

In vivo EPRを用いた紫外線照射したマウスの皮膚における フリーラジカル生成の評価

神林 勲・塚本 未来*・木本 理可**・東郷 将成***・秋月 茜[†]・沢村 祥子^{††}・内田 英二^{†††}

北海道教育大学札幌校保健体育教育研究室

*東海大学国際文化学部

**藤女子大学人間生活学部

***旭川大学短期大学部

[†]拓殖大学北海道短期大学

^{††}北海道教育大学岩見沢校卒業生

^{†††}大正大学社会心理学部

In vivo EPR Studies on Free Radicals Generation in UV-irradiated Mouse Skin

KAMBAYASHI Isao, TSUKAMOTO Miku*, KIMOTO Rika**, TOGO Masanari***,
AKIZUKI Akane[†], SAWAMURA Shoko^{††} and UCHIDA Eiji^{†††}

Physical Education Laboratory, Sapporo Campus, Hokkaido University of Education, Sapporo 002-8502

*School of International Culture Relations, Tokai University, Sapporo 005-0825

**Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University, Ishikari 061-3204

***Asahikawa University Junior College, Asahikawa 079-8501

[†]Takushoku University Hokkaido College, Fukagawa 074-8585

^{††}A graduate of Sports Education Department, Iwamizawa Campus, Hokkaido University of Education, Iwamizawa 068-8642

^{†††}Faculty of Psychology and Sociology, Taisho University, Tokyo 017-8470

ABSTRACT

This study was designed to investigate the generation of free radicals (including reactive oxygen species) during exposure to ultraviolet light (UV) in intact mouse skin by an *in vivo* EPR (electron paramagnetic resonance) spectrometer. Two kinds of nitroxyl probes, TEMPONE (4-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-d16-1-oxyl) and CMP (3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl), were injected intraperitoneal and/or directly supplicated to skin. Signal decays of nitroxyl probes were monitored with the *in vivo* EPR spectrometer equipped with a surface-coil-resonator after UV (UVA + B) irradiation for 3 minutes. In the direct skin supplication study, there was no significant difference between

the control and UV-irradiation groups in half-lives (sec.) of TEMPONE. However, half-lives of CMP were significantly prolonged in the UV-irradiation group compared with the control group, and the difference was substantially eliminated with a spin-trapping agent (PBN, N-tert-butyl- α -phenylnitrone) before UV-irradiation. In the intraperitoneal injection study, half-lives of CMP measured in the skin were significantly prolonged in the UV-irradiation group compared to that of the control group. Our results suggest that direct applicating the nitroxyl probe to the skin is useful as an extremely noninvasive method to evaluate free radical generation after UV-irradiation.

キーワード：活性酸素種，酸化還元バランス，ナイトロオキサイド，半減期，塗布

緒 言

太陽から生じる紫外線 (ultraviolet, 以下UV) 放射は細胞内でフリーラジカル (一部の活性酸素種を含む) を生成させる (Jung et al., 2008; 中込ほか, 2010)。皮膚の角膜細胞には一酸化窒素合成酵素が存在し, UV照射によって一酸化窒素 (NO) やペルオキシナイトライト (ONOO⁻) が生成され, それらが角質細胞の機能異常をもたらす (Delicostantinou et al., 1996)。そのため皮膚をUVに露出することは, 紅斑・浮腫や色素沈着, 炎症, 早期の皮膚老化など様々なタイプの損傷を引き起こすといわれている (Herrling et al., 2006)。しかしながら, ヒトの皮膚表面は様々な環境因子に囲まれ, 生活をする限りUVに露出することはやむを得ない。したがって, 皮膚におけるUV誘発性のフリーラジカル生成やそれらによる損傷の定量的評価が求められる (Takeshita et al., 2006; Jung et al., 2008)。

