

〔原 著〕

放射線照射ヒト血清から発生する活性酵素種に  
対するエピネフリン含有塩酸リドカインの影響

金田 英生

北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

(主任：金田 英生)

The role of local anesthetics as a radical  
scavenger against HO· and H· generated  
from the irradiated human serum

Eisei KANEDA

Department of Dental Radiology, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Prof. Eisei KANEDA)

**Abstract**

This study was carried out using the ESR spin trapping technique to examine whether lidocaine hydrochloride with epinephrine (LHE), one of the best used regional anesthetics in dentistry, could scavenge hydroxyl radicals (HO·) generated in the irradiated human serum, and to clarify, as quantitatively as possible, the relationship between the various concentration of LHE added into the reaction system and its scavenging abilities at each concentration.

One hundred  $\mu\text{l}$  of human serum was irradiated with 0.5Gy of X-ray radiation under the coexistence of 35 $\mu\text{l}$  of DETAPAC, 50 $\mu\text{l}$  of various concentration of LHE, and 15 $\mu\text{l}$  of DMPO. ESR spectra obtained at each concentration were recorded. The signals were identified by obtaining their hyperfine coupling constants (hfcc) and, then, normalized as the relative signal intensities (RSI) against the standard signal intensity of manganese oxide marker. These RSI obtained were plotted and compared.

The results showed that LHE could play the role of radical scavenger against HO·, and that the scavenging ability of LHE was depending on its concentration.

**Key words :** hydroxyl radical, hydrogen radical, radical scavenger, regional anesthetic, ESR spin trapping technique

## 緒 言

日常の歯科臨床で最も広く用いられているエピネフリン含有塩酸リドカインは（以後含エピネフリン塩酸リドカインと略す）は毒性が小さく、持続時間も比較的長いことから、欠くことのできない歯科用麻酔薬であるとみなされている<sup>1)</sup>。通常は73.8mM溶液として用いられ、70 $\mu$ Mのエピネフリンが血管収縮剤として添加されている。図1に示す如くりドカインそのものは構造式中に2つのメチル基と2つのエチル基を有するアミド型を成し、含まれるエピネフリンは1つのメチル基を有するカテコールアミンである。従って、これらの基が生体内で遊離すれば、溶存酸素と反応してアルコキシラジカル( $\text{LO}\cdot$ )やペルオキシラジカル( $\text{LOO}\cdot$ )の発生を惹起する可能性を否めない。また、生体では、構成成分として脂質が存在するので脂質由来のアルキル基が遊離し、溶存酸素と反応して、脂質アルコキシラジカルや脂質ペルオキシラジカルを発生する可能性が考えられる<sup>2-5)</sup>。これらのラジカルは反応性が大きく、過酸化脂質の発生に重要な役割を成していると考えられている<sup>6)</sup>。

一方、放射線によって、生体の水分子からヒ

ドロキシラジカル( $\text{HO}\cdot$ )と水素ラジカル( $\text{H}\cdot$ )が発生する<sup>7-10)</sup>。ヒドロキシラジカルは拡散律速に近い早さで反応することから生体中の成分と種々の反応を経由して過酸化脂質の形成を惹起すると考えられている。従って、この系に塩酸リドカインやエピネフリンが共存すれば、発生するヒドロキシラジカルに何らかの影響を与えるものと考えられる。日常の歯科診療では、局所麻酔下でのエックス線撮影を避けることが不可能なケースも多く、エックス線照射によるラジカル発生と麻酔薬によるラジカル発生との関係を検討することが極めて重要であると考えられる。しかし、全身麻酔薬については活性酸素発生のみから比較的多くの報告が認められる<sup>11-28)</sup>ものの、歯科用麻酔薬として用いる塩酸リドカインについての検索は、臨床的見地からのみ成されているのがほとんどであり、ラジカルの発生と関連づけたものは1件も見あたらないのが現状である。

本研究では、含エピネフリン塩酸リドカインが、放射線照射ヒト血清から発生する活性酸素種に、どのような影響を与えるかを検索することを目的とし、発生する活性酸素種の同定と発生量の変化をESRスピントラップ法で測定した。

## 材料および方法

フリーラジカルの発生はヒト血清（当教室にて凍結保存）100 $\mu$ l, DETAPAC (diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid) (和光純薬)35 $\mu$ l, DMPO(5,5-dimethylpyrrolidine-1-oxide) (Labotec)15 $\mu$ lならびに各種濃度の塩酸リドカイン(和光純薬), エピネフリン(和光純薬),あるいは含エピネフリン塩酸リドカインの中の一つ50 $\mu$ lの混合液に0.5Gyのエックス線照射を行って発生することとした。なお、

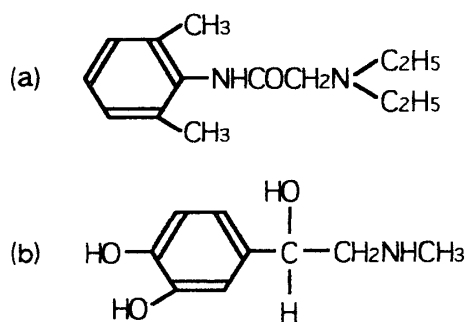


図1 リドカインとエピネフリンの構造式  
(a)リドカイン (b)エピネフリン

対照にはリン酸緩衝液(以後PBSと略す)(関東薬品)をこの系に使用した。

エックス線照射は、軟X線発生装置(Sofron BST-1505CX, 綜研)を用い、管電圧60kVp, 管電流3mA, 線量率0.5Gy/min, 半価層0.32mmAl, 照射時間1min, 距離30cmの条件下で行った。

ラジカルの同定と発生量の測定はESR装置(JES FR-80, 日本電子)を用い、ESRスピントラップ法によって行うこととした。ESRによる測定は、出力8mW, 周波数9.45GHz, 中心磁場334.5mT, 掃引幅 $\pm 7.5$ mT, 変調幅 $0.5 \times 0.1$ mT, 感度 $4 \times 100$ , 時定数0.1sec, 掃引時間2min, 測定温度は室温の条件下で行った。

ラジカル量はDMPOとラジカルが結合したアダクトの信号強度を測定し、標準として用いたMnO $\cdot$ の信号強度との比, すなわち, 相対信号強度(relative signal intensity, 以後RSIと略す)として求めた。エックス線照射は混和後30秒で開始し, 照射終了後1分からESRによる測定を開始した。掃引時間を2分とし, 混和から測定終了までの時間を正確に3分30秒で一定として測定を行った。

ESRスピントラップ法による検索は, 1. 放射線照射ヒト血清から発生するラジカルの同定と定量, 2. 塩酸リドカイン単独添加時に発生するラジカルの同定と定量, 3. エピネフリン単独添加時に発生するラジカルの同定と定量, 4. 含エピネフリン塩酸リドカイン添加時に発生するラジカルの同定と定量, 5. 含エピネフリン塩酸リドカイン中のエピネフリン濃度の変化によるラジカル発生量への影響, について行うこととした。

1~5における照射線量は常に0.5Gyで一定とした。2の塩酸リドカイン単独添加時には, 濃度をそれぞれ $3.7 \times 1$ ,  $3.7 \times 2$ ,  $3.7 \times 4$ ,  $3.7 \times 6$ ,  $3.7 \times 8$ ,  $3.7 \times 10$ ならびに $3.7 \times 20$ mMとしPBS添加のみを対照群とした。3のエピネ

フリン単独添加群では, 濃度をそれぞれ $3.5 \times 1$ ,  $3.5 \times 2$ ,  $3.5 \times 4$ ,  $3.5 \times 6$ ,  $3.5 \times 8$ ,  $3.5 \times 10$ ならびに $3.5 \times 20 \mu$ Mとし, 無添加の対照と比較することにした。4の含エピネフリン塩酸リドカイン添加群では, 臨床的に用いる塩酸リドカインが一般に2%, すなわち $3.7 \times 20$ mMであることから, 塩酸リドカインの濃度を $3.7 \times 20$ mMで一定とし, 含まれるエピネフリン濃度のみを $3.5 \times 1$ ,  $3.5 \times 2$ ,  $3.5 \times 4$ ,  $3.5 \times 6$ ,  $3.5 \times 8$ ,  $3.5 \times 10$ ならびに $3.5 \times 20 \mu$ Mと変化させ, PBS添加のみの対照とした。

なお, 本実験に先立ち予備実験として, 無照射PBSならびに無照射ヒト血清に対する塩酸リドカイン, エピネフリンならびに含エピネフリン塩酸リドカインの影響を検索し, 照射ヒト血清群に対する対照とした。予備実験では, 日常の臨床で用いる塩酸リドカイン濃度( $3.7 \times 20$ mM)ならびにエピネフリン濃度( $3.5 \times 20 \mu$ M)における影響を見ることとし, 塩酸リドカイン単独添加時, エピネフリン単独添加時ならびに含エピネフリン塩酸リドカイン添加時について検討した。

また, 発生するラジカルの由来を検索するために, アミド型麻酔薬とエステル型麻酔薬との比較, 不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸との比較, ならびに添加するカテコール類ならびにアミド類の相違による比較を行うこととした。アミド型麻酔薬としては塩酸リドカイン, 塩酸メピバカインならびに塩酸ジブカインを, エステル型麻酔薬としては塩酸テトラカインならびに塩酸プロカインを使用した。各麻酔薬の濃度は臨床に用いる濃度とし, それぞれにエピネフリンを含有させて用いた。不飽和脂肪酸はリノール酸を, 飽和脂肪酸はステアリン酸を, それぞれ50mMの濃度で用い, 含エピネフリン塩酸リドカインの添加時について検討した。カテコール類は芳香環に2つのHO基を持つエピネフリンならびにピロカテコールと, HO基のかわりに2つの

水素を持つエフェドリンならびにプロパミンを塩酸リドカインに含有させて検討することとし、ハイドロキノンについても同様の比較を行うこととした。

## 結 果

### 1 予備実験の結果

#### 1) 無照射PBS群に対する歯科用麻酔薬の影響

(1)無添加群：無添加群では図2-(a)に示す如くの、4本線のピークを示すシグナルが認められた。超微細結合定数 $aN=1.5000\text{mT}$ 、 $aH\beta=1.5000\text{mT}$ が得られたことから、このシグナルはDMPO-OHに由来すると同定された<sup>29,30)</sup>。RSIは $0.103\pm 0.021$ であった(表1-a)。

(2)塩酸リドカイン ( $3.7\times 20\text{mM}$ ) 単独添加群：塩酸リドカイン単独添加群では図2-(b)に示す如くの、無添加群と比較すればやや弱い4本線のピークを示すシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.5000\text{mT}$ 、 $aH\beta=1.5000\text{mT}$ を得たことからDMPO-OHであると同定され

