

DDS の生体内挙動の精確な評価を可能とする
時空間イメージング技術の創出

2020 年度

北海道科学大学大学院 薬学研究科
臨床薬学専攻 博士課程

石澤 清心

目次

緒言	1
第 1 章 FRET 現象を応用したイメージング技術の構築	
第 1 節 序論	3
第 2 節 実験方法	5
第 3 節 結果	9
第 4 節 考察	18
第 2 章 組織透明化手法を応用したイメージング技術の構築	
第 1 節 序論	20
第 2 節 実験方法	21
第 3 節 結果	24
第 4 節 考察	29
第 3 章 腫瘍病巣における DDS の精確な生体内挙動の時空間的 イメージング	
第 1 節 序論	31
第 2 節 実験方法	33
第 3 節 結果	36
第 4 節 考察	41
総括	43
謝辞	44
関連論文	45
参考文献	46

本論文で用いた略語

BxPC3-Red-Fluc : *Lucifera Itarica* 由来ホタルルシフェラーゼ遺伝子導入 BxPC-3

CUBIC : clear unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis

DDS : ドラッグデリバリーシステム

DiD : 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzene-sulfonate salt

DiI : 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

DiO : 3,3'-dioctadecyloxacarbo-cyanine perchlorate

DiR : 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine iodide

DMEM : Dullbecco's modified Eagle's medium

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FBS : ウシ胎児血清

FRET : フェルスター共鳴エネルギー移動

FUnGI : fructose, urea, and glycerol for imaging

PBS : 生理的リン酸緩衝液

PEG-PDLLA : poly(ethylene glycol) methyl ether-block-poly(D, L lactide)

PET : positron emission tomography

PVDF : polyvinylidene difluoride

RPMI 1640 : Roswell park memorial institute medium

SPECT : single-photon emission computed tomography

X線 CT : X-ray computed tomography

緒言

病巣に薬物を選択的に送達することで薬効増強と副作用軽減を実現する、ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発研究が盛んに行われている。特に近年では、標的とする細胞や組織成分に親和性を有する抗体¹⁾やペプチド²⁾を用いた標的指向性や、細胞内のpH³⁾や組織内の温度⁴⁾の変化などの病巣における環境変化に応答する薬物放出性の付与といった、ドラッグキャリアに多種多様かつ分子レベルの機能を搭載したDDSが数多く研究されている。しかしながら、ドラッグキャリアの生体内挙動を評価する技術力不足が臨床応用への足枷となる場合がある⁵⁾。特に、血液及び組織中濃度の測定試料⁶⁾や組織薄切切片による観察検体⁷⁾を作製する際に起こる生体構造の破壊によって、ドラッグキャリアの精確な挙動を評価することが困難となることが問題として挙げられる。そのため、生体構造を維持したままリアルタイムかつ視覚的にドラッグキャリアの生体内挙動を評価する技術の開発が強く求められている。

体内の状況を視覚的に表現する技術として、positron emission tomography (PET)、single-photon emission computed tomography (SPECT) 及びX-ray computed tomography (X線CT) などの放射線イメージング法がある。これらの方法は、低侵襲的イメージング技術として臨床で広く利用されているが、分解能が低く微小な変化の検出には不向きである⁸⁻¹¹⁾。一方、蛍光イメージング法は、励起光の照射が必要であることから前臨床までの利用に限られるものの、撮影装置の選択により全身から細胞レベルまで多様なスケールでの観察が可能である¹²⁻¹⁴⁾。しかしながら、DDSの蛍光イメージングにおいては、ドラッグキャリアの標識又は内封物質の標識に用いる蛍光プローブがDDSから解離又は流出することに加えて^{15,16)}、組織内の観察において光が減衰することが問題となり、精確な評価を妨げている。

以上の背景を踏まえ、本研究では DDS の開発研究に用いる蛍光イメージング法の応用技術について検討した。ドラッグキャリアとして、様々な機能を搭載可能であり、幅広い薬物を内封可能な高分子ナノ粒子¹⁷⁻¹⁹⁾を選択し、第 1 章では、ドラッグキャリアと内封された薬物の正確な時間的体内挙動を可視化するために、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を応用したイメージング技術を構築した。第 2 章では、病巣組織内の薬物の精密な空間的分布を可視化するために、組織透明化手法を応用したイメージング技術を構築した。第 3 章では、第 1 章及び第 2 章で構築した新規イメージング技術を用いて、腫瘍病巣における DDS の正確な生体内挙動を時空間的に可視化した。以下、その詳細について各々論述する。

第 1 章 FRET 現象を応用したイメージング技術の構築

第 1 節 序論

効率的に薬物を病巣へ送達するためには、薬物を内封したドラッグキャリアが標的臓器に到達するまで、その形態を保持していなければならない。しかしながら、生体内において、血流によるせん断応力の影響²⁰⁾や血漿タンパク質との相互作用²¹⁾により、ドラッグキャリアが崩壊する場合がある。現在、単一の蛍光プローブを内封することでドラッグキャリアを標識し、その挙動を追跡するイメージング法が汎用されている^{7,22,23)}。しかしながら、ドラッグキャリアが崩壊した後もプローブ由来のシグナルが検出されるため、ドラッグキャリアの正確な挙動を評価できない。

FRET 現象とは、2 種類の蛍光物質が近接しているとき、donor が発した蛍光エネルギーが acceptor に遷移する現象である (Fig. 1A)²⁴⁾。FRET 現象の発生の有無から donor と acceptor 間の距離の変化を検出できることから、一般に、タンパク質などの分子間相互作用²⁵⁾や分子内立体構造の変化²⁶⁾を評価するために用いられている。本章では、ドラッグキャリア自体とその崩壊後に放出された蛍光プローブの時間的体内挙動を区別して可視化するため、FRET 現象を応用した蛍光イメージング戦略を立案し (Fig. 1B)、全身から細胞レベルまでの幅広いスケールにおいて応用可能かを検討した。

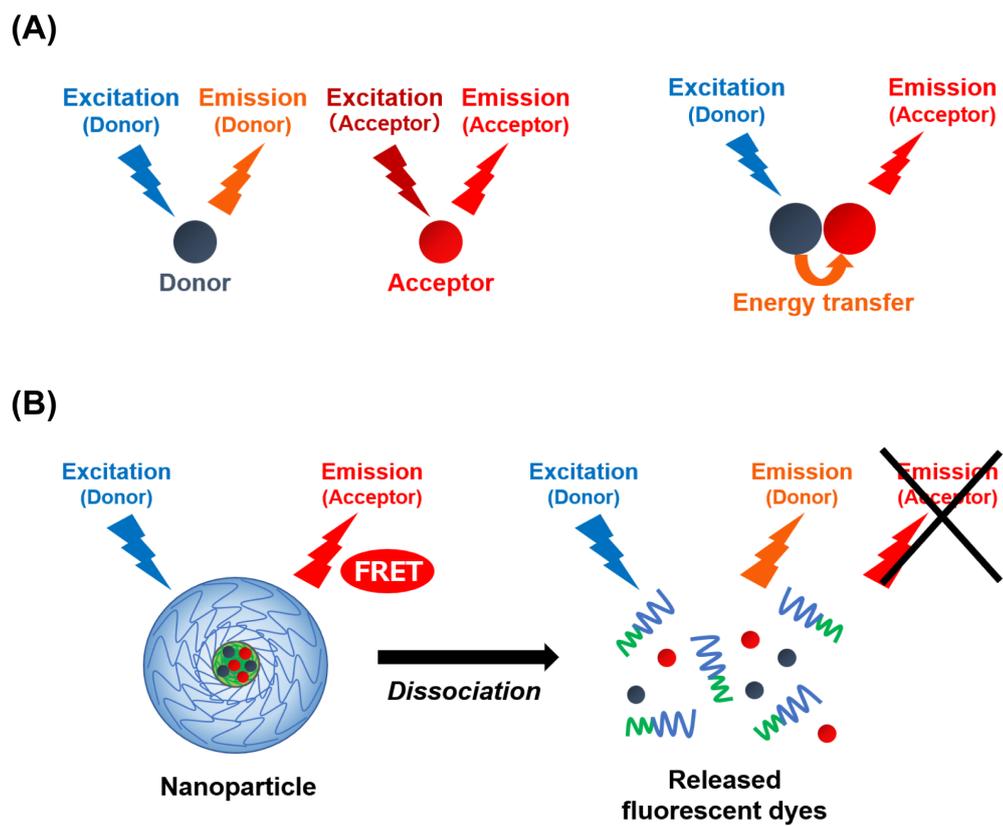


Fig. 1 FRET phenomenon (A) and FRET imaging strategy for detecting the dissociation of polymeric nanoparticle (B)

第 2 節 実験方法

1. 試薬

Poly(ethylene glycol) methyl ether-block-poly(D, L lactide) (PEG-PDLLA; PEG = 2 kDa, PDLLA = 2 kDa)、1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) 及び 3,3'-dioctadecyloxa-carbocyanine perchlorate (DiO) は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine iodide (DiR) 及び 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt (DiD) は Biotium Inc. (Fremont, CA, USA) から購入した。その他の試薬は特級品を用いた。

2. 高分子ナノ粒子の調製

PEG-PDLLAを構成成分とし、エマルジョン法¹⁸⁾により高分子ナノ粒子を調製した。*In vivo* FRET imaging及び*intravital* FRET imagingに用いるナノ粒子には、蛍光物質としてDiR及びDiDを内封した。すなわち、PEG-PDLLA (25 μmol)、DiR及びDiD (各10-80 nmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、超音波処理下 (50 W, 2分間) で生理的リン酸緩衝液 (PBS, 10 mL) に滴下した。その後、室温で攪拌 (700 rpmで30分間, 300 rpmでovernight) し、0.22 μm 孔径のpolyvinylidene difluoride (PVDF) フィルター (Millex-GV, Merck Millipore Ltd, Burlington, MA, USA) でろ過した。*In vitro* FRET imagingに用いるナノ粒子には、蛍光物質としてDiI及びDiOを内封した。すなわち、PEG-PDLLA (2.5 μmol)、DiI及びDiO (各10-40 nmol) をジクロロメタンに溶解し、超音波処理下で精製水 (10 mL) に滴下し、その後は上記と同様に調製した。粒子径は、粒子径・ゼータ電位測定装置 (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK) を用いて、動的光散乱法により測定した。調製したナノ粒子は、すべて30-50 nmであり、多分散指数は0.24未満であった。

3. 蛍光スペクトルの測定

調製したナノ粒子の蛍光スペクトルは、蛍光分光光度計（RF-6000、島津製作所、京都）を用いて測定した。すなわち、DiR 及び DiD を内封したナノ粒子は励起波長 640 nm に固定し、蛍光波長 650-850 nm の範囲で、DiI 及び DiO を内封したナノ粒子は励起波長 488 nm に固定し、蛍光波長 490-640 nm の範囲で、バンド幅 3 nm、200 nm/min のスキャンスピードでそれぞれ測定した。

4. *In vivo* FRET imaging

5 週齢の ICR マウスを日本 SLC 株式会社(静岡)から購入し、AIN-93G 配合精製飼料（D10012G, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA）を 1 週間以上自由給餌した 6~8 週齢のものを実験に用いた。DiR 及び DiD を内封したナノ粒子を、マウスに静脈内投与（DiR 及び DiD として 10 nmol/kg）した。イソフルラン麻酔下で、Multi-functional *in vivo* imager(MIIS, Molecular Devices Inc., San Jose, CA, USA)を用いて、FRET channel（励起フィルター：640/20 nm、吸収フィルター：809/81 nm）、donor channel（励起フィルター：640/20 nm、吸収フィルター：680/22 nm）及び acceptor channel（励起フィルター：708/75 nm、吸収フィルター：809/81 nm）において経時的に蛍光撮影した。また、投与 15 分及び 8 時間後において各臓器を摘出し、蛍光撮影した。得られたすべての画像は、MetaMorph software（version 7.10.1.161, Molecular Devices）を用いて輝度解析し、マウスの胸部及び腹部を含む領域における平均蛍光強度を求めた。FRET の発生効率を示す FRET ratio を、下記式により算出した。なお、 I_{FRET} 及び I_{Donor} は FRET 及び donor channel における平均蛍光強度を示す。

$$\text{FRET ratio} = I_{\text{FRET}} / (I_{\text{FRET}} + I_{\text{Donor}})$$

なお、すべての動物実験は、北海道科学大学動物実験委員会の審査及び北海道科学大学学長の承認（No. 2019-002）を受け、北海道科学大学動物実験規程に基づいて実施した。