電磁常磁性体共鳴 (electron paramagnetic resonance, 以下EPR) 法は磁場を発生させて不対電子を検出する磁気共鳴分光法であり, フリーラジカル生成の評価を可能にする。フリーラジカルの寿命は極めて短く, EPRで直接検出するのは困難なため, スピンプローブ剤であるナイトロオキサイドの応用が必要となる (Soule et al., 2007)。ナイトロオキサイドは不対電子を持ち, 生体内では生物学的還元システムによりEPR信号が減衰す

るが, その周囲にフリーラジカルが多量に存在するとEPR信号の減衰速度が鈍化する。そこで, ナイトロオキサイドのEPR信号の減衰速度に着目することでフリーラジカル生成を間接的に評価することが可能となる (Bobko et al., 2007)。

フリーラジカルの出現や消失は血流量, 代謝やその他の生理学的因子に影響される。このため, 生きた動物に対して非侵襲的な技術を用いることによつてのみ, フリーラジカルの正確な実態を明らかにすることができる。現在, 低周波数の電磁波により実験動物に投与されたナイトロオキサイドのEPR信号の*in vivo*測定が可能である。Take-shita et al. (2006) によれば, EPRに装備されたサーフェイスコイルは, コイル表面から1~2 mmの範囲のナイトロオキサイドを捕らえて信号強度を測定し, この感度はコイル表面からの間隔の増加と共に急激に低くなると報告されている。ヒトの表皮の厚さは0.05~0.1mmであり, その下の真皮は1~5 mm, さらにその下にはcm単位の皮下組織がある (Herrling et al., 2006)。このことからサーフェイスコイルは皮膚組織の表皮から真皮周辺のナイトロオキサイドを選択的に測定できる。したがって, サーフェイスコイルを用いることによつて, 皮膚表面のUVによるフリーラジカル生成の実態をEPRによつて評価することが可能となる。

これまでEPRやナイトロオキサイドを用いて, 皮膚におけるフリーラジカル生成などが評価され

てきたが、それらは皮膚バイオプシー組織を対象としたもの (Herrling et al., 2003; Herrling and Fuchs, 2006; Albrecht et al., 2016), もしくは生体内にナイトロオキサイドを投与するもの (小澤・竹下, 2001; Takeshita et al., 2006) という侵襲的評価のみであった。今後、ヒトの皮膚における外的刺激の影響や抗酸化物質の評価をより簡便に行うことを可能にするには、非侵襲性を重視したナイトロオキサイドの皮膚への塗布という投与方法の確立が必要である。

そこで本研究では、生きた動物の皮膚におけるUV照射によって誘発されたフリーラジカル生成を、ナイトロオキサイドを皮膚に塗布するという極めて非侵襲的な方法の基礎的データの収集を目的に、生体内投与 (腹腔内投与) と塗布による方法との結果を比較し、塗布の可能性について検討した。

方 法

1. 実験の概要

健康なマウスの皮膚へのUV照射の影響を、EPRやスピントラップ剤を用いて測定した。スピントラップ剤であるナイトロオキサイドを、マウスの皮膚表面に塗布する塗布実験と、生体内投与としてマウスの腹腔内に注射する腹腔内投与実験を行った。塗布実験においてはコントロール群 (control group, 以下C群), UVを皮膚へ照射するUV群, スピントラップ剤であるN-tert-butyl- α -phenylnitron (以下PBN) を投与してUV照射を皮膚に行うUV+PBN群に分けた。腹腔内投与実験においてはC群とUV群の2群に分けた。それぞれの群においてEPRを用いてナイトロオキサイドの信号強度を測定し、生体内のフリーラジカル生成による酸化還元バランスの変化を半減期によって評価した。

2. 試 薬

ナイトロオキサイドとして用いた3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl (以下CMP)

と4-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-piperdine-d₁₆-1-oxyl (以下TEMPONE), スピントラップ剤であるPBNはToronto Research Chemicals社から購入した。アセトンとエタノールは和光純薬工業株式会社から、ウレタンはSigma社から購入した。

