シリーズ・バイオサイエンスのためのアイソトープ測定機器

Ⅲ. 液体シンチレーション計測用の試料調製装置[†]

高橋千太郎

放射線医学総合研究所内部被ばく研究部
263 千葉県稲毛区穴川 4-9-1

Key Words: sample preparation, liquid scintillation counting, heating shaker, microwave digester, sample oxidizer

1. 液体シンチレーション計測と試料調製

液体シンチレーション測定法は放射能の検出や測定のための高感度で多方面に応用のきく技術であり、 α -, β -, γ -線放出核種や電子捕獲核種に適用される。現在広く用いられている方法は、計数試料を直接液体シンチレータに混入する内部試料計数法である。このため、計数しようとする試料は、液体シンチレータ中に溶解、分散または懸濁する必要がある、種々の試料調製法が用いられている。試料調製は分析技術として液体シンチレーション測定がうまくいくかどうかの最も重要な部分で、測定に要求される精度を念頭におきながら試料調製を進めなければならない。液体シンチレーション測定試料の調製法に関しては、すでに多くの論文や総説があるが^{1)~4)}、固体試料については、主に以下のような方法が用いられている。

- a) 可溶化剤を用いた溶解法
- b) 灰化して懸濁液または均質溶液にする方法
- c) 燃焼によってガスまたは液体に変換する

る燃焼法

液体シンチレーション試料の調製は、一般に手作業で行われることが多い。しかし、試料の数が多い場合や高レベルで汚染の可能性の高い場合などは市販の装置を活用することによって、より安全かつ迅速な試料調製が可能となる。ここでは、①組織溶解剤を用いて試料を溶解する際に利用できる専用の加温装置、②試料を迅速に灰化できるマイクロウェーブ式湿式灰化装置、③ ^3H , ^{14}C に使用できる自動燃焼装置、を紹介する。

2. 組織溶解用振とう加温装置

2・1 組織溶解剤による試料調製

生体試料や電気泳動ゲルなどは、組織溶解剤を用いて溶解後、シンチレータと混合し均質試料として測定することができる。組織溶解剤としては第4級アンモニウム塩基が使用されてい

表1 液体シンチレーション試料溶解剤

商 品 名	メーカ一名	使用が推奨される 液シンカクテルの 商品名
BTS-450	Beckmann	READY PROTEIN
NCS II	Amersham	ACS II
SOLVABLE	New England Nuclear	ATOMLIGHT
Soluene-350	Packard	INSTA-FLUOR, HIONIC-FLUOR

† Instruments for Radiation Measurement in Bio-sciences. III. Sample preparation apparatus for liquid scintillation counting. Sentaro TAKAHASHI: Division of Radiotoxicology, National Institute of Radiological Sciences, 4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi 263, Japan.

だが、種々の改良がなされ、現在、市販されている主なものとしては表1のようなものがある。これらの溶解剤の組成、配合は公表されていないが、主成分は第4級アンモニウム水酸化物または塩化物である。一般に、これらの溶解剤を用いて動物組織などを溶解する場合、溶解を促進させるため40-50℃程度に加熱し振とうすることが推奨されている。また、血液などのような溶解後に強い着色のある試料は、正確な測定を行うために過酸化水素水で脱色する必要があるが、この際にも加熱することで反応が促進される。このような加熱には、一般に振とう装置のついた恒温水槽などが使用されているが、「LSC用組織溶解シェーカー」の商品名で専用の加熱装置が市販されている。この装置を使用すると一度に300本の標準バイアルを加熱、振とうすることが可能であり多数試料の処理に便利である。

2・2 装置の仕様と特徴

本装置の仕様をメーカーのカatalogより抜粋し表2に示した。本装置の第一の特徴は、液シンバイアル購入時に付属している紙箱をそのまま使用できることである。従来の振とう式恒温水槽ではバイアルを専用のラックに移し変える必要があり、非常に面倒であるが、本装置ではそのような必要がなく、標準バイアル用の紙箱をしっかりと保持し、振とうできる構造になっている。第二の特徴は、振とうに水平回転方式を採用していることである。水平の往復運動を用いる一般の振とう式恒温水槽では、しばしば試料がバイアルの壁に付着し、乾燥してしまう

