

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SUMMER 1975
VOL.18 NO.2

U.D.C. 621.385.833.2:57.086.3

目次

巻頭言

電子顕微鏡によりかかって……
………俵 寿太郎……1

報文

走査電子顕微鏡による昆虫の表面
構造の観察………赤井 弘 松本健次……3
512形日立分光けい光光度計によ
るけい光差スペクトルの測定………浅井 博……8
薄層クロマトグラフィの2波長デ
ンシトメトリによる、2-(2-
フリル)-3-(5-ニトロ-2-
フリル)アクリル酸アミドの
定量について………和田 裕
中岡正吾 川名清子 平野昌代……11
高速液体クロマトグラフの新しい
分析法——635形日立液体クロ
マトグラフ用溶媒プログラミング
装置並びに分取りサイクル付
属装置の応用………小島勝治
秋間丈佳 塚田勝男 鴈野重威……13
716形日立自動分析装置——UV
法によるGOTの測定—— 只
野寿太郎 野村 靖 古田芳輝……16

トピックス

200シリーズ日立ダブルビーム分
光光度計の基本システム………18
556形日立2波長自記分光光度計……19
635形日立高速GPCクロマトグ
ラフ………20
横浜市立大学・医学部殿へ H-500
形日立電子顕微鏡トータルシス
テムを納入………10

巻頭言

電子顕微鏡によりかかって

俵 寿太郎*



電子顕微鏡の発達史をひもといてみると、電子顕微鏡開
発のスタートは1932年で、はじめは倍率わずか12~13倍と
いう虫眼鏡程度のものから出発した。今年でちょうど43年
の歴史をもつことになるわけだが、そのことを知って今日
の発展を顧みると、これまで電子顕微鏡の開発に努力され
た方々及びその後もたゆまず研究を続け今日に至らしめた
方々に対し、おのずから頭の下がる思いがする。

私が細菌学教室に助手として入って数年たったころ、医
学部で電子顕微鏡を買うことになり、その選定委員を命ぜ
られた。その後引き続き微生物の電子顕微鏡的研究を担当することになったが、た
まにその研究が自分の体質に合ったこともあって、たちまち電子顕微鏡の魅力に完
全にとりつかれてしまった。

電子顕微鏡が当医学部にはじめて設置されたころ、ある有名な教授が、本日の午
後は電子顕微鏡を自分の部屋に持ってきて見せて欲しいといわれた。当時は皆その
程度の知識であったので、今ではとても考えられない昔話である。

東昇著『電子顕微鏡の世界』によると、谷安正、小林恵之助及び東昇諸氏の話し
合いで昭和24年5月13日日本電子顕微鏡学会が発足したと記してある。その日は偶然
私の長女の生れた日にあたるが、このことも電子顕微鏡と私が浅からぬ縁で結ばれ
ているような気がする。それで私と電子顕微鏡とのつき合いは、もう25年になっ
ているのに気がついた。当然過去を思い、現在を見、さらに医生物研究者の未来に多
くの希望を託したくなるわけである。

電子顕微鏡の出現以来、鏡体自身の発達とその応用面の研究は、まさに破竹の勢
で科学の少なからざる領域に浸透してゆき、世界各国が電子顕微鏡学会を設立し、
国際会議ができ、あらゆる種類の学術雑誌に電子顕微鏡学関係の論文が見られるよ
うになった。

故きを温ねて新しきを知る、とまではいかないが、これは一朝一夕にできたわざ
ではないので思い出してみたい。

電子顕微鏡の発達により、われわれ医生物学を研究する者は古典的形態学の域を
はるかに超えて生物の構造を分子レベルで直接的に可視観察するまでに至った。し
たがって、これまで以上に生化学的機能とのつながりが密接にして不可分となりつ
つある現状は否定できない。

* 岡山大学 医学部 ウイルス学教室 教授、医博



電子顕微鏡の明らかにする超構造は生化学的構造の性格を帯び、超形態学と生化学とは極度に接近しつつある。かつて、生化学者の多くは形態学に無関心であってこと足り一方、形態学者の多くは生化学的背景なしで済まされた時代があった。ところが、電子顕微鏡の急速な発達、このように医生物学の研究を大きく動かした。

生物の構造は、その働きに応ずるように必要にして、十分なように仕組みられている。電子顕微鏡により見られる分子レベルの構造は、光学顕微鏡による所見とは異なった特色をもつユニークな超微形態学であるとされる東先生の言葉は深く印象に残っている。そして精製されたウイルスが結晶として電子顕微鏡写真で紹介されたとき、ウイルスは果たして生物か非生物かといわれたことがあるが、ウイルスこそはまさに生物・非生物及び工学の接点である。

私は長い間電子顕微鏡と共に研究を続けてきたためもある、日本では、電子顕微鏡メーカーの方々を含めた工学系研究者の積み重ねてきた技術的研究基礎の大きいことをよく知っており、心より敬意を表するものである。また、それを応用して大いにこの方面の活路を拓いた方々のたゆまざる自然科学への探究心と、驚異的な優れた研究心とに頭が下がる。

わが国では、電子顕微鏡的研究をする場合、工学屋と生物屋との連繋が特によく行われており、比較的廉価で優秀な電子顕微鏡を提供してもらうことができる。したがってわれわれ医生物の電子顕微鏡的研究を行う者は、常にわが国の優れた工学及び技術の恩恵を受けていることを知っている。世界の最先端に行く優秀な機器を使って実験を行うことをモットーにしている者にとっては、まさにわが国は最高の条件下にあることになる。

電子顕微鏡の出現が、光学顕微鏡の領域を超えた分野の観察を可能にしたことは、このことにより新発見が多くなったことと、それまでは假定または想像していた諸構造及び現象が確認されるといった成果を挙げたこととがその主たるものであろう。その研究の進み方の早かったことも事実で、それはたびたび発行された電子顕微鏡写真集を見ればすぐわかる。編集当時には確かに最先端に行く輝かしい成果であったに違いないものが、出版発行された頃になると、幾分新鮮味を失った感じを与えることがあるほど、激しい進み方であった。

私はかねがね、もし米粒大ないしバナナ大の細菌を作ることができたなら、種々の研究ことに形態学の研究が容易になるであろうと考え、理論的にはできることではないと知りながらも、なお夢を捨てきれなかったので、電子顕微鏡試料作製法のひとつとして、超薄切片法が確立されたときには、せめて細菌の切片写真を多数重ね合せて、1個の細菌模型を作り上げようと考えたことがある。理論的にはできないことはないであろうが、いたって実現性の乏しいアイデアである。

かつて、キャベツとダイコンの交配種子を作ってこれを発芽させ、葉の部分はキャベツ、根の部分はダイコンという新品種の野菜を作ろうとしたところ、結果的には考えと逆のものができ、地上部は大きなダイコンの幹となり花が咲き乱れ、地下部はゴボウのような細い根が長々と伸びた

「おぼけ」であったということ、またカキの養殖場で、最大の敵であるヒトデを撲滅するべく、これを集めてきてことごとく金槌で粉々に打ち砕いたところ、その屑の各々が数年後には完全なヒトデに再生して、そのためカキが全滅してしまったという話のように、予想と現実が相反した結果として現われることがよくある。ただ、私の考えはこうした話とは内容が違っているので、まだ幾分未練をもっている。

透過形電子顕微鏡の出現以後、今日ではその研究方法は多数の学者により確立されてしまった感がある。ところが最近、これとはその目的を異にした、物の表面や粒子を立体的に見る走査電子顕微鏡が出現して、研究面で再び新しい華やかな時代がやってきたようにも思うが、かつて経験したのと同じ経路をたどっているような気がする。このため、現在では、生物体の構造を平面的または立体的に、内側と外側からと攻めて行く研究方針が打ち立てられつつあるようである。顕微鏡の特長をわきまえ、この顕微鏡でなければできないという領域の観察をするのが、この研究方法本来の目的でなければいけないはずで、今後いろいろの試料作製法が考案されるであろうし、また、同時に応用的研究者の工学系研究者への希望も述べられて行くであろう。現に鏡体中の試料をマイクロマニプレータで分解しつつ内部構造を観察して行くことも考えられているようだし、血管その他に樹脂を突込んで鋳型を作り、組織内部の微細構造を内側から見て行く方法も新たな技術として登場してきたし、さらに、細菌を生きたまま観察する目的で、凍結状態で観察後、これを再び培養することにも成功もしている。なお、高分解能の走査電子顕微鏡の発達と試料作製技術の進歩により、ウイルスの観察も可能になってきた。このように各方面の研究者の今後の希望と努力で、ますます発達し続けて行くに違いない。目で見える形態学は了解を得ることが早く、かつ、確実で、正確である。情報の媒体としてテレビがラジオより優れているのと同じことである。最近友人の1人がフィールドエミッション形走査電子顕微鏡写真をロンドンで英国学者に見せたところ、日本は金持ちで電子顕微鏡は優秀だから、医生物学者は、いくらでもよい研究ができるだろうから全くうらやましいといったそうだが、これは事実であろう。

周知のとおり、日本の電子顕微鏡は、わが国の科学水準のシンボルとして、海外技術協力しているもののひとつである。外国の研究室に日本製電子顕微鏡が使われているのを見るのは、実に何ともいえない心強さを感じる。ただし日本人の体格に合わせた短小操作部を外人向きのゆったりした操作用に改めたり、アフターサービスを十分よくするなどの課題はあるであろうが。

とにかく、工学関係の方々には、今後も応用面ことに生物学者の希望を取入れながら、ますます優秀な電子顕微鏡を作り、世界に提供されるようお願いする次第である。つまり、基礎面と応用面の研究者が連繋して研究して行くことは、どういふ場合でも望ましいことであることを特に強調したい。

走査電子顕微鏡による昆虫の表面構造の観察

赤井 弘* 松本 健次**

走査電子顕微鏡が開発されて以来約10年になるが、この間、生物分野への普及は著しいものがあり、その研究成果も急速に増加している。昆虫についても体表面の微細構造を中心に多数の研究がなされているが、形態学的な観点から昆虫の生活環に伴う表面構造の総合的な観察は行われていない。

カイコガは一般にカイコと呼ばれ、繭糸を生産する昆虫で、古代より我が国で飼育されてきた重要な産業昆虫である。そのため、膨大な研究業績の蓄積があるため生物学的にもまた極めて重要な動物のひとつである。最近、大都市を中心に生物教材としても各種の教育段階で広く使用され始めている。¹⁾

筆者らは、カイコガの生活環を通してその表面構造と生理学的な諸問題との関連性について研究しているが、ここではその一部である頭部の付属器官、皮膚、気管系などについて簡単に論じることにした。

1. 幼虫の小顎

カイコガの幼虫はクワの葉を唯一の食物としてきたが、最近では人工飼料でも飼育が可能になっている。カイコもまた他の昆虫と同様、味や臭を感じ食物の選択を行っているが、それらの感覚器官は頭部に存在している。幼虫の頭部は硬いキチン質の外骨格で包まれ、多くの剛毛が生じている。頭部の下方部には口器が存在し、口器は上唇、大顎小顎及び下唇から構成される。大顎の側方に触肢が、さらにその側方に6対の単眼が散在している。小顎には小顎肢及び粒状体、下唇には下唇肢及び吐糸管が付属している。²⁾

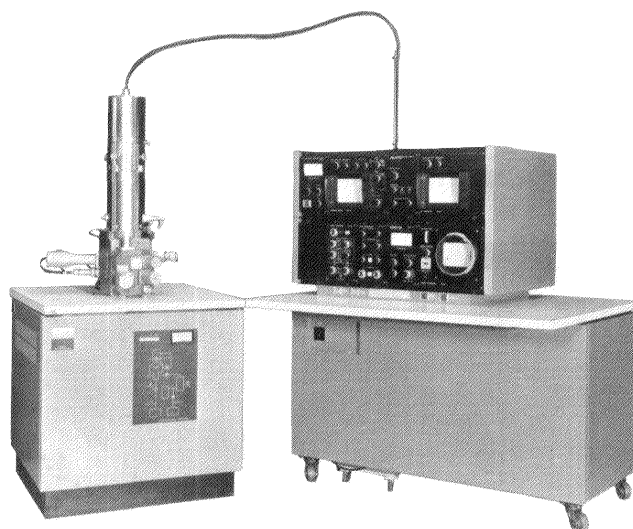
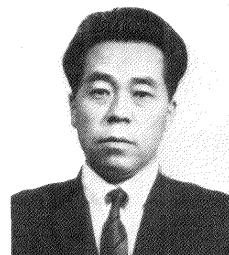
小顎は、基部の白色部を小顎基節、これに接する白色の小節を蝶紋節、さらにその上に位置する半環状の小節を担節と呼び、その上に小顎肢及び粒状体が並列している。

小顎粒状体には、2本の毛(sensilla trichodea)、1本の剛毛(sensilla chaeticum)および3本の有柄突起(sensilla styloconica)が存在するといわれていた。2本の毛は電気生理学的に見て接触受容器であることが明らかにされている。²⁾

Sensilla styloconicaの走査電顕写真によると、有柄突起は2本で、他の1本は小形の円錐状突起であることが明らかになった。図1(図1～5は次ページ)に有柄突起I(Ss-I)の走査電顕写真を示す。この有柄突起はシュウクロース、イノシトールおよびその他多くの糖に反応し、3種の糖受容細胞、すなわち、イノシトール以外の糖に感受性をもつもの、イノシトールに感受性をもつものおよびグルコ

ースに感受性をもつものの存在が知られている。³⁾その先端部には小窩が存在し、糖受容細胞との連絡が考えられる。

図2に有柄突起II(Ss-II)を示すが、忌避物質を感受するR受容細胞、水に強い感受性をもつW受容細胞、塩類または有機酸類に感



HHS-2R形 日立走査電子顕微鏡

ずる2種類の受容細胞 N_2 および N_2' が存在するといわれている。³⁾

小顎肢の先端部には、図3の走査電顕写真に示すように8～9本の円錐状突起が存在し、小顎肢は摂食に関する臭覚器として主体的な役割を果していることがカイコガ幼虫の行動実験から明らかにされており、⁴⁾円錐状突起が関与しているものと考えられる。