表1 無照射PBSにおけるラジカルの発生量

条件/RSI	HO・/Mn <sup>++</sup>
(a)無添加群	$0.103\pm 0.021$
(b)塩酸リドカイン添加群	$0.094\pm 0.049$
(c)エピネフリン添加率	$0.130\pm 0.014$
(d)含エピネフリン 塩酸リドカイン添加群	$0.164\pm 0.022$

平均±標準偏差  
(n = 5)

た<sup>29,30)</sup>。RSIは $0.094\pm 0.049$ であり、無添加群と比較すればやや低値であるものの標準偏差の範囲内であった(表1-b)。

(3)エピネフリン ( $3.5\times 20\mu\text{M}$ ) 単独添加群：エピネフリン単独添加群では図2-(c)に示す如く、4本のピークを示すシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.5000\text{mT}$ 、 $aH\beta=1.5000\text{mT}$ であることからDMPO-OHのシグナルであると同定され<sup>29,30)</sup>、相対信号強度は $0.130\pm 0.014$ であった(表1-c)。無添加群ならびに塩酸リドカイン単独添加群に比べればやや高値を示すものの、標準偏差の範囲内に含まれる値であった。

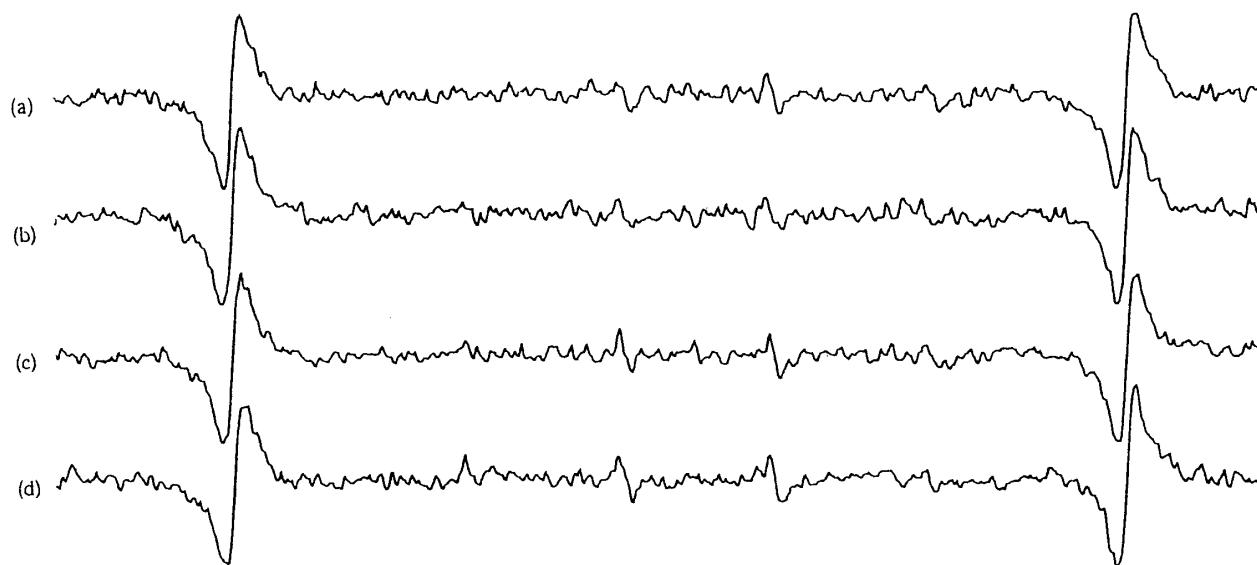


図2 歯科用麻酔薬添加無照射PBS群から得られたESRスペクトル

- (a)無添加(対照)群
- (b)塩酸リドカイン ( $3.7\times 20\text{mM}$ ) 単独添加群
- (c)エピネフリン ( $3.5\times 20\mu\text{M}$ ) 単独添加群
- (d)含エピネフリン ( $3.5\times 20\mu\text{M}$ ) 塩酸リドカイン ( $3.7\times 20\text{mM}$ ) 添加群

(4)含エピネフリン (3.5×20μM) 塩酸リドカイン (3.7×20mM) 添加群：含エピネフリン塩酸リドカイン添加群では図2-(d)に示す如く、無添加群、塩酸リドカイン単独添加群ならびにエピネフリン単独添加群に比べてやや強いピークを示す4本線のシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.5000mT$ 、 $aH\beta=1.5000mT$ が得られたことから、このシグナルはDMPO-OHに由来すると同定された<sup>29,30</sup>。相対信号強度は $0.164\pm0.022$ であり(表1-d)、前三者に比較してやや高値であったが、標準偏差の範囲内であることが確認された。

2) 無照射ヒト血清群に対する歯科用麻酔薬の影響

(1)無添加群：無添加群では図3-(a)に示す如くの、4本線のピークを示す弱いシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.5000mT$ 、 $aH\beta=1.5000mT$ が得られたことからDMPO-OHに由来するシグナルであると同定された<sup>29,30</sup>。RSIは $0.116\pm0.024$ であった(表2-a)。

(2)塩酸リドカイン (3.7×20mM) 単独添加

表2 無照射ヒト血清におけるラジカルの発生量

条件/RSI	HO·/Mn <sup>++</sup>
(a)無添加群	0.116±0.024
(b)塩酸リドカイン添加群	0.104±0.017
(c)エピネフリン添加群	0.155±0.054
(c)含エピネフリン 塩酸リドカイン添加群	0.757±0.130
平均±標準偏差 (n = 5)	

群：塩酸リドカイン単独添加群では図3-(b)に示す如くの、4本線のピークを示す弱いシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.5000mT$ 、 $aH\beta=1.5000mT$ が得られたことからDMPO-OHに由来するシグナルであると同定された<sup>29,30</sup>。RSIは $0.104\pm0.017$ であり(表2-b)、無添加群に比べてやや低値を示すものの標準偏差内であった。

(3)エピネフリン (3.5×20μM) 単独添加群：エピネフリン単独添加群では図3-(c)に示す如くの4本線のピークを示す弱いシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.5000mT$ 、 $aH\beta=1.5000mT$ が得られたことからDMPO-OHに

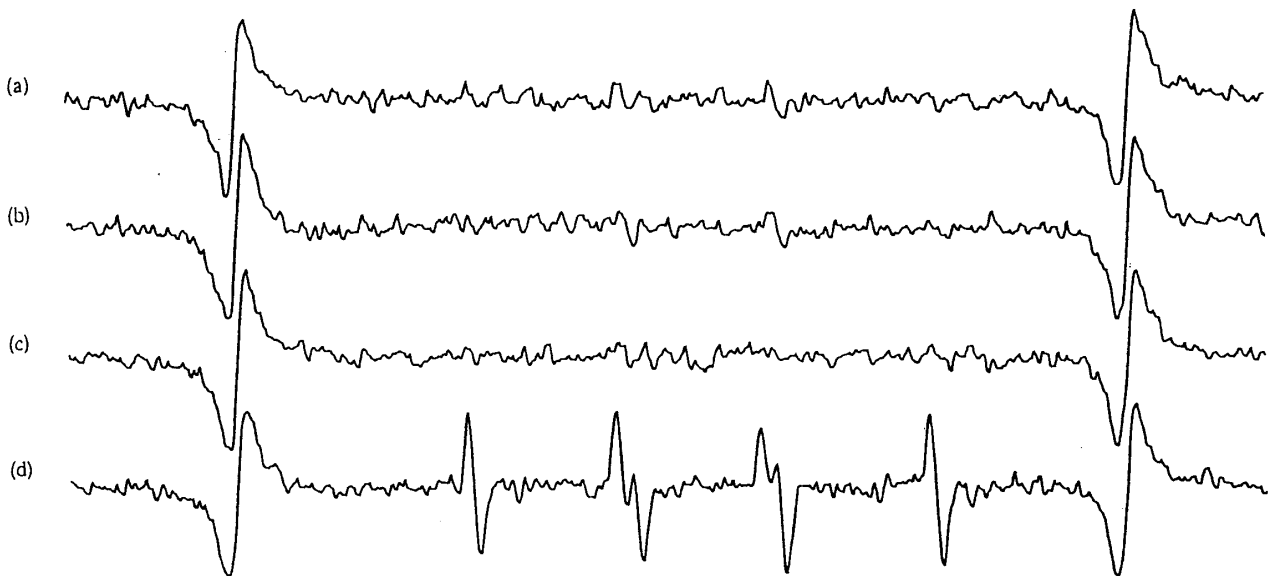


図3 歯科用麻酔薬添加無照射ヒト血清から得られたESRスペクトル  
 (a)無添加(対照)群  
 (b)塩酸リドカイン (3.7×20mM) 単独添加群  
 (c)エピネフリン (3.5×20μM) 単独添加群  
 (d)含エピネフリン (3.5×20μM) 塩酸リドカイン (3.7×20mM) 添加群

由来するシグナルであると同定された<sup>29,30</sup>。RSIは $0.155 \pm 0.054$ であり(表2-c), 無添加群ならびに塩酸リドカイン単独添加群に比較すればやや高値ではあるが, 標準偏差内であった。

(4)含エピネフリン ( $3.5 \times 20 \mu\text{M}$ ) 塩酸リドカイン ( $3.7 \times 20 \text{mM}$ ) 添加群: 含エピネフリン塩酸リドカイン添加群では, 図3-(d)に示す如くの6本線のピークを示す強いシグナルを認める。超微細結合定数 $aN=1.4750 \text{mT}$ ,  $aH\beta=1.5938 \text{mT}$ が得られたことからDMPO-OLに由来するシグナルであると同定された<sup>29,31</sup>。RSIは $0.757 \pm 0.130$ であり(表2-d), 無添加群, 塩酸リドカイン単独添加群ならびにエピネフリン単独添加群に比較して極めて高値を示した。またDMPO-OHのシグナルの確認は不可能であった。

3) 無照射ヒト血清群に対する含エピネフリン塩酸リドカインのエピネフリン濃度の影響

塩酸リドカイン濃度を $3.7 \times 20 \text{mM}$ で一定とし, エピネフリン濃度のみを $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ に変化して得られたESRスペクトルを図4に示す。最上段のスペクトル(a)はエピネフリン無添加の対照で得られたものであり, 2段目から8段目までのスペクトルは, それぞれ,  $3.5 \times 1$  (b),  $3.5 \times 2$  (c),  $3.5 \times 4$  (d),  $3.5 \times 6$  (e),  $3.5 \times 8$  (f),  $3.5 \times 10$  (g)ならびに $3.5 \times 20 \mu\text{M}$  (h)の添加時に得られたものである。対照の無添加群(a)から $3.5 \times 2 \mu\text{M}$  (c)添加の範囲ではDMPO-OHのシグナルのみが認められる。 $3.5 \times 4 \mu\text{M}$  (d)添加からDMPO-OLのシグナルがDMPO-OHと重複して現れ始め,  $3.5 \times 20 \mu\text{M}$  (h)ではDMPO-OL

