

ホウ素中性子捕捉療法のためのホウ素薬剤開発の現状と DDS を用いた新規ホウ素薬剤に関する研究

白川 真

Applications of boron drugs and development of novel boron drugs using DDS for Boron Neutron Capture Therapy

Makoto Shirakawa

ABSTRACT

Recently, for the tumor treatment, Boron Neutron Capture Therapy (here in after, also referred to as “BNCT”) is attracting attention as one of the radiation therapy. And as method of boron accumulation, DDS (Drug Delivery System) is remarkable in BNCT. A liposome is widely used as DDS material. Therefore, the various liposome using boron compounds are developed until now, but the approaches are roughly two methods. The one is encapsulation of boron compounds into liposome. Another one is incorporation of lipids conjugated boron into the liposome membrane. However these liposomes are suggested that it causes the destabilization of liposome membrane by high ionic concentration and osmotic pressure. Furthermore these two strategies are difficult to develop novel drug including more boron groups. Therefore, we proposed new strategy and focused on outer layer of liposome membrane. We synthesized phospholipid derivative as novel boron lipid and prepared liposome with the lipid. The boron groups of the lipid are at the position of outer layer of liposome and not interfere with liposome membrane or internal water phase.

In this review, we introduce the novel boron lipid (name PBL) and property of liposome using this lipid.

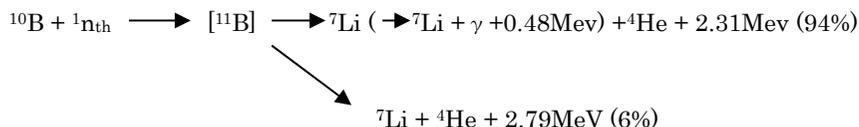
1. はじめに

近年の医療技術の進歩にも関わらず、現在、悪性腫瘍は日本人の死因の第1位である。2006年には悪性腫瘍と診断された69万人のうち、35万人に及ぶ患者が亡くなっている。悪性腫瘍の種類によっては手術療法および化学治療により、治癒が見られるものも存在する。しかし、手術療法では正常組織と隣接または浸潤のため、あるいは臓器の機能温存が必要で、完全に取り除くことが困難なことがある。また、化学療法では全身的な副作用の問題が常に

存在する。それに対し放射線療法は、近年の放射線治療機器の進歩と共に複数の角度から腫瘍組織へ集中して照射することで、正常組織への影響を極力減らすQOLを下げない治療法として確立されている。

しかしながら、悪性腫瘍の中には正常組織に浸潤するがん腫もあり、さらに例えば腺がんは放射線感受性が低く、周囲の正常組織に強い障害が現れるほどに大量照射してもその局所治療は困難であるなど、治療の限界もある。そこで、新たな治療法として注目されている放射線治療の一つが、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) である。BNCT は、通常の放射線治療とは異なり、原理上は悪性腫瘍を細胞レベルで選択的に障害を与えることができる。ゆえに、正常組織損傷を低く抑えられる治療法として注目されている [1]。

BNCT の原理は、次の通りである。BNCT で用いる中性子線は、原子炉で大量に発生する高速中性子を重水層や黒鉛層を通して減速させた比較的エネルギーが低く、人体には影響の少ない熱中性子線 (<0.53 eV) である。また、悪性腫瘍を成す細胞に取り込まれるようにホウ素 (^{10}B) 化合物をあらかじめ投与しておくことで、熱中性子を腫瘍組織に照射すると、中性子捕捉断面積の大きい ^{10}B の存在する部分のみで、熱中性子による ^{10}B の核分裂によって α 線とリチウム核 (^7Li) を生成する。(Eq.1)



Eq.1 Reaction of boron atom by BNCT.

