

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SPRING 1976
VOL. 19 NO. 1

目 次

ごあいさつ…………井上清二…1

報 文

ウイルス学における走査電子顕微鏡……………

俵寿太郎 公文裕巳 宇野文夫…2

凍結超薄切片作成法の改良と検討

……………米原勝久

石川春律 山田英智 浅井孝行…6

熱分析機—質量分析計の併用同時

測定……………吉村 貢

提 和生 阿部 勲 田島英司…9

解 説

S-500形日立高分解能走査電子顕微鏡……………

齊藤康示 古屋寿宏 山田 理…13

200シリーズ日立ダブルビーム分

光光度計とその応用例(Ⅲ)——微

分スペクトル付属装置——……

……………遠山恵夫

福田健二 保田和雄 小森律夫…15

204R形日立分光けい光光度計と

その応用……………

広瀬 広 嶺岸久子 馬場護郎…17

トピックス

H-1250形日立超高圧電子顕微鏡…19

H-700形日立200kV電子顕微鏡……20

ごあいさつ

井上清二*



日頃、日立の理化学機器をご愛顧いただき、ありがたく厚くお礼申しあげます。

日立製作所が、昭和16年、国産第1号の電子顕微鏡を完成して以来早くも35年を経過いたしました。その間、質量分析計、核磁気共鳴装置などの電磁気分析装置、最近是小形の電界放射形走査電子顕微鏡をはじめとする一連の電子顕微鏡シリーズ、また、分光分析装置としては、臨床検査や環境計測に広く用いられている紫外可視分光光度計や赤外分光光度計、さらに分離分析装置では、ガスクロマトグラフや高速液体クロマトグラフを開発する一方、病院の検体検査の自動化に寄与する自動分析装置を開発するなど、微力ながら科学技術の進歩に役立つよう努力を重ねてまいりました。また、これらの機器を生産する中核的存在として、昭和36年、那珂工場を設立いたし、業界に確固たる地歩を得ましたことは、ひとえに皆様のご援助の賜物と深く感謝いたしております。

科学の進歩は日々に新しく、また、複雑になっています。私どもメーカーには、各種機器の機能の高度化と多様化がますます強く要求されています。一方、低成長経済下の現在では、これらの機器は十分な経済性を備えたものでなければなりません。

このような社会的な指向は、当然、システム化と省力化にあるといえます。つまり、システム化・省力化が進むにつれて、前処理を含む分析機器の自動化ないしは製造工程への組み込みが一層強く進められることになると考えられます。また、新しい原理を取入れた機器の研究開発も、将来の発展のためには一時もなおざりにすることはできません。このような基礎研究の積重ねが社会の発展を支える基盤となるものであり、また、新技術の裏付けがあつてはじめて機器に対する信頼が得られ、学術の進歩が保障されるわけです。こうした社会的条件を十分にカバーし、時代に適応した機器を作り出すためには、学術的分野におけるソフトウェアと私どもメーカーのハードウェアとがこれまで以上に緊密に協力し、均衡のとれた発展が必要とされます。

私どもは、現代の社会経済の諸情勢を十分に検討分析し、ご利用者の方々のご要求にお応えするため、社内体制を整え、万全の用意をいたしております。何とぞ、今後とも、従来にもまして、皆様の絶大なご指導・ご援助を賜り、日立製品を一層活発にご利用くださいますようお願い申し上げます。

* 日立製作所 計測器事業部 事業部長

ウイルス学における走査電子顕微鏡

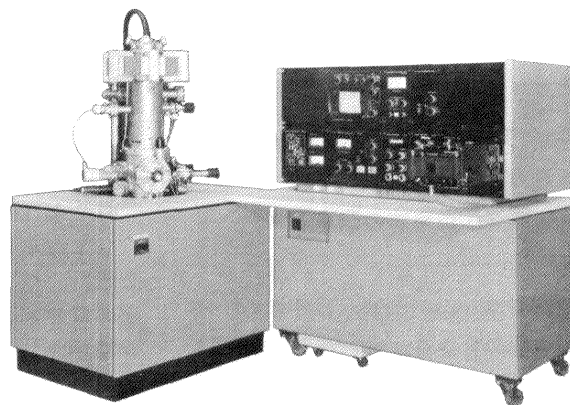
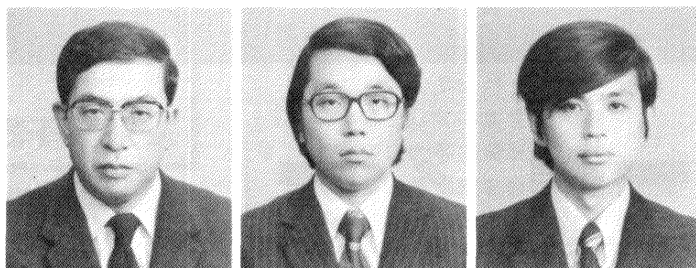
俵 寿太郎* 公文 裕巳** 宇野 文夫**

走査電子顕微鏡（以下「走査電顕」という）が生物学領域に應用されるようになってから10数年になるが、当初はその分解能が透過電子顕微鏡に比べてかなり劣っていたこともあり、微生物学領域への應用が行われるようになったのはここ数年來のことである¹⁾。ところで、従来の熱電子形走査電顕の分解能は200 Å程度であり、我々の研究対象であるウイルス学の分野では、ウイルス感染細胞における特異的細胞変性効果の觀察などごく限られた範囲での應用しかできなかった。しかし、最近フィールドエミッション電子銃の実用化により走査電顕の分解能は飛躍的に向上し^{2), 3)}、現在我々が使用しているHFS-2形日立フィールドエミッション形走査電顕では30 Åの分解能が得られるようになり、ウイルス粒子を直接三次元的に觀察することも可能となってきた⁴⁾。

1. ウイルス学への應用と免疫走査電顕法

走査電顕のウイルス学への應用は、従来の感染細胞における形態的变化の觀察は別として、ウイルス粒子レベルでの應用は、現在までのところ大きく次の2種に分けることができる。すなわち、(1)ウイルス粒子固有の特異的反應を利用して觀察する方法で、例えば、インフルエンザウイルスの血球凝集反應を應用⁴⁾する方法と(2)バクテリオファージ⁵⁾、タバコモザイクウイルス、VSV (Vesicular Stomatitis Virus)⁶⁾のようなウイルス自体の形態的特徴を利用する方法の2つである。以上のことを換言すれば、ウイルス粒子を確認しようとする場合、走査電顕の分解能は必要条件であっても充分条件ではないということである。したがって、血球凝集反應のような特異反應のないウイルスや形態的特徴のないウイルス粒子を認識する場合、マイクログリラーなどの細胞構造物からウイルス粒子を識別し同定することは、実際にはかなり困難なことである。そのような場合、もし免疫学的に標識が可能となれば、ウイルス感染細胞における出芽ウイルスはもとより、その他の細胞表面抗原のトポグラフィに関する多くの知見が得られるであろうことは容易に想像することができる。すなわち、免疫走査電顕法は走査電顕によるウイルス学の研究に充分条件を与えるものである。

ところで、走査電顕用マーカには、(1)形態的に識別できる特徴的な形及び大きさを有すること、(2)非特異的に細胞表面に吸着しないこと、(3)化学的に比較的安定であること、(4)精製が容易であり、かつ収量のよいこと、が要求される条件であると我々は考えており、すでにT₄バクテリオファージ^{7) 8)}及びタバコモザイクウイルス⁹⁾をマーカとして使



HFS-2形日立フィールドエミッション形走査電子顕微鏡

用した免疫走査電顕法を我々は報告している。以上が走査電顕のウイルス学應用の現在までの概略であるが、本号に我々の成績を集約した形でご紹介する。

2. 実験材料と方法

(1) インフルエンザウイルス血球凝集反應

1日雞のニワトリ赤血球とインフルエンザB型ウイルス (Strain B/大阪/2/1970)とを使用し、常法により血球凝集反應を行ない、凝集血球を洗浄後走査電顕の試料とした。

(2) T₄バクテリオファージ (T₄)

T₄はブイヨン培地に培養した宿主菌E.coli Bより得た溶菌液から低速遠心(5,000×g)及び高速遠心(11,000×g)の繰返しにより精製し、電顕試料及びマーカとして架橋実験に使用した。

(3) タバコモザイクウイルス (TMV)

サムスタタバコ病葉汁液(0.01Mリン酸緩衝液pH=7.2)をクロロホルム・ブタノール処理後分画遠心及び蔗糖密度勾配遠心法により精製し、マーカとして架橋実験に使用した。

(4) 免疫走査電顕法

(a) 抗体 (Ig G)

抗ヒト赤血球ヤギ血清及び抗ヤギIg Gウサギ血清より硫酸塩析後、DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィにより得られたIg G分画を使用した。

* 岡山大学 医学部 教授、医博

** 岡山大学 医学部 ウイルス学教室

(b) Ig Gとマーカ (T_4 , TMV)の架橋及び架橋物 (T_4 -Ig G, TMV-Ig G)の精製

T_4 とTMVとでは架橋条件が若干異なるので方法の詳細は文献に譲り^{8), 9)}ここでは T_4 -Ig Gの場合を簡単に述べる(図1参照)。抗体は直接法の場合にはヤギ(抗ヒト赤血球)Ig Gを、間接法の場合にはウサギ(抗ヤギIg G)Ig Gを使用した。Ig G及び T_4 をリン酸緩衝液で蛋白量を35mg/ml及び7mg/mlとし、蛋白量比を1 (Ig G): 2 (T_4) に調製した溶液を穏やかにかくはんしつつグルタルアルデヒドを終濃度0.05%になるように加え、室温で1時間反応した。その後これにグリシンを終濃度0.1 Mに加え、リン酸緩衝液に一夜透析し、低速遠心(2,000×g)及び高速遠心(11,000×g)の繰返しにより T_4 -Ig Gを得た。

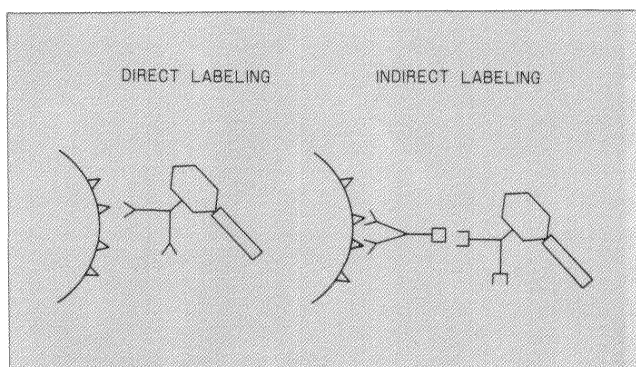


図1 免疫走査電顕法の模式図

(c) ヒト赤血球膜抗原の標識

牛血清アルブミンを0.2%含むリン酸緩衝液 (PBS-BSA) で洗浄した2%血球浮遊液を、直接法の場合には T_4 -Ig G (抗ヒト赤血球) と反応させ、間接法の場合には抗ヒト赤血球ヤギIg Gで処理後PBS-BSAで洗浄し、これと T_4 -Ig G (抗ヤギIg G) を37℃ 30分間反応させ、洗浄後、走査電顕の試料とした。TMV-Ig Gの場合も同様に行った。

(5) 走査電顕用試料作製法

試料をグルタルアルデヒドで前固定、オスミウム酸で後固定し、エタノール系列で脱水、その後酢酸イソアミルに置換して臨界点乾燥法を行い、蒸着には金-パラジウムを使用した。なお、観察にはHFS-2形 日立フィールドエミッション形走査電顕を使用した。

3. 成績

図2はウイルスの特異反応中代表例であるインフルエンザウイルスの血球凝集反応像であるが、ニワトリ赤血球表面に吸着している多数のウイルス粒子(直径100~120nm)が観察される。特に、血球と血球の接合部には数個のウイルス粒子が存在し、血球凝集の機構が三次元的に確認できた。

T_4 は最も形態の特徴を有するウイルス粒子のひとつであるが、図3に示すように比較的低倍率で、その特徴的な頭部及び尾部構造が解像された。

図4~8は免疫走査電顕法に関するものである。図4はコントロール実験のヒト赤血球であるが、写真に示すよう

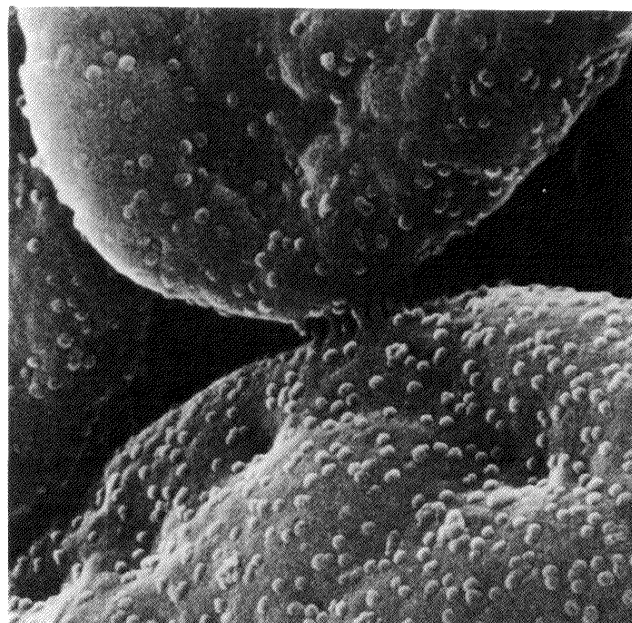


図2 インフルエンザウイルス血球凝集反応の走査電顕像
ニワトリ赤血球に吸着した多数のウイルス粒子が観察され、血球凝集の機構が三次元的に示されている。(×14,000)

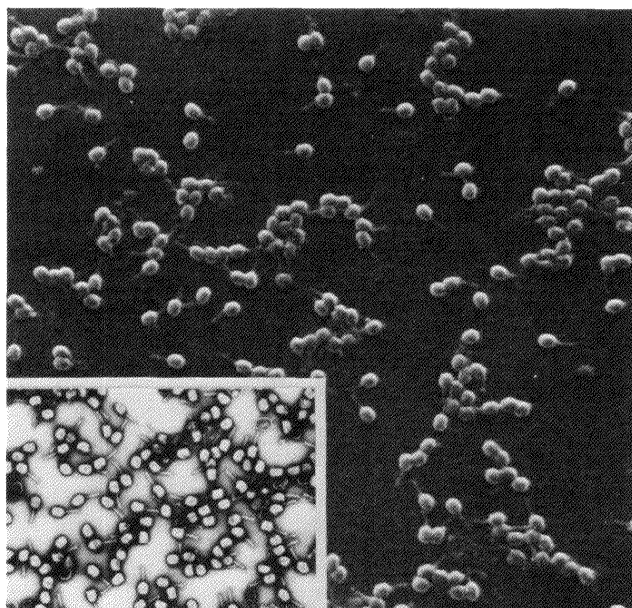


図3 精製 T_4 -ファージの走査電顕像及び陰性染色像(左下図×20,000)
精製度が高く、夾雑物がほとんどないことが分るとともに、比較的低倍率の走査電顕像(×20,000)でも、 T_4 -ファージの頭部及び尾部構造が観察される。

