

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05622

研究課題名(和文) 海水中光化学反応過程に係る活性酸素種の動態把握および役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of behavior and roles of photochemically active reactive oxygen species in seawater

研究代表者

佐久川 弘 (SAKUGAWA, Hiroshi)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：80263630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：瀬戸内海で海水を採取し、活性酸素種であるヒドロキシルラジカル(OH)、スーパーオキシド(O₂⁻)、過酸化水素(H₂O₂)、一重項酸素(¹O₂)、一酸化窒素(NO)、有機過酸化物(ROOH)、脂質過酸化物(LOOH)、ペロキシナイトレート(ONOO⁻)の測定を行った。溶存有機物から光化学的にO₂⁻、¹O₂、H₂O₂が発生すること、NO₂-光分解によりOHおよびNOが発生すること、O₂⁻とNOとの反応からONOO⁻が発生することが明らかとなった。これらの活性酸素種は10⁻¹²から10⁻⁹M/sの光化学的生成速度、10⁻¹⁸から10⁻⁹Mの濃度であった。ONOO⁻の存在を本研究で初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海水中の活性酸素種の動態を包括的に明らかにした研究は国内外に存在しない。従来研究では、OHやH₂O₂などの単独の活性酸素種の測定が行われてきたので、活性酸素同士の消失反応も踏まえた動態の総合評価がなされていなかった。また、特定のDOM、金属等との同時測定がなされていないので、活性酸素種とこれらの物質の反応速度が不明であった。本研究により、海洋においてはDOMの酸化分解を介しての炭素循環、窒素化合物の酸化還元を介しての窒素循環にそれぞれ大きな役割を果たしていることを明らかにした。また、活性酸素種同士の相互作用や、メチル水銀や農薬などの有害物質の分解過程への関与を明らかにしたことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Seawater was collected in Seto Inland Sea, Japan to analyze reactive oxygen species such as hydroxyl radical(OH), superoxide ion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂), nitric oxide (NO), organic hydroperoxides (ROOH), peroxide lipid (LOOH) and peroxy nitrite (ONOO⁻). O₂⁻, ¹O₂ and H₂O₂ were mainly produced by photochemical reactions of dissolved organic matter in seawater while photolysis of NO₂⁻ generated OH and NO. Reaction of O₂⁻ with NO was found to form ONOO⁻. Photochemical formation rate and steady state concentrations of these reactive oxygen species were 10⁻¹² to 10⁻⁹ M/s and 10⁻¹⁸ to 10⁻⁹ M, respectively. This study first identified ONOO⁻ in seawater.

研究分野：地球化学

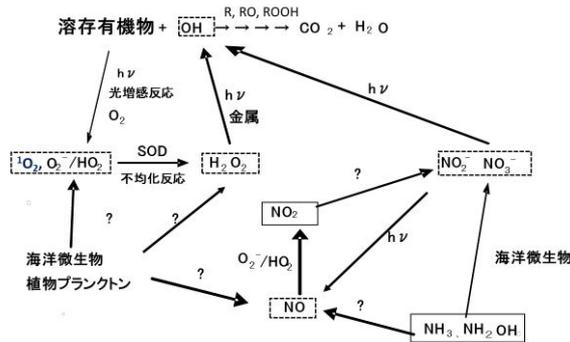
キーワード：活性酸素 スーパーオキシド OHラジカル 一重項酸素 過酸化水素 瀬戸内海 光化学反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海水中の活性酸素種 (反応性の高い酸素種; OH, H₂O₂, O₂⁻, ¹O₂, NO, R, RO, ROOH など、R=アルキル基) は、海洋表層への太陽光入射により主に生成する。海洋微生物や植物プランクトンもこれらの活性酸素種を放出すると考えられるが、詳細は明らかでない。活性酸素種は、溶存有機物 (DOM) 金属イオン、金属化合物などと反応し、これらの物質の寿命やサイクルを決定すると考えられる化学種である。従来、海水中に超微量 (ラジカル類は 10⁻¹⁸ ~ 10⁻⁸M) 超短命 (ラジカル類は 10⁻⁶ ~ 10¹ 秒) で存在する活性酸素種を測定することは困難であったが、欧米の研究者および申請者の先行研究等で近年ようやく高感度、迅速測定が可能になった。図 1 に海水中の活性酸素種の生成・消失過程、そして溶存有機物 (DOM) 金属、窒素化合物、海洋生物との相互作用を示す。DOM の酸化分解に主に関与するのがヒドロキシルラジカル (OH) であるが、

