

電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance; ESR) 法による生物医学応用
—医薬品開発のための抗酸化能評価—

李 昌一

Biomedical Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy
—Assessment of Antioxidant Property for Development of Drugs—

Masaichi-Chang-il LEE

Department of Clinical Care Medicine, Division of Pharmacology and ESR Laboratories,
Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho Yokosuka City 238-8580, Japan

(Received January 11, 2008)

Reactive oxygen species (ROS) are associated with oxidative stress-mediated alterations under pathophysiological conditions, and particularly brain ischemia, brain tumor, and neurodegenerative diseases. Electron spin resonance (ESR) is recognized as one of the most powerful techniques available for the detection of ROS in tissues and cells. We previously developed an *in vitro* ESR-based technique for the detection of free radical reactions in biological systems. In addition, significant advances in the field of *in vivo* ESR techniques over recent years have now made it possible to visualize the distribution and metabolism of oxidative stress, and the degree of tissue oxygenation *in vivo*. Nitroxyl radicals are very useful as exogenous spin probes for measuring free radical distribution, oxygen concentration, and redox metabolism by *in vivo* ESR in biological systems, using a combination of these ESR methods collectively focused on animal models of disease such as spontaneously hypertensive rat (SHR) or stroke-prone SHR (SHRSP) for the assessment of antioxidant property of drugs. Our results suggest that ESR could be applied to the assessment of antioxidant property on oxidative stress in target organs, especially brain, using animal disease models, SHR or SHRSP. After screening drugs for antioxidant property using such as *in vitro* or *in vivo* ESR assessment, we'll be able to develop and find novel antioxidant drugs for ROS-induced brain disease in the near future.

Key words—electron spin resonance; reactive oxygen species; oxidative stress; antioxidant property

1. はじめに

フリーラジカル, 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS), 活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species; RNS) による酸化ストレス (Oxidative Stress) は様々な疾患あるいは病的な加齢の原因として知られている。¹⁾ 特に, 糖尿病, 動脈硬化, 高血圧症などの生活習慣病だけではなく, 脳梗塞, 認知症, 神経変性疾患などの脳疾患との関連性が注目されている。²⁻⁴⁾ したがって, これら疾患の予防あるいは発症を防ぐためにフリーラジカル, ROS, 及び RNS の酸化ストレスを減弱させる抗酸化治療への期待は大きい。しかしながら, 抗酸化治療の現状において

かならずしも現在抗酸化薬剤の開発が期待通りの成果が得られているとはいえない。それは酸化ストレスを惹き起こすフリーラジカル, ROS, 及び RNS の測定方法が抗酸化薬剤, 抗酸化物質の抗酸化能を評価, さらにスクリーニングするには様々な問題を含むからである。実際, 測定対象である大半のフリーラジカル, ROS, 及び RNS の寿命が短く, *in vivo* 測定, 特にヒトにおける測定は困難である。これまで行われてきた研究から, これらのフリーラジカル, ROS, 及び RNS の測定における方法論としては大きく2つに大別される。1) フリーラジカル, ROS, 及び RNS 種をトラップし, トラップした分子を測定する方法と 2) フリーラジカル, ROS, 及び RNS 種によって酸化損傷を受けたレベルを測定する方法である。⁵⁾ この稿では 1) の方法論として知られている電子スピン共鳴 (ESR) 法の生物学的応用としてのこれらのフリーラジカル,

神奈川歯科大学学生体管理医学講座薬理学分野・ESR 研究室 (〒238-8580 横須賀市稲岡町 82 番地)
e-mail: ieeman@kdcnet.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム S40 で発表したものを中心に記述したものである。

ROS, 及び RNS 種の測定の中で特に ROS 測定法を基にした薬剤の *in vitro*, *in vivo* 抗酸化能評価の実際例と医薬品の開発・応用への可能性について述べる。

2. 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS)

ヒトは呼吸をすることで「酸素」を取り入れ、効率よくミトコンドリアでエネルギーを獲得する。この過程で数パーセントの割合で産生するのがいわゆる ROS と呼ばれるもので、一般に ROS は不安定で寿命が短く、反応性に富む酸素分子種である。ROS は最外殻軌道にペア (対) にならない電子 (不対電子) を有しているスーパーオキシド (O_2^-) やヒドロキシルラジカル (HO^\bullet) のようにフリーラジカルの性質を有するものと過酸化水素 (H_2O_2) や一重項酸素 (1O_2) のように不対電子を有さないフリーラジカルに含まれないものがある (Fig. 1)。また「酸素」もそれ自身フリーラジカルであり、不対電子を 2 つ有している。これら ROS の最外郭軌道の電子配置と ROS 生成系の全体のスキームを示した (Fig. 1)。主要な ROS の特徴を簡単にまとめると次のようになる。

2-1. スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-)

O_2^- は一般にスーパーオキシドと呼ばれ、酸素が 1 電子還元されて片側に不対電子を有する (フリーラジカル) ROS である (Fig. 1)。寿命は $1\ \mu M$ O_2^- で 5s (pH 7.0) で⁶⁾、生体に対する酸化力はそれほど強くない。スーパーオキシドは、ミトコンドリア、白血球 (NADPH oxidase), xanthine-oxidase などから生成される (Fig. 1)。

2-2. 過酸化水素 (H_2O_2) O_2^- がさらに 1 電子還元されて生成する H_2O_2 はフリーラジカルの性質を有さないが (Fig. 1)、分子生物学領域で酸化ストレスとして実験的にも頻用されている ROS である。他の ROS と異なり、生体内においても安定で後述する抗酸化酵素のカタラーゼ (catalase; CAT) あるいはペルオキシダーゼによる反応以外は消滅しない。⁷⁾ 酸化力は弱い、生体内金属 (鉄、銅イオン) と反応して反応性に富む HO^\bullet を生成する。

2-3. ヒドロキシルラジカル (HO^\bullet) HO^\bullet は H_2O_2 が 1 電子還元されて片側に不対電子を有するので、フリーラジカルの性質をもつ ROS である (Fig. 1)。寿命が短い ($1\ \mu M$ HO^\bullet で約 $200\ \mu s$)

が、⁶⁾ 酸化力は強く、酵素タンパク質や細胞骨格タンパク質、脂質、糖質、核酸 (DNA, RNA) などと非特異的に反応する。また、 HO^\bullet は生体内で消去する抗酸化酵素が存在しないことから、様々な ROS 由来の疾患に最も関連深いとされている。¹⁾

