

フリーラジカルをプローベとした画像化法

藤井 博 匡

東京都臨床医学総合研究所

はじめに

今から100年以上も前から、多くの化学反応においてフリーラジカルという孤立電子を持った不安定な分子が重要な働きをしていることが明らかにされている。しかし、こんな不安定で反応性の高いフリーラジカルがまさか生体内で生じているとは全く想像もされてはいなかった。ところが、1965年、山崎らは、生体内の酵素が触媒する化学反応においてもフリーラジカルが生成している可能性を示唆する論文を発表した。その後、McCordら¹⁾により、生体内でフリーラジカルが生成していることが証明され、この生成したラジカルがスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) であることも明らかにされた。それ以来、フリーラジカルが関与する生体内反応に関心が集まるようになり、生体から生成されるフリーラジカルの検出法を検討したり、有害な活性酸素などのフリーラジカルを消去する研究などが盛んに行われるようになった。現在、家庭でもよく見かけるポリフェノール類を含んだ食品なども、このような研究から生まれてきたものである。

一方、現在まで、フリーラジカルを検出しようという方法が幾つも報告されている。フリーラジカルは一般に反応性に富んで寿命が短いため、フリーラジカルを直接観測するのではなく、そのフリーラジカルから生じる安定な生成

物を観測するのが主流であった。例えば、先の例の $O_2^{\cdot-}$ では、 $O_2^{\cdot-}$ を直接観測するのではなく、 $O_2^{\cdot-}$ から生じる過酸化水素を観測するのである。しかし、過酸化水素が生成している系で必ずしも $O_2^{\cdot-}$ が生成している訳ではなく、やはり、困難であっても、フリーラジカルを直接観測することは非常に重要である。そこで、本稿ではフリーラジカルを直接的に観測することができ、また、そのフリーラジカルの化学構造までも明らかにできる、電子スピン共鳴法 (electron spin resonance : ESR) を用いたフリーラジカル研究、特にフリーラジカルをプローベとした画像化法について紹介する。

フリーラジカルと ESR

現在、医学・生物学の領域で着目されているフリーラジカルとして、 $O_2^{\cdot-}$ 、一酸化窒素ラジカル (NO)、ヒドロキシラジカル (HO^{\cdot}) などが挙げられるが、これらのラジカルは生理的な条件下では寿命が数秒以下と短く不安定であるので、これらのラジカルの ESR スペクトルを観測するのは難しい。そこで、1960年代のフリーラジカルの初期の研究では、検体や生体から取り出した組織標品を急速に凍結してフリーラジカルの消滅を止め、そのラジカルの ESR スペクトルを観測しようとする研究手法が盛んに行われた。これらの研究から、大変興

キーワード EPR, free radicals, bioradicals, *in vivo*, imaging

味深いフリーラジカル種やラジカル反応が観測された。しかし、このような研究手法では、試料を凍結する過程でアーチファクトとしてのフリーラジカル（自動酸化産物など）が混在することが多く、現在この手法はあまり行われなくなった。一方、生体内で生成したフリーラジカルを生理的な条件下でリアルタイムに無侵襲で観測するため、1980年代から *in vivo* ESR の研究が開始された²⁾。

1. *In vivo* ESR システムについて

従来、常磁性物質の分析用に利用される ESR 装置では約 9 GHz の X バンド帯のマイクロ波を用いている。しかし、図1に示した水の誘電率のマイクロ波周波数依存性から 9 GHz では誘電損失が大きく、X バンドのマイクロ波を用いた ESR システムではマウスやラットなどの実験動物を生きたまま測定するこ

とは出来ない。そこで実験動物の測定に適した L バンド帯のマイクロ波・ラジオ波 (300~1200 MHz) でループ・ギャップ共振器 (loop gap resonator) を用いる ESR 測定システムの開発が進められてきた^{3)~5)}。

