

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 JAN./FEB. 1989
VOL.32 NO.1

U.D.C. 543.4/5.001.7

目次

Hyphenated Instrument 特集

巻頭言

解析装置の機能化 ……波多野博行-1

報文

- TLC/MS, LC/MSによる糖脂質の
分析 ……榎 泰典 飯田静夫-7
- 液体クロマトグラフィーのリアル
タイム・アナライザー……………
……………高橋浩二郎 谷口茂彦-10
- LC-AASシステムによる血清中金属
結合蛋白の分析 ……野本昭三-13
- キャピラリー-G.L.C.によるMycobacterium
LepaeおよびMycobacterium Bovis
のPGLの糖鎖の絶対構造の決定
……………藤原 剛-17

解説

- U-6000形日立顕微分光光度計 ……
…松井 繁 根本 勲 笹田勝弘-20
- バイオインテグレーションシステム ……
横倉武文 山田宜昭 滝内裕美
大沼定文 野上太郎 高田芳矩 -24
- F-2000形日立分光蛍光光度計 ……
…越 裕之 大和田実 網 雅子-29

トピックス

- H-9000形日立超高真空(UHV)電子
顕微鏡 ……………-23
- AS-1000形/AS-3000形/AS-4000形
日立インテリジェントオートサ
ンプラ ……………-19
- E-1030形日立イオンスバツタ ……-32
- 日本臨床検査自動化学会第20回記
念大会開催さる(第2報)…………-23
- 第3回臨床検査の自動化と新技術
に関する国際会議開催さる ……-16
- 日本分析化学会第37年会開催さる -32
- 第49回応用物理学会学術講演会
開催さる ……………-23
- EUREM'88(欧州電子顕微鏡学会)
開催さる ……………-28
- 鷹野重威氏1988年度日本分析化学
会技術功績賞を受賞 ……………-12

Hyphenated Instrument 特集

巻頭言

解析装置の機能化

Hyphenated Instrumentation for Extended
Technological Analysis

波多野 博行*



クロマトグラフは、本来、分離を目的とする機器であるから、これが分析計としての機能を持つためには、必ず検出測定用の機器を連結する必要がある。ここにクロマトグラフのカラムに連結して、機器分析に使われる測定機器が検出器として用いられる先験的理由が存在する。

解析装置の機能化とは、単一の性能を持つ測定機器を連結した系、あるいは共働させる系を開発することによって、その系に連結した個々の機器には無かった機能を発揮する解析機器を作り出すことをいう。例えば、ガス(GC)および液体(LC)クロマトグラフ、赤外(IR)および紫外可視(UV-VIS)分光計、質量分析計(MS)、核磁気(NMR)および電子スピン(ESR)共鳴分光計などから成る解析法は、構造解析システムとして、もはや有機化学の常法となっている。

クロマトグラフの検出器は、GCの熱伝導度計(TCD)やフレイムイオン化検知器(FID)にしても、また、LCのUV-VIS検出器にしても、いずれも信号強度を定量的に記録するには充分その目的を果たし得るものであるが、定性的同定を保持時間や保持容量に頼っている限り充分な定性分析を行うことはできない。この欠陥は、本来の目的である分離がますます高性能化されるに伴って深刻な問題となってきた。このために、MSやNMRなどの定性的情報の豊富な機器が連結されたシステムの開発が盛んに行われるに至った。

本稿では、筆者の研究室において開発されてきた高性能解析機器の例を挙げ、その特徴を記して巻頭言とする。

1. イオン交換クロマトグラフと紫外可視自記分光光度計との連結システム

1958年、江頭らは自記分光光度検出方式自動液体クロマトグラフの試作を始めた¹⁾この装置はイオン交換クロマトグラフと紫外可視自記分光光度計とを連結した装置で、イオン交換法で分離された成分の、約200nmから約750nmに亘る紫外可視領域の

* 京都大学名誉教授、神奈川歯科大学教授、財団法人 体質研究会 国際解析研究所長・理博

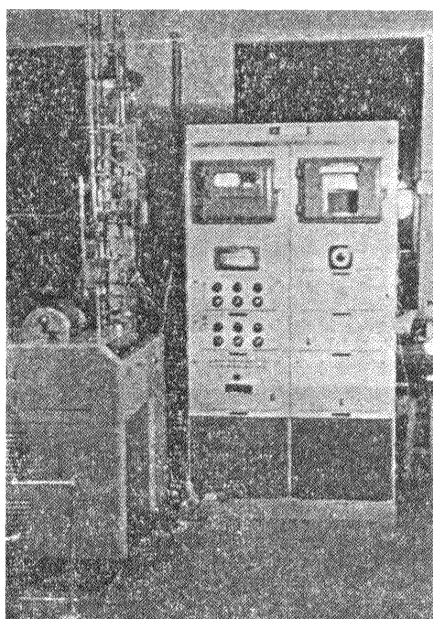


図1 KLF-1形日立自動液体クロマトグラフ
(自動液体クロマトグラフ, 自記分光光電
検出器, 自動制御装置)

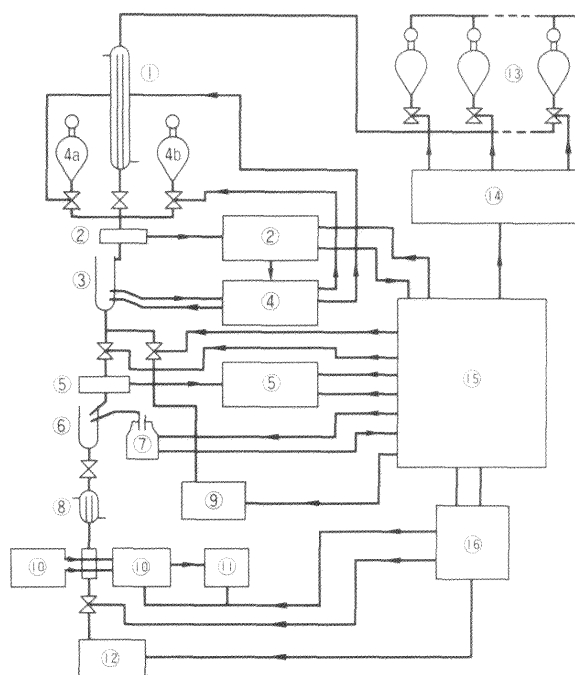
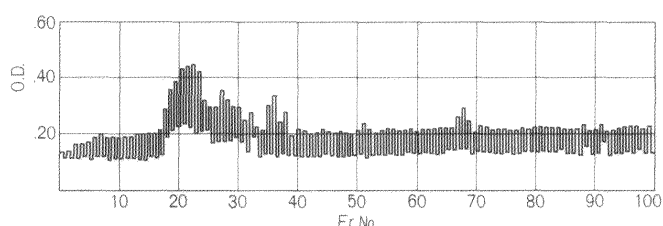


図2 自動液体クロマトグラフのブロックダイアグラム^{2,3)}

- ① カラム ②⑤ 滴数計数計
③ 溶出液コレクター ④ pHス
タット ⑥ 発色管 ⑦ 発色試
薬瓶 ⑧ 冷却管 ⑨⑫フラクシ
ョンコレクター ⑩ 分光光電比
色検出器 ⑪ 計録計 ⑬ 溶離
液槽 ⑭ 段階溶出システム ⑮
自動調節制御装置 ⑯ 分光光
電比色検出制御装置
X 電磁バルブ



上: 蛋白質の280 nmにおける分離のクロマトグラム
下: 助酵素NADの340 nmにおける酵素活性クロマトグラム

図3 二波長同時記録自動液体クロマトグラフによる酵母抽出液から
アルコール脱水素酵素の分離^{2,3)}

吸収スペクトルが自動的に記録できるものであった。図1は、KLF-1形日立自動液体クロマトグラフ²⁾として作られたこの装置で、図2はそのブロックダイアグラム³⁾である。この装置によって、例えば、図3に示すように、酵母からアルコール脱水素酵素を抽出する過程で、酵素タンパク質を280nmで、そして、その助酵素ニコチンアミドジヌクレオチドが基質アルコールのアルデヒドへの酸化に共役して還元される反応を340nmで同時記録することによって、活性を有する酵素のピークを直に見いだすことができ、そのフラクションを分取して酵素標品を調製することができた。

これに続いて鷹野らによって開発されたKLA-2形日立アミノ酸分析計⁴⁾は図4に掲げるものであるが、この装置ではニンヒドリン発色を、図5に示すように570nmと440nmのほかに、640nmで検出する三波長検出方式がとられ、この三波長の吸光度比は、それぞれのピークのアミノ酸の吸収スペクトルの特性を反映するものであって、その定性的同定に有効な方式であった。

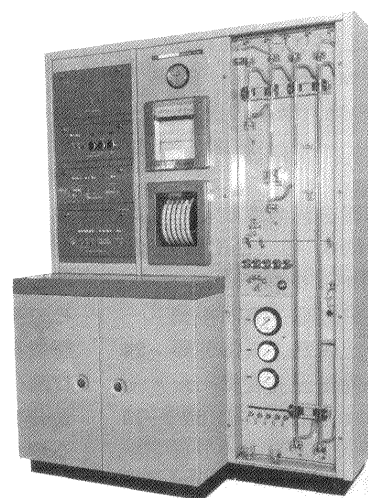


図4 KLA-2形日立アミノ酸分析計⁴⁾

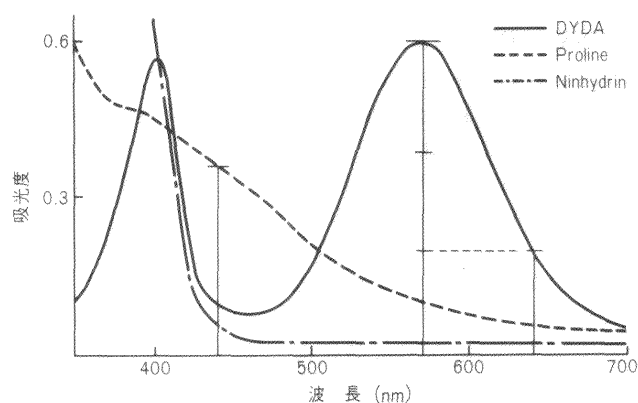


図5 ニンヒドリン発色の吸収スペクトルと440nm, 570nm, 640 nmにおける三波長検出の原理⁴⁾

2. 超臨界圧流体クロマトグラフとイオン移動度分析計との連結システム

液晶物質がGCの固定相として有効であることが認められ、キャピラリーGCの固定相に用いる液晶がK.P.Naikwadiらによって合成された⁵⁾。これによって、有機化合物の異性体や構造の類似した環状有機化合物の高性能分離が行われ⁶⁾、F. I. Onuskaらによって液晶を固定相とするキャピラリーGCの開発が成功した⁶⁾。

1986年、六鹿らは高分子液晶を合成し⁷⁾、これをキャピラリーカラムの固定相とする超臨界圧流体クロマトグラフ(SFC)を開発した⁸⁾。

イオン移動度分析計とはIon Mobility Spectrometer (IMS)と呼ばれる、図6に示すような気相中の分子イオンを、電気泳動移動度の差に基づいて分離する微量分析装置で、1970年F.W.Karasekらが開発した当時は、プラズマクロマトグラフ(PC)と呼ばれていたものである。IMSは図7に示すように、フェムトモル量の分離と検出が可能な超微量分離分析装置である⁹⁾が、GCと連結すればGC-IMSとしてGCの高感度検出器とすることもできるし¹⁰⁾、またMSと連結すればIMS-MSとして高性能分離装置として用いることができる¹¹⁾。

1987年H.H.Hillらは図8に示すようにSFCとIMSとの連結に成功し、CO₂を分離と検出とに共通のキャリアーガスとして、脂肪酸エステル類の高性能分離高感度検出システムを開発した¹²⁾。図9にその結果を示す。

さらに六鹿らは、IMSと四重極質量分析計(QMS)との連結を試み、1987年IMS-QMSシステムを完成した¹³⁾。図10はそのIMS-MS装置である。

3. 高速液体クロマトグラフと電子スピン共鳴分光計との連結システム

常磁性金属を含む化合物はいうまでもなく、化学反応の中間体にも、また生体内の代謝の過程においても、不對電

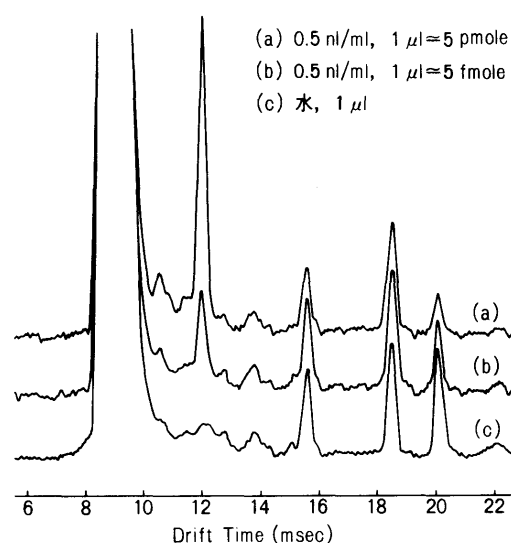


図7 2, 4, 6-コリジンのフェムトモル検出⁹⁾
(197.5°C, 756.5mmHg)

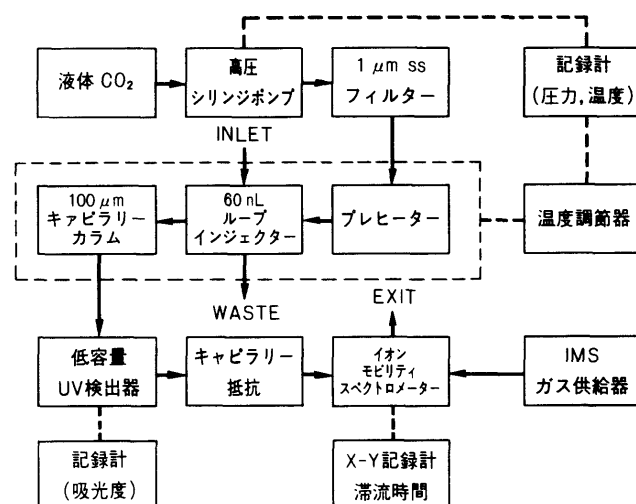


図8 SFC-IMS連結システムのブロックダイアグラム¹²⁾

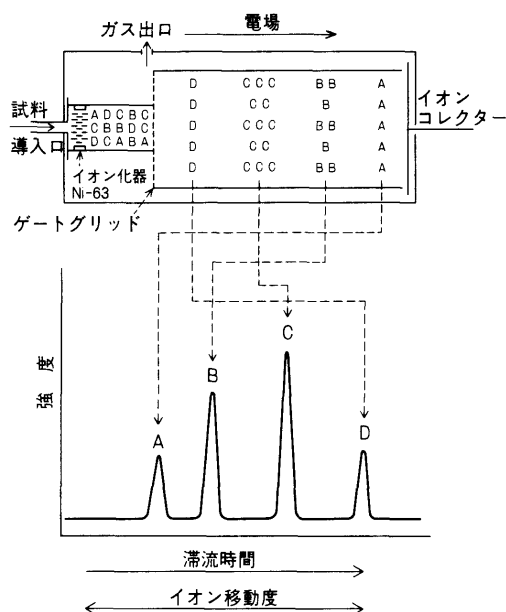
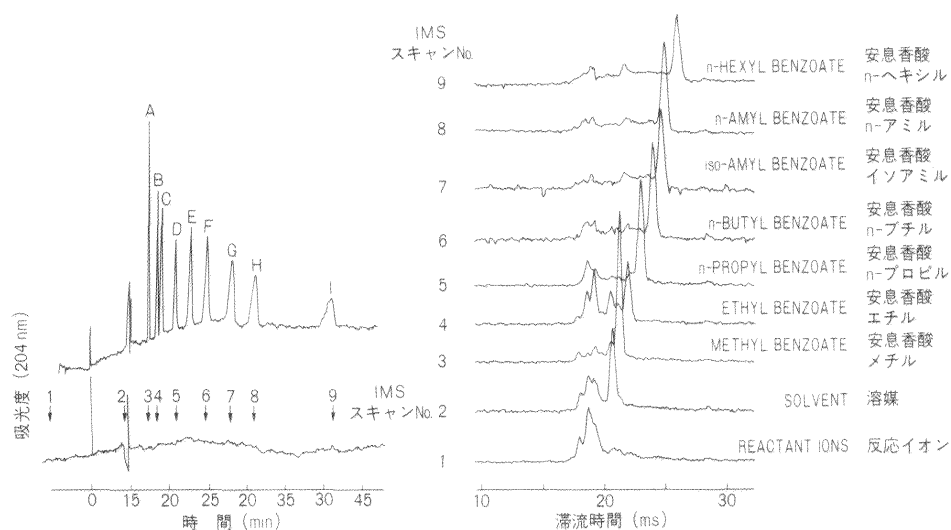
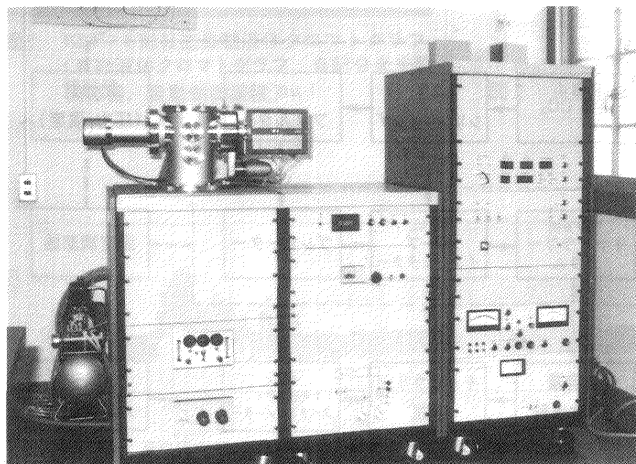
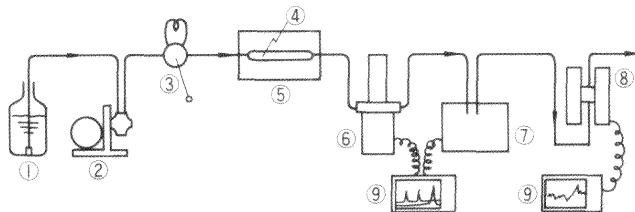


図6 イオンモビリティスペクトロメトリーにおける分離の機構⁹⁾

子を含む化合物、すなわちフリーラジカルが出現する機会が極めて多い。しかしながら、これらの不對電子を含む化学種はいずれもその寿命が極めて短く、その実験的検出は容易ではない。

電子スピン共鳴分光計(ESR)は、このような不對電子を含む化学種のみを特異的に検出できる極めて高感度の検出測定機器である。そこで1975年、谷口らは、図11に示すような構成で、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に検出器としてESRを連結した図12に示すHPLC-ESRシステムを開発して、まず、安定なラジカルの分離検出に適用し、図13に示すように、その有用性を指摘した¹⁴⁾。不安定なフリーラジカルの場合には予め生成系にスピントラップ剤を添加しておき、短寿命のフリーラジカルが生成するや否や直ちにスピニアダクトとなって安定化する方法を適用した。この方法によって、牧野や森家らはアミノ酸¹⁵⁾やペプチド¹⁶⁾の水溶液に放射線を照射した際に生成する、短寿命フリーラジ

図9 SFC-IMS連結システムによる脂肪酸エステルの分離と検出¹²⁾図10 IMS/QMS連結システム¹¹⁾

- ① 溶離液槽, ② ミニポンプ, ③ 六方バルブ式試料注入器,
④ カラム, ⑤ 水冷槽, ⑥ 紫外検出器 (254nm),
⑦ 紫外可視検出器 (510nm), ⑧ ESR検出器, ⑨ 記録計

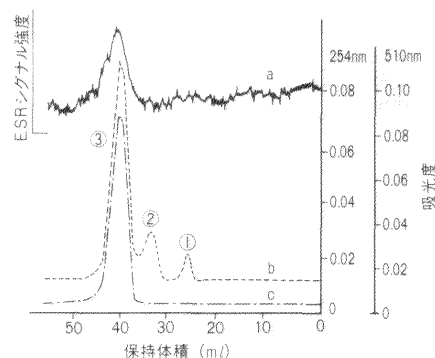
図11 HPLC-ESR連結システムのブロックダイアグラム¹⁴⁾

カルを数多く証明した。また、小南らはヌクレオチド¹⁶⁾について、放射線照射によって生成するフリーラジカルを証明した。

この方法は内藤らによって光化学反応¹⁷⁾に、牧野らによって超音波分解反応¹⁸⁾に、そして岡崎らによって電極表面における酸化還元反応¹⁹⁾に応用され、数多くの反応中間体ラジカ



- a 溶離液溜, b 送液ポンプ (ミルトンロイミニポンプ), c 圧力ゲージ, d パルスダンパー, e, i 分光光度型可視紫外検出器および電源 (日立034型), f カラム (メルクシリカプレパックカラムまたはイオン交換耐圧カラムなど), g, h 紫外検出器および電源 (日本分光UV254nm), j, k, o 記録計, l ESR検出器流通型キャビティ, m ESR検出器マグネット, n フラクションコレクター, p, q ESR検出器操作部

