

H-6 地下水利用に伴う広域的ヒ素汚染に対する地球環境保全のための環境計画に関する研究
(1)-2 ヒトへの健康影響とその防止対策手法の開発

九州大学大学院

薬学研究院

内海 英雄

平成 12～14 年度合計予算額	5,824 千円
(うち、平成 14 年度予算額	1,567 千円)

【要旨】 培養細胞を用いたヒ素の毒性発現機序は NADPH Oxidase の活性化と活性酸素種(ROS)の産生、特にフリーラジカル種が毒性に関与すると考えられている。生体内におけるヒ素の毒性発現への ROS の関与を明らかにするためには、生体内におけるフリーラジカル産生を無侵襲解析し得る手法の解析が欠かせない。そこで、生体内における NADPH Oxidase 活性化および ROS 産生を評価することを目的として、生体計測 ESR/スピンプローブ法の確立を試みた。肝灌流法により、細胞膜透過性、細胞内貯留性の異なる 3 種のスピンプローブについて検討したところ、Carbamoyl-PROXYL が肝 NADPH Oxidase の活性化を無侵襲に評価可能な特異的プローブであることを見出した。次に、肝でのフリーラジカル産生の亢進が知られている鉄負荷マウスに Carbamoyl-PROXYL を静脈内投与し、上腹部における ESR シグナルを測定したところ、コントロール群に比べシグナル強度の減衰速度が有意に亢進した。また、生体内におけるフリーラジカル産生部位の特定を目的として、生体計測 ESR 画像解析法 (ESRI) によるラジカル種の二次元空間画像を作成すると共に、ESRI 画像と MRI 画像を取得し両画像を重ね画像化するためのアルゴリズムを構築した。マウスに Carbamoyl-PROXYL を投与し、その生体内挙動を ESRI により解析した。フリーラジカル産生評価法として各ピクセルにおけるシグナル減衰速度を画像化することによりフリーラジカル産生部位の空間情報を取得することが可能となった。以上、Carbamoyl-PROXYL を用いた生体計測 ESR/スピンプローブ法ならびに画像解析法によりヒ素による毒性発現へのフリーラジカルの関与が解明されるものと期待される。

【キーワード】 生体計測 ESR、スピンプローブ法、フリーラジカル、活性酸素、画像解析

1. はじめに

ヒ素の摂取は皮膚、肝、腎、脳、膀胱等に対して組織障害をもたらす。ヒ素による組織障害には活性酸素・フリーラジカル種が関与していると考えられている^{1,2)}。雄ラットに亜ヒ酸ナトリウムを 12 週間に亘り飲料水に混和して (100 ppm) 投与しつづけたところ、還元型グルタチオン/酸化型グルタチオン比が低下し、脂質過酸化の指標であるチオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARs) 値の上昇が観察されたと報告されている³⁾。Lynn らは⁴⁾、ヒト血管平滑筋細胞を亜ヒ酸で処理したところ酸化的 DNA 障害が誘導され、この障害を DPI (diphenylene iodonium; NAD(P)H オキシダーゼを始めとするフラビン酵素の阻害剤)、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、DMSO (ヒドロキシルラジカルのスカベンジャー) およびマンニトール (ヒドロキシルラジカルのスカベンジャー) が有意に抑制したと報告している。一方、近年、細

胞のアポトーシスの誘導に酸化ストレスが関与することが明らかにされている。Chen らは⁵⁾、NIH3T3 細胞を亜ヒ酸で処理するとアポトーシスが誘導されること報告している。ヒ素によるアポトーシスの誘導は、DPI、SOD、Tiron (4, 5-dihydro-1, 3-benzen disulfonic acid; スーパーオキシドスカベンジャー)、カタラーゼ、N-acetyl-L-cysteine により有意に抑制されるのに対し、キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノール、COX の阻害剤であるインドメタシンは抑制効果を示さない。Duyndam らは⁶⁾、細胞内活性酸素種 (ROS) の蛍光検出試薬である DCFH-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) により、亜ヒ酸で処理したヒト卵巣ガン細胞 OVCAR-3 中の ROS 産生を検討したところ、有意な発蛍光が認められ、この発蛍光はカタラーゼおよびマンニトールにより抑制されたと報告している。これらの結果より、亜ヒ酸により誘導される酸化的組織障害は NAD(P)H オキシダーゼ系の活性化により産生されるスーパーオキシドの還元により生成されるヒドロキシルラジカルによることが培養細胞を用いた in vitro 実験により示唆されている。しかしながら、生体を用いた In vivo 実験系におけるフリーラジカル産生を明らかにした例はない。

2. 研究目的

本分担研究では、生体内における亜ヒ酸曝露による活性酸素・フリーラジカル種の産生を生体計測 ESR/スピンプローブ法で評価するための方法確立し、さらに、これら活性種の産生部位を特定するために生体計測 ESR 画像解析システムの構築を目的とした。

3. 研究方法

(1) 肝灌流法によるスピンプローブの評価

実験方法；基本灌流液として O₂/CO₂ (95/5%) 混合ガスで飽和した Krebs-Henseleit bicarbonate buffer を用いた。灌流液を液だめに入れ、恒温槽で加温したものを灌流ポンプを介してリザーバーにつなぎ、ここから門脈カニューレを連結し、肝へ灌流液を流入する。腹部下大静脈カニューレより灌流液を回収し、石英試料管（理科電子工業㈱製）を用いて X-band ESR キャビティを通過させた。