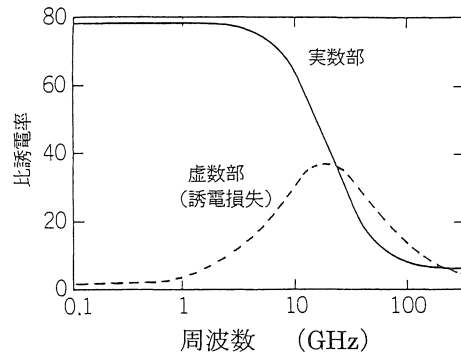


図1. 水の誘電率の周波数依存性

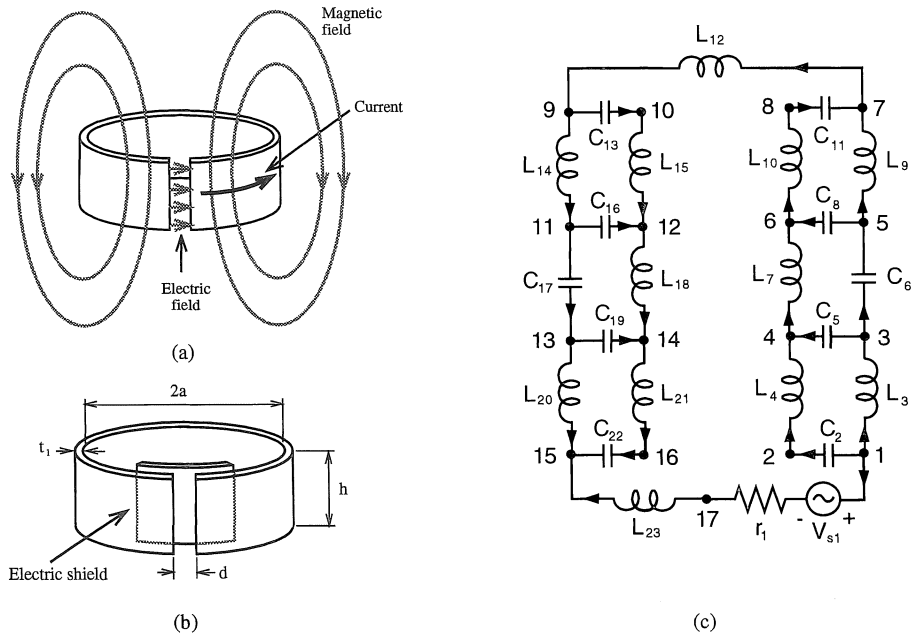


図2. ループ・ギャップ共振器の構造

(a)共振器の基本構造, (b)電解シールド付き共振器, (c)共振器の等価回路

1999年3月1日受理

別刷請求先 〒113-8613 東京都文京区本駒込3-18-22 東京都臨床医学総合研究所 藤井博匡

図2(a)はループ・ギャップ共振器の基本的な構造を示している。この共振器は円筒形の導体(ループ)と対向する導体端により形成されるギャップを有している。ループ部に形成されるインダクタンスと、ギャップ部に形成されるキャパシタンスにより共振回路が構成されている。共振器中心部に形成されるマイクロ波磁界は比較的均一な分布を示す。この部分にサンプルを挿入し ESR 測定(電子スピン共鳴計測)を行う。電界はギャップ部に集中しているが、ループの内側にも電界は存在する。そのため、マウスやラットなどのマイクロ波損失の大きいサンプルをループ部に挿入すると共振器の Q (共振先鋭度) が急激に低下する。これは、生体試料内での誘電損失に起因するもので、この損失を最小に押さえるために、図2(b)に示すような電界シールドをギャップ部の内側にもうけた共振器が使用されている。このタイプの共振器は、特にブリッジド・ループ・ギャップ共振器と呼ばれている^{3),5)}。図2(c)は、2ループ・2ギャップから構成されるブリッジド・ループ・ギャップ共振器の等価回路を表している。共振器はより細かい集中定数回路素子の組み合わせにより表されている。共振器は、電界シールドとループによって構成されるキャパシタ(例えば、C2, C5)とギャップ部のキャパシタ(C6)、ループ部のインダクタンス(例えば L12)などの素子に分割されている。この回路の振る舞いは、節点解析(電気回路を解析する一つの系統的手法)により求めることができる。回路中の枝(又は節点)の電圧(又は電流)を周波数の関数として求めることにより、共振器の共振周波数を計算することが可能である。一方、比較的低い周波数(0.5~2.0 GHz)を使用する *in vivo* ESR 計測では、サーフェスコイル形の共振器が使用されることもある。多くの場合、直径が数 mm から 2 cm 程度のコイルと高周波電送線路を用いた構造になっている。サーフェスコイルは局所的な情報を得るために使用されることが多く、実験動物の体内に挿入

して計測を行う場合もある。近年、サーフェスコイル型のプローブの共振周波数とマッチングを電子的に制御する試みも行われている^{6),7)}。ループ・ギャップ共振器とサーフェスコイルの形状を図3に示した。