図12 ラジカルクロマトグラフ¹⁴⁾図13 HPLC-ESR連結システムによる安定ラジカルの分離検出¹⁴⁾

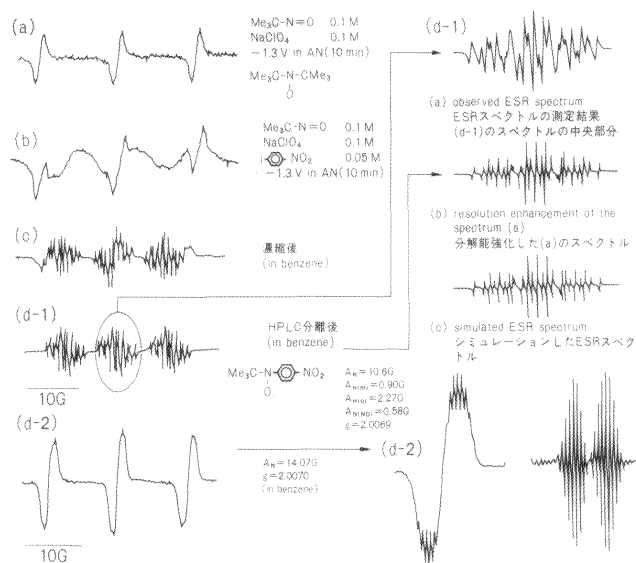


図14 ESRスペクトルの分解能強化¹⁹⁾

ルが証明され、反応機構が解明された。生化学反応によって生ずる中間体ラジカルは青島らによって検索された²⁰⁾が、これらの反応機構の解明に際しては、ラジカルの構造が正確に決定される必要がある。しかし、これらのラジカル、殊に森家らが検討したアミノ酸酸化酵素系においては、HPLCで完全に分離され純粋な状態にあってもなお幅広いスペクトルを示し、精確な超微細結合定数 (hfsc) やg値の決定が困難な場合が少なくない。この様な場合のために、野崎らによってコンピューターソフトが開発され、ESRスペクトルの分解能強化の方法が電極表面の酸化還元反応の解析に適用され²¹⁾ラジカルの構造決定が容易になった。図14にその結果を示す¹⁹⁾。

4. 高速液体クロマトグラフと質量分析計との連結システム

HPLCによって分析できる対象は、分子量数十万にものぼる高分子にまで亘っているにも拘らず、質量分析計で分析できる対象はせいぜい分子量数千までであるから、これ以上の分子量をもつ高分子に関しては、現在のところ、HPLCとMSを連結するシステムを開発する意味がない。また、HPLCの溶質だけを含む溶出液は数種の溶媒の混合物であることも多く、溶媒を除いて溶質だけをMSの真空系へ導入することは極めて難しい。このために、いろいろなインターフェースが考案されてきたが、1987年日立製作所では図15に示す常圧イオン化質量分析計 (APIMS) と噴霧噴出型インターフェースを用いてHPLCへの連結に成功した。井元らはギムネマシルベスターというインド産の植物の葉から抽出したギムネマ酸について図16に示すように、トリテルペン骨格に結合する脂肪酸エステル位置と脂肪酸の種類との組合せが、ギムネマ酸の構造と生物活性とに密接な関係があることをHPLC-APIMSで解明し、数種のギムネマ酸の脂肪酸エステルの種類と結合位置を決定した²²⁾。

このようにHPLC-APIMSはMSの対象となる分子量数千以下の化合物であれば、難揮発性の化合物であってもHPLC-APIMSのよい分析対象と成り得るもので、殊にこれらの

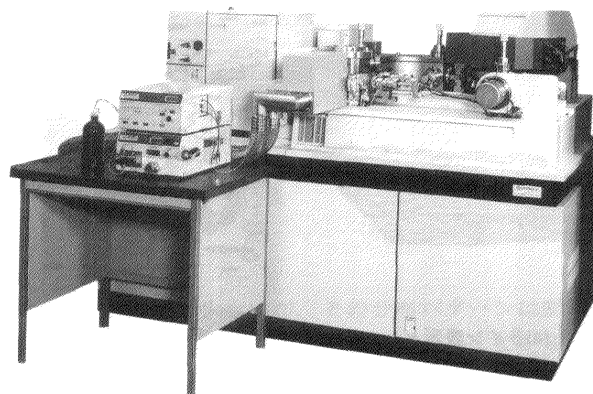
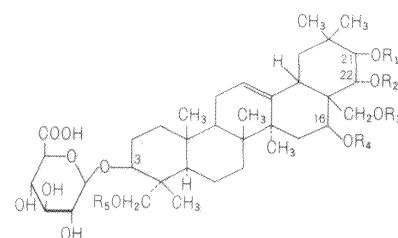


図15 HPLC-APIMS連結システム (M-2000形)



$R_1 \sim R_5$: H or $-\text{COCH}_3$ acetic acid
 $-\text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$ tiglic acid*
 $-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2(\text{CH}_3)$ 2-methylbutyric acid
 $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$ benzoic acid
 * isomeric $-\text{COCH}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ angelic acid

図16 HPLC-APIMSによって明らかにされたギムネマ酸の構造²²⁾

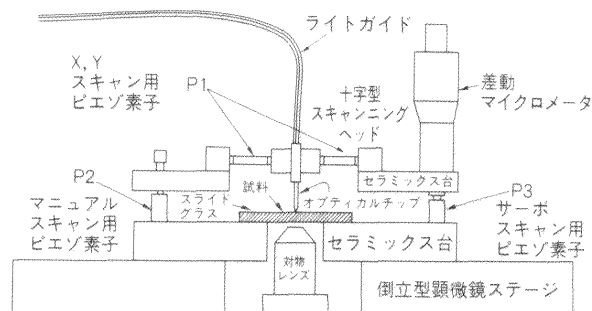


図17 SFM用スキャンユニット構成図²³⁾

オリゴマー程度の分子量をもつ物質の構造と生物活性との関係を解明するには絶好の解析機器である。

5. 走査トンネル顕微鏡と走査蛍光顕微鏡

走査トンネル顕微鏡 (STM) とは、試料の表面分子と、白金あるいはパラジウムの探針の尖端原子との距離が約 $10\text{ \AA}$ 以下に近づいたときに流れるトンネル電流を検出し、二次元微駆動走査により試料表面の形状を反映した二次元図形を得る装置である。STMは主として物理的形状に関する分子レベルでの情報を与える装置であるが、この原子探針微駆動走査装置に、光ファイバーを用いて試料表面分子に蛍光励起を行わせると、蛍光発光の化学情報を分子レベルで取得することができる。岡崎らは図17に示す光ファイ

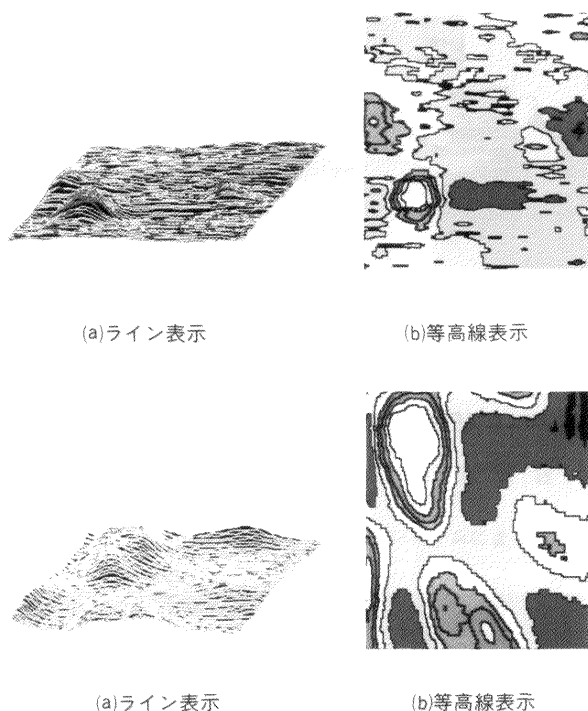


図18 蛍光ラテックスのSFM像(上)とイースト透過光測定像(下)

バー蛍光微駆動装置を用いる高分解能走査蛍光顕微鏡(SFM)を開発した²³⁾。この装置を用いて、蛍光ラテックス表面を蛍光部位やイースト表面を観測すると、図18に示すようにSTMとSFMによって分子レベルで物理的形状と化学的特性に関する有用な情報を得ることができる。

6. あとがき

クロマトグラフは試料を、その構成要素に分けて、それぞれの構成成分に関する情報を取得する解析機器であるが、STMやSFMは試料をあるがままに、構成要素に分けないで、その特異性を観測する方法である。これらの両者は一見対照的な手法のように見える。しかしながら、探針を駆動させて試料との相互作用を検出記録するという点に就いてみれば、探針の固体を移動させるクロマトグラフの手法ともみることができる。この見解はいささか筆者の我田引水の見解に過ぎないかもしれないが、化学センサーの素子の特異性認識機構とクロマトグラフ固定相が試料成分を認識識別して分離する機構との類似性を考え併せると、両者の認識識別の機構と能力には共通に見えるものがあって、STMやSFMを固体クロマトグラフの一種と称するのも、あながち故なしとはしないものであると思われる²⁴⁾。

以上述べたように、単一機能の装置を複数個連結して新たな機能を発揮させること、すなわち装置の機能化によって、高度な機能をもつ解析装置を開発することができる。総じて、このような新しい機能をもつ装置による方法論の発展によって、自然界の複雑な存在状態にある化学種の解析と存在状態の決定(Chemical Speciation)と、その存在状態にあるときにのみ現れる特異な役割の解明(Chemical Characterization)が可能となり、新たな化学の知識体系を形造るものであるといえる。

参考文献

- 1) 江頭 暁, ぶんせき, 10, 693 (1961)
- 2) 波多野博行, 最新の分析化学, 13, 50 (1961)
- 3) H. Hatano, Research/Development, 24 (4), 28 (1973)
- 4) 波多野博行ら, 日立評論, 44, 2068 (1962)
- 5) K. P. Naikwadi, et al., J. Chromatogr., 331, 69 (1985)
- 6) S. Rokushika, et al., H. R. C. & C. C., 8, 480 (1985)
- 7) K. P. Naikwadi, et al., Mikromol. Chem., 187, 1407 (1986)
- 8) S. Rokushika, et al., Anal. Chem., 58, 361 (1986)
- 9) T. Ohkawa, et al., 京都大学大学院理学研究科修士学位論文
- 10) F. W. Karasek, et al., Anal. Chem., 50, 7013 (1978)
- 11) H. Hatano, et al., イオンモビリティスペクトロメリーとその応用, 科研費報告書 (1987)
- 12) S. Rokushika, et al., Chromatographia, 22, 209 (1986)
- 13) S. Rokushika, et al., Anal. Chem., 59, 8 (1987)
- 14) S. Rokushika, et al., Anal. Letters, 8 (3), 205 (1975)
- 15) F. Moriya, et al., J. Phys. Chem., 84, 3085 (1980)
- K. Makino, et al., Anal. Letters, 13, 301 (1980)
- J. Phys. Chem., 84, 1016 (1980); 84, 1968 (1980)
- Chem. Letters, 119 (1980); J. Phys. Chem., 83, 2520 (1979)
- N. Suzuki, et al., J. Phys. Chem., 85, 263 (1981)
- H. Hatano, et al., J. Rad. Chem., 23, 9 (1982)
- H. Iguchi, et al., Can. J. Chem., 62, 1722 (1984)
- F. Moriya, et al., J. Phys. Chem., 84, 3614 (1980)
- J. Am. Chem. Soc., 104, 830 (1982)
- Can. J. Chem., 62, 2206 (1984)
- 16) S. Kominami, et al., Rad. Res., 72, 89 (1977)
- 17) H. Hatano, et al., Internatl. Symp. Fast Excitation Process, Univ. Tokyo (1988) Tokyo
- 18) K. Makino, et al., Rad. Phys. Chem., 23 (1-2), 217 (1984)
- 19) H. Hatano, et al., 9th Internatl. EPR Symp., (1986) Denver
- 20) H. Aoshima, et al., J. Biochem., 82, 1559 (1977)
- 21) K. Nozaki, et al., J. Mag. Resonance, in press (1988)
- 22) H. Hatano, et al., 17th Internatl. Symp. Column Liquid Chromatogr., (1988) Washington DC
- 23) S. Okazaki, et al., Microchem. Acta., Anniversary Issue, (1988)
- 24) H. Hatano, Symp. on LC'88 Kyoto (1988) Kyoto

筆者略歴

現職	京都大学名誉教授 神奈川歯科大学教授 財団法人 体質研究会 国際解析研究所長
住所	〒520 大津市大平一丁目25-2 (電話) 0775-34-0941
略歴	昭和22年9月 京都帝国大学理学部卒業 22年10月 京都帝国大学理学部副手 24年4月 京都大学理学部助手 30年4月 神戸大学理学部講師 33年4月 京都大学理学部講師 38年1月 京都大学理学部教授(放射線化学講座担当) 56年4月 京都大学付属機器分析センター長 58年10月 京都大学理学部教授(分析化学講座担当) 63年3月 京都大学理学部教授 定年退官 63年4月 神奈川歯科大学教授 63年4月 財団法人 体質研究会 国際解析研究所長 学位 35年4月 理学博士 兼職 55年1月～ 日本学術会議会員 61年7月 日本学術会議分析化学研究連絡会委員長

報 文

TLC/MS, LC/MSによる糖脂質の分析

Analysis of Glycolipids with TLC/MS and LC/MS

楠 泰典* 飯田 静夫**

(昭和63年10月12日受理)

質量分析法とクロマトグラフィーを組み合わせるとそれぞれ単独の方法だけでは得られない情報が得られる。例えば、質量数の全く同じ立体異性体がクロマトグラフィーでは区別できるとか、クロマトグラフィーでは同一の性状を示す物質が質量分析法でみると混合物であることが判るなど数多くの利点がある。特にクロマトグラフと直結した質量分析計の有用性は広く認められている。その中でもガスクロマトグラフと電子衝撃イオン化法(EI)や化学イオン化(CI)法を用いた質量分析計を直結したGC/MSは優れたキャリアーガスセパレーターの開発によって世界中で広く用いられている。一般にEIやCIでは試料がガス状になる必要があるが、GC/MSではガス状の試料がガスクロマトグラフで分離され、ガス状のままイオン化されるので理想的な結合と考えられる。生物から得られる試料の多くは難揮発性で熱には不安定な物質が多く、分析のため種々の誘導体にするなどの工夫が行われているが、しかし、誘導体にしても熱分解のために測定できないものも多い。一般に分子量が増加するのに伴って測定が著しく困難となる。またリン酸や硫酸のような極性基を持つものは測定ができないので、GC/MSでは質量数1,000前後までの物質がよく分析されている。

GC/MSで分析できない試料に対するクロマトグラフィーとして現在広く用いられているのは薄層クロマトグラフィー(TLC)と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)である。一方、EI法やCI法以外のイオン化法として二次イオン質量分析法であるFast atom bombardment(FAB)やsecondary ion mass spectrometry(SIMS)など難揮発性の物質でも誘導体とせず、常温でもかなり高分子のものまでイオン化できる方法が実用化されている。TLCやHPLCで分画した試料を質量分析計で分析することは以前から行われていたが、最近これらのクロマトグラフィーと質量分析計を直結する試みが種々行われ、TLC/MS, LC/MSなどと呼ばれている²⁾。以下に筆者らが研究している糖脂質についての応用例をいくつか示して説明を加えたい。糖脂質は長鎖塩基のスフィンゴシンに脂肪酸が結合したセラミドと呼ばれる脂質部分に糖が単糖またはオリゴ糖の形で結合したもので、通常この糖鎖部分の構造で分類されており現在100種類もの構造が知られている。更に脂質部分を構成するスフィンゴシンや脂肪酸の鎖長、不飽和結合、水酸基の有無による違いがあり、これらと糖鎖の組合せによってはかなりの数の分子種が存在する。細胞中の含量は全脂質の

数パーセント以下と少ないが、その分布パターンは動物の種属、臓器、細胞の種類などに特異的であることが知られている³⁾。

1. TLC/MSによる分析

TLCは手軽で分離能に優れ、検出感度も良いので広く用いられている。通常プレート上での移動度と検出試薬による発色や特定のリガンドとの結合によって同定され、デンストメーターによって定量化されている。TLCで分離した試料をプレートから回収して質量分析計で測定することもあるが、この場合プレートから溶出される夾雑物の除去のためのクリーンアップが必要だったり、スポットが接近していて分画が困難だったりすることがある。この困難さを除くためクロマト後プレートを直接質量分析計に導入して分析する方法が開発された⁴⁾。通常TLCと同様に展開した後、プレートをヨード蒸気にさらすなどの非破壊的方法でスポットを検出し、マトリックスとしてのグリセロールまたはトリエタノールアミンなどを塗布したプレートを質量分析計に導入して、FABまたはSIMS法でイオン化して分析を行う。

図1は糖脂質代謝異常症であるTay-Sachs病患者から剖検で得られた脳の分析に応用した例である⁵⁾。この病気は糖脂質を分解する酵素の1つである β -ヘキソサミニダーゼAが遺伝的に欠損し、そのためこの酵素の基質となるガングリオシドGM₂と呼ばれる糖脂質が蓄積することが知られている。症例の脳から抽出した総脂質のTLCを行うと同図のようにガングリオシドGM₂と一致する移動度のところに対照例には認められないスポットが検出された。このスポットのTLC/SIMS測定を行うと、図2に示すように正イオン検出では(M+Na)⁺m/z 1406が、負イオン検出では(M-

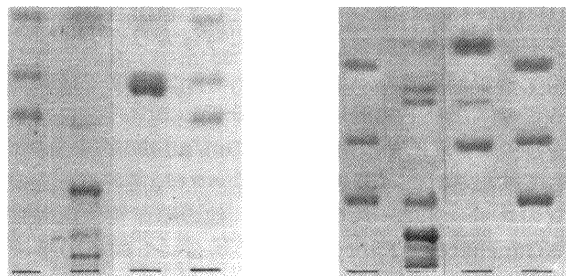


図1 Tay-Sachs病患者の脳から得られた全脂質画分の薄層クロマトグラフィー A(レゾルシン検出), B(コマシブル染色), 1, 4(標準糖脂質), 2(ウジ全酸性糖脂質), 3(Tay-Sachs病患者から得られた全脂質画分)

* 東京医科歯科大学医学部 分子医化学教室助手・医博

** 東京医科歯科大学医学部 分子医化学教室教授・医博

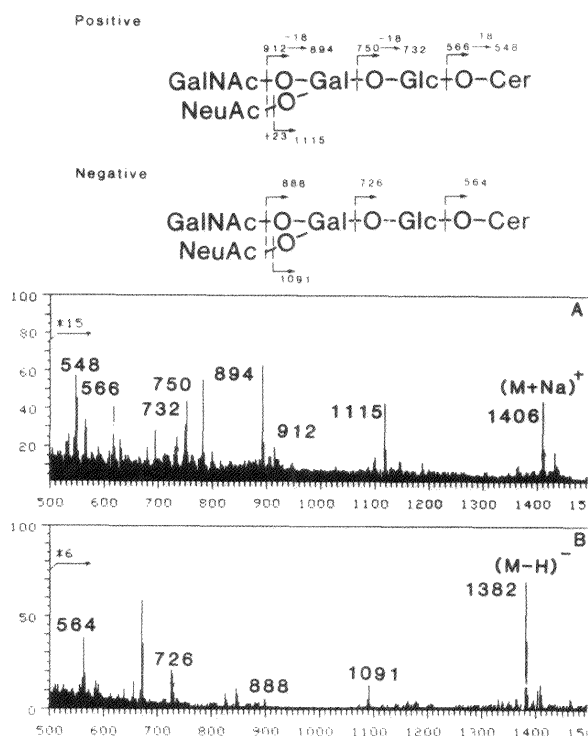


図2 Tay-Sachs病患者の脳から得られたGM₂のTLC/SIMSスペクトラム A(正イオン検出), B(負イオン検出)

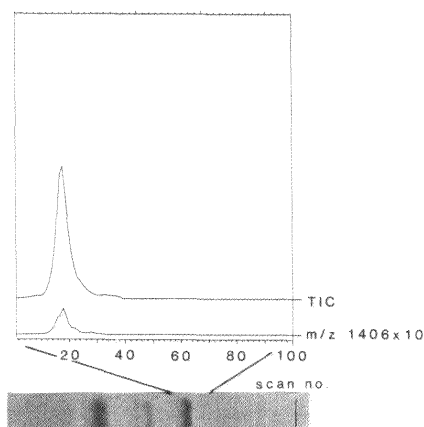


図3 TLC/SIMSのマスキロマトグラム

H)-m/z 1382が擬分子イオンとして検出され、またグリコシド結合部位で開裂して生じたフラグメントイオンから糖の配列が推定される。プレートを一一定速度で移動させながらこのスポットの周辺を質量分析してマスキロマトグラムを描くと、TICと (M+Na)⁺のm/z 1406が同一のピークとして検出された(図3)。このピークは、プレート上の蓄積物質のスポットに一致していた。他の糖脂質代謝異常症であるGaucher病やFabry病などの場合にも同様の手法で分析が行われた。従来の分析法ではこのような場合、臓器からの脂質抽出物を数種類のカラムクロマトグラフィーを組み合わせさせて純品を得て初めて測定できたので、必然的に出発材料はかなりの量が必要で、またクロマトグラフィーを繰り返しても純品を得るのが困難な試料も多かった。この方

Immunostaining Orcinol

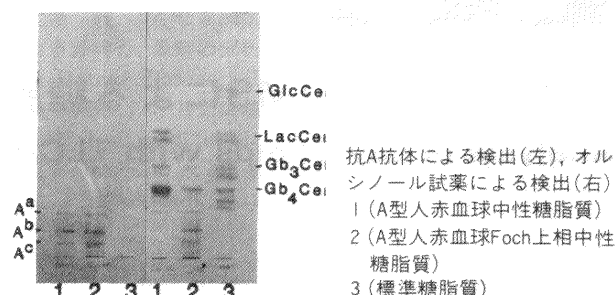


図4-A 抗A抗体に反応するA型糖脂質の検出

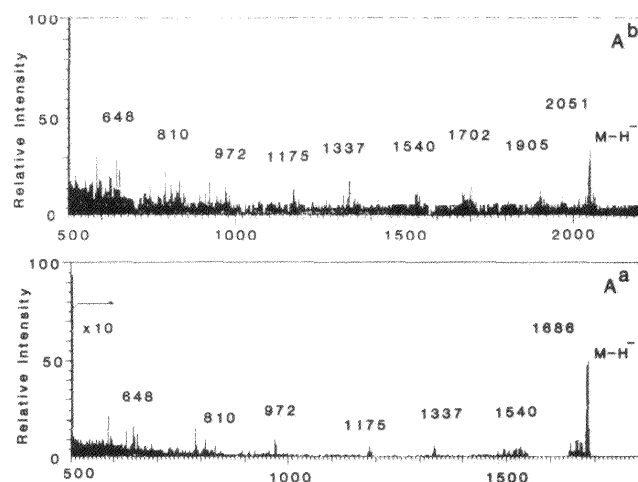


図4-B A型糖脂質の負イオンTLC/SIMSスペクトラム
上 [A^a (ラクトネオヘキサシルセラミド)]
下 [A^b (ラクトネオオクタシルセラミド)]

