

ダイナミック造影磁気共鳴画像法 (DCE-MRI) による微粒子製剤の腫瘍移行性評価

川野久美,* 米谷芳枝

Tumor Permeability of Nanocarriers Observed by Dynamic Contrast-enhanced Magnetic Resonance Imaging

Kumi KAWANO* and Yoshie MAITANI

Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, Ebara 2-4-41, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received September 1, 2010)

The structure of tumor vasculature is crucial for the nanocarrier-mediated chemotherapy. Recently, transforming growth factor- β (TGF- β) inhibitor was reported to increase the tumor accumulation of nanocarriers by changing the structure of tumor vasculature. To identify the parameters of tumor vasculature function following TGF- β inhibitor (A-83-01) treatment, dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) was performed using Gd-DTPA and its liposomal formulation (Gd-L) as contrast agents. Observation of tumor MR image before, during, and after injection of contrast agent could calculate the parameters of vascular function, such as volume transfer constant between blood plasma and extracellular space (K^{trans}) and fractional plasma volume (v_p). A-83-01 treatment significantly increased these parameters within 24 h that was positively related to pericyte coverage and tumor cell proliferation. Furthermore, apparent diffusion coefficient (ADC) determined by diffusion-weighted imaging was decreased by A-83-01 treatment, suggesting the decrease of tumor interstitial fluid pressure. Vascular function of the tumor improved by A-83-01 treatment well assessed on post-Gd-L-enhanced MR images, which predicted delivery of liposomal drug to the tumor. These findings suggest that DCE-MRI and, in particular, K^{trans} and v_p quantitation, provide important additional information about tumor vasculature by A-83-01 treatment.

Key words—liposome; tumor permeability; magnetic resonance imaging; transforming growth factor- β inhibitor

1. はじめに

がん化学療法は抗がん薬の副作用が大きく、薬物を有効濃度まで投与できないことが問題となっている。そのため、薬物を腫瘍部位へ効率よく送達することによって副作用を軽減し、治療効果を高める試みが盛んにされている。その方法の1つとして、抗がん薬を高分子化、あるいはリポソームや高分子ミセルのように微粒子化することが挙げられる。腫瘍に新生する血管は正常組織の血管に比べ血管透過性が亢進しており、数十から数百 nm スケールの微粒子においても血管外へ漏出し、また腫瘍ではリンパ管が未発達で欠如していることから高分子等の排泄が抑制されており、留まり易い。腫瘍血管はこのような特徴的な構造を持っているので、微粒子を長時

間血中に滞留させると腫瘍に集積し、これは enhanced permeability and retention (EPR) 効果と呼ばれている。¹⁾

微粒子は低分子薬物に比べてサイズが大きいので、腫瘍の血管構造や血流の影響を受け易く、EPR 効果が十分に発揮されない場合もある。高分子では昇圧薬²⁾や血管拡張薬³⁾、微粒子では、transforming growth factor- β (TGF- β) I 型受容体阻害薬⁴⁾の併用によって腫瘍微小環境を変化させて、薬物送達性を促進する試みが報告されている。本稿では、まず TGF- β I 型受容体阻害薬である A-83-01 の腫瘍血管に対する影響をダイナミック造影磁気共鳴画像 (DCE-MRI) を用いて非侵襲的に評価し、つぎに、A-83-01 処置による微粒子の透過性変化を評価したので報告する。

2. TGF- β I 型受容体阻害薬 (TGF- β 阻害薬)

TGF- β の作用は多岐にわたり、細胞の増殖、分化、接着、遊走などを制御する。上皮細胞やリンパ球といった多くの細胞の増殖を抑制する代表的な増

星薬科大学医薬品化学研究所 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)

*e-mail: kkumi@hoshi.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S10 で発表したものを中心に記述したものである。

殖抑制因子であるが、腫瘍細胞に対して上皮間葉転換、湿潤能・運動性の亢進や、がん周囲環境には免疫抑制、血管新生、細胞外基質産生を引き起こし、がん化を促進することも知られている。よって腫瘍の TGF- β シグナル阻害は、抗腫瘍効果を促進し転移の抑制効果があることが報告されているものの、逆に TGF- β の上皮細胞増殖抑制作用を減弱させて腫瘍増殖が起こるなどの副作用も考えられる。