2. スピントラップ法について : *ex vivo* ESR 法について

先に述べたように、生理的な条件下ではフリーラジカルの寿命は数秒と短く、たとえ高感度の *in vivo* ESR システムにより実験動物からフ

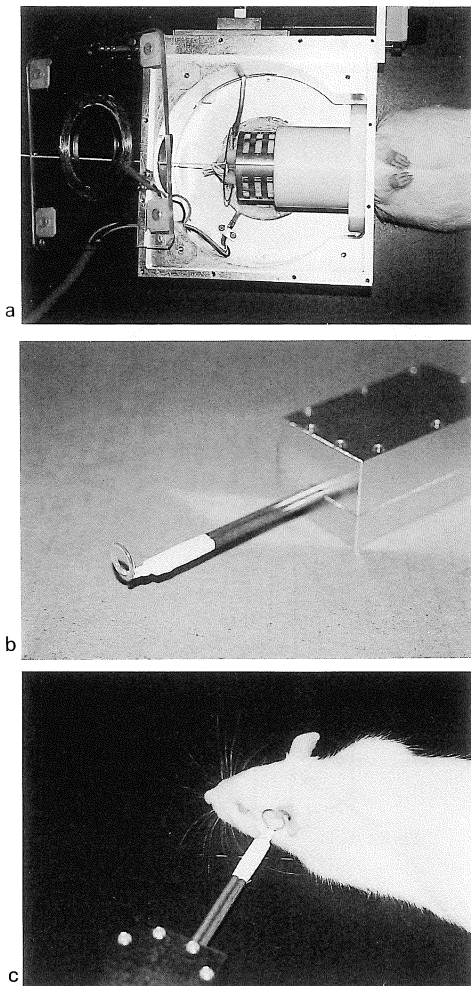


図3. ループ・ギャップ共振器(a)とサーフェスコイル(b, c)の構造

フリーラジカルの ESR スペクトルが観測できたとしても、そのスペクトルは数秒後には消えてしまっていることになる。そこで、不安定な（反応性の高い）フリーラジカルをスピントラップ剤と呼ばれる分子に捕獲させ、より安定なフリーラジカル種に変換して、そのフリーラジカルの ESR 特性を観測するスピントラップ技術（Spin-trapping method）が 1970 年代の初めに確立された^{8),9)}。フリーラジカル種を捕獲したスピントラップ剤（これを、ラジカルアダクトと呼ぶ）の ESR スペクトルは、捕らえたフリーラジカル種により多様に変化するので、そのスペクトルを解析することにより、捕らえたフリーラジカルの種類や化学構造を明らかにできるという利点がある。スピントラップ法の原理と広く一般に用いられているスピントラップ剤の例を図 4 に示した。5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO), α -phenyl-N-t-butyl-nitrone (PBN) は、共に $O_2^{\cdot-}$ や HO^{\cdot} などの活性酸素の捕獲に利用されている。

生体内で生成するフリーラジカルはごく微量であるので、たとえ不安定なフリーラジカルをスピントラップ剤で捕獲できたとしても、*in vivo* の状態でフリーラジカルの ESR スペクトルを観測することはたやすいことではない。そこで、あらかじめ実験動物に投与したスピントラップ剤によりフリーラジカルを捕獲した後、

組織試料を取り出して ESR スペクトルの測定を行う実験手法、*ex vivo* ESR の手法が一般に行われるようになり、*in vivo* 系では得られなかった興味深い結果が得られている。

In vivo ESR—生体内フリーラジカルの検出

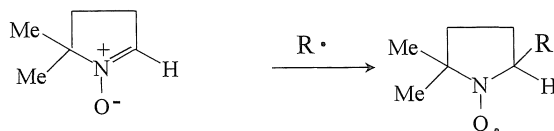
体外からの特別な刺激や誘導がなくても、体内で自然に発生してくるフリーラジカルとしてメラニンラジカルやアスコルビン酸ラジカルなどが挙げられる。これらのラジカルは、*in vitro* 系や *ex vivo* 系での実験でそれぞれのラジカルの ESR スペクトルが観測されている。これらのラジカルは比較的安定で長時間観測することができるが、*in vivo* 系ではほとんど検出されていない。

一方、薬物を実験動物に与えた際に、体内でその薬物から生成するフリーラジカルの ESR スペクトルが観測できるようになり、生体内フリーラジカルの特性が詳細に検討されている。

1. 芳香族ニトロソ化合物からのフリーラジカルの生成¹⁰⁾

発がん性を有する芳香族ニトロソ化合物が血中に混入するとフリーラジカルが生成することが見いだされ、芳香族ニトロソ化合物がマウスの体内に取り込まれた際に生成するフリーラジカルについて *in vivo* ESR 法により詳細に調べ

5,5-Dimethylpyrroline N-oxide (DMPO)



Phenyl-*tert*-butylnitrone (PBN)

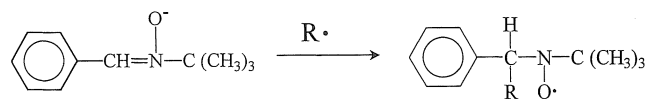


図 4. スピントラップ剤の構造とその反応機構

られた。発がん性を有するニトロソベンゼンをマウスの腹腔内に投与した場合、ニトロソベンゼンは比較的速やかに体内の不飽和脂肪酸と反応してニトロキシドラジカル誘導体を生成する。そのニトロキシドラジカルの ESR スペクトルが無侵襲で観測できるようになった。マウスの体内でのこのラジカルの濃度は 30~40 μM と非常に高く、また、寿命は 12 時間以上と長い。このラジカルの ESR 観測例は、生体内で薬物から誘導されたフリーラジカルを無侵襲下で観測した最初の報告例である。

2. ヒドラジン化合物からのフリーラジカル^{11),12)}

ヒドラジン誘導体は、医薬品の原料として広く一般に利用されている有用な物質である。ところがこれらの物質が体内に取り込まれると赤血球に何らかの作用を及ぼし溶血性の貧血を起こす。この原因が、ヒドラジンから生成されるフリーラジカルではないかと考えられていた。そこで、赤血球とヒドラジン化合物を含む *in vitro* 系で生成するフリーラジカルを捕らえる様々な試みがなされた結果、スピントラップ剤