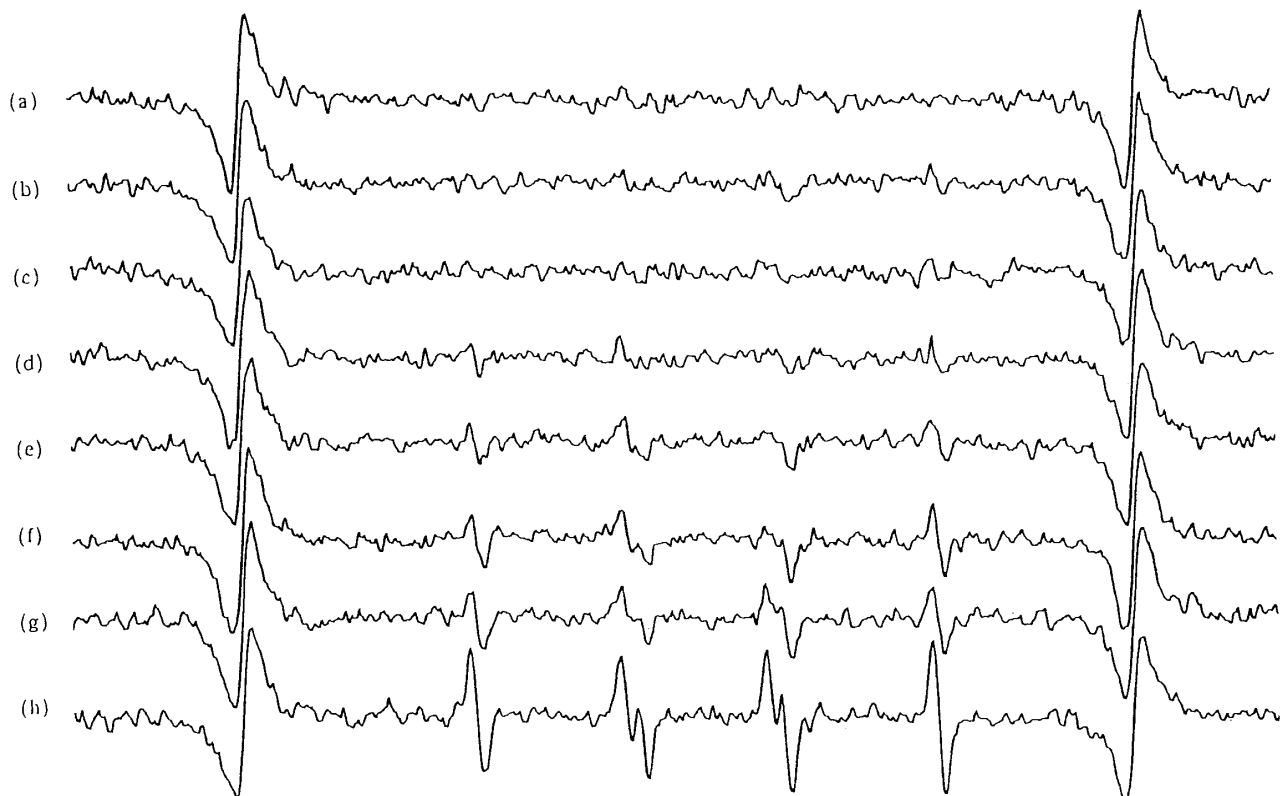


図4 歯科用麻酔薬中のエピネフリン濃度を変えて得られた無照射ヒト血清群のESRスペクトル  
(a)無添加(対照)群 (b) $3.5 \times 1 \mu\text{M}$ 添加群 (c) $3.5 \times 2 \mu\text{M}$ 添加群 (d) $3.5 \times 4 \mu\text{M}$ 添加群  
(e) $3.5 \times 6 \mu\text{M}$ 添加群 (f) $3.5 \times 8 \mu\text{M}$ 添加群 (g) $3.5 \times 10 \mu\text{M}$ 添加群 (h) $3.5 \times 20 \mu\text{M}$ 添加群

のシグナルのみが強く認められる。DMPO-OHの確認は不可能であった。得られたスペクトルからDMPO-OL量をRSIとして求めると表3の如くであった。DMPO-OL発生量は、対照群で $0.088 \pm 0.013$ ,  $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ の範囲では、それぞれ、 $0.119 \pm 0.044$ ,  $0.136 \pm 0.017$ ,  $0.206 \pm 0.040$ ,  $0.246 \pm 0.015$ ,  $0.356 \pm 0.044$ ,  $0.433 \pm 0.036$ ならびに $0.781 \pm 0.087$ であった。表3をグラフで示すと図5の如くであり、無照射ヒト血清群で発生するLO $\cdot$ 量は、添加するエピネフリン濃度に比例して増大することが確認された。

表3 無照射ヒト血清におけるエピネフリン濃度の影響

エピネフリン濃度 ( $\times 3.5 \mu\text{M}$ )	LO $\cdot$ / Mn $^{++}$
0	$0.088 \pm 0.013$
1	$0.119 \pm 0.044$
2	$0.136 \pm 0.017$
4	$0.206 \pm 0.040$
6	$0.246 \pm 0.015$
8	$0.356 \pm 0.044$
10	$0.433 \pm 0.036$
20	$0.164 \pm 0.022$

平均 $\pm$ 標準偏差  
(n = 5)

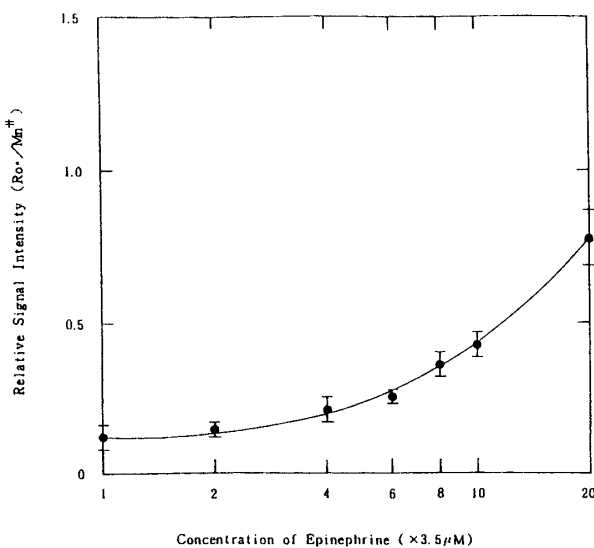


図5 歯科用麻酔薬のエピネフリン濃度の変化による無照射ヒト血清から得られたアルコキシラジカル量の変化

#### 4) アミド型麻酔薬とエステル型麻酔薬の比較

含エピネフリンアミド型麻酔薬添加ヒト血清群ならびに含エピネフリンエステル型麻酔薬添加ヒト血清群から得られたESRスペクトルを図6に示す。含エピネフリン塩酸リドカイン添加群(a), 含エピネフリン塩酸ジブカイン添加群(b)ならびに含エピネフリン塩酸ジブカイン添加群(c)のアミド型麻酔薬添加では6本線のピークを示すシグナルを認める。信号強度に相違があるものの、超微細結合定数 $aN = 1.4625 \sim 1.4813 \text{ mT}$ ,  $aH\beta = 1.5325 \sim 1.6000 \text{ mT}$ を得たことからDMPO-OLに由来するシグナルであると同定された<sup>29,31</sup>。一方、含エピネフリン塩酸テトラカイン添加群(d)ならびに含エピネフリン塩酸プロカイン添加群(e)のエステル型麻酔薬添加群ではPBS添加のみの対照群(f)とほぼ同様のシグナルを示し、DMPO-OLの発生は認められなかった。以上の結果から、含エピネフリンアミド型麻酔薬添加時のみにアルコキシラジカルの発生が有ることが確認された。

#### 5) 不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の比較

リノール酸溶液ならびにステアリン酸溶液に含エピネフリン塩酸リドカインを添加して得られたESRスペクトルを図7に示す。不飽和脂肪酸(a)のリノール酸では6本線のピークを示すシグナルが認められ、超微細結合定数 $aN = 1.4625 \text{ mT}$ ,  $aH\beta = 1.5750 \text{ mT}$ が得られたことからDMPO-OLに由来するものと同定された<sup>29,31</sup>。一方、飽和脂肪酸のステアリン酸溶液(b)では、PBS添加のみの対照と同様のスペクトルを示し、DMPO-OLの発生は認められなかった。以上の結果から、含エピネフリン塩酸リドカイン添加によるLO $\cdot$ 発生は不飽和脂肪酸に由来することが確認された。

