



THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SUMMER 1985
VOL.28 NO.2

U. D. C. 57.086.3:537.533.71

● 目 次 ●

バイオテクノロジー特集

報 文

立体構造の中の局所化学——反射電子像の生物試料への応用—— 牛木辰男 藤田恒夫 米原勝久…1	高速液体クロマトグラフィー用多波長同時検出システムとその生体成分分析への応用……………佐久間一郎 江部和俊 土肥健純 舟久保熙康 高井信治 大久保昭行 丹羽寛文 竹内 啓…………5
糖・糖アルコールの高速液体クロマトグラフィ……………向山吉之 平井 修 鴈野重威…10	エルトリエータロータによる細胞分離と蛍光偏光解消法への応用……………横山三男 塩月一英…12
ステップ勾配遠心法によるプラスミドDNAの迅速分離……………立原定幹…16	

解 説

U-3200/U-3400形日立自記分光光度計とその応用例(その1)……………小森律夫 根本 勲 小松 均 広瀬 弘 山本秀雄…19	F-3000/F-4000形日立分光蛍光光度計……………野上太郎 越 裕之 嶺岸久子…26
--	---

トピックス

H-7000形日立125kV電子顕微鏡…………25	日立300kV電子顕微鏡(超高分解能モード)……………31
D-2000形日立クロマトデータ処理装置……………32	ピッツバーク会議/展示会……………31

バイオテクノロジー特集

報 文

立体構造の中の局所化学

——反射電子像の生物試料への応用——

Topochemistry in Three-Dimensional Structures ——Application of Backscattered Electron Image to Biological Specimens.——

牛木 辰男* 藤田 恒夫** 米原 勝久***

(昭和60年4月25日受理)

1. はじめに

走査電子顕微鏡が生物試料の観察に用いられるようになってから、生体のさまざまな細胞や組織の立体超微構造が明らかにされてきた。ところが、こうした従来の走査電子像といえば、二次電子像を示しており、物体の表面の凹凸像を観察するには非常に優れているが、その内部の情報を得ることはできない。また、ある物質のみを染色して観察を行なうというようなこともできない。そのため、光顕と透過電顕像との正確な対応が難しいことが多く、さらに細胞内の物質の立体的な局在を調べるに至っては、まず不可能と言えよう。こうした悩みを解消するひとつの方法として、われわれは、生物試料の反射電子像による観察を試みている。本稿では、現在われわれが実際に行なっている観察方法をいくつか紹介し、反射電子像の将来性を考えてみたい。

2. 反射電子像の観察の原理と方法

反射電子像を生物試料に用いる試みは、Watanabe(1972)¹⁾やAbrahamとDeNee(1973)²⁾によって最初に報告されて以来、幾多の報告がなされている³⁾⁻⁵⁾。こうした試みは、その多くが試料を重金属で染色して反射電子像で観察するもので、次のような原理によって成り立っている。

反射電子の大きな特徴は、反射電子の放出率が物質の原子番号に依存することにある。原子番号の大きな物質ほど多くの反射電子を放出する。生物試料の組成は主にC、O、H、Nからなっているので、このままでは組成の違いによる反射電子像は得られない。そこで、試料内の特定の場所に重金属を多量に付着させれば、反射電子像では、その部位を原子番号コントラストとして表わすことができるようになる。さらに、反射電子の発生源が二次電子に比べて深いので、試料のいくぶん深い部分からの情報も得ることができる。

こうした原理にもとづいて重金属で染色した標本を、通常の走査電顕の試料作製

* 新潟大学 医学部 第三解剖学教室

** 新潟大学 医学部 第三解剖学教室 教授 医博

*** 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ

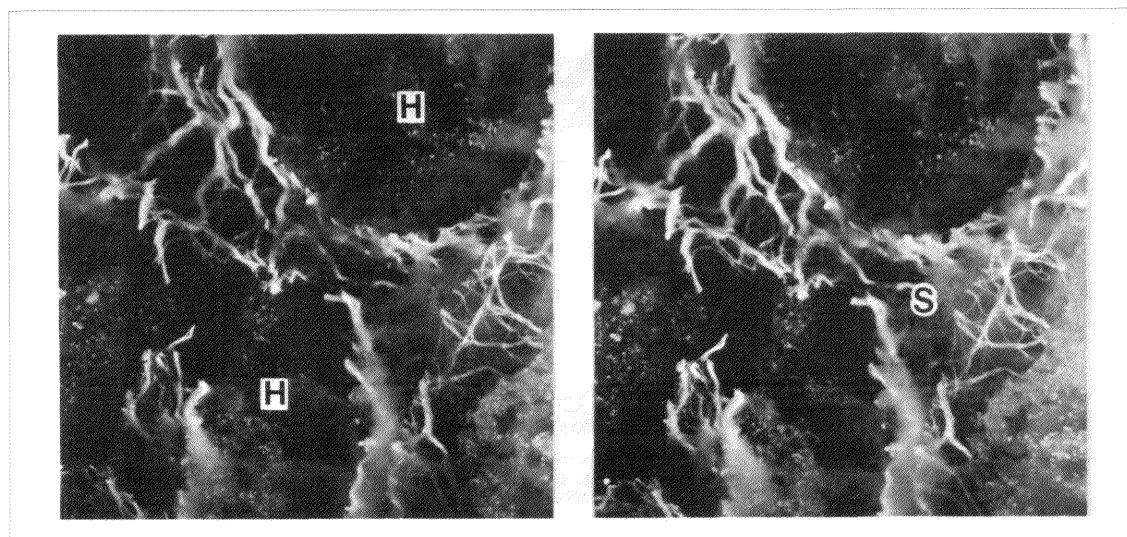


図1 ヒト肝臓の鍍銀標本の反射電子像(×2500)
H: 肝細胞, S: 類洞

法と同様に、臨界点乾燥を行ない、試料台に載せて、反射電子検出器を装着した走査電顕で観察すればよいわけである。

現在、反射電子検出器は大きく分けて二つのタイプがある。シンチレータによるものと半導体からなるものであるが、共に短所長所があるようである。今回われわれが用いた検出器は、シンチレータ型の日立S-4548と、半導体型のGW type30の2種類で、それぞれ日立S-450とS-530形走査電顕に装着して観察を行なった。反射電子像の観察条件は、加速電圧20-25kV、プローブ電流 1×10^{-11} - 10^{-7} Aとした。

3. 光顕切片の観察

反射電子像による観察で従来最もよく用いられているのは、包埋切片や凍結切片の観察である。ここでは、肝臓の格子線維の鍍銀染色標本(東北大学石井敏弘教授の御好意によるもの)を例に示す。

標本はヒト肝臓の約 $15\mu\text{m}$ のパラフィン切片をBielschowsky-Mareschの鍍銀染色(石井の変法)で染色したもので、臨界点乾燥後、試料台に両面テープで接着し、カーボン蒸着を行なった後に反射電子検出器(S-4548)で観察した。

反射電子像(図1)では、肝細胞と類洞の間のディッセ腔に、格子線維が銀($Z=47$)で染色されて特異的に光って見える。切片の深さ方向の情報は光顕にははるかに及ばないが、分解能が格段にあがると、より立体的に観察できるのが利点と言えよう。さらに立体写真を撮影することで、格子線維が分岐、吻合する様子をはっきりと観察することができる。

4. 切断試料の観察

上述した切片の観察では、走査電顕の特徴を十分に活かしていきっているとは言えない。そこで、切断試料を使って立体的に細胞内の物質の局在を調べる方法を示してみたい。

ここではビタミンA過剰症のラット肝臓を用いて、細胞内の脂肪の局在の様子を例に示す。試料作成法を簡単に以下に示す。

(1) ビタミンA過剰投与ラットを4%パラフォルムアルデ

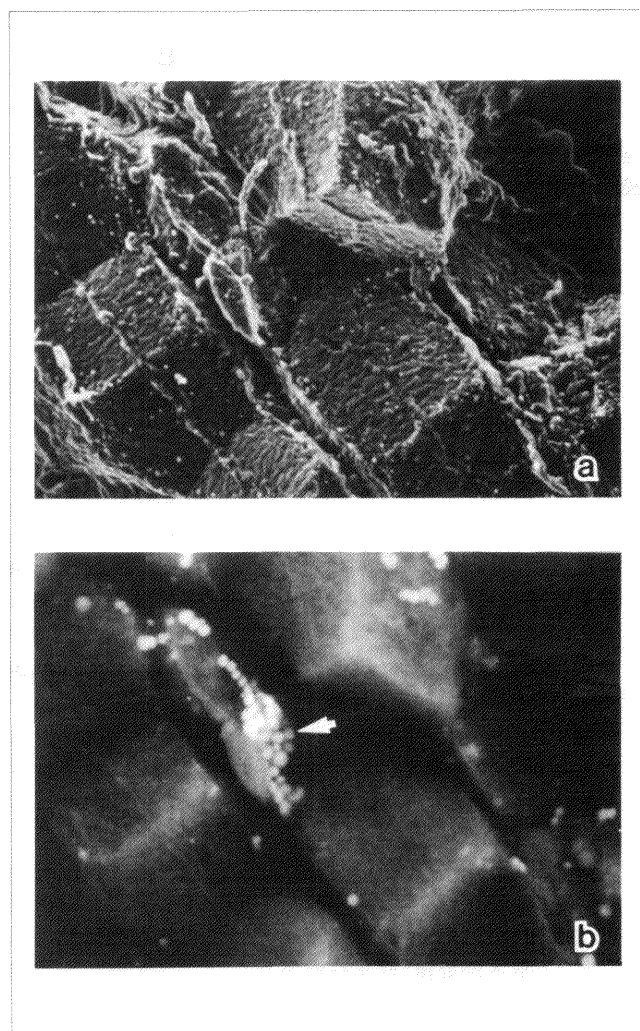


図2 ラット肝臓の切断標本(オスミウムで脂肪染色したもの)
(×1300)
a. 二次電子像 b. 同一部位の反射電子像

ヒド溶液で灌流固定後、肝臓をとり出し、細切して同液で浸潤固定(2時間以上)

- (2) 1%オスミウム水溶液に浸潤固定(30分-1時間)
- (3) 脱水、凍結割断後、臨界点乾燥
- (4) 試料台に接着し、カーボン蒸着(約10nm)
- (5) 二次電子像と反射電子像(GW type 30)で観察

二次電子像(図2a)でみると、肝臓の表面構造がよくわかる。同一部位を反射電子像(図2b)で観察すると、肝細胞と伊東細胞内の脂肪滴が特異的にオスミウム($Z=76$)で染色されて、明るい果粒となって見えてくる。特にビタミンA過剰投与のため、伊東細胞内に脂肪滴がびっしりとつまっている様子がよくわかる。

5. 免疫組織化学への応用

HartmanとNakane(1981)⁶⁾は、酵素抗体法で染色した樹脂切片を、反射電子像で観察するという試みを報告している。ペルオキシダーゼで酸化したジアミノベンチジンとオスミウムとの親和性の高いことを利用したものである。われわれはこの方法を応用し、割断した組織を酵素抗体法で染色し、反射電子像で観察する方法を行なっている⁷⁾。ここでは膵ランゲルハンス島を抗インスリン抗体で免疫染色した標本を例に示す。方法の概略は次のとおりである。

- (1) ラットを4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定後、膵臓をとり出し、細切して同液で浸潤固定(約4時間)
- (2) 70%アルコールにて凍結割断
- (3) 抗インスリン抗体を用いて酵素抗体間接法にて染色
- (4) 1%四酸化オスミウム水溶液に浸潤(10分-1時間)
- (5) 脱水後、臨界点乾燥
- (6) 試料台に接着後、カーボン蒸着
- (7) 二次電子像と反射電子像(GW type 30)にて観察

二次電子像(図3a)ではランゲルハンス島の割断面のどの細胞がインスリン産生のB細胞に相当するのかかわからないが、反射電子像(図3b)では、B細胞のみが明るく光ってみえる。拡大率をあげてみると、果粒状の反応産物が集

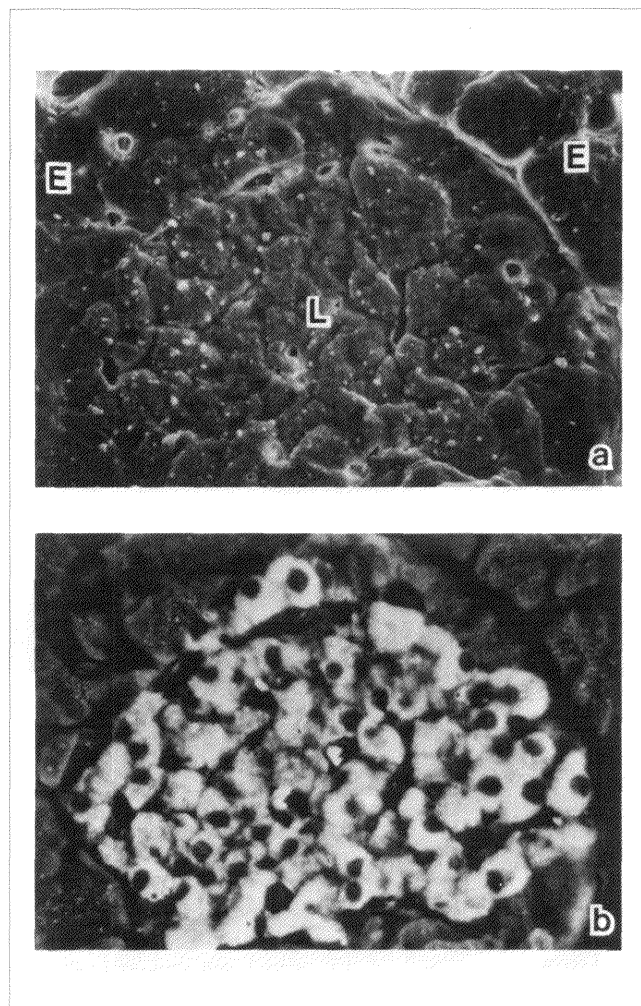


図3 ラット膵臓の割断標本(抗インスリン抗体で免疫染色したもの)
($\times 600$)
a. 二次電子像, b. 同一部位の反射電子像
L: ランゲルハンス島 E: 外分泌腺

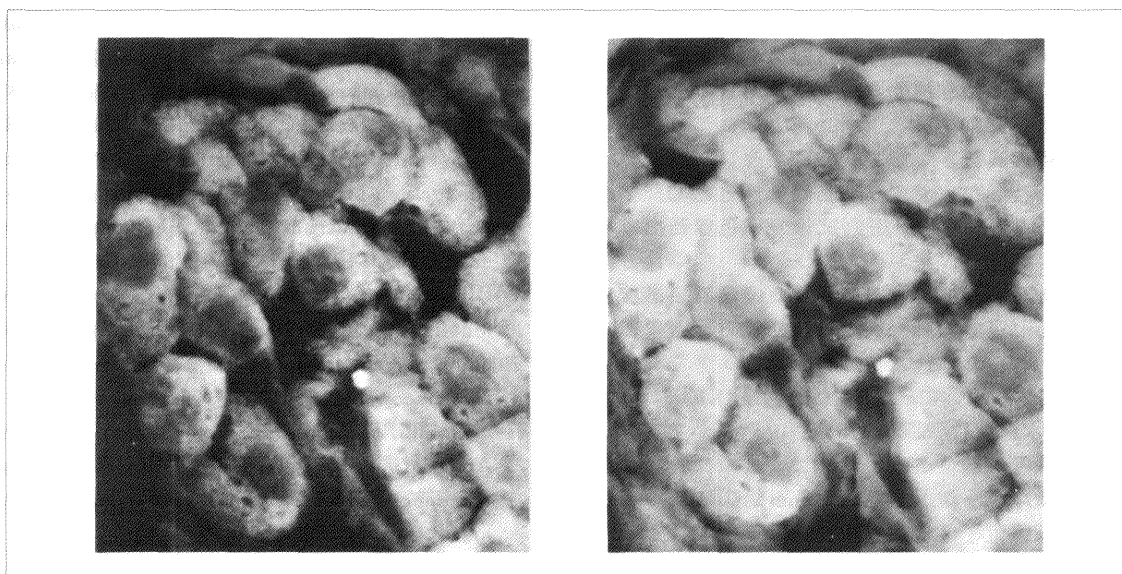


図4 図3と同一標本の拡大像(立体写真)($\times 1600$)

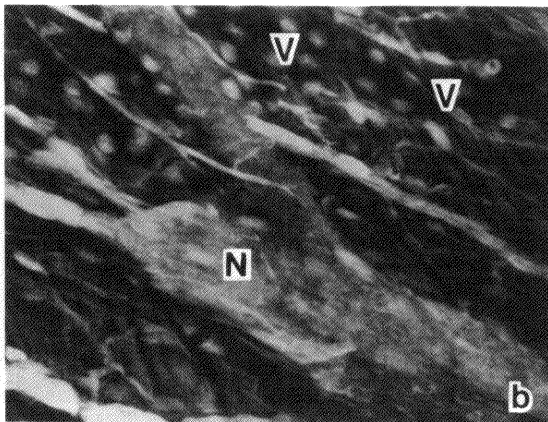
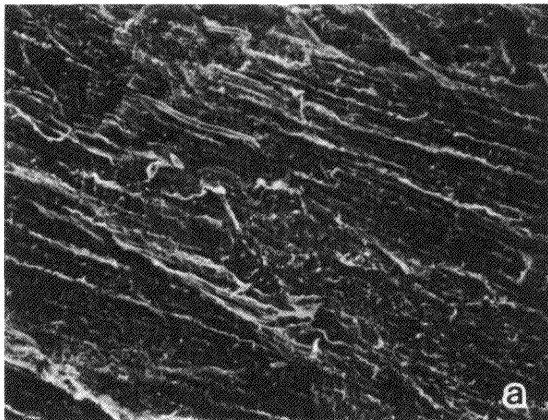


図5 モルモット大腸の伸展標本(抗S-100蛋白抗体で免疫染色したものの)($\times 380$)

a. 二次電子像, b. 同一部位の反射電子像

N: 神経叢 V: 静脈

まっているのがわかる。さらにこうした部分を立体写真(図4)で観察すると、抗原の立体的な局在がはっきりとしてくる。

6. 反射電子の情報の奥行き

最後に反射電子の特徴をよく表わしている例として、アウエルバッハの神経叢を抗S-100蛋白抗体で染色した標本を示す。

- (1) モルモットを4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定後、アウエルバッハの神経叢を外縦走筋とともにひき剥がす。
- (2) 抗S-100蛋白抗体を用いてPAP法で染色
- (3) 1%オスミウム水溶液に浸潤(約10分)
- (4) 脱水後、臨界点乾燥
- (5) 試料台に接着後、カーボン蒸着(約10nm)
- (6) 二次電子像と反射電子像で観察

二次電子像(図5a)では試料表面が結合組織に覆われているので有効な情報が得られない。しかし、反射電子像(図

5b)で観察すると、S-100蛋白陽性のグリアが結合組織などを透して光ってきて、神経叢をはっきりと観察することができる。さらに、免疫染色した部位以外にもオスミウムが少し結合するので、血管や平滑筋がbackgroundとしてみえてくる。

7. おわりに

このように、反射電子像を用いた観察には従来の二次電子像の観察では得られないさまざまな利点がある。とりわけ、標本を染色して、ねらいの形象を観察できる点、切片に限らず立体的な標本や凹凸のある断面にも「染色」を応用できる点、被覆物をすき透してかなり深い位置の情報を得ることが出来るという点が大きな特徴である。光顕や透過電顕と、従来の走査電顕像との橋わたしを可能にしているとも言えよう。現在のところ反射電子像による観察は、あまり一般化されていないが、今後大いにこの分野の研究を行なうべきであろう。ここに紹介した方法も、まだまだ改良の余地が残されており、さらに改良を重ね、さまざまな立体構造や、その中の局所化学を解明する方法として発展させたいと考えている。

参考文献

- 1) Watanabe, S. : The scanning electron microscopic study of the lymph node. Acta Haem. Jap. 35 : 483-505, 1972.
- 2) Abraham, J. L., and DeNee, P. B. : Scanning-electron-microscope histochemistry using backscatter electrons and metal stains. Lancet 1 : 1125, 1973.
- 3) DeNee, P. B., and Abraham, J. L. : Backscattered electron imaging (Application of atomic number contrast). In ; (ed. by M. A. Hayat) : Principles and techniques of scanning electron microscopy, biological applications, Vol. 5. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1976, (p. 144-180).
- 4) Dichiaro, J. F., Rowley, P. P., and Ogilvie, R. W. : Backscatter electron imaging (BEI) of paraffin sections stained with heavy metal histopathologic stains, with observations on some variables encountered in BEI. Scanning Electron Microscopy/1980/III : 181-188, 1980.
- 5) Becker, R. P., and Sogard, M. : Visualization of subsurface structures in cells and tissues by back-scattered electron imaging. Scanning Electron Microscopy/1979/II : 835-870, 1979.
- 6) Hartman, A. L., and Nakane, P. K., Intercellular localization of antigens with backscatter mode of SEM using peroxidase-labeled antibodies. Scanning Electron Microscopy/1981/II : 33-44, 1981.
- 7) Ushiki, T., Yonehara, K., Iwanaga, T., and Fujita, T. : Application of a backscattered electron image to immunocytochemistry in freeze-cracked tissues. Arch. histol. Jap. 47 : 553-557, 1984.

