デンシトメトリーに関する考察 (2)

東京医科歯科大学

島 尾 和 男

Notes on Densitometry (2)

Tokyo Medical and Dental University

Kazuo Shimao

A new and easy method for the calibration of densitometers was proposed by which linearity of photoelectric current and uniformity either of illumination of slit or photosensitive surface of photocell can be tested. The method consists in scanning of a black paper having a triangular hole (wedge type) with the densitometer to be tested. Two of the densitometers commercially available in Japan were tested by the method. Errors due to nonlinearity of photoelectric current were illustrated.

I 緒 言

前報¹⁾ではデンシトメトリーをおこなう場合に、白地が吸光度の測定値におよぼす影響を中心として、デンシトリーによつて定量分析をおこなう際の基本的な問題について述べた。この種の問題の実験的検討をおこなうに際して、デンシトメーターの検定法について簡単にふれておいたが、この報告では検定法についてさらに詳しく述べるとともに、市販のデンシトメーター2例についての検定の結果および直線性(後出)のないデンシトメーターによる測定値と直線性をもつたデンシトメーターによる測定値の比較検討の結果について報告する。

検定法をのべるに先立つて、まずデンシトメーターが具備すべき条件について考察することにする。デンシトメーターは光源の安定性、光電流の安定性、機械的機能の正確などをそなえていなければならないことは勿論であるが、さらに次にのべる3つの条件をもっていることが必要と考えられる。

- 1)* スリットのどの部分も一様な明るさで照明されていること。
- 2)** 光電池の受光面が一様な(分光電流)感度をもっていること。
- 3)*** 光電流が入射光量に比例すること。

前報¹⁾においてものべたように、理想的な電気泳動図についてデンシトメトリーをおこなう場合には、直線性***をもつたデンシトメーターを用いれば、スリット照明の一様性*は必ずしも正しい吸光度の測定に必要で

はないのであるが、完全に理想的な電気泳動図を作ることとは非常に困難であるので、理想的でない電気泳動図についての測定値を補正して正しい値を算出することの必要な場合も起り得るし、またペーパークロマトグラムの測定においては着色部分の形は円形または長円形であることがむしろ普通なので、白地の影響の補正をおこなうことが必要である。この種の補正を照明の一様性、および感度の一様性のないデンシトメーターによる測定値に対してほどこすことは不可能に近い。直線性がデンシトメーターの具備すべき条件であることはいまさら多言を要しない。このような考察から上述の3つの条件が必要と考えられるので以下にその検定法について述べることにする。

II 実験方法

1. 楔形の穴をもつた黒紙による検定法

デンシトメーターの電気泳動図をはさむ部分に、第1図 a, b, c, に示したような楔形の穴をもつた黒紙(乾板の包装紙など)をはきんで、デンシトメトリーと同様に、黒紙を一定距離づつ動かして、電流計のふれを透過率目盛でよんでゆく。楔形の穴の巾の最も広い部分はスリットにより照明される部分よりも広くしておき、電流計の最大のふれが透過率目盛 100.0%を示すように調節しておいてから測定をおこなう。

この測定では、黒紙が一定距離移動するごとに、スリットの有効な長さが一定値づつ増加(または減少)するわけであるから、前項 1)~3)の条件を兼ねそなえた理

* 照明の一様性 ** 感度の一様性 *** 光電流の直線性あるいは単に直線性とよぶことにする。

想的なデントミーターでは、電流計のよみを黒紙の横方向の長さに対してプロットしてえられる図形は第1図dのI（破線）に示されるような屈折した直線となるはずである。楔形の穴の位置がaであるような場合についてだけこの結果がえられることは、デントミーターが照明および感度の一様性をもっているための必要条件であるが十分条件ではない。スリットの有効長が一定値だけ長くなつたとき、光量の増加が一定値より大きく（または小さく）なると同時に新しく照らされるようになった光電池受光面の感度が、一定値よりも小さく（または大きく）なつたために、プロットの結果がみかけ上直線になるということもないとはいえないからである。

しかしながらこのような事情がスリットのあらゆる部分、光電池受光面のあらゆる部分について成立っていることは極めて稀なことと考えられるので、第1図aの楔形の穴の位置で同図d Iのプロットがえられるならば、デントミーターは正しいといつてもほとんど誤りを犯すことはないが、第1図bあるいはcのような位置についても同じ結果がえられるとをたしかめれば更に確実である。

一方プロットの結果が曲線となりしかも楔形の穴の位置が第1図aおよびbのいずれから同じ形の曲線がえられる場合には照明および感度の一様性は成立っているが、直線性が成立しておらず、得られた曲線は光量と光電流の関係を示すぐらふとなる。

照明または感度の一様性が成立していない場合には、楔形の穴の位置をかえた時えられるプロットの結果が重なり合わない。この場合楔形の穴の位置が第1図aおよびbの時えられる2つの曲線が、第1図の点Aに関して対称ならば直線性は成立しているものと考えてもよい。これらの場合以外については、この検定法のみから照明の一様性、感度の一様性、直線性を個々に検討することはむづかしい場合が多い。