5. Intravital FRET imaging

DiR 及び DiD を内封したナノ粒子を ICR マウスに静脈内投与 (DiR 及び DiD として 10 nmol/kg) した。イソフルラン麻酔下で、マウスの耳をスライドガラスに密着させ、ズーム蛍光顕微鏡 (Axio Zoom. V16, Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて、FRET channel (励起フィルター: 640/20 nm、吸収フィルター: 809/81 nm)、donor channel (励起フィルター: 640/20 nm、吸収フィルター: 680/22 nm) 及び acceptor channel (励起フィルター: 708/75 nm、吸収フィルター: 809/81 nm) において経時的に蛍光観察した。また、DiR 及び DiD を内封したナノ粒子をマウスに静脈内投与 (DiR 及び DiD として 10 nmol/kg) 後、イソフルラン麻酔下で開腹し、肝臓をスライドガラスに密着させた²⁷⁾。その後、ズーム蛍光顕微鏡を用いて、肝臓表面を経時的に蛍光観察した。

6. *In vitro* FRET imaging

HepG2 (ヒト肝臓がん由来) 細胞は Riken cell bank (筑波) から購入した。非働化した 10%ウシ胎児血清 (FBS) 及び 40 µg/mL ゲンタマイシン (ゲンタシン、MSD、大阪) を含む Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) を使用し、37°C、5%CO₂-95% air 条件下で培養を行った。コンフルエントに達した細胞は 0.25%トリプシン-EDTA (富士フィルム和光純薬) を用いて回収し、継代した。実験には、継代数 22-24 の細胞を用いた。HepG2 細胞 (5×10⁴ cells) を 14 mm ガラスボトムディッシュ (松波硝子工業株式会社、大阪) に播種し、37°C、5%CO₂-95%Air 条件下で 24 時間培養した。培養後、Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて細胞核を蛍光染色した。1% FBS を含む DMEM を分散媒とした DiI 及び DiO を内封したナノ粒子 (DiI 及び DiO として 2.0 µM) の懸濁液を適用し、37°C 条件下で、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700; Zeiss) を用いて、FRET channel (励起レーザー: 488 nm、吸収フィルター: 560 nm long-pass フィルター)、donor channel (励起レーザー: 488 nm、吸収フィルター: 550 nm short-pass フィルター) において経時的

に蛍光観察した。細胞核は励起レーザー：405 nm、吸収フィルター：
415-735 nm を用いて蛍光観察した。

第 3 節 結果

全身から組織レベルまでの FRET イメージングに供するため、DiR 及び DiD を内封した高分子ナノ粒子を調製し、蛍光スペクトル及び撮影装置による蛍光画像の取得により FRET が検出可能か評価した。蛍光スペクトルにおいて、DiR 及び DiD の濃度が 1.0-3.0 μM の範囲においては、濃度の増加に応じて、donor シグナルを示す 670 nm 付近のピーク (donor ピーク) の蛍光強度は減少し、FRET シグナルを示す 770 nm 付近のピーク (FRET ピーク) の蛍光強度は増大した (Fig. 2A)。一方、4.0 μM 以上において FRET ピークの蛍光強度が減少した。そのため、以降の実験においては 3.0 μM のものを使用した。PBS を希釈溶媒とした場合、DiR 及び DiD を内封したナノ粒子の donor ピークの蛍光強度は、同濃度の DiD のみを内封したナノ粒子に比べて低値であった。また、FRET ピークの蛍光強度は、同濃度の DiR のみを内封したナノ粒子に比べて高値であった (Fig. 2B)。一方、エタノールを希釈溶媒とした場合、DiR 及び DiD を内封したナノ粒子の FRET 及び donor ピークの蛍光強度は、DiR 又は DiD のみを内封したナノ粒子のピークの蛍光強度の合計と、それぞれほぼ同値となった。Multi-functional *in vivo* imager (Fig. 2C) 及びズーム蛍光顕微鏡 (Fig. 2D) を用いて検出した FRET 及び donor シグナルと、蛍光スペクトルにより検出された FRET 及び donor ピーク (Fig. 2B) との間で、各ナノ粒子間の強弱関係はほぼ一致した。

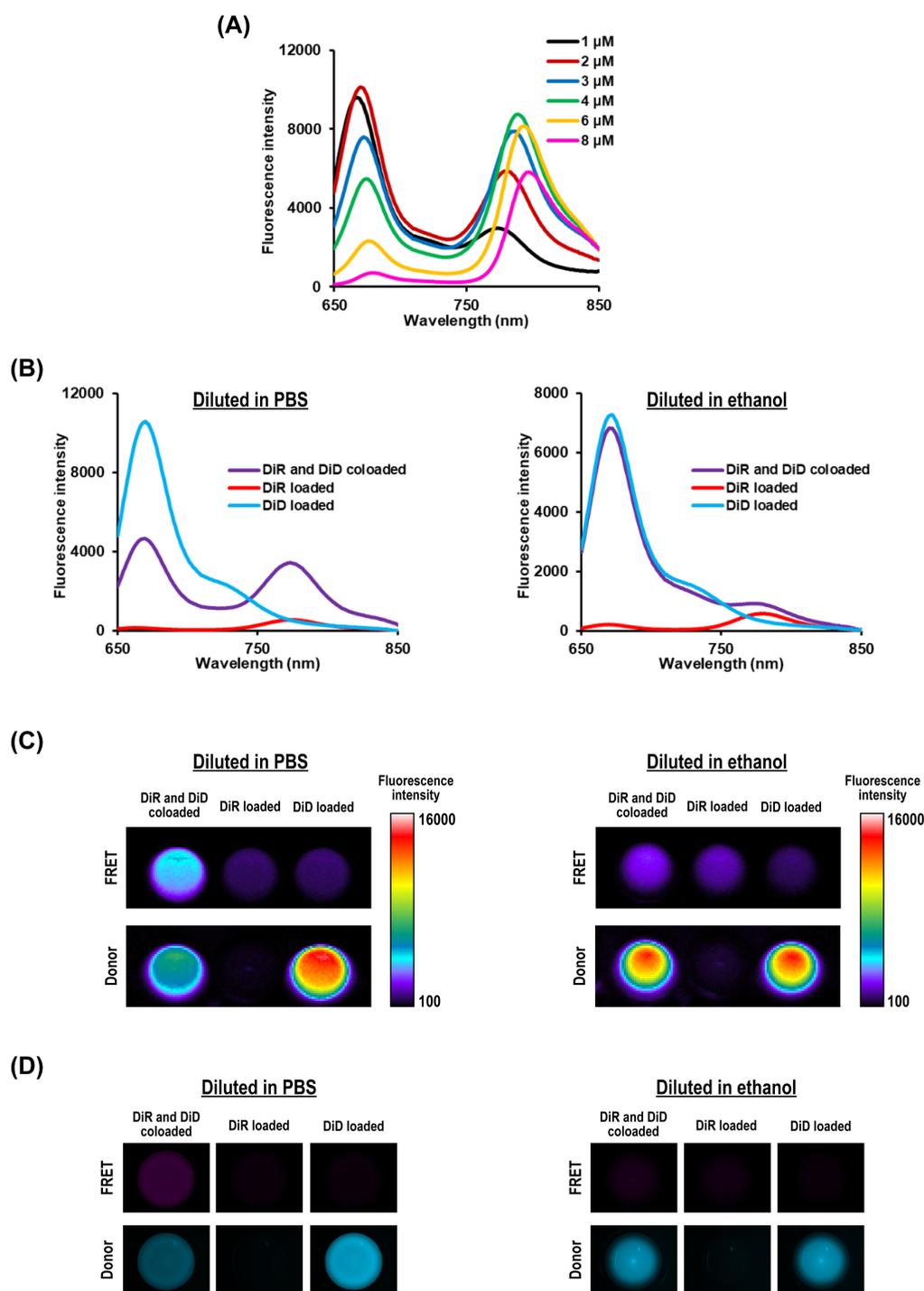


Fig. 2 Validation for FRET imaging of DiR and DiD coloaded nanoparticles

Fluorescence spectra of DiR and DiD coloaded nanoparticles encapsulated various amount of DiR and DiD (A). Fluorescence spectra of 3.0 μM DiR or/and DiD loaded nanoparticles diluted 5-fold in PBS and ethanol (B). Fluorescent images of 3.0 μM DiR or/and DiD loaded nanoparticles diluted 5-fold in PBS and ethanol obtained by multi-functional *in vivo* imager (C) and zoom fluorescence microscopy (D).

高分子ナノ粒子の体内挙動を全身スケールで評価するために、*in vivo* FRET imaging を行った。DiR 及び DiD を内封したナノ粒子を投与後、マウスの全身に検出された FRET シグナルは経時的に減弱し、逆に donor シグナルは経時的に増強した (Fig. 3A)。一方、acceptor シグナルの強度は殆ど変化しなかった。また、FRET の発生効率を示す FRET ratio は経時的に減少した (Fig. 3B)。これらの結果は、ナノ粒子が体内で経時的に崩壊していることを示している。摘出した臓器においては、特に肺と肝臓に強い蛍光が観察された。いずれの臓器も、投与 15 分後に比べて 8 時間後では、FRET シグナルは減弱、donor シグナルは増強し、acceptor シグナルは殆ど変化しなかった (Fig. 3C)。これらの結果は、投与したナノ粒子が主に肺及び肝臓に分布し、経時的に崩壊することを示している。

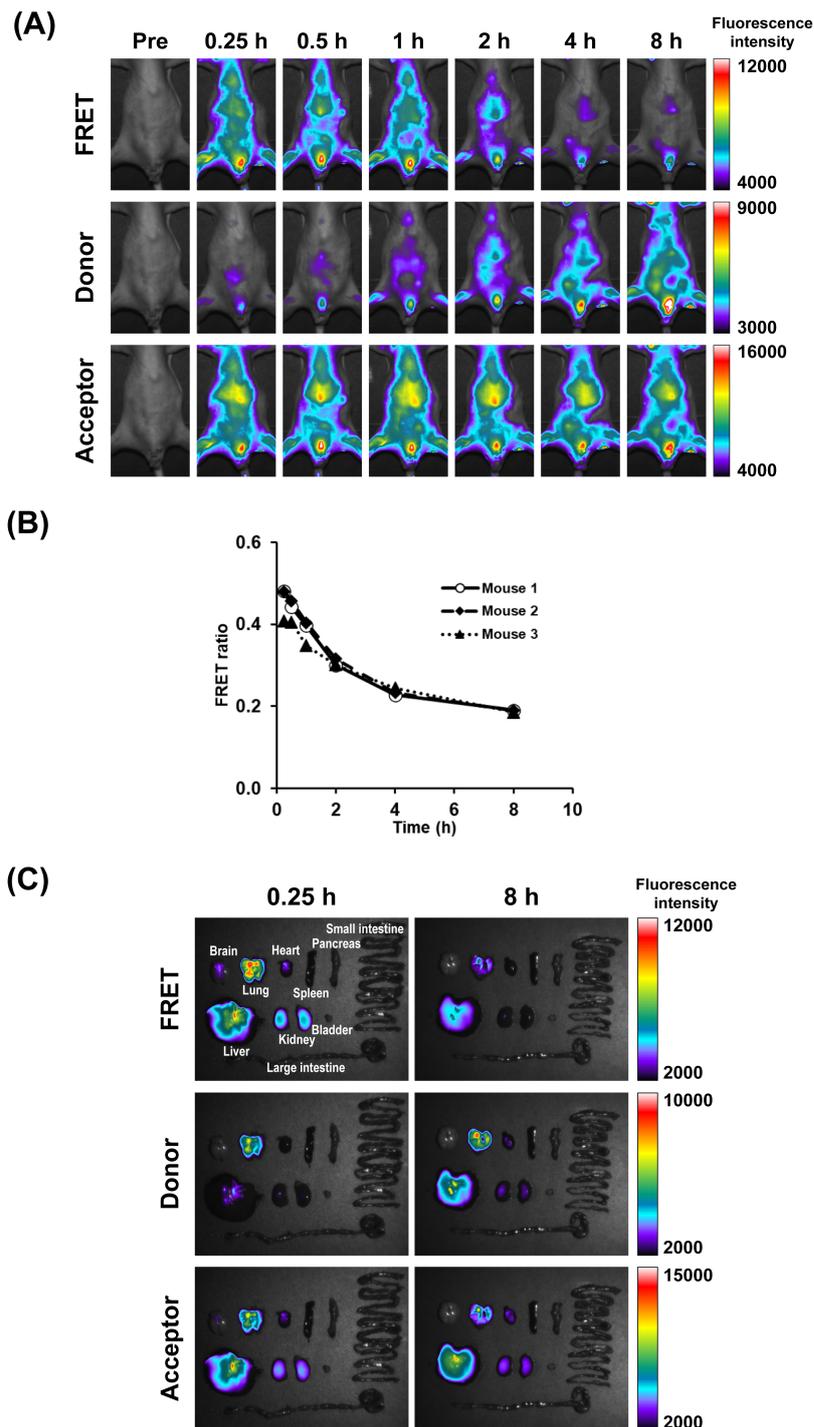


Fig. 3 FRET imaging of DiR and DiD coloaded nanoparticles in mice at whole body scale

DiR and DiD coloaded nanoparticles (10 nmol of DiR and DiD each/kg) were intravenously administered to mice. The images were obtained by multi-functional *in vivo* imager (A). Pre-image indicates before administration of the nanoparticles. FRET ratio was calculated from fluorescence intensity at FRET and donor channels on the images of panel A (B). *Ex vivo* fluorescent images were obtained at 0.25 and 8 h after administration (C).

