生体情報計測のためのヒト由来生体試料の高感度極微弱発光検出 およびスペクトル分析[†]

小林 正 樹*・宇 佐 史*・稲 場 文 男**

Highly Sensitive Detection and Spectral Analysis of Ultraweak Photon Emission from Living Samples of Human Origin for the Measurement of Biomedical Information

Masaki KOBAYASHI*, Masashi USA* and Humio INABA**

Ultraweak photon emission originating from living systems and organisms is generally called biophoton emission and has known to occur naturally in conjunction with various vital processes of life. The aim of our study is to develop new techniques for biomedical measurements and analyses based on highly sensitive detection and characterization of biophoton emission from living samples of human origin. In this paper, we report the fundamental techniques and instrumentation developed newly for the measurement of ultraweak photon emission intensity and its spectral distribution together with basic characteristics of ultraweak photon emission from blood plasma, urine, sputum and breath samples taken from various subjects.

Key Words: biophoton, ultraweak photon emission, blood plasma, urine, sputum, breath

1. はじめに

生物は全て肉眼では視認できないようなきわめて弱い光を常に発しながら生命を営んでいることが近年漸く認められるようになってきた。「生物フォトン」(biophoton)現象¹⁾と総称されるこの種の発光は、生体内における日常的な様々の生理代謝活動に伴う生化学反応過程で生じる励起分子種にその起源をもつものであり、発光強度はおよそ 10^{-15} W/cm² 以下である。そのため、この現象は微視的には化学発光(chemiluminescence)の範疇に入るが、ホタルなどに代表される生物発光とは、分子進化の過程で特異化したと思われる特殊の発光物質をもたないこと、発光収率がかなり低いなどの点で大きく異なる。また、生体表面温度や環境温度での可視波長域付近の黒体放射強度は、一般に生物フォトン発光強度より2~3桁以上も弱く、このような熱平衡系の温度放射と

は本質的に相違なるものである。この発光現象は生物界全般にみられる現象であり、様々な生命現象や生体活動に密接に関連して観測されること、さらに生体系を構成する種々の階層構造(系、器官、組織、細胞、細胞小器官、体液、生体構成物質など)において検出されるということが明らかとなってきた^{1)~6)}。

本報では、このような生物フォトン現象と深い関わりをもつ、ヒト生体から採取した試料の極微弱発光強度とスペクトル特性の測定結果と、それらに基づく新しい生体情報の抽出、特に生体の生理活性や病態などに関する情報の定量的な把握という新しい生体計測への応用の検討について述べる。

2. 生物フォトン発光の特徴および発光機構

生物フォトンとは外部からの光による励起やそのほかの物理的、化学的な刺激、操作をいっさい加えないありのままの状態ですpontaneouslyに発生する発光現象であり、微視的にみると生体内での生化学反応によって生じた励起状態にある分子種が基底状態に遷移する際に光としてエネルギーを放出する過程に基づいている^{1)~4)}。通常その多くが生体内で産生される酸素分子種による酸化反応を起源

[†] 光学連合シンポジウム京都'92で発表(1992・9)

* (株)生体光情報研究所 山形市大字沼木字車の前 683

** 東北工業大学 仙台市太白区八木山香澄町 35-1

* Biophotonics Information Lab., Yamagata

** Tohoku Institute of Technology, Sendai

(Received January 5, 1993)

とするものであり、酸化代謝反応過程での活性酸素種やフリーラジカルの産生と、その際の生体物質の酸化、過酸化過程などに付随して観測される場合が一般的に多い。脂質過酸化反応を例にとると、生体内で内的あるいは外的要因で発生した活性酸素(ヒドロキシラジカルなど)が開始剤となって脂質ペルオキシラジカルや脂質ヒドロペルオキシドが連鎖反应的に生成されるが、その際ペルオキシラジカルの 2 分子反応により、励起カルボニル分子や励起一重項酸素分子が形成される(Russel 機構)⁴⁾。また、励起一重項酸素分子がさらに不飽和化合物と反応することによってジオキセタンを生成し、その開裂によっても励起カルボニル分子を生じる⁴⁾。これらの励起分子種や、それらからのエネルギー移行により励起された蛍光性物質が蛍光種となる。