灌流流出液、灌流肝及び胆汁中スピンプローブの測定；基本灌流液で 20 分間の予備灌流を行った後、スピンプローブを含む灌流液で一回灌流を開始した。腹部下大静脈より回収される流出液の ESR スペクトルを X-band ESR で経時的に測定し、流出液中への未変化体（ラジカル体）の回収率を求めた。フェリシアン化カリウム（最終濃度 1 mM）で流出液中の一電子還元体（ヒドロキシルアミン）を再酸化し X-band ESR 測定を行った。灌流終了後の肝に 3 倍量の灌流用緩衝液を加えホモジネートを調製した。ESR 測定条件は以下の通りである。ESR 測定条件：マイクロ波出力 10 mW；マイクロ波周波数 9.4 GHz；外部磁場 335.0±7.5 mT；変調周波数 100 kHz；変調幅 0.1 mT。

(2) 鉄負荷モデルを用いた生体計測 ESR/スピンプローブ法によるフリーラジカル解析

鉄(III)-クエン酸錯体による鉄負荷：クエン酸鉄(III)を 0.1 M 塩酸溶液に溶解した。使用前に、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調整し、さらに、生理食塩水により最終濃度が 30 mM となる

ように希釈してマウスに投与した。

鉄(III)-Nitrilotriacetic acid (Fe-NTA) 錯体による鉄負荷：硝酸第二鉄溶液（200 mM）および Nitrilotriacetic acid disodium salt（NTA、400 mM）を 1 : 1 で混和し、炭酸ナトリウムで pH を 7.0 に調整し、Fe-NTA 錯体溶液を調製した。雄性 ddY マウス(3 週齢)を購入日より 1 週間飼育した後、Fe-NTA 溶液を 3 週間腹腔内投与した（鉄総投与量、45 μ mol/マウス）。

生体計測 ESR・スピンプローブ法によるフリーラジカル反応解析：鉄負荷モデルマウスに対し、ネンブター麻酔下(50 mg/kg 体重、腹腔内投与)、100 mM carbamoyl-PROXYL(0.25 mmol/kg 体重、尾静脈内投与)を投与し、上腹部におけるシグナル減衰速度を L-band ESR（ESR 条件：Magnetic field, 40.0 $\pm$ 5 mT; Frequency, 1.1 GHz; Modulation, 100 kHz, 0.2 mT; Microwave power, 1.0 mW; Time constant, 1.0 s; Sweep time, 8 min）により測定した。

グルタチオン濃度および TBARs 値の測定：ESR 測定後、肝臓を摘出し、生理食塩水にて灌流脱血した後、臓器の重量を測定した。肝臓の中葉から 0.2 g を計り取り、1.15% KCl 溶液および 100 mM 2,6-di-tert-butyl-p-cresol を加えてホモジネートした。TBARs 値は定法[4]に従い測定した。グルタチオン濃度は DTNB-glutathione reductase recycling method[5]により測定した。

（3）生体計測 ESR 画像解析法によるフリーラジカル解析

ESRI 装置；図 1 a に ESRI 装置の外観図を示した。JEOL 製生体計測 L-band ESR(JES-RE-3x)の外部磁場内に x-, y-, z-の磁場勾配コイル、掃引コイルを設置し、勾配用電源、コンピューターを付属し、磁場勾配内における ESR シグナルの測定を行った。X-Z 平面の磁場勾配を回転させ 18 の投影スペクトルを得た。そして磁場勾配を付加して得た ESR スペクトルから線幅、超微細分裂などのスペクトル情報をデコンボリューションにより除去し空間情報を分離した。そしてスペクトル空間画像をフィルタ補正逆投影法により再構成し 2 次元のラジカル画像を得た。

MRI 装置；図 1 b に臨床用 0.2 T MRI 装置の外観図を示した。外部磁場には 0.2 T の磁場強度の永久磁石であり受信コイルは動物用に新たに内径 60mm のソレノイドコイルを作製し測定に用いた。

動物実験；ESR 画像と MR 画像を正確に重畳するためにマウスの両側に 2 本ずつ計 4 本のファントムを設置した。ファントムには 5mM の Carbamoyl PROXYL (150 μ L) を充填した。マウスをペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) で麻酔した後、ファントムを設置した台に固定した。続いて 150mM Carbamoyl PROXYL (300 μ L) をマウスの尾静脈より注射し直ちに Fig. 1 a で示したループギャブプレゾネーター内にマウスを移し ESRI 測定した。ESRI 測定は下記の条件で CORONAL 断面の撮像を経時的に 3 回行った。

ESRI 測定条件	Frequency: 1056MHz	Power: 3mW
	Seep: 143Gauss	Gradient: 7.04Gauss/cm
	Average: 3	Data Point: 5
	Projection: 18	

ESRI 測定終了後マウスを MRI 装置の Fig. 1b に示すソレノイドコイル内へと移動させ T₁ 強調のスピンエコー法により MR 画像を得た。

MRI 測定条件 Spin Echo method (T₁ weighted image)

FOV: 200×200mm

TR: 500msec

TE: 25msec

Thickness: 2.5mm

Average: 6

Projection:192

そしてESR画像を先に示した方法により作成後MR画像を画像処理ソフトウェア上でファントムを基準として重ね合わせることでESR/MRI 重畳画像を得た。

4. 結果・考察

スピンプローブとして分子型のスピンプローブとして Carbamoyl-PROXYL、イオン型のプロローブとして Carboxyl-PROXYL、および細胞内貯留性の AMC-PROXYL について検討した。*in situ* 肝灌流モデルを用いて、各スピンプローブを一回灌流法で灌流したときの流入液に対する流出液の ESR シグナル強度比の経時的变化を図2に示す。定常値に達した後、この定常値をスピンプローブの肝一回通過でのラジカル体（未変化体）回収率とした。灌流液をサンプリングし、フェリシアン化カリウムで再酸化して ESR 測定することで灌流液中の一電子還元体を含んだ総スピンプローブを検出した。この値から未変化体の回収率を差し引いた分を灌流液中の一電子還元体の回収率として求めた。