図 1 海水中における活性酸素種の生成・消失過程



その生成源は DOM から発生したスーパーオキシドイオン (O₂⁻) を介しての過酸化水素 (H₂O₂) の光解離、そして亜硝酸イオン (NO₂⁻) や硝酸イオン (NO₃⁻) の光解離反応である。OH は H₂O₂ と二価鉄との反応 (フェントン反応) から発生する。DOM からは一重項酸素 (¹O₂) が、O₂⁻ とともに光化学的に発生し、海水中酸化還元反応に関与する。一酸化窒素 (NO) は、NO₂ や NO₃⁻ の光解離により発生する。脂質過酸化物 (LOOH) などの有機過酸化物 (ROOH) については未解明な部分が多い。これらの活性酸素種は、海洋表層で活発に生産され、相互に反応するので、単一の活性酸素種の測定のみでは、海水中での活性酸素種の動態や役割の全体像を探ることは困難である。

2. 研究の目的

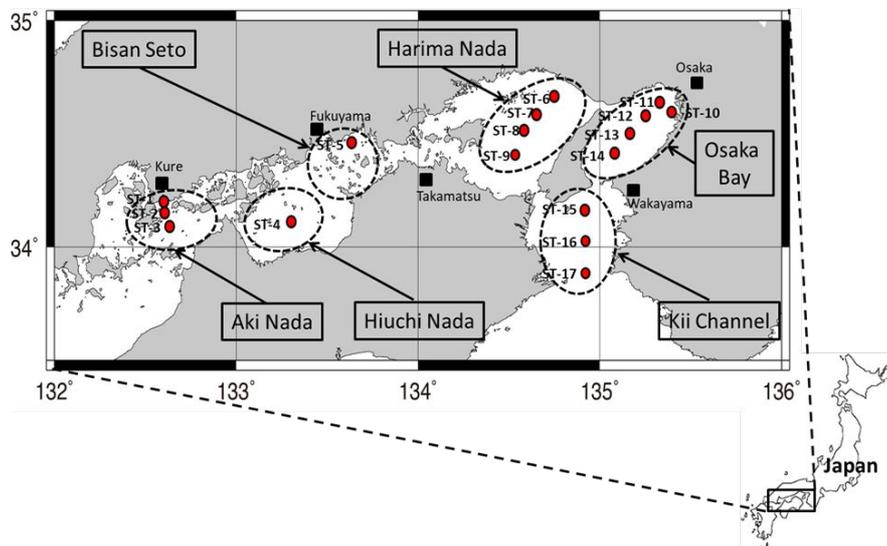
本研究の目的は、瀬戸内海や外洋中の海水中の主要な活性酸素種の動態の把握および DOM などの海水中化学成分の酸化・分解に果たす役割を解明することである。沿岸および外洋での活性酸素種濃度の測定を行い、表層海水中での継時的変化および鉛直分布を明らかにし、DOM の光分解速度の見積もりや金属との反応速度を求める。主要な活性酸素種を同時に測定することにより、活性酸素種同士の相互作用も含めて、活性酸素種の動態や役割を総合的に評価することが本研究の特徴である。

3. 研究の方法

海水試料の採取:

広島大学生物生産学部練習船の豊潮丸航海 (平成 28 ~ 30 年度、年 2 回) において瀬戸内海 (安芸灘、燧灘、備讃瀬戸、播磨灘、大阪湾) および紀伊水道において表層海水をニスキン採水器で採取した。水中光量子、CTD、GPS、気象データは、船の観測シ

