

パプラール製剤のヒドロキシラジカル消去活性 —スピントラッピング ESR 法による速度論的研究—

京都工芸繊維大学 繊維学部応用生物学科
田嶋 邦彦 渡部 るしる 金折 賢二

要 旨

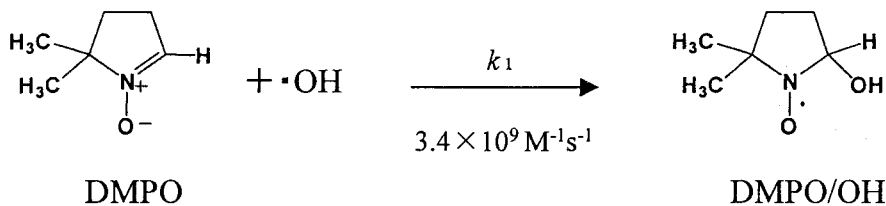
パラジウムと白金の混合コロイド溶液であるパプラール製剤とヒドロキシラジカルの反応を、電子スピン共鳴 (ESR) によるスピントラッピング測定法で検討した。過酸化水素の紫外線照射で生成するヒドロキシラジカルと 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) の反応で生成する DMPO-OH ラジカルを測定対象として、パプラール製剤のヒドロキシラジカルに対する消去活性を評価した。DMPO-OH ラジカルの濃度はパプラール製剤の添加量が増加するにつれて段階的に減少した。観測結果をヒドロキシラジカルに対する DMPO (反応速度定数 $k_1=3.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) とパプラール製剤との競争反応として解析した。DMPO-OH ラジカルの濃度がコントロールの 50% (ID_{50}) に減少したパプラール製剤の希釈率は 0.22% であった。同様の測定条件で解析したアスコルビン酸、マニトールおよびエタノールとの比較から、パプラール製剤のヒドロキシラジカル消去活性を議論する。

キーワード：パプラール製剤，活性酸素，ヒドロキシラジカル消去活性，ESR，スピントラッピング

緒 言

生命活動の維持に関わる物質変換反応には、化学結合の切断と形成を伴う過程と、電子の移

動を伴う酸化還元過程に大別できる。前者の過程では、しばしば奇数電子を有するラジカル種が反応過程に関与する。他方、後者の一電子移動過程では必然的に不対電子を有するラジカル種が反応に関係している¹⁾。これらの生体化学



Scheme 1

反応系で生成するラジカルは生物ラジカル種と総称され、たとえば、ビタミンE²⁾およびC³⁾などの抗酸化反応に由来するラジカル種は生物ラジカルの代表例である。この他にも脂質過酸化過程で生成する脂質ラジカルおよび補酵素の酸化還元種も生物ラジカルに含まれる⁴⁾。さらに、活性酸素ラジカルは好気性生物が酸素の還元的代謝過程で副産する短寿命で化学反応性の高い生物ラジカルである。生体系には活性酸素種に対する防御系としてスーパーオキシド消去酵素 (SOD) あるいはカタラーゼなどの酵素だけでなく、ビタミンEおよびC等の活性酸素消去系が存在している⁵⁾。しかし、活性酸素ラジカルの生成と消去のバランスが崩れるとラジカル障害と呼ばれる様々な疾患、たとえば動脈硬化、心筋梗塞、ガンあるいは虚血再灌流障害などが誘発される⁶⁾。今日、活性酸素種が関与するラジカル障害の機構解析と、抗ラジカル障害薬剤の開発が多方面で精力的に行われている⁷⁾。

生物ラジカルを直接的に検出する分光学的な手法は、不対電子の電子スピンを測定対象とする電子スピン共鳴法 (ESR) である⁸⁾。比較的長寿命の生物ラジカル種は直接検出可能であるが、極めて短寿命で反応性の高い活性酸素ラジカルの直接 ESR 検出は困難である。そのために、活性酸素種を安定な長寿命ラジカルに変換して ESR 検出する方法として、スピントラッピング ESR 法^{9,10)}が開発された (1式)。

たとえば、代表的なスピントラッピング試薬である DMPO の二重結合部分にヒドロキシラジカルが付加すると、安定なスピニアダクト (DMPO-OH) が生成する。この DMPO-OH ラジカルを高感度で定量的かつ迅速に計測する手法がフローインジェクション ESR 法 (FI-ESR) で

あり、スピントラッピング ESR 測定を精度良く実施するための方法論として注目されている。

我々は、FI-ESR法とスピントラッピング法を併用して様々な薬剤の抗酸化反応の機構と反応速度定数¹¹⁾を評価している。本研究では、パラジウムと白金のコロイド薬剤であるパプラール製剤¹²⁾を研究対象とし、活性酸素との反応機構を検討した。パプラール製剤は化学的な組成から酸化還元反応と関連する活性が注目されており、なかでも活性酸素種に対する反応性が期待されている。しかし、パプラール製剤の抗酸化活性については物理化学的な研究例が乏しく、その詳細な機能性は不明である。本研究では、FI-ESR法とスピントラッピング法を併用した速度論的な検討から、パプラール製剤とヒドロキシラジカルの反応機構と速度論的な解析について報告する。