法では粗抽出液から一段階で測定できるので、試料の量、労力、時間のいずれも軽減される利点がある。

癌関連抗原に対するモノクローナル抗体やコレラトキシンなどの毒素、病原性の細菌などが細胞膜に結合する部位は、膜の特定の糖脂質である場合が数多く知られている。こうしたリガンドの結合相手となる物質を同定するためにTLCで展開した膜の構成成分とリガンドをプレート上で反応させ検出する方法が開発されている。この方法は非常に鋭敏で特異性の高い検出法ではあるが、プレート上で検出されたスポットの化学的性質については不明のことが多い。こうした場合にTLC/SIMSは非常に有用である。ここではモデルとしてヒト赤血球膜のA型血液型物質の場合を示す⁶⁾。A型のヒト赤血球から抽出した脂質抽出物をTLCで展開後、抗A抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて酵素抗体法でA型糖脂質を検出した(図4-A)。同時に展開した別のTLCプレートの同じRf値の部分のTLC/SIMS測定を行った(図4-B)。A^aでは(M-H)⁻m/z 1686、A^bではm/z 2051が検出され、グリコシドの開裂によるフラグメントイオンも検出されて、A^aはラクトネオヘキサシルセラミド、A^bはラクトネオオクタシルセラミドと同定された。このようにTLCのリガンドによる検出法とTLC/MSを組み合わせると、TLC上での移動度、リガンドとの結合の特異性、質量分析のデーターと豊富な情報をごく微量の試料から得ることができるので、細胞膜上での

糖脂質の構造と機能との関連を明らかにするための有力な手段になるものと考えられる。

2. LC/MSによる分析

LCと質量分析計を直結したLC/MSでは、真空系を中心とする質量分析計と液体をキャリアとするLCとの組み合わせで、キャリアの溶媒が真空系に入ると莫大な量の気体となるので、この2つをつなぐインターフェースが重大な問題になる。GC/MSのヘリウムセパレーターに匹敵するような標準的なインターフェースはまだ確立されておらず、サーモスプレー、エレクトロスプレー、ムービングベルト、Frit-FAB、APIなど種々の方法が試みられている。

図5にグルコシルセラミドを逆相カラムを用いたLC/API-MSで分析した結果を示す⁷⁾。この方式ではLCで分離された試料は細いパイプを通り加熱して噴霧され、大気圧中でコロナ放電によってイオン化される(大気圧イオン化, API)。イオン化された試料は細孔から分析計に導入されて測定される。同図に示しているように、紫外吸収によるクロマトグラムとLC/API-MSによるTICとはほぼ一致している。マスクロマトグラムとそれぞれのピークのマスペクトルから試料のグルコシルセラミドが、逆相のカラムによって構成脂肪酸に応じた分子種に分離されていることが分かる。図6に示すように、溶出順のピークのマスペクトルでは(M+H)⁺の分子イオンのほかに、セラミド、グリコシルスフィンゴシン、脂肪酸、スフィンゴシンに由来するフラグメントイオンが検出された。糖鎖の部分が、2糖、3糖の糖脂質についても同様の分析を行ったが、この場合は(M+NH₄)⁺のイオンも検出され、これはLCの溶媒に含まれていた酢酸アンモニウムに由来するもので、API-MSのイオン化は化学イオン化反応に非常に近いものと考えられる。2糖をもつラクトシルセラミドの60ngをLC/API-MSに注入し、SIMモードでその分子イオンm/z 890とm/z 918(それぞれ構成脂肪酸はC18:0で、スフィンゴシンがC18:1とC20:1に対応するもの)で、モニターするとS/N 7~8でピークを検出することができ、LCの検出器としてはかなりの感度であった。

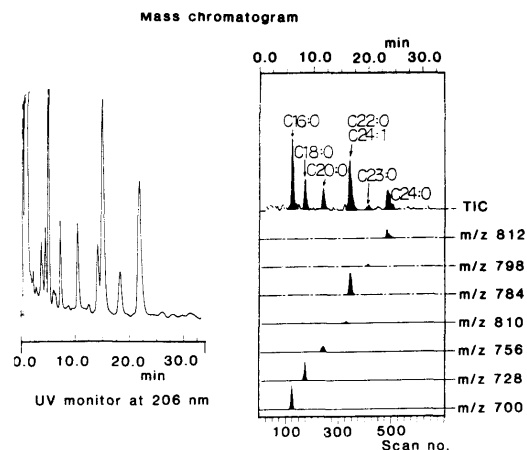


図5 グリコシルセラミドのHPLC/API-MS
A (206nmでのUV吸収)
B (TICと (M+H)⁺のマスキロマトグラム

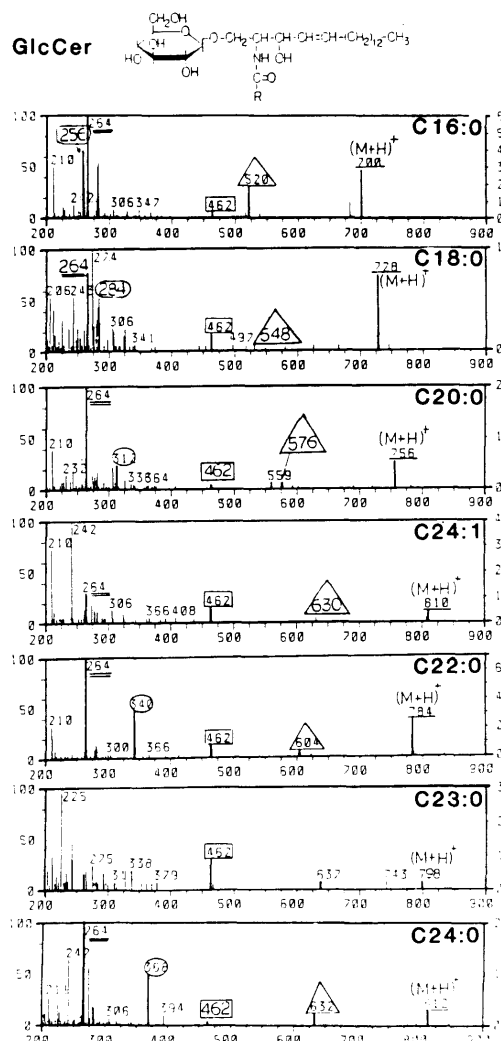


図6 グリコシルセラミドの逆相HPLC/API-MSスペクトラム

3. おわりに

TLC/MS, LC/MSともにまだ解決すべき問題点が多いが、クロマトグラフィーと質量分析の両方の特長を十分に発揮するような組合せによって、特に生体試料分析への応用が一段と広がるものと期待される。

参考文献

- 1) 土屋正彦：ぶんせき，1988，pp. 628～638
- 2) Burlingame, A. L., Maltby, D., Russell, D. H. & Holland, P. T.: Anal. Chem. **60**, 294R-342R (1988)
- 3) Wiegandt, H. (ed): "Glycolipids, New Comprehensive Biochemistry Vol. 10". Elsevier, Amsterdam (1985)
- 4) 中川有造, 岩谷宏治：ぶんせき，1988，647～656
- 5) Kushi, Y. Rokukawa, C. & Handa, S.: Anal. Biochem. **174**, in press (1988)
- 6) 櫛 泰典, 六川千秋, 小倉潔, 飯田静夫, 加藤義昭, 沼尻陽子：生化学，**59**, 853 (1987)
- 7) Handa, S. & Kushi, Y.: in "New Trends in Garglioside Research, Neurochemical and Neuroregenerative Aspects" (Ledeer, R. W., Hogan, E. L., Tettamanti, G. & Yates, A. L. eds.) pp. 37～45, Liviana Press, Padova (1988)

液体クロマトグラフィーのリアルタイム・アナライザー： —フローインジェクション分析法のシステムを採用した 全自動の微量ストップフロー装置の応用—

Real Time Analyzer for Liquid Chromatography: Application of Fully Automated Micro Stopped-Flow Apparatus with Flow Injection Analysis

高橋 浩二郎* 谷口 茂彦**

(昭和63年8月24日受理)

1. はじめに

我々は、最近、酵素反応等のタイムコースを連続測定できる装置として、フローインジェクション分析法のシステムを採用したストップフロー装置（以下SF-FIA装置と略す）を試作した¹⁾。この新しいSF-FIA装置の主な特徴は、(1) 一つのタイムコース測定に必要な試料液及び反応液の量は、各々約30 μ l
(2) データ集積をも含む全操作の自動化
という二点である。全自動化されたその微量SF-FIA装置にさらにUVディテクター、pHメーター、電気伝導度計を接続した装置は、液体クロマトグラフィー（以下LCと略す）での有効なリアルタイム・アナライザーとして利用できた。ここでは、その装置の概略等とLCへの応用を紹介する。

2. SF-FIA装置の概略

高速で流れる二つの液を混合直後に停止し、進行し始めた反応の時間変化をミリ秒～秒のオーダーで追跡する方法をストップフロー法（以下SF法と略す）という²⁾。一方、キャピラリーチューブ内を数ml/minの流速で流れているキャリアー液中に注入される試料液が、キャリアー液内の成分と反応して生じる変化を観測する方法をフローインジェクション分析法（以下FIA法と略す）という^{3),4)}。これらの方法の各々の特徴の機能的な併合によって、全自動化された微量反応測定装置を組み立てた。

図1は、二組みのFIAシステムを一つのSFシステムで対称的に連結しているSF-FIA装置の概略を示している。この装置の基本的な操作は、次の手順で行われる。

- (1) キャリヤー溶液の流れがJ1点でまず二等分され、二つのバルブ（Va及びVs）のループ（1→6）を経由した後にJ2点で再び合流され、そしてフローセル：D1（分光光度計）を経て排出されているような高速の定常流の作成
 - (2) 定常流達成後、ループ（1→6）からループ（1→2→5→6）への切り換えによって、ループ（2→5）中の反応液及び試料液を、分流されたキャリアー溶液中に注入
 - (3) 注入されたそれら二液がJ2点での混合後のD1に達したとき、フローストップパーFSによる流れ全体の停止
 - (4) 進行し始めた反応の時間変化の追跡
 - (5) 反応追跡後のキャリアー液によるD1の洗浄
- これら一連の操作は、バルブの切り換え、ポンプのON/OFF

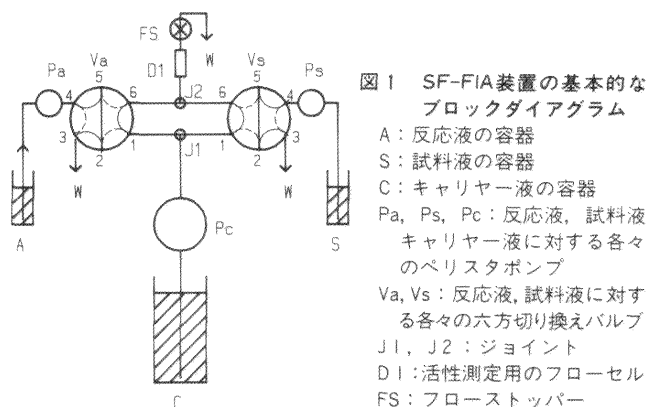
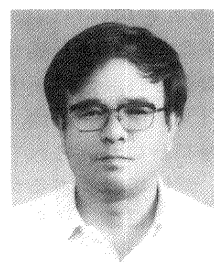


図1 SF-FIA装置の基本的なブロックダイアグラム

A: 反応液の容器
S: 試料液の容器
C: キャリヤー液の容器
Pa, Ps, Pc: 反応液, 試料液
キャリアー液に対する各々の
ペリスタポンプ
Va, Vs: 反応液, 試料液に対する
各々の六方切り換えバルブ
J1, J2: ジョイント
D1: 活性測定用のフローセル
FS: フローストップパー

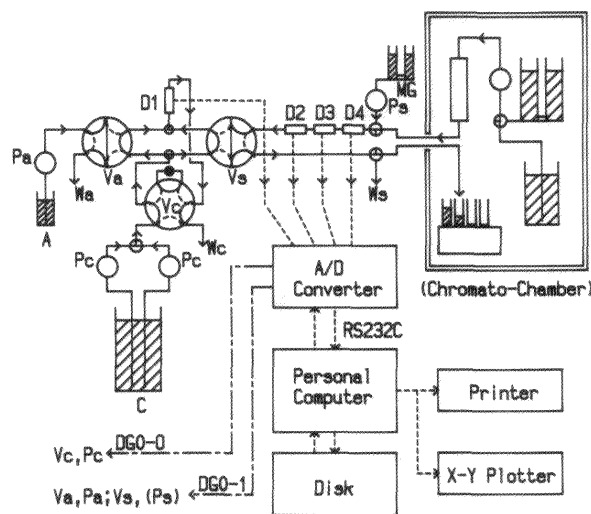


図2 実用的なSF-FIA装置のブロックダイアグラム

D2, D3, D4: UVモニター, pHメーター, 電気伝導度計のフローセル
Vc: キャリヤー液に対するFSとしての六方切り換えバルブ
MG: マイクログラジエーター

* 岡山大学歯学部 口腔生化学教室 助手・理博

** 岡山大学歯学部 口腔生化学教室 教授・理博

の繰り返しであるから、全体の操作は容易に自動化できる。従って、さらに(1)~(5)のサイクルの繰り返しによって、反応曲線の連続測定も可能となる。

実際に組み立てられたSF-FIA装置のブロックダイアグラムが、その装置に対する試料供給部と操作制御部と共に、**図2**に示してある。この**図2**から分かるように、**図1**に比べて次の四つの改良点を加えられている。

- (1) 高流速のキャリアー溶液の流れを得ることと、その流れの脈流を減少させることを目的として、2台のペリスタポンプ(Pc)を並列に設置
- (2) 高流速のキャリアー溶液を瞬時に、しかも完全に停止するためのFSとして、六方切り替えバルブ(Vc)を設置
- (3) 試料液の濃度(D2:UVモニター), pH(D3:pHメーター), イオン強度(D4:電気伝導度計)測定のためのフローセルの設置
- (4) 試料液に対する濃度グラジエント作成のためのマイクログラジエーター(MG:内径1cm長さ4.6cmの2本の円柱を底面で連結管により接続), 或いはLCカラムからの分離液の一部の取り出口の設置

ペリスタポンプを経由した容器とバルブの間の接続は、シリコンチューブ(内径:1mm)で、一方、バルブ内、バルブ間及びバルブとD1の間の接続はステンステューブ(内径:0.5mm)で行われている。従って、反応液と試料液の各々の注入量は、Va及びVs内に形成されたループ(2→5)の長さが15cmのため、 $29.4\mu\text{l}$ である。この注入量は、試料液及び反応液が各々3mlあれば約100回の反応曲線の測定ができることを意味している。

3. SF-FIA装置の性能

図2に示したようにSF-FIA装置の操作は、3組みの六方切り換えバルブと3種類のペリスタポンプをコントロールするだけの非常に簡単なものである。これらのコントロールとデータ集積は、二組みのデジタル・アウトプットライン(DGO-1, DGO-2)を備えた1レンジ-4チャンネルのA/Dコンバーターを接続した1台のパソコンで行っている。そのコンバーターは、RS232Cでパソコンに連結されているため、データ・サンプリングは0.1秒以上の時間領域で可能である(従来のSF法のようにミリ秒オーダーの高速反応の測定が必要な場合には、通信システムを変更するか、バッファ内蔵のA/Dコンバーターに変更すればよい)。

今回のSF-FIA装置では、2台のPcで作られるキャリアー液の流れの量大流速は、J1点では40ml/minで、D1直後では少し減速されて30ml/min(255cm/s)であった。二液が再合流する点(J2)から測定セル(D1)の中心までの距離が4cmとキャピラリーチューブの内径が0.5mmであるから、SF法的な測定での見掛けの不感時間は、D1での流速が255cm/sのとき約16msであった。この不感時間は、J2点とD1の間の距離の短縮によってミリ秒オーダーにすることが可能である。

SF-FIA装置の性能に対する一つのチェックは、Vsから供給される反応液(50mM Tris-HCl緩衝液:pH8.5)とVsから供給される試料液(MGによって段階的な濃度勾配が形成されている上記緩衝液中のパラニトロフェノール)とをJ2点で混合することによって調べられた(**図3**)。試料液

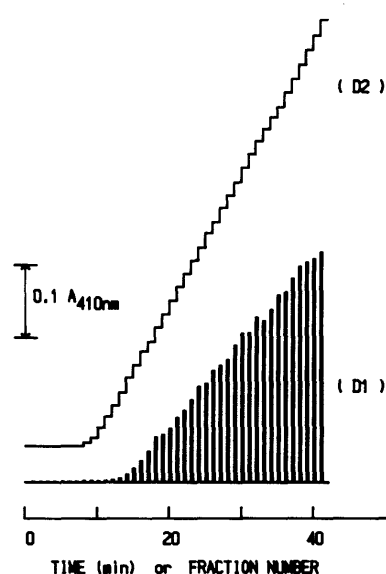


図3 自動化された微量SF-FIA装置の混合能率

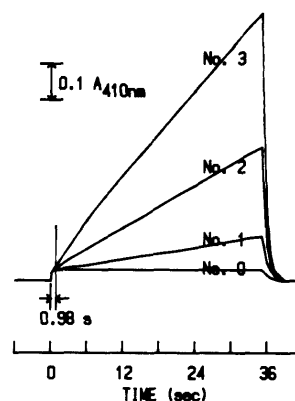


図4 自動化された微量SF-FIA装置によるアルカリホスファターゼの加水分解反応の連続測定

の希釈前の濃度変化はD2を用いて、一方、二分の一に希釈された後の濃度変化はD1を用いて、各々410nmの吸光度で測定された。このときのキャリアー液の流速はJ1点で40ml/minであった。**図3**に示されるように、D2側の吸光度変化の割合は、D1側の約1.9倍であった。これは、今回の装置では、反応液と試料液の理想的な1:1の混合が行われていないことを示している。

全自動化された微量SF-FIA装置での酵素反応のタイムコースの連続測定は、コウシ骨アルカリホスファターゼ(AIP)とパラニトロフェニル・ホスフェートとの反応系で行った。その加水分解反応のタイムコースの一部が**図4**に示してある。この測定条件では、キャリアー液の流速が20ml/min(不感時間:31ms)で行われており、AIPの濃度がMGによって段階的に変化させてある(No.0の直線のシフトは、AIPの濃度ゼロでの基質自体の410nmの吸光度を示している)。**図4**での一つのタイムコースを得るためのサイクルタイムは約40秒であるけれども、キャリアー液の流速やタイムコースの観測時間等をコントロールすることによって、このSF-FIA装置のサイクルタイムは約10秒にまで短縮可能

である。

4. SF-FIA装置のLCへの応用

イオン交換クロマト・グラフィー (Q-セファロース) によるコウシ骨AIPの精製に対して、微量SF-FIA装置が試験的に適用された。図5は、その精製過程が完全自動化された時に得られたクロマトグラムである。このクロマトでの流速は1.05ml/minで、フラクション当たりの体積は2.12mlであるから、約5時間のクロマト終了時にはUV、イオン強度及び酵素活性の測定が完了していることになる。それらの三つのパラメータのリアルタイム測定により、最初のイオン・グラジエント (G1: 0~0.05M NaCl) でのAIP溶出未達の判断がクロマト進行中にでき、即座のグラジエント変更 (G2: 0.05~0.5M NaCl) によって目的の酵素の溶出が可能となっている。同じような操作、判断、修正操作が、Zn²⁺を吸着させたイミノジアセティックアシド・アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーでのコウシ骨AIPの精製過程でも行われている¹⁾ (この場合、UV、pH及び酵素活性の測定)。これらの結果は、今回試作したSF-FIA装置がLCでのリアルタイム・アナライザーとして非常に有用であることを示している。また、SF-FIA装置による連続的な活性測定におけるワンサイクルの時間間隔が約10秒にまで短縮できることから、今回の試作装置がそのままHPLCに対してもリアルタイム・アナライザーとして役立つものと思われる。さらに、クロマト・ワークの前後で行われるカラムの平衡化の度合、或いはカラムの洗浄の度合のチェックにもこのSF-FIA装置の一部が利用可能である。

5. おわりに

全自動化された微量SF-FIA装置は、LC以外でも、平衡透析法或いは流動透析法を利用した生化学的な数多くの結合実験や、可能な限りのクローズド・システムが望ましいラジオアイソトープを用いた実験等で、大いにその威力を発揮するものと思われる。さらに、今回試作したSF-FIA装置では、活性測定用のフローセルまでの反応液及び試料液