高速液体クロマトグラフィー用多波長同時検出システムとその生体成分分析への応用

Development of A Multiwavelength Detection System for HPLC and It's Application to Biological Fluid Analysis

佐久間 一郎* 江部 和俊* 土肥 健純* 舟久保 熙康*

高井 信治** 大久保 昭行*** 丹波 寛文*** 竹内 啓****

(昭和60年4月25日受理)

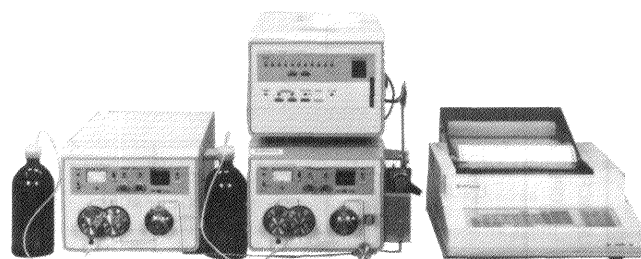
1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、生体液等の多成分系の分析に適した分離分析法である。HPLCにより尿などの生体液をできるだけ多く分離分析し、多成分の挙動を1個のパターンとしてとらえ多変量解析することにより、生体内の代謝のプロファイリングを行なおうとする試みが近年なされてきている^{1),2),3)}しかしながら、生体液、例えば尿中には数十から百以上の成分が含まれていると言われており、前処理をほとんど行わずに尿をHPLCにより分離し、特定の成分のみではなく多くの成分について注目する場合には、クロマトグラム中の不分離ピーク、テーリングが問題となる。同一保持時間に存在するとみなされるピークであっても、複数の成分から構成される場合もしばしば観察される。このような場合、従来の単一波長吸光度検出法ではこれに関する情報を得ることは難しい。この点を改善するために、多波長吸光度同時検出法により、各ピークの保持時間のみならず吸収スペクトルをも計測するシステムの開発を行なっている。これによりたとえ不分離ピークが存在しても、何らかの情報がピークの吸収スペクトルの変化として把握することが可能となる。本報では本システムの設計、生体液分析への応用及び診断クロマトグラフィーへの応用における問題点について報告する。

2. システムの設計

システムの設計にあたっては以下の点を考慮に入れた。

従来報告されている多波長検出システムとは異なり、本システムにおいては吸収スペクトルを、一定時間間隔で測定し、そのデータは全て記録する。ある波長での吸光度モニタ結果に基づきピークの立上り、立下り、頂点を検出し、そこでの吸収スペクトルを計測するだけでは、モニタ波長選定の誤りによるピーク検出の失敗、ピークのテーリングとして現われる不分離ピークの解析を詳しく実行できない等の問題があるため、一定時間間隔ごとに計測した吸収スペクトルを全て記録する方法を採用した^{4),5)}生体液のHPLC分析には1時間以上の分析時間を要することから、システムは十分なデータ処理能力を持たねばならない。また、ポンプの流量設定、試料注入、計測はできるだけ自動化し効



655A形日立高速液体クロマトグラフ

率化を図ることとした。更に、多波長検出により得られるデータから有用な情報を取り出す手法については、現状では定まった方法がないため、種々の処理アルゴリズムを試みることが可能となるようにした。

以上の点から図1に示す計測システムを構成した³⁾システムは4つの部分システムから構成される。これらはシステム管理部、データ処理部、HPLC部、多波長同時検出部である。各部は16ビットもしくは8ビットのマイクロプロセッサにより制御される。そして、システム管理部が他の3つの部分を制御する階層システムとなっている。この構成では、計測、記録、制御を複数のシステムが分担するため、マイクロコンピュータベースのコンパクトなシステムであっても、比較的大量のデータを扱うことが可能となった。以下に各部の機能について概説する。

システム管理部は他の3つの部分の制御、例えば多波長検出部の測定モード(単一走査、繰り返し走査など)の設定を行ない、HPLCによる試料の自動分析を行なう。多波長検出部から送られてくる分析結果はシステム管理部の補助記憶装置に記録され、オフラインで後述するデータ処理部とシステム管理部において処理される。

HPLC部は、2台のHPLCポンプ(日立655形)と1台のオートサンプラ(日立638-08形)、及びこれらを制御する自作のマイクロコンピュータから構成される。2台のポンプの送液量の組合せを変化させることによる、高圧混合方式のグラジエント装置を実現した。

多波長検出部は200nmから800nmの波長領域でのフローセル中の試料の吸光度を512素子(うち447素子が有効)のフォ

* 東京大学工学部

** 東京大学生産技術研究所

*** 東京大学医学部

**** 東京大学農学部

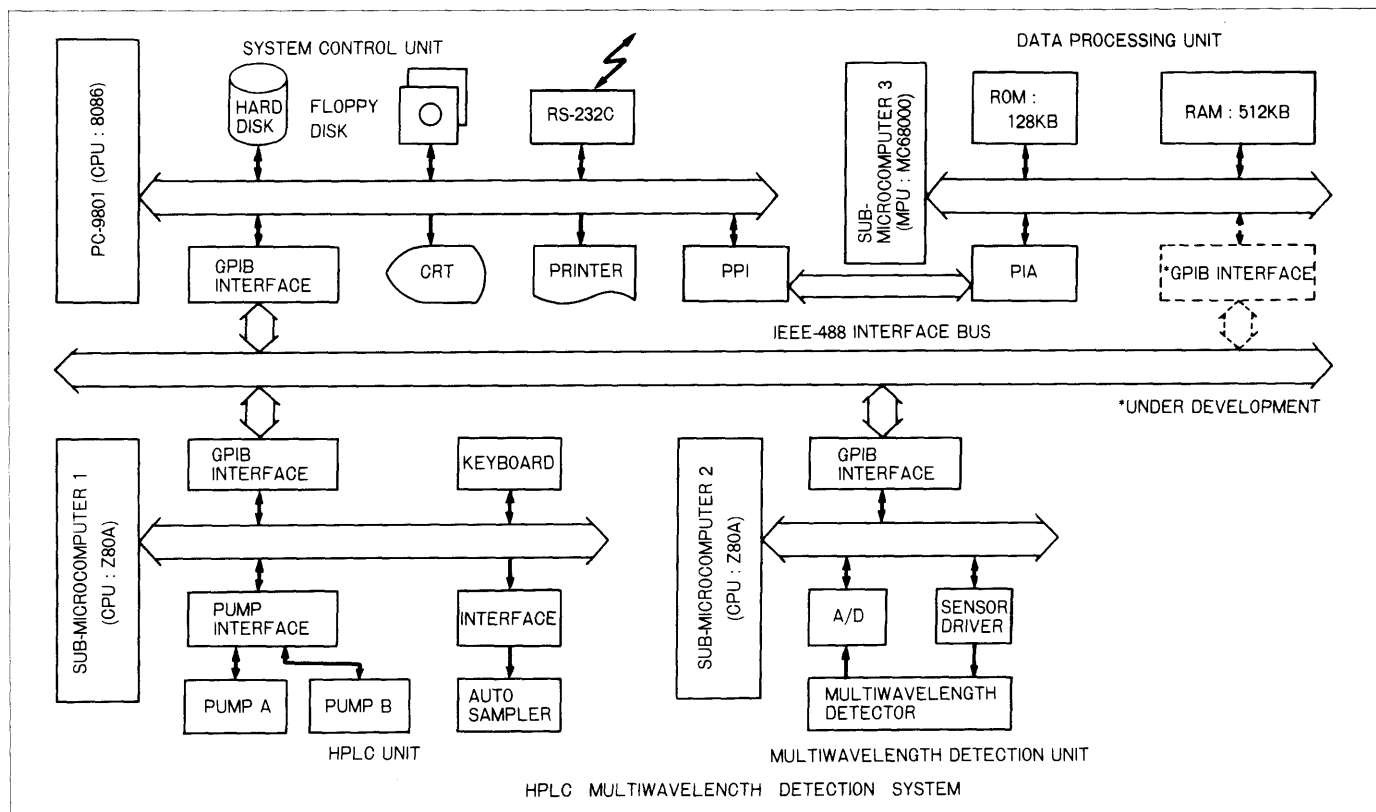


図1 システムブロック図

トダイオードアレイで測定するものである。測定信号は12ビットA/D変換後、積算平滑化、イメージセンサの暗電流補償処理を受け、各波長(チャンネル)でのフローセル透過光強度に比例した数値としてシステム管理部へ転送される。

データ処理部はシステム管理部と共同してデータ処理を行なう。システム管理部はデータファイルの管理、ユーザーインターフェース(CRT表示など)を担当し、データ処理部が実際の演算を16ビットMPU(HD68000-8)と大容量メモリ(512kバイト)を使用して行なう。比較的大量のデータを主記憶上に置いて処理が行なえるため、スペクトル形状のチェックも含めたピーク検出、クロマトグラムのグラフィックス処理などの頻繁なデータ検索を必要とする処理を効率良く行なうことができる。なお処理用ソフトウェアの開発はCP/M-68K(Digital Research社)上で走るCコンパイラ(White Smith社)を使用して、データ処理システム上で行なった。

3. システム使用例⁶⁾

図2に健康者尿の過塩素酸アンモニウム溶液を溶離系とする。陰イオン交換クロマトグラフィーの結果の3次元クロマトグラムを示す。また図3は、同一溶離条件による急性肝炎患者の尿の3次元クロマトグラムである。横軸に保持時間、縦軸に吸光度を示し、210nmから370nmに位置するチャンネルのうち32チャンネルでの吸光度を図示した。健康者尿の結果と比較すると、31分付近に肝炎患者では可視光域に吸収する成分が認められた。この相違は単波長吸光度検出器を用いた場合には見落とされる可能性がある。こ

の点で多波長同時検出器の有用性が示されている。

別の例として、健康者尿と腎疾患患者尿の分離結果の3次元クロマトグラムを図4、5に示す。溶離液は前述の例と同一であるが、グラジエントステップが異なるため、若干異なるパターンとなっている。保持時間17分から37分での吸光度変化を波長軸を少し傾けて表示し、吸収スペクトル変化を観察しやすくしている。3次元クロマトグラムの回転、一部分の拡大などは、データ処理システムを使用した対話形グラフィックス処理により容易に実現できる。この点は本システムの特長の1つである。一見したところ、これら2つのパターンは、各ピークの高さの違いはあるが、おおむね同様のものと思われた。しかし、19分30秒付近に現われたピークの吸収スペクトルを比較すると、230nm付近の吸収極大と280nm付近の吸収極大での吸光度の比が異なることが観察された。これはこのピークが複数の成分を含み、その存在比が変化していることを示したものである。単波長検出により従来は同一視されていたピークであっても、多波長検出により更に新しい情報が得られることを示した例と考えられる。

4. 考 察

HPLCは従来の単一成分のみに注目する分析法とは異なり、多数の成分を同時に分析する分離分析法であるため、未知成分をも含めた生体液のパターン解析には適している。更に多波長検出法により、この特長を助長することができる。未知成分の検出に関しては前述の通り試料の紫外可視吸収バンドの位置にかかわらず検出が可能であるため、単

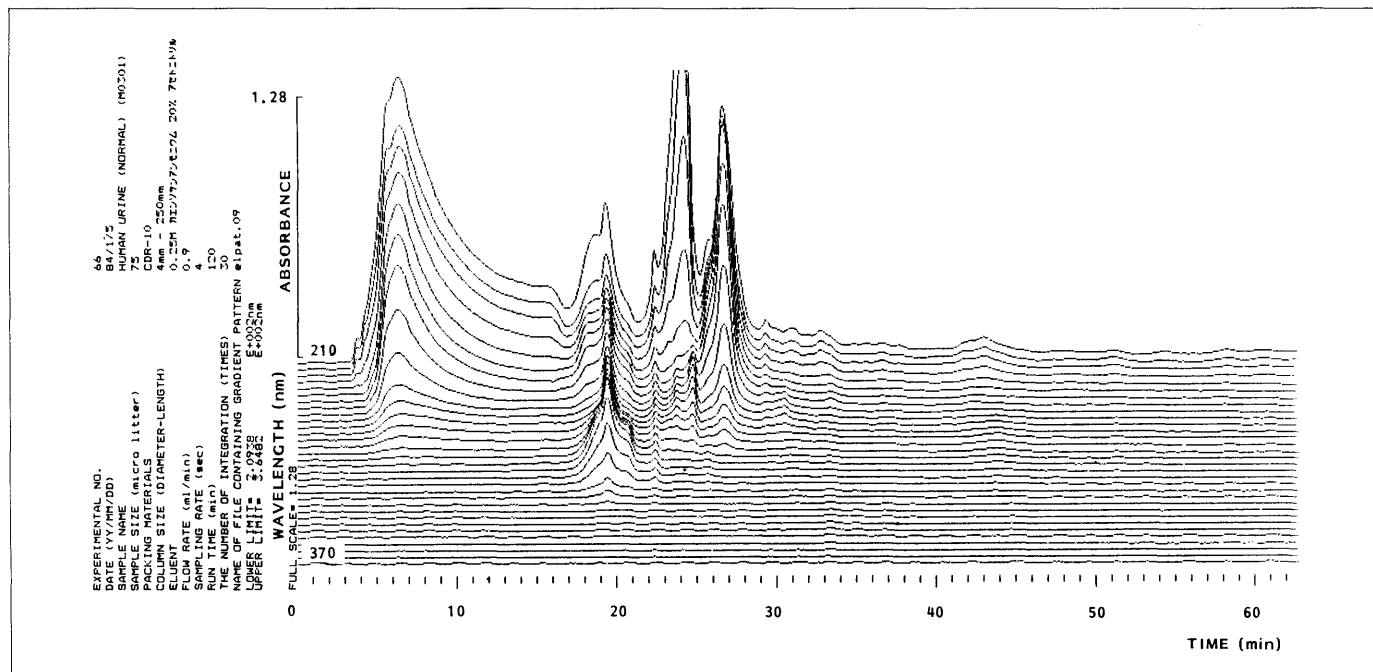


図2 健常者尿の3次元クロマトグラフ

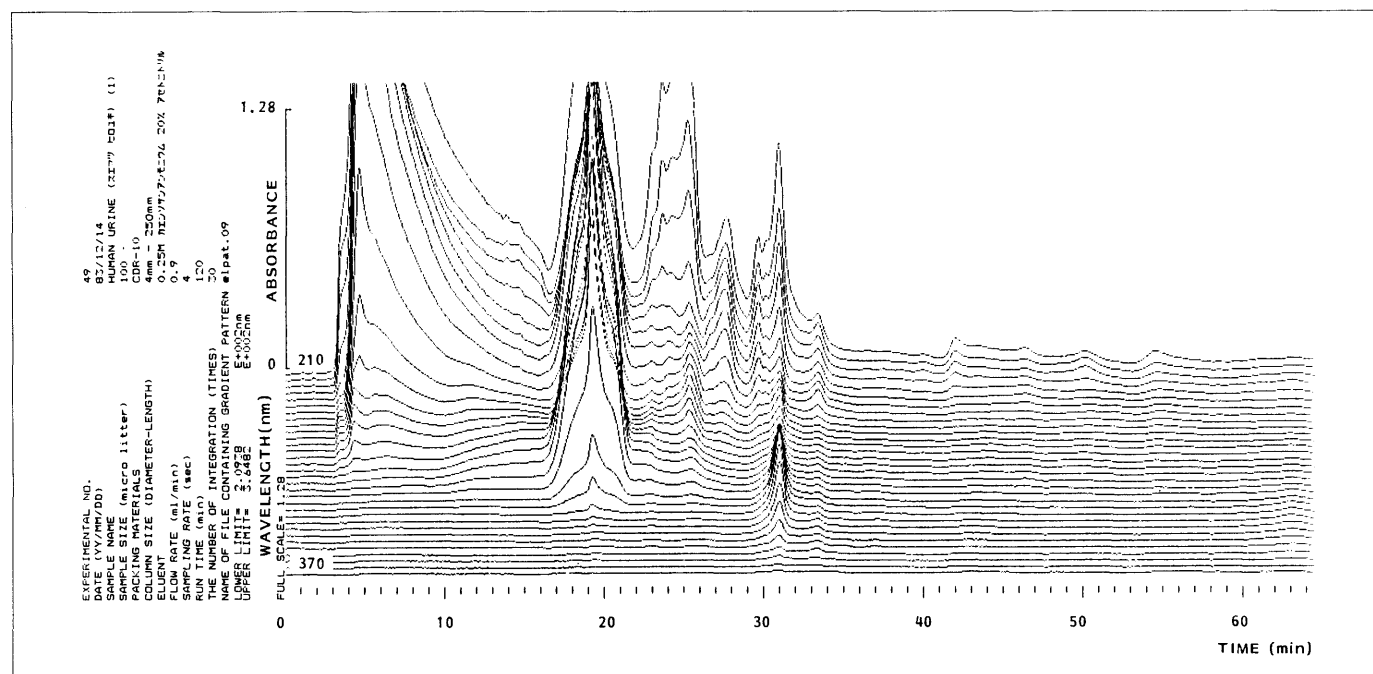


図3 急性肝炎患者尿の3次元クロマトグラフ

一波長吸光度検出法の欠点を補うことができる。また保持時間が接近しており、従来ならば同一と見なされているピークであっても、生体液分析の場合は、その吸収スペクトルを調べることで、共存する別の成分の情報が得られることがしばしばあるため、多波長検出法により複数の成分の変動パターンがより詳細に得られ、診断に有用な情報が得られる可能性が示された。その反面それらの成分の同定ができない場合には、既知の病態との関係からそれぞれ

の病理学的意味を推定していくほかはない。そのため有用性は半減することも明らかである。他方単一成分の検査であっても、臓器特異性の高い検査であれば病態の一面を明らかにできる。このように目標とする物質が明らかな場合は、その成分の分離を最適化し、適切な検出法を採用すればよく、多波長検出を行なう必要はない。多波長検出法が有効となるのは、目標とする成分が明確でない、あるいは多くの成分の変動を同時に把握したい場合である。またマ