というトラブルを経験するが、水平回転式の振とうではそのようなことは少ない。第三の特徴は、比例制御による温風強制循環加熱方式を採用していることである。これにより、比較的高精度で、かつ恒温水槽を用いた場合のようにバイアルを濡らすこともなく、長時間の安定した加熱が可能である。

2・3 実際に使用しての感想

本装置を使用する前、筆者らは、試料が少数のときは振とう装置付き恒温水槽を用い、試料数が多いときは大型の温風乾燥器内に水平回転振とう装置をいれたものを使用していた。このため、バイアルを各振とう装置専用のラックに移し変える必要があり、これが意外に時間のかかる作業であった。さらに、バイアルを紙ラックから振とう装置用ラックへ移し変える際の破損の危険性、バイアルの蓋が十分に閉まっていないためにおこる有機溶媒の飛散と放射能汚染の危険性、汚染させてしまったときの除染の困

表2 液体シンチレーション計測用試料の振とう式加熱装置

装置商品名：LSC用組織溶解シェーカー
メーカー名：(株)杉山元医理器
温度調節：室温+10~50℃, 比例制御方式
加熱・送風：水平温風強制循環方式, ニクロムヒーター500W
振とう方式：水平回転式, 振幅50mm, 0-100rpm
寸法, 重量：W520×D650×H650, 80kg
本体価格：約120万円

図1 液体シンチレーション試料調製用の組織溶解振とう加熱装置

難さなどを考えると、専用の装置を導入するメリットは大きい。また、図1に示すように、本装置にはガasketのついた蓋がつけられていて、処理中はチャンバー内を半密閉状態にできるため、安全性も高い。一方、実際に使用した経験から感じる本装置の一番の欠点は、その重量と大きさである。300本の液シンバイアルを振とうするためには本体をある程度重くする必要のあることは理解できるが、80kgもあると使用しないときに部屋の隅へ移動するといったことが困難である。必要な設置スペースも大きく、使用できる実験スペースが制限されることが多い放射線管理区域内に設置させるを得ない本装置の性格上、もう少しコンパクトな設計であることが望まれる。また、バイアルの内容物を誤ってこぼしたときのために、チャンバー内を凹凸のない除染の容易な構造にしておくべきである。

3. マイクロウェーブ式試料灰化装置

3.1 灰化による試料調製

組織溶解剤を用いる可溶化法は比較的操作が容易で試料の散逸の少ない処理法であるが、硬

質の試料（骨や植物繊維）には適用できないし、処理可能な量も、生体試料でおよそ100mg以下に限られる。硬質の試料や量の多い試料の場合で、測定しようとするRIが揮発したり、熱分解して散逸する可能性のないものであれば、試料を灰化して酸に溶解するか、あるいは灰分を微粒子にしてシンチレータに懸濁することで測定に供することができる。灰化には、高温で酸を加えずに灰化する乾式灰化法と、硝酸などの酸溶液を添加し灰化する湿式灰化法がある。灰化法の問題点は処理中に試料が散逸しやすく、装置や周辺環境を汚染させてしまう危険性が高いこと、灰化に長時間を要すること、高温の強酸溶液を使用するので安全性に問題があることなどである。しかし、最近、密閉もしくは半密閉状態でマイクロ波をもちいて試料を湿式灰化する装置が市販され始めた。この装置は、原子吸光分光分析やICP（誘導結合プラズマ発光分光法）といった化学分析に使用するために開発されてきたものであるが、液体シンチレーション用の試料灰化装置としても多くの利点を有している。ここでは現在、本邦で市販されている5機種について、その概要を紹介する。

表3 マイクロウェーブ式湿式灰化装置

型 式 名	MDS-2000	RMS-150	MICRODIGEST-301(A301)	MICRODIGEST-401
製 造 元	CEM 社	PROLABO 社	PROLABO 社	PROLABO
国内取扱い業者	アステック(株)	(株)アーンスト・ハンセン商会	(株)アーンスト・ハンセン商会	(株)アーンスト・ハンセン商会
マイクロ波出力	630 W	600 W	200 W	300 W
圧力コントロール	0-200 psi, 5段階	200 psi, 固定	なし	なし
1回に処理可能な試料数	12試料	12試料	1試料	1試料
処理可能な最大試料量	約1.0 g	約1.0 g	約2.0 g	約10 g
使用容器	120 ml, テフロン PFA	120 ml, テフロン PTFE	100 ml ホウケイ酸塩ガラス 石英ガラス, テフロン PTFE	250 ml ホウケイ酸塩ガラス 石英ガラス, テフロン PTFE
排 気	本体内蔵, 常時排気	別置き, 安全装置による	なし(別売フードに収容)	なし(別売フードに収容)
自 動 化	加熱処理のみ	加熱処理のみ	加熱, 溶液注入, 試料交換*	加熱処理, 溶液注入
本体寸法(W×D×H, mm)	489×457×609	545×370×330	240×440×400	220×380×525
重 量(kg)	41.7	約10	15.0	25.0
価格(本体と標準的な付属品)	約300万円	約375万円	約330万円 (*自動16試料交換のA301は約695万円)	約360万円