の DMPO によりヘモグロビンのシステイン残基に S^{\cdot} が生成していることが明らかとなった。

3. カルシウムチャンネルブロッカーから生じるフリーラジカル

ニトロソベンゼンなどのニトロソ化合物が生体内で不飽和脂肪酸類と反応してニトロキシドラジカルが生じることを先に述べた。一方、nifedipine などのカルシウムチャンネルブロッカーは本来ニトロ化合物であるが光反応により比較的容易にニトロソ化合物に変換される。そこで、光照射によりニトロソ化した nifedipine をマウスの腹腔内に投与したところ、肝臓の組織においてニトロソ化 nifedipine からニトロキシドラジカルの生成が ESR で確認された。その結果を図 5 に示したが、このラジカルはニトロソベンゼンから生じたニトロキシドラジカルよりも寿命は短く（約数時間）、生体内での反応性は高いものと思われる。

フリーラジカルの視覚化—ESR イメージング

フリーラジカルの分布を視覚化する ESR イ

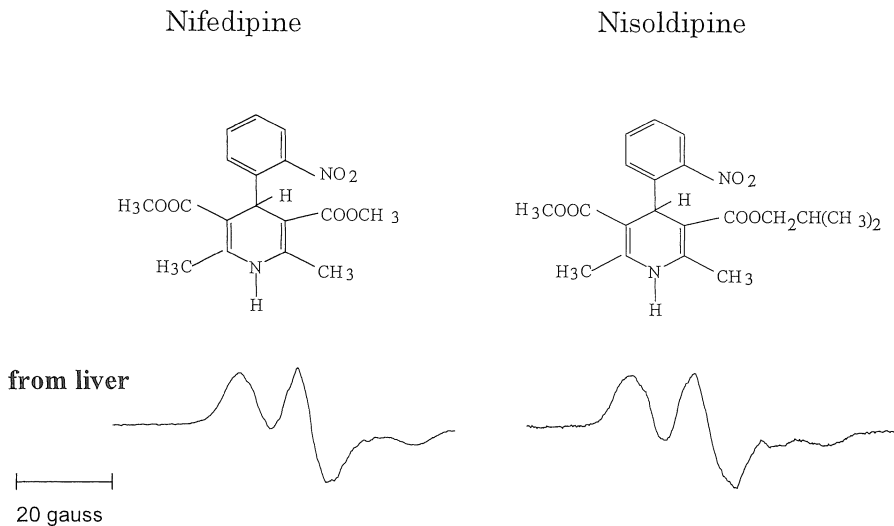


図 5. ニトロソ化 nifedipine および nisoldipine が肝臓組織でラジカル化した ESR スペクトル

Block diagram of ESR imaging instrument

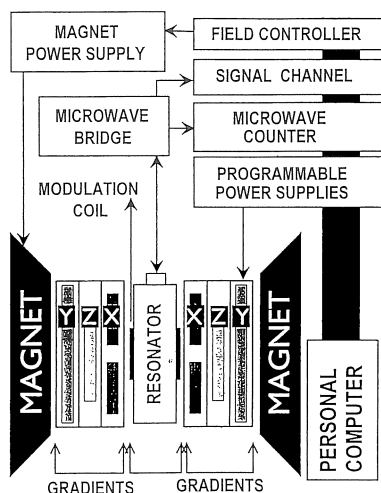


図 6. 三次元 ESR イメージングシステムのブロックダイアグラム

メージング法が 1980 年代後半から始められた。まず、三次元 ESR イメージングシステムのブロックダイアグラムを図 6 に示した¹³⁾。主磁場は Helmholtz 型の磁石、resonator は LGR (loop-gap resonator) 型、磁場勾配コイルは Anderson 型のコイルが一般に用いられている。マウス用のシステムではマイクロ波周波数 1.2 GHz、主磁場 400 ガウスで、ラットの whole body 用では 350 MHz、100 ガウスの条件でシステムが構成されている。

1. ニトロキシドラジカルの分布画像

先に示したように、現在開発中の *in vivo* ESR システムにより、実験動物に投与した幾つかの薬物から生成するフリーラジカルを観測することができるようになった。一般にこのようなフリーラジカルは体内の非常に限られた部位においてのみ発生しているため、これらのラジカル種の局在部位を二次元画像として表すよりも、むしろサーフェスコイルを用いてフリーラジカルの局在分布を部位特異的に検出する研究手法が広く一般に行われている。

一方、*in vivo* ESR 装置の開発が始まった 1980 年代半ばから安定なフリーラジカルであるニトロキシドラジカル (スピンラベル剤、あるいは、スピンプローベと呼ばれる物質) を実験動物に投与し、その体内分布を利用して生体内部の情報を得ようとする ESR イメージング法の研究開発が開始された。現在、ESR イメージング用に用いられているニトロキシドラジカルの構造を図 7 に示した。

