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

放射線医学総合研究所

小澤俊彦、竹下啓蔵

There have been little reports about direct evidence of generation of free radicals including oxygen radicals during exposure to ultraviolet (UV) light, although free radicals may be involved in various injuries caused by UV light. In this study, generation mechanism of oxygen radicals during photodynamic reaction was examined precisely with in vitro spin trapping technique, and then induction of radical reaction in skin of living mouse was examined under UV light by using in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy. ESR signal of hydroxyl radical (OH) adduct of spin trapping agent, DMPO, formed during uroporphyrin photosensitization increased in the presence of NADPH. This increase was suppressed by addition of scavengers of OH and singlet oxygen (¹O₂), and enhanced in deutrated solvent. The appearance of ¹O₂, as determined by the oxidation of TEMPD, was delayed with an increase in the concentration of NADPH, while the production of OH was upregulated. Addition of H₂O₂ did not increase the signal. These results suggest that the OH was produced ¹O₂-dependently, and that its production involves neither superoxide anion radical nor H₂O₂. An aqueous solution of carbamoyl-PROXYL was injected intravenously as a redox probe to an anesthetized mouse, and ESR spectrum of the probe was measured at the dorsal region of hair-removed ddY mice and hairless mice using an L-band ESR spectrometer with a surface-coil-type resonator. The rate of signal decay increased during irradiation of UV light. The increase was statistically significant. The increase of signal decay rate was suppressed by pre-administration of spin trapping agent, PBN, while PBN did not change the decay rate of non-irradiated mouse. These observations suggest that the estimation of radical generation under UV-irradiation may be possible by using in vivo ESR spectroscopy with a nitroxyl redox probe./

1. 緒 言

太陽光に含まれ地上にまで達する紫外線はUVA(320-400nm)とUVB(280-320nm)で、これらの過剰の曝露は 皮膚に日焼け、炎症、老化、免疫抑制、発がんなどを起こ す。最近の研究では、これら障害の一因として生体構成成 分(核酸、脂質、タンパク質)の酸化や、ある種の遺伝子 発現の促進による細胞内シグナル伝達の変化が関係してい ることがわかってきている1-4)。さらに、紫外線照射によ る生体構成成分の酸化が活性酸素消去剤により抑制される ことや生体内抗酸化物質の量が変動すること、培養細胞系 や切除皮膚の紫外線照射でスピントラップ-ESR 法により 酸素ラジカルが確認されたことなどから、紫外線照射によ り活性酸素やフリーラジカルが生成することが示唆されて いる 1.2.5-7)。また、電離放射線についても皮膚がんなどを 発生させ、また、in vitroの実験では水の電離分解により ヒドロキシルラジカル ('OH) などの活性酸素を生じさせ ることが古くから知られている。活性酸素・フリーラジカ ルは遺伝子の損傷や転写調節に関与することが培養細胞を 用いた実験等で示唆されていることから、紫外線・電離放 射線による細胞内シグナル伝達に活性酸素・フリーラジカ



Non-invasive measurement of radical reactions in skin induced by UV and ionizing radiation and its application to evaluation of antioxidants for protection of skin injury.

Toshihiko Ozawa, Keizo Takeshita National Institute of Radiological Sciences ルが関わっていることが十分考えられる。

最近、UVA 照射によりウミホタル・ルシフェリンアナ ログ (CLA) を塗布したマウス皮膚で発光が起こること が報告された⁸⁾。CLA はスーパーオキシドラジカル (O2⁻⁻) や一重項酸素 (¹O₂) に特異的に反応すると考えられてい ることから、これは活性酸素生成を比較的特異的に、しか も非侵襲的に検出した最初の報告である。しかし、この場 合発光は紫外線照射をやめた直後から増加し始め、照射中 に生きた動物皮膚でどのような活性酸素あるいはラジカル が生成されているかは不明である。

本研究では、まずウロポルフィリン光増感反応による ¹O₂発生系を利用して¹O₂がNADPH等の存在で強力な 酸素ラジカルである[·]OHに変換されることを *in vitro* で 示した。さらに、生体内ラジカル反応の無侵襲測定が可能 な生体計測 ESR(電子スピン共鳴)と試料表面のラジカ ル検出に最適なサーフェイスコイル型検出器を組み合わせ、 生きた動物皮膚において紫外線等により惹起されるラジカ ル反応を解析した。

