

〔原 著〕

ESRスピントラッピング法による
スーパーオキシドラジカル測定法の再評価

金子昌幸, 神田秀治, 竹林義人,
内海 治, 堀川孝明, 土井統雄,
金田英生, 金子和子

東日本学園大学歯学部歯科放射線学講座

(主任：金子昌幸教授)

Reevaluation of ESR Spin Trapping Method
on Superoxide Anion Radicals

Masayuki KANEKO, Shuji KANDA, Yoshito TAKEBAYASHI,
Osamu UTSUMI, Takaaki HORIKAWA, Tsugio DOI,
Eisei KANEDA and Kazuko KANEKO

Department of Dental Radiology,

HIGASHI-NIPPON-GAKUEN-UNIVERSITY School of Dentistry.

(Chief : Prof. Masayuki KANEKO)

Abstract

The optimum concentration of xantine oxidase(XOD), quantity of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO), and time of the hypoxantine-xantine oxidase(HPX-XOD) reaction was reevaluated and discussed to determine the conditions of measurement of superoxide anion radicals(O_2^-) by ESR spin trapping method.

Superoxide radicals were generated from a HPX-XOD reaction system. Sodium phosphate buffer(PH 7.8) was used as a solvent. A solution of 2.0 mM HPX, 5.5 mM diethylene-triamine-pentaacetic acid (DETAPAC), various concentrations (0.1 U/ml~0.5U/ml) of XOD, and various quantities (5.0 μ l~17.5 μ l) of DMPO were prepared. The XOD solution was stored in an ice bath to prevent enzyme inactivation.

Fifty μ l of HPX, 35 μ l of DETAPAC, 50 μ l of PBS, and 15 μ l of DMPO were placed in a test tube. Then, 50 μ l of XOD was added to the mixture. After quick stirring, the measurement of DMPO- O_2^- was carried out using an ESR spectrometer(JEOL JES

-FR80).

A quantitative analysis of DMPO-O₂⁻ was performed by ESR spectrometry under the conditions of center field : 334.5 mT; sweep width: ±5 mT; modulation width: 0.5×0.1 mT; receiver gain: 4.0×100; and time constant: 0.1 sec. The ESR spin was recorded on a spectrometer (JEOL JES-REIX) using an aqueous quartz flat cell (JEL LC-12, inner size 60 mm×10 mm×0.31mm) with an effective volume of 160μl.

After recording, the signal intensity of the lowest field peak of the spectrum was normalized as the relative height against the standard signal intensity of the manganese oxide(MnO) marker.

All results obtained from the present experiment showed that the optimum XOD concentration was 0.3 U/ml, the optimum quantity of DMPO was 15 μl and the optimum time of reaction was within 4 minutes after addition of XOD.

Key words : ESR Spin Trapping Method, Superoxide Anion Radical, Active Oxygen.

はじめに

不対電子を持つ原子または原子団はフリーラジカルと呼ばれている¹⁻³⁾。フリーラジカルは不安定であり、他の原子や原子団から電子一個を奪って電子対を作って安定化するか、他の原子や原子団に不対電子を与えるかして安定化する性質が強い⁴⁾。従って、フリーラジカルは反応性に富み、生体にとっても種々の影響を与えることがあるといわれている。このような性質を持つフリーラジカルの中で、生体と深い関係があるものとして活性酸素が挙げられる⁵⁻⁹⁾。活性酸素は狭義にはスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂⁻)、ヒドロキシルラジカル(・OH)、一重項酸素(¹O₂)および過酸化水素(H₂O₂)の4種を示すが、有機過氧化物や遷移金属イオンの酵素との錯体、アルコキシルラジカル、ペルオキシルラジカルなども、広義の活性酸素として分類されている^{1,8,9)}。これらの活性酸素は反応性が高く不安定なため、生体組織を攻撃して障害をもたらすことが多い¹⁰⁻²⁰⁾。従って、生体に対する酸素の障害を検索するうえで、活性酸素の測定は極めて重要な事項であると考えられる。

これまでのところ、活性酸素の測定は、主としてチトクロームC法^{21,22)}などの分光学的方法によって行われてきたが、近年では電子スピン共鳴装置(以後、ESR装置と略す)を用いたESRスピントラッピング法も用いられ始めている²³⁻⁴⁵⁾。ESRスピントラッピング法はJanzen⁴⁶⁾によって開発されたフリーラジカルの測定方法であり、短半減期の不安定なフリーラジカルをラジカル捕捉剤と反応させることにより、比較的長半減期の安定なラジカルに変換してESR装置で測定する方法である。本法の特徴としては、①生成したフリーラジカルがラジカル捕捉剤によって選択的に捕捉され、スピニアダクトとして測定出来ること、②スピニアダクト量から生成したフリーラジカル量が求められること、③ESRパラメータからフリーラジカル種の同定が可能であること、④フリーラジカルとその消去物質との二次反応速度定数が求められること、などが挙げられる。

しかし、以上に述べたごとくの利点や特徴を有しながら、ESRスピントラッピング法は、これまでのところ、生体成分、特に液体成分の観察にはほとんど用いられていなかった。生体成