第3小節の粒状体に面する側面には、これまでに知られていなかった1本の偏平突起が小節に接して存在することが今回の観察によって明らかにされた。

2. 幼虫の単眼

カイコガ幼虫の単眼は側単眼に属し、完全変態を行なう昆虫の幼虫の唯一の視覚器官で、成虫や若虫に見られる背単眼とは根本的に異なる。側単眼は、一般に明暗を感受するだけでなく、色覚の能力もあり、またわずかながら形態の感覚もあるといわれている。⁵⁾

カイコガ幼虫の単眼は触肢の側方に左右各6個ずつ存在している。図4に5個の単眼を、図5には単眼の拡大写真

* 農林省蚕糸試験場 生理部、農博

** 日製産業株式会社 日立理化学機器センター



をそれぞれ示す。6個の単眼のうち4個は半円状に分布し、1個はやや離れ、さらに1個は触肢の基部に位置している。本稿では、説明の便宜上触肢の基部に分布するものから順次第1単眼から第6単眼と呼ぶ。

第1～4単眼は通常半球状で、第3単眼が最大である。第5、第6単眼は一般に変形した半球状をなしている。

単眼は発育に伴って形態的にもかなりの変化を示すが、大きさも齢ごとに増大し、1齢起蚕では直径約25 μ 、2齢では約40 μ 、3齢で約60 μ 、4齢で90～100 μ 、5齢で120～150 μ に達する。⁶⁾

3. 吐糸管

下唇はその基部から順次、下唇基節、下唇茎節および担節に区分され、1対の下唇肢と1本の吐糸管が先端部に位置している。吐糸管は幼虫期にのみ存在する細長い円錐形の突起で先端部には吐糸孔が開いている。図6は吐糸管の下方側面から写した走査電顕写真で、吐糸孔が観察できる。図7は幼虫脱皮直後の吐糸管の先端部の写真で、吐糸孔から細い繭糸が吐出されている。

カイコが繭を作る時期、すなわち熟蚕期

には絹糸腺で合成された液状絹が吐糸管を通り吐糸孔から吐出されて繭糸になるが、この場合には、フィブロインを中心にその周囲をセリシンで被覆した太い繭糸が吐出され

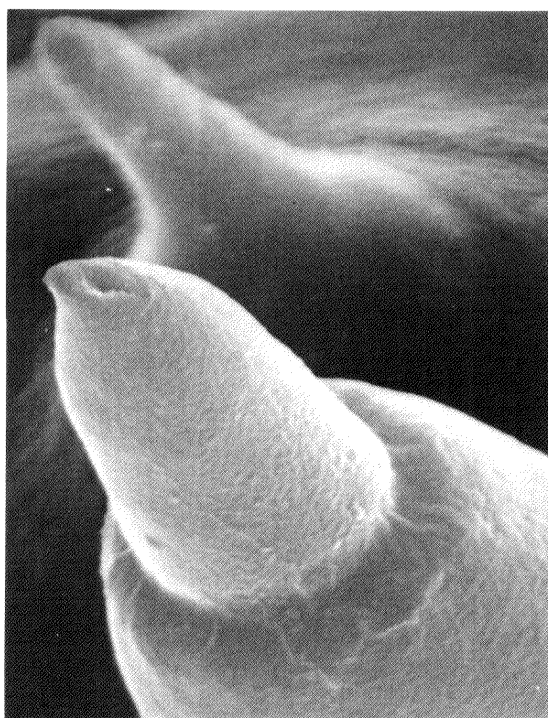


図1 カイコガ幼虫の小顆粒状体の有柄突起($\times 11,900$)
この突起は多くの糖類に感受性をもつ。

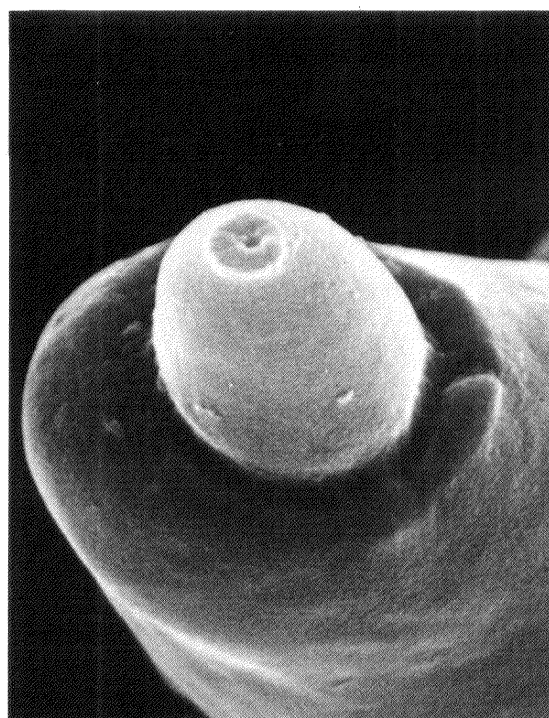


図2 カイコガ幼虫の小顆粒状体の有柄突起($\times 12,100$)
この突起は、水、忌避物質、塩類などに感受性をもつ。

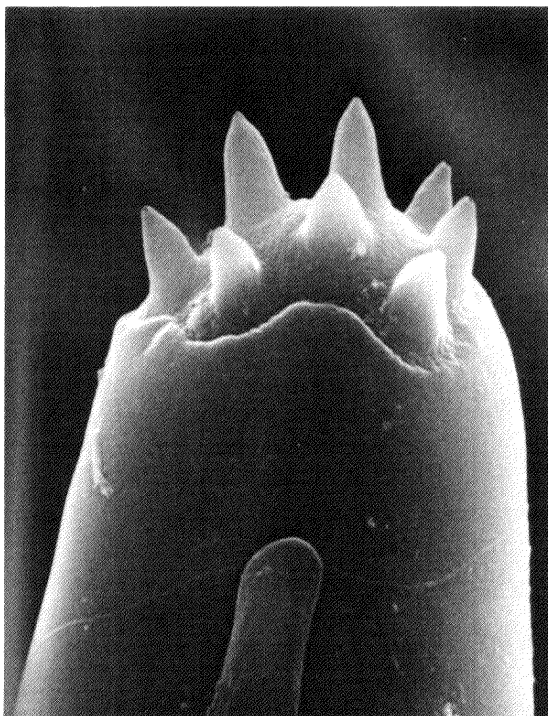


図3 幼虫の小顎肢($\times 3,600$)

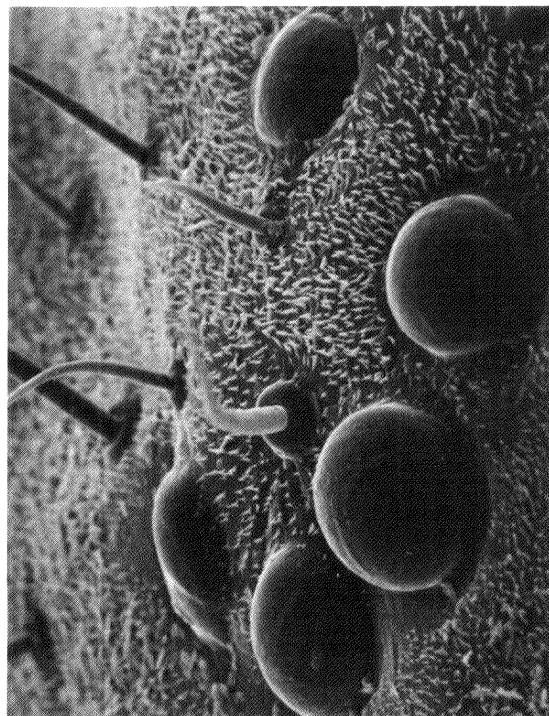


図4 幼虫の単眼($\times 236$)
6対存在するが、この写真には触肢の基部にあるものが示されていない。

る。幼虫脱皮直後に吐糸される糸は、この時期にフィブロインの合成が活発に行われていないため水分の多いセリシンを主体にした細い糸が吐出される。⁷⁾

4. 幼虫の皮膚

幼虫の皮膚は体表面を包む器官で、真皮細胞とクチクルから構成されている。クチクルは硬さと柔軟性により昆虫の外形を保ち、また保温や防水、さらに体表面から水分の消失を防ぐ重要な役割をもっている。

クチクルの表面には、種々の形の乳嘴突起が形成されている。図8は5齢幼虫の皮膚の断面の走査電顕像を示したもので、外表面には多数の円錐状の乳嘴突起が見られる。カイコガ幼虫のクチクルに種々の形態の乳嘴突起が存在することは走査電顕によっても観察されている。⁶⁾

図9は、孵化直後の幼虫の皮膚表面を示したもので、そこには著しく多数の皺が存在している。図10は孵化後48時間経過時の皮膚表面の写真であるが、孵化直後に見られた皺は減少し、体軀の肥大成長に伴って皺は引伸ばされたものと観察できる。図11は5齢起蚕、図12は5齢96時間経過時の皮膚表面の走査電顕写真である。両者を比較すると、1齢期と同様齢の初期に見られる多数の皺が体軀の肥大成長に伴って次第に引伸ばされて行くことが理解できる。5齢起蚕時のクチクルはエピクチクルとこれに接する数層の繊維状クチクル層とから構成されているが、皺の部分は主としてエピクチクルの起伏によるものと推定される。

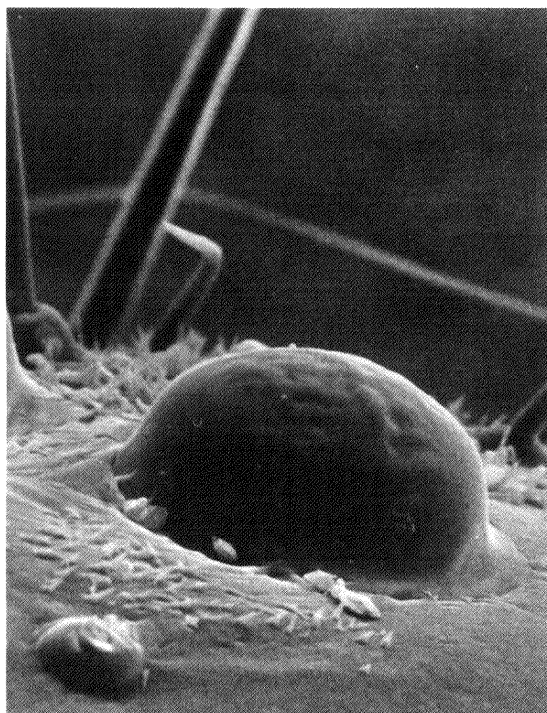


図5 幼虫の単眼 (×820)

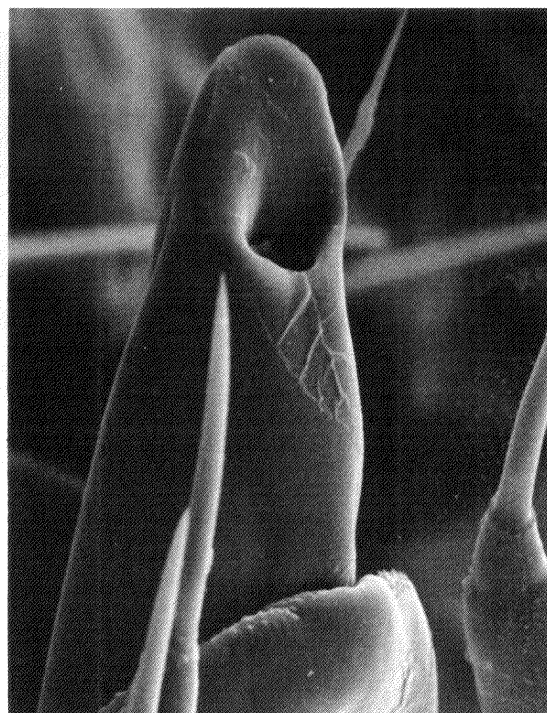


図6 下唇に付属する吐糸管 (×650)

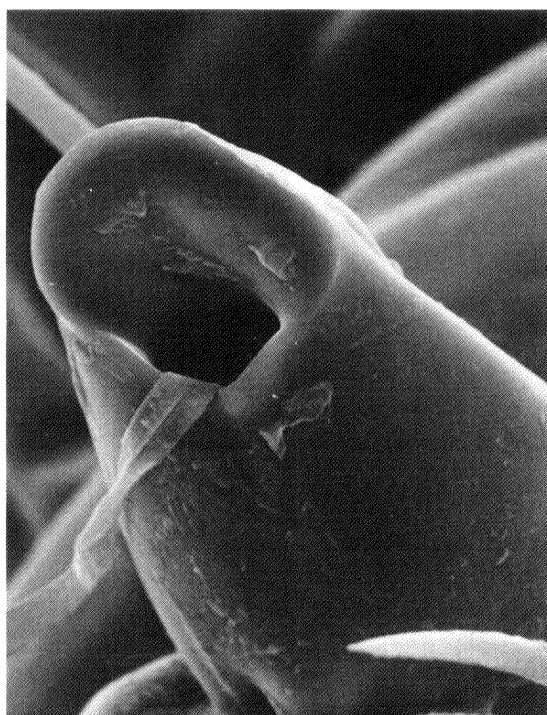


図7 幼虫脱皮直後の吐糸管 (×900)
細い菌糸が吐出されている。

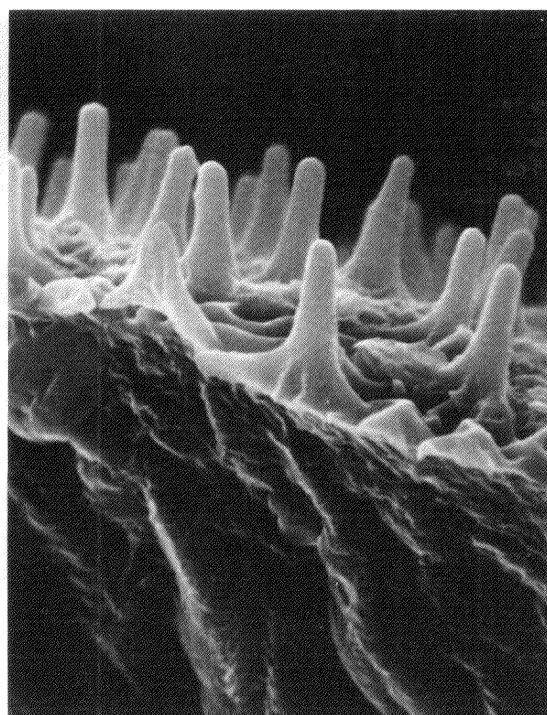


図8 幼虫のクチクルの断面 (×3,000)
表面には乳嘴突起が多数存在する。

5. 幼虫の気門

昆虫の呼吸は気管系によって行われ、気管系は気門、気管および毛細気管から成る。毛細気管は直径 1μ 以下の細管



で、組織との間にガス交換が行われ、脊椎動物の毛細血管と組織との間の関係によく以ている。

カイコガ幼虫の気門は、胸部の第1環節と第4～11環節の側面に各1対ずつ計9対存在し、中胸および後胸の境界部に1対の退化気門がある。気門は内部閉鎖形で表面の篩板はよく発達し、気門輪はメラニン色素の沈着により黒色を呈し、この部位に乳嘴突起は存在しない。

