



THE HITACHI

SCIENTIFIC INSTRUMENT
NEWS

APRIL, 1971

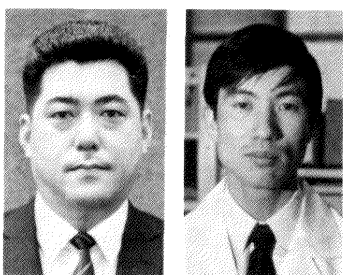
Vol.14 No.2-2₁

臨床検査特集

400形 日立自動分析装置について

* 奥田 清 * 森田 寛二 *

大阪市立大医学部中央臨床検査部では、400形日立自動分析装置の導入を決定し、本装置の調整および基礎実験を終えた後、昭和45年8月3日より国産機としては最初の日常検査への稼動を開始した。



奥田 清 森田 寛二

今回は現在までに得られた若干の経験を報告し、参考に供する。

本装置の概要

Discrete方式、6チャンネルで、データ処理はLog-LinearおよびA-D変換後、濃度として各検体ごとにプリントアウトされる。反応はテフロン製反応容器に、同社のオートピペットを用いて試薬の添加ならびに血清の採取が行われ、恒温水槽中で一定時間（可変）保温後、呈色度を比色計（干渉フィルタ付き）で測定され、データ処理後プリントアウトされる。比色計は複光路方式のためdriftがほとんどなく、また用途に応じて血清ブランクを電気的に補正することもできる。検体採取機構はCarry Overを最少限にするため、ピペット先端の洗じょうその他が考慮されている。また反応混液のかくはんは分析対象により選択が可能である。

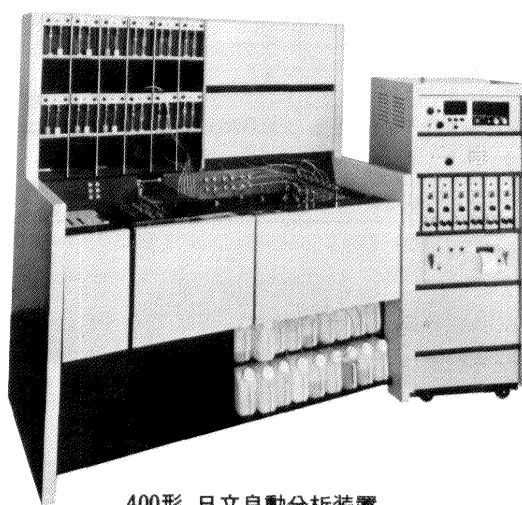
測定項目の選択

日常検査への導入に当っては、当病院の各診療科から少なくとも6項目同時に依頼される確率を各検査について検討し、また臨床的情報としての有意性も考慮し、さらに本装置の特質などの条件として、次の6項目を適用した。すなわち、GOT、GPT(R-F変法)、総ビリルビン(Jendrassik変法)、TP(ビウレット法)、TTT、ZTT(マックラガン・ラインホルド法)である。

反応系の概要

表1に各項目の測定条件をまとめた。トランスアミナーゼ活性値測定に関しては3mM DNPおよびアルカリ溶液に0.2N-NaOH、0.1Mロッセル塩およびシリコーン消泡剤添加試薬を使用した。また、T、P測定用ビウレット試薬には界面活性剤(ティボール)を3%の割合に添加した。なお、検体使用量は6項目当り360 μ lであるが、再検査を考慮してサンプルカップには0.5~0.6mlを採取しておく必要がある。

* 大阪市立大学 医学部 付属病院 中央臨床検査部



400形 日立自動分析装置

表1 各項目の測定条件

ライン	項目	方法	反応温度	反応時間 (min)	測定波長 (m μ)
1	GOT	R-F変法	37℃	30-3-3	505
2	GPT	R-F変法	37℃	30-3-3	505
3	Bilirubin	Jendrassik 変法	25℃	23-10-3	600
4	TP	Biuret	25℃	36	540
5	TTT	Reinhold	23℃	36	660
6	ZTT	Reinhold	23℃	36	660

目次

臨床検査特集

- 400形 日立自動分析装置について…………… 奥田 清・森田寛二…………… 1
- 400形 日立自動分析装置について…………… 荒木英蔵
三橋文子・植本和子・和田佳子・仁井谷久暢…………… 5
- 034形 日立液体クロマトグラフによる有機酸
(TCAサイクル)の分配クロマトグラフィ……………
尾辻省悟・満留敏弘・越山邦子・宮内圭治・鷹野重威…………… 7
- 208形 日立原子吸光分光光度計と臨床化学分析……………
内野興一…………… 11
- 040形 日立自動試料前処理装置による蛍光分析の自動化
……………佐藤猛英・内藤茂昭…………… 13
- K23形 日立ガスクロマトグラフによる尿中17-ケトステ
ロイドおよびプレグナンジオールの分画定量……………仁科甫啓…………… 15
- 臨床用クロライドカウンタ(CL-1)…………… 水野映二…………… 17

本機の精度

表2には同一検体多重測定の実現性およびベースライン(試薬ブランク)の変動についての測定結果を示した。トランスアミナーゼ活性値測定においては、ベースのSDがそのまま検体のSDに表現されている様子である。その後、ピペッタノズル先端に残存する水滴がSDに影響を及ぼすと考え、エアーポンプおよびノズルを用いて残存する水滴を吹き飛ばすことにより、SDの減少することを確認した。現在本機はこの装置を取付けて使用している。なお、他の項目については有意な変動を示さず良好な成績であった。

表2 同一検体多重測定の実現性およびベースライン(試薬ブランク)の変動

	$\bar{x}$	SD	試薬ブランクのSD
GOT	20.0	1.34u	1.02u
GPT	18.1	0.75u	0.73u
Bil.	0.8	0.00mg/dl	0.00mg/dl
T P	6.9	0.016g/dl	0.00g/dl
TTT	1.52	0.04u	0.02u
ZTT	6.20	0.16u	0.00u

前試料の汚染

表3にCarry Overの実測値を示した。トランスアミナーゼ活性の高値を示す検体についてややCarry Overを認めるのみで、その他については有意の影響を認めなかった。

表3 Carry Overの実測値

	GOT	GPT	Bil.	TP	TTT	ZTT
血清1	56	46	8	110	11	70
	56	47	7	110	11	68
	54	46	7	110	11	69
水	2	0	0	0	0	2
	1	0	0	0	0	0
	-1	-1	0	0	0	1
血清2	31	49	22	71	8	32
	35	52	21	71	8	32
	34	51	21	71	8	31
水	0	2	2	0	0	0
	-1	-3	0	0	-1	0
	0	-1	0	0	-1	0
血清3	10	17	6	75	8	18
	12	17	7	75	8	18
	10	17	6	75	9	17
水	0	0	0	0	0	1
	0	0	-1	-1	0	0
	0	-1	0	-1	0	0
血清4	218	439	88	69	10	28
	219	451	90	69	10	29
水	4	14	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0

モニタの使用

本機のデータはデジタルプリンターにより記録されるため、測定の過程を監視することができない。このためわれわれは図1のようにアナログレコーダをモニタとして使用し、セル内の気泡や電気的な原因によるノズルのチェックを行なっている。

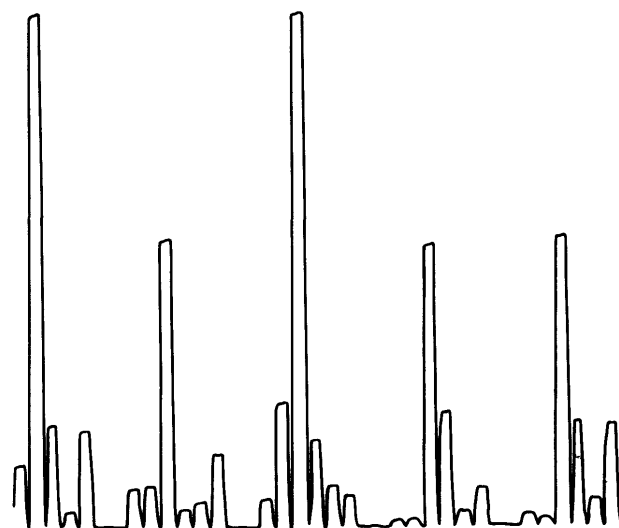


図1

他法との相関

図2は400形日立自動分析装置による血清GOT活性測定値と用手法との相関を示している。ほぼ80カルメン単位までは直線性を示すが、高値になるにつれて400形の数値がより低い単位を示す。したがって、高値を示す検体は適当な希釈を必要とする。

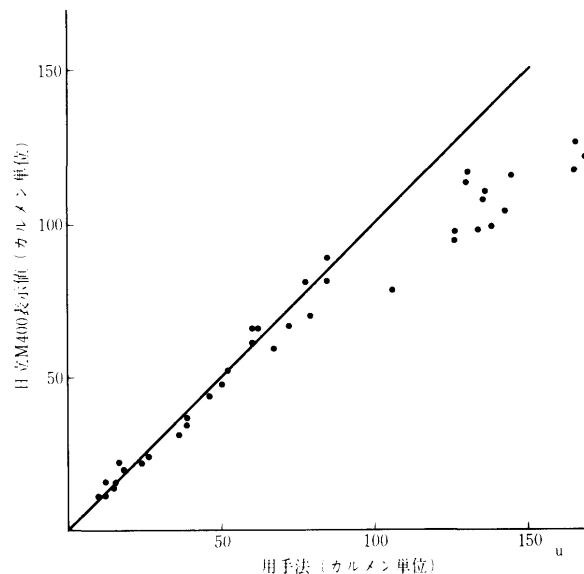


図2 400形日立自動分析装置による血清GOT活性測定値の用手法との相関(R-F法)

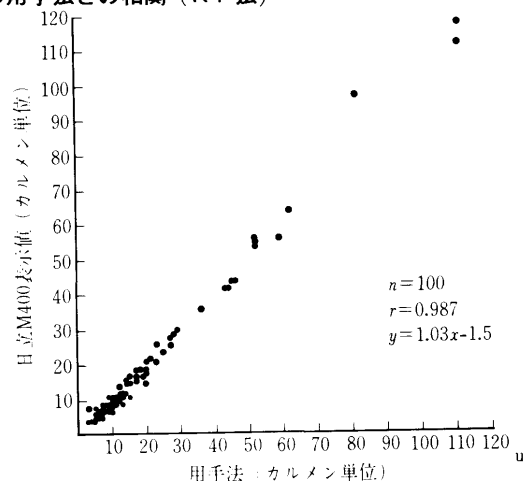


図3 400形日立自動分析装置による血清GPT活性測定値の用手法との相関(R-F法)

図3に血清GPT活性測定値の用手法との相関を示す。130カルメン単位までの相関は図に示すように $r=0.987$
 $y=1.03x-1.5$ という数値を示した。しかし、GOTと同様、130単位付近から高値の検体では400形の数値が用手法に比べて低い値を示している。

図4に血清ビリルビン測定値の用手法との相関を示す $r=0.986$ と直線性は満足すべき結果を示したが、 $y=0.86x+0.1$ と用手法に比べて400形の値がやや低い値を示した。

