

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SUMMER 1982
VOL.25 NO.2

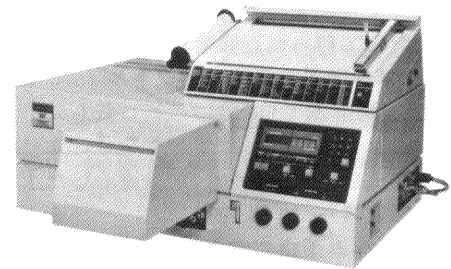
U.D.C. [543.422.5:681.785.423.4]
:547.963.4.062:616.3/.4-074

報 文

二波長分光光度計による臓器中ヘム蛋白測定法の検討とその意義

佐二木 順子*

(昭和57年3月25日受理)



557形日立二波長自記分光光度計

1. はじめに

これまで実験動物を用いて種々の環境汚染物質の中毒実験を重ねてきた。そのなかで血管透過性が高まり、出血ないしは溶血が生ずる症例、又は血管栓塞が原因で出血をおこす症例等が多々観察された。しかしながら、これまで、これら出血、溶血等の度合を示す適当な尺度がなかったため、これらの基準は肉眼的ないしは病理組織学的な観察に頼っていた。

とくに、生体内の一定の臓器中において短時間内に、虚血、出血、溶血等がひきおこされると、その臓器中のヘモグロビンをはじめとするヘム蛋白の増量が生ずるものと予測される。その臓器中のヘム蛋白を定量することは、病態の進行状態を把握する上で重要な指標になりうるものと思われる。

血液中のヘム蛋白である血色素の測定に関しては、これまで種々の方法が考案されてきた。なかでも、シアンメトヘモグロビン測定法が簡便かつ精度の高い方法として確立されているが、臓器中のヘム蛋白の測定、とくに臓器けんだく液を用いて直接測定することは、“にぎり”が大きいと非常に困難である。

ところが、二波長分光光度法は、本来、生体試料のようなにごりのある状態で微量成分を分別定量することを目的としてChance^らにより開発された。

そこで、本報では、はん雑な前処理を加えないで臓器ホモジネート中のヘム蛋白を直接測定する方法として、二波長分光光度法が適当か否かについて検討を加えた。なお、臓器中のヘム蛋白の二波長分光光度計による方法を確立するにあたり、まず、ヘム蛋白の一種であるオキシヘモグロビンの吸収スペクトルを示す溶血液を用い、直線性を検討した。その上で各臓器のホモジネートの吸収スペクトルをとり、二波長分光光度法によるヘム蛋白測定が可能か否か確かめた。なお、肝ホモジネートを用い回収率、再現性等を検討した。同時に吸収スペクトルを微分することにより、濁りを消去する微分分析法についても検討を加えた。

* 千葉県衛生研究所

目 次

報 文

二波長分光光度計による臓器中
ヘム蛋白測定法の検討とその意義
……………佐二木 順子… 1

日立医用液体クロマトグラフ……
……………宮城宏行
三浦順吉 滝 守 高田芳矩
上武成吾 鴈野重威 山形 陽… 7

解 説

H-800形日立高性能200kV
総合分析電子顕微鏡……………
……………上村昌司… 12

I 05形日立臨床検査用システム
分析装置……………小松 均
金子紀夫 鈴木 忠 杉浦良夫… 15

トピックス

R-90H形日立核磁気共鳴装置…………… 6

750形日立炎光光度計…………… 14

日立ガスクロマトグラフ用
光イオン化検出器(PID)…………… 20

また、二波長分光光度法による臓器中のヘム蛋白測定例として、カドミウム中毒の際、炎症がひきおこされるラット精巣中のヘム蛋白の測定を行ない、ヘム蛋白の測定意義について考察した。

2. 測定材料

測定法検討のためのサンプルとしてdd-Y-マウスの血液、肝、腎、脾、心、肺、精巣を用いた。

ヘム蛋白測定の応用例として、1.5mg CdCl₂を1回投与することにより炎症がひきおこされたウィスター系ラットの精巣を用いた。

3. 測定器材

血球ヘモグロビン測定のため、Hemoglobin Counter Hb 100 (TOA)を用いた。

二波長分光光度計は、日立557形を用いた。なお、分光光度計による微分スペクトルは、デジタル方式で1～4次微分まで測定できる。

4. 測定方法

4.1 二波長分光光度法による血色素の直線性について

マウスの血球を適宜、蒸留水にて希釈したものをヘモグロビンメーターを用いた方法、および二波長測定法($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$; $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$)を用い測定し、ヘモグロビンメーターによって得られた血色素の濃度と、二波長分光光度計にて得られた吸光度差との相関を調べた。

4.2 マウス各臓器の吸収スペクトル

血球は、蒸留水で600倍に希釈したものを、各臓器(肝、腎、脾、心、肺、精巣)は生理食塩水により5%のホモジネートを作成し、2,000×g, 10分遠心した上清を用い、それぞれの吸収スペクトルを得た。

4.3 臓器中ヘム蛋白測定における二波長分光光度法の適用性について

生食にてホモジナイズした肝を、2,000×g, 5分遠心した後の上清および同一ホモジネートを114,000×g, 30分遠心することにより、組織中の顆粒成分をのぞいた上清を用い、それぞれの吸収スペクトルをとり、両者の比較検討を行なった。

4.4 二波長分光光度法および微分法による肝ホモジネート中ヘム蛋白の直線性について

生食にて肝の10%ホモジネートを作成し、2,000×g, 5分間遠心し得られた上清を適宜、生食で希釈した。それらのサンプルについて二波長分光光度法($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$; $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$)および微分法(4次微分)によるヘム蛋白の測定を行ない、希釈率による直線性を検討した。

4.5 ヘモグロビンの添加回収試験

臓器中の未知物質に影響されずにヘム蛋白が測定できるかどうか確かめるため、既知のヘモグロビン液(16.0, 28.6, 62.2g/dl)を生食にて適宜濃度に調整した肝ホモジネート(3種の濃度を作成)に添加した。添加前後のホモジネート液について各波長($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$; $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$)における吸光度を測定し、ヘモグロビン添加前後の吸光度の差と添加ヘモグロビンの各波長($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$; $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$)における吸光度差との比をもって回収率とした。

4.6 同一検体同時測定による再現性について

生食により作成された5%肝ホモジネートを2,000×g, 10分間遠心し、得られた上清を20本の試験管に分注した。その20検体のサンプルについて二波長分光光度計による測定を行ない、そのCVを求めた。

4.7 二波長分光光度法によるカドミウム中毒ラット精巣中のヘム蛋白測定

塩化カドミウム(CdCl₂) 1.5mgを1回ラットの皮下に注射し、24時間後、精巣を取り出した。直ちに生食にて10%ホモジネートを作成し、2,000×g, 10分遠心した後の上清について二波長分光光度計($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$)にてヘム蛋白を測定した。なお、無処置対象群についても同様に測定を行ない、値を比較した。

5. 結 果

5.1 二波長分光光度法による血色素の直線性について

生食希釈液にシアンを添加し、ヘモグロビンをシアノメトヘモグロビンに変えた場合と蒸留水にて溶血させたオキシヘモグロビンの形で測定する場合とで、ヘモグロビンメ

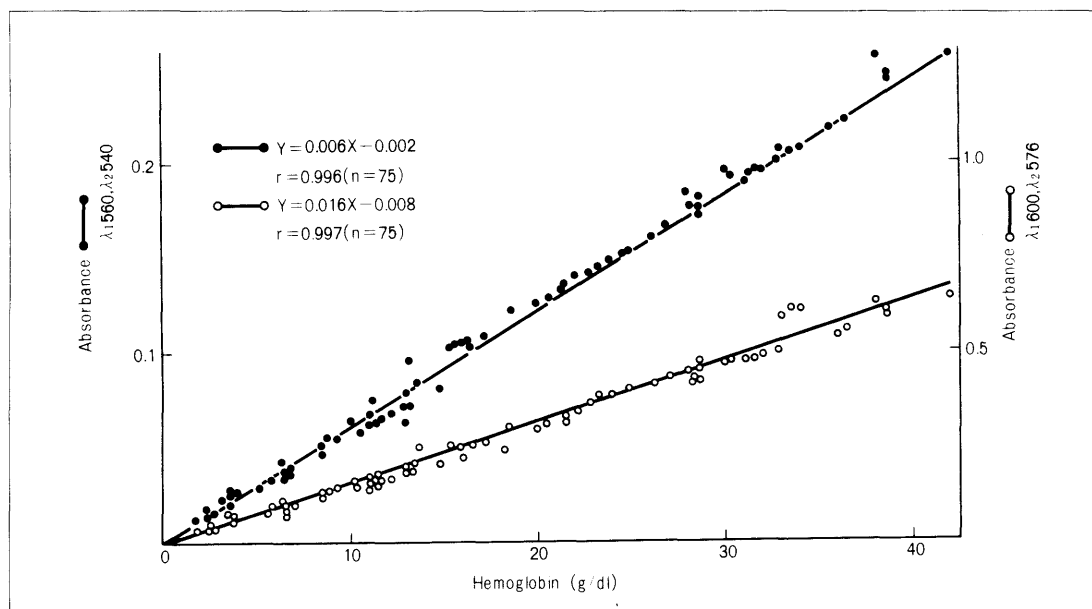


Fig.1 Correlations between hemoglobin concentration and absorbance by double wave length spectrophotometry

ーターの測定値に差があるかどうか検討した結果、希釈倍率を変化させても、それらの値に差は認められなかった。

そこで、血液を蒸留水で適宜希釈溶血させた液のヘモグロビンを、ヘモグロビンメーターにより測定し、一方、同じ溶血液の二波長分光光度計における吸光度差($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$; $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$)を測定した。

各波長により得られた吸光度(ΔA)とヘモグロビンメーターで得られた血色素値との相関は、図1に示したとおりであった。すなわち、 $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ にて測定されたものは、 $Y=0.006X-0.002$, $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$ にて測定されたものは、 $Y=0.016X-0.008$ であった。以上の結果から、二波長分光光度法によるヘモグロビン値は、 $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ の場合

場合 $\frac{\text{吸光度}(\Delta A)+0.002}{0.006}$ (g/dl) で、 $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$ の場合 $\frac{\text{吸光度}(\Delta A)+0.008}{0.016}$ (g/dl) で求められることが示された。

5.2 マウス各臓器の吸収スペクトル

血液および各臓器ホモジネートの400nm~700nmまでの吸収スペクトルを図2に示した。それぞれバックグラウンドに差があったが、各臓器で、540nm, 576nmに最大吸収をもつオキシヘモグロビンのパターンが得られ、本実験に用いたすべての臓器で二波長分光光度法によるヘム蛋白の測定が可能ながわかった。ただし、各ピークの高さについては、血色素では、576nmにおける吸光度が540nmにおけるものより大きいのに比べ、各臓器では、540nmにおける吸光度の方が576nmのものより大きかった。この現象は、肝で最も強くあらわれた。

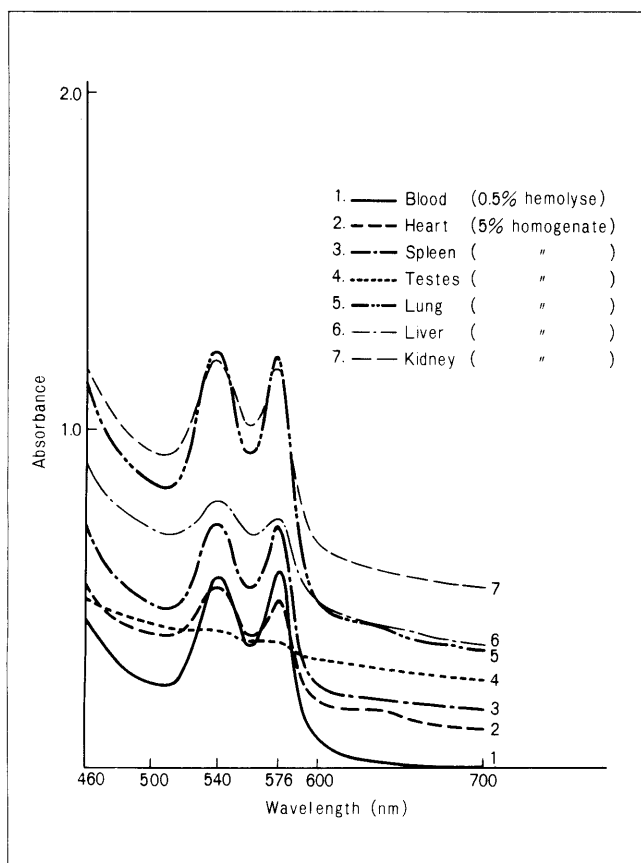


Fig. 2 Absorption Spectrum of homogenized various viscera of mouse

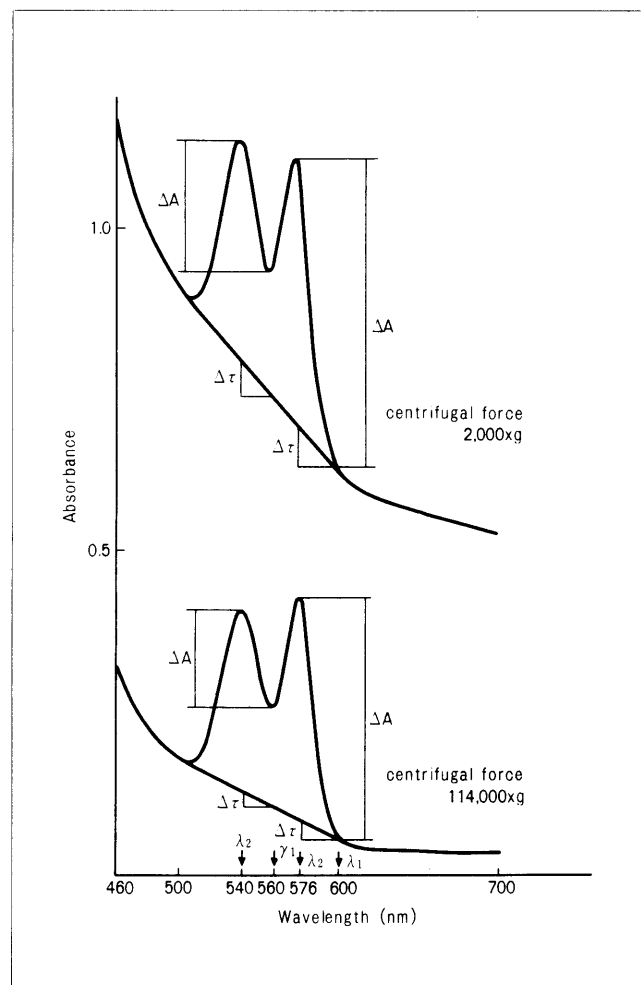


Fig. 3 Absorption Spectrum of the mouse liver supernatants by centrifugation at 2,000×g for 10min., and 114,000×g for 30min.