高分子ナノ粒子の体内挙動を組織スケールで評価するために、**intravital FRET imaging**を行った。ナノ粒子を投与後、耳の血管内において強い FRET シグナルが認められ、経時的に減弱した (Fig. 4A)。一方、**donor** シグナルは殆ど変化しなかったが、**acceptor** シグナルは経時的に減弱した。これらの結果は、血中でナノ粒子が崩壊したことによって FRET シグナルの減弱及び **donor** シグナルの増強が起こったことに加え、**donor** である DiD が血中から消失したことにより、**donor** シグナルが殆ど変化しなかったことを示唆している。肝臓においては、投与後、肝血管内に強い FRET シグナルが認められ、経時的に減弱した。一方、**donor** シグナルは、肝組織全体において経時的に増強した (Fig. 4B)。これらの結果から、投与されたナノ粒子は、肝臓において血管外へ漏出すると共に崩壊し、内封されていた蛍光物質が放出されたことが示唆された。

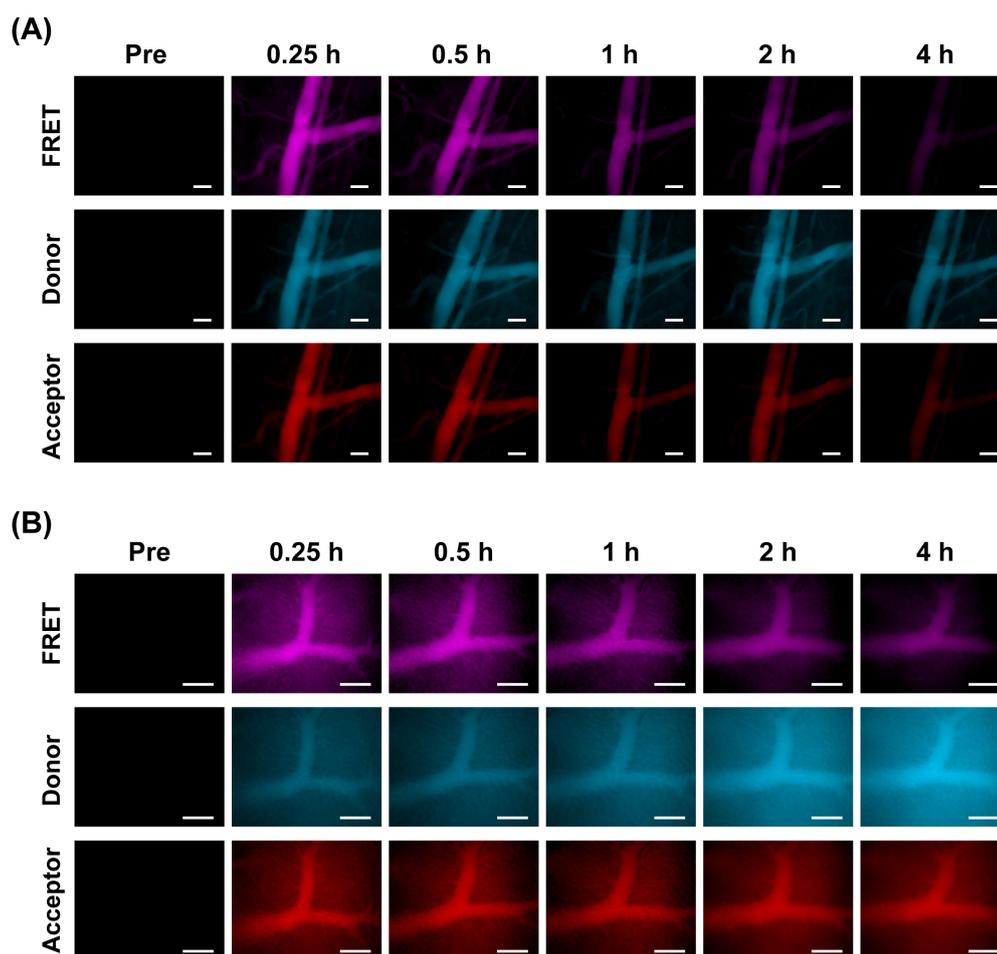


Fig. 4 Intravital FRET imaging of DiR and DiD coloaded nanoparticles in mice ear blood vessels (A) and liver tissue (B)

DiR and DiD coloaded nanoparticles (10 nmol of DiR and DiD each/kg) were intravenously administered to mice. The images were obtained at designed time by zoom fluorescence microscopy. Pre-image indicates before administration of the nanoparticles. Scale bar is 100 μm .

細胞レベルにおける FRET イメージングに供するため、DiI 及び DiO を内封した高分子ナノ粒子を調製し、DiR 及び DiD を内封した高分子ナノ粒子の場合と同様に蛍光スペクトル及び共焦点レーザー顕微鏡で取得した蛍光画像によって FRET が検出可能であるかを評価した。蛍光スペクトルにおいて、DiI 及び DiO の濃度が 1.0-2.5 μM の範囲においては、濃度の増加に応じて、donor シグナルを示す 510 nm 付近のピーク（donor ピーク）の蛍光強度は減少し、FRET シグナルを示す 570 nm 付近のピーク（FRET ピーク）の蛍光強度は増大した（Fig. 5A）。一方、3.0 μM 以上において FRET ピークの蛍光強度が減少した。そのため、以降の実験においては 2.5 μM のものを使用した。PBS を希釈溶媒とした場合、DiI 及び DiO を内封したナノ粒子の donor ピークの蛍光強度は、同濃度の DiO のみを内封したナノ粒子に比べて低値であった。また、FRET ピークの蛍光強度は、同濃度の DiI のみを内封したナノ粒子に比べて高値であった（Fig. 5B）。一方、エタノールを希釈溶媒とした場合、DiI 及び DiO を内封したナノ粒子の FRET 及び donor ピークの蛍光強度は、DiI 又は DiO のみを内封したナノ粒子のピークの蛍光強度の合計と、それぞれほぼ同値となった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した FRET 及び donor シグナル（Fig. 5C）と、蛍光スペクトルにより検出された FRET 及び donor ピーク（Fig. 5B）との間で、各ナノ粒子間の強弱関係はほぼ一致した。

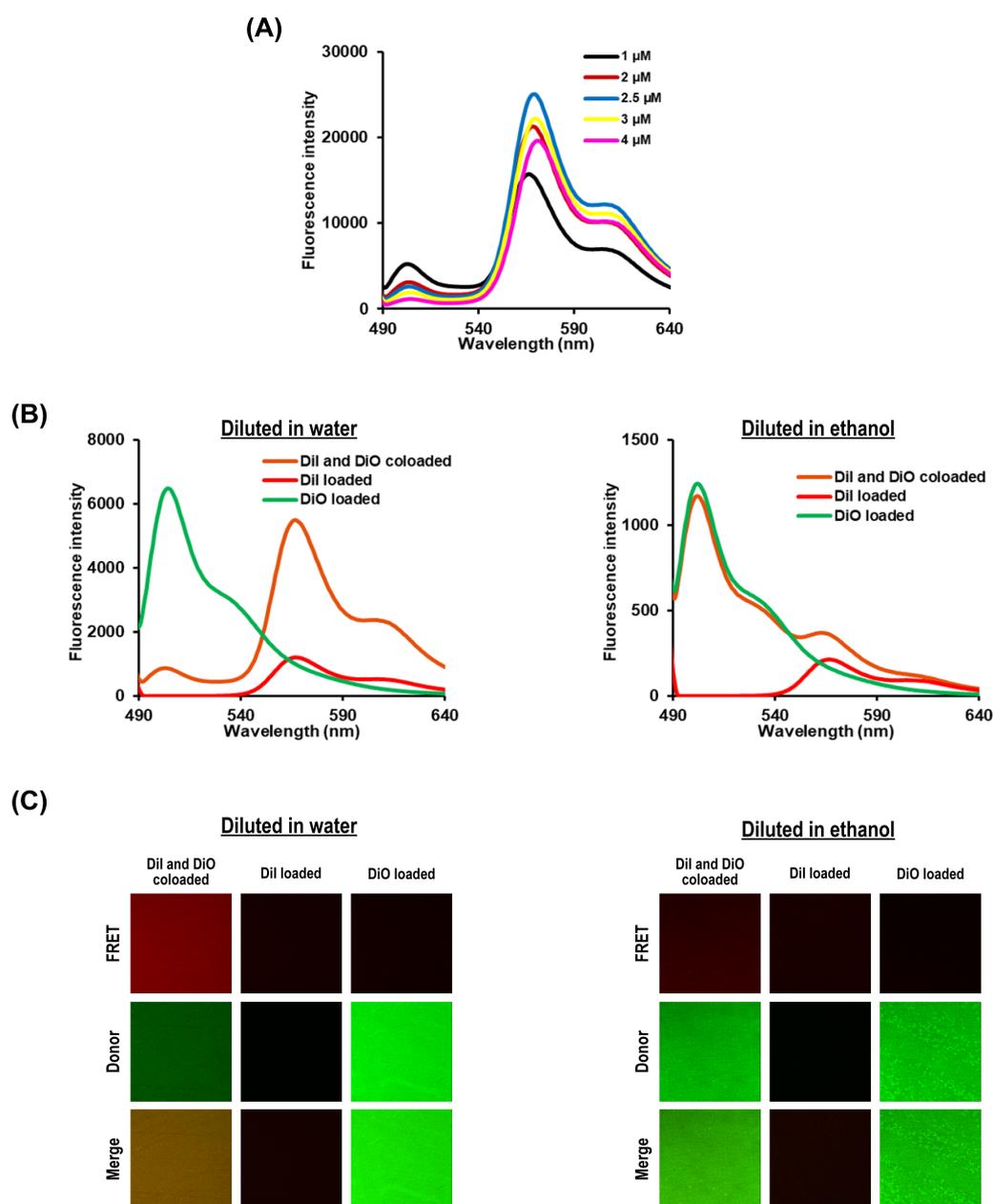


Fig. 5 Validation for FRET imaging of DiI and DiO coloaded nanoparticles

Fluorescence spectra of DiI and DiO coloaded nanoparticles encapsulated various amount of DiI and DiO (A). Fluorescence spectra of 2.5 μM DiI or/and DiO loaded nanoparticles diluted 5-fold in water and ethanol (B). Fluorescent images of 2.5 μM DiI or/and DiO loaded nanoparticles diluted 5-fold in water and ethanol obtained by confocal laser microscopy (C).

