総説と解説**顕微レーザー光散乱法とマルチ・チャンネル顕微分光法：
赤血球への応用を例として**

西 尾 泉

青山学院大学理工学部物理学科 東京都世田谷区千歳台 6-16-1 (〒157)

(1987年2月17日受理)

Laser Light Scattering Spectroscopy and Multichannel Spectrophotometry
under Microscope: Application on Normal and Sick Erythrocytes

Izumi NISHIO

Department of Physics, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin
University, Chitosedai, Setagaya, Tokyo 157

(Received February 17, 1987)

準弾性光散乱法は、御存知の様に、レーザー技術の発展と共に1960年代の初めに開発された測定法で、短い時間に溶液中の粒子の並進拡散係数等の情報を与えてくれます¹⁾。非接触・非破壊的な測定手段である有利さのために、その応用は初め徐々に広がりましたが、1970年代の Logic circuit の発達により、光がその本来の姿である photon として扱われる photon counting 法が発展するに至り、爆発的に広がりました。

発展の一つの方向は、非常に精度の高い物性的な測定で、臨界指数の決定や臨界点近傍における物性理論の検証²⁾等に大きな成果をあげています。他方、短時間に精度良く(0.1%程度)粒子の大きさを決定できるという特色を生かして、蛋白粒子の大きさの決定等ルーチン的に活用され大きな成功を修めています³⁾。今回ここでは、この測定法の、非破壊的(non-destructive, non-invasive)でかつ高い空間分解能を持つという特徴を生かして、顕微鏡下での生体細胞の測定に応用した幾つかの例をまとめます。

“準弾性散乱法”

レーザーの光に多数の小さな粒子が照らされている場

合を考えてみましょう。簡単のため、その粒子には光学的異方性が無いと仮定しましょう。レーザー光の電場により、それぞれの粒子には溶液との屈折率の差に対応した大きさと位相を持った電気双極子が励起されます。この双極子は、粒子の感ずる電場と同じ周波数で振動し、光を放出します。この光が散乱光になります。この散乱光が検出器である光電子増倍管(PMT)に達して散乱光が検出されるわけですが、この時各粒子からの散乱光は、各々の粒子の位置によって決定される位相を持っており、相互の干渉の結果、検出器に達する散乱光の全体としての強度が決定されます。今、粒子がブラウン運動等で位置を変えると、各々の散乱光の位相が変化し、従って散乱光の干渉状態が変化し、結果として総散乱光強度が変化します。従って、散乱光強度の時間的変化(揺らぎ)は、散乱体積中の粒子の運動についての情報を与えてくれることになります。

この散乱強度の「揺らぎ」を測定する方法に散乱光強度のフーリエスペクトルを調べる方法と、散乱光強度の自己相関関数を計算する方法とがあります。最近のロジック IC 技術の発展により、リアルタイムで計算ができる等の長所を持った後者の方向が急速な発展をしています。

す。

以上を少し式を使って書いてみましょう。検出器に達した散乱光の電場は、

$$\vec{E}_{\text{total}}(t) = \vec{E}_0(t) \left\{ \sum_j \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t)) \right\} \quad (1)$$

と書くことができます。ここで j は粒子の名前、 $\vec{r}_j(t)$ は時刻 t における粒子 j の位置、そして $\vec{E}_0(t)$ は各粒子に共通した部分をまとめたものです。 $\vec{k}_s$ は散乱ベクトルに対応していて、入射レーザー光に対応する波数ベクトル $\vec{k}_i = (2\pi/\lambda)\hat{n}_i$ (λ は溶液中のレーザー光の波長、 $\hat{n}_i$ はレーザーの進行方向を向いた単位ベクトル) と散乱光の波数ベクトル $\vec{k}_f = (2\pi/\lambda)\hat{n}_f$ ($\hat{n}_f$ は散乱光の進行方向を向いた単位ベクトル) の差

$$\vec{k}_s = \vec{k}_i - \vec{k}_f = \frac{2\pi}{\lambda}(\hat{n}_i - \hat{n}_f) \quad (2)$$

として定義されます (図 1 参照)。

その大きさは、

$$|\vec{k}_s| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (3)$$

で与えられます。ここで θ は $\hat{n}_i$ と $\hat{n}_f$ のなす角で散乱角といわれます。この式は、 $|\vec{k}_s|$ の値が散乱角によって自由に変化させることができることを示しています。

$\vec{E}_{\text{total}}(t)$ の式の中で、最も重要な項は、それぞれの粒子からの散乱光の干渉の状態を表わしている、

$$\Sigma = \sum_j \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t)) \quad (4)$$

の項です。この項は粒子の分布関数

$$\rho(\vec{r}) = \sum_j \delta(\vec{r} - \vec{r}_j) \quad (5)$$

を使うことにより、

$$\Sigma = \int \rho(\vec{r}) \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}) d\vec{r} = \rho(\vec{k}_s) \quad (6)$$

図 1

図 2 散乱ベクトル $\vec{k}$ と、その散乱光で検出される濃度の揺らぎの関係。模式図。

と書き変えることができます。これは分布関数のフーリエ成分のうち、空間波数が $\vec{k}_s$ に対応しているものになっています。従って散乱ベクトル $\vec{k}_s$ に対応した方向の散乱光の強度は

$$I = |\vec{E}_{\text{total}}|^2 = I_0 |\rho(\vec{k}_s)|^2 \quad (7)$$

となり、前記のフーリエ成分の強度の 2 乗に比例していることがわかります。

これは粒子の濃度の揺らぎのうち、空間波数 $\vec{k}_s$ を持つ成分を散乱光が検出していることに対応しています (図 2)。従って、散乱光の強度の揺らぎの特徴的な時間 (持続する時間) も、この濃度の揺らぎの持続時間に直接関係していると考えられます。

実際、自由な拡散運動をしている粒子からの散乱光の自己相関関数は

$$C(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle = \langle I \rangle^2 \{ \exp(-2Dk_s^2\tau) + 1 \} \quad (8)$$

で与えられます。ここで D は粒子の拡散係数であり、 $(Dk_s^2)^{-1}$ は、粒子が $|k_s|^{-1}$ という距離を拡散していくのに必要な時間に対応しており、粒子がこの距離を動く間に、濃度の揺らぎが消滅していくことを示しています。 D は粒子の大きさ a と Einstein-Stokes の式

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (9)$$

によって関係づけられており、 D の測定から、粒子の大きさ等を決定できます。ここで k_B はボルツマン定数、 η は溶液の粘度です。

ここで、後の議論、特に、動きを制限された粒子からの散乱光を理解するために

$$\Sigma = \sum_j \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t)) \quad (4)$$