5.3 臓器中ヘム蛋白測定における二波長分光光度法の適用性について

肝の5%ホモジネートを2,000×g, 10分遠心することにより得られた上清, および114,000×g, 30分遠心することにより得られた上清についての吸収スペクトルを図3に示した。この図から明らかなように、遠心重力の度合によりバックグラウンドは著しく変化する。114,000×gで30分遠心したものは、顆粒成分が沈殿するため、バックグラウンドが低く、576nmにおける吸収ピークは540nmのものに比して高く、溶血液で得られた血色素のスペクトルと良く合致した。また、この際、二波長測定により得られた値、およびスペクトル(図3)から求められたバックグラウンドの二波長による吸光度の差($\Delta \tau$)は表1に示したとおりであった。この表から $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ におけるバックグラウンドの影響を除去した値は、2,000×g, 114,000×g処理において、殆ど変わらないことが明らかであった。すなわち、2,000×g処理検体の二波長分光光度計による測定は十分可能なものと考えられた。ただし、 $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$ の測定でバックグラウンドの影響を除いた値は、2,000×gで処理されたものが114,000×gで処理されたものより高値を示した。

表I Hemo protein values of the mouse liver supernatants by centrifugation at 2,000×g for 10min. and 114,000×g for 30min. using double wave length spectrophotometry

wave length (nm)	centrifuge gravity (×g)	OD(ΔA)	back ground OD(Δr)	true value OD($\Delta A - \Delta r$)
($\lambda_1=560$ $\lambda_2=540$)	2,000	0.184	0.058	0.126
	114,000	0.146	0.025	0.121
($\lambda_1=600$ $\lambda_2=576$)	2,000	0.456	0.070	0.386
	114,000	0.364	0.030	0.334

5.4 二波長分光光度法および微分法による肝ホモジネート中ヘム蛋白の直線性について

肝の10%ホモジネートでは、バックグラウンドが高すぎる(660nmにおける吸光度が0.6を超える)ため、ヘム蛋白のピークが2つに分離せず、550nm付近に単一のピークが認められた(図4)。そのため、ヘム蛋白測定は不可能であった。さらに2倍以上に希釈すると測定可能となった。そこで、5%ホモジネートを原液とし、それをさらに6段階に希釈した場合の希釈によるヘム蛋白の直線性を検討した結果は、図5に示すとおりであった。

両波長($\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$; $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$)で、希釈によるヘム蛋白の直線性は十分認められた。

またスペクトルを4次微分した時の、微分スペクトルおよび希釈による直線性は、それぞれ図6、7のとおりであ

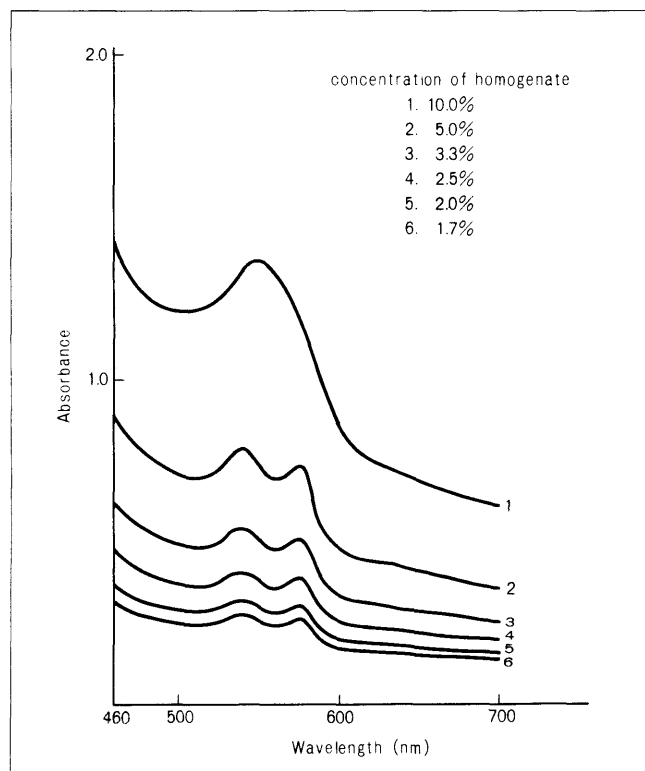


Fig. 4 Absorption Spectrum of the homogenized mouse liver in various concentrations

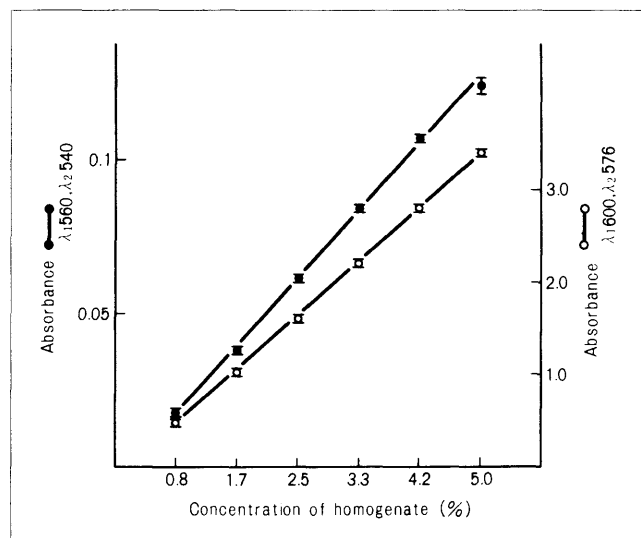


Fig. 5 Calibration curve for the homogenized solution by double wave length spectrophotometry

った。微分法により得られた直線性も二波長分光光度法と同様満足できるものであった。

5.5 ヘモグロビンの添加回収試験

肝ホモジネートの濃度が高い(660nmにおける吸光度が0.33を示した)ものに16.0, 28.6, 62.2g/dlのヘモグロビン液を加えた場合の回収率は、 $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ においてそれぞれ $102.0 \pm 2.0\%$, $91.7 \pm 1.5\%$, $97.7 \pm 0.6\%$, $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$ においてそれぞれ $109.3 \pm 6.0\%$, $94.0 \pm 1.7\%$, $98.7 \pm 0.6\%$ であった。また、肝ホモジネート濃度が低い(660nmにおける吸光度が0.09)ものに同濃度のヘモグロビン液を加えた場合の回収率は、 $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ においてそれぞれ $107.3 \pm 0.6\%$, $98.8 \pm 0.4\%$, $101.0 \pm 1.0\%$, $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$ においてそれぞれ $101.0 \pm 1.0\%$, $97.5 \pm 0.7\%$, $99.7 \pm 0.6\%$ と良い結果であった。

5.6 同一検体同時測定による再現性について

同一検体について20回測定を行なった結果、 $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ における平均値とその標準偏差は 0.356 ± 0.001 で、CVは0.28%, $\lambda_1=600$, $\lambda_2=576$ における平均値とその標準偏差は 0.417 ± 0.004 で、CVは0.97%であった。

5.7 二波長分光光度法によるカドミウム中毒ラット精巣中のヘム蛋白測定

1.5mgの CdCl_2 を皮下注射することにより出血性の炎症が精巣にひきおこされる。その精巣中のヘム蛋白パターンを図8(破線)に示した。対象ラット(図8実線)の精巣に比べ540nm, 576nm両ピークの高さが高く、溶血ないし出血をひきおこしていることが明らかである。Cdにより炎症がひきおこされた精巣中では、脂質の過酸化が亢進していることが明らかであり、炎症の進行とともに過酸化脂質の値も増加する²⁾。そこで、ヘム蛋白値が炎症のパラメーターになりうるか調べるため、 CdCl_2 投与ラット27, 無処置対象ラット7, 計34匹について $\lambda_1=560$, $\lambda_2=540$ で測定した精巣中のヘム蛋白値と同時に測定した精巣の過酸化脂質値との相関をとった。その結果、 $r=0.861$ と同じ関係にあることがわかった。

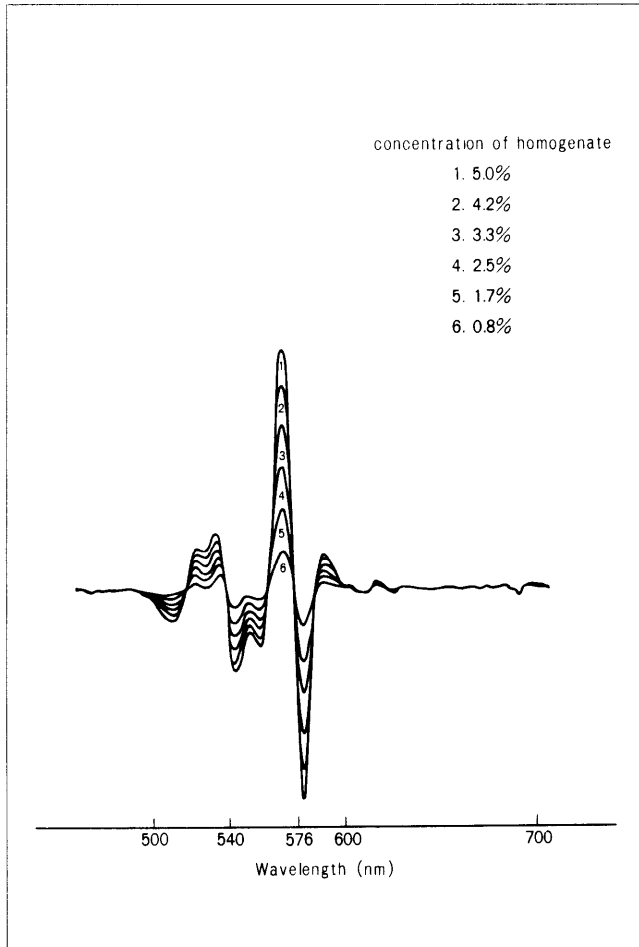


Fig. 6 Fourth derivative Absorption Spectrum of the homogenized mouse liver in various concentrations

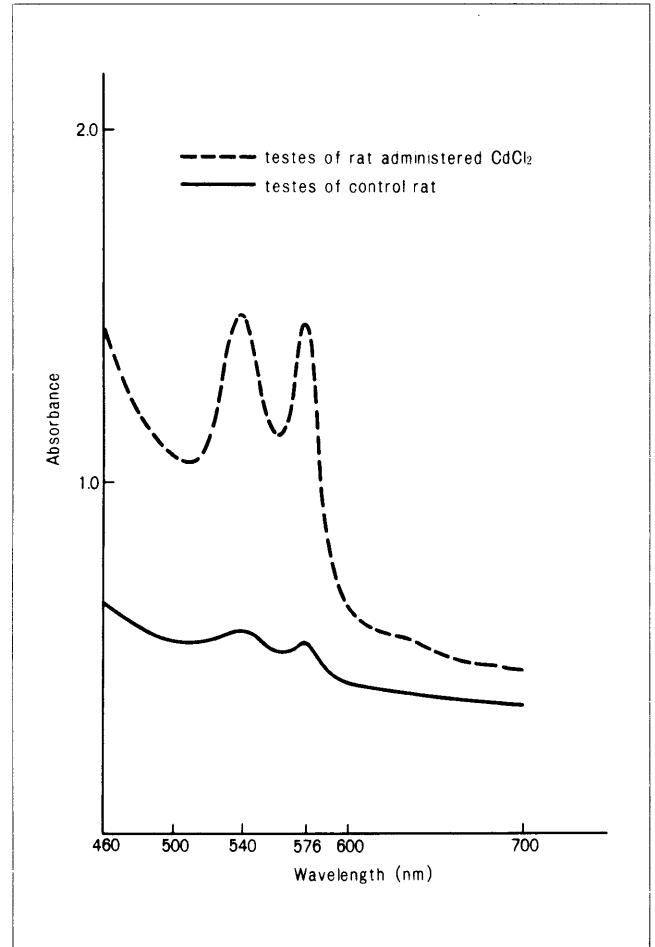


Fig. 8 Absorption Spectrum of the homogenized testes from rats administered CdCl_2