このほか、生物フォトン発光現象には、励起分子種と電子供与性蛍光物質との間での電子の授受による電荷移動錯体の形成(電荷分離)と電荷消滅を経た蛍光物質の励起(CIEEL 機構)など、エネルギー移行を含む複雑な反応過程に基づいて、複数の蛍光種が関与することが、スペクトル分析などの結果から示唆されている^{5),6)}。また、異分子間でなく同一分子内での電子移動、電荷分極による蛍光性基の発光などもあるものと考えられている。これらの発光反応過程は、ホタルや発光バクテリアなどのような主として酵素反応による、固有の発光種と発光機構をもつ生物発光とは発光量子収率の点で大きな差異があり、生体内の通常の生理代謝機能とそれらの状態の変化などを司る生化学反応に本来的に起因しているものといえる。

近年諸種の疾患に関連して、脂質、核酸、酵素、タンパク質などへの酸化修飾による生体機能障害や発ガンのプロモータとしての活性酸素種やフリーラジカルの関与が注目されているが、これらの作用や過程が生物フォトンの発生にも多かれ少なかれ反映していると考えられることができる。たとえばマウスやラットの臓器や細胞、血液からの生物フォトン発光強度の増加が紫外線や放射線照射、あるいは過酸化脂質、発ガン物質の投与などの酸素雰囲気下におけるストレス状態を招来するような条件において認められる⁷⁾⁻⁹⁾ことや、加齢に伴う各種臓器の極微弱発光の増大、老化ラットでの老化色素リポフスチンの増加との相関¹⁰⁾⁻¹⁴⁾などが報告されている。また、ラット心筋を用いた虚血再灌流障害の実験では、虚血再灌流時に発光が増強する様子が *in vivo* で実時間計測⁹⁾されるなど、老化と活性酸素、フリーラジカル、過酸化脂質の関連性において興味深い知見が得られている。生物フォトン発光はこのような生体の酸化的ストレス状態、すなわち活性酸素種やフリーラジカルの産生と生体の抗

酸化機能の間のバランス状態が不均衡になるような様々な過程で検出されることが一般的に多いということがいえる。

3. 極微弱発光の計測およびスペクトル分析方法

本実験には極微弱発光強度とその時間的推移を計測するための極微弱発光強度計測装置、および発光スペクトルを分析するための極微弱発光分光計測装置を試作して用いた。極微弱発光検出には光電子増倍管(PM)を検出器とした単一光電子計数法(通常光子計数法と略称する)が最適であるが、生物フォトン発光の波長領域は普通可視域を中心に紫外域から近赤外域までの広い範囲にわたるため、対象となる試料の発光波長分布特性を把握した上で、それぞれに適した波長感度特性をもち、検出感度を決定する主要因である性能指数⁷⁾⁻¹⁰⁾の良い PM を選定して使用した。

また生物フォトン発光は通常 2 次元的な広がりをもった面発光として観測され、そのスペクトル分布は一般的にブロードで高い波長分解能は要求されないことから、発光スペクトル計測には広い受光立体角をもち、かつ透過特性のできるだけ良好な、複数枚の色ガラスフィルタの組合せによる分光法^{7),8)}を採用した。本実験では約 250~850 nm の波長域にわたる 37 枚の短波長シャープカットオフ特性をもつ色ガラスフィルタを用いてその透過光強度を順次単一光電子計数法によって計測し、その差分計数値より発光スペクトル分布を解析した^{10),11)}。試作したフィルタ差分方式生物フォトン発光スペクトル分析装置のブロック図を Fig. 1 に示すが、2 種類の異なる波長感度特性をもつ PM(R 1333, R 375: 浜松ホトニクス(株)製、波長領域はそれぞれ 300~900 nm, 160~650 nm)が装着してある。スペクトル分布算出方法のフローチャートおよびスペクトル分布導出過程を模式的に表わした図をそれぞれ Fig. 2 および Fig. 3 に示す。フィルタは回転円盤上に配置されており、1 回転ごとに各フィルタの透過光強度と測定波長領域全体の発光強度のカウント数および暗電流パルスのカウント数が記録される。実際の測定データ群(Fig. 3(a))から、全体の発光強度および暗電流のカウント数をそれぞれ時系列的に図示したのが Fig. 3(b)であるが、まずこれらのデータに対しあらかじめ測定してある各色ガラスフィルタに固有のバックグラウンド強度の差し引きを行い、その上で発光強度の時間変化および暗電流のドリフトを補正する。つぎにそのデータの積算平均処理を行い、Fig. 3(c)のようなヒストグラムを得る。その後、隣接する色ガラスフィルタ間のカウント数の差分値を順次計算すると Fig. 3(d)のようになり、さらに(e)に示したような PM の波