CMPとTEMPONEを用いたのは、予備実験の結果を基にした。皮膚中のフリーラジカル生成を測定するには、ナイトロオキサイドを皮膚組織内にてできるだけ滞在させておくことが重要である。塗布という投与方法は外的刺激や代謝など様々な因子からの影響を受け特に困難である。そのため、皮膚に浸透しやすく、代謝速度が遅いという特性を有するナイトロオキサイドを用いる必要がある。この条件に合うものを特定するため、3種類のナイトロオキサイドを用いて予備実験を試みた。CPH (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl), TEMPONEおよびCMPをリポゾーム (Honzak et al., 2000), エタノールあるいはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させて試験したところ、TEMPONEとCMPのエタノール50%溶液がより再現性が高く、塗布実験に適していた。エタノールがTEMPONEやCMPの皮膚への浸透を促進したと考えられる。このため、本研究ではナイトロオキサイドとして、TEMPONEとCMPを用いた。

3. 実験動物

塗布および腹腔内投与実験のいずれにおいても健康な雄性ICRマウス (測定時6~7週齢, 体重約30g) を使用した。マウスは日本エスエルシー株式会社から購入し、室温・湿度が調節された部屋で飼育され、実験開始まで市販の飼料や水を自由摂取させた。塗布実験においては12匹のマウスを対象にマウスへの負担を考慮して、対照測定 (C1群) とUV照射測定 (UV群) を行うマウス6匹と、対照測定 (C2群) とUV照射前にPBNを投与して測定 (UV+PBN群) を行うマウス6匹に分けた (計4群)。また、腹腔内投与実験では、3匹のマウスを対象に、対照測定 (C3群) とUV照射測定 (UV群) を行った (計2群)。なお、本

研究は札幌医科大学の動物実験実施規則に則り実施された。

4. *In vivo* EPR測定

EPR法とナイトロオキシドによってマウスの皮膚のフリーラジカル生成を測定した。直径5 mmのサーフェイスコイルが装備された*in vivo* EPR装置 (Sato-Akaba et al., 2009) を用いた。周波数は1.2 GHz, 中心磁場強度は42 mTとした。測定パラメーターについては, time constantは100 ms, sensitivityは1 mV, modulationは0.1 mTとした。また, 測定条件については, 開始電流は-3A, 電流増分は0.01A, 終了電流は3 A, 立上時間は0.05秒, 保持時間は0.08秒, 繰返回数は10回, 測定点数は601回とした。特別な場合を除き, 全ての測定は同じ条件で行われた。測定は他の磁気の影響を受けないよう, 細心の注意を払い行われた。

5. UV照射

UV照射にはUV照射装置RUVF-203S (SAN-EI ELECTRIC社製) を用いた。UV光はUVA+B (290-400nm) であり, いずれの実験においても一定の強度 (320mJ/cm²) で3分間照射した。

6. 実験プロトコル

(1) 塗布実験 (Fig. 1)

マウスにウレタン (1200mg/kg) を腹腔内注射して麻酔し, マウスの背部を除毛して皮膚を露出させた。皮膚を均一に洗浄するため, 露出された皮膚をアセトンでふき, 3分間の経過後にナイトロオキシド (TEMPONEもしくはCMP) を10 μ l塗布した。

マウスの露出した背部の皮膚を上から首部・背部・臀部と3つに分類し, 1匹のマウスから3箇所測定部位を確保した。C1群とC2群の対照群においては, 塗布後およそ5分たってから皮膚表面に残っている試薬をふき取り, 塗布した部位に透明なラップをおき, その上からサーフェイスコイルを添えてEPRでの測定を行った。

UV群においては, 塗布2分後にUVを3分間照射し, その直後に対照群と同じ要領で測定した。UV+PBN群においては, PBNをナイトロオキシド水溶液に溶解したものを塗布し, これ以外はUV群と同じ要領で測定を行った。

(2) 腹腔内投与実験

塗布実験と同様に, マウスにウレタンを投与して麻酔し, 背部を除毛して皮膚表面を露出させた。そしてCMP水溶液 (200mM, 75 μ l) を腹腔内投与した。対照群であるC3群においては, その直後背部にサーフェイスコイルを添えて測定を行い, UV群においてはCMP水溶液の注射器による投与7分後にUVを3分間照射し, その直後に測定を行った。



Fig. 1 The experimental protocol of the direct skin supPLICATION study.