図 2 瀬戸内海における試料採取地点



ステムから得た。

O_2^- 、OH、 H_2O_2 、NO の測定 (実験 1):

採取した海水試料 (1L) はガラス繊維ろ紙でろ過した後、船上にて直ちに、もしくは研究室に持ち帰り、活性酸素種の測定を行った。 H_2O_2 は、HPLC 蛍光分析により測定を行った (Olasehinde et al. *Analytica Chimica Acta*, 627(2), 270-276, 2008)。ラジカル類 (OH, O_2^- , NO) は、疑似太陽光照射装置 (ソーラーシミュレーター) による光照射後、HPLC 蛍光分析により測定を行うことにより、光化学生成速度、消失速度定数、半減期、定常状態濃度を求めた (Olasehinde et al. *Analytical Chemistry*, 81(16), 6843-6850, 2009; Olasehinde et al. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 1(5), 7-14, 2012; Anifowose et al. *Analytical Chemistry*, 87(24), 11998-12005, 2015)。またラジカル類の発生源である有色溶存有機物 (CDOM)、蛍光性溶存有機物 (FDOM)、 H_2O_2 、フェントン反応、 NO_2^- などからのラジカル発生寄与率をそれぞれ求めた。また、ラジカル同士の反応による消失速度に関しては、反応速度定数を求めることにより、明らかにした。これらの測定を通して、活性酸素種の海洋表層での継時的および鉛直的動態を明らかにした。

1O_2 、ONOO $^-$ 、LOOH の測定法の開発 (実験 2):

1O_2 は、光照射後に発生する 1O_2 を発色試薬と反応させた後に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -紫外分析により測定を試みた。ペロキシナイトライト (ONOO $^-$) は、光照射後、蛍光試薬と反応させた後に、HPLC-蛍光分析により測定を試みた。LOOH は、蛍光試薬を用いたフローインジェクション (FIA) 分析で測定することを試みた。これらの物質の測定法開発にあたっては、発色試薬や蛍光試薬との反応性、検出限界、再現性、干渉や妨害の有無を調べ、方法の有効性を確認した後に、実海水試料の測定を行った。

DOM、農薬、溶存金属の測定および反応速度の見積もり (実験 3):

溶存有機炭素 (DOC) 濃度は、全有機体炭素計で測定した。CDOM は、紫外可視分光光度計により測定した。FDOM は、蛍光分光光度計で 3D-EEM スペクトルを解析することにより腐植物質などを特定した。瀬戸内海海水中の農薬濃度は Kaonga et al. (2014) の方法で測定した。瀬戸内海海水中のメチル水銀濃度は、国立水俣病総合研究センターの丸本幸治博士から提供を受けた。瀬戸内海海水における、活性酸素種と農薬やメチル水銀との反応速度は、室内実験により反応速度定数を求めることにより、あるいは文献値に基づき、見積もられた。

4. 研究成果

O_2^- 、OH、 H_2O_2 、NO の測定 (実験 1):

瀬戸内海海水中の O_2^- 、OH、 H_2O_2 、NO の光化学的生成速度はそれぞれ 10^{-10} 、 10^{-10} 、 10^{-12} 、 10^{-12} Ms^{-1} レベルであった (表 1)。また、定常状態濃度はそれぞれ 10^{-12} 、 10^{-18} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M レベルであった。これら 4 つの化学種の消失反応過程を解析した結果、 O_2^- と NO との直接反応により ONOO $^-$ が生成することが予想された。他の活性酸素種同士の消失反応はほとんど無視できると見積もられた。