Fig. 1 Block diagram of the filter-differential type biophoton spectral analyzer system

Fig. 2 Flow chart for extracting the spectral information in the filter-differential type biophoton spectral analyzer system

Fig. 3 Schematic illustrations of the data processing in the filter-differential type biophoton spectral analyzer system

長感度特性に対する校正を行うと Fig. 3(f) のようなスペクトル分布を表わすヒストグラムが求められる。さらに、必要に応じてスペクトルパターンとして視覚化するために、色ガラスフィルタの透過特性の差分によって与えられる Fig. 3(g) のようなウインド関数を用いて (f) の結果のコンボリューション処理を行うと、Fig. 3(h) に模式的に示したようなスペクトル分布が算出される。なお、試作した装置の波長分解能は各フィルタのシャープカットオフ特性より、300~700 nm の範囲で約 20~30 nm、それ以外では約 30~50 nm である。

4. ヒト由来生体試料からの極微弱発光の検出とスペクトル分析

生物フォトン発光現象を生体計測や臨床検査に応用するため、ヒト生体から採取した各種試料を用いて、種々の疾患や生理状態などとの関連性について検討を行った。Table 1 は本実験で取り上げる各種の生体試料からの極微弱発光強度の概略値とその発光波長特性をまとめたものであるが¹²⁾、以下におおの試料について個別的に述べる。

4.1 血液

血液や血漿の極微弱発光現象は、比較的早い時期から知られており、臨床応用の検討が行われてきた。肝・胆道系の疾患では極微弱発光強度が高い傾向を示すことなどがこれまでに報告されている¹³⁻¹⁴⁾。また紙巻タバコ喫煙者の血漿の発光が非喫煙者に比較して高値を示す¹⁵⁾ことなども観測されており、タバコの煙中に含まれる不安定なフリーラジカルや分子種が極微弱発光の高値に寄与していると推察されている。

Fig. 4 は血液透析患者と健康人の血漿の発光強度の比

較であるが、血液透析患者において有意に高い極微弱発光強度が認められた^{10),12),14)}。両者ともに喫煙習慣についての区別は行っていないが、健康人で高値を示した例はいずれも喫煙者である。慢性腎不全患者における活性酸素消去能の低下などその酸化ストレス傾向を示すデータが近年報告されており¹⁵⁾、発光強度の高値はそのような状態の反映であるとも推察される。Fig. 5 は両者の発光スペクトル分布の比較であるが、血液透析患者血漿は相対的に 500~700 nm 付近の波長領域での発光強度が高いという傾向が認められた。

Fig. 6 は健康人血漿の酸素およびアルゴン雰囲気下での発光スペクトル分布、また Fig. 7 はアルカリ性条件下での血漿およびビリルビン IX の発光スペクトル分布を比較したものである。血漿では酸素雰囲気下やアルカリ性条件下で 670 nm 付近のピークが特異的に増強するこ

Fig. 4 Comparison of ultraweak photon emission intensity of blood plasma samples taken from hemodialysis (HD) patients and normal subjects

Table 1 Comparison of ultraweak photon emission intensities and spectral characteristics of typical biomedical samples of normal (healthy) human origin

