

愛知教育大学の学生による訪問科学実験のための 生物発光化学発光の化学マジック実験法の検討

戸谷義明

理科教育講座 (化学)

Investigation of the “Chemical Magic” Experimental Methods in Bioluminescence and Chemiluminescence for the Demonstration at Many Schools by the Visiting Students from Aichi University of Education

Yoshiaki TOYA

Department of Science (Organic Chemistry), Aichi University of Education, Kariya, Aichi 448-8542 JAPAN

ABSTRACT

The visiting university students from Aichi University of Education have exhibited the scientific experimental demonstration at various schools and scientific exhibitions since 1997. For the visiting exhibition of the chemical demonstration, “Chemical Magic”, the experimental methods in bioluminescence and chemiluminescence were investigated. Five luminescent systems, “Chemiluminescence of Luminol”, “*Vargula* Bioluminescence”, “Firefly Bioluminescence”, “Bioluminescence of Photoprotein Aequorin”, and “Chemiluminescence of Active Oxalates” were selected and their demonstration methods fit for the visiting exhibition were investigated. Several practice of the developed demonstration methods have been performed. The experimental demonstration of bioluminescence and chemiluminescence is not only very attractive, impressive and effective educationally for the primary school students, but also useful to be known widely about bioluminescence and chemiluminescence to the public audience who visited the scientific exhibition.

1. はじめに^{1,2)}

物質の化学反応に伴って光が出る現象を化学発光といい、これは高温の物体から光が出る、たとえば電球のフィラメントの白熱発光とは異なる。化学発光はほとんどの場合、燃焼や鉄の錆生成と同様の、物質が酸素と結びつく酸化反応で、通常、有機物の発光物質が酸素や過酸化水素によって酸化されて生じる。しかし、一般の酸化反応では、反応で発生したエネルギーは通常、熱として放出されるが、化学発光では熱ではなく、主に冷光として放出される非常に特殊なケースである。図1に主な化学発光物質と発光が発表された年を示した。

生物が発光する現象である生物発光は美しく魅惑的であるばかりでなく、ほんとうにふしぎで神秘的な現象である。発光生物としては、動物ではホタル、ウミホタル、植物ではツキヨタケ、発光細菌 (バクテリア)

などが有名であるが、実際、動物では夜光虫のような単細胞動物から魚類まで広く多種にわたり、いろいろな発光動物が存在する。しかし植物ではバクテリアと

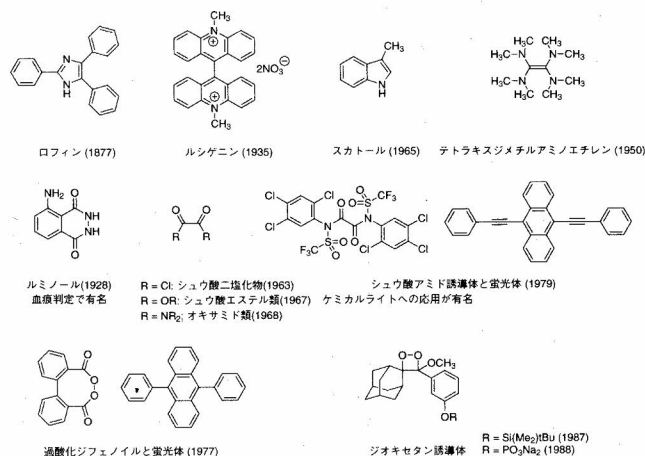


図1. 化学発光物質と発光が発表された年

キノコ類に見いだされるだけである。生物発光は、化学発光の一種であり、発光反応に酵素等のタンパク質が関与することが大きな特徴で、一般の化学発光に比べ、発光の効率（発光量子収率＝放出される光子の数／発光物質の分子の数）がよいのが特長である（表1）。生物発光で発光する（ために酸化される）物質はルシフェリン（発光素）と呼ばれ、生物門で構造が異なる7種のもの知られている（図2）。ルシフェリンは酵素ルシフェラーゼの助けを借りて酸素等と反応し、発光を生じる（ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応システム）。一方、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、および酸素が合体した形に相当するものもあり、その一種でクラゲからとれたエクオリンは、カルシウムイオンがあると発光する（発光タンパク質システム）。ホタル等の昆虫類の生物発光ではルシフェリンは共通であるが、ルシフェラーゼの構造が違ふことによって発光色が変わる。

生物・化学発光の応用としては、結婚式の発光セレモニー（キッコーマンホタライト、ルミカセレモニー・セット等使用）や、祭りの夜店・コンサートのケミカルライト（ペンライト）が身近であり、ルミノールの発光による犯罪捜査の血痕の鑑別も有名である。

		発光量子収率
生物発光	バクテリア	0.12-0.17
	ウミシイタケ	0.055
	カモメガイ	0.09-0.27
	ウミホタル	0.31
	ホタル	0.88
	オワンクラゲ	0.23
化学発光	ルミノール（誘導体）	0.0125 (0.045)
	アクリジン誘導体	~0.05
	ロフィン	10^{-3} - 10^{-4}
	インドール誘導体	$\sim 10^{-5}$
	オキサミド誘導体	~0.34 (蛍光物質共存)
	ジオキセタン誘導体	~0.25

表1. 生物発光と化学発光の発光量子収率

ルシフェリンはAまたはBのシステムで構成要素や誘導体として存在
A. ルシフェリン（酸化される基質）-ルシフェラーゼ（酵素）反応システム
B. 発光タンパク質システム

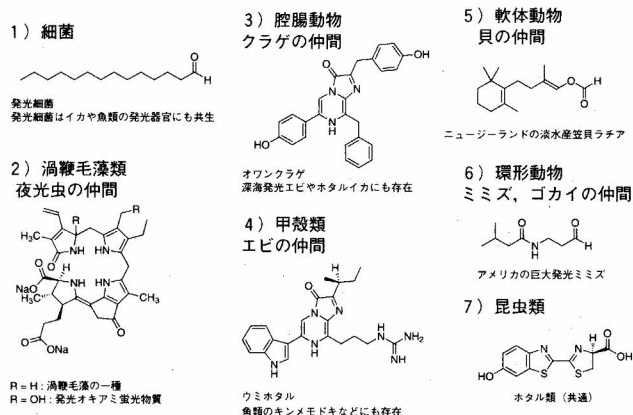


図2. 7つの生物発光システムにおける発光物質ルシフェリン

さらに光は非常に高感度で検出できるため、生物・化学発光は放射性物質を使わない安全で簡便な微量分析法として細菌汚染検査などへ利用されている他、ルシフェリンやルシフェラーゼが医学、生化学などの研究で盛んに活用されている。