図13はエリサン幼虫の気門の走査電顕写真である。篩板は気門輪の内縁部から気門の中央部へ向う多数の平行枝の集合したものであり、個々の平行枝は多数の小枝を有する樹枝状突起であることがわかる(図14～16)。図14はエリサンの気門の中央部の一部を示したものであるが、平行枝の微細構造からこれらの構造が除じん装置としての役割を果たしていることがよく理解できる。⁸⁾

図15および図16はカイコガ幼虫の篩板の断面の高倍率の写真で個々の平行枝の連絡状態、さらに平行枝から生ずる多数の小枝の微細構造を観察することができる。個々の平行枝は、その断面像から見て、内部が中空の管状の構造をなしていることが走査電顕によってはじめて明らかになったが、この構造は篩板の強靱性を保つことに役立っているものと考えられる。

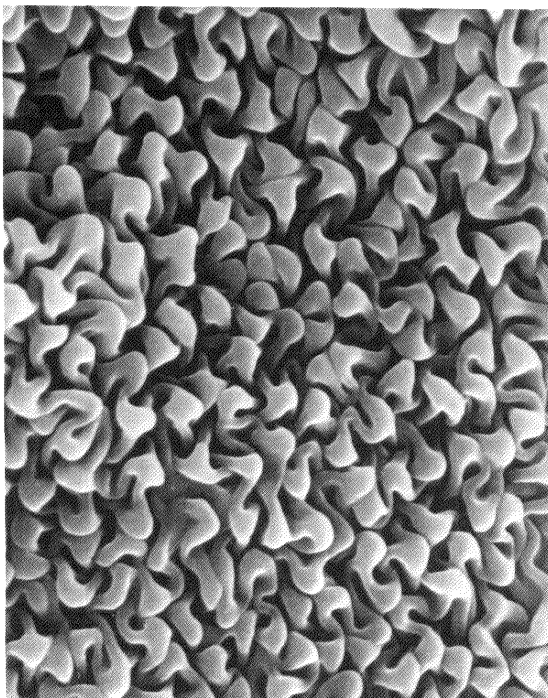


図9 孵化直後の幼虫の皮膚表面(×3,700)
多数の皺が生じている。

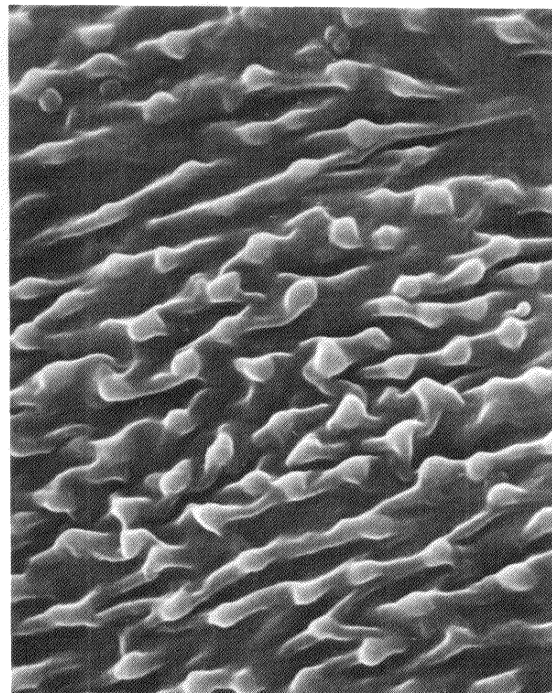


図10 孵化後2日経過した幼虫の皮膚表面(×2,900)
皺が伸びてくる。

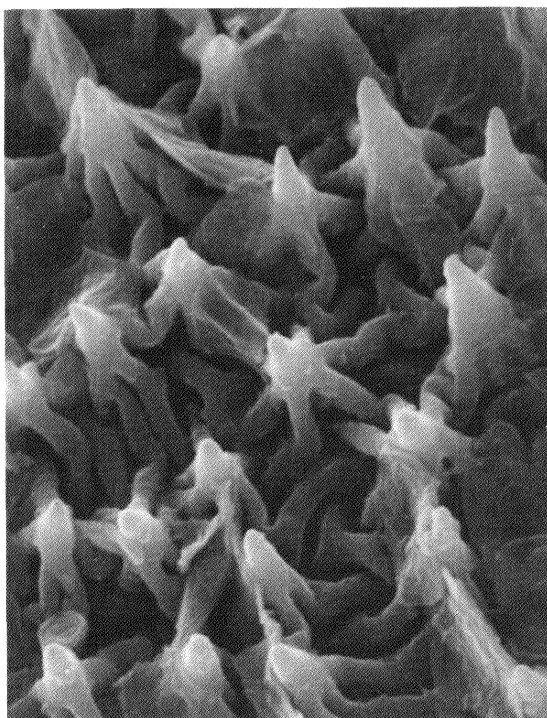


図11 5齢脱皮直後の幼虫の皮膚表面(×2,900)
乳嘴突起と皺が密集している。

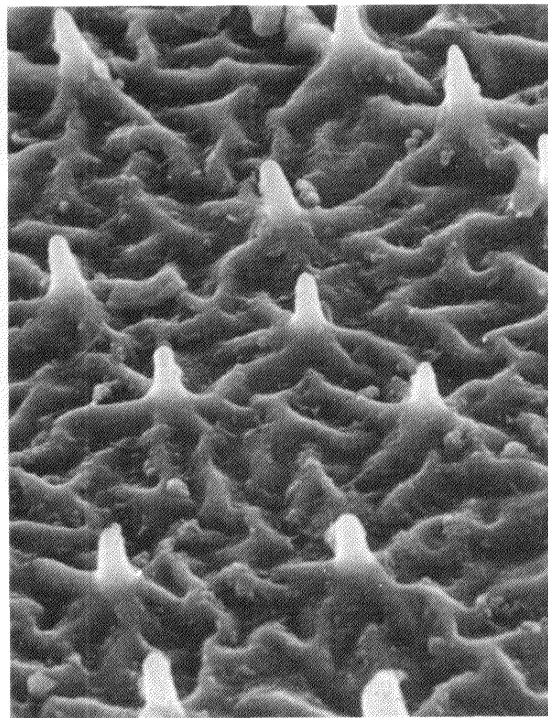


図12 5齢96時間の幼虫の皮膚表面(×2,950)
皺が伸び乳嘴突起の分布密度が低下している。

以上、カイコガの表面構造の一部を走査電顕写真で示し、その表面構造と生理・生態学との関係を述べたが、走査電顕による昆虫の研究は始まったばかりで、今後解決しなけ

ればならない問題が山積している。最近では走査電顕試料作製技術にも新手法が導入され、急速に進行しているため昆虫のこの種の研究も進展するものと予想されるが、一方、さらに多くの問題が生じるものと考えられる。

参考文献

- 1) 森精：カイコによる新生物実験——生物科学の展開——，三省堂，東京(1970)
- 2) 田中義磨：蚕体解剖学講義(上巻)，明文堂，東京(1928)
- 3) 石川誠男・平尾常男：家蚕幼虫の味覚に関する電気生理学的研究——小顎の sensilla styloconica の感受性，蚕試報告 18 297-357 (1963)
- 4) 平尾常男，石川誠男，荒井成彦：カイコの摂食機構に関する研究 (I)——走化性と摂食に關与する嗅覚器の役割，日蚕雑，41 413-417 (1972)
- 5) Chapman R.F.: The Insect, Structure and Function, English University Press Ltd, London (1969)
- 6) 赤井弘，松本健次：走査電顕による鱗翅目昆虫の表面構造——とくに幼虫頭部の付属器官について——，昆虫と自然 (1975) (印刷中)
- 7) 赤井弘：カイコの絹糸線の微細形態に関する研究 IV，

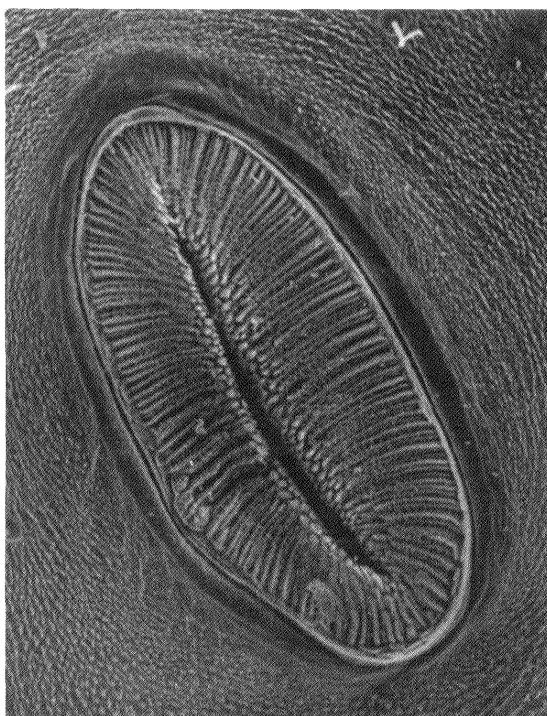


図13 エリサン 5 齡幼虫の気門(×90)

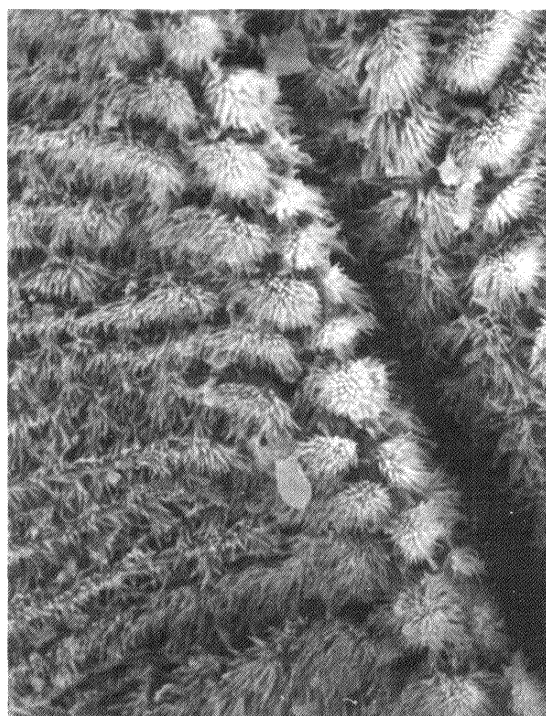


図14 エリサン 5 齡幼虫の気門の平行枝(×680)

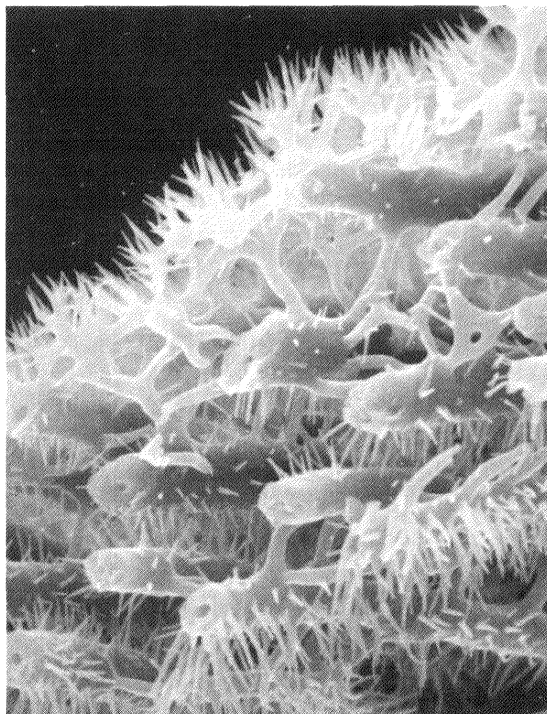


図15 カイコガ 5 齡幼虫の気門の平行枝の断面(×1,140)

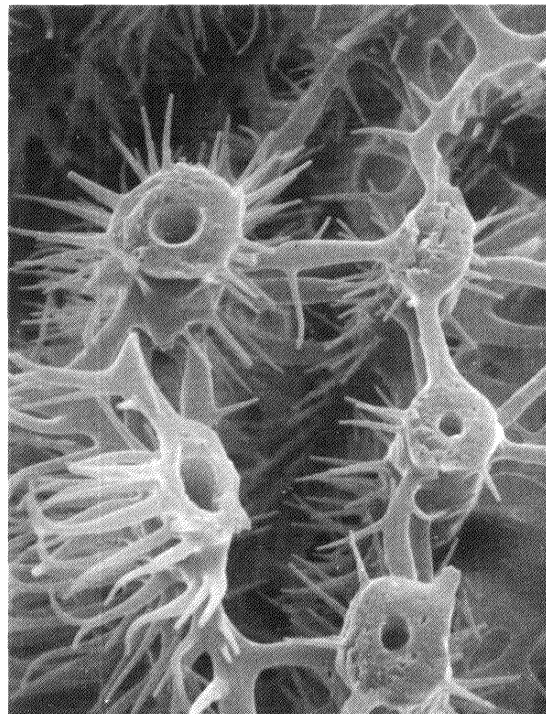


図16 カイコガ 5 齡幼虫の気門の平行枝の横断面(×2,450)

蚕試報告, 19 375-484 (1965)

- 8) 赤井弘：カイコのクチクル表面の走査電子顕微鏡観察，細胞，5 (3) 29-37 (1973)



