

# 電子スピン共鳴(ESR)法を用いた 薬剤の抗酸化能評価

李 昌 一

**要約：**様々な疾患に関わる酸化ストレス (oxidative stress) の原因である活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) を特異的に検出可能であるのが電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) 法である。酸化ストレスとは ROS 産生と抗酸化システム (抗酸化酵素, 抗酸化物質) のバランスが崩れた状態をいい, ROS による酸化作用 (例えば脂質過酸化作用) により生体の様々な病態生理現象に関わる。抗酸化能の本質は生体の抗酸化酵素, 抗酸化物質が有する酸化ストレスを惹き起こす ROS を消去する能力を意味するものである。In vitro ESR 法による抗酸化能評価は in vitro ESR 法による ROS の検出方法が基本となり, 検討する薬剤がいかなる 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。さらに, in vivo ESR 法によって生体における酸化ストレスを含めた redox 情報を提供可能なことを, 酸化ストレスが原因とされる高血圧, 脳卒中が惹き起こされる生活習慣病のモデル動物を用いた脳内の酸化ストレス評価法を確立した。今後これら ESR 法による評価法を用いて薬物や飲食物品の抗酸化能評価を進め, 優れた抗酸化能を有する新規薬物, 飲食物品の開発に寄与する評価技術として発展させたい。

## 1. はじめに

電子スピン共鳴 (ESR) 法は電子スピン (不対電子) を有する物質であるフリーラジカルを特異的に測定する技術として知られている。様々な疾患に関わる酸化ストレス (oxidative stress) の原因である活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: 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 法の生物医学的応用がこれまで進められてきた。従って, ESR 法の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。本研究室ではこれまで ESR 法の生物医学的応用に取り組んできた。昨今マスコミを含め注目されている健康機能飲食物品を中心とした抗酸化能とは ROS による生体に対する酸化ストレスを軽減する間接的な意味で多用されているが, 抗酸化能という言葉だけ独り歩きをしている感が否めない。この稿では ESR 法の対象である ROS とその性格を述べ, 抗酸化能の意義を理解し, 実際の in vitro ESR 法における ROS の検出と薬剤における ESR 法の抗酸化能評価を中心に最近の in vivo ESR 法における知見も含めご紹介したい。

## 2. 活性酸素種 (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 ( $O_2^{\cdot-}$ ) やヒドロキシルラジカル ( $HO^{\cdot}$ ) 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。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 の特徴を簡単にまとめると次のようになる。

#### 1) スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ )

$O_2^{\cdot-}$  は一般にスーパーオキシドと呼ばれ、酸素が一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。寿命は  $1\mu M O_2^{\cdot-}$  で 5s (pH 7.0) で生体に対する酸化力はさほど強くない。スーパーオキシドは、白血球 (NADPH oxidase), xanthine-oxidase, ミトコンドリアなどから生成される。

#### 2) ヒドロキシルラジカル ( $HO^{\cdot}$ )

$O_2^{\cdot-}$  が一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  $HO^{\cdot}$  は寿命が短い ( $1\mu M HO^{\cdot}$  で約  $200\mu s$ ) が、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。またこれら反応性に富むことに加えて、 $HO^{\cdot}$  は生体内で直接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。

#### 3) 過酸化水素 ( $H_2O_2$ )

$H_2O_2$  は、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 で他の ROS と異なり、生体内においても nM レベルで常に存在しているので安定であるが、酸化力は弱い。しかしながら、生体内金属 (鉄、銅イオン) と反応して反応性に富む ROS である  $HO^{\cdot}$  を生成する。

#### 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、 $\Sigma$  型と  $\Delta$  型が存在する。 $\Sigma$  型は非常に不安定で寿命が短い ( $\sim 10 ps$ ) ので、問題となるのは  $\Delta$  型である。 $\Delta$  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。 $\Delta$  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  $HO^{\cdot}$  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。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やすい ROS でもある。

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膜に含まれる脂質を酸化する作用で、この反応は連鎖的に続く (脂質過酸化反応)。ROS はこの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。

### 3. 酸化ストレスと抗酸化能

これら 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) をもっている。例えば、サプリメントとしても広く知られ、重要な抗酸化物質であるビタミン C, E は ROS を直接消去する能力を有する。とくに、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。若年者や健康である場合は一般に ROS 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一つとされている加齢や生活習慣病が進むと抗酸化システムの能力が衰えてバランスが崩れ、ROS の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という (1)。この酸化ストレスが加齢や生活習慣病のみならず、様々な病態あるいは生理学的現象に関与している。ビタミン C, E だけではなく SOD, CAT, GPx などの抗酸化酵素も ROS を消去する。従って、抗酸化能の本質は酸化ストレスを惹き起こす「ROS を消去する能力」を意味するものである。

