

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 AUTUMN 1984
VOL.27 NO.3

U.D.C. 577.17.083.3.086.2/.3

目次

免疫分析特集

 免疫組織化学によるホルモン局在
の証明, 特に免疫電顕法の「同
一切片対応法」への応用………
……………渡 伸三… 1

 生体系におけるヘマトポルフィリ
ン誘導体(HpD)の蛍光スペクト
ルの測定法と解析……………
三好憲雄 久住治男 嶺岸久子… 6

 蛍光偏光法——免疫学, 生化学へ
の応用を中心として……………
……………前田 浩 小田達也…10

 自動分析装置による測定……………
……………牧口恭子 野村 靖…15

 マイクロタイタープレートを用い
る蛍光免疫測定法……………
渡来 仁 保田立二……………18

解 説

 光学素材の透過・反射スペクトル
の測定……………小森律夫
内野興一 皆川定雄 遠山恵夫…22

トピックス

 日立原子吸光分光光度計
グラフィートアトマイザ用
オートサンブラ……………21

日立カラーセンサシリーズ……………21

 日本電子顕微鏡学会
第40回学術講演会開かる……………28

第45回分析化学討論会開かる……………28

第9回アナリチカ展……………14

免疫分析特集

免疫組織化学によるホルモン局在の証明, 特に 免疫電顕法の「同一切片対応法」への応用

Ultrastructural identifications of hormone localizations using the immunohistochemistry and immunocytochemistry, especially an application of one-section method

渡 伸三*

(昭和59年7月20日受理)

1. はじめに

われわれは形態学的にホルモンの産生細胞の同定を行なっているが、一般の染色法による光学顕微鏡の観察でも、ある程度、細胞の特殊顆粒の染色性によって細胞を区別することが出来るが、しかし、その超微形態の観察は光顕では分解能が低く不可能であった。一方、電子顕微鏡を駆使してホルモン産生細胞を観察すれば、その分泌顆粒や細胞小器官の特徴からその細胞の同定は可能であるが、残念ながら電顕写真は一般に白黒であって、光顕所見と必ずしも一致しないうらみがあつた。そこでわれわれはさらに、「隣接切片対応法」¹⁾あるいは「同一切片対応法」²⁾という方法で、光顕と電顕のそれぞれの利点を生かす研究法によって、それぞれの欠点をカバーし、細胞の同定を行なつて来た。しかし、例えば脾臓ランゲルハンス島のいわゆるA細胞の分泌顆粒に、果してグルカゴンが存在するか否か、あるいはまたB細胞にインスリンが含まれているか否かといえ、的確にイエスと言い切れないうらみがあつた。そこで登場したのがホルモンの組織化学的検出法である。例えば(1)ホルモンやホルモンと結合している担体物質をある染色法によって一定の色に染色してホルモンを同定する組織化学ないし細胞化学的方法、(2)蛍光色素をホルモンやその担体に結合せしめて蛍光顕微鏡で同定する方法、(3)アイソトープをホルモンの前駆物質に結合せしめて、動物に投与して、そのアイソトープの組み込まれたホルモンを細胞内局在として証明するラジオ・オートグラフィー (radioautography) の方法、および(4)免疫組織化学的方法などがそれである。

われわれも最近、この内の(4)免疫組織化学的方法、特に免疫電子顕微鏡学を応用して、ホルモン産生細胞の同定を試みているので、その一部についてご紹介したいと思う。まだ研究が緒にすぎたばかりであるので、むしろ、この方面の先駆者のご教示を賜り度く、あえて執筆した次第である。

2. 免疫組織化学の原理と方法

細胞や組織の構成成分の分析は、今まで一般の組織化学的手法にたよっていたが、これらの方法は特異性に乏しく、また同定しうる物質にも限度があり、また手技も同定する物質によって相違があるなどの欠点が指摘されていた。この欠点をカバーすべく考案されたのが免疫組織化学である。組織あるいは細胞中の特定の物質(抗原、

*名古屋市立大学医学部教授(解剖学) 医博

antigen) に対する抗体をあらかじめ作製して、この抗体に可視的な蛍光色素を標識して反応せしめれば、組織ないし細胞内で抗原-抗体反応が起って、抗原の所在部位は蛍光を発して認められる。この様な原理からまず蛍光抗体法が Coons³⁾ により開発された。その後、蛍光物質の代りに可視的な酵素(ペルオキシダーゼなど)を標識する酵素抗体法⁴⁾ やさらに電顕的に証明しうるフェリチン抗体法⁵⁾ およびプロテインA-金コロイド法⁶⁾ などが次々と開発された。以下、それらの原理や方法について簡単に紹介する。

2.1 蛍光抗体法 (immunofluorescence technique)

抗体あるいは抗原のどちらかを蛍光色素で標識して、組織切片内で、抗原抗体反応を行ない、蛍光顕微鏡で蛍光反応を観察すれば、抗原あるいは抗体の有無や局在が証明される。一般的には、組織や細胞内に局在する抗原を検出するため抗体に蛍光色素を標識するが、抗体を産生する細胞内においてその抗体の局在を証明するためには、それに対する抗原を蛍光色素で標識しなければならない。この方法を特に蛍光抗原法という。蛍光抗体法に用いられる蛍光色素としては、普通、フルオレスセインイソチオシアネート (FITC) やローダミンイソチオシアネート (RITC) などがある。

蛍光抗体法には直接法 (direct method) と間接法 (indirect method) とがある^{11), 15)}。

(1) 直接法: 同定しようとする抗原に対して、蛍光色素を標識した特異抗体を反応せしめて、抗原の所在を証明する方法である。これも反応は敏感であるが、さらに感度を上げるために開発されたのが間接法である。

(2) 間接法: まず抗原を同定するために第1抗体 (特異抗体) を結合させた後に、さらに抗免疫グロブリン抗体 (第2抗体) に蛍光色素を結合させたものを反応させ、間接的に抗原の局在を同定しようとする方法である。直接法よりもさらに感度は高く、また蛍光色素で標識した抗免疫グロブリン抗体は1抗原に限らず、他の抗原の同定にも応用出来るので、この方法は最も一般的に用いられる方法である。

2.2 フェリチン抗体法 (immunoferritin technique)

電子散乱性の高い物質フェリチンなどを抗体に結合せしめて、抗原の局在を知ろうというアイデアで⁵⁾、この方法によって電顕的にも、免疫学的物質の局在を知ることが出来るようになった。フェリチンは電子顕微鏡で可視的であるばかりでなく、フェリチン粒子と抗体分子とが等モル結合を行なうので⁷⁾、組織内で完全に抗原抗体反応が行なわれたならば、抗原を定量的に測定することも可能であるという利点がある。ただし、フェリチン標識抗体はかなり分子量が大きく、強拡大の写真でその局在を云々する場合には多少の問題があるという⁸⁾。これをカバーするために考案されたのが次の酵素抗体法である。

2.3 酵素抗体法

酵素抗体法は、1966年に Nakane⁴⁾ により考案された免疫組織化学であって、前記した蛍光抗体法の蛍光色素の代りに、酵素を使用するもので、酵素として、例えば西洋ワサビの horseradish peroxidase を用い、これと抗体とを結合させて標識抗体とし、組織中の抗原と反応させた後、peroxidase の活性を Graham と Karnovsky (1966)⁹⁾ の方法で染色し、

電顕で観察する。この方法は、電顕的にホルモンの局在を証明しうる方法として開発されたが、(1) 光顕的にも応用が可能であるし、(2) 標本が半永久的に保存出来、また (3) 対照染色も可能であり、有利の点が多い¹⁴⁾。ただし、フェリチン抗体法に比べ、酵素抗体法の場合、抗体分子が等モル結合せず (抗体1分子に peroxidase は1分子前後結合するという)¹⁰⁾、定量測定には難点がある。

2.4 ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ法 (PAP法)^{11), 17)}

PAP法は初め抗原に対して一次抗体を反応せしめ、これに未標識の二次抗体を反応させる。次いで、一次抗体を作製した動物と同一種類の動物を用いてペルオキシダーゼを抗原とする抗体 (二次抗体) を作製し、これとペルオキシダーゼを反応させ抗原抗体複合体として置き、これを前記の未標識の二次抗体を反応させた組織切片に反応させると、複合体は二次抗体と結合する。そこでペルオキシダーゼを基質と反応させ、染色すれば、抗原の局在が証明される。

2.5 プロテインA-金コロイド法^{6), 12)}

フェリチン抗体法や酵素抗体法などが開発されて、免疫組織化学も超微形態的に応用され、ペプチドホルモン産生細胞の同定に著々成果を挙げて来たが、これらの方法はやや繁雑のきらいがあり、一般的でないうらみがあった。そこで登場して来たのが、表記のプロテインA-金コロイド法で、この方法は手技が極めて簡単である他、金粒子の大きさを揃えることによって、その大きさの差を利用して、同一細胞内の2つの抗原ないしホルモンの同時に証明することも可能となった。

プロテインAは黄色ブドウ球菌の細胞壁に含まれる塩基性の蛋白で、分子量は41,000 (市販のもの) である¹¹⁾。このプロテインAはIgGのFc部分と高い親和性を持つので、IgGにこれを標識して使用すれば二次抗体として使用しうる訳である。この場合、プロテインA1分子はIgG2分子と結合しうる¹³⁾。しかし、これは動物の種類によりあるいはIgGのサブクラスによって多少異なるので注意を要する¹¹⁾。

一方、コロイド金は、親水性コロイドで塩化金酸を還元することによって得られ、負に電荷している。還元剤には種々のものがあり、これをうまく利用することによって、直径3~150nm大のコロイド金が得られる。プロテインAはIgGよりも小さく、またコロイド金の粒子もフェリチン粒子より小さいので、その分解能は極めて良い。さらにプロテインA-金コロイド複合体 (PAG) の超薄切片への非特異的反応も極めて少ないのが特徴的である。

3. われわれ研究室で実際行なっている方法と成果

以上、簡単に、代表的な免疫組織化学の原理と方法について述べたが、さらにわれわれ研究室で行なっている実際の方法と成果についてご紹介して見よう。

3.1 免疫組織化学の「同一切片対応法」への応用¹⁶⁾

最初に一寸ふれた様に、われわれの教室では、古くから同一切片を光顕と電顕で観察する「同一切片対応法」を行なっている²⁾。免疫組織化学が、この研究に応用出来ればと思い開発したのがこの方法である¹⁶⁾。

(1) ラットの臓器やブタの十二指腸など、内分泌細胞の含まれる組織を採取して、Bouin液に投入し、4°C、2時間固定を行なう。

- (2) PBS液 ($\text{NaCl } 8.0\text{g} + \text{KCl } 0.2\text{g} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 1.15\text{g} + \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } 0.2/\text{l}$, pH 7.4, $9.6 \times 10^{-3}\text{M}$) にて2時間洗滌。
- (3) 50%エタノール中に1晩浸漬
- (4) 型の如くパラフィン包埋して， $5\mu\text{m}$ 厚の切片とし，スライドガラスに貼布。
- (5) 脱パラフィンした切片をPBS液で3回5分ずつ洗滌し，間接酵素抗体法を施す。
- (6) 検出する細胞の種類によって，あらかじめ用意した抗

血清（抗グルカゴン，抗インスリン，抗ソマトスタチン，抗グストリンなど）を第1抗体として反応せしめる。反応は 37°C で1時間，または 4°C で一昼夜。

(7) 次いでPBSで3回洗滌した後，HRPを標識した第2抗体（Anti-rabbit IgG-goat IgG-pox）を反応せしめる。

(8) そして最後に，PBS液で洗滌した後，基質溶液（3,3'-ジアミノベンチジン^{*1} 20~30mgを，0.005%の割合に H_2O_2 を含んだpH 7.6, 0.05Mのトリス緩衝液の100mlに溶解）に

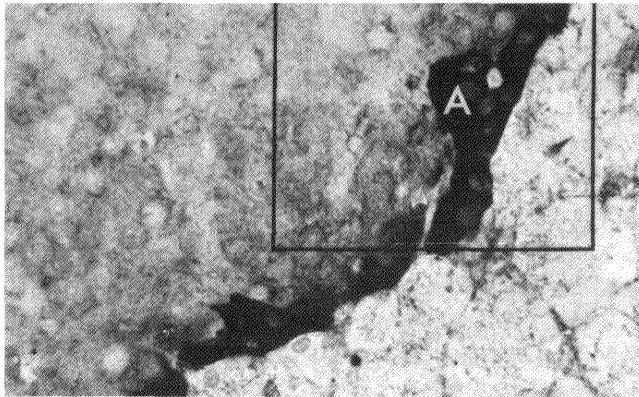


図1 ラットの膵島に酵素抗体法を施した光顕写真。A細胞（抗グルカゴン血清を作用）は黒く染色されている（A）。（ $\times 500$ ）

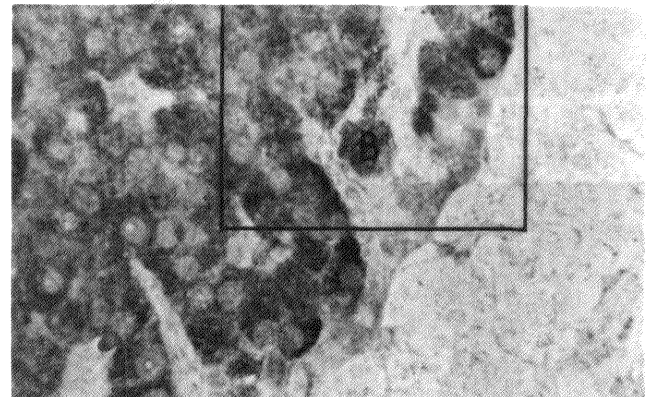


図4 ラット膵島に酵素抗体法を施した光顕写真。B細胞（抗インスリン血清を作用）は黒化して見える（B）。（ $\times 500$ ）

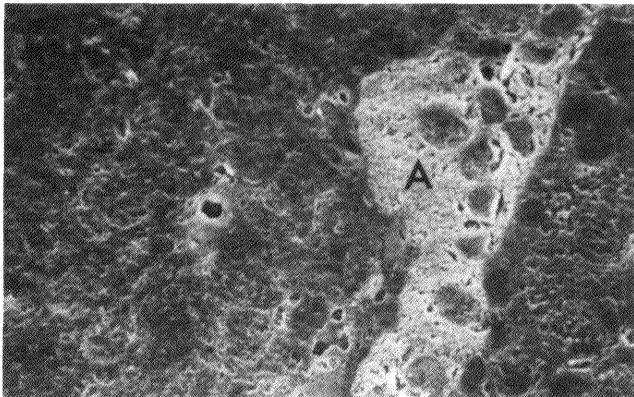


図2 同一切片を走査電顕で観察。A細胞(A)は白く光って見える(A)。（ $\times 1,000$ ）

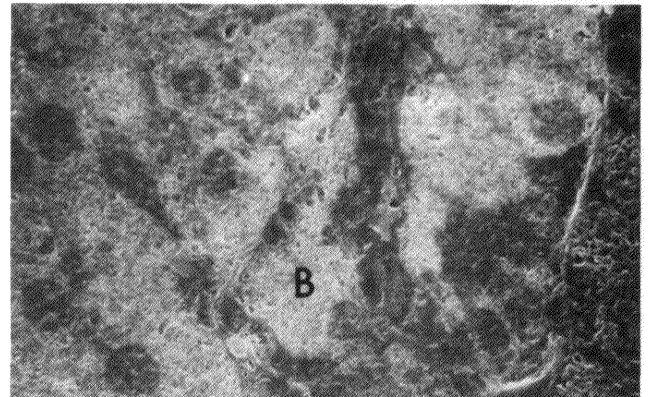


図5 同一切片を走査電顕で観察。B細胞(B)は白く光って見える。（ $\times 1,000$ ）

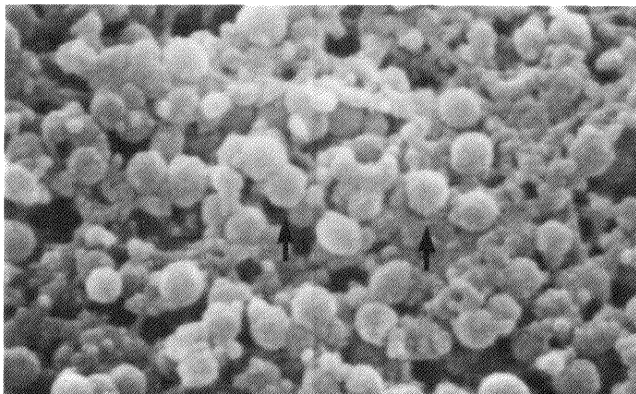


図3 同強拡大写真。A顆粒（矢印）や細胞小器官が良く認められる。（ $\times 19,000$ ）

浸漬して，染色を行なう（室温で約30分）。

(9) PBS液で洗滌した後，グリセリン-カーボネートで封入して光顕で観察。

(10) 必要な部分をカラー写真に撮影する（反応産物は褐色に染まって見える）（図1,4,6,8）。

(11) カバーガラスを，切片を痛めない様にはがして，水洗しグリセリン-カーボネートを取る。

(12) Auでイオン・コーティングし，切片のある部分のみをガラス・カッターで切断して，走査電顕用の試料台に接着剤で貼布し，走査電顕（日立製S-450型）で観察，光顕写真と同一視野を撮影（図2,5,7,9）。必要に応じ，強拡大写真を撮る（図3）。

(13) 光顕と電顕の写真を比較検討し，細胞の同定を行なう。この方法によってラットの膵臓ランゲルハンス島内の3種

* 1 3,3'-ジアミノベンチジンは現在市販されていないので，代りに塩酸3,3'-ジアミノベンチジンを使用すると良い。

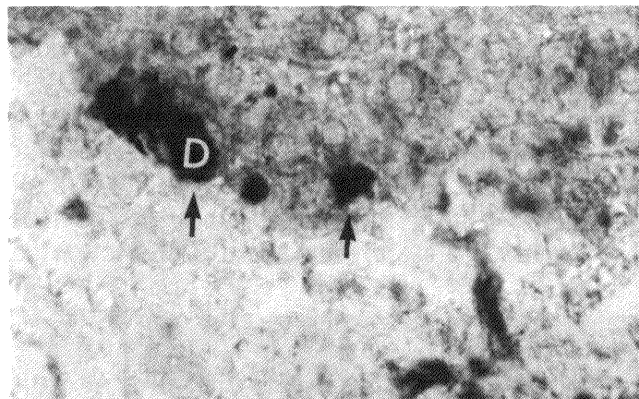


図6 ラットの膵島に酵素抗体法を施した写真。D細胞（抗ソマトスタチン血清を作用）は黒化して認められる（D, 矢印）。(×500)

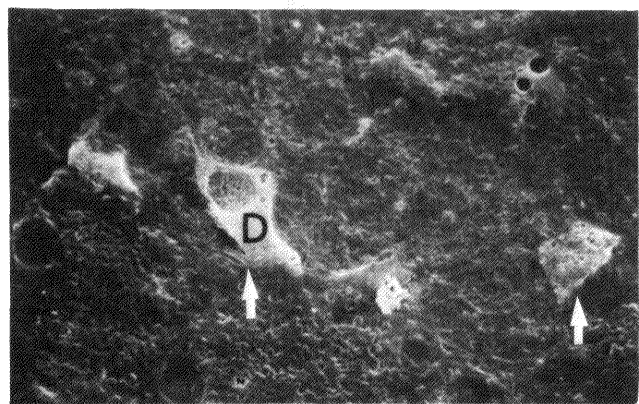


図7 同一切片を走査電顕で観察。D細胞(D, 矢印)は白く光って見える。(×1,000)

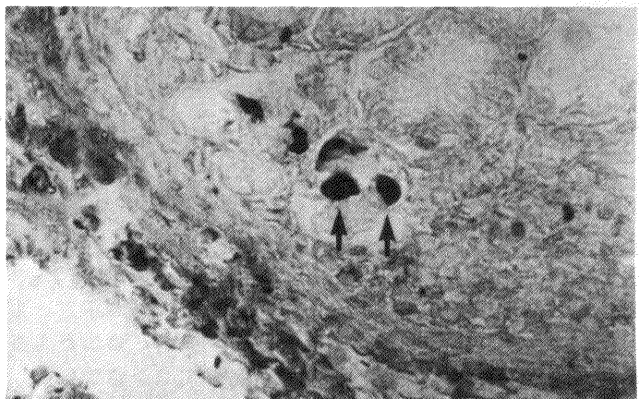


図8 ブタ十二指腸のガストリン産生細胞（G細胞）の酵素抗体法による証明（光顕写真）。G細胞（抗ガストリン血清を作用）は黒化して見える（矢印）。(×500)

類の細胞種（グルカゴン産生A細胞、インスリン産生B細胞およびソマトスタチン産生D細胞）およびブタの十二指腸粘膜内のガストリン産生細胞が光顕では色彩的に区別され（図1, 4, 6, 8）、電顕では超微形態的に区別された（図2, 3, 5, 7, 9）。電顕的にはDABによる反応部分が、特異的に二次電子を放出して、光って良く認められた。また、強拡大にすると分泌顆粒や粗面小胞体など細胞小器官も明瞭に認