分は、60%以上が水であり、ESRによる測定では誘電損失が大きいので正確な値を得ることが出来なかったことも、大きな理由の一つとして挙げられる。しかし、それらの欠点は装置や使用するセルの改良によって、現在では十分に使用し得るようになった。近年になって、生体成分における活性酸素種の測定もようやく盛んになり、そのための種々の検討が成されてきた^{28-33,35,37,41-43}。しかし、それらの報告によるデータは測定技術の相違や薬剤の種類あるいは装置の種類によって細かな相違が認められるのが現状である。

そこで、今回われわれは、活性酸素種の測定に従来から用いられてきた条件が、われわれの実験系においても合致するものか否かを検討することを目的とし、O₂発生系における種々の条件について再検討を加えたので報告する。

材料と方法

O₂の生成は図1に示すごとく hypoxanthine-xanthine oxidase系の反応を利用した。使用した hypoxanthine は Sigma 社, xanthine oxidase (以後, XODと略す) は Boehringer Mannheim 社, diethylene triamine pentaacetic acid (以後, DETAPACと略す) は和光純薬社, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (以後, DMPOと略す) は Labotec 社から購入した。

O₂発生の手順は 0.1M sodium phosphate buffer (Ph=7.8, 以後, PBSと略す) で調整した 2mM hypoxanthine 溶液 50 μ l と 5.5mM DETAPAC 溶液 35 μ l の混合液に原液の DMPO 15 μ l と PBS 50 μ l を混合した溶液を加え、この混合液に PBS で調整した xanthine oxidase 溶液 50 μ l を加えて反応を開始させ、DMPO-O₂アダクトの形で O₂ 相対強度を得ることとした。O₂ の相対強度の測定は XOD 添加後から正確に 1 分後に開始し、反応開始後 3 分以内で終了した。発生した O₂ の測定は図 2 に示す日本電子社製

ESR 装置 (JES-FR80) を用い、表 1 に示す条件で行った。DMPO-O₂アダクトの ESR シグナルは図 3 のごとく 12 本のピークを持つシグナルを示し、それぞれ $a_N=1.4049\text{mT}$, $a_{H\beta}=1.1285\text{mT}$, $a_{H\alpha}=0.1325\text{mT}$, $g=2.0059$ である。得られた ESR スペクトルの相対強度は、同社製定量式デジタルマンガンマーカ (ES-DM1) を用い、図 4 に示すように、Mn の波高 (X) に対する O₂ の波高 (A) との比で表すこととした。O₂ 発生量に及ぼす種々の条件の検討は、①反応時間による O₂ 相対強度の変化、②XOD 濃度による O₂ 相対強度の変化、③DMPO 量による O₂ 相対強度の変化、について行うこととした。反応時間による O₂ 相対強度の変化の測定は、hypoxanthine 濃度 2mM, DETAPAC 濃度 5.5mM, DMPO 量 15 μ l を一定とし、反応時間のみを 1 分, 4 分, 7 分, 10 分, 13 分, 16 分に変化させ、XOD 濃度 0.1U/ml, 0.2U/ml, 0.3U/ml, 0.4U/ml, 0.5U/ml のそれぞれについて、O₂ 相対強度を検討した。

XOD 濃度による O₂ 相対強度の変化は hypoxanthine 濃度 2mM, DETAPAC 濃度 5.5mM, DMPO 量 15 μ l を一定とし、XOD 濃度のみを 0.1U/ml, 0.2U/ml, 0.3U/ml, 0.4U/ml, 0.5U/ml の 5 段階に変化させ、各々の XOD 濃度における O₂ 相対強度を検討した。

DMPO 量の変化による O₂ 相対強度の変化は、hypoxanthine 濃度 2mM, DETAPAC 濃度 5.5mM, XOD 濃度 0.3U/ml を一定とし、DMPO 量のみを 5.0 μ l, 7.5 μ l, 10.0 μ l, 12.5 μ l, 15.0 μ l, 17.5 μ l の 5 段階に変化させ、各々の DMPO 量で得られる O₂ 相対強度を検討した。

結果

(1) 反応時間による O₂ 相対強度の変化

Hypoxanthine-xanthine oxidase 系の反応開始 1 分後から 16 分後までの O₂ 相対強度を表 2 に示し、そのグラフを図 5 に示す。XOD 濃度

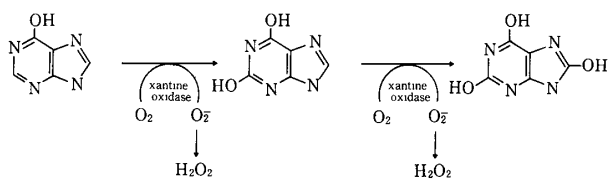


図1 hypoxanthine-xanthine oxidase系の反応によるO₂⁻

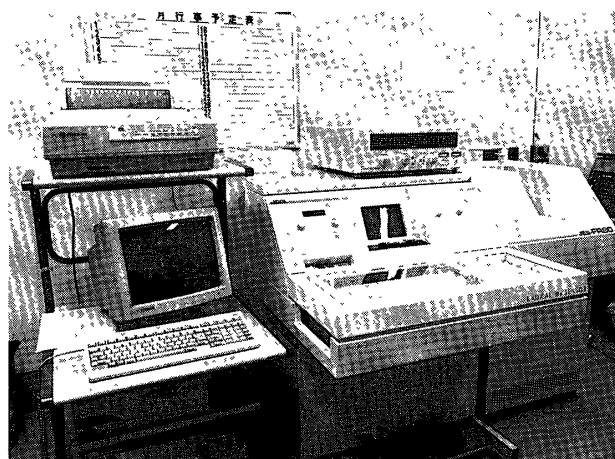


図2 ESR装置 (JEOL, JES-FR80)

