

ESR における簡易キャピラリー法による迅速ラジカル測定 —フラットセル法との比較—

伊藤 要子¹, 水野 貴文², 菊池 有純³, 石口 恒男¹,
綾川 良雄¹

¹愛知医科大学放射線医学 ²鈴鹿医療科学大学医用工学部 ³大雄会病院

緒 言

フリーラジカルは、多くの疾患の発症や進展に密接に関係しており、これを測定することは病態の原因解明および治療に大いに貢献する^{1)~7)}。しかし、フリーラジカルの寿命は極めて短く微量しか存在しないため測定が困難であった。これに対し、近年電子スピン共鳴装置 (ESR) が生体内のフリーラジカル反応の研究に広く応用されるようになってきた^{8),9)}。

しかし、装置が複雑なことに加え、*in vitro* 測定では、熟練を要するフラットセルを使用するため、操作が煩雑で必ずしも測定は容易ではなかった。また、手技に手間がかかり瞬時に起こるフリーラジカル反応を迅速に測定することは困難であった。フラットセルの代わりにディスプレイのキャピラリーを用いる簡易キャピラリー法については記載¹⁰⁾はあるものの詳細についての報告はなく、従来のフラットセル法との比較についての報告はない。そこで我々は、キャピラリー法を確立するとともに従来のフラットセル法との相関および最少検体量、測定時間、coefficient variation (CV)、感度、手技を比較検討し、フリーラジカル測定におけるキャピラリー法の有効性を検討した。

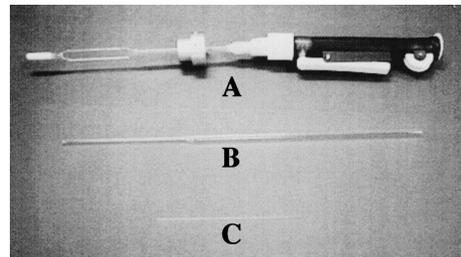


Fig. 1. Flat cell, capillary cell folder and capillary

A : Flat cell
B : Capillary cell folder
C : Capillary

実験材料および実験方法

電子スピン共鳴装置 (FR30ESR : JEOL, Japan) を使用し、下記の項目を従来のフラットセル法とキャピラリー法で比較検討した。Fig. 1 の A はフラットセル、B はキャピラリー用ホルド管、C はキャピラリーを示す。

1. SOD 活性測定

1) SOD 標品による標準曲線とその相関

SOD 標品 (Superoxide dismutase ; Sigma) を 50, 25, 12.5, 8.0, 5.0, 1.7, 0.5 単位となるよう調整し、従来のフラットセル法とキャピラリー法の両者で SOD 活性を各単位 3 回測定し

た。フラットセル法では (FR30ESR での既存の反応系), 9.2 M DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide; Sigma) 15 μ l, 2 mM HPX (Hypoxanthine; Sigma) 50 μ l, 5.5 mM DETAPAC (Diethylene triaminepenta acetic acid; Sigma) 35 μ l, SOD 50 μ l, XOD (Xanthine oxidase; Boehringer Mannheim) 50 μ l を試験管内で混和し, フラットセルにとり混和から 45 秒後の SOD 活性を測定した。フラットセル法の測定条件は, power: 4 mW, field: 335.5 mT, sweep width: 5 mT, sweep time: 2 分, modulation width: 0.079 mT, gain: 320, time constant: 0.1 秒とした。キャピラリー法では, 9.2 M DMPO 4 μ l, 2 mM HPX 13 μ l, 5.5 mM DETAPAC 9 μ l, SOD 13 μ l, XOD 13 μ l をマイクロチューブ内で混和し, 毛細管現象でキャピラリー管 (Microcaps; Drummond) に採取し下端をヘマトクリット用のパテ (テルモ) で詰めキャピラリー用ホールド管 (Labotec Co.) に入れ, 混和から 45 秒後に SOD 活性を測定した。キャピラリー法の測定条件は, power: 4 mW, field: 336.7 mT, sweep width: 5 mT, sweep time: 2 分, modulation width: 0.079 mT, amplitude: 790, time constant: 0.3 秒とした。なお, 使用したキャピラリーおよびパテはこれら自身でバックグラウンドシグナルは認めなかった。

このとき, SOD を添加しないブランクのシグナル強度 (I_0) を各単位の SOD 活性によるシグナル強度 (I) で除した値 (I_0/I) から, 原点を通る直線とするため 1 を差し引いた値 ($I_0/I - 1$) をプロットして両測定法における SOD の標準曲線を求めた。