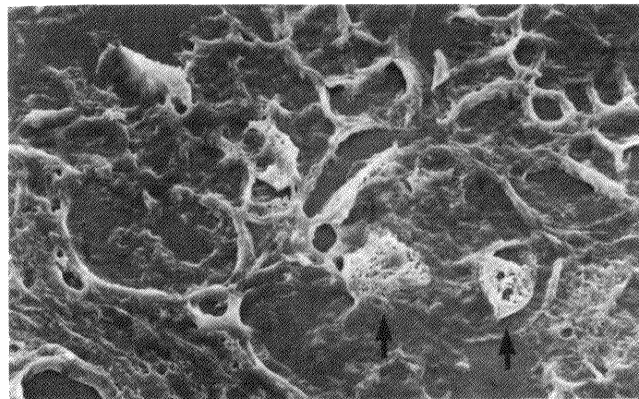


図9 同一切片の走査電顕写真。G細胞（矢印）は白く光って見える。(×1,000)

められた（図3）。

(14) さらに、走査電顕で観察した切片は、エポンに再包埋して、超薄切片となし、透過電顕で観察すると、やはり分泌顆粒が明瞭に認められ、分泌顆粒の周辺部が強く、DAB反応陽性である事が解った（図10）。

3.2 プロテインA-金コロイド法の応用

原理と方法の項で述べた如く、プロテインA-金コロイド法(PAG法)は比較的たやすく出来るので、使用価値がある¹²⁾。ただし、一定の大きさのコロイド金を作る場合には、それ相当の手間がかかるので、われわれは取あえず、市販されているものを用いている(E-Y Laboratories, Inc., P.O. Box 1787, San Metro, CA 94401, U.S.A.)。もちろん、抗体も市販のものを用いている〔(株)日本抗体研究所、〒370 群馬県高崎市栄町17-5〕。

- (1) われわれの場合ヘビの膵組織を用いたが、2.5%グルタルアルデヒド-磷酸緩衝液で、4°C、2時間固定し、型の如く、Epon 812に包埋した（ただし、像の質をあげるためには、1%オスミウム酸で1時間ほど後固定を行なうと良い）¹²⁾。
- (2) 超マイクロームで超薄切片となし、ニッケルまたは金メッシュに貼布。
- (3) グルタルアルデヒドのみの固定の場合はそのまま次の処置を施すが、オスミウム酸で後固定した場合は、メタ過ヨード酸ナトリウム飽和水溶液（約10%）で約1時間脱

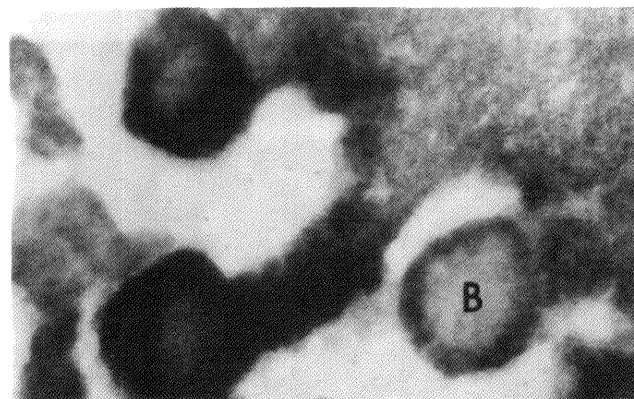


図10 酵素抗体法を施したラット膵島B細胞を、光顕と走査電顕で観察した後、再包埋して超薄切片として透過電顕で観察。B顆粒(B)は周辺のみDAB反応が陽性である。(×88,000)

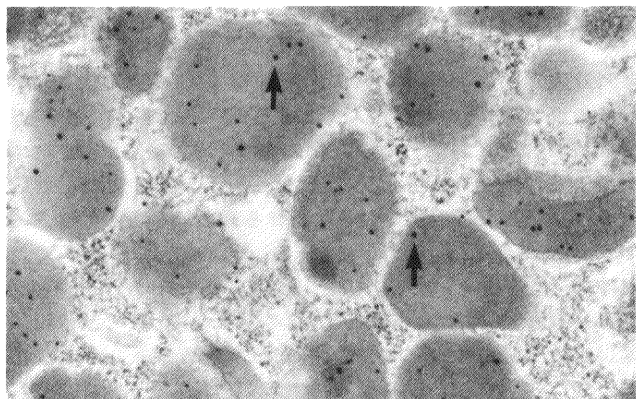


図11 ヘビ膵島B細胞（インスリン産生細胞）に，プロテインA-金コロイド法（抗インスリン血清使用）を施し，透過電顕で観察。B顆粒のみに金粒子の沈着が認められる（矢印）。（ $\times 30,000$ ）

オスミウムを行なう¹²⁾。

- (4) 1～2%ウシ血清アルブミンを加えたPBS液に30分以内浸漬。これは非特異反応を減少させるため。
- (5) 1～2%ウシ血清アルブミンを含むPBS液で適当に希釈した一次抗血清（抗体）を反応させる（4℃で12時間以上）。
- (6) PBSで洗滌。
- (7) 1%ウシ血清アルブミンを含むPBS液で希釈したPAG複合体に浸す。室温で30分から1時間程度。ただしPAG複合体の希釈度により，反応時間は異なる。PAG複合体のピンクがほとんど見えない程度に希釈するのが良いという¹²⁾。
- (8) PBS液と蒸留水で充分洗い，電子染色する。
- (9) 電子染色は通常の酢酸ウラニールと鉛の二重染色を行なう。ただし鉛の沈澱が起きないように注意する。
- (10) 透過型電子顕微鏡（日立H-500型）で観察，写真撮影する。

この結果，ヘビの膵島細胞が明瞭に同定された。図11は，グルタルアルデヒド単独固定であったが，強拡大において明らかな結晶の周期構造が，インスリン顆粒に認められた。非特異反応もほとんど見られない。

4. おわりに

以上，最近応用範囲の広い免疫組織化学の概要を述べ，またわれわれの研究室で行なっている方法を紹介したが紙数の都合もあり，舌足らずのところが多かったことをお詫びしたい。なおそれぞれの抗体の作製法や検定法，金コロイドの作製法などについては，それぞれの専門書を参照できれば幸いである（この研究の一部は文部省科学研究費No.57480093の援助によった）。

参考文献

- 1) 渡 伸三，佐藤道子：III-78，隣接切片対応法のための光顕ならびに電顕用切片の作製法。電子顕微鏡試料技術集（日本電子顕微鏡学会関東支部編），誠文堂新光社，東京，344-346頁，1970。

- 2) Watari, N., Hotta, Y., and Mabuchi, Y. : Comparative light and electron microscopic study of the adrenal gland of the snake. *Arch. histol. jap.* **40** (Suppl) : 80-85, 1977.
- 3) Coons, A. H. : In ; *Fluorescent Antibody Methods* (ed. by J.F.Danielli), P.399, Academic Press, New York, 1958.
- 4) Nakane, P.K., and Pierce, G.B., Jr : Enzyme-labeled antibodies : Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem Cytochem*, **14** : 929-931, 1966.
- 5) Singer, S. J. : Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature*, **183** : 1523-1524, 1959.
- 6) Romano, E. L., and Romano, M. : Staphylococcal protein A bound to colloidal gold : an useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochem.* **14** : 711-715, 1977.
- 7) 馬杉洋三 : D. 免疫学，フェリチン抗体法，医学のあゆみ，**76** : 410-418, 1971.
- 8) Singer, S. J., and Schick, A. F. : The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9** : 519-537, 1961.
- 9) Graham, R. C., and Karnovsky, M. J. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **14** : 291-302, 1966.
- 10) 鈴木郁雄 : 酵素標識抗体法——とくに peroxidase 抗体法を中心に——，医学のあゆみ，**76** : 419-426, 1971.
- 11) 西岡久寿弥，他 : 10. 形態学的手法，役に立つ免疫実験法（西岡久寿弥，嶋田孝吉，真崎知生編集），184-203頁，講談社サイエンティフィック，東京，1984.
- 12) 内田 隆 : ホルモン産生細胞のためのプロテインA・金コロイド法について，細胞，**16** (2) : 52-59, 1984.
- 13) Hjelm, H., Sjödahl, J., and Sjöquist, J. : Immunologically active and structural similar fragments of protein A from *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Biochem.* **57** : 395-403, 1975.
- 14) 瓦井康之，中根一穂，黒住一昌 : 4. ホルモン，新組織化学（小川和朗，武内忠男，森富編集），355-384頁，朝倉書店，東京，1975.
- 15) 平田健雄 : 22. 免疫組織学，医学要点双書，8. 免疫学（桂 義元，桜美武彦編著），37頁，金芳堂，京都，1983.
- 16) Watari, N., Hotta, Y., Mabuchi, Y., Fukuda, S., Seki, A., and Matsuo, Y. : An application of correlative light and electron microscopy using one-section method in the field of immunohistochemistry. I. rat pancreatic islets and pig duodenum. In ; *Electron Microscopy, 1982* (10th Internat. Congr. on EM, Hamburg, Aug. 17-24, 1982), **3** : 281-282, 1982.
- 17) 森 茂郎 : PAP 染色法，ABC 染色法，検査と技術，**12** (3) : 239-245, 1984.

生体系におけるヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) の蛍光スペクトルの測定法と解析

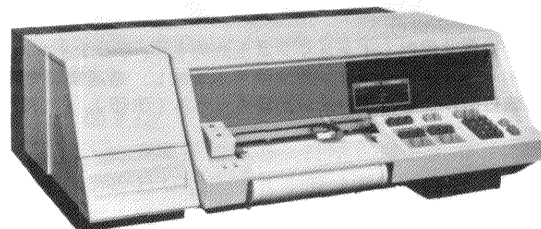
Measurement Method and Analysis of Fluorescence Spectra of Hematoporphyrin Derivatives (HpD) in Bio-Systems

三好 憲雄* 久住 治男** 嶺岸 久子***

(昭和59年5月1日受理)

1. はじめに

近年、ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) が、腫瘍組織と親和性を持つことを利用して、レーザー光照射による治療およびその基礎的研究が盛んになった^{1)~3)}。我が国においても、1981年度から厚生省癌助成金を受けている研究グループにより「レーザー機器のがん診療への応用研究」班会議が持たれ、年2回活発に討議されている^{4)~8)}。当教室においても、1982年から argon-dye laser で膀胱癌の治療を行っている。つまり、表在性膀胱腫瘍および上皮内癌に対する HpD とレーザー光による spot⁹⁾ ならびに total photo-radiation therapy¹⁰⁾ の検討を行なっている。また、基礎的研究としては、ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47) による HpD の取り込みに関して分光学的に検討¹¹⁾ を加え、HpD と argon-dye laser 光照射による、KK-47 細胞の殺細胞効果の形態学的検討を行なっている。しかし、生体内に取り込まれた HpD の分光学的特性を測定することは困難とされていた。それは、生体系組織を損なわないように測定するのが困難であるからである。現に、生体内における HpD の補正された蛍光スペクトルは、ほとんど報告されていない。培養細胞内の HpD の分光学的特性は、浮遊細胞にて測定可能であるが、臨床関係または動物組織内の HpD の蛍光スペクトルは、溶液用のキュベットでは測定不可能である。そこで、我々は腫瘍組織の新鮮度を損なうことなく、しかも定量的に、組織内 HpD の蛍光発光スペクトル、励起スペクトル、偏光スペクトルを測定可能としたので、試料の作製法



と合わせて報告する。また、現在、臨床で使用されている HpD は、ヘマトポルフィリン誘導体の混合物であり、主に、hematoporphyrin (Hp), protoporphyrin (PP), hydroxy-vinyldeutoporphyrin (HVD), および hematoporphyrin-diacetate (HDA) の4誘導体が含まれていると考えられている。しかし、腫瘍内に取り込まれている主成分は、まだ明らかにされていない。そこで今回、我々は、腫瘍内 HpD の蛍光スペクトルと、いろいろな溶媒系における Hp, PP, HVD, HDA 単体のスペクトルパターンの類似性から、腫瘍に高親和性の主成分の存在を推定した。また、腫瘍内 HpD の分子配向等も、検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 実験装置

850型分光蛍光光度計 (図1) に付属品 (固体試料ホルダー、偏光付属装置、りん光付属装置) を接続して使用した。

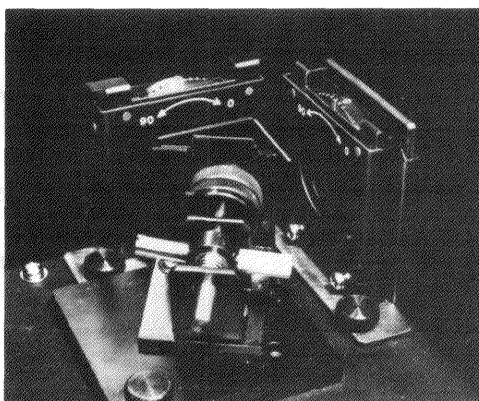
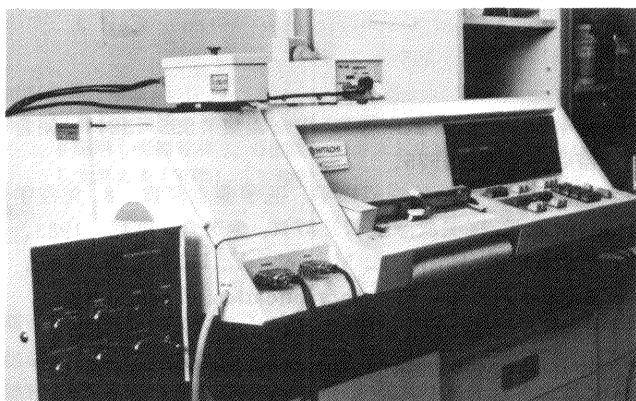


図1 850型日立分光蛍光光度計と付属装置

* 福井医科大学医学部 第一病理学教室
** 金沢大学医学部 泌尿器科学教室
*** 日立製作所 郡珂工場 応用技術センター

2.2 生体試料作成法

2.2.1 臨床標本

HpD (I) 3mg/kg を静脈注入後、48時間目の乳頭状の膀胱腫瘍を生検とともに採取したり、または全摘の腫瘍膀胱から切除した組織を凍結切片 (30 μ m) にして、粉末セルに5枚重ね合わせて装着し測定した。

2.2.2 実験的に発癌させたラットの膀胱組織標本

ウィスター系ラット (9令, 200g, ♂) に、0.05% butyl-butanolnitrosoamine (BBN) と 0.005% Tween 80 を飲料水に溶解し、20週経口投与して膀胱に発癌させ、HpD (I) (10mg/kg) を静脈注入して1週間後、切除し、ただちに凍結切片を作り、同様に重ね合わせて測定した。

2.3 ミセル溶液系

0.1mM, 0.5mM, 1.0mM, 3.0mM の各濃度のカチオン性界面活性剤 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) の水溶液に、一定濃度 (4.35×10^{-5} M) になるように、HpD を溶解し、蛍光スペクトルを測定した。また、6 μ g/ml の HpD (HpD の平均分子量を600と仮定すると 10μ M に相当する) と、 10^{-5} M の HVD, Hp, HDA を 0.1mM CTAB 水溶液に溶解させて、蛍光スペクトルを測定した。低温 77K での蛍光スペクトル測定は、りん光付属装置を使用した。

3. 結果と考察

HpD は臨床面で Photofrin I[®] (Oncology Research & Development, Inc., Cheektowage, New York) として市販されているものを使用した。図2は、いろいろな生体に投与

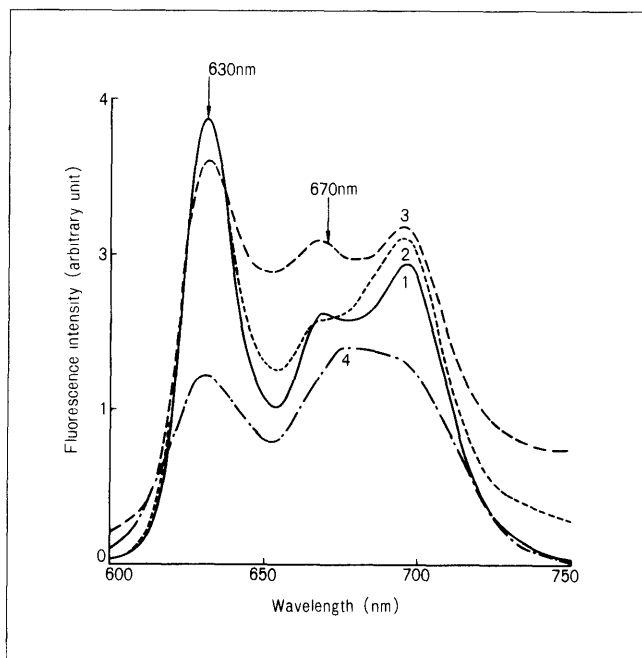


図2 生体内における HpD の蛍光スペクトル (Fluorescence spectra of HpD in bio-systems.)

curve 1, ヒトの膀胱腫瘍組織

curve 2, ラットの膀胱腫瘍組織

curve 3, ノドマウス移植腫瘍組織

curve 4, KK-47細胞

HpD の投与法や資料作成法は本文を参照。

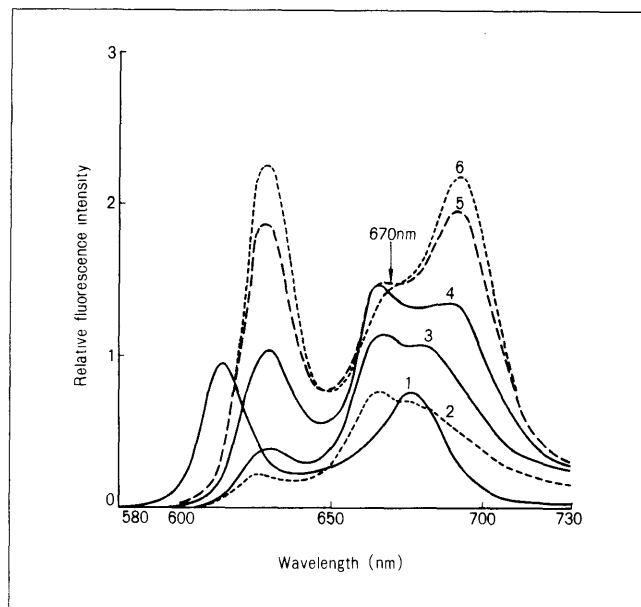


図3 種々の濃度の CTAB ミセル溶液における HpD の蛍光スペクトル (Fluorescence spectra of HpD at various concentrations of CTAB.)

curve 1, H₂O ; curve 2, 0.1mM CTAB ; curve 3, 0.3mM CTAB ; curve 4, 0.5mM CTAB ; curve 5, 1.0mM CTAB ; curve 6, 3.0mM CTAB ; HpD 4.35×10^{-5} M

して、腫瘍組織に取り込まれた HpD の蛍光スペクトルである。また、正常組織内からも同様なスペクトルパターンが得られたが、上記の投与条件、測定条件では腫瘍組織内に比べて蛍光強度は約半以下であった。生体内のスペクトルパターンは、投与前の水溶液中のパターン (図3の curve 1) と次の点で異なる。第一に、ピークが長波長にシフトしている。次に、2峰性のピークの間に、ピークもしくはショルダーが見られる。また、630nm のピーク強度に対する 670nm 付近の蛍光強度比は、KK-47細胞内 (curve 4)、ヌドマウス移植腫瘍組織内 (curve 3)、ヒトの膀胱腫瘍組織内 (curve 1)、ラットの膀胱腫瘍内 (curve 2) の順で小さくなっている。この新しい発光帯は、図3で詳しく検討するが、恐らく HpD 集合体に由来すると考えられる。以上のことから、腫瘍細胞そのものが KK-47細胞、およびヌドマウス移植細胞組織の内では、他の2つの組織の内比べて、多量体の割合が大であることが言える。なお、蛍光強度を測定することによって HpD を定量することは、問題はあるにせよ、慎重に行なえば可能となりつつある。

種々の濃度の CTAB ミセル溶液における HpD の蛍光スペクトルを図3に示した。Curve 1 から 6 は、CTAB 濃度を 0 から 3.0mM まで変化させたもので、670nm の発光帯は 0.1, 0.3, 0.5mM の時でピークとなるが、1.0mM 以上になると shoulder になり、さらに 10mM 以上になると shoulder もなくなり 2 峰性になった。一般に、界面活性剤のミセル形成臨界濃度 (critical micelle concentration = CMC) 近辺もしくはそれ以下の濃度域では、前期ミセル領域と言われ、この領域の溶液に色素分子を入れると、完全な 1 個のミセルを形成するに至らない点で色素分子を加えるため、不足分の界面活性剤分子を補う形で、2 個以上の色素分子を可溶化する。したがって、前期ミセル領域では色素分子

