

# Mitochondria の 90° 光散乱, pyridine nucleotide の 螢光 及び酸素消費量変化の同時測定装置の試作

岡山大学医学部癌研代謝部

内 海 耕 慥  
山 本 剛 禧  
浦 上 博 之

岡山大学医学部病理学教室

西 風 桂 子

〔昭和 39 年 3 月 13 日 受稿〕

Mitochondria の構造と機能に関する研究はその energy transducing mechanism と関係して近年著しく進歩して来た<sup>1)</sup>。特に細胞内エネルギー代謝制御機構の研究は生化学の分野に於ける大きな課題であり、mitochondria の解体再構成法とあいまつて、intact な mitochondria のエネルギー代謝に関連した形態変化が注目される所となつている。私達は癌細胞に於けるエネルギー代謝調節機構を研究する一つの方法として、mitochondria が示す酸素消費を oxymetric に測定し酸化的磷酸化能を測るとともに、これら酸素消費にともなつて示される mitochondria 内結合型の pyridine nucleotide の酸化還元及び mitochondria の構造変化を同時に記録測定することを試みその装置を試作することに成功した。本論文では主としてこの装置について記述し、ラット肝より分離した mitochondria で見られる酸素消費、pyridine nucleotide の酸化還元、形態変化の三者の関係について述べる。

## 装置の概略

本装置は反応液中に溶存する酸素張力の変化、即ち、mitochondria 或いは遊離細胞等が示す酸素消費量を測定する oxymeter と、mitochondria の swelling-shrinkage として知られている容積変化測定のための 90° 光散乱装置及び mitochondria 内結合型 pyridine nucleotide 酸化還元を測定する螢光分光装置の三者より構成されている (図 1, 2)。

### 1. オキシメーター (oxymeter)

oxymeter は萩原氏考案<sup>2)</sup>によるセミクロウズシステムの回転白金電極によるポーラログラフィック法に従つて作製した。即ち、液槽は図 3 の如き長方体の三面石英ガラスよりなる light pass 1cm, 容積 2ml の cell 中に回転白金電極を挿入し、電解電圧

は  $-0.6V$  とし配線はすべて萩原氏法<sup>2)</sup>に従つた。Cell は図 3 に示す如く一面及び上面にそれぞれ 2 個の小穴をもうけ、上面の中心にある穴より回転白金電極を挿入し他の穴は物質添加のために使用、又、側面の一つの穴は KCl-寒天橋によりカロメル半電池に導き、一つの穴は添加物攪拌のため細いビニール管で攪拌用ピストンに連結した。記録計は横河電機製作所の電子式大型記録計 (60 型 ER) を使用し

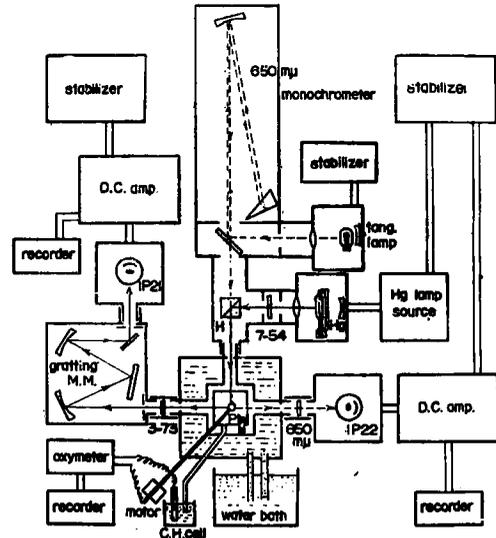


Fig. 1. Outline of the apparatus.

tang. lamp: tungsten lamp, monochromator: Prism monochromator, H: half mirror, 650 mμ: 650 mμ filter, 1P22: photomultiplier, D. C. amp.: D. C. amplifier, recorder: autorecorder, stabilizer: stabilizer, Hg lamp source: mercury lamp source, Hg: mercury lamp, 7-54: Corning No. 7-54 or Hitachi 365 mμ filter, 3-73: Corning No. 3-73 filter, grating M. M.: grating monochromator, 1P21: photomultiplier, Pt: rotating platinum electrode, motor: synchronous motor, C. H. cell: caromel half cell, oxymeter: oxymeter constructed by the method of Hagihara<sup>2)</sup>.