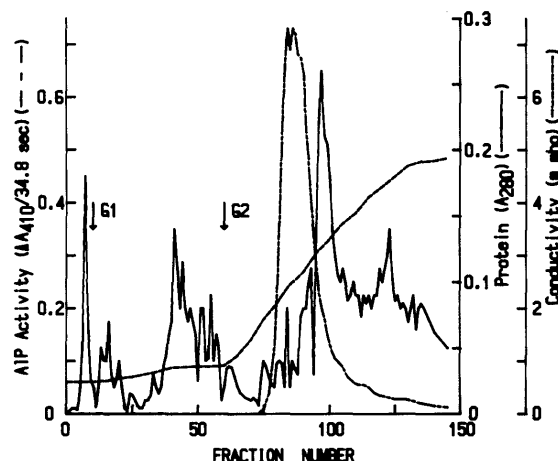


図5 自動化された微量SF-FIA装置を用いたアルカリホスファターゼのイオン交換カラムクロマトグラフィーでの精製

の輸送システムにはキャピラリーチューブが用いられており、反応検出器としては分光光度計以外の種々の検出器が利用できるであろう。

著者らは、本装置試作において御協力頂いた株式会社 日立製作所 計測器事業部の保田和雄、日立計測エンジニアリング株式会社の黒石忠文の両氏と広島大学理学部物性学科の佐野孝行助教授に対し深謝の意を表す次第である。

参考文献

- 1) K. Takahashi, T. Kuroishi, K. Yasuda, T. Sano & S. Taniguchi: Anal. Chim. Acta. in press (1988)
- 2) 廣海啓太郎: 酵素反応解析の実験 (講談社サイエンティフィック)
- 3) J. Ruzicka, E. H. Hansen 共著、石橋信彦、与座範政共訳: フローインジェクション分析法 (化学同人)
- 4) 上野景平、喜納兼勇共著: フローインジェクション分析法 入門—実験と応用— (講談社サイエンティフィック)

Topics

鷹野重威氏1988年度 日本分析化学会 技術功績賞を受賞

去る10月1日、日本分析化学会第37年会において、日立計測エンジニアリング(株)主管研究長鷹野重威理博は、同学会の技術功績賞を受賞した。本賞は本会会員であって、分析技術の向上、あるいは分析技術により社会への貢献

が著しい者の中から、特に優秀な者に毎年3件以内に授けられる。今回の受賞は、一昨年設けられた本賞の第1回目の受賞者、計測器事業部の保田和雄主管技師長に続く快挙で、「アミノ酸分析装置の開発」に関する業績に対して表彰されたものである。

鷹野氏は、京都大学在職中から微生物に関する生化学的研究に取り組み、これらの研究を通じてアミノ酸や蛋白質の分離分析に強い関心を持った。特に、液体クロマトグラフィーによる分離分析及びその自動化に関する研究に力を注ぎ、昭和42年には、日立製作所に入社しその製品化を行い、我が国におけるアミノ酸分析計を中心とする高

性能液体クロマトグラフの開発に成果を挙げ、分析化学の発展に貢献した。氏の経歴は、そのまま日立の液体クロマトグラフの歴史となったといっても過言ではないほど、日立の液体クロマトの発展は氏に負うところが大きい。まことに同慶にたえない。

今回の年会では、(株)堀場製作所の大浦正弘代表取締役社長が技術功績賞を受賞された。さらに、有功賞には日製産業(株)の沖渡氏、多賀工場の黒田秀雄氏、那珂工場の真山新治氏及び菊地正弘氏が受賞するなど、日立とその関係者の多くがその功績を認められた真に良い年となった。

(高田芳矩 記)

LC-AASシステムによる血清中金属結合蛋白の分析

Trace Metal Analysis of Metalloprotein In Serum with LC-AAS



野本 昭三*

(昭和63年10月12日受理)

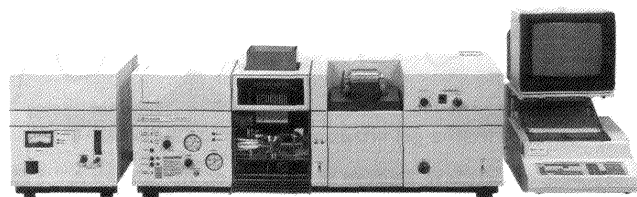
1. はじめに

ウサギの血清中に、ニッケルを含有する分子量約70万の蛋白が存在することを認めて、Biochemistryに報告したのは今から17年前になる。当時我々がこの蛋白の分離に用いたシステムと手順は、Sephadex-G-200によるゲルろ過法とフレーム型原子吸光分析で、ウサギの血清からニッケルを結合した高分子蛋白を含む画分を、アルブミン結合ニッケルの画分から分離する形で分取し、次いで高分子画分をDEAE celluloseによるイオン交換クロマトグラフィーと原子吸光分析で比較的に純度の高いニッケル結合高分子蛋白画分(アクリルアミドゲル・ディスク電気泳動で単一のバンド)を得るというもので、そのようにして分画したニッケル結合蛋白の性状を確かめる実験を行って、その結果も含めた報告書にしている。また、1973年には、このシステムで人血清からもニッケル結合蛋白を分離してこれを報告した。

ところで、その後、このニッケル結合蛋白の生理的意義についての検討など、深く追求することを怠っている間に、追試して我々と同様のものを認めたとする報告に接することなく17年が経過して、最近、あの蛋白のその後はどうなったのか?、また、その本態は何か?といった問いかけにも接するようになったのを機に、1987年夏、あらためてこの蛋白の分離と確認の実験に取り組むことになった。今回は、このときに用いた手法の内容と成果について述べ、更にこの手法を血清亜鉛の分析に応用した例についても付け加えて述べることにした。

2. LC-AASシステムの素材と構成

図1に示すように、液体クロマトグラフ(LC)は、PharmaciaのモデルP-500 high-precision solvent delivery systemと、モデルP-250 programmerで構成されたFPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) systemで、ゲルろ過法には1~2 mlのloop形sample injectorと、モデルHR-10/30とHR-16/50のカラムにSuperose-6を詰めたものを、溶離液としてトリス緩衝液50mmol/L、pH7.7に、硝酸ナトリウムを75mmol/Lになるよう溶解したものを用いた。イオン交換クロマトグラフには、モデルHR-5/5のカラムにMono-Qを詰めたものを用い、溶離液にはゲルろ過法用の緩衝液(トリス50mmol/L、pH7.7に硝酸ナトリウムを75mmol/L)をスターティング緩衝液とし、硝酸ナトリウム1,000mmol/Lが終濃度となるようなグラジエントシステムを用いた。なお、これらのシステムに280nmのモニターとレコーダーを付加した。原子吸光分析装置は日立モデルZ-8000グラフィットファネスを用いた。



Z-8000形日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計

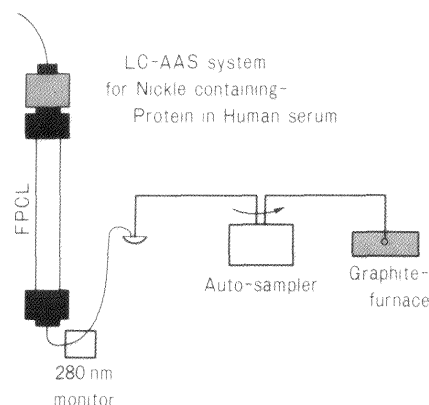


図1 LC-AAS System

3. 溶離プログラムとLC-AAS間のインターフェイス

ゲルろ過では、溶離液流速を0.4mlまたは0.6ml/minにセットし、カラムのアウトレットに付けた280nmのモニターを経て流出する溶離液を、原子吸光分析装置のオートサンプラー用の試料カップで、1.5~2mlずつ分取するようにフラクションコレクターをセットして得られた分画を、原子吸光分析装置のグラフィットファネス用オートサンプラーのトレイに移してニッケルの分析を行った。

イオン交換クロマトでのプログラムは、ポンプの流速を1ml/minにしてstarting bufferで十分に洗ったカラムに試料を添加した後、2分間はそのままstarting bufferを流し、2分から24分の間に硝酸ナトリウムの濃度を75mmol/Lから270mmol/Lに直線的に上げ、次いで24分から26分の間に1,000mmol/Lに上げてそのまま2分間カラムを洗い流してから、一気にstarting bufferに戻して次の試料に備えるということにした。なお、この間の試料の分取は1mlずつカップに受け、これをそのまま原子吸光分析装置のオートサンプラーのトレイに移してニッケルの測定をした。

結果：図2は人血清を試料としてゲルろ過法で得られたクロマトグラムで、同図中の③と⑤にニッケルの存在が認められる。この分画①から⑥までをアガロースゲル電気泳動にかけたのが図3で、同図中の1~6までの番号は、図

* 信州大学医療技術短期大学部教授・医博

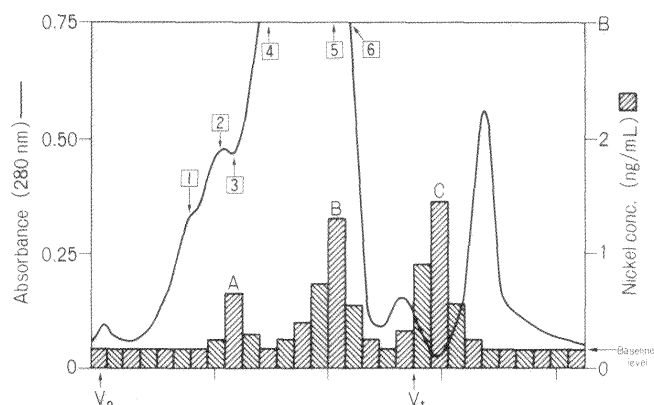


図2 Chromatographic profiles of Ni and Abs. 280nm in effluent from a gel-filtration column of "superose-6"

2の①～⑥と対応している。すなわち、②、③は α_2 分画、④は γ -グロブリン分画、⑤はアルブミンと β -グロブリン、⑥はほとんどアルブミンのみが、それぞれ主体をなしていることを示している。この③(A)の分画を、イオン交換クロマトにかけて得られたクロマトグラムが図4で、トリス50 mmol/L硝酸ナトリウム150mmol/Lの辺りにニッケル結合蛋白A3が認められている。なお、このA3と②、③を免疫電気泳動法で同定してA3は人坑 α_2 -マクログロブリンとのみ沈降線を示すことを確認している。なお、図2で⑥の後に2つのピークが認められるが、これらは、アミノ酸類と考えられる低分子のものであった。

考察：今回のニッケル結合蛋白分離の実験を進める上で重要な最初のステップは、コンタミネーションの少ない原料試薬（クロマトグラフィーに用いる溶離液用）を捜すために特に注意深く予備実験を重ねて確認することであった。幸運にも、複数のメーカーの多数のロットの中から、シグマ社の古いロットの中に、それぞれ（トリスも硝酸ナトリウムも）今回の目的に合った純度のものを見つけることができてこれを用いた。

次に、今回選んだ手法の中で特筆すべきと考えられることは、グラジエントバッファーの中に硝酸ナトリウムを用いたことである。この硝酸ナトリウムは、280nmに吸収を持っていることから、グラジエントに用いると蛋白のモニターリングが困難になるというのが一般の常識になっている。今回あえてこの常識にさからって硝酸ナトリウムを用いたのは、グラジエントの素材として一般に用いられているNaClや Na_2SO_4 は、ニッケルをグラファイトファネスによる原子化で測定する段階で、強い干渉を示して測定を不可能にする（一般には原子吸光分析装置に添加する前に、適切な前処理操作でこれを除去することが不可決であり、しかも、この場合の前処理法は、塩酸とTCAによる除蛋白または硝酸による灰化の後、キレート剤を加えてニッケルを不溶化し、これをMIBKなどの有機溶媒で抽出するなど、極めて難しい、しかも時間のかかる作業である）のに対して、硝酸ナトリウムは、試料中にかなりの高濃度（1mol/Lくらいまで）に存在していても、原子吸光測定に際してこのような干渉を全く示さないことから、カラムからの溶出液を前処

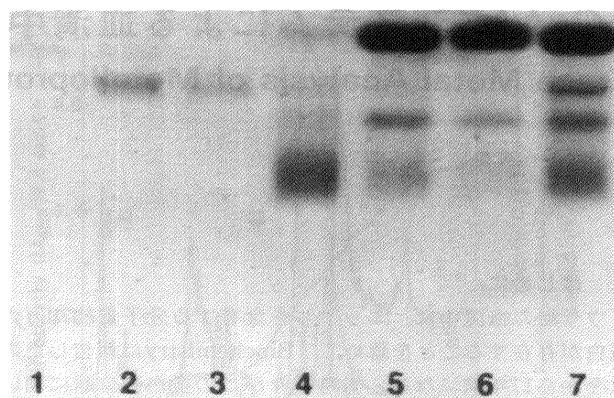


図3 Electrophoretic fractionation of the samples in lanes 1 to 6 are fractions ① to ⑥ obtained by gel-filtration chromatography.(see figure-2)

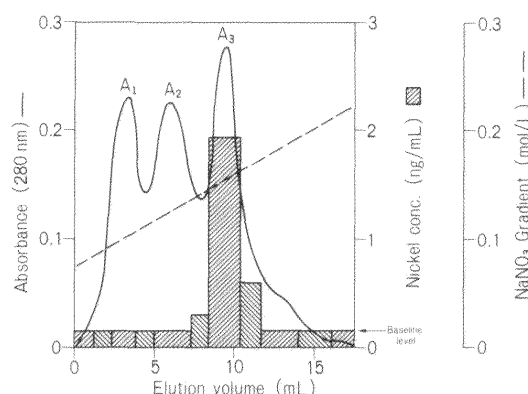


図4 Chromatographic profiles of Ni and Abs. 280nm in effluent from an ion-exchange column of "Mono-Q".

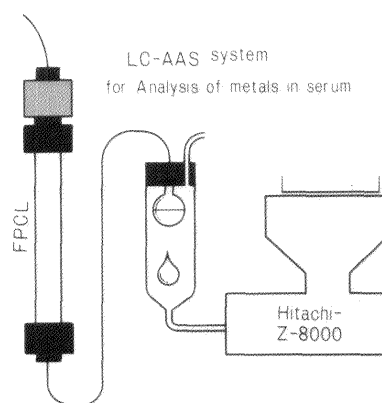


図5 LC-AAS System

理なしで直接グラファイトファネスに添加して、 $0.2\mu\text{g/L}$ くらいのニッケルの存在も検出可能にした。なお、今回はここにLCとAASを用手的に結合した形で提示したが、カラムから溶出する試料を前処理をせずに原子吸光装置のファネスに添加できることが明らかになったので、フラクションコネクターと原子吸光装置のAuto samplerのサンプルトレイの機構をうまく組み合わせることができれば、完全な自動化も可

能と考えている。その場合は、グラファイトファネス型の原子吸光分光光度計がクロマトグラフのモニター用検知器のひとつということになる。

つぎに、フレーム型原子吸光分光光度計をLCのモニター用検知器にした例について述べる。

前述のニッケルの仕事を、一応はじめに目指した段階まですませたところで、かねてから携っていた血清中 α_2 -マクログロブリン結合亜鉛(α_2 -M-Zn)の分析とその生理学的機能に関する検討にもこの手法を応用することにした。図5が、その際組み立てたシステムの概略図で、この中でLCとAASのインターフェイスとして用いた点滴型の試料添加装置が新たに考案したもの、ということができよう。この点滴型試料添加装置は、すでにフレーム型原子吸光分析における1滴法として用いられている手法の応用であるが、滴下する一滴の容量を70 μ l前後になるようにした点がひとつの工夫である。元来カラムのアウトプットに連結したテフロンチューブの先端からの一滴の容量はせいぜい12~15 μ lで、このような一滴から得られるシグナル高はあまりにも低すぎて、血清中の亜鉛をカラムで分画して検知するには不適當であった。図6は、この一滴法における一滴の容量と亜鉛のシグナルの高さの関係を示す実測チャート(それぞれ3重測定)で、この結果一滴が70 μ lになると、試料液を原子吸光装置に連続的に吸引させた場合とほぼ等しくなることを示している。我々は、この一滴の容量を大きくするために、ポリエチレンチューブ(PharmaciaのCode No.

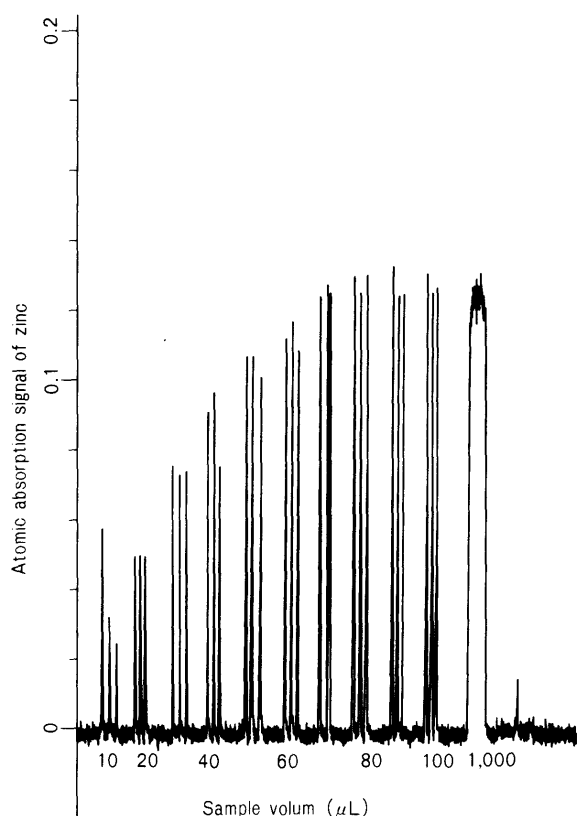


図6 A correlation between a sample volume of the one drop and a signal height of the atomic absorption

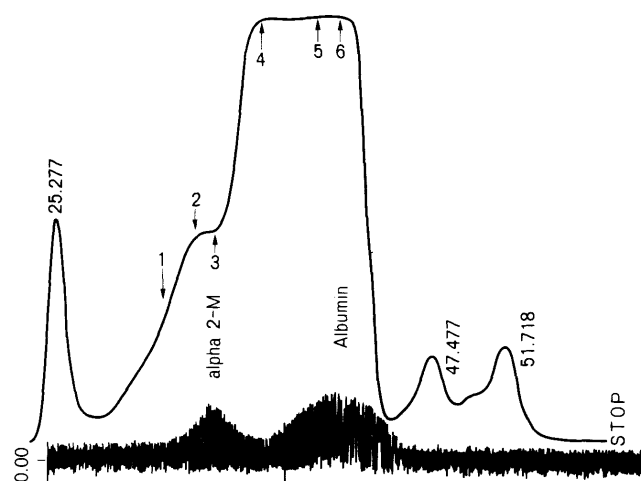


図7 A typical Chromatographic profiles of Zinc and Abs. 280 nm in effluent from gel-filtration column of "Superose 6"

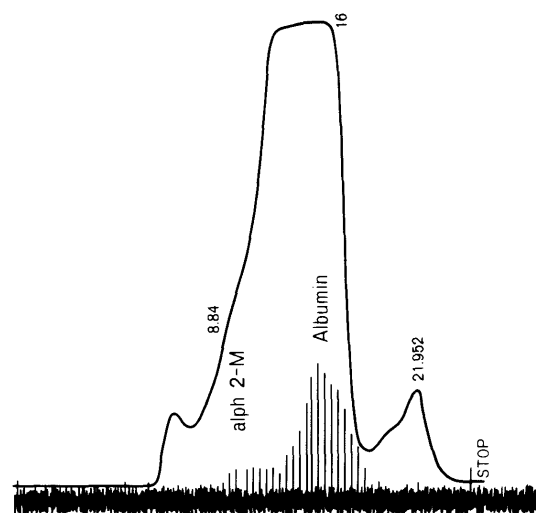


図8 A typical Chromatographic profiles of Zinc and Abs. 280 nm in effluent from gel-filtration column of "Superose 6"

19-0040-01)をまず直角に切って、その切り口をバーナーの炎にかざすようにして少しずつ温め、先端が直径6~7 mmの皿形に広がるのを待って、これをカラムからのテフロンチューブの先端に取り付け、更にこれを、ガラス管で作った円筒状の受け口にセットした。なお、この場合のLCには、PharmaciaのHR-10/30またはHR-5/20にSuperose-6を詰めたカラムを用いた。なお前者HR-10/30は試料調整用に、後者は一般の血清試料中 α_2 -マクログロブリン結合亜鉛のスクリーニング用に用いることにした。また、システムへの試料の添加には200 μ lまたは100 μ lのLoop-injectorを用いた。

結果：図7は、HR-10/30を装備したLC-AASシステムに血清を添加して得られたクロマトグラム、図8、9はHR-5/20を付けたシステムに血清を添加したもので、図8の方が血清そのまま、図9の方が血清に塩化亜鉛をスパイクしてから、システムに添加して得られたクロマトグラムである。図8と図9を比較すると、血清にスパイクされた亜鉛の大

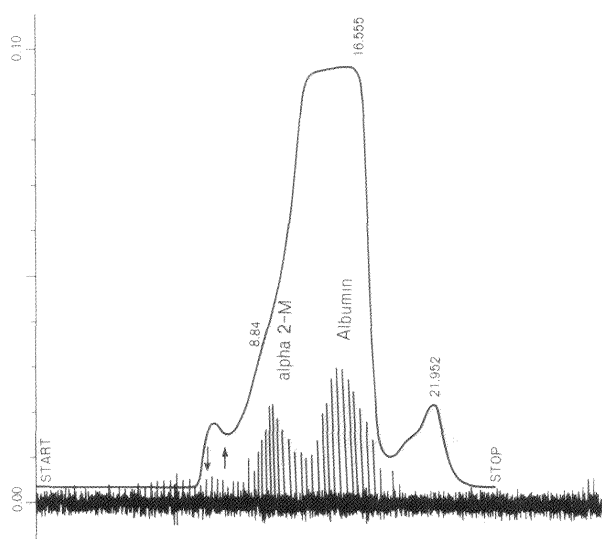


図9 A typical Chromatographic profiles of Zinc and Abs. 280 nm in effluent from gel-filtration column of "Superose 6"

部分が α_2 -マクログロブリン (α_2 -M) 分画に現れていることがわかる。なおこのシステムを利用して α_2 -M-Znとアルブミン結合蛋白 (Alb-Zn) を分取し、この両蛋白の亜鉛との結合の仕方に関する情報を得る目的で、次のような実験を行った。すなわち、分取した両蛋白溶液の蛋白濃度を求め、これをそれぞれ4本に分け、それぞれ2本または1本を用いて次の処理を施してから、各試料中の亜鉛の測定をした。

(1) 適当量の亜鉛を各2本の蛋白溶液に加えた後、これをpH-7.4のBufferd salinで十分に透析して亜鉛で飽和された

α_2 -M (Zn-saturated- α_2 -M) と、亜鉛で飽和されたアルブミン (Zn-saturated-Alb) を作った。

(2) 無処理の α_2 -M-Zn 1本と1本のZn-saturated-Alb, 1本の無処理のAlb-Znと1本のZn-saturated- α_2 -Mの間で平衡透析をした。

その結果、

- (1) α_2 -MのpH7.4における総亜鉛結合能は、700~900 μ g/g, アルブミンのそれは30~50 μ g/gであった。
- (2) 正常者の循環血しょう中の α_2 -Mに結合している亜鉛量は、 α_2 -Mの総亜鉛結合能の1/10にすぎない。
- (3) α_2 -Mに対して、invitroで亜鉛を付加することが可能である。

参考文献

- 1) Nomoto, S., McNeely, M. P., and Sunderman, F. W., Jr.: Isolation of a nickel a 2-macroglobulin from rabbit serum. Biochemistry 10: 1647~1651, 1971.
- 2) Nomoto, S., Decsy, M. I., Murphy, J. R., and Sunderman, F. W., Jr.: Isolation of ^{63}Ni -labelled nickeloplasmin from rabbit serum. Biochem. Med. 8: 171-181, 1973.
- 3) Sunderman, F. W., Jr., Decsy, M. I., Nomoto, S., and Nechay, M. W.: Isolation of a nickel a 2-macroglobulin from human and rabbit serum. Fed. Proc. 30: 1274 (Abst. 1294), 1973.
- 4) Manning, D. C.: Aspirating small volume sample in flame atomic absorption spectroscopy. Atomic Absorption News letter. Vol. 14, No. 4, July-August 1975.
- 5) 牧野鉄男, 高原喜八郎: フレーム原子吸光「一滴法」による血中微量金属の定量. 臨床病理, 28: 478~482, 1980.