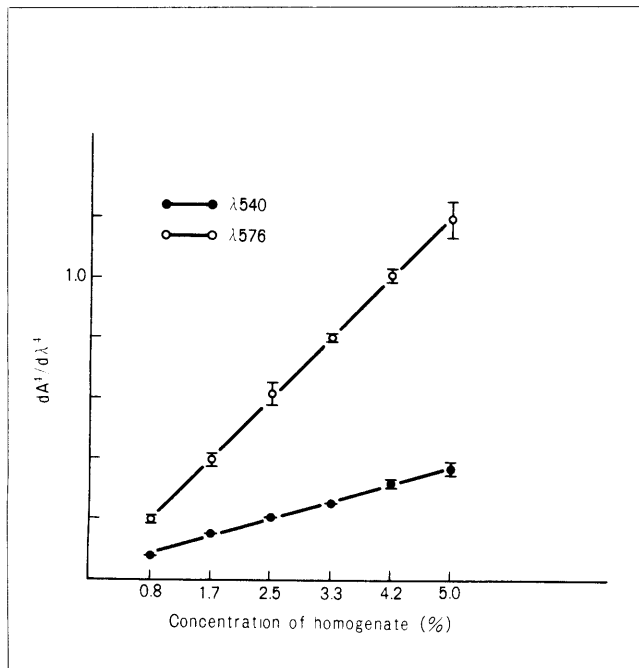


Fig. 7 Calibration curve for liver homogenate of mouse by 4th derivative spectrum

6. 考 察

二波長測定は、混濁試料測定用に開発され、“にごり”を最小限にとどめられるが、バックグラウンド自体の2つの波長間差(Δr)が加算されるため、この Δr の影響を受けないためには少しでもシャープなピークを用いて、二波長を設定することが必要となる。このような理由から、二波長測定を用いたヘム蛋白測定には、シアンメトヘモグロビンのブロードなピークを用いるよりも、オキシヘモグロビンのピークを用いる方が二波長測定の条件にかなっていると考えられた。

本研究においては、オキシヘモグロビンのもつ540nm, 576nmの両吸収ピークを用いてその直線性を検討した。溶血液についての両ピークを用いた二波長測定法($\lambda_1=560$ および $\lambda_2=576$)は共に良好な成績であった。

次にマウスの各臓器(肝、腎、心、肺、脾、精巢)ホモジネートの二波長分光計による吸収スペクトルが、血中の酸化ヘモグロビンの吸収スペクトルと同じパターンを示したことは、今回検討したすべての臓器中において、二波長測定法によるヘム蛋白測定が可能であることを示している。ただし、血中ヘモグロビンは576nmのピークが540nmのピークより高いのに比べ、臓器中では540nmのピークの方が576nmより高かった。この傾向は肝でとくに大きかった。しかし、

この肝ホモジネートにさらに遠心重力をかけ($114,000 \times g$)組織中顆粒成分をとり、のぞいた試料を用い、吸収スペクトルをとった結果、図3に示したとおり、血中ヘモグロビンと全く同じパターンになった。さらに、 $\lambda_1 = 560$, $\lambda_2 = 540$ による測定により得られた真の値($\Delta A - \Delta \tau$)は $2,000 \times g$, $114,000 \times g$ 両処理で等しかった。

すなわち、臓器中のスペクトルのピークの高さの違いは、バックグラウンドの傾斜によるもので、バックグラウンドは、それぞれの臓器特有の混濁形態(粒子径、粒子の形、粒子の数など)による物理学的な要因によるものと考えられた。

以上の結果から、バックグラウンドの影響を最小限($\Delta \tau$)にとどめた測定法である二波長測定法は、バックグラウンドの大きな臓器中のヘム蛋白測定に十分適応しうることが明らかであった。

さらに、酸化ヘモグロビンの吸収スペクトルを微分することにより、“にぎり”を除去する測定法も二波長測定法と同様、良好な成績であった。

次に、臓器中のヘム蛋白測定の応用例としてカドミウム投与により、出血性の炎症がひきおこされた精巣のヘム蛋白の測定を試みた。カドミウムを一定量以上ラットに投与すると、精巣に出血性の炎症が生ずることは周知の事実である。これらの変化については、生物学的、病理組織学的には十分検討が加えられる。すなわち、血管の透過性が増し、出血ないしは溶血が生ずることがCdCl₂中毒炎症時の重要な所見である。これまでCd中毒精巣の炎症を示す簡

便なパラメーターとしては、精巣の重量の変化がたびたび用いられてきたが、重量と炎症程度とに一定の関係が見られない。すなわち、CdCl₂投与24時間までは精巣重量に増加がみられるが、それ以降徐々に低下するため、炎症程度を把握するのに不都合が多かった。

しかし、最近臓器中の過酸化脂質含量が、CdCl₂中毒による精巣の炎症の程度を把握する上で、よいパラメーターになりうることが明らかになった²⁾。脂質の過酸化は、近年、種々の病態において、病因と関連の深いものとして注目されている現象である。

カドミウムにより炎症のひきおこされた精巣中の過酸化脂質値とヘム蛋白含量との相関を調べたところ、非常に高い相関関係にあることがわかった。このことは、ヘム蛋白が出血性の炎症の進行および修復状態を知る上で良い指標になりうること示している。

なお、本報で示した二波長測定法は、酸化ヘモグロビンの形で測定するため、安定性に限界がある。臓器ホモジネート作成後40分以内は値が安定であったが、それ以降は徐々に値が減少した。

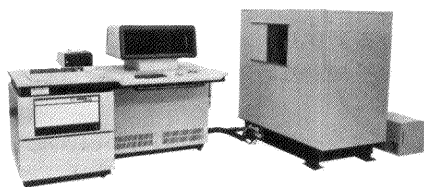
今後、試料の調整を迅速に行ない、二波長分光光度法にてヘム蛋白を測定することは、出血(溶血)をとまなう種々の病態の進行を把握する上で有意義であると考えられる。

参考文献

- 1) B. Chance: Science, 120, 767 (1954)
- 2) J. Sajiki, Y. Fukuda and E. Fukushima, J. Appl Biochem., 3, 467, 1981

Topics

R-90H形 日立核磁気共鳴装置



R-90H形は高磁場の大型永久磁石に、大容量ディスクメモリをもつデータ処理システムとコンピュータ制御されたスペクトロメータとを合わせて、あらゆる応用測定に対応できるFT-NMR装置です。

■特 長

- (1) プローブのインサート交換が簡単にできます。測定試料に応じて最適なインサートを選ぶことによって、

極めて高感度に測定できます。

- (2) 安定性の高い永久磁石、マスタークロックから合成される相関のとれた周波数源、高感度の²Dインターナルロックとコンピュータ制御による分解能調整とによって長時間にわたる高安定な測定が可能です。
- (3) 観測周波数、位相、照射パワー、デカップラ周波数、デカップラパワー、試料温度などの測定パラメータを前もって設定するだけで、パラメータを可変しながら連続してデータを格納(ファイル)します。
- (4) 磁場のロック・オン、分解能調整、受信器の利得調整など従来の煩雑な操作を、コンピュータ制御することによって操作を簡略化するとともに、常に最高性能の状態が稼働させます。
- (5) テレビディスプレイとキーボードによる対話方式の操作は極めて簡単です。条件設定も標準的な測定は数多く記憶されており、顧客の測定条件も登録することもできるので、簡単に設定できます。

■仕 様

磁 場	2.114テスラ永久磁石
共鳴周波数	¹³ C: 22.6MHz, ¹ H: 90.0MHz *多核種
	5.0~36.5MHz, 84.0~90.0MHz
分 解 能	0.2Hz
感 度	¹³ C: ≥100, ¹ H: ≥75
ロック方式	² Dインターナルロック* ² D/ ¹⁹ Fエクスターナルロック
周波数設定	50kHz(0.1Hzステップ)
デカップリング	¹ H-{ ¹ H}, ¹³ C-{ ¹ H}
自動分解能調整	Y, B
積 算 語 長	32ビット
多重処理	4重処理
自動測定	50データ(16kポイント/データ)
デ ー タ ・ ファイル	70データ(固定デスク), 140データ(カートリッジデスク)

日立医用液体クロマトグラフ

宮城 宏行* 三浦 順吉* 滝 守* 高田 芳矩* 上武 成吾** 鴈野 重威** 山形 陽***

(昭和57年4月16日受理)

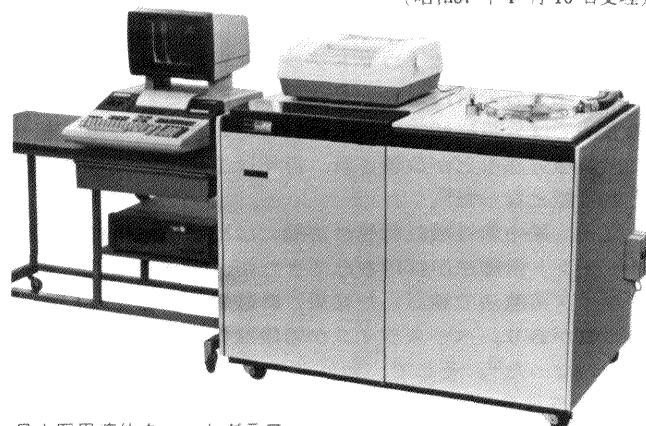
1. はじめに

血液や尿などの生体液中には、数百ないし数千の化合物が含まれており、それらの多くは病態に関する情報を有している。したがって、多数の生体液構成物質を同時分析すれば、病態を知ることも可能と考えられている¹⁾。このような目的に使用する分析装置としては、前処理操作が簡単で、常温付近で分析できるなどの点で液体クロマトグラフが最適であるが、複雑な分析結果を病態診断に有効利用する方法が確立されていない。

筆者らは生体液を液体クロマトグラフで分析し、分析結果を病態診断に利用しやすい形に変換して出力する装置を試作した²⁾。この装置を「医用液体クロマトグラフ」と呼ぶが、ここでは、システム構成及びこの装置を腎機能診断に応用した例について述べる。

2. 装置構成

医用液体クロマトグラフは図1に示すように、生体液を分析する自動液体クロマトグラフと病態診断用マイクロコンピュータから構成されている。自動液体クロマトグラフは835形日立高速アミノ酸分析計を改造したものであり、病態診断用マイクロコンピュータはYHP製9845B/T形を用いた。分離カラムと検出器は分析成分と目的により種々の組合せが可能であるが、ここでは尿中紫外吸収物質を分析す



日立医用液体クロマトグラフ

るために、陰イオン交換樹脂日立ゲル#3013-Nをステンレス鋼製カラム(250mm×4.6mm i.d.)に充填した分離カラムと多波長UVモニタ(M)を用いた。2本の分離カラムを並列に設置し、一方を分析に使用している間に他方は洗浄及び平衡化を行なうようにした。溶離液供給系は単一溶媒溶離法あるいは5～6段のステップワイズ溶離法を採用できるものである。

紫外吸収モニタの検出信号は、自動液体クロマトグラフに内蔵されているデータ処理装置で積分された後、マイク

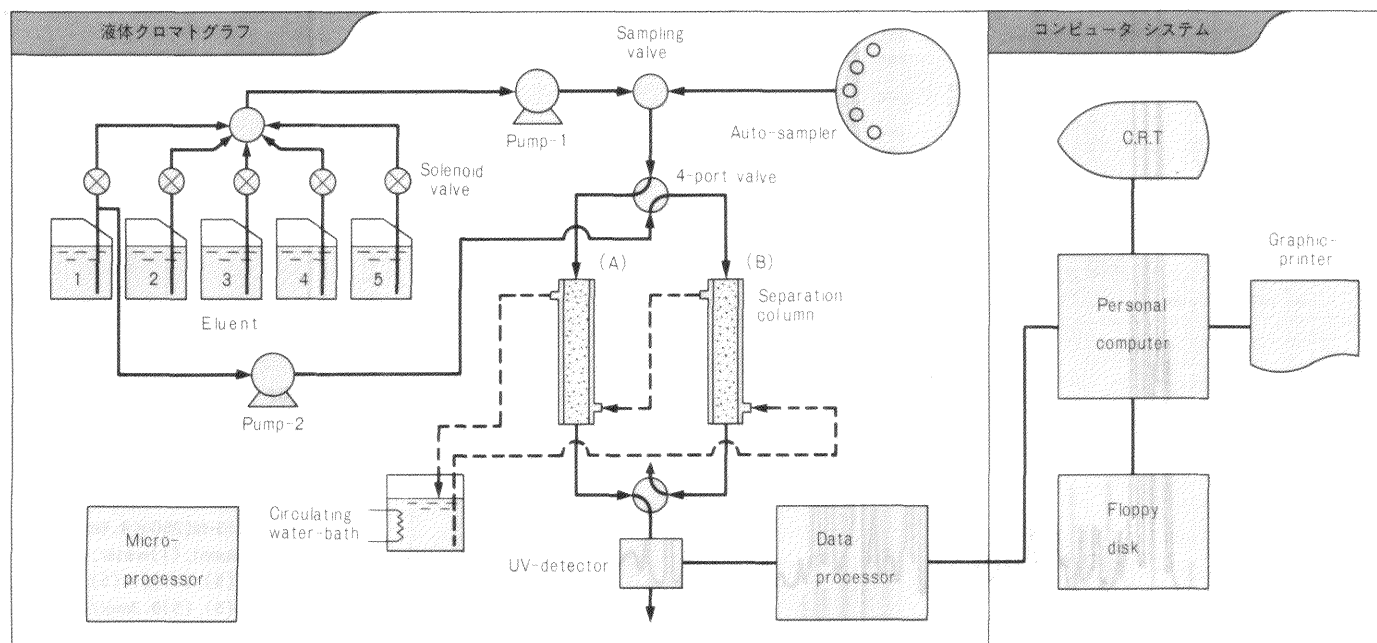


図1 医用液体クロマトグラフの構成

* 日立製作所中央研究所 第9部日研分室, ** 日立製作所那珂工場 光学装置設計部, *** 日立製作所日立総合病院 腎臓内科

ロコンピュータに転送されてフロッピーディスクに集録される。最終的な出力はCRTに表示し、必要に応じてハードコピーをとる。

検体を低温オートサンプラーにセットするだけで、全ての操作は予め設定したプログラムに従って自動的に遂行されるので、医用液体クロマトグラフではオペレータの習熟度などによる誤差は最小限とすることができる。