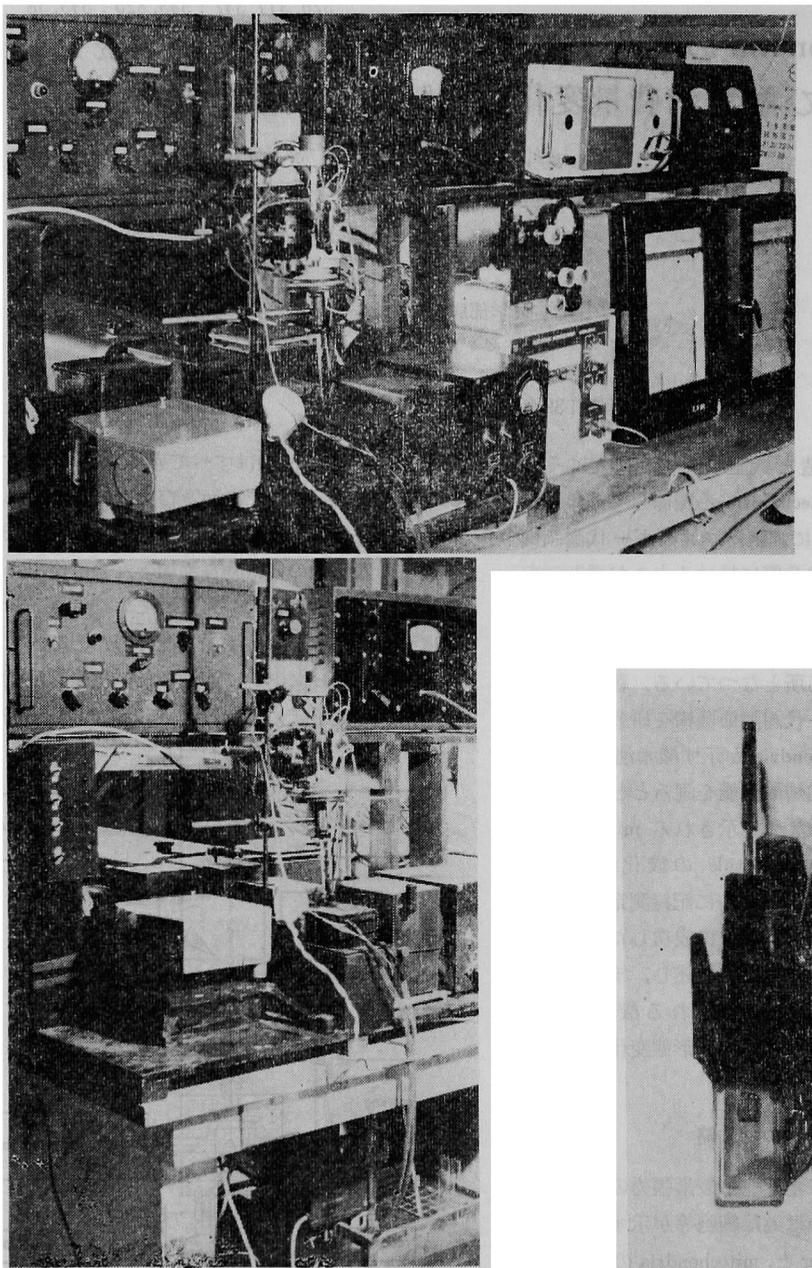


Fig. 2. Photographs of the apparatus.

た。又試料 cell の外側は一定の温度に保てる様恒温槽を取付けた。このようにして作られた oxymeter はコハク酸基質下  $25^{\circ}$  の反応で正常ラット肝 mitochondria 1 mg 蛋白当り  $10 \mu\text{M}\text{O}_2/\text{min}$  の酸素消費を示し Warburg マノメーターの測定値とほぼ一致した値を得る事が出来た。又 cell 内溶存酸素を  $\text{N}_2$  ガスにて取除き30分間回転白金電極を回転し続けた状態に於て酸素の溶解は  $10 \mu\mu$  atoms 以下で、10

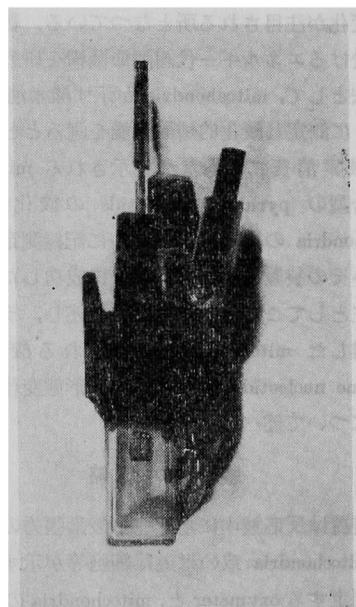


Fig. 3. Photograph of a cell for polarographic,  $90^{\circ}$  light scattering and fluorometer.

