

活性酸素・フリーラジカルを含むレドックス代謝が多くの生理現象や酸化ストレス疾患の成因・進展に密接に関与することが徐々に明らかになりつつある。この生体内レドックスの変動・活性酸素生成消去を実験小動物で無(低)侵襲的に可視化できれば、生命現象の解明・疾病の解析とその治療法の確立・医薬品の開発に大きく貢献する。ヒトや小動物を無(低)侵襲測定するために生体浸透性の高く有害性の低い電磁波を用いた磁気共鳴法(MRI)が広く用いられている。一方、活性酸素の多くやレドックス反応の中間体は不対電子を有するフリーラジカルで磁気モーメントを有することから、その検出には磁気共鳴法(特に、電子スピン共鳴法(ESR))が有効で、ESR 画像を体内臓器像と対応させるためにヒト診断用 MRI と ESR との融合機開発も報告されている。最近では、オーバーハウザー効果を利用してフリーラジカルを MRI で検出する試みもなされている。本講演では、これら磁気共鳴法による生体内レドックス・活性酸素の無侵襲計測・画像化について概説する。

電子スピン共鳴法(ESR)による生体内レドックス・活性酸素の解析

通常のESRでは 9GHz ないしそれ以上の高周波電磁波が用いられているが、高周波電磁波は生体浸透性が低い。そこで生体計測 ESR 分光器では 0.3~1 GHz 程度の低周波の電磁波で、電磁波の生体吸収を抑制するためのループギャップ共振器やリエントランと型共振器が用いられている。この生体計測 ESR 分光器は市販されるようになったが、感度が通常の ESR 分光器の 1/100 程度と低い。常磁性物質であるニトロキシルラジカルは、レドックス反応や活性酸素反応により常磁性を失う性質を有する。我々はニトロキシルラジカルが生体内レドックス代謝に感受性が高いに着目し、生体内での活性酸素・レドックス動態を無侵襲評価する方法として生体計測 ESR・ニトロキシルプローブ法を提唱してきた。この方法はニトロキシルラジカルをスピンプローブとし、その ESR

シグナルの変化から生体内フリーラジカル反応を間接的に評価する解析する方法で、表1に示すように、他の研究室でも広く用いられ、種々の疾患モデルでのレドックス動態が明らかになりつつある。このプローブ剤の細胞膜透過

表1. 生体計測 ESR・ニトロキシルプローブ法の奉納の応用報告例

| 疾患モデル | 著者 | 雑誌名(掲載年) |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 高酸素・低酸素状態 | Miura, Y. <i>et al.</i> | Biochem. Biophys. Res. Commun.(1992) |
| 虚血-再灌流障害 | Utsumi, H. <i>et al.</i> | Free Radic. Res. Commun.(1993) |
| X線照射 | Miura, Y. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(1997) |
| ストレプトゾトシン誘発糖尿病 | Sano, T. <i>et al.</i> | Diabetologia(1998) |
| ガン細胞(RIF-1)移植 | Kuppusamy, P. <i>et al.</i> | Cancer Res.(1998) |
| 鉄過剰症 | Phumala, N. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(1999) |
| カイン酸誘発てんかん発作 | Yokoyama, H. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(1999) |
| ディーゼル粒子惹起肺障害 | Han J.Y. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(2001) |
| 心不全 | Tsutsui H. <i>et al.</i> | Circulation (2001) |
| アスベスト肺 | Leonard, S.S. <i>et al.</i> | Mol. Cell. Biochem.(2002) |
| アンモニア惹起胃潰瘍 | Kasazaki, K. <i>et al.</i> | Free Radic. Res.(2003) |
| 脳虚血-再灌流障害 | Yamato, M. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(2003) |
| ストレプトゾトシン誘発糖尿病 | Matsumoto, S. <i>et al.</i> | Free Radic. Res.(2003) |
| トリクロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎 | Togashi, H. <i>et al.</i> | Gut(2003) |
| 水浸拘束惹起胃潰瘍 | Yasukawa, K. <i>et al.</i> | Free Radic. Res.(2004) |
| グリセロフルビン惹起光過敏症 | Takeshita, K. <i>et al.</i> | J. Invest. Dermatol. (2004) |
| 肥満症(ob/obマウス, Zuckerラット) | Sonta T. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(2004) |
| ストレプトゾトシン誘発糖尿病 | Tsubouchi H. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(2005) |
| ディーゼル粒子惹起肺障害(チオレドキシニ-1による抑制) | Kaimul Ahsan, M. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med.(2005) |
| インドメタシン惹起胃潰瘍 | Utsumi, H. <i>et al.</i> | J. Pharmacol. Ther. Exp. (2006) |
| アジュバンド惹起関節炎 | Yamada, K. <i>et al.</i> | Free Radic. Res. (2006) |
| ジェチルニトロソアミン誘発肝ガン | Yamada, K. <i>et al.</i> | Free Radic. Biol. Med. (2006) |
| 糖尿病性眼疾患 | Yamato M. <i>et al.</i> | Antioxid. Redox Signal. (2007) |
| 移植ガン | Ichikawa K. <i>et al.</i> | Antioxid. Redox Signal. (2007) |
| 心不全 | Tsutsumi T. <i>et al.</i> | Cardiovasc. Res. (2008) |