3. 分析条件

陰イオン交換液体クロマトグラフィーによるヒト尿中紫外吸収物質の分析法はScott³⁾によって開発されたが、当初の方法では分析に40時間以上を要していた。その後、充填剤、溶離方法などが改善され、近年は2時間で分析することも可能となった⁴⁾。

従来、尿中紫外吸収物質の溶離には酢酸緩衝液によるグラジェント溶離法が採用されてきたが、筆者らは、ステップワイズ溶離法で検討した結果、酢酸緩衝液はそれ自体紫外吸収があり、ベースラインが階段状に変化することが明らかとなった⁵⁾。そこで、紫外吸収端がより短波長側で、分析の高速化に適する溶離液を探索したところ、 $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN}$ 系溶離液が適することがわかった。また、溶離液の切替えに同期させてカラム温度を階段状に上昇させることにより、一層高速化できる。

最適化された分析条件で得た市販管理尿のクロマトグラムを図2に示す。最終段溶離液として $0.3\text{mol/l NH}_4\text{Cl}-0.05\text{mol/l NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4-30\%(\text{v/v})\text{CH}_3\text{CN}(\text{pH}4.8)$ を用い、初段(蒸留水)を除く各段の溶離液は最終段溶離液を蒸留水で希

釈したものとした。また、カラム温度は 30°C から 50°C 、 60°C へと昇温させた。この方法では約80の紫外吸収物質を100分で分析することができ、また、検出波長 230nm でも良好なクロマトグラムが得られる(図3)。

医用液体クロマトグラフでは、2本の分離カラムを交互に使用するため、1日の処理検体数は約12検体である。また、日内のピーク保持時間の再現性(C.V.)は約2%($n=11$)である。

4. 病態診断への応用

尿中紫外吸収物質のクロマトグラムで明らかのように、一般に生体液中の多数成分を同時分析すると複雑なクロマトグラムが得られ、データの解析が容易ではない。そこで、図4に示すようにクロマトグラムをバーグラフ化して表示することとした。各ピークは 230nm (黒バー)と 250nm (白バー)で検出したピーク面積で表示されるので、黒いバーと白いバーの高さの比はその成分の吸光度比(A_{230}/A_{250})を示すことになる。したがって、保持時間と吸光度比からピークを同定することができるので、保持時間の順序に同定されたピークの番号を付してクロマトグラムを再構成することとした。

各種疾患の尿を分析し、再構成したクロマトグラムのプロファイルを図5に示す。健常人のパターン(No.1~No.4)は良く一致し、また、同一患者を経日的に分析した結果(No.5~No.7)も類似したパターンとなることがわかった。慢性腎炎、腎不全患者などについても系統的に分析すれば、それぞれ特徴的なパターンが得られるものと思われる。

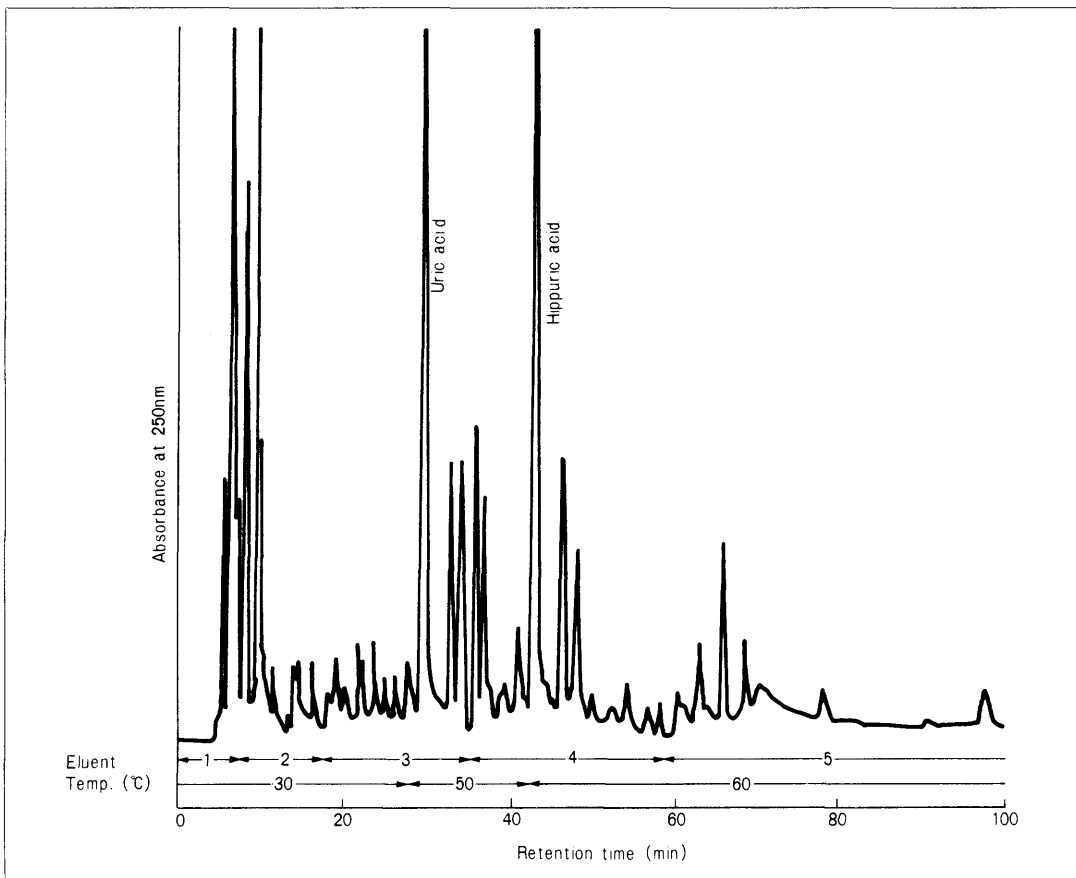


図2 市販管理尿のクロマトグラム(検出波長 250nm)

Sample, chemical control urine; sample volume, $50\text{ }\mu\text{l}$; column Hitachi Gel # 3013-N($250\times 4.6\text{mm i.d.}$); eluent, (1) water, (2) $\frac{1}{2}\times(5)$, (3) $\frac{1}{3}\times(5)$, (4) $\frac{1}{4}\times(5)$, (5) $0.3\text{mol/l NH}_4\text{Cl}/0.05\text{mol/l NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/30\text{vol}\%\text{CH}_3\text{CN}, \text{pH}4.8$; flowrate, 0.8ml/min ; detector sensitivity, 0.32 AUFS .

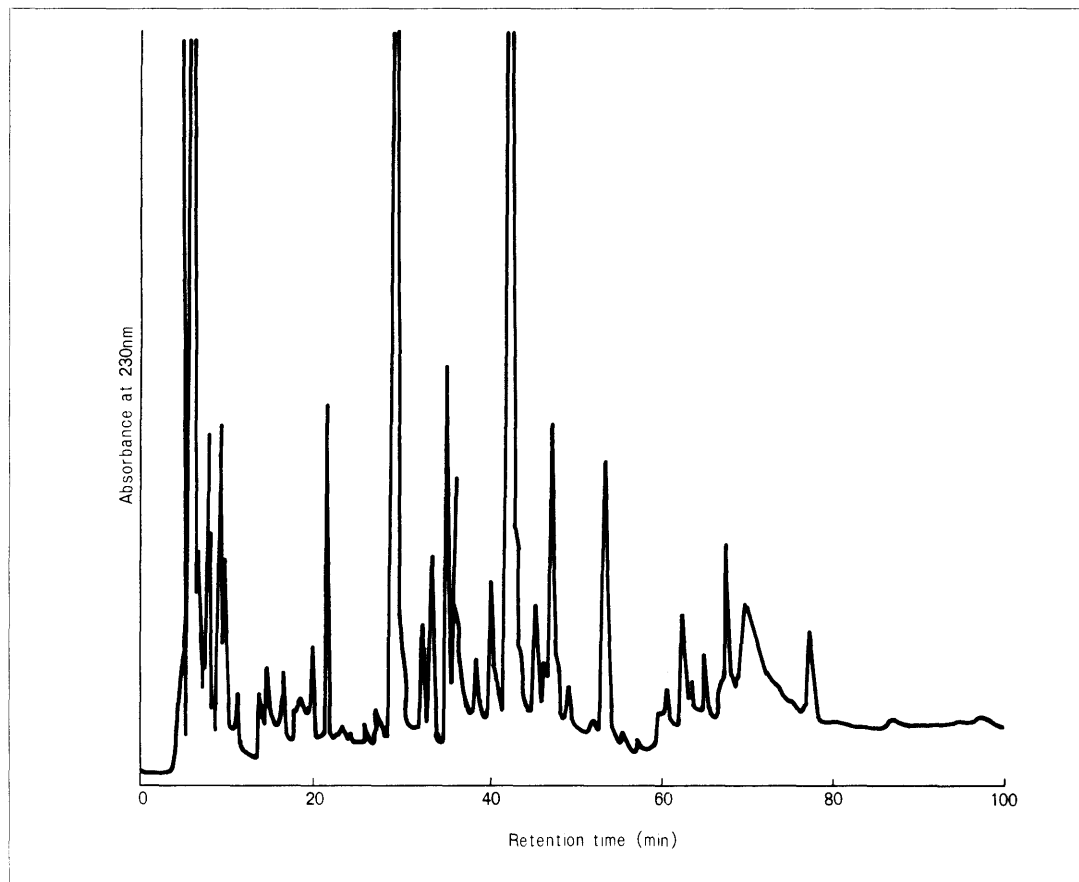


図3 市販管理尿のクロマトグラム(検出波長230nm)
(分析条件は図2と同じ)

