

抗酸化剤を一定期間経口投与されたラットの ニトロキシドラジカル還元能の検討 —*in vivo* electron spin resonance (ESR) 法による研究—

松本清治^{1,3}, 森 則夫^{1,*}, 土橋宣昭², 尾形健明⁴,
林 一晶⁴, 横山秀克¹, 石田信一¹, 丹羽真一¹

¹福島県立医科大学医学部神経精神医学講座 ²同附属放射性同位元素研究施設
³針ヶ丘病院精神科 ⁴山形大学大学院理工学研究科 *現 浜松医科大学精神科神経科

はじめに

活性酸素をはじめとするフリーラジカルが多くの疾患に関与していることに対して、広く関心がもたれている^{1)~4)}。脳は、他の臓器に比べて酸素の消費量が多く、カテコールアミンや不飽和脂肪酸のような酸化されやすい物質を豊富に含有し、かつ、活性酸素の発生を媒介する鉄が多く存在する器官である。そのため脳では活性酸素が発生しやすく、それによる傷害を受けやすい。中枢神経系の疾患では、例えば、脳血管の虚血・再灌流障害、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん発作などにフリーラジカルがかかわっていると考えられている^{3),4)}。

てんかん発作の治療に抗てんかん薬とビタミンCの併用は広く行われてきたが、小児のてんかん患者に抗てんかん薬とともにビタミンEを投与するとてんかん発作の抑制効果が強く現れたという報告⁵⁾や、遅発性ジスキネジアがビタミンEにより改善されたという報告⁶⁾がある。これらは、ビタミンの抗酸化作用により、症状が軽減されたものと考えられている。ビタミンC (Vit-C) は、水溶性の抗酸化剤であ

る^{7),8)}。ビタミンE (Vit-E) は、脂溶性の抗酸化剤としてよく知られている^{9),10)}。イデベノン (ID) は、キノン系の脂溶性の薬物で、ラジカル消去作用を示す^{11)~13)}。一般に、抗酸化剤は *in vitro* 系では、活性酸素などのフリーラジカルを還元して消去するが、抗酸化剤を生体へ投与した場合に、その *in vivo* 系での酸化還元作用への影響は明らかではない。もし、抗酸化剤を投与された生体の還元能 (抗酸化能) についての情報が得られれば、このような疾患に対する抗酸化剤の治療効果を解析する一助となる。さらに、抗酸化剤が生体のラジカル還元能を増強することが明らかになれば、抗酸化剤のフリーラジカル関連疾患治療への応用が期待される。

電子スピン共鳴 (electron spin resonance ; ESR) 法はフリーラジカルの不対電子を直接観測できる唯一の方法である。さらに、ESR法では、系の中に存在するフリーラジカルを非破壊で選択的に検出できる。そこで、生体内でのフリーラジカルの挙動を無侵襲で観測する *in vivo* ESR 装置が開発され、医学への応用が試みられている^{14)~16)}。現在の *in vivo* ESR 装

キーワード *in vivo* ESR, antioxidants, rat, Tempol

置では、成熟ラットの頭部大の生体試料計測が可能であるが、感度は生体内で発生したフリーラジカルを検出できるまでには達していない。そこで、比較的安定であるが、生体内で代謝されるフリーラジカルであるニトロキシドラジカルを生体に投与し、*in vivo* ESR 装置を用いてその動態や体内の分布を観察し、フリーラジカルと生体機能との関連を解析する研究が進められてきた^{17)~25)}。マウスやラットに投与したニトロキシドラジカルを計測した研究では、その ESR 信号を経時的に観測すると信号強度の対数値が投与後の時間に対して直線的に減少した。そこで、この直線の傾きから半減期が求められた^{17),19),22)}。このようにして求めた半減期はマウスやラットのニトロキシドラジカル還元能を反映しており、ニトロキシドラジカルをプローベとして生体の酸化還元機能を解析することが可能になった^{19),22),25)}。我々は先の研究で、大量の脂溶性の抗酸化剤（薬用量の約 100 倍）をあらかじめ経口投与されたラットでは、この還元能が強められたことを報告した²⁵⁾。