高分子ナノ粒子の挙動を細胞スケールで評価するために、*in vitro* FRET imaging を行った。HepG2 細胞内において、FRET シグナルは観察されず、donor シグナルのみが経時的に増強した (Fig. 6)。この結果は、ナノ粒子が細胞内に取り込まれる段階で崩壊し、放出された蛍光物質が細胞内に集積することを示している。

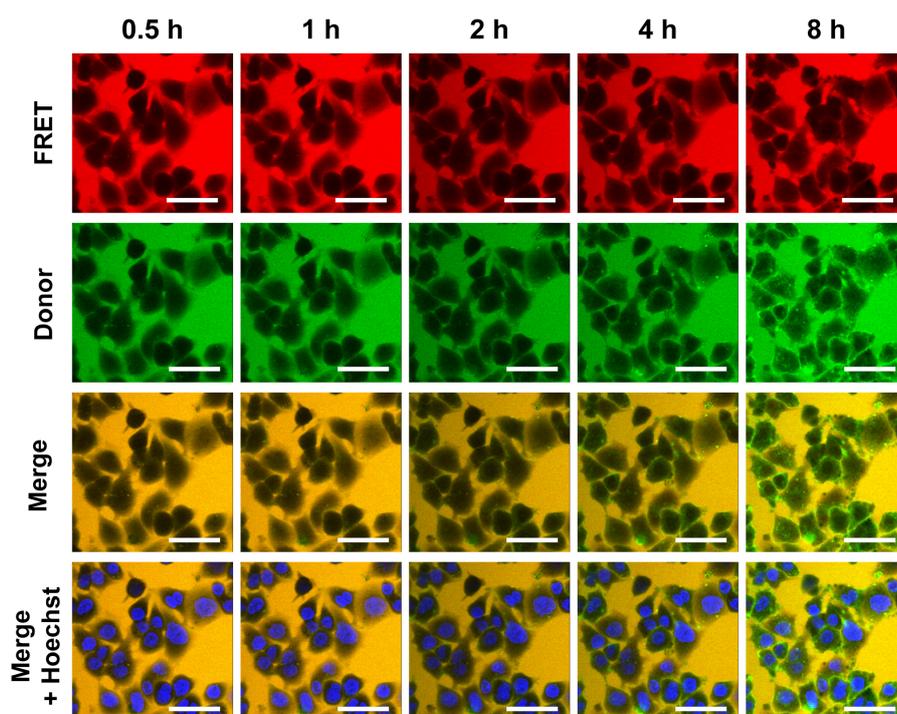


Fig. 6 FRET imaging of DiI and DiO coloaded nanoparticles in HepG2 cells at cellular scale

DiI and DiO coloaded nanoparticles (2.0 μM of DiI and DiO each) in DMEM containing 1% FBS were applied to the cells. The images were obtained at designed time using confocal laser microscopy. Scale bar is 50 μm .

第 4 節 考察

本章では、ドラッグキャリア自体とその崩壊後に放出された蛍光プローブの時間的体内挙動を区別して可視化するため、FRET 現象を応用した蛍光イメージングについて検討した。

DiR と DiD 又は DiI と DiO の組み合わせで、2 種類の蛍光物質を高分子ナノ粒子に内封することにより FRET 現象を発生させ、全身から細胞レベルまでの幅広いスケールにおいて生体内挙動を視覚化することが可能となった。FRET 現象は donor と acceptor が 10 nm 以内に近接すると発生する²⁴⁾。本研究で調製した高分子ナノ粒子は、内部に疎水性物質を内封可能なコアを形成する²⁸⁾。ナノ粒子の標識に用いた蛍光物質はいずれも高い疎水性を有することから、ナノ粒子のコア部分に密集したことによって FRET 現象が発生したと考えられる。多種多様にわたるドラッグキャリアにおいて FRET 現象を応用したイメージングを行うためには、その物理化学的特性に応じて、ドラッグキャリア内に密集可能かつ FRET 現象が発生する組み合わせの蛍光プローブを選択する必要がある。

本研究で調製した高分子ナノ粒子は、投与 8 時間後までに主に肝臓などに集積し、体内で崩壊することが明らかとなった。肝臓の類洞は約 150-200 nm の間隙を有する不連続内皮であり、これ以下のサイズのナノ粒子は容易に肝細胞に到達可能である²⁹⁾。In vitro において、ナノ粒子が肝細胞に取り込まれる過程において崩壊することが明らかとなったことから、肝臓中におけるナノ粒子の崩壊には、肝細胞への集積過程が一部関与していると考えられる。

Acceptor シグナルは FRET の影響を受けないため、単一の蛍光プローブ標識による従来行われてきたイメージングの結果と同様となる。本研究で調製したナノ粒子の蛍光イメージングにおいて、FRET シグナルと acceptor シグナルの挙動は異なった。すなわち、従来の手法では確たる評価が不可能であった DDS の挙動を正確に検出し、可視化することができた。

本章において構築した FRET イメージング技術により、生体内の様々なスケールにおいて、形態を保持したドラッグキャリアと放出された物質の正確な時間的体内挙動が評価可能となった。

第 2 章 組織透明化手法を応用したイメージング技術の構築

第 1 節 序論

種々の DDS の標的組織内への送達能は、主に組織薄切切片を観察することで評価されている^{7,13,30)}。しかしながら、この手法では薄切による組織への損傷や、蛍光プローブの流出などを引き起こす可能性がある。一方で、臓器内をそのまま顕微鏡などで蛍光イメージングしようとしても、臓器中の成分によって光が減衰するため、臓器内の蛍光検出が妨げられる。また、生体透過性が高い長波長の蛍光プローブを使用しても、分解能及び感度が低いことから、組織スケールの詳細な分布を評価することは困難である。

組織透明化手法は、臓器の光透過性を向上させることにより、臓器内部の詳細な蛍光イメージングを可能にする (Fig. 7)³¹⁾。この技術は、主に臓器内の立体構造を組織・細胞レベルで明らかにする目的で開発され、有機溶媒又は水性溶媒をベースとした様々な手法がある³²⁻³⁷⁾。本章では、ドラッグキャリアによって送達された物質の組織内における空間的分布を評価することを目的とし、最適な組織透明化手法について検討した。

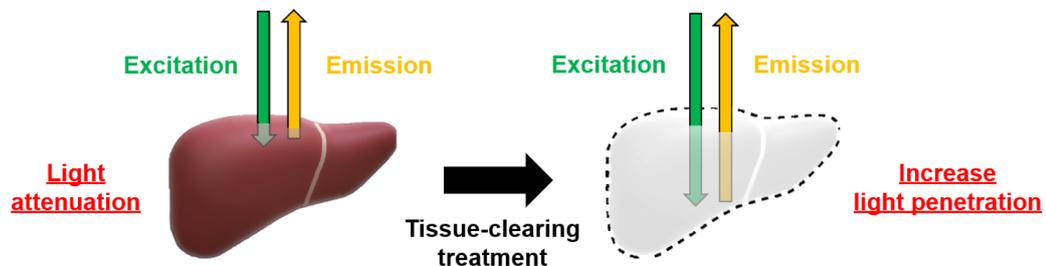


Fig. 7 Advantage of tissue-clearing techniques

第 2 節 実験方法

1. 試薬

ホルムアミド、D-ソルビトール、尿素、メチル- β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、ジメチルスルホキシド、スクロース及び 2,2',2''-nitrilotriethanol は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。*N*-acetyl-L-hydroxyproline 及び *N,N,N',N'*-tetrakis(2-hydroxypropyl)-ethylenediamine は東京化成工業株式会社(東京)から購入した。Triton X-100 は Alfa Aesar (Heysham, UK)から購入した。Polyethylene glycol (8 kDa) 及び glycerol は Sigma-Aldrich Co.から購入した。DyLight 649-conjugated tomato lectin は Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA) から購入した。その他の試薬は第 1 章第 2 節第 1 項に示したものをを用いた。

2. 高分子ナノ粒子の調製

第 1 章第 2 節第 2 項と同様の方法で PEG-PDLLA を構成成分とする高分子ナノ粒子を調製し、蛍光物質として DiI (100 μ M) を内封した。

3. マウス肝臓の透明化処理

6~8 週齢の ICR マウスに、DiI を内封したナノ粒子 (DiI として 333 nmol/kg) を静脈内投与した。投与 3 時間 50 分後に DyLight 649-conjugated tomato lectin (3.3 mg/kg) を静脈内投与した。ナノ粒子投与 4 時間後に 4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液を用いて全身灌流固定を行った。肝臓を摘出し、4°C 条件下で 4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液に一晩浸漬した。肝葉に分離後、Clear^{T2}³⁴⁾、ScaleSQ(0)³⁵⁾、clearing agent comprising fructose, urea, and glycerol for imaging (FUnGI)³⁶⁾及び clear unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis(CUBIC)法³⁷⁾により透明化処理した(Fig. 8)。また、CUBIC 法をベースに、処理液の組成及び処理時間を改変した

Modified CUBIC 法により肝葉を透明化処理した。

Tissue-clearing techniques	Procedure		
Clear^{T2}	25% formamide 10% polyethylene glycol (RT, 1 h)	➡ 50% formamide 20% polyethylene glycol (RT, 1 h)	➡ 50% formamide 20% polyethylene glycol (RT, 5 h)
ScaleSQ(0)	22.5% D-sorbitol 9.1 M urea (37°C, 2 h)	➡ 40% D-sorbitol 10% glycerol 4 M urea 20% dimethyl sulfoxide (RT, 2 h)	
FUnGI	50% glycerol (vol/vol) 2.5 M fructose 2.5 M urea 10.6 mM Tris Base 1 mM EDTA 50 mg/mL ascorbic acid 0.05 ng/mL L-glutathione (RT, 2 h)		
CUBIC	25% urea 25% <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine 15% Triton X-100 (RT, 72 h)	➡ PBS (RT, 24 h)	➡ 50% sucrose 25% urea 10% 2,2',2"-nitrilotriethanol 0.1% Triton X-100 (RT, 72 h)
Modified CUBIC	50% sucrose 25% urea 10% 2,2',2"-nitrilotriethanol (RT, 0.5 h)		

Fig. 8 Composition of clearing reagents and protocols for five tissue-clearing techniques (Clear^{T2}, ScaleSQ(0), FUnGI, CUBIC, and modified CUBIC)

4. 透明化処理による DiI の漏出量の測定

DiI のエタノール溶液 (5 mg/mL) を肝葉の組織片に 1 μ L 適用し、30 分間静置した。Clear^{T2}、ScaleSQ(0)、FUnGI、CUBIC 及び Modified CUBIC 法にて透明化処理し、回収した処理液中の DiI 濃度をプレートリーダー (Powerscan HT, Pharma Biomedical Co.,Ltd、大阪) を用いて励起波長 530/25 nm、蛍光波長 590/35 nm における蛍光強度を測定することで求めた。肝葉の組織片に適用した DiI の残存率を算出した。

5. 透明化処理後の肝臓サンプルの蛍光観察

透明化処理後の肝臓サンプルを 14 mm ガラスボトムディッシュ（松波硝子工業株式会社）に配置し、共焦点レーザー顕微鏡（LSM700, Zeiss）を用いて、蛍光観察した。肝臓サンプルの表面から 2 μm 毎の深さでスタック画像を撮影し、得られた画像を ZEN software (black edition 3.0 SR, Zeiss) を用いて 3 次元的に再構築した。

第 3 節 結果

透明化処理後の肝葉の透明度を比較した (Fig. 9)。Clear^{T2} 法で処理した肝葉においては、背景の黒線は殆ど視認できなかったが、ScaleSQ(0)、FUnGI 及び Modified CUBIC 法で処理した肝葉においては、背景の黒線の視認性が増大した。また、CUBIC 法で処理した肝葉においては、特に明確に視認可能となった。

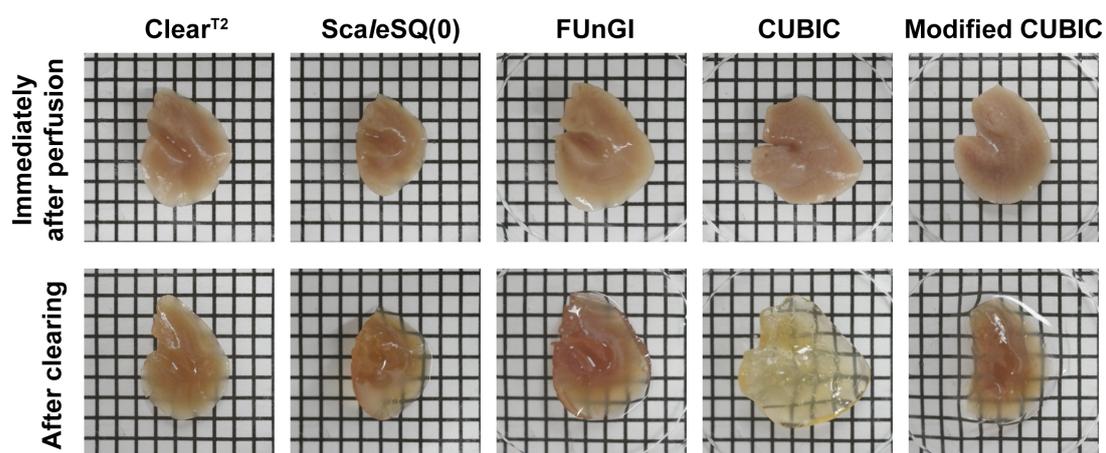


Fig. 9 Transparency of mouse liver lobe after tissue-clearing treatments

Each square indicates $2 \times 2 \text{ mm}^2$.