512形 日立分光けい光光度計によるけい光差スペクトルの測定

浅井 博*

1. はじめに

近年高精度・高感度の分光けい光光度計が市販され、物理化学、生物化学、医学などの研究の有力な装置の1つとなっている。しかし、日本国内ではまだ分光光度計は一般的な研究手段とはなっていない。分光光度計では、ダブルビーム方式、すなわち2つの試料の光吸収スペクトルの微小な差を精度よく測定できる装置が一般的となった。10年前の比色計の時代に比べると隔世の感がある。

ところで、一般的には試料がけい光性の場合、光吸収よりもけい光のほうが環境の変化に応じて敏感に変化することが期待される。また、測定可能な濃度範囲も、光吸収よりもけい光のほうが格段に広い。著者はかねてから、2つの試料溶液のけい光スペクトルの微小差を直接測定できるダブルビームの分光けい光光度計が開発製作されることを待ち望んでいた。実際に、例えば、筋肉タンパク質の1つであるアクチンは塩の添加によって重合するとき、芳香族のアミノ酸残基によるけい光強度がわずかに変化することが知られている¹⁾。生物的に重要なタンパク質類や色素類について似た例はたくさんある。512形 日立分光けい光光度計・(以下「512形」という)、はダブルビーム方式を採用しているので、そのような測定が可能である。われわれが関心をもっている二、三の生物試料の測定が可能になったので、本稿で測定結果について、装置の説明とあわせて簡単に報告する。

2. 装置

図1は512形の光学系の略図である。試料セル部のみにけい光物質を置いて通常のけい光測定ができるが、対照セル部にもけい光物質を置いて、2つの物質のけい光差を直接検出することができる。

3. 測定例

3.1 β ナフチル 3 リン酸の酵素分解とけい光変化

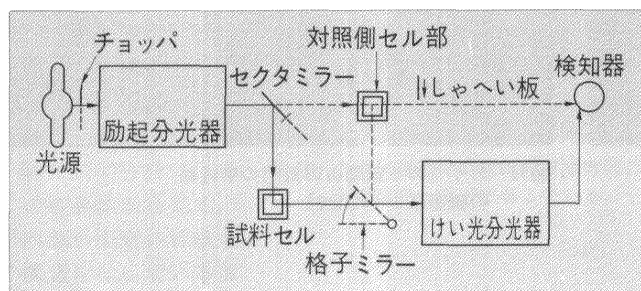
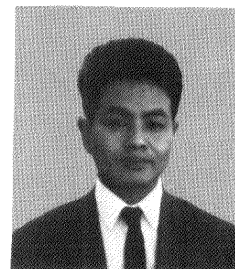


図1 512形日立分光けい光光度計の機能系統図

β ナフチル 3 リン酸はATPと同じようにATP分解酵素によって β ナフチル 2 リン酸と無機リン酸とに分解される。分解されるときにけい光スペクトルが変化するので、分解の時間過程はけい光の変化を直接測定することによって求めることができる。²⁾



512形 日立分光けい光光度計

図2にリン酸分解前後のけい光スペクトルを示す。図2の左側の点線は β ナフチル 3 リン酸の60 μ M溶液のけい光波長345nmにおける励起スペクトルを、右側の点線は励起波長317nmにおけるけい光スペクトルを示している。実線の2つのグラフは、 β ナフチル 3 リン酸が微量のHメロミオシンの添加によって β ナフチル 2 リン酸と無機リン酸とに分解された後のけい光の励起スペクトルとけい光スペクトルである。この場合、励起及びけい光強度の最大値はそれぞれ317nmと340nmのところにあることがわかる。しかし、実線と点線との変化量の最大値、すなわち、リン酸分解による変化の最大値が、どの波長にあるのかはこの図からはよくわからない。リン酸分解前後のけい光特性の差を直接に3.3倍の感度で測定したのが図3である。下の2つのグラフは2つの試料セルの配置を逆にしたときの励起及びけい光スペクトルの測定結果である。上下の曲線がほ

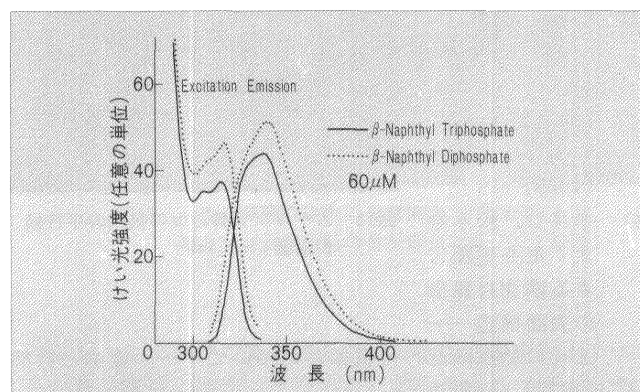


図2 リン酸分解前後のけい光スペクトル

* 早稲田大学 理工学部 生物物理、教授、理博

ば横軸に対して対称になっているのは、試料セルを入れ換えても、符号が反対になるだけで変化量は変わらず、全く同等な測定であることを示している。励起光及びけい光の強度変化が最大になるのはそれぞれ323 nmと345 nmの波長であることがこの図から明らかである。 β ナフチル3リン酸のリン酸基がHメロミオシンによって分解されると、けい光強度が増加するばかりでなく、けい光スペクトルが赤色方向にシフトすることが容易にわかる。

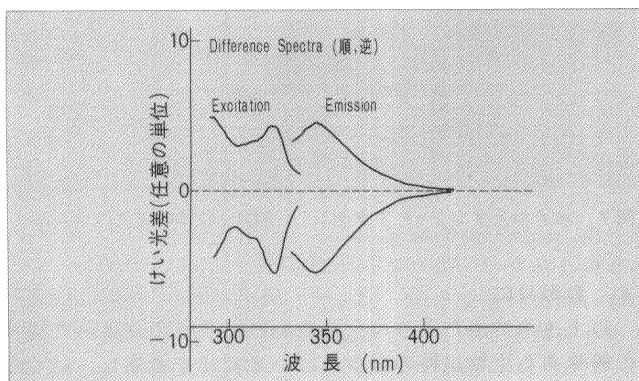


図3 リン酸分解前後のけい光差

3.2 ピリドキサル3リン酸の分解とけい光変化

β ナフチル3リン酸の場合と似たような測定が、ピリドキサル3リン酸においてもなされる。図4の実線でピリドキサル3リン酸の励起及びけい光スペクトルを示す。励起及びけい光の最大波長はそれぞれ348 nmと418 nmである。Hメロミオシンによってピリドキサル2リン酸と無機リン酸とに分解されると、けい光強度がわずかに減少することが、図4の点線によって示されている。

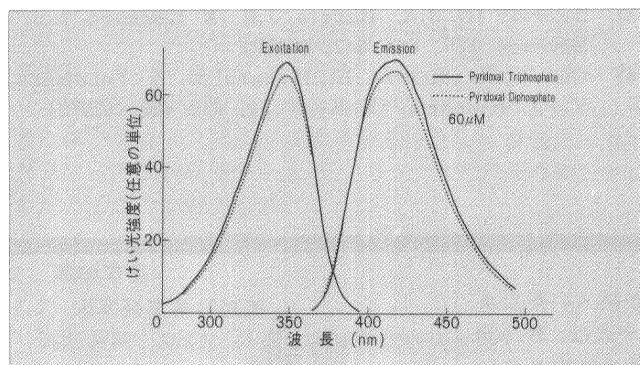


図4 ピリドキサル3リン酸の励起及びけい光スペクトル

512形のサブトラクションモードの使用によって、上記2試料のけい光スペクトルの差を測定すると、図5のように観測される。図5の右下にはピリドキサル3リン酸の2つの試料の片方にHメロミオシン溶液の微量を添加した後2試料のけい光差の時間変化を直接記録したチャートを添付した。約3minで60 μ Mのピリドキサル3リン酸がすべて2リン酸と無機リン酸とに分解されたことがわかる。この例からもわかるように、Hメロミオシンによって3リン酸

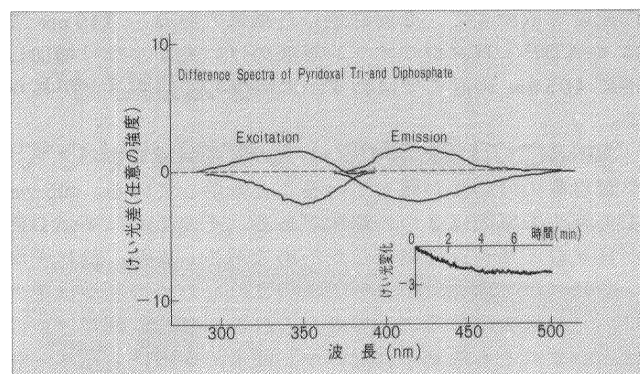


図5 ピリドキサル3リン酸2試料のけい光差

が分解されるとき、けい光変化が微少であっても、変化量を直接測定することによって、分解過程を追跡することが可能である。

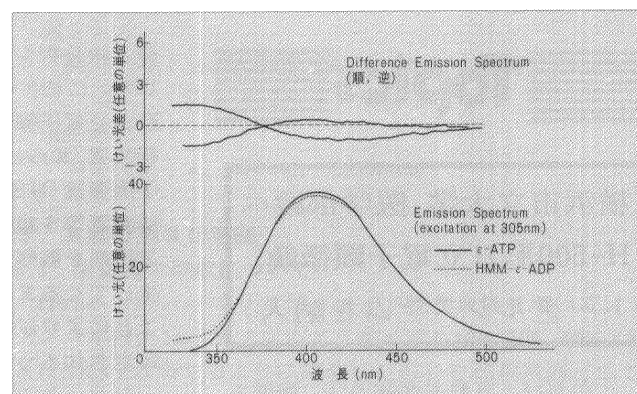
3.3 ϵ -ATPの場合

ϵ -ATPは、弱酸性の条件下で、ATP溶液にクロロアセトアルデヒドを添加することによってけい光性にしたATPの類似物である³⁾。この ϵ -ATPは、ミオシンまたはHメロミオシンとで酵素と基質の複合体を形成したときけい光が変化するが、 ϵ -ADPと無機リン酸とに分解した後では、そのけい光は変化しないと考えられている⁴⁾。512形を用いて、 ϵ -ATP溶液とそれが分解した後の ϵ -ADP溶液とのけい光スペクトルの差を直接測定してみたが、差は全くないことがわかった。

3.4 ϵ -ADPとHメロミオシンとの結合

ϵ -ATP溶液に高濃度Hメロミオシンを加えると、直ちに ϵ -ADPと無機リン酸とに分解されるが、分解生成物の ϵ -ADPもHメロミオシンに結合する。結合してもけい光は変化しないといわれているが、はたしてそうなのかを次に調べてみた。

305 nmで励起したときの ϵ -ATP溶液と ϵ -ADP・Hメロミオシン溶液のけい光スペクトルを、それぞれ図6の実線と点線で示した。図6の上の図は、これら2試料のセル


 図6 ϵ -ATP溶液と ϵ -ADP・Hメロミオシン溶液のけい光スペクトル



の配置を取換えて、2回測定した結果である。340nmでは ϵ -ADP・Hメロミオシン溶液のけい光がかなり増加し逆に405nmの近くではわずかに減少していることがわかる。

340nmでのけい光の増加は、この波長領域でまだタンパク質自身のけい光が残っていることを示している。405nmでの減少の原因は2つの解釈がある。その1つは ϵ -ADPがHメロミオシンに結合したためである。また、励起光が一部Hメロミオシンによって吸収されたための見かけ上のけい光の減少によることも考えられる。この実験だけからは、いずれとも決められないが、前者の原因によることを期待したい。励起光の波長を330nmに変えても、図6の上の曲線のような傾向はわずかに残っていたことから、原因の推測が正しいのではないかと考えられる。減少率は約半分の0.8%であった。

3.5 Fアクチン(ϵ -ADP)とHメロミオシンとの結合

われわれは、かつて、Fアクチンに ϵ -ADPをADPの代りとして結合させることができることを見出した。さらに、このFアクチン(ϵ -ADP)メロミオシンを結合させると、 ϵ -ADPによるけい光がわずかに増加することも見出している。ここでは、Hメロミオシンのトリプトファン残基を400nmの近くに光吸収をもつ化合物ヒドロキシニトロベンゼンプロマイドで修飾したものと、しないものについてけい光スペクトルの違いを調べた。

図7の下の方の実線は修飾したHメロミオシン・Fアクチン(ϵ -ADP)のけい光スペクトルを、点線は修飾しないもののけい光スペクトルをそれぞれ3mMピロリン酸の存在下で測定したものである。ピロリン酸の存在下では、HメロミオシンとFアクチンとは解離している。ピロリン酸がない場合も同じような実験がなされた。図7の上の方の実線は、その場合のけい光の差を感度を上げて直接測定した結果である。点線は3mMピロリン酸の存在下で測定した結果である。修飾によってけい光エネルギーの転移があることを示している。

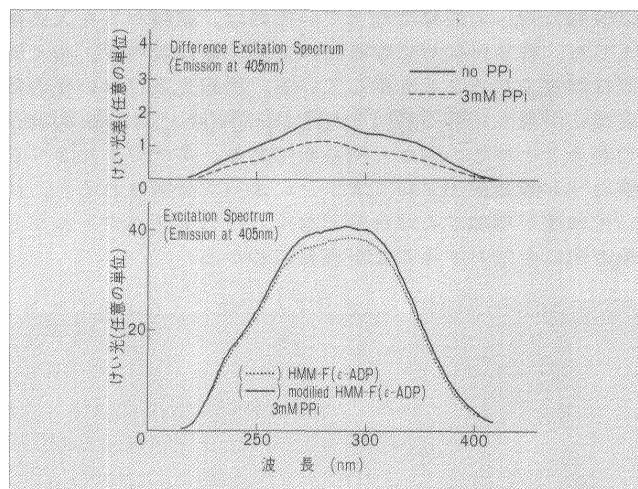


図7 Hメロミオシン・Fアクチン(ϵ -ADP)のけい光スペクトル

4. おわりに

以上述べてきたように、われわれは512形によって種々の興味ある生物試料の微量なけい光変化を測定し、いくらかの知見を得ることができた。サブトラクションモードを使用し、2つの試料のけい光差を拡大した感度で測定したほうが、S/N比もよくなり、定量的な解析も可能である。このような装置が普及することが期待される。なお、Hメロミオシンとピリドキサル3リン酸は、それぞれ当研究室の安藤敏夫、藤崎久雄両氏の提供によった。