に非特異的な吸着はほとんど認められなかった。標識を行ったヒト赤血球には図5のように T_4 (T_4 -Ig G) が膜面に一様に分布しているのが観察された。標識の特異性は種々のヒト赤血球のみを使用したコントロール実験のほかに、ヒト及びニワトリ赤血球浮遊混液を使用し、間接法で標識した図6でも立証された。すなわち、ヒト赤血球と比べて大きな楕円形のニワトリ赤血球は T_4 -Ig Gによって標識されず、一方ドーナツ形のヒト赤血球は一様に標識された。

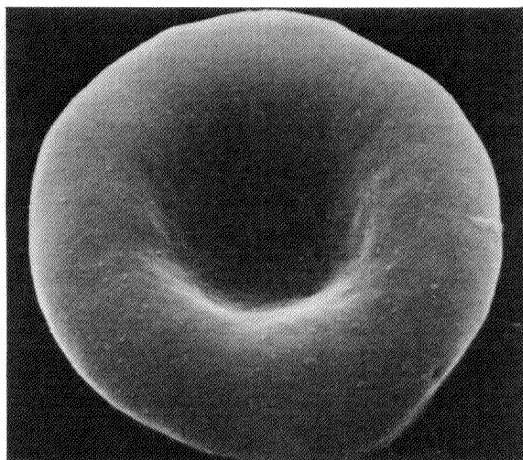


図4 コントロール実験のヒト赤血球 (×10,000)
T₄-ファージの非特異的吸着は、ほとんど観察されない。

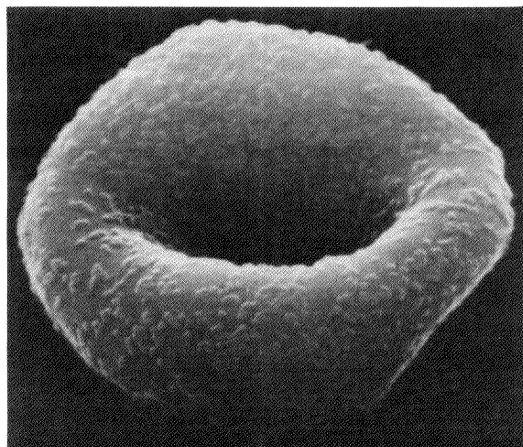


図5 T₄-Ig G標識を行ったヒト赤血球 (×10,000)
膜面に一様に分布しているT₄-ファージが観察される。

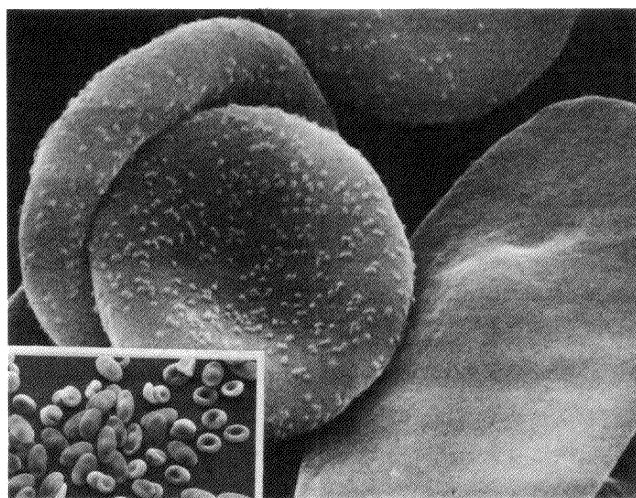


図6 ヒト及びニワトリ赤血球浮遊混液を使用し、ヒト赤血球膜抗原をT₄-Ig G標識した像
左下図はその低倍率の像(×470)であるが、楕円形のニワトリ赤血球及びドーナツ形のヒト赤血球が比較的均等に分布しており、一部を強拡大(×7,900)した像では、ニワトリ赤血球はT₄-Ig Gによって標識されず、ヒト赤血球のみが標識されているのがよくわかる。

標識されたヒト赤血球を一部強拡大すると図7のように特徴的なT₄の形態である六角形の頭部及び尾部構造が一層よく解像されており、もしこの標識をより複雑な構造の細胞表面に行ったとしても、容易に識別できるものと考えられる。図8はTMV-Ig Gを使用し、間接法で標識したヒト赤血球であるが、その膜面に一様に分布している20数nm径の桿状ウィルスが観察された。膜面に平行して横たわっている大多数の粒子に比較して、その一部が膜面に対して立っているものではコントラストがよくつき、標識がより容易に確認できた。なお、使用したT₄-Ig G及びTMV-Ig Gの血清学的性状は、架橋したIg Gに対する抗血清との沈降反

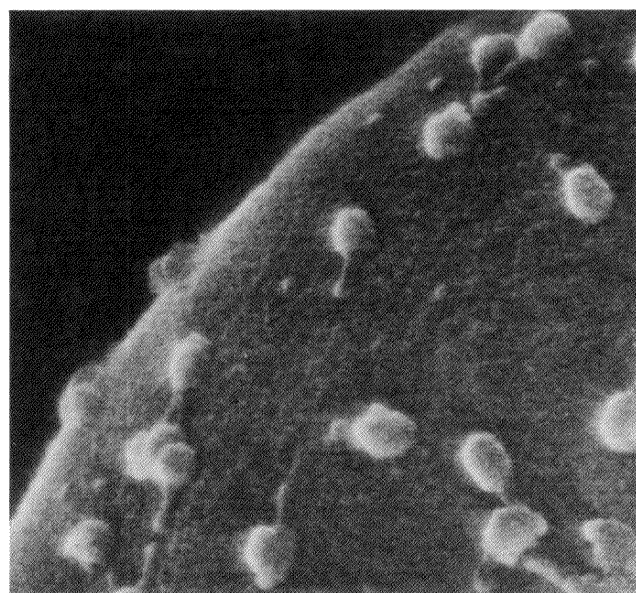


図7 標識を行った赤血球を一部強拡大した像 (×69,000)
特徴的なT₄の形態である六角形の頭部及び尾部構造が一層よく解像されている。

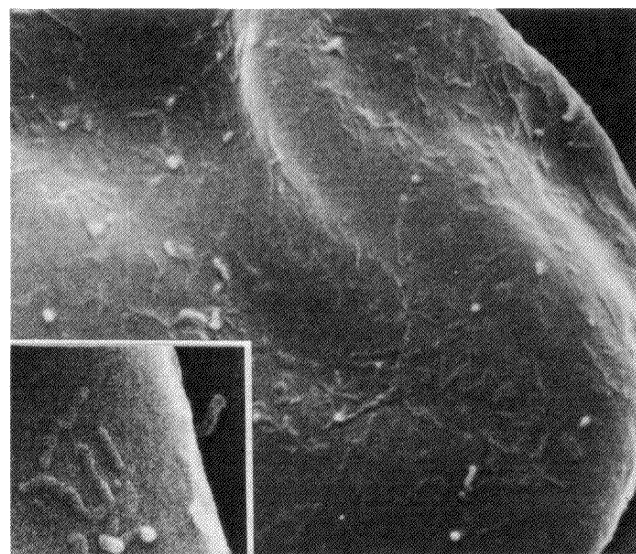


図8 TMV-I G標識を行ったヒト赤血球
20数nmの桿状ウィルスが膜面に一様に分布しており(×23,000) 強拡大した左下図(×50,000)では個々のTMV粒子がよく解像されている。



応及び直接法の場合は直接赤血球凝集反応、間接法の場合は架橋したIg G抗体に対応する抗原をコーティングした赤血球による間接赤血球凝集反応からも検討できた。

4. 考 察

ウイルス感染の超微形態学は、現在までのところ、主として透過電子顕微鏡（以下「透過電顕」という）の領域である。しかし、透過電顕より得られる情報は二次元的なものであり、三次元的情報を得ようとするのが走査電顕によるウイルス感染形態学である。例えば、ウイルスによる血球凝集反応は一般的によく知られた現象¹⁰⁾ではあるが、従来の透過電顕による観察では血球を溶血しなければ観察できなかった。しかし、走査電顕の場合には血球を溶血することなく、血球凝集反応をそのまま三次元的に観察することが可能であり、凝集機構そのものを観察することができるといえる。一方、ウイルス感染に伴う細胞表面の形態変化の観察も我々の興味の対象である。その場合、細胞表面を“拉がりある面”として解析することが当然必要となってくるが、これは透過電顕においてはかなり困難なことである。しかし、走査電顕の場合、観察は細胞表面であり一度に多数の細胞の観察ができること、すなわち、解析可能な“拉がりある面”が広いという長所がある。特に、試料作製に凍結乾燥法及び臨界点乾燥法を用いた場合は、自然の形態に非常に近い像が得られる¹¹⁾と考えられており、ウイルス感染細胞表面の解析に走査電顕が利用されてきたわけである¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。さらに免疫走査電顕法を導入することにより感染細胞の形態的变化と細胞表面へのウイルス抗原の出現及びウイルスの出芽との相関関係とか、出芽ウイルス及びウイルス抗原のトポグラフィに関する多大の知見が得られるものと考えられる。したがって、先に述べたように、免疫走査電顕法は走査電顕によるウイルス学研究に充分条件を与えるものと考えられる。

しかし、免疫走査電顕法に関する報告は、我々の報告^{8,9)}を含めて現在若干はあるが¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、いまだ確立されたものではなく、最適条件のマーカ及びその標識法が種々検討されている現状である。我々は、先に述べたマーカの条件の中で最も重要なのは特徴的な形態であると考えており、T₄及びTMVはその条件を主体にして選択したものである。なぜならば、一般に感染細胞表面にはマイクロビリなど種々の突起があるので、それらと容易に識別できるマーカでなければ意味がないからである。もちろん、T₄及びTMVのいずれを用いた場合でも、マーカとしては透過電顕用マーカと比べて大きい（T₄；頭部約80×115nm 尾部約19×95nm, TMV；18×300nm、計測は陰性染色による）ために、詳細かつ厳密な抗原の局在を知ることはできない。このことは、走査電顕では、透過電顕のように電子密度の差を利用するといった標識ができないため、マーカ自体を表面形態で識別しなければならず、ある程度の大きさを必要とするためである。また、仮りに詳細な抗原局在を見るために非常に小さなマーカを使用したとすると、その場合、標識の確認にかなりの高倍率を必要とすることとなり、その結果、走査電顕の最大の長所である“拉がりある面”の解析を小さく限局することとなる。したがって、走査電顕にお

ける理想的なマーカとは、細胞表面抗原の“より詳細な局在”及び“拉がりある面としての解析”という相反する目的の接点にあることとなり、現段階においては、T₄及びTMVは共に優れた走査電顕用マーカと考えられ、目的により使い分けることで種々の応用範囲があるとともに、2種の抗原を同時に標識することも可能であると考えられる。今回の赤血球膜抗原の標識実験はウイルス感染細胞標識のための予備的なものであるが、特異性などの点から感染細胞に充分応用できるものと考え、現在なお標識実験中であり、機会があればそのときに報告するつもりである。

以上のように走査電顕は現在ウイルス学領域に応用されようとしている段階であるが、分解能という必要条件はすでに満たされており、ウイルス学における走査電顕の位置は今後ますます重要となって行くものと確信している。

稿を終るに当り、本実験を通して走査電顕の撮影にご協力いただいた林信男技官に深謝いたします。

■参考文献

- 1) 俵 寿太郎, 他: 医学と生物学, 83, 25 (1971)
- 2) Crewe, A. V., : Sci. Am., 224, 26 (1971)
- 3) Komodo, T. & Saito, S.: IITRI/Scanning Electron microscopy/1972, 129
- 4) 俵 寿太郎: 臨床とウイルス, 2, 83 (1974)
- 5) Amako, K., et al.: J. Electron Micro., 23, 301 (1974)
- 6) Holmes, K. V., : J. Virol., 15, 355 (1975)
- 7) 公文裕巳, 他: 医学のあゆみ, 95, A-575 (1975)
- 8) Kumon, H., et al.: Virology, (in press)
- 9) 公文裕巳, 他: 医学のあゆみ, (in press)
- 10) Hirst, G. K.: Science, 94, 22 (1941)
- 11) Boyde, A., et al.: Exp. cell Res., 71, 313 (1972)
- 12) 松本 明: 細胞, 7, 218 (1975)
- 13) 宇野文夫, 他: 医学のあゆみ, 95, A-577 (1975)
- 14) Mannweiler, K. & Rutter, G.: J. gen. Virol., 28, 99 (1975)
- 15) 天野保二: 細胞, 7, 80 (1975)
- 16) Molday, R. S., et al.: J. cell Biol., 64, 75 (1975)
- 17) Nemanic, M. K., et al.: J. cell Biol., 64, 311 (1975)
- 18) Hämmerling, U., et al.: J. Exp. Med., 141, 518 (1975)

凍結超薄切片作成法の改良と検討

米原 勝久* 石川 春律** 山田 英智** 浅井 孝行*

1. はじめに

電子顕微鏡のための凍結超薄切片法 (Frozen thin sectioning) の歴史は古く、1952年 Fernández-Morán^{1) 2)} によって初めて試みられたが、技術的困難に加えて、樹脂包埋による通常の超薄切片法の華やかな発達の蔭に隠れ、単なる記録にとどまってしまった。1960年代に入り、免疫化学または細胞化学の分野での必要性から、Bernhard のグループ^{3), 4)} は、凍結超薄切片法の本格的な開発に乗り出した。また、Bernhardらの研究に刺激され、装置の開発や手技の改良が Christensen⁵⁾、Appleton^{6), 7)}、徳安^{8), 9)} らによりなされ、今日、実用化の段階にきている。しかし、実際の手技については、なお多くの問題点が残されている。詳細については、酒井¹⁰⁾ の解説もあるので参照されたい。

