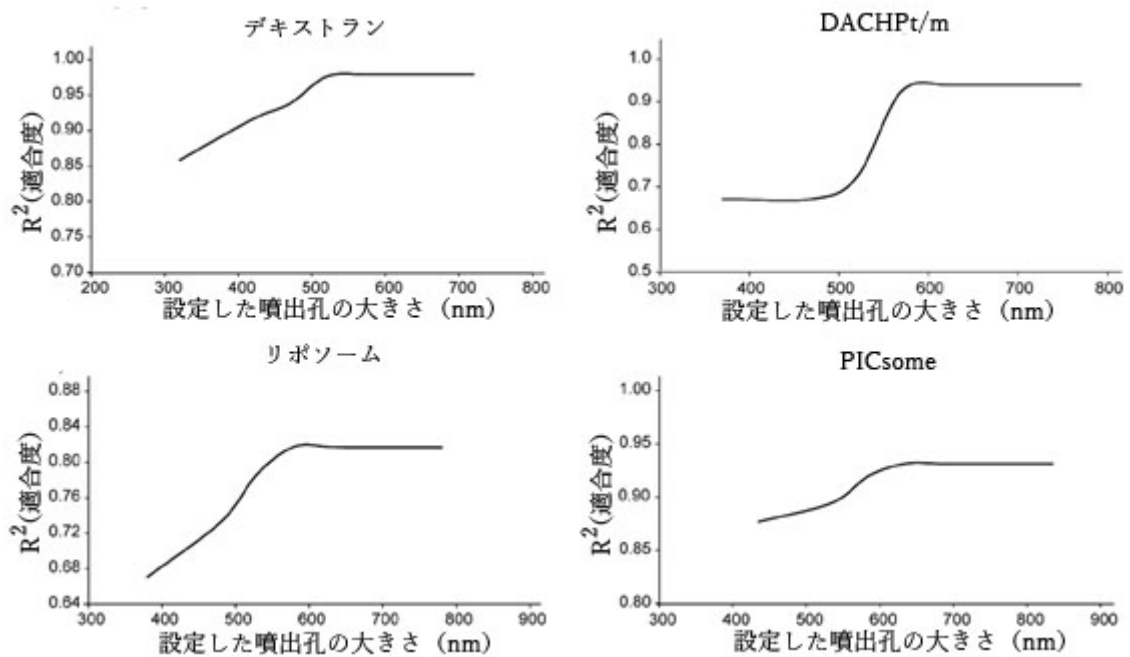


図 13：BxPC3 膵癌における噴出孔の大きさを変数とした場合の実験データに対する数理モデルの適合度 (R^2)。デキストラン、DACHPt/m、リポソーム、PICsome はそれぞれ噴出孔の大きさを 520nm、570nm、580nm、635nm に設定したところで R^2 が頭打ちとなり、以降噴出孔をさらに大きくしても R^2 は横ばいで推移していた。

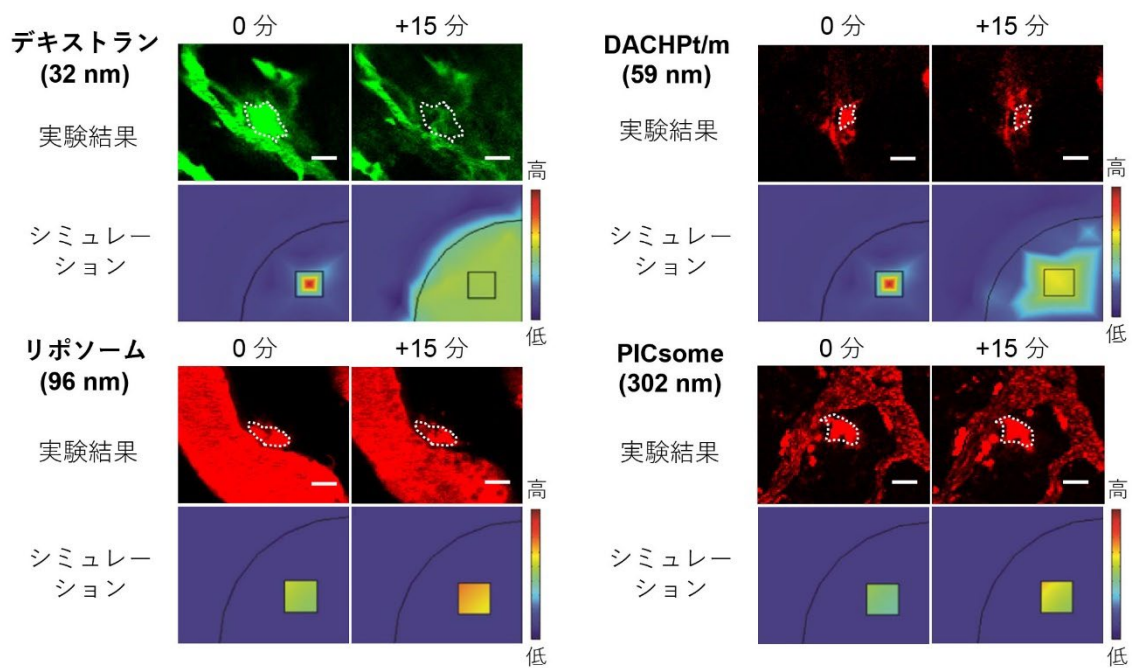


図 14：BxPC3 膵癌における実際の噴出画像と適合度が最大となる噴出孔の大きさでの数理モデルによるシミュレーション結果画像。スケールバー 20 μm 。粒子径が大きくなるに従い周囲への拡散が乏しくなることがシミュレーションでも再現されている。

同様に、4T1 乳癌におけるデキストラン、PICsome それぞれの噴出について、噴出孔の大きさを変数として小さい値から大きい値に変化させた際の数理モデルとその適合度 (R^2) (図 15、図 16) から推定された噴出孔の大きさは 520 nm 以上、620 nm 以上であり、両粒子における噴出はすべて共局在していることから、噴出孔の大きさはすべて 620 nm 以上であると推定された。実際の噴出画像と適合度が最大となる噴出孔の大きさでの数理モデルによるシミュレーション結果画像を図 17 に示す。