SAMPLE	EMISSION INTENSITY			SPECTRAL RANGE (PEAK WAVELENGTH) (nm)	MEASUREMENT CONDITION
	(counts/10 s) ⁺	($\times 10^3$ photon/s) ⁺⁺	($\times 10^{-16}$ W) ⁺⁺		
BLOOD PLASMA	800~1500	2.2~4.1	7.0~13	500~700 (530*, 630*, 670)	Non-smoker, 2.5 ml
URINE	300~1500	0.9~4.4	2.8~14	450~650 (490, 530*, 630)	2.5 ml
SPUTUM	2000~10000	5.8~28.8	19~90	450~700 (530*, 610, 670)	1 g
SALIVA	400~800	2.4~4.9	8.6~17	450~650 (530*, 610)	2.5 ml
BREATH	400~600	—	—	—	1.8 l/min.
HUMAN BODY SURFACE	500~800	—	—	500~700 (550, 630~670*)	Finger tip, 2 cm diameter

* At peak wavelength.

⁺ Obtained from actual measurements.

⁺⁺ Obtained from emission spectra after correction for light collection efficiency.

と、さらにこのピークはビリルビンのアルカリ性条件下での化学発光スペクトルと良い一致を示すという結果が得られた。またそれ自身の発光が検出されない中性のビ

Fig. 5 Ultraweak photon emission spectra of blood plasma samples taken from HD patient and normal subject

Fig. 6 Ultraweak photon emission spectra of blood plasma sample taken from normal subject under oxygen and argon gas atmospheres

Fig. 7 Ultraweak photon emission spectra of blood plasma sample and bilirubin IX under an alkaline condition (pH 12)

リルビン溶液を血漿に添加することによっても、極微弱発光強度が増加し、670 nm にピークをもつ発光スペクトル分布が観測された。酸素雰囲気下でない通常の状態での血漿試料に見られたほかの発光ピークについては、それらがどのような発光機序に基づくものかまだ明らかでないが、リポタンパクやアルブミンの酸化と関連したビリルビンなどの生体色素が関与しているものと推察される。

4.2 尿

尿は代謝の最終産物であり、また臨床試料として採取しやすいという利点がある。これまでに尿路感染症や急性・慢性膀胱炎、化膿性扁桃腺炎など炎症性疾患を有する患者でその極微弱発光強度が健康人と比較して2倍以上高い傾向が報告されている^{3),4)}。またウロビリノーゲンとの相関やC反応性タンパク試験(CRP)値との相関も得られている。喫煙習慣との関連性においては、血漿と同様に喫煙者群で発光強度の高値傾向も測定されている^{3),4)}。しかしその値は濃度やpHなどに対する依存性を有しており、これらの条件を揃えるための前処理あるいはデータの補正などが必要になると考えられる¹⁶⁾。

Fig. 8 に健康人から採取した尿のスペクトル分布の測定例を示す。Fig. 5 に示した血漿に類似した分布となっているが、血漿でみられたような酸素雰囲気下での特徴的な変化、とくに670 nm 付近のピークの顕在化は認められなかった。また、同一健康人について採取尿の経時的なスペクトル測定も行ったが、濃度に依存して発光強度の強弱はあるが、スペクトル分布の顕著な変化は観測されなかった。

4.3 喀痰

顆粒球やマクロファージは細菌や異物の侵入の際の食食時に極微弱発光を呈する。これは殺菌、すなわち生体防御を目的とした活性酸素種の産生に由来するもので、その発光スペクトル分析等から発光機序や発光種についての研究も比較的详细に行われている¹⁷⁾。喀痰に含まれ

Fig. 8 Ultraweak photon emission spectrum of a urine sample taken from normal subject

るこの種の細胞成分は、肺や気管支などの炎症状態を反映していると考えられることから、その極微弱発光特性について検討した。

Fig. 9 に、喀痰の典型的な発光スペクトル分布を唾液の測定結果と比較して示す。発光強度ならびにスペクトル分布の両者について差異が認められる。炎症や感染症との関連性において、食道癌患者の摘出手術後の喀痰を経日的に採取して行った測定では、術後感染による発光強度の増加を示すデータが得られている¹⁰⁾。また、喫煙後の喀痰の発光強度の高値などの測定結果も報告されており¹⁸⁾、タバコ煙に含まれるフリーラジカル種などが発光に関与しているものと推定される。喀痰中の発光に寄与する細胞成分、構成成分の分析など今後の課題もあるが、試料の採取や測定が容易であることから早期の臨床診断法としての応用の可能性は高いものと考えられる。

