



目 次

超微量分析研究会第 2 回講演会	2
講演会の報告と講演概要	
分析機器解説シリーズ (7)	5
フーリエ変換赤外分光光度計 (FT / IR - 3) の特長	
トピックス	11
核酸プローブ法による遺伝子の分析	
お知らせ	15
・ FT / IR フロッピーディスクシステムの設置	
・ 移管装置	
・ 線回折計用 Fe 管球構入	
・ 高周波 2 極スパッタ装置の設置	
・ エネルギー分散型 線回折計取扱い説明会について	

超微量分析研究会第2回講演会

中央分析センター、超微量分析研究会の第2回講演会が11月9日(金)午後2時より4時まで薬学部第1講堂で開催されました。石橋センター長の開会挨拶の後、九大農学部江藤守総数授の座長で松本清氏(九大農学部)の「電流計測型酵素電極による食品成分の分析」と題する講演が、次いで九大工学部石橋信彦教授の座長で小川禎一郎氏(九大総理工)の「レーザー光イオン化による高感度分析」と題する講演がありました。約60名の参加者があり、活発な質疑応答が行われました。

今回の講演会の開催に当っては、薬学部大倉洋甫教授をはじめ大倉研究室の方々に会場の設営と運営に多大の御協力をいただきました。

小川、松本両先生の講演概要を以下に掲載します。

レーザー光イオン化による高感度分析

総合理工学研究科分子工学専攻 小川 禎一郎

レーザーは新しい明るい光源としてその分析化学的応用が期待されている。レーザーによれば分子に一度に複数個の光子を吸収させイオン化することができる。すなわち、



電場をかけてこのさい流れる電流を測定すれば、光を吸収する物質の新しい高感度な機器分析法となると期待した。気相ではこの方法により一原子の検出が報告されている。

レーザー多光子イオン化による過渡電流波形には速い成分と遅い成分とがある。速い成分の強度はレーザー強度の二乗、印加電圧の n 乗に比例し、その速さからみて何かが動いているのではなく、geminate ion pairの解離過程に帰属できる。遅い成分はそのピーク位置が溶媒の粘度や印加電圧に依存し、生成したイオン種の移動に関連づけられる。光イオン化電流は正の温度依存性を有し、電子移動度の温度変化と対応している。

電流信号の、レーザー強度・バイアス電圧・電極間距離・セルの形状などにたいする依

存性を調べ、高感度分析のための最適条件を探り、芳香族分子の高感度分析を試みた。ピレンを試料として検量線は 1×10^{-8} - 1×10^{-11} M の範囲で直線であり、この検出限界として 6ng/ml を得た。いろいろな分子について高感度な分析が可能であるが、その検出感度は光イオン化波長での吸光係数と相関していた。この結果より、レーザー多光子イオン化法は蛍光法よりは感度が劣るが、光の吸収を原理とする方法のうちでは高感度といわれている光音響法より優れていることを見いだした。

波長可変色素レーザーを光源に用いれば、この方法の適用性・選択性がひろがる。ペリレンの検出限界 (435nm 励起) は 3×10^{-9} M (800ng/ml) であった。

レーザー多光子イオン化法の選択性を良くするため、高速液体クロマトグラフ法と組み合わせた。高速液体クロマトグラフ溶出液にレーザー光を集光し光イオン化信号をボックスカー積分器により計測した。検出限界は UV 法よりやや良く、この方法が極めて高感度であることを示している。ダブルビームとすればさらに検出感度がよくなる。

電流計測型酵素電極による食品成分の分析

九州大学農学部 松本 清

バイオセンサー技術は、生体の持つ神技ともいえる分子識別能 (特異性) を積極的に利用しようとするもので、食品のように多成分混合系で、かつその成分が動的平衡にある試料に対しては極めて有力な手段と言える。これまで多数のバイオセンサーが開発されているが、講演会では最も基本的なセンサーとして電流計測型酵素電極について紹介した。

アスコルビン酸オキシダーゼ (AO) はアスコルビン酸と酸素との反応を触媒する酵素として知られている。そこで、植物体より抽出した AO を再生コラーゲン膜に固定化し、クラーク型酸素電極に装着することによってアスコルビン酸選択性電極を作製し、この電極の性能並びにフロー系への応用について紹介した。