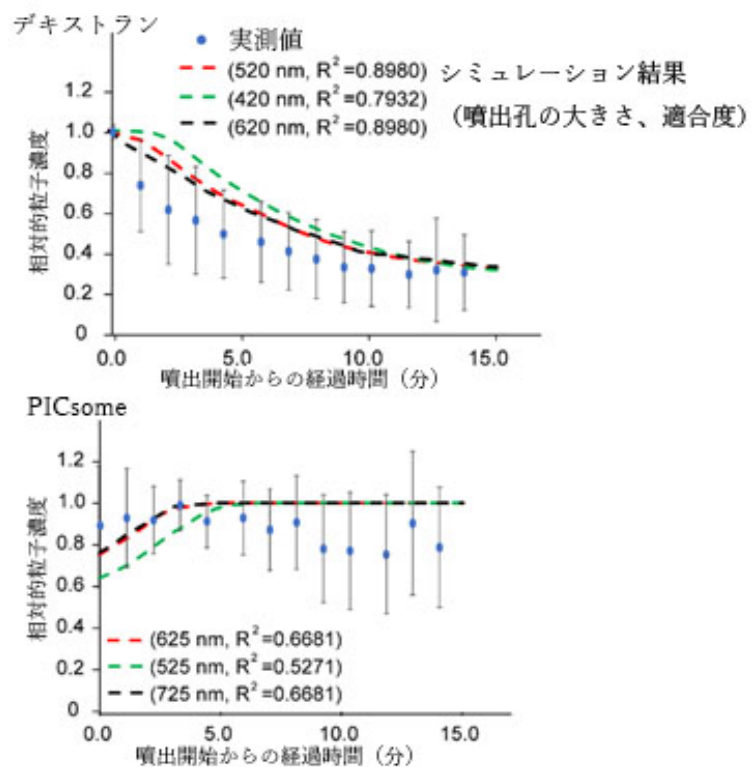


図 15：4T1 乳癌における実験データから抽出した相対的粒子濃度（ $n = 10$ 、平均値 \pm 標準偏差）と噴出孔を異なる大きさに設定した場合の数値モデルにより推定される相対的粒子濃度の推移。噴出孔の大きさを変化させることで推定される粒子濃度の推移も変化し、実測値との適合度（ R^2 ）も変化することが分かる。

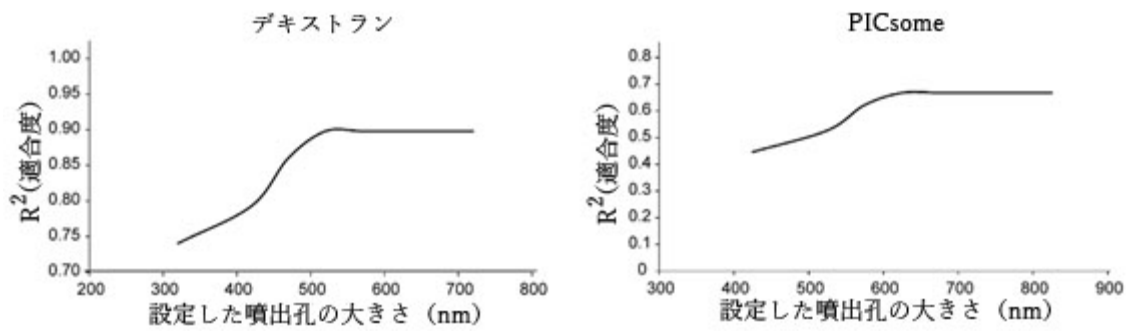


図 16：4T1 乳癌における噴出孔の大きさを変数とした場合の実験データに対する数理モデルの適合度 (R^2)。デキストラン、PICsome はそれぞれ噴出孔の大きさを 520nm、625nm に設定したところで R^2 が頭打ちとなり、以降噴出孔をさらに大きくしても R^2 は横ばいで推移していた。

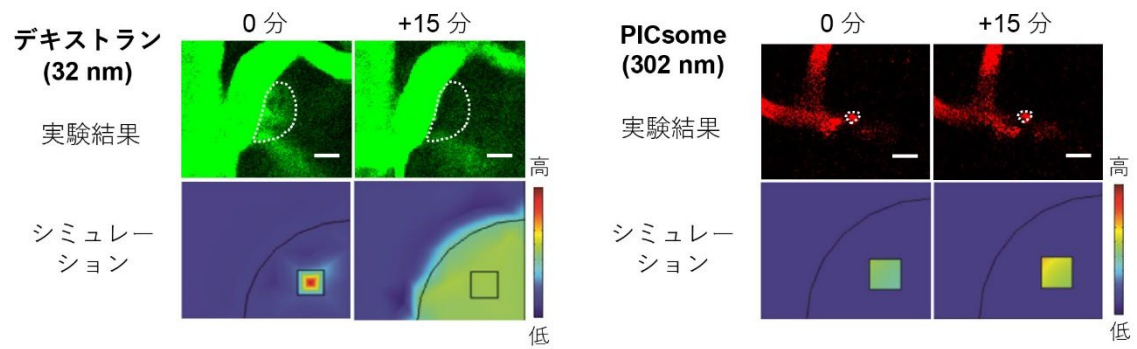


図 17：4T1 乳癌における実際の噴出画像と適合度が最大となる噴出孔の大きさでの数理モデルによるシミュレーション結果画像。スケールバー 20 μm 。デキストランが周囲に拡散していくのに対し、PICsome がほぼその場に留まることが、シミュレーションでも再現されている。

7.4 考察

この生体内共焦点顕微鏡でしか観察できない腫瘍血管における粒子噴出現象において、これまで記録されたデキストラン及びさまざまな粒子径のポリマーナノ粒子の局所粒子濃度の経時的变化は、血管壁に孔が生じるというシンプルなメカニズムを再現したシミュレーションを用いて、少なくとも $R^2 = 0.67 \sim 0.95$ という高い適合度で説明が可能であった。一定以上大きい噴出孔を想定した場合に粒子と噴出孔辺縁との間の相互作用が乏しくなるため、残念ながら噴出孔の上限値は計算できなかったが、BxPC3 膵癌では 635 nm 以上、4T1 乳癌では 620 nm 以上の孔が実測データを最もよく説明し得ることがシミュレーションより推定された。