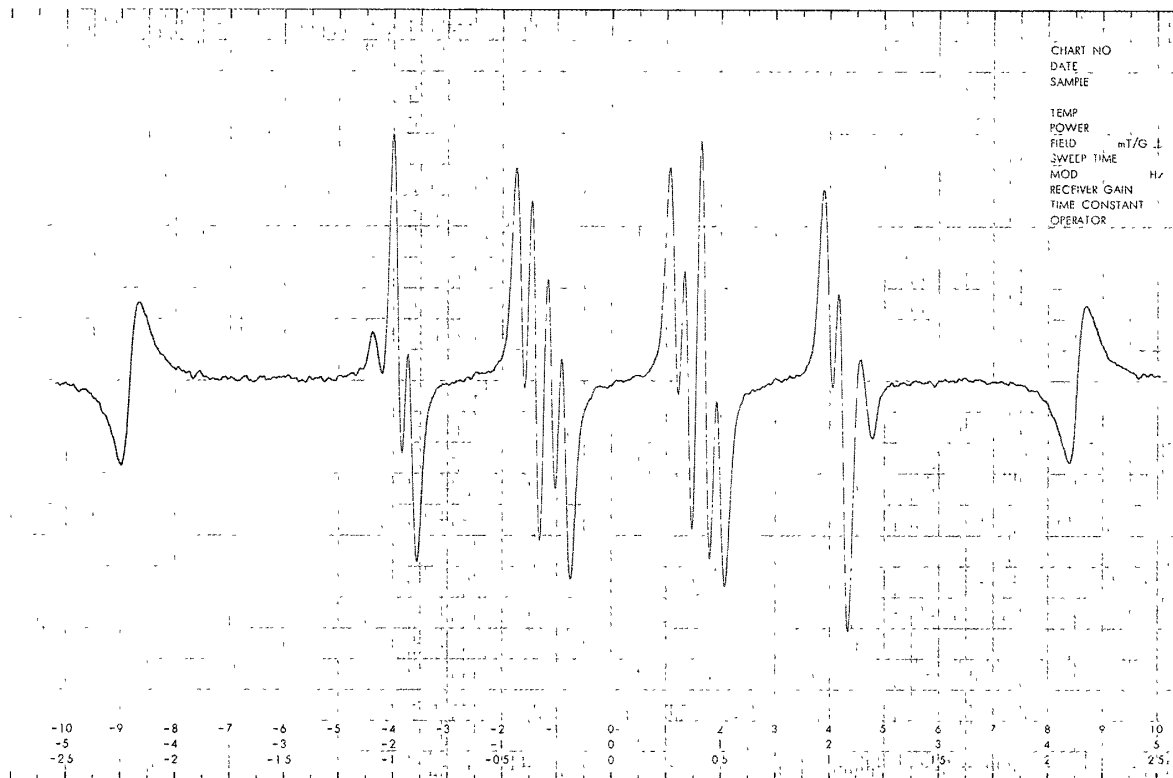


図3 DMPO-O₂⁻のESRスペクトル

表1 ESRの測定条件

マイクロ波周波数	9. 4 0 7 5 GHz
マイクロ波出力	8. 0 mW
磁場掃引幅	3 3 4. 5 ± 5. 0 mT
変調周波数	1 0 0 kHz
磁場変調幅	0. 5 × 0. 1 mT
増幅率	4 × 1 0 0
応答時間	0. 1 秒
測定温度	室温
掃引時間	2 分

0.2U/mlまでは反応開始1分後から4分後までO₂⁻生成は増加を示し、その後16分後までほぼ比例的に減少を示した。XOD濃度0.3U/mlでは1分後から4分後までほぼ等しい発生量を示し、その後は指数関数的に減少することが確認された。XOD濃度0.4U/ml以上では反応開始1分後から急激な減少が指数関数的に認められた。以上の値から、今回の実験系では0.3U/mlのXOD濃度が、測定時間内において、最も安定したO₂⁻生成を呈していることが判明した。

