

シリーズ「生理学者のための分子モニタリング技術講座」

## 一 酸化窒素の *in vivo* 計測

横山 秀 克<sup>1,2)</sup>

(<sup>1)</sup>山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所・<sup>2)</sup>福島県立医科大学神経精神科)

### I. はじめに

一酸化窒素(NO)は不対電子を有する無機のフリーラジカルであり、その生体内における様々な役割に多くの医学生物学分野の関心を集めている。例えば、NOが血管内皮細胞、神経細胞、マクロファージ等の細胞でNO合成酵素の働きにより、L-アルギニンから産生され、血管を拡張して血圧を調整し、中枢神経では神経伝達物質として作用し、免疫系ではマクロファージによる標的細胞への細胞障害因子として作用していることなどが、明らかにされてきている[1,2]。

NOは反応性の高いフリーラジカルである故、生体内での消失速度は大変速い[3]。このため、NOの*in vivo*計測は困難であり、NOの生体内における挙動には、今なお、解明されていない点が多々残されている。従来から知られているNOの計測法には化学発光法と吸光法がある。これはマイクロダイアリースと組み合わせるとNOを*in vivo*計測しようとするものであるが、NOの代謝産物である亜硝酸イオンにも反応するという重大な技術上の欠点がある[4,5]。現時点で、最も信頼性の高いNO計測法は電子スピン共鳴(ESR)法とポルフィリン修飾電極法である。ESR法はラジカルの不対電子を直接観測する唯一の手段であり、すでに、*in vitro*において特異性の高いNO計測が行われている[6]。一方、ポルフィリン修飾電極法は、最近Malinskiら[7]によって開発されたもので、NOに優れた選択性をもっている。本稿では、ESR法によるNOの*in vivo*計測と、Malinskiらの原法に改良を加えた電極によるNOの*in vivo*計測に関して、その具体的な手

技について筆者の経験をもとに述べてみたい。

### II. ESR法によるNOの*in vivo*計測

前述したように、ESRはフリーラジカルの不対電子を直接観測できる唯一の手法である。しかし、種々の理由により、従来のESR装置による計測は*in vitro*に限られ、*in vivo*計測は不可能であった。この点を解決するため、ここ十年にわたり、筆者らは実験用小動物を対象とした*in vivo* ESRイメージング装置の開発を行ってきた。しかし、この装置は現段階では生体内で発生するフリーラジカルを観測できる感度は有していない。そこで、筆者らはNOの不対電子を安定な形態に変換するスピントラップ剤を新たに開発することにより、NOのESRイメージングが可能になるのではないかと考えた。本項では、まず*in vivo* ESRイメージング装置について概説を行ったうえで、NOのESRイメージングの手法について、内毒素ショックマウスにおけるNOイメージングを例にあげて解説する。

#### A. *in vivo* ESR イメージング装置

##### 1. 共振周波数と共振器

*in vivo* ESR計測を行うためには、生体という、大容量で水の多い試料を常温で測定できなければならない。空洞共振器に試料を挿入し約9.5 GHzのマイクロ波(Xバンド)を照射して感度の向上を図る従来のESR装置では、試料挿入空間は狭く、水による誘電損失が大きいため*in vivo*計測は不可能であった[8,9]。また、ESR計測においては、マイクロ波の磁界成分のみが必要であり、誘電損失を引き起こす電界成分は邪魔な存在となる。従って、誘電損失の

大きい *in vivo* 計測においては、両成分を分離して広いマイクロ波磁界空間のみを利用できることが望ましい。筆者らは、感度は低下するが誘電損失の少ない 700 MHz マイクロ波を使用している [10-20]。また、共振器にはループギャップ型を用いた [10-20]。これは円筒状ループがインダクタンスをギャップ部がキャパシタンスを与える集中定数素子による共振器であり、電界はギャップ部にみに集中し、ループ内に試料を挿入することにより、ループ内に広く分布した磁界のみを有効に利用できる [21-23]。

2. 高速磁場掃引法

ESR は核磁気共鳴 (NMR) と同一の原理に基づく現象であり、観測アルゴリズムには共通のものが多い。しかし、ESR の緩和時間は NMR に比べ遥かに短いため、測定法には連続波法が主に使われている。そのため、測定時間は磁場掃引速度に依存する。そこで、筆者らは磁気ヒステリシスを有しない空心コイルを主電磁石と

した高速磁場掃引法を開発した [12,25]。この手法を用いれば、最大 15 mT/s の高速掃引が可能であり、また、安定なスピントラップ剤をもちいることにより高積算処理をも可能にする。積算回数の平方根に感度は比例するので、これは、感度向上にも寄与する。

3. 装置構成

図 1 に *in vivo* ESR イメージング装置のブロックダイアグラムを示す。本装置は、主電磁石、一对の磁場掃引コイル、一对の磁場勾配コイル、電源、パソコン、ループギャップ共振器、発振器、700 MHz マイクロ波分光部、磁場変調コイルから構成される [10-15,17-20]。主電磁石は水冷式ヘルムホルツ型空心コイルであり、最大電流 10 A を流すことにより、最大静磁場 60 mT を発生させることができる。磁場掃引コイルを電流制御することにより、最高 15 mT/s の磁場掃引が可能であり、これが前述の高速磁場掃引法である。磁気ヒステリシスが存在しな