7. 半減期の算出

Fig. 2 にEPRで得られたナイトロオキシド (TEMPON) の時間経過 (75秒後, 225秒後および450秒後) による信号減衰の様子, およびより詳細な時間経過に伴う信号強度の減衰を数値で示した。信号強度を自然対数で規格化し経時的に表示することで一次速度反応式を求め, 半減期を2

の自然対数 (0.693) で一次速度反応式の速度定数 (a) で除すことで算出した [半減期 ($t_{1/2}$) = $0.693/a$]。

8. 統計処理

測定結果はすべて、平均値 ± 標準誤差 (Mean ± SE) で示した。塗布実験における平均値の差の検定には対応のある t 検定を用い、各 C 群に対する相対値の比較には対応のない t 検定を用いた。また、腹腔内投与実験では Wilcoxon 符号付き順位検定により平均値を検定した。危険率はすべて 5% 未満をもって有意とした。

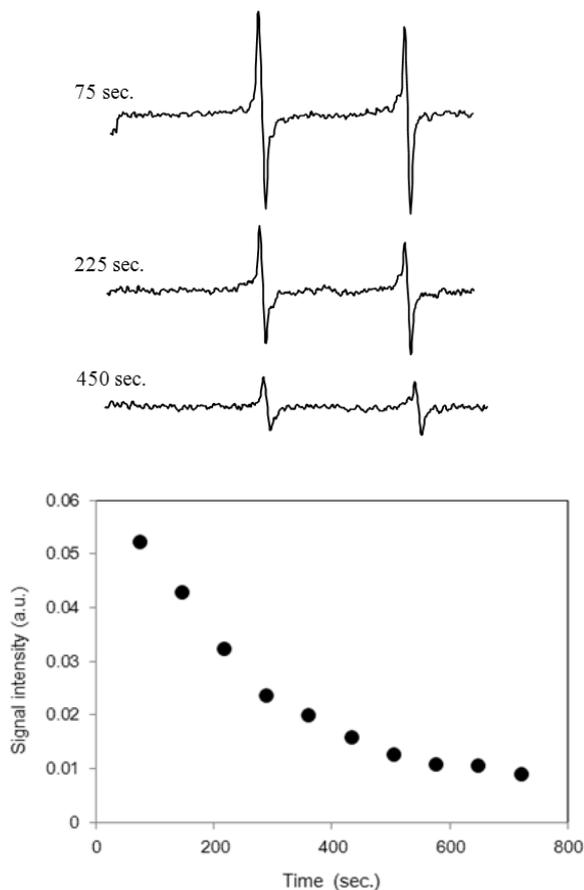


Fig. 2 A typical example of EPR spectrum of TEMPONE (top panel) and time-dependent decay of signal intensity (bottom panel).

結果

1. 塗布実験

TEMPONEを用いた塗布実験の結果をFig. 3に示した。各群の半減期は、C1群 232.7 ± 10.2 sec, UV群 183.2 ± 31.6 secおよびC2群 247.5 ± 24.4 sec, UV+PBN群 240.8 ± 44.7 secとなり、それぞれC群との間で有意差はなかった (Fig. 3A)。しかしながら、UV群はC1群に比べて半減期が小さく、UV+PBN群はUV群よりもC2群の半減期に近づく傾向が見られた。C群の値を100として算出したUV群とUV+PBN群の相対値を比較したが、UV群 $78.7 \pm 12.3\%$, UV+PBN群 $99.9 \pm 17.4\%$ となり、有意差はなかった (Fig. 3B)。