分以内の反応時間中に於いて溶入する酸素による誤差はほとんど考慮に入れなくてもよい。感度その他は萩原氏考案によるものとはほぼ同じ様に製作した。

## 2. $90^{\circ}$ 光散乱装置

図1, 2に示す如く、光源は定電圧電源をもつタングステン灯をプリズムモノクロメーターにて分光し  $650 \text{m}\mu$  の光線を cell に導き、その光に対し  $90^{\circ}$

方面に図4に示す 650 $\mu$  のフィルターを置き pyridine nucleotide の螢光 (440~445 $\mu$ )<sup>3)</sup> を完全に除去し, 図5に示す様な感度曲線をもつ光電増巾管 1P22 にて受光し直流増巾器にて増巾, 横河電機製

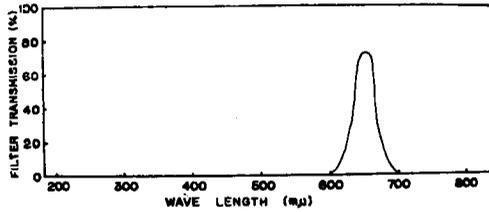


Fig. 4. Typical transmittance curve of filter for registration of 90° light scattering at 650 $\mu$ .

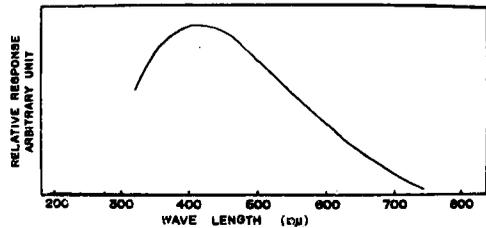


Fig. 5. Typical relative response curve of photomultiplier 1P22 for registration of 90° light scattering at 650 $\mu$ .

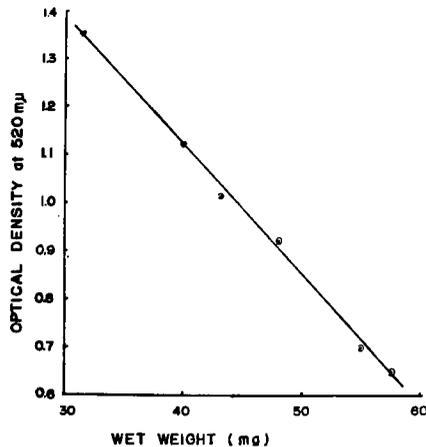


Fig. 6. Relation between the optical density at 520 $\mu$  and wet weight of mitochondria in equal protein contents. Rat liver mitochondria (0.5g tissue equivalent) were added to 50ml of 0.15M KCl-0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing Na-oleate ranging from 0.001 to 0.005 per cent and were incubated at 25° for 40 minutes. The changes of optical adsorbancy after incubation at 520 $\mu$  were measured using 1.0cm cell. The mitochondria were collected by centrifugation and wet weight were determined.

作所の電子大型記録計 (60型 ER) にて記録, 650 $\mu$  による 90° 光散乱を百分率にて示すようにした.

此の装置で示される mitochondria の swelling-shrinkage 度合は 520 $\mu$  の吸光度による膨潤収縮度合や 520 $\mu$  の 90° 光散乱で示されるそれと完全に平行し, 図6, 7に示す如く 650 $\mu$  で示される

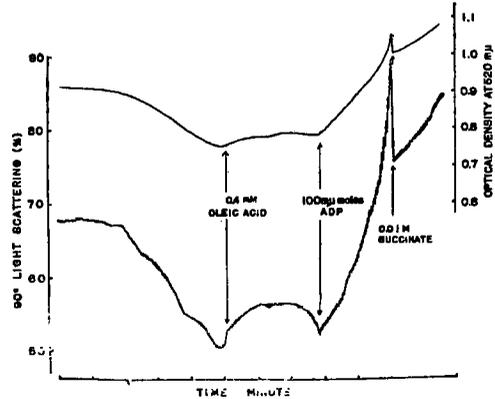


Fig. 7. Relation between the changes of optical absorption at 520 $\mu$  and changes of 90° light scattering at 650 $\mu$  of mitochondria. Mitochondria were incubated in 2ml of 0.05M sucrose, 40 $\mu$ M EDTA, 20mM KCl, 20mM K-phosphate buffer (pH 7.4) at 24°.

90° 光散乱の値は mitochondria 内含水量の変化を示すものと考えられる。(注, この場合 mitochondria 量が 3mg protein/ml を越える時は 90° 光散乱値と膨潤収縮度合は直線的関係からはずれる)<sup>4)</sup>.

### 3. 螢光分光装置

オリンパス光学製の紫外線顕微鏡用の水銀灯を光源とし, 図8に示す如き可視光線不透過の Corning

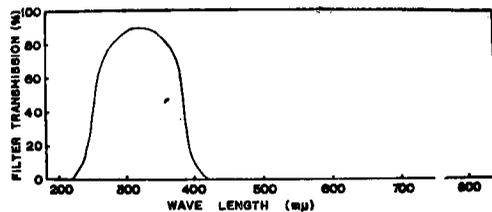


Fig. 8. Typical transmittance curve of filter Corning No. 7-54 for excluding visual radiation above 410 $\mu$ . It was used for excitation light.