実 験

1. 測定装置

ESR 測定には RRX-1X 型電子スピン共鳴装置 (Radical Research 社) を WIN-RAD (ver. 1.20) および WIN-EKS システムと組み合わせてして使用した。FI-ESR測定システムは高速液体クロマトグラフ分析用 (HPLC) ポンプ、6方切り替えバルブ、インジェクションバルブおよび ESR フローセルで構成され、これらを HPLC 用の PEEK チューブ (外径 1.58mm, 内径 0.13mm) で接続した。フロー ESR セルは水溶液扁平石英セル (LFC09L2 Radical Research 社) を使用した。紫外線照射には光ファイバー式照射装置 (RUVF-203S Radical Research 社) を使用し、照射光の光量は照度計 (UVP-365, SAN-EI

Electronics) で記録した。FI-ESR測定ではESR装置からADボードを介して200 μ 秒間隔で獲得した信号を5000回積算してSN比を改善した。DMPO-OH ラジカルの濃度は、安定ラジカルであるTEMPOLのESR信号強度と濃度の検量線から評価した。また、磁場掃引形式で観測するESR信号の強度補正には外部標準試料として酸化マグネシウムに希釈したMn(II)イオンを使用した。

2. 試薬

パプラーン製剤((株)東洋厚生製薬所)は3.0ml中にコロイド状の白金0.6mgとパラジウム0.9mgを含む水溶液で、コロイド粒子の平均原子数はおおよそ70万であり、主な効能は急性胃炎および胃粘膜損傷に対する効果である¹²⁾。パプラーン製剤の原液を超純水(Q-II)で希釈した溶液を測定に試用し、その濃度は希釈率(体積%)で示した。DMPOは市販の試薬(同人(株))を精製せずにそのまま測定に使用した。ESR信号の強度補正にはTEMPOL(2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxy-piperidine-N-oxyl, 和光純薬)をそのまま使用した。その他、アスコルビン酸、エタノールおよびマニトールなどは特級試薬を使用した。いずれの試薬も測定の前直前に所定の濃度に調製した。

3. フローインジェクションESR測定の手法

過酸化水素の紫外線分解で生じるヒドロキシラジカルのDMPOによるスピントラッピングESR測定は次の手順で実施した。超純水を1.0ml毎分の速度で送液したFI-ESR測定系にDMPO(50 μ M)と過酸化水素(1.0mM)の混合溶液200 μ lをインジェクションバルブから注入した。FI-ESR法では、試料溶液がESRセル中で紫外線照射を受けて生成するDMPO-OHラジカル強度の時間変化を記録する。DMPO-OHラジカルの信号強度は、試料溶液がセルに到達するにつれて増加し、試料溶液がセルを通過すると信号強度は再びベースラインに戻る。実際には同一の試料溶液を3回注入して得られた信号強度をラジカル濃度に変換し、その平均値を観

測値とした。本法で解析されたラジカル濃度の実験誤差は5%以内である。

結 果

1. パプラーン製剤がスピントラッピング反応に及ぼす影響

これまでに金属コロイド製剤の抗酸化活性をスピントラッピングESR法で評価した研究例は皆無である。そこで、パプラーン製剤がスピントラッピング反応におよぼす影響を主にESR法で検討した。まず、パプラーン製剤とスピントラッピング試薬であるDMPOの反応を観測するために、DMPO(最終濃度20mM)とパプラーン製剤(原液)を混合したが、両者の錯形成を示唆する色調の変化は認められず、DMPO由来のESR信号も観測できなかった(図1-a)。この溶液に紫外線(180mW/cm²)を2秒間照射したが、ESRスペクトルに有意な信号変化は見られなかった。同様の反応溶液に過酸化水素(最終濃度1.0mM)を加えても、ESR信号は全く検出されず(図1-b)、過酸化水素の酸化反応に由来する酸素の発生も認められなかった。つぎに、パプラーン製剤とニトロキシドラジカルの反応を検討した。パプラーン製剤の原液を加える前後で安定ニトロキシドラジカルであるTEMPOLのESR信号強度を比較した。しかし、TEMPOLラジカルの線形、強度およびg値に有意な変化は認められなかった。このように、パプラーン製剤は過酸化水素、DMPOおよびニトロキシドラジカルに対して反応性が低く、スピントラッピング反応に関与しない。