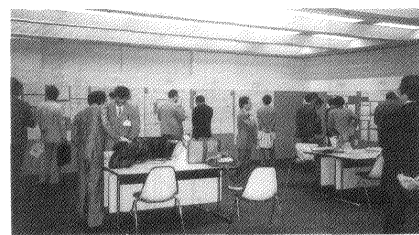
Topics

第3回臨床検査の自動化と新技術に関する国際会議開催さる

去る9月5日~9月8日の日程で、神戸ポートアイランドの国際会議場で首記の国際会議が開催された。今回の会議は、「エキスパートシステム」、「免疫疾患」、「全血の生化学分析」、「分離技術」、「ロボット」、「血液及び体液中の痕跡金属分析」、「遺伝子技術」、「凝固新技術」、「唾液による新診断技術」、「微生物学の新技术」、「バイオセンサー」、「微生物学における自動化」、「フローサイトメトリー」、「血液学の新技



術」、「発光」など、メディカル分野の全域にわたるともいえる広範囲の主題が設けられた。そして、それからの主題に基づいた内容での特別講演2件、一般講演62件及びポスター61件の報告と、それに対しての質問と討論が連日3会場に分かれて活発に行われた。参加者は、約210人(海外からの参加者は75人)とこの種の国際会議としては少なかったにもかかわらず、逆にそれが幸いしてか講演と討論には十分な時間が費やされ、各会場は終日アカデミッ



クな雰囲気になりあふれながら予定どおり閉幕した。各国における臨床検査(自動化と技術)の急速な発展と研究・開発への関心の高さがうかがわれた国際会議であった。

なお、日立関係では、血液及び体液中の痕跡金属分析のテーマで、「原子吸光分析法における痕跡元素の同時分析」と題した講演(計測器事業部 保田主管技師長)と、ポスター4件(血液ガス、電解質、痕跡金属分析及び免疫学)の報告を行った。(山田英雄 記)

キャピラリー-G.L.C.による *Mycobacterium Leprae* および *Mycobacterium Bovis* のPGLの糖鎖の絶対構造の決定

Determination of Absolute Configurations for Sugar Residues of Phenolic Glycolipids Involved in *Mycobacterium Leprae* and *Mycobacterium Bovis* by Capillary-G. L. C.

藤原 剛*

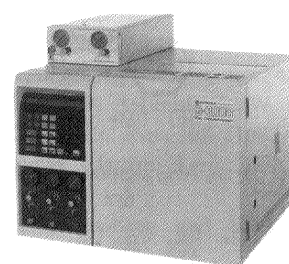
(昭和 63 年 6 月 21 日受理)

1. はじめに

糖類の構造研究において、糖残基の絶対構造、即ちD型、L型、の決定は重要であるにもかかわらず、しばしばかなりの困難をとまう。糖残基の絶対構造の決定には、①旋光度の測定、②旋光度とNMRの組合せ、③酵素の使用などの方法があるが、①と②は相当高純度の試料がかなりの量必要であること、混合物の場合は適用できないこと、③は必ずしも必要な特異性をもつ酵素が得られるわけではないこと、特に対象が部分メチル化糖などの、単純な糖ではなく、誘導体になっている場合には適用しにくいことなどが大きな問題である。この点を解決する手法として、キャピラリー-G.L.C.による方法^{1)~3)}が開発された。この方法は、試料がごく微量で済むこと、混合物でもそのまま分析することができること、など生体成分の分析には極めて好都合である。

これを実際に行う方法としては、①試料を光学活性な液相をコートしたカラムで分析する¹⁾か、②試料を光学活性なアルコールをアグリコンとするグリコンに変換した後、通常の液相をコートしたカラムで分析する方法^{2),3)}が可能である。しかし、①の方法は適当なカラムが入手しにくいこと、価格が高いことなどの問題があり、②の方が応用範囲が広い。Gerwigらは種々の単糖について2-ブタノールをアグリコンとして用い、そのTMS誘導体をWcoat型OV-1カラムで分析を行い、良い成績を得ている²⁾。またLeonteinらは2-オクタノールを用い、アセチル誘導体について分析を行っている³⁾。

ところで我々は *Mycobacterium* 属から得られた非常に種特異性の高い抗原物質であるフェノール性グリコリピッド (PGL) の研究を進めて来た。この過程において我々は、らい菌 (*M. leprae*) のPGLについては、図1に示すように三糖がフェノール部分を介して非常に大きな炭素鎖をもつフィチオセロールジマイコレートに結合したものであり、三糖の構造はO- (3, 6-ジ-O-メチル-β-D-グルコピラノシル) - (1→4) -O- (2, 3-ジ-O-メチル-α-L-ラムノピラノシル) -3-O-メチル-α-L-ラムノピラノシドであると報告した⁴⁾。しかしながら、三糖の絶対構造については、量的な問題から決定には至っておらず、推定にとどまっている。その後我々は、D-グルコースとL-ラムノースを出発材料として、この三糖鎖の全合成を行った。合成された三糖はELISAやELISA inhibition assayによって、PGLとほぼ同一の活性と特異性をもつことが明らかになり、これを利用してらい



G-3000形日立ガスクロマトグラフ

感染の有無を診断する血清診断薬の開発が行われた^{4)~6)}。この事実は我々の推定が正しい事を示唆するものであるが、糖残基の絶対構造については尚間接的な証拠にとどまっている。

また、仔牛の結核菌である *M. bovis* のPGLの構造については、Demarteau-Girsbergらは *M. leprae* のPGLとの同一の構造をもつ脂質部分にフェノール基を介して2-O-メチル-D-ラムノースが結合したものと報告している⁷⁾。しかし、D-ラムノースは天然では非常に珍しい糖類であり、その構造の決定には充分なデータが必要であるが、この場合旋光度のみで決定がなされており再検討が必要である。

これら二つのPGLの構造のうちで、残された問題である糖残基の絶対構造を確定すること、とりわけらい菌のPGLについては、らい菌の感染をうけているかどうかや、その病変が、らい菌によるものかどうかなどの血清診断に極めて重要である。そこで我々は、Gerwigらの方法を用いて絶対構造の決定を試みた。また、Gerwigらの方法や前述のLeonteinらの方法が、部分メチル化糖などの置換をうけた糖については報告していないので、この点についても検討を加えた。

2. 実験方法

らい菌のPGL (L-PGL), *M. bovis* のPGL (B-PGL), p- (2-メトキンカルボニルエチル) フェニル O- (3, 6-ジ-O-メチル-β-D-グルコピラノシル) - (1→2) -3-O-メチル-α-L-ラムノピラノシド (L-PGLの糖鎖, 化合物1, 合成品) または2-O-メチル-L-ラムノピラノース (B-PGLの糖鎖, 合成品) 500μgを0.5mlの(+)又は(±)-2-ブタノール中で、25mgのアンバーライトIR-120 (H+) 存在下で封管中100℃で15時間加熱した。アンバーライトを汙別した後、脂質部分を除去するため3mlのヘキサンで2回洗浄した後(合成糖の場合はこの処理は省略)、メタノールを添加しつつ数回乾固する。これに1mlのメタノールを加え、生じる不溶性の物質はセライトを助材にして汙過し、乾固する。

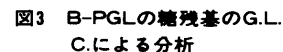
* 奈良大学 自然科学教室 助教授・農博



3.1 らい菌のPGLの糖鎖の絶対構造

図2 L-PGLの糖残基のG.L.C.による分析

a: (+)-2-ブタノールで処理したL-PGL
b: (±)-2-ブタノールで処理したL-PGL
c: (+)-2-ブタノールで処理した化合物1



- a: (+)-ブタノールで処理したB-PGL
- b: (±)-2-ブタノールで処理したB-PGL
- c: (+)-2-ブタノールで処理した2-O-メチル- β -ラムノース

3.2 M. bovisのPGLの糖鎖の絶対構造

(±)-2-ブタノールで処理したB-PGLは、1対の面積比1:1のピークを7.60分および7.80分に与えた(図3(b))。一方(+)-2-ブタノールで処理した2-O-メチル-L-ラムノースの場合は、G.L.C.で7.80分に1本のピークを与えた(図3(c))。従って、図3(b)で7.60分のピークは2-O-メチル-β-D-ラムノースに、また7.80分のピークは2-O-メチル-α-L-ラムノースに対応する。そこで、(+)-2-ブタノールでB-PGLを処理してG.L.C.を行ったところ、ただ1本のピークを7.80分に認めた(図3(a))。従って、B-PGLの糖残基の絶対構造はDemarteaue-Girsbergらの報告⁷⁾のようにD型ではなく、L型であることが明らかになった。

3.3 本法の部分メチル化糖やその他の糖誘導体への適用性について

本実験ではL-PGLとB-PGLという、部分メチル化糖を構成成分にもつ糖脂質をそのままブタノリシスし、それぞれの構成糖を分画する事なく混合物のままで、わずか5mとい

うごく短いキャピラリーカラムを用いて分析を行ったが、それぞれの構成糖について二つのエピマーをほぼ完全に分離することができた。本実験の条件下(4℃/minの昇温)においては、 β 体と α 体のリテンションタイムの差はわずか0.2~0.3分と小さく、また一定温度での分析でもその差はあまり大きくならないが、両者は極めて明瞭に区別できる。従って、部分メチル化糖を構成部分にもつような多糖などの場合でも充分分析が行えるものと考えられる。また、部分メチル化糖以外に化合物1の全合成の過程で得られたいくつかのベンジルエーテルや、アリルエーテルについても分析を行ったが、いずれの場合も、良好な結果を得た。また、*M. Kansaii*の抗原物質の構成糖の1つであるN-アシルカンソサミン(4.6-ジ-デオキシ-4-[(R)-2-メトキシプロパンアミド]-3-C-メチル-2-O-メチル- α -マンノピラノシド)のような複雑な構造をもつ、分枝アミノ糖⁸⁾の場合でも本法で絶対構造の決定が可能であった。しかし、いずれの場合もリテンションタイムの差が小さいだけにクロマトグラムの再現性が良い事が必須で、特に、オープンの温度コントロールを精度良く行う事が不可欠である。本分析法は、 β 体又は α 体のどちらか一方の標準物質が必要であるという問題点はあるが、分析の為の操作がごく簡単であること、サンプル量がごく少量で済むこと(本実験では500 μ gのPGL-糖量として150~100 μ gを用いたが50 μ g程度のPGLでも充分分析可能)、混合物のままで分析できること、など極めて優

れた方法ということができる。

本稿の執筆にあたって、谷口智子氏に図表の製図、原稿の清書等を行っていただいた。深謝する。

参考文献

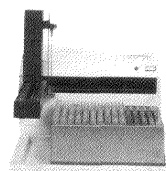
- 1) P. Husek and K. Macek, *J. Chromatogr.*, **113** (1975) 139.
- 2) G. J. Gerwig, J. P. Kamerling and J. F. G. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.*, **62** (1978) 349.
- 3) K. Leontein, B. Lindberg and J. Lonngren, *Carbohydr. Res.*, **62** (1978) 359.
- 4) T. Fujiwara, S. W. Hunter, N.-S. Cho, G. O. Aspinall and P. J. Brennan, *Infect. Immun.*, **43** (1984) 245.
- 5) T. Fujiwara, G. O. Aspinall, S. W. Hunter and P. J. Brennan, *Carbohydr. Res.*, **163** (1987) 41.
- 6) T. Fujiwara and S. Izumi, *Agric. Biol. Chem.*, **51** (1987) 1539.
- 7) H. Demarteau-Ginsberg and E. Lederrerr, *Biochem. Biophys. Acta*, **70** (1963) 442.
- 8) J. Yoshimura, A. Aqeel, K.-I. Sato and H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.*, **166** (1987) 253.

Topics

AS-1000形/AS-3000形 AS-4000形 日立インテリジェント オートサンプラ

現在の最先端の研究では、多検体をいかに早く、かつ高精度で測定できるかということが研究成果を左右するようになっていきます。また、化学・薬品メーカーなどでは、製品の品質が最も重要なポイントとなり、品質管理がますます重要になっていきます。これに対応するため、実験室の自動化(LA)が急速に発展してきており、システム化に対応した分析装置が求められえています。このような要望にお応えするため、日立がメカトロニクスを駆使してインテリジェントオートサンプラシリーズを開発しました。

AS-1000形は、シンプルな吸入動作だけを行うオートサンプラです。



AS-1000形 日立インテリジェント
オートサンプラ



AS-4000形 日立インテリジェント
オートサンプラ

AS-3000形は、分光光度計との組合せを、AS-4000形は液体クロマトグラフとの組合せを配慮して設計した製品で、試料の前処理などの溶液操作の自動化を実現します。

■主な特長

- (1) 液体試料の前処理ができます。
試料・試薬の分注、希釈、添加、混合などが可能で、前処理を含めた自動化ができます。
- (2) 微量びんからビーカー、フラスコまで容器を選びません。内蔵のコンピュ

ータが、ニードルをX,Y,Z3方向の三次元動作を正確にコントロールして、液体移送を行います。

(3) 高精度、低コンタミネーションを実現しました。ニードルや流路は1検体測定ごとに洗浄します。洗浄液量は試料や試薬の粘性、分析目的に応じて自由に設定することができます。

(4) 使いやすさを追求しました。単純な順次測定の場合はシーケンシャル機能、高度な前処理の自動化には、プログラム機能をそれぞれの目的に応じて使い分けることができます。

(5) システム化対応機能が豊富です。LA化時代を迎え、オートサンプラも大きなシステムに組み込まれることが多くなっています。システム化に対応し、RS-232C、PAN(日立LC用ネットワーク)、入出力端子などがあり、外部システムとの効果的な連携が可能です。

(6) フルフレキシブルプログラミングが可能です。コマンドコントロール方式のプログラミングですから、あらゆる動作を自由に組み合わせることができます。

解 説

U-6000形日立顕微分光光度計

HITACHI Model U-6000 Microscopic Fourier-Transform Spectrophotometer

松井 繁* 根本 勲* 笹田 勝弘*

(昭和63年10月12日受理)

1. はじめに

半導体分野やオプトエレクトロニクス分野等では、高集積度化や構造・加工の微細化に伴い、顕微鏡下で試料の微小領域におけるスペクトル（反射・透過・蛍光）測定が求められている。また生物・基礎医学分野では、細胞レベルで試料の吸収・蛍光スペクトルを測定したいという要求も高まっている。従来これらの測定は、実際の寸法より大きく作られたテストピースを用いたり、抽出・培養等によって試料を作成することにより、通常の分光光度計を用いて行われていた。しかし、製品レベルの試料の非破壊検査や、生物細胞をそのまま測定するためには、光学顕微鏡と分光光度計を結合させた顕微分光測定システムが必要となる。これらの要求に応えるため、日立では回折格子分光器に替わる、干渉計を採用した新しい原理（フーリエ分光方式）のU-6000形顕微分光光度計を開発した。このU-6000形顕微分光光度計には、主にオプトエレクトロニクス関連の材料の分光特性や液晶ギャップの測定等を行うための標準タイプと、主に蛍光スペクトル等の微弱光測定を目的とした高感度タイプの2つのバージョンがある。

2. 特徴

フーリエ分光方式はFT-IRとして赤外域では広く普及し、性能の良さを認識されているが、U-6000形顕微分光光度計は世界で初めて可視域顕微分光測定にフーリエ分光方式を採用した画期的な製品であり、次のような特徴を持つ。

(1) 光学顕微鏡により、試料上の測定したい領域を直接観察しながら位置出しすることができ、見ている所がそのまま測定できる。高感度タイプでは、100×の対物レンズを使用して最小3 μm までの微小領域で吸収・蛍光スペクトルの測定が可能である。

また、光学顕微鏡に2種類の光源を備えることにより反射と透過、または透過と蛍光の2種類の測定が、試料をセットしたままで切替可能であり、同一箇所両方のスペクトルが得られる。

(2) スキャン機構を必要としない新しい方式の干渉計と、高速演算プロセッサの採用により、最短4秒でスペクトル測定が可能である。

(3) T-5000形日立高速膜厚測定装置と同一原理の光学系を採用しているため、液晶ギャップ（2～18 μm ）や比較的厚い膜厚（1～20 μm ）を高い再現性で測定できる。そのため「膜厚・液晶ギャップ測定プログラム」も完備している。

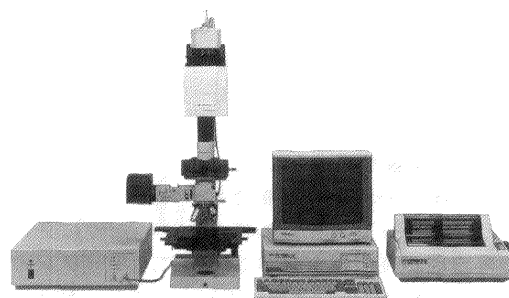


図1 U-6000形日立顕微分光光度計

(4) 測定光を約1,000倍に増倍できるイメージンテンシファイアを搭載した高感度タイプでは、従来測定が困難であった顕微鏡下での微弱な蛍光スペクトル測定が可能となった。また本装置では全波長域を同時にかつ高速で測定するため、褪色等により変化しやすい試料にも有利である。これにより、出導体分野では μm オーダーの微小異物の解析、生物・医学分野では細胞単位での蛍光スペクトル分析等への応用が考えられる。

(5) データ処理部に市販の16bitパーソナルコンピュータを採用した。CRTとの対話方式により操作性の向上を図るとともに、測定したデータが自由に活用できるようになった。ユーザ自身がBASIC言語で作成したプログラムで処理できるほか、市販のソフトウェアも利用可能で、U-6000形の表示画面を切り取ってワープロ文書中にはめ込み、レポートを作成することもできる。

3. 装置の構成及び原理

3.1 構成

図2に本装置のブロック図を示す。本装置は光学顕微鏡の上部に配置した新開発の干渉計と、干渉計の制御・データ収集を行うコントロールユニット、及び操作・表示を行うデータステーションから成る。この干渉計は従来FT-IRで用いられているマイケルソン干渉計のようなミラー駆動機構を一切必要とせず、干渉光信号（インターフェログラム）を空間的に形成させ、イメージセンサでその全信号を一度に取り込む新しい方式によるもので、振動の影響を受けにくく、小型化、高速化、高再現性を同時に達成している。U-6000形には検知器の違いから、1,024bitフォトダイオードアレイを用いた標準タイプと、イメージンテンシファイア付きの1,024bitフォトダイオードアレイを搭載した高感度タイプがある。半導体や工業材料等の反射・透過スペクトルの測定のように十分な光量がある場合の測定には標準タイプが適するが、暗い試料や強い光の当てられない試

* 株式会社 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

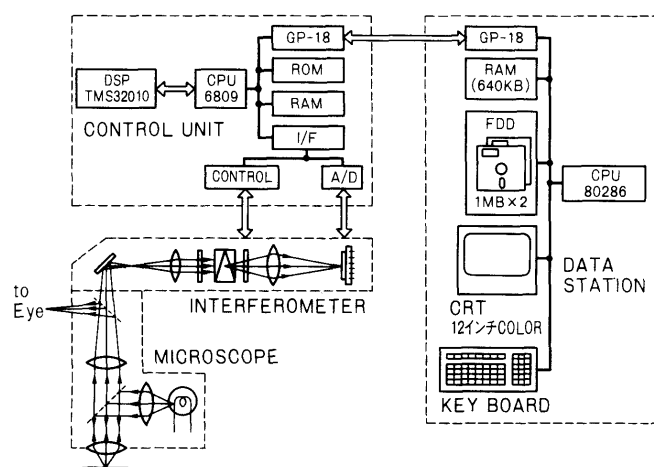


図2 装置の構成

料及び蛍光測定等、微弱光の測定は高感度タイプにより可能となる。コントロールユニットには、1回の乗算をわずか200nsで実行できる高速演算プロセッサを内蔵し、インターフェログラム信号からスペクトルを得るためのフーリエ変換を高速で処理する。汎用の16bitパソコンを用いたデータ処理部は、1MBのFDD2基を備え、対話形式の操作や見やすいカラーCRT表示の採用により、優れた操作性を示す。また測定したスペクトルデータはフロッピーに落とすことができ、ユーザ自身がパソコン上で自由に処理することができる。