表 1 瀬戸内海表面海水中の活性酸素種の光化学的生成速度および定常状態濃度

活性酸素種	光化学的生成速度 (M/s) [*]	定常状態濃度 (M) [*]
スーパーオキシド (O_2^-)	7.85×10^{-10} ($4.54 - 18.2 \times 10^{-10}$)	3.79×10^{-12} ($2.29 - 8.34 \times 10^{-12}$)
ヒドロキシルラジカル (OH)	17.6×10^{-12} ($6.98 - 35.3 \times 10^{-12}$)	7.23×10^{-18} ($3.88 - 12.2 \times 10^{-18}$)
一酸化窒素 (NO)	20.3×10^{-12} ($1.20 - 58.3 \times 10^{-12}$)	1.39×10^{-10} ($0.16 - 4.67 \times 10^{-10}$)
一重項酸素 (1O_2)	9.03×10^{-9} ($5.28 - 21.1 \times 10^{-9}$)	3.28×10^{-14} ($1.91 - 7.64 \times 10^{-14}$)
ペロキシナイトライト (ONOO $^-$)	9.00×10^{-10} ($0.62 - 51.3 \times 10^{-10}$)	2.26×10^{-12} ($0.98 - 6.11 \times 10^{-12}$)
過酸化水素 (H_2O_2)	1.84×10^{-10} ($1.22 - 2.97 \times 10^{-10}$)	126×10^{-9} ($20 - 204 \times 10^{-9}$)
脂質過酸化物 (LOOH)	ND	$<10 \times 10^{-9}$

*: 平均値(最小値 最大値), ND: not determined

1O_2 、ONOO $^-$ 、LOOH の測定法の開発 (実験 2):

1O_2 は Furfuryl alcohol と反応させ、反応物を HPLC-紫外検出法により測定した。この分析方法の検出限界、再現性等を調べ、海水中の分析法として有効であることを確認した。瀬戸内

海における $^1\text{O}_2$ の光化学的生成速度および定常状態濃度は、それぞれ 10^{-9} Ms^{-1} および 10^{-14} M レベルであり(表 1)、大阪湾で最も高く、紀伊水道で最も低かったことを示した。海水中の有色溶存有機物(CDOM)濃度を併せて測定した結果、 $^1\text{O}_2$ との相関が高く、CDOMが $^1\text{O}_2$ の主な生成源であることが推定された。

海水中のONOO \cdot は、光照射後に(2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl)-boronic acidと反応させ、反応物をHPLC-蛍光検出法で測定することにより、高感度で測定可能であることを明らかにした。瀬戸内海におけるONOO \cdot の光化学的生成速度および定常状態濃度は、それぞれ 10^{-10} Ms^{-1} および 10^{-12} M であった(表 1)。その空間的分布は、大阪湾で最も高く、紀伊水道で最も低かった。海水中のNOがONOO \cdot の生成に寄与する割合は10%以下と低く、大部分のNOはNOガスとして海水から大気に移行することが示唆された。本研究により、海水を含む天然水中でONOO \cdot が存在することが初めて確認された。

LOOHの測定には、蛍光試薬であるLiperfluoを脂質過酸化物と反応させ、生成物をHPLC-蛍光検出法で測定する方法を開発した。この方法を用い、黒瀬川河川水中の濃度を測定した結果、数十nMレベルで脂質過酸化物が存在することを明らかにした。さらに、脂質過酸化物が光化学的に容易に分解することや、その分解過程で過酸化水素が生成することを明らかにした。さらに、開発した方法により、瀬戸内海海水中のLOOHを測定した結果、すべての海域で検出限界以下(<10 nM、表 1)であり、海水中濃度が極めて低いことを確認した。

DOM、農薬、溶存金属の測定および反応速度の見積もり(実験3):