についてもう少し考えてみましょう。

量 $\exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t))$ は複素平面上の単位円上の一つの点に対応しています (図 3)。この量は $\vec{r}_j(t)$ が変化するに従って、この単位円上を動きまわることになります。この結果、その和である量 Σ は半径 n の円の内部を自由に動きまわることになります。実は、これはそれぞれの粒

図 3

子の動きに相関がない場合のみ正しいことですが、ブラウン運動をする粒子には相関は無視できるので、ここでは粒子間の相関は無視致します。

これから後でお話する、細胞中に存在する粒子は、自由な粒子として存在する物ばかりではありません。膜やサイト=スケルトン等の構造に結合している物もあるでしょうし、又、ほんの少しの自由度しか持たない閉じ込められた粒子も存在するでしょう。従って、細胞等の複雑な系からの散乱光を解析するためには、この様な自由を制限された粒子からの散乱光の性質を良く理解しなければなりません。

自由を制限された粒子の例として、ある点を中心とした長さ L の領域に動きを制限された粒子からの散乱光について考えてみましょう。粒子の位置は、粒子の閉じ込められている檻の中心 $\vec{r}_{0,j}$ とその位置からのズレ $\Delta\vec{r}_j(t)$ によって $\vec{r}_j(t) = \vec{r}_{0,j} + \Delta\vec{r}_j(t)$ で与えられます。ただし、 $\langle \Delta\vec{r}_j(t) \rangle = 0$ 。ここで注意すべき点は、準弾性光散乱は $|\vec{k}_s|^{-1}$ を長さの基準として粒子の運動を測定する方法であるということです。従って L と $|\vec{k}_s|^{-1}$ との大小関係によって散乱光の「揺らぎ」の大きさに大きな相異が予想されます。先づ、次の様な場合から考えていきましょう。

① $L < |\vec{k}_s|^{-1}$

この場合

$$\begin{aligned} \sigma_j &= \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t)) \\ &= \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_{0,j}) \exp(i\vec{k}_s \cdot \Delta\vec{r}_j(t)) \end{aligned} \quad (10)$$

において、 $\vec{k}_s \cdot \Delta\vec{r}_j(t) < 1$ です。図4の様に σ_j は単位

円上の非常に小さな円弧上に制限されることとなります。従ってその和の $\Sigma = \sum_j \sigma_j$ の動ける範囲も制限されることになり、それに対応した散乱光の「揺らぎ」も小さくなります。特に極端な場合で $L \ll |\vec{k}_s|^{-1}$ を満たす場合には、散乱光の強度の揺らぎは消滅することになります。

② $L \gg |\vec{k}_s|^{-1}$

逆にこの場合には、 σ_j は単位円上に自由に動き回ることができ、従って、散乱光の「揺らぎ」は束縛されていない粒子からのそれと差は見られないでしょう。即ち、その粒子は自由な粒子と見分けがつかないと考えられます。

さて、ここで散乱光強度の「揺らぎ」の大きさに注目してみましょう。揺らぎの大きさは

$$\langle I^2 - \langle I \rangle^2 \rangle = \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 \quad (11)$$

で定義しておきます。 $I = E \cdot E^*$ です。

$$\langle I \rangle = \langle I_0 \rangle \left\langle \left\{ 1 + \sum_{j,j'} \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_{j'})) \right\} \right\rangle \quad (12)$$

$$\langle I^2 \rangle = \langle I_0^2 \rangle \left\langle \left\{ \sum_{j,j',j'',j'''} \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_{j'} + \vec{r}_{j''} - \vec{r}_{j'''})) \right\} \right\rangle \quad (13)$$

となりますが粒子間の相関が無い場合には、

$\sum_{j,j'} \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_{j'}))$ の項は平均すると 0 になり、 $\langle I \rangle = \langle I_0 \rangle \cdot n$ (n は粒子の数) となります。同様にして $\langle I^2 \rangle$ についても

$$\langle I^2 \rangle = 2\langle I_0^2 \rangle n(n-1) \div 2\langle I \rangle^2 \quad (14)$$

となります。

散乱光強度の「揺らぎ」の大きさは自己相関関数の測定から求めることができます。散乱光強度の自己相関関数は

$$\begin{aligned} C(\tau) &= \langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t) \cdot I(t+\tau) dt \end{aligned} \quad (15)$$

と定義されます。 $\tau=0$ とおくと

$$\begin{aligned} C(0) &= \langle I(t) \cdot I(t) \rangle \\ &= \langle I^2 \rangle \end{aligned} \quad (16)$$

であり、又、 $\tau \rightarrow \infty$ では散乱強度に相関がなくなると考えられますから

$$C(\infty) = \langle I \rangle^2 \quad (17)$$

となります。この様にして、ここで定義された「揺らぎ」の大きさは相関関数を測定することにより、

$$\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 = C(0) - C(\infty) \quad (18)$$

として決定されます。これは光学系が理想的な場合で、

図 4 自由度を制限された粒子からの散乱光の電場ベクトルの因子 $\Sigma = \sum_j \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t))$ の複素数自由度. 各小矢印はそれぞれ $\exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_{0,j}(t))$ に対応し, その終点にある円弧がその自由度, 影で示される部分が終点の動き得る範囲 ($j=1$ からの和) を示しています. 従って, 一番大きな領域が Σ のとり得る範囲に対応しています. 図上方の円弧は自由粒子の場合の Σ の範囲を示しています.

実際には測定される相関関数と今まで議論してきました揺らぎの大きさは,

$$C(0) - C(+\infty) = A \cdot \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 \quad (19)$$

という関係で結びつけられます. ここで A は光学系により決定される 1 より小さな量で, その光学系の散乱光強度の揺らぎを検出する能率に対応しています. 一般の準弾性光散乱装置では, $1 > A > 0.7$ 程度の大きさであり, 顕微鏡散乱の場合には, 0.1 のオーダーです. この A は, 標準試料により簡単に決定され, それにより, もとの光の揺らぎは計算されます.

以上の直感的な議論, 特に $|\vec{k}_s| \cdot |\Delta \vec{r}_j(t)| \ll 1$ の場合に

ついて, 更に詳しく考えて見ましょう.

$$\Sigma = \sum_j \{ \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_{0,j}) \exp(i\vec{k}_s \cdot \Delta \vec{r}_j(t)) \} \quad (20)$$

を $|\vec{k}_s| \cdot |\Delta \vec{r}_j(t)| \ll 1$ の条件の下で

$$\exp(i\vec{k}_s \cdot \Delta \vec{r}_j(t)) = 1 + i\vec{k}_s \cdot \Delta \vec{r}_j(t) + \dots \quad (21)$$

と展開し, 2 次以上の項を無視すると,

$$\Sigma = \sum_j \{ \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_{0,j}) \} + i \left\{ \sum_j \langle \vec{k}_s \cdot \Delta \vec{r}_j(t) \rangle \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_{0,j}) \right\} \quad (22)$$

となります.