8. 302 nm より大きい粒子と腫瘍血管における粒子噴出現象

8.1 目的

過去の文献[6-9]を含め、これまで腫瘍血管における粒子噴出現象で輸送されることが確認できた最大の粒子は直径 302 nm のポリマーナノ粒子 PICsome である。シミュレーションを用いても噴出孔の上限値は推定できず、302 nm より大きい粒子について本現象が血管透過を促すことができるのかは依然として明らかでない。粒子径が 320 nm より十分に大きく、蛍光を発し、静脈注射を想定されてい

る粒子は限られており、デキストランやポリマー粒子では基本的に実現が難しい。従って、直径 1040 nm の PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアを用いて、直径 302 nm より大きな粒子について本噴出が適応可能か検証すると共に、場合によっては噴出孔の上限値を求める目的で、実験を行った。

8.2 方法

8.2.1 粒子の準備・合成

FITC 標識 500 kDa デキストラン（直径 32 nm）、赤色蛍光(580/605)標識ポリスチレンマイクロスフィア（粒子径 $1\ \mu\text{m}$ ）、アミノプロピル PEG($\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-\text{NH}_2$, $M_n=5,000$) (SUNBRIGHT MEPA-50H)、有機トリアジン誘導体 DMTMM をそれぞれ Sigma-Aldrich 社、Thermo Fisher 社、日油株式会社、東京化成工業株式会社より購入した。マイクロスフィア粒子数 1×10^{10} 、アミノプロピル PEG 1 g、DMTMM 120 mg を Milli-Q 水 1 ml で溶解し、室温下で 24 時間混和した。混和後、3000 rpm で 30 分間遠心し、上清を取り除くことを 3 度繰り返すことで未反応の PEG と DMTMM を取り除き、赤色蛍光標識 PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアを回収した。

8.2.2 粒子の性質評価

赤色蛍光標識 PEG 化ポリスチレンマイクロスフィア（10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で希釈して粒子数 3.6×10^4 /ml、25°C 下）の Z-average diameter、多分

散指数、ゼータ電位を、動的光散乱法（DLS）と電気泳動光散乱法を用いて測定した。測定機器には $\lambda = 633 \text{ nm}$ のダイオードレーザーを備えた Zetasizer Nano-ZS を用いた。血中半減期は既に確立している手順[27,48,49]に倣って以下の通り測定した。7 週齢メス BALB/c nu/nu マウスを、2%イソフルラン吸入で全身麻酔をかけた状態で、37°C ヒートステージの上に固定した。マウスの右耳介の皮下血管を、20×/0.75 CFI Plan Apo Lambda 対物レンズを備えた ECLIPSE Ni-E Nikon A1R 正立共焦点顕微鏡にて持続的に観察した。観察開始 10 秒後から 30 秒間かけて尾静脈より粒子数 $3.6 \times 10^5 / \text{ml}$ となるよう 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で希釈した赤色蛍光標識 PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアを 100 μl 投与し、耳介血管の蛍光強度の推移を経時的に記録した。投与前の自家蛍光を差し引いた投与直後の蛍光強度のピークを 100%と定義し、蛍光強度からマイクロスフィアの相対的血中濃度を算出した。

8.2.3 粒子噴出現象の観察・解析

5.2.2 腫瘍モデルマウスの準備と噴出現象の観察と同様に BxPC3 膵癌モデルマウスを準備した。 $\lambda = 480 \text{ nm}$ と 560 nm のレーザーをそれぞれ 5~7%（1.5 mW 未満）と 5%（1 mW 未満）で、励起光の検出フィルターを 500-550 nm と 570-620 nm とした以外は、**5.2.2 腫瘍モデルマウスの準備と噴出現象の観察**と同じ条件で撮影を行った。撮影開始 3 分後より 500 kDa デキストランと PEG 化ポリスチ

レンマイクロスフィアをそれぞれ 100 μ l (デキストラン 1.0 mg/ml、ポリスチレンマイクロスフィア 粒子数 3.6×10^5 /ml)、尾静脈から 60 秒間で静注した。ポリスチレンマイクロスフィアは半減期が短く、血中滞留性を維持するため 10 μ l/分の持続静注を行いつつ、投与後 1 時間、腫瘍の観察を行った。噴出現象の同定と解析は 5.2.3 粒子噴出現象の同定と解析と同様に行った。

8.3 結果

8.3.1 粒子の性質評価

合成した赤色蛍光標識 PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアの性質を表 4 に示す。

表 4：赤色蛍光標識 PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアの性質一覧

粒子名	粒子径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)	血中半減期 (時間)
赤色蛍光- PEG 化ポリ スチレンマ イクロスフ ィア ^{a)}	1040 ± 2.8 b)	0.029 ± 0.011 ^{b)}	-3.5 ± 0.2 c)	0.05

a) 非公表の赤色蛍光色素（励起光/蛍光=580/605 nm）

b) 動的光散乱法にて測定した Z-average diameter ± 標準誤差（ $n=3$ ）

c) 電気泳動光散乱法にて測定したゼータ電位 ± 標準誤差（ $n=5$ ）

8.3.2 PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアと粒子噴出現象

直径 1040 nm の PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアは、その大きさ故に血中に網羅的に分布できず、蛍光シグナルが血中に点状に散在する状態であった。

BxPC3 マウス ($n = 3$) の観察においてデキストラン (直径 32 nm) の噴出は 58 回同定されたが、PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアはデキストランの噴出するタイミングによっては必ずしもその近傍に存在していなかった。一方、デキストランの噴出の内の 13 箇所において、マイクロスフィアは噴出と同時に血管壁近くに位置し、その後の観察期間中、例外なくその場に留まっていた (図 18)。