2) マウス血液の SOD 活性測定

ddY 雄マウス 6 匹 (7~24 週齢) を使用し, エーテル麻酔で死亡させ下大静脈よりヘパリン添加で採血し, 速やかにフラットセル法およびキャピラリー法で 1) の条件下 SOD 活性を測定

した。

2. マウス腎虚血・再灌流実験におけるラジカル測定とその相関

ddy 7 週齢雄マウスをネンブタールで麻酔し, 伏臥位に固定し左腎部位の皮膚を切開し, 左腎動・静脈をクランプで 45 分間結紮後, 30 分間再灌流し (虚血・再灌流群), スピンプロープとして pH 7.4 リン酸緩衝液に溶解した 270 mM の C-PROXYL (3-Carbamoyl-proxyl) を 0.1 ml/10 g body weight 尾静脈から投与し, 1, 9, 15, 30, 45 分後にエーテル麻酔下で死亡させ下大静脈からヘパリン添加で採血し, 速やかに, フラットセル法およびキャピラリー法でフリーラジカルを測定した。なお, sham 群については, 左腎部位の皮膚を切開するのみで虚血・再灌流せず同様の操作を実施した。フラットセル法では, 得られた全血 180 μ l に 1 mM 過マンガン酸カリウム 20 μ l を加え良く攪拌後, フラットセルに吸引させ ESR で測定した。キャピラリー法では, 全血 27 μ l に 1 mM 過マンガン酸カリウム 3 μ l を加え良く攪拌後, キャピラリーに全血を毛細管現象で入れパテで下端を詰め ESR で測定した。両群とも各時間ごとに 3 匹 ($n=3$) を使用した。

3. SOD 活性測定における coefficient variation (CV) の比較

フラットセル法においては 25, 10 単位の SOD を各 8 回測定し, キャピラリー法では 8, 4 単位の SOD を各 8 回測定し, CV を算出した。

結 果

1. SOD 活性測定

1) SOD 標品による標準曲線とその相関

0~50 単位の SOD 活性測定によるフラットセル法およびキャピラリー法による SOD の標準曲線を Fig. 2 に示した。フラットセル法で

は相関係数 0.985, キャピラリー法では 0.993 と両法とも高い相関を示す標準曲線が得られた (Fig. 2A). キャピラリー法はフラットセル法に比べ標準曲線の傾きが約 1/2 と感度は劣るものの SOD 活性を十分定量的に測定できることが示された. また, 両測定法の相関は 0.978 ($p < 0.0001$) と高く (Fig. 2B), キャピラリー法がフラットセル法に代わって SOD 活性を正確に測定できることが示された.

2) 両測定法によるマウス血液の SOD 活性の相関

マウス血液の SOD 活性をフラットセル法とキャピラリー法で測定し, 両測定法による相関を求めた. その結果, Fig. 3 に示されたごとく $y = 0.156 + 0.236x$ の式で表示され, 有意に高い相関 ($R = 0.713, p < 0.0031$) を認めた. よって, キャピラリー法はフラットセル法同様十分な信頼性をもってマウス血液の SOD 活性を測定できることが確認された.

2. マウス腎虚血・再灌流実験におけるラジカル測定とその相関

マウス左腎虚血・再灌流後の ESR によるスピンプローブのシグナル強度は Fig. 4A に示されたごとく, 1~9 分で急激に低下し, 15 分後はゆっくりと低下し, ラジカルの経時的推移が示された. フラットセル法, キャピラリー法ともに同様な推移を示し, それらの感度はフラットセル法が高値であった. しかし, フラットセル法とキャピラリー法による経時的測定値の相関は, Fig. 4B に示されたグラフのごとく $y = 12.873 + 0.420x$, 相関係数 $R = 0.981$ と高い相関を示し, キャピラリー法においてもフラットセル法同様, 虚血・再灌流によって発生するフリーラジカルの測定が可能であることが示された.

これらの関係は, マウス背部皮膚の切開のみの sham 群においても同様に認められ, 両測定法は $y = 13.851 + 0.412x$ の関係で相関係数 $R = 0.951$ と高い相関を示した.

