

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655060

研究課題名(和文)一重項酸素の新しい絶対濃度測定法の開発と新原理に基づいた高感度検出装置の試作

研究課題名(英文) Absolute concentration measurement and experimental detection equipment of singlet oxygen on the basis of a new principle

研究代表者

八木 幹雄 (YAGI, Mikio)

横浜国立大学・工学研究院・教授

研究者番号：00107369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な活性酸素である一重項酸素は酸素分子の電子励起状態であり、種々の疾患関連因子として、また光線力学療法のがん細胞壊死の主役として注目されている。近年、種々の一重項酸素検出法が考案され検出装置の高感度化が進行しているが、一重項酸素を定量することが困難な状況が続いている。

本研究では基底状態の酸素分子と一重項酸素が共に常磁性であり、電子スピン共鳴装置と呼ばれる装置で電子常磁性共鳴信号として同時に検出可能であることに着目し、基底状態の酸素分子を濃度標準とした一重項酸素の新しい絶対濃度測定法を開発した。さらに、一重項酸素からの近赤外発光と電子常磁性共鳴信号の同時検出装置を試作した。

研究成果の概要(英文)：Singlet oxygen, the lowest excited state of molecular oxygen, is a representative of reactive oxygen species and is of much interest because of its importance in many photosensitized oxidations, in photocarcinogenesis, and in the photodynamic therapy of cancer. Recently, many kinds of techniques have been employed to improve the sensitivity of the detector. However, the currently used technology has important limitations of quantitative information about singlet oxygen concentration which need to be overcome.

It is notable that singlet oxygen is paramagnetic owing to its angular momentum and ground-state oxygen is also paramagnetic. In the present work, we observed the electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of singlet oxygen. We have succeeded in determining the absolute concentration of singlet oxygen by using ground-state oxygen as a quantitative standard. We made an experimental equipment to observe the EPR and near-IR emission spectra of singlet oxygen at the same time.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：一重項酸素 近赤外発光 電子常磁性共鳴 りん光 活性酸素 紫外線吸収剤 サンスクリーン剤

## 1. 研究開始当初の背景

一重項酸素とは最低電子励起状態( $^1\Delta_g$  状態)の酸素分子であり、光酸化反応における主役として合成化学的・生化学的に興味もたれている。近年は、種々の疾患の関連因子として、また、光線力学的療法におけるがん細胞壊死の主役として注目されている。電子励起状態である一重項酸素は基底状態である三重項酸素に緩和する際に約 1270 nm の近赤外領域に固有のりん光を発する。この近赤外発光を検出する方法が、現在の国内・国外における主たる一重項酸素の直接検出方法となっている(1)。しかし、一重項酸素の放射速度定数が不明のため、発光法により定量を行うことは困難である。近年、近赤外発光検出法の他に種々の一重項酸素検出法が考案され、検出装置の高感度化が進行しているが、一重項酸素を定量することが困難である状況が続いている。

基底状態の酸素分子は三重項状態であり、常磁性を示す極めて珍しい分子である。三重項酸素と通常は一重項状態である有機化合物との酸化反応はあまり速く進行しないため、反応を促進するためには一重項酸素などの活性酸素と総称される酸素に変換する必要がある。

一重項酸素は角運動量が死滅せずに残っているため、スピン角運動量がゼロの“一重項状態”であるにもかかわらず常磁性であり、電子スピン共鳴(ESR)と呼ばれる装置で観測可能である。ESR よりも EPR (Electron Paramagnetic Resonance) をより一般性のある学術用語とすべきであるという議論において、必ず引用されるのがこの一重項酸素である。本研究では、三重項酸素と一重項酸素が同時に観測される EPR 法の特性に着目した。

基底状態の酸素濃度は正確に測定可能であるため、三重項酸素を濃度標準物質とすることにより、一重項酸素の絶対濃度を決定できる。しかし、EPR 法は装置が高価であり、携帯性に乏しく野外観測には適さない。一方、赤外発光検出器は比較的安価であり、携帯性に優れているが定量性に乏しい。EPR と赤外発光を同時観測し、赤外発光検出器を較正することができれば、EPR 装置から分離独立したのちの赤外発光検出器自体が携帯性、簡便性、経済性に優れた一重項酸素絶対濃度測定器となる。

ESR を用いた研究に長年従事してきた本研究代表者等は一重項酸素の常磁性に着目し、気相において EPR スペクトル測定に成功し、EPR 法が定量性に優れた一重項酸素の検出法であることを示した(2,3)。また、本研究代表者は大学院生時代およびカリフォルニア大学客員研究員として光検出磁気共鳴法を用いた励起分子の研究に従事しており、分子の光学的性質と磁氣的性質を組合せた分光法に関する十分な経験を有している。

- (1) C. Schweitzer, R. Schmidt, *Chem. Rev.*, 103 (2003) 1685–1757.
- (2) M. Yagi, S. Takemoto, R. Sasase, *Chem. Lett.*, 33 (2004) 152–153.
- (3) K. Hasegawa, K. Yamada, R. Sasase, R. Miyazaki, A. Kikuchi, M. Yagi, *Chem. Phys. Lett.*, 457 (2008) 312–314.