参考文献

- 1) Weltman, J.K., Szaro, R.P., Frackelton, A.R. Jr. & Dowben, P.M.: FEBS Letters **22**, 61-63, (1972)
- 2) Kagawa, H., Kuwajima, T. & Asai, H.: Biochim. Biophys. Acta **338**, 496-504. (1974)
- 3) Secrist III, J.A., Barrio, J.R. & Leonard, N.J.: Science **175**, 646-647. (1972)
- 4) Onishi, H., Ohtsuka, E., Ikehara, M. & Tonomura, Y.: J. Biochem. (ToKyo) **74**, 435-450. (1973)

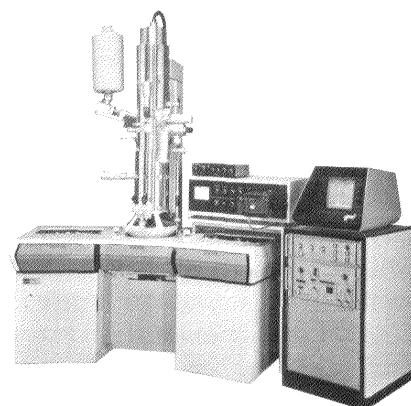
Topics

横浜市立大学 医学部殿へ
H-500形日立電子顕微鏡
トータルシステムを納入

このたび、日製産業㈱では、横浜市立大学・医学部殿へ、H-500形日立電子顕微鏡トータルシステム（極微小部

分X線分析システム）を納入いたしました。このトータルシステムは、H-500形日立電子顕微鏡に、非分散形X線分析装置（Kevex 5100形）、透過走査電子像装置（HSE-2形）、試料全方位傾斜装置等を組合せたもので、H-500形で試料を観察しながらその局所より発生してくるX線のエネルギーを分析することにより試料の微小部分に存在する元素を知ろうとするための装置です。

なお、このシステムは、医学、生物学関係のほか、理工学関係にも広い用途をもっています。





U.D.C. 543.544.42.087:681.785.423]:547.391.1'171.1'175' 722.1.062

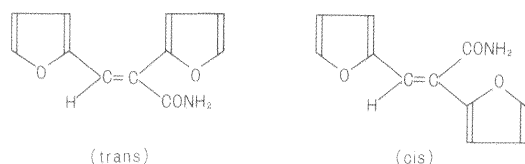
薄層クロマトグラフィの2波長デンシトメトリによる 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリル酸アミドの定量について

和田 裕* 中岡正吉* 川名清子* 平野昌代**

1. はじめに

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリル酸アミド¹⁾ (以下「フリルフラマイド」という)は、AF-2あるいはフリルフラマイドと略称され、食品中の殺菌剤として市販されていたが、1974年フリルフラマイドに癌原性のあることが報告され、直ちに食品添加物から削除された。従来、ニトロフラン誘導体が食品添加物として使用された例は、1950年にニトロフラゾン及び1954年にニトロフリルアクリル酸アミドが許可され、これらは魚肉ねり製品、あんななどの殺菌防腐剤として利用されてきたが、いずれも現在は食品添加物から削除され、その後、より安全性の高いものとして1965年に本品が食品添加物として許可されたものである。

フリルフラマイドについては、幾何異性体²⁾が報告されており、その挙動については多様性をもつものである^{3),4)}



フリルフラマイドの定量法としては、菅野らによるフリルフラマイドのメタノール溶液を水酸化ナトリウムで分解して生成する亜硝酸をスルファミン、ナフチルエチレンジアミンにより呈色させる方法⁵⁾、近紫外吸収による方法⁶⁾、ガスクロマトグラフィによる方法^{7),8)}あるいは、ポーラログラフィに付す方法^{9),10)}などが報告されている。このほど、著者らはフリルフラマイドの簡易定量法として薄層クロマトグラフィの2波長デンシトメトリについて若干の検討を試みたのでここに報告する。

2. 実験方法

2.1 測定装置及び試薬

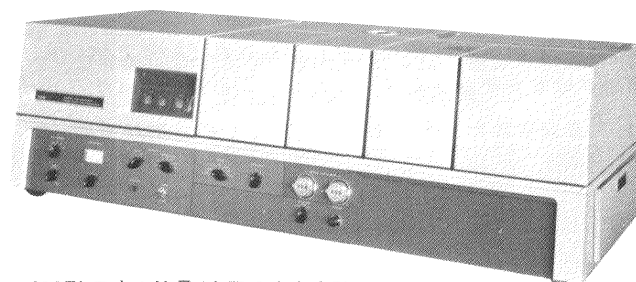
測定装置：356形 日立2波長自記分光光度計、

薄層クロマト付属装置

薄 層：シリカゲル(ワコーゲルB-5)和光純薬製

展開溶媒：ベンゼン-アセトン(7-3)¹¹⁾trans-フリルフラマイド標準原液：trans-フリルフラマイド(上野製薬製)100mgを秤取し、メチルアルコールを加えて100mlとした。

標準原液1ml = $C_{11}H_8O_5N_2$ 1,000 μ g



356形 日立2波長/自記分光光度計

cis-フリルフラマイド標準原液：菅野らの方法により、cis-フリルフラマイドを調製し、これをcis-フリルフラマイド標準品とした。cis-フリルフラマイド標準品100mgを秤取し、メチルアルコールを加えて100mlとし、これをcis-フリルフラマイド標準原液とした。

標準原液1ml = $C_{11}H_8O_5N_2$ 1,000 μ g

2.2 試験溶液の調製

細切した試料20~50gをホモジナイズカップに採取し、菅野らの方法⁵⁾に従って試験溶液を調製し、得られたメタノール溶液を室温でロータリエバポレータを用いて濃縮しメタノールを加えて1mlとし、これを試験溶液とした。

2.3 試験操作

試験溶液2 μ lをとり、シリカゲル薄層の一边から2cmの位置に2cmの間隔で塗布し、溶媒先端を15cm展開する。展開後、得られたクロマトグラムの R_f 値を求め、2波長デンシトメトリに付す。別に、trans-及びcis-フリルフラマイド標準原液を用いて、1ml中のフリルフラマイド含有量が0.1、0.2、0.3mgになるようにメタノールを加えて調製したものをフリルフラマイド標準溶液とする。それぞれの標準溶液2 μ lをとり、試験溶液の場合と同様にデンシトメトリに付し、これより試料中のフリルフラマイド濃度を求める。

測定条件

機 種：356形 日立2波長自記分光光度計、
薄層クロマト付属装置

反射測定

測定波長： λ_1 430nm, λ_2 390nm

3. 実験結果及び考察

3.1 検量線の作成について

trans-及びcis-フリルフラマイド標準原液を用いて、メタノール溶液1mlがフリルフラマイドを100、200、300、400及び500 μ g含有するように調製したものを標準系列として、シリカゲルプレート上にそれぞれ2 μ lを塗布し、展開後、得られた黄色のスポットをリニヤスキャンニングして得られたプロファイルを図1に示した。

* 神奈川県衛生研究所 食品薬品部

** 日立製作所 那珂工場 応用技術部



得られたそれぞれのピークは比較的シャープであったため、検量線をピーク高法により描くことを試みた結果を図2及び図3に示した。プレート上への塗布量がフリルフラマイド0.2~1.0 μg ではほぼ直線性を示すが、それ以上では必ずしも直線上にはのらなかった。また、再現性の点でも常に良好な結果ばかりが得られるとは限らなかった。このために、検量線作成時に縦軸にピーク面積値をとり、横軸にスポット量の平方根をとるような操作がなされている。しかし、このことは多くの試みがなされているとはいえ、薄層クロマトデンシトメトリのもつ不可避のマイナス因子

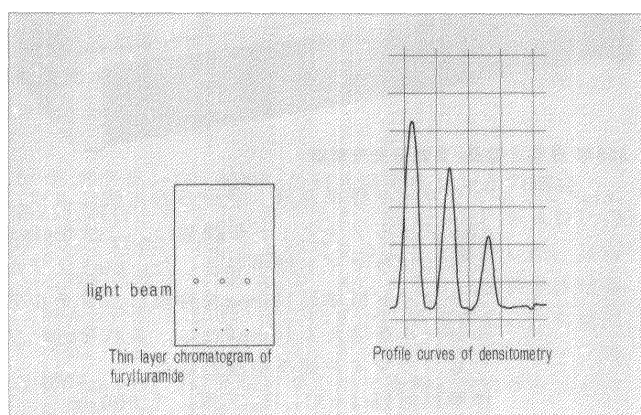


図1 Two-wavelength densitometry of furylfuramide

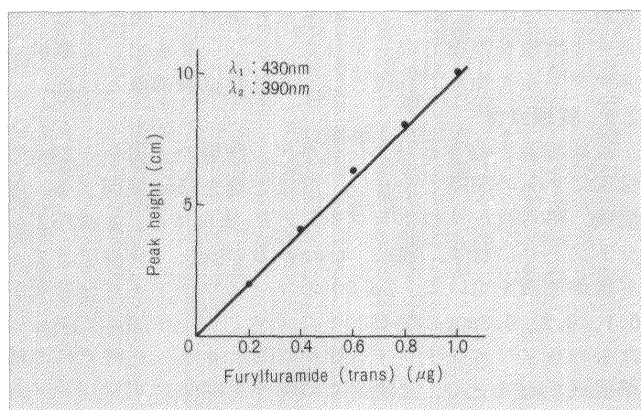


図2 Calibration curve of furylfuramide (trans)

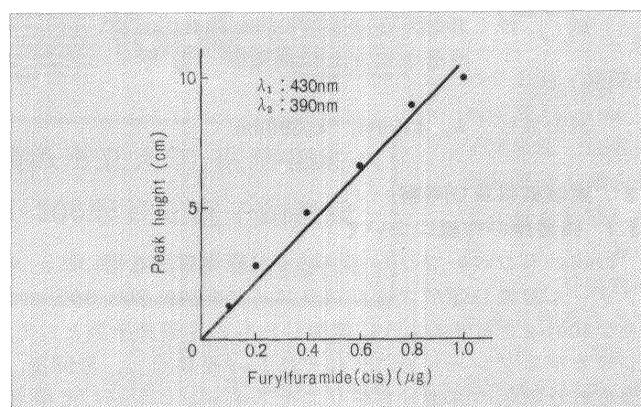


図3 Calibration curve of furylfuramide (cis)

に由来すると思われる。すなわち、薄層プレート上に展開された物質へ直接光源をあてて、直接その物質を定量しようとするとき、担体のもつ条件、展開の条件、展開後のスポットの形などにより、必ずしも反射光が濃度に比例するような条件がそろうとは限らない。しかし、最大の注意を払い、誤差因子を最小にする条件を設定するならば、薄層クロマトグラフィの2波長デンシトメトリがAF₂の簡易定量に有効な手段であると考えられる。

3.2 trans-及びcis-フリルフラマイドが混在した場合のデンシトメトリについて

展開溶媒としてベンゼン-アセトン(7-3)を用い、trans-及びcis-フリルフラマイドを展開後得られたクロマトグラムのデンシトメトリによるプロフィールを図4に示した。

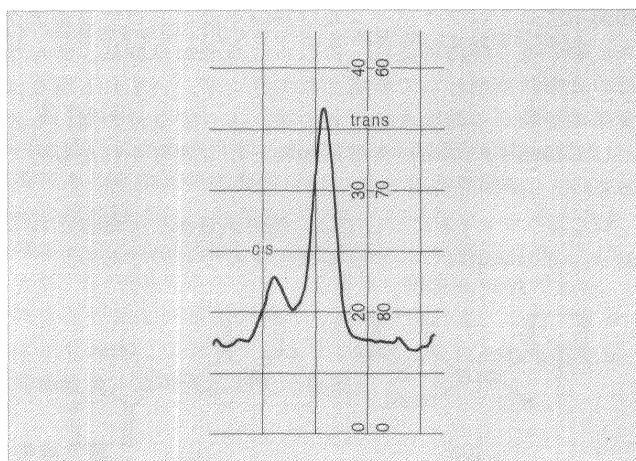


図4 Two-wavelength densitometry of furylfuramide

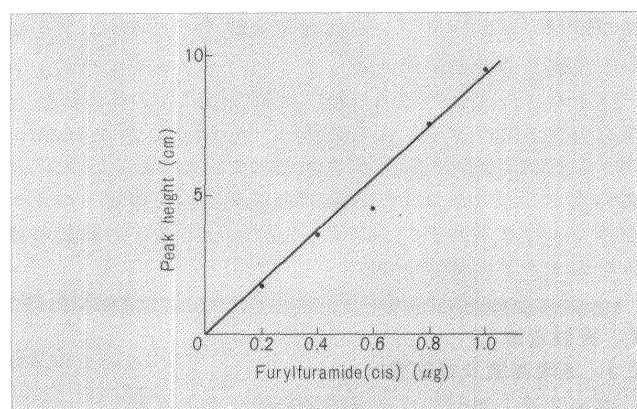


図5 Relation between cis-furylfuramide/trans-furylfuramide ratio and peak height

trans-及びcis-フリルフラマイド標準原液を用いて、それぞれ100ppmのメタノール溶液を調製し、trans-フリルフラマイド0.5 μg を一定にし、cis-フリルフラマイド0.2, 0.4, 0.6, 0.8及び1.0 μg を薄層プレート上に添加塗布したのち展開し、trans-フリルフラマイドとcis-フリルフラマイドのスポットを得た。同様にcis-フリルフラマイドを一定にし、trans-フリルフラマイドを0.2, 0.4, 0.6, 0.8及び1.0 μg とし、trans-フリルフラマイドを一定にした場合と

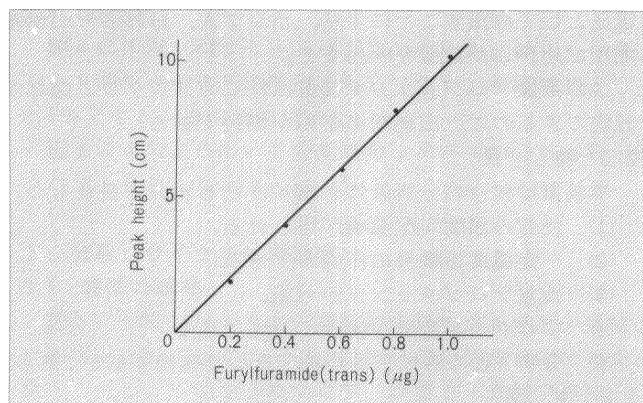


図6 Relation between trans-furfuryluramide/cis-furfuryluramide ratio and peak height