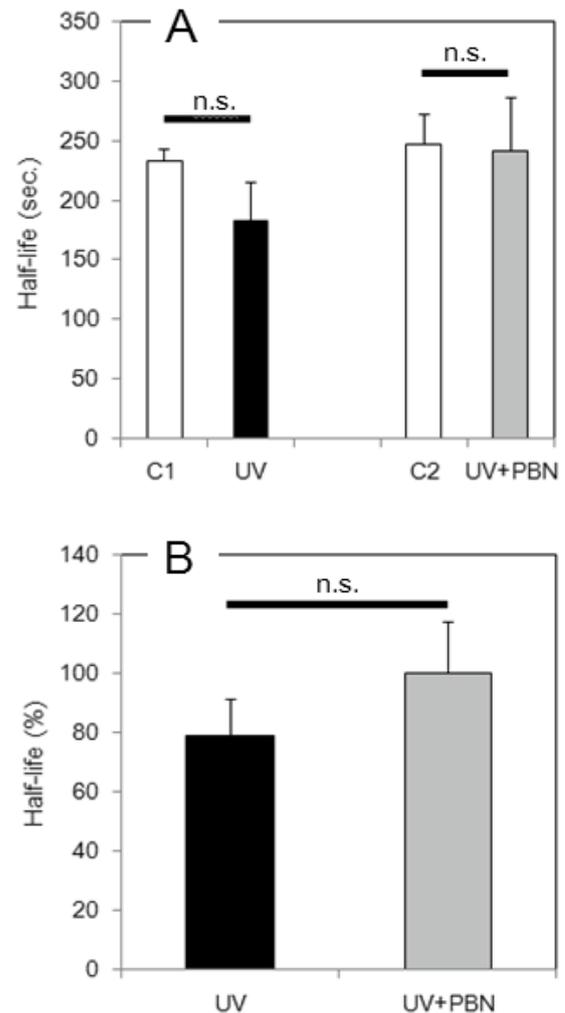


Fig. 3 Mean half-life time of EPR signal intensity of TEMPON applied to the mice skin. The panel A and B denote comparison of absolute and relative values in each group, respectively.

CMPを用いた塗布実験の結果をFig. 4に示した。各群の半減期は、C1群 403.9 ± 29.6 sec, UV群 485.7 ± 23.7 secおよびC2群 802.0 ± 32.1 sec, UV+PBN群 535.0 ± 23.8 secとなり、それぞれC群との間で有意差が認められた (Fig. 4A)。また、C群の値を100として算出したUV群とUV+PBN群の相対値を比較したところ、UV群 $120.0 \pm 2.7\%$, UV+PBN群 $66.9 \pm 3.4\%$ となり、群間に有意差があった (Fig. 4B)。

