

ESR および MRI を用いた活性酸素の *in vivo* 測定

藤井博匡

札幌医科大学保健医療学部

はじめに

フリーラジカル（別名：遊離基あるいはラジカル）という孤立電子をもった物質が今からちょうど100年前の1900年に、Gomberg博士により発見された。以来、いろいろな分野でフリーラジカルに関する研究が始められ、最近では生体内で発生するフリーラジカルである“活性酸素”についての研究が盛んに行われるようになった。

さて、“フリーラジカル”あるいは“遊離基”という言葉ではどうもピンとこないという読者に、フリーラジカルとはどんなものか、以下にその例を示した。例として取り上げた分子はメタンガスとして有名なメタン。メタンの化学構造式は CH_4 で、メタン分子の電子配置を Fig. 1(a)に示したが、結合に関与している電子はすべて図のようにペアを作っており、孤立電子、つまり、ペアを作っていない電子は存在しない。ところが、放射線などがメタンに照射されるとメタンは水素原子を失い、ペアを作れない1個の電子が分子中に残る (Fig. 1(b))。これがフリーラジカル、あるいは、遊離基である。つまり、 CH_4 はフリーラジカルではなく、 $\cdot\text{CH}_3$ がフリーラジカルである。一般に、フリーラジカルの孤立電子は安定に存在せず、孤立電子は他の分子に引き抜かれたり（還元反応）、あるいは他の分子から電子が1個移動し

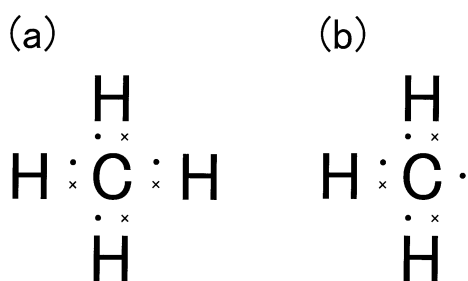


Fig. 1. Methane (a) and methyl radical (b)
 · : electrons belonged to the carbon atom, × : electrons belonged to the hydrogen atom

(酸化反応)、フリーラジカルは不対電子をもたないエネルギー的に安定な分子に変化していく。そのため、フリーラジカルは孤立電子をもたない一般の化学物質に比べ、化学反応性に富んでおり、寿命が短い。今回、本総説で取り上げる活性酸素もフリーラジカルの一種で、生体内で生成される活性酸素を磁気共鳴法を用いてどのようにして捕らえ、視覚化するかを解説する。

活性酸素—狭義と広義の定義について—

私達のまわりに存在する普通の基底状態にある酸素分子（三重項酸素と呼ばれている）以外に、反応性に富んだ様々な酸素化合物がある

キーワード ESR, NMR, free radical, NO, MRI

が、これらを総称して活性酸素と呼んでいる。このように呼ぶようになったのは二つの歴史的な大発見が関与している。まず1969年に、スーパーオキシド (O_2^-) と呼ばれるフリーラジカルを消去する酵素、スーパーオキシドジスムターゼが発見され¹⁾、さらに、1973年、白血球は自ら O_2^- を作り、これを殺菌に役立っていることが見いだされた²⁾。白血球からは O_2^- のみならず、反応性に富んだ一重項酸素やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) なども副次的に生成することが明らかになり、白血球から生成される反応性の高い活性化された酸素化合物を「活性酸素」と呼ぶようになった。現在、これらの活性酸素は「狭義での活性酸素」として識別されている (Fig. 2)。さて、1987年に、生体内で生成するフリーラジカルに新たなメンバーが加わった。それが、一酸化窒素 (NO) である³⁾。NOは、血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) として血圧の調整をするばかりではなく、神経においては情報伝達をつかさどるセカンドメッセンジャーとして重要な働きをするフリーラジカルとして発見された。そこで、上

記の「狭義での活性酸素」に加え、このNOや過酸化脂質も含めた新たな活性酸素ファミリーが出来上がり、これらすべての活性酸素を「広義での活性酸素」と呼ぶようになった (Fig. 2)。

“活性酸素=フリーラジカル”ではない!

Fig. 2にまとめた活性酸素すべてがフリーラジカルではない。フリーラジカルはあくまでも不対電子をもった物質で、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、一酸化窒素、過酸化脂質が“フリーラジカルとしての活性酸素”である。ここで注意が必要なのは、私達の身の回りにある酸素。実は酸素もフリーラジカル物質で、酸素は別々の酸素原子軌道にそれぞれ不対電子をもったピラジカルと呼ばれるフリーラジカルである。

そこで本総説では、Fig. 2に示したフリーラジカルとしての“活性酸素”と、フリーラジカルとしての性質をもった“酸素”とを磁気共鳴法でどのように測定するか解説する。