これらの粒子は極めて飛程が短く、 ^7Li :5 μm , ^4He :9 μm であり、平均的な細胞の径と比較して小さいため、正常組織には到達せず、選択的にホウ素の取り込まれている細胞か、最大でも近接の細胞のみを障害し得ると考えられる。熱中性子そのもののみでは人体や正常組織において影響は少ないため、副作用の極めて少ない治療法である。この治療法は、悪性神経腫瘍のように浸潤性が高く、腫瘍組織と正常組織との境界が不明瞭な悪性腫瘍の治療に適していると考えられている (Fig.1) [2-4]。

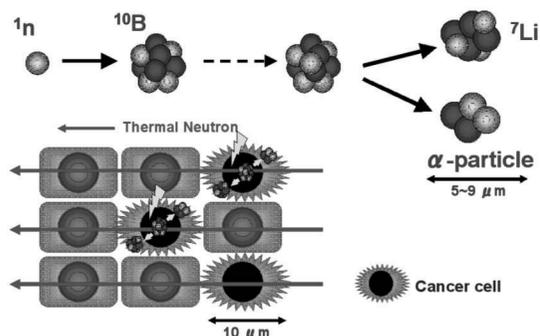


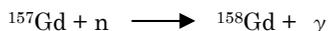
Fig. 1 Concept of BNCT

熱中性子が原子核に捕捉される確率は、反応断面積 (σ) で通常表される。単位は barn (1 barn=10⁻²⁴cm²) である。反応断面積の大きい元素は、ホウ素の他に ⁶Li, ¹⁵⁵Gd, ¹⁵⁷Gd などがある (Table.1)。

Table. 1 The reaction cross-section to thermal neutron of the main elements.

Nuclide	Cross section(σ)
¹⁰ B	3837
¹¹ B	0.0055
⁶ Li	940
¹⁵⁵ Gd	61000
¹⁵⁷ Gd	254000
¹¹³ Cd	19910

このうち MRI 造影剤として使用されるガドリニウム同位体である ¹⁵⁷Gd は、反応断面積が 254,000 と極めて大きく、中性子捕捉療法に应用できる可能性がある [5, 6]。ただしガドリニウムと熱中性子の反応によって生じる放射線は主に γ 線とオージェ電子であり (Eq.2)、BNCT で生じる α 線に比べて飛程が長いいため効果はやや広範囲になるが、腫瘍の局在、形状によっては治療に应用できると期待される。



Eq.2 Reaction of gadolinium atom by NCT.

中性子源としては近年、熱中性子 (thermal neutron) に代わって、ややエネルギーの高い熱外中性子 (epithermal neutron) が注目されている。中性子捕捉療法を最も効率よく起こすのはエネルギーの低い熱中性子だが、体表近くにピーク (<4mm) があり、深部がんの治療には有効性が低いと考えられている。それに対して熱外中性子は表面より深さおよそ 2cm 部分にそのエネルギーに対する線量ピークを形成し、より深部までの治療が可能となるため、その臨床応用は BNCT のひとつのブレイクスルーとして世界各国で臨床研究が開始されている [3, 7-10]。

2. 薬剤開発の変遷

BNCT の概念は、1936 年に Locher によって最初に提唱された [11]。第 1 世代の BNCT 研究は熱中性子ビームの開頭照射とホウ素化合物として "Borax", "sodium pentaborate", "p-carboxyl analog of phenylboronic acid", "sodium perhydrodecaborate" を用いて 1950 年代にアメリカの Brookhaven 国立研究所ならびに Massachusetts Institute of Technology (MIT) で行われた [11-13]。これら 2 施設の悪性神経膠腫を対象とした臨床研究では良好な治療成績は得られなかった。この原因としては、ホウ素化合物の純度や腫瘍組織移行性などの問題が挙げられている [8, 13-15]。

第2世代のBNCT研究は帝京大学島中らによって行われた。熱中性子ビームと非常に低毒性であるホウ素イオンクラスター（mercaptoundecahydrododecaborate：BSH）を用い、初めて脳腫瘍を対象にBNCTを施行した[16]。その後、小野らは京都大学原子炉実験所（Kyoto University Reactor：KUR）での神経膠芽腫を対象としたBNCT治療成績について、脳表近く（<4mm）の病巣で従来の放射線治療よりも良好な成績であると報告した。

第2世代以降では、投薬の手法は発展したが、臨床応用された薬物としてはBPA、BSHの二つの化合物のみで40年以上にわたり、新規ホウ素化合物の開発が継続されているが、実用化したものはその後出現していない。