血管は血管内皮細胞とその周囲を覆う壁細胞（血管平滑筋細胞、ペリサイト）からなり、壁細胞が裏打ちすることにより構造的に安定化し、機能を示す。腫瘍などの病的血管ではペリサイトの配列異常や欠如があり、血流の不整など血管の機能性が低い。しかし膵臓がんやびまん性の胃がんなどの難治性腫瘍ではペリサイト被覆の強い血管構築性を示し、微粒子を用いた化学療法が奏功しない。Kanoらは、このような微粒子集積性の低い腫瘍に対して、TGF- β 阻害薬（LY364947）の副作用を最小にするために低用量で併用し、ドキシソルピシン封入高分子ミセル又はリポソームの腫瘍集積性を向上させ、治療効果を増大させた。⁴⁾ これは TGF- β 阻害薬が腫瘍新生血管のペリサイトの被覆を一過的に減少させたためである。LY364947 の併用によりフリーのドキシソルピシンの集積量は増加しなかったことから、ペリサイトの存在が特に微粒子の血管透過性に関与すると報告されている。

TGF- β I 型受容体阻害薬である A-83-01⁵⁾ は、*in vitro* で TGF- β I 型受容体キナーゼ（ALK-5）に対して IC₅₀ = 12 nM の TGF- β シグナル阻害活性を有し、前出の LY364947（IC₅₀ = 59 nM）に比べて約 5 倍高い阻害活性を有する。しかし、*in vivo* での腫瘍血管に対する作用はこれまで報告されていなかった。そこで、A-83-01 の腫瘍血管透過性に対する作用を MRI を用いて調べた。

3. ダイナミック造影 MRI (DCE-MRI)

筆者らは、血管透過性の評価方法としてダイナミック造影 MRI (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI) に着目した。DCE-MRI は近年盛んに開発されている血管新生阻害薬の臨床試験での評価に用いられている。血管新生阻害薬は腫瘍新生血管に作用することによりがん細胞の増殖抑制に働くために、これまでの抗がん薬のように腫瘍サイズの縮小などをエンドポイントと

すると正確な評価が困難である。腫瘍内の血管変化は、腫瘍切片の免疫染色による血管分布や構造変化、あるいは蛍光物質を用いて血流の有無や血管透過性を顕微鏡観察して評価される。しかしこのような侵襲的な手法は、経時的な評価に多数の動物を必要とし、臨床での応用性に乏しいなどの欠点を有する。一方、DCE-MRI は血管の機能を非侵襲的に評価する方法であり、血管新生阻害薬が血管透過性に影響する初期の薬効、すなわち、効果が腫瘍サイズに反映する前に評価することが可能となる。⁶⁾

DCE-MRI 法では、連続的に腫瘍の撮像を行いながら MRI 造影剤の投与を行う。腫瘍内の信号強度変化は血流による造影剤の移行量に相当し、血流量、血管の表面積や透過性、血管外細胞外の体積 (v_e) などが関与する (Fig. 1)。よって腫瘍画像強度変化を解析することで、造影剤の移行性に係わるこれらの変化を表すパラメータを得ることができる。

以下に DCE-MRI による評価に用いられるパラメータについて説明する。MRI 造影剤ではシグナル強度と濃度に単純な比例関係がないため濃度を算出するのは困難なものの、定量性の高い撮像シーク

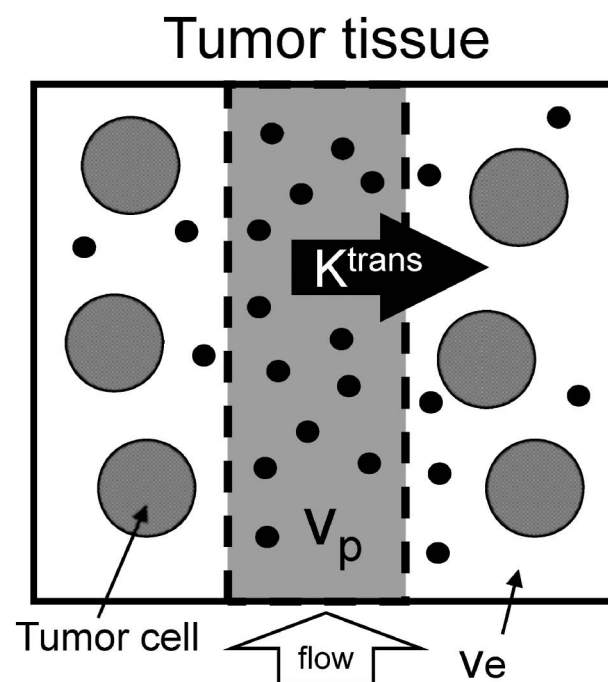


Fig. 1. Compartmental Modeling of the Tumor Microvasculature

Contrast agents (represented as black dots) distribute in the blood plasma volume (v_p) and the volume of the extravascular extracellular space (v_e). The rate of transfer is described by the volume transfer constant (K^{trans}) from blood plasma to the v_e .

