

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SUMMER 1979
VOL.22 NO.2

U.D.C. 616-074:543.084-52

目次

展 望

もうすぐ試薬がいなくなる？…

……………小沢恭一… 1

報 文

生物領域における走査電顕ミクロ

マニプレータの効用…久能 均… 2

ガスクロマトグラフー質量分析計

による、血清胆汁酸の分析……

……………猪川嗣朗 秋森伯美… 7

340形 日立自記分光光度計を用い

た、超微量試料の蛋白および酵

素測定の研究……………遠藤 仁…11

解 説

コンピュータを利用した、マッス

ペクトルの検索……………加藤義昭…14

トピックス

H-600形 日立高性能分析電子顕微

鏡……………17

M-80形 日立二重収束GC質量分析

計……………6

100-25/100-26形 日立シッパフォ

メータ……………13

170-70形 日立ゼーマン原子吸光分

光度計用、日立自動サンプリ

ングシステム……………17

650-60形 日立分光けい光光度計…18

706D形 日立自動分析装置、欧州諸

国へ輸出を開始……………18

展 望

もうすぐ試薬がいなくなる？

小沢 恭一*

身近な例で言えば、血中のコレステロールとか、糖の濃度を測る検査の分野、つまり、病院の臨床検査室などにおける生化学成分の分析において、自動化装置が出現してから約20年になる。今、この自動化装置に静かな変化が起きようとしているようである。

L. T. Skeggs, Jr.が考案した連続流れ方式(フロー方式)の自動化学分析装置を米国のテクニコン社が商品化したのは1957年であった。これがオートアナライザであって、その後2年程して我が国にも輸入された。その頃の自動分析装置は病院の検査機器としては非常に高価なものであった。事実、実現はしなかったが、国立東京第一病院では、1台の機器を多目的に使用し、しかも、病院群で活用する計画が立てられたと言う話である。当時は米国でも、多くの病院の検査室に自動分析装置は1台しかなく、その1台で、尿素窒素と糖の2つの測定を午前と午後に分けて分析するなど行われていたようである。これが、1961年頃から1台のオートアナライザに2ch, 3chを組みこんで、2項目、3項目の測定を同時に行うようになり、さらに1966年には12項目が同時測定できるSMA12/30が、1968年にはSMA12/60が発表され、いわゆるマルチチャンネル分析装置が自動分析装置の一つの形と考えられるようになった。

フロー方式でない、いわゆるディスクリット方式の自動分析装置が発売されるようになったのはこの頃である。これは、試験管のような反応容器を沢山もっており、1つの検体の1つの分析をこの反応容器の1つずつの中で行うようにしたもので、検査技師がそれぞれの生化学検査を試験管で行っている作業をそのまま機械化したと言えるもので非常に分り易い機構となっている。6項目同時測定の日立400形自動分析装置は、1968年11月に仙台で開かれた日本臨床病理学会で発表された。400形が、実際に検査室でルーチンに使用されだしたのは1969年である。こうして、我が国の検査室の自動化が本格化し始めたのは、実にオートアナライザが輸入され始めてから10年もたってからであった。しかし、その後の自動化の歩みは目覚ましく、1978年末では、推定14,000chの自動分析装置が稼働していると見られる。うち約35%が日立製品である。

さて、これらの殆どどの装置は、いわば、自動湿式化学分析装置であって、フロー方式であっても、ディスクリット方式であっても、さらに、ディスクリット方式のうちでも、試験管のような反応容器を用いるものはもちろん、プラスチックの袋を反応の場所としたバッグ方式であっても、遠心力場を混合攪拌の手段とした遠心方式であっても、いずれも検体を試薬溶液と混合して化学反応を起させ、その結果である吸光度の変化量、または、変化速度を分光光度計で測定するものである。

* 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部 副技師長、理博



このような、単なる化学分析の自動化ではあっても、その後の技術の進歩、殊に半導体技術の進歩、そして、コンピュータの低価格化にささえられて、検体処理数の増大、同時分析項目の多数化、検体必要量の微量化、それに、これらのように数字には表わせないが、操作上の容易さ、便利さなどへの開発改良がなされ、検査室の能率、精度の向上に大きな効果を及ぼして来た。(日立 716形, 706(D)形, 726形, 712形など)

所で、ここ数年、これとは別に、全く新しい方式の分析装置が産れて来ている。その一つは、固定化酵素を用いたものであり、また、イオン選択電極を用いたものである。

種々雑多な物質の混合物である血清中の成分の測定においては、共存成分の干渉なしに正確な値をうるのはかなり難しいものである。従って、目的とする物質に特異的に作用する酵素を用いた反応によって正確な値をえようとするのは自然の成り行きである。そうして、血清中の尿素、ぶどう糖、コレステロールなどの測定にそれぞれ特異的に働く酵素を含む試薬が用いられている。酵素を用いる事は、ひとり測定の正確度を向上させるだけでなく、従来の化学分析で用いられて来た強酸や強アルカリ、または、重金属などを用いないで済むとか、高い温度を用いないで済むという点も見逃がせない事である。自動分析装置の構成や保守上にも好都合であるし、また、排水処理にも余計な手間をかけずに済む点きわめて秀れている。ここまで来ると、

酵素が本来、自身は変化せずに化学反応を進めるものである事から、この酵素を繰り返し使用するようにできないかと考えるのは当然の帰結である。ここに、酵素を何らかの方法で固定化(粒状、フィルム状のものに、或は、管の内側などに、化学的な方法でつけたり、物理的に閉じ込めたり)して用いる試みが生れて来た。すでにこの技術を用いたグルコースメータや、尿素分析計が考案されている。

他方、各種の電極が開発されて来ている。ここにくわしく記述する余裕はないが、その種類は多く、固体電極、液膜電極、酵素電極、はては生物電極まで考え出されている。日立702形電解質分析装置も、ナトリウム、カリウム、塩素各イオン用の新しいプラスチック膜イオン選択電極を用いたものである。上のグルコースメータや、尿素分析計にもO₂電極や、H₂O₂電極、或いはアンモニア電極を用いたものがある。

最初オートアナライザが世に現われてから20年たった生化学検査の自動化は、ようやく今までと異った方向に進み出そうとしているようである。固定化酵素の膜やカラムを用いたり、いろんなイオン選択電極を用いたマルチチャネルの分析装置が、現在のように高価な試薬をどんどん消費するという事なく、多数の検体をどしどし処理している検査室が見られるようになるのはそう遠い将来ではないのではあるまいか。

報 文

U.D.C. 581.24.086.863:621.385.833.28

生物領域における走査電顕ミクロマニプレータの効用^{*}

久能 均^{**}

1. はじめに

走査電顕が実用化されてからかなりの年月が経過したが、その間に走査電顕は広い分野で活用され、様々な新しい知見を得るために役立ってきた。当初、走査電顕は試料の表面構造観察に専ら用いられていたが、その後色々な手法あるいは付属装置が開発されて、応用面がますます広がっていく。

ミクロマニプレータは数年前に開発された付属装置の一つで、二次電子像を見ながら試料の解剖ができるユニークな装置である。マニプレータは光学顕微鏡の付属装置として長い歴史をもっているが、走査電顕のミクロマニプレータはその繊細な動きあるいは解像力の点で光顕マニプレータの比ではない。

我々の研究室では、過去数年、植物とカビの研究にミクロマニプレータを応用し、若干の新しい知見を得てきた。

本論文では、当研究室で検討したテクニックを紹介すると共に、すでに公表した我々の業績を抄録することによって、生物領域におけるミクロマニプレータの効用について述べてみたい。

2. 観察試料

ミクロマニプレータ用の試料は全体が導電性をもっているものが望ましい。試料に蒸着をほどこして表面にのみ導電性を与えたものでは、マニプレータで解剖して試料内部が露出するとチャージアップして像が見にくくなり、正確な解剖は期待できない。しかし、内部がチャージアップしたもので、一旦鏡体外へ試料をとり出し蒸着をほどこし、少しずつ解剖を進めることをくり返せば、利用できないことはない。後述するように、灰化した組織はチャージアップし難いので、割合扱い易い。試料全体に導電性を与える方法には、現在のところ、タンニン酸法と導電染色法とがあるが、いずれもタンニン酸を用いることによってオスミウムの結合を促進させ、試料に導電性を与えるものである。

* 三重大学 農学部 植物病理学研究室業績 No.47

** 三重大学 農学部 植物病理学研究室、助教授、農博、Ph. D.

3. 針の作製 (図1, 2)

マニプレータの針は、電気分解法によって容易に作ることができる。市販の直径約1mm(太さはマニプレータの針の取り付け口の径によって決まる)のタングステン線と低電圧装置を用意する。別に約10N NaOH又はKOHを入れたシャーレを用意し、その中にリング状にした銅線を入れ、マイナスの極とする。このマイナス極と低電圧装置のマイナス極を接続し、さらに約1.5cmに切ったタングステン線と装置のプラス極を接続する。約5ボルト、0.1—0.3アンペアの電流を流し、タングステン線をゆっくりと上下させ、線の先端を液面に出したり入れたりする。電気分解が始ると、銅線のリング部分から大量の気泡が出る。もし、気泡が生じない場合には適宜NaOHを加えて溶液のアルカリ濃度を高める。約10—15分で先端が細くなるので、簡単に水洗いをして低倍の光学顕微鏡で調べて、適当な細さになるまで電気分解を続ける。最後に約5NHClに浸漬して中和し、水洗した後に乾燥させ使用する。中和が不十分であると針の表面はザラザラになる。NaOH, HClの濃度、電圧、電流は厳密なものではなく、大体の目安である。

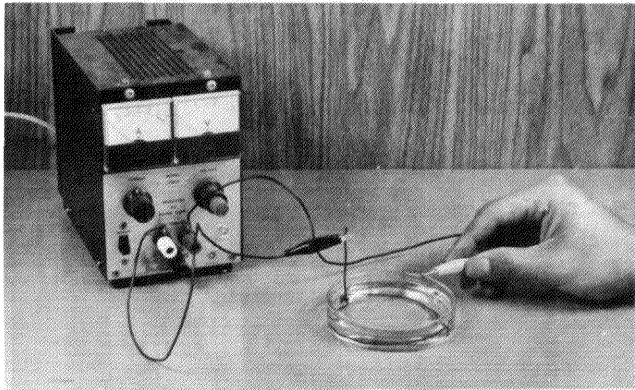


図1 マニプレータの針作製装置。低電圧装置(菊水電子工業株式会社製)を使用。

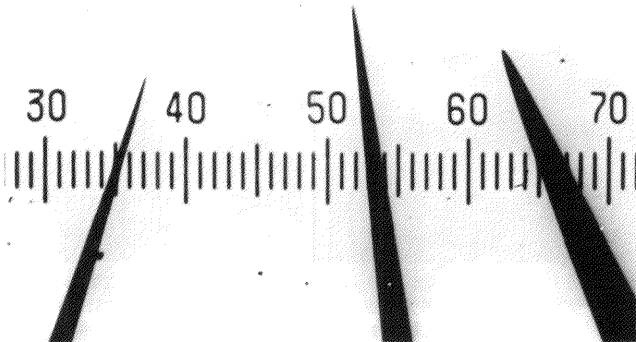


図2 マニプレータの針。(1目盛=10 μ m)。

4. 針のとりつけ

マニプレータの針のとりつけ口は、製品によって多少の大小があるが、とりつけ口の径が針の太さに対して大きすぎる場合には、アルミホイルをまきつけて調整するとよい。取り付け口から針の先端までの長さは一定でなければならない。一応約5mmくらいとされているが、これも製品によって多少のバラツキがあるので、常に一定になるように定規であらかじめ長さを定めておく必要がある。要は、マ

ニプレータ操作の実際倍率で、画面の中央部に針の先端が位置するように取り付ければよい。

5. マニプレータの操作 (図3)²⁾

まず、テレビスクリーンまたは高速走査のブラウン管上に試料の像をうつす。次にZ軸を用いて試料の working distance を20mm程度に下げた後にマニプレータを操作して針を挿入し、画面中央に針の先端が来るように調整する。針の先端に焦点を合わせ、ゆっくりとZ軸で試料を上昇させる。試料が針先に近づくにつれて試料にも焦点が合ってくるので、その焦点の合い方によって針先端と試料表面の距離を測る。この時点から解剖操作に移るが、以後マニプレータには手を触れず、X、Y、Z軸の操作によって試料の解剖を行なう。試料に針をつきさすのはZ軸、試料を水平方向に切るにはXまたはY軸を専ら用いるが、例えば細胞壁のような構造を裏返すためにはZ軸とXまたはY軸とを同時に操作しなければならない。各軸の動きを左右の手におぼえさせ、画面を見つめながら操作する必要がある。解剖の中途段階で写真撮影をする場合には、その都度 working distance をチェックする必要がある。解剖の中途段階では針先も試料も動かせないことが多いので、working distance が17mmとか18mmのような中途半端な数値を示すことが多い。したがって、メータに表示される倍率と実際の倍率が異ってくる。これを補正するために、working distance の数値ごとに、メータの表示倍率と実際の倍率の差をあらかじめ求めておくとう便利である。

