＜第46回日本油化学会学会賞受賞論文＞

バイオミメティックアプローチによる活性酸素に関する研究

Studies on Reactive Oxygen Species by Means of Biomimetic Approaches

湯浅 真^{1, 2)}

¹⁾ 東京理科大学理工学部工業化学科

²⁾ 東京理科大学総合研究機構

〒278-8510
千葉県野田市山崎 2641

Makoto YUASA^{1, 2)}

¹⁾ Department of Pure and Applied Chemistry,
Faculty of Science and Technology, Tokyo
University of Science

²⁾ Research Institute for Science and
Technology, Tokyo University of Science

2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510, JAPAN

論文要旨：バイオミメティックアプローチによる活性酸素に関する研究として、生体内での活性酸素検出に関するセンサー研究ならびに生体内での活性酸素利用に関する抗酸化・抗癌剤研究について解説する。センサー研究では、*in situ* にスーパーオキシドアニオンラジカルのような活性酸素を検出・定量できる電気化学的なセンサーを創製し、虚血再灌流モデル、排卵モデル等の各種モデルにおいて活性酸素に基づく生体での病理作用、生理作用等に関する知見を得ている。抗酸化・抗癌剤研究では、スーパーオキシドジスムターゼミックスに基づく抗酸化剤さらにはその作用による抗癌剤を創製し、高い抗癌作用を有するナノドラッグデリバリーシステムを構築している。

Abstract: The author explains in detail for the sensor research detecting reactive oxygen species (ROS) *in vivo* and for the research of antioxidant and anticancer drug as the studies on ROS by means of biomimetic approaches. Firstly, in the sensor research, he creates the electrochemical sensor that it is possible to detect and determine the quantity of ROS such as superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) *in situ*. Then, he obtains the knowledge for pathology and physiological actions based on ROS in various model as ischemia-perfusion, ovulation, *etc.* Secondly, in the drug research, he creates the antioxidant and anticancer drug on the basis of superoxide dismutase (SOD) mimics. Then, he fabricates the nano-drug delivery system (n-DDS) having a potential to act as a carcinostatic agent.

Key words: Biomimetic approach, Reactive oxygen species (ROS), Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), ROS sensor, Anticancer drug, Nano-drug delivery system (n-DDS)

1 はじめに

生体の多くは呼吸により酸素 (O_2) を取り入れ、それを細胞内に運んで有機物を酸化する際に発生するエネルギーを利用して生命を支えている。その過程でスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) 等の活性酸素 [厳密には活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) であるが、ここでは活性酸素と略称する] が生成する。生体において $O_2^{\cdot-}$ のような活性酸素は生命機構を支える

不可欠な因子として機能しており、また、過剰な活性酸素の生成に対してはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ等のラジカル消去系酵素を備えることにより恒常的なバランスを保っている [生理作用 (“作用” と略称する)]。しかしながら、生体内で活性酸素の生成と消去の恒常性が崩れて酸化ストレス状態になると、大量の活性酸素が生成されて強いラジカル毒性が生じ、引いては、炎症疾患、神経疾患、動脈硬化、癌、糖尿病、虚血再灌流障害、加齢促進等の多くの病態に陥ると考えられている [病理作用 (“障害” と略称する)]。このため、それら生理作

連絡者：湯浅 真
E-mail : yuasa@rs.noda.tus.ac.jp

用(作用), 病理作用(障害)等の機序, 制御, 防止等に関する広範な研究がなされている¹⁻¹⁰⁾。特に, 脂質, 脂質関連の生体物質等に関する科学ならびに技術分野においても, 多数の活性酸素に関する研究が展開されている^{2, 4, 5-10)}。

著者は, 永年に亘り, 細胞(脂質膜), ヘムタンパク質等のバイオミメティックケミストリーを研究してきている。特異的な機能を有するヘムタンパク質系の活性中心であるヘム(鉄(II)イオンを有する金属ポルフィリン)に着目し, ポリペプチド等の役割を代替する修飾を施した金属ポルフィリンをミミックすることにより, 高性能な先端材料の創製を展開している(Fig. 1)。例えば, Table 1⁶⁾に示すように, 赤血球ミックスである人工酸素運搬体, シトクロムc酸化酵素系ミックスである燃料電池触媒等の高機能材料の創製を展開してきた^{6, 11-20)}。特に, このバイオミメティックケミストリーによるアプローチに基づいた活性酸素に関する研究を精力的に推進している⁶⁻¹⁰⁾。ここでは, 活性酸素の恒常性維持や非恒常性状態の早期発見と活性酸素による癌細胞や組織への対処, 消失等を目指して, 生体内における活性酸素検出としてのセンサー研

究^{6-8, 10, 21-41)}ならびに生体内における活性酸素利用としてSOD ミックスのナノドラッグデリバリーシステム(n-DDS)による抗酸化・抗癌研究^{6, 9, 10, 42-58)}に(Table 1の網掛け部分)について詳説する。