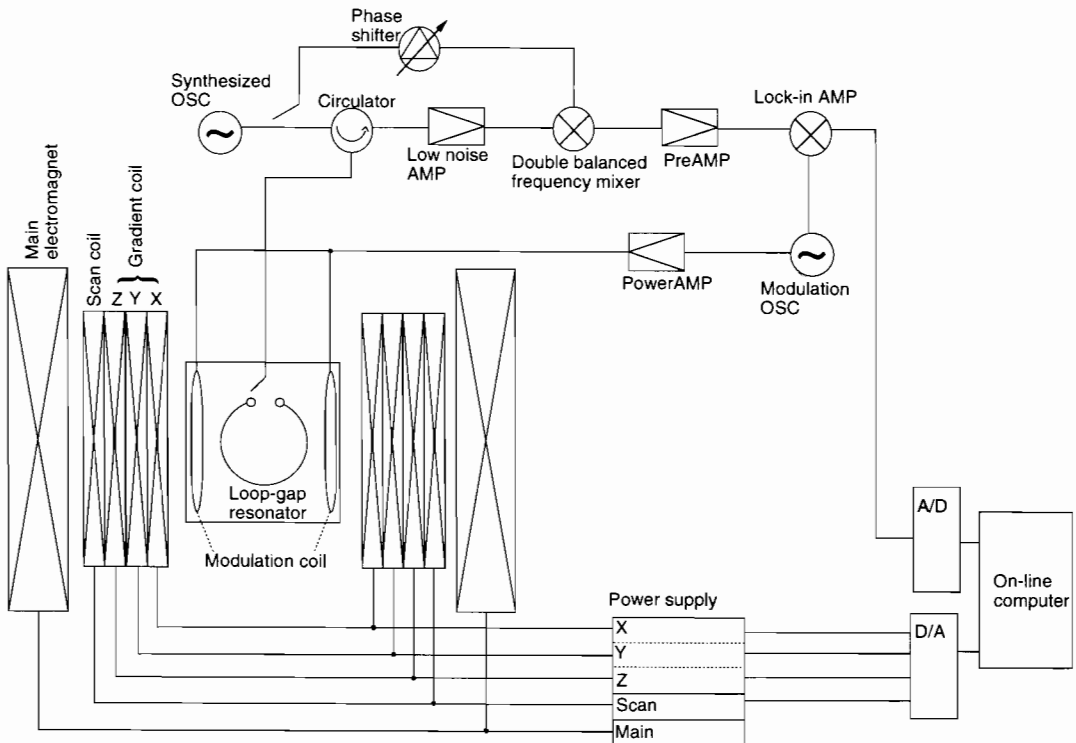


図 1. ESR イメージング装置のブロックダイアグラム。文献20より。

いため[25], 空心コイルは高速磁場掃引を繰り返すことができる。

磁場勾配コイルは, 最大 1 mT/cm, 中心から 20 mm の範囲で, X-, Y-, Z-軸に直線性の良好(設定値からのずれは $\pm 0.01$  mT 以下)な勾配磁場を発生することができる。磁場勾配の直線性が良好な領域は共振器の占める空間と一致している。対向した磁場勾配コイルの間隔は 101 mm である。これらのコイルは Z-軸用の反ヘルムホルツ型コイルと, X-, Y-軸用の 8 の字形のシムコイルと呼ばれるコイルからなる。

共振器には前述のループギャップ共振器を用いている。これは, 内径 41 mm, 軸長 10 mm の 2-ギャップ型であり, 材質は無酸素銅で表面は金メッキ加工してある。ギャップの内側にループ内に電界が漏れるのを防ぐブリッジシールド(テフロンと銅板の二層構造)を有している(図 2)。この共振器内部にはラットなら頭部, マウスなら全身の挿入が可能である。共振点は約 700 MHz で, この周波数帯域の波長は共振器の大きさに充分対応する長さである[22]。

共振器はシールドケース(日本電子)に装着してある。このシールドケースには外部回路と共振器を磁氣的に結合させる結合コイル, 磁場変調を引加するための一対の磁場変調コイルが実装済みである。このシールドケースに装着した状態での無負荷 Q 値は約 600 である。シールドケースは, 内部の共振器の中心が, 対向した磁場勾配コイルの中心に位置するように固定した。これにより, 共振器内部の空間(内径 41 mm, 軸長 10 mm)が, 磁場勾配の直線性が保証されている空間(直径 40 mm の球)にほぼ含まれるようになる。共振器の磁界は共振器の軸長より軸長方向に約 5 mm 遠方まで有効であることが報告されている[11, 26]。また, 共振器内部における変調磁界強度の平坦性が保証されているのは中心から 15 mm の範囲なので[22], 共振器を中心として直径 30 mm, 軸長 20 mm の円筒内の空間が, 有効な画像範囲となる。

共振器は発振器(R4262, アドバンテス)で駆動される。ESR 測定時には共振器からの反

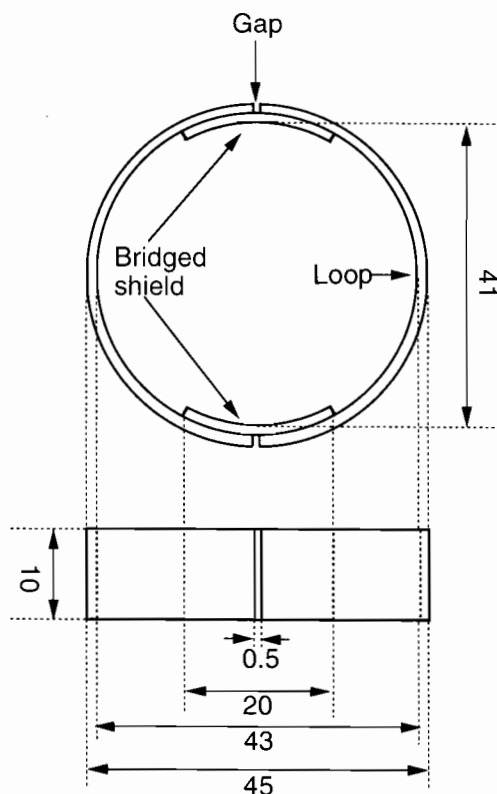


図 2. ループギャップ共振器. 単位は mm. 文献 20 より.