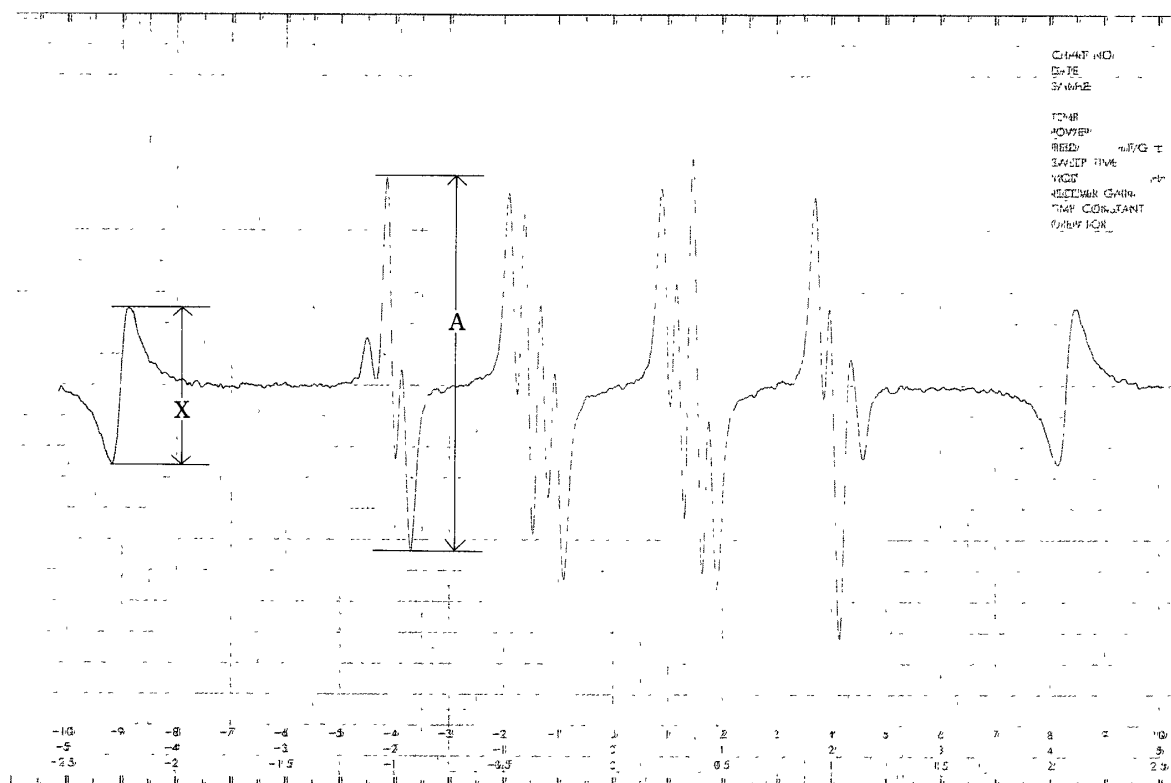


図4 O₂相対強度の求め方

(2)XOD濃度によるO₂相対強度の変化

Hypoxantine 濃度2mM, DETAPAC濃度 5.5mM, DMPO量15μlを一定とし, XOD濃度のみを0.1U/ml~0.5U/mlまで変えて得たO₂相対強度を表3と図6に示す。XOD濃度0.3U/mlまでのO₂相対強度はほぼ直線的に増大し, 比例関係が成り立つことが判明した。以上の結果から, XOD量の測定にこのグラフが検量線として用いられることが確認された。

(3)DMPO量によるO₂相対強度の変化

Hypoxantine濃度2mM, DETAPAC濃度 5.5mM, XOD濃度0.3U/mlを一定とし, DMPO量のみを5.0μl~17.5μlまで変えて得られたO₂相対強度の変化を表4と図7に示す。DMPO量10.0mlまでのO₂相対強度は放物線状増加を示し, 12.5μl以上ではO₂の飽和状態が認められる。従って15μl以上のDMPO量を用いれば, 常に同条件の測定値を得られることが確認された。

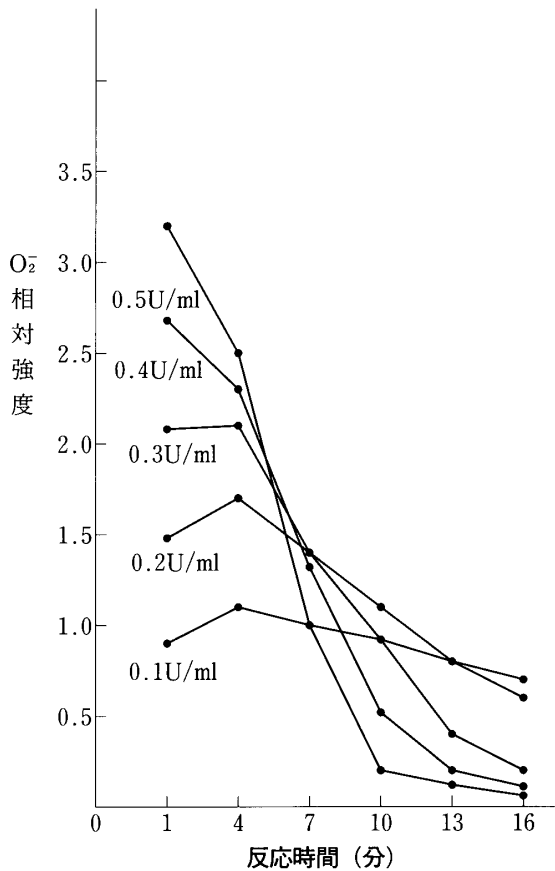
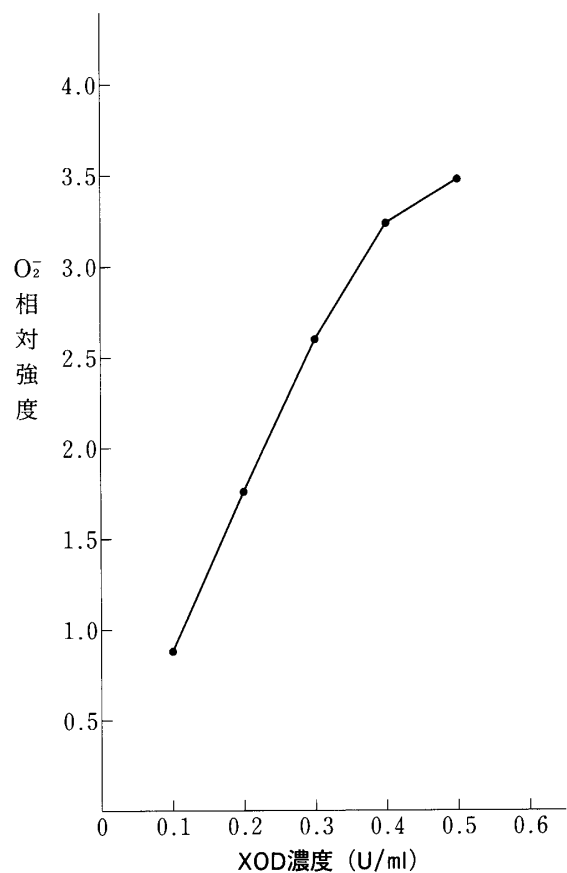
考 察