本研究の目的は、薬用量の抗酸化剤の経口投与が動物のラジカル還元能に影響を及ぼすかどうかを明らかにすることである。そこで、薬用量の抗酸化剤を経口摂取させるために飼料（標準食）に Vit-E, Vit-C 又は ID を添加してラットを一定期間飼育し、これらの動物にニトロキシドラジカルを投与して *in vivo* ESR 計測を行い、その半減期を求めて、標準食で飼育した対照群の半減期と比較検討した。

実 験

1. 実験動物と Vit-E, ID 又は Vit-C の投与方法

実験動物にはウィスター系雄性ラット (n=24) を用いた。まず動物を、対照群 (n=9)、Vit-E 群 (n=5)、ID 群 (n=5)、そして Vit-C 群 (n=5) の 4 群に分けた。対照群には 13 週

齢まで標準食を自由摂食させた。Vit-E 群の動物には薬用量のビタミン E を摂取するように調整した飼料 (Vit-E 食) を与えて、11 週齢から 13 週齢までの 2 週間飼育した。ID 群は、ID の薬用量に相当する量を摂取するように調整した飼料 (ID 食) で同様に 2 週間飼育した。Vit-C 群は、薬用量のビタミン C を摂取するように調整した飼料 (Vit-C 食) で 13 週齢までの 2 週間、飼育した。

標準食は、飼料 1 kg 当たり 5 IU の Vit-E と 25 mg の Vit-C を含有していた。Vit-E 食には、ヒトの薬用量に相当する 400 IU/day の Vit-E を動物が摂取できるように体重換算で標準食に Vit-E を添加し、飼料 1 kg 当たり 100 IU の Vit-E を含むように調整した。ID 食には、ヒト薬用量に相当する 100 mg/day の ID を摂取するように標準食に ID を添加し、飼料 1 kg 当たり 25 mg の ID を含むよう調整した。Vit-C 食には、ヒト薬用量の 1,200 mg/day の服用に相当するように、飼料 1 kg 当たり 300 mg の Vit-C を含むように調整した。

2. ESR 計測

13 週齢の時点で、すべてのラットを ESR 計測に供した。本研究で用いた ESR 装置とその操作方法、および共振器（ループギャップ共振器；内径 41 mm, 軸長 10 mm）の詳細は、既報のとおりである^{25),26)}。まず、水溶性のニトロキシドラジカルである 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) を、生理食塩水に 0.05 M の濃度で溶解した。次に、ラットにペントバルビタール麻酔 (50 mg/kg, i.p.) を行い、その頭部を共振器内に挿入し、これを ESR 装置に固定した (Fig. 1)。このラットに Tempol 溶液を 66.7 μ mol/kg (1.33 ml/kg) の用量で尾静脈から投与した。

予備実験では、投与直後から Tempol 由来の 3 本線の ESR 信号が観察された。Fig. 2 に示

2000 年 5 月 8 日受理 2000 年 9 月 5 日改訂

別刷請求先 〒963-0201 福島県郡山市大槻町字天正坦 11 針生ヶ丘病院精神科 松本清治

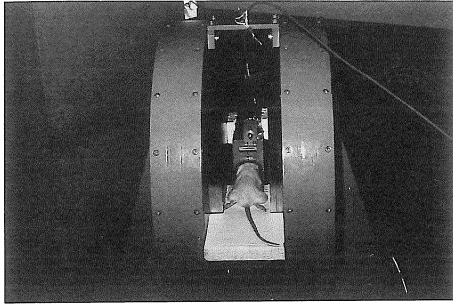


Fig. 1. The rat was anesthetized ; its head was positioned in the resonator and was set in the ESR system.

すように、2分間で低磁場側から $M = +1$, $M = 0$, $M = -1$ へと磁場掃引している間にも、 $M = 0$, $M = -1$ のピークは順次減衰していった。これらの3本線の信号のうち、 $M = 0$ の信号成分は Vit-C の影響を受けやすく、 $M = -1$ 成分の線幅は環境の影響を最も受けやすいので、 $M = +1$ の成分を経時的に観測することとした。なおこの成分の線幅は、本研究を通じて変化が

なかった。このように、本研究では、この3本線の信号のうち低磁場側 ($M = +1$) の信号のみを繰り返しスキャンし、信号強度 (I_{pp}) の変化を経時的に観測した。この信号は次第に減衰し、約3分でノイズレベルにまで低下した。続いて、5分間隔で、同用量の Tempol を計5回反復投与し、Tempol の投与のたびに同様の計測を行った。