図1-cに示したESRスペクトルは、DMPO(0.5mM)と過酸化水素(1.0mM)の混合溶液に2秒間紫外線(180mW/cm²)を照射した直後に記録した。ESR信号は強度比1:2:2:1の4本線の微細分裂($a^H=a^N=1.50$ mT)を示し、その信号の線形と微細結合定数から、本ラジカルをDMPO-OHラジカルと帰属した¹³⁾。つぎに、照射光の光量を20から180(mW/cm²)の範囲で変えて、DMPO-OHラジカルの信号強度に及ぼす照射光量の影響を検討した。図2-aに示すよう

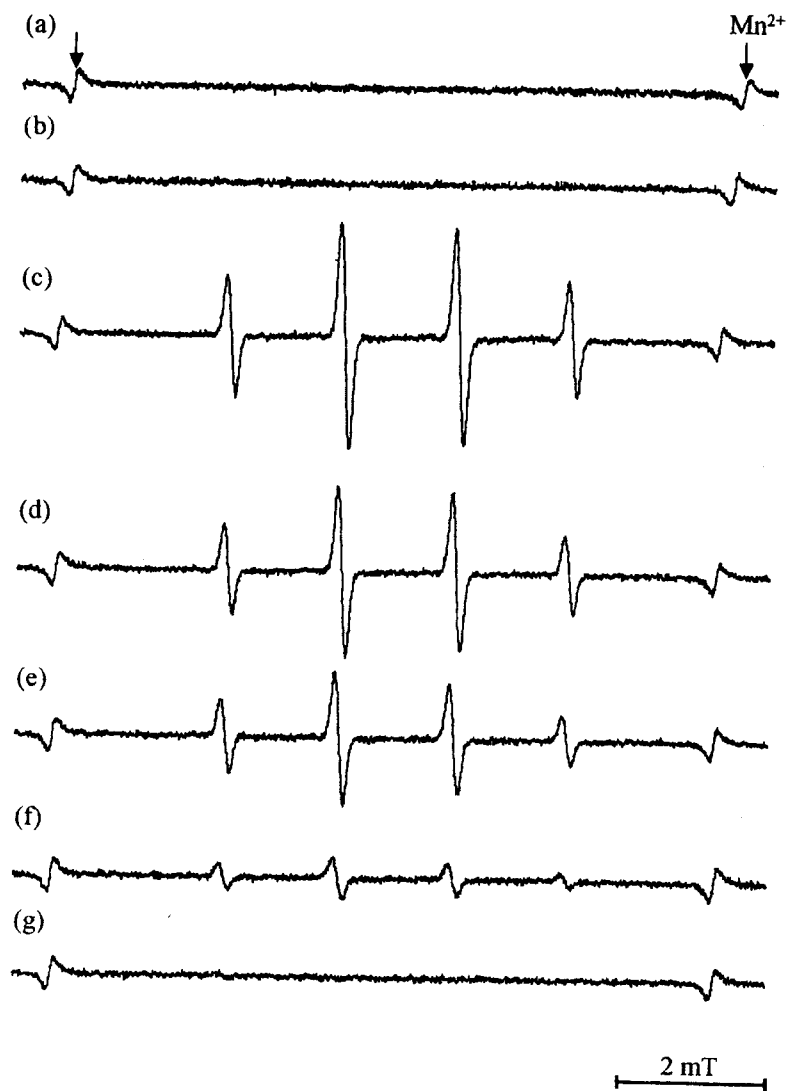


Fig. 1 Spin trapping ESR spectra recorded at 25°C for reaction solutions composed of DMPO, hydrogen peroxide, and papuraru. (a) spectrum recorded for DMPO (20mM) and papuraru (10%), (b) spectrum recorded after addition of hydrogen peroxide (1.0mM) to the solution of (a), (c) spectrum recorded for DMPO (0.5mM) and hydrogen peroxide (1.0mM) after UV irradiation for 2 sec, (d) spectrum recorded by changing papuraru content to 0.1%, (e) 0.5%, (f) 1.0%, and (g) 3.0%. ESR conditions are as follow; microwave power 3.0mW; modulation strength 0.79 μ T; receiver amplitude 300; center field 334.5 mT; sweep width \pm 5 mT; sweep time 2min.

に、照射光量とラジカル濃度には直線関係が認められた。過酸化水素の紫外線分解で生成するDMPO-OHラジカルの濃度は、過酸化水素濃度と照射時間が一定であれば照射光量に比例する。

Clinical Pharmacology and Therapy

次に、黒色のパプラー製剤が照射光量におよぼす影響を評価するために、パプラー製剤の希釈溶液を充たしたESR扁平セルを照度計の検出部分に固定して照射光量の変動を計測した。