ESR装置の歯科における利用は比較的古くから行われている⁴⁷⁾。しかし, それらの利用は主として金属成分の同定など, 化学的分野の研究や理工学的分野の研究においての利用であった。1959年になって, 生物学的分野の研究に本

表2 反応時間によるO₂活性の変化

時 間	X O D 濃 度				
	0.1u/ml	0.2u/ml	0.3u/ml	0.4u/ml	0.5u/ml
1 分 後	0.8658	1.4723	2.0844	2.6856	3.1882
4 分 後	1.1388	1.6692	2.0702	2.2942	2.4719
7 分 後	0.9676	1.4469	1.4415	1.2620	1.0071
10 分 後	0.8836	1.1079	0.8763	0.4837	0.2466
13 分 後	0.7857	0.8454	0.4314	0.1775	0.0724
16 分 後	0.7020	0.5753	0.1962	0.0985	0.0524

装置を用いる道が開かれたことにより, これまで未解決の種々の問題を解決することが可能となり, 生体内の複雑な現象の解明に有力な実験的根拠を与えてきた^{48,49-51)}。しかし, 従来の測定法では, 生体成分の60%以上が水分であること

図5 反応時間によるO₂相対強度の変化図6 XOD濃度によるO₂相対強度の変化

から、誘電損失を伴うため、生体組織そのものの測定は困難であった。従って生体成分の観察時には凍結乾燥する方法が好んで用いられてきた^{27,48,49)}。その後、水溶液の測定法として低温測定法や流通測定法、あるいはスピンラベル法などが、種々の研究の目的に合わせて開発されてきた²⁷⁾。ESRスピントラッピング法⁴⁶⁾も比較的新しい液体成分のフリーラジカル測定法の一つである。本法の開発により、これまで観察が不可能であった短半減期のフリーラジカルをラジカル捕捉剤と結合してスピンアダクトを生成

し、比較的長半減期のラジカルとして測定することが可能となった。本法の原理はJanzen⁴⁶⁾によってすでに述べられているものであるが、医学分野の研究や歯学分野の研究に、本格的に応用され始めたのは比較的最近のことである。その後、血球^{34,36-38,42)}や血清^{37,40)}、細菌⁴⁵⁾や炎症³⁰⁾あるいは抗癌剤⁴⁴⁾等の薬物、皮膚³⁹⁾等について種々の報告が成されつつあるが、未だに未解決の分野が多々認められる。

ここで、従来から行われてきたO₂測定法とESRスピントラッピング法による測定の比較について述べる。従来の方法としては、チトクロームC法^{21,22)}や、ニトロブルーテトラゾリウム法(NBT法)⁵²⁾、亜硝酸法⁵³⁾など、種々の分光学的方法がある。これらの方法はすべてが比色定量法であり、O₂を直接測定するものではない。従って、ヘモグロビン等の有色色素を持つ生体成分の測定には不適切であるとともに、

表3 XOD濃度によるO₂活性の変化

XOD濃度	O ₂ 比活性
0.1 U/ml	0.8755
0.2 U/ml	1.7625
0.3 U/ml	2.5900
0.4 U/ml	3.2200
0.5 U/ml	3.4800

浮遊組織やホモジネートなどの測定にも困難をきたすことが多い。これに対してESRスピントラッピング法はフリーラジカルそのものを直接的に測定する方法である。凍結乾燥を行った組織中のO₂を測定する方法と、ラジカル捕捉剤によりスピニアダクトを生成させてO₂を測定す

表4 DMPO量によるO₂活性の変化

DMPO量	O ₂ 比活性
5.0 μl	2.0025
7.5 μl	2.5493
10.0 μl	2.8014
12.5 μl	2.9643
15.0 μl	2.9921
17.5 μl	3.0152