化学修飾型電極は固体電極表面に酵素を化学的に固定し、触媒反応を効果的に行い、電極上の反応生成物 (電極活性物質) を定量的に検知しようとするものである。この型の電極として、グラッシーカーボン電極表面に化学結合しうる官能基を導入し、 - ガラクト

シダーゼ、グルコースオキシダーゼの二酵素固定化系によるラクトース電極を紹介した。

酵素電極は選択性が優れている反面、個々の測定対象物質に対して、各々一個ずつの電極が必要である。この問題がクロマトグラフィーと比較して酵素電極の致命的欠陥と考えられてきたが、最近多機能センサーの開発が行われるようになった。そこで、食品中の糖成分の同時定量を目指し、マルチチャンネル型の白金電極フローセルと、固定化カラムとを用いる多成分同時計測装置を試作し、その性能を紹介した。

近年、酵素と補酵素NAD⁺の同時固定化が研究されているが、これらを分析に利用する目的においては未だ満足のいく結果は得られていない。そこで、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)系をモデルとして、臭化シアン活性化セファロースゲル担体にヘキサメチレンジアミンとグルタルアルデヒドを交互に反応させ、担体の方にスパーサーを修飾させた後、ADHとNAD⁺あるいはNAD⁺-アナログをシッフ塩基を介して共有結合させる同時固定化法を検討した。活性の高い同時固定化ゲルの調製には、グルタルアルデヒドの濃度及び反応時間を厳密に制御することが必要であることを示唆した。

現在までに生体から分離されている酵素は既に800種を越えており、理論的にはそのそれぞれについて酵素センサーの作製が可能である。しかしながら、このセンサーを生産現場での検定、管理分析用センサーとして発展、確立させるためには、固定化酵素の安定化など更なる進展が切望される。

分析機器解説シリーズ(7)

フーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR - 3) の特長

工学部 松田 勲

工学分室にフーリエ変換赤外分光光度計が設置されてからほぼ一年になる。すでに利用回数が多い機器の一つとなっているが、まだ一般の研究者の方々には馴染がすくないようなので、この FT/IR - 3 型を使った例を示して、通常の赤外分光光度計 (分散型 IR) と較べての特長を紹介しよう。フーリエ変換法を用いる IR 分光法の基礎については、すでに本センターニュースの Vo1.1, No.4, 1984 に解説されているので合わせて参照していただきたい。

FT/IR 法のもつ特長は古くから知られていたが、波数精度を上げること、とくに光路差の小さい干渉波形の精度と再現性を上げること、インターフェログラム (光路差と光強度との関係) からフーリエ変換して吸収波形を得る計算の時間を短くすることに難点があった。最近の精密工作技術の進展、とくにコンピュータの飛躍的な性能の向上によりコンピュータにより駆動される測定装置として実用化された。最近では分散型の IR においてもマイクロプロセッサを組み込んで透過率の拡大、吸光度表示が出来るようになり、また光学櫛を用いずに電氣的に吸収の変化を測定するなど機能が拡大されている。

高い分解能や測定結果の信頼性などは従来の分散型 IR 装置ですでに実現されているが FT/IR は従来の分散型のものと基本的な測定原理が異なり、次のような特長をもっている。

- 1) 入射光束が有効に利用できる。(光量利用率の利点)
- 2) 単位時間当りのエネルギー利用率 (スペクトル要素検知率) が高い。(多重度の利点)
- 3) フーリエ変換過程での迷光の除去が容易である。
- 4) レーザー光干渉縞の利用により高い波数精度が得られる。

FT 法では従来のプリズムや回折格子を用いて分散させることにより狭い波長範囲の光束 (単色光) を取り出すこと、および分解能を上げるためにスリットで光束を狭くする必要はなく、円型 (7mm) の光束をそのまま用いるため光束の利用率が非常に大きく、とくに

弱いエネルギーの検出に有利となっている。また測定中に測定波数範囲（ FT / IR - 3 では 3950 ~ 400 (cm^{-1}) の全領域からのデータを同時にとっているため、時間当りのエネルギー利用率が高く、また積算の機能を用いることにより短い測定時間においても S / N 比が非常に大きい利点をもっている。