3. 臨床研究に用いられているホウ素薬剤とその現状

現在、臨床研究で使用されているホウ素化合物は、BSHとp-boronophenylalanine（BPA）である。（Fig.2）

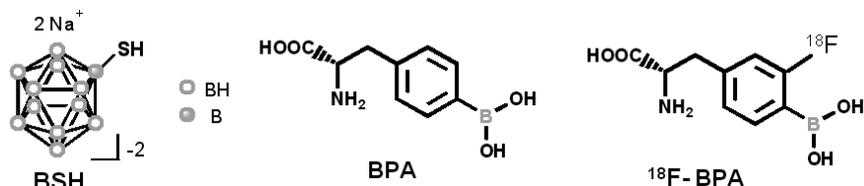


Fig.2 Structures of BSH, BPA, and 18F-BPA

BSHは1960年代にSolowayによって開発された[17]。BSHは血液脳関門（BBB）のため、正常脳にとりこまれず、BBBの破綻している腫瘍組織にのみ取り込まれると言われている。動物モデルを用いた実験では、BSHの腫瘍/血液比は0.5-1.0であるが、glioblastomaにおけるBSHの腫瘍/血液比は0.56-2.0とされ、臨床例では動物実験に比べ、高い値が報告されている。しかし、BBBの破綻は、腫瘍に分布する毛細血管内皮の断裂に依存しており、その段階は同一腫瘍内でも均一な状態ではない[2]。BSHの構造はFig.2に示す12個のホウ素原子からなるboron cageにジスルフィド基が結合した極めて小さい分子であり、腫瘍への侵入機序は拡散によるとされているが、明らかになっていない[18, 19]。

一方、BPAはBSHよりもさらに古くに開発された化合物であったが、BBBを通過して正常脳へ蓄積するなどの問題があったため、脳腫瘍に対して長く顧みられなかった。しかし、1987年神戸大学三島らがアミノ酸誘導体であるBPAを用いて悪性黒色腫（メラノーマ）のBNCTに成功したことは、BPAが見直されるきっかけとなった[20]。BPAは必須アミノ酸であるフェニルアラニンの類似化合物であり、分裂の盛んな細胞に多く取り込まれる[21-23]。*in vitro*での細胞内取り込みはBSHに比べて高く、*in vivo*でのT/B ratioもBSHが0.5-1であるのに対し、3と高いデータが得られており、B16メラノーマ細胞やラット9L gliosarcoma細胞を用いた*in vitro*および*in vivo*の実験ではBNCTにおけるBPAの有用性が示されている。現在ではメラノーマに限らず、様々な腫瘍に応用可能なホウ素キャリアーとして期待されている。

また、悪性神経膠腫においても、1994年に今堀らが¹⁸F-BPA (Fig.2)を用いたPET (positron emission tomography) 診断法を開発し^[24]、あらかじめ腫瘍部位のホウ素蓄積量を見積もることができるようになったため、使用されるようになってきた^[8, 23, 25]。しかし、BPAは、正常組織にも腫瘍の3分1程度は蓄積するため、正常組織の耐容線量により照射線量が制限を受け、また腫瘍でも静止期にある細胞に取り込まれにくいという報告があり、それらの点が問題とされている^[26, 27]。

4. ホウ素薬剤開発の現状

さて、BNCTにおいて治療の成否を握るのは腫瘍内¹⁰B濃度となるわけだが、具体的には薬剤として次の条件が挙げられる。

1. 悪性腫瘍におけるホウ素濃度が30 ppm以上であること。
2. 腫瘍／正常組織、腫瘍／血液などの濃度比が3-4以上であること。
3. 中性子線照射時までの間の血液中や正常組織からの速い除去率と腫瘍組織における高い滞留性。

これらの条件を達成するために、様々なホウ素薬剤の開発が行われているわけだが、本稿では最近注目されているDDS (Drug Delivery System)を用いたホウ素薬剤の開発の現状について紹介する。

4.1. ホウ素ポルフィリン

ポルフィリン骨格を有する化合物は、がん細胞親和性と光学特性を有し、レーザー光照射により励起三重項状態の分子となり、他の分子への電子移動や他の分子からの水素引き抜きによるラジカル反応を起こす。最終的には過酸化物を生成し、がん細胞を傷害する経路および周囲に存在する酸素分子への電子移動によって励起一重項酸素分子を生成し、がん細胞を酸化して傷害する経路により、がん細胞を壊死させることができる。ゆえに、光線力学療法 (PDT :Photodynamic Therapy) の有効成分として有用であり、ポルフィリン誘導体の1つであるレザフィリンは、早期肺がん患者の治療に用いられている。

