



ESR技術を活用した酸化ストレス研究の進展：フリーラジカルの挙動解明に向けて

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 福島県立医科大学総合科学教育研究センター 公開日: 2024-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井田, 由美 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2002342

ESR 技術を活用した酸化ストレス研究の進展： フリーラジカルの挙動解明に向けて

井田 由美

福島県立医科大学
総合科学教育研究センター 生物・化学領域

本総説では、ESR（電子スピン共鳴）技術がフリーラジカルの挙動解析において果たす重要な役割を論じる。特に、酸化ストレスが関与する疾患の理解において、ESR 技術が果たす役割が重視される。技術の進展により、*in vivo* でのリアルタイムモニタリングが可能となり、神経変性疾患や心血管疾患における酸化ストレスの動態解明に貢献している。また、ナノ医療や抗酸化物質の研究においても ESR 技術が広く応用されている。

1. はじめに

フリーラジカルは、不対電子を持つ非常に反応性の高い分子であり、生体内で重要な化学反応に深く関与する。通常、フリーラジカルは免疫システムが病原体を攻撃する際や、細胞呼吸の過程で生成されるが、過剰なフリーラジカルは細胞や組織に損傷を与える可能性がある¹。これらのフリーラジカルが引き起こす酸化ストレスは、老化やさまざまな慢性疾患に関連しており、健康維持において重要な課題である²。

ESR（電子スピン共鳴）技術は、不対電子を持つ分子やラジカルを高感度で検出できるため、フリーラジカルの挙動を正確に評価するために非常に有用である。この技術のもとになる ESR 現象は、1944 年に Zavoisky によって初めて観測された³。当初は限られた用途であったが、その後の技術的進展により、感度や精度が大幅に向上し、化学、物理学、生物学、さらには医療分野に至るまで、幅広い領域で応用されるようになった⁴。

本総説では、ESR 技術がフリーラジカルの挙動解析にどのように貢献し、特に酸化ストレスが関与する疾患の理解と治療において重要な役割を果たしているかを論じる。また、ESR 技術の進展とその応用の広がりについても言及し、今後の研究や医療分野での可能性について展望する。

2. ESR の基本メカニズム

ESR は、不対電子を持つ分子やラジカルの性質を解析するための技術である。そもそも電子は、小さな磁石のような性質をもっており、その性質をスピンという。通常では、電子はペアを組んでおり、お互いのスピンの打ち消しあうため、磁石の性質を見ることができない。ところが、不対電子が存在するとき、その電子が外部磁場の影響を受けるため、スピンの性質が強く現れる。スピンには α スピンと β スピンの 2 種類がある。 α スピンはスピンの方向が磁場に対して同じ向きであり、 β スピンはスピンの方向が磁場に対して反対向きであることを意味し

ている。これらのスピンのエネルギーは、外部磁場によってエネルギー状態が変化する。図 1 の上段のように、 α スピンと β スピンのエネルギーが分裂するため、この現象は「ゼーマン効果」もしくは「ゼーマン分裂」として知られている。