また、肝組織への移行について調べるため、灌流終了後、肝ホモジネートの再酸化によりホモジネート中のスピンプローブ量の測定を行った。この方法で、Carbamoyl PROXYL、Carboxy PROXYL および AMC PROXYL の肝一回通過における灌流液への未変化体及び一電子還元体の回収率、また肝臓実質への残存率を求めた（図3）。Carbamoyl PROXYL は灌流液中に未変化体として約 70 %、一電子還元体として約 30 % 回収された。すなわち、Carbamoyl PROXYL は肝において一電子還元を受けシグナルが消失するが、この一電子還元体はすべて灌流液中において回収されることがわかった。Carboxy PROXYL は灌流液中に未変化体で約 90 % 回収されたが一電子還元体は検出されず、肝ホモジネートからもほとんど検出されなかった。また、AMC PROXYL は灌流液中に未変化体で約 30 %、一電子還元体として約 30 % 回収された。肝ホモジネートからは約 40 nmol/g tissue のスピンプローブが検出され、これは流入量の約 25 % に換算された。

Carbamoyl PROXYL の還元に対する生体内の主な酸化還元系の寄与を各種阻害剤や活性化剤を用いて検討した。薬物は予備灌流液及びスピンプローブを含む灌流液に加えて用いた。阻害剤及び活性化剤の灌流液中の濃度は、*in situ* 灌流実験及び細胞を用いた *in vitro* 実験で阻害効果の得られる濃度に設定した。また、灌流流出液の LDH 活性（細胞膜障害の指標）が正常値を保つ薬物濃度で実験を行った。ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ阻害剤として、アロプリノール及びその活性代謝物であるオキシプリノール、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤として Complex I 阻害剤であるロテノンを用いて阻害実験をした。結果を図4に示す。これらの阻害剤による Carbamoyl PROXYL の還元への影響は小さいことが明らかとなった。一方、NAD(P)H オキシダーゼ等のフラビンタンパク質の阻害剤である diphenylene iodonium (DPI) の影響を検討したところ、DPI 処理群で灌流液への未変化体の回収率が陰性対照群に比べ増加した。また、一電子還元体量は、DPI 処理群で陰性対照群に比べ抑制されることが示唆された（図5）。ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ及びミトコンドリア電子伝達系もフラビンタンパクで構成される酸化還元系であるが、それらの特異的阻害剤の影響が見られなかった。NADPH オキシダーゼはフラビンタン

パク質を含む酸化還元酵素であり、NADPH オキシダーゼの関与を検討するために、ホルボールエステル (PMA) による NADPH オキシダーゼの活性化について検討した。PMA 処理群で灌流液への未変化体の回収率が陰性対照群に比べ減少し、流出液の一電子還元体量を求めると PMA 処理群は陰性対照群に比べ有意に高く、一電子還元反応が亢進していることが示唆された (図 5)。これらの結果より Carbamoyl PROXYL の肝組織での還元は NADPH オキシダーゼ系が関与していることが示唆された。

鉄はトランスフェリンにより肝に運ばれ、肝ではフェリチンの形で貯留される。生体内で遊離の状態が存在する鉄イオンは、Haber-Weiss 反応によりヒドロキシルラジカルを産生する。生体内では、一般に遊離鉄の存在は極めて低いと考えられるが、鉄の過剰負荷により遊離鉄が存在する場合にはヒドロキシルラジカルの産生が亢進される。

マウスに対してクエン酸鉄を $0.2 \mu\text{mol/g}$ 体重となるように皮下投与し、90 分後における肝中鉄含量を測定したところ、対照群 ($0.19 \pm 0.02 \mu\text{mol}$) に比べ顕著に増加した ($1.87 \pm 0.14 \mu\text{mol}$)。鉄負荷マウスに対し、鉄負荷 10 分、30 分、および 60 分後にスピンプローブとして Carbamoyl-PROXYL を尾静脈内投与し、生体計測 ESR・スピンプローブ法によるシグナル減衰速度 (上腹部) を測定した。結果を図 6 に示す。鉄負荷後、10 分において最もシグナル減衰速度が亢進されることが明らかとなった。

さらに、クエン酸鉄錯体投与による急性肝障害マウスにおけるシグナル減衰速度の亢進に対する Trolox (α -トコフェロール構造類似体) の影響について検討した。マウスに対してクエン酸鉄を $0.2 \mu\text{mol/g}$ 体重となるように皮下投与し、10 分後に生体計測 ESR におけるシグナル減衰速度を測定した。Trolox は、クエン酸鉄投与の 10 分前に $0.4 \mu\text{mol/g}$ 体重となるように腹腔内投与した。結果を図 7 に示す。鉄負荷により亢進されたシグナル減衰速度は Trolox 投与により有意に抑制された。また、鉄負荷により、脂質過酸化の指標である肝 TBARs 値は有意に上昇するが、Trolox 投与によりその上昇は有意に抑制された。これらの結果より、クエン酸鉄負荷によりラジカル産生が亢進され、膜脂質の過酸化が促進することが明らかとなった。

Fe-NTA は肝あるいは腎に対する慢性障害の誘導に用いられ、Fe-NTA への慢性曝露は腎および肝に対してガンを誘発することが知られている [7,8]。Fe-NTA 処理マウスに Carbamoyl-PROXYL を尾静脈内投与し、上腹部における ESR シグナルの減衰速度を測定したところ、対照群 (NTA 投与) に比べシグナル減衰速度の有意な亢進が認められた (図 8)。また、肝における脂質の過酸化の指標である TBARs 値は対照群に比べ有意に増加し、肝グルタチオン含量も低下傾向が認められた。肝 TBARs 値および肝グルタチオン濃度との間には負の相関が認められた ($r=-0.543$, $p<0.0001$)。一方、シグナル減衰速度と肝グルタチオン濃度との間には負の相関が認められた ($r=-0.671$, $p<0.005$)。以上の結果より、生体計測 ESR・スピンプローブ法はクエン酸鉄錯体による急性障害のみならず、Fe-NTA による慢性障害におけるフリーラジカル反応を解析することが可能であった。