近年、ポルフィリン骨格を有する化合物にホウ素を導入することで水溶性を高めたホウ素ポルフィリン誘導体が開発されている。中でもKahlらによって開発されたBOPP (Fig.3)は、C6グリオーマモデルマウスに対して100mg/kgの用量で腹腔内投与および静脈投与した場合、90ppmも腫瘍に蓄積することから臨床応用が期待されたが、臨床第1相試験において血小板減少などの副作用により開発が断念された。しかしながら、ホウ素ポルフィリン誘導体はその高い腫瘍選択性からBNCTに有効な化合物として期待されている。

がん細胞親和性に優れ、低毒性により高用量の投与を可能にするホウ素ポルフィリン誘導体の研究が進められている。

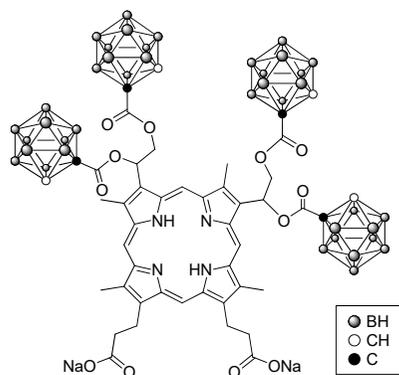


Fig. 3 Structure of BOPP (2,4-bis-(a,b-dihydroxyethyl)deuterioporphyrin)

4.2. ホウ素リポソーム

リポソームを用いたホウ素デリバリーの方法は大きく二つの strategy に分けることができる。ひとつはリポソームの内水相にホウ素化合物を封入する一般的な方法、もうひとつはホウ素をリポソーム膜に埋め込む方法である。リポソームを用いた DDS は 1991 年に柳衛らによって最初に報告された^[28]。柳衛らは BSH 内封イムノリポソームを合成し、細胞に対する中性子照射により、60%以上の殺細胞効果を得た。またマウスを用いた動物実験においても腫瘍増殖を 50%以下に抑えることに成功した^[29]。その後も前者の方法により PEG 修飾リポソーム^[30, 31]、葉酸修飾リポソーム^[32]、EGF 修飾リポソーム^[33]、Transferrin 修飾リポソーム^[34]、抗体修飾リポソーム^[35]など、様々なりガンド結合型リポソームに BSH を封入し、BNCT が試みられた。

このように、多面体構造のホウ素クラスターイオンを封入したりポソームを用いて、高い治療効果を得られる Boron Delivery System (BDS) が達成できる可能性が示されてきた。しかしながら、使用されているホウ素封入リポソームは非常に高いイオン濃度であり高浸透圧な溶液であることから、これ以上の高濃度化は困難であると同時に、このような条件下でのリポソーム膜の安定性の問題が生じている。さらに、このような高いホウ素クラスターイオン濃度のリポソームを調製する際には、封入効率の低さが無視できなくなってくる。そこで、後者の方法によるホウ素リポソームの作製が試みられた。リポソームの脂質二分子膜は、分子間相互作用により自己集積化しているため密度が高く、この二分子膜へホウ素分子を導入できれば、非常に高濃度でホウ素を腫瘍へ送達できると考えられる。さらに、リポソーム膜内にホウ素を導入させることで、リポソーム内水相に抗がん剤など様々な薬物が封入できることから、BNCT と化学療法の併用治療が可能となる。

リポソーム膜内にホウ素を導入する試みは Hawthorne らによって最初に報告された^[36]。Hawthorne らは一本鎖 nido 型ホウ素イオンクラスター脂質を開発し、EMT6 担がんマウスに投与ホウ素濃度 18mg / kg で投与したところ、腫瘍内ホウ素濃度 48ppm を達成した。また、同様に中村らは二本鎖 nido 型ホウ素イオンクラスター脂質を開発し、投与ホウ素濃度 14.4mg / kg で投与、腫瘍内ホウ素濃度 40ppm を達成した。しかしながら、どちらのリポソームも高確率で急性毒性を引き起こすことが明らかとなった^[37]。そこで、中村らは毒性の原