7-54 (9863) あるいは日立製作所の 365 $\mu$  フィルターにて主として 365 $\mu$  の輝線を励起光とし, 650 $\mu$  の光路に半鏡を挿入し cell に導く. Cell 内の mitochondria の pyridine nucleotide の発する螢

光は  $445\text{ m}\mu$  に最大螢光を示す。従つてこの螢光を得るため、Corning 3-73 (3389) (図9) にて励起光を完全に取除き、更に Farrand Optical Co. INC. の grating monochromator にて分光し  $445\text{ m}\mu$  の螢光のみを受光部に導いた。このようにして得られた光を図10に示す如き  $450\text{ m}\mu$  附近に最も高い感度

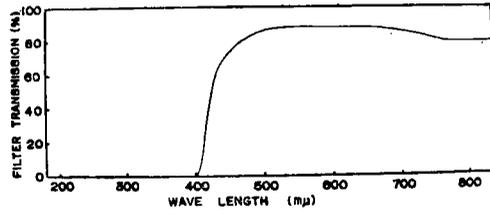


Fig. 9. Typical transmittance curve of filter Corning No. 3-73 for excluding ultraviolet radiation above  $410\text{ m}\mu$ . It was placed before grating mirror monochromator to eliminate direct primary scatter and possible second order ultraviolet transmission above  $430\text{ m}\mu$ .

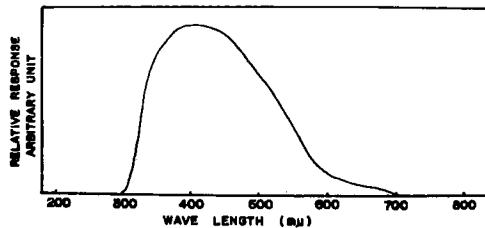


Fig. 10. Typical relative response curve of photomultiplier 1P21 for registration of fluorescence light.

をもつ光電子増倍管 1P21 で受光し、直流増巾器にて増巾し東亜電波工業の高感度記録計 EPR-2T 型で記録した。従つてこの装置により  $365\text{ m}\mu$  で励起された pyridine nucleotide は  $440\sim 445\text{ m}\mu$  の螢光を發し励起光の爽雜なしに  $440\sim 450\text{ m}\mu$  の螢光度を測定出来る。Farrand 螢光分光光度計により測定された mitochondria の pyridine nucleotide の螢光と本装置を使用して測定されたそれを比較し本装置の信頼度を確かめて見た。即ち、Farrand 螢光光度計の cell に自動回転攪拌棒を挿入し外側から試薬を導入する様考案し、光学系はクセノンランプの光を Corning 7-54 にて可視光を取除き、grating monochromator にて分光、cell から出る螢光は Corning 3-73 にて励起光を取除き螢光のみを取出し、更に grating monochromator にて分光、光電管 1P21 にて受光し東亜電波工業の高感度記録計 EPR-2T 型にて記録した。このような光学系をもつ螢光分光装置にラット肝より分離した mitochondria 約  $0.5\text{ mg}$

protein を  $0.1\text{ M}$  sucrose  $3\text{ ml}$  中に懸濁し、励起光を  $360\text{ m}\mu$  として mitochondria 内 pyridine nucleotide の螢光を分光すると図11の如く  $445\sim 450\text{ m}\mu$  に最大螢光をもつ  $420\sim 620\text{ m}\mu$  の広い螢光を示す。勿論この場合、 $410\text{ m}\mu$  以下の励起光の爽雜はない。又、 $450\text{ m}\mu$  を受光光とし励起光を変化せしめる時図12に示す如く、 $330\sim 340\text{ m}\mu$  の光で最もよく励起されるが可視部の爽雜は Corning 7-54 で完全に

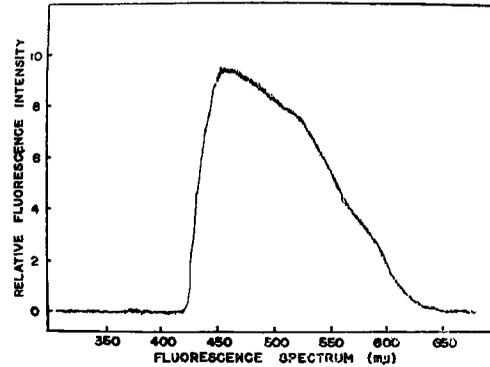


Fig. 11. Fluorescence emission spectrum of reduced pyridine nucleotides of rat liver mitochondria suspended in the medium of  $0.1\text{ M}$  sucrose,  $20\text{ mM}$  KCl,  $5\text{ mM}$  Tris-HCl buffer (pH 7.4),  $50\text{ }\mu\text{M}$  EDTA,  $1\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $3\text{ mM}$  K-phosphate buffer (pH 7.4) and  $3\text{ mM}$  Na-succinate. The curve was obtained by excitation at  $365\text{ m}\mu$  using Farrand fluorometer.