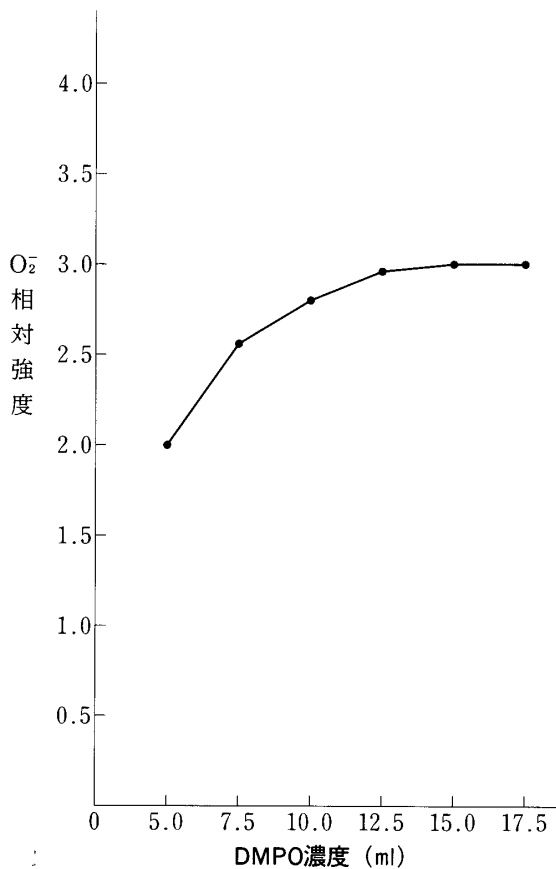


図7 DMPO量によるO₂相対強度の変化

る方法があり、これらの方法によってO₂のより直接的な情報を得ることが可能である。しかし、O₂発生系の問題や測定条件の問題などに、未だ

に解決が成されていない部分が多いのも事実である。現時点では、平松ら³⁰⁾の原法で測定するのが一般的であるが、得られた結果は研究者によって多少の相違が認められる。

今回、われわれが行った再評価でも同様の相違が認められた。即ち、XOD濃度によるO₂相対強度の変化についていえば、河野や³⁵⁾上田ら³³⁾は、XOD濃度が0.2U/mlまでは完全な比例的関係が成立するが、それ以上の濃度ではO₂相対強度の鈍化が現れ始めると述べている。また、平松ら³⁰⁾やMoriら³⁷⁾は、XOD濃度0.4U/mlまで比例的関係が成立すると報告している。われわれが得た結果では、XOD濃度0.3U/mlまでは比例的関係が成立するが、0.4U/ml直前からO₂相対強度の鈍化が見られ、河野や³⁵⁾や上田ら³³⁾の値と平松ら³⁰⁾やMoriら³⁷⁾の値との中間であった。従って、定量的観察は、XOD濃度0.3U/mlまでの範囲が最も適切であるとの結果であった。このような相違は測定技術や方法の相違によるものと考えられるが、DMPOやXODの純度が影響を与えていることも考慮に入れなければならない。元来、他の副産物であった低純度のDMPOも、現在では、ESRスピントラッピング法を目的とした高純度のものが得られることから、これらの結果はいずれもが正しいものと考えられる。以上に述べた先人の報告とわれわれが得た結果を総合すると、現段階では、0.1U/ml～0.4U/mlの間で用いることが最も安定であると思われる。

一方、反応時間によるO₂相対強度の変化については、上田ら³³⁾やMoriら³⁷⁾が報告している。上田ら³³⁾の方法は、hypoxantine濃度を2mM、DETAPAC濃度10mM、DMPO量15μl、XOD濃度0.2U/mlを一定としたものであるが、反応開始3分後までO₂相対強度はほぼ一定であったと報告している。Moriら³⁷⁾は同様の変化について、hypoxantine濃度2mM、DETAPAC濃度5.5mM、DMPO量15μlを一定とし、XOD濃度

0.2U/ml, 0.6U/ml, 0.8U/mlの3段階で検討した。得られた結果は反応開始16分後までは、いずれの場合でも O_2^- 相対強度が増大し、その後減少する傾向にあったと報告している。われわれの実験系においては、XOD濃度0.1U/ml, 0.2U/ml, 0.3U/ml, 0.4U/ml, 0.5U/mlの5段階で O_2^- 相対強度の時間的変化を検討したが、反応開始4分後まで、0.1U/mlならびに0.2U/mlでは増大傾向を示し、0.3U/mlではほぼ一定値を示した。0.4U/mlならびに0.5U/mlでは反応開始1分後から減少するのみの傾向を示した。以上の結果から、測定に最も適した条件は、XOD濃度0.3U/mlで、測定時間は反応開始後4分以内であることが確認された。

