



## 極微弱光計測技術の医学および生命科学への応用

稲場 文男

東北大学電気通信研究所 〒980 仙台市片平 2-1-1

(1983年3月31日受理)

### Applications of Measuring Techniques of Extremely Weak Light to Medicine and Life Sciences

Humio INABA

Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University,  
2-1-1, Katahira, Sendai 980, Japan

#### 1. はじめに

レーザーの出現によって固いきずなの築かれた光学とエレクトロニクスの結びつきは、この20数年の間にまことに目覚ましい光エレクトロニクスの進展をもたらした。それに伴ってレーザーの応用に対するさまざまな期待が次々と現実的なものになりつつあり、光エレクトロニクス技術のもたらす自然科学や生命科学、情報、計測、制御、エネルギー、工業生産、医学などへのインパクトの大きさは、ますます増大しつつある。このようなレーザーの多岐にわたる分野での華々しい活躍に呼応して、一方では測定感度の格段の向上を図り、さらに何らかの新しい現象や作用の発見、検知を目指して、強度の非常に弱い極微弱光の秘める情報を的確にとらえることの可能な検出器や計測技術の研究開発が着実に進められてきた<sup>1-4)</sup>。

光を送り出すレーザーの高性能化、高出力化と光を受ける検出装置の高感度化、高精度化はちょうど車の両輪のようなものであって、この両者の緊密な競合的發展が、今日の光エレクトロニクスという革新技術を育成するために大きな役割を果たしてきたといえるであろう。とくにメディカル光エレクトロニクス、または医用光エレクトロニクス (medical opto-electronics; MOE)<sup>5-7)</sup>、さらには生体光エレクトロニクス (bio-optical electronics; BOE) と名づけられる新分野では、この後者に基づく技術がユニークな情報をもたらす、きわめて有用であることが最近世界的に認識されるようになってきた。

われわれは十数年前より<sup>8)</sup> 極微弱光の検出法およびスペクトル情報分析技術<sup>1-3,8-13)</sup> とそれらの新しい応用<sup>7,14-20)</sup> の研究開発を進めており、その一部は以前に本誌の総合報告としても発表した<sup>12)</sup>。そこで本文では、その後引き続き MOE ならびに BOE の観点から開拓してきた医学的ならびに生命科学的应用面の最近のいくつかを紹介し、ようやく扉が開かれてきたこのような学際領域の意義を知っていただくための一助としたいと思う。

#### 2. 生命活動に関連する発光現象の種類と特徴

人間が眼を主体とする視覚系によって通常感知する光の明るさは、強度の対数に比例しており、10桁近いダイナミックレンジと、1秒間に数十~100個程度の優れた光子検出感度を備えている。しかし、蓄積能力が短いうえに定量的でなく、個体差によるばらつきがあるため、せっかくの優れた効力も科学的には客観性を欠いている。そこでわれわれの眼ではまったく見えにくい程度の超微弱な光を定量的に測定したり、スペクトル分析をしたいという願望が生まれてくるわけで、そのような極微弱光の情報が検知できたら何か新しい現象や生物、化学系において極微弱発光の存在が占める機序がわかるのではないかとの期待が生まれてくる。現代の自然科学や技術は常に人間の感知能力や許容される生活環境条件から非常にへだたった種々の極限状態を探究し、そこから新しい知見やそれに基づく応用を生み出すことを試みており、レーザーや極微弱光の情報検出法の研究開発もそのカテゴリーに入るものと考えられるであろう。

Table 1 生命現象や生体作用に関連する諸種の発光現象の分類と特徴

分 類		発 光 形 態		代 表 例
比較的強度の強い発光現象	生物発光 (Bioluminescence)	発光を生じる固有の物質が存在する	酵素反応 (ルシフェリン-ルシフェラーゼ) による (L-L反応)	ホタル, 発光バクテリア, ヒカリコメツキ, ウミホタル, ウミシイタケ, ミミズ, エビ, ゴカイ
			非酵素的反応による	オワンクラゲ(エクオリア), ハリスタウラ, 過鞭毛虫, ツバサゴカイ, エビ
	化学発光* (Chemiluminescence)		気体系	O <sub>3</sub> , NO, NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , S, P など
			溶液系	ルミノール, ルシゲニン, ロフィン, ウラニンなど
極微弱発光現象	極微弱化学発光 (Ultraweak chemiluminescence)	発光を生じる特定の物質はなく, 有機化合物に関連して自然界に広く発生する	非酵素的反応による	油脂, 食品, 薬物, 高分子材料, ゴム, 脂質, タンパク質などの自動酸化に伴う現象
			酵素反応による	ミクロゾーム脂質過酸化系, リノール酸ナトリウム-リポキシダーゼ系, キサンチン酸化酵素-アセトアルデヒド系
	極微弱生体発光 (Ultraweak bioluminescence)		光照射後の極微弱光化学発光 [Ultraweak photochemiluminescence]	タンパク質の光化学反応
			光励起を必要としない極微弱暗生化学発光 [Ultraweak (dark) chemiluminescence]	生体臓器, 筋肉, 神経, 血液, 血球, ガン細胞, 異常細胞, 植物類など一般に広く検出される

\* 生命活動や生体作用に関与する発光ではないが, 血痕の検出や環境汚染の測定に利用されているので, 参考のために掲載した。

一般に生命現象や生体作用に密接な関連をもつ発光現象は, Table 1 に示した形態や代表例からも知られるように, その強度によって 2 種類に大別される<sup>7,15)</sup>。

このうち, 生物および化学発光は比較的強度が強くて, 普通肉眼でも感知できる程度のものであり, 発光を生じる固有の物質があることが知られている。生物発光<sup>21)</sup>はホタルや発光バクテリア, 夜光虫をはじめ, 70 以上の異なった動植物群の生物に見いだされており, その基本的機構によって酵素反応と非酵素的反応に基づく 2 種に分けられる。前者については, 発光物質となる基質がルシフェリン (luciferin), 酵素がルシフェラーゼ (luciferase) で, その反応をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応 (以下 L-L 反応と略す) と称している。それぞれに固有の L-L 反応が確認された生物は, 発光昆虫ヒカリコメツキを最初として, Table 1 に示した例などを含め約 16 種に及んでいる。他方, 後者の場合の生物はおのおの特有の発光タンパク質を有しており, 多数の生物発光がこの種の機構に基づくものと考えられるが, 実際に発光物質が抽出されたのは Table 1 に記されているオワンクラゲ (エクオリア; aequorea) など数種である。

これらの生物発光の強度が反応系の構成要素の濃度に依存することは一般の化学発光現象と同様であり, ルシフェリンやルシフェラーゼ, または発光タンパク質, さらに反応に関与する触媒などの物質の濃度の影響を受ける。したがって, それらの反応の基本的過程において生じる発光を極微弱光検出技術によって計測すれば, 生体関連物質の極微量分析を迅速, かつ簡便に行なうことが可能となる<sup>7,15)</sup>。しかも, これらの生物発光はそれぞれに固有の発光物質を必要とし, 類似の構造をもった他の物質では置換することが絶対にできないから, 非常に高い選択性を有していることになり, さらに発光量子収率についても一般の化学発光系より高いものが多いという優れた特徴を備えている。

一方, Table 1 に収めたもう一つの極微弱発光現象は, 肉眼や従来広く用いられている通常の光検出器ではまったく検出できないような本来的に超微弱なものであって, 大きくは極微弱化学発光と極微弱生体発光の二つの現象に分けられる<sup>7,15)</sup>。これらの現象は先に述べた種々の固有な物質に基づく生物発光と一見類似のように見られるが, 両者の発光効率の差は 10<sup>10</sup> 程度以上もあって,

発光機構に本質的な差異があるものと判断される。すなわち、この極微弱発光現象には、発光のための特定物質は介在せず、生命維持のための代謝や細胞の活性機能自体に密接に関連して、自然界にごく一般的に生じているものと推定されるが、その機序や生命科学的な意義についての全貌はまだほとんど解明されておらず、今後の広汎な研究に待つところがきわめて大きい。