射波が最小になるように, 結合コイルの位置を合わせ, その時の共振周波数に発振器をチューニングする。700 MHz マイクロ波分光部はホモダイナ検波のための, 分波器(HDH, ヒロセ), サーキュレータ(60N50, ウィルトロン), 位相器(PS3, R&K), 低雑音増幅器(AFS-2, MITEQ), ダブルバランスドミキサ(M-19CA, R&K)から構成される。検波増幅された信号は磁場変調周波数でロックイン増幅される。一対の磁場変調コイル(日本電子)はロックイン増幅器(5210, PARC)の内部発振器とパワーアンプ(日本電子)で駆動される。

#### 4. イメージングアルゴリズム

イメージングのアルゴリズムには, NMR でも一部使われていたズームグラフ法[27, 28]を用いている。これは, 一定の面内で磁場勾配強度を一定に保ち, 磁場勾配角度を系統的に変

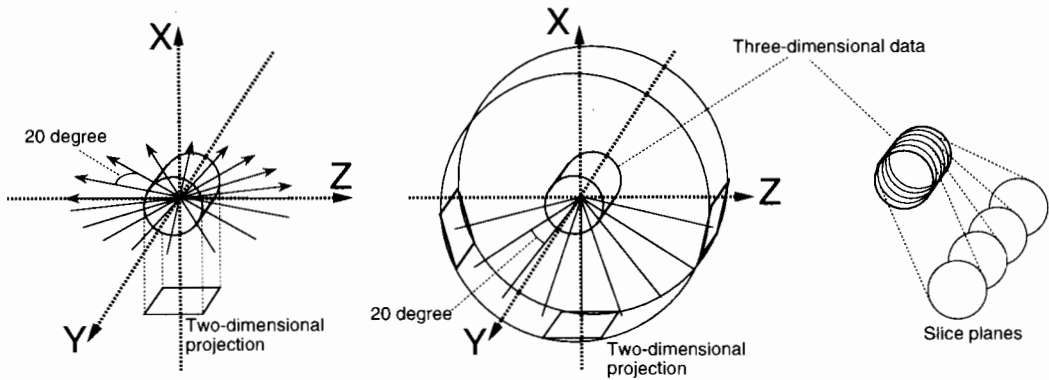


図3. 三次元ズームグラフ法の図解. 磁場勾配変更角度を20度とした場合. 文献20より改変.

化させて、投影スペクトルを得る手法である。例えば、YZ平面上に磁場勾配を20度刻みで回転させながら9回測定を行うことにより、YZ平面に平行な二次元投影像を得る。この二次元投影像を同じく20度刻みで9枚取得することにより、このデータから試料の三次元データを得ることができる。ここより、任意の面のスライス(すなわちCT画像)を切り出す。すなわち、二次元投影像の取得には9回、CT画像の取得には $9 \times 9$ 回、つまり81回の磁場勾配下の測定が必要となる(図3) [11,17,20]。

## B. NO の ESR イメージング

### 1. ジチオカルボキシサルコシン鉄錯体

従来用いられてきたNOのスピントラップ剤には、ヘモグロビン、ジエチルジチオカルバメイト鉄錯体(Fe-DDC)、メチルグルカミンジチオカルバメイト鉄錯体(Fe-MGD)などが知られている。しかし、ヘモグロビンは常温で測定ができず、Fe-DDCは水溶性が低く、生体内での使用には適さなかった。また、Fe-MGDはトラップ剤自体の水溶性は非常に高いが、NOとの反応の後に生ずるNOアダクトの水溶性が極端に低下する点が問題である。そこで、筆者らは、トラップ剤およびNOアダクトの水溶性が高く、かつ常温で使用可能なNOのスピントラップ剤である、ジチオカルボキシサルコシン鉄錯体(Fe-DTCS)を開発した[29]。

Fe-DTCSは以下の手法で合成した。まず、

水酸化ナトリウム(4g, 0.10 mol)を蒸留水(30 ml)に溶解し、水浴させた。サルコシン(4.45 g, 0.05 mol)を加え、攪拌し、固体が全て溶解したのち、二硫化炭素(5 ml, 0.083 mol)のエタノール溶液(15 ml)を激しく攪拌しながら滴下した。滴下中、反応液の温度は0~10度になるよう注意した。滴下終了後、反応液を減圧下濃縮後、エーテルと分液し水層を乾固させ、DTCSを得た。さらに、純粋窒素ガスで十分に酸素をパージした生理食塩水中で、塩化第二鉄とDTCSを1:3の割合で混合することにより、Fe-DTCSを得た。

Fe-DTCSのスピントラップ剤としての特性を、通常のXバンドESR装置を用いて*in vitro*で検討を行ない、以下の結果を得ている。Fe-DTCSはNOと反応してNOアダクト(Fe-DTCS-NO)となり、常温で3本線のESR信号が観測される(図4)。また、このFe-DTCS-NOはヘモグロビンなどと同様に、低温での測定も可能である。さらに、Fe-DTCS-NOは酸素雰囲気下に曝露されても、その信号強度はほとんど減少することなく、Fe-DTCS-NOが極めて安定なNOアダクトであることが示された[29]。

### 2. マウス腹部における内在性に発生したNOのイメージング

先に述べたように、現在の*in vivo* ESR装置は感度では、内在性のフリーラジカルを検出するのは非常に困難なので、内在性のNOイメー

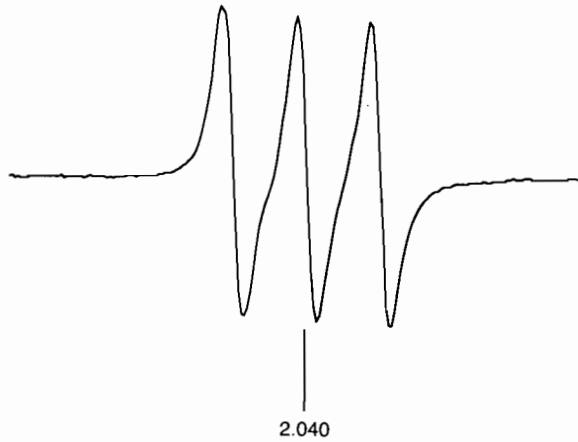


図4. Fe-DTCS-NO の ESR スペクトル. 文献29より.