愛知教育大学では1997年度から毎年、理科教育講座および教育実践総合センターの教員の指導・引率のもと、多くの学生が小・中学校等を訪問し、訪問科学実験（科学実験教室）を行ってきた。この活動は、学生の将来の教員としての資質向上と、理科好きの子どもを育むための学校や地域への貢献を主な目的とする。著者は2000年度から訪問科学実験の活動に参加し、2003年度には学生の引率指導を引き受け、中心となって活動に関わり、2004年度には指導教員代表となり、大学の国立大学法人化に対応するため、これまでの活動を省み、学生の自主性を最大限尊重し、蓄積したノウハウを生かしつつ、交通手段等の運営方法を大幅に見直した。その結果、現在、訪問科学実験は大学が学校行事として認定した学生のボランティア活動として運営されている。著者は訪問科学実験の実験テーマのうち、化学マジックについて重点的に指導を行ってきた。

著者は、これまでウミホタルの生物発光機構を中心に生物発光・化学発光に関する研究を行ってきた。学習の課程では高校の生物Iの多くの教科書で生物体の構造の発光・発光器官としてウミホタルが取り上げられている。生物発光は生物I、生物IIの学習指導要領の酵素にも関連しており、生物発光の教材として乾燥ウミホタルが市販されている。ウミホタルの発光実験は学生の印象度が高く、非常に好評であるという評判をよく聞いており、実際、本学の牛田教授による理科離れ実相調査によると、愛知教育大学に入学してきた学生の記憶に残っている理科実験の1つである。そこで、生物発光・化学発光の現象を訪問科学実験の化学マジックとして紹介することを計画した。理科好きの子どもを育むため、さらに生物発光・化学発光について広く世の中の人々に知ってもらうために役立つような生物・化学発光系の演示実験を、入手が容易なものを利用し、簡単に行えることを前提に、5種の発光系（ルミノールの化学発光、ウミホタルの生物発光、ホタルの生物発光、発光タンパク質エクオリンの生物発光、活性シユウ酸エステルの化学発光）について検討を行った。以下にその結果を順に示す。

2. ルミノールの化学発光^{3,4,5)}

ルミノールは化学発光物質の中では比較的発光量子収率が大きい化合物の1つであり、血痕鑑別に用いられることで有名である。ルミノールはアルカリ溶液（pH 10-11）中、分子状酸素 O_2 または過酸化水素 H_2O_2 のような種々の酸化剤（および金属イオンのよ

うな多様な触媒)の存在下で酸化されて発光する。発光機構は反応条件により異なり複雑であるが、ルミノールの発光反応の主な経路を図3に示す。

水溶液中では425 nm, ジメチルスルホキシド DMSO のような非プロトン極性溶媒中では480 nm の発光が観測され、発光体は図3のような構造である。

演示実験法としては、主に文献^{5,6)}を参考に以下の検討を行った。

2.1. ルミノール + 水酸化ナトリウム NaOH 水溶液 + 過酸化水素 H_2O_2 水 + ヘキサシアノ鉄(III)カリウム $K_3Fe(CN)_6$ または (牛)ヘモグロビン

これは最も一般的な方法で、文献^{6,7)}の方法を、最終濃度が同じで、劇物の濃い濃度の NaOH を使用しなくても済むように改良した。ルミノール 30 mg の溶解の速さは 3 mol/L (劇物) 1 mL の方が速いが、1 mol/L (劇物指定外) 3 mL でも短時間でほとんど溶解した。超音波処理すれば確実に溶解した。なお、水は水道水を用い、3% H_2O_2 (劇物指定外) を 30% H_2O_2 (劇物) から調製する場合のみ蒸留水を使用した。

A液: ルミノール [分子量 177.16] 30 mg (1.69×10^{-4} mol) + 1 mol/L NaOH [式量 40.00] 3 mL (3×10^{-3} mol) + H_2O 77 mL (約 80 mL)

B液: 3% H_2O_2 [分子量 34] 8 mL (7.06×10^{-3} mol) + H_2O 72 mL (約 70 mL)

A液とB液を混合し、そこに $K_3[Fe(CN)_6]$ [式量 329.25] (固体) またはヘモグロビン (粉末) を適量加えた。明るい発光が観察できる時間は1-2分間程度で、発光を増すために、少量の1 mol/L NaOH を追加した場合もあった。

最終濃度は以下ようになる。

ルミノール: 1.06×10^{-3} mol/L (1 eq)

NaOH: 1.88×10^{-2} mol/L (17.7 eq), 0.063%

H_2O_2 : 4.41×10^{-2} mol/L (41.6 eq), 0.15%

$K_3[Fe(CN)_6]$: 0.24 g 以上, 4.56×10^{-3} mol/L (44.3 eq) 以上, 0.15% 以上

溶解性鉄の排水基準 (10 mg/L) を考慮すると、 $K_3[Fe(CN)_6]$ でなく、ヘモグロビンを使用した方が廃棄処理が容易と思われる。別法で NaOH の代わりに炭酸ナトリウム Na_2CO_3 を用いる方法も検討した。ルミノール 50 mg に 20% (2.5 mol/L) Na_2CO_3 14 mL

を加えると速やかに溶解した。これに H_2O 11 mL と 3% H_2O_2 25 mL を加えたところに $K_3[Fe(CN)_6]$ (固体) を加えた。 $K_3[Fe(CN)_6]$ を追加していくと泡が発生し、再び明るく光った。発光後さらに NaOH を加えても再び明るく光ったので、この系ではアルカリとしては Na_2CO_3 より NaOH を用いた方がいいと思われる。

