

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2009

課題番号：18560423

研究課題名（和文） 活性酸素のダイナミクス測定装置の開発

研究課題名（英文） Development of dynamics measurement system for active oxygen species

研究代表者 水本 巖

(MIZUMOTO IWAO)

富山高等専門学校・電子情報工学科・教授

研究者番号：40239257

研究成果の概要（和文）：高輝度 LED を用いた簡易型活性酸素発生装置、可搬型 ESR 測定装置、可搬型近赤外域微弱光検出装置の開発を行った。それらを用いて、ローズベンガル 5 W の超高輝度 LED で光励起した場合、発生する一重項酸素は、 $6.4 \times 10^{11}$ 、スーパーオキシドは、 $2.4 \times 10^{20}$  の分子が発生すると見積もられた。活性酸素種の主な種類について、発生個体数を算出し活性酸素作用基準の基礎特性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The active oxygen species, singlet oxygen, was generated by high power green-LED photoexcitation of Rose Bengal. Portable ESR spectrometer, a Charge integrating amplifier operated at Low Temperature for Near-Infrared low-level light were developed. The signal-intensity of singlet oxygen generated by 5W LED irradiation was as strong as  $10^{13}$ W emission by an InGaAs LED. We estimated that  $6.4 \times 10^{11}$  molecules of the singlet oxygen. We estimated that  $2.4 \times 10^{20}$  molecules of the radical were generated from the Rose Bengal photoexcitation. The part standard action of main active oxygen was made explicit by this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・測定工学

キーワード：活性酸素 ESR 近赤外域 微弱光分光

## 1. 研究開始当初の背景

従来、癌治療に用いられる PDT (Photo Dynamic Therapy) では、癌細胞のみに選択的に染色する特定色素を、レーザーなどで光励起することにより、活性酸素を発生させ癌細胞のみを選択的に死滅させる治療が行われてきた。また養殖池などで消毒に使用さ

れるローズベンガルは、太陽光のエネルギーを得てえび白斑ウイルスなどの菌を死滅させる。その際、癌細胞や菌などが死滅するメカニズムにおいて、有効に作用する主な活性酸素種の内、一重項酸素もしくはスーパーオキシドのどちらの酸素種が活性に働くのか作用基準が明らかになっていなかった。

この一重項酸素の検出には化学的方法と物理的方法の二種類の検出方法があるが、化学的検出方法は活性酸素種のほぼすべてに反応すること、薬品そのものの影響をすべて取り除くことができないため、近赤外域での一重項酸素特有の微弱発光を捉える物理的方法が一番確からしい。一方、スーパーオキシドの検出においても化学的方法を用いた場合同様の可能性があり、そのため特定磁場においてマイクロ波吸収を伴う ESR (Electric Spin Resonance) を用いた物理的手法が主に用いられてきた。そのため、それぞれ活性酸素の検出方法が大きく違い、これまでこの酸素種のダイナミクスが明らかにされなかった。物理的な方法による検出比較が困難になった理由の一つには、装置が大型でかつ高価であり、実際に試薬の研究開発や実験を行っている現場に普及していないことがあげられる。そこで可搬型でかつ操作性の良い、ダイナミクス測定用装置の開発が必要となった。

## 2. 研究の目的

医学的な治療分野や農水産物の養殖過程、もしくは除草・滅菌等の分野で、活性酸素は多く利用されている。作用基準や発生する活性酸素の内、どの種類の活性酸素が有効なのか、支配的なのかを明らかにするため、種々の分野での活性酸素種のダイナミクスを明らかにするために以下の装置が必要とされる。数々の実験場所での汎用性をもって実験を行う為に、

- ・可搬型の活性酸素発生装置およびスーパーオキシド測定装置 (ESR 測定装置)、
- ・一重項酸素測定装置 (近赤外域微弱光検出装置) の開発を行う。

これらの装置を用いて活性酸素種の主な成分であるスーパーオキシドおよび一重項酸素の発生量を比較検討することにより、ダイナミクスを明らかにする。

## 3. 研究の方法

活性酸素発生装置は、ローズベンガルやメチレンブルー、ヘマトポルフェリン等の色素を、高輝度 LED を励起光源として活性酸素を発生させる。これまでレーザー光源を用いて光励起してきたため、励起用光源だけで装置が大型になった。一方高輝度 LED は、レーザー以上に高出力光が得られるほか、発振線幅がレーザー光より広がった発光スペクトルは、ローズベンガル色素の吸収波長帯域とほぼ一致し、そのため励起効率も向上する。

一方、ESR 測定装置は巨大な電磁石を用いる代わりに小型搬送可能な電磁石を利用して装置の超コンパクト化を目指す。一方、シリコン検出器もしくはフォトマルチプライヤーを用いることができない  $1\sim 2\mu\text{m}$  帯