ジングを行うためには、多量の NO が発生している系を使う必要がある。そこで、筆者らは、免疫系で産生される NO に着目し、リポ多糖 (LPS) 誘発内毒素ショックを NO 発生系として用いることにした。LPS を投与するとマクロファージ等の免疫系細胞内の NO 合成酵素から NO が産生されることが、血中の亜硝酸イオンや NO-ヘモグロビン濃度の上昇により示唆されている [30,31]。筆者らは LPS 投与マウスで NO の ESR イメージングを試み、これに成功した [19]。これは世界で初めての内在性の NO の *in vivo* イメージングであるだけでなく、内在性のフリーラジカルの *in vivo* イメージングとしても、初めてのものである。ここでは、この LPS 投与マウスでのイメージングを例にとりながら、NO の *in vivo* ESR イメージングについて説明する。

まず、マウス (ICR 系雌性 30 g) に大腸菌由来の LPS (10 mg/kg) を I. P. 投与し、その 5.5 時間後にスピントラップ剤 Fe-DTCS (300 mM) を 0.3 ml 皮下に投与した。Fe-DTCS 投与の 3 時間後に、マウスを体軸が Y-軸に一致し、かつその腹部が共振器内に納まるように固定した。そして、約 25 mT の静磁場下に約 700 MHz のマイクロ波を照射して ESR 測定を行ったところ、NO アダクトの ESR 信号が検出された。この ESR 信号は NO 合成酵素阻害剤であるモ

ノメチル L アルギニン (NMMA) を LPS 投与後に間歇的に腹腔内投与することによって抑制される。このことより、NO アダクトの ESR 信号として捉えられた NO の発生は、NO 合成酵素由来であることが示された。また、摘出腹部臓器の ESR 信号強度を測定することにより、NO の臓器分布を検討したところ、肝臓により多く分布していることが示された。

NO アダクトの ESR 信号検出時に、ESR イメージングを行うために、1 mT/cm の磁場勾配を 20 度刻みで回転させながら変更しながら、ESR 計測を行った。詳細な計測条件は以下のとおりである。共振周波数 710 MHz、マイクロ波電力 40 mW、静磁場 25 mT、磁場掃引幅 15 mT、磁場掃引速度 15 mT/s、磁場変調幅 0.2 mT、磁場変調周波数 100 kHz、積算回数 32 回。得られた ESR 信号から位置情報を抽出するために、磁場勾配下 ESR 信号に対して無勾配下 ESR 信号の線形を用いてデコンボリューション処理を施した。デコンボリューション処理には高速フーリエ変換法を用いた。さらに、デコンボリューションされた信号にフィルタ補正逆投影法を施して、画像再構築を行った。こうした画像処理の結果、図 5 に示すような画像を得た。この画像は ZX 面におけるマウス腹部の二次元投影である。先に行った臓器分布の結果より、この画像は肝臓が描出されたものと考え

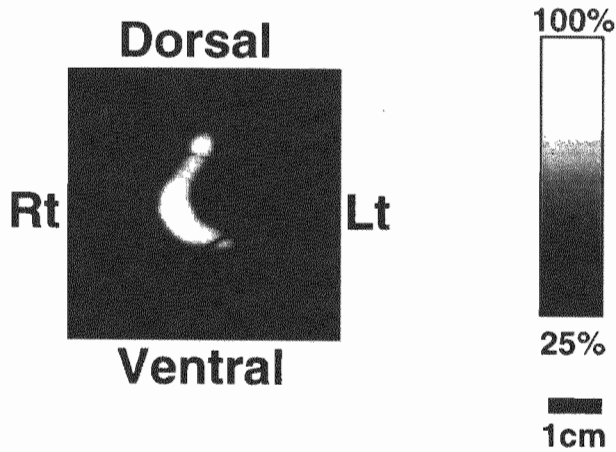


図5. マウス腹部における LPS 誘発内毒素ショック時に発生した NO の ESR 画像 (ZX 面における二次元投影像). 文献19より改変.

られた. 無勾配下 ESR 信号に, 無勾配下 ESR 信号自身を用いてデコンボリューション処理を施すと, デコンボリューション処理に使われた本来の信号線形が得られる. こうして得られた線形の半値幅より空間分解能が求められる. この画像における空間分解能は約 6.3 mm である.

### Ⅲ. ポルフィリン修飾電極法による NO の *in vivo* 計測

ポルフィリン修飾電極は電気化学的に NO の酸化電流値を検出するものである. ここでは, この電極を NO 電極と呼称する. NO 電極は炭素電極の表面に重合した Ni-ポルフィリン誘導体を, さらにその外層にナフィオン膜を有している. Ni-ポルフィリン誘導体は NO に対する感度を高める役割を担っている. すなわち, Ni-ポルフィリン誘導体は NO の電気的酸化を触媒して, ポルフィリン修飾電極の NO に対する感度を高めている. 一方, ナフィオン膜は NO に対する選択性を高めている. これは NO の代謝産物である亜硝酸イオンは NO と酸化電位がほぼ同じであるため, NO 電極が特異性をもつには, 亜硝酸イオンを排除しなければならないからであり, ナフィオン膜は亜硝酸イオンを通さないイオン交換膜として機能してい

る. これらの機構によりポルフィリン修飾電極は NO に対する高い選択性と感度を有している (図 6) [7,32]. 筆者らは Malinski ら [7] の NO 電極を改良して構造を強化し, それをラット脳内に植え込み, 無麻酔無拘束下で使用できるようにした. 以下に, 筆者らの NO 電極の作成手順と, その *in vivo* 応用について, NMDA レセプター刺激後のラット脳内 NO 濃度計測を例にあげながら解説する.

#### A. ポルフィリン修飾電極の作成 [32-35]

##### 1. 炭素電極の作製

カーボンファイバー (外径  $10 \mu\text{m}$ ) を 10 本束にしたものを, 銀ペーストを用いて銅線と導通させ, その接合部をテフロン溶液を用いて絶縁・保護し,  $130^\circ\text{C}$  で 1 時間放置してテフロンを固化させた. 続いて  $50 \text{ mM}$  アミノプロピルシラン溶液にカーボンファイバーを浸して表面を活性化した後, ベンゼンで数 10 s, 蒸留水で 1 min 間洗浄した. その後カーボンファイバーの束をテフロン溶液に 5~6 s 浸した後, 30 min 風乾することにより絶縁した. このカーボンファイバーの束を低粘性のエポキシ樹脂を用いてガラス管 (外径 1 mm) 内に封入し, ガラス管と銅線の接合部をデンタルセメントで固定した後,  $70^\circ\text{C}$  で 8 時間放置してエポキシ樹脂を固化