3・2 装置の仕様と特徴

現在、本邦で入手が容易なこの種の装置としては、CEM 社「サンプル前処理装置 MDS-2000 型」、PROLABO 社「マイクロウェーブダイジェスター RMS-150 型」、同じく PROLABO 社「マイクロダイジェスト 301 型、A301 型および 401 型」などがある。前者の 2 機種は 1 回に 12 試料を処理でき、比較的多数の試料の湿式灰化が可能であるが、酸溶液の添加や試料の交換は自動ではない。一方、後者の 3 機種は 1 回に 1 試料を湿式灰化する装置であるが、酸溶液の添加を自動で行い、さらに A301 型では試料の交換も自動で行うことができる。これらの装置の主な仕様を表 3 に示す。いずれの装置もマイクロ波を用いて加熱する点では同一原理であるが、多数試料を処理できる MDS-2000 型と RMS-150 型は、一般の電子レンジと同様に広範囲にマイクロ波を照射するのに対し、301 型、A301 型および 401 型は焦点を絞ったマイクロ波で試料部分を局所的に加熱する方式を採用し、試料の加熱状態の制御を容易にしている。また、前 2 機種ではテフロン製の試料容器を使用し、後 3 機種ではテフロン製以外に石英ガラス製の容器も使用できる。これらのことから、1 種類の酸溶液を用いて多数試料を同時に処理する場合は MDS-2000 型や RMS-150 型が、数種類の酸溶液を用い加熱状態を制御しながら、少数試料を極微量化学分析のために処理する目的には、301 型、A301 型および 401 型が適しているといえる。一般に、液体シンチレーション計測用試料の灰化では特に複雑な加熱パターンや酸溶液の添加は必要としないので、その意味では、前 2 機種で十分であるといえる。

このような装置を使用して放射性物質を含んだ試料を灰化する場合に問題となることは、試料の散逸に伴う装置や環境の汚染の問題である。MDS-2000 型や RMS-150 型では、試料容器は密閉されているが、規定圧より内圧が高くなると安全装置によって容器内のガスは放出さ

図2 マイクロウェーブ式試料灰化装置（アステック社、MDS-2000）および専用の密閉型試料容器

れる。MDS-2000 型ではこのような事態を想定して、装置の庫内は常時排気され、簡易ダクトをフードやドラフト内に導入して使用する設計である。一方、RMS-150 型は、本体とは別に排気装置が付属しており、本体側で安全装置が作動したとき自動的に排気装置が作動するようになっている。301 型および 401 型の容器は半密閉構造であり処理中に酸溶液が蒸発、散逸する可能性があるが、本体には排気装置等は設けられていない。したがって、フードまたはドラフト内に設置するか、別売の専用フードを購入する必要がある。フードの近くに設置された MDS-2000 型と、その専用試料容器を図 2 に示した。

3・3 実際に使用しての感想

筆者は、プルトニウムを含むマウス、ラットの臓器の湿式灰化に MDS-2000 型を使用している。本装置を導入する前は、ルツボに入れた試料を乾式灰化炉（電気オーブン）で灰化した後、酸溶液に溶解するか、あるいはサンドバスにビーカーをならべ組織と硝酸を入れて湿式灰化処理していたが、周辺を汚染させず安全に灰化するには、かなりの神経を要する作業であった。また、臓器の種類によるが処理時間も 10 時間以上が必要であった。これに対し、MDS-2000 型では密閉した状態で灰化処理が可能である。あらかじめ非汚染の試料を用いて、適当