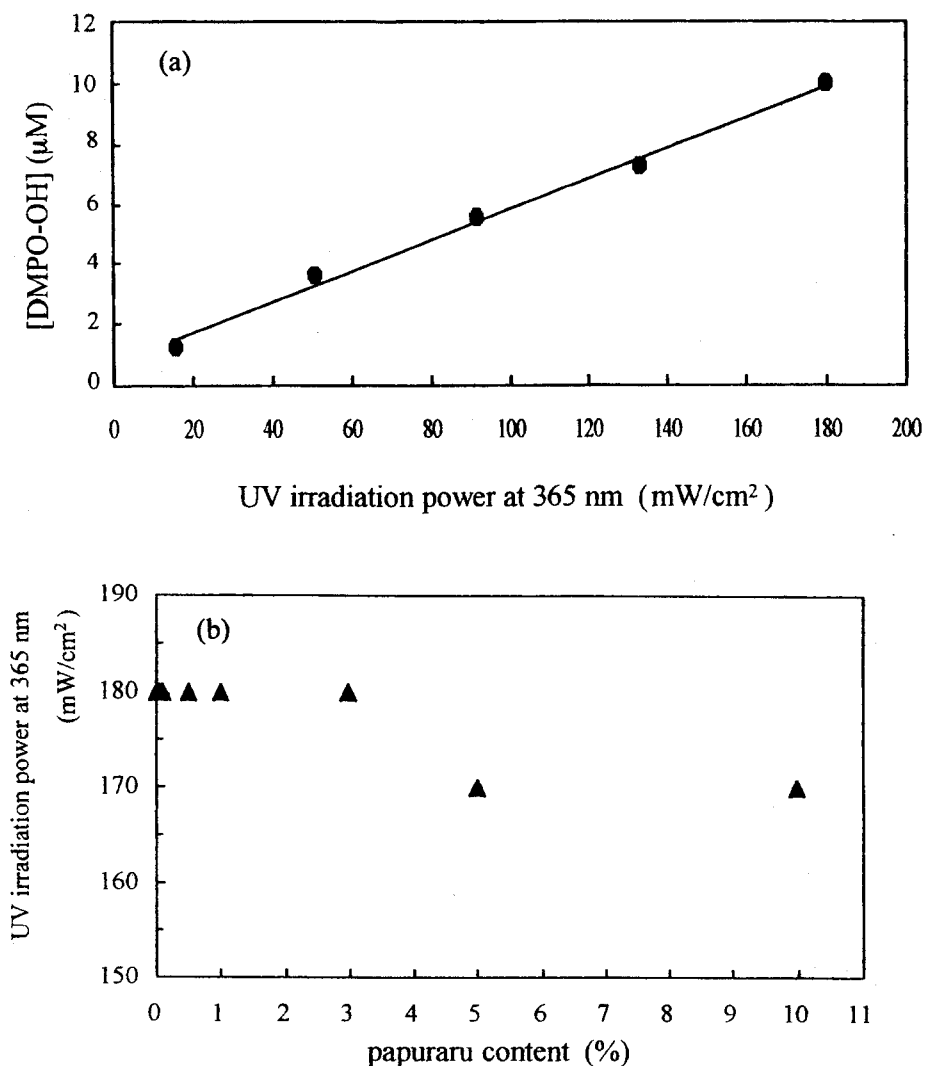


Fig. 2 Plots of UV irradiation power (at 365 nm) and (a) concentration of DMPO-OH radical, and (b) papuraru content in ESR flat cell. The concentration of DMPO-OH radical was recorded after 2 sec UV irradiation to solution of DMPO (20mM) and hydrogen peroxide (1.0mM).

図2-bに示すように、365nmの照射光量はパプラーレ剤の希釈率が3%以下ではほぼ一定値(180mW/cm²)を示した。しかし、希釈率が5%以上では光量が170(mW/cm²)に減少し、DMPO-OHラジカルの生成濃度への影響が無視できない。パプラーレ剤の希釈率が3%以下であれば、DMPO-OHラジカル濃度におよぼすパプラーレの影響は実験誤差範囲内であるから、本