従来の IR 法で測定の困難なものとしては、物体の表面にごく少量付着している、たとえば触媒の表面に吸着した物質や高分子の膜の表面に付着した生物試料などの吸収の弱いもの、またカーボンや金属の微粉など光を透過しないものや強い水の吸収で妨害された透過率が非常に小さいものがあげられる。FT / IR 法では、吸光度 0 ~ 4 (0.01%T) の範囲の測定ができるので、縦軸の透過率 (吸光度) の拡大機能を併用して透過率の小さい試料 (暗い試料) の測定が可能である。一方、吸収が弱く透過率で 90 ~ 100%T 程度の場合には S / N 比が悪くなり、分散型 IR では特殊な機構をもつ装置が必要となるが、FT / IR では積算を利用することにより S / N 比の高い測定結果を容易に得ることができる。一回の積算 (走査) は 1 秒程度であるので比較的短い時間で容易に多数回の積算を行うことが可能である。

なお、能力の大きいコンピュータを内蔵しているので、豊富な測定値のデータ処理が出来ることは云うまでもない。

以下、メーカーの資料によって FT / IR の特長を用いた測定例を示す。

1) 縦軸の信頼性

定量分析においてはできるだけ広い濃度範囲の試料が使えることが望ましいが、通常の分散型分光計では A B S (吸光度) が 2 以上になると直線性が問題となる。図 1 は FT / IR により酢酸ビニールフィルムを 4 枚重ね、A B S 0 ~ 4 の範囲で透過法により測定した例である。1260 cm^{-1} の波長における濃度 (枚数) と吸光度の関係は下に示すように 0 ~ 3 の間でよい直線性を示すことが分かる。このように広い吸光度の範囲で使えることは、以下に示すような特殊な条件下での測定に必要な性能である。

2) 低濃度試料の測定

吸収の弱い低濃度試料の測定では縦軸の拡大が必要であるが、先に述べたように S / N 比の低下が問題となる。

図 2 は KBr 板上で作ったポリメチルメタクリレートの薄い膜を FT 法で 500 回積算して測定した例であるが、多重度の利点を生かし縦軸を 140 倍に拡大 (%T89.5 ~ 90.2) して

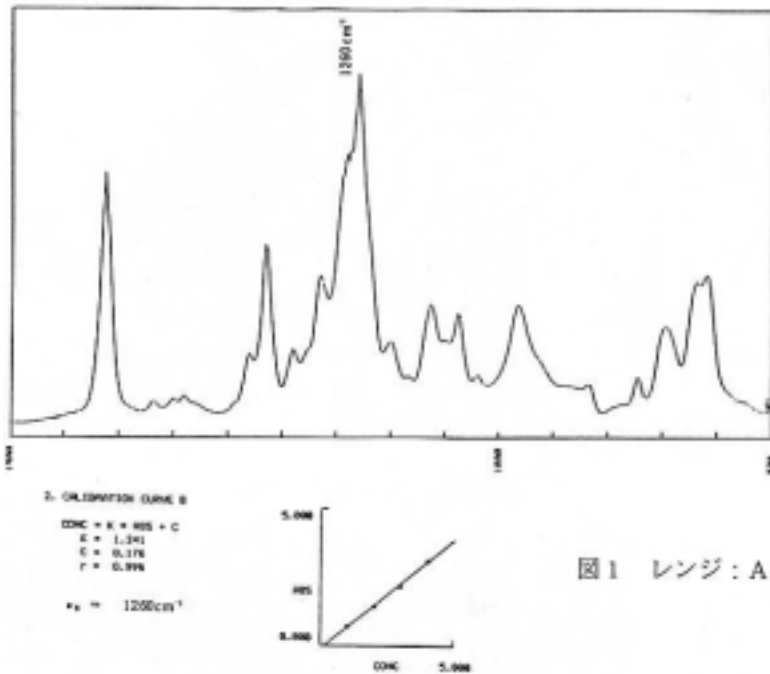


図1 レンジ: ABS 0~4

も十分なスペクトルを与えることを示している。

3) 弱いエネルギーでの測定 (暗い試料)

