

電子スピン共鳴法

Electron Spin Resonance Spectroscopy

1. はじめに

ESR 法は、不対電子をもつフリーラジカルなどの常磁性物質を非破壊で測定することができる唯一の分析法である。

前報では、小動物などの生体を生きたままで測定することが出来る生体計測用 ESR 装置の開発について紹介した。本稿では、その装置を改良して行われた、生体内の目標部位における投与スピンプローブ剤の動的变化を観るための時空間計測法を紹介する。

2. 生体内投与スピンプローブ剤の挙動

図 1 に示すように、ラットなどの生体に投与したスピンプローブ剤（ニトロキシルラジカル類、左図）は、一般に一次反応速度式（信号強度の対数値と経過時間が直線関係にある）に従って、ESR サイレントのヒドロキシルアミン体（右図）に還元される。その半減期（ニトロキシルラジカルの濃度が半分になるまでの時間）は、生体内のレドックスバランスを反映しており、半減期が短いほど生体内はより強い還元的雰囲気にあることを意味する。

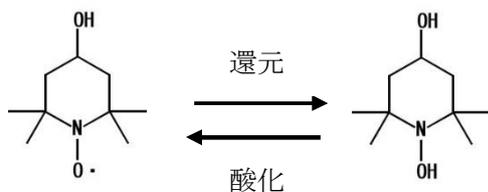


図1. ニトロキシルラジカル(左)とヒドロキシルアミン(右)の関係

3. ESR 時空間計測法の開発

生体内のレドックスバランスを観るためには、目標部位における投与スピンプローブ剤の動的变化を計測する必要がある。著者らはこれを時空間計測法と定義し、以下の二つの方法を開発した。

3.1 時系列画像法 ループ・ギャップ共振器(前報を参照)を用いて試料を丸ごと計測して、一組の時系列 ESR 画像を得たのち、その画像から目標部位の ESR 画素値を抽出し、画素値の時間変化から

4. *In vivo* ESR 時空間計測法

4. *In vivo* ESR spatio-temporal measurement

反応速度を求める方法である。この方法は、脳などの生体の奥部に存在するプローブ剤の計測に用いられる。画像を構築するためには、磁場勾配下における ESR スペクトルを数多く取得する必要がある(3 次元画像を構成するには、約 80 本の ESR スペクトルが必要)、そのためには磁場掃引を高速にするのが有効であると考え、空芯コイルを導入した高速磁場掃引(15 mT/s) ESR-CT システムを開発した。

一例として、脳血液関門を通過して脳内に侵入することができる PCAM を投与したラット頭部の結果を図 2 に示す。図 2a は、ラット頭部における PCAM の分布を示す冠状断面図である。その画像には、大脳皮質 (cortex)、線条体 (striatum) の解剖学的図も表示した。それぞれの部位における画素値の時間変化 (図 2 b) から求めた半減期を図 2 c に示す。また、脳以外の部位 (extracranium) の半減期も示す。線条体、大脳皮質、その他の順に、半減期が延長した。すなわち、線条体における還元能が高いことが分かった。

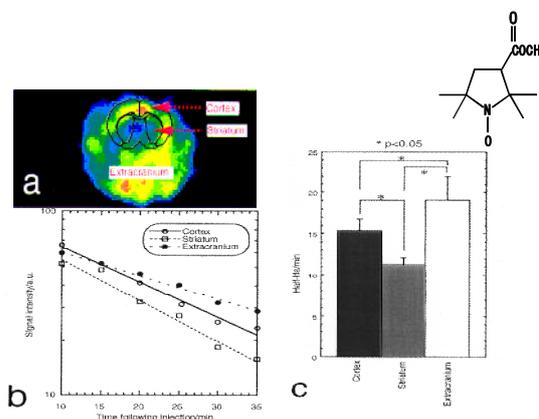


図2. PCAM(図の右上)を投与したラット頭部における時空間計測

3.2 局所マイクロ波法 表面コイル型共振器のコイル(直径 3-10 mm)を目標部位に留置してプローブ剤の ESR 信号を直接検出し、その時間変化を観測する方法である。この共振器は、聴診器様あるいは内視鏡様に使用することができる(図3)。