生体内におけるフリーラジカル産生部位の特定を目的として、生体計測 ESR 画像解析法

(ESRI) について検討した。生体計測 L-band ESR の外部磁場内に磁場勾配を発生させる三次元磁場勾配コイルおよび掃引コイルを設置し、磁場勾配内における ESR シグナルの測定を行い、ラジカル種の二次元空間画像を構築した。さらに、ESRI 画像と MRI 画像を取得し両画像を重ね画像化するためのアルゴリズムを構築した。

マウスに CmP を経口投与、静脈内投与および下肢大腿筋への筋内投与し、投与部位における ESRI 画像を経時的に取得した。結果を図 9、図 10 および図 11 に各々示した。フリーラジカル産生評価法として各ピクセルにおけるシグナル減衰速度を画像化することによりフリーラジカル産生部位の空間情報を取得することが可能となった。

5. 本研究により得られた成果

培養細胞を用いた *in vitro* 実験により、亜ヒ酸に曝露された細胞内では NAD(P)H オキシダーゼの活性化が誘導されることが報告されている。今回検討したスピンプローブのうち、Carbamoyl PROXYL は NAD(P)H オキシダーゼの活性ならびにそれに伴う活性酸素・フリーラジカルの産生評価に適したスピンプローブであることを明らかとした。鉄負荷により肝におけるラジカル反応を誘導し、生体計測 ESR・スピンプローブ法によりシグナル減衰速度を測定したところ、シグナル減衰速度の有意な亢進が観察された。このシグナル減衰の亢進は、鉄負荷によるラジカル反応の亢進を反映することが今回の研究より明らかとなった。ヒ素によるラジカル産生機序と鉄負荷によるラジカル産生機序は厳密には異なると考えられるが、生体計測 ESR・スピンプローブ法はヒ素による生体への毒性発現機序の解明ならびに防止対策手法の開発に有効な手法となり得るものと考えられる。ヒ素の摂取は皮膚、肝、腎、脳、膀胱等に対して特異的に組織障害をもたらす。フリーラジカル産生の位置情報は障害部位の特定に必須である。本研究では、さらに、生体計測 ESR/スピンプローブ法を用いた画像解析法を確立した。また、組織の位置情報を示す MRI 画像を重ねることにより、フリーラジカル産生組織の特定が可能となった。以上、フリーラジカル産生に関する時間-空間情報の取得が可能となったことによりヒ素暴露の評価のみならず医療に重要な知見を与えるものと期待する。

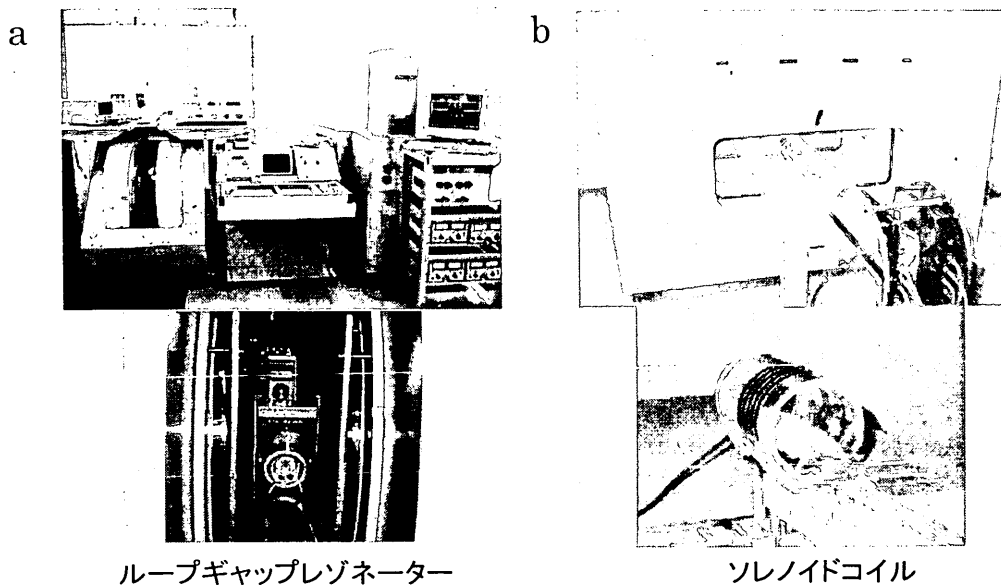


図1 生体計測 ESR および ESRI・MRI 画像解析装置

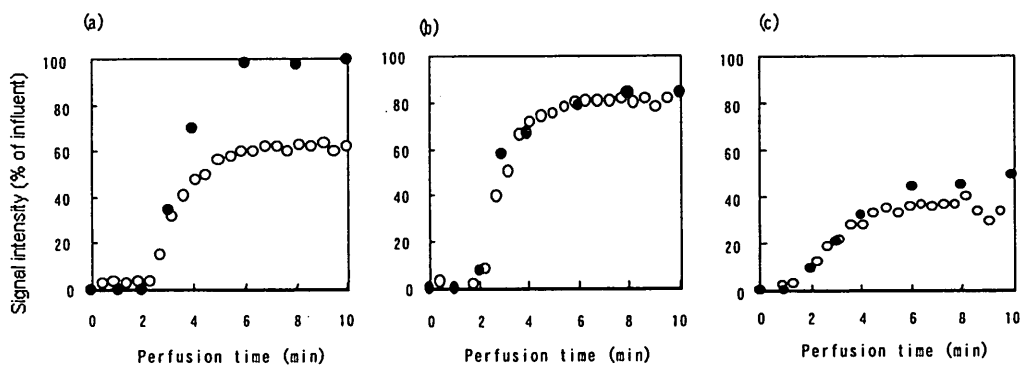


図2 肝灌流液中ニトロキシラジカル濃度の経時変化
○、未処理肝灌流液；●、フェリシアン化カリウム処理肝灌流液. ニトロキシラジカル濃度、 $10\mu\text{M}$. (a) Carbamoyl PROXYL. (b) Carboxy PROXYL. (c) AMC PROXYL.