## 2. 研究の目的

本研究では、一重項酸素の絶対濃度を決定する信頼性の高い測定法である EPR 法により予め較正された赤外光検出器を用い、携帯性、簡便性、経済性に優れた「一重項酸素の新しい絶対濃度測定法の開発」を第一の目的とした。また、EPR 信号を赤外発光強度の変化として検出する新しい原理に基づいた一重項酸素の高感度検出装置(赤外発光検出 EPR)を試作することを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 概要

発光検出用の窓を備えた光透過型空洞共振器を用いて、赤外発光 - EPR 同時検出装置を試作し、種々の濃度の一重項酸素を発生させ EPR 信号強度と赤外発光強度を同じ条件で観測することを試みた。前述のように、一重項酸素濃度は EPR 信号から正確に決定されるため、一重項酸素濃度と赤外発光強度の関係が求められる。すなわち赤外発光検出器の較正が可能であることを確認することを計画した。

通常の ESR 装置はマイクロ波検出器と S/N 比向上のための磁場変調を外部磁場に加えて信号を検出しているが、装置の時間分解能決定因子の一つである磁場変調周波数には制限があるため、短寿命化学種や磁場変調幅より広い線幅を有する化学種の検出は困難という原理的な問題を抱えている。本研究ではこの問題を克服するために、新しい原理に基づいた一重項酸素検出装置を試作した。

EPR 信号が観測される共鳴磁場の前後で赤外発光強度の変化を観測する。変化が観測されれば磁場変調をかけずに磁場を掃引し、EPR 信号を赤外発光強度の変化として観測する。すなわち「赤外発光検出 EPR 法」を用いた一重項酸素の新しい検出装置を試作した。

### 3.2. 一重項酸素の赤外発光 - EPR 同時検出装置の試作

一重項酸素の赤外発光と EPR 信号を同時に観測するためには、一重項酸素の効果的および安定的な発生方法を考える必要がある。本研究では、有機化合物を水銀灯やレーザーを用いて励起一重項状態に光励起し、項間交差により生成した励起三重項状態から基底三重項状態の酸素分子へのエネルギー移動により一重項酸素を生成させた。すなわち、

光増感法を選択した。

増感剤の選択は極めて重要で、適切な増感剤を選択しないと EPR 信号が全く得られないことが判明している。現在のところ最も S/N 比が良好なスペクトルが得られる三重項増感剤はオクタフルオロナフタレンであるが、さらに効率よく一重項酸素を発生させるために、より適切な増感剤を検索した。

一重項酸素は最低の回転状態では  $|g| \sim 2/3$  となり、通常の X バンド ( $\sim 9$  GHz) EPR スペクトロメーターでは約 1.0 T が共鳴磁場となる。したがって、EPR 装置本体は現有の JEOL JES-FA200 電子スピン共鳴装置 (最大磁場 1.35 T) を使用した。通常の空洞共振器は照射用の窓はあるが、発光を取り出すための窓はない。本研究では、観測用窓がある光透過型空洞共振器を用いることにより、EPR 信号と発光の同時検出を試みた。

### 3.3. 一重項酸素の絶対濃度測定法の確立

EPR 測定と同時に空洞共振器から赤外発光を取り出し検出するために、赤外発光検出には、冷却水・液体窒素不要の近赤外光電子増倍管モジュールを用いた。光増感で生じる一重項酸素の濃度は励起光強度により容易に変えられるので、種々の濃度で EPR と赤外発光強度を同時測定し、赤外発光検出器の較正を行うことを計画した。較正された赤外発光検出器を二次標準とすることにより、携帯性、簡便性、経済性の面で困難な EPR 測定が行えない環境においても、絶対濃度が決定可能となる。

本研究で試作した装置の一重項酸素発生ユニットは、濃度が保証された「一重項酸素発生器 (Singlet Oxygen Generator)」の試作品とみなすことができる。