#### 6) エピネフリン構造類似物質添加による比較

含エピネフリン類似物質塩酸リドカイン添加

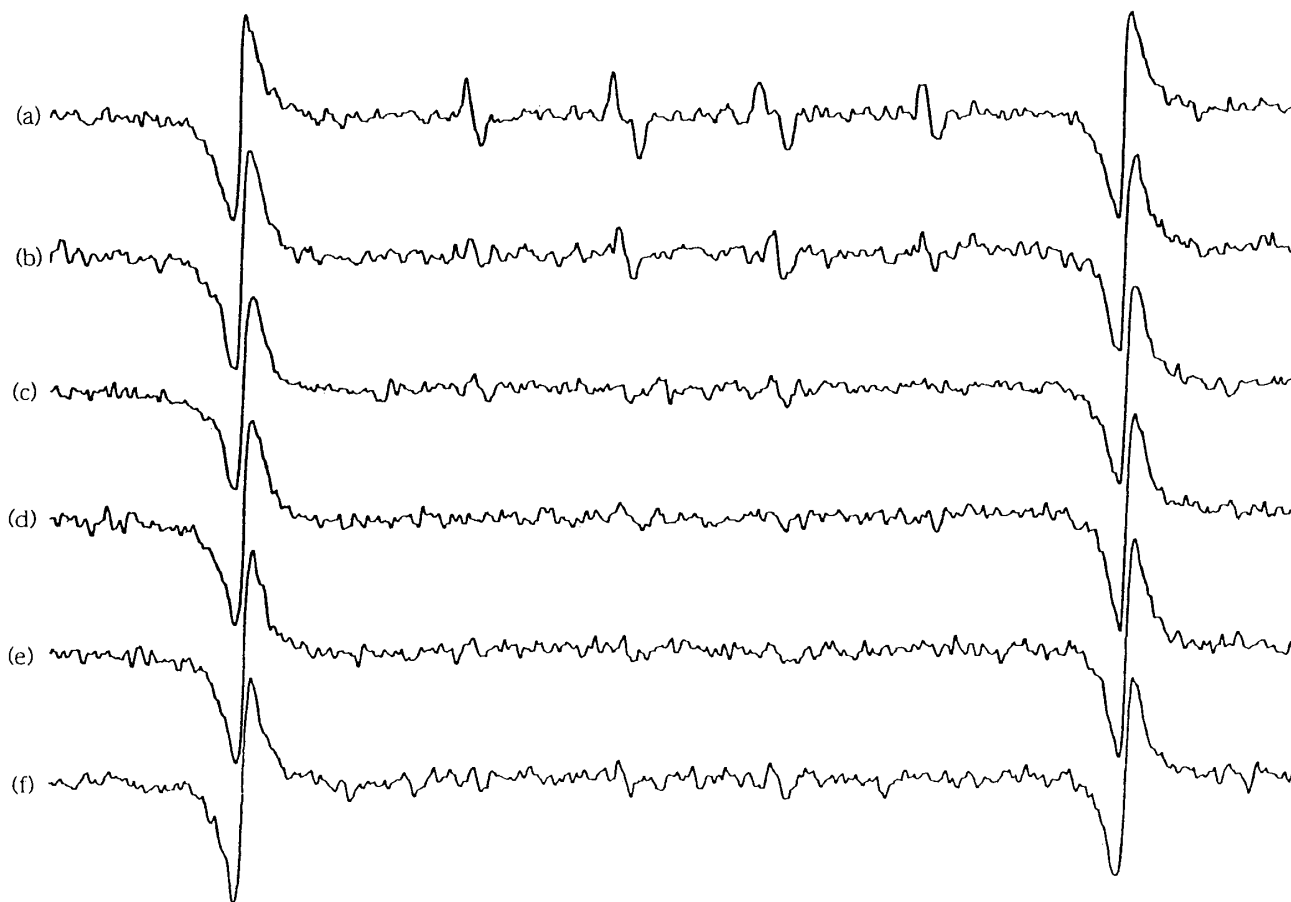


図6 アミド型麻酔薬添加群ならびにエステル型麻酔薬添加群から得られたESRスペクトル  
 (a)塩酸リドカイン添加群 (b)塩酸メピバカイン添加群 (c)塩酸ジブカイン添加群  
 (d)塩酸テトラカイン添加群 (e)塩酸プロカイン添加群 (f)無添加(対照)群

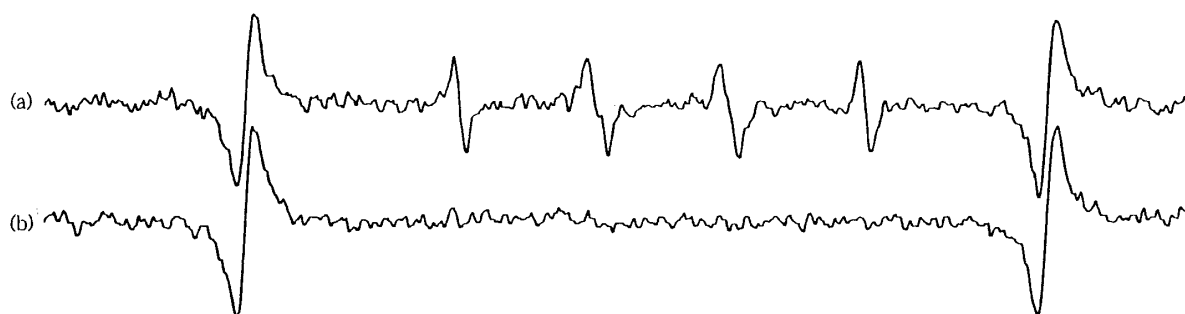


図7 含エピネフリン塩酸リドカイン添加不飽和脂肪酸群ならびに飽和脂肪酸群から得られたESRスペクトル  
 (a)リノール酸群 (b)ステアリン酸群

ヒト血清群から得られたESRスペクトルを図8に示す。含エピネフリン塩酸リドカイン添加群(a)ならびに含ピロカテコール塩酸リドカイン添加群(b)では6本線のピークを示すシグナルが認められ、超微細結合定数がそれぞれ $aN=$

$1.4625\text{mT}$ ,  $aH\beta=1.5998\text{mT}$ , ならびに $aN=1.4753\text{mT}$ ,  $aH\beta=1.5938\text{mT}$ が得られたことから, DMPO-OLであると同定された<sup>29,31)</sup>。含ハイドロキノン塩酸リドカイン添加群(c)では4本線のピークを示すシグナルと12本線のピークを



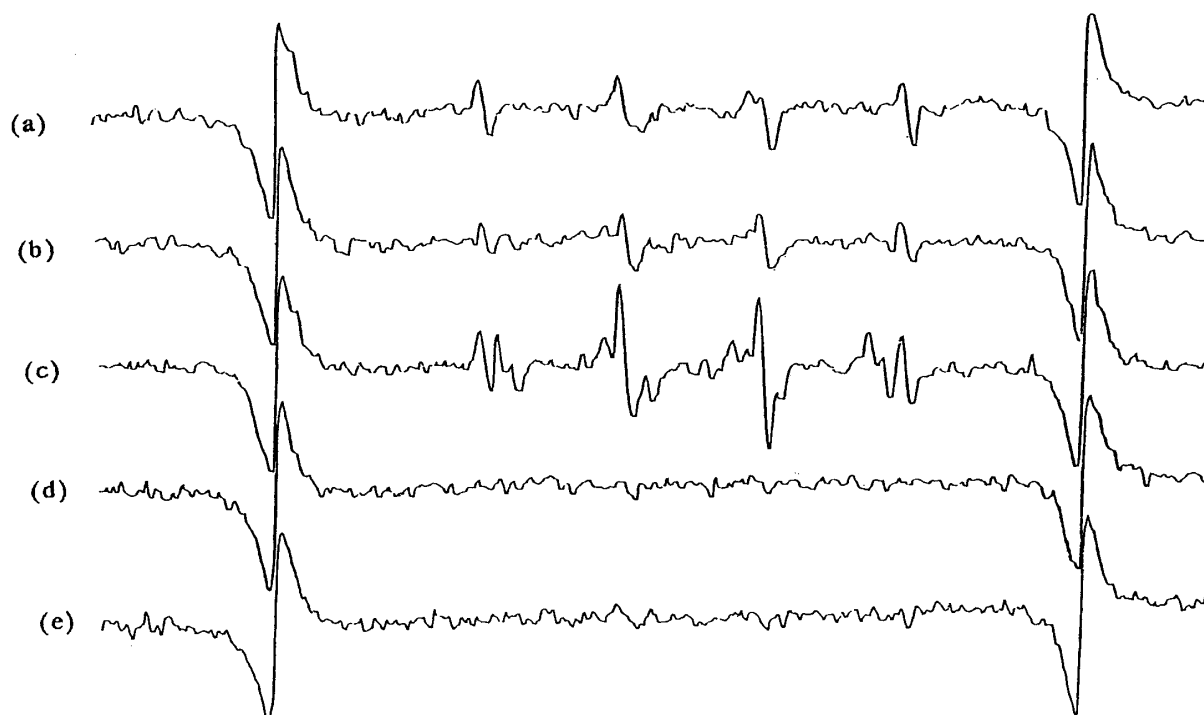


図8 エピネフリン構造類似物質添加ヒト血清群から得られたESRスペクトル  
 (a)エピネフリン添加群 (b)ピロカテコール添加群 (c)ハイドロキノン添加群  
 (d)エフェドリン添加群 (e)プロパミン添加群

示すシグナルが共存して認められた。4本線のピークを示すシグナルは超微細結合定数 $aN=1.4825\text{mT}$ ,  $aH\beta=1.4825\text{mT}$ が得られたことからDMPO-OHであると同定された<sup>29,31)</sup>。12本線のピークを示すシグナルは超微細結合定数 $aN=1.4625\text{mT}$ ,  $aH\beta=1.0748\text{mT}$ ,  $aH\gamma=0.1500\text{mT}$ が得られたことからDMPO-OOLであると同定された<sup>29,31)</sup>。しかし、含エフェドリン塩酸リドカイン添加群(d)ならびに含プロパミン(1-phenyl-2-animopropane)塩酸リドカイン添加群(e)では、PBS添加の対照と同様のスペクトルを示すのみで、DMPO-OL, DMPO-OHあるいはDMPO-OOLの発生は認められなかった。以上の結果から、ベンゼン核中に含まれる2つのHO基がラジカル発生に関与していることが確認された。

## 2 本実験の結果

### 1) 放射線照射ヒト血清から発生するラジカルの同定

放射線照射ヒト血清から得られたESRスペクトルは図9に示す如くの4本線のピークを示すシグナルと9本線のピークを示すシグナルが重複して認められる。4本線のシグナルは1:2:2:1の信号強度を示し、超微細結合定数 $aN=1.5000\text{mT}$ ,  $aH\beta=1.5000\text{mT}$ が得られたことからDMPO-OHであると同定された<sup>29,30)</sup>。9本線のシグナルは1:1:2:1:2:1:2:1:1の信号強度を示し、超微細結合定数 $aN=1.6375\text{mT}$ ,  $aH\beta=2.2500\text{mT}$ を得たことからDMPO-Hであると同定された<sup>29)</sup>。即ち、放射線照射によって生じるラジカルはHO・とH・であることが確認された。



図9 放射線照射ヒト血清から得られたESRスペクトル

2) 放射線照射ヒト血清から生じるラジカル  
に対する歯科用麻酔薬の影響

(1) 塩酸リドカイン単独添加群：塩酸リドカインの濃度を0～90mM( $3.7 \times 0 \sim 3.7 \times 20$ mM)として放射線照射時に添加して得られたESRスペクトルを図10に示す。最上段のスペクトルは(a)塩酸リドカイン無添加時に得られたものであり、2段目から8段目までのスペクトルは、それぞれ、 $3.7 \times 1$ (b)、 $3.7 \times 2$ (c)、 $3.7 \times 4$ (d)、

$3.7 \times 6$ (e)、 $3.7 \times 8$ (f)、 $3.7 \times 10$ (g)、ならびに $3.7 \times 20$ mM(h)の塩酸リドカイン添加時に得られたものである。対照の無添加群(a)から $3.7 \times 20$ mM添加群(h)の8段目まで、HO・ならびにH・の信号強度はほぼ同等の強度を示すことから、濃度の変化によって発生量は影響を受けないことが確認された。表4は各濃度で得られたHO・ならびにH・のRSIである。各濃度におけるHO・発生量は、それぞれ、 $0.318 \pm 0.019$ 、