1) メラノーマ組織の二次元 ESR 画像

マウスの尾部にメラノーマ細胞を移植し、固形腫瘍をもつマウスを作り、このマウスの尾静脈から安定ニトロキシドである carbamoyl-PROXYL (3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl) を投与し、固形腫瘍内を分布していく carbamoyl-PROXYL の二次元 ESR 画像が 1985 年に得られた^{12),14)}。得られた ESR 画像を図 8 に示したが、carbamoyl-PROXYL は尾静脈を通してメラノーマ組織に拡散したため、二本の静脈が明瞭に識別され、また、carbamoyl-PROXYL がメラノーマ組織の部分に局在している様子が示されている。この例では、両親媒性の carbamoyl-PROXYL を用いたが、図 7 に示したようにスピンラベル剤であるニトロキシド誘導体には様々な構造を持つ化合物が市販されており、異なる構造を持つニトロキシドを利用することにより組織特異性を反映した画像を得たり、また、組織の親水性や疎水性部位を強調した画像を得ることができるようになってきている。

2) 摘出心臓の三次元 ESR 画像^{15),16)}

ラットから摘出した心臓を用いて、*in vivo* 用の ESR 装置で灌流実験が行われている。ランゲンドルフ灌流液に安定ラジカルであるニトロキシド化合物(この場合は 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl: Tempo) を添加して、ニトロキシドラジカルの心臓への取り込みや心臓からの流出が計測されている。また、非常に早いデータの取り込みにより心臓が鼓動している様子が三次元画像として捕らえられており、心臓

Structures of spin-label nitroxides

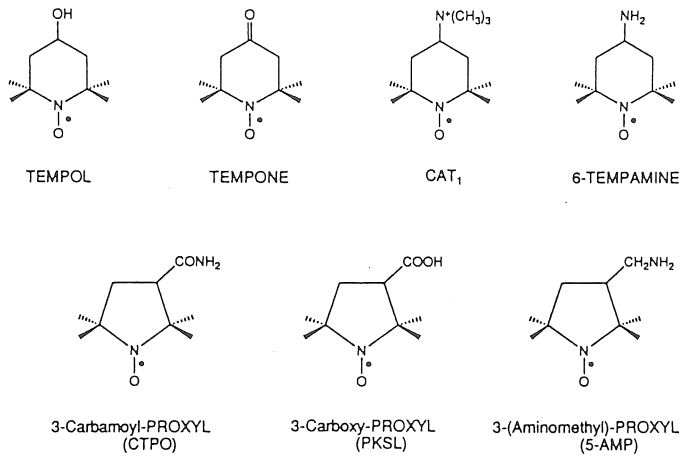


図7. 代表的なスピラベル剤の構造

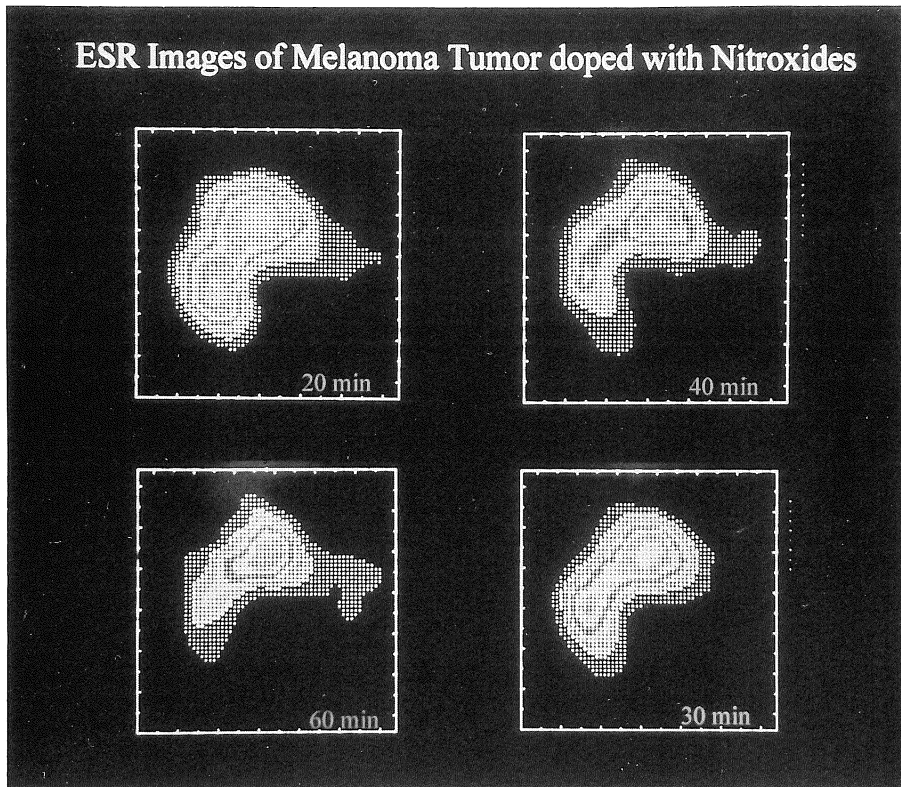


図8. マウスの尾部に植えられたメラノーマ組織のESR画像
尾静脈から投与されたニトロキシドの拡散を経時的に画像化した。

が鼓動している様子をビデオ画像として見るようにできている。

2. Nitric oxide (NO) ラジカルの分布画像

1989年、一酸化窒素 (NO) は血管弛緩因子として血圧の調整を行う重要な生体内物質であることが明らかにされた¹⁷⁾。それ以来、NOは多方面で研究され、脳の情報伝達や記憶にも関与していることが明らかにされ、現在最もホットな物質のうちの一つである。NOは一酸化窒素合成酵素 (NOS) によりL-アルギニンを基質として生体内で合成されている。NOSにはもともと体内に存在する常在型のNOS (cNOS) と誘導型のNOS (iNOS) の二種類がある。NOは O_2^- と同様、水中での寿命は数秒と短く、酸素と速やかに反応して亜硝酸となる。そのため、生体内で生成するNOをフリーラジカルとして捕らえるにはスピントラップ剤が必要で、ジチオカルバメート誘導体と二価鉄との錯体が一般に用いられている。現在、