2.2. 粉末法⁵⁾

文献に従って以下の粉末を調製した

粉末C-1 (ルミノール 0.02 g, リン酸ナトリウム $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ 3.00 g, ペルオキシホウ酸ナトリウム $NaBO_3 \cdot 4H_2O$ 0.40 g, ヘモグロビン 0.40 g, スクロース 3.0 g, 全量 6.82 g)

粉末C-2 (粉末C-1 1.00 g + フルオレセイン二ナトリウム塩 0.005 g)

粉末C-3 (粉末C-1 1.00 g + ローダミン B 0.005 g)

粉末C-4 (ルミノール 0.04 g, $NaHCO_3$ 4.80 g, Na_2CO_3 0.80 g, $(NH_4)_2CO_3 \cdot H_2O$ 0.10 g, $NaBO_3 \cdot 4H_2O$ 1.00 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08 g, 全量 6.82 g)

粉末C-5 (粉末C-4 1.00 g + フルオレセイン二ナトリウム塩 0.005 g)

粉末C-6 (粉末C-4 1.00 g + ローダミン B 0.005 g)

この方法は各粉末 1.0 g をマグネティック・スターラーで攪拌した水 200 mL に加えるだけであり、非常に便利である。蛍光色素を粉末に混合することにより3色 (ルミノールのみ: 青色; フルオレセイン二ナトリウム塩添加: 黄緑色; ローダミン B 添加: 紫色) の発光が可能であり、特にフルオレセイン二ナトリウム塩を添加したものは明るく感じられた。明るい発光が観察できる時間は1-2分間程度である。

しかし、粉末C-1, C-2, C-3 には粉末に吸湿性があり、ライナー付のスクリーバイアルに保存しても1ヶ月ぐらいで湿ってしまい、あめ状になって発光能がなくなってしまった。また、粉末C-4, C-5, C-6 には吸湿性はなかったが、スクリーバイアルに保存して半年程度で黒くなり、発光能がなくなった。したがって、どちらも長期の保存は難しい。廃棄に関しては、発光後の溶液を (酸で中和し)、大量の水とともに流しに廃棄すればよいが、どちらもホウ素 ($NaBO_3 \cdot 4H_2O$ の質量の 7%, 粉末C-1, C-4 各 1.0 g 中にそれぞれホウ素を 4 mg, 10 mg 含有) の排水基準 (10 mg/L, 環境基準は 1 mg/L), また、粉末C-4 は銅 (粉末 1.0 g 中に 3 mg 含有) の排水基準 (3 mg/L) を考慮する必要があると思われる。ペルオキシホウ酸ナトリウムを使わずに、水に過酸化水素を入れておき、ヘモグロビンを使用する粉末法を検討中である。

2.3. KOH + 水滴 + DMSO + ルミノール

試験管 (直径 21 mm x 長さ 200 mm) に KOH のペレット 1 個 (約 0.1 g) を入れ、これに 3 滴の水 (約 0.1 mL) を加え、振って湿らせた後 (おそらく KOH

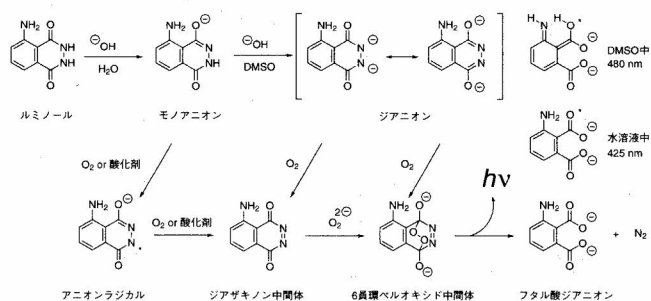


図3. ルミノールの発光反応

とともに、表面の炭酸塩も溶けてDMSO中にKOHが溶解しやすくなる), ただちにDMSO 10-20 mLを加えた。これにルミノール粉末をスパーテルで少量(数mg)加えた後、ゴム栓(No. 5)で栓をして激しく上下に振ると発光が開始した。

この方法は水系に比べて長時間(20-30分以上)黄色い発光が持続し、観察が可能である。しかし有毒なDMSOを使用(手袋着用、皮膚に付けない)する必要がある。

廃棄は発光後の溶液を(酸で中和の後)、大量の水とともに流しに流せばよい。

ルミノールの価格はNacalai GR 5 g ¥4300であり、1回の実験あたり最大0.2 g使用し、他の使用する薬品を考慮してもコストは¥300以下で、低コストであるのが最大の特長である。しかし、訪問科学実験のように、完全な暗室等が望めない場所で実践するためには、記述した実験法では発光強度がやや不足しているように感じられた。発光強度を強くする条件検討が必要であると思われる。

3. ウミホタルの生物発光⁸⁾

ウミホタル(*Vargula hilgendorffii*)は甲殻類介形目に属する2-3 mmの米粒状をした発光生物である。主に日本の沿岸に棲息し、夜行性で、昼間は海岸近く(水深3-4 m)のきれいな海底の砂の中に潜んでいるが、夜間は死魚等の餌を求めて遊泳する。この際に刺激されると、2種の発光腺から別々に、直径2-3 μmの無色の顆粒と直径10 μmの黄色顆粒を海水中に放出する。これらが海水で溶解混合されて青紫色の光雲が生成すると同時に、自分自身は暗闇の方へ逃げ去る。

ウミホタルの生物発光は、黄色顆粒に含まれる発光物質ルシフェリンが、無色顆粒に含まれる酵素ルシフェラーゼの触媒下、海水中の溶存分子状酸素O₂により酸化される反応である。後述するホタルとは異なり、反応には上記以外の他の物質を必要としない。ウミホタルの発光反応を図4に示す

ウミホタルが近くで採集できる場合、もしくは、最近では生きたウミホタルを通信販売している業者〔シュリンプ、ウミホタルを自家繁殖? 10匹+αで¥1050+送料・梱包料(¥1685-2505)]⁹⁾もあるもので、生きたウミホタルを入手できる場合には、それを刺激¹⁰⁾したり、水から出してつぶしたりすれば発光が観察できる。電気刺激(AC 30V)を用いると、殺さないで発光を観察することが可能である。発光しな