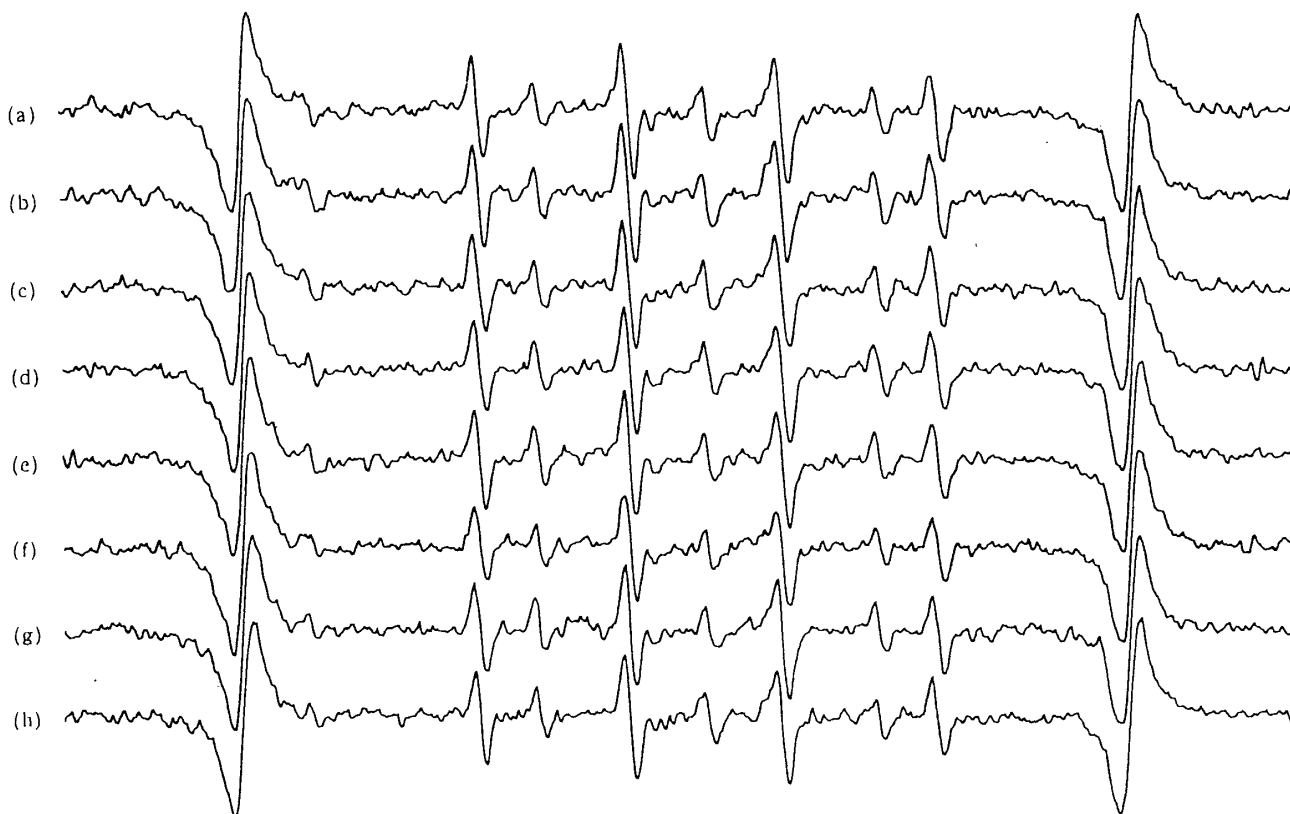


図10 各種濃度の塩酸リドカイン単独添加放射線照射ヒト血清群から得られたESRスペクトル  
(a)無添加(対照)群 (b) $3.7 \times 1$  mM添加群 (c) $3.7 \times 2$  mM添加群 (d) $3.7 \times 4$  mM添加群  
(e) $3.7 \times 6$  mM添加群 (f) $3.7 \times 8$  mM添加群 (g) $3.7 \times 10$  mM添加群 (h) $3.7 \times 20$  mM添加群

表4 照射ヒト血清における塩酸リドカイン濃度の影響

塩酸リドカイン濃度 (×3.7mM)	HO·/Mn <sup>++</sup>	H·/Mn <sup>++</sup>
0	0.318±0.019	0.142±0.020
1	0.310±0.030	0.138±0.020
2	0.299±0.028	0.135±0.020
4	0.335±0.017	0.152±0.020
6	0.321±0.029	0.145±0.025
8	0.300±0.022	0.135±0.017
10	0.317±0.020	0.132±0.048
20	0.300±0.020	0.135±0.013

平均±標準偏差  
(n = 5)

0.310±0.030, 0.299±0.028, 0.335±0.017, 0.321±0.029, 0.300±0.022, 0.317±0.020ならびに0.300±0.026であり, H·発生量が, それぞれ, 0.142±0.020, 0.138±0.020, 0.135±0.020, 0.152±0.020, 0.145±0.025, 0.135±0.017, 0.132±0.048, ならびに0.135±0.031であった。HO·発生量ならびにH·に対する塩酸

リドカイン濃度の変化の影響も認められなかった。得られたRSIをグラフで示すと図11となり, 標準偏差内であることが確認された。

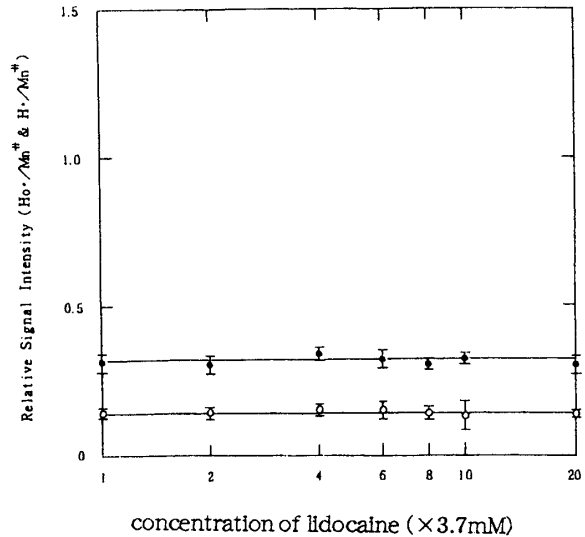


図11 各種濃度の塩酸リドカイン単独添加放射線照射ヒト血清から発生するラジカル量  
● : HO· ○ : H·

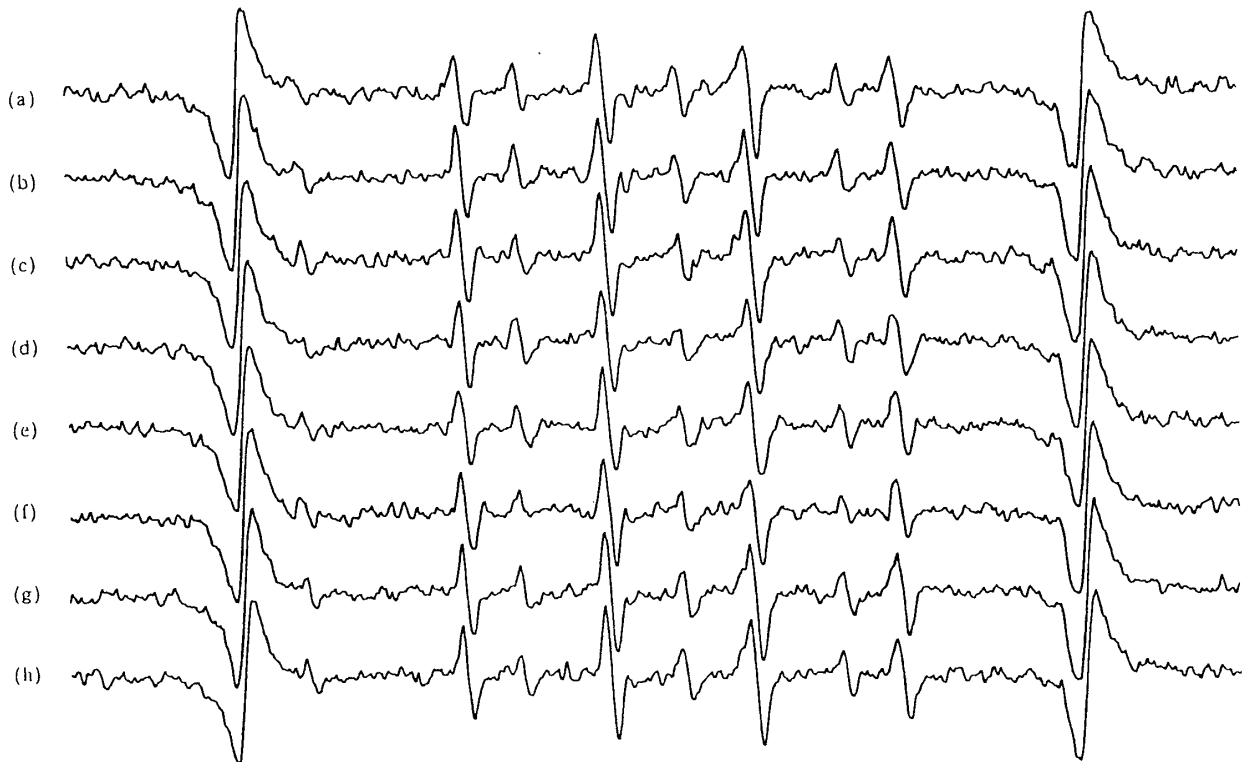


図12 各種濃度のエピネフリン単独添加放射線照射ヒト血清群から得られたESRスペクトル  
(a)無添加(対照) (b)3.5×1μM (c)3.5×2μM (d)3.5×4μM (e)3.5×6μM  
(f)3.5×8μM (g)3.5×10μM (h)3.5×20μM

(2)エピネフリン単独添加群：エピネフリンの濃度を $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ として放射線照射時に添加して得られたESRスペクトルは図12に示す如く、4本線のピークを示すDMPO-OH<sup>29,30</sup>と9本のピークを示すDMPO-H<sup>29</sup>に由来するものであった。最上段のスペクトル(a)はエピネフリン無添加の対照であり、2段目から8段目までのスペクトルは、それぞれ、 $3.5 \times 1$ (b),  $3.5 \times 2$ (c),  $3.5 \times 4$ (d),  $3.5 \times 6$ (e),  $3.5 \times 8$ (f),  $3.5 \times 10$ (g)ならびに $3.5 \times 20 \mu\text{M}$ (h)のエピネフリン単独添加で得られたものである。DMPO-OHならびにDMPO-Hのシグナル強度ともに、肉眼的には塩酸リドカイン単独添加時とほぼ同様であり、対照から $3.5 \times 20 \mu\text{M}$ 添加の範囲においてほぼ同等の信号強度を示した。得られたスペクトルからHO・発生量ならびにH・発生量をRSIとして求めると表5の如くであった。HO・発生量は、それぞれ、 $0.273 \pm 0.023$ ,  $0.261 \pm 0.036$ ,  $0.264 \pm 0.037$ ,  $0.263 \pm 0.031$ ,  $0.258 \pm 0.044$ ,  $0.295 \pm 0.053$ ,  $0.289 \pm 0.034$ ならびに $0.309 \pm 0.034$ であり、極めて小さな値であるが、 $3.5 \times 6 \mu\text{M}$ を越えるとHO・発生量の増大が認められた。H・発生量は、それぞれ $0.123 \pm 0.020$ ,  $0.118 \pm 0.024$ ,  $0.114 \pm 0.024$ ,  $0.118 \pm 0.025$ ,  $0.117 \pm 0.029$ ,  $0.134 \pm 0.035$ ,  $0.131 \pm 0.029$ , ならびに $0.140 \pm 0.029$ であり、 $3.5 \times 8 \mu\text{M}$ を越えると、HO・発生量と同様に、極めてわずかであるが増大傾向が認められた。表5をグラフで