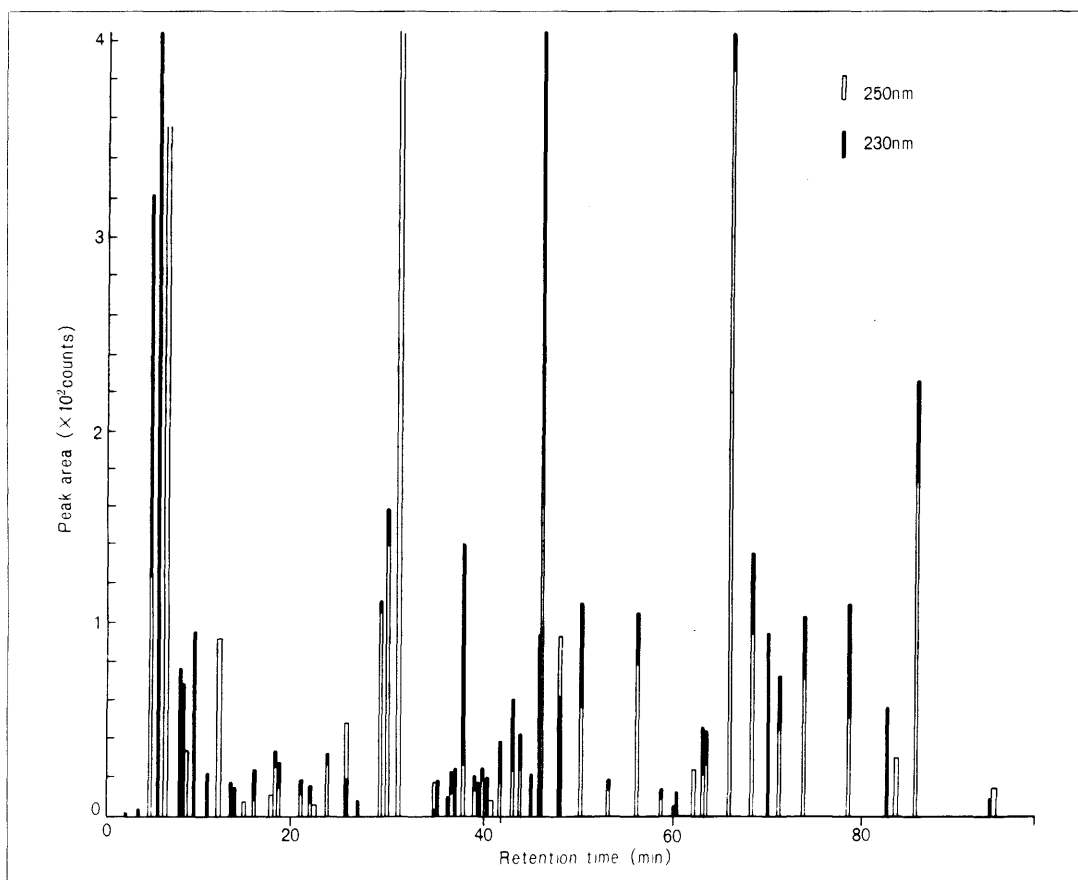


図4 健常人尿のバーグラフ

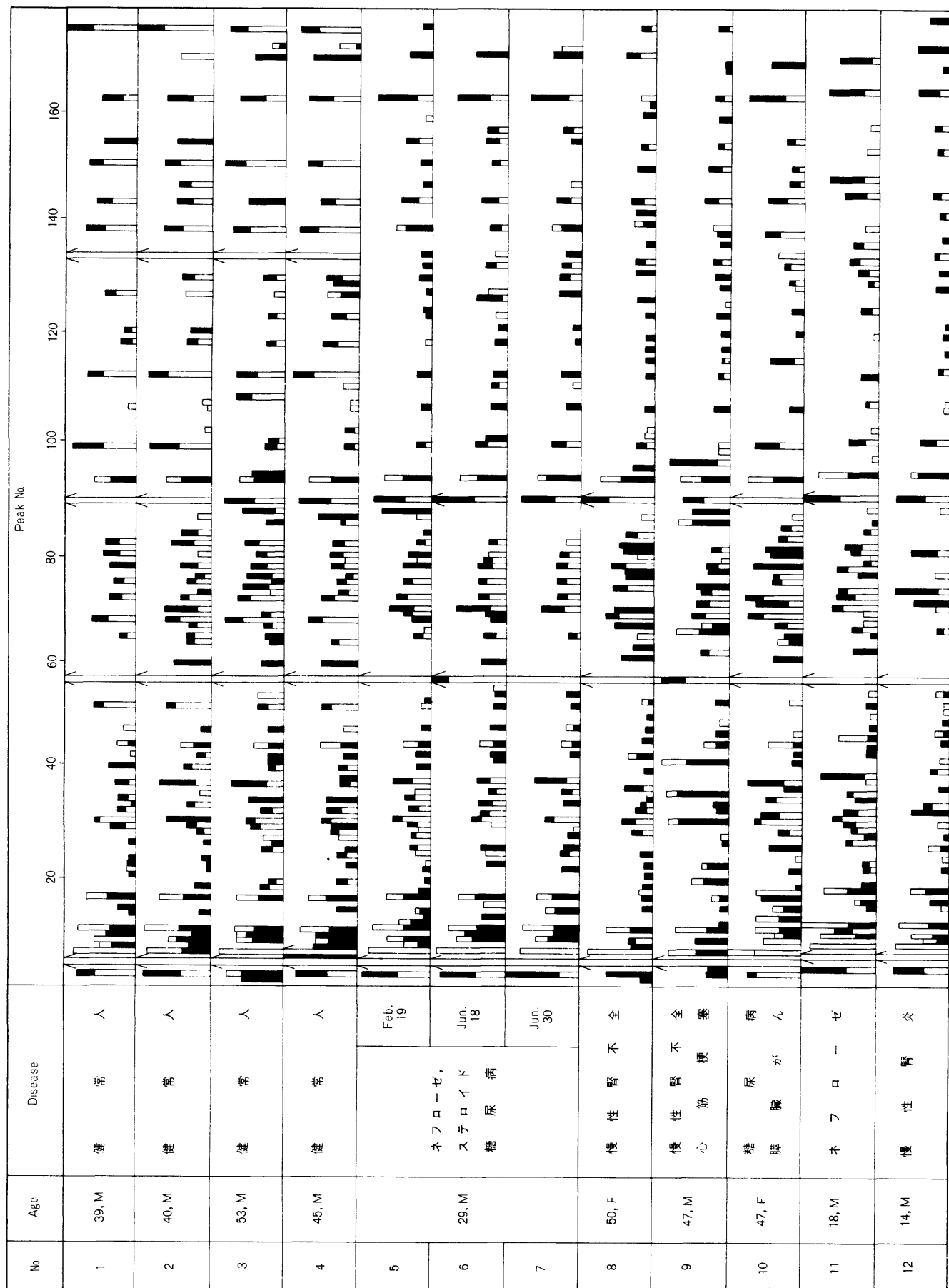


図5 健康人および各種疾患患者尿のクロマトグラムプロファイル

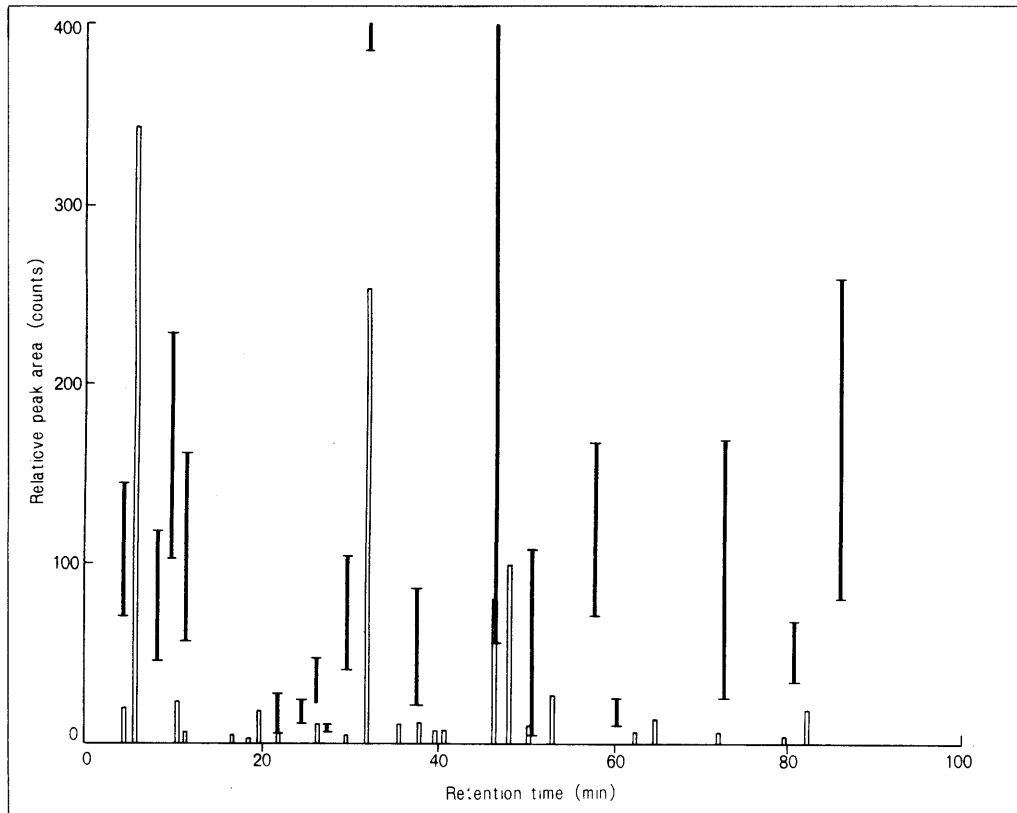


図6 腎疾患患者尿の病態データ

健康人尿40検体を分析して同定されたピークについて $\pm 2SD$ の範囲を正常域とし、腎患者尿の分析結果と比較した例を図6に示す。腎患者尿と健康人尿では検出される物質に差があるため、直接的な比較は難しいが、多くのピークが同図中に示した正常域(I)より低くなることが明らかとなり、この種の病態判定法は病態のスクリーニングなどに有効ではないかと思われる。

岡野ら⁶⁾は、逆相クロマトグラフィーで尿中紫外吸収物質を分析し、2つのピーク間の相関性をガンの診断に利用できることを報告している。この方法は、種々の病態診断に有効と思われるが、相関性を有するピーク対を見出すことは容易ではない。そこで、筆者らは健康人尿では良好な相関性を有し、疾患患者尿ではその相関性からかい離するピーク対を病態診断に利用できるものと考え、この種のピーク対を探索した。その結果、図7に示すように、ピーク番号11と135が健康人では良好な相関を有し(相関係数 $r=0.955$)、腎疾患患者などではこの相関性からはずれることが明らかになった。

5. おわりに

医用液体クロマトグラフは、分析から病態診断に利用できるデータの出力までを全自動化したものであり、分離カラム、検出器を選択することにより、各種の分析対象に対応できる。また、分析結果を病態診断に利用する手法も各種試みたが、ここではその一部を報告するにとどめた。これらの手法の有効性は、更にデータを蓄積し、医師の判定を加えた上で評価されるべきものと考えられる。おわりに、医用液体クロマトグラフの有効性が大学病院などの研究機関で実証されることを期待したい。

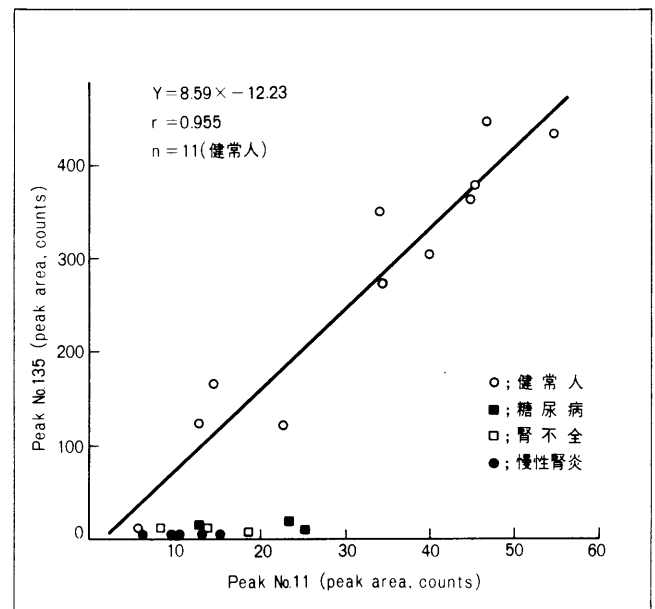


図7 ピーク間(No.11/No.135)の相関性

参考文献

- 1) L. Pauling, Science, **160**, 268(1968)
- 2) H. Miyagi et al., J. Chromatogr., **239**, 733(1982)
- 3) C. D. Scott, Clin. Chem., **14**, 521(1968)
- 4) 瀬田, 他, 分化, **27**, 73(1978)
- 5) H. Miyagi et al., Clin. Chem., **25**, 1617(1979)
- 6) 岡野, 他, 第24回液体クロマトグラフ研究会講演要旨集, **22**, 98(1981)

解 説

H-800形日立高性能200kV総合分析電子顕微鏡

上村 昌司*

(昭和57年4月6日受理)

H-800形は、透過像(以下、TEMと略す。)における高分解能化と、マイクロコンピュータ内蔵による操作性の向上と多機能化をはかり、物質の形態観察から元素分析に至るまでワンタッチで切り換え可能とした本格的な高性能200kV総合分析電子顕微鏡である。図1にその外観を示す。

次にH-800形の主な特長について述べる。図2はH-800形のレイダイヤグラムである。試料表面の情報が得られる2次電子像(SEMと略す。)の検出器、電子線が試料にあたって発生する特性X線を捕らえ元素分析を行なうエネルギー分散形X線分析(EDXと略す。)の検出器がある。また、下方には試料の走査透過像(STEMと略す。)を観察するための検出器がもうけてある。電子が試料を透過する際にエネルギーを失った電子を利用し元素分析を行なう電子線速度分析(ELS)用検出器がある。ELSはEDXで不得意とする軽元素に感度が高く、ELSとEDXを共用することにより、リチウムからウランまで全ての元素分析が可能である。

筆者らはH-800形で高性能対物レンズを開発した。それは日立の大形コンピュータを使用し有限要素法による電子光学系の計算にもとづき設計した。対物レンズは電子光学の理論と厳選された材料とNC切削加工の結合により完成したものである。対物ボールピースの球面収差係数(C_s)は1.0mm, 色収差係数(C_c)は1.2mmと世界最小である。この対物レンズにより1.02 Å(結晶格子像)の分解能が得られる(トップエントリー方式)。代表的な分解能撮影例を図3に示す。

EDXにおいてX線の取り出し角は68°と試料の上方から検出する方式を採用した。このため、試料を傾斜せずにX線分析ができるので、結晶性試料のように分析に際して方位合わせをすることができる。また取り出し角68°は水平の位置で検出する場合に比べ、約50%のP/Bが改善されると言われており、薄膜だけでなくバルブ試料の定量分析精度を向上することができた。

H-800形は200kV電顕として世界ではじめてマイクロコンピュータを内蔵し、スイッチひとつでTEM, SEM, EDX, ELSのモードがワンタッチで切り換えられる。これは、各モードで異なる7系統のレンズ条件をメモリエリアにストアし、スイッチで瞬時に最適条件を読み出すことができるからである。また、マイクロコンピュータにより新たな機能を加えることができた。主なものを次に掲げる。

- (1) 倍率を変えても像の明るさを常に一定にすることができる。
- (2) 試験面上のスポットサイズを制限し、試料損傷を防ぐ

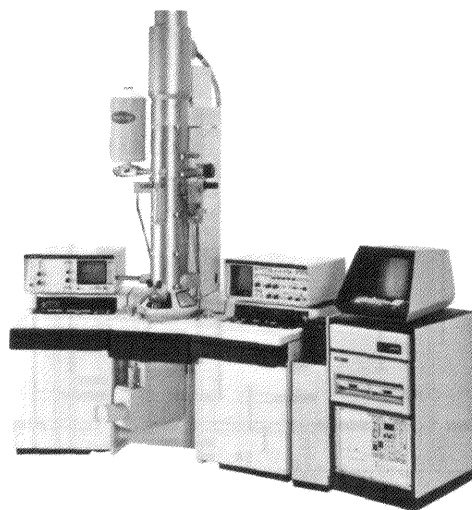


図1 H-800形日立電子顕微鏡

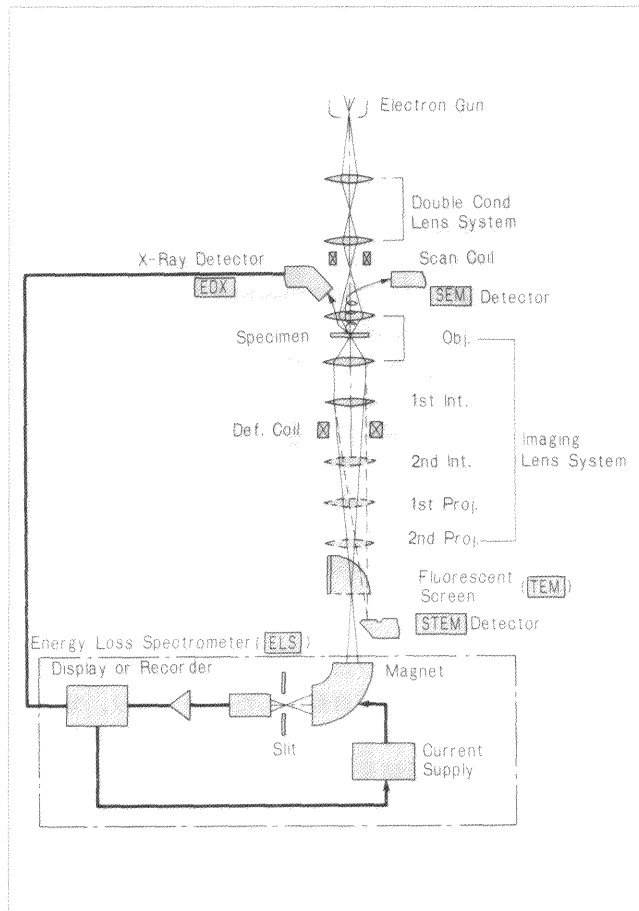


図2 分析システムのレイダイヤグラム

* 日立製作所那珂工場 電子装置設計部



図3 高分解能写真 試料：金(2.04Å ½格子間隔)の結晶格子(200)