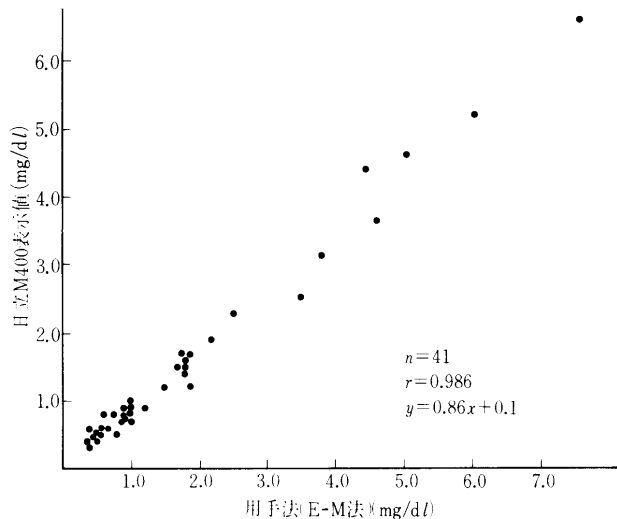


図4 400形 日立自動分析装置による血清ビリルビン測定値の用手法との相関 (E-M法)

図5に血清総蛋白量測定値のPye-Unicam AC 500使用との相関を示す。 $r=0.986$ 、 $y=0.91x+0.7$ とほぼ満足すべき値を示した。

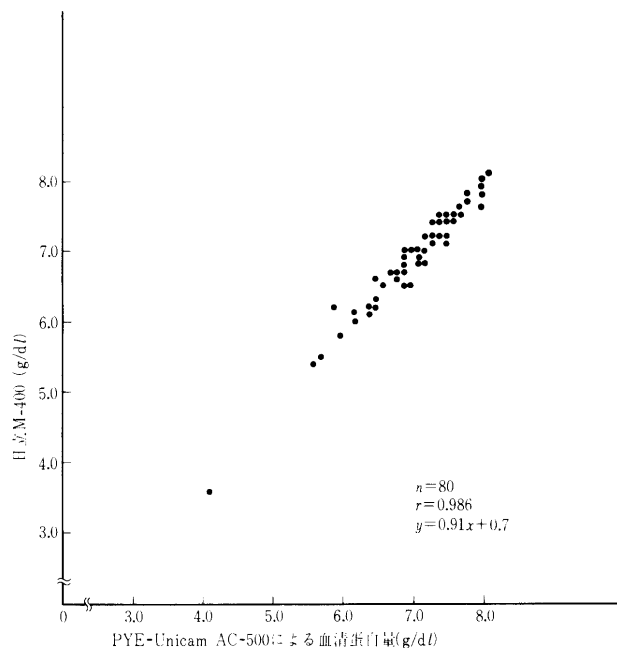


図5 400形 日立自動分析装置とPye-Unicam AC 500による血清総蛋白量測定値との相関

図6に血清T T T測定に及ぼすかくはんの影響を示すが、かくはんの有無による差は見られなかった。以後T T T測定にはマグネティックスターラによるかくはんを取外した。

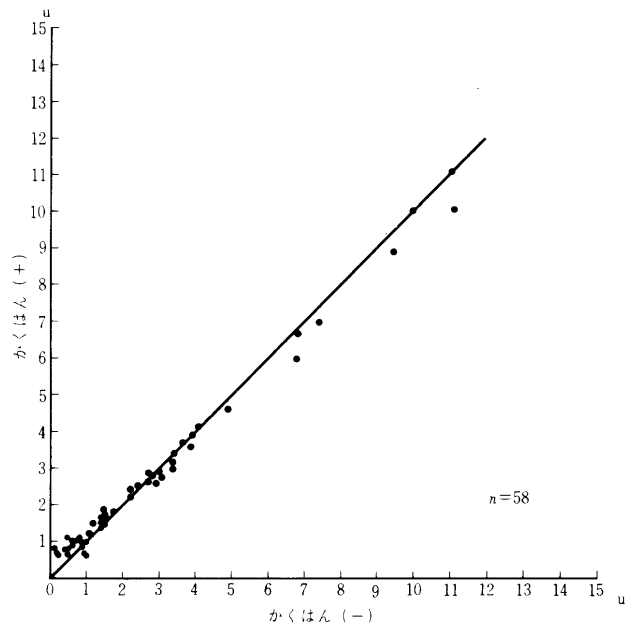


図6 400形 日立自動分析装置による血清T T T測定に及ぼすかくはんの影響

図7に血清T T T測定値の用手法との相関を示す。用手法において比色計はColeman Jr.を使用した。高値の検体では400形の値がColeman Jr.の値よりもより高い値を示した。これは比色計の特性や測定温度の相違による差と考えられる。

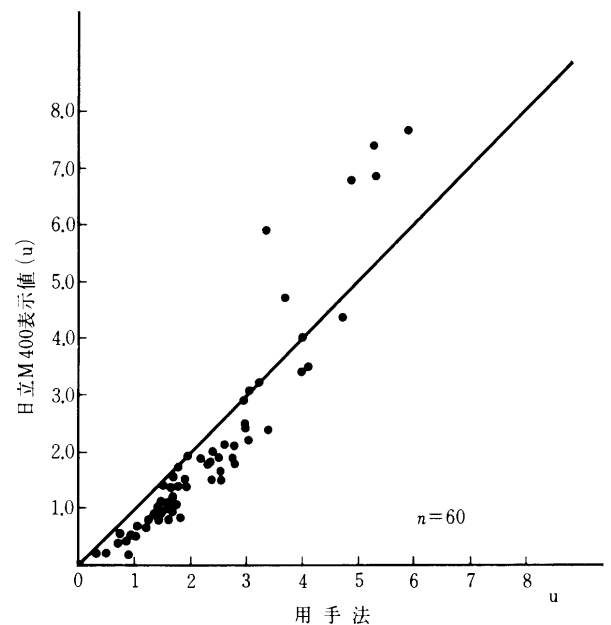


図7 400形 日立自動分析装置による血清T T T測定値の用手法との相関 (Coleman Jr. 使用)

図8は血清Z T T測定値の用手法との相関を示すがT T Tと同様の結果を得た。

精度管理

400形における精度管理の結果の一部を表4にまとめその一例を図9に示した。

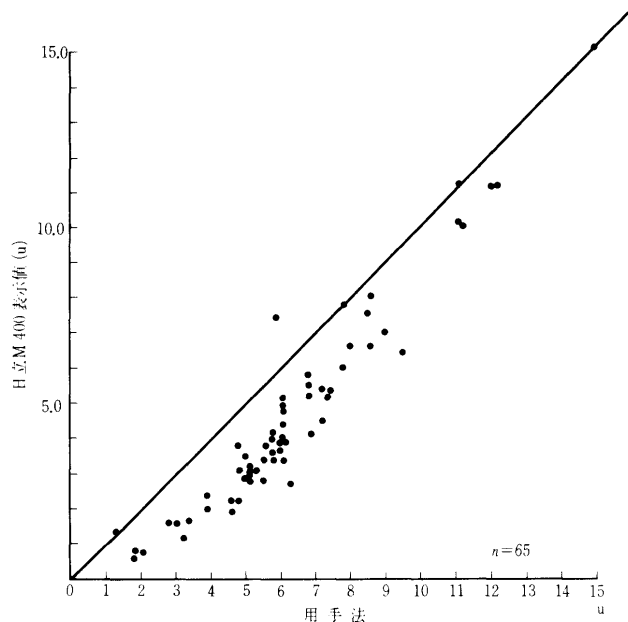


図8 400形 日立自動分析装置による血清ZTT測定値の
用手法 (Coleman Jr. 使用) との相関

表4 日立400形 による精度管理値

	$\bar{x}$	SD	CV
GOT	20.5	1.16u	5.6%
GPT	9.0	0.3u	3.3%
Bil.	0.55	0.04mg/dl	7.2%
T P	6.8	0.026g/dl	0.4%
TTT	1.5	0.1u	6.6%
ZTT	6.1	0.23u	3.8%

日数 21日

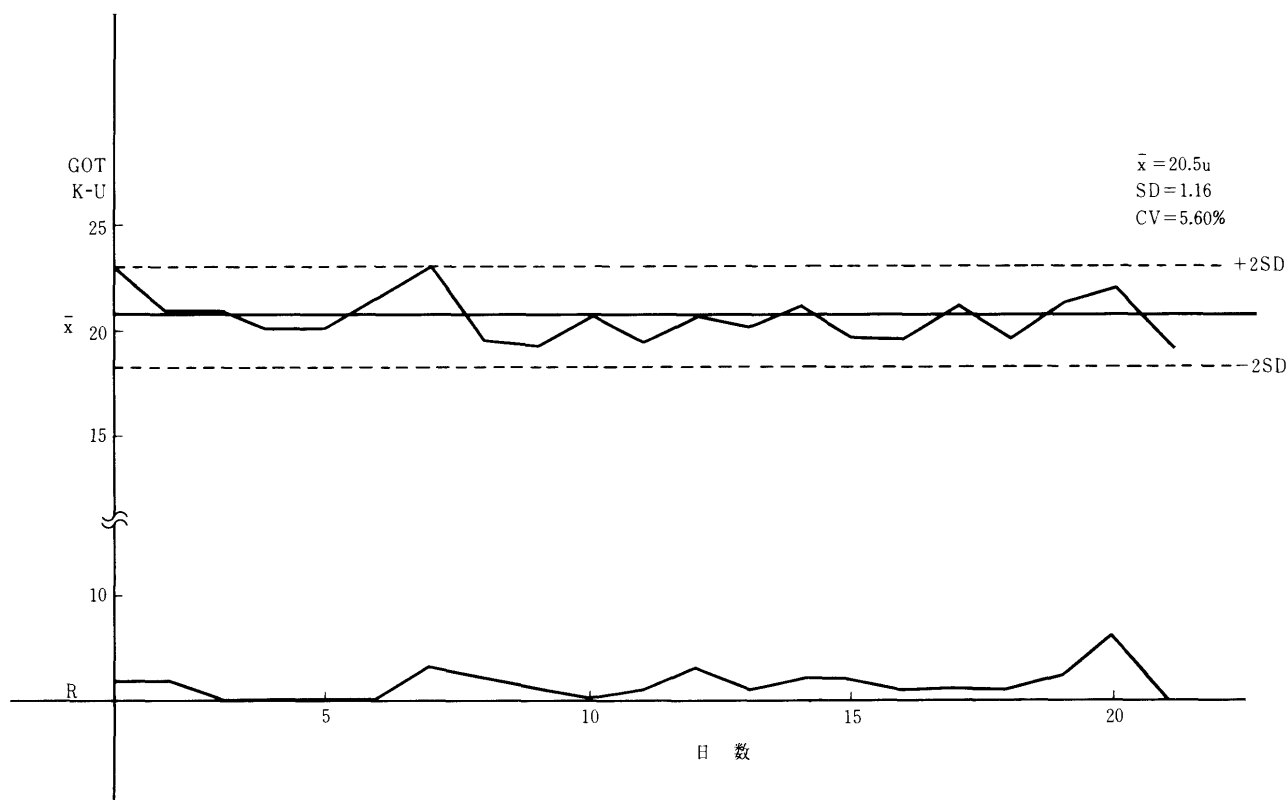


図9 400形 日立自動分析装置によるGOTの精度管理

まとめ

本機は検体使用量が比較的少なく、また長時間連続運転にも耐え得ることが確認ができた。データ処理に関しては濃度または単位でデジタルプリントアウトされるため簡単であり、比較的大量の検体を処理してもはん雑さは感じられない。一方、いくつかの初期トラブルやトランスアミナーゼの高値を示す検体を希釈により処理する手間やピペッタの調整(約2カ月はそのまま使用できる)、TTTやZTTの標準液などの問題点を残しているが前記の6項目をスクリーニングテストとしてセットし、本機をフルに使用しつつあるのが現状である。

