



Title	金ナノ粒子による放射線量増加の推定と腫瘍微細血管破壊効果の検証
Author(s)	権, 池勲
Description	配架番号 : 2522
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14058号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14058
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77893
Type	doctoral thesis
File Information	Jihun_Kwon.pdf



学位論文

金ナノ粒子による放射線量増加の推定と 腫瘍微細血管破壊効果の検証

(Evaluation of gold nanoparticle-induced radiation dose
enhancement and disruption of tumor microvasculature)

2020 年 3 月

北海道大学

権 池 勲

学位論文

金ナノ粒子による放射線量増加の推定と 腫瘍微細血管破壊効果の検証

(Evaluation of gold nanoparticle-induced radiation dose enhancement and disruption of tumor microvasculature)

2020 年 3 月

北海道大学

権 池勲

目次

発表論文目録及び発表目録	1
要旨	3
略語表	6
第 1 章 全体の緒言	7
1.1 放射線治療	7
1.2 放射線増感剤としての金ナノ粒子	7
1.3 金ナノ粒子と放射線の物理的相互作用	9
1.4 金ナノ粒子が放射線増感効果を及ぼすメカニズム	11
1.5 本論文の構成	12
第 2 章 金ナノ粒子のクラスター形成が線量増加に与える影響の推定	13
2.1 緒言	13
2.1.1 金ナノ粒子の放射線増感剤利用	13
2.1.2 モンテカルロシミュレーションを用いた線量増加の推定	13
2.1.3 金ナノ粒子のクラスター形成	14
2.2 方法	15
2.2.1 概要	15
2.2.2 巨視的検討	16
2.2.3 微視的検討	20
2.3 結果	23
2.3.1 巨視的検討の結果	23
2.3.2 微視的検討の結果	27
2.4 考察	29
2.4.1 本研究結果の解釈	29
2.4.2 本研究の限界	31
2.5 小括	32

第3章 金ナノ粒子による血管破壊効果の音響血管造影を用いた評価.....	34
3.1 緒言	34
3.1.1 金ナノ粒子の微細血管破壊剤としての利用	34
3.1.2 治療効果の微細血管イメージングによる評価	34
3.1.3 音響血管造影 (Acoustic Angiography)	35
3.2 方法	36
3.2.1 実験体系	36
3.2.2 超音波画像の取得	37
3.2.3 画像解析	39
3.3 結果	42
3.3.1 腫瘍体積の測定結果	42
3.3.2 腫瘍血流の定量化	43
3.4 考察	47
3.4.1 本研究結果の解釈	47
3.4.2 本研究の限界	48
3.4.3 今後の展望	48
3.5 小括	49
第4章 総括及び結論.....	50
謝辞	52
利益相反	54
引用文献	55

発表論文目録及び発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Jihun Kwon, Kenneth Sutherland, Anastasia Makarova, Taeko Matsuura, Takayuki Hashimoto, Hao Peng, Toshiyuki Toshito, Kikuo Umegaki, Hiroki Shirato, and Shinichi Shimizu
“Investigation of energy absorption by clustered gold nanoparticles”
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 429, 34-41 (2018)
2. Jihun Kwon, Rajalekha M. Rajamahendiran, Needa A. Virani, Sijumon Kunjachan, Erin Snay, Max Harlacher, Marios Myronakis, Shinichi Shimizu, Hiroki Shirato, Tomasz J. Czernuszewicz, Ryan Gessner, Ross Berbeco
“Use of 3D contrast-enhanced ultrasound to evaluate tumor microvasculature after nanoparticle-mediated modulation”
Ultrasound in Medicine & Biology, 46(2), 369-376 (2020)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Jihun Kwon, Kenneth Sutherland, Anastasia Makarova, Taeko Matsuura, Takayuki Hashimoto, Hao Peng, Kikuo Umegaki, Hiroki Shirato, and Shinichi Shimizu
“Dose Absorption by Bystander Gold Nanoparticles under Proton Irradiation”
56th Annual Conference of the Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG56), 2017, 5, 2, Yokohama, Japan
2. Jihun Kwon, Kenneth Sutherland, Anastasia Makarova, Taeko Matsuura, Takayuki Hashimoto, Hao Peng, Kikuo Umegaki, Hiroki Shirato, and Shinichi Shimizu
“Evaluation of energy absorption by bystander gold nanoparticles: a microscopic study”
The American Association of Physicists in Medicine (AAPM) 59th Annual Meeting, 2017.7.31, Denver, Colorado, USA
3. Jihun Kwon, Rajalekha M. Rajamahendiran, Needa A. Virani, Sijumon Kunjachan, Ein Snay, Max Harlacher, Marios Myronakis, Shinichi Shimizu, Hiroki Shirato, Tomasz J. Czernuszewicz, Ryan Gessner, Ross Berbeco
“Evaluating Gold Nanoparticle and Radiation Induced Tumor Microvascular

Disruption Using Acoustic Angiography”

AAPM 60th Annual Meeting, 2018.7.29, Nashville, Tennessee, USA

要旨

1. 金ナノ粒子のクラスター形成が線量増加に与える影響の推定

【背景と目的】 放射線治療において腫瘍への生物学的効果を高めるために、金ナノ粒子 (Gold Nanoparticles: GNPs) を放射線増感剤として利用することが検討されている。GNPs は以下の過程で放射線増感効果を起こすと考えられている。まず、投与された GNPs は腫瘍細胞に集積する。GNPs は高原子番号であるため、放射線との間で物理的相互作用を起こし低エネルギー二次電子を放出する。これらの二次電子が GNPs 周囲の放射線量を局所的に増加させ (線量増加)、腫瘍細胞の DNA を損傷させる。

GNPs が及ぼす局所的な線量増加は、これまでシミュレーションを用いて推定されてきた。しかし多くの先行研究は GNPs が腫瘍細胞内で均一に分布すると仮定して線量増加を推定してきたのに対し、近年では GNPs は細胞内で凝集しクラスターを形成するという報告がされている。

GNPs がクラスターを形成すると、均一に分布した場合と比較して GNPs 同士が極端に接近する。この結果、GNPs から放出された二次電子は近傍の GNPs に吸収され (線量吸収)、十分な線量増加が起こらない事が予想される。しかし、GNPs による線量吸収を均一分布とクラスター形成時で比較する検討はこれまでされておらず、GNPs のサイズや濃度が線量吸収に与える影響も明らかになっていない。そこで本研究の目的は、1. クラスターを形成した GNPs による線量吸収を計算し、均一分布時と比較すること、2. クラスター内の GNPs サイズ・濃度を変化させ、GNPs による線量吸収が起こる過程を明らかにすること、とした。

【対象と方法】 スケールの異なる 2 種類のモンテカルロシミュレーションである、巨視的検討と微視的検討を行った。巨視的検討では、細胞を模した水ファントム中に GNPs を均一、もしくはクラスター状に分布させ、100 keV の X 線を照射したときの GNPs による線量吸収を計算した。さらに、GNPs の濃度や直径を変化させた場合についても検討した。この際、発生した電子と光子が水中、または GNPs のどちらで生成されたものであるのかを分別し、それぞれの線量吸収への寄与を評価した。

微視的検討では、水ファントム内に円筒状の GNP を 1 つ設置し、100 keV の X 線を照射した。円筒状 GNP の表面から放出される電子・光子のエネルギー分布を計算し、続いてそれを円盤状線源から放出させた。円盤状線源と別の円筒状 GNP 間の距離を変化させ、GNP に吸収される線量と入射電子数を計算した。

【結果と考察】 巨視的検討の結果、クラスターを形成した GNP_s は均一に分布した GNP_s より高い線量吸収を示した。水中で生成された電子・光子が線量吸収に与える影響は GNP_s 濃度に比例して増加した。一方、GNP_s 内で生成された電子・光子が線量吸収に与える影響は、GNP_s の空間分布・サイズによって大きく変化した。特にこの影響は、クラスター形成時に GNP_s 濃度の増加に伴い非線形に増加し、GNP_s サイズが小さくなるにつれ急激な増加を見せた。これらの結果から、GNP_s 間距離が線量吸収に大きな影響を与えることが示唆された。

微視的検討の結果、GNP_s 間距離が離れるにつれ線量吸収は低下し、この傾向は GNP_s サイズが小さいほど顕著であった。これは、GNP_s 内で生成された電子が近傍の GNP_s に到達し吸収される程度が、GNP_s 間距離により決定されることを示唆する。

巨視的検討と微視的検討の結果は、GNP_s のクラスター形成を考慮せずに線量増加を計算した場合、線量増加を過大評価する可能性があることを意味する。さらに、GNP_s が一定重量濃度の場合、GNP_s サイズが小さいほど GNP_s 間距離が接近するため線量吸収が起こりやすくなることを示す。近年直径約 2 nm の微小な GNP_s を用いた検討が盛んに行われているが、本研究から、GNP_s サイズが小さい場合ほど線量吸収の影響を考慮する必要があることが示唆された。

【結論】 本研究は、放射線治療において GNP_s を放射線増感剤として用いる場合に、GNP_s による線量吸収を考慮し線量増加を効率的に向上させるため GNP_s サイズ・濃度等のパラメータの選択を、物理的側面からサポートするといえる。

2. 金ナノ粒子による血管破壊効果の音響血管造影を用いた評価

【背景と目的】 腫瘍血管は腫瘍細胞へと酸素を届け、また転移の経路にもなりうることから、治療におけるターゲットとして注目されている。そこで、放射線照射時に GNP_s が線量増加を起こす現象を応用し、腫瘍血管を標的した GNP_s を血管破壊剤として用いることが検討されてきた。そこで本研究では、血管標的 GNP_s と放射線治療を組み合わせた血管破壊治療前後の血管空間分布の変化を、音響血管造影 (Acoustic Angiography: AA) を用いて評価することを目的とした。また、腫瘍微細血管分布の三次元的な不均一性を定量的に評価することを試みた。

【対象と方法】 ヒト非小細胞肺癌 (A549) 細胞を皮下移植させたマウスに対し、放射線治療のみ、もしくは放射線治療と腫瘍血管を標的した GNP_s による血管破壊治療を行った。腫瘍への画像誘導 X 線治療 (10 Gy) を行い、AA 装置を用いて超音波 B モード画像と AA 画像を照射後 62 日目まで撮影した。血管破壊前後の微細血管三次元分布の変化を定量的に評価するために、新しい指標として累積血管密

度 (Cumulative Vessel Density: CVD) ヒストグラムと血管密度半減深 (50% Vessel Penetration Depth: VPD₅₀) を導入した。

【結果と考察】 血管破壊治療をしたマウス腫瘍の相対血流量は、放射線治療のみを行った腫瘍と比較して血管破壊 24 時間後に血流が一時的に増加したのち、1 週間後には急激に低下した。この結果は、血管破壊によりマイクロバブルが血管外に一時的に放出されたことを示唆する。

また、コントロール群においては治療 0 日目の VPD₅₀ と 1 週間成長率の間に正の関係がみられた。治療 0 日目の VPD₅₀ と腫瘍体積の 1 週間成長率の両方が低いマウスの AA 画像を解析したところ、他のマウスと比較して明らかに腫瘍内の血流が乏しいことがわかった。よって、コホート内で外れ値となる可能性の高い異常な個体を、治療 0 日目の段階で血流状態をもとにフィルタリングする、という新しい用途に AA と VPD₅₀ を応用できることが示唆された。

【結論】 本研究では、血管標的 GNP と放射線治療による血管破壊前後の微細血管三次元分布の変化を、AA を用いて定性的・定量的に評価した。血管の三次元分布を表す新しい指標として CVD ヒストグラムと VPD₅₀ を導入し、その有用性を示した。また、治療前の血管分布を AA によって把握し、腫瘍の将来的な増殖率を予測できる可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

A549	human non-small-cell lung carcinoma cells
AA	acoustic angiography
BOLD	blood oxygen level dependent
BVD	blood vessel density
BVM	blood vessel morphology
CT	computed tomography
CVD	cumulative vessel density
DCE-MRI	dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging
DDM	Danielsson distance map
EPR	enhanced permeability and retention
FBS	fetal bovine serum
GNPs	gold nanoparticles
MRI	magnetic resonance imaging
PEG	polyethylene glycol
PET	positron emission tomography
PIXE	particle induced X-ray emission
SVP	spatial vascularity pattern
REA _{Macro}	macroscopic relative energy absorption
REA _{Micro}	microscopic relative energy absorption
RGD	Arginine-Glycine-Aspartic
ROS	reactive oxygen species
TOLD	tissue oxygen level dependent
VDAs	vascular disrupting agents
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPD ₅₀	50% vessel penetration depth

第1章

全体の緒言

1.1 放射線治療

1895年に Röntgen によって X 線が発見されて以来、放射線は医療の様々な場面で用いられてきた (Röntgen, 1896)。中でも放射線治療は、外科治療・薬物療法と並び癌の三大療法と呼ばれ、近年では癌患者の半数以上が単独・または他の治療法と組み合わせて放射線治療を受けている (American Cancer Society, 2017)。

放射線治療では、高エネルギーの光子や粒子を体の外部・または内部から腫瘍へと照射する。この際、放射線により正常組織に潰瘍や二次発癌等の副作用が発生するリスクがある。よって、放射線治療を行う上で重要なことは、正常組織にあたる放射線量を最小限に抑えつつ、治療ターゲットである腫瘍に対しては放射線を高精度に集中させることである。近年、このような高精度な放射線治療を実現するため、強度変調放射線治療 (Brahme et al., 1982)、動体追跡放射線治療 (Shirato et al., 2000)、そして陽子線治療をはじめとする粒子線治療 (Shimizu et al., 2014) 等の技術が開発され、用いられてきた。

1.2 放射線増感剤としての金ナノ粒子

前述したように、放射線治療、特に外部放射線治療では高精度な放射線の照射を行うことができるようになってきた。しかし、膵臓癌等の難治性癌の治療では、高線量の放射線を照射すべき状況でも、正常組織の副作用のリスクから十分な線量を照射できない場合が存在する。こうした中で、腫瘍に集中的に高線量を与える方法として、放射線増感剤の利用が検討されてきた。

放射線増感剤とは、放射線の生物学的効果を高める薬剤のことをいう。放射線増感剤の代表例にシスプラチン (Cisplatin) がある。放射線治療とシスプラチンによる化学療法を組み合わせることで、フリーラジカルの生成量が増加することや (Richmond et al., 1984)、DNA 損傷の修復機構が阻害されることが報告されている (Amorino et al., 1999; Eastman and Barry, 1987)。近年、このような放射線増感剤の候補として、金ナノ粒子 (Gold Nanoparticles: GNPs) の利用が研究されている。ここで GNPs とは、直径が数ナノ～数百ナノメートル程度の金粒子のことをいう。GNPs は後述する物理化学的な 3 つの特徴から、放射線増感剤として注目を浴びている。

まず、①GNPs は化学的に不活性であり生体適合性が高いため、毒性が低い (Connor et al., 2005)。次に、②GNPs を腫瘍へ選択的に集積させることができる。腫瘍血管は正常組織の血管と比較して血管新生が活発であり、血管透過性が高く、リンパ液の循環が弱い。そのため、直径 200 nm 以下の粒子は体内を循環するうちに腫瘍に集積するという性質があり、これは Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果として知られている (図 1.1) (Couvreur and Vauthier, 2006; Maeda et al., 2003; Matsumura and Maeda, 1986)。また、GNPs をペプチド (Wang et al., 2013)、抗体 (Riley and Day, 2017)、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol: PEG) (Arnida et al., 2011; Lin et al., 2012) 等で化学的に修飾することで、腫瘍に選択的に取り込ませることができる。このような化学的標識により腫瘍を標的した金ナノ粒子 (targeted GNPs) は、非標的な金ナノ粒子 (untargeted GNPs) と比較して、約 20 倍高濃度に腫瘍に集積することが報告されている (Berbeco et al., 2011)。

そして、GNPs は③高原子番号 ($Z=79$) であるため放射線と物理的相互作用を起こしやすい、という特徴を持っている。本研究において重要な意味を持つこの特徴については、次節で詳しく述べる。

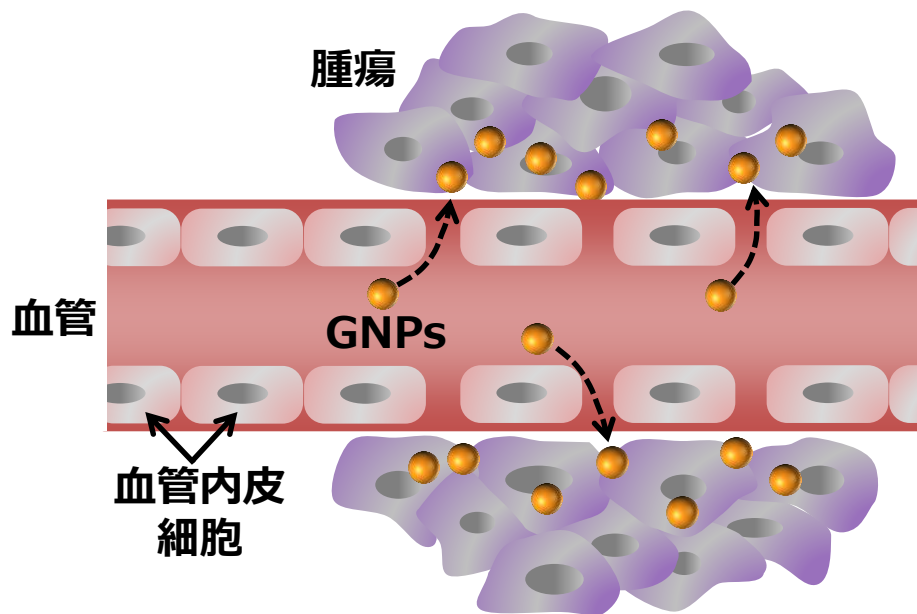


図 1.1 EPR 効果の模式図。腫瘍血管は血管透過性が高く、血管外ではリンパ液の循環が弱いため、直径が 200 nm 以下の GNPs は腫瘍血管を透過し、腫瘍細胞に取り込まれる。

1.3 金ナノ粒子と放射線の物理的相互作用

前節で述べたとおり、GNPs は高原子番号であるため、放射線と物理的相互作用を起こしやすい。図 1.2 に、X 線エネルギーに対する水と金の質量減弱係数と、両者の比を示す (Berger et al., 2010 より作成)。質量減弱係数とは、単位密度、単位長さあたりに減弱する光子線の割合を表し、質量減弱係数が高いほどその物質が X 線と物理的相互作用を起こしやすいことを意味する。図 1.2 から、金は水と比較して、特に 1 keV から 100 keV の間において高い質量減弱係数を示すことが分かる。例えば 100 keV においては、金の質量減弱係数は水の約 30.2 倍である。