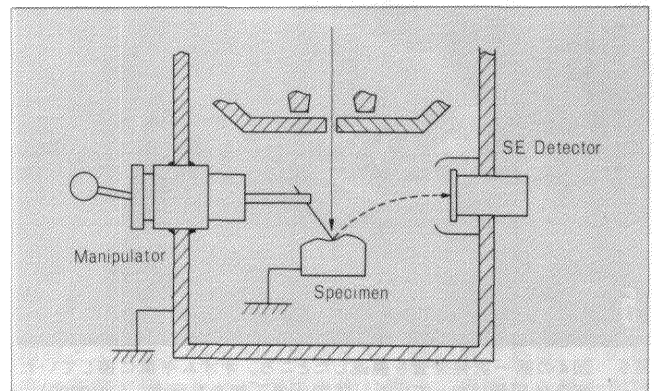


図3 走査電顕鏡体基部のマニプレータ取り付け部模式図。

6. マニプレーションの実際

6.1 オオムギ葉に寄生するうどんこ病菌分生胞子の発芽 (図4—6)³⁾

オオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis hordei*) の分生胞子をオオムギ葉に接種すると、約1時間で短い第一次発芽管を生じ、続いて約3—4時間で付着器とよばれる大きな発芽管を生じる(図4)。やがて付着器から細い侵入菌糸ができ、これが葉の表皮細胞壁を貫通して、表皮細胞内に吸器とよばれる栄養吸収器管を作ること、古くから知られていた。しかし、第一次発芽管はあまり重視されず、副次的に生じ、胞子の生育上あまり意味のないものと考えられていた。我々は第一次発芽管が本菌の分生胞子に必ず見られることに注目し、マニプレータを用いて、注意深く第一次発芽管を裏返してみた。その結果、図5、6に示

すように、第一次発芽管からも短い侵入菌糸が生じ、それが表皮細胞壁に孔を開けていることが明らかになった。この孔がどのくらいの深さにまで達しているかという点は透過電顕によって解決されるべきであるが、オオムギ葉への本菌の感染過程に第一次発芽管が何らかの影響をもっていることが示唆された興味深い結果である。

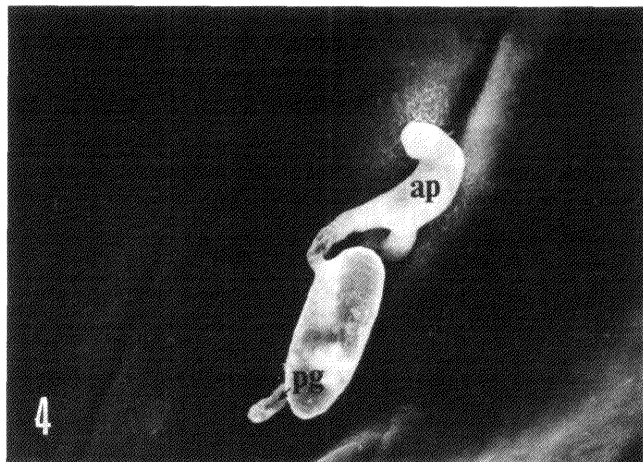


図4 オオムギ葉上のうどんこ病菌の発芽胞子。
ap：付着器。pg：第一次発芽管。(×1500)。

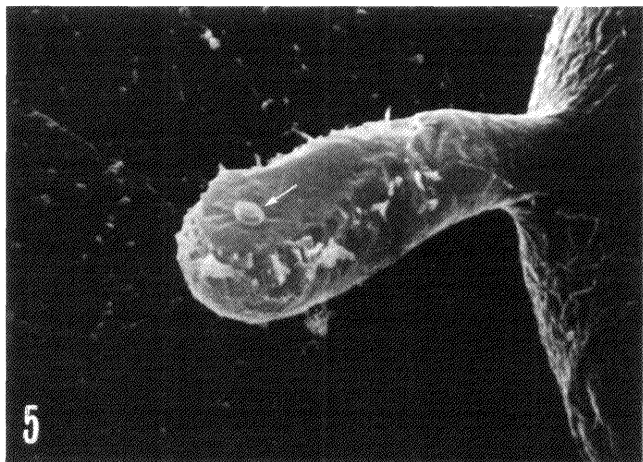


図5 図4の第一次発芽管を裏返したところ。オオムギ葉に接していた部分は平坦になっている。矢印は侵入菌糸を示す。(×10000)。

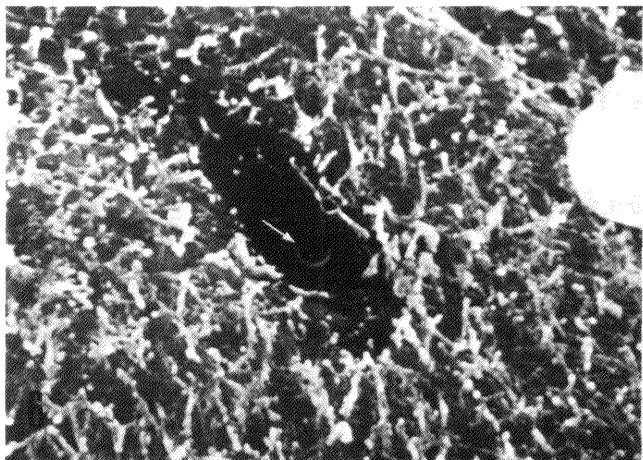


図6 図5の第一次発芽管がオオムギ葉に接していた跡。
矢印は侵入菌糸が挿入されていた孔。(×10000)。

6.2 オオムギ葉表皮細胞内に誘導されるパピラの形態 (図7—8)⁴⁾

Erysiphe graminis hordei の分生孢子付着器から侵入菌糸が表皮細胞に挿入されると、それをとりまくように表皮細胞内にパピラが形成される。付着器をマニプレータで取り除いてみると、侵入地点にパピラ(矢印)があり、その周辺部は明るく見える(図7)。この部分の表皮細胞壁をマニプレータで裏返してみたところ、細胞壁裏側に疣状のパピラが認められ、明るく見えた周辺部は裏側から見ると凹状になっていることが明らかになった。同時に、葉肉細胞内に葉緑体が極めて整然とならんでいることも明らかになった。

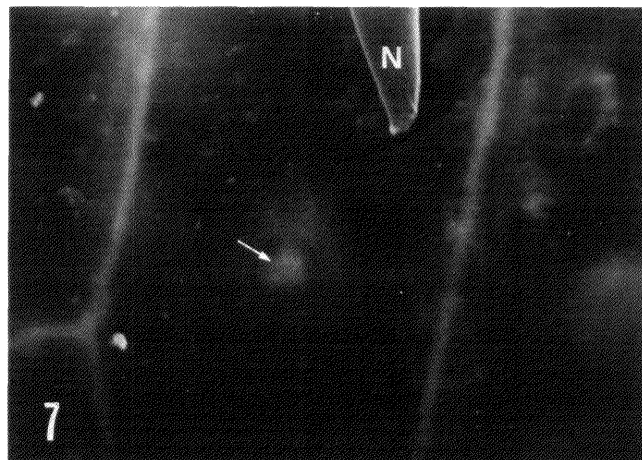


図7 オオムギ葉上のうどんこ病菌分生孢子付着器の接触部。マニプレータで付着器を除いた後に現われたパピラ(矢印)およびその周辺部。N：マニプレータの針。(×2000)。

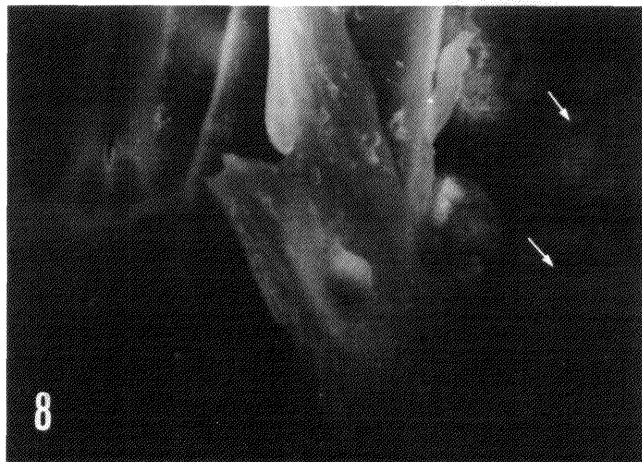


図8 図7のパピラ周辺部の表皮細胞壁を裏返した状態。図7のパピラ周辺の明るい部分は凹状になっており、その中心部に疣状のパピラが認められる。また、葉肉細胞(矢印)内には整然と並んでいる葉緑体が認められる。(×2000)。

6.3 白絹病菌菌核上に生じたアスペルギルス菌の寄生状態 (図9—13)⁵⁾

カビが他のカビに寄生する現象は比較的古くから知られている。図9は白絹病菌(*Corticium rolfii*)という土壌性のカビの菌核にアスペルギルス菌(*Aspergillus terreus*)が寄生している状態を示している。菌核の表面に*A. terreus*の分生孢子柄が林立し、それらの頂部には無数の分生孢子が形成されている。図10は菌核から生じている分生孢子柄

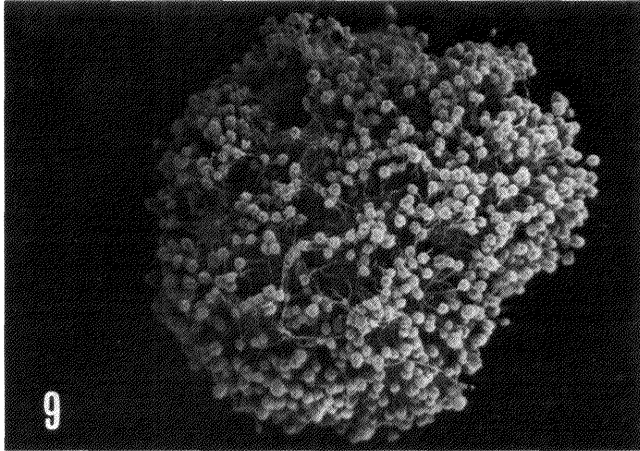


図9 白絹病菌菌核上に密生しているアスペルギルス菌の分生孢子柄および分生孢子。(×40)。

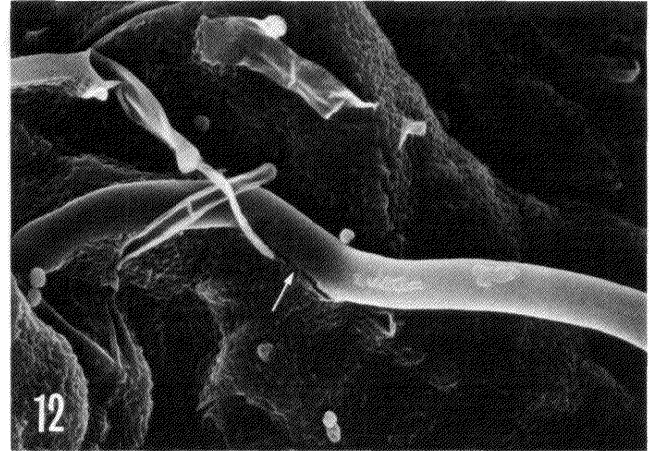


図12 白絹病菌菌核上をはっているアスペルギルス菌分生孢子柄の一部。(×1500)。

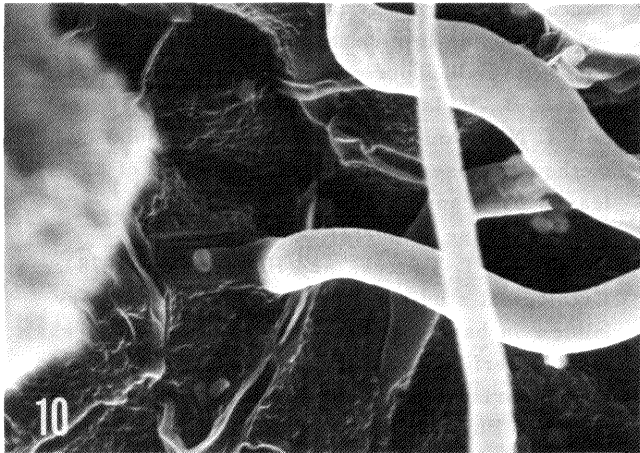


図10 白絹病菌菌核から生じているアスペルギルス菌分生孢子柄基部。(×2000)。



図13 図12の分生孢子柄(矢印部)をとり除いた状態。矢印は図12の矢印部を示す。(×1500)。

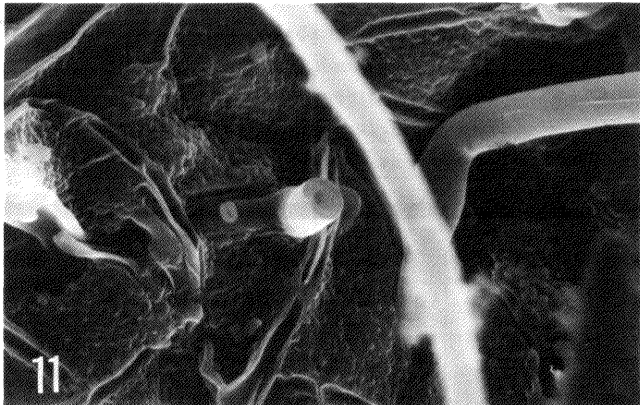


図11 図10の分生孢子柄基部を切断した状態。(×2000)。

の基部を示しており、図11はその基部をマニプレータで切断した切り口を示している。孢子柄はかなり厚い細胞壁に囲まれ、内部が中空になっていることが分る。図12は菌核の表面をはっている *A. terreus* の菌糸である。この菌糸を菌核表面からマニプレータでひきはがした状態が図13である。菌糸が接していた菌核表面は滑らかになっており、菌核表面固有の粒状構造が消失している。このような結果から、*A. terreus* の菌糸は菌核表面を溶かす酵素を分泌していることが推定される。