図3はポリスチレンフィルムにピンホールをもつマスクをかけ、ピンホールの大きさを絞って、どの程度までの弱いエネルギーまで測定できるかを調べたものである。

%T0~0.35のような弱いエネルギーしか得られない場合でも十分に測定できることが分かる。

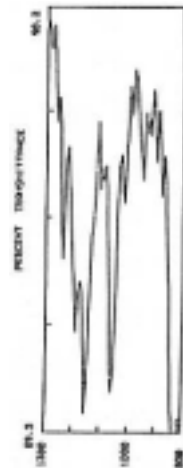


図2

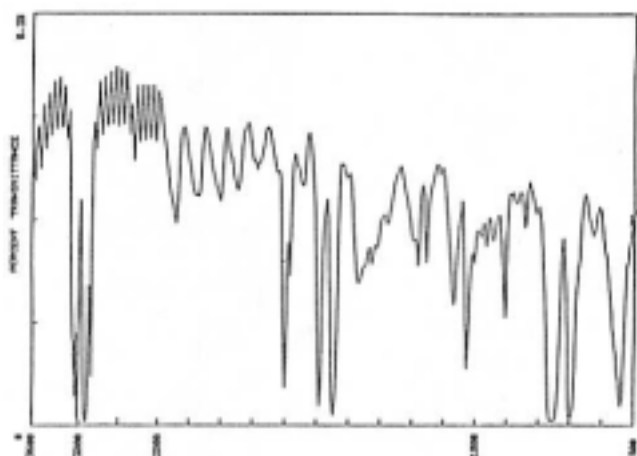


図3 積算回数：1024
レンジ：%T 0～0.35

始め殆ど透明であるグリースは使用にともなって磨耗した金属が入り真黒になって著しく透明度が低下する。図4はこのような試料を測定したもので、%T 0～1.5 の範囲でも十分なスペクトルを与えている。始めのものとの差スペクトルを求めれば、含まれる添加剤の量やその変化の検討に使える。

同様にして複写機用のカーボン表面に塗布してある樹脂成分などを調べることが出来る。

強い吸収と弱い吸収の両者を同時に定量するには、縦軸のレンジを広くとることが必要となる。図5は結晶シリコンの上に薄くドーブしたアモルファスシ

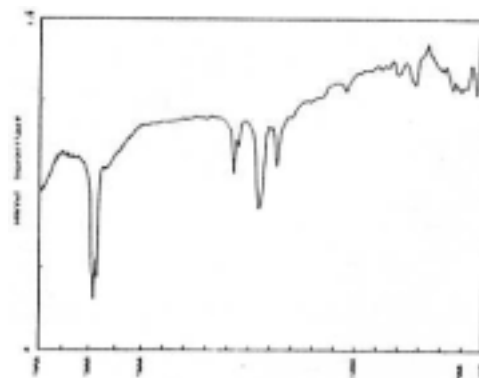


図4 レンジ：%T 0～1.5
積算回数：1000

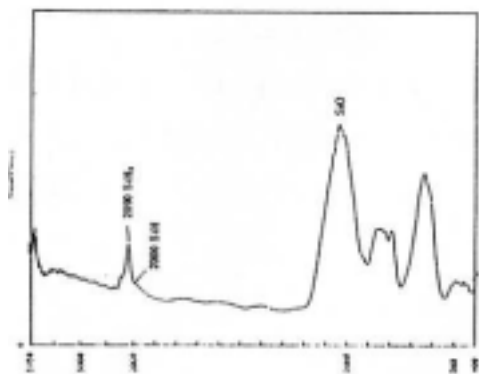


図5 レンジ：ABS 0～3
積算回数：32

リコンを透過法で、A B S 範囲 0 ~ 3 において測定したもので、先に述べたように直線性の範囲が広いので強度の弱い Si - H の吸収と強い Si - O の吸収の同時定量が出来る。現在、半導体の分野では FT / IR 法が広く用いられている。

4) 水を含む溶液の測定

水の吸収は強いので、一般に水溶液中の物質の IR 測定は困難であり、ラマン分光法がよく用いられる。水の 1600cm^{-1} 付近の強い吸収は $20\mu\text{m}$ の厚さで A B A S 3 程度であり、通常の 0.05mm のセルでは吸収が強すぎる。しかし図 6 に示すように比較的吸収の弱い波数域では、2%水溶液中の油の定量を、差スペクトルを利用して行うことが出来る。A T R 法を利用すれば、光の侵入する距離は $2.5\sim 20\mu\text{m}$ 程度なので水溶液の測定が可能となり、分散型の IR 法においてよく利用されている。FT 法では差スペクトルの計算、ベースラインの補正などが容易で、また積算により弱い吸収も精度よく測定できる利点がある。(水溶液の場合には K R S - 5 の代りに耐水性のプリズム (As_2Se_2) を用いる必要がある。)

