

# 生体内で生成するフリーラジカル種とその検出について

札幌医科大学 医療人育成センター 教授 藤井 博匡



## 1 はじめに

フリーラジカルと呼ばれる不対電子を持った物質が、今から110年ほど前、ドイツのGombergにより発見された(表1参照)。フリーラジカル分子では、電子が対を作らない、いわゆる孤立電子の状態で存在するため、一般に不安定で化学反応性が高い。このようなフリーラジカル分子が反応の過程で生成することが明らかになってきたが、私たちの体の中では起こりえない反応だと考えられていた。1960年代にはいり、酸化還元酵素やペルオキシダーゼの反応機構の研究が進むにつれ、“生体の中でもフリーラジカルを伴う反応が起こっているのではないか”と考えられはじめた。そのような折に、米国のMcCordとFridovich<sup>1)</sup>はスーパーオキシドラジカルを消去する(つまり、スーパーオキシドを過酸化水素に不均化する反応)酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase: SOD)が赤血球内に存在することを発見した。SODは赤血球中に多量に存在することから、赤血球内でスーパーオキシドの発生を阻害するためにSODが存在

していると考えられるようになり、それから数年後、白血球が殺菌作用を示すとき、白血球膜にある酵素(NADPHオキシダーゼ)は爆発呼吸と呼ばれる急激な酸素消費を起こし、これがスーパーオキシドの生成のための酸素消費であることを米国のBabiorら<sup>2)</sup>が明らかにした。その後、ミトコンドリアでの電子伝達系においてもスーパーオキシドの生成が明らかとなり、また、血管の拡張・収縮をコントロールしている、“血管弛緩因子(EDRF)”が一酸化窒素NOであることが明らかにされ、21世紀を前にして、生体内でフリーラジカルが生成していることは明白な事実となった<sup>3)</sup>。

## 2 生体内で発生するフリーラジカルについて

殺菌時、白血球からのスーパーオキシド生成が見いだされてから、生体内で作られるフリーラジカルは活性酸素と呼ばれてきた。活性酸素とは、白血球から生成するスーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )や、 $O_2^{\cdot-}$ から二次的に合成される一連の酸素化合物のことである。しかし白血球から生成された $O_2^{\cdot-}$ から不均化反応により生成する過酸化水素はフリーラジカルではないため、定義上の注意が必要である。活性酸素であり

表1 生体内フリーラジカル発見の歴史について

1. フリーラジカルという概念の登場 (1900年頃) Gomberg, M. (1900) により、トリフェニルメチルラジカルが発見された。
2. 生体内でのフリーラジカル生成の可能性が示唆 Superoxide dismutase (SOD) の発見 (McCord & Fridovich: 1969)
3. 白血球からスーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )が生成 (Babior BM et al. 1973) $O_2 \xrightarrow{\text{電子}} O_2^{\cdot-}$ 電子配置
4. 血管内皮由来弛緩因子(EDRF: endothelium-derived relaxing factor)は、NOである(1990年代後半)

### 著者略歴

1979年 東京工業大学大学院理工学研究科(高分子工学)終了 工学博士  
 1983年 米国オハイオ州立大学 Biochemistry部門客員助教授  
 1987年 東京都臨床医学総合研究所研究員  
 1999年 札幌医科大学保健医療学部教授  
 2008年より現職

### 主な学会活動・受賞歴

2007年 日本磁気共鳴医学会優秀論文賞受賞

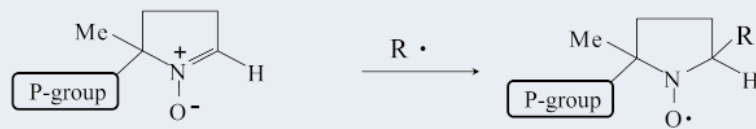
フリーラジカル物質であるのは、 $O_2^{\cdot-}$ 、ヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ )、脂質過酸化物 ( $LOO\cdot$ )、一酸化窒素 ( $NO$  注：通常  $NO\cdot$  とは書かず、孤立電子を省略した記載が多いので、本稿でも省略した記載を用いた) 等である。現在は、活性酸素と呼ぶよりも Reactive Oxygen Species (ROS) と呼ばれている。発見された当時は、生体内で作られたフリーラジカルは組織障害性を示す原因分子である、とだけ考えられていたが、その後、多量に作られたフリーラジカルは細胞障害性を示すのは勿論であるが、少量のフリーラジカル分子は生体内で重要な情報伝達因子として機能していることも明らかとなってきた。