同じ操作をし、スポットを得た。これらのスポットをデンストメータに付し、得られたプロフィールについてピーク高法により検量線を描いたものを図5及び図6に示した。

これらの結果より、異性体が混在した場合においても、低濃度ではほぼ直線性を示したが、さきに述べた事実を全く無視することはできない。しかし、薄層プレート上のスポットから直接 R_f 値を検索の後、それぞれの異性体を分別定量できるという利点は大きいと考える。

4. おわりに

356形 日立2波長自記分光光度計及び薄層クロマト付属装置を用いて、trans-フリルフラマイド及びcis-フリルフラマイドの定量法について若干の検討を試みたところ、食品中のフリルフラマイドの定量とその異性体の分離定量の可能性を見出すことができた。

参考文献

- 1) 食品添加物公定書注解編集委員会：第2版食品添加物公定書注解，P768(1968)，金原出版
- 2) 西海枝東雄等：第23回日本薬学大会講演要旨集，104(1966)
- 3) 菅野三郎等：食衛誌，8，253(1967)
- 4) 吉柳節夫等：食衛誌，8，540(1967)
- 5) 菅野三郎等：食衛誌，7，140(1966)
- 6) 菅野三郎等：食衛誌，4，205(1963)
- 7) 青山敏信等：衛生化学，13，130(1967)
- 8) 和田裕等：日本食品衛生学会第25回学術講演会要旨
- 9) 荒井伸一郎等：日水会誌，32，655(1966)
- 10) 日本薬学会編：衛生試験法注解，P220(1973)
- 11) 竹下隆三等：食衛誌，8，124(1967)

U.D.C. 543.544.42.084.82-52:681.533.38'132

高速液体クロマトグラフによる新しい分析法

——635形 日立液体クロマトグラフ用溶媒プログラミング付属装置

ならびに分取りサイクル付属装置の応用——

小島勝浩* 秋間丈佳* 塚田勝男* 鴈野重威**

1. はじめに

液体クロマトグラフィでは、分離の向上や分析時間の短縮を図るために色々な方法が使われる。その内の一つに溶離液の組成，すなわち塩濃度，pH，極性などを連続的に変化させるグラジェント溶離法がある。また，組成一定の溶離液を用い，流量を連続的に増加させることにより，保持時間の大きいピークの溶出時間を短縮する流量プログラミング法もある。これらの目的のために，日立では，635形日立液体クロマトグラフ（以下「635形」という）の付属装置として溶媒プログラミング装置を製作した。

分離を改善する別の方法として，試料をカラムに繰返し循環させるリサイクルクロマトグラフィがあり，主に試料の精製分取に利用される。このための分取りサイクル付属装置も製作した。以下にこれら付属装置の内容，応用例について紹介する。

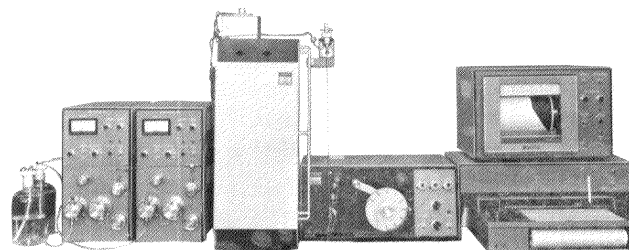


図1 溶媒プログラミング付属装置を装置した635形 日立液体クロマトグラフ

2. 溶媒プログラミング装置

2.1 装置の概要

図1に溶媒プログラミング付属装置を装着した635形の外觀図を示す。溶媒プログラミング装置はプログラマ，高圧ポンプ，ミキサから成り，635形本体と組合せて使用される。また，図2は本装置の構成を示したもので，溶離液Aを送液するポンプA及び溶離液Bを送液するポンプBがあり，

* 日立製作所 那珂工場 光学装置部

**日立製作所 那珂工場 光学装置部 主任技師 理博

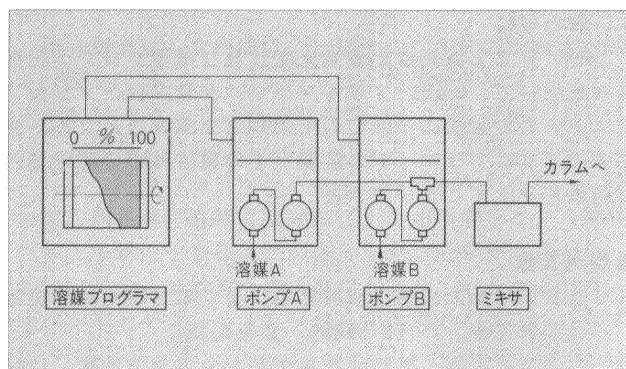


図2 溶媒プログラミング装置の構成

プログラマからの信号によりプログラムどおりの流量を吐出する。この場合、2台のポンプの総吐出量は一定に保たれるようにしてあるので、溶離液A、Bの濃度が連続的に変化する。2台のポンプからの供給された各々の溶離液はミキサで混合され、カラムに送り込まれる。この場合、ポンプ1台だけを用いると時間とともに流量が変わる流量プログラミングができる。

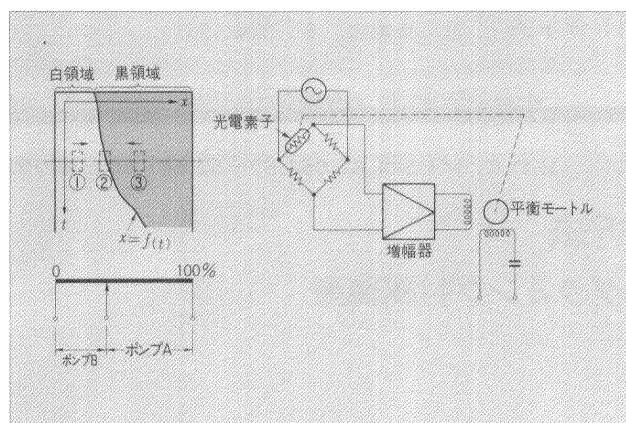


図3 溶媒プログラマの原理

プログラマは、プログラム設定器（VL₅₅-G）を内蔵している。この設定器は、プログラム曲線の検出に光電素子を用い、反射光検出図形追従方式を採用した自動平衡器の一種である。図3がその原理を示したもので、検出器は入射光量により電気抵抗が変化する光電素子と光源とを内蔵し、プログラムチャート上に描かれた白黒両領域では入射光量が異なり電気抵抗が変化する。光電素子を一边とするブリッジを構成し、自動平衡動作により検出器が白領域にあるとき（状態①）、ブリッジ出力が⊖になり、右方向に移動し、黒領域にあるとき（状態③）は⊕になり、左方向に移動するように平衡モートルを回転させる。平衡モートルと連動している検出器は常に白黒両領域の境界に向って移動し、境界線で安定する。したがってプログラムチャートをドラムにより定速回転させると検出器はプログラム曲線を追従する。一方、平衡モートルと連動するスライド抵抗器の両端にポンプA、Bの加算電圧に相当する電圧を加える。この電圧を検出器の位置で2分割し、ポンプA電圧、ポンプB

電圧として取出すことにより、ポンプA、Bは各々の供給電圧に比例した流量を吐出する。

この溶媒プログラミング装置は任意のプログラム曲線が設定できるので、広範囲の応用が期待できる。

2.2 特 長

本装置は種々の分析条件を満足させる次の特長をもつ。

- (1) 任意の濃度勾配曲線が得られる。
- (2) 一定濃度溶離液の作成ができる。
- (3) 流量プログラミングが可能。
- (4) プログラム時間が幅広く設定できる。
- (5) 分析ごとの溶媒交換や補充なしで連続運転ができる。

2.3 性 能

635形本体と組合せた場合の性能は次のとおりである。

- (1) 流量設定範囲 0.1~6.0ml/min (0.1ml/min)
- (2) プログラム時間 $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24時間
- (3) グラジエント曲線 任意
- (4) 濃度表示 0~100% スケール表示
- (5) 精度 (0.5ml/min~6.0ml/minの流量範囲)
 - 直線性 $\pm 2\%$ (10%~90%)
 - 再現性 $\pm 1\%$

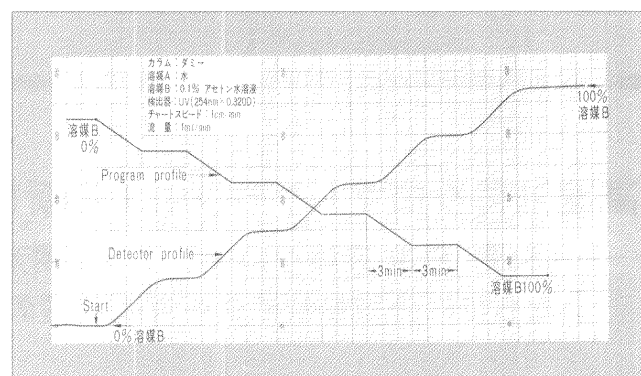


図4 溶媒プログラミング装置のグラジエント曲線

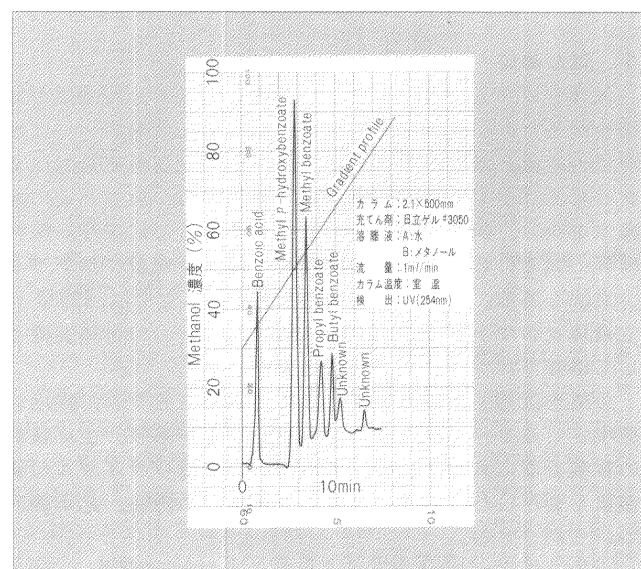


図5 溶媒プログラミングによる安息香酸エステルの分析



2.4 測定例

図4に溶媒プログラミング装置の性能を試験したグラジエント曲線を示す。溶離液Aとして水を、溶離液Bとして0.1%アセトン水溶液を用いた。

図5に本装置を用いて安息香酸エステルの分析を行ったクロマトグラムを示す。

3. 分取リサイクル付属装置

3.1 装置の概要

図6に分取リサイクル付属装置の概略図を示す。通常のクロマトグラフィでは、検出器から出た溶出液はそのまま捨てられる。リサイクルクロマトグラフィを行うには、検出器以降にバルブを設け、このバルブの切換えにより検出器から出た溶出液を再びポンプの吸入口に供給し、ポンプにより吸入、吐出されてカラムに循環させる。このように何回も試料をカラムに循環させることにより、分離困難な成分も分離させることができる。今近接した2つのピークの1回のクロマトグラフィで得られる分離能を R_s とすると、 N 回のリサイクルで達成される分離能 $R_s(N)$ は、

$$R_s(N) = \sqrt{N} \cdot R_s$$

となる。この式から近接した2つの成分を完全に分離する($R_s=1.5$)のために何回リサイクルを行えばよいか予想することができる。目的とする分離が達成されたならば、バルブを切換えて分離された成分を順次分取することができる。

このリサイクル方式では、分離された成分が再びポンプを通るので、ポンプ内のデッドボリュームは極力小さいことが望ましい。分離された成分がポンプ内で拡散し再び混合され、リサイクルすることによりかえって分離の低下をきたすおそれがあるからである。635形のポンプはこの点を考慮し極めて小さく抑えてあり、リサイクルクロマトグラフィを行うのに最適である。図7にこの点を確かめるために行った実験の結果を示す。2回目のリサイクルで、分離は1回目比べて $\sqrt{2}$ 倍向上しており、ポンプ内での分離低下は無視できるほど小さいことを示している。

リサイクルがはじまると、溶離液は閉流路内を循環しているの、溶離液の消費量はゼロとなり、分取のようにカラムに大流量を流す必要がある場合、この点でも有効である。

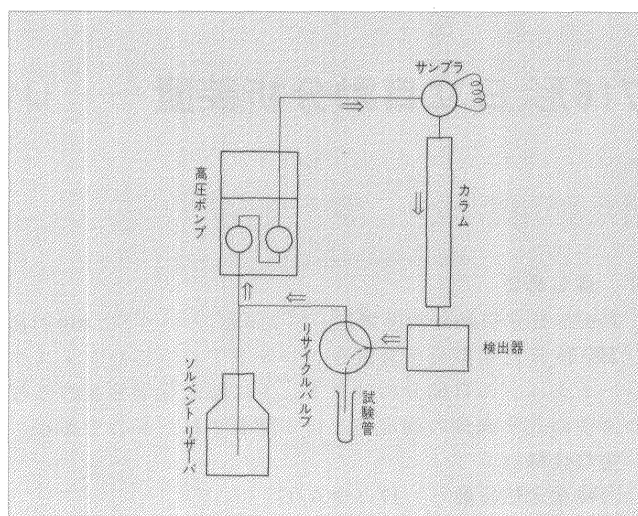


図6 リサイクルクロマトグラフィの説明図

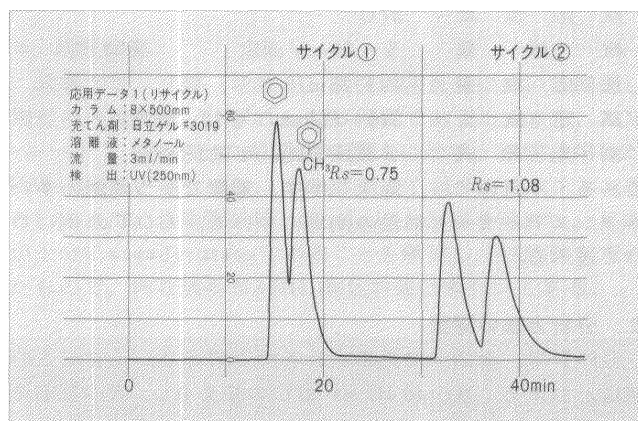


図7 リサイクルによる分離の向上

3.2 測定例

図8にエポキシ樹脂を分離した例を示す。斜線のピークは順次分取して系外に取出したことを示しているが、このように、リサイクルを続けることにより、一連の成分を完全に分離、分取することができる。