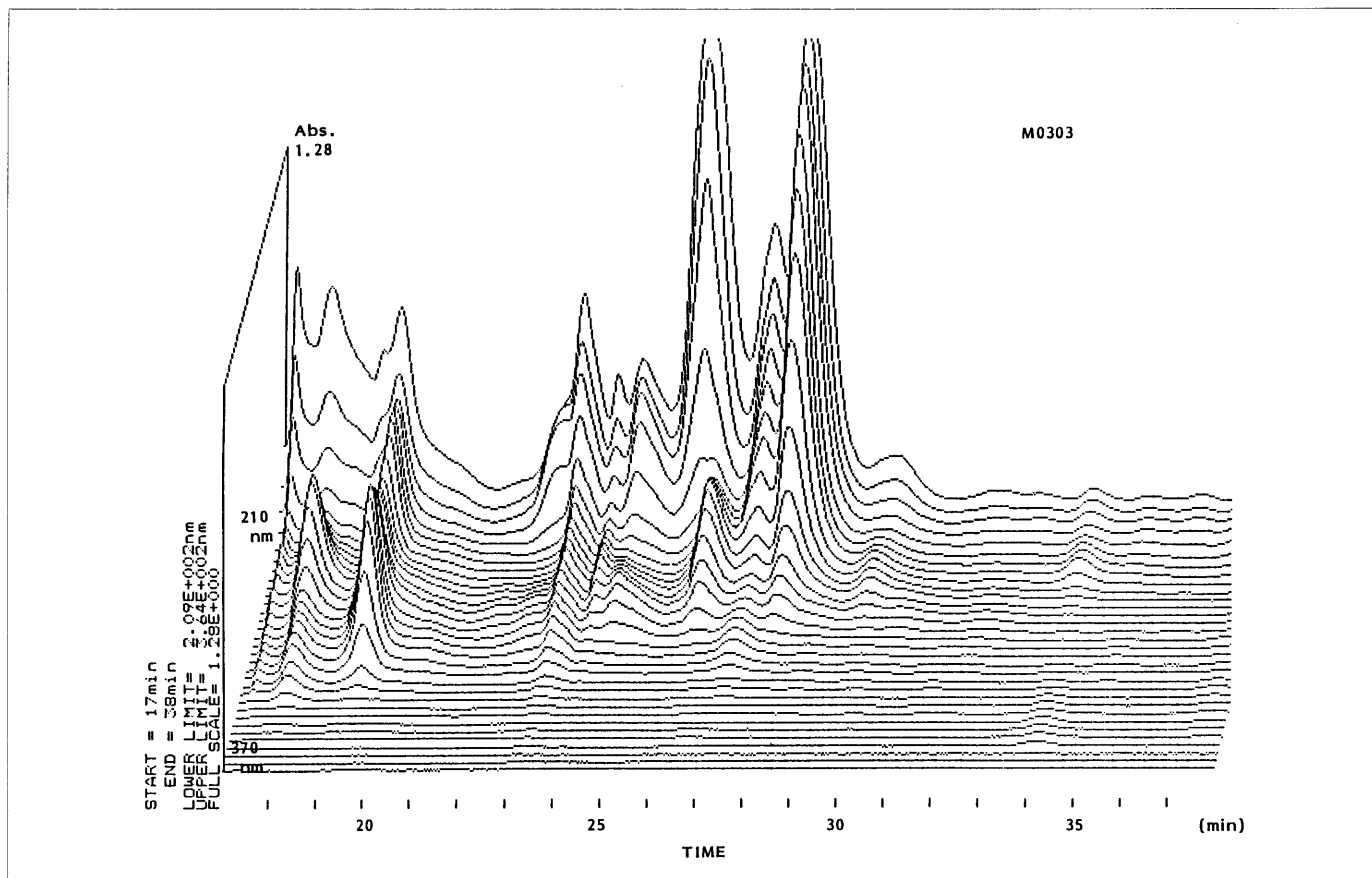


図4 健常者尿のクロマトグラフ

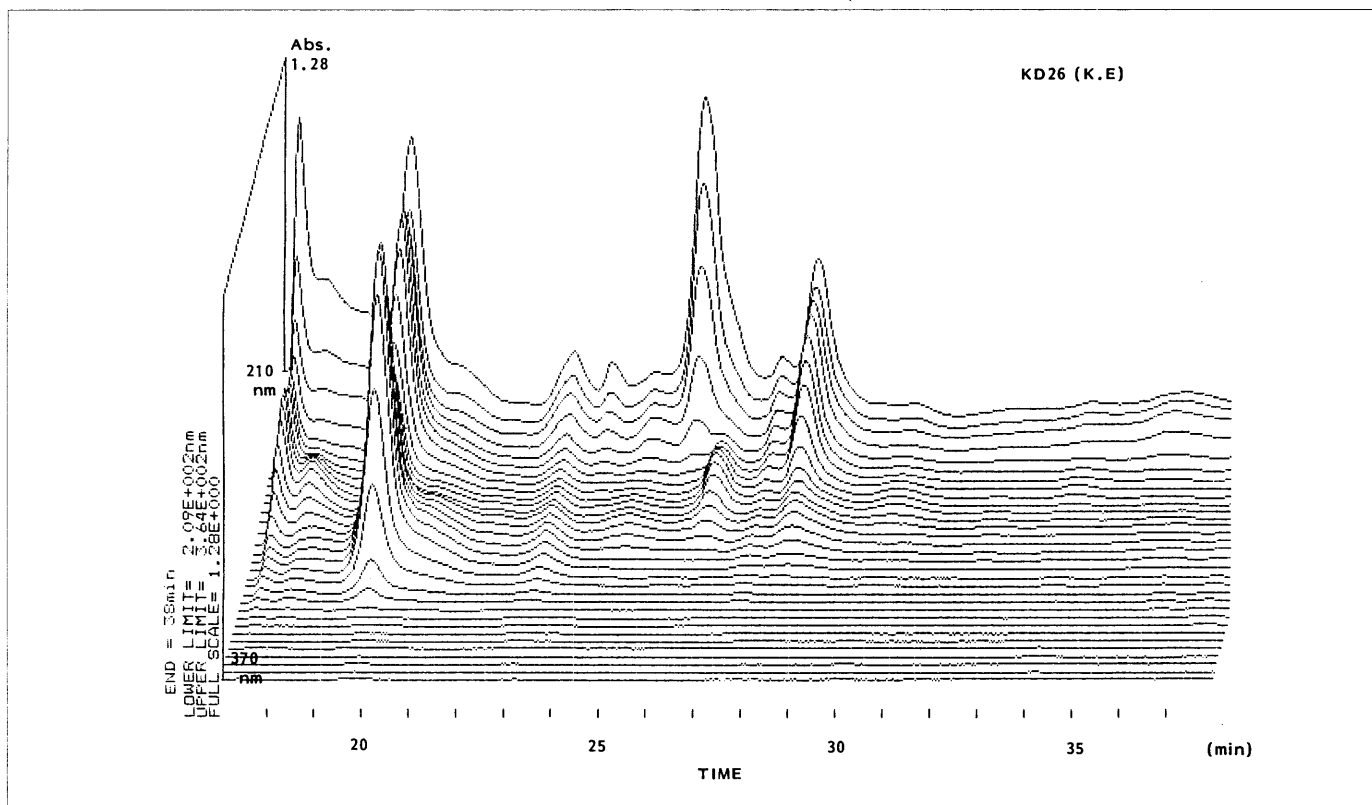


図5 腎疾患患者尿のクロマトグラフ

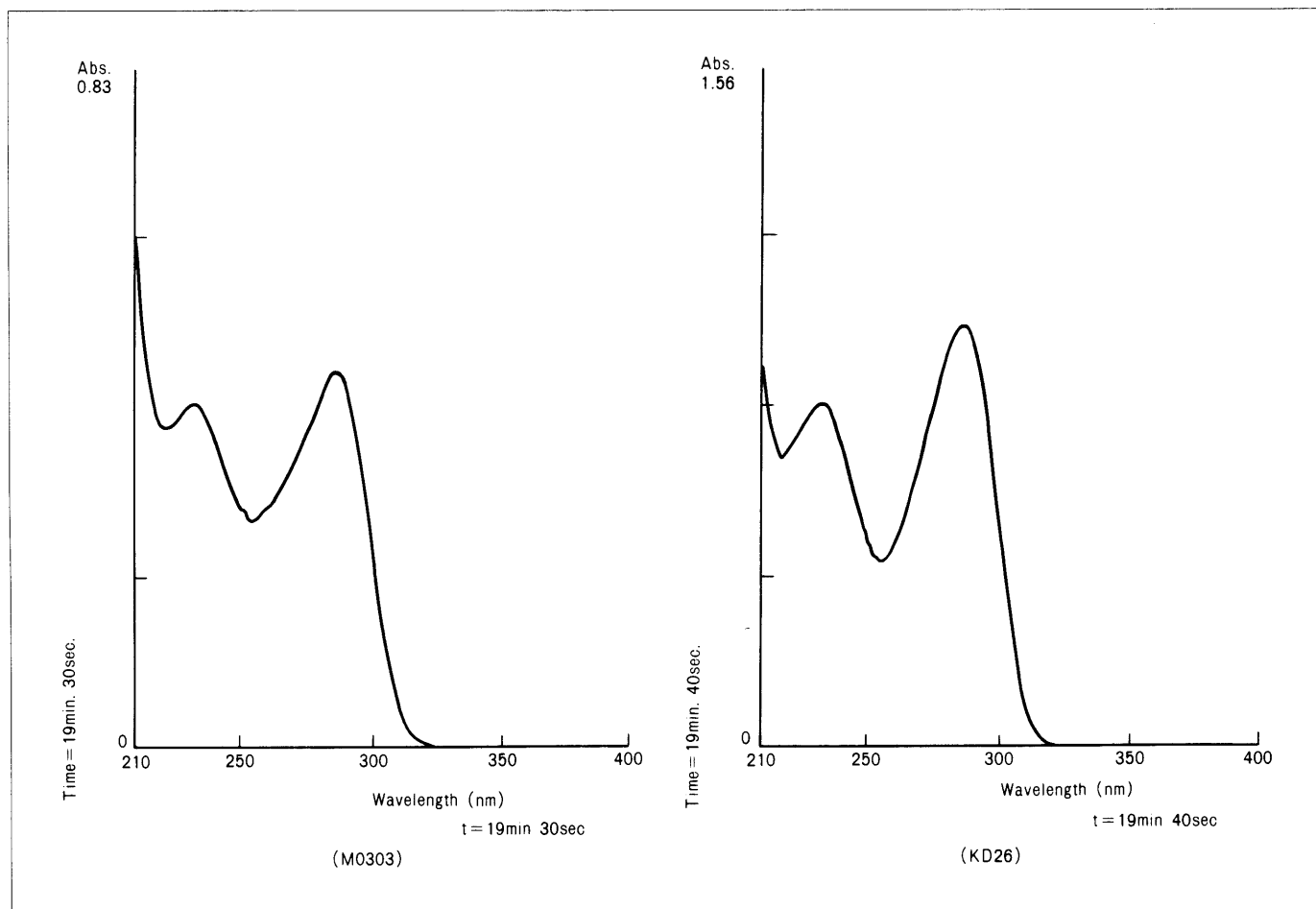


図6 吸収スペクトルの比較

表1 多波長同時測定HPLCと単波長測定HPLCの比較⁶⁾

	多波長	単波長	対 象
新しい成分の検出	+++	+	癌, 肝・腎不全, 原因不明疾患など
代謝異常の検査			
1. 薬物の影響	++	+	薬物の代謝産物生体の反応
2. Screening, target, multiphase	+	++	特定疾患
	++	+	プロフィール検査
3. 診断学への応用	++	+	パターン診断

イクロコンピュータを用いたデータ解析により、分析データを多方面から解析し、種々の情報を得ることができる点は、更に有利である(例えば、波形解析による複数成分の存在確認、ライブラリ化した標準物質とのスペクトルの比較など)。以上の点をまとめ、単波長検出器を用いるHPLCと多波長検出を用いるHPLCの長所、短所を表1に示す。

5. 結 論

HPLC用多波長同時吸光度検出システムを開発し、その生体液分析への応用を試みた。本システムは未知成分を含めた多成分の変動を把握する場合に有効な手段となる。今

後は本システムを用いて健常者尿パターン、疾患患者尿パターンの差異を明らかにできるか否かについて、更に検討を行なう予定である。

終わりに、本研究の一部は、文部省科学研究員補助金試験研究(2)(課題番号58870125)による援助を受けた。ここに深く感謝の意を表わす次第である。

参考文献

- 1) C.D. Scott: Clin. Chem. 14, 521 (1968)
- 2) 山田, 岡野, 他: 第5回液体クロマトグラフィー討論会講演要旨集, 131 (1984)
- 3) 桜井, 高井編: 臨床液体クロマトグラフィー 講談社 (1984)
- 4) M.J. Milano et al.: J. of Chromatogr 125, 315 (1976)
- 5) R.E. Dessy et al.: J. of Chromatogr. Sci., 14, 195 (1976)
- 6) 大久保, 山中ほか, 第一回診断クロマトグラフィーシンポジウム論文集 51 (1984)
- 7) 佐久間, 土肥ほか, 第一回診断クロマトグラフィーシンポジウム論文集 45 (1984)

糖・糖アルコールの高速液体クロマトグラフィー

High Performance Liquid Chromatography of Sugars and Sugar Alcohols —— Salt-Form Strong Acid Cation Exchange Column ——

向山 吉之* 平井 修** 鷹野 重威***

(昭和60年4月12日受理)

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィーによる糖類の分析法には、カラム充填剤に、 NH_2 基含有シリカゲルを用いた分配クロマトグラフィー、アニオン交換樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィー、多孔性陽イオン交換樹脂または親水性多孔性樹脂を用いたゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) などが知られている。

分配クロマトグラフィー¹⁾やイオン交換クロマトグラフィー²⁾では、溶離液に有機溶媒を混合したり、ほう酸塩の濃度を変えることで糖類の分析を行なうのに対して、イオン交換樹脂を利用したGPC³⁾の場合には、充填剤のポアサイズと塩を構成する対イオンの種類を変えることによって分析を行なう。この場合、溶離液に水を使用することができるので、目的とする物質の分離可能なカラム充填剤が調製できれば、糖類を分取したり、ポストカラム法で検出するのに有利な方法といえる。そこで、イオン交換樹脂の適用範囲の拡大のために、主に1価および2価の陽イオンを対イオンとした各種カラム充填剤を開発し、糖類に対する分離状態を調べた。その結果、糖類の分離に特長のあるカラム充填剤であることが確かめられたので、その分離性能を中心に報告する。

2. 実験

2.1 カラム充填剤

ポアサイズのほぼ一定なイオン交換樹脂で、対イオンとして、1価の陽イオン (Gelpack GL-C610, C613, C614)、2価の陽イオン (Gelpack GL-C611, C615)、第3級アンモニウムイオン (Gelpack GL-C612) の6種のカラム充填剤を調製した。

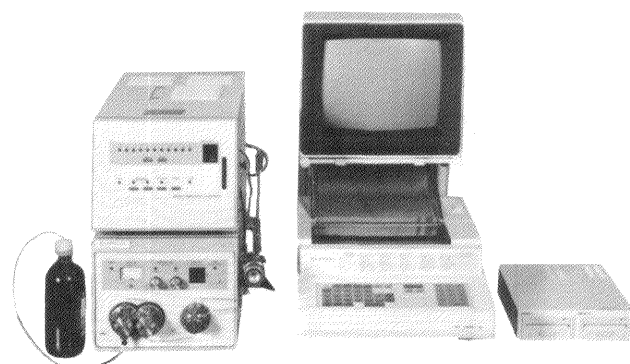
2.2 実験条件

内径10.7mm、長さ300mmのステンレス鋼製ジャケット付カラムに充填し、655A形日立高速液体クロマトグラフで、水または $1 \times 10^{-4}\text{N}$ NaOH水溶液を、1.0mL/minの流速で溶出し、示差屈折モニタ (RIモニタ) で検出した。カラム温度は、循環恒温槽を用いて60°Cに設定した。なお試料はすべて市販の特級試薬を使用した。

3. 結果と考察

糖類25種類、糖アルコール5種類の合計30種類の標準試料について、各々単独で測定したときの溶出容量値を表1にまとめて示した。

分子量が同一の単糖類であるグルコース、ガラクトース、マンノース、フラクトースの分離について検討した結果、



655A形日立高速液体クロマトグラフ

表1 糖・糖アルコールの溶出容量* (mL)

Column				C610	C611	C612	C613	C614	C615
No.	Sample name	Formula	MW						
1	Stachyose	$\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$	666	9.8	10.8	8.6	9.4	16.2	11.0
2	Melzitose			10.5	11.3	9.4	10.1	14.4	11.9
3	Raffinose	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	504	10.8	11.6	9.6	10.2	16.4	11.8
4	Maltotriose			11.1	12.6	9.7	10.3	16.4	12.0
5	Trehalose			12.2	12.6	10.4	11.7	16.4	13.0
6	Maltose			12.4	13.2	10.8	11.7	17.4	13.6
7	Cellobiose			12.0	12.6	10.6	11.3	17.2	12.2
8	Sucrose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342	12.2	12.3	10.8	11.7	16.2	12.8
9	Melibiose			12.4	13.4	10.5	11.6	19.7	12.6
10	Gentiobiose			11.8	12.4	10.4	11.1	17.0	12.0
11	Isomaltose			12.3	12.9	10.5	11.4	18.3	12.3
12	Lactose			12.6	13.6	10.8	11.9	19.7	12.8
13	Glucoheptose	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_7$	210	14.8	20.2	12.2	14.3	19.3	15.4
14	Glucose			15.0	14.9	12.7	14.1	19.0	14.4
15	Sorbose			15.4	16.8	12.9	14.6	18.7	14.6
16	Galactose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180	16.0	16.8	12.9	15.0	21.6	15.4
17	Mannose			16.1	18.0	13.0	15.2	22.1	15.6
18	Fructose			16.3	19.4	13.0	15.4	21.6	15.4
19	Rhamnose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	164	15.3	16.7	13.3	15.0	19.8	15.2
20	Fucose			17.5	18.3	13.2	16.4	23.6	16.8
21	Xylose			16.1	16.4	13.5	15.1	19.1	15.2
22	Arabinose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150	17.3	18.7	13.8	16.3	22.2	16.5
23	Ribose			19.1	21.3	14.2	18.4	24.6	18.1
24	Lyxose			16.5	19.1	13.8	15.8	20.5	16.0
25	Digitoxose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4$	148	16.1	17.6	13.4	17.1	19.9	17.1
26	Maltitol	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	344	12.6	17.0	10.5	12.6	20.0	13.8
27	Mannitol			15.1	21.4	12.7	15.8	20.7	17.0
28	Sorbitol	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	182	15.7	25.8	12.6	16.6	22.7	18.0
29	Inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180	16.8	19.5	12.6	15.4	26.5	15.9
30	Xylitol	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$	152	16.6	25.3	13.0	17.5	22.9	18.7

* カラム: 10.7×300mm 60°C

溶離液: H_2O (C611のみ 10^{-4}N NaOH) 1.0mL/min

C612では溶出容量が12.7~13.0の間となり、混合試料では分離できないが、C611では、これら4種の完全分離ができた。図1にそのクロマトグラムを示した。ただしこの場合、溶離液に $1 \times 10^{-4}\text{N}$ NaOH水溶液を使用する必要がある。

なお、この程度のアルカリ水では、単糖類のエピマー化

* 日立化成工業(株)茨城研究所

** 日立化成工業(株)茨城研究所

*** (株)日立製作所那珂工場 理博

は起らないことを確認した。また水を溶離液とした場合には、単糖類のピークが経時変化でブロードになり、分離能が低下するので使用できない。単糖類中の異性体などが分離するのは、対イオンである金属イオンと糖との錯生成能の差によるメカニズム³⁾であると考えられる。金属イオンの代りに第3級アンモニウムを対イオンとしたC612では、錯生成が生じないために、異性体分離ができず逆に、親水性多孔性樹脂系充填剤と同じ分子サイズによる分離挙動を示すものと考えられる。そのためC612は、未知試料の分子量測定用カラムとして利用することができる。

2 糖類の分離にはC614が最も適しており、シュクロース、

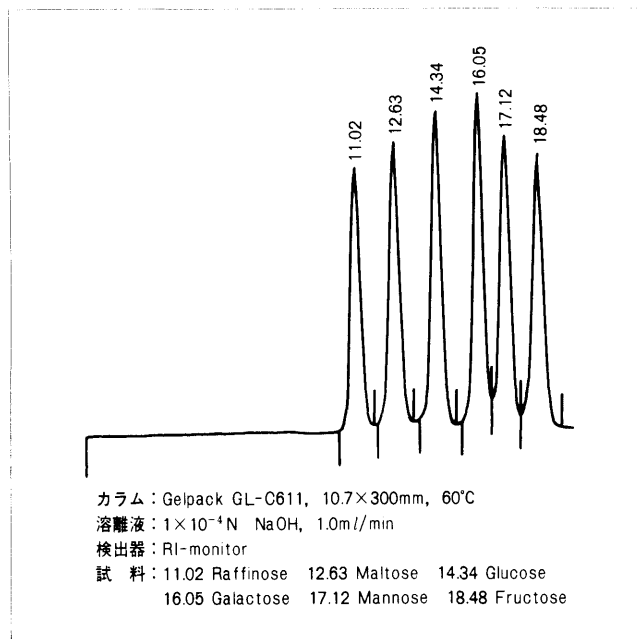


図1 糖のクロマトグラム

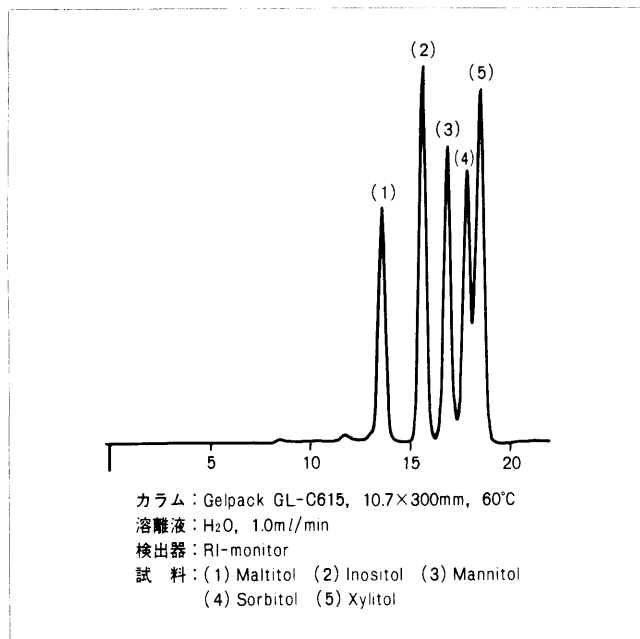


図2 糖アルコールのクロマトグラム

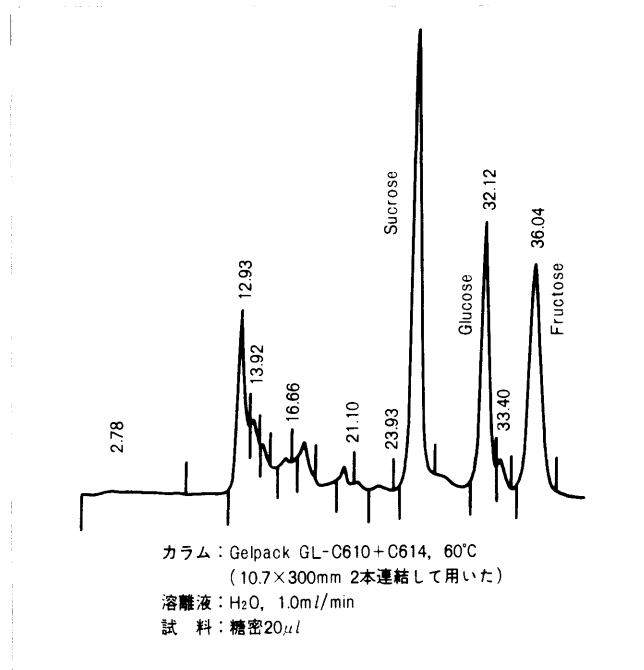


図3 糖蜜のクロマトグラム

マルトース、イソマルトース、メリビオースなどの分離が可能である。また3糖類は、1種類のカラムで分離するのは困難であるが、C611とC614を組み合わせることによって分離できることを確かめた。

糖アルコールは、C615カラムを用いることによって、図2に示したように、5種類すべてが分離可能であることが分かった。

これらのカラムは、溶離液として水または微アルカリ水のため、それぞれ特長のあるカラムを組み合わせることによって、目的物質を分離することができる。図3に、C610とC614を組み合わせ、糖蜜の分析を試みたクロマトグラムを示した。

図3に示したカラムでは、例えば単糖類と2糖類の混合試料であるシュクロース、グルコース、フラクトース中の微量のマルトース、イソマルトースの分離も可能で、C611とC614を組み合わせることによって、シュクロースとマルトースや、フラクトースとソルビトールの分離が可能であることも分かった。

4. おわりに

以上報告したように、糖・糖アルコールの分離・分析に適したカラム充填剤を開発し、その主な性質と応用について述べた。今後更に、オリゴ糖や糖たん白質の分離・分析など、重要且つ比較的分離の困難な物質に対し応用できるような充填剤の開発に努力を続けたいと思う

参考文献

- 1) F.M.Rabel, A.G.Guputo, E.T.Butts : J.Chromatogr., 126, 731(1976)
- 2) S.Honda, Y.Matsuda, M.Takahashi, K.Kakehi, S.Ganno : Anal. Chem., 52, 1079(1980)
- 3) R.W.Goulding : J.Chromatogr., 103, 229(1975)

エルトリエーターロータによる細胞分離と蛍光偏光解消法への応用

Cell Isolation by Centrifugal Elutriator ; An Application to Fluorescence Polarization

横山 三男* 塩月 一英**

(昭和60年4月10日受理)

1. はじめに

新しいバイオテクノロジーの開発によって、これまで、同一の細胞集団として分類されていた細胞群が不均一な細胞の集団で構成されていることが明らかになった。

近年、細胞生物学の分野へ、新しいテクノロジーが開発、応用されるにいたり、各種の細胞集団をさらに機能的な亜集団に識別・分類することができるようになった。

これまで個々の細胞集団を分離し、その細胞の機能を探索するために、研究目的の材料となる特定の細胞を細胞群の特性に従って種々の細胞集団に分離することが試みられてきた。たとえば、密度勾配遠心法、ガラスウールやセファデックスなどの細胞粘着法、モノクローナル抗体に蛍光色素を標識して細胞との反応から特定の細胞のみを分離するセルソーター法などがある。ことに、細胞融合法によって、モノクローナル抗体の作製技術が進み、セルソーターで細胞の亜集団を単一の細胞または細胞集団として分離・分析できるようになった。その結果、生体の複雑で多彩な免疫ネットワーク機構の解析が行われるようになっていく。

1948年、Lindahlらによって、Counter-flow centrifugal elutriation (CCE) は、“Counter-streaming centrifugation”として初めて報告された。CCEは、細胞の大きさや密度によって多量の細胞を高純度で分離できるという特徴がある。しかし、従来のCCE装置では、操作が複雑であるほか、細胞の分離能や結果の再現性に欠点があった。

今回、われわれは、簡単な操作法により、短時間で特定の血液細胞を分離できるCCE装置を独自に開発し、この機

器を用いた細胞分離能について検討した。さらに健康人ならびに癌患者の末梢血単核球を細胞の大きさと密度の違いに基づいて種々のフラクションに分離した後、それぞれのフラクションに細胞をPHAで刺激し細胞内に特異的に取り込まれる蛍光色素 (Fluorescein diacetate, FDA) をパラメーターとして用い、それらの蛍光分子の動きを蛍光偏光解消法で測定し、細胞質の粘度すなわち細胞質の流動性を解析した。

2. 方 法

2.1 Counterflow centrifugal elutriation法の原理

図1は、CCE〔SRR-6Y形エルトリエーター、日立工機(株)〕の内部構造の模式図で、図2は、細胞分離チェンバー内の試料(粒子)の流れを示している。Centrifugal elutriation法は、細胞分離チェンバー内に一定の流量(flow velocity, Q)で粒子を浮遊した緩衝液を送り込みながら、その流れと逆方向に遠心力(G)をかけるという仕組みの遠心法である。分離チェンバー内に送り込まれた粒子は、その粒子の大きさ、密度および形状に基づいて、分離チェンバー内の G と Q のバランスがとれる部位(equilibrium position)に均一の大きさ(homogeneity)の粒子が、それぞれのequilibrium positionに集合する。その結果として、分離チェンバー内でいくつかの粒子の層を形成する。ついで、一定時間ごとに流量(Q)を上げて粒子を流出させると、それぞれ均一の大きさをもつ粒子の集団をフラクションごとに集めることができる。

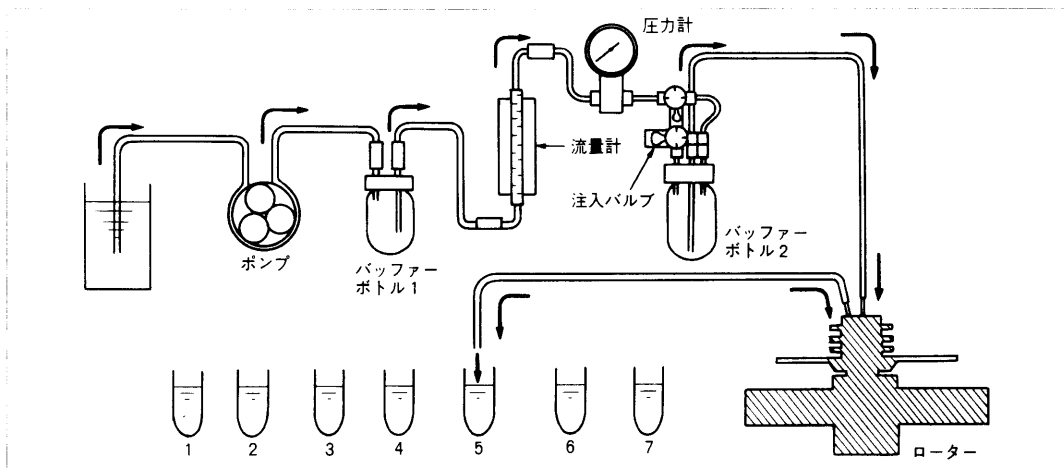


図1 日立SRR-6Y形エルトリエーターの模式図

* 久留米大学医学部免疫学講座教授 医博

**久留米大学医学部小児科学講座 医博

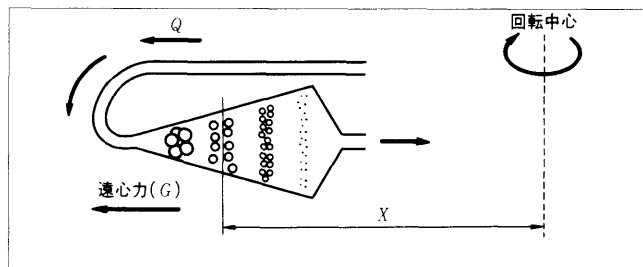


図2 分離チェンバー内で粒子が配置されるパターン

この一定の回転速度(G)と一定の流量(Q)のとき、回転半径 X の部位に集合する粒子径(D) (球型の粒子と仮定する)は次の式で求められる。

$$D = \frac{K \cdot Q \cdot \eta}{(\rho_p - \rho_m) \cdot X \cdot A(x) \cdot \omega} \cdot \frac{1}{\omega}$$

ここに η : 溶媒の粘度

ρ_p : 粒子の密度

ρ_m : 溶媒の密度

$A(x)$: X 地点における流路(チェンバー)の断面積

K : 粒子の形状定数(球体の場合 $K=18$)

Q : 溶媒の流量

ω : 角速度

2.2 単核球の分離法

健康人へパリン加末梢血100mlを0.01%EDTA加りん酸緩衝液(PBS)と1:2の割合で希釈し、その20mlを15mlのFicoll-Triosil比重液(比重1.077g/cm³, 25°C)を入れたコニカルチューブ(Cornical tube, Falcon社, Cockyessville, MD)に界面を乱さないように静かに重層した。ついで、25°C冷却遠心機(温度25°Cにセットできる日立特殊遠心機)で、400g、20分間遠心したのち、単核球層を採取し、0.01%EDTA加PBSで2回洗浄した。2%胎児血清(FCS)を含むEDTA加PBS(以後、緩衝液とよぶ)で、単核球浮遊液(5×10^6 cells/ml)とした。癌患者(子宮癌3名、卵巣癌1名)の末梢血からの単核球の分離にはへパリン加血液30mlを用いて健康人の場合と同様の操作で分離を行った。

2.3 Elutriator の操作

採血してから単核球浮遊液を作製する間、CCE(SRR 6Y形エルトリエーター)の血液流通回路系を70%エタノール200mlでペリスタルチックポンプ(peristaltic pump)で流して消毒滅菌した後、400mlの滅菌蒸留水で洗浄した。ついで、緩衝液200mlを流しながら、血液流通回路内に気泡が残らないようにしてから、温度を20°C、ロータースピードを2000rpmにセットし、初期流速が12ml/minとなるように調整した。ついで、バッファボトル(buffer bottle 2)の注入バルブから単核球浮遊液を入れ、6分ごとに0.5ml/minずつ流速を増し、最終速度を16ml/minとした。流出してくる細胞浮遊液は、Falconのコニカルチューブに各流速ごとに採取した。各細胞浮遊液の分画を集め終わってから、ロータースイッチを切り、分離チェンバー内に流出されずに残っている単球を集め、これを最終フラクションとした。収集した各フラクションの細胞浮遊液を250gで5分間遠心し、細胞を分取した。この遠心分離に要するローターの作動時間は60-70分前後であった。

2.4 細胞の形態学的な検索

分取した各フラクションの細胞は、May-Giemse染色および非特異的エステラーゼで染色し、各フラクションに含まれる細胞を顕微鏡下で同定した。

2.5 蛍光偏光解消法

CCEで分離したフラクション1~3, 4~6, 7~9および最終フラクションを、それぞれフラクションI, II, IIIおよびIVとした。各フラクションの細胞をPBSで 3×10^6 cells/mlに浮遊させ、それぞれの細胞浮遊液0.2mlにPHAの最終濃度が1000 μ gとなるように添加し、37°Cで45分間反応させた。コントロールとしてPBSを加え、37°C45分間インキュベイトした。癌患者の場合も同様におこなった。

FDA(Fluorescein diacetate)溶液(0.25 μ g/ml, pH 7.4, 浸透圧330mOsm)3mlに細胞浮遊液をそれぞれ0.2ml加える。その後2分間、26°Cでインキュベイトさせ、蛍光偏光光度計(日立MPF-4改良型、試作機)を用いて励起波長470nmおよび測光波長510nmで測定した。

入射光測偏光フィルターは垂直方向に固定し、測光側偏光フィルターを垂直方向と水平方向に変えて、それぞれの蛍光強度、すなわち $I_{\perp}(T)$ および $I_{\parallel}(T)$ を6分間測定した。測定終了後、0.22 μ mのミリポアフィルター(装置に前もって装着しておく)で40cmHgの圧で吸引濾過した。その後、濾液の蛍光を同様に $I_{\perp}(T)$ および $I_{\parallel}(F)$ 成分に分けて測定した。

偏光度(P-value)の算出は、濾過中間時点における $I_{\perp}(T)$, $I_{\parallel}(T)$, $I_{\perp}(F)$ および $I_{\parallel}(F)$ を求め、 $I_{\perp}(T)$ および $I_{\parallel}(T)$ の値から、 $I_{\perp}(F)$ および $I_{\parallel}(F)$ を差し引いた $I_{\perp} = I_{\perp}(T) - I_{\perp}(F)$ および $I_{\parallel} = I_{\parallel}(T) - I_{\parallel}(F)$ を用いて、

Perrinの公式: $P = \frac{I_{\perp} - I_{\parallel}(G)}{I_{\perp} + I_{\parallel}(G)}$ から求めた。 G は偏光方向による測定効率の違いを補正する定数で、励起光を水平方向とした平行 i と直角 i 方向の偏光成分の測定値から求めた。以上の操作をマイトゲンで刺激した細胞とコントロール細胞について行い、それぞれのP-valueを求めた。反応率は、

$$R = \frac{P_{\text{PHA}}}{P_{\text{cont}}} \times 100(\%)$$
 から算出した。

蛍光偏光解消法の原理から、細胞質の流動性は、刺激細胞のP-value(P_{PHA})が小さいほど、つまり反応率が小さいほど細胞質の流動性が亢進していると考えられる。

2.6 Ethidium bromideを用いたリンパ球の幼若化能の解析

フラクションI, II, IIIおよびIVのそれぞれの細胞を10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI1640培養液に、 1×10^6 cells/mlとなるように浮遊させた。細胞浮遊液1.0mlにPHA 30 μ gを加え、5%CO₂インキュベーター内で37°Cで72時間培養し、PHA無添加の細胞をコントロールとした。すべてトリプリケートで培養を行った。

幼若化率の測定は、72時間培養後それぞれの細胞浮遊液をTris緩衝液(pH7.6)1.0mlに浮遊させた。この浮遊液0.4mlをTriton $\times$ 100溶液(グリシン0.75g, NaCl 17.53g, Triton $\times$ 100 0.9mlに蒸留水を加え、1 ℓ とした。pH9.5)2mlに加え、さらに0.02% ethidium bromide溶液を0.1ml添加した(サンプル調整の終了)。

ethidium bromide は、細胞内のDNAと結合すると蛍光を発するので、その蛍光強度を flow cytometry (Spectrum III, Ortho社) で測定し、細胞内のDNA量すなわち幼若化能を解析できる。幼若化能は、PHAを添加した細胞浮遊液の全蛍光強度 (I_{PHA}) とPHA無添加の細胞浮遊液の全蛍光強度 (I_{cont}) をそれぞれ測定し、stimulation index ($S.I.$) = $I_{\text{PHA}}/I_{\text{cont}}$ で幼若化率を定量した。なお、本研究の対象とした癌患者では採血量が30mlと少なかったため、ethidium bromide を使用したリンパ球幼若化能の解析を各フラクションごとに行うことができなかった。

2.7 トリパンプブルー色素による細胞染色テスト

PHA 1000 μ gをそれぞれの細胞浮遊液に添加し、37°C、45分間反応させた後、それぞれの細胞の生存率をトリパンプブルー染色法で調べた。

3. 結 果

健康人の単核球浮遊液をCCE装置に流すと、リンパ球および単球が分離されるパターンを図3に示した。フラクション1～4 (流速12ml/min～13.5ml/minで分取した) にはほとんどのリンパ球が流出されるが、フラクション5 (流速14ml/min) から徐々に単球が流出しはじめ、最終フラクションには多量の単球が回収された。分離前の単核球、及び分離されたリンパ球と単球の顕微鏡写真を図4に示す。

最終フラクションに回収される細胞数ならびに細胞の純度は、単球が $7.7 \pm 1.5 \times 10^6$ cells で $79.8 \pm 5.9\%$ 、リンパ球が $0.94 \pm 0.6 \times 10^6$ cells で $10.3 \pm 6.1\%$ 、顆粒球 (好中球および好塩基球) が $0.96 \pm 0.4 \times 10^6$ cells で $9.9 \pm 4.3\%$ であった。なお、すべての細胞の回収率は、常に80%以上の値を示した。また細胞の生存率も98%以上の値を示した。

新たに作成したフラクションI、II、IIIおよびIVそれぞれの細胞のPHA刺激による細胞質流動性の変化は、健康人では、それぞれ $82 \pm 3\%$ 、 $84 \pm 11\%$ 、 $74 \pm 10\%$ および $88 \pm 6\%$ で、フラクションIIIの細胞がPHAと反応し細胞質流動

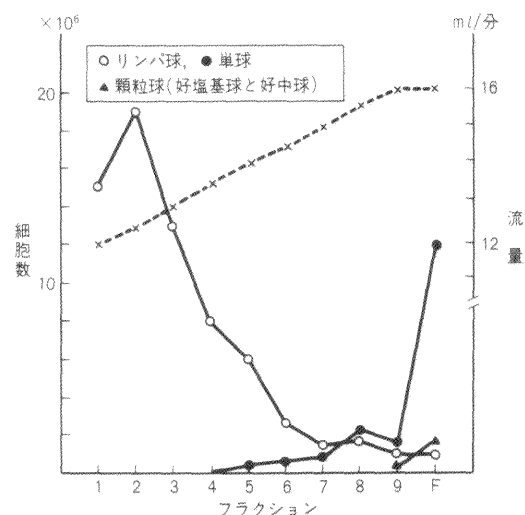
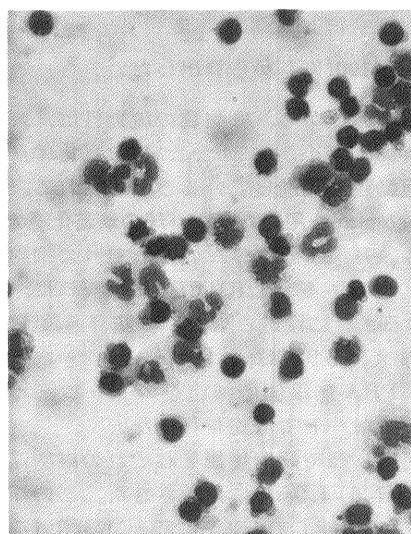


図3 CCEによって単球およびリンパ球が分離されるパターン
フラクション1～4まではリンパ球、フラクション5から徐々に単球が分離されはじめ、最終フラクションはほとんど単球を分取できる。

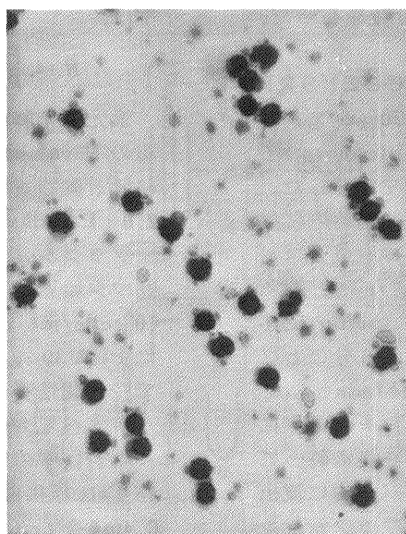
性に最も変化がみられた。

健康人では、各フラクション (I、II、IIIおよびIV) のPHAによるリンパ球幼若化率 ($S.I.$) は、それぞれ 1.38 ± 0.21 、 1.43 ± 0.19 、 1.92 ± 0.25 および 1.0 ± 0.2 で、フラクションIIIの細胞がPHAに最も反応し、幼若化率が高い値を示した。

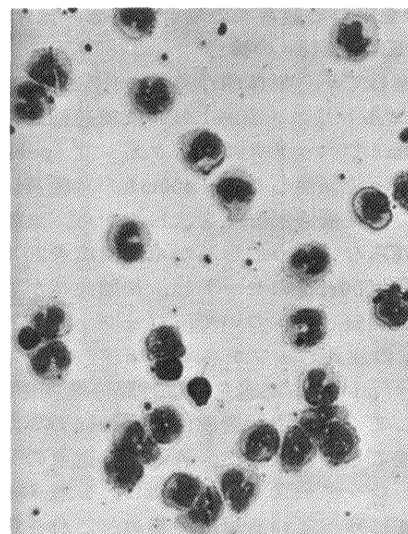
したがって、PHAによる細胞質流動性が最も亢進するフラクションとPHAによる細胞の幼若化率が最も高いフラクションは、ともにフラクションIIIの細胞であることがわかった。



(a) 分離前単核球



(b) リンパ球



(c) 単球

図4 May-Giemsa染色によるリンパ球・単球の顕微鏡写真($\times 200$)

つぎに、癌患者の各フラクションのPHAによる細胞質流動性の変化は、フラクションⅠ、Ⅱ、ⅢおよびⅣでは、それぞれ $82.5 \pm 2.65\%$ 、 $78.2 \pm 1.70\%$ 、 $67 \pm 2.94\%$ 、および $90.5 \pm 2.9\%$ で、健康人の場合と同様にフラクションⅢの細胞が、PHAと反応して細胞質流動性が最も亢進した。

4. 考 察

一般に、CCEによる細胞分離は、(1)細胞の生理活性を失うことなく、細胞を大きさと細胞の密度差によって細分画できることと、(2)純度の高い細胞分離ができる、などの特徴を備えている。これらの目的のためには、遠心の回転速度(G)をできるだけ一定に保つことが必要で、このためSRR 6Y形エルトリエーターローターを取り付けた遠心機(SCR 20BA、日立高速冷却遠心機)は、専用のスピードコントローラーによって $\pm 10\text{rpm}$ の精度を保つように改良されている。また、エルトリエーターローターに流す緩衝液の流速を正確に保持することが重要である。このため脈流の少ないペリスタルティックポンプ(Masterflex, Cole-Parmer社, Chicago, IL)を用いて流量を一定にする工夫がなされている。

また、遠心の回転速度(G)や流量(Q)が一定でないと、分離チャンバー内で各細胞層がバランスを保てないため、均一な細胞集団を分取することが困難となる。ことに、バッファボトル(1)から流量計の中に気泡があると流量が変化するため注意が必要である。

今回、独自に開発したCCE装置を使用して、末梢血の単核球をリンパ球と単球に分取したところ図3に示すように極めて分離能が優れていることを確認した。

Cercekらは、Ficoll-Triosil比重遠心法(F-T法)を用いて、健康人と癌患者末梢血から単核球を分離すると、健康人では単核球層の上域に位置する細胞がPHAと反応して、細胞質の流動性が亢進するが、癌患者では逆に下方に位置する細胞がPHAに反応して細胞質の流動性が亢進すると報告している。彼らの報告が正しいとすれば、健康人のリンパ球と癌患者のリンパ球ではPHAと反応するリンパ球の密度に差があると考えられる。

CCE装置は、細胞の大きさと密度の違いに基づいて細胞を分離する特長を備えている。したがって、CCE装置では、F-T法で採取する単核球層をさらに分画することが可能である。しかも、それぞれのフラクションの細胞質流動性の変化を蛍光偏光解消法で測定すれば、健康人と癌患者では、PHAに最も反応する細胞が、それぞれ異なるフラクションとして分取できるものと考えられる。われわれは、この理論に基づき、まず、健康人の末梢血から単核球をF-T法によって分離し、その単核球をCCE装置を用いて、種々のフラクションに分取した。そのあと、各フラクションの細胞をPHAで刺激し、これらの生きた細胞内に特異的に取り込まれる蛍光色素(FDA)を細胞に取り込ませ、その蛍光分子の動きを蛍光偏光解消法で測定することで細胞質流動性の変化を解析した。その結果、第Ⅲフラクションに分取される細胞がPHAと反応し、細胞質の流動性が最も亢進することがわかった。PHAによるリンパ球の幼若化能が最も高いS.I.値を示す細胞が、このフラクションに存在することがわかった。このことから、レクチンで

細胞を刺激した後、数十分以内におこる細胞質の流動性の亢進は、レクチンで細胞を刺激した3日後のリンパ球幼若化能と関連した所見を示した。

つぎに、癌患者の末梢血を同様の操作で分離し、健康人の場合と同様に、PHAで細胞を刺激し細胞質の流動性を解析したところ、健康人と同様に第Ⅲフラクションの細胞が、PHAと反応して細胞質の流動性が最も亢進した。

一般に、癌患者では、レクチンによるリンパ球幼若化能が、健康人に比べ低下している報告が多いが、われわれが検討した癌患者の症例では、リンパ球幼若化能の検討を試みていないけれども、レクチン刺激による細胞質の流動性の亢進は、健康人と同様に認められ、健康人と比べ有意差を認めなかった。

Cercekらが、F-T法で単核球層を上層と下層に分離しているが、F-T法は、細胞の密度差によって細胞を分離する方法で、CCE法は、細胞を大きさと密度の両方の要素によって細胞を分離する方法であるが、CCE法は、特に細胞の大きさの要素が分離能に影響する。したがって、CCE法が単にF-T法で採取する単核球層をさらに細かく分画しているとは言えない。

Cercekらの方法が、彼らの報告のように癌の診断に有用であるかについては、多くの研究室で追試がなされたが、再現性があるとは言い難い。しかし、新しい角度から癌患者の末梢血リンパ球の細胞動態を解析しようとした試みは意義があると思われる。

蛍光色素を使用するテクノロジーは近年さかんに細胞生物学へ応用されている。特に、蛍光偏光解消法は蛍光色素の動きを追求し、蛍光色素の周辺の微少環境を解析する上で極めて有用な方法である。生きた細胞内に取り込まれる種々の蛍光色素が、現在多く開発され、細胞の動態を解明することに応用されている。われわれは、新しいテクノロジーであるCCE法と蛍光偏光解消法とを併用してFDA以外に種々の蛍光色素を用いて、各種疾患の血液細胞について、その動態の解析に取り組んでいる。このことは、疾患の診断や病態を知るパラメーターや治療の効果をj知るモニターとして応用できるものと期待している。

参考文献

- 1) 塩月一英、本田福美子、八坂達臣、横山三男、早坂浩、永田明朗、是枝正国：カウンターフロー遠心分離装置を用いた単球分離法と評価について、臨床検査；29、337～340（1985）
- 2) 早坂浩、永田明朗、是枝正国、塩月一英、本田福美子、八坂達臣、横山三男：カウンターフロー遠心分離法の原理と基礎的研究、臨床検査 in press.
- 3) 塩月一英、八坂達臣、町淳二、横山三男、高畑藤也、住山弘：PHAおよびFMLPが細胞膜の動態と細胞質の流動性におよぼす影響について、アレルギー；34(2)、135～141（1985）
- 4) Cercek, L. and Cercek B : Application of the phenomenon of changes in the structuredness of cytoplasmic matrix (SCM) in the diagnosis of malignant disorders. A review. Eur. J. Cancer ; 13, 903～915（1977）

ステップ勾配遠心法によるプラスミドDNAの迅速分離

Rapid Separation of Plasmid DNA by Step Gradient Centrifugation

立原 定幹*

(昭和60年4月10日受理)

1. はじめに

DNAの分離はMeselsonら¹⁾(1959)が超遠心機を用いて塩化セシウム(CsCl)溶媒中で分離して以来、密度勾配沈降平衡法(Isopycnic Centrifugation)として普及した。この方法²⁾はCsClとDNAを混合した試料をチューブに入れ、高速回転(遠心加速度 $105,000 \times g$)で長時間分離させる。CsClは遠心力により沈降し、また拡散してトップからボトムに向かって一定の密度勾配を形成する。分子量の大きいDNAは密度勾配が形成されるにつれて、沈降または浮上して溶媒の密度と等しいところに帯状に分離する。

バイオテクノロジーにおける遺伝子組換え実験で、ベクターに用いるプラスミドDNAもこの方法で行なわれている。しかし、この方法は長時間を要する欠点があった。この度、分離時間を短縮する方法としてステップ勾配^{3),4)}とパーティカルロータを組み合わせを行なうことを試みた。この方法によれば、分離時間を約2時間(従来の1/10以下)にできる。以下この遠心法と結果について述べる。

2. ステップ勾配遠心法

2.1 沈降平衡到達時間

CsClの沈降平衡到達時間⁵⁾は沈降距離($rb - rt$)の自乗に比例する。次の(1)式に示す($rb - rt$)が小さいほど短時間となる。

$$t(\text{sec}) = \frac{0.44}{D} (rb - rt) \dots\dots\dots (1)$$

ここに D : 拡散係数(cm^2/sec)

rt : 回転中心からトップまでの距離(cm)

rb : 回転中心からボトムまでの距離(cm)

ステップ勾配遠心法は低比重液と高比重液を2段に重層することにより拡散距離を半分にし、より早く沈降平衡に到達できる。その時間はCsClの拡散係数⁶⁾ $D = 2.291 \times 10^{-5}$ ($4M$)として、時間(hr)を求めると(2)式となる。

$$t(\text{h}) = 1.33 (rb - rt)^2 \dots\dots\dots (2)$$

また、パーティカルロータを用いると更に沈降距離を短くでき、拡散面積も図1に示すように大きくできる。同一チューブでスイングロータと比較して約6倍となる。

2.2 密度勾配と回転数

密度勾配の形状は初密度(ρ_0)と沈降距離、回転数によって決まる。同一チューブで初密度と遠心加速度を同じにし、沈降距離の長いものと短いものを比較すると長い方は広範囲の密度勾配を形成し、短いものは狭い範囲となる。図2にそれを示す。パーティカルロータを用いた場合は沈降距離($rb - rt$)が短くなるので回転数を上げる必要がある。

回転数と密度勾配の関係⁷⁾は直線勾配と近似して(3)式で

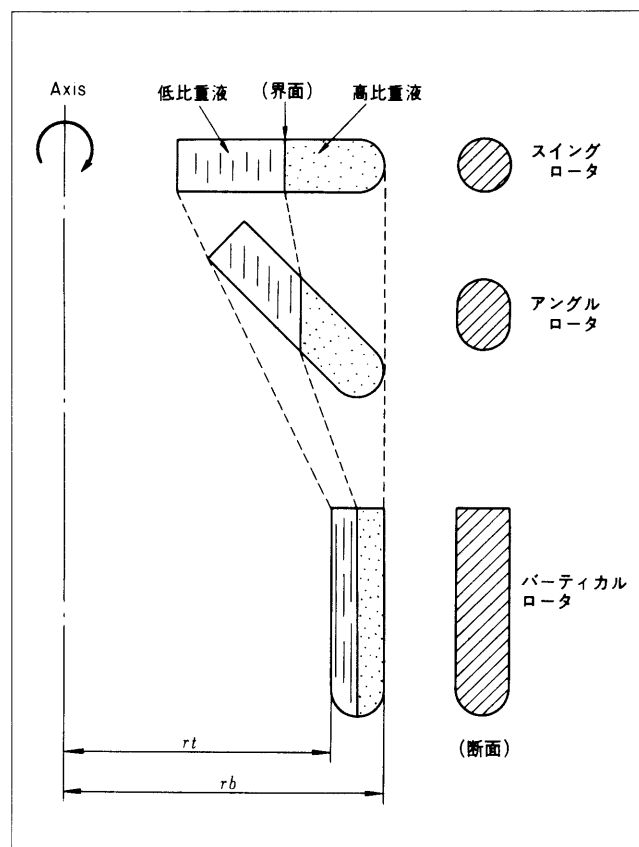


図1 各ロータの断面横比較

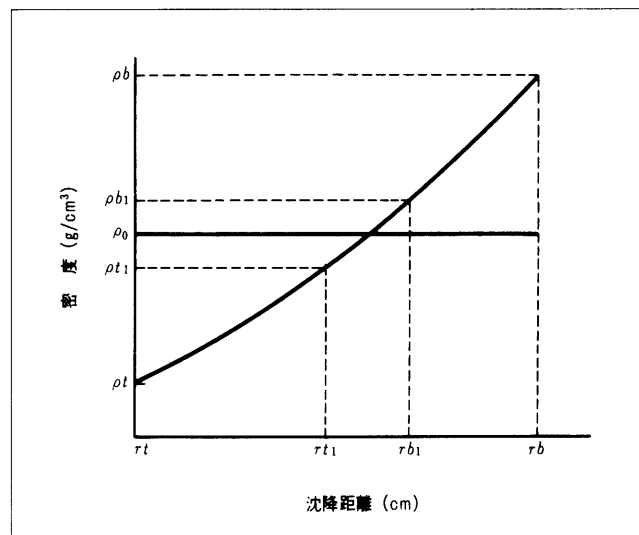


図2 CsClの密度勾配

求めることができる。係数 β は表1を用いる。

$$\text{rpm} = 9.55 \sqrt{\frac{\beta}{r} \cdot \left(\frac{d\rho}{dr} \right)} \dots\dots\dots (3)$$

$$r: \text{平均回転半径} \sqrt{\frac{rt^2 + rb^2}{2}} \text{ (cm)}$$

$$\frac{d\rho}{dr}: \text{勾配} \left(\frac{\rho b - \rho t}{rb - rt} \right) \text{ (g/cm}^4\text{)}$$