エンスを選択することで薬動的に解析することが可能となる。造影剤投与直後の腫瘍内造影剤濃度-時間曲線下面積 initial area under the contrast agent concentration-time curve (IAUGC) は比較的求め易いパラメータであるが、どのような生理的現象の変化によって透過性が変化したのかを深く言及できない。そこで、さらに生理的な変化を解析するために薬動的モデル解析が行われる。⁷⁾ 組織中の造影剤濃度 (C_t) は、血漿中濃度 (C_p) と組織 (v_e) に分布した量の和として考えられ、コンパートメントモデルに当てはめて解析すると Eq. (1) が得られる。⁸⁾

$$C_t(t) = K^{\text{trans}} \int_0^t C_p(\tau) d\tau + v_p C_p(t) \quad (1)$$

ここで、 K^{trans} は血液から組織への移行定数であり、 v_p は腫瘍内血漿体積である。両辺を $C_p(t)$ で除して得られる直線からこれらのパラメータは算出することができ、パトラックプロットと呼ばれる。⁹⁾ K^{trans} は血管透過性のパラメータとして用いられるが、このように単純化したモデルから求められる K^{trans} は純粋な血管透過性のみではなく、血流や血管の表面積などにも影響される。より詳細なコンパートメントモデルを想定することでこれらの因子を区別することも可能であるが、⁷⁾ より高い時間分解能が必要とされ実現には困難を伴うため、想定したモデルに応じたパラメータの解釈が必要とされる。血管新生阻害薬や血流遮断薬の評価には、IAUGC や K^{trans} が基本的なバイオマーカーとして用いられている。¹⁰⁾

4. 微粒子造影剤を用いた DCE-MRI による TGF- β 阻害薬の評価

TGF- β 阻害薬 A-83-01 の腫瘍血管透過性に対する作用を評価するために、マウス結腸がん colon26 細胞皮下移植マウスで DCE-MRI を行った。なお以後の実験は、星薬科大学の動物実験委員会に諮られ承認を受けたものである。MRI 装置は 9.4 T 垂直型 MRI (Varian NMR System; Varian, Inc.) を使用した。

DCE-MRI に用いる造影剤としては、常磁性の Gd イオンをキレート化した Gd-DTPA や Gd-DO-TA などの低分子造影剤が臨床で使用されている。Gd イオンは周囲のプロトンに作用し水分子の T_1 緩和時間を短縮することから、 T_1 強調画像で画像強度を増強する陽性造影剤である。DCE-MRI にお

いて従来の低分子造影剤を用いると、血流の影響が大きく血管透過性を正確に見積もることが難しい。そこで、血管透過を律速にして血流の影響を無視できるようにするために、アルブミンのような高分子化した造影剤が使用されるようになっていく。^{11,12)} ここではさらにサイズの大きい Gd-DTPA 封入りポソーム (Gd-L) を造影剤として用いることで、血管透過性の評価に加えて微粒子製剤の腫瘍移行性を調べることにした。

Gd-L は、卵黄フォスファチジルコリン、コレステロール、PEG₂₀₀₀-DSPE からなるリポソームに Gd-DTPA を内封し、粒子径を約 120 nm に調整した。 T_1 強調画像の信号強度を高める能力である T_1 緩和能は、 $4.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、フリーの Gd-DTPA ($4.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) と同程度であることを確認した。DCE-MRI における撮像は、 T_1 強調 spoiled グラジエントエコー法により 1 秒間に 1 枚ずつ 6 分間行った。時間分解能を高めることで造影剤投与時における血液の画像強度増加の正確なピークの取得を可能とし、カーブフィッティングや血行動態の解析精度を高めることが可能である。腫瘍と左心室を含むスライスを設定し、ベースラインを約 20 秒間取得したのち、造影剤 (0.1 mmol Gd/kg) を投与した。