2-4. 一重項酸素 (1O_2) 酸素が光などのエネルギーを吸収し、励起状態になり、不対電子がスピンの向きを変えて生成され (Fig. 1)、 Σ 型と Δ 型が存在する。 Σ 型は非常に不安定で寿命が短い (~ 10 ps) ので問題となるのは Δ 型である。⁶⁾ Δ 型は自発的に消去する場合は水溶液中で 1O_2 で $2\ \mu s$ の寿命であるが、非極性の溶媒中では寿命が長くなり生体膜などの疎水環境下でも同様である。⁶⁾ Δ 型は片側の電子が片側の軌道に入り込み、片側が空の軌道になっていることから HO^\bullet と同様に反応性は強く、ヒスチジンなどのアミノ酸、リン脂質、多糖類、核酸などとよく反応する。⁸⁾ また、マスコミなどで話題になっている紫外線によって皮膚下組織に発生し易い ROS である。⁸⁾

これら ROS の生体に対する作用の中で最も問題になるのが生体を構成する細胞の細胞膜を構成する脂質を酸化してしまう作用で、この反応は連鎖的に続く (脂質過酸化反応)。ROS は主として脂質過酸化反応によって細胞膜を変性させて細胞に障害を与えることで様々な病態を惹き起こすのである。¹⁾

3. 酸化ストレスと抗酸化能

ROS による脂質過酸化作用を含めた生体の酸化作用に対して、生体は ROS を消去する機能を有するスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD)、カタラーゼ (catalase; CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase; GPX) などの抗酸化酵素や抗酸化物質により ROS による細胞の酸化を防御するシステム (抗酸化システム) を持っている (Fig. 1 and 2)。抗酸化酵素について簡単にまとめると次のようになる。



李 昌一

'63 神奈川県生まれ。'98 年 Johns Hopkins 大学医学部に留学。'00 年同客員助教授。現在 神奈川歯科大学歯学部生体管理医学講座薬理学分野教授 電子スピン共鳴 (ESR) 法による薬剤・食品の抗酸化能評価と新規抗酸化薬剤・食品の開発とともに ESR 法による疾患予防診断システムの開発に現在取り組んでいる。

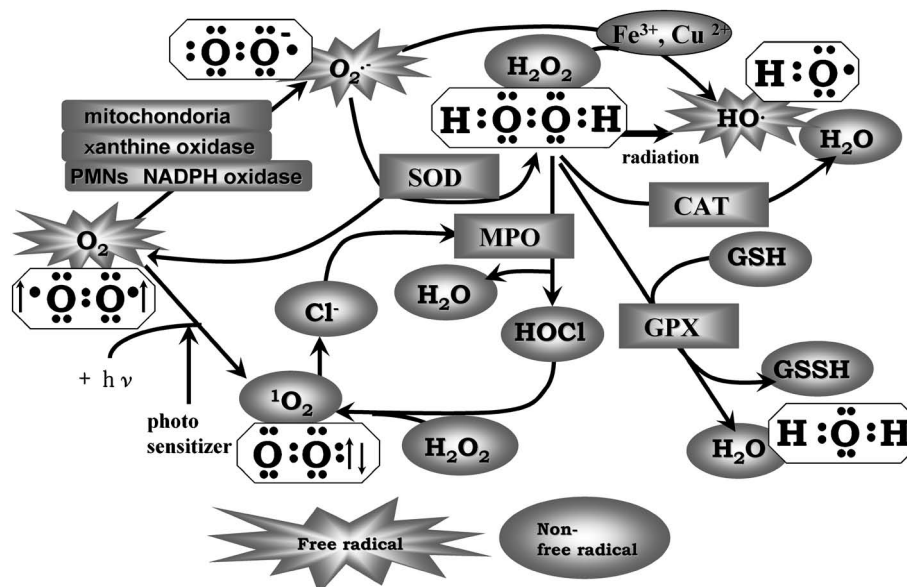
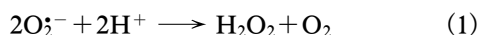


Fig. 1. Reactive Oxygen Species (ROS: electrn dot structure) & Antioxidant Enzyme

O_2^- : superoxide, 1O_2 : singlet oxygen, H_2O_2 : hydrogen peroxide, $HO\cdot$: hydroxyl radical, $HOCl$: hypochlorous acid, MPO: myeloperoxidase, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPX: glutathione peroxidase, GSH: glutathione PMNs: polymorphonuclear leukocytes.

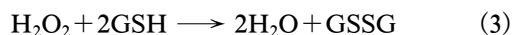
3-1. SOD 代表的な O_2^- のスカベンジャーで、 O_2^- を不均化させて H_2O_2 と O_2 に変換する酵素であり [Eq. (1)], この酵素が見い出されたことによりフリーラジカル生物医学研究が始まったといわれる。⁹⁾ 細胞質やミトコンドリア内に存在していて、銅 (Cu) や亜鉛 (Zn) やマンガン (Mn) を含む金属酵素である。



3-2. CAT 代表的な H_2O_2 のスカベンジャーで、 H_2O_2 を不均化させて O_2 と H_2O に変換する酵素で [Eq. (2)], ヘムタンパクである。CAT 活性は酵素の中で高いといわれているが、実際に H_2O_2 を除去する作用はグルタチオン (GSH) が生体に最も多いチオールであることから、GSH 濃度に依存する次に述べる GPx に比べ弱いともいわれている。^{7,10)}



3-3. GPx 生体内抗酸化物質として重要である GSH の存在下で、 H_2O_2 を H_2O と酸化型グルタチオン (GSSG) に変換する酵素である [Eq. (3)]. GPx はセレン (Se) を活性中心とする金属酵素である。



これら抗酸化酵素に加え、抗酸化物質も抗酸化システムにおいて重要である。例えば、重要な抗酸化

物質であり、ビタミンであるビタミン C, E は ROS を直接除去する能力を有する。特に、ビタミン E は ROS による連鎖的な脂質過酸化反応を止める重要な抗酸化物質である。一般に若年者や健康である場合は ROS 産生と抗酸化システムのバランスは問題にならないが、例えば ROS による酸化ストレスが原因の 1 つとされている疾患 (生活習慣病, 病的な加齢) においては抗酸化システムの能力が衰えてバランスが崩れ、ROS による酸化作用が強くなる。「酸化ストレス」の本来の定義としてはこの両者のバランスの崩れた状態をいう (Fig. 2)。¹¹⁾ この酸化ストレスが様々な病態あるいは生理学的現象に関与している。SOD, CAT, GPx などの抗酸化酵素、ビタミン C, E もみなこれまで述べてきたように ROS を直接除去する能力を有している。したがって、抗酸化能の本質は酸化ストレスを惹き起こす「ROS を除去、無毒化する能力」であるといえる。