結 果

1. 半減期の算出

観察された Tempol の ESR 信号は、時間の経過とともに減衰した。信号強度の対数値を経過時間に対してプロットすると直線関係が得られたので、この直線の傾きから半減期を求めた。対照群の動物では、Tempol の初回投与の半減期の平均値は約50秒であった。Tempol の投与ごとに、同様にして半減期を求めた。

2. 半減期の推移

すべての動物群での半減期を Table に示し

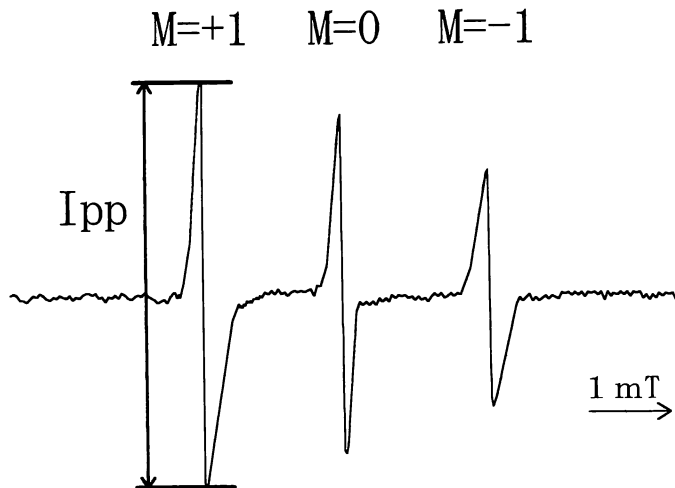


Fig. 2. An *in vivo* ESR spectrum of Tempol from the rat head
The measurement conditions were as follows : microwave frequency, 700 MHz ; microwave power, 10 mW ; scanning time, 2 min/10 mT ; field modulation, 100 kHz ; modulation width, 0.2 mT.

Table. Changes of Half-life after Repeated Injections of Tempol

Group	n	half-life (s)				
		1st	2nd	3rd	4th	5th
Control	9	50.1±1.3	54.3±1.4	58.9±1.8 ^{††}	61.5±1.7 ^{††}	64.1±1.8 ^{††}
Vit-E	5	50.8±1.2	51.1±1.8	49.1±2.5*	50.1±1.3**	53.5±1.8*
ID	5	50.4±1.9	54.0±4.1	53.1±3.5	54.0±3.5*	55.4±3.1*
Vit-C	5	39.8±2.1**	43.8±2.5**	48.2±1.7**	46.5±1.7**	48.4±2.7**

Five doses of Tempol were given iv at 5 min interval. Note the significant shortening of the half-life (* p<0.05; ** p<0.01, unpaired t-test) compared to the corresponding value for controls and significant increase (†† p<0.01) compared to the first value in the controls. Values are means±SEM. See the Fig. 3 for the tendency.

た. Tempolの初回投与時には, 対照群とVit-E群, ID群の半減期に有意差はなく, いずれでも約50秒であった. 一方, Vit-C群では約40秒であり, 対照群に比し有意に短い半減期を示した (p<0.01, unpaired t-test). Tempolを反復投与した場合, 対照群では投与回数増加に従い半減期は初回投与時よりも有意に延長

した. Vit-E群, ID群では, 半減期の統計学的に有意な延長は認められなかった. Vit-C群の半減期は2回目以降も常に対照群より短い値を示し (p<0.01), 反復投与による有意な延長も認められなかった. 各群での半減期の平均値の推移を Fig. 3 に示す.