ρb : ボトムの密度(g/cm³)

ρt : トップの密度(g/cm³)

β : 係数

2.3 ステップ勾配

ステップ勾配は沈降平衡の条件に合せ、トップ側の低比重液(ρt)とボトム側の高比重液(ρb)を用い、平均密度を初密度(ρ_0)と同一にする。

プラスミドDNAは $\rho t: 1.47 \sim \rho b: 1.81$ の範囲で密度1.57のところから分離されるので、 $\rho t: 1.47$ 液、 $\rho b: 1.81$ 液を用いる。その割合は $\rho t: \rho b = 7: 3$ となる。例えば5mlのチューブを用いる場合はボトム側に $\rho t: 1.81$ 液1.5ml、トップ側に $\rho t: 1.47$ 液を3.5ml重ねればよい。

3. 密度勾配の測定例

日立工機(株)が新しく開発したカーボンファイバー材からなるRP67VF形パーティカルロータを用いた密度勾配の測定例について述べる。

このロータの仕様を表2に示す。重量が4.6kgと軽量で最高67,000rpmまで回転できる。

実験は5mlチューブにCsCl $\rho t: 1.47$ 液3.5mlを入れ、チューブ底からCsCl $\rho b: 1.81$ 液1.5mlを静かに注入し、日立

表1 CsClの β ファクター⁷⁾

ρ_0	β	ρ_0	β
1.20	1.984×10^9	1.55	1.216×10^9
1.25	1.715	1.60	1.197
1.30	1.546	1.65	1.190
1.35	1.430	1.70	1.190
1.40	1.346	1.75	1.199
1.45	1.286	1.80	1.215
1.50	1.245	1.85	1.236

表2 RP67VF形パーティカルロータの仕様

最大回転数	67,000rpm
最大遠心加速度	$410,000 \times g$
回転半径	Max. 8.16cm
	Av. 7.50cm
	Min. 6.84cm
チューブ	名称 5PAシールチューブ
	容量 5ml
	寸法 $\phi 13 \times 60.5\text{mm}$
チューブ・アダプタ本数	8本
重量	4.6kg

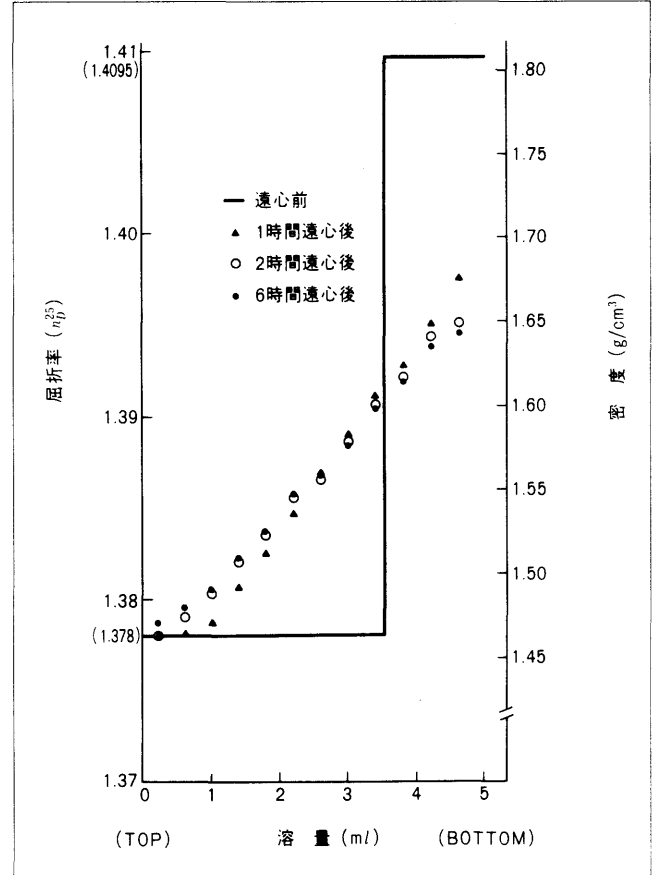


図3 塩化セシウムの密度勾配変化(67,000rpm, 20°C)

分離用超遠心機SCP85Hで67,000rpm, 20°Cにて1時間、2時間、6時間と運転した。運転後、フラクショネータ(日立DGF-U形)を用い、滴数分画し、屈折計(アツベPRA-B)で屈折率を測定し、勾配の変化を確認した。その結果を図3に示す。勾配は2時間で形成できることが確認できた。この時間は沈降距離1.2cmとして(2)式で求めた値とも一致する。プラスミドDNAの分離もこの条件で行なうことにした。

4. プラスミドDNAの分離

4.1 試料の調製

プラスミドDNA試料は大腸菌の培養液から調製したものをを用いた。実験に必要な試薬と密度の調製は下記の手順で行なった。

- (1) TE Buffer pH8.0液(10mM Tris HCl, 1mM EDTAを含む)を調製する。
- (2) エチジウムブロマイド(Eth.Br)液(10mg/ml)を調整する。
- (3) 比重1.47CsCl溶液を調製する。

TE Buffer 1mlに対し、0.771gのCsClを溶解すれば比重1.47CsCl溶液となる。

- (4) 比重1.81CsCl溶液を調製する。

この比重液はDNA試料、CsCl, Eth.Brを加え比重1.81になるようにする。Eth.Brはチューブ容量に合せfinal 0.1mg/mlになるように10mg/ml液を高比重液側に最後に加え、全量で1.5mlとする。全量1.5mlで比重1.81にするには

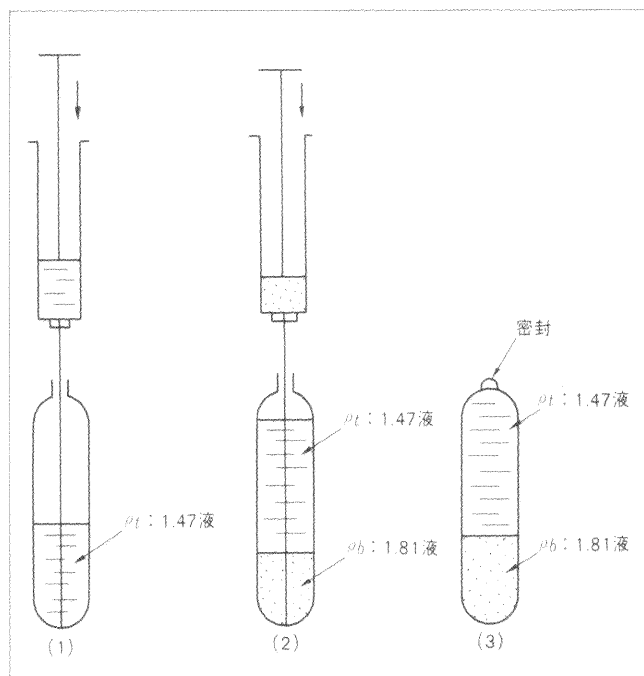


図4 試料の注入手順

プラスミドDNA試料1.02mlにCsCl1.689g(容積0.43ml), Eth.Br(10mg/ml)液0.05mlを加える。

4.2 試料の注入と遠心分離

4.2.1 試料の注入

始めに5PAシールチューブに比重1.47液3.5mlをシリンジで注入する。

次に比重1.81に調製した試料液1.5mlを針先の長い(70mm以上)シリンジでチューブ底から静かに注入する。2溶液を注入後、5PAシールチューブの上端部をチューブシーラー(日立STF-1形)で密封する。

その手順を図4に示す。

次に左右(ロータ穴の対称位置)バランスを確認後、アダプターにセットし、キャップを締付け、ロータ穴に挿入する。

4.2.2 遠心分離

日立SCP85Hの場合、運転モードをSlow Accにする。加速12分、整定2時間、減速10分、回転数67,000rpm、温度20°Cにセットし運転する。この加減速特性は図5のようになり、全行程151分で終了する。

5. 結果

結果は暗室で分離後のチューブにUV(302nm)を照射し、蛍光を発するDNAバンドを写真で判定した。

図6に示すように2時間と6時間では差は見られなかった。すなわち2時間で十分に分離できることが確認できた。この試料は80μgのDNAを含む。

6. おわりに

DNAおよびプラスミドDNAの分離は24~48時間かけていたが、ステップ勾配遠心法を用いると2時間で分離ができるようになる。このことにより、超遠心機本体の消耗も少なくなり省力化に役立つものと思う。

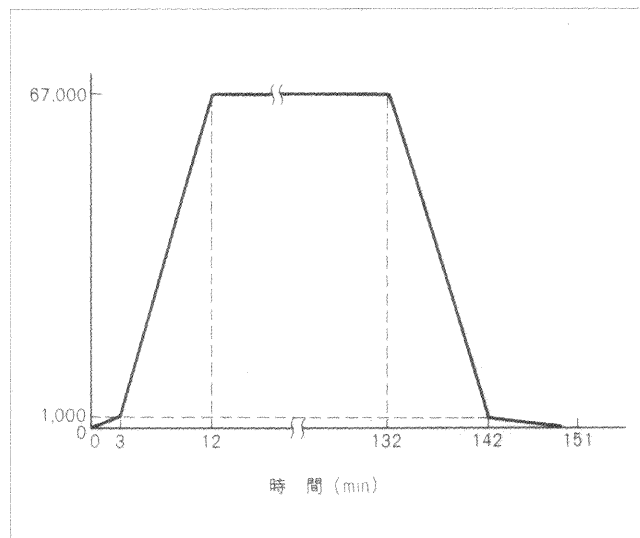


図5 RP67VFの加減速特性

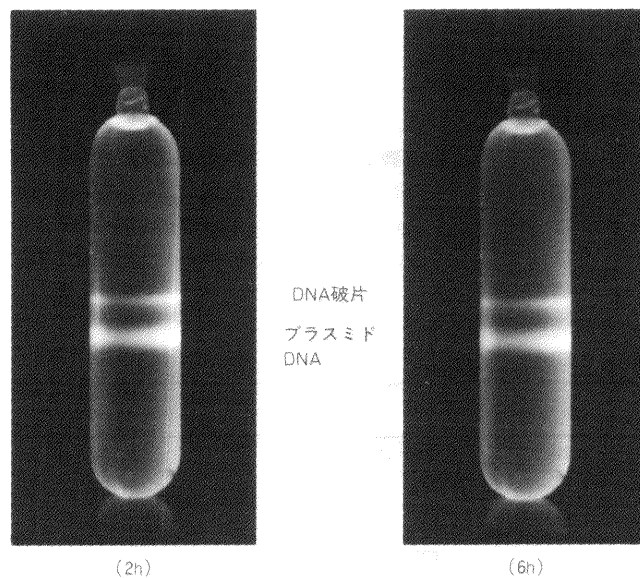


図6 分離結果

参考文献

- 1) M. Meselon, F. W. Stahl, J. Vinograd : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. ;43, 581 (1957)
- 2) W. G. Flamm, H. E. Bond and H. E. Burr : Biochim. Biophys. Acta ;129, 310-319 (1957)
- 3) Clifford F. Brunk and Vagn Leik : Biochim. Biophys. Acta ;179, 136-144 (1969)
- 4) John R. Wells and Clifford F. Brunk : Anal. Biochem ;97, 196-201 (1979)
- 5) 藤田博, 小高忠男, 内山敬康 : 続生物物理学講座 2. 物理的測定法II 19 (1968)
- 6) 丸善(株) : 化学便覧基礎編, 改訂2版, p. 1194 (1967)
- 7) 小高忠男, 内山敬康 : 生物物理, 29-36, (1967)

解 説

U-3200/3400形日立自記分光光度計と応用例(その1)

HITACHI Model U-3200/U-3400 Recording Spectrophotometer and Its Applications

小森 律夫* 根本 勲* 小松 均* 広瀬 弘* 山本 秀雄** 皆川 定雄*

(昭和60年3月11日受理)

1. はじめに

昭和32年に国内初の自記分光光度計を発売して以来、時勢にマッチした製品を製作してきたが、今回、新たに種々の機能をもつU-3200/3400形自記分光光度計(以下、U-3200形、U-3400形と略す)を製品化した。

最近、先端技術分野における技術力の優劣が、企業ひいては国の位置を決めると言われており、先端技術への取り組みが注目されている。主な対象分野は、新素材、半導体、エレクトロニクス、バイオテクノロジー、光通信など多岐にわたる。基礎研究、開発研究はますます複雑化、高度化の傾向を深めてきている。

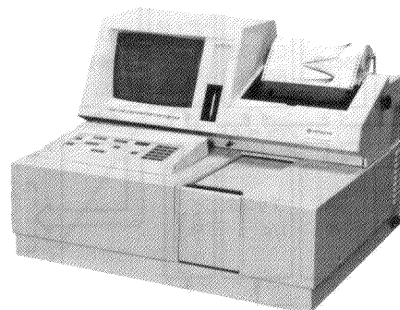
高度技術の進展に伴い、補完的側面を踏まえてほぼ同列的に分析技術の追従が要請されており、測定精度への信頼感、より高度な機能が求められる。このような現代の趨勢に応じて、日立製作所では長年の経験を基とし新製品を完成した。

従来の吸光光度法による測定はもとより、固体系試料の表面分析などに威力を発揮するよう特に留意した。

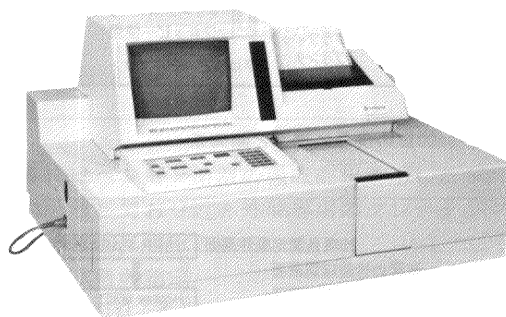
2. 開発の背景

U-3200/U-3400形日立自記分光光度計の基本となる構成に対し、広く各方面の意見を集め、特にユーザーおよび第一線営業担当者の声を聞き、次のような諸点に着目し開発の主眼が置かれている。

- (1) 測光値の信頼性が基本である観点に立ち、両機種ともダブルモノクロメータ方式を採用した。高い精度を得るためには低速光が必須である。また新素材、光学部品などでは近赤外域の計測が注目されているが、偏光特性を少なくすることに注力した。
- (2) 日立独自の日立分析機器簡易言語(以下、簡易言語と略す)を搭載した。汎用言語(BASIC)などでもプログラムの作成は面倒であり一般的ではない。簡易言語は電卓感覚でプログラムが組めることをモットーとしている。分析に用いられる言葉を基本にして作成し、プログラム理解や、練磨を要せず誰にでも簡単に構築できるのが特長である。
- (3) 目的に合わせたシステム構成が時代の大勢である。光産業分野には、大形試料室積分球付きの「表面分析システム」「膜厚計測システム」が、バイオテクノロジー分野には「酵素反応システム」,「多重データ自動収集システム」などがある。



(a) U-3200形日立自記分光光度計



(b) U-3400形日立自記分光光度計

顧客のニーズに即応し、迅速に答える体制を整えた。

- (4) 現代の分光光度計の具備すべき機能を備え、かつフロッピーディスクの自在性、拡張性を駆使することが吸光光度法の応用に役立つとの見地から、データファイル機能、20項目の分析条件記憶、初動条件設定機能(Auto Start)などを搭載する。従来、付属機能として取り扱われた、レートアッセイ2、3波長演算、微分・積分、ピーク検出等の諸機能を集成した。
- (5) 新素材、半導体関連では、固体系試料の透過、反射曲線の測定が日常的に行われる。この場合、基準物質は空気であり、積分球検知方式が柱となる。広い波長範囲(紫外、可視、近赤外域)にわたり高感度の積分球の製作に成功しており、高精度の測定値が得られる。

3. 装置の概要

測光値の信頼性が基本であり、両機種ともダブルモノクロメータ方式を採用した。高い精度を得るためには低速光が必須である。U-3200形は瀬谷・波岡型を採用し、トロイド形グレーティング(G₁)を用い、メインモノクロメータには日立独自のグレーティング技術を結集し、新開発の可変ピッチ

* 日立製作所 那珂工場

** 日立計測エンジニアリング(株)

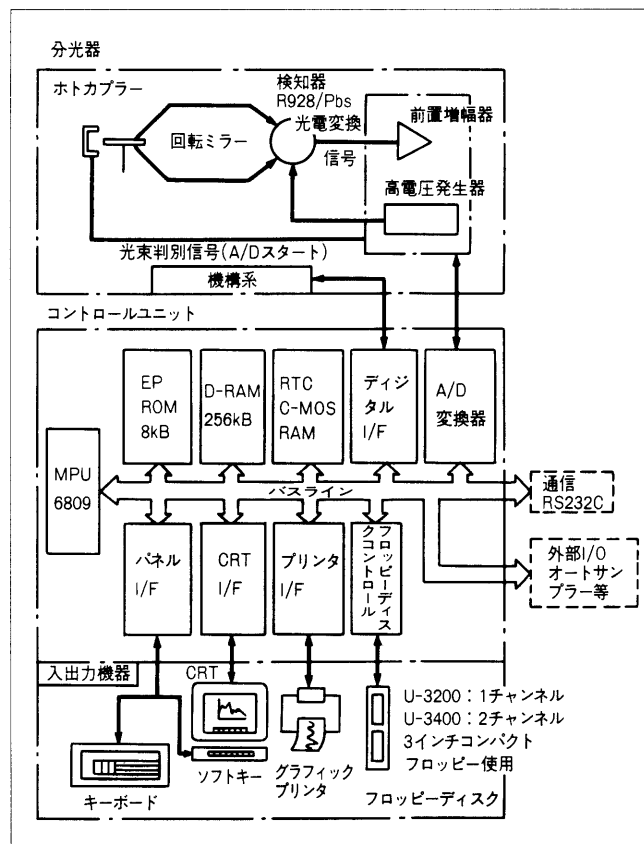


図1 U-3200/U-3400形の信号処理系と制御系

の収差補正グレーティング(G_2)を使用し高分解能を実現した。

またU-3400形では既に定評のある340形日立自記分光光度計のプリズム・グレーティングモノクロメータを採用した。特に光学素材の測定を注視し、近赤外域の偏光特性を軽減した。両機種とも試料室の光束は完全対称形となるよう工夫されている。

試料室は既に発売されている320/330形、220A形、150-20形、228形などと同形であり各種付属装置を共通で転装できる。

図1にU-3200/3400形の信号処理系、制御系を示した。検知器からの信号はすべてCPU演算で行われ、特に%TとABSの変換(log変換)もCPU化されており、すべての演算は論理的に行われる。3インチコンパクトフロッピーを使用し、U-3200形は1チャンネルであるが、付属装置としてさらに1ヶ増設できる。これによりデータファイル機能をさらに拡充できる。

図2に、CRT画面の種類を示してあるが、多様化された機能を網羅しておりワンタッチで所要のモードに切り替えて測定できることがわかる。従来用いられている汎用言語(例: BASIC)でも「キー操作の複雑性」、「プログラムの構築の難しさ」などが指摘されている。

これらの要望に応え開発したのが簡易言語で、機器制御・測定およびデータ処理のためプログラムが簡単に組めるのを特長としている。本言語は、本体に内蔵されており省力化に役立つ。