4. *In vitro* ESR 法による活性酸素種の検出

ESR 法は不対電子 (電子スピン) を特異的に検出する方法であることから、直接的に不対電子を有する原子、分子であるフリーラジカルを検出可能な唯一の方法である。^{5,12)} これまで述べた様々な疾患に係わる酸化ストレスの原因である ROS はフリーラジカルの性質を有するものもあり、これら ROS を特異的に検出可能であることから ESR 法の生物

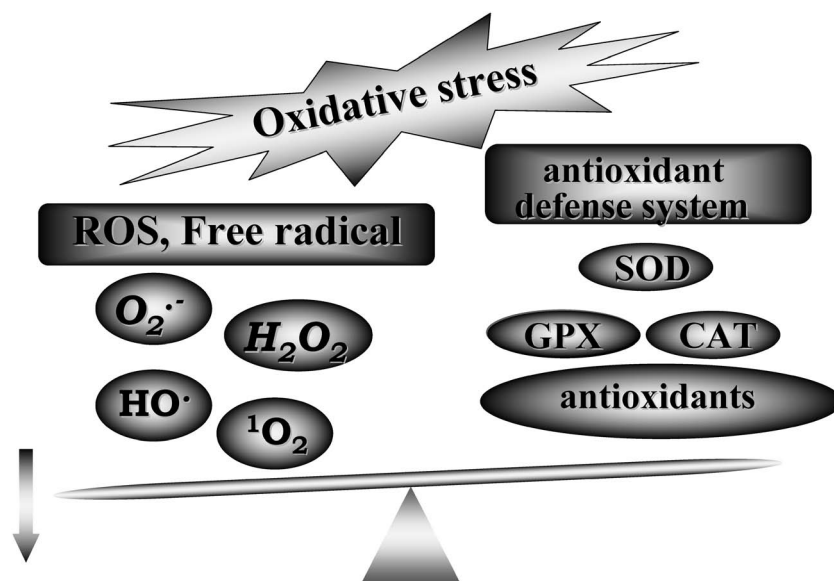


Fig. 2. Oxidative Stress; the Disruption of the Balance between ROS & Antioxidant Defense System

医学的応用をこれまで進めてきた。¹³⁻²¹⁾ ESR 法による酸化ストレス評価における特徴としては酸化ストレスを惹き起こす ROS の直接的な定性、定量、そして実際に生体系（小動物）で ROS が産生している証拠である酸化ストレスを含めた redox 反応を情報として与えることの可能な方法である点に集約される。¹³⁻²¹⁾

In vitro ESR 法による ROS の検出はマイクロ波が X-band（周波数；9.5 GHz 付近）領域である ESR 装置を用いる。実際には生体内フリーラジカルである $O_2^{\cdot-}$ 、 HO^{\cdot} などの ROS は極めて不安定であることから、ESR 法により検出することは特殊な技術を必要とする。その技術はスピントラップ法と呼ばれるもので、不安定な ROS をトラップするスピントラップ剤を用いて、これら安定なラジカル種に変換してから ESR 法により測定する方法である。現在主に使用されているスピントラップ剤は 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO), α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitron (PBN) である。特にこれまでこの方法で多用されてきた DMPO は $O_2^{\cdot-}$ 、 HO^{\cdot} などの ROS が検出可能で、 $O_2^{\cdot-}$ 、 HO^{\cdot} をトラップして常温で ESR 法により DMPO-OOH spin adduct と DMPO-OH spin adduct を測定する (Fig. 3)。このスピントラップ法は 1970 年代に Janzen らにより始められ、²²⁾ ESR 法により実質的な生体における ROS の検出が至便になったことにより ESR 法による生物医学アプリケーションは拡大した。実

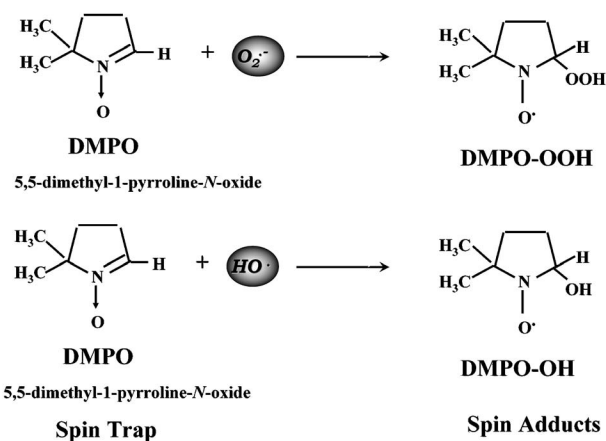


Fig. 3. Spin Trapping & Spin Adduct of ROS with DMPO

際の測定でこれら ROS をトラップして生成される $O_2^{\cdot-}$ 産生を示す DMPO-OOH spin adduct と HO^{\cdot} 産生を示す DMPO-OH spin adduct を示す (Fig. 4)。しかしながら、この検出において $O_2^{\cdot-}$ 産生を示す DMPO-OOH spin adduct と HO^{\cdot} 産生を示す DMPO-OH spin adduct の弁別が問題点であった。これら spin adduct のスペクトルによる ROS の弁別を容易にする 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO) の開発がなされ、²³⁾ われわれも実際の xanthine oxidase, あるいは多形核白血球からのこれらラジカル種の同定に応用しており、^{13,14)} 実際の ROS 弁別の問題についても解説した。¹⁵⁾ さらに、日本で開発された 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyr-

