

簡便なルミノール発光解析のための CdS セルおよびデジタルカメラの活用

村上 祐*・今泉庸子**・菊地洋一*・武井隆明*

(2009年3月4日受理)

Tasuku Murakami, Youko Imaizumi, Yoichi Kikuchi and Taka-aki Takei

Analyses of Luminol Reaction by the Use of Convenient Devices, CdS Cell and Digital Camera

1. はじめに

「ルミノール発光」は日常よく耳にする言葉である。科学捜査を扱ったTVドラマで、化学薬品を散布して室内を暗くすると血痕部分が青白く光るシーンがよく出てくる。このような血痕の鑑識に使われる化学薬品が「ルミノール」で、ルミノールによる発光は「化学発光」と呼ばれる。化学発光は、物質内の化学結合の変化によって、高エネルギー状態（励起状態）から低エネルギー状態（基底状態）へ変わる際、その余剰のエネルギー分を光エネルギーとして放出するときに見られる現象である。ルミノールは、酸化されると励起状態を経て安定な物質に変わる。血液中のヘモグロビンはこの酸化反応に触媒として作用し、反応を促進するので、血痕部分で発光するのである。これと似た機構で発光するものに、ホタルの発光がある。ホタルは、発光の元になる物質とその化学変化を助ける酵素を体内でつくっている。このときの化学変化も空気中の酸素による酸化で、ホタルが呼吸して酸素を取り入れるたびに光る。このように、生物がつくり出す物質が体内で反応して発光する現象を「生物発光」といい、夜光虫やホタルイカなど数多く知られている¹⁾。1962年、下村 脩ボストン大名譽教授が光るオワンクラゲから発見した緑色蛍光タンパク質（GFP）も、発

光物質の一つである。この GFP は生きた細胞中のたんぱく質の目印に使われ、現在では生命科学の研究に不可欠なものとなっている（下村氏は、GFP の発見により2008年ノーベル化学賞を受賞した。）。

化学発光の大きな特徴は、物質の反応を自らの発光で発信していることであり、観測者が目視によってそれを容易に確認できることである。このため、自然の科学現象の美しさ・不思議さを直接観察できる教材として、中学校や高校、あるいは大学初学年の学生実験等で取り上げられることが多い²⁻⁵⁾。さらに言えば、化学発光は、光を使った分析で最も一般的な吸光分析のように励起光を当てる必要はなく、適当な光検知器がありさえすれば、反応を精密に分析できる。これらの発光現象を単に目視だけの定性分析的に扱うだけではなく、身近に入手できる簡単な検知器を使って定量化・数値化することができれば、より深い理解が可能となり、学生・生徒の科学的興味・関心をいっそう高めることができると思われる。

本論文では、大学での学生実験や中高の生徒実験のための教材研究として、CdS セルとデジタルカメラを光検知器として用い、ルミノール発光を速度論的に追跡した結果を報告する。

* 岩手大学教育学部 ** 岩手大学教育学部学校教育教員養成課程中学校教育コース（平成20年卒）

2. ルミノール反応と発光

ルミノールの発光は、上に述べたように、ルミノールが酸化されるときいったん高エネルギー状態（励起状態）になり、それが低エネルギー状態（基底状態）へ変わる際、余剰のエネルギー分を光エネルギーとして放出する現象である。その発光強度や反応速度等に影響する要因が多く、反応機構は複雑で諸説がある^{2,5,6)}。現在でも確定していないが、塩基性水溶液中における酸化反応の概略を図1の2式に示す。