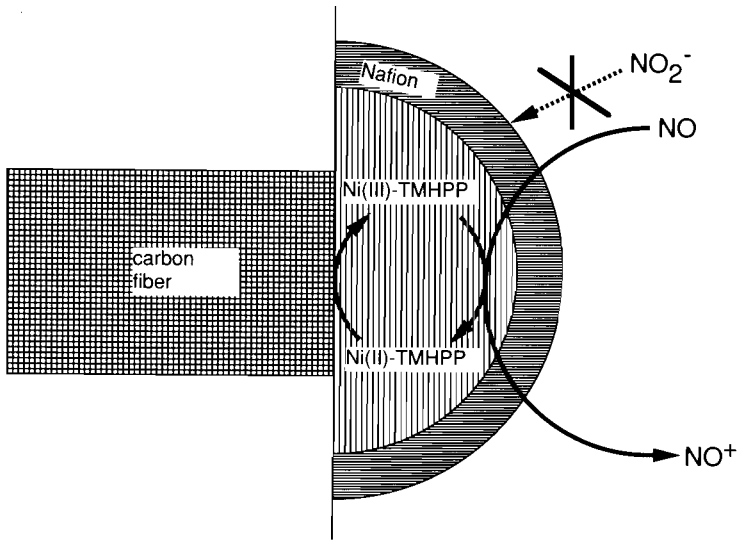


図6. ポリフェリン修飾電極の原理.

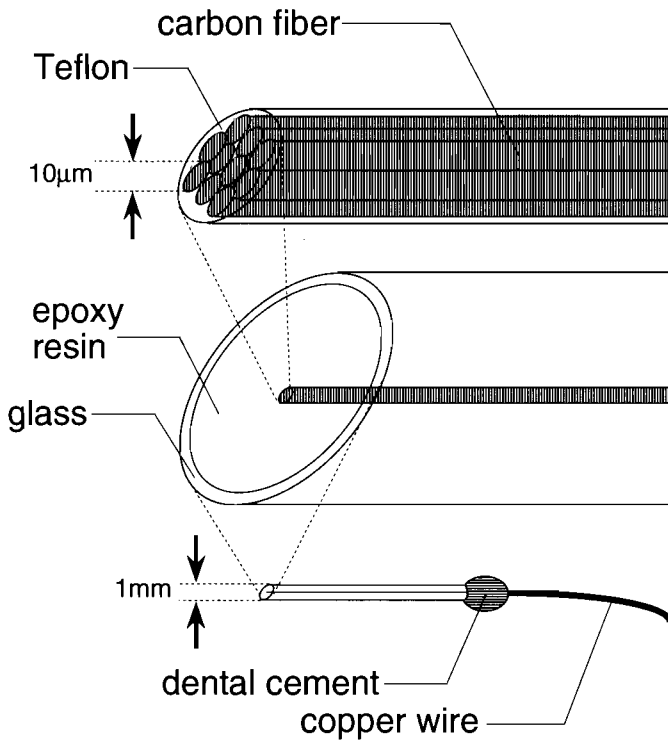


図7. 炭素電極の構造. 文献34より.

させた. 続いて, ガラス管の先端を研磨してカーボンファイバーの断面を露出させ, これを炭素電極として用いた(図7).

Malinski の原法では, 炭素電極のカーボンファイバーはシリンダ状に露出しており, 強度は低い. 彼らの電極も *in vivo* 実験に供されて

いるが、麻酔下の動物を用いた報告しかなされてない。我々の手法では、上述のように、外径 1 mm のガラス管内に充填されたエポキシ樹脂でカーボンファイバーを保護することにより、電極の強度を増強している。これにより、無麻酔無拘束下での計測に耐えうるようになった。

## 2. Ni-ポルフィリン誘導体の重合とナフィオンによるコーティング

炭素電極を 0.1 N NaOH を含む 1 mM の Ni-

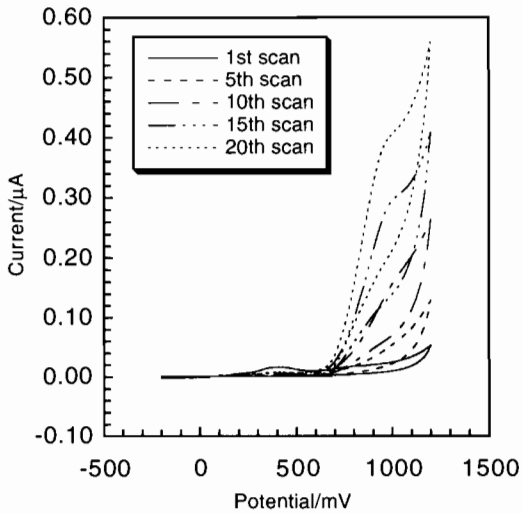


図8. Ni-ポルフィリン誘導体の重合. 文献34より.

テトラキス(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)ポルフィリン(Ni-TMHPP)溶液中において  $-200 \sim 1200$  mV vs 銀/塩化銀電極, 50 mV/s でサイクリックヴォルタンメトリー(CV)を20 スキャンを行なって, 炭素電極の表面に Ni-TMHPP を酸化電解重合した. この電気化学操作には, コンピュータ制御電気化学計測装置(CS1090, サイプレス)を用いた. 後述の電気化学操作はすべて, この装置を用いて行っている. CV スキャンを繰り返すと, 電極表面に析出した重合 Ni-TMHPP に起因する酸化還元ピーク(カーブの右端)の増大が観察され, このピークの増大により, 電極上に Ni-TMHPP が重合されていることを確認した(図8). 重合後, 電極を 5% 低級アルコールを含むナフィオン溶液に 15 s 間浸漬した. 5 min の風乾の後, 電極は pH 7.4 磷酸カリウム緩衝液(PBS)内に保管し, NO 電極を得た. この NO 電極は作用極として機能する.