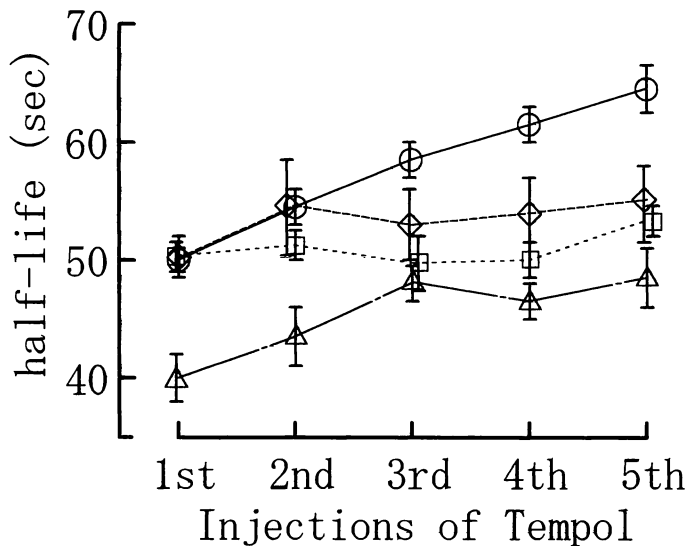


Fig. 3. The changes of the half-life after repeated injections of Tempol. Five doses of Tempol were given iv at 5 min interval. After repeated injections of Tempol, the control group (○) showed a gradual increase in the half-life compared to the first value. On the contrary, Vit-E group (□) and ID group (◇) showed no increase. The half-lives of Vit-C group (△) always smaller than the corresponding value of control group. Values are means±SEM.

考 察

本研究では、Tempol をラットに投与し、その信号強度の減衰を *in vivo* ESR 法によって経時的に観測した。本研究で観測された Tempol の ESR 信号の対数値が、投与後の時間に対して直線的に減少したので、この直線の傾きから半減期を求めた。これは既報の事実とよく一致していた^{17)~25)}。

生体は様々な抗酸化機構をもち、フリーラジカルによる酸化的傷害から自らを守っている。例えばスーパーオキシドジスムターゼ、Vit-C や Vit-E などのラジカル捕捉型抗酸化物質によるラジカル消去機構やフリーラジカルによって傷害を受けた生体を修復・再生する機構などである。さらに、生体には恒常性があり、これらの機構を一定に保とうとする力が働いている。

Tempol のようなニトロキソラジカルは、生体内では速やかに還元されてヒドロキシルアミンになり、その常磁性を失う^{24),27)}。ヒドロキシルアミンは腎から排泄されるが、Tempol そのものも腎から排泄され尿中でヒドロキシルアミンに還元される。しかし通常、Tempol やヒドロキシルアミンの腎からの排泄には約 6 時間を要する²⁷⁾。ゆえに、本研究で求めた Tempol の半減期に反映されているのは、主として生体内の Tempol を還元して常磁性を失わせる能力、すなわち還元能であると考えられる。これは、Tempol と生体内の抗酸化物質との直接反応・生体の代謝機構・生体の恒常性など様々なものを包括した生物の総合的な能力である。したがって、このようにして Tempol の半減期の長短を比較することは、生体の還元能の総合力を比較することであるといえる。本研究で観測された ESR 信号強度は、共振器内の Tempol 量に比例するが、Tempol は血液脳関門を通過できない^{28),29)}ため、これは主としてラットの頭部の血管内を循環している Tempol 量を反映していると考えられる²⁶⁾。

対照群では、Tempol の投与回数増加に従

い半減期は初回投与時よりも有意に延長した (Table)。これを解釈するには、前述した生体の恒常性の機構を考慮する必要がある。恒常性は、生体内の酸化還元系についても成り立ち、ラジカル傷害に対応していると考えられる。生体内に、ラジカルが発生した場合、種々の酸化還元反応によりラジカルが消去されて生体を守る。その後、ある程度の時間をかけて、これらの酸化還元機能が元の状態に戻るのが恒常性である。本研究では、Tempol が投与されたラットは、この生体内酸化還元系を使って還元反応を起こし、Tempol を消去した。対照群のラットでは、初回投与時には Tempol を消去する能力は十分備わっており、これに対処できた。しかし、5 分間隔で同量の Tempol を反復投与されると、生体内還元物質は消費され、また各臓器などでの還元能は 5 分間では投与前のレベルにまでは回復せず、反復投与された Tempol を円滑には処理できなくなったために、5 分間隔で投与を重ねると半減期の延長が起こったと考えられる。これは、Tempol の反復投与により、対照群では、生体内還元物質の消費・消耗を含む還元能の低下、恒常性の疲弊などの総合的な能力が低下したことを示している。すなわち、対照群のラットでは生体内還元能が Tempol の反復投与によって衰退したことを示している。Tempol を 1 回投与したラットに対し、翌日に再度投与実験をすると、その半減期は元に戻っている (未公表データ) ことから、この考え方は妥当であると思われる。

Vit-C 群での各投与の半減期は、Table と Fig. 3 に記載したように、対照群よりも常に有意に短かった。半減期が短いということは、薬用量の Vit-C の投与によってラットの Tempol に対する還元能が対照群よりも高められたことを示している。