2. 腹腔内投与実験

CMPをマウスの腹腔内に投与した結果をTable 1に示した。C3群に比較してUV群のCMP半減期

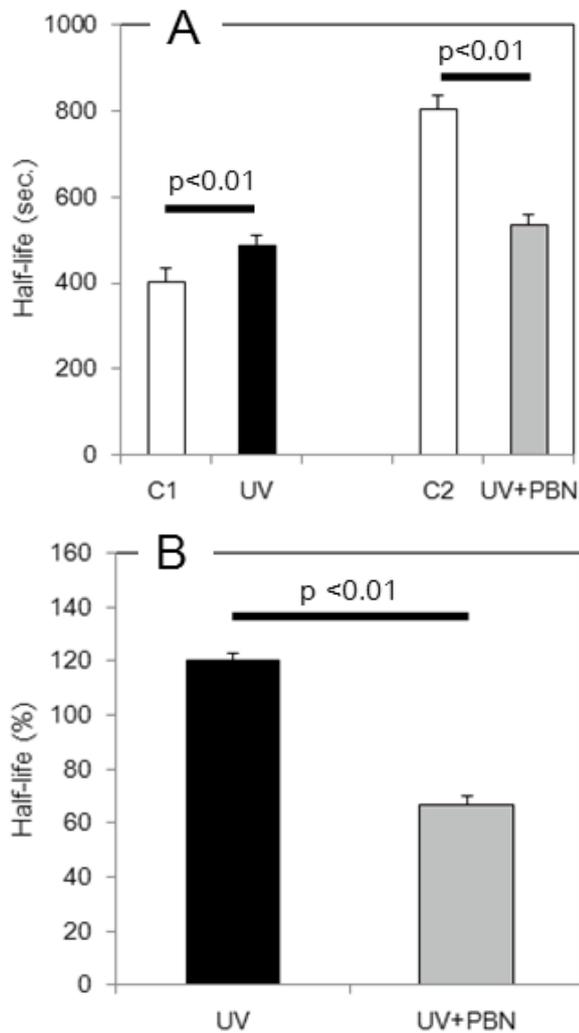


Fig. 4 Mean half-live time of EPR signal intensity of CMP applied to the mice skin. The panel A and B denote comparison of absolute and relative values in each group, respectively.

は有意に長く、CMPを用いた塗布実験の結果と同様な結果が得られた。

考 察

本研究では、生きたマウスの皮膚中においてUVにより誘発されたフリーラジカル生成について、EPRおよびスピンプローブであるナイトロオキサイドを用いて評価した。本研究は、ナイトロオキサイドの投与方法として、皮膚への塗布と腹腔内投与とを比較し、より非侵襲的な方法である塗布の可能性について検討した最初の研究例である。生体内の酸化還元バランスはどちらかに偏ることなく、両者のバランスをとり均衡が保たれることが重要である。本研究では、UV照射によって皮膚内で生成したフリーラジカルが、皮膚表面で酸化損傷を誘起し、酸化還元バランスを崩壊させた一例を示していると思われる。

TEMPONEはシグナルの線幅が細いためピークの高さを検出しやすく、またN-15にすることで信号が2本になるためよりピーク値が高くなり信号が検出しやすい。TEMPONEの塗布実験では、標準誤差が大きく群間で有意な差は見られなかった (Fig. 3A)。TEMPONEは信号強度の検出は比較的容易だが、その一方でそれ自体の代謝速度が速いため、UV照射やPBN投与の影響を反映し難かったと推察される。そこで、TEMPONEと比較して代謝速度が遅いCMPを用いて塗布実験を行った。CMPは脂溶性があり、容易に皮膚へ浸透した。CMPを用いた塗布実験でC1群とUV群の半減期を比較すると、有意にUV群の半減期は長くなっていた (Fig. 4A)。これはUV群において、UV照射によって皮膚表面にフリーラジカル生成が誘発され、そのため生体内の還元力が低下して還元速度が遅くなったと考えられる。CMPの半減期の増加は、フリーラジカル生成による抗酸化物質の損失が原因であろう。Yamato et al. (2009) は抗酸化物質量の減少により還元速度が遅くなることを、脳梗塞モデルマウスを用いた実験で明らかにしている。

Table 1 Mean half-life time of EPR signal intensity of CMP administrered intraperitoneally.