表5 照射ヒト血清におけるエピネフリン濃度の影響

エピネフリン濃度 ( $\times 3.5 \mu\text{M}$ )	HO・ /Mn <sup>++</sup>	H・ /Mn <sup>++</sup>
0	$0.273 \pm 0.023$	$0.123 \pm 0.020$
1	$0.261 \pm 0.036$	$0.118 \pm 0.024$
2	$0.264 \pm 0.037$	$0.114 \pm 0.024$
4	$0.263 \pm 0.031$	$0.118 \pm 0.025$
6	$0.258 \pm 0.044$	$0.117 \pm 0.029$
8	$0.295 \pm 0.053$	$0.134 \pm 0.035$
10	$0.289 \pm 0.034$	$0.131 \pm 0.029$
20	$0.309 \pm 0.034$	$0.140 \pm 0.029$
	平均 $\pm$ 標準偏差 (n = 5)	

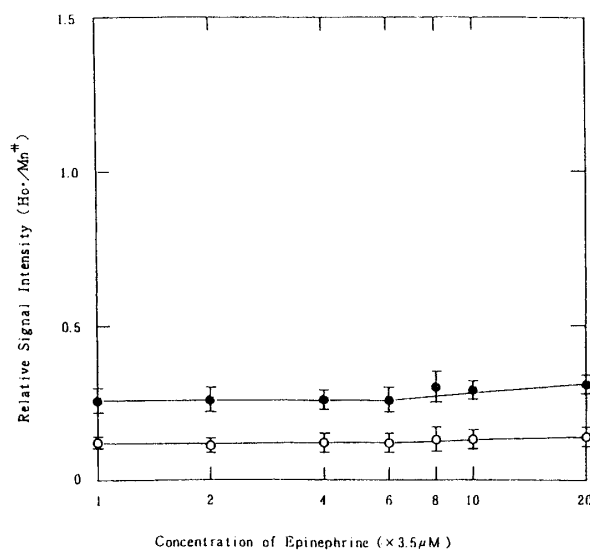


図13 各種濃度のエピネフリン単独添加放射線照射ヒト血清から発生するラジカル量  
● : HO・ ○ : H・

表すと図13の如くであり、ほぼ標準偏差内であると確認された。

(3)含エピネフリン塩酸リドカイン添加群：塩酸リドカイン濃度を臨床で用いる2% ( $3.7 \times 20 \text{ mM}$ ) で一定とし、エピネフリン濃度のみを $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ に変化して得られたESRスペクトルを図14に示す。最上段のスペクトル(a)は無添加のコントロール群であり、2段目から8段目までのスペクトルは、それぞれ、 $3.5 \times 1$  (b),  $3.5 \times 2$ (c),  $3.5 \times 4$ (d),  $3.5 \times 6$ (e),  $3.5 \times 8$  (f),  $3.5 \times 10$ (g)ならびに $3.5 \times 20 \mu\text{M}$ (h)のエピネフリン添加時に得られたものである。対照の無添加群(a)から $3.5 \times 4 \mu\text{M}$ (d)までの濃度では、塩酸リドカイン単独添加群ならびにエピネフリン単独添加群と同様に、HO・とH・のみが強く認められる。しかし、 $3.5 \times 6 \mu\text{M}$ (e)の添加から、徐々にHO・ラジカルの崩壊が現れ始め、 $3.5 \times 10 \mu\text{M}$ (g)を越えるとDMPO-OL・のシグナルのみが強く認められた。HO・のシグナルは確認不可能であった。しかし、H・は、肉眼的に $0 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ の範囲でほとんど変化は認められなかった。得られたスペクトルからDMPO-OL, DMPO-OH, DMPO-HのRSIを求める

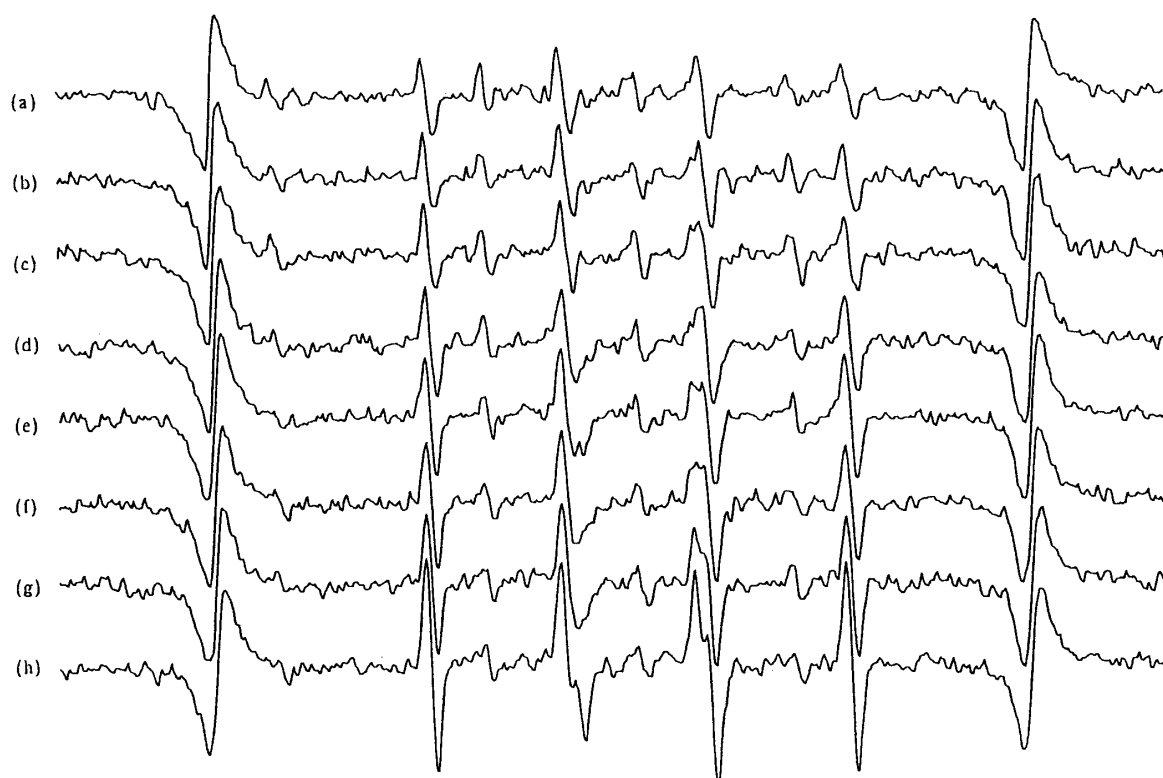


図14 歯科用麻酔液中のエピネフリン濃度のみを変えたときに放射線照射ヒト血清群から得られたESRスペクトル  
 (a)無添加(対照) (b) $3.5 \times 1 \mu\text{M}$  (c) $3.5 \times 2 \mu\text{M}$  (d) $3.5 \times 4 \mu\text{M}$  (e) $3.5 \times 6 \mu\text{M}$   
 (f) $3.5 \times 8 \mu\text{M}$  (g) $3.5 \times 10 \mu\text{M}$  (h) $3.5 \times 20 \mu\text{M}$

表6 照射ヒト血清における含エピネフリン塩酸リドカインのエピネフリン濃度の影響

エピネフリン濃度 ( $\times 3.5 \mu\text{M}$ )	HO $\cdot$ /Mn $^{++}$	H $\cdot$ /Mn $^{++}$	LO $\cdot$ /Mn $^{++}$
0	0.276 $\pm$ 0.078	0.128 $\pm$ 0.024	0.083 $\pm$ 0.022
1	0.207 $\pm$ 0.085	0.112 $\pm$ 0.020	0.153 $\pm$ 0.119
2	0.257 $\pm$ 0.068	0.131 $\pm$ 0.026	0.171 $\pm$ 0.088
4	0.269 $\pm$ 0.041	0.112 $\pm$ 0.028	0.245 $\pm$ 0.097
6	0.267 $\pm$ 0.030	0.124 $\pm$ 0.019	0.396 $\pm$ 0.082
8	0.226 $\pm$ 0.038	0.102 $\pm$ 0.035	0.513 $\pm$ 0.124
10	0.249 $\pm$ 0.025	0.119 $\pm$ 0.026	0.663 $\pm$ 0.070
20	0.233 $\pm$ 0.012	0.106 $\pm$ 0.012	1.068 $\pm$ 0.094

平均値 $\pm$ 標準偏差  
(n = 5)

と、表6に示す如く、無添加のコントロール群では、HO $\cdot$ 発生量は0.276 $\pm$ 0.078であり、 $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ の範囲では、それぞれ、0.207 $\pm$ 0.085, 0.257 $\pm$ 0.068, 0.269 $\pm$ 0.041, 0.267 $\pm$ 0.030, 0.226 $\pm$ 0.038, 0.249 $\pm$ 0.025ならびに0.233 $\pm$ 0.012であった。H $\cdot$ 発生量はコントロールで0.128 $\pm$ 0.024であり、 $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ の範囲では、0.112 $\pm$ 0.020, 0.131 $\pm$ 0.026,

0.112 $\pm$ 0.028, 0.124 $\pm$ 0.019, 0.102 $\pm$ 0.035, 0.119 $\pm$ 0.026ならびに0.106 $\pm$ 0.012であった。また、DMPO-OLの発生量はコントロールで0.083 $\pm$ 0.022,  $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ の添加で、それぞれ、0.153 $\pm$ 0.119, 0.171 $\pm$ 0.088, 0.245 $\pm$ 0.097, 0.396 $\pm$ 0.082, 0.513 $\pm$ 0.124, 0.663 $\pm$ 0.070ならびに1.068 $\pm$ 0.094でありLO $\cdot$ 発生量の著しい増大が認められた。表6から得られた