6.4 イネ葉垂鈴状構造 (図14—16)¹⁾

イネ葉表面には様々な突起があり、全体の構造は非常に複雑になっている。図14はイネ葉を低温灰化装置で灰化した後の表面構造である。矢印で示している構造は、垂鈴状細胞とよばれる特異的な形態をもつ細胞群である。この構造は非常に固いため切片を作り難く、表面から見た形態から垂鈴状という名称が与えられていたが、マニプレータ

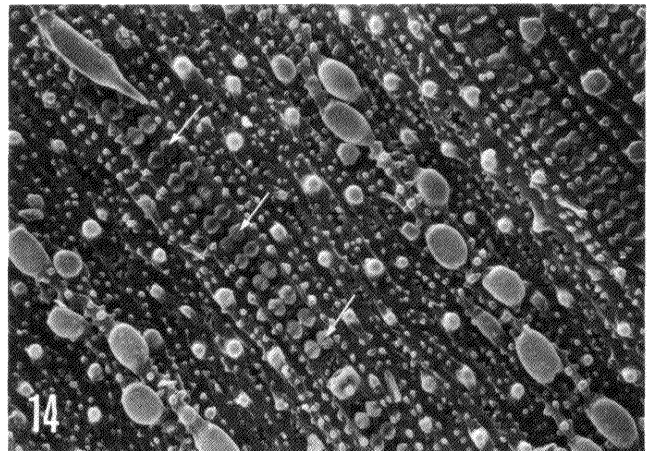


図14 イネ葉の灰化像。矢印はいわゆる垂鈴状構造を示す。(×400)。

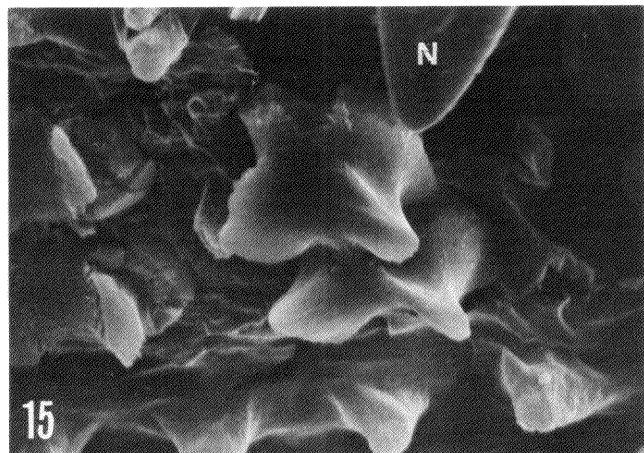


図15 図14の垂鈴状構造の一つを掘りおこしたところ。
N：マニプレータの針。(×5000)。

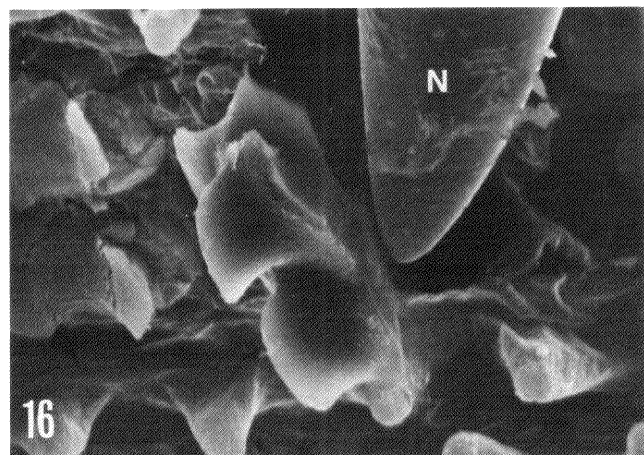


図16 図15の構造の側面図。(×5000)。

で掘りおこしてみたところ、図15、16に示すように、二つの奥歯状の構造がつらなっているものであることが明らかになった。この構造を針で押しつぶしてみると、全体が結晶化しており、中心の帯状部は非常に固く、完全につぶすことは難しかったが、両翼の部分はもろい結晶であった。

この試料は、生のイネ葉を走査電顕用の試料台にのせ、

周囲を銀ペーストでぬり固め、試料が処理中にまるまらないようにして灰化したものである。

7. おわりに

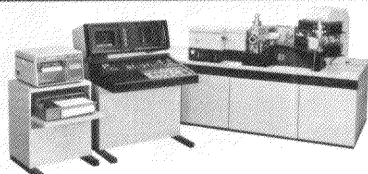
マニプレーションの実例で示したように、このテクニックは、切る、裏返す、掘り起す等の操作が可能で、走査電顕により広い応用幅を与えるものである。6.1に示した結果は、従来のテクニックでは証明の難しい事例である。このように、走査電顕の表面観察と透過電顕の切片観察を補うような使い方によって新しい知見が得られる可能性は十分ある。現状では、小さい試料、全体が動きやすい試料などには応用が難しいし、試料作製法に限られること等に難点はあるが、今後さらに改良、検討を加えれば、より広い応用分野が開かれることが期待される。

■引用文献

- 1) Kunoh, H. and S. Akai (1977). Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis of dumbbell-shaped bodies in rice lamina epidermis (*Oryza sativa*). Bull. Torrey Bot. Club 104 : 309—313.
- 2) Kunoh, H., H. Ishizaki, T. Watanabe, M. Yamada, and T. Nagatani (1976). A micromanipulating method to observe the inner structure of diseased leaves by scanning electron microscopy. Plant Disease Reporter 60 : 95—97.
- 3) Kunoh, H., T. Tsuzuki, and H. Ishizaki. (1978). Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. IV. Direct ingress from superficial primary germ tubes and appressoria of *Erysiphe graminis hordei* on barley leaves. Physiol. Plant Pathol. 13 : 327—333.
- 4) Kunoh, H., T. Watanabe, M. Yamada, and T. Nagatani. (1975). The conductive staining method suitable for x-ray microanalysis and micromanipulation of plant materials. J. Elect. Microscopy 24 : 301—304.
- 5) Shigemitsu, H., H. Kunoh, and S. Akai. (1978). Scanning electron microscopic studies of *Corticium rolfsii* sclerotia parasitized by *Aspergillus terreus*. Mycologia 70 : 935—943.

Topics

有機化学分野のための 高性能万能形GC/MS M-80形日立二重収束 GC質量分析計



M-80形日立二重収束GC質量分析計

この度日立では、有機化学分野で待望されていました、高性能万能形二重収束GC質量分析計を開発しました。

このM-80形GC-MSは、新たに開発した立体収束イオン光学系と、クリーニング容易なイオン源、コンピュータ制御装置、全自動排気システムなどの採用により、かつてなかったような、操作の容易な高性能GC-MSです。

M-80の特長は次のとおりです。

1. 従来のGC-MSの性能を上回る次のような高性能を保証します。

- a) 分解能 M/OM ≤ 20,000
- b) メチルステアレート 0.1ng が検出できます。

2. あらゆる用途におこなえてきる多機能装置ですから、たとえば次のような分析が可能です。

- a) GC-MS, GCミリマス
- b) EI, CI, FD, IB (インビームイオン化法)
- c) メタステーブルイオン (MIKES, IKES)
- d) 負イオン

3. M-80はコンピュータ制御による大幅自動化と集中操作パネル全自動排気システムなどの採用により、操作は高性能機にもかかわらず極めて容易です。

ガスクロマトグラフ—質量分析計による，血清胆汁酸の分析

猪川 嗣朗* 秋森 伯美**

1. はじめに

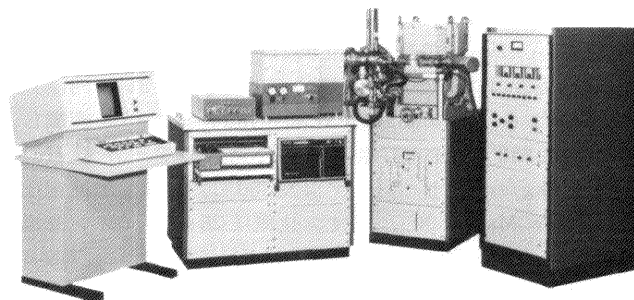
近年 Sandberg ら¹⁾ によってヒト血清中微量に存在する胆汁酸のガスクロマトグラフィー (GC) による分析例が報告され，それ迄正常ヒト血清中ではその存在さえも不確定であった胆汁酸の存在に明確な実証を与えることになった。しかしながらこの分析方法は臨床検査としてはその分析のための前処理が複雑でかなり時間的にも制約を受け，かつまたかなり高度の分析技術を要求されることから急速な臨床応用への道は開かれるに至らなかった。最近ではより迅速で簡易な血清胆汁酸の定量法に関心が持たれ 3α -hydroxysteroid dehydrogenase を用いた酵素法²⁾ やラジオイムノアッセイ³⁾ さらには酵素免疫学的測定法⁴⁾ が開発されている。しかしながらこれらの方法にはその分析法の性質上胆汁酸以外の物質との多少の交叉反応が避けられない場合があり，またこれらの方法は反応系そのものがかなり複雑なのでその反応系の条件によっての影響も強く信頼性に乏しい場合もある。それゆえ，正常ヒト血清胆汁酸の構成やそのレベルを次元の異なる化学的手法で精査することはこれらの方法による分析に対する信頼性を確認する上でも意義のあることと考えられる。

これまでヒト血清胆汁酸のガスクロマトグラフィー—マススペクトロメトリー (GC-MS) による分析に関する報告^{5,6,7)} はいくつか散見するが正常日本人の血清胆汁酸構成の GC-MS による詳細な報告は見あたらない。今回，日立ガスクロマトグラフ—質量分析計 (M-60) および 002B-8DK GC-MS データ処理システムを使用して正常日本人血清胆汁酸を分析する機会を得たので報告する。

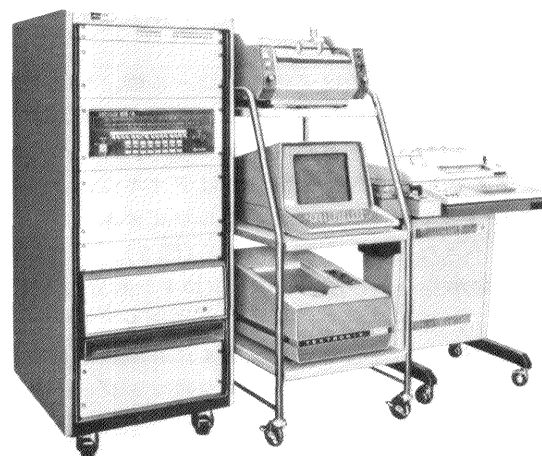
2. 試料および実験方法

試料および分析法：肝，胆道に疾患なく，血清コレステロール値，GOT，GPT，ALP などの肝機能検査も正常な健康成人男性 5 名 (25～40 才) の空腹時の末梢血血清 (各 4 ml 総量 20 ml) を用い，分析に供するまで -20°C で凍結保存した。分析法の概略を図 1 に示す。

解凍した血清を 9 倍量の 1N NaOH—0.9% NaCl 溶液で希釈し 20 ml ごとに Ikawa らの方法⁸⁾ で Amberlite XAD—2 カラム (20×0.5cm 内径) を用いて血清中胆汁酸を抽出した。得られた胆汁酸画分はさらに Makino らの方法⁹⁾ で非硫酸抱合胆汁酸画分と硫酸抱合胆汁酸画分に分画した。非硫酸抱合胆汁酸画分は常法により水解，n-ヘキサンで中性脂質画分を除去後希塩酸性下にエチルエーテルで遊離胆汁酸画分を抽出した。一方硫酸抱合画分は Almé らの方法⁶⁾ でソルボリシス後，非硫酸抱合胆汁酸画分と同様に処理して遊離胆汁酸画分を得た。遊離胆汁酸はジアゾメタンでメチル化後，Sandberg らの方法¹⁾ でアルミナカラムを用いてモノヒドロキシおよびモノヒドロキシモノケト胆汁酸メチルエステルを含む中性脂質画分とジ—およびトリヒドロキ



M-60 日立ガスクロマトグラフ—質量分析計



002B-8DK 形日立 GC—質量分析計データ処理システム

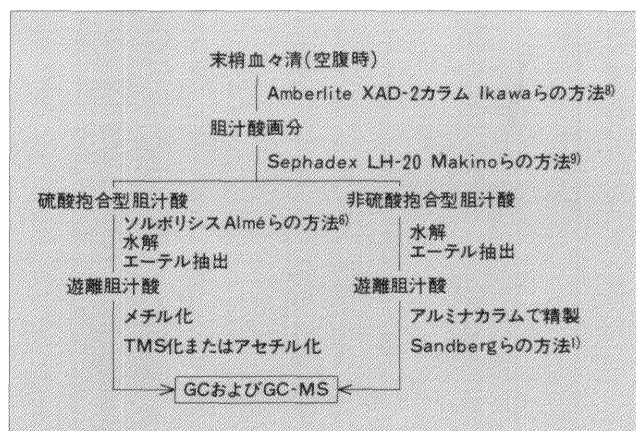


図 1 血清胆汁酸の分析法

シ胆汁酸メチルエステル画分に分画した。後者の一部は無水酢酸でアセチル化 (138°C ，4 時間) を行ない胆汁酸のメチルエステルアセタートを得た。前者および後者の一部は常法によりトリメチルシリルエーテル (TMS) 誘導体導びいた。硫酸抱合胆汁酸画分から得られた遊離胆汁酸はメチル化後，一部をメチルエステルアセタートに，他の一部を TMS 誘導体導びいた。