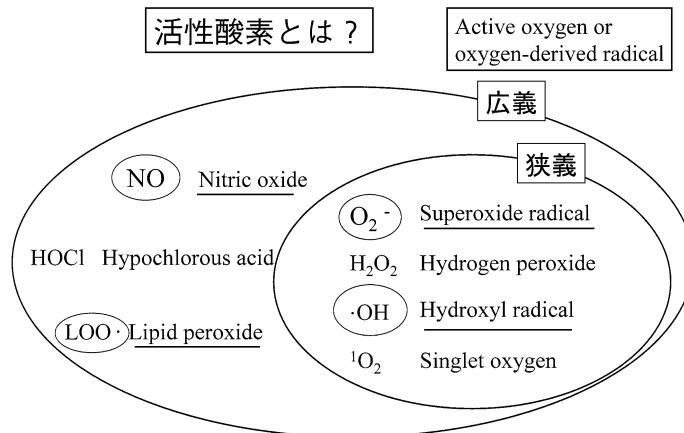


Fig. 2. Active-oxygen family
Names underlined are active-oxygen free radicals.

2001年1月18日受理

別刷請求先 〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目 札幌医科大学保健医療学部 藤井博匡

フリーラジカルを捕らえ、検出する 手法について

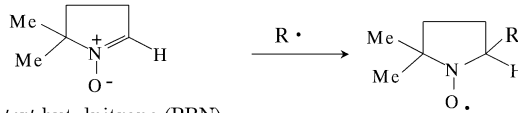
フリーラジカルは一般に寿命が短く、極微量しか存在しない、という性質から、フリーラジカルをフリーラジカルの状態で直接検出するのは難しい。短寿命のフリーラジカルを検出するには、フリーラジカルが消滅してしまう前に、フリーラジカルをある程度寿命の長い安定な状態に保つ必要がある。フリーラジカルの研究が始められたころは、フリーラジカルを含む反応系を急速に凍結してフリーラジカルを安定化する手法（急速凍結法）がとられてきたが、キネティクスが追えない、自動酸化の影響を受けアーティファクトのフリーラジカルが生成してしまう、という欠点があった。そこで、室温でも不安定なフリーラジカルの寿命を延ばすことが可能な“スピントラップ法”が開発された⁴⁾。スピントラップ法は、スピントラップ剤と呼ばれる化合物と短寿命のフリーラジカルとを反応させて寿命の長い化合物にし、元のフリーラジカルを検出しやすくする手法で、寿命が延びたフリーラジカル化合物（これを、スピニアダクトと呼ぶ。）を電子スピン共鳴法（ESR :

electron spin resonance) で測定すると、その ESR スペクトルの線形から、どのような構造のフリーラジカルが捕獲できたか判定することが可能である。代表的なスピントラップ剤を Fig. 3 にまとめた。

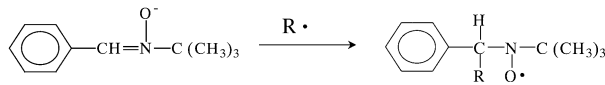
1. 5,5-dimethylpyrroline N-oxide (DMPO)⁵⁾: DMPO は、フリーラジカルであり活性酸素でもある O_2^- や $\cdot OH$ を捕獲する目的で使われており、白血球から生成する O_2^- はこの DMPO で捕らえられた。DMPO は水溶性が高いため生体系で使われることが多いが、少ないながら細胞毒性があるため高濃度で使えないという問題がある。また、スピニアダクトの安定性、特にスーパーオキシドを捕獲したときの安定性が低く、 O_2^- を捕獲しても $\cdot OH$ を捕獲した場合のスピニアダクトの構造に分子内変換してしまうので注意が必要である。このような問題点を改良した新たなトラップ剤として、5,5-Dimethyl-4-phenyl-1-pyrroline N-oxide (4PDMPO)⁶⁾ や 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO)⁷⁾ が開発された。DMPO で O_2^- と $\cdot OH$ を捕らえたときの ESR スペクトルを Fig. 4 に示したが、捕らえたフリーラジカルの種類によってスペクトルの線形が異な

Spin-trapping method

5,5-Dimethylpyrroline N-oxide (DMPO)



Phenyl-*tert*-butylnitron (PBN)



Sodium diethyldithiocarbamate (DETC)

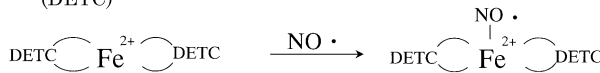


Fig. 3. Spin trapping of active-oxygen species

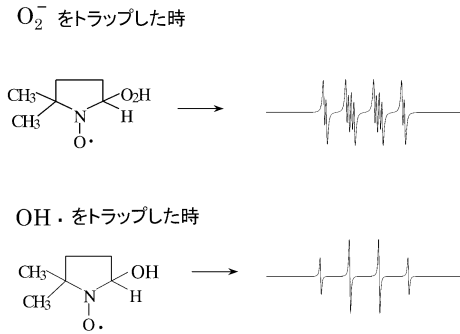


Fig. 4. ESR spectra of spin adducts of DMPO with O_2^- and $\cdot OH$

り、スペクトル線形のデータベースやスペクトルシミュレーションの解析からどのようなフリーラジカルが捕らえられたかを判定することができるのもスピントラップ法の利点である。