これに対し、Vit-E 群と ID 群では、Tempol の初回投与時の半減期には、対照群との有意差は認められなかった (Table)。これは、Vit-E 群と ID 群でも、初回投与量の Tempol を還元

するのに対照群と同等な能力があったことを示している。そのため同等の速度で Tempol が消去された。これは、Tempol の 1 回の投与だけでは Vit-E や ID の効果は半減期には反映されなかったことを示している。これらの群では、Tempol の投与を繰り返して行っても半減期の有意な延長は認められず、投与回数を重ねるとともに対照群の半減期との差が明らかになった (Table)。すなわち、反復投与による半減期の推移に対照群との違いが認められ (Fig. 3)、これらの群での還元能は対照群よりも強化されたことを示している。

Vit-E 群や ID 群では、投与された Vit-E や ID は主に膜内に存在するが、その場合でも、生体内の酸化還元系の恒常性は、対照群と同じレベルであると考えるのが自然である。In vitro の実験では、血液内でラジカルが発生すると、血漿中の抗酸化剤がまず作用し、Vit-C、ビリルビン、尿酸、血漿中の Vit-E の順で消費され、続いて、赤血球膜の Vit-E が減少したという報告がある³⁰⁾。つまり、Vit-E や ID は酸化還元系のストック材料として保存されていると考えられる。Tempol の繰り返し投与でこの酸化還元系が危機的状況になったとき、ストックされていた Vit-E や ID が動員されて、生体内物質との間で何らかの電子伝達が起こって、生体の酸化還元系の恒常性が保たれたのであろう。したがって、脂溶性の抗酸化剤を経口摂取した実験群で、Tempol を 5 回反復投与しても半減期が変化しないということは、投与された Tempol を還元する能力は、Tempol の繰り返し投与によっては衰退しなかったということである。これは、対照群に比べて Tempol 負荷への対処能力すなわち還元能が強化されたと解釈できる。

さて、本研究で認められた Vit-C 群と Vit-E 群・ID 群との半減期の推移の違いは、それぞれの抗酸化剤の水溶性と脂溶性という性質の違いに起因していると考えられる。すなわち Vit-C は水溶性の抗酸化剤であり、Vit-E と ID が

脂溶性の抗酸化剤であることが関係している。Vit-C は生体内では、水相でラジカル連鎖反応を断ち切ることによりその還元能を発揮している^{7),8)}。本研究では、経口投与により水相に大量に存在する Vit-C が Tempol と直接反応することが、Tempol の半減期の短縮という結果として現れたと考えられる。これに対し、Vit-E はラジカルを還元して安定化するが、この効果は生体膜の脂質成分において発揮されるものであり、水相ではそのような作用はほとんどみられない⁹⁾。それゆえ、Vit-E 群での初回の半減期では対照群のものと有意差がなかったと考えられる。

ID は、脂溶性の抗酸化剤であるので、Vit-E と類似の機構が推定される。ID は、経口投与されたあと、血液脳関門を通過し、脳ミトコンドリア膜の脂質過酸化を抑制し、その安定化をはかっている³¹⁾。またこのような ID による生体膜や生体機能の保護作用は、脳以外の臓器においても同様に発揮され、今回の実験の結果に寄与しているものと考えられる。いずれにしても ID を投与されたラットでは、対照群に比べて Tempol の消去作用に変化が認められたという事実は、ID のラジカル消去作用と密接な関係があるものといつてよい。

我々は、先の研究で大量の抗酸化剤をあらかじめ経口投与されたラットではこの還元能が強められたことを報告した²⁵⁾が、本研究で Vit-C、Vit-E、ID は薬用量の経口投与で十分な還元能の強化効果を現すことを明らかにした。

ま と め

本研究では、生体のラジカル還元能に対する薬用量の抗酸化剤の影響を評価するために、in vivo ESR 装置を用いた。ラットにニトロキシドラジカルを尾静脈から反復投与し、その半減期を指標としてラットの還元能を評価した。その結果、対照群のラットでは半減期は次第に延長し、ラジカル還元能が衰退することが示され