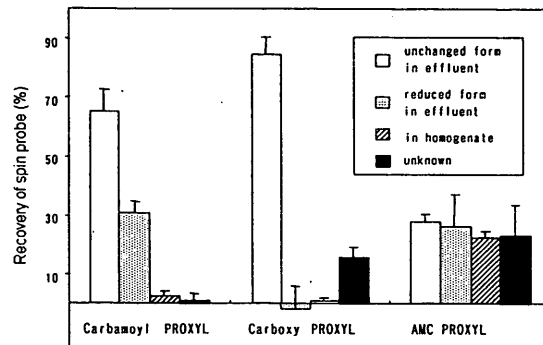


図3 肝灌流液中スピンプローブの回収率
 ニトロキシルラジカル濃度、 $10\mu\text{M}$ 。スピンプローブの還元型はフェリシ
 アン化カリウム処理により産生されるニトロキシルラジカル体として測定。

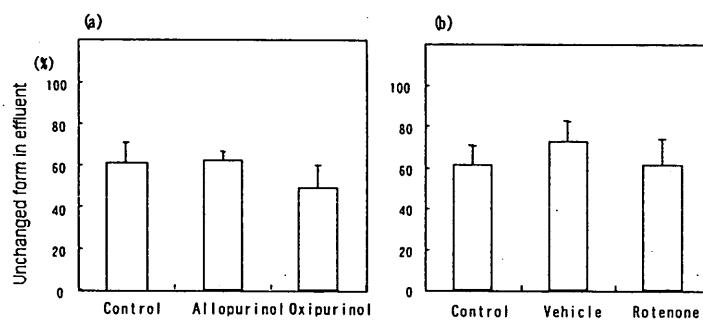


図4 肝灌流による Carbamoyl-PROXYL の還元への各種酵素阻害剤の影響
 (a) 1mM アロプリノールおよびオキシプリノール。
 (b) $5\mu\text{M}$ ロテノン in 0.01% DMSO
 Carbamoyl-PROXYL、 $10\mu\text{M}$

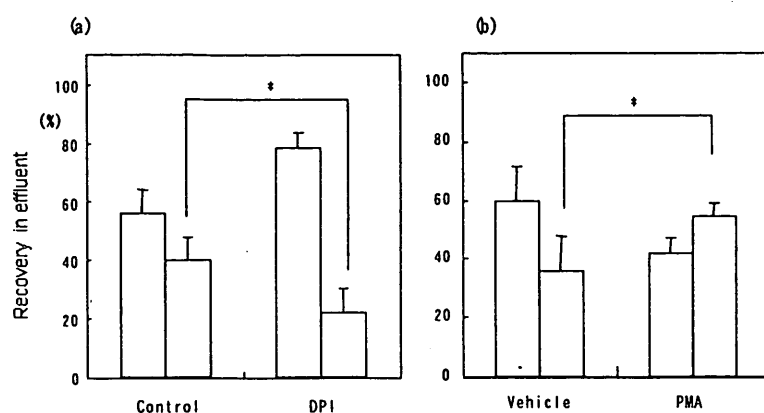


図5 肝灌流による Carbamoyl-PROXYL の還元への NADPH オキシダーゼの阻害剤および活性化剤の影響

(a) 10 μM DPI. (b) 0.1 μM PMA in 0.01% DMSO

Carbamoyl-PROXYL、(a) 10 μM ; (b) 2.5 μM

有意差、 $p < 0.05$.