次に、DMPO量による O_2^- 相対強度の変化については、上田ら³³⁾が報告している。彼らはXOD濃度0.05U/ml~0.8U/mlの条件下で、DMPO量2.5 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ lの5段階で検討した結果、XOD濃度0.4U/mlまではDMPO量15 μ lで飽和に達して安定するが、0.8U/mlでは飽和に達せず、 O_2^- 相対強度の増大が認められることを確認した。以上のことからDMPO量15 μ l以上であればXOD濃度0.3U/mlの条件下で安定した O_2^- 相対強度が求められることが判明した。われわれもXOD濃度0.3U/mlの条件下でDMPO量を検討した結果、DMPO量12.5 μ l以上で飽和に達し、安定した O_2^- 相対強度が得られるとの結果であった。 O_2^- 相対強度の測定には、正確性を見越しても、DMPO量15 μ lを用いれば十分であることが再確認された。しかし、以上に述べた O_2^- 測定に関する諸条件は、いずれもがhypoxanthine-xantine oxidase系における条件設定であり、生体における条件設定にそのまま用いることは困難である。DMPOそのものの毒性や、生体の代謝あるいは排泄による減衰を考慮に入れなければならない。それらの事項については種々の検討が成されているものの、これからの研究によるところが多いのが現状といえ

る。

結 論

今回われわれは、ESRスピントラッピング法による O_2^- の測定条件を再評価することを目的とし、前述のごとくの検討を行い、以下の結果と結論を得た。

- (1) Hypoxanthine-xantine oxidase系における反応時間の変化による O_2^- 相対強度はXOD濃度0.2U/mlまでの範囲で反応開始4分後まで上昇し、0.3U/mlでは4分後まで一定であった。XOD濃度0.4U/以上では反応開始後から急激な減少が認められた。
- (2) Hypoxanthine-xantine oxidase系におけるXOD濃度の変化による O_2^- 相対強度はXOD濃度0.3U/までの範囲で比例的關係が成り立ち、検量線として用いられることが確認された。
- (3) Hypoxanthine-xantine oxidase系におけるDMPO量の変化による O_2^- 相対強度は、DMPO量12.5 μ l以上で飽和に達することが確認された。

以上の結果から、hypoxanthine-xantine oxidase系における O_2^- 相対強度の測定は、hypoxanthine濃度2mM, DETAPAC濃度5.5mMを一定とすれば、XOD濃度0.3U/ml, DMPO量15 μ l, 測定時間4分以内が最適条件であることが確認された。これらの条件は以後の研究に応用し得るものと考えられる。

参考文献

1. 中野 稔: 酸素毒性. 生化学, 48: 226-257, 1976.
2. 中野 稔: フリーラジカルの測定. 肝胆 16: 201-209, 1988.
3. Pryor, W.A.: フリーラジカル. 小林道夫訳, 共立出版, 東京, 1968.
4. 河野泰久: 生体内フリーラジカル, 活性酸素の消去系: 分布と作用機序. 日本臨床 46: 2130-2137, 1988.

5. 浅田浩二：酸素毒性. 生化学 48：226-257, 1976.
6. 浅田浩二：活性酸素の細胞内生成. 医学のあゆみ 142：717-719, 1987.
7. 浅田浩二：活性酸素の生物に対する作用. 代謝 15：1277-1285, 1978.
8. 徳丸克己編：酸素の化学. 共立出版, 東京, 1973.
9. 二木鋭雄：活性酸素 (八木国夫, 中野 稔監修). 医歯薬出版, 東京, 1987, pp. 1-32.
10. 小林正夫：炎症における食細胞活性酸素の役割. 医学のあゆみ 142：726-728, 1987.
11. 赤松 誠, 土屋雅春：微小循環障害における活性酸素の関与. 医学の歩み 142：729-732, 1987.
12. 児玉昌彦：普遍的発癌因子としての活性酸素. 医学のあゆみ 142：733-735, 1987.
13. 伊藤 誠：消化管粘膜障害と活性酸素. 医学のあゆみ 142：736-738, 1987.
14. 石井裕正, 加藤真三：肝障害の成因における活性酸素の関与. 医学のあゆみ 142：739-741, 1987.
15. 水島 裕：炎症と抗炎症. 日本臨床 46：2203-2207, 1988.
16. 八木国夫：フリーラジカル・過酸化脂質と疾病. 日本臨床 46：2174-2178, 1988.
17. 吉川敏一, 近藤元治：消化管疾患. 日本臨床 46：2241-2245, 1988.
18. 宮地好樹：皮膚疾患. 日本臨床 46：2252-2256, 1988.
19. 児玉雅彦：発癌, 抗癌剤の効果. 日本臨床 46：2257-2261, 1988.
20. 湯川修身, 中沢 透：放射線障害. 日本臨床 46：2262-2268, 1988.
21. McCord, J.M., and Fridovich, I. : Superoxid dismutase. J Biol Chem 244：6049-6055, 1969.
22. McCord, J.M., and Fridovich, I. : The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. J Biol Chem 244：6056-6063, 1969.
23. Harbour, J.R., chow, V., and Bolton, J. R. : An electron spin resonance study of the spin adducts of OH and HO₂ radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions. Can J Chem 52：3549-3553, 1974.
24. Janzen, E.G., Nutter, D.E.Jr., Davis, E. R., and Blackburn, B.J. : On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. Can J Chem 56：2237-2242, 1978.
25. Janzen, E.G. : Free radicals in biology. Vol. IV., ed. by Pryor, W.A., Academic Press, New York, 1980, pp. 115-154.
26. McGay, P.B., Noguchi, T., Fong, K.L., Lai, E.K., and Poyer, J.L. : Free radicals in biology. Vol. IV., ed. by Pryor, W.A., Academic Press, New York, 1980. pp. 154-186.
27. 石津一彦編集：実用ESR入門. 講談社, 東京, 1981, pp. 91-137.
28. 手老省三, 池上雄作, 中野 稔：医学および生物学者のための活性酸素ラジカルのスピントラップ法. 炎症 5：3-13, 1985.
29. 西川弘恭：代謝研究とその周辺の先端技術(A). 代謝 23：465-473, 1986.
30. 平松 緑, 河野雅弘：ESRによるSuperoxide Dismutase活性測定法の開発. 日本電子ニュース 26：106-109, 1986.
31. Hiramatsu, M., and Kohno, M. : Determination of superoxide dismutase activity by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. JEOL News 23A：7-9, 1987.
32. 手老省三：. 蛋白質, 核酸, 酸素 33：2693-2698, 1988.
33. 上田 浩, 秋山正康, 鍵山明浩, 申 浩, 小路高史, 三森史朗, 小倉良平, 河野雅弘：電子スピン共鳴(ESR)スピントラッピング法による superoxide anion (O₂⁻) 定量法の検討. 久留米医学会雑誌 51：1032-1038, 1988.
34. 谷川 徹, 吉川敏一, 宮川春雄, 上田茂信, 竹村俊樹, 田井中憲三, 森田 豊, 伊谷憲次, 吉田憲正, 杉野 茂, 近藤元次：ESRを用いたヒト抹消多形核白血球のsuperoxide生産能の測定とその臨床応用. 炎症 8：443-477, 1988.
35. 河野雅弘：ESR法によるスーパーオキシドの分析. Laboratory and Clinical Practice 7：65-71, 1989.
36. Ueno, I., Kohno, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Kanegasaki, S. : Reevaluation of the spin-trapping adduct formed from 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide during the respiratory burst in neutrophils. J Biochem 105：905-910, 1989.