2. 実 験

2.1 In vitro の光増感反応における活性酸素の測定

酸素ラジカルの生成は 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)を用いたスピントラップ法による DMPO 付加体 の生成により、また $^{1}O_{2}$ の生成は TEMPD の酸化による 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl (TEMPON)の生成 により調べた。ウロポルフィリン (UP) と DMPO あるい は TEMPD を含み 20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で調製し た試料溶液を ESR 測定用の石英製フラットセルに入れ、室 温で可視光線を照射し、X-バンド ESR (JEOL JES RE-1X) で測定した。過酸化水素(H₂O₂)は Frew らの方法⁹⁾で 測定した。この方法では H₂O₂は 4-aminoantipyrine および phenol と反応し、505nm に吸収極大をもつ quinoneimine chlomogen を生成する。いずれも、可視光源として反射板 と集光レンズを装備したタングステンランプを用いた。光 照射はスピントラップ法では 0.7W/m²で、H₂O₂の定量に は 10W/cm² で行った(SL021/FQI 検出器を装着した IL 1400 A 光量計(International Light, Inc.)による計測)。

2.2 紫外線照射によるラジカル生成の in vivo 検出

除毛した ddY 系マウス(雄性,4週齢)あるいはヘア レスマウス(雄,5週齢)をペントバルビタールナトリウ ムで麻酔し、ESR マグネットの間にうつ伏せに固定した。 尾静脈より3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-Noxyl (carbamoyl-PROXYL)水溶液(280 mM、60 µL)を 投与し、直ちにサーフェイスコイル型共振器を背部皮膚 に当てて ESR を測定した。ESR 測定装置は、直径5 mm の電子同調サーフェイスコイル型共振器^{10,11}並びに磁場 変調コイルを日本電子製 L-バンド ESR 測定装置に接続し て用いた。紫外線照射はマウスの照射部以外の部位をアル



 図 1 UP 光増感反応で生成した DMPO 付加体の ESR スペクトル
(A) UP+NADPH+DMPO 2 分間照射, (B) UP+DMPO 2 分 間照射, (C) UP+NADPH+DMPO+ エタノール 2 分間照射,
(D) UP+NADPH+DMPO+ ぎ酸ナトリウム 2 分間照射, (E) UP+NADPH+DMPO+ アジ化ナトリウム 2 分間照射, (○)
DMPOの OH付加体, (△) DMPOの CH(OH)CH³ 付加体, (◇)
DMPOの CO^{2−} 付加体.

ミ箔で覆った後、マウスの上方からラジカルリサーチ社製 RUVF-203S型紫外線照射装置に 290nm カットフィルター を装着して行った。この装置は光源に水銀キセノンランプ を用いており、365nm、410nm 及び 435nm にピークを持つ。

3. 結果

3.1 ¹O₂ 依存的酸素ラジカルの生成

3. 1. 1 NADPH 存在下の OH の生成

UP を NADPH と DMPO の存在下光照射したところ、4 本線の ESR スペクトルが観測された (図1A)。このスペクトルはピ ーク比(1:2:2:1)と超微細分裂定数(a^N=a^H=1.49mT)か ら、DMPOの OH 付加体 (DMPO-OH) のスペクトルと同 定された。このスペクトルのシグナル強度は NADPH を省 いたときには小さく(図1B)、また暗所に同じ時間おいたと きにはシグナルが検出されなかった。この反応系にエタノー ルあるいはぎ酸ナトリウムを存在させたところ、DMPO-OH のシグナルは小さくなり、代わりに DMPOの CH (OH) CH₃ 付加体 (a^N=1.59 mT, a^H=2.29 mT) あるいは CO₂⁻付 加体 (a^N=1.57 mT, a^H=1.87 mT) に由来する6本線シグナ ルが観測された。エタノール、ぎ酸ナトリウム、あるいは dimethylsulfoxide (DMSO) を添加した場合には DMPO-OH のシグナルが3-30%に減少した(図1、表1)。これらの ことから検出されたDMPO-OHの70%以上はO2⁻⁻のDMPO 付加体の分解などによるものではなく、遊離の 'OH と DMPO との反応によるものであることが示唆される。