### 4. In vitro ESR 法による活性酸素種の検出

In vitro ESR 法による ROS の検出は X-band ESR 装置を用いたもので実際にはスピントラップ法を用いる。 $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  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が必要とする。スピントラップ法とはスピントラップ剤を用いてこれら不安定な ROS をトラップし、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。このスピントラップ法は 1970 年代に Janzen らにより始められ (2), 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 法による生物医学的アプリケーションが進んだ。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), alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) である。とくにこれまで多用されてきた DMPO は  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  などの ROS が検出可能で、実際の測定でこれら 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 の ESR スペクトルと  $HO^{\cdot}$  産生を示す DMPO-OH spin adduct の

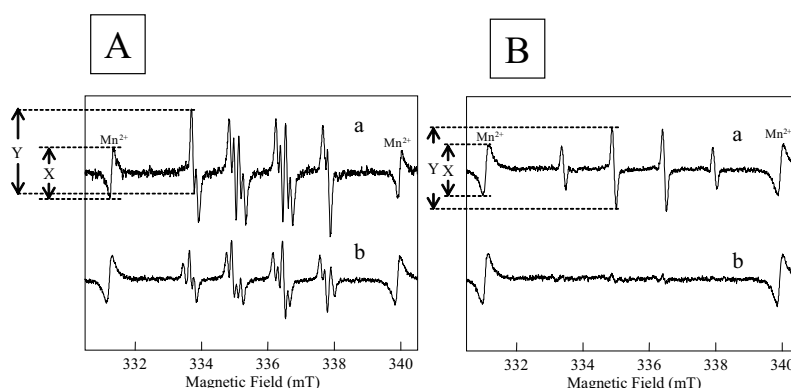


図1  $O_2^{\cdot -}$  産生を示す DMPO-OOH spin adduct (A) と  $HO^{\cdot}$  産生を示す DMPO-OH spin adduct (B)

(A)  $O_2^{\cdot -}$  産生系によるコントロールとなる ESR スペクトル (a), 検討するサンプル (薬剤, 飲食物品) により ESR スペクトルが減弱した ( $O_2^{\cdot -}$  産生に抗酸化能がみられた) 例 (b). (B)  $HO^{\cdot}$  産生系によるコントロールとなる ESR スペクトル (a), 検討するサンプル (薬剤, 飲食物品) により ESR スペクトルが減弱した ( $HO^{\cdot}$  産生に抗酸化能がみられた) 例 (b). 一般に標準マーカーとして  $Mn^{2+}$  の ESR スペクトルが両端に見られ, 左端の ESR スペクトル (X) とそれぞれ産生系の基準となる ESR スペクトル (Y) との比 (Y/X) を信号強度 (signal intensity) として定量化している.

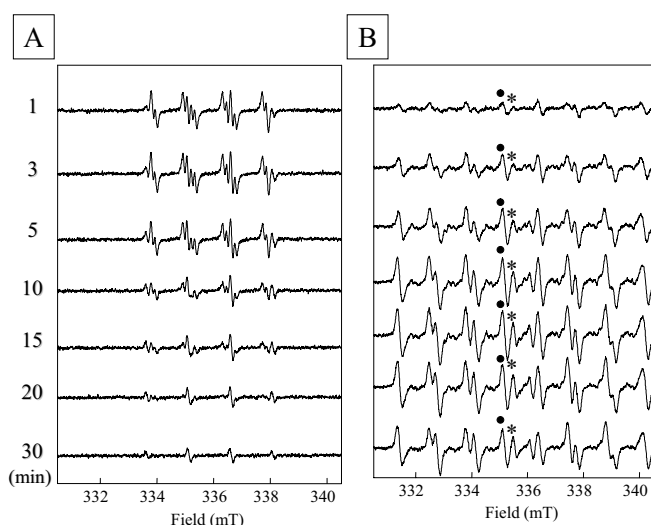


図2 スピントラップ剤 DMPO と DEPMPO を用いた  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HO^{\cdot}$  産生系が共存する系における DMPO-OOH spin adduct (A) と DEPMPO-OOH spin adduct (B) の経時変化

DMPO-OOH spin adduct (A) は時間が経過すると  $HO^{\cdot}$  産生を示す DMPO-OH spin adduct に decay してしまう (図1). DEPMPO-OOH spin adduct の基準となる ESR スペクトル (B: ●) は  $HO^{\cdot}$  産生を示す DMPO-OH spin adduct の基準となる ESR スペクトル (\*) に decay しないので  $O_2^{\cdot -}$  と  $HO^{\cdot}$  の弁別が実験系で DMPO に比べ容易である. また, それぞれ産生系の基準となる ESR スペクトル (●, \*) から  $O_2^{\cdot -}$  と  $HO^{\cdot}$  が共に産生されていることも観察可能である (B).