2. Phenyl-tert-butyl nitron (PBN)⁵⁾: PBNは元々心臓病の治療薬として開発されたという経緯があるだけに毒性は低い。PBNはDMPOに比べて水溶性が低い、 O_2^- だけではなく多種多様な酸素ラジカルや炭素ラジカルを捕らえることができ、ラジカルアダクトの安定性も高いので、利用法を考慮すればDMPOより優れた結果が得られることもある。

3. Sodium diethyldithiocarbamate (DETC)⁸⁾: 生体内で生成されるNOを捕獲するのに、Fe(II)とdithiocarbamateとの錯体((DETC)₂-Fe(II))が用いられてきた。DETCも鉄イオンも水溶性であるが、両者からの錯体(DETC)₂-Fe(II)は水に不要であるため使いづらいという問題がある。そこで、水溶性の鉄錯体がsodium N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate (MGD)⁹⁾やN-(dithiocarboxy) sarcosine (DTCS)¹⁰⁾を用いて作られ、*in vivo*系でのNOの検出に利用されている。

In vivo ESR—生体内フリーラジカルの検出

一般に化学分析に用いられるESRは、X-

band帯と呼ばれる高周波のマイクロ波(約9.5 GHz)を用いる分光計である。この分析用ESR装置は一般にX-band ESRと呼ばれ、感度はNMRの約650倍と非常に高いものの、この装置では①実験動物を扱えるような大きな共振器が設計できない、②X-band帯のマイクロ波は動物の体内まで到達できない、③9 GHzのマイクロ波では水による誘電損失が大きい、などの理由から生き物そのもののフリーラジカルを測定するのに利用できなかった。そこで、実験動物用のESRシステム(*in vivo* ESR装置)が比較的低周波のマイクロ波(300 MHzから1.2 GHz)を使って開発された。この周波数帯のマイクロ波はL-band帯に属するので、この動物用のESRシステムをL-band *in vivo* ESR装置と呼ぶようになった¹¹⁾。 *In vivo* ESR装置を用いた生体内フリーラジカルの検出やESRイメージング法については既報^{11),12)}を参照していただき、本総説ではNOの*in vivo*測定について概説する。

生体内で生成されたNOを直接観測するには、まずNO用スピントラップ剤であるジチオカルバメート-鉄錯体でNOを捕らえて安定化し、このNOスピニアダクトのスペクトルを*in vivo* ESR装置で測定する¹³⁾。敗血症モデルマウスの肝臓で生成したNOを*in vivo*で観測した結果をFig. 5に示したが、得られたESRスペクトルはスピントラップ剤の(MGD)₂-Fe(II)がNOと反応してできた(MGD)₂-Fe(II)-NOに由来するもので、NO分子中の¹⁴Nはスピンが1であるため3本線のスペクトルが得られている(Fig. 5A)。一方、あらかじめ¹⁵N(スピン1/2)で置換したアルギニンをマウスに投与して同様の実験を行うと¹⁴Nと¹⁵Nとから成る5本線のESRスペクトルが得られ、以上の結果から、¹⁵N置換アルギニンを基質としマウスの体内で生合成されたNO(¹⁵NO)を観測できたことが分かる¹⁴⁾(Fig. 5B)。

さて、NOスピントラップ剤の(MGD)₂-

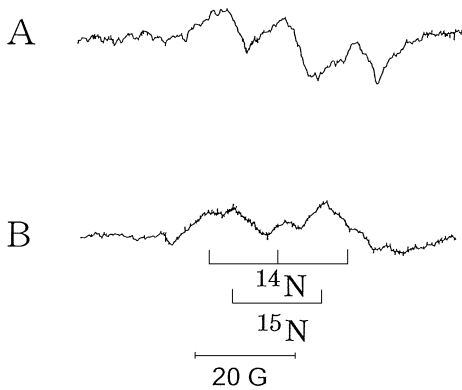


Fig. 5. *In vivo* L-band ESR spectra of $(\text{MGD})_2\text{-Fe(II)-NO}$ in septic-shock mice
A : mouse doped with $^{14}\text{N-L-arginine}$, B : mouse doped with $^{15}\text{N-L-arginine}$.