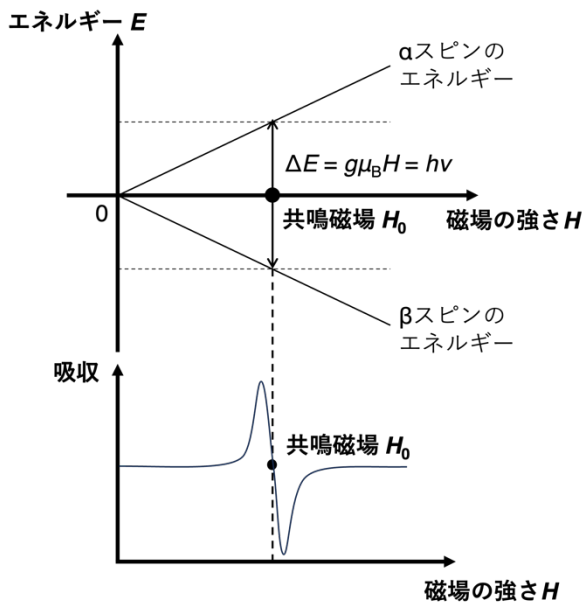


図 1 ゼーマン効果と ESR スペクトル

エネルギー状態の変化は、(1)式で表される。

$$\Delta E = g \mu_B H = h\nu \quad (1)$$

ここで、 ΔE はエネルギー差、 g はランデの g 因子、 μ_B はボーア磁子、 H は磁場の強さ、 h はプランク定数、 ν は振動数である。このエネルギー差に対応する周波数のマイクロ波を照射すると、不対電子は低いエネルギー状態から高いエネルギー状態に遷移する。このときの磁場を共鳴磁場といい、マイクロ波の吸収が ESR スペクトルとして観測される (図 1 の下段)。実験的に共鳴磁場と振動数 ν が定まれば、 g 値を求めることができる。この g 値は物質固有の値であるため、物質の同定にも使用することができる。

ESR では磁場のパラメータに H を使用しているが、磁気共鳴の分野では磁束密度 B とし、単

位は T (テスラ) を用いる。磁場の強さ H と磁束密度 B の関係は $B = \mu_0 H$ と表す (μ_0 は透磁率である)。磁場の強さ H の単位を T (テスラ) と表記しているものが多々見受けられるので、留意していただきたい。

ESR スペクトルには、分子の周囲に存在する原子核の影響が反映される。具体的には、電子スピンと隣接する原子核のスピンの相互作用することで、スペクトルに細かな分裂が現れる。この現象は「超微細構造」と呼ばれ、分子の内部構造やその環境に関する詳細な情報を提供する重要な指標である。また、ESR スペクトルは、分子が置かれている環境やその運動状態にも大きく影響を受ける。たとえば、分子が液体中にあり自由に回転できる場合、ESR スペクトルはシャープになるが、高速に拡散している場合はスペクトルが広がり、超微細構造がぼやけることがある。

3. フリーラジカルと酸化ストレス

フリーラジカルは、不対電子を有する分子や原子であり、非常に高い反応性を持つ。一方、活性酸素種は、酸素分子がより反応性の高い化合物に変化したものの総称である。多くの活性酸素種 (ROS) は不対電子を持つためフリーラジカルではあるが、一重項酸素 (1O_2) のようにフリーラジカルではない活性酸素種も存在する。

フリーラジカルと活性酸素種は異なる概念であるが、多くの活性酸素種がフリーラジカルであるため、「活性酸素・フリーラジカル」と合わせて記述されることが多い⁵。フリーラジカルである活性酸素種は、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、過酸化脂質 ($ROO\cdot$, $RO\cdot$)、一酸化窒素 ($\cdot NO$)、二酸化窒素 ($\cdot NO_2$) などがある。一方、フリーラジカルではない活性酸素種には、一重項酸素 (1O_2)、過酸化水素 (H_2O_2)、オゾン (O_3) などがある (図 2)。

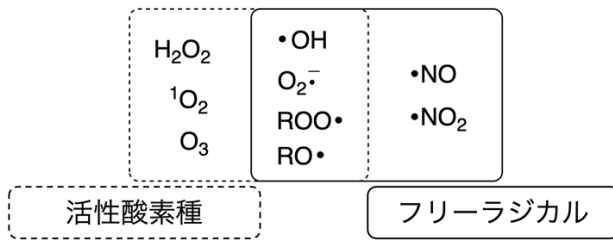


図 2 フリーラジカルと活性酸素種

生体内で生成されるフリーラジカルは、それを制御する機能が十分に働かなくなると酸化ストレスを引き起こす。特に、フリーラジカルによる DNA の損傷は、遺伝情報の破壊や突然変異のリスクを増大させ、がんの発症に寄与する可能性が高い⁶。また、フリーラジカルによる脂質の酸化は、細胞膜の流動性を低下させ、細胞機能の障害を引き起こすことがある⁷。さらに、タンパク質が酸化されると、その構造変化によって酵素活性や細胞内シグナル伝達が阻害されることがある^{5,8}。