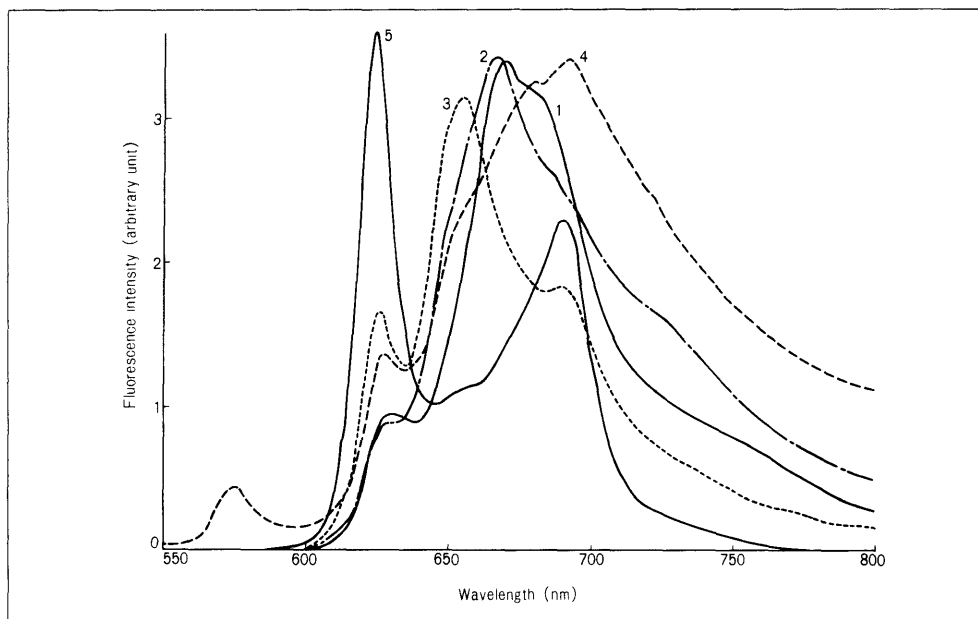
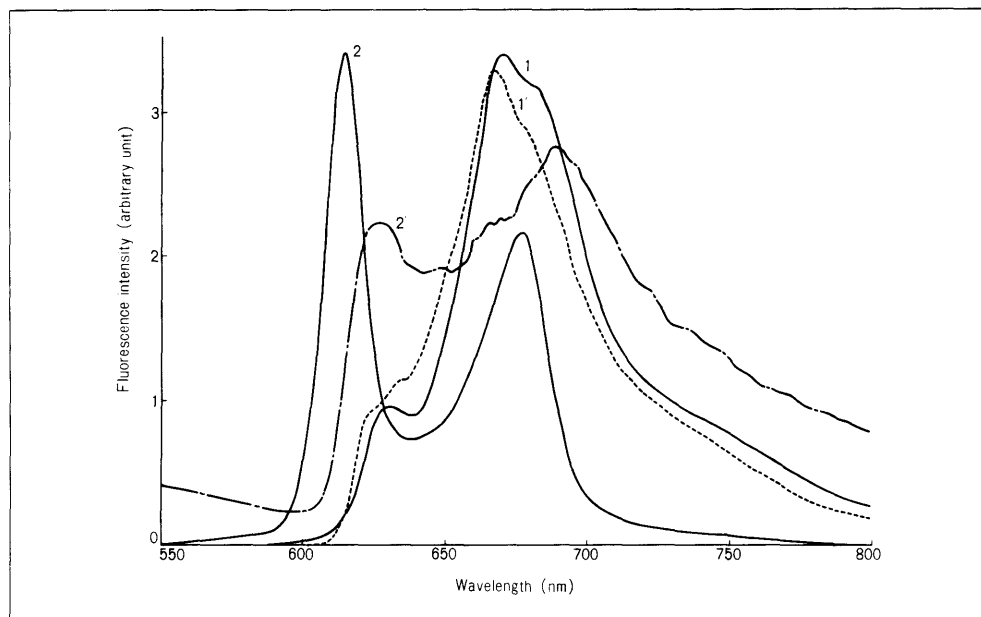


図4 0.1mM CTABミセル溶液中におけるHp誘導体の蛍光スペクトル (Fluorescence spectra of HpDs at 0.1 mM CTAB micellar solution.)
curve 1, HpD ; curve 2, HVD ;
curve 3, Hp ; curve 4, PP ; curve 5,
HDA ; HpDs, 1×10^{-5} M ; CTAB,
0.1 mM

図5 水溶液と0.1mM CTAB溶液中におけるHpDの常温と77 Kでの蛍光スペクトル (Fluorescence spectra of HpD in aqueous and 0.1mM CTAB micellar solutions at 20°C or 77 K.)
curve 1, 0.1mM CTAB, 20°C ; curve 2, 0.1mM CTAB, 77 K ; curve 3, H₂O, 20°C ; curve 4, H₂O, 77 K ;
HpD, 1×10^{-5} M



は aggregate を形成していると言われている。しかし, CMC よりも大きい濃度域になると, 完全なミセルの親水基 (アミノ基) と色素分子の側鎖 (カルボキシル基) との結合により, 色素の単量化が起こると言われている。図3の curve は, 如実に上記のことを物語っている。前期ミセル領域では670nm band が強く出現し, ミセル濃度が増加するにつれてHpD は monomerize されて, 2 峰性のスペクトルパターンを得ると考えられる。図4は, HpD の構成成分である Hp, PP, HVD, HDA をそれぞれ0.1mM CTAB 溶液に可溶化した蛍光スペクトルを示す。この目的は, HpD 内の主要成分を, スペクトルパターンの類似性から類推することにある。HpD の aggregate が monomer に比較して, 一重項酸素による酸化反応性が高いこと¹²⁾ から, HpD の aggregate を生成

しやすい0.1mM CTAB 溶液系で, スペクトルパターンを比較した。最も似ているものは恐らく curve 2 の HVD であろうと考えられる。Dougherty らが, 最近, 光過敏症になりにくいという新しい HpD (Photofrin II®) のスペクトルパターン¹³⁾ は, 675nm の shoulder が減少し, 725nm の shoulder が出現している。HVD の発光スペクトルパターンは, Photofrin (II)® にさらに酷似している。したがって, Photofrin (I) および (II) とも, HVD が主要成分の可能性が高く, aggregate 形成に大きく関与していると考えられる。一方, HDA は, 最も aggregate しにくい物質で, acetyl 基が aggregate 形成阻害に起因していると思われる。図5は, 水溶液と0.1mM CTAB 溶液中の HpD (I) の常温と77 K で測定したときの蛍光スペクトルである。一般に, 低温にするとスペクトルに

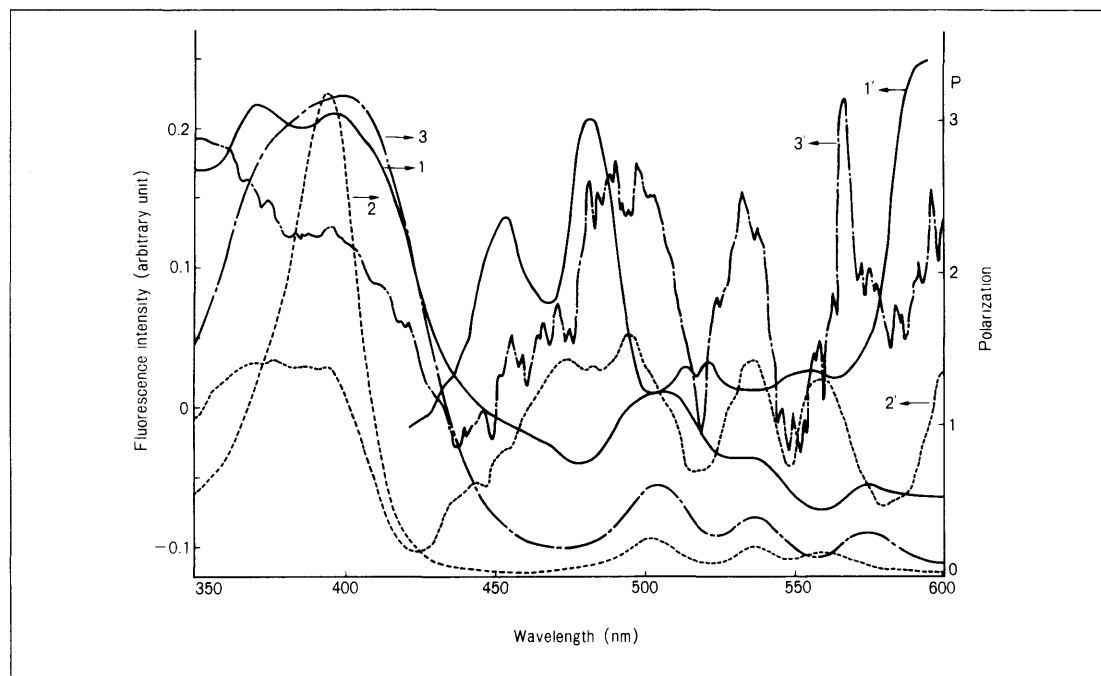


図6 HpDの励起スペクトルと蛍光偏光度スペクトル (Excitation and polarization spectra of HpD.)
 curve 1, ラットの膀胱腫瘍組織; curve 2, H_2O ; curve 3, 0.1 mM CTAB ミセル溶液中における HpD の励起スペクトル; curve 1', 2', 3', curve 1, 2, 3 に対応する 蛍光偏光スペクトル;
 λ_f : fluorescence emission maximum.

における微細構造が現われ、結合状態がより安定化するとされている。水溶液中 (curve 2) では低温 (curve 2') にすると、red-shift し 0.1 mM CTAB 溶液中 (curve 1) では低温 (curve 1') にすると blue-shift した。このように溶媒系によっては低温にするとピークの shift が全く逆で、特に水溶液において大きな変化を示した。この水溶液系は興味あるところであるので、今後、研究する予定である。図 6 は、HpD の励起スペクトルと蛍光偏光スペクトルを示す。curve 1 はラットの膀胱腫瘍内の HpD のスペクトルであり、curve 2 は水溶液中、curve 3 は 0.1 mM CTAB micelle 溶液中の HpD のスペクトルである。生体系では 398 nm のピークの他に 370 nm にピークをもち、aggregate の形で取り込まれていると考えられる。前期ミセル系では水溶液系に比べて *soret band* は broad になり、可視部は red-shift している。一方、偏光スペクトルも前期ミセル系では、水溶液系に比べて偏光度は 350~600 nm band で大きく、また、red-shift しており、可視部では $Q_x(0-1)$ band (567 nm) が特に大であった。生体系では $Q_y(0-1)$ band (482 nm) がピークを示し、454 nm に、帰属できないピークを得た。このピークは恐らく生体内の安定化に由来する band と思われる。

4. 結 言

850 型の活かし得るすべての機能を駆使し、特に固体試料測定装置を使って、生体組織内の HpD 蛍光スペクトルを測定した。この試みは、我々のところが初めてと思われる。今後装置の改良により、さらに精度良く、しかも 420 nm 以下の励起スペクトル、蛍光強度の定量化および再現性を良くすることも可能と思われる。つまり、サンプルホルダーの受光面の面積のコントロール、サンプルホルダーの前後、左右、角度の微調整を可能にすることが必要と考える。

終りに、HVD, PP, HDA を提供していただいた浜理薬品(株)に対し深謝する。

参考文献

- 1) Lipson, R. L., Mastar's Thesis, University of Minnesota, 1960.
- 2) Lipson, R. L., Baldes, E. J. and Olsen, A. M., J. Natl. Cancer Inst., **26**, 1 (1961).
- 3) Dougherty, T. J., Grindey, G. B. and Fiel, R., J. Natl. Cancer Inst., **55**, 115 (1975).
- 4) 會沢勝夫, 大畑進, 大多和正樹, 西宮克明, 沢裕幸, 小野寿太郎, 小中千守, 会田征彦, 加藤治文, 早田義博, J. J. Cancer Therapy, **3**, 790 (1983).
- 5) Aizawa, K., Kato, H., Ono, J., Konaka, C., Kawate, N., Yoneyama, K., Otawa, M., Shinohara, H., Saito, M., Takahashi, H., Nakamura, H., Yamada, T., Sakai, H. and Hayata, Y., 印刷中 (1983).
- 6) Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C., Ono, J. and Takizawa, N., Chest, **81**, 269 (1982).
- 7) Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C., Ono, J., Matsushima, Y., Yoneyama, K. and Nishimiya, K., Chest, **82**, 10 (1982).
- 8) Yamashita, M., Honda, T., Sato, T. and Aizawa, K., IEEE Transactions Instrumentation and Measurement, **32**, 124 (1983).
- 9) Hisazumi, H., Misaki, T. and Miyoshi, N., J. Urol., **130**, 685 (1983).
- 10) Hisazumi, H., Miyoshi, N., Naito, K. and Misaki, T. in press. (1984).
- 11) Miyoshi, N., Hisazumi, H., Ueki, O. and Nakajima, K., Photochem. Photobiol., **39**, 359 (1984).
- 12) Miyoshi, N., et al. 未発表データ
- 13) Miyoshi, N., et al. 未発表データ

蛍光偏光法——免疫学，生化学への応用を中心として——

Fluorescence Polarization Method

——Its application for immunology and biochemistry

前田 浩* 小田 達也**

(昭和59年7月17日受理)

1. はじめに

蛍光偏光(fluorescence polarization, 以下FPと略)あるいは同義的に用いられている蛍光偏光解消(fluorescence depolarization)と称される現象、あるいはそれを用いた手法については、1920年代にフランスのPerrinによる先覚的研究にはじまり¹⁾、その後Weber²⁾を中心として1950年以降、生体高分子への応用の基礎的研究がすすめられ、さらに1970年代後半から本格的に生化学あるいは生物学への広範囲な応用が始まったと言える。引きつづきその応用に関していくつ報告されたが^{3)~5)}、FP法の有用性についてはほとんど広くは知られないまま現在にいたっている。その第1の理由は測定装置の開発が遅れていたためで、在来のままでは操作がめんどろなことが、加えて、後述の蛍光偏光度Pの計算[式(1)]を行わねばならないこと、第2の理由は、在来型のディフラクション方式のモノクロ波によるスペクトロフルオロメーターでは、diffraction anomalyといわれるartifactの補正が必要であり⁶⁾、それらがさらに装置と操作を複雑にしていたことがあげられる。さらに、適当な蛍光試薬(たとえばFITC)で純度もよく、かつ蛋白質などとの反応機構、抗原抗体反応に与える影響などがはっきりとしたものが少なかったこともその他の理由として考えられる。

以上の問題点のうち主な点については、最近の電子工学あるいは分光工学のめざましい進歩によって大幅に改良され、ようやく医学・生物学の分野の研究上、有力な手段となりうるものがほぼ確立したと考えられる。本稿ではまずFP法の理論的側面について概観し、さらに最近の研究を中心に主として免疫学と生化学における応用例を中心に解説したい。

2. 蛍光偏光(FP)法の特徴

2.1 簡便性

FP法の重要な利点は操作が簡単なことである。他の方法では必要な遠心あるいは沈澱その他の分離操作が不要である。またその操作の前後にさらに試薬を加えるなどの手間も不要である。特にcell-lysateなど複雑物が多く存在する反応混合液をそのまま用いても経時的な測定が可能である。このことは実用面においても非常に大きなメリットである。最近市販されている専用のFP測定装置では、試料の入ったキュベットをセットするのみの操作である。しかしながら、在来型の蛍光分光器を用いるときは、検光側の偏光子を90度ずつ手で動かして水平と垂直の2成分の蛍光強度を別々に測り、下記の式(1)によって1回ごとに計算をしなければ

ならないので操作はやや煩わしい。

2.2 迅速性

FP専用装置(我々の使用している装置やアボット社のDX型装置など)では瞬時または数分内で測定が終了する。それに比べて通常の抗原抗体反応の測定には多くの場合一夜以上を要するし、放射活性測定の場合も一定時間の積算を要する。

2.3 高感度

放射能を用いることなく10pico mole/mlまで十分検出可能である。

2.4 Kineticsの解析が容易

蛍光標識した基質を用いることにより、例えばcell-lysateにおいても、生体高分子の加水分解、特定の酵素反応などを1つのサンプルのみで経時的な測定が可能である。このときも基質と反応生成物の分離操作は不要である。これに反し、ラジオアイソトープを用いる場合にはこの分離操作が必須であり、一段と複雑な操作を要する。

2.5 質的变化と量的変化の両方が測定可能

一般に、放射活性や蛍光分光の測定では、蛍光強度や放射活性の強さからそれらの標識化合物の量を測定できるのみであるが、FP法では同時に質(蛍光偏光度)、つまり分子量の大小、あるいは粘性の高低の測定が可能である。

2.6 経済性と安全性

蛍光物質はラジオアイソトープよりも安価な試薬で、半減期もなく、廃棄物による公害やシンチレーターの処理などの心配もない。また、取扱いも安全である。

3. 装置ならびに原理

蛍光偏光専用の測定装置は最近種々の機種が開発されている。いずれのメーカーのものも本質的には同様の部分から構成されており、後述の式(1)の計算はすべて内蔵のコンピュータによって行うものが多い。模式的な装置の見取り図を図1に示す。普通の蛍光測定と同じく四面透明セルを用いる。可視部での測定においては石英セルは要らない。フィルターあるいはグレイティングプリズムによってモノクロ波を得、それを偏光子により偏光し励起光(λ_{excit})が得られる。FITC-結合蛋白の励起波長 λ_{excit} は約490nmである。この波長は多くの生体試料の吸収あるいは自家蛍光波長域から遠いので好都合である。この励起光をセルにあてると、溶液中の蛍光色素(フロロクローム)をもつ分子のうち蛍光を発する分子は、ポラライザーの偏光角と同じ配向をしている分子のみである。その様子を図2に示す。図2Aは大小2種類の分子がランダムに存在している状態を示し、図2Bでは、○が λ_{excit} を吸収して励起状態となっている分子を示している。それらの分子の配向は○につけた棒

* 熊本大学医学部 微生物学教室 農博、医博

** 熊本大学医学部 微生物学教室 農博

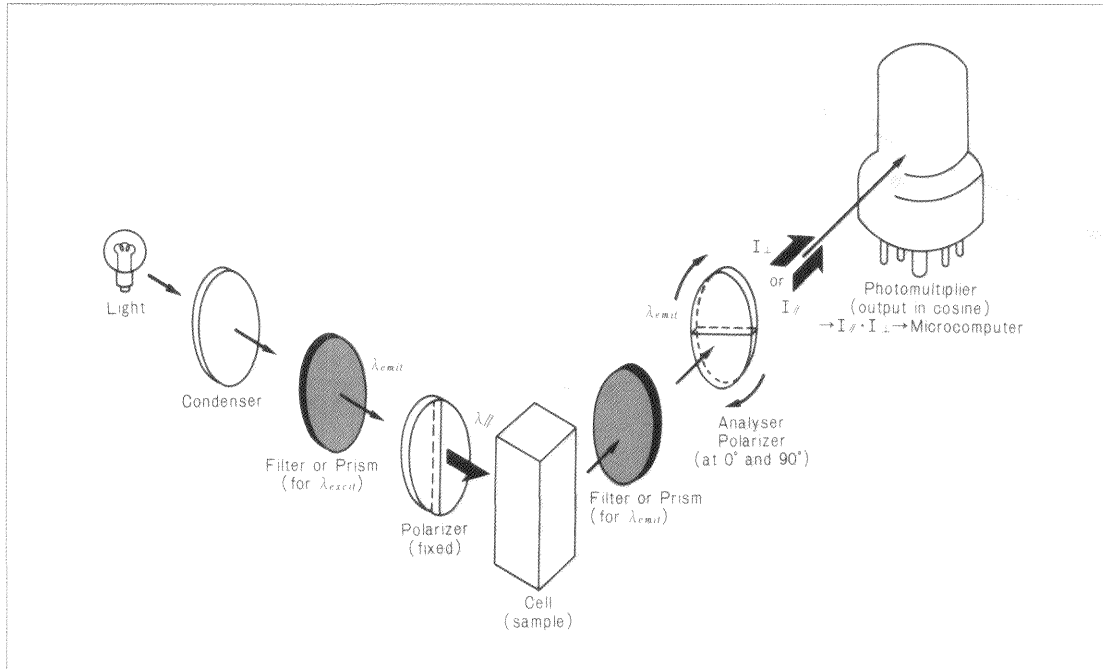


図1 蛍光偏光測定装置のdiagram¹⁴⁾(図説明は本文参照)。

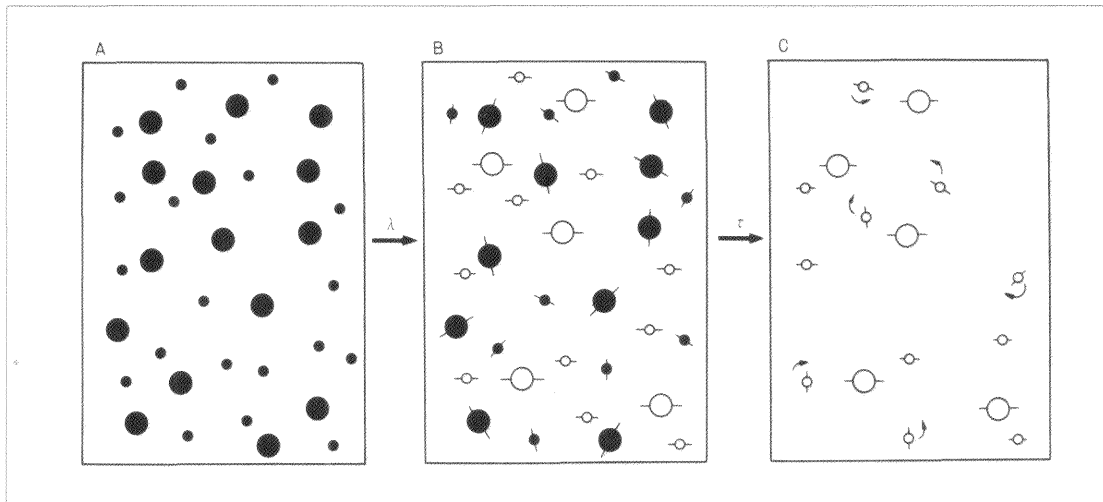


図2 蛍光標識分子を励起させたときの分子の配向と蛍光偏光
●は未励起の分子，丸の大小は分子のサイズ，○は励起状態の分子，○についた棒軸の方向は分子の配向を示す。励起光の偏光角と同一の配向分子のみ励起される(B)。Cは蛍光を発するときの分子の配向を示す。低分子の多くはτ(蛍光励起時間)内に回転していることに注意(本文参照)。