A-83-01 投与と DCE-MRI の実施は Fig. 2 (A) に示すスケジュールで行い、各時間での腫瘍内 Gd 濃度推移を Fig. 2 (B, C) に示す。低分子の Gd-DTPA を用いると、A-83-01 を腹腔内投与 3 時間後において腫瘍内 Gd 濃度が高くなったが、投与 24 時間後には投与前と同程度に戻った [Fig. 2(B)]. すなわち A-83-01 の効果は一過的であると考えられる。また、投与 3 時間後では個体間で移行性にばらつきが認められたが、A-83-01 を 21 時間目に追加投与した繰り返し投与 (A-83-01 \times 2) では、すべてのマウスにおいて Gd 濃度が増大した。そこで、繰り返し投与時の微粒子の移行性を Gd-L を用いて評価した [Fig. 2(C)]. 未処置の腫瘍では、Gd-L は Gd-DTPA を用いたときに比べて、低い腫瘍内 Gd 濃度を示した。これは Gd-L は微粒子であるために、低分子に比べ腫瘍への移行性が低下したと考えられる。しかし、A-83-01 を繰り返し投与すると Gd-DTPA を用いたときと同様に高い腫瘍内 Gd 濃度を示した。この得られた腫瘍内 Gd 濃度-時間

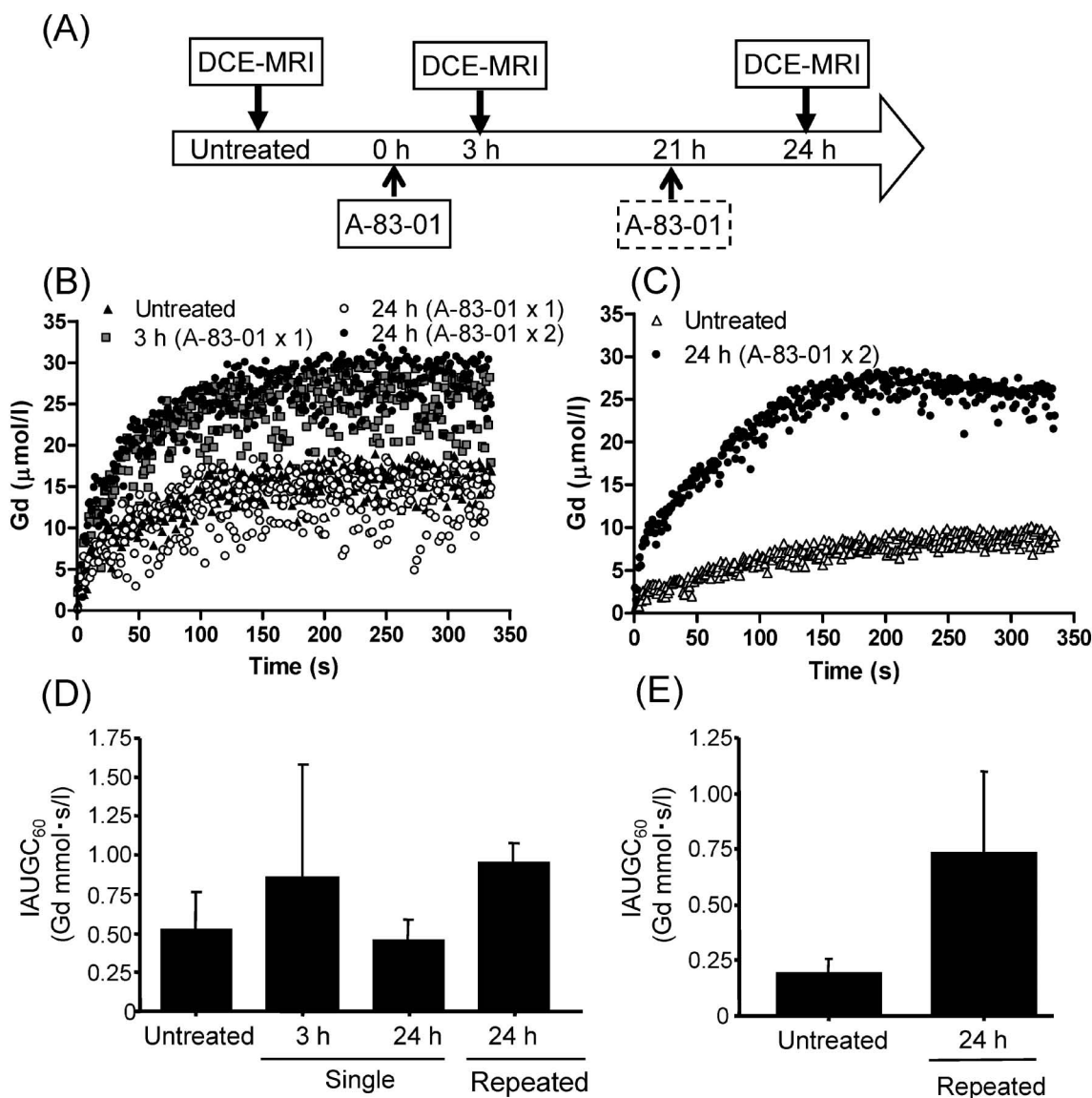


Fig. 2. Evaluation of Tumor Vascular Permeability Using DCE-MRI

Protocol of the experiment (A), mean Gd uptake curves in mice bearing colon 26 tumors before and after intraperitoneal A-83-01 injection using Gd-DTPA (B) and Gd-L (C) as a contrast agent, and the initial area under the Gd concentration-time curve over 60 s (IAUGC₆₀) with Gd-DTPA (D) and Gd-L (E). (A) Single-treated mice were intraperitoneally injected with A-83-01 at 0 h, and repeat-treated mice were injected at 0 h and 21 h. Values in (C) and (D) represent the mean ± S.D. ($n=3-6$).