3. 1. 2 OH の生成における ¹O2 依存性

NADPH存在下のDMPO-OHのシグナルは $^{1}O_{2}$ 消去剤であるアジ化ナトリウム、L-ヒスチジン、 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)の添加で完全に 消失した(表1)。アジ化ナトリウムを添加した場合には、 ·OHとアジ化ナトリウムとの反応で生じる ·N₃のDMPO 付加体のシグナルはほとんど検出されなかった(図1E)。 $^{1}O_{2}$ の寿命は溶媒を重水素化することで延長されることが

表1 NADPH存在下UP光増感反応で生成するDMPO-OH に及ぼす活性酸素消去剤の影響

阻害剤	濃度	DMPO-OH (relative signal intensity)
None		1.89±0.26 (100)
·OH 消去剤		
Ethanol	600 mM	0.53±0.03 (27)
DMSO	143 mM	0.33±0.14 (18)
Sodium formate	143 mM	0.06±0.03 (3)
1O2 消去剤		
NaN ₃	5 mM	0.06±0.02 (3)
L-Histidine	5 mM	0.06±0.02 (3)
DABCO	5 mM	0.26±0.01 (14)
鉄キレート剤		
Dsferrioxamine	20 µM	2.03±0.21 (107)
O2 ^{・-} 及び H2O2 消去剤		
SOD	100 U/mL	2.93±0.59 (155)
Catalase	280 U/mL	2.43±0.40 (129)
SOD+Catalase	100 U/mL+280 U/n	nL 2.70±0.20 (143)

平均±S.D.(阻害剤なしに対する百分率)

知られているため、[•]OHの生成における¹O₂の関与を確認 するために、反応溶媒を重水素化して同様に DMPO-OHの 生成を調べた。97%の水を重水に置き換えると DMPO-OH の生成速度と生成量が共に増加した(図2)。これらのこと は、¹O₂が[•]OHの生成中間体であることを強く示唆する。

·OH の生成と¹O₂の関係を調べるために、[·]OH と¹O₂を 別々に測定し重ね描きした(図3)。NADPH の存在しない ときには TEMPON のシグナルが時間と共に増加した。こ のシグナルは¹O₂の消去剤であるアジ化ナトリウムや L-ヒスチジンの存在で減少したが、[·]OH 消去剤、カタラー ゼ、およびスーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)の存 在はシグナル強度に影響しなかった(表2)。このことは TEMPD から TEMPON への酸化はこの条件下では¹O₂ に 特異的であることを示している。この系に NADPH を存在 させると TEMPON のシグナルの出現にラグタイムが生じ た。このラグタイムは NADPH の濃度が増加するに従い



図 2 重水素化溶媒中での DMPO-OH の増加 UP+NADPH+DMPO を H2O (○) あるいは 97 % D2O -3 %H2O (●)中で調製し、光照射した。

表2	NADPH 非存在下 UP の光増感反応で生成する	TEMPON に及
ぼう	「活性酸素阻害剤の影響	

阻害剤	濃度	TEMPON (relative signal intensity)	
None		0.396 ± 0.084	(100)
1O2 消去剤			
NaN ₃	5 mM	0.135 ± 0.025	(34)
L-Histidine	5 mM	0.000 ± 0.000	(0)
DABCO	5 mM	0.295 ± 0.025	(74)
·OH消去剤			
Ethanol	600 mM	0.393 ± 0.020	(99)
DMSO	143 mM	0.276 ± 0.031	(70)
Sodium formate	143 mM	0.275 ± 0.022	(67)
鉄キレート剤			
Desferrioxamine	20 µM	0.282 ± 0.087	(71)
Oz , H2O2 消去剤			
SOD	100 U/mL	0.425 ± 0.060	(107)
Catalase	280 U/mL	0.391 ± 0.027	(99)

平均±S.D.(阻害剤なしに対する百分率)



図 3 UP 光増感反応での DMPO-OH および TEMPON 生 成における NADPH の効

UP+DMPO に NADPH を (A) 0M, (B) 7M, (C) 33 M, and (D) 167M を添加して光照射した。

延長された。一方、DMPO-OHの生成速度はNADPHの 濃度が増加するに従い増加した。このことは、NADPH依 存的に¹O₂が[•]OHに変換されることを意味する。このと き TEMPON のシグナルの出現にラグタイムが見られるの は、¹O₂と NADPH との反応が¹O₂と TEMPD との反応 に比べてはるかに速いためと推測される。