### 3.4. 一重項酸素の新しい原理に基づいた分光学的検出装置の試作

一重項酸素は全角運動量  $J = 2$  をもち磁場下では  $M_J = 2, 1, 0, -1, -2$  の五つの副準位に分裂する。一方、三重項酸素はスピン角運動量  $S = 1$  をもち  $M_S = 1, 0, -1$  の三つの副準位に分裂する。各副準位からの放射遷移確率が異なる場合、例えば EPR 遷移により放射遷移確率の大きい副準位の占有数が増加すると赤外発光強度は増加する。すなわち、EPR 遷移を赤外発光強度の変化として検出可能であると考えられる。

通常の EPR 測定は磁場変調法により行われるため、EPR スペクトルは磁場についての微分形として得られる。酸素分圧が高くなると EPR スペクトルの線幅が増大し信号強度が低下する。磁場変調幅は最大でも 2 mT 程度と限界があり、高い酸素分圧下での測定を著しく困難にしている。発光検出法では磁場変調を用いないため、この問題点が克服されることが期待される。また放射遷移確率の増大により寿命が短くなると一重項酸素の定常濃度が減少するため磁場変調法では信号

が弱くなるが、発光検出法では単位時間当たりの光子数が増加するため短寿命でも信号が観測可能となる特徴がある。

## 4. 研究成果

平成 24 年度に本研究経費により近赤外光電子増倍管モジュール (浜松ホトニクス, 電子冷却型, H10330A-45, 950 ~ 1400 nm) を購入し、現有のパルスレーザー (Nd:YAG レーザー, 266nm, 355 nm, 532 nm), 小型分光器 (島津製作所, SPG-120IR, 700 ~ 2500 nm) およびアンプユニット (浜松ホトニクス, C9999, DC ~ 10 MHz) と組合せて近赤外領域における時間分解りん光測定装置を立ち上げ、一重項酸素の 1270 nm 近赤外発光を時間分解能約 100 ns で測定可能とした。溶液中で光増感生成した一重項酸素を検出し、装置の作動確認を行った。

平成 25 年度は現有の光透過型空洞共振器 (日本電子, ES-MCX3B, X バンド) を用いて気相における一重項酸素の赤外発光 - EPR 同時検出装置を試作し、種々の圧力条件下で測定を行った。

溶液中の実験からはサンスクリーン剤として使用されているアントラニル酸メンチル, ショウノウ誘導体, ベンゾフェノン誘導体などの紫外線吸収剤から一重項酸素が光増感生成することが判明した。時間分解りん光測定装置を用いて、一重項酸素の寿命および生成量子収量を求めた。さらに、ある種の紫外線吸収剤は一重項酸素の消光剤としての機能を有することが判明した。

気相における一重項酸素の最適な増感剤を選定するために、種々の有機化合物を用いて実験した。しかし、オクタフルオロナフタレンを超える増感剤を見出すことができなかったため、気相における以後の実験はすべて増感剤としてオクタフルオロナフタレンを用いて行った。

大気圧下における一重項酸素の近赤外発光検出に成功し、一重項酸素の大気圧下の寿命を求めることができた。しかし、EPR 信号は線幅の広がりのために検出されなかった。一方、線幅が狭くなる低圧においては EPR 信号が検出可能であったが、近赤外発光を観測することは困難であった。この原因は低圧下では一重項酸素の濃度が低いためと考えられ、検出装置をさらに高感度化することが必要である。試作装置の高感度化が今後の課題となった。

## 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 7 件)

- [1] Ryo Kumasaka, Azusa Kikuchi, Mikio Yagi  
Photoexcited states of UV absorbers,  
benzophenone derivatives  
*Photochemistry and Photobiology*,