因と考えられる nido 型カルボランではなく、硫黄置換型 undecahydrododecaborate を合成に用いた二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質を開発し、研究を進めている [38]。

5. 新規ホウ素リポソーム製剤の開発

5-1. 新規ホウ素脂質の開発

前章において、様々なホウ素リポソームを紹介したが、丸山らの開発したホウ素封入りリポソームは非常に高いイオン濃度であり、高浸透圧な溶液であることから、これ以上の高濃度化は困難であると同時に、このような条件下ではリポソーム膜の安定性の問題が生じることが報告されている。さらに、このような高いホウ素イオン濃度のリポソームを調製する際には、封入効率の低さも問題となる。また、Hawthorne および中村らの開発した二本鎖ホウ素イオンクラスター脂質は、リポソームを構成する二分子膜へホウ素分子を導入するため、リポソームを構成できる修飾率の限界もある。

そこでわれわれはこれらの解決策としてリポソームの外水相へホウ素分子を導入し、二分子膜の構造を変化させないことでリポソーム膜自体に影響を与えないホウ素化合物 (PBL) を開発した [39]。

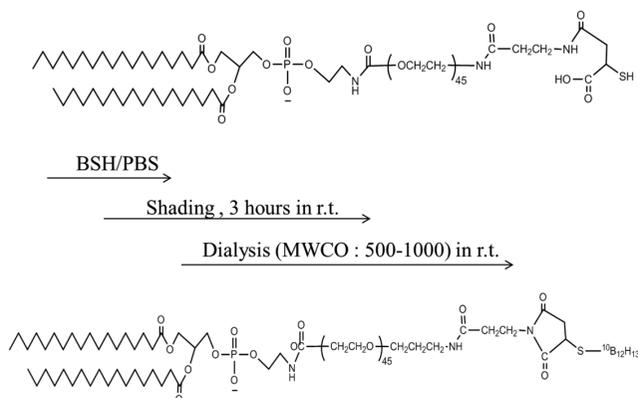


Fig. 4 Scheme of the synthesis of PBL

5-2. PBL 修飾リポソームの調製と物理化学的性質

PBL 修飾リポソームは超音波処理法および凍結融解法で容易に調製でき、サイズ排除クロマトグラフィーにて精製することが可能である。また、その粒子径はEPR効果の得られる100nm前後を示し、 ζ 電位はPEGよりもさらに高いマイナス電位を示す (Table.2)。さらにPBL修飾リポソームの形態をTEMを用いて観察すると、PBLが二重ラメラを形成し、単層構造であることが確認できる (Fig.5)。

Table.2 Physicochemical property of functionalized liposome

	DSPC/Chol/DSPE-PEG/B2000lipid (molar ratio)	Particle size (nm,u/G2)	Zeta potential (mV)
Bare Liposome	50/50/0/0	147	-4
PEG Liposome	47/47/6/0	143	-15
PBL 5% Liposome	47.5/47.5/0/5	168.8	-42.3
PBL 10% Liposome	45/45/0/10	125.7	-36.5

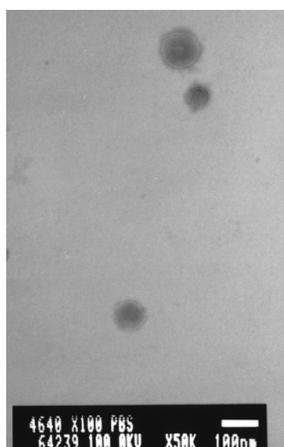


Fig.5 Form of PBL modified liposome at acceleration voltage 100 kV in transmission electron microscope (TEM).

5-3. PBL 修飾リポソームの中性子照射による殺細胞効果 (*in vitro*)

脂質組成比 (DSPC: Chol: PBL=1: 1: 0.12) で調製した PBL 5% 修飾リポソームを用い、① wash (薬剤添加後、培地を交換し取り除く) ② non wash (培地に薬剤が含まれた状態のままにする) の 2 通りの方法で V79 379A 細胞に中性子線照射を行うと、PBL 修飾リポソームを V79 379A 細胞に添加後、①の操作を行った群は、中性子線照射のみを行った群と比較して、中性子線照射のみを行った群と同等の殺細胞効果しか観察されず、PBL 修飾リポソーム添加による有意差がないことを確認された。また、②の操作を行った群においては、中性子線照射により殺細胞効果が観察され、PBL 修飾リポソームが¹⁰B-enrich のホウ素原子団を含有していることを確認された (Fig.6)。