3. 1. 3 ¹O₂ 依存的 [•]OH の生成経路

¹O₂はNAD(P)Hにより一電子還元あるいは二電子還元 されてそれぞれ O2^{·-12,13)}、H2O2 へ変換されること¹⁴⁾が すでに報告されている。O2⁻⁻やH2O2は金属触媒下 ·OH を生成することがわかっている。NADPH存在下の UP 光 増感反応で検出された[•]OH が O2^{••} や H2O2 を経由してで きたものか否かを調べるため、DMPO-OHの生成に及ぼ す desferrioxamine (DFO)、SOD およびカタラーゼの影 響を調べた(表1)。その結果 DFO およびカタラーゼは DMPO-OHの生成を減少させなかった。SODはDMPO-OHの生成をわずかに増加させたが、ここにカタラーゼを 存在させても増加は抑えられなかった。このことはSOD により DMPO-OH の量がわずかに増加した結果が SOD による O2⁻⁻の不均化により H2O2の生成が増加したた めではないことを示している。カタラーゼは存在濃度を 21000U/mLまで増加させても影響無かったが、DFOは 0.7mM まで濃度を増加させると DMPO-OH のシグナルが 減少した。

反応経路をさらに明らかにするために NADPH 存在下 UP の光増感反応で生成する H_2O_2 を定量した。その結果 約 50 μ M の H_2O_2 が生成された。カタラーゼおよびアジ化 ナトリウムは完全に H_2O_2 生成を抑えたが、SOD は影響 なかった。DFO は H_2O_2 の生成を少し増加させた。 OH



図 4 UP 光増感反応による DMPO-OH 形成に及ぼす H²O² 添 加の影響

UP+DMPO (\triangle), UP+DMPO+H²O² (0.63 mM) (\blacktriangle), UP+NADPH+DMPO (\bigcirc), UP+NADPH+H²O² (0.63 mM)+DMPO (\bigcirc)

の生成における H_2O_2 の役割を確認するために、UP およ び UP-NADPH 系に 0.63 mM の H_2O_2 を添加し DMPO-OH の生成を調べた。図 4 に示すように DMPO-OH の 生成は H_2O_2 の存在下でも増加しなかった。このことは、 H_2O_2 から 'OH への変換はたとえ H_2O_2 が生成されてもこ の反応系では起こりにくいことを示している。またその結 果は同時に、DMPO-OH の生成を SOD が増加させ、DFO が減少させたのは ·OH 生成が H_2O_2 の鉄触媒反応に由来 したためではなく、SOD および DFO の別の反応によるも のであることを示唆する。SOD は Cu 触媒 'OH 生成反応 を起こし ¹⁵⁾、DFO は 'OH を消去することが報告されて いる ¹⁶⁾。

3.2 In vivo におけるラジカル反応の検出

3. 2. 1 サーフェイスコイル型共振器で測定された ESR シグナル

Carbamoyl-PROXYLをヘアレスマウスに静脈内投与 した後、背部にてサーフェイスコイルを用いてESRを 測定すると、ほぼ等強度の3本線シグナルが観測され た。そのシグナルの時間変化を図5Aに示す。シグナルは carbamoyl-PROXYL投与2-3分後まで増加した後減少し た。一度剥離したマウスの皮膚を再びもとの場所へ戻し、 その上にサーフェイスコイルを当てて、静脈内投与した carbamoyl-PROXYLのESRを測定すると、シグナル強度 は未処理のマウスの場合の約2/3となった。このことか ら皮膚表面でサーフェイスコイル型共振器によって検出さ れたシグナルのうち約1/3は皮膚に存在する carbamoyl-