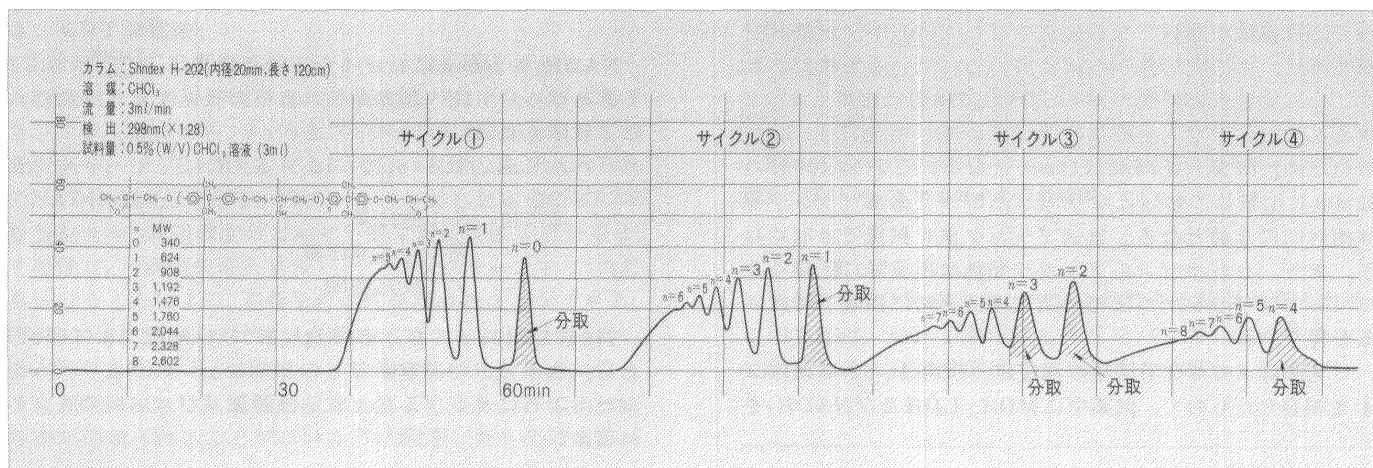


図8 エポキシ樹脂のリサイクルクロマトグラム



U.D.C. 543.432.084.8—529:616.153—074

716形 日立自動分析装置——UV法によるGOTの測定——

只野壽太郎* 野村 靖** 古田芳輝**

1. はじめに

716形 日立自動分析装置(以下「716形」という)は400形及び500形 日立自動分析装置をグレードアップしたディスクリットタイプの自動分析装置で、主に臨床化学検査のうち血清中の化学成分の測定用として開発されたものである。

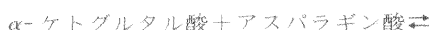
主な仕様は

同時測定種目数	17 (含A/G)
処 理 速 度	120検体/h
反 応 時 間	15min
反 応 温 度	37℃
検 体 量	5～20 μ l / 測定
反 応 液 量	約1.25ml
測 定 波 長	340～850nm 中12, 固定
測 光 方 式	2波長測光, 1波長測光

である。本報告では、臨床化学中、重要でかつ問題の多いトランスアミナーゼ活性の測定について、GOTの例について述べる。

2. 分析方法の選択

GOTは、血清中に見出される酵素であり、正常人の値は、およそ 8～40 IU at 37℃の値を有し、次の反応をつかさどる。



生成したオキザロ酢酸の一部は非酵素的に脱炭酸を受け、ピルビン酸になる。

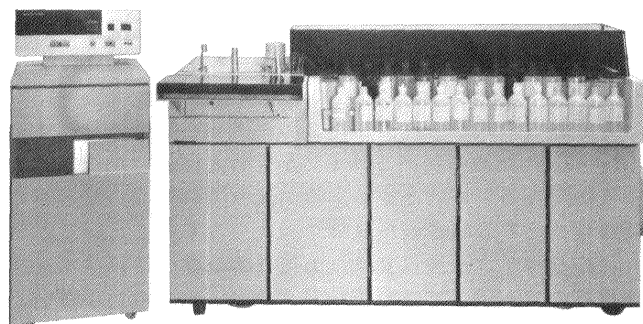
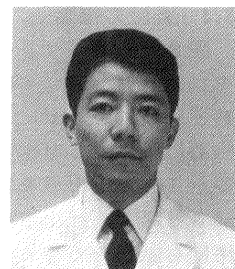


ライトマンフランケル法は、反応(1)、(2)により生じたオキザロ酢酸及びピルビン酸をヒドラゾンとし、次いで反応液をアルカリとすることにより発色させ、比色測定するので、検量線が曲線となる欠点を有しているが、試薬が安価であり、その実用性から広く用いられている方法である。

この方法を反応時間が15minである716形に応用しようとすると、ヒドラゾン生成反応及びアルカリ発色に4minかかるため、酵素反応時間は11minとなる。これは400形の32minと比較して約1/3となり(したがって血清ブランク値は相対的に3倍となる)、血清ブランク値を無視できなくなる。また、ヒドラゾンのアルカリ発色は再現性に乏しく、ライトマンフランケル法の時間短縮は非常に困難と考えざるを得ない。

UV法によるGOT活性の測定は、反応(1)、(2)に反応(3)(4)を組合せたもので、試薬中にMDH、LDH及びNADH₂を

加え、反応に伴うNADH₂の減少を340nmにおける吸光度の変化として測定するものである。



716形 日立自動分析装置



NAD……Nicotineamide adenine dinucleotide

NADH₂……NADの還元形

MDH……Malate dehydrogenase

LDH……Lactate dehydrogenase

NADH₂の340nmにおける分子吸光係数は $E_{\text{mM}}^{340\text{nm}} = 6.22$ であるから、1IU(国際単位)当りの吸光度変化は次の式により示される。

$$\Delta E_{340\text{nm}} / \text{IU} = 6.22 \times 10^{-3} \times S / R \times T \cdots \cdots (5)$$

ここに S: 検体量

R: 反応液総量

T: 反応時間

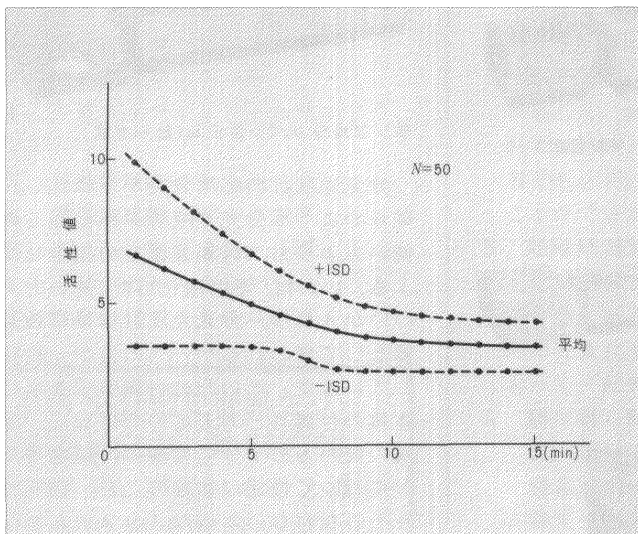
716形の340nmにおける吸光度1での分解能を0.0005ODとし、1単位まで測定するものとする、式(5)より式(6)を満たすようにサンプル量と反応液総量及び反応時間を定めればよい。

$$\frac{S}{R} \times T > \frac{0.0005}{0.00622} \approx 0.08 \cdots \cdots (6)$$

* 東海大学医学部 臨床病理学講座

** 日立製作所那珂工場 光装部

一方、測定系に用いる NADH_2 は補酵素として生体内に存在する物質であり、各種酸化還元酵素の H_2 受容体ないし供与体として作用するのであるから、当然血清中の物質により容易に酸化される。図1は、GOT測定系から α -ケトグルタル酸を除いた試薬に血清を $\frac{1}{100}$ 容加え、1minごとの NADH_2 の酸化速度を求めたもので、測定に使用したのは患者血清50個である。この NADH_2 の酸化はいわゆる内蔵性のものであり、仮に14min目に α -ケトグルタル酸を加えてGOT活性を測定したとしても $3.8\text{IU} \pm 0.8(\text{ISD})$ の測定誤差を生じることになる。


 図1 血清の内蔵性 NADH_2 酸化活性

式(6)より明らかなように、 S と T とは反比例関係にある。検体量 (S) を716形の仕様に合せるには T をできるだけ長くとり、 S を小さくすればよく、また、血清を測定する際に時々観察されるラグフェースによる誤差についても相対的に小さくすることができる。

以上の観点から、716形のGOT測定には、UVによるEND-POINT法を採用することとし、検体ブランク値を差引くことにした。

3. GOT測定法

716形でのGOT測定法のブロック図を図2に示す。

測定チャンネルで観察される吸光度の変化分(対試薬ブランクは(血清の色)+(内蔵性の NADH_2 酸化)+GOT活性であり、ブランクチャンネルでは(血清の色)+(内蔵性の NADH_2 酸化)である。両チャンネルとも反応液中にLDHを含むため、既知濃度のピルビン酸で較正することができ、その後で、(測定チャンネル)-(ブランクチャンネル)の計算を行うことにより、GOTの活性を求めることができる。716形では、これらの計算が自動的にできるようになっている。なお、 R_1 と R_2 が通常のUV測定法に比較して逆になっているが、これは、試薬中に含まれているLDHにより、検体が汚染されることがないように配慮したものである。

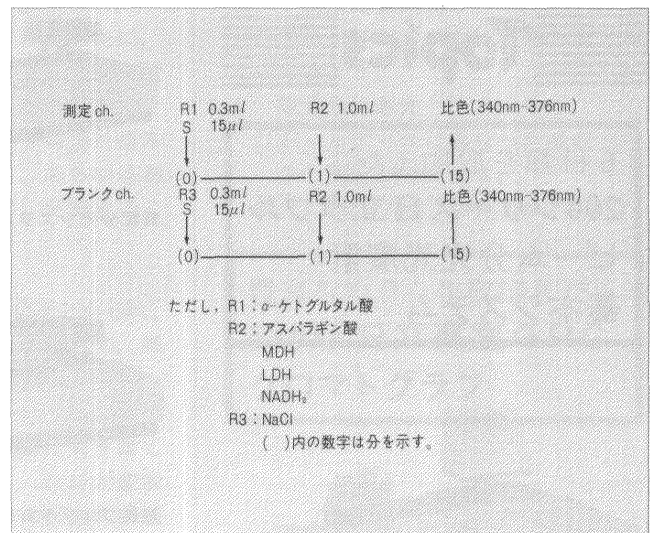


図2 GOT分析法ブロック図

4. 測定結果

試薬ブランク値(活性0)及び正常血清について繰り返し測定の再現性は、いずれも1IU以下であった。また、UV-レートアッセイとの相関図を図3に示す。測定に用いたUV-レートアッセイは、十分にプリインキュベーションを行い、また、反応開始後、20min以上反応を追跡し、反応が十分にsteady-stateであることを確認し、活性値を求めたもので、内蔵性の NADH_2 酸化の値は差引いてある。

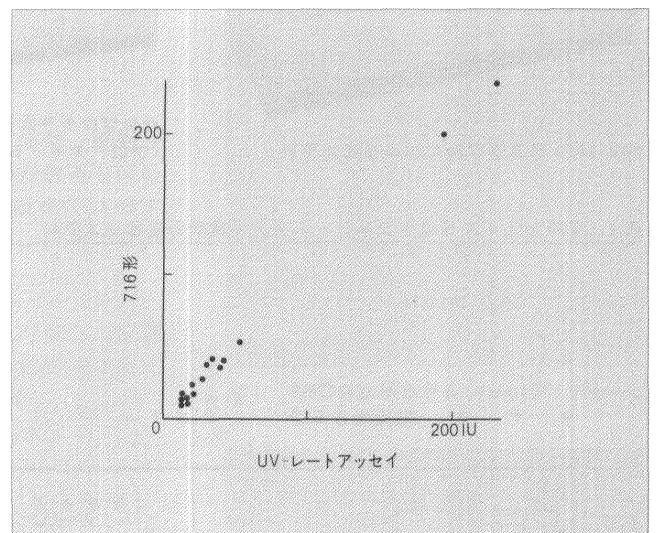


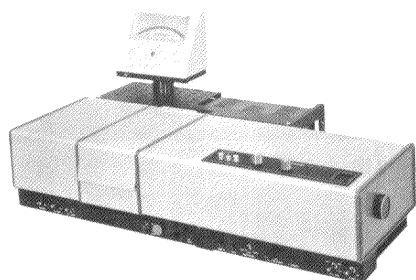
図3 UV-レートアッセイとの相関図

5. むすび

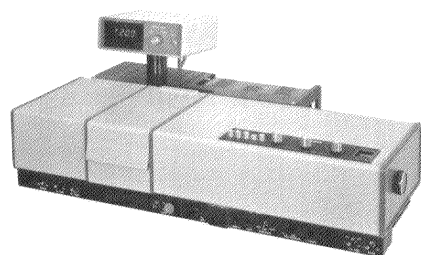
716形用GOT測定法として満足できる結果が得られた。この方法は、GPT測定にも、アスパラギン酸をアラニンに代えることにより応用できることを付記しておく。