2 活性酸素センサーに関する研究

生体内において *in situ* で $O_2^{\cdot -}$ 等の活性酸素を検出, さらに定量できる電気化学的なセンサーをバイオミメティックアプローチにより創製した。具体的には, Fig. 2^{7, 8, 10, 21)}に示すように, シトクロムcやSODの活性中心に対応する鉄ポルフィリンに導電性高分子の単量体であるチオフェンの置換基を有するミックスを新規に分子設計ならびに合成し, その導電性重合膜を電極触媒として用い, 活性酸素の酸化電流を計測することを原理とする。本センサーは全合成かつ全固体型のセンサーであり, 生体用センサーとしてニードル型やカテーテル型を作製した(Fig. 3^{7, 8, 10, 21)})。どちらも, 1 mmφ程度の同軸上に中心より作用極/絶縁シールド/対極が設定され, これのみで生体内での計測を可能にしている。

Fig. 4 (a)^{7, 21)}に本センサーの電極触媒である導電性

Fig. 1 Biomimetic chemistry of hemoprotein systems.

Table 1 Functions of hemoprotein systems and these biomimetic chemistry⁶⁾.

hemoprotein systems	functions (reactions)	biomimetic chemistry
Hemoglobin	O_2 transport in blood ($[Fe(II)P]_4 + 4O_2 \rightleftharpoons [Fe(II)P-O_2]_4$)	artificial blood
Myoglobin	O_2 storage in muscle tissue ($Fe(II)P + O_2 \rightleftharpoons Fe(II)P-O_2$)	(O_2 carrier)
Cytochromes	e^- transfer in energy production system ($Fe(III)P + e^- \rightleftharpoons Fe(II)P$)	reactive oxygen species (ROS) sensor
Cytochrome c oxidase	O_2 reduction catalyst in energy production system ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$)	cathode catalyst of fuel cell
Cytochrome P-450	O_2 (or O) addition catalyst in metabolism system ($S + O_2^* + XH_2 \rightarrow SO^* + X + H_2O$)	catalyst of synthesis
Superoxide dismutase	$O_2^{\cdot -}$ dismutation catalyst <i>in vivo</i> ($O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)	anti-oxidant anti-cancer drug
Peroxidase	use (reduction) of H_2O_2 <i>in vivo</i> ($H_2O_2 + XH_2 \rightarrow 2H_2O + X$)	anti-oxidant
Catalase	decomposition of H_2O_2 <i>in vivo</i> ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)	biosensing system
Chlorophyll	photosynthesis in plant (Photoenergy $\rightarrow$ Chemical energy (Energy conversion))	artificial photosynthesis (H_2 production)

Fig. 2 (a) Mechanism for the amperometric response of the electropolymerized ironporphyrin-modified reactive oxygen species (ROS) sensor based on catalytic oxidation of ROS and (b) structure of electropolymerized ironporphyrin^{7, 8, 10, 21)}.

Fig. 3 Images of ROS sensors, (a) needle-typed sensor, (b) catheter-typed sensor and (c) expanded image of sensor head, and (d) X-ray photograph of rat inserting catheter-typed sensor in blood vessel^{7, 8, 10, 21)}.

Fig. 4 (a) Differential pulse voltammograms (DPVs) at the electrode modified with electropolymerized ironporphyrin and bare electrode^{7, 21)}. (b) Current response from the sensor modified with the electropolymerized ironporphyrin obtained for a solution of xanthine (XAN) in pH 7.4 phosphate buffer solution in the absence (solid curve) and the presence (dotted curve) of superoxide dismutase (SOD). "XOD" and "SOD" in this figure show the addition xanthine oxidase (XOD) and SOD to the solution, respectively^{8, 21)}.

重合膜を修飾した炭素電極での微分パルスボルタモグラム (DPV) を示す。導電性重合膜を修飾していない裸の炭素電極では観測されないピークが示され、これは電極触媒である鉄ポルフィリンの鉄(II/III)に基づくレドックスピークであって、鉄ポルフィリンが効果的に作動している。さらに、Fig. 4 (b)^{8, 21)} に示す本センサーの中和試験より、キサンチン (XAN)/キサンチンオキシダーゼ (XOD) 系による活性酸素の発生および SOD による活性酸素の消失 (中和) が確認できる。また、Fig. 5^{7, 8, 10, 21)} に示すように、XAN/XOD 系の活性酸素発生系において、XOD 添加濃度の増加に伴ってセンサー電流値も増加しており、定常状態でのセンサー電流増加値 (ΔI) と XOD 添加濃度からの活性酸素濃度との相関が得られている。これらより、生体内での活性酸素の定量的な検出を可能にしている。