われわれは、これまで Sorvall 社製 MT-2 形ミクロトーム用 Cryokit (FTS/LTC-2) を用いて、凍結超薄切片を作成してきたが、その間試みた 2, 3 の改良とその応用について報告する。

2. 凍結超薄切片法の装置及び手技について

2.1 装置

図 1 にわれわれが使用した Sorvall 社製 Cryokit (FTS/LTC-2) を示す。基本的には、低温槽部、温度コントロール部、液体窒素容器の 3 つの部分から構成されている。試料ヘッド、試料ホルダ及びナイフは、断熱材でできた低温槽内に液体窒素容器からの窒素ガスを流入させ、冷却されるようになっている。ミクロトーム本体は室温下にあり、切削アームと試料ヘッドは、断熱材で遮断されている。組織片は試料ホルダに載せて凍結し、試料ヘッドに装着できるようになっている。

2.2 手技の基本

Bernhard をはじめ、この分野の先駆的研究者はそれぞれの研究目的に適した凍結超薄切片法を開発してきた。したがって手技にもいろいろあるが、基本的な過程を図示すると図 1 のようになる。われわれは、固定、染色を行う場合は徳安法により、固定が許されない切片を必要とする場合は Christensen 法に準じて行っている。

3. 手技における問題点とその対策

3.1 試料ホルダの親水化処理

試料ホルダは、一般に凍結時の熱伝導のよい銅、アルミなどの金属でできている。薄切時にしばしば試料の脱落があるため、われわれはイオンクリーニング装置を使用し親

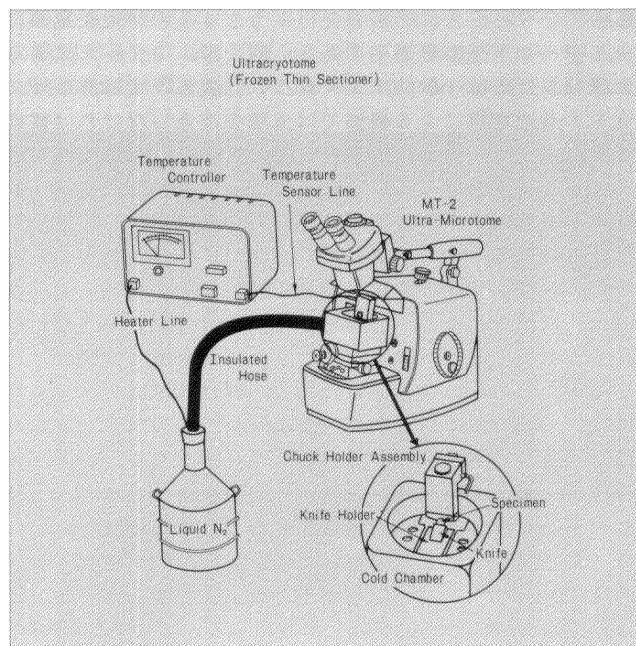


図 1 Sorvall 社製 MT-2 形ミクロトームに装置した Cryokit

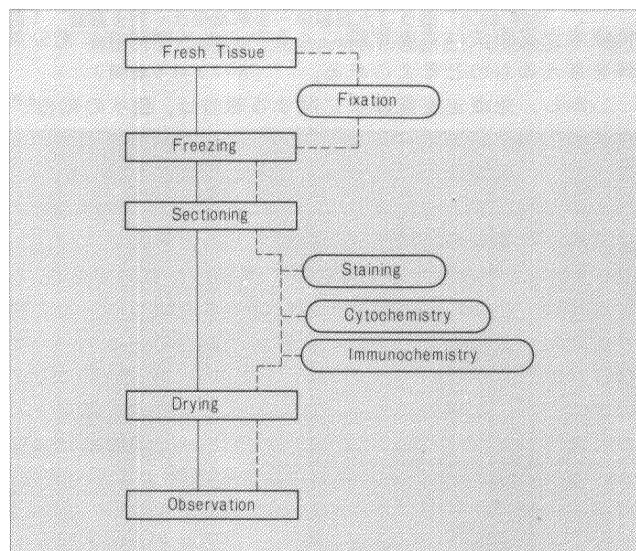


図 2 凍結超薄切片法の過程

水化処理を行っている。組織の周囲に余分な液が残らなくなると同時に、試料ホルダへの組織の接着が確実にできるようになった。図 3 にイオンクリーニング条件を示し、図 4 に試料ホルダに組織片を載せた状態を示す。

* 日立製作所 那珂工場 応用技術部

** 東京大学 医学部 解剖学教室、医博

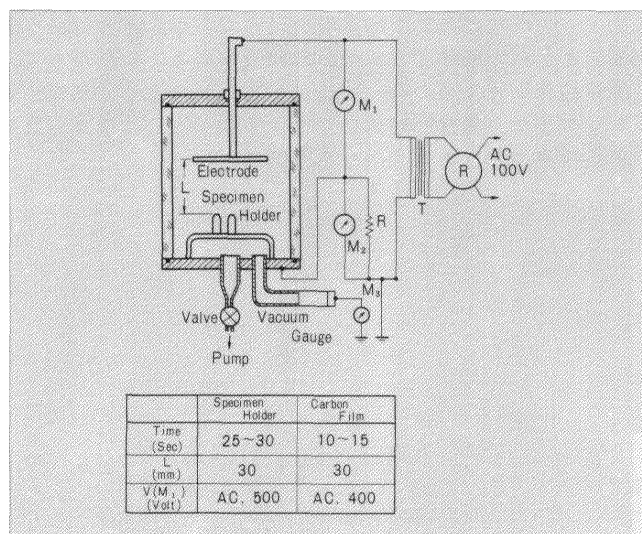


図3 イオンクリーニングの条件

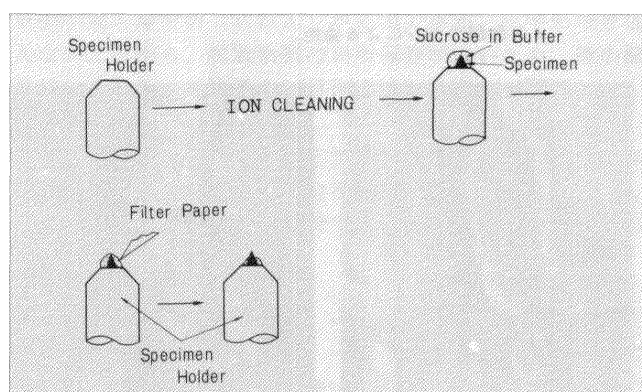


図4 試料ホルダへの組織の載せ方

3.2 支持膜の親水化処理

カーボン補強した支持膜にイオンクリーニングを施すことにより、切片の伸展及び膜への接着が容易になる。同時に、ネガティブ染色も均一にできる。

3.3 液体フレオンによる試料凍結

液体窒素で冷却したフレオン液による試料凍結を試みたところ、液体窒素で直接凍結するより氷晶形成による構造破壊が少なくなった。特に無固定試料の場合効果がある。液体フレオンを作成するために、図5(b)のような容器をアルミニウムで作成した。試料(組織片)を載せた試料ホルダを液体フレオン中で20~30秒凍結後、濾紙で余分な液体フレオンを拭き取ってから、液体窒素中に移すとよい(図5(a))。

3.4 トリミングについて

凍結後、しばしば、トリミング処理を必要とすることがある。われわれは、図6(a)に示すようなトリミング台を作成した。トリミング台につけた試料ホルダを、マイクローム低温槽内または槽外で液体窒素中に浸したままトリミングできる。トリミング用ナイフは、不熱伝導性の柄にカミソリの刃を付けたものである(図6(b))。また、このトリミング台は、凍結前に試料を載せる際にも使える。

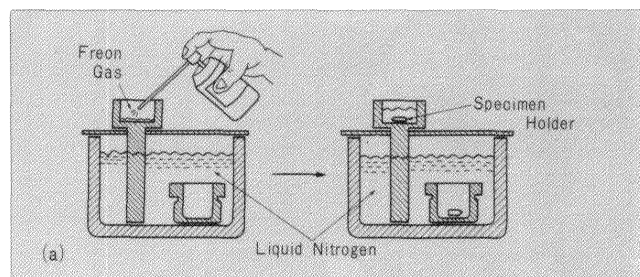


図5 (a) 液体フレオンの作成と組織の凍結手順

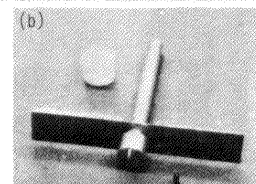


図5 (b) 液体フレオン作成のための道具

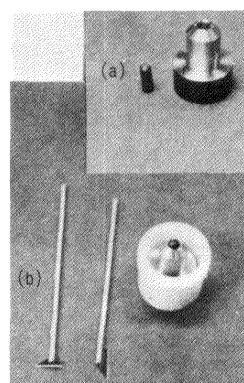
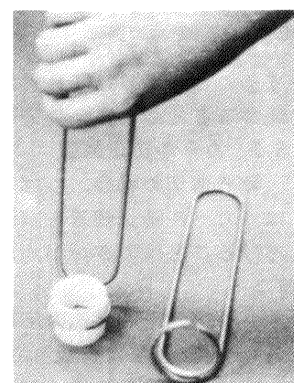

 図6 (a) トリミング台と試料ホルダ
(b) トリミング用ナイフ


図7 移送用容器とキャリア

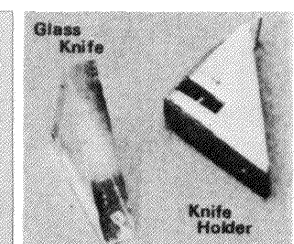
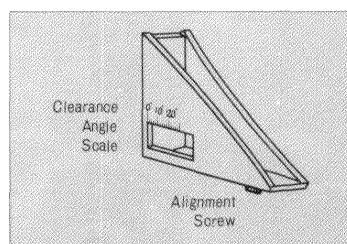


図8 ガラスナイフホルダー

3.5 試料ホルダの移送

試料の移送の際、空气中にさらされるため、試料の温度上昇を招き、霜形成及び氷晶により試料が損傷することがあった。そこで、われわれは、試料ホルダを液体窒素とともにマイクローム低温槽に持ち込めるような容器とキャリアを作成し(図7)、上記の問題を解決した。

3.6 ガラスナイフのカセット化

ナイフの脱着及びナイフの角度などの調整が非常に煩雑

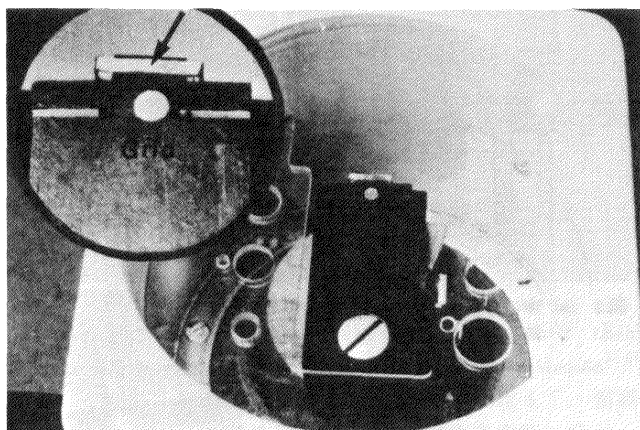


図9 ガラスナイフホルダとカール防止装置(矢印)をマイクローム低温槽にセットした状態

である。われわれは、ガラスナイフにカセット方式を採用することにより、予め外部でナイフのクリアランス角度を決めることができ、脱着が容易になった(図8)。

3.7 カール防止装置

乾式薄切の場合、しばしば切片がカールする。われわれは、カール防止装置を試作してみた(図9)。一応の効果をあげることができたが、まだまだ改良する必要がある。

4. 凍結超薄切片法の応用

4.1 超微形態の観察

凍結超薄切片法は、通常の超薄切片法に比べて、固定、

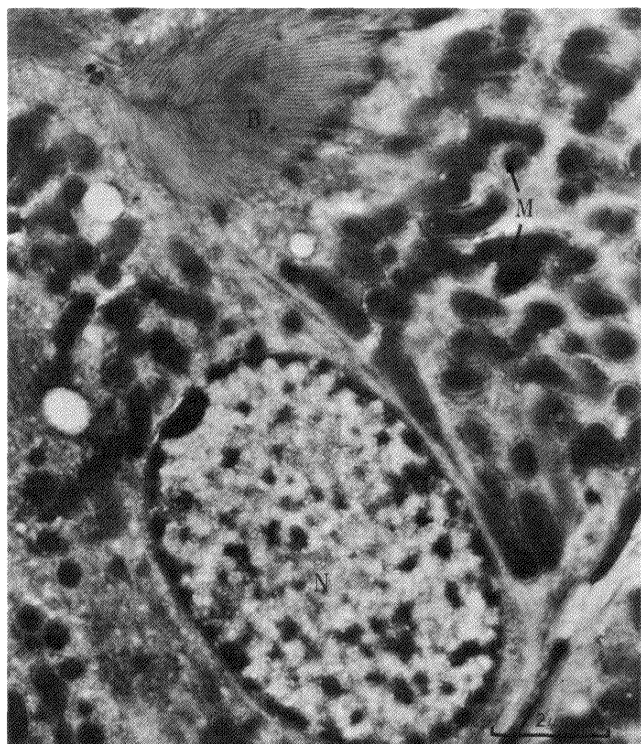


図10 マウスの腎臓(近位尿管の横断像)

図の左上部が内腔、右下部が基底側になり、核(N)や多数の糸粒体(M)、内腔側に刷子縁(B)を示す。4%酢酸ウランによる染色。

脱水、包埋などの化学的処理を行わないか、または最小限度にとどめて観察できるという利点がある。したがって、凍結超薄切片をネガティブ染色することにより、組織や細胞レベルで、通常の超薄切片では不明りょうな構造の高分解能観察ができることになる(図10~14)。