研究ではパプラーレの希釈率の上限を3%とした。

2. ヒドロキシラジカルとパプラーレ剤の反応解析

次に、DMPO(最終濃度0.5mM)と過酸化水素(1.0mM)の溶液にパプラーレ剤(最終希釈率0.1%)を添加した反応溶液に2秒間紫外線

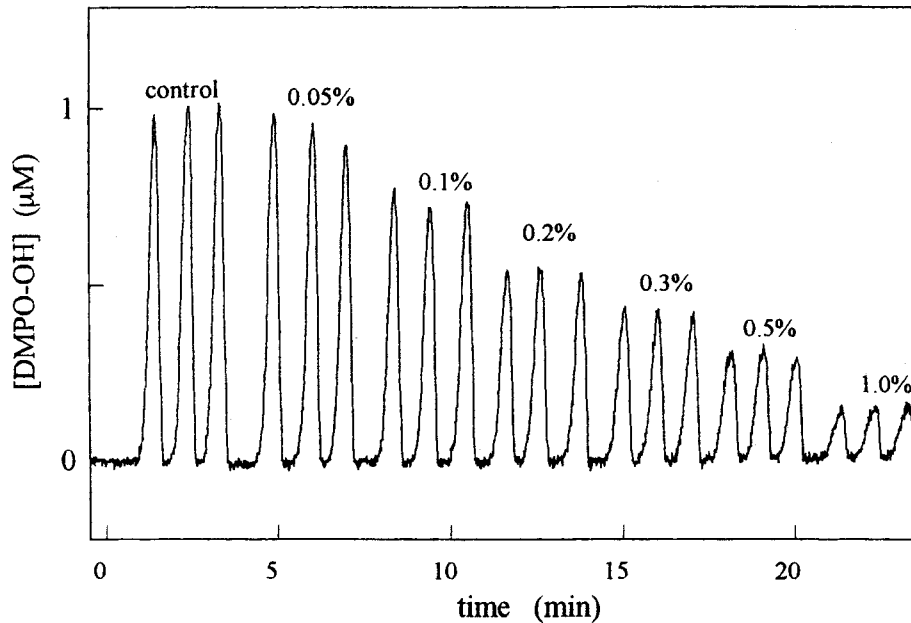


Fig. 3 Flow-injection ESR of DMPO-OH radical observed for reaction mixture containing DMPO (50 μ M), hydrogen peroxide (1.0 mM) and papuraru (0.0 to 1.0 %). FI-ESR conditions are as follow; microwave power 3.0mW; modulation strength 0.79 μ T; receiver amplitude 2000; flow rate 1.0 ml/min; injection volume 200 μ l; data interval 1.0 sec; sampling time 200 μ sec; acquisition number 5000.

を照射してESR測定に供した。DMPO-OHラジカルの信号強度はコントロール溶液に比べて約20%減少した(図1-d)。パプラール製剤の添加量が増えるにつれてDMPO-OHラジカルの信号強度は減少し(図1-d, -e, -f)、パプラール製剤の希釈率が3%でDMPO-OHラジカルの信号はほぼ完全に消失した(図1-g)。DMPO-OHラジカルの濃度がパプラール製剤の希釈率に依存して減少したことは、パプラール製剤のヒドロキシラジカルに対する消去活性を示唆している。

ヒドロキシラジカルに対するDMPOと抗酸化活性物質の競争反応を精度良く評価するには、DMPO初濃度を可能な限り下げる必要がある。そのためには検出感度の優れたFI-ESR法が適している。実験で述べたように、DMPO(50 μ M)と過酸化水素(1mM)の混合溶液200 μ lを流速1.0ml/minのフロー系に注入して観測されたDMPO-OHラジカルの濃度は1.0 μ Mであった(図3)。パプラール製剤の希釈率が0.05から1.0

%の範囲でFI-ESR測定を行うと、DMPO-OHラジカルの強度はパプラール製剤の濃度に依存して減少した。同様のFI-ESR測定をヒドロキシラジカル消去物質であるマニトール、エタノールおよびアスコルビン酸について行った。いずれの消去物質も、添加量に依存してDMPO-OHラジカル濃度が減少した。

考 察

1. パプラール製剤と過酸化水素およびDMPOの反応性

スピントラッピングESR測定法でヒドロキシラジカル消去活性を評価するには、被検物質の特性に合わせてヒドロキシラジカルの生成反応を選択する必要がある。ヒドロキシラジカル生成反応として、過酸化水素の鉄錯体による分解(フェントン反応)¹⁾あるいは紫外線分解反応が多用されている。フェントン反応系に含まれる