曲線から 60 秒間の AUC (IAUGC₆₀) を算出した [Fig. 2(D) and (E)]. A-83-01 の繰り返し投与によって, IAUGC₆₀ は Gd-DTPA では約 1.8 倍, Gd-L では 3.8 倍に上昇した. A-83-01 の繰り返し投与は腫瘍血管の透過性を高め, 特に Gd-L のような微粒子の移行性を高めることが明らかになった.

これらの腫瘍内造影剤濃度推移を 2-コンパートメントモデルで解析し, v_p と K^{trans} を算出した (Fig. 3). A-83-01 単回投与 3 時間後においては, 6 匹中 2 匹で高い v_p と K^{trans} を示したが, 他の 4 匹では上昇がみられず大きなばらつきを示した. A-

83-01 単回投与の 24 時間後では, v_p や K^{trans} は投与前と同じ値を示し, 変化しなかった. A-83-01 繰り返し投与の 24 時間後では, Gd-DTPA を用いたすべてのマウスで v_p と K^{trans} が増加しており, Gd-L においても同様に増加した. v_p は造影剤の静脈内投与直後に, 腫瘍血管に流れ込んだ造影剤の量に依存する. そのため v_p の増加は, 血流のある腫瘍血管体積が増加したと考えられる. また, K^{trans} は腫瘍血管から腫瘍間質への移行性を示し, A-83-01 により血管透過性が亢進したと考えられる.

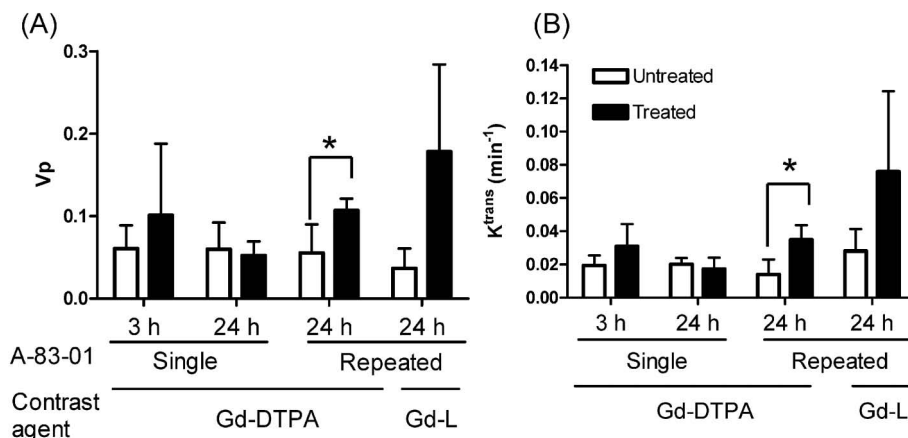


Fig. 3. Values of Fractional Plasma Volume (v_p) (A) and Volume Transfer Constant (K^{trans}) between the Blood Plasma and the v_e (B)

Mice bearing colon 26 tumors were examined before and at 3 h and 24 h after single or repeated A-83-01 injection using Gd-DTPA and Gd-L as a contrast agent. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3-6$). * $p < 0.05$.