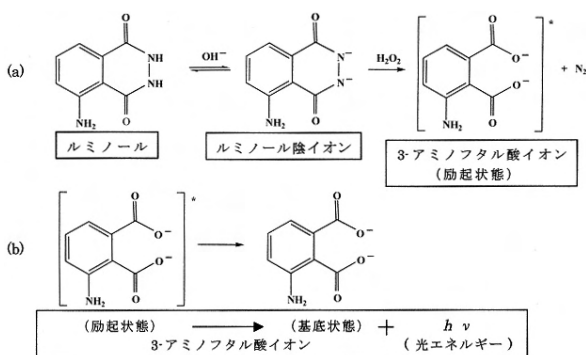


図1 ルミノール反応機構

(a)式は、ルミノールが塩基性で酸化されて3-アミノフタル酸イオンの励起状態が生ずることを表しており、(b)式は、それが基底状態になるとき発光することを表している。この励起状態にある3-アミノフタル酸イオンが直接の発光種であることは、諸説で一致している。したがって、本研究のように、発光の検知によりCdSセルやデジタルカメラが追跡している反応過程は、(b)式の「励起状態」→「基底状態」である。また、ヘモグロビンなどの触媒は、H₂O₂がルミノールイオンを酸化する段階に作用する。すなわち、触媒は直接的にはH₂O₂の還元的分解を促進し、それによって酸化反応を速めるといわれている⁷⁻⁹⁾。

励起状態の3-アミノフタル酸イオンをA*で表すと、(b)の反応は、反応速度が次式のように濃度[A*]にのみ依存する一次反応である（kは速度定数）。

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = k[A^*] \quad (1)$$

発光種A*の初濃度をaとし、時間t後にその濃度がxだけ減少するとして速度式を整理すると、

$$\log(a-x) = -\frac{k}{2.303}t + \log a \quad (2)$$

となる。log(a-x) vs tのプロットで直線が得られれば一次反応ということになり、直線の傾きから速度定数kを求めることができる。なお、(2)式を変形した次式からわかるように、速度定数kの単位は(時間)⁻¹で、発光種の濃度には依存しない。

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{a}{a-x} \quad (3)$$

3. 測定装置および測定方法

本研究では、ルミノール反応による発光強度およびその時間変化を測定する光検知器として、光導電素子のCdSセルおよびデジタルカメラを用いた。CdSセルは、街灯などに組み込まれている部品で、明るいほど電気抵抗値が低くなる「光量可変抵抗」の機能を持つ。ルミノール反応を検知するためにCdSセルを用いた例はいくつか報告されている^{10,11)}。以下、本研究のCdSセルを用いた装置制作と測定方法について説明する。また、近年普及しているデジタルカメラを用いた発光強度の測定方法についても説明する。

(1) CdSセルを用いた測定装置の制作

光を検出するフォトセンサにはいろいろな種類があり、それぞれ特性を持っている¹²⁾。その中から本研究ではCdSセルを選んだ。その理由は次の通りである。

- ・ルミノールの発光が青色発光（460nmにピーク）であるため、まず可視領域に感度を持つ必要がある。CdSは、可視光に対して最も感度の良い光導電素子である（使用波長範囲400～700nm。ただし、460nmにおける感度は、最高感度を示す波長の感度の10%程度でかなり

低い。)

- ・暗室もしくは暗箱で測定するとしても、その他の光の影響を受けないためには紫外領域に感度を持たない方がよい。
- ・ルミノール発光の発光強度の時間変化（消光）を追跡するので、微弱光の検出にも対応できる必要がある。
- ・学生実験や中高の教育現場で使用することを考えれば、できるだけ安価に入手でき、測定装置も簡単に作れるものがよい。

一方、CdS の応答速度は光導電素子の中では比較的遅く、10ms (10^{-3} s) 程度である。今回用いた CdS セルは20mmセル（秋月電子通商200円/個程度）で、抵抗値 8 ~ 20k Ω (10Lux), 暗抵抗 2 M Ω 以上 (0 Lux) という特性を持っている。

図2に自作の測定装置を示した。暗箱の材料には、光の透過性が低く、耐水性にも優れ、加工しやすいということから、ポリエチレン樹脂の黒色合板を用いた。また、暗幕を併用することで、暗箱と実験台の隙間および暗箱上部のピペット用の穴から入る光を遮断し、内部光量をほぼゼロとすることができた。