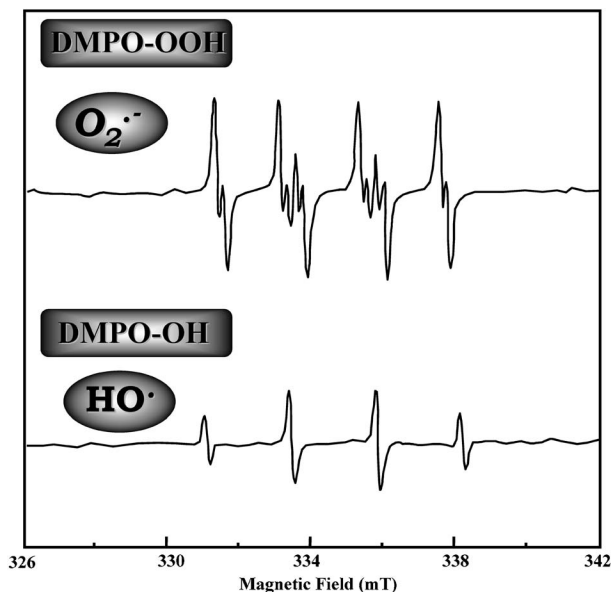


Fig. 4. Typical DMPO-OOH Spin-adduct ESR from $O_2^{\cdot-}$ Generating System by Xanthine/Xanthine Oxidase System. Typical DMPO-OH Spin-adduct ESR from HO^{\cdot} Generating System by Fenton Reaction

roline *N*-oxide (CYPMPO)²⁴⁾はこのDEPMPOの利点を生かし試薬の操作性も優れていることから、現在、CYPMPOを用いた生物学的アプリケーションを進めているところである。また、これまで行ってきたESR法によるROSの検出と生物医学的アプリケーションについては $O_2^{\cdot-}$ 、 HO^{\cdot} に加え、 H_2O_2 、 1O_2 の検出方法についても既に報告している。^{16,17)} H_2O_2 の場合はhorseradish peroxidase存在下でdesferrioxamine radicalを測定する方法である。¹⁶⁾ また、 1O_2 の検出方法はトラップ剤として2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMP)を用いて2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO)ラジカルの生成から 1O_2 の産生を確認する方法である。¹⁷⁾

X-band ESR spin trap法の酸化ストレス評価における最大の利点は酸化ストレスを引き起こすROSをトラップしたESRスペクトルから直接的に定性・定量が可能な点である。しかしながら、これまでのX-band ESR spin trap法における検出感度はいまだ細胞レベルでは十分とはいえない。この点を今後改良・改善するための開発を現在PCによる高速積算処理を可能とした流通型ESR装置の開発とその生物学的応用に現在取り組んでいる。また、新しいスピントラップ剤として5-(ethoxycarbonyl)-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (EMPO)、²⁵⁾ 5-*tert*-buto-

xy carbonyl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (BMPO)²⁶⁾の開発がなされ、生物学的応用が進められているが現状では先のスピントラップ剤に代わるものとして認知されるまでには至っていない。現在先に述べた新規スピントラップ剤であるCYPMPOによる細胞レベルを含めたROS検出における資質を検討しているところである。

5. *In vitro* ESR法による薬剤の抗酸化能評価の実際

In vitro ESR法による抗酸化能評価については先に述べた*in vitro* ESR法によるROSの検出方法が基本となる。抗酸化能とは酸化ストレスを惹き起こすROSを消去する作用であると既に述べた。これまでは間接的にROSによる酸化ストレスと脂質、核酸(DNA)、タンパク質との結果起こるバイオマーカーに対する効果をみる研究が中心である。例えば、酸化ストレスによる脂質のバイオマーカーとしては F_2 -isoprostanes,²⁷⁾ DNAでは8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG),²⁸⁾ そしてタンパク質ではcarbonyls²⁹⁾などを指標とする抗酸化能評価が行われてきた。これらの方法と*in vitro* ESR法による抗酸化能評価が異なる点は先に述べたように直接的に酸化ストレスを惹き起こすROSに対する効果を直接的に定性・定量的に検討することが可能である点にある。実際の測定例について述べよう。

静脈麻酔薬で現在頻用されている麻酔薬であるpropofol-Medium Chain Triglyceride (MCT)/Long Chain Triglyceride (LCT) (1% propofol “Maruishi”)には抗酸化作用がみられることが報告されてきたが、^{30,31)}直接的なROSに対する効果については検討されていなかった。今回propofol-MCT/LCTにおける抗酸化能、特に $O_2^{\cdot-}$ と HO^{\cdot} に対する効果の検討を行った結果、濃度依存的な HO^{\cdot} に対する消去効果が確認されたが(Fig. 5)、 $O_2^{\cdot-}$ ではそのような消去活性はみられなかった(Fig. 6)。³²⁾この場合は HO^{\cdot} 産生系としてはFenton反応(Fe^{2+} と H_2O_2 により HO^{\cdot} を生成する反応)、 $O_2^{\cdot-}$ ではxanthine/xanthine-oxidase系を利用した。このようにROS産生系の選択は*in vitro* ESR法による抗酸化能評価をする際に重要である。また、ROS産生系を変えることでROSの種特異性に対する効果をみることで他の抗酸化能評価法では難しいROSに対する定性的な評価が可能になる。また、vehicleの

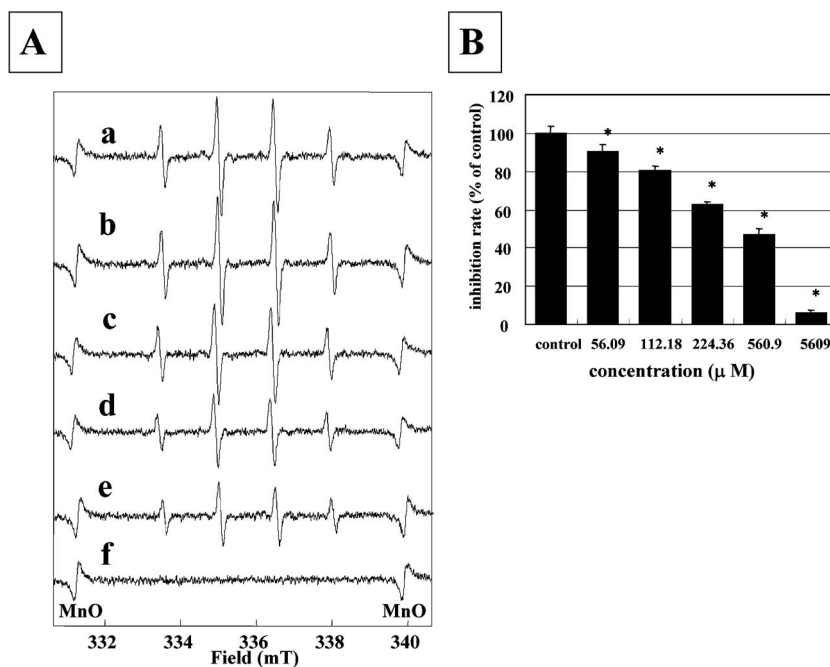


Fig. 5.³²⁾ Effects of Propofol MCT/LCT (1% propofol “Maruishi”) upon HO• Generation