4. 測定例

(1) 過マンガン酸カリウム水溶液の測定

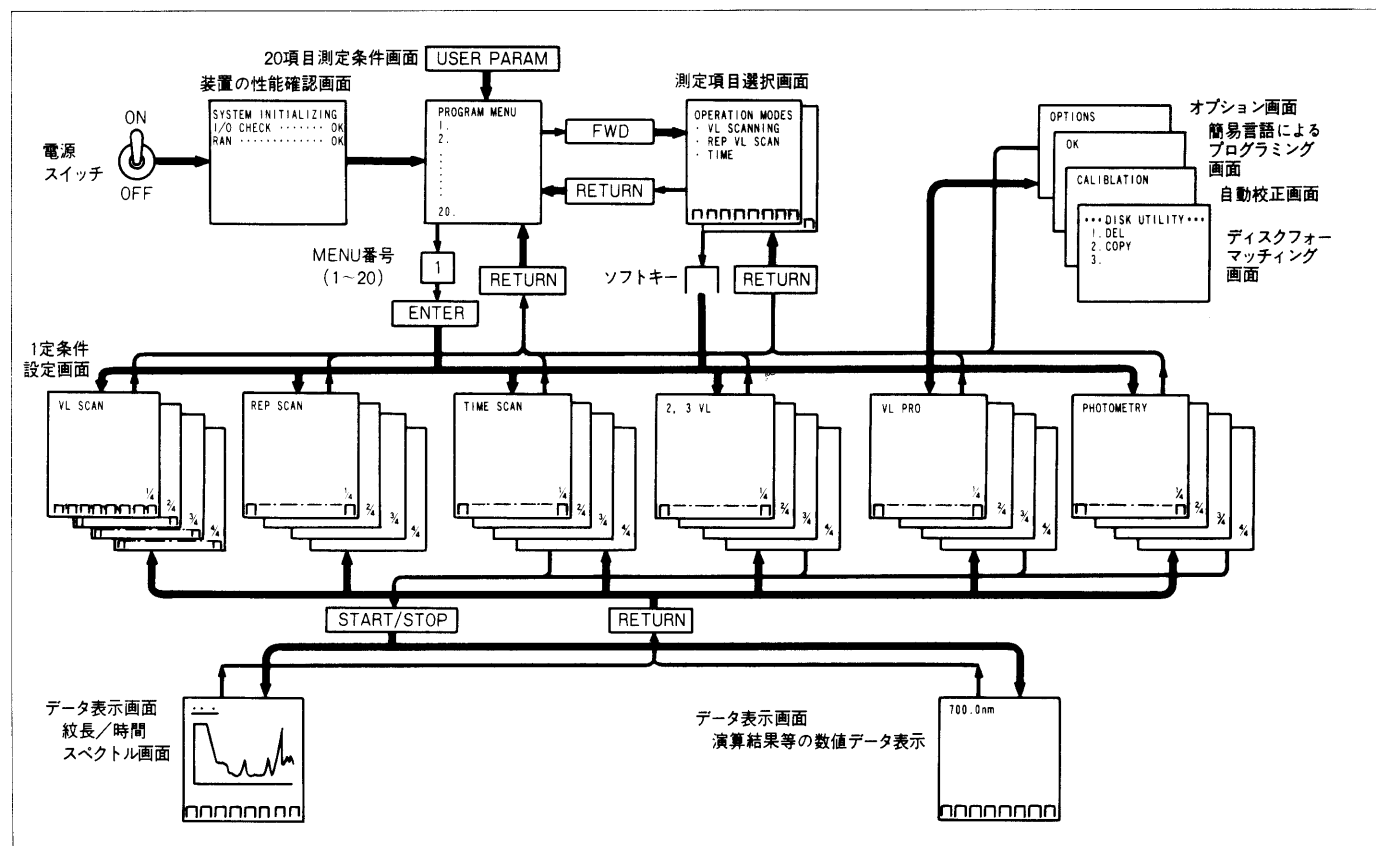


図2 画面の種類と流れ

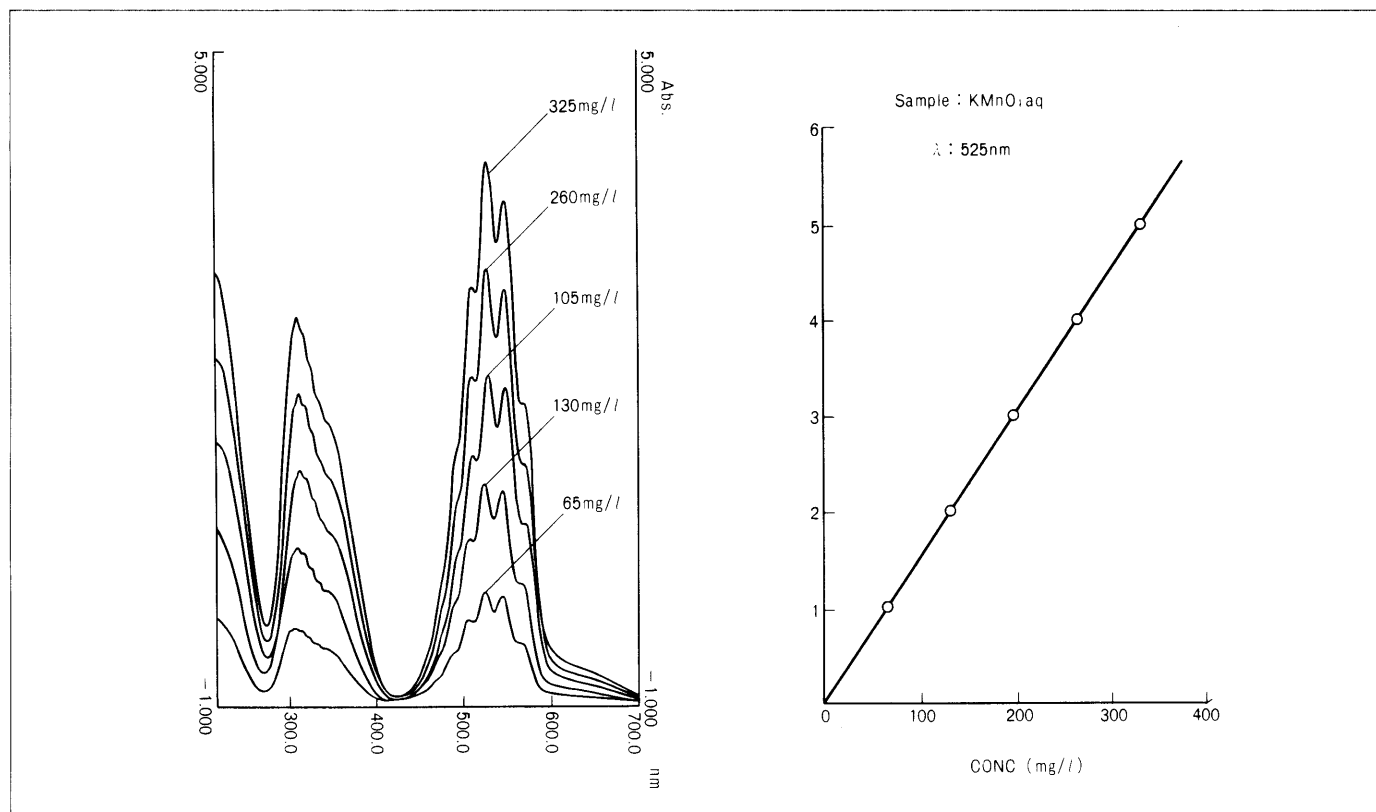


図3 過マンガン酸カリウム水溶液の吸収曲線と検量線

図3に過マンガン酸カリウム水溶液の濃度を段階的に変えた場合の吸収曲線を示した。測光スケールをAbs. -1~5に設定し、標準側光路に1/10減光板を置くと実効測光スケールはAbs. 0~6に相当する。整理すると、Abs. 5以上まで直線性が維持されており良質な検量線が得られている。代表的な物質を用いて各波長における直線性範囲を図4に示した。紫外・可視ではAbs. 5、近赤外域ではAbs. 3.5程度まで直線であり、高濃度試料の直接測定、差スペクトルが測定できる。

(2) 塩酸蒸気による分解

図5に近赤外(1850~1700nm)における塩酸蒸気の吸収曲線を記録した。100mm長吸収セル中に塩酸数滴を垂らし、吸収セル中に充満させる。ベースラインまで微細構造が切れ込んでおり、近赤外域の分解能が高いことがわかる。ま

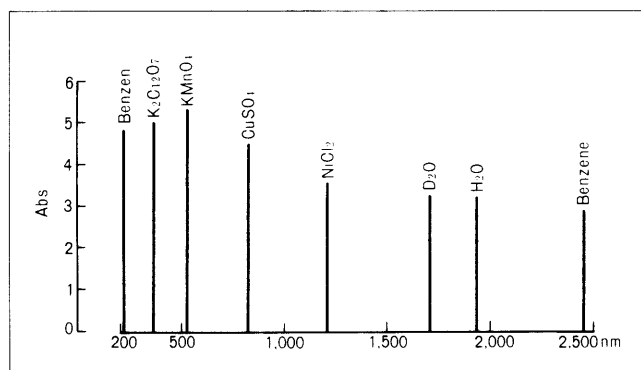


図4 ダブルモノクロメータを用いた分光光度計の検量線直線範囲

た図6にはベンゼン溶液の吸収曲線を示したが、○印部は3本に分離しており近赤外域専用のグレーティングを使用している効果が具現化されている。

(3) 混濁試料の測定

適度な「濁り」を有する試料、いわゆる乳び試料は化学分析やバイオ関連でしばしば遭遇する事象である。この種の検体は、標準測光では、見掛けの吸収バックグラウンドを生じ、高値を示すが、これは測光値の信頼性を損なう。バックグラウンドを除去する有力な手段には、積分球やヘッドオン形ホトマル測光法を用いる方法があるが、僅かな濁りの場合には、積分法が効果的である。図7にR-3号赤食用色素と市販牛乳を混合した混濁液を調製し、定量性を検討した。積分法は2つの波長間に囲まれた吸収スペクトルの面積を分離計算する方法であり、2点間波長における接線を算定し、上部面積(吸収ピーク部)と下部面積(バックグラウンド部)を分割して算出する機能である。

本例ではR-3号赤食用色素の濃度を変えた場合の吸収スペクトルの積分値(Abs.・nm値)と濃度の関係を求めた。

図8に検量線を示したが、良質な直線性が得られている。

(4) ゲルマニウムの測定

図9に、光学部品(例えば偏光ビームスプリッタ、レンズ、薄膜……)や半導体のレジスト膜厚、新素材などの計測に有用な表面分析システムの外観図を示した。本システムに装着できる45°正反射付属装置を用いると鏡面反射の絶対反射スペクトルが得られる。その光学系を図10に示した。V字形光路であらかじめ100%補正を行い、次にN字形光路とし、反射体を光路に置けば3ヶのミラーの反射率は既に

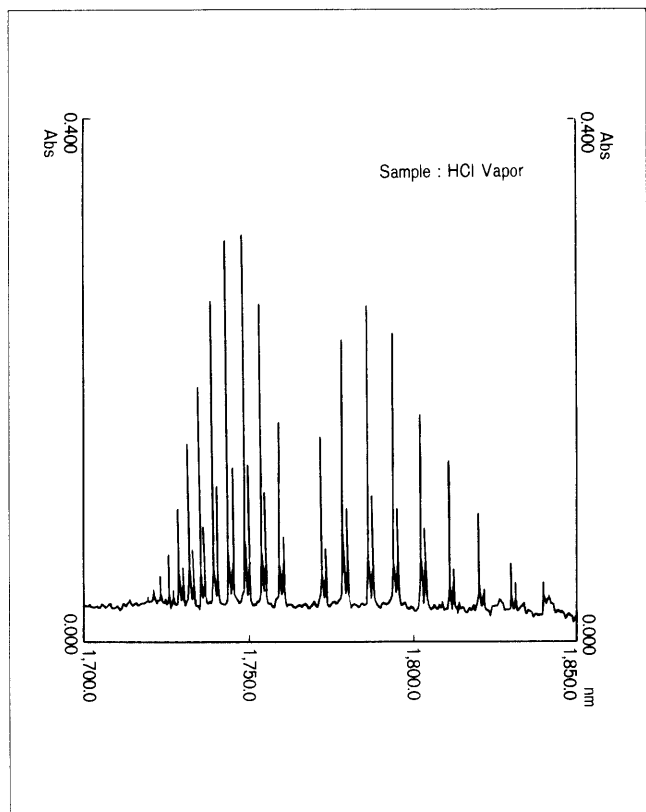


図5 近赤外域の塩酸蒸気による分解

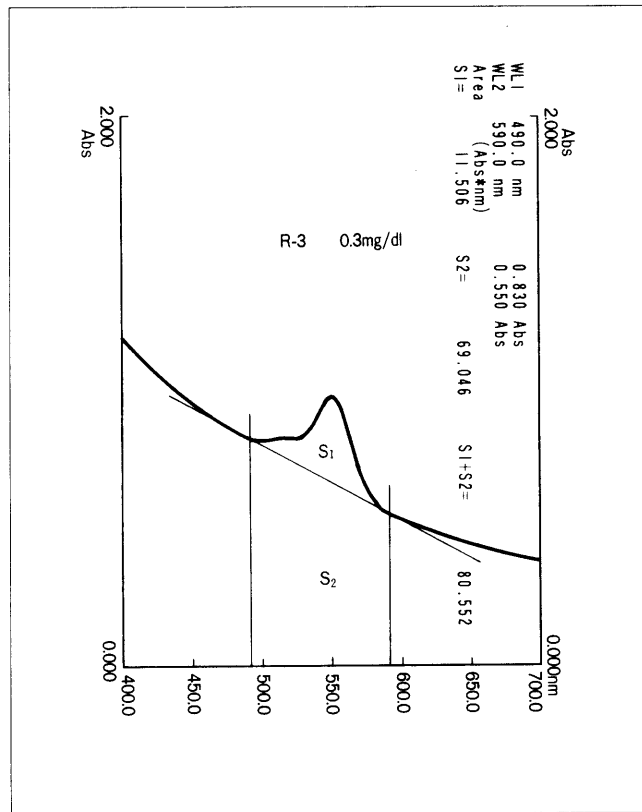


図7 R-3号赤色食用色素+牛乳混濁液の吸収曲線

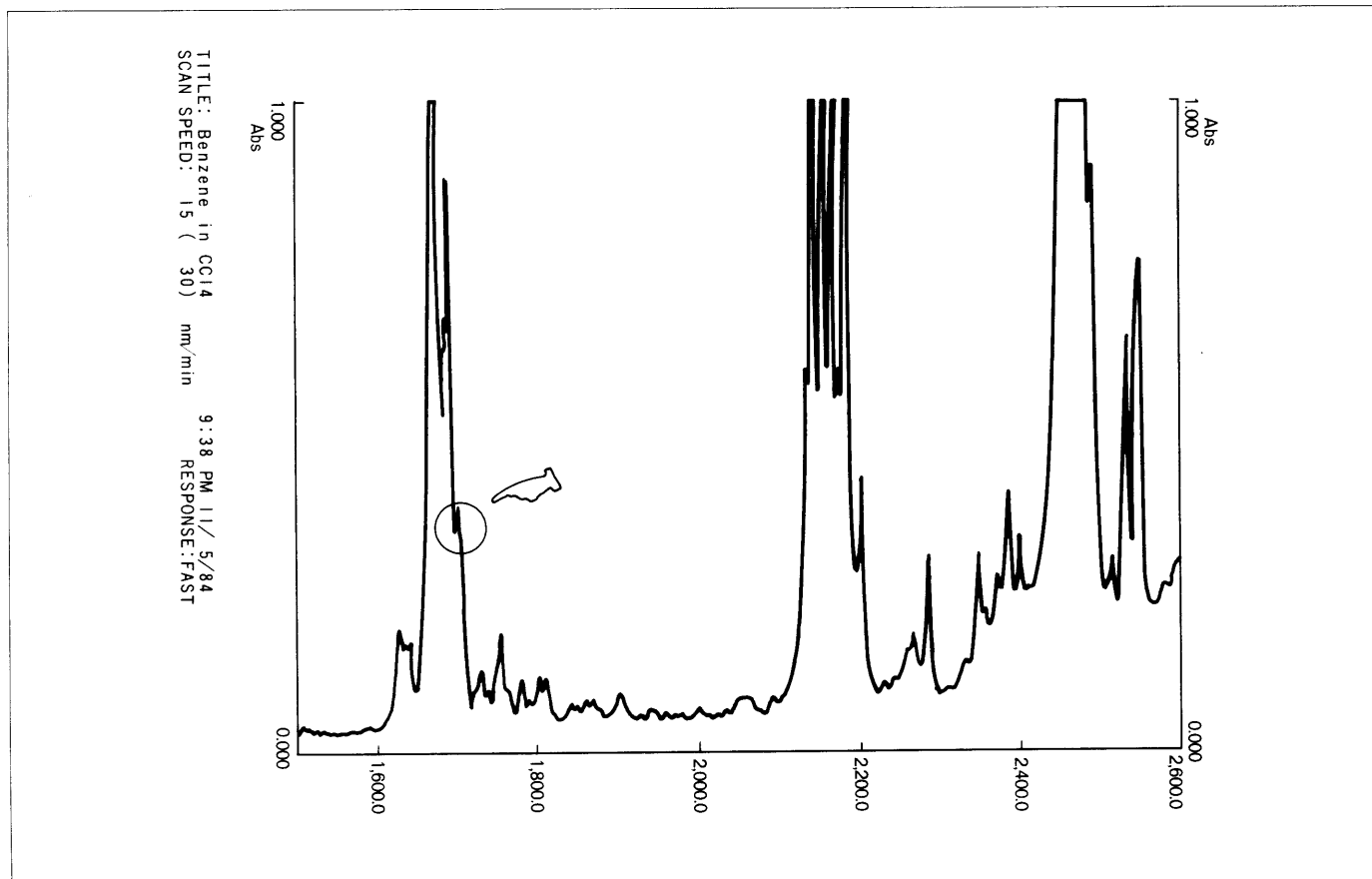


図6 近赤外域の分解 (四塩化炭素中のベンゼン)

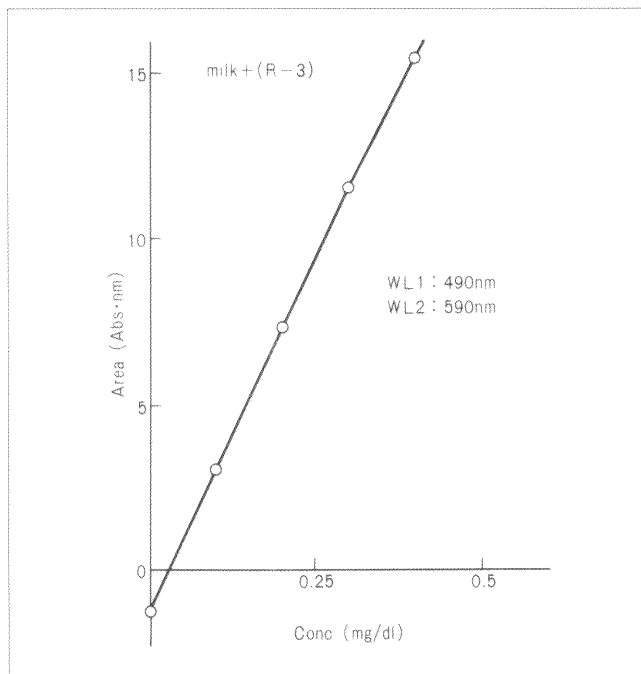


図8 混濁試料(R-3号+牛乳)の濃度と面積の関係—検量線—

補正されているので、介在する試料面の絶対反射率が得られることになる。この場合、入射角による偏光特性を補完するために、入射光を垂直成分(s-成分)と平行成分(p-成分)に分離することが必要で、グラン・トムソン・ティラー形偏光子を用いる。このようにして各偏光成分に対する反射率を求めれば、フレネルの式が適用でき屈折率が算出できる。即ち反射による偏光は、入射面とこれに垂直の平面を考えると、この2つの平面内の偏光成分によるそれぞれ

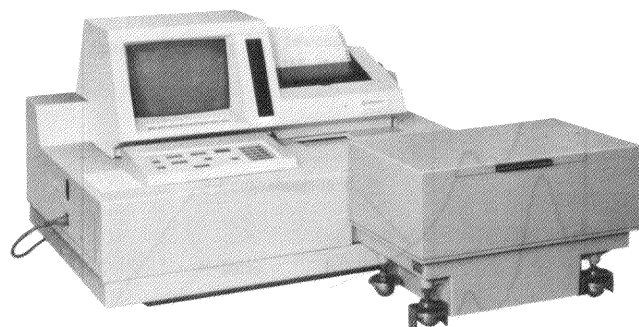


図9 表面分析システム

の反射率は、

$$R_p = \frac{\tan^2(\phi_1 - \phi_2)}{\tan^2(\phi_1 + \phi_2)} \quad (1)$$

ϕ_1 : 入射角, ϕ_2 : 屈折角

$$R_s = \frac{\sin^2(\phi_1 - \phi_2)}{\sin^2(\phi_1 + \phi_2)} \quad (2)$$

で与えられることは周知の通りである。 R_p , R_s は測定でき ϕ は 45° であるから ϕ_1 は計算により求められる。

$$\sin \phi_1 = n \cdot \sin \phi_2 \quad (3)$$

スネルの法則から(3)式により屈折率 n が算出できる。

図11にはゲルマニウムの 45° 入射における各偏光成分の反射スペクトルを記録した。s-成分、p-成分におけるそれぞれの反射率は波長589nmにおいて $R_s \approx 49.3\%$, $R_p \approx 24\%$ である。これから、(1), (2), (3)式を用いて計算すると $n \approx 4.1$ となる。ちなみに、理科年表値は4.092 at 589.3nmであり良い合致度を示している。このように新素材などで光学定数を

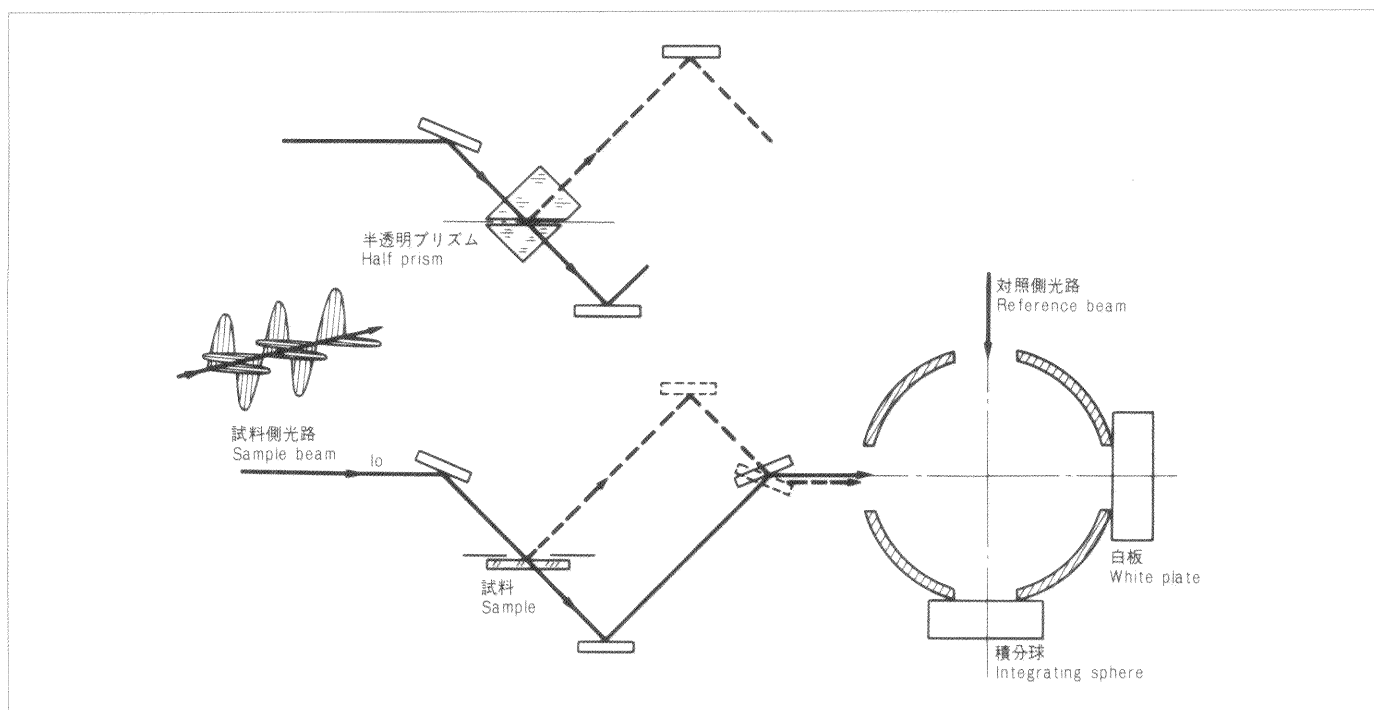


図10 45°正反射付属装置の光学系

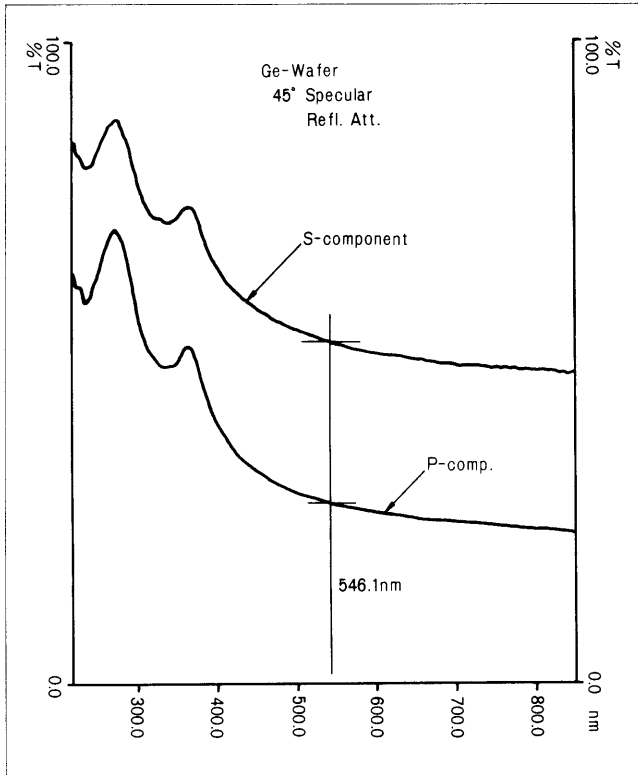


図11 ゲルマニウムの45°入射角-反射特性

定めたいときや、未知物質の膜厚測定の場合などに有用である。

(5) ガリウムヒ素ウエーハの測定

超高速LSIの素材として注目されているGa-Asウエーハは、時代の花形である。図12に全域にわたる透過および反射スペクトルを示した。波長範囲は2500nmから200nm間を記録したもので、近赤外域では約60%程度透過し限界波長は850nmである。反射スペクトルの測定は、図12に併記したように60mm直径積分球付属装置を用いて測光窓部に10⁰ス

