

THE HITACHI

Scientific Instrument

NEWS

October, 1964 Vol. 7 No. 5

 Hitachi, Ltd.

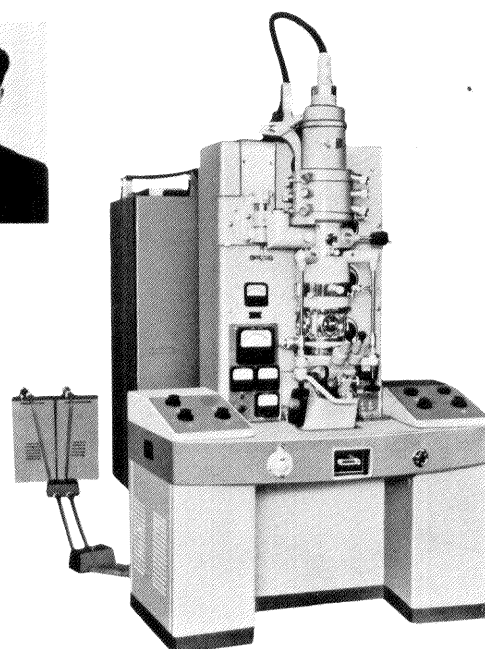
目 次

1. フォルマリン—オスミック酸二重固定について……………安澄権八郎…………… 1
2. EPS-3 形日立自記分光光度計 ……………赤松 貫之, 吉川 宏, 水野仙太郎…………… 3
——そのメリットの二, 三について——
3. 熱分解ガスクロマトグラフの再現性と温度条件について……椎 名 勝, 返田 武雄…………… 5

フォルマリン—オスミック酸二重固定について

安 澄 権 八 郎*

従来のオスミック酸または過マンガン酸カリなどの単純固定法によって得られた細胞核においては、核質が殆んど均質または凝集して、一定の organization を観察することができなくて、多くの核学者をして嘆かしめたものである。フォルマリンで前固定して、次いでオスミック酸で後固定すると、従来見られなかった核の微細構造、特に核を構成する各種の要素間の相互関係が明瞭となり、核の内部構造は細胞質の構造よりも複雑であるとさえいえる。細胞の機能は核を中心とするものであって、核の構造が細胞のそれよりも綿密であることは、当然肯定できる。この二重固定法は材料および目的によって必ずしも同一でないが、その基本となる方法を述べる。5~10% フォルマリン（日本薬局方のフォルマリンはフォルム・アルデヒドを40%含むから、フォルム・アルデヒドの2~4%）（磷酸または Millonig で pH 7.0~7.4 に緩衝）中で 30 分乃至 2 時間（さらに長時間も良好）固定し、7.5% 蔗糖液で数回水洗し、次いで同様に緩衝された 1~2% オスミック酸で固定する。以後の操作は従来と変りない。最近フォルマリン以外に glutaraldehyde その他のアルデヒドが用いられているが、核の固定にはフォルマリンが最適と考える。アルデヒドは容易に酸化して蟻酸を生ずるから（蟻酸は組織を膨化さ

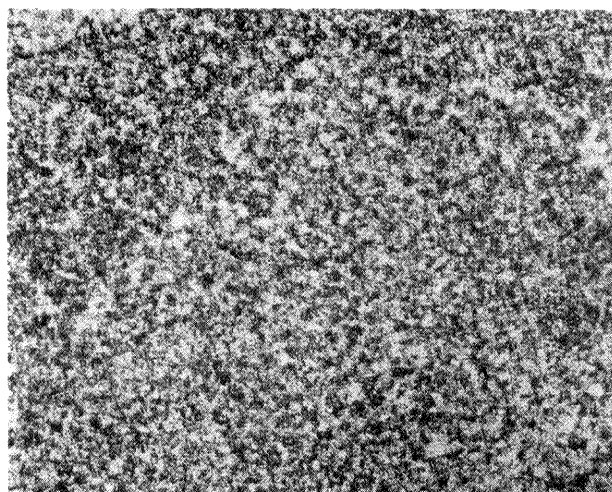


* 奈良医科大学 解剖学教室 電子顕微鏡研究室

す) アルデヒドの保存は日光をさけ、冷所に貯蔵しておくことが肝要である。この二重固定によって得られた最近の電子顕微鏡像を参考までに供する。

第1図は Ehrlich 腹水癌分裂前期早期の核を示す。この細胞の同時期では、多数の仁(NL)が現われ、これを染色質(CH)が包囲する。染色質は仁よりも密度大なるために容易に判別できる。核質中に多くの細胞質(CY)の陥入(IN)が現われる。また核膜の内外2層のうちの内層が核質中に突入して、仁まで到達し、あたかも管状に見える(C)。この構造を安澄と杉原は intranuclear membrane または intranuclear canaliculus と称えた(Experimental Cell Research, 1964 in press)。この膜を中心として染色体の replication が行なわれることが明らかに示される。あたかも細胞質において、endoplasmic reticulum の二重膜を中心として蛋白の合成が行なわれると同様である。仁は RNP から構成されると考えられていたが、この固定法によって DNP をも含むことが明らかとされている。仁のほぼ中央に密度の低い部分が認められるが、この部分は nucleolus (NO) と称えられ、RNA の合成または貯蔵と関係あると考えられつつある。