な試料の量、必要な酸溶液量、出力制御値などを十分検討しておけば、試料容器内圧が高くなり安全装置が作動することによって、内部のガスが放出されてしまうこともない。また、処理に要する時間も数10分であり、作業性が格段に向上する。また、20種類の処理プログラムをメモリーしておくことができるので、たとえば、ラットの大腿骨、マウスの肺といった臓器ごとに専用の処理プログラムを作成、保存しておくことができる。

一方、本装置の従来法に比べた短所は、処理中に酸溶液の追加や加熱の程度の変更ができないことである。サンドバスに並べたビーカーであれば、灰化の状態を見て温度を下げたり、酸溶液を補充したりできるが、本装置では、あらかじめこれらの点について十分検討しておく必要がある。つまり、処理する試料の種類や量、1回に処理する個数、使用する酸の種類や濃度といった実験条件にあわせて、装置の出力や処理時間の最適条件をあらかじめ決めておく必要がある。したがって、本装置は毎回異なる少数の試料を処理するような用途には適さず、多数の同じ種類、同じ量の試料を処理するような場合に適している。また、本装置を放射性物質の灰化処理に使用する場合に生じる問題点として、廃棄物の問題がある。放射性物質で汚染した器具は、除染、洗浄して再使用するよりも、廃棄してしまう方が、排水の処理、コスト、放射線安全の面から有利なことが多い。たとえば、筆者らはプルトニウムを含む動物試料を湿式灰化するために用いたガラス製ビーカーは再使用せずに廃棄していた。しかし、本装置の専用試料容器は、1個2万円程度であり、使い捨てるには経費の面で難しい。また、廃棄する場合、ガラス製ビーカーのように粉碎して減容することが困難であり不燃性廃棄物の量が多くなる。安価で廃棄の容易な試料容器が開発されることを期待している。

4. 自動燃焼装置

4.1 燃焼法による試料調製

液体シンチレーション計測用の試料として調

表4 可溶化剤による溶解法と自動燃焼装置を用いた燃焼法との比較

	溶 解 法	燃 焼 法
適用核種	ほとんどすべて	^3H , ^{14}C
化 学 形	揮発性の高いものでは散逸することがある	燃焼可能なもの
原 理	4級アンモニウム塩基やアルカリによる加水分解	酸素気相下での燃焼
処理可能試料量	数十mg程度	数百mg程度
処理時間	数時間～数日	数分
問 題 点	クエンチング、着色、ケミルミネッセンス、液シンカケテルとの適合性	専用の装置を要する、回収率のチェックを要する、メモリー(キャリアオーバー)

製の難しいものには、固体試料（生体組織、ゲル、フィルタ、土壌など）や着色した試料がある。このような試料には、前述のように組織溶解剤を用いて可溶化した後、脱色する方法も用いられているが、クエンチングや化学発光による妨害、労力や安全性、測定できる試料量などの点で種々の問題がある。また、湿式灰化や乾式灰化による灰化法は、当然のことながら揮発性の高いアイソトープには使用できない。一方、燃焼法は、適用できる核種が ^3H , ^{14}C に限定され、専用の装置を必要とするが、可溶化法や灰化法による調製が困難な試料にも適用でき、比較的多量の試料を自動化して短時間で処理できるという利点がある。表4に、可溶化法と燃焼法の比較を示した。

試料を燃焼法で処理するためには、一般に、液体シンチレーション試料自動燃焼装置（サンプルオキシダイザー）が用いられる。この装置は、はじめに試料を燃焼室で酸素を流入させつつ完全に燃焼させ、 ^3H は H_2O 、 ^{14}C は CO_2 に変換する。発生した燃焼ガスは、冷却コンデンサに導入され、ここで水蒸気となった ^3H の凝縮が行われる。このコンデンサ内壁に付着した凝縮物は水または水蒸気を用いて ^3H 測定用バイアルに洗い流される。一方、 $^{14}\text{CO}_2$ を含む燃焼ガスは CO_2 吸着カラムへ導かれ、一般にアミン系の CO_2 吸着剤に捕集される。次に CO_2 吸着カラムは、 $^{14}\text{CO}_2$ 用シンチレータによって洗

図3 自動燃焼装置（サンプルオキシダイザー）の作動原理図

サンプルは①の燃焼カラム（アロカ社）または燃焼フラスコ（パッカード社）で燃焼され、燃焼ガスは②の冷却コンデンサに送られ、ここで水蒸気となった $^3\text{H}\text{H}\text{O}$ の凝結が行われる。次に、 CO_2 に変換された ^{14}C は③のカラムで吸収される

