

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

WINTER 1987
VOL.30 NO.4

目次

免疫分析特集(II)

巻頭言

期待される独創的な免疫検査法の開発……………横山三男… 1

報文

AIDS VIRUSを見る ……中井益代… 3

非放射性イムノアッセイ——蛍光及び発光検出法……………辻 章夫 前田昌子… 7

7050形日立自動分析装置による腫瘍マーカーの測定……………藤田誠一 河田興一 片山善章…11

705形日立自動分析装置による検体原液での各種炎症蛋白の定量……………首藤昇一 宇佐利隆…16

解説

Z-9000形日立多元素同時分析原子吸光分光光度計……………奥本豊治 塚田正道 戸辺早人 北川正敏 米谷 明 沢株 均…21

インテリジェントポンプを用いた日立高速液体クロマトグラフィシステム……………野上太郎 山田宜昭 大沼定文 平田源蔵 岩淵 等…25

トピックス

S-8000形日立EBテスター …… 6
日立理化学機器分析データ集発刊のお知らせ…………… 2
第11回科学機器展開催さる…………… 2
第2回北京分析測試展開催さる…………… 2
第26回分析機器展開催のご案内 …… 28

免疫分析特集(II)

巻頭言

期待される独創的な免疫検査法の開発

How to Develop Original Immunoassay

横山 三男*

(昭和62年9月23日受理)

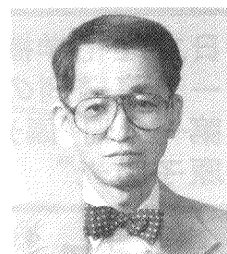
免疫という機能は、外因的なならびに内因的な侵襲から生体を保護するために作動している。免疫に関連する細胞は、多種類の細胞群から構成されており、それらの細胞のもつ多彩な機能がうまく調節されている。免疫系は、刺激伝導系として全身に分布し、連結している神経系と同じようにネットワークを形成している。そして、このような免疫細胞による連結によって免疫という生体防御機構が成立し、細胞群は、秩序正しく作業を営んでいる。免疫に関連する細胞群は、それぞれ互いに情報を交換し、免疫の回路を動かし、バランスを整えながら生体の恒常性を保っている。

もし、免疫細胞に異常が起こると、免疫回路に“歪み”が現れ、免疫調節の仕組みにアンバランスが見られるようになる。このような免疫調節機構の欠損が、先天的または後天的に免疫不全症の状態となる。それらの免疫不全症が、遺伝子を背景とした不調に由来するものか、免疫関連細胞の機能的な異常、たとえば、食細胞の機能が低下したり、細胞から細胞へのシグナルの伝達に不正が起こったり、細胞からの生理活性因子や異物に対する傷害性物質が放出されなくなったり、抗体産生能力が低下したりすることによるのかについて解析する必要がある。

このような免疫細胞群の機能的な欠損は、生体防御機構をアンバランスにする。このため、外来からの病原菌の侵入を招いたり、内因性の異物、すなわち癌細胞の発育、増殖へと繋がるチャンスともなる。それゆえ、多角的で目的に合致し、集中的で選択的な免疫学的検査法を確立し、診断と治療へのモニターを設定する必要がある。このことは、やがて、疾患の予防に多くの資料を提供することにもなる。

これまでに、バイオテクノロジーやバイオエンジニアリングの開発が進んだ。その結果、検査法が鋭敏で、正確で、オートメーション化され、さらに、検査結果が再現性よく得られるようになった。この結果、疾患を早期に、しかも確率高く診断できるようになった。

これらの検査によって、免疫の仕組みに“ズレ”が検証されることから、免疫不全症の由来が診断できるようになった。免疫という知識とテクノロジーを臨床に応



* 久留米大学 医学部 免疫学講座 教授 医博

用することによって、その損なわれた免疫能を修復するための正しい回路が設定され、新しい免疫学的な治療法、たとえば、欠損した免疫細胞の機能を活性化したり（免疫賦活剤）、欠損した細胞を補給する（骨髄移植）ことなどが適用されるようになってきた。

人間は、外界から、常にウィルスに狙われている。そして、ウィルスの感染によって人間は滅亡の危機に脅やかされている。ひとたびウィルスに感染すると、ウィルスの核酸が宿主の感染細胞の核酸代謝系に組み込まれる。このため細胞、ことに免疫細胞の回転を狂わせ、細胞を破壊したり（AIDS）、細胞を腫瘍化し、異常に増殖させたり（ATL）する。

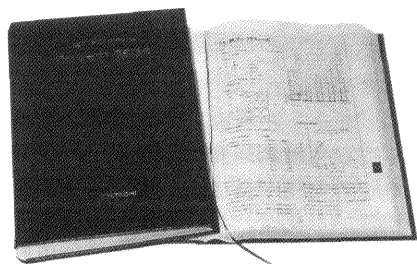
細胞の回転が狂った腫瘍細胞は、その細胞膜表面に腫瘍抗原を出現する。正常な生体の免疫細胞は、今まで生体内に存在しなかった抗原をいち早く認識し、免疫細胞より体

液因子（抗体）および傷害因子（サイトカイン）を放出し、腫瘍細胞の増殖を抑制または破壊する。しかし、免疫不全症では、このような免疫細胞によるコントロールが欠如しているため、腫瘍細胞は異常に増殖する結果となる。

失われた生体の免疫調節機構が遺伝子のレベルから探求されている。また、ウィルスの感染機構、さらに感染細胞の腫瘍化ならびに細胞破壊の機序についても研究が進められている。そして、それらの研究のステップから創作された新しい免疫検査法が考案され、開発され、実用化されている。この“S.I. News”では、それぞれの専門分野の方々が、免疫にまつわるこれまでの知識と技術とを用いて、病態を解析するテクノロジーと手順について記述されている。これらの記載を通して、読者がさらに独創的なアイディアの発想を起こし、飛躍的なテクノロジーを開発されることを期待している。

Topics

日立理化学機器分析データ集発刊のお知らせ 第一分冊“偏光ゼーマン原子吸光”



日立製作所那珂工場応用技術センタ、日立テクノリサーチセンタでは、過去25年間にわたって蓄積された分析データノウハウを集大成し、日立科学機器分析データ集の発刊を、年4回（機種）の頻度で実施いたします。

今回その第1回として「偏光ゼーマン原子吸光」（A4判720頁）が完成し、原子吸光分析利用の顧客からご好評を頂いています。

内容：元素別・分野別分類、測定例、710データ。解説（加熱プログラム、ランプ電流、燃焼条件などの選択方法に関する解説）定価20,000円、日製産業（株）または日立科学機器特約店へご注文下さい。

第2回北京分析測試展 開催さる



第二回北京分析測試展

第2回北京分析測試展および学術報告会が、中華人民共和国の北京市において去る10月19日から10月25日の7日間開催され、中華人民共和国全土から研究者等延べ4,000人の参加者を集め盛況のうちに終了した。

本展示会は2年に一度開催される中華人民共和国で最大の分析機器展であり、今回は世界16ヶ国98社から最新の分析機器が出展された。

今回の日立グループ出展実演機種は、17機種（電子顕微鏡3機種、光学装置12機種、遠心機2機種）出展テーマ、方法においても他社を圧倒し、特に合作コーナでは、天津光学儀器歴との合作品赤外分光光度計270-30形を展示し、江南光学儀器歴とのH-600形電子顕微鏡を紹介した。また、原子吸光光度計の保守サービスを目的として、中華人

民共和国と共同で設立した日立原子吸収維修站の紹介を行うなど、中国參觀者の関心を集め好評を博した。

（山本秀雄記）

第11回科学機器展 開催さる

去る10月14日～17日の4日間、インテックス大阪（大阪国際見本市会場）において、第11回科学機器展が、過去最大規模で開催され、入場者総数約4万人と盛況のうちに終了した。入場者の中にはアメリカ、中国、台湾をはじめ東南アジア諸国からの顧客の来場も多く、随所に商談風景も見られ国際色も強くなった。

科学機器の分野では、2月末の分析機器展、10月中旬の科学機器展が、2大イベントとしての地位を確立した感じがあり、各メーカーとも出品商品、展示方法に工夫が見られ、企業イメージ向上のための努力が目についた。

日立のブースも、世界に先駆けた多元素同時分析のゼーマン原子吸光Z-9000形、分光光度計U-3400形に大形試料室、クライオシステムを付属して、新素材研究のニーズに対応し、また液体クロマトグラフの多様化するニーズにこたえて、イナートポンプをはじめ新形検出器など、すべて新製品を展示発表し、国内最大手メーカーの実力を示した展示会であった。（谷川信一記）

報 文

AIDS VIRUSを見る

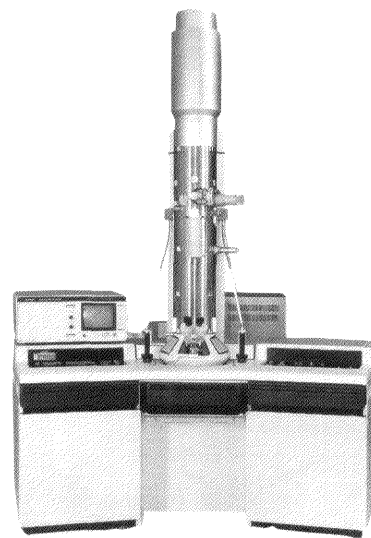
Observation on Aids Virus with Electron Microscope

中井 益代*

(昭和62年9月30日受理)

1981年6月アメリカのCDC (Center for Disease Control) は、ロスアンゼルスでニューモンスチス・カリニという原虫の一種によってひきおこされる通常はあまりみられない5例の肺炎が発生したことを報告したり¹⁾。その後、この疾患はニューヨーク市、カリフォルニアなどでカポジ肉腫の患者の間にも発生していることが判明し、しかもこれらの患者はすべて男性同性愛者であり²⁾、免疫不全を伴っていることが明らかとなり、後天性免疫不全症候群 (Acquired Immune Deficiency Syndrome) AIDSという名称がつけられた。症状としては、まず発熱、盗汗、体重減少、全身倦怠感、下痢、リンパ節腫脹などの不定の全身症状³⁾と、検査所見としてヘルパーT細胞数の減少、白血球数の減少、血清グロブリン量の増加、PHA刺激などによるリンパ球機能の低下など³⁾がみられるARC (AIDS Related Complex AIDS関連症候群) と呼ばれる段階の後、細菌、真菌、原虫、ウイルスなどの種々の微生物による日和見感染やカポジ肉腫と合併して現われる³⁾疾患である。そして、AIDS患者はアメリカのみならず世界各国で増加の一途をたどり、現在わが国でも50名の患者発生をみるに至った。この疾患の死亡率は50%以上と著しく高く、かつ有効な治療法もないためその発生が非常におそれられ、原因解明に多くの努力が払われた結果、1983年パスツール研究所のMontagnierらにより、リンパ節腫脹のAIDS前段階の患者からレトロウイルスが分離されLAV (lymphadenopathy associated virus) と称し報告された。また、1984年には米国でもAIDSおよびARC (AIDS関連症候群) の患者から類似のウイルスが分離され、HTLV-III (human T-lymphotropic virus type III) あるいはARV (AIDS-associated retrovirus) と呼称されていた。しかし、その後これらのAIDS患者から分離されたウイルスは同一のレトロウイルスであることが判明し、AIDSの原因ウイルスとみなされるにいたり、国際命名委員会では、HIV (human immuno deficiency virus) として命名することが決定した⁴⁾。

HIVの形状はマウス白血病ウイルスで代表されるC型粒子とやや異なり、Mason-PfizerサルウイルスのD型粒子に類似するともいわれているが、C、D型粒子との詳細な異同点が明らかでないため、HIVの形態学的位置づけが確立されていない。ここではHIVを俗称AIDSウイルスとして記述し、ウイルスの形状について私たちの観察成績を中心に最近の知見について述べる。



H-800形日立電子顕微鏡

1. AIDS ウイルスの形態構造

ウイルス粒子は超薄切片像によると類円形で、その径は110nm前後である。粒子表面には微毛状構造が存在するとされているが⁵⁾、そのような構造は常に認められない。しかし、従来のAIDSウイルスと性状の少し異なったウイルスがアフリカ原住民のAIDS患者から分離され、LAV-IIあるいはHIV-IIと呼ばれている粒子表面には突起様構造が見られるといわれている。

粒子の内部には中心性または偏心性に小型類円形あるいは桿状の核様体を有する粒子と同心性の電子密度の大なる二重のリングを有するドーナツ型の粒子が存在する (図1)。これら種々の内部構造を示す粒子は、既知AIDS患者血清によるフェリチン免疫電子顕微鏡法によって、いずれの粒子表面にもフェリチン粒子の吸着が認められる。さらに抗ヘルペスウイルス血清や抗成人T細胞白血病ウイルス血清による免疫電顕法によって陰性を示すため、これら種々の内部構造を示す粒子は全てAIDSに関連したウイルスといえることができる。

このように、AIDSウイルスには内部構造の異なった数種類の粒子が超薄切片像で認められるが、透明な球の中心部に桿状体を配置した模型粒子のそれぞれの投影像が、前述の各種の内部構造を示す超薄切片像とよく一致することから、中心性、偏心性に類円形の核様体を有した粒子像は、

* 大阪医科大学 微生物学教室 教授 医博

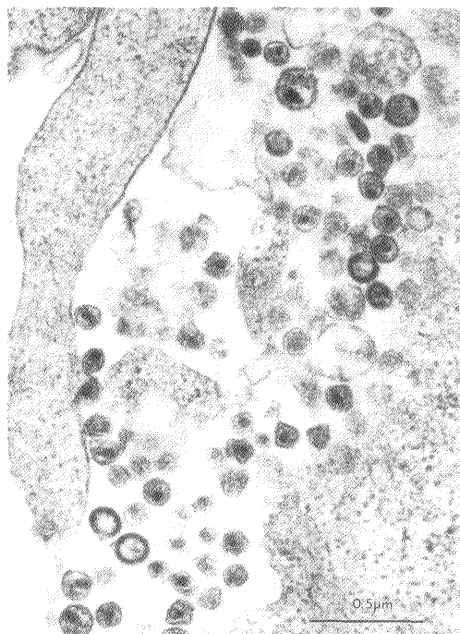


図1 種々な内部構造を示すAIDSウイルス粒子。

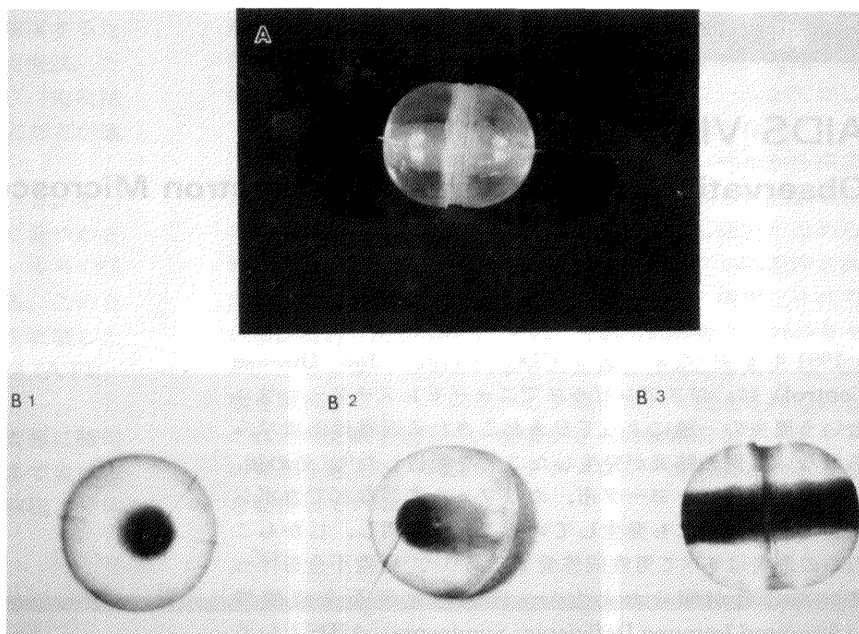


図2 桿状体を中心に配置した模型粒子とその投影像。

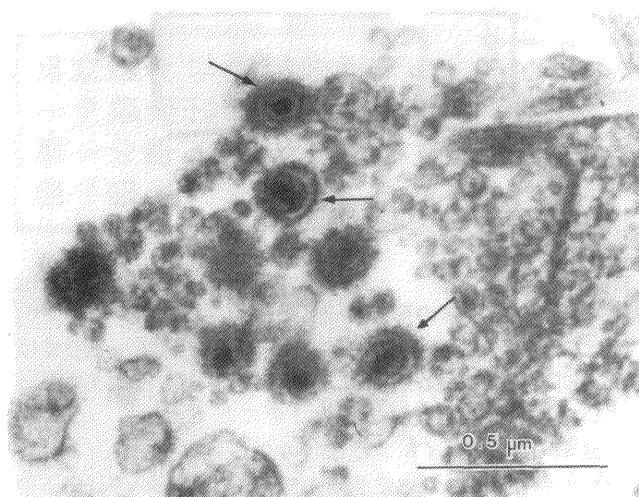


図3 AIDS患者リンパ節より培養した細胞から放出されるAIDSウイルス粒子。層状構造を有する粒子が多く認められる。

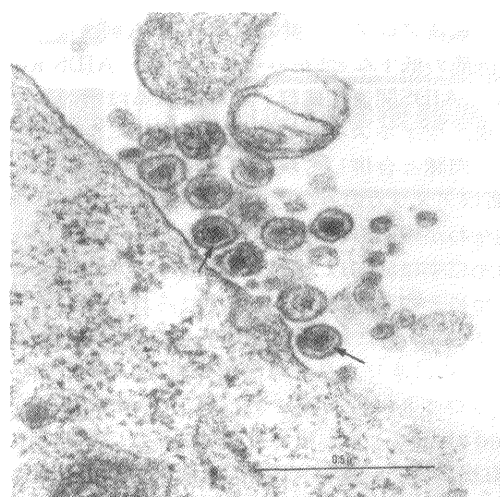


図4 核様体周囲に層状構造のみられる粒子(矢印)で培養細胞より放出された粒子。

桿状核様体を有した粒子と同一のものであることが判明した(図2)。また、ときには核様体と淡明層を介して高電子密度の層状構造を有する粒子が観察されることがある。この形態の粒子は、AIDS患者リンパ節から直接培養した数代後の継代培養細胞から放出される粒子に多く見られる(図3中矢印)。これと類似の構造の粒子はAIDSウイルス感染培養細胞から産生される粒子の中にもごく少数であるが認められることがある(図4中矢印)。しかし、このような粒子から他の内部構造を有する粒子への移行像は確認されていないが、この粒子もAIDS患者血清による免疫電顕法で陽性を示すことから、AIDSウイルス成熟過程の一時期の粒子ではないかと考えられる。しかし、核様体を取り囲む層状構造物出現の意義については明らかでない。この型の粒子