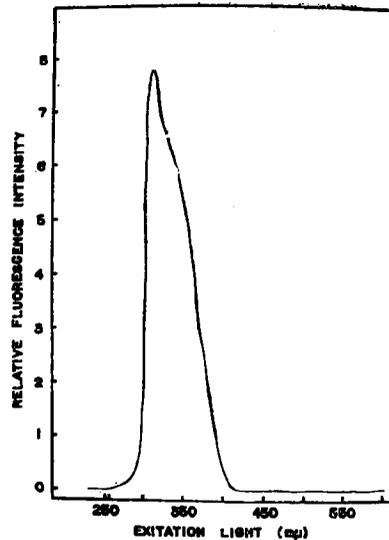


Fig. 12. Excitation spectrum of reduced pyridine nucleotide fluorescence of rat liver mitochondria in the medium as described in Fig. 10. The curve was obtained by registration at  $450\text{ m}\mu$  using Farrand fluorometer.

取除かれる。即ち、この光学系に於いて mitochondria の pyridine nucleotide は励起光の光散乱の爽雜を全く受けず螢光の強度を示す事が明らかである。試作の装置について 365 m $\mu$  を励起光とした場合も図 13 に示す如くほとんど Farrand 螢光分光光度計と

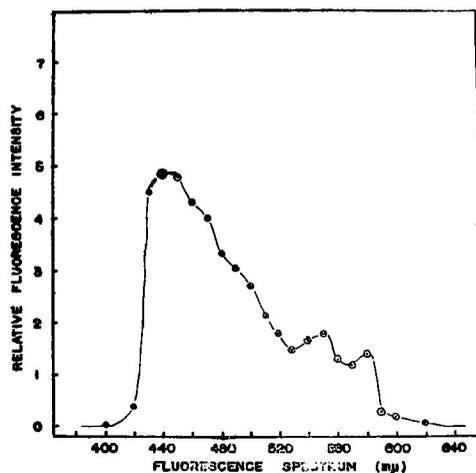


Fig. 13. Fluorescence emission spectrum of reduced pyridine nucleotides of rat liver mitochondria in the medium as described in Fig. 10. Curve was obtained by excitation at 365 m $\mu$  using the apparatus constructed by the authors.

同一の螢光曲線を得ることが出来た。この場合螢光のスペクトラムは 440~450 m $\mu$  に最大エネルギーを見た。従つて実験に当つては螢光は 440~455 m $\mu$  で受光した。今、同時に分離された mitochondria を同一の反応液中に懸濁せしめ、Farrand 螢光分光器及び試作の螢光分光器により同一の反応を行わしめ、その pyridine nucleotide の酸化還元を記録し比較すると図 14 の如く全くその反応様式は封合し、本装置で十分に還元型 pyridine nucleotide の量的変化を測定出来る事が明らかになった。(ここで注意すべきは添加剤の 360 m $\mu$  の吸収による quenching である)

以上の事から試作の装置により pyridine nucleotide の螢光と 90° 光散乱を同時に二つの波長で測定出来る可能性が示唆されるが、実際両者を同時に測定し、各々の光源を点滅してその影響をみると図 15 に示す如く 90° 光散乱には 360 m $\mu$  の励起光や pyridine nucleotide の螢光は全く関係せず、又、650 m $\mu$  の 90° 光散乱用光線は pyridine nucleotide の螢光に全く関与しないことから二つの光源でそれぞれ pyridine nucleotide 及び 90° 光散乱を同時に測定し得ることが明らかになった。

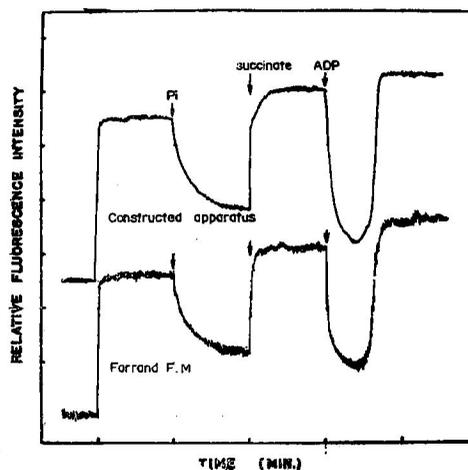


Fig. 14. Comparison of curves of fluorescence intensity of pyridine nucleotides in rat liver mitochondria obtained by using fluorometers of Farrand and the constructed apparatus. Mitochondria were suspended in the medium as described in Fig. 10 except K-phosphate and Na succinate. Added reagents were 3 mM K-phosphate, 3 mM Na-succinate and 100  $\mu$ M adenosine-diphosphate (ADP).