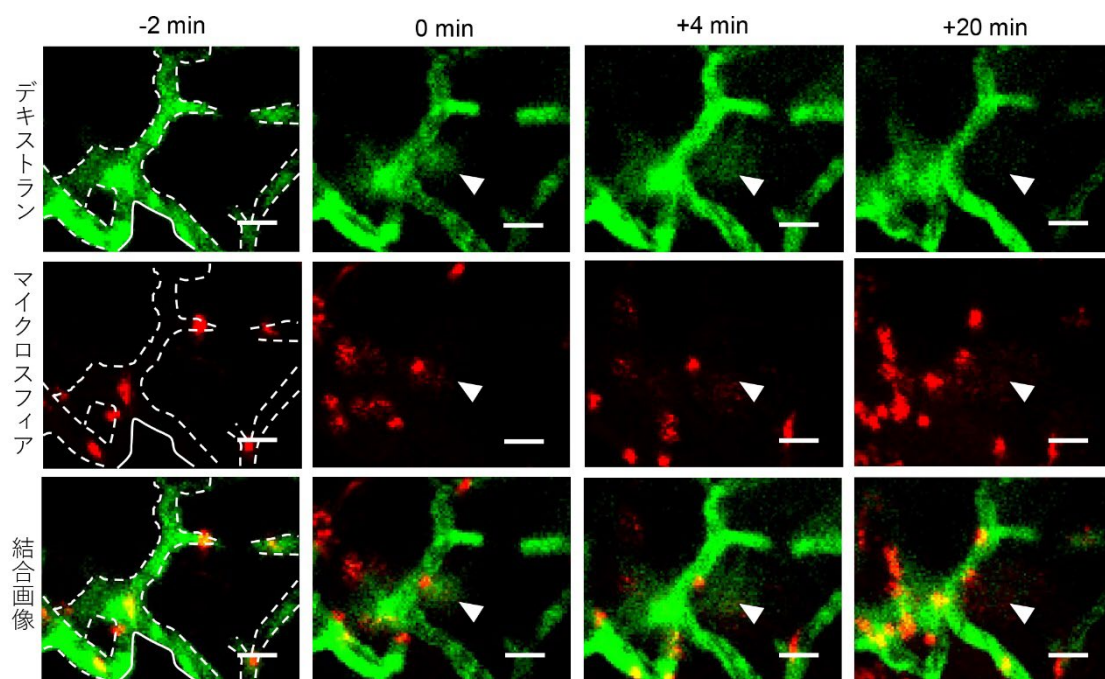


図 18：マイクロスフィアとデキストランが共局在する噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。Scale bar 20 μ m。デキストランの噴出と同じタイミングで同部位の血管壁付近に位置したマイクロスフィアが、以降持続的にその場に留まっている様子が観察された。

8.4 考察

直径 1040 nm もの巨大な粒子は腫瘍間質に深く透過することが難しい[29,50]ため、血管壁から十分な距離離れることを以てマイクロスフィアが噴出現象によって輸送されたと判断することはできなかった。一方、粒子径が大きい方が血管内皮に沈着しにくく[51]、PEG 化によってより一層沈着を低減できること[52]を踏まえると、デキストランの噴出と同時に出現し、固定された状態で撮影時間の終わりまで、最長で 50 分以上に渡り留まっていたことは、噴出現象によって少なくともマクロスフィアの一部が血管外にアンカーされた状態となったことを示唆するのではないかとと思われる。より明確な結論を導くには、生体内蛍光顕微鏡の限界解像度[53]を踏まえると、少なくとも血管壁から数 μm 以上透過できる粒子を用いて再実験を行う必要があるものと考ええる。

再実験による検証は本現象のメカニズムを解明する上で重要な手掛かりとなり得るものの、本実験によって、1040 nm の PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアは噴出現象を以てしても腫瘍血管壁から数 μm 以上深く透過できない、またはできたとしても極めて稀であることが確認された。従って、本現象を腫瘍への薬剤送達経路として捉えた場合、腫瘍の深部へと到達できないこの粒子径の薬剤は実用性が低い[29]。よって、薬剤として実用的な範囲の大きさの粒子の送達において本現象はその粒子径の影響を受けない一方、これまで最適化されてきた粒子径の

上限を引き上げるような駆出力は確認できなかったということをひと先ずの結論としたい。

9. 抗体と腫瘍血管における粒子噴出現象

9.1 目的

我々が渉猟し得た範囲ではこれまで腫瘍血管における粒子噴出現象で抗体が輸送されるか確認されたことはない[6-9]。抗体は生理的に重要なことは勿論、近年では抗体医薬として臨床でも頻用されている[54,55]。本現象と抗体の関係を検証することで、臨床薬の送達に寄与できる可能性を探ることを目的とした。

9.2 方法

9.2.1 蛍光標識抗体の合成

Sulfo-Cy5 標識抗マウス PD1 抗体は以下の手順で合成した。まずラット抗マウス PD1 (CD279) モノクローナル抗体を BioXCell 社より、sulfo-Cy5-NHS ester を Lumiprobe 社より購入した。抗マウス PD1 抗体 (6.3 mg/ml)、sulfo-Cy5-NHS ester (0.24 mg/ml PBS) を重量比 100:1 で混和し、室温にて 3 時間反応させた。GE Healthcare 社より購入した PD10 desalting カラムにて濾過することで非結合 sulfo-Cy5-NHS ester を取り除き、sulfo-Cy5 標識抗マウス PD1 抗体を回収した。

9.2.2 粒子の性質評価

Sulfo-Cy5 標識抗マウス PD1 抗体（10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で希釈して抗体濃度 0.6 mg/ml、25°C下）の Z-average diameter と多分散指数を、動的光散乱法（DLS）法を用いて測定した。測定機器には $\lambda = 532 \text{ nm}$ のダイオードレーザーを備えた Zetasizer Nano-ZS を用いた。抗 PD1 抗体はゼータ電位を電気泳動光散乱法で測定することができないため、販売元の社内データを引用した。血中滞留性についてはそれぞれ過去の報告を引用した[56]。

9.2.3 粒子噴出現象の観察・解析

5.2.2 腫瘍モデルマウスの準備と噴出現象の観察と同様に BxPC3 肝癌モデルマウスを準備し、同じ条件で撮影を行った。撮影開始 3 分後より 500 kDa デキストラン及び sulfo-Cy5 標識抗マウス PD1 抗体をそれぞれ 100 μl （デキストラン 1.0 mg/ml、抗 PD1 抗体 6.3 mg/ml）、尾静脈から 60 秒間で静注した。噴出現象の同定と解析は **5.2.3 粒子噴出現象の同定と解析**と同様に行った。なお、抗体薬の腫瘍間質における拡散が早く、XY 方向に 3×3 、Z 方向に 5 μm 間隔で 9 枚と言った 2 分刻みでの撮影では検出不能の場合があったため、追加実験として XY 方向に 2×2 、Z 方向に 5 μm 間隔で 3 枚の 20 秒刻みでの撮影も合わせて行った。