透明化処理後の肝臓における DiI の保持性を確認した。Clear^{T2}、ScaleSQ(0)、FUnGI、CUBIC 及び Modified CUBIC 法による透明化処理後の肝臓における DiI の残存率は、それぞれ $96.4 \pm 1.4\%$ 、 $96.5 \pm 0.4\%$ 、 $97.3 \pm 1.5\%$ 、 $22.0 \pm 9.0\%$ 及び $98.4 \pm 0.2\%$ であった (Fig. 10)。

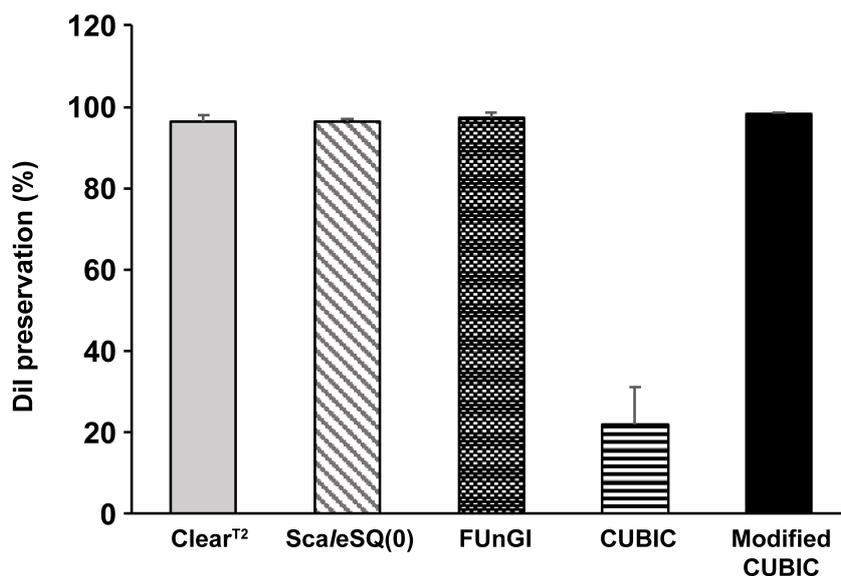


Fig. 10 Percentage of DiI preservation in the liver after tissue-clearing treatments

DiI solution (5 mg/mL, 1 μ L) in ethanol was spotted onto fixed liver samples, which were immersed in specific clearing reagents, and DiI concentration in each clearing reagent was measured. Data are presented as means \pm SD (n = 3).

DiI を内封したナノ粒子を投与後の肝臓において、各種透明化処理によって蛍光イメージング可能な深度を比較した (Fig. 11)。Clear^{T2}法では肝臓表面のみ、ScaleSQ(0)及び FUnGI 法では肝臓表面から 50 μm の深さまで、Modified CUBIC 法では 100 μm の深さまで DiI 及び DyLight 649-conjugated tomato lectin 由来の蛍光分布が観察可能であった。CUBIC 法で処理した肝臓においては、表面から 100 μm の深さまで明瞭に観察可能であったが、灌流固定直後と比較して DiI 由来の蛍光シグナルの分布が大きく変化した。また、可視化された DiI 及び DyLight 649-conjugated tomato lectin の蛍光画像を基に 3 次元的に再構築した (Fig. 12)。Modified CUBIC 法が、最も鮮明に深くまで可視化できる方法であった。

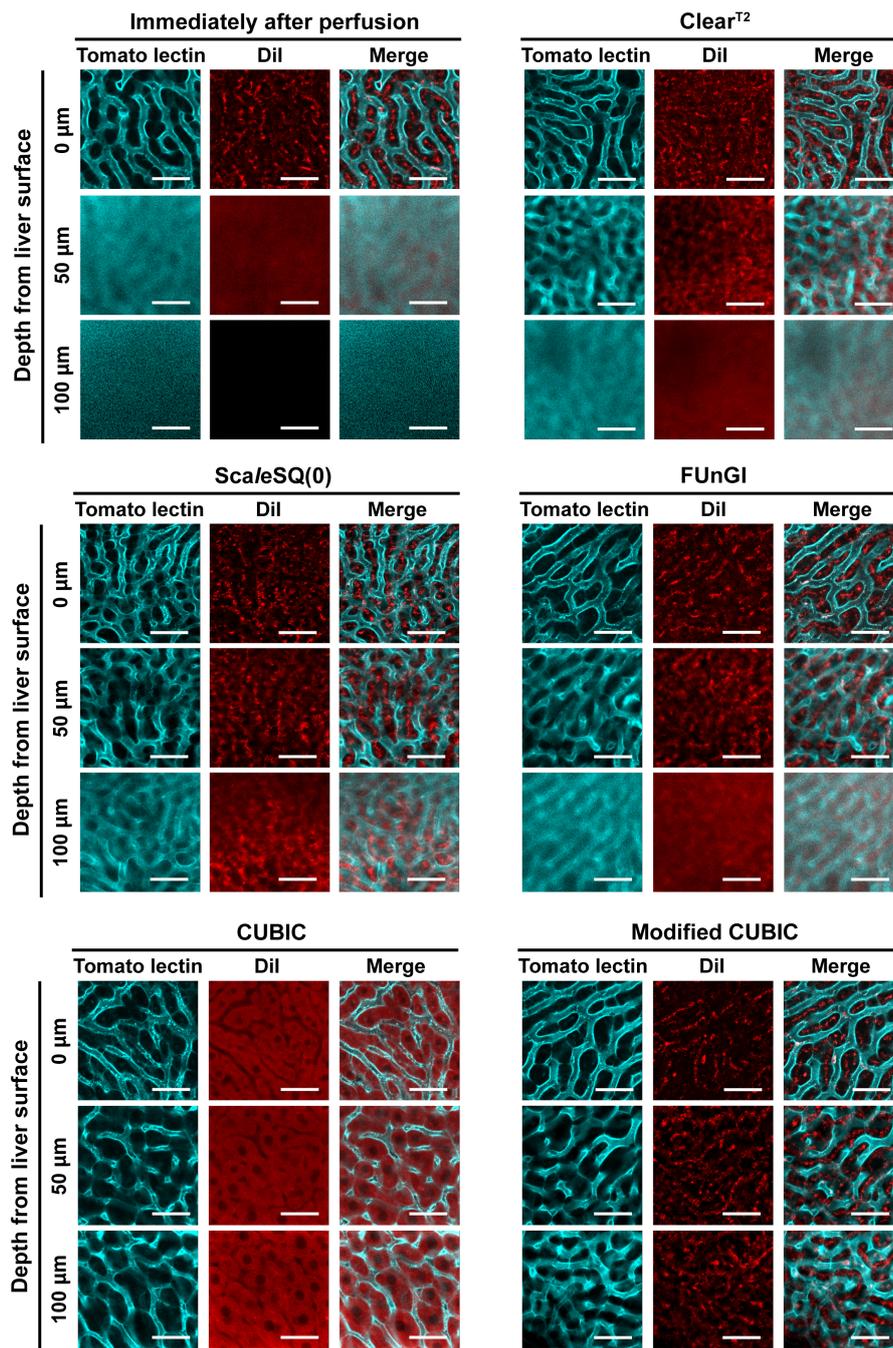


Fig. 11 DiI distribution and tomato-lectin labeled sinusoidal structures of mouse liver after tissue-clearing treatments

DiI loaded nanoparticles (333 nmol/kg for DiI) was administered intravenously to mice. At 4 h after administration, the liver was perfused for fixation and excised. DyLight 649-conjugated tomato lectin (3.3 mg/kg) was administered intravenously ten minutes before perfusion. After tissue-clearing treatment, the tissues were observed with confocal laser microscopy. Each fluorescent image at 0, 50, and 100 μm below the liver surface was individually analyzed at the respective depth. Scale bar is 50 μm .

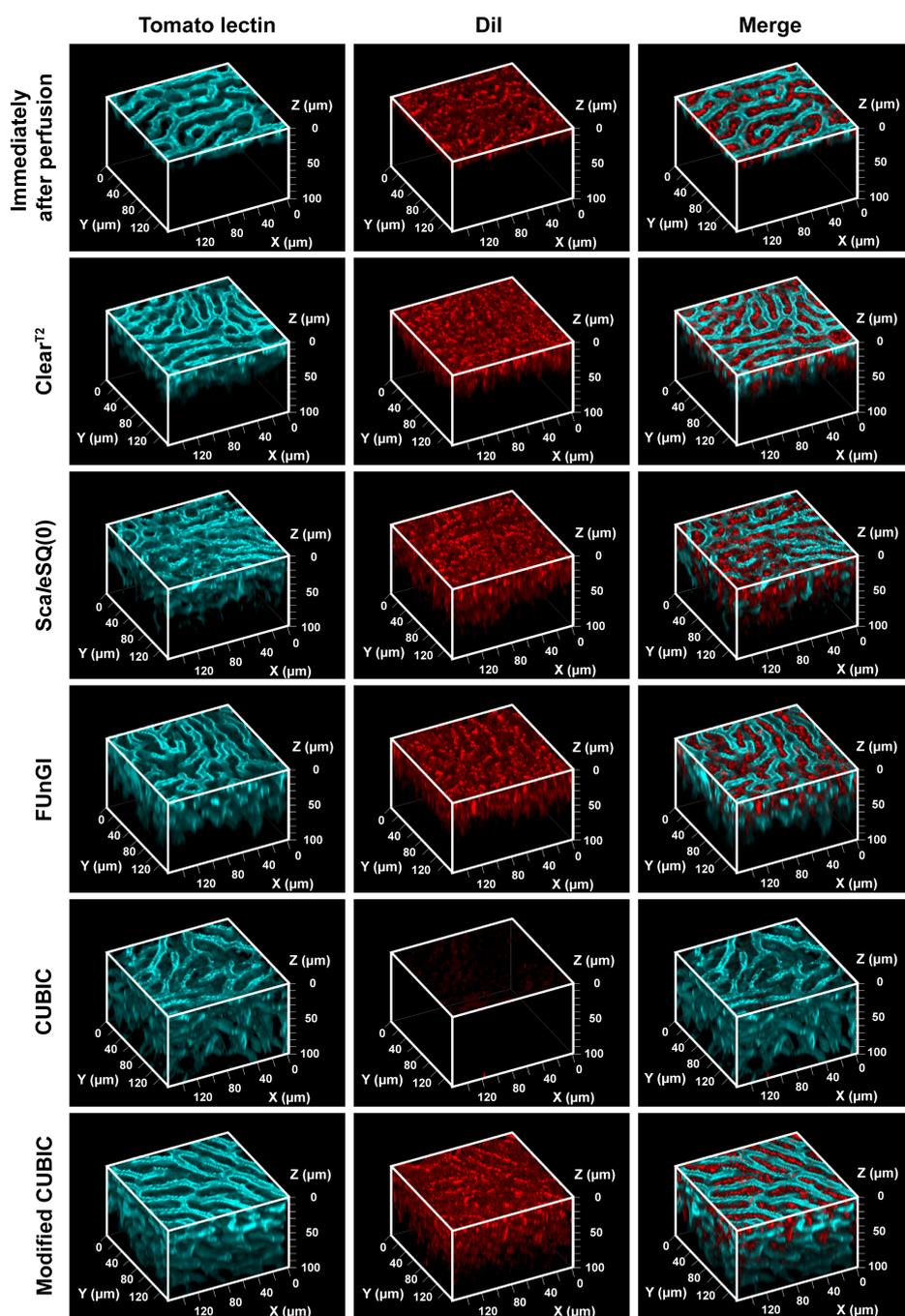


Fig. 12 Three-dimensional images of Dil distribution and tomato-lectin labeled sinusoidal structures of mouse liver after tissue-clearing treatments

The images were reconstructed from Z-stack fluorescent images of liver samples presented in Fig. 11. Each 2- μm stack is obtained from 0 to 100 μm below the liver surface.