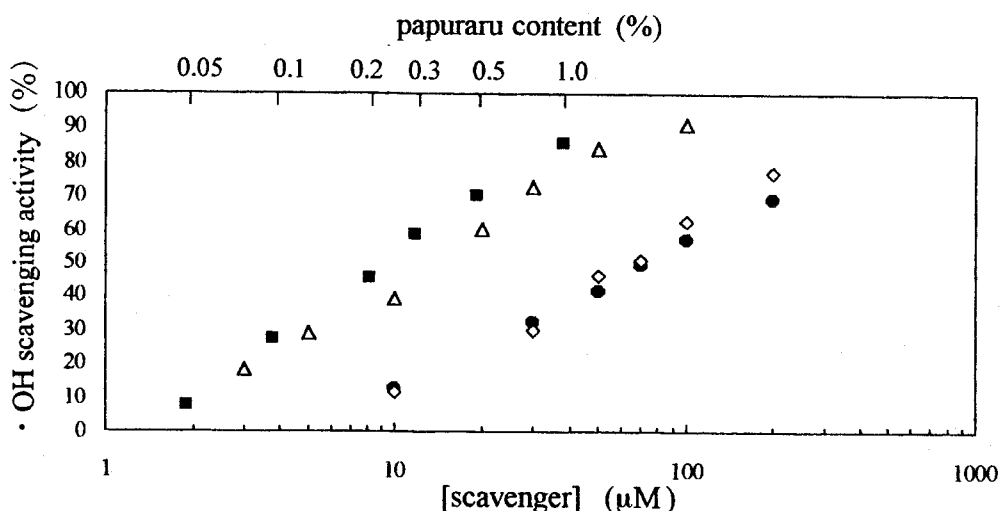


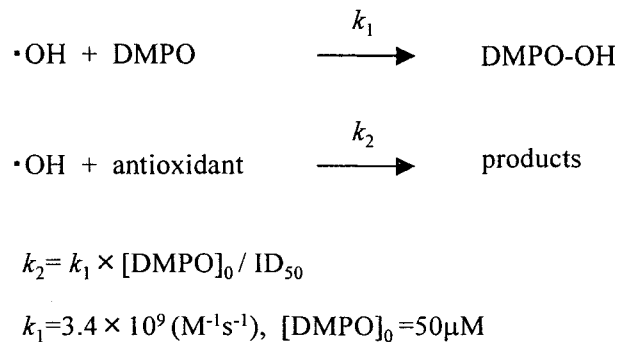
Fig. 4 Plots of hydroxy radical scavenging activity (%). The vertical axis is the ratio of the scavenged DMPO-OH radical (%). The horizontal axis (bottom) is logarithm of the concentration of antioxidants (Δ) ascorbic acid, (\diamond) mannitol, (\bullet) ethanol. The horizontal axis (top) is logarithm of the content (%) of (\blacksquare) papuraru.

鉄イオンに対するキレート試薬は、ヒドロキシラジカルに対して抗酸化活性¹¹⁾を示すだけでなく、パプラール製剤に含まれる金属コロイドの安定性に影響する可能性がある。結果で述べたように、パプラール製剤は短時間の紫外線照射下でラジカル反応に寄与しない。また、パプラール製剤が照射光の光量に及ぼす影響は、本製剤が3%以下に希釈されていれば実験誤差の範囲内である。本研究では過酸化水素の紫外線分解をヒドロキシラジカル生成反応系として選択した。

パプラール製剤の抗酸化活性を正確に評価するには、本製剤とDMPO、過酸化水素およびDMPO-OHラジカルの反応性を検討する必要がある。スピントラッピング試薬であるDMPOは本来鉄イオンに対する呈色試薬であり、金属イオンに対する優れたキレート作用を備えている。たとえば、DMPOは鉄イオンと安定な青色の錯体を形成し、この錯体を經由して非ラジカル反応的にDMPO-OHに水酸化される¹⁵⁾。また、DMPOおよびその誘導体は銅あるいは鉄などの金属単体と強く相互作用する性質がある¹⁶⁾。しかし、図1-aに示したように、パプラール製剤と

DMPOの混合溶液では錯形成を示唆する色調の変化も見られず、DMPO-OH由来のESR信号も観測できなかった。このようにパプラール製剤がDMPOに対して酸化活性を持たないことから、DMPOをパプラール製剤の抗酸化活性評価に適したスピントラッピング試薬として結論した。

パラジウムと白金のコロイド製剤であるパプラール製剤が過酸化水素とのフェントン類似反応でヒドロキシラジカルを生成する可能性がある。結果で述べたように、パプラール製剤と過酸化水素の反応をスピントラッピング法で検討したが、DMPO由来の信号は全く検出できなかった(図1-b)。これは、パプラール製剤が過酸化水素に対して安定で、ヒドロキシラジカルの生成に関与しないことを支持している。他方、過酸化水素はマンガンなどの金属イオンとの反応で酸素に酸化されるが、パプラール製剤と過酸化水素の混合液には酸素の生成は認められなかった。本研究でヒドロキシラジカルの生成源として過酸化水素を選択したことの妥当性が実験的に支持された。



Scheme 2

スピントラッピングESR法ではDMPO-OHラジカルと抗酸化物質の酸化還元反応がしばしば副反応として進行する。たとえば、DMPO-OHラジカルはアスコルビン酸によってヒドロキシシラミン体に還元されて、ESR信号が消失する^{17, 18)}。逆に、酸化反応ではDMPOXと呼ばれる酸化生成物に変化して¹⁵⁾、DMPO-OHとは異なるESR信号を与える。パプラール製剤とDMPO-OHラジカルの反応解析を試みたが、このラジカルの半減期が約30分と短いため¹⁹⁾、定量的な反応解析は実験的に困難である。そこで、DMPO-OHと類似のニトロキシドラジカルであるTEMPOLとパプラール製剤の反応を検討した。実験で述べたように、TEMPOLにパプラール製剤を添加してもそのESR信号強度に有意な変化は観測されず、パプラール製剤はニトロキシドラジカルに対して不活性であった。さらに、パプラール製剤が共存してもDMPO-OHラジカルのESR信号(図1-d, -eおよび-f)の寿命には顕著な減少は認められなかった。この結果は、パプラール製剤はTEMPOLと同様にDMPO-OHラジカルに対しても反応性が低いことを示唆している。