また、本センサーにおいて、電極触媒である鉄ポルフィリン、その導電性高分子となる単量体、電解重合法等の改良により、高感度化、高耐久性、抗血栓性等の性能向上を図り、従来のバイオセンサー等に比べて多くの利点を有するセンサーを構築している。例えば、超臨界二酸化炭素 (scCO_2) 溶媒中での電解重合により作製したセンサーによる高感度化の結果を Fig. 6⁴¹⁾ に示す。電極触媒である導電性重合膜を scCO_2 溶媒中で合成したものは、ジクロロエタンのような有機溶媒中で合成したものに比べ、拡散係数が大きく、電荷移動速度が比較的遅い scCO_2 環境によりゆっくりと高分子成長することで均一かつ薄い膜が形成される (Fig. 6 (a))。このため、導電性、触媒密度等が向上し、高い電流応答に基づく高感度化が達成できる。有機溶媒中で合成したものに比べ数 10 倍の電流応答、低濃度検出が可能になる (Fig. 6 (b))。

本センサーは、前述の Fig. 3 のようにニードル型やカテーテル型に成形し、生体内に留置した状態で継続的に活性酸素を計測し、*in vivo* における各種虚血再かん流

Fig. 5 (a) Current responses from ROS sensor obtained by the addition of various amounts of xanthine oxidase (XOD) to xanthine (XAN) solutions and (b) its working curve for ROS such as superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot -}$) detection^{7, 8, 10, 21)}.

Fig. 6 (a) Growing process of the ironporphyrin films electropolymerized in organic solvent such as dichloroethane (CH₂Cl₂) and in supercritical carbon dioxide (scCO₂) solvent. (b) working curves for ROS such as O₂•⁻ detection by using the electrodes modified with electropolymerized ironporphyrin in CH₂Cl₂ and in scCO₂ solvents⁴¹⁾.

モデル, 炎症モデル, 排卵モデル等において, 活性酸素に基づく生体における病理作用, 生理作用等に関する知見を明らかにしている。例えば, ヒトを含めた哺乳類動物において排卵現象に活性酸素が関与していることが示唆されている^{59, 60)}。ニードル型センサーを用いたウサギ卵巣での *in vivo* 計測によりこの現象を評価している (Fig. 7²³⁾)。ウサギ卵巣としては, 卵胞の過剰発育を促す馬絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG あるいは妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG)) と排卵を促進するヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を両投与した排卵誘起群 (図中の “eCG+hCG”), eCG を投与した卵胞発育群 (図中の “eCG”) およびホルモンを投与していない未処置群 (図中の “sham”) を検討し, eCG+hCG, eCG および sham 群の確認を目視観察および酵素免疫測定 (EIA) による血中ステロイド (エストラジオール (E₂) およびプロゲステロン (P₄)) 濃度変化より行っている (Fig. 9 (a) および (b))。これらに基づき, 各群についてウサギ卵巣実質内にセンサーを穿刺してセンサーからの電流応答を計測している。定常状態での電流値 (Fig. 7 (c)) の比較により, 排卵処置をした eCG+hCG 群のウサギ卵巣のみが他に比べて高い電流値を示している (Fig. 9 (d))。排卵中では活性酸素を産生する好中球やマクロファージが集積すること, 活性酸素の代謝・消去系酵素である SOD が局在すること等が報告されてお

Fig. 7 *in vivo* detection of ROS such as O₂•⁻ in the area of the ovary at the time of ovulation of rabbit by using the needle-typed sensor. Blood-sex steroid concentrations such as (a) estradiol (E₂) and (b) progesterone (P₄) of the group administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (eCG+hCG), the group administering eCG (eCG) and the sham group. (c) Current response from ROS sensor and (d) the current values of the eCG+hCG, eCG and sham groups and blank²³⁾.

Fig. 8 *in vivo* detection of ROS such as O₂•⁻ in the ischemia-reperfusion injury model of rat forebrain by using the catheter-typed sensor. (a) Comparison with the reperfusion group, the reperfusion and SOD addition group and the sham group. (b) Dosage effect of ulinastatin (UTI)^{31, 39)}.

Fig. 9 (a) TEM image of ironporphyrin-loaded liposome as anticancer nano-drug delivery system (n-DDS) and (b) its structure and mechanism of anticancer action^{9, 45)}.

