

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 号	氏 名	林 里采
<p>[論文題名]</p> <p>Acceleration effect of the forensic luminol reaction induced by visible light irradiation of whole human blood aqueous solutions (ヒト全血水溶液の可視光照射による法医学的ルミノール反応の加速効果)</p> <p>Forensic Science International, 299: 208-214, 2019 DOI: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.04.007</p> <p>[要 旨]</p> <p>【背景】</p> <p>ルミノールはアルカリ性条件下において過酸化水素と血液の触媒作用により青白色の蛍光を呈する。この反応はルミノール反応と呼ばれ、数万倍希釈された血液でも発光が観測されることから、犯罪や事故現場での血痕の検出に頻用されている。科学捜査において、血痕の検出は犯罪現場で生物学的証拠を得るために重要であり、その検出法の感度や特異性についての改良がこれまで行われてきた。最近、血液に対する温度変化やタンパク質変性剤などの外的要因による血液状態の変化に伴うルミノール発光の増強効果が報告されている。他の外的要因として太陽光も十分に考えられるが、光照射が及ぼす影響については、未だ明らかにされていない。太陽光には、紫外線、可視光線、および赤外線が含まれる。そこで、本研究では赤血球内のヘモグロビンが可視光を吸収する色素であることに着目し、血液への可視光照射がルミノール反応に及ぼす効果を解明する。</p> <p>【研究方法】</p> <p>市販の全血を脱イオン水で希釈し、ヘモグロビン内のヘム鉄の Soret 帯である 415 nm の吸光度が 1.3 となる全血水溶液を調製した。光照射は、円筒セル(25 mm φ × 40 mm)内で全血水溶液を攪拌しながら、LED ランプ(>400 nm ; 14 mW cm⁻²)を用いて行った。アルゴン雰囲気下での光照射は、円筒セル内の全血水溶液を冷却しながらアルゴンガスを 15 分間通気した後に行った。また、アジ化ナトリウム(NaN₃)存在下での光照射は、20 mM の NaN₃ を含む全血水溶液を調製し、空気下にて行った。蛍光分光光度計を用いてルミノール発光の最大発光波長である 440 nm における発光強度の経時変化を測定し、光照射前後のルミノール反応を比較した。ルミノール試薬は Weber 法に従って調製した。単色光がルミノール反応に及ぼす効果は、角型セル(10 mm × 10 mm)内で全血水溶液を攪拌しながら、モノクロメーターを用いて各単色光(390, 415, 440, 500, 540, 700 nm)を 30 分間照射して測定した。</p>			

【結果】

全血水溶液の吸収スペクトルにおいて、光照射前後でヘム鉄(Ⅱ)の典型的な吸収スペクトルが得られた。すなわち、可視光照射によるヘモグロビン(Ⅱ)のメトヘモグロビン(ヘモグロビン(Ⅲ))への光酸化は起こらなかった。

ルミノール試薬と同量の全血水溶液を反応させた時の発光強度の経時変化を測定した結果、全血水溶液への可視光照射によるルミノール反応の加速が見られた。5秒後における光照射前後の発光強度比(I/I_0)を加速効果の指標として用いると、加速効果は光照射時間に比例して直線的に増加し、120分間の光照射においてルミノール反応が1.7倍加速した。また、6つの波長の単色光に対する加速効果を測定し、「作用スペクトル」を作成した結果、その形状はヘム鉄(Ⅱ)の吸収スペクトルの形状と一致した。すなわち、ヘム鉄(Ⅱ)の増感作用によって加速効果が誘起された。

アルゴン雰囲気下での加速効果は空気下と比較して顕著に抑制された。さらに、一重項酸素(1O_2)のみを除去する NaN_3 存在下で光照射した結果、空気下においても加速効果が著しく抑制された。アルゴン雰囲気下と NaN_3 存在下での加速効果は同程度抑制された。

【考察】

一般に、ルミノール反応の反応速度は、ヘム鉄(Ⅱ)に対してよりもメト型であるヘム鉄(Ⅲ)に対しての方が速いことが知られている。また、タンパク質変性剤で血痕を前処理するとグロビタンパク質が変性し、ルミノールとヘム鉄の接近が容易になることで、ルミノール発光が増強されることが報告されている。これらの報告を考慮すると、今回観測された加速効果は、光照射によってメト型が生成していないことから、ヘモグロビン内のヘム鉄(Ⅱ)に対して、ルミノール試薬が接近しやすくなったため誘起されたと考えられた。一方、光化学の分野では、酸素分子存在下、金属ポルフィリン錯体に光照射すると、酸化力の強い活性酸素の一つである 1O_2 が発生することがよく知られている。本実験では、可視光照射により全血水溶液中の酸素分子から生成された 1O_2 がルミノール反応の加速効果に寄与することが示唆された。この結果から、色素の増感作用により発生した 1O_2 による赤血球の損傷(光酸化的溶血)が報告されていることを考慮すると、 1O_2 がヘム鉄(Ⅱ)周辺のタンパク質を損傷すると考えられた。

以上のことから、全血水溶液への光照射によるルミノール反応の加速効果の機序は、光照射によりヘム鉄(Ⅱ)の励起三重項($^3Fe(Ⅱ)^*$)が形成され、 $^3Fe(Ⅱ)^*$ から三重項酸素(3O_2)へのエネルギー移動により 3O_2 から生成した 1O_2 が、ヘム鉄(Ⅱ)周辺のタンパク質あるいは赤血球由来の膜タンパク質を損傷することで、ルミノール試薬がヘム鉄(Ⅱ)へより接近しやすくなったためと考えられた。

備考 論文要旨は、和文にあつては2,000字程度、英文にあつては1,200語程度