2. 光学楔による検定法

前項の方法による検定の結果が、最後にのべた場合の結果になつた時は、光学楔を用いて直線性の検定をおこない、これと前の結果をあわせて照明および感度の一様性を検討することになる。

中性ガラスまたは中性フィルターの光学楔（あるいは乾板感度測定用の中性フィルター）による直線性の検定法については周知であるが、この種のものが場合によっては入手が困難であるので、ここでは濾紙電気泳動に頻用されるアミドブラック 10B の光学楔を用いる方法について述べる。

平面図

第2図 a

第2図 b

第2図aに示したような硝子製の枠に、アミドブラック 10Bを 0.05%にとかした 1.0%精製寒天温溶液（～90℃）を流しこんだ後、ガラス板のふたを第2図aに示したように斜めにかぶせ、室温に放置してゲル化させた

後にふたをはずし室温で乾燥することによつて、色素濃度がガラス板の長さの方向に直線的に変化しているような光学楔を作つた*。(第2図b)この光学楔についてデンストメトリーをおこなつて、楔上の位置と吸光度のよみの関係をプロットすることによつて直線性の検定をおこなつた。なお製作した光学楔を日立分光光度計付属のデンストメトリー装置で $600m\mu$ および $550m\mu$ で検定したところ、第3図aのように色素濃度は光学楔の長さの方向に直線的に変化していることが確かめられた。

Ⅲ 実験成績

1. 楔形の穴をもつた黒紙による方法

第1図dのⅡおよびⅡ'は東洋理化学工業製 S-2 型デンストメーターについての実験成績である。

この成績からスリットの上部の照明の弱いこと、および直線性がほぼ成立つていていることがわかる。第1図dのⅢおよびⅣは夏目製作所製デンストメーター(製品番号 H. M. 610101)についての成績であるが、これからは照明および感度の一様性は成立つているが、直線性が成立つていないこと、さらに直線性のずれはスリットの中が

太くなると大きくなることがわかる。

2. アミドブラック 10B 光学楔による実験

第3図bのⅠ～Ⅳは東洋理化学工業製品、Ⅴは夏目製作所製品についての実験成績である。この方法によつても後者は直線性をもつていないことがわかる。

3. 直線性からのずれが測定値に及ぼす影響

第4図は同一の寒天電気泳動図〔文献2〕の第3図, No. 26〕を上記2種のデンストメーターを用い、いくつかの条件のもとで測定した時の測定値のプロットおよび吸光度の総和と各分割の百分率を示す。吸光度のスケールはどのプロットについても一様にとつてあるが、図からみられるように、楔形の穴をもつた黒紙による検定の結果が第1図dのⅢ,Ⅳのような形となる場合では、吸光度の測定値はかなり小さくなる。このことは第3図bの曲線ⅠとⅤを比較すれば当然予期されることである。各成分の百分率においても、直線性のある場合とない場合を比較すると、前者においてアルブミン値の低いことがみられる。

Ⅳ 考 察

Ⅱ-1 で述べたことから、第1図dの曲線ⅢおよびⅣは、それぞれの測定条件における光量と光電流の関係を表わすものである。したがつてこれらの曲線から、それぞれの条件のもとで、夏目製作所製品による吸光度の測定値(E')がえられた時、真の吸光度(E)は如何なる値をとるかということを経算することができる。その結果を第5図に示す。これらの図は使用した夏目製作所製品でえられるみかけの吸光度(E')と真の吸光度(E)の関係を示すもので、曲線Ⅰ及びⅡはそれぞれ第1図dの曲線ⅢおよびⅣから求めたものである。 E' は E よりも小さく、 E'/E は E が小さくなるほど小さくなる。同じ電気泳動図と同じデンストメーターで測定しても、測定条件によつて異つた吸光度がえ

第 3 図

* 1%寒天温溶液にパイロット製図用黒インキを 1% (v.v.) にとかしたものをを用いると、中性光学楔に近いものをつくることができる。東洋理化学工業 S-2 型デンストメーターによる測定では、白色光に対する吸光度が 0.484 の場所を橙色、緑色、赤色フィルターを用いて測定したところ、それぞれ 0.444, 0.472, 0.390 という吸光度測定値がえられた。比較的自作しやすい中性フィルター光学楔として便利なものと考えるので追記する。

られる（第4図参照）ことの原因は、それぞれの測定条件のもとでの直線性からのずれの違いにあるわけである。

第1図Ⅲを測定したと同じ条件のもとでアミドブラック 10B の光学楔について吸光度を測定した結果(第6図Ⅱ)から第5図の曲線Ⅰを用いて真の吸光度を求めたのが第6図Ⅲである。第6図Ⅰは同じ光学楔を東洋理化学工業製品で測定した値をプロットしたものであるが、ⅠとⅡがほとんど一致していることは上記の補正の方法がほぼ正当なものであることを示している。両者の絶対値のわずかのちがいは使用しているフィルターの相違によるものと考えられる。