37. Mori, M., Hashizume, N., Suzuki, M. and Kawamura, K.: Superoxide dismutase activity in serum and plasma measured by electron spin resonance spectrometry. *Dokkyo J Med Sci* 16: 103-109, 1989.
38. 内藤裕二, 吉川敏一, 谷川 徹, 小山田裕一, 上田茂信, 竹村敏樹, 杉野 茂, 近藤元次, 牧野圭祐: スピントラッピング法を用いたヒト抹消多形核白血球のスーパーオキシド産生能の測定—刺激剤の相違による検討—. *炎症* 9: 323-327, 1989.
39. 山岸玲子, 市原 隆, 永野剛造, 上出良一: Electron spin resonanceスピントラッピング法による健常皮膚superoxide dismutase活性の測定. *日皮会誌* 99: 163-165, 1989.
40. 工藤秀機, 神白和正, 原 律子, 間宮智子, 大場さとえ, 水田幸男, 河野雅弘: 輸血用血液中の過酸化脂質量とスーパーオキシドジスムターゼ様活性に与える保存の影響. *Medical Postgraduates* 28: 153-157, 1990.
41. Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohno, M., Hiramatsu, M. and Mori, A.: The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull Chem Soc Jpn* 63: 187-191, 1990.
42. 上野郁子, 金ヶ崎士朗: ESRスピントラッピング法によるフリーラジカル測定法の原理と実際—特に酸素ラジカルの測定について—. *日本細菌学雑誌* 45: 653-663, 1990.
43. Kohno, M., Yamada, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Yoshikawa, T.: Spin trapping studies on the reaction of iron complexes with peroxide and the effects of water-soluble antioxidants. *Bull Chem Soc Jpn* 64: 1447-1453, 1991.
44. 木村博人: プレオマイシン類のフリーラジカル生成増強作用に関する研究. *口科誌* 40: 291-301, 1991.
45. Akaike, T., Sato, K., Ijiri, S., Miyamoto, Y., Kohno, M., Ando, M. and Maeda, H.: Bactericidal activity of Alkyl peroxy radicals generated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch Biochem Biophys* 294: 55-63, 1992.
46. Janzen, E.G.: Spin trapping. *Acc Chem Res* 4: 31-40, 1971.
47. 古本啓一: 電子スピン共鳴の生物学への応用. *歯学* 55: 433-444, 1968.
48. 玉沢 修: 放射線と制癌剤(Bleomycin)の併用効果に関する研究. *歯学* 59: 305-323, 1971.
49. 北村信安: 実験的ハムスター舌癌における放射線とプレオマイシンの併用効果に関する基礎的研究. *歯学* 66: 21-36, 1979.
50. 鈴木 貢: 顎嚢胞の増大因子. *炎症* 4: 43-45, 1984.
51. 岩崎みどり, 島野達也, 三木俊克, 池谷元伺: 歯のESRによる被曝線量測定の基礎的検討 (第1報). *歯放* 26: 218, 1986.
52. Ponti, V., Dianzani, M.U., Cheeseman, K., and Slater, T.F.: Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem Biol Interaction* 23: 281-291, 1978.
53. 大柳善彦: SOD活性測定亜硝酸法とそのキット化. *炎症* 4: 63-73, 1984.