* 鳥取大学 医学部 附属ステロイド医学研究施設，教授，医博

** 日立製作所 那珂工場 応用技術センター

測定法： ガスクロマトグラフィー (GC) は日立163形ガスクロマトグラフを使用し、コイル形ガラスカラム (1.75m × 3mm内径) に3% OV-1 (Gas Chrom Q 100~120メッシュ) を充填し、カラム温度250℃、注入口温度270℃、キャリアーガス (N₂) 入口圧1.2kg/cm² で行なった。

GC-MS にはM-60形日立ガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、データ処理は日立002B-8DKシステムを用いた。測定条件はコイル形ガラスカラム (2m × 3mm内径) に2% OV-1 (Chromosorb W 80~100メッシュ) を充填し、カラム温度250℃、注入口温度270℃、キャリアーガス (He) 入口圧2.1kg/cm²、セパレータ温度300℃、イオン加速電圧3.2kV (m/e Max. 1500)、イオン化電圧20eV、イオン源温度180℃、イオン化法は電子衝撃法 (EI) で行なった。

3. 結果および考察

非硫酸抱合胆汁酸のうちジエおよびトリヒドロキシ胆汁酸画分のメチルエステルアセタートのガスクロマトグラムを図2に、硫酸抱合胆汁酸のメチルエステルアセタートを図3に示す。

非硫酸抱合胆汁酸画分ではデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸、ウルソデオキシコール酸およびヒオコール酸に相当する保持時間をもつピークが認められる (図2)。また硫酸抱合胆汁酸画分ではデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸、ウルソデオキシコール酸に相当する小さなピークが認められる (図3)。これらの画分および非硫酸抱合胆汁酸のモノヒドロキシ画分のTMS誘導体を用いて、また一部ではメチルエステルアセタートを用いてGC-MS分析を行なった。図4に非硫酸抱合胆汁酸中モノヒドロキシ胆汁酸画分のマスキロマトグラムとマ

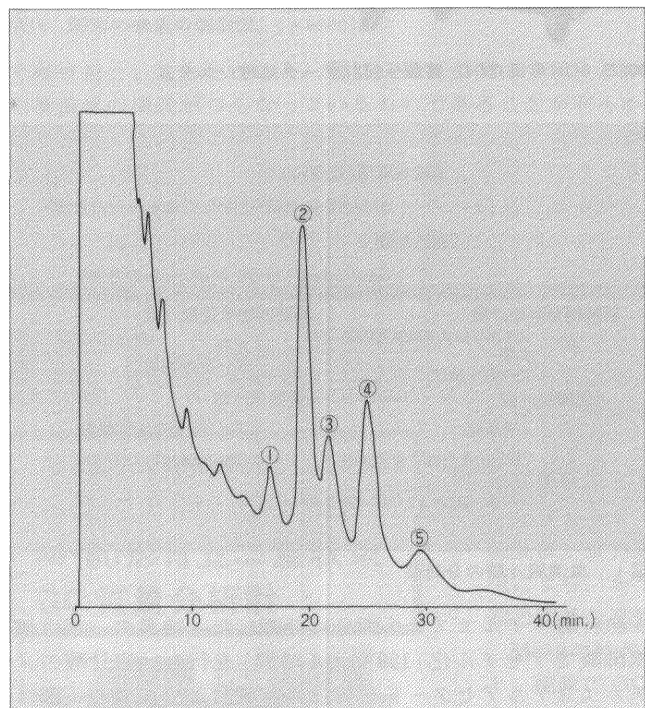


図2 ヒト血清胆汁酸の非硫酸抱合胆汁酸 (ジエおよびトリヒドロキシ胆汁酸画分) のメチルエステルアセタートのガスクロマトグラム。分析条件は本文参照。①デオキシコール酸、②ケノデオキシコール酸、③コール酸、④ウルソデオキシコール酸、⑤ヒオコール酸に相当する相対保持時間を示すピーク。

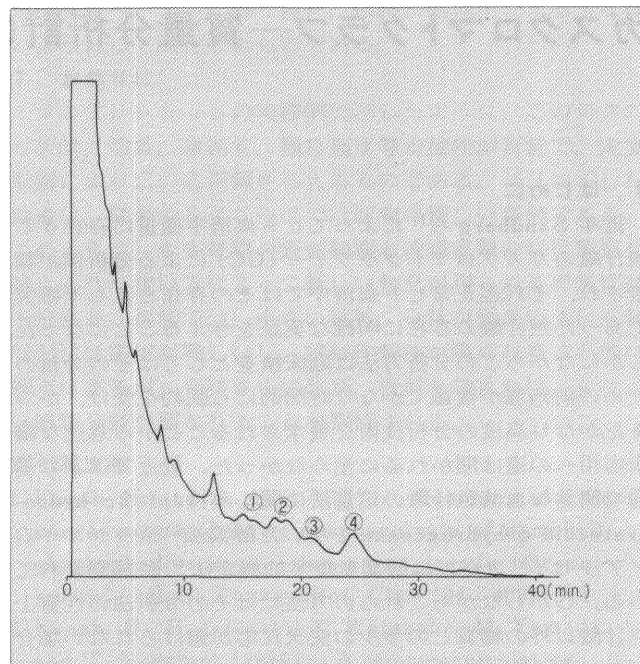


図3 ヒト血清胆汁酸の硫酸抱合胆汁酸画分、メチルエステルアセタートのガスクロマトグラム。分析条件は本文参照。①デオキシコール酸、②ケノデオキシコール酸、③コール酸、④ウルソデオキシコール酸に相当する相対保持時間のピーク。

ススペクトルを、図5に非硫酸抱合胆汁酸ジエおよびトリヒドロキシ胆汁酸画分のTMSおよびメチルエステルアセタートのそれを、図6に硫酸抱合胆汁酸画分のそれを示す。

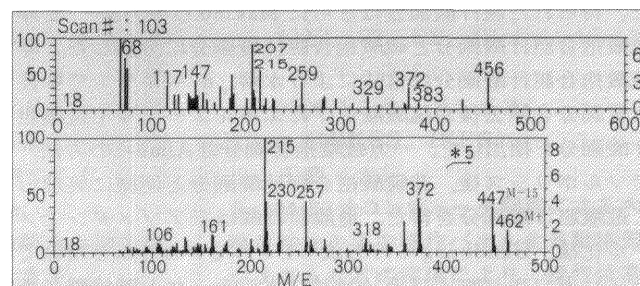
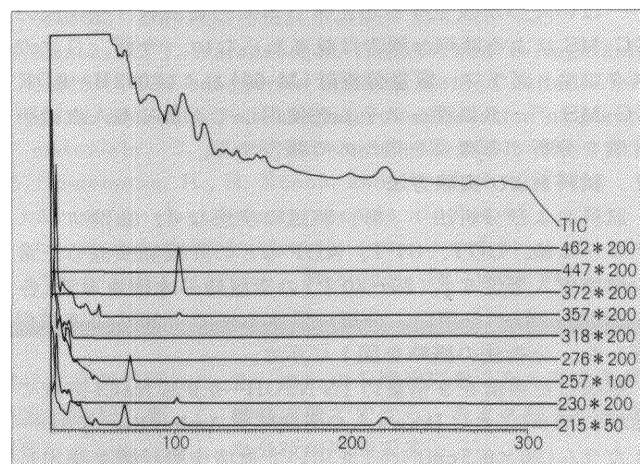


図4 ヒト血清胆汁酸の非硫酸抱合胆汁酸モノヒドロキシ画分、トリメチルシリルエーテルのマスキロマトグラムおよびマススペクトル。分析条件は本文参照。Scan #103はリトコール酸トリメチルシリルエーテルの相対保持時間に相当する。

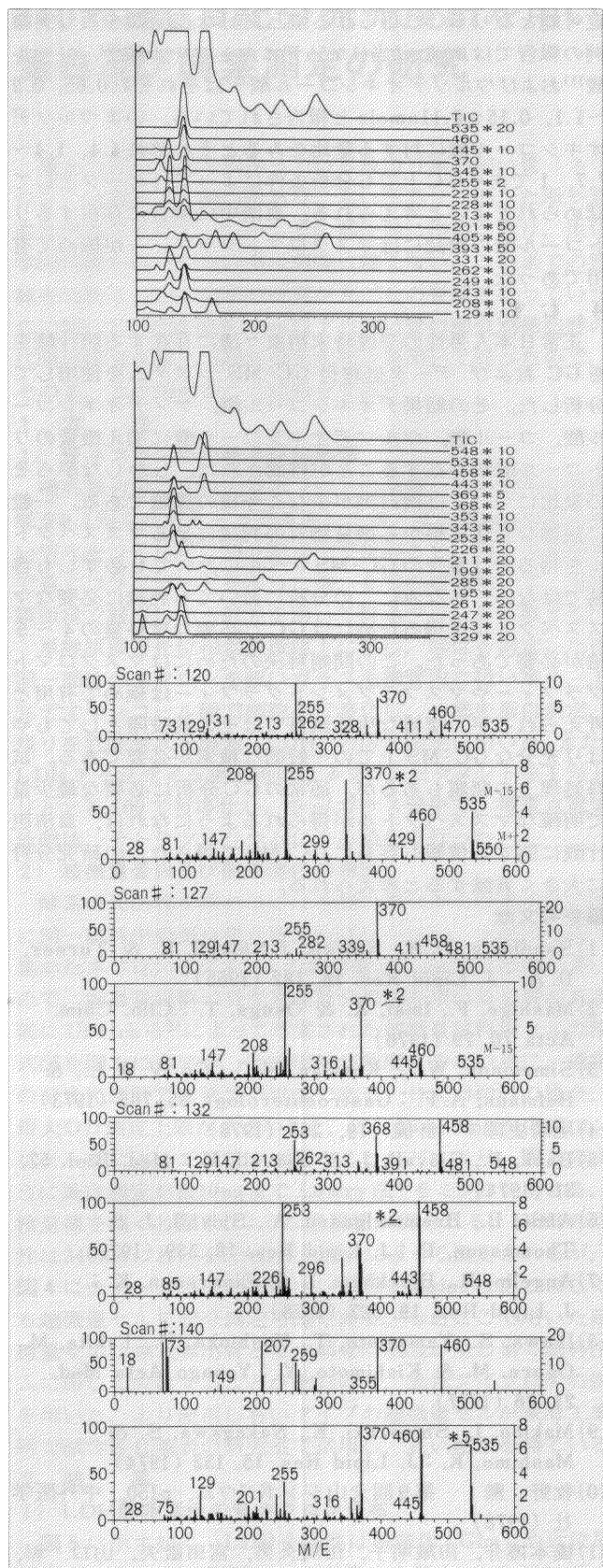


図5A 非硫酸抱合胆汁酸ジマーおよびトリヒドロキシ胆汁酸画分、トリメチルシリルエーテルのマスプロマトグラムおよびマススペクトル。Scan # : 120, 127, 132, 140はそれぞれデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸、ウルソデオキシコール酸のトリメチルシリルエーテルの相対保持時間に相当する。

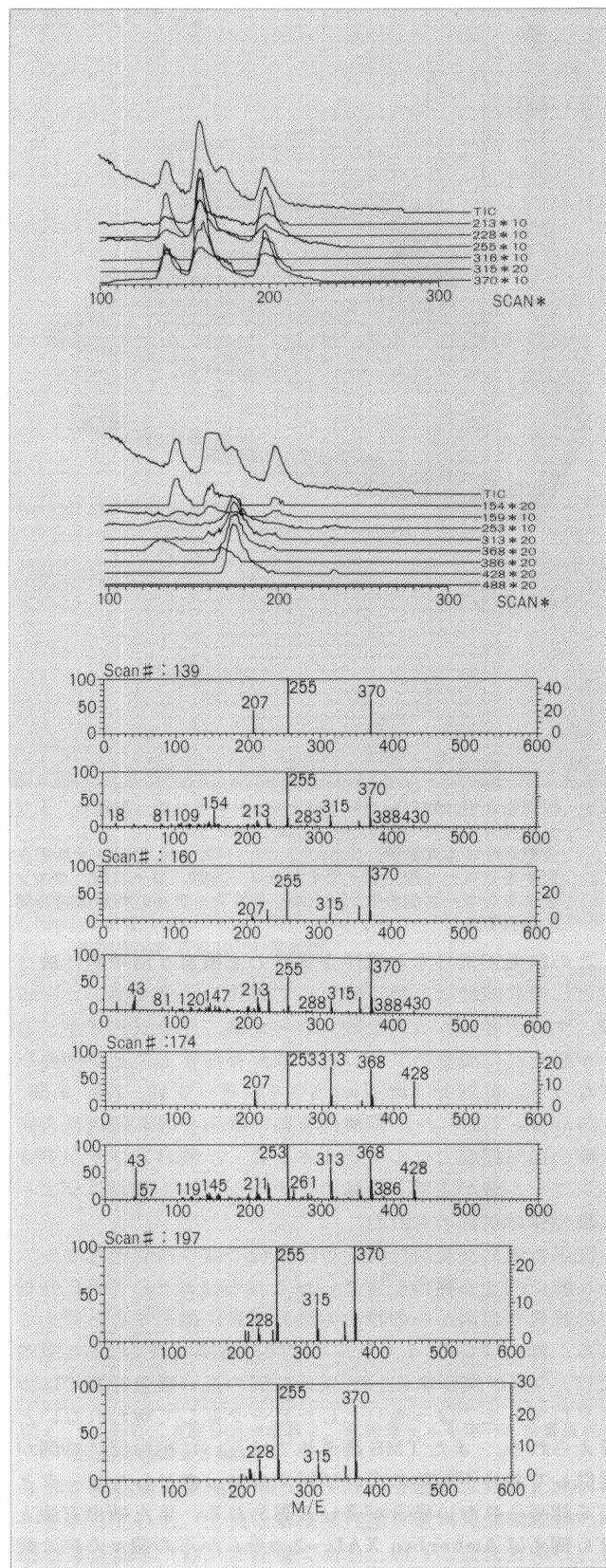


図5B 非硫酸抱合胆汁酸ジマーおよびトリヒドロキシ胆汁酸画分、メチルエステルアセタートのマスプロマトグラムおよびマススペクトル。分析条件は本文参照。Scan # : 139, 160, 174, 197はそれぞれデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸、ウルソデオキシコール酸のメチルエステルアセタートの相対保持時間に相当する。