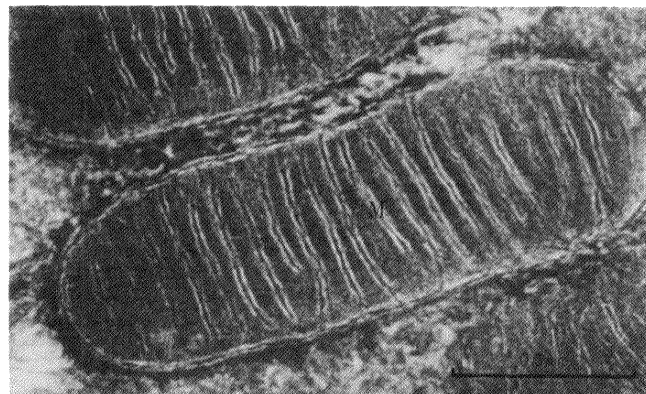


図11 マウスの腎臓(近位尿管上皮細胞内の糸粒体(M)の強拡大像 4%酢酸ウランによる染色。

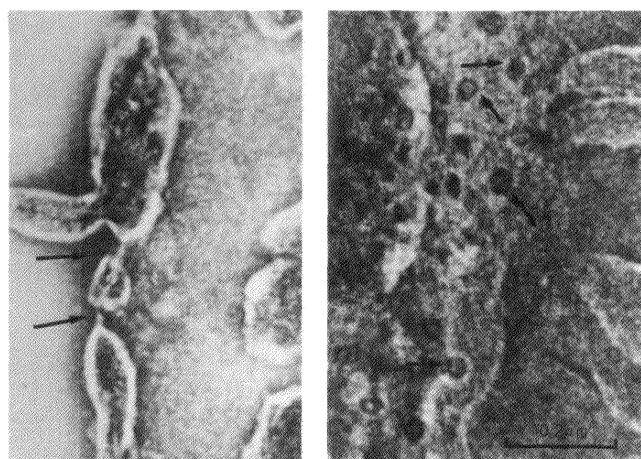


図12 マウスの腎臓

尿管周囲毛細血管内皮細胞にみられる窓構造(矢印)の横断像(図左)と表面像(図右)

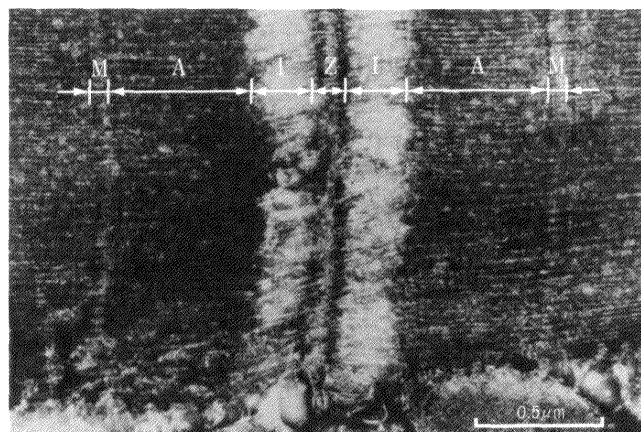


図13 マウスの心筋(筋原線維の縦断像)

横紋構造(A,I,Z,M)で構成するフィラメントがネガティブ像として見える。4%酢酸ウラン染色。

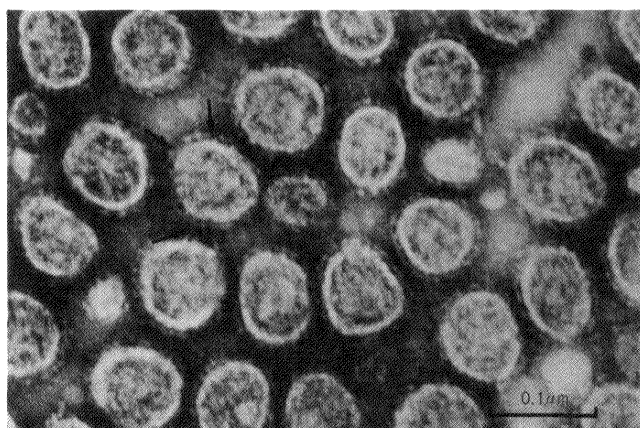


図14 マウスの小腸（上皮細胞の微絨毛の横断像）
細胞膜表面の小粒子がよく染められている。4%酢酸ウラン染色。

4.2 元素分析への応用

凍結超薄切片を乾燥させて、最近開発され普及しはじめた微小部X線分析（EDX）が応用できる。化学処理を加えないことから、拡散物質の局所保存がよいため、微小部X線分析のための重要な試料作成法といえる（図15）。

4.3 その他

凍結超薄切片の場合、反応物質の浸透が容易であり、また細胞内の拡散性物質や脂溶性物質の保存がよいことから、最近は細胞化学、免疫学的研究、ラジオオートグラフィの応用が試みられている。

5. おわりに

以上のような改良の結果、一応の成果をあげることができたが、まだまだ問題点が多い。しかし、その応用価値の大きさから見て、凍結超薄切片法は、医学、生物学における重要な試料作成法であることは明らかで、今後さらに検討して行きたい。

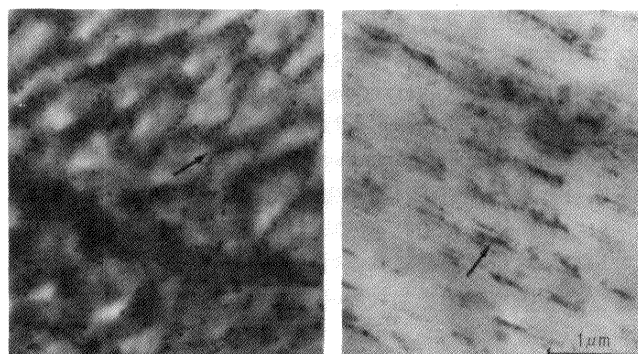
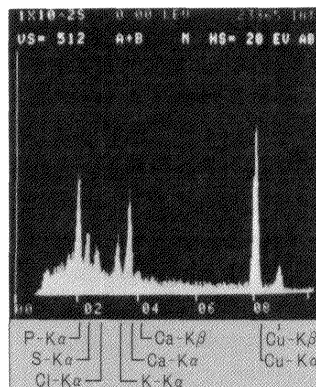


図15 マウス骨格筋の無固定凍結超薄切片。無染色での微小部X線分析例。
筋線維の横断像（図左上）と縦断像（図右上）で、筋原線維周囲に小顆粒の集積（矢印）が認められる。この顆粒を微小部X線分析すると、CaとPの著明なピークを示す（図左下）。



参考文献

- 1) Fernández-Morán, H.: EXP. Cell Res., 3, 282(1952).
- 2) Fernández-Morán, H.: Ark. Fys., 4, 471(1952).
- 3) Bernhard, W. & Leduc, E. H.: J. Cell Biol., 34, 757(1967).
- 4) Bernhard, W. & Viron, A.: J. Cell Biol., 49, 731(1971).
- 5) Christensen, A. K.: J. Cell Biol., 51, 772(1971).
- 6) Appleton, T. C.: Acta Histochem. Suppl. 8, 115(1968).
- 7) Appleton, T. C.: in Autoradiography of Diffusible Substances (L. J. Roth & W. E. Stumpf; editors,) P301. Academic Press Inc., New York, 1969.
- 8) Tokuyasu, K. T. & Singer, S. J.: Proc. 31st Ann. Electr. Microsc., 614(1973).
- 9) Tokuyasu, K. T.: J. Cell Biol., 57, 551(1973).
- 10) 酒井俊男：「医学，P.190 生物学のための応用電子顕微鏡学（総論）」（山田英智他編集），医歯薬出版，東京，1972。

U.D.C. 543.226:543.51

熱分析機—質量分析計の併用同時測定

吉村 貢* 堤 和生** 阿部 勲*** 田島英司****

1. はじめに

物質の熱的性質の研究に汎用される最近の熱分析機は、同時技法^①（Simultaneous Techniques）を採用して、多くの情報を得ようとしているが、単用では分解生成物に関する情報は全く得られない。分解生成物の定性・定量の手

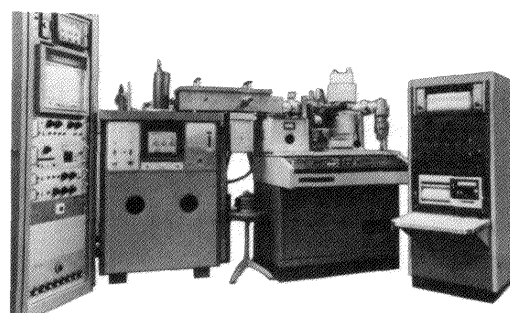
* 三重大学 農学部 教授，D. For.

** 三重大学 農学部 技官

*** 三重大学 農学部 助教授，農博

**** 日立製作所 那珂工場 電装部

① ICTA (International Confederation for Thermal Analysis) の1974年の承認用語



総合熱分析機（併用同時TG・DTA-MS測定機）

HITACHI 9

法として、加熱過程でガス採取を行い、後にGC-MS（ガスクロマトグラフを直結した質量分析計）にかかる不連続同時技法^④（Discontinuous Simultaneous Techniques）がある。また、連続測定を行う併用同時技法^⑤（Coupled Simultaneous Techniques）の一つにTCDあるいはFIDを用いたEGAがあるが、発生ガスの全量を測定するに過ぎない。そこで、発生ガスの定性定量のできる併用同時技法として、熱分析機と質量分析計の直結併用を考え、試作改良のうえ、昭和49年2月完成し、操作にも習熟したので、ここに報告する。

2. 装置

写真は本装置の前景を示し、左半分が熱分析部でMettler Thermoanalyzer 1型、右半分が質量分析部で日立RM-50にMIDを付属している。両部の中間にあって両機を結合しているインターフェースが接続部である。接続部を中心とした全体のシステムを図1に示す。

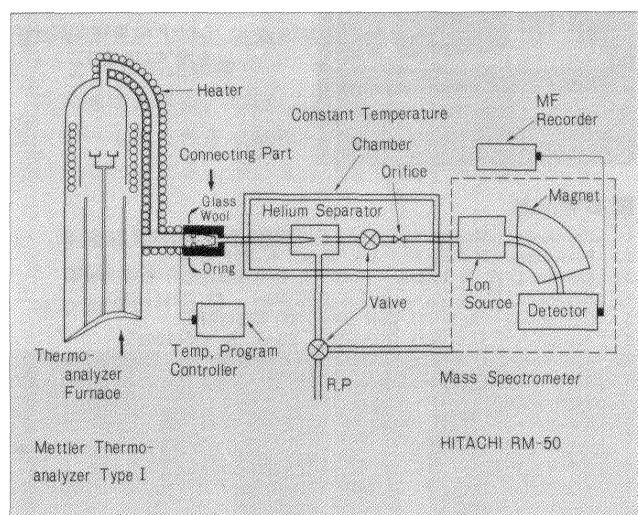


図1 熱分析機—質量分析計の接続系

2.1 熱分析部¹⁾

中温炉（1,000℃）を備えた標準仕様のうち、真空系を欠いている。炉は石英製で、下方の天秤部を通して送られるキャリアガス（Heを使用）と試料の熱分解生成物の混合気体は炉の上部に設けた径3mmの石英ガラス管を通して取出され、炉の側面に沿って下り、炉の中央部で炉体に直角に突出して接合部にはまる。この間に300Wのヒータと測温用CA熱電対が取付けられており、プログラムによって制御が可能である。

2.2 質量分析部²⁾

日立RM-50の標準仕様を備え、RM-50GCのGCに代えて熱分析機を接続し、検出はTIM（Total Ion Monitor）に加えてMID（Multi-Ion Detector）を用いた。熱分析機からのガスの導入はバルブによって遮断できるので、直接試料導入系を用いて独立に質量分析ができる。

磁場偏向形のMSではコレクタに捕捉されるイオンは $m/e = k \cdot r^2 \cdot B^2 / V$ で与えられる。

ここに m ：イオン質量数，
 e ：イオン電荷数，
 k ：比例定数，
 r ：イオン軌動半径（mm），
 B ：磁場強度，
 V ：イオン加速電圧（V）

単一イオン軌動を利用する検出法をとっているので、コレクタに入射する異なる質量数のイオンを検出するには、磁場強度あるいはイオン加速電圧を変化することによって質量スペクトルが得られる。MIDは高速性、操作性などの点から B を一定に保ち、 V を4個の特定 m/e について設定し、その電圧を順次高速で切替えることにより、4個のMF（Mass Fragment）を検出し、QPR₈₃形の6打点記録計に印画する。

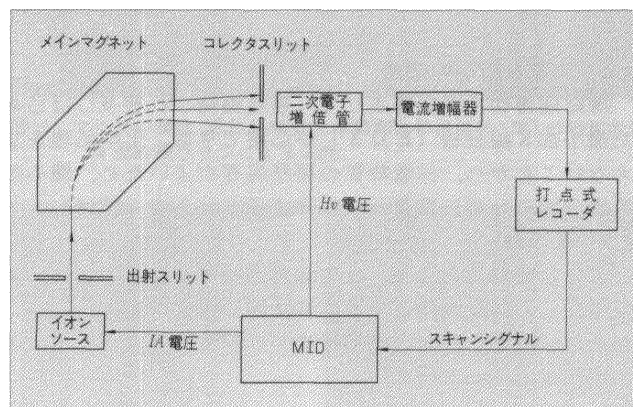


図2 MIDの動作原理を示すブロックダイアグラム

MIDの簡単な動作原理を図2に示す。MIDによって加速電圧（IA）と二次電子増倍管電圧（HV）を発生する。基準となるイオン加速電圧に対し、測定対象4個の m/e のうち最も小さい質量数のイオンがコレクタに正しく入射するよう磁場を設定する。さらに、測定対象イオンを捕捉するため順次それぞれのイオン加速電圧を相当電圧に設定する。一測定における m/e の選定可能範囲、すなわち加速電圧変化は30%の範囲に限定され、最大は520である。

まず、基準となる $m/e = n_1$ のイオンがコレクタに入射し、イオンは二次電子増倍管及び電流増幅器によって増幅され、記録計に入力される。記録計はそのときの出力電圧を記録紙に打点し、同時に次のペンに自動的に切替わる。この切替信号がMIDスキャンシグナルとなってMIDに送られ、次のIA電圧とHV電圧に切替えると、このIA電圧に相当する $m/e = n_2$ イオンがコレクタに入り、同様にしてこの動作が順次 n_3, n_4 と繰返され、4個のMFが得られる。HV電圧はイオン電流強度に応じて、予め設定しておく。この切替は打点記録計の切替時間2秒ごとに行われる。1サイクル6打点で、初めの4つをMF、次を温度（後述の接合部の温度）、最後をTIMに割当ててある。