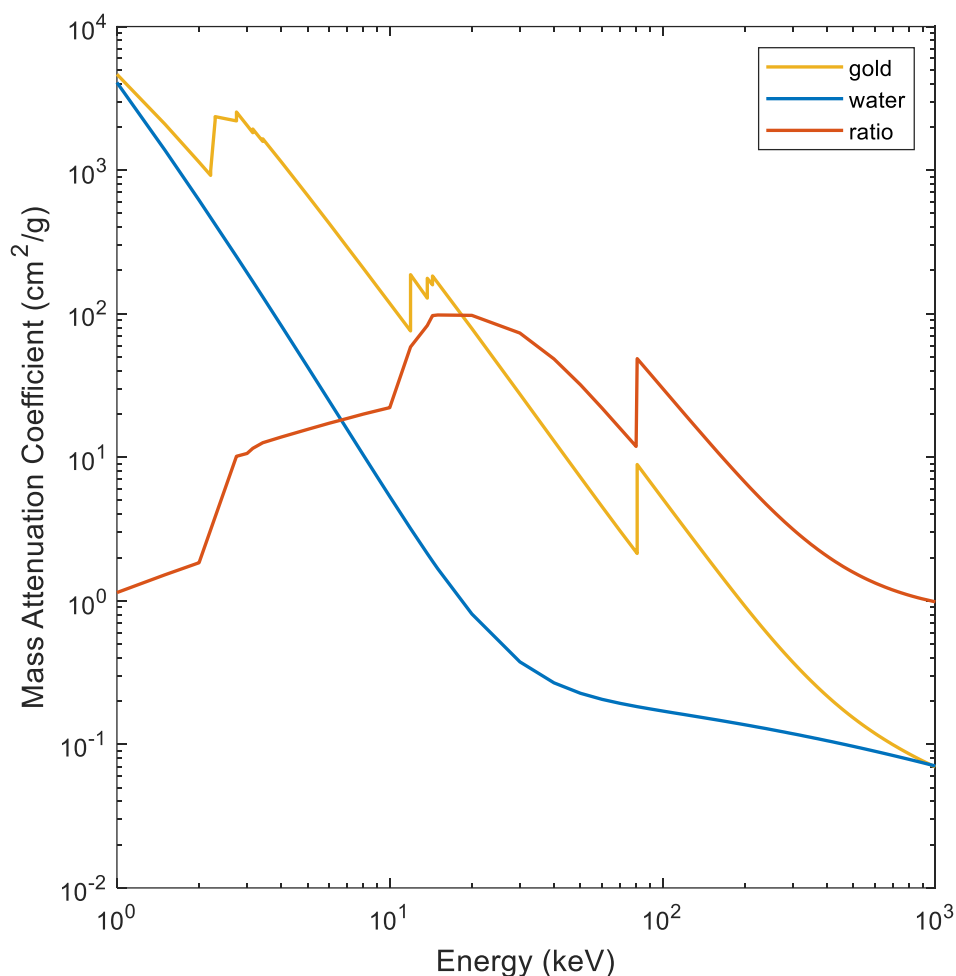


図 1.2 水と金の X 線エネルギーに対する質量減弱係数とその比。特に 1 keV から 100 keV の間において、金は水よりも高い質量減弱係数を示す。

このように金は低エネルギー領域で高い質量減弱係数を示すが、これは金がこのエネルギー帯域で光電効果を起こしやすいためである。光電効果とは、入射した光子が軌道電子に全てのエネルギーを付与し、軌道電子をその軌道の外へ放出する効果のことをいう。金における光電効果とコンプトン散乱の質量減弱係数を図 1.3 に示す (Berger et al., 2010 より作成)。光電効果の質量減弱係数は、特に X 線エネルギーが 1 keV から 100 keV の範囲内でコンプトン散乱よりもはるかに高く、このエネルギー帯域で起こる物理的相互作用は光電効果が中心であることが分かる。図 1.3 において、光電効果の質量減弱係数は不連続的に変化しているが、これは電子の束縛エネルギーが電子軌道ごとに異なり、光電効果の起こりやすさが軌道に応じて変化するためである。この不連続的な変化は、放出される電子の軌道ごとに、低エネルギー側から M 吸収端、L 吸収端、K 吸収端と呼ばれている。これらに対応するエネルギーはそれぞれ、2.2~3.4 keV, 11.9~14.4 keV, 80.7 keV である (Berger et al., 2010)。

また、光電効果による二次電子の放出に伴い、電子軌道に空孔ができると、外殻の軌道電子が空孔を埋めるよう遷移する。この過程で、2 つの電子軌道の束縛エネルギー差に等しいエネルギーが特性 X 線として放出される。さらに、特性 X 線が他の軌道電子にエネルギーを付与し軌道外へ弾き飛ばすことをオージェ効果と呼び、放出された電子をオージェ電子という。

前述の通り、放射線と GNP の物理的相互作用により、光電子やオージェ電子をはじめとした二次電子、そして特性 X 線等の光子が放出される。これらは GNP 周囲に局所的に高線量の放射線を付与する。この局所的な放射線量の増加を線量増加と呼ぶ。

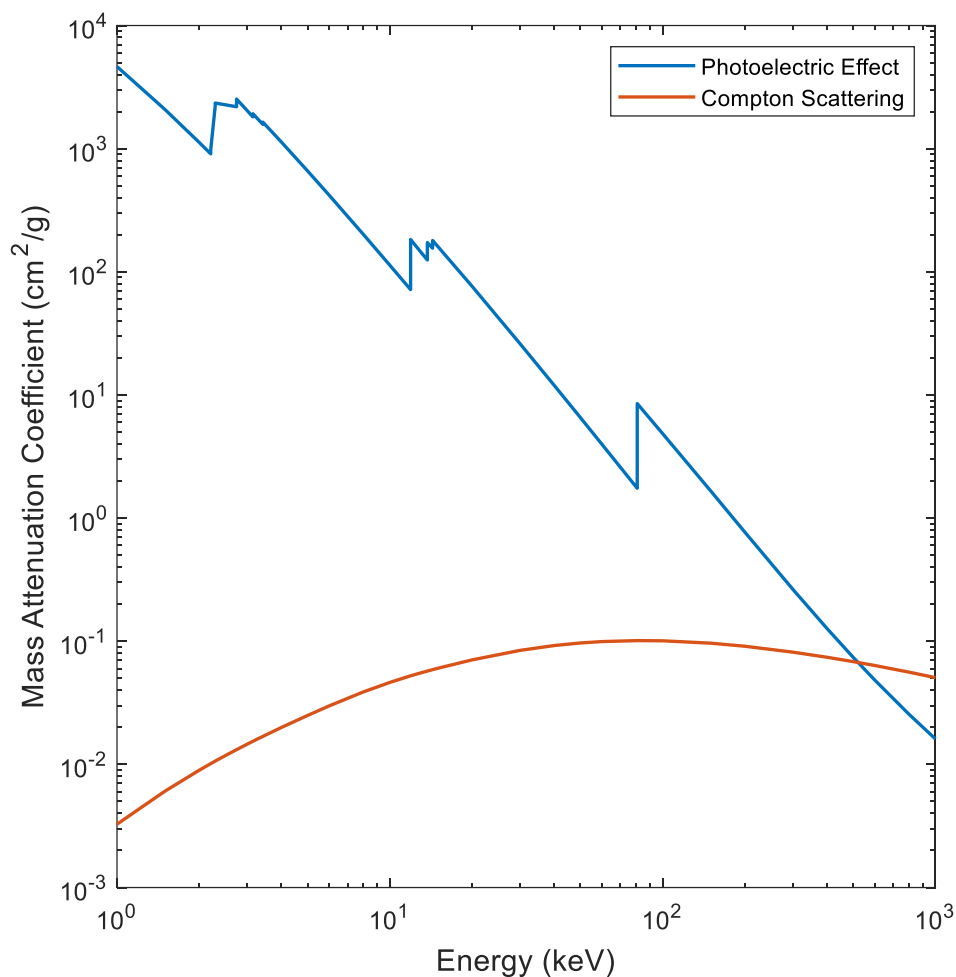


図 1.3 金における光電効果 (Photoelectric Effect) とコンプトン散乱 (Compton Scattering) の質量減弱係数と、X 線エネルギーの関係。1 keV から 100 keV のエネルギー帯域においては、光電効果の質量減弱係数はコンプトン散乱よりもはるかに高い。光電効果の質量減弱係数は不連続的に変化しており、低エネルギー側から M 吸収端 (2.2~3.4 keV)、L 吸収端 (11.9~14.4 keV)、K 吸収端 (80.7 keV) と呼ばれている。

1.4 金ナノ粒子が放射線増感効果を及ぼすメカニズム

前述の GNP の特徴を踏まえ、GNP は以下の過程で放射線増感効果を起こすと考えられている。まず、腫瘍細胞に集積した GNP は、治療用放射線との間で物理的相互作用、特に光電効果やオージェ効果を起こす。GNP から放出された二次

電子は、GNPs 周囲で局所的な線量増加を起こし、活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) 等を介して腫瘍細胞内の DNA やミトコンドリア等の構造体に損傷を与え、放射線治療の生物学的効果を高める (図 1.4) (Butterworth et al., 2010; Geng et al., 2011; Misawa and Takahashi, 2011; Tran et al., 2016)。

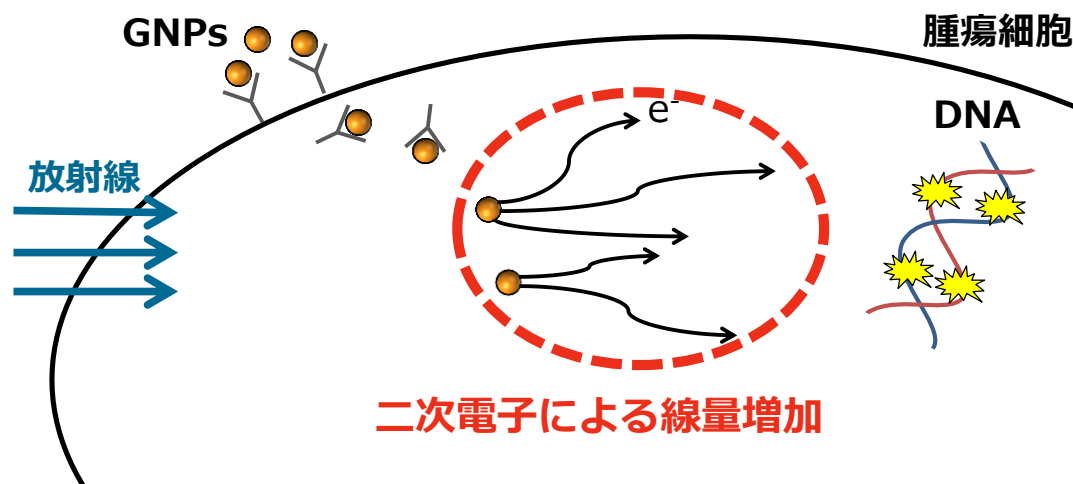


図 1.4 放射線増感効果のメカニズム。GNPs は化学的標識や Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果により腫瘍細胞に集積する。GNPs は高原子番号であるため、治療用放射線との間で光電効果やオージェ効果を起こし、二次電子を放出する。これらの二次電子は GNPs 周囲で局所的な線量増加を起こし、放射線治療の生物学的効果を高める。

1.5 本論文の構成

本論文は全 4 章からなる。第 1 章では、本論文全体を通しての研究対象である GNPs について、その特徴と線量増加・放射線増感効果の起こるメカニズムを説明した。続く第 2 章では、GNPs が細胞内で凝集しクラスターを形成した場合の影響を、モンテカルロシミュレーションを用いて推定している。次に第 3 章において、GNPs のクラスター形成による影響を受けにくい治療法として、GNPs と放射線治療を組み合わせた、腫瘍の血管破壊治療について検討する。ここでは、マウス腫瘍の血管破壊効果を定量化するために、音響血管造影 (Acoustic Angiography) により撮影した画像を解析している。最後に第 4 章で全体の内容をまとめ、本論文の総括及び結論とする。

第2章 金ナノ粒子のクラスター形成が線量増加に与える影響の推定

2.1 緒言

2.1.1 金ナノ粒子の放射線増感剤利用

歴史的に、GNPs のような高原子番号の物質を用いて放射線の生物学的効果を上げる試みは、まずコンピュータ断層撮影 (Computed Tomography: CT) 用の造影剤として、ヨウ素やガドリニウム等について研究されてきた。Hahnagy らにより、ヨウ素造影剤と診断領域の X 線を組み合わせることで、リンパ球の染色体変異数が増加することが報告されている (Hahnagy et al., 1982)。また、CT 撮影時の低エネルギー X 線を用いて放射線増感効果を得る検討が、脳腫瘍を対象になされてきた (Iwamoto et al., 1987; Mello et al., 1983; Mesa et al., 1999; Robar et al., 2002; Solberg et al., 1992)。

GNPs においても同様に、GNPs を取り込んだ細胞に対してキロボルトやメガボルトのエネルギーの X 線を照射すると、DNA の二本鎖切断数が増加することが報告されてきた (Brun et al., 2009; Butterworth et al., 2008; Chithrani et al., 2010a)。Hainfeld らは *in vivo* の検討において、マウス腫瘍に直径 1.9 nm の GNPs を集積させた後に 250 kVp の X 線を照射した結果、腫瘍体積が顕著に減少したと報告している (Hainfeld et al., 2004)。一方で、GNPs を用いた放射線増感効果は GNPs サイズに依存することも報告されている (Chithrani et al., 2010b)。

2.1.2 モンテカルロシミュレーションを用いた線量増加の推定

第 1.4 節で述べたとおり、GNPs が及ぼす放射線増感効果において、GNPs から放出された二次電子による局所的な線量増加が重要な役割を果たす。これまで、この線量増加はモンテカルロシミュレーションを用いて推定されてきた。

モンテカルロシミュレーションとは、モンテカルロ法を用いた放射線輸送シミュレーションのことである。一般にモンテカルロ法は、発生させた乱数に基づき対象 (ここでは光子や電子) の挙動を決定する。よって放射線輸送計算におけるモンテカルロシミュレーションでは、シミュレーション内の構造体に対してあらかじめ物理的相互作用の反応断面積の分布を設定しておき、発生させた乱数に基づき粒子の挙動や物理過程を決定する (Butcher and Messel, 1960; Varfolomeev and Svetllobov, 1959)。

これまで多くのモンテカルロシミュレーションで、GNPs に対し低エネルギーX線を照射すると、光電効果やオージェ効果を介して、GNPs 近傍で高い線量増加が起こることが示されてきた (Douglass et al., 2013; Incerti et al., 2016; Jones et al., 2010; Lechtman et al., 2011)。Jones らは、低エネルギーX線を GNPs に照射し、GNPs からの径方向の線量分布 (radial dose distribution) を計算した結果、GNPs から約 30 μm まで線量増加が確認されたと報告している (Jones et al., 2010)。

2.1.3 金ナノ粒子のクラスター形成

モンテカルロシミュレーションを用いた先行研究の大部分は、GNPs が腫瘍細胞内で均一に分布すると仮定して検討を行ってきた (Cho, 2005; Cho et al., 2009; Koger and Kirkby, 2016; McMahon et al., 2011; Strigari et al., 2017)。この均一モデルは計算が比較的高速であるため、線量増加の概要を把握するのには適しているものの、単純化されたモデルであるため現状に則していない可能性がある。そこで、より実際に近いシミュレーションとして、平面上に並んだ GNPs や六角形に並んだ GNPs による線量増加を計算した報告もある (Kirkby et al., 2017; Zygmanski et al., 2013b, 2013a)。

一方、複数の *in vitro* 実験によれば、GNPs は細胞内で凝集し、クラスターを形成することが報告されている (Chithrani et al., 2006, 2010a; Jain et al., 2011; Peckys and De Jonge, 2011; Rahman et al., 2009)。特に Peckys と De Jonge は、細胞内に形成された GNPs クラスターについて定量的な計測を行い、GNPs がクラスター内の小胞 (Vesicle) 内に格納されていると報告した (Peckys and De Jonge, 2011)。

GNPs がクラスターを形成すると、均一に分布した場合と比較して、GNPs 同士が極端に接近する。この結果、物理的相互作用により GNPs から放出された二次電子が近傍の GNPs に吸収され、細胞内での十分な線量増加が起こらない事が予想される。すなわち、均一な GNPs 分布を仮定して計算された線量増加は、実際の線量増加を過大評価している可能性がある。さらに、細胞内の GNPs の重量濃度を一定とした場合、GNPs サイズが小さいほど GNPs 間距離が近くなるため、より多くの二次電子が周囲の GNPs に吸収され、線量増加が過大評価されやすくなる可能性がある。しかし、GNPs に吸収される線量を計算し、均一分布とクラスター形成時で比較した検討はいまだ報告されておらず、また GNPs サイズ・濃度が及ぼす影響は明らかになっていない。

そこで本研究では、1. クラスターを形成した GNP_s による線量吸収を計算し、均一分布時と比較すること、2. 異なる GNP_s サイズ・濃度について線量吸収を比較し、クラスターを形成した GNP_s により線量吸収の起こる過程を明らかにすること、を目的とした。

2.2 方法

2.2.1 概要

本研究では、GNP_s のクラスター形成が線量吸収に及ぼす影響を把握するために、スケールの異なる 2 種類のモンテカルロシミュレーションを行った。これらを本論文ではそれぞれ巨視的検討・微視的検討と呼ぶこととする。巨視的検討では、2.1.3 項で述べた Peckys と De Jonge による報告をもとに GNP_s クラスターをシミュレーション上で構築し、線量増加を計算した (Peckys and De Jonge, 2011)。続く微視的検討では、クラスター形成による影響を深く理解するため、巨視的検討よりも小スケールかつシンプルな体系での計算を行った。

モンテカルロシミュレーションには、Geant4 (version 10.02.p02) (Agostinelli et al., 2003; Allison et al., 2006) を用いた。シミュレーションにおける低エネルギー電子の挙動の決定には、低エネルギーでの計算に適した電磁物理リストである “Geant4-Penelope” リストを用いた。粒子の挙動を計算するエネルギーの下限であるエネルギーカットオフは、一次粒子は飛程が 1 nm になるまで、二次粒子については初期エネルギーが 250 eV 以上の粒子までを計算に考慮するものとした。シミュレーションにおいては、二次電子による線量増加に寄与する可能性があるすべての物理過程：原子の脱励起過程 (atomic de-excitation process)、蛍光放出 (fluorescence emission)、オージェ電子放出 (Auger electron emission)、オージェカスケード (Auger cascade)、粒子線励起 X 線 (Particle Induced X-ray Emission: PIXE) を考慮した。GNP_s に照射する X 線のエネルギーは 100 keV とした。これは、金原子の K 吸収端 (80.7 keV) より高く (図 1.3 を参照)、かつ外部放射線治療において X 線が深部の腫瘍に到達するまでに減衰することを考慮して決定した (Detappe et al., 2016)。実際の治療において腫瘍に入射する X 線は、様々なエネルギーが混ざった多色 X 線である。しかし本研究では、GNP_s のクラスター形成のメカニズムを明らかにするた

め、クラスター形成の影響を評価しやすいよう単一エネルギーの X 線を用いた。照射 X 線数は、巨視的検討では 4.8×10^9 本、微視的検討では 10^8 本とした。

2.2.2 巨視的検討

巨視的検討のシミュレーションでは、Peckys と De Jonge が報告した GNP クラスターのパラメータをもとに、細胞を模した水立方体ファントム内で GNP クラスターを構築した (Peckys and De Jonge, 2011)。Peckys と De Jonge の報告では、GNP クラスターの観察にサル線維芽細胞である COS-7 細胞を用いた。しかし、COS-7 細胞の体積情報は同論文に記されていないため、本研究ではハーバード大学が運営するデータベースである BioNumbers (Milo et al., 2010) をもとに、COS-7 細胞の体積を $2016 \mu\text{m}^3$ とした。よって、立方体細胞ファントムの一辺は $12.6 \mu\text{m}$ とした。均一分布においては、球体の GNP が細胞ファントム内でランダムに分布するとした (図 2.1 (a))。一方クラスターにおいては、細胞ファントムの中心に設置した直径 $4.6 \mu\text{m}$ のクラスター球内にて小胞をランダムに設置し、各小胞内で GNP をランダムに分布させた (図 2.1 (b) と (c))。小胞の直径と個数は Peckys と De Jonge の報告からそれぞれ 260 nm 、 164 個とした (Peckys and De Jonge, 2011)。

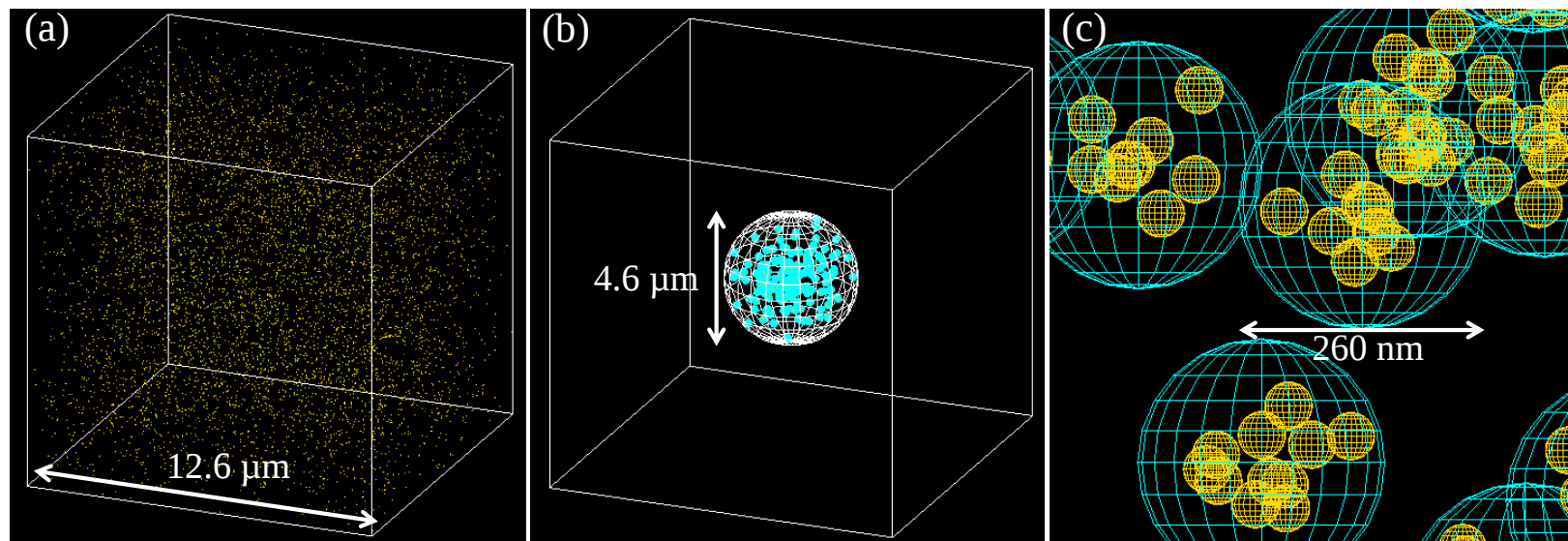


図 2.1 巨視的検討における、モンテカルロシミュレーションの体系。(a): 均一分布時のシミュレーション体系。均一分布時には、球体の GNP (黄色) が立方体細胞ファントム内でランダムに分布するとした。細胞ファントムの一辺は $12.6\ \mu\text{m}$ である。(b): GNP クラスター形成時のシミュレーション体系。クラスター形成時には、ファントム中央に置かれた直径 $4.6\ \mu\text{m}$ のクラスター球 (白色) 内で、球体の小胞 (水色) がランダムに分布するとした。(c): GNP クラスターの拡大図。小胞球 (水色) の直径は $260\ \text{nm}$ とし、各小胞球内で GNP (黄色) がランダムに分布するとした。