の近赤外域において、液体窒素を用いて冷却しない冷媒での可搬型微弱光検出システムの構築を目指す。

## 4. 研究成果

これまで水冷もしくは空冷のアルゴンレーザーなど、大掛かりな光源を用いて光励起を行って活性酸素を発生させていた。これら装置は高額である他、水冷装置が必要である等大きさ的にも、運用的にも可搬が不可能であった。本研究では、交通信号器用超高輝度 LED を光源に用いることにより、極めてコンパクトかつ安価な活性酸素発生装置を開発した。図 1 に励起用光源を比較する。

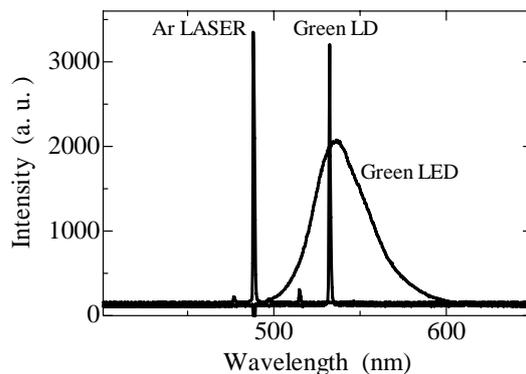


図 1 色素励起用光源の比較

高輝度 LED は、一般の Ar レーザー (約 500mW ~ 数 W 程度) と比べて、5W から 10W 近くの出力が得られる。またレーザーと比べて発振線幅が広いが、これらは逆にローズベンガルの吸収波長とほぼ一致し、励起効率が向上する。

次に活性酸素発生装置のブロック図を示す。

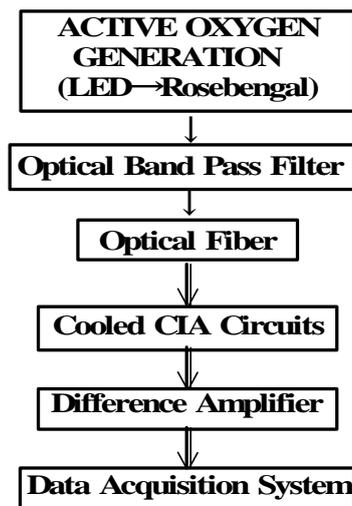


図 2 高輝度 LED を用いた活性酸素発生装置のブロック図

本システムは、光励起光源に流す電流量を調節することにより発生させる活性酸素量を可変することができる。また光バンドパスフィルタを用いて分光システムを構築することにより発生した活性酸素（一重項酸素の1.27  $\mu\text{m}$  発光スペクトルの半値全幅約50nm）近赤外域発光）を容易にモニタリング可能である。更に装置自体が小型ため、可搬が可能であるほか、スーパーオキシド想定用 ESR 装置との組み合わせが容易である特徴を有する。そのため、フィールド試験などが可能であり、使用環境はこれまでレーザーを用いていた環境下とは全く異なり、汎用性が著しく増したことが成果として挙げられる。

次に図3に、本装置で得られた一重項酸素の発光スペクトルを示す。1.27  $\mu\text{m}$  に発光のピークが見られ通常のレーザーで励起した場合と変わらない。レーザー設備を使用しない分だけ、低コスト化とコンパクト化を実現した。

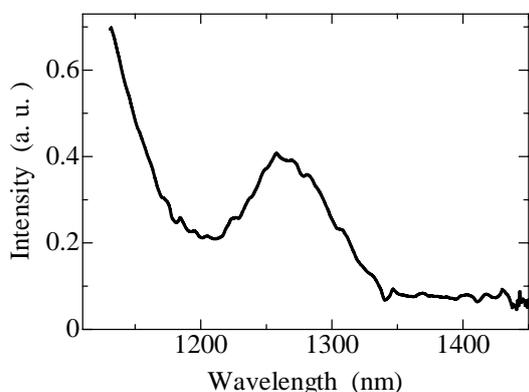


図3 一重項酸素近赤外域発光スペクトル

これまで、近赤外域の微弱光検出には Ge-PIN フォトダイオードと電流電圧変換回路 (TIA: Trans Impedance Amplifier) を組み合わせ、これをロックインアンプを用いて計測していた。暗電流を抑えて検出感度を高めるため、受光素子の冷却には、液体窒素を用いていた。液体窒素は微弱光を測定するための暗室など密閉した空間では窒息や、やけどなどの危険が伴うほか、常に液体窒素を保管しなければならない煩雑さなどが、本装置の普及を妨げてきた。

そこで、液体窒素を冷媒として使わずに、市販の小型冷凍機 (-60度) を冷媒として使用した、極めて容易に搬送可能な小型の InGaAs フォトダイオードを用いた電荷蓄積型近赤外域微弱検出装置 (InGaAs-CIA; InGaAs Charge Integrating Amplifier) を開発した。