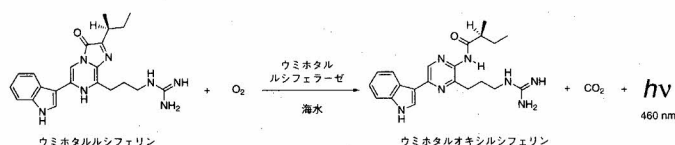


図4. ウミホタルの生物発光反応

くなるまで電気刺激してから1-2週間飼育すると、再び電気刺激で発光ようになる。各地の水族館等で行われているウミホタルの発光ショーはこの方法を用いている。しかし一般に、ウミホタルを飼育して個体数を維持すること、特に継代飼育はかなり困難である。訪問科学実験での実践は行っていない。

ウミホタルを採集後、直ちに天日干し等で上手に乾燥させたものは、水を加えて粉碎するだけで強く発光する。乾燥ウミホタルは乾燥剤とともに室温または冷蔵下で保存すれば発光能が保たれ、長期保存が可能である。量を採集できれば各自で調製できるが、既述のように生物発光の教材として複数の理科教材の業者から乾燥ウミホタルが市販(3-4 mLで¥5000ぐらい)されており、非常に便利である。暗幕のある理科室等での実践では自家調製した乾燥ウミホタルを乳鉢に入れ、水を加えてすりつぶして発光を観察させている。明るい発光が観察できる時間は数分間である。実験操作は極めて簡単であり、しかもウミホタルの毒性に関するデータはない(恐らくない)ので、実験後の溶液を流しに流して廃棄できるのが最大の特長である。発光持続時間は1-2分間程度で、しかし、1回の演示実験には少なくとも1 mL ぐらひは必要と思われる、¥1250-1670/回と、かなり高コストになるのが欠点である。また、最近、中村理工工業のように乾燥ウミホタル(6 mLで¥5250)の取り扱いを中止した業者もあり、入手が困難になっているとも聞く。

ウミホタルの生物発光の応用への最大の障害はルシフェリン、ルシフェラーゼの供給である。ウミホタルのルシフェリンの化学合成はホタルや腔腸動物のルシフェリンに比べて困難である。ルシフェラーゼも遺伝子組換えで調製可能で、ホタルのルシフェラーゼに比べて安定であるという長所があるにもかかわらず、大腸菌では発現させることができないので、後述するホタルやエクオリンのように大量供給に至っていない。現時点では実験にウミホタルの個体そのものが必要であり、現在改良法を検討・開発中である。

4. ホタルの生物発光^{11,12)}

ホタルの仲間は世界中に分布しており、約2000種におよぶ。日本にはそのうち約50種が知られており、身近なものにはゲンジボタル(*Luciola cruciata*)、ヘイケボタル(*Luciola lateralis*)、ヒメボタル(*Hotaria parvula*)がある。ホタルの生物発光もウミホタルと同様にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応で起こるが、細胞内で発光し、神経に支配されて明滅する特徴がある。この発光系ではルシフェリン(ホタル類で共通)、ルシフェラーゼ、酸素O₂の他に、アデノシン三リン酸(ATP)、およびマグネシウムイオンMg²⁺が必要で、生成物であるオキシルルシフェリンによる発光反応の阻害もあるなど、複雑である。ホタルの発光反応

を図5に示す。

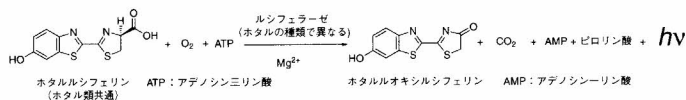


図5. ホタルの生物発光反応

この反応は、すべての生物に存在するエネルギー源であるATPに依存するので、細菌検査（調理場から火星探索宇宙船の汚染検査まで使用されている）やATPにリンクさせた様々な物質の高感度微量分析に広範囲に応用されている。ホタルのルシフェリンは化学合成が容易で、ルシフェラーゼも、いろいろな発光色が得られるものを遺伝子操作により大腸菌につくらせることが可能になっており、現在、大量に供給・市販されている。したがってルシフェラーゼやルシフェリンを得るためにホタルの個体を大量に採集して抽出する必要はなくなった。

キッコーマン株式会社製ホタライトはキッコーマン社が開発した結婚式やパーティー用の発光遊具である。水に溶かして混合するだけで黄色（自然色）、または赤色の発光が楽しめるものであり、以下のような内容で構成されている。

A粉末：ルシフェラーゼ〔自然色（黄色）または赤色〕+ トリス (Tris) 緩衝剤

B粉末：ルシフェリン + ATP + 硫酸マグネシウム $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + Tris 緩衝剤

残念ながらキッコーマン社からは内容物の詳細（特に物質質量）についての情報をいただくことはできなかった。

実験操作は各粉末の入ったアルミパックに各同量（50 mLまたは500 mL）の水（水道水でもいいが、残った溶液を保存することを考慮し、蒸留水を使用）を加え、溶解してA液、B液を調製し、これらを等量混ぜるだけである。

実践の際にはポリプロピレン製細口びん（50 mL）2本に、目盛を目安に蒸留水各50 mLを入れたものを訪問先に持って行った。実験直前にアルミパックにこの蒸留水を入れ、A液、B液を調製し、蒸留水の入っていた細口びんに移した。または凍結保存されていたA液、B液の入った細口びんを冷凍庫からとり出し、室温下、訪問先まで運搬し、解凍されて室温になってから使用した。

1 mL目盛付、または5 mLのところ油性ペンで印をつけたガラス製試験管（直径18 mm x 長さ180 mm）を4本用意し、A液（黄色、赤色）、B液（2本）各5 mLを印や目盛を目安に入れ、試験管立てに立てて実験準備を完了しておいた。演示の際はA液が入った試験管にB液を加えるようにした。こうすれば実験を繰り返す際は、発光後の試験管の内容物を流し