近年では極微弱化学発光は、極微弱光情報計測に最も適したデジタル的な単一光電子計数法 (single photoelectron counting 法; 略して SPC 法)<sup>1-4, 8-13)</sup>、または通称光子計数法 (photon counting 法) を用いて、さまざまな有機液体や高分子材料、ゴム、塗料、食品、薬品、油脂、脂質、タンパク質などの多様な物質で検出されている<sup>7, 10-19)</sup>。これらは酸素分子により常温で比較的緩やかに進行する自動酸化の過程において、連鎖的に生じる過酸化遊離基や炭化水素遊離基などの再結合反応によって発光するものがかなりの部分を占めると考えられる。

また、ある種の酵素反応に伴う極微弱化学発光も種々測定されている<sup>1, 12, 13, 15, 22)</sup>。それらは、1) 反応生成分子の励起状態からの発光であり、一重項酸素や励起炭酸、励起カルボニルなどによる、2) 基底状態の反応生成物が蛍光前駆物質を酸化して励起分子を生成し、その分子から発光するもので、たとえば活性酸素生成系におけるルミノールによる、3) 生成励起分子から他の分子へのエネルギー移動により、新たに生じた励起分子からの発光もあり、一重項酸素や三重項の炭酸、カルボニルなどの励起分子と重原子を分子内にもつ蛍光物質間のエネルギー交換に伴う増光作用による、ことなどが明らかにされている<sup>22)</sup>。

また、極微弱生体発光は光照射後に生じる極微弱化学発光と光照射をまったく必要としない、生体内部の化学的な励起に基づく極微弱暗生化学発光の2種に大別されるが<sup>15)</sup>、おもに検知、測定されているものは後者である。これらの発光はこれまでに、肝臓や心臓、腎臓、肺、脳などの生体臓器や筋肉、神経、血液、血球などの動物組織およびタマネギの支根、コムギ茎などの植物組織、さらにガンや悪性腫瘍などを含む各種の生体細胞などから検出されている<sup>10, 11, 14-20)</sup>。このような極微弱暗生化学発光の発生機構についてはいまだ推測の域を出ていないが、その基本的過程は多かれ少なかれ活性酸素種に起因する酸化反応が関係すると見られており、一部では脂質の非酵素的酸化に基づく脂質誘導体過酸化遊離基との相関が論じられている。

いまままでに極微弱化学または生体発光が検出されたも

のの大部分は、このような観点から検討してみると、いずれにしても活性酸素種である  $^1\text{O}_2$ ; 一重項酸素 (singlet oxygen),  $\text{O}_2^-$ ; 超酸化イオン (superoxide anion),  $\text{OH}\cdot$ ; 水酸ラジカル (hydroxyl radical) および  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 過酸化水素 (hydrogen peroxide) が関与、または発生すると思われる有機体や酵素系および生体組織などである。これらの酸素種は生体成分に対して非特異的な反応性の非常に強いもので<sup>16, 23-25)</sup>、後にも触れるように、それらに起因する種々の障害に関しては酸素毒性という表現も用いられている<sup>16, 23)</sup>。したがって、このような極微弱発光の測定により、酸素毒性的な関連において生化学的ならびに病理学的に新たな知見や解明が得られれば、臨床医学的検査や診断、治療のための貴重な情報をもたらすものと期待される。

### 3. 極微弱生物発光系を利用した生体微量物質の定量分析

**Table 1** の最上部に示した生物発光は、前節で述べたようにそれぞれに固有の発光物質が介在し、その強度が系の構成要素の濃度に依存することから、極微弱光計測技術を応用すれば生体微量物質の分析、定量が可能と考えられる。われわれは極微弱生物発光アッセイ法と名づけることのできるこの方式に着目して、血清を用いる臨床化学検査用の生体微量物質分析装置の研究開発を行った<sup>7, 15, 26)</sup>。

分析に利用する生物発光系としては、前節で指摘したホタル (北米産) および発光バクテリアの2種類の L-L 反応系と、オワンクラゲから抽出した発光タンパク質 (エクオリンという名称) 反応系の3種を選定し、定量精度は臨床分析に要求される10%以内を目標とした。分析対象はこれら3種の発光反応におけるそれぞれの必須物質で、基礎反応を要しない ATP (adenosine triphosphate), NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) および  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと、これらの生物発光必須物質が関与する基礎反応を利用するものとして<sup>15, 21)</sup>、ホタル L-L 反応系では c-AMP (cyclic-adenosine monophosphate), グルコース, CPK (creatine phosphokinase), バクテリア L-L 反応系ではアンモニア、尿素、さらにエクオリン反応系では総カルシウムと透析性カルシウムの各項目を一応目標とした。なお、設計に当たっては将来の項目拡張が可能のように考慮した。

試作装置は極微弱生物発光強度を測定する本体部と分析の自動制御、測定結果の記憶および各種のデータ処理を実行するデータプロセッサ部から成っている。**Fig. 1**

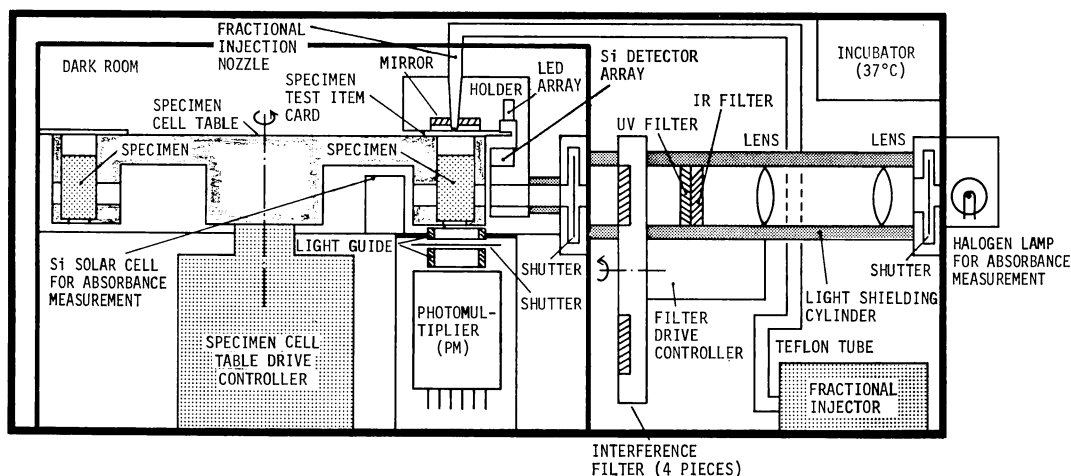


Fig. 1 試作した極微弱生物発光方式生体微量物質分析装置の本体部の基本構成

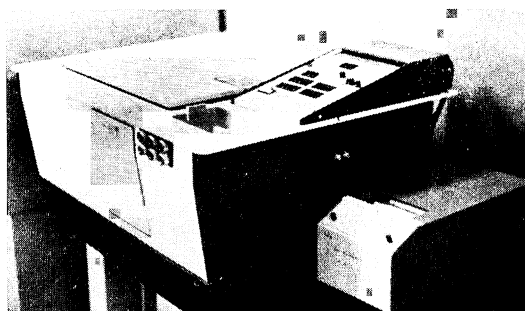


Fig. 2 試作した極微弱生物発光方式生体微量物質分析装置の本体部の外観 (右側はデジタルプリンタ)

は基本的な自動分析の可能な本体部の模式的構成を図示したものである。また、Fig. 2 に試作した本体部の外観を示す。分析感度と精度の向上のために最も重要な極微弱光計測には、光電変換によって光電子増倍管 (以下 PM と略す) から発生する光電子パルスの波高値のある一定の上限と下限にそれぞれ弁別レベルを設定して、最適動作を実現するようにした単一光電子計数法 (SPC法) を用いるとともに、繰返し計数、積算計数および発光極大値サンプリングの 3 種類の計数方式を選定できるようにした。また、検体キューベットと PM の光電面の最大限の近接による光学的結合の高効率化、複数項目の検体の自動分析を可能にするため、識別した項目に応じて設定される光学系や自動分注器などを含めた装置全体の動作の単一クロックパルスによる迅速な同期化など、新しい機能を具備している。

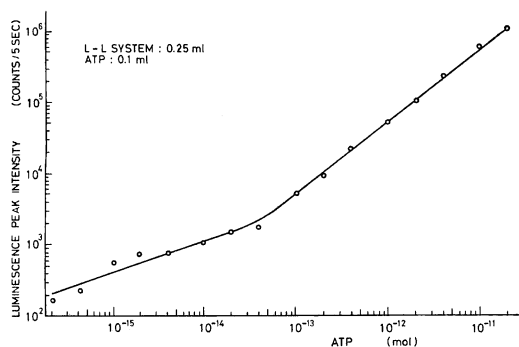
なお、診断のために通常行なわれる生化学的検査の対象となる生体微量物質は約 30 項目であるが、特別検査を含めると 60 項目を越えるものとみられる。ATP や

NADH は生体内酵素反応に広く関与する重要な物質であるが、これら数十項目に及ぶすべての物質と関連づけることは原理的に困難であり、従来の吸光光度法による分析で十分な物質も存在する。それゆえ、本装置の実用機器としての有用性をいっそう高めるために、吸光度測定部を併設して、極微弱生物発光法と吸光光度法の両方式の分析を同一システムで行なえるように設計した。また、本体部は基本的な自動測定のためのハードロジック回路をも内蔵しており、データプロセッサとは独立に動作することが可能である。

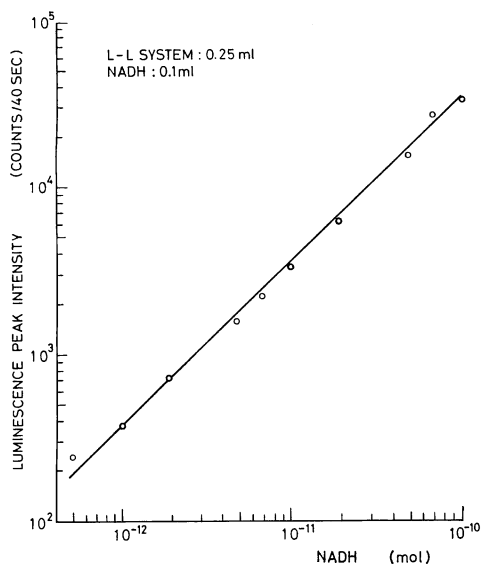
一方、データプロセッサ部は広い実用性を主眼として設計試作されたもので、CPU である 8 ビット並列処理汎用マイクロプロセッサを主体として構成されている。複数の検体項目や単一項目の自動識別による自動分析、あるいは発光強度の時間的変化の記憶などのソフトウェアとともに、基礎生化学的な測定や検討のための各種のデータ処理用プログラムを有している。さらに分析に際しては測定パラメータの不備、生物発光系の異常、あるいは不審な測定結果などを検出して報知するなどの誤測定についての対策も施されており、本試作装置は迅速かつ簡便な操作法とあわせて、臨床生化学検査のための十分な実用性を備えているものと考えられる。

Fig. 3~5 は本装置で測定した前記の 3 種類の発光反応におけるおのおのの必須物質の検量線を図示したものである。Fig. 3 の ATP では  $10^{-16} \sim 10^{-11}$  mol の範囲が定量され、全範囲にわたって直線性は得られていないが、 $10^{-16}$  mol はアイソトープを用いるラジオイムノアッセイ (radio immunoassay ; RIA) 法の検出感度と同程度の高感度性を実証する値である。一方、Fig. 4 の NA-

DHの検量線では、約 $4 \times 10^{-13}$  molの検出限界まで直線性が保たれていることがわかる。また、**Fig. 5**はカルシウムの定量測定のためのデータであり、検討の結果オワンクラゲ(エクオリン反応)発光系を利用すれば、血中カルシウムの分析において、タンパク結合性カルシウムを含む総カルシウムとこれに含まない透析性カルシウムの両者



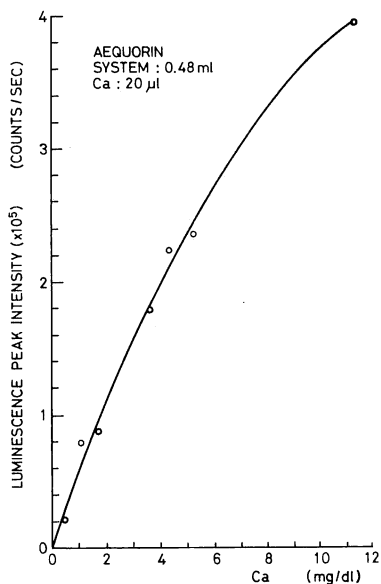
**Fig. 3** ホタル発光系による ATP の検量線



**Fig. 4** バクテリア発光系による NADH の検量線

を、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 濃度を変化させることによって、同一機器で分析できるという新規性と高い有用性が明らかになった。なお、**Table 2**にこれら3種類の定量物質についての本試作分析装置の基本的性能を比較して示しておく。

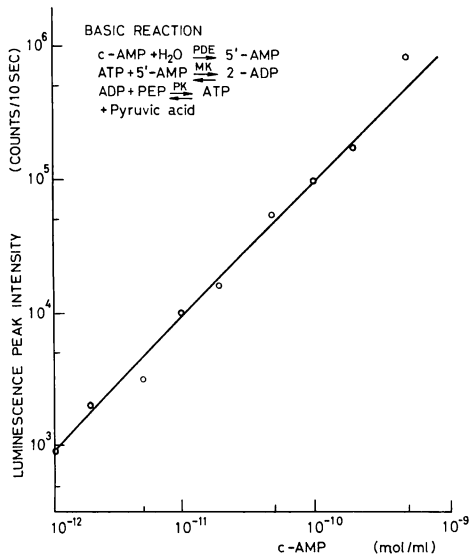
次に、これらの生物発光必須物質が関与する基礎反応を利用した生体微量物質の定量分析で得られた検量線の代表例を**Fig. 6~8**に示す。**Fig. 6**はホタル L-L 系を用いた c-AMP の測定結果で $10^{-12}$  mol/ml まで検出されており、正常血中値が $2 \sim 5 \times 10^{-11}$  mol/ml 程度の生体内濃度のきわめて低いこのような物質は、これまではもっぱら RIA 法で分析されていたものである。また、**Fig. 7**はグルコースをホタル発光系で定量した検量線であり、 $5 \times 10^{-3} \sim 1 \mu\text{g/ml}$  という従来法に比してきわめて高い感度特性を実現している。さらに、**Fig. 8**はバクテ



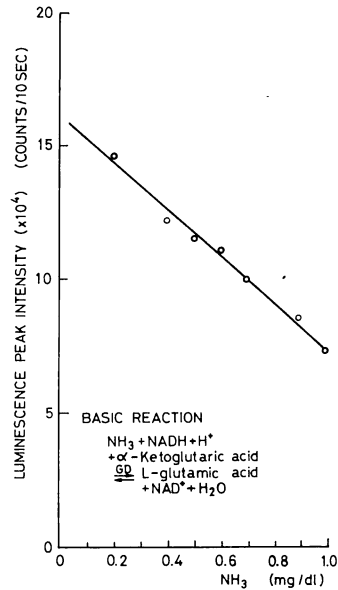
**Fig. 5** オワンクラゲ(エクオリン)発光系によるカルシウムの検量線

**Table 2** 極微弱生物発光方式生体微量物質分析装置による ATP, NADH およびカルシウムの定量特性

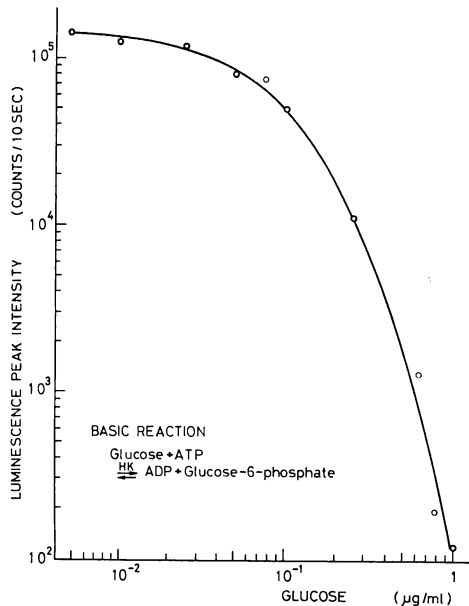
発光系	発光の中心波長 (nm)	定量物質	検出限界 (mol)	定量精度 (%)	従来法とその検出限界
ホタル (L-L 反応)	560	ATP	$10^{-16}$	6~7	NADH に変換 吸光法: $10^{-9}$ mol 蛍光法: $10^{-12}$ mol
バクテリア (L-L 反応)	530	NADH	$4 \times 10^{-13}$	6~7	吸光法: $10^{-9}$ mol 蛍光法: $10^{-12}$ mol
オワンクラゲ (エクオリン反応)	500	カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ )	$2.5 \times 10^{-7}$ (1 $\mu\text{g/ml}$ )	10	イオン電極法 (50 $\mu\text{g/ml}$ )



**Fig. 6** ホタル発光系を用いた c-AMP の検量線 (AMP: adenosine monophosphate, ADP: adenosine diphosphate, PEP: phosphoenolpyruvate, PDE: phosphodiesterase, MK: myokinase, PK: pyruvate kinase)



**Fig. 8** バクテリア発光系を用いたアンモニアの検量線 (NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, GD: glutamate dehydrogenase)



**Fig. 7** ホタル発光系を用いたグルコースの検量線 (HK: hexokinase)

リア L-L 系を利用したアンモニアの分析データで、この範囲内にほとんどの正常血中値は含まれている。これらの結果を含めて、本試作分析装置を用いて行なった 0.1ml 以下の検体中の生体微量物質の定量分析の性能や各項目の臨床検査の意義および従来法との比較などを

**Table 3** に要約して示しておく。このほか、ホタル L-L 系では  $\alpha$ -アミラーゼ、クレアチニン、一方バクテリア L-L 系では LDH (乳酸脱水素酵素)、GOT (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)、GPT (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)、MDH (リンゴ酸脱水素酵素) など十分実用に供しうる微量定量分析が可能ながことが確かめられた<sup>15)</sup>。

以上述べた極微弱生物発光アッセイ法の大きな特徴は、高感度性、高選択性ととも、RIA 法のような特殊な資格技術や管理をまったく必要としない点での安全性と汎用性、ならびに迅速かつ簡便性にあるものといえよう。また、特別な分光系や高価な生物発光系、基礎反応系などを要しない点で経済性においても優っている。これらの長所は酵素反応系を基礎反応として用いていることに由来するものであるが、今後さらに再現性が向上され、また抗原抗体反応とも組み合わせることにより、本方式の臨床検査や診断の分野での有効性と実用性がいっそう発揮されるものと考えられる。

#### 4. 生体組織および血液における極微弱発光の計測

近年医学や生命科学の領域では、2 節の最後に述べたような活性酸素種が必然的に介入する、生体脂質 (不飽

Table 3 極微弱生物発光方式生体微量物質分析装置による主要な定量分析特性

発光系	分析物質	血中正常値*	測定分析範囲	測定検体量 (ml)	所要時間 (基礎反応)	従来法と測定所要時間例	臨床検査的意義
ホタル (L-L反応)	c-AMP	$2 \sim 5 \times 10^{-11}$ mol/ml	$10^{-12} \sim 10^{-9}$ mol/ml	0.1	65分 (62分)	RIA法 24時間	種々の内分泌異常に関連した疾患の診断, とくに副甲状腺機能低下
	グルコース	60~100 mg/dl	$5 \times 10^{-4} \sim 10^{-1}$ mg/dl (希釈検体使用)	0.1	31分 (30分)	各種吸光法, 滴定法 30~60分 (多くは煮沸や除タンパクを要す)	糖尿病その他の糖質代謝障害の診断
	CPK	5~20 mU/ml	1~50 mU/ml	0.05	3分 (2分)	各種吸光法 20~60分	筋肉, 心臓, 脳などの機能の診断
バクテリア (L-L反応)	アンモニア	0.2~1.0 $\mu$ g/ml	0.2~1.0 $\mu$ g/ml	0.1	27分 (25分)	各種吸光法 60~90分 (イオン交換・脱着を要するものあり)	肝機能診断, 肝性昏睡と糖尿病性昏睡の診断にはとくに重要
	尿素	16~40 mg/dl	0.05~0.5 mg/dl (希釈検体使用)	0.1	42分 (40分)	各種吸光法 30~90分以上 (多くは除タンパクを要す)	腎機能診断
オワンクラゲ (エクオリン反応)	総カルシウム	9~11 mg/dl	0.5~12 mg/dl	0.02	0.5分	吸光法 30分	血中カルシウムはタンパクに結合した非透析性カルシウムとクエン酸カルシウムおよびイオン化カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) の透析性カルシウムに分けられる。後者は主として副甲状腺ホルモンの支配を受け, 生理学的に重要
	透析性カルシウム	5.5~7.5 mg/dl	1.0~11 mg/dl	0.02	0.5分	イオン電極法による $Ca^{2+}$ 分析 3分	

\* 単位は臨床検査の慣例に従って用いた。

和化合物)→脂質過酸化(遊離基発生)→遊離基連鎖反応による過酸化脂質の蓄積, という非特異的(非酵素的)な過程が, 生体のさまざまな疾患に密接に関連していることが明らかにされつつある<sup>16, 25, 27-29)</sup>。そのために酸素毒性という言葉が使われているほどで, 「酸素による生体成分の非特異的な酸化に基づく障害, さらに破壊(死)」を意味している<sup>23)</sup>。たとえば, 新鮮な油脂をネズミに与えると良好に発育するが, 自動酸化を受けた変質(過酸化)油脂を食餌中に加え, しだいに増量していくと発育停止から体重減少を生じ, やがて死を招くことが知られている<sup>15, 16)</sup>。

このような過酸化脂質反応は人類に対しても長い年月の間には, 脂質を主要成分とする各種の生体膜の破壊とそれに伴う酵素類の不活性化や脂質の代謝異常をひき起こし, その積重ねによって溶血現象や貧血, 糖尿病, 肝や肺の障害のほか, 放射線障害や大気, 環境汚染による公害病などにも係わっていると判断されており, また血栓形成との関係も示唆されている。さらに, 新生児, と

くに未熟児を濃度の高い酸素雰囲気中で育てると, 未熟児網膜症によって失明したりすることがあるが, その原因は過酸化脂質の増加によるものである。一方, 成人病の代表例といわれる動脈硬化症の患者の粥状硬化動脈壁にも過酸化脂質が多いことが認められている。動脈硬化や皮膚に沈着したシミなどをはじめとする老化現象の重大な原因の一つは過酸化脂質であるという見解は定着しつつあり, 核酸などの変性と結びつくと見られる発ガンにも何らかの相関があると考えられている。

すでにわれわれの研究グループは10年以上前に種々の生体臓器やガン組織, 悪性腫瘍細胞などで極微弱暗生化学発光が検出されることを発表しており<sup>10, 11, 14, 15)</sup>, 前者についてはソ連の報告もある<sup>30)</sup>。しかし, 筆者らがSPC方式を基本とする新しいデジタル的な極微弱光計測法の研究開発を進めるとともに, BOE的応用の開拓に着手した10年ほど以前には, この目的に適したPMを入手することは困難で, それゆえ検出感度は理論的に期待されるほどの十分低いレベルまでには達しなかつ

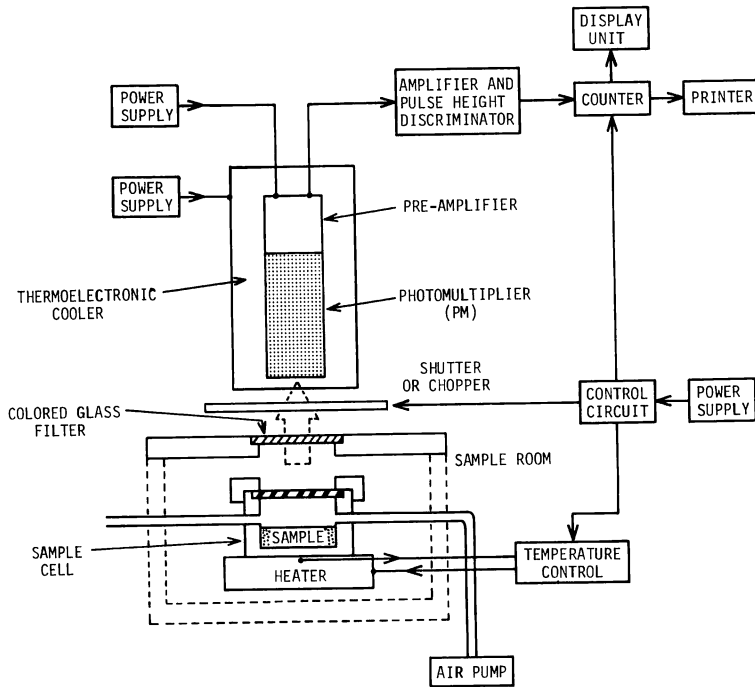


Fig. 9 試作開発した極微弱発光計測装置の一機種の基本構成 (ケミルミネッセンス・アナライザー OX-7)