軸の方向により示している。図2Cでは蛍光を発するときの状態が示してあり、Bに比べると蛍光の緩和時間 τ が経過している。この間に大分子と小分子の配向の状態に違いが生ずる。すなわち、分子の大きさに基づく回転ブラウン運動の差である。大分子は蛍光の緩和時間 τ 内に回転せず、小分子はすでに配向が変っている。すなわち、大分子では蛍光強度のうち、入射偏光角に対して平行な成分 $I_{||}$ があまり減少しない。これに反し、小分子では回転にともなって配向方向がずれるのでそれが減少し、もう一方の垂直成分 $I_{\perp}$ が逆に比較的大きくなる。こうして発した蛍光は、2次フィルターとグレイティングプリズム(図1)を透過する(これは蛍光の波長 λ_{emit} のみを選択的に通し、 λ_{excit} その他に由来する散乱光を拾わないようになっている)。それゆえ λ_{emit} が可視部域にあるFITCなどの蛍光色素を用いる系では、自家蛍光とのオーバーラップ(多くの場合近紫外部)

から遠いので散乱光は実際にはほとんど問題にならないし、励起波長 λ_{excit} を通さず、蛍光 λ_{emit} のみを通すのである。さて、蛍光偏光度 P はつぎのように定義されている。

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \dots \dots \dots (1)$$

ここで、 $I_{||}$ は一次偏光子に対して平行な成分の蛍光の強さであり、 $I_{\perp}$ は垂直な蛍光成分の強さである。図2Cのように小分子では回転運動のため $I_{\perp}$ 成分が強くなり、 $I_{||}$ は弱くなる。すなわち(1)式において P は小さくなる。それに反し大分子では P 値は大きくなる。この P 値と蛍光分子の分子量との間にはつぎの関係が知られている。

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{RT\tau}{V \cdot \eta} \dots \dots \dots (2)$$

ここで、 P_0 は定数で特定の蛍光色素を固体中においたとき、すなわち $\frac{\tau}{\eta} = 0$ としたときに得られる P 値である。fluore-

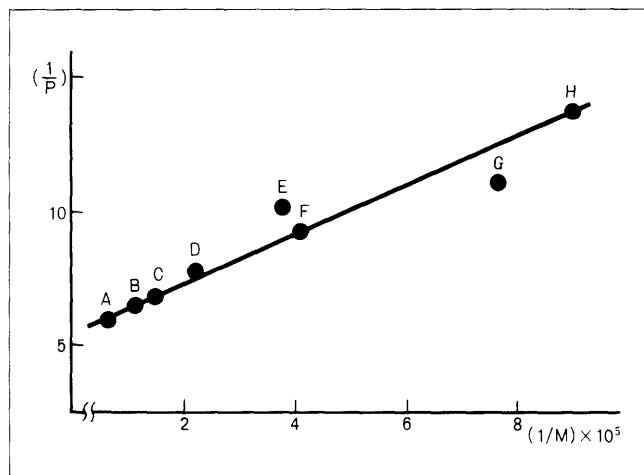


図3 各種蛋白質(FITCで標識)とP値の関係図はPerrinの(2)式に基づき、 $\frac{1}{P}$ と $\frac{1}{V}$ の関係を示している⁷⁾。
A), IgG(1.6×10^5); B), transferrin(9×10^4); C), human serum albumin(6.8×10^4); D), fragment C of IgG(5×10^4); E), chymotrypsinogen(2.6×10^4); F), trypsinogen(2.5×10^4); G), bovine pancreatic ribonuclease(1.3×10^4); H), Neocarzinostatin(1.2×10^4).

sceinでは、約0.49である⁶⁾。 R は気体常数、 T は絶対温度、 τ は特定のクロモフォアのもつ平均励起寿命で、fluoresceinでは約 5×10^{-9} 秒である。 η は溶液の粘度(poise)、 V は分子の実効容積で分子量に比容積を乗じたものである。すなわち、 $V \propto \text{Mol. wt.}$ である。したがって、分子量(あるいは V)が一定であれば P は一定になるはずであり、 P 値の測定から、そのみかけ上の分子量を推定できる(図3)⁷⁾。それゆえ、分子量の変化は P 値の変化として検出することが可能である。例えば、蛋白質や核酸の分解あるいは抗原抗体反応などにともなう見かけ上の分子量変化の定量が可能である。(2)式から容易に理解できるが、 P 値はその蛍光物質の濃度と無関係にはほぼ一定である。また同様に、 V 、 T 、 τ などが一定で、 η が変化する場合、その変化を鋭敏にとらえることが出来る(細胞質の粘性測定など)。

4. 応用例

4.1 抗体の定量^{8),9)}

蛋白質制御剤ネオカルチノスタチン[NCS](分子量1.2万)にpoly-L-lysineを結合させ、それを抗原としてウサギを感作し、抗NCS血清を得る。その血清中のNCSに対する抗体を定量する方法を例にとることにしよう。この測定に際しては、別にFITCを標識したNCS(F-NCS)を作成し抗原として用いる。一定量のF-NCS(例えば、 $0.3 \mu\text{g/ml}$ の溶液2ml)と0~100 μl の抗体(抗血清)を反応させた場合の P 値の変化を図4 A, Bに示す。抗体量が増すに従い P 値も増加することがわかる。これはF-NCSに抗体(IgG)が結合し、その複合体の分子量[(F-NCS)·(IgG)17.1万]が増すことによる。さらに非蛍光標識NCSとその抗血清をあらかじめ反応させておくと、あとからF-NCSを加えても、先のNCSが抗体を占拠しているのでF-NCSとの結合を阻害し、蛍光性の抗原抗体複合体は形成されず、 P 値の上昇はみられない。すなわち免疫学的な特異性をも簡単に調べること

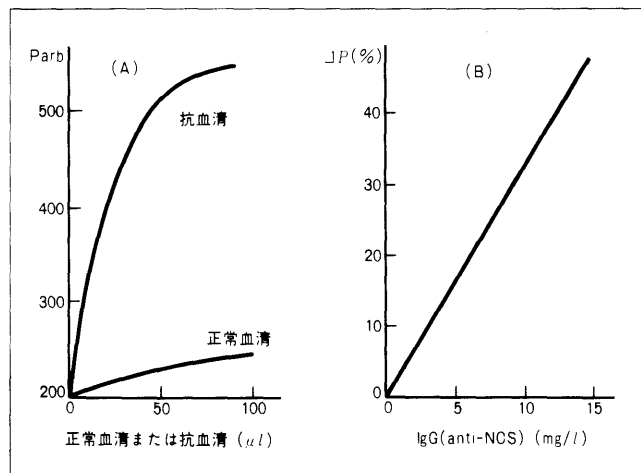


図4 抗原存在下での抗ネオカルチノスタチン(NCS)抗体の添加と P 値の増加の関係^{8),9)}。
(A)抗血清と正常血清を加えた場合の P 値。(B)精製抗体の添加と P 値の増加。抗原はFITC標識ネオカルチノスタチン(0.04 nmol/ml)

ができる。この方法を利用すれば、抗原感作した多数の動物血清の抗体価を迅速に測定可能であり、また抗原抗体複合体形成の経時的速度(本法では瞬時にしかも自動的に測定できる)をみれば、結合係数の強弱も知ることができる。

4.2 抗原の定量

標識抗原+抗体の系に未標識抗原(血清などのサンプル)を加えることによって起こるブロッキングの割合を測定し、抗原を定量する間接法について述べる。ここでは、Watson¹⁰⁾やJolley¹¹⁾らによって報告された血中アミノグリコシド系抗生物質の定量法を紹介する。必要な試薬としては、(1)蛍光標識した抗生物質抗原、(2)ウサギなどで作製した抗生物質に対する抗体である。測定すべき検体の血清(この中に当該する抗生物質を含む)を試験管内で(1)、(2)とともに反応させ、その混合液の蛍光偏光値を測定する。既知量の抗生物質を(1)、(2)とともに反応させた時の P 値変化を測定し、得られる標準曲線から、検体血清中の抗生物質濃度を決定する。図5 Aにゲンタマイシンを例にとって、その標準曲線を示した。血清中の薬剤濃度が上昇するにつれて、標識したゲンタマイシンと抗体との結合の割合が減少し(ブロッキングが大となり) P 値が低下することになる。この方法は、再現性がよく、また特異性、感度も非常に高く、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 程度まで測定可能であり、実際に臨床検査で応用されている。また、この方法によって抗てんかん剤フェニトイン^{12),13)}、フェノバルビタール¹³⁾、その他薬物などの血中濃度測定も行われており、その例を図5 Bに示す。さらに、各種体液中および各種細胞表面に通常に見出され、また組織適合抗原(histocompatibility antigen, HLA)の1つのドメイン(L-鎖)を構成する、 β_2 -ミクログロブリン(分子量約1.2万)の尿中あるいは血中濃度の測定にも上記方法が非常に有用であることが明らかにされている。その他われわれも含めて多くの研究者が、この方法により各種のホル

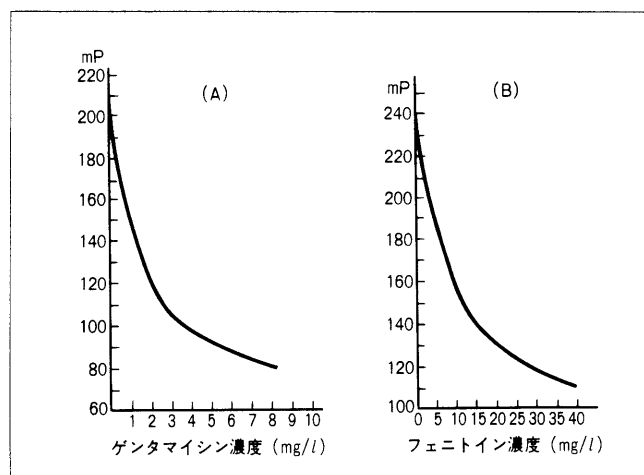


図5 抗原の定量 (A)血中ゲンタマイシンの検量線¹⁰⁾ (B)血中フェニトインの検量線¹²⁾。

モンやインターフェロンなどの定量を行っている^{9),14),15)}。

4.3 細胞質流動性の測定

この目的のためには細胞内に蛍光プローブを取り込ませる必要がある。RotmanとPapermaster¹⁶⁾によって報告されたfluorescein diacetate(FDA)が、生細胞にのみ取り込まれる蛍光色素として広く用いられている。FDAの特徴は(1)生細胞にのみ取り込まれる。(2)FDAはそのままでは(つまり細胞外では)無蛍光であり、細胞内に取り込まれた後、細胞内エステラーゼにより加水分解を受け、fluoresceinとなって初めて蛍光性となる。(3)このものは細胞外へ漏出し難い。つまり、細胞浮遊液にFDAを加えた場合、細胞外にあるFDAを除去しなくてもよいことであろう。

以下にこのFDAを用いて、がん患者の免疫応答能を測定した応用例について述べる。

一般に、健康人の末梢血液より分離したリンパ球を植物凝集素(phytohemagglutinin, 以下PHAと略)で処理すると、静止期にあったリンパ球はDNA合成を開始し、ついで細胞分裂が誘発される。

Cercekら¹⁷⁾はPHA刺激リンパ球に上述のFDAを取り込ませ、 P 値の変化を測定した。このときの P 値は健康人では大きく低下するのに反し、癌患者ではほとんど変化がなく、両者に大きな差があることを見出した。さらに、PHAの代りにヒトの癌組織由来の蛋白成分、彼らの言うCancer basic proteinで処理すると、逆に癌患者リンパ球は大きな P 値の低下を示すが、健康人はほとんど変化を示さないことがわかった。この方法を本邦の高久らや我々も、胃癌(33例)¹⁸⁾や膀胱癌(61例)¹⁹⁾に適用してみたが、Cercekらとほぼ同様の結果を得ている。健康人と癌患者のリンパ球を $4.0\mu\text{g/ml}$ のPHAで30分間 37°C で処理後、 $2.5\mu\text{M}$ のFDAを加えた時の P 値とFDAの取り込みの変化を比較すると、FDA添加2分以後30分まで、癌患者と非癌患者の間に大きな差が見出され、診断的意義が認められ、患者の予後との相関も見出された¹⁹⁾。この変化は癌の進行度がstage III, IVになると顕著に増大するが、初期(stage I, II)では小さいことが問題である。

さらに我々はヒト白血病細胞の細胞質流動性を本法で測定したところ、リンパ性白血病と骨髄性白血病との間に大きな差があることを見出し、これら二種の白血病の鑑別診断に対し本法が重要な手法となりうることを報告した²⁰⁾。この細胞質流動性は後述のShinitzkyらの膜流動性よりもはるかに大きな差として定量できるので信頼度も高い。

4.4 細胞膜流動性の測定

この目的のために最も広く用いられている蛍光プローブは、ジフェニルヘキサトリエン(diphenyl-hexatriene, DPH)である。DPHの特徴は、それが親水性の環境では無蛍光であり、疎水性の環境では強く蛍光を発することである。このDPHを用いShinitzkyとInbar²¹⁾は、正常リンパ球と白血病リンパ球の膜のmicroviscosityを測定し、両者間に大きな差があることを見出している。すなわち、正常と腫瘍は 25°C で 2.80p と 1.65p であった。

4.5 各種生体高分子分解酵素活性の測定

適当な基質(高分子)を蛍光標識し、その基質の分解酵素による分子量低下を P 値の減少として測定することにより、酵素活性を定量することができる。図6は、細菌菌体より調製したペプチドグリカン FITCで標識したものを基質として用い、これに種々の濃度のリゾチームを添加した時の P 値の減少を示したものである。卵白リゾチームを用いた場合、 $0.05\mu\text{g/ml}$ の活性まで十分検出できる²²⁾。在来の溶菌活性測定法に比べ、本法ははるかに高感度であるため、少量のマクロファージあるいは多形核白血球の細胞内リゾチーム量、あるいは種々の刺激によって放出されるリゾチーム量をも測定できる。さらに本法と同様の手技により、核酸分解酵素²³⁾、蛋白分解酵素⁷⁾の活性測定も可能であり、急性肺炎や肺癌などのリボヌクレアーゼ活性の上昇する疾患の補助診断として、あるいはプラズミンやプラズミノゲン活性化酵素の定量²⁴⁾にも用いられる。これらとは逆に、

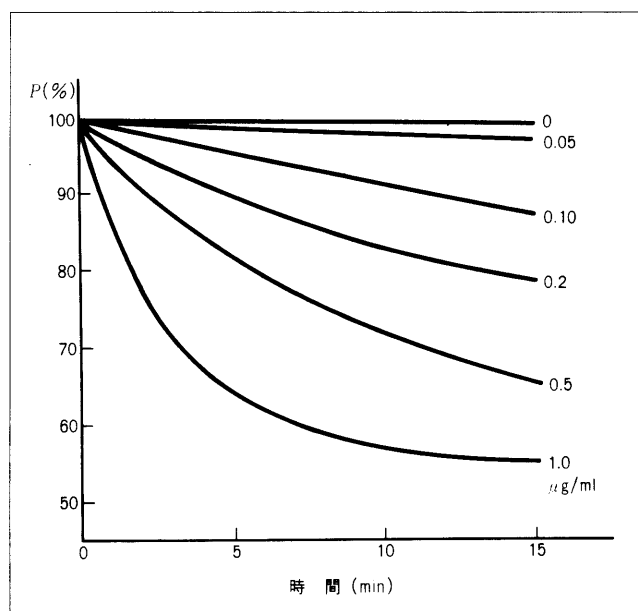


図6 リゾチームによる蛍光ペプチドグリカンの P 値の変化。数字はリゾチームの最終濃度を示す²¹⁾。

プロテアーゼとそのインヒビターとの結合のAssociation Kineticsの研究にも応用され、その有用性が示されている²⁵⁾。

5. おわりに

以上、蛍光偏光法(FP法)の原理ならびにその特徴、さらに免疫学、生化学領域におけるいくつかの応用例について述べてきたが、その最も大きな特徴は、在来の蛍光分光法では量的変化のみの測定であるのに比べ、質的变化をも同時に測定できる点にある。最近の電子工学の急速な進歩を導入したすぐれた蛍光偏光専用測定装置が開発されることを希望すると同時に、今後、益々この分野の発展が期待される。本稿が多くの分野へのFP法の導入のきっかけとなれば幸いである。

参考文献

- 1) M.F. Perrin, J. Phys. Radium, **7** 390(1926)
- 2) G. Weber, Adv. in Prot. Chem, **8** 416(1953)
- 3) H. Haber, J.C. Bennett, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **48** 1935(1962)
- 4) W.V. Dandliker, M.C. Schapiro, J.W. Meduski, R. Alonso, G.A. Feigen, J.R. Hamrick, Jr., Immunochem, **1** 165(1964)
- 5) C.W. Parker, Handbook for Experimental Immunol. Second Ed. Ch. 14, 14.1-14.25 ed. by D.W. Weir, Black-well Sci. Pub., Oxford. (1973)
- 6) R.F. Chen, R.L. Bowman, Science, **147** 729(1965)
- 7) H. Maeda, Anal. Biochem, **92** 222(1979)
- 8) H. Maeda, Clin. Chem., **24** 2139(1978)
- 9) S. Sakamoto, J. Ogata, K. Ikegami, H. Maeda, Cancer Treat. Rep., **62** 453(1978)
- 10) R.A.A. Watson, Clin. Chim. Acta, **73** 51(1976)
- 11) M.E. Jolley, Clin. Chem., **27** 1190(1981)
- 12) A.R. McGregor, J.O. Crookall-Greening, J. Landon, D.S. Smith, Clin. Chim. Acta. **83** 161(1978)
- 13) M.E. Jolley, S.D. Stroupe, K.S. Schwenzer, C.J. Wang, M. Lu-Steffes, H.D. Hill, S.R. Potelka, J.T. Holen, D.M. Kelso, Clin. Chem. **27** 1575(1981)
- 14) H. Maeda, M. Nakayama, D. Iwaoka, T. Sato, KININS-II, Biochemistry, Pathophysiology and Clinical Aspects, Ed. by S. Fujii, H. Moriya, T. Suzuki; Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Pub. Corp. New York 203(1976)
- 15) S.A. Levinson, W.B. Dandliker, R.J. Grawn, W.P. Vanderlan, Endocrinology, **99** 1129(1976)
- 16) B. Rotman, B.W. Papermaster, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55** 134(1966)
- 17) L. Cercek, B. Cercek, Europ. J. Cancer **13** 903(1977)
- 18) F. Takaku, T. Yamanaka, Y. Hashimoto, Br. J. Cancer **36** 810(1977)
- 19) S. Sakamoto, H. Maeda, K. Yamasaki, S. Aikawa, Y. Hinuma, Eur. J. Cancer Clin. Oncol., **17** 1105(1981)
- 20) H. Tsuda, H. Maeda, S. Kishimoto, Br. J. Cancer **43** 793(1981)
- 21) M. Shinitzky, M. Inbar, Biochim. Biophys. Acta **433** 133(1976)
- 22) H. Maeda, J. Biochem., **88** 1185(1980)
- 23) K. Yonemura, H. Maeda, J. Biochem., **92** 1297(1982)
- 24) K. Kinoshita, H. Maeda, Y. Hinuma, Anal. Biochem., **104** 15(1980)
- 25) J.W. Brodrick, C.B. Glaser, C. Largman, C.M. Geokas, M. Graceffo, M. Frasset, H. Maeda, Biochem., **19** 4865(1980)