第 4 節 考察

本章では、ドラッグキャリアによって送達された物質の組織内における空間的分布を評価するための最適な組織透明化手法について検討した。

組織透明化は数多くの方法が報告されており、処理液の組成や処理時間の違いによって、どの程度透明化できるか、組織の形態を保持できるかなどが大きく異なる³¹⁾。Clear^{T2}法は脳や肺において透明化可能であるが³⁴⁾、内因性色素の豊富な肝臓に対しては不十分であったと考えられる。最も高い透明度を示した CUBIC 法は、他の臓器においても高い透明度を実現可能であるが³⁷⁾、肝臓における DiI の分布が大きく変化した。DiI は疎水性が高いため、界面活性剤を含む CUBIC 法の透明化液によって漏出したものと考えられる。DiI 以外にも Nile Red³⁸⁾や coumarin 6³⁹⁾といった蛍光物質が DDS の蛍光標識に用いられるが、いずれも疎水性が高いことから、界面活性剤を含む CUBIC 法はドラッグキャリアの空間的分布を評価するための手法としては不適であると考えられる。高い DiI の保持性を示した ScaleSQ(0)、FUnGI 及び Modified CUBIC 法の中で、本章で構築した Modified CUBIC 法が最も深部まで可視化できた。以上のことから、Modified CUBIC 法が、ナノ粒子によって送達された物質の組織内分布を空間的に可視化するための最適な方法であることが示された。内因性色素が特に豊富で大きな臓器である肝臓が透明化可能であったことは、Modified CUBIC 法が他の殆どの臓器においても高い透明度を実現できる可能性を示唆している。

Tomato lectin は、肝臓においては、類洞を含む血管構造に結合することが報告されている^{40,41)}。そのため、DyLight 649-conjugated tomato lectin によって可視化されたのは肝臓の血管構造であると考えられる。蛍光標識 tomato lectin は脳、脾臓、腎臓及び腸など他の臓器についても、血管構造の標識が可能である⁴⁰⁻⁴²⁾。そのため、蛍光標識 tomato lectin を併用した Modified CUBIC 法による空間的イメージング手法は、様々な臓器や組織への応用が可能であると考えられる。

Modified CUBIC 法を用いた 3 次元イメージングにより、肝臓の血管構造及び蛍光物質の分布を空間的に捉えることが可能となり、肝臓の血管外の領域までナノ粒子に内封した蛍光物質が到達していることが明らかとなった。本章において構築した Modified CUBIC 法を用いた 3 次元イメージング技術により、ドラッグキャリアによって送達された物質の組織内における精密な空間的分布が評価可能となった。

第 3 章 腫瘍病巣における DDS の精確な生体内挙動の 時空間的イメージング

第 1 節 序論

がんに対する薬物治療においては、抗悪性腫瘍薬の多くが強い細胞毒性を有しているため、腫瘍病巣に選択的に薬物を送達する DDS の開発が望まれている。がん治療を指向した DDS の開発に際しては、ドラッグキャリアが腫瘍病巣に到達するまで薬物を内封したまま形態を保持し、がん細胞周辺又は細胞内で内封していた薬物を放出することが、安全性・有効性の観点から重要である。

腫瘍病巣周辺においては、血管透過性が亢進し、ある程度大きな分子や粒子でも血管壁を通過して病巣へ到達する⁴³⁾。それゆえ、ドラッグキャリアの粒子径を最適化することで、選択的に腫瘍病巣へ薬物を送達する DDS 開発戦略が採られてきた⁴⁴⁻⁴⁶⁾。しかしながら、従来の単一の蛍光プローブによるドラッグキャリアのイメージング法では、ドラッグキャリア自体とその崩壊後に放出された物質の移行性を区別して評価していない。そのため、投与されたドラッグキャリア自体の血中から腫瘍病巣へ至るまでの正確な時間的体内挙動を評価し、最新の知見を基にして、高度な腫瘍選択能を搭載した DDS を新規開発することが重要である。

一方、腫瘍病巣は過剰な細胞外マトリックスによって高密度の構造を形成するため、薬物の病巣深部への浸透が妨げられることが報告されている^{47,48)}。この問題を解決するために、近年、様々な戦略に基づくドラッグキャリアが開発されているが、腫瘍病巣深部への送達性評価については、組織薄切切片の観察に限られているのが現状である^{49,50)}。そのため、腫瘍病巣内における精密な空間的薬物分布を評価できる新たな技術が重要となる。

本章では、ドラッグキャリア自体及び内封した物質の全身から腫瘍病巣への到達性を精確に評価するために、第 1 章及び第 2 章で構築したイメージング技術を応用し、腫瘍病巣における DDS の生体内挙動を時空間的に可視化した。

第 2 節 実験方法

1. 試薬

アカルミネ塩酸塩は富士フィルム和光純薬から購入した。その他の試薬は第 1 章第 2 節第 1 項及び第 2 章第 2 節第 1 項に示したものを同様に用いた。

2. 腫瘍病巣モデルマウスの作製

Luciola Italica 由来のホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した BxPC-3 (ヒト膵臓癌細胞、BxPC3-Red-Fluc) は Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, USA) から購入した。非働化した 10% FBS 及び 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを含む RPMI 1640 (富士フィルム和光純薬) を使用し、37°C、5%CO₂-95%Air 条件下で培養を行った。コンフルエントに達した細胞は 0.25%トリプシン-EDTA を用いて回収し、継代を行った。実験には、継代数 7 - 15 の細胞を用いた。5 週齢の BALB/c Slc-nu/nu 雌性ヌードマウス (日本 SLC) に AIN-93G 配合精製飼料を 1 週間以上自由給餌し、馴化したものを実験に用いた。6 ~ 10 週齢のヌードマウスに BxPC3-Red-Fluc (2×10^7 cells) を皮下投与し、7 日間飼育することで腫瘍病巣を形成させた。細胞投与後 7 日目に、生理食塩水に溶解したアカルミネ塩酸塩 (3.3 mg/kg) を腹腔内投与し、15 分後に Multi-functional *in vivo imager* を用いて発光観察 (吸収フィルター: 680/22 nm) することで、腫瘍病巣の形成を確認した (Fig. 13)。

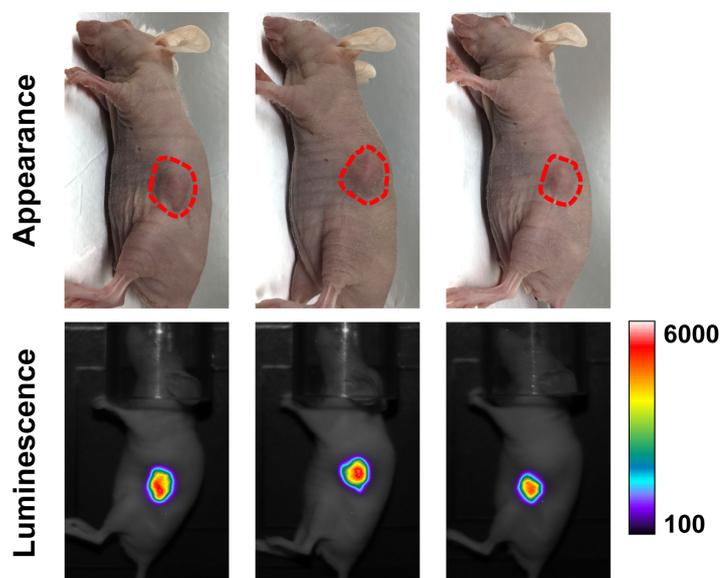


Fig. 13 Appearance of tumor region and luminescence imaging in tumor-bearing mice

Akalumine hydrochloride (3.3 mg/kg) was administered intraperitoneally to tumor-bearing mice at 7 days after injection of BxPC3-Red-Fluc cells. The luminescence images were obtained by multi-functional *in vivo* imager.

3. 高分子ナノ粒子の調製

FRET イメージングに用いるナノ粒子として、第 1 章第 2 節第 2 項と同様の方法で、DiR 及び DiD を内封したナノ粒子 (DiR 及び DiD として 3.0 μM) 及び DiI 及び DiO を内封したナノ粒子 (DiI 及び DiO として 2.5 μM) を調製した。また、3 次元イメージングに用いるナノ粒子として、第 2 章第 2 節第 2 項と同様の方法で、DiI を内封したナノ粒子 (DiI として 100 μM) を調製した。

4. 腫瘍病巣モデルマウスにおける *in vivo* FRET imaging

作製した腫瘍病巣モデルマウスに、DiR 及び DiD を内封したナノ粒子 (DiR 及び DiD として 10 nmol/kg) を静脈内投与した。イソフルラン麻酔下で、Multi-functional *in vivo* image を用いて、第 1 章第 2 節第 4 項と同様に、FRET、donor 及び acceptor channel において経時的に蛍光撮影した。また、投与 8 時間後において腫瘍病巣を摘出し、摘出した各臓器とともに蛍光撮影した。

5. 腫瘍組織の透明化処理と蛍光観察

作製した腫瘍病巣モデルマウスに、DiI を内封したナノ粒子 (DiI として 333 nmol/kg) を静脈内投与した。投与 7 時間 50 分後に DyLight 649-conjugated tomato lectin (3.3 mg/kg) を静脈内投与した。ナノ粒子投与 8 時間後に 4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液を用いて全身灌流固定を行った。腫瘍病巣を摘出し、Modified CUBIC 法による透明化処理を行い、第 2 章第 2 節第 5 項と同様の方法で、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss) を用いて蛍光撮影した。

6. 腫瘍病巣を構成するがん細胞における *in vitro* FRET imaging

BxPC3-Red-Fluc 細胞 (1×10^5 cells) を 14 mm ガラスボトムディッシュに播種し、37°C、5%CO₂-95% air 条件下で一晩培養した。Hoechst33342 を用いて細胞核を蛍光染色した。37°C 条件下で、1% FBS を含む PBS を分散媒とした DiI 及び DiO を内封したナノ粒子 (DiI 及び DiO として 2.0 μ M) の懸濁液を適用し、第 1 章第 2 節第 6 項と同様の方法で、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss) を用いて経時的に蛍光観察した。

第 3 節 結果

腫瘍病巣への高分子ナノ粒子の移行性を評価するため、*in vivo* FRET imaging を行った。DiR 及び DiD を内封したナノ粒子を投与後、腫瘍病巣部位に強く検出された FRET シグナルは経時的に減弱し、逆に donor シグナルは経時的に増強した (Fig. 14A)。また、投与 8 時間後に摘出した臓器においては、腫瘍組織に加え、肺と肝臓に強い FRET シグナルが観察された (Fig. 14B)。DiR 及び DiD を内封したナノ粒子投与後の腫瘍組織において観察された FRET シグナルの蛍光強度は、DiR 又は DiD のみを内封したナノ粒子投与後の腫瘍組織において観察された FRET シグナルの蛍光強度の合計にほぼ一致した。これらの結果は、投与したナノ粒子が腫瘍病巣に集積した後に経時的に崩壊し、投与 8 時間後にはその多くが崩壊していることを示している。

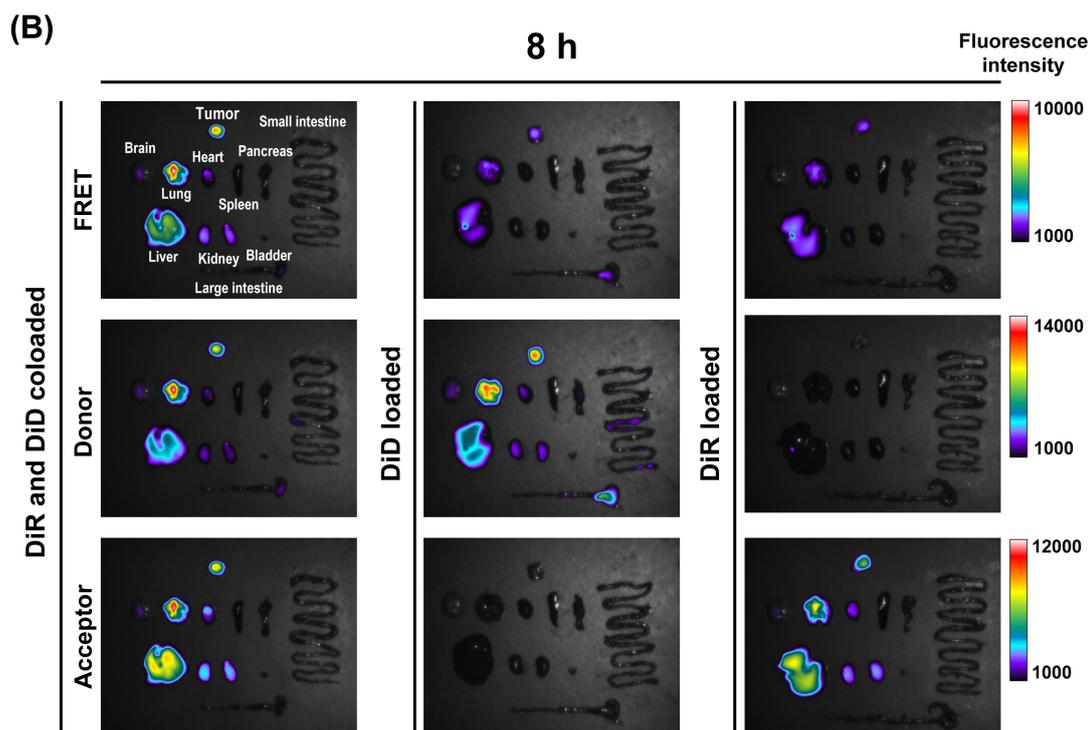


Fig. 14 Continued.