第4図に示した同一電気泳動図についての測定結果は第5図または第6図から具合よく説明される。夏目製品による吸光度が東洋理化工業製品による値よりも小さいことは第5図および第6図から明らかである。また夏目製品によるアルブミンの百分率が大きいことは、第5図Ⅰ、Ⅱにみられるように E'/E がEが小さくなるほど減少することから説明がつく。直線性からのずれのちがいため、EとE'の関係が第5図ⅠとⅡのように異なれば、えられる各成分の百分率も異なつてよさそうであるが、第4図Ⅲ、Ⅳにみられるように百分率の変化は少ない。これは一見不思議であるが、測定された吸光度の大部分

を占める範囲（真の光吸度でいつて 0.050~1,000）では第5図の曲線ⅠおよびⅡの種類の曲線から E' の比を求めると、その値はほぼ一定であることから説明がつく。

スリットの巾や長さのような測定条件を変化させて、ほぼ理想的な電気泳動図について測定した時、各成分の百分率がどの条件のもとも一致するという事は、上記の事実がらも判るように、デンストメーターが直線性をもっているということの保証にはならないのである。各成分の百分率のみでなく吸光度の絶対値自身がスリットの巾や長さを変えても変化しないことが大切である。

楔形の穴をもつた黒紙を用いる方法は、簡単な方法ではあるが、楔形の穴の位置を変えることにより、デンストメーターの照明、感度の一様性、直線性を検定するのに有効に用いられることは上記の通りである。

直線性のみを検定するために光学楔を用いる方法は周

知の方法でたとえば E. M. Crook³⁾ は中性ガラスを用いている。アミドブラック 10B の光学楔のような、色素を用いる光学楔では、色素の分光吸収曲線と使用するフィルターの分光透過率曲線の形の如何により、直線性をもったデンシトメーターを用いても検定の結果が直線からわずかに外れることは第 5 図 I ~ IV にみられる通りである。この種の実実は例えばブロムフェノールブルー溶液についても観察されている⁵⁾。したがってアミドブラック 10B のような、色素の光学楔による検定法では、直線性の精密な検定をすることはできないが、大体のことは見当がつく。この種の実験はむしろ寒天膜内の色素について、どの程度まで Beer の法則が成立つかを、直線性をもったデンシトメーターで検討するためにおこなうべきものといえよう。中性ガラスあるいは中性フィルターの光学楔を用いればフィルターの相違による困難を防げることは勿論である。

ここに使用したデンシトメーターの 2 例は必ずしも各メーカーの製品を代表するものではない。文部省科学試験研究「濾紙電気泳動法の標準化に関する研究」班において進行中の実験によれば、製造年月の古い型の夏目製作所製品の直線性は、筆者の検討したものよりかなりよいようである。また東洋濾紙株式会社製のデンシトメーターについて筆者と小林が検討した結果では、この製品

についてもこの報告でのべた夏目製品程度の直線性からのずれがみられる。濾紙電気泳動法による正常人血清蛋白分層値に実験者間にかなりの相違がみられること⁴⁾は久しく問題となつている点であつて、その原因の何分の一かがデンシトメーターに起因していることはかねてから指摘⁴⁾されているが、市販されているデンシトメーターについてその生命ともいふべき直線性がかならずしも成立つていない現在、各研究者がそれぞれのデンシトメーターを検定した上で使用することが必要であると考えると同時に、メーカーに対しては製品の性能に関する十分な検討を望みたい。直線性からのずれが、たまたま筆者の使用した製品についてのみみられるものであるとすれば研究者の 1 人として喜ばしいことである。

V 総 括

1. 楔形の穴をもった黒紙を用いるデンシトメーターの検定法についてのべた。この方法は簡単におこなうことができるばかりでなく、デンシトメーターの照明、感度の一様性および直線性をかなりよく検定することができる。
2. アミドブラック 10B 光学楔の作り方とこれを用いる直線性の大きな検定法についてのべた。
3. 市販のデンシトメーター 2 例について上述の方法による検定の例をあげた。
4. 上記のデンシトメーターによる測定例を検定の結果から説明した。

この研究に際しては東京医科歯科大学歯学部生化学教室、東京大学医学部生化学教室、東京厚生年金病院臨床検査科から実験上多大の便宜を提供された。また本研究は文部省科学試験研究費に負うところ大である。記して深謝の意を表する。

文 献

- 1) 島尾和男; 生物物理化学, **5**, 1 (1958)
- 2) 島尾和男; 生物物理化学, **5**, No. 2, 72 (1958)
- 3) Crook, E. M. et al.; Biochem. J. **56**, 434 (1952)
- 4) 濾紙電気泳動標準法委員会, 生物物理化学 **4**, No. 3, 4, 62 (1958)
- 5) Klaskin, G. et al.; J. Lab. Clin. Med. **48**, 476 (1956)

訂正 前報¹⁾の 6 頁, 左欄下から 8 行目 ... $2sb=0.5$ の時 ..., および下から 2 行目 ... $2sb$ が 0.5 ... の 0.5 は 0.8 の誤りにつき訂正する。