ESR スペクトルを示す (図1). 然しながら, この検出系において  $O_2^{\cdot -}$  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 (図2A). 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) (図2B) の開発がなされ(3), 我々も実

際の xanthine oxidase, あるいは多形核白血球からの  $O_2^{\cdot -}$  産生系に実験的に応用している(4,5). また, これまで我々が確立した ESR 法による ROS の検出については  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HO^{\cdot}$  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(6,7).  $H_2O_2$  の場合は horseradish peroxidase 存在下で desferrioxamine radical を測定する方法である(6). 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(7).

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惹き起こす ROS をトラップした ESR スペクトルから定性・定量が可能な点である (図1). 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 装置の開発と生物学的応用に現在取り組んでいる. さらに, 新しいスピントラップ剤として 5-(ethoxycarbonyl)-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (EMPO) (8), 5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (BMPO) (9) 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, 細胞レベルを含めた ROS 検出を可能とするスピントラップ剤の開発に努めている.

## 5. In vitro 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



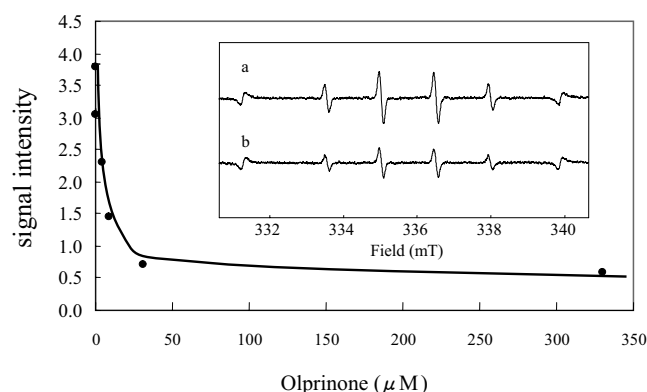


図3 HO<sup>·</sup>産生系に対するOlprinoneの濃度依存的抑制効果  
挿入図: HO<sup>·</sup>産生系によるコントロールとなるESRスペクトル(a)とOlprinone (10 μM)を添加したHO<sup>·</sup>産生系のESRスペクトル(b). Olprinone添加により; HO<sup>·</sup>産生を示すDMPO-OH spin adductの信号強度が減弱していることが観察される.  
(池田幸穂, 他. 日本集中治療医学会誌, 2006;13:59-61 より改変)

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。これまで間接的に ROS のよる酸化ストレスの結果起こるバイオマーカーに対する効果をみる、例えば酸化ストレスによる DNA 損傷マーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) などを指標とする抗酸化能評価が広くおこなわれてきた(10)。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酸化ストレスを惹き起こす ROS に対する効果を定性・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る。

我々が PDEIII 阻害薬である olprinone における抗酸化能、とくに HO<sup>·</sup>に対する効果の検討をおこなった結果(図3)、定量的な解析により、IC<sub>50</sub> は 6.10 ± 0.44 μM (n = 3; mean ± S.E.) であった(11)。この場合は HO<sup>·</sup>産生系としては Fenton 反応 (Fe<sup>2+</sup> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により HO<sup>·</sup>を生成する反応) を利用したため、産生系に Fe<sup>2+</sup> が関与するので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検討する必要がある。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、産生系を変えることで ROS の種特異性に対する効果を検討することで他の抗酸化能評価法では難しい定性的な評価が可能になる。2002 年に Kim による *in vitro* ESR 法による抗酸化能評価では同じ PDEIII 阻害薬である cilostazol においては IC<sub>50</sub> が 2.58 ± 0.07 μM と報告されている(12)。正確には HO<sup>·</sup>産生系を同条件にする必要があるが、このままの ESR データを採用すれば

cilostazol は olprinone 約 2 倍の抗酸化能を有するということになる。

以上の実例からわかるように *in vitro* ESR 法による抗酸化能評価において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)という直接的な抗酸化能評価をすることが可能であるということで、とくに olprinone の例で示したとおり、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、これまで問題点として挙げられているのは技術的な問題からこの比較を可能にするための施設間における ESR 測定、定量において誤差がみられることであった。この誤差を少なくするためには先に述べた抗酸化能評価に適した ROS 産生系の選択と条件の規格化から測定者の 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基準の設定が早急に望まれる。現在我々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(13)。