9.3 結果

9.3.1 粒子の性質評価

合成した sulfo-Cy5 標識抗マウス PD1 抗体の性質を表 5 に示す。

表 5 Sulfo-Cy5 標識抗マウス PD1 抗体の性質一覧

粒子名	粒子径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)	血中半減期 (時間)	引用文献
Sulfo-Cy5-抗 PD1 抗体	14 ± 0.6 ^{a)}	0.283 ± 0.012 ^{a)}	負電荷 ^{b)}	120 ^{‡‡}	^{‡‡} 56

^{a)} 動的光散乱法にて測定した Z-average diameter ± 標準誤差 (n=3)

^{b)} 等電点 6.5-7.4、販売元より情報提供

9.3.2 抗体薬の噴出現象

500 kDa デキストラン（直径 32 nm）と抗 PD1 抗体（直径 14 nm）を投与した BxPC3 マウス（ $n = 3$ ）では、デキストランの噴出が 46 回、抗 PD1 抗体の噴出が 41 回認められ、一部の噴出において抗 PD1 抗体が認められず、デキストランのみ存在していた。抗 PD1 抗体の蛍光シグナルが弱く、僅かに確認できる程度の噴出も見受けられ、抗 PD1 抗体の拡散速度が速いことで、2 分刻みでの撮影では一部の噴出を検出できていない恐れがあると考えられた（図 19）。このため、撮像範囲を絞ることで、改めて 20 秒間隔での撮影を行った。この撮影条件下ではデキストランの噴出が 27 回、抗 PD1 抗体の噴出が 27 回認められ、その全ての位置及び開始時間が共通（共局在）していた。また噴出した抗 PD1 抗体の蛍光シグナルが 2 分以内に検出感度未満まで低下する噴出も認められ（図 20）、拡散速度が速いことによって 2 分刻みの撮影では検出できない噴出があることが明らかとなった。

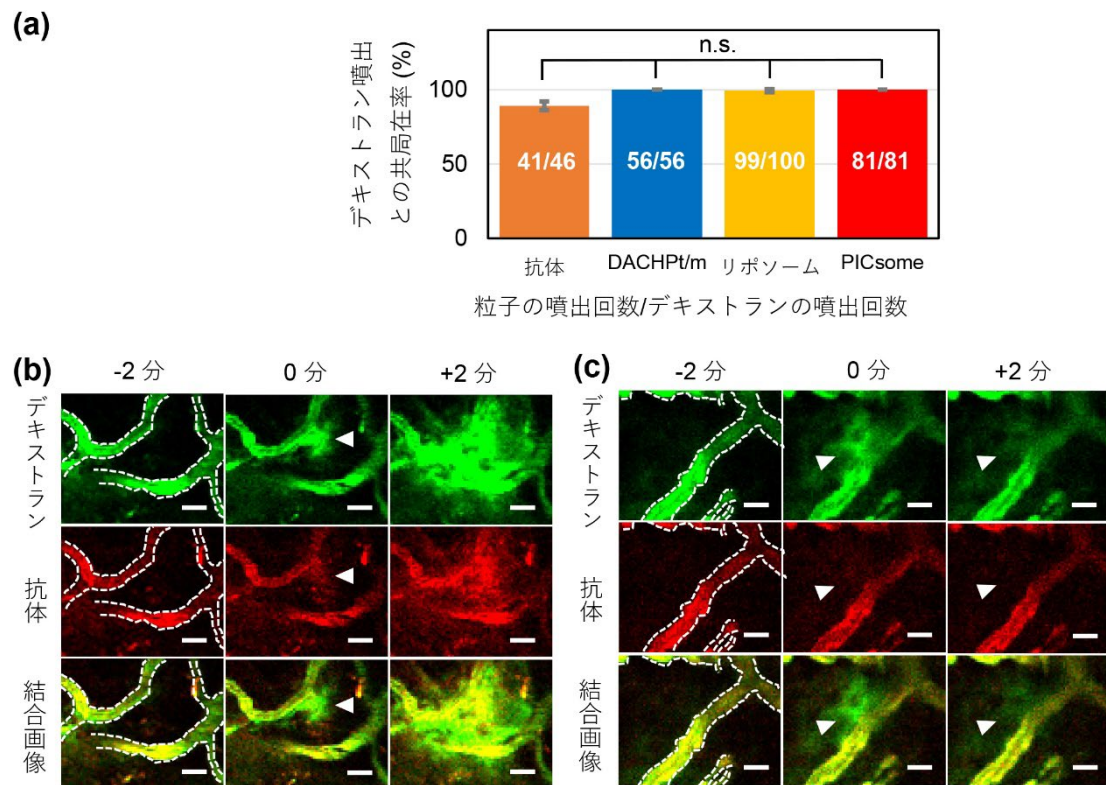


図 19 : (a) 抗 PD1 抗体と DACHPt/m、リボソーム、PICsome の共投与したデキストランとの噴出箇所における共局在率（噴出の位置及び開始時刻が共通していた割合）の比較。(b) 抗 PD1 抗体とデキストランが共局在する噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。Scale bar 20 μ m。(c) 抗 PD1 抗体とデキストランが共局在するものの、抗体の拡散が極めて速い噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。Scale bar 20 μ m。

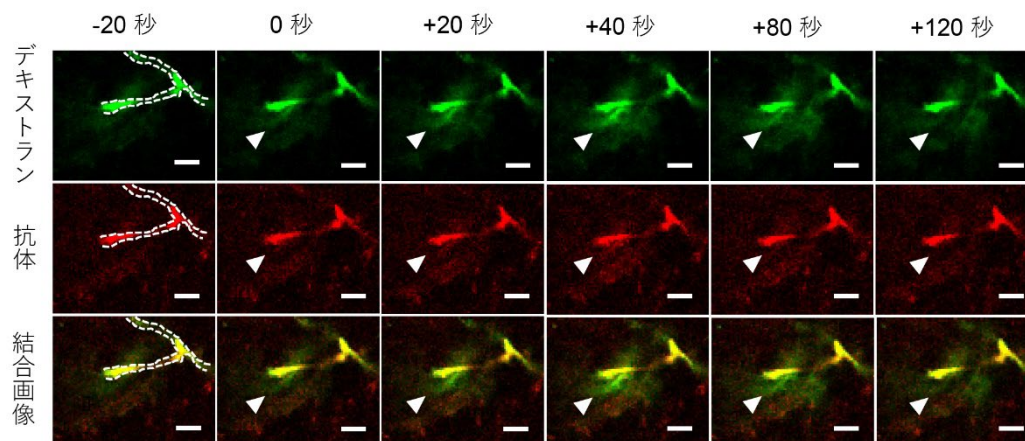


図 20：抗 PD1 抗体とデキストランが共局在（噴出の位置及び開始時刻が共通）するものの、抗体の拡散により蛍光シグナルが 2 分以内に検出できなくなる噴出の一例。点線は血管壁、矢印は噴出位置を示す。Scale bar 20 μ m。