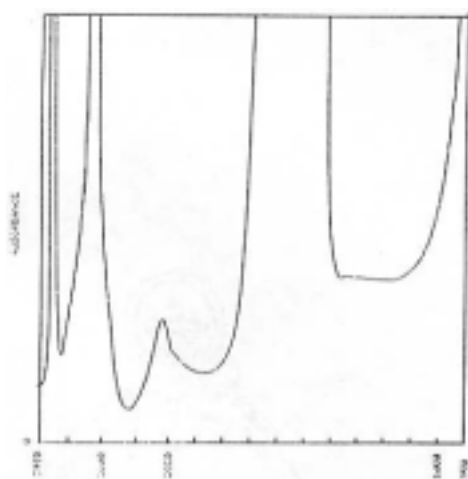


図 6 a) 水の吸収スペクトル
0.05mm、レンジ：A B S 0 ~ 4

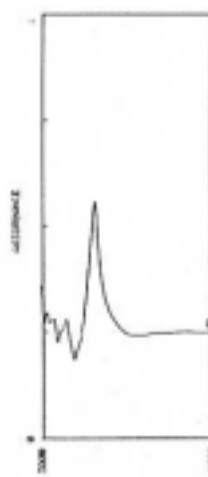


図 6 b) 切削油 (2%水溶液) の差スペクトル
0.05mm、レンジ：A B S 0 ~ 4

以上、FT / IR の特長を生かした測定のいくつかの例を示した。云うまでもなく、工学分室に設置している FT / IR - 3 は通常の IR 測定の機能も十分に具えており、測定結果がデータファイルとして保存され、種々の測定値の計算、変換に繰り返して利用出来る利点も持っている。

なお、FT/IR-3の附属品としては、通常のセルの他ATR法に用いるマイクロ多重反射装置（KRS-5プリズム）、微小試料測定用のビームコンデンサーを備えており、また近くデータファイル保存のための容量の大きいフロッピーデスク装置も加えることになっている。

この短い解説が、研究の過程においてお手持のIR装置では困難な測定試料や条件が生じた場合の参考になれば幸いである。

核酸プローブ法による遺伝子の分析

工学部合成化学科 片山佳樹
大木章

遺伝子工学の研究において、目的とする特定の核酸（遺伝子）の分離、精製および分析（検出）法の開発は、非常に重要な課題である。従来目的遺伝子の分析法としては、種々の精製法（密度勾配遠心法、電気泳動法、アフィニティークロマトグラフィー等）によって単一遺伝子としたものを塩基配列解析（マキソン - ギルバート法等）を行い同定することが一般的であった。近年、核酸を *in vitro* で分離、再会合させることが可能となったが、このような核酸の hybridization 技術を利用して、多種遺伝子混合物（例えば細胞そのもの）から直接目的遺伝子のみを分離、検出する手法「核酸プローブ法」が注目を集めるようになった。ここでは、このような遺伝子分析法について最近の文献を中心に紹介する。

核酸プローブとは、1本鎖核酸（またはその断片）を何らかの形でラベル化したもので、これと相補的な塩基配列を持つ核酸と選択的に会合し2本鎖を形成する。「核酸プローブ法」の大要を述べれば、¹⁾ 図1に示すように、(i)検体細胞の破壊、(ii)DNAの変性による1本鎖核酸の生成とマトリックス（ニトロセルロースフィルター、ガラススライド、セファローズビーズなど）上への固定、(iii)核酸プローブの添加による hybrid 形成反応、() 過剰の核酸プローブの洗浄、()ラベル化したプローブの検出である。すなわち、検体のDNAと hybridization しない核酸プローブは洗い落されるので、マトリックス中にラベル化した種が検出されれば、検体細胞中に核酸プローブと相補的な塩基配列を持つ核酸が存在することがわかる。