3.2 原理

3.2.1 干渉計によるスペクトル測定（フーリエ分光法）の原理

干渉計に波長 λ の単色光を入射すると図3に示すようにインターフェログラムとして一定のピッチのcos波形を生じる。このcos波形の周波数は波長 λ に反比例する。すなわち波長の短い青い光による波形は、波長の長い赤い光による波形よりも密なcos波形となる。実際に測定する光は一般に複数の波長、あるいはある範囲の波長を連続的に含む光なので、そのときのインターフェログラムは種々の周波数のcos波形の重ね合わせとなる。この信号から各波長におけるスペクトル強度を求めるためには、混在している各周波数のcos波形を分離してやる必要がある。複数の周波数成分を含む信号から個々の周波数成分を分離して各々の強度分布を調べる計算処理をフーリエ変換と呼び、干渉計の出力信号であるインターフェログラムをフーリエ変換することによりスペクトルが得られる。本装置で採用した方式

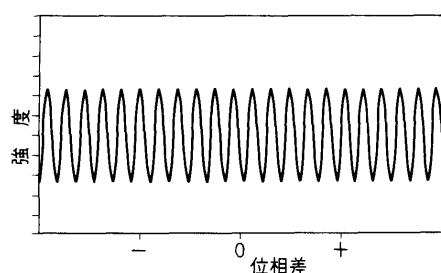


図3 単色光によるインターフェログラム

の特徴として次の点があげられる。

- (1) 入射・出射スリットが不要で光の利用効率が高い。
- (2) メカ的なスキャン機構が不要で小型化が容易な上、振動に強く、耐久性が高い。
- (3) 全波長域を同時に、しかも短時間で測定できるため、変化の早い試料でも正しいスペクトルが測定できる。

3.2.2 イメージインテンシファイアの構造と原理

図4に示すように、イメージインテンシファイアは光電面、マイクロチャンネルプレート、そして蛍光面から構成されている。インターフェログラム信号は、明暗の干渉縞として光電面上に結像されて、光の強弱の二次元像が光電子の放出の多い少ないの強度の像に変換され、二次元の像のままマイクロチャンネルプレートで増倍される。マイクロチャンネルプレートで増倍された像は蛍光面で再び光の強弱の像に変換され、後ろにオプティカルファイバで結合したシリコンフォトダイオードアレイで検知される。マイクロチャンネルプレートは図5のように、基板にチャンネルと呼ばれる穴が蜂の巣状に多数並んでおり、この一つ一つが下図に示すように、1本の光電子増倍管のような働きをする。すなわちマイクロチャンネルプレートの両端面の間には高電圧がかけられており、入射した電子が壁との衝突を繰り返すうちに増倍されるものである。このチャンネルが多数集まることによって、昆虫の複眼のように像としての二次元の強度分布を保ったまま増倍を行うことができる。光電面から蛍光面の間での光量の増倍率は約1,000倍に上り、従来シリ

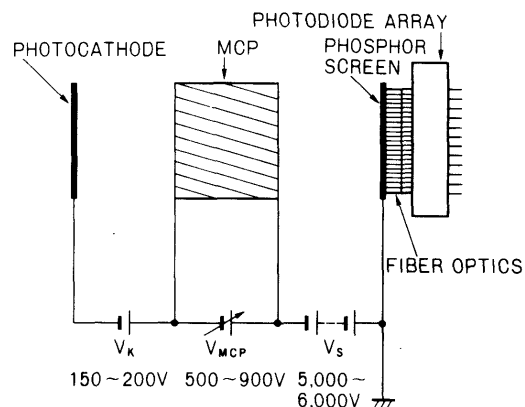


図4 イメージインテンシファイアの構成

(a) MCPの模式図

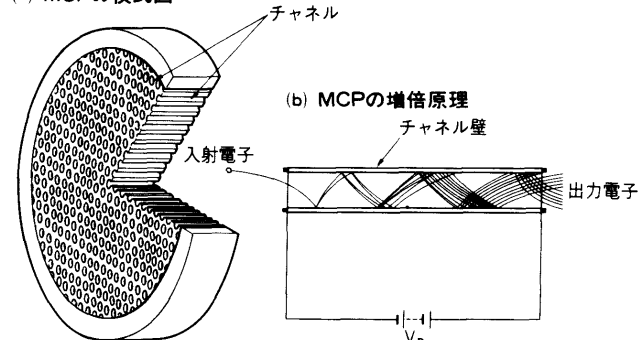


図5 マイクロチャンネルプレートの構造と原理

コンフォトダイオードアレイだけでは検出できなかった微弱光の測定や、回折格子のメカニカルなスキャンとフォトマルの組み合わせでは達成できなかった短時間での測定を実現することができる。

4. 測定例

(1) 液晶ギャップの測定

ポータブルワードプロセッサやラップトップパソコンなどの表示部にはSTN（スーパーツイストネマティック）方式の液晶が広く用いられているが、液晶を封入するギャップの厚さのわずかな変動が色ムラとなって現れるため、製造においては $0.01\mu\text{m}$ オーダーでのギャップ厚さ管理が求められている。ところで、液晶ディスプレイで表示の1ドットに相当する部分は $200\sim 500\mu\text{m}$ 平方程度の微小面積で、その部分の断面図は図6のようになっている。このような微小部分の液晶封入層のギャップを測定するためには、顕微鏡下で測定することが不可欠である。本装置に膜厚・液晶ギャップ測定プログラムを組み合わせることにより、図7に示したような測定・結果の印字ができる。この例のように、本装置では液晶を封入した状態において、液晶ギャップを $0.02\mu\text{m}$ 以下の再現性で測定できる。従来は液晶封入後の測定は困難とされており、空気層での測定しか行われていなかったが、本装置の特長であるフーリエ分光法を用いると、検知器の出力信号から直接厚みを計測することができるため、

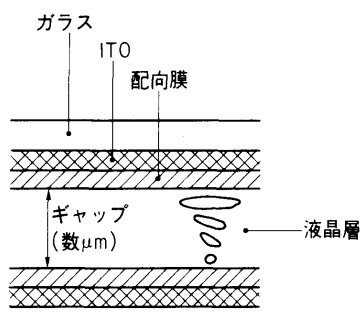


図6 液晶セルの構造

***** RESULTS *****

1. $6.28\mu\text{m}$ 2. $6.28\mu\text{m}$ 3. $6.29\mu\text{m}$ 4. $6.28\mu\text{m}$ 5. $6.29\mu\text{m}$
 6. $6.28\mu\text{m}$ 7. $6.30\mu\text{m}$ 8. $6.28\mu\text{m}$ 9. $6.29\mu\text{m}$ 10. $6.28\mu\text{m}$
 mean= $6.29\mu\text{m}$ 3 sigma= $0.02\mu\text{m}$ (max.= $6.30\mu\text{m}$, min.= $6.28\mu\text{m}$)

図7 液晶ギャップ測定例

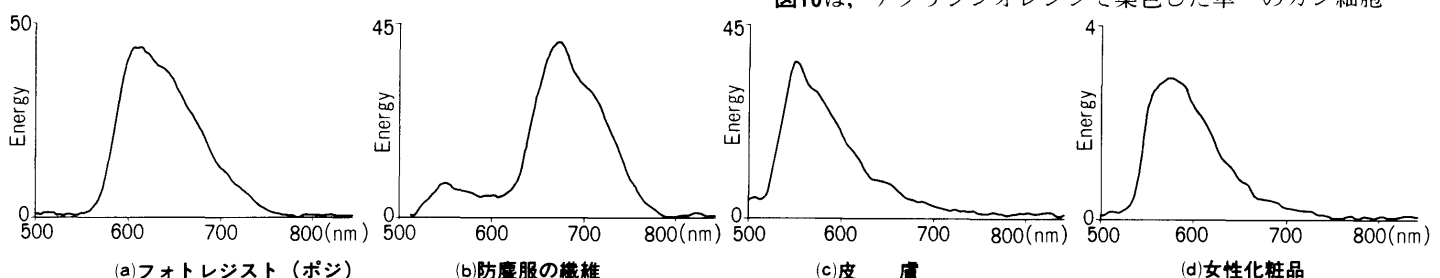


図8 有機異物の蛍光スペクトル（B励起）

回折格子を用いた従来のスペクトル解析法のようなピーク検知やスペクトル補正が不要で、液晶封入後でも高精度の測定ができる。

(2) 微小な有機異物の蛍光分析

クリーンルームで生産される半導体等においては、異物の付着が製品の性能に重大な影響を与えるため、異物を同定し、その発生原因をつきとめることが品質管理上、重要な課題となっている。元素分析によれば無機質な異物の同定は可能であるが、有機異物の場合には決め手が得られない。有機異物の同定で最も強力な手段は赤外スペクトル分析であるが、FT-IR顕微鏡ではスポット径が数十マイクロメートルと大きいため、ミクロンオーダーの微小異物の分析は困難であった。有機異物の同定で次に有効な手段は蛍光スペクトル分析であるが、顕微鏡下での蛍光発光はたいへん微弱なため、これまでは有効な測定手段がないと思われていた。しかし、超高感度検知器を採用したU-6000形高感度タイプに超高圧Hg灯励起光源を用いた蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、異物からの微弱蛍光を測定できるようになった。クリーンルーム内での発生が考えられる種々の有機異物につき、測定した蛍光スペクトルを図8に示す。FT-IR顕微鏡による反射スペクトル測定では、異物がスポット径以下の場合、下地からの反射光が強く影響するためスポット径以上の異物でなければ測定が困難であるが、蛍光測定の場合は下地となるSi, Al, Cr等は蛍光を発生しない。従って図9のように真暗な下地の上で異物のみが蛍光を発して明るく光っており、異物がスポット径（最小 $3\mu\text{m}\phi$ ）より小さい場合でも異物からの蛍光のみが測定できる。本測定方法では、半導体ウェーハ上等についた異物を前処理や真空を全く必要とせず、直接ウェーハを蛍光顕微鏡で観察し、そのまま測定することができる。

(3) 単一細胞の蛍光スペクトル測定

顕微鏡下の測定を必ず要求されるのが生体試料の細胞レベルでの分光測定である。特に蛍光試薬の発達に伴い、蛍光スペクトル法は今後急速に研究が進むと言われている。しかし、このような蛍光測定の中には強い励起光により短時間に褪色するものも多く、回折格子を走査する顕微分光装置では波長走査中に蛍光強度が変化し、スペクトルに歪が生じる。本装置ではイメージセンサで全信号を同時に測定するスキャンレスのフーリエ分光法を採用しているため、全波長域の情報が同時に取り込まれ、スペクトルの歪は極小にできる。また1回の測光（インターフェログラムの取り込み）の後、スペクトルを表示するまでに要する時間（フーリエ変換実行時間）はわずか2秒である。

図10は、アクリジンオレンジで染色した単一のガン細胞

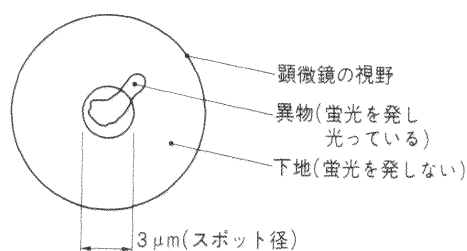


図9 異物の蛍光測定

の蛍光スペクトルである。アクリジンオレンジは結合する相手（DNAとRNA・単鎖化したDNA）により顕著に蛍光波長が異なるため、これらの染め分けが可能で広く用いられている蛍光試薬である。このように、本装置では細胞1個1個を顕微鏡で観察しながらその蛍光スペクトルを最小3μmのスポット径で測定することができる。

（試料御提供：福井医科大学 三好先生）

5. おわりに

顕微分光光度計は従来からその必要性が叫ばれていながら、なかなかユーザーのニーズを満たす製品化がなされなかったものの一つである。U-6000形は新しいフーリエ分光

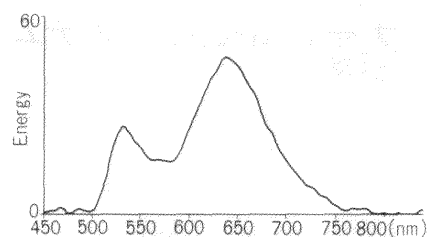
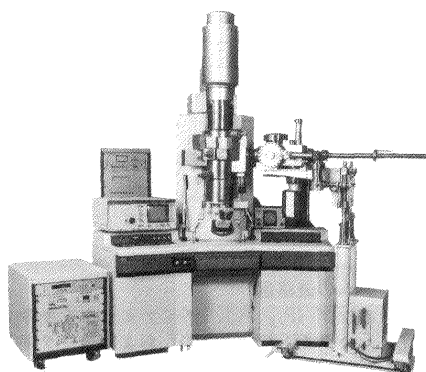


図10 アクリジンオレンジで染色したガン細胞の蛍光スペクトル(V励起)

方式の採用により、これらのニーズに応えるべく開発した顕微分光光度計であり、多方面の研究者たちの基本的な道具としての汎用性と、エレクトロニクス分野を始めとした生産現場で使われる専用機としての高いスループットを同時に備えたものである。今後、微小領域における分光測定のニーズはますます高まってゆくものと考えられるが、例えば「膜厚・液晶ギャップ測定プログラム」の増設により液晶ギャップ測定装置となるように、U-6000形は拡張性に優れており、各々の分野でのニーズに応じてゆくことが期待される。

Topics

H-9000形日立超高真空(UHV)電子顕微鏡



新素材分野において、コンタミネーションフリーの状態での表面情報を得る要望が急速に増えています。この表面科学の研究分野では、試料の表面を清浄に保つため、その表面を取りまく雰囲気をも 10^{-8} Paオーダの真空度にしておく必要があります。また、試料を必要に応じた処理後、酸化させることなく電子顕微鏡試料室に装着する機能を持つ試料前処理室が必要です。H-9000形日立超高真空電子顕微鏡はこれらを満足し、試料室の真空度は 10^{-8} Paオーダを可能にしました。

主な仕様

No.	項目	仕様
1	分解能	0.2nm(点間隔)
2	加速電圧	100, 150, 200, 250, 300kV
3	倍率	$\times 5,000 \sim \times 1,500,000$
4	試料ステージ	2軸傾斜 $\pm 10^\circ$ トランスファカートリッジ方式 試料前処理室付き
5	真空系	電子銃：イオンポンプ60ℓ/s 鏡体部：TMP(磁気浮上形) タンデム方式420ℓ/s イオンポンプ 20ℓ/s $\times 3$ -200℃焼出し可能 試料処理室：TMP 50ℓ/s ノールポンプ60ℓ/s
6	到達真空度	電子銃： $< 4 \times 10^{-5}$ Pa 試料室： $\sim 10^{-8}$ Paオーダ

日本臨床検査自動化学会 第20回記念大会開催 さる（第2報）



日本臨床検査自動化学会が、去る9月9日、10日の両日（展示会は8日から10日の3日間）神戸国際会議場及び国際展示場（神戸ポートアイランド）で開催された。

展示会には約3,800人の入場者があり盛況を極めた。当社からは、8700形血液ガス・電解質分析装置、HILAS-

300シリーズ臨床検査システム、Z-9000形多元素同時分析原子吸光光度計、自動血清分取装置（学術参考出品）などの新製品の展示を行い注目を集めた。

（高畑藤也 記）

第49回応用物理学会 学術講演会開催さる



1988年度秋季応用物理学会は、富山大学において、10月4日～7日の4日間にわたって開催された。講演は、放射線・プラズマ、計測・制御、光、量子エレクトロニクス、光エレクトロニクス、薄膜・表面、ビーム応用、応用物理、超伝導、有機、バイオエレクトロニクス、半導体、結晶工学、非晶質、応用物一般の14分科と多岐に分かれ、さらに、超伝導、高機能有機材料などの新分野を含む10件のシンポジウムが加わり、成功裡に終わった。

論文数は、3,075件で秋季応用物理学会としては、史上最大規模となった。相変わらず半導体関連の発表が多く、約80%を占めた。

参加者は、延べ人員で6,000人を優に超えた。（田村一二三 記）

バイオイナートHPLCシステム

横倉 武文* 山田 宜昭** 滝内裕美** 大沼 定文** 野上 太郎** 高田 芳矩**

(昭和63年10月12日受理)

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が分離・定量および精製的手段に利用されている分野の中には、送液部やカラムの耐薬品性を高め、金属イオンの溶出が極力低減される装置の開発を望むユーザーが数多くいる。このうち、(1) 流路系からの微量な金属イオンの溶出が分離・定量の妨げになるイオンクロマトグラフィー、(2) 金属イオンにより生理活性の失活が懸念される生体高分子を取り扱うクロマトグラフィー (ゲル透過、イオン交換、アフィニティ、疎水性クロマトグラフィー)、(3) 溶離液にトリフルオロ酢酸等の強酸を用いるペプチド・タンパク質の逆相クロマトグラフィー。等で、この傾向が特に顕著に見られる。

HPLCは一般に高速分離を目的にしているため、流路系は高圧 (～数百kgf/cm²) になり、送液部およびカラムの材質は主としてステンレス鋼 (SUS316) が使用されている。従って、溶離液には流路系の材質に問題を発生させない溶液を用いるが、分析条件によっては塩素イオンを含む溶離液や酸性 (pH2以下) の溶離液を使用しなければならないこともある。こういう場合には、腐食により金属イオンが溶出し、分離・定量の妨害やカラムの汚染、再現性の低下、寿命の低下等が起り、装置の維持管理および分析の精度管理に問題を生ずることがある。これらの欠点を解決するために、接液部の材質としてアルミナセラミックス、フッ素樹脂を使用した送液ポンプを開発した。またカラムはガラス (バイレックス)、フッ素樹脂を使用し、日立ゲル#3161-C18 (逆相分配) を充てんしたカラムを開発し、特にペプチドやタンパク質の分析に適したシステムを構築したので、その応用例とともに紹介する。

2. 装置の概要

システムを構成したときの外観の一例を図1に示す。また高圧グラジエントシステムの流路図を図2に示す。L-6210形インテリジェントイナートポンプおよびL-6010形イナートポンプ (以下それぞれL-6210形、L-6010形と略す) はL-6000シリーズのポンプ機構部を継承し、高い流量精度・安定性を持っている。接液部にはアルミナセラミックス、フッ素樹脂、特殊フッ素樹脂、ルビーおよびサファイアを使用しており耐食性に優れている (図3)。またペプチドやタンパク質の分析には、高濃度の塩を含む緩衝液を使用する場合が多く、結晶の析出によるポンプシールやプランジャの劣化が予想される。この結晶の析出を防止するために、L-6210/L-6010形はシール洗浄機構を標準装備している (図

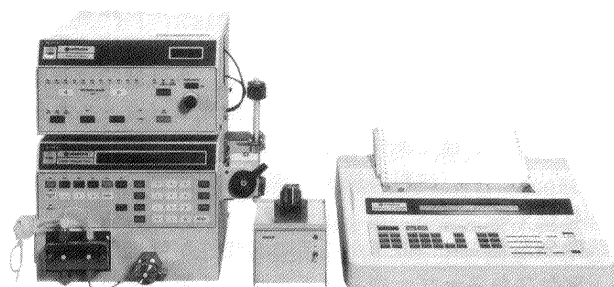


図1 低圧グラジエントシステムの外観

低圧グラジエントシステムは、L-6210形インテリジェントイナートポンプ (左下) を中心として構成される。低圧グラジエント用バルブは、L-6210形の左側に、インジェクタ、ガラスカラムは右側にそれぞれホルダを介して取り付けられている。L-4000形UV検出器がL-6210形の上に置かれ、L-6210形の右側にダイナミックミキサ、D-2500形クロマトデータ処理装置が配置されている。このシステムにより、3液までのグラジエント分析を行うことができる。

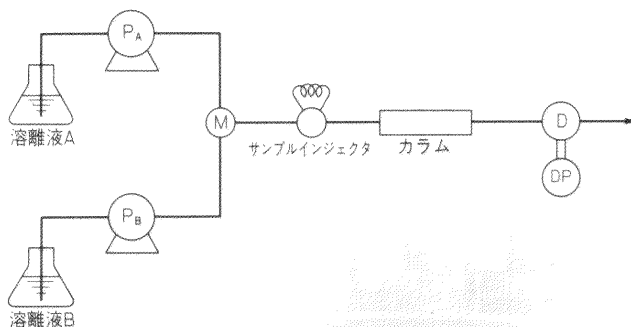


図2 高圧グラジエントシステムの流路図

システムは2台の高圧送液ポンプ (P_A, P_B)、ダイナミックミキサ (M)、サンプルインジェクタ、カラム、検出器 (D) およびデータ処理装置 (DP) から構成される。溶離液A、Bの混合比はP_A, P_Bの流量の比を変化させることにより決定される。2つの溶離液は高圧下でダイナミックミキサにより混合され、試料注入を行うサンプルインジェクタを介してカラムへ送られる。カラムにより分離された試料は、成分の特性により各種検出器により検知され、この検出器からの出力信号によりデータ処理装置でクロマトグラムを得る。

4)。サンプルインジェクタも接液部はアルミナセラミックス、フッ素樹脂、特殊樹脂を使用して保守管理が容易な構造となっている。溶離液の混合部や配管もすべてフッ素樹脂を使用している。混合は低容量で混合効率を向上させるためダイナミックミキサを標準とした。このミキサは低圧グラジエント時にも使用でき、ベースラインの安定化に寄与している。分離用カラムは、シリカボロン系ファインセラミックスを母体とし、オクタデシル基 (-C₁₈H₃₇) を化学結