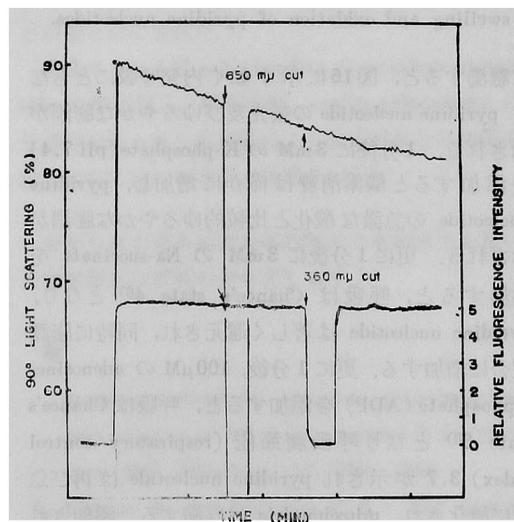


Fig. 15. Effect of excitation light or fluorescence emission light on the 90° light scattering at 650 m $\mu$  and 650 m $\mu$  light for 90° light scattering on the fluorescence emission light.

#### 本装置を使用し測定した実験の一例

前報で述べた Hogeboom の変法<sup>5)</sup> で分離されたラット肝 mitochondria を 0.1M sucrose, 20 mM KCl, 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 50  $\mu$ M EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub> よりなる cell 内の incubation mixture

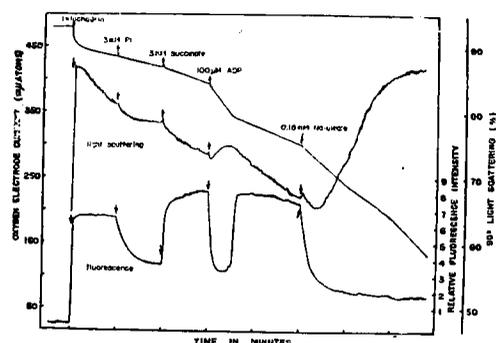
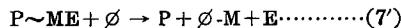
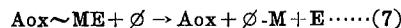
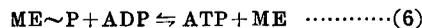
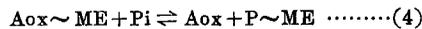
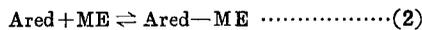
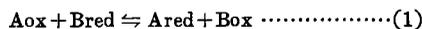


Fig. 16. Simultaneous measurement of oxidation-reduction of pyridine nucleotides, respiration state and  $90^\circ$  light scattering at  $650\text{ m}\mu$  in rat liver mitochondria in the medium of  $0.1\text{ M}$  sucrose,  $20\text{ mM}$  KCl,  $5\text{ mM}$  Tris-HCl buffer (pH 7.4),  $50\text{ }\mu\text{M}$  EDTA and  $1\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  at  $25^\circ$ . Arrows show an addition of substance. Uppertrace refer to the oxygen concentration in the medium, middletrace to the  $90^\circ$  light scattering at  $650\text{ m}\mu$  and undertrace to the fluorescence intensity of pyridine nucleotides. The time moves from left to right and downward deflections indicate oxygen consumption, swelling and oxidation of pyridine nucleotides.

に懸濁すると、図16に示す如く内発呼吸にともなう pyridine nucleotide の螢光及びゆるやかな膨潤が示される。1分後に  $3\text{ mM}$  の K-phosphate (pH 7.4) を添加すると酸素消費は僅かに増加し、pyridine nucleotide の急激な酸化と比較的ゆるやかな膨潤が示される。更に1分後に  $3\text{ mM}$  の Na-succinate を添加すると、呼吸は Chance's state  $4^6$ ) となり、pyridine nucleotide は著しく還元され、同時に膨潤度は増加する。更に1分後、 $100\text{ }\mu\text{M}$  の adenosine-diphosphate (ADP) を添加すると、呼吸は Chance's state  $3^6$ ) となり呼吸調節能 (respiratory control index)  $3.7$  が示され pyridine nucleotide は再び急激に酸化され、mitochondria は収縮する。添加された ADP が磷酸化され adenosine triphosphate (ATP) になり state 4 に帰ると pyridine nucleotide は再び還元され形態も膨潤に変る。この場合 pyridine nucleotide の酸化は ADP 添加で極めて急激に酸化されるが state 3 にある間でも一定のレベル以上は酸化されず次第に還元される傾向を示し、state 4 に帰ると同時に急激な還元を示す。次にこのような条件下で酸化的磷酸化 (oxidative phosphorylation) の共軛阻害剤 (uncoupler) である Na-oleate ( $0.16\text{ mM}$ ) を添加すると uncoupling にともない呼吸は解放さ