ジチオカルバメート誘導体としてN-methyl-D-glucamine dithiocarbamate (MGD) と diethyl-dithiocarbamate (DETC) が一般に用いられている^{18),19)}。

リポポリサッカリド投与による敗血症モデルマウスから産生されるNOが、NOトラップ剤の $(MGD)_2-Fe(II)$ を用いて*in vivo*系で観測された²⁰⁾。*In vivo* ESRシステムによりNOの生成している部位を検索したところ、肝臓周辺部で40~60 μM という多量のNOの生成が確認された。図9に肝臓で捕らえられたNOのラジカルアダクト ($(MGD)_2-Fe(II)-NO$ として捕らえられている) のESRスペクトルおよび肝臓周辺部でのNOの生成を示す二次元ESR画像を示した²¹⁾。

フリーラジカルの視覚化 —MRI spin-trapping 法

ESRイメージング法はフリーラジカルの二次元・三次元分布を知る最適の方法である。しかしながら、ESRイメージング法では、NOラジカルアダクトのように線幅が広いと(約4 Gauss)画像解像度が上げにくいという欠点があり、更に組織内でのフリーラジカルの分布しか観測し得ないという欠点もある。それでは、MRIの画像のような解剖学的な組織画像上にフリーラジカルの情報を付加するような手法がとれないであろうか? 現在、二つのストラテジーでの研究が進められている。まず第1の方法は、proton-electron double-resonance imaging (PEDRI)法で、強力なマイクロ波でESR共鳴を飽和させ、フリーラジカルのような不対電子を持つ物質と双極子相互作用のある核スピンの分布を分極させてNMR信号を観測するとこの信号が増幅されるという特性を利用し、この増幅されたNMR信号の位置情報からフリーラジカルの局在位置を知ることができるという方法である。現在、ラットに投与したニトロキシドラジカルの分布を二次元画像と

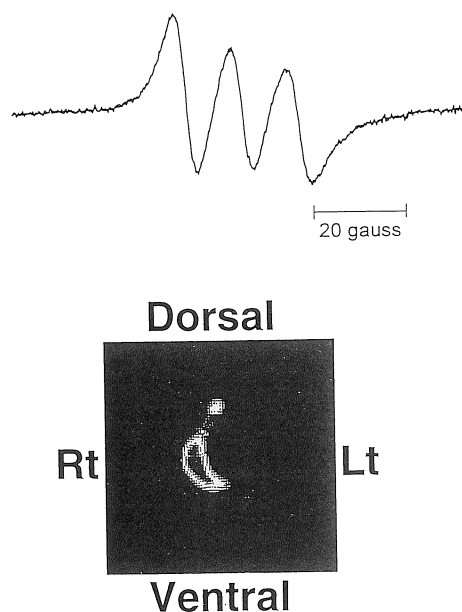


図9. 敗血症モデルマウスの肝臓の組織でのESRスペクトル (top) および上腹部でのESR画像 (bottom)

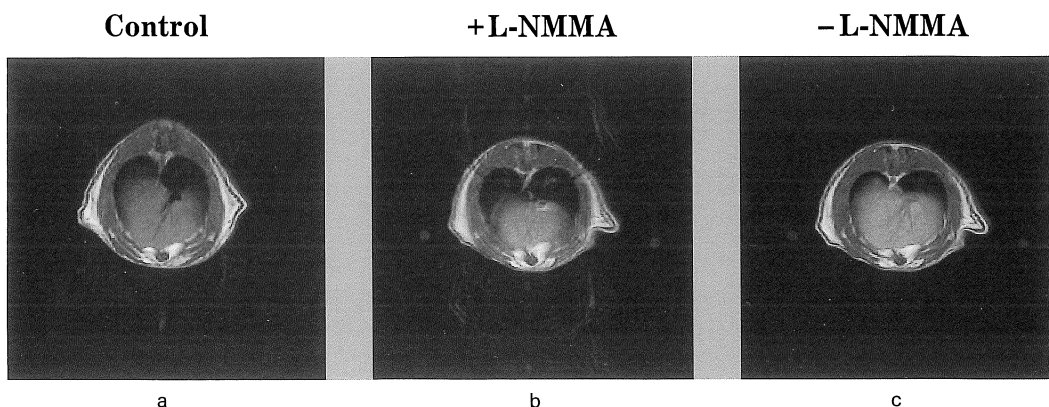


図 10. 敗血症モデルラットの MR 画像
(a)コントロール, (b)NO 生成阻害剤を添加した際の画像, (c)NO 生成時の画像

して観測しうる段階に達している²²⁾.