2.3 熱分析部—質量分析部接続系⁵⁾⁶⁾

(1) 熱分解ガスの排出誘導管

熱分析部の炉内の試料容器で熱分解を受けて発生したガスは二次変化を受けることなく、速かに、逐次MSに達す

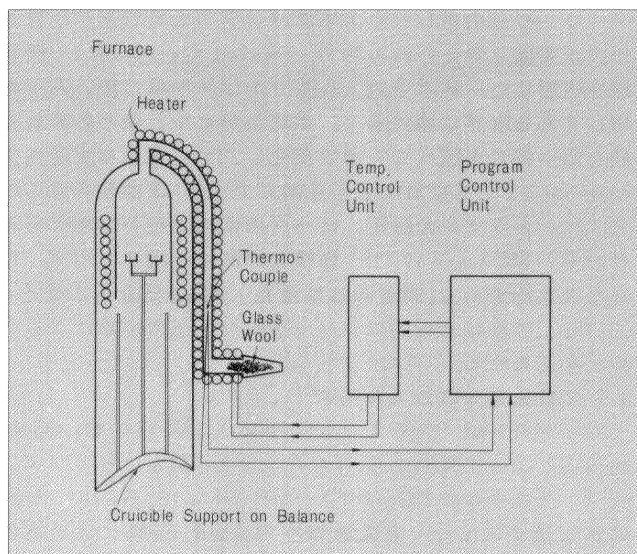


図3 炉付属熱分解ガスの排出誘導管の温度制御系のブロックダイヤグラム

る必要がある。このため空間を少なくするとともに排出誘導管を加熱制御した。しかし、この排出誘導管が加熱炉の側面に接するため、加熱条件によってはTGやDTAに影響するおそれがある。試みとして現在使用している制御系を図3に示す。制御は大倉電気PG2001形プログラムコントローラを用い、炉温プログラムに追従して排出誘導管をプログラム加熱している。

(2) 排出誘導管と濃縮圧力調整部との接合

熱分析部への試料の出入れに伴う炉の取外しのため、誘導管末端はテフロンOリングだけでセパレータに連なるステンレス管の先端の円筒形ステンレスコネクタに接続している。この接合部はヒータを組入れた逆U字被いを用い、スライダックスによって三面から加熱され、CA熱電対で測温し、MIDの記録計に打点している。また、タール状分解ガスを漏過するため、排出誘導管の末端の内径10mmの内部に石英ガラス綿が詰めてある。

(3) 熱分解ガスの濃縮圧力調整部(セパレータとオリフィス)

熱分析部は普通大気圧で操作され、MSは高真空中で測定される。また、熱分解ガスは多量のキャリアガス(He)によって希釈されているので、セパレータで選択的にキャリアガスを排除すると同時に圧力調整を行い、濃縮ガスの一部を金箔に設けたオリフィスを通してMSに導入する。オリフィスの直前には系を遮断するバルブが設けてある。

セパレータは日立の開発したパイレックスガラス製ジェット形である。これらの系は内径1mmのステンレス管によって連結され、一定温度に保つため1kWのヒータを内蔵したステンレス製蓋付箱(660×235×150mm)内に収容されている。これら一連のインターフェースによって、測定時MSは 2×10^{-6} t以上の真空度に保たれる。

3. 測定

GC-MSはGCによって分離した単一成分を定性しているが、TG(DTA)-MSは混合成分を直接MSに導入して、特定成分のMFを連続測定し定量を望むので、大変わずか

しい。普通MSによる定量は、混合ガスがどんな成分からなっているかを知り、各成分について標準スペクトルを得、検出感度及びパタン係数を求め、混合ガスの成分数だけ適当なイオンピークを選んで、連立方程式を解き、成分比を求めなければならないが、その詳細は成書³⁾に譲る。

測定に当っては、MSの真空度の安定など測定条件を一定にすることが大切である。MIDによる測定では、バックグラウンドピークはMFピークのベースラインに相当する。一方、熱分析部においては炉の内圧の制御に注意を要する。普通MSに直結した閉鎖系で操作すると、熱分解ガスの発生量の変化による圧力調整が困難である。熱分析部炉内のガス圧を大気圧に維持し、分解ガスの炉の下方天秤部への逆流を防ぐため、セパレータの吸引量よりやや多量のキャリアガスを送り、過剰を雰囲気調整用パイプラインを通して放流させる。しかし、過度または不安定なキャリアガスの送入は、分解ガスの希釈度に影響し、定量性を低下する。試行の後、250ml/minの一定流量(セパレータの吸引量230ml/min)で安定した測定ができることを知った。

一連のインターフェースの温度の基準については、炉側面のガス排出誘導管の加熱は炉温プログラムに追従させ、接合部は分解ガス沸点よりやや高目(最高300℃)に、濃縮圧力調整部は漏過分解ガスの沸点より約50℃高目(最高500℃)に設定する。

3.1 単一成分の定量⁴⁾⁵⁾⁶⁾

一成分の定量性は、試料量(発生ガス量=TGの重量減少)とMF面積との関係、すなわち検量線を検討すればよい。CuSO₄·5H₂Oの脱結晶水の測定における熱測定曲線とH₂OのMF曲線を合せて、図4に併用同時測定図を示す。図5はCuSO₄·5H₂O及びCaC₂O₄·H₂Oの結晶水の離脱と対応するMF面積との関係を示しているが、試料量、温度に関係なく、脱水量とMF面積とは良好な比例関係にある。

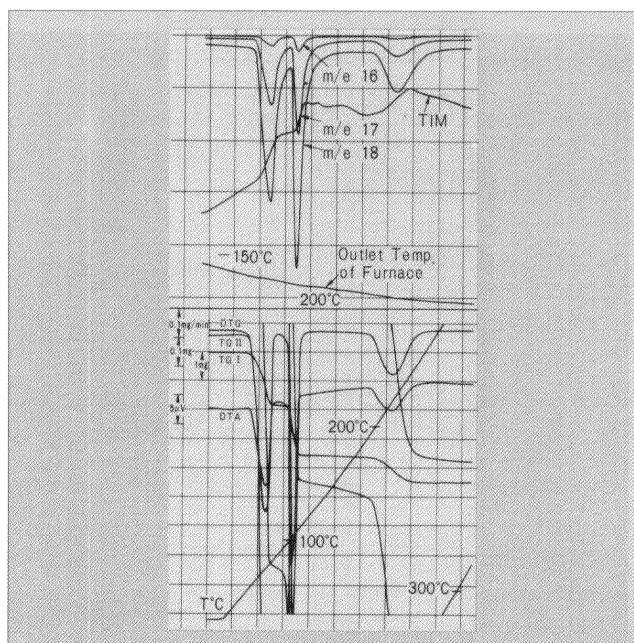


図4 硫酸銅五水塩の加熱による脱水のTG-DTA-MSの併用同時測定図

図6はパラホルムよりホルムアルデヒドの発生の熱測定とMSとの併用同時測定例を示している。図7は $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 量と CH_2O (m/e 29, 30)のMF面積との関係を示す検量線で、定量の可能を示している。

図4に見られるように、粉末試料よりの結晶水の離脱に伴うMFピークの立上り及び終末の不明確さ、MFピークの

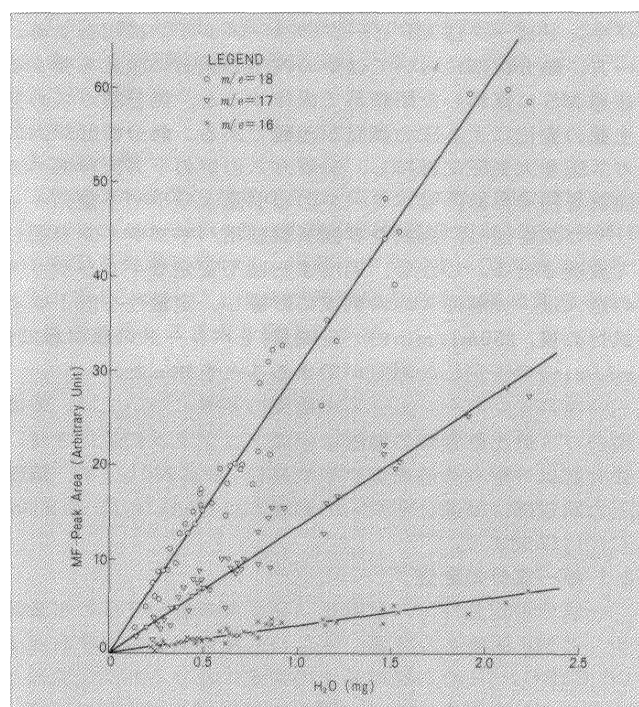


図5 硫酸銅及びシュウ酸カルシウムの粉末試料の熱分解における結晶水の脱離とMF ($m/e=16, 17, 18$) ピーク面積の関係 (試料量を異にする $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 14試料と $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2試料)

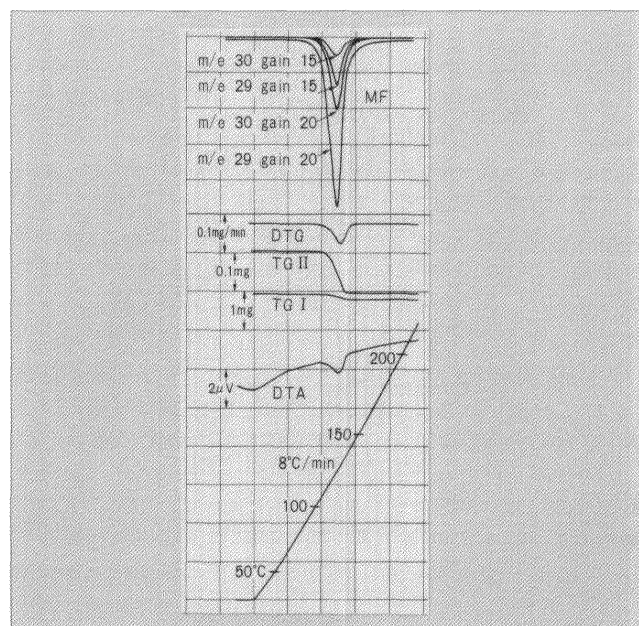


図6 パラホルムの熱分解とホルムアルデヒドのMF ($m/e=29, 30$) の併用同時測定

テーリング部の重なりによる面積測定 of 困難などが検量線の誤差要因と考えられるので、Sealed Cellを用いて検量線を検討した。純水を封入したセルは、加熱に伴い内圧を増してある限界に達すると、水蒸気がセルと蓋との密着の最も弱い部分を破って一挙に蒸発し、TGに急激な重量減少が見られるとともにMIDにも急激に立上るMF曲線を描くので、ベースラインの設定、ピーク面積の測定が容易である。水の量とMF (m/e 17, 18) 面積との関係を図8に示す。良好な直線性を示し、両直線は横軸を0.03mgで切って相交っている。これはセル内にシールされた空気の影響によるものと考えられる。

3.2 二成分系分解ガスの測定⁵⁾⁶⁾

モリブデン酸アンモニウム $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ は熱分解によって NH_3 と H_2O を発生する。図9にモリブデン酸アンモニウムのTG-DTA-MF (m/e 16, 17, 18) の同時測定図を示した。定量計算をSealed Cellによる水の $m/e=16, 17, 18$ のMF面積比(パタン係数)とリン酸二水素アンモニウムより得た $m/e=16, 17$ のMF面積比を用いて行い、その結果を表1に示した。MF面積よりの定量値はTGの実測値ならびに理論値と比較して可成りよく一致している。

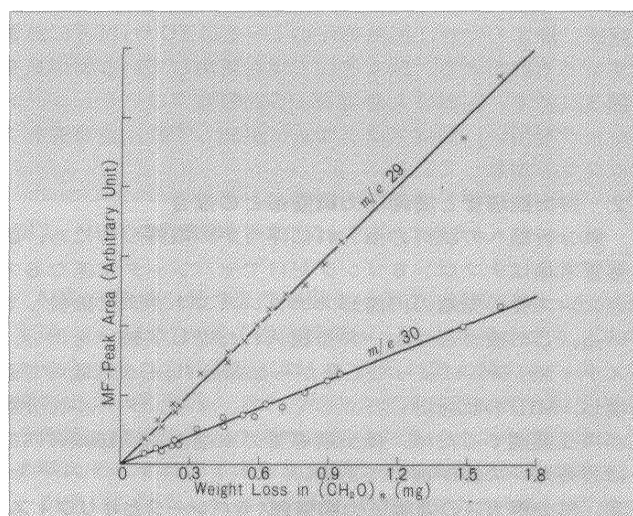


図7 加熱によるパラホルムの重量減少とMF ($m/e=29, 30$) ピーク面積との関係

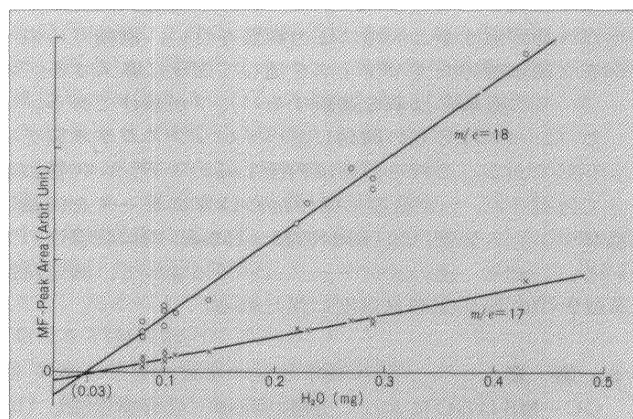


図8 Sealed Cellを用いた測定における水よりの水蒸気の発生とMF ($m/e=18, 17$) ピーク面積の関係

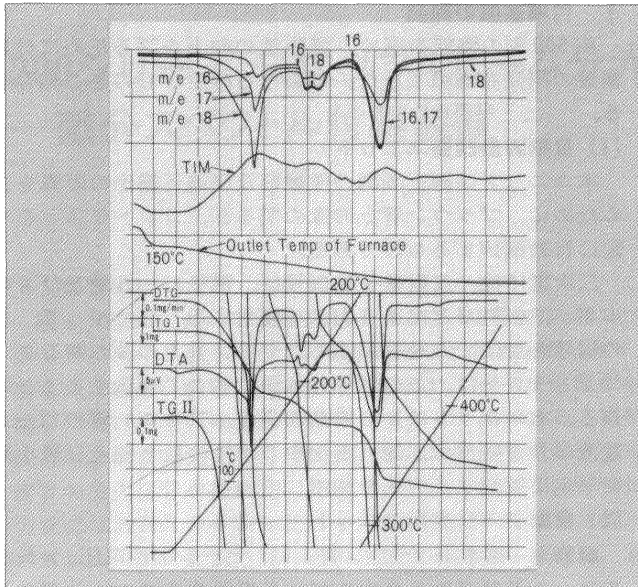


図9 モリブデン酸アンモニウムの熱分解におけるTG-DTA-MF (m/e=18, 17, 16)の併用同時測定

有機高分子の複雑な熱分解ガス中の特定成分の測定例として、ポリウレタンフォームの熱分解におけるシアンの発生が測定されている。⁵⁾

表1 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の熱分解における発生ガス (NH_3 , H_2O)のMF曲線よりの定量(%)