3. SOD 活性測定における CV の比較

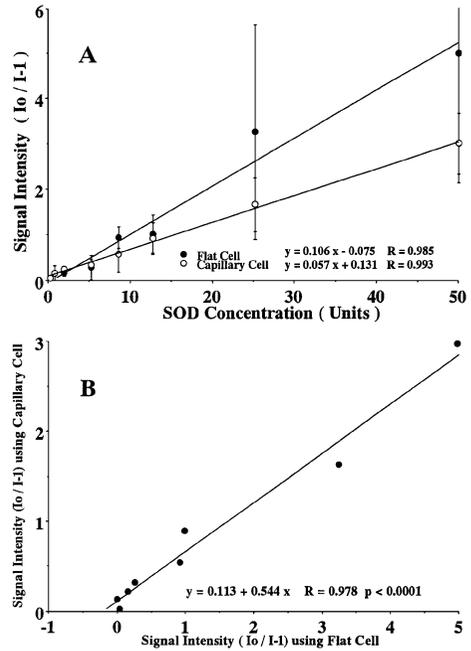


Fig. 2. Standard curves of SOD using the flat cell method or capillary cell method and their correlation coefficient

I₀: Signal intensity at 0 units of SOD. I: Signal intensity at each unit of SOD.

For details, see Methods and Materials.

A: Standard curves of SOD using flat cell or capillary cell

Data are presented as mean \pm SD for 3 measurements at each point.

B: Correlation coefficient between the standard curves by flat cell method and capillary cell method.

フラットセル法で 25 および 10 単位の SOD 活性を各 8 回測定したときの CV は 7.04 および 6.32% であった. 同じく, キャピラリー法で 8 および 4 単位の SOD 活性を各 8 回測定したときの CV は 10.34 および 7.32% であった. 両測定法ともに SOD 活性単位の高い方が CV 値は高値を示したが, 両測定法とも臨床測定法として使用するに十分な CV であった.

4. フラットセル法およびキャピラリー法の比較

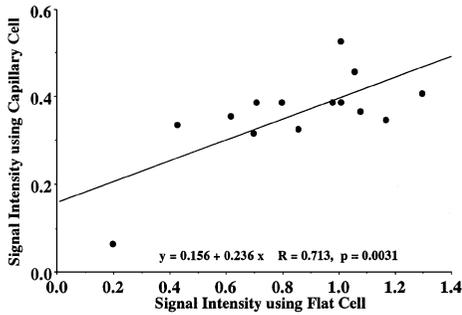


Fig. 3. Correlation coefficient between mice blood SOD activities by flat cell method and capillary cell method
For details, see Methods and Materials.

フラットセル法およびキャピラリー法での各項目における比較を Table に提示した。今回使用した ESR (FR30; JEOL) におけるフラットセル法での最少検体量はラジカル測定時で $180 \mu\text{l}$ (総量 $200 \mu\text{l}$)、キャピラリー法では $27 \mu\text{l}$ (総量 $30 \mu\text{l}$) とフラットセル法では約 7 倍の検体量を必要とした。SOD 測定時においても、それぞれ $50 \mu\text{l}$ (総量 $200 \mu\text{l}$) と $13 \mu\text{l}$ (総量 $52 \mu\text{l}$) とフラットセル法では約 4 倍の検体量が必要であり、キャピラリー法では顕著な検体量の削減ができた。この結果は、微量の検体しか得られない乳幼児や小動物での測定に有益である。

検体測定時間は、ラジカル測定においてフラットセル法で約 5 分/検体、キャピラリー法で 3 分/検体とフラットセル法では 1.7 倍の時間を要した。SOD 活性測定においては、6 分と 4 分で 1.5 倍の時間を要した。この測定時間差の最大の原因はフラットセル法におけるセルの洗浄にある。Fig. 1 に示したごとく、検体を入れるフラットセルは厚さ 0.2 mm (外径) の薄いセルであり洗浄に手間がかかる。特に血液など粘稠な検体を使用する測定では、次の測定に対し、前検体の混入を防ぐため十分な洗浄が必要である。これに対しキャピラリー法では各測定ごとにキャピラリーは使い捨てであり、洗

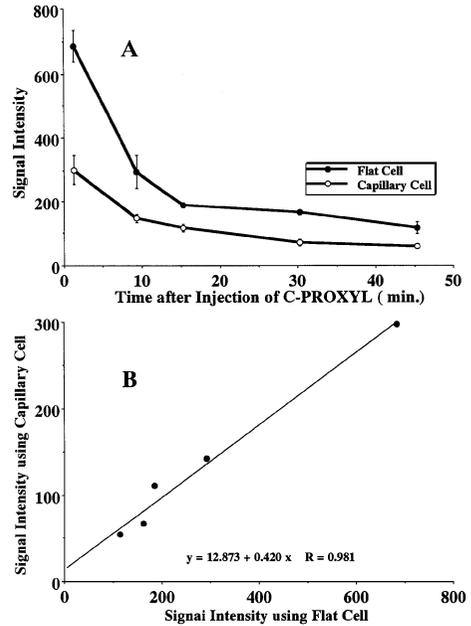


Fig. 4. Decrease in signal intensity measured by ESR using flat cell or capillary cell in blood of ischemia-reperfusion mice after injection of C-PROXYL and their correlation coefficients.
For details, see Methods and Materials.