従って, 時刻 t における散乱強度 $I(t)$ は $\vec{k}_s \cdot \Delta \vec{r}_j(t)$

の2次以上の項を無視すると、

$$I(t) \propto \sum_{j,j'} \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_{0,j} - \vec{r}_{0,j'})) \times \{1 + i\vec{k}_s \cdot (\Delta\vec{r}_j(t) - \Delta\vec{r}_{j'}(t))\} \cdot I_0 \quad (23)$$

となり、その平均は $\langle \Delta\vec{r}_j(t) \rangle = 0$ に注目すれば

$$\langle I \rangle \propto \sum_{j,j'} \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_{0,j} - \vec{r}_{0,j'})) I_0 \quad (24)$$

に比例します。従って

$$\begin{aligned} I - \langle I \rangle &\propto I_0 \sum_{j,j'} \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_{0,j} - \vec{r}_{0,j'})) \\ &\times \{i\vec{k}_s \cdot (\Delta\vec{r}_j(t) - \Delta\vec{r}_{j'}(t))\} \\ (I - \langle I \rangle)^2 &\propto I_0^2 \sum_{j,j',j'',j'''} [\exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_{0,j} - \vec{r}_{0,j'} + \vec{r}_{0,j''} - \vec{r}_{0,j'''})) \\ &\times \{i\vec{k}_s \cdot (\Delta\vec{r}_j(t) - \Delta\vec{r}_{j'}(t))\} \{i\vec{k}_s \cdot (\Delta\vec{r}_{j''}(t) - \Delta\vec{r}_{j'''}(t))\}] \end{aligned} \quad (25)$$

$\langle \Delta\vec{r}_j(t) \rangle = 0$ である事に注目し、更に $j \neq j'$ 間に相関はないとすると、0にならない項は、 $j=j'', j'=j'''$ を満たす項のみとなり、結果として、

$$(I - \langle I \rangle)^2 \propto I_0^2 \sum_{j,j'} |\vec{k}_s \cdot (\Delta\vec{r}_j(t) - \Delta\vec{r}_{j'}(t))|^2 \quad (26)$$

を得ます。定義から明らかな様に、 I_0 は一つの粒子からの散乱強度ですから、散乱強度の揺らぎの大きさは

$$\langle (I - \langle I \rangle)^2 \rangle \propto \left\langle \sum_{j,j'} |\vec{k}_s \cdot (\Delta\vec{r}_j(t) - \Delta\vec{r}_{j'}(t))|^2 \right\rangle I_0^2 \quad (27)$$

となり、粒子の動くことのできる自由度 $|\Delta\vec{r}_j(t) - \Delta\vec{r}_{j'}(t)|^2$ についての情報を与えてくれることが良く判ります。又揺らぎの大きさは、 $\langle I \rangle$ 等に依らず、又、 $|\vec{k}_s|^2$ に比例することを示しており、逆にこれが見出されれば、自由度が理論的に求められることになります。

ここで赤い光の He-Ne (ヘリウム・ネオン) レーザーを例に取って、 $|\vec{k}_s|^{-1}$ を考えてみると、 $|\vec{r}_s|^{-1}$ が最小になるのは θ が π (180°) の時で

$$|\vec{k}_s|^{-1} = \frac{\lambda}{4\pi n} \approx 400 \text{ \AA} \quad (28)$$

で、 $|\vec{k}_s|^{-1}$ の大きい方は論理的には無限大ですが、実用的には $1 \sim$ 数 μm 程度と考えられます。

以上の議論からお判りのように、制限された自由度を持つ系に対して、散乱光の「揺らぎ」の大きさを手がかりとして、その自由度を測定することができることが理解できると思います。

この他に、細胞等からの光散乱を考える上で重要な要素は動かないものからの散乱光です。動かない粒子又は粒子集合からの散乱光は、統計学的な揺らぎ (光が光量子であるために、一定の強さの光であっても、二項分布

的な揺らぎを持っています。その相関時間は非常に短く (理論的には0)、相関関数は $\delta(\tau)$ (デルタ函数) になるために、容易に分離できます。) 以外の揺らぎは持っていません。従って、それ等からの電場の総和を $\vec{E}_n$ 、散乱光強度を I_n とすると、

$$\langle I_n^2 \rangle = \langle I_n \rangle^2 \quad (29)$$

が成立することは明らかでしょう。

このような揺らぎのない散乱光と、今まで述べてきた、自由粒子からの散乱光が混在している場合の散乱光の揺らぎについて考えてみましょう。このとき、全体としての散乱光の電場は

$$\vec{E}_{\text{total}} = \vec{E}_n + \vec{E}_m \quad (30)$$

と書けます。ここで n は non-moving, m は moving を表わしています。したがって散乱光強度は

$$I_{\text{total}} = \vec{E}_n \vec{E}_n^* + \vec{E}_n \vec{E}_m^* + \vec{E}_m \vec{E}_n^* + \vec{E}_m \vec{E}_m^* \quad (31)$$

となります。ここで動かない物体も、同じ粒子の集合体と考えると、

$$E_n = E_0(t, 0) \left\{ \sum_{j=1}^N \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j) \right\} \quad (32)$$

$$E_m = E_0(t, 0) \left\{ \sum_{j=N+1}^{N+N'} \exp(i\vec{k}_s \cdot \vec{r}_j(t)) \right\} \quad (33)$$

と書けます。ここで、 $j \leq N$ のときには、 $\vec{r}_j$ は時間に依存しない定ベクトルで、 $N < j \leq N+N'$ のときには、 $\vec{r}_j(t)$ は時間に依存します。又、 $j \neq j'$ のときには、

$$\langle \exp(i\vec{k}_s \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_{j'})) \rangle = 0 \quad (34)$$

ただし、 $j > N$ or $j' > N$

すなわち、相関がないとすると、

$$\langle E_n E_m^* \rangle = \langle E_n^* E_m \rangle = \langle E_n^* E_n \rangle = 0 \quad (35)$$

となります。したがって、このときには、

$$\langle I \rangle = \langle E_n E_n^* \rangle + \langle E_m E_m^* \rangle = \langle I_n \rangle + \langle I_m \rangle \quad (36)$$