性やレドックス応答性を調節することが可能である。一例として、膜透過・非透過性ニトロキシルプローブを経口投与後に *in vivo* ESR 測定し、損傷との関係を調べることで、非ステロイド抗炎症剤(NSAIDs)の副作用「胃粘膜傷害」では細胞内で活性酸素が生成し、この活性酸素が障害を齎すことが示されている。

オーバーハウザー効果MRI (OMRI)

オーバーハウザー効果は NMR では NOE として広く知られているが、オーバーハウザーの発見は「電子スピンを励起する電子と相互作用している核スピンの偏極することで NMR シグナルが増加する」現象である(2)。OMRI はフリーラジカルの電子スピンを励起させオーバーハウザー効果による水プロトン信号の増強からフリーラジカルの分布画像を得る方法で、1988 年に Lurie らが開発に成功した(3)。この方法は MRI と同様に空間・時間分解能が非常に高いことが特徴である。

Philips R&D 社は酸素濃度診断装置として 15mT OMRI の開発を試みた。感度の関係でヒト用診断装置として市販されなかったが、小動物用 R&D 機が米国 NIH、ドイツ応用科学大学、九州大学に導入された。我々は導入に際し、図1に示すように ^{14}N 、 ^{15}N ラジカルを交互に ESR 共鳴させ位相エンコードすることで、 ^{14}N 、 ^{15}N で標識したニトロキシルプローブの同時分離画像が可能と考え、新たなシーケンスを提案した(4)。

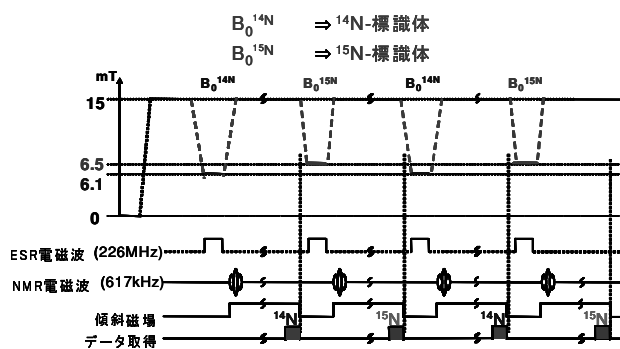


図1 ^{14}N 、 ^{15}N 標識ニトロキシルプローブの同時分離画像シーケンス

この同時分離型 OMRI を用いると、酸化還元反応や膜内外での反応を同時分離画像することが可能である。図 2 のように、アスコルビン酸(AsA)封入りリソソームと混和すると膜透過性プローブの輝度のみが減衰する様子が明瞭に示されている。現在、我々はこの OMRI 装置の高磁場化を図っており、0.1 mm 程度の空間分解能が得られている。

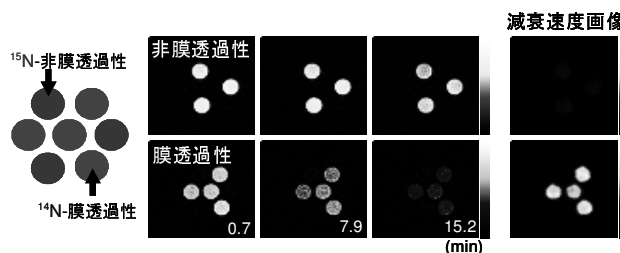


図2. 膜透過・非透過プローブの同時分離画像

このように、生体計測 ESR・OMRI・スピンプローブ法は、生体内のフリーラジカル反応を無侵襲解析し得る非常に有効な手法で、ナノメートルスケールでの可視化も可能であることから、医療、創薬など広範囲な分野で、その重要性が益々高まるものと期待される。

参考文献

- 1) Utsumi H. et al. Arch. Biochem. Biophys. 416 1-8 (2003), 2) Overhauser A.W. Phys. Rev. 92 411-412 (1953), 3) Lurie D.J. et al., J. Magn. Reson. 76 366-370 (1988), 4) Utsumi H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 463-1468 (2006)