5. A-83-01 投与後の腫瘍の組織学的評価と水の見かけの拡散係数

腫瘍内の微小環境変化を組織学的に評価するために、A-83-01 繰り返し投与後の腫瘍切片を作製し、顕微鏡観察を行った。ヒト膵臓がん BxPC3 移植腫瘍において TGF- β 阻害薬 (LY364947) を投与すると、腫瘍血管のペリサイトは減少すると報告されている。⁴⁾ colon26 細胞移植腫瘍においては、 α -smooth muscle actin (SMA) に対する免疫染色によって確認されるペリサイトの分布は少なく、A-83-01 繰り返し投与によってペリサイトは逆に増加した。¹³⁾ 腫瘍によって血管の構築性が異なるために、TGF- β 阻害薬による血管への作用が異なることが推察された。

腫瘍細胞の形態は類円形ないしは紡錘型を示しており、A-83-01 繰り返し投与群と未投与群との間に形態の差はみられなかった。血管の形態は、未処置群では歪な形態の腫瘍血管が認められたが、A-83-01 繰り返し投与の 24 時間後では血管の形態が円形又は楕円形の正常に近い状態に変化しており、腫瘍における血管面積は減少する傾向が確認された [Fig. 4(A)]. さらに抗 Ki67 抗体を用いた免疫染色により増殖期にある細胞核を染色して Ki67 陽性細胞の割合を算出したところ、腫瘍細胞の中心部では陽性細胞が少なく、辺縁部では陽性細胞が多かった。また、腫瘍血管周辺部において増殖期にある細胞数を比較すると、A-83-01 繰り返し投与により有意に増加していた [Fig. 4(B)]. 腫瘍新生血管で

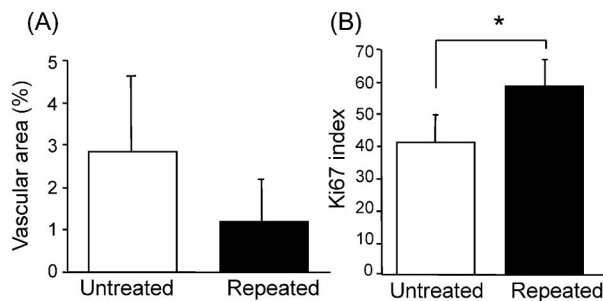


Fig. 4. Tumor Vascularity (A) and Ki67 Index (B) of Colon 26 Tumors before and after Repeated A-83-01 Injection

(A) Percentage of the vascular areas within the tumors. (B) Percentage of Ki67 positive proliferating cells in the perivascular region. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=5$). * $p < 0.05$.

は血流のうっ帯など機能的に障害があり、十分な酸素や栄養を届けることが困難である。増殖期にある細胞数は周辺の酸素状態と関連していると考えられ、A-83-01 処置により血流が回復し周辺環境が改善したと推測される。腫瘍摘出直前に Hoechst33342 を尾静脈から投与して血流のある血管を染色した結果、A-83-01 の処置後に Hoechst33342 の蛍光強度が増大していた (未発表データ) ことから、A-83-01 処置による血流の回復が示唆された。

これらの変化は、Jain¹⁴⁾ が提唱する血管正常化 (normalization) に類似した結果であると考えられる。血管正常化とは、血管新生阻害薬を用いた治療において併用した抗がん薬や放射線治療のような血流に依存する効果を高めることから、血管新生阻害薬が未熟で低効率な微小血管を取り除き、血管の構

造や機能を一時的に正常に近づけたことにより併用治療の効果を高めるという仮説である。A-83-01の繰り返し投与によって、血管形態においては円形に近づきペリサイト被覆が増加したことや、DCE-MRIの評価にて血漿体積 (v_p) の増大などにより血流の回復が示唆されたことから、一過的な血管正常化効果が微粒子の移行性亢進に関与する可能性が示唆された。