酸化ストレスは、特に動脈硬化、アルツハイマー病、糖尿病、がんなどの慢性疾患においてその影響が顕著である。例えば、動脈硬化において、フリーラジカルが LDL コレステロールを酸化する。これが血管壁に沈着してプラークを形成し、血管の硬化や狭窄を引き起こす^{9,10}。脳内の酸化ストレスは、神経細胞の損傷と死の一因となり、アルツハイマー病などの神経変性疾患に寄与すると考えられている¹¹。

これに対して、体内にはフリーラジカルを無毒化するための抗酸化システムが備わっている。主要な抗酸化酵素として、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼがあり、これらは活性酸素種 (ROS) を無毒化する役割を果たしている^{2,12}。さらに、ビタミン C やビタミン E などの抗酸化物質もフリーラジカルを中和し、細胞を酸化ストレスから保護する役割を担っている^{2,12}。しかし、これらの抗酸化システムが不完全である場

合、酸化ストレスが増大し、さまざまな健康問題を引き起こす可能性がある¹²。このように、酸化ストレスとフリーラジカルの関係は、健康維持や疾患予防において重要なテーマであり、これを理解するには、ESR 技術の活用が鍵となる。

4. ESR とフリーラジカルの関係

ESR 技術は、フリーラジカルの検出と解析において不可欠な手段である。特に、酸化ストレスが関与する疾患の理解において、ESR 技術の役割はますます重要になっている。ESR 技術は、フリーラジカルが引き起こす酸化ストレスの影響を直接検出し、その動態を解析できるためである。酸化ストレスが関与するさまざまな疾患は、フリーラジカルの生成と消去のバランスが崩れることが病態の進行に直結している。

酸化還元反応の研究において、ESR 技術はフリーラジカルの反応や、それが細胞や組織に与える影響を調査する上で非常に有効である。酸化還元反応は、生体内でエネルギー生成や代謝に関与し、フリーラジカルがこれらの反応を通じて細胞膜や DNA、タンパク質を損傷することがある。この損傷が、細胞機能の障害や組織の劣化につながり、病気の進行に影響を与えることがある。例えば、心血管疾患では、ESR を用いてフリーラジカルの生成と酸化ストレスの関係を明らかにし、それが動脈硬化や心筋梗塞の進行にどのように寄与しているかを解析している¹³。また、フリーラジカルは神経細胞の損傷を与え、神経変性疾患の発症に関与している。アルツハイマー病の原因物質として疑われているアミロイド β ペプチド自体がフリーラジカルを発生させることを ESR 技術で明らかにし、培養細胞実験とともにその神経細胞毒性を証明した¹⁴。

このように、ESR 技術はフリーラジカルの挙動を解明することで、酸化ストレスに関与する

疾患の理解において、今後さらなる貢献を果たすことが期待される。

5. 近年の研究動向

5.1. ESR 技術の進展

ESR 技術は、長年にわたりさまざまな分野で利用されてきており、技術の進展とともに、解析の精度と応用範囲が拡大している。医療分野では、酸化ストレス関連疾患の診断や治療において重要なツールとして使用されているが、物理化学分野でも ESR 技術は不可欠な役割を果たしている。

例として、錯体における磁気的相互作用の定量が挙げられ、極低温 ESR 技術や高周波数帯での測定技術を用いることで、磁気的相互作用の強さを厳密に定量することができる¹⁶⁻¹⁸。これにより、錯体の電子構造や磁性の理解が深まり、新しい磁性材料の設計にも貢献している。