A: ESR spin trapping measurement of HO• generation from H₂O₂ (20 μM) and FeSO₄ (20 μM) in 0.1 M PBS (pH 7.2) as spin trap DMPO (50 mM) (a) in the absence of propofol MCT/LCT [control] control (b, c, d, e) with propofol MCT/LCT pre-treatment at 56.09 μM, 112.18 μM, 224.36 μM, and 560.9 μM respectively. (f) original liquid; 5609 μM. Signals appearing at either side of the ESR spectra correspond to Mn²⁺ (MnO) installed in the cavity as a reference. B: we report the dose-response of propofol MCT/LCT (56.09–5609 μM) upon HO• generation from Fenton reagents. The signal intensity of the second peak of the spectrum was normalized as the relative height against the standard’s signal intensity of the MnO marker. Data are presented as mean ± S.D. of triplicate experiments. Values annotated with * were significantly different (*p* < 0.05) from the corresponding control value.

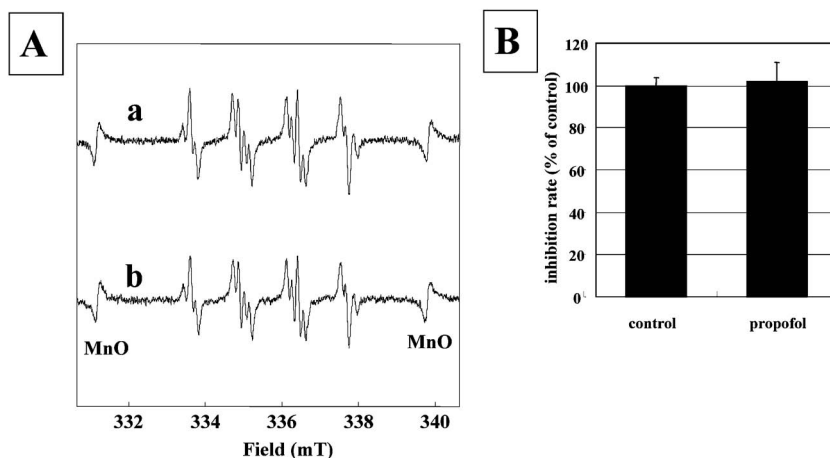


Fig. 6.³²⁾ Effects of Propofol MCT/LCT on O₂^{•-} Generation

A: ESR spin trapping measurement of O₂^{•-} generation from xanthine oxidase (XO: 0.1 unit/ml) and xanthine (362 μM) in 0.1 M PBS (pH 7.2) as spin trap DMPO (440 mM) (a) in the absence of propofol MCT/LCT [control] (b) with propofol MCT/LCT pre-treatment (original liquid; 5609 μM). Signals appearing at either side of the ESR spectra correspond to Mn²⁺ (MnO) installed in the cavity as a reference. B: we report the effects of propofol MCT/LCT (original liquid; 5609 μM) upon O₂^{•-} generation from XO and xanthine. The signal intensity of the second peak of the spectrum was normalized as the relative height against the standard’s signal intensity of the MnO marker. Data are presented as mean ± S.D. of triplicate experiments.

異なる propofol 製剤である propofol-MCT (Depri- van) の HO• に対する抗酸化能評価においては propofol-MCT/LCT の方が propofol-MCT に比較して高い HO• 消去活性が確認された (Fig. 7).³²⁾ 現在

このメカニズム解明の検討を行っているところで、それぞれの propofol 製剤の vehicle (MCT/LCT と MCT) の抗酸化活性に対する相違が関与しているのではないかと考えている。³²⁾

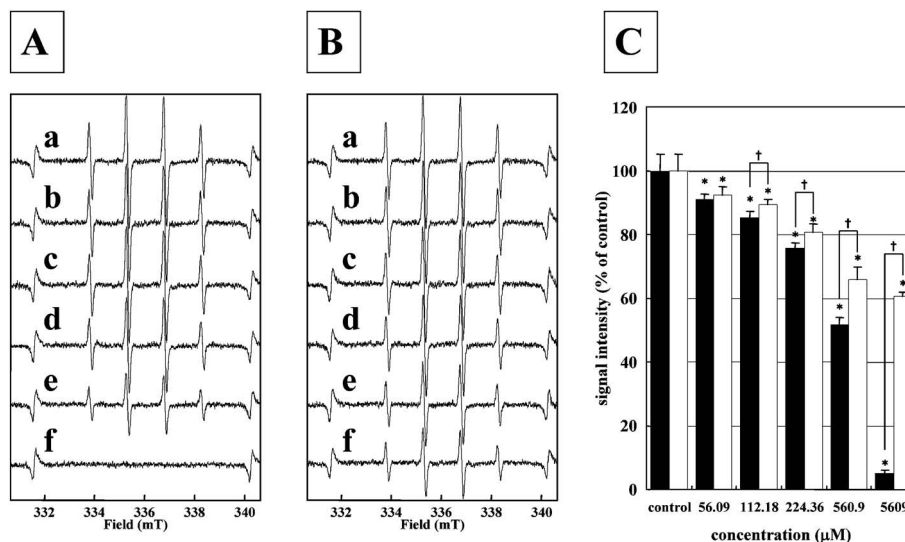


Fig. 7.³² Effects of Propofol MCT/LCT or Propofol LCT (Diprivan) upon HO[•] Generation from Fenton's Reaction

A: ESR spin trapping measurement of HO[•] generation from H₂O₂ (20 μM) and FeSO₄ (20 μM) in 0.1 M PBS (pH 7.2) as spin trap DMPO (50 mM): (a) in the absence of propofol MCT/LCT [control], (b, c, d, e) with propofol MCT/LCT pre-treatment at 56.09 μM, 112.18 μM, 224.36 μM, and 560.9 μM respectively, (f) original liquid: 5609 μM. B: ESR spin trapping measurement of HO[•] generation from H₂O₂ (20 μM) and FeSO₄ (20 μM) in 0.1 M PBS (pH 7.2) as spin trap DMPO (50 mM) (a) in the absence of propofol LCT [control] (b-f) with equivalent propofol LCT pre-treatment at 56.09 μM, 112.18 μM, 224.36 μM, 560.9 μM, and original liquid: 5609 μM of propofol MCT/LCT respectively. Signals appearing at either side of the ESR spectra correspond to Mn²⁺ (MnO) installed in the cavity as a reference. C: we present the dose-response (56.09–5609 μM) of propofol MCT/LCT or propofol LCT upon HO[•] generation from Fenton's reaction. The signal intensity of the second peak of the spectrum was normalized as the relative height against the standard's signal intensity of the MnO marker. Data are presented as mean ± S.D. of quadruplicate experiments. Values annotated with * were significantly different (*p* < 0.05) from the corresponding control value. Values also annotated with † are significantly different (*p* < 0.05) from the corresponding value of propofol LCT.