5-4. PBL 修飾リポソームの中性子照射による腫瘍増殖抑制効果 (*in vivo*)

PBL5% 修飾リポソームを 10mg¹⁰B/kg で投与した担がんマウスに中性子線照射を行なうと、10 日目以降いずれの群と比較しても有意に腫瘍増殖抑制が見られ、特に 14 日目までは腫瘍が増大することはなかった (Fig.7)。また、PBL 修飾リポソーム投与群 6 例のうち 1 例に腫瘍の完全消失を確認することができた。

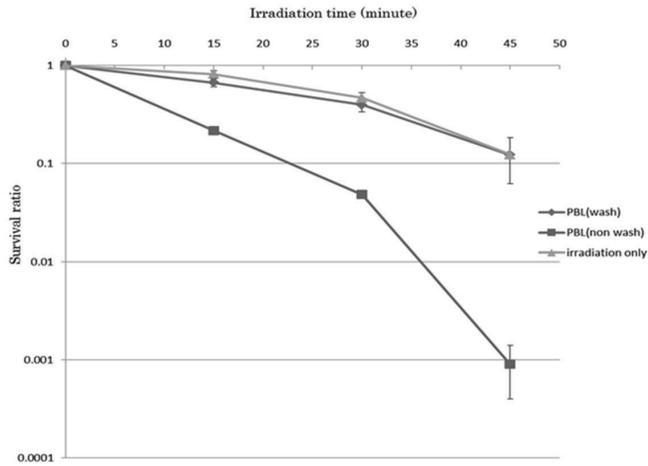


Fig.6 Cytotoxicity reaction by thermal neutron irradiation with PBL modified liposome. The V79 379A cells were irradiated with 5.6Gy for 15minute, 12.1Gy for 30minute and 18.4Gy for 45minute. Data are represented as ratio of control. Each assay was done in five (mean±S.D.).

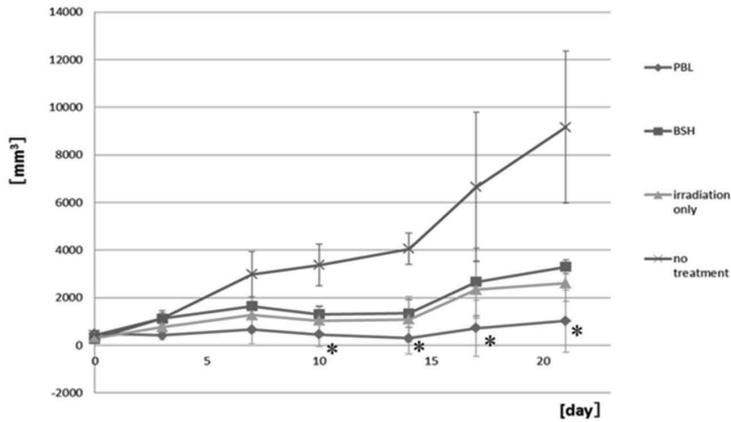


Fig.7 Tumor growth inhibitory effect by thermal neutron irradiation with PBL modified liposome. The tumour-bearing mice were irradiated with 14.2 Gy for 2 hours. Each assay was done in six (mean ±S.D.).

*P<0.05 (BSH, irradiation only, no treatment vs. PBL modified liposome)

5. まとめ

ホウ素含有 PEG 脂質 (PBL) 修飾リポソームは EPR 効果による腫瘍への高い物質送達能力を持つホウ素修飾リポソームとなる可能性があり、その化学構造から BSH をリポソーム外水相に持つ世界初のリポソームである。