高分子ナノ粒子によって送達された物質の腫瘍組織内における分布を評価するために、摘出した腫瘍組織を Modified CUBIC 法により透明化処理し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察した。(Fig. 15)。腫瘍組織内において、ナノ粒子に内封した DiI の蛍光は DyLight 649-conjugated tomato lectin によって蛍光標識された血管以外の部位に広く観察された。

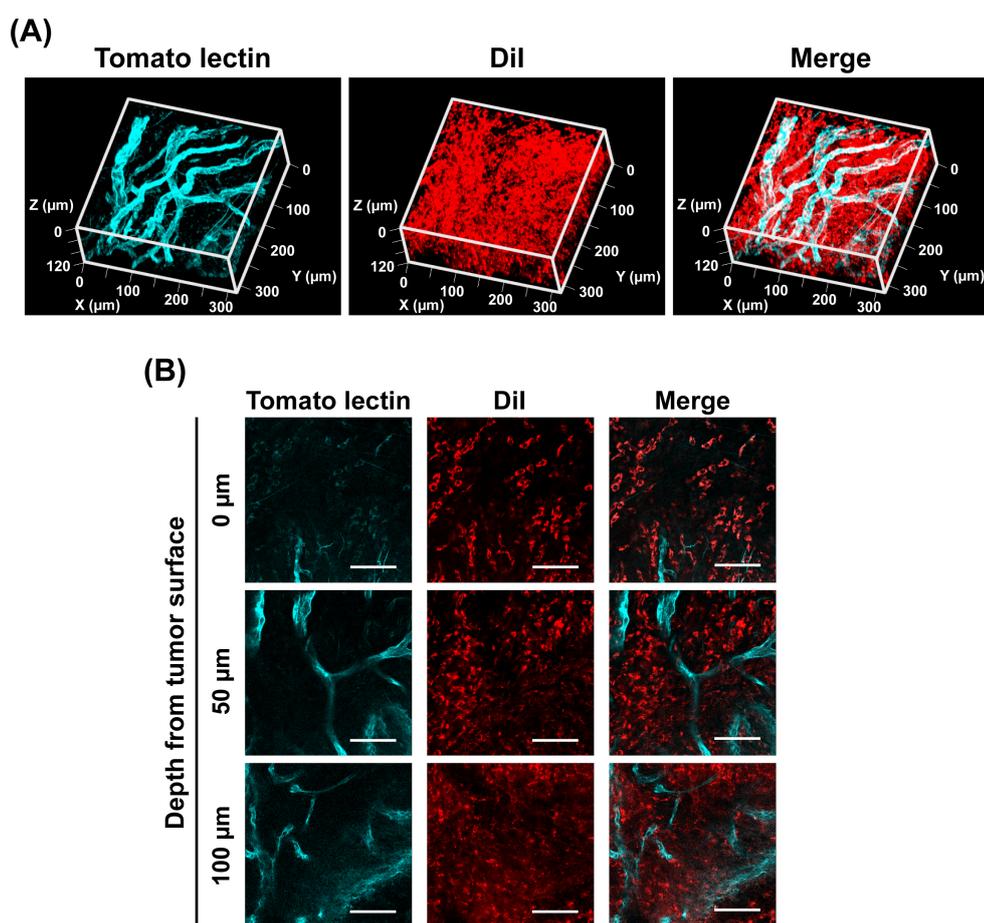


Fig. 15 Three-dimensional images of DiI distribution and tomato lectin labeled vascular structures of tumor tissue after tissue-clearing treatments

DiI loaded nanoparticles (333 nmol/kg for DiI) was administered intravenously to tumor-bearing mice. At 8 h after administration, the tumor was perfused for fixation and excised. DyLight 649-conjugated tomato lectin (3.3 mg/kg) was administered intravenously ten minutes before perfusion. After tissue-clearing treatment using Modified CUBIC technique, the tissues were observed with confocal laser microscopy. Scale bar is 100 μm. Three-dimensional images (A) reconstructed from single-plane fluorescent images (B) of tumor tissues. Each 2-μm stack is obtained from 0 to 120 μm below the tumor surface.

高分子ナノ粒子のがん細胞への取り込みを評価するために、*in vitro* FRET imaging を行った (Fig. 16)。BxPC3 細胞内において、FRET シグナル及び donor シグナルが経時的に増強した。一方、DiI 又は DiO を内封したナノ粒子適用後のがん細胞内において、FRET シグナルは殆ど検出されなかった。これらの結果は、BxPC3 細胞内に形態を保持したナノ粒子と放出された蛍光物質の両方が存在することを示している。

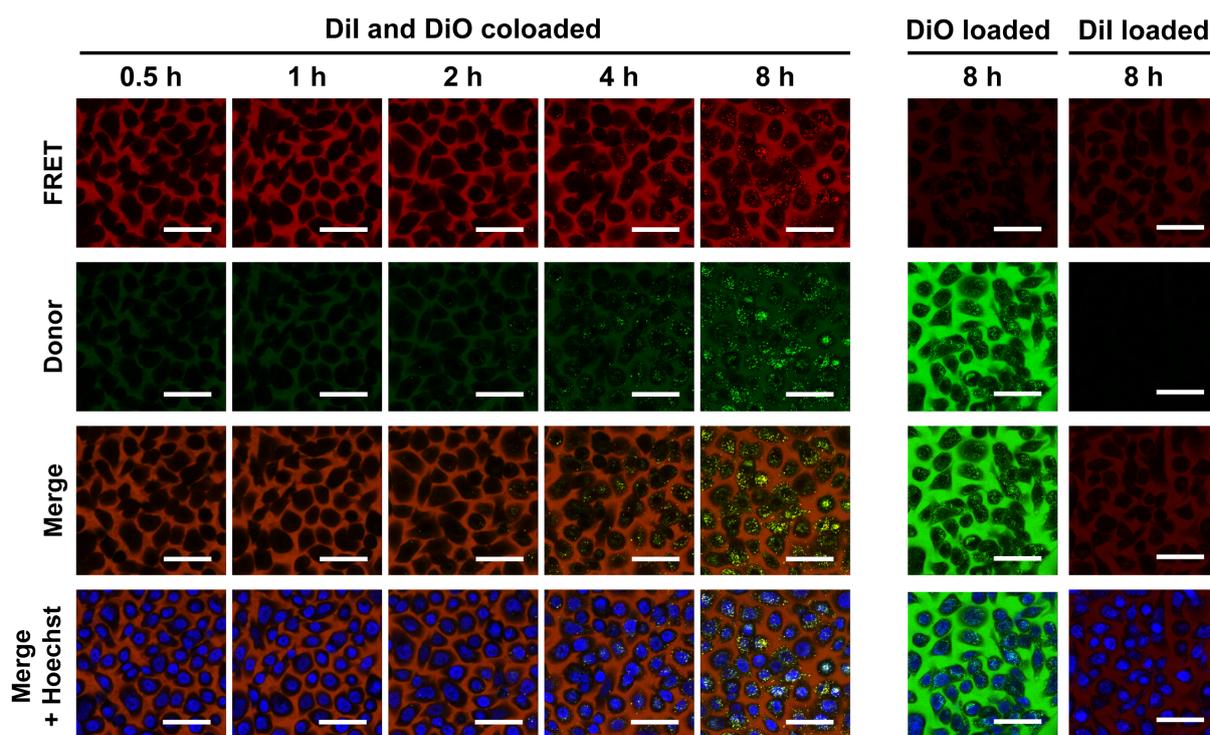


Fig. 16 FRET imaging of DiI and DiO coloaded nanoparticles in BxPC3-Red-Fluc cells

DiI and DiO coloaded nanoparticles (2.0 μM of DiI and DiO each), and DiI or DiO loaded nanoparticles (2.0 μM of DiI or DiO each) were applied to the cells. The images were obtained using confocal laser microscopy. Scale bar is 50 μm .

第 4 節 考察

本章では、ドラッグキャリア自体及び内封した物質の全身から腫瘍病巣への到達性を精確に評価するために、第 1 章及び第 2 章で構築したイメージング技術を応用し、腫瘍病巣における DDS の生体内挙動を時空間的に可視化した。

本研究で調製した粒子径 30-50 nm の高分子ナノ粒子は、形態を保持した状態で腫瘍病巣へと移行することを FRET イメージングによって正確に、血管外の腫瘍細胞に到達することを組織透明化を応用したイメージングによって精密に示した。一般に、粒子径が 200 nm 以上の微粒子は特に肝臓や脾臓等に捕捉されやすく、数 nm 以下の微粒子は腎臓から排泄されやすいとされているため^{51,52)}、約 10-200 nm といった幅広い粒子径のナノ粒子が腫瘍病巣への薬物送達のためのドラッグキャリアとして用いられている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。これらの知見は、腫瘍組織中濃度の測定又は組織薄切切片の観察などに基づくものであるが、いずれも正確性又は精密性に難がある手法である。本研究で構築した時空間的イメージング技術を駆使し、様々な粒子径のナノ粒子の腫瘍病巣への集積性に関する知見を蓄積することで、現在よりさらに緻密な動態制御を可能とする新たな DDS の開発が可能になるろう。

腫瘍組織内においては、正常組織と比較して、新生血管が増生し血流が不均一となる⁵³⁾。また、がんの種類によって、深部への薬物送達を妨げる細胞外マトリックスの存在割合や組織内密度が異なることが報告されている⁵⁴⁾。そのため、ドラッグキャリアの腫瘍組織内分布は、がんの種類や部位ごとに大きく異なることが想定される。現在、がん細胞のみならず細胞外マトリックスを標的としたドラッグキャリアも開発されていることから⁵⁵⁾、腫瘍組織の血管構造を描写可能な本技術の意義は大きいと考えられる。今後、蛍光タンパク質を導入したがん細胞⁵⁶⁾や、細胞外マトリックスの蛍光標識法⁵⁷⁾と複合的に用いることで、様々な腫瘍組織内における DDS の分布をより詳細に把握できるものと期待される。

多くのがん細胞において、エンドサイトーシスによって高分子ナノ粒子がそのまま取り込まれることが示唆されている⁵⁸⁻⁶⁰⁾。また、送達する薬物の作用機序に応じて、細胞内のターゲット分子へ送達するDDSも提唱されている⁶¹⁾。本研究で構築したイメージング技術は、ナノ粒子の崩壊と放出された物質の分布を時空間的に描写できることから、細胞内動態を制御する高度なDDSの機能評価にも対応可能であると考えられる。

総 括

本研究では、DDS の生体内挙動を精確に評価するためのイメージング技術について検討した。得られた結果を以下に示す。

1. 形態を保持したドラッグキャリアと放出された物質の正確な時間的体内挙動を可視化する FRET 現象を応用したイメージング技術を構築した。
2. ドラッグキャリアによって送達された物質の組織内における精密な空間的分布を可視化する組織透明化手法を応用したイメージング技術を構築した。
3. FRET 現象及び組織透明化手法を応用したイメージング技術を用い、腫瘍病巣における DDS の精確な生体内挙動を時空間的に可視化した。

本研究の成果は、ドラッグキャリアによる病巣への薬物送達を全身から細胞レベルまでの幅広いスケールにおいて精確かつ視覚的に評価する技術として有用であり、DDS 研究の学術的基盤をより一層強固なものにすると共に、様々な DDS を実用化に導くうえで有益な情報を提供するものである。

謝 辞

本研究の遂行に際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました北海道科学大学 薬学部 応用薬学部門 薬剤学分野 丁野純男教授に厚く感謝の意を表します。

本研究の遂行に際して、数々の御懇篤なる御指導と御鞭撻、並びに御激励を賜りました北海道科学大学 薬学部 社会薬学部門 薬事管理学分野 多田均教授に厚く感謝の意を表します。

本研究の細部にわたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻、並びにご激励を賜りました北海道科学大学 応用薬学部門 薬剤学分野 戸上紘平准教授に厚く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御示唆を頂きました北海道科学大学 薬学部 臨床薬学部門 臨床薬理学分野 戸田貴大教授に深く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御示唆を頂きました北海道科学大学 薬学部 基礎薬学部門 医薬化学分野 山岸丈洋教授に深く感謝の意を表します。

日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に採用いただき、生活面での経済的な御支援を賜りましたこと、厚く感謝の意を表します。

つくし奨学・研究基金に採用いただき、生活面での経済的な御支援を賜りましたこと、厚く感謝の意を表します。

関連論文

本研究の内容の一部は以下の学術論文として発表した。

Ishizawa K, Togami K, Tada H, Chono S. Multiscale Live Imaging Using Förster Resonance Energy Transfer (FRET) for Evaluating the Biological Behavior of Nanoparticles as Drug Carriers. *J Pharm Sci.* 2020;109(12):3608-3616.