### 3 フリーラジカルの測定法について

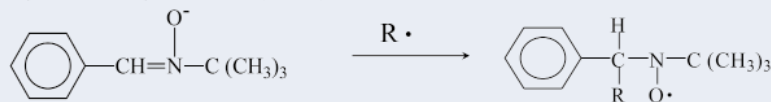
#### 3.1 フリーラジカル検出手法としての電子スピン共鳴法<sup>4-6)</sup>

活性酸素フリーラジカルを検出する数々の手法が開発されてきた。しかし、これらの手法の中で常磁性である活性酸素フリーラジカルを直接的に捕らえることが可能なのは電子スピン共鳴法 (Electron Paramagnetic Resonance: EPR 法あるいは Electron Spin Resonance: ESR 法とも呼ばれる。本稿では ESR 法とする) である。ESR 法は、試料の形状を選ばない (液体、固体、気体の試料でも測定可能) という特色があり、特に動物体内で発生する活性酸素フリーラジカルについての情報を得ることが可能な点が優れている手法である。

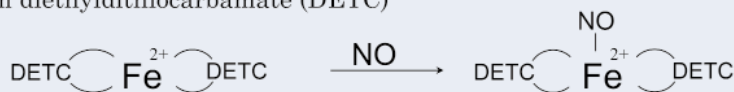
5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO)



Phenyl-tert-butyl nitron (PBN)



Sodium diethyldithiocarbamate (DETC)



R·は、スーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) やヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ ) である。

図1 スピントラッピング法について

#### 3.2 短寿命のフリーラジカルを如何にして検出するか？

一般に検出しようとしている“フリーラジカル分子”は短寿命である。生体内で生成する代表的なフリーラジカルであるスーパーオキシドや一酸化窒素の水溶液中での寿命 (半減期) は数秒で、より反応性の高いヒドロキシラジカルになるとマイクロ秒程度となる。それでは、このような短寿命ラジカルを如何にして ESR で検出すれば良いのであろうか？歴史的には、測定対象試料を凍結し低温で ESR スペクトルを測定して観測できたラジカル種を同定するという手法がとられていた。本手法は急速凍結法と呼ばれ、xanthine oxidase から生成されたスーパーオキシドラジカルの定量化に活用された。しかし、本手法を生物そのものには適用しにくく、凍結試料の自動酸化によるアーティファクトとしてのスペクトルの発生などの問題があることから、現在はほとんど利用されなくなった。以下に現在フリーラジカルの検出に使われている 2 つの手法について記載する。

#### 3.3 スピントラッピング法<sup>6-8)</sup>

活性酸素フリーラジカルは一般に短寿命である。このような不安定で短寿命なフリーラジカルを定量的に ESR 法で観測するためにはフリーラジカルの寿命を延長させて安定化し、その ESR スペクトル測定を可能とさせる“スピントラッピング法”が広く利用されている。その例を図 1 に示した。スーパーオキシドやヒドロキシラジカルなどの活性酸素フリーラジカルを、DMPO (5,5-dimethylpyrroline N-oxide)<sup>6)</sup>、PBN (phenyl-tert-butyl nitron)<sup>6)</sup>、DEPMPO (5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide)<sup>7)</sup>、CYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide)<sup>8)</sup> と呼ばれている二重結合を持った nitron 系の化合物と反応させることによってフリーラジカルを安定化させ、その化合物の寿命を延ばすという手法がとられている。一方、NO の捕獲は、鉄キレート剤 (Fe(II) と dithiocarbamate 誘導体との錯体) に NO を配位結合させることによって NO を安定化させる手法が用いられている<sup>9)</sup>。

スピントラッピング法では、スピニアダクト（フリーラジカルとスピントラップ剤とが反応して生成する化合物）の寿命が延長してそのスペクトルを測定できるのはもちろんであるが、アダクトのESRスペクトル解析から捕獲したラジカル種を決定できる点も大きな特徴である。図2に、DMPOがスーパーオキシドとヒドロキシラジカルをそれぞれトラップした時のスペクトルを示した。スペクトル線型の違いからトラップしたラジカル種を識別し同定することが可能である。