核酸プローブのラベル化法としては、放射性同位体（ $^{32}\text{P}^{2-4}$ ）、 $^{125}\text{I}^{5)}$ 、 $^3\text{H}^{6)}$ ）を用いる方法が最も一般的である。この方法は、放射性同位体がオートラジオグラフィー等で容易に検出できること、高感度であること、さらにプローブの合成が容易であること等の利点がある。しかしながら、検出に長時間を要すること、プローブの長期保存が困難な

こと、分解能が低いこと、ならびに放射性物質を取り扱うので危険性が高いなどの欠点も多い。

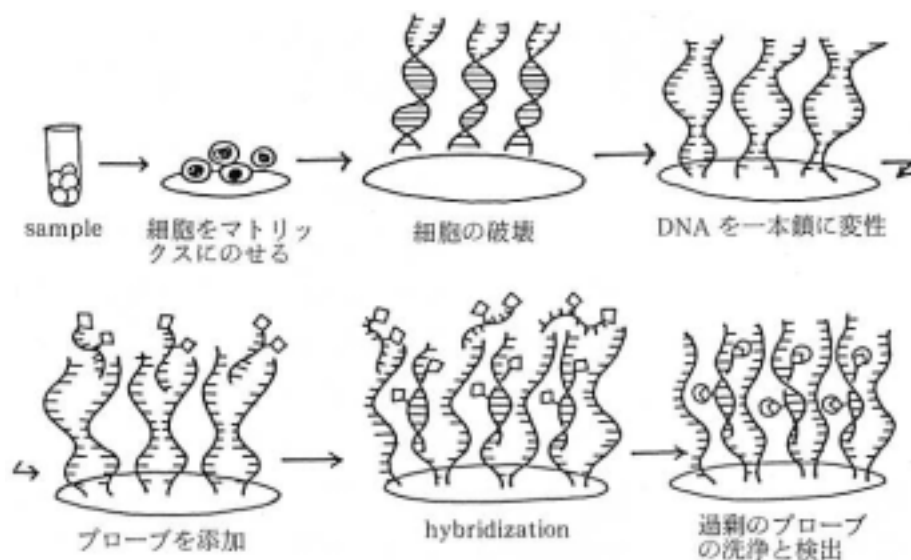


図1 核酸プローブ法

このため、ラベルとして小分子を用い、これをけい光法もしくは酵素化学的な方法によって検出する手法が検討されはじめた。図2に小分子によってラベル化した核酸プローブの構造を示す。また、小分子ラベルの検出法としてこれまでに試みられた方法を図3にまとめた。

最も簡単な小分子ラベル検出法は、ラベル分子自体にけい光性色素を用いる方法（ローダミンラベルプローブ等）である^{7,8)} この方法は操作が簡単迅速であるという利点を持つが、プローブ自体がかなり不安定であり高温（60～70℃）で hybrid 形成を行うことができない欠点がある。また、色素分子がマトリックス上に吸着する現象も起り、バックグラウンドが増加する不都合がある。

核酸プローブ検出法に免疫細胞化学的な手法を応用した例も数例報告されている。^{9～11)} 免疫細胞化学とは、抗原抗体反応を利用して細胞内の化学成分を同定する手法である。図3に示すように、抗原（ビオチンやアミノアセチルフルオレン等）で修飾した核酸プローブを用いる。この抗原に標識抗体（けい光性色素や酵素で修飾した抗体）を作用させた後、けい光法や酵素化学的な方法で検出する。これらの検出法は、免疫細胞化学の分野ではそ

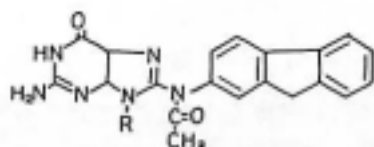
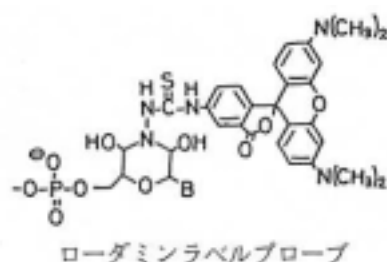
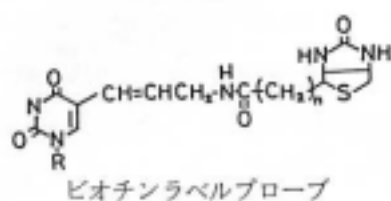