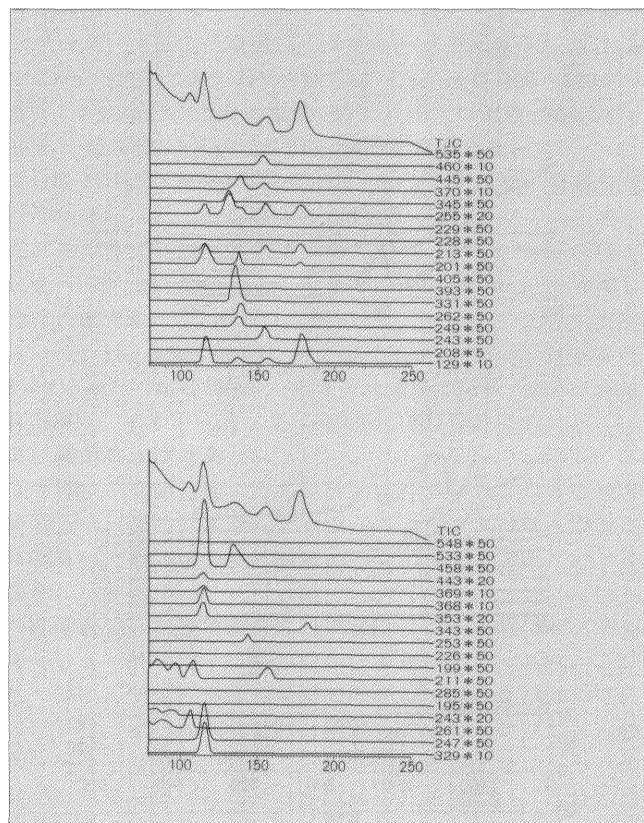


図6 硫酸抱合胆汁酸のジーおよびトリヒドロキシ胆汁酸画分，トリメチルシリルエーテルのマスプロトグラフ。
分析条件は本文参照。Scan#: 132, 140, 144, 154はそれぞれデオキシコール酸，ケノデオキシコール酸，コール酸，ウルソデオキシコール酸のトリメチルシリルエーテルの相対保持時間に相当する。

この結果正常日本人男性空腹時の末梢血々清中胆汁酸は主として非硫酸抱合胆汁酸として存在し，デオキシコール酸，ケノデオキシコール酸，コール酸，ウルソデオキシコール酸それに微量のリトコール酸が存在することが明らかとなった。前四者は血清 ml 当りそれぞれ 0.19 , 1.0 , 0.56 , 0.56 nmole であった。硫酸抱合胆汁酸画分は非硫酸抱合胆汁酸の 10% 程度でウルソデオキシコール酸およびケノデオキシコール酸が主で，微量のデオキシコール酸およびコール酸の存在が認められた。

従来末梢血々清胆汁酸のGC分析ではウルソデオキシコール酸に関する報告が少ないがこれらはおそらくGC分析上の差異や血清からの抽出方法の差異に由来すると考えられる。例えばQF-1カラムでは保持時間が長くなると急激にピーク高が減少するため，保持時間の長い微量物質ではガスクロマト上でははっきりとしたピークとして現われないと考えられる。またTMS誘導体では互いに相対保持時間が近似しており不純物の多い試料でははっきりとしたピークとして認められない場合が多いと思われる。また抽出方法上でも例えばAmberlite XAD-2カラムからの個々の胆汁酸の溶出にも問題が残されている。筆者の用いる分析方法ではいずれの日本人血清中にもウルソデオキシコール酸が多少とも検出されているが，既報において分析された試料との相違による結果であることも否定出来ない。近年，ラジオイムノアッセイで日本人血清中の個々の微量胆汁酸が測

定可能となりGCで得られる値と良好な相関性をもつ実験例の報告では血清 ml 当りケノデオキシコール酸¹⁰⁾，コール酸¹¹⁾およびウルソデオキシコール酸¹²⁾はそれぞれ 0.65 , $0.2 \sim 1.1$, $0.15 \pm 0.11 \text{ nmole}$ と報告されている。いまウルソデオキシコール酸に対する量比をみるとそれぞれ 4.4 , $1.4 \sim 7.7$, 1 でありGC上でも分析条件によってはピークとして認められてよいと考えられる。血清中に微量に存在するリトコール酸の確認にはマスプロトグラフィーが極めて有用であった。

4. むすび

正常日本人男性の空腹時末梢血々清中存在する胆汁酸ををGCおよびデータ処理付GC-MSシステムを使用して分析した。その結果デオキシコール酸，ケノデオキシコール酸，コール酸，ウルソデオキシコール酸に加え微量のリトコール酸が存在することが確認された。しかしながらその量比については検討例が少なく今後の課題である。一般に複雑な生体試料から微量物質の判読に足るマススペクトルを得るのは現今のGC-MSレベルにおいても必ずしも容易ではない。ちなみにこの分析においても判読に必要なマススペクトルを得るためにはGCで必要な試料量の $4 \sim 5$ 倍が必要であった。この問題解決のためにはマスプロトグラフィーやマスフラグメントグラフィーは極めて有用と考えられるが，複雑な生体試料ではその前段階としてもやはり充分なGC-MS上での一般的な検索が必要である。試料処理上の問題もあるが，通常のGC分析に必要な最少で明確なマススペクトルが得られるようになれば，血清胆汁酸に関する情報も容易にGC-MSで得られこの研究分野に大きく貢献すると考えられる。

■参考文献

- 1) Sandberg, D. H., Sjövall, J. Sjövall, K. & Turner, D. A. : J. Lipid Res. 16, 182 (1965)
- 2) Mashige, F., Imai, K. & Osuga, T. : Clin. Chim. Acta 70, 79 (1976)
- 3) Simmonds, W. J., Korman, M. G., Go. V. W. L., & Hofmann, A. F. : Gastroenterology 65, 705 (1973)
- 4) 尾崎史郎 : 肝臓 19, 286 (1978)
- 5) Back, P., Sjövall, J. & Sjövall, K. : Med. Biol. 52, 31 (1974)
- 6) Almé, B., Bremmelgaard, A., Sjövall, J. & Thomasson, P. : J. Lipid Res. 18, 339 (1977)
- 7) Angelin, B., Björkhem, I. & Einarsson, K. : J. Lipid Res. 19, 527 (1978)
- 8) Ikawa, S., Yamamoto, T., Yoshioka, D., Takita, M., Ogura, M. & Kishimoto, Y. : Yonago Acta Med. 21, 76 (1977)
- 9) Makino, I., Shinozaki, K., Nakagawa, S. & Mashimo, K. : J. Lipid Res. 15, 132 (1974)
- 10) 牧野 勲 : 第9回大山シンポジウム, p150, 中外医学社 (1978)
- 11) 橋本博介, 田城明子, 田尻久男, 宮田敏夫, 山口 彰, 篠崎堅次郎, 牧野 勲, 中川昌一, 吉沢逸雄 : 肝臓, 14, 419 (1977)
- 12) Makino, I., Tashiro, A., Hashimoto, H., Nakagawa, S. & Yoshizawa, I. : J. Lipid Res. 19, 443 (1978)

340形日立自記分光光度計を用いた超微量試料の蛋白及び酵素測定の研究

遠藤 仁*

尿をつくる腎臓を形作っている数10万本の細い管（ネフロン）は複雑で、細い所あり、太い所あり、曲った所や真直な所など多彩で、しかもその部位別に作用が異り、生化学的代謝も同一でない事は想像に難くない。これまでの腎臓を材料とした生化学的研究が丸ごとの腎臓を扱っていたのに対してこの直径0.1mm以下の細い管の部位別細胞群の代謝の研究を日立 340形分光光度計を用いて行ったので、その2、3の知見をここに紹介する¹⁾

1. 方 法

1) 腎ネフロンの分離及び前処理

哺乳類の中で比較的腎ネフロンの単離し易い家兎の腎動脈を0.1%コラゲナーゼで灌流した後、厚さ数mm程度の薄い切片をつくり37℃50分間温浴で反応させ、而る後緩衝液で良くコラゲナーゼを洗った後、0℃の緩衝液中で、実体顕微鏡で観察し乍ら針先を用いて腎ネフロンを単離する²⁾

単離尿細管を位相差顕微鏡下に移し、部位を固定した後、同一部位のネフロンを細いガラス毛细管内に吸い集め、1%デオキシコール酸で細胞を可溶化し、一部を蛋白測定、残りを乳酸脱水素酵素（LDH）の活性測定に用いた。また、LDHアイソザイム測定用にはネフロンセグメントを1%トリトンX-100で可溶化し、5μlガラス管中で、等電点電気泳動後、テトラツオリウムによる染色を行った。

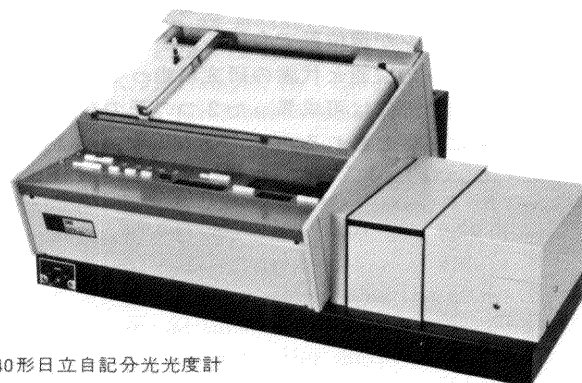
2) 超微量蛋白及び酵素活性の測定

酵素の比活性を求めるには当然の事ながら酵素活性の他に同一試料中の蛋白量を求めねばならない。上述の方法で集めたネフロンセグメントの蛋白量は1μg以下の事が多いので、超微量試料の分光光度計分析法を用いる必要がある。既にUllrichら³⁾によって考案された超微量試料用セルの模式図を図1に示すが、光路面積が極度に少ない為に、通常の分光光度計では使用不可能である。日立 340形の場合、最大OD測定上限が大きいこと、又、base lineを内臓コンピュータによって記憶させ得ることなどにより、図2のように蛋白測定が数10ngまでLowry法⁴⁾をマイクロ化できる。検量線を描くと図3のような直線性が得られる。LDHの活性は340nmにおけるNADHの減少によって測定されるが、図4にチャートの一部を示す。多少のnoiseはあるにしても超微量セルで充分測定可能である。なおここで用いた超微量セルは導入導出管とセル部分に気泡が生じ易く試料注入に際して失敗することがあるので、黒色ダイフロン筒を用いた、より使用し易いタイプの超微量セルが東海工業所で試作され筆者の研究室で試用し、良い結果を得ている。

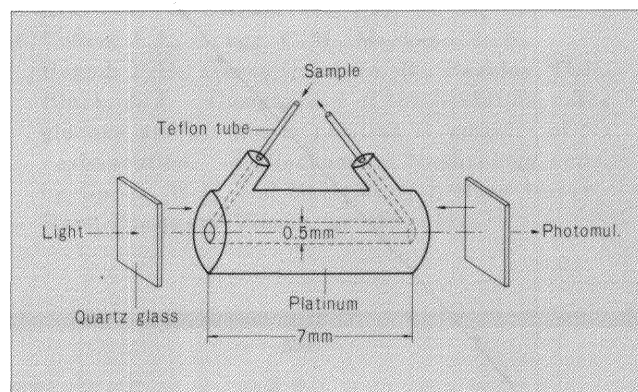
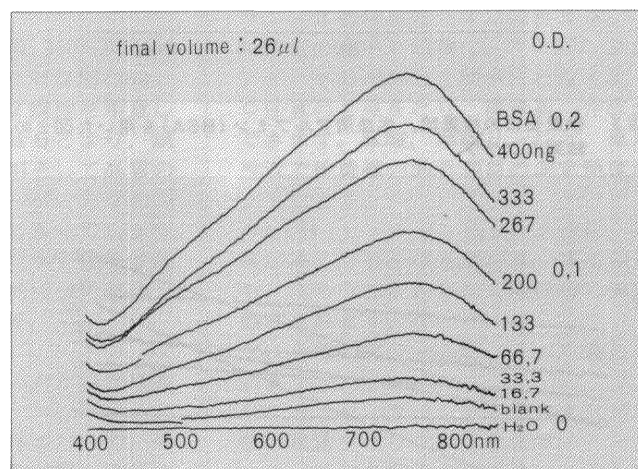
2. 結 果