た。そのため、それまでにまったく未知であったこのような極微弱発光現象をもっと高感度で詳しく検証したりさらに多様な生体試料や物質にまで拡張するには到底至らなかった。だが、近年極微弱光のデジタルの検出方式の優れた実用性が認められ、世界的に普及化するに伴い、SPC用PMとして特別に配慮して設計された製品が、HTV(浜松ホトニクス(株))をはじめとする国内外の数社で市販されるようになった。現在では、SPC用のなかでもとくに選別された高性能なPMと高速で小型・安定なICやLSIを用いて最適動作法<sup>2, 12, 31)</sup>を実現すれば、1秒ないし数分当り1個程度の単一光電子でも計数することが可能である。

そこで、このような極微弱光計測に必要な技術レベルの総合的な向上に基づいて、筆者は極微弱化学および生体発光の高感度検出を通して、生物の体内やさまざまな脂質含有量の高い食品、食糧や油脂類などで生じている脂質過酸化の度合を、かなり早期のうちに検査、判定することを目的とした装置の開発に着手した<sup>18, 31, 32)</sup>。Fig. 9は、数年前に筆者の研究室と東北電子産業(株)の共同研究によって、同社が新技術開発事業団との開発委託契約の下に試作、製品化した極微弱発光計測装置のうちの一機種(OX-7)の構成を示すブロック図である。また、Fig. 10にケミルミネッセンス・アナライザーと名づけ

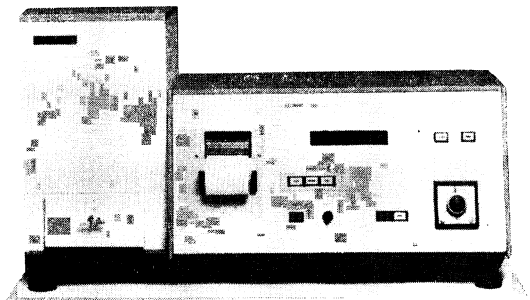


Fig. 10 試作開発した極微弱発光計測装置(ケミルミネッセンス・アナライザー OX-7)の外観

られたこの装置の外観を示す。

使用しているPM(HTV R 878, R 550, R 375など)は受光面直径が50mmで、特別に選別した低雑音のものを電子冷凍装置に納めて光電面を冷却し、雑音の極度の低減を図っている。このような開口面の広いPMは、化学発光や生体発光のような面光源状の試料から放射される光の測定には好適であり、さらに試料室との間の光学系を工夫して、有効立体角を広くすることにより全体の集光効率を増大している。また、PMの電磁シールドを徹底するとともに、増幅器や電源その他装置全体の電氣的雑音を極力小さくするなどの、システムの最適化により優れた高感度を実現している。検出した極微弱光の



強度は単一光電子パルスのカウント数で表示され、プリンタやレコーダで記録される。また、マイクロコンピュータに接続し、必要なデータ処理や制御を行なうこともできるようにしてある。

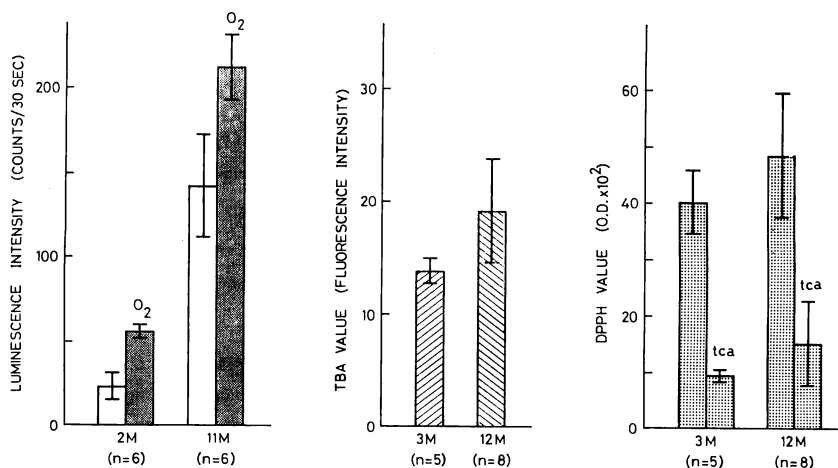
試料室は直径 50mm, 高さ 15mm のセルを挿入するようになっており、試料は液体に限らず、固体や粉末などでも測定可能で、室温から 200°C の任意の温度に保つことができる。さらに、セル室内の雰囲気は必要の際にはエアポンプによって、空気以外の他のガスに置換される。このほか、セル室上部に分光フィルタを順次挿入してスペクトル分析<sup>1,2,12,13)</sup>を自動的に行なえるようにした機種とか、生きたままの実験動物や試料を測定できる装置などが、この機種のシリーズの中に含まれている。

この装置は試作、性能評価と平行して、各種の新しい応用開発が試みられ、まず酸化による油脂や脂質類の劣化度および動物生体組織の老化度や障害度に関連してきわめて興味深いいろいろな実験結果が得られた。前者に関しては紙面の制約上原論文や他の報文にゆずることにして<sup>19,32,33)</sup>、ここでは後者の主要なもののいくつかについて述べる。

一連の実験のなかの一つは、月齢の異なる、すなわち老化度の違うラットの血液の極微弱発光強度の比較を行なったもので、その結果を **Fig. 11** に示す<sup>19,32)</sup>。図には同時に測定した、生体内の脂質過酸化物の定量や老化の判定法として医学の分野で頻用されている TBA (thio-barbituric acid) 値<sup>17,28)</sup>、ならびに値が小さいほど組織抗酸化力の程度が大きいと見られている DPPH ( $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picryl hydrazyl) 値の変化も示してある。

$n$  は使用したラットの検体数で、また  $O_2$  と記したデータは発光強度の定量化を行なうため、一定量の酸素ガスを試料セル内に吹き込みながら測定した結果である。図から明らかなように、月齢  $M$  が 2 か月と 11 か月のラットの血液では、その発光強度に 4~5 倍くらいの差異が見られる。同様に、3 か月および 12 か月のラットで測った TBA 値および DPPH 値も、加齢とともに増加していることが認められるが、その変化分は発光の場合ほど顕著ではなかった。次に、過酸化物質 (POV) 400 の自動酸化アミノ油を体重 220g のラット群に LD<sub>50</sub> (薬剤投与量の単位で、毎日一定量の毒物を与えて全ラットが死亡するような量を 100 としたときの 50% の量) の 1/5 の量で 10 日間毎日経口投与して、血液や臓器の発光強度を連日測定した。その結果、脳以外の組織の発光強度は明瞭に増加しており、とくに肺、腎、心臓は肝臓や血液に比べて多かった<sup>7,19,32)</sup>。また、TBA 値や POV との有意な相関性が認められた。

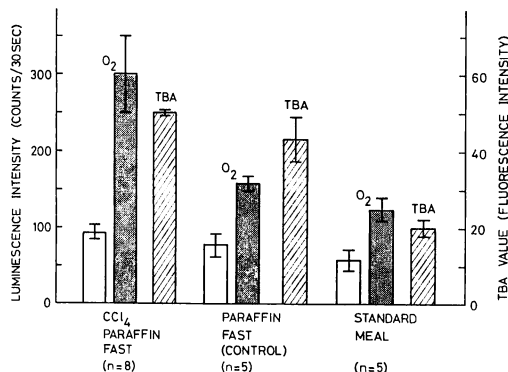
さらに、生体組織は一般に放射線や紫外線の照射によって遊離基発生が強められ、抗酸化力が低下して脂質過酸化が亢進することが知られている<sup>16,28)</sup>。このことを確かめるために、ラットに 15W の紫外線ランプを 40cm の距離から 90 時間照射して、照射前後の各組織の極微弱発光強度の比較を行なった。**Table 4** はその結果をまとめたもので、いずれも著しいカウント数の増大を示し、TBA 値や DPPH 値も差異を生じていることがわかる<sup>7,19,32)</sup>。また、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) をラットに投与すると、肝ミクロゾーム脂質の過酸化によって脂肪肝が誘発されるので、パラフィンで希釈した四塩化炭素、コント