に捨て、A液が入っていた試験管だけを水洗し、既述と同様にA液（黄色、赤色）、B液（2本）を準備すればよい。発光の観察は暗幕のある理科室等の照明を落とした部屋、暗室、または暗箱の使用が望ましく（特に赤色）、体育館での実践の際には、混合後の試験管を段ボール箱の暗箱の中に入れて観察してもらっている。強い発光が観察できるのは30秒ぐらいであるが、暗室だとかなり長い間（1時間）発光していることが確認できる。

ホタライトには開封前の粉末でも9か月以内の有効期限があり、長期保存は5℃以下の冷蔵または冷凍で保存する（著者は念のため-40℃の冷凍庫中で保存している）。溶液にした後は5℃の冷蔵で2-3日で使用とのことである。しかし調べた結果、A液は-40℃の冷凍庫中で数週間-2か月間冷凍保存しても使用可能であった。一方、ホタルのルシフェリンは酸化されやすい不安定な化合物であり、実際、B液は冷凍保存しておくと次第に発光量が減少したが、2週間程度の保存では使用に問題はなかった。どちらも輸送中等、溶液状態で1日ぐらい室温にしても使用に問題はなかった。製品安全データシート（MSDS）によるとホタライトには急性毒性や変異原性はなく、多量の水を使用して廃棄するように指示がある。使用しているものが安全なので、液を混ぜる操作を児童に試験管を持たせて行ってもらった場合が多い。また、ウミホタルの実験と同様に、実験後の溶液を流しに流して廃棄できるのが最大の特長である。

価格は黄色、赤色どちらも100 mL（A粉末、B粉末各50 mL分）x 3セットで¥5250 + 送料¥1000（協和化成、中村理科工業では5セット¥7875、ただし黄色のみ）であり、A液5 mL + B液5 mLで実験すると、コストは1回あたり¥158-208（10回で¥1575-2080）になる。

予備的な検討として、ホタライトの発光後の溶液にATP（高濃度でオキシルシフェリンによる生成物阻害を除去することが知られている）、または $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を加えてみたが、発光は観測されなかった。今後、ルシフェリン（+ATP）を添加して再利用できないかを検討する予定である。

5. オワンクラゲの発光タンパク質 エクオリンの生物発光^{1, 2, 13)}

発光タンパク質エクオリンはアメリカワシントン州のフライデー・ハーバー島近郊の海岸に生息するオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) の傘の縁（発光器）から単離された。最大の特徴は微量のカルシウムイオン Ca^{2+} （あるいはストロンチウムイオン Sr^{2+} ）と特異的に結合し、青色に瞬間発光し、発光の際に酸素などの酸化剤を必要としないことである。エクオリンは189のアミノ酸からなる、分子量約21400の単純アポエク

オリンと発光基質である腔腸動物ルシフェリン（セレンテラジン），および分子状酸素 O_2 から構成されている。発光後のアポエクオリンを2-メルカプトエタノール（またはジチオスレイトール），エチレンジアミン四酢酸EDTA，および分子状酸素 O_2 の存在下，セレンテラジンと処理すると，エクオリンが再生される。エクオリンの生物発光反応と再生を図6に示す。

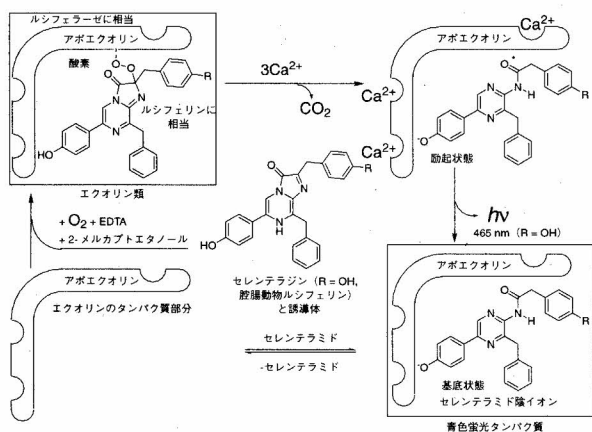


図6．エクオリンの生物発光と再生

エクオリンは生体内や細胞内の微量カルシウムイオンの検出定量試薬として医学や生化学の研究に盛んに使用されてきた。ホテルのルシフェラーゼと同様にアポエクオリンは遺伝子組換えで大腸菌につくらせることが可能になっており，現在，アポエクオリンから調製したエクオリンが大量に供給・市販されている。X線結晶構造解析も行われ，その構造は高効率生物発光機構の謎を解くための貴重な情報となっている。

チッソ株式会社製の組換えエクオリン（チッソ社ではエクオリンを「イクオリン」と表示）は研究用試薬以外の使用が可能で，チッソ社ではポリプロピレン製マイクロチューブに入ったエクオリンの凍結溶液〔1 mg/mLまたは2 mg/mLの，硫酸アンモニウム（安定剤）を含むTris-EDTA（TE）緩衝液溶液，2 mg ¥9450〕の他，以下のような発光実験用のキットを販売している。

1) 水溶液キット

ポリスチレン製栓付試験管に入ったエクオリン溶液（25 μ g/TE緩衝液1 mL）と先を折ってバンドで封じたディスポスポイトに入った5 mmol/L塩化カルシウム $CaCl_2$ 溶液2 mLで構成。エクオリン溶液の入った試験管にスポイトの塩化カルシウム溶液を滴下すると，瞬時に青色の光を発光する。

2) 霧吹きキット

ポリプロピレン製マイクロチューブに入ったエクオリン溶液（1 mg/TE緩衝液1 mL），ポリボトル入り希釈用TE緩衝液250 mL，および300 mL霧吹き容器で構成。エクオリン溶液をTE緩衝液で希釈して霧吹

き容器に入れる。希釈液（4 μ g/1 mL）を霧吹きで Ca^{2+} が含まれるもの（微量でも光る！），例えば普通の紙，ろ紙，コンクリート壁等に溶液をスプレーすると発光する。

これらキットは冷蔵便で，エクオリンの凍結溶液は冷凍便で送られてくる。キットのエクオリン溶液は，4℃の冷蔵で3ヶ月以上，エクオリンの凍結溶液は冷凍で10年以上安定である。室温保存では3週間で発光量が8割に低下する。¹⁶⁾