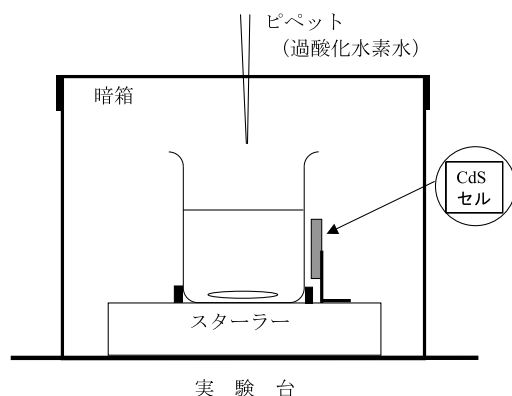


図2 CdS セルを用いた測定装置

反応容器を50mlビーカーとし、それを常にマグネチックスターラーの中央付近の定位置に置くことができるように、スターラーの上に四角型にストッパーをつけた。また、検出感度を上げるためビーカーのすぐ横に CdS セルを固定し、ビーカーと CdS セルの位置関係が常に一定になるように

した。

CdS セルで受光した光の強度を数値化するために、図3の電気回路を作成し、光量を電流値として測定した。電源は1.5V乾電池を4個直列につないで6Vとし、抵抗はカーボン被膜抵抗100k Ω を1個用いた。また、電流値を μ A 単位で測定できる検流計を用いた。

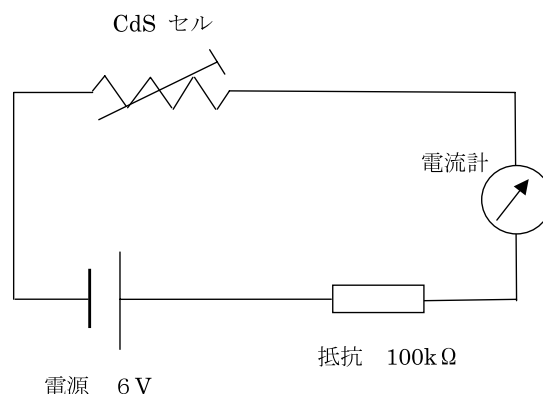


図3 CdS セルを組み込んだ電流測定回路

(2) CdS セルを用いた測定手順

発光試薬ルミノールおよび触媒ヘミンを水酸化ナトリウム水溶液に溶かした溶液（これをA液とする）30mlを、50mlビーカーに入れ、図2の暗箱内のマグネチックスターラーの上に置く。スターラーで攪拌しながら、箱の上部から過酸化水素水（B液とする）1mlを、デジタルピペットで加える。B液を加えた時点を反応開始時とし、5~20秒ごとに回路を流れる電流値を読み取った。

発光強度およびその減衰速度に対する反応条件の影響を調べるため、A液中のルミノール濃度（溶液1ℓ中に0.25~1.0g）、ヘミン濃度（1回の測定溶液30ml中に0.5~2.0mg）、さらにA液のpH（10~13）を変えて実験した。また、B液として加える過酸化水素水の濃度も0.025~1.0%と変えて測定した。これらの実験においては、同じ条件での実験を少なくとも3回行っている。なお、触媒として用いたヘミンは、ヘモグロビン中の鉄-ポルフィリン錯体に対応している。本研究では、この鉄-ポルフィリン (Fe-Por) 部位の存在状態による触媒効果を調べるため、ヘミンの他に、Fe