GNPs サイズ・濃度がクラスター形成に及ぼす影響を評価するために、GNPs の直径を 10, 30, 50 nm と変化させつつ、それぞれの直径において GNPs の濃度を 0.5, 1, 2, 3 mg/mL と変化させ、GNPs と水のエネルギー吸収を計算した。GNPs と水のエネルギー吸収を計算した。本研究で使用した各 GNPs 直径・重量濃度における、細胞ファントム内と小胞内の GNPs 数を表 1 に示す。

表 1 各 GNPs 直径・濃度における、細胞ファントム内と小胞内の GNPs 数

GNP 直径 (nm)	10		30		50	
GNPs 濃度 (mg/mL)	細胞	小胞	細胞	小胞	細胞	小胞
0.5	99645	608	3691	23	797	5
1	199290	1215	7381	45	1594	10
2	398579	2430	14762	90	3189	19
3	597869	3646	22143	135	4783	29

細胞ファントムに対して、100 keV の X 線を水平に照射し、水中・GNPs 中に付与されるエネルギーを計算した。これらのエネルギーを本研究ではエネルギー吸収 (energy absorption) と呼ぶものとする。クラスター形成の影響は、GNPs が均一分布した場合とクラスターを形成した場合とでエネルギー吸収を比較することで評価した。シミュレーションにおいては、図 2.2 に示すように二次電子や二次光子が (a) GNPs 中、または (b) 水中のどちらで生成されたものであるのかを分別することで、それぞれの粒子のエネルギー吸収への寄与を評価した。

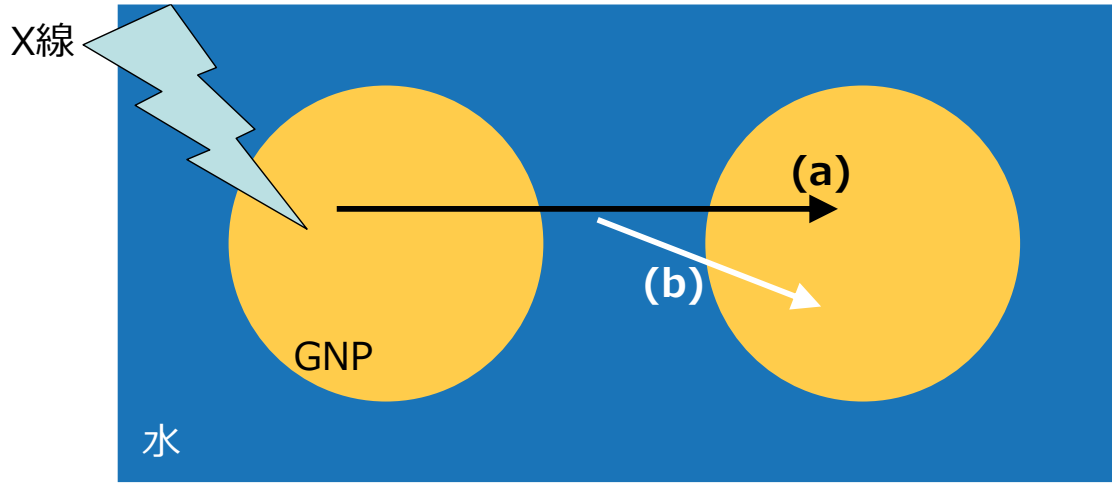


図 2.2 電子・光子の発生源に応じた計算の分別。(a): GNPs 内で生成された電子・光子のエネルギーが、GNPs に吸収される場合。(b): 水中で生成された電子・光子のエネルギーが、GNPs に吸収される場合。

本研究では、同一 GNPs 濃度・質量下におけるクラスター形成の影響を評価するために、新しい指標である Clustering Factor を定義した。Clustering Factor は、クラスター形成時と均一分布時に GNPs に吸収されたエネルギーの比から計算され、式(1)で表される。すなわち、クラスター形成によるエネルギー吸収の影響が大きいほど Clustering Factor は増加する。

Clustering Factor

$$= \frac{\text{クラスターを形成したGNPsに吸収されたエネルギー}}{\text{均一分布したGNPsに吸収されたエネルギー}} \quad (1)$$

次に、細胞ファントム全体に吸収されたエネルギーのうち、GNPs に吸収されたエネルギーを評価するために、巨視的相対エネルギー吸収 (Macroscopic Relative Energy Absorption: REA_{Macro}) を定義した。 REA_{Macro} は細胞ファントム内の GNPs を含むすべての構造物に吸収されたエネルギーに対する、GNPs に吸収されたエネルギーの割合から計算され、式(2)で表される。式(2)より、GNPs クラスター形成による影響が大きいほど、クラスター形成時の REA_{Macro} は均一分布時よりも高くなる。

$$REA_{Macro} [\%] = \frac{GNPsに吸収されたエネルギー}{水とGNPsに吸収されたエネルギー} \times 100 \quad (2)$$

2.2.3 微視的検討

微視的検討では、クラスター形成の影響を深く理解するため、巨視的検討よりも小さいスケールで 2 つの GNPs を用いたシンプルなシミュレーションを行った。2 つの GNPs とは、①入射 X 線との相互作用により二次電子や二次光子を放出する GNP、② ①の GNPs の近傍に位置し、①から放出された二次電子や二次光子を吸収する GNP (図 2.2 における右側の GNP に相当) である。この、近傍に位置する GNP (②) を、本研究ではバイスタンダーGNP と呼ぶこととする。

なお、微視的検討で用いた GNP は、巨視的検討で用いた球形の GNP とは異なり円筒状である。これは、微視的検討においては 2 つの GNPs 間の距離がエネルギー吸収を決定する非常に重要な要素であると予想されるため、2 つの GNPs 同士が面する側を平面にすることで、GNPs 間距離を側面のどの位置においても一定にするためである (球体の GNP は表面が湾曲しているため、GNPs 間距離が表面上の位置によって変化してしまう)。また、球形の GNPs のみならず、円筒形の GNPs においても放射線増感効果が起こることが実験的に報告されている (Rane and Armani, 2016; Wolfe et al., 2015)。

微視的検討は 2 つのステップから成り立つ。まずステップ 1 では、巨視的検討と同様の細胞ファントムの中心に、1 つの円筒形 GNP を設置した (図 2.3)。円盤状線源を円筒形 GNP に密着させ、100 keV の X 線を水平に照射した。円筒形 GNP 内で発生した二次電子・光子が、円筒形 GNP 表面から放出されるときエネルギーを計算した。

続いてステップ 2 では、前述のステップ 1 で取得したエネルギー分布の電子・光子を円盤状線源として使用し、同軸上に設置された別の円筒形 GNP (バイスタンダー GNP) に対して水平に照射した (図 2.4)。円盤状線源とバイスタンダーGNP 間の距離を 0 から 500 nm まで変化させ、それぞれの距離において水とバイスタンダーGNP に吸収されたエネルギーを計算した。

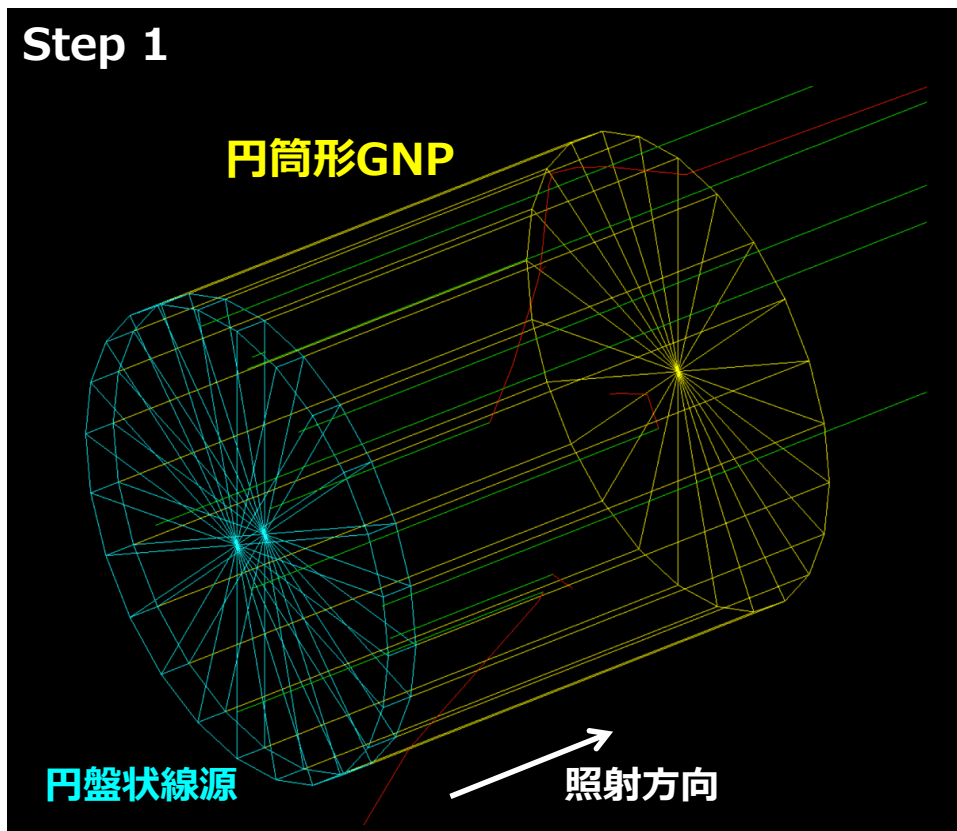


図 2.3 微視的検討におけるステップ 1 のシミュレーション体系。円盤状線源 (水色) を円筒形 GNP (黄色) に密着させ、100 keV の X 線 (緑色) を円筒形 GNP に対し水平に照射した。X 線と GNP の物理的相互作用で発生した二次電子 (赤) ・光子 (緑) のうち、円筒形 GNP 表面を通過し放出されるもののエネルギーを計算した。

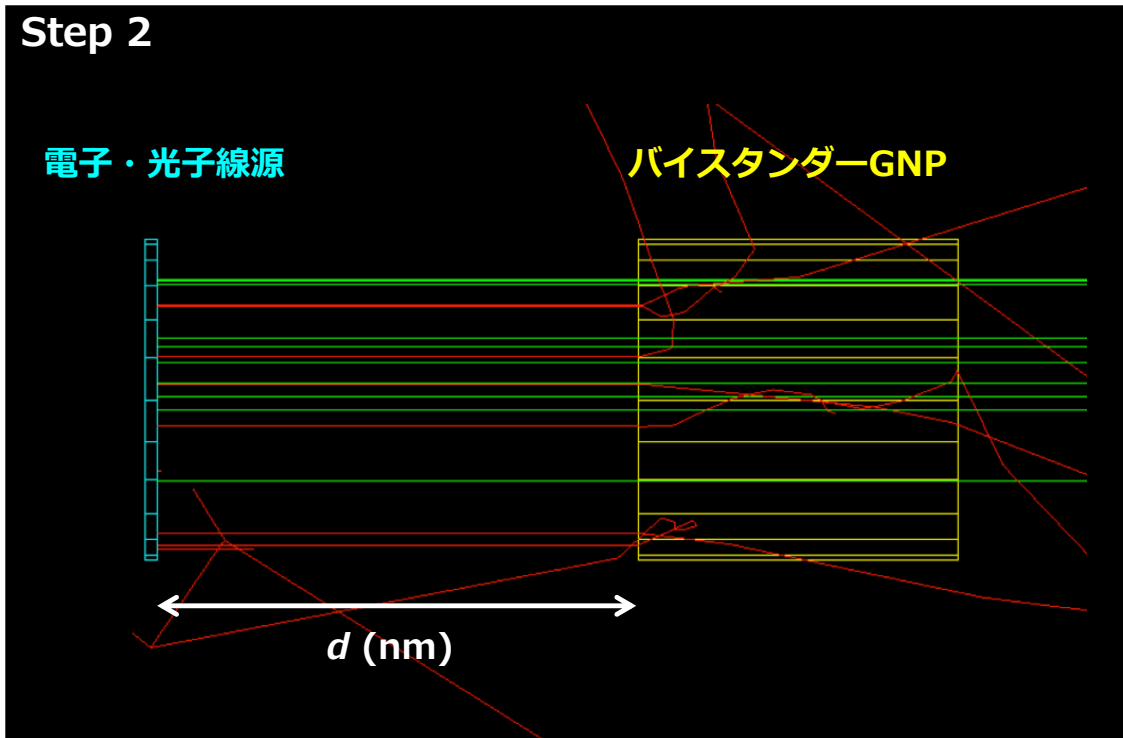


図 2.4 微視的検討におけるステップ 2 のシミュレーション体系。ステップ 1 (図 2.3) で取得したエネルギー分布の電子 (赤)・光子 (緑) を円盤状線源 (水色) として使用し、同軸上に設置された円筒形のバイスタンダーGNP (黄色) に対して水平に照射した。円盤状線源とバイスタンダーGNP 間の距離 (d) を変化させ、水とバイスタンダーGNP に吸収されたエネルギーを計算した。

円盤状線源の直径、円筒形 GNP の底の直径、円筒形 GNP の高さは同一とし、それぞれ 10, 30, 50 nm と変化させた。バイスタンダーGNP に吸収されるエネルギーは、微視的相対エネルギー吸収 (Microscopic Relative Energy Absorption: REA_{Micro}) によって評価した。 REA_{Micro} は前項の REA_{Macro} と同様、細胞ファントム内の GNP を含むすべての構造物に吸収されたエネルギーに対する、バイスタンダーGNP に吸収されたエネルギーの割合から計算され、式(3)で表される。

$$REA_{Micro} [\%] = \frac{\text{バイスタンダーGNPに吸収されたエネルギー}}{\text{水とバイスタンダーGNPに吸収されたエネルギー}} \times 100 \quad (3)$$

2.3 結果

2.3.1 巨視的検討の結果

均一分布時とクラスター形成時に GNP_s に吸収された電子・光子のエネルギーを図 2.5 に示す。各グラフは電子・光子が生成された構造物に応じて 2 色に分かれているが、これは GNP_s によるエネルギー吸収を計算するにあたり、図 2.2 に示したように、電子・光子の発生源に応じて計算を分別したことによる。棒の下部 (青色) は、水中で生成した電子・光子が GNP_s に吸収されたエネルギーを示し、上部 (黄色) は GNP_s 中で生成した電子・光子が GNP_s に吸収されたエネルギーを示す。それぞれの重量濃度において、水中で生成した電子・光子が付与したエネルギー (青色) は GNP_s の空間分布とサイズの影響をあまり受けず、重量濃度の増加とともに上昇した。一方、GNP_s 中で生成した電子・光子が GNP_s に吸収されたエネルギー (黄色) は、GNP_s の空間分布とサイズに大きく影響された。よって、エネルギー吸収の全体の傾向は、GNP_s 中で生成した電子・光子によるエネルギー付与 (黄色) に依存した。また、クラスター形成時のエネルギー吸収は均一分布時よりも高く、GNP_s サイズが大きいほど高くなった。

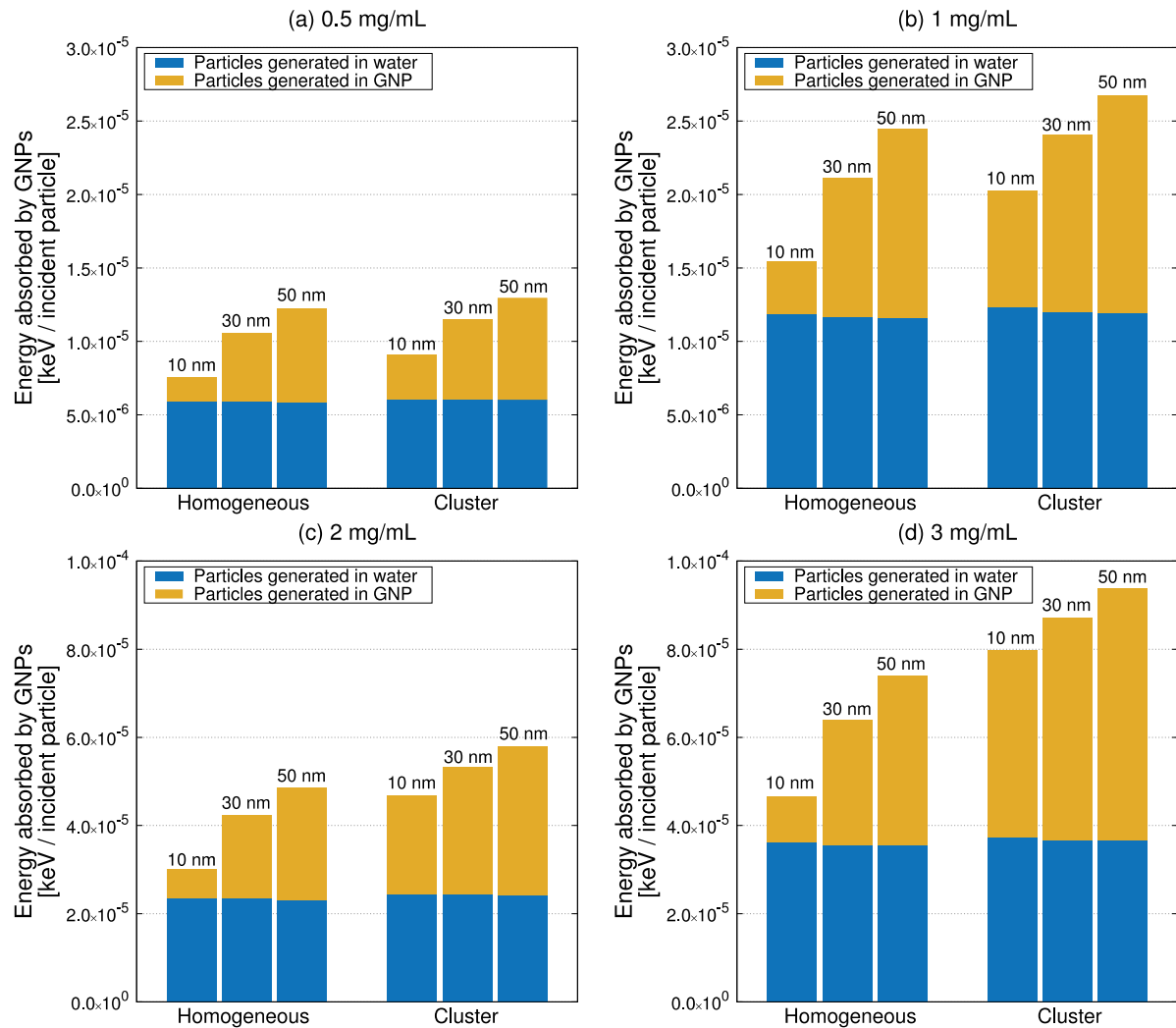


図 2.5 均一分布時とクラスター形成時に GNPs に吸収されたエネルギー。(a), (b), (c), (d)はそれぞれ、重量濃度が 0.5, 1, 2, 3 mg/mL の場合を示す。各グラフにおける左側の 3 つの棒は均一分布時を、右側の 3 つの棒はクラスター形成時を示し、GNPs の直径が 10, 30, 50 nm の場合を示す。各棒の下部 (青色) は水中で生成した電子・光子が GNPs に吸収されたエネルギーを示し、上部 (黄色) は GNPs 中で生成した電子・光子が GNPs に吸収されたエネルギーを示す。

GNPs 中で生成した電子・光子が GNPs に吸収されたエネルギー (図 2.5 における黄色部分) と重量濃度の関係を図 2.6 に示す。均一分布におけるエネルギー吸収は、重量濃度に比例して増加した。一方クラスター形成時には、エネルギー吸収は GNPs 濃度の増加に伴い非線形に増加し、均一分布時よりも高いエネルギー吸収を示した。