海水中における特定のDOMや金属化合物への分解過程への活性酸素種の関与について調査した。特に、農薬などの有害有機物やメチル水銀などの毒性物質の分解における $^1\text{O}_2$ およびOHの役割について、反応速度論解析をおこなった。先行研究により、これらの化学物質の分解反応においては、 $^1\text{O}_2$ もしくはOHのいずれかが主要な酸化剤として作用することが予測されていた。そこで、室内実験により反応速度定数を求め、また文献値を参考にして、これらの物質の海水中における分解速度を求めた。その結果、瀬戸内海海水中においては、たとえば有機リン系殺虫剤であるDiazinonの分解にはOHが主な酸化剤として作用した。一方メチル水銀の分解にはOHよりも $^1\text{O}_2$ が主な酸化剤として作用すると見積もられた。ただし、 $^1\text{O}_2$ によるメチル水銀の分解速度は遅い(半減期が数千日)ので、実海水では他の分解過程(例えば腐植物質との相互作用や海洋生物による取り込み)が主な分解・除去過程であると結論した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- (1) Kinetics of photocatalytic removal of imidacloprid from water by advanced oxidation processes with respect to nanotechnology
A. Derbalah, M. Sunday, R. Chidya, W. Jadoon, H. Sakugawa
Journal of Water and Health, **17**(2), 254-264, 2019. 査読有
DOI: 10.2166/wh.2019.259
- (2) Photogeneration and interactive reactions of three reactive species in the Seto Inland Sea, Japan
A. O. Adesina, A. J. Anifowose, K. Takeda, H. Sakugawa
Environmental Chemistry, **15**(4), 236-245, 2018. 査読有
<https://doi.org/10.1071/EN18035>
- (3) A fluorometric method for the selective determination of lipid hydroperoxides in river water
M. O. Sunday, H. Sakugawa
Geochemical Journal, **51**(6), 571-581, 2017. 査読有
DOI: 10.2343/geochemj.2.0492
- (4) Determination of daytime flux of nitric oxide radical (NO \cdot) at an inland sea-atmospheric boundary in Japan
A.J. Anifowose, H. Sakugawa
Journal of Aquatic Pollution and Toxicology, **1**(2),1-6, 2017. 査読有
<http://www.imedpub.com/aquatic-pollution-and-toxicology>

[学会発表](計6件)

- (1) Spatial distribution of singlet oxygen and hydroxyl radical in Seto Inland Sea and their significance towards pollutant degradation
Michael Oluwatoyin Sunday, Kazuhiko Takeda and Hiroshi Sakugawa
日本地球化学会 2018 年度年会 2018 年 9 月 琉球大学

- (2) Novel fluorescence method for determination of photochemically generated peroxyxynitrite in seawater
Adeniyi Olufemi Adesina, Kazuhiko Takeda, Hiroshi Sakugawa
日本地球化学会 2018 年度年会 2018 年 9 月 琉球大学
- (3) Development of fluorescence method for photochemically generated peroxyxynitrite in seawater
Adeniyi Olufemi Adesina, Kazuhiko Takeda, Hiroshi Sakugawa
日本海洋学会 2017 年度秋季大会 2017 年 10 月 東北大学
- (4) Spatial distribution of singlet oxygen generation in surface water of Seto Inland Sea
Michael Oluwatoyin Sunday, Kazuhiko Takeda, Hiroshi Sakugawa
日本海洋学会 2017 年度秋季大会 2017 年 10 月 東北大学
- (5) Selective determination of lipid hydroperoxides in natural waters using a fluorescent probe
Michael Oluwatoyin Sunday, Kazuhiko Takeda, Hiroshi Sakugawa
American Geophysical Union (AGU) Fall Meeting December, 2016, San Francisco.
- (6) Selective determination of lipid hydroperoxides in natural waters using a fluorescent probe
Adesina Adeniyi Olufemi, Anifowose Adebajo Jacob, Kazuhiko Takeda, Hiroshi Sakugawa
日本化学会中国四国支部大会、2016 年 11 月、香川大学.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: <https://home.hiroshima-u.ac.jp/eac/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 竹田 一彦

ローマ字氏名: TAKEDA, Kazuhiko

所属研究機関名: 広島大学

部局名: 大学院生物圏科学研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 00236465

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: サンデー マイケル

ローマ字氏名: SUNDAY, Michael

研究協力者氏名: アデシナ アデニユイ

ローマ字氏名: ADESINA, Adeniyi

研究協力者氏名: ダーバラ アリー

ローマ字氏名: DERBALAH, Aly

研究協力者氏名: アニフォワセ アデバンジョ ジェイコブ

ローマ字氏名: ANIFOWOSE, Adebajo Jacob

研究協力者氏名: 丸本 幸治

ローマ字氏名: MARUMOTO, Koji