group	C3	UV	p
Half life (sec.)	808.5 ± 57.8	1309.7 ± 77.0	0.01

上記した還元速度の低下の要因がフリーラジカル生成であるか否かを確かめるため、PBNを事前投与と同様に実験を行った。C2群とUV+PBN群の半減期を比較すると、UV+PBN群の方が有意に低値を示した (Fig. 4A)。また、UV群とUV+PBN群の半減期を相対値で比較すると、有意にUV+PBN群の方が小さかった (Fig. 4B)。スピントラップ剤であるPBNの事前投与は、UVにより発生したフリーラジカルを減少させ、UV照射下での還元速度減衰を抑制したと考えられる。このことから、Fig. 4Aで見られたUV群における半減期の増加は、UV照射によって誘発されたフリーラジカル生成によるものであったと推察される。また、PBNはフリーラジカルの捕捉作用だけでなく、抗酸化作用や抗老化作用、および神経保護作用なども報告されている (Kawai et al., 2008)。C2群よりUV+PBN群の半減期が小さかったことについては、このようなPBNの作用が働き、生体内におけるフリーラジカルの還元作用が促進したと考えられる。

代謝速度が遅いCMPを用いて腹腔内投与実験を行い、塗布実験の結果と比較することで、塗布による評価の可能性を検討した。腹腔内投与実験でも塗布実験と同様に、UV群の方がC3群と比較して有意に半減期が大きかった (Table 1)。このことから塗布実験は腹腔内投与実験と同様に、生体内の酸化還元バランスを観察し、フリーラジカル生成やそれらによる損傷を評価することができる方法であると考えられる。塗布は極めて非侵襲的な方法であるため、今後ヒトの皮膚における外的刺激の影響や抗酸化物質の評価等をより簡易に、また安全に行うことが可能となるだろう。

本研究で観察されたUV照射によるナイトロオキサイド (CMPとTEMPONE) の半減期の増加は、

生体内の抗酸化物質の減少に関与していると推察されるが、この点を実証するため、抗酸化物質の定量化が今後の課題であると考えられる。また、UV照射下でナイトロオキシドの動態を観察したEPR研究 (小澤と竹下, 2001; Takeshita et al., 2006) では、ナイトロオキシドの還元速度の増加が報告されており、本研究の結果とは異なる。疾病や炎症反応等により慢性的にフリーラジカルや活性酸素種が生成されると、それに対抗するため抗酸化物質の量が増加し、ナイトロオキシドの還元速度が増加することが報告されている (Kuppusamy et al., 2002; Fujii et al., 2013; 神林ほか, 2017)。ヘアレスマウス皮膚に対するUVB照射では照射直後から血管透過性亢進や細静脈拡張等の即時性の微小循環系挙動変化が報告されている (申込ほか, 2010)。以上のことから、今後は様々な生体の状況において *in vivo* EPRを用いてナイトロオキシドの動態を検討する必要があるであろう。

結 論

本研究では、皮膚表面におけるUV照射によるフリーラジカル生成を、サーフェイスコイルを装備したEPRやスピンプローブ剤であるナイトロオキシドを用いて非侵襲的に評価することを目的とした。また、ナイトロオキシドの投与方法として、極めて非侵襲的な塗布という投与方法の可能性について、腹腔内投与実験とを比較検討した。主な結果は以下の通りである。

1. TEMPONEを用いた塗布実験では測定値のばらつきが大きく、半減期に群間で有意な差は認められなかった。
2. CMPを用いた塗布実験では、UV群の半減期

がC2群と比較して有意に大きく、UV+PBN群の半減期はC2群と比較して有意に小さかった。UV群とUV+PBN群のC2群に対する相対値と比較したところ、UV+PBN群の方が有意に大きかった。

3. CMPを用いた腹腔内実験では、UV群の半減期が有意にC3群より大きかった。

以上のことから、3分間のUV照射によって生体内にフリーラジカルが生成され、それによって生体内の酸化還元バランスが崩壊し酸化損傷が生じる可能性が明らかとなった。また、ナイトロオキシドの投与方法として、塗布も腹腔内投与と同様に、信頼性のある方法であることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行に当たり多くのご助言とご指導を頂きました北海道医療大学特任教授（元札幌医科大学医療人育成センター教授）の藤井博匡先生に心より感謝致します。また、測定の実施において多大な補助を頂きました北海道教育大学岩見沢校卒業生の今崎光佳氏と札幌校卒業生の桑原洋子氏にお礼申し上げます。

参考文献

Albrecht, S., Ahlberg, S., Beckers, I., Kockott, D., Lademann, J., Paul, V., Zastrow, L. and Meinke, M.C. (2016) Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy. *Methods*, 109: 44-54.