* 日立計測エンジニアリング株式会社 第二設計部
** 株式会社 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

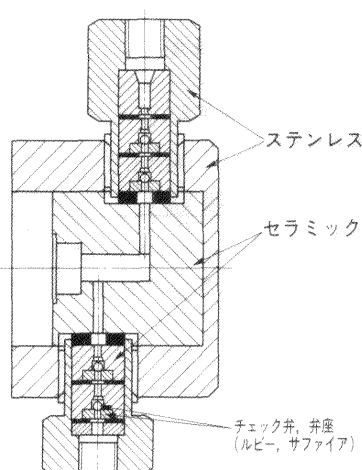


図3 ポンプヘッドの断面図

ポンプヘッドの流路形状は既存のL-6000形ポンプのものを継承し、接液部の金属部品をセラミックスに置き換え、セラミックスピースをステンレス製のホルダでおさえる構造となっている。ルビー、サファイア製であるブランジャ、チェック弁や樹脂製であるパッキン等はL-6000形のものと同じである。

合した充てん剤（粒径 $10\mu\text{m}$ 、破碎状）を内径4mm、長さ150mmのパイレックス製ガラスカラムに充てんしたものである（図5）。この母体は、ケイ酸、ホウ酸、アルミナ、アルカリ金属等を含むガラスが熱処理（数百 $^{\circ}\text{C}$ ）により酸に可溶な部分と不溶な部分とに分相する性質を利用して製造され、極めて均一な細孔分布を持っている。また、シリカ系充てん剤より機械的強度があり、孔径が50nmと大きいにもかかわらず耐圧性に優れている。

3. 接液部の特性

アルミナセラミックスはサファイアと同じ結晶（コランダム； $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ）の焼結体であり、ダイヤモンド、炭化ホウ素、炭化ケイ素に次ぐ硬さ（新モース12）を持ち耐摩耗性に優れている。また、コランダム結晶であるので化学的、物理的に非常に安定であり、酸化、風化、溶解等のおそれがなく、化学薬品に対し安定で、溶離液としてはフッ化水素

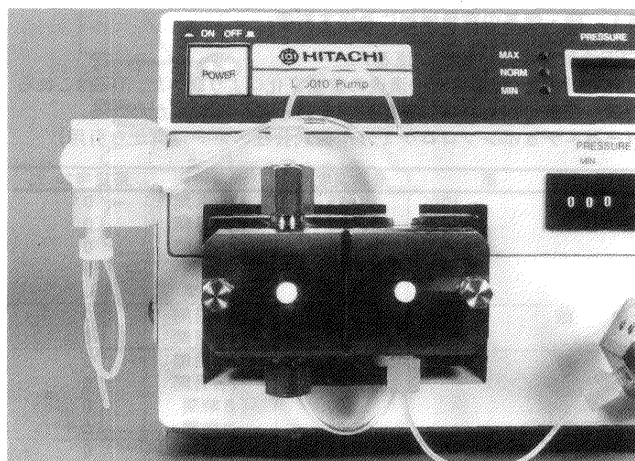


図4 ポンプシール洗浄機構

ポンプで塩溶液を送液する場合、ブランジャ上にわずかに残る溶離液が乾燥し、結晶が析出することがある。この結晶によりポンプシール等が異常に摩耗することを防ぐため、L-6210/L-6010形はポンプシール洗浄機構を装備している。ポンプヘッド左側のディバイダから水を注射筒により注入すると、水はポンプシール裏側を通り下方のドレインチューブから排出される。この機構は結晶の析出を防止するとともに、シール漏れを生じた際、ドレインチューブからの液漏れが生ずるためシールの寿命管理が容易であることが特長である。

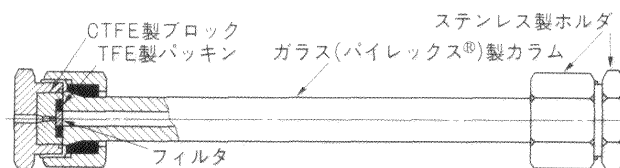


図5 ガラスカラムの断面図

ガラスカラムも図3のポンプヘッドと同様に、非金属製の接液部部品をステンレスのホルダでおさえる構造となっている。接液部の材質はガラス（パイレックス®）のほかにTFE、CTFEを用いている。

酸等の特殊な溶媒を除き使用可能である（図6）。

フッ素樹脂としては、テトラフルオロエチレン樹脂（TFE）、テトラフルオロエチレン・パーフルオロエチレン

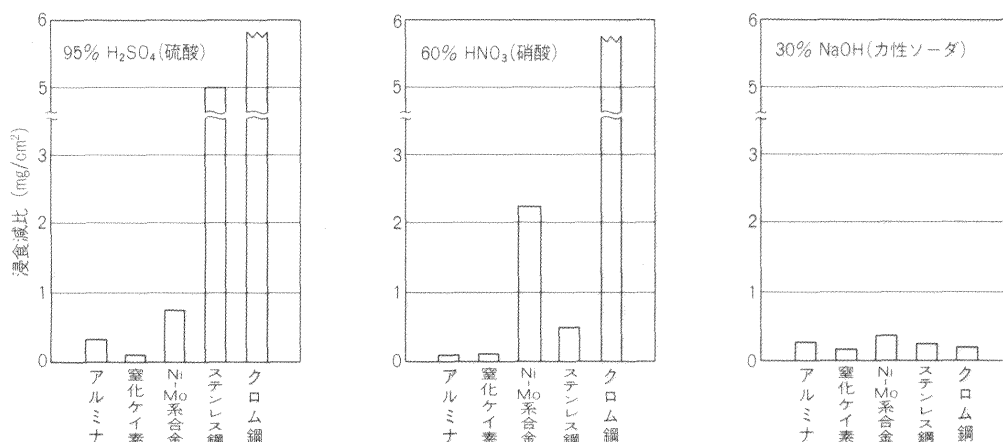


図6 アルミナセラミックスの耐薬品性

アルミナセラミックス（イナートポンプ使用材料）、窒化ケイ素セラミックス、Ni-Mo系合金、ステンレス鋼およびクロム鋼の耐薬品性を硫酸、硝酸、碱性ソーダ中で30分間煮沸し、重量減少を調べることによって比較した結果である。アルミナセラミックスがステンレスに比べ高い耐薬品性を持っていることがわかる。（京セラ株式会社のカタログから引用）

表1 酸・塩基の重量増加に及ぼす影響

TFEの耐薬品性 (耐酸、塩基)

TFEの耐酸、塩基性を浸漬後の重量変化により調べた。TFEはこれらの酸、塩基に対し非常に高い耐性を持っていることがわかる。
(三井・デュポンフロケミカル株式会社のカatalogから引用)

試薬	濃度	暴露温度℃	浸漬時間	重量増加 %
塩酸	10%	25	12ヵ月間	0
		50	12ヵ月間	0
		70	12ヵ月間	0
	20%	100	8時間	0
		200	8時間	0
硝酸	10%	25	12ヵ月間	0
		70	12ヵ月間	0.1
硫酸	30%	25	12ヵ月間	0
		70	12ヵ月間	0
		100	8時間	0
		200	8時間	0.1
水酸化ナトリウム	10%	25	12ヵ月間	0
		70	12ヵ月間	0.1
	50%	100	8時間	0
		200	8時間	0
水酸化アンモニウム	10%	25	12ヵ月間	0
		70	12ヵ月間	0.1

注：●リストした化合物の沸点で、多くの実験室の評価が行われた。これは「テフロン」のその雰囲気における最高使用温度ということではない。
「テフロン」はずっと高い温度で使用可能である。
●これらは、実質的に平衡に達したときの試験値である。更に暴露時間を伸ばしても、値が著しく増加することはないであろう。
●0.2%以内の重量変化は、実験的に意味があるとは考えられない。

表3 「テフロン」 160 (FEP), 「テフロン」 350 (PFA) の代表的薬液の吸収性¹⁾

PFAの耐薬品性

PFAの耐薬品性を浸漬後の重量変化により調べた。PFAはTFEと同様 (表1, 表2参照) 酸、塩基に対しては高い耐性を持っているが、四塩化炭素等の溶剤に対しては、若干の重量増加が見られる。
(三井・デュポンフロケミカル株式会社のカatalogから引用)

溶剤(各々の沸点で168時間暴露) ²⁾			酸(168時間暴露)		
溶剤	温度℃	重量増加の範囲 %	溶剤	温度℃	重量増加の範囲 %
ア ニ リ ン	185	0.3~0.4	臭 素 (無水)	22	0.53)
ア セ ト フ ェ ノ ン	201	0.6~0.8	塩 素 (無水)	120	0.5~0.6
ベン ズ アル デ ヒ ド	179	0.4~0.5	ク ロ ル ス ル ホ ン 酸	150	0.7~0.8
ベン ジ ン アル コ ー ル	204	0.3~0.4	ク ロ ム 酸 50%	120	0.00~0.01
n - ブ チ ル ア ミ ン	78	0.3~0.4	塩 化 鉄 (III) 25%	100	0.00~0.01
四 塩 化 炭 素	78	2.3~2.4	塩 酸 37%	120	0.00~0.03
ジメチルスルホキシド	190	0.1~0.2	濃 リ ン 酸	100	0.00~0.01
フ レ オ ン ® 113	47	1.23)	塩 化 亜 鉛	100	0.00~0.03
i - オ ク タ ン	99	0.7~0.8			
ニ ト ロ ベ ン ゼ ン	210	0.7~0.9			
パークロロエチレン	121	2.0~2.3			
塩 化 ス ル フ ェ ン	68	1.7~2.7			
ト ル エ ン	110	0.7~0.8			
リン 酸 ト ル ブ チ ル	200 ⁴⁾	1.8~2.0			

注：1) これらの試験で、FEP樹脂とPFA樹脂との間に顕著な差はなかった。
2) これらは実質的に平衡値である。更に暴露時間を伸ばしても、値が著しく増加することはないであろう。
3) PFA樹脂のデータのみ
4) 沸騰せず。
5) 値は試験の平均値を示し、規格を目的とするものではない。

共重合樹脂 (PFA), クロロトリフルオロエチレン樹脂 (CTFE) およびテトラフルオロエチレン・エチレン共重合樹脂 (ETFE) を使用している。TFEとPFAは極めて強力な酸化性および環元性物質 (たとえば、Na元素, F₂, 三フッ化塩素等) 以外の薬品には化学的に浸されない。また物理的な溶媒の吸収性はゴム、フッ素樹脂以外のプラスチック等に比べ極めて低く、優れている。特に酸・アルカリを含めた無機塩水溶液の吸収性は極めて低い。またベンゼン等の芳香族炭化水素およびケトン類は約1% (室温, 1年間) 程度しか吸収されないが、ハロゲン化炭化水素はフッ

表2 溶剤の重量増加に及ぼす影響

TFEの耐薬品性 (耐溶剤性)

TFEの耐溶剤性を浸漬後の重量変化により調べた。TFEは四塩化炭素等で若干の重量増加が見られる。
(三井・デュポンフロケミカル株式会社のカatalogから引用)

溶剤	暴露温度℃	浸漬時間	重量増加 %
アセトン	25	12ヵ月間	0.3
	50	12ヵ月間	0.4
	70	2週間	0
ベンゼン	78	96時間	0.5
	100	8時間	0.6
	200	8時間	1.0
四塩化炭素	25	12ヵ月間	0.6
	50	12ヵ月間	1.6
	70	2週間	1.9
	100	8時間	2.5
	200	8時間	3.7
エチルアルコール(95%)	25	12ヵ月間	0
	50	12ヵ月間	0
	70	2週間	0
	100	8時間	0.1
	200	8時間	0.3
酢酸エチル	25	12ヵ月間	0.5
	50	12ヵ月間	0.7
	70	2週間	0.7
トルエン	20	12ヵ月間	0.3
	50	12ヵ月間	0.6
	70	2週間	0.6

注：●値は試験の平均値を示し、規格を目的とするものではない。
●試薬の沸点以上における試験は、密閉した容器内で行われたので、圧力はその温度の蒸気圧におけるものである。

素樹脂との親和性が高い (化学構造的な類似性に起因) ため、若干吸収性が高い (表1~表3)。CTFEはTFEより有機溶媒の吸収性は若干高い。特にテトラヒドロフランは親和性が強く、他の有機溶媒より良く吸収されるので注意が必要である。

特殊フッ素樹脂は芳香族ポリイミド樹脂であり、耐摩耗性に優れ無潤滑でも極めて摩耗が少なく、シール材として最適である。耐薬品性も優れているが、アンモニア、一級・二級アミン、ヒドラジン等の強アルカリおよびpH10以上の水溶液には除々に浸される。

以上流路系に使用している材質の耐薬品性について述べたが、接液部材質の特性から使用する溶離液は、水溶液の場合はpH 1~10が望ましい。添加する有機溶媒は、通常よく使用されるメタノール、アセトニトリルおよびケトン類は水と混和すれば特に制限はない。また非水系で測定を行わなければならない場合は、樹脂への溶媒の吸収は少なからず起こるので、表2、表3等を参照し、重量増加パーセントのより低い溶媒の代替使用の検討、あるいはシステムの変更等を行う必要がある。

4. 測定例

まず、L-6010形ポンプ、L-4000形検出器、#3161-C18を用いて、多環芳香族3成分(ナフタレン、アントラセン、クリセン)

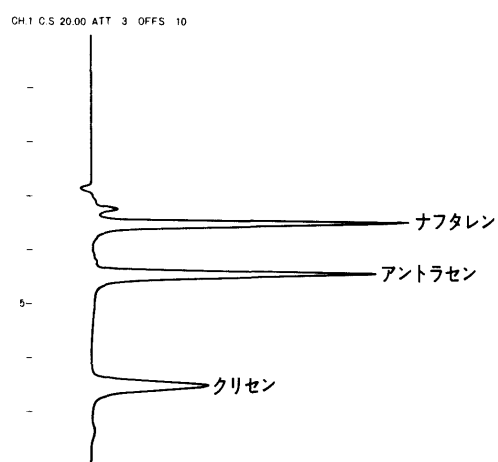


図7 多環芳香族のクロマトグラム

日立ゲル#3161-C18を充填したガラスカラム(4 mmφ×150 mm)で芳香族標準サンプルを分析した。溶離液は70%アセトニトリル、流量は0.5 ml/minである。芳香族炭化水素をメタノールに溶解し、10 μlを注入した。試料中にはナフタレン80 ng、アントラセン2.4 ng、クリセン3 ngを含んでいる。検出は254 nm (フルスケール0.02 AU)で行った。保持時間3分付近のマイナスピークは注入によるショック、3分強のピークおよび7分付近のピークは不純物または分解物と思われる。クリセンのピークで理論段数を算出するとN=6,500段である。

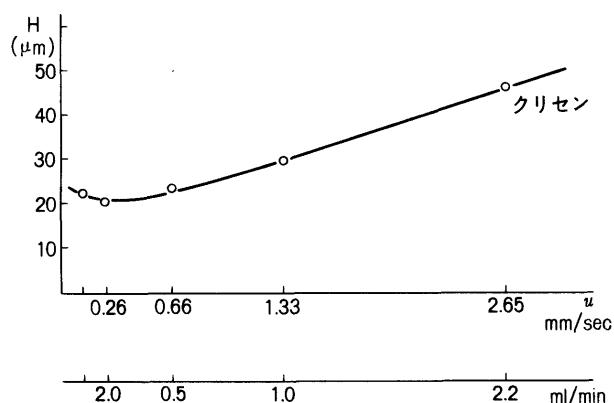


図8 線速度 (u) と理論段高さ (H) の関係

日立ゲル#3161-C18を充填したガラスカラム(4 mmφ×150 mm)で芳香族標準サンプルを分析し、クリセンのピークについて線速度 (u) と理論段高さ (H) との関係を調べた。流速を変化させたことを除き条件は図7と同じである。理論段高さHは線速度0.26 mm/s (内径4 mmのカラムでは流速0.2 ml/min) 前後で最小(カラムの理論段数は最大)となる。このときの理論段高さはH=20 μm、150 mmのカラムでの理論段数はN=7,500段となる。

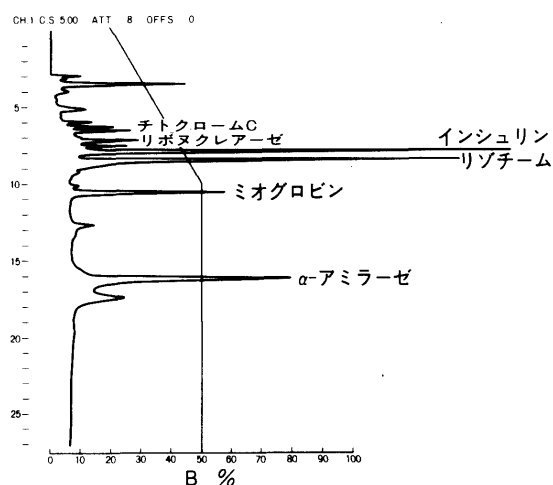


図9 市販タンパク質の分析(1)

日立ゲル#3161-C18を充填したガラスカラムを用いたイナートシステムにより、市販タンパク質混合物の分離を行った。溶出は0.1% TFAを含む水とアセトニトリルのグラジエントで行い、流量は0.5 ml/minとした。検出は215 nmの吸光度変化で行った。フルスケールは0.64 AUである。試料は市販タンパク質チトクロームC 0.2 mg、リボヌクレアーゼ 0.2 mg、インシュリン 0.1 mg、リゾチム 0.2 mg、ミオグロビン 0.4 mg、α-アミラーゼ 0.4 mgを1 mlの0.1% TFA水溶液に溶解したもので、10 μlをカラムに注入した。

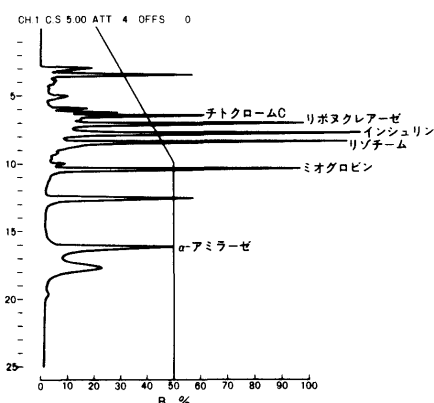


図10 市販タンパク質の分析(2)

検出を280 nm、フルスケール0.04 AUで行ったことを除いて、図9と同じ分析を行った結果である。

の測定を行ったがその例を図7に示す。また図8には理論段高さ (H) と流量の関係を示したが、これからこのカラムは比較的高性能の得られることがわかる。すなわち、#3161-C18は母体が破碎状の10 μmの樹脂であるが、 $H_{min} \approx 2dp$ (dp: 粒径) であり、その粒径から考えても比較的良好な分離が得られているといえる。この良好な性能は母体の細孔径が均一であること、およびガラス製カラムを用いているので、その管内壁が均質であること等に起因していると考えられる。

次に、L-6210/L-6010形ポンプを用いた高圧グラジエントシステム(図2)を市販タンパク質の分離に応用した。検出は215 nmと280 nmの二波長で行った(図9、図10)。インシュリンを除いて各タンパク質はそれぞれ分子量の小さい順に溶出している。215 nmでの検出法は、トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルのグラジエント溶出においてバックグラウンドの吸光度変化が210 nmに比べかなり少なくなる

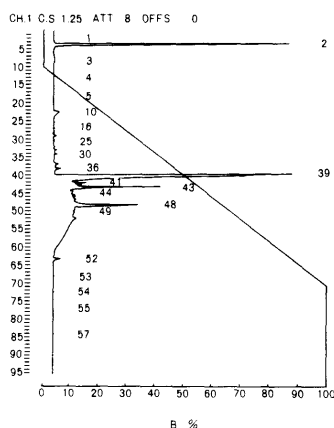


図11 管理血清の分析

日立ゲル#3161-C18を充てんしたガラスカラム(4mmφ×150mm)を用いて管理血清を分析した。溶出は0.1%TFAを含む水とアセトニトリルのグラジエントで行い、流量は0.5ml/minである。0.45μmのフィルタで濾過した管理血清10μlを注入し、検出は280nmで行った。

こと、およびペプチド結合に基づく吸収を検出するため、アミノ酸組成の影響を受けにくいことから、低分子量のタンパク質、ペプチドの分析によく利用される。また280nmでの検出法はベースラインは215nmのときと比べ安定し、より高感度で測定できる。主に構成アミノ酸のトリプトファンとチロシンに基づく吸収を検出しているため、アミノ酸組成の影響を受けやすい。したがって、分子量の大きなタンパク質の分析にはむしろ適しているといえる。

図11、12に上記と同じシステムでグラジエント条件等を変えて、管理血清および大腸菌細胞質分画を分析した例を示す。生体液には低極性から高極性の物質、また低分子量から高分子量の物質等、幅広く物性値の異なる物質が混在している可能性があり、グラジエント溶出条件によっては、

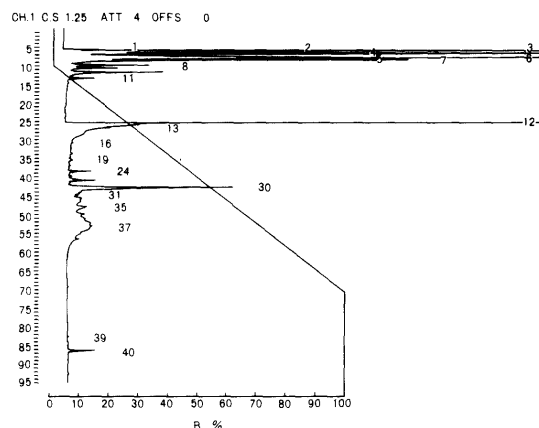


図12 大腸菌細胞質分画の分析

大腸菌は細胞膜を破壊し、遠心分画により細胞質分画を得た。試料は0.45μmのフィルタで濾過された後100μl(0.1~0.2mgのタンパク質を含む)をカラムに注入した。分析の条件は、ガラスカラム2本を直列につないだことを除いて図11の条件と同じである。