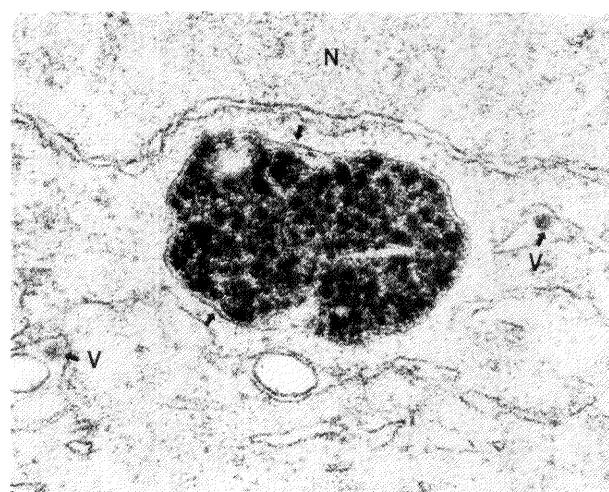
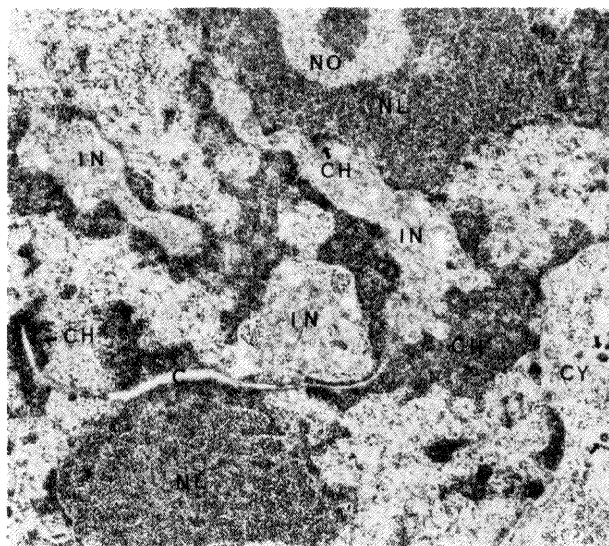
Ehrlich 腹水癌細胞中には virus が現われることは、既に発表されているが、この視野においても細胞質中に少なくとも2個の virus 粒子(矢印)が見られる。



第2図 Ehrlich 腹水癌細胞核中の染色質。フォルマリン-オスミック酸二重固定。撮影 HU-11 A. $\times 200,000$.

第2図は Ehrlich 腹水癌細胞核中の染色質の微細構造を示す。単純固定法によると、染色質は均質に見える場合が多いが、フォルマリン-オスミック酸二重固定法によると、微細な線維から構成されていることが明らかである。しかも各線維毎に2本の原線維から構成されていることがわかる。密度小なる層をはさんで、2本の密度大なる線が見られる(矢印)。その各々の大きさは約 $20\text{\AA}$ である。各原線維はさらに螺旋状であるように見える。Watson & Crick の DNA 螺旋構造が生物細胞核中において可視の段階に一步近づいたといつてよかろう。

第1図 Ehrlich 腹水癌細胞。フォルマリン-オスミック酸二重固定。撮影 HU-11 A. $\times 35,000$.



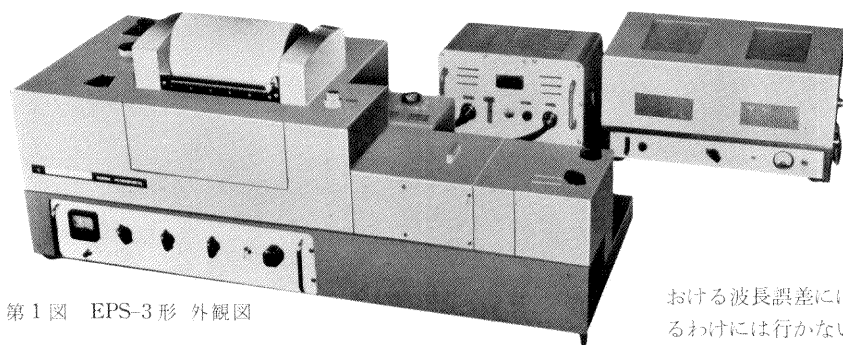
第3図 日本脳炎罹患ハツカネズミ脳視床部神経細胞の細胞質中に現われた封入体。フォルマリン-オスミック酸二重固定。撮影 HU-11 A. $\times 110,000$.