### 3.4 フリーラジカルの間接的測定法：ニトロキシドの利用について<sup>10,11)</sup>

スピントラッピング法によるフリーラジカル検出は *in vitro* 系や *ex vivo* 系において多くの成果が得られた。しかし、小動物の体内で発生するフリーラジカルをスピントラッピング法で捕獲して *in vivo* ESR 装置でそのスペクトルを検出するのは測定感度とアダクト量がごく微量であることから非常に難しい。そこで、実験動物を用いた *in vivo* 系でもフリーラジカルを検出やフリーラジカルが関与する疾患の解析を可能とする間接的手法が開発された。この間接的手法では、ニトロキシド化合物を利用する（図3を参照）。

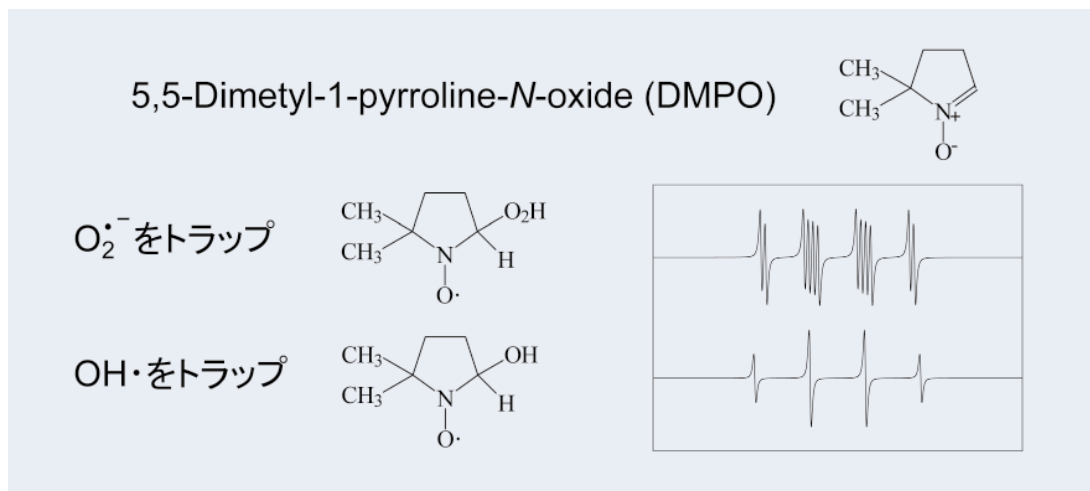


図2 DMPOによるスーパーオキシドおよびヒドロキシラジカルの捕獲後のESRスペクトル

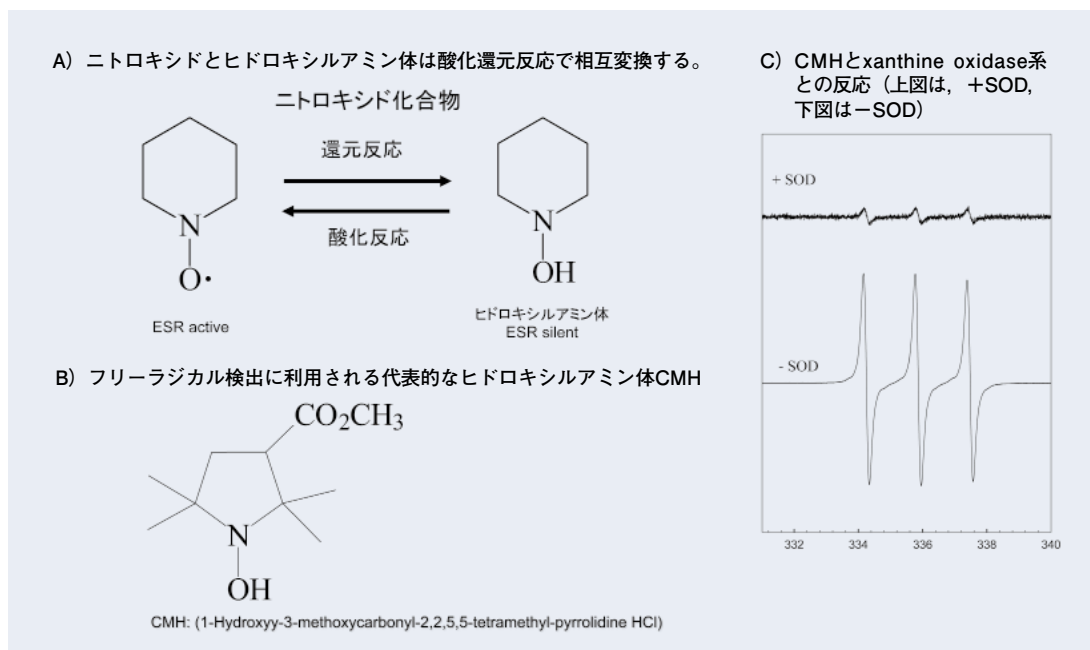


図3 ニトロキシド化合物の酸化還元反応

ニトロキシド化合物は還元反応を受けるとヒドロキシルアミン誘導体へと変化する。ニトロキシド化合物は常磁性を持っており ESR 信号が観測できるが、ヒドロキシルアミン化合物になると反磁性体となり ESR 信号を失う。その一方、ヒドロキシルアミン体は酸化反応を受けるとニトロキシドに戻り ESR 信号が再び観測できるようになり、この特性をフリーラジカルの測定に利用するようになった（図3A）。スーパーオキシド生成酵素系である xanthine oxidase と基質である

hypoxanthine をヒドロキシルアミン体（代表的なヒドロキシルアミン体 CMH を図3B に示した）に添加すると、ニトロキシドの ESR スペクトルが観測される（図3C 参照）。これは、スーパーオキシドによりヒドロキシルアミンが酸化されてニトロキシドとなったため、この系にスーパーオキシドスカベンジャーである SOD を添加しておく、ESR 信号の出現を大部分抑えることができ、以上の結果からヒドロキシルアミン体がスーパーオキシドを捉えていることが分かる。