れ、pyridine nucleotide は激しく酸化状態となり、形態は収縮 (shrinkage) 状態へと変化する。

以上の如き mitochondria 内における pyridine nucleotide の現象はすでに Chance 一派によりくわしく研究されているが、本装置を使用することにより Chance らの結果に、さらに  $90^\circ$  光散乱による mitochondria 形態の変化を同時に記録出来るようになった。今此処に示した三者の相関々係を理解するため、Lehninger<sup>7)</sup> 及び Slater 一派<sup>8)</sup> の phosphorylation sequence を合せ考えて次の様な phosphorylation sequence を提出し以上の現象に考察を加える。



今 A, B, C は電子伝達系の酸化還元物質を示し、ME は coupling enzyme を示す。又  $\emptyset$  は uncoupler を示し、 $\text{M} + \text{E}$  は loosely に uncoupling した mitochondria の coupling enzyme を、Pi は無機磷を示す。この sequence は我々が色々な uncoupler や ion transport に関する実験結果から誘導したものである。

今、図16に示した実験結果をこの sequence にあてはめて考えると steady state への Pi の添加にともなう pyridine nucleotide の酸化は、Pi 添加にともなうわづかの酸素消費からも明らかな如く内発呼吸を内在基質酸化以上に増加せしめるためと考えられ (1) 式の反応以上に (4) 式の反応が増加することによる。又 state 4 においては呼吸の増大、即ち (1) 式の反応とあいまつて (3) ~ (4) 式で形成された中間体の増大により succinate から pyridine nucleotide への reversal electron transport<sup>9)</sup> によるもので、これと平行してこの中間体 ( $\text{P-ME}$ ) の増大は mitochondria の swelling を誘起する<sup>4)10)</sup>。State 3 における pyridine nucleotide の酸化は呼吸の増大からも明らかな如く、基質酸化即 (1) 式の反応よりは (6) 式の反応の方が反応速度が早いためと理解され、さらに ADP により  $\text{P-ME}$  の減少をきたし mitochondria は shrinkage を示す。然しこの場合、添加の ADP 量の磷酸化により state 4 に帰

る場合は先づ pyridine nucleotide が還元されるがこれは (2)~(6) 式の反応が (1) 式よりゆるやかになるため reversal electron transport が増大するためと考えられる。これに次いで中間体が増加し mitochondria は再び swelling する。さらに uncoupler の添加にともない  $\phi$ -M の形式 (7)(8) 式で呼吸は解放され P~ME の形成はなく従てこれら中間体のエネルギーを使用して示される succinate から pyridine nucleotide への reversal electron transport は示されず pyridine nucleotide は一方向的に酸化状態へと近づくが一定レベル以上の酸化は容易に起らない。又、P~ME の減少は形態的にも shrinkage として現われるようになる。

以上の如く試作の装置を使用することにより mitochondria の機能と形態を種々の角度から観察出来ることが明らかにされた。

### 結 論

癌細胞エネルギー代謝調節機構を解析する一方法としてエネルギー転換機構の場である mitochondria の形態と機能の関係を研究するため、mitochondria の酸素消費と pyridine nucleotide の酸化還元及び 90° 光散乱による形態変化を同時に測定出来る装置を試作した。

反応液中の mitochondria による酸素消費は萩原氏法を改良し本装置の光学系に石英ガラスの液槽 (Cell) を組入れ、その中に回転白金電極をもつポラログラフィック法により自動記録せしめた。

### 文

- 1) "Biological structure and function" vol. II. Edited by Goopwin T. W. and Lindberg O. L. Academic Press, New York, 1961, p. 1-265.
- 2) Hagihara, B.: Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. Biochim. Biophys. Acta 46, 134, 1961.
- 3) Avi-Dor, Y., Olson, J. M., Doherty, M. D. and Kaplan, F. O.: Fluorescence of pyridine nucleotides in mitochondria. J. Biol. Chem. 237, 2377, 1962.
- 4) 内海耕穂, 山本剛禧外: ミトコンドリアの膨潤収縮と酸化的磷酸化, 細胞化学シンポジウム, 13, 113, 1963.
- 5) Utsumi, K.: Relation between mitochondrial

Mitochondria の swelling-shrinkage は 650 $\mu$  の 90° 光散乱測定によつて観察され得る。この装置はプリズム分光により 650 $\mu$  の光を液槽に照射し、90° 方向に 650 $\mu$  の赤いフィルターを置き、光電増倍管 1P22 にて受光し増巾、自動記録出来得る。