## 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 が発生している証拠である酸化ストレスを含めた redox 反応を含めた情報として与えることの可能な方法であると述べた。現在我々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最後に簡単に紹介する。

*In vivo* ESR 測定のさきがけとなった研究は 1976 年に Feldman(14) らのラット体内に helix coil をラット体内に挿入して安定ラジカル(ニトロキシラジカル)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のため生体測定には適さない(15)。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、1.1-1.3GHz 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(16)。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でもなされてきた(17, 18)。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すで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(19)．とくに近年，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および質の向上に関する試みが Johns Hopkins University, ESR Center (現在, Ohio State University, Davis Heart Lung Institute に移転) を中心に報告されてきた(20,21)．

我々もここ数年にわたり生体 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-PROXYL) を用いることで，小動物頭部領域の脳内ニトロキシ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(22-24)．さらに，我々はこの実験技術により，すでに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) および脳卒中易発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(22-24)．さらに，現在，ラット脳内の MC-PROXYL の減衰速度を画像と ESR スペクトルの信号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開発している (未発表データ)．

## 7. 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 消去能を ESR 法の ROS 検出技術を基本として検討する方法について述べた．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なされてい

ないことから，真の抗酸化能評価には ESR 法よる技術が今後重要になると考えている．さらに，これに加えて現在 ESR 法による疾患モデルにおける酸化ストレス評価として in vivo ESR 法よる SHR, SHRSP などの生活習慣病のモデル動物を用いて脳内の酸化ストレス評価法を確立した(22-24)．従って，薬物，飲食物品の in vitro ESR 法よる直接的な ROS に対する消去効果の定性・定量的な評価に加えて，酸化ストレス由来の疾患動物に検討する薬物，飲食物品を与えることでこれら薬物，飲食物品の脳内酸化ストレスに対する効果 (抗酸化能) をみることが可能になった．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おこなうことで，近い将来に生活習慣病，とくに脳保護作用示すような優れた抗酸化能を有する新規薬物，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．

## 文 献

- 1) Sies H. *Exp Physiol.* 1997;82:291-295.
- 2) Janzen EG. *Methods Enzymol.* 1984;105:188-198.
- 3) Frejaville C, et al. *J Med Chem.* 1995;38:258-265.
- 4) Lee CI, et al. *J Biol Chem.* 2000;275:9369-9376.
- 5) Lee CI, et al. *J Biol Chem.* 2000;275:38965-38972.
- 6) Kiyose M, et al. *Chem Res Toxicol.* 1999;12:137-143.
- 7) Ishibashi T, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277:350-358.
- 8) Zhao H, et al. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:599-606.
- 9) Stolze K, et al. *Biol Chem.* 2002;383:813-820.
- 10) Toyokuni S. *Pathol Int.* 1999;49:91-102.
- 11) 池田幸穂, 他. *日本集中治療医学会誌.* 2006;13:59-61.
- 12) Kim KY, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:709-715.
- 13) 李 昌一. *Food Style* 21. 2005;9:24-28.
- 14) Feldman A, et al. *Phys Med Biol.* 1975;20:602-612.
- 15) Foster KR, et al. *Phys Med Biol.* 1979;24:1177-1187.
- 16) Berliner LJ, et al. *Magn Reson Med.* 1987;4:380-384.
- 17) Utsumi H, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172:1342-1348.
- 18) Miura Y, et al. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:854-859.
- 19) Eaton GR, et al. *EPR imaging and in vivo EPR.* CRC Press Inc; 1991. p.14.
- 20) Kuppusamy P, et al. *Cancer Res.* 1998;58:1562-1568.
- 21) He G, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4586-4591.
- 22) Miyazaki H, et al. *Redox Rep.* 2002;7:260-265.
- 23) Lee MC, et al. *Magn Reson Med Sci.* 2003;2:79-84.
- 24) Lee MC, et al. *Hypertens Res.* 2004;27:485-492.

## 著者プロフィール

李 昌 一 (り まさいち (ちゃんいる))

神奈川歯科大学歯学部 生体管理医学講座薬理学分野・ESR 研究室，教授。

◇ 1989 年神奈川歯科大学歯学部薬理学教室助手，'98 年長期派遣研究員として米国 Johns Hopkins 大学医学部に留学，'00 年同 客員助教授，'02 年神奈川歯科大学歯学部薬理学教室助教授，'06 年～現在に至る．◇研究テーマ：電子スピン共鳴 (ESR) 法による生物医学的応用，ESR 法による薬剤・飲食物品の抗酸化能評価と新規抗酸化薬剤・飲食物品の開発，ESR 法を用いた疾患予防診断装置・システムの開発。