図2 小分子でラベルしたプローブ
R : デオキシリボース、B : 塩基

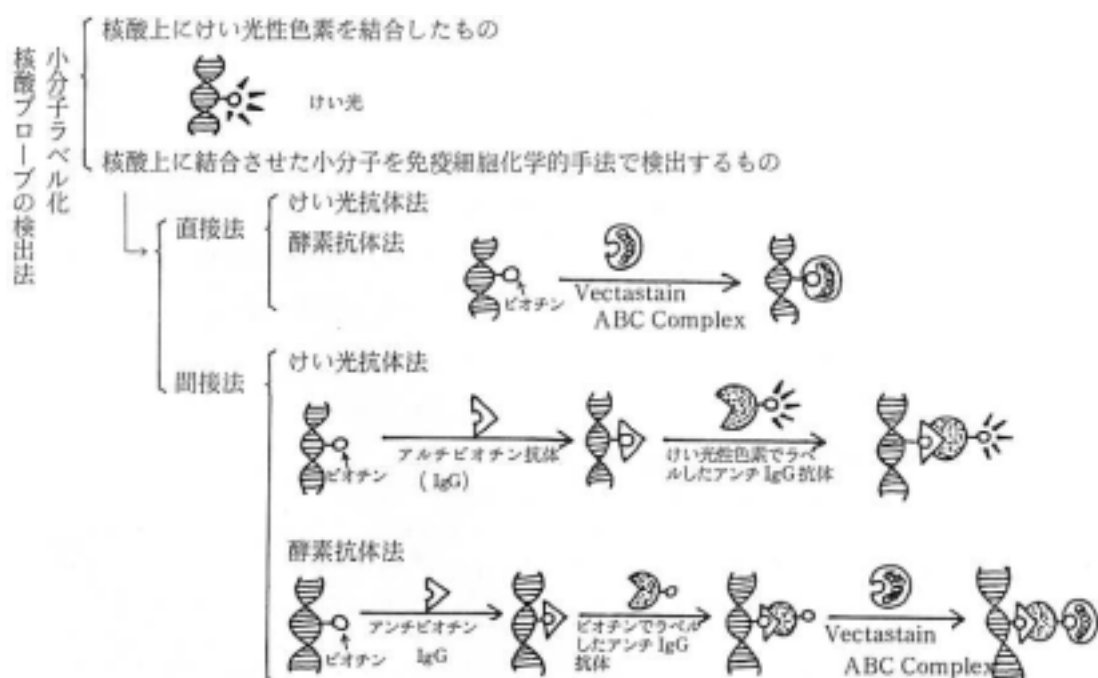


図3 小分子ラベル化核酸プローブの検出法
(IgG : 免疫グロブリンGタイプ; VectastainABC Complex : ペルオキシダーゼでラベルしたアビジン。ジアミノベンジジン塩酸塩等で発色できる。)

それぞれ「けい光抗体法」および「酵素抗体法」として常用されている手法である。けい光抗体法は、ラベルした色素のけい光をそのままけい光顕微鏡等で測定する。酵素抗体法では、酵素を発色剤によって発色させ光学顕微鏡で観測する。

これらの免疫化学的手法は、通常の細胞内成分の検出には有効であるが、核酸上に化学結合した抗原小分子に対しては、けい光が消光されやすいこと、核酸との相互作用のため酵素反応が阻害されること等の欠点がある。このため、核酸プローブ上の抗原を間接的に検出する方法が実施された。^{10,11)} この手法は、抗原を通常の抗体（修飾していない抗体）と作用させた後、第2の抗体（標識抗体であり、また第1の抗体を抗原とする抗体である）と反応させる方法である。標識抗体は、けい光性色素や酵素反応に活性な小分子（ビオチン等）によってラベルされている。間接法を用いれば、前述した直接法の欠点（けい光の消光や酵素反応の阻害）が改善される。また、同一の標識抗体を用いて様々な抗原の検出を実施できる利点がある。例えば、直接法では、アンチビオチン抗体やアンチアミノアセチルフルオレン抗体それぞれについてラベル化した抗体を合成しなければならないが、間接法ではラベル化したアンチIgG抗体を広く利用できる。