Fe(II) は水溶性であるため、親水性の領域で発生したり、あるいは、親水性領域にまで拡散してきた NO をトラップすることが可能である。しかし、疎水性の領域や、脳組織内部のようにバリアが存在する場所で発生した NO をトラップすることはできない。例として敗血症モデルラットの脳内部（小脳）で発生した NO を水溶性スピントラップ剤の $(\text{MGD})_2\text{-Fe(II)}$ で捕らえようとした結果を Fig. 6 に示した。MGD-鉄錯体、DETC-鉄錯体共に、肝臓ではほぼ同程度の NO を捕らえることができているが (Fig. 6a, c), $(\text{MGD})_2\text{-Fe(II)}$ では小脳で発生する NO を全く捕らえることができていない (Fig. 6c)。ところが脳血液関門を通過できる DETC を用いると, Fig. 6d に示すように小脳で生成した NO を捕らえることができる。DETC の場合、鉄とのコンプレックス $(\text{DETC})_2\text{-Fe(II)}$ は水に不溶であるが DETC 自身は水溶性であり、また、脳血液関門も通過することができるため、DETC と二価鉄を各々別々に動物に投与すると、組織内で $(\text{DETC})_2\text{-Fe(II)}$ 錯体が作られ、この錯体が NO をトラップしている。この手法を使うと、 $(\text{DETC})_2\text{-Fe(II)}$ 錯体で脳・小脳・海馬な

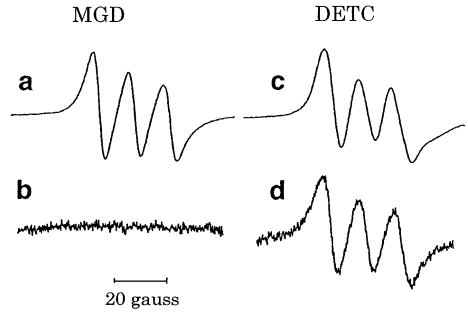


Fig. 6. ESR spectra of the NO spin-trapping adducts, $(\text{DETC})_2\text{-Fe(II)-NO}$ and $(\text{MGD})_2\text{-Fe(II)-NO}$, in septic-shock rats
ESR spectra of $(\text{MGD})_2\text{-Fe(II)-NO}$ in liver (a) and brain (b), whereas $(\text{DETC})_2\text{-Fe(II)-NO}$ in liver (c) and brain (d).

どの脳組織中で生成する NO を定量評価することが可能である¹⁵⁾。この手法の問題点は、 $(\text{DETC})_2\text{-Fe(II)}$ 錯体が必ずしも脳組織内で均一に存在するわけではないという点で、組織内での錯体分布に差がありすぎると単純には NO 産生量を組織間で比較することはできないという問題がある。

ESR による生体内酸素濃度測定

私たちの身の回りにある普通の酸素である“三重項状態の酸素”は、2 個の対電子をもった常磁性物質である。この酸素の緩和時間は他の物質の緩和時間に比べて短く、そのため他のフリーラジカルに対しては強力な緩和剤として働く。つまり、酸素がフリーラジカルと共存すると、酸素はフリーラジカルに対し磁気緩和効果を及ぼし、その結果フリーラジカル物質の ESR スペクトル線形をブロードにする。このスペクトル線形の変化が酸素濃度に依存して起こるため、スペクトル線形の変化の度合いから酸素濃度を定量的に評価することが可能となる。一例として酸素濃度が極端に違う環境下に置かれた炭素化合物（グルコースを燃やして

作った炭)の ESR スペクトルの線形の変化を Fig. 7 に示した¹⁶⁾。酸素濃度が 0.001% と非常に低い環境下では、炭のスペクトルの線幅は 0.165 gauss と極端に狭いが、酸素濃度が 2% と高くなると磁気緩和効果が顕著に現れ、スペクトル幅は 19.5 gauss と約 120 倍にまで増加する。また、Fig. 7 に示したように、酸素濃度と炭の ESR スペクトルの線幅との間には非常に直線関係が得られており、線幅の変化から酸素濃度を推定することが可能である。このように、酸素濃度測定用に用いるフリーラジカル化合物を酸素濃度測定用のスピンプローベと呼んでいる。

原理的にはすべてのフリーラジカルが酸素濃度測定用プローベとなり得るが、現実的な必要最低限の要求を以下にまとめた。

1. 生体内で安定であること。
2. 毒性が低いか、あるいは皆無であること。
3. 酸素濃度の変化に対し、迅速な応答性があること。

必ずしも上記のすべての要求を十分に満足しているとはいえないが、ニトロオキシド¹⁷⁾、墨汁¹⁸⁾、Lithium phthalocyanine¹⁹⁾、グルコースから作った炭¹⁶⁾、Triaryl methyl radical²⁰⁾などについて、測定プローベとしての可能性が検討されている。また、この手法はヒトの皮膚や組織中の酸素濃度の測定にも応用し得る可能性がある。ヒトの上腕の入れ墨の染料(墨)を酸素濃度測定用スピンプローベとして用い、そのスペクトルの変化から入れ墨の入った皮膚組織の酸素濃度が推定されている²¹⁾。Fig. 7 に示したように、適当なスピンプローベを選択すると ESR スペクトルの線幅の変化から酸素濃度を非常に高感度でかつ迅速に測定することが可能で、近い将来、サーフェスコイルを用いて特定の部位に局在させたスピンプローベの ESR スペクトルを測定し、局所部位での酸素濃度を測定する臨床用システムが出現するものと思われる。