となります。散乱光のゆらぎを考えると、

$$\begin{aligned} \langle I^2 \rangle &= \langle (E_n E_n^*)^2 \rangle + \langle E_n E_n^* E_n E_m^* \rangle + \langle E_n E_n^* E_m^* E_m \rangle \\ &+ \langle E_n E_n^* E_m E_m^* \rangle + \langle E_n E_m^* E_n E_n^* \rangle + \langle E_n^2 E_m^{*2} \rangle \\ &+ \langle E_n E_m^* E_n^* E_m \rangle + \langle E_n E_m^* E_m E_m^* \rangle \\ &+ \langle E_n^* E_m E_n E_n^* \rangle + \langle E_n^* E_m E_n E_m^* \rangle \\ &+ \langle E_n^{*2} E_m^2 \rangle + \langle E_n^* E_m E_m E_m^* \rangle \\ &+ \langle E_m E_m^* E_n E_n^* \rangle + \langle E_m E_m^* E_n E_m^* \rangle \\ &+ \langle E_m E_m^* E_n^* E_m \rangle + \langle (E_m E_m^*)^2 \rangle \end{aligned} \quad (37)$$

という16個の項が出てきますが、時間平均を行ったとき生残るのは、 n と m が偶数項づつ含まれている項で、か

つ $E_m E_m^*$ というかたちの積になっている項のみで、さらに、 $E_n^* E_n = I_n = \text{const.}$ に注意すると、容易に $\langle I^2 \rangle = \langle I_n^2 \rangle + 4\langle I_n \rangle \langle I_m \rangle + \langle I_m^2 \rangle$, したがって、

$$\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 = 2I_n \langle I_m \rangle + \langle I_m^2 \rangle \quad (38)$$

の結果を得ます。この結果から、全体の散乱光強度のうち、揺らぎのある、動いている粒子に起因する散乱光の占める割合

$$\left. \begin{aligned} R &= \frac{\langle I_m \rangle}{\langle I_n \rangle + \langle I_m \rangle} \\ R &= 1 - \sqrt{1 + \frac{C(0) - C(+\infty)}{A \cdot C(+\infty)}} \end{aligned} \right\} \quad (39)$$

として求められます。

“顕微鏡レーザー散乱”

顕微鏡下での光散乱の実験は幾つかのグループで1970年代の始めから研究されてきています⁴⁾。ここでは我々の使用した装置の紹介から始めましょう⁵⁾。図5に装置のデザインを示してあります。右の Laser と記されているのが光源である He-Ne レーザーで、ここでは 15 mW 出力の Spectra-Physics 社製の 124A を使用しました。この光は、図に示しました様に顕微鏡の対物レンズにより集光されて、単一モードの光ファイバーに導入されま

す。この光ファイバーは、その柔軟性により、光学系に大きな自由度を与えてくれることになり、以下に述べる散乱角度の設定の自由度やレーザー光の集光される位置の微調等を可能にしてくれるばかりでなく、そのモード選択性により、伝送の途中で高次のモードを減衰させて、出力される光の空間における強度分布からノイズを取り除く働きもしております。

光ファイバーから出てくるレーザー光は、次に述べます二つの方法で、試料に集光されます。そのうちの一つは、顕微鏡のコンデンサー=レンズを暗視野として使用する方法で、これは顕微鏡光散乱のパイオニアである日本の前田等の方法を応用しているものです。ここでは、光ファイバーから出た光束が拡大してから並行光に変えられ更に集光されているのが大きな違いで、これにより焦点におけるスポットの大きさを、より小さくしています。他の方法は、光ファイバーから広がりながら出てくる光束を、顕微鏡の対物レンズの横においたもう一つの対物レンズにより試料に集光する方法です。この図より明らかな様に、前者は散乱角度の小さい前方散乱、後者は散乱角の大きな後方散乱に適しています。この2つの照射方法は、光ファイバーを固定した円筒を移動させて簡単に切り換えられる様にしてあります。

前方散乱用の光学系は、コンデンサー=レンズに入射する位置を変化させることにより入射角（散乱角）を変

図5 顕微鏡光散乱装置の概略。光源の位置Aが前方散乱 ($\theta < 90^\circ$)、Bが後方散乱 ($\theta > 90^\circ$) に対応しています。

化させることができ、又、コンデンサー=レンズの位置を変化させることにより集光する位置を任意に設定できます。後方散乱の光学系は、その全体が、試料の位置を通り光軸に垂直な軸を中心とした、回転ステージに載せられており、更にその回転ステージを含む全体がXYZステージ上に固定されて、入射角（散乱角）と集光点が可変となっています。

以上のような照射系からレーザー光を照射された試料からの散乱光は、顕微鏡の対物レンズにより集光されて接眼レンズ内の結像面に実像を結びます。この結像面に一端を固定された光ファイバーにより、散乱光は光電子増倍管に導びかれ処理されます。この様な検出光学系にすることにより、実験者は試料のどの部分からの散乱光を測定しているか容易に顕微鏡観察が可能となり、又、測定中のモニターも可能となります。

従って、測定装置に導かれる散乱光は、試料のレーザー光に照らされた部分のうち、対物レンズを通して検出用光ファイバーの入口に投影された部分からの散乱光だけということになります。従って散乱体積は、焦点付近でのレーザー光束の半径と光ファイバーの入光端の断面積と対物レンズの倍率の3つの因子によって決定されます。

この光学系に要求されることは、試料の不要な部分からの散乱光を除き、必要な部分からの散乱光を効率良く取り込む性能です。従って、照射系には出来るだけ細いビームを試料の目的の部分に照射する性能が、又、検出系には不要な部分からの散乱光を排除する能力（分解能）が求められます。焦点付近でのビームの太さは、回折限界により

$$s = \lambda f / d$$

で与えられます。ここで s は焦点付近でのビームの直径、 λ はレーザーの波長、 f はレンズの焦点距離、 d は集光されるビームの径に対応しています。従って、最小のビーム径を得るためには、一旦ビーム径を大きくした後焦点距離の短いレンズで集光することが必要になります。一方、対物レンズの分解能は

$$Z = 1.22\lambda / 2 \text{ NA}$$

で与えられます。ここでNAは対物レンズの numerical aperture（開口数）であり、簡単には一点から出て対物レンズに入る光のコーンの角度の半分の正弦に比例しています。従って、高い分解能を要求すると広い角度に散乱された光を検出する結果となります。これは単一の散乱ベクトルのみを検出する光散乱と顕微鏡下での光散乱の大きな差であり、結果として解析が複雑になります。

前出の、拡散運動をする粒子からの光散乱を例にとって顕微鏡下の光散乱について、もう少し検討を加えて見ましょう。

顕微鏡下の光散乱の場合には、散乱光の強度の自己相関関数は

$$C(t) = A \left[\int P(k) e^{-Dk^2 t} dk \right]^2 + \langle I \rangle \quad (A < 1) \quad (40)$$