1) LDH酵素活性の腎ネフロン分布

図5に示す如く、LDH全活性は糸球体（Glm）や近位尿細管S₁、S₂、S₃（PTS₁～S₃）⁵⁾等の上部ネフロンには低く、他方ヘンレの上行脚太い部分（TAL）や遠位尿細管（DCT）



340形日立自記分光光度計


 図1 超微量試料用セル³⁾の模式図。

 図2 340形日立自記分光光度計と、超微量セルを用いた微量蛋白のLowry法による測定⁴⁾

及び皮質部集合尿細管（CCT）など下部ネフロンに高い活性を示している。これは解糖系代謝が電解質能動転送の活潑な遠位部ネフロンで旺盛であるということを意味し、腎での乳酸消費がNaの輸送と関連しているという結果⁶⁾と良く一致する。

2) LDHアイソザイムの分布

LDHの全活性を超微量セルで測定した結果に、微量試料

* 東京大学 医学部 薬理学教室

のマイクロゲル等電点電気泳動によるアイソザイムパターン(図6に示す)を加えた, LDHアイソザイムの腎ネフロン分布を示したのが図7である。下部ネフロンにはLDH1が圧倒的に高い特徴を示す以外に腎ネフロンの発生を推定するに, LDH5が遠位ネフロン以下に存在しないことは, 糸球体側より分化した上部ネフロンと集合尿細管側から分化した下部ネフロンが遠位部で合体したものである。従って腎ネフロンの機能と代謝の研究に当っては遠位尿管を境に上部と下部では可成異った2つの系の存在を念頭におく事が常に必要とされる。

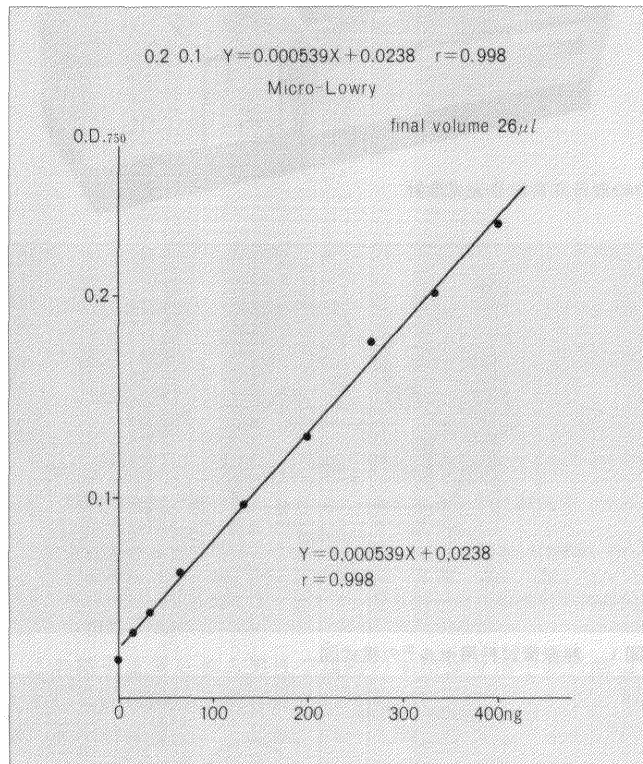


図3 微量蛋白の検量線。牛血清アルブミン(BSA)を用いた図2の結果のグラフ。

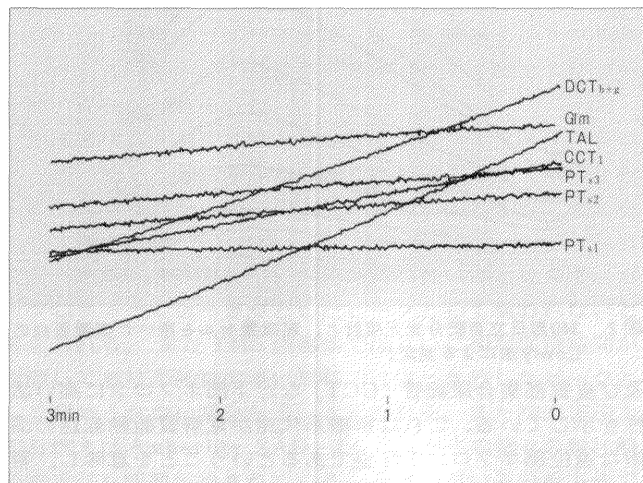


図4 単離腎ネフロンの部位別乳酸脱水素酵素活性の分布。超微量セル中での, NADHの減少を340日分光光度計で記録させたチャートの一例。Gln: 糸球体。PT: 近位尿細管。S1~S3⁵⁾: Segment 1~3。TAL: ヘンレ上行脚太い部分。DCT: 遠位尿細管。CCT: 皮質部集合尿細管。

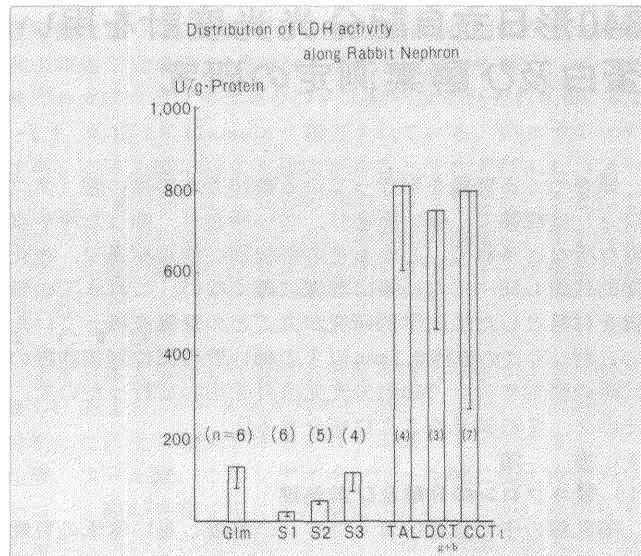


図5 腎ネフロンにおける乳酸脱水素酵素活性の分布。

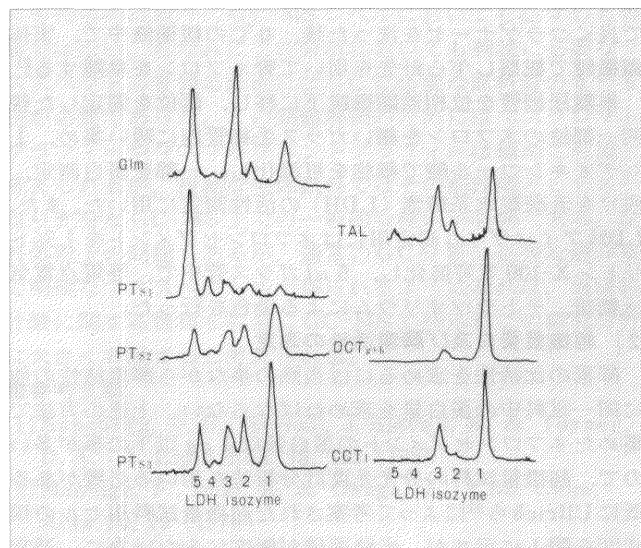


図6 マイクロゲル(5 μl毛細管使用)等電点電気泳動による, 腎ネフロンセグメントのLDHアイソザイム像の違い。

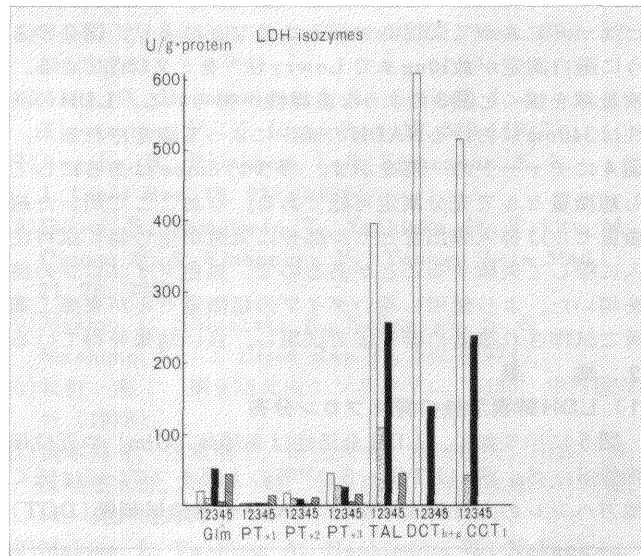


図7 腎ネフロン各分節におけるLDHアイソザイムの分布。

3. 考 察

微量試料の分析法を中心に略記すると、 μl オーダーの試料の分光光度計測定は、測定の全体の系をマイクロ化して行うことが可能である。これには既に述べたが、分光光度計の感度が問題になり、又少い光エネルギーを強く増巾する必要があるため、それに伴う noise と基線のゆれに対処することも又不可欠な問題である。幸にして日立 340形分光光度計は今のところ上の問題点を解消してくれ、5~10 μl の試料の分析には何の支障もない程である。次に測定に使用するマイクロセルである。図1の模式図にあるタイプのセルは原理的には問題はなさそうであるが操作の過程で混入してくる小泡の問題が大きく、世界的にもこのタイプのセルは博物館入りしている。しかし乍らこのピンホールタイプの改良型であるダイフロンを用いたセル（東海工業所試作品）は全く独自のアイデアを加えて小泡の生じ難い機構になっており、エッペンドルフタイプのマイクロピペットを用いて試料を注入できマイクロメソードにつきものの複雑な操作は解消されている。

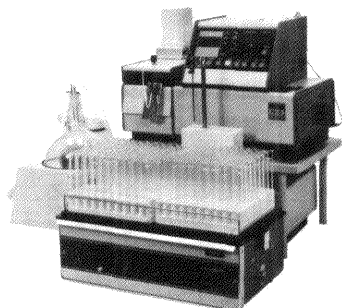
近年、アフィニティークロマトを中心に少い原試料からの蛋白精製等が普及してきている反面、純化される標品が余りにも少くて、精製過程での蛋白量測定も思うにないとの嘆きを聞くにつけ、微量分析法開発の必要性を痛感する。以上述べた超微量分光光度分析が何処かの誰かの研究にお役に立てば幸である。

■参考文献

- 1) Endou, H., Kimura, K., Nakajima, T., Sudo, J., Sakai, F.: Distribution of lactate dehydrogenase isozymes along the single nephron of rabbit. Abstracts of VIIth Int. Cong. Nephrol. A5 (1978)
- 2) Imbert, M., Chabardes, D., Montegut, M., Clique, A., Morel, F.: Adenylate cyclase activity along the rabbit nephron as measured in single isolated segments. Pflügers Arch. 354, 213 (1975)
- 3) Ullrich, K.J., Hampel, A.: Eine einfache Mikrocuvette für Monochromator Zeiss und Beckman Model DU. Pflügers Arch. 268, 177 (1958)
- 4) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 5) Maunsbach, A.B.: The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat proximal tubule cells. I. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmium tetroxide fixatives. J. Ultrastruct. Res. 15, 242 (1966)
- 6) Cohen, J.J., Gregg, C.M., Merckens, L.S., Brand, P.H., Garza-Quintero, R., Pashley, D.H., Black, A.J.: Comparison of the oxidation rates of glucose and lactate in relation to support of Na^+ reabsorption. in Biochemical Nephrology (eds. by Guder, W.G. and Schmidt, U.), Hans Huber, Bern Stuttgart Vienna, pp 418, (1978)

Topics

臨床検査室の必需品；
マイコン内蔵で更に使い
やすくなりました
100-25/100-26形
日立シッパフォトメータ



100-25/100-26形日立シッパフォトメータ

十数年にわたり、101形および100形シリーズ分光光度計を発売し、臨床検査室になくはない装置としてご愛用いただいております。このたび、100形シリーズにマイクロコンピュータ

を内蔵し、操作性と機能を一段と向上したシッパフォトメータが加わりました。

使用目的により可視用(330~900nm；100-25形)および紫外可視用(200~900nm；100-26形)の2機種を用意しており、ルチーン検査はもとより、試薬のチェック用、研究用そして品質の管理検査用として、ユーザの方々の手足の一部となって活躍できるでしょう。また別売のオートサンプルラを接続することにより、160検体を約12分で処理し、一層の省力化が果せめます。

■特 長

1. マイクロコンピュータが操作性を一段と向上させました。
 - レバーをワンタッチ押すだけで、サンプルの吸入から、濃度演算、表示そしてプリントアウトまで、すべてコンピュータによって処理されます。
 - ブランクを吸入すると自動的にゼロ合わせが行なわれます。
 - スタンダードの濃度値はディジスイッチから直接入力することができます。
 - サンプル番号は3桁で、任意の番号からスタートできます。
2. 信頼性の高い測定ができます。
 - 検体ブランクの補正が自動化されて