-Por 部位の周りをタンパクが覆っているヘモグロビン (Hb) およびミオグロビン (Mb) を用いて実験した。

(3) デジタルカメラを用いた測定

近年、発色する反応系の定量分析にデジタルカメラが使われ、良好な結果が得られている^{13,14)}。その方法は、着色した試料をデジタルカメラで撮影し、その画像をパソコンに取り込み、画像解析ソフトで試料の色を色情報として数値化することによって行っている。本研究のルミノール反応による発光は、460nmにピークを持っており、青白く見える。この青白いルミノール発光の強度をデジタルカメラで定量できるかどうか検討した。本研究で用いたデジタルカメラは、現在最も普及しているコンパクトタイプのものである。デジタルカメラによる測定は、CdSセルの場合と同じ反応容器を用いて、撮影は暗室で行った。なお、カメラは反応容器から約20cm離して固定した。

測定手順は上の(2)と同様であるが、デジタルカメラの場合はB液を加えた時点から発光を動画撮影した。この画像データをパソコンに取り込み、Windows Movie Makerを起動して動画を時間ごとに切り分け、静止画像に変換した。次に、PaintShopを起動し、静止画像を開いて色情報値 (rgb 値) のうち b 値を発光強度の測定値とした。

4. 結果と考察

(1) CdS セルによる測定結果

初めに、A液中のルミノールおよび触媒の濃度や pH などについて、組み立てた暗箱実験装置で測定するための最適条件を調べた。その結果、ルミノール濃度 0.5 g/l、ヘミン濃度 1.0mg/試料30ml、pH12.0が最適であることがわかった。以後、これらの条件のA液を使うこととし、B液の H₂O₂濃度を変えて発光強度を測定した。

図4には、B液の H₂O₂濃度を0.75%としたときの回路電流値 I (μA) およびその対数值 ($\log I$) の時間変化を示した。B液を加えた直後は発光強

度が大きいので、電流値も大きい。時間が経つにつれてそれが減衰していくことがわかる。 $\log I$ vs t のプロットがほぼ直線になったことから、CdSセルによって検知された発光反応は一次反応であり、図1の(b)式の発光過程を捉えているといえる。(2)式より、この直線の傾きから、速度定数 k を求めることができ、 $k=0.014\text{s}^{-1}$ と決定された。

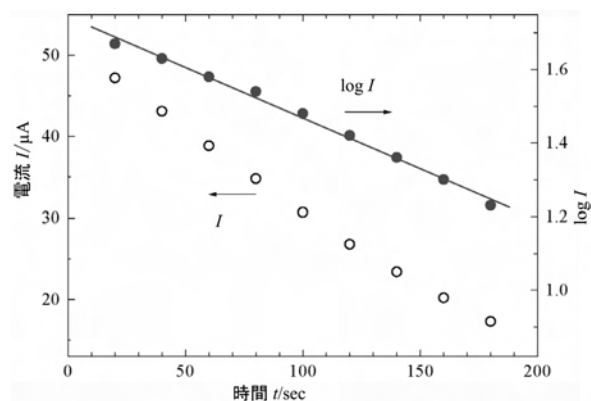


図4 CdS セルによる測定例
[H₂O₂] = 0.75% (触媒:ヘミン)

(2) デジタルカメラによる測定結果

上と同じ条件での発光をデジタルカメラで撮影 (暗室) した結果を、図5に示す。b値は、B液を加えた直後から時間とともに減衰していくが、120秒を過ぎると減衰の様子がすこし変わった。 $\log b$ vs t のプロットでも、120秒までは $\log b$ は直線的に変化しているが、その後は急激に落ちていることがわかる。これは、デジタルカメラの光受容を補正する特性から起こることと思われる。本研究では、デジタルカメラによる動画の撮影を行ったが、その中で光が弱いときに (明るさが十分でないとき)、光受容の感度を上昇させる機能が働いた可能性がある。このようにして、デジタルカメラは弱い光も検知するが、画像を処理して得られる色情報値としては精度が落ちることになる。このため、図5の発光反応の収束部分において、発光強度が小さくなるので、b値の精度が著しく低下すると考えられる。このことは、カメラの性能に依存する部分である。今回用いたデジタ