となります。ここで $P(k)$ は光学系で決定される、取り込まれる散乱ベクトルの分布関数を代表しています。粒子の拡散係数に分布がある場合には、

$$C(t) = A \left[\int \int dk dD P(k) \rho(D) e^{-Dk^2 t} \right]^2 + \langle I \rangle^2 \quad (41)$$

となり、通常の準弾性光散乱に比べて非常に複雑になります。ここで $\rho(D)$ は正規化された拡散係数 D の分布（粒子径の分布に対応している）関数です。これはキュラント展開により、

$$C(t) = A \exp \left[-2\langle D \rangle \langle k^2 \rangle t + \langle P^2 \rangle \langle k^4 \rangle - \langle D^2 \rangle \langle k^2 \rangle^2 t^2 + \dots \right] + B \quad (42)$$

となります。ここで、

$$\left. \begin{aligned} \langle D \rangle &= \int \rho(D) D dD \\ \langle D^2 \rangle &= \int \rho(D) D^2 dD \\ \langle k^2 \rangle &= \int P(k) k^2 dk \\ \langle k^4 \rangle &= \int P(k) k^4 dk \end{aligned} \right\} \quad (43)$$

で定義されます。

通常の場合の

$$C(t) = A \exp \left[-2\langle D \rangle k^2 t + (\langle D^2 \rangle - \langle D \rangle^2) k^4 t^2 + \dots \right] + B \quad (44)$$

に比較してかなり複雑になりますが、 $\langle k^2 \rangle$ や $\langle k^4 \rangle$ が決定されていればほぼ同様の情報を与えます。

装置の $\langle k^2 \rangle$, $\langle k^4 \rangle$ 等は、 $\rho(D)$ がデルタ関数であるような試料を使って測定することができます。この様な試料では、従来の測定法と顕微鏡下の測定法とでそれぞれ

$$C_n(t) = A_n \exp(-2Dk^2 t) + B \quad (45)$$

$$C_m(t) = A_m \exp(-2D\langle k^2 \rangle t + D^2(\langle k^4 \rangle - \langle k^2 \rangle^2) t^2 + \dots) + B \quad (46)$$

となり、従来の測定法の D の分布と全く同様な効果を生みます。図6に両者の比較を示しました。

図6 顕微鏡光散乱装置に特有の $\vec{k}_s$ の広がり、散乱光強度の自己相関関数に及ぼす影響。通常の準弾性光散乱の光学系での測定 ((a), (c)) と顕微鏡光散乱 (MLLSS) ((b), (d)) のとを、後方散乱 ((a), (b)) と前方散乱 ((c), (d)) の各々で比較してあります。 $\vec{k}_s$ の広がり、の影響は片対数プロット上の直線からのズレとして現われます。光学系は同じ立体角を取り込んでいるために、 $|\vec{k}_s|$ の小さい前方散乱で、 $\vec{k}_s$ の相対的広がりが大きく、従ってズレが顕著です。試料は $0.109 \mu\text{m}$ の標準ポリスチレン球を使用しています。

“赤血球への応用”

ここでは、これまで述べてきた装置と理論を適用して、赤血球内部の蛋白質（ヘモグロビン）の運動を測定した例を御紹介しましょう。

赤血球は、直径7～8ミクロンで厚さ2ミクロンのバコーン＝ケーブ型（白玉団子形）をしています。膜に包まれた原形質は細胞核も存在せず、単純には濃度の高い（～35 mg/cc）蛋白質の溶液とみなすことができます。原形質の主な成分（97.5%）はヘモグロビンと呼ばれる、酸素を吸着する蛋白質で、血液中的の酸素の運搬を担っていることは衆知のことです。この単純な構造は顕微鏡下での光散乱の測定の恰好の対象となりますが、逆に、あまりに単純すぎると見えるかも知れません。しかしながら、赤血球には、鎌形赤血球病という興味深い遺伝病があります⁶⁾。この病気の人のヘモグロビンは一次構造のうちたった一つのアミノ酸が他のアミノ酸に置き換わっており、ヘモグロビンSと呼ばれています。この異常遺伝子をホモに持った人の赤血球では、酸素濃度の低い

環境におかれると、ヘモグロビンSが重合し棒状に長く伸びた重合体ができることが知られています。多数の重合体が軸を揃えて絡み合って発達し、円板形だった赤血球を三日月型に引き伸ばしてしまいます。この結果、2～3ミクロンの毛細血管を通過できる程柔軟性に富んだ赤血球は、柔軟性を失ない毛細血管を通過できなくなります。一方変形した赤血球は脾臓で破壊されます。こうして極度の貧血と組織の酸欠による壊阻を招きます。この様な鎌型赤血球の症状は、全体の赤血球のうち極く僅かの特殊な状態にある赤血球によって起こされると考えられており⁷⁾、赤血球全体の平均ではなく、一つ一つの細胞の状態を測定することのできる手段が望ましい事は明らかです。顕微鏡下の光散乱の様に、個々の赤血球内部のヘモグロビンの重合状態を赤血球を破壊することもなく測定できる装置を作り、重合過程を測定することは、非常に有益なことと言えます。

ヘモグロビンの重合過程を解析するにあたって、レーザー光散乱は、細胞の中の粒子の運動についての情報を与えてくれますが、その粒子の生化学的な状態について

は何の情報も与えてくれません。従って、何らかの方法で、それを制御するか決定する必要があります。ヘモグロビンSの状態のうち最も重要なものは酸素の吸着度であり、これがヘモグロビンSの重合能を決定する要因です⁷⁾。赤血球の様に膜に包まれた自立的な系では内部の蛋白の状態を制御することは非常に難しく、従って何らかの方法でヘモグロビンの状態をモニターする必要があります。この目的でヘモグロビンの酸素吸着度を決定するために、顕微鏡に更に可視光用の分光光度計を組み込

図7 顕微分光法による吸収スペクトル決定手順。
最上図には基礎となる3つのスペクトルを示す。上から順に細胞(赤血球)のない部位の透過光、赤血球の透過光、分光光度計のダーク・ノイズ。中央図にはダーク・ノイズ補正後の光源特性曲線(上)と細胞による吸収(下)を示す。下図には両曲線の比 $(\text{Background}(\lambda) - \text{Through cell}(\lambda)) / (\text{Background}(\lambda) - \text{Dark}(\lambda))$ で得られる規格化された吸収スペクトルを示す。