A: Decrease in signal intensity measured by ESR using flat cell or capillary cell in blood of ischemia-reperfusion mice after injection of C-PROXYL

Data are presented as mean \pm SD for 3 measurements at each point.

B: Correlation coefficient between signal intensity measured by ESR using flat cell and capillary cell

浄の必要がなく検体の混入は全くない。この測定時間の差は検体数の増加に伴い大となるので、多数の検体測定時には顕著となる。また、検体量が少量の場合は、薄いフラットセル内への検体挿入時に気泡が入りやすいので注意が必要である。

両測定法で SOD の標準曲線の相関係数はフラットセルおよびキャピラリー法ともに 0.99 と高い相関を示し、両測定法ともに SOD 活性測定に高い信頼性を認めた。

Table. Comparison of the Properties between Flat Cell and Capillary Cell

		Flat cell method	Capillary cell Method	Ratio (Flat/Capillary)
Sample volume	Radical	180 μ l	27 μ l	7 times
	SOD	50 μ l	13 μ l	4 times
Time (min)	Radical	5 min	3 min	1.7 times
	SOD	6 min	4 min	1.5 times
Correlation coefficient of SOD standard curve		0.99	0.99	Equal
CV (%)		6.68	8.83	Low
Sensitivity (SOD activity)		2~5	1	2~5 times
Easiness of operation		Complication (cell-washing)	Easiness (throw-away)	
Technique		Necessary of training	Simplicity	

CVについては、フラットセル法で6.68% (25, 10単位のSODで7.04, 6.32%の平均値)、キャピラリー法で8.83% (8, 4単位のSODで10.34, 7.32%の平均値)とフラットセル法の方がCVは低く測定ごとの変動が少ないことが示された。しかし、キャピラリー法における8.83%も臨床および研究目的における検査法のCVとしては十分信頼性におけるCVであった。

感度については測定条件の amplitude との関連もあり正確には算出できないが、SOD活性に換算しフラットセル法の方がキャピラリー法に比べ約2~5倍感度が高いと思われた。

操作上の問題については、フラットセル法ではフラットセルが薄く細長い形状で取り扱いにくく、かつ高価であるため取り扱いに注意が必要であった。また、フラットセル法では洗浄操作が煩雑であるため、迅速な測定を要する場合においては熟練を要する。特に多数の検体測定では1検体ごとに洗浄時間がかかるフラットセル法に比し、混入物の恐れのないディスプレイのキャピラリー法が簡便であった。

考 察

フリーラジカルが動脈硬化、虚血性心疾患、発癌、炎症など種々の疾患の原因^{(1)~(15)}となっていることから、実際に発生するフリーラジカルを測定することが切望されている。ESRはこの寿命の極めて短いフリーラジカルを測定する唯一の分析手段である。そこで、使用上種々の煩雑さを有するフラットセル法に代わって、少量の検体においても簡便にフリーラジカルの測定ができるキャピラリー法を確立するため、従来のフラットセル法とキャピラリー法における最少検体量、両測定法の相関、測定時間、CV、感度、操作上の問題点など比較検討した。このキャピラリー法については記載⁽¹⁰⁾はあるものの臨床的な測定に対する信頼性や従来のフラットセル法との比較については全く報告はない。

そこで本研究ではESRを用いての測定で最も需要の高いスーパーオキシドアニオンを不均化するSODの活性測定と血管内皮細胞、神経細胞、マクロファージなどで産生されるNOを含むラジカルの測定において、従来のフラットセル法とキャピラリー法の双方で測定し、最

少検体量, 両測定法の相関, 測定時間, CV, 感度, 操作上の問題点など比較検討した。

検体量が 1/7~1/4 と少量で測定できることは, 検体が微量の場合でも測定でき用途が広がる。また, SOD, XOD などの酵素やラジカル測定で使用する DMPO, C-PROXYL などのトラッピング剤は比較的高価な試薬であるため, 試薬が少量で測定可能なキャピラリー法は経済的である。

SOD 検量線の相関は両測定法ともに 0.99 と高く, また両測定法間の相関も 0.978 と高い。腎虚血・再灌流で発生するラジカル測定においても同様両測定法間で 0.981 と高い相関を示したことから, 種々のラジカル測定においてキャピラリー法はフラットセル法と同様に使用できることが示された。