400形 日立自動分析装置について

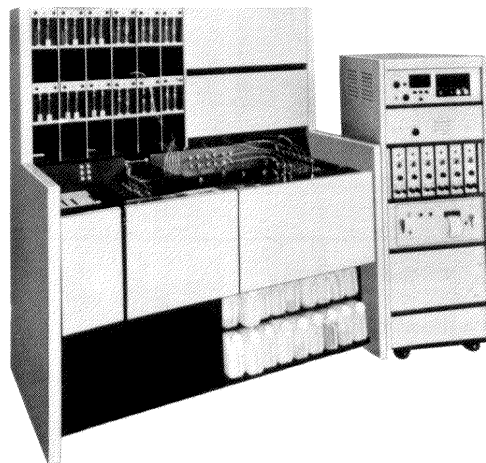
荒木英蒨* 三橋文子*

植本和子* 和田佳子* 仁井谷久暢*



植本和子 和田佳子 三橋文子

荒木英蒨 仁井谷久暢



400形 日立自動分析装置

はじめに

臨床化学検査は診療のなかで医師みずからが行ってきたものであるが、分光分析がとり入れられるに及んで、定量化、高度精密化が進み、もっぱらその方面の専門教育をうけた検査技術者の手で行われるようになった。その後、多種目の体内成分をひん繁に測定するという検査の濃密化傾向は著しく、従来の検査方法では病床数の15%は必要であるといわれる検査室スタッフ獲得の困難性、熟練技師養成のむずかしさなどとあいまって、次第に、試薬分注、比色などの分析操作の部分的機械化、能率化が進められてきた。最近ではさらに完全自動化をめざすcontinuous flow system, discrete batch systemなどの多チャンネル分析装置が開発されている。

400形 日立自動分析装置は上記の目的に対処して開発されたdiscrete batch systemの自動分析装置で、この方式の装置に共通した用手法の定量分析操作をそのまま自動化できる。したがって測定種目の選択に柔軟性があること、検体ごとに別個の容器で反応させるため相互の汚染がないことなどの特長をもつが、加えて誤動作の際反応中の検体を可能な限り生かすように設計された警報一停止装置、反応容器の洗浄再生装置などの特性をもつ装置である。この装置による血清分析で、例えば患者の栄養状態、肝臓機能などが総合して検査できる。

本稿では、400形 日立自動分析装置による臨床化学分析の基礎的検討事項の一部について述べたい。

分析種目

検査の件数分布、緊急度と本装置各partsの特性を考慮して、本装置2台による検査種目を表1のように選定した。

表1 検査種目とその条件

検査種目	測定方法	定量的測定範囲	備考
総蛋白	Biuret法	0~10.0g/dl	血清量50 μ l 測定波長 540m μ
Albumin	HABCA法	0~6.0g/dl	血清量 100 μ l 測定波長 480m μ blank: 1 channel
Bilirubin	Michaelson変法	0~20mg/dl	血清量 100 μ l 測定波長 600m μ
チモール混濁反応			血清量50 μ l 測定波長 660m μ
硫酸亜鉛反応			血清量50 μ l 測定波長 660m μ
アルカリホスファターゼ	Kind-King 法	0~60unit	血清量40 μ l 測定波長 540m μ blank: 1 channel
トランスアミナーゼ (GOT)	Reitman-Frankel変法	0~70unit	血清量30 μ l 測定波長 505m μ blank: 1 channel
トランスアミナーゼ (GPT)	Reitman-Frankel	0~80unit	血清量30 μ l 測定波長 505m μ blank: 1 channel

分析の定量性、精度

各種目について検量線を作成したところ表1に示した範囲内で直線性を示した。図1, 2にBilirubin, アルカリホスファターゼの検量線を示した。日常検査では日差変動を少なくすることが重要な条件であるが、この再現性は本装置各partsの動作の再現性などが総合されたものであり、血清採取、希釈、試薬分注、flowcell-比色計での相互汚染の可能性など、各段階での問題が含まれる。本装置による繰返し測定の際のC.V.は、例えば総蛋白、アルブミン、アルカリホスファターゼについて、それぞれ1%以下、2%、3%であった。

* 国立がんセンター 検査部 生化学

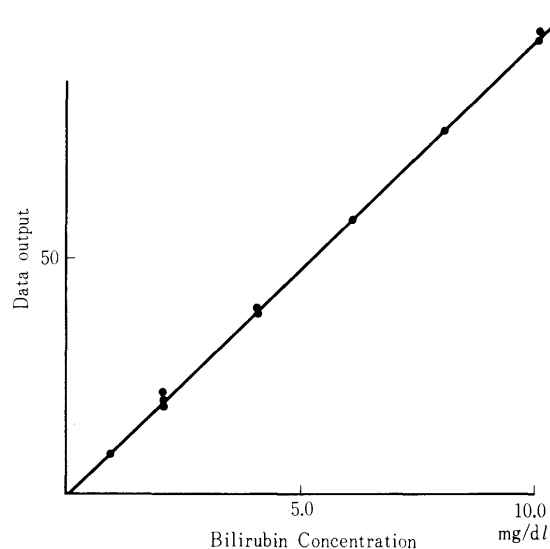


図1 Bilirubin 検量線

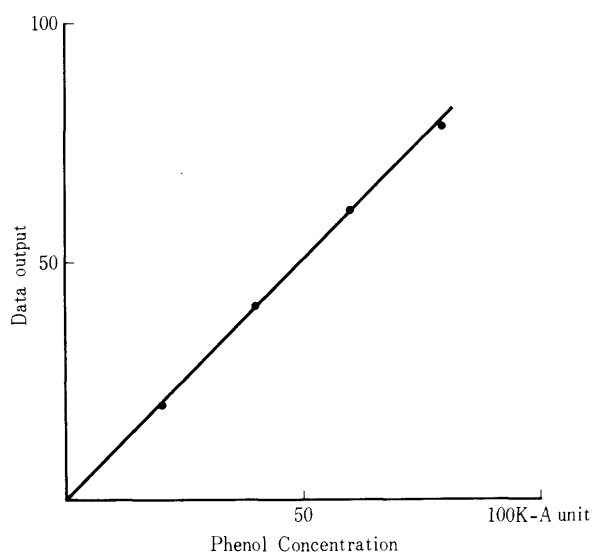


図2 アルカリホスファターゼ (Kind-King法) 検量線

用手法との相関

基本的には用手法の定量操作を自動化したものであるが、反応時間、検体—試薬など諸条件の改変から、定量条件を検討することが必要である。前記8種目の検査について従来の用手法による測定値と本装置による測定値を比較検討したが、ほとんどの種目についてはほぼ満足できる相関性を認めた。

試料相互の影響

flow cellへの吸上げ部分での著しい高(低)値を示す試料の直後の試料測定値への影響はわずかである。例えば総蛋白濃度7.0g/dlから0溶液への汚染率は1.4~2.1%、蛋白濃度として0.1~0.2g/dlである。他種目での汚染率もわずかで、他の誤差範囲内に入る程度である。

データ処理方法

400形 分析装置での分析成績はロール紙と紙テープに出力される。紙テープのデータは試料番号—患者登録番号を対応させたうえで処理され、当日の検査報告書は電算機 (HITAC-8300) から出すことができる。

おわりに

以上のような基礎的検討から、本装置の性能はわれわれをほぼ満足させるものであることが示された。本装置が一日たりとも分析を休むことを許されない日常生化学検査の自動化に有効に使用されるためには、

- ①各partsの補給、修理が迅速であり、
 - ②安定した均質な試薬の持続的供給、
- などが不可欠の条件と考えられる。

034形 日立液体クロマトグラフによる有機酸 (TCAサイクル) の分配クロマトグラフィ (その1)^{1) 2)}

尾辻省悟* 満留敏弘* 越山邦子*

宮内圭治** 鵜野重威**

1. 緒 言

生体代謝過程には種々の有機酸が含まれており、それらの有機酸特にTCAサイクルに関する有機酸を相互に分離定量することは生化学的に極めて意義深いことである。

有機酸の分析手段として、従来、電気泳動や種々のクロマトグラフィ (ガス、分配³⁻¹⁰⁾、イオン交換¹¹⁻¹⁴⁾などが報告されている。しかし、いずれも分析条件あるいは精度などの点で問題点を少なとししない。

著者らは、034形 日立液体クロマトグラフに改良を加えるとともに、分配クロマトグラフィによる有機酸分析の基礎的検討、簡易化を試み好結果を得たので、その概要を報告する。

分配クロマトグラフィで分離した有機酸の検出法として、普通はフラクションコレクタに分取した各分画についてNaOH滴定を行うが、この滴定法を自動化する方法は困難であり、一般的な物性モニタを利用する方法、例えば、Shimomuraら¹⁵⁾は差動屈折計、Yamazakiら¹⁶⁾は赤外吸収法、Forsanderら¹⁷⁾はpHモニタ法、Zerfingら¹³⁾はdichromate酸化法を用い、Auto Analyzer (Technicon) によって自動化している。

本実験で用いた検出法は、Kesnerら¹⁸⁾によるo-Nitrophenol Na塩を用いる中和滴定法である。これは有機溶媒中で行うため定量性に優れ、分配クロマトグラフィの自動モニタとして適している。

2. 実験方法

2-1 装 置

分析には、034形 日立液体クロマトグラフを耐薬品形に改良して使用した。流路系統図を図1に示す。すなわちカラム系は、流速120ml/hに設定したポンプ1を用いて6チャンバのグラディエント装置の溶離液で溶出するようにし、ポンプとカラムの間にあらかじめテフロンコイルに充てんした試料をバルブの切換えによってカラムに添加されるようなサンプリング装置を設けた。溶出液は先ずそのまま紫外 (260, 280m μ) 部の吸収を測定するために多波長流動光度計-1を通してから、あとで述べる指示薬をポンプ2で30ml/hの流速で送り、混合をよくするため内径2mmのテフロンチューブ1~2mをコイル状に巻いたミキシングコイルを通してから、多波長流動光度計-2で350m μ の吸収を測定し、これら3波長の吸収をQPR83形日立多打点記録計で記録させるようにした。

2-2 展開方法

有機酸の分析には複雑なグラディエント溶離法を要求される例が多いが、本研究では6チャンバのグラディエント装置を用いた。すなわち、各チャンバにそれぞれ0, 7, 15, 30, 50, 50% (V/V) の ι -アミルアルコール/クロロホルムを各200mlずつ入れ、展開溶離液とした。溶離液の流量は120ml/hとした。