り^{59, 60)}, この高い電流値は活性酸素の発生によるものと考えられる。このように, ニードル型センサーによるウサギ卵巣での *in vivo* 計測により, 排卵時の活性酸素の関与を示唆する結果が得られている。

生体内において活性酸素が発生する事例として組織, 臓器等での虚血再灌流がある。カテーテル型センサーを用いてラットの虚血再灌流における *in vivo* 計測を行い, 活性酸素発生を評価している³⁰⁻⁴¹⁾。例えば, カテーテル型センサーをラット頸静脈内に留置し, 虚血時より電流値を経時的に計測している (Fig. 8^{31, 39)})。ラットにセンサーを設置しただけの対照群 (sham 群) では, ほぼ定常的な値を示すが, 虚血再灌流モデルのラット (reperfusion 群) においては, 再灌流後に電流値が増加している。さらに, 虚血再灌流後に SOD を添加したラット (reperfusion+SOD 群) においては, 再灌流後に電流値が増加し, SOD を添加すると電流値が減少している。これらより, 従来から指摘されていた虚血再灌流での活性酸素・発生を *in vivo* かつ *in situ* で計測, 確認している (Fig. 8 (b))。また, このような虚血再灌流障害に臨床的な効果を発現するウリナスタチン (ウリナリー・トリプシン・インヒビター (UTI)) を虚血再灌流モデルに投与した場合においては, UTI 添加により虚血再灌流障害が軽減されている (Fig. 8 (c))。このように, 診断, 治療等のモニターとして, 本センサーの可能性が示唆されている。

3 抗酸化剤・抗癌剤に関する研究

生体内の過剰な活性酸素の消去や代謝を促進する検討の一つとして, SOD の作用 ((1)~(3) 式) を有するモデル化合物 (SOD ミックス) が研究され, さらに, これを用いた生体内における活性酸素利用が推進されている。また, ナノオーダーのドラッグデリバリーシステムとして, 水溶性高分子, マイクロスフェア, 高分子ミ

セル, そして細胞ミックスであるリポソーム等を用いたナノドラッグデリバリーシステム (n-DDS) 技術が展開されている。ここで, 生体用 n-DDS の要件としては, ①腎排泄, 異物排除システム, 細網内皮系 (Reticuloendothelial System, RES) 等の排泄・代謝回避性, ②血中安定性・滞留性, ③患部組織・細胞集積性, ④患部細胞内輸送性, ⑤患部 (組織・) 細胞選択攻撃性等がある^{9, 61)}。

[SOD[M⁽ⁿ⁾⁺] および SOD[M⁽ⁿ⁻¹⁾⁺]: SOD の酸化状態

および還元状態, H⁺: 水素イオン, H₂O₂: 過酸化水素]

著者は, これらを融合し, 投与から癌細胞内作用までを視野に入れて分子設計した, SOD および細胞ミックスである修飾鉄ポルフィリンとリポソームから構成される抗癌作用の n-DDS を検討している (鉄ポルフィリン導入リポソーム, Fig. 9^{9, 45)})。この抗癌作用 n-DDS には, Fig. 10⁹⁾ に示すように, 投与後の①および②を考慮した粒径 (4 nm~400 nm 程度), ポリエチレングリコール (PEG) 表面修飾等が, ③を考慮した EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果を発現させる粒径 (100 nm 以下), 光線力学療法 (Photo-dynamic Therapy) の裏付けによるポルフィリンのリガンド物質としての導入等が, ④として細胞へのリポソームの吸着, 融合, エンドサイトーシスを考慮した pH 感受性, リガンド物質導入等の機能性リポソーム設計が, そして, ⑤として癌細胞に選択的な DNA 阻害, 細胞膜損傷, 細胞死等を誘導させる薬効として鉄ポルフィリンによる抗酸化作用・Fenton 反応誘導のアポトーシス・ネクローシス作用等が施されている。

著者らが検討している SOD ミックスである修飾ヘムタンパク質^{43, 46, 48)}, 高分子結合金属ポルフィリン^{42, 44)}等の SOD 活性は, 分子設計において活性酸素導入のためのカチオン性官能基を活性部位近傍に構築したもので, その付近の高分子ドメインの立体障害により影響を受ける。そこで, 高分子系であっても立体障害の影響を受けないような分子設計が重要となり, デンドリマー型

Fig. 10 Mechanisms for the n-DDS of anticancer drug and its factor on molecular design (a) in the prescription to cancer cell and (b) in cancer cell⁹⁾.

多量化金属ポルフィリンを⁵⁰⁾, さらに, より高分子量で, かつ, 活性部位である鉄やマンガン等の金属ポルフィリンを表面・表層に分子分散させる試みとして, リポソームの表層付近にカチオン性金属ポルフィリンを導入した高分子系 SOD ミミックスである金属ポルフィリン導入リポソームを得ている。これは, 水溶性であるカチオン性金属ポルフィリンをリポソーム (小さな一枚膜ベシクル, SUV) の表層に導入するために, カチオン性の金属ポルフィリンとアニオン性の脂肪酸イオンからイオンコンプレックスを構築させたハイブリッドな分子集合体構造である。特に, ①リポソームを SUV にしているので粒径 100 nm を切るサイズに調製できること (TEM 観察および動的光散乱測定より粒径 30 nm 程度), ②リポソームの成分組成が容易に変えられるので PEG, 糖鎖, リガンド等を導入でき, かつ, 温度感受性, pH 感受性等の機能を付与できること, ③薬剤 (活性部位) がイオンコンプレックスであるので容易に刺激に対して薬剤徐放ができること, ④リポソームなので二分子膜中に疎水性および内水相に親水性の他の薬剤を封入できること, ⑤金属ポルフィリンが表層付近に存在しているのでこれ自体がリガンド物質としても作用すること等であ