Topics

第9回アナリチカ展

第9回アナリチカ展が4月10日から13日まで西独ミュンヘン市のTrade Fairセンタで開催された。アナリチカ展は2年に1回開催され、世界中の最

新鋭機が一同に会することからユーザ、メーカーとも最も注目する展示会の一つとされている。同展開催者によれば18ヶ国の444社から出展があり、58ヶ国の23,000人が入場した。また、入場者の分野は21%が工業、13%が医学、16%が公立研究所、15%が大学、5%が政府関係であった。日立からは737形臨床用自動分析装置、655形液体クロマトグラフ、Z6000形原子吸光光度計、270形赤外分光光度計、650形蛍光分光光度計が欧州のディーラを通じて展示され好

評を博した。日立科学機器に関連する機器で最も多数の出品があったのは液体クロマトグラフであり、31社に及んだ。以下、分光24社、原子吸光9社、ICP発光、蛍光、赤外それぞれ8社の順であった。また、ラボラトリインフォメーションマネジメントシステム(LIMS)とその一部であるデータ処理装置が人気を集めており、分析機器分野における新しい動きが感じられた。

(内野興一 記)

自動分析装置による測定

Automated Immunological Determination of Clinically Interested Materials

牧口 恭子* 野村 靖*

(昭和59年8月14日受理)

1. はじめに

免疫学的手法を用いた生体成分の分析は、最近臨床検査の分野でも注目をあびてきている。これは臨床検査が、(1)複雑な成分より構成される“生体試料”を被測定試料に用いること。(2)多数の試料についての分析を、短時間に処理しなければならないことから、時間を必要とする抽出やその他の前処理を必要としない分析手法が必要なこと。が主な原因であるといえる。一方、臨床検査の他の分野である生化学分析では、分析法それ自体が、非常に単純化された比色分析——いわゆるレート分析も含めて——を基礎に発達をとげ、又同時に、検体数の多さ等も誘因となって、自動化がほぼ完成された状態にまで展開されてきた。また、臨床検査の自動化が、測定値の精度の向上、処理能力の拡大に十分に効果がある事が実証されている。これら生化学領域での自動化の現状をふまえ、免疫学、血清学分野の検査自動化を試みることは、免疫学、血清学分野での臨床検査の発展にとっても、又免疫学的手法の導入により、微量成分の測定が生化学的検査の領域で、万能になる点においても、有用であることは論を待たない。

免疫学的分析手法としては、ラジオアイソトープを用いるRIA法、蛍光物質を標識化合物とする種々のFIA法、電子スピンラベルを用いる方法、酵素を標識化合物に用いるEIA法、生物学ないし化学的発光を用いるもの、さらには、抗原抗体反応により生じた抗原抗体コンプレックスを、濁度により測定する方法等、数多くの方法が提案されている。又分析手順においては、抗原抗体反応物を未反応部分と物理的手段、例えば、洗浄などの操作により分離してから測定するいわゆるヘテロジナス法や、これを含めホモジナス法がある。これらの方法の中から、現在自動化の完成度の高い自動分析装置に、応用可能な測定技術であり、かつ十分な測定感度を有する方法として、濁度測定をとりあげ、検討をおこなった。この方法は、自動分析装置の検出手段である比色計で測定可能である事はもとより、ホモジナス系として、反応液を扱える事など、自動化にとって、ふさわしい方法であるといえる。又、感度の点については、最近開発された微粒子担体(直径 $0.1\mu\text{m}$ 程度)を、増感剤として用いることにより飛躍的に感度を上げる事が可能である。

我々は、いくつかの免疫分析項目について、自動分析装置を用いて測定を試み、実用化が可能であるとの成果を得たので報告する。

2. 比濁法による測定

免疫比濁法によるCRPの定量例を次に示す。

2.1 CRP

CRP (C Reactive Protein) は、急性相蛋白質の一種であり、病態の変動に伴ってその血中濃度が増減することが知られている。このため、臨床検査では従来の血沈と同様な意味合いで、CRP測定が広くなされている。健康診断をはじめとして、スクリーニング検査として測定される場合も多い。従来では、毛細管法やSRID(Single Radial Immuno Diffusion)法により定量され、結果を得るまで十数時間を要していた。

2.2 測定方法

血清(抗原としてCRPを含む試料) $20\mu\text{l}$ に緩衝液 $500\mu\text{l}$ を加えて 37°C で5分間反応させた。反応液の吸光度を測定(第1の吸光度)したのち、抗CRP抗体 $50\mu\text{l}$ を加えてさらに5分間反応させた。5分後に再度、吸光度を測定(第2の吸光度)した。CRP濃度は第2の吸光度から第1の吸光度を差し引いた値(検体ブランク値)を基にして予め検量線を作成しておくことにより求めた。測定には日立705形自動分析装置を用いた。測光は主波長 340nm 、副波長 700nm の二波長とした。

2.3 測定結果

図1に検量線を示す。CRP濃度0から 15mg/dl まで直線検量線を得た。図2に、従来法のSRID法との相関を示す。相関係数 0.984 という良好な結果を得た。同時再現性を表1に示す。

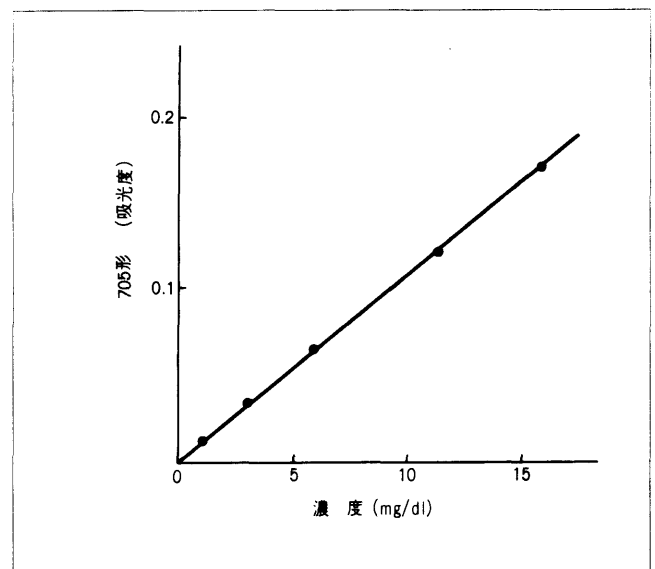


図1 検量線

*日立製作所 那珂工場

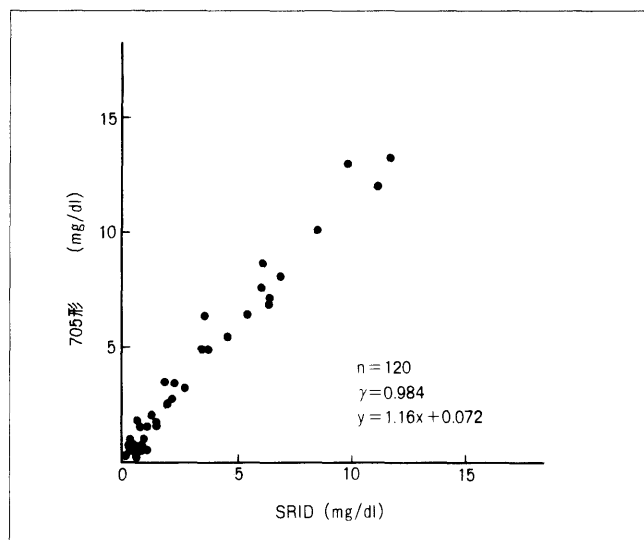


図2 相関図

表1 再現性

n	10	10
$\bar{x}$	2.6 mg/dl	6.5 mg/dl
SD	0.12	0.20
CV (%)	4.5	3.1

3. ラテックス凝集反応による測定

微粒子担体であるラテックス粒子は、目的とする抗原抗体反応に直接関与しない、比重が生体成分に近い、粒子径が均一である等の理由で免疫反応の担体として利用されるようになってきている。用手法のスライド凝集法で用いられる場合と異なり、ラテックス凝集法を自動分析装置に適用させる場合には0.1 μ m程度の微粒子を担体とすることが多い。

3.1 ラテックス凝集反応の基礎検討

ラテックス凝集反応は、ラテックス粒子の表面に抗体を結合させた感作ラテックスと試料中の抗原を反応させるもので、抗原抗体反応の進行に伴いラテックス粒子を仲立ちとして反応物が凝集することを利用している。この凝集の状態を、種々の粒子径のラテックス粒子で代用させることにより、ラテックス凝集反応の測定条件を検討した。

3.2 結 果

図3に、種々の測定波長におけるラテックス粒子径と吸光度の関係を示す。図4に、測定波長700nmにおけるラテックス粒子の凝集状態の模式図を示す。凝集模式図は、凝集塊が球形であると仮定して求めた。

3.3 ラテックス凝集反応による測定例

ラテックス凝集法による高感度な濁度分析例を次に示す。ラテックスによる増感効果をみるために、測定対象は2.と同じくCRPとした。また、ラテックス粒子の凝集状態を電子顕微鏡を用いて観察することも試みた。

3.3.1 測定方法

血清（抗原としてCRPを含む）2 μ lに緩衝液400 μ lを加

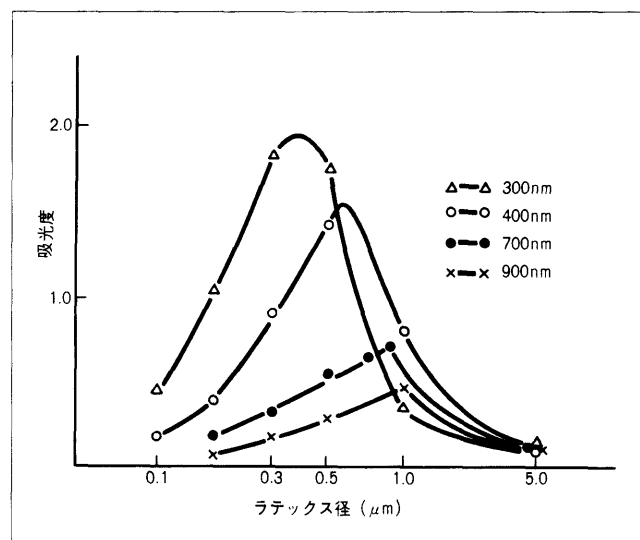


図3

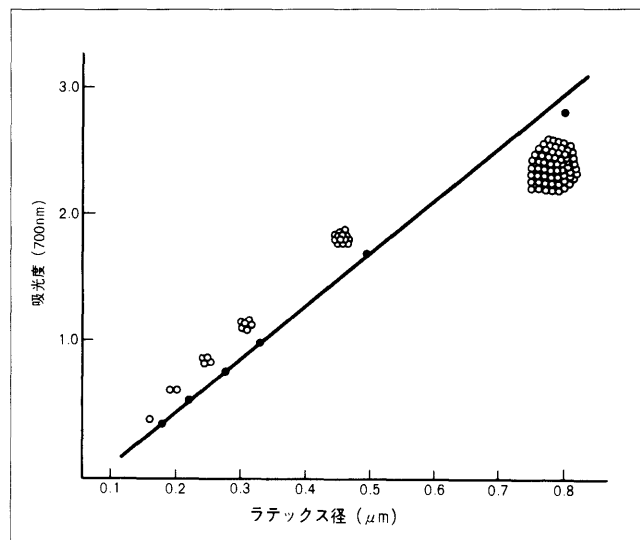


図4

えて、37℃で5分間反応させた後に吸光度を測定した（第1の吸光度）。この反応液に、粒子表面に抗CRP抗体を担持させたラテックス懸濁液100 μ lを加えて、さらに5分間反応させた。反応液の吸光度を測定し（第2の吸光度）、得られた吸光度値から先の吸光度値（第1の吸光度）を差し引いた値を基にして検量線を作成した。測定は、日立705形自動分析装置を用いて700nmの一波長測光とした。

ラテックス粒子の凝集状態の観察には、H-800型走査形電子顕微鏡を用いた。倍率は30,000倍とした。

3.3.2 結 果

図5に検量線を示す。CRP濃度0から5mg/dlまで直線検量線を得た。図6に免疫比濁法との相関を示す。

ラテックス凝集反応におけるラテックス粒子の凝集状態を観察した結果を写真1および写真2に示す。抗原抗体反応進行前のラテックス粒子はよく分散しているが、免疫反応により4倍以上の粒径に生長している事が観察された。

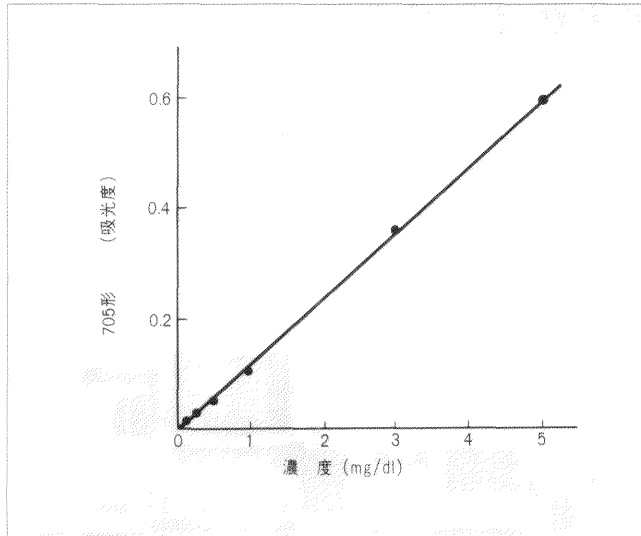


図5 検量線

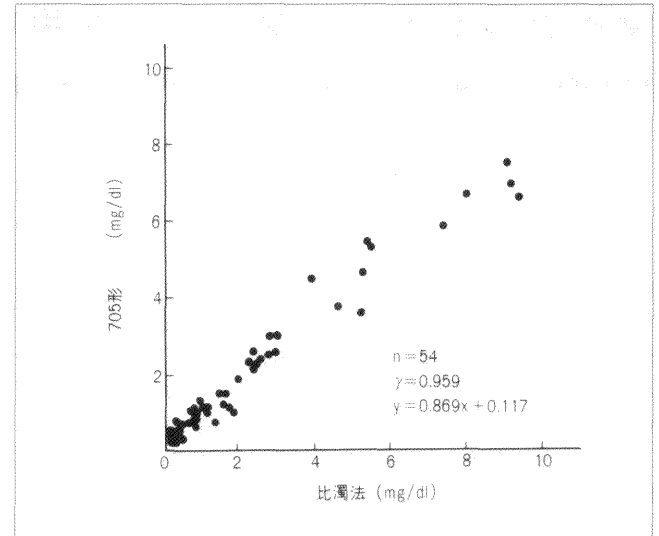


図6 相関図

表2 免疫学的測定項目と血清中濃度

濃度	10^{-4} モル/l	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
項目	α -AT IgG	IgA C ₃ , C ₄	IgM	CRP HCG β -ミクログ	T ₃	IgE プロラクチン	α -FP	CEA

(1) 単純比濁法

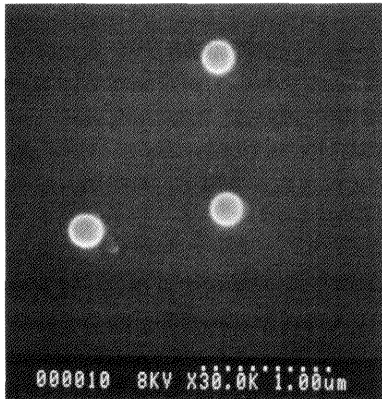
試料量 $20\mu\text{l}$ 、反応液量 $570\mu\text{l}$ での測定感度は、試料中のCRP濃度 1mg/dl 当り 0.01 の吸光度変化であり、又この測定での再現性は、 0.095mg/dl であった。又従来用いられているSRID法との相関についても十分な結果を得た。

この場合の測定感度は 10^{-8} モル/lである。従って、単純濁度測定では、免疫蛋白であるIg G.A.Mはもとより、C₃、C₄等の測定が可能である事が推定される。又この測定法では、CRPが限界であり、CEAや α -フェトプロテイン (α -FP)については感度が不十分である。

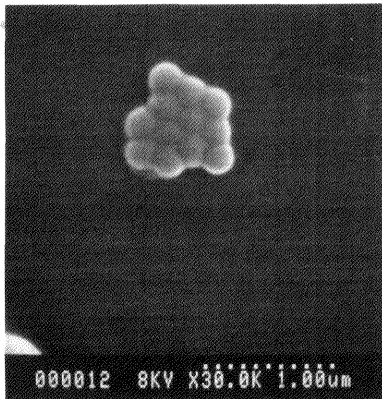
(2) ラテックス法

単純濁度法の感度を増すために導入したLATEX法では、単純濁度法とは異なり、反応液中に存在する粒子全体の体積はほとんど一定であるが、それらの粒度分布が変化する。この様なにごりの機械的変化を計測するには、明らかに、一波長測定が優れており、又この検量線は、直線を示した。モデルとして用いたCRPでは、ラテックスに抗CRP抗体を結合させたものを試薬として用いた。その結果、試料量 $2\mu\text{l}$ 、反応液量 $502\mu\text{l}$ での測定条件下で、試料のCRP濃度 1mg/dl 当り 0.12 の吸光度変化を得た。

単純比濁法とラテックス法の発色感度は、前者が、反応液中のCRP 1mg/dl 当り $0.285(0.01 \times \frac{570}{20})$ に対し後者のそれは $30.12(0.12 \times \frac{502}{2})$ である。従って、前出の単純濁度法に比し、ラテックスを導入する事により、 105.7 倍の感度を有する測定系を組立てる事が可能である。すなわち、濁度法による測定範囲が、ラテックスを導入する事によりさらに低濃度のものへと展開可能であり、最近注目を集めているガンマーカ (CEAや α -フェトプロテイン)まで拡大できる事を示唆している。



写1



写2

4. 考 察

免疫反応による測定の自動化を目的とし、生化学用自動分析装置に用いられている比色法を検出手段としている事から、濁度法をとりあげ、検討をおこなった。

濁度法には、単純に抗原抗体反応の結果生じる混濁度を比色定量する“単純比濁法”と、ラテックス粒子を増感剤として用いるラテックス法とがある。この両者について、測定感度比較をおこなうことができるように、両方法について測定のモデルとして、CRPを取りあげた。

マイクロタイタープレートを用いる蛍光免疫測定法

Fluoroimmunoassay using microtiter plates

渡来 仁* 保田 立二**

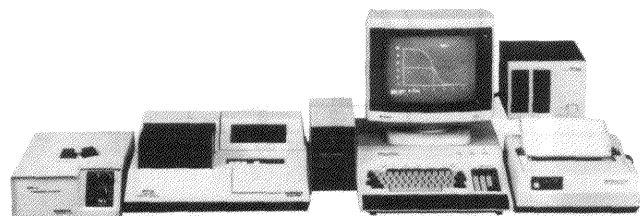
(昭和59年7月16日受理)

1. はじめに

抗原抗体反応による免疫測定法は、特異性、感度、簡便性に優れた方法である。抗原抗体反応で抗原または抗体量を測定する基本的な方法は、抗原抗体結合物が沈降するという性質を利用したもので、沈降物を直接測定する方法や、ゲル内で沈降線をつくらせる方法などがある。しかし、沈降物を測定する方法は複雑な操作がなく、簡便である利点がある反面、測定感度において劣っている。測定感度という点では、ラジオイムノアッセイ(radioimmunoassay,RIA)が良いとされているが、RIAの場合はラジオ・アイソトープ(RI)を用いるため、放射性廃棄物の処理に問題がある。近年、RIの代わりに微量で検出できるマーカーを用いた免疫測定法が開発されてきた。特に、酵素や蛍光物質をマーカーとした微量測定法が注目されてきている。中でも、蛍光強度を測定する方法は、適切な蛍光波長を選ぶことでバックグラウンドを少なくし、高い感度を得ることができる。そこで我々は、96穴マイクロタイタープレートを用い、蛍光測光によって抗体価、抗原量を感度よく微量で測定できる方法を確立するとともに、マイクロタイタープレート上で直接蛍光強度測光できる装置を、文部省科学研究費(56870049)の援助を受け、コロナ電気の協力により開発した。

2. 装置(図1)