以上の実例から分かるように *in vitro* ESR 法による抗酸化能評価は他の方法とは以下の点で異なる。いかなる ROS に対して消去活性があるのか (定性)、どれくらい消去活性を有しているのか (定量) という直接的な ROS に対する抗酸化能評価をすることが可能であるということ、特に propofol-MCT/LCT と propofol-MCT の例で示した通り、抗酸化能において薬物間の比較をすることが可能であるということである。しかしながら、X-band ESR spin trap 法による抗酸化能評価において問題点として挙げられているのは、例えば今回用いた HO[•] 産生系に H₂O₂ と Fe²⁺ が関与する Fenton 反応を利用していることから、H₂O₂ への直接的な作用と鉄キレート作用を有する薬物では異なる産生系を用いてさらに検討する必要がある。したがって、ROS 産生系の特徴とそれぞれの抗酸化能評価における組み合わせが重要となるので注意を要する。また、ESR 法の測定者の技術的習熟度などの問題から施設間における ESR 測定、定量において誤差をみられることであるので注意する。この定性・定量評価の比較・検討を可能にするためにはこの誤差を少なくするために、先に述べた抗酸化能評

価に適した ROS 産生系の選択から測定者の ESR 測定技術の習熟度を含め、ROS 消去能を中心とする抗酸化能の基準設定が早急に望まれる。現在われわれは薬剤だけではなく、飲食料品を含め様々な *in vitro* ESR 法による抗酸化能評価に取り組んでいる。³³⁾

6. *In vivo* ESR 法による酸化ストレス評価への応用

In vitro ESR 法による抗酸化能評価について述べてきたが、ESR 法は生体系 (小動物) で ROS が産生している証拠である酸化ストレスを含めた redox 反応を含めた情報を与えることの可能な方法であると述べた。現在われわれが進め開発してきた *in vivo* ESR 法による酸化ストレス評価について述べる。¹⁸⁻²¹⁾

In vivo ESR 測定のさきがけとなった研究は 1976 年に Feldman³⁴⁾ らの、helix coil をラット体内に挿入して安定ラジカル (ニトロキシルラジカル) を測定した研究である。また、従来 *in vitro* ESR アプリケーションで用いられていた周波数帯である X-band 帯では試料の水分による誘電損失が高いこととマイクロ波による加熱が生体測定に適さない。³⁵⁾

この欠点を克服するために測定マイクロ波の低周波数化を実現し 1.1–1.3 GHz までの L-band 帯を利用した ESR 法と新しいレゾネーターが開発された.³⁶⁾ これ以降小動物の生体 ESR アプリケーションが可能になり、生体 L-band ESR 法によるニトロキシルラジカルの代謝を含んだ redox 状態の解析を酸化ストレスとして小動物で測定する試みが本邦を中心になされてきた.^{37–39)} さらに、生体におけるフリーラジカルの空間情報を得るために既に画像診断法として確立していた NMR 法と同じ原理を用いて磁場勾配を与える ESR 画像法が生体のフリーラジカル画像化を目的とする医科学の分野として発展してきた.⁴⁰⁾ 特に近年、さらに有益な生体におけるフリーラジカルの空間情報を獲得するため画像の解像度及び質の向上だけではなく、癌などの病態情報に有用となる酸素濃度測定に *in vivo* ESR 法及び ESR 画像法の応用 (ESR oximetry) が報告されている.^{41,42)} われわれもここ数年に渡り生体 ESR 画像法においてコンピューター断層撮影法 (CT) を併用した生体 ESR-CT 画像法を標的臓器として脳を中心とした領域で試み、脳-血液関門を通過可能なニトロキシルラジカルスピンプローブである 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl (MC-PROX-

YL) を用いることで、小動物頭部領域の脳内ニトロキシルラジカルの分布領域の画像化を可能にすることに成功した.^{18–21)}

従来 ESR 法で応用されてきたニトロキシルラジカルであるスピン部を化学物質に加えてラベル試料とするスピンプローブ法と単に系にプローブとして加えるスピンプローブ法が生体系に限らず応用されてきた。特に、先に述べた通り本邦を中心にニトロキシルラジカルをスピンプローブとしてラットなどの小動物の生体系に用いられる *in vivo* L-band ESR 法を用いた研究が報告されてきた.^{36–39)} このニトロキシルスピンプローブ法の基本はニトロキシルスピンプローブの減衰速度を測定することである。この減衰速度は測定部位の臓器 (MC-PROXYL では脳) の redox 状態に影響を受ける。その影響は還元物質であるアスコルビン酸や cytochrome-c などの薬物代謝酵素により変化し、酸化ストレスにより亢進することが知られている。^{36–39)} 実際の MC-PROXYL を投与したマウス脳内のニトロキシルラジカルの減衰を Fig. 8 に示す。さらにこの方法を用いて、生活習慣病モデルとして酸化ストレスが亢進していることが知られている高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats; SHR) 及び脳卒中易発