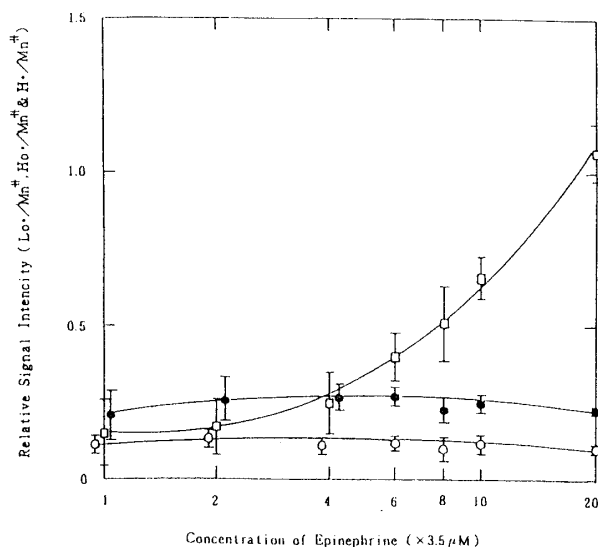


図15 含エピネフリン塩酸リドカイン中のエピネフリン濃度の相違によるラジカル発生量の変化  
●: HO· ○: H· □: LO·

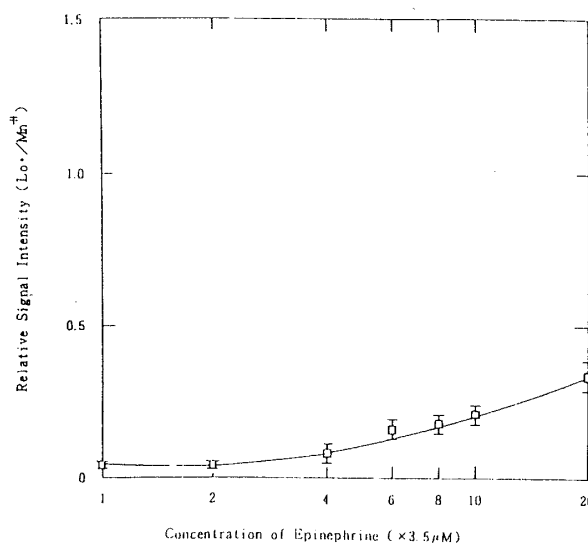


図16 放射線照射によるLO·発生量の増大

グラフを図15に示す。LO·発生量はエピネフリン濃度に比例して増大することが確認された。

### 3) 放射線照射によるLO·発生量の増大

含エピネフリン塩酸リドカイン添加時の放射線照射によって増加したLO·量は表7に示す如く、無添加群の対照では、 $0.002 \pm 0.005$ ,  $3.5 \times 1 \sim 3.5 \times 20 \mu\text{M}$ 添加の範囲では、それぞれ、 $0.038 \pm 0.009$ ,  $0.041 \pm 0.007$ ,  $0.082 \pm 0.030$ ,  $0.160 \pm 0.030$ ,  $0.181 \pm 0.027$ ,  $0.215 \pm 0.026$ ならびに $0.342 \pm 0.050$ であった。表7から得られた値をグラフに示すと図16であり、照射によって発生するLO·増大量も、エピネフリン濃度の上昇に比例関係を示すことが確認された。

表7 放射線照射によるLO·発生量の増大

エピネフリン濃度 ( $\times 3.5 \mu\text{M}$ )	増大LO·量 (LO·/Mn <sup>++</sup> )
0	$0.002 \pm 0.005$
1	$0.038 \pm 0.009$
2	$0.041 \pm 0.007$
4	$0.082 \pm 0.030$
6	$0.160 \pm 0.030$
8	$0.181 \pm 0.027$
10	$0.215 \pm 0.026$
20	$0.342 \pm 0.050$
平均 $\pm$ 標準偏差 (n = 5)	

## 考 察

### 1 予備実験の結果について

#### 1) 無照射PBS群について

無照射PBS群に塩酸リドカイン単独添加、エピネフリン単独添加あるいは塩酸リドカインとエピネフリンが共存する含エピネフリン塩酸リドカイン添加を行っても、発生するラジカルはHO·のみであり、その発生量も無添加群の対照における発生量とほとんど変化が認められなかった。以上の結果は塩酸リドカインの構造式中に含まれるメチル基やエチル基あるいはエピネフリン中に含まれるメチル基は水溶液中でメチルラジカルやエチルラジカルとして遊離することはないものと考えられる。

#### 2) 無照射ヒト血清群について

無照射ヒト血清群に塩酸リドカイン単独添加およびエピネフリン単独添加を行っても、検出し得るラジカルは無照射PBS群と同様にヒドロキシラジカルのみであった。しかるに、塩酸リドカインとエピネフリンが共存する含エピネフリン塩酸リドカイン添加では、無照射PBS群では見られないアルコキシラジカルの著明な発生が認められた。以上の結果から、塩酸リドカ



を認めるものの、含エピネフリンエステル型麻酔薬添加群ではLO•の発生が認められないことから、麻酔薬そのものの化学構造式の相違も関与しているものと考えられた。即ち、アミド型麻酔薬は構造式中に  $\begin{array}{c} \text{-N=C-} \\ | \quad || \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$  を有し、この  $\begin{array}{c} \text{-N=C-} \\ | \quad || \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$

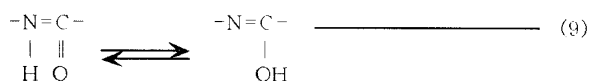
がエタノールタイプの  $\begin{array}{c} \text{-N=C-} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{OH} \end{array}$  となり、これにエ

ピネフリンが2つのフェノール性HO基を持つ還元剤として働き、水素引き抜き反応を行って  $\begin{array}{c} \text{-N=C-} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{O} \cdot \end{array}$  を生じる。ここで生じた  $\begin{array}{c} \text{-N=C-} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{O} \cdot \end{array}$  はアルコ

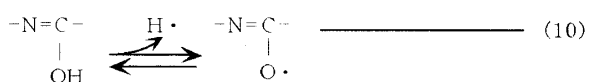
キシラジカルであり、これが血清中の不飽和脂質に作用して反応式(1)の



を行うことによってラジカル反応を開始するものと考えられる。一方、不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸に対する含エピネフリン塩酸リドカイン

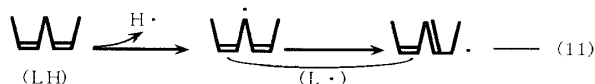


の平衡状態を作り、この状態でエピネフリンが作用して

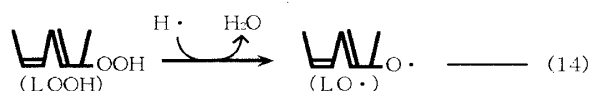
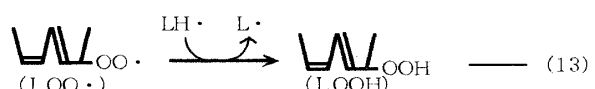
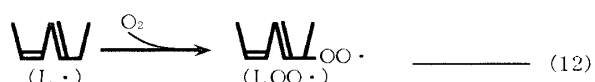


を生じ、ここで発生する  $\begin{array}{c} \text{-N=C-} \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{O} \cdot \end{array}$  が血清中に存在

する不飽和脂肪酸の重アリル水素を引き抜くことによって



反応でL•を生じ

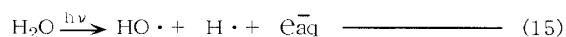


の過程を経てLO•を生じるものと考えられる。

## 2 本実験の結果について

### 1) 放射線照射ヒト血清から生じるラジカルについて

放射線照射によって

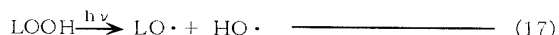


の反応を生じ、ヒドロキシラジカルと水素ラジカルを発生する<sup>7-10)</sup>。生体内では、生体に存在するヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼによってO<sub>2</sub><sup>-</sup>を発生し、二次的にHO•を発生する<sup>2-4)</sup>こと、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が金属イオンとの反応でHO•を発生すること<sup>29)</sup>などが知られているが、直接HO•を発生するのは放射線照射のみと考えられている。今回の実験で認められたLO•はHO•の水素が脂質アルキル基(L)に置換されたものも一部含まれていると考えられる。即ち、放射線照射によって発生したHO•の水素原子が、血清中で含エピネフリン塩酸リドカインによって発生したL•と



の置換反応を生じるものと考えられる。

一方、血清は自動酸化で発生したLOOHを含んでいるので、光照射と同様の



の反応でアルコキシラジカルが直接発生するとともに、このとき発生したHO•が反応式(16)を経てLO•発生に関与している可能性も否定できない。

### 2) 放射線照射によるLO•の量的変化について

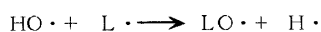
無照射ヒト血清に含エピネフリン塩酸リドカインを添加して得られたアルコキシラジカル量が  $0.716 \pm 0.039$  内外であるのに対して、 $0.5\text{Gy}$  の放射線照射を行って得られたLO•の発生量は  $1.068 \pm 0.094$  であり、約  $0.342 \pm 0.050$  のLO•量の増大を認めた。無照射ヒト血清群で認められるLO•は、含エピネフリン塩酸リドカイン添加



時に認められることから、発生するLO・は含エピネフリン塩酸リドカイン添加の影響による発生のみと考えられる。従って、もしも照射がLO・発生に何らの関係がないものとするれば、照射時に発生するLO・も、含エピネフリン塩酸リドカインのみの影響であり、発生するLO・量も無照射ヒト血清群と同じ値でなければならないはずである。しかし、同濃度の条件で、照射によってLO・量が極めて増大したことは、照射によってLO・量が増大したと考えざるを得ない。考えられる反応の1つとして、放射線照射によって血清中のLOOHが反応式(17)の



の反応を行うことによってLO・量の増加きたしたものと考えられる。また、照射によって発生したHO・の一部が反応式(16)で



と置換されてLO・発生の増加をきたしたのものとも考えられる。現段階では、放射線照射によるLO・発生量の増大を明確にすることはできず、推測の域を出ないが、これらいくつかのラジカル反応が同時に絡み合って発生しているものと考えられる。

### 3. ESRスピントラップ法について

今回用いたESRスピントラップ法は、Janzen<sup>32)</sup>によって開発されたスピントラップ法をESRによるラジカルの測定に応用したものである。一般に活性酸素は短半減期であり、不安定な性質を有するので、ESRで直接測定することは不可能である。しかし、ESRスピントラップ法では、短半減期の不安定なラジカルをラジカル捕捉剤と反応させて比較的長半減期の安定なラジカルに変換することからESR装置で測定することが可能となる。

本法の特徴としては、1)生成したフリーラジカルが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できること、2)スピニア