2波長マイクロプレート比色計をベースに、光源部と測光部を外部に設置し、本体との間を光ファイバーケーブルで結んだ。ハロゲンランプから出た光をカットフィルターで特定の波長とし、光ファイバーケーブルの中心部を通して、マイクロタイタープレートのウェルに当て、反射光をケーブルの周辺部で採光、外部付属装置内のフィルターを通し、フォトマルで測光する構成とした。フィルターを交換することにより、種々の蛍光物質の測定に使用できる。また、既存の可視部用測定機種にも増設可能となっている。マイクロタイタープレートを用いることにより、測定検体数が増加し、そのデータ処理に時間がかかることから、市販のマイクロコンピュータに直接データを送るインターフェースも同時に製作した。マイクロコンピュータへの出力はRS232C規格とし、低価格の市販マイクロコンピュータへ接続可能である。マイクロコンピュータ搭載BASICでプログラムを作成し、データのディスクへの保存、計算処理を行うようにした。原データから換算結果までを書き移さずに記録できるので、研究用としては大変便利な装置である。現在、コロナ電気から日製産業を通じてMTP-22形



蛍光付属装置及びパソコンシステムを装着したMTP-22形コロナ2波長マイクロプレート光度計

コロナ2波長マイクロプレート光度計のMTP-F蛍光付属装置、MTP-IFインターフェースとして市販されている。

以下、本システムを用いた免疫測定法として、Enzymelinked Immunosorbent Assay (ELISA) 法およびLiposome Immune Lysis Assay (LILA) 法について紹介する。

3. ELISA法

3.1 原理

ELISA法は、Engvallら^{1),2)}によって酵素抗体法(酵素で標識した抗体を用い、組織内の抗原を特異的に検出する方法)の原理を応用して開発された酵素標識免疫定量法である。

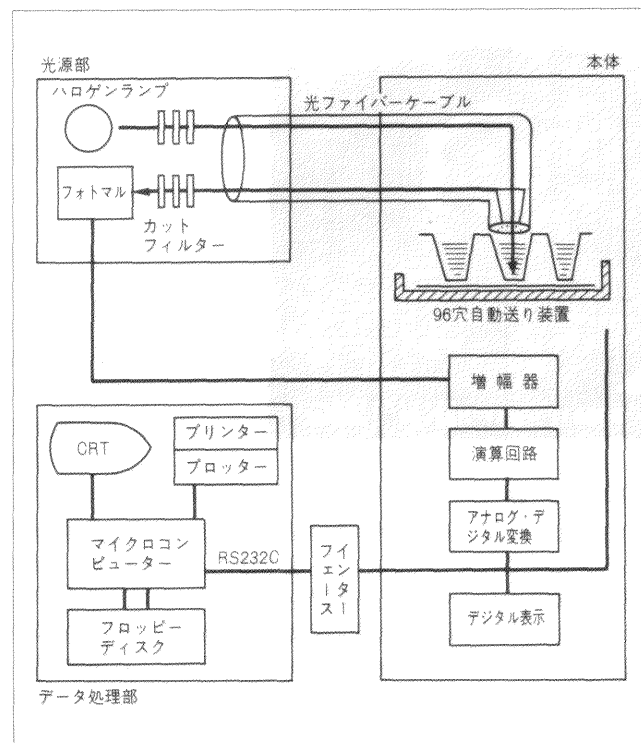


図1 マイクロタイター蛍光光度計の構成

* 東京大学医科学研究所生物製剤試験製造施設 助手

** 東京大学医科学研究所生物製剤試験製造施設 助教授 医博

ELISA法は、現在まで種々の改良が加えられ、感度、精度、簡便さ、自動化の可能性などの点でRIA法とほぼ同様になってきており、RIA法の短所である放射性廃棄物処理の問題や、アイソトープを使用するための高価な施設が必要でないことから、現在ひろく使われる様になっており、多種類の検体への応用もなされる様になっている。ELISA法には、競合結合法、サンドイッチ法、抗体測定法がある。

競合法は、抗原を固相に固定化させ、測定する抗体を標識抗体の存在下に競合的に結合させて抗原と結合した標識抗体、あるいは結合しなかった標識抗体の量から、抗体の量を測定する方法である。測定すべき抗体をあらかじめ抗原と反応させ、後に標識抗体と反応させる方法と、測定すべき抗体を標識抗体の存在下で反応させる方法とがある。

サンドイッチ法は、抗体を固相に固定化させ測定する抗原を固相へトラップした後、酵素標識抗体を結合させ、固相に結合した酵素活性から測定する抗原量を知るものである。また、抗体結合固相にトラップした抗原に、標識されていない抗体を結合させ、さらに、酵素標識第2抗体（抗体に対する抗体）を結合させる方法もある。

最も良く用いられるのが、抗体測定法である。抗原を固相に固定化しておき、測定する抗体を固相上にトラップし、その後、酵素標識第2抗体（抗体に対する抗体）を結合させ、固相上の酵素活性から測定する抗体の量を知る方法である。標識抗体を選ぶことにより、IgG、IgM、IgEなどの抗体を別々に、またそれらの総量を測定することもできる。我々は、酸性 β -ガラクトシダーゼ欠損症の病因究明を目的とし、ヒト胎盤から本酵素の精製を行い抗体の作製を試みているので、以下、 β -ガラクトシダーゼを抗原とする抗体価測定法を例にとり、マイクロタイタープレートで全反応、測定が行えるELISA法について述べる。

3.2 抗体価の定量

96穴マイクロタイタープレート（U底、平底いずれでもよい）のウェルに10 μ g/ml（1 μ g/mlでも可能）の濃度の精製酸性 β -ガラクトシダーゼ抗原を50 μ l入れ、37°C 1時間、水で飽和した保温器中で抗原を吸着させる。洗浄用phosphate buffered saline (PBS) (0.05% Tween20の入ったPBS)で3回洗浄し、非吸着抗原を除いた後、ウェルに希釈した抗体を50 μ l入れる（この場合、抗体のプレートへの非特異的な吸着を防ぐため、0.05% Tween20入りのPBSにウシ血清アルブミン(BSA)を2%加えた溶液で抗体を希釈し、ウェルに入れる）。37°C 1時間、水で飽和した保温器中で反応させた後、再び洗浄用PBSで3回洗浄し、抗原と結合しなかった抗体を除いてやる。ついで、200倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウスIg抗体（希釈は0.05% Tween20入りPBSにBSAを2%加えた溶液で行う）を50 μ lウェルに加え、水で飽和した保温器中で37°C、1時間反応させる。反応終了後、洗浄用PBSで3回以上洗浄し、基質として0.5 mM 4-メチルウンベリフェリルフォスフェイト溶液（4-メチルウンベリフェリルフォスフェイトを、50mM Na₂CO₃・10 H₂O、50mM NaHCO₃、1mM MgCl₂から成る炭酸緩衝液で0.5mMにする）を100 μ lウェルに入れ、37°Cで1時間反応させる。アルカリホスファターゼ標識抗体ならびに基質は、注射筒を使うディスペンサー（例えばニチリョーモデル

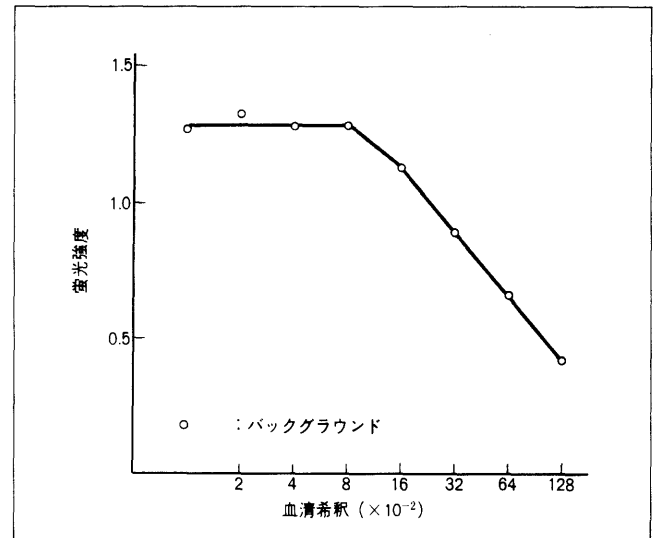


図2 マウス抗 β -ガラクトシダーゼ血清のtitration

8100)あるいはタイタ・テックマルチチャンネルピペットを用いると便利である。酵素反応は、0.4M K₂HPO₄と0.02 M NaOHから成る溶液を100 μ l加えて停止させ、励起360nm、蛍光450nmの波長で蛍光強度を測定する。蛍光基質を用い蛍光強度を測定するELISA法は、吸光度を測定する従来のELISA法に比べ感度が10~100倍良いことが示されている。図2にこの方法により測定したマウス抗 β -ガラクトシダーゼ抗血清の測定例を示す。この方法は、ハイブリドーマのスクリーニングの様な、多数の検体を迅速かつ感度良く検出する場合に適しているものと思われる。

4. LILA法

4.1 原理

リポソームは、脂質二重層からなる小胞と定義されるモデル人工膜である。生体内における抗原抗体反応を考えた場合、それは、生体膜上での反応であることが多い。したがって生体膜上の抗原物質（血液型物質、組織適合性抗原、腫瘍特異抗原、細菌膜抗原、ウィルス膜抗原等）に対する反応は、抗原物質が膜に存在していたのと同様の状態で調べることにより、より実際に近い結果が得られるものと考えられる。リポソームに抗原物質を組み込むことにより、個々の単離精製された抗原に対する生体の反応が明らかにすることができる。抗原物質を組み込んだリポソームを用い、それに対する抗体を検出する方法は、(1)凝集反応、(2)沈降反応、(3)補体による膜損傷反応、を利用するものがある。これらの中で最も感度が良いのは、(3)の方法であり、この原理を応用したものがLILA法である。すなわち、リポソームの脂質二重層に抗原物質を組み込むとともに、リポソーム内にマーカーとなる物質を封入させておき、それに抗原に対する特異抗体を反応させると、抗体が抗原と反応し、抗原抗体複合体を形成する。このとき補体が存在すると、補体成分により、膜攻撃単位が形成され、それがリポソームに働きマーカーが外液に遊出する。このマーカーの遊出を測定することにより、抗体価を求めることができる。現在まで用いられてきたマーカー物質としては、K⁺、Na⁺な

どのイオン、グルコース、ガラクトースなどの糖、 ^{51}Cr などのラジオアイソトープなどがある。中でもグルコースがマーカーとして最も良く用いられてきた。しかしながら、グルコースを抗体価測定のマーカーとして応用した場合、血清を前処理し、血清中のグルコースを除去しなければならず実用化する上で大きな障害となっていた。そこで我々は、カルボキシフルオレセインという取り扱いの簡単な蛍光色素をマーカーとして用い、96穴マイクロタイタープレートを用い、全反応、測定が行える微量簡便な抗体価、抗原量の測定法を開発した。以下、フォルスマン抗原を例にとりその方法について述べる。

4.2 抗体価・抗原量の定量

4.2.1 抗体価の定量^{(3),(4),(6)}

抗体価のassayに用いるリボソームは通常、以下の様にして作る。卵黄レシチン $0.5\mu\text{mol}$ 、コレステロール $0.5\mu\text{mol}$ 、ホスファチジン酸 $0.05\mu\text{mol}$ 、フォルスマン糖脂質 $0.05\mu\text{mol}$ (10%フォルスマン-リボソーム)をナシ型フラスコにとり、エバポレーターで溶媒を除去し、ガラス壁に脂質フィルムを作る。次に、 0.2M カルボキシフルオレセイン液 0.1ml を加えVortexミキサーで強く攪拌して脂質懸濁液とする。リボソームに封入されていない蛍光色素は遠心分離で除き、ゲラチンペロナール緩衝液で 2ml とする。この様にしてできたリボソームを用い抗体価のassayを行なう。

56°C で30分間非働化した被験血清を Ca^{++} 、 Mg^{++} を加えたゲラチンペロナール緩衝液(GVB^{++})で希釈し、 $25\mu\text{l}$ をマイクロタイタープレートのウェルに入れる。これに GVB^{++} で100倍希釈したリボソーム溶液 $5\mu\text{l}$ をリピーティングディスペンサーで加える。補体は、モルモット新鮮血清を用い、 GVB^{++} で100倍希釈したものを $25\mu\text{l}$ 加える。マイクロプレートミキサーで充分混和させ、水で飽和した保温器中で 37°C 90分反応させる。反応後、 10mM EDTAを含むペロナール緩衝食塩水を各ウェルに $100\mu\text{l}$ 加え反応を停止させ、励起 490nm 、蛍光 520nm の波長で蛍光強度を測定する。100%マーカー流出量は、 GVB^{++} $25\mu\text{l}$ 、リボソーム $5\mu\text{l}$ に10%TritonX-100、 $25\mu\text{l}$ を加えて反応させたものを用い、補体+リボソームのみのウェルを0%として個々のウェルのマーカー流出パーセントを計算する。図3にこの方法で測定したウサギ抗

フォルスマン血清の測定例を示す。また、リボソーム内に反応基をもった物質を入れておき、bifunctionalな作用をもつ架橋剤でタンパク抗原をリボソームに結合させることにより、タンパク抗原に対する抗体価の定量も可能である。我々の研究室では、ヒトIgGやC-反応性タンパク質をリボソームに結合させ、抗体価の定量を行っている。

4.2.2 抗原量の定量^{(5),(6)}

抗原量の測定は、上記の蛍光色素入りリボソームによる抗体価測定法を応用し、精製した糖脂質抗原を含む蛍光色素封入リボソームと、特異性の高い抗体を用い、生体組織にある抗原物質を競合させることにより行う。すなわち、抗フォルスマンIgG抗体を蛍光色素入り0.5%フォルスマンリボソームであらかじめtitrationし、マーカー遊離曲線がプラトーから下がり始める希釈倍率を求めておく。 $25\mu\text{l}$ の希釈抗血清に、GVBで希釈した試料、標準曲線用超音波処理リボソームを $25\mu\text{l}$ 加え充分混和後、 4°C で一晩反応させる。次いで、蛍光色素入り0.5%フォルスマンリボソームを $5\mu\text{l}$ 加え補体を $25\mu\text{l}$ さらに加えて上記の抗体価のassayを行う。得られた遊離マーカーパーセントからインヒビションパーセントを計算し、標準曲線から試料に含まれる抗原量を計算する。図4にこの方法により作製した標準曲線、図5にヒツジ赤血球におけるフォルスマン抗原のインヒビション曲線を示す。フォルスマン抗原では ng 以下のレベルで定量が可能であり、従来のRIA法よりも感度の良いことが示されている。また、タンパク抗原を結合させたリボソームを用

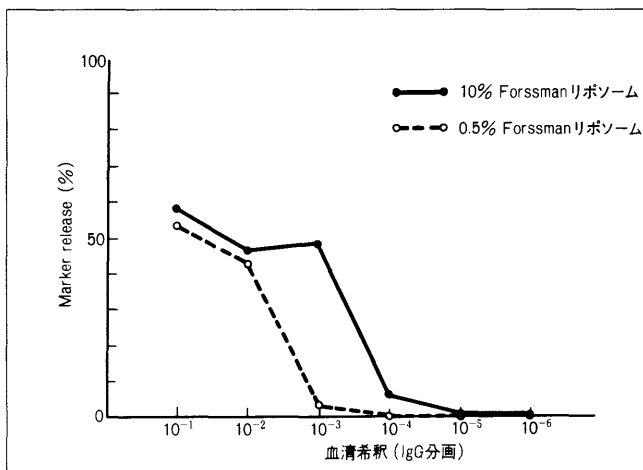


図3 ウサギ抗Forsman血清 (IgG分画) のリボソームによるtitration

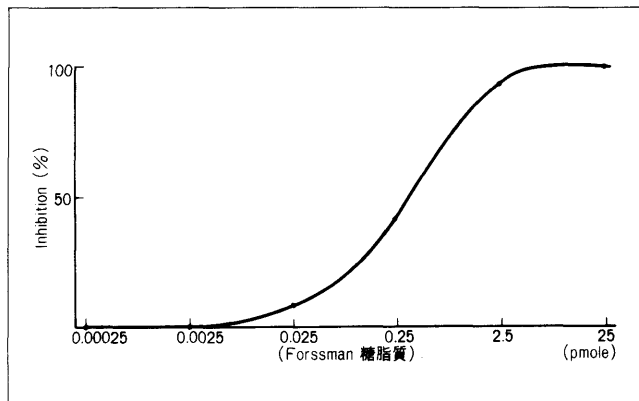


図4 Forsman抗原の定量法標準曲線

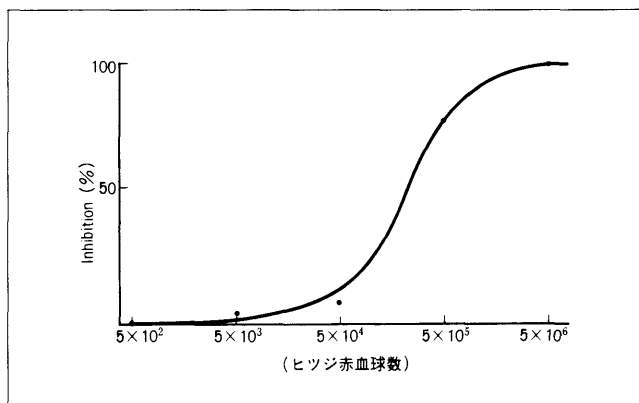


図5 ヒツジ赤血球におけるForsman抗原の定量

いることにより、タンパク抗原の定量も可能となっている。ヒトIgGやC-反応性タンパク質の定量を行い良い結果を得ている。

5. おわりに

最近における免疫測定法は、微量でしかも高感度のものが求められている。我々は、96穴マイクロタイタープレートを用いて微量の反応液で全反応を行い、蛍光強度を測定することにより、従来のassay系よりも高感度でしかも簡便な測定法を開発し、またそのためにマイクロタイタープレート上で直接蛍光強度を測定できる装置も考案した。このシステムは、一度に多数の検体が測定でき、感度のうえからも実用性の面からもすぐれた方法であると考えられる。

参考文献

1) Engvall, E., and Perlmann, P. : Immunochemistry,

8, 871(1971)

2) Engvall, E., and Perlmann, P. : J. Immunol., 109, 129 (1972)

3) Yasuda, T., Naito, Y., Tsumita, T., and Tadakuma, T. : J. Immunol. Methods, 44, 153(1981)

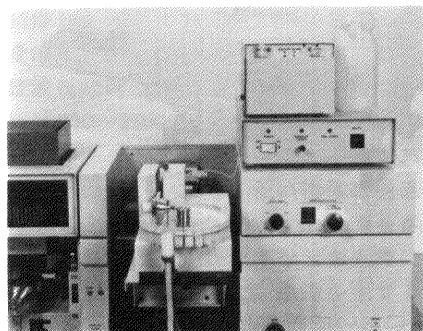
4) 保田立二, 内藤祐子, 多田隈卓史 : 免疫実験操作法, IX : 2989(1980)

5) 内藤祐子, 保田立二, 多田隈卓史 : 免疫実験操作法, X : 3371(1981)

6) 海瀬俊治, 保田立二 : 免疫実験操作法, XII : 3845(1983)

Topics

日立原子吸光分光光度計 グラファイトアトマイザ用オートサンプラ



グラファイトアトマイザ原子吸光法は、試料量が少なくてもよいこと、感度が非常に高い(ppbレベルの分析が可能)ことなどから、かなり普及し、1982年にはJIS(日本工業規格)にも採用されました。この度、このグラファイト原子吸光分光光度計の特別オプションとして、オートサンプラを製品化しました。これにより、サンプリングに熟練を要すること、測定者が拘束されることなどが解消されます。

■特長

(1) 再現性の向上

測定に熟練しなくとも、良好な結果が得られます。総合性能として、手動の5%以上(C, V, 値)に対し、3%以

下の精度が得られます。

(2) 省力化が可能

セッティングをすれば、後は、サンプリングと測定を自動的に行ないます。測定者が拘束されません。

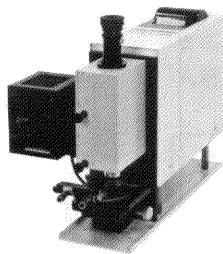
(3) 特定の有機溶媒試料に利用可能

サンプルカップや流路系に耐有機溶媒材質を使用することにより、MIBK等の有機溶媒にも使用できます。

(4) コンパクト設計

サンプリング部を小型化することにより、取扱いが容易です。

日立カラーセンサシリーズ



日立カラーセンサは、工業製品や自然物など、従来の測色装置では測定しにくい試料を、短時間で分光測色する装置で、光ファイバを用い、物体各部の色を自在に計測するライトガイド形(C-1040)、1mm以下の微小部分の測色をする顕微形(C-1060)とがあります。

従来の色彩測定器には、いわゆる分光測色器と、光電色彩計とがありますが、前者は積分球開口に試料をあてるため試料の形や大きさが制限され、か

つ測定に時間がかかる欠点があり、後者は三色フィルタを用いる刺激値直読法のため、ある条件下での色しか測定できない欠点があります。カラーセンサは、短時間に波長を走査する分光測色ですから、試料の物理的反射特性が測定されるので、種々の照明、観測者に対する測色値が予測できるほか、試料に対する照明及び受光の条件に工夫を加え、ライトガイド、望遠レンズ、顕微鏡が用意されているので、かなりの自由度で対象物を測定することができます。