い流され、 ^{14}C 測定用バイアルに入る。このような試料の燃焼、捕集、シンチレータの添加は自動で行われ、最後に窒素ガスを用いて燃焼室や配管系、カラム等が洗浄される（図3を参照）。なお、本装置では ^{35}S は一般に SO_2 を経て SO_3 となり、配管内に強く付着して回収が困難な場合が多い。

このような専用の装置を用いず、簡単なガラスフラスコを利用して燃焼法による試料調製を行った報告もある。斉藤らは、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{51}Cr 、 ^{125}I を含むスミアろ紙を酸素を満たしたフラスコ中で燃焼させることで測定用試料を調製しており、小規模な実験室で燃焼法による試料調製を行う際には有用と考えられる^{5),6)}。

4.2 製品の仕様と特徴

本邦で入手の容易な燃料装置としては、アロカ社 ASC-113 型、パッカード社 307 型および 387 型がある。これらの機種仕様を表5に示す。なお、パッカード社 387 型自動サンプルオキシダイザーは、307 型をベースとし、これにサンプルやバイアルの交換を行う Oximate 80 型無人処理システムを付加したものであり、燃焼、凝縮、吸着等の処理方式は 307 型と同一である。

表5 サンプルオキシダイザーの主要なカタログ仕様と性能

	アロカ ASC-113型	パッカード307型
燃 料 室	燃焼管方式	酸素フラスコ方式
回 収 率	97%以上 (typical 99±1%)	^3H : 99±1% ^{14}C : 99±1%
メ モ リ ー	0.2%以下 (typical 0.1±0.05%)	^3H : 0.05%以下 ^{14}C : 0.05%以下
混 入 率	0.2%以下 (typical 0.1±0.05%)	$^3\text{H}\rightarrow^{14}\text{C}$: 0.001% $^{14}\text{C}\rightarrow^3\text{H}$: 0.02%
燃 焼 可 能 量	^3H : 乾燥物 300mg 湿潤物 500mg ^{14}C : 乾燥物 300mg 湿潤物 500mg	固体: 1.2 g 液体: 1.5 ml
試料処理能力	30~40試料/時	最大60試料/時
使用バイアル	標準とミニバイアル	標準バイアル
寸法(W×D×H)	960×530×800mm	940×450×810mm
本 体 重 量	約150kg	約100kg
本 体 価 格	約660万円	約930万円 (387型は約2 500万円)

2社の製品とも ^3H 、 ^{14}C を効率よく回収することを目的に設計されており、この点では、大差のない性能であるといえる。筆者の経験では、回収率は使用する吸収剤の種類や量でかなり変動するので、仕様書に示された回収率は、メーカーの指定する吸収剤を用いて得られるもっとも良い値であると考えべきである。メモリー（前のサンプル中の RI が次へもち込まれる率）や他核種への混入率については、仕様からみてパッカード 307 型の方が低いようであるが、実際の測定精度に大きく影響するほどの

差とは思えない。むしろ、実際の測定にあたっては、十分にメモリーや他核種の混入率について検討し、サンプル放射能の概要の傾向がわかっている場合には放射能の低いものから順に高いものへと処理するといった注意を払うことが重要である。

燃焼可能量はアロカ ASC-113 型が数百 mg まで、パッカード 307 型が 1.2 g までとなっている。これは前者の装置が試料の燃焼にカラム状の燃焼管を用いているのに対し、後者が酸素フラスコ燃焼法の原理を応用したフレイム燃焼室を用いていることによるものと推察される。燃焼室（管）は本装置の心臓部ともいえる部分であり、燃焼可能量だけでなく、回収率やメモリーにも関係するので購入にあたっては、メンテナンスの容易さも含めて十分に検討する必要がある。また、同じ重量でも試料の種類によっては、完全な燃焼をさせることが難しいものもあり、特に、タールや脂肪のような試料が難しい。したがって、実際に処理しようとする試料で燃焼が可能な量をあらかじめよく検討しておくことが必要である。また、このような試料では、ろ紙などに塗付すると完全な燃焼が可能となる場合がある。使用できるバイアルは、アロカ ASC-113 型では標準とミニバイアルの両方が使用できるが、パッカード 307 型では標準バイアルを使用することになる。いずれの装置も、ガラスバイアル以外にポリエチレンバイアルも使用できる。この他、パッカード 307 型では購入後においても無人処理システム Oximate 80 を追加できるという特徴を有している。この装置を付加するとサンプル調製の全工程を無人状態で 80 サンプル／ランで処理することが可能であり、多検体の試料調製の必要な事業所には有用であろう。