前項において、スピンプローベの ESR スペ

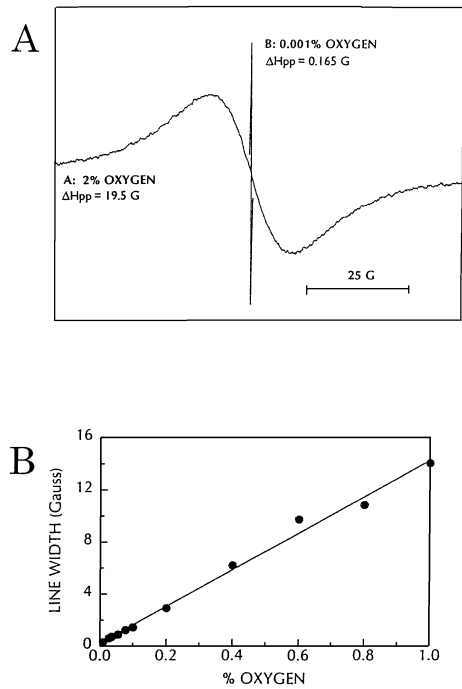


Fig. 7. Effect of oxygen on the ESR spectra of the glucose char
 A : ESR spectra of char in the presence of 0.001 and 2% oxygen.
 B : ESR linewidth of the glucose char against oxygen concentration in the range of 0–1%.

クトルが酸素濃度依存的に変化するのを利用して酸素濃度を定量する手法について述べた。一方、スピンプローベに対する酸素の磁気緩和効果の度合いを画像化すると、酸素濃度を視覚化することも可能である。ファントムの例を Fig. 8 に示したが²²⁾、6本各々のチューブにはニトロオキシド (15N-labeled 4-oxo-2,2,5,5-tetramethylpyrrolinyl-d16-N-oxy ; perdeuterated tempone (PDT)) 水溶液が入れている。各チューブ内の酸素濃度は Fig. 8 に示したようにそれぞれ異なっているため、酸素は濃度依存的に PDT の ESR スペクトルをブロード化し、線幅が増加する。この線幅の情報は、系内の酸素濃度値を反映しているため PDT の線幅

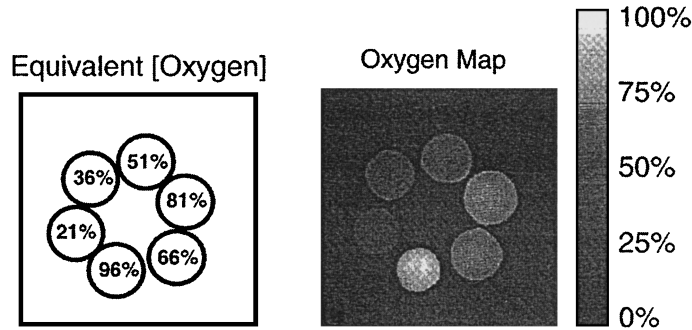


Fig. 8. Imaging of oxygen in a six-tube phantom by ESR oximetry
A phantom was constructed of six identical tubes filled with different concentrations of PDT

をマッピングすることにより酸素濃度マップを得ることができる (Fig. 8). 今後はこの手法を応用し、動物組織内の酸素濃度マップが視覚化されるようになると思われる。

NMR・MRIによる活性酸素の検出 および視覚化

前項において、フリーラジカルである活性酸素や酸素を *in vivo* ESR 法で測定する手法について述べた。この技術は 1980 年代中ごろから開発され始めた比較的新しい技術ではあるが、“フリーラジカルの測定に ESR を用いる”という従来からの発想を発展させたものであることから、本手法はオーソドックスで堅実な手法である。

一方、NMR の進歩、特に近年の MRI の進歩により、MRI の高解像度の解剖画像上でフリーラジカルの情報が視覚化できないだろうか、という期待が出てきた。そこで、本項では NMR の手法でフリーラジカルを検出し視覚化する手法について解説する。NMR あるいは MRI でフリーラジカルを検出するには現在のところ、三つの手法が考えられる。

1. スピントラップ法の利用

スピントラップ法は、ESR でフリーラジカ

ルを観測するのに開発されたという歴史的経緯があるが、スピニアダクトを必ずしも ESR で測定する必要はない。例えば、スピニアダクトの蛍光スペクトルや NMR スペクトルを観測し、フリーラジカルをトラップする前後でのスペクトル変化が有意に測定できれば、この変化からフリーラジカルに関する情報を入手することが可能である。このような発想から、P を含むスピントラップ剤 DEPMPO を用いて、活性酸素に関する情報を ^{31}P -NMR スペクトルから得ようという試みがなされた²³⁾。DEPMPO の構造並びにフリーラジカルとの反応式を Fig. 9 に示した。DEPMPO がフリーラジカル R \cdot と反応すると 2 種類のスピニアダクト (RA1 と RA2) ができるが、これらは互いに立体異性体で ESR スペクトルで識別可能である。濃度が比較的高いと (通常、我々の実験条件はこれにあたるが)、RA1 と RA2 は不均化反応や還元反応により、ヒドロキシアミン化合物となり、フリーラジカルの性質を失う。つまり、反磁性化合物となる。したがって、NMR での分析では、フリーラジカルとしてのスピニアダクトを観測するのではなく、常磁性を失った反磁性のヒドロキシアミン化合物を測定することになる。NMR は ESR に比べ約 650 倍感度が低いにもかかわらず NMR でフリーラジ