Bobko, A.A., Kirilyuk, I.A., Grigor'ev, I.A., Zweier, J.L. and Kharamtsov, V.V. (2007) Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: Roles for ascorbate and glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 42: 404-412.

Deliconstantinos, G., Villiotou, V. and Stavrides, J.C. (1996) Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. *Biochem.J.*, 320: 997-1003.

Fujii, H.G., Sato-Akaba, H., Emoto, M.C., Itoh, K.,

Ishihara, Y. and Hirata, H. (2013) Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Magn. Reson.Med.*, 31: 130-138.

Herrling, T. and Fuchs, J. (2006) Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochim.Acta A*, 63: 840-845.

Herrling, T., Fuchs, J., Rehberg, J. and Groth, N. (2003) UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radic.Biol.Med.*, 35: 59-67.

Honzak, L., Sentjurc, M. and Swartz, H.M. (2000) In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applied to the skin of hairless and normal mice. *J. Control Release*, 66: 221-228.

Jung, K., Seifert, M., Herrling, T. and Fuchs, J. (2008) UV-generated free radicals (FR) in skin: their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. *Spectrochim.Acta A*, 69: 1423-1428.

神林勲・沢村祥子・塚本未来・木本理可・東郷将成・秋月茜・内田英二 (2017) ナイトロオキシドを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける生体内酸化還元バランスの非侵襲的評価. 北海道教育大学紀要（自然科学編）, 67 : 35-42.

Kawai, A., Nishinaka, Y., Arai, T., Hirota, K, Mori, H., Endo, N., Miyoshi, T., Yamashita, K. and Sasada, M. (2008) α -phenyl-N-tert-butyl nitron has scavenging activity against singlet oxygen (1O_2) and attenuates 1O_2 -induced neuronal cell death. *J.Pharmacol., Sci*, 108: 545-549.

Kuppusamy, P., Li, H., Ilangoan, G., Cardounel, A.J., Zweier, J.L., Yamada, K., Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. (2002) Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res.*, 62: 307-312.

中込哲・牛山昭・高橋美雪・小笠原裕樹・石井一行・浅野牧茂・大久保千代次 (2010) UVB照射によるマウス皮膚微小血管床における急性炎症反応に関する研究. 生体医工学, 48 : 42-49.

小澤俊彦・竹下啓蔵 (2001) 紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用. コスメトロジー研究報告, 9 : 56-61.

Sato-Akaba, H., Kuwahara, Y., Fujii, H. and Hirata, H. (2009) Half-life mapping of nitroxyl radicals with three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging at an interval of 3.6 seconds. *Anal. Chem.*, 81: 7501-7506.

Soule, B.P., Hyodo, F., Matsumoto, K., Simone, N.L., Cook, J.A., Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. (2007) The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, 42: 1632-1650.

Takeshita, K., Chi, C., Hirata, H., Ono, M. and Ozawa, T. (2006) In vivo generation of free radicals in skin of live mice under ultraviolet light measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.*, 40: 876-885.

Yamato, M., Shiba, T., Yamada, K., Watanabe, T. and Utsumi, H. (2009) Noninvasive assessment of the brain redox status after transient middle cerebral artery occlusion using Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging. *J.Cereb. Blood Flow Metab.*, 29: 1655-1664.

(神林 勲 札幌校教授)

(塚本 未来 東海大学講師)

(木本 理可 藤女子大学准教授)

(東郷 将成 旭川大学短期大学部准教授)

(秋月 茜 拓殖大学北海道短期大学助教)

(沢村 祥子 北海道教育大学岩見沢校卒業生)

(内田 英二 大正大学教授)