第3図は日本脳炎に罹患したハツカネズミの脳の視床部の神経細胞の細胞質中に現われた封入体を示す。ほぼ楕円形の封入体は核(N)に接して現われ、これは一重または三重の限界膜(矢印)で包まれる。この三重膜は $20\text{\AA}$ 大の密度大なる内外の層と、その中間層 ($30\text{\AA}$) から構成される。日本脳炎ウイルス(V)は細胞質の小胞中に現われ、その大きさは $370\sim 380\text{\AA}$ である。このウイルス粒子よりも小なる粒子(約 $230\text{\AA}$ 大)が多数封入体の中に見られる。この固定法は組成の差を明らかに示す利点があるが、この例においても封入体中の粒子とウイルス粒子とが密度の上において顕著な差を示すことは興味深いと考える。

EPS-3形 日立自記分光光度計

——そのメリットの二、三について——

赤松 貫之*, 吉川 宏*, 水野仙太郎*



第1図 EPS-3形 外観図

最近数年間製作をつづけてきた EPS-2 U 形自記分光光度計をモデルチェンジして EPS-3 形とした。第1図は本装置の外観図である。この際設計の主眼とした点、およびそのメリットの二、三について簡単に述べる。

(1) 波長リニア表示としたこと

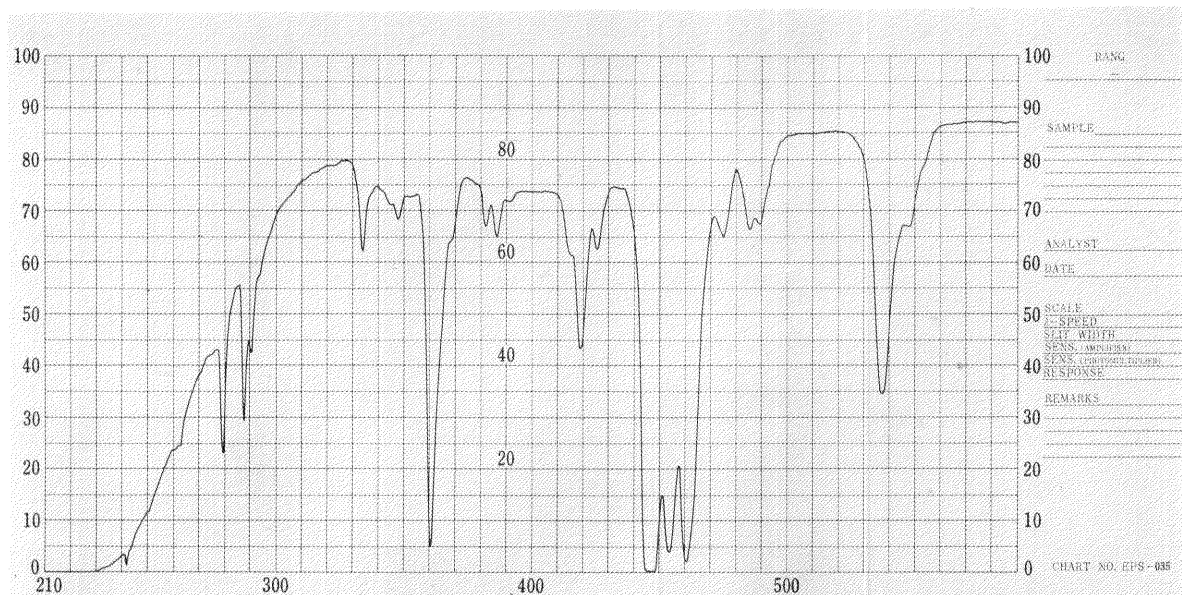
EPS-2 U 形では、波長目盛板および記録ドラムの回転がプリズム回転角度とリニアな関係にある。良く知られているように一般にプリズムの分散は波長によって大きく変わるので、目盛板および記録ドラムの波長表示は、リニアではない。EPS-3 形ではカム機構を用いて波長リニア表示とした。赤外分光光度計などでは、やはりカム機構を用い、プリズムの分散特性を補償して、波長リニアまたは波数リニアなどの表示を行なっている事から考えると、紫外～可視の分光光度計で波長リニア表示をカムを用いて実現することには、さほど問題ないように見える。然し実際には後者では著しく高いカム精度が要求され、その理由は次の如くである。

(イ) 紫外、可視域で透明な石英またはガラスは、可視域で分散が小さい。一方これを用いた分光光度計の方から、この領域に

おける波長誤差にはあるリミットがあり、これを無制限に悪くするわけには行かない。したがって従来の分光光度計では、プリズムを一樣に回転し、これを連動して回転する波長目盛板に、非直線的に波長を目盛する方法を用い、波長精度を確保してきた。つまりプリズムの分散特性から見て、相当“無理な”波長精度を、単純な機構を用いることによって実現してきたわけである。したがって、この波長転換をカムで行なうとすればこれに当然高い精度を要求されるのは必然である。

(ロ) またカムの精度を高くして、従来の手動の分光光度計または EPS-2 U など保証してきた波長精度が得られたとしてもなお問題が残る。というのは可視域における吸収スペクトルは、殆んど試料について相当滑らかなので、波長精度に凹凸がある、すなわち波長誤差が波長に対して正になったり負になったりすると、測定された吸収スペクトル曲線がこれを反映して凹凸をもつ結果となる。したがってカムには一層の滑らかさが必要となる。

以上の理由によって、プリズム回転の精度 — その一樣さ — は 10^{-5} radian まで要求される。このようなことは他の形式の分光光度計には見られないものである。このような要求を満足するカムは勿論手仕上げでは製作不可能に近い。われわれは数倍に引き伸ばしたマザーカムを何度かの修正を繰返して完成し、これを数分の一に自動的に縮小して研磨する所謂“ナライ”研磨装置を用い製作している。したがって製品毎による波長精度のバラツキは非常に小さい。



第2図

* 日立製作所那珂工場

(2) 紫外可視域の境界に吸収のある試料を測定するのに
便利にしたこと

ESP-3では、 $340\sim 360\text{ m}\mu$ を紫外可視域の境界とし、これより長い、または短い波長域は夫々紫外、可視域となっている。しかし実際の試料では、この境界付近に吸収スペクトルが見られるものが多い。本装置では紫外用チャートと、可視用チャートの $1\text{ m}\mu$ 当りの目盛幅は夫々 2 mm 、 1 mm 、で $2:1$ の比になっている。一方波長目盛板と記録用ドラムの回転比は $2:1:1/2$ 切換可能で、このことを利用すると一枚のチャートに $340\text{ m}\mu\sim 360\text{ m}\mu$ をさしはさむ波長域— $360\text{ m}\mu$ の幅—の吸収スペクトルを、同じ波長目盛幅で記録可能である。第2図はポロニウムガラスの吸収スペクトルをこのようにして測定したものである。

(3) その他のメリットについて

(イ) 光源の切換へが簡単である

測定が紫外域～可視域にまたがる場合、光源を水素放電管～タングステンランプに切換える時に、EPS-2Uでは光源ミラー固定ピンの抜差、ミラーの切換、回路スイッチの切換など煩雑な操作を必要としたが、EPS-3形では光源部ミラーのツマミを切換えるのみでミラー軸に連動するスイッチおよびタイムリレーの働きにより自動的に光源が点灯するようになっている。したがって従来の四動作を一動作で済ませることができる。

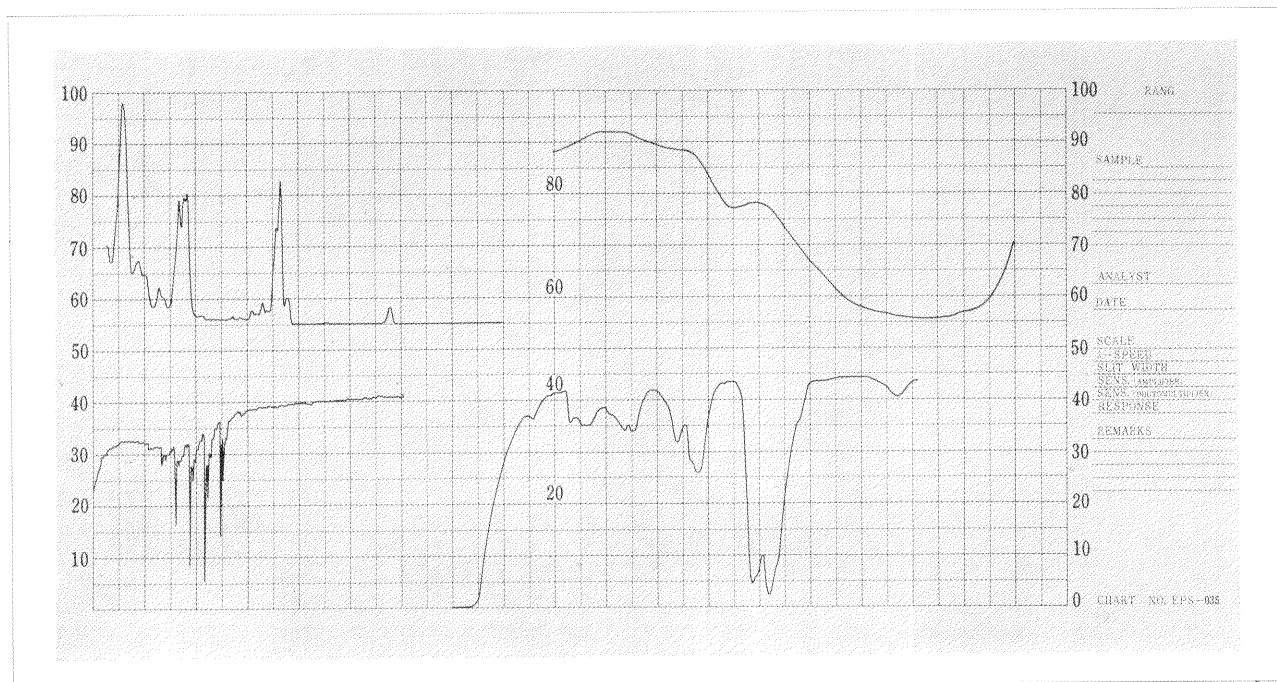
(ロ) 周囲の温度変化による波長ズレが少ない

分光素子として使用しているプリズムの温度特性のため、周囲温度の変化によって測定波長精度に誤差を生ずるもので、分光器固定ミラーにバイメタル動作を応用した機構を採用することによって波長ズレを補償し、実用上無視できる程度まで誤差を軽減している。

(ハ) 縮少記録が可能である

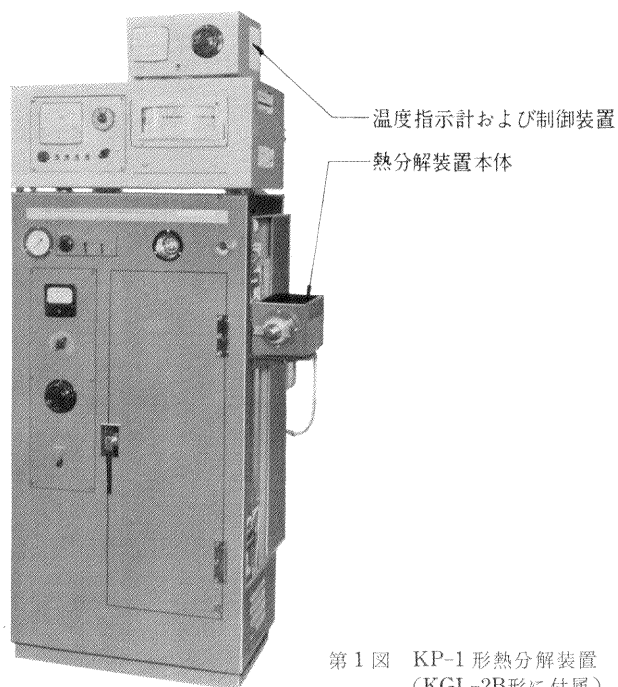
透過率 100% 以下の試料を測定する時 $T0\sim 200\%$ のレンジに切換えかつ波長送りを $1/2$ に縮少すれば例、横ともに $1/2$ の縮少記録が可能であり、これは一枚のチャートに4種の試料を測定記録できる利点がある。第3図はその記録例である。

第3図



熱分解ガスクロマトグラフの再現性に及ぼす要因としては、熱分解温度、分解時間、試料量、キャリアガス流速、分解装置、および操作方法などを挙げることができるが、就中温度条件が最大の要因である。

以下 KP-1 形 熱分解装置の概要と再現性の実験結果につき記述する。



第1図 KP-1形熱分解装置 (KGL-2B形に付属)

1. KP-1 形 熱分解装置の概要

加熱炉により予め一定温度に加熱した分解管中に試料を導入し分解させる間接方式で、その構造を第2図に示す。

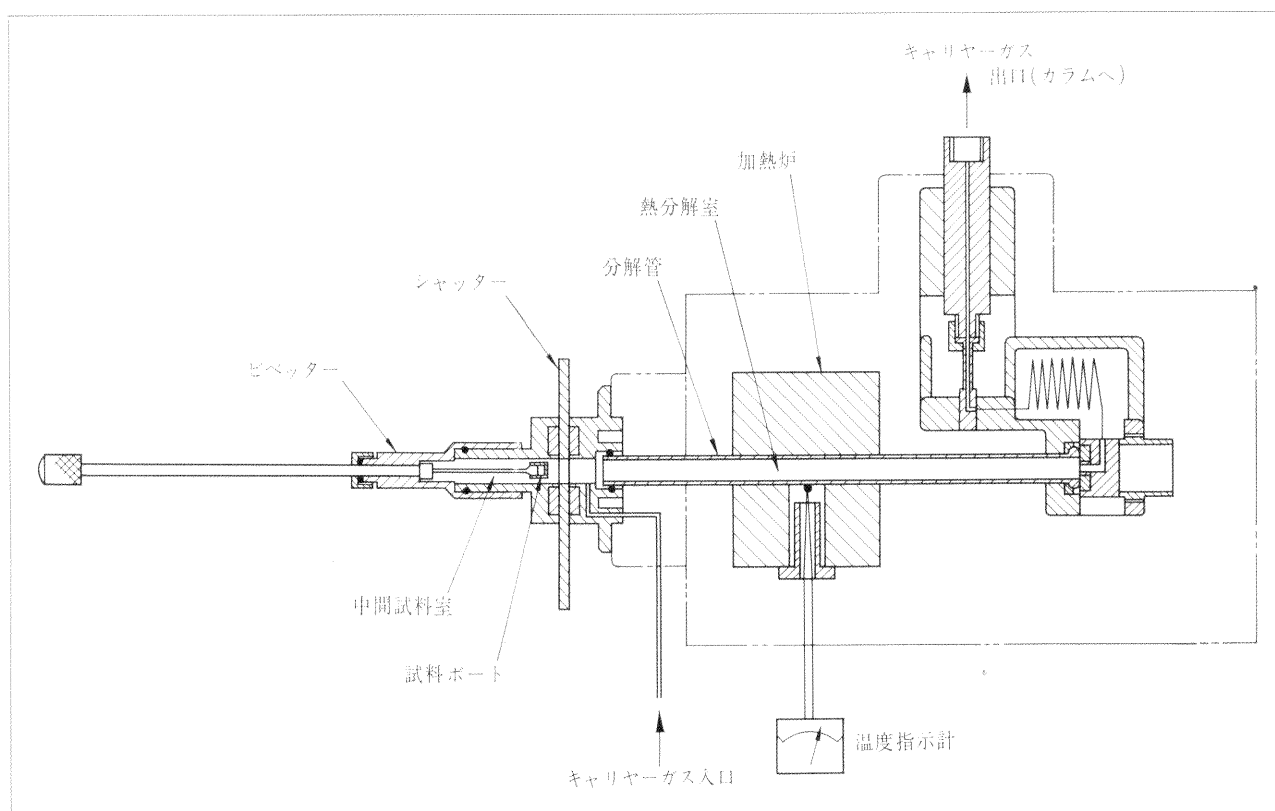
熱分解管は石英ガラス製で、内径 8 mm、内容積 8 ml で、例えばキャリアガス流速 60 ml/min の場合、管中のガスが完全に置換えられるに要する時間は約 8 sec である。温度測定は熱分解室と等価な小室を熱分解室近くに設け、この小室に熱電対を挿入して検温するようにした。指示計はミリボルト電圧計で最小目盛 50℃、最大目盛 1,100℃ である。

試料の挿入は容積 0.35 ml の白金製ボートに予め秤量した試料を収納し、ピペッターによりキャリアガスをストップすることなく挿入できる所謂中間試料室法によっている。

一般に間接加熱方式に基づく熱分解装置では、温度の安定時間が短かくかつ試料の分解時間も 5~20 秒程度であるため、スタビライザーを付属していない。つまり監視調節を前提としている。KP-1 形もこの点に関しては同じである。第1表に KP-1 形の 800℃ の場合における、電圧変動に対する温度変化と安定時間との関係を示す。

第1表 KP-1 形の電圧変化に対する温度と安定所要時間との関係

電圧 (V)	電圧降下の場合		電圧上昇の場合	
	温度 (−℃)	時間 (min)	温度 (+℃)	時間 (min)
1	8	1.5	8	1.5
3	23	4.0	23	2.5
5	40	7.0	40	4.0
10	83	17.0	83	17.0



第2図 熱分解装置構造図

* 日立製作所那珂工場

2. 実験条件および方法

高温度の温度測定では、とくに読取精度が問題になるので、われわれは付属の温度指示計による場合の外に、電子管式記録計を用い、連続的に温度の監視を行なった場合に付き実験してみた。