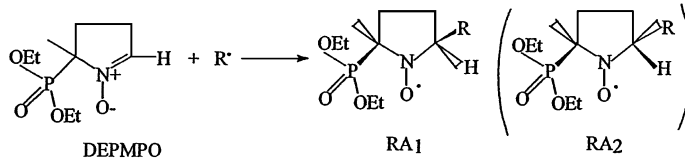


Fig. 9. Spin trapping of radical R· with DEPMPPO

カルの情報が見られるのは、① ESR が安定ではないフリーラジカルとしてのスピニアダクトを観測しているのに対し、NMR では最終生成物で安定なヒドロキシアミン化合物を測定していること、②不安定なフリーラジカルのスピニアダクトは測定系に蓄積されにくい、最終生成物としてのヒドロキシアミン化合物は時間の経過とともに蓄積され続ける、③特に生体では、フリーラジカルとしてのスピニアダクトが“bio-reduction”により常磁性を失いやすい、という理由によるものと思われる。DEPMPPO を用いて O_2^- 、 $\cdot OH$ などの活性酸素や $\cdot CH_3$ などの炭素ベースのフリーラジカルがトラップされ ^{31}P -NMR スペクトルの解析がなされている²⁴⁾。一例として、DEPMPPO が白血球から出る O_2^- をトラップした ESR スペクトルと ^{31}P -NMR スペクトルを Fig. 10 に示した。現在、この手法をさらに発展させ、F や ^{13}C を含むスピントラップ剤が合成され、そのトラップ効率が詳細に検討されている。

2. 磁気緩和効果を利用した、MRI によるフリーラジカルの画像化

MRI はスピンの存在する環境の差を相対的なコントラストの差として画像化する手法であるため、いかにコントラストをつけるかがよい結果を得る鍵となる。ある特定の領域の画像にコントラストをつけるには、その領域のスピンの性質を変えるのが有効で、意図的にスピンの緩和時間を変化させるという手法がとられている。緩和時間に影響を与えて画像コントラストを強調させる物質を“造影剤”と呼んでおり、現在、常磁性金属のガドリニウムや鉄が臨

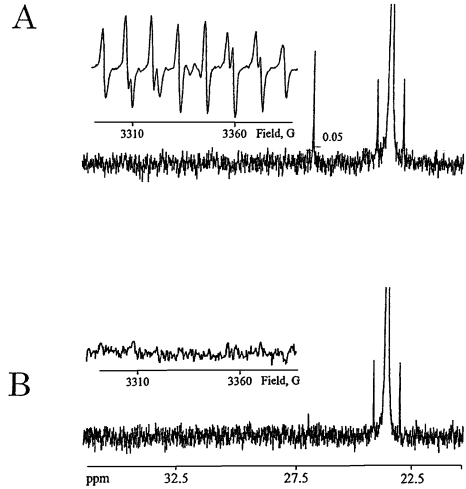


Fig. 10. ^{31}P -NMR and ESR spectra of spin adducts from DEPMPPO and O_2^- from neutrophils
A : O_2^- was generated from a stimulated human neutrophils.
B : Same as A, except that resting neutrophils were used.

床用造影剤として用いられてはいるが、ニトロオキシドなどの安定なフリーラジカル化合物も造影剤として造影効果を発揮する。NO スピニアダクト ($(MGD)_2Fe(II)\cdot NO$) も常磁性のフリーラジカル化合物であるので造影効果を発揮すると思われる、“NO スピニアダクトが有効な画像コントラストを生み出せるのであれば、組織特異的なコントラストの変化から NO 生成部位を MRI 画像上で特定できないだろうか？”という発想を得、MRI スピントラップ法が開発された。そこで、敗血症モデルラットの体内で生成する NO を MRI 画像上で識別す

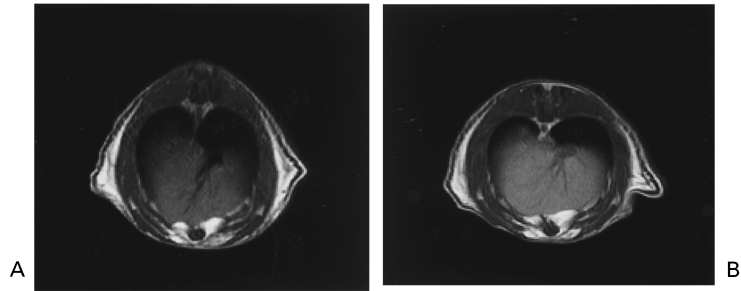


Fig. 11. Imaging of NO in the liver of a septic-shock rat by MRI
 A: T₁-weighted MR image of the liver in a control rat.
 B: T₁-weighted MR image of the liver in an NO-generated rat.