みました。光源には顕微鏡付属の白色光源を利用し、赤血球を透過した光と、細胞の存在しない部分を透過した光の差スペクトルを決定することにより、図7に示されている手順をへて赤血球の吸収スペクトルを測定するものです。それぞれの透過光は、光散乱用とは別の接眼レンズに組込んだ光ファイバーにより導出されて、optical multichannel analyzerにより、スペクトルが決定されます。この分光光度計は、その名の示す通り、マルチチャンネル・ディテクターを使ったもので、総ての波長についての光度を同時に計測し、形態や厚み等の経時変化で吸収強度に経時変化が存在する系で、特に威力を発揮し、歪の無いスペクトルを与えることができます。実際、この実験は、当初、単色光と、光度計により、波長スキャンによりスペクトルの決定を行いました。満足の行く結果を得ることは出来ませんでした。

以下で議論されているヘモグロビンの酸素吸着度は、このスペクトルから計算されたものです(図8)。

この装置は、レーザー光散乱の補助として組込んだものですが、予測以上の興味深い結果を出してくれました。

実験は、2つの系に対して行なわれました。1つは、厚さ100 μm 、幅3 mm、長さ5 cmの細い矩形のガラス管の一端を封じ、酸素を抜いた後赤血球を入れて酸素を透過させるシールによって他端を閉じた系です。拡散による酸素の侵入が許されており、酸素分子の水溶液中の拡散係数を用いて管内の任意の場所の任意の時刻の酸素濃度が概算できます。他方は、赤血球の表面に分布する電荷を利用して、ポリライシンを接着剤として赤血球をフローセルの表面に固定した後、注射器を利用したポンプと切換えスイッチにより外液を交換できるようにした系です。任意の酸素濃度の溶液を流すことができ、薬品等の効果を主に実験しました。

図9に示しましたのが、私の正常赤血球で得られた、外液中の酸素濃度(ここでは実験開始からの時間で表わされています)とスペクトルから計算された酸素吸着度です。ここで重要なことは測定された酸素吸着度の曲線が非常に揃っているという点です。図10には鎌型赤血球症の赤血球を使った結果を示してあります。まず最初に気がつくことは、正常のものと比較して大きなばらつきがあるということです。この図の中で太い実線で示されているのが同時に完全に同じ条件で測定された正常赤血球(対照群)から得た平均の酸素吸着曲線です。「完全に同じ条件」等と書くに疑問に思われる方がいるかも知れません。実はこれにはタネがあります。この実験は正常細胞と鎌型赤血球を混合した試料を用い、実験開始時の無酸素状態で個々の赤血球がどちらの群に入るか判別

図 8 ゆっくり酸素吸着する 1 個の赤血球から測定された吸収スペクトルの変化. 560 nm にピークを持つ還元型スペクトルから 540 及び 580 nm にピークを持つ酸化型スペクトルへの変移が明確に読み取れます. 各スペクトルは約 2 秒の測定で得られ, このスペクトルから算出される酸素吸着度が図右隅に示されています.

図 9 正常赤血球の酸素吸着度曲線. 時間は環境の酸素分圧の増加に対応しています. 酸素吸着度は顕微分光法を用いて14個の赤血球に個別に測定されていますが, 非常に均一でよく曲線にのります.

図10 鎌型赤血球の酸素吸着度曲線。条件は図9と同じ。実線は同一光学セル内にて同時に測定した正常赤血球の酸素吸着度曲線を示しています。図上方に各時点での個々の赤血球の形状と、正常型への形態的回復の時点(矢印)が示されています。各赤血球の形状回復は異なる時刻(酸素分圧)で起こりますが、その時点の酸素吸着度はほぼ等しく、図右の大きな矢印で示された範囲にあります。

した後、追跡測定したものです。従って測定中の対照群(コントロール)と実験群(鎌型赤血球)は混ざり合っ
て数ミクロンも離れず隣りどうし並んでいますので、
「完全に同じ条件」と見栄をされるわけです。これも顕
微鏡下で行った光吸収の実験の高い分解能のおかげと言
えます。更に図11に示されているのは異常な吸着曲線
の例で、一つ一つの細胞を測定することの重要性が良く
判ると思います。この結果についての生物学、病理学的
な詳細は良く判りませんが、もしこの様に異常に酸素吸
着力の低い赤血球があると非常に都合が悪いことは自明
でしょう。なぜなら、ヘモグロビンの重合は、酸素濃度
ではなく、酸素吸着度の低い時に起こるからです。次に
図12に示したのが、フロー・セルを使用した同様の実験
結果です。ここでは正常赤血球についてのみの結果を示

していますが、個々の細胞が、ほぼ均一な、酸素濃度対
酸素吸着度曲線を持っているという、前記と同様な結果
が、より短い、数分という時間領域で示されています。

現在まで、個々の赤血球が同一の酸素吸着曲線を持つ
ことは予想されていましたが、それが、実験結果として
示されたのは、私が知るかぎり、これが初めてのことで
あり、これは、マルチ・チャンネル・フォトダイオード
を使用した顕微分光法の、高い空間分解能と、全波長同
時測定という特徴により、始めてなし得たものだと考え
られます。

この全波長同時測定という特徴は、例えば、脈搏等によ
る、時間変化をもつ系の測定に、特に威力を発揮しま
す。この説明として、多少我田引水的な例を考えてしま
しょう。図13に波長掃引式の従来の分光器を、又、図14

図11 鎌型赤血球が示す不連続な酸素吸着度曲線の例. この様な変化は、顕微分光法の高い空間分解能により初めて検出できる.

図12 フローセルを利用した、酸素の脱吸着の実験. 矢印の示す時刻に、酸素を含んだ外液と含まない外液を切換えました. 試料は正常赤血球を使用. ほぼ同一の脱吸着曲線を示しています.

図13 掃引型分光光度計模式図。

図14 今回の測定に使用したマルチ・チャンネル分光光度計模式図。光源の白色光は、光ファイバーにより試料に導かれ、透過光は検出用の光ファイバーにより分光器に導かれます。回折格子分光器の出力スリットの位置にスリット型のマルチ・チャンネル・フォトダイオード・アレイがあり、スペクトルはここで電荷量に変換・積算されます。積算されたスペクトルはタイミング回路で順次読み出され、ミニコンピュータにインターフェイスされているアナログ・デジタル変換器により数量化されて記録されます。フォトダイオード・アレイの感度のバラツキ、光源の特性、光ファイバーの透過性、分光器の中央からのズレによる強度の差等の装置の特性は、ミニコンピュータにより、試料のない場合のスペクトルで規格化して補正します。

に全波長同時測定の、マルチ・チャンネル分光光度計を示します。図15のなかで、各曲線は、 t_1 から t_6 で表示されている時刻における、透過光などのスペクトルで、例えば、脈搏や細胞の運動などによって、大きさは変化していますが、その形は、すべて相似形で変化はしていません。この様な系を、一時に一つの波長しか測定できない分光器で測定する場合をシミュレートしてみましょう。時刻 t_1 に波長 λ_1 の値を測定したとしましょう。この結果として得られる曲線は、同図、下に示されている