訪問科学実験の実践では，まず，和光の10 x TE粉末（pH 8.0，1L x 10袋，¥15000）と日本ミリポア社製MilliQ Laboで調製した純水1 Lで，10 x TE緩衝液1 L，およびこの10 x TE緩衝液100 mLを純粋900 mLで希釈し，TE緩衝液1 Lを調製した（純水を使用しなくても，ポリボトルに入った精製水でも問題ないと思われる）。なお，エクオリンが発光してしまう Ca^{2+} の混入や影響を除去するため，緩衝液の調製や保存の際にはガラス製器具・容器類（ Ca^{2+} が溶出）を使用せず，樹脂製のメスシリンダー等の器具類や容器を用い，エクオリン溶液を保存する容器や後述する筆等の器具類はすべて蒸留水で洗浄の後，10 x TE緩衝液で洗った。

ポリプロピレン製の細口びん（50 mL）にエクオリンの凍結溶液（1 mg/mL）をポリエチレン製のディスポスポイトでTE緩衝液を用いて移し，細口びんの目盛を目安に40 mLに希釈し，エクオリン溶液（25 μ g/TE緩衝液1 mL）を調製した。これを霧吹き容器（20 mL）に入れ，実践の準備をした。

実践では，霧吹きキットと同じ実験の他，ガラス製試験管（直径18 mm x 長さ180 mm）に5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液の他，水道水または牛乳（ Ca^{2+} を含有）を2-3 mL入れ，これに霧吹き器からエクオリン溶液を吹き込むと青色の短時間の発光が観察できた。また，霧吹き器からポリプロピレン製の細口びん（50 mL）に出したエクオリン溶液を筆につけて普通の紙（OA紙）に字を書くと，筆の跡に青い発光が観察できた。霧吹き容器や細口びんに残った溶液は，そのまま冷凍庫で凍結保存し，次回の実践に用いた。

エクオリンやエクオリンに含まれる腔腸動物ルシフェリン（セレンテラジン）の安全性試験はまだ行われていない。しかしエクオリンの使用量は少量（数十 μ g）であるため，安全性は高いと考えられる。また，腔腸動物ルシフェリン（セレンテラジン）はホテルイカの肝臓に多量に存在し，食されている。TE緩衝剤や硫酸アンモニウムも使用量が少ないので安全性に問題はない。ウミホテル，ホテルの実験と同様に，実験後の溶液を流しに流して廃棄できるのが利点である。しかし，発光反応が瞬間的で持続せず，あまり強くはないこと，および Ca^{2+} があると微量でも発光してしまうので，使用する容器や水等に注意が必要なこ

とが欠点である。発光の観察には状態のよい暗幕のある理科室や暗箱等の相当暗い場所、特に筆で字を書く実験では暗室が必要不可欠である。

水溶液キットは1キット¥262、霧吹きキットは1キット¥6000(250 mL, 相当回数霧吹き可能)市販されており、それほど高価ではない。訪問科学実験の実践では、スプレー溶液を1回に5 mL使用するとして¥590/回(¥9450/16)と、比較的高コストになる。

ちなみに、ろ紙に5 mmol/L CaCl_2 溶液で字や絵を書いて乾かしておき、そこにエクオリン溶液をスプレーすれば字や絵が青く発光するとの情報もあったが、ろ紙そのものが微量の Ca^{2+} を含み、そのままで発光するので難しいと思われた。1 mmol/L EDTA 溶液でろ紙を処理して乾かしてから (Ca^{2+} をマスク), CaCl_2 溶液で字や絵を書けばよいという情報もあったので、今後検討する予定である。

6. 活性シュウ酸エステルの化学発光^{2,4,14,15)}

シュウ酸誘導体-過酸化水素 H_2O_2 系による化学発光反応は、過シュウ酸エステル化学発光反応と呼ばれている。American Cyanamide 社で主に非常用ライトを作る目的で研究が行われ、その成果は化学発光を利用した最初の非常用ライト、ケミカルライト(ペンライト)「サイリウム」(Cyalume® Lightsticks)として1971年に実用化された。通常の光源は熱や発火を伴い、それらを避けなければならない場所での使用は危険であるが、ケミカルライトは冷光であり、安全である。非常用ライト以外に、釣り用(浮き、さお先の確認、集魚)、光る遊具、各種パーティーイベント用等、現在に至るまで、最も経済的かつ汎用的で、実用化が進んでいる化学発光系であるといえる。過シュウ酸エステルの化学発光は1963年に発見された比較的新しい化学発光系であるが、それまでに知られていた化学発光系に比べ、発光効率が優れているため、分析化学的な応用研究も盛んに行われてきている。

発光に適するシュウ酸エステルは電子吸引性の強い置換基で置換されたアリール基を有したもので、活性シュウ酸エステルと呼ばれる。ルミカ社が使用しているCPPOを含め、いろいろな構造のものが開発されている。活性シュウ酸エステルの化学発光反応を図7に示す。シュウ酸エステルと H_2O_2 により生じた過酸エステルから1,2-ジオキセタンジオンまたは置換1,2-ジオキセタノンが生じ、これと蛍光物質との間で電荷移動錯体が形成され、これが励起状態の蛍光物質と二酸化炭素に分解すると一般に考えられている。発光は励起状態の蛍光物質から生ずる。