034形 日立液体クロマトグラフ

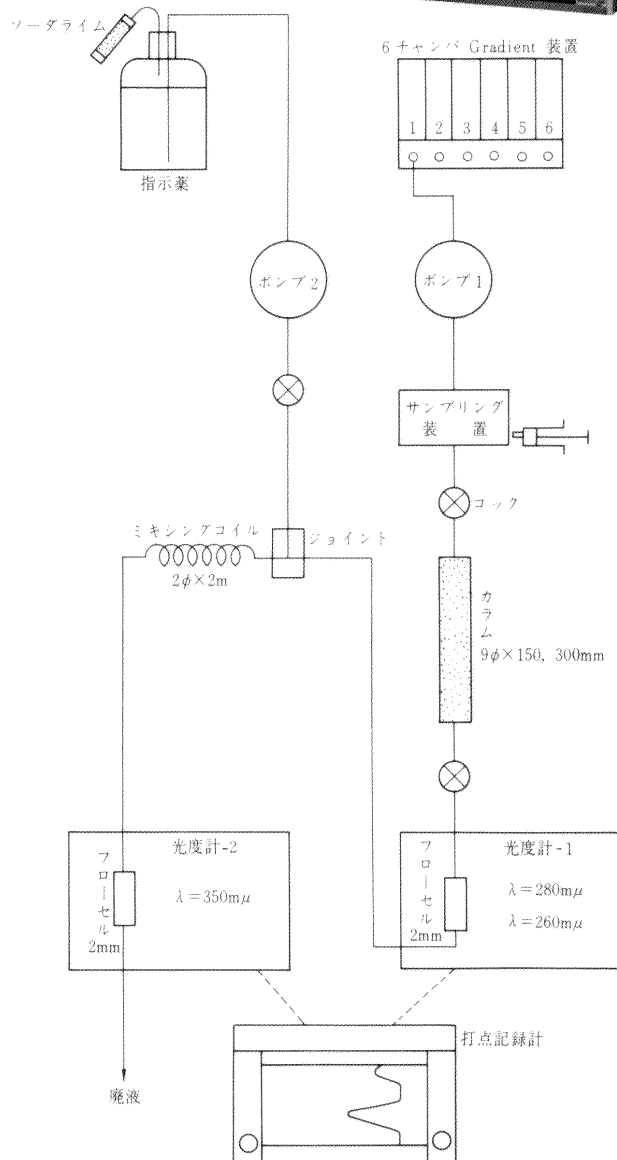


図1 流路系統図

* 鹿児島大学医学部付属病院 中央検査部
** 日立製作所 那珂工場

2-3 カラム

固定相としてのシリカゲルは Silicic Acid, 100mesh (Powder, Mallinkrodt, A. R.) を使用した。乾燥したシリカゲル 92g に $0.1\text{NH}_2\text{SO}_4$ 50ml を加え、べとつきがなくなるまでガラス棒で混合する。シリカゲルに吸着した硫酸の再現性をよくするため、クロロホルムでシリカゲルを洗い、クロロホルム中に貯えておく。

カラムは 9mmID×300mm を使い、シリカゲルを充てんし、約10分間クロロホルムでカラムを洗い流してからサンプリングを行い、それと同時に展開を開始した。

2-4 標準試料調製法

液体クロマトグラフィでは、ガスクロマトグラフィに比べて試料の複雑な前処理を必要としないことが便利な点である。標準混合試料は50% (V/V) アセトン/水に各酸を溶解して調製した。

2-5 指示薬調製法

1g の *o*-Nitrophenol Na 塩を 500ml のエタノールに加え、加温溶解させる。これに *t*-アミルアルコール 500ml、クロロホルム 1l を加える。*t*-アミルアルコール、クロロホルムは指示薬溶液の密度、粘度をカラム展開液のそれに近づけるためであり、カラム展開液と指示薬溶液の混合をよくするのに役立っている。指示薬溶液の溶媒の混合比を変化させても定量には影響を与えない。

3. 実験結果と測定例

3-1 指示薬滴定法の検討

滴定塩基である *o*-Nitrophenol Na 塩を過剰に使用し、連続的、自動的にカラム溶出液の有機酸の定量を行う。これは有機酸の $[\text{H}^+]$ イオンにより、*o*-Nitrophenol Na 塩のフェノキシドイオン型から遊離のフェノール型になり、*o*-Nitrophenol による 350m μ の吸収が増大する。有

機酸の量と、中和により生成された *o*-Nitrophenol の量は等しいので、350m μ の吸収の読みにより有機酸の定量を行うものである。図 2 に *o*-Nitrophenol Na 塩、*o*-Nitrophenol、有機酸を加えた場合の吸収スペクトルを示した。

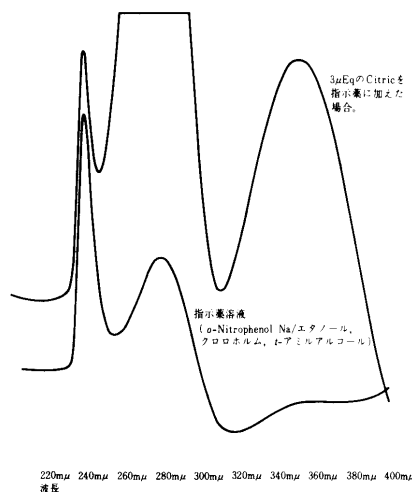


図 2 (I) *o*-Nitrophenol Na の吸収曲線と有機酸を加えた時の変化

測定器：124形 日立自記分光光度計
スケール：0-0.1
セル厚：10mm

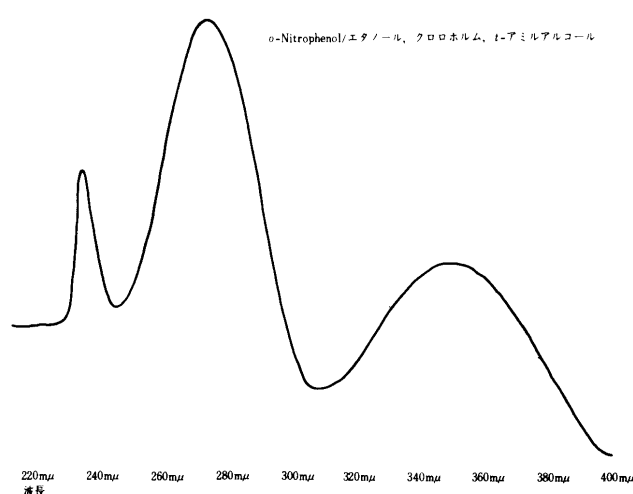


図 2 (II) *o*-Nitrophenol の吸収曲線

測定器：124形 日立自記分光光度計
スケール：0-0.1
セル厚：10mm

3-2 測定例

図 3 に以上の方法で得られたクロマトグラムを示す。試料濃度は各酸について 3 μeq である。9mmID×300mm カラムで分析した場合、分析時間は 7 時間 30 分であった。各有機酸の溶出位置の再現性は十分立証されたが、シリカゲルの詰め方によりピークの幅がわずかに変化する。ピークの幅とカラム充てん法との関係は今後さらに検討を要する。

Kesner の報告によれば、ベースラインは分析の進行とともにドリフトしているが、これはシリカゲル中の硫

酸が次第に溶出してきて指示薬と反応し、350m μ のブランク値が高くなるためであろう。著者らの実験ではベースラインは非常に安定であり、ブランク値の上昇は見られなかった。展開液の *t*-アミルアルコールの濃度が高くなるにしたがって、硫酸層のカラムにおける位置が下降し、硫酸層がカラムより溶出してくるとベースラインが急激に上昇する。

なお、reference 側を空とすれば 260m μ の吸収はグラディエントおよび炭素間二重結合有機酸のモニタとして使用することもできる。

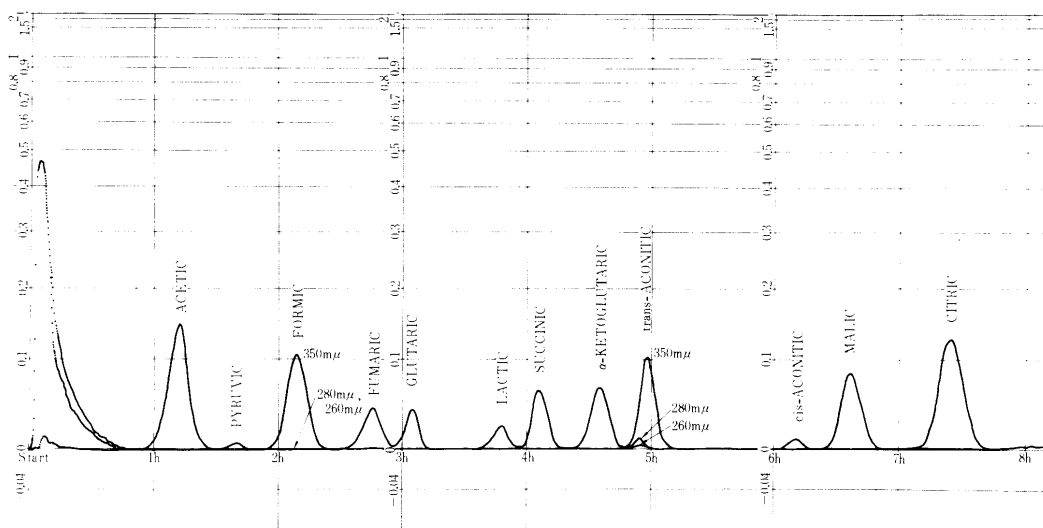


図3 有機酸の標準分析——(1)

図4にAcetic, Formic, Glutaric, α -Ketoglutaric, *trans*-Aconitic, Malic, Citricの7成分を分析したクロマトグラムを示す。測定条件は9mmID×150mm カラムを用い展開液はグラディエント装置の各チャンバに0, 7, 10, 30, 50, 50% (V/V) *t*-アミルアルコール/クロロホルム各100mlを入れて展開した。分析時間は3時間半であった。このように試料中の有機酸の種類が多くないときには、条件を適宜変更して簡易分析を行うことも可能である。図5は天然物中の有機酸分析の一例として、ミカン果汁中の有機酸を分析したものである。絞り出した果汁中の固形物を遠心分離で除き、その上澄液に6N-硫酸を数滴添加し、それを供試試料とした。分析条件は先の図3と全く同じである。

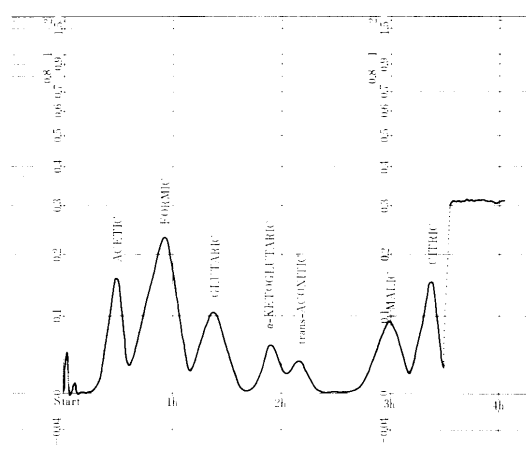


図4 有機酸の標準分析——(2)

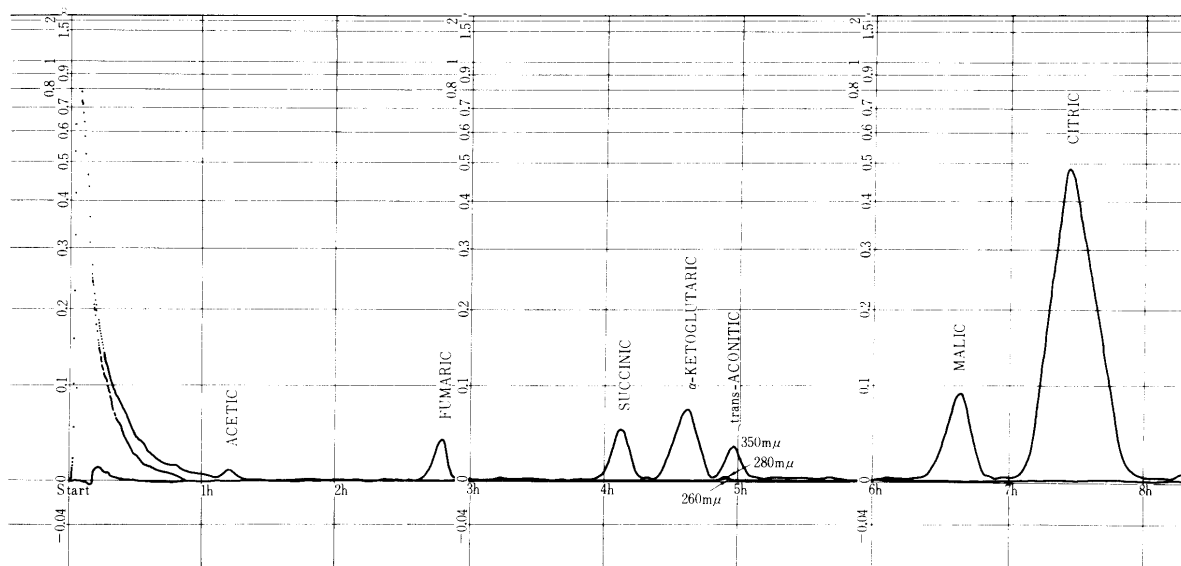


図5 ミカン果汁中の有機酸の分析

4. 結 語

本研究は有機酸 (TCAサイクル) の分配クロマトグラフィについて主に基礎分析を行ったもので、この結果、有機酸分析が可能であることが確認された。本法は広い応用面をもつ意義ある分析手段と考えられる。さらに分析の簡易化、条件の改善によって簡単なルーティン分析化を目標としている。