4.4 呼吸

Fig. 9 Comparison of ultraweak photon emission spectra of sputum and saliva taken from normal subject

Fig. 10 Temporal changes of ultraweak photon emission intensity of expiration from normal subject and minute ventilation (VE) during exercise with a bicycle ergometer between rests

呼吸中には代謝に関連して排泄される種々の微量成分が含まれており、極微弱発光の観測が報告されている^{9),18),19)}。その発光には生体内で産生される活性酸素種やフリーラジカルが関与するものと考えられるが、ここでは呼吸による生体内部の酸化的ストレス状態などの定量的な把握を目的として行った。過度の運動負荷時の呼吸極微弱発光強度の測定結果について述べる。過度の運動負荷時には血漿中の過酸化脂質の増大や脂質過酸化物の分解生成物である低級炭化水素の呼吸中濃度の増加などが示唆されており、その機序としては心機能の低下による組織内での酸素濃度の低下、虚血状態による電子伝達系からの電子の漏出と活性酸素種の産生に由来するものと考えられている²⁰⁾。

Fig. 10 は運動負荷時およびその前後の安静時における呼吸の極微弱発光強度と換気量の経時的な推移を図示したものである。被験者は健康な 20 歳代の男性であり、運動負荷時は anaerobic threshold を越える状態で約 15 分間にわたって継続して行っている。運動継続中の発光の漸増傾向や運動終了直後の発光の高値の持続に特徴がみられ、極微弱発光強度と換気量の間には経時的なヒステリシスの存在が認められた。これは過度の運動負荷に起因する呼吸の遅延的な極微弱発光の発生を示すものといえる。

脂質過酸化との直接的な関連性については今後の詳細な検討が必要であるが、この計測法により実時間での動的な生体系の変化、応答に関する新たな情報が得られることから、今後スポーツ医学的な面のみならず、種々の疾患や生理状態に関する有効な計測・診断への応用が可能であると推定される。また直接採取した呼吸ガスそのものだけでなく、冷トラップによる被濃縮成分についてもその極微弱発光が観測されており¹⁸⁾、発光成分を分析する上での効果的な手掛かりを与えるものである。

5. おわりに

本文では生体より採取した各種の試料からの極微弱発光の生体情報計測への応用の検討について記述した。各試料の個別的な発光機序については未解明の点が多く、今後の臨床データの多面的な蓄積と分析が必要と考えられるが、本計測法は生体のグローバルな健康状態とそれからの偏移(不調など)を把握するために有用な新しい生体光情報をもたらすものと判断される。このような生きたまま、ありのままの状態での生体、あるいは組織や細胞などについて、生物フォトン検出による「生

の]情報の特徴的抽出・定量化を行う技術の研究・開発は今後の高齢化・高福祉社会の進展に伴って一層重要になるものと思われる。そのためには、光検出素子や光検出系の高性能化に基づく、生物フォトン発光およびそのスペクトルの空間的・時間的動態の計測技術と生物フォトン情報の解析・応用技術の追究・展開が不可欠であり、ハードとソフトの両面からの相互補完的アプローチが必須であるといえる。

生物フォトン計測は特殊な前処理技術や熟練を必要とせず、しかも高感度でかつ再現性良く、多数の試料や検体の測定・分析がリアルタイムで行えるという優れた特長をもっており、今後このような先端的な測定・情報処理技術の実用開発が実現すれば、医用計測・診断にも広汎な応用が期待されるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 稲場文男：生物フォトン，月刊BME(日本ME学会雑誌)，1-8，628/635 (1987)
- 2) 稲場文男：極微弱光計測技術の医学および生命科学への応用，光学，12-3，166/179 (1983)
- 3) 稲場文男：生物フォトンの超微弱発光計測，病態生理，9-2，101/110 (1990)
- 4) 宮沢，稲場：極微弱発光，生物発光と化学発光—基礎と実験—，126，廣川書店 (1989)
- 5) 渡辺，稲場：生物フォトンの生化学—代謝，発光機構，進化—(1)，O plus E，142，112/123 (1991)
- 6) 渡辺，稲場：生物フォトンの生化学—代謝，発光機構，進化—(2)，O plus E，143，139/153 (1991)
- 7) 清水，達，稲場：極微弱な光情報の計測—その基礎と極微弱発光スペクトル分析への応用—，光学，4-3，105/123 (1975)
- 8) H. Inaba, Y. Shimizu, Y. Tsuji and A. Yamagishi: Photon Counting Spectral Analyzing System of Extra-Weak Chemi-and Bioluminescence for Biochemical Applications, Photochem. Photobiol., 30, 169/175 (1979)
- 9) 小林，稲場：極微弱生物フォトン検出法と生体情報計測への応用，呼吸，9-5，543/548 (1990)
- 10) 小林，稲場：極微弱生物フォトンの検出・分析による生体計測，光技術コンタクト，28-12，690/700 (1990)
- 11) 小林正樹：生体試料の生物フォトン検出と生体情報計測，創造科学技術推進事業稲場生物フォトンプロジェクト研究概要集，p. 21，新技術事業団 (1991)
- 12) 小林，稲場：極微弱生物フォトン発光による生体計測，臨床検査，35-6，610/615 (1991)
- 13) B. Yoda, Y. Goto, K. Sato, A. Saeki and H. Inaba: Ultra-weak Chemiluminescence of Smoker's Blood, Arch. Environ. Health, 40, 148/150 (1985)
- 14) 我妻，関野，小林，稲場：透析患者血漿における極微弱発光の測定，腎不全，2-1，81/88 (1990)
- 15) M. Kuroda, S. Asaka, Y. Tofuku and R. Takeda: Serum Antioxidant Activity in Uremic Patients, Nephron, 41, 293/298 (1985)
- 16) 小林，我妻，関野，稲場：生体試料の極微弱発光の測定，腎不全，2-1，73/80 (1990)
- 17) 中野稔：白血球の食作用時の発光，生物発光と化学発光—基礎と実験—，p. 50，廣川書店 (1989)
- 18) 小林，浅井，稲場：ヒト呼吸及び喀痰からの極微弱発光の高感度検出，日本レーザー医学会誌，9-3，527/530 (1988)
- 19) M. D. Williams and B. Chance: Spontaneous Chemiluminescence of Human Breath, J. Biol. Chem., 258, 3628/3631 (1983)
- 20) 小林，浅井，飛田，井上，滝島，稲場：運動負荷時のヒト呼吸極微弱発光特性の測定，日本レーザー医学会誌，10-3，509/512 (1989)

[著 者 紹 介]

小 林 正 樹 (正会員)

1985年，東北大学工学部電気工学科卒業，86年新技術事業団稲場生物フォトンプロジェクトに参加，同研究員を経て，91年山形県テクノポリス財団バイオフィトン研究室研究員，93年(株)生体光情報研究所主任研究員，現在に至る。生物フォトンによる生体計測の研究に従事(工学博士)，応用物理学会，日本ME学会などの会員。

宇 佐 史

1985年，大阪大学大学院医学研究科修士課程修了，同年(株)島津製作所入社，87年新技術事業団稲場生物フォトンプロジェクト研究員を経て，93年(株)生体光情報研究所第1研究室長，現在に至る。生体と光の相互作用の研究に従事。

稲 場 文 男

1951年，東北大学理学部地球物理学教室卒業，同大学院特別研究生(旧制)を経て，57年同大学電気通信研究所助手，65年から教授，90年より同研究所長，92年定年退官し東北大学名誉教授，現在，東北工業大学教授，86年より5年間新技術事業団創造科学技術推進事業稲場生物フォトンプロジェクト統括責任者を兼務。レーザー，光エレクトロニクス，バイオフィotonicsなどの研究に従事(工学博士)，IEEEおよびOSA Fellow，電子情報通信学会(90～92年副会長)，応用物理学会，日本ME学会，日本レーザー医学会などの会員。