測定時間に関しては, 1 回の測定では 1/1.5~1/1.7 の短縮であるが, 検体が多数ある場合は 1 回ごとの煩雑な洗浄時間が大きく影響して長時間を要し, 迅速な測定を要するラジカル測定にとって重大な問題であった。しかし, キャピラリー法では検体ごとの使い捨てであり, 洗浄時間が不要であるとともに前検体の混入の恐れもないことから, 多くの検体を正確かつ迅速に測定できる。測定値の変動 (CV) については, キャピラリー法の方が若干大きく精度は劣るが, 臨床検査としては十分許容される範囲である。なお, 今回は, 示していないが, 測定者間による測定値の変動も認められるので, 一連の測定に関しては同一測定者が実施することが好ましい。

フラットセルは, 厚さ 2 mm と薄く検体吸引時において気泡が入りやすく測定上の誤差につながりやすい。特に, SOD 測定のように 45 秒間で磁場内にセットする場合熟練を要する。

以上, ESR での *in vitro* のラジカル測定に際して, キャピラリー法は従来のフラットセル法に比べ, 感度, CV は若干劣るもののフラットセル法との相関も高く, かつフラットセル法より微量で短時間に容易に測定可能であり, 臨床

的に十分に利用できることが示された。

文 献

- 1) Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y: Role of oxygen-derived free radical, in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Rad Res Commun* 1989; 7: 285-291
- 2) Kogawa K, Muramatsu H: Enhanced inhibition of experimental metastasis by the combination chemotherapy of Cu-Zn SOD and adriamycin. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 239-244
- 3) Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H: Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia; involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 2448-2453
- 4) 井上正康. 活性酸素と病態. 井上正康編, 学会出版センター, 1992
- 5) Freeman EA, Crapo JD: Biology of disease: free radical and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426
- 6) Laurent B, Ardaillou R: Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 1986; 251: F765-F776
- 7) 佐野浩亮, 内海英雄: 生体内フリーラジカル反応の *in vivo* 検出. *日薬理誌* 1999; 114: 107-114
- 8) 庄司洋史, 李 昌一, 阿部栄逸朗, 河野雅弘: *in vitro, in vivo* における生体内 NO トラッピングの基礎的検討. *磁気共鳴と医学* 1998; 9: 25-28
- 9) 内海英雄, 伊藤正吾: ESR による活性酸素の測定. *腎と透析* 1994; 2: 197-203
- 10) 中川公一: 石英フラットセルは活性酸素の測定に有益か? *J Act Oxyg Free Rad* 1994; 5: 81-85
- 11) Hotta T, Murakami HO, Fujita M, et al.: Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea myocardial mitochondria. *Eur J Pharma* 1999; 380: 37-48
- 12) 前畑英介, 下村弘治, 鈴木順子, 他: 電子スピン共鳴 (ESR) による superoxide dismutase (SOD) 活性測定法と臨床検査としての評価. *磁気共鳴と医学* 1993; 4: 63-70

- 13) 前畑英介, 下村弘治, 清瀬 闕, 林 旭, 坂岸良克: 糖尿病における Glycated Compounds と Superoxide Dismutase (SOD) 活性値との比較及び関連項目の加齢変化について. 日老年医誌 1991 ; 28 : 520-529
- 14) Ito S, Ueda Y, Sugiaki T, Iidaka K : Induction of glomerular injury by singlet oxygen. Nephron 1992 ; 60 : 204-209
- 15) 川島成乃亮, 井上信孝, 横山光宏: 動脈硬化血管での炎症制御における NO と酸化ストレスの相互作用. 動脈硬化 2000 ; 27 : 171-177

Simplified Measurement of Free Radicals with ESR Using Disposable Capillary Cell Method : Comparison with the Conventional Method Using Flat Cell

Youko H. ITOH¹, Takafumi MIZUNO², Arizumi KIKUCHI³,
Tsuneo ISHIGUCHI¹, Yoshio AYAKAWA¹

¹*Department of Radiology, Aichi Medical University
Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi 480-1195*

²*Department of Medical Electronics, Suzuka University of Medical Sciences*

³*Daiyukai Hospital*

Currently, the only analytical means for measuring the very short life of free radicals is ESR. An easier method for measuring the free radicals which cause disease is anticipated. The conventional ESR measuring technique using the flat cell is complicated, and specific training is required.

We propose a capillary cell method for use with a smaller sample. We feel that it is easier to use than the conventional flat cell method. When we used this method, the sample volume was 1/4-1/7, and the measuring time was shortened to about half. The correlation coefficient was 0.99, sensitivity was lowered to 1/2-1/5, and the technique was much simpler than the conventional method. The capillary method is therefore useful for measuring a small sample quickly and very economically.