著者の尾辻ら^{1) 2)}が現在、基礎的改良面、定量精度、および血液、肝、癌などをはじめとする生体諸組織および体液における有機酸(TCAサイクル—TCA-Acidogram)の分析とその病態生理解明への応用面を追求中である。その結果については本報(その2)に発表の予定である。

5. 参考文献

- 1) 尾辻省悟, 満留敏弘, 越山邦子: 臨床病理, **18** (補冊), 151 (1970)
- 2) 尾辻省悟, 満留敏弘, 越山邦子: 生化学, **42**, 583, (1970)
- 3) Isherwood, F. A.: Biochem. J., **40**, 688, (1946)
- 4) Phares, E. F., Mosbach, E. H., Denison, F. W. and Carson, S. F.: Anal. Chem., **24**, 660, (1952)
- 5) Frohman, C. E., Orten, J. M. and Smith, A. H.: J. Biol. Chem., **193**, 277, (1951)
- 6) Bulen, W. A., Varner, J. E. and Burrell, R. C.: Anal. Chem., **24**, 187, (1952)
- 7) Zbinovsky, V. and Burris, R. H.: Anal. Chem., **26**, 208, (1954)
- 8) Marshall, L. M., Donaldson, K. O. and Friedberg, F.: Anal. Chem., **24**, 773, (1952)
- 9) Kesner, L. and Muntwyler, E.: J. Lab. Clin. Med., **61**, 604, (1963)
- 10) Kesner, L., Muntwyler, E., Griffin, G. E. and Abrams, J.: Anal. Chem., **35**, 83, (1963)
- 11) Busch, H., Hurlbert, R. B. and Potter, V. R.: J. Biol. Chem., **196**, 717, (1952)
- 12) 江頭暁: Japan Analyst, **10**, 693, (1961)
- 13) Zerfing, R. C. and Veening, H.: Anal. Chem., **38**, 1312, (1966)
- 14) Schenker, H. H. and Rieman, W.: Anal. Chem., **25**, 1637, (1953)
- 15) Shimomura, K. and Walton, H. F.: Anal. Chem., **37**, 1012, (1965)
- 16) Yamazaki, C., Nagashima, N. and Takenishi, T.: Anal. Chem., **32**, 733, (1960)
- 17) Forsander, O. and Neuenschwander, P.: J. Chromatog., **5**, 515, (1961)
- 18) Kesner, L. and Muntwyler, E.: Anal. Chem., **38**, 1164, (1966)

メ 毛

208形 日立原子吸光分光光度計と臨床化学分析

内野興一*

血清、尿、あるいは生体組織中のナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、鉛、水銀、カドミウム、リチウムなどの金属元素の分析が必要となる場合はきわめて多い。しかし、臨床化学分析においては、分析精度だけでなく、その性質上、試料量に制約があり、しかも、分析結果が早急に必要とされるため、炎光光度計によるナトリウムおよびカリウムの分析法を除いて、他の元素については満足できる分析法は少ない。

最近、非常にすぐれた金属分析法として原子吸光分光光度計が注目され、今まで行っていた他の分析法をこれに置きかえることによって、測定迅速化、省力化を図り、また将来、不可能だった物質の分析に広く利用されている。原子吸光分光光度計は発表されてからまだ10年たらずであるが、その普及はめざましく、金属元素の分析を必要とするあらゆる分野で研究や日常分析に盛んに活用されており、その数は全世界で10,000台以上、日本国内で2,000台近くに及んでいる。また、特に近年公害問題がクローズアップされるに伴い、原子吸光分光光度計は尿中の鉛や毛髪中の水銀、臓器中のカドミウムなどの分析には不可欠の装置となっている。

検出限界

生体試料の分析においては、下記のような理由から特に検出限界がすぐれた原子吸光光度計が必要である。

- (1) ナトリウムやカルシウムなど一部の元素を除いて金属成分の含有率は非常に低い。特に公害測定の対象となる金属元素はかなり低濃度であることが多い。
 - (2) なるべく少量の試料で分析することが前提となるため、試料は高度に希釈して測定できることが望ましい。
 - (3) 試料を高度に希釈して測定できれば、多種多様な物質が共存しているものから目的物だけを分離するというめんどろな前処理が省略できることが多い。
 - (4) 血清のように粘稠性の試料も希釈すれば粘度の問題が解決できる。
- このため、208形原子吸光光度

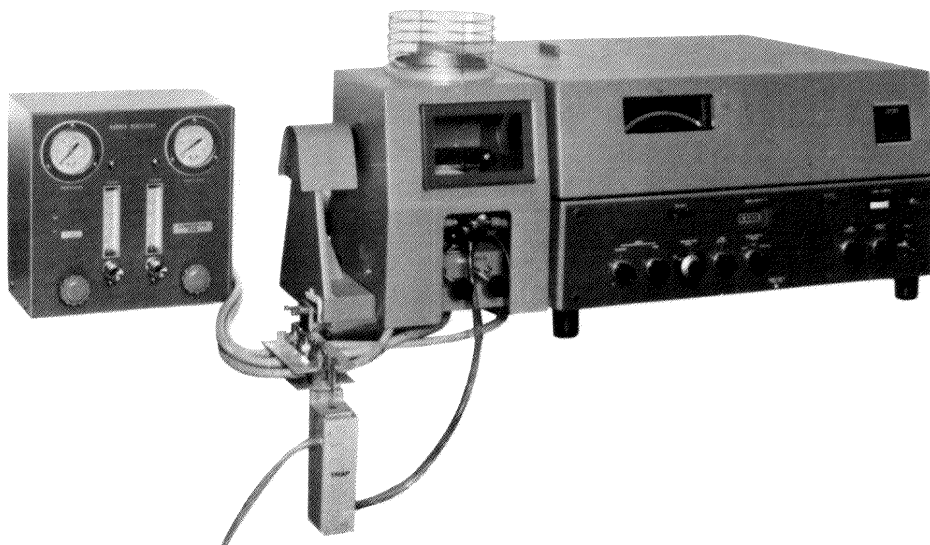


図1 208形 日立原子吸光分光光度計

表1 208形 日立原子吸光光度計による検出限界

元素	検出限界 (ppm)	元素	検出限界 (ppm)	元素	検出限界 (ppm)	元素	検出限界 (ppm)
Ag	0.0015	Co	0.003	Mg	0.00005	Ru	0.004
Al*	0.02	Cr	0.003	Mn	0.001	Sb	0.1
Au	0.003	Cu	0.001	Mo	0.05	Si**	0.04
Ba	0.11	Fe**	0.002	Na	0.001	Sn	0.14
Be*	0.001	Hg**	0.00005	Ni	0.003	Sr	0.002
Bi	0.05	In	0.008	Pb	0.008	Ti**	0.04
Ca	0.001	K	0.005	Pd	0.0035	V**	0.03
Cd	0.001	Li	0.0015	Pt	0.02	Zn	0.001

* 高温バーナ使用

** Hgガスセル使用

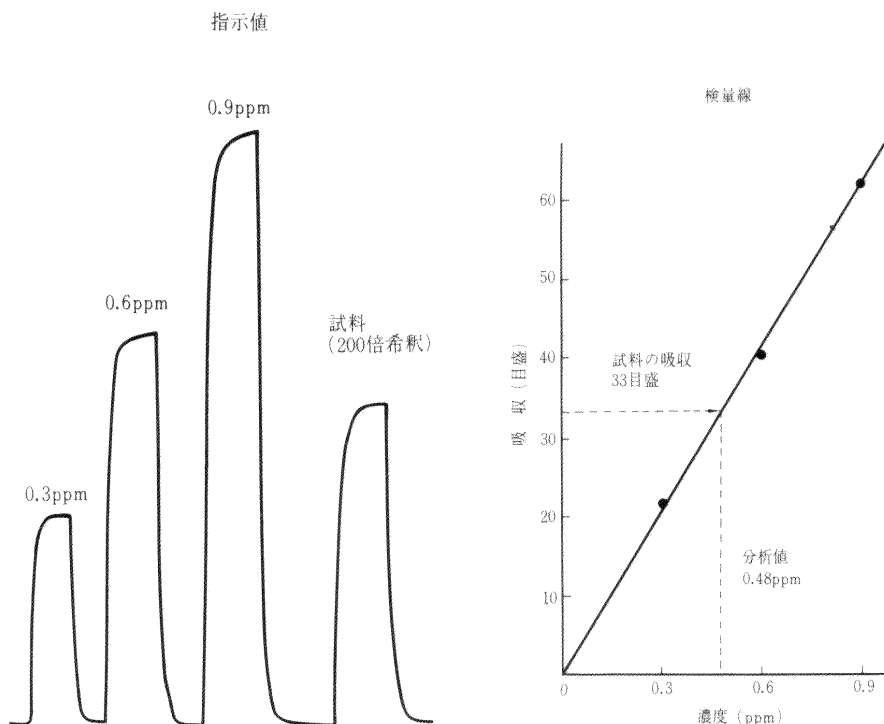


図2 血清中Caの測定例

計はスリースロット形バーナによって吸収感度を上げ、さらにロックイン形アンプを採用することによって、フレームの発光に基づくノイズを除去して指示値の安定性を高めている。この結果、20倍ものスケール拡大が可能になり、表1に示すような非常に優れた検出限界が得られている。例えば、血清中のカルシウムは検体を200倍に希釈して十分に測定可能である。その測定例を図2に示す。

迅速性

検出限界と並んで重要な条件は分析の迅速さである。迅速な分析ということは内容的に2つに分けられる。すなわち、測定が短時間にできることを測定値から計算処理が単純であることである。

原子吸光分析法において測定の迅速さに障害となるものは光源を点灯してから安定するまでの待ち時間の問題である。これを解決するために、208形日立原子吸光光度計では図3に示すように光源部には3本のランプがセットでき、予備点灯できるようになっている。したがって、1つの元素を測定している間に次に測定する予定のランプを安定化させることができ、このようにしていくつかの元素を次々と能率よく測定できる。

原子吸光分析では測定値を吸光度に直すための対数換算が必要であるが、208形日立原子吸光光度計はこれを電氣的に計算処理してメータに表示する。このため測定値は図2に示したように濃度リニアとなっており、測定値をそのまま検量線にプロットして、直に濃度を求めることができる。