ダクト量から生成したフリーラジカルの量を求められること、3)ESRパラメーターから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。本法はスーパーオキシドラジカルを始めとする種々の活性酸素種の測定に広く用いられているが<sup>29,33~46)</sup>、今回の実験で得られたLO・やHO・の検出についても、現在のところ、最も信頼できる方法であると考えられている<sup>34)</sup>。捕捉剤としては、ニトロ化合物やニトロゾ化合物が用いられているが、ニトロゾ化合物は酸素ラジカルと反応しないかあるいは得られるラジカルアダクトが不安定であるため、もっぱらニトロ化合物が用いられているのが現状である。今回著者が用いた捕捉剤はDMPOであるが、DMPO-OHやDMPO-OLの寿命が比較的長いことから、ESRによる検出や測定には最も適していると考えられる。また、その他のニトロ化合物としてPBNが挙げられるが、得られるスピニアダクトのスペクトルが超微細結合定数のわずかな違いを示すのみで極めて類似していること、両アダクトも速やかに減衰するので極めて迅速な測定が要求されること、および炭素中心ラジカルのアダクトもあまり変化を示さないことなどの理由から、今回の実験ではDMPOを使用した。事実、無照射ヒト血清群にしても、照射ヒト血清群にしても、発生するDMPO-OHとDMPO-OLは明瞭かつ簡単に同定することが可能であった。スーパーオキシドラジカルやヒドロペルオキシラジカルの測定と同様に、ヒドロキシラジカルやアルコキシラジカルの測定に際しても、DMPOが最も適しているものと考えられる。以上に述べた如く、DMPOはHO・およびLO・の検出や測定に最も適していると考えられるが、DMPOそのものから種々のアダクトを発生する経路があるので、使用には注意を払う必要があると考えられる<sup>33,34)</sup>。

## 結 論

放射線照射ヒト血清から生じるアルコキシラジカル量に対する歯科用麻酔薬の影響をESRスピントラップ法で検索し、以上の結果から以下の結論を得た。

1. 放射線照射ヒト血清から生じるラジカルは、ヒドロキシラジカルと水素ラジカルであると同定された。
2. 塩酸リドカイン単独添加時に放射線照射ヒト血清から生じるラジカルはヒドロキシラジカルと水素ラジカルのみであった。
3. エピネフリン単独添加時に放射線照射ヒト血清から生じるラジカルはヒドロキシラジカルと水素ラジカルのみであった。
4. 含エピネフリン塩酸リドカイン無添加時に放射線照射ヒト血清から生じるラジカルはアルコキシラジカルと水素ラジカルのみが認められ、ヒドロキシラジカルは確認できなかった。
5. 放射線照射によって発生するアルコキシラジカル量は、無照射ヒト血清から発生するそれと比較して極めて高値を示した。また、発生量の増大は含まれるエピネフリンの濃度に比例的に依存した。

以上の結果から、含エピネフリン塩酸リドカインがヒト血清中に添加されるとアルコキシラジカルを発生し、放射線照射によってその発生量が含まれるエピネフリン濃度に依存して増大することが判明した。放射線照射時に含エピネフリン塩酸リドカインが存在すると、脂質アルコキシラジカルの著しい発生をきたし、脂質ペルオキシラジカルを経て、過酸化脂質の発生の原因となる可能性が大きいものと考えられた。従って、麻酔下におけるエックス線照射時にはこの様な影響もある点に留意し、十分な注意を払う必要があるものと考えられた。

## 謝 辞

本稿を終わるにあたり、終始、本研究遂行と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座金子昌幸教授に感謝の意を表し、また貴重な御助言ならびに御校閲を賜った歯科薬理学講座松本仁人教授および歯科麻酔学講座新家昇教授に深謝致します。そして本研究に対して御協力くださいました歯科放射線学講座の教室員の皆様に心から感謝いたします。

## 参考文献

1. 堤 璋二編集：歯学薬理学。第2版，第1刷，学研書院，1981，169-170.
2. 中野 稔：フリーラジカルをめぐる用語の概念と定義。日本臨床46：2117-2124，1988.
3. 二木鋭雄：生体内フリーラジカル，活性酸素種の生成機構。日本臨床46：2125-2129，1988.
4. 寺尾純二：脂質。蛋白質 核酸 酵素，33：3060-3066，1987.
5. 寺尾純二：脂質のラジカル連鎖過酸化反応と膜障害。日本臨床46：2149-2154，1988.
6. 松尾光芳：過酸化脂質の生成と分解過酸化。内山充，松尾光芳，嵯峨井勝編集，脂質と成体，学会出版センター，1988，13-44.
7. 吉井義一：放射線生物学概論。第2版，北海道大学図書刊行会，1986，55-63.
8. 小沢俊彦：放射線。蛋白質 核酸 酵素，33：2811-2817，1988.
9. 元鹿宗治：放射線による酵素の失活。蛋白質 核酸 酵素，33：3087-3093，1988.
10. 湯川修身，中沢 透：放射線障害。日本臨床，46：152-158，1988.
11. Hall EJ：Radiology for the radiologist, 2nd Ed., Harper&Row, Publishers, Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, and London, 1978.
12. Hall ED, Yonkers PA, Taylor BM, et al：Lack of potinjry treatment with methylprednisolone on tirilazad mesylate on the increase in eicosanoid levels in the acutely injured cat spinal cord. *J Neurotrauma* 12：245-256，1995.
13. Shen JG, Zhou DY：Efficiency of Ginkgo biloba extracyed (EGb 761) in antioxidant pro-

- tection against myocardial ischemia and reperfusion injury. *Biochem Mol Biol Int* **35** : 125-134, 1995.
14. Green TR, Bennett SR, Nelson VM : Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. *Toxicol Appl Pharmacol* **129** : 168-169, 1994.
  15. Oivonen HJ, Ahotupa M : Free radical reaction products and antioxidant capacity in arterial plasma during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* **108** : 140-147, 1994.
  16. da-Lug PL, Chagas AC, Lauriando FR, et al : Antagonizing the hydroxyl ion free radical (HO·) dose not abolish reperfusion ventricular fibrillation in anesthetized dogs. *Braz J Med Biol Res* **26** : 477-489, 1993.
  17. Li XY, McCay PB, Zughuib M, et al : Demonstration of free radical generation in the "stunned" myocardium in the conscious dog and identification of major differences between conscious and open-chest dogs. *J Chin Invest* **92** : 1025-1041, 1993.
  18. Vollman B, Conzen PF, Habazettl H, et al : Heparin-protamine reaction in pigs : role of oxygen-derived free radicals. *J Appl Physiol* **74** : 2412-2420, 1993.
  19. Takahashi T, Miura M, Katsumata U, et al : Involvement of superoxide in ozone-induced airway hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis* **148** : 103-106, 1993.
  20. Lundgren J, Smith ML, Siesjo BK : Effects of dimethylthiourea on ischemic brain damage in hyperglycemic rats. *J Neurol Sci* **113** : 187-197, 1992.
  21. Usui A, Kato K, Murase M, et al : Manganese-containing superoxide dismutase in blood and urine during open-heart surgery. *Jpn Circ J* **56** : 1206-1213, 1992.
  22. Kazui M, Andreoni KA, Norris EJ, et al : Breath ethan: a specific indication of free-radical-mediated peroxidation following reperfusion of the ischemic liver. *Free Radic Biol Med* **13** : 509-515, 1992.
  23. Rosolia DL, McKenna DJ, Gee MH, et al : Infusion of zymosan-activated plasma affects neutrophils in peripheral blood and bone marrow in sheep. *J Leucoc Biol* **52** : 501-515, 1992.
  24. Nihro Y, Sogawa S, Izumi A, et al : 3-O-alkylascorbic acids as free radical quenchers. 3. protective effect on coronary occlusion-reperfusion induced arrhythmias in anesthetized rats. *J Med Chem* **35** : 1618-1623, 1992.
  25. Wilson WC, Swetland JL, Laborde P, et al : General anesthesia and exhaled breath hydrogen peroxide. *Anesthesiology* **76** : 703-710, 1992.
  26. Prasado K, Kalra J, Bharadway B, et al : Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortic coronary bypass surgery. *Am Heart J* **123** : 37-45, 1992.
  27. Ooiwa H, Stanley A, Felanous-Bylund AC, et al : Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol fails to limit myocardial infarct size after 30 min ischemia followed by 72h of reperfusion in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* **23** : 119-125, 1991.
  28. Koerner JE, Anderson BA, Dage RC : Protection against postischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbit with scavengers of oxygen-derived free radicals: superoxide dismutase, catalase, N-2-mercaptopyropionyl glycine and captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* **17** : 185-181, 1991.
  29. Kohno M, Yamada M, Mitsuta K, et al : Spin-trapping studies on the reaction of Iron Complexes with peroxides and the effect of water-soluble antioxidants. *Bull Chem Soc Jpn* **64** : 1447-1453, 1991.
  30. Rosen GM, Rauckman EJ : Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical. In methods in enzymology vol 105 : Packer L ed. *Academic Press*, 1984, 198-209.
  31. Chamulitrat W, Takahashi N, Mason RP : Peroxyl, alkoxyl, and carbon-centered radical formation from hydroperoxides by chloroperoxidase. *J Biol Chem* **264** : 7889-7899, 1989.
  32. Janzen EG : Spin trapping. *Acc Chem Res* **4** : 31-40, 1971.
  33. 毛老省三 : 活性酸素のESRによる測定法. 蛋白質核酸 酵素, **33** : 2693-2698, 1988.
  34. 毛老省三, 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.
35. Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ : Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol* **16** : 676-685, 1979.
36. Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ : Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radical with nitrones. *J Am Chem Soc* **102** : 4994-4999, 1980.
37. Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ : Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical. Practical aspect. *Arch Biochem Biophys* **200** : 1-16, 1980.
38. Harbour JR, Chow V, Bolton J R : An electron spin resonance study of the spin adducts of OH and H<sub>2</sub>O radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solution. *Can J Chem* **53** : 3549-3553, 1974.
39. Janzen EG, Nutter DE Jr, Davis ER, et al : On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. *Can J Chem* **56** : 2237-2242, 1978.
40. Janzen EG : Free radicals in biology. Vol. IV, ed. by Pryor WA, *Academic Press*, 1980, 115-154.
41. McGay PB, Noguchi T, Fong KL, Lai EK, Poyer JL : Free radicals in biology, Vol. IV, ed. by Pryor WA, *Academic Press*, 1980, 154-186.
42. Akaike T, Sato K, Ijiri S, et al : Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals generated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch Biochem Biophys* **294** : 55-63, 1992.
43. 谷川 徹, 吉川敏一, 宮川春雄, 上田茂信他 : 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.
44. Klyanaraman B, Mottley C, Mason RP : A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *J Biol Chem* **258** : 3855-3858, 1983.
45. Ueno I, Kohono M, Mitsuka M, Mizuta Y, 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.
46. 石津一彦編集 : 実用ESR入門. 講談社, 1981, 91-137.