in press. (査読あり)  
DOI: 10.1111/php.12257

- [2] Azusa Kikuchi, Nozomi Oguchi-Fujiyama, Kazuyuki Miyazawa, Mikio Yagi  
Triplet-triplet energy transfer from a UV-A absorber butylmethoxydibenzoylmethane to UV-B absorbers  
*Photochemistry and Photobiology*, 90 (2014) 511–516. (査読あり)  
DOI: 10.1111/php.12222
- [3] 小口 希, 宮沢和之, 菊地あづさ, 八木幹雄  
新規 UV-B 吸収剤: ジオクチルメトキシベンジリデンマロネートの設計と UV-A 吸収剤光安定化効果  
*日本化粧品技術者会誌*, 47 (2013) 209–215. (査読あり)
- [4] Azusa Kikuchi, Yuki Hata, Ryo Kumasaka, Yuichi Nanbu, Mikio Yagi  
Photoexcited singlet and triplet states of a UV absorber ethylhexyl methoxycrylene  
*Photochemistry and Photobiology*, 89 (2013) 523–528. (査読あり)  
DOI: 10.1111/php.12017
- [5] Azusa Kikuchi, Kenji Shibata, Ryo Kumasaka, Mikio Yagi  
Optical and time-resolved electron paramagnetic resonance studies of the excited states of a UV-B absorber (4-methylbenzylidene)camphor  
*Journal of Physical Chemistry A*, 117 (2013) 1413–1419. (査読あり)  
DOI: 10.1021/jp3071772
- [6] Azusa Kikuchi, Kenji Shibata, Ryo Kumasaka, Mikio Yagi  
Excited states of menthyl anthranilate: a UV-A absorber  
*Photochemical & Photobiological Sciences*, 12 (2013) 246–253. (査読あり)  
DOI: 10.1039/c2pp25190f.
- [7] Nozomi Oguchi-Fujiyama, Kazuyuki Miyazawa, Azusa Kikuchi, Mikio Yagi  
Photophysical properties of dioctyl 4-methoxybenzylidenemalonate: UV-B absorber  
*Photochemical & Photobiological Sciences*, 11 (2012) 1528–1535. (査読あり)  
DOI: 10.1039/c2pp25101a
- [学会発表] (計 10 件)
- [1] 杉山一翔, 菊地あづさ, 八木幹雄  
サリチル酸エステル系紫外線吸収剤の光励起状態と一重項酸素の光増感生成  
日本化学会第 94 春季年会  
2014 年 3 月 28 日  
名古屋大学 東山キャンパス
- [2] 屋中智生, 菊地あづさ, 八木幹雄  
紫外線吸収剤アミノ安息香酸誘導体による一重項酸素の光増感生成と消光  
日本化学会第 94 春季年会  
2014 年 3 月 28 日  
名古屋大学 東山キャンパス
- [3] 熊坂 亮, 杉山一翔, 平本祐也, 屋中智生, 菊地あづさ, 八木幹雄  
紫外線吸収剤による一重項酸素の光増感生成と消光  
第 52 回電子スピンスイエンズ学会年会  
2013 年 10 月 25 日  
さいたま市 大宮ソニック市民ホール
- [4] 熊坂 亮, 菊地あづさ, 八木幹雄  
紫外線吸収剤からの一重項酸素の光増感生成  
日本化学会第 93 春季年会  
2013 年 3 月 24 日  
立命館大学 びわこ・くさつキャンパス
- [5] 南部祐一, 菊地あづさ, 八木幹雄  
UV-A および UV-B 領域に吸収帯を有する新規紫外線吸収剤の合成と光励起状態  
日本化学会第 93 春季年会  
2013 年 3 月 24 日  
立命館大学 びわこ・くさつキャンパス
- [6] 平本祐也, 菊地あづさ, 八木幹雄  
紫外線吸収剤ジオクチルヒドロキシジメトキシベンジリデンマロネートの光励起状態  
日本化学会第 93 春季年会  
2013 年 3 月 24 日  
立命館大学 びわこ・くさつキャンパス
- [7] 杉山一翔, 菊地あづさ, 八木幹雄  
紫外線吸収剤ベンゾトリアゾール誘導体の光励起状態  
日本化学会第 93 春季年会  
2013 年 3 月 24 日  
立命館大学 びわこ・くさつキャンパス
- [8] 菊地あづさ, 芝田謙二, 熊坂 亮, 八木幹雄  
UV-A 吸収剤アントラニル酸メンチルの励起状態と緩和過程  
第 51 回電子スピンスイエンズ学会年会  
2012 年 11 月 1 日  
札幌コンベンションセンター
- [9] 熊坂 亮, 菊地あづさ, 八木幹雄  
紫外線吸収剤ベンゾフェノン-3 およびベンゾフェノン-6 のりん光増強現象  
2012 年光化学討論会  
2012 年 9 月 14 日

東京工業大学 大岡山キャンパス

[10] 小口 希, 宮沢和之, 菊地あづさ, 八木幹雄  
UV-B 吸収剤 Dioctyl  
4-Methoxybenzylidenemalonate の励起状態  
と光安定性  
2012 年光化学討論会  
2012 年 9 月 14 日  
東京工業大学 大岡山キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
活性酸素の研究  
(八木・菊地研究室ホームページ)  
<http://www.chem.ynu.ac.jp/lab/yagilab/oxygen.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八木 幹雄 (YAGI MIKIO)  
横浜国立大学・工学研究院・教授

研究者番号： 00107369

### (2) 研究分担者

菊地 あづさ (KIKUCHI AZUSA)  
横浜国立大学・工学研究院・准教授

研究者番号： 30452048

### (3) 連携研究者

なし