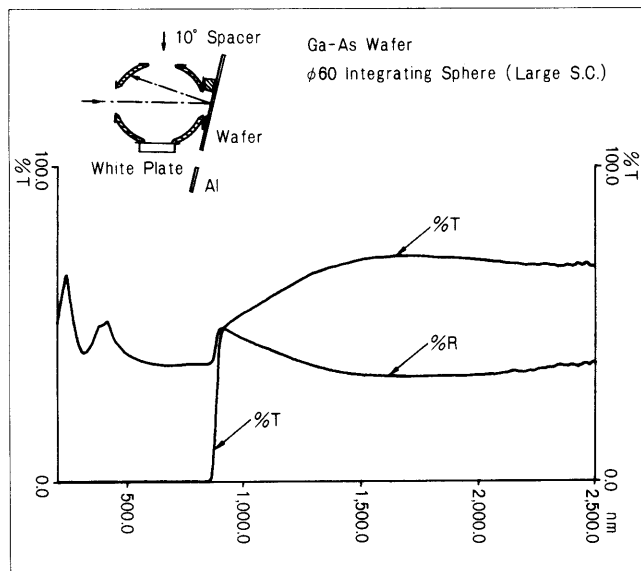


図12 Ga-Asウエーハの透過・反射スペクトル

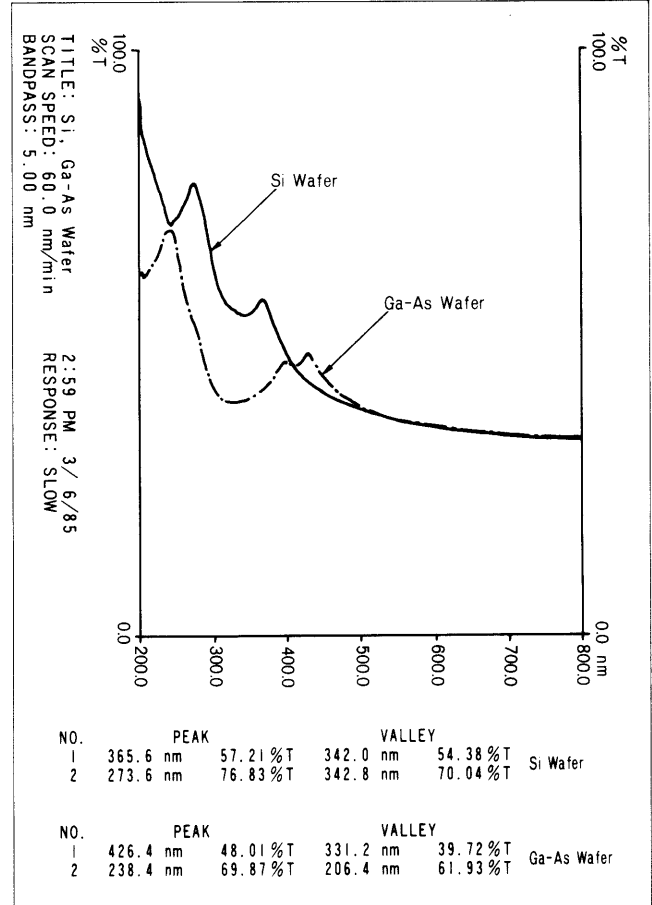


図13 Si, Ga-Asウエーハの反射スペクトル

ペーサーを置き、あらかじめ新鮮なアルミニウム蒸着面で100%補正したのち、Ga-Asウエーハを測定した。アルミニウム蒸着面の反射率は別法で測定できるから、補正して求められる。近赤外域における%T値と%R値の和はほぼ100%であり、この波長域では吸収はないようである。

反射スペクトルが900nm付近で減少するのは、透過率の急減にともない、裏面反射が同様に減少するため限界波長を越えると表面反射光のみとなる。

図13にSiウエーハとGa-Asウエーハの紫外・可視域の反射スペクトルを記録した。それぞれ、特異なピークを有しており材料の識別法として有用と思われる。

(6) 窒化シリコン膜の測定

半導体のウエーハの拡散処理用のマスクや絶縁性を保つためなどに用いられる窒化シリコン膜の膜厚管理が重要である。図14に、大形試料室付属装置に45°正反射付属を組み合わせて、45°入射における正反射スペクトルを記録した。

図11にその光学系を示すように、45°正反射付属装置の入射光は偏光子を用いてp-成分、s-成分に分離する。偏光成分により大きく反射率が異なり、波長589.3nm付近の反射率は、s-成分で約29%、p-成分で9%程度である。(1)、(2)、(3)式から、屈折率を概算すると2.4~2.5が得られる。干渉縞から膜厚を求めるときは、このn値を用い、入射角を45°として計算すると、約1.16μmが得られる。

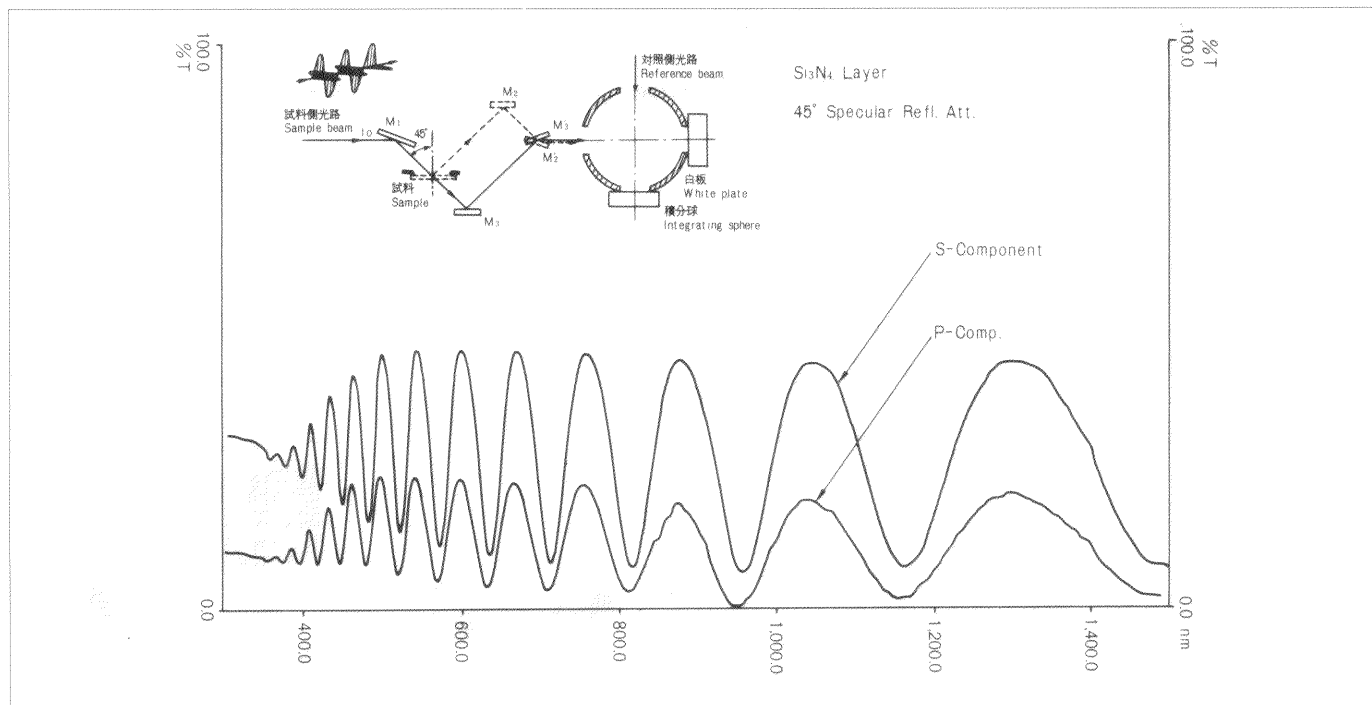


図14 窒化シリコン膜の各偏光成分による正反射スペクトル

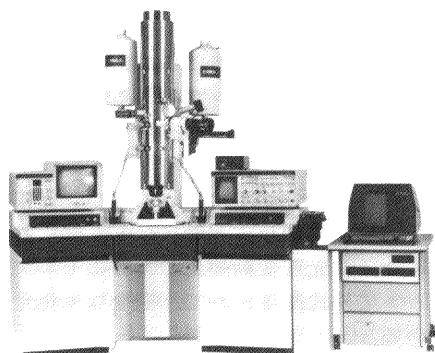
5. 結 言

新素材、光産業、半導体などの諸分野では高度技術の進展とともに、さらに開発に拍車がかかるものと考えられる。また、バイオテクノロジー、エレクトロニクス分野では、より精密計測が要求され、品質管理面での省力化、多機能

が要望される。U-3200/3400形は、簡易言語を駆使することによりさらに高度な吸光分析に適用できるので、各種研究部門に最適である。性能を生かした多くのシステム、付属装置は活動幅を拡大強化するものと期待される。なお、簡易言語の詳細については別報する。

Topics

H-7000形日立125kV 電子顕微鏡



医学や生物分野に代表されるバイオテクノロジーの研究、開発に応える高性能電子顕微鏡H-7000形を開発しました。H-7000形は高分解能、高コントラストを両立させ、テレビシステムにより試料損傷を少なくし、観察撮影に操作性の向上を図りました。

■特 長

(1) 高コントラスト、高画質像が得られます。

像のコントラストを低下させる余分な電子線を吸収する鏡体構造や電子軌道のシミュレーションによる対物絞りの最適位置の決定、高画質像のための新形ポールピースの開発により、像質の向上を図りました。

(2) 試料を大切にします。

試料周辺の高真空化設計とベロー方式可動絞りの採用により、コンタミネーションを少なくしました。また少な

い電子線量で焦点合せ、適正露出が可能なテレビシステムの開発により、試料損傷を少なくすることができます。

(3) 操作性の向上

倍率を変えても像の回転しないズーム方式はもとより、視野の構図に合わせて像を回転することもできます(±90°回転)。また観察室内に倍率表示するなど操作性の向上を図りました。

(4) テレビによるTEM像観察が可能です(オプション)。

本体に内蔵した大形CRTにはTEM像がリアルタイムで観察、焦点合せ、適正露出ができますから操作が容易になりました。またイメージメモリ、VTRを接続することにより、動的な像観察、記録ができます。画像処理装置とオンラインで接続し、寸法計測、立体構築等へも拡張できます。

F-3000/4000形日立分光蛍光光度計

HITACHI Model F-3000/4000 Fluorescence Spectrophotometers

野上 太郎* 越 裕之* 嶺岸 久子**

(昭和60年4月24日受理)

1. はじめに

分光蛍光光度計の使用される分野は、分光吸光光度計の使用される分野とかなり共通しているが、微量物質の高感度測定が望まれる場合には、特に分光蛍光光度計の方が使用される。この点から一般には、感度が最も重視される。従来の日立分光蛍光光度計においても、感度に重点を置いた設計がなされているが、今回さらに回折格子の改良を行ない、一層の感度向上を図った。

分光蛍光光度計において、感度の次に重要視されるのは、データ処理機能である。分光蛍光光度計は、本質的にはシングルビーム光度計であり、装置の波長特性がスペクトル情報に重畳する。これを補正し、正しいスペクトルを得るためのスペクトル補正機能が必要である。また装置の感度が高くなるほど、溶媒の蛍光・共存物質の蛍光がスペクトルに重畳する場合が多くなる。このようなバックグラウンド除去のためのデータ処理も必要視される。F-3000/4000形においては、データ処理にも重点が置かれている。

3番目として、操作性があげられる。データ処理等の機能が豊富になるにつれ、操作が複雑になり勝ちであるが、F-3000/400形は、ソフトキー付きCRTの採用により、この点を解決している。

図1にF-4000形の外観を示す。F-3000の外観は、フロッピーディスクドライバを有していない以外、F-4000形と同じである。

2. 構造

図2に機能系統図を示す。キセノンランプを出た光は、励起側分光器で分光され、試料を励起する。試料の発する蛍光は、蛍光側分光器で分光され、フォトマルで受光された後A-D変換されて、コンピュータ部に読み込まれる。励起光の一部は、別の検知器でモニターされ、同様にA-D変換されてコンピュータに読み込まれ、光源変動補正のための比演算に用いられる。各々の分光器の波長・スリットは、インターフェースを介してコンピュータにより制御される。特にF-3000/4000形において特長的なのは、ソフトキー付きCRTを有していて、対話形操作を最も容易な形で実現している点である。

結果は、グラフィックプリンタに、出力されるが、スペクトルと測定条件が同じチャートの上に記録される形になる。

図3に、光学系統図を示す。従来の日立650形分光蛍光光度計シリーズと同様、無収差凹面回折格子を用いた鉛直分散分光器を採用している。これにより、試料位置で水平方向に長い断面を有する光束を作り¹⁾、感度を高めるとともに、0.6ml程度の少試量の測定を可能にしている。無収差凹面回折格子は、メカニカルルーリングによるもので、ブレード波長付近で70%以上の回折効率を有している。従来の650形との違いは、回折格子の溝本数が、600本/mmから900本/mmに増えている点で、これにより、同じバンド幅における機械的スリット幅が増加し、入射スリット部における光量ロスが少なくなる。光源変動補正のためのモニタ光学系は、出射スリットの外に配置されて、完全な単色光モニタの形を取っている。



図1 F-4000形分光蛍光光度計の外観

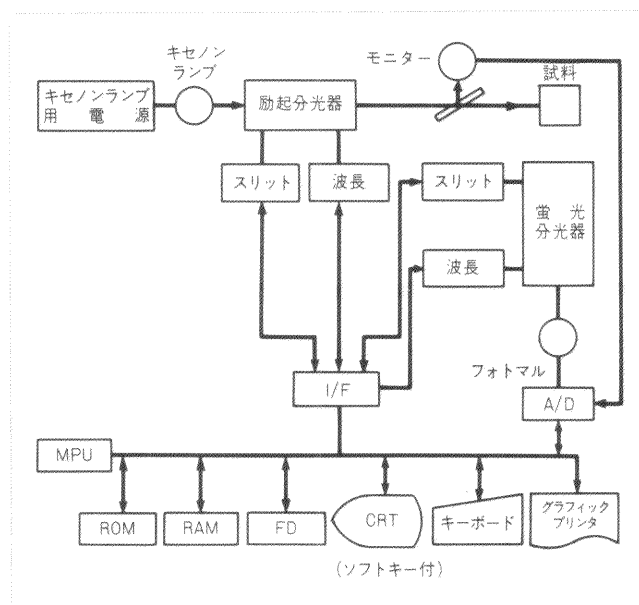


図2 機能系統図

もに、0.6ml程度の少試量の測定を可能にしている。無収差凹面回折格子は、メカニカルルーリングによるもので、ブレード波長付近で70%以上の回折効率を有している。従来の650形との違いは、回折格子の溝本数が、600本/mmから900本/mmに増えている点で、これにより、同じバンド幅における機械的スリット幅が増加し、入射スリット部における光量ロスが少なくなる。光源変動補正のためのモニタ光学系は、出射スリットの外に配置されて、完全な単色光モニタの形を取っている。

3. 基本性能

図4に、最小バンド幅による水のラマンスpektrルのデ

* 日立製作所那珂工場 光学装置設計部
** 日立製作所那珂工場 応用技術センター

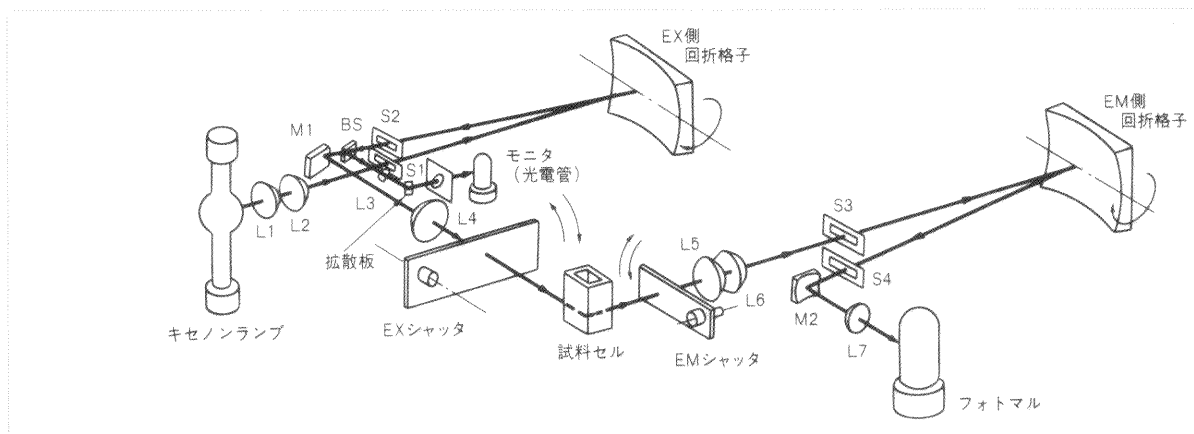


図3 光学系統図

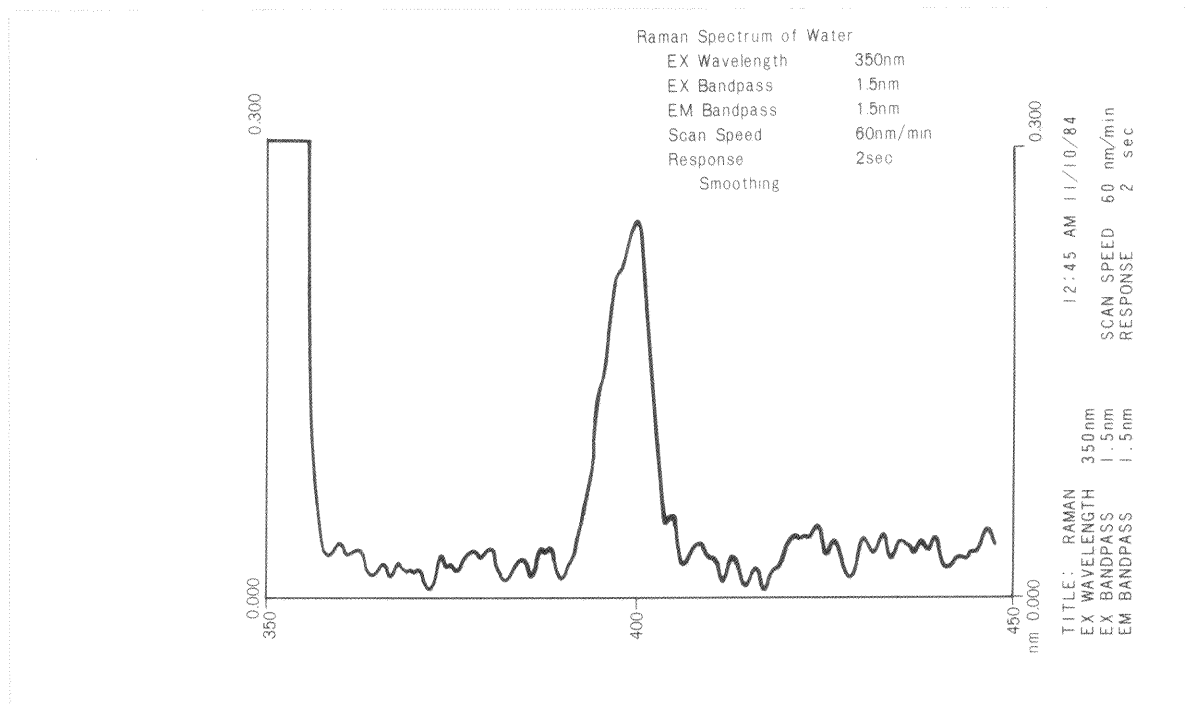


図4 最小バンド幅による水のラマンスペクトル

ータを示す。従来の分光蛍光光度計においては、両分光器のバンド幅を2nm以下に設定すると、ほとんど測定不可能であったが、F-3000/4000形においては、両バンド幅を1.5nmに設定しても十分な感度を有することがわかる。図4においては、CAT（積算処理）を使用せず平滑化処理のみ行なった。CATを併用すると、さらに良好なSN比が得られる。

4. 操 作

図5に操作部の写真を示す。CRTに近接して8個のソフトキーが存在し、各キーの名称がCRTの下部に表示されている。いずれかのソフトキーを押せば、各ソフトキーの名称は、次の操作のための名称に変わり、次に何をすればよいかが、その上方に表示される。すなわち、操作者は特に取扱説明書を見なくても、CRT画面に従うだけで、操作することができる。手前のキーボードは、波長走査や波長

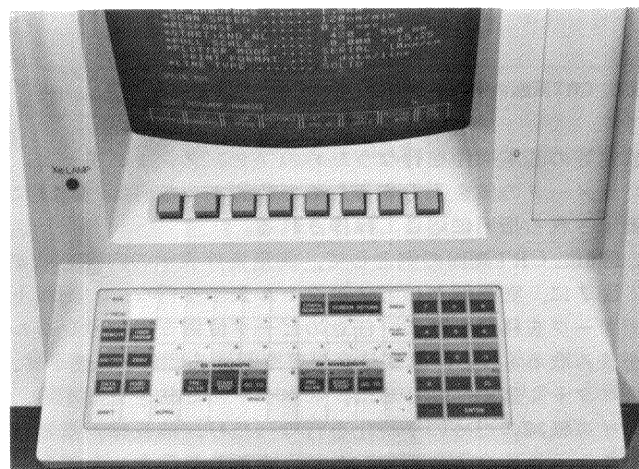


図5 操作部

** TITLE :MODEL F-3000

DATA 0.154

EX 250 nm EM 350 nm

WAVELENGTH SCAN

** INSTRUMENT PARAMETER

```

EX BANDPASS . . . . . 5 nm
EM BANDPASS . . . . . 5 nm
SCAN SPEED . . . . . 60 nm/min
RESPONSE . . . . . 2 sec
START,END WL . . . . . 350 , 650 nm
FULL SCALE . . . . . 0.000 , 100.0
PLOTTER MODE . . . . . OFF
PRINT FORMAT . . . . . 1 data/line
LINE TYPE . . . . . SOLID

```

** SPECIAL MODE

SELECT PARAMETER FUNCTION !