Peak No.	1	2	3	4	Total	Calculated
NH_3	1.35	0.95	1.24	4.78	8.31	8.25
H_2O	6.37	0.50	0.71	3.03	10.61	10.19
Total	7.72	1.45	1.95	7.81	18.92	18.44
Weight Loss(TG)	8.76	1.37	1.39	7.21	18.73	18.44

4. おわりに

熱分析機—質量分析計の結合装置を作り、操作に習熟して、併用同時測定が一応可能になったので、例をもって説明した。この結合装置はまだまだ改善を要するところが多く、今後の研究開発を強く望むものである。

参考文献

- 1) Mettler Instrumente AG, Thermoanalyzer 1 TG-DTG—DTA-T-P (1.7038.72)
- 2) 日立製作所：RM-50GC形取扱説明書、多重イオン検出装置取扱説明書、QPR₈₃形日立打点記録計取扱説明書
- 3) 土屋利一、質量分析(基礎分析化学講座25)88~89、共立出版(1967)；横田 勉、質量スペクトル解析法(日本化学会編、実験化学講義14、質量スペクトル207~234、丸善(1966))など
- 4) 堤 和生、阿部 勲、吉村 貢、日本木材学会研究発表要旨(24回)、37(1974)
- 5) 堤 和生、吉村 貢、同上(25回)、216(1975)
- 6) 堤 和生、吉村 貢、田島英司、熱測定討論会講演要旨集(10回)7~8(1974)

解 説

U.D.C. 621.385.833.28

S-500形 日立高分解能走査電子顕微鏡

齊藤康示* 古屋寿宏* 山田 理*

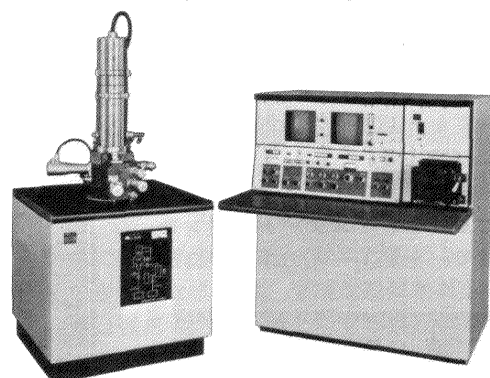
S-500形 日立高分解能走査電子顕微鏡(以下「S-500形」という)は、高性能で定評のあるHHS-2R形SEMを母体にして、年々増大する新しい需要分野の要求に沿って開発した新形走査電子顕微鏡(以下「SEM」という)である。

S-500形は、70 Åの高い保証分解能に加えて、新しく開発した新機能と装置の自動化により、簡単な操作で使える高性能・多機能SEMであることが特長である。以下S-500形の主な特長、及び仕様の概略について述べる。

1. 高分解能

S-500形は、レンズ系として3段レンズ系の採用により、十分小さな電子プローブ径を得ており、これに加えて、分解能を低下させる原因である散乱電子を完全に取除く設計になっているので、70 Åの高い分解能を余裕をもって保証している。

また、対物鏡りにセルフ・クリーニング絞りを採用しており、長期間にわたって、高分解能が維持できる特長をも



S-500形 日立高分解能走査電子顕微鏡

っている。

2. 観察性能の向上

2本の大形ブラウン管と、全視野ラピッドスキャンの採用により、大幅に観察性能が向上した。すなわち、大形ブラウン管でS/Nの良い静止画像での観察が可能になり、

HITACHI 13

* 日立製作所 那珂工場 電装部



SEMでの視野探し、焦点合せ、非点補正が容易にできるようになった。

また、シグナル・セレクトラ部を設けることにより、二次電子像以外に、6種の像信号（吸収電流像、反射電子像、X線像など）をワンタッチでブラウン管上に出す機能が追加された。

3. 操作性の向上

電子回路の自動化により操作パネル部のつまみは、機能の増加にかかわらず少なくなっており、押しボタンスイッチによるワンタッチ操作が可能となり、操作が簡単になった(図1)。

以下、自動化の主なものについて述べる。

(1) 全自動倍率表示

S-500形の倍率表示は、ビーム加速電圧による倍率自動補正に加えて、試料位置による倍率補正を、焦点合わせをする操作と連動して自動的に補正される機能が付加された。これは、試料上に焦点を合わせることで、試料までの距離を計測し、倍率を補正する自動回路の開発により可能となった。

また、表示はオートレンジ方式を採用しており、操作者はビーム加速電圧の設定と焦点を合わせるだけで、あとは倍率切換えつまみを回せば正しい倍率が自動的に表示される。

(2) クイックリターン・システム

観察像を写真にとる場合の自動化システムである。

通常のシステムでは、次の8ステップの手順が必要とされている。すなわち、

- ①ラスタスキャン速度を像観察の速度から像撮影の速度に切換える。
- ②フォト・スタンバイ (Photo standby) 状態にする (撮影用ブラウン管の像を消す)。
- ③カメラのシャッターを開ける。
- ④フォト・スタート (Photo start) ボタンを押す (撮影状態になる)。
- ⑤撮影状態が完了したことを確認する。
- ⑥カメラのシャッターを閉じる。
- ⑦フォト・スタンバイ状態を解除する。
- ⑧ラスタスキャン速度を像撮影から観察の速度に切換える。

本システムでは、日立オートカメラをもっているのので、フォト・スタートボタンを押す操作だけで、上記①～⑧の手順が自動に行われる。

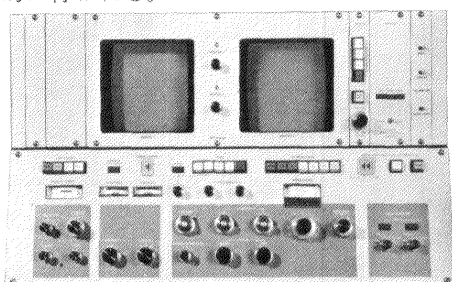


図1 ディスプレイ本体の操作パネル部
及び像表示部(オプションを含む)

4. 付属装置の開発

S-500形の機能を高め、操作性の向上を図るために付属装置の開発を進めてきた。このうちの主なものをご紹介します。

(1) 自動画像調整ユニット

本ユニットは適正画調の像観察及び適正露出の写真をとるために、ブラウン管上の像の明るさ、コントラストを一定に自動制御するものである。

二次電子像、反射電子像信号は、電子ビーム量及びエネルギー、試料などにより大きく変化する。したがって、この信号を受けて像を表示するブラウン管上の像の明るさ、コントラストは、この信号の強弱に応じて変化するようになる。本ユニットによる自動画調は、ブラウン管のビーム電流信号を検出し、像一画面中の信号の最大値及び最小値を一定に制御する方式を採用している。

(2) 自動データ表示ユニット

観察用・撮影用ブラウン管上に、ビーム加速電圧、 μ 長さスケール及びフィルムナンバーを表示するユニットである(図2)。これらの表示は加速電圧つまみ、倍率表示器及びフォト・スイッチと連動した全自動方式となっている。

5. 主な仕様

- | | |
|-------------|---|
| (1) 分解能 | 70 Å |
| (2) 倍率 | $\times 20 \sim \times 200,000$ |
| (3) 加速電圧 | 1 ~ 30 kV, 8 ステップ |
| (4) 試料微動 | X: ± 8 mm, Y: ± 5 mm
T: $-5^\circ \sim +45^\circ$, R: 360° |
| (5) ブラウン管 | 観察用 $\times 2$, 150 $\times$ 135 mm
撮影用 $\times 1$, 120 $\times$ 90 mm |
| (6) スキャンモード | ラスタスキャン, ラインセット, ラインアナリシス, スポット, オブリック |

以上 S-500形の主な特長・仕様について述べた。

S-500形は高性能・多機能に加えて操作性を向上させたことに特長がある。この装置が各応用分野における研究・開発のお役にたてば幸いである。

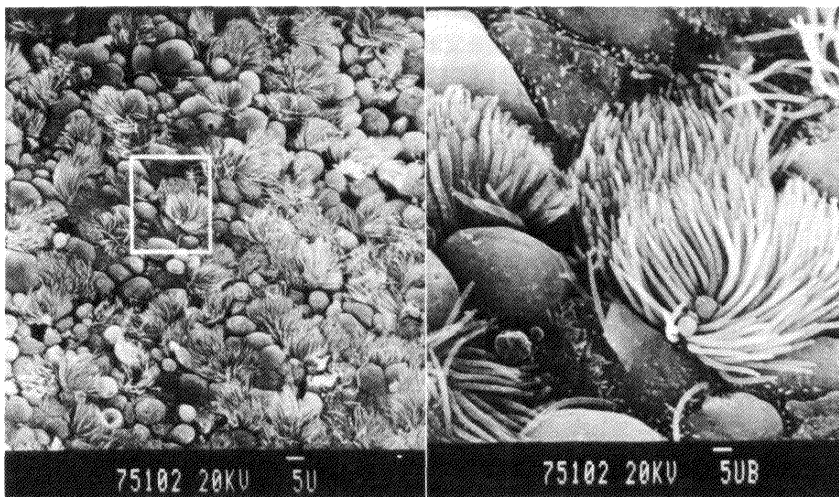


図2 撮影例



U.D.C. 681.785.422.2.087.92:681.335.7

200シリーズ 日立ダブルビーム分光光度計(Ⅱ) —微分スペクトル付属装置—

遠山 恵夫* 福田 健二* 保田 和雄* 小森 律夫**

1. はじめに

吸光光度法において、測定しようとする試料の吸収スペクトルがバックグラウンドの影響を受けて浮き上がったり、あるいは幅広い吸収バンドの中に隠されてピーク位置が判別しにくい場合の検出法に微分スペクトル法がある。微分法には2波長分光光度計に代表される光学的方法と分光光度計の出力信号を電氣的に処理する方法とがある。電氣的方法には波長スキャンしたデータをデジタルメモリやテープレコーダに記憶させ、その後微分処理する方法と、直接アナログ回路により微分する方法とがある。

このほど、200形 日立ダブルビーム分光光度計の特別付属品として、微分スペクトル付属装置を製作したので、その装置の内容、測定例について報告する。

2. 微分スペクトルの測定法

本装置ではアナログ回路による微分方式を採用している。図1は(i)従来の微分法と(ii)本報告による微分法の差を示すが、1回微分を行った情報をさらに微分する場合、微分情報を1回ずつ平滑化(スムージング)することにより、高次微分になるほど平滑化の効果が高まる。図1の下段は(i)従来の微分回路、(ii)平滑化の効果を加えた回路を示す。(ii)

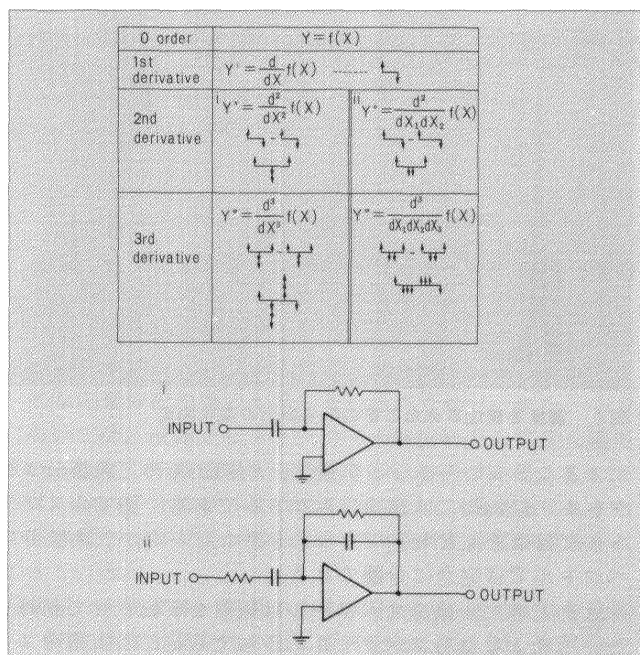
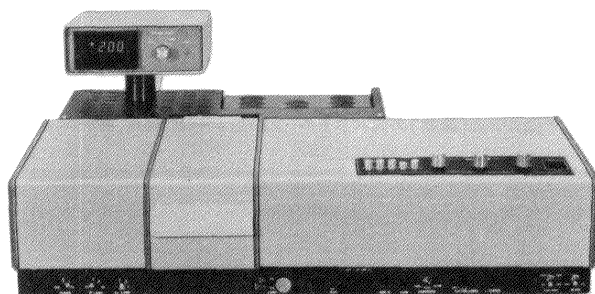


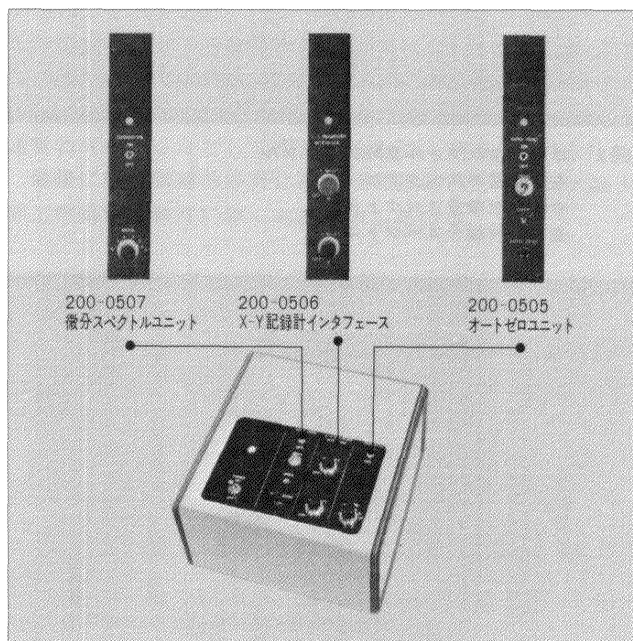
図1 微分法の比較 (i)従来の方式 (ii)平滑化の効果を入れた方式

* 日立製作所 那珂工場 光装部

** 日立製作所 那珂工場 応用技術部



200-20形 日立ダブルビーム分光光度計



微分スペクトル付属装置

の方式では従来方式に比べて X_1 と X_2 の2点(あるいは2回)の情報を必要とするが、平滑化の効果が大きい。アナログ微分法は従来より高次微分になるほど雑音レベルが大きくなって使いづらく、また定量性に欠けるといわれてきたが、本方式によりこれらの欠点が改善され、十分実用に足ることが証明された。

3. 二次微分への発展

一次微分スペクトルでは微分を行わない通常のスペクトルとの対応が付きづらいのに対し、二次微分スペクトルあるいは偶数次微分のスペクトルでは、ピークの表われ方がよく似ており、対応が付きやすい。図2は干渉フィルタを

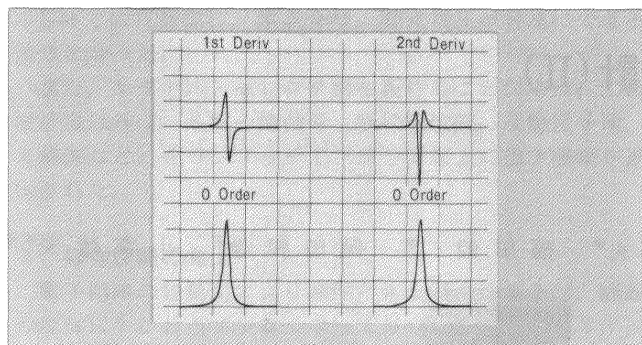


図2 干渉フィルタによる0次、一次、二次微分スペクトル
下段が0次(通常)のスペクトル 上段左が一次微分、右が二次微分

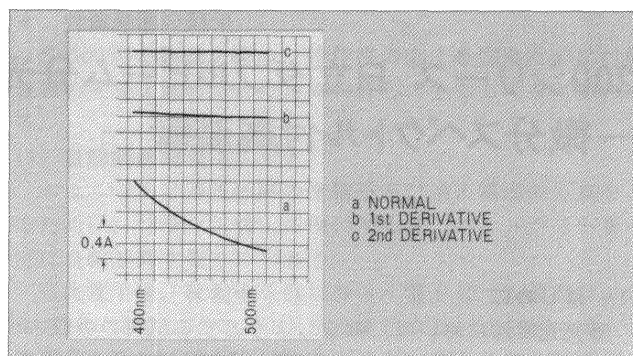


図5 微分によりバックグラウンドを除去した例

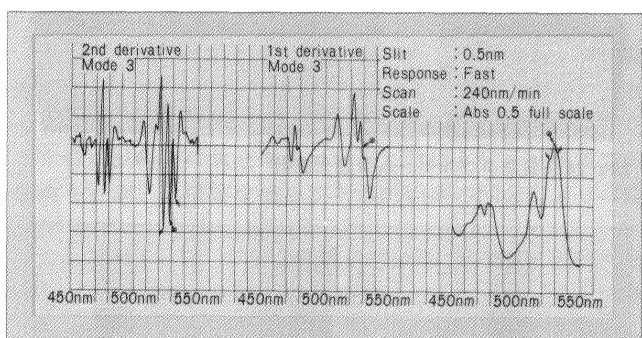


図3 ネोजウムフィルタのスペクトル
右：通常のスペクトル
中：一次微分スペクトル
左：二次微分スペクトル

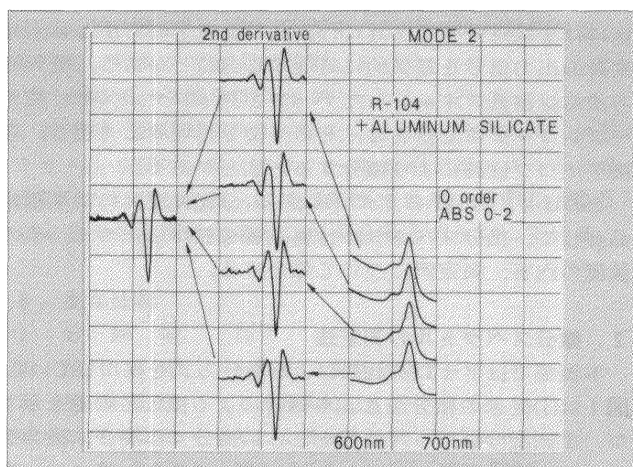


図6 バックグラウンドを除去し、必要な吸収ピークのみを測定した例

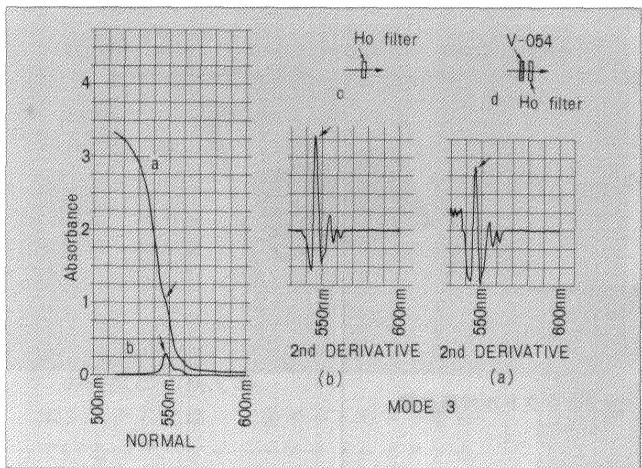


図4 二次微分による隠れたピークの検出例

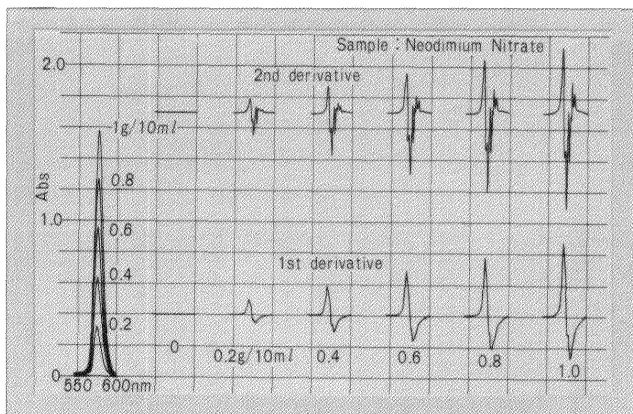


図7 濃度を変化させたときの微分出力の変化測定

用いて、通常のスペクトルと一、二次微分スペクトルとを比較したものである。

図3はネोजウムフィルタを用いて通常のスペクトルと一、二次微分スペクトルを比較したもので、一次微分ではピーク位置がベースラインを切る部分に相当するのに対し、二次微分ではピーク位置が通常のスペクトルと対比が付きやすくよくわかる。ただし、ピークの出る方向が通常のスペクトルと逆方向に出ることが特徴である。

図4はホルミウムフィルタ(b)と540nmで急激な立ち上がりをもつショートカットフィルタV-054を重ねた(a)もの

によるシミュレーション実験で、cはbのみの二次微分スペクトル、dはaの二次微分スペクトルである。通常のスペクトルではほとんど判別できない小さなピークが二次微分スペクトルでは完全に分離できる。

このとき二次微分スペクトルは極性を反転させて記録した。これより微分スペクトルのうちでも特に二次微分スペクトルはピークの判定には有利であることがわかる。

4. バックグラウンドの除去

一般にバックグラウンドと呼ばれる吸光度の浮き上がり

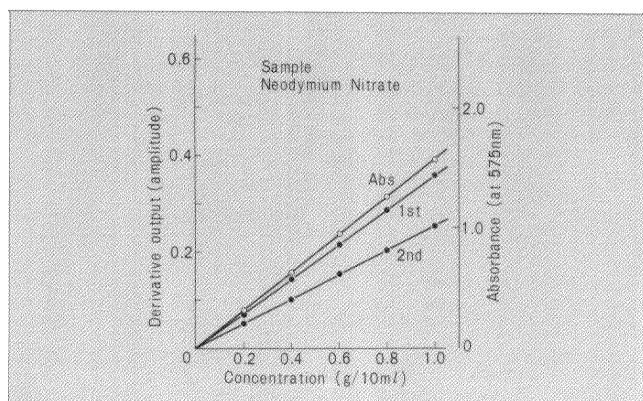


図8 微分出力の直線性

は、波長とともに直線的に変化するか、または二次函数的な曲りをもつ。このような場合は、微分を重ねればバックグラウンドによる浮き上がりを補償できる。

図5は試料に牛乳懸濁液を用いてそのときの通常のスペクトルと、一次、二次微分スペクトルを比較したもので、二次微分になるとほぼ完全に浮き上がりが補償されていることがわかる。

図6は食品着色料として用いられているR-104号を一定濃度とし、ケイ酸アルミニウムを増加させて濁りを変化させた場合の混濁試料の吸収スペクトルで、右側が通常のスペクトル、中央が二次微分スペクトルで0点位置を移動さ

せて記録したもの、左側は同一0点位置で4種のスペクトルを重ねて記録した。ピークの位置の一致度は当然のことであるが、その振幅にもよい一致度が得られる。

これより微分スペクトル法はバックグラウンドの除去に威力を発揮することがわかる。

5. 微分測定の定量性

図7は硝酸ネオジウムの吸収スペクトルのうち、550～600nmの間のピークについてその微分スペクトルを記録したものである。このときの微分値の振幅を測定し、グラフにまとめたのが図8で、吸光度1.5近辺までよい直線性が得られることがわかる。

6. おわりに

微分スペクトルにより隠れたピークの検出、バックグラウンドの除去ができることがわかった。特に本報告のアナログ回路による微分法は操作が簡単で安価であるという特長があり、今後、混濁試料の検査や汚水の管理などにも有効な手段となることが期待できる。

現在のところでは、微分スペクトル法の普及率が低く、また微分スペクトル自体が通常のスペクトルよりも一見複雑に見えるので、バックグラウンドのみを微分法により除去し、その後積分して目的の試料の吸収スペクトルのみを通常のスペクトルとして復元する方法に期待がかけられる。

最後に微分回路の設計に当たりご指導いただいた大阪大学工学部南助教授に厚くお礼を申しあげる。

U.D.C. 681.785.452:543.426

204-R形 日立分光けい光光度計とその応用

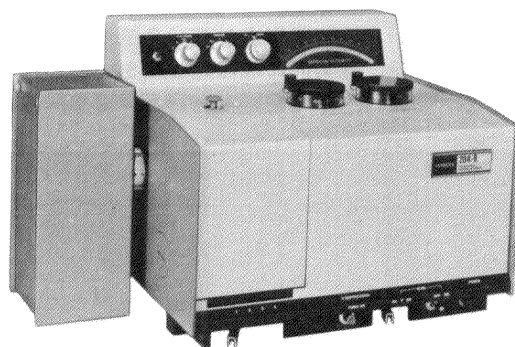
1. はじめに

近年、ますます微量かつ高精度分析を旨とする分析化学の中で、けい光分析は、高感度な分析法として注目されてきている。定性的なスペクトル測定に加えて、例えば、ベンツピレンやポリフィリンの測定に見られるように、ルーチン的な定量分析の場にも取り入れられており、また、一方においては、液体クロマトグラフの検出器として広く活用されるなど、その活躍には目ざましいものがある。このように、けい光分析が一般的になるに伴い、従来よりもさらに高感度かつ高安定な簡易形のけい光測定装置が要求されてきている。

今回、日立では、従来の204形分光けい光光度計を見直し、特に感度と安定性の面に改良を加えて、204-R形分光けい光光度計（以下「204-R形」という）として製品化したので、その紹介と応用の一端について報告する。

* 日立製作所 那珂工場

広瀬 弘* 嶺岸 久子* 馬場 護郎*



204-R形 日立分光けい光光度計(本体)

2. 装置

2.1 構造

204-R形は、従来簡易形けい光分析装置として好評を博してきた204形分光けい光光度計の光学系を引継ぎつつ、

HITACHI 17

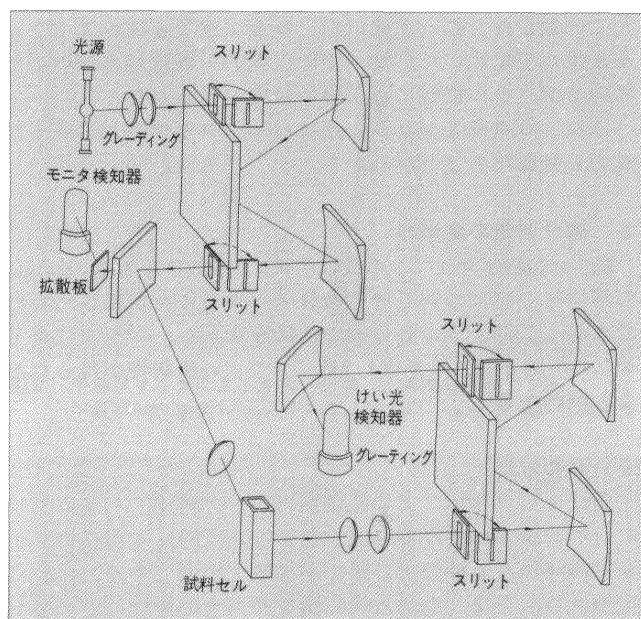


図1 204-R形の光学系統図

その電気系を大幅に改良し、併せて高感度化、高安定化の改良を行ったものである。右にその外観を示すように、デザインは204形分光けい光光度計をそのまま引継いでいる。光学系を図1に示す。光源には定電流点灯の150Wキセノンランプを用いていること、励起用の単色光を得るためと、放射されたけい光を測定するための2台の明るい(F:3)分光器を備えていること、さらに、けい光の検知器として、特に選別した高感度・低暗電流のホトマルチプライヤを用いていること、などは、従来の204形分光けい光光度計と同じであるが、204-R形の特長は、新たにモニター検知器を付け加えて励起光をモニタしていること、従来の10nmスリットに加えて20nmスリットを設け、バンドパスを2段切換としたことにある。

モニタ用の検知器は、励起光分光器射出スリットの後に配置され、励起光をモニタするものである。試料から放射されるけい光は励起光強度に比例しているの、励起光強度に変動がある場合には、その変動の影響をまともに受ける。しかし、けい光検知器出力とモニター検知器出力との比をとることにより、等価的に励起光強度を一定と見なすことができる。一般に、けい光光度計においては、その安定