9.4 考察

今回の実験によって、これまで腫瘍血管からの噴出現象において検証されてきた糖鎖やポリマー粒子に限らず、抗 PD1 抗体も本現象により血管外へと透過することが確認された。一方、抗 PD1 抗体は直径が 14 nm と小さいために噴出後の拡散が速く、撮影間隔によっては噴出の検知が難しいことがあった。量子ドット（直径 10~20 nm）やウシ血清アルブミン（直径 7 nm）も腫瘍間質での拡散が速いことが知られており [57-59]、これらの粒子の噴出を認めなかったとの報告[8]について、同様に検知ができていなかった可能性も考えられる。従って、径の小さい粒子と本現象の関係について実験を行う場合は、撮影間隔に留意すると共に、本現象における粒子選択性の有無については更なる研究を要するものとする。

10. 結論

今回、腫瘍血管における粒子の噴出現象を利用できる粒子の条件について検証すると共に、噴出箇所の局在について解析を行った。噴出現象を活用できるのは、これまでの報告で検証された概して直径 100 nm 以下の糖鎖やポリマーナノ粒子[6-9]に限らず、より大きな直径 302 nm のポリマーナノ粒子である PICsome も可能であることが明らかとなった。一方、直径 1040 nm の PEG 化ポリスチレンマイクロスフィアは噴出現象を以てしても、その大きさ故に血管壁から数 μm 以上

離れた位置まで透過されることは無く、腫瘍への薬剤送達という観点からする

と、1040 nm の粒子は本現象を活用し得ないことが示唆される結果であった。

これまで噴出現象はあくまで生体内共焦点顕微鏡を用いて撮影したタイムラプス画像から、それぞれの研究グループが同じ特徴を持つ粒子の挙動として報告していたに過ぎず、異なる粒子を用いた各報告[6-9]が研究グループの枠を越えて同一の現象を指しているか厳密には明らかではなかった。今回、2種類の異なる粒子を同時に静注するという実験手法にて、同時に投与した糖鎖のデキストラン、ポリマーナノ粒子の DACHPt/m、PEG 化リポソーム、PICsome、PIC micelle が原則としてすべての噴出において同じ箇所から同じ開始時刻で噴出する（共局在する）ことが確認された。従って、これまで異なる研究グループから散発的に報告されていた噴出現象が、少なくとも糖鎖及びポリマーナノ粒子については共通したものと見なせることが明らかとなった。加えて、臨床的にも重要性の増している抗体医薬の代表例として今回用いた抗 PD1 抗体についても、デキストランと共局在する形で噴出現象を活用する様子を認めた。

噴出箇所の局在の解析では、径の細い血管において、太い血管よりも一定体積当たりの噴出頻度が高いことが確認された。これは直径 5 μm 未満の血管において噴出の頻度が高いという報告[8]を支持する結果であった。また細血管において噴出頻度が高い理由としては、径が細いことで同体積当たりの表面積が広くなる

ことが影響していることが相関分析の結果より示唆された。片や、血管壁が脆いなどの血管固有の性質の関与は統計学上、明らかではなかった。これら結果を踏まえると、本現象は腫瘍内の細血管を減少させることが知られている血管新生阻害薬などとは相性が悪いと考えられる。もともと血管新生阻害薬との相性の悪さについてはドラッグデリバリー全般において言及されてきた事象だが、本現象も例外ではないものと考えられ、注意を要する[60]。

また腫瘍血管周囲の粒子濃度の推移を推計するための数理モデル[34,40]を用いたシミュレーションによって、全ての噴出箇所において血管壁に直径 620 nm 以上の孔が生じていることが推定された。残念ながら血管壁の孔が粒子より一定以上大きくなると、その間の相互作用が消失するため、孔の直径の上限は推定できなかった一方、本現象が血管壁に孔が生じるという単純なメカニズムでも説明可能であり、その孔の大きさは 620 nm 未満でさまざまな値を取ることなく、概して 620 nm 以上であることが示唆される結果であった。

もともと腫瘍への薬剤送達において理想的な粒子径は 5 nm 以上、200 nm 以下とされてきたものの[4]、必ずしもその粒子径に収まるよう設計できるものばかりではなく、例えば DNA を用いたナノキャリアなどは 450 nm 近いものも存在し[61]、複雑なリガンドを導入した粒子にも 200 nm を超えるものがある[62]。今回の実験によって、噴出現象を通じて理想的と言われる粒子径よりやや大きい粒子

の輸送を促進できる可能性が示唆されたことは、薬剤設計に幅を齎す期待を持たせる結果であった。

一方、今後の課題としては、噴出現象を亢進することで実際に薬剤送達が増えるのか、検証を進める必要がある。既報にある抗 TGF- β 阻害薬[7]などを用いて、腫瘍集積量の変化がどの程度生じるのか分析を進めたい。また好中球やマクロファージの血管外遊走の関与も示唆されている[8,9]ことから、好中球数を増やす顆粒球コロニー形成刺激因子製剤の投与後や、細胞療法で用いられる CAR-T 細胞の静注後の変化を解析することも意義深いものと考ええる。

11. 謝辞

本研究全般における御指導を賜りました東京大学工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 カブラル オラシオ准教授、東京大学医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 耳鼻咽喉科学分野 松本有講師、公益財団法人 川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター 片岡一則センター長に謹んで御礼申し上げます。また PIC micelle、PICsome の合成について御指導賜りました東京大学工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 安楽泰孝特任准教授に心より感謝申し上げます。最後に、本研究に従事する機会を与えていただき、遂行を御支援・指導賜りました東京大学医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機

能医学講座 耳鼻咽喉科学分野 山嵜達也教授に深謝申し上げます。

12. 引用文献

- [1] C. Mattiuzzi, G. Lippi, Current Cancer Epidemiology, *J. Epidemiol. Glob. Health*, **2019**, *9*, 217-222.
- [2] W. Poon, B. R. Kingston, B. Ouyang, W. Ngo, W. C. W. Chan, A framework for designing delivery systems, *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15*, 819-829.
- [3] R. K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2010**, *7*, 653-664.
- [4] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941-951.
- [5] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, R. Langer, Engineering precision nanoparticles for drug delivery, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2021**, *20*, 101-124.
- [6] Y. Matsumoto, J. W. Nichols, K. Toh, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Miura, R. J. Christie, N. Yamada, T. Ogura, M. R. Kano, Y. Matsumura, N. Nishiyama, T. Yamasoba, Y. H. Bae, K. Kataoka, Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 533-

539.