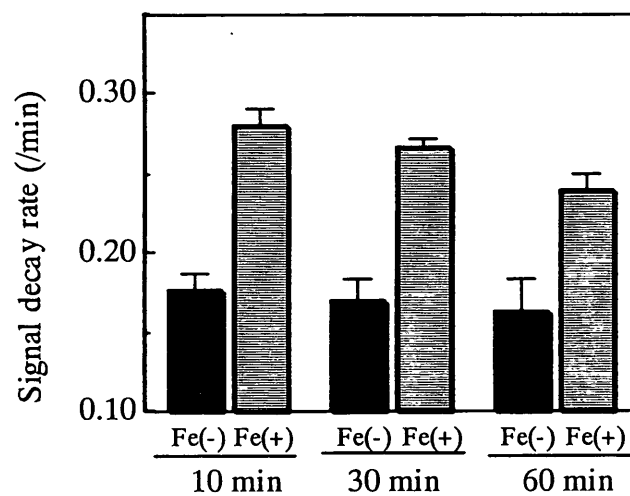


図6 クエン酸鉄惹起急性肝障害モデルマウス上腹部におけるシグナル減衰速度の経時変化

クエン酸鉄錯体 0.2 μmol/g 体重をマウスに皮下投与し、投与10分、30分、60分後にシグナル減衰速度を測定した。

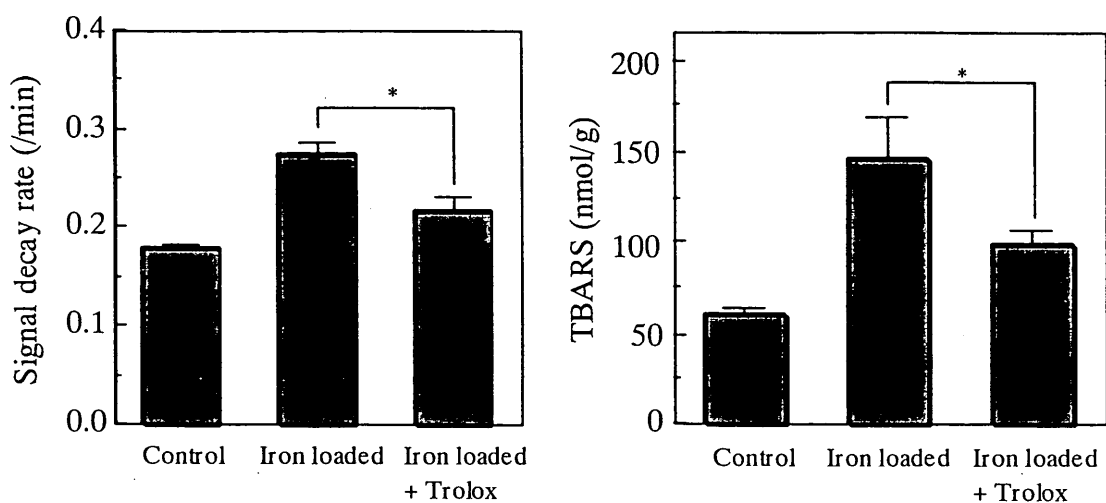


図7 クエン酸鉄錯体投与による急性肝障害への Trolox の影響

クエン酸鉄錯体 0.2 $\mu\text{mol/g}$ 体重をマウスに皮下投与した。Control はクエン酸を投与した。投与 10 分後に生体計測 ESR 測定を行った。0.4 $\mu\text{mol/g}$ 体重 Trolox は鉄負荷 10 分前に腹腔内投与した。*, $p < 0.05$.

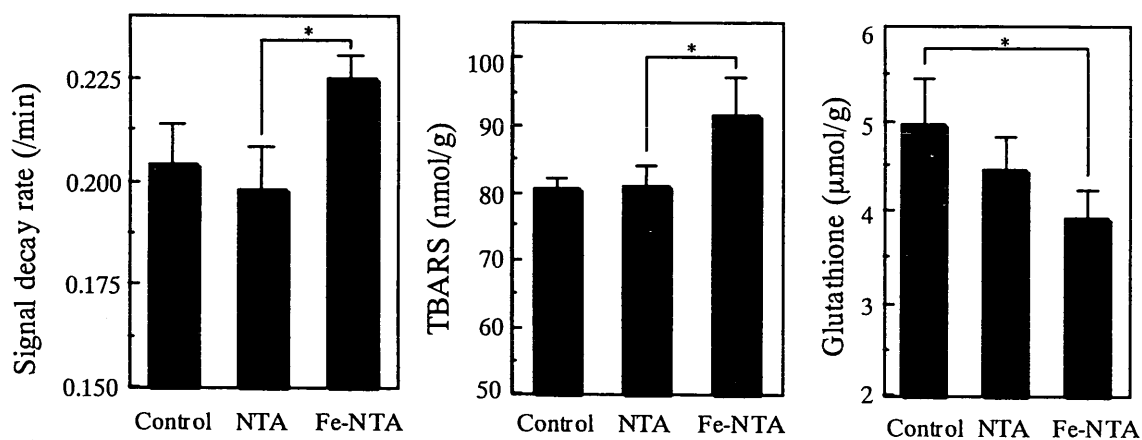


図8 Fe-NTA 錯体投与によるマウス上腹部におけるシグナル減衰速度、肝 TBARS 値および肝グルタチオン濃度の変動

マウスに Fe-NTA 溶液を 3 週間腹腔内投与した。鉄としての総投与量は 45 $\mu\text{mol/}$ マウスとした。*, $p < 0.05$.

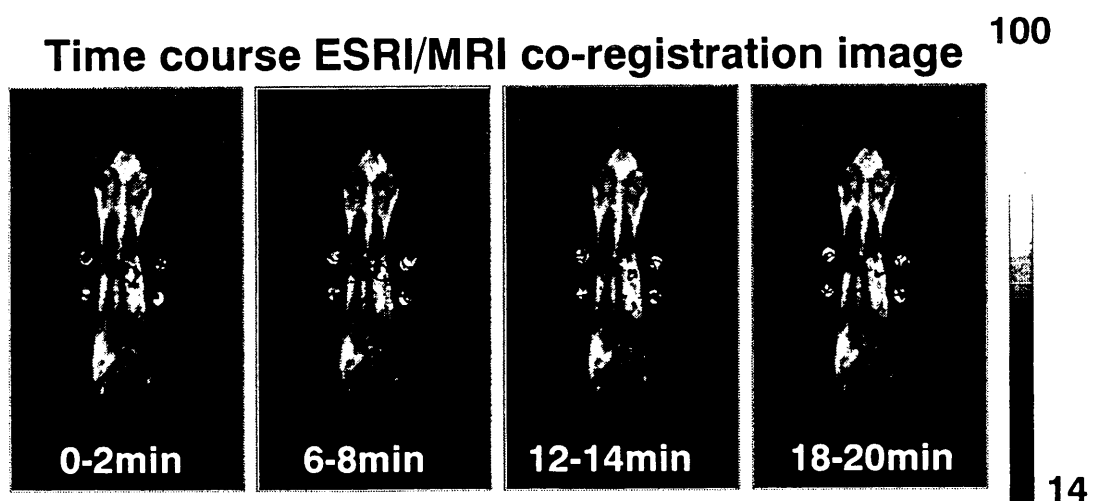
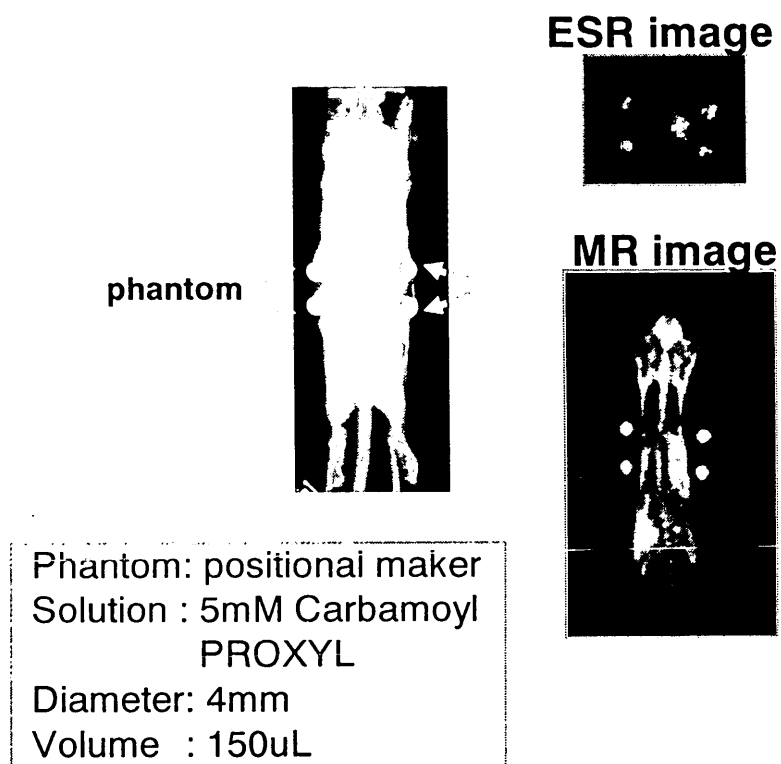