 図 5 サーフェイスコイル型共振器により皮膚表 で測定され た carbamoyl-PROXYL の ESR シグナル強度の時間推移と紫 外線照射の影響

A. ヘアレスマウスに carbamoyl-PROXYL を尾静脈内投与 し、背部においてサーフェイスコイル型共振器を装着した L-バンド ESR でシグナルの消長を追跡した。

B. Carbamoyl-PROXYL 投与 5 分後から紫外線を照射しな がら測定した。 PROXYLに由来するものと推定される。

3. 2. 2 シグナルの消長に及ぼす紫外線照射の影響

図5Bはcarbamoyl-PROXYLの投与5分後から紫外線 を照射しながら測定したときのシグナル強度の時間推移を 示す。明らかに照射してからのシグナルの消失が照射しな い場合(図5A)に比べて増加した。剥離した皮膚を再び 元の場所に戻したマウスを用いて同様の実験を行ったとこ ろ、紫外線照射によるシグナル消失速度の増加は見られな かった。このことは、紫外線によるシグナル消失速度の増 加は皮膚に存在するプローブの消失によることを示唆する。

シグナル消失速度を1次反応速度定数として求め、紫外 線照射の有無で比較した結果を表3に示す。この実験はへ アレスマウス並びに除毛した ddY 系マウスを用いて行っ たが、いずれの場合にもシグナル消失速度の増加は統計的 に有意であった。

3. 2. 3 紫外線照射によるシグナル消失速度の増加と ラ ジカル反応の惹起

紫外線照射による carbamoyl-PROXYL のシグナル消失 速度の増加とラジカル反応惹起との関係を調べるためにス ピントラップ剤 N-t-butylaphenylnitrone (PBN)の投与 効果を調べた。図6に示す様に紫外線照射によるシグナ ル消失速度の増加は PBN の投与により見られなくなった。 一方、紫外線照射しない場合には PBN はシグナル消失速 度に影響しなかった。このことから紫外線照射下では何ら かのフリーラジカルが生じ、それが carbamoyl-PROXYL のシグナル消失を促進した可能性が考えられる。

4. 考察

In vitro の光増感反応で得られた結果は、NADPH存在 下で¹O₂を介して[•]OHが生成することを示している。¹O₂ 依存的 DMPO-OH の生成は様々な系で報告されており、 次の経路が推定されている。

 $^{1}O_{2} \xrightarrow{e^{-}} O_{2} \xrightarrow{\bullet^{-}} \xrightarrow{e^{-}} H_{2}O_{2} \xrightarrow{\text{Metals}} \xrightarrow{\bullet} OH \xrightarrow{\text{DMPO}} DMPO-OH (1)$

 $^{1}O_{2} \xrightarrow{\text{DMPO}} [\text{DMPO-}^{1}O_{2}] \xrightarrow{\text{H}^{+}} \text{DMPO-OH} + ^{\bullet}OH$ $\xrightarrow{\text{DMPO}} \text{DMPO-OH} (2)^{17}$

 $^{1}O_{2} \xrightarrow{-SH} -SOOH \longrightarrow -SO^{\bullet} + ^{\bullet}OH \xrightarrow{DMPO} DMPO-OH$ (3)

NADPHの存在下で $^{1}O_{2}$ 依存的に O_{2} ··や $H_{2}O_{2}$ の生成が 起こることが報告されている $^{12-14}$ 。NADPH存在下のUP 光増感反応では $H_{2}O_{2}$ が生成することが確認されたため、 もし遷移金属がこの反応系に存在すれば $^{\cdot}OH$ が生成する 可能性が考えられる。しかし、本研究で見られた現象は、 表3 ESR シグナル消失速度(/min)に及ぼす UV 照射の影響

	除毛ddYマウス	ヘアレスマウス
UV照射下	0.063±0.006 (14)	0.082±0.008 (3)
UV非照射下	0.048±0.007 (17)	0.065±0.005 (3)
	p<0.001	p<0.05