これまでに、PBL 修飾リポソームは *in vitro*, *in vivo* での機能解析において正常細胞への低毒性および腫瘍増殖抑制効果で良好な結果を得ている。しかし、先述した BNCT における理想のホウ素薬剤の開発にあたっては、まだ様々な条件検討の必要がある。PBL 修飾リポソームは PEG 修飾リポソームと同様に EPR 効果により腫瘍へと集積し、腫瘍増殖抑制効果を示したと考えられるが、中性子線照射時の腫瘍内ホウ素濃度を含め、その体内動態は現在不明である。ゆえにその体内動態を観察することで、ホウ素薬剤の条件のひとつである腫瘍組織への高い滞留性と正常組織からの速やかな代謝を PBL 修飾リポソームが保持しているか検討する必要がある。本リポソームはすでに細胞毒性のない濃度での腫瘍増殖抑制効果を得ているが、さらに内水相に BSH を封入することで、中性子線量を抑えた BNCT や、ホウ素薬剤投与量の減量の実現が見込まれる。

以上より、まだまだクリアすべき課題は多いが、PBL 修飾リポソームは非常に汎用性が高い新規ホウ素化合物として、BNCT のブレイクスルーとなることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始暖かい激励と御指導、御鞭撻を頂きました筑波大学医学医療系 松村明教授および福山大学薬学部 富田久夫教授に甚大なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、実験ならびにこれに関連した発表、論文作成に際して、誠意御指導を頂きました筑波大学医学医療系 中井啓准教授に心より御礼申し上げます

京都大学複合原子力化学研究所での中性子照射実験にあたって、実験手技ならびに装置の使用方法について、数多くの御助言、御指導を頂きました京都大学 鈴木実教授および増永慎一郎教授に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Soloway, A.H., et al., *The Chemistry of Neutron Capture Therapy*. Chem Rev, 1998. 98(4): p. 1515-1562.
- 2) Barth, R.F., et al., *Boron neutron capture therapy of brain tumors: an emerging therapeutic modality*. Neurosurgery, 1999. 44(3): p. 433-50; discussion 450-1.
- 3) Coderre, J.A., et al., *Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme using p-boronophenylalanine and epithermal neutrons: trial design and early clinical results*. J Neurooncol, 1997. 33(1-2): p. 141-52.
- 4) Wazer, D.E., et al., *The effects of postradiation treatment with tamoxifen on local control and cosmetic outcome in the conservatively treated breast*. Cancer, 1997. 80(4): p. 732-40.
- 5) Zhang, T., et al., *Comparison of gadobenate dimeglumine and gadopentetate dimeglumine: a study of MR imaging and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy in rat brain tumors*. AJNR Am J Neuroradiol, 2002. 23(1): p. 15-8.

- 6) Matsumura, A., et al., *In vivo gadolinium neutron capture therapy using a potentially effective compound (Gd-BOPTA)*. *Anticancer Res*, 2003. 23(3B): p. 2451-6.
- 7) Capala, J., et al., *Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: clinical studies in Sweden*. *J Neurooncol*, 2003. 62(1-2): p. 135-44.
- 8) Chanana, A.D., et al., *Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: interim results from the phase III dose-escalation studies*. *Neurosurgery*, 1999. 44(6): p. 1182-92; discussion 1192-3.
- 9) Yamamoto, T., et al., *In-phantom two-dimensional thermal neutron distribution for intraoperative boron neutron capture therapy of brain tumours*. *Phys Med Biol*, 2002. 47(14): p. 2387-96.
- 10) Yamamoto, T., et al., *Characterization of neutron beams for boron neutron capture therapy: in-air radiobiological dosimetry*. *Radiat Res*, 2003. 160(1): p. 70-6.
- 11) Farr, L.E., et al., *Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme*. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 1954. 71(2): p. 279-93.
- 12) Slatkin, D.N., *A history of boron neutron capture therapy of brain tumours. Postulation of a brain radiation dose tolerance limit*. *Brain*, 1991. 114 (Pt 4): p. 1609-29.
- 13) Sweet, W.H., *Early history of development of boron neutron capture therapy of tumors*. *J Neurooncol*, 1997. 33(1-2): p. 19-26.
- 14) Soloway, A.H., et al., *The rationale and requirements for the development of boron neutron capture therapy of brain tumors*. *J Neurooncol*, 1997. 33(1-2): p. 9-18.
- 15) Laramore, G.E. and A.M. Spence, *Boron neutron capture therapy (BNCT) for high-grade gliomas of the brain: a cautionary note*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996. 36(1): p. 241-6.
- 16) Mishima, Y., et al., *New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: melanogenesis-seeking 10B molecule-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial*. *Pigment Cell Res*, 1989. 2(4): p. 226-34.
- 17) Soloway, A.H., H. Hatanaka, and M.A. Davis, *Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds*. *J Med Chem*, 1967. 10(4): p. 714-7.
- 18) Yang, W., et al., *Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of sodium borocaptate with or without blood-brain barrier disruption*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997. 37(3): p. 663-72.
- 19) Haselsberger, K., et al., *Subcellular boron-10 localization in glioblastoma for boron neutron capture therapy with Na2B12H11SH*. *J Neurosurg*, 1994. 81(5): p. 741-4.
- 20) Mishima, Y., et al., *Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking 10B-compound*. *Lancet*, 1989. 2(8659): p. 388-9.
- 21) Capala, J., M.S. Makar, and J.A. Coderre, *Accumulation of boron in malignant and normal cells incubated in vitro with boronophenylalanine, mercaptoborane or boric acid*. *Radiat Res*, 1996. 146(5): p. 554-60.
- 22) Coderre, J.A., et al., *Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for neutron capture therapy*. *Cancer Res*, 1987. 47(23): p. 6377-83.