る。さらに, この金属ポルフィリン導入リポソームは, ⑥修飾ヘムタンパク質, 高分子結合金属ポルフィリン等と比べ, 高い SOD 活性を示し, 高分子系でない低分子系の SOD ミミックスと同等である (k_{cat} 値で $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 程度^{9, 45)})。また, ⑦金属ポルフィリンの親疎水バランスを制御できるのでポルフィリン錯体の二分子膜中での存在位置を変化させることが可能となり, SOD 活性をも調整することもできることも興味深い点である。

in vitro におけるポルフィリン導入リポソームの細胞内取り込みの確認をフローサイトメトリー (FCM) および共焦点レーザー走査顕微鏡観察 (CLSM) から行っている (Fig. 11 および 12⁵⁷⁾)。FCM での蛍光プローブとして, SOD ミミックスと同様な環構造を有する金属フリーのカチオン性ポルフィリンを用いている。Fig. 11 において, ポルフィリン導入リポソームを添加していないコントロールに比べ, ポルフィリン導入リポソームでは細胞当たりの蛍光強度の増大が観測され, 細胞へのポルフィリン導入リポソームの取り込みの可能性が示されている。さらに, 同様の蛍光プローブを用いた CLSM (Fig. 12 (a)) から細胞内での蛍光が観測されている。また, 蛍光プローブとして Dextran-Texas RedTM を用いた CLSM (Fig. 12 (b)) からは細胞へのポルフィリン導入

Fig. 11 Flow cytometry (FCM)-histograms (single linear region) of the porphyrin-loaded liposomes composed of (a) 5, 10, 15, 20-tetra (N-methylpyridinium-4-yl) porphyrin ($\text{H}_2\text{T2MePyP}$) and (b) 5, 10, 15, 20-tetra (S,S-dimethylsulfonium-4-yl) porphyrin ($\text{H}_2\text{T4Me2SuP}$) as fluorescence probes⁵⁷⁾.

Fig. 12 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of the porphyrin-loaded liposomes in cell by using the fluorescence probes as (a) metal-free porphyrin and Dextran-Texas RedTM.

リポソームの取り込みがエンドサイトーシスによる傾向であることが示唆されている。

鉄ポルフィリン導入リポソームによる抗癌作用は、癌細胞中に高濃度存在する活性酸素である $O_2^{\cdot -}$ を抗酸化剤であり、かつ、Fenton 試薬である鉄ポルフィリンを有する本系が消去すると大量の過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($OH^{\cdot}$) 等が生成し、これらによりアポトーシス、ネクローシス等が誘導され (抗酸化作用・Fenton 反応誘導のアポトーシス・ネクローシス等)、癌細胞をより優先的に死滅させるのである。例えば、Fig. 13^{9, 10, 45)} にマウス肺癌細胞 Lewis Lung Carcinoma (LLC) を用いた Alamar Blue Assay に基づく殺細胞試験 (*in vitro* 試験) の結果を示す。各抗癌剤での細胞生存率 (LD) 50% における薬剤濃度 (LD_{50}) 値を比較したところ、シスプラチン $5.0 \times 10^{-5} M$ > マイトマイシン C (MMC) $2.6 \times 10^{-5} M$ > 金属ポルフィリン錯体導入 DMPC リポソーム $1.3 \times 10^{-5} M$ の順となり、金属ポルフィリン錯体導入リポソームは優れた抗癌作用を示している。さらに、リポソームを pH 感受性リポソームにしたところ、この LD_{50} 値は、 $6.5 \times 10^{-6} M$ となり、さらに抗癌作用が向上

Fig. 13 Cell viability tests of Lewis lung carcinoma (LLC) tumor cells using alamar-blue assay for the liposomes in the absence (○) and the presence of ironporphyrin (□), the pH-sensitive liposomes in the absence (●) and the presence of ironporphyrin (■), cisplatin (△), and mitomycine c (▲). The ironporphyrin concentration (in μM) was determined from the amount of the amphiphile (in mM), assuming that $[\text{ironporphyrin}]/[\text{amphiphile}] = 1/200$ ^{9, 10, 45)}.

している。これより、抗癌作用 n-DDS としての優れた効果が見出されている。

鉄ポルフィリン導入リポソームによる抗癌作用の *in vivo* 試験として、メラノーマ (皮膚癌) 移植マウスにおける動物実験を行った。マウスのフットパットにメラノーマ (皮膚癌) 分散液を投与して癌を移植し、移植後 10 d において癌が定着しているのを確認している。尾静脈より鉄ポルフィリン導入リポソーム等の抗癌剤を 0, 4, 8 および 12 d で 4 回投与し、2 d 間隔で 20 d 程度まで癌体積、体重等の経過測定をしている。例えば、Fig. 14 に 20 d 後の目視観察を示す。抗癌剤を投与していないマウス群 (コントロール群) では、癌体積の大きな増大が観察される。また、参照試料である市販品の抗癌剤、シスプラチンを投与したマウス群 (シスプラチン投与群) では、コントロール群に比べて癌体積が減少している。鉄ポルフィリン導入リポソームを投与したマウス群 (鉄ポルフィリン導入リポソーム投与群) では、コントロール群およびシスプラチン投与群に比べて、より癌体積が減少し、数例完全寛解しているもの (Fig. 14 (c) の左から 1 番目と 3 番目) も観察される。また、別のマウスの動物試験において、上記と同様な投与と経過測定を行い、経過日数～相対癌体積増加率の関係をまとめたものを Fig. 15⁵⁸⁾ に示す。コントロール群や参照試料である市販品の抗癌剤、マイトマイシン c を投与したマウス群 (マイトマイシン c 投与群) では、癌体積の増大が見られる。鉄ポルフィリン、鉄ポルフィリン導入 DPPC リポソーム、鉄ポルフィリン導入 pH 感受性リポソーム等を投与したマウス群では、癌体積増大が抑制される傾向を示している。鉄ポルフィリン導入 pH 感受性リポ

Fig. 14 Visual observations on the footpad of cancer transplantation-mice. (a) the control group, (b) the group administering cisplatin and (c) the group administering ironporphyrin-loaded liposome.

Fig. 15 Time dependence to relative tumor volume in treated mice with control (a), mitomycin C (b), ironporphyrin (c), ironporphyrin-loaded DPPC liposomes (d), and ironporphyrin-loaded pH-sensitive liposomes (e)⁵⁸⁾.

ソーム系では完全寛解するものも見られる。特に、鉄ポルフィリン系に比べて鉄ポルフィリン導入リボソーム系では癌体積増加率が減少しており n-DDS のため効果的に薬剤が送達されていること、DPPC リボソーム系に比べて pH 感受性リボソームでは癌体積増加率がさらに減少しておりエンドサイトーシス等によって薬剤が癌細胞により効果的に取り込まれていること等が考察される。*in vivo* においても、抗癌作用 n-DDS としての優れた効果が見出されている。

4 おわりに

以上のように、活性酸素の恒常性維持や非恒常性状態の早期発見と活性酸素による癌細胞や組織への対処、消失等を目指して、生体内における活性酸素検出としてのセンサー研究、生体内における活性酸素利用として SOD ミミックスのナノドラッグデリバリーシステム (n-DDS) による抗酸化・抗癌研究等のバイオミメティックアプローチによる活性酸素に関する研究を解説した。もしこれらの技術が可能になれば、健康状態をセンサーにより常に計測し、抗酸化・抗癌作用のサプリメントや薬剤等により健康維持等が可能となり、Fig. 16 に示すような人間の健康管理、食の安全管理等といった「豊かな社会の実現」が可能になるでしょう。現在、活性酸素に関する研究・開発は、より広範な領域により多彩な技術が広がっている。これらの結実による先端技術の実現、さらには、豊かな社会の実現を切望する次第である。

最後に、本研究の推進と展開ならびに本研究の貴学会賞受賞に当たり、精神的な支えとなった家族、研究に協力頂いた研究室のスタッフ、学生、修了・卒業された同

Fig. 16 The realization of generous human society by means of biomimetic approaches.