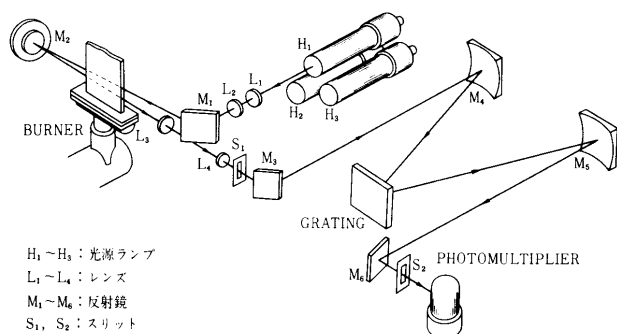


図3 208形日立原子吸光光度計の光学系

測定

原子吸光分析法では試料は溶液状態でなければならない。したがって、血清や尿のような液体試料は蒸留水で希釈すればよいが、生体組織の場合には湿式または乾式灰化したのち酸溶解するという処理が必要となる。

溶液状態としたあとは共存物の干渉の有無、目的元素の濃度などの条件によって前処理方が異なるが、ほとんどの場合次の4つに限られる。

(1) 単なる希釈のみの場合

例 尿中のマグネシウム (1)

(2) リン酸などの干渉を抑制するために、ストロンチウムあるいはランタンを添加する。

例 血清中のカルシウム (2)

(3) 目的元素が非常に微量の場合には、ジエチルジチオカルバミン酸アンモニウム (APDC) やエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) などでキレート化し、メチルイソブチルケトン (MIBK) で抽出するという方法がとられる。なお、血清の場合には、

トリクロル酢酸による除タンパクを行ってからキレート抽出を行う場合が多い。本法は抽出時の濃縮操作が容易であるほか、有機溶媒を用いたことによる増感効果、共存物の除去などが加わり、非常に有効な方法としてしばしば用いられる。

例 血清および尿中の鉛 (3) カドミウム (4)

(4) 水銀は気化し易いという性質を利用して、還元剤を試料に添加して気化し、これを吸収管に導いて原子吸光測定するというフレームレスの方法がよいとされている。このため付属品としてHgガスセルが用意されている。

分析目的元素が低濃度のため希釈率を上げられない場合、および、干渉抑制剤として添加したランタンなどがかなり濃い場合などは、従来のバーナでは試料がバーナ火口に付着して目づまりを起すためしばしば測定を中断せざるを得ないという不都合があったが、208形では先に述べたようにスリースロット形バーナが採用されており、このような不便はない。

参考文献

- 1) Gimblet, Marney, Bonsnes, Clin. Chem., 13, 204(1967)
- 2) Willis, Anal. Chem., 33, 556(1961)
- 3) Berman, A. A. Newsletter, 3, 111(1964)
- 4) Berman, ibid, 6, 57(1967)

040形 日立自動試料前処理装置による炎光分析の自動化

佐藤猛英* 内藤茂昭*

1. はじめに

電解質は神経の刺激伝導や酵素作用に欠くことができない成分であり、体液の酸・塩基平衡、浸透圧の維持にも関与している。また、体液電解質の恒常性の保持は生体の機能にきわめて重要な役割を演じている。したがって、電解質の異常がどの程度であるかを知ることが、診療上重要な指針を与える。

血清および尿中の多数の電解質中Na、Kの測定は、簡便さ、迅速さ、正確さからほとんどの病院で炎光光度法が用いられている。

ところが、近年の検査件数の急増に伴って、Na、Kの測定依頼は今後ますます増大の傾向にあり、多くの病院では数十から百検体以上の炎光分析を毎日かかりっきりで処理しているのが現状である。

205形 日立炎光光度計をはじめとする高級装置の出現で、測定時間は著しく短縮されたが、個人の技術差から生じる再現性・希釈時間、データ処理時間は以前と変わらない。

このような情勢から、精度向上と分析の能率化を目的とした希釈操作を含めて、測定の自動化が強く望まれている。

このほど日立製作所では新製品040形 日立自動試料前処理装置を開発した。本装置と205形 日立炎光光度計と組合せれば炎光測定の自動化が可能となり、精度・能率ともに病院検査室の要望に十分応えることができるようになった。

本稿では、040形 日立自動試料前処理装置を紹介し、血清を試料とした自動測定の結果を報告する。

2. 040形 日立自動試料前処理装置について

040形 自動試料前処理装置は、装置にセットされた多数の試料を順次一定比に希釈し、炎光光度計に導入するまでを自動的に行うものである。本装置を205形炎光光度計、205-0028コントローラ、記録計と組合せることによって、血清および尿中のNa、Kの定量が試料の希釈から測定・記録まですべて自動的に行なうことができる。

図1に本装置の外観を示す。

本装置は、040形オートサンプラと、400-0020形日立オートピペットより構成されている。その動作原理は図2に示すとおりで、試料容器にセットされた試料は、まず(A)の位置で試料ノズルを介してオートピペットに一定量(20 μ l)量り取られ、次に試料ノズルが希釈容器の位置に移動して量り取られた試料と希釈液(Li希釈液)がオートピペットにより同時に希釈容器に吐出され、一定比に希釈される。以上の希釈操作が(A)の位置で順次行われ、希釈された試料は(B)の位置で炎光光度計に導入される測定される。

本装置と205形 炎光光度計を組合せることによって大

* 日立製作所 那珂工場

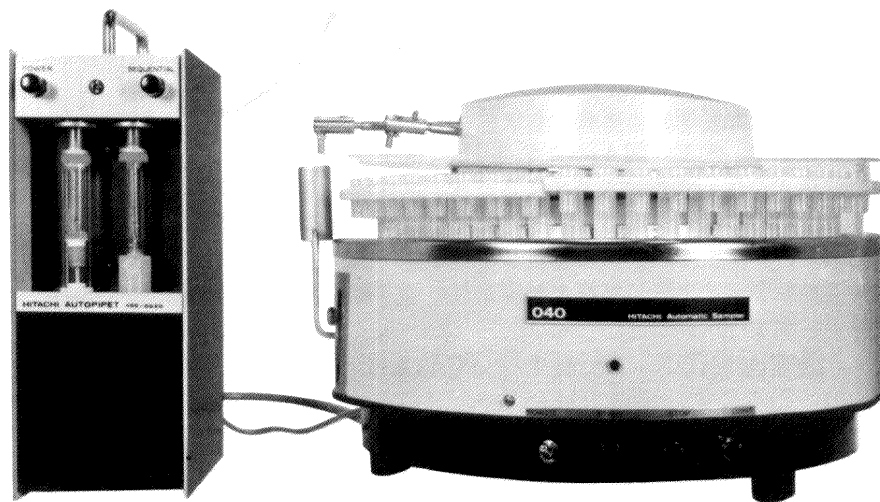


図1 040形 日立自動試料前処理装置

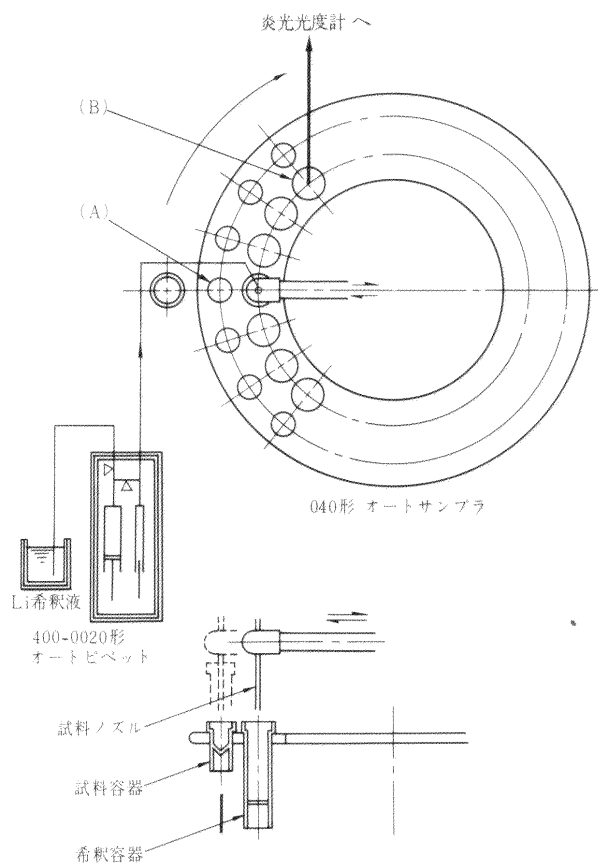


図2 040形 自動試料前処理装置の動作原理

幅に省力化ができ、炎光分析の結果が迅速に得られる。

(1) 50試料が自動的に順次希釈、測定され、それらのNa、Kの測定結果が記録計に記録される。

50試料の測定に要する時間は、希釈を含めて約27分かからない。

(2) 測定に熟練を必要としない。

微量の試料を正確に希釈するため、これまでのように

特に熟練を必要とせず、同時に人手により希釈操作を行った場合のように個人差が入らない。

- (3) スイッチひとつで作動し、分析が終ると自動停止ができる。

任意の試料数で自動的に停止させることができる。また、205-0028コントローラと組合せることにより、コントローラのスイッチひとつで炎光光度計、自動試料前処理装置および記録計がスタートできる。

3. 血清による測定結果

3.1 構成

205形炎光光度計と組合せたブロックダイアグラムを図3に示す。配置は図4に示すように机の上にセットした位置で全体の操作が容易である。また、床面積を少なくし、さらに炎光光度計との配管を最短距離とし積分時間、コンタミなどの影響を防止した。

この組合せで実際に試料を測定したので、その結果を以下に記す。

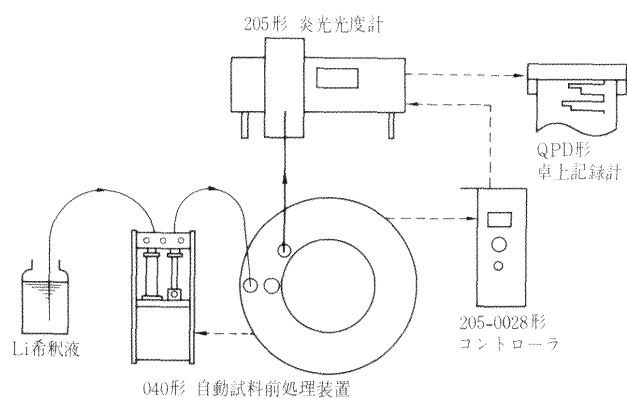


図3 205形 自動炎光光度計ブロックダイアグラム

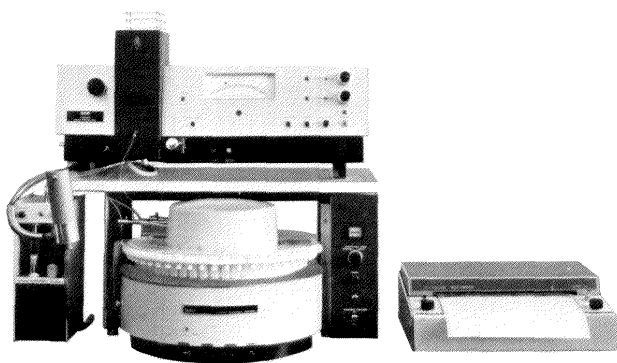


図4 205形 自動炎光光度計+QPD₃₃ 記録計

3.2 再現性

- (1) 同一血清による205形 自動炎光光度計の再現性の一例を図5に示す。

長時間の運転に対しバーナーヘッドを水冷式にし、また、独自のバーナ構造の採用によりきわめて安定した再現性が得られ、値のドリフトも見られない。

本装置による自動測定でC.V. (標準偏差率) および $\bar{x}$ の経日変化を見たのが表1である。試料はプール血清を、標準液は205形用標準液血液用A1、A2を用いた。