ることができるかどうか検討した。その詳細な結果については既に本誌などにまとめているので既報^{12),24)}を参照されたいが、NO スピニアダクトの造影効果を通して肝臓での NO 生成部位を画像化した結果を Fig. 11 に示した。ESR による測定から、このラットの肝臓ではグラム組織当たり 50~100 nmol の NO が生成しており、0.1 mM オーダーの NO アダクトが存在すると造影剤として機能することが MRI 画像で確認できた。敗血症モデルマウスの肝臓での NO 生成部位が、既に ESR イメージング法により画像化されているが¹⁰⁾、現在のところ、MRIの方が画像解像度が高く、画像情報量も多いと思われる。

3. Overhauser 効果を利用したフリーラジカルの視覚化

この手法は、proton-electron double-resonance imaging (PEDRI) と呼ばれているフリーラジカルを画像化する手法である²⁵⁾。フリーラジカルを含む実験系で、フリーラジカルの共鳴条件を満たすようにマイクロ波を照射して電子スピン共鳴を飽和させておき、次にこの条件下で NMR シグナル（通常は水溶液中のプロトンのシグナル）を観測する。すると、適切な飽和条件が達成されていると、励起された電子スピンのエネルギーの遷移により NMR シグナルが数百倍にまで増加し、フリーラジカルの近傍

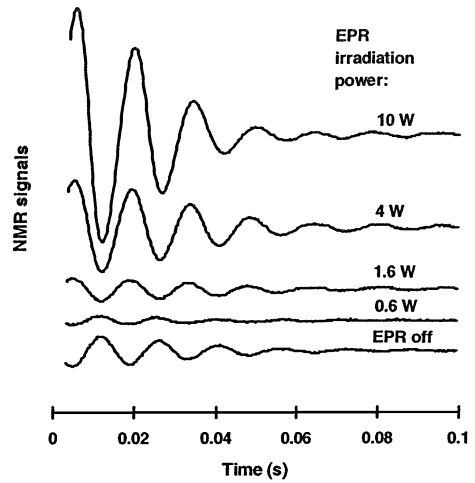


Fig. 12. Dynamic nuclear polarization
 Proton NMR FIDs obtained at 10 mT from a 60 ml aqueous sample contained 2 mM nitroxide free radical. The bottom trace was obtained without ESR irradiation, and the rests were obtained while continuously irradiating the sample at 288 MHz with the power indicated.

にある（エネルギー的に相関している）水分子のプロトンシグナルが著しく増強される。この現象は dynamic nuclear polarization (DNP)（あるいは Overhauser 効果）として知られているが、DNP により NMR シグナル強度がどの程度増強されるかを Fig. 12 に示した。理論

的には約300倍ほどシグナル強度が増加するが、現在、ニトロオキシド水溶液でのプロトンシグナルは50~60倍程度増強できている。PEDRI法を用いたフリーラジカルの画像化では、ESR用のマイクロ波照射の有無の二つの条件下でproton-MRI画像を観測し、両者の差画像を計算するとフリーラジカルの位置情報を現す画像が得られる²⁸⁾。この手法はまだまだ発展段階にあり、装置の設計やパルスシーケンスなど検討されるべき点も多いが、フリーラジカルを画像化する手法としては非常に将来性がある手法であるので、多くの研究者の参加が期待されている。