**Fig. 11** 老化に伴うラット血液の極微弱発光強度と TBA 値および DPPH 値の変化の比較 (血液試料: 4ml/8ml バッファ,  $O_2$ : 酸素ガス通気下測定, tca: トリクロロ酢酸処理試料,  $n$ : 検体数)

**Table 4** 紫外線照射前後のラットの血漿および各臓器の極微弱発光強度, TBA 値ならびに DPPH 値の変化 (♀ラット, 200 g)

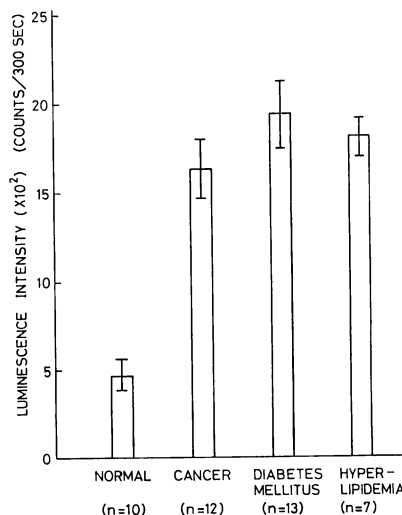
測定試料	測定量	紫外線照射	発光強度 (カウント/秒)	TBA 値	DPPH 値 (O.D. × 10 <sup>2</sup> )
血漿 (5ml)	前後	前	8	3.1	4.4
		後	141	3.4	29.5
心臓	前後	前	19	3.4	2.7
		後	90	8.5	12.6
肺臓	前後	前	34	4.0	4.9
		後	238	20.0	11.3
肝臓	前後	前	10	4.8	2.5
		後	126	29.5	10.9
腎臓	前後	前	64	4.7	2.9
		後	87	21.0	10.1



**Fig. 12** 四塩化炭素を投与したラットと対照群ラットの肝臓ホモジネートの極微弱発光強度および TBA 値の変化の比較 (試料: 1.5g/15ml 生理食塩水, O<sub>2</sub>: 酸素ガス通気下測定, n: 検体数)

ロールとしてのパラフィンおよび標準食餌をそれぞれ与えたラットの肝臓ホモジネート (homogenate) を試料として測定を試みた。Fig. 12 は発光強度と TBA 値のこれらの試料の間の変化の様子を示すもので、予想したとおりの結果が確認された<sup>7,19,32)</sup>。

一方、ビタミン E は BMP (2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol) や BHT (butyl hydroxytoluene) などとともに近年生体における大切な抗酸化剤の代表例として注目されているが<sup>16,25,29)</sup>、極微弱生体発光計測法による生体酸化度、ひいては老化度の判定の普遍性をさらに追求するため、ビタミン E 欠乏状態のラット組織の発光特性の比較検討を行なった<sup>19)</sup>。その結果、7か月間 α-トコフェロール (tocopherol) 欠乏食で飼育したラットでは、普通食のものに比べて発光強度が高く、とくに肝臓では 4 倍以上の増大が検出された。さらに、腎、肺、心臓、脳で



**Fig. 13** 健康人と癌、糖尿病および高脂血症患者から採取した血液 (全血) の極微弱発光強度の比較 (n: 検体数)

も 2 ~ 3 倍の変化が見いだされるとともに、血液の発光強度と溶血率の増加および α-トコフェロール含量の著減の間に相関が認められた。しかし、TBA 値では平均として上昇の傾向が伺われたが、有意差として捉えることはできなかった。

以上のようなラットをモデルとした種々の実験により極微弱暗生化学発光の定量的計測法は、生体中での脂質過酸化の進行度や老化度を判定するために、従来から用いられている TBA 法や過酸化化物価法、共役ジエン法などの化学的方法<sup>17,29)</sup> とはまったく異なる、迅速、簡便で、しかも感度の優れた新しい MOE 的手法を提供することが明らかとなった。この測定方法は臨床医学的にもきわめて興味深いものであり、たとえば健康な正常人と何らかの疾患をもつ患者とでは、血液などの生体組織からの極微弱発光強度が異なるのではないかと推測される。そこで、われわれは健康人と患者の血液を採取して比較測定を試みた。一般に人の血液の発光強度は極度に弱く、われわれが開発した極微弱発光計測装置を用いて初めてその測定が実現されたものであり、両者の発光強度の相違を明らかに確認することができた。

Fig. 13 はその測定結果の一例を示すもので<sup>20,31,32,34)</sup>、採血はすべて早朝空腹時に行ない、抗凝固剤として少量のヘパリンを加えた 2 ml の全血試料を用いている。また、測定時間は発光が非常に微弱であるため 300 秒とし、37°C の一定温度に保って計数した。患者の疾患は癌 (12 例)、糖尿病 (13 例) および高脂血症 (7 例) であり、

コントロールとしての健康人のデータは10例で、それぞれ平均をとってある。図から明らかなように、何らかの疾患を有する血液の場合には、平均として健康人の3~4倍の発光強度を生じていることがわかる。そのなかでは、早期胃癌患者(2例)の血液の発光強度は低く、全体的に見て食道や胃に癌を有する症例は比較的弱いのに対し、肝、胆道系の癌については相当高い値が観測された。一方、糖尿病患者の血液の発光強度は、ある程度低い値からかなりの高い値まで分布しており、空腹時血糖値との間の直接的相関は認められなかった。さらに、健康人と転移性肝癌患者および腸管癌患者の全血とそれから遠心分離して得られた血漿成分および血球細胞を比較すると<sup>20,34)</sup>、全血と血漿の発光強度は患者のほうが健康人より常に高く、一般に血漿では全血の2~数倍の値を示すことが多かった。また、血球細胞の場合はほぼ全血に近いが、多くはそれより低く、患者と健康人の違いはわずかしき見られなかった。全血は不透明であるため、発光強度は見掛上小さいと思われるにもかかわらず、両者の間の差異をよく判定することができる。

しかし、血漿のほうが発光強度が高く安定した結果が得られるので、次に血漿を用いて糖尿病や肝疾患の患者についての比較検討を行なった<sup>20,35)</sup>。Fig. 14は糖尿病患者(39例)と健康人(21例)の発光強度の測定結果であり、危険率0.1%以下で前者の値のほうが有意に大きいことが認められる。なお、この場合、加齢の影響を除くため、患者と健康人の年齢構成はほぼそろえてある。また、肝炎や肝硬変、原発性肝癌、閉塞性黄疸などの肝疾患患者の血漿では、糖尿病の場合よりはるかに高い発光強度が検出された。これらのなかでも、閉塞性黄疸で高度の高ビリルビン血症を示す患者の血漿は、経時的に発光強度が増加してピークに達した後には下降し始めるという、他の患者や健康人には見られない特殊なパターンを示し、そのピーク値は健康人の場合の50倍以上に達するものも見いだされた<sup>35-37)</sup>。しかも、これらの血漿の発光強度はFig. 15に示すように、酸素の通気のもとでは大気中よりも数倍高い時間的変化を示し、逆に窒素下におくとやがて消失することがわかった<sup>37)</sup>。窒素通気の初期部分の発光は試料や測定セル中の残存酸素によるものと考えられ、これらの測定結果は、少なくともこの種の患者の血液の極微弱発光と酸素との切り離せない深い係わりを実証するものと見ることができ。

このようにして動物の種々の生体組織や血液、さらに人の血液からの極微弱暗生化学発光は、それらの老化度や健康度などに関連する有用な情報を提供することが初

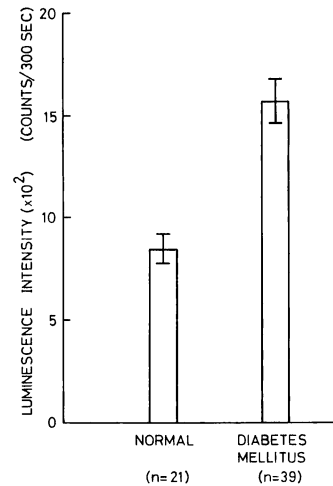


Fig. 14 健康人と糖尿病患者から採取した血漿の極微弱発光強度の比較 (危険率<0.1%, n: 検体数)