ルカメラは比較的安価なコンパクトタイプのものであるが、図5からわかるように $\log b$ vs t のプロットは120秒あたりまで直線に近似できる。この直線の傾きから、速度定数は $k=0.013s^{-1}$ と求められた。この値は、CdSセルを用いた実験結果とほぼ一致しており、デジタルカメラによる撮影および画像処理でも、CdSセルでの検知と同様に、図1(b)式の発光過程（の初期段階）を捉えていると考えられる。

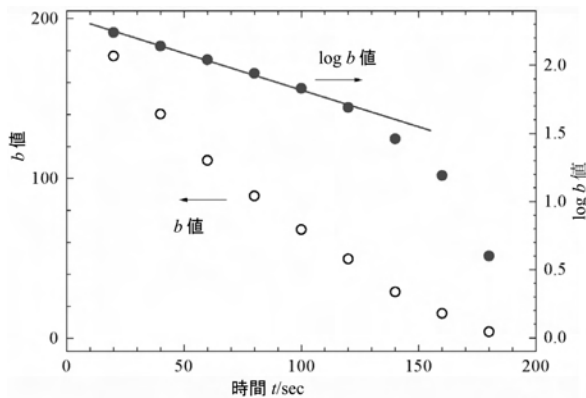


図5 デジタルカメラによる測定例
[H₂O₂] = 0.75% (触媒:ヘミン)

(3) 種々の [H₂O₂] における速度定数

反応を開始させる B 液中の H₂O₂ の濃度を変えて、CdS セルとデジタルカメラの二つの方法で測定した。上述のように、これらの測定は図1の(b)式の反応過程をモニターしており、それから得られる速度定数は発光種 A* の濃度には関係しない(3式)。したがって、(a)式の発光種 A* の生成に関与している H₂O₂ の濃度にも関係しないと考えられる。表1に、これらの測定で得られた $\log I$ vs t プロット (CdS セル) および $\log b$ vs t プロット (デジタルカメラ) の近似直線のデータを示した。(2)式と対比させると、傾きは $-k/2.303$ であり、切片は $\log a$ (a は発光種 A* の初濃度) に対応するものである。

表1の結果から、H₂O₂の濃度によってややばらつきが見られるものの、それぞれの測定法で近似直線の傾きはほぼ同じと見なすことができる。これらの傾きの平均値から、デジタルカメラでの

表1 種々の [H₂O₂] における近似直線データ

[H ₂ O ₂]/%	デジタルカメラ		CdS セル	
	傾き	切片	傾き	切片
0.050	-0.0062	1.75	-0.0093	1.21
0.075	-0.0058	2.01	-0.0068	1.34
0.10	-0.0050	2.01	-0.0050	1.30
0.25	-0.0041	2.23	-0.0042	1.49
0.50	-0.0051	2.25	-0.0054	1.63
0.75	-0.0056	2.37	-0.0062	1.74
1.00	-0.0080	2.38	-0.0102	1.82
傾きの平均	-0.0057		-0.0067	

測定における速度定数は $k=0.013s^{-1}$ 、CdS セルによる測定における速度定数は $k=0.015s^{-1}$ となった。また、それぞれの方法における切片の値は、[H₂O₂]が増大するにつれて大きくなっている。上述したように、この切片は(2)式の $\log a$ (a は発光種 A* の初濃度) に対応するので、[H₂O₂] 増大とともに A* の初濃度が増大していることを示している。このことから、図1(a)の3-アミノフタル酸イオン A* 生成が H₂O₂ 濃度に依存すること、および (b) の発光反応の速度定数には A* の初濃度は無関係であることが確認できた。