窓の皆様ならびに貴学会の関係者の皆様に心より深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 2) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦, 活性酸素 - 生物での生成・消去・作用の分子機構 -, 共立出版 (1988).
- 3) D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **99**, 2573 (1999).
- 4) 吉川敏一, 河野雅弘, 野原一子, 活性酸素・フリーラジカルのすべて - 健康から環境汚染まで -, 丸善 (2000).
- 5) 大柳善彦, 井上正康, 活性酸素と老化制御 - 多細胞社会の崩壊と長寿へのシナリオ -, 共立出版 (2001).
- 6) 湯浅真, オレオサイエンス, **1**, 131 (2001).
- 7) 湯浅真, 小柳津研一, 化学と教育, **53**, 128 (2005).
- 8) M. Yuasa, K. Oyaizu, *Curr. Org. Chem.*, **9**, 1685 (2005).
- 9) 湯浅真, 小柳津研一, 村田英則, オレオサイエンス, **6**, 307 (2006).
- 10) 湯浅真, オレオサイエンス, **11**, 45 (2011).
- 11) 土田英俊, 湯浅真, 人工臓器, **14**, 934 (1985).
- 12) 湯浅真, 土田英俊, 高分子錯体アニユアルビュー, **11** (1986).
- 13) M. Yuasa, K. Aiba, Y. Ogata, H. Nishide, E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 558 (1986).
- 14) M. Yuasa, Y. Tani, H. Nishide, E. Tsuchida, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1917 (1987).
- 15) M. Yuasa, H. Nishide, E. Tsuchida, A. Yamagishi, *J. Phys. Chem.*, **92**, 2897 (1988).
- 16) 湯浅真, 表面, **32**, 680 (1994).
- 17) 湯浅真, 表面技術, **46**, 303 (1995).
- 18) 湯浅真, 表面, **36**, 157 (1998).
- 19) 湯浅真, 日本油化学会誌, **49**, 315 (2000).
- 20) 湯浅真, 小柳津研一, 村田英則, ケミカルエンジニアリング, **51**, 353 (2006).
- 21) M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Yamaguchi, M. Ishikawa, K.