ことができる。

- (3) 自動的にフォーカス量を変えながら写真撮影することができる(スルーフォーカス)。
- (4) 生物試料等の像に適切なコントラストを付けるオートマムフォーカスが自動的に行なうことができる。
- (5) 任意の時間、任意の明るさのどちらでも適正な露出が得られる。
- (6) アライメント系は各モード毎にプリセットが可能で再調整が不要。
- (7) 鏡体系の軸調整方法がCRTに表示され、操作が容易である。
- (8) 電頭に必要なデータがCRTに一括表示される。

像観察や元素分析を行なう場合、試料周辺のガス分子によるコンタミネーションが多いと、試料からの真の情報が得られなくなる。H-800形はコンタミネーションを極めて少なくするために、

- (1) 排気容積をできるだけ小さく、
- (2) Oリングの数を少なく、
- (3) アウトガス源を真空中におかない、

ことを目標に電子線が通る部分のみを真空排気することに心がけ、鏡体内部にステンレス製のチューブを挿入し、部品は真空外に配置するようにし高真空化をはかった。図4に鏡体の断面図を示す。図5はこの高真空鏡体構造で得られた排気特性で、再排気後約1時間で 8×10^{-7} Torr、コールドトラップに液体窒素を入れて 2×10^{-7} Torrに達する。高真空化により高輝度長寿命を特長とするLaB₆フィラメントを安定に使用することができるようになった。

従来の電子顕微鏡では倍率を変えると、像が回転する現

象があった。H-800形では、従来の形像レンズ系に1段追加して5段レンズ系とし、レンズの持つ歪を互いに補正し、かつ倍率を変えても像が回転しないようにした。図6は倍率を変えたときの像の回転する角度を表わしたもので、従来品は180°も回転している個所があるが、H-800形では全倍率で約±10°しか回転しない。

表1にH-800形の主な仕様を示す。

以上、H-800形は一層の高分解能化をはかり、100kV電顕と同じように汎用性、多機能性を持たせ、すでに実績のある安定した200kVの高電圧系を組合せることにより、幅広い研究分野で長期間安定な状態で使用できる装置と言えるよう。

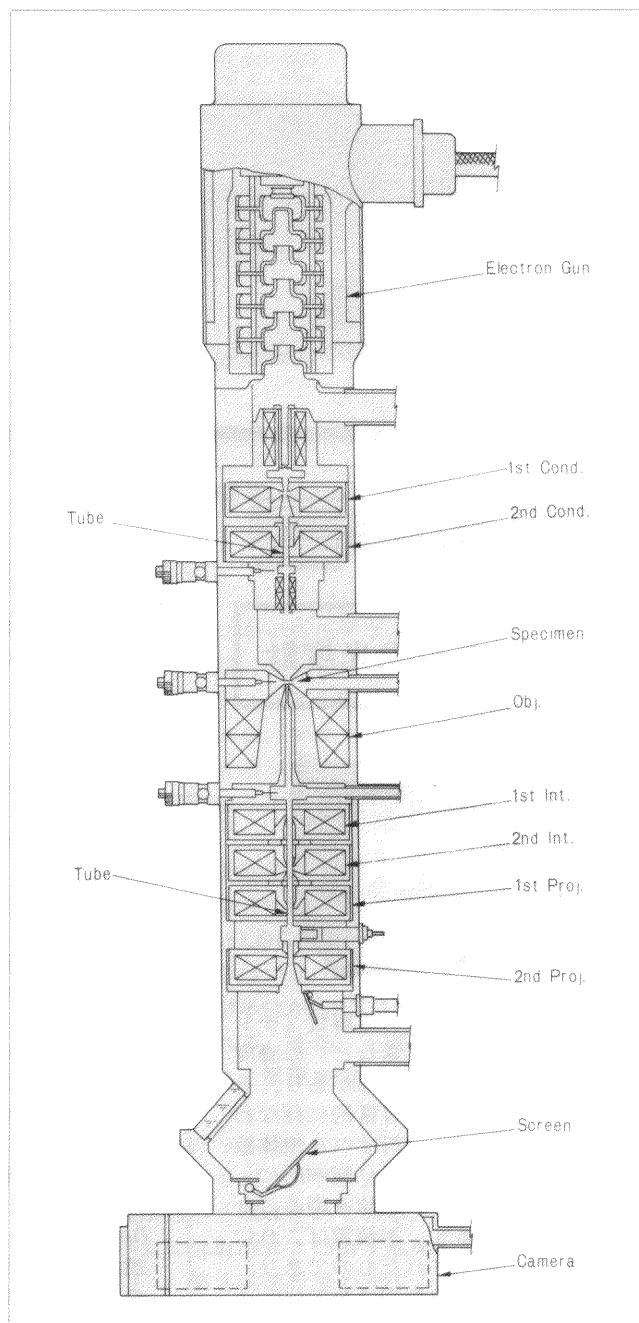


図4 H-800形の鏡体断面図

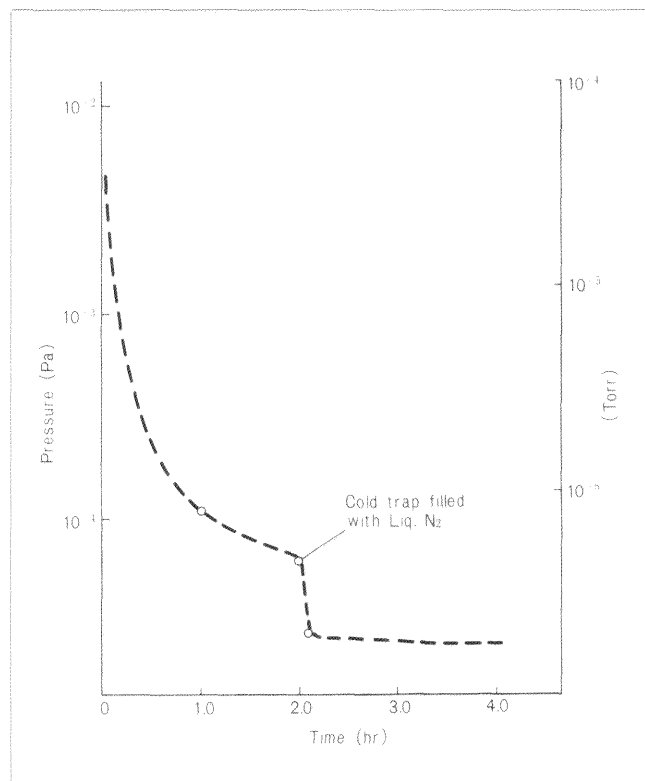


図5 排気特性

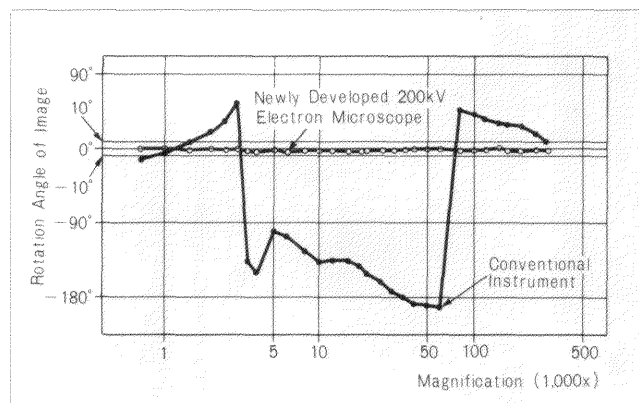


図6 各倍率における像無回転

表1 H-800形日立電子顕微鏡の仕様

Accelerating voltage :	75, 100, 150, 175, 200kV
Resolution :	TEM mode ; 1.02Å (Top)(option) 1.4Å (Side±20° TILT) SEM mode ; 30Å (Side±60° TILT) STEM mode ; 15Å (Side±60° TILT)
Magnification :	TEM mode ; 1000,000x(Top) SEM, STEM mode ; 300,000x
Analytical range of elements :	³ Li~ ⁹² U(EDX & EA)

Topics

750形日立炎光光度計



血清、あるいは尿中の電解質（ナトリウム、カリウム、塩素など）の濃度は、健康状態と密接な関係があり、その分析は臨床検査室で日常的に行なわれています。近年、分析すべき検体数の急激な増加に伴い、より能率的に、しかも信頼度の高い測定値を得ることが要求されています。本装置はこれに応えるために開発されたものであり、従来、別々の装置で測定されていたナトリウム・カリウムと塩素イオンを同時に測定できることや、管理検体を定

期的に測定した統計値によって信頼度を管理できるなど、高能率・高信頼度分析のための数々の機能を備えています。

■特 長

(1) 信頼度の高い分析値

- (a) 平均値校正による正確度の高い検量線
- (b) セシウム内部標準法によるすぐれた再現性
- (c) 正常値範囲をはずれた検体の自動再測定
- (d) 管理検体の定期的測定と統計演算機能

(2) 能率の高い測定

- (a) 炎光法によるナトリウム・カリウム測定と電量滴定法による塩素イオン測定のプロセスを同時進行
- (b) ターンテーブル上の検体の欠番と最終番を検出して、オートサンプルを自動制御。
- (c) 緊急検体の随時割込と通常検体への自動復帰

(3) すぐれた操作性

- (a) 読み易いブラウン管表示
- (b) 校正値、正常値など分析条件の選択・記憶機能によるユーザ専用プログラム作成
- (c) 分析結果の記憶機能を備え、必要部数の報告書をプリントアウト。

■仕 様

分 析 対 象	血清および尿
分 析 項 目	ナトリウム、カリウム、リチウムおよび塩素イオン（ただし、リチウムは血清のみ）
分 析 原 理	セシウム内部標準炎光法および電量滴定法
検 体 数	通常検体………40 緊急検体………15 管理検体………1
検体消費量	30μl/検体
測定所要時間	28.5秒/検体
表 示 計	ブラウン管
表 示 値	濃度(mEq/l単位)
記 録 装 置	プリンタ
測定濃度範囲	ナトリウム… 0 ~ 200 (尿の場合のみ0 ~ 100) リチウム……0.05 ~ 10 塩素イオン… 10 ~ 200
検 量 線	平均値法（ソーブスリーメソッド）により校正
校 正 間 隔	20検体毎
精 度 管 理	管理検体測定値の平均値および変動率による。
大 き さ	幅840mm×奥行720mm×高さ675mm

105形日立臨床検査用システム分析装置

小松 均* 金子 紀夫* 鈴木 忠* 杉浦 良夫*

(昭和57年4月20日受理)

1. はじめに

近年臨床検査の発展とともに、検体数と検査項目が著しく増加している。これに対応して、特に大規模な施設向けに多量検体を複数項目同時処理のできる大形自動分析装置の需要が増加している。一方、大形の自動分析装置に乗らない項目測定、中小病院等における少数検体多項目分析、特殊検査等のための小形自動分析装置の需要も増加しており、低価格で適用範囲の広い装置であることが要求されている。

従来これらの需要に対しては前処理は用手法で行ない、測定は汎用の分光光度計に試料の自動吸入装置を付属品として対処してきた。しかし、最近の情勢としてマイクロコンピュータの分析機器への導入が盛んになるにつれ、これらの付属品を標準とし操作、機能面で臨床検査専用の分光光度計に移行する動きが見られる。さらにシステムとして発展させ、前処理までも含めた小形の自動分析装置としての機能が要求されている。105形臨床検査用システム分析装置はこれらの要求にこたえるために開発された装置であり、以下に本装置の概要、基礎データおよび応用例について紹介する。

2. 装置の概要

105形臨床検査用システム分析装置(以下、105形分析装置という)は、図1に示すように、試料の前処理を行なう自動分析ユニットと試料の測定および演算を行なう分光光度計から構成されている。分光光度計にはエンドポイント測定専用の105-40形とエンドポイントおよびレート測定のできる105-50形分光光度計の2機種がある。ここでは、105-50形分光光度計を使用した分析装置についてのみ説明する。

分光光度計単体でも用手法の光度計として使用でき、また自動分析ユニットを付属するとシングルチャンネルの自動分析装置にビルドアップすることができる。

最大2試薬系までの測定が可能であり、検体量、試薬量およびインキュベーション時間は広範囲にわたって設定できるので、従来の分析装置のように試薬を固定することなく、多くの試薬および分析法をカバーできる。処理速度は試薬の種類によっても異なるが、最大90~120検体/時であり、項目切換えも試薬瓶の交換だけで簡単にできる。また、反応の終了した試料をターンテーブルに並べて、バッチ的に測定するエンドポイント分析の機能も備えている。図2に105形分析装置の構成を示し、以下それぞれの主要部分について説明する。