一方、第2の方法は MRI spin-trap 法と我々が名付けている方法で、フリーラジカルの常磁性により水分子の磁気緩和効果が促進される、いわゆる造影効果を利用する方法である。生体内で生成した不安定なフリーラジカルをスピントラップ剤で安定なラジカルアダクトとする。このアダクトはフリーラジカルに比べはるかに寿命が長く安定化されているが、まだフリーラジカルとしての特性をもっていることから、この安定ラジカルの造影効果が現れた MR 画像を観測すれば造影効果を及ぼしているフリーラジカルの位置を知ることが可能である。1例として、敗血症ラットの肝臓周辺部の MR 画像を図 10 に示した。NO が産生していないコントロール画像 (図 10a) に比べ、NO が産生すると (図 10c) 肝臓組織での画像強度は著しく増加しており、この画像強度の増加は NO 合成酵素阻害剤 (L-NMMA : N-monomethyl L-arginine) により著しく押さえられることから (図 10b)、画像強度の増加は NO ラジカルアダクトの造影効果によるものと思われる。以上の結果から、フリーラジカルを十分安定化するスピントラップ剤があれば、フリーラジカルの位置情報を MRI の手法で得ることが可能であ

る。

おわりに

敗血症モデルラットで NO が生成されているときの MR 画像、並びに同モデルマウスでの ESR 画像を図 11 に示した。ESR 画像よりも MR 画像の方が多くの情報を持っていることが一見にして理解できる。この MRI の持つ優れた解剖学的な画像情報をうまく利用し、ESR を MRS の一種と位置付け、MRI と ESR とを合体させた NES-MRI (nuclear and electron spin resonance magnetic resonance imaging) システムがいつの日か世に現れないだろうか?、と考えている。また、現在、*in vivo* ESR システムのパルス化が始まったばかりで²³⁾、一日も早くパルスシステムが稼働するようにしなければならない。So little done, so much to do! というある人の言葉を思い出させる状況である。

文 献

- 1) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte.

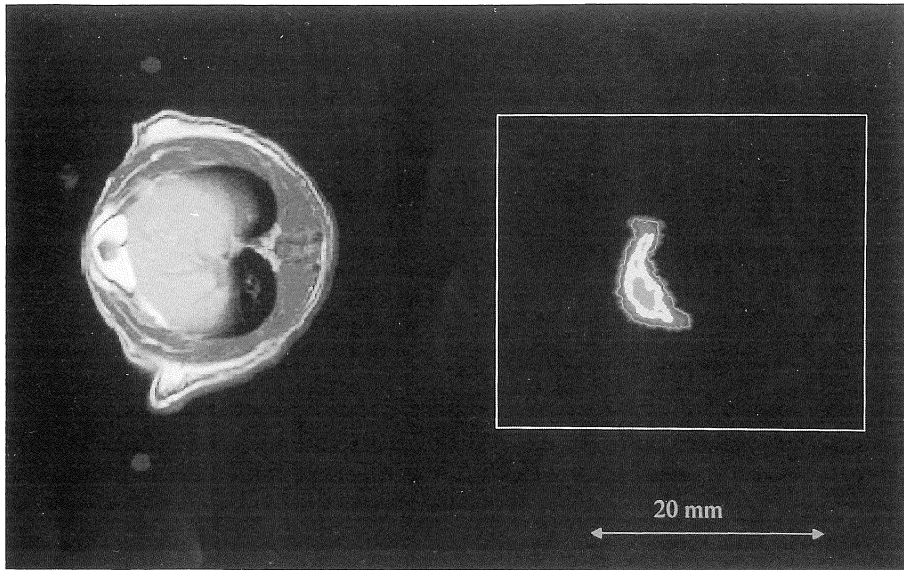


図 11. 敗血症モデルラットおよびマウスの NO 産生時における MR 画像 (左) と ESR 画像 (右)