た。薬用量の抗酸化剤をあらかじめ2週間経口投与されたラットでは、その還元能が増強されることが示された。この還元能の増強効果は、ビタミンCでは、ニトロキシドラジカルの初回投与時から速やかに観測された。一方、ビタミンE又はイデベノンによる増強効果は、ニトロキシドラジカルの1回投与の時点では明らかではなかったが、反復投与すると次第に明瞭になった。本研究により、薬用量の抗酸化剤の経口投与が生体のラジカル還元能を強化することが明らかになった。このことは、フリーラジカル関連疾患に対する抗酸化剤の治療効果の解析につながるものである。少なくとも、てんかんや遅発性ジスキネジアに対する抗酸化剤による治療が、ラジカル還元能の強化という観点からは合理的であることが示された。

文 献

- 1) Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, aging, and disease. In: Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. New York, USA : Oxford University Press, 1989 ; 416-508
- 2) 二木鋭雄. 活性酸素とは何か. 八木國夫, 中野稔監修. 活性酸素. 東京, 日本 : 医歯薬出版, 1987 ; 1-32
- 3) 浅沼幹人, 西林佐紀子, 小川紀雄. 神経機能制御と活性酸素代謝. 井上正康編. 活性酸素とシグナル伝達. 東京, 日本 : 講談社サイエンティフィック, 1996 ; 150-165
- 4) 吉川敏一. フリーラジカルと疾患. フリーラジカルの医学. 東京, 日本 : 診断と治療社, 1997 ; 69-141
- 5) Ogunmekan AO, Hwang PA : A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of D- α -tocopheryl acetate (vitamin E), as add-on therapy, for epilepsy in children. *Epilepsia* 1989 ; 30 : 84-89
- 6) Shiqui CL, Bradwein J, Annable L, Jones BD : Vitamin E in the treatment of tardive dyskinesia : a double-blind placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 1992 ; 149 : 391-393
- 7) Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM : The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radic Biol Med* 1986 ; 2 : 419-444
- 8) Niki E : Vitamin C as an antioxidant. *World Rev Nutr Diet* 1991 ; 64 : 1-30
- 9) Tappel AL : Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamin Hormone* 1962 ; 20 : 493-510
- 10) Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against lipid peroxidation. In : Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. New York, USA : Oxford University Press, 1989 ; 237-253
- 11) Nagaoka A : Pharmacological action of idebenone, a new therapeutic drug for cerebrovascular disorders. *J Takeda Res Lab* 1985 ; 44 : 137-155
- 12) Suno M, Nagaoka A : Inhibitory effects of a novel compound, Idebenone (CV-2619), on free radical generation and lipid peroxidation. *J Takeda Res Lab* 1985 ; 44 : 30-33
- 13) Zs.-Nagy I : Chemistry, toxicology, pharmacology and pharmacokinetics of idebenone. *Arch Gerontol Geriatr* 1990 ; 11 : 177-186
- 14) 土橋宣昭 : *in vivo* 計測用 ESR 装置の開発. *化学と生物* 1990 ; 28 : 461-467
- 15) 尾形健明 : L-バンド ESR による生体試料の測定. *ぶんせき* 1991 ; 1 : 54-60
- 16) 土橋宣昭, 尾形健明. ESR 計測のフロンティア ESR の画像化 法医学領域における応用. 桜井弘編. バイオサイエンス ESR. 東京, 日本 : 廣川書店, 1996 ; 189-211
- 17) Berliner LJ, Wan X : *In vivo* pharmacokinetics by electron magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1989 ; 9 : 430-434
- 18) Bacic G, Nilges MJ, Magin RL, Walczak T, Swartz HM : *In vivo* localized ESR spectroscopy reflecting metabolism. *Magn Reson Med* 1989 ; 10 : 266-272
- 19) Ishida S, Kumashiro H, Tsuchihashi N, Ogata T, Ono M, Kamada H, Yoshida E : *In vivo* analysis of nitroxide radicals injected into small animals by L-band ESR technique. *Phys Med Biol* 1989 ; 34 : 1317-1323
- 20) Ferrari M, Colacicchi S, Gualtieri G, Santini MT, Sotgiu A : Whole mouse nitroxide free radical pharmacokinetics by low frequency electron paramagnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 166 : 168-173