分析の結果、従来の手分析に対して満足すべき精度が得られた。

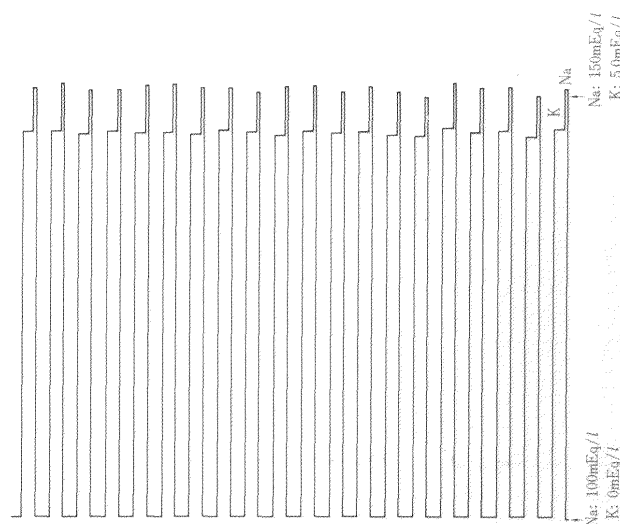


図5 同一血清による自動測定の再現性

表1 自動測定によるプール血清のC.V.および $\bar{x}$ の経日変化

日数	C.V. (%)		$\bar{x}$ (mEq/l)	
	Na	K	Na	K
1	0.69	0.62	141.8	5.07
2	0.50	0.76	142.1	5.10
3	0.40	0.65	142.0	5.06
4	0.49	0.50	141.6	5.06
5	0.40	0.85	141.5	5.09
6	0.55	0.57	142.1	5.06
7	0.40	0.85	142.2	5.09
8	0.48	0.65	141.7	5.07
9	0.34	0.86	141.9	5.08
10	0.54	0.51	142.0	5.10

3.3 自動測定例

実試料(血清)を自動測定させた例を図6に示す。

Naの検量線のわん曲は電気回路系で補正されているので、検量線はもちろん不要であり、標準液A1、A2をそれぞれチャートの0・50に合せるだけで直読できる。例えば、チャートの40を指示すれば、Naなら140mEq/l、Kなら4.0mEq/lを意味する。

したがって、検量線の作成や記録の換算などが不要となり、データ処理時間が著しく節約でき、自動化本来の目的が達せられる。

また、Naを指示した後、Kを指示しベースラインに戻る記録方式のため、読み誤りがない。

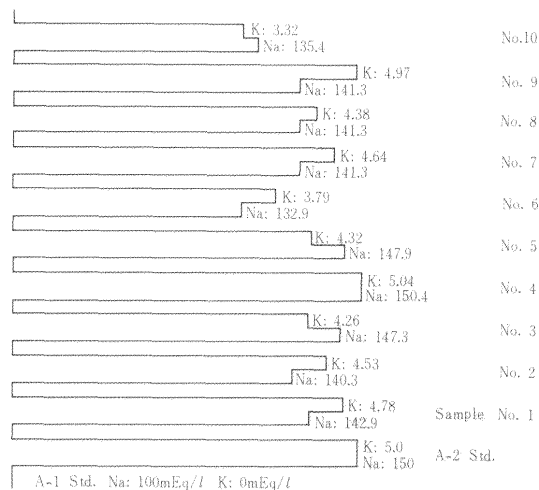


図6 自動測定例(血清)

4. おわりに

040形 日立自動試料前処理装置を組合せた 205形日立自動炎光度計は、病院検査室のルーチン分析に十分な精度をもち、1 サイクル50検体の測定が約27分で完了する。検査技師は手のあいたときに報告用紙への書移しを行うだけでよく、時間が節約できる。以下 040形日立自動試料前処理装置と組合せた 205形日立自動炎光度計の仕様を記す。

測定範囲 血清…Na100—200mEq/l

K 0—10mEq/l

尿…Na100—200mEq/l

K 0—100mEq/l

Naが100mEq/l以下の場合、全試料測定終了後Na、0—100レンジで再測定を行う。

試料消費量 0.02ml

試料希釈率 $\frac{1}{500}$

試料数 50試料 / 1 サイクル

測定終了 任意の試料数に設定可能

測定速度 1 試料 / 30s

再現性 Na, Kとも標準偏差率 1%以下

試料容器 ポリプロピレン製容量 0.5ml

希釈容器 ポリプロピレン製容量 4ml

参考文献

- 1) 臨床化学自動分析研究会編：臨床化学自動分析法 P25—31 (1969)
- 2) 浜田エツ子：日本衛生検査技師会誌 18巻 8号 P20—23 (1969)
- 3) 齊藤正行：日立SI News13巻 2号P12—13(1970)
- 4) 谷敷輝夫：日立SI News14巻 2号P17—18(1971)
- 5) 内野興一：日立SI News13巻 2号P10—12 (1970)

K23形 日立ガスクロマトグラフによる尿中17-ケトステロイドおよびプレグナンジオールの分画定量

仁 科 甫 啓 *

はじめに

臨床検査領域には多種の新鋭の分析機器が導入されている。その中で、ガスクロマトグラフは分離手段と微量定量手段を同時に備えたユニークな分析機器である。

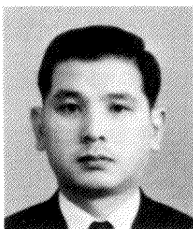
1941年、Martinらによってガスクロマトグラフが実用化されたときから、ガスクロマトグラフの臨床検査への導入とその有用性について種々論じられて来た。しかし、現実にはガスクロマトグラフは臨床検査室であまり活用されていない。これにはそれなりの事情があるが、その一つとして、検査室で容易にできる操作法、特にガスクロマトグラフにかけるまでの前処理の適切な方法が確立されていないことがあげられる。

われわれの検査室では、ガスクロマトグラフの導入の第1段階として、尿中17-ケトステロイドであるアンドロステロン (Andro)、エチオコラノロン (Etio)、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) および黄体ホルモンの代謝の一つであるプレグナンジオール (Pd) の同時分画定量をとりあげ、一般の臨床検査室でも容易に、かつ迅速、正確に測定できるような条件を検索した。その結果、ほぼ満足する方法を確立し、この3年近く、日常検査として実施している。本稿では、これらについて二、三触れたい。

測定方法

詳細な方法についてはすでに報告しているので、ここでは概略を述べるに止める。

1 日尿の $\frac{1}{50} \sim \frac{1}{100}$ 量に塩酸100ml、ホルマリン1ml、トルエン100mlを加え、冷却管をつけて15分間沸騰させる。トルエン層を水酸化ナトリウムおよび水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後トルエンを留去する。残渣を約5mlのベンゼンに溶かし、シリカゲルカラム(2g)のクロマトグラフィを行う。5%酢酸エチル・ベンゼン液で洗浄後、40%酢酸エチル・ベンゼン液で溶出させる。これに内部標



K23形 日立ガスクロマトグラフ

準物質用としてコレステロール (100—200 μg) を加えて溶媒留去し、これをTrimethylsilyl (TMS) 化する。2%NGS (担体、クロモソルブW100—120mesh、カラム温度 210 $^{\circ}\text{C}$) で水素炎イオン化検出器を備えた K23形日立ガスクロマトグラフで分析する。

実験結果と考察

臨床検査室で容易に操作できるように検討した点について主に述べる。

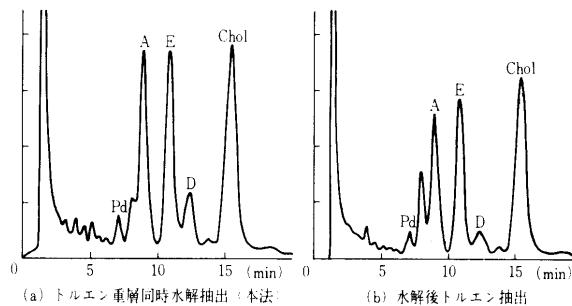
(1) 加水分解条件

尿中ステロイドは通常グルクロン酸抱合または硫酸抱合の型で排泄される。ガスクロマトグラフによる分画では、これらの抱合体をなんらかの方法で切断することが必要となる。この場合、ステロイドの破壊がおきないようにすることが要求され、このために酵素による加水分解または過塩素酸-酢酸エチルによるSolvolysisの方法がとられている。しかし、これらの加水分解法は長時間を要し、かつ、操作もはん雑となる。

われわれの検査室では、ステロイドの破壊が大きくて、ガスクロマトグラフィの前処理法として不適当とされていた酸加熱加水分解法にトルエンを重層させて実験したところ、目的とする4つのステロイドの破壊がほとんどないことを見出した。これより、トルエン重層による酸加水分解条件を詳細に吟味した。図1(a)はトルエンを重

* 虎の門病院 生化学科

層せず酸水解した結果、図1(b)はトルエンを重層させた場合の結果である。両図により、トルエンを重層しない従来の酸水解ではステロイドの破壊が大きいことがわかる。一方、添加回収実験結果からもトルエン重層による酸加熱加水分解条件はほぼ満足するものであった。



Pd: pregnandiol, A: androsterone, E: etiocholanolone
D: dehydroepiandrosterone, Chol: cholesterol (内部標準物質)

図1 同一層による水解条件の比較

(2) 計算法の簡素化

計算は内部標準法で行い、内部標準物質としては、入手が容易で、かつ、安定性の高いコレステロールと決めた。また、ピーク計算法は一般にピーク高さ×半値幅による面積法がとられているが、この面積法はややはん雑であり、また半値幅の測定にも問題があるので、面積法をとらず、ピーク高さのみによる計算法を採用し、手順の簡素化と精度の向上を図った。図2に示すように検量線は原点を通る直線となった。

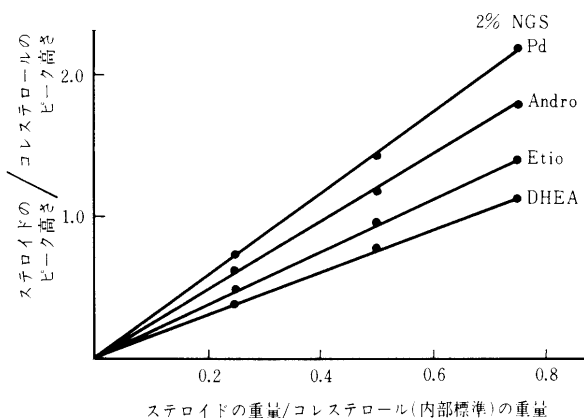


図2 検量線

(3) 臨床症例の分析結果

各疾患別に分析結果をまとめたのが図3であるが、疾患により排泄パターンが異なり、興味ある知見が得られている。例えば、末端肥大症ではEtioが他のAndro, DHEAに比べて著しく増加しており、また、多毛症では患者は女性でありながら、DHEAの排泄が著しく増加している。