は、AIDS患者のその他の組織内や体液中からまだ見いだされていない。

粒子の核様体構造は、超薄切片像では雲絮状に見え、ネガティブ染色では粒状集合体として観察されているが、まだ核様体の詳細な構造は明確にされていない。

現状ではAIDSウイルス粒子の形態は、桿状核様体を有した粒子とこの核様体を取り囲む一層の層状構造を有する粒子ならびにドーナツ型粒子の3つの型の粒子が細胞外に存在すると思われるが、それぞれの粒子の相互関係については不明である(図5)。

2. AIDSウイルス粒子の形成過程

ウイルス粒子の形成は細胞膜、空胞膜から出芽(budding)により始まる。すなわち、粒子形成の初期は細胞膜

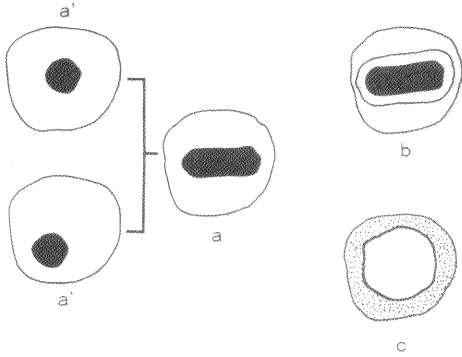


図5 AIDSウイルス粒子の模型図

- a: 桿状核様体を有す粒子
 a': 中心性あるいは偏心性に類円形の核様体を有す粒子
 b: 核様体周囲に一層の層状構造を有す粒子
 c: ドーナツ型粒子



図6 ドーナツ型粒子として放出される粒子。
 粒子は、AIDS患者血清による免疫電顕法でフェリチン粒子の吸着が認められる。

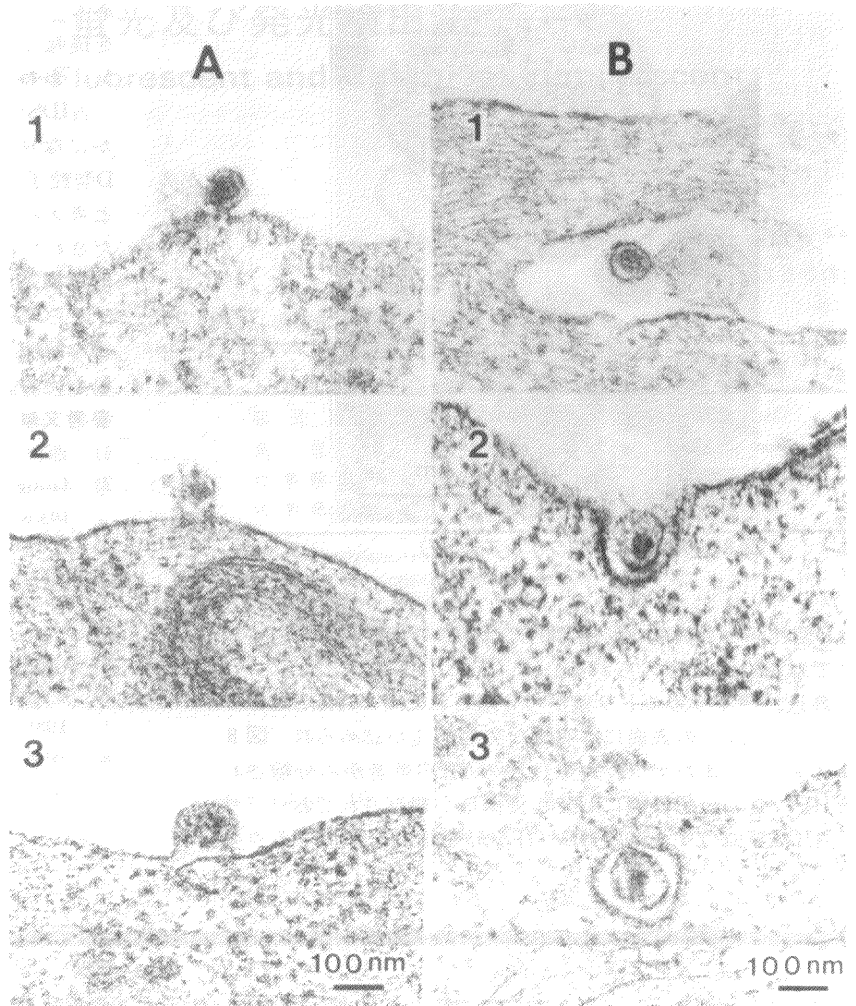


図7 AIDSウイルス粒子の細胞内侵入様式。

- A: 細胞膜とウイルス被膜の融合により始まる侵入様式。
 B: 細胞のpinocytosis (飲作用) によって始まる侵入様式。
 A, Bの2様式により、AIDSウイルス粒子は侵入する。

の一部が半球状に盛り上がり、その内部に粒子成熟後にコアとなる電子密度の高い構造物が形成される⁷⁾。この隆起部の細胞膜は免疫電顕法によってすでにウイルス被膜と同一の抗原であることが明らかにされているが⁵⁾、基本的な膜の組成は宿主由来のものである。その後、細胞膜の隆起部は次第に半球状の突出から球状となり、内部は開環状コアとなりやがて細胞膜との連絡部がくびれてドーナツ型粒子を形成し、この形態のままで細胞膜から離脱する⁸⁾ (図6)。この過程は既知C型粒子の形成過程と同様で、D型粒子のように出芽粒子形成前に細胞質内に粒子の前駆体と考えられるような形態構造は全く認められない。

出芽粒子はドーナツ型粒子の状態では細胞外に放出され、細胞外で形態学的に成熟した粒子(桿状核様体を有する粒子)へと移行すると思われるが、その移行像は明確にされていない。

3. AIDSウイルスの細胞内侵入過程

AIDSウイルスの細胞への侵入には、まずウイルス粒子が細胞表面に吸着した後、ウイルス被膜と細胞膜が融合し、ウイルス核様体のみが細胞質内に侵入する場合と、細胞の飲作用(pinocytosis)により食胞内に取り込まれたウイル

スの被膜と食胞膜が融合し、ウイルス核様体が侵入する2様式がある(図7)。一般にウイルスの細胞内侵入には、①宿主細胞の貪食機序による取り込み、②ウイルス自体あるいは細胞外でウイルス被膜がはずれて核様体のみが細胞内に侵入する場合、③ウイルス被膜と宿主細胞膜の融合が起こり、続いてウイルス核様体が細胞内に侵入する3つの様式が知られている。レトロウイルス科に属すどのウイルスもこれらのうちいずれか1つの様式をとって侵入する。しかるにAIDSウイルスのみがどうして1種類の宿主細胞に対し、2つの様式によって侵入するのか明らかでないが、このことはAIDSウイルス感染機序の上になんらかの意義があるように思われる。

4. AIDSウイルスと他のレトロウイルスとの異同について

AIDSウイルスもC型粒子と同様な出芽様式によって形成されることには相違ないが、AIDSウイルスの核様体は桿状形であり、C型粒子には全くこのような形の核様体は見いだされていない。一方、D型粒子とは粒子内部の形態構造で類似する点もあるが⁹⁾、D型粒子のように出芽粒子形成前に細胞質内にウイルスの前駆体と考えられるような構造物は認められない。これらの点からもAIDSウイルスはC型あるいは

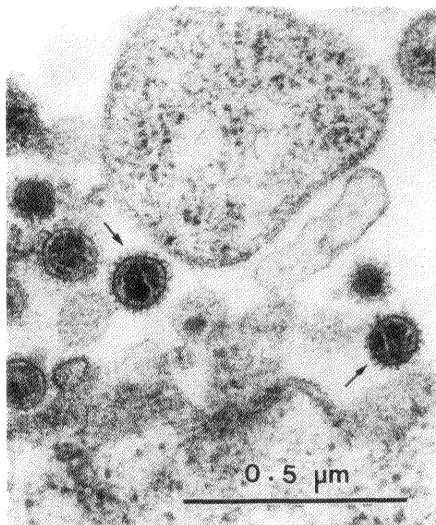


図8 サルAIDS類似ウイルス (SIV)

はD型粒子とも異なる形態学的には新しい型のレトロウイルスではないと考えられる。

最近、アフリカミドリ猿から分離されたサルAIDS類似ウイルス (SIV) の表面には明瞭な突起構造が認められ (図8中の矢印)、またアフリカ原住民のAIDS患者から分離されたHIV-IIの粒子表面にも突起様構造が観察されており、サルAIDS類似ウイルスとHIV-IIが形態学的に類似する点の

あることから、AIDSウイルスの起源に関して興味ある問題を提起している。

5. おわりに

AIDSウイルスが発見されその生物学的性状もかなり明らかになり、他方、形態学的にもAIDSウイルスは既知C型、D型粒子とは異なる全く新しい型のウイルスではなからうかと考えられるに至ってきた。また、AIDS患者材料から見いだされた新しい型のウイルス粒子は、AIDSウイルス粒子の形態構造と性状の関連性を知る上で一助となるかもしれない。

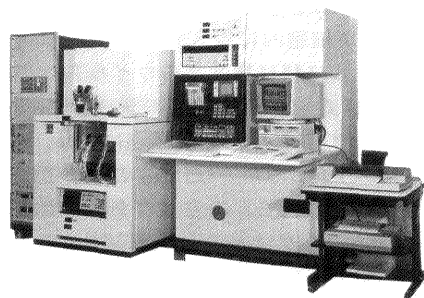
さらに、サルAIDS類似ウイルスとの形態学的類似性の詳細な解明は、AIDSウイルスの起源を探る上に役立つかもしれない。

参考文献

- 1) 西岡久寿弥：AIDSを知る，講談社，東京，1983
- 2) Gong, V. ed. : Understanding AIDS, Cambridge Univ. press, London 1985
- 3) 小林信元，佐藤博行，栗村 敬，宮本 勉，小室勝利，松元孝夫ほか：Immunohaematology, 8, 143-159 1986
- 4) 井川洋二監修：細胞工学, 15, 1104, 1986
- 5) Palmer, E. et al : Arch. Virol. 85, 189-196, 1985
- 6) 中井益代ほか：臨床とウイルス, 14, 396-402, 1986
- 7) Tsuchie, H. et al. : Microbiol. Immunol. 30, 545-552, 1986
- 8) 中井益代：細胞工学, 15, 1137-1145, 1986
- 9) 星野宗光：電子顕微鏡, 15, 139-145, 1981

Topics

S-8000形 日立EBテスター



S-8000形日立EBテスターは、電子ビームをプローブとして用い、集積回路チップ上の微細な回路配線の電圧波形の測定を行なう装置です。高輝度新形FE電子銃と専用電子光学系の採用に

より、次世代メモリデバイス、超高速GaAs、バイポーラデバイス等の解析に十分な性能を備えています。

■ 特長

(1) 微細かつ大電流電子ビームプローブ
加速電圧1kV、プローブ電流5nAの条件でプローブサイズ0.1μmを実現、サブミクロン配線上の電圧波形を正確に測定できます。

(2) 広帯域、高精度測定

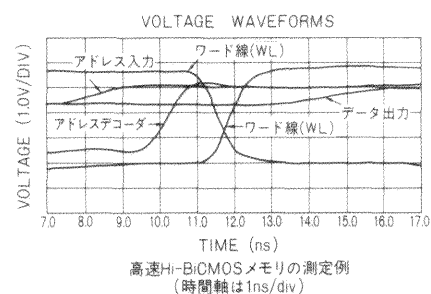
2GHz以上の帯域幅と、数十ミリボルトの電圧振幅を測定できる高いSN比を持ち、かつ非接触で負荷効果がないので、正確な測定ができます。

(3) 明るい画像

画像処理機能付きイメージメモリを採用し、回路配線の電圧分布を示すストロボ像などを明るいTVスキャン像で観察できます。

(4) 簡単な測定位置指定

回路レイアウト図面の上をペンで指示するだけで、その場所を観察視野へ移動できる方式を採用し、測定箇所の



高速Hi-BiCMOSメモリの測定例
(時間軸は1ns/div)

設定が簡単にできます。

■ 主な仕様

空間分解能：0.1μm
測定帯域幅：2GHz
時間差分解能：10ps
電圧分解能：10mV
加速電圧：500~2000V
表示画像：二次電子像、電位分布像、ストロボ像 (TVスキャン静止画像)
試料ステージ：60×40mm、コンピュータコントロール

■ 定価

1億3,000万円

非放射性イムノアッセイ——蛍光及び発光検出法——

Non Isotopic Immunoassay——Fluorescent and Chemical Luminescent Detection System——

前田 昌子* 辻 章夫**

(昭和62年9月23日受理)

1. まえがき

BasonとYalowによって開発されたラジオイムノアッセイ(RIA)は、高感度で特異性が高く、また操作が簡便であることから急速に発展し、バイオメディカルの分野をはじめ多くの分野で利用されている。

しかし、放射性物質を用いる点で制約があり、最近是非放射性イムノアッセイが数多く報告され、実用化されている。特に、酵素の増幅作用を利用する酵素イムノアッセイ法は高感度で広く利用されているが、更に酵素反応の検出法の高感度化への工夫が種々試みられている。本稿では著者らの研究室で開発した方法を中心に、最近報告されている高感度非放射性イムノアッセイの検出系を中心に紹介する。ラジオアイソトープの検出感度は ^3H で $1 \times 10^{-15} \text{ mol}$ 、 ^{14}C で $1 \times 10^{-13} \text{ mol}$ であり、半減期の短い ^{125}I で $1 \times 10^{-17} \text{ mol}$ 、 ^{131}I では $1 \times 10^{-18} \text{ mol}$ 程度が検出可能といわれている。一方、非放射性イムノアッセイの検出に用いられる吸光度法、蛍光法及び化学発光法の感度は表1に示すように算出される。すなわち濃度 C と各分析法の測定値(吸光度： A 、蛍光強度： F 、化学発光強度： E)との関係式は表1の(1)～(3)式で表わされ検出感度 C が算出される。実際に過酸化水素(H_2O_2)の測定について比較した結果を表2に示す。 H_2O_2 の高感度な吸光度法といわれているチタン

表2 過酸化水素測定の感度

分 析 法	反 応	検 出 感 度
吸 光 度 法	Ti(IV)/PAR	150n mol
蛍 光 法	HPPA/POD	100p mol
化 学 発 光 法	IL/POD	1p mol
化 学 発 光 法	TCPO/ANS	0.1p mol

PAR: 4-(2-pyridylazo)resorcinol

HPPA: 3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid

IL: isoluminol, POD: peroxidase

TCPO: bis(2, 4, 6-trichlorophenyl)oxalate

ANS: 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid

(I V) - 4 - (2-ピリジルアゾ) レゾルシノール法の検出感度が $150 \times 10^{-9} \text{ mol}$ 、p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸-ペルオキシダーゼによる蛍光法が $100 \times 10^{-12} \text{ mol}$ 、イソルミノール・ペルオキシダーゼによる化学発光法が $1 \times 10^{-12} \text{ mol}$ 、TCPO-ANSによる化学発光法が $1 \times 10^{-13} \text{ mol}$ で、理論計算よりも低い値であったが、吸光度<蛍光法<化学発光法の順に100～1,000倍検出感度が向上していることがわかる。

2. 蛍光酵素イムノアッセイ(Enzyme Immunoassay EIA)

標識した酵素の活性測定に蛍光反応を用いる酵素イムノアッセイで、主な標識酵素としてはペルオキシダーゼ(POD)、グルコースオキシダーゼ(GOD)、 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)、アルカリホスファターゼなどが用いられている(表3)。PODを標識酵素とp-ヒドロキシフェニルプロピオン酸(HPPA)/ H_2O_2 を基質とした17 α -ヒドロキシprogesterone (17-OHP)の蛍光EIAを紹介する。著者らのEIAのシステムは第二抗体を固相化してB(結合型)/F(遊離型)分離するヘテロジニアスな方法でそのシステムを図1に模式的に示した。また図2に測定法と検量線の例を示した。試料として乾燥濾紙血液ディスクを用いた場合も血清の場合も検出限界は1 pg/アッセイまで17-OHPを測定可能である。

3. 時間分解蛍光法を用いたイムノアッセイ(Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay, DELFIA)

最近、Eu(III)イオンのキレート化合物が遅延蛍光性(蛍光寿命が長い性質)であることを利用した新しい蛍光標識剤が開発され、イムノアッセイに利用されている。通常の蛍光は光源の強度や検出器の感度に依存し、励起光源の強度を大にすると蛍光強度も大となるがバックグラウンドの蛍光も同様で、SN比は変わらない。本法では溶媒中や生体成分由来のバックグラウンドの蛍光が消滅してから、Eu(III)

表1 各分析法の感度

分 析 法	測定・濃度の関係式	感 度
吸 光 法	$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot C \cdot l \cdots (1)$ ($A=10^{-4}$, $\epsilon=10^5$, $l=1\text{cm}$)	$C=10^{-9} \text{ mol/l}$
蛍 光 法	$F = K \cdot I_0 \cdot \phi \cdot \epsilon \cdot C \cdot l \cdots (2)$ ($K=0.01$, $I_0=1\text{mW}=2 \times 10^{15}$ フォトン/秒 $\phi=0.5$, $\epsilon=10^5$, $l=1\text{cm}$ $F=100$ フォトン/秒)	$C=10^{-14} \text{ mol/l}$
化学発光法	$E = K \cdot N \cdot \phi \cdot C \cdots (3)$ ($K=0.01$, $N=6.02 \times 10^{23}$ $\phi=0.01$, $E=100$ フォトン/秒)	$C=1.7 \times 10^{-18} \text{ mol/l}$

K: 全方向に分散する蛍光又は発光の有効受光比率

 ϕ : 量子収率

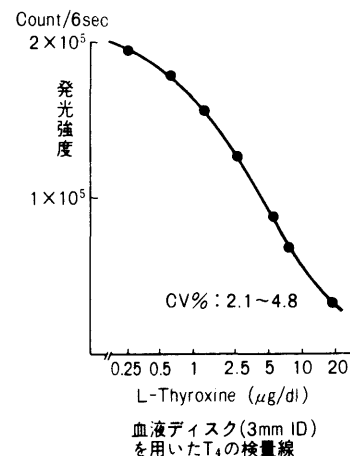
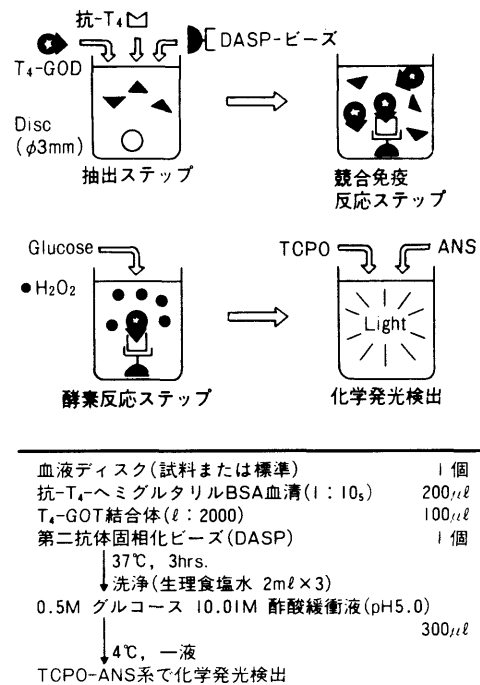
N: アボガドロ数

* 昭和大学 薬学部 薬品分析化学教室 助教授 薬博

** 昭和大学 薬学部 薬品分析化学教室 教授 薬博

表5 化学発光検出による酵素活性の測定法

酵 素	化 学 発 光 反 応
ペルオキシダーゼ (POD)	ルミノール
グルコースオキシダーゼ (GOD)	グルコース $\xrightarrow{\text{GOD}}$ グルコンラクトン + H_2O_2 グルコンラクトン + H_2O_2 $\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{O} + \text{F} \rightarrow \text{F}^* + \text{CO}_2, \text{F}^* \rightarrow \text{F} + \text{light}$
インペルターゼ (INV)	サッカロース $\xrightarrow{\text{INV}}$ グルコース + フルクトース (還元糖) 還元糖 OH^- 2 還元糖 + light
β -Dガラクトシダーゼ (β -Gal)	① lactose + $\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\beta\text{-Gal}}$ α-D-glucose + β-D-galactose α-D-glucose $\rightleftharpoons$ β-D-glucose β-D-glucose $\xrightarrow{\text{GOD}}$ $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ Gluconic acid $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}_2}$ $\text{CO}_2 + \text{ANS}^*$ $\text{TCPO} + \text{ANS}^* \rightarrow \text{light}$ ② $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{OH}^-}$ light イソルミノール マイクロペルオキシダーゼ ③ O-nitrophenyl β-D-galactoside $\xrightarrow{\beta\text{-Gal}}$ β-D-galactose + O-nitrophenol β-D-galactose $\xrightarrow{\text{Gal DH}}$ $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ 1-MPMSH₂ $\xrightarrow{\text{O}_2}$ 1-MPMS + $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2)$ 1-MPMS $\xrightarrow{\text{m-POD}}$ $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2) \rightarrow \text{light}$ isoluminol D-galacto-1,5-lactone
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH)	グルコース-6-P $\xrightarrow{\text{NAD}^+ \text{ G6PDH}}$ 6-phosphogluconolactone + NADH G6P $\xrightarrow{\text{G6PDH}}$ 6PG $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ MPMSH₂ $\xrightarrow{\text{O}_2}$ MPMS + $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2)$ MPMS $\xrightarrow{\text{m-POD}}$ $\text{O}_2^- (\text{H}_2\text{O}_2) \rightarrow \text{light}$ IL

図4 T₄の化学発光EIAと検量線

nm, Em460nm) バクテリアフェラーゼを用いた生物発光法などが知られており、この中で生物発光法が量子収率もよく高感度である。著者らの開発したNADHの化学発光法は、電子伝達体の1-メトキシフェナジンメチルサルフェート(1-MPMS)の共存下、NADHから O_2^- (H_2O_2)を生成させ、これが発光触媒のマイクロペルオキシダーゼ(m-POD)の存在でイソルミノール(IL)と反応して化学発光する原理で、検量域は図5に示すように生物発光法よりも若干感度が落ちるが、蛍光法よりも高感度にNADHを測定できる。この発光反応を用いるとNADHを生成する酵素はいずれも標識酵素として用いることが可能である。

グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)の活性を測定したところ 10^{-18} mol以上で検出できた。図6にG6PDHを標識酵素とした17-OHPのCLEIAを示す。検出限界は0.1 pg/アッセイである。

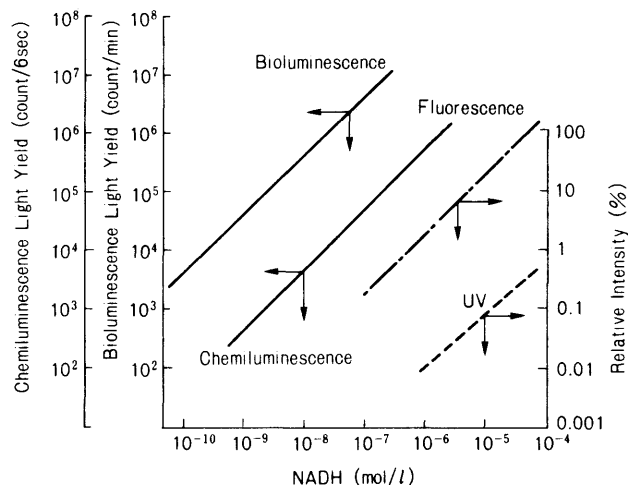


図5 種々の方法でのNADHの検量線の比較

17-OHP 標準液	0.1ml
抗-17-OHP 抗血清 (1 : 2.5×10 ³)	0.1ml
17-OHP-G6PDH (1 : 7.5×10 ³)	0.1ml
緩衝液	0.1ml
第二抗体固相化ビーズ	1個
↓ 37℃, 4hrs.	
↓ 洗浄 (生理食塩水) 3×	
NAD (5×10 ⁻⁴ M)	0.05M トリス 緩衝液 pH7.8
G6P (6×10 ⁻⁴ M)	
1-MPMS (5×10 ⁻⁷ M)	
↓ 4℃, 一夜	
反応液 0.2ml+水 0.3ml	
↓	
イソルミノール (1.2×10 ⁻⁵ M)	炭酸ナトリウム 緩衝液 pH9.5
m-POD (5×10 ⁻⁸ M)	
↓	
化学発光測定 (6秒間)	

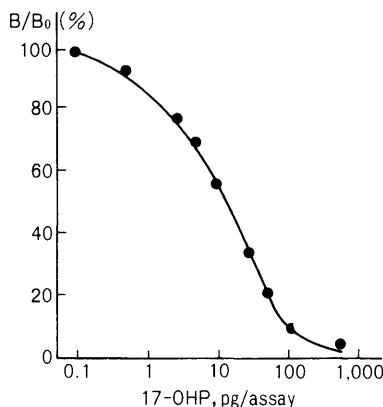


図6 G6PDHを標識酵素とした17-OHPのEIAとその検量線

表6 種々の検出法でのβ-D-ガラクトシダーゼの感度の比較

検出方法	検出限界
比色法 (D-NPGal, 410nm)	5×10 ⁻¹⁰ mol
蛍光法 (4-メチルウンベリフェリルガラクトシド)	2×10 ⁻¹⁴ mol
化学発光法 (ラクトース/IL/m-POD)	5×10 ⁻¹⁵ mol
(ラクトース/TCPO/ANS)	2×10 ⁻¹⁶ mol
(O-NPGal/GalDH/IL/m-POD)	1×10 ⁻²⁰ mol
生物発光法* (O-NPGal/GalDH/bacterial luciferase)	2×10 ⁻²² mol

* Ishikawa E., et al. Anal Lett, 19, 433, 1986.

著者らは表5に示したように、(β-Gal)の化学発光検出法①～③を確立した。β-Galの種々の検出法の感度の比較を表6に示す。著者らは表5の③法でも17-OHPのCLEIAを確立した。この時の17-OHPの検出感度は約30fg/アッセイである。

一方、KrickaらはPOD/ルミノール/H₂O₂の発光反応に対するエンハンサーを検討し、D-ルシフェリン、6-ヒドロキシベンゾチアゾール類、パラハロゲノフェノール類などが有効であることを見いだした。特にパラヨードフェノールはPODのルミノール発光を約5,000倍増強し、しかも、発光の持続時間が長くなり、発光の測定が容易になった。彼らはPOD標識EIAに本反応を適用し、極めて高感度なEnhanced CLEIAを開発した。マイクロタイタープレートを用いる測定装置や、インスタントフィルムに発光を写す装置も開発され、Amerliteの商品名で種々のホルモン、ガンマーカナーなどのキットとともに市販されはじめています。

5. 化学発光イムノアッセイ (Chemiluminescent Immunoassay CLIA)

RIAの放射性物質の代わりにルミノールやイソルミノール、アクリジニウムエステル誘導体などの化学発光性物質を抗原や抗体に標識する方法である。ルミノール誘導体のうち最もよく用いられているのはABEI (図7)で、免疫反応後にH₂O₂と触媒によりABEI標識体を化学発光検出する方法で、西ドイツのWoodやKlinglerらによって臨床診断への応用が進められている。一方、McCapraやWoodheadら

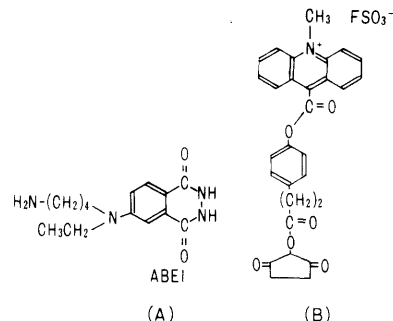


図7 イソルミノール誘導体とアクリジニウム誘導体

A: N-(4-アミノエチル)-N-エチルイソルミノール

B: N-メチルアクリジニウムエステルの活性エステル体

はアクリジニウムエステル誘導体 (図7) を標識化合物とするCLIAを報告している。この標識試薬は市販されていないが、種々のイムノアッセイのキットは市販されている。RIAより高感度であり、特にヒト甲状腺刺激ホルモン (TSH) は従来のRIAでは測定感度以下であった正常値以下のレベルの測定が可能となり、Hypothyroid Euthyroidなどの病態の診断に有用である。

Magic Liteの商品名で専用の測定器も開発され、キットとして現在臨床治験が行われている。

6. まとめ

生体成分の分析法はますます高感度化、微量化が要求されてきている。化学発光法や時間分解蛍光法による生体成分の分析法は高感度であり、測定のダイナミックレンジが広く、測定時間も短いなどの利点がある。ここではイムノアッセイについての応用をまとめた。ここで述べた方法は、いずれも実用分析法として用いられており、試料の微量化が進み、少量の試料で多くの情報が得られるようになった。

検出器の発展とあいまって、更に超高感度分析法への挑戦が今後も続けられることと思われる。

参考文献

- 1) 石川栄治, 宮井 潔, 辻 章夫編: 酵素免疫測定法 (第3版) (1987) 医学書院
- 2) K. Van Dyke (Ed): Bioluminescence and Chemiluminescence VolIII, CRC Press (1985)
- 3) L.J.Kricka (Ed): Ligand-Binding Assays, Labels and Analytical Strategies, Marcell Dekker (1985)
- 4) G.H.G.Thorpe and L.T Kricka: Methods in Enzymology 133 331 (1986)
- 5) 前田昌子, 辻 章夫: ホルモンと臨床, 35 677 (1987)
- 6) 辻 章夫, 前田昌子: 酵素免疫測定法 (蛋白質, 核酸, 酵素特集号) 共立出版 (1987)
- 7) W.G.Wood et al. (Ed): Bioluminescence and Chemiluminescence, New perspectives, 1987 John Wiley

7050形日立自動分析装置による腫瘍マーカーの測定

Automatic Determination on Tumor Markers with Hitachi Model 7050 Automatic Blood Chemistry Analyzer

藤田 誠一* 河田 興一* 片山 善章**

(昭和62年9月30日受理)

腫瘍マーカー (tumor markers) とは、理想的には、悪性腫瘍だけが産生する物質であり、もちろん健常人あるいは良性腫瘍には認められない物質のことを言う。

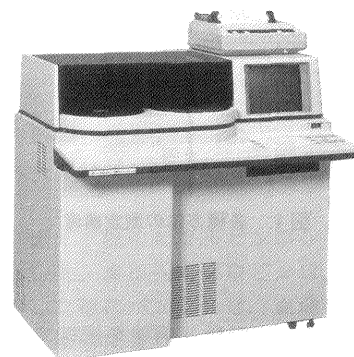
しかし、一般的に腫瘍マーカーと言えば、悪性腫瘍だけが産生する物質、いわゆる腫瘍特異物質と、健常人あるいは良性腫瘍ではほとんど証明されないか、ごく微量しか産生されない腫瘍関連物質の両者のことを指す。ところが、現在までに腫瘍特異物質の実用的な測定法が確立されていないため、腫瘍マーカーと言えば腫瘍関連物質を指すといっても過言でない。よって癌など悪性腫瘍以外の疾患でも認められることがあるので、他の検査成績や臨床データを加えて総合的に判断する必要がある。

腫瘍マーカーを測定する意義は、第1に癌の早期発見および特定臓器の推定、第2に治療後の病態把握である。ところが、現実には、前者の目的にはまだ満足する結果は得られず、もっぱら後者の目的で用いられる場合が多い。

現在までに知られている主な腫瘍マーカーを表1に示した。このように、腫瘍マーカーと呼ばれる物質は数多く報告されているものの決め手となるマーカーが無いのも現実である。

このようなことから最近では、単一のマーカーを測定するのではなく、いくつかの項目を組み合わせることによって、よりの確かな情報を得る傾向にある。

従来、腫瘍マーカーの測定法には、主に Radioimmunoassay (RIA) が用いられてきたが、この方法は周知のとおり特定の施設を必要としたり、廃棄物の処理などの問題があったが、測定感度の良さなどから他法への移行は



7050形日立自動分析装置

表2 Non isotopic immunoassay

1	Enzyme immunoassay
2	Spin immunoassay
3	Viro immunoassay
4	Metal immunoassay
5	Fluorescent immunoassay
6	Fluorescent polarization immunoassay
7	Luminescent immunoassay
8	Latex photometric immunoassay

必ずしもスムーズに行なわれてはいなかった。しかし、RIAのようなラジオアイソトープを用いない、いわゆる non isotopic immunoassay が数多く開発されるとともに RIA からの移行も速やかに行なわれつつある。

これら non isotopic immunoassay は、最終的に検知する物質によって分類され、主なものを表2に示した。これらの中で一般的に用いられているのは、Enzyme immunoassay (EIA)、Fluorescent immunoassay (FIA)、Latex photometric immunoassay (LIA) などである。

EIAでは、抗体感作ビーズを用いる方法が一般的であるが、抗体をコートした試験管を用いる方法やマイクロプレートに抗体を固相化した方法などがあり、今後広く普及する方法の一つと思われる。

FIAも感度が高い方法ではあるが、蛍光光度計など特定の機器が必要である。これらの問題が解決されれば普及する方法である。

また、LIAは感度も高く反応時間も短く簡便であるので、現在普及しつつある方法である。

以上述べたように腫瘍マーカーを測定する方法はかなりの数になる。ところが、先に述べたように現在の腫瘍マーカーにはまだ特異性に問題があり、単一の項目だけを測定

表1 主な腫瘍マーカー

癌胎児性物質	AFP	PAP
	CEA	γ-セミノプロテイン
	POA	
腫瘍関連酵素	ALP	
	AMY	
	γ-GT	
腫瘍関連物質	フェリチン	
	β ₂ -MG	
	ポリアミン	
	TPA	

POA: Pancreatic oncofetal antigen

TPA: tissue polypeptide antigen

* 国立循環器病センター 臨床検査部

** 国立循環器病センター 臨床検査部 医博

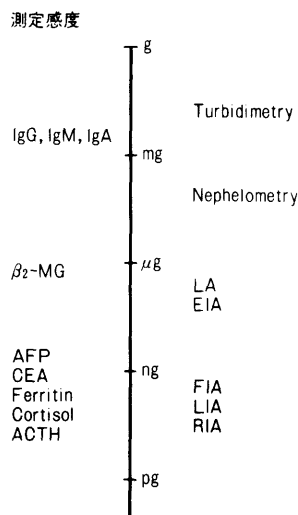


図1 各種方法の測定感度

CHEMISTRY PARAMETERS

TEST	[AFP]	[FER]	[BMG]
ASSAY CODE	{2POINT}: {22}-{32}	{2POINT}: {21}-{32}	{2POINT}: {22}-{32}
SAMPLE VOLUME	{20}	{20}	{10}
R1 VOLUME	{380}{50}{NO}	{380}{50}{NO}	{380}{50}{NO}
R2 VOLUME	{180}{20}{NO}	{180}{20}{NO}	{180}{20}{NO}
WAVE LENGTH	{ }{700}	{ }{700}	{ }{700}
CALIB. METHOD	{LINEAR}{0}	{LINEAR}{0}	{LINEAR}{0}
STD.(1) CONC.-POS.	{ 0.0}-{1}	{ 0.0}-{1}	{ 0.0}-{1}
STD.(2) CONC.-POS.	{116.0}-{2}	{524.0}-{2}	{312.0}-{2}
STD.(3) CONC.-POS.	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}
STD.(4) CONC.-POS.	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}
STD.(5) CONC.-POS.	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}
STD.(6) CONC.-POS.	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}	{ 0}-{0}
UNIT	{NG/ML}	{NG/ML}	{NG/ML}
SD LIMIT	{ 0}	{ 0}	{ 0}
DUPLICATE LIMIT	{10000}	{10000}	{10000}
SENSITIVITY LIMIT	{ 0}	{ 0}	{ 0}
ABS. LIMIT(ING/DEC)	{30000}{INCREASE}	{30000}{INCREASE}	{30000}{INCREASE}
PROZONE LIMIT	{ 70}{LOWER}	{ 40}{LOWER}	{ 65}{LOWER}
EXPECTED VALUE	{ 0}-{ 99999}	{ 0}-{ 99999}	{ 0}-{ 99999}
INSTRUMENT FACTOR	{1.00}	{1.00}	{1.00}

図2 日立7050形自動分析装置におけるパラメーター

するだけでは特定の疾患、病態を把握できないのが現状であり、他の項目の測定、すなわち複数の項目の測定によって病態を把握する必要がある。

このようなことにより、従来のように複数の項目を別々に長時間かけて測定するのは非能率的であり、他の生化学項目のように多項目同時分析、いわゆるランダムアクセス方式の分析機器が腫瘍マーカーの分野にも要求されるのは自然であり、現実的にも各メーカーによって開発されつつある。

とは言えこれらの機器のほとんどが専用機器であって各施設での希望する項目、方法を100%満足するのは難しい。

実際測定するときは複数項目測定するわけで、図1の様に免疫グロブリンの様にmg/dlオーダーからCEAのように数ng/mlを同じ機器で測定するのは非常に難しいと言える。

しかし、これらは項目に応じて測定法を変えることにより簡単に解決できる。

例えば、免疫グロブリン、補体成分C₃、C₄およびCRPなど高濃度（AFP、CEAなどに比べて）に存在するものは免疫比濁法（TIA）で測定し、AFP、CEA、フェリチン、β₂-MGなどはLIAで測定すると、同時分析も可能である。もっとも、CRPは最近ではより低濃度域での意義も注目されているので、LIAで測定してもかまわない。

これで問題が解決したわけではない。免疫化学的に測定するこれらの方法の検量線は、S字曲線か放物線を描く（一部には、ほとんど直線に近い検量線もあるが）のが普通である。このことから、用いる分析機器に多点検量線作成が可能な機能を有することが要求される。

今回、これらの機能すなわちランダムアクセス方式で多項目を同時分析でき、多点検量線作成も可能である「7050形日立自動分析装置」を用いて腫瘍マーカーの一つであるAFP、FER、β₂-MGの測定について述べる。

測定系をLatex photometric immunoassay (LIA) を用いる関係上、ここで簡単にLIAについて述べておきたい。

LIAは試料中の抗原物質に、それに対応する特異抗体を感作させたLatex粒子の懸濁液を添加すると抗原抗体反応が

開始して、Latex粒子が凝集し始め凝集塊が生成する。したがって、測定すべき物質の濃度に比例して凝集塊による濁度増加の速度を吸光度増加としてとらえ、測定すべき物質をfixed time rate assayで定量するものである。

以下、測定の詳細について述べる。

(1) 測定機器

日立7050形自動分析装置

(2) 試薬

日立7050形自動分析装置用試薬(AFP, FER, β₂-MG) (ヤトロン)

R1: 安定化液

R2: ラテックス懸濁液

(3) 測定方法

測定のパラメーターを図2に示した。

試料はAFP、FERは原血清を用い、β₂-MGは添付の希釈液で15倍希釈したものを試料とした。

(4) 検討成績

(a) 検量線

図3, 4, 5に示したような検量線が得られた。最少検知感度を0 ng/mlの試料を20回測定し、Mean±5SDの吸光度に相当する濃度とした場合の各々の項目の測定範囲は、AFP: 6~250ng/ml, FER: 20~1,000ng/ml, β₂-MG: 10~500ng/mlであった。なお、図3, 4, 5に示したように検量線はほぼ直線的であったので、AFP: 116ng/ml, FER: 524ng/ml, β₂-MG: 312ng/mlの標準液を用い、一点検量で測定し、以後の検討を行なった。

(b) 同時再現性

低、中、高濃度域の患者検体を用い各々20回測定した。

表3に示したようにFERの低濃度でCV11.4%とばらつきが見られたものの、各項目ともほぼCV 5%以内に収まっている。

(c) 希釈直線性

高、中濃度の患者検体を添付の希釈液で希釈し、その直線性について検討したところ図6に示したようにAFP: 250

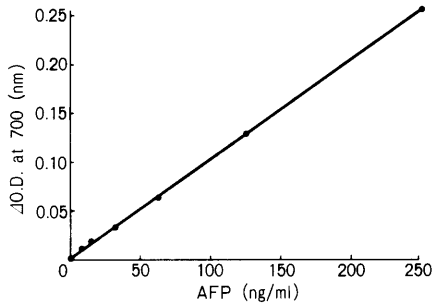


図3 検量線 (AFP)

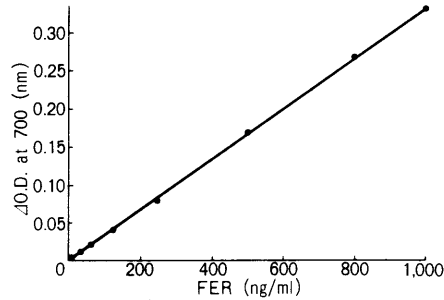


図4 検量線 (FER)

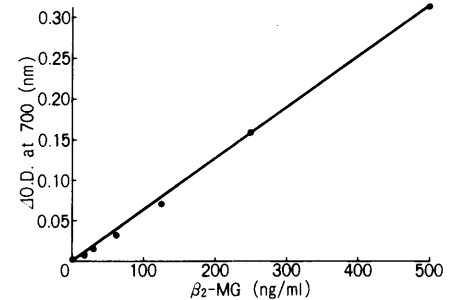


図5 検量線 (β₂-MG)

表3 同時再現性

	n	$\bar{X}$ (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
AFP	20	9.7	0.52	5.3
	20	17.1	0.58	3.4
	20	81.8	1.74	2.1
	20	146.0	2.42	1.7
	Mean			3.1
FER	20	16.6	1.90	11.4
	19	67.7	3.70	5.5
	20	213.0	2.52	1.2
	20	494.1	3.63	0.7
	Mean			4.7
β₂-MG	20	23.3	1.73	7.5
	20	52.5	1.83	3.5
	20	100.7	2.18	2.2
	20	468.9	3.04	0.6
	Mean			3.5

ng/ml, FER: 1,000ng/ml, β₂-MG: 500ng/mlまで直線性を示した。一方、低濃度域についてはβ₂-MGがやや直線性を示さない傾向を示したが、これは検量線からもわかるように若干S字曲線を示したためと思われる。

(d) 共存物質の影響

ビリルビンとヘモグロビンについて、その影響を検討した。

ビリルビンは、デイド社のビリルビンコントロール血清を患者血清に添加した。またヘモグロビンは、赤血球を生理食塩水にて洗浄した後にパンクさせ、血清に添加した。結果は図7に示したようにビリルビン、ヘモグロビン各々20mg/dl, 640mg/dlまで影響を認めなかった。

(e) 添加回収試験

本法の正確性を検討するために正常血清、溶血血清、黄疸血清、乳白血血清、RF陽性血清、M-タンパク血清に標準血清を添加して、その影響を検討した。表4, 5, 6に示すようにおおむね良好であった。

(f) 抗原過剰域の検討

免疫化学的手法を用いる方法である限り、いちばん問題となるのがこの抗原過剰域のチェックである。幸いに、本装置には独自の機構によって抗原過剰域のチェックが可能である。その結果、チェック可能域は図8に示すようにAFP: 1~300μg/ml, FER: 2.5~9μg/ml, β₂-MG: 1~45μg/mlであった。

(g) 他法との相関性

各項目についてEIA, RIAとの相関性を検討した。

図9に示したように、各項目とも良好な相関性が得られ

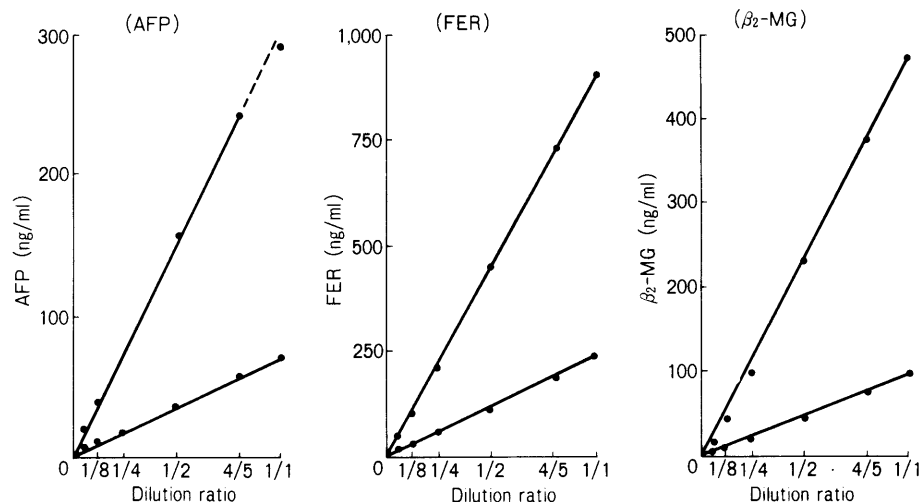


図6 直線性

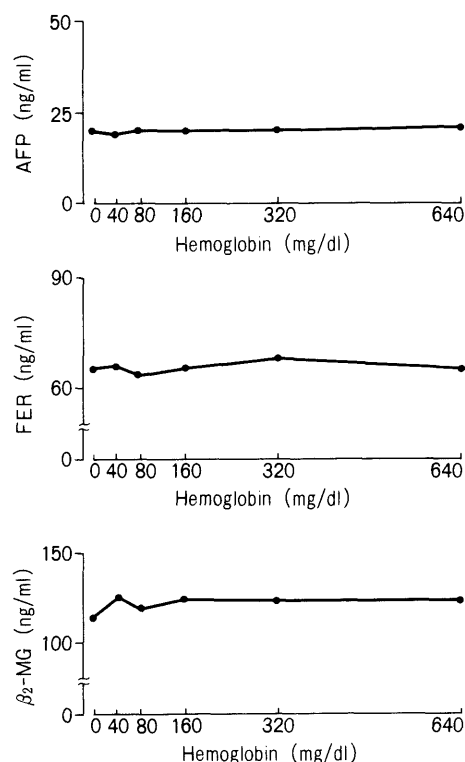


図7(a) ヘモグロビンの影響

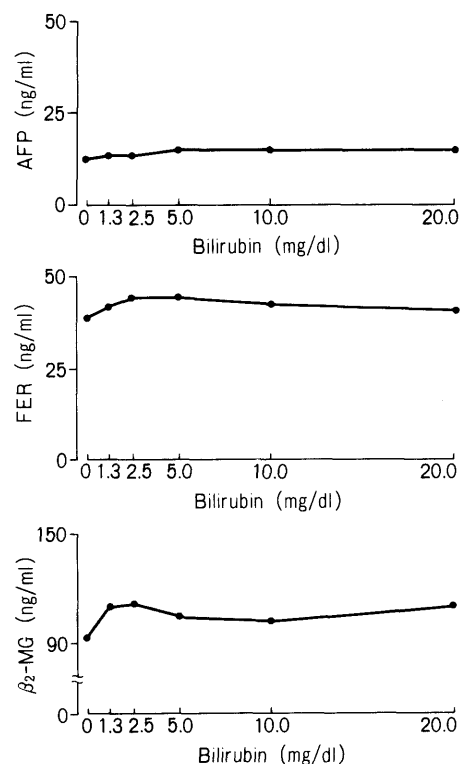


図7(b) ビリルビンの影響

た。項目によっては傾きに問題があるものがあるが、これは標準物質の濃度表示によるものと考えられる。

以上述べたように、日立7050形自動分析装置によるAFP、FER、β₂-MG測定は迅速かつ簡便である。

表4 添加回収試験 (AFP)

検 体	初濃度 (ng/ml)	添加濃度 (ng/ml)	実測値 (ng/ml)	回収率 (%)
正常血清	0.1	39.5	36.7	93
	0.1	91.5	80.3	88
	0.1	161.7	153.5	95
溶血血清A (200mg/dl)*	3.0	52.6	50.6	90
	3.0	93.1	93.1	97
	3.0	202.1	178.5	87
溶血血清B (200mg/dl)*	1.7	52.6	47.0	86
	1.7	93.1	82.1	86
	1.7	202.1	165.5	81
黄疸血清A (7.5mg/dl)**	2.1	52.6	55.6	102
	2.1	93.1	92.9	98
	2.1	202.1	201.6	99
黄疸血清B (11.2mg/dl)**	1.4	52.6	54.1	100
	1.4	93.1	105.3	107
	1.4	202.1	211.3	104
乳ビ血清A	0.3	52.6	40.2	76
	0.3	93.1	80.4	86
	0.3	202.1	151.7	75
乳ビ血清B	1.0	52.6	37.2	69
	1.0	93.1	66.9	71
	1.0	202.1	131.0	64
RF血清A (1:160)***	37.7	52.6	82.0	84
	37.7	93.1	122.9	92
	37.7	202.1	211.6	86
RF血清B (1:2560)***	2.7	52.6	42.0	75
	2.7	93.1	84.2	88
	2.7	202.1	170.0	83
M-血清A****	2.8	51.6	51.9	95
	2.8	102.8	99.1	94
	2.8	215.7	202.6	93
M-血清B****	9.1	51.6	56.2	91
	9.1	102.8	105.4	94
	9.1	215.8	204.1	90

* :ヘモグロビン濃度 *** :抗体価(RAHA)

** :ビリルビン濃度 **** :M蛋白血清

表5 添加回収試験 (FER)

検 体	初濃度 (ng/ml)	添加濃度 (ng/ml)	実測値 (ng/ml)	回収率 (%)
正常血清	30.9	27.2	59.7	106
	30.9	48.7	71.9	84
	30.9	84.3	112.1	96
溶血血清A (100mg/dl)*	150.4	21.8	173.7	107
	150.4	53.7	195.2	83
	150.4	109.2	245.0	87
溶血血清B (200mg/dl)*	99.7	27.2	119.5	73
	99.7	48.7	138.7	80
	99.7	84.3	183.3	99
黄疸血清A (17.5mg/dl)**	409.0	27.2	435.4	97
	409.0	48.7	459.1	103
	409.0	84.3	515.7	127
乳ビ血清A	34.5	27.2	57.2	98
	34.5	48.7	74.5	82
	34.5	84.3	116.7	98
乳ビ血清B	272.2	21.8	295.7	108
	272.2	53.7	314.7	79
	272.2	109.2	357.8	78
RF血清A (1:320)***	30.6	20.4	51.0	100
	30.6	38.6	66.9	94
	30.6	80.0	112.7	103
RF血清B (1:320)***	77.4	20.4	96.4	93
	77.4	38.6	114.7	96
	77.4	80.0	160.6	104
M-血清A****	286.6	21.8	305.5	87
	286.6	53.7	332.0	85
	286.6	109.2	383.6	89

* :ヘモグロビン濃度 *** :抗体価(RAHA)

** :ビリルビン濃度 **** :M蛋白血清

表6 添加回収試験 (β_2 -MG)

検体	初濃度 (ng/ml)	添加濃度 (ng/ml)	実測値 (ng/ml)	回収率 (%)
正常血清	96.0	89.2	189.6	105
	96.0	185.3	279.1	99
	96.0	366.5	445.3	95
溶血血清A (300mg/dl)*	56.2	89.2	175.1	133
	56.2	185.3	263.9	112
	56.2	366.5	395.7	93
溶血血清B (200mg/dl)*	209.1	89.2	316.7	121
	209.1	185.3	403.3	105
	209.1	366.5	605.3	108
黄疸血清A (4.3mg/dl)**	174.0	89.2	311.1	154
	174.0	185.3	408.4	126
	174.0	366.5	516.9	94
黄疸血清B (5.6mg/dl)**	74.7	89.2	146.5	80
	74.7	185.3	254.5	97
	74.7	366.5	431.1	97
乳ビ血清A	51.1	89.2	139.1	99
	51.1	185.3	246.4	105
	51.1	366.5	403.7	96
乳ビ血清B	62.3	89.2	151.1	100
	62.3	182.3	240.9	96
	62.3	366.5	394.4	91
RF血清A (1:160)***	69.7	89.2	160.0	101
	69.7	182.3	268.1	107
	69.7	366.5	398.3	90
RF血清B (1:320)***	145.8	89.2	242.5	108
	145.8	182.3	334.6	102
	145.8	366.5	473.7	89
M-血清A****	235.6	89.2	360.4	140
	235.6	182.3	451.1	116
	235.6	366.5	597.3	99
M-血清B****	281.3	89.2	381.0	112
	281.3	182.3	440.7	86
	281.3	366.5	561.9	77

* :ヘモグロビン濃度 *** :抗体価 (RAHA)
 ** :ビリルビン濃度 **** :M蛋白血清

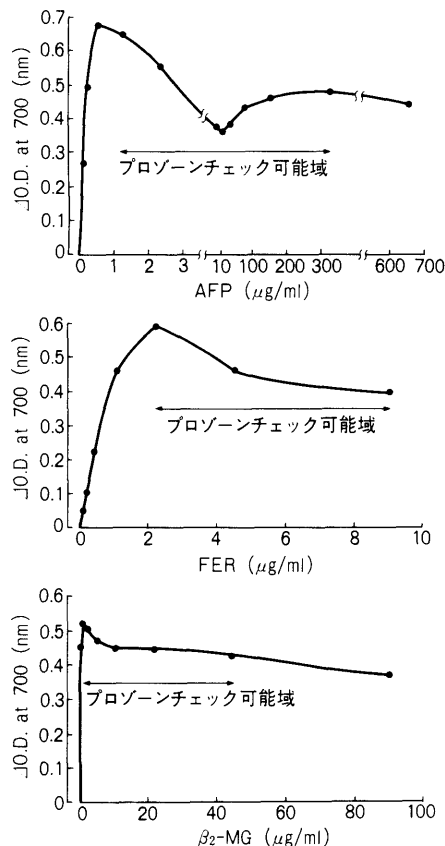
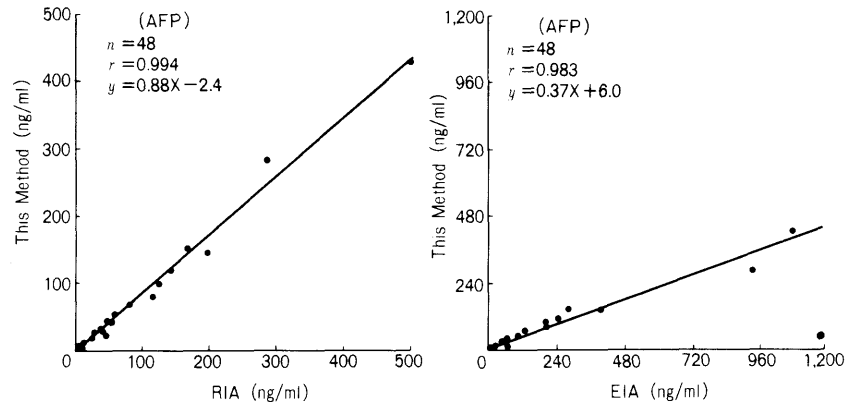
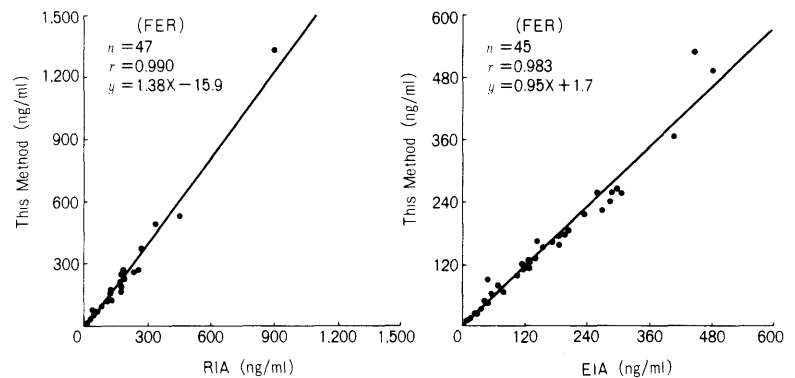


図8 ゾーン現象



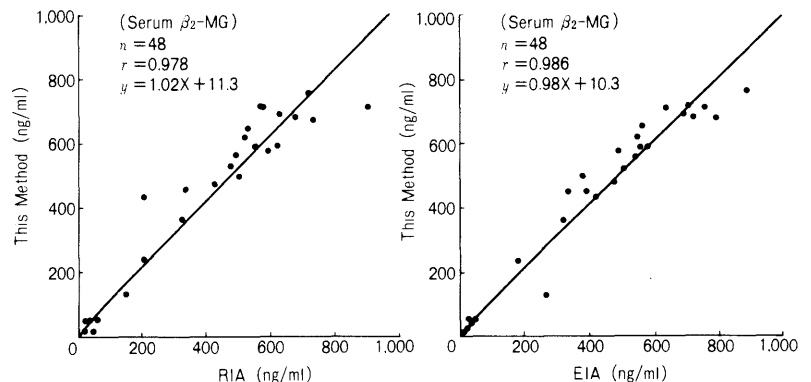
(a) 他法との相関 (AFP)

図9 (a) 他法との相関 (AFP)



(b) 他法との相関 (FER)

図9 (b) 他法との相関 (FER)

(c) 他法との相関 (血中 β_2 -MG)図9 (c) 他法との相関 (血中 β_2 -MG)

また、最初に述べたように現在の腫瘍マーカーは、単一項目で測定しても病態把握は難しく、複数項目を測定することによってより多くの情報を得ることができる。

今後はもっと多くの腫瘍マーカーと急性相反応性物質である C_3 、 C_4 、CRP、シアル酸などを同時に測定することによって、より多くの臨床データと対比させ、その結果、どの腫瘍マーカーを組み合わせると、どのような疾患に有効であるかが分かるようになると思われる。

最後に、本装置がこのような目的に使われることを期待して稿を終えたい。

705形日立自動分析装置による検体原液での各種炎症蛋白の定量

Automatic Determination on Some Plasma Proteins Acute Phase Reactants by Non-Dilution Method with Hitachi Model 705 Automatic Blood Chemistry Analyzer

首藤 昇一* 宇佐 利隆**

(昭和62年10月2日受理)

要旨

現在、各種血漿蛋白の定量は種々の測定方法が開発され、実用化されている。従来法では低濃度域における血漿蛋白の測定が困難であったが、今回我々のTIA法では感度ならびに精度に関して、はるかに良好な成績が得られた。また705形日立自動分析装置を用いることにより、緊急検体、少量検体等の測定が可能になり、臨床的にも有用性が得られたので報告する。

1. はじめに

現在の各種血漿蛋白の定量法としては、一元免疫拡散法 (SRID法)、レーザーネフェロメトリー法 (LN法)、免疫比濁法 (TIA法) 等が実施されているが、SRID法は結果が得られるまでに2～3日間かかってしまい緊急検体の処理が不可能である。LN法では専用機器を必要とするし、従来の免疫比濁法では検体を希釈しなければならず、生化学の項目と同時測定が不可能であり、また日立705形ではOne point calibration法でしか測定できないため、低濃度域での可溶化による測定値の低下がみられ、正確な定量値が得られなかった。そこで今回我々は、検体を希釈せずに低濃度域まで正確に測定が行なえる方法を検討し、良好な結果を得た。

2. 材料及び方法

(1) 測定原理

本法は血清中の補体 (C_{3c}, C₄, Factor B)、ハプトグロビン、 α_1 -アシッドグリコプロテイン、トランスフェリン、 α_1 -アンチトリプシン、 α_2 -マクログロブリン、CRP等の抗原量を抗原抗体反応を用いて免疫比濁法にて主波長340nmで比色測定し、求めるものである。

3. 試薬及び測定機器

試薬：各種抗血清はLN用抗血清 (ベーリング社)、緩衝液はリン酸緩衝液 (分散剤含有)、又は、アクセレレータ (ベーリング社)、標準血清はLN蛋白標準血清 (ベーリング社) のそれぞれ原液を使用した。

測定機器：705形日立自動分析装置を用いた。

4. 測定操作

本法による血漿蛋白の自動測定操作は、表1に示したような設定条件のもとに実施した。すなわちLN蛋白標準血清 (各項目の濃度は能書に記載) を対照として、検体 (原血清) と緩衝液を混合し、37℃で5分間incubateし、検体ブランクを340nmで測定し、第2試薬である抗血清を添加し、さらに5



705形日立自動分析装置

表1 分析パラメータ CHEMISTRY PARAMETERS (6画面・7画面)

TEST CODE	任意	* Sample Volume
ASSAY CODE	End	○ CRP 20 μ l
SAMPLE VOLUME *	5~20 μ l	○ α_1 -AG, HP, Tf, α_2 -MG
R1 VOL.	350 μ l	○ α_1 -AT, C _{3c} , C ₄ , C ₃ Ac (Factor B)
R2 VOL.	50 μ l	5 μ l
R3 VOL.		
WAVE LENGTH 1	700nm	
WAVE LENGTH 2	340nm	
RGT.BLK.ABS		
RGT.BLK.CONC		
STD.CONC	任意	
FACTOR		
STD.ABS.ALLOWANCE	2%	
NORMAL RANGE L		
NORMAL RANGE H		
ABS.LIMIT (RATE)		
CONTROL.ID.NO.		

7画面 任意 1-1

分間incubateして340nmにて抗原量を求めた。

5. 成績

[希釈試験]：LN蛋白標準血清を用いて希釈系列を作成して検討を行なったところ、図1に示すような濃度まで各項目とも原点を通る直線性が確認された。

[同時再現性]：各項目の低濃度、中濃度、高濃度試料を用いて、20回同時測定による再現性の結果を表2に示した。すなわち、各濃度ともCVで1%以内と良好な結果が得られた。

* 国立佐賀病院 研究検査科

** 国立佐賀病院 内科

表2 同時再現性 INTRAASSAY

	Low			Med.			High		
	Mean	S.D.	C.V. (%)	Mean	S.D.	C.V. (%)	Mean	S.D.	C.V. (%)
CRP	0.3	0.0026	0.87	3.2	0.022	0.68	14.7	0.031	0.21
α_1 -AG	2.8	0.014	0.49	54	0.234	0.41	162	0.437	0.27
HP	3.6	0.0068	0.19	104	0.187	0.18	280	0.56	0.20
TF	97	0.208	0.21	203	0.426	0.12	340	3.09	0.91
α_2 -MG	105	0.21	0.20	210	0.336	0.16	289	1.33	0.46
α_1 -AT	31	0.068	0.22	72	0.194	0.27	251	0.83	0.33
C _{3c}	4.5	0.007	0.16	54	0.119	0.22	108	0.95	0.88
C ₄	7.8	0.016	0.20	25.6	0.049	0.19	49	0.181	0.37
C _{3Ac}	3.2	0.030	0.93	14.5	0.078	0.54	41	0.201	0.49

 α_1 -AG： α_1 -アシッドグロブリン α_2 -MG： α_2 -マクログロブリン α_1 -AT： α_1 -アンチトリプシン

unit: mg/dl

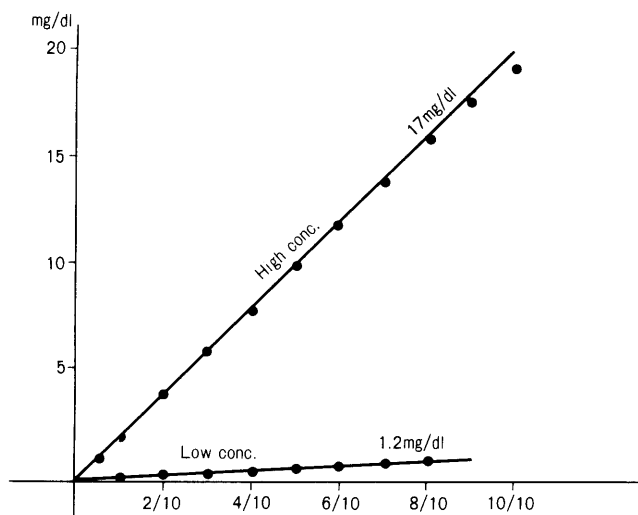


図1 CRP測定の直線性 Linearity of CRP assay

[従来法との相関]：本法とLNとの相関についての結果は、各項目とも相関係数 $r=0.9$ 以上という近似的相関が認められた。またReaction time courseは図2示すようにほとんど反応が終了する。

6. 臨床的検討

本院に入院中の各種疾患患者における血漿蛋白量の動態について追求を行なった。

症例1〔図3：(a)~(c)〕：肺疾患

症例2〔図4：(a), (b)〕：尿路感染症

症例3〔図5：(a)~(c)〕：ウイルス感染症

症例4〔図6：(a), (b)〕：膠原病

症例5〔図7〕：肝疾患

急性炎症性疾患の中で細菌感染症ではCRPをはじめとして、 α_1 -AG、Hp、 α_1 -ATの著明な上昇がみられた（図3：(a)~(c)、図4：(a), (c)）。しかし、ウイルス性疾患（インフルエンザや急性肝炎）では、炎症物質の増加は弱く補体の上昇も軽微であった（図5：(a)~(c)）。

炎症症状の強いリウマチ様関節炎（RA）やSLEでもCRPと α_1 -AGは上昇したがHPは低下傾向を示し、補体群ではC₄とFactor B（C_{3Ac}）が軽度上昇しH₅₀の低下をみた（図6：(a), (b)）。また、炎症物質の合成の一部は肝臓で行なわれるため、肝疾患ことに肝硬変症ではHPや α_1 -AGの著しい低下をみた（図7）。興味ぶかいことは、胆のう炎を合併した肝硬変症の患者では、正常域にあったHPと α_1 -AGが治療により症状の改善とともに両者が著明に低下し、肝障害の程度を示した。

7. 考察

各種疾患における血漿蛋白の推移は、病態の診断、予後

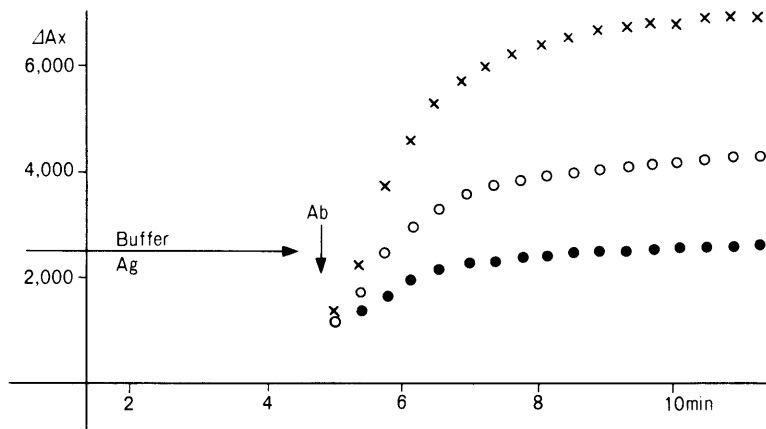


図2 免疫反応のタイムコース Reaction time on assay

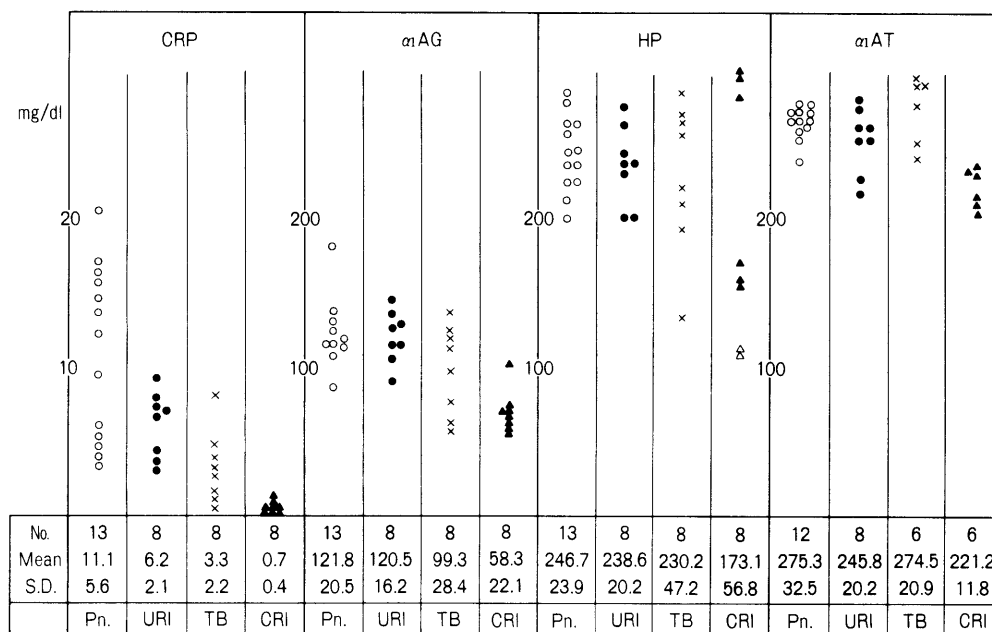


図 3 (a) 症例 1 : 肺疾患の測定例

M.M. 28y.o. Female #36737

Dx. Acute tonsillitis

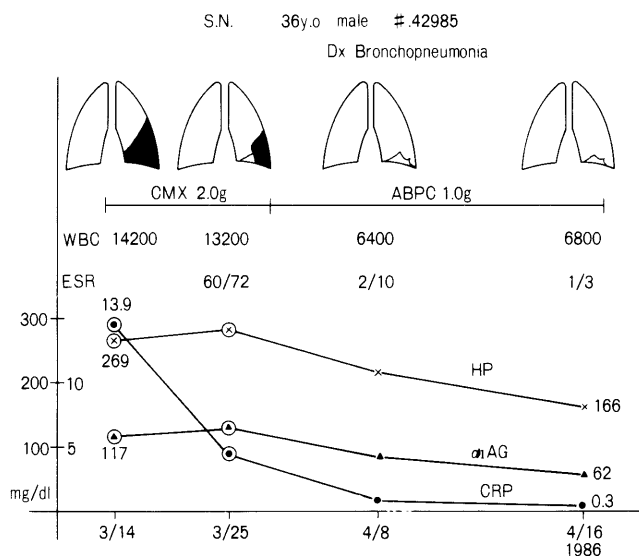


図 3 (b) 症例 1 : 肺疾患の測定例

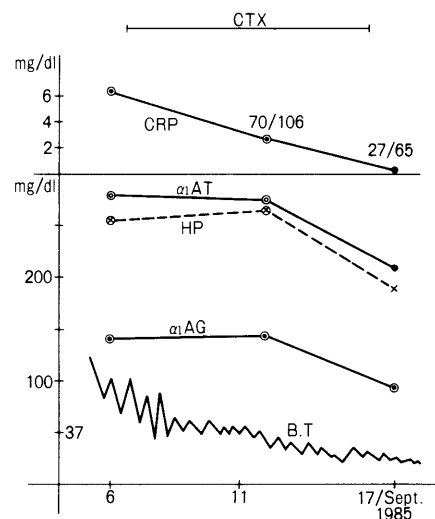


図 3 (c) 症例 1 : 肺疾患の測定例

の経過観察等に役立つが、従来法では測定操作上において、再現性や操作の複雑さ、低濃度域での測定不能など種々問題点が指摘されてきた。特にその中で問題となるのは、比色測定時の非特異的比濁（乳白血清等）のため食後の測定が不可能であり、また、未熟児のAPRスコア、IgA、IgMなどの低濃度域での正確な測定は可溶性現象のため測定ができなかったが、分散効果を強めることにより、これらは解決された。

今回我々は、LN用抗血清を使用して、自動化への適用として、測定機器に705形日立自動分析装置を用いて、基礎的検討を行ない、合わせて臨床的に満足すべき結果が得られた。すなわち感度および精度に関しては、すこぶる良好な

成績が得られた。特に低濃度、高濃度域における成績は臨床データとも良く一致し、種々の疾患における病態を十分に把握できるものと考えられた。さらに測定項目を増し、綿密な検討を加えることにより、一層病態把握における効果が見られるものとして、今後の汎用が期待される。

本論文の要旨は

第40回国立病院療養所総合医学会（1985年）

第7回日本炎症学会（1986年）

第18回日本臨床検査自動化学会（1986年）

第8会日本炎症学会（1987年）において発表した。

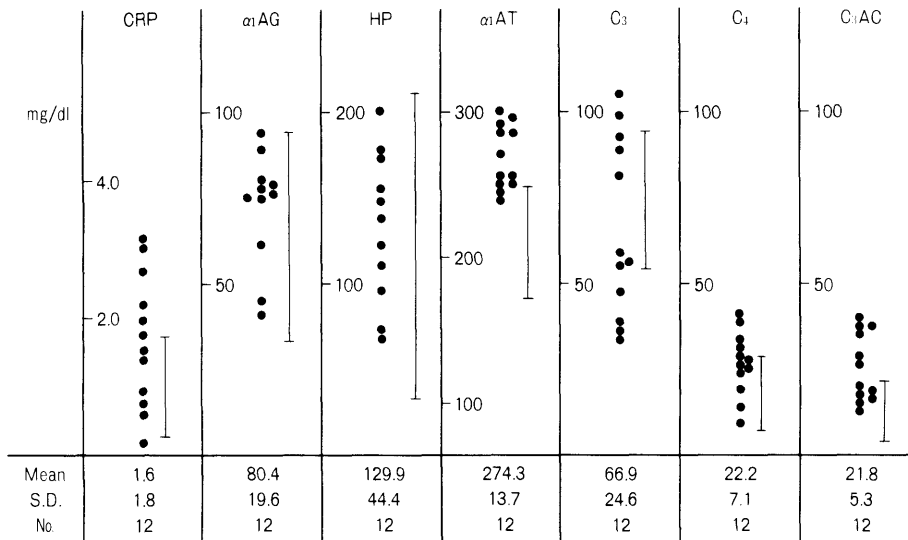


図 4 (a) 症例 2：尿路感染症の測定例

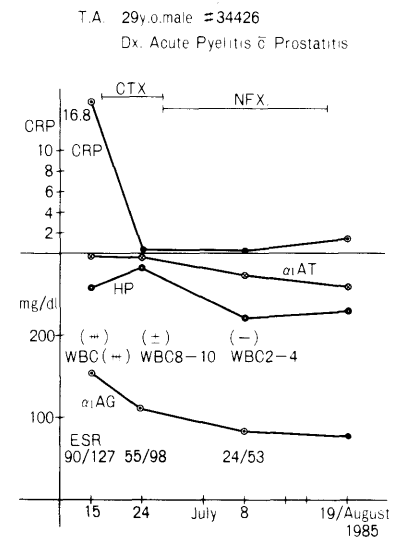


図 4 (b) 症例 2：尿路感染症の測定例

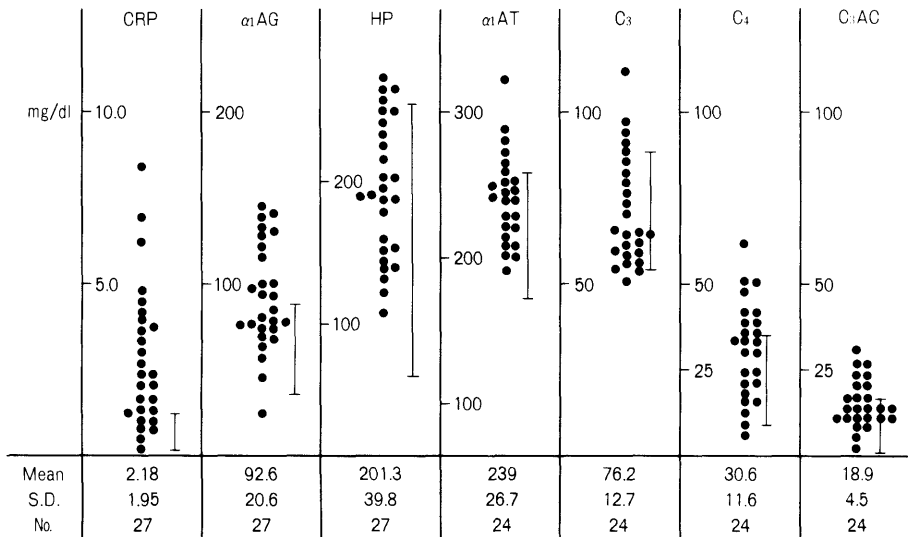


図 5 (a) 症例 3：ウイルス感染症の測定例

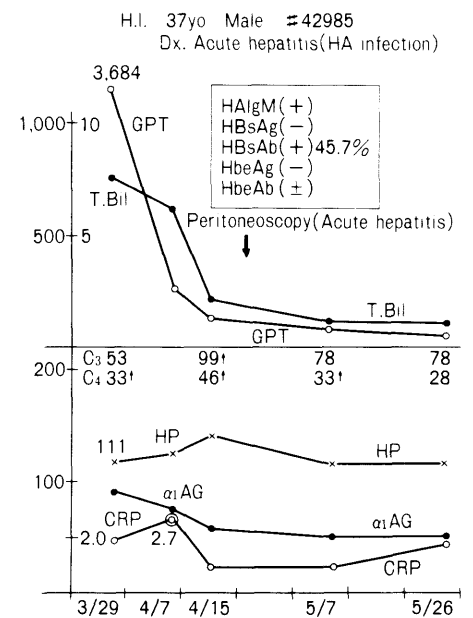


図 5 (c) 症例 3：ウイルス感染症の測定例

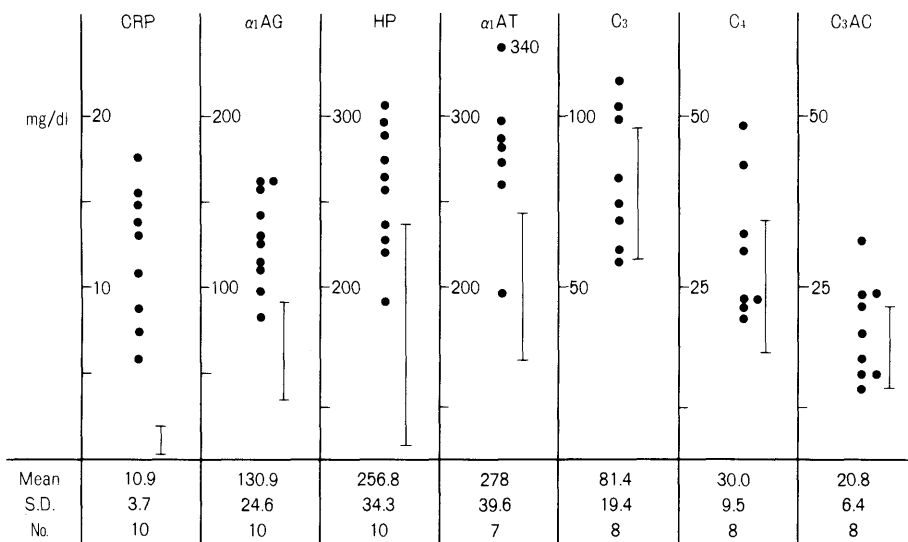


図 5 (b) 症例 3：ウイルス感染症の測定例

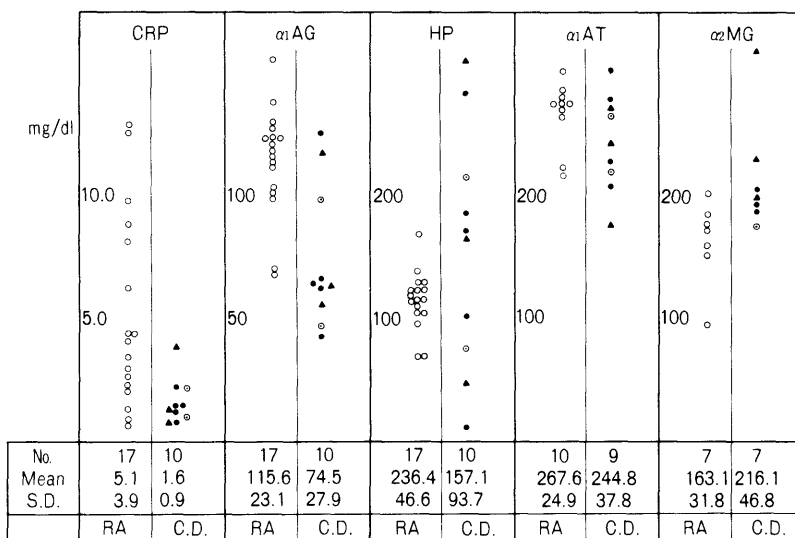


図 6 (a) 症例 4 : 膠原病の測定例

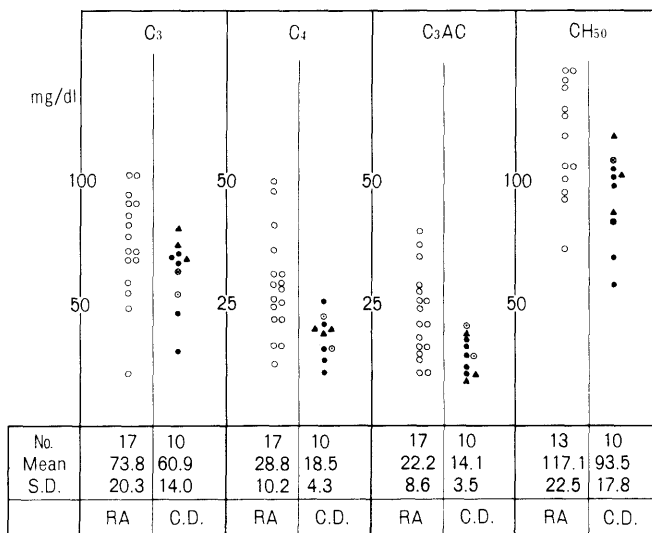


図 6 (b) 症例 4 : 膠原病の測定例

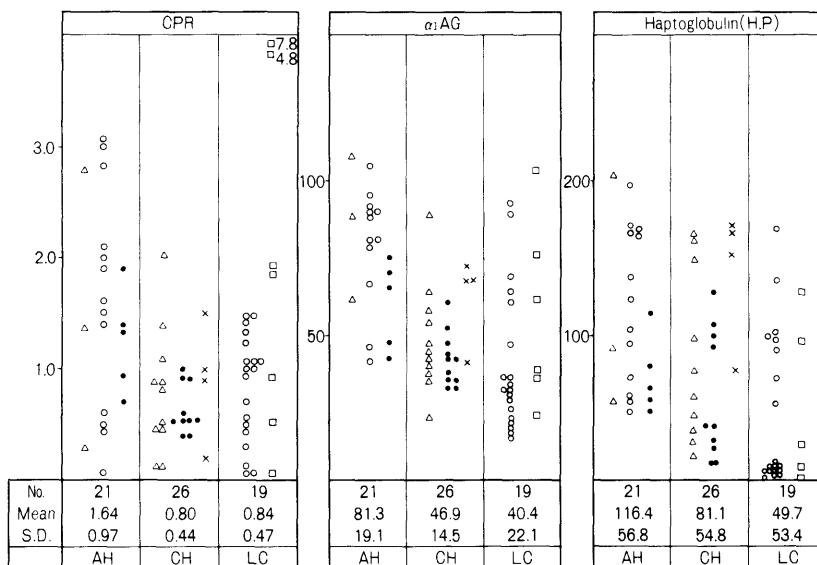


図 7 症例 5 : 肝疾患の測定例

解 説

Z-9000形日立多元素同時分析原子吸光分光光度計

Hitachi Model Z-9000 Simultaneous Multielement Atomic Absorption Spectrophotometer

奥本 豊治* 塚田 正道* 戸辺 早人* 北川 正敏* 米谷 明** 沢株 均***

(昭和62年7月22日受理)

1. はじめに

最近先端分野（新素材、半導体）の超微量分析、疾病と微量元素の相関研究、ICP発光分析装置使用顧客では試料の微量化、高感度化などで多元素同時高感度分析のニーズが高まっており、それらにこたえるためZ-9000形日立多元素同時分析原子吸光分光光度計（以下、Z-9000形と略す。）を開発した。Z-9000形（図1）は1回の原子化による複数元素の同時分析を世界に先駆けて実現した原子吸光分光光度計である。

従来原子吸光光度法は、1試料1元素測定の領域にとどまっていたが、偏光ゼーマン法を用いた理想的なダブルビーム測光の使用と、多数のホローカソードランプの光源をグラファイトキュベット部へ、1本の光源のようにたばねる光量ロスの少ない光学系の開発により4元素同時、8元素自動測定が可能となった。

2. 特長

Z-9000形は、微量試料の多元素同時分析と高感度分析を目的としたグラファイト炉原子化法専用の装置で、最大4元素までの同時測定、8元素自動分析機能や、偏光とゼーマン効果を用いたバックグラウンド吸収補正機能を備え、またオートサンプラや光温度制御装置、12インチグラフィック表示CRT、データ処理装置、グラファイト用電源、多機能形オートサンプラなどがすべて内蔵されている。

主な特長を以下に述べる。

- (1) 4元素の同時測定、8元素自動分析ができる。ホローカソードランプからの光量のロスを最小限に抑える光学系の開発により、原子吸光法における多元素同時分析を実現した。従来装置に比較してスループットの大幅向上と、試料中の元素存在比の決定など、新分野への対応が可能である。
- (2) 原子化部としてグラファイトアトマイザを採用しているので、微量な試料量（10～40 μ l）で高感度な測定（フレイム法に比べ1～2桁高感度）ができる。
- (3) 内蔵のオートサンプラにより、測定を大幅に簡略化した。

キュベット内添加による標準添加法・簡易標準添加法の自動測定や、100倍の希釈、試料注入および乾燥の繰返しによる濃縮機能、試薬添加機能などを備えている。希釈およ



図1 Z-9000形日立多元素同時分析原子吸光分光光度計

び濃縮機能ピーク幅法による検量線作成機能を備えることにより、測定可能濃度範囲を約1,000倍拡大した。

(4) 光温度制御によるキュベットの加熱が、キー入力一つで可能である。試料による汚れのない新しい光学系を採用することによって、長時間にわたり安定した制御が行えるようになった。もちろん、電流制御方式との切り替えも可能である。

(5) ゼーマン法によるバックグラウンド補正機能を備えているので、安定したベースラインが得られる。また、全波長域にわたる正確なバックグラウンド補正が可能である。

3. 構成

本装置は、最大8本のホローカソードランプが装着できる光源室、1T（テスラ）の静磁場が印加されたグラファイト炉原子化部、独立に動作する4個の回折格子を備えた分光器、4元素分の光の吸収量を個々に検知する4個の光電子増倍管、CPU制御による希釈、濃縮、添加機能を保有するオートサンプラ、グラファイト炉用電源、CPUデータ処理装置、グラフィックス表示CRT、新採光方式による光温度制御装置によって構成されている。

3.1 光学系

本装置の光学系を図2に示す。

同時測定を行う最大4本のホローカソードランプから発せられた目的元素特有の波長の発光線群は、集光ミラーによってあたかも1本の光束であるかのように集光され、グラファイト炉原子化部を通過する。グラファイト炉原子化部は1Tの永久磁石の中に置かれており、試料蒸気には常時静磁場が印加されている。このため、目的元素の原子吸収線

* 株式会社日立製作所 那珂工場 光学装置設計部
** 日立計測エンジニアリング株式会社 日立テクノリサーチセンター
*** 日立計測エンジニアリング株式会社 設計部

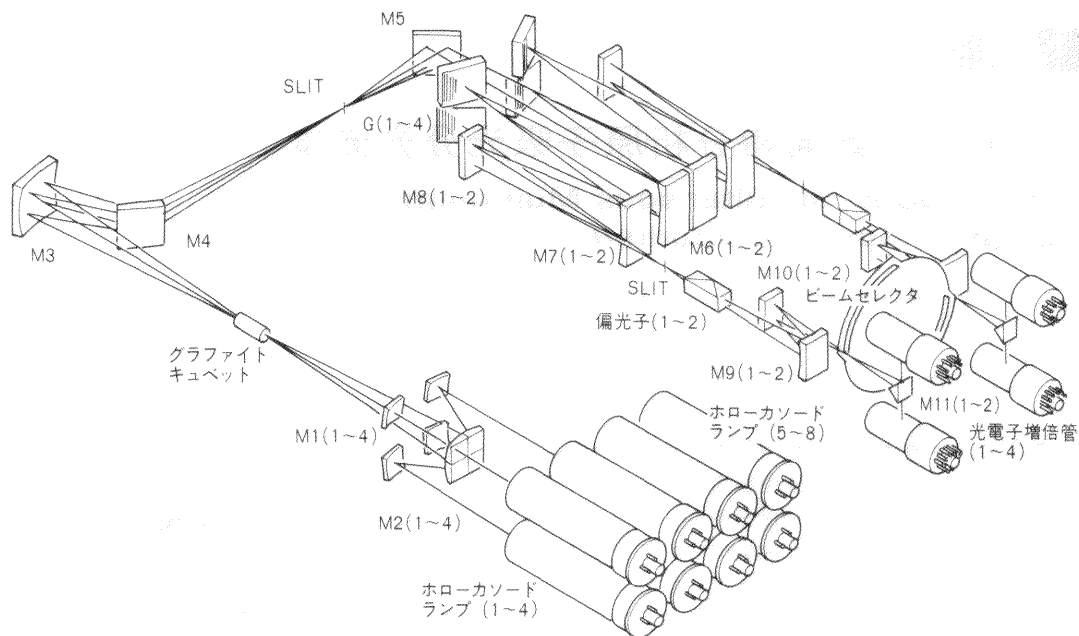


図2 光学系

のスペクトルは、ゼーマン効果によって磁場方向に平行な直線偏光特性を持ち、波長の変化しない π 偏光成分と、垂直な直線偏光特性を持ち、 π 偏光成分を中心に短波長側と長波長側にシフトする σ 偏光成分に分裂する。試料蒸気中では次のような現象が生じる。

- (1) 磁場方向に平行な直線偏光成分 ($P_{\parallel}$) の光は原子蒸気とバックグラウンド成分により吸収される。
- (2) 磁場方向に垂直な直線偏光成分 ($P_{\perp}$) の光は、バックグラウンド成分により吸収されるが、原子蒸気による吸収はわずかである。

原子化部において吸収を受けた最大4元素分のそれぞれの偏光成分の光は、入射スリットにおいて集光された後、互いに独立に動作する4個の回折格子によりそれぞれ分散される。そして、4元素に特有の分析波長の光がそれぞれ取り出され、その4本の光束が偏光子を通過することによって、それぞれの偏光成分の光に分離される。その後、偏光子により分けられた4元素分の磁場方向に平行な直線偏光成分 ($P_{\parallel}$) と垂直な直線偏光成分 ($P_{\perp}$) は、4元素に対応する4個の光電子増倍管によって検知される。以上の説明のように、4元素分のホローカソードランプから出た光束は、試料の原子化部であるキュベットおよびスリット部において立体的に交差するだけであり、その他の部分では全く異なる空間を通過している。

3.2 オートサンプラ

本装置は、高性能オートサンプラ (図3) を内蔵しているので、簡単な入力操作で多項目の測定に対応することが可能である。分析試料は72個 (希釈を行う場合は36個) まで設定でき、その他標準試料を9個、試薬を1個設定することができる。また、希釈作業や濃縮作業も行う。希釈機能は10 μ lの試料を吸引し、この試料と希釈液990 μ lを同時に吐き出して行う。すなわち、希釈倍率は100倍の固定とな

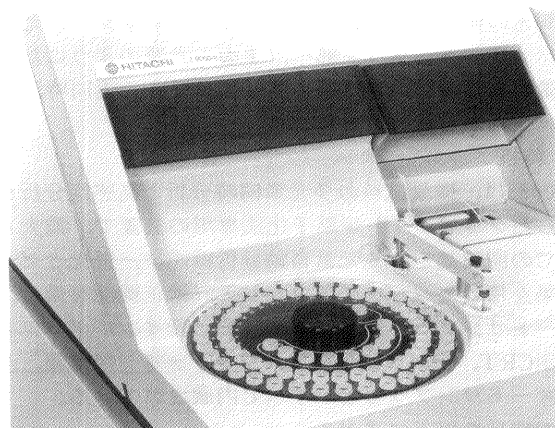


図3 オートサンプラ

る。濃縮は図4に示すように、試料注入と乾燥の繰返しにより行う。まずオートサンプラが試料を吸引し、キュベットの中へ吐き出す。ここで乾燥ステージだけが実行され、試料中の溶媒分が除去される。その後再びオートサンプラが試料を注入し、以下同様に繰返しが行われる。このようにしてキュベットの中には繰返し回数分だけの試料が乾燥状態で入っていることになり、これを原子化することによって濃縮された試料の原子化信号を得ることができる。キュベットへの試料注入量は、10, 20, 30, 40 μ lの4段切換えである。測定モードは、単に吸光度を求めるモードのほか、検量線法や標準添加法、簡易標準添加法にも対応する。標準添加法および簡易標準添加法は、炉内添加法 (従来のように、あらかじめ標準試料と未知試料を混合させ、試料を作成する必要はない) を採用し、キュベットの中へオートサンプラが2回試料を注入し、キュベットの中で試料の

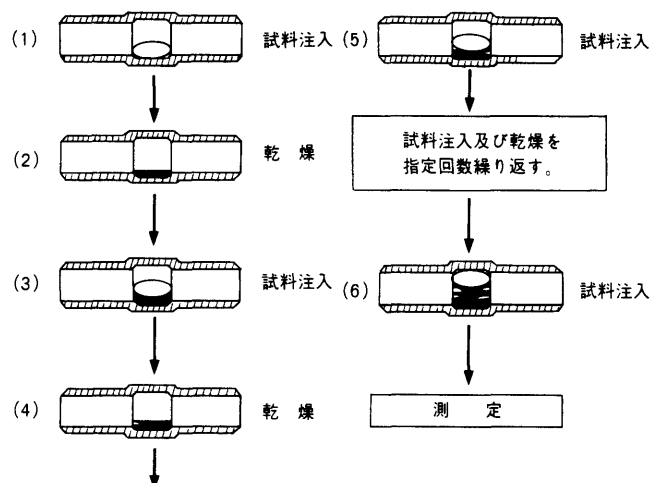


図4 本装置による濃縮機能

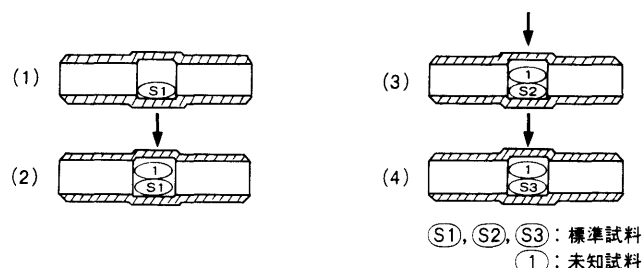


図5 標準添加法における測定用溶液の調製

混合が行われる。

すなわち図5に示すように、まず標準試料(S1)の測定を行いブランクの吸光度を求めた後、標準試料(S1)を炉内に注入し、引き続き未知試料①を炉内に注入して測定を行う。次に、標準試料(S2)と未知試料①を注入して測定を行う。この動作を指定された標準試料数だけ繰り返すことにより、未知試料①の濃度を算出する。

3.3 光温度制御

キー入力1つで、キュベットの加熱方法として光温度制御と電流制御を切り換えることが可能である。電流制御方式は、一定電流がキュベットに流れるように制御する方法であるため、キュベットの抵抗値の変化やばらつきによって、温度が若干変化する場合がある。また電流値によって、キュベットの温度上昇率が変化し、一定温度に到達するのにかなりの時間を必要とする。これに対し光温度制御は、キュベットの発光量を検知し、その発光量に応じて電流を制御するものである。図6に、各制御方式による経過時間と電流及び温度の関係を示す。

光温度制御は、キュベットの温度により制御を行うので、キュベットの抵抗の変化やばらつきによる温度の変化を最小限に抑えることができる。また、原子化ステージ初期のキュベットの温度上昇率を高めることができ、かつ設定温度に関係なく一定の温度上昇率を得ることができる。この方式により、ピーク信号が高くなり感度が上昇する。光ファイバを用いず光軸上のキュベットの発光を直接採光する

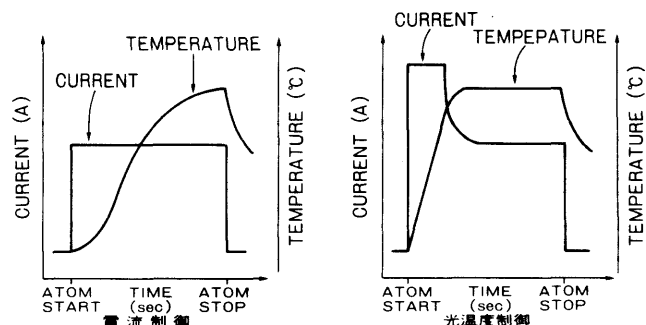


図6 各制御方式による経過時間と電流及び温度の関係

新方式を採用しているため、試料による汚染の心配がなく、長時間にわたり安定した制御が可能である。

4. 多元素同時分析条件の検討

従来のフレームレス原子吸光法においては、原子吸収感度や各元素ごとに温度プログラムが決められていた。しかしながら、同時測定が可能な4元素について原子化が1回で行われるため、新しく温度プログラムを検討することが必要である。特に今回は原子化温度についての実験を行った。実験は原子吸収感度の原子化温度依存性を見るために、乾燥・灰化温度を一定にし、原子化温度のみを変化させ、そのときの原子吸収信号（ピーク高さ）を測定した。実験に使用した試料は主にICP発光分析用の混合標準試料（Merck社製）である。

得られた結果を図7に示す。同図は最も高い原子吸収信号の点を1として正規化したものである。一般に原子化温度が高くなるほど原子吸収信号（ピーク高さ）は増加し、装置で得られる最高温度（3,000℃）において最大となる。

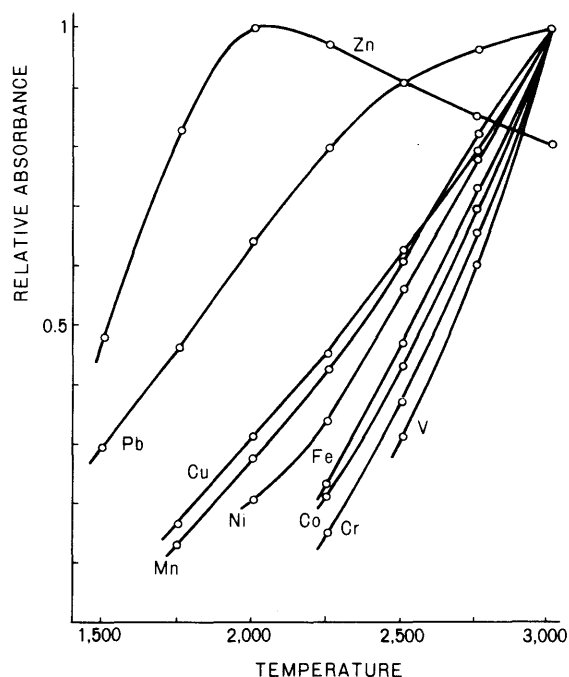


図7 原子吸収信号の原子化温度依存性

表1 混合標準溶液の調整 (各元素の濃度)
(単位: ppm)

元素	STD.1	STD.2	STD.3	STD.4
Cr	0.00	1.00	2.00	4.00
Cu	0.00	1.00	2.00	4.00
Mn	0.00	0.50	1.00	2.00
Pb	0.00	1.00	2.00	4.00

表2 測定条件 (同時測定)

Element	Lamp current (mA)	Wavelength (nm)	Sample sizes	Heating (°C;sec)*			
				Dry	Ash	Atomize	Clean
Cr	10	359.3	10 μ l	80-120;20	420;30	2900;10	3000;3
Cu	7.5	324.8					
Mn	7.5	279.5					
Pb	7.5	283.3					

また、原子化温度が3,000℃よりも低い温度で原子吸収信号が最大となる元素は極めて少ないことがわかった。

大部分の元素については、原子化温度を高くするほど、原子吸収信号は増加している。したがって、原子化温度についてのみ言えば、原子化温度を3,000℃に統一して多元素同時測定が可能である。すなわち、原子化温度は与えられた元素群の中で最も高い温度を必要とする元素の原子化温度に設定する方法が有効であると考えられる。

5. 高濃度試料の測定——検量線ダイナミックレンジの拡大のため線幅法を採用——

本装置は従来の装置と異なり4元素を同時に定量分析することができる。したがって、特に検量線のダイナミックレンジの拡大は必須である。

確認は銅、クロム、マンガンそして鉛の4元素を同時に測定して行った。調製した各標準溶液中に含まれる各元素の濃度を表1に示す。そしてホローカソードランプの点灯電流、測定波長、カーボンキューベットの加熱温度プログラムなどの測定条件を表2に示す。なお、原子化段階においてはキャリアガス流量(30ml/min)をゼロにして測定を行った。各標準溶液を2回繰返して測定したときに得られる各元素のプロファイルの濃度依存性を図8に示す。各元素ともに最も低濃度(No.2の標準溶液)を除いた各濃度のプロファイルは頭打ちやroll-overによってピーク位置の高さ(吸光度)に差はほとんど生じない。すなわち、ピーク値を測定して検量線を作成する方法では、定量分析が不可能な濃度域である。

線幅の測定位置は対話形式でオペレータが入力する。本例では最も濃度の低い標準溶液の測定で得たプロファイルにおいて、1/10の高さ位置での線幅の大きさを検量線作成に用いた。各元素ともに直線または湾曲の程度の小さな検量線が得られる(図9)。

6. おわりに

以上、Z-9000形の主な機能、性能について述べた。微量試料で高感度の測定ができるグラファイト炉原子化法に多元素同時分析という特長を兼ね備えた本機は、今後、生体中の元素存在比の決定など、従来装置では成し得なかった新分野で広くご使用いただけるものと確信している。

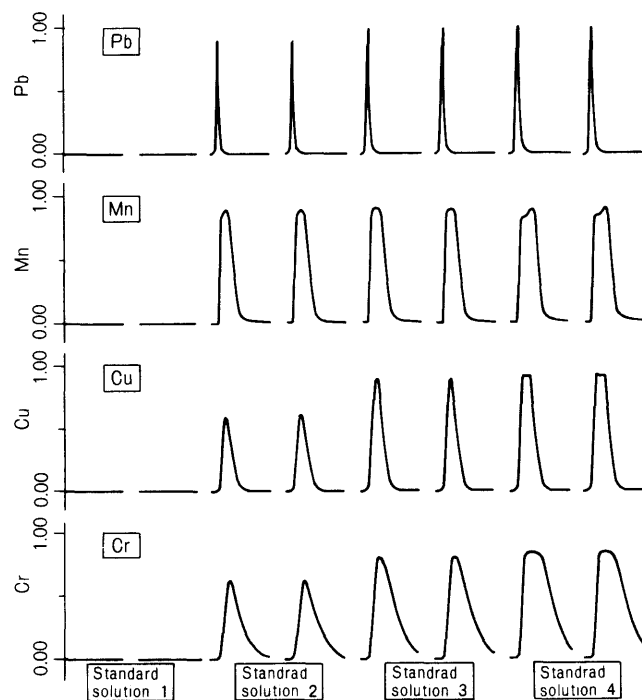
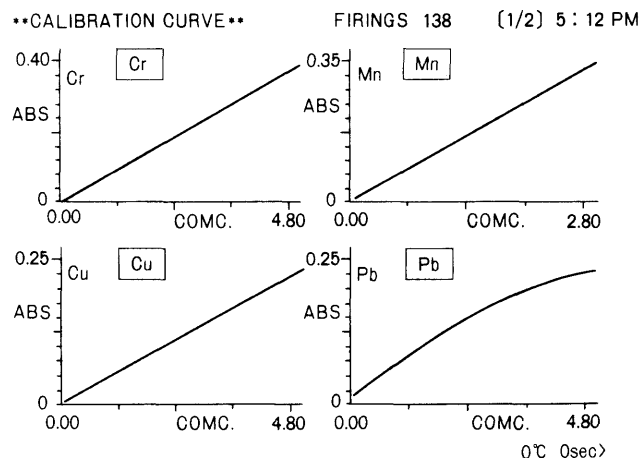
図8 吸光度-時間曲線プロファイルの濃度依存性
(鉛、マンガン、銅及びクロム)

図9 線幅法の検量線 (クロム、銅、マンガン及び鉛)

インテリジェントポンプを用いた日立高速液体クロマトグラフシステム

Hitachi High Performance Liquid Chromatograph System Incorporating Intelligent Pump

野上 太郎* 山田 宜昭* 大沼 定文* 平田 源蔵* 岩淵 等**

(昭和62年10月2日受理)

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィーの溶出は、過去においては、単一溶媒が主に用いられていたが、近年成分組成の複雑な試料の分析を中心に、2種類以上の溶離液を混合比を制御しつつ用いるグラジエント溶出が一般的になっている。このグラジエント溶出には、単一のポンプを用いて、吸入液の組成をポンプの前に取り付けた低圧バルブの開閉によって変化させる低圧グラジエントと、複数のポンプを用いて各々の流速を変化させる高圧グラジエントに大別される。いずれのグラジエントシステムも長所・短所があり、1本化には至っていない。いずれにおいても、溶媒の混合比の変化をあらかじめプログラムしておき、分析開始後自動的に混合比を変化させるためのコントローラが必要である。結果的に、コントローラ及びグラジエント用部品が付加され、また配線・配管が多くなる。

今回開発したL-6200形日立インテリジェントポンプは、ポンプとコントローラを一体化することにより、システム全体を煩雑にすることなく、低圧グラジエント、高圧グラジエントを可能にするところに特長を有する。またグラジエントプログラムのみならず、各種外部ユニットを制御するための接点信号プログラム、フォトダイオードアレイ検出器の波長プログラム等も可能となっている。

インテリジェントポンプを用いた日立高速液体クロマトグラフシステムの応用分野は、きわめて多岐にわたっているが、最近生化学、食品化学関係で多くなっている各種反応クロマトグラフィーは、インテリジェントポンプを用いたシステムの応用としての代表例である。

以下に、装置の原理・特長と反応クロマトグラフィーを主体とする応用例について報告する。

2. L-6200形インテリジェントポンプ

2.1 装置の概要

図1に、L-6200形インテリジェントポンプを用いた液クロシステムの最も簡単な構成を示す。インテリジェントポンプの上に検出器が位置する。両者は、オーガナイザと呼ばれるフレーム内に設置されるが、オーガナイザの上部には、インジェクションバルブ、カラム等を設置できるケースがあり、システム全体を、よりコンパクトにすることに役立っている。低圧グラジエントの場合は、この構成で、L-6200形の内部にプロポーショニングバルブが挿入され、オーガナイザのケース内にミキサーが設置される形になる。高圧グラジエントの場合は、L-6000形ポンプが設置されるが、その場合でも図2に示すように、オーガナイザで一体化されるため、

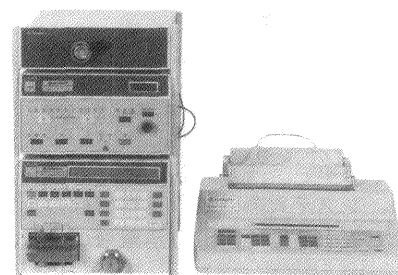


図1 基本構成

床面積が広がらない。

L-6200形の操作は、前面中段のパネルキーからの入力によって行われる。操作キーには、フラットパネルを採用しており、耐薬品性の点でも優れている。またキーの配置も、左側に装置動作実行時に用いるキー（ポンプスタート、プログラムスタート等）、中央部に条件設定時に用いるキー、右側に数値キーと分けて配置し、操作性の向上を図っている。

前面上段の液晶ディスプレイは、40文字×2行のキャラクターディスプレイを行い、プログラム作成時に、対話形の操作が行える。プログラムスタート後には、溶媒の混合条件や流速のほか、タイマの状態などをリアルタイムでモニタすることができる。

左側面には、低圧グラジエント時に用いるプロポーショニングバルブ格納部があらかじめ設けられており、低圧グラジエントのときにも形状・配線が煩雑とならないよう配慮されている。

外部装置との接続は、背面パネルに設置された多くのコネクタにより行われる。この中には、日立のオートサンプラ、インテグレータ、マルチチャンネル検出器との接続を行うためのPAN (Private Area Network) インタフェース及びパーソナルコンピュータ等と接続するためのRS-232Cインタフェース、さらには、多くの接点入出力端子が含まれる。

2.2 操作モード

L-6200形インテリジェントポンプの用い方は、大きく分けて次の3種類にまとめられる。

(1) マニュアルポンプモード

L-6200形を単純な液クロ用ポンプとして使用する場合に用いられる。グラジエントプログラムやシステム制御プログラムを必要としないユーザーは、単純な操作でポンプを動作させることができる。

(2) 低圧グラジエントモード

L-6200形をプロポーショニングバルブと組み合わせて、溶媒吸入側バルブ開閉時間を制御するモードである。L-6200形内部のコントローラ部は、各時間において、プログラムされた混合比から各々の溶媒チャンネルのバルブの開放時間を算出する。前述のとおり、プロポーショニングバルブは、

* (株)日立製作所 那珂工場 光装設部

** 日立計測エンジニアリング(株) 日立テクノロジーリサーチセンタ

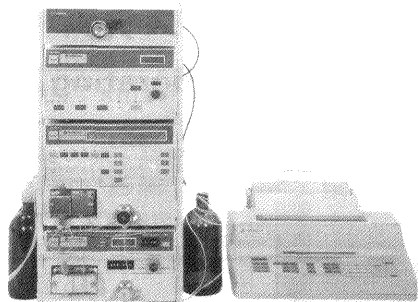


図2 高圧グラジエントシステム

本体内部に挿入され、ミキサーは、オーガナイザ内部に設置されるため、システムの外観は基本構成のシステム（図1）とほとんど変わらない。混合溶離液の数は、3液まで可能である。

(3) 高圧グラジエントモード

このモードは、L-6200形にL-6000形を接続して、双方の流量を変化させることによりグラジエント溶出を行うモードである。コントローラは、プログラムされた混合比とトータルの流量から、各ポンプの送液流量を計算し、各ポンプに送信する。混合溶離の数は3液まで可能であるが、ポンプ1台はL-6200形の内部に存在するため、2液混合の場合は1台のL-6200形を、3液混合の場合は2台のL-6000形を接続することになる。図2に2液混合高圧グラジエントシステムの外観を示す。

2.3 グラジエントシステムの仕様

L-6200形を用いたグラジエントシステムの仕様を表1に示す。

3. インテリジェントポンプを用いた専用HPLCシステム

インテリジェントポンプの生化学・食品化学への応用の代表例として、反応液体クロマトグラフィーがあげられる。反応液体クロマトグラフィーは、分離カラムからの溶出液に反応試薬を混合し、誘導体を形成させて検出を行う分析法である¹⁾。特異的な誘導体形成反応を導入することにより、(1)高感度の測定が可能となる、(2)組成の複雑な試料においても同定・定量が比較的容易に行える、といった特長を有する。日立の反応クロマトグラフシステムは、通常L-6200形インテリジェントポンプ、655A-13形反応ポンプ、カ

CH. 1 C.S. 2.50 ATT 8 OFFS 0 04/28/87 11:31

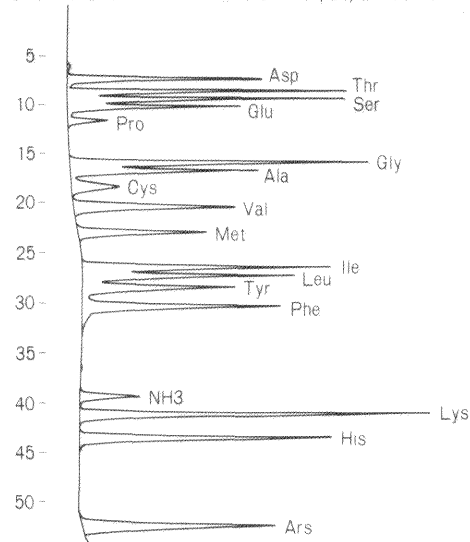


図3 オルトフタルアルデヒド法によるアミノ酸の分析例

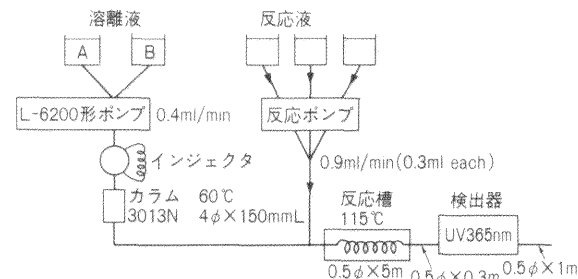


図4 リン酸アニリン法による糖分析の流路系

ラムオープン、反応槽、検出器等により形成される。また分析対象及び分析法により、(1)アミノ酸-オルトフタルアルデヒド法分析システム、(2)アミノ酸-ニンヒドリン法分析システム、(3)還元糖-2-シアノアセト法分析システム、(4)還元糖-ピシンコニン酸法分析システム、(5)カテコールアシントリヒドロキシインドール法分析システム等に分類される。図3にオルトフタルアルデヒド法によるアミノ酸の分析例を示す。各アミノ酸は250pmol、プロリンのみ500pmolである。

表1 L-6200形を用いたグラジエントシステムの仕様

項目	低圧グラジエント	高圧グラジエント及びセミ・マイクロ高圧グラジエント
混合溶離式	3液まで(ただし、Accポンプ使用時は4液まで送液可)	2液又は3液(3液はL-6000との組み合わせ時)
混合方式	パルス時間制御方式	2又は3ポンプ流量制御方式
混合比範囲	0~100%(1%ステップ)	0~100%(1%ステップ)
流量範囲	0.001~9.999ml/min(0.001ml/minステップ)	0.001~9.999ml/min(0.001ml/minステップ)
分析保証流量範囲	0.3~3ml/min	0.3~3.0ml/min 0.05~0.3ml/min(セミ・マイクロLC時)
圧カリミットの範囲	0~420kgf/cm ² (1kgf/cm ² 単位)	0~420kgf/cm ² (1kgf/cm ² 単位)
グラジエントプロフィール	直線、多段	直線、多段
ステップ数	最大100ステップ/1プログラム 最大100ステップ/9プログラム	最大100ステップ/1プログラム 最大100ステップ/9プログラム
プログラム時間	最大600分(0.1分ステップ)	最大600分(0.1分ステップ)
プログラム項目	B, C液混合比 流量(メインポンプ, Accポンプ) 波長(L-3000形検出器を接続時) タイマ(マーカ)出力 ポンプストップ, ブザー	B液又はBC混合比 流量 波長(L-3000形検出器を接続時) タイマ(マーカ)出力 ポンプストップ, ブザー
プログラム数	9個	9個
表示器	液晶(80キャラクタ 2行)	液晶(80キャラクタ 2行)
表示内容	入力パラメータ モニタ(経過時間, 混合比, 流量, 圧力, タイマなど)	入力パラメータ モニタ(経過時間, 混合比, 流量, 圧力, タイマなど)

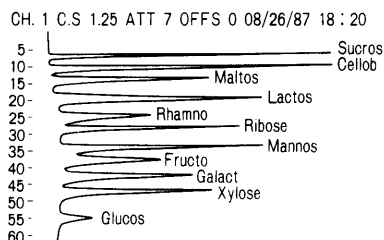


図5 リン酸アニリン法による糖標準試料の分析

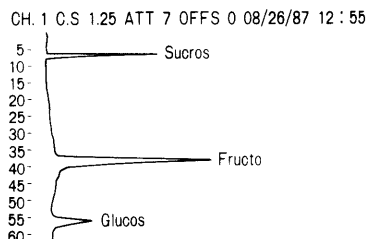


図6 リン酸アニリン法による分析例(1)

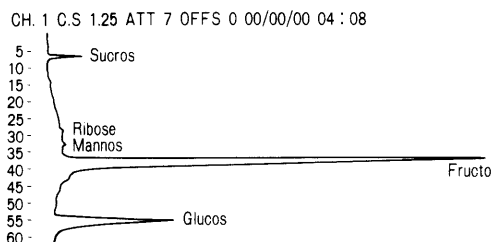


図7 リン酸アニリン法による分析例(2)

反応クロマトシステムは、導入反応を変化させることにより様々なバリエーションの可能性を有する。新しい発色反応を用いた例として、次にリン酸アニリン法³⁾を用いた糖分析について報告する。図4に、リン酸アニリン法による糖分析の流路系統図を示す。反応試薬の高粘性による影響を避けるため、反応ポンプの三つのヘッドのすべてを用い、各々の流速を0.3ml/minに落としている。また、検出器の出入口のチューブ内径をφ0.5mmと大きめに定めている。リン酸アニリン法においては、反応ポンプの代わりに、最近開発された液クロ用イナートポンプを用いることも可能である。図5に、各成分5～63μgの混合成分の分析例を示す。図6、図7は、オレンジジュース（市販の缶ジュース）を分析したものである。図6は、果汁10%と表示されたジュースを10倍に希釈し、5μl注入して分析したものである。図8は、果汁50%と表示のあったものを50倍に希釈して、5μlについて分析したものである。このシステムにより、従来のRI検出器を用いた分析法よりも安定した測定が可能となる。

4. 今後の展開

以上述べた各種専用システムは、特に最近生物学・生化学分野で多く使用されるようになってきているが、この分野では、現在二つの大きな要求がある。一つは、流路にステンレス等の金属を用いないイナート液クロである。日立においては、最近ポンプヘッドの接液部にセラミクスを用いたイナートポンプを開発した。セラミクスは、生理活性低下²⁾を防止する点と、溶媒の制限を受けない点でチタンよりも

表2 L-6250形の仕様

(高圧グラジエントは、L-6050形と組み合わせ時)

ポンプ部	送液方式	2連プランジャ往復ポンプ方式
	最大使用圧力	100kgf/cm ² (最大流量にて)
	吐出流量範囲	0.01～30.00ml/min
	流量設定方式	テンキー入力方式
	圧力表示方式	デジタル表示
	流量設定精度	±3%(0.3～30ml/min)
	流量安定性	±1%(0.3～30ml/min)
	圧力表示正確さ	±5%
	接液部材質	SUS316, ルビー, サファイア, テフロン
	混合溶離液数	2液又は3液
コントローラ部	混合方式	ポンプ流量制御方式
	混合比範囲	0～100%
	グラジエント保証流量範囲	3～30ml/min
	グラジエントプロファイル	直線, 多段
	ステップ数	最大100ステップ/1プログラム 最大100ステップ/9プログラム合計
	プログラム時間	最大999.9min
	プログラム入力項目	① 日液・C液混合比 ② 流量 ③ 波長(L-3000形と組み合わせ時) ④ タイマ(マーカ)出力 ⑤ ポンプストップ・ブザー
	プログラム数	9個
	表示器	液晶(80キャラクタ/2行)
	表示内容	① 入力パラメータ ② モニタ(経過時間, 混合比, モニタなど)
その他	外部通信	PAN通信又はRS-232C
	タイマ出力	8接点
	寸法・重量	260×400×210mm, 約14kg
	電源・消費電力	100±10V, 50/60Hz, 110VA

さらに優れている。今後は、セラミクス製イナートポンプの活用により、液体クロマトグラフの生物学・生化学分野における重要度が増すものと予想される。この分野におけるもう一つの要求は、分取液クロである。分取においても、グラジエントコントロールをはじめとするシステムコントロールは必要な場合が多く、L-6200形インテリジェントポンプをベースとした分取用インテリジェントポンプL-6250形を開発した。表2に仕様を示す。主要な点としては、流量が、30ml/minまで可能なこと、コントロールプログラムのプログラム時間が999.9minまで可能なことである。高圧グラジエントの場合は、L-6000形をベースとしたL-6050形分取用ポンプと接続して使用する。分析用専用システムと同様、今後分取用各種専用システムが重要視されるものと思われる。

5. おわりに

以上L-6200形インテリジェントポンプ及びこれを用いた各種専用システム、さらには、これらのバージョンアップとも言うべきイナートシステムと分取システムについて報告した。いずれの場合においても、中心となるポンプがインテリジェントポンプである以上、外部通信機能を用いて外部コンピュータと接続することがきわめて容易である。今後は、パーソナルコンピュータ等を用いた各種集中制御システムについても力を入れていきたい。

参考文献

- 1) 原 昭二ほか編：バイオメディカルクロマトグラフィー，南江堂（1986）
- 2) 宇井信生ほか編：タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー，化学同人（1984）
- 3) E.L.Warlborg, L. Christensson: Anal. Biochem **13**, 186 (1965)

Topics

第26回分析機器展 のご案内

分析機器業界恒例の分析機器展が、本年度も下記のとおり行なわれることになりました。

1. 場所：東京・晴海見本市会場(西館・南館)

(日立グループは西館で展示)

2. 会期：昭和63年2月29日(月)～3月3日(木)

3. 開場時間：午前10時～午後5時

分析展の開催場所も、従来の東京・浅草(東京都立産業貿易センター)から晴海に移してはや今回で3回目を迎えることになりました。同時に開催時期も従来の11月から2月又は3月になり、当初寒い時期でもあり、また大学の入試シーズンとも重なるということでも入場者の減少が心配されましたがお客様の熱意によって幸いに落ち込みもなく順調に推移してまいりました。

さて今回の特長的なことは、従来の



前回(第25回、昭和61年度)の分析機器展の日立ブース展示風景

西館にプラスして南館も分析展として借り切れるため面積が広がったことです。これにより従来に比べてゆったりとした展示会ができるものと期待されています。

日立グループ(日立産業、平沼産業、堀場製作所、日立製作所)はメイン館になると考えられる西館に出品展示することが既に決定しております。

出展製品は、走査電子顕微鏡、質量分析計、核磁気共鳴装置、赤外分光光度計、可視紫外分光光度計、蛍光光度計、原子吸光度計、高速液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフほか、

新製品を中心に多数展示実演する予定になっております。また単なる本体装置の展示だけにはとどまらず、最新のデータ処理装置が各種アクセリとドッキングし、システム指向を目指した展示にいたします。それに加えて、最新のデータもできる限り多く用意し、日立グループとして魅力ある展示会にするよう努力いたしております。

是非この機会に分析展日立コーナーに御来場いただき、日立グループの数々の新製品を御覧いただくと同時に忌憚のない御意見をいただきますようお願い申し上げます。(高橋秀夫記)

日立産業株式會社

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(025)241-3011
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
筑波支店 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>

- 本号は、Vol.27 No.3(59年10月号)に続いて免疫分析特集(II)として編集致しました。
- 横山先生には、巻頭言を、中井先生にはAids Virusの形態観察について、藤田先生にはLIAによる腫瘍マーカーの測定について、また首藤先生にはTIAによる血漿蛋白の定量についての報文をそれぞれお願い致しました。
- 本ニュース10月号に同封のアンケートは、発送部数の6%に近い多数のご返信を頂き誠に有難うございました。ご回答の内容から本ニュースに対するお客様の関心の高さを窺うことができ、数々の貴重なご意見は、これを今後の編集に採り入れて参ります。

- 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、日立産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。
- 日立計測エンジニアリング(株) 日立テクノロジーリサーチセンター
茨城県勝田市市毛882番地
〒312 電話 勝田(0292)73-2111(代)
- 日立産業株式会社
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 WINTER 1987 Vol.30 No. 4

発行 昭和63年1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