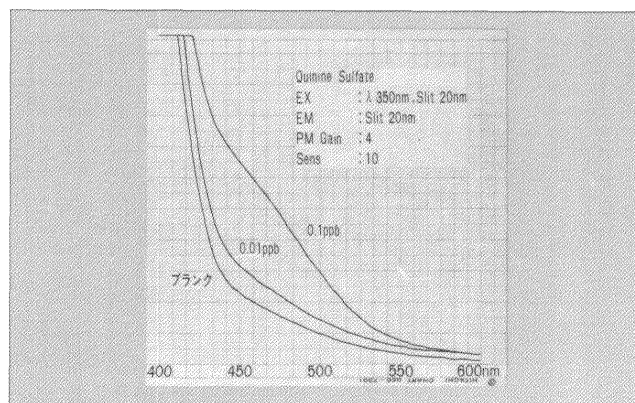


図3 204-R形の検出限界

性は光源の安定性に支配される場合が多いが、このようにして光源の明るさの変動を補償しているの、高い安定性を得ることができる。しかも、光源から出た光をそのままではなく、分光器を通った励起単色光としてモニタしているの、確実な動作が得られる。図2に204-R形の安定性を示す。試料には拡散板を用いた。

スリットは、励起側・けい光側両分光器とも、10nm、20nmの2段に、それぞれ独立に切換えることができる。20nmスリットは特に低濃度試料の分析に適している。図3に、低濃度の硫酸キニーネの測定例を示す。0.01ppbの硫酸キニーネが明りょうに測定できているのがわかる。

ゼロサプレッションはフルスケールの3倍まで可能にした。ブランクレベルの高いサンプルの測定も、精度よく行うことができる。

2.2 性能

204-R形の主な性能は次のとおりである。

測定方式：比測定

分光器：たて形エパート・マウンティング

グレーティング 600本/mm

300nmブレース

波長範囲：0次、220～650nm

スリット幅：10, 20nm 2段切換

感度切換：ホトマル 5段

増幅器 5段

ゼロサプレッション(フルスケールの3倍)付

波長送り：60nm/min

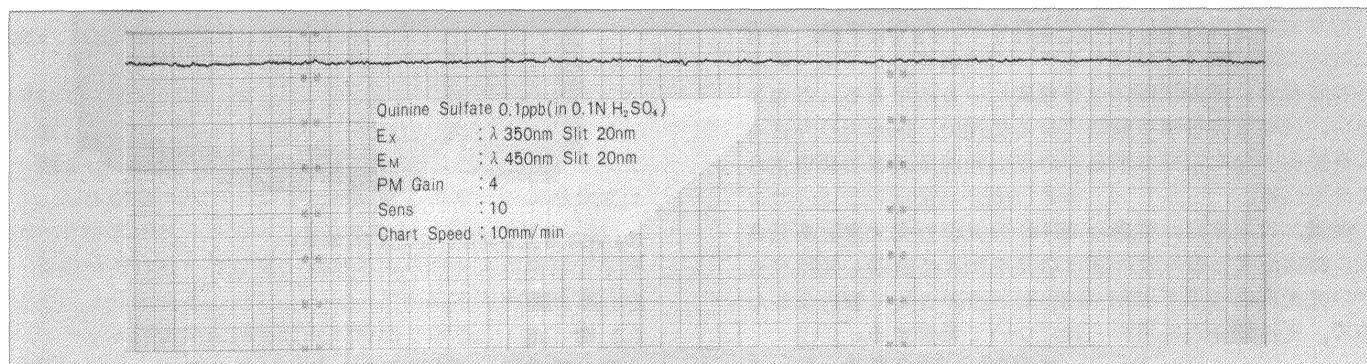


図2 204-R形のドリフト特性

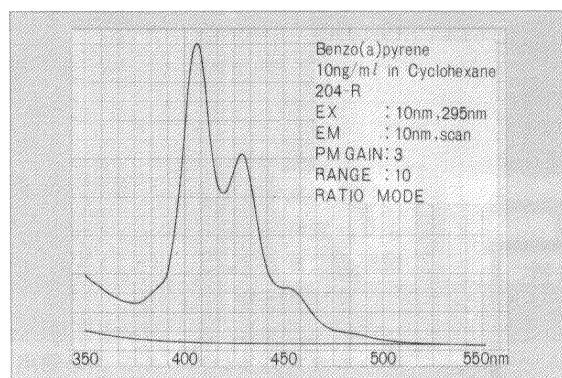


図4 ベンゾ(a)ピレンのけい光スペクトル

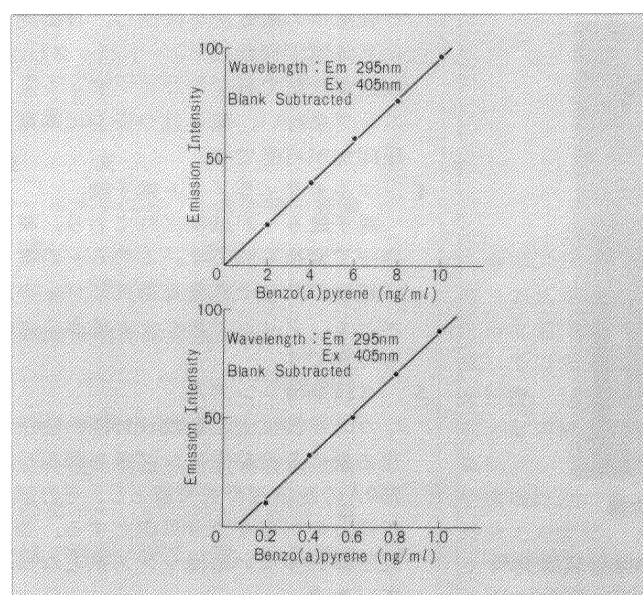


図5 ベンゾ(a)ピレンの検量線

3. 測定例

3.1 ベンゾ(a)ピレン

発ガン物質として有名なベンゾ(a)ピレンのけい光スペクトルを図4に示す。濃度は10ng/ml(約10ppb)である。特徴的な3本のピークがはっきり現われており、定性分析に使用できる。また、図5に10ng/mlから0.2ng/mlの濃度範囲

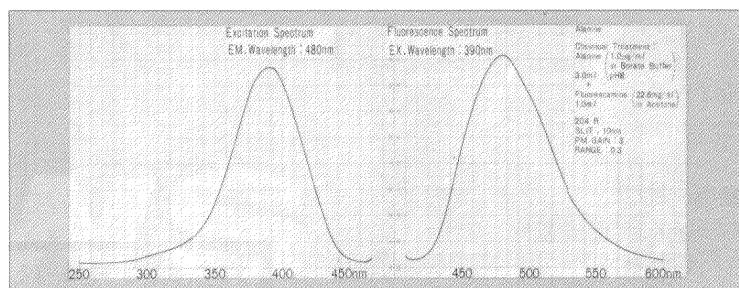


図6 アラニンの励起・けい光スペクトル

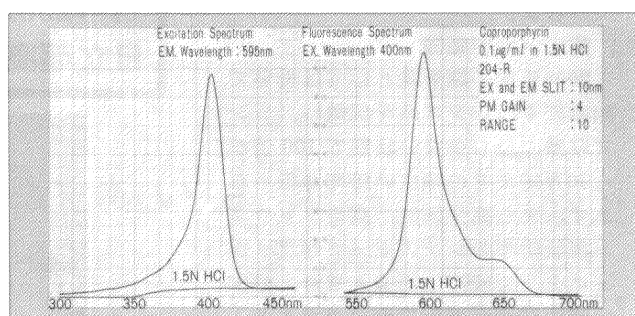


図7 コプロポルフィリンの励起・けい光スペクトル

の検量線を示す。かなりよい直線性を示しているので、定量分析が可能である。なお、検出限界は0.1ng/mlである。

3.2 アラニン(フロレスカミンで発色させた場合)

ほとんどのアミノ酸はけい光性でないで、発けい光のための処理をしなければけい光測定はできない。発けい光試薬に関してはいろいろな研究がなされており、二、三の試薬は市販されている。フロレスカミンは現在最も新しい試薬であり、1級アミンと直接反応して強いけい光を生ずる。アミノ酸の一種であるアラニンを処理してけい光スペクトルと励起スペクトルを測定した結果を図6に示す。

3.3 コプロポルフィリン

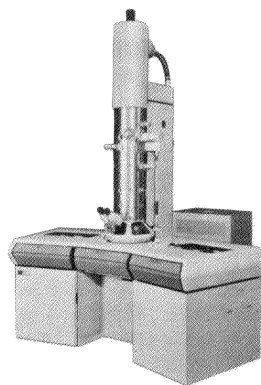
鉛中毒患者の尿の中にはポルフィリンが多量に含まれている。ポルフィリンは赤色の強いけい光を有しているので、尿をけい光光度計で測定することによって、中毒患者を発見することができる。図7にコプロポルフィリンのけい光及び励起スペクトルを示す。なお、コプロポルフィリンの検出限界は0.1ng/mlであった。



安定した200kVの加速電圧
による高透過能, 2.8Å分解能
保証, 高信頼性, すぐれた
操作性をもつ

H-700

日立200kV電子顕微鏡



このたび、日立では、生物、医学はもとより金属分野の広い応用分野をもつ、いわば普及形ミニ超高压電子顕微鏡 H-700形を開発しました。

この H-700 形は、加速電圧が 200kV で、その他の機能は H-500 形高性能電子顕微鏡と同様なので、常に安定した高性能、すべての要求にかなえられる多くの機能(付属装置等)を持つ使いやすい電子顕微鏡です。電子銃および高压系は 200kV にもかかわらず小形化され、据付面積も H-500 形と変わりあ

りませんので、通常の部屋に設置可能で、全ソリッドステート化により信頼性は向上し、消費電力も従来相当品に比べ半減しています。

■特 長

1. 200kVの加速電圧

新技術によるコンパクトな多段加速電子銃、新開発の高圧基準抵抗素子の採用により、安定した高電圧が得られます。

2. 幅広い倍率範囲

200kV電子顕微鏡としては世界で始めて4段レンズ系を採用し、レンズ収差の最も少ない状態で100倍から30万倍までの幅広い倍率が得られます。また高分解能、高コントラスト極低倍率のレンズモードをプッシュボタンで瞬時に切替えでき、倍率はデジタル表示で直読できます。

3. 多目的に対応できる電子回折モード

制限視野像と回折像はワンタッチで切換えられ、制限視野回折のカメラ長は100mmから2,000mmまで5段階に切換えられます。また高分解能回折はもとより、高分散回折も可能で最高30mまで伸ばすことができます。

4. 操作容易な全自動カメラ

シャッターレバーの操作だけで撮影、フィルムへの記録、フィルム送りが自動的にこなれます。撮影したフィルムには、撮影順にフィルムナンバー、倍率、加速電圧、レンズ条件などを自動的に焼き込むことができます。

5. 全自動排気系

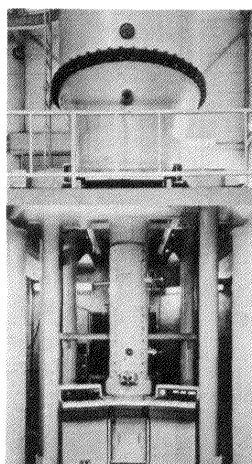
始動ボタンを押せば、プログラムに従い自動的に排気操作が進みます。停止時も同様です。また誤操作、停電、断水などの外因事故に対しても、必要な保護操作をただちに実行しま

すので安心して無人運転ができます。

6. 付属装置の完備

サイドエントリーゴニオステージ、SEM、EDX、アタッチメントなど豊富な特別付属装置が完備されています。

高性能、万能形、操作性に優れた H-1250形 日立超高压電子顕微鏡



H-1250形日立超高压電子顕微鏡

このたび日立では、無機材質研究所殿よりの受注を契機として、新たにH-1250形超高压電子顕微鏡を開発いたしました。

従来のH-1000形超高压電子顕微鏡の加速電圧を、1,000kVより1,250kVとし、レンズ励磁電流回路のIC化を計り、その性能、信頼性及び、操作性を一段と向上させ、2Åの分解能撮影が可能で、更に超高压電子顕微鏡の特長を充分発揮させる為の照射室、試料室、5段結像レンズ系、イオンポンプ使用

の排気系等の設計には種々の考慮を払っています。

■特 長

1. 高分解能20Åの撮影ができます。

独自の超高压基準抵抗素子使用により、短時間で安定になり高分解能撮影ができます。

2. 一体化加速管

電極と絶縁部が一体化されており、アウトガスの多いパッキングの使用を最小限としています。

3. 高電圧自動昇圧装置

極微少の暗電流を検出し、自動的に昇降電圧回路にフィードバックし、無放電状態で昇圧及びコンディショニングを行い、簡単且つ安全に高電圧印加が可能です。

4. マルチフィラメント電子銃

電子銃6ヶが装填されており、真空中で交換可能です。この6ヶの電子銃は、それぞれ異なる条件にフィラメント、グリッドをセットすることも可能です。

5. 5段結像レンズ系

カメラ長拡大と制限視野径の縮小化の為に5段結像レンズ系を採用し、250Åの制限視野を可能とし、その回折像との対応を充分可能とする、相互干渉の少ない結像レンズ系となっています。

6. 能率的なズームレンズ方式

レンズ励磁電流回路のIC化により、新方式のズーム式倍率変換システムの採用を可能とし、1個のつまみで倍率を最低から最高へと一挙に変えることが出来ます。

7. イオンポンプによる加速管の排気

加速管のクリーンバキュームと連続排気の操作性向上の目的からイオンポンプによる排気を行っております。

〔編集後記〕

■本ニュースの刷り色として数年間採用してきました茶色を、このたび、日立理化学機器に採用しております「うぐいす色」に変更いたしました。ご諒承下さい。

■俵先生には、フィールドエミッション形SEMを使用しての、免疫走査電顕法によるウイルスの研究について報告していただきました。

■吉村先生には、熱分析機と質量分析計を連結し、検出器にTIMとMIDを用いた同時分析システムによる分解ガスの定量につ

いて報告していただきました。

■200シリーズ日立ダブルビーム分光光度計微分スペクトルによる、隠れたピークの検出やバックグラウンドの除去は、今後広い分野における活用が期待されます。

本NEWSに関するお問合せは、下記へご連絡ください。

日製産業株式会社 精機部
東京都港区芝西久保桜川町2 第17森ビル
〒150 TEL (03) 501-5311

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SPRING 1976, Vol.19 No. 1

発行 昭和51年4月1日

(年4回 発行)

発行人 湯川 清

編集人 岩橋 勲 岩井孝之

発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
東京都港区芝西久保桜川町2 第17森ビル
〒105 TEL (03) 501-7201

印刷所 日立印刷株式会社