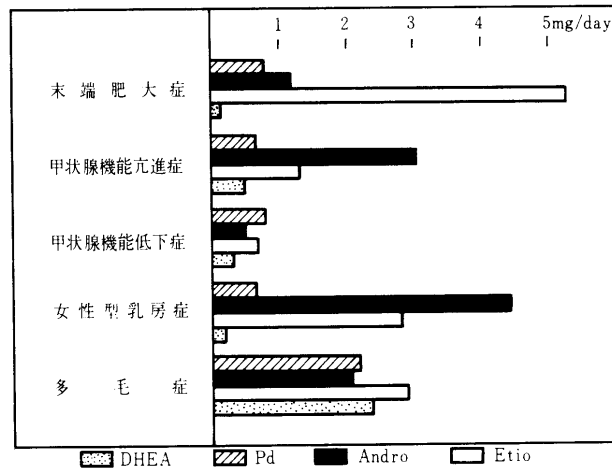


図3 各種疾患に於けるSteroid排泄パターン

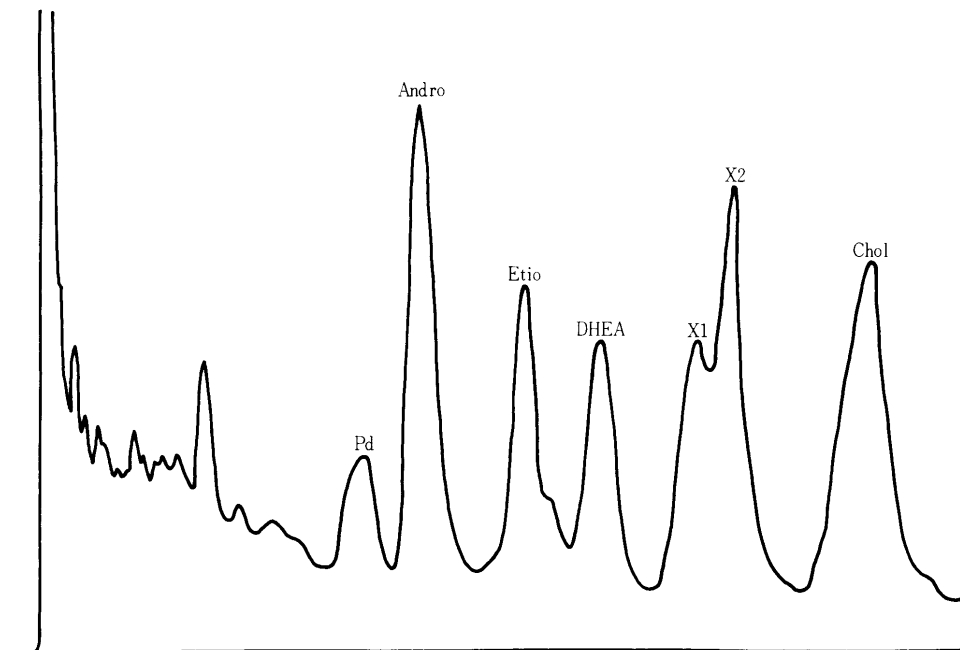


図4 精上皮腫の患者尿のクロマトグラム

図4は精膜の細胞に由来する睾丸の腫瘍である精上皮腫 (Seminoma) の患者尿を分析したパターンである。通常排泄される17-ケトステロイド以外にDHEA と内部標準物質のコレステロールとの間に2つの不明なピーク $\times 1, \times 2$ が出現している。これらのピークがどのような物質であるか、また疾患との関係がどのようなになっているのかなかなか興味深い。今後、症例を増すとともに、ガスクロマトグラフと質量分析計などの組合せによって解明する必要があるであろう。さらに、 ^{63}Ni による電子捕獲検出器でのガスクロマトグラフで血中の微量ステロイドの分析へとその展開が期待される。

まとめ

臨床検査室でのガスクロマトグラフの応用例としてわれ

われの検査室で実施している尿中17-ケトステロイドおよびプレグナンジオールの分画定量についてその実例を簡単に述べた。

ガスクロマトグラフが日常検査の分析機器として大いに利用されるには、簡便、迅速かつ正確に分析ができるような操作法の確立が急務であり、一層の検討の積上げが要求される。なお、ガスクロマトグラフは今後臨床検査でますます活用され、病態生化学の発展に大きく寄与するものであろう。

参考文献

- 1) 伊藤寿美子ほか：臨床病理, 16, 599 (1968)

臨床用クロライドカウンタ (CL-1)

水野映二*

はじめに

血漿中の Cl^- (塩素イオン) は陰イオンの約70%を占めており、浸透圧、酸-塩基平衡の維持および水分代謝に重要な役割を果している。このため、診断や治療の経過の観察に欠くことのできない生化学検査の一つである。

その分析法としては、従来から滴定法および比色法が用いられていたが、いずれも操作の複雑さ、高度熟練の要求あるいは試薬の品質、さらに必要試料の多いことなどに問題を残していた。これらの方法とは別に、古くから電量法もあったが、近年になってエレクトロニクスの技術が進むに伴い、1958年、CotloveらによってAutomatic electrometric titratorが開発され、さらに研究が進み、クロライドカウンタとして、米国Buchler社、英国Evans社、ポーランドMarius社および日本の平沼産業(株)の臨床用のものが市販されるようになった。(写真)。

われわれの検査室での血清クロール測定の件数は2500件/月のレベルで、毎年20%ずつ増している。そのため操作時間の短縮、微量化および精密度の向上に役立てようと考え、平沼産業製の臨床用クロライドカウンタを導入した。以下その経験を述べる。

原理

試料と電解液 ($0.1\text{N} \cdot \text{HNO}_3$) の入ったセル内に2本のAg電極間に一定時間定電流を流すと、既知量の Ag^+ が移動する。これに試料中の Cl^- が入ると、 Ag^+ は AgCl となり、 Cl^- がすべて AgCl となるまでAgが消費される。 Cl^- が消費された時点ではフリーのAgが溶液中に遊離する。このときの Ag^+ を利用して、指示電極を作動させ電流を止める。このようになるまでの時間内に放出した Ag^+ 量 (電解時間) を測定し、Agすなわち試料中の Cl^- を指示計で mEq/l 単位として読取る。



CL-1形 平沼臨床用クロライドカウンタ

という原理で測定される。

本装置の改良

従来、市販されていたクロライドカウンタは、試料量に関係なく、設定された絶対量を基準に mEq/l 濃度をカウントするように作られていたので、マイクロピペットの器差による正確度のズレがあり、 Cl^- の定量値として許容できないほど大きかった。そこで濃度表示の調節ツマミ (compensator-unit) を導入してもらい、試料採取用として同一のマイクロピペットで操作するかぎり正確度のズレを生じないようにした。さらに多数検体処理に合

* 虎の門病院 臨床生化学検査部

うように、電解セルを図1のようにフローセル・システム化して使用した。

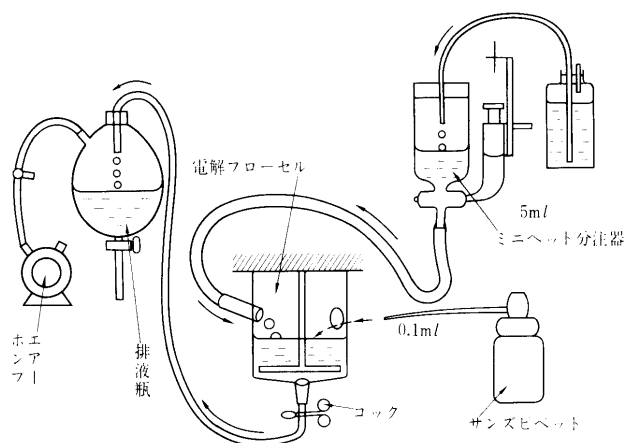


図1 クロライド・カウンタの電解フローセルシステム

操 作

- (1) フローセル内に希釈液 (0.1N-HNO₃, 0.1% アミラジン) を標線 5ml まで (ミニベット分注器) 入れ、サンズピペットで 0.1ml (標準液 0.1M-NaCl または 血清) を採取し、フローセル側面の穴から注入する。
- (2) カウンタが 000.0 であることを確認し、スタート・スイッチを押すと、電解とカウンタが同時に開始される。測定が終了するとカウンタが止まり、測定表示灯も消灯する。表示は mEq/l の濃度となる。

まず標準液で (1) (2) の操作を行い、検量の表示濃度を Compensator ツマミで合せる。次いで管理血清および患者血清を測定する。

実験成績

(1) 精密度

標準液およびプール血清の連続同時測定における変動係数はともに ±0.2% 以下であった。

(2) 検量線

0.1M-NaCl 標準液で 100mEq/l にセットしたとき、原点を通る 500mEq/l まで検量の直線性が得られた。

(3) 電解液量と硝酸濃度

希釈液 4 ~ 6 ml (規定 5 ml) の範囲と硝酸 0.05 ~ 0.2 N (規定 0.1N) の範囲内で液量および硝酸濃度を一定にして標準液によって定めれば、5 ml および 0.1N-HNO₃ の厳密さを要求しない。

(4) 溶血、黄疸

ほとんど影響ないといえる。

また、血清以外の試料については、尿、リコールおよび穿刺液などの測定も可能である。ただし、薬尿などは電極を汚すことがあるので注意する。

(5) 正確度

最終濃度 $Cl^- \cdot 10mEq/l$ の添加回収では 100% とよい結果を得た。さらに各種市販のコントロール血清についてチェックしたところ従来の方法と同様な値を得た。

一般的に使われている Schales & Schales 法との相関を 210 例についてとったところ、相関係数 $\gamma = +0.975$ を得た (図2)。

なお、フローセル内での連続使用の汚染は皆無であった。

われわれは、上記のクロライドカウンタを日常作業で 2 台併用し、毎時 90 検体処理の能率と連日変動係数 ±0.4 % の精密度で現在使用中である。

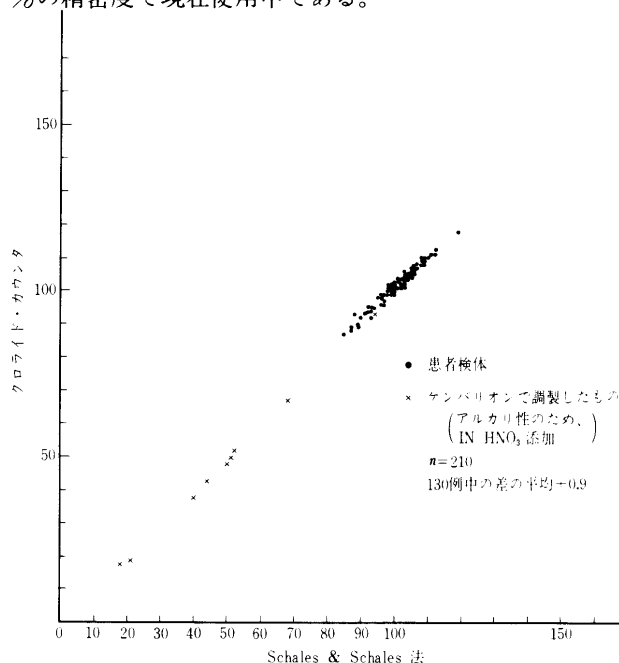


図2 クロライド・カウンタとSchales & Schales法との相関係

97 ~ 107 mEq/l

Cl⁻の生理的変動は 4.2 mEq/l である。平均して 0.9 mEq/l 高めに
出るがことさら正常値を改める必要はないように思う。

THE HITACHI Scientific Instrument News
Vol. 14 No. 2-2₁

昭和46年 3月20日印刷

昭和46年 4月1日発行

非売品

年 6 回 毎偶数月発行

編集人 石川 直成

発行人 比 良 清 一

発行所 **** 日立製作所

印刷所 日立印刷株式会社

Printed in Japan NH-S(H)