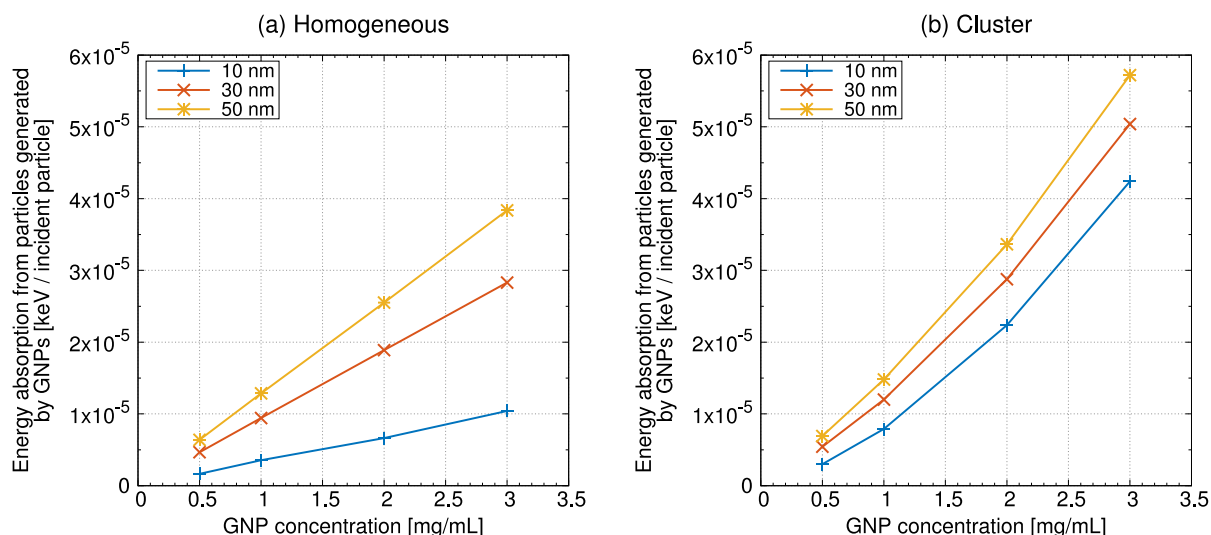


図 2.6 GNPs の重量濃度と、GNPs 中で生成した電子・光子が GNPs に吸収されたエネルギーの関係。(a) 均一分布時、(b) クラスター形成時。それぞれの実線は GNPs サイズが 10, 30, 50 nm の場合を示す。

クラスター形成時のエネルギー吸収における GNPs サイズの影響を、Clustering Factor (式(1)) を用いて評価した。GNPs の重量濃度と Clustering Factor の関係を図 2.7 に示す。Clustering Factor は GNPs 重量濃度に比例して増加し、GNPs サイズが小さいほど高い値を示すという傾向が見られた。特に直径 10 nm のときには、直径 30, 50 nm の場合と比較してはるかに高い値を示した。例えば重量濃度が 3 mg/mL のときの Clustering Factor は、GNPs の直径が 10, 30, 50 nm の場合にそれぞれ 1.74, 1.36, 1.27 であった。

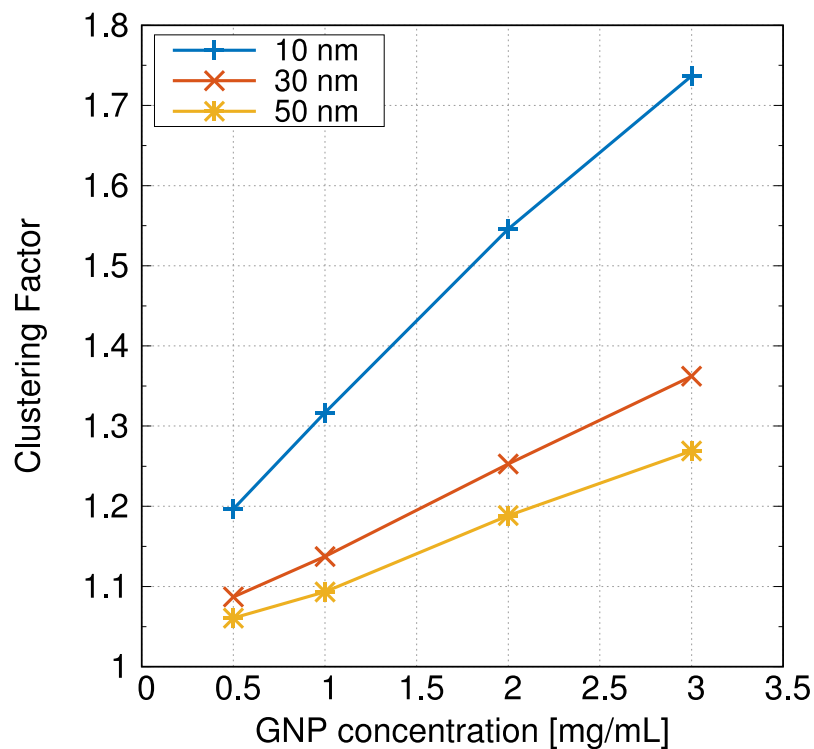


図 2.7 GNPs の重量濃度と Clustering Factor の関係。それぞれの実線は GNPs サイズが 10, 30, 50 nm の場合を示す。

細胞ファントム全体に吸収されるエネルギーのうち、GNPs に吸収されるエネルギーの割合を評価するために、 REA_{Macro} (式(2)) を計算した。GNPs の重量濃度と REA_{Macro} の関係を図 2.8 に示す。全体として、 REA_{Macro} は均一分布時・クラスター形成時ともに GNPs 重量濃度に比例して増加したが、クラスター形成時にはより急激な増加がみられた。この傾向はいずれの GNPs サイズ・重量濃度においてもみられた。均一分布時・クラスター形成時ともに、GNPs サイズが大きいほど高い REA_{Macro} を示した。

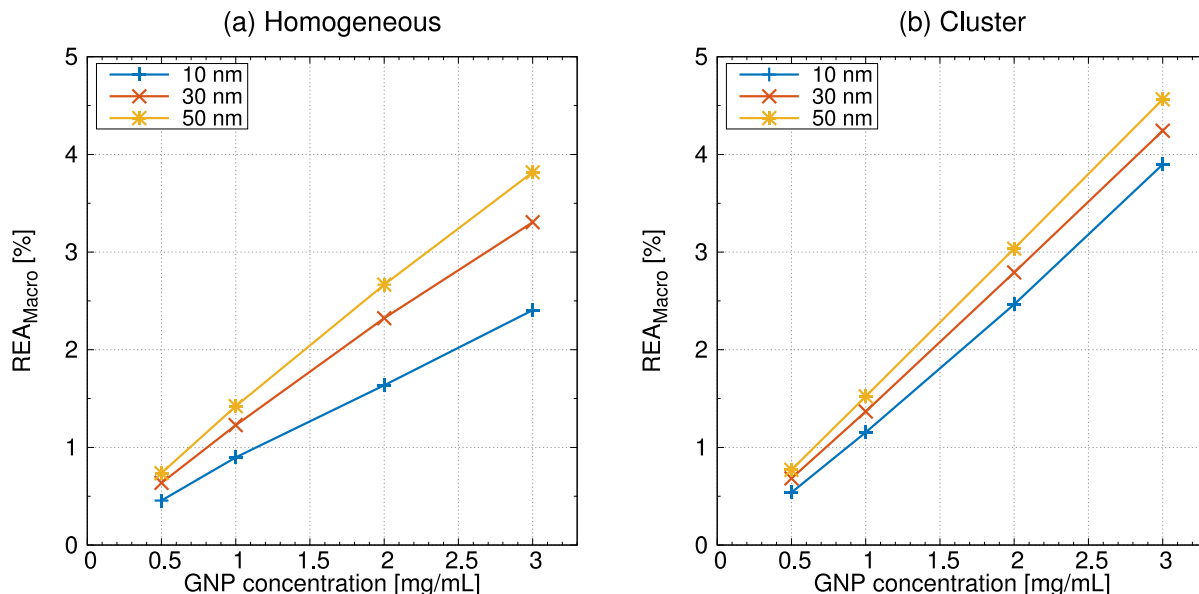


図 2.8 GNPs の重量濃度と REA_{Macro} の関係。(a) 均一分布時。(b) クラスタ形成時。それぞれの実線は GNPs サイズが 10, 30, 50 nm の場合を示す。

2.3.2 微視的検討の結果

前述の巨視的検討では、クラスタ形成時に GNPs によるエネルギー吸収が増加するという結果となった。この現象をさらに詳しく評価するため、次に微視的検討を行った。微視的検討では、2 つの GNPs によるシンプルな体系により、バイスタンダー GNP に吸収されるエネルギーを計算した。線源-バイスタンダー GNP 間距離と REA_{Micro} の関係を図 2.9 に示す。 REA_{Micro} は GNP サイズが大きいほど高い値を示し、線源-バイスタンダー GNP 間距離が遠くなるにつれ減少した。特に線源-バイスタンダー GNP 間距離が 0 から 100 nm 程度と近接しているとき、 REA_{Micro} は距離の増加に伴い急激に減少した。線源-バイスタンダー GNP 間距離とバイスタンダー GNP に入射する相対電子数の関係を図 2.10 に示す。各データ点は、各 GNPs サイズにおける線源-バイスタンダー GNP 間距離が 0 nm のときの入射電子数で正規化されている。相対入射電子は線源-バイスタンダー GNP 間距離が遠くなるほど減少し、かつ小さい GNPs ほど急激に減少した。全体としては REA_{Micro} と似た傾向を示した。

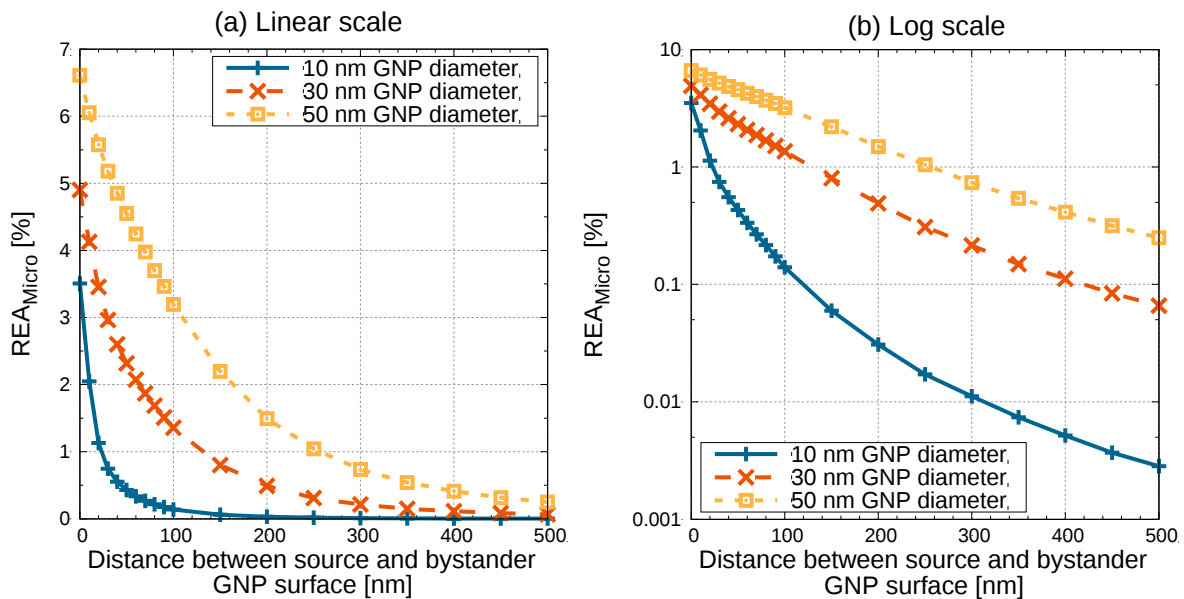


図 2.9 線源-バイスタンダーGNP 間距離と REA_{Micro} の関係。(a)リニアスケール、(b)ログスケール。

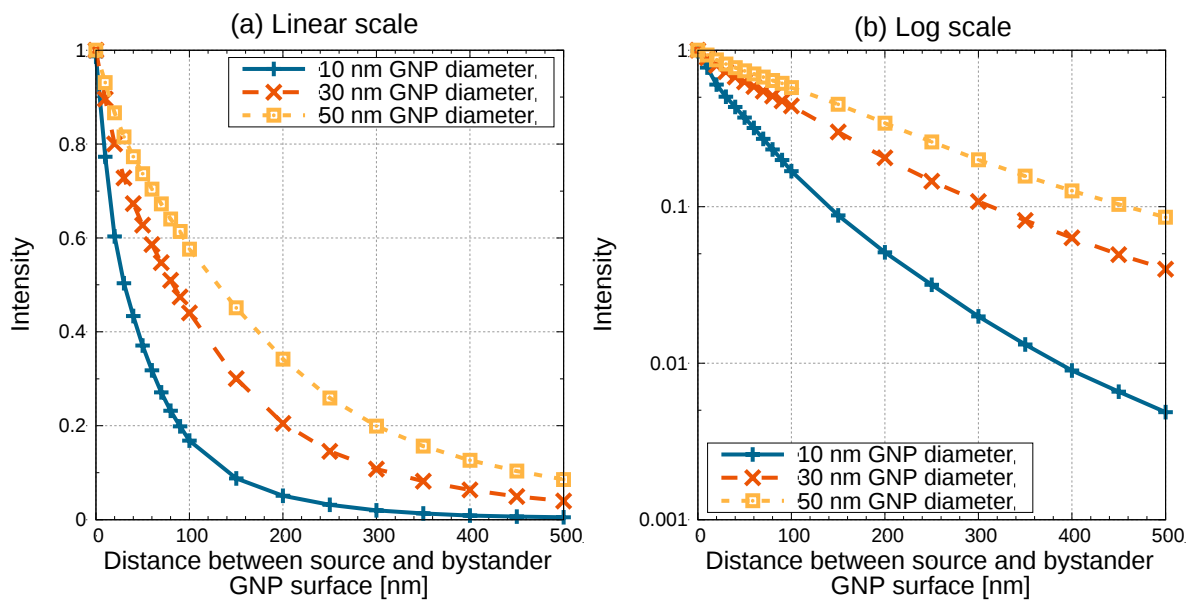


図 2.10 線源-バイスタンダーGNP 間距離とバイスタンダーGNP に入射する相対電子数の関係。(a)リニアスケール、(b)ログスケール。

GNPs が立方体であると仮定した場合の各 GNP 重量濃度・GNP サイズにおける GNP 間の推定距離を表 2 に示す。均一分布時の GNP 間距離は、GNP サイズが 10 nm、重量濃度が 3 mg/mL のときに最短の 140 nm となった。一方クラスター形成時の GNP 間距離は均一分布時よりもはるかに短く、最長でも 74 nm であった (GNP サイズが 50 nm、重量濃度が 0.5 mg/mL のとき)。GNP 間距離は GNP サイズの減少に伴い短くなったが、これは同一の重量濃度下では GNP 数が立方体 GNP の一辺の長さの 3 乗に比例して増加するためであるといえる。

前述の REA_{Micro} (図 2.9) と GNP 間距離 (表 2) の間には関係性がみられる。例えば均一分布時には重量濃度 3 mg/mL、GNP サイズ 10, 30, 50 nm の場合の GNP 間距離はそれぞれ 140, 420, 700 nm であったが、これらの GNP 間距離における REA_{Micro} は 0.08, 0.14, 0.33% であった (本研究で計算した線源-バイスタンダー GNP 間距離は最大 500 nm であるため、0.33% は 500 nm の場合の結果である)。一方、クラスター形成時には同条件における GNP 間距離は、均一分布時よりも接近し、それぞれ 4, 11, 18 nm であった。これらの GNP 間距離における REA_{Micro} は 2.84, 4.08, 5.73% であった。このように、クラスター形成時には均一分布時と比較して GNP 間距離がはるかに接近し、 REA_{Micro} も増加した。

表 2 各 GNP 重量濃度・GNP サイズにおける、立方体 GNP 間の推定距離 (nm)

立方体 GNP の 一辺の長さ (nm)	10		30		50	
重量濃度 (mg/mL)	Homo geneous	Cluster	Homo geneous	Cluster	Homo geneous	Cluster
0.5	263	15	788	44	1312	74
1	206	10	619	29	1031	48
2	162	6	485	17	700	28
3	140	4	420	11	700	18

2.4 考察

2.4.1 本研究結果の解釈

本研究では、GNPs がクラスターを形成した時のエネルギー吸収を明らかにするため、巨視的検討・微視的検討の 2 種類のモンテカルロシミュレーションを行った。GNPs のクラスター形成が線量増加に及ぼす影響は、先行研究では、GNPs を比較的

単純に並べた、または密集させたに方法より推定されてきた (Kirkby et al., 2017; Zygmanski et al., 2013b)。一方本研究では、細胞内の GNP クラスタを実測した報告 (Peckys and De Jonge, 2011) に基づき、GNP クラスタをシミュレーション上で再現した。Peckys と De Jonge が報告したパラメータを用いて GNP クラスタを再現する試みは過去にも行われたものの、GNP から放出される二次電子数を評価するにとどまっていた (Jeynes et al., 2014)。本研究では、さらに GNP と周囲の水に吸収される電子・光子のエネルギーを計算することで、クラスタ形成時には GNP に吸収されるエネルギーが増加することを明らかにした。この結果は、GNP の均一分布を仮定した場合には線量増加を過大評価する可能性がある」と指摘した過去の報告と傾向が一致する (Martinov and Thomson, 2017; Zygmanski et al., 2013a)。また、このような傾向は GNP にとどまらず、セラミックである Ta₂O₅ ナノ粒子を対象としたシミュレーションにおいても報告されている (McKinnon et al., 2016)。

モンテカルロシミュレーションの長所は、一つひとつの電子や光子の挙動を解析できることである。この長所を生かし、本結果では GNP に吸収される電子・光子のエネルギーを、その電子・光子が水と GNP のどちらで生成したのかを分別した (図 2.2)。筆者の知りうる限りにおいて、これは初めての試みである。この計算の結果、GNP に吸収されるエネルギーのうち水中で生成された電子・光子によるものは、GNP の空間分布やサイズに依存せず、重量濃度によって決定されることがわかった。この結果は、均一分布時に GNP に吸収されるエネルギーの大部分が、エネルギーの自己吸収、すなわち GNP 内で発生した電子・光子がその GNP 内で吸収されたものであることを示唆している。次に、GNP に吸収されるエネルギーのうち GNP 中で生成された電子・光子によるものは、均一分布時・クラスタ形成時いずれにおいても GNP サイズと重量濃度の影響を強く受けた (図 2.5)。また均一分布時には、GNP に吸収されるエネルギーのうち GNP 中で生成された電子・光子によるものは、重量濃度に比例して増加した (図 2.6 (a))。一方で、クラスタ形成時には非線形かつ均一分布よりもはるかに高いエネルギー吸収がみられた (図 2.6 (b))。これは、クラスタ形成時に GNP 間距離が極端に接近したことで、ある GNP から発生した二次電子が周囲のバースタンダー GNP に吸収されやすくなったためであるといえる。すなわち、極端に接近した GNP 間でエネルギーの交換が起こることが、GNP クラスタにより線量吸収が増加するメカニズムであることを示唆する。GNP の細胞内での不均一な分布を考慮した先行研究では、この GNP 間のエネルギー交換は指摘されてこなかった (Kirkby and Ghasroddashti, 2015; Lin et al., 2015)。

本研究ではまた、クラスタ内の GNP サイズがエネルギー吸収に及ぼす影響を評価した。先行研究では GNP 数を一定にして計算を行っているが (Retif et al., 2016)、

この手法では GNP 間距離が線量吸収に及ぼす影響を評価することができない。本研究における仮説は、クラスター内で GNP 間距離が接近することでエネルギー吸収が増加する、というものであったため、GNP の重量濃度を一定として GNP サイズを変えることで GNP 間距離を変化させ、シミュレーションを行った。巨視的検討と微視的検討の両方で、大きい GNP ほど高いエネルギー吸収を示したが (図 2.5、図 2.8、図 2.9)、これは図 2.10 に示したように GNP が小さいほどバイスタンダー GNP へ入射する二次電子数が低下するためであることが示された。この傾向は、過去のシミュレーション (Leung et al., 2011; Lin et al., 2015; Zygmanski et al., 2013a) や電子スピン共鳴装置を用いた定量的な測定とも一致する (Guidelli and Baffa, 2014)。また、小さい GNP ほど高い Clustering Factor を示し、この傾向は GNP 濃度が増加するにつれ顕著であった (図 2.7)。表 2 に示したように、GNP サイズが小さいほど、また GNP 重量濃度が増加するほど GNP 間距離は接近することから、GNP 間距離が GNP クラスターによるエネルギー吸収を決定する重要な要素であるという本研究の仮説が裏付けられた。この傾向は、微視的検討において、GNP 間距離が遠ざかるにつれ REA_{Micro} とバイスタンダー GNP への電子・光子入射数が急激に減少したことからも確かめられた (図 2.9、図 2.10)。なお、この微視的検討による傾向は、GNP クラスター内における GNP 間距離と線量増加の関係を評価した過去の検討と一致する (Ahn et al., 2017)。これらの結果は、一定 GNP 重量濃度下において、GNP サイズが小さいほどクラスター形成によるエネルギー吸収の影響が顕著になることを意味する。これまでの先行研究において、直径 1.9 nm 程度の微小な GNP は最も広く用いられてきたサイズの 1 つである (Butterworth et al., 2010; Hainfeld et al., 2004; Lechtman and Pignol, 2017; Lechtman et al., 2011; Taggart et al., 2016)。しかし、本研究の結果から、GNP の均一分布を仮定して線量増加を推定した場合には、特に小さいサイズの GNP において線量増加を過大評価する恐れがあることが示唆された。また、多くの先行研究では、線量増加の計算において、まず GNP の表面から出る電子や光子の情報を位相空間 (phase space) に保存し、次にその情報を線源として用いる、という 2 段階の手法がとられてきた (Lin et al., 2014; Sung et al., 2017)。この手法は径方向の線量分布 (radial dose distribution) を計算するのに適しているものの、本研究で明らかとなったバイスタンダー GNP によるエネルギー吸収を考慮していないため、線量増加を正確に計算できていない可能性があり、今後の改善の余地があるといえる。