以上述べたように、免疫細胞化学的手法（間接法）を用いる検出法はかなり実用化の可能性が高いものであるが、迅速さのある程度犠牲とすることや小分子ラベルプローブでは2本鎖の安定性を減ずることなど、いまだ解決されねばならない問題も多い。しかしながら、「核酸プローブ法」は、遺伝子の検出法として従来法にはない簡便さや高選択性を持っており、今後さらに発展を期待される技術である。

〔文 献〕

- 1) A.Klausner, T.Wilson : *Biotechnology*, 472 (1983).
- 2) R.E.Thayer : *Anal. Biochem.*, 98, 60 (1979).
- 3) S.Razin, M.Gross, M.Wormser, Y.Pollack, G.Glaser : *In Vitro*, 20, 404 (1984).
- 4) J.H.Fisher, J.F.Gusella, C.H.Scoggin : *Proc Natl.Acad.Sci.USA*, 81,520 (1984).
- 5) D.S.Gerhard, E.S.Kawasaki, F.C.Bacroft, P.Szabo : *Ibid.*, 78, 3755 (1979).
- 6) A.Rodgers : *J. Cell. Sci.*, 38, 391 (1979).
- 7) J.G.J.Bauman, J.Wiegant, P.V.Duijin : *J. Histochem. Cytoche.*, 29, 227 (1981).
- 8) *Idem* : *Ibid.*, 238 (1981).
- 9) D.J.Brigati, D.Myerson, J.J.Laery, B.Spahholz, S.Z.Travis, C.K.Y.Fong, G.D.Hsiung, D.C.Ward : *Virology*, 126, 32 (1983).
- 10) R.R.L.Safer, M.Levine, D.C.Ward : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4381 (1982).
- 11) J.E.Landegent, N.Jansen, R.A.Baam, J.H.J.Hoeijmakers, M.Van der Ploeg ; *Exp. Cell Res.*, 153, 61 (1984).

お 知 ら せ

FT / IR フロッピーディスクシステムの設置（箱崎地区）

標記の FT / IR スペクトルデータ補助記憶装置が設置されました。これを利用すればスペクトルデータを長時間保存し、比較、演算を行うことができます。利用される方は、各自 8 インチフロッピーを御用意下さい。また、工学分室では、定量ソフトウェアも所持しており、これにより、検量線作成と未知試料スペクトルの定量が行えます。

移管装置（筑紫地区）

下記の装置がセンターに移管されましたのでご利用下さい。なお装置の仕様および利用料金などについては中央分析センター「案内（昭和 60 年 2 月発行予定）」を御覧下さい。

No.	装 置 名	場 所
1	走査型電子顕微鏡	電子顕微鏡室
2	質量分析計	質量分析室
3	ラバープレス	溶解加工室
4	雰囲気中液体急冷装置	〃
5	引上げ法単結晶作成装置	高純度試料作成室
6	核磁気共鳴吸収装置（R - 24）	磁気分析室（1）
7	磁気天秤	〃
8	自記分光光度計	分光分析室
9	赤外分光光度計（IR - 440）	〃
10	回折格子遠赤外分光光度計	〃
11	示差走査熱量計	熱分析室
12	直読式動的粘弾性測定装置	〃

X線回折計用 Fe 管球の購入（箱崎地区）

工学分室設置の X線回折計の対陰極は従来 Cu のみでしたが、今度 Fe 管球を購入しました。Fe 管球を使用すれば、Cu 管球では分析に不適である Co や Fe の分析が可能で、Mn、Cr、等の分析にも適しています。

高周波 2 程スバッタ装置の毀甘（筑紫地区）

この装置（昭和 59 年度特別設備 1 千万円以下）が、昭和 60 年 3 月中旬にセンター溶解加工室に設置されます。装置の仕様および利用料金などについては、次回のセンターニュース（昭和 60 年 Vol.2, No.4）でお知らせします。

エネルギー分散型 X線回折計取扱い説明会について（筑紫地区）

昭和 58 年度特別設備として設置されましたエネルギー分散型 X線回折計（装置の構成についてはセンターニュース Vol.2, No.1, P.6 を参照下さい）の取扱いに関する説明会を 2 月に行う予定です。日時、場所および受講の申込み方法などにつきましては 1 月に御案内しますので、御参加下さい。