このような応用は、ESR 技術が単に医療だけでなく、物理化学を含む幅広い科学技術分野で革新的な研究を支えていることを示している。

5.2. in vivo での応用

ESR 技術は、in vitro（生体外）での応用にとどまらず、in vivo（生体内）でのフリーラジカルの動態をリアルタイムで観察する手法としても飛躍的に進化している。特に、酸化ストレスの評価において、in vivo ESR は従来の技術では捉えられなかった動態を詳細に明らかにする新たなツールとして期待されている。in vivo ESR は、神経変性疾患や心血管疾患の進行に伴う酸化ストレスの動態を詳細にモニタリングするための重要な手段であり、これにより疾患の進行状況をリアルタイムで追跡し、治療の効果を客観的に評価することが可能となっている¹⁴。

酸化ストレスの指標を高感度かつリアルタイムで検出する蛍光プローブの開発も進展している¹⁹。これらのプローブは、特定の酸化ストレ

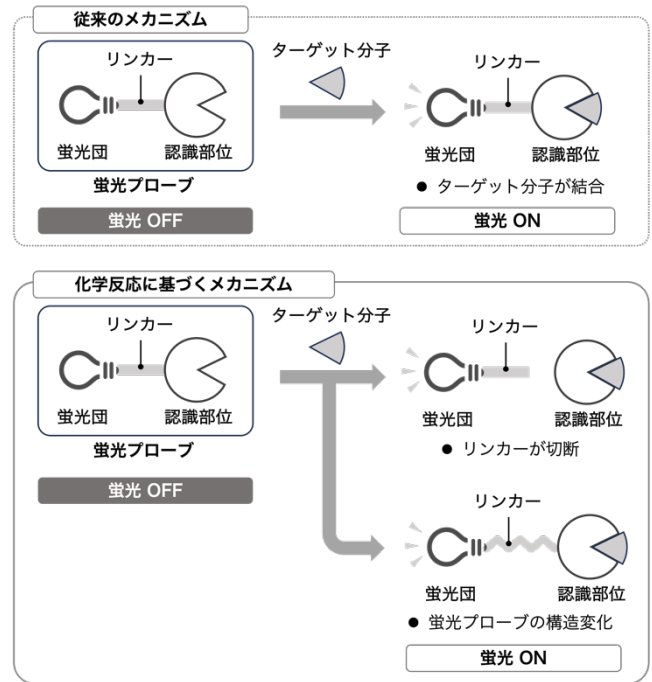


図 3 蛍光プローブの設計戦略の概略

スマーカーに対して高い選択性と感度を持つように設計されており、従来の手法では困難であった、活性酸素種の中でも短寿命な分子を含む微細な酸化ストレスの変動を可視化することが可能である (図 3)。この技術により、疾患モデルにおける酸化ストレスの役割を詳細に解明することが可能となった。つまり、蛍光プローブを用いた生体内イメージングを使用することができる。これは、特定の細胞や組織における特定の酸化ストレスバイオマーカーのレベルと位置を視覚化する方法である。例えば、過酸化水素 (H_2O_2)、過酸化ニトロソ ($ONOO^-$)、次亜塩素酸 ($HClO$)、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\bullet-}$) などのバイオマーカーの変化を、それらに反応するように設計された蛍光プローブを用いて画像化することができる。これらのプローブは、in vivo で使用すると、特定の酸化ストレスバイオマーカーの存在下で蛍光強度が増大し、蛍光色が変化する。この技術を使用して、炎症、臓器損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん、うつ病、糖尿病、がんを含む多くの疾患の動物モデルにおいて、これらのバイオマーカーの役割を調べることができる。本質的には、蛍

光プローブは、生きている動物の中で酸化ストレスがどのように変化するかを見るための「窓」を提供する。

これらの蛍光プローブの進化は、酸化ストレスが関与する様々な疾患の病理学的理解を深めるだけでなく、治療戦略の開発にも新たな方向性を示唆している。これらの技術的進歩により、蛍光イメージング技術は酸化ストレスの動態を詳細に捉え、病態の理解を飛躍的に向上させる手段として確立されつつある。