さらに、MRIにより拡散強調画像を取得し、見かけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient, ADC) を求め、A-83-01の処置による腫瘍内の水分子の動きの変化を評価した (Fig. 5)。ここでのADC値は、腫瘍内の血流を除外し、細胞外液と細胞内液の体積変化の指標として用いた。A-83-01の単回投与3時間と24時間後では、ADC値は投与前と比べて変化がなかったのに対し、繰り返し投与では有意に低下していた。細胞外液の水は、細胞内液と比較して自由度が高いので、拡散係数が大きくなる。腫瘍組織観察からA-83-01を投与しても細胞形態の変化やネクローシスはみられないことから、細胞内液の体積変化は少なく、ADC値の低下は細胞外液の減少を反映したと考えられる。腫瘍血管の正常化に伴う血流の回復によって、間質圧の低下が起こり、薬物の移行性が高まることが報告されている。¹⁵⁾ 回復した血流が腫瘍の過剰な細胞外液を回収し、それによって腫瘍間質圧が低下したことが、Gd-Lの透過性亢進に寄与した可能性も考えられる。A-83-01によるGd-Lの透過性亢進の作用メカニズムについては、さらに詳細な検討が必要である。

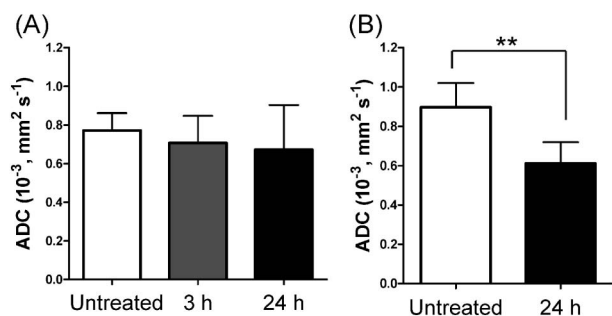


Fig. 5. Apparent Diffusion Coefficient (ADC) of the Colon 26 Tumors before and at 3 h or 24 h after Single (A) and Repeated (B) A-83-01 Injection

Each value represents the mean \pm S.D. ($n=4$). ** $p < 0.01$

6. A-83-01 併用によるドキソルビシン封入リポソームの抗腫瘍効果

DCE-MRIの結果より、A-83-01の併用は微粒子の腫瘍移行性を高めることが示された。そこで、A-83-01併用時のドキソルビシン封入血中滞留性リポソーム (SL) と葉酸修飾リポソーム (F-SL) の腫瘍集積性と抗腫瘍効果の評価を行った。ここでは、葉酸受容体を発現するマウス肺がん M109 細胞を皮下移植したマウスを用いた。M109 腫瘍においても、A-83-01 投与 3 時間後において Gd-L での IAUGC の増加がみられ、24 時間後には未投与時と同程度へ戻り、colon26 腫瘍と同様に一過的な作用が認められた。¹⁶⁾ A-83-01 の併用により、SL 及び F-SL の投与 24 時間後の腫瘍集積量は 1.5 から 1.7 倍増大し、¹⁶⁾ F-SL においては抗腫瘍効果が有意に増大した (Fig. 6)。A-83-01 の作用が一過的であることから、受動的腫瘍送達 SL と能動的腫瘍送達の F-SL に対する影響が異なる可能性や、F-SL は腫瘍集積後、葉酸受容体による取り込みにより薬効が高まったと推察された。以上より、A-83-01 は抗がん薬封入微粒子の腫瘍集積性を高め、抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。

7. おわりに

これまでに、1) Gd-L を用いた DCE-MRI は、腫瘍の血管透過性と、腫瘍への微粒子製剤送達の評価に有用である、2) MRI による ADC 値の取得は、造影剤を使用せずに容易に腫瘍の微小環境変化を評価できる、3) DCE-MRI ガイド下で腫瘍微小

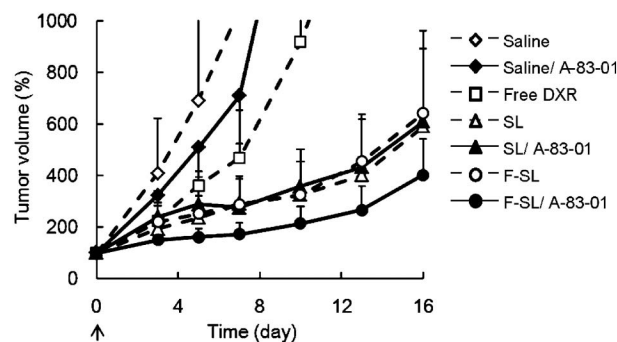


Fig. 6. Effects of A-83-01 on the Antitumor Activity of Liposomal Doxorubicin (DXR) in Mice Bearing M109 Tumors

Free DXR, PEGylated liposomal DXR (SL), or folate-linked SL (F-SL) at 8 mg/kg body weight was administered intravenously with or without intraperitoneal A-83-01 injection. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=6-8$).