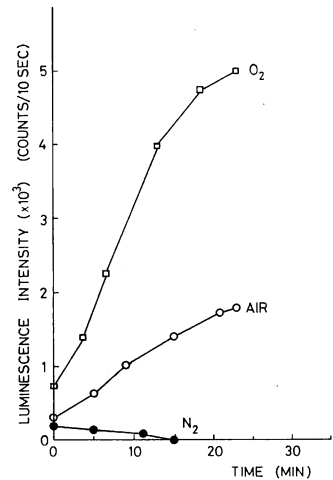


Fig. 15 高ビリルビン血症を示す閉塞性黄疸患者の血漿の酸素、空気および窒素の通気下における極微弱発光強度の時間的変化

めて明らかにされたわけであるが、さらに、発光種の検討、同定のためにそれらのスペクトル分析を行ないたいという要求が当然生じる。しかし、このような極微弱発光現象は発光強度が著しく低いうえに、点光源でなく、出てくる光の方向がまったくランダムであるために、その分光測定はきわめてむずかしい課題といえる。だが、筆者らは長年にわたる極微弱光計測法の総合的な研究開発の一環として、すでに極微弱化学および生体発光の分光分析装置を試作開発しており<sup>1,12)</sup>、これを用いて生体試料のスペクトル情報を得ることが可能である。フィルタースペクトル分析システム (filter spectral analyzer

system ; FISAS と略称) と名づけられたこの装置は、275~670 nm の近紫外域から可視域の波長範囲で、シャープカットオフ特性を有する 27 枚の色ガラスフィルタと同期単一光電子計数 (synchronous SPC ; 略して SS-PC) 方式を組み合わせ、オンラインのミニコンピュータであらかじめ設定したプログラムに従って全自動的に分光データを求めることができる構成を有している<sup>2)</sup>。その詳しい動作法や性能などについては以前に報告してあるが<sup>1,2,12,13)</sup>、 $10^{-15}$  W 程度以下の極微弱発光の分光が可能な装置は、世界でも筆者らの第 1 号機のほかに、1, 2 台を数えるのみである。

そこでこの FISAS および同じ原理に従って動作するように設計した Fig. 10 と類似のケミルミネッセンス・アナライザーのシリーズ中の機種を用いて、各種の生体試料や酸化過程に基づく劣化に伴うさまざまな油脂や油添加食品類からの極微弱発光スペクトルの分析を試みた。まず Fig. 16 に参考のために、自動酸化によって POV が 108 まで劣化した大豆油の測定結果を示す<sup>19,32,38)</sup>。図の上部には、この波長域で励起一重項酸素の衝突分子対 ( $^1\text{O}_2$ )<sub>2</sub> によって生じる蛍光スペクトルの中心波長 (矢印) と遷移の上側の励起状態 (括弧内は上, 下の単位の振動量子数) を記入してあるが<sup>1,13,39-41)</sup>、それらと測定した発光スペクトルのピークとの間にはかなり良好な一致が見られる。さらに、この活性酸素の強力な一種である  $^1\text{O}_2$  の消光剤 (quencher) の一つとして知られた  $\beta$ -カロチン (carotene) や代表的な抗酸化剤の BHT を添加すると、それぞれ図示したように 600 nm 以下のほとんどのスペクトルが明瞭に抑制されることが認められた。これに対し、ローズベンガル (rose bengal) を用いたリノール酸メチルの光増感酸化により  $^1\text{O}_2$  を生成させると、これらの化学発光は急増しており、この一連の実験結果から、自動酸化油脂の発光種のかなりの部分は  $^1\text{O}_2$  であると判定される。なお、Fig. 16 の短波長側 (およそ 300~500 nm) の  $^1\text{O}_2$  の発光スペクトルと重畳した幅広いスペクトルはカルボニル類によるものと考えられる。

次に Fig. 17 はラットの肝臓ホモジネートに脂質過酸化化物の一種である自動酸化アミノ油を添加した系からの極微弱発光スペクトルの分析結果である<sup>19,42)</sup>。また点線はこの系に  $\beta$ -カロチンを加えた場合のスペクトル分布を表わしている。この結果や上側に矢印で示した ( $^1\text{O}_2$ )<sub>2</sub> の蛍光スペクトルの中心波長との対応から、この系での主要な発光種は  $^1\text{O}_2$  であり、一部はカルボニル化合物などに基因するものと推定される。なお、この系の全発光

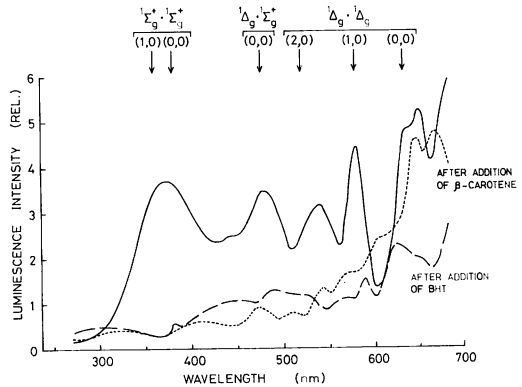


Fig. 16 自動酸化大豆油の極微弱化学発光スペクトルと 2 種類の抗酸化剤添加に伴う発光抑制効果 (自動酸化大豆油 POV : 108)

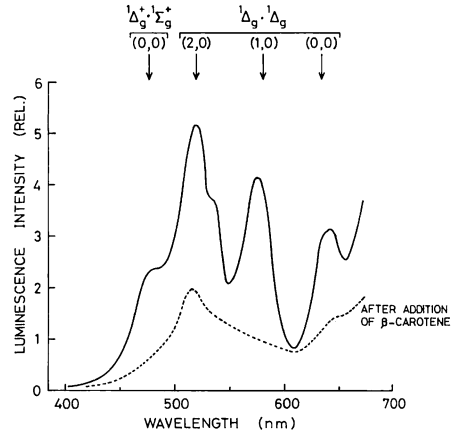
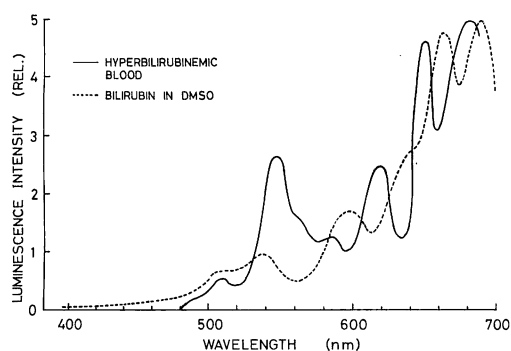


Fig. 17 ラットの肝臓ホモジネートに自動酸化アミノ油を添加した系からの極微弱化学発光スペクトルと  $\beta$ -カロチンによる消光効果 (試料: ラット肝臓 4g, 生理食塩水: 20ml, 自動酸化アミノ油: 1.5ml,  $\beta$ -カロチン: 100  $\mu\text{mol}$  添加)

強度は添加自動酸化油の量にほぼ比例し、 $\beta$ -カロチンのほかに各種のトコフェロールなどの  $^1\text{O}_2$  の消光剤で明瞭に抑止されるとともに、遊離基の消去剤 (scavenger) によってもある程度消光されることが観測された。これらの事実より  $^1\text{O}_2$  は添加した過酸化脂質から非酵素的に生成される脂質過酸化遊離基の分解に由来するものと推察されるが、酵素的に生じた超酸化イオン  $\text{O}_2^{\cdot-}$  からの不均化反応によるものも若干あると考えられる。なお、Fig. 17 とよく類似したスペクトルはラットに酸化油を経口投与した後の肝臓ホモジネートからの極微弱発光についても得られており、上述のような種々の抗酸化剤の