- Eguchi, T. Kobayashi, Y. Toyoda, S. Tsutsui, *Polym. Adv. Technol.*, **16**, 287 (2005).
- 22) M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Yamaguchi, M. Ishikawa, K. Eguchi, T. Kobayashi, Y. Toyoda, S. Tsutsui, *Polym. Adv. Technol.*, **16**, 616 (2005).
- 23) 成相孝一, 石川満寿英, 江口勝哉, 坪田昭人, 藤瀬清隆, 小柳津研一, 湯浅真, 第50回日本不妊学会総会・学術講演会抄録, No.O-05 (2005, 熊本).
- 24) 湯浅真, 小柳津研一, 村田英則, 石川満寿英, 筒井暁, 南波真広, 高分子論文集, **63**, 427 (2006).
- 25) M. Yuasa, K. Oyaizu, H. Murata, T. Kobayashi, T. Kobayashi, C. Kobayashi, *J. Oleo Sci.*, **56**, 81 (2007).
- 26) 湯浅真, 小柳津研一, 村田英則, 江口勝哉, 豊田裕次郎, 高分子論文集, **64**, 90 (2007).
- 27) 湯浅真, 小柳津研一, 村田英則, 大関聖子, 青木徹也, *Mater. Technol.*, **25**, 175 (2007).
- 28) 湯浅真, 小柳津研一, 村田英則, 豊田裕次郎, 南波真広, 設楽正樹, 高分子論文集, **65**, 349 (2008).
- 29) 湯浅真, 小林朋広, 青木徹也, 藤井宏行, 五十嵐政嗣, 村田英則, *Electrochemistry*, **77**, 940 (2009).
- 30) H. Shinagawa-Aki, M. Fujita, S. Yamashita, K. Fujimoto, K. Kumagai, R. Tsuruta, S. Kasaoka, T. Aoki, M. Nanba, H. Murata, M. Yuasa, I. Maruyama, T. Maekawa, *Brain Res.*, **1292**, 180 (2009).
- 31) M. Fujita, R. Tsuruta, S. Kasaoka, K. Fujimoto, R. Tanaka, Y. Oda, M. Nanba, M. Igarashi, M. Yuasa, T. Yoshikawa, T. Maekawa, *Free Rad. Biol. Med.*, **47**, 1039 (2009).
- 32) T. Ono, R. Tsuruta, M. Fujita, H. Shinagawa-Aki, S. Kutsuna, Y. Kawamura, J. Wakatsuki, T. Aoki, C. Kobayashi, S. Kasaoka, I. Maruyama, M. Yuasa, T. Maekawa, *Brain Res.*, **1305**, 158 (2009).
- 33) R. Tsuruta, M. Fujita, T. Ono, Y. Koda, Y. Koga, T. Yamamoto, M. Nanba, M. Shitara, S. Kasaoka, I. Maruyama, M. Yuasa, T. Maekawa, *Brain Res.*, **1309**, 155 (2010).
- 34) Y. Koda, R. Tsuruta, M. Fujita, T. Miyauchi, K. Kaneda, M. Todani, T. Aoki, M. Shitara, T. Izumi, S. Kasaoka, M. Yuasa, T. Maekawa, *Brain Res.*, **1311**, 197 (2010).
- 35) S. Kutsuna, R. Tsuruta, M. Fujita, M. Todani, T. Yagi, Y. Ogino, M. Igarashi, K. Takahashi, T. Izumi, S. Kasaoka, M. Yuasa, T. Maekawa, *Brain Res.*, **1313**, 242 (2010).
- 36) M. Todani, R. Tsuruta, M. Fujita, T. Nakahara, T. Yagi, C. Oshima, M. Igarashi, K. Takahashi, S. Kasaoka, M. Yuasa, T. Maekawa, *Free Rad. Res.*, **44**, 462 (2010).
- 37) R. Tanaka, M. Fujita, R. Tsuruta, K. Fujimoto, H. Shinagawa-Aki, K. Kumagai, T. Aoki, A. Kobayashi, T. Izumi, S. Kasaoka, M. Yuasa, T. Maekawa, *Inflammation Res.*, **59**, 597 (2010).
- 38) M. Fujita, R. Tsuruta, T. Kaneko, Y. Otsuka, S. Kutsuna, T. Izumi, T. Aoki, M. Shitara, S. Kasaoka, I. Maruyama, M. Yuasa, T. Maekawa, *Shock*, **34**, 299 (2010).
- 39) Y. Koga, R. Tsuruta, M. Fujita, Y. Koda, T. Nakahara, T. Yagi, T. Aoki, C. Kobayashi, S. Kasaoka, M. Yuasa, T. Maekawa, *Neurological Res.*, **32**, 925 (2010).
- 40) T. Kaneko, C. Kaise, Y. Kimoto, S. Suzuki, T. Kondo, M. Yuasa, *J. Oleo Sci.*, **60**, 647 (2011).
- 41) 湯浅真他, 特許第4128530号, 特許第4909632号等.
- 42) 湯浅真, 山口有朋, 大平俊明, 堀内愛子, 川上浩良, 朝山章一郎, 長岡昭二, *Mater. Technol.*, **21**, 7 (2003).
- 43) M. Yuasa, A. Yamaguchi, S. Mikami, U. Midorikawa, H. Kawakami, S. Nagaoka, *J. Oleo Sci.*, **52**, 149 (2003).
- 44) A. Yamaguchi, T. Ishino, N. Matsukura, H. Kawakami, S. Nagaoka, M. Yuasa, *J. Oleo Sci.*, **52**, 269 (2003).
- 45) M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Horiuchi, A. Ogata, T. Hatsugai, A. Yamaguchi, H. Kawakami, *Mol. Pharm.*, **1**, 387 (2004).
- 46) M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Yamaguchi, T. Hayashi, U. Midorikawa, *J. Oleo Sci.*, **54**, 115 (2005).
- 47) M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Ogata, N. Matsukura, A. Yamaguchi, *J. Oleo Sci.*, **54**, 233 (2005).
- 48) M. Yuasa, K. Oyaizu, T. Hayashi, A. Yamaguchi, *J. Oleo Sci.*, **54**, 413 (2005).
- 49) M. Yuasa, K. Oyaizu, Y. Hanyu, K. Kasahara, A. Yamaguchi, *J. Oleo Sci.*, **54**, 465 (2005).
- 50) M. Yuasa, K. Oyaizu, Y. Hanyu, T. Hayashi, A. Yamaguchi, *J. Oleo Sci.*, **54**, 513 (2005).
- 51) H. Kawakami, K. Hiraka, M. Tamai, A. Horiuchi, A. Ogata, T. Hatsugai, A. Yamaguchi, K. Oyaizu, M. Yuasa, *Polym. Adv. Technol.*, **18**, 82 (2007).
- 52) M. Yuasa, K. Oyaizu, H. Murata, T. Hatsugai, A. Ogata, *J. Oleo Sci.*, **56**, 87 (2007).
- 53) M. Yuasa, K. Oyaizu, H. Murata, M. Komuro, *J. Oleo Sci.*, **56**, 95 (2007).
- 54) 村田英則, 小柳津研一, 小室雅廉, 阿波亮太, 月岡東恵, 早乙女智洋, 湯浅真, 色材, **81**, 37 (2008).
- 55) 村田英則, 伊藤裕二, 新保智幸, 小柳津研一, 湯浅真, 高分子論文集, **65**, 277 (2008).
- 56) K. Hiraka, M. Kanehisa, M. Tamai, S. Asayama, S. Nagaoka, K. Oyaizu, M. Yuasa, H. Kawakami, *Colloids & Surf. B: Biointerfaces*, **67**, 54 (2008).
- 57) 湯浅真, 佐原義純, 結城りさ, 立石哲也, 村田英則, 原泰志, 小島周二, 高分子論文集, **67**, 82 (2010).
- 58) 湯浅真他, 特許第4741205号等.
- 59) T. Suzuki, N. Sugino, T. Fukaya, S. Sugiyama, T. Uda, R. Takaya, A. Yajima, H. Sasano, *Fertility and Sterility*, **72**, 720 (1999).
- 60) 植原久司, 日本産科婦人科学会雑誌, **52** (11) N-403 (2000).
- 61) 永井恒司監修, 新・ドラッグデリバリーシステム, シーエムシー (2000).