5.3. ナノ医療における ESR の応用

5.3.1. 量子センサーへの応用

量子センサーを活用した ESR 技術は、ナノ医療における革新的な診断および治療ツールとしての可能性を示している。ESR 技術と MRI（磁気共鳴イメージング）を組み合わせることで、ナノスケールでの酸化ストレスやレドックス状態において、リアルタイムモニタリングが可能であることが示されている。

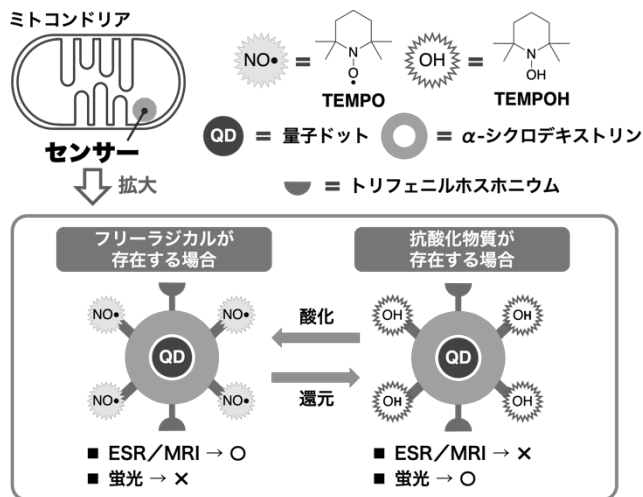


図 4 量子センサーの作動メカニズム

図 4 に概略図を示す。量子ドット (QD) を α -シクロデキストリンによってコーティングし、そこにニトロキシド (TEMPO ラジカル) やトリフェニルホスホニウムを修飾した量子センサー

である。一般的に、トリフェニルホスホニウムは、ミトコンドリアに対して高い親和性を持つ。そのため、修飾したセンサーをミトコンドリアへ選択的に送達することができる。その細胞内で酸化ストレスによって生じたフリーラジカルが存在する場合、酸化が促進され、TEMPO ラジカルの存在率が多くなり、下段の左図のような状態となる。このとき、ESR/MRI シグナルは活性化され、蛍光シグナルは抑制される。一方、細胞内で抗酸化物質が存在する場合、還元が促進され、TEMPO ラジカルは還元体の TEMPOH となる。量子センサーは下段の右図のような状態となる。このとき、ESR/MRI シグナルは抑制され、TEMPOH の存在割合に応じて、蛍光シグナル強度が変化する。

このアプローチは、生体内での微細な変化を捉え、治療の効果を高精度に評価するための新たな手段を提供するものである。特に、酸化ストレスが関与する疾患の進行を詳細に追跡できるため、治療の効果を最適化し、副作用を軽減することが期待されている²⁰。量子センサーの高感度と精密な測定能力は、ナノ医療の分野において、より個別化された医療の実現に貢献するであろう。

5.3.2. ナノ粒子のがん治療への応用

ナノ粒子を用いた ESR 技術は、がん治療において革新的なアプローチとして注目されている。まず、ESR 技術を用いてナノ粒子のがん細胞へのエンドサイトーシス（細胞内取り込み）をモニタリングする技術が開発されている。この研究により、ナノ粒子のがん細胞にどのように取り込まれるかをリアルタイムで追跡することが可能となった。限定的な細胞種と濃度範囲ではあるが、ナノ粒子を用いた安全性の評価における重要な知見が得られた²¹。この技術は、ナノ粒子を用いた治療法の安全性と有効性をより深く理解するための基盤となる。

このような技術的進展は、ナノ医療における ESR 技術の応用範囲を大きく拡大し、従来の治療法に比べて精度の高い治療戦略の実現を促進している。ナノ粒子を用いた ESR 技術は、がん治療の最前線で活用され、今後もその応用が広がることが期待されている。