株式会社ルミカはケミカルライト、およびそれを使用した様々な製品類(LUMICALIGHT®)を開発・販売している。訪問科学実験では以下の化学発光スティック

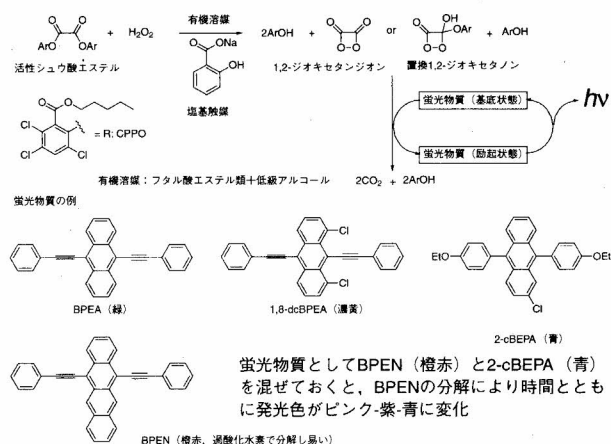


図7. 活性シュウ酸エステルの化学発光反応

ック(ペンライト、ケミカルライト)とセレモニー・セットを演示に使用している。

1) 化学発光スティック(ペンライト、ケミカルライト), 6インチレギュラー高輝度型

化学発光スティックの構造を左に示す。通常、いちばん内側のガラスアンプル内には酸化液 [H_2O_2 + 触媒(サリチル酸ナトリウム?, 塩基触媒) + フタル酸エステル類(フタル酸ジメチル, 有機溶媒) & 低級アルコール(第三ブチルアルコール)] と不活性ガスが入っており、ガラスアンプルと外側の樹脂製(ポリプロピレンまたはポリエチレン)容器との間は蛍光液[活性シュウ酸エステルCPPO + 蛍光物質 + フタル酸エステル類(フタル酸ジブチル, 有機溶媒)] と不活性ガスの空洞から成る。スティックを軽く折り曲げてガラスアンプルを割る(「パチッ」と音がする)ことによりスティックの中に入っていた2種類の液が混合され、発光反応が開始されることで光を発生する。スティックは湿気により光らなくなるため、アルミパックで密封包装されている。室温保存で4年間の有効期限がある。

活性シュウ酸エステルの化学発光では蛍光物質を変えると様々な色の発光を生じさせることができ、発光色8色[発光持続時間10-12時間: 緑(Green), 橙(Orange), 黄(Yellow), 赤(Red); 発光持続時間6-12時間: 青(Blue), 桃(Pink), 白(White), 紫(Violet)]と高輝度型[発光持続時間30分-1時間: 桃(Pink-Hi), 黄(Yellow-Hi)]の10種類が市販されている。さらに過酸化水素に不安定なBPEN(Orange)のような蛍光物質と別の2-cBEPA(Blue)のような蛍光物質を混ぜておくとBPENが分解するにつれ、時間とともに発光色が桃-紫-青と変色する(PVB)。この原理を利用した、生物発光ではありえない変色発光が観察できるスティック2種(ワンダー6

インチ，発光持続時間：4-6時間，PVB，OYG，最後までの変色に要する時間約30分）も市販されている。

これらのうち，高輝度型のスティック（Yellow-Hi，Pink-Hi），特にYellow-Hiは感覚的にも強度的にもかなり強力で，体育館のような明るい場所の実験でも発光の観察が可能である。演示では実験体験者に後述のセレモニー・セットの実験で化学発光スティックが発光する原理を理解してもらった後，スティックを折り曲げて発光を体験してもらった。また発光実験の最後に新品を実験体験者にお土産として配付した場合（暗いところで楽しみ，発光後のスティックはプラスチックではなく，必ず可燃物のゴミとして廃棄するように指示）もあった。

2) セレモニー・セット 高輝度型OYG，OWB

化学発光スティックの中に入っているのと同様の酸化液，蛍光液の各ポリビン（各500 mL，または 100 mL），ポリ手袋，発光試験用計量カップ（少量の各液を混合して事前に発光することを確認するためのもの），およびオイル吸収材とポリ袋（発光後の溶液を吸収させてポリ袋に入れ，可燃物として廃棄するためのもの）から構成されている。各ポリボトルはジップ付のアルミパックの中に密封されている。結婚式等の演出で使用されており，実験操作は容器を用意し，各液を等量混合するだけでよい。

発光色はスティックと同じ8色&エメラルド（Emerald）（発光持続時間4-6時間）があり，変色タイプもPVB（発光持続時間4-6時間），および高輝度型OYG，OWB（発光持続時間30分-1時間，最後までの変色に要する時間約2分）がある。

高輝度型のセレモニー・セットは化学発光スティックの比較にならない程，まぶしいぐらいに明るく，極めて強力に発光するので，明るいところでも発光の観察には全く支障がない。また，変色タイプのスティックとは異なり，変色タイプのセレモニー・セットは変色の時間が早い。時間に制約がある訪問科学実験の演示実験で冷光（光っているのに熱くない！）と不思議な変色発光を体験してもらうのには最適である。実践では100 mLコニカルピーカー2個に，それぞれOYG，OWB蛍光液各50 mL，50 mLピーカー2個に酸化液各50 mLを入れて用意した。コニカルピーカーの蛍光液に長波長紫外線検出灯の光またはブラックライトを当てると，オレンジ色の蛍光が見え，発光後の各溶液に長波長紫外線またはブラックライトを当てると，緑色または青色の蛍光が見えることが確認できた。この蛍光が最初と最後の発光の色と同じであること，さらに光を当てないで化学反応のエネルギーで蛍光を出させるのが化学発光であることを説明した。コニカルピーカーの蛍光液にピーカーの酸化液を加える（実験体験者に加えてもらう場合も多い）と，強烈に発光

が開始するので，コニカルピーカーに触ってもらい，熱くないことを確認し，化学発光スティックの中で起こっている反応を理解し，発光の不思議な変色を観察してもらった。

最近，酸化液をろ紙等にしみ込ませておき，これに蛍光液を筆につけて字等を書く実験も検討している。エクオリンより強く，長時間発光する文字等が書けることが判明している。

繰り返して演示する際には，コニカルピーカーの蛍光液は市販のオイル吸収剤（吸わせるテンブル，1個で110 mLの油を吸収，蛍光液100 mLあたり1個使用，オイル固化剤は不可）に吸収させてポリ袋に入れ，コニカルピーカーは洗ビンのエタノールで洗い，ドライヤーで乾かしている。エタノール洗液は酸化液や蛍光液が入っていた500 mLポリビンの空びんの廃液びんに入れた。50 mLピーカーは洗わずにそのまま再使用し，演示後にエタノールで洗っている。演示後のピーカー類の洗浄はトイレトペーパー等でできるだけ蛍光液をふき取った後，洗剤で洗浄してもよい。なお，オイル吸収剤の入ったポリ袋は大学に持ち帰って可燃物として廃棄し，エタノール洗液は有機廃液として処理している。