2.4.2 本研究の限界

本研究の限界点は何点かある。まず、本研究では細胞ファントムの外へ出る電子・光子については挙動を計算しなかった。なぜなら、本結果の焦点は細胞内でクラスタ

一を形成した GNP_s によるエネルギー吸収を計算することだったためである。特に GNP_s が均一分布した場合には一定数の GNP_s が細胞ファントム辺縁に位置することになるため、水に吸収されるエネルギーが過小評価されている可能性がある。しかし、この誤差を補正したとすると、 REA_{Macro} の定義 (式 2) より、均一分布時とクラスター形成時の REA_{Macro} の差 (図 2.8) はさらに広がることとなる。よって、本研究の結果である、クラスター形成時のほうが均一分布時よりも REA_{Macro} が高くなる、という結果は変わらないといえる。

次に、本研究では GNP_s サイズによって異なる細胞への取り込みやすさの影響を考慮していない。腫瘍細胞への取り込みに最適な GNP_s サイズは、いまだ明らかになっていない。例えば Chithrani らは直径 14, 50, 74 nm の GNP_s のうち、直径 50 nm が最も効率よく取り込まれたと報告しているが (Chithrani et al., 2006)、別のグループでは直径 20, 40, 60, 80 nm のうち 20 nm が最適であったと報告している (Perrault et al., 2009)。よって本研究では、GNP_s の細胞への取り込みやすさは GNP_s サイズにかかわらず一定とし、計算を行った。

また、計算の際には細胞核やミトコンドリア等、細胞の生存に重要な構造体の存在を考慮していない。これらの構造体は、GNP_s を用いた放射線増感治療の主要なターゲットである可能性が指摘されている (Ghita et al., 2017; McNamara et al., 2016; Taggart et al., 2016)。よって、将来的には実際の細胞内での GNP_s の空間分布を高精度に測定することで、これらの構造体に対するエネルギー付与を計算する必要がある。さらに、ROS の挙動をシミュレーションに組み込むことで、最終的な生物学的効果を推定できるようになるといえる。

2.5 小括

本章では、GNP_s によるクラスター形成と、クラスター内の GNP_s サイズ・濃度がエネルギー吸収に与える影響を推定した。クラスター形成時には均一分布時と比較して高い線量吸収がみられたが、これは発生した二次電子が近接した GNP_s に吸収されるためであることが明らかとなった。また、GNP_s のサイズが小さいとき、そして GNP_s が高濃度のときには GNP_s 間距離が特に接近するため、クラスター形成による影響が大きくなることが示された。以上から、GNP_s の均一分布を仮定したこれまでの研究は、特に GNP_s サイズが小さい場合に、実際の線量増加を過大評価している可能性があるといえる。本知見は、GNP_s による放射線治療の効果増強のためには、クラスター形成を考慮した線量吸収の影響を加味し、線量増加を効率的に向上させるた

めの GNP_s サイズ・濃度等のパラメータの選択が必要であることを示唆した。本検討は今後、高い放射線増感効果を得つつ、使用する GNP_s 量を最小限に抑えることで、副作用の少ない治療スキームの最適化につながる可能性があるといえる。

第3章 金ナノ粒子による血管破壊効果の音響血管造影を用いた評価

3.1 緒言

3.1.1 金ナノ粒子の微細血管破壊剤としての利用

腫瘍の微細血管は酸素や栄養を腫瘍細胞へと供給するだけでなく、転移の経路でもあることから、40年以上前から研究されてきた (Folkman, 1971, 1972)。このような微細血管を治療目的に破壊し、下流の腫瘍細胞への血流を遮断することで虚血や壊死を引き起こす薬剤を、血管破壊剤 (Vascular Disrupting Agents: VDAs) という (Clémenson et al., 2013; Denekamp et al., 1983; Hori et al., 2002; Siemann, 2011; Siemann and Rojiani, 2005)。第 1.4 節で述べたように、放射線と GNP の物理的相互作用から発生した二次電子は、周囲に局所的な線量増加を起こす。この特徴を応用し、GNPs を VDAs として利用する試みがなされてきた。すなわち、GNPs を腫瘍血管に標的させ放射線治療を行うと、GNPs 近傍の腫瘍血管内皮細胞に高線量を付与して血管を破壊できることが、これまでに *in vitro*, *in vivo* 実験、シミュレーションから示されている (Berbeco et al., 2011, 2012; Kunjachan et al., 2015)。

第 2 章では、GNPs を放射線増感剤として用いた場合、GNPs のクラスター形成を考慮しなければ線量増加が過大評価される可能性があることを示した。一方 GNP を血管破壊剤として用いる場合には、腫瘍血管内皮細胞と GNP が近接し、二次電子が内皮細胞に十分な線量を付与できるため、GNPs によるクラスター形成の影響を受けにくいことが報告されている (Berbeco et al., 2011; Kunjachan et al., 2015)。

3.1.2 治療効果の微細血管イメージングによる評価

腫瘍血管が重要である理由は、それが治療のターゲットになるためだけではない。治療後に腫瘍体積が減少し始めるよりも数週間前の段階で、腫瘍の微細血管には変化が見られることが報告されており、腫瘍血管は治療効果の早期の判定材料としての有用性も示されている (Brindle, 2008; Marcus et al., 2009)。よって、腫瘍血管の変化を評価することは診断・治療効果判定の両方に重要であり、近年注目されている。

治療に対する腫瘍微細血管の反応は、これまで様々なイメージング手法によって研究されてきた。これまでに報告されている手法には、例えば磁気共鳴画像 (Magnetic Resonance Imaging: MRI) (Hoff et al., 2012; O'Connor et al., 2007; Salmon and Siemann, 2006; Seshadri and Toth, 2009) やポジトロン断層法 (Positron Emission Tomography: PET)

(Kotz et al., 2009)、スペクトラルイメージング (Wankhede et al., 2010)、バイオルミネッセンスイメージング (Alhasan et al., 2012)、造影超音波撮像 (Wang et al., 2015)、パワードップラー超音波撮像 (Alhasan et al., 2012; Gee et al., 2001; Goertz et al., 2002) などがある。中でも Hoff らは、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) 阻害剤の効果を検証するために、ダイナミック造影 MRI (Dynamic Contrast-Enhanced MRI: DCE-MRI) と拡散強調 (Diffusion Weighted) MRI を用いている (Hoff et al., 2012)。しかし、前述の手法の空間分解能は、腫瘍の微細血管を描出するのに十分に高いとはいえない (Turkbey et al., 2009)。そのため、これらの手法を用いた微細血管の変化の定量化は、腫瘍血流 (Gee et al., 2001; Goertz et al., 2002; Salmon and Siemann, 2006; Seshadri and Toth, 2009)、光強度 (Alhasan et al., 2012)、薬物動態パラメータ (Hoff et al., 2012) の測定など、比較的巨視的な指標による検討に留まっていた。

3.1.3 音響血管造影 (Acoustic Angiography)

音響血管造影法 (Acoustic Angiography: AA) とは、マイクロバブル造影剤を用いた、比較的新しく非侵襲的な小動物用の腫瘍血管撮像法である (Dayton et al., 2014; Gessner et al., 2013a)。AA の特徴は、単一の超音波プローブから 2 種類の振動数の超音波を送受信できる点である。血管造影において AA は、低振動数の超音波を単一のプローブから送信することでマイクロバブルを共鳴させて高調波を生成し、反射した高振動数の超音波を受信することで、マイクロバブルが流れる血管を高解像度・高コントラストで描出することができる (Gessner et al., 2012, 2013b)。AA を用いては、これまでに血管新生阻害治療に対するマウス腫瘍微細血管の変化 (Rojas et al., 2018) や放射線治療に対するラット腫瘍微細血管の変化 (Kasoji et al., 2018) を定量的に評価できることが報告されてきた。しかし、ナノ粒子薬剤を介した血管破壊治療に対する腫瘍血管空間分布の変化は、これまで AA を用いては検討されていない。

そこで本研究では、マウス腫瘍に対し血管標的 GNP と放射線治療を組み合わせる血管破壊治療を行い、治療の前後で起こる腫瘍微細血管の三次元空間分布の変化を、AA を用いて評価することを目的とした。また、腫瘍血管分布の三次元的な不均一性を定量化するために、新しい指標を考案しその有用性を検討した。

3.2 方法

3.2.1 実験体系

すべての動物実験は、Dana-Farber Cancer Institute の Institutional Animal Care and Use Committee によって承認され、国際実験動物ケア評価認証協会 (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) に準拠して実施した。実験には Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Invitrogen, USA) で培養されたヒト非小細胞肺癌 (A549) 細胞を使用し、10%の fetal bovine serum (Invitrogen, USA)、1%のペニシリンとストレプトアビジン (Invitrogen, USA) で培養した。実験には生後 4-6 週齢のメス無胸腺ヌードマウス (nude-FOXn1) (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) を 9 体使用し、標準的な固形試料により飼育した。マウス背外側脇腹の皮下に、100 μ l の生理食塩水と共に 3×10^6 の A549 細胞を接種させた。マウスを 3 群: コントロール、放射線治療のみ、放射線治療と環状 Arginine-Glycine-Aspartic (RGD) acid により腫瘍血管を標的した GNP (RGD-GNP) に分けた。コア部の直径が 2-3 nm の GNP を眼窩静脈叢投与した。

GNPs 投与 24 時間前に小動物用放射線治療装置 (Small Animal Radiation Research Platform; Xstrahl, Inc., Suwanee, GA) を用いて腫瘍への画像誘導 X 線治療 (10 Gy) を行った (図 3.1)。腫瘍体積は caliper を用いて 0 日目 (照射前) から 3, 4 日おきに、照射後 62 日目まで計測を行った。腫瘍体積の計算には以下の式 (4) を用いた。

$$\text{Volume} = (\text{length} \times \text{width})^2 / 2 \quad (4)$$

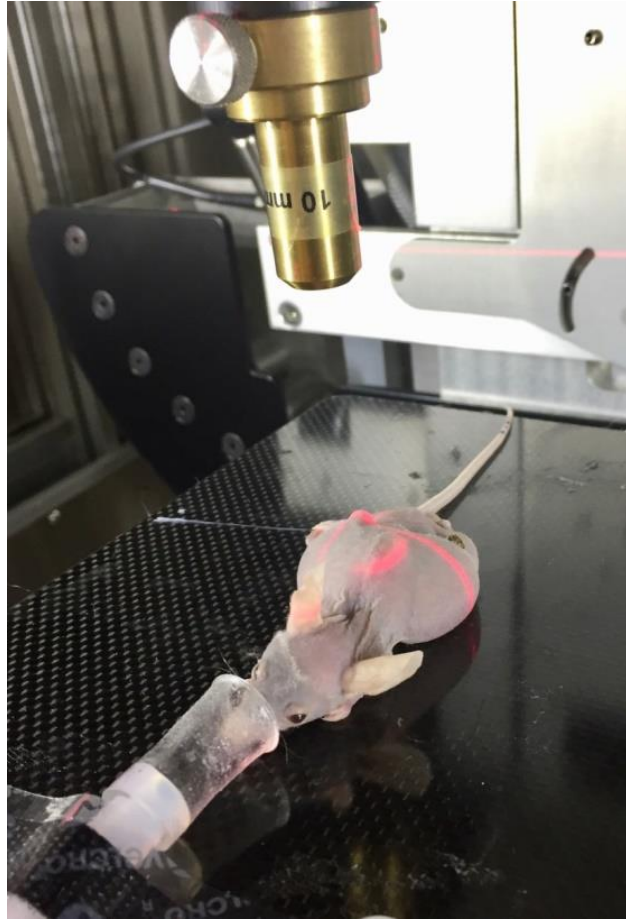


図 3.1 小動物用放射線治療装置によるマウス腫瘍への放射線治療体系。ガントリー(金色)を回転させて Cone-beam CT を撮影した。取得した CT 画像を基に治療計画を立案し、治療用 X 線を照射した。

3.2.2 超音波画像の取得

超音波画像の取得には、2 種類の振動数の超音波を送受信することができるロボティック超音波撮像装置のプロトタイプ機を用いた (SonoVol, Inc., Research Triangle Park, NC) (Czernuszewicz et al., 2018)。まず腫瘍の位置を確認するために三次元 B モード画像を取得し、腫瘍が撮像領域の中心に位置することを確認した後、続けてマイクロバブルを注入して AA 画像を取得した。

図 3.2 に画像取得の体系を示す。マウスに 2%イソフルランを吸入させ麻酔し、水で満たした撮影容器の底に設置した。マウスと水の間に超音波透過性の膜を置くことで、マウスが水やロボティック超音波トランスデューサと物理的に接触しないようにした。また、マウス体表と膜の接触面には少量の超音波ジェルを塗った。

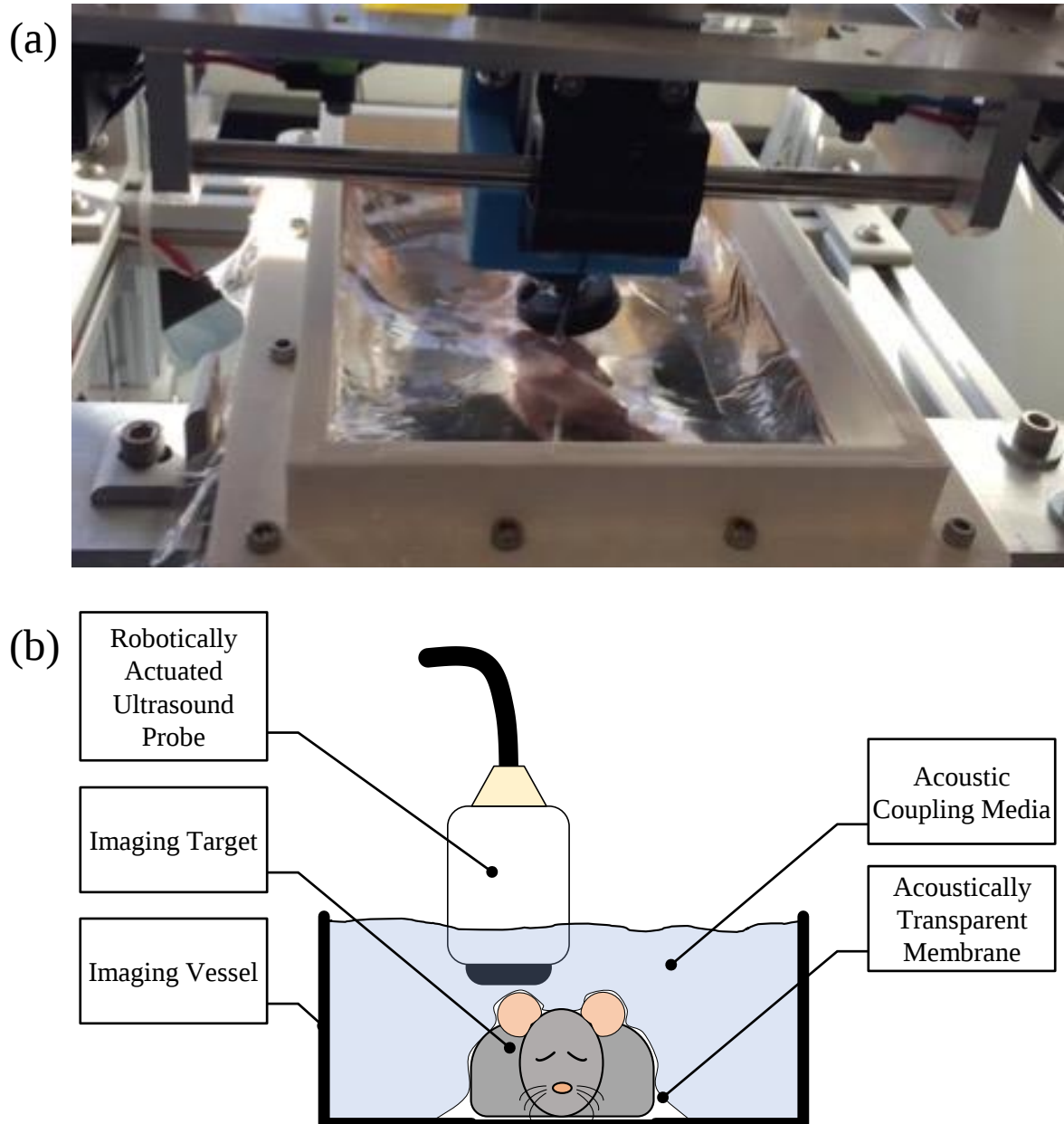


図 3.2 (a) 画像取得体系の写真。(b) 画像取得体系の模式図。水で満たした撮影容器の底に、麻酔下のマウスを設置した。マウスと水の間に超音波透過性の膜を置くことで、マウスが水・超音波トランスデューサと物理的に接触しないようにした。超音波トランスデューサを機械的に素早く走査させることで、B モード画像と AA 画像を取得した。AA 画像取得の際には尾静脈からマイクロバブルを注入して血管を造影した。

この装置の特徴であるロボティックトランスデューサは、体軸方向へ水平移動しながら素早く走査し超音波を送受信することで、広い範囲の三次元画像を取得することができる (Czernuszcwicz et al., 2018)。三次元画像は、連続的に取得した二次元画像から再構成した。B モード画像は 26 MHz の振動数で送受信し、AA 画像は 2 MHz で送信、26 MHz で受信した (Gessner et al., 2010)。B モード画像と AA 画像を一定のフレームレート (それぞれ 14, 8 Hz) で取得し、取得直後に (60, 60, 200) μm のボクセル間隔で位置合わせを行った。

AA 画像取得の際には、造影剤であるマイクロバブル (Advanced Microbubbles Laboratories, Boulder, CO) を 28 ゲージの尾静脈用カテーテルから 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で、無菌生理食塩水に対し 4.5×10^9 bubbles/mL の濃度で注入した。画像取得にかかった時間は約 5 分であった。

AA には、2 種類の撮像モード: 血管密度 (Blood Vessel Density: BVD) モードと、BVD モードの maximum intensity projection である血管形態 (Blood Vessel Morphology: BVM) モードがある (Czernuszcwicz et al., 2018)。本研究では、BVD モードを腫瘍血管密度の定量化に使用し、BVM モードを腫瘍内の血管分布の可視化及び定性的な評価に使用した。

3.2.3 画像解析

画像解析の流れを図 3.3 (a) に示す。まず、B モード画像上で腫瘍輪郭を三次元的にセグメンテーションした (図 3.3 (b))。セグメンテーションには 3D Slicer (version 4.8.0) の Editor モジュールを用いた (Fedorov et al., 2012)。セグメンテーションにより腫瘍輪郭を示す三次元的バイナリ画像を取得した (図 3.3 (c))。ここで、腫瘍の深さ方向への血管分布、すなわち腫瘍内部における血管の三次元空間分布を評価するために、三次元腫瘍セグメントに Danielsson distance フィルタ (Danielsson, 1980) を適用した (図 3.3 (d))。Danielsson distance フィルタとは、三次元腫瘍セグメント内の各ピクセル値を、腫瘍辺縁からのユークリッド距離に応じて変化させるフィルタである (腫瘍辺縁を低輝度に、腫瘍深部を高輝度にする)。以下、このフィルタを適用して作成したミリメートル単位の距離マップを Danielsson Distance Map (DDM) と呼ぶこととする。

次に、AA 撮影の BVD モード (図 3.3 (e)) 上でしきい値処理を行い、腫瘍の微細血管をセグメンテーションした (図 3.3 (f))。しきい値処理には MATLAB (Mathworks, Natick, MA) を用い、画像の最大輝度に対する 45%以上の輝度の領域を、マイクロバ