ように、実際とは、かけ離れた、歪んだものになってしまいます。全波長同時測定の場合には、図中の全ての曲線の平均が測定されることになり、歪のない、正確なスペクトルを得ることができます。

図16は人間の皮膚に白色光を当てその後方散乱光（後方散乱といっても、散乱体に届くまで、そして、散乱されてから検出されるまでに通過する組織による吸収がみられる）のスペクトルを求めた例で、入射光と人体からの散乱光は直径 1mm の光ファイバーにより導入及び検

出されています。この例は、被験者が呼吸を一時止めて、停止した時刻から、1秒ごとに、40本測定したスペクトルを10秒ごとに示したもので、図から時間に伴う酸素吸着度の変化が明確に読取れると思います。このような系は、心臓の鼓動にともない、組織中の血液量が変動し、吸収スペクトルの強度に経時変化が予想されますが、全波長同時測定では、歪のない測定が可能になるわけです。

さて、レーザー光散乱に話を戻しましょう。図17に示したのが、酸素をゆっくり吸着していく赤血球から測定された、散乱光強度の自己相関関数です。ここで横に示されている数字は、散乱実験の直前に吸光スペクトルを測定して決定した酸素吸着度です。図の上半分は正常な赤血球より測定されたもので、酸素吸着度によって大きな変化は現われていません。図の下半分は鎌型赤血球よ

図15 全波長同時測定法と掃引型測定法の違い。上図は時刻 t_1 から t_5 まで強度のみが変動している透過光スペクトルの例。 $t_1 \sim t_5$ の各時刻に $\lambda_1 \sim \lambda_5$ という様に掃引して得られるスペクトル（図中の黒丸）と全波長同時測定で得られるスペクトル（実線）を下図に比較する。掃引型ではスペクトルに大きな歪みを生ずる点に御注意下さい。

図16 マルチ・チャンネル分光光度計で測定した指の吸収スペクトル。縦軸は透過光度計。息を止めて一秒間隔で測定した40本のスペクトルから、（下から順に）停止後1, 10, 30, 40秒後のスペクトルを例示してあります。ヘモグロビンによる吸収帯（50～600 nm）が、540と580 nmにピークを持つ酸化型のスペクトルから560 nmにピークを持つ還元型に移行していくのが良く判ります。630 nmにある吸収は光ファイバーによるものです。

図17 単一赤血球からの散乱光強度の自己相関関数。顕微分光法により決定された、その赤血球の測定直前の酸素吸着度が図右に示されています。

り測定されたもので、酸素の吸着度により大きな変化が見られます。まず酸素吸着度の低い領域を見てみましょう。A₁ 及び A₂ と表示されている自己相関関数曲線は、全く緩和を示していません。実際、図には示してありませんがこの自己相関関数の base line (C(∞)) も同じ高さであり、時間により変化がないこと、言葉を変えて言えば、散乱光に統計学的以外の「揺らぎ」がないことを示しています。これは、先に述べた $|k_s|L \ll 1$ に対応しており、全ての粒子（ヘモグロビン）がトラップされて動いていないことを示しています。今の鎌型赤血球の場合に考えられるトラップのメカニズムは、重合体が大きくなり過ぎて赤血球の膜に達してしまい動けなくなることが、最も容易に想像されることで、又、この考え方は、これまで顕微鏡や電子顕微鏡を用いて観測されてきた事象と良く一致します。ここで注意して頂きたいのは、「動いていない」という表現は正確ではなく、 $|k_s|^{-1}$ という分解能で観測する限り、動きは無視できるということです。今の測定条件では $|k_s|^{-1}$ はおよそ 3000 Å です。従って、A₁, A₂ の赤血球内のヘモグロビンは 3000 Å に比べて無視できる動きしかしていないということになります*。

* 以後、常に「動き」には「3000 Å に比べて無視できない動き」という言葉を置き換えて読んで下さい。

ここで、どうして膜の中のヘモグロビンの動きが見えるのか簡単に説明しましょう。細胞に含まれているもので光散乱の原因になる要素は大きく分けて、膜や細胞内のサイトスケルトン等の動きまわらない構造要素と、ヘモグロビン等の細胞内を移動できる構成要素の2つに分けられます。大きな要素からは散乱される光の量も大きいのですが、散乱光のうち「揺らぎ」に寄与するのは動いている散乱体からの散乱光だけです。したがって、この散乱光の揺らぎを調べる事により、細胞内の運動している粒子の情報を取り出すことができるわけです。

図中、酸素吸着度の増加 (A₂→B→C₁) に伴う相関関数の緩和成分, C(0)−C(∞) の増加として測定される散乱光の揺らぎの増加は、動き得る散乱体の増加（正確に言えば動き得る散乱体からの散乱光の増加）に対応していると考えられます。実際、(39) 式を使って計算される全

図18 単一の鎌型赤血球の散乱光強度の自己相関関数より決定された拡散係数(上)と運動している散乱体(源)からの規格下された散乱強度(下)。図中領域Aにおける値のばらつきは、緩和成分(下図)が小さく、S/Nの悪さに起因するもので、その値の信頼度は余り良くありません。酸素吸着度の上昇に伴ない、自由に動くことのできる粒子の数が増加し(下図)、又その大きさの小さくなること(上図)が明確に読み取れます。これは観測下にある赤血球内部でヘモグロビンの重合体が解離していく過程に対応しています。

体の散乱光強度中に動いている粒子に起因する散乱光の占める割合が、次の図18に示されていますが、ここに、明確に、動き得る粒子の増加を見ることができます。従ってこの酸素吸着度の領域では、巨大な重合体が分解して、動くことのできる散乱体ができ、増加していくことがこの測定により明確に示されていることになります。

更に酸素吸着度が増加すると ($C_1 \rightarrow C_2$)、今度は相関関数の緩和成分の減少が見られます。この領域では、重合体が分解していき、最後にはほとんどがモノマー (単量体) にまで解離することが知られています。この緩和成分の減少は、図18に見られるように、動き得る散乱体からの散乱光の減少に対応しており、したがって、動き得る散乱体の大きさが減少したことに対応していると推論できます。2つの粒子が一緒に動いている重合体 (ダイマー) を考えてみましょう。この2つの粒子の位置は常に同一と考えることができますから、2つの粒子からの散乱光の位相差は非常に小さくなり、その結果、散乱光の電場は2倍となり、従って強度は4倍となります。n量体に重合すれば、1個の単量体の n^2 倍、n個の単量体の総和のn倍の散乱光強度が得られます。このように、重合体の散乱強度は重合度が大きければ大きい程大きくなるのが判ります。したがって、すべてのヘモグロビンの重合体 (単量体をも含めて) が動き得る場合には、散乱光の揺らぎの大きさは、膜などの動きのない物を基準にした、動き得る粒子からの散乱光の大きさに対応しているわけです。以上の説明から、酸素濃度領域 $C_1 \rightarrow C_2$ における散乱光の揺らぎの減少が、ヘモグロビン重合体の解離に対応していたことが御理解いただけると思います。

