

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 SPRING 1987
VOL.30 NO.1

目次

生化学特集(II)

ごあいさつ……………上妻 冲… 1

報 文

 日立710形電解質自動分析装置による尿中電解質測定への検討…
西 功 鍵田正智 木下恵明
大矢秀和 林 貞夫 有末一隆
甲田一馬 林 長蔵 宮井 潔… 3

 蛍光プローベ(Quin2, Fura-2)による細胞内Ca⁺⁺の測定—ラット好塩基性白血病細胞(RBL-2H3)への適用—……………前山一隆…11
アミノ酸分析計における各アミノ酸の定量性に関する検討……………池田水江
青木光夫 新宮平三 浜野吉政…17

解 説

 日立LC/MSシステムとその応用
高橋貞夫 加藤義昭 広瀬 博
沼尻陽子 神原秀記 坂入 実…23
L-6000シリーズ日立高速液体クロマトグラフ……………野上太郎 大沼定文 関貴和夫
松浦俊一 三輪哲之 平田源蔵…29

トピックス

 Z-9000形日立多元素同時分析原子吸光度計…………… 2
G-3000形日立ガスクロマトグラフ …… 2
8200形日立血液像自動分類装置…………28
第15回医学・生物学のための走査電顕シンポジウム開催さる…………22
Å-SEM, S-900セミナー及びワークショップを開催…………… 2
セミコン・ジャパン'86開催さる…………28
日製産業(株)科学機器センター(SIC)移転完了, 業務を開始……………32

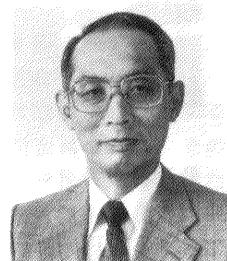
生化学特集(II)

ごあいさつ

An Address

上妻 冲*

(昭和61年12月9日受理)



The Hitachi Scientific Instrument News が、第30巻の発行を迎えるに当たり一言御挨拶を申し上げます。

私ども日立製作所計測器事業部、那珂工場は、その発足以来30年近くにわたって電子顕微鏡、電磁分析装置、分光光度計、クロマトグラフ等、各種科学機器の開発、生産に従事してきておりますが、現在、微力ながら斯界の発展に貢献させていただけるようになりましたのも、ひとえにユーザー各位の御懇篤な御指導、御支援、御愛顧によるもので、心から有り難く御礼申し上げます。

さて、最近これら科学機器の応用面はますます多岐・多様化し、これとともに、御使用いただく各位もかつてのように研究室における専門研究者の方々ばかりでなく、ごく通常の生産、検査ラインの方々にも及ぶようになりました。これに伴い、機器に要求される仕様も、科学機器の持つ宿命的な「絶えざる限界測定の追及」とあいまって、機器の効率、使いやすさ、親しみやすさ、あるいは多くの他種機器との有機的連係を可能とするシステムの展開性、またそれとともに、ハードウェア機器機能を最高に発揮させるためのいわゆる分析アプリケーション、ソフトウェアの充実完備といったものが必要となってきました。これらの実現には、優れたマン・マシン性の追及、超精密機械加工技術、更にはコンピュータを中心とした各種情報処理技術等々が必要であります。我々は、我々グループの得意とする技術に加え、日立社内の各研究所、各工場で広範かつ高度に開発された技術成果の粋を総合し、来るべき時代にフィットした科学機器をユーザー各位に御提供していきたいと心から念じております。

現在、脱工業社会の到来とか、産業の空洞化といった言葉で象徴されるように、社会全体が産業界の地殻変動を中心として大きく様変わりしつつあります。しかし、いつの時代にあっても、「新しい知識の発見」とそれによる「新しい技術」の展開が、時代の新しい局面を転換させてゆく原動力であることを考えると、科学機器というものは、コンピュータ、半導体といった華やかさはないものの、反って各産業が失速状態に陥った現在こそ、次の輝かしい希望に満ちた未来を発掘する可能性

* ㈱日立製作所 計測器事業部長 工博

を持った、極めて有力で大切な機器として考えるべきと思われます。

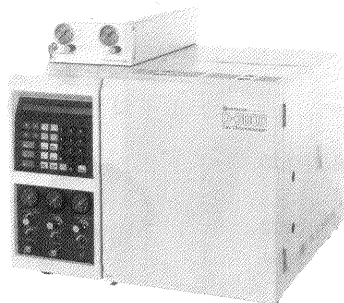
我々は、ユーザー各位が、「使って見て本当に良かった」と喜んでいただける製品を開発し御提供できることを無上の誇りと喜びと思っております。これにはユーザー各位の潜在的、顕在的な御要求を理解把握し、ユーザー各位のお心になり切って製品の開発生産を行うことが極めて大切と

考えております。この意味で今後とも各位の絶えざる御指導、御教示及び御愛顧のほどを衷心よりお願い申し上げる次第であります。

最後に、ユーザー各位のいっそうの御清栄を心から祈念してやみません。

Topics

G-3000形 日立ガスクロマトグラフ



最近、ガスクロマトグラフィーの分野では、フューズドシリカキャピラリーカラムを用いた高分離分析が増加しており、これに対応すべくガスクロマトグラフ「G-3000形」を製品化いたしました。

G-3000形は、高性能カラムオープンにより保持時間の良好な再現性を得るとともに、ベースライン記憶によりシングルカラム昇温分析を可能にする等、コンパクトなボディーながら高性能・高機能のガスクロマトグラフです。

■ 主な特長

- (1) 高性能カラムオープンにより保持時間の再現性良好。
- (2) ベースライン記憶によるシングルカラム昇温分析可能（2チャンネル）
- (3) 40文字2行の液晶ディスプレイとの対話による簡単な操作。
- (4) メガボアカラム収容可能なワイドカラムオープンとコンパクトなボディー。

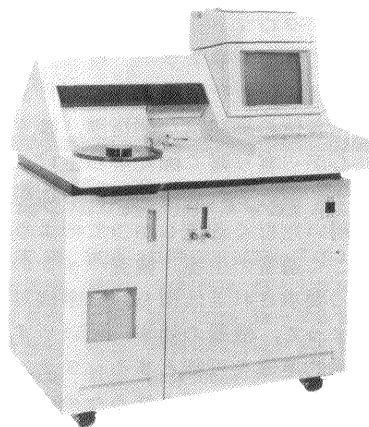
■ 主な仕様

- (1) カラムオープン
温度範囲：室温+10～400℃
冷却降下時間：250→50℃
再安定まで7分以内

温度係数：周囲温度変化10℃に対し0.1℃以下

- (2) 温度制御部（注入口，FID，TCD）
温度設定範囲：0～400℃
- (3) スプリット/スプリットレス注入口（オプション）
カラム流量及びスプリット比：独立制御

Z-9000形 日立多元素同時分析 原子吸光光度計



長い間、分析化学者に待望されてきましたグラフィットファース法の同時多元素分析原子吸光光度計がようやく誕生いたしました。

Z-9000形の主な特長を以下に示します。

■ 主な特長

- (1) 4元素同時に8元素を自動分析します。
- (2) 内蔵のオートサンプラーによりオート測定を自動化します。
- (3) 測定可能な濃度範囲を1,00倍も拡張しました。
- (4) 試料別の自動条件設定など、操作は極めて簡単です。

- (5) 偏光ゼーマン法により、長時間にわたり安定した分析値が得られます。

Å-SEM, S-900 セミナー、及びワーク ショップを開催

ロングストロームSEMを'86 ICEMに出展して以来初めての試みとして、日立計測器サービス㈱にてS-900セミナー及びクローズドワークショップを次のテーマで開催した。

- (1) 超高分解能8 Åで見えるロングストロームの超微細立体形態とはどんな世界か。

- (2) 低加速電圧1 kV無蒸着の生の表面とはいかなるものなのか。

大学の形態学の諸先生方、民間の研究者の多数の方々の参加を頂き成功のうちに終了した。セミナー110人、ワークショップ50人の感想は、アンケートで見ると分解能や装置に高い評価を受け、価格が79,000,000円でも妥当の価格であると3割以上の方々に支持されている。

測定試料から(1)GaAsの多層膜、(2)超微粉末、(3)生物の超微細形態とハイテクの時代に相応したSampleであり、新しいSampleとの出会いは参加者にとっていかに見えるのか、大きな期待がかけられ、測定者にとっては、どんな測定技術で答えるか不安と圧力がかかる。クローズドに招待された参加者のほとんどが驚きと感嘆の声を上げておられた。

これまでTEMによっても、通常のSEMによっても知ることができなかった未知の世界……マイクロコスモスの扉がS-900によって開かれようとしている。
(船岡武司 記)

報 文

日立710形電解質自動分析装置による尿中電解質測定への検討

A Study on the Determination of Electrolytes in Urine
with HITACHI Model 710 Automatic Electrolytes Analyzer西 功* 鍵田 正智* 木下 憲明* 大矢 秀和* 林 貞夫*
有末 一隆* 甲田 一馬* 林 長蔵** 宮井 潔***

(昭和61年11月21日受理)

臨床化学の分野において、電解質の測定は重要な役割を占めている。特に、Na, K, Clの血中レベルでの測定は、酸・塩基平衡、浸透圧調節及び筋肉・神経組織などの異常発見や診断・治療に欠かせないものである¹⁾。

従来から電解質の測定は、Na, Kは炎光光度法、Clは電量滴定法が主に用いられていたが、最近、イオン選択性電極を用いた測定法が最も利用されるようになってきた。文字どおり、ある特定のイオンを選択的に測定しようとするものであるが、利用しやすいという長所ばかりでなく問題点も少なくない。炎光光度法が総濃度を測定するのにに対し、電極法はイオン濃度として測定するという表現単位の相違や、イオン選択性物質の特性により共存イオンの影響を受けやすいなどがその例としてあげられる。

血中のNa, K, Clの変動幅は非常に微少で、当院の各々の正常値はNa 138~146mEq/l, K 3.8~5.1mEq/l, Cl 96~107mEq/lである。このため測定の正確度に対しては十分な注意を払う必要があり、できる限り問題点の少ない測定方法を導入するのが望ましいと思われる。そういう意味において、現状ではNa, Kは炎光光度法、Clは電量滴定法が最も優れた方法だと言えよう。

今回我々は、上述したようにNa, K測定に炎光光度法、Cl測定に電量滴定法を採用している日立710形電解質自動分析装置を使用する機会を得た。

本装置の性能は、血清使用レベルでの評価は高い。我々は試料として尿を選択し、尿中電解質分析装置としての評価を目的とした。

尿中のNa, K, Cl濃度は、体内の塩分や水分の過不足状態、酸・塩基平衡、腎機能の状態把握などの目的で測定され、尿の浸透圧値を決定する重要な因子でもある^{2),3)}。

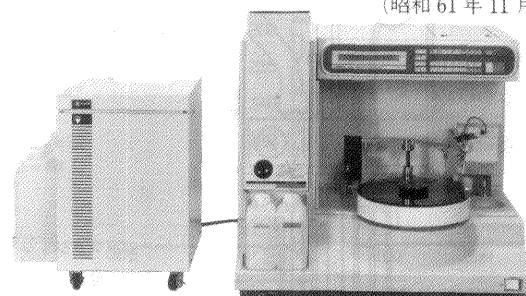
尿という試料は非常に多様性を示すものであり、血清のようにある程度恒常性を保っている試料ではない、といっても過言ではない。

今回は、このような尿の多様性を考慮しながら検討を加えていくこととした。

1. 測定原理

(1) Na, K

分子あるいは原子が十分な高温で熱せられると、それぞ



710形日立電解質自動分析装置

れ元素固有の量子化されたエネルギーを得て励起される。これを励起状態という。この状態は非常に不安定で、より安定なエネルギー準位か、通常の基底状態に戻ろうとする。このとき、アルカリ金属やアルカリ土類金属などは、その差に相当するエネルギーを、それぞれ原子独特の輝線または帯スペクトルとして輻射し、その強度は原子の量と比例関係にある⁴⁾。

本装置では、以上に基づく原理から炎によりNa, Kを励起させ、その発光スペクトルを各々Na589nm, K767nmで測定している。また、分析精度を高めるため試料中にLiを添加して、試料の吸引、噴霧や炎の変動による誤差を補正する内部標準法が採用されている。

(2) Cl

電解液の入ったセルに、発生極、発生対極、指示電極、参照電極の4本の電極が配置されている(図1)。発生極を陽極、発生対極を陰極として電気を流すと、陽極からAg⁺が電解発生し、試料中のCl⁻と1対1で反応してAgClとなり沈殿する。Cl⁻が存在する間はフリーのAg⁺は存在しないが、Cl⁻が無くなった時点からフリーのAg⁺が増加する。このとき、参照電極に対する指示電極の電位が急激に変化し、終点検出器によりAg⁺発生が止められる。

Faradayの法則により、電解により生成したAg⁺の量は、電解に費やした電気量に比例する。

本装置は、電解生成物質を発生させるのに要した電気量を測定し、その値と注入した検体量から演算してCl⁻濃度を求めている。

2. 測定方法

尿モードを使用し、Clについては尿の広い測定レンジに対応するため、Cl SPEED GAINを10と設定し、Ag⁺を発生させる電気量を最も大きくした。

* 大阪大学医学部附属病院 中央臨床検査部

** 大阪大学医学部附属病院 中央臨床検査部 副部長 助教授 医博

*** 大阪大学医学部附属病院 中央臨床検査部 部長 教授 医博

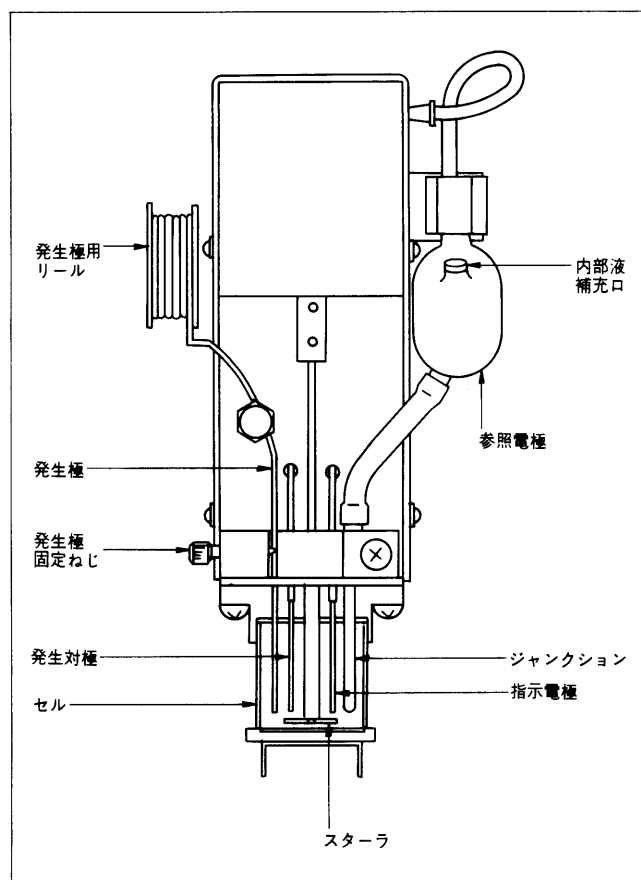


図1 クロライドカウンタの構造

3. 測定材料及び機器

(1) 測定材料

- ① 市販コントロール尿
 - 1) UR-SURE Chemistry Urine Control-I
 - 2) UR-SURE Chemistry Urine Control-II
 - 3) URICONTROL
- ② 当院における患者尿

(2) 測定機器

- ① 日立710形電解質自動分析装置
- ② TECHNICON SMA 12/60
- ③ BECKMAN ASTRA-8
- ④ RADIOMETER PHM 83 AUTOCAL pH METER

日立710形電解質自動分析装置の主な仕様を表1に示す。

4. 検討方法

(1) 直線性

図2に当院中央臨床検査部に提出された尿試料の1週間分(n=1,126)のNa, K, Cl濃度分布におけるヒストグラムを示す。

このヒストグラムから直線性が少なくともなくてはならない範囲をNa 0~250mEq/l, K 0~100mEq/l, Cl 0~250mEq/lと決定し, NaCl及びKCl(共に和光純薬, 特級)を用いて, 濃度が段階的に異なる水溶性の試料を調整し, 直線性の検討を行った。

表1 日立710の主な仕様

No.	項目	仕様
1	分析項目	血清: Na, K, ClまたはLi 尿: Na, K, Cl
2	濃度範囲	Na: 0~200meq/l(血清, 尿) K: 0~10meq/l(血清) 0~100meq/l(尿) Li: 0.05~10meq/l(血清) Cl: 10~350meq/l(血清, 尿)
3	分析原理	Na, K: Li/Cs内標準炎光光度法 Li: Cs内標準炎光光度法 Cl: 電量滴定法
4	検体消費量	Na, K測定時: 20μl Na, K, Cl測定時: 40μl Li測定時: 30μl
5	検体数	通常検体: 40 緊急検体: 13 管理検体: 炎光用, 電量滴定用各1
6	測定時間	32秒/検体

(2) 同時再現性

3種類の市販コントロール尿及び患者尿を用い, 各々10回測定による同時再現性の検討を行った。

(3) 日差再現性

3種類の市販コントロール尿を用いて10日間測定による, 日差再現性の検討を行った。なお, 1日の測定は3重測定とし, その平均値を用いて10日間の集計を行った。

(4) キャリーオーバーの検討

図3に示すように, Na, K, Clの各低濃度及び高濃度の患者尿を用いて交互に5重測定を繰り返すことにより, キャリーオーバーの検討を行った。

(5) 干渉物質の影響

尿中には, 各種有機酸, 窒素成分, タンパク質, アミノ酸, 重金属, 色素成分, ホルモン等非常に多種多様の物質が存在している⁵⁾。

このうち測定値への影響をみるため, 干渉物質として, Na, K, Clについてタンパク質の影響Na, KについてMg⁺⁺ Ca⁺⁺が炎色反応に及ぼす影響, ClについてF⁻, Br⁻, I⁻のハロゲン, 硝酸, 重炭酸の影響について検討を行った。

(6) pHの影響

尿のpHは, 一般に健常人では弱酸性と言われているが, 実際は非常に広範囲にバラついている。当院の患者尿n=238例のpH分布は図4に示すように, pH4.5~9.0でその平均値は6.7であった。

試料としてTris-ホウ酸Bufferを用いて, pHを6.0~9.0まで0.5刻みで変化させ測定値への影響をみた。

(7) 自己相関

本装置における精密度の検討に自己相関という方法を用いた。この詳しい方法は, 日本臨床化学会分析部会関東支部機器委員会から提出されている⁶⁾。

これは, 同一試料による2回測定の結果の相関から誤差変動(Sy·x)を求め, Sy·xが許容範囲内にあるかを判定

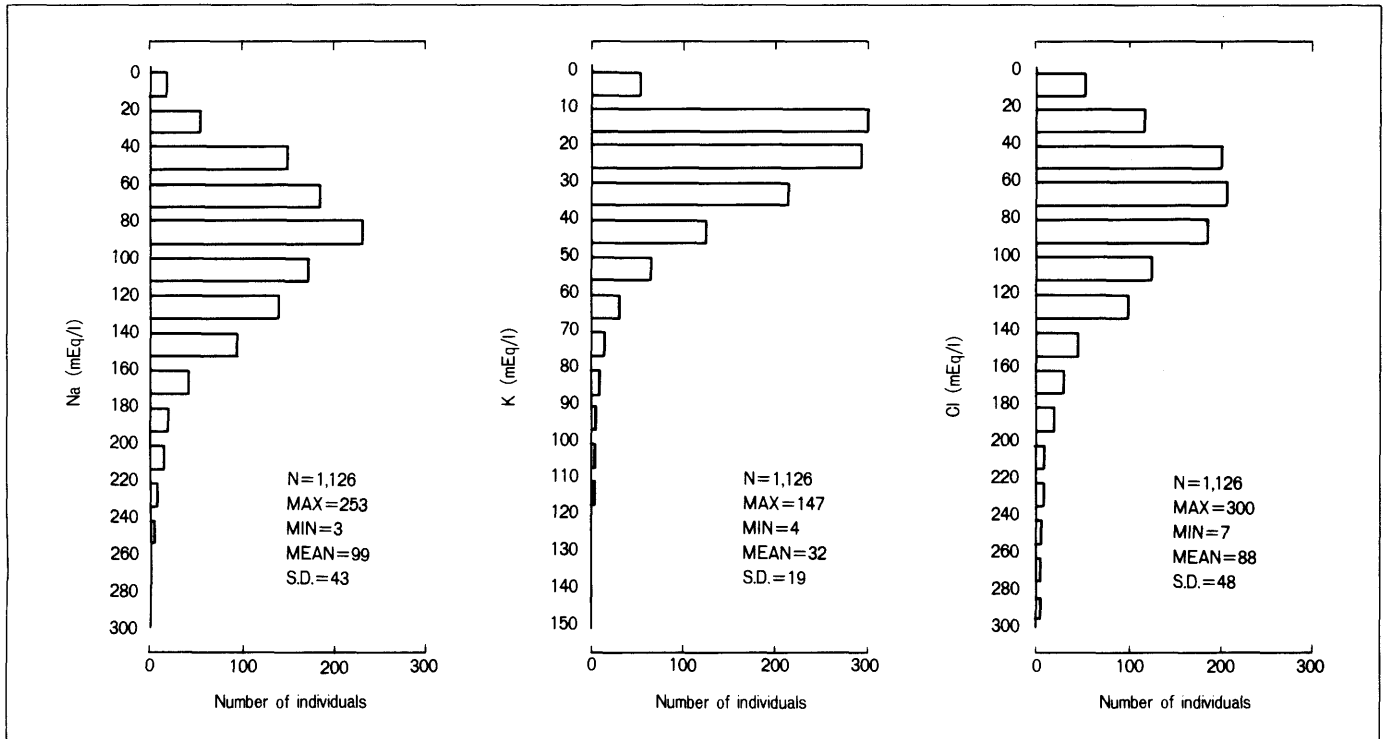


図2 当院尿試料1週間分のNa, K, Cl濃度分布

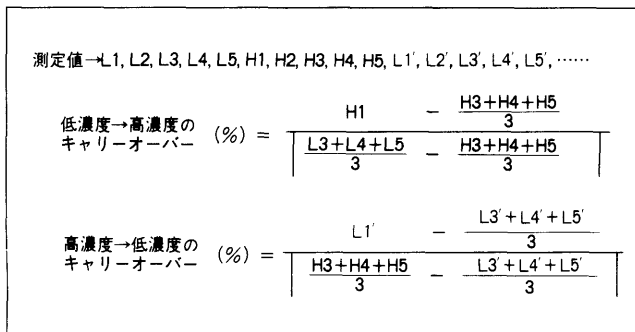


図3 キャリーオーバーの検討方法

する方法である。

(8) 他法との相関性

当院患者尿100例について、日常検査法であるSMA12/60 (Na, K: 炎光法, Cl: チオシアン酸第2水銀法) と ASTRA-8 (Na, K: イオン選択電極法, Cl: 電量滴定法) を用い、本装置との相関性を検討した。

5. 結果及び考察

(1) 直線性

図5に示すように、Na 300mEq/l, K 100mEq/l, Cl 300 mEq/lまで、原点を通る良好な直線性が得られた。これより本装置は、ほとんどの患者尿が無希釈で測定可能であると思われる。

(2) 同時再現性

n=10例において、NaでC.V.0.15~0.37%, KでC.V.0.15~0.21%, ClでC.V.0.10~0.45%と非常に良好な結果を得た。(表2)

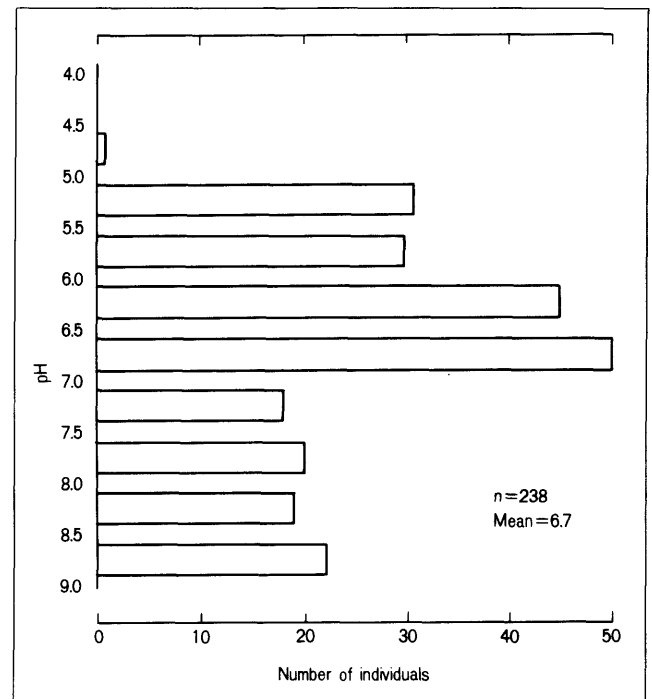


図4 pH分布

(3) 日差再現性

10日間の日差再現性は、NaでC.V.0.75~1.23%, KでC.V.0.75~1.02%, ClでC.V.0~0.33%と、同時再現性と同様に良好な結果を得た(表3)。

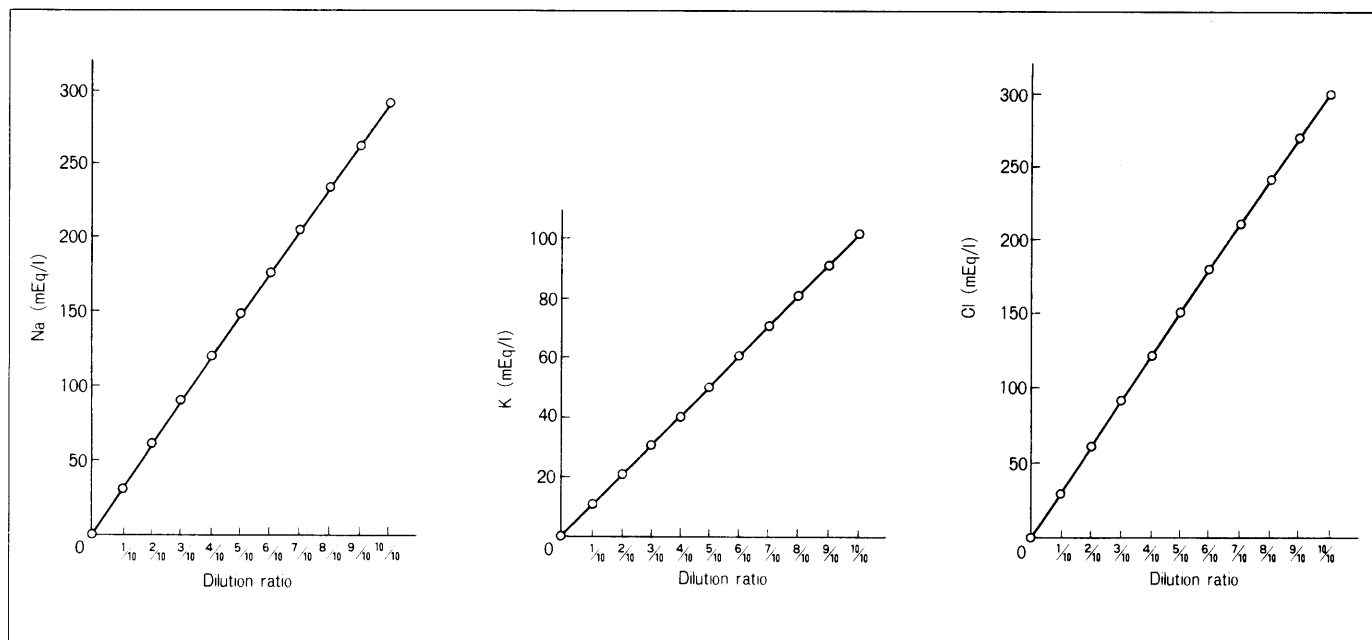


図5 直線性

表2 同時再現性

	Control-A			Control-B			Control-C		
	Na	K	Cl	Na	K	Cl	Na	K	Cl
Mean (mEq/l)	87.7	30.8	43.4	81.5	73.5	133.5	149.9	130.8	275.1
S.D. (mEq/l)	0.14	0.05	0.20	0.18	0.12	0.16	0.28	0.21	0.52
C.V. (%)	0.15	0.16	0.45	0.22	0.17	0.12	0.19	0.16	0.19
(n=10)									
	Sample-A			Sample-B			Sample-C		
	Na	K	Cl	Na	K	Cl	Na	K	Cl
Mean (mEq/l)	52.0	37.5	46.6	104.8	22.5	101.3	202.2	55.0	258.9
S.D. (mEq/l)	0.14	0.06	0.13	0.29	0.05	0.22	0.75	0.09	0.25
C.V. (%)	0.26	0.15	0.27	0.27	0.21	0.22	0.37	0.17	0.10
(n=10)									

表3 日差再現性

	Control-A			Control-B			Control-C		
	Na	K	Cl	Na	K	Cl	Na	K	Cl
Mean (mEq/l)	86.3	30.9	43.0	78.1	69.5	127.2	151.2	132.1	276.8
S.D. (mEq/l)	1.06	0.32	0.00	0.74	0.53	0.42	1.14	0.99	0.92
C.V. (%)	1.23	1.02	0.00	0.95	0.76	0.33	0.75	0.75	0.33
(n=10)									

表4 キャリーオーバーの検討

	Na	K	Cl
L1	52	21	49
L2	52	21	50
L3	52	21	50
L4	52	21	50
L5	52	21	50
H1	197	101	200
H2	197	101	200
H3	197	101	199
H4	197	101	199
H5	197	101	199
L1'	53	21	49
L2'	53	21	50
L3'	52	21	50
L4'	52	21	50
L5'	53	21	51

低濃度→高濃度	高濃度→低濃度
Na 0%	Na 0.48%
K 0%	K 0%
Cl 0.67%	Cl -0.87%

(4) キャリーオーバーの検討

結果を表4に示す。Na, Kの測定においては全くキャリーオーバーは認められなかったが、Cl測定において、低濃度→高濃度で+1 mEq/l, 高濃度→低濃度で-1 mEq/lとごくわずかではあるが、キャリーオーバーが認められた。

この原因として、電量滴定法において Ag^+ 発生の電気量を大きく設定していることによる低濃度域での反応性や、極端な濃度変化が滴定の終点をとらえる参照電極と指示電極の電位に、一時的な変化をもたらしたのではないかと考える。

(5) 干渉物質の影響

図7に示すように、タンパク質の影響、Na、Kにおける Mg^{++} 、 Ca^{++} の影響は、認められなかった。

また、図8に示すように、Clについては同族のハロゲンである Br^- と I^- で約5 mmol/lより上昇傾向がみられた。特に Br^- は鎮咳剤、催眠剤などの薬剤に多用されており、尿中に大量に排泄されている可能性があるが、実際の排泄量の確認においては今後の検討課題とされる。

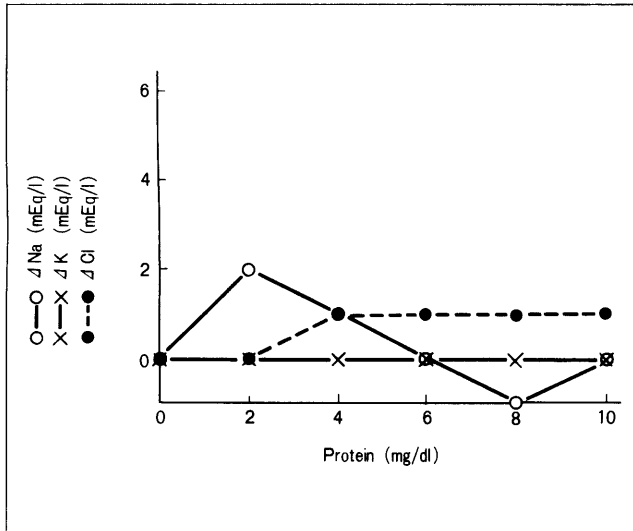


図6 タンパク質の影響

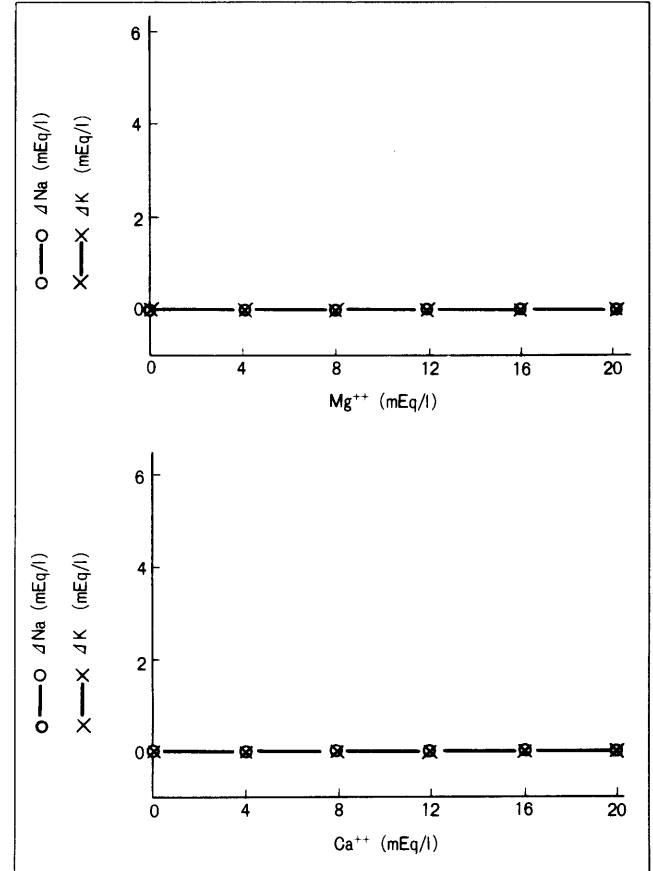


図7 Mg^{++} 、 Ca^{++} の影響

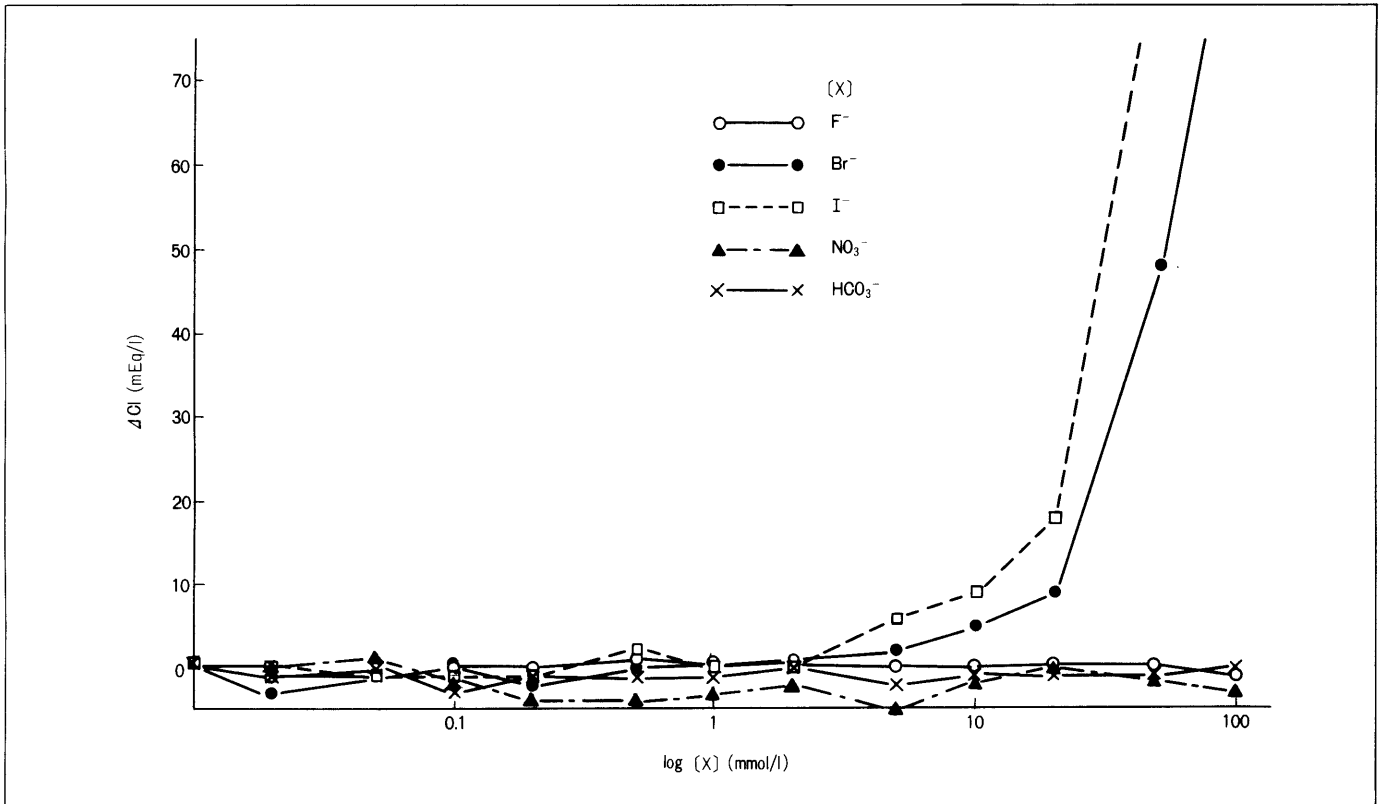


図8 ハロゲン、硝酸、重炭酸の影響

(6) pHの影響

図9に示すように、Na, K, ClともpH6.0~9.0までは影響はみられなかった。

極度の酸性域及びアルカリ域の試料の作製が困難であったため、今回は検討を加えられなかったが、Na, Kの測定に関しては、炎光法という原理から考慮して、pHの影響はないであろう。またClの測定に関しては、電解液が強酸性であり、注入される検体量は比率として非常に微量であることからその影響は無視でき、尿への対応は十分可能であると考えられる。

(7) 自己相関

結果を図10に示す。今回用いた評価方法は血中電解質の評価方法であり、尿を試料とした自己相関において算出した $Sy \cdot x$ に対して、精密度を判断するための判定基準に明確な提示がないため、判定方法を見いだせない。

しかし、血清に比べ生理的変動幅が非常に広いことなどから、算出されたNaの $Sy \cdot x = 0.89$, Kの $Sy \cdot x = 0.45$, Clの $Sy \cdot x = 0.88$ という結果は十分な精密度があると評価してよいであろう。

(8) 他法との相関性

図11に示すように、SMA12/60においては、

$$Na : y = 0.979x + 1.673 \quad r = 0.999 \quad n = 100$$

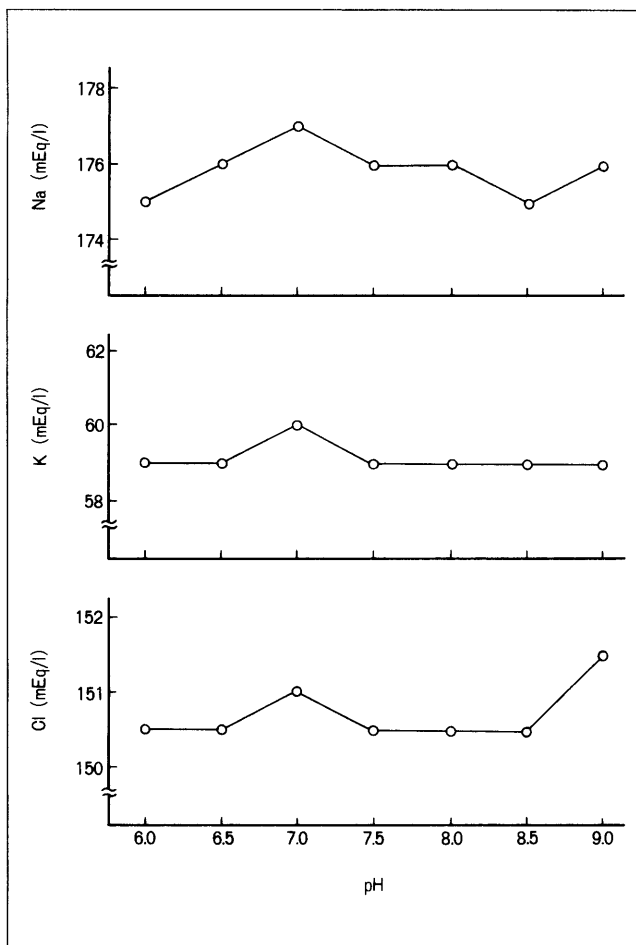


図9 pHの影響

$$K : y = 0.983x + 1.526 \quad r = 0.999 \quad n = 100$$

$$Cl : y = 0.944x + 3.522 \quad r = 0.997 \quad n = 100$$

また、図12に示すように、ASTRA-8においては

$$Na : y = 0.934x + 8.425 \quad r = 0.998 \quad n = 100$$

$$K : y = 0.899x - 1.953 \quad r = 0.998 \quad n = 100$$

$$Cl : y = 1.038x - 3.414 \quad r = 0.999 \quad n = 100 \quad \text{という結果を得た。}$$

このうちASTRA-8とのKの相関で、若干の傾きがあり、低値では良好な相関性を示したが、高値になるほどASTRA-8による測定値が本法に比べ高値を示す傾向が認められた。

この原因を追及するため、それぞれ専用に使っている標準校正液の交差分析を行った。

まず、ASTRA-8の標準校正液を日立710にて測定したところ、Kの表示濃度が4.0及び8.0mEq/lであるにもかかわらず4.8及び9.1mEq/lと測定された。ここで標準法とされる炎光法（日立710）での測定値を絶対値と仮定し、この値をもって標準校正液としてASTRA-8に用いた場合には、結果としてASTRA-8での測定値は日立710より低値となるはずである。このことは、ASTRA-8による測定値が本法に比べ高値を示す傾向とは逆の結果である。

次に、日立710の標準校正液をASTRA-8にて測定したところ、Kの表示濃度が50.0mEq/lであるところが51.4mEq/lと測定された。この結果を先と同じようにして考えると、ASTRA-8による測定値は日立710より約3%高値となるはずで、相関から得られる傾向が少なからず認められる。

同時にASTRA-8でのKの直線性の確認を行ったが、100mEq/lまで良好な直線性を確認した。

以上のように、交差分析及び直線性の確認のみで原因とされる明確な事実は得られなかったが、回帰式の解離については、標準校正液の組成が機種間によって異なり、交差測定においてそれぞれ表示値と一致しないということが、なんらかの関与をしていると考える。

特にイオン選択性電極法においては、電極に対しての安定性、親和性等の点から、メーカー独自の処方で作製されているのがほとんどであり、他の標準校正液を適用できないとの報告もあり、今回はASTRA-8による測定システムと本法のシステム間での測定値の解離と考えてもよいであろう。

いずれにしても、相関係数は良好であり、回帰式の傾きのみが異なるのであるから、標準法をどちらかに決定すれば（ここでは炎光法である日立710）、その両システム間の回帰式 $y = ax + b$ の逆関数を求め、その補正係数を組み込むことで測定値の一致は可能であろう。

6. まとめ

Na, Kに炎光光度法、Clに電量滴定法と現在標準法とされている各方法を原理とした日立710形電解質自動分析装置において、尿試料を対象とした分析の検討を行った。

同時再現性、日差再現性、自己相関の検討から、本装置における精密度が非常に優れていることを確認した。

直線性においては、十分な濃度範囲で原点を通る直線性が得られ、無希釈のまま測定可能であると思われる。また、多成分を共存する尿試料ということで、それらのうち、タ

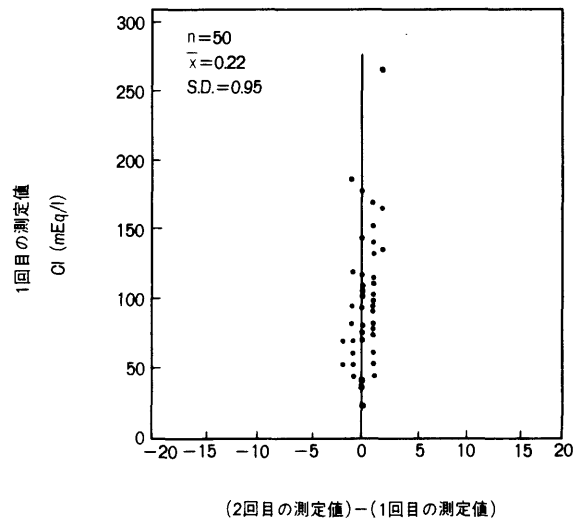
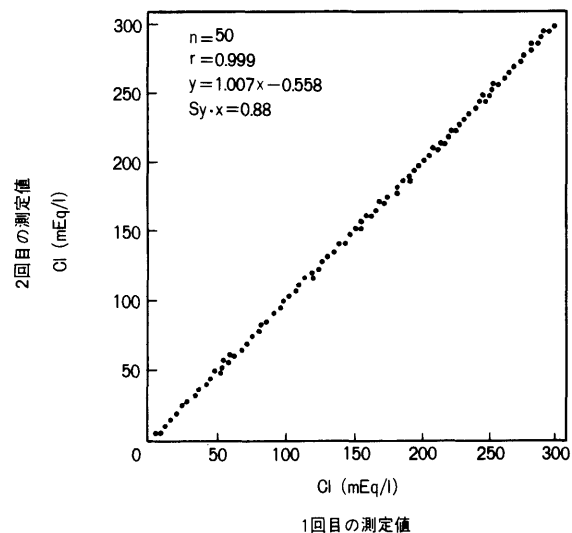
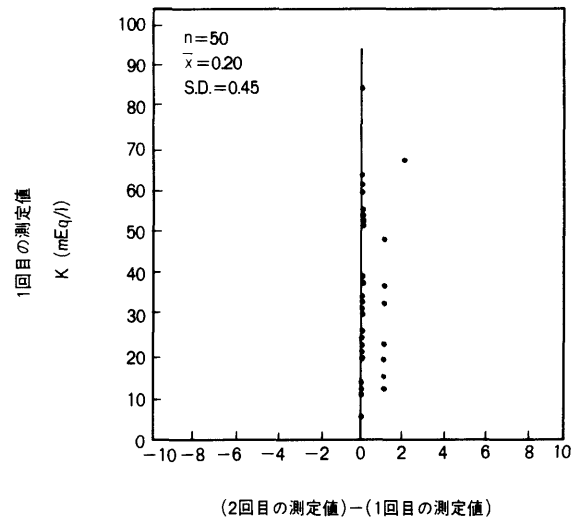
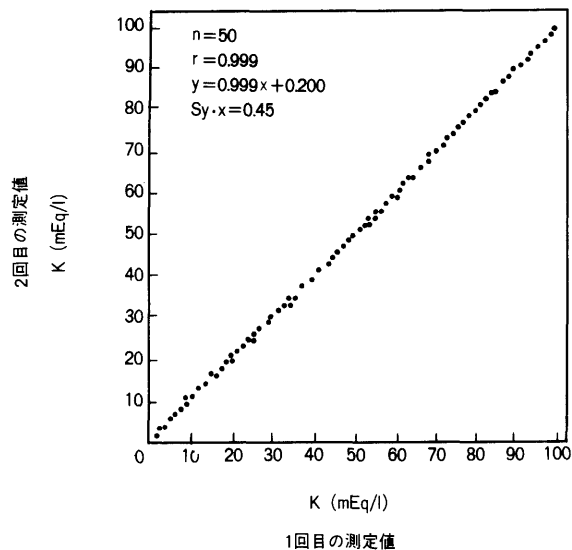
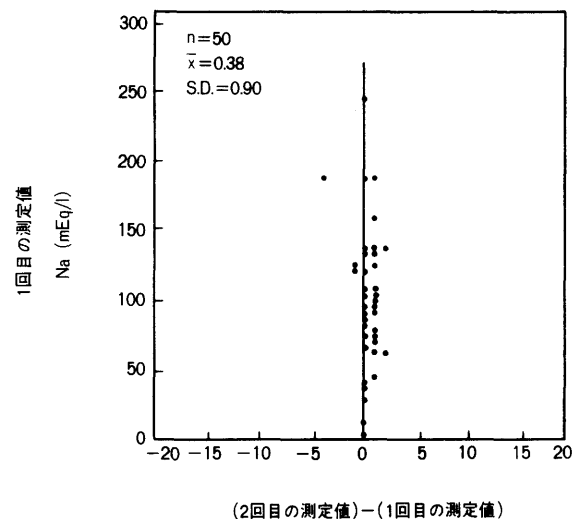
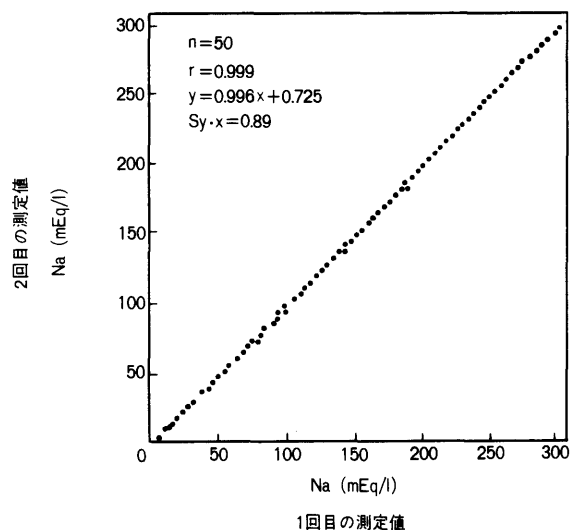


図10 自己相関

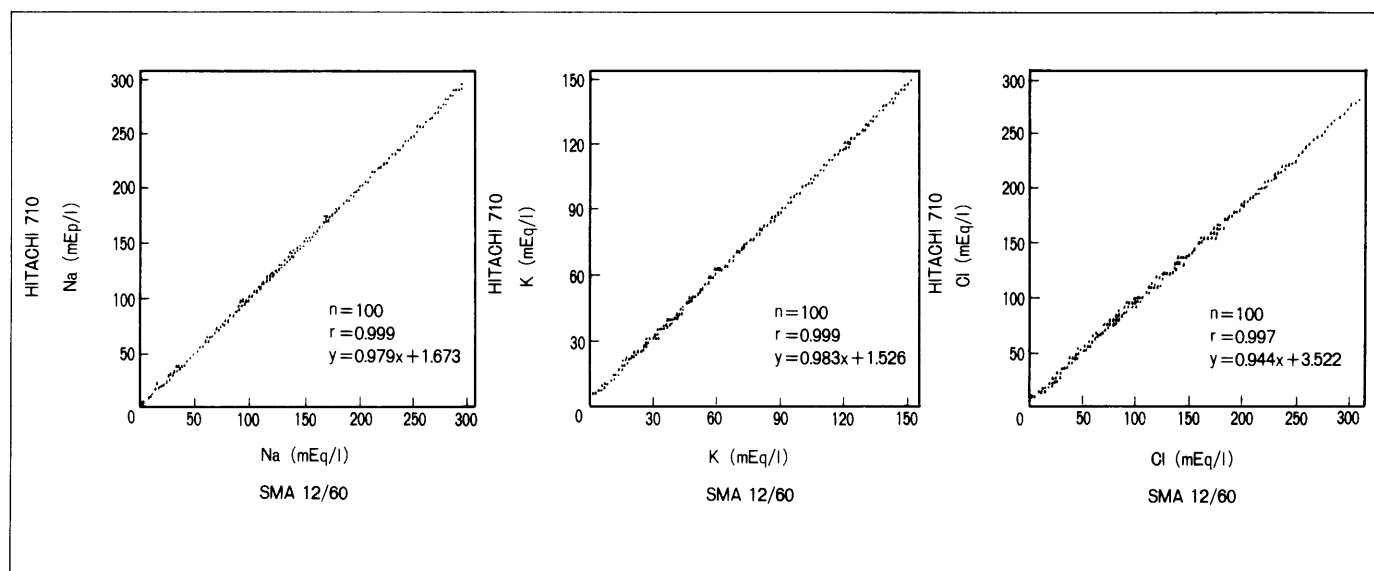


図11 SMA12/60との相関性

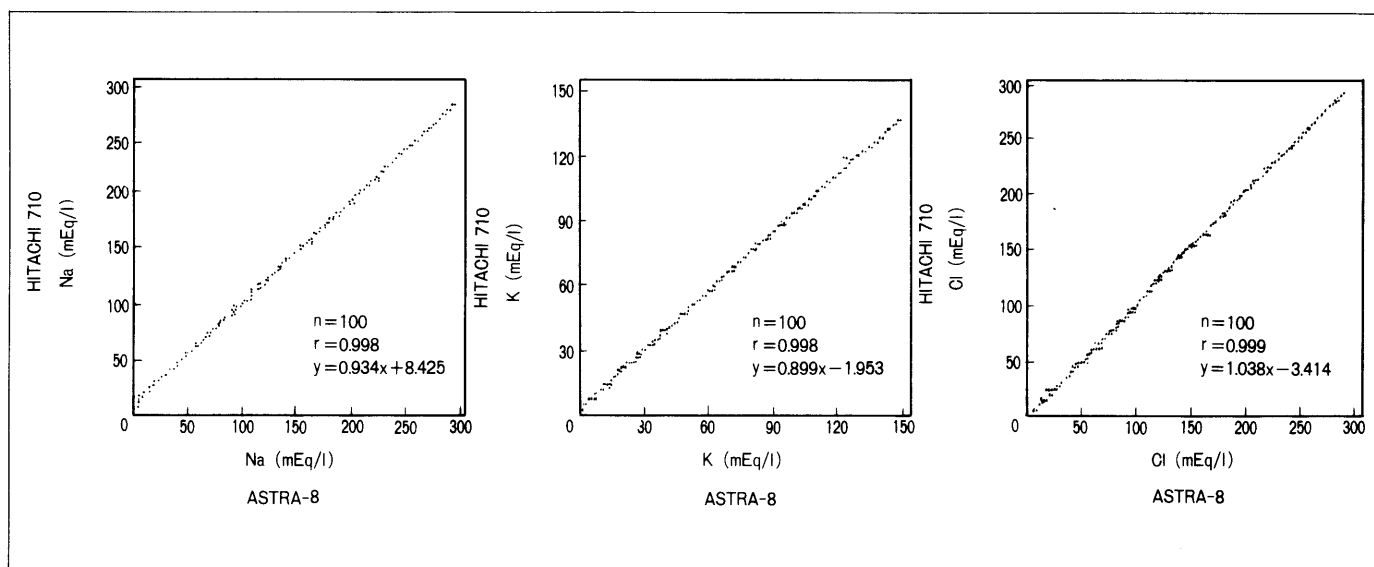


図12 ASTRA-8との相関性

ンパク質及びアニオン、カチオン成分の共存による影響の検討を行ったが、Cl測定においてBr⁻で約5 mmol/l、I⁻で約3 mmol/l以上より正の誤差を認めた以外は影響はみられなかった。薬剤として頻繁に投与されるBr⁻やI⁻の代謝に関連し、これらの排泄量が明確ではないため臨床的な判断は下せないが、測定方法的に見ると、現在広く使用されているイオン選択性電極法と比べ、Br⁻、I⁻の影響は受けにくく、十分な評価が可能である。

以上のように本装置を用いた尿中電解質の測定は、日常検査法として適用可能であると考えられる。今後Clの滴定時間短縮による処理能力の向上、あるいはCl⁻を高感度にも選択的に測定可能な電極の開発など、特にCl電極に対しての

改良を期待したい。

参考文献

- 1) 飯田喜俊：電解質検査（1972）
- 2) 高原喜八郎，他：尿定量検査のすべて 6，13 1148～1151（1978）
- 3) 金井 泉，他：臨床検査提要（1983）
- 4) 鈴木信明：臨床検査機器の原理と保守 47～62，137～141（1978）
- 5) 山川辰夫，他：生化学データブック I
- 6) 日本臨床化学会分析部会関東支部機器委員会，関口光夫：第6回日本臨床化学会夏期セミナー資料集，348～（1986）

蛍光プローベ(Quin2, Fura-2)による細胞内Ca⁺⁺の測定 ——ラット好塩基球性白血病細胞(RBL-2H3)への適用——

Determination of Intracellular Ca⁺⁺ in Rat Basophilic Leukemia Cell(RBL-2H3) by Fluorescent Dyes, Quin2 and Fura-2

前山 一隆*

(昭和61年12月18日受理)

1. はじめに

細胞内Caは結合型と遊離型の平衡状態を保って存在しており、細胞が刺激されると細胞内の遊離Ca濃度が増加し、それが以後の細胞内反応の引金を引くという点でセカンドメッセンジャーとして重要である。細胞内Ca濃度を上昇させる要因として、細胞内Caプール(小胞体、ミトコンドリア、核)からの遊離と細胞膜のCaチャンネルを介しての外液Caの流入があるが、元来、高濃度のCaは細胞にとっては好ましいものではなく、細胞を傷害しないように遊離Ca濃度を下げる機構として、小胞体やミトコンドリアへのuptakeと細胞外への汲み出しが存在する。Caと結合する蛋白質としてカルモジュリンやprotein kinase Cなどが知られており、これらは他の蛋白質を活性化して次の反応を誘起させる点で重要であり、細胞内の遊離Caの動態を知ることが、細胞の刺激応答連関を解析するために不可避であると考えられてきた。その方法としては、⁴⁵Caを用いたアイソトープ取込み法がよく用いられてきたが、Caの流入、流出を区別して解析できるという長所はあるが、技術的な面で、同一標本や単一細胞での経時変化をみるのに満足できるものではなかった。近年、細胞又は組織に各種の色素を取り込ませ、細胞内の遊離Ca濃度を測定する方法が発達してきた。吸光試薬としてArsenazoIII, Murexideが、蛋白質プローベとしてAequorinが用いられている。Tsien¹⁾によりCaのキレート剤の誘導体として開発された各種の蛍光試薬が、感度や使い易さなど他のCaプローベと比較して多くの利点を持つことにより広く用いられ、さらに改良が加えられてきた。その代表としてQuin 2, Fura-2が挙げられる。原理としては、これらの試薬がCaと結合したときに、得られる蛍光強度がCa濃度に依存していることから、蛍光プローベのCaとの結合型、遊離型の比を求め、解離定数から細胞内遊離Ca濃度を導ける点を利用しており、これまで多くの細胞に試みられてきた。ここではラット好塩基球性白血病細胞(RBL-2H3)を例として、細胞刺激後の細胞内Caの変化を検討してみた。

2H3細胞の細胞膜には、IgE受容体が細胞1個当たり約30万個存在しており、IgEのFc部分が $10^5\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ といった高い親和性をもって結合する。IgEに対する抗原を加えることによりIgE受容体を凝集させると、ヒスタミン遊離がみられることから肥満細胞のモデルとして広く研究されてきた。⁴⁵Caを用いてIgE受容体凝集後、Ca流入が生じることが明らかとな



F-4000日立分光蛍光光度計

り、他の分泌細胞でCaがセカンドメッセンジャーとして分泌の引金になっているのと同様、細胞内Ca濃度の上昇がヒスタミン遊離をもたらす要因となっていることが言われてきた。よって、細胞内Ca濃度の変化を経時的にとらえることが、ヒスタミンの遊離機構を追求する上で必要となる。Beaven²⁾は、Quin 2を用いてIgEで感作した2H3細胞に抗原(卵白アルブミン)刺激をすることで、細胞内Ca濃度が増加することを示した。以下にQuin2, Fura-2を用いた測定法について述べ、その応用として2H3細胞での例を示す。

2. Quin2測定法

25mM PIPES (pH7.2) 緩衝液(119mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.4mM MgSO₄, 5.6mM Glucose, 40mM NaOH, 0.1% Bovine Serum Albuminを含む)に、2H3細胞を 10^6 個/mlの密度で浮遊させAcetoxymethyl Quin 2 (Quin2·AM) 5 μ Mを添加して37℃, 50分間インキュベートすると、細胞膜を通過したQuin2·AMは細胞内エステラーゼの作用によりQuin2となって細胞内に捕獲される。この時、最大蛍光波長が430nmから492nmに移動することから、細胞へのQuin2の取り込みを確認することができる。³H-Quin2·AMを用いると、2H3細胞内のQuin2濃度は、2.0~5.7mMであった。図1に励起波長339nmにおけるQuin2の蛍光スペクトルを示した。Ca濃度の増加により蛍光波長490nm付近での蛍光強度が増加するのがみられる。この蛍光強度の変化を利用して、

$$[\text{Ca}^{++}] + [\text{Quin2}] \xrightleftharpoons{K_d} [\text{Ca}^{++}\cdot\text{Quin2}]$$
$$([\text{Ca}^{++}] = K_d \cdot [\text{結合型Quin2}] / [\text{遊離型Quin2}])$$
の式から細胞内Ca濃度が得られる。図2(a)に励起波長339nm, 蛍光波長492nmにおける細胞刺激時の蛍光の経時変化を示した。蛍光強度からCa濃度に換算するため、刺激応答後TritonX-100(0.05%)を添加すると細胞膜が破壊され、細胞内に捕獲されていたQuin2が外液Ca1mMと結合すると結合型Quin2として飽和状態となり、この時の蛍光強度を

* 東北大学医学部 第一薬理学教室 助手 医博

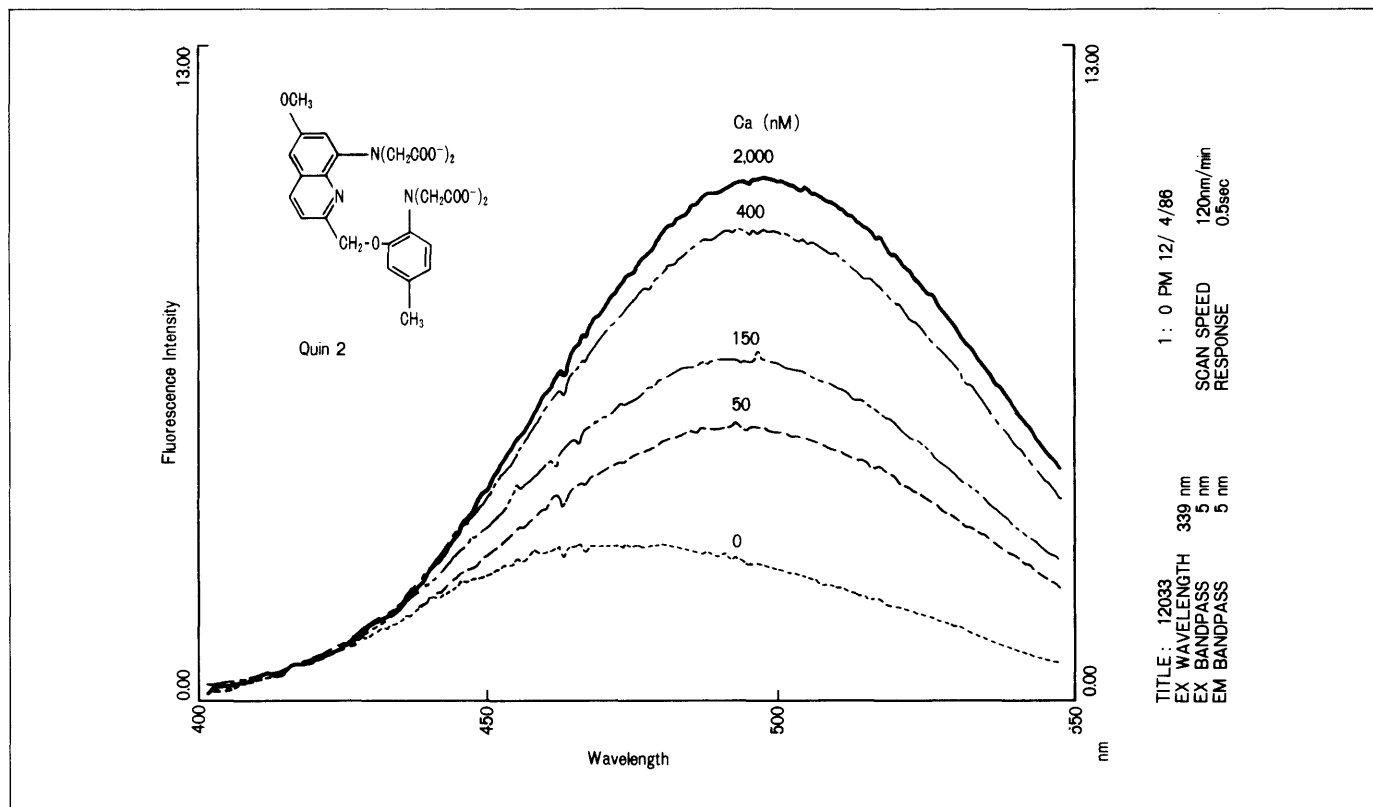


図1 Quin2の蛍光スペクトル-励起波長339nmにおいて異なるCa濃度下のスペクトル(蛍光波長400~550nm)を記録

$F_{\max}$ とする。次にMn0.5mMを添加するとQuin2はMnに対してはCaより約500倍の親和性を持ち、この時Quin2-Mn結合体の蛍光強度はQuin2-Ca結合体のものと比べて無視できることから消光を受け、この時の蛍光強度を $F_{\min}$ とする。Quin2-Mg結合体がQuin2-Ca結合体の16%の蛍光強度をもつことから、Heskethら³⁾は、Quin2飽和度 $S = (I - 0.16\Delta I) / 0.84\Delta I$ なる補正式を導き、 $[Ca^{++}]_i = K_d \cdot S / (1 - S)$ がより正確な値であるとしている。図2(b)に2H3細胞におけるCa応答を日立分光光度計F-4000のプログラムを用いて $[Ca^{++}]_i$ を計算し図示した。反応時間を長くした場合、細胞からのQuin2の漏れの問題があり2H3細胞では1時間に約15%の漏れがみられることから、刺激前のQuin2飽和度を54%と仮定して自発蛍光を計算し、その蛍光分を差し引くという計算式を用いて細胞内Caを得た。しかし、用いる細胞により安静時の細胞内Ca濃度、漏れの程度が異なるため、それぞれの場合について検討する必要があるだろう。Quin2が広く用いられるにつれて以下の問題点が現われてきた。

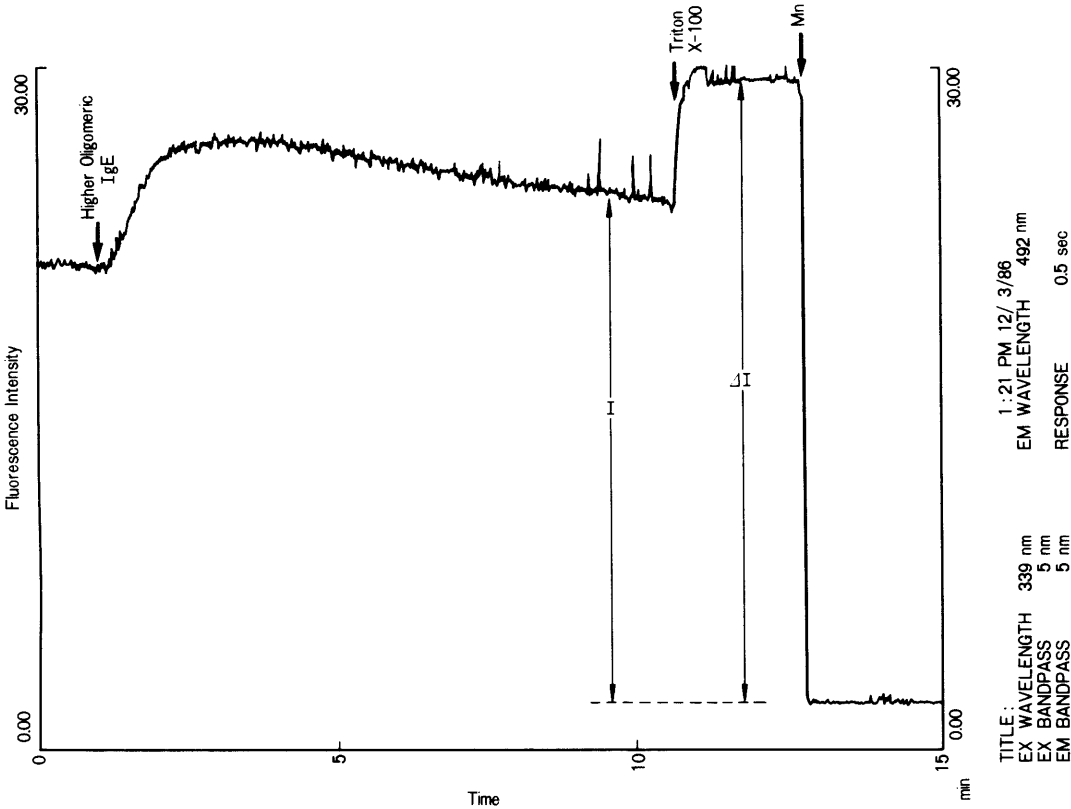
- (1) 単細胞を用いるためには、さらに強力な蛍光強度が必要である。
- (2) Quin2の K_d は115nMでありCaに対して親和性が高いため、安静時レベル(100nM)付近のCa濃度の変化が緩衝を受ける。
- (3) Photobleachingのため、長時間経時変化を追うことができない。

これらの点を改良して、Tsienらは新しい蛍光プローベと

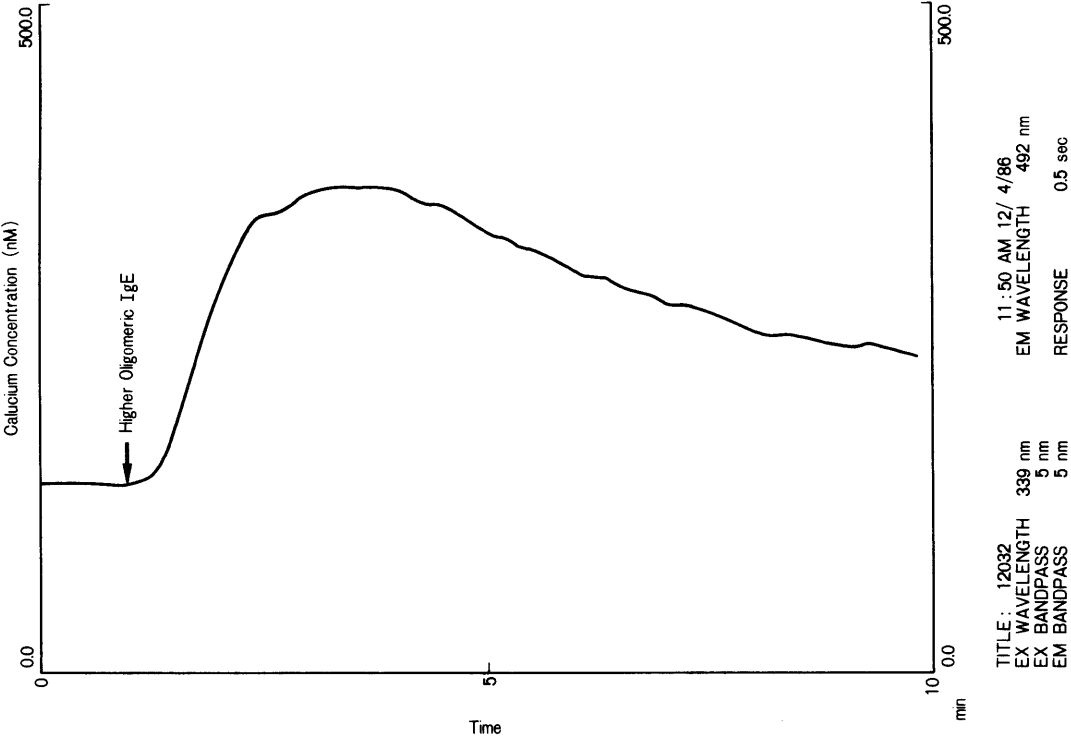
してFura-2、Indo-1を開発した⁴⁾。Quin2と同様、細胞内に取り込ませるためAcetoxymethyl体のFura-2、Indo-1が発売されている。

3. Fura-2測定法

Fura-2はCaと結合した時に、励起側において最大波長が360nmから340nmへと移動するため、340nm、380nmに2相性の蛍光ピークがみられ、その比を求めることにより、Ca濃度に換算できる(図3)。また、Fura-2はQuin2と比べると6倍の吸収率と5倍の量子効率を持つため、同じ蛍光強度を得るにはQuin2の1/30の濃度で済み、負荷量を減らすことができ、Caを緩衝する作用を減らすことができる。特に蛍光色素の量にかかわらず、2波長の比でCa濃度を求めることができるので、単細胞を用いて蛍光顕微鏡下で細胞内Caの動きをみるのに適している⁵⁾。最近はいメージプロセッサを用いて細胞内Ca濃度を色合の違いで表わすことが可能となり刺激後の変化を克明に追うことができるようになった⁶⁾。細胞内Caの動きを中心から外側へ向かうといったベクトルの変化としてとらえることができる。また各々の細胞は刺激をしていない時期でも、Caの一過性の増加・減少を繰り返していることが明らかとなった⁷⁾。一方、キュベット中の浮遊細胞を用いた場合、10⁶個/mlの細胞の群の変化をみていることになり必ずしも同期した細胞を使っているわけではないため、単細胞の変化と異なることになるが、2H3細胞を用いてヒスタミン遊離反応と細胞内Caの変化との関係を経時的に追う際には、ヒスタミン定量の感度の点から細胞の集団で見る必要がある。さてFura-2測定の特徴は、二



(a) Quin2 (励起波長339nm, 蛍光波長492nm) の経時変化



(b) F-4000 Quin2-Ca演算プログラムによるCa濃度への換算

図2 2H3細胞における細胞内Caの変化 I

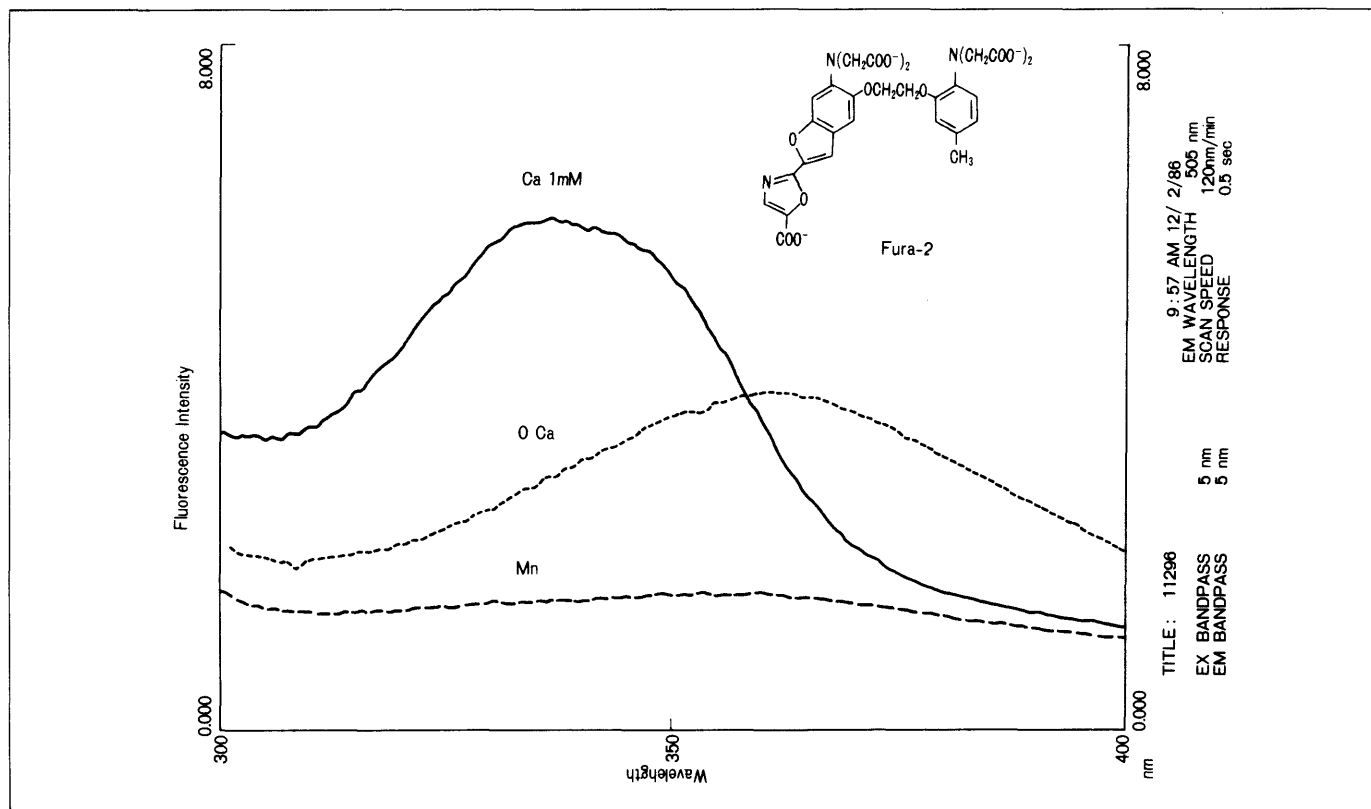


図3 Fura-2の蛍光スペクトル—蛍光波長505nmにおいて励起波長300~400nm間を記録

つの励起波長340nm, 380nmを用いる点であるが、この点に関しては機械的な限界があり、米国ではSpex社から細胞内Ca測定用として2波長が使える蛍光光度計とプロセッサが発売されているが、現在国内ではこれを満足するものは見当たらない。Tsienらは開発に当たり、一つのXenon光源で2波長を得る方式を採用せず、二つのXenon光源を用いてチョッパーを2.5~15Hzで回転させて、サンプルを励起する方法を選択した⁸⁾。この目的にかなった蛍光光度計は現時点では国内で見当たらないので、私は無理を承知で1光源を用いて約10秒間隔で二つの励起波長を得る方法をF-4000を用いて検討した。Fura-2負荷の方法はQuin2の場合と同様に、2H3細胞 10^6 個/mlに対してFura-2AMを $0.5\mu\text{M}$ 添加し、 37°C で50分間インキュベートして細胞内にFura-2を捕獲させた。F-4000では励起波長340nmから380nm間の40nmの波長移動に約5秒かかることから蛍光波長505nm, 励起波長340nm, 380nmで、それぞれを10秒間隔で記録し、その中点を補正して2波長での蛍光比を求めることにした(図4(a))。自発蛍光の問題に関しては、Tsienらは蛍光顕微鏡下での単細胞測定では数パーセント以下で無視できるものとしているが、キュベットを用いた浮遊細胞の場合、Fura-2を負荷していない同標本を用いて自発蛍光を得てそれを差し引いた後比を求め、Ca濃度に換算した。ここでは、Triton X-100 (0.05%) 添加で最大Ca値 (1mM) ($F_{\text{max } 340,380}$) を得、EGTA (2mM, pH8.2) を添加してO-Ca ($F_{\text{min } 340,380}$) の蛍光を測定する。さらにMn (10mM) を加えてFura-2の蛍光を消去して自発蛍光 ($F_{\text{BG } 340,380}$) を

得た(図4(b))。励起強度、光路長といった機械による要素や溶媒などの諸条件を考慮したS factorを用いると、

$$F'_{340} = F_{340} - F_{\text{BG } 340} = S_{f1} \cdot C_f + S_{b1} \cdot C_b$$

$$F'_{380} = F_{380} - F_{\text{BG } 380} = S_{f2} \cdot C_f + S_{b2} \cdot C_b$$

(S_f , S_b はそれぞれCa遊離, 結合時のfactor, C_f , C_b はそれぞれ遊離型, 結合型のFura-2濃度である。)となる。

$$R = F'_{340}/F'_{380} = (S_{f1} \cdot C_f + S_{b1} \cdot C_b) / (S_{f2} \cdot C_f + S_{b2} \cdot C_b) \quad \dots\dots(1) \text{と} \text{お} \text{き},$$

Fura-2とCaの解離定数を K_d とすると、

$$C_b = C_f \cdot [\text{Ca}^{++}] / K_d \quad \dots\dots(2) \text{となる。}(2) \text{を}(1) \text{に代入して} [\text{Ca}^{++}] \text{について解くと},$$

$$[\text{Ca}^{++}] = K_d \cdot \left(\frac{R - (S_{f1}/S_{f2})}{(S_{b1}/S_{b2}) - R} \right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) = K_d \cdot \frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad \dots\dots(3)$$

となる。 S_{f1}/S_{f2} はO-Ca, S_{b1}/S_{b2} は1mMCaの時の340nm, 380nmでの蛍光比 R_{min} , R_{max} であり、 S_{f2}/S_{b2} は380nmにおけるO-Caと1mMCaの比で求められることより、(3)式から細胞内Ca濃度が得られる。2H3細胞では刺激数分後に細胞内Caがピークに達することから10秒間隔で測定しても、Ca動態の追求が可能である。血小板、肝細胞ではそれぞれThrombin, Vasopressinなどで刺激した時、細胞内Caの急激な上昇が認められるが、これらの細胞では10秒間隔の蛍光測定では誤差が大きくなり、F-4000でのプログラム使用は難しいと考えられる。そのような鋭い立上りを見せる細胞でも励起波長340nmでの単独測定をした場合、Quin2に比

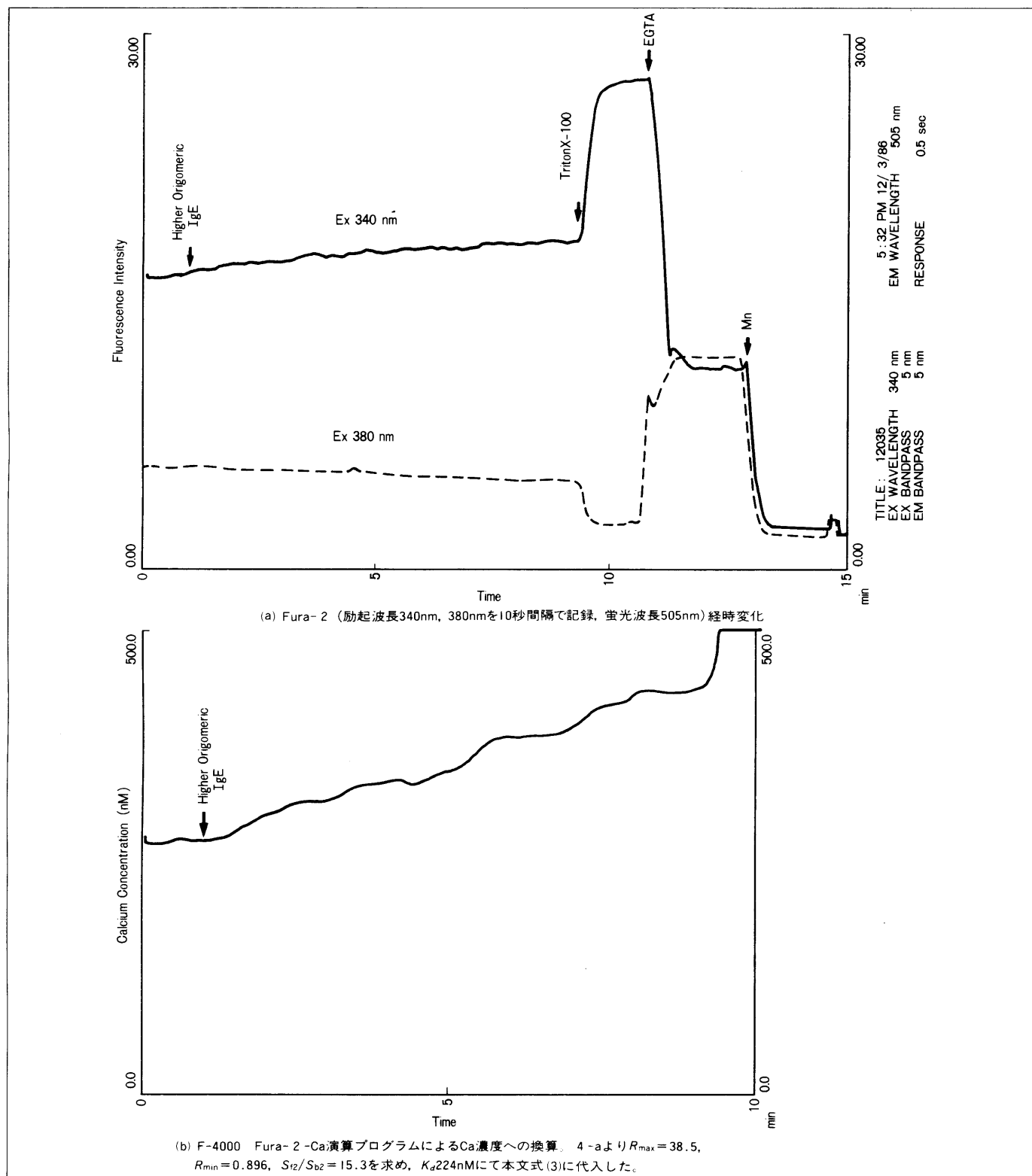


図4 2H3細胞における細胞内Caの変化II

べて緩衝作用が少なく、Caがピークに達した後、刺激前値に戻る時にTailingが少なくなることからFura-2を用いることが勧められる。Fura-2と同時に開発されたIndo-1は、励起波長を355nmに固定して蛍光波長を400nm, 483nmの2波

長を用いることにより蛍光光度の比で細胞内Ca濃度を測定できる点はFura-2と同様である。Indo-1も細胞内Ca濃度測定に応用され、特にセルソータを用いての細胞分離に利用されつつある⁹⁾。最近Lückhoffが血管内皮細胞にIndo-1・

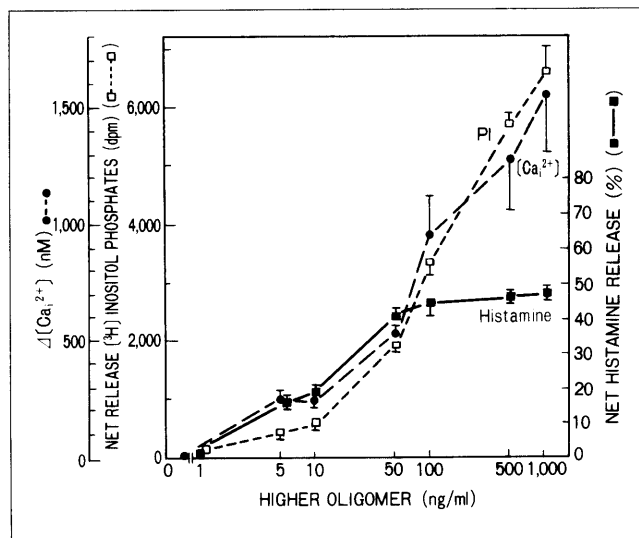


図5 2H3細胞におけるIgE重合体刺激によるイノシトールリン脂質の加水分解 (PI), 細胞内Ca変化 ($[Ca^{2+}]$) およびヒスタミン遊離反応

AMを負荷した場合に、エステル分解が不完全であるため細胞内にIndo-1-AMが一部残り、蛍光測定に影響を及ぼして正確なCa測定が行えないことを報告している¹⁰⁾。エステラーゼ活性は細胞により差があり、各々用いる細胞でのエステル分解を検討する必要がある、分解が不十分な場合は直接Indo-1を細胞内に注入する方法を考慮しなければいけないだろう。

4. 応用例

2H3細胞における細胞内Ca変化をQuin2を用いて検討した。細胞刺激にはIgE受容体凝集と細胞内Ca変化、ヒスタミン遊離を数的に比較するために、抗原刺激のかわりに直接にIgE受容体を刺激するIgE重合体を用いた (図5)。IgE単量体では反応はみられず、三量体、四量体と重合度を増すことにより細胞内Ca、イノシトールリン脂質の代謝回転、ヒスタミン遊離が増加していく。また三量体、四量体での用量反応をみると、ヒスタミン遊離と細胞内Ca反応、イノシトールリン脂質の代謝回転との間には解離が認められ、ヒスタミン遊離がプラトーに達した後も二者の反応が増加することから、最終反応であるヒスタミン遊離を起こす以上の初期シグナルが産生しているものと考えられる¹¹⁾。

さて、細胞によってCaの反応性の違いがみられるが、近年Berridgeら¹²⁾はイノシトールリン脂質の加水分解の結果生じたイノシトール1,4,5-三リン酸が細胞内小胞体からCaを動員させることを提唱し、多数の細胞系で認められている。最近イノシトールリン酸の分画にHPLCが用いられイノシトール三リン酸に異性体が存在し、活性型のイノシトール1,4,5-三リン酸はイノシトール1,3,4,5-四リン酸を経て、不活性型のイノシトール1,3,4-三リン酸になることが示された。¹³⁾ 2H3細胞ではイノシトール1,4,5-三リン酸が増加せずイノシトール1,3,4-三リン酸の増加しか認められないことから、活性型のイノシトール1,4,5-三リン酸は細胞質のキナーゼにより即座にイノシトール1,3,4,5-四リン酸に変換されて、次にフォスファターゼにより不活性型のイノシトール1,3,4-三リン酸に代謝されてしまうため、小胞体か

らCaを動員することができないのではないかと考えられる。2H3細胞ではCaの反応は外液Caに依存しており、Quin2およびFura-2でみられるCaの反応パターンが急峻な立上りを示さず、2～3分をピークとするゆっくりした反応であることが上述したイノシトールリン脂質の代謝回転の結果と合致しているものと考えられる。まだ外液からのCa流入の機構は明らかではなく、細胞内Caの動態を検討し細胞の刺激応答反応を明らかにしていくためには、これらのCa測定用プローブが有用であり、今後、単細胞をはじめとして種々の細胞・組織にさらに応用が広がるものと考えられる。また、細胞内Caの測定のみではなくpHも蛍光プローブBCECFを用いて測定されており、新しいプローブの開発により種々の細胞内セカンドメッセンジャーの測定の可能性が期待される。

5. おわりに

最後に、御討論をいただいた東北大学医学部第一薬理学教室の渡辺建彦教授に対し感謝する次第である。使用したデータの一部はN.I.HのLaboratory of chemical Pharmacology, National Heart, Lung and Blood InstituteのDr. M. A. Beaven, Arthritis and Rheumatism Branch, National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney DiseasesのDr. H. Metzger, Dr. R. J. Hohmanとの共同研究によるものである。また、F-4000のQuin2, Fura-2測定プログラムの開発には、日立製作所那珂工場光学装置設計部の越 裕之氏、東北大学医学部学生の佐々木雅幸君の御協力をいただいた。

参考文献

- 1) Tsien, R.Y. : Biochemistry 19, 2396~2404 (1980)
- 2) Beaven, M.A., Rogers, J., Moore, J.P., Hesketh, T. R., Smith, G.A. and Metcalfe, J.C. : J. Biol.Chem. 259, 7129~7136 (1984)
- 3) Hesketh, T.R., Smith, G.A., Moore, J.P., Taylor, M.V. and Metcalfe, J.C. : J.Biol.Chem.258, 4876~4882 (1983)
- 4) Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. : J. Biol.Chem.260, 3440~3450 (1985)
- 5) Poenie, M., Alderton, J., Tsien, R.Y., and Steinhardt, R.A. : Nature 315, 147~149 (1985)
- 6) Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y., and Fay, F.S. : Nature 318, 558~561 (1985)
- 7) Tsien, R.Y., and Poenie, M. : Trends in Biochem. Sciences 11, 450~455 (1986)
- 8) Tsien, R.Y., Rink, T.J., and Poenie, M. : Cell Calcium 6, 145~157 (1985)
- 9) Lazzari, K.G., Proto, P.J., and Simons, E.R. : J. Biol.Chem.261, 9710~9713 (1986)
- 10) Lückhoff, A. : Cell Calcium 7, 233~248 (1986)
- 11) Maeyama, K., Hohman, R.J., Metzger, H., and Beaven, M.A. : J.Biol.Chem.261, 2583~2592 (1986)
- 12) Berridge, M.J. : Biochem.J.212, 849~858 (1983)
- 13) Irvine, R.F., Letcher, A.J., Heslop, J.P., and Berridge, M.J. : Nature 320, 631~634 (1986)

アミノ酸分析計における各アミノ酸の定量性に関する検討

A Study on Quantitative Range of Amino Acids with the Amino Acid Analyzer

池田 水江* 青木 光夫* 新宮 平三* 浜野 吉政**

(昭和61年8月11日受理)

1. はじめに

専用のアミノ酸分析計によるアミノ酸分析は、高速化されるとともに、分析のコントロールからデータの計算に至るまでコンピュータによる自動化が進み、その信頼性も増大してきている。その結果、デジタルでプリントアウトされてくる膨大なデータは、人為的な再検討の余地もなく、日常あまり疑問視されることなく利用されがちである。さらに、定量計算の基準となる標準溶液についても、濃縮混合溶液として容易に入手することができるようになり、使用する際は、単純に希釈するのみで調製することができる。

一方、検量線については、アミノ酸分析計ではほとんどの例が一点検量線を用いており、二点検量線を用いる分析はごく限られた場合に過ぎない。それゆえ、標準溶液に近い濃度範囲の分析では、それほど問題にならないが、成分によってその量に大きな違いがある試料については、その定量値に対応する誤差を知っておかなければ、誤まった判断を下す危険性がある。そこで、著者らは、トリプトファンを含む18成分のアミノ酸混合溶液を用いて、200pmol~50nmolの濃度範囲における各アミノ酸の定量性と再現性について検討したので報告する。

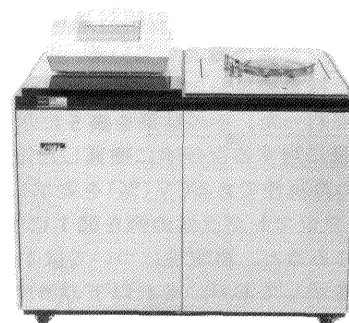
2. 実験方法

2.1 装置および分析条件

835-50形日立高速アミノ酸分析計を用い、カラムは4mmI. D. X150mmLのステンレスカラムに、日立カスタム陽イオン交換樹脂#2619Fを充填したものを使用した。分析条件は、日立の分類法による高分離分析法に従い、そのときの主なる条件、プログラム内容および溶離液組成は、それぞれ特記したもの以外表1~3に示すとおりである。

表1 分析条件

分 析 法	高 分 離 分 析 法
分 離 カ ラ ム	4mmI.D X 150mmL (#2619F) 53°C
アノモニアフィルタ	4mmI.D X 120mmL (#2650)
流 量	P ₁ 0.225ml/min (50kg/cm ²) P ₂ 0.300ml/min (15kg/cm ²)
反 応 条 件	ニンヒドリン法 温度: 98°C 反応コイル: 0.25mmI.D X 20m



835-50形日立高速アミノ酸分析計

表2 分析プログラム

No.	File	Oper	Time	No.	File	Oper	Time	No.	File	Oper	Time
1	1	1	0	6	4	2	10	11	1	2	90
2	2	11	0	7	1	3	17	12	3	53	90
3	3	53	0	8	1	4	35	13	1	1	95
4	4	1	1	9	3	60	75	14	4	2	115
5	1	2	6	10	1	6	80	15	6	2	120

表3 溶離液の組成

項 番	名 称	IPH-1	IPH-2	IPH-3	IPH-4	IPH-RG
	用 途	第 1 溶離液	第 2 溶離液	第 3 溶離液	第 4 溶離液	再生液
	Na 濃 度	0.2N	0.2N	0.2N	1.2N	0.2N
1	蒸溜水	700ml	700ml	700ml	700ml	700ml
2	クエン酸ナトリウム(2H ₂ O)	7.74g	7.74g	14.71g	26.67g	—
3	塩化ナトリウム	7.07g	7.07g	2.92g	54.35g	—
4	クエン酸(H ₂ O)	21.00g	21.00g	10.50g	6.10g	—
5	水酸化ナトリウム	—	—	—	—	8.0g
6	エチルアルコール	130ml	20ml	—	—	—
7	ベンジルアルコール	—	—	2ml	5ml	—
8	チオジグリコール	5ml	5ml	5ml	—	—
9	BRIJ-35 (a)	4ml	4ml	4ml	4ml	4ml
10	カプリル酸	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
11	全 量	1ℓ	1ℓ	1ℓ	1ℓ	1ℓ
12	公称pH	pH3.3	pH3.2	pH4.3	pH4.9	—

(a) BRIJ-35:25gを100mlの水に入れ、50°Cに加熱して溶かす。

* (株)大塚製薬工場 研究開発部 製剤研究室

** (株)日立製作所 那珂工場 応用技術センター

2.2 標準試料溶液および試薬

標準溶液は市販混合標準アミノ酸液〔宝興産(株)〕を0.02 N-HClで分析時の注入量50 μ l中のモル数に合わせて希釈して調製した。原液の組成は表4に示す。

溶離液はアミノ酸分析用〔三菱化成工業(株)〕および試薬特級グレードのものを、発色用のニンヒドリン試薬は835形用として市販されている二液形のもの〔和光純薬工業(株)〕をそれぞれ流用した。

3. 結果および考察

高分離分析法で用いる試料の絶対量は、一成分5 nmol (Proは10nmol)を標準量としている。したがって、この濃度で作成した検量線をもとに、250pmol~50nmol量のアミノ酸の定量を行った。その結果を表5に示す。同表中の上段には絶対量に対する百分率に換算した定量値を、下段にはそのときの再現性であるCV(%)を表示した。また、5 nmolにおけるクロマトグラムの例を図1に示す。

このデータからみると、再現性については1 nmol以上では良好な再現性を示しており、それ以下の濃度では数種類の

アミノ酸について予想以上のばらつきがみられる。これは、微量成分であるため、緩衝液の切換えに伴うベースラインの変動が計算時に考慮されなかったこと、および希釈液に含まれる微量アミノ酸の影響によるものと考えられる。それゆえ、定量値でみると、微量域では成分によっては2倍近い値を示す例もみられた。特に今回の実験では、検量線を作成する5 nmolを基準としているため、データ処理の計算条件を固定しており、各々の濃度に合わせて処理条件には設定していない。一方、高濃度側では、特にCysが低い値を示し、その他の成分についても低値を示す傾向にあった。これは前述の希釈液中のアミノ酸による検量線のファクター誤差によるものと、シャープなピーク即ち高濃度で溶出する成分に対する吸光度の飽和からくるものと予想される。これらの結果に基づいて得られた $\pm 3\%$ の誤差内における定量可能域を図2および図3に示す。

これらのデータをみると、一般に予想されている以上に定量可能域の狭いことが判る。したがって、測定対象に適した濃度の標準溶液を調製するのが好ましいといえる。し

表4 標準アミノ酸溶液の組成

アミノ酸	mM
L-Lysine	2.50
L-Histidine	2.50
Ammonia	2.50
L-Arginine	2.50
L-Aspartic Acid	2.50
L-Threonine	2.50
L-Serine	2.50
L-Glutamic Acid	2.50
L-Proline	5.00
Glycine	2.50
L-Alanine	2.50
L-Cystine	2.50
L-Valine	2.50
L-Methionine	2.50
L-Isoleucine	2.50
L-Leucine	2.50
L-Tyrosine	2.50
L-Phenylalanine	2.50

2.5 + 0.004mM

味の素(株) 宝興産(株)製 5mlアンフル入り

L-Tryptophanは、希釈時に加える。

表5 各アミノ酸の濃度による定量値の変動(図1のプログラムによる)

	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	15	25	35	nmol 50
ASP	182.4 4.1	148.6 3.6	118.4 1.1	103.4 0.4	100 0.6	96.2 0.3	95.1 0.4	94.1 0.6	94.7 0.6
THR	179.2 4.2	140.8 0.6	116.7 0.9	102.9 0.6	100 0.6	96.5 0.5	95.6 0.4	94.5 0.5	94.8 0.5
SER	167.6 3.3	137.6 1.4	114.8 1.0	102.7 0.4	100 0.5	96.8 0.5	95.8 0.5	94.6 0.5	94.6 0.5
GLU	126.3 2.3	119.8 0.6	105.6 0.8	100.3 0.3	100 0.6	98.3 0.5	97.8 0.4	97.1 0.4	98.0 0.6
GLY	104.2 1.9	111.2 1.9	101.3 0.6	98.9 0.1	100 0.5	99.1 0.6	99.0 0.4	98.5 0.6	100.0 0.7
ALA	41.5 40.2	81.0 33.8	98.9 1.6	98.1 0.2	100 0.3	99.8 0.4	99.7 0.4	99.3 0.6	100.9 0.6
CYS	190.4 1.4	146.0 0.8	118.1 0.9	103.7 0.1	100 0.5	95.4 0.4	92.8 0.4	89.9 0.5	84.8 0.3
VAL	142.9 0.6	125.4 2.7	110.2 0.6	102.3 0.3	100 0.6	97.5 0.4	96.2 0.4	94.8 0.6	94.1 0.5
MET	151.4 1.8	125.8 3.9	111.5 1.3	103.3 1.9	100 0.7	96.5 0.4	95.6 0.4	94.6 0.5	95.1 0.5
ILE	162.3 3.3	133.5 5.3	114.2 0.9	103.1 0.7	100 0.6	97.2 0.4	96.5 0.4	95.7 0.5	96.7 0.6
LEU	153.3 5.7	128.9 3.3	113.3 0.2	102.8 0.2	100 0.4	97.4 0.5	96.7 0.4	96.0 0.6	97.2 0.6
TYR	142.1 36.4	147.1 6.4	121.9 1.0	105.3 0.6	100 0.6	95.2 0.4	94.1 0.4	93.3 0.5	94.5 0.6
PHE	111.7 64.6	165.9 4.8	133.1 1.1	106.7 0.9	100 0.4	94.5 0.5	93.1 0.5	92.3 0.6	93.4 0.5
LYS	170.0 3.6	131.8 3.7	114.5 2.2	103.2 0.5	100 0.6	96.7 0.5	95.7 0.3	94.6 0.6	94.5 0.5
HIS	205.7 9.8	159.4 7.0	125.7 2.2	105.1 0.9	100 0.7	95.2 0.5	94.1 0.6	93.2 0.6	94.0 0.7
TRP			115.5 23.5	107.6 0.8	100 1.2	93.0 0.5	91.5 0.4	90.6 0.6	91.4 0.7
ARG	130.6 29.1	129.0 5.0	109.7 1.2	100.0 0.3	100 0.6	98.3 0.4	98.0 0.5	97.5 0.6	98.8 0.6
PRO	86.4 7.4	96.4 5.6	96.7 2.9	97.7 0.8	100 1.1	102.0 0.4	102.5 0.3	102.9 0.6	105.1 0.6

注：単位(%)、上段は面積より算出した定量値、下段は面積の再現性(CV値)である。N=5

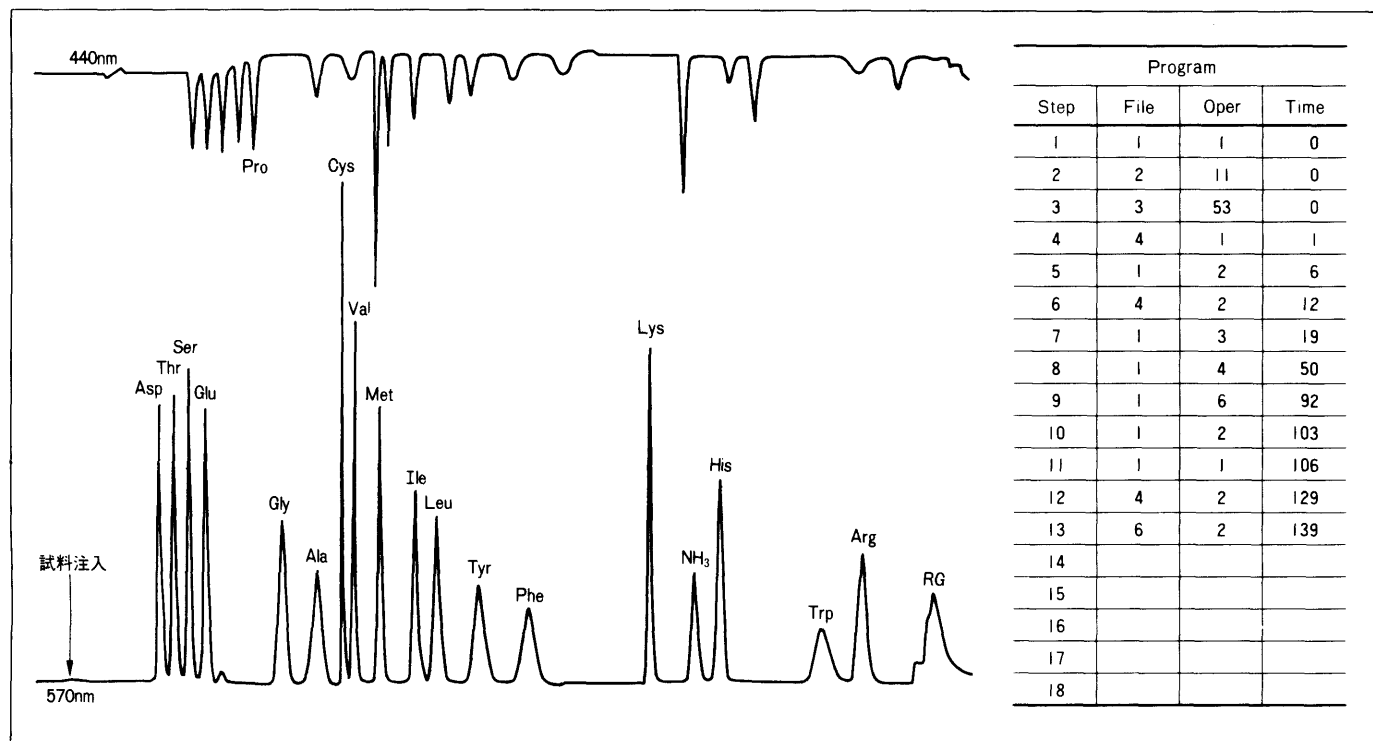


図1 標準アミノ酸溶液 (5 nmol) の分析クロマトグラム

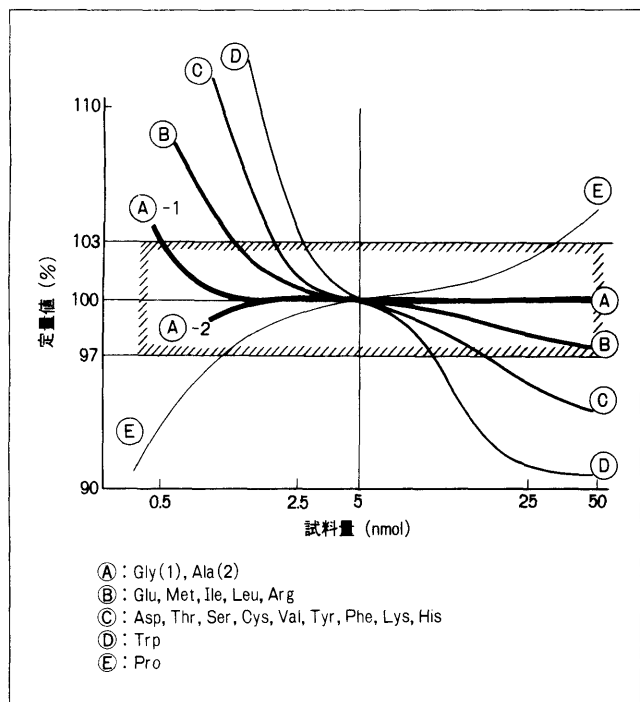


図2 各アミノ酸の濃度による定量値の変動

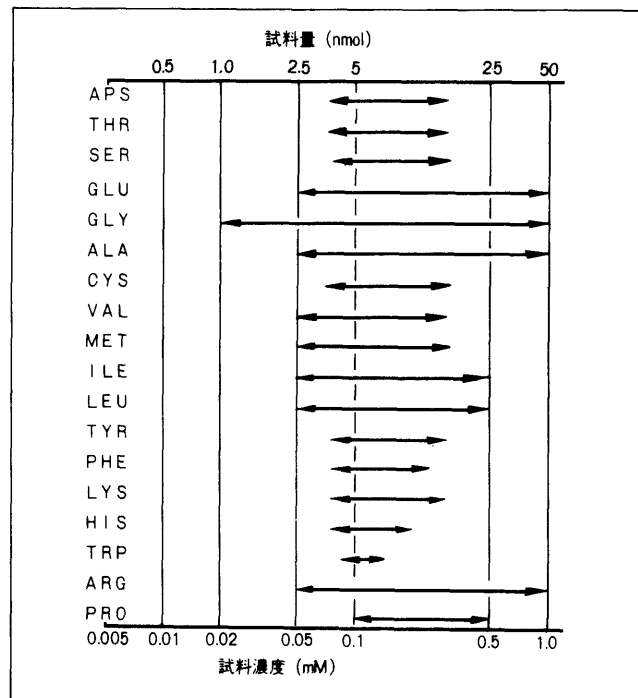


図3 各アミノ酸の定量範囲

かしながら、試料中の成分濃度はあらかじめ予測できるものではない。そこで、前述の原因の一つと考えられる希釈液中のアミノ酸を除去*し、かつ定量可能域の最も狭いTrpのピーク形状改善を目的としてTrp溶出位置付近のカラム

温度を上げた場合について、同様の測定を行った。それらの結果を表6に示す。この場合もデータ処理条件は、標準溶液に対する通常の設定値に固定した。また、変動パターンが大きく4種に分けられることが判ったため、その傾向

* 市販の希釈液中には100~200pmolのアミノ酸が不純物として含まれていることがあり、陽イオン交換樹脂処理をすることによりこれらは除去できる。

表6 各アミノ酸の濃度における定量値の変動(2)
(脱アミノ酸希釈液使用・Trpピーク形状改善)

	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50
	nmol							
Asp	109.5 2.9	102.8 3.2	97.0 2.7	99.0 0.6	100.0 0.2	101.0 0.7	99.5 1.5	99.6 1.4
Thr	99.0 7.2	98.8 4.8	98.0 1.4	99.5 0.5	100.0 0.2	101.0 0.6	99.5 1.4	98.8 1.3
Ser	93.5 4.1	96.4 3.3	97.0 1.4	99.0 1.1	100.0 0.5	100.0 0.6	99.0 1.6	98.2 1.2
Glu	88.0 1.7	95.4 1.1	97.0 1.6	100.0 1.7	100.0 0.3	101.0 0.6	99.5 1.7	99.6 1.4
Gly	90.0 1.0	92.4 1.3	95.0 0.9	97.5 0.4	100.0 0.3	100.0 0.7	99.5 0.9	100.0 1.3
Ala	93.0 2.8	94.4 1.4	96.0 1.0	99.0 1.0	100.0 0.4	100.0 0.7	99.0 0.8	99.2 1.3
Cys	133.5 1.1	109.4 1.6	102.0 1.3	100.5 0.3	100.0 0.3	97.0 0.8	94.0 0.9	73.8 0.6
Val	144.5 2.8	115.0 2.2	104.0 2.0	101.5 0.3	100.0 0.2	98.0 0.9	96.0 1.0	90.2 0.7
Met	123.0 1.1	105.8 1.5	99.9 1.1	98.5 0.3	100.0 0.3	98.0 0.8	96.0 0.6	95.4 1.3
Ile	95.0 1.4	95.0 1.5	95.0 1.3	97.5 0.8	100.0 0.4	101.0 0.8	100.5 0.6	101.2 1.4
Leu	98.5 1.5	94.2 2.5	96.0 1.4	98.0 0.7	100.0 0.3	102.0 1.0	101.5 0.8	103.2 1.4
Tyr	143.0 2.6	112.0 2.4	103.0 1.3	101.5 0.6	100.0 0.3	101.0 0.8	100.0 0.8	100.4 1.5
Phe	118.0 0.7	104.4 2.6	100.0 1.2	100.0 0.7	100.0 0.3	101.0 0.7	100.0 0.8	100.8 1.4
Lys	93.0 0.9	95.2 1.1	97.0 1.0	98.5 0.6	100.0 0.3	101.0 0.8	95.0 0.8	97.6 1.2
His	91.5 2.8	94.2 1.3	96.0 1.1	98.5 0.7	100.0 0.2	101.0 1.5	100.0 1.1	100.0 1.5
Trp	79.5 3.3	70.1 1.2	86.8 1.6	95.2 0.5	100.0 0.5	101.8 0.7	99.6 0.5	160.1 1.5
Arg	88.5 1.9	91.8 1.4	94.0 1.1	97.5 0.5	100.0 0.2	101.0 0.9	100.0 0.9	101.4 1.4
Pro	87.5 4.7	88.8 3.2	90.5 3.0	98.0 6.5	100.0 0.4	101.5 0.7	101.3 0.9	101.9 1.4

単位: % 上段: 面積から算出した定量値 N=5,
下段: 面積の再現性(CV値)

表7 各アミノ酸の濃度における定量値の変動(高さより計算)
(脱アミノ酸希釈液使用)

	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50
	nmol							
Asp	98.5 1.2	98.0 0.4	96.2 1.9	99.5 1.5	100 0.6	101.3 0.9	98.5 0.7	95.0 1.2
Thr	95.5 2.2	104.0 0.3	95.9 2.1	99.0 1.3	100 1.0	101.7 0.9	100.5 0.7	99.6 1.4
Ser	93.0 1.4	95.0 0.7	94.6 1.8	97.5 1.3	100 0.4	101.6 0.8	101.5 0.7	100.6 1.1
Glu	92.0 0.3	95.4 0.7	95.2 1.8	98.0 1.3	100 0.7	101.2 0.9	100.0 0.7	98.4 1.4
Gly	102.5 0.5	104.8 3.9	103.6 1.1	103.5 1.3	100 4.3	106.6 2.2	95.5 4.3	96.2 3.4
Ala	96.5 1.4	97.4 0.6	96.3 1.4	99.0 0.9	100 0.3	101.4 1.2	101.5 1.2	102.2 1.3
Cys	113.0 0.4	84.0 0.3	96.8 2.2	99.0 1.7	100 0.7	99.0 1.1	96.5 0.9	62.6 0.0
Val	106.5 0.6	100.4 0.4	97.0 2.1	99.0 1.3	100 0.7	100.2 1.2	99.0 0.8	88.4 0.0
Met	101.0 0.1	97.8 0.4	96.1 1.6	98.0 1.0	100 0.8	100.4 0.9	99.0 0.7	99.8 1.3
Ile	94.0 0.5	95.0 0.5	95.1 1.6	97.5 1.1	100 1.0	100.9 0.8	99.5 0.7	98.8 1.4
Leu	102.0 2.2	95.0 2.1	97.1 1.7	102.0 2.5	100 0.8	84.1 2.2	88.0 2.5	87.4 1.5
Tyr	107.5 0.6	100.2 0.2	96.8 2.2	99.0 1.3	100 0.4	100.5 0.9	100.0 0.6	100.4 1.5
Phe	102.0 0.4	98.4 0.2	96.3 2.0	98.5 1.3	100 0.6	100.4 0.9	99.5 0.8	99.8 1.2
Lys	92.5 0.6	95.2 0.2	95.5 1.2	98.5 1.1	100 0.5	100.3 0.9	99.5 0.7	98.0 0.0
His	92.5 1.0	95.4 0.2	95.8 1.2	98.5 1.1	100 0.6	100.4 1.1	99.0 0.6	99.2 1.3
Trp	87.0 2.8	80.8 0.3	89.6 1.3	96.5 1.9	100 0.4	101.1 0.7	100.5 0.8	161.4 1.4
Arg	92.0 1.0	94.4 0.2	95.5 1.4	98.5 1.2	100 0.5	99.7 0.9	97.5 0.8	95.4 1.4
Pro	95.5 1.8	96.2 0.9	95.0 3.3	99.5 2.0	100 3.9	103.5 1.3	101.0 1.3	98.2 1.8

単位: % 上段: 高さから算出した定量値 N=5,
下段: 高さの再現性(CV値)

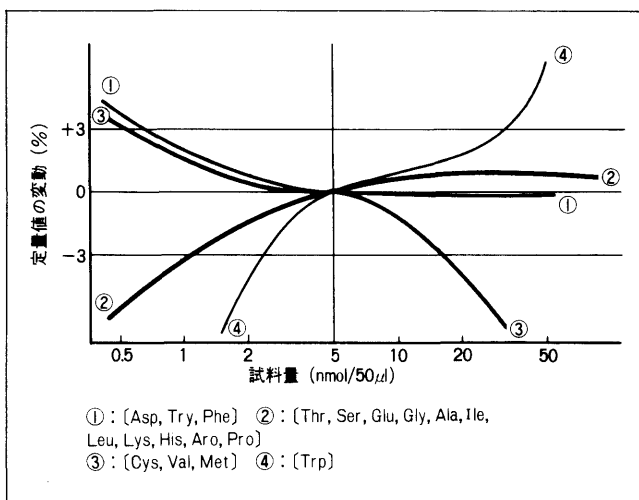


図4 各アミノ酸の定量値の変動(2) (脱アミノ酸希釈液使用・Trpピーク形状改善)

を図4に、個々の成分に対する詳細な範囲を図5に示す。このように、サンプルの希釈液に注意を払うことにより、定量範囲はより広くなることが判る。また、このときの再現性を図6に示す。いずれの測定結果においても、再現性は広い範囲で良好であり、このことより、分析計自体は良好な安定性を有しているものといえる。したがって、定量値の誤差については、データ処理上でのベースラインの判定基準が影響してくるものと考えられる。そこでピーク高さで算出した結果をまとめたところ、表7に示す値が得られた。これから判断すると、ベースライン変動が大きいためけたを覆くような形状の場合は、中間点の高さのみで判定する結果、微量試料については、より正確度が増すものとする。一方、スケールアウトするようなCysでは、高さが飽和して、より小さな値を得ることになる。なお、これらの測定結果のクロマトグラムの例を図7および図8に示す。

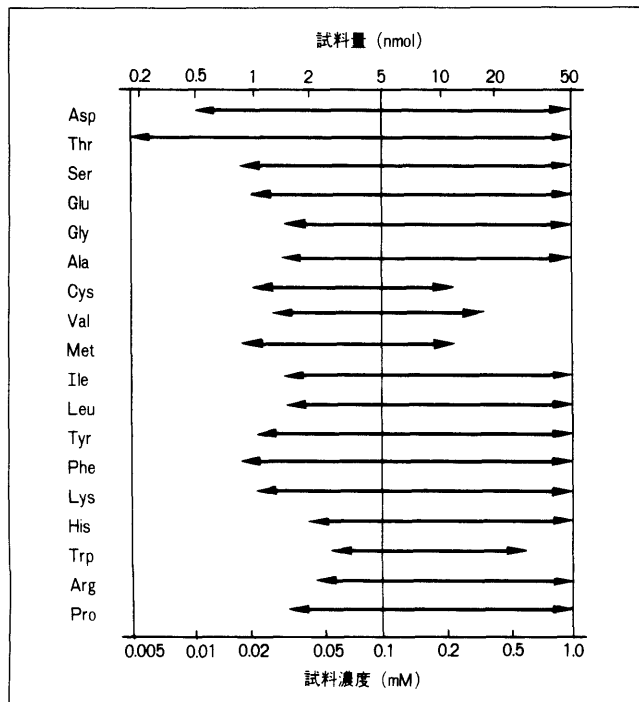


図5 各アミノ酸の定量範囲 (2) (脱アミノ酸希釈液使用 $\pm 3\%$)

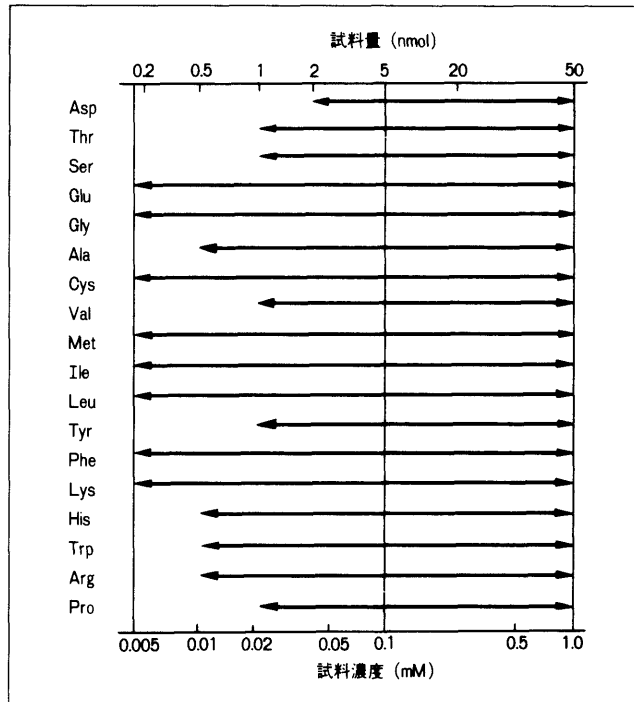


図6 各アミノ酸の再現性の良い範囲 (脱アミノ酸希釈液使用 CV $\pm 1.5\%$ 以下)

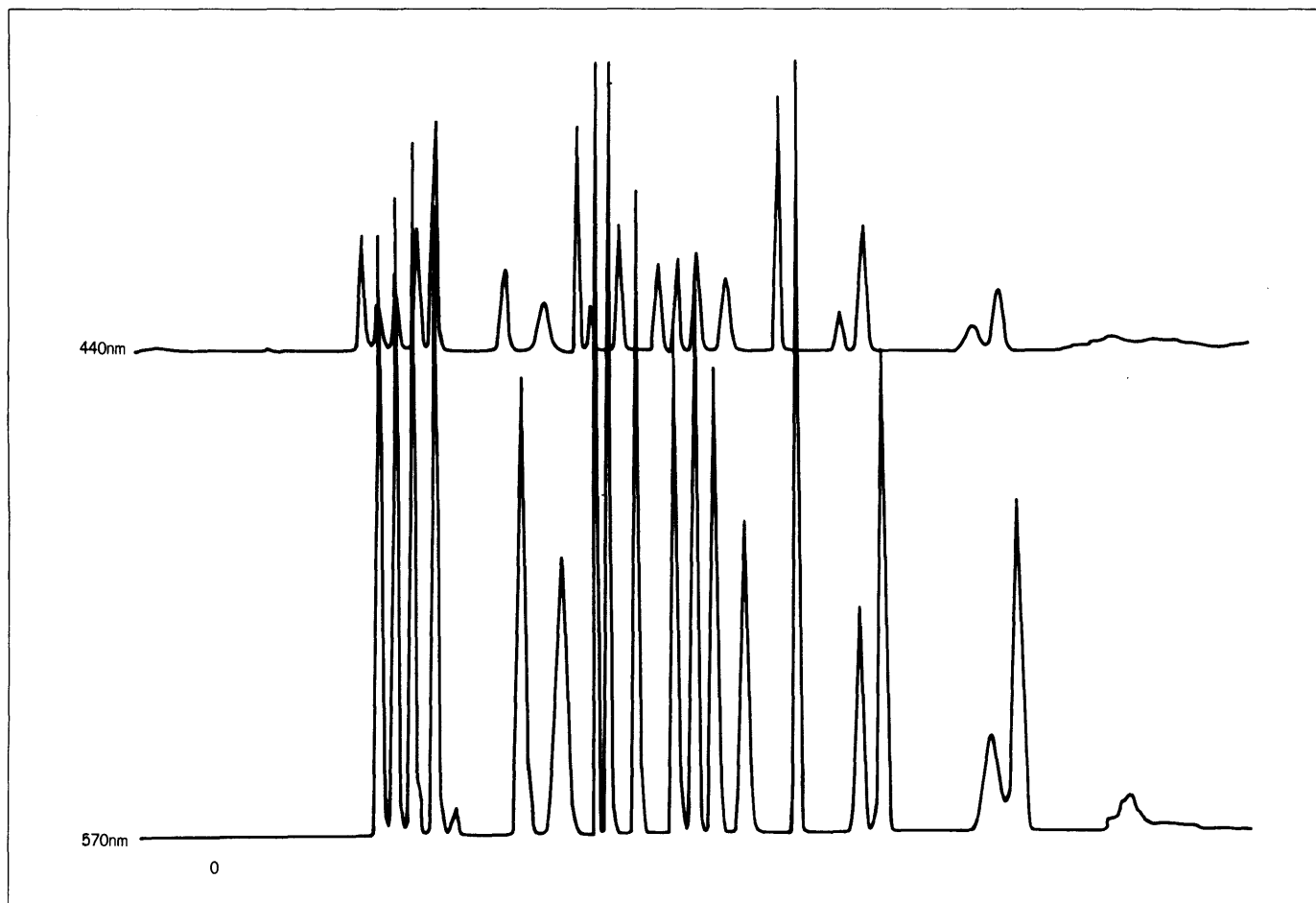


図7 標準アミノ酸溶液のクロマトグラム (サンプル 20nmol/50 μ l, 感度1.0 A.U.F.S 表2のプログラムによる)

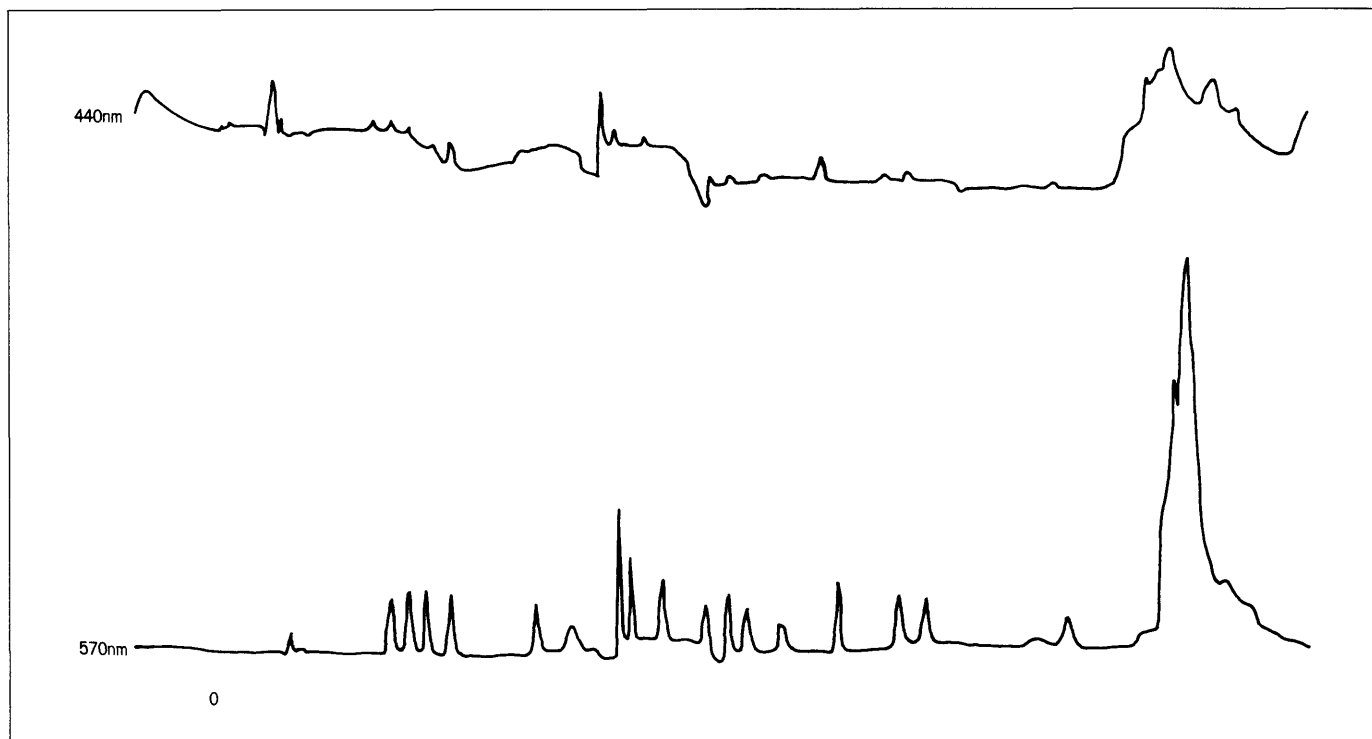


図8 標準アミノ酸溶液のクロマトグラム (サンプル 200pmol/50μl, 感度 0.1 A.U.F.S 表2のプログラムによる)

4. おわりに

アミノ酸分析計を用いるアミノ酸の分析は広く普及しているものの、その再現性や直線性についての報告は特定の濃度や成分についてのみであり、全成分について公表されたものがない。通常の定量は一点検量線法であり、それに伴う定量値については、今回の検討結果から次のような傾向にあることが明らかになった。

- (1) 自動分析のため再現性は広範囲にわたって良好である。
- (2) 定量値は成分により、その定量範囲が大きく異なる。

- (3) 希釈液中の微量アミノ酸が低濃度側での定量範囲に影響を及ぼすことがある。
- (4) 含有量の多いアミノ酸については、検出器の定量可能な吸光度範囲を越えないように希釈する必要がある。シャープなピークでは量的に多いわけではないために気付かないことが多い。
- (5) 微量成分の定量については、ベースラインのとり方により、誤差に大きく影響するため、計算条件としてのパラメータ設定は微量成分に合わせたほうがよい。

Topics

第15回医学・生物学のための走査電顕シンポジウム開催さる

昭和61年11月9日～11日の3日間にわたり、新潟県南魚沼郡六日町において、上記学会が開催された。本学会は、走査電子顕微鏡（以下、SEMと言う。）の黎明期である昭和47年に発足した後、

15年間にわたってSEMの発展に貢献してきたが、発足以来合宿形式で行われてきたことや、医学・生物学関係の研究者のみならず、理工系の研究者ならびに装置メーカーが一堂に会して議論を尽す機会が設けられてきたなど非常にユニークな学会として知られている。

今回は参加者が約100人で、33件の講演発表が行われたが、これらの講演内容から医生物分野におけるSEM研究が二つのテーマに向けて着実に前進していることが感じられた。その一つは超高分解能SEMに対する装置および観察技術双方からのアプローチであり、特に超高分解領域での像の忠実度、コントラスト、SN比などに検討を加えたい

くつかの興味ある報告がなされた。

もう一つは、SEM実用化以来継続したテーマである臨床医学へのSEM応用の試みであり、今回はいくつかの試料作製法や観察法が紹介された。しかし、臨床診断への具体的な応用例の報告はなく、実用化への道程はまだ遠いものと思われるが、今後の成果に是非着目したいテーマである。

近年の傾向として、薬品、食品、化学製品メーカーなどの研究者の参加が増加してきており、今後ますます盛会になることが予想される。

(山田 満彦 記)

解 説

日立LC/MSシステムとその応用

Hitachi LC/MS System and It's Applications

高橋 貞夫* 加藤 義昭* 広瀬 博* 沼尻 陽子* 神原 秀記** 坂入 実**

(昭和62年1月19日受理)

1. はじめに

生体関連物質など複雑な混合系の分離、分析に偉力を発揮している高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と有機化合物の高感度測定が可能で、かつ構造情報の豊かな質量分析 (マスマススペクトロスコピー、MS) のオンラインによる直結システムは、生化学、医学、薬学をはじめ多くの分野から、その完成が渴望されてきた。今日まで、内外の多くの研究者、メーカーから種々の原理に基づくインターフェースを用いたLC/MS直結システムが発表、供給されてきた。これらは年ごとに改良が加えられ、応用例もかなり多く見られるようになってきたが、Thermospray法を除き一般的に普及したものは少ないようである¹⁾。これは、いずれの手法とも長期的な安定性、持続性に欠けることが大きな問題点であった。筆者らも大気圧イオン化 (API) を利用したLC/MSインターフェース (LCAPI) を開発し、基礎的な研究を推進してきた^{2)~5)}。この成果として、長時間安定に作動し、かつ広範な応用の期待できるLC/MSを製品化することができた。ここにLCAPIの構成、基本的特性、応用例などについて紹介する。

2. LCAPIの構成と原理

図1にM-80LCAPI形質量分析計の外観を、また、図2にはLCAPIイオン源部の外観図を示す。このM-80LCAPI装

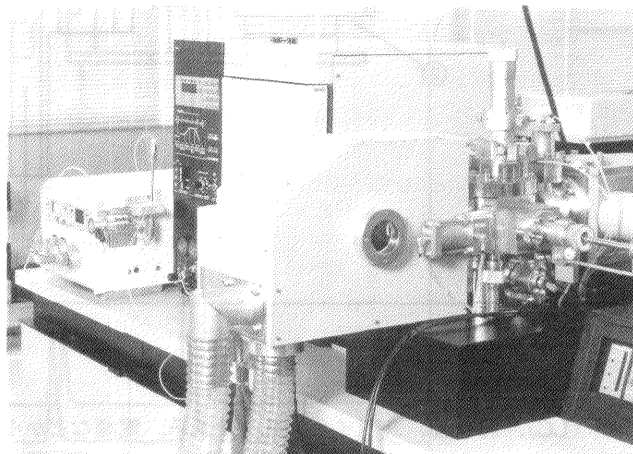


図2 APIイオン源外観図

置はLC/MS測定のほかGC/MSとして作動させることができ、通常のMSの測定と共用が可能なが特長である。

図3にLCAPIの模式図を示す。LCAPIは液体クロマトグ

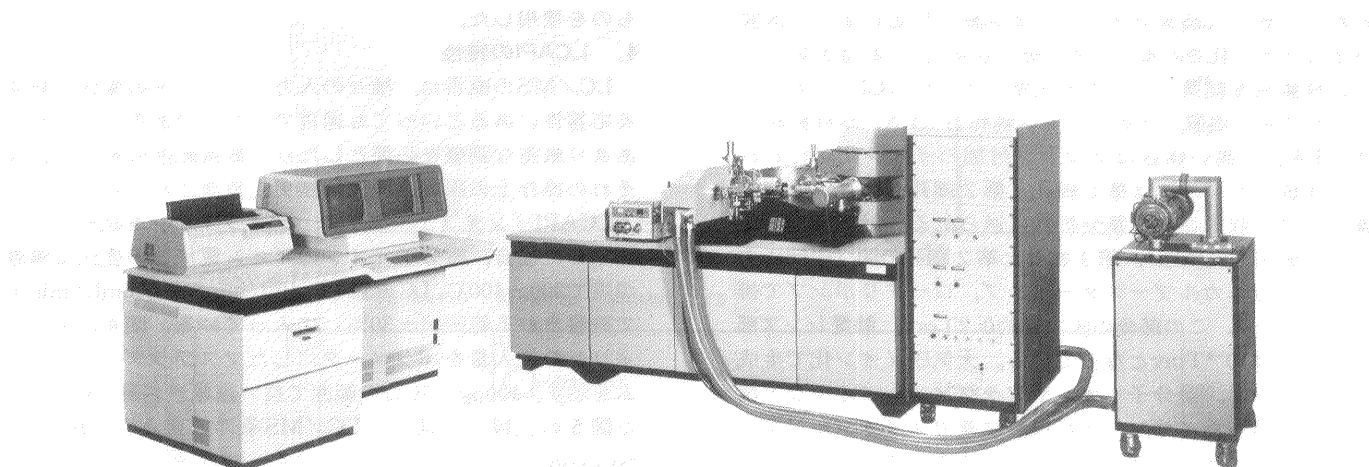


図1 LCAPI質量分析計の外観図

* ㈱日立製作所 那珂工場
** ㈱日立製作所 基礎研究所

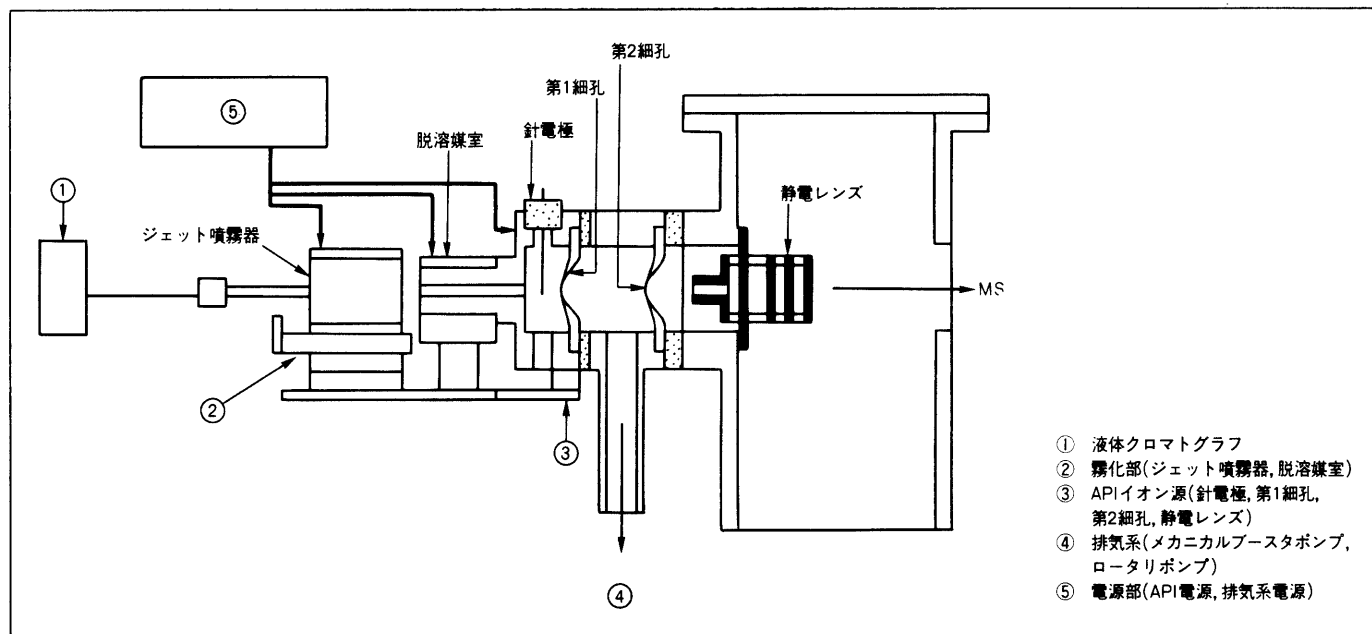


図3 LC-APIの模式図

ラフ (LC), 霧化部, APIイオン源, 排気系, 電源などから構成される。LCから溶出した成分はテフロンパイプを通じてジェット噴霧器に達し, ここで300~400℃に加熱されて霧となって脱溶媒室内に噴霧される。噴霧された霧は, 溶質分子と移動相の分子が水素結合などで結びついたもので, この移動相分子は脱溶媒室の加熱で気化される。溶質の分子は一般に熱に弱い分子が多いとされているが, 加えられた熱の大部分は移動相の気化熱として奪われるため安定な気化が得られる (これをBlanket効果と呼ぶ)。気化した溶質分子は針電極部に達し, この針電極に印加された高電圧 (10kV) によるコロナ放電により溶媒の一次イオン化が行われる。続いて溶質分子とのイオン分子反応により, 溶質分子はイオン化される (イオン分子反応)。これは大気圧下での移動相を試薬ガスとする化学イオン化 (CI) と考えることができ, 溶質分子のプロトン親和力 (PA) が移動相分子のPAより高い場合はプロトン付加のイオン化が行われる。生成したイオンは第1細孔と第2細孔を通り, 更に静電レンズで収束され質量分析計に送られる。針電極部の圧力は1気圧 (大気圧), 第1細孔と第2細孔の間 (中間圧力部) はメカニカルブースターポンプ, ロータリポンプで排気されており, この部分の圧力は約0.2Torr, 静電レンズ部の真空度は 10^{-5} Torrとなっている。大気圧イオン化で生成するイオンは, 擬分子イオンやフラグメントイオンなど構造情報を持ったイオンのほかに, 試薬ガスイオンが付加したクラスタイオンなどがある。これらクラスタイオンはマススペクトルを複雑にするだけでなく, 解析を困難にする。このクラスタイオンは第1細孔と第2細孔両電極間に電圧 (ドリフト電圧) を印加することで取り除くことができる。これは両細孔間に印加された電圧により, ドリフト電界が形成されるとクラスタイオンは電界方向にドリフトし, 中性分子に追突する。このため, ドリフト電圧を制御するこ

とでクラスタイオンを少なくすることができる。更に過剰のエネルギーで衝突をさせると, C-C, C-O結合までも切断することができ (Collision Activation), 構造情報豊かなマススペクトルを得ることができる。

3. 実験

LCは日立655A形液体クロマトグラフにグラジエント測定のためL-5000形LCコントローラを付加した。更に, LCカラムから溶出してくる成分をLC/MSとは独立にモニタするために, 655A-21形UVモニタを用いた。使用したカラムは日立ゲル # 3056ODSで, 4mm×150mm, 4mm×250mmのものを用いた。移動相や溶媒などはすべてLCグレードなものを使用した。

4. LC-APIの特性

LC/MSの成否は, 種々の入力パラメータの変化に対する応答性にあるといっても過言ではないであろう。それは, あまり厳密な調整を必要としたり, 最適範囲の狭い方式は, その操作上の困難さゆえに歴史上放棄されてきている。本LC-APIインタフェースでは, テオフィリンを試料として測定した場合, 擬分子イオンのイオン電流値の変化は噴霧温度で300~400℃, LC流量で0.4ml/minから1.6ml/minまで許容される範囲 (±30%) に入っている。図4にテオフィリンの注入量をパラメータにしたマスフラグメントグラムを示す。100pg~50ngの範囲で良い直線性が得られた。また図5の上段には通常のLC/MS条件で得られたPhenylbutazoneのマススペクトルを示す。擬分子イオンが基準ピークとなり, フラグメントイオンはほとんど見えない。下段はドリフト電圧を170Vに設定して得たLC/MSマススペクトルで, 多くのフラグメントイオンを与えている。このようにLC-API法はLCから流入する成分を連続的にソフトイオン化し, 分子量情報を与えるとともに分子構造情報をも与えることができる。

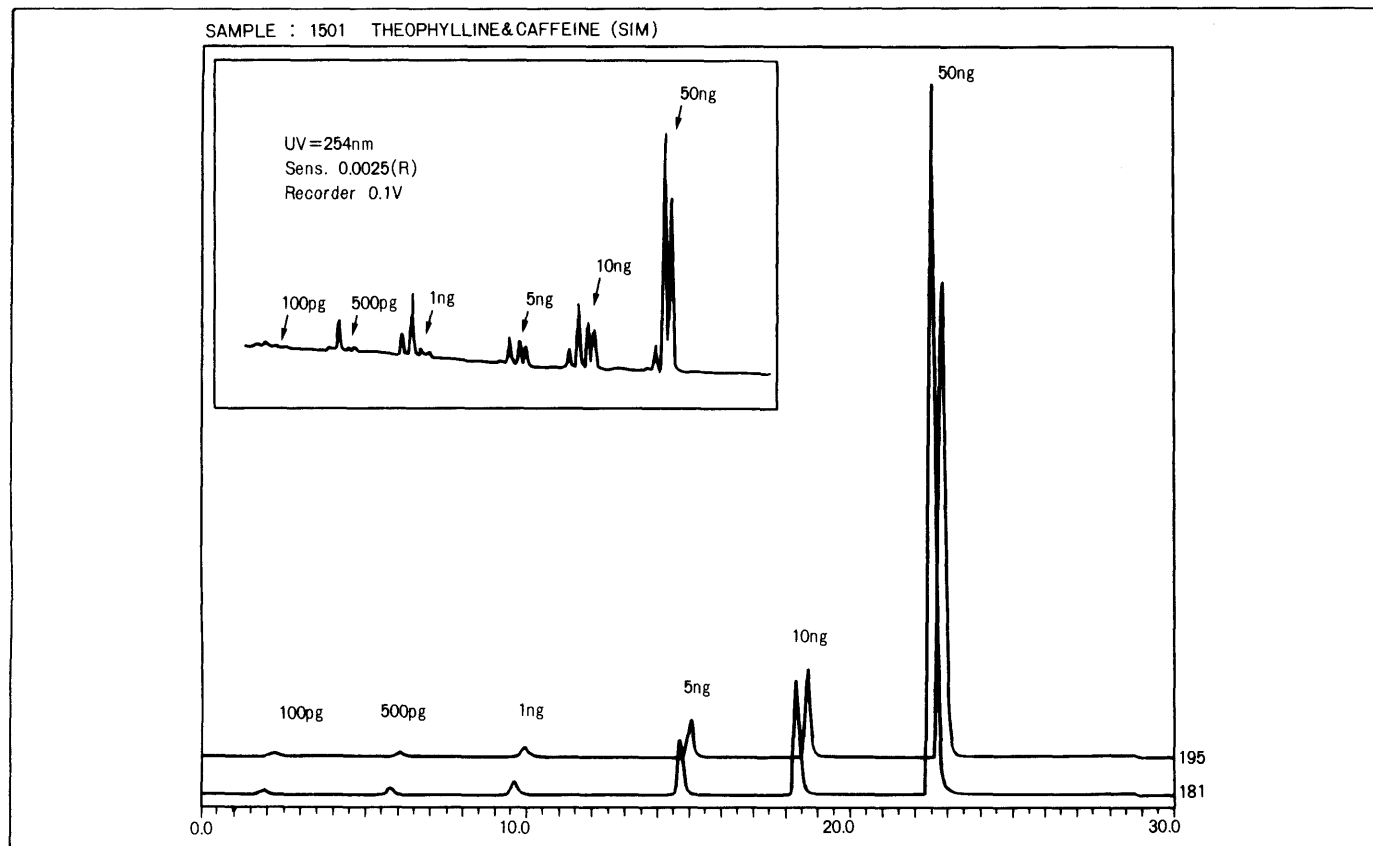


図4 LC/MSの感度の直線性

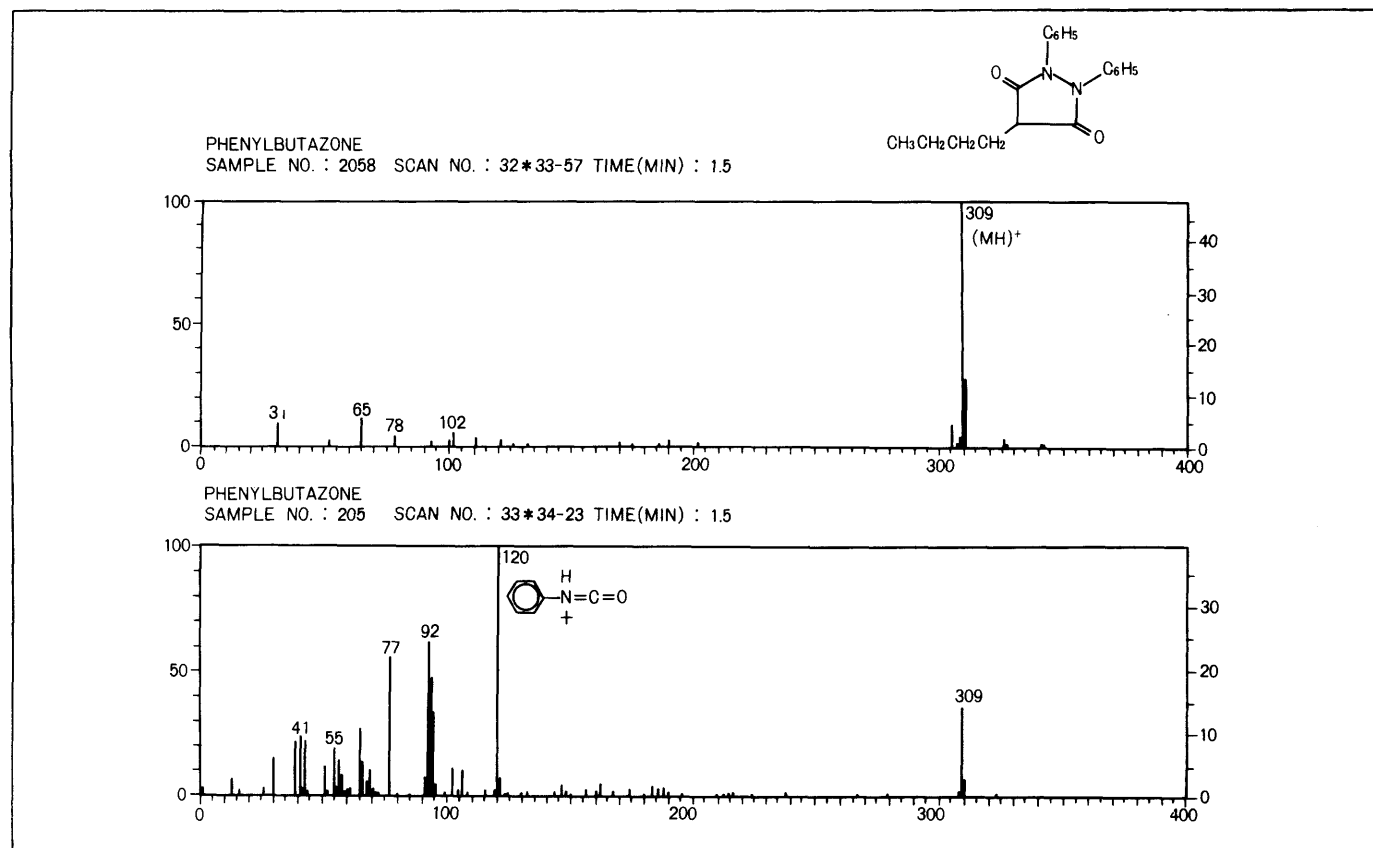


図5 ドリフト電圧の変更によるフェニルブタゾン マススペクトルの変化 上段80V, 下段170V

5. 応用例

(1) 胆汁酸

胆汁酸のLC/MSの試みはDLICI法やLCFAB法などでも試みられた。両方式ともに良好なクロマトグラムを与えたのに対し、マススペクトルでは分子量を示す擬分子イオンの強度が極めて低かったと言える。ソフトイオン化の代表であるCI法やFAB法でも、ステロイドの骨格についた水酸基の脱水を防ぐことはできなかった。LCAPI法では0.1M酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリルを移動相に用いることにより $(M+NH_4)^+$ イオンを基準ピーク又はそれに準ずる強度のピークとして得ることができた(図6)。

(2) スピラマイシン

グラム陽性菌及びリケッチャ類に有効な抗生物質スピラマイシンには、I, II, IIIの化合物を知られている。試料をメタノールに溶解し0.1M酢酸アンモニウム55%, CH_3CN 40%, CH_3OH 5%の移動相で測定を行った。UVモニタの波長は230nmでTICのクロマトと良く一致している。マススペク

トルは、いずれも $(M+H)^+$ イオンが基準ピーク又はそれに続く強度を与えている。また擬分子イオンから糖基1個及び2個の脱離したピークが明りょうに出現している。マススペクトルは構造情報が豊かなことがよく分かる。(図7)

(3) アミグダリン、フェニルグルコシド

ウメやモモの種の仁中に存在するCyanogenic glycosideとして知られているアミグダリンと試薬として市販されているフェニルグルコシドを混合し測定した。この両者は簡単に分離することができ、またマススペクトルも $(M+NH_4)^+$ イオンが基準ピークとなっている。アミグダリンはSIMSでも測定されたが⁷⁾、アミグダリンとマトリックスのグリセロールの結合したクラスタイオンが擬分子イオンより高質量領域に出現し解析を著しく困難にしたのに対し、LCAPIスペクトルは極めて単純なスペクトルとなっている(図8)。

6. 最後に

LC/API/MSは以下のような特長を有している。

(1) 安定に作動する。長時間、比較的手がかからず安定に

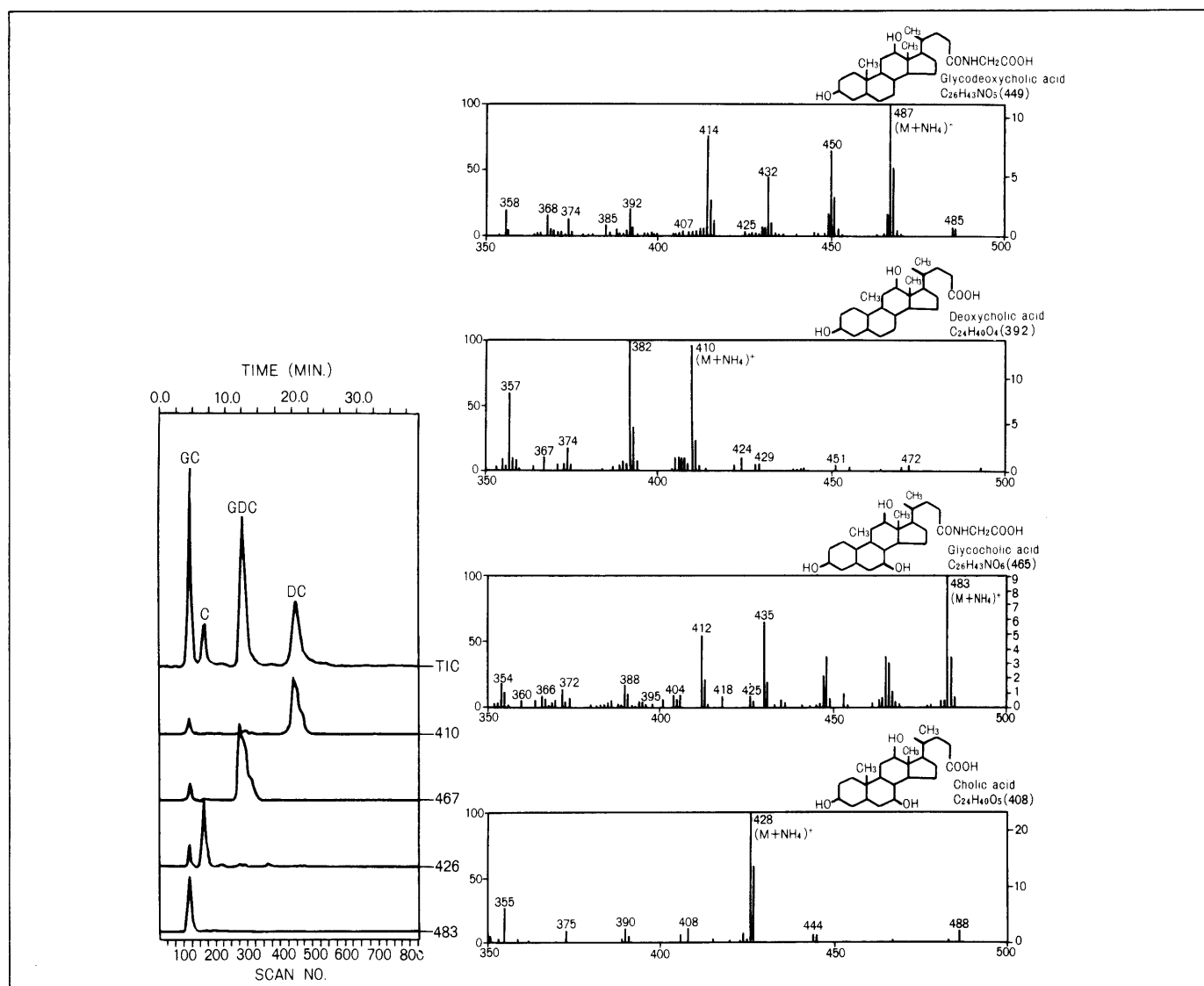


図6 胆汁酸のLC/MS

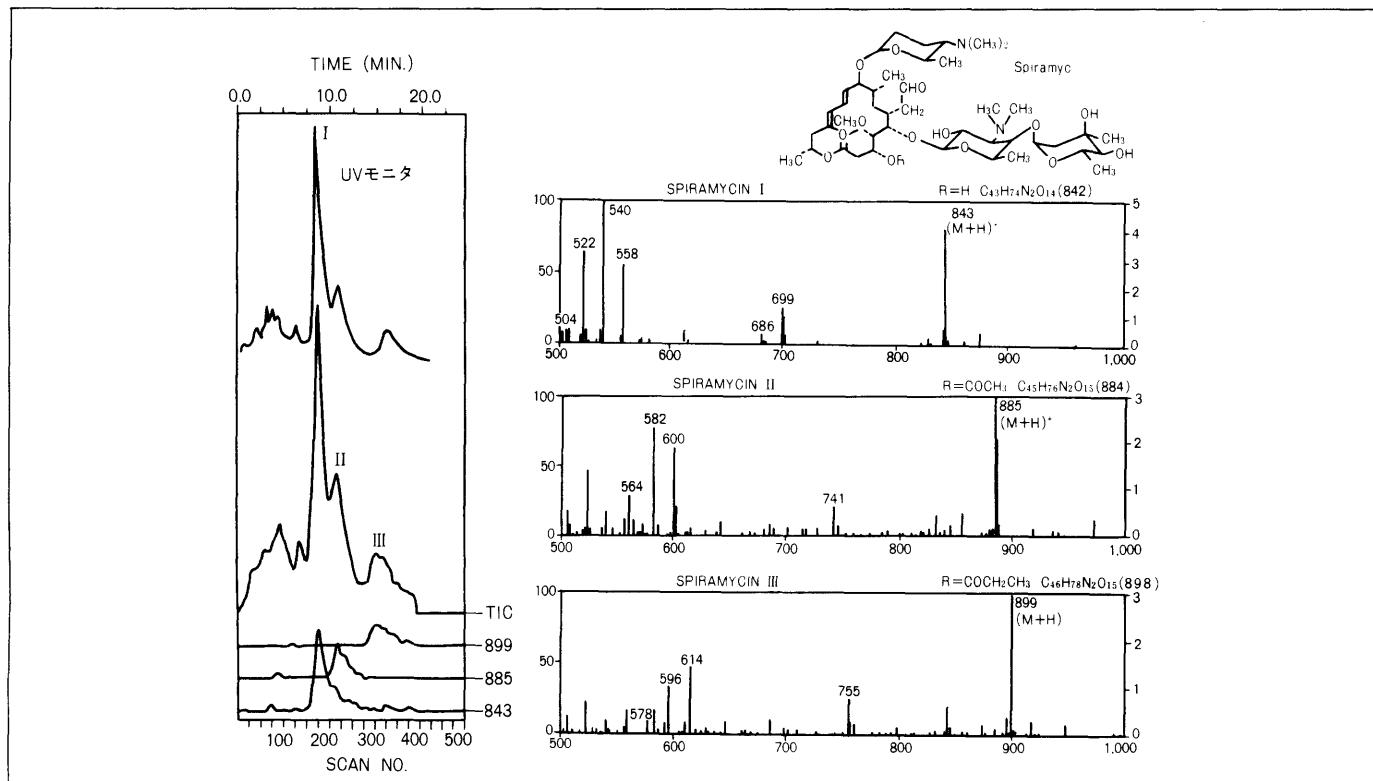


図7 スピラマイシンのLC/MS

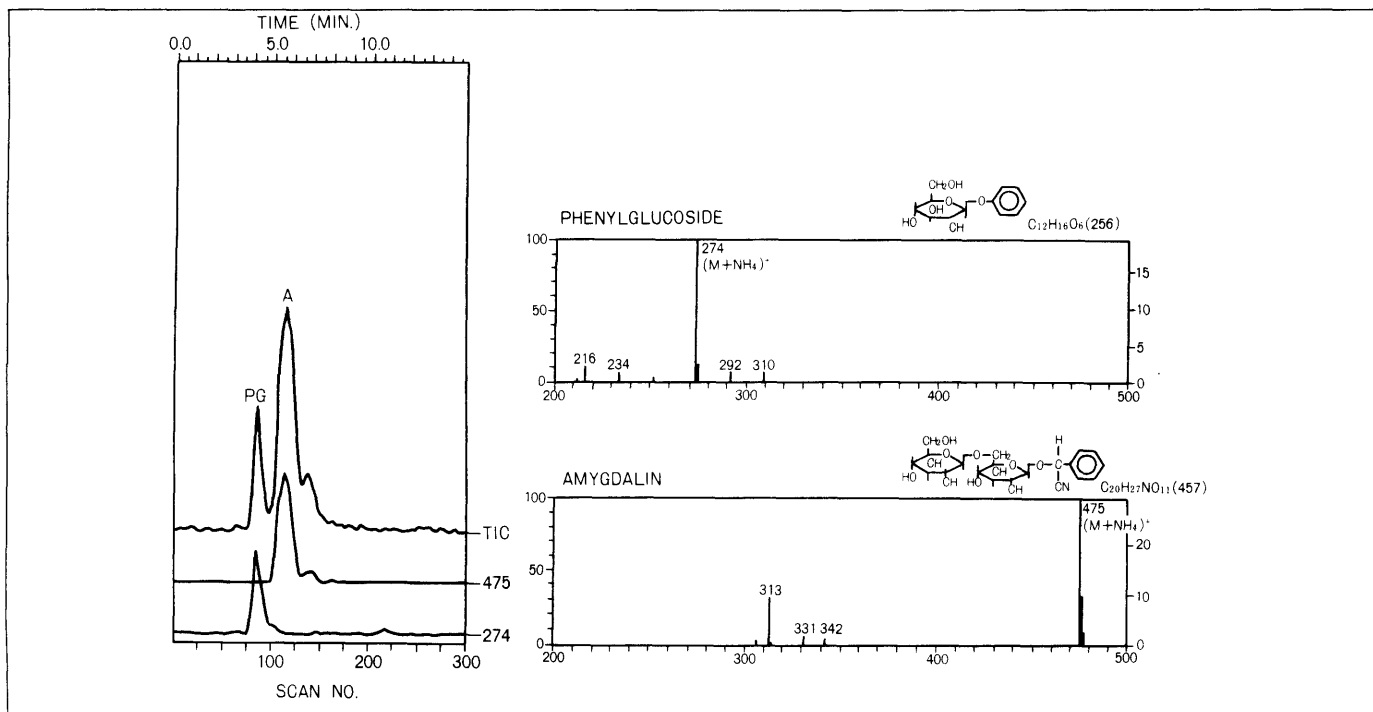


図8 アミグダリン、フェニルグルコシドのLC/MS

作動する。

(2) スペクトルが単純。大気圧CI法によるソフトイオン化により分子量、構造情報に富んだスペクトルを与える。

(3) 安定同位体を用いたLC定量の道が開けた。安定同位体

ラベル化合物を用いてSIM (Selected Ion Monitoring) を行えば、LC単独では不可能であった定量測定が可能となる。

他にも種々特長点はあるが、製品化から年も若く応用面

の検討についても今後に残されたものは種々あると思われる。多くの研究者の方々の御指導、御検討をお願いする次第である。

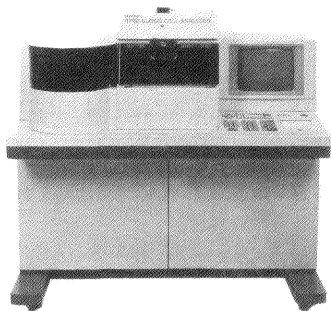
参考文献

1) Covey, T.R., Anal. Chem., 58 (1986), 1451A~1461A

- 2) Kambara, H., Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 24 (1977), 453~463
- 3) Kambara, H., Anal. Chem., 49 (1977), 270~275
- 4) Kambara, H., Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 25 (1977), 129~136
- 5) Kambara, H., Anal. Chem., 54 (1982), 143~146
- 6) Sakairi, M., Mass Spectrosc., 31 (1983), 87~92
- 7) 菱田, 沼尻, 昭和60年度質量分析連合討論会 要旨集

Topics

8200形 日立血液像自動分類 装置



一度に300検体の大量の血液標本を毎時最大120検体の高速度で自動検査し、かつ異常検体を迅速に再検査できる機能をもった血液像自動分類装置「8200形」を開発しました。

この装置は、一般病院の臨床検査室や検査センタの血液学検査部門で使用されます。機能はスライドガラスに塗抹、染色された血液中の白血球・赤血球、血小板及び網赤血球の顕微鏡画像をパターン認識の手法を用いて識別し、それぞれの血球の種類を分類するもので、白血病、貧血などの血液疾患のスクリーニングに重要な役割をもっています。

■ 主な特長

1. 高速、大量かつ迅速な検体処理
 - (1) 300検体の同時架設
 - (2) ワークシートに基づく白血球分類と網赤血球計数の同時全自動処理
 - (3) 最大120検体1／時の処理能力

- (4) 1検体単位での緊急検体の割込処理

2. 高い信頼性の血球分類

- (1) 鮮明なメイグリュンワルド・ギムザ二重染色検本の使用
- (2) 分解能0.23 μ mの高解像度顕微鏡の使用
- (3) 高い識別能力をもつ多段階識別論理の採用

3. 種々の用途に対応できる再検機能

- (1) 任意標本の顕微鏡による一括再検
- (2) VTRによる一括再検
- (3) 特異血球の長期記憶による血球単位の再検

4. 豊富なCRT表示機能

- (1) 血球画像・分類データのオーバーラップ表示
- (2) データー一覧表
- (3) 精度管理データ 他

セミコン・ジャパン'86 開催さる

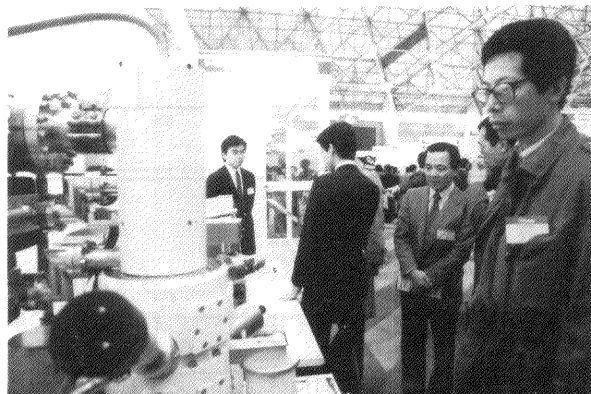
日本における半導体産業関係の最大のイベント「セミコン・ジャパン'86」が今年も東京・晴海東京国際貿易センターにおいて12月4日から12月6日までの3日間開催された。半導体産業会

全体が底冷えのする環境下で開催された「セミコン・ジャパン'86」だが、会期中の入場者数約5万人と昨年と同規模で行われ半導体界への各社の根強い意気込みが感じられる展示会であった。

日立製作所は、日立産業、日立冷熱、日立建機、日立機電工業、日立エンジニアリング、正興電気、日立東京エレクトロニクス、日立那珂精器の各社と合同して、半導体の前工程/ウェーハ検査から後工程/最終検査、ユーティリティと一貫した製品群を紹介した。

那珂工場電装製品からは、S-6000 FEB測長装置とS-900FEB超薄膜評価装置の実機展示を行い、その低加速、無蒸着直接観察の実演に多くの来場者が強い関心を示された。また、日立那珂精器製のイメージプロセッサを接続してのデータメモリの実演、データのプリントアウトサービスは、写真コストの軽減化などの面から注目を浴びた。

今年の展示会の特徴は、円高不況を反映したためか外人客が減少した。しかし、他方では出展社数が増加して、仮設テントを使用している展示など、半導体業界に参入している各社間の競争が一層激化しているを感じさせられる「セミコン・ジャパン'86」であった。(後藤真知夫 記)



S-900超薄膜評価装置に強い関心
が示された「セミコン・ジャパン
'86」の風景

L-6000シリーズ 日立高速液体クロマトグラフ

Hitachi Model L-6000 High Performance Liquid Chromatograph Series

野上 太郎* 大沼 定文* 関 貴和夫* 松浦 俊一* 三輪 哲之* 平田 源蔵*

(昭和62年1月20日受理)

1. はじめに

近年、高速液体クロマトグラフ及びその周辺機器について、機能の向上が図られてきたが、特に最近、それと平行して装置の小形化、低価格化が強く要求されている。それだけ多くの分野で高速液クロが使用されるようになったと解釈すべきであろう。今回、開発したL-6000シリーズは、性能面において数多くの改良を図ると同時に、時代のニーズである小形化・低価格化にも重点を置いた。一方、最近液クロのシステム化が進み、多くのモジュールの組み合わせた形で用いる場合が増えている。今回シリーズの一つとして開発したL-6200形インテリジェントポンプは、システム全体をコンパクトで使い易くする効果を有する。図1に最も基本的な組合せであるL-4000形UV検出器とL-6000形ポンプの外観を示す。L-4200形UV-VIS検出器は、重水素ランプとタングステンランプの切替えノブを有する以外は、L-4000形と同じである。図2は、L-6200形インテリジェントポンプの外観を示す。

2. ポンプの低脈流化及び微量送液

現在、多くの検出器がクロマトグラフ用として使用されている。この中で、RI検出器やクーロメトリック検出器は、送液圧力の周期的変動が直接データに影響を与えることで知られている。またイオンクロマトグラフ用電導度検出器も同様の問題を生じやすい検出器である。最も一般的に用いられているUV検出器においても、溶媒の種類や吸光度レンジによっては、周期的変動がデータに重畳することがあり得る。これらの問題を逃げるための一手段は、メカニカルダンパを流路に組み込むことであるが、メカニカルダンパは、溶媒を切り換えた時の追従性をはじめとするいくつかの点が、用途によっては問題となる。今回、ポンプ機構及びその制御方式自身に検討を加え、この点の解決を図った。

周期的変動、すなわち脈流を低減する方法として、従来から2個のシリンダに液をシリーズに流す方式を採用し、圧力ドロップの生じる圧縮期間にプランジャを倍速駆動する駆動法を取ってきた。これは、シングルプランジャ方式に比較して著しく脈流の小さな方式であったが、今回さらにマイクロコンピュータを採用し、この倍速制御をより最適化することによって改良を加えた。

従来の倍速制御方式では、2連のプランジャの状態を機械的に読み取り、圧縮期間に入ると見なされる時点で倍速

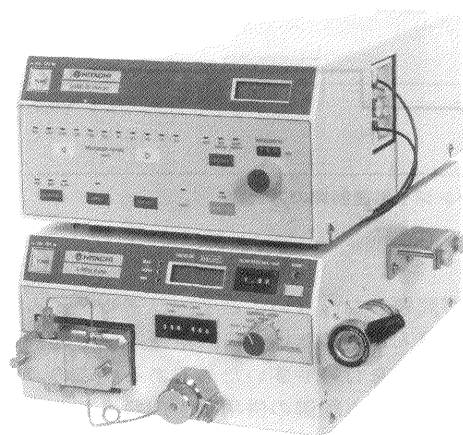


図1 L-4000形UV検出器およびL-6000形ポンプ



図2 L-6200形インテリジェントポンプ

をスタートさせる。倍速開始後液の圧力を監視し、圧縮期間の終了をリアルタイムで検知して倍速をストップさせる。

今回図3に示すように、倍速の開始時点を前回の情報に基づいて決定する記憶制御方式を採用することにより、さらに改良を加えた。2連プランジャの状態を機械的に読み取り、倍速スタートを行わせる方法よりも、より適格にスタートのタイミングを定めることができる。倍速の終了時期は、従来と同様、圧力をモニタしつつリアルタイムで行っている。一つには、終了時期に関しては圧力モニタ系の

* ㈱日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

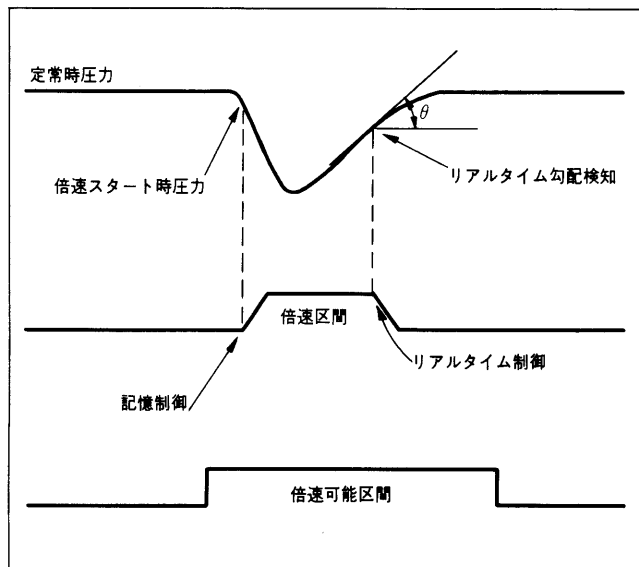


図3 プランジャ倍速制御の方式

応答速度が問題とならないことと、リアルタイム制御の方が、気泡の混入が生じた場合に、倍速期間を延長して気泡を押し出すことを行いやすいためである。このような記憶制御とリアルタイム制御の併用は、内蔵されたワンチップマイクロコンピュータにより行っている。

低脈流化のための改良の効果は、検出器の種類及び測定条件により若干異なる。平均的には、低脈流を特長としてきた従来の2連プランジャポンプのさらに1/2程度に改良されている。図4に、脈流の影響を受けやすいとされているクーロメトリック検出器をダンパなしで使用した例を示す。

以上に述べた低脈流化の結果は、低流量送液を可能にする上で一つの重要な事項であるが、 $10\mu\text{l}/\text{min}$ 以下の送液のためには、その他にも必要な事項が多くある。流路系のデッドボリュームの低減、プランジャ機構のバックラッシュの除去、及び駆動用パルスモータの1パルス当たりの送液量の低減等について検討を行った。流量範囲の仕様は、最終的に $1\mu\text{l}/\text{min}$ より $9.99\text{ml}/\text{min}$ までとした。

3. 検出器の性能

検出器の性能の中で最も重要なのは、感度である。L-4000形、L-4200形においては、光学系の改良と増幅系のヘッドの部分のグレードアップにより、ノイズレベルの低減を達成することができた。図5に、時定数0.5秒におけるノイズレベル測定結果を示す。また、ベースラインの安定性の中で検出器に依存するものとして、溶媒密度の変化の影響がある。L-4000形、L-4200形においては、テーパセルの採用とそれに合った光学系を用いることにより、この点に関しても優れている。図6に、溶媒密度変化の影響を確認するために、流量を変化させた場合のベースラインの状態を測定した結果を示す。テーパセル他の効果により、ベースラインの変化量は小さい。このことは、流量変化のみならず溶媒組成変化に対しても、ベースラインが影響を受けにくいことを意味する。

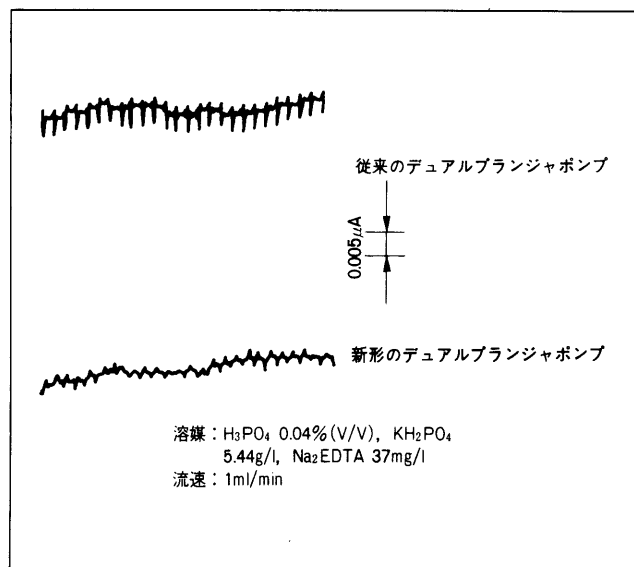


図4 ダンパなしでクーロメトリック検出器を用いたデータの拡大記録

4. L-6200形インテリジェントポンプ

L-6200形は、液クロマトローラをポンプと一体化するという新しい概念のポンプである。基本性能は、前述のL-6000形と同等であるが、ポンプのプランジャの制御を行うマイクロコンピュータの他に、グラジエントプログラムをはじめ各種コントロール用プログラムを受け持つマイクロコンピュータを内蔵している。液クロマトロール機能に関しても、従来の独立したコントローラよりも改良され、高圧グラジエントにおいても3液混合まで可能にする他、操作面においても改良されている。またポンプとコントローラの一体化自身システム全体をコンパクトにし、取扱いを容易にするという応用分野よりの要求に合っている。

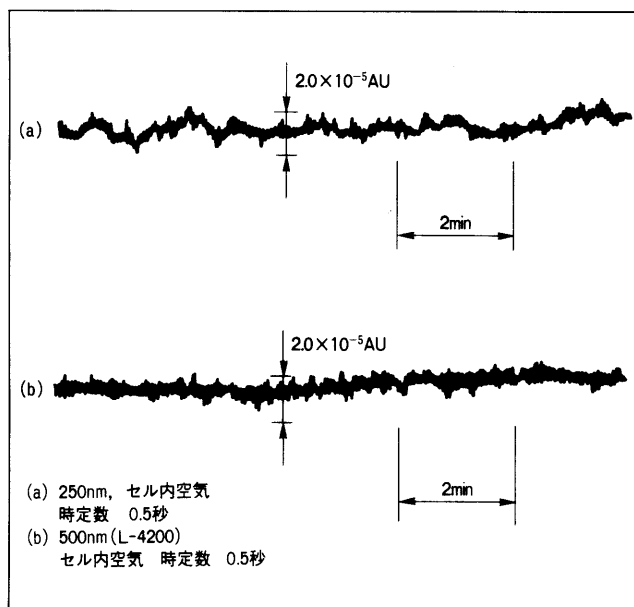


図5 ノイズレベルの測定

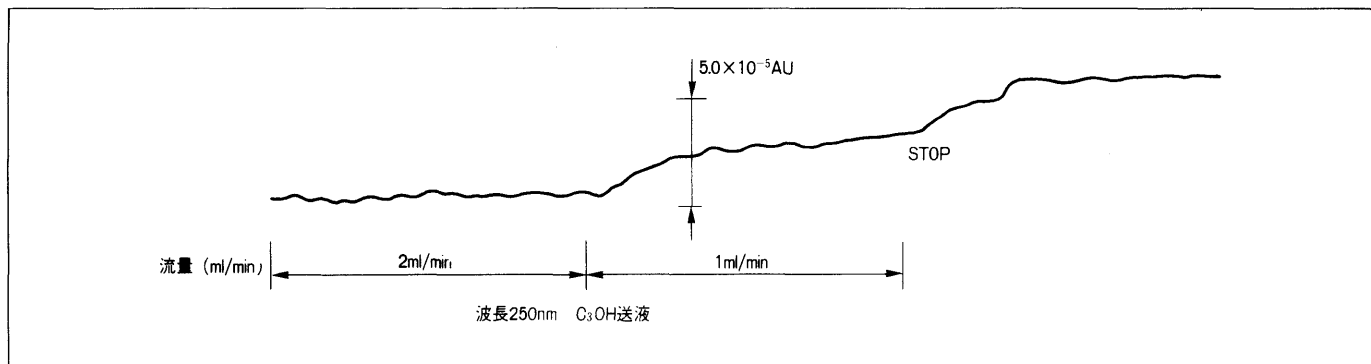


図6 流量感度の測定

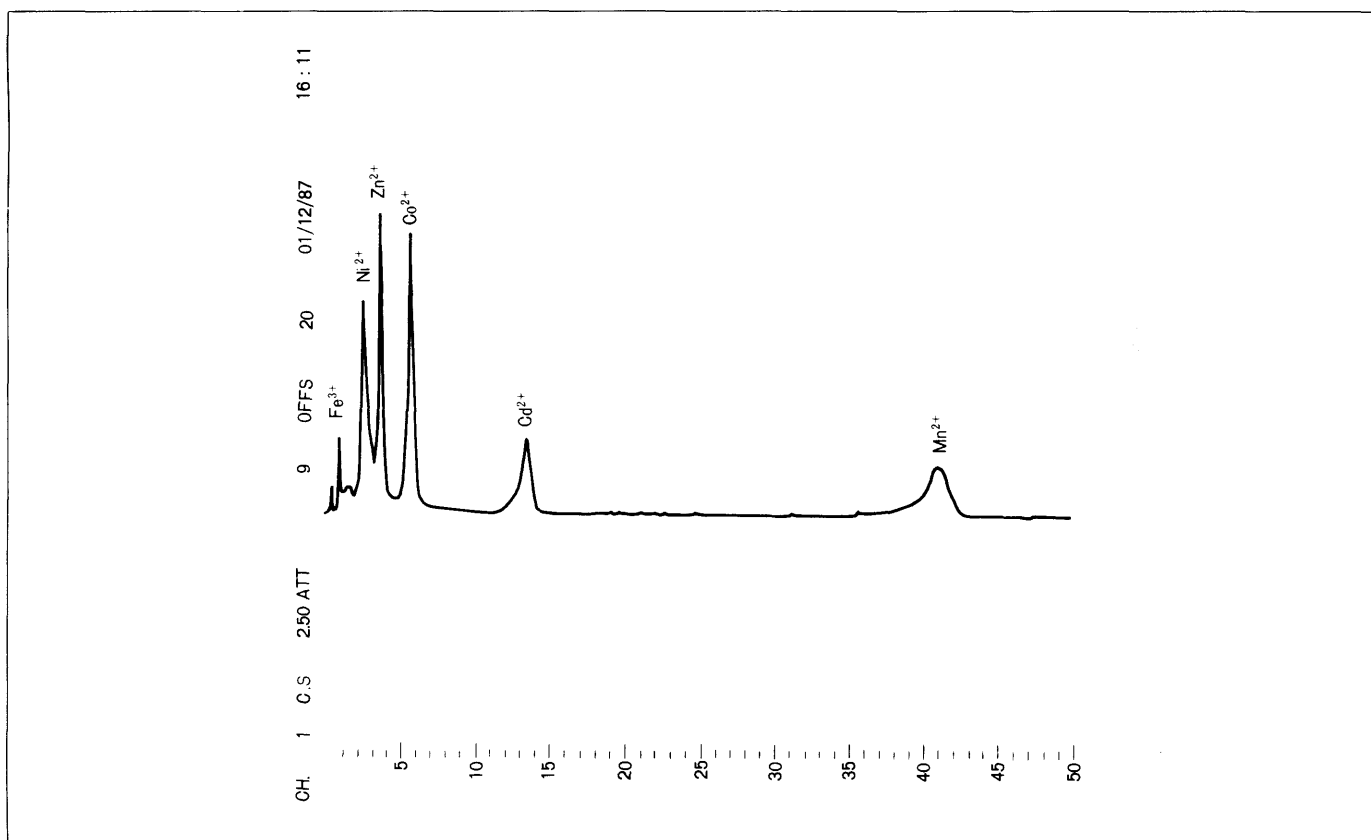


図7 ポストカラム反応LCによる重金属イオンの分析

5. 応用例

図7にL-4200形UV-VIS検出器とL-6000形ポンプを用いた応用例を示す。これは、ポストカラム反応LCにより重金属イオンの分析を行った例である。測定条件を下記する。

装置：L-6000形ポンプ、L-4200形UV-VIS検出器
6554-52形カラムオープン、D-2000形データ処理装置

カラム：強酸性陽イオン交換樹脂#2618、カラム温度 60℃、測定波長：530nm

反応液：0.2mM PAR, 0.2M NH₄OH, 0.1M CH₃COOH

溶離液：0.2M NaCl, 0.1M CH₃COONa, 0.005M シュウ酸

6. おわりに

今回は装置を主体に報告したが、今後装置の特長を生かした各種応用を手がけていきたい。特に安定送液を生かしたイオンクロマト、GPC等は、一つの重要な応用であり、安定送液と検出器の感度を生かした各種微量成分分析とともに、今後取り組むべき分野と思われる。また、このマイクロ液クロに関しては、世の中一般に、装置の性能以外にも課題の多いものであるため、この点にも力を入れたい。

Topics

日製産業(株) 科学機器センター(SIC) 移転完了、業務を開始

このたび日製産業株式会社・科学機器営業本部では、理化学機器センター(SIC)を下記のとおり移転し、3月末日、業務を開始いたしました。

購入調査のための試料測定、各種の

セミナー、分析ソフトの共同研究などに広くご利用いただくようご案内申し上げます。

なお、個々の行事につきましては、別途ご案内申し上げます。

■所在地

〒160 新宿区坂町26番地27

IPB (インテリジェントプラザビル) 1, 2F

■設置機器

1 F TEM, SEM, XSAM-800
AA, ICP, GC

2 F LC, UV-VIS, FL, IR
ザイメートロボット



案内図



IPB

■交通 (案内図をご参照下さい)

- 国鉄 中央線 四谷駅、市ヶ谷駅から850m、徒歩約10分
- 地下鉄 都営新宿線 曙橋駅から320m 徒歩約4分

日製産業株式會社

本社 電話 東京(03) 504-7211
水戸営業所 電話 水戸(0292)32-0112
新潟営業所 電話 新潟(0252)41-3011
名古屋支店 電話 名古屋(052)583-5841
四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
九州支店 電話 福岡(092)721-3501

札幌支店 電話 札幌(011)221-7241
筑波営業所 電話 土浦(0298)23-7391
北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
京都営業所 電話 京都(075)241-1591
岡山営業所 電話 倉敷(0864)25-1316
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

仙台支店 電話 仙台(022)264-2211
横浜営業所 電話 横浜(045)671-5421
豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191
大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
広島支店 電話 広島(082)221-4514

<編集後記>

- 本ニュースは、昭和33年(1958年)1月の創刊以来、30年目を迎えることができました。これも偏に、お客様各位のご愛顧、ご支援の賜と厚くお礼申し上げます。
- 本号は、Vol. 29. No. 1に続き、生化学特集(II)として編集致しました。大阪大学の西先生には、710形による尿中電解質の測定について、東北大学の前山先生には、F-4000による細胞内Ca⁺⁺の測定について、大塚製薬工場の池田先生には、アミノ酸の定量性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
茨城県勝田市市毛882番地
〒312 電話 勝田(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
東京都港区西新橋1-24-14
〒105 電話 東京(03)504-7195(ダイヤルイン)

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SPRING 1987 Vol.30 No.1

発行 昭和62年4月1日(年4回発行)
発行人 岡本匡史
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