これらの光学系で受光された光は、大口徑凹面回折格子を用いた分光器で分光され、スペクトル面に配置されたシリコン・フォトダイオードアレイによって受光されます。測色計算は標準として、2度視野・標準の光Cと10度視野・標準の光D₆₅に対して行われ、三刺激値、色度座標、L a b 表色値と、各波長ごとの分光反射率がプリントアウトされます。これら出力は、信号出力として送信されますので、他の条件に対する測色計算や統計処理は、外部計算機を用いて行うことができます。

カラーセンサは、従来測色が困難であった対象物の測色を可能とするもので、ライトガイド形は、肌色、化粧品、美術工芸品、各種工業製品の直接測色に、望遠形は、動物、農水産物の非接触測色や、工業製品の色彩管理に、顕微形は印刷物、写真、染色物、動植物などの部分測色や、最近特に進歩が著しいカラープリンタ、カラーディスプレイの測色に応用されます。

光学素材の透過・反射スペクトルの測定

Transmittance and Reflectance Spectrum of Optical Elements

小森 律夫* 内野 興一* 皆川 定雄* 遠山 恵夫*

(昭和59年7月25日受理)

1. はじめに

本年に入って顕著な産業界の動向は、その高度な技術開発力を基礎とし新素材開発への姿勢と意欲である。

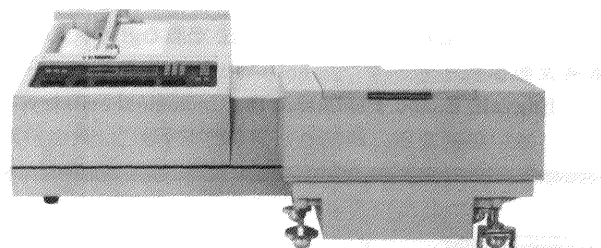
その成果も着実に具体化し、はずみがついてきた。特に光情報処理機器関連に用いる光学部品は脚光を浴び、その付加価値の高さ、将来にわたる旺盛な需要、周辺機器への牽引力などの見地から、市場規模は確実に拡大の趨勢にある。

その典型的な事例は、光ファイバーや光ディスクの情報書込み、VTRなどに用いられる光学素材であり部品である。

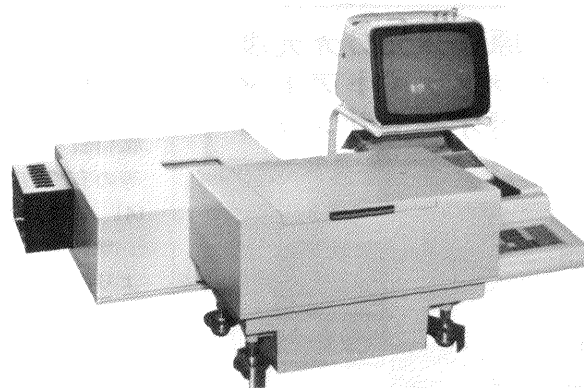
これらの素子は従来の常識を破り、現代の風潮である小形化の波をうけて微小化の傾向をますます強めてきた。

例えば、光ディスクに用いられる偏光ビームスプリッターでは一辺が8mmの立方体の透過率、反射率を測定する必要性に迫られる。しかも、この特殊な光学部品は薄膜光学を駆使するため、入射角特性や偏光性など、製品の良否を決める物理光学的な諸特性を厳密に求めることが要請される。

一方、長大物も測定対象になる。カメラやテレビ撮影用のズームレンズや大口径航空用レンズは言うに及ばず、最近では素材そのものの光学的特性を精度よく知る必要から、十分に長くして光路長を与え、透過率を拡大記録するなどである。光ファイバ用素材の屈折率調節の混入物質の定量や透過材などの試験に有用であり、試料室は十分に大きい



330形自記分光光度計に取り付けた外觀図



150-20形ダブルビーム分光光度計に取り付けた外觀図

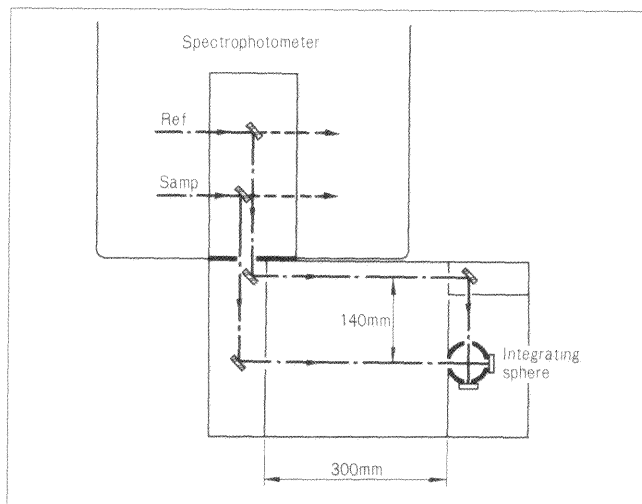


図1 分光光度計と大形試料室積分球付属装置の配置

が必要になる。

前号 (Vol.26, No.4) において報告したように、日立製作所では、各分光光度計 (320/330形, 228形, 150シリーズ 220A形……) に共用できる大形試料室積分球付属装置 (以下、大形試料室と略す) を開発し、この種の測定に供給している。既にその概要については前号に記述し、原理、構造について説明したので割愛させていただき、その光学系と特長について述べ、二、三の測定例を示す。

2. 大形試料室の概要

図1には大形試料室の光学系を示した。自記分光光度計の試料室に中間光学ユニットを設定し、光束を手前に取り出して、大形試料室に導入する。標準側と試料側の光束間隔は140mmで、試料サイズは最大径200mmφ、長さ300mmの円筒形試料までV形ホルダーにセットして測定できる。また、平板形試料では200mm四方程度まで設置できる。測定台上には、各種の入射角における正反射光測定装置 (5°, 12°, 30°, 45°, 60°……標準付属) が準備されており、光学素材の物理光学的な情報を得るのに極めて有用である。また、このような固体試料では、基準物質が空気であって、かつ

*日立製作所 那珂工場

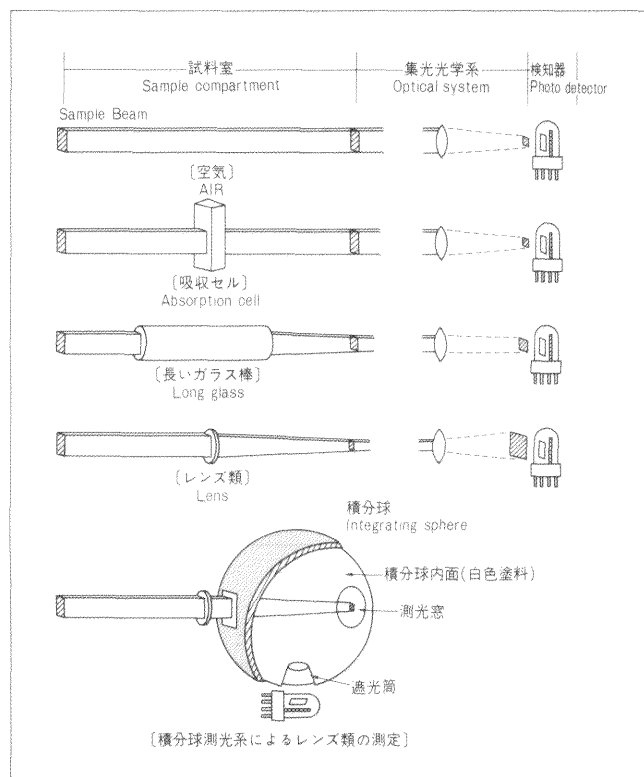


図2 光学部品（例えばレンズなど）の測定

諸基本量（焦点距離、屈折率など）により、検知器受光面の結像形が変わるので検知器の感度ムラ（locality）の影響を受ける。このために積分球検知方式が必要となる。性能保証波長範囲は250～1500nmであるが、若干のノイズを見込めば200～2500nm全域の測定も可能で赤外域に連結できる。測定例をご参照いただければ幸いである。

図2には、レンズや長い物体の透過率測定の場合に、光電管受光面における結像形の状態を示した。基準物質、空気の場合の像と、レンズなどを光路に置いたときでは明らかに像形が異なるので、誤差を生ずることがわかる。積分球方式では、入射光束が捕捉積分されるので解消できる。

3. 大形試料室の特徴

本装置の利点は、従来の分光光度計の試料室では“狭い”と感じられた多くの試料が測定できることである。このため測定用に試料を裁断したり、特製する必要は著しく軽減した。また積分球検知方式の採用により、表面のキズや若干の“曇り”，平行度などに影響を受けにくくなった。

(1) 直径200mmφ、長さ300mmまでの円筒状長大物の透過スペクトルの測定、平面状大板では250mm×250mm程度まで装着できる。

(2) 光学系に工夫を凝らし光束径を1mmφ程度の微小ビームに絞ることもできる。微小レンズや微小面の測定に有効である。

(3) 偏光子の挿入が容易である。入射角が大きくなると反射、透過率は偏光成分により異なるから、P成分、S成分に分けて測定する必要がある。各種の正反射付属装置（5°、12°、30°、45°、60°……）が準備されている。

4. 測定例

(1) 偏光ビームスプリッタの反射・透過特性

家電製品の花形であるVTRや光情報処理機器の光ディスクなど、幅広い分野で用いられる偏光ビームスプリッタは、直角プリズムを二つ重ね合わせて、その接合部に特別な工夫を凝らしてある。

この接合面にみられる薄膜光学の進歩は最近における新技術の成果の一つであって、選択波長帯における反射率が99%以上が望まれる。

図3に示すように半導体レーザーによる完全単色、直線偏光光波が偏光ビームスプリッタに入射すると（入射面に平面偏光）、まずストレートに透過する特性が要求される。次に透過光波はλ/4波長板などを通過して楕円偏光し、ディスクなどに情報書込みしたあと反射して、再度、偏光ビームスプリッタに入射する。この光波は90°回転して垂直偏光成分に転換されているので、接合面は垂直偏光成分に対して反射率が十分に高いことが所期の目的を達することになる。

図4には、測定に用いた正反射測定付属装置の光学系を示した。まず[a]に示すように3枚のミラーをV字形光学系としてあらかじめ100%ラインを補正しておき、次に[b]のようにM₂ミラーをM₂'の位置に移動し、M₃をM₃'のように角度を変えて設定したあと、試料表面を試料ホルダ部に密着して置けばN字形光学系が得られる。各ミラーの反射率は既に補正してあるので、この光学系に介在するのは、試料の表面のみであるから、試料の反射率は、ほぼ絶対反射率として求められる。

図5には、45°正反射付属装置の試料ホルダ部を取り外し、枠上ラインに偏光ビームスプリッタの接合面を置いた状態を示した。透過スペクトルはV字形光学系で、反射スペクトルはN字形光学系で求められる。

図6には、選択波長帯の中心波長が750nm付近にある偏光ビームスプリッタの透過および反射特性を示した。まず、偏光子を90°偏光（P成分）とし、V字形光学系で100%補正を行ない、そのあと偏光ビームスプリッタを光路に挿入する。98%と良好な透過特性を示している。この透過率は、入射、出射面にほどこす反射防止膜の巧劣と接合面の透過

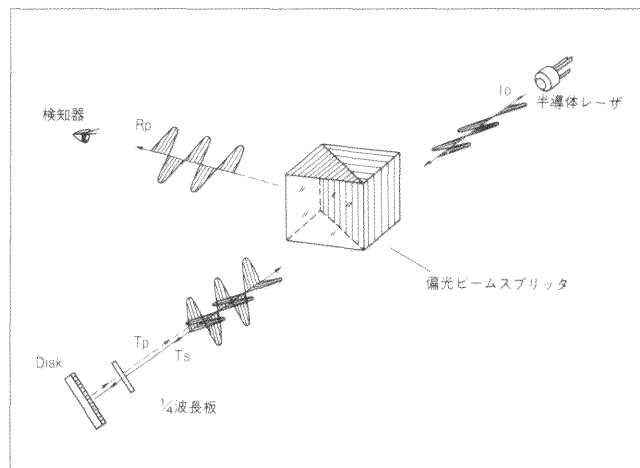


図3 偏光ビームスプリッタの使用例

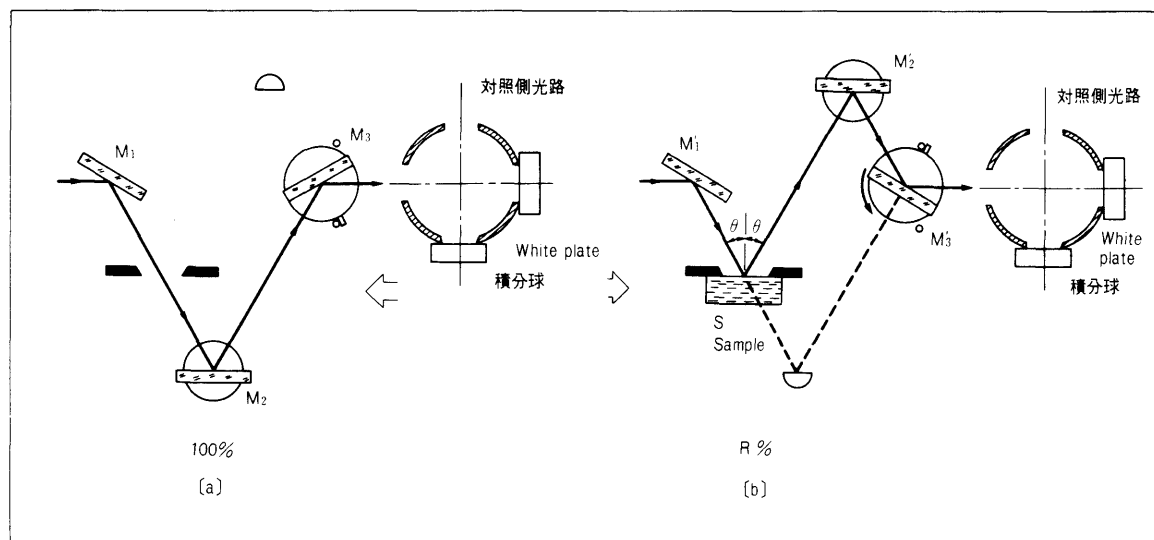


図4 正反射測定付属装置の光学系

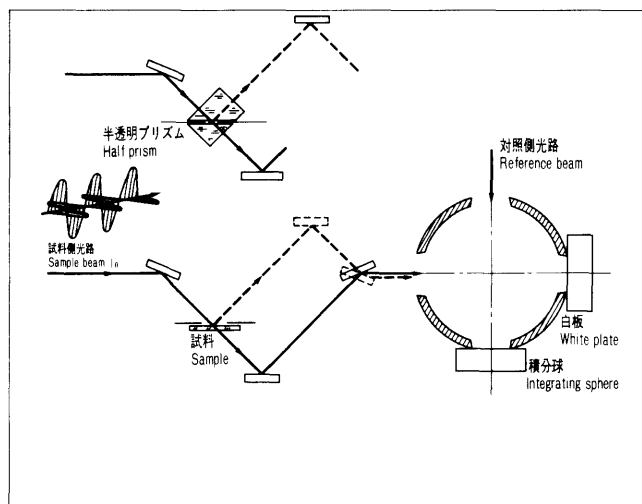


図5 45°正反射付属装置の光学系

性に係わることは明らかである。

次に、偏光子を0°偏光(S成分)として、再びV字形光学系で100%補正をして、前回の入射面を180°回転し(逆方向から)、設置して、N字形光学系で測定した。これにより接合面の反射スペクトルが得られる。約97%の高い反射率を示している。

次に、V字形光学系に戻すと、透過スペクトルが記録できる。透過する光は1%弱であり、逆入射光に対して、良好なcut off効果が得られている。

図7には、別のタイプの偏光ビームスプリッタを示した。まず、入射光の透過特性をもたせておく(点線記録)。そして、逆入射光波の反射特性を広くする(実線記録)。ラップした斜線部分が有効選択波長帯になるから、結果的には同じ効果が得られる。

(2) 窒化シリコン膜の反射特性

図8には、シリコン・ウェハの表面に絶縁体である窒化

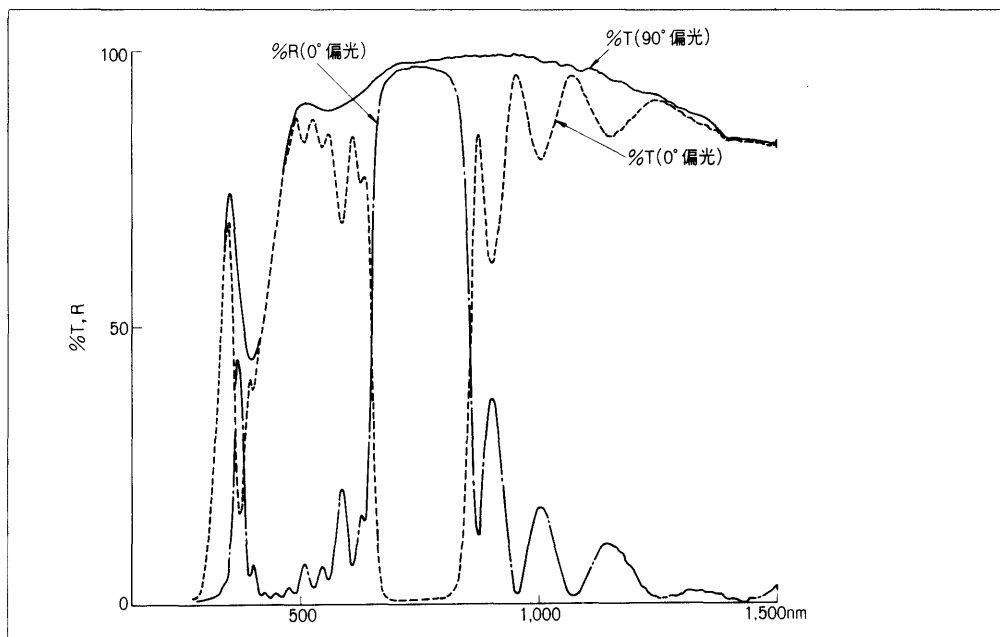


図6 偏光ビームスプリッタの透過・反射特性

シリコン膜処理した場合の干渉縞の測定例を示した。

図9のように大形試料室用5°正反射付属装置を用いて、5°の入射角で処理面に照射し、その反射光を積分球検知部で捕捉する。本付属装置はコーティング面の反射吸収や干渉縞から求める膜厚測定などに有用である。積分球入口に近いので、例えば板ガラスなどの表面および裏面反射光が同時に取り込めるので、総合的な反射スペクトルを知りたいときなど便利である。

図8において点線は窒化シリコン膜の干渉縞でこれから膜厚が計算できる。また干渉縞のピークに接する点線は、シリコン・ウェハそのものの反射スペクトルである。

実線は、ピンに接続する引出し線用のアルミニウムスポットの反射スペクトルである。あらかじめ、適当な波長で

の反射率を定めておけば、この反射率から厚さを管理できる可能性が開ける。

図10には、全域(200~2500nm)にわたる反射スペクトルを330形自記分光光度計で測定した。

(3) テレビ用ズームレンズの透過測定

テレビ撮影用レンズは、波長帯域や明るさがポイントになる。また特殊な目的のために用いる場合、例えば夜間撮影などでは、近赤外域の透過力や距離補正が問題となる。また航空用カメラレンズなどでも同様な特性が必要である。

図11には一般に用いられているテレビ用カメラレンズと赤外線用カメラ透過スペクトルを示した。レンズ表面のコーティング処理により大幅に分光特性が異なる。一般用は可視域の末端波長である700nm付近から急激に透過率が低下し、