4.3 実際に使用しての感想

筆者は ^3H や ^{14}C の標識化合物を投与した動物臓器の試料調製に ASC-113 型を使用している。サンプルオキシダイザーを使用して感じる第 1 の利点は、組織溶解剤では可溶化が困難な試料（たとえば、動物試料では皮膚、毛髪、軟

骨など）でも、比較的簡単に液体シンチレーション試料に調製できることである。また、溶解することはできても溶解後に強く着色するので脱色が必要な試料（血液、糞など）にも有用である。サンプルオキシダイザーの第二の利点は、上記のことと関連するが、処理の原理が酸素気相下で燃焼させるだけであるので、可溶化法のようにクエンチングや化学発光の問題が少ないことである。試料の量や種類が多少異なってもクエンチングの補正や化学発光のモニターが必要ない。また、 ^3H と ^{14}C は測定前に化学的に分離されるので精度の良い二重標識実験が可能である。このようにサンプルオキシダイザーをもちいる燃焼法は種々の利点を有しており、すでに多くの事業所で導入されているが、（私の研究室も含めて）必ずしもすべての事業所で有効に利用されている訳ではない。その理由は、装置のセットアップやメンテナンスにかなりの手間と時間を要するためと思われる。燃焼室の清掃、ガスの供給や圧力調整、シンチレータや CO_2 吸収剤の補給、配管系の清掃、交換などにかかなりの時間と労力、技術を要する。したがって、日常的に多数の試料を処理し、専用の技術者を有する事業所では問題ないが、大学や研究所の RI 施設のように研究者自身が、何か月かに 1 回程度の実験に使用するような事業所では、せっかく導入しても活用が難しいといえる。燃焼室や配管系をカセット式のようなものにして、容易に交換、使い捨てできるようにすると有難い。また、今回紹介したいずれの装置もかなり大型の装置である。本体の設置スペースと作業スペースを合わせると、大型実験台が 1 台必要である。内部の配管系やポンプの設置方法を工夫した、よりコンパクトな装置の市販を希望する。

問合せ先:

組織溶解用振とう加温装置;

(株)杉山元医理器 〒113 東京都文京区本郷 2-34-9 Tel 03-3814-0285

マイクロウェーブ式試料灰化装置;

(株)アーンスト・ハンセン商会 (PROLABO 製品

発売元) 〒651 神戸市中央区小野柄通 7-1-18

(三宮ビル北館) Tel 078-251-3911

アステック(株) 〒169 東京都新宿区高田馬場 4-

39-7 (高田馬場21ビル) Tel 03-3366-0811

自動燃焼装置 (サンプルオキシダイザー);

バックカード・ジャパン(株) 〒101 東京都千代田区

岩本町 1-7-1 (瀬木ビル) Tel 03-3866-5850

アロカ(株) 〒181 東京都三鷹市牟礼 6-22-1

Tel 0422-45-5111

文 献

- 1) Knoche, H. W. : "Liquid Scintillation : Sample preparation and counting", In Radioisotopic Methods for Biological and Medical

Research, pp. 211-231, Oxford University Press, Oxford (1991)

- 2) 放射能測定および測定用試料調製法, "ラジオアイソトープ薬物代謝実験法", 日本アイソトープ協会編, pp.121-186, 丸善, 東京 (1981)
- 3) Peng, C. T. (石河寛昭監訳) "液体シンチレーション計測のための試料調製法", ボクスイ・ブラウン(株) (1978)
- 4) 草間慶一: "生化学実験講座 6, トレーサー実験法(上)", pp. 42-226, 東京化学同人 (1977)
- 5) Saito, K., Miyatake, H. and Kurihara, N. : *Anal. Biochem.*, **190**, 276-280 (1990)
- 6) Saito, K., Miyatake, H., Kobori, H. and Kurihara, N. : *Health Phys.*, **65**, 82-86 (1992)