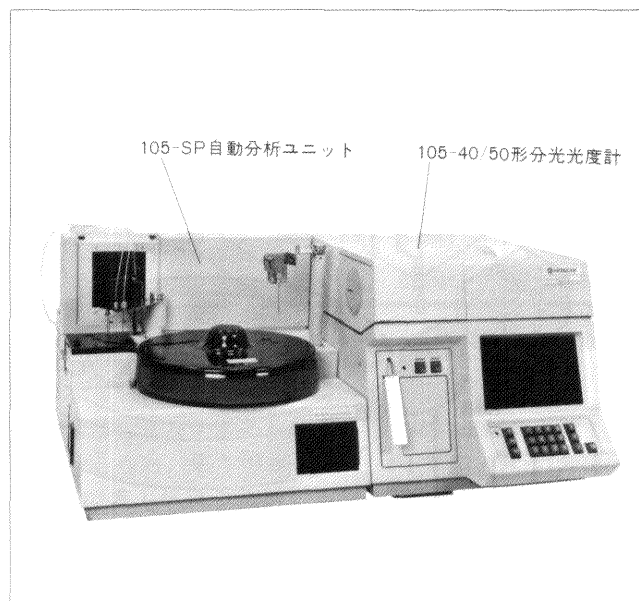


図1 105形日立臨床検査用システム分析装置

(1) 分光光度計部

光学系は安定性にすぐれたダブルビーム方式を採用している。2光束の分割にはインコネルを蒸着したハーフミラーを使い(回転ミラーなどの可動部分が一切ない)、装置の信頼性を高めている。フローセルはバイレックスガラス製で、試料はしごきポンプでフローセル内に導かれる。フローセル内の試料はペルチェ素子で温度コントロール(25°, 30°, 37°C)される。

分光器から出た単色光はフローセルを透過し、フォトセルに照射される。光信号はフォトセルで電気信号に変換され、その出力信号はLOG変換器で吸光度に変換される。吸光度変換された信号はマイクロコンピュータで処理され、吸光度、濃度および単位がCRTに表示されると同時に、プリンタにも印字される。また、一度入力したパラメータはメモリーに記憶され、電源を切っても記憶内容は確実に保持される。

(2) 自動分析ユニット部

分注アーム、 SHIPPINGアーム、ターンテーブル、シリンジの各機構部から構成されている。

分注アームには血清および第1試薬を分注するための分注ノズル(1)、第2試薬専用の分注ノズル(2)がある。また、第2試薬の添加と同時に、反応液をかくはんするためのかくはん装置が付いている。アームは回転と上下運動を

* 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

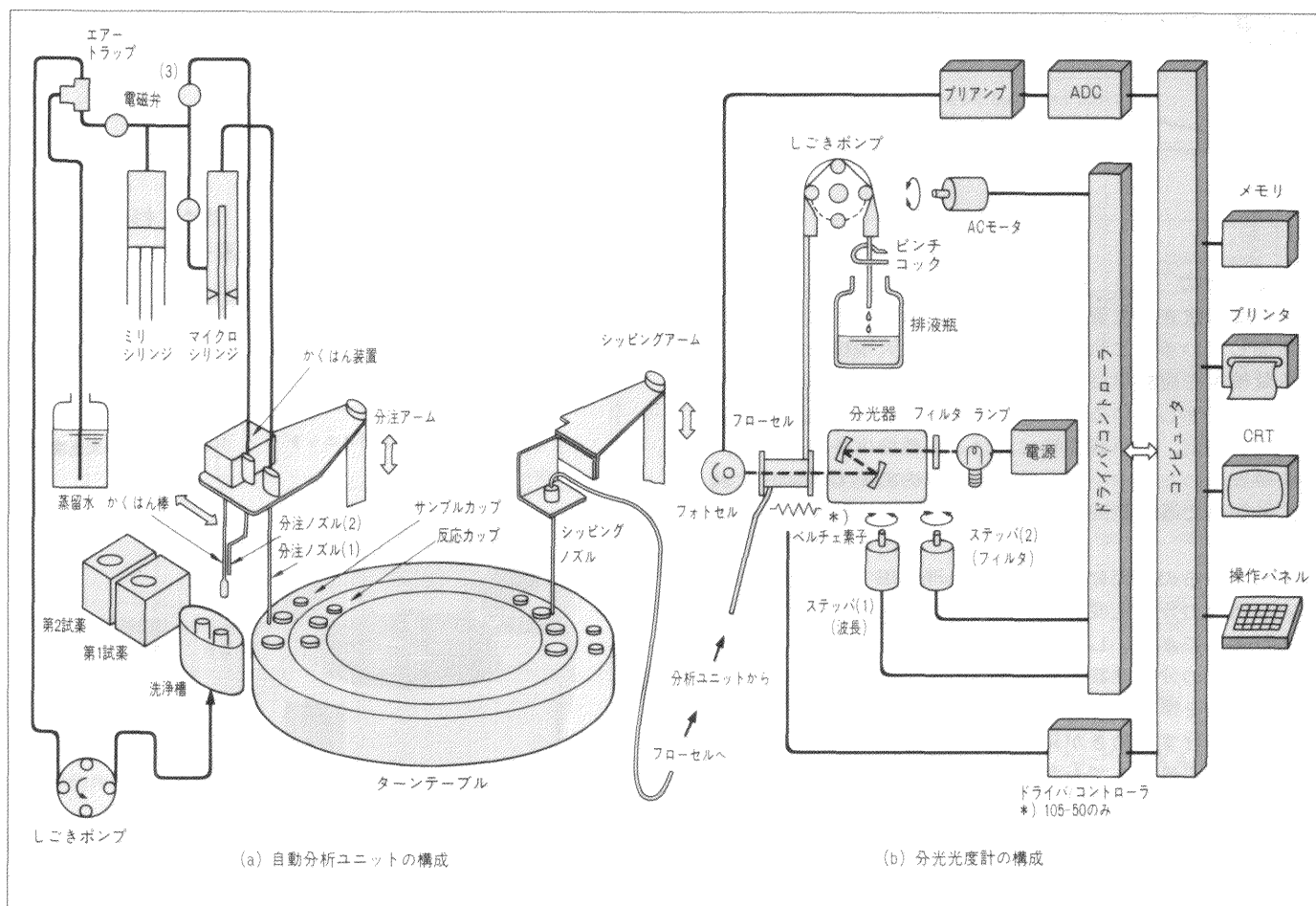


図2 105形日立臨床検査用システム分析装置の構成

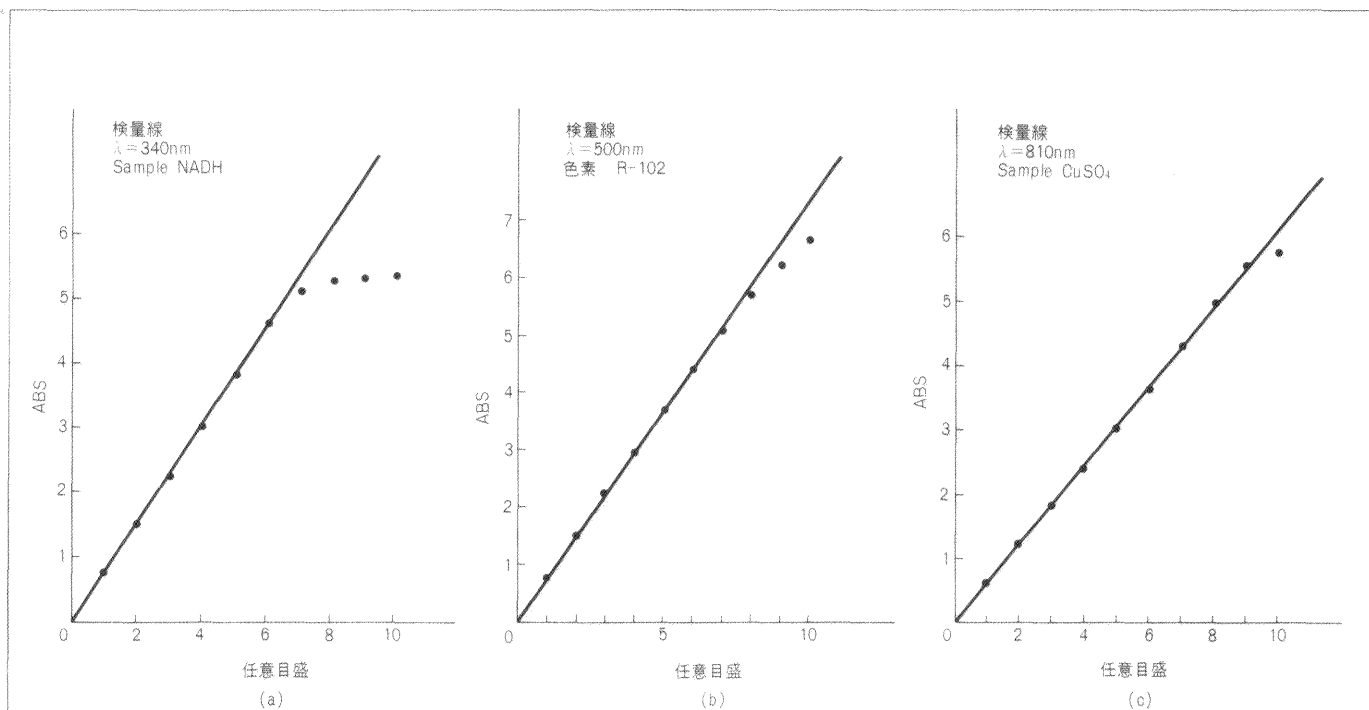


図3 光度計の直線性

行ない、各ノズルを試薬槽—洗浄槽—サンプルカップ—反応カップの各箇所に移動させる。

シリンジはミリシリンジとマイクロシリンジの2本を備えており、電磁弁(1)～(3)を切換えることによりミリシリンジは試薬の分注に、マイクロシリンジは血清の分注にそれぞれ使用される。

ターンテーブルはサンプルカップ(40個)、反応カップ(10連、4個)を乗せて正転逆転する。このことにより、従来の単方向回転では困難だったインキュベート時間に広い融通性をもたすことができる。

洗浄槽の中の蒸留水は分析中にノズルの内側と外側とを洗浄し、汚染を防ぐ。シッピングアームは上下運動をして反応の終了した試料の中にシッピングノズルを差し込み、フローセル内に試料を吸入する。また、前処理なしのモードとしてバッチ式のエンドポイント分析を行なう時は、試料を入れた容器(市販の外径12mm、長さ105mmの試験管を使用)をターンテーブルのサンプルカップの位置に並べて測定する。

3. 基礎データ

(1) 光度計の直線性

波長340nm, 500nm, 810nmにおける光度計の直線性試験の結果を図3に示す。また、図4はにごりのある試料の検量線で試料として牛乳を用いた。

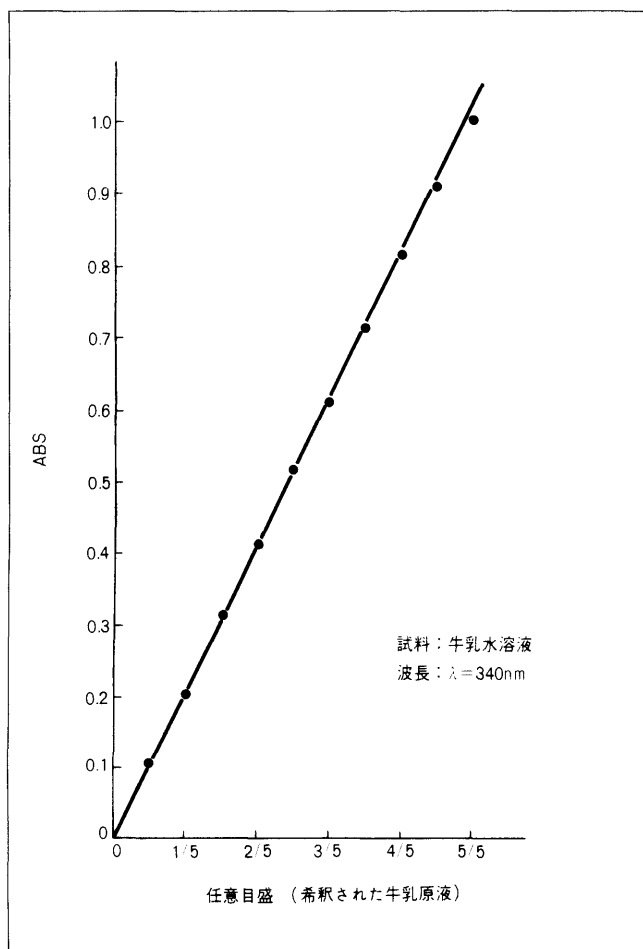


図4 にごり試料の検量線

表1 第1試薬分注量の正確度

設定量 (ml)	分注量 (ml)	誤差 (%)	標準偏差 SD	変動係数 CV(%)
1.25	1.237	-1.0	0.0018	0.15
1.00	0.981	-1.9	0.0015	0.16
0.50	0.491	-1.8	0.0017	0.34

表2 第2試薬分注量の正確度

設定量 (ml)	分注量 (ml)	誤差 (%)	標準偏差 SD	変動係数 CV(%)
0.50	0.502	+0.4	0.0012	0.25
0.30	0.305	+1.7	0.0011	0.37
0.10	0.107	+7.0	0.0007	0.72

(2) 試薬分注量の正確度と再現性

重量法によって求めた試薬の分注量の正確度を表1, 2に示す。なお、第1試薬の測定は1本のノズル(分注ノズル(1))に第1試薬と血清の両方を吸入するので、血清の代りに空気を吸入させて測定を行なった。

(3) フローセルの温度応答

自動分析ユニットの反応槽で、37°Cにインキュベートされた反応液を吸入した時のフローセル内の温度応答を図5に示す。試料はフェノールレッドのトリスバッファ溶液を用いた。