Topics

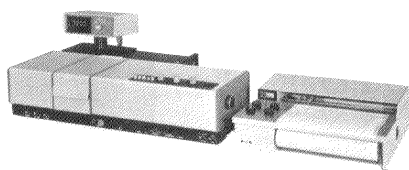
6種類を取揃えた
200シリーズ日立ダブル
ビーム分光光度計
基本システム



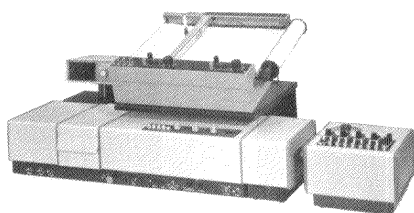
200-10形 日立ダブルビーム分光光度計



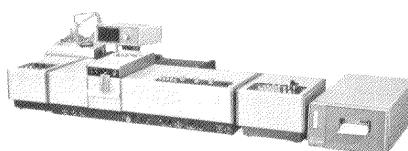
200-20形 日立ダブルビーム分光光度計



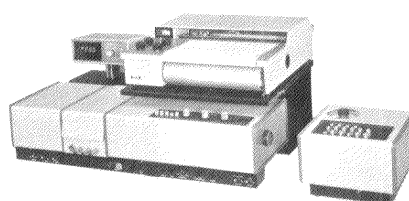
自記分光システム(フローチャート記録計)



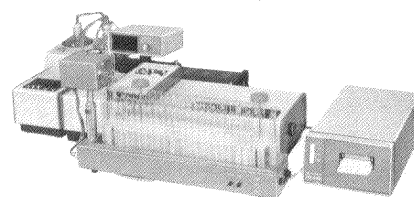
波長プログラムシステム(X-Y記録計)



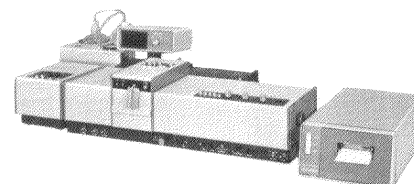
酵素反応分析システム



セルプログラムシステム
(フローチャート記録計は特別付属品)



オートサンプリングシステム(ヒータ式)



サンプルシッパシステム(ヒータ式)

分光光度計の応用分野が多様化し、従来のような分光光度計単体としての使い方よりも、付属装置との組合せによる、いわば「専用機化した」使い方、いいかえれば、分光光度計は単に検知器として使われるケースの方が一般化しています。そのため付属装置を単に本体の付属品と考えるのではなく、専用の使い方を十分に考慮し、組合せた形において性能は勿論のこと、機能性をそこなわないような「システムとしての構成」を実現することが必要となります。

前号にてご紹介しました200シリーズの開発に当っては、単に本体の性能向上のみならず、付属装置の統一化をはかり、表1のような6組のシステム

表1 200シリーズ 日立ダブルビーム分光光度計の基本システム *200-20形のみに対応します。

構成		200形本体	専用記録計	X-Y記録計	X-Y記録計ユニット	波長読み出しユニット	記録計台	シッパセルユニット(ヒータ式)	(循環水式)	シッパコントロールユニット	ポンプユニット	サンプルフイダー	デジタルレコーダ*	エンザイムカリキュレータ	波長プログラムユニット	セルプログラ		
使用目的 基本システム	スタート → 主にスペクトルを記録するのですか → はい → スペクトルは時間とともに変化しますか → いいえ → 試料は時間とともに変化しますか → はい → 酵素反応分析にのみ用いますか → いいえ → 省力化をお望みですか → はい → → いいえ →	自記分光システム	フローチャート	☐	☐		☐											
			X-Y記録計	☐		☐	☐	☐										
		波長プログラムシステム	フローチャート	☐	☐		☐										☐	
			X-Y記録計	☐		☐	☐	☐										
		酵素反応分析システム	分析システム	☐					☐			☐	☐		☐	☐		
			セルプログラムシステム	☐														☐
オートサンプリングシステム	ヒータ式	☐					☐			☐	☐	☐	☐	☐				
	循環水式	☐																
サンプルシッパシステム	ヒータ式	☐					☐			☐	☐	☐	☐	☐				
	循環水式	☐								☐	☐	☐						

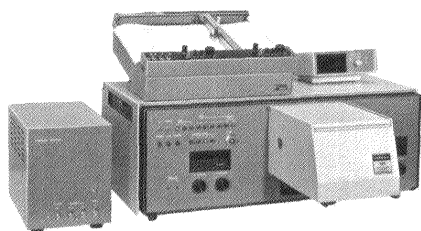


構成を完成いたしました。これらのシステムの使い分けにより、いかなる応用分野のご要求にもお答えすることができます。また、どのシステムを取上げても、組合せた形は一体感があり、システムとしての操作性を十分考慮した上で機能美もそなわれないようなデザインになっています。

なお、表1の基本システムに含まれた付属装置のほか、次のような付属装置も完備しています。

1. 検量線曲り補正器
2. 微分スペクトルユニット
3. オートゼロユニット
4. 少量スイクエンシャルサンプリングユニット
5. 積分球ユニット
6. 循環水式恒温セルホルダー
7. ターレットセルホルダー
8. フローセルユニット
9. ミクロフローセルユニット

2波長分光で世界をリードする日立が、独創的なアイディアでおくる2波長自記分光光度計の決定版 556形 日立 2波長自記分光光度計



このたび日立では、新たに、556形日立2波長自記分光光度計を開発いたしました。556形は、従来の356形をさらにグレードアップし、2波長測光法のもつ特長を、あますところなくひきだせるように細心の配慮で製作された分光光度計です。

■特長

1. 測光モードの切換がワンタッチでできます。

2波長測光法、自記分光測光法、微分測光法が、プッシュボタンにより、簡単に切換られます。

2. 豊富な測光スケール

吸光度、透過率スケールの他に、目的物質の濃度を、デジタルで読み取れる濃度スケールがあります。さらに、記録計のレンジ切換と組み合わせることによって、あらゆる測定に最適のスケールで、記録することがができます。

3. 抜群の操作性

スイッチ類は一箇所にまとめられ、プッシュボタンの採用によって、操作は極めて簡単です。

4. ユニークな試料室

試料室は、装置の前面に突き出ているので、試料の出し入れに大変便利です。また、種々の付属装置が装着でき、広範囲の応用分野に利用することができます。

5. 短時間測定ができます。

全波長域を、わずか1分以内で測定することが出来ます。スペクトルの時間変化も、リピートスキャンによって、記録できます。

6. 繰り返し記録ができます。

X-Yレコーダによって、酸化還元元素スペクトルや、ダブルビーム測光—微分測光など、一枚のチャートに重ねて記録することができ、波長位置の対応が、大変簡単にできます。

7. 豊富な付属装置

ラピッドミキシング装置、薄層クロマト装置、励起光照射装置をはじめ数々の付属装置が用意されています。

8. スペースをとらない、コンパクトな装置

556形は小形軽量でスペースをとらず、使う人の身になった細心の配慮がゆき届いています。必要な最少床面積は120cm×60cmです。

■測光法

1. ダブルビーム測光

- 透明試料、混濁試料の吸収スペクトルが得られます。
- 任意の波長間隔でリピートスキャンができます。
- 差スペクトルが得られます。

2. 2波長分光測光

- 反応の微小変化の測定ができます。
- 混合物中の一成分の測定ができます。
- 2現象測光ができます。(2現象付属装置を使用)

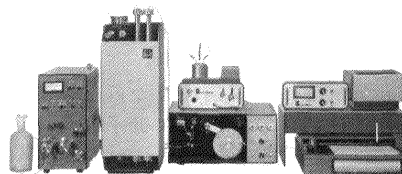
3. 1波長走査測光

- 標準試料がとれない試料の測定ができます。

4. 微分分光測光

- ショルダー状に重なった吸収ピークの測定ができます。
- バックグラウンドの消去ができます。

豊富なカラムを取揃えた 635形 日立高速GPC クロマトグラフ



このたび、日立では、635形日立高速液体クロマトグラフによりGPCを高速で行なうためのカラムおよび付属品を発売いたしました。

GPCによる分離は、分子量あるいは分子サイズに起因するもので、他の

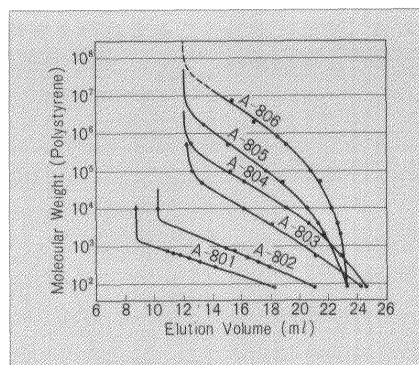


図1 GPC分析用カラム(8mm ID×500mm L)による検量線

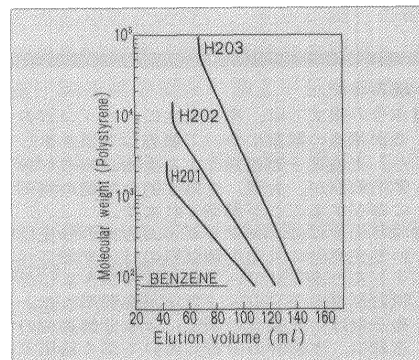


図2 GPC分取用カラム(20mm ID×60mm L)による検量線



分離法にみられるような化学的要素が含まれません。その結果、成分の溶出時間は、それら分子量などに応じて一定しています。それゆえ、未知成分の分析に対して、全成分の溶出を容易に確認できますから、合成高分子物質やその添加剤の分析、未知天然物質の分析などに適しています。これ等の成分は、分子量の大きい方から順に溶出され、その溶出量（または時間）と分子量の対数が直線関係にあります。図1および図2は、ポリスチレン標準試料による、溶出容量と分子量の関係を各カラムについて示しています。

■特 長

1. 高速GPCができます。
- 高分解能・高理論段カラムを使用することにより、従来の分子量分布測定は大幅に短縮されます。
2. 高性能定流量ポンプ
- 定流量方式ですから極めて再現性の高いデータが得られます。
- 連続吸入、連続吐出の容量の小さいポンプですから、溶離液の連続供給ができ溶離液の交換も迅速に行えます。
3. 豊富なカラム
- 分析用—極めて高い理論段数(13,000段以上/50cm)を有し、短い

■カラムの種類

●分析用(内径8mm 長さ500mm 1本) (※) A-803、A-804、A-805、A-806の混合ゲルカラム

名 称	バ ー ツ No.	排 除 限 界	理 論 段 数/50cm
Shodex A-801	635-0563	1×10^3	10,000
Shodex A-802	635-0564	5×10^3	13,000
Shodex A-803	635-0565	7×10^4	13,000
Shodex A-804	635-0566	5×10^5	13,000
Shodex A-805	635-0567	5×10^6 (推定)	13,000
Shodex A-806	635-0568	5×10^7 (推定)	13,000
Shodex A-80M(※)	635-0569	5×10^7 (推定)	13,000

●分取用(内径20mm 長さ600mm 2本組)

名 称	バ ー ツ No.	排 除 限 界	理 論 段 数/60cm
Shodex H-201	635-0560	1×10^3	8,000
Shodex H-202	635-0561	5×10^3	9,000
Shodex H-203	635-0562	7×10^4	9,000

- 分析時間を誇る高性能カラムです。
- 分取用—多量の試料を短時間に処理する能力があり1回に数百mg～1gの試料を分取できます。
4. 簡便な操作
- リサイクル分取がワンタッチで行えます。
- カラム交換、検出器の交換が簡単にできます。
5. 多種類の検出器
- RIをはじめUV検出器、UV～VIS波

長可変検出器、波長スキャン検出器、ケイ光光度計検出器等が用意されております。

6. 豊富な充填剤

- 吸着、分配、イオン交換等液クロ用カラム充填剤も豊富に用意してあります。

■付 属 品

サンプリングバルブ、ミリポアフィルタキット、カラムホルダ、パイプ類等から成っています。

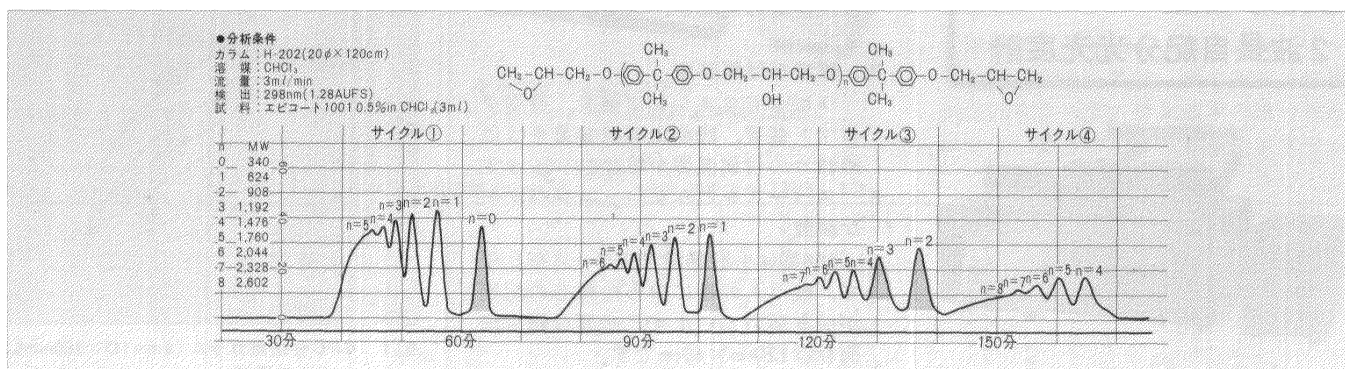


図3 GPCリサイクルによるエピコート1001の分取例

(編集後記)

●本号の報文では、赤井先生に、カイコガの表面構造の観察について報告して頂きました。走査電子顕微鏡による生物試料の形態学的観察が、生理、生態学的な問題の解明に寄与することが期待されます。

●浅井先生には、ダブルビーム方式の分光けい光光度計による生物試料のけい光差スペクトルの測定について報告して頂きました。特にサブトラクションモードを利用した、微小なけい光変化の測定による分解過程の追跡は、生物学の分野において広く適用できるものと考えます。

●薄層クロマトグラフィの2波長デンシトメトリによるAF₂の定量法は、展開された薄板を直接、薄層クロマト付属装置に装着して2波長測光できますので、他の方法に比較して操作が簡単で、かつ正確なサンプリングができることにご注目下さい。

本NEWSに関するお問合せは、下記へご連絡ください。

日製産業株式会社 精機企画室
東京都港区芝西久保桜川町2 第17森ビル
〒105 TEL (03) 501-5 3 1 1

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SUMMER, 1975, Vol. 18 No. 2

発行 昭和50年7月1日
(年4回発行)

発行人 湯川 清
編集人 野田 保 岩井孝之
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
東京都港区芝西久保桜川町2 第17森ビル
〒105 TEL (03) 501-7 2 0 1
印刷所 日立印刷株式会社