ブルが存在する微細血管と定義した。このしきい値は、肉眼で認識できる血管分布をできるだけ反映するよう主観的に決定された。

続いて、腫瘍の深さ情報を表す DDM と、BVD モードで得た微細血管分布を統合することで、累積血管密度 (Cumulative Vessel Density: CVD) ヒストグラムを生成した。CVD ヒストグラムは本研究において初めて定義された指標であり、腫瘍辺縁からの相対深に対する、血管密度を表す (図 3.4 (a))。言い換えると、CVD ヒストグラムは腫瘍辺縁からの単位深さごとに、その点より深部に位置する血管の体積が、腫瘍全体の血管体積に占める割合で計算される。CVD ヒストグラムから、CVD が 50%になるときの相対的な深さとして 50% Vessel Penetration Depth (VPD₅₀) を定義した。VPD₅₀ は、腫瘍辺縁から見て血管密度が半減するときの相対深とも解釈することができ、腫瘍深部の血管密度を表す。図 3.4 に腫瘍内部の血管分布の変化が CVD ヒストグラムと VPD₅₀ を用いてどのように表現されるかの例を示す。治療前 (青色) では VPD₅₀ は 28%程度と高いのに対し、治療 15 日後 (黄色) では VPD₅₀ は 17%程度である。これは、治療前には図 3.4 (b) のように腫瘍深部に血管が存在しているのに対し、治療 15 日後には図 3.4 (c) のように深部の血管体積が減少したことで、腫瘍辺縁に存在する血管体積が全体に占める割合が増加したことを表している。

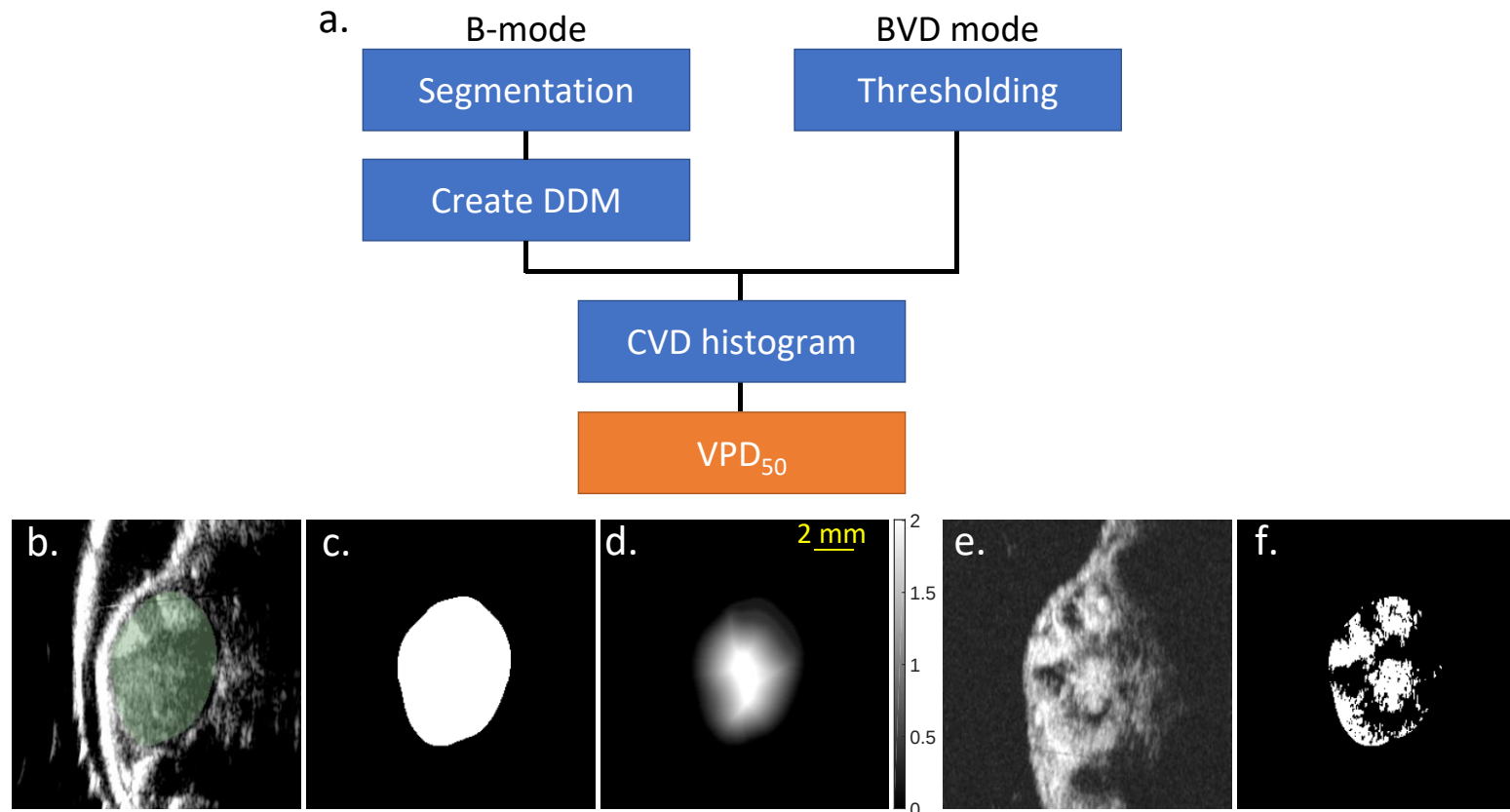


図 3.3 (a) 画像解析の流れ。画像解析によって VPD_{50} を取得し、血管分布の評価に用いた。(b) B モード画像上で腫瘍を三次元的にセグメンテーションした (緑色)。(c) セグメンテーションされた腫瘍のバイナリ画像。(d) 腫瘍セグメントに Danielsson distance フィルタを適用して作成した、腫瘍の DDM。濃淡は辺縁からのユークリッド距離をミリメートル単位で表し、腫瘍深部が高輝度となる。(e) AA で取得された、BVD モード画像。マイクロバブルが存在する血管が高輝度で表されている。(f) 腫瘍内の BVD モード画像にしきい値処理をして微細血管をセグメントした画像。(d) と (f) を統合することで CVD ヒストグラムを生成し、 VPD_{50} を計算した。

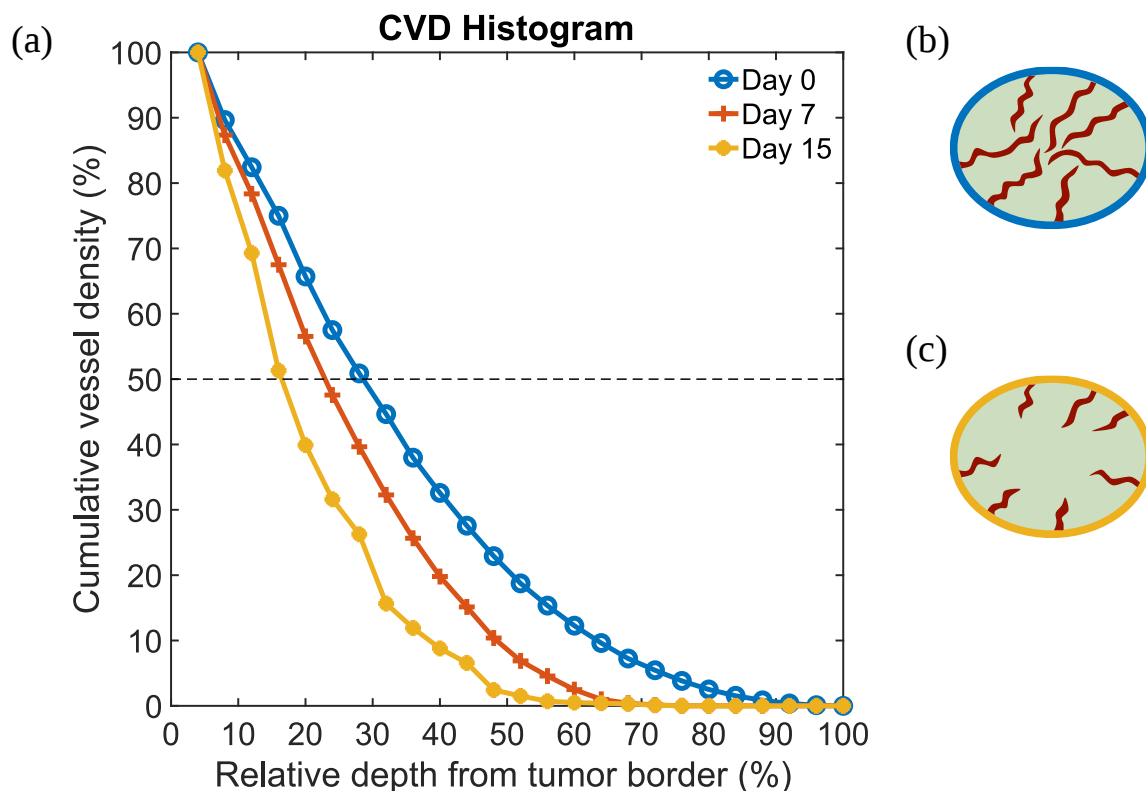


図 3.4 (a) マウス 1 体について、3 つの時点 (治療前、治療 7 日後、治療 15 日後) における CVD ヒストグラム。腫瘍縁からの相対距離は、0, 100% がそれぞれ腫瘍縁、腫瘍最深部に相当する。黒破線は 50% CVD を示し、CVD ヒストグラムと交わる深さが VPD₅₀ となる。このマウスの例では、治療後の時間経過に伴い、(b) から (c) へと腫瘍深部の血管体積が減少しており、腫瘍縁に分布する血管体積が全体に占める割合が増加している。

3.3 結果

3.3.1 腫瘍体積の測定結果

図 3.5 に Caliper と超音波撮影の B モードで測定された腫瘍体積の関係を示す。データ点は、個々のマウスの各時点における腫瘍体積を表す。二つの手法の測定結果は完全には一致しなかったが ($R^2 = 0.67$)、これは Caliper では体表面で測定するのに対し、B モードでは腫瘍深部までを測定に含めることができるためである。

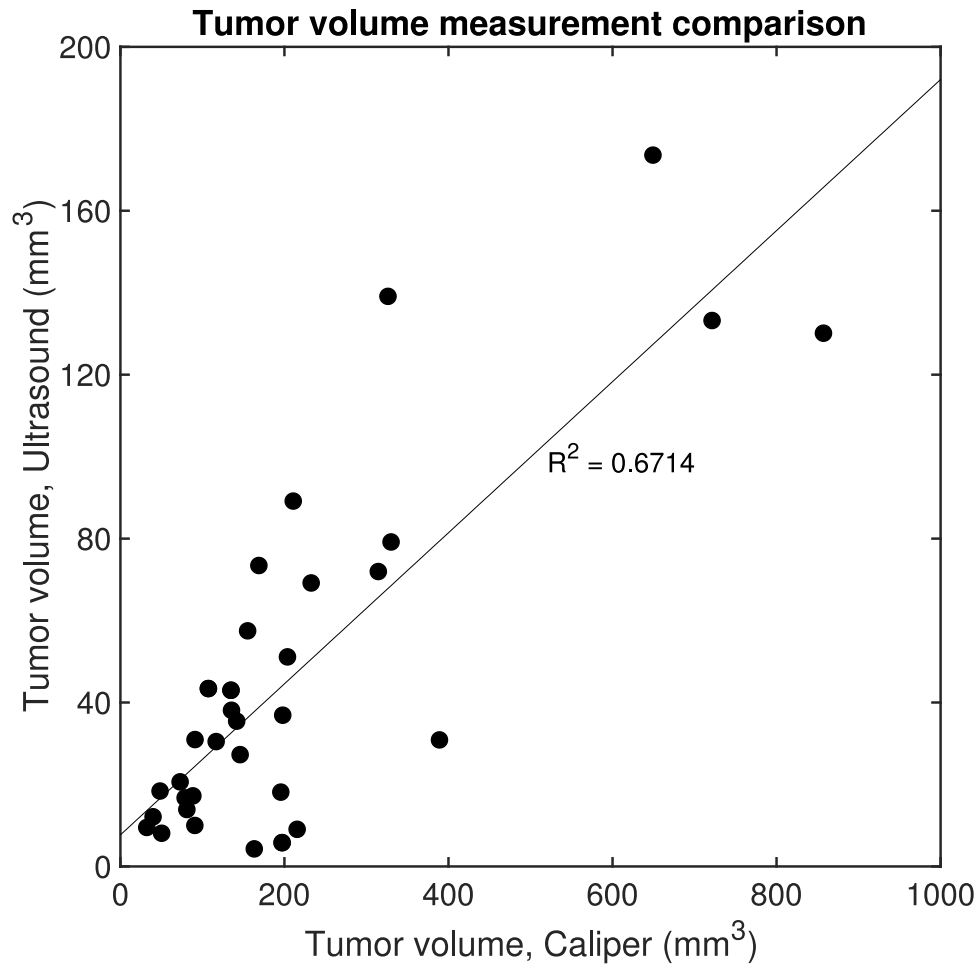


図 3.5 Caliper と超音波撮影の B モードで測定された、マウス腫瘍体積の関係。データ点は、それぞれのマウスの各測定時点における腫瘍体積を表す。

3.3.2 腫瘍血流の定量化

コントロールのマウス腫瘍の B モード画像、AA の BVD モード画像の例をそれぞれ図 3.6 (a) と (b) に示す。前述の通り、B モード画像は腫瘍輪郭のセグメンテーションに用い、血流情報を持つ BVD モード画像は微細血管分布の定量化に用いた。図 3.6 (c) に AA の BVM モードの例を示す。BVM モードは BVD モード (図 3.6 (b)) の maximum intensity projection で得られ、腫瘍血管の構造や形態の定性的な評価に用いた。

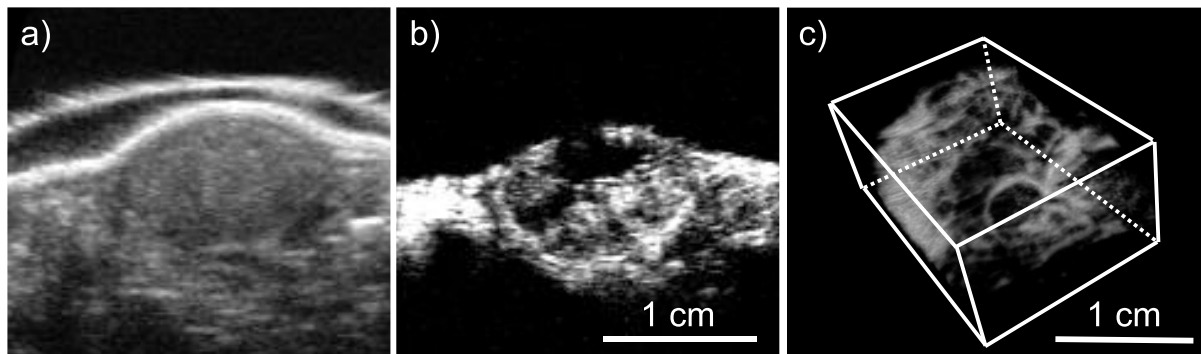


図 3.6 (a) B モード画像。腫瘍輪郭のセグメンテーションに用いた。(b) AA の BVD モード画像。微細血管分布の定量化に用いた。(c) AA の BVM モードの画像。腫瘍血管の構造や形態の定性的な評価に用いた。(a), (b), (c) はすべて同一のマウス腫瘍の画像である。

放射線治療のみを行ったマウス腫瘍 (RT-only) と、血管標的 GNP_s と放射線治療を組み合わせる血管破壊治療を行ったマウス腫瘍 (RGD-GNP+RT) の、3つの時点 (治療前、治療 24 時間後、治療 1 週間後) における BVD モード画像の例を図 3.7 に示す。RGD-GNP+RT のマウスでは治療 24 時間後には腫瘍内で血流がみられたものの、治療 1 週間後には血流が低下した。これらのマウス腫瘍の血流量の経時的な変化を、しきい値処理によって定量化したものを図 3.8 に示す。データ点は各マウスの治療前の血流量で正規化されている。図 3.7 で見られた定性的な傾向は、定量的な評価である図 3.8 でも見られた。治療 24 時間後では、RGD-GNP+RT マウスは RT-only マウスと比較してはるかに高い血流量を示し、相対血流量はそれぞれ 20.9、1.71 であった。RGD-GNP+RT マウスの腫瘍血流量はその後低下したが、治療 16 日後までは RT-only と比較して高い血流量を示した。

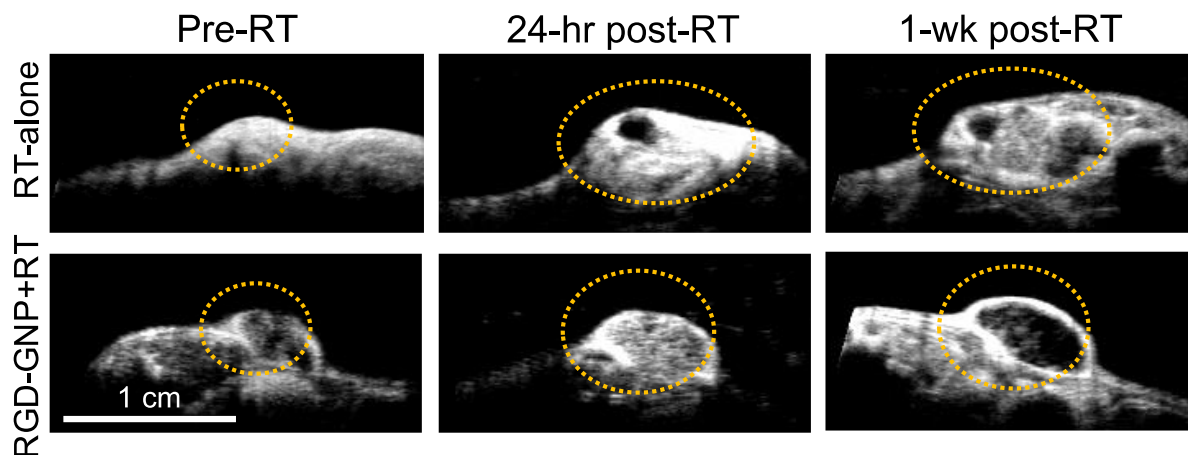


図 3.7 放射線治療のみを行ったマウス腫瘍 (RT-alone) と血管標的 GNP と放射線治療を組み合わせる血管破壊治療を行ったマウス腫瘍 (RGD-GNP+RT) の、治療前、治療 24 時間後、治療 1 週間後の代表的な BVD モード画像。

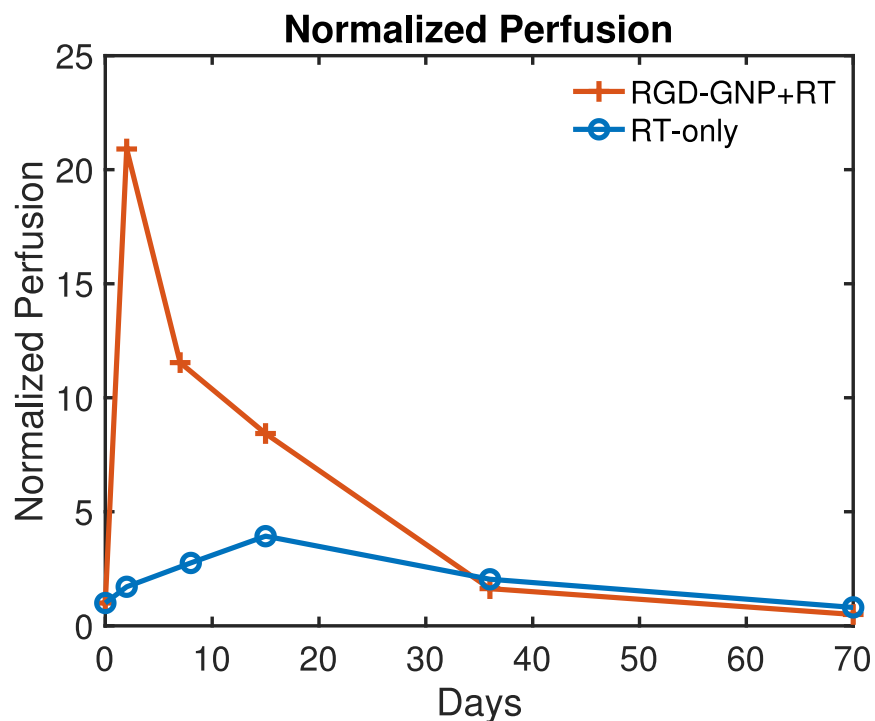


図 3.8 放射線治療のみを行ったマウス腫瘍 (RT-only) と、放射線治療と GNP を組み合わせる血管破壊治療を行ったマウス腫瘍 (RGD-GNP+RT) の血流の経時的変化の代表例。データ点はそれぞれのマウスの治療前の血流量で正規化されている。