これらのルミカの両製品には，取り扱い説明（書）やMSDSが用意されており，使用の注意（スティックを分解しない，酸化液や蛍光液は有機溶剤を使用しているので火気厳禁，乾いた容器を使用），安全性（使用物質には刺激性以外，毒性はほとんどなし），保管方法（湿気に注意，高温日光を避けて冷暗所に保管，使用直前にアルミパック開封等），廃棄処理（有機溶剤を使用しているので可燃物として処理，一般排水への廃棄不可），応急処理（皮膚，眼球は流水洗浄，誤飲は吐かせて医師の診断を受ける，家具等に付いた場合，速やかに（うすめた中性洗剤で）ふき取る等）に関してきちんと記述・指示されている。セレモニー・セットについては，酸化液は空气中にさらすと比較的短時間で変質し，白濁や発光不良を起こす。蛍光液も空气中で5時間以上の放置は避ける。どちらも長期保存をしないよう記述がある。著者は念のため，開封前のアルミパックに入ったポリびんを-40℃の冷凍庫中で保存している。しかし，使いかけの各ポリビンの溶液については，しっかりフタをし，アルミパックに入れ，付いているジップをしっかりしておけば室温で2か月間放置しておいても使用に問題はなかった。

6インチの化学発光スティックの参考価格は各色1本¥189である。セレモニー・セットの教育価格は各（変化）色の酸化液，蛍光液各500 mL 1セット¥6300，各100 mL 1セットx10入で¥21000である。訪問科学実験では各500 mLのセットを購入し，1回各50 mL（全容100 mL）で実験しているので，コストは¥630/回である。1回各5 mL（全容10

mL) で試験管等を用いて実験すると、コストは ¥63-210/回である。

活性シュウ酸エステルの化学発光系は有機溶剤（環境ホルモンとしては否定されたが、ポリ塩化ビニルの可塑剤として使用されているのと類似のフタル酸エステル類等）が使用されているのが現状で、発光後の溶液の廃棄処理、および使用した容器の洗浄が大変であるのが欠点である。しかし、発光強度や発光色の多様性、発光の持続時間を考えると、生物発光化学発光の演示実験のうちで最高のコスト・パフォーマンスを誇ることが最大の長所である。

7. おわりに

今回、著者の長年の研究テーマでもある化学発光や生物発光を題材とした化学マジック実験法を検討し、演示実験として訪問科学実験や学会発表（日本理科教育学会第55回全国大会においてルミノール以外の実験を実演発表）において実践・発表することができた。現在、生物発光、特にウミホタルの生物発光で活性シュウ酸エステルの化学発光を凌駕するような演示実験法が開発できないかを検討中である。

化学マジックで炎色反応と生物発光化学発光の実験を連続して演示すると、実験体験者に熱い光と冷光を同時に体験してもらうことができる。発光現象の不思議、おもしろさに触れ、理科への興味を膨らませてもらえれば幸いである。

謝辞

本研究は日産科学振興財団平成15年度理科教育助成、および平成16年度愛知教育大学地域貢献支援事業費により財政的にご支援いただきました。この場を借りて深謝いたします。また、日本理科教育学会第55回全国大会において配付した無償サンプルをご供与いただきました株式会社ルミカ（ケミカルライト、セレモニー・セットPVB）、およびチッソ株式会社〔イクオリン（エクオリン）発光キット〕に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 後藤 俊夫, “生物発光”, 共立, 東京, 1975。
- 2) 今井 一洋編, “生物発光と化学発光 基礎と実験”, 廣川, 東京, 1989。
- 3) 文献2), pp 57-58, pp 82-84, pp 110-113。
- 4) K.-D. Gundermann, F. McCapra, “Chemiluminescence in Organic Chemistry”, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1987, pp 77-108 (luminol), pp 69-76 (peroxy oxalate)。
- 5) 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 化学発光・錯体”, 丸善, 東京, 1997, pp 35-46。粉末法はp 38の手順C。
- 6) フィーザー, ウィリアムソン, “有機化学実験 原書6版”, 丸善, 東京, 1989, pp 286-288。
- 7) フィーザー, ウィリアムソン, “有機化学実験 原書8版”, 丸善, 東京, 2000, pp 439-446。
- 8) ウミホタル生物発光の記述のある主な日本語単行書: 文献1); 2); 羽根田 弥太, “発光生物”, 恒星社厚生閣, 東京, 1985; 羽根田 弥太, “発光生物の話”, 北隆館, 東京, 1983; 阿部 勝巳, “海蛍の光-地球生物学にむけて-”, 筑摩, 東京, 1994。
- 9) シュリンプ (shrimp), <http://shrimp.redirectme.net/index.html>。
- 10) 千葉県立幕張西校等学校科学同好会, “刺激に対するウミホタルの応答-ウミホタルはなぜ光るのか-”, 第36回日本学生科学賞入選1等作品, 1992。
- 11) ホタル生物発光の記述のある主な日本語単行書: 文献1); 2); 羽根田 弥太, “発光生物”, 恒星社厚生閣, 東京, 1985; 羽根田 弥太, “発光生物の話”, 北隆館, 東京, 1983; 大場 信義編, “ホタル点滅の不思議-地球の奇跡”, 横須賀市自然・人文博物館, 神奈川, 2004; 神田 左京, “ホタル”, サイエンティスト社, 東京, 1981。
- 12) キッコーマン, “ホタルの光” ホタライト (PhotaLite) の遊び方, 2001。
- 13) チッソ, カルシウム受容発光蛋白質Aequorin イクオリンパンフレット。
- 14) ルミカからの資料と情報: 1. 化学発光液の作成方法; 2. ケミホタル・ルミカライトの化学発光システム; 3. 蛍光物質リスト; 4. 化学発光スティック及び化学発光原液の安全性と事故対応について; 5. 製品安全データシート; 6. ルミカ・セレモニー・セット リーフレット及び取り扱い説明書。
- 15) 文献5), pp 24-34。
- 16) チッソ株式会社からの私信。

(平成17年9月16日受理)