ところで、同じ試料 ([H₂O₂]=0.75%) について、蛍光分光光度計を用いて460nmでの光量を測定したときの速度定数は $k=0.036s^{-1}$ であった¹⁵⁾。これは、CdS セルやデジタルカメラを検出器とした場合に比べて、約2.5倍の差しかない。蛍光分光光度計は、試料室に置かれたセル内で起こるルミノール発光を高感度に（発光強度のピークの波長で）検出できる。一方、「3. 測定装置および測定方法」のところでも述べたように、CdS セルやデジタルカメラの場合は発光を間接的に検出しているに過ぎない。しかも、CdS セルには、460nmにおける感度が最高感度の10%程度であることと応答速度も比較的遅いこと、デジタルカメラには、弱い光の場合、色情報値の精度が落ちるなどの弱点があった。それだけに、CdS セルやデジタルカメラによる結果は、理論値からかなり離れたものになると予測された。しかし、これらの

方法での測定結果は(2)式の数式に合致しており、しかも、速度定数の値も精密な実験から得られた値との差が2.5倍にとどまっている。このことから、CdSセルやデジタルカメラによる測定は、簡便さを考えれば、学生実験や生徒実験に十分適用できるものと思われる。

(4) ヘミンからヘモグロビン(Hb),ミオグロビン(Mb)へ

これまで触媒として用いてきたヘミンは、Hbに含まれている鉄-ポルフィリン(Fe-Por)錯体の一種で、タンパク部分を含まない。HbはそのFe-Porをタンパク質が取り囲んだユニットを4個有する4量体であり、Mbはユニット1個を含む単量体である。図6は、ヘミン、HbおよびMbを触媒とし、それぞれFe-Porを等量含むように調製した試料の発光を、CdSセルで測定した結果である。ただし、ヘミンの場合の観測値が他よりかなり大きいので、図では1/10でプロットしている。さらに、実験条件として、Hb、Mbの場合、 H_2O_2 濃度を2.5%とし、ヘミン(0.25%)の10倍としている。この結果から、発光強度はヘミン>Hb>Mbの順であり、触媒能もこの順であることがわかった。HbもMbも、 H_2O_2 の分解を触媒するFe-Por部位がタンパクで覆われているため触媒作用を阻害され、Fe-Por部位がむき出しの状態であるヘミンより触媒能が小さくなったと理解できる。

HbとMbの触媒能の差は、これらのヘムタンパクの生体内での機能の違い(Mb中のFe-Por部位は酸素との親和性が強く、Mbは酸素貯蔵体として機能する。一方、Hb中の各Fe-Por部位はそれほど酸素との親和性が強くなく、4量体が共同して酸素運搬体として機能する)に由来すると考えられる。すなわち、 H_2O_2 の分解を触媒する際、MbのFe-Por部位はすぐに酸素化されるが、その酸素を離しにくいいため触媒能を弱めていると推測される。ただし、この実験条件では、HbとMbを触媒とした場合の発光強度が弱く、速度定数を求められなかったため、詳しい議論はできない。しかし、Fe-Por部位の存在状態によって触媒能が

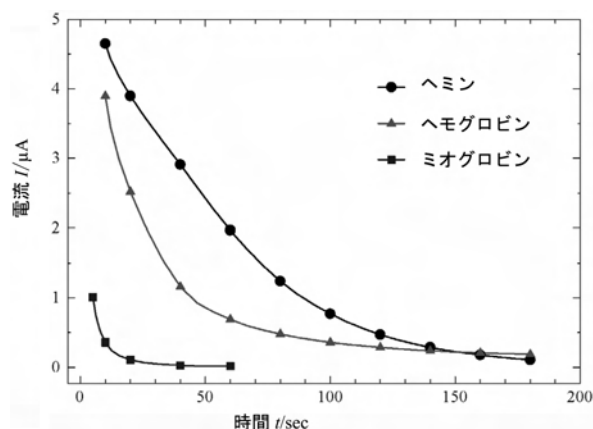


図6 ルミノール発光強度の触媒による変化 (CdSセルによる測定)