以上の結果は、数時間にわたる、非常にゆっくりした酸素分子のヘモグロビンへの吸着の過程を測定したもので、定常状態における測定と考えられます。この測定は、従って、測定時間約20秒 (顕微鏡レーザー光散乱) と約3秒 (顕微分光) という、この二つの測定手段の特徴を十分に生かしているとは言えません。又、実際の生体内での血液循環による酸素脱吸着の周期は15秒程度と考えられており、又、体内の赤血球は平衡状態にあるとは保証されていません。この点を追求するために、フローセルを使用した、一回の脱吸着の周期が数分という実験も行い、ほぼ同様な結果を得ていますが、二つの測定手段の紹介と解説という今回の目的では、あまり重要ではありませんので、省略させていただきます。

“ま と め”

以上、顕微鏡レーザー光散乱法についての簡単な解説

と細胞等に応用するための拡張、および、マルチ・チャンネル・フォトダイオードを利用した顕微分光法を用いた細胞計測の例として、赤血球、特にカマ型赤血球への応用について述べてきました。ここでもう一度強調しておきたい点は、これ等の光学的な測定法が非破壊的であるという点と、高い空間分解能により、個々の細胞を別々に測定しているという点です。ここで例として示された赤血球は、それぞれ、何回もくり返して測定されており、それが、ここで示されたような、個々の細胞の個体差を明確に示しているという点に、空間分解能の高い、非破壊的な実験の重要性があります。

又、ここで述べました赤血球に対する応用は、MITで行った、微小ゲルの弾性率測定⁹⁾、ニワトリのレンズの分化および発生過程の測定¹⁰⁾、その他の細胞¹¹⁾についての実験等の応用の一つにすぎません。このなかで、上記のレンズの発生過程についてのプレリミナリーな実験は、Nature 誌の、“news and views” のなかで取りあげられ、その非破壊性より“Gentle hands of Physicist”として紹介されました。この実験は、未分化のレンズ表皮細胞が、レンズ特有の蛋白を合成しつつ分化していく様子を測定したもので、未分化の、オルガネラ等の巨大粒子 (測定された大きさは、約6000 Å) が主に存在している状態から、レンズ蛋白 (同~50 Å) が合成され、蓄積されていく状況を測定したもので、この実験法が、オルガネラ等と蛋白粒子が共有する系にも適応できることを示しています。

“最 後 に”

ここで述べました装置及び実験は、私が MIT および BU に在席しました、1980~1985までの間に、MIT の田中豊一教授の研究室において、作製、実験を行ったもので、全ての装置は、PDP-11/73ミニコンピュータに接続され、Unix-V. 65 のもとで作動していました。この間、ボスである田中教授はじめ、同僚であった、孫召棠博士に非常にお世話になりました。又、この赤血球の問題を持込み、上記の装置作製の動機を作ったのは、当時、フィラデルフィアのハーネマン大学にいらした、S.T. Ohnishi 先生であり、Unix, C. などの私の先生は、当時 MIT の大学院生だった G. A. Swislow 氏であり、赤血球の実験は、J. A. Peetermans に行ったもので、彼女の博士論文になったものです。

ここで使用した赤血球は、カマ型赤血球患者のボランティアの女性の他、Joyce および、私のもので、特にJoyce は、指が穴だらけ (おわりのように、この実験に必要なのは、数千個の赤血球ですので、一滴の血液で

も十分すぎますので、指をつついて血を出していたわけです。)になる程、熱心の実験を行ってくれました。

この機会をかりて、皆様にお礼申しあげます。

文 献

- 1) G.B. Benedek: Polarization, matter and radiation; Presses Universitaires de France, Paris (1969).
H.Z. Cummins and H.L. Swinney: Progress in Optics; Volume 8, Ed. E. Wolf, North Holland Publ. Co., Amsterdam (1970).
- 2) T. Tanaka, A. Hocker and G.B. Benedek: Spectrum of light Scattered from a viscoelastic gel; J. Chem. Phys. **59**, 5151-5159 (1973).
I. Nishio, S.-T. Sun, G.A. Swislow, and T. Tanaka: First observation of the coil-globule transition in a single polymer chain; Nature, **281**, 208-209 (1979).
V. Taratuta et al.: Light scattering study of a polymer nematic liquid crystal; Phys. Rev. Let. **55**, 246-247 (1985).
- 3) N. Ostrowsky et al.: Exponential sampling method for light scattering polydispersity analysis; Optical Acta. **28**, pp. 1059-1070 (1981).
- 4) T. Maeda, and S. Fujime: Quasielastic light scattering under optical microscope; Rev. Sci. Instr. **43**, 566-567 (1972).
R. Johnson: Laser Doppler microscopy; Eds. J. Earnshaw and M. Steer, Plenum. Press. New York (1983).
- 5) I. Nishio, J. Peetermans and T. Tanaka: Microscope Laser Light Scattering Spectroscopy of single biological cells; Cell Biophysics, **7**, 91-105 (1985).
- 6) Pauling et al.: Sickle cell anemia, a molecular disease; Science **110**, pp. 543-548 (1949).
V. Ingram: A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle cell anemia hemoglobin; Nature **178**, pp. 792-794 (1956).
- 7) C.M. Smith: The irreversibly sickled cell; Am. J. Ped. Hemat. & Onc. **4**, pp. 307-315 (1982).
S.T. Ohnishi: Inhibition of in vitro formation of irreversibly sickled cells by cepharanthine; Br. J. Haematol. **55**, pp. 665-671 (1983).
- 8) J. Peetermans, I. Nishio, S.T. Ohnishi and T. Tanaka: Light scattering study of depolymerization kinetics of sickle hemoglobin polymers inside single erythrocytes; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 352-356 (1986).
- 9) T. Tanaka, E. Sato, Y. Hirokawa, S. Hirose and J. Peetermans: "Critical kinetics of volume phase transition of gels" *to be published*.
- 10) S.-T. Sun, T. Tanaka, I. Nishio, J. Peetermans, J. Maizel and J. Piatigorsky: Direct observation of δ -crystalline accumulation by laser light-scattering spectroscopy in chicken embryo lens; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 785-787 (1984).
- 11) T. Tanaka: 私信.