います。

- 測定中、同一サンプルの再測定が、サンプル番号を変えずにできます。
 - 測定の途中や最後に、ブランク、スタンダードの再測定を簡単に行なえます。
 - 任意の2点を取り、検量線の作成ができます。尿酸、無機リンなど、原点付近で検量線の曲る項目の測定精度が向上します。
 - LDH（ヒドラジン法）のように、濃度が高くなると吸光度が減少する項目も、ふつうと変わりなく濃度値に演算処理されます。
3. 各種のアラームシステムを備えています。
- ブランク、スタンダードおよび測定値の異常チェックができます。
 - 万一操作を間違えた場合は、ランプの点滅で知らせます。
4. サンプル量は少量ですみます。
- 100-25形では約1.5mlです。
 - 100-26形では約1.0mlです。
5. 高性能な分光光度計により正確な測定ができます。
- 既に好評をいただいている低迷光トロイダル凹面回折格子を採用し、測定値の正確さと信頼性を長期間にわたり保っております。

解 説

U.D.C. 543.51.087.6(084.2).001.36:681.322.056

コンピュータを利用したマスペクトルの検索

加藤義昭*

1. はじめに

GC-MS データ処理システムの急速な発展は、多成分混合物の迅速分析を可能にした。しかし、膨大なデータの解析に高度の知識を持つ人が忙殺されることが多くなり、自動的に化合物を同定することが強く求められてきた。マスペクトルから化合物を同定する試みは多くのグループによって精力的に行われてきたが、その中で比較的単純かつ成功しているものにデータ検索がある。

データ検索はコンピュータのメモリに貯えられた既知スペクトルと測定された未知スペクトルを比較し、類似性の高いものを選び出すものである。実際の応用に際して、種種の問題も提起され、解決の為に種々のグループの努力がなされてきた。ここに、年代を追って研究の推移を簡単に紹介する。

2. マスペクトルの簡略化

比較的初期の段階では、マスペクトルの簡略化及び一致の具合を把握するための数値化が検討された¹⁾。生のマスペクトルはデータ検索に必要な以上の情報を持ち、同一か否かを決めるのを複雑にし、検索に必要な時間を長びかせる。また不必要にメモリーを占有し、全体として貯えられるデータ量を制限する。

類似性を数値化するにあたっては次の点を満足せねばならない。

- (1) スペクトルが一致したか、類似したものか、全く異なるものかを明確に区別出来る。
- (2) 異なるソースによるマスペクトルの差を明確に把握でき、ライブラリのメンテナンスを容易にする。
- (3) 一致しなくても、類縁化合物が抽出され、化合物のタイプを推定できる。

Abrahamssonら²⁾は若干の制約下に5本の最強ピークを抽出する簡略方式と Disagree Index $\sum_{i=1}^M |I_r - I_k| i$ を提案した。Knockら³⁾は6または10本の最強ピークを用いる方式といくつかの Degree of Matching (DM) 方式について検討を加えた。6または10本の最強ピークが抽出され、強度順にならびかえられる。この順序に一致するスペクトルを最良の一致と見なす。DMはこの強度の順からのずれを数値化したものである。単純に全体から強度の大きい順にピークを抽出する方法のほかに、全スペクトルを区分けし、区分毎にいくつかのピークを抽出する方式も検討した。

Grotch^{4,5,6)}は火星探査 Viking 計画の予備実験で、マスペクトルのユニークな簡略法を提案した。遠く火星から宇宙空間をこえてマスペクトルを伝送するためには、マスペクトルの本質を失わずに圧縮することが必要であ

った。多数のマスペクトルを統計的に検討し、マスピークがあるスレシールドレベルを越えたものをピークが存在する(1レベル)、越えないものをピークがない(0レベル)という二つのレベルに定義し、スペクトルを圧縮する方式である。これにより1ピークを2進の1桁(ビット)に対応させることが出来る。分子量200のマスペクトルは200ビットで表現でき、32ビット/語のコンピュータであれば、僅かに7語でマスペクトルを表現することができる。類似度を求める計算には、このコード化されたマスペクトルは未知、既知間でXÖR(排他的論理和)が実行され、検索の計算が極めて単純に行われる。

Grotchは更に良い一致を求める為にスペクトルの対比に若干の修正を加えた⁵⁾一致、不一致の判定条件Cは次式により求める。

$$C = \mu N + \sum_{i=1}^M [(XÖR)_i - \mu(AND)_i]$$

μ は実験的に2~3が適当とされ、Cが小さい場合、一致が良い事を示している。また強度も0, 1の2つのレベルではなく、2進3ビット(マスピーク強度をlogスケールで表わして0~7の8レベル)に修正したものについても検討している。0, 1の2レベル方式に比し、8レベル方式が若干良い結果を与えるが、当然検索時間が長くなる。

Grotchの方式がマスペクトルの強度を結果的に軽視したのに対し、Biemannら⁷⁾は強度を比較の重要な要素とした方式を提唱した。マスペクトルを14マス毎の区分(m/e 6~19, 20~33, 34~47, ...)に分け、各区分中の最強ピークn個(一般には2個)を取り出し、全体として強度とm/eの対によりスペクトルを表現する。

類似度 Similarity Index (SI) は未知スペクトルピークと既知スペクトルの同じm/eのピークの強度比から求める。対応するピークがない場合には強度比を零と見なし、これら強度比の偏差をSIと定義する。一般にマスペクトルにおいては、低質量領域に大きい強度のピークが集中するため、Knockらのn個の最強ピークをとる方法は結果的に低質量領域に重みを置くことになる。Biemannらの簡略法は高質量領域にも同等の重みを持たせることが出来る。これは人間によるスペクトルの解析法に類似している。また、Biemannの簡略スペクトルのもう一つの利点は単純な簡略化と異り、マスペクトルの様子を十分に示している点である。検索結果が必ずしも満足しない場合も、対比する簡略化されたスペクトルを人間の判断に委ねることが可能となる。

3. Pre-search

検索時間の短縮、メモリーの有効利用などのため、マスペクトルの簡略化が種々報告されているが、類似性を求

* 日立製作所 那珂工場 電子装置設計部

める本検索に先立ち、ある制限による荒ぶるい(Pre-search)を行い、本検索の時間短縮を行う提案もなされている。

KnockやGrotchは分子量による制限を検索に導入した。しかし、一般にマススペクトルから分子量を判定することは必ずしも容易でなく、この制限は必ずしも一般的ではない。

Biemannら¹⁰⁾は基準ピークが、未知、既知相互に25%以上の強度をもつか否かをPre-searchの方法とした。

Dromeyは⁸⁾マススペクトルの重心点、クラス分けによるPre-searchを提案している。マススペクトルのクラス分けとは同種化合物のスペクトルではイオンシリーズスペクトルが似る性質を利用することである。クラス分けは次のステップをふんで数値化される。スペクトルの全イオン量を50としてノルマライズする。スペクトルをアルケンイオンシリーズに対応する区間 m/e (41~54), (55~68), (69~82), (….)に区切る。各区間に含まれるピークについて、各区間のスタート点との質量差を求め、強度を乗ずる。スペクトルの全ピークについて上述の数値の総和をもとめる。例えば m/e 51 (23%), 57 (27%) の場合、

$$(51-41) \times 23 + (57-55) \times 27 = 284 \quad \text{となる。}$$

このクラス分けによれば、飽和炭化水素類は約100、アルキルベンゼン類は約450の値を示す。このPre-search法を利用して検索速度をあげることが可能となる。

4. “in house”ライブラリー

GC-MS オンライン検索システムの有用性が証明される反面、種々の問題も提起されてきた。

前述の方式においては、いずれも一義的な解答は得られず、ランク分けされた解答がえられる。出力されたリストの中に正解があるかもしれないし、また無いかもしれない。

ライブラリーに登録されていない化合物の場合とか、立体異性体などマススペクトルが酷似する場合など、同定は一層困難になる。装置、測定条件の違いによって生ずるマススペクトルの変動なども検索精度の低下を招く。特に市販スペクトル集や文献より得たスペクトルをライブラリーとする場合は、その影響が大きい。

装置、測定条件によるスペクトルの変動の影響を防ぐには自分の所でえられたスペクトルをライブラリーとする。即ち“in house”ライブラリーを作ることである。しかも、対象とする分析分野が限られていることが多いので、ライブラリーのスペクトル数も限定され、検索速度が高められる。

検索過程に分析に特有な情報を付与すれば検索精度を高めることが出来る。Biemannらはマススペクトル情報に相対リテンションインデックス⁹⁾を併用し、良好な検索結果をえた¹⁰⁾。試料にリテンションインデックス用として三種の飽和炭化水素及び定量用の標準物質を内部標準として加え、自動的に相対リテンションインデックスを求め、その範囲内の物質の検索を行っている。この方法は他の研究者によっても採用され、検索の有力な制限項目として注目されている。

5. 混合物マススペクトルの検索とReverse Search

生体成分、環境汚染物質など複雑な多成分系試料の場合ガスクロマトグラフィー的に充分分離出来ないことも多い。

不完全分離の場合は勿論、カラムブリード、その他のバックグラウンドなどにより、一般にマススペクトルはいくつかの成分の重畳したものとなる。

解決法の一つは、マススペクトルに重畳している妨害スペクトルを自動的に削除し、“きれいな”スペクトルを得ようとするものである^{11,12)}。マスクロマトグラフィーを利用し、互に妨害する成分、即ちマスクロマトグラム上わずかに保持時間の異なるピークを見出し、相互に寄与分を相殺したり、バックグラウンドも連続成分と考え、自動的に削除する方法である。しかしこのようにしても、多数の成分が重畳したり、立体異性体が重畳する場合には充分なClean Upは困難となる。このClean Up手法に対してSweelyら¹³⁾が彼らのシステムを基にした批判を行っているので参照されたい。

他の解決法はAbramsonら¹⁴⁾のReverse Search法である。今までのべてきた検索法は未知スペクトルを基にして、ライブラリー中に一致するスペクトルを探す方法で、AbramsonのいうForward Search法である。Reverse Search法はライブラリースペクトルが未知スペクトルに含まれるか、否かを探す方法である。一見検索方法を単に裏返えしただけのように見えるが、今までのForward Searchでは解決できなかった問題を解決し、広範な応用を可能にした。Reverse Searchの手法は、まずライブラリースペクトルが未知スペクトル中に含まれるか否かを探すことで始まる。混合物のマススペクトルは構成各成分のマススペクトルの総和となるので、連立方程式を解くことで構成成分を定性定量できる。これはマススペクトロメリーの初期、石油化学分野に応用されたパターン分析に似ている。このパターン分析の場合、構成成分は予め、人間が与えるのに対し、Reverse Searchではコンピュータが次々とライブラリースペクトルを組合せ、未知スペクトルと照合して成分を推定する。

McLaffertyらは統計的手法とReverse Search手法との結合に成功した^{15,16,17)}。人がマススペクトルを解析する際、 m/e 43と m/e 286に有意の強度でピークがあれば、 m/e 286に重みをかけて考察する。これはマススペクトルの性質から m/e 286が m/e 43に比してより特徴的であることに基づいている。 m/e 毎に特徴の度合は異り、出現する頻度の高いものと、特別な構造、元素などに由来するピークとの差として認識される。 m/e の特異性を数値として把握するため、McLaffertyらは約32,000のマススペクトルを検討した。この方法はProbability based matching法とよばれ、強度と m/e 両者に重みをかける検索法である。ライブラリースペクトルが未知スペクトル中に存在しうる可能性はConfidence Value (K Value)、即ち、ライブラリースペクトルの個々のマスピークが未知スペクトル中に存在する確率の積で表わされる。

$$K = \prod_{i=1}^n P_i \quad P_i \text{は個々のピークの存在確率である。}$$

実際には対数的取扱により加算として求める。個々のピークに対するK Valueは次式で求まる。

$$K_j = U_j + A_j + W_j - D$$

U_j はピークの特異性を示す数値で、約32,000のマススペ

クトルから統計的に予め求めたものである。 A_i はライブラリースペクトルに存在するピーク強度に対応する数値である。 W_i は窓函数でリファレンスと未知スペクトルの間に許容できる強度に対応する数値である。 D は Dilution Factor で未知スペクトル中のピークが他の成分の混入により強度が下げられる割合を数値化したものである。 K Value の大きいものが未知スペクトル中に存在する確率の高いことを示している。ライブラリーはいくつかの制限項目に従って作られているが、 $U+A$ の大きなピーク15本で構成されている。この方式は定性ばかりでなく、かなりの精度で定量も可能であることを示した。

Sweelyら¹³⁾は Reverse Search の手法と、相対リテンションインデックスなどの情報をもりこんだ“in house”ライブラリーを併用し、尿中の複雑な代謝物の自動検索、定量に成功した。かれらのライブラリーはユニークなもので、分析成分のタイプ別にライブラリーを用意し、ライブラリースペクトルは相互に他のスペクトルと識別できる8個の m/e と強度の対とする簡略化されたものである。 m/e の選択も統計的手法に改善され、8個のマスピークの1つは Designated Ion とよばれ、これによるマスキロマトグラムの面積で定量が行われる。残り7つのピークは Confirming Ion とよばれ、一致度を求めるのに用いられる。

6. 日立データ検索システム

6.1 002B-8DKの構成

- | | | |
|-----------|-----------------|--------|
| a) 中央処理装置 | Hitac 10II/A | 8 KW |
| b) 補助メモリー | Disk | 4.8 MW |
| c) 入出力装置 | キーボード付 CRT | |
| | XY-プロッタ | |
| | データタイプライタ | |
| | (紙テープ読取、パンチャー付) | |