- (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969 ; 244 : 6049-6055
- 2) Nishikawa H, Fujii H, Berliner LJ : Helices and surface coils for low-field *in vivo* ESR and EPR imaging applications. *J Magn Reson* 1985 ; 62 : 79-84
 - 3) Ono M, Ogata T, Hsieh K, Suzuki M, Yoshida E, Kamada H : L-band ESR spectrometer using a loop-gap resonator for *in vivo* analysis. *Chem Lett* 1986 ; 491-494
 - 4) Sotgiu A : Resonator design for *in vivo* ESR spectroscopy. *J Magn Reson* 1985 ; 65 : 206-214
 - 5) Hirata H, Ono M : Resonance frequency estimation of bridged loop-gap resonator for magnetic resonance measurements. *Rev Sci Instrum* 1996 ; 67 : 73-78
 - 6) Hirata H, Iwai H, Ono M : Analysis of a flexible surface-coil type resonator for magnetic resonance measurements. *Rev Sci Instrum* 1995 ; 66 : 4529-4534
 - 7) Hirata H, Ono M : Impedance-matching system for a flexible surface-coil type resonator. *Rev Sci Instrum* 1997 ; 68 : 3528-3532
 - 8) Janzen EG : Chemistry and biology of spin-trapping radicals. *Accounts Chem Res* 1971 ; 4 : 31-40
 - 9) Buettner GR : Spin trapping : ESR parameters of spin adducts. *Free Rad Biol Med* 1987 ; 3 : 259-303
 - 10) Fujii H, Zhao B, Koscielniak J, Berliner LJ : *In vivo* EPR studies of metabolic fate of nitrosobenzene in mice. *Magn Reson Med* 1994 ; 31 : 77-80
 - 11) Maples KR, Eyer P, Mason RP : Aniline-, phenylhydroxylamine-, nitrosobenzene-, and nitrobenzene-induced hemoglobin thiyl free radical formation *in vivo* and *in vitro*. *Mol Pharmacol* 1990 ; 37 : 311-318
 - 12) Fujii H, Berliner LJ : Some applications of ESR to *in vivo* animal studies and EPR imaging. *Biol Magn Reson* 1993 ; 11 : 307-319
 - 13) Kuppusamy P, Chzhan M, Vij K, Shteynbuk M, Lefer DJ, Giannella E, Zweier JL : 3-D spectral-spatial EPR imaging of free radicals in the heart : technique for imaging tissue metabolism and oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 3388-3392
 - 14) Berliner LJ, Fujii H, Wan X, Lukiewicz SJ : Feasibility study of imaging a living murine tu-

- mor by Electron paramagnetic resonance. *Magn Reson Med*, 1987 ; 4 : 380-384
- 15) Zweier JL, Kuppusamy P : Electron paramagnetic resonance measurements of free radicals in the intact beating heart : a technique for detection and characterization of free radicals in whole biological tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 5703-5707
- 16) Kuppusamy P, Wang P, Zweier JL : Three-dimensional spatial EPR imaging of free radicals in the rat heart. *Magn Reson Med* 1995 ; 34 : 99-105
- 17) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA : Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 ; 43 : 109-142
- 18) Lai CS, Komarov AM : Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-shock mice. *FEBS Lett* 1994 ; 345 : 120-124
- 19) Kubrina LN, Caldwell WS, Mordvintcev PI, Malenkova IV, Vanin AF : EPR evidence for nitric oxide production from guanidino nitrogens of L-arginine in animal tissues *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 1992 ; 1099 : 233-237
- 20) Fujii H, Koscielniak J, Berliner LJ : Determination and characterization of nitric oxide generated in mice by *in vivo* L-band EPR spectroscopy. *Magn Reson Med* 1997 ; 38 : 565-568
- 21) Yoshimura T, Yokoyama H, Fujii S, Kamada H : *In vivo* EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. *Nat Biotechnol* 1996 ; 14 : 992-994
- 22) Alecci M, Seimenis I, McCallum SJ, Lurie DJ, Foster MA : Nitroxide free radical clearance in the liver rat monitored by radio-frequency CW-EPR and PEDRI. *Phys Med Biol* 1998 ; 43 : 1899-1905
- 23) Murugesan R, Cook JA, Devasahayam N, et al. : *In vivo* imaging of a stable paramagnetic probe by pulsed-radiofrequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1997 ; 38 : 409-414

Imaging of the Spatial Distribution of Bioradicals by L-band *in vivo* EPR Spectroscopy

Hirotsada FUJII

*Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science
18-22, Honkomagome 3-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613*

The challenge of developing both spin-imaging and *in vivo* electron paramagnetic resonance (EPR) in living systems requires a large number of changes in classical x-band EPR spectroscopy. These changes were necessary in x-band EPR system for two reasons ; (1) the large water content of living tissue, and (2) the large volume of the sample itself. In order to obtain free radical information from the biological system including small animals and cultured cell systems, we have been developing *in vivo* EPR spectroscopy using loop-gap resonator operating at L-band microwave frequency and lower frequency (250–300 MHz).

EPR imaging instrumentation, enabling the performance of three-dimensional spectral-spatial images of free radicals, has been developed at L-band to study spatially defined differences in tissue metabolism and oxygenation. Using this instrumentation, 3D images of nitroxides in mouse or rat tail and rat heart were obtained.

Using L-band *in vivo* EPR spectroscopy, we succeeded in detecting three bioradicals generated in mice or rats. (1) Bioradicals generated from the metabolism of nitrosobenzene or nitrosotoluene in live mice. (2) Bioradicals generated from a prescription drug for patients with hypertension, named as calcium channel blocker. (3) Nitric oxide (NO) generated by nitric oxide synthase in septic-shock mice or rats.

Finally, we presented a new approach to use MRI method combined with spin-trapping method to visualize bioradicals generated in the small animals. Free radicals captured by spin-trapping agent, if their stability is long enough, can be used as contrast agents in MRI, and spatial localization of free radicals might be visualized by MRI. We showed a feasibility study that a new methodology called “MRI spin-trapping method” can visualize NO distribution in septic-shock rats.