Mitochondria 結合型の pyridine nucleotide の酸化還元は螢光分光々度計によつた。即ち、水銀灯の 365 $\mu$  の輝線を Corning 7-54 フィルターあるいは日立製作所製の 365 $\mu$  のフィルターにて分離し、プリズム分光器と試料液槽の間に半鏡を置いて液槽に 365 $\mu$  の光線を照射し、還元型の pyridine nucleotide により発せられる螢光を 90° の方向に Corning 3-73 フィルターを置き励起光の散乱光を取除き、grating monochromator にて 445 $\mu$  の螢光を分離し、光電増倍管 1P21 にて受光、増巾後自動記録せしめた。

この方法により一つの試料について同時に酸素消費、90° 光散乱、螢光の三者が測定記録出来、90° 光散乱のための 650 $\mu$  の光は螢光に全く影響を与えず、逆に 650 $\mu$  の散乱光に対して 360 $\mu$  の励起光や pyridine nucleotide の螢光は影響のないことが明らかにされた。

最後にラット肝 mitochondria の pyridine nucleotide の酸化還元、呼吸活性、swelling-shrinkage の三者の相関々係を本装置により測定記録した結果を示しそれに対して若干の考察を加えた。

おわりにのぞみ測定器具作製のため御助力を戴いた難波毅氏に深謝の意を表します。

### 献

- swelling induced by inorganic phosphate and accumulation of  $^{32}\text{P}$  in mitochondrial Pi fraction. Acta Med. Okayama, 17, 259, 1963.
- 6) Chance, B. and Williams, C. P.: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Advances in Enzymol. 17, 65, 1956.
- 7) Wadkins, C. L. and Lehninger, A. L.: Distribution of an oligomycinsensitive adenosine triphosphate-adenosine diphosphate exchange reaction and its relationship to the respiratory chain. J. Biol. Chem. 238, 2555, 1963.
- 8) Hemker, H. C.: The contribution of the various phosphorylating steps in the respiratory chain to the DNP-induced ATPase of rat-liver mito-

- chondria. *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 311, 1963.
- 9) Chance, B. and Hollunger, G.: The interaction of energy and electrontransfer reactions in mitochondria I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide.
- 10) Packer, L.: Metabolic and structure states of mitochondria I. Regulation by adenosine diphosphate. *J. Biol. Chem.* **235**, 242, 1960.

---

**An apparatus for simultaneous measurement of 90° light scattering,  
pyridine nucleotide fluorescence and oxygen consumption  
of mitochondria**

By

Kozo Utsumi,

Goki Yamamoto

Hiroyuki Urakami

(Department of Biochemistry, Cancer Institute of Okayama University Medical School, Okayama, Japan)

and

Keiko Nishikaze

(Department of Pathology, Okayama University Medical School)

An apparatus for simultaneous measurement of 90° light scattering, pyridine nucleotide fluorescence and oxygen consumption of mitochondria was designed and constructed for the purpose to study the mitochondrial structure and function.

Oxygen consumption was measured by rotating platinum electrode by the modification of Hagihara's method, attached in the cell of the apparatus.

Mitochondrial swelling and shrinkage were measured by 90° light scattering at 650 m $\mu$ . The monochrome light was made by prism monochromator and was led to the cell of the apparatus. Scattered light of 650 m $\mu$  at 90° was filtered through the filter transmitting 650 m $\mu$ , excluding visual and ultra-violet radiation under 600 m $\mu$ . Then the scattered light was registered by photomultiplier tube 1P22 which is a good choice for measurement of the light near red end of spectrum.

Relative reduced pyridine nucleotide concentration was measured by fluorometry. Fluorometer was constructed as follow: For excitation, a bright light at 365 m $\mu$  line of mercury lamp was isolated from other bright light by passing through the Hitachi interference filter (365 m $\mu$ ) or Corning No. 7—54 (9863) which transmits ultraviolet light and excludes visual radiation above 410 m $\mu$  and was led to the cell by half mirror at a position of light path between the monochromator for 90° light scattering and the cell. The fluorescence light was passed through the filter of Corning No. 3—73 (3389) which transmits visual radiation at approximately 440 m $\mu$ . Then the fluorescence intensity in the spectral interval set by the grating monochromator was registered by photomultiplier 1P21 which has good signal-to-noise ratio, and is suitable for measurements of compounds that fluorescence between 350 and 650 m $\mu$ .

The scattered light at 650 m $\mu$  was not affected by excitation light and fluorescence light, and fluorescence intensity was not by scattered light at 650 m $\mu$ .

The simultaneous measurements of the oxidation-reduction of pyridine nucleotides, the respiration states and the change of 90° light scattering is given as an example of the performance of the present apparatus.

---