図7 偏光ビームスプリッタの透過・反射特性

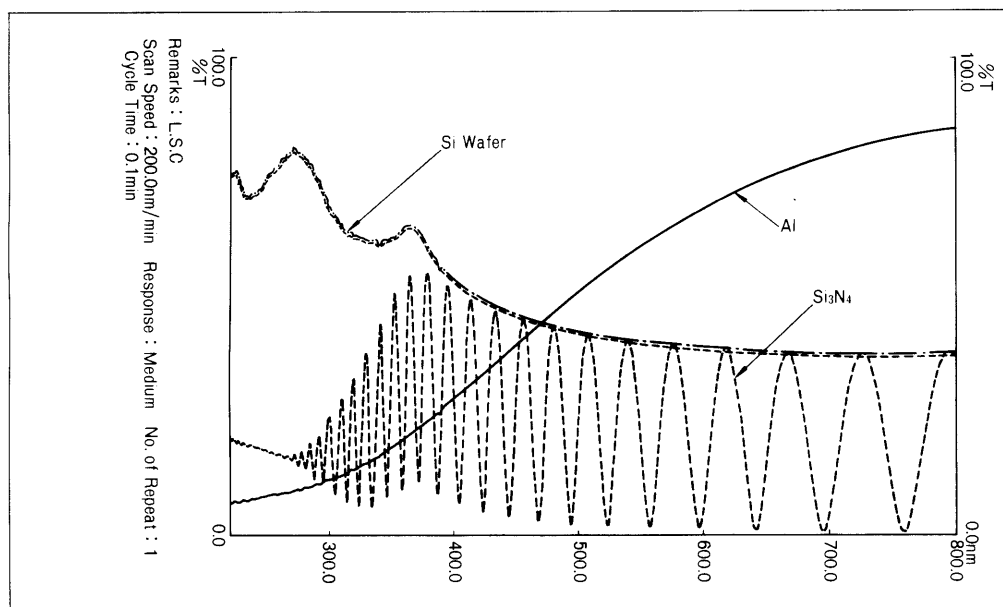
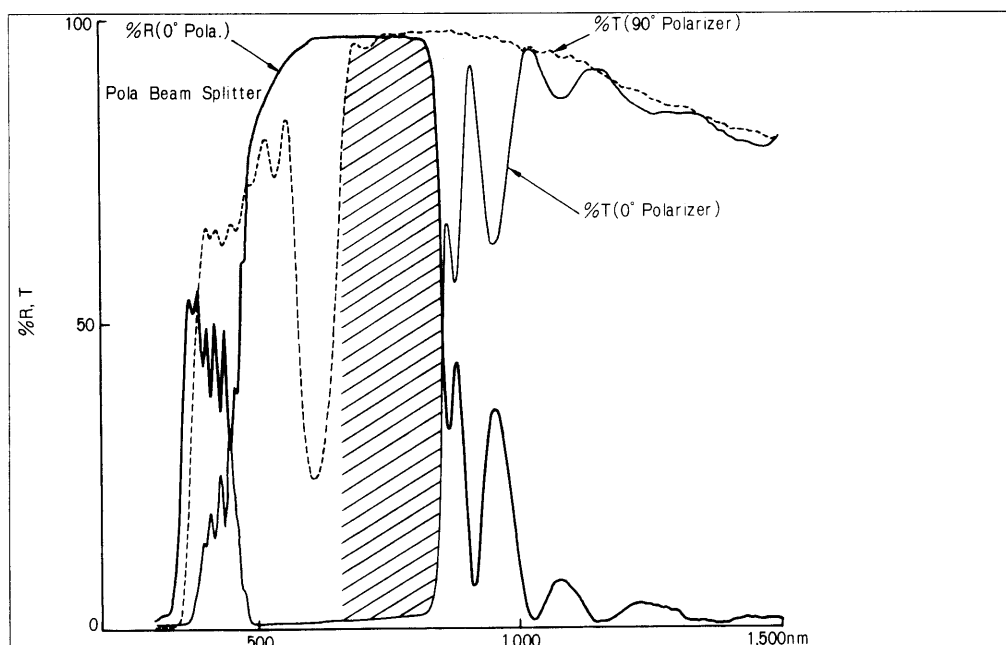


図8 窒化シリコンおよび接続用アルミニウムの反射スペクトル

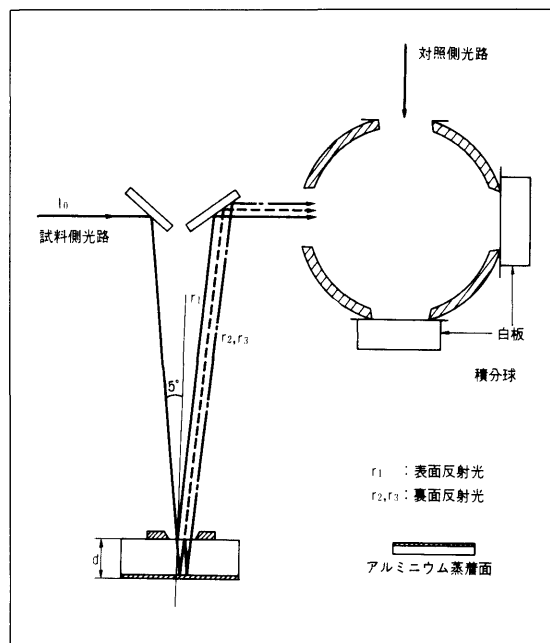


図9 大形試料室用5°正反射付属装置の光学系

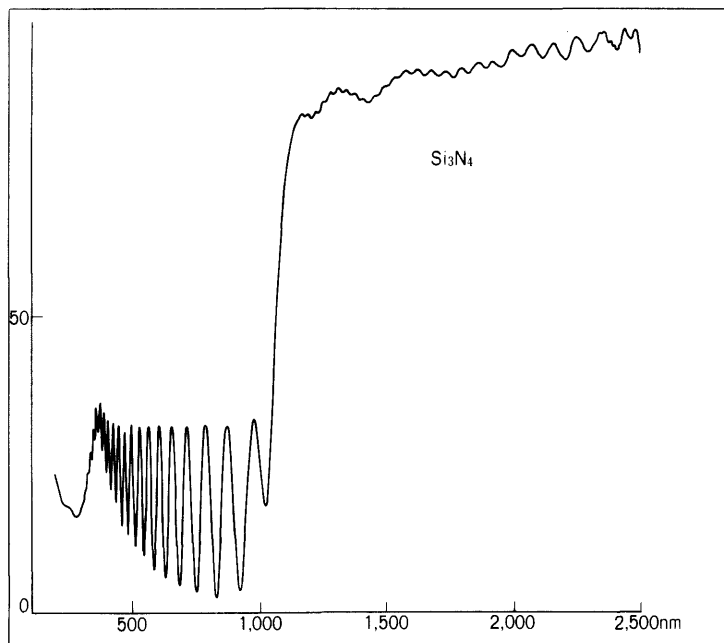


図10 窒化シリコン膜の反射スペクトル

1000～1500nmでは30～40%程度で暗い。赤外線用は、可視域を犠牲にして近赤外域で充分な透過率を示しており、1000nm前後で95%に達し、長波長側にかけて緩やかなスロープで漸減する。十分に高い透過率が得られており明るい。また、中間的特性をもたせたVIS typeの透過特性を併記した。

本測定はV型ホルダーを用いたが、試料の大きさは200mmφ×300mmまで可能であり、2000～2500nmの長波長域でも少ないノイズレベルで記録できている。

(4) ダイクロイック ミラーの測定

カラーテレビや天然色写真(ワンショットカメラ)の三色分解用などに用いられているフィルターは、ZnS(高屈

折率物質), MgF_2 (低屈折率物質)の交互層をつけたもので、図12にその代表的な光学系を示した。I, IIのようにcut offする波長帯が異なるので色分解として用いることができる。

Iは白色光中の赤および緑色を通し青色のみを反射する。IIは赤と青を通過して緑色を反射する。

図13にはIの0°偏光に対する45°入射角における特性を示した。青色部の波長域帯で反射率と透過率の和はほぼ1に近く、透過しない光はほとんど完全に反射する。

図14は、0°および90°偏光における反射特性を示したもので、90°偏光が入射すると波長域帯は狭まるが、緑色、赤色の波長帯におけるcut off特性は大幅によくなる。

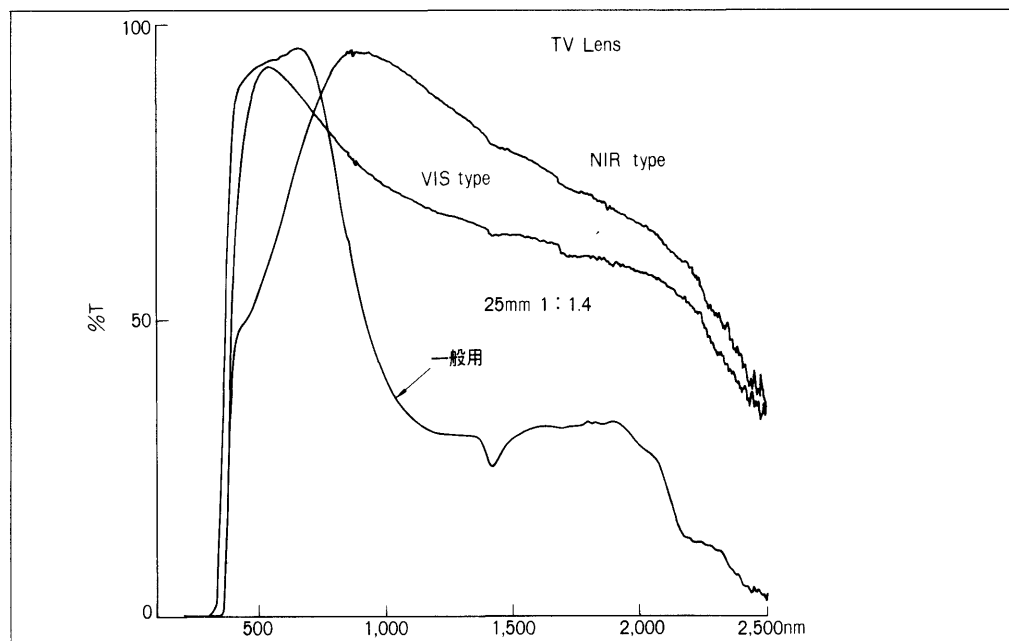


図11 各種ズームレンズの透過スペクトル

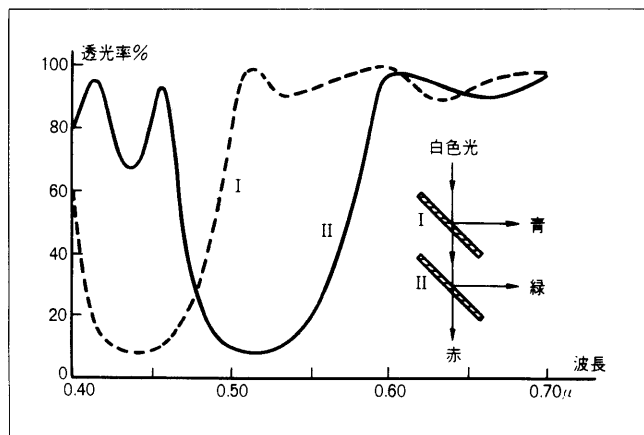


図12 多層膜による三色分解フィルター

5. 結 言

最近の産業界の趨勢からみて新素材開発の緊急性は加速化の傾向にある。特に小形精密化と高性能化が並列的に同時進行している光技術は、基本的な光素材や光学部品への応用が拡大している。光ファイバー、半導体レーザー等に用いる光システムの開発には、透過、反射特性はもちろんのこと、入射角、偏光特性や複屈折性など、従来困難といわれた物理光学的な諸特性の研究が必要となる。また、微小部分の測定も今後ますます増えると予測される。

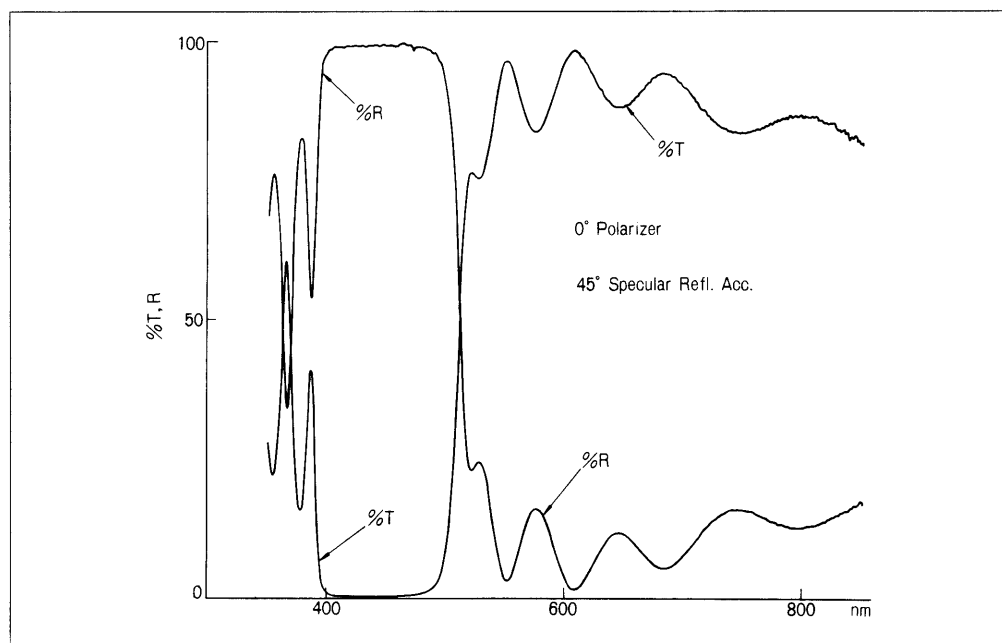


図13 ダイクロイックミラーの透過および反射スペクトル

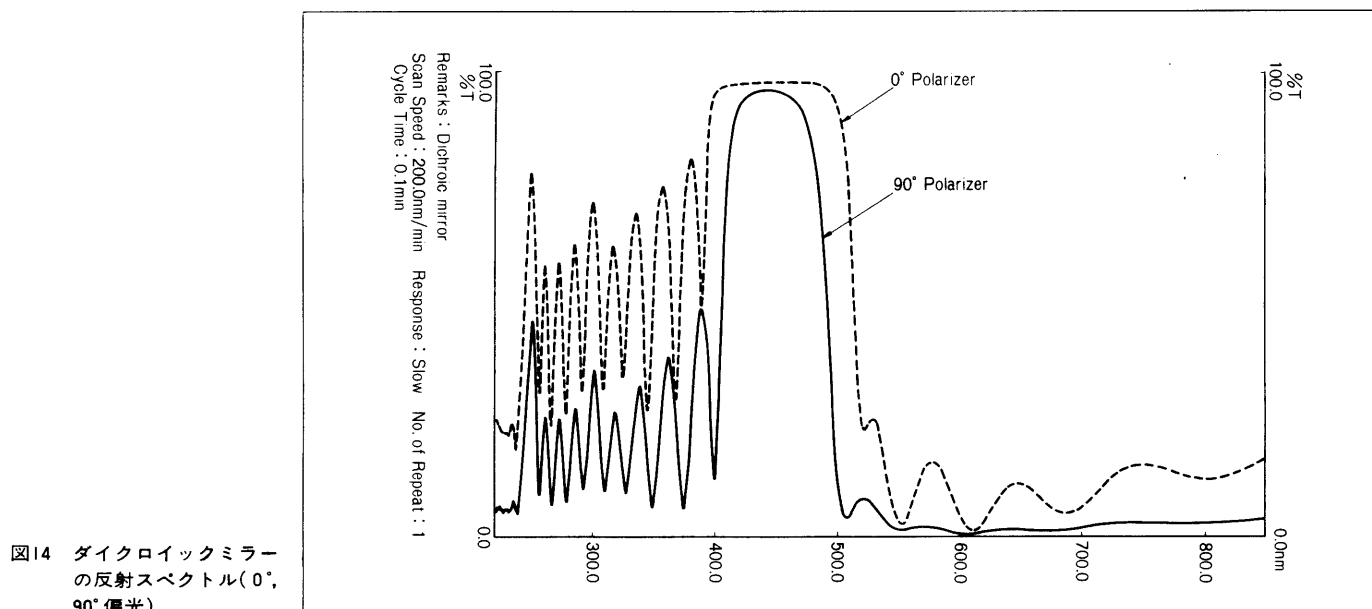


図14 ダイクロイックミラーの反射スペクトル(0°, 90° 偏光)

Topics

日本電子顕微鏡学会 第40回学術講演会開かる



去る6月27日～29日の3日間、第40回日本電子顕微鏡学会が、仙台市の仙台市民会館で開催された。

現在、電子顕微鏡は、半導体、セラミックスなどの新素材、新技術の開発や、バイオテクノロジーの研究において、より一層原子レベルでの日常観察が必要となり高性能に対する要求が高まっている。

これらを背景に本学会では、テーマ別に3つの会場に分かれ、装置および周辺技術の開発成果や、各分野の幅広い応用例が報告された。

学術講演会と併設された展示場での目立ブースは、日立電子顕微鏡の基本テーマ「Nanoテクノロジーへの挑戦」のもとに、7つのサブテーマのパネル展示と、H-800形透過電子顕微鏡、S-800、S-530走査電子顕微鏡を中心に周辺装置の実演展示を行ない、大きな話題をさらった。

その1つは、「原子レベルに挑む」を

サブテーマに、商用電顕で昨年の0.88Åの世界記録を更新する0.72Å撮影成功の発表を行なった。このニュースは、当日の新聞でも一面記事として大きく取り上げられ、各界から大きな反響を呼んだ。

もう1つの話題は、半導体、新素材分野で注目をあびている電界放射形SEM (FE-SEM) S-800形の国内部の展示であった。従来からFE-SEMは立上げに1週間以上を必要とされているが、このS-800はわずか2日間で像観察を実証し、日立のFE技術の深さが認められた。

また、学術講演会では、超高分解能、微小領域の分析などができる、世界で初めての超高压分析電顕の研究開発の成果が名古屋大学の電顕グループと日立より発表された。これにより、超高压電顕での厚い試料の直接観察、EELSによる元素分析が可能になり、これまでにない新しい応用が期待される。

応用面では、格子欠陥など新材料での超高分解能観察などの具体事例の発表が多く、中でも日立中央研究所からのセラミックスのクラックの発生メカニズムの発表は、試料薄切技術を含め原子レベルの日常観察の実現を大きく近づけた発表で注目をあびた。

(渡部忠雄 記)

第45回分析化学討論会 開かる

去る7月26、27日の両日、室蘭市で第45回分析化学討論会が開催された。講演件数は183件で、出席者は約400名

と盛況な討論会だった。実行委員でもある室蘭工大・室住教授の御挨拶にもあったように、討論主題 1) 原子スペクトル分析における信頼性、迅速性、および感度の向上、2) クロマトグラフィーにおける誘導体化、3) 分析化学における界面活性剤の利用とし、テーマ演題については討論時間をたっぷりとり実のある討論をできるようにしたとのことだった。これは時間に追われて議題を消化するのが精一杯である最近の学会では、異色なものであり、久しぶりに楽しめた討論会だった。また休憩も、部屋湯茶の準備が整い、ここで落着いて種々な議論ができたのは何よりも幸いだった。

当社からは単独、連名を合わせて9件の発表を行なった。ICPにおける分光干渉の補正について、バックグラウンドになる近接線のプロファイルをフォークト型でなくガウス関数およびローレンツ関数のどちらかで補正しても分析上は問題のないことを報告した。定性分析では、平均して3本の線対を選び、波長のずれ、線対間の強度化を求め選定した条件の中に入っておれば検出可とする方法を提示した。また試料の粘度の影響については内標準法を用いて除去する方法についても話した。原子吸光分析における高温炉は二重管方式が一般化され始めている。これについて北見工大との共同研究が大学側より発表された。

FIAにおける分析について、反応温度を上げることによるF⁻の迅速分析、触媒反応を用いるCu、Fe、Coの超微量分析、鉄の2価、3価の形態分析およびイオン選択電極を検出器とした方法について発表した。

(保田和雄 記)

日製産業株式会社

本社別館 電話 東京(03) 504-7211
新潟出張所 電話 新潟(0252)41-3011<代>
京都出張所 電話 京都(075)241-1591
名古屋支店 電話 名古屋(052)583-5841
岡山出張所 電話 倉敷(0864)25-1316
郡山出張所 電話 郡山(0249)32-0581
札幌支店 電話 札幌(011)221-7241<代>

本郷出張所 電話 東京(03) 815-2051
大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
水戸営業所 電話 水戸(0292)27-2101
豊田出張所 電話 豊田(0565)28-5179
仙台支店 電話 仙台(0222)64-2211<代>
九州支店 電話 福岡(092)721-3501
富山支店 電話 富山(0764)24-3386<代>

横浜出張所 電話 横浜(045)671-5421
四国出張所 電話 高松(0878)62-3391<代>
筑波営業所 電話 土浦(0298)23-7391
広島支店 電話 広島(082)221-4514<代>
秋田出張所 電話 秋田(0188)64-2244
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311~7

<編集後記>

- 本号の免疫分析特集は、最近著しい進歩を遂げつつある免疫学の分野で、機器分析、就中、電子顕微鏡法、自動分析法、蛍光光度法、蛍光偏光法、FIAなどの手法を用いて、種々の試料を分析した例について、諸先生に報告して頂きました。
- 光学素材の透過・反射スペクトルの測定(解説)は、Vol.26.No.4にて、ズームレンズ、ガラス等のスペクトルについて解説したのに続き、VTR、光ディスクなどに用いられる偏光ビームスプリッター等のスペクトルにつき解説いたしました。

- 日立理化学機器による報文のご投稿を歓迎します。
- 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
科学機器営業本部 企画開発部
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 AUTUMN 1984 Vol.27 No.3

発行 昭和59年10月1日(年4回発行)
発行人 鶴沼伸充
編集人 永谷 隆 岩井孝之
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部 科学機器部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
電話 東京(03)214-3123(直通)
印刷所 日立印刷株式会社