環境を改変することにより、抗がん薬封入微粒子の腫瘍集積性を亢進し、抗腫瘍効果を増大できることを明らかにした。非侵襲的な測定法であるMRIは、腫瘍進行とともに変化する微小環境を経時的に評価することができるので、微粒子製剤の腫瘍集積に最適な投与計画の決定に役立つ。また、血管構造からでは不明確な血流の有無などを、血管の機能から評価できる。本稿で紹介したMRIの手法が、がん化学療法の最適化の一助となることを期待する。

謝辞 本研究の遂行にあたり、箕輪卓也氏、谷口幸覧氏を始めとする星薬科大学創剤構築研究室の大学院生・学生諸氏に感謝を申し上げます。また、リポソーム型MRI造影剤の開発・評価にご助言頂きました神奈川科学技術アカデミー・横山昌幸先生、白石貢一先生（現 東京慈恵会医科大学）、DCE-MRI法の導入・解析にご協力頂きましたバリアン・テクノロジー・ジャパン・リミテッド・栗林秀人博士、組織学的評価にご協力頂きました福島県立医科大学・杉野隆先生に深く感謝申し上げます。さらに、本研究は厚生労働科研費、文科省科研費、オープンリサーチセンタープロジェクトの研究助成により遂行された研究であり、心より謝意を表します。

REFERENCES

- 1) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986).
- 2) Li C. J., Miyamoto Y., Kojima Y., Maeda H., *Br. J. Cancer*, **67**, 975-80. (1993).
- 3) Seki T., Fang J., Maeda H., *Cancer Sci.*, **100**, 2426-2430 (2009).
- 4) Kano M. R., Bae Y., Iwata C., Morishita Y., Yashiro M., Oka M., Fujii T., Komuro A., Kiyono K., Kaminishi M., Hirakawa K., Ouchi Y., Nishiyama N., Kataoka K., Miyazono K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3460-3465 (2007).
- 5) Tojo M., Hamashima Y., Hanyu A., Kajimoto T., Saitoh M., Miyazono K., Node M., Imamura T., *Cancer Sci.*, **96**, 791-800 (2005).
- 6) Morgan B., Thomas A. L., Dreves J., Hennig J., Buchert M., Jivan A., Horsfield M. A., Mross K., Ball H. A., Lee L., Mietlowski W., Fuxuis S., Unger C., O'Byrne K., Henry A., Cherryman G. R., Laurent D., Dugan M., Marme D., Steward W. P., *J. Clin. Oncol.*, **21**, 3955-3964 (2003).
- 7) Tofts P. S., *J. Magn. Reson. Imaging*, **7**, 91-101 (1997).
- 8) Ewing J. R., Knight R. A., Nagaraja T. N., Yee J. S., Nagesh V., Whitton P. A., Li L., Fenstermacher J. D., *Magn. Reson. Med.*, **50**, 283-292 (2003).
- 9) Patlak C. S., Blasberg R. G., Fenstermacher J. D., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **3**, 1-7 (1983).
- 10) O'Connor J. P., Jackson A., Parker G. J., Jayson G. C., *Br. J. Cancer*, **96**, 189-195 (2007).
- 11) Daldrup-Link H. E., Okuhata Y., Wolfe A., Srivastav S., Oie S., Ferrara N., Cohen R. L., Shames D. M., Brasch R. C., *Microcirculation*, **11**, 387-396 (2004).
- 12) Daldrup H., Shames D. M., Wendland M., Okuhata Y., Link T. M., Rosenau W., Lu Y., Brasch R. C., *AJR Am. J. Roentgenol.*, **171**, 941-949 (1998).
- 13) Minowa T., Kawano K., Kuribayashi H., Shiraishi K., Sugino T., Hattori Y., Yokoyama M., Maitani Y., *Br. J. Cancer*, **101**, 1884-1890 (2009).
- 14) Jain R. K., *Science*, **307**, 58-62 (2005).
- 15) Tong R. T., Boucher Y., Kozin S. V., Winkler F., Hicklin D. J., Jain R. K., *Cancer Res.*, **64**, 3731-3736 (2004).
- 16) Taniguchi Y., Kawano K., Minowa T., Sugino T., Shimojo Y., Maitani Y., *Cancer Sci.*, **101**, 2207-2213 (2010).