ヒドロキシラジカルのスピントラッピングESR測定では、DMPO-OHラジカルの信号強度が定量的解析の対象である。パプラール製剤がDMPO-OHラジカルの生成あるいは分解反応などの副反応に関与すれば、ヒドロキシラジカル消去活性の正確な評価は難しい。磁場掃引型のESR測定結果(図1)から、パプラール製剤が

これらの副反応を促進する可能性は低いことが判明した。

2. パプラール製剤とヒドロキシラジカルの反応速度評価

DMPOとヒドロキシラジカルの反応は拡散律速($k_1 = 3.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)で進行する早い反応であり、その反応収率はおおよそ100%であることから、DMPO-OHラジカルの濃度は系内で生成するヒドロキシラジカルの濃度に等しいと見なすことができる²⁰⁾。反応系にヒドロキシラジカルと反応する抗酸化物質が共存する場合、スキーム2に示すようなヒドロキシラジカルに対する競争反応が成立する。

ヒドロキシラジカルと抗酸化剤の反応速度定数(k_2)は、DMPOの初濃度($[\text{DMPO}]_0$)と、DMPO-OHラジカル濃度がコントロール値の50%に達する抗酸化剤の濃度(ID_{50})およびDMPOとヒドロキシラジカルの反応速度定数(k_1)から算出できる(スキーム2)²¹⁾。 ID_{50} 値は抗酸化剤濃度の対数値とDMPO-OHラジカル濃度のプロット(ヒドロキシラジカル消去曲線)から解析される。FI-ESR法によるスピントラッピング測定結果(図3)から、パプラール製剤、マニトール、エタノールおよびアスコルビン酸のヒドロキシラジカル消去曲線を得た(図4)。モル濃度が表現できないコロイド溶液であるパプラール製剤については、原液の希釈率に対してDMPO-OHラジカルの濃度をプロットした。比較のために、

Table 1; OH radical scavenging activity of papuraru and relating compounds, estimated by FI-ESR spin trapping measurements for DMPO-OH radical.

antioxidants	ID ₅₀ (μ M)	ID ₅₀ (μ g) in 200 μ l solution	k_2 (M ⁻¹ s ⁻¹)	ref.
papuraru	0.22% ¹	Pd, 0.08, Pt, 0.12	-----	*
Pd(II) ion	80 μ M ²	1.7	2.1 x 10 ⁹	24
Pt(II) ion	140 μ M ²	5.5	1.2 x 10 ⁹	25
Ethanol	70 μ M	----	2.4 x 10 ⁹	*
"			1.8 x 10 ⁹	23
mannitol	70 μ M	----	2.4 x 10 ⁹	*
"			2.7 x 10 ⁹	22
ascorbic acid	15 μ M	----	1.2 x 10 ¹⁰	*
"			1.2 x 10 ¹⁰	23

*, present study. 1) papuraru content in volume %, 2) calculated value from k_2 .

パプラール製剤のヒドロキシラジカル消去曲線では本製剤の希釈率 (%) と、希釈率から換算したパラジウムと白金の総モル濃度が対応している。

図4に示すように、マニトール、エタノールおよびアスコルビン酸のヒドロキシラジカル消去曲線はいずれも類似の線形を示し、それぞれのID₅₀値を70, 70および15 μ Mと解析した。ID₅₀値はDMPOの初濃度に依存して変化するため(スキーム2)文献値と比較できない。スキーム2に示した関係式でヒドロキシラジカルとこれらの抗酸化物質の反応速度定数(k_2)を算出した。マニトールとエタノールの k_2 値はほぼ等しく、 $2.4 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と解析された(表1)。アスコルビン酸の速度定数はこれらに比べておよそ一桁早い $1.2 \times 10^{10} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と評価された(表1)。これらの k_2 値はパルスラジオリシス法で解析された文献値^{22, 23)}と良好な一致が認められ、FI-ESR法とスピントラッピングを組み合わせた本法の有効性が支持された(表1)。

他方、パルスラジオリシス法で求められたパラジウムおよび白金2価イオンとヒドロキシラジカルの k_2 はそれぞれ 2.1×10^9 および $1.2 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と報告されている^{24, 25)}。両金属イオンのヒドロキシラジカル消去活性はアスコルビン酸よりほぼ一桁低いことが分かる。これらの k_2 値を本測定系のID₅₀値に換算すると、パラジウムおよび白金2価イオン錯体の値はそれぞれ80 μ M