数値は平均±S.D.(n) 有意差検定はStudent's t-testによった。



図 6 紫外線照射による ESR シグナル消失速度の増加に及ぼ
す PBN の影響

PBN は照射 35 分前に腹腔内投与した。

(i) 反応系に H₂O₂ を添加しても DMPO-OH の生成量の増 加は見られなかったこと、(ii) カタラーゼ、DFO はいずれ も NADPH 存在下の UP 光増感反応における DMPO-OH の生成に影響しなかったことから経路(1)によるのではな いことが明らかである。また、70%以上のDMPO-OHの シグナルがエタノールなどの OH 消去剤の存在で失われ たことから経路(2)により DMPO-OH が生成された可能性 も除去されよう。Buettner¹⁸⁾ はシステイン存在下ヘマト ポルフィリン誘導体の光増感反応で OH が生成すること を見いだし、-SHと1O2との反応による-SOOHがホモリ ティカルに解裂して[・]OHが生成したと推定した。今回の 反応で同様な反応が起きているか否かは不明であるが、こ こで得られた結果はこれまでに報告されている経路とは 異なる経路で[・]OH が生成している可能性を示唆している。 NADPH はシステインと同様に生体内で絶えず turn over されている物質である。本研究で得られた結果は皮膚で ¹O₂が生成すれば[•]OHの様な傷害性の強い酸素ラジカル に即座に変換される可能性を示唆するものである。

一方、紫外線で生じるラジカル反応の *in vivo* 測定では、 紫外線照射下で惹起されるラジカル反応を *in vivo* でモニ タリングできる可能性を示した。Carbamoyl-PROXYLの ESR シグナル消失速度の増加が如何なる活性酸素あるい はフリーラジカルの生成によるものかは、今後様々なラジ カル消去剤を用いてそのシグナル消失への影響を調べるこ とにより明確になるものと思われる。また、更にこのラジ カル反応のモニタリング系が確立されれば、抗酸化剤ある いはサンスクリーン剤のラジカル反応の抑制に基づく in vivo における評価法として有用となるものと思われる。

(引用文献)

- 1) Fuchs J, : Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection, *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 848-873, 1998.
- 2) Ryter SW, Tyrrell RM, : Singlet molecular oxygen (¹O₂): a possible effector of eukaryotic gene expression, *Free Radic. Bio. Med.*, 24, 1520-1534, 1998.
- 3) Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, et al., : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure, *J. Invest. Dermatol.*, 107, 733-737, 1997.
- 4) Saliou C, Kitazawa M, McLaughlin L, et al., : Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line, *Free Radic. Biol.* Med., 26, 174-183, 1999.
- 5) Connor MJ, Wheeler LA, : Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation, *Photochem*. *Photobiol.*, 46, 239-245, 1987.
- 6) Taira J, Mimura K, Yoneya T, et al., : Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells, *J. Biochem.* 111, 693-695, 1992.
- 7) Masaki H, Atsumi T, Sakurai H, : Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 474-479, 1995.
- 8) Yasui H, Sakurai H, : Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 131-136, 2000.
- 9) Frew JE, Jones P, Scholes G, : Spectrophotometric

determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentration in aqueous solution, *Anal. Chim. Acta*, 155, 139-150, 1983.

- Hirata H, Walczak T, Swartz HM, : Electronically tunable surface-coil-type resonator for L-band EPR spectroscopy, J. Magn. Reson., 142, 159-167, 2000.
- 11) 高城徳子,竹下啓蔵,平田 拓 ほか2名,:ポルフィ リン症モデルマウスの光照射により皮膚で生じるラジ カル反応の in vivo ESR 解析,磁気共鳴と医学,10,135-138,1999.
- 12) Peters G, Rodgers MAJ, : Single-electron transfer from NADH analogues to singlet oxygen, *Biochim. Biophys. Acta*, 637, 43-52, 1981.
- 13) Inoue K, Matsuda T, Saito I, : A convenient method for detecting the superoxide ion from singlet oxygen reactions of biological systems. Superoxide formation from hydrogenated nicotinamide adenine dinucleotide and 5-hydroxytryptophan, *J. Photochem.*, 25, 511-518, 1984.
- 14) Bodanes RS, Chan PC, : Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide, *J. Biol. Chem.*, 10, 8554-8560, 1977.
- 15) Yim MB, Chock PB, Stadtman ER, : Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5006-5010, 1983.
- 16) Halliwell B, : Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine; what is its mechanism of action?, *Free Rad. Bio. Med.*, 7, 645-651, 1983.
- 17) Feix JB, Kalyanaraman B, : Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during merocyanine-540-mediated photosensitization: Analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection, *Arch. Biochem. Biophys.*, 291, 43-51, 1997.
- 18) Buettner GR, : Thiyl free radical production with hematoporphyrin derivative, cysteine and light: a spin-trapping study, *FEBS Lett.*, 177, 295-299, 1985.