次に、コントロール群の3体のマウス (animal #1, #2, #3) における、治療0日目 (治療前) の VPD_{50} と1週間成長率の関係を図3.9 (左) に示す。1週間成長率は治療0日目と7日目の腫瘍体積の比で定義され、腫瘍の成長の早さを表す。図3.9 (左) から、 VPD_{50} と1週間成長率の間には正の関係がみられた。これら3体のマウス (animal #1, #2, #3) における、治療0日目のBモード画像とBVDモード画像を重ね合わせたものを図3.9 (a), (b), (c) に示す。図3.9 (左) において、Animal#3 (黄色) は他の2体と比較して極端に低い1週間成長率と VPD_{50} を示した。さらに図3.9 (c) から、Animal#3 は他の2体 (図3.9 (a), (b)) と比較して治療0日目の腫瘍内の血流が乏しいこと見られた。すなわち、Animal#3 の腫瘍は治療0日目にもかかわらず、深部の血管が乏しい、もしくは壊死状態にあるために、 VPD_{50} が低くなった可能性がある。

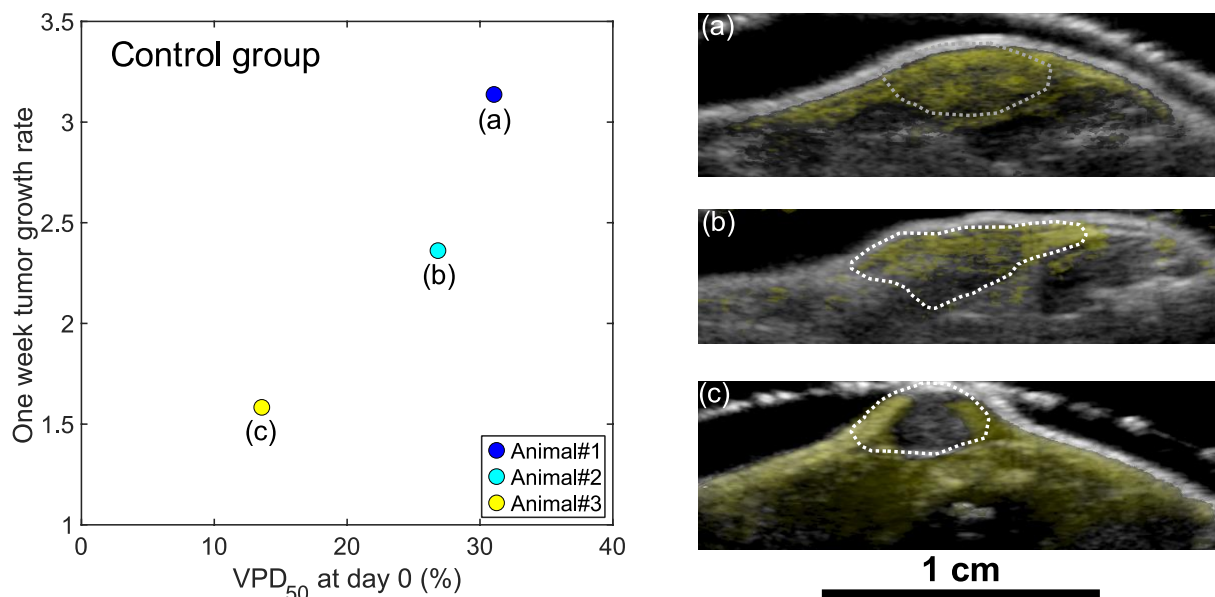


図3.9 (左): コントロール群の3体のマウス (animal #1, #2, #3) における、治療0日目 (治療前) の VPD_{50} と1週間成長率の関係。(a), (b), (c): それぞれ animal #1, #2, #3 における、Bモード (グレースケール) とAAのBVDモード (黄色) の重ね合わせ画像。(a) と (b) では腫瘍内で豊富な血流がみられたのに対し、(c) では腫瘍内部で血流が乏しいことが確認され、 VPD_{50} と1週間成長率ともに低い値であった。点線は腫瘍輪郭を示す。

3.4 考察

3.4.1 本研究結果の解釈

本研究では、AA を用いて血管標的 GNP_s と放射線治療による血管破壊治療の効果を定量化した。微細血管の三次元空間分布の変化を、AA により非侵襲的かつ高空間分解能で評価できることを示した。

これまでにいくつかのグループから、VDAs を用いた治療の後には腫瘍血流が低下するという報告がされている (Hoff et al., 2012; Salmon and Siemann, 2006)。一方本研究では、血管破壊の 24 時間後に一時的な血流の増加がみられたのち、1 週間後には急激に低下した (図 3.8)。この結果は、血管標的 GNP_s と放射線治療を組み合わせた血管破壊によりマイクロバブルが血管外に一時的に放出されたことで、BVD 画像上で高信号として現れたためである可能性がある。先行研究では、血管標的 GNP_s と放射線治療を組み合わせることで腫瘍への GNP_s 輸送効率が上昇したという報告があり (Kunjachan et al., 2015)、本研究の結果はこの傾向と合致する。

AA で撮影された微細血管空間分布の定量化には、過去に tortuosity (Gessner et al., 2012) や volumetric vascular density (Kasoji et al., 2018) といった指標が用いられてきた。また、パワードップラー超音波装置で撮影した腫瘍血管の三次元分布を評価するために、空間血管走行パターン (Spatial Vascularity Pattern: SVP) という指標を用いた報告もある (Caresio et al., 2018)。この SVP とは、腫瘍内の血管の三次元分布を 0 か 1 のどちらかの数字で表す指標である。一方本研究では、SVP と同様に血管の三次元分布を評価するために、腫瘍辺縁からの深さを考慮した CVD ヒストグラムを新たに定義した。前述の指標とは異なり、CVD ヒストグラムから抽出したパラメータ VPD₅₀ は、「血管体積の半減深」に相当する指標である。よって図 3.4 に示したように、VPD₅₀ を用いることで腫瘍内部の血管三次元分布の変化を効果的に評価することができる可能性があるといえる。

コントロール群において、治療 0 日目の VPD₅₀ と 1 週間成長率の間には正の関係がみられた (図 3.9)。これは、初期の腫瘍の血流状態が、将来的な腫瘍の成長度を決定するパラメータの一つであることを示し、AA を用いて腫瘍の増殖率を予測できる可能性があるといえる。さらにこの結果から AA の新たな応用方法が考えられる。すなわち、長期的にはコホート内で外れ値となる可能性の高い個体を、治療 0 日目の段階で血流状態をもとに群から除外する、という目的に AA を応用できる可能性がある。一般に、群内における腫瘍個々のサイズや状態にはばらつきが大きい。コホートから除外されるべき個体を AA によって早期に客観的に決定することができれば、治療に

対する反応の個体間のばらつきを小さくすることにつながり、治療効果の評価をしやすくなるといえる。

3.4.2 本研究の限界

本研究では、CVD ヒストグラムを生成するために DDM を用いた。この手法は、血管破壊後の腫瘍血管体積の減少が腫瘍核心部 (最深部) からはじまる、ということを仮定している。この仮定が放射線治療時に妥当であることは過去に示されている (Fokas et al., 2010; Ng et al., 2007)。しかし、血管標的 GNP と放射線治療による血管破壊時に関してはこのような傾向は十分に示されていないため、将来的により大きいコホートでの実験によって明らかにされる必要がある。

また、本研究で用いたマウス数は計 9 体と、比較的小さいコホートでの検討であった。これは、マウス尾静脈に適切にマイクロバブルを注入する作業が当初の予想以上に高い技術を要したため、長時間の注入作業をする中で何体かのマウスが死に、9 体のみが長期間生存したためである。よって、同様の実験を行う場合には、小動物への薬剤投与の経験の多い者の協力が必要だと思われる。本研究においても、同様の経験の豊富な獣医師の協力を得てからは、安定してマイクロバブルの注入を成功させることができた。

3.4.3 今後の展望

本研究では血管標的 GNP と放射線治療による血管破壊効果を評価したが、血管を破壊した後には腫瘍への酸素の供給が絶たれるため、腫瘍内部では一時的な低酸素状態 (Hypoxia) が生じる可能性がある。一般に、放射線治療時には細胞内の酸素濃度が高いほど ROS が発生しやすいため、放射線の生物学的効果が高くなることが知られている。すなわち、血管破壊治療後に腫瘍細胞が低酸素状態になるとすると、その後続く放射線治療の生物学的効果が低くなる可能性がある。よって、今後は低酸素状態の程度や空間分布を評価する必要があるといえる。低酸素状態を評価する方法には、小動物に HypoxiSense680 などの低酸素領域標的薬剤を投与する fluorescence imaging や、病理学的な手法がある。しかし、これらの手法は侵襲的であり、また前者は空間分解能が低いという欠点がある。一方、空気吸入時と高濃度酸素吸入時の腫瘍の MRI 信号を比較する、Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) 法や Tissue Oxygen Level Dependent (TOLD) 法であれば、非侵襲的かつ高空間分解能な評価が可能であるため、血管破壊後の低酸素領域イメージングに有効な可能性がある。これまでに、ラット腫

瘍に高線量の放射線治療を行った後に生じる低酸素領域については、BOLD 法と TOLD 法の有効性が報告されている (Hallac et al., 2014; Zhou et al., 2017)。

また、本研究では血管破壊 24 時間後にマイクロバブルが腫瘍血管外に漏出したことが示唆された。よって、血管標的 GNP_s と放射線治療による血管破壊に続いて化学療法を行うことで、薬剤の腫瘍への輸送効率を高められる可能性がある。

3.5 小括

本研究では、血管標的 GNP_s と放射線治療による血管破壊前後の微細血管三次元分布の変化を、AA を用いて定性的・定量的に評価した。血管標的 GNP_s と放射線治療による血管破壊効果の評価に AA が有効であることが示唆された。血管の三次元分布を表す新しい指標として CVD ヒストグラムと VPD₅₀ を導入し、その有用性を示した。また、腫瘍の微細血管分布を AA によって把握し、腫瘍の将来的な増殖率を予測できる可能性が示唆された。

第4章 総括及び結論

①本研究全体から得られた新知見

- GNPがクラスターを形成した場合には、均一分布時と比べて GNP間距離が接近し、GNPから放出された二次電子が近傍の GNPに吸収されやすくなるため、GNPによる線量吸収が増加することが明らかとなった。
- 一定重量濃度の場合、GNPサイズが小さいほどクラスター形成による線量吸収の影響が顕著になることが示された。
- 小動物の実験において、血管標的 GNPと放射線治療の併用療法による血管破壊効果の評価に AAが有効であることが示された。
- AA画像の解析において、腫瘍微細血管の三次元分布を定量的に評価する指標として、CVDヒストグラムと VPD₅₀を新たに導入し、その有用性が示された。

②新知見の意義

- GNPのクラスター形成を考慮せずに線量増加を推定すると、実際の線量増加を過大評価する可能性があるといえる。
- GNPを放射線増感剤として用いる場合に、GNPによる線量吸収を加味し、線量増加を効率的に向上させるための GNPサイズ・濃度等のパラメータの選択に有用であるといえる。
- 腫瘍の微細血管分布を AAによって把握し、腫瘍の将来的な増殖率を予測できる可能性があることが示唆された。
- 小動物を用いた実験において、実験初期の微細血管を AAによって撮影し血管の三次元分布を定量的に把握することで、異常な状態にある個体を早期に客観的に除外し、コホート内での個体間の腫瘍状態のばらつきを小さくするという、AAの新しい利用方法を提案した。

③本研究から得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

- GNPに吸収される放射線量を計算したことで、今後は高い放射線増感効果を得つつ、使用する GNP量を最小限に抑えるという、治療スキームの最適化の検討を行うことができる。
- 腫瘍血管破壊後には、腫瘍内で低酸素状態になることが予想される。腫瘍内の酸素濃度は放射線治療の生物学的効果に影響するため、今後は血管破壊後の低酸素状態の程度や空間分布を評価する必要がある。

- 血管標的 GNP_s と放射線治療による血管破壊に続いて化学療法を行うことで、薬剤の腫瘍への輸送効率を高められるかどうかを検討する。

④今後の課題

- 本研究では、計算の際には細胞核やミトコンドリア等、細胞の生存に重要な構造体の存在を考慮していない。これらの構造体は、GNP_s を用いた放射線増感治療の主要なターゲットである可能性が指摘されている。よって、今後は実際の細胞内での GNP_s の空間分布を高精度に測定し、その分布をもとに細胞核やミトコンドリア等への線量増加を計算する必要がある。また、ROS の挙動をシミュレーションに組み込むことが、生物学的効果の推定に有用である。
- 本研究で用いたマウス数は 9 体と少数であるため、より大規模な検討が必要である。また、今後の AA 撮影の際にはマウス尾静脈にマイクロバブルを正確に注入する技術の訓練が必要である。
- 血管標的 GNP_s と放射線治療の併用療法では、これまでに電子顕微鏡や MRI を用いた手法においては血管破壊効果が示唆されていたものの、今回の Acoustic Angiography を用いた検討では、必ずしもこの組み合わせが効果を保証するものではないことが示された。第 2 章において示されたように、GNP_s のサイズや濃度の最適化等により、血管標的 GNP_s と放射線治療の効果も、より精密な検討が必要であると考えられる。具体的には、GNP_s 投与法の最適化、放射線の線量の最適化、そして、今回考案した指標を用いた、生体における併用効果の定量化等が挙げられる。

謝辞

本研究は、JSPS 特別研究員奨励費 17J03616 並びに JSPS 若手研究者海外挑戦プログラムの助成を受けたものである。本論文は北海道大学医学研究科ならびに米国 Brigham and Women's Hospital, Dana-Farber Cancer Institute, and Harvard Medical School において、清水 伸一教授、白土 博樹教授、Ross Berbeco 准教授の御指導のもと、研究成果をまとめたものである。研究に際して、多くの方々の御助力を賜りましたことを末尾ながらここに御礼申し上げます。

指導教員である北海道大学大学院医学研究院放射線医理工学教室 清水 伸一教授には丁寧で有益な御助言と御指摘を頂きました。心より感謝の意を表します。北海道大学大学院医学研究院陽子線治療医学教室 白土 博樹教授には研究者としての心構え等について御指導と御助言を頂き、また 1 年 4 ヶ月間の米国留学の機会を頂いたことに謹んで感謝の意を表します。

留学先であった Brigham and Women's Hospital, Dana-Farber Cancer Institute, and Harvard Medical School 放射線腫瘍学部門の Ross Berbeco 准教授、Jeremy Bredfeldt 臨床医学物理士長には、研究者としての可能性を広げる有益な御指導を頂きました。Needa A. Virani 博士研究員、Marios Myronakis 元博士研究員、Sijumon Kunjachan 助教には、金ナノ粒子を用いた生物実験や画像解析など、私になじみの薄かった知識・技術を快く御教授頂きました。また、留学中に会った多数の研究者の皆様には、多岐にわたる御助言や激励のお言葉を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

北海道大学大学院工学研究院量子理工学部門 松浦 妙子准教授、北海道大学大学院医学研究院放射線治療科 橋本 孝之特任准教授、名古屋市立大学大学院医学研究科 歳藤 利行先生、北海道大学大学院保健科学研究院 石川 正純教授と石川研究室の皆様には、研究方針やデータ解析に関して多大な御助言を頂きました。深く感謝致します。

SonoVol 社の Rajalekha M. Rajamahendiran 研究員、Tomasz J. Czernuszewicz 最高技術責任者、Ryan Gessner 最高経営責任者には、Acoustic Angiography 画像の取得・解析について丁寧な御助言を頂きました。御礼申し上げます。

北海道大学国際連携研究教育局量子医理工学グローバルステーションの Kenneth Sutherland 助教、Anastasia Makarova 元博士研究員、Hao Peng 訪問研究員には、モンテカルロシミュレーションの構築と研究方針について、多大な御協力を頂きました。また、Qiong Xu 元博士研究員、Jeff Wang 博士研究員、Qin Zhang 元訪問研究員、北海道大学医学研究科 野村 友祐氏とは、居室を共にする中で、互いに助け合い、切磋琢磨しながら研究に励むことができました。心から感謝いたします。

最後に、4 年間にわたる私の博士課程の生活を支えてくれた家族に、この場をお借りして心より御礼申し上げます。ありがとうございました。

権 池 勲

利益相反

本論文における第3章の基礎論文 “Use of 3D contrast-enhanced ultrasound to evaluate tumor microvasculature after nanoparticle-mediated modulation” について、共著者である Rajalekha M. Rajamahendiran, Max Harlacher, Tomasz J. Czernuszewicz, Ryan Gessner は、Acoustic Angiography 装置を開発・販売している SonoVol 社と雇用関係にある。

引用文献

Agostinelli, S., Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Araujo, H., Arce, P., Asai, M., Axen, D., Banerjee, S., Barrand, G., et al. (2003). Geant4—a simulation toolkit. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 506, 250–303.

Ahn, S.H., Chung, K., Shin, J.W., Cheon, W., Han, Y., Park, H.C., and Choi, D.H. (2017). Study on dependence of dose enhancement on cluster morphology of gold nanoparticles in radiation therapy using a body-centred cubic model. *Phys. Med. Biol.* 62, 7729–7740.

Alhasan, M.K., Liu, L., Lewis, M.A., Magnusson, J., and Mason, R.P. (2012). Comparison of Optical and Power Doppler Ultrasound Imaging for Non-Invasive Evaluation of Arsenic Trioxide as a Vascular Disrupting Agent in Tumors. *PLoS One* 7, e46106.

Allison, J., Amako, K., Apostolakis, J., Araujo, H., Dubois, P.A., Asai, M., Barrand, G., Capra, R., Chauvie, S., Chytrcek, R., et al. (2006). Geant4 developments and applications. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 53, 270–278.

American Cancer Society (2017). Radiation Therapy Basics, <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/basics.html>. [2019, October. 15]

Amorino, G.P., Freeman, M.L., Carbone, D.P., Lebwohl, D.E., and Choy, H. (1999). Radiopotentiality by the oral platinum agent, JM216: Role of repair inhibition. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 44, 399–405.

Arnida, Janát-Amsbury, M.M., Ray, A., Peterson, C.M., and Ghandehari, H. (2011). Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 417–423.

Berbeco, R.I., Ngwa, W., and Makrigiorgos, G.M. (2011). Localized dose enhancement to tumor blood vessel endothelial cells via megavoltage X-rays and targeted gold nanoparticles: New potential for external beam radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 81, 270–276.

Berbeco, R.I., Korideck, H., Ngwa, W., Kumar, R., Patel, J., Sridhar, S., Johnson, S., Price, B.D., Kimmelman, A., and Makrigiorgos, G.M. (2012). DNA Damage Enhancement from Gold Nanoparticles for Clinical MV Photon Beams. *Radiat. Res.* 178, 604–608.

Berger, M.J., Hubbell, J.H., Seltzer, S.M., Chang, J., Coursey, J.S., Sukumar, R., Zucker, D.S., and Olsen, K. (2010). XCOM: Photon Cross Section Database (version 1.5). [Online] Available [Http//Physics.Nist.Gov/Xcom](http://Physics.Nist.Gov/Xcom) [2019, Sept. 17].

Brahme, A., Roos, J.E., and Lax, I. (1982). Solution of an integral equation encountered in rotation therapy. *Phys. Med. Biol.* 27, 1221–1229.

- Brindle, K. (2008). New approaches for imaging tumour responses to treatment. *Nat. Rev. Cancer* 8, 94–107.
- Brun, E., Sanche, L., and Sicard-Roselli, C. (2009). Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 72, 128–134.
- Butcher, J.C., and Messel, H. (1960). Electron number distribution in electron-photon showers in air and aluminium absorbers. *Nucl. Phys.* 20, 15–128.
- Butterworth, K.T., Wyer, J.A., Brennan-fournet, M., Latimer, C.J., Shah, M.B., Currell, F.J., and Hirst, D.G. (2008). Variation of Strand Break Yield for Plasmid DNA Irradiated with High- Z Metal Nanoparticles. *Radiat. Res.* 387, 381–387.
- Butterworth, K.T., Coulter, J. a, Jain, S., Forker, J., McMahon, S.J., Schettino, G., Prise, K.M., Currell, F.J., and Hirst, D.G. (2010). Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology* 21, 295101.
- Caresio, C., Caballo, M., Deandrea, M., Garberoglio, R., Mormile, A., Rossetto, R., Limone, P., and Molinari, F. (2018). Quantitative analysis of thyroid tumors vascularity: A comparison between 3-D contrast-enhanced ultrasound and 3-D Power Doppler on benign and malignant thyroid nodules. *Med. Phys.* 45, 3173–3184.
- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., and Chan, W.C.W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6, 662–668.
- Chithrani, D.B., Jelveh, S., Jalali, F., van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R.G., Hill, R.P., and Jaffray, D. a. (2010a). Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiat. Res.* 173, 719–728.
- Chithrani, D.B., Dunne, M., Stewart, J., Allen, C., and Jaffray, D.A. (2010b). Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6, 161–169.
- Cho, S.H. (2005). Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys. Med. Biol.* 50, N163–N173.
- Cho, S.H., Jones, B.L., and Krishnan, S. (2009). The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources. *Phys. Med. Biol.* 54, 4889–4905.