および140 μ Mに相当する。パプラール製剤との比較のために、これらの2価イオンが200 μ lの試料溶液に含まれるmg当量を算出すると、それぞれ 1.7×10^{-3} および 5.5×10^{-3} mg当量となる。パプラール製剤のID₅₀値は原液の希釈率として0.22%と解析され(図4)、試料溶液200 μ l中のパラジウムおよび白金コロイド含有量はそれぞれ 0.8×10^{-4} および 1.2×10^{-4} mgである。試料溶液中の含有量を比較すると、パプラール製剤に含まれるパラジウムおよび白金コロイドはそれぞれの2価イオンの1/10量以下で同程度のヒドロキシラジカル消去活性を示す。すなわち、パプラール製剤に含まれるパラジウムおよび白金コロイドは両金属の2価イオンに比べて活性が1桁高い。この結果は、パプラール製剤のヒドロキシラジカル消去活性は、マニトールおよびエタノールを上回り、アスコルビン酸に匹敵する可能性を示唆している。

白金あるいはパラジウムなどの2価イオンヒドロキシラジカルの反応は、ヒドロキシラジカルによる金属イオンの酸化反応として解釈され、3価イオンとヒドロキシイオンを生成する。金属コロイドとヒドロキシラジカルの反応機構は明らかではないが、コロイド表面における酸化還元反応の関与が予測できる。パプラール製剤のヒドロキシラジカル消去反応の機構を明らかにするには、消去活性とコロイド粒子の平均原子

数あるいは粒径との相関について検討する必要がある。今後はFI-ESR法でパプラール製剤とスーパーオキシドラジカル、過酸化脂質ラジカル、あるいはビタミンEラジカル等の生物ラジ

カル種との反応を速度論的に解析し、パプラール製剤に含まれるパラジウムと白金コロイドの薬理作用¹²⁾を分子レベルで解釈する予定である。

文 献

- 1) W. A. Pryor: Free Radicals in Biology, vol. 1, Academic Press, 1982
- 2) G. W. Burton, K. U. Ingold: Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function, *Acc. Chem. Res.*, **19**: 194, 1986
- 3) 重岡成 : 活性酸素・フリーラジカル, **2**: 148, 1991
- 4) 向井和男 : 新しいビタミンE誘導体の合成と生体内における活性酸素除去のメカニズム, *油化学*, **40**: 1063, 1991
- 5) J.M. McCord, I. Fridovich: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049, 1971
- 6) 内山充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編 : 過酸化脂質と生体, 255, 学術出版センター, 1985
- 7) 吉川敏一: フリーラジカルの科学, **65**, 講談社サイエンティフィック, 1997
- 8) J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz: Electron paramagnetic resonance, A Wiley-Interscience Publication, 1994
- 9) E. G. Janzen: Spin trapping, *Acc. Chem. Res.*, **4**: 31, 1971
- 10) C. Lagercrantz: Spin trapping of some short-lived radicals by the nitroxide method, *J. Phys. Chem.*, **75**: 3466, 1971
- 11) Y. Mori, R. Watanabe, S. Sakamoto, N. Endo, S. Nakano, K. Kanaori, H. Takashima, M. Ohkawa and K. Tajima: Flow-injection EPR investigation on OH radical scavenging activity of Gd(III) containing MRI contrast medias, *J. Medicine.*, 2004, in press.
- 12) 曲 暁非: パプラールのラット胃障害モデルに対する効果, *薬理と臨床*, **8**: 215, 1998.
- 13) I. Yamazaki and L. H. Piette: ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ Ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**: 51, 1977
- 14) H. J. Fenton: Oxidation of tartaric acid in presence of iron., *J. Chem. Soc.*, **65**: 899, 1894
- 15) K. Makino, A. Hagi, H. Ide, A. Murakami, and M. Nishi: Mechanistic studies on the formation of aminoxyl radicals from 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in Fenton systems. Characterization of key precursors giving rise to background ESR signals, *J. Can. Chem.*, **70**: 11, 1992
- 16) Private communication from Prof. Dr. K. Makino of Kyoto University.
- 17) The 2nd order reaction rate constant for reduction of DMPO-OH radical by ascorbic acid was estimated to be about $6.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
- 18) Z. Yu, Y. Kotake, E. G. Janzen: Structural dependence of nitroxide spin labels and nitroxide spin adducts on their reducibility by ascorbate ion, *Redox Report*, **2**: 133, 1996
- 19) A. Carmichael, K. Makino, and P. Riesz: Quantitative aspects of ESR and spin trapping of hydroxyl radicals and hydrogen atoms in gamma-irradiated aqueous solutions, *Radiat. Res.*, **100**: 222, 1984
- 20) E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman: Spin trapping kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**: 4994, 1980
- 21) K. Mitsuta, Y. Mitsuta, M. Kohno, M. Hiramatu, A. Mori: The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**: 187, 1990
- 22) B.M. Hoey, J. Butler, B. Halliwell : On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals, *Free Radic. Res Commun.*, **4**: 259, 1988
- 23) G. E. Adams, J.W. Boag, J. Carrant, and B. D. Michael: Absolute rate constants for the reaction of the hydroxyl