- [7] Y. Inoue, Y. Matsumoto, K. Toh, K. Miyano, H. Cabral, K. Igarashi, S. Iwasaki, K. Kataoka, T. Yamasoba, Manipulating dynamic tumor vessel permeability to enhance polymeric micelle accumulation, *J. Control. Release*, **2021**, *329*, 63-75.
- [8] V. A. Naumenko, K. Y. Vlasova, A. S. Garanina, P. A. Melnikov, D. M. Potashnikova, D. A. Vishnevskiy, S. S. Vodopyanov, V. P. Chekhonin, M. A. Abakumov, A. G. Majouga, Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors, *ACS Nano*, **2019**, *13*, 12599-12612.
- [9] M. A. Miller, R. Chandra, M. F. Cuccarese, C. Pfirschke, C. Engblom, S. Stapleton, U. Adhikary, R. H. Kohler, J. R. Mohan, M. J. Pittet, R. Weissleder, Radiation therapy primes tumors for nanotherapeutic delivery via macrophage-mediated vascular bursts, *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaal0225.
- [10] G. Egawa, S. Nakamizo, Y. Natsuaki, H. Doi, Y. Miyachi, K. Kabashima, Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1932.
- [11] E. von Dobschuetz, S. Pahernik, T. Hoffmann, R. Kiefmann, K. Heckel, K. Messmer, J. Mueller-Hoecker, M. Dellian, Dynamic intravital fluorescence microscopy-A novel method for the assessment of microvascular permeability in

acute pancreatitis, *Mircovasc.* **2004**, *67*, 55-63.

[12] E. Bellard, B. Markelc, S. Pelofy, F. Le Guerroue, G. Sersa, J. Teissie, M. Cemazar, M. Golzio, Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electroporabilization, *J. Control. Release*, **2012**, *163*, 396-403.

[13] M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kaminishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- β signaling, *PNAS*. **2007**, *104*, 3460-3465.

[14] J. Pelt, S. Busatto, M. Ferrari, E. A. Thompson, K. Mody, J. Wolfram, Chloroquine and nanoparticle drug delivery: A promising combination, *Pharmacol.* **2018**, *191*, 43-49.

[15] H. Maes, A. Kuchnio, A. Peric, S. Moens, K. Nys, K. De Bock, A. Quaegebeur, S. Schoors, M. Georgiadou, J. Wouters, S. Vinckier, H. Vankelecom, M. Garmyn, A. C. Vion, F. Radtke, C. Boulanger, H. Gerhardt, E. Dejana, M. Dewerchin, B. Ghesquiere, W. Annaert, P. Agostinis, P. Carmeliet, Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy, *Cancer Cell* **2014**, *26*, 190-

206.

[16] P. Carmeliet, R. K. Jain, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 417-427.

[17] T. S. C. Ng, M. A. Garlin, R. Weissleder, M. A. Miller, Improving nanotherapy delivery and action through image-guided systems pharmacology, *Theranostics*, **2020**, *10*, 968-997.

[18] O. C. Farokhzad, R. Langer, Impact of Nanotechnology on Drug Delivery, *ACS Nano*, **2009**, *3*, 16-20.

[19] G. Lin, H. Zhang, L. Huang, Smart Polymeric Nanoparticles for Cancer Gene Delivery, *Mol. Pharmaceutics*, **2015**, *12*, 314-321.

[20] M. Elsabahy, K. L. Wooley, Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545-2561.

[21] K. M. El-Say, H. S. El-Sawy, Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery, *Int. J. Pharm.* **2017**, *528*, 675-691.

[22] N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, O. C. Farokhzad, Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971-3010.

[23] J. Liu, H. Cabral, B. Song, I. Aoki, Z. Chen, N. Nishiyama, Y. Huang, K.

Kataoka, P. Mi, Nanoprobe-Based Magnetic Resonance Imaging of Hypoxia Predicts Responses to Radiotherapy, Immunotherapy, and Sensitizing Treatments in Pancreatic Tumors, *ACS Nano*, **2021**, *15*, 13526-13538.

[24] T. Krasia-Christoforou, T. K. Georgiou, Polymeric theranostics: using polymer-based systems for simultaneous imaging and therapy, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3002-3025.

[25] Y. Zhong, F. Meng, C. Deng, Z. Zhong, Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy, *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 1955-1969.

[26] K. Miyano, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, Y. Mochida, H. Kinoh, C. Iwata, O. Nagano, H. Saya, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Yamasoba, cRGD peptide installation on cisplatin-loaded nanomedicines enhances efficacy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma bearing cancer stem-like cells, *J. Control. Release*, **2017**, *261*, 275-286.

[27] T. Khan, K. Igarashi, A. Tanabe, T. Miyazawa, S. Fukushima, Y. Miura, Y. Matsumoto, T. Yamasoba, A. Matsumoto, H. Cabral, K. Kataoka, Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells, *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 5030-5039.

- [28] H. Cabral, N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama, K. Kataoka, Preparation of biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II)(DACHPt)-loaded polymeric micelles, *J. Control. Release*, **2005**, *101*, 223-232.
- [29] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815-823.
- [30] Y. Anraku, A. Kishimura, A. Kobayashi, M. Oba, K. Kataoka, Size-controlled long-circulating PICsome as a ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6054-6056.
- [31] A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W.-D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Semipermeable Polymer Vesicle (PICsome) Self-Assembled in Aqueous Medium from a Pair of Oppositely Charged Block Copolymers: Physiologically Stable Micro-/Nanocontainers of Water-Soluble Macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5988-5989.
- [32] Y. Anraku, A. Kishimura, M. Oba, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Spontaneous Formation of Nanosized Unilamellar Polyion Complex Vesicles with Tunable Size

and Properties, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1631-1636.