試料は板状のポリスチレンをナイフを用いて約1mgに切削し、0.001 mg 感度の天秤で秤量した。ガスクロマトグラフは KGL-2A形を用い、検知器は熱伝導セルによった。測定は連続6回行なった。再現性の検定はポリスチレン中のスチレンに注目し、試料量に対するスチレン面積の比で行なった。

実験条件を第2表に示す。

3. 実験結果

温度指示計によった場合を第3表に、記録計によった場合を第4表に、また記録の一例を第3図に示す。即ち当初に予想した通り記録計により監視した場合の方が、温度指示計によった場合よりも約5%良好な結果を得た。しかし温度指示計による監視でも、バラツキ10%以下で分析できることが分った。

第3表 温度指示計によった場合の再現性

試料 No.	試料量 (W)	スチレンピーク面積 (S)	S/W (xi)	※ 誤差率
1	1.02 mg	4,560 mm ²	4,480	-1.80 %
2	0.89	3,920	4,410	-3.33
3	0.84	4,080	4,850	+6.32
4	1.05	4,680	4,460	-2.23
5	1.01	4,780	4,730	+3.69
6	1.01	4,480	4,440	-2.67
算術平均値 $\bar{x}$			4,561.6	
バラツキ			440.0	9.65 %

第2表 KP-1形 再現性実験条件

項目	条件	項目	条件
熱分解温度	760°C	キャリアーガス	He 60ml/min
熱分解時間	20 sec	検出器電流	200 mA
室温	21°C	記録感度	3mV Full scale
カラム	TCP 20% 1m	チャートスピード	20ml/min
カラム温度	110°C		

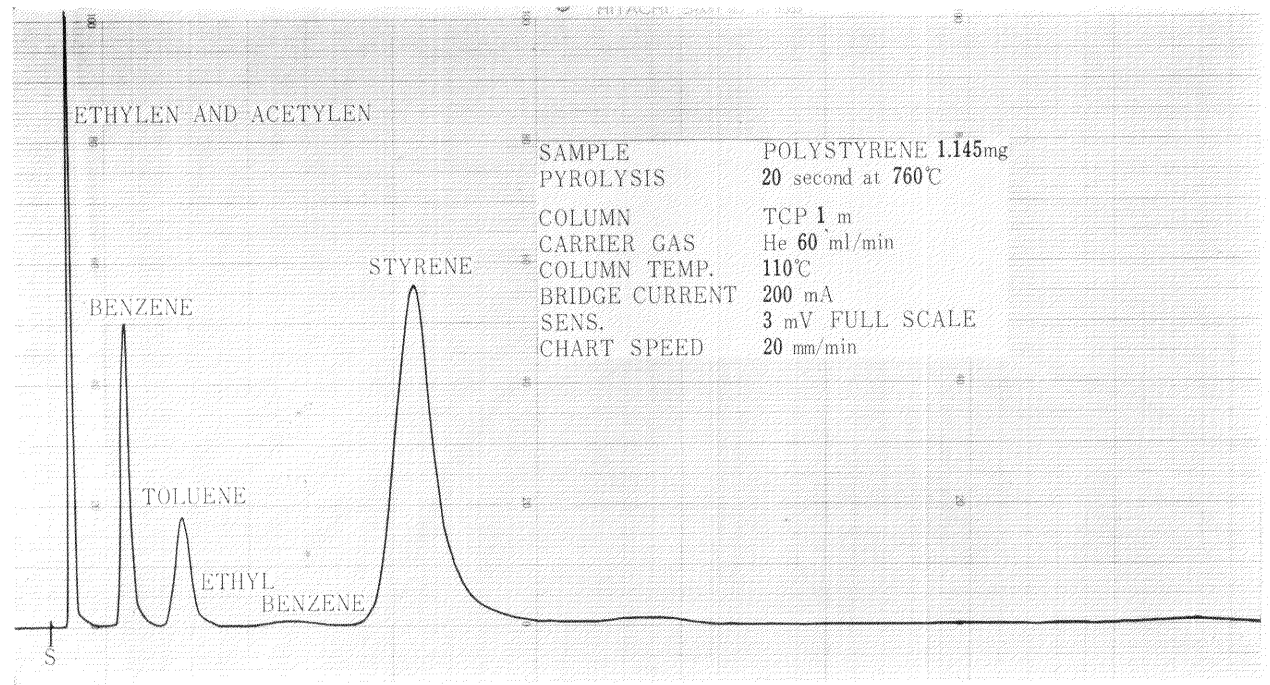
注 熱分解温度の測定は零接点を設けてないので真の熱分解温度は室温を加えた値である。