- 21) Utsumi H, Muto E, Masuda S, Hamada A : *In vivo* ESR measurement of free radicals in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 172 : 1342-1348
- 22) Takeshita K, Utsumi H, Hamada A : ESR measurement of radical clearance in lung of whole mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 177 ; 874-880
- 23) Gomi F, Utsumi H, Hamada A, Matsuo M : Aging retards spin clearance from mouse brain and food restriction prevents its age-dependent retardation. *Life Sci* 1993 ; 52 : 2027-2033
- 24) Kocherginsky N, Swartz HM. Metabolism and distribution of nitroxides *in vivo*. In : Nitroxide Spin Labels, Reactions in Biology and Chemistry. Boca Raton, USA : CRC Press, 1995 ; 153-173
- 25) Matsumoto S, Mori N, Tsuchihashi N, Ogata T, Lin Y, Yokoyama H, Ishida S : Enhancement of nitroxide-reducing activity in rats after chronic administration of vitamin E, vitamin C, and idebenone, examined by an *in vivo* electron spin resonance technique. *Magn Reson Med* 1998 ; 40 : 330-333
- 26) Ishida S, Matsumoto S, Yokoyama H, et al. : An ESR-CT imaging of the head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. *Magn Reson Imaging* 1992 ; 10 : 109-114
- 27) Couet WR, Eriksson UG, Tozer TN, Tuck LD, Wesbey GE, Nitecki D, Brasch RC : Pharmacokinetics and metabolic fate of two nitroxides potentially useful as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Pharmacol Res* 1984 ; 1 : 203-209
- 28) Brasch RC, Nitecki DE, Brant-Zawadzki M, et al. : Brain nuclear magnetic resonance imaging enhanced by a paramagnetic nitroxide contrast agent. *AJNR* 1983 ; 4 : 1035-1039
- 29) Brasch RC, London DA, Wesbey GE, Tozer TN, Nitecki DE, Williams RD, Doemeny J, Tuck D, Lallemand DP : Works in progress : nuclear magnetic resonance study of a paramagnetic nitroxide contrast agent for enhancement of renal structures in experimental animals. *Radiology* 1983 ; 147 : 773-779
- 30) Niki E, Yamamoto Y, Takahashi M, et al. : Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants, *J Nutr Sci Vitaminol* 1988 ; 34 : 507-512
- 31) Suno M, Nagaoka A : Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound (CV-2619) in brain mitochondria and mode of action of the inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 ; 125 : 1046-1052

**Evaluation of Nitroxide-Reducing Activity in Rats after Peroral
Administration of an Antioxidant :
A Study by *in vivo* Electron Spin Resonance**

Seiji MATSUMOTO^{1,3}, Norio MORI^{1,*}, Nobuaki TSUCHIHASHI²,
Tateaki OGATA⁴, Yijing LIN⁴, Hidekatsu YOKOYAMA¹,
Shin-ichi ISHIDA¹, Shin-ichi NIWA¹

¹*Department of Neuropsychiatry and ²Radioisotope Center, Fukushima Medical University School of Medicine
1 Hikariga-oka, Fukushima-shi, Fukushima 960 - 1295*

³*Psychiatry, Haryuga-oka Hospital*

⁴*Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University*

* *Department of Psychiatry & Neurology, Hamamatsu University School of Medicine*

Using an *in vivo* ESR technique, we evaluated the nitroxide reducing activity of continuing treatments of medicating doses of an antioxidant in rats. The rats were given medicating doses of an antioxidant, vitamin E (Vit-E), idebenone (ID), or vitamin C (Vit-C) in their food for 2 weeks. After feedings, the rats ability to reduce 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) in terms of Tempol half-life was examined as a specific marker. A shorter half-life implying a higher reducing activity. Tempol was injected five times via the tail vein at 5 minute intervals. Its half-life was then serially observed by an *in vivo* ESR system.

The half-life of the control group gradually increased with the injections of Tempol. Although in the Vit-E and ID groups the half-life of the first injection of Tempol was similar to the control group, they showed no increase after repeated injections of Tempol. The half-life of the Vit-C group was always smaller than the corresponding value of the Vit-E, ID, and control groups.

These findings demonstrate that the radical-reducing activity was enhanced by continuous treatment with medicating doses of Vit-E, ID, and Vit-C. However, the enhancement of the activity was varied between the Vit-E, ID, and Vit-C groups. The effect of Vit-C appeared during the early stages of repeated injections, while in the other groups effects did not appear until later stages. This difference is due to whether the antioxidant is water soluble (Vit-C) or not (Vit-E and ID).