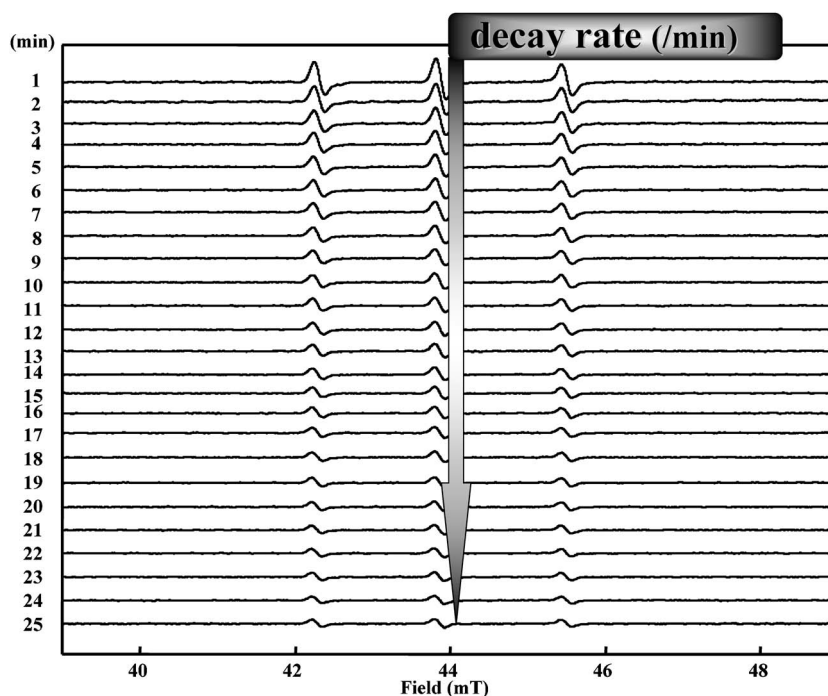


Fig. 8. Typical L-band ESR Signal Decay in the Head Region of Live Mice (ICR mice) after *i.v.* Injection of MC-PROXYL (140 mM, 10 ml/kg; 1–25 min)

症性高血圧自然発症ラット (stroke-prone spontaneously hypertensive rats; SHRSP) の脳内酸化ストレスが亢進していることを MC-PROXYL の減衰速度の解析により, 生体 L-band ESR 法と ESR 画像法を用いて初めて評価した.¹⁸⁻²¹⁾ この測定におけるそれぞれの病態モデルは測定上の制約からそれぞれの病態 (高血圧, 脳卒中) が発症する前の年齢における摘出脳で測定されたものであることから, 病態発症前の脳内酸化ストレスを測定・画像化したものである. したがって, 将来的に ESR 画像法がヒトに応用されれば, 酸化ストレス由来疾患の予防診断装置としての可能性に向け現在検討を重ねている.¹⁸⁻²¹⁾ さらに, 現在, ラット脳内の MC-PROXYL の減衰速度を画像とスペクトル強度の両面から経時的に脳内の酸化ストレスを含めた redox 状態をモニタリングし, 解析する技術を現在開発している.⁴³⁾

7. *In vivo* ESR 法による抗酸化能評価の実際

In vitro ESR 法による抗酸化能評価については先に述べた *in vivo* ESR 法による酸化ストレス評価が基本となる. 既に述べた通り SHR 及び SHRSP の脳内における酸化ストレスが亢進していることから, 評価しようとする薬剤をこれら疾患動物モデルに投与した場合の効果について評価することになる. すなわち, 投与した薬剤が亢進した酸化ストレスによる減衰速度を正常状態に回復させることが可能かどうかを評価しようとするものである. 先ほど *in vitro* ESR 法による抗酸化能評価の例として挙げ

た静脈麻酔薬である propofol-MCT/LCT で SHRSP を麻酔した場合と通常の実験動物で 사용되는静脈麻酔薬である pentobarbital で麻酔した場合の SHRSP の脳内酸化ストレス評価を *in vivo* ESR 法において MC-PROXYL を用いて行った (Fig. 9). Pentobarbital で麻酔した場合はこれまで報告した通り, SHRSP の脳内 MC-PROXYL の減衰速度は亢進し, 酸化ストレスが亢進していることが確認されたが [Fig. 9(A)], propofol-MCT/LCT で麻酔した場合は SHRSP 脳内 MC-PROXYL の減衰速度が低下し, コントロールラットである Wister Kyoto Rat (WKY) 脳内の MC-PROXYL 減衰速度と比較して有意な差がみられなかった [Fig. 9(B)].³²⁾ 以上の結果から, propofol-MCT/LCT が SHRSP 脳内酸化ストレスの亢進を抑える抗酸化作用が確認された. *In vitro* ESR 法による抗酸化能評価における結果 (Figs. 4 and 5) を踏まえて, propofol-MCT/LCT は ROS である HO[•] 産生を抑制し結果的に脳内酸化ストレスを低下させる優れた抗酸化能を有する薬剤であることが示唆された.³²⁾ この結果は生体の, 特に脳を標的臓器とした酸化ストレス評価を生活習慣病モデルを用いて検討したことから, propofol-MCT/LCT が脳内酸化ストレスにより起こる高血圧症, あるいは脳外傷・脳梗塞などの脳外科領域の麻酔薬として原疾患の進行を予防する可能性が示唆された. したがって, 今後 propofol-MCT/LCT の抗酸化能を生かした臨床応用がさらに期待される.

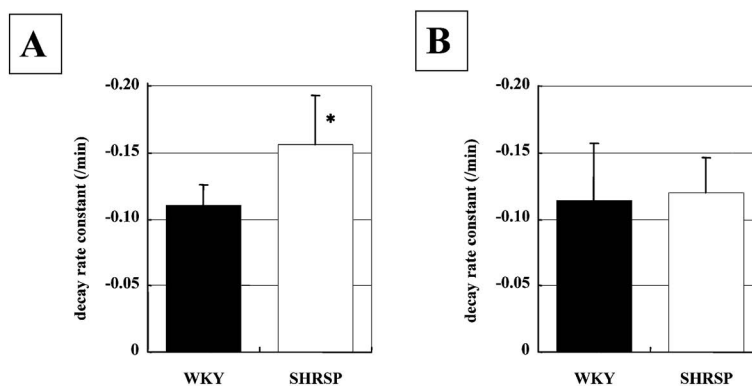


Fig. 9.³²⁾ Effects of Propofol MCT/LCT upon SHRSP-induced Oxidative Stress in the Brain

Rats were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg, *i.v.*) (A) and propofol MCT/LCT (20 mg/kg, *i.v.*) (B). L-band ESR was used to determine the signal decay rate of MC-PROXYL in the head region of live WKYs and SHRSPs following the *i.v.* injection of MC-PROXYL. Rats were treated with MC-PROXYL (140 mg/kg, 10 ml/kg) *via* the tail vein and ESR spectra were measured within the head region of live rats. Data are presented as mean \pm S.D. of WKYs ($n=5$) or SHRSPs ($n=5$) with pentobarbital and with propofol MCT/LCT. Values annotated with *represent significance $p<0.05$ from the corresponding control value of the WKYs.