ヘミン： $[H_2O_2] = 0.25\%$ (電流値 I は1/10)
ヘモグロビン、ミオグロビン： $[H_2O_2] = 2.5\%$

異なることは確認できた。これは、血痕鑑定の際、新しいものよりやや古いものの方が強い発光を示すと言われていることとも関連する。

5. おわりに

日本の教育界で「理科離れ」が喧伝されて久しい。最近のOECDの国際理解度調査PISA2006でも、日本の15歳段階の生徒たちは、「科学的な疑問を認識する」・「現象を科学的に説明する」科学的な能力や、「生徒の科学に対する自己効力感」・「科学の楽しさ」・「理科学習に対する道具的な動機付け」などの科学的態度に関わる多くの点で国際的に低い水準であるという結果になった¹⁶⁾。このような状況を改善するためとして、大多数の生徒の科学的リテラシーを向上させるような教育、具体的には、「日常生活や実社会での科学的出来事が理解でき、説明できるようになる学習」、「科学の大切さや意義が実感でき、科学を学習する目的を明確に意識できる学習」、「経験に基づき、主体的に追求する楽しさを実感できる学習」などが必要であると提言されている¹⁷⁾。

本研究で取り上げた発光現象は、身近にあって、しかも最先端の科学の基礎となっていることから、この提言の格好の教材と言える。本研究の結果、廉価で簡単に入手できるCdSセルやデジタルカ

メラを検出器に用いても、発光現象の定量的な取り扱いを学生実験や中高の教育現場に導入することは十分に可能であり、大きな教育効果を期待できると考えられる。

謝辞 本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（基盤研究(C) 課題番号19500714）によって行われた。記して感謝の意を表する。

注・参考文献

- 1) 松岡英明, 「光ってくる魚 (光のはなしⅡ, 藤島・相澤編)」、技法堂出版, 1986
- 2) B. Z. Shakahashiri (池本勲訳), 「教師のためのケミカルデモンストレーション2」, 丸善, 1997
- 3) 日本化学会編, 「教師と学生のための化学実験」, 東京化学同人, 1987
- 4) 日本化学会編, 「実験で学ぶ化学の世界2」, 丸善, 1996
- 5) ルミノール反応に関するウェブサイト
http://www.lumica.co.jp/support/support_gijutu2.html
<http://www.mfc-online.org/luminol.html>
<http://science.is.akita-u.ac.jp/education/sentan/chemilumi/principle.html>
http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/kojima/Lecture_11.pdf#search='ルミノール反応%20原理'
- 6) E. L. Bastos, et al., *Luminescence*, 22, pp. 113–125, 2007
- 7) 大沢善次郎, 「ケミルミネッセンスー化学発光の基礎・応用事例」, 丸善, 2003
- 8) 守永健一, 「基礎化学選書9 (酸化と還元)」, 裳華房, 1972
- 9) J. A. Barltrop and J. D. Coyle (志摩健介他訳), 「有機化学と励起状態」, 広川書店, 1980
- 10) 盛口襄, 高田博志, 「いきいき化学アイデア実験」, 新生出版, 1990
- 11) ウェブサイト
<http://www.ed.kagu.tus.ac.jp/~kaken/studies/2004fri.htm>
- 12) H. A.アトウォーター, 「ナノの世界を照らす次世代光技術 プラズモニクス」, 日経サイエンス2007(7)日経サイエンス社
- 13) 菊地洋一他, デジタルカメラと画像処理ソフトを用いた天然水中の微量鉄の定量, *化学と教育*, 50, pp714–717, 2002
- 14) 菊地洋一他, デジタルカメラを検出器として用いた簡易水質分析法の開発, *日本理科教育学会全国大会論文集*, 6, p225, 2008
- 15) 今泉庸子, 卒業論文「ヘミンおよびヘモグロビンによるルミノール発光の速度論的解析」, 岩手大学教育学部, 2008
- 16) 国立教育政策研究所, 「PISA 調査のアンケート項目による中3調査集計結果 (速報)」, <http://www.nier.go.jp/>
- 17) 小倉 康, PISA2006で見えてきた科学的リテラシー育成の課題, *日本科学教育学会第32回年会論文集*, pp1–4, 2008