Ishizawa K, Togami K, Tada H, Chono S. Evaluation of tissue-clearing techniques for intraorgan imaging of distribution of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020;46(12):2061-2069.

参考文献

- 1) Wang Y, Liu F, Wang Q, Xiang H, Jin H, Li H, Mao S. A novel immunoliposome mediated by CD123 antibody targeting to acute myeloid leukemia cells. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):531-542.
- 2) Li C, Wang W, Xi Y, Wang J, Chen JF, Yun J, Le Y. Design, preparation and characterization of cyclic RGDfK peptide modified poly(ethylene glycol)-block-poly(lactic acid) micelle for targeted delivery. *Mater Sci Eng C.* 2016;64:303-309.
- 3) Xu Z, Xue P, Gao YE, Liu S, Shi X, Hou M, Kang Y. pH-responsive polymeric micelles based on poly(ethyleneglycol)-b-poly(2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate) block copolymer for enhanced intracellular release of anticancer drugs. *J Colloid Interface Sci.* 2017;490:511-519.
- 4) Luo YL, Yang XL, Xu F, Chen YS, Zhang B. Thermosensitive PNIPAM-b-HTPB block copolymer micelles: Molecular architectures and camptothecin drug release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;114:150-157.
- 5) Jong WH De, Paul JB. Drug delivery and nanoparticles : Applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):133-149.
- 6) Deng Z, Wang X, Wang F, Qin Z, Cui Y, Sun Y, Sun L. Pharmacokinetics and tissue distribution study of 16-dehydropregnenolone liposome in female mice after intravenous administration. *Drug Deliv.* 2016;23(8):2787-2795.
- 7) Park C, Yoo J, Lee D, Jang SY, Kwon S, Koo H. Chlorin e6-loaded PEG-PCL nanoemulsion for photodynamic therapy and in vivo drug delivery. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16).
- 8) Laan AC, Santini C, Jennings L, de Jong M, Bernsen MR, Denkova AG. Radiolabeling polymeric micelles for in vivo evaluation: a novel, fast, and facile method. *EJNMMI Res.* 2016;6(1):1-10.
- 9) Kang CM, Koo HJ, Lee S, Lee KC, Oh YK, Choe YS. ⁶⁴Cu-Labeled

- tetraiodothyroacetic acid-conjugated liposomes for PET imaging of tumor angiogenesis. *Nucl Med Biol.* 2013;40(8):1018-1024.
- 10) Attia MF, Anton N, Akasov R, Chiper M, Markvicheva E, Vandamme TF. Biodistribution and Toxicity of X-Ray Iodinated Contrast Agent in Nano-emulsions in Function of Their Size. *Pharm Res.* 2016;33(3):603-614.
 - 11) Fallahi B, Manafi-Farid R, Eftekhari M, Fard-Esfahani A, Emami-Ardekani A, Geramifar P, Akhlaghi M, Hashemi Taheri AP, Beiki D. Diagnostic efficiency of ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT as compared to ^{99m}Tc-Octreotide SPECT/CT and conventional morphological modalities in neuroendocrine tumors. *Asia Ocean J Nucl Med Biol.* 2019;7(2):129-140.
 - 12) Yamasaki M, Muraki Y, Nishimoto Y, Murakawa Y, Matsuo T. Fluorescence-labeled liposome accumulation in injured colon of a mouse model of T-cell transfer-mediated inflammatory bowel disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;494(1-2):188-193.
 - 13) Wang X, Huang H, Zhang L, Bai Y, Chen H. PCM and TAT co-modified liposome with improved myocardium delivery: In vitro and in vivo evaluations. *Drug Deliv.* 2017;24(1):339-345.
 - 14) Chen Q, Li S, Feng Z, Wang M, Cai C, Wang J, Zhang L. Poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate)-based, pH-responsive, copolymeric mixed micelles for targeting anticancer drug controlled release. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:6857-6870.
 - 15) Tenuta T, Monopoli MP, Kim JA, Salvati A, Dawson KA, Sandin P, Lynch I. Elution of labile fluorescent dye from nanoparticles during biological use. *PLoS One.* 2011;6(10).
 - 16) Andreozzi P, Martinelli C, Carney RP, Carney TM, Stellacci F. Erythrocyte incubation as a method for free-dye presence determination in fluorescently labeled nanoparticles. *Mol Pharm.* 2013;10(3):875-882.
 - 17) Zhang J, Jiang W, Zhao X, Wang Y. Preparation and Characterization of Polymeric Micelles from Poly(D, L-lactide) and Methoxypolyethylene Glycol Block Copolymers as Potential Drug Carriers. *Tsinghua Sci Technol.* 2007;12(4):493-496.
 - 18) Diao YY, Li HY, Fu YH, Han M, Hu YL, Jiang HL, Tsutsumi Y, Wei QC, Chen DW, Gao JQ. Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells. *Int J*

- Nanomedicine*. 2011;6:1955-1962.
- 19) Master AM, Qi Y, Oleinick NL, Gupta A Sen. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: In vitro studies. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2012;8(5):655-664.
 - 20) Takeda KM, Yamasaki Y, Dirisala A, Ikeda S, Tockary TA, Toh K, Osada K, Kataoka K. Effect of shear stress on structure and function of polyplex micelles from poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers as systemic gene delivery carrier. *Biomaterials*. 2017;126:31-38.
 - 21) Kastantin M, Missirlis D, Black M, Ananthanarayanan B, Peters D, Tirrell M. Thermodynamic and kinetic stability of DSPE-PEG(2000) micelles in the presence of bovine serum albumin. *J Phys Chem B*. 2010;114(39):12632-12640.
 - 22) Hofmann CL, O'Sullivan MC, Detappe A, Yu Y, Yang X, Qi W, Landon CD, Therien MJ, Dewhirst MW, Ghoroghchian PP, Palmer GM. NIR-emissive PEG-b-TCL micelles for breast tumor imaging and minimally invasive pharmacokinetic analysis. *Nanoscale*. 2017;9(36):13465-13476.
 - 23) Liu H, Marquez RT, Wu X, Li K, Vadlamani S, Li S, Wang Y, Xu L, Wu D. A non-intrusive evaluation method for tumor-targeting characteristics of nanomedicines based on: In vivo near-infrared fluorescence imaging. *J Mater Chem B*. 2019;7(31):4751-4757.
 - 24) Sahoo H. Förster resonance energy transfer - A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev*. 2011;12(1):20-30.
 - 25) Piston DW, Kremers GJ. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(9):407-414.
 - 26) Ghadami SA, Bemporad F, Sala BM, Tiana G, Ricagno S, Chiti F. FRET studies of various conformational states adopted by transthyretin. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(19):3577-3598.
 - 27) Heymann F, Niemietz PM, Peusquens J, Ergen C, Kohlhepp M, Mossanen JC, Schneider C, Vogt M, Tolba RH, Trautwein C, Martin C, Tacke F. Long term intravital multiphoton microscopy imaging of immune cells in healthy and diseased liver using CXCR6.Gfp reporter mice. *J Vis Exp*. 2015;2015(97):10-15.

- 28) Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int J Pharm.* 2013;453(1):198-214
- 29) Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release.* 2016;240:332-348.
- 30) Shi C, Gao F, Gao X, Liu Y. A novel anti-VEGF165 monoclonal antibody-conjugated liposomal nanocarrier system: Physical characterization and cellular uptake evaluation in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother.* 2015;69:191-200.
- 31) Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell.* 2015;162(2):246-257.
- 32) Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, Deussing JM, Eder M, Zieglgänsberger W, Becker K. Ultramicroscopy: Three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods.* 2007;4(4):331-336.
- 33) Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, Hellal F, Bradke F, Sheng M, Dodt HU. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc.* 2012;7(11):1983-1995.
- 34) Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C. ClearT: A detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Dev.* 2013;140(6):1364-1368.
- 35) Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A. ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci.* 2015;18(10):1518-1529.
- 36) Rios AC, Capaldo BD, Vaillant F, Pal B, van Ineveld R, Dawson CA, Chen Y, Nolan E, Fu NY, Jackling FC, Devi S, Clouston D, Whitehead L, Smyth GK, Mueller SN, Lindeman GJ, Visvader JE. Intraclonal Plasticity in Mammary Tumors Revealed through Large-Scale Single-Cell Resolution 3D Imaging. *Cancer Cell.* 2019;35(4):618-632.e6.
- 37) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails

- and computational analysis. *Cell*. 2014;157(3):726-739.
- 38) Valerii MC, Benaglia M, Caggiano C, Papi A, Strillacci A, Lazzarini G, Campieri M, Gionchetti P, Rizzello F, Spisni E. Drug delivery by polymeric micelles: An in vitro and in vivo study to deliver lipophilic substances to colonocytes and selectively target inflamed colon. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2013;9(5):675-685.
 - 39) Ren H, Gao C, Zhou L, Liu M, Xie C, Lu W. EGFR-targeted poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine micelle loaded with paclitaxel for laryngeal cancer: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Drug Deliv*. 2015;22(6):785-794.
 - 40) Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. Cellular organization of normal mouse liver: A histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol*. 2009;131(6):713-726.
 - 41) Robertson RT, Levine ST, Haynes SM, Gutierrez P, Baratta JL, Tan Z, Longmuir KJ. Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochem Cell Biol*. 2014;143(2):225-234.
 - 42) Mazzetti S, Frigerio S, Gelati M, Salmaggi A, Vitellaro-Zuccarello L. Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *Eur J Histochem*. 2004;48(4):423-428.
 - 43) Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release*. 2000;65(1-2):271-284.
 - 44) Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K. Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J Control Release*. 2001;77(1-2):27-38.
 - 45) Yokoe J ichi, Sakuragi S, Yamamoto K, Teragaki T, Ogawara K ichi, Higaki K, Katayama N, Kai T, Sato M, Kimura T. Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. *Int J Pharm*. 2008;353(1-2):28-34.
 - 46) Dhule SS, Penformis P, Frazier T, Walker R, Feldman J, Tan G, He J, Alb A, John V, Pochampally R. Curcumin-loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*.

- 2012;8(4):440-451.
- 47) Jain RK. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review. *Cancer Res.* 1987;47(12):3039-3051.
 - 48) Jain RK, Boucher Y, Wolmark N. Interstitial Hypertension in Human Breast and Colorectal Tumors. *Cancer Res.* 1992;52(22):6371-6374.
 - 49) Wong C, Stylianopoulos T, Cui J, Martin J, Chauhan VP, Jiang W, Popović Z, Jain RK, Bawendi MG, Fukumura D. Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(6):2426-2431.
 - 50) Kato M, Hattori Y, Kubo M, Maitani Y. Collagenase-1 injection improved tumor distribution and gene expression of cationic lipoplex. *Int J Pharm.* 2012;423(2):428-434.
 - 51) Kulkarni SA, Feng SS. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res.* 2013;30(10):2512-2522.
 - 52) De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials.* 2008;29(12):1912-1919.
 - 53) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-364.
 - 54) Kano MR, Komuta Y, Iwata C, Oka M, Shirai YT, Morishita Y, Ouchi Y, Kataoka K, Miyazono K. Comparison of the effects of the kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor- β receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci.* 2009;100(1):173-180.
 - 55) Murakami M, Ernsting MJ, Undzys E, Holwell N, Foltz WD, Li SD. Docetaxel conjugate nanoparticles that target α -smooth muscle actin-expressing stromal cells suppress breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(15):4862-4871.
 - 56) Li N, Yang Y, Ding M, Huang W, Li H, Ye J, Xiao J, Zha X, Xu H. GFP Stable Transfection Facilitated the Characterization of Lung Cancer Stem Cells. *Mol Biotechnol.* 2014;56(12):1079-1088.
 - 57) Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an

- autocrine loop. *BMC Cancer*. 2013;13.
- 58) Zhang Z, Xiong X, Wan J, Xiao L, Gan L, Feng Y, Xu H, Yang X. Cellular uptake and intracellular trafficking of PEG-b-PLA polymeric micelles. *Biomaterials*. 2012;33(29):7233-7240.
- 59) Mahmud A, Lavasanifar A. The effect of block copolymer structure on the internalization of polymeric micelles by human breast cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2005;45(2):82-89.
- 60) Qiu L, Shan X, Long M, Ahmed KS, Zhao L, Mao J, Zhang H, Sun C, You C, Lv G, Chen J. Elucidation of cellular uptake and intracellular trafficking of heparosan polysaccharide-based micelles in various cancer cells. *Int J Biol Macromol*. 2019;130:755-764.
- 61) Misra R, Sahoo SK. Intracellular trafficking of nuclear localization signal conjugated nanoparticles for cancer therapy. *Eur J Pharm Sci*. 2010;39(1-3):152-163.