5.4. 抗酸化研究と ESR の役割

抗酸化物質の研究では、ESR 技術がフリーラジカルの検出と抗酸化能力の評価において重要な役割を果たしている。特に、特定のフリーラジカルを用いて抗酸化物質のラジカル消去能力を定量的に評価することで、その効果を詳細に解析することができる。具体的には、安定した標準的なラジカルである DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) や生理学的に関連性の高いラジカルである $O_2^{\bullet-}$ (スーパーオキシドラジカル) を使用することが多い。

フェノール化合物は、その高い抗酸化作用で注目されている。その抗酸化能力を評価する研究では、DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) ラジカルを用いた標準的な抗酸化試験に加え、ESR 技術が併用されている。具体的には、フェノール化合物やポリフェノールを含む飲料などの抗酸化物質を用いて、キサンチンオキシダーゼ系から生成される $O_2^{\bullet-}$ の消去能を測定している。このように、ESR 技術は抗酸化能を評価する一つの方法として利用されている²²。

さらに、Fenton 反応を利用して植物抽出物の抗酸化活性を評価する方法として、ESR 技術を使用している²³。Fenton 反応とは、 H_2O_2 (過酸化水素) と Fe^{2+} (鉄(II)イオン) が反応して、 $\bullet OH$ (ヒドロキシラジカル) と OH^- (水酸化イオン) を生成する化学反応である。Fenton 反応により生成されたヒドロキシラジカルの捕捉を通じて、抽出物がラジカルをどの程度無害化できるかを評価する。その無害化能力は植物抽出物の抗酸化効果を評価するために重要である。この研究では、抗酸化活性の測定結果を正確に解

釈するためには、植物抽出物の組成とヒドロキシラジカル生成系の両方の影響を考慮することが不可欠であることを明らかにした²³。

これらの研究は、抗酸化物質の効果を多角的に評価するために ESR 技術は不可欠な手段であることを示している。

6. おわりに

本総説では、ESR 技術がフリーラジカルの検出と解析において果たす重要な役割について論じた。ESR 技術は、不対電子を持つ分子やラジカルを高感度で検出することで、疾患の病態生理学的メカニズムを明らかにし、治療効果の評価を可能にしている。特に、酸化ストレスが関与する疾患の理解と治療において、ESR 技術が極めて有用であることを示している。

ESR 技術の進展により、極微量のフリーラジカルや生体内での複雑な分子挙動を詳細に解析することが可能となり、これが疾患の予防や治療において新たな知見をもたらしている。例えば、*in vivo* ESR 技術の進化により、神経変性疾患や心血管疾患における酸化ストレスの役割がより明確に理解されるようになり、これらの疾患に対する新たな治療法の開発が進んでいる。また、ナノ医療においても、ESR 技術はナノ粒子の体内動態や抗がん剤の効果をモニタリングするための重要なツールとして活用されている。

今後、ESR 技術は他の分析技術との組み合わせにより、さらに精度と応用範囲が拡大し、臨床現場での迅速かつ正確な診断や個別化医療において、ますます重要な役割を果たすことが期待される。特に、*in vivo* ESR 技術のさらなる進化やナノ医療への応用が進むことで、ESR 技術は未来の医療においても不可欠なツールであり続けると考えられる。