[33] J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, T. C. Fisher, The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 4259-4270.

[34] V. P. Chauhan, T. Stylianopoulos, J. D. Martin, Z. Popovic, O. Chen, W. S. Kamoun, M. G. Bawendi, D. Fukumura, R. K. Jain, Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 383-388.

[35] A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchillin, L. Huang, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS. J.* **1990**, *268*, 235-237.

[36] V. T. Baron, J. Welsh, P. Abedinpour, P. Borgstrom, Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors, *Am. J. Cancer Res.* **2011**, *1*, 674-686.

[37] T. W. Ridler, S. Calvard, Picture Thresholding Using an Iterative Selection Method, *IEEE Trans. Syst. Man Cybern. Syst.* **1978**, *8*, 630-632.

[38] The jamovi project; (2020). *Jamovi (Version 1.2)* [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

- [39] R Core Team; (2018). *R: a language and environment for statistical computing* [Computer Software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>.
- [40] F. Mpekris, S. Angeli, A. P. Pirentis, T. Stylianopoulos, Stress-mediated progression of solid tumors: effect of mechanical stress on tissue oxygenation, cancer cell proliferation, and drug delivery, *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2015**, *14*, 1391-1402.
- [41] T. Stylianopoulos, K. Soteriou, D. Fukumura, R. K. Jain, Cationic nanoparticles have superior transvascular flux into solid tumors: insights from a mathematical model, *Ann. Biomed. Eng.* **2013**, *41*, 68-77.
- [42] T. Stylianopoulos, L. L. Munn, R. K. Jain, Reengineering the Physical Microenvironment of Tumors to Improve Drug Delivery and Efficacy: From Mathematical Modeling to Bench to Bedside, *Trends Cancer.* **2018**, *4*, 292-319.
- [43] A. Pluen, Y. Boucher, S. Ramanujan, T. D. McKee, T. Gohongi, E. Di Tomaso, E. B. Brown, Y. Izumi, R. B. Campbell, D. A. Berk, R. K. Jain, Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4628-4633.
- [44] J. R. Levick, Flow through interstitium and other fibrous matrices, *Q. J. Exp. Physiol.* **1987**, *72*, 409-437.

- [45] M. W. Deen, Hindered transport of large molecules in liquid-filled pores, *AIChE J.* **1987**, *33*, 1409-1425.
- [46] T. Stylianopoulos, J. D. Martin, M. Snuderl, F. Mpekris, S. R. Jain, R. K. Jain, Coevolution of Solid Stress and Interstitial Fluid Pressure in Tumors During Progression: Implications for Vascular Collapse, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3833-3841.
- [47] L. T. Baxter, R. K. Jain, Transport of fluid and macromolecules in tumors. I . Role of interstitial pressure and convection, *Microvasc. Res.* **1989**, *37*, 77-104.
- [48] S. Kurimoto, N. Yoshinaga, K. Igarashi, Y. Matsumoto, H. Cabral, S. Uchida, PEG-OligoRNA Hybridization of mRNA for Developing Sterically Stable Lipid Nanoparticles toward In Vivo Administration, *Molecules*, **2019**, *24*, 1303.
- [49] T. Miyazaki, K. Igarashi, Y. Matsumoto, H. Cabral, One-Pot Synthesis of PEG-Poly(amino acid) Block Copolymers Assembling Polymeric Micelles with PEG-Detachable Functionality, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 5727-5733.
- [50] M. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, F. Yuan, A. Chilkoti, Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers. *JNCI*, **2006**, *98*, 335-344.
- [51] P. Decuzzi, B. Godin, T. Tanaka, S.-Y. Lee, C. Chiappini, X. Liu, M. Ferrari, Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected

particles, *J. Control. Release*, **2010**, *141*, 320-327.

[52] F. Meng, G. H. M. Engbers, A. Gessner, R. H. Muller, J. Feijen, Pegylated polystyrene particles as a model system for artificial cells. *J Biomed Mater Res A* **2004**, *70A*, 97-106.

[53] M. Khurana, E. H. Moriyama, A. Mariampillai, B. C. Wilson, Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment, *J. of Biomedical Optics*, **2008**, *13*, 040502.

[54] M. Chvatal-Medina, Y. Mendez-Cortina, P. J. Patino, P. A. Velilla, M. T. Rugeles, Antibody Responses in COVID-19: A Review, *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 633184.

[55] S. Baah, M. Laws, K. M. Rahman, Antibody-Drug Conjugates-A Tutorial Review, *Molecules*, **2021**, *26*, 2943.

[56] V. Ghetie, E. S. Ward, E. S. Vietta, Pharmacokinetics of Antibodies and Immunotoxins in Mice and Humans in *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, (Eds: W. D. Figg, H. L. McLeod), *Humana Press*, Totowa, NJ. **2004**, Ch. 29.

[57] K. Gonda, T. M. Watanabe, N. Ohuchi, H. Higuchi, In Vivo Nano-imaging of Membrane Dynamics in Metastatic Tumor Cells Using Quantum Dots, *Mol. Biol.*

Cell, **2010**, *285*, 2750-2757.

[58] L. J. Nugent, R. K. Jain, Extravascular Diffusion in Normal and Neoplastic Tissues, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 238-244.

[59] N. Desai, Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (Abraxane®) in *Albumin in Medicine*, (Eds: M. Otagiri, V. Chuang), *Springer*, Singapore. **2016**, Ch. 6.

[60] T. Annese, R. Tamma, S. Ruggieri, D. Ribatti, Angiogenesis in Pancreatic Cancer: Pre-Clinical and Clinical Studies, *Cancers*, **2019**, *11*, 381.

[61] Q. Jiang, S. Zhao, J. Liu, L. Song, Z.-G. Wang, B. Ding, Rationally designed DNA-based nanocarriers, *Adv. Drug Deliv.* **2019**, *147*, 2-21.

[62] F. Danhier, P. Danhier, C. J. Saedeleer, A.-C. Fruytier, N. Schleich, A. des Rieux, P. Sonveaux, B. Gallez, V. Preat, Paclitaxel-loaded micelles enhance transvascular permeability and retention of nanomedicines in tumors, *Int. J. Pharm.* **2015**, *479*, 399-407.