- 23) Elowitz, E.H., et al., *Biodistribution of p-boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme for use in boron neutron capture therapy*. *Neurosurgery*, 1998. 42(3): p. 463-8; discussion 468-9.
- 24) Imahori, Y., et al., *Positron emission tomography-based boron neutron capture therapy using boronophenylalanine for high-grade gliomas: part II*. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(8): p. 1833-41.
- 25) Saris, S.C., et al., *Boron neutron capture therapy for murine malignant gliomas*. *Cancer Res*, 1992. 52(17): p. 4672-7.
- 26) Jackson, R.C., *The problem of the quiescent cancer cell*. *Adv Enzyme Regul*, 1989. 29: p. 27-46.
- 27) Ono, K., et al., *Radiobiological evidence suggesting heterogeneous microdistribution of boron compounds in tumors: its relation to quiescent cell population and tumor cure in neutron capture therapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996. 34(5): p. 1081-6.
- 28) Yanagie, H., et al., *Application of boronated anti-CEA immunoliposome to tumour cell growth inhibition in in vitro boron neutron capture therapy model*. *Br J Cancer*, 1991. 63(4): p. 522-6.
- 29) Yanagie, H., et al., *Inhibition of human pancreatic cancer growth in nude mice by boron neutron capture therapy*. *Br J Cancer*, 1997. 75(5): p. 660-5.
- 30) Shelly, K., et al., *Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: boron delivery to murine tumors with liposomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(19): p. 9039-43.
- 31) Feakes, D.A., et al., *Na³[B²⁰H¹⁷NH₃]: synthesis and liposomal delivery to murine tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(8): p. 3029-33.
- 32) Pan, X.Q., et al., *Boron-containing folate receptor-targeted liposomes as potential delivery agents for neutron capture therapy*. *Bioconjug Chem*, 2002. 13(3): p. 435-42.
- 33) Kullberg, E.B., et al., *Introductory experiments on ligand liposomes as delivery agents for boron neutron capture therapy*. *International Journal of Oncology*, 2003. 23(2): p. 461-467.
- 34) Maruyama, K., et al., *Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT)*. *J Control Release*, 2004. 98(2): p. 195-207.
- 35) Pan, X., et al., *Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR*. *Bioconjug Chem*, 2007. 18(1): p. 101-8.
- 36) Feakes, D.A., K. Shelly, and M.F. Hawthorne, *Selective boron delivery to murine tumors by lipophilic species incorporated in the membranes of unilamellar liposomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1367-70.
- 37) Li, T., J. Hamdi, and M.F. Hawthorne, *Unilamellar liposomes with enhanced boron content*. *Bioconjug Chem*, 2006. 17(1): p. 15-20.

- 38) Lee, J.D., et al., Synthesis of boron cluster lipids: closo-dodecaborate as an alternative hydrophilic function of boronated liposomes for neutron capture therapy. *Org Lett*, 2007. 9(2): p. 323-6.
- 39) BORON CLUSTER-MODIFIED PEG LIPID DERIVATIVE, AND MOLECULAR ASSEMBLY USING SAME; MAKOTO SHIRAKAWA, KEI NAKAI, AKIRA MATSUMURA, European patent No.2889302, 2017.