4. 入力パラメータ及びデータ印字

図6, 7にプリンタに印字された入力パラメータ及びデータの印字例を示す。

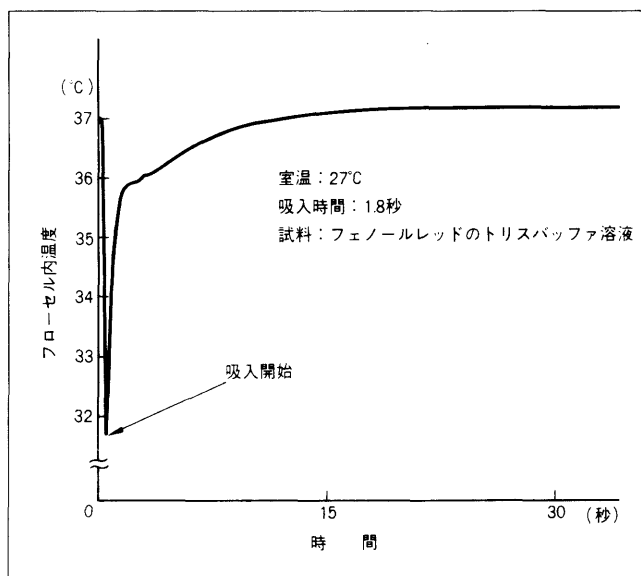


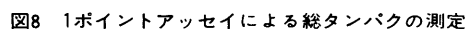
図5 フローセル内の温度特性

図6 入力パラメータ例

図7 データ印字例

日立705形自動分析装置と105形分析装置で得られたデータの相関について、図8～11に示す。いずれも良好な相関が得られている。

(1) 1ポイントアッセイの応用例



(2) 2ポイントアッセイの応用例

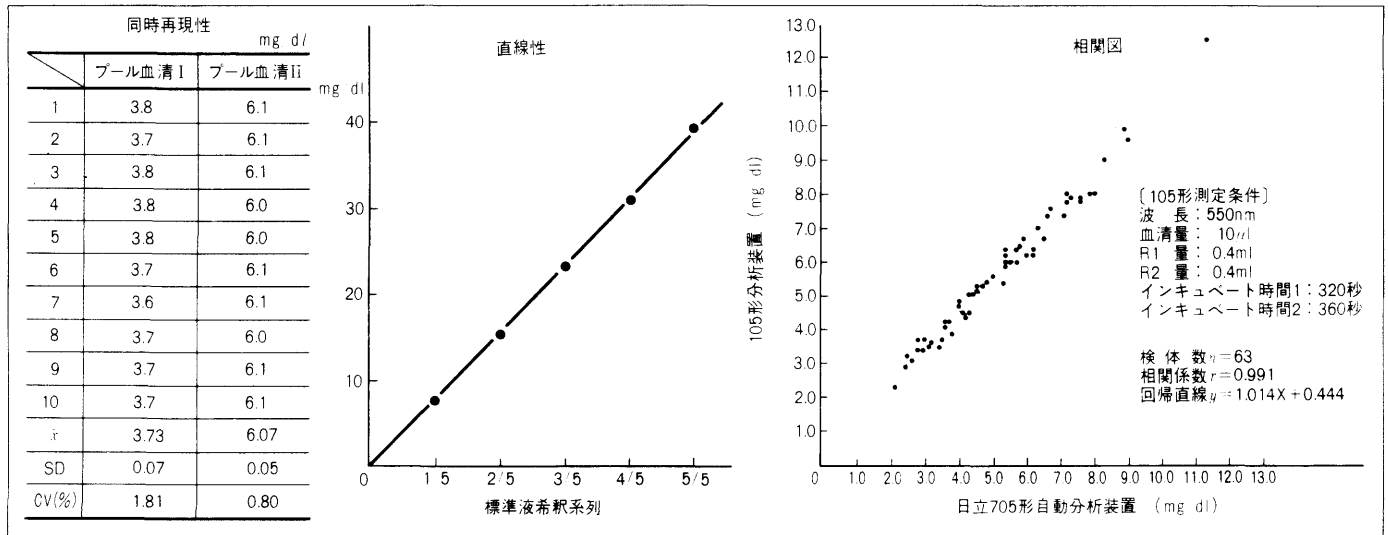


図9 2ポイントアッセイによる尿酸の測定

(3) 2液レートアッセイの応用例

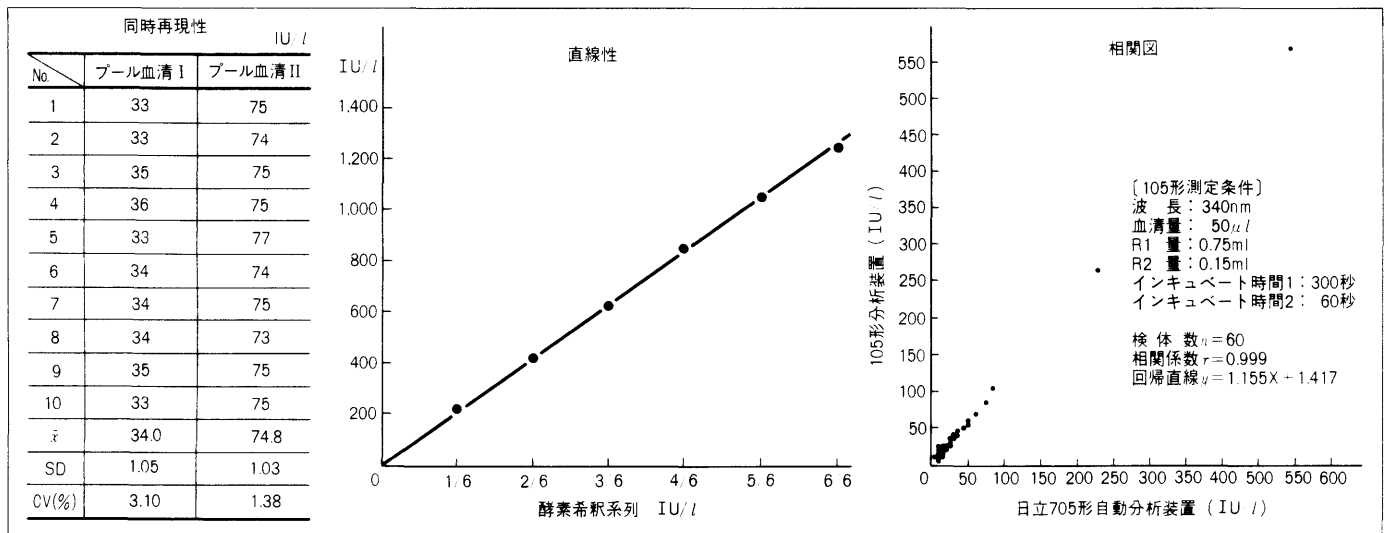


図10 2液レートアッセイによるGOTの測定

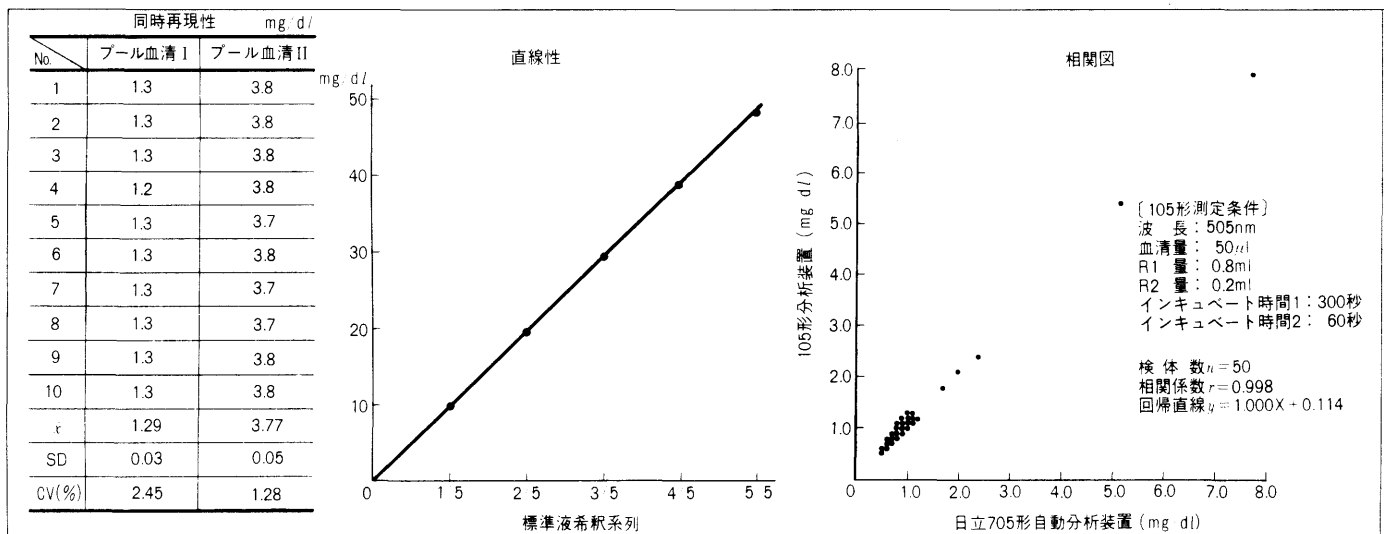


図11 2液レートアッセイによるCREの測定

6. おわりに

以上、105形臨床検査用システム分析装置の概要および基礎データとその応用例について簡単に紹介した。この装置は臨床検査専用の分光光度計から発展し、分析ユニットを付属としてシングルチャンネルの自動分析装置へと発展できる。また、従来の分析装置と異なり試薬を固定しないので、多くの試薬および分析法がカバーできる。また、光

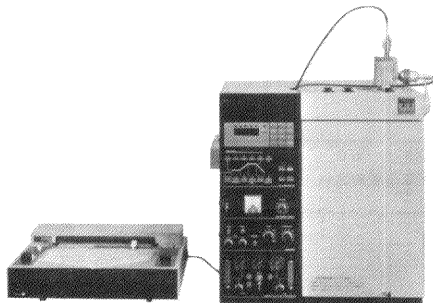
度計としての高い性能をもっているため、信頼性のあるデータが確保でき、自動分析装置のバックアップ、緊急検査、特殊検査等幅の広い用途が期待できる。

なお、本応用例のデータは第一化学薬品(株)殿の御好意により提供していただいたものである。ここに感謝の意を表わし、厚く御礼申し上げる。

Topics

日立ガスクロマトグラフ用 光イオン化検出器(PID)

従来、無機ガスの測定には、熱伝導検出器(TCD)を使用していましたが検出感度に限界があり、数十ppm以下の微量分析ができないことがありました。そこでこのたび、特に無機ガス成分を高感度に測定することを目的とし、光イオン化検出器(PID)を開発しました。このPIDには、ヘリウム雰囲気中での放電により、遠紫外線を出す日立独自



の方式を採用しています。また、この検出器はコレクタ室と放電室を分離させ、試料ガスによる放電室の汚染を防止する構造になっていますので、数ppmの微量ガスを長時間安定して検出します。

■特 長

- (1) 無機ガスに対して、従来のTCDより約50倍以上高感度を示します。

- (2) PIDのみを用い、微量無機、有機混合試料を測定できます。
(3) 放電電極は試料ガスに触れない構造ですので、電極の汚染がありません。
(4) PIDは非破壊形検出器ですので、他の検出器との接続により同時検出もできます。

■仕 様

最小検出濃度 1ppm(N₂/He 1ml/注入時)

直 線 性 10⁴ (0-Xylene)

常用使用温度 250°C

最高設定温度 350°C

放電電圧ノッチ 500, 550……1,000 V (50 V間隔)

放電電流指示 0~1mA (メータ表示)

注：キャリアガス及び放電ガス流路内に残留する空気成分を、バージするリークバルブを標準に装備しています。

日製産業株式會社

本社別館 電話 東京(03) 504-7211
四国出張所 電話 高松(0878) 62-3391<代>
名古屋支店 電話 名古屋(052) 583-5841
仙台支店 電話 仙台(0222) 64-2211<代>
沖縄出張所 電話 那覇(0988) 78-1311~7
新潟出張所 電話 新潟(0252) 41-3011<代>

横浜出張所 電話 横浜(045) 671-5421
京都出張所 電話 京都(075) 241-1591
広島支店 電話 広島(082) 221-4514<代>
秋田出張所 電話 秋田(0188) 64-2244
札幌支店 電話 札幌(011) 221-7241<代>

大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
筑波営業所 電話 土浦(0298) 23-7391
岡山出張所 電話 倉敷(0864) 25-1316
九州支店 電話 福岡(092) 721-3501
富山支店 電話 富山(0764) 24-3386<代>

<編集後記>

- 本号の報文では、千葉県衛生研究所の佐二木先生に、バックグラウンドの大きな、臓器中のヘム蛋白の定量に、二波長分光測光法を応用し、良好な結果が得られた例について報告して頂きました。
- 本ニュースは、日立理化学機器をお買上げ頂いた方々には、全てお送りすることになっています。もし、貴殿のお近くに、受取っておられない方がありましたらご一報下さい。直ちに新規に名簿に登録し、以後継続的にお送り致します。

- 日立理化学機器による報文のご投稿を歓迎致します。
- 本ニュースに関するお問合せは、下記へ、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。
- 株式会社 日立製作所 那珂工場 応用技術センター
茨城県勝田市市毛882番地
〒312 電話 水戸(0292) 73-2111<代>
- 日製産業株式会社 マーケティング部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号 第17森ビル
〒105 電話 東京ダイヤルイン(03) 504-7187

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS SUMMER 1982 Vol.25 No.2

発行 昭和57年7月1日
(年4回 発行)
発行人 湯川 清
編集人 中嶋康雄 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
電話ダイヤルイン 東京(03) 504-7866
印刷所 日立印刷株式会社