4 フリーラジカルのイメージングについて

ニトロキシド分子は常磁性であることから、水分子の緩和時間を変化させることが可能である。これを利用すると、核磁気共鳴法による画像化、つまりMRI (magnetic resonance imaging) によりニトロキシド分子の分布を観測可能である。図4に、濃度の異なるニトロキシドを含んだ水溶液からなるファントムのMRI画像を示した。ニトロキシドは水の縦緩和時間(T1)を短縮するため造影剤として働き、濃度とともに画像強度が変化していることが分かる(図4A)。図4Bに、

ニトロキシドをマウスに投与した際の撮像例を示した。ニトロキシドは脳内へ拡散して画像強度を上昇させていることが分かる。このようなフリーラジカル分子の造影効果を活用すると、生体内で生成するフリーラジカルを画像として視覚化することが可能となる。炎症性疾患モデル動物の体内で生成するNOを画像化した例を図5に示した<sup>12)</sup>。敗血症モデルラットの肝臓において生成するNOをスピントラップ剤により捕獲し、常磁性であるNOアダクトの造影効果からNO生成部位をMRIで検出した例である。NO生成後の肝臓では、画像強度が著しく上昇しており、

NOアダクトの生成による造影効果によりNO生成部位が特定できている。

5 おわりに

*In vitro*系におけるESR法を利用したフリーラジカルの検出法と、*in vivo*系でのMRIによるフリーラジカルのイメージング法の例を示した。*In vivo* ESR法を用いたフリーラジカルのイメージングは積極的に進められており、詳細は文献を参考にさせていただきたい<sup>5)</sup>。ESRイメージングとMRIにおける融合イメージングも進められており、本手法の発展が期待されている。