INSTRU. PARAMETR	SPECIAL MODE			TITLE		U.PARAM STORE	PARAMETR PRINT
---------------------	-----------------	--	--	-------	--	------------------	-------------------

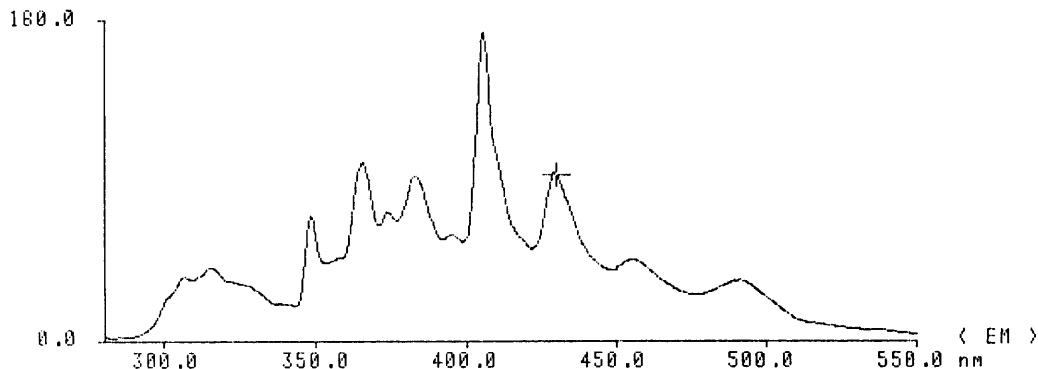
図6 CRT画面の例(1)

** TITLE :B(a)P 0.2mg/ml

1:32 AM 11/ 9/84

DATA 0.416

EX 250 nm EM 220 nm



SCAN TRACE !

430.0nm

93.36

◀◀	◀	▶	▶▶	CURSOR PRINT			
----	---	---	----	-----------------	--	--	--

図7 CRT画面の例(2)

設定等の基本操作を行なうためのファンクションキーと、パラメータの値を入力するための数値キーを有し、CRTに表示される指示に応じて操作される。

図6に、CRT画面の例として、測定条件表示の内容を示す。

図7に、別の例としてスペクトル表示を行ない、画面上でマークを移動させて、任意のピーク位置での信号レベルを読み取る（あるいはプリントアウトする）モードを示す。スペクトル表示に関しては、スペクトル形状を見ながら、ノイズ軽減のための平滑化を行ったり、波長軸、信号軸のスケールを適当に調整したり、必要な処理をした後、グラフィックプリンタに記録したりすることが可能である。

5. データ処理

図8に、励起側スペクトル補正に関するデータを示す。

光量子計（ローダミニB）は、本来600nm以下において平坦な励起スペクトルを示すものであるが、非補正の場合には、平坦とならず、補正スペクトルにおいてのみ平坦な形状を示す。補正のためのキャリブレーションに用いたのも光量子計であり、この特性を用いた補正法により、励起側、蛍光側とも220～600nmの補正が可能である。またF-4000形の場合は、標準光源を併用して、蛍光側の補正範囲をさらに長波長まで拡大することが可能である。

図9に希塩酸中のプラセオジウムの蛍光スペクトルを、

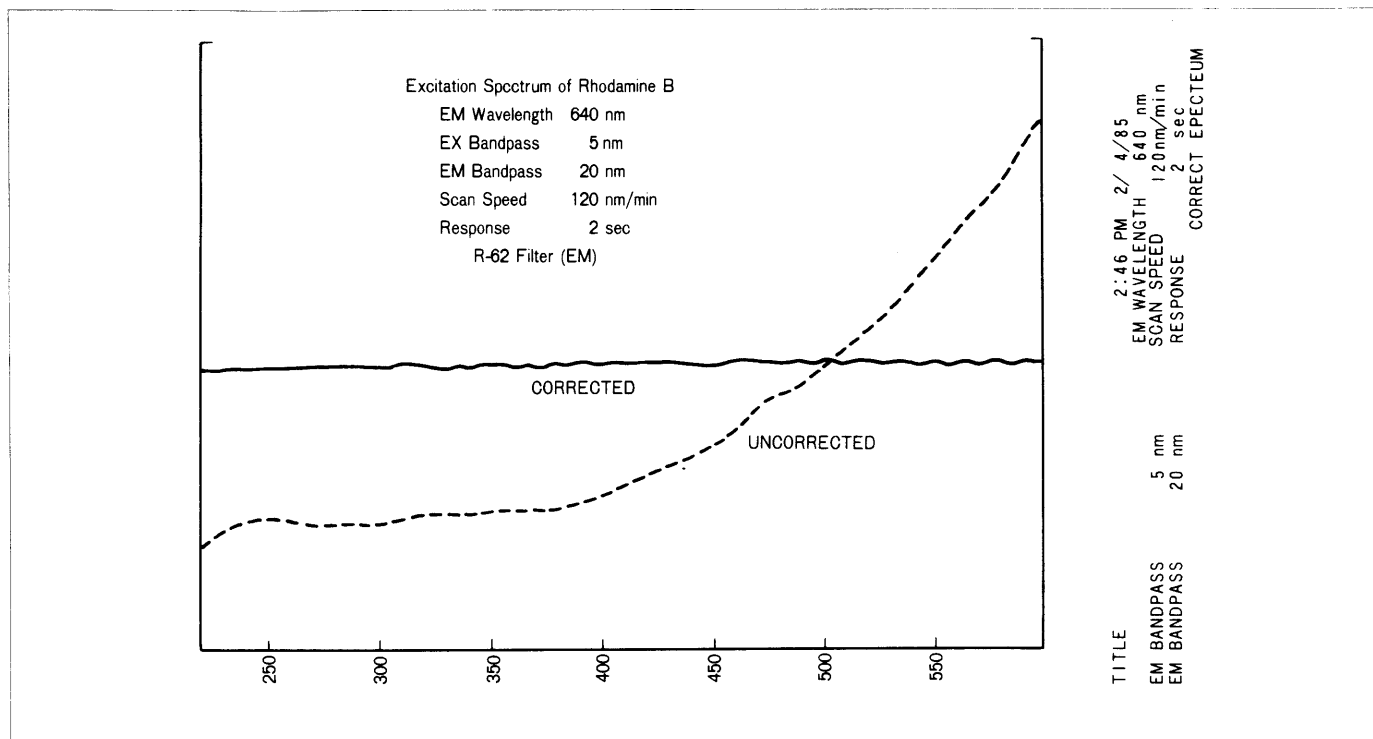


図8 励起側スペクトル補正

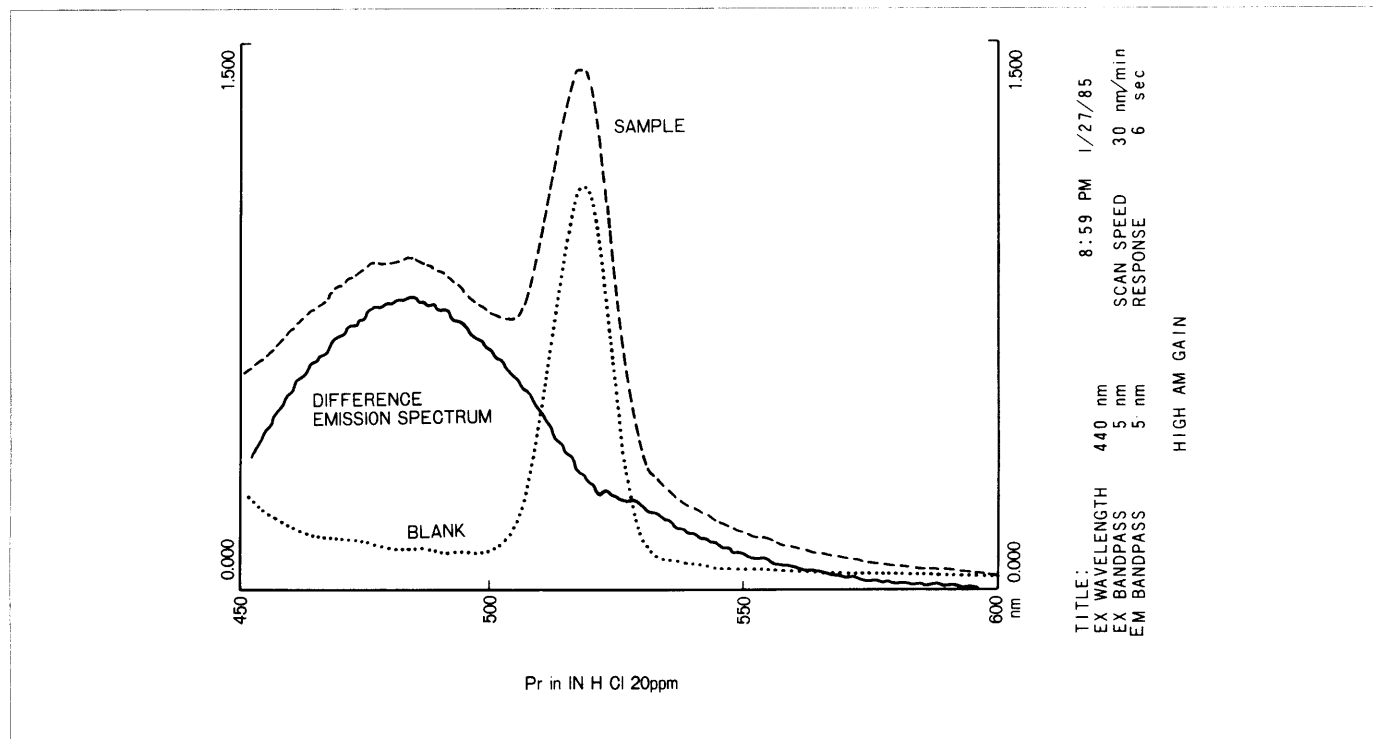


図9 差スペクトルによるラマン光の除去

差スペクトルモードにより測定した例を示す。試料の蛍光側スペクトルと溶媒(BLANK)の蛍光側スペクトルを記憶しておき、両者の差をとると実線でプロットされた差スペクトルが得られる。これは、溶媒のラマンピークを差し引いた例であるが、溶媒蛍光を補正する場合や、スペクトル

の微小変化を拡大記録する場合にも用いられる。

図10に、4次微分スペクトルを用いた微量ウランの測定例を示す。NaF₂²⁾によりウランを前処理すると、ペレット状となる。これを固体試料ホルダに固定して測定した蛍光スペクトルが、点線にてプロットされたスペクトルであ

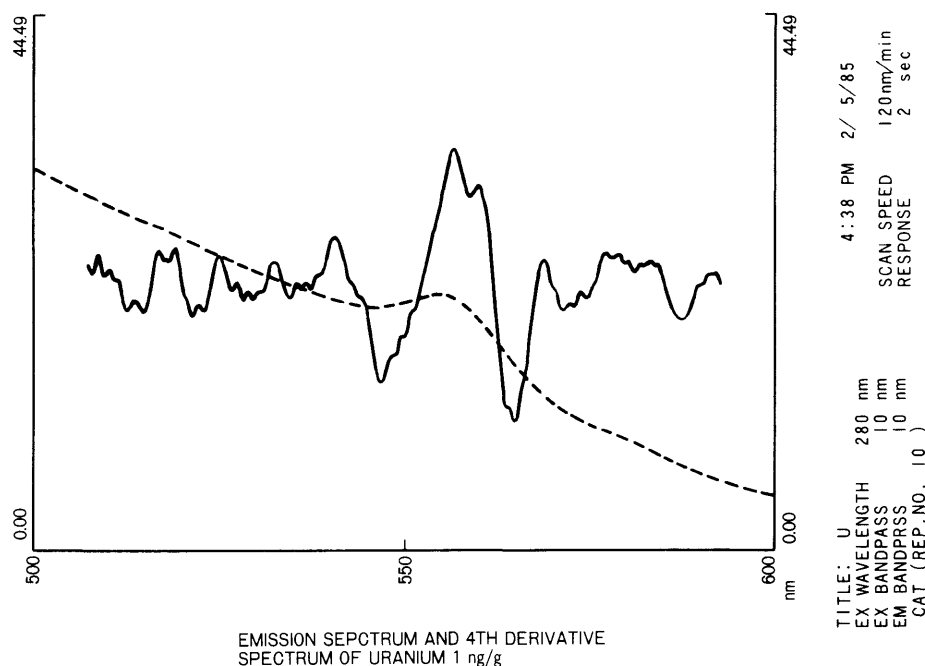


図10 微分スペクトルによる微量ウランの測定

SAMPLE NO.	DATA	CONCENTRATION

		mg/ml
BLANK	0.014	0.000
STANDARD	16.49	100.0
1	16.21	98.35
2	14.47	87.79
3	5.964	36.17
4	14.46	87.71
5	16.48	99.98
6	11.58	70.26
7	2.323	14.09
8	1.080	6.551
9	16.51	100.2
10	14.48	87.86
11	14.54	88.20

図11 定量測定におけるデータ印字

る。ウランが微量の場合は、一般にバックグラウンド蛍光の方が大きく、図9のように、ウランのピークがショールダ状になることもしばしばである。この場合にも、微分を取ると、実線のようなウランピークの微分波形が得られ、peak-to-peakの大きさから定量が可能となる。

以上は、スペクトル情報に関するデータ処理であったが、図11に定量測定の例を示す。この例は、濃度既知の標準試料を用いた濃度直読モードのデータである。標準試料をセットしてその濃度の値を入力すると、以後の試料の測光値

は、濃度に換算されて表示される。またこの値をグラフィックプリンタ上にプリントアウトすることができる。

上記したデータ処理機能の他に、前章で述べたCATによるSN比改善、リヒートスキャンクロマトグラムのピーク積分等、蛍光分析において用途の多い種々の機能を有している。

F-4000形のみ機能としては、量子収率算出のための波数積分、偏光度スペクトルの他、分析用簡易言語によるユーザー自身のプログラミングがある。分析用簡易言語の使い方は色々あるが、類別すると、(1)操作手順を記憶させて、自動的に装置を動作させる、(2)準備された分析コマンドをユーザーのプログラムした通りに読み出す、(3)ユーザー自身が分析コマンドを作成する、の3種類となる。

6. おわりに

分光蛍光光度計の利用される分野としては、従来は、生化学と薬学が最も大きかったと言える。しかし、近年これに加えて、素材関係の応用が多くなってきている。またウランの測定等特殊な分野にも用いられている。分光蛍光光度計の用いられ方は、益々多様化し、ハードウェア・ソフトウェアともに同じものを一律に供給することが困難となっている。今後、各種用途別の付属装置開発を進めるとともに、特にF-4000形の分析用簡易言語の分野別の活用法を明確化していきたい。

参考文献

- 1) T. Nogami, et al. : Paper No. 510, Pittsburgh Conference, 1976.
- 2) 明石準, 矢部明 : JAERI-memo 3622, 1969.

Topics

日立300kV電子顕微鏡 (超高分解能モード)

透過形電子顕微鏡(電顕)の高電圧化時、像の高分解能化、エネルギーアナライザーの高性能化等の他、試料観察の容易さにとっても有利となることから、特に新素材、半導体関係の研究分野で高電圧化が望まれていました。今回、通常の部屋に設置できる操作容易な加速電圧300kV電顕を開発し、大阪大学超高压電子顕微鏡センターに据付けられました。

図1はその外観で、トップエントリーステージの超高分解能タイプです。高さは2.68mと従来の200kV電顕(H-800)と変わりません。照射レンズ系は3段レンズ、結像系は5段レンズ構成で、全倍率範囲で像無回転。また像と電子回折パターンが一致しています。

電顕の理論分解能は、対物レンズポールピースの球面収差で決まります。対物レンズポールピースの設計に有限要素法を採用し、球面収差係数0.9mm、色収差係数1.5mmのものを得ることができました。理論分解能 $\alpha=0.65Cs^{1/4}\lambda^{3/4}$ による値は0.19nmです(Cs :色収差係数、 λ :電子線波長 1.9×10^{-3} nm at 300kV)。対物疏路は傾斜装置付きトップおよびサイドエントリーのステージが装着可能です。

電子銃と鏡体の排気にイオンポンプとターボ分子ポンプを用いています。ターボ分子ポンプは磁気浮上形で、動作中機械的接触部のないことから従来のターボ分子ポンプに比べて振動が約一桁小さく、電顕性能に全く問題ありません。装置の防振には、除振効果の優れた密封式空気バネを採用しており、高性能実現に大きな役割をはたしています。

■概要仕様

加速電圧 100, 150, 200, 250, 300kV
(LaB₆フィラメント)
分解能 0.10nm(格子像)、
0.19nm(点分解能)

対物レンズ 球面収差係数 Cs : 0.9mm
色収差係数 Cc : 1.5mm
試料ステージ トップエントリーステージ
($\phi 3$ mmメッシュ)
2軸傾斜 $\pm 10^\circ$ 、試料6個交換機構
倍率 1,000 $\times$ ~1,000,000 $\times$ (Zoom),
200 $\times$ ~500 $\times$ (Low Mag)
電子回折 250~4,000mm(SA),
カメラ長 10~250mm(HD)
真空度 $<1.3\times10^{-5}$ Pa(1×10^{-7} Torr)
ドライバキューム方式
装置寸法 高さ 2.68m
重量 1,600kg(本体),
120kg(左右操作盤)

ピッツバーグ会議/ 展示会

アトランティック・シティの会議場が改築中のため、今年のピッツバーグ会議は暖かいニューオーリンズで、2月25日から3月1日の間開催された。ピッツバーグ、クリーブランド、アトランティック・シティと寒い所での開催であった。3月上旬といっても冬の季節といった感じが強く、荒涼した中での会議という印象が付随していた。どこか暖かい春を思わせる所での開催を多くの人々が待ち望んでおり、ニューオーリンズはまさに望まれたところであった。展示した企業は七百数十社と昨年に比べて八十社近くも増加した。参加者は2万人強で3,000名ほど少なかった。しかし、米国化学会の人々は興味半分の子供らの見学がアトランティック・シティでは多かったもので、これらを差し引き、かつ地理的な条件の悪さを考慮すると昨年とほぼ同じではなかろうかとの判断であった。

学会での興味の一つはロボティクスであり、試料の前処理が一つの技術の流れになってきたことである。また高度技術の医用への応用の一つとして、蛍光の時間分割測光の免疫分析や、有機物に関する表面分析にも焦点が当て

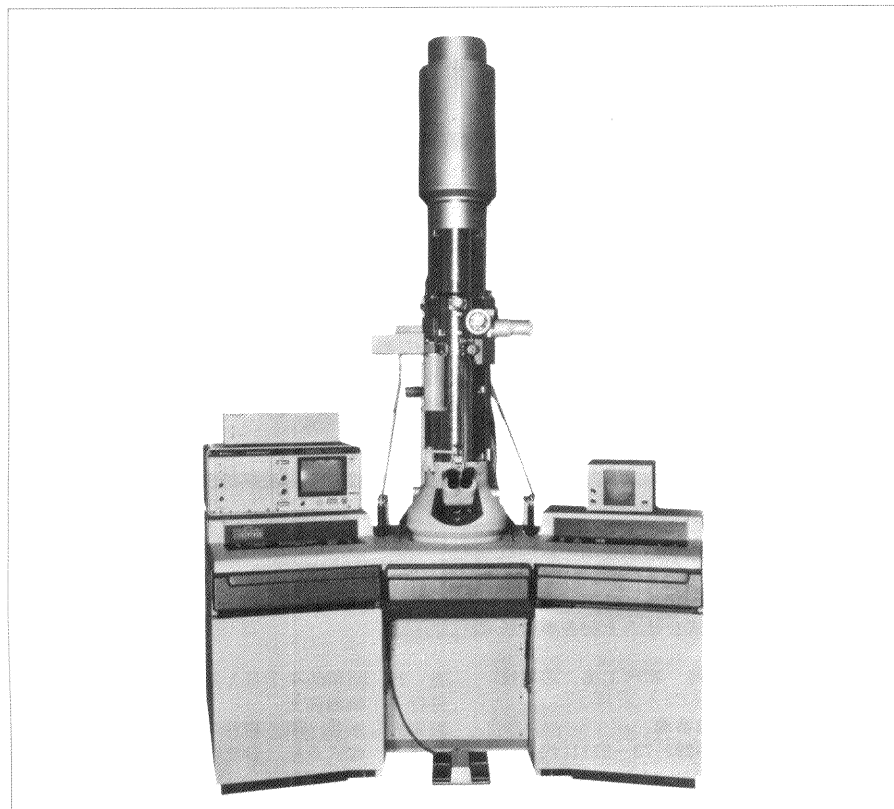


図1 日立300kV電子顕微鏡

られていた。展示も学会と同じような傾向で、ロボティクスに関係するもの、超高感度分析へのアプローチ、微小表面分析、粒子計測がハイライトといってもよいであろう。

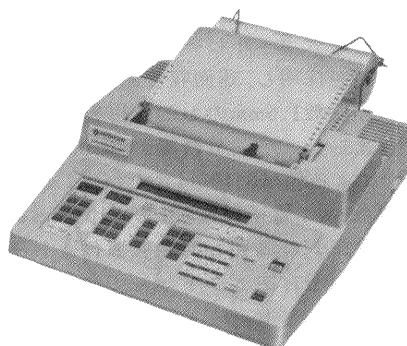
当社からは液体クロマトグラフ、FIAを中心として8件の報告を行なった。特に液体クロマトグラフ用蛍光検出器は多くの興味を引いた。

展示会での注目すべき点は日本と英国がそれぞれ国内メーカーを集めて、一つのクラスを作ったことである。特に日本は、国内のほとんどすべての理化学機器メーカーが特長のあるものを展示した。そして、日本の工業力の底力は強いという印象を覚えた。

(保田和雄 記)

D-2000形 日立クロマト用 データ処理装置

液晶表示器を対話用のディスプレイに用い、操作性を向上した新しいタイプの液体クロマトグラフおよびガスクロマトグラフ用のデータ処理装置を開発しました。この装置は、分離信号の



データ処理だけでなく、クロマトグラフの分析の自動化を目指すもので、クロマトグラフの周辺機器との接続をし、クロマトシステム全体のシステムアップを図ることができます。

■ 主な特長

- (1) 液晶表示器の採用により、操作が簡単になりました。
- (2) 大容量記憶メモリの採用で、多数のデータ記憶が可能になりました(クロマトグラム又は再計算用データ)。
- (3) 日立独自の通信ネットワークにより、液体クロマトグラフやガスクロマトグラフの周辺機器との接続ができ、分析の自動化を図ることができます。

■ 主な仕様

- (1) 同時処理 標準 1チャンネル

オプションで2チャンネル可

- (2) 入力電圧 $-10\text{mV} \sim +1\text{V}$
- (3) クロマトグラムの記録
 - (a) 記憶可能時間 サンプルイングレイト 0.8秒で約7時間
 - (b) 再計算用記憶ピーク数 約6,000
- (4) ピークの同定法

絶対保持時間法又は相対保持時間法
- (5) 定量計算
 - (a) 百分率法
 - (b) 修正百分率法(スケールファクタ付)
 - (c) 内部標準法
 - (d) 外部標準法
 - (e) 指数計算法
- (6) タイムプログラム

14種類のパラメータのタイムプログラム可能
- (7) パラメータファイル

リンク可能
- (8) 使用条件
 - (a) 温度 $10 \sim 35^\circ\text{C}$
 - (b) 湿度 $45 \sim 85\%$
 - (c) 形状 幅380×奥行430×高さ120(mm)

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>

- 本号は、報文について、バイオテクノロジー特集として編集しました。すなわち、広い意味におけるバイオテクノロジーの分野の研究に、科学機器を応用した例についての報告です。
- 牛木先生には、SEMの反射電子像を用いて、生物試料の深い位置の局所分析を行った例を、佐久間先生には、HPLCの多波長同時吸光度検出システムにより3次元クロマトグラムを得、診断クロマトグラフィへ応用した例を、横山先生には、エルトリエータロータにより細胞を高純度で分離した上で、これを、蛍光偏光消滅法で測定し細胞質流動性の変化を解析した例について報

告して頂きました。

- 日立科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
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 SUMMER 1985 Vol.28 No.2

発行 昭和60年7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