## 3. 検量線の作成

100 ml の PBS で満たされたバブラー内(図9 A)の酸素を純粋アルゴンガスで十分にパージした後, 純粋 NO ガスでバブリングすることにより飽和 NO 水溶液を得た. 4 ml の PBS が注入された電解セル内に NO 電極の作用極(WE), 対極(CE)としての白金線, および参

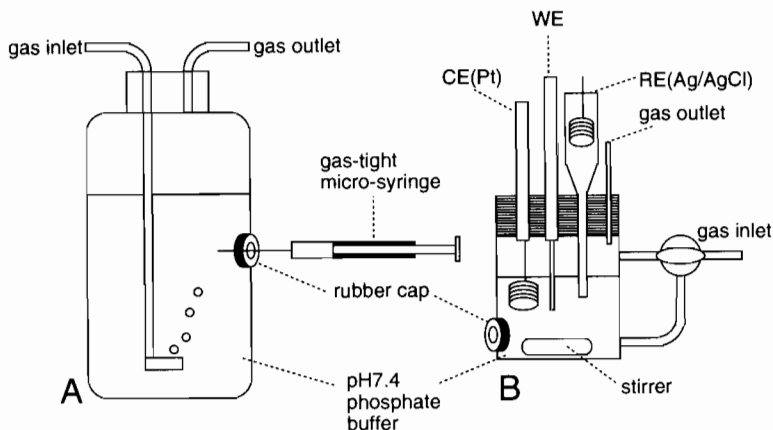


図9. 飽和 NO 水溶液作成用のバブラー(A)と NO 電極の検量線作成用の電解セル(B). 文献34より.



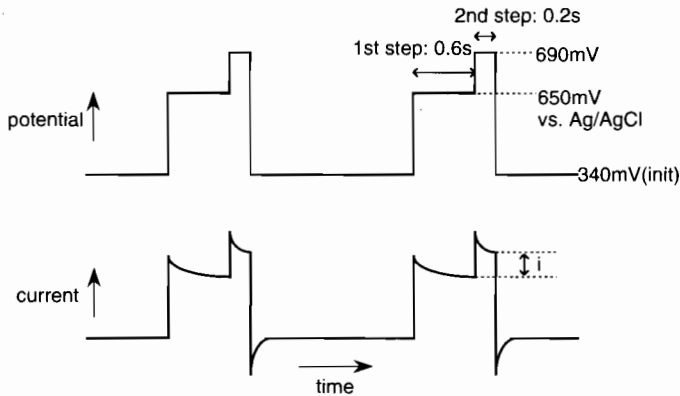


図10. NO 計測用の DDPA. 文献32より.

照極(RE)としての銀/塩化銀電極を留置した(図9B). 酸素をパーズした電解セル内のPBSへ, 飽和NO溶液をマイクロシリンジで注入して希釈することにより, セル内に各種濃度のNO水溶液を調製した. 本電極は *in vivo* 応用を前提にしたものである. 従って, 分析法には, ある酸化電位を有する物質のみを選択的に高感度に定量できる微分ダブルパルスアンペロメトリー(DDPA)を採用した. 1st step: 650 mV/0.6 s, 2nd step: 690 mV/0.2 s の条件でDDPAを行うと(図10), NO濃度に比例した応答酸化電流が得られた. これをもとに各種NO濃度に対応した触媒酸化電流値との関係をプロットし, 検量線を作成した. これを見ると本電極により $10^{-6}$  MオーダーのNOの計測が十分に可能ながわかる(図11). しかし, このような良好な濃度-電流関係を得られない電極も多々存在する. このような不良電極を選別するためにも, 検量線の作成は必須である. 電極作成手技が熟練すれば, 電極不良率は低下するが, ある程度熟練しても, 60~70%は覚悟しなければならない.

#### B. NMDA 投与後の脳内 NO 濃度の変化

我々が採用したDDPA法は, 測定対象物質の濃度の変化量を計測することはできるが, 対象となる物質の絶対濃度を求めることはできない. したがって, NO濃度を変化させるような

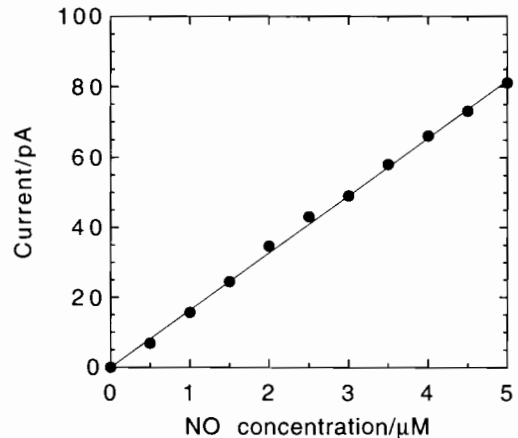


図11. NO電極の検量線. 文献32より.

薬物を投与した後の, NO濃度の推移を知るのに適した手法である. 前述したように, 中枢神経系において, NOが神経伝達物質として機能していることはよく知られている. そのなかでも, NMDAレセプターの作用の一部がNOを介するという事実[36]には多くの関心がよせられている. なぜなら, NMDAレセプターは, 長期増強効果[37], てんかん現象[38,39], 精神分裂病の成因[40,41]などに深く関与していると考えられるからである. しかし, NMDAレセプター賦活後の脳内のNO濃度の変化を *in vivo* で計測した報告はなかった. そこで, 筆者らは, NO電極を用いて, NMDA投与後のラット脳内のNO濃度の時間変化を無麻酔無

拘束下で計測し、NMDA レセプター賦活により脳内 NO が上昇していることを *in vivo* で実証した[32]。ここでは、NO 電極の *in vivo* 応用について、NMDA 投与ラットの脳内 NO 計測を例にあげて説明する。

ペントバルビタール麻酔下で、ラット(ウイスター雄性 200~250 g)の右側海馬背側部に NO 電極(作用極)を留置した。参照電極は対側半球の硬膜上に留置した。参照電極は作用極に対して十分大きいので、対極は使用せず、参照電極でその機能を兼用している。術後2~4日後に、NO 濃度を計測のための DDPA (設定値はⅢ-A-3 参照)を、ラットに植え込んだ電極に対して無麻酔無拘束下で行った。得られた電流値を経時的に記録し、その電流値を、あらかじめ作成しておいた検量線を用いて NO 濃度に変換する。したがって、植え込んだ電極全て