**Fig. 18** 高ビリルビン血症を示す閉塞性黄疸患者の血漿および DMSO 溶液中のビリルビンの極微弱発光スペクトル (ビリルビン DMSO 溶液濃度: 20mg/dl)

併用による消光効果も確かめられている<sup>43,44)</sup>。

また、人の血液の発光強度は先に述べたように著しく微弱なためスペクトル分析は困難であるが、**Fig. 15** に示したような高ビリルビン血症を伴う閉塞性黄疸患者の血漿では測定が可能であった。その結果の一例を **Fig. 18** に示す<sup>37)</sup>。さらに、ビリルビンの水溶液の発光強度はきわめて低いが、DMSO (dimethyl sulfoxide) 中に溶かすと日を経るに従って増加し、数日後には高ビリルビン血症血漿と同程度のカウントレベルに達することが見いだされた。**Fig. 18** の点線はその場合のスペクトル分布を示すもので<sup>37)</sup>、ビリルビン自体による発光ではなく、数日間の通気下で構造的に変化を生じる過程で形成された物質によるものと推測される。この両者のスペクトルの傾向は全般的に類似しており、**Fig. 15** の結果をも考慮すると、これらの発光には活性酸素種の寄与が示唆されるものと解釈される。

なお、ごく最近の実験によって煙草を常時吸う人と吸わない人の血液の極微弱発光強度には数倍程度の開きがあり、吸う人でも喫煙を止めると1日くらい後には正常人のレベルまで低下する事実が発見されたことを付記しておく<sup>45)</sup>。

## 5. おわりに

以上これまでに筆者らが十数年にわたって研究開発を進めてきた極微弱光計測およびスペクトル情報分析技術の医学的ならびに生命科学的な応用を中心として最近の動向を述べた。このような測定法の最大の特徴は、いろいろな生体の構成成分や組織をはじめ、多種多様な油類や油脂系食品、薬品、高分子材料、脂質、タンパク質などからの極微弱発光が、外部から何ら擾乱を加えられな

い生 (intact) の状態を反映している点にあるといえる。しかも、試料の準備や前処置が容易で、測定に熟練を必要とせず、簡便で操作性に優れ、短時間で多数の試料を高感度で検定できるという大きな長所を備えている。このような学際的分野の研究はまだ数少なく、発光機構などを含めた本質的問題はほとんど解明されていない現状であるが、今後のいっそうの進展と広汎な領域への貢献を期待して結びとする。

最後に、本文に記した種々の実験結果をはじめとするさまざまな学際的成果は長年にわたる医学、生化学、薬学、食糧化学、生体工学などの各分野の専門家の方々と の緊密な共同研究によるものであり、引用文献中に列記した各位に深く感謝の意を表する次第である。

## 文 献

- 1) H. Inaba, Y. Shimizu and Y. Tsuji: Jpn. J. Appl. Phys., **14**, Suppl. 14-1 (1975) 23.
- 2) 稲場文男: O plus E, No. 12 (1980) 78.
- 3) 稲場文男: 光学的測定ハンドブック, III. 2.2, 田幸敏治, 辻内順平, 南 茂夫編 (朝倉書店, 1981) p. 399.
- 4) 林 達夫: 生物物理, **22** (1982) 280.
- 5) 稲場文男: 昭和53年電気四学会連合大会シンポジウム論文集 (1978) 120.
- 6) 桜井健二郎, 松本 元: 医用電子と生体工学, **17** (1979) 1.
- 7) 稲場文男: 新医療, **7**, No. 6 (1980) 87.
- 8) 初期的な研究としては, 稲場文男, 小林喬郎: 応用物理, **36** (1967) 747; H. Inaba, T. Kaneko and T. Ichimura: IEEE J. Quantum Electron., **QE-5** (1969) 14 などがある。
- 9) 市村 勉, 稲場文男: 応用物理, **39** (1970) 913.
- 10) 浅井和弘, 稲場文男: 画像技術, **2**, No. 7 (1971) 15.
- 11) 清水慶昭, 稲場文男: 分光研究, **22** (1973) 195.
- 12) 清水慶昭, 遠 保宏, 稲場文男: 光学, **4** (1975) 105.
- 13) H. Inaba, Y. Shimizu, Y. Tsuji and A. Yamagishi: Photochem. Photobiol., **30** (1979) 169.
- 14) Y. Shimizu, H. Inaba, K. Kumaki, K. Mizuno, S. Hata and S. Tomioka: IEEE Trans. Instrum. Meas., **IM-22** (1973) 153.
- 15) 遠 保宏, 稲場文男: 画像技術, **7**, No. 3 (1976) 33.
- 16) 稲場文男: 科学と実験, **32**, No. 11 (1981) 8.
- 17) 稲場文男: 科学と実験, **33**, No. 2 (1982) 28.
- 18) 稲場文男: 科学と実験, **33**, No. 4 (1982) 70.
- 19) 稲場文男: 科学と実験, **33**, No. 5 (1982) 60.
- 20) 稲場文男: 科学と実験, **33**, No. 9 (1982) 22.
- 21) 後藤俊夫: 生物発光 (共立出版, 1975).
- 22) 中野 稔: 蛋白質 核酸 酵素, **24** (1979) 1431.
- 23) 浅田浩二: 生化学, **48** (1976) 226.
- 24) 浅田浩二: 蛋白質 核酸 酵素, **23** (1978) 200.
- 25) 大柳善彦: スーパーオキシドと医学 (共立出版, 1981).
- 26) 遠 保宏: 東北大学大学院工学研究科工学博士学位論文 (1978).
- 27) 水野佐一, 早石 修, 吉田善一, 美濃 真, 内藤周幸, 山村秀夫, 菅原 努, 坂本澄彦: 生体と酸素 (朝倉書店, 1976).
- 28) 平井俊策: 代謝, **15** (1978) 1329.
- 29) 二木鑑雄: 現代化学, 6月号 (1981) 24.
- 30) たとえば, G. M. Barenboim, A. N. Domanskii and

- K. K. Turoverov: *Luminescence of Biopolymers and Cells* (Plenum Press, New York, 1969).
- 31) H. Inaba, A. Yamagishi, C. Takyu, B. Yoda, Y. Goto, T. Miyazawa, T. Kaneda and A. Saeki: *Opt. Lasers Eng.*, **3** (1982) 125.
  - 32) 山岸昭雄, 田久長一, 稲場文男, 宮沢陽夫, 薄木理一郎, 金田尚志, 依田敏行, 後藤由夫: 電子通信学会技術研究報告, 医用電子・生体工学研究会, **MBE80-48** (1980).
  - 33) R. Usuki, T. Kaneda, A. Yamagishi, C. Takyu and H. Inaba: *J. Food Sci.*, **44** (1979) 1573.
  - 34) 依田敏行, 後藤由夫, 宮沢陽夫, 金田尚志, 稲場文男: 医学のあゆみ, **118** (1981) 343.
  - 35) 依田敏行, 後藤由夫, 佐伯昭雄, 稲場文男: イメージ診断, **1** (1981) 251.
  - 36) 依田敏行, 後藤由夫, 佐伯昭雄, 稲場文男: 医学のあゆみ, **123** (1982) 816.
  - 37) 依田敏行, 後藤由夫, 佐伯昭雄, 田久長一, 稲場文男: 電子通信学会技術研究報告, 医用電子・生体工学研究会, **MBE82-38** (1982).
  - 38) 薄木理一郎: 化学と生物, **19** (1981) 400.
  - 39) 坪村 宏: 酸素の化学, 第3章, 共立化学ライブラリー4 (共立出版, 1973).
  - 40) M. Nakano, T. Noguchi, K. Sugioka, H. Fukuyama, M. Sato, Y. Shimizu, Y. Tsuji and H. Inaba: *J. Biol. Chem.*, **250** (1975) 2404.
  - 41) M. Nakano, K. Takayama, Y. Shimizu, Y. Tsuji, H. Inaba and T. Migita: *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (1976) 1974.
  - 42) T. Miyazawa, T. Kaneda, C. Takyu, A. Yamagishi and H. Inaba: *Agric. Biol. Chem.*, **45** (1981) 1597.
  - 43) 宮沢陽夫, 永岡綾子, 佐藤干春, 金田尚志, 田久長一, 稲場文男: 脂質生化学研究, **24** (1982) 251.
  - 44) T. Miyazawa, T. Kaneda, C. Takyu and H. Inaba: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29** (1983) 53.
  - 45) 依田敏行, 後藤由夫, 佐藤勝朗, 佐伯昭雄, 田久長一, 稲場文男: 昭和57年度文部省科学研究費補助金総合研究(A), 極微弱光による生体内過酸化脂質の同定とその老化ならびに成人病における意義, 研究成果報告書 (1983) p. 202.