Clémenson, C., Chargari, C., and Deutsch, E. (2013). Combination of vascular disrupting agents and ionizing radiation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *86*, 143–160.

Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J., and Wyatt, M.D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* *1*, 325–327.

Couvreur, P., and Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease.

Czernuszewicz, T.J., Papadopoulou, V., Rojas, J.D., Rajamehendiran, R.M., Perdomo, J., Harlacher, M., O’Connell, G., Zukic, D., Aylward, S.R., Dayton, P.A., et al. (2018). A New Preclinical Ultrasound Platform for Widefield 3D Imaging of Rodents. *Rev. Sci. Instrum.* *89*, 075107.

Danielsson, P.E. (1980). Euclidean distance mapping. *Comput. Graph. Image Process.* *14*, 227–248.

Dayton, P.A., Gessner, R.C., Phillips, L., Shelton, S.E., Heath Martin, K., Lee, M., and Foster, F.S. (2014). The implementation of acoustic angiography for microvascular and angiogenesis imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 4283–4285.

Denekamp, J., Hill, A., and Hobson, B. (1983). Vascular Occlusion and Tumour Cell Death. *Eur J Cancer Clin Oncol* *19*, 271–275.

Detappe, A., Kunjachan, S., Drané, P., Kotb, S., Myronakis, M., Biancur, D.E., Ireland, T., Wagar, M., Lux, F., Tillement, O., et al. (2016). Key clinical beam parameters for nanoparticle-mediated radiation dose amplification. *Sci. Rep.* *6*, 34040.

Douglass, M., Bezak, E., and Penfold, S. (2013). Monte Carlo investigation of the increased radiation deposition due to gold nanoparticles using kilovoltage and megavoltage photons in a 3D randomized cell model. *Med. Phys.* *40*, 071710.

Eastman, A., and Barry, M.A. (1987). Interaction of trans-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation of Monofunctional Adducts and Their Reaction with Glutathione. *Biochemistry* *26*, 3303–3307.

Fedorov, A., Beichel, R., Kalphaty-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robbin, J.-C., Pujol, S., Bauer, C., Jennings, D., Fennessy, F., Sonka, M., et al. (2012). 3D slicers as an image computing platform for the quantitative imaging network. *Magn. Reson. Imaging* *30*, 1323–1341.

Fokas, E., Hänze, J., Kamlah, F., Eul, B.G., Lang, N., Keil, B., Heverhagen, J.T., Engenhart-Cabillic, R., An, H., and Rose, F. (2010). Irradiation-dependent effects on tumor perfusion and

endogenous and exogenous hypoxia markers in an A549 xenograft model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 77, 1500–1508.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.

Folkman, J. (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* 175, 409–416.

Gee, M.S., Saunders, H.M., Lee, J.C., Sanzo, J.F., Jenkins, W.T., Evans, S.M., Trinchieri, G., Sehgal, C.M., Feldman, M.D., and Lee, W.M.F. (2001). Doppler Ultrasound Imaging Detects Changes in Tumor Perfusion during Antivascular Therapy Associated with Vascular Anatomic Alterations. *Cancer Res.* 61, 2974–2982.

Geng, F., Song, K., Xing, J.Z., Yuan, C., Yan, S., Yang, Q., Chen, J., and Kong, B. (2011). Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology* 22, 285101.

Gessner, R., Lukacs, M., Lee, M., Cherin, E., F. Stuart, F., and Dayton, A.P. (2010). High-Resolution, High-Contrast Ultrasound Imaging Using a Prototype Dual-Frequency Transducer: In Vitro and In Vivo Studies. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 57, 1772–1781.

Gessner, R.C., Aylward, S.R., and Dayton, P.A. (2012). Mapping Microvasculature with Acoustic Angiography Yields Quantifiable Differences between Healthy and Tumor-bearing Tissue Volumes in a Rodent Model. *Radiology* 264, 733–740.

Gessner, R.C., Frederick, C.B., Foster, F.S., and Dayton, P.A. (2013a). Acoustic angiography: A new imaging modality for assessing microvasculature architecture. *Int. J. Biomed. Imaging* 2013.

Gessner, R.C., Hanson, A.D., Feingold, S., Cashion, A.T., Corcimar, A., Wu, B.T., Mullins, C.R., Aylward, S.R., Reid, L.M., and Dayton, P.A. (2013b). Functional ultrasound imaging for assessment of extracellular matrix scaffolds used for liver organoid formation. *Biomaterials* 34, 9341–9351.

Ghita, M., McMahon, S.J., Taggart, L.E., Butterworth, K.T., Schettino, G., and Prise, K.M. (2017). A mechanistic study of gold nanoparticle radiosensitisation using targeted microbeam irradiation. *Sci. Rep.* 7, 44752.

Goertz, D.E., Yu, J.L., Kerbel, R.S., Burns, P.N., and Foster, F.S. (2002). High-Frequency Doppler Ultrasound Monitors the Effects of Antivascular Therapy on Tumor Blood Flow Advances in Brief High-Frequency Doppler Ultrasound Monitors the Effects of Antivascular Therapy on Tumor Blood Flow. *Cancer Res.* 62, 6371–6375.

Guidelli, E.J., and Baffa, O. (2014). Influence of photon beam energy on the dose enhancement factor caused by gold and silver nanoparticles: An experimental approach. *Med. Phys.* 41, 032101.

Hadnagy, W., Stephan, G., and Kossel, F. (1982). Enhanced yield of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro using contrast media in X-irradiation. *Mutat. Res. Lett.* 104, 249–254.

Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., and Smilowitz, H.M. (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* 49, N309–N315.

Hallac, R.R., Zhou, H., Pidikiti, R., Song, K., Stojadinovic, S., Zhao, D., Solberg, T., Peschke, P., and Mason, R.P. (2014). Correlations of noninvasive BOLD and TOLD MRI with pO₂ and relevance to tumor radiation response. *Magn. Reson. Med.* 71, 1863–1873.

Hoff, B.A., Bhojani, M.S., Rudge, J., Chenevert, T.L., Meyer, C.R., Galbán, S., Johnson, T.D., Sebolt, J., Rehemtulla, A., Ross, B.D., et al. (2012). DCE and DW-MRI monitoring of vascular disruption following VEGF-Trap treatment of a rat glioma model. *NMR Biomed.* 25, 935–942.

Hori, K., Saito, S., and Kubota, K. (2002). A novel combretastatin A-4 derivative, AC7700, strongly stanches tumour blood flow and inhibits growth of tumours developing in various tissues and organs. *Br. J. Cancer* 86, 1604–1614.

Incerti, S., Istituto, I., Nucleare, F., and Bernal, M.A. (2016). Simulation of Auger electron emission from nanometer-size gold targets using the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B.* 37, 91-101.

Iwamoto, K.S., Cochran, S.T., Winter, J., Holburt, E., Higashida, R.T., and Norman, A. (1987). Radiation dose enhancement therapy with iodine in rabbit VX-2 brain tumors. *Radiother. Oncol.* 8, 161–170.

Jain, S., Coulter, J.A., Hounsell, A.R., Butterworth, K.T., McMahon, S.J., Hyland, W.B., Muir, M.F., Dickson, G.R., Prise, K.M., Currell, F.J., et al. (2011). Cell-Specific Radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 79, 531–539.

Jeynes, J.C.G., Merchant, M.J., Spindler, A., Wera, A.-C., and Kirkby, K.J. (2014). Investigation of gold nanoparticle radiosensitization mechanisms using a free radical scavenger and protons of different energies. *Phys. Med. Biol.* 59, 6431–6443.

Jones, B.L., Krishnan, S., and Cho, S.H. (2010). Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations. *Med. Phys.* 37, 3809–3816.

- Kasoji, S.K., Rivera, J.N., Gessner, R.C., Chang, S.X., and Dayton, P.A. (2018). Early assessment of tumor response to radiation therapy using high-resolution quantitative microvascular ultrasound imaging. *Theranostics* 8, 156–168.
- Kirkby, C., and Ghasroddashti, E. (2015). Targeting mitochondria in cancer cells using gold nanoparticle-enhanced radiotherapy: A Monte Carlo study. *Med. Phys.* 42, 1119.
- Kirkby, C., Koger, B., Suchowerska, N., and McKenzie, D.R. (2017). Dosimetric consequences of gold nanoparticle clustering during photon irradiation. *Med. Phys.* 44, 6560–6569.
- Koger, B., and Kirkby, C. (2016). A method for converting dose-to-medium to dose-to-tissue in Monte Carlo studies of gold nanoparticle-enhanced radiotherapy. *Phys. Med. Biol.* 61, 2014–2024.
- Kotz, B., West, C., Saleem, A., Jones, T., and Price, P. (2009). Blood flow and Vd (water): both biomarkers required for interpreting the effects of vascular targeting agents on tumor and normal tissue. *Mol. Cancer Ther.* 8, 303–309.
- Kunjachan, S., Detappe, A., Kumar, R., Ireland, T., Cameron, L., Biancur, D.E., Motto-Ros, V., Sancey, L., Sridhar, S., Makrigiorgos, G.M., et al. (2015). Nanoparticle Mediated Tumor Vascular Disruption: A Novel Strategy in Radiation Therapy. *Nano Lett.* 15, 7488–7496.
- Lechtman, E., and Pignol, J.-P. (2017). Interplay between the gold nanoparticle sub-cellular localization, size, and the photon energy for radiosensitization. *Sci. Rep.* 7, 13268.
- Lechtman, E., Chattopadhyay, N., Cai, Z., Mashouf, S., Reilly, R., and Pignol, J.P. (2011). Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys. Med. Biol.* 56, 4631–4647.
- Leung, M.K.K., Chow, J.C.L., Chithrani, B.D., Lee, M.J.G., Oms, B., and Jaffray, D. a (2011). Irradiation of gold nanoparticles by x-rays: Monte Carlo simulation of dose enhancements and the spatial properties of the secondary electrons production. *Med. Phys.* 38, 624–631.
- Lin, I.C., Liang, M., Liu, T.Y., Monteiro, M.J., and Toth, I. (2012). Cellular transport pathways of polymer coated gold nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8, 8–11.
- Lin, Y., McMahon, S.J., Scarpelli, M., Paganetti, H., and Schuemann, J. (2014). Comparing gold nano-particle enhanced radiotherapy with protons, megavoltage photons and kilovoltage photons: a Monte Carlo simulation. *Phys. Med. Biol.* 59, 7675–7689.

Lin, Y., McMahon, S.J., Paganetti, H., and Schuemann, J. (2015). Biological modeling of gold nanoparticle enhanced radiotherapy for proton therapy. *Phys. Med. Biol.* *60*, 4149–4168.

Maeda, H., Fang, J., Inutsuka, T., and Kitamoto, Y. (2003). Vascular permeability enhancement in solid tumor: Various factors, mechanisms involved and its implications. *Int. Immunopharmacol.* *3*, 319–328.

Marcus, C.D., Ladam-Marcus, V., Cucu, C., Bouché, O., Lucas, L., and Hoeffel, C. (2009). Imaging techniques to evaluate the response to treatment in oncology: Current standards and perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *72*, 217–238.

Martinov, M.P., and Thomson, R.M. (2017). Heterogeneous multiscale Monte Carlo simulations for gold nanoparticle radiosensitization. *Med. Phys.* *44*, 644–653.

Matsumura, Y., and Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. *Cancer Res.* *46*, 6387–6392.

McKinnon, S., Engels, E., Tehei, M., Konstantinov, K., Corde, S., Oktaria, S., Incerti, S., Lerch, M., Rosenfeld, A., and Guatelli, S. (2016). Study of the effect of ceramic Ta₂O₅ nanoparticle distribution on cellular dose enhancement in a kilovoltage photon field. *Phys. Medica* *32*, 1216–1224.

McMahon, S.J., Hyland, W.B., Muir, M.F., Coulter, J.A., Jain, S., Butterworth, K.T., Schettino, G., Dickson, G.R., Hounsell, A.R., O’Sullivan, J.M., et al. (2011). Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. *Radiother. Oncol.* *100*, 412–416.

McNamara, A.L., Kam, W.W.Y., Scales, N., McMahon, S.J., Bennett, J.W., Byrne, H.L., Schuemann, J., Paganetti, H., Banati, R., and Kuncic, Z. (2016). Dose enhancement effects to the nucleus and mitochondria from gold nanoparticles in the cytosol. *Phys. Med. Biol.* *61*, 5993–6010.

Mello, R.S., Callisen, H., Winter, J., Kagan, A.R., and Norman, A. (1983). Radiation Dose Enhancement in Tumors with Iodine. *Med. Phys.* *10*, 75–78.

Mesa, A. V., Norman, A., Solberg, T.D., Demarco, J.J., and Smathers, J.B. (1999). Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents. *Phys. Med. Biol.* *44*, 1955–1968.

Milo, R., Jorgensen, P., Moran, U., Weber, G., and Springer, M. (2010). BioNumbers The database of key numbers in molecular and cell biology - BNID 101666. *Nucleic Acids Res.* *38*, 750–753.

Misawa, M., and Takahashi, J. (2011). Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7, 604–614.

Ng, Q.S., Goh, V., Carnell, D., Meer, K., Padhani, A.R., Saunders, M.I., and Hoskin, P.J. (2007). Tumor Antivascular Effects of Radiotherapy Combined with Combretastatin A4 Phosphate in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 67, 1375–1380.

O'Connor, J.P.B., Jackson, A., Parker, G.J.M., and Jayson, G.C. (2007). DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. *Br. J. Cancer* 96, 189–195.

Peckys, D.B., and De Jonge, N. (2011). Visualizing gold nanoparticle uptake in live cells with liquid scanning transmission electron microscopy. *Nano Lett.* 11, 1733–1738.

Perrault, S.D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H.C., and Chan, W.C.W. (2009). Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano Lett.* 9, 1909–1915.

Rahman, W.N., Bishara, N., Ackerly, T., He, C.F., Jackson, P., Wong, C., Davidson, R., and Geso, M. (2009). Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 5, 136–142.

Rane, T.D., and Armani, A.M. (2016). Two-Photon Microscopy Analysis of Gold Nanoparticle Uptake in 3D Cell Spheroids. *PLoS One* 11, e0167548.

Retif, P., Reinhard, A., Paquot, H., Jouan-Hureau, V., Chateau, A., Sancey, L., Barberi-Heyob, M., Pinel, S., and Bastogne, T. (2016). Monte Carlo simulations guided by imaging to predict the in vitro ranking of radiosensitizing nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 11, 6169–6179.

Richmond, R.C., Khokhar, A.R., Teicher, B.A., and Douple, E.B. (1984). Toxic Variability and Radiation Sensitization by Pt(II) Analogs in *Salmonella typhimurium* Cells. *Radiat. Res.* 99, 609.

Riley, R.S., and Day, E.S. (2017). Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy : applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 9, e1449.

Robar, J.L., Riccio, S. a, and Martin, M. a (2002). Tumour dose enhancement using modified megavoltage photon beams and contrast media. *Phys. Med. Biol.* 47, 2433–2449.

Rojas, J.D., Papadopoulou, V., Czernuszewicz, T., Rajamahendiran, R., Chytil, A., Chiang, Y.C., Chong, D., Bautch, V., Rathmell, K., Aylward, S., et al. (2018). Ultrasound

Measurement of Vascular Density to Evaluate Response to Anti-angiogenic Therapy in Renal Cell Carcinoma. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 66, 873–880.

Röntgen, W. (1896). A New Form of Radiation. *Science* (80-.). 3, 726–729.

Salmon, H.W., and Siemann, D.W. (2006). Effect of the second-generation vascular disrupting agent OXI4503 on tumor vascularity. *Clin. Cancer Res.* 12, 4090–4094.

Seshadri, M., and Toth, K. (2009). Acute Vascular Disruption by 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid in an Orthotopic Model of Human Head and Neck Cancer. *Transl. Oncol.* 2, 121–127.

Shimizu, S., Miyamoto, N., Matsuura, T., Fujii, Y., Umezawa, M., Umegaki, K., Hiramoto, K., and Shirato, H. (2014). A proton beam therapy system dedicated to spot-scanning increases accuracy with moving tumors by real-time imaging and gating and reduces equipment size. *PLoS One* 9, 3–9.

Shirato, H., Shimizu, S., Kitamura, K., Nishioka, T., Kagei, K., Hashimoto, S., Aoyama, H., Kunieda, T., Shinohara, N., Dosaka-Akita, H., et al. (2000). Four-dimensional treatment planning and fluoroscopic real-time tumor tracking radiotherapy for moving tumor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 48, 435–442.

Siemann, D.W. (2011). The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* 37, 63–74.

Siemann, D.W., and Rojiani, A.M. (2005). The vascular disrupting agent ZD6126 shows increased antitumor efficacy and enhanced radiation response in large, advanced tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62, 846–853.

Solberg, T.D., Iwamoto, K.S., and Norman, A. (1992). Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours. *Phys. Med. Biol.* 37, 439–443.

Strigari, L., Ferrero, V., Visonà, G., Dalmaso, F., Gobbato, A., Cerello, P., Visentin, S., and Attali, A. (2017). Targeted dose enhancement in radiotherapy for breast cancer using gold nanoparticles, part 2: A treatment planning study. *Med. Phys.* 44, 1993–2001.

Sung, W., Ye, S.-J., McNamara, A.L., McMahon, S.J., Hainfeld, J.F., Shin, J., Smilowitz, H.M., Paganetti, H., and Schuemann, J. (2017). Dependence of Gold Nanoparticle Radiosensitization on Cell Geometry. *Nanoscale* 9, 5843–5853.

Taggart, L.E., McMahon, S.J., Butterworth, K.T., Currell, F.J., Schettino, G., and Prise, K.M. (2016). Protein disulphide isomerase as a target for nanoparticle-mediated sensitisation of cancer cells to radiation. *Nanotechnology* 27, 215101.

Tran, H.N., Karamitros, M., Ivanchenko, V.N., Guatelli, S., McKinnon, S., Murakami, K., Sasaki, T., Okada, S., Bordage, M.C., Francis, Z., et al. (2016). Geant4 Monte Carlo simulation of absorbed dose and radiolysis yields enhancement from a gold nanoparticle under MeV proton irradiation. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 373, 126–139.

Turkbey, B., Kobayashi, H., Ogawa, M., Bernardo, M., and Choyke, P.L. (2009). Imaging of tumor angiogenesis: Functional or targeted? *Am. J. Roentgenol.* 193, 304–313.

Varfolomeev, A.A., and Svetlilobov, I.A. (1959). Monte Carlo calculations of electromagnetic cascades with account of the influence of the medium on bremsstrahlung. *Sov. Phys. JETP* 36, 1263–1270.

Wang, G., Norton, A.S., Pokharel, D., Song, Y., and Hill, R.A. (2013). KDEL peptide gold nanoconstructs: Promising nanoplatfroms for drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9, 366–374.

Wang, H., Hristov, D., Qin, J., Tian, L., and Willmann, Jürgen, K. (2015). Three-dimensional Dynamic Contrast-enhanced US Imaging for Early Antiangiogenic. *Radiology* 277, 424–434.

Wankhede, M., Dedeugd, C., Siemann, D.W., and Sorg, B.S. (2010). In vivo functional differences in microvascular response of 4T1 and Caki-1 tumors after treatment with OXi4503. *Oncol. Rep.* 23, 685–692.

Wolfe, T., Chatterjee, D., Lee, J., Grant, J.D., Bhattarai, S., Tailor, R., Goodrich, G., Nicolucci, P., and Krishnan, S. (2015). Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 11, 1277–1283.

Zhou, H., Zhang, Z., Denney, R., Williams, J.S., Gerberich, J., Stojadinovic, S., Saha, D., Shelton, J.M., and Mason, R.P. (2017). Tumor physiological changes during hypofractionated stereotactic body radiation therapy assessed using multi-parametric magnetic resonance imaging. *Oncotarget* 8.

Zygmanski, P., Liu, B., Tsiamas, P., Cifter, F., Petersheim, M., Hesser, J., and Sajo, E. (2013a). Dependence of Monte Carlo microdosimetric computations on the simulation geometry of gold nanoparticles. *Phys. Med. Biol.* 58, 7961–7977.

Zygmanski, P., Hoegeler, W., Tsiamas, P., Cifter, F., Ngwa, W., Berbeco, R., Makrigiorgos, M., and Sajo, E. (2013b). A stochastic model of cell survival for high-Z nanoparticle radiotherapy. *Med. Phys.* *40*, 024102.