これらを用いて、ローズベンガル色素を光励起して一重項酸素の発光スペクトルを観測した。

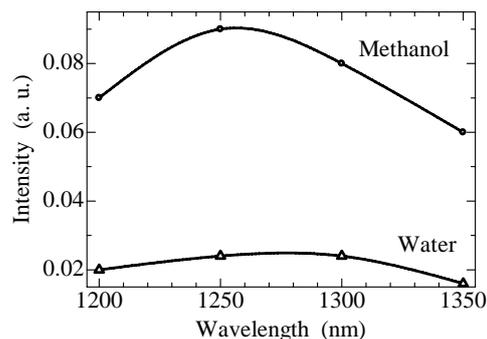


図4 可搬型近赤外域微弱発光検出システムにより得られたローズベンガルの光励起による一重項酸素発光スペクトル

これら可搬型の活性酸素発生装置、ESR 装置および近赤外域微弱光検出装置を用いて、一重項酸素とスーパーオキシドのダイナミクスを測定比較した。

図5にローズベンガルと ESR の標準試料である DPPH の ESR 信号強度比を示す。

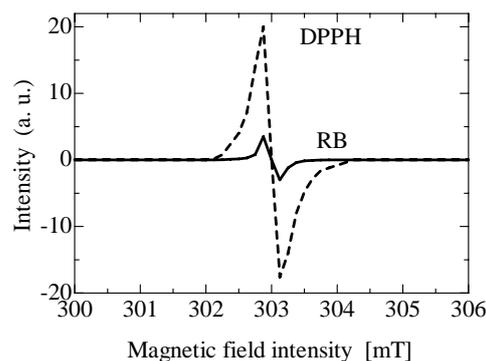


図5 DPPH とローズベンガルの ESR スペクトル比較

DPPH (関東化学) 0.1g はラジカル濃度が約 97%、 $1.48 \times 10^{21}$  個であるので、ラジカル濃度は ESR スペクトルの面積に比例して求められることかができる。そのためローズベンガルのラジカル濃度は DPPH に比べて約 16% 相当となり、発生したラジカル量は  $2.4 \times 10^{20}$  個程度であると推測される。

一方、近赤外域微弱光計測による一重項酸素の検出は、高輝度緑色 LED を用いて光励起した一重項酸素発光スペクトルより、励起用光源 LED の励起光源 5W 照射に対して、1300nm 帯で発光する InGaAs LED の発光強度で比較換算すると一重項酸素の発光強度は約  $10^{-13}$  W 相当であった。波長約 1260nm 付近における水の吸光度は約 0.1 であり、光路は励起からセル側面までの光路 1mm を考えると約

100 分の 1 に吸収減衰する。そのため元の発光強度から水による光の吸収などを除いたとすれば、赤外発光として励起された一重項酸素分子の個数は、およそ  $6.4 \times 10^6$  個であると推定される。また水中における一重項酸素の寿命は、空気中での寿命の 1000 分の 1 である。そのため、発生した一重項酸素分子は、 $10^5$  倍と見積もられる。そのため発生した一重項酸素は  $6.4 \times 10^{11}$  個と考えられる。

一方ローズベンガルを光励起した実験では、ESR スペクトルは光照射の有無に関わらず同じ強度で観測された。近赤外域での微弱発光は光を照射した場合のみ観測された。

その結果から、ローズベンガルの光励起では、光の照射でスーパーオキシドの発生には殆ど寄与せず、一重項酸素の発生にのみ関与しているものと考えられる。したがってローズベンガルを用いたウイルス不活性化は光照射時のみに効果があったことから、不活性化効果は一重項酸素によってもたらされたものだと考えられる。今後は、ローズベンガルの以外にも類似した性質をもち、同じく魚病薬として使用されているメチレンブルーや光化学療法で使用されているフェオフォルバイト、ヘマトポルフィリン、などを対象に実験を行う必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

水本 巖、橋本真以子、響田真治、小竹外治、益子信郎、鈴木喜孝, “高輝度 LED 光源を用いた一重項酸素発生装置”, 分光研究, **56** p123-124(2007) .

Iwao Mizumoto, Shinji Kustuwada, Nobutaka Suzuki, “Detection of Active Oxygen Species Generated by Light Excitation of Rose Bengal”, ITE-IBA Letters, **2**, p54-59(2009).

水本 巖、鈴木喜隆, “低温で動作する電荷蓄積型近赤外域微弱検出器”, 電気学会論文誌 C, **130**, p1-2(2010).

[学会発表] (計 2 件)

響田真治、水本 巖、鈴木喜隆, “色素由来による活性酸素の検出”, 平成 19 年度電気関係学会北陸支部連合大会, B-10(2007).

橋本真以子、水本 巖、鈴木喜隆, “近赤外域分光法を用いた一重項酸素検出システムの製作”, 平成 20 年度電気関係学会北陸支部連合大会, H-15(2008).

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水本 巖 (MIZUMOTO IWAO)

富山高等専門学校・電子情報工学科・教授

研究者番号: 40239257

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号: