

平成14年度 石田(實)記念財団研究発表会資料

生体極微弱発光現象の量子光学的分析法の研究

—生物における自己組織化現象の描出—

小林 正樹

東北工業大学工学部電子工学科
〒982-8577 仙台市太白区八木山香澄町 35-1

1. はじめに

生物の生体内で営まれるさまざまな代謝反応過程で極めて微弱な光が放出されていることが知られている。このような、生体由来の極微弱発光現象を生物フォトン（バイオフィトン；biophoton）と総称する¹⁻⁶⁾。この発光現象はホタルのような生物発光とは異なり、発光スペクトルは可視から近赤外波長領域におよび、また発光強度はおよそ 10^{-16} W/cm^2 ($\sim 10^3 \text{ photon/s}\cdot\text{cm}^2$) 程度以下と、肉眼で検知できる発光強度のおよそ 1/1000 以下である。そのメカニズムは主に代謝反応過程における生体構成物質の酸化的励起に起因するものであり、生理機能の発現やエネルギー代謝に付随して普遍的に観測される。たとえば細胞内ミトコンドリアにおいてエネルギー代謝過程で不可避免的に産生される活性酸素種や、紫外線、放射線、環境化学物質などによる外因的な活性酸素種の産生、あるいは活性酸素種に対しての防御機構としての抗酸化機能の低下による生体の「酸化的ストレス」状態と呼ばれる病態と密接に関連している^{7,8)}。

われわれは、生物フォトンの高感度検出による生体の生理・病病情報の抽出法に関する研究にこれまで携わってきた。生物フォトンによる生体計測は、通常の生体計測法が外部からエネルギーを投入しそれと生体との相互作用により情報を獲得するのに対し、生体内部の化学反応エネルギーにより生ずる極微弱発光を受動的に検出するものであり、その物理的特性を詳細に分析することにより有用な生理情報を抽出することが求められる。これまで極微弱発光の超高感度検出技術を基盤とし、2次元発光画像分析やスペクトル分析技術の研究開発を行ってきたが、最近その分析手法の一つとして極微弱発光の量子統計特性に着目した新しい計測・分析技術の研究に取り組んでいる。光子統計・光子相関分析として従来から光散乱特性の分析などに用いられてきた計測手法を、独自の計測システムと解析アルゴリズムにより極微弱発光現象に適用し、これまでの方法では得られなかった特徴的情報抽出を可能とした。

本報告では、極微弱発光の光子統計・光子相関分析法の原理とその意味、実際の生物フォトン光子統計分析に関する実験、およびこれにより得られた生物の自己組織化や協同現象という、生命現象に特有な振る舞いについての新たな情報抽出法としての可能性について述べる。

2. 光子統計・光子相関分析

2.1 極微弱発光の光子統計・光子相関分析の原理および目的^{9,10)}

半古典論を用いると、光電子増倍管（PMT）光電面において、ある時間 t から微小時間間隔 ΔT の間に 1 個の光電子が出力される確率は、量子効率を η 、時間 t における光強度を $I(t)$ とすると $\eta \langle I(t) \rangle \Delta T$ で与えられる。これは光電子パルスの平均計数値が光強度に比例するという関係を表し、光電子計数法（通常は略して光子計数法）の原理を示す。時間間隔 T の間に光電子数 n 個を計数する確率は

$$P(n, T) = \int_0^\infty P(W) \left[\frac{W^n e^{-W}}{n!} \right] dW \quad (1)$$

で与えられ、光子統計分布（正確には光電子計数分布，光電子統計分布）関数を表す。ここで W は $W = \eta \int_T I(t) dt$ で定義される積分強度であるが、式 (1) はその確率密度 $P(W)$ のポアソン変換の形になっているという特徴をもつ。また、強度相関関数を規格化して、光の2次のコヒーレンス度を

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t) I(t+T) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2)$$

と定義するが、これが光子相関（正確には光電子相関）関数を与える式である。ある時刻 t_1 で光電子パルスを検出しさらに t_2 で検出する条件付き確率を $\tau = t_1 - t_2$ を用いて $P_c(\tau)$ とすると、

$$P_c(\tau) = \eta \langle I(t) \rangle g^{(2)}(\tau) \quad (3)$$

の関係にあることから、連続したパルス時間間隔データから光子相関関数を求めることができる。また光子相関（電場の2次の相関）は、計数値の2次のファクトリアルモーメントに対する2階微分の関係で光子統計分布特性と結ばれている。光子統計分布特性に対する指標として、ポアソン分布からの偏差を光電子計数値の平均値と分散値の比であるファノファクタ（Fano factor）を用いて定量することができる。

$$F_n(T) = \langle \Delta n^2 \rangle / \langle n \rangle \quad (4)$$

光の状態が古典的なコヒーレント状態にあるとき、式 (1), (2), (4) はそれぞれ

$$P(n) = \frac{\langle n \rangle^n e^{-\langle n \rangle}}{n!}, \quad g^{(2)}(\tau) = 1, \quad F_n(T) = 1$$

となり、すなわち光電子事象時系列は、古典的ショット雑音に対応して無相関でありランダムな状態として観測される。一方、インコヒーレントなカオス光（熱放射）の場合は、そのコヒーレンス時間に対応した光子バンチング効果が現れ、 $g^{(2)}(\tau) > 1$ のように正の相関および光子統計分布でのスーパーポアソン特性（ $F_n(T) > 1$ ）を示すことになる。この場合ファノファクタは

$$F_n(T) = 1 + \frac{\langle n \rangle}{M} \left(M^{-1} = \frac{1}{T^2} \int_0^T \int_0^T [g^{(2)}(t_2 - t_1) - 1] dt_1 dt_2 \right)$$

で与えられるが、通常 PMT による計測ではコヒーレンス時間 τ_c が観測時間 T に対し $\tau_c \ll T$ となるため、熱的光源に対してはそのバンチング効果をとらえられず、結果としてポアソン分布として観測される。しかし、発光源が中心極限定理が成立するような圧倒的多数でない場合や、励起過程がここで対象とするような化学反応系のように、系内あるい

は系外からのフィードバックや反応系のマルコフ性が存在した場合、観測される光子放出時間列は光子相関特性を伴って観測される。

たとえば、あるランダムな個々の事象に複数のフォトンが伴うような、ランダムパルス発光を想定した場合、光電子事象はクラスタリング特性を示し、あたかもカオス光にみられたバンチング様の振る舞いを示すと考えられる。このとき、光子統計はポアソン分布ではなくスーパーポアソン分布特性を示し、正の相関特性をもつことになる。前述のファノファクタは、

$$F_n(T) = 1 + \frac{\langle n \rangle}{M} + \frac{\langle \alpha \rangle}{M_p}$$

で与えられる¹¹⁾。ここで M_p は自由度パラメータと呼ばれ、特性遅延時間 τ_p を用いて

$$M_p^{-1} = \frac{2}{\tau_p} \int_0^T \left(1 - \frac{\tau}{T}\right) g_0^{(2)}(\tau) d\tau \quad \text{で与えられる。}$$

また α は $\langle n \rangle = \mu \langle \alpha \rangle T$ 、 $\langle \alpha \rangle = \eta \int_0^{\infty} I_0(t) dt$ により定義される光子多重化因子である。 μ はランダム事象の発生頻度、 T は計測時間、 η は PMT 量子効率である。

2.2 極微弱発光の光子統計分析システムと方法¹²⁻¹⁴⁾

極微弱光領域で光子統計分析を行うためには、光電子増倍管 (PMT) の暗電流やアフターパルスに起因する相関特性を十分把握した上で、それを考慮した入射信号光子の計測、分析を行う必要がある。また発光が微弱であるために計測時間の長時間化が避けられないことから、計測系の高安定化が要求されることはもちろんのこと、対象とする観測時間内での生物フォトン発光強度の経時変化に対する補正が必要となる。試作した検出システムは長期安定性を追求し、PMT をパルス管冷凍機をもつ二重クライオチャンバー内に装着している。PMT から出力される光電子パルスの各隣接パルス時間間隔を時間分解能 12.5ns で連続記録して、測定後に演算処理により光子統計・光子相関分布を求めるという解析手法を開発した。PMT 暗電流には、宇宙線や環境放射線が入射する際の管面でのチェレンコフ光やシンチレーション光の発生、あるいは PMT 本体でのダイノード間の微小放電などに由来すると考えられる相関性暗電流成分があるため、あらかじめ計測した暗電流パルス相関分布を統計的に差引き処理し、光源の光子統計分布特性および光子相関分布特性を導出する。また非定常過程でのファノファクタの導出は、発光強度時間関数を推定し、暗電流の分散値を逐次実測データの分散値から差し引くことによって行うこととした。

3. 生物フォトンの光子統計分析

3.1 細胞性粘菌の分化、形態形成過程における生物フォトン発光

自己複製（細胞分裂，増殖），形態形成（分化），自己修復は，生命現象を特徴づけるキーワードであり，無生物（物質）世界と「生き物」の世界を大きく隔てている。形態形成は，生体を構成するマイクロな要素である細胞が相互に協同してマクロな構造や機能分化パターンを形成することであり，要素間相互作用による自発的な時空間秩序形成という意味で「自己組織化」現象として特徴づけることができる。細胞分化は，多細胞生物の発生過程において，特定の細胞パターンの形成を担う細胞の機能的かつ構造的 specialization であり，一般に分化と細胞の増殖は連関して進行する。ところが，ここで取り上げる細胞性粘菌の場合，増殖期と分化期が時間的に完全に区別されており，周囲に栄養源があるときは直径 10 μm ほどのアメーバ状の単細胞で存在し，二分裂法で増殖を繰り返す（増殖期）が，飢餓状態になると分化期へ移行し，それまで単細胞として独立していた細胞が集合し多細胞体制を確立するという特異な生活環を有する。図 1 (a) に細胞性粘菌の生活環の模式図と各ステージの写真を示す。飢餓ストレスにより増殖期から分化期へスイッチングされた粘菌細胞は，集合して半球体の集合塊（mound）を形成する。これはサイクリック AMP を走化性物質とした走化性によるものであり，一つの集合中心は直径 10mm 程の領域に影響を及ぼし，約 10^5 個程の細胞からなる集合塊を形成する。その後移動体（slug）を経て，さらに胞子とそれを支える柄の 2 種類の細胞型からなる子実体（fruiting body）を形成する。このように，細胞分化が増殖期と明確に区別されて進行すること，極めて単純な分化系を有していること，また実験室での培養やそれらの制御も容易なことから，細胞分化や形態形成，細胞間コミュニケーション，シグナル伝達に関する優れた実験材料として利用されている^{15,16)}。

このような特異な発生プロセスを示す細胞性粘菌の生物フォトン発光を観測すると，細胞分化の各ステージでその発光強度が特徴的な変化を示す^{17,18)}。大腸菌との二員培養により増殖した粘菌細胞を，遠心操作によりバクテリアと分離，洗浄することによって飢餓処理を行った後，約 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞を集め無栄養寒天培地上にまき，直後から生物フォトン発光計測を行った。図 1 (b) は発光強度経時変化の典型的な一例であるが，測定開始後 15 ～ 30 分頃において，生物フォトン発光の一過的増加がみられる。その後発光強度は，約 5 時間にわたって低い水準で推移するが，約 10 時間目頃を最大とするような発光ピークが観測された。約 5 時間目頃発光強度が上昇に転じるころから，細胞集合の流れ（aggregation streams）が顕在化し，10 時間頃発光強度がピークに達するころに集合塊の形成が観察された。飢餓処理後に測定用培地内にフリーラジカル消去剤を添加すると，飢餓処理直後の発光ピークが濃度依存的に抑制されることや，発生異常がみられるなどの実験データが得られており，飢餓処理直後の発光の増強は，飢餓ストレスによって誘導されたミトコンドリア呼吸鎖におけるエネルギー代謝の擾乱が活性酸素種の産生をもたらした結果であると考えられる。またこれは発生を開始するための遺伝子発現を制御するストレスシグナルであるとも推測され¹⁸⁾，極微弱発光強度の経時変化は，分化過程の各ステージでの遺伝子発現，機能発現に伴うエネルギー代謝活性の変化を反映するものと考えられる。

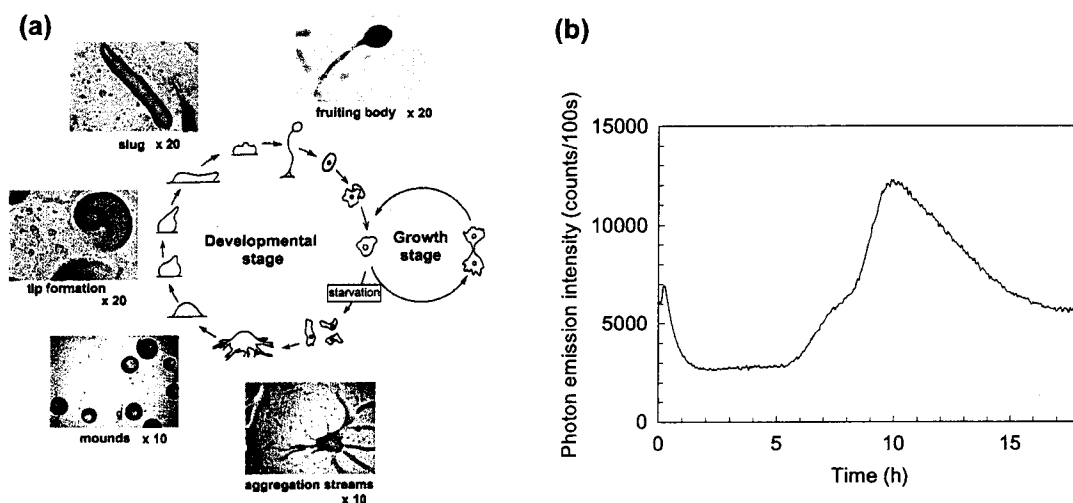


図 1 (a)細胞性粘菌の生活環, (b) 細胞性粘菌分化期における生物フォトン発光の経時変化

3.2 細胞性粘菌の分化初期過程における光子統計特性

飢餓処理直後から最初の発光ピークが現れ、その後発光強度が再び増加するまでの約5時間の間、発光強度は比較的安定し大きな経時変化を伴わないが(図2(a)),そこでの光子統計特性をファノファクタの観測時間特性の経時変化として3次元表示してみると(図2(b)),最初の発光ピークに相当する時間領域では光子統計分布はポアソン特性を示し、その後スーパーポアソン分布特性に変化することがわかった。図2(c)は解析方法の妥当性を検討するために、(b)と同一の発光強度経時変化を示すよう制御した発光ダイオードのファノファクタ特性を同様の手法で求めた結果であるが、全計測時間にわたってポアソン分布特性が得られている。飢餓処理直後の発光増強が前述のように飢餓ストレス応答として現れる細胞呼吸代謝系の変化によるものであるとすると、光子放出事象は個別細胞間で独立でありランダムであるといえる。その後の光子統計のスーパーポアソン特性は、**aggregation stream**の形成に先行した、局所的な細胞間の協同的振る舞いの存在を示唆するものであり、前述の光子放出過程のクラスタリング特性に起因するものと推察される。

形態形成の各段階において分化を誘発するシグナルが細胞内あるいは細胞間でどのように発せられ、伝達・処理されているのかを細胞集団レベルで知ることは、多細胞体制を形成する自己組織化過程を明らかにする上で重要である。細胞内におけるセカンドメッセンジャーとしての細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$)が重要な役割を担っていることはよく知られており、分化に際し細胞質の形態的・生理的变化を誘導するシグナルとしての機能が明らかにされている。遺伝子組替え細胞を用いた、飢餓処理後から形態形成過程における $[Ca^{2+}]_i$ の経時変化に関する報告¹⁹⁾では、形態形成過程全般にわたり生物フォトン発光パターンに類似した発光強度変化パターンが得られていることから、生物フォトン発光は分化シグナルと共役した細胞代謝活性の変化を表しているものと推察される。また集合前段階においてカルシウムウエーブ²⁰⁾として現れる局所的な細胞間の協同性による、カルシウム

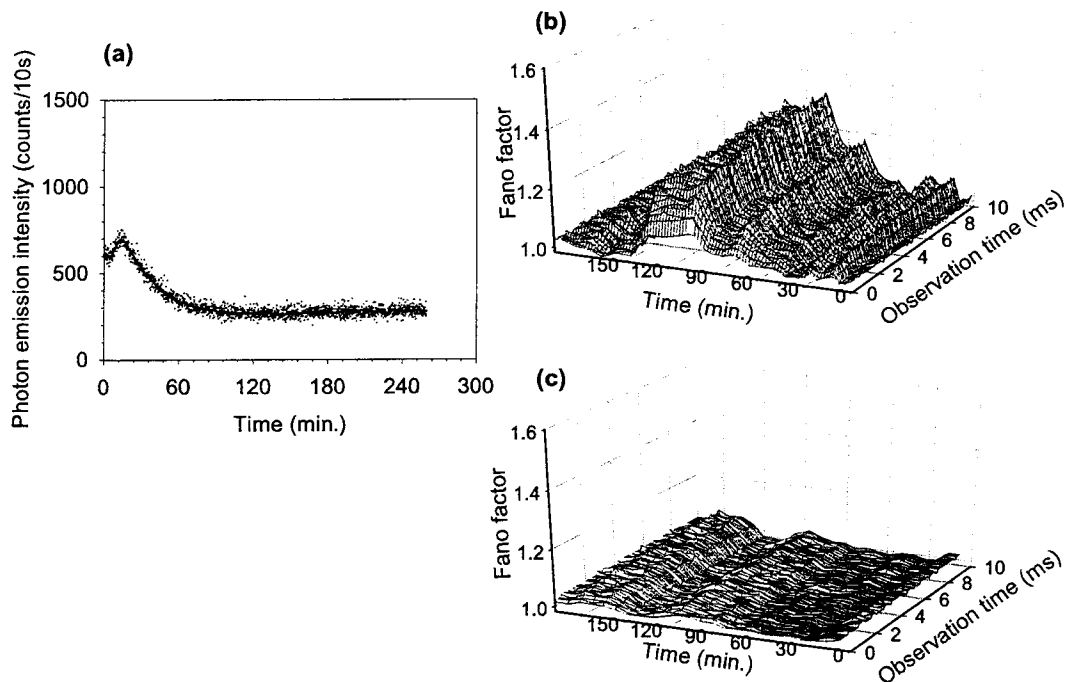


図2 細胞性粘菌発生初期過程における生物フォトン発光の光子統計分析。(a)初期過程における発光強度変化, (b)(a)に相当する時間領域における, ファノファクター-観測時間特性の経時変化, (c)発光ダイオードの発光強度を(a)と同様に变化させた場合のファノファクター-観測時間特性の経時変化

スパイクの発生が知られており²¹⁾, これが生物フォトンのクラスタリング特性の起源になっているのではないかと推察している。つまり局所的に発生した細胞間における相互作用, いわば細胞間コミュニケーションに由来する協同現象を表すと考えられる。

4. おわりに

光子統計・光子相関分析により記述される生物フォトンの量子統計特性は, 従来の計測では得ることのできない生体の細胞間相互作用や調節機能などの高度にかつ複雑に制御された生体の情報を抽出, 特徴化するのに有効であると考えられる。一般に自己組織化とは, 要素間における非線形作用を起源とし, 系(システム)の構成要素・要素群での競合・協調による巨視的秩序形成を意味するが, これは熱平衡状態から遠く離れた非平衡開放系において, 系外からのエネルギーや物質(情報)の流れの中で発生し時間発展する, 動的秩序状態である(散逸構造)。現実の世界が熱平衡状態の「死んだ」世界ではなく, 地球というレベルでの開放系上に存立する非平衡なダイナミックな世界であるように, 自己組織化は生命現象に限らず非生物系においても広くみられる現象である。生物における自己組織化を考えたとき, それは構成要素である部品の相互作用のみによって成立するのか, あるいはそれらを総合する「場」がはじめに用意されていて, その内部要素が組織化されるの

か、DNA の遺伝情報が自己組織化とどのように関わりコードされているのか、また生体系を構成する要素は階層構造を有するが、階層システムにおいて自己組織化がどのように発展するのか、など自己組織化現象のシステム論的・物理的メカニズムは大変興味深い。その解明には、分子生物学に代表される要素還元手法による分析は必須であるが、これと協奏的、相補的にシステム論的視点での生命理解の研究が必要であると考えられる。

われわれは、このような問題意識から、生物フォトンの光子統計特性の分析は、生物の自己組織化過程のダイナミズムに関する特徴抽出に有効であると考えている。ここで紹介した細胞性粘菌による実験は、独立した単細胞集団が多細胞体制を構築する発生過程を対象としたものであり、分化シグナルに関連した生物フォトン発光の光子統計分析が細胞集団レベルでの自己組織化現象に対する新しい情報表現法としての可能性を提示するものである。今後さまざまな生命現象に伴う生物フォトン発光についての量子統計特性分析を行うことにより、新たな生体光計測法の応用技術に発展する可能性を有している。

5. 謝辞

本研究の遂行に対する石田(實)記念財団からの研究助成に対し深謝いたします。

6. 参考文献

- 1) 稲場文男編：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 (新技術事業団, 1992).
- 2) 稲場文男：生物フォトンの計測とその応用 (レーザー技術総合研究所, 1995).
- 3) H. Inaba: "New bio-information from ultraweak photon emission in life and biological activities: Biophoton," *Modern Radio Science 1990*, ed. J.B. Andersen (Oxford Univ. Press, Oxford, 1990), pp.163-184.
- 4) M. Kobayashi, M. Takeda, T. Sato, Y. Yamazaki, K. Kaneko, K.-I. Ito, H. Kato and H. Inaba: *In vivo* imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress," *Neurosci. Res.* **34** (1999) 103-113.
- 5) M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: "Development and applications of new technology for two-dimensional space-time characterization and correlation analysis of ultraweak biophoton information," *Frontiers Med. Biol. Engng.*, **7** (1996) 299-309.
- 6) M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: "Two-dimensional imaging of ultraweak photon emission from germinating soybean seedlings with a highly sensitive CCD camera," *Photochem. Photobiol.* **65** (1997) 535-537.
- 7) 小林正樹, 稲場文男: "バイオフィトンによる生体計測", *医科器械学会誌* **68** (1998)347-356
- 8) 小林正樹: "極微弱発光を用いた生体内活性酸素の高感度画像検出", *オプトロニクス* (1999) No.12, 139-147

- 9) 小林正樹, 稲場文男: “光子統計と光子相関—光子放出の時空間相関分析・統計解析とのための光電子計測法—”, オプトロニクス(1995) No.6, 110-117.
- 10) 小林正樹, 稲場文男: “極微弱生物フォトン発光現象の量子統計解析, 時空間特性分析と生体情報計測への応用”, レーザー研究 **25** (1997) 197-203.
- 11) M. C. Teich and B. E. A. Saleh: “Fluctuation properties of multiplied-Poisson light: Measurement of the photon-counting distribution for radioluminescence radiation from glass,” *Phys. Rev. A* **24** (1981) 1651-1654.
- 12) M. Kobayashi, B. Devaraj and H. Inaba: “Observation of super-Poisson statistics of bacterial (*Photobacterium phosphoreum*) bioluminescence during the early stage of cell proliferation,” *Phys. Rev. E* **57** (1998) 2129-2133.
- 13) M. Kobayashi and H. Inaba: “Photon statistics and correlation analysis of ultraweak light originating from living organisms for extraction of biological information,” *Appl. Opt.* **39** (2000) 183-192.
- 14) 小林正樹: “細胞の自己組織化過程を光子でとらえる”, *光学* **28** (2000) 561-566.
- 15) 荒木剛, 雨貝愛子, 前田靖男: “粘菌の形態形成”, *生物の形態形成 生物の科学遺産別冊 6号* (裳華房, 1994) pp. 8-17.
- 16) 前田みね子, 前田靖男: *粘菌の生物学* (東京大学出版会, 1978)
- 17) P. R. Fisher, P. Karampetsos, Z. Wilczynska and L. T. Rosenberg: “Oxidative metabolism and heat shock-enhanced chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*,” *J. Cell Sci.* **99** (1991) 741-750.
- 18) P. R. Fisher and L. T. Rosenberg: “Chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*,” *FEMS Microbiol. Lett.* **50** (1988) 157-161.
- 19) A. L. Miller, E. Karplus and L. F. Jaffe: “Imaging $[Ca^{2+}]_i$ with aequorin using a photon imaging detector,” *Meth. Cell Biol.* **40** (1993) 305-338.
- 20) A. B. Cubitt, R. A. Firtel, G. Fischer, L. F. Jaffe and A. L. Miller: “Patterns of free calcium in multicellular stages of *Dictyostelium* expressing jellyfish apoaequorin,” *Development.* **121** (1995) 2291-2301.
- 21) Y. Tanaka, R. Itakura, A. Amagai and Y. Maeda: “The signal for starvation response are transduced through elevated $[Ca^{2+}]_i$ in *Dictyostelium* cells,” *Exp. Cell Res.* **240** (1998) 340-348.