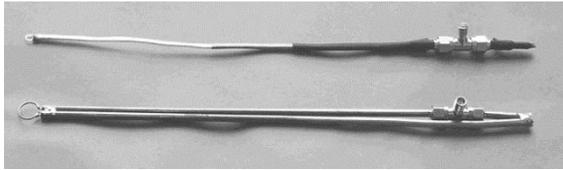


図3. 表面コイル型共振器 上:フレキシブルタイプ、下:セミリジッドタイプ いずれも左先端の一巻きのコイルがセンサー部

この方法では、時空間計測法の時間分解能が大幅に向上する。生体の目標部位に共振器を留置してプローブ剤の ESR 信号の時間変化を時間分解能 1 秒で追跡できるようになり、Tempol などの反応が速いプローブ剤の計測が可能である。これを応用して、ラットの各種臓器におけるスピンプローブ剤の動態や植物葉のレドックスモニタリングが研究されているので、その成果の一部を紹介する。

麻酔下のラットの肝臓部に表面コイル型共振器を留置し、TEMPOL 生食水を 5 分間隔で尾静注して、その都度、ラット肝臓部での信号強度の時間変化を追跡した。図4に示すように、尾静注後ただちに信号が増加し、その後信号が減衰した。この減衰初期の部分が一次反応速度式に従うので、半減期を求め、還元能を評価した。その結果、対照群は投与を繰り返すほど、減衰速度が低下、すなわち半減期が延長したが、抗酸化剤投与群では半減期の延長が抑えられ、還元能が強まっていることが分かった。抗酸化剤と TEMPOL は直接反応しないので、生体内還元能増強機構に興味が集まっている。

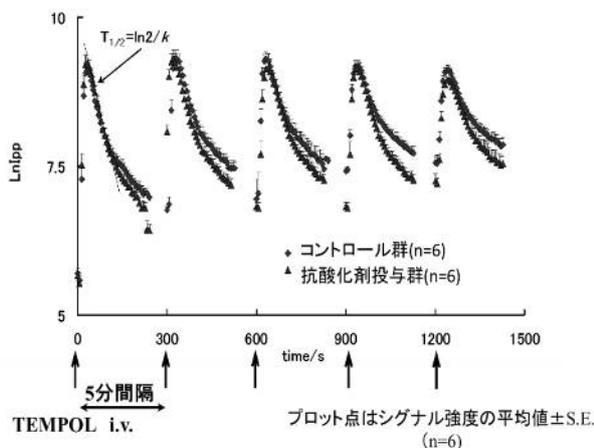


図4. TEMPOL 繰返し投与法によるラット肝臓部における ESR 信号強度の時間変化

もう一つの例として、オウトウ花芽の環境応答を調べた結果を示す。あらかじめ花芽に Carbamoyl-PROXYL 水溶液を吸わせておく。このニトロキシラジカルは生体内の還元剤(ビタミン C など)によって、一部がヒドロキシルアミンに還元されている。この条件下で、花芽に表面コイル型共振器を留置して、花芽の周辺の温度を変化させた。結果を図5に示す。初めに温度を低下させたところ、ESR 信号はおよそ 1.5 倍に増加した。160 分経過したところで温度を上昇させたところ、ESR 信号強度が著しく増加した。信号強度の増加は、生体内が酸化的雰囲気に変化したことを意味している。急激な温度低下や上昇は植物にとって酸化的ストレスであり、とくに解凍時にそのストレスが著しく大きくなることが示唆された。

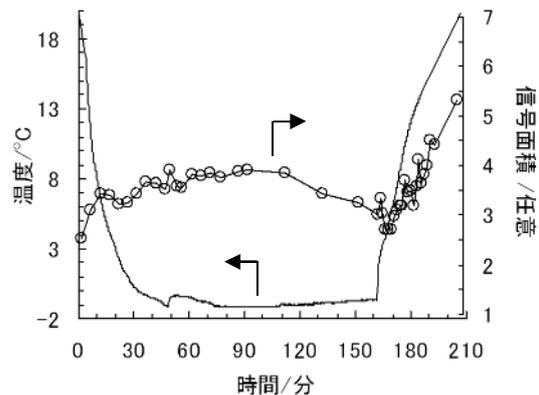


図5. オウトウ花芽の冷却ストレス応答

【続く】 次回の紀要では、スピントラップ法による抗酸化能評価法について紹介したい。

本紀要は、本校の教員が実践力のある技術者や経済人を地域に送り出すため、日ごろ行っている教育研究活動の一端を纏めたものである。これらの情報は、教員のお互いを理解し次の展開を進めるための糧となるだけではなく、多くの皆様に読んでいただくことによって、本校の教育研究活動をご理解いただくのみならず、皆様と本校教員との共同研究・技術相談などが、今後より一層推進されることを期待している。

山形県立産業技術短期大学校庄内校
校長 尾形 健明