参考文献

- (1) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fifth edition.; Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, 2015.
- (2) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39* (1), 44–84.
- (3) Zavoisky, E. K. Paramagnetic Relaxation of Liquid Solutions for Perpendicular Fields. *Zhur. Eksperiment. i Theoret. Fiz.* **1945**, *15*, 344–350. Received July 12, 1944.
- (4) Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Electron Paramagnetic Resonance. In *Characterization of Materials*; Kaufmann, E. N., Ed.; Wiley, 2012; pp 1–13.
- (5) Anzai K. Generation, Detection and Bio-protection of Reactive Oxygen Species/Free Radicals. *YAKUGAKU ZASSHI* **2021**, *141* (12), 1359–1372.
- (6) Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* **2002**, *82* (1), 47–95.
- (7) Halliwell, B. Effect of Diet on Cancer Development: Is Oxidative DNA Damage a Biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, *32* (10), 968–974.
- (8) Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Galano, A. Melatonin Reduces Lipid Peroxidation and Membrane Viscosity. *Front. Physiol.* **2014**, *5*.
- (9) Babić, N.; Peyrot, F. Molecular Probes for Evaluation of Oxidative Stress by In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging: State-of-the-Art and Limitations. *Magnetochemistry* **2019**, *5* (1), 13.
- (10) Schwartz, C. J.; Valente, A. J.; Sprague, E. A.; Kelley, J. L.; Nerem, R. M. The Pathogenesis of Atherosclerosis: An Overview. *Clin Cardiol* **1991**, *14* (S1), 1–16.
- (11) Zhong, S.; Li, L.; Shen, X.; Li, Q.; Xu, W.; Wang, X.; Tao, Y.; Yin, H. An Update on Lipid Oxidation and Inflammation in Cardiovascular Diseases. *Free Radical Biology and Medicine* **2019**, *144*, 266–278.
- (12) Markesbery, W. R. The Role of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Arch Neurol* **1999**, *56* (12), 1449.
- (13) Rahman, K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clinical Interventions in Aging* **2** (2), 219–236.
- (14) *In Vivo EPR (ESR): Theory and Application*; Berliner, L. J., Ed.; Biological Magnetic Resonance; Springer US: Boston, MA, 2003; Vol. 18.
- (15) Harris, M. E.; Hensley, K.; Butterfield, D. A.; Leedle, R. A.; Carney, J. M. Direct Evidence of Oxidative Injury Produced by the Alzheimer's β -Amyloid Peptide (1–40) in Cultured Hippocampal Neurons. *Experimental Neurology* **1995**, *131* (2), 193–202.
- (16) Ida, Y.; Ghosh, S.; Ghosh, A.; Nojiri, H.; Ishida, T. Strong Ferromagnetic Exchange Interactions in Hinge-like $\text{Dy}(\text{O}_2\text{Cu})_2$ Complexes Involving Double Oxygen Bridges. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (19), 9543–9555.
- (17) Ishida, T.; Watanabe, R.; Fujiwara, K.; Okazawa, A.; Kojima, N.; Tanaka, G.; Yoshii, S.; Nojiri, H. Exchange Coupling in TbCu and DyCu Single-Molecule Magnets and Related Lanthanide and Vanadium Analogs. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (44), 13609.
- (18) Shimada, T.; Okazawa, A.; Kojima, N.; Yoshii, S.; Nojiri, H.; Ishida, T. Ferromagnetic Exchange Couplings Showing a Chemical Trend

- in Cu–Ln–Cu Complexes (Ln = Gd, Tb, Dy, Ho, Er). *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (21), 10555–10557.
- (19) Geng, Y.; Wang, Z.; Zhou, J.; Zhu, M.; Liu, J.; James, T. D. Recent Progress in the Development of Fluorescent Probes for Imaging Pathological Oxidative Stress. *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52* (11), 3873–3926.
- (20) Lazarova, D.; Semkova, S.; Zlateva, G.; Tatsuya, H.; Aoki, I.; Bakalova, R. Quantum Sensors To Track Total Redox-Status and Oxidative Stress in Cells and Tissues Using Electron-Paramagnetic Resonance, Magnetic Resonance Imaging, and Optical Imaging. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (5), 2828–2837.
- (21) Krzyminiewski, R.; Dobosz, B.; Krist, B.; Schroeder, G.; Kurczewska, J.; Bluysen, H. A. R. ESR Method in Monitoring of Nanoparticle Endocytosis in Cancer Cells. *IJMS* **2020**, *21* (12), 4388.
- (22) Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.-O.; Dommès, J. Comparative Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds Measured by Various Tests. *Food Chemistry* **2009**, *113* (4), 1226–1233.
- (23) Sanna, D.; Fadda, A. Role of the Hydroxyl Radical-Generating System in the Estimation of the Antioxidant Activity of Plant Extracts by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). *Molecules* **2022**, *27* (14), 4560.