第4表 記録計によった場合の再現性

試料 No.	試料量 (W)	スチレンピーク面積 (S)	S/W (xi)	※ 誤差率
1	0.970 mg	1,456 mm ²	1,503.09	-3.05 %
2	1.115	1,732	1,553.36	+0.20
3	1.145	1,742	1,521.40	-1.87
4	1.059	1,665	1,572.24	+1.41
5	1.075	1,699	1,580.47	+1.94
6	1.085	1,705	1,571.43	+1.43
算術平均値 $\bar{x}$			1,550.33	
バラツキ			77.38	4.99 %

※誤差率は次式による

$$\text{誤差率}(\%) = \left(\frac{\bar{x}_i}{\bar{x}} \times 100 \right) - 100$$



第3図 再現性の測定例（ポリスチレンのクロマトグラム）

4. 考 案

熱分解条件により分解生成物の異なることは、Lehmann¹⁾ および Etter²⁾ などの報告により既に周知のことであるが、それらは何れも 100°C おきの Data であるため、微少な温度変化により生ずる影響を推定することは適当でなく、われわれはポリスチレンにつき、10°C おきの変化に対する生成量につき実験し、第4図に示す結果を得た。即ち 760°C の領域では、10°C につき 3.6% の変化を示すことが分った。一方高温での温度測定では、指示および読取誤差を合わせて、約 10°C (再現性にして 4%) 程度の誤差はまぬかれがたい。さらにこの他に面積の測定、試料の秤量、記録計の指示、およびその他の誤差を含めると、ほぼ実験結果と一致する。またこの結果は武内³⁾ らのポリスチレンとアクリロニトリル共重合物(粗粒)の再現性実験結果ともよく一致している。ただ武内などの実験においては、温度の測定条件が報告されていないので、この点に関しては別に確かめる必要がある。

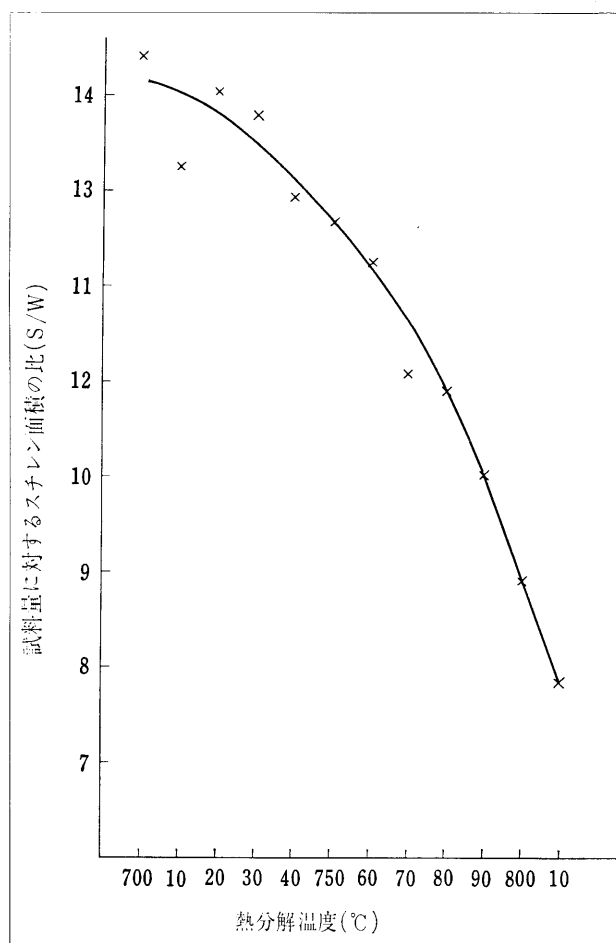
5. 結 言

以上ポリスチレンのみについての実験ではあるが、高分子物質のポリスチレンやポリメチルメタアクリレートなどは 90% 以上が定量的にその構成モノマーに戻ることが確かめられているので、そうした物質に関する限り、現在の装置で充分満足な結果を保證することができる。

なお温度監視の煩雑さをなくし、さらに精度もあげたい場合には安定度 0.5% 以下のスタビライザーを前置する必要がある。

参考文献

- 1) F.A. Lehmann, G.M. Brauer, Anal chem, **33**, 673 (1961)
- 2) K. Etter, P.F. Varach, Anal chem. **35**, 69 (1963)
- 3) 武内次夫, 角五正弘, 工業化学雑誌 第67巻 第2号 (1964)



第4図 熱分解温度 10°C おきの変化に対するスチレン生成量

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 7 No. 5

昭和39年10月20日印刷

昭和39年10月30日発行

非売品

年6回毎偶数月発行

編集人 麓 吉 次

発行人 白 川 義 雄

発行所 株式会社日立製作所

印刷所 株式会社日立印刷所