6.2 検索方式

- 簡略化 m/e 6 より出発し14マス毎に m/e 軸を区切り、区分中の最大ピーク2本を用いる。
(あるいは全スペクトル中最強10本のピークを用いる方式も可能)
- ライブラリースペクトル
固定ディスク上に最大6,000スペクトルを収納。
- 類似度は Biemannらの方式を一部変更したもので、Forward Search により2つのスペクトル間のパターンの比の偏差から求める。

6.3 その他の機能

- Pre-Search法を付加することが出来る。
- オンラインによるライブラリーの追加、削除。
- ライブラリースペクトルが CRT 又はプロッタに出力出来る。
- ライブラリースペクトルのインデックスによる出力。
(分子量、名称、分子式等13種のインデックス)
- その他

7. おわりに

マススペクトルの検索システムの研究は1960年代から始まり、現在まで続いている。マススペクトルの簡略化、Pre-searchの検討、検索法自体の検討など高品質の検索結果をうるための努力がなされてきた。近年 Reverse Search の

手法が紹介され、この手法が自動検索、定量に適していることから、従来の Forward Search を凌ぐ勢いとなりつつある。しかし Forward Search も妨害成分の除去方法が更に改善されれば、類似度の数値化、類縁化合物の推定など利点も多く、捨てがたい面を持っている。

検索システムで重要なことは、常にライブラリーを高品質に保つ努力を続けることである。ライブラリーが貧弱であればいかに良い検索方式でも良い結果はえられない。

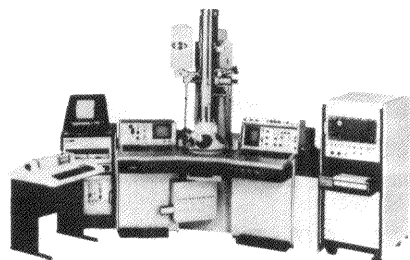
このためにも、日頃のメンテナンスの容易さを考えると、大きなライブラリーよりも分析対象毎のローカルなライブラリーが適していると思われる。

■参考文献

- 1) R. G. Ridley in "Biological Application of Mass Spectrometry" G. Waller, Ed., Wiley-Interscience, N. Y. 1972, Chapter 6
- 2) S. Abrahamsson, Sci. Tools, **14**, 29 (1967)
- 3) B. A. Knock, I. C. Smith, D. E. Wright and R. G. Ridley, Anal. Chem., **42**, 1516 (1970)
- 4) S. L. Grotch, Anal. Chem., **43**, 1362 (1971)
- 5) S. L. Grotch, Anal. Chem., **43**, 1370 (1971)
- 6) S. L. Grotch, Anal. Chem., **47**, 1285 (1975)
- 7) R. A. Hites and K. Biemann, Advan. Mass Spectrom., **4**, 37 (1968)
- 8) R. G. Dromey, Anal. Chem., **48**, 1464 (1976)
- 9) E. Kováts, Helv. Chim. Acta, **41**, 1915 (1958)
- 10) H. Nau and K. Biemann, Anal. Chem., **46**, 426 (1974)
- 11) R. G. Dromey, M. J. Stefik, T. C. Rindfleisch and M. Duffield, Anal. Chem., **48**, 1368 (1976)
- 12) D. H. Smith, M. Achenbach, W. J. Yeager, P. J. Anderson, W. L. Fitch and T. C. Rindfleisch, Anal. Chem., **49**, 1623 (1977)
- 13) S. C. Gates, M. J. Smisho, C. L. Ashendel, N. D. Yong, J. F. Holland and C. C. Sweely, Anal. Chem., **50**, 433 (1978)
- 14) F. P. Abramson, Anal. Chem., **47**, 45 (1975)
- 15) F. W. McLafferty, R. H. Hestel and R. D. Villwock, Org. Mass. Spectrom., **9**, 690 (1974)
- 16) G. M. Pesyna, F. W. McLafferty, R. Venkataraghavan and H. E. Dayringer, Anal. Chem., **47**, 1161 (1975)
- 17) G. M. Pesyna, R. Venkataraghavan, H. E. Dayringer and F. W. McLafferty, Anal. Chem., **48**, 1362 (1976)

Topics

総合分析機能を備え、世界ではじめてコンピュータを内蔵した
H-600形
日立高性能
分析電子顕微鏡



H-600形日立高性能分析電子顕微鏡

最近の電子顕微鏡の分解能は原子像の観察を可能にするほどになっており、さらに拡大像の観察のみならず試料の微小部分の結晶構造の解析や元素分析といった情報を同時に得られることが要求されています。今回これに対応できるH-600形を開発しました。

H-600形には電子線のエネルギーを分析するエネルギーアナライザ(EAと略す)が取付けられ、これにより従来のX線分析では不可能であった軽元素まで測定範囲を広げています。H-600形はコンピュータを内蔵し、主にレンズ系を制御して精度のよいズームやオートマムフォーカス、オートスルーフォーカス、明るさ倍率リンクなど新機能を加えて使いやすい装置としています。

■特 長

1. 高分解能

標準構成で1.4Å(格子像)を保証します。±60°傾斜, STEM/SEM, EDX, EAは共通ボールピースで試料位置を変える事なく同一位置で分析が行なえます。

2. クリーンな超高真空鏡体

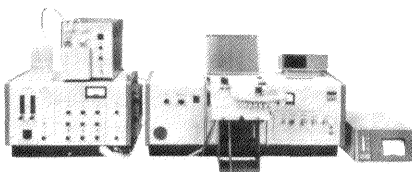
電子レンズ系、スティグマトール、偏向コイルなど電子線通路の部品は特殊SUSパイプを用いて真空外に出して、従来の方式に比べ真空容積を約1/5に、Oリングの数も1/10に減らして短時間

で高真空(5×10^{-7} Torr)が得られ、試料汚染の少ない像観察が可能となりまた高輝度、高寿命のLaB₆フィラメント(オプション)を使用可能にしています。

3. コンピュータ内蔵による機能向上

7段からなるレンズ系はコンピュータにより、各倍率において最適レンズ値に制御され、キースイッチにより倍率は最低から最高まで自由に変えられ、明るさの変化ありません。そのほか試料のビーム損傷を防ぐために試料面上の明るさをある値以下におさえたり、焦点を少しずつ変化させて撮影するなど従来にない機能をもっています。

170-70形日立ゼーマン 原子吸光分光光度計用 日立自動サンプリング システム



170-70形日立ゼーマン原子吸光分光光度計用
日立自動サンプリングシステム

グラフィットアトマイザを用いる原子吸光法は、グラフィットチューブに、極微量(数10μl)の試料をマイクロピペットにより注入し、加熱、原子化する方法で、正確な注入とサンプリングが要求されます。

これらの要求にお応えして、日立では、新たに、ピーク値のデジタル印字機能も備えた170-70形用自動サンプリングシステムを開発いたしました。

■特 長

1. 測定値の再現性が向上します。

予め設定された試料量を正確に秤量し、常に同一状態でグラフィットチューブに注入します。秤量精度はC.V.値で1%以下です。

2. 大幅な省力化が計れます。

30検体までの試料を自動測定します。

3. 同一試料を任意の回数だけ繰返し測定できます。

1～9回までの繰返し回数を任意に設定することができます。

4. キャリーオーバーの心配はありません。

ん。

ノズルは1測定毎に洗滌され、キャリーオーバーは 10^{-5} 以下です。(銅水溶液の場合)

5. ピーク値を自動プリント印字できます。

原子化時の吸収ピークを自動的にプリントアウトします。またピーク値を任意の数値に設定できますので、濃度の直読も可能です。又記録計上で同様のことも行うことができます。

6. 試料量が4段階に設定できます。

簡単な操作で試料量を10, 20, 30, 40μlのいずれかに変更することができます。

■仕 様

試料使用量

4段可変(10, 20, 30, 40μl)

洗滌液使用量

1.5ml/回

サンプリング時間

約30秒

同一検体サンプリング回数

1～9回および無限

サンプリング精度

C.V.値1%以下

キャリーオーバー

10^{-5} 以下

電 源

100V 50/60Hz

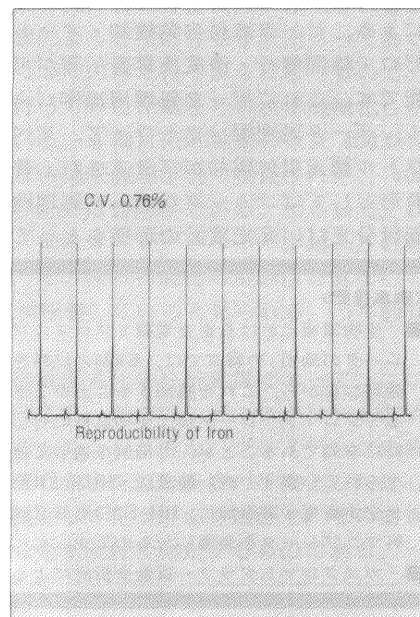
大きさ

コントロール部 22W×45D×28H(cm)

サンプリング部 29W×26D×38H(cm)

■測 定 例

一例として、鉄水溶液試料(0.1ppm, 10μl)のデータを示します。





Topics

スペクトル補正・差スペクトル・微分スペクトル・偏光度スペクトル・CAT・リピートスキャン等を標準装備

650-60形

日立高感度分光けい光光度計



650-60形日立高感度分光けい光光度計

650-60形は、すでに発売されている650-10形、650-40形と同様、高感度、少試料量等種々の特長を有しますが、それに加えてスペクトル補正を始めとする色々なデータ処理が可能であるという点で、機能的には高級機に匹敵するものです。

650-40と同様マイクロコンピュータによる、ピーク波長自動検知・オートゼロ・時間積分・濃度換算表示等が可能です。これにデータ処理用操作パネル、データ処理用ソフトウェア、スペクトル補正用付属品がプラスされ、普及形としてはユニークなデータ処理機能付分光けい光光度計の形態をとって

います。

■650-10形、650-40形と共通の特長

高感度・少試料量・オゾン自己解消・高安定性・試料室の広さと融通性・バンドパス任意選択。

■650-40形と共通の特長

広波長領域・ピーク波長自動検知・レコーダスケール自動調整・波長走査速度任意選択・オートゼロ・自動濃度換算表示・時間積分・ダイナミックレンジ7桁の測光値表示、X-Yレコーダインターフェース内蔵。(タイムスキャン可)

■650-60形固有の特長

1 スペクトル補正

1回または2回のキャリブレーション走査を行なうだけで、以後装置特性の補正されたスペクトルを得ることができます。

2 差スペクトル

バックグラウンドけい光を記憶しておくことにより、これを差し引いたスペクトルを得ることができます。

3 微分スペクトル

1次より4次までの微分スペクトルを得ることができます。

4 偏光度スペクトル

励起偏光度スペクトル及び、けい光偏光度スペクトルが記録可能です。

5 CAT

積算処理によりS/Nの改善されたデータを得ることができます。

6 リピートスキャン

任意の波長区間・周期・走査回数によるリピートスキャンが可能です。

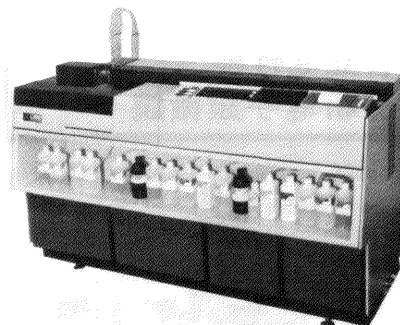
7 機能の併用

スペクトル補正と他のすべてのデータ処理機能の併用、CATと微分の併用が可能です。

欧州諸国へ輸出を開始

706D形

日立自動分析装置



706D形日立自動分析装置

このたび、日製産業(株)では、試薬の世界的なトップメーカである。ベーリンガーマンハイム社(西独)と提携を行い、同社の子会社であるクリニコ社を通じて、欧州諸国向けに706D形日立自動分析装置の輸出を開始しました。

日立の臨床用自動分析装置は、ハードの面からは、従来より欧米製品と同等以上の技術水準にありましたが、この分野では、試薬を中心としたソフトの面でもユーザの信頼がなければ販売が難しく、この点がこれ迄輸出のネックとなっていました。このため、試薬の分野で世界的に信頼されているベーリンガーマンハイム社と手を結ぶことにより、日立のハードと同社の試薬とを一体とした形でユーザにシステム販売できることになり、欧州のユーザにも非常に安心感を持って頂いています。

販売開始以来、欧州諸国では、706D形の性能に関し大きな反響があり、予想を上廻る受注が続いており、同装置の優秀さが実証された形となりました。

<編集後記>

■「生物領域における走査電顕ミクロマニプレータの効用」の報文では、SEMの試料を観察しながら、これを解剖することができるミクロマニプレータが、生物試料に対し特に有効であることが、応用例を通じて述べられています。尚、装置は、HHS-2R形日立走査電子顕微鏡に、HH-SM3形日立試料マニプレータを装着したものです。

■「ガスクロマトグラフー質量分析計による、

血清胆汁酸の分析」の報文では、GC-MSの臨床検査への応用例の一つとして、血清胆汁酸の構成の定性分析について報告して頂きました。

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 精機部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号 第17森ビル
〒150 電話 ダイアルイン 東京(03)504-7211

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SUMMER 1979 Vol.22 No.2

発行 昭和54年7月1日
(年4回発行)

発行人 湯川 清

編集人 菱田真三郎 岩井孝之

発行者 株式会社 日立製作所 計測器事業部

〒105 東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル

電話 ダイアルイン 東京(03)504-7866

印刷所 日立印刷株式会社