図 9 ESRI/MRI 画像重畳画像化アルゴリズムと胃内腔へ投与された Carbamoyl-PROXYL の経時変化画像

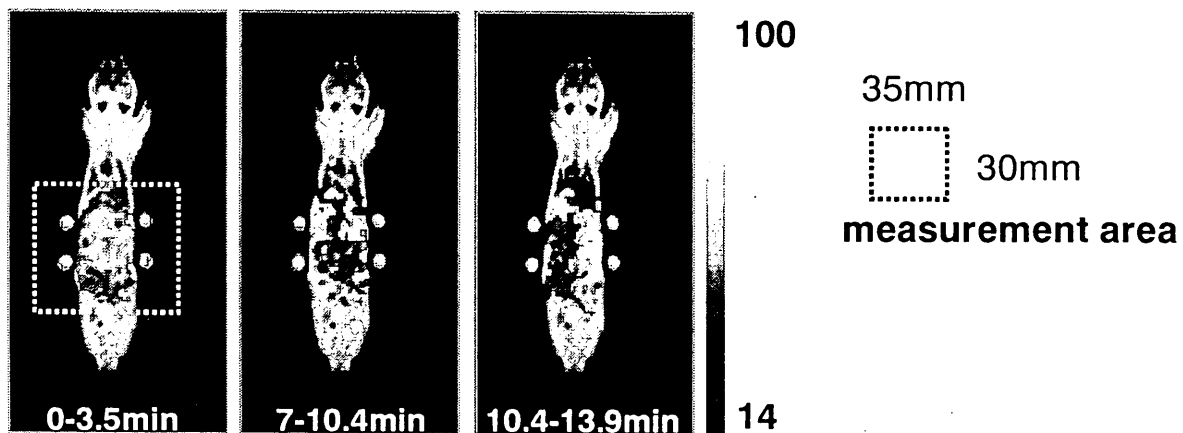


図 10 尾静脈内投与された Carbamoyl-PROXYL の腹部における経時変化画像

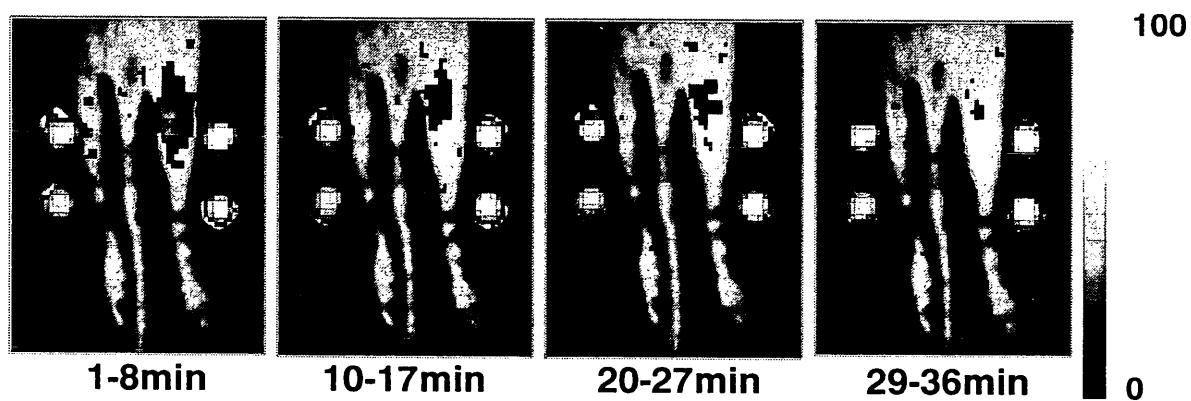


図 11 下肢大腿筋へ投与された Carbamoyl-PROXYL の経時変化画像

6. 引用文献

1. Wang TS., Hsu TY., Chung CH., Wang ASS., Bau DT., and Jan KY. (2001) Arsenite induced oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.*, **31**, 321-330.
2. Liu SX., Athar M., Lippai I., Waldren C., and Hei TK. (2001) Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 1643-1648.
3. Flora SJ. (1999) Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetyl cysteine and meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**, 865-869.
4. Lynn S., Gurr JR., Lai HT., and Jan KY. (2000) NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **86**, 514-519.
5. Chen YC., Lin-Shiau SY., and Lin JK. (1998) Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, **177**, 324-333.
6. Duyndam MCA., Hulscher TM., Fontijn D., Pinedo HM., and Boven E. (2001) Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1 α protein by the oxidative stressor arsenite. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48066-48076.
7. Li J.L., and Okada S. (1987) Subcutaneous nephrotoxicity and induction of renal cell carcinoma in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Cancer Res.*, **47**, 1867-1869.
8. Iqbal M., Giri U, and Athar M. (1995) Ferric nitriloacetate (Fe-NTA) is a potent hepatic tumor promoter and acts through the generation of oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 557-563.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