文 献

- 1) McCord JM, Fridovich I : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969 ; 244 : 6049-6055
- 2) Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT : Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin Invest 1973 ; 52 : 741-744
- 3) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987 ; 327 : 524-526
- 4) Janzen EG : Chemistry and biology of spin-trapping radicals. Accounts Chem Res 1971 ; 4 : 31-40
- 5) Harbour JR, Chow V, Bolton JR : An electron spin resonance study of the spin adducts of OH and HO₂ radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions. Can J Chem 1974 ; 52 : 3549-3553
- 6) Konaka R, Kawai M, Noda H, Kohno M, Niwa R : Synthesis and evaluation of DMPO-type spin traps. Free Rad Res 1995 ; 23 : 15-25
- 7) Frejaville C, Karoui H, Tuccio B, Le Moigne F, Culcasi M, Pietri S, Lauricella R, Tordo P : 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-oxide : a new efficient phosphorylated nitron for the *in vitro* and *in vivo* spin trapping of oxygen-centered radicals. J Med Chem 1995 ; 38 : 258-265
- 8) Kubrina LN, Caldwell WS, Mordvintcev PI, Malenkova IV, Vanin AF : EPR evidence for nitric oxide production from guanidine nitrogen of L-arginine in animal tissues *in vivo*. Biochim Biophys Acta 1992 ; 1099 : 233-237
- 9) Lai CS, Komarov AM : Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-shock mice. FEBS Lett 1994 ; 345 : 120-124
- 10) Yoshimura T, Yokoyama H, Fujii S, Takayama F, Oikawa K, Kamada H : *In vivo* EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. Nature Biotechnol 1996 ; 14 : 992-994
- 11) Eaton RG, Eaton SS, Ohno K, eds. EPR imaging and *in vivo* EPR. Boca Raton, USA : CRC Press Inc., 1991
- 12) 藤井博匡 : フリーラジカルをプローベとした画像化法. 日磁医誌 1999 ; 19 : 174-185
- 13) Komarov AM, Mattson D, Jones MM, Singh PK, Lai CS : *In vivo* spin trapping of nitric oxide in mice. Biochem Biophys Res Commun 1993 ; 195 : 1191-1198
- 14) Fujii H, Koscielniak J, Berliner LJ : Determination and characterization of nitric oxide generation in mice by *in vivo* L-band EPR spectroscopy. Magn Reson Med 1997 ; 38 : 565-568
- 15) Fujii H, Berliner LJ : *Ex vivo* EPR detection of nitric oxide in brain tissue. Magn Reson Med 1999 ; 42 : 599-602
- 16) Zweier JL, Chzhan M, Ewert U, Schneider G, Kuppusamy P : Development of a highly sensitive probe for measuring oxygen in biological tissues. J Magn Reson 1994 ; B105 : 52-57
- 17) Hyde JS, Subczynski WK. Spin-label oximetry. In : Berliner LJ, Reuben J, ed. Biological Magnetic Resonance. New York, USA : Plenum Press, 1988 ; 399-425
- 18) Nakashima T, Goda F, Jiang J, Shima T, Swartz HM : Use of EPR oximetry with India ink to measure the pO₂ in the liver *in vivo* in mice. Magn Reson Med 1995 ; 34 : 888-892
- 19) Liu KJ, Gast P, Moussavi M, Norby SW, Vahidi N, Walczak T, Wu M, Swartz HM : Lithium

- phthalocyanine : a probe for electron paramagnetic resonance oximetry in viable biological systems. Proc Natl Acad Sci USA 1993 ; 90 : 5438-5442
- 20) Kuppusamy P, Wang P, Chzhan M, Zweier JL : High resolution electron paramagnetic resonance imaging of biological samples with a single line paramagnetic label. Magn Reson Med 1997 ; 37 : 479-483
- 21) Goda F, Liu KJ, Walczak T, O'Hara JA, Jiang J, Swartz HM : *In vivo* oximetry using EPR and India ink. Magn Reson Med 1995 ; 33 : 237-245
- 22) Velan SS, Spencer RGS, Zweier JL, Kuppusamy P : Electron paramagnetic resonance oxygen mapping (EPROM) : direct visualization of oxygen concentration in tissue. Magn Reson Med 2000 ; 43 : 804-809
- 23) Khramtsov V, Berliner LJ, Clanton TL : NMR spin trapping : detection of free radical reactions using a phosphorus-containing nitron spin trap. Magn Reson Med 1999 ; 42 : 228-234
- 24) Fujii H, Wan X, Zhong J, Berliner LJ, Yoshikawa K : *In vivo* imaging of spin-trapped nitric oxide in rats with septic shock : MRI spin trapping. Magn Reson Med 1999 ; 42 : 235-239
- 25) Lurie D, Bussel DM, Bell LH, Mallard JR : Proton-electron double magnetic resonance imaging of free radical solutions. J Magn Reson 1988 ; 76 : 366-370

***In Vivo* Measurement of Active Oxygen Free Radicals by ESR and MRI**

Hirota FUJII

*School of Health Sciences, Sapporo Medical University
Minami-1, Nishi-17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556*

The ultimate goal of *in vivo* ESR spin trapping is to provide a window into the characterization and quantification of free radicals in living organisms in real time. The practical application of *in vivo* ESR to biological systems involving reactive oxygen radicals has been challenging. Some of the limitations relate to *in vivo* ESR instrumental sensitivity, particularly to the relative stability of the radicals and their nitron adducts. Our aim is to review the strengths and weaknesses of both traditional and *in vivo* ESR spin trapping with methodologies that pledge to overcome some of the problems, particularly radical adduct decomposition. The new complementary techniques include : NMR spin trapping, detection of NO by ESR with dithiocarbamate-Fe(II) spin trap complexes, MRI spin trapping, oxygen mapping by ESR imaging methodology using oxygen sensitive paramagnetic material, and PEDRI (proton-electron double resonance imaging). NMR spin trapping monitors new NMR lines resulting from diamagnetic products of radical spin adduct degradation and reduction. MRI spin trapping images the dithiocarbamate-Fe(II)-NO complexes by proton relaxation contrast enhancement. PEDRI is a new visualization method of free radicals. Although some of these approaches are in their infancy, they are showing promise as versatile techniques to measure and possibly image oxidative stress in living systems.