8. おわりに

ESR 法による薬剤の抗酸化能評価について抗酸化能の本質的な意義である直接的な ROS 消去能と生体内酸化ストレス評価を *in vitro* ESR 法による抗酸化評価方法と *in vivo* ESR 法による脳内抗酸化能評価の実際について述べた。これまでの抗酸化能評価がこれらの情報について検討されることがまだ現状でありされていないことから、真の抗酸化能評価には ESR 法による技術が今後重要になると考えている。さらに、これに加えて、飲食物品の *in vitro* あるいは *in vivo* ESR 法による抗酸化能評価も現在進めている。³³⁾ これらの ESR 技術による評価法を用いた薬物や飲食物品の抗酸化能評価におけるスクリーニングテストを行うことで、近い将来に ROS 由来生活習慣病や脳梗塞、神経変性疾患などの脳疾患に対して優れた抗酸化能を有する創薬や飲食物品の開発に寄与する評価技術になると期待している。

REFERENCES

- Halliwell B., Gutteridge J. M., "Free Radicals in Biology and Medicine," Oxford University Press, Oxford, (1999).
- Chan P. H., *Stroke*, **27**(6), 1124–1129 (1996).
- Halliwell B., *Drugs Aging*, **18**(9), 685–716 (2001).
- Butterfield D. A., *Free Radic. Res.*, **36**(12), 1307–1313 (2002).
- Halliwell B., Whiteman M., *Br. J. Pharmacol.*, **142**(2), 231–255 (2004).
- Kobayashi K., "Tanpakusitu Kakusan Kouso Rinji Zoukangou" No. 16 Kyoritsu, Tokyo, 1988, pp. 2678–2683.
- Yamazaki I., "Tanpakusitu Kakusan Kouso Rinji Zoukangou" No. 16 Kyoritsu, Tokyo, 1988, pp. 2934–2939.
- Davies M. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**(3), 761–770 (2003).
- McCord J. M., Fridovich I., *J. Biol. Chem.*, **244**(22), 6049–6055 (1969).
- Niki E., "Tanpakusitu Kakusan Kouso Rinji Zoukangou" No. 16 Kyoritsu, Tokyo, 1988, pp. 2973–2978.
- Sies H., *Exp. Physiol.*, **82**, 291–295 (1997).
- Villamena F. A., Zweier J. L., *Antioxid. Redox Signal.*, **6**(3), 619–629 (2004).
- Lee C. I., Liu X., Zweier J. L., *J. Biol. Chem.*, **275**, 9369–9376 (2000).
- Lee C. I., Miura K., Liu X., Zweier J. L., *J. Biol. Chem.*, **275**, 38965–38972 (2000).
- Lee M. C., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **128**, 293–297 (2006).
- Kiyose M., Lee C. I., Okabe E., *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 137–143 (1999).
- Ishibashi T., Lee C. I., Okabe E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, 350–358 (1996).
- Miyazaki H., Shoji H., Lee M. C., *Redox Rep.* **7**, 260–265 (2002).
- Lee M. C., Shoji H., Miyazaki H., Yoshino F., Miyake S., Ikeda Y., Anzai K., Ozawa T., *Magn. Reson. Med. Sci.*, **2**, 79–84 (2003).
- Lee M. C., Shoji H., Miyazaki H., Yoshino F., Hori N., Toyoda M., Ikeda Y., Anzai K., Ikota N., Ozawa T., *Hypertens. Res.*, **27**, 485–492 (2004).
- Lee M. C., *Neurosci. Imag.*, **1**, 143–156 (2006).
- Janzen E. G., *Methods Enzymol.* **105**, 188–198 (1984).
- Frejaville C., Karoui H., Tuccio B., Le Moigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R., Tordo P., *J. Med. Chem.*, **38**, 258–265 (1995).
- Kamibayashi M., Oowada S., Kameda H., Okada T., Inanami O., Ohta S., Ozawa T., Makino K., Kotake Y., *Free Radic. Res.* **40**(11), 1166–1172 (2006).
- Zhao H., Joseph J., Zhang H., Karoui H., Kalyanaraman B., *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 599–606 (2001).
- Stolze K., Udilova N., Nohl H., *Biol. Chem.*, **383**, 813–820 (2002).
- Morrow J. D., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**(2), 279–286 (2005).
- Collins A. R., Horvathova E., *Biochem. Soc. Trans.*, **29** (Pt 2), 337–341 (2001).
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A., *Trends Mol. Med.*, **9**(4), 169–176 (2003).
- Wilson J. X., Gelb A. W. J., *Neurosurg. Anesthesiol.*, **14**, 66–79 (2002).
- Kato R., Foex P., *Can. J. Anaesth.*, **49**, 777–791 (2002).
- Kobayashi K., Yoshino F., Takahashi S., Todoki K., Maehata Y., Komatsu T., Yoshida

- K., Lee M. C., *Anesthesiology*, 2008 (in revised).
- 33) Lee M. C., “*Shokuhin to Kaihatu*,” **42**, 9–12 (2007).
- 34) Feldman A., Wildman E., Bartolinini G., Piette L. H., *Phys. Med. Biol.*, **20**, 602–612 (1975).
- 35) Foster K. R., Schepps J. L., Stoy R. D., Schwan H. P., *Phys. Med. Biol.*, **24**, 1177–1187 (1979).
- 36) Berliner L., Fujii H., Wan X. M., Lukiewicz S. J., *Magn. Reson. Med.*, **4**, 380–384 (1987).
- 37) Utsumi H., Muto E., Masuda S., Hamada A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1342–1348 (1990).
- 38) Han J. Y., Takeshita K., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 516–525 (2001).
- 39) Miura Y., Ozawa T., *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 854–859 (2000).
- 40) “EPR Imaging and *In vivo* EPR” eds. by Eaton G. R., Eaton S. S., Ohno K., CRC press, Boca Raton, FL, 1991.
- 41) Kuppusamy P., Afeworki M., Shankar R. A., Coffin D., Krishna M. C., Hahn S. M., Mitchell J. B., Zweier J. L., *Cancer Res.*, **58**, 1562–1568 (1998).
- 42) Zhu X., Zuo L., Cardounel A. J., Zweier J. L., He G., *Antioxid. Redox Signal*, **9**, 447–455 (2007).
- 43) Lee M. C., “*Igaku no Ayumi Betsusatsu Sanka Sutoresu ver. 2*,” Ishiyaku, Tokyo, 173–175 (2006).