〈学術誌(査読あり)〉

- ① Matsumoto K, Utsumi H : *Biophys J*. 2000 Dec;79(6):3341-9.
「Development of separable electron spin resonance-computed tomography imaging for multiple radical species: an application to .OH and .NO.」
- ② Sano H, Naruse M, Matsumoto K, Oi T, Utsumi H : *Free Radic Biol Med*. 2000 Mar 15;28(6):959-69.
「A new nitroxyl-probe with high retention in the brain and its application for brain imaging.」
- ③ Han JY., Takeshita K., Utsumi H : *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 516-525, 2001.
「Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles.」

- ④ Takahashi K, Ohsawa M, Utsumi H : *J. Health Sci.*, 48(2), 161-167, 2002
「A simple bioassay for evaluating immunotoxic properties of chemicals by use of in vitro antibody production system」
- ⑤ Kubo T, Urano K, Utsumi H : *J. Health Sci.*, 48(6), 545-554, 2002
「Mutagenicity characteristics of 255 environmental chemicals」
- ⑥ Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Yamada K, Utsumi H : *Appl. Magn. Reson.*, in press.
「Application of in vivo ESR spectroscopy to pharmaceutical sciences –Evaluation of in vivo inhibitory mechanism of anti-gastric lesion drugs-」
- ⑦ Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Utsumi H : *Free Radic. Res.*, in press.
「Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH₄OH-induced gastric lesion of rats using a 300 MHz in vivo ESR technique」
- ⑧ Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H, Utsumi H : *Free Radic. Res.*, in press.
「Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice」
- ⑨ Yonekura Y, Koshiishi I, Yamada K, Mori A, Uchida S, Nakamura T, Utsumi H : *Nitric Oxide*, in press.
「Association between expression of inducible nitric oxide synthase by chondrocytes and its nitric oxide-generating activity with adjuvant arthritis in rats」

〈学術誌(査読なし)〉

- ① 内海英雄：用水と廃水。
「化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発に関する研究」
- ② 佐野浩亮、内海英雄：ぶんせき P192-P198、(2000).
「無侵襲 ESR 法による生体中のフリーラジカル測定」
- ③ 内海英雄：CLINICAL NEUROSCIENCE, 19(5)、P14-P17、2001.
「フリーラジカルとは」
- ④ 西村哲治、内海英雄：水環境学会誌 24(8)、P16-P20、2001.
「未知有害化学物質にどう対応するか-バイオアッセイによる有害負荷量の把握に向けて-」

〈書籍〉

- ① 興石一郎、韓眞伊、内海英雄：別冊 医学のあゆみ ―フリーラジカル医学生物学の最前線―、P119-P122、2001.
「In vivo ESR による酸化ストレスの無侵襲解析」

〈報告書類等〉

- ① 内海英雄：財団法人沖縄県環境科学センター報(第 3 号)
「化学物質と環境との係わり」
- ② 世良暢之、志水信宏、塚谷裕子、田中義人、北森成治、内海英雄：福岡県保健環境研究所年報第 28 号、P49-P54、2001.

「簡易生物評価法の開発と問題点－8-ヒドロキシグアニン試験について－」

- ③ 世良暢之、志水信宏、塚谷裕子、田中義人、北森成治、内海英雄：福岡県保健環境研究所年報第 28 号、P1-P5、2001.

「新しい試験菌株を用いたエームス試験の有用性について－255 化学物質についての検討－」

(2) 口頭発表

- ① 内海英雄、静岡市衛生試験所 技術講演会、「化学物質と水道-安全性と健康影響-」、2000 年 1 月 14 日：静岡市職員会館、静岡
- ② 内海英雄、第 15 回環境工学連合講演会、「水環境における新規毒性物質」、2000 年 2 月 1 日：日本学術会議講堂、東京.
- ③ 内海英雄、平成 11 年度環境保全研究発表会、「化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発」、2000 年 2 月 2 日：東京ビッグサイト、東京.
- ④ 内海英雄、環境化学講演会(第 11 回)、「環境への影響負荷をトータルとしてキャッチする」、2000 年 11 月 7 日：日本化学会 7 階ホール、東京.
- ⑤ 市川和洋、金洙賢、内海英雄、生体計測 ESR による化学物質酸化ストレス惹起性の in vivo 解析、日本薬学会第 120 年会、岐阜 (2000 年 3 月) .
- ⑥ Hideo Utsumi (2001) In vivo ESR measurement of free radical reactions in living mice and its imaging, *International Society of Magnetic Resonance*, Aug 16-23 at Rhodes, Greek
- ⑦ 内海英雄、日中国交正常化 30 周年記念科学技術交流事業「循環型社会の創造をめざして」に関する記念シンポジウム、北京、中国、2002.
- ⑧ The Occupational Safety & Hygiene International Symposium on 2002. -The Laboratory's Safety & Hygiene in Campus-. Tajen, Taiwan, 2002.

(3) 出願特許

- ① 内海英雄：九州大学大学院；「電子スピン共鳴装置における画像作成方法」(日本電子と共同権利) 特許 P3347553 .
- ② 内海英雄：九州大学大学院；「電子スピン共鳴装置」(日本電子と共同権利、市販中) 特許 P3117847 .

(4) 受賞等

内海英雄 平成 13 年日本水環境学会学術賞

(5) 一般への公表・報道等

- ① 内海英雄、海洋汚染, 薬事日報 夏季随想 平成 12 年 7 月 10 日 pp8-9

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

今後、学会発表、学術論文等を通じ、成果の広報・普及に努める。