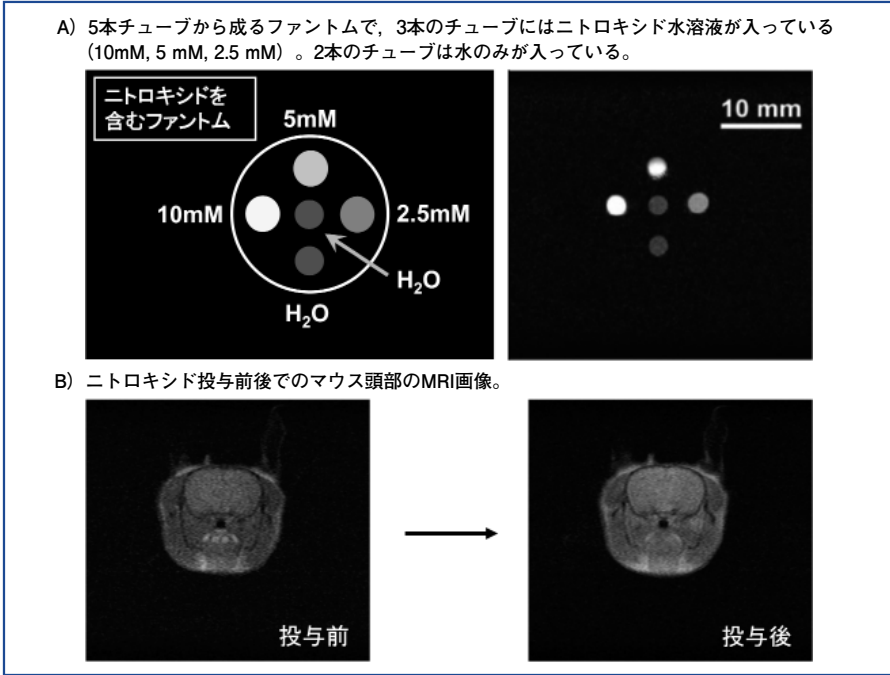


図4 ファントム及びマウス頭部のMRI画像

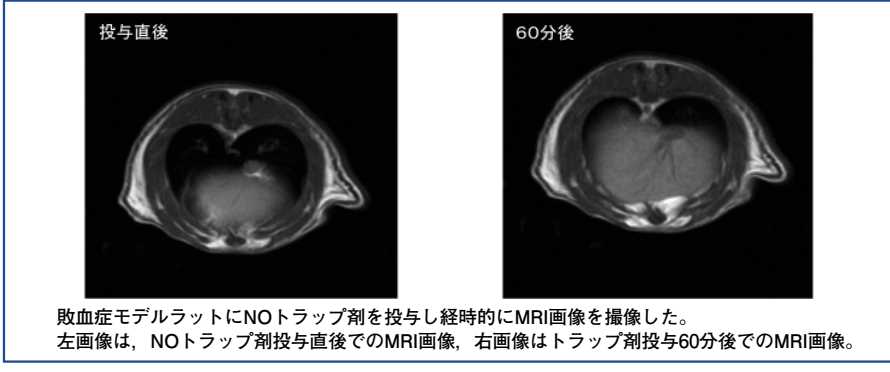


図5 敗血症モデルラットのMRI画像

文献

- 1) McCord JM. et al.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocytes. J. Biol. Chem., 244: 6049-6055, 1969
- 2) Babior BM. et al.: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J. Clin. Invest., 52: 741-744, 1973
- 3) Ignarro LJ. : After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 7816-7817, 2002
- 4) In: Eaton GR. et al. eds. EPR imaging and *in vivo* EPR. Boca Raton: CRC Press, 1991.
- 5) In: Berliner LJ, ed. Biological magnetic resonance-Volume 18: *In vivo* EPR (ESR) theory and applications. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- 6) In: Berliner LJ, ed. Biological magnetic resonance-Volume 8: Spin labeling theory and applications. New York: Plenum Press, 1989.
- 7) Frejavi C. et al.: 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the *in vitro* and *in vivo* spin trapping of oxygen-centered radicals. J. Med. Chem., 38: 258-65, 1995
- 8) Kamibayashi M. et al.: Synthesis and characterization of a practically better DEPMPPO-type spin trap, 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPPO). Free Rad. Res., 40: 1166-1172, 2006
- 9) Lai CS. et al.: Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-shock mice. FEBS Lett., 345: 120-124, 1994
- 10) Fink B. et al.: A new approach for extracellular spin trapping of nitroglycerin-induced superoxide radicals both *in vitro* and *in vivo*. Free Rad. Biol. Med. 28: 121-128, 2000
- 11) Matsumoto K. et al.: High-resolution Mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. Clin. Cancer Res. 12: 2455-2462, 2006
- 12) Fujii H. et al.: *In vivo* imaging of spin-trapped nitric oxide in rats with septic shock: MRI spin trapping. Magn. Reson. Med. 42: 235-239, 1999