タンパク質の凝固によるカラム圧力の上昇あるいは溶出残留物の蓄積によるカラム性能の劣化等が起こることがある。このような場合には、プレカラム(あるいはラインフィルター)の使用による分析カラムの保護が必要である。また、溶離液中に低極性(脂溶性)物質が溶出するような溶媒を添加することも有効な場合がある。

5. おわりに

接液部に金属を使用しない液体クロマトグラフシステムを用いて、タンパク質を逆相クロマトグラフィーにより分離した例を紹介したが、今後、ゲル濾過、イオン交換、疎水性クロマトグラフィーおよびイオンクロマトグラフィー等の分離カラムを適用し、イナート液体クロマトグラフィーの特長のある応用分野を広げていきたい。

Topics

EUREM'88(欧州電子顕微鏡学会)開催さる

9月4日から9日まで、イギリスの歴史の町ヨーク市でEUREM'88が開催された。雨続きの日本に比べ、ミンスタ寺院が青空に突き刺さるように見えたすばらしい気候であった。学会参加者は約1,500人で、616件の発表があった。このうち非生物は330件であり、各セクションの主な内訳は高分解能観察23件、界面および欠陥26件、画像処理26件、超伝導材料22件、装置29件、分析22件などである。前4件は新素材の高分解観察とシミュレーションとにま

とめられる。高分解能電子顕微鏡技法は、今や材料研究者が自分で実験できる一手段にまで発展したと言える。日立からは次の3件の発表をおこなった。(1) Design and Initial Performance of a UHV-HREM; 本題では、試料室を 4×10^{-10} Torrの高真空中に保ち、しかも0.14nmの格子分解能を持つ300kV電子顕微鏡を紹介した。すでにノースウェスタン大学のMarks教授の研究室に納入し稼動していることに驚く研究者が多かった。また超高真空を得るための磁路の溶接のしかたなど具体的な質問もあった。(2) Direct Observation of Disorder in GaAs/AlGaAs Heterointerface by CAT Method; 本法は日立で開発された新しい分析手法で、基板上にエピタキシャル成長した化合物半導体などの超構造の組成を、電子回折の動力学理論を巧みに利用し

て、0.4nmの空間分解能で測定が可能になった。今回は組成だけでなくわずかな格子ひずみも測定できることを示した。本法はPhilips, Siemensなどの半導体メーカーの評価センタで使われ始めた。(3) Cross-sectional Observation of Superconducting Film; 今まで開発されてきた半導体の断面観察手法を超伝導材料に適用して、基板上に形成した超伝導薄膜の特に界面での結晶構造について研究したものである。発表のほとんどは、焼結体を粉碎した試料の端部の高分解能観察とシミュレーションであったが、今後はデバイスの観察が増すものと思われる。日立の商業展示室では新しく発表されたS-4000形FESEMとバイオTEMとして好評を得ているH-7000形TEMが展示され連日多くの研究者が訪れた。

(永田文男 記)

F-2000形日立分光蛍光光度計

HITACHI Model F-2000 Fluorescence Spectrophotometer

越 裕之* 大和田 実* 網 雅子**

(昭和63年10月3日受理)

1. はじめに

より高感度な測定を目的として、分光蛍光光度計の使用される分野はますます広がりつつある。従来、分光蛍光光度計は研究用として、微量測定に必要な高い感度、複雑なスペクトルを持つサンプルを測定するのに十分な分解能、スペクトル解析に必要なデータ処理機能を必要とされていた。しかし、一方では各種の蛍光プローブを使用し、波長固定の定量測定を行う場合も多い。この場合には、高感度は必要であるが、分解能、スペクトル解析機能よりも、定量分析用の検量線機能などが必要とされる。日立分光蛍光光度計には、従来からスペクトル測定に重点を置いたF-3010形/F-4010形、850形がある。これらに、今回定量測定に重点を置いたF-2000形分光蛍光光度計を加えた。

F-2000形は、小形ながら高感度で豊富な定量分析機能を持つ定量測定用の分光蛍光光度計である。また、最近話題となっている細胞内カルシウムの測定など、目的に応じたシステム化を図れるように考慮してある。

2. 主な特長、機能

(1) 高感度

F-2000形は、初めての定量測定用蛍光光度計であり、単一波長での測定はもちろん、特にバックグラウンドのある蛍光物質の定量測定に有効な2、3波長演算機能を内蔵しを確認するためには、水のラマンスペクトルを測定し、そのピーク波長でのノイズの大きさと、ラマン光ピークの高さからS/Nを計算していたが、F-2000形では、これらの計算、S/N計算を自動化し、装置の状態を簡単にチェックできるようにした。図2に、感度確認データの一例を示す。

(2) 豊富な定量分析機能

F-2000形は、初めての定量測定用蛍光光度計であり、単一波長での測定はもちろん、特にバックグラウンドのある蛍光物質の定量測定に有効な2、3波長演算機能を内蔵している。また、標準試料10点までの検量線を作成でき、1つの標準試料については、最大10回まで繰り返し測定し、その平均値による定量演算ができる。さらに、標準試料の再測定、検量線の修正、検量線評価のための統計演算など、従来にない豊富な機能を持っている。

以上は、データ処理の内容であるが、蛍光光度計としては、約6桁のダイナミックレンジを持ち、この広い濃度範囲にわたって試料濃度と蛍光強度が対応している。このため、濃度未知のサンプルを測定する場合、感度調整がほとんど必要なく、操作が簡単という優れた特長を持っている。



図1 F-2000形日立分光蛍光光度計

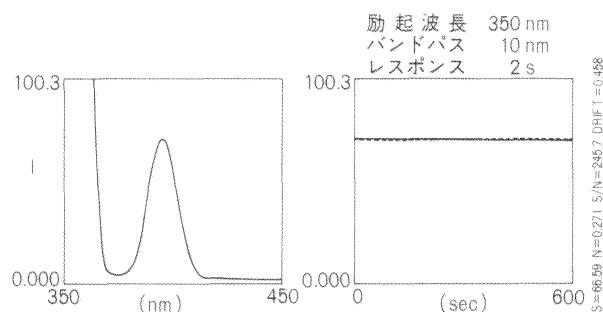


図2 感度の確認データ例

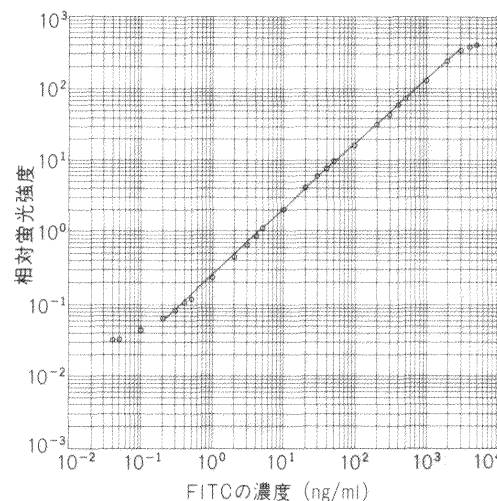


図3 F-2000形の検量線

図3は、サンプルとしてFITCを用いたときの検量線である。約30点のデータから作成したものであるが、ダイナミックレンジの広さがよく分かる。図4に分析条件を、図5にF-2000形で作成された検量線の例とその統計演算の結果を示す。

* 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 テクノリサーチセンター

定量分析/FITC	88/09/12 18:09
データモード	濃度
波長数	1
サンプル番号	1
波長1(nm)	励起 470 蛍光 512
測定回数	1
測定待ち時間(sec)	2
積算時間(sec)	2
濃度上限	9999
濃度下限	0.000
濃度単位	ng/ml
検量線近似法	1次直線
標準試料数	6
検量線作成	新規検量線
レスポンス(sec)	2
バンドパス(nm)	励起 10 蛍光 10
光電子増倍管(V)	400
測定結果印字	ON

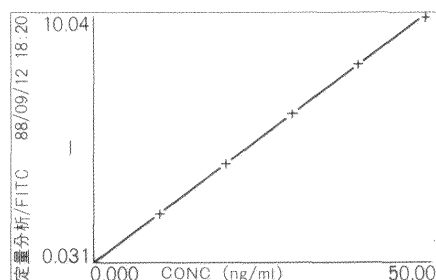
図4 分析条件例

定量分析/FITC

88/09/12 18:11

ID	I	ng/ml
STD 1	2.039	10.00
STD 2	4.099	20.00
STD 3	6.128	30.00
STD 4	8.157	40.00
STD 5	10.04	50.00
STD 6	0.031	0.000

(a) 測定結果



(b) 検量線表示

定量分析/FITC			88/09/12 18:20		
ID	I	CONC(I)	DIFF	RD	t
STD 1	2.039	9.878	-0.122	-2.401	-0.509
STD 2	4.099	20.11	0.114	2.243	0.475
STD 3	6.128	30.19	0.195	3.836	0.813
STD 4	8.157	40.27	0.277	5.450	1.155
STD 5	10.04	49.63	-0.367	-7.222	-1.531
STD 6	0.031	-0.100	-0.100	-1.968	-0.418
CORRELATION COEFFICIENT=0.999					

CORRELATION COEFFICIENT=0.999

(c) 統計演算

図5 定量分析結果の例

(3) 励起、蛍光波長の自動設定

未知試料の蛍光測定を行う場合に、第一に問題となるのは励起または蛍光波長の選択である。日立分光蛍光光度計は、従来から“PRE-SCAN”と呼ばれる機能を持っている。この機能は高速でスペクトルを測定し、最大ピーク波長に励起または蛍光波長を設定するものであり、これにより最適励起、蛍光波長への設定を行ってきた。しかし、蛍光光度計の高感度化に伴い、溶媒のラマン光強度が蛍光強度より高くなる場合が多くなってくると、単に最大ピーク

励起波長.....走査ピーク検出波長設定
 蛍光波長.....走査ピーク検出
 溶媒のラマン波長.....検出
 2次光、散乱光.....検出
 蛍光波長.....選択、設定
 信号強度.....スケール調整

ワンタッチ操作

図6 励起/蛍光波長自動設定

定量分析	88/09/12 18:20
1. データモード	濃度
2. 波長数	1
3. 波長1 (nm)	励起 300 蛍光 400
4. 波長2 (nm)	励起 300 蛍光 450
5. 波長3 (nm)	励起 300 蛍光 500
6. 標準試料数	1
7. 検量線作成	測定待ち時間 (sec) 2
8. 検量線データ	積算時間 (sec) 0
9. 測定条件名	濃度上限 9999
10. 装置の条件	濃度下限 0.000
11. 条件保存	濃度単位 mg/ml

数値を入力してください [1-9999] :

図7 日本語表示による条件設定画面の例

を検知するだけでは、蛍光のピークをとらえられないようになってきた。このため、F-2000形では蛍光によるピークと、それ以外のピークを識別し、励起、蛍光波長を設定する機能を持たせた。¹⁾ (図6)。

(4) 日本語表示による簡単な操作

蛍光光度計は、励起、蛍光側の2つの分光器を持っていることなどから、分析条件設定が分かりにくいといわれることが多い。これを少しでも簡単にするため、分光蛍光光度計としては初めて日本語表示を採用した (図7)。

3. システム化

(1) 細胞内カルシウム測定

カルシウムイオンは、細胞外の情報を細胞内に伝達する機能を持っているため、細胞における分泌、収縮、代謝、増殖といった活動と密接にかかわっている。このため、細胞内カルシウムイオンの測定は注目を集めているが、細胞内カルシウム測定用蛍光試薬 (Quin2, Fura2他) が開発されて以来、蛍光法による細胞の測定は急激に広がってきた。

これに応じて、F-2000形では、オプションとして供給されるカルシウム測定用プログラムなどとの組み合わせによる細胞内カルシウム測定システム (図8) を用意している²⁾。これは、測定から、カルシウム濃度計算、結果の打ち出しまでを一体化したものであり、例えば、カルシウムイオン濃度と細胞内pHの同時測定が可能など、いくつかの優れた特長を持っている (図9)。また、これには200nm/sの超高速波長移動が可能というF-2000形本体の特長が生かされている。

(2) LC用検知器として

蛍光光度計は、従来から液体クロマトグラフ (LC) の検知器として広く使われてきた。最近では、LC専用の蛍光検知器も多数出ているが、それらと比較してF-2000形は数倍

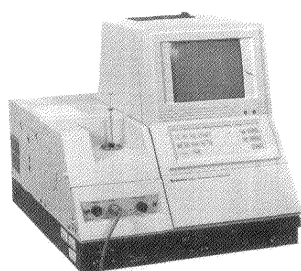


図8 細胞内カルシウム測定システム

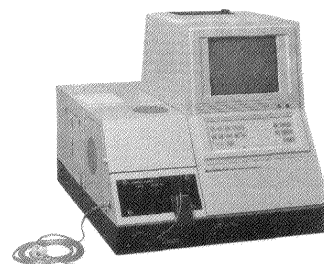


図13 シッパ蛍光光度計

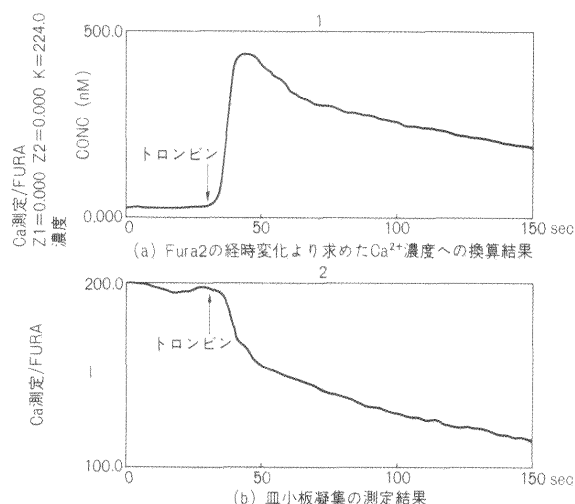


図9 Ca^{2+} 濃度と血小板凝集の同時測定

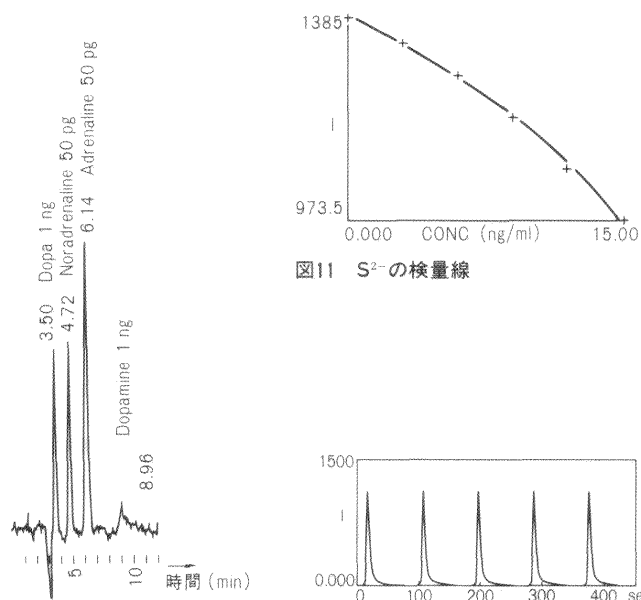


図10 カテコールアミンの分析 (LCとの組み合わせ) 図11 S^{2-} の検量線 図12 FIAによる再現性測定チャート

以上の高い感度を持っているため、LC用フローセルとの組み合わせにより、LC用検知器として使用することも有効である(図10)。特に、LCで分離される各成分の保持時間に応じて、各成分の最適励起、蛍光波長に切り替え可能な波長

プログラムを併用することにより、さらに高感度化を図ることができる。

(3) FIAを用いた前処理の自動化

蛍光法は高感度であるが、試料によっては煩雑な前処理を必要とすることも多い。また、前処理を手動で行った場合には、再現性などの問題があることもある。このような場合には、FIAとの組み合わせによる前処理の自動化により良好な結果が得られる。図11、図12は、硫化物イオンの定量測定に、F-2000形とFIAとのシステムを適用した例である³⁾。

(4) シッパ蛍光光度計

蛍光測定の試料としては、液体が最も多い。液体試料の測定では、通常、石英製の角セルを使用するが、試料数が多い場合には、セルの洗浄に要する時間が長くなり効率が悪い。この場合には、フローセルを使用し、連続的に試料を吸引、測定することにより、洗浄の手間を省くことが有効である。F-2000形はオプションとして用意されているサンプルシッパとの組み合わせにより、このようなシッパ蛍光光度計(図13)として使用することができる。

(5) 外部コンピュータとの接続

最近の分光蛍光光度計は、豊富なデータ処理機能を持っているが、ユーザー独自のデータ処理、作表、グラフィック表示などパーソナルコンピュータが得意とする内容については、通信機能を介して、光度計とコンピュータを接続し、パーソナルコンピュータ側で処理する必要がある。F-2000形はこのような場合を考え、RS-232C方式による通信機能を標準装備している。

4. おわりに

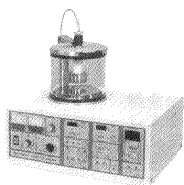
ここでは、F-2000形の主な特長、システム化の例を述べてきたが、今後、新たな蛍光試薬の開発などによって、蛍光分析の応用分野はますます広がっていくと考えられる中で、F-2000形が有効な道具の一つであり続けることができるよう、周辺装置、応用プログラムの開発を行っていきたい。

参考文献

- 1) 越, 外: 第23回応用スペクトロメトリー東京討論会要旨集, 2 BO 4 (1988)
- 2) 日立テクニカルデータ, FL, No. 30
- 3) 網, 外: 日本分析化学会第37回年会講演要旨集, 3L14 (1988)

Topics

E-1030形 日立イオンスパッタ



膜厚測定ユニット、電子冷却式試料ステージ冷却ユニットを装着したE-1030形日立イオンスパッタ

マグネトロンタイプでCPUを搭載したイオンスパッタを製品化しました。マグネトロン電極の構成は、ダイオード放電の一種です。ターゲット（マイナスイオン電極）に永久磁石を組み込み、ターゲットの表面に電界と直交する形で磁界を作ります。このため、電子はターゲット近くで螺旋運動をしながら、雰囲気ガスとの衝突を繰り返しますので、ターゲットをスパッタするプラスイオンの密度を上げる結果となります。この働きにより、放電中のチャンバー内圧力と放電電圧を低く抑えることが可能となり、反射イオンなどの高速粒子の入射による試料損傷が軽減されるとともに、粒状性も高真空、低放電電圧の相乗効果で、より一層高まります。

また、チャンバー内の雰囲気ガス（残留ガス）は、自動的に効率よくアルゴンに置き換えられますので、スパッタリング率が向上してコーティング処理時間が短縮されます。

■特長

(1)マグネトロンタイプの電極構成の採用により、試料損傷、平均コーティング粒子径を最小に抑えました。

(2)オプション（一部）にもCPUを搭載し、本体のCPUと連動させたシステムフルオート機能により、手軽に再現性の良い試料処理が行えます。

(3)膜厚測定ユニット、電子冷却式試料ステージ冷却ユニットなど、豊富なオプションを用意し、広範囲なお客様のニーズにシステムの拡張でお応えします。

日本分析化学会 第37年会開催さる

日本分析化学会第37年会が、9月30日から3日間、北海道大学で開催された。今回のトピックスは、1,300人を超す参加者と、内容も3件のシンポジウム、特別講演、依頼講演、受賞講演のほか約700件もの研究発表が行われたことである。プログラム編成も、これまでの「方法別分類」を「対象別分類」



へと大きく変わり、従来とは違った討論と交流の場になった。そのほか付設展示会でも、ソフトウェアを重点にする趣向が凝らされ、23社が参加した。10月1日授賞式後の懇親会は400人以上が参加され、当日の申し込みは満員止めとなるなど、例年とは違った盛り上りをみせた。

研究発表は13会場に分かれ、若手研究者のポスターセッションや、教育用ビデオの試写会も行われた。当社からは、原子吸光、フローインジェクション、液体クロマト、NMRデータ処理など11件の発表を行い、それぞれ活発な討論が行われた。ある先生からは、「メーカーの研究発表は、装置の性能や機能向上のための開発研究、その応用例、分析上の問題点の解明なども重要だが、製造そのものの性能向上への努力もより重要である……。」という意味のことを漏らされておられた。

すがすがしい秋空の札幌での年会は大盛況に終わった。来年の年会は東北大学で開かれる予定である。（鴈野重威 記）

日製産業株式会社

本社 電話 東京(03) 504-7211
筑波支店 電話 土浦(0298) 23-7391
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

札幌支店 電話 札幌(011) 221-7241
北関東営業所 電話 大宮(0486) 53-2341
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

仙台支店 電話 仙台(022) 264-2211
西関東営業所 電話 八王子(0426) 43-0080
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

<編集後記>

- 本ニュースは、本年をもって32年目を迎えることができました。これもひとえにお客様各位の日立科学機器に対するご愛顧の賜物と篤くお礼申し上げます。
- 本号は、本来ならばVol.31 No.4 WINTER 1988 (Fiscal Year) として発行すべきところですが、本ニュースは1989年より年6回発行することに変更致しましたため、これをVol.32 No.1 JAN./FEB. 1989 (Calendar Year) とさせて頂きました。
- 本号は、Hyphenated Instrument特集として編集致しました。適当な日本語がないため、原文のまま使用致しました。

- 日立科学機器による報文のご投稿を歓迎いたします。
- 本ニュースに関するお問い合わせは、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。
- 日立計測エンジニアリング株式会社
テクノリサーチセンター
〒312 茨城県勝田市市毛882番地
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
〒105 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京(03) 504-7195(ダイヤルイン)

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
JAN./FEB. 1989 Vol.32 No.1

発行 平成元年1月9日(年6回発行)
発行人 岡本匡史
編集人 永谷 隆
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