に対して、Ⅲ-A-3 に示した方法で検量線を作成しておく必要がある。

以上のような手法で、NMDA 20 mg/kg (5 ml/kg) を I. P. 投与したラットの NO 濃度を無麻酔無拘束下で測定したところ、対照群(生理食塩水 I. P.)に対して有意な NO 濃度の上昇が観察された。この NO 濃度の上昇は NO 合成酵素阻害剤である NMMA の前処置(30 mg/kg, I. P.)により阻止されており、NMDA 刺激後の NO 上昇が NO 合成酵素由来の反応であることが示された(図12)。

#### Ⅳ. ま と め

NO は *in vivo* 計測が困難である。その高い反応性と速い消失速度のためである。最近、新たな技術の開発によりこれらの問題点が克服されようとしている。ひとつは *in vivo* ESR イ

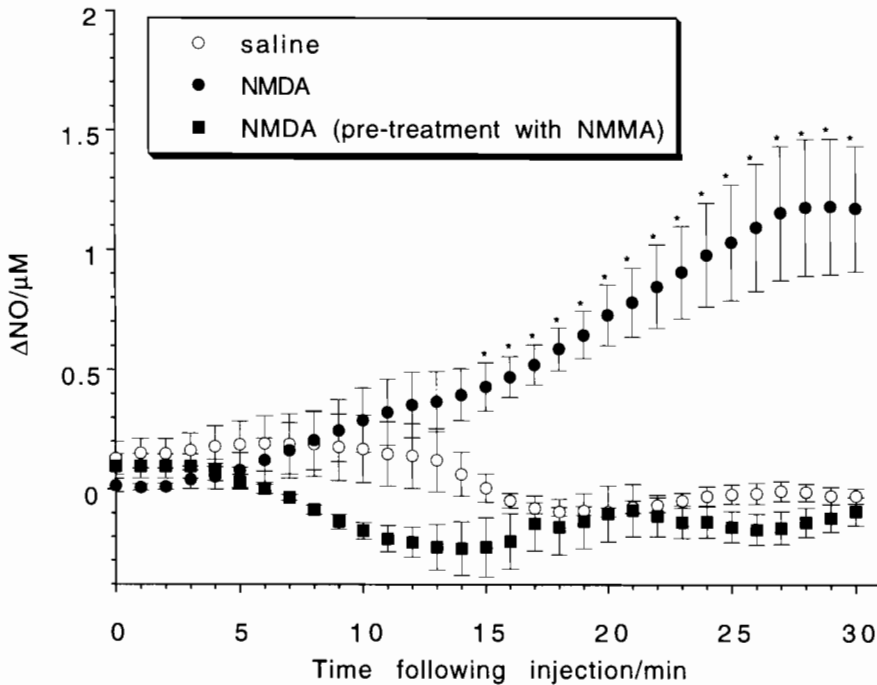


図12. NMDA または生理食塩水腹腔内投与後の NO 濃度の推移。  
 平均値±S. E. M. (Student's t-test:  $p < 0.01$ , \*)  
 生理食塩水投与ラット n=5  
 NMDA 投与ラット n=5  
 NMMA 前処置後 NMDA 投与ラット n=4  
 文献32より。

メーキングである。現状では NO が大量に発生する系でしか成功していないが, *in vivo* ESR は進歩の著しい開発段階の技術であり, 将来, 多くの領域で有効な研究手段となるだろう。もうひとつはポルフィリン修飾電極法, すなわち, NO 電極を用いる方法である。電極の作成功率が低く, 作成者の習熟度に依存している点が問題だが, 現時点では, この方法が生体内の NO の挙動を理解する上で最も優れている。以上の技術における最近の筆者の知見を紹介した。

### 謝 辞

本稿で紹介した研究成果は次の方々との共同研究によるものです。記して謝意を表します(敬称略)。

山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所;  
藤井敏司, 吉村哲彦, 平松 緑, 大矢博昭,  
鎌田 仁

山形大学工学部; 尾形健明  
山形県工業技術センター; 及川和夫  
大分医科大学薬理学; 高山房子  
NTT 物性科学基礎研究所; 河西奈保子  
東北工科大学部; 末永智一, 内田 勇  
東北大理学部; 小林長夫  
浜松医科大学精神科; 森 則夫  
福島県立医科大学神経精神科;  
小藪江浩一, 丹羽真一  
福島県立医科大学 RI 研究室; 土橋宣昭

### 文 献

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-142, 1991.
2. Kerwin Jr JF, Lancaster Jr JR, Feldman PL: Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* **38**: 4343-4362, 1995.
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526, 1987.
4. Huygen C, Lanting RW: Short communications on the Saltzman factor. *Atmos Environ* **9**: 1027-1029, 1975.
5. Menon NK, Pataricza J, Binder T, Bing RJ: Reduction of biological effluents in purge and trap micro reaction vessels and detection of endothelium-derived nitric oxide by chemiluminescence. *J Mol Cardiol* **23**: 389-393, 1991.
6. Mordvintcev P, Mulsch A, Busse R, Vanin A: On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem* **19**: 142-146, 1991.
7. Malinski T, Taha Z: Nitric oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**: 676-677, 1992.
8. Schwan HP, Foster KR: Microwave dielectric properties of tissue. *Biophys J* **17**: 193-197, 1977.
9. Schwan HP, Foster KR: RF-field interactions with biological systems: Electrical properties and biophysical mechanisms. *Proc IEEE* **68**: 104-113, 1984.
10. Ishida S, Kumashiro H, Tsuchihashi N, Ogata T, Ono M, Kamada H, Yoshida E: *In vivo* analysis of nitroxide radicals injected into small animals by L-band ESR technique. *Phys Med Biol* **34**: 1317-1323, 1989.
11. Ishida S, Matsumoto S, Yokoyama H, Mori N, Kumashiro H, Tsuchihashi N, Ogata T, Yamada M, Ono M, Kitajima T, Kamada H, Yoshida E: An ESR-CT imaging of the rat head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. *Magn Reson Imag* **10**: 21-27, 1992.
12. Yokoyama H, Ogata T, Tsuchihashi N, Hiramatsu M, Mori N: A spatiotemporal study on the distribution of intraperitoneally injected nitroxide radical in the rat head using an *in vivo* ESR imaging system. *Magn Reson Imag* **14**: 559-563, 1996.
13. Yokoyama H, Ogata T, Tsuchihashi N, Hiramatsu H, Mori N: An analysis of the intracerebral ability to eliminate a nitroxide radical in the rat after administration of idebenone by an *in vivo* rapid scan ESR spectrometer. *MAGMA* **4**: 247-250, 1996.
14. Yokoyama H, Fujii S, Yoshimura T, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H: *In vivo* ESR-CT imaging of the liver in mice receiving subcutaneous injection of nitric oxide-bound iron complex. *Magn Reson Imag*, **15**: 249-253; 1997.
15. Yokoyama H, Itoh O, Ogata T, Obara H, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H: Temporal brain imaging by a rapid scan ESR-CT system in rats receiving intraperitoneal injection of a methyl ester nitroxide radical. *Magn Reson Imag* **15**: 1079-1084, 1997.
16. Yokoyama H, Sato T, Tsuchihashi N, Ogata T, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H: A CT using Longitudinally Detected ESR (LODESR-CT) of Intraperitoneally Injected Nitroxide Radical in a Rat's Head. *Magn Reson Imag* **15**: 701-708, 1997.
17. 横山秀克: NO の ESR イメージング。血管と内皮 **7**: 26-31, 1997.
18. Yoshimura T, Fujii S, Yokoyama H, Kamada H:

- In vivo electron paramagnetic resonance imaging of NO-bound iron complex in a rat head. *Chem Lett* 309-310, 1995.
19. Yoshimura T, Yokoyama H, Fujii S, Takayama F, Oikawa K, Kamada H: In vivo EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. *Nature Biotech* 14: 992-994, 1996.
  20. Yoshimura T, Yokoyama H, Fujii S: Electron paramagnetic resonance detection and imaging of endogenous synthesized and exogenously supplied nitric oxide. *J Magn Reson Anal* 3: 125-140, 1997.
  21. Froncisz W, Hyde J.: The loop-gap resonator: a new microwave lumped circuit ESR sample structure. *J Magn Reson* 47: 515-521, 1982.
  22. 尾形健明, In vivo 測定用 L-バンド ESR システムの開発とその応用. 昭和59~61年度科学研究費補助金試験研究(2)研究成果報告書, 1987.
  23. Ono M, Ogata T, Hsieh K, Suzuki M, Yoshida E, Kamada H: L-band ESR spectrometer using a loop-gap resonator for in vivo analysis. *Chem Lett* 491-494, 1986.
  24. Hirata H, Ono M: Resonance frequency estimation of a bridged loop-gap resonator used for magnetic resonance measurements. *Rev Sci Instrum* 67: 73-78, 1996.
  25. Oikawa K, Ogata T, Lin Y, Sato T, Kudo R, Kamada H: Rapid field scan L-band electron spin resonance computed tomography system using an air-core electromagnet. *Anal Sci* 11: 885-888, 1995.
  26. 土橋宣昭: 小動物用 L-バンド電子スピン共鳴画像システムの開発. 昭和62~平成元年度科学研究費補助金試験研究(2)研究成果報告書, 1990.
  27. Lauterbur PC: Image formation by induced local interaction: Example employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 242: 190-191, 1973.
  28. Lauterbur PC, Lai CM: Zeugmatography by reconstruction from projections. *IEEE Trans Nucl Sci NS-27*: 1221-1231, 1980.
  29. 吉村哲彦, 藤井敏司, 横山秀克: 一酸化窒素測定試薬. 公開特許広報 JP96179024, 1996
  30. Stuehr DJ, Marletta MA: Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7738-7742, 1985.
  31. Westenberger U, Thanner S, Ruf HH, Gersonde K, Sutter G, Trnz O: Formation of free radicals and nitric oxide derivative of homoglobin in rats dying shock syndrome. *Free Rad Res Comms* 11: 167-178, 1990.
  32. Yokoyama H, Mori N, Kasai N, Matsue T, Uchida I, Kobayashi N, Tsuchihashi N, Yoshimura T, Hiramatsu M, Niwa S: Direct and continuous monitoring of intrahippocampal nitric oxide (NO) by an NO sensor in freely moving rat after N-methyl-D-aspartic acid injection. *Denki Kagaku* 63: 1167-1170, 1995.
  33. Yokoyama H, Mori N, Osonoe K, Kasai N, Hiramatsu M, Yoshimura T, Matsue T, Uchida I, Kobayashi N, Tsuchihashi N, Niwa S: Increase of central nitric oxide during pentylentetrazol-induced seizures in rats. *Psych Clin Neurosci* 49: S277-S279, 1995.
  34. 横山秀克, 河西奈保子, 平松 緑, 吉村哲彦, 末永智一, 内田 勇, 小林長夫, 土橋宣昭, 森則夫, 丹羽真一: NO マイクロセンサーの中樞神経領域における *in vivo* 応用. *生物物理*, 35: 123-124, 1995.
  35. 横山秀克: 一酸化窒素の *in vivo* 計測法の進歩. *脳と精神の科学* 7: 249-254, 1996.
  36. Bread DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 1989, 9030-9033.
  37. Gustafsson B, Wingstrom H: Physiological mechanisms underlying long-term potentiation. *Trends Neurosci* 11: 156-162, 1988.
  38. Mori N, Wada JA, Sato T, Saito H, Kumashiro H: Important roles of N-methyl-D-aspartate receptors in expression of amygdaloid-kindled seizure demonstrated by intraperitoneal administration of L-aspartate in dimethyl sulfoxide. *Epilepsia*, 33: 583-588, 1992.
  39. Nevins ME, Arndt SM: A comparison of the anticonvulsant effects of competitive and non-competitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Brain Res* 503: 1-4, 1989.
  40. Kemp JA, Foster AC, Wong EHF: Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 10: 294-298, 1987.
  41. Sonders M, Keana JFW, Weber E: Phencyclidine and psychotomimetic sigma opiates; recent insights into their biochemical and physiological sites of action. *Trends Neurosci*, 11: 37-40, 1988.