THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

WINTER 1979
VOL.22 NO.3/4

● 目　次 ●

報　文

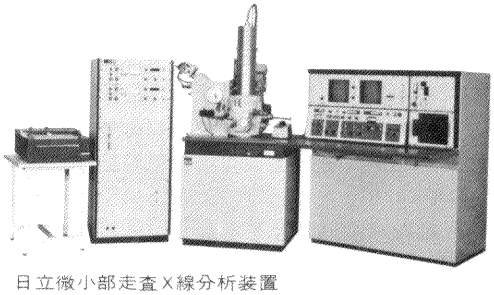
U.D.C. 581.43.086.3:57.086.13
543.423.8:543.84:546.32.06

X線マイクロアナライザによる植物体中水溶性イオンの凍結試料の分析

茅野　充男*　肥高　洋**

1．はじめに

植物体内における無機元素の微細分布を知ることは植物の栄養状態を知るうえで必要なことである。従来はミクロオートラジオグラフィーや組織化学的手法が利用されていたが，近頃はX線マイクロアナライザの利用が増えてきている。[1~3]



日立微小部走査X線分析装置

生物体内で重要な役割を果しているK，Ca，Mg，P，Cl，Sなどの元素は水溶性の形態で存在している部分が多く，試料調製の過程で流失して分布が変ってしまうという問題が起る。このような問題を回避するため凍結乾燥法が専ら利用されているが，植物細胞は容積の大部分が液胞と呼ばれる水の袋であり，外側に強固な細胞壁があるので精緻な凍結乾燥技法を用いても不均一な収縮が生じて観察される像は期待されるほどのものとならない。そこで生体試料を凍結させたままで像観察と元素分析を行なうこととした。

すなわち，液体窒素で短時間に凍結した生試料を波長分散形X線分光器と試料冷却ステージを装着したX線マイクロアナライザの試料室内で割断し，凍結状態で二次電子像の観察と元素分析を行った。

試料の固定，脱水，包埋，薄切，蒸着等の操作を全て省くことができ，しかも鮮明な像を得ることに成功した。植物について同様の手法を用いたものとして西ドイツの*Läuchli*一派の報告[4]と著者らの報告[5]がある以外にはあまり多くないが，試料調製が容易で，元素分布の乱れが生じにくい点で広く利用されてもよいように思われる。ここで述べるカリウムは適当なラジオアイソトープがないうえに体内では水溶性イオンとして存在するので本法でなければ正確な分布を知ることは現在のところ不可能と思われる。

2．装置および試料調製

用いた装置は日立X-560形X線マイクロアナライザに冷却ステージを装着したものである。冷却ステージは液体窒素で-150℃まで冷却でき，また電熱で加熱できるようになっている。X線検出器は感度の点で波長分散形のものを選んだが試料の破壊は試料電流を低くして最小限としたのであまり問題にならなかった。

試料調製は至って簡単で，植物生体を試料台に保持できるようにカミソリの刃で

*　東京大学 農学部 植物栄養肥料学研究室，農博
**　日立製作所 那珂工場 応用技術センタ

切りだし，試料台に固定したあと液体窒素で凍結し直ちに電顕試料室内の冷却ステージに固定する。ついで試料室内で特製のカッタを用いて試料を切断し，その切断面の形態観察と元素分析を行う。

試料としては著者らは植物の根を対象とし，Kの分布を中心に調べてみた。アルミニウム製の試料台に細孔をあけ，そこに植物根を立てて固定した。また，土壌中に生育している根については土壌のまま台に固定して凍結・切断して観察・分析に供した。従来，土壌中の植物根の微細観察は樹脂包埋・研摩等の技術を要し，時間もかかったが[6]この方法だと容易である。

加速電圧は目的に応じてかえ，試料電流は10nA，試料冷却温度は−100℃とした。

3．観察・分析結果

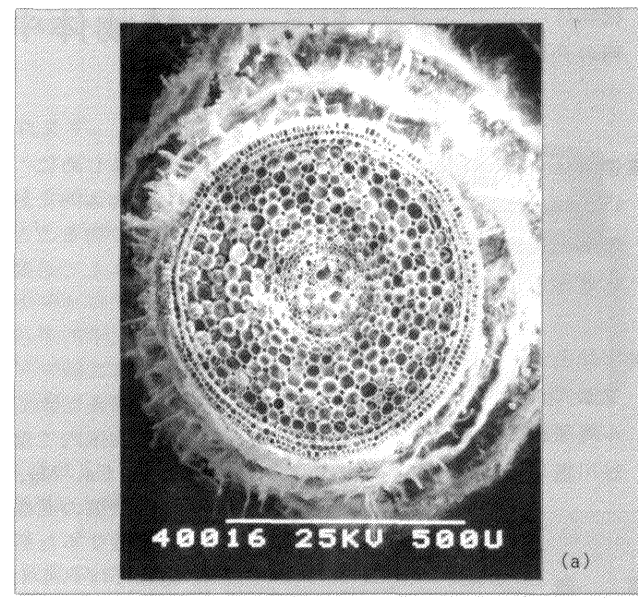
イネ，トウモロコシおよびダイズの根の横断面の2次電子像を，それぞれ**図1**，**図2**，**図3**に示す。図からわかるように組織の像は鮮明であり，形態もよく保持されている。**図1**では根毛が密に発生している様子が立体的に観察される。**図2**はトウモロコシの根端であるが，表皮細胞の外側に根冠細胞がみえ，外側の方は細胞の形も崩れている。**図1**，**図2**,とも中心柱内の大導管内には氷の存在が認められ，これらの導管が水を根から地上部へ送っていることがわかる。しかし，皮層細胞の間隙には氷の存在が認められない。これらの根は水耕液で育てたもので水は十分に吸収できるのであるが，そのような場合でも細胞間隙には水が入りこまないようである。このことは細胞間隙が養分や水分の通路とはならないことを示している。

図3はダイズ根の皮層細胞であるが，やはり，間隙には水は存在しない。**図3**では細胞の一部は内容物が露出する形で割れ，他は細胞壁を残してはがれている。細胞内には膜状物質，粒状物質などが複雑にからみあって存在する様子が認められる。**図4**はダイズの根の中心柱内の細胞であるがフィラメント様のものが多数，複雑に入りくんでいる状態にあることがうかがえて興味深い。

図5(a)は土壌（荒川沖積土壌）に生育しているイネの根の横断面である。イネの根は成熟老化すると図のように皮層の部分が崩壊して破生間隙を生ずるが，表皮細胞（第1層），外皮細胞，厚膜細胞の層は崩壊することなく残っている。この図では根が円形でなく，多少歪んでいるが，周辺土壌からの圧力によるものであろう。同図(b)は(a)の一部分を拡大したものであるが，土壌と表皮細胞との密着している様子が伺える。表皮細胞層と土壌粒子の間に糸状の物質が介在していることがわかる。この部分におけるKの分布を調べたところ**図5**の(c)のようになった。Kは土壌中に少し分布しているが表皮細胞にはほとんど存在せず，外皮細胞の内部に高濃度に比較的均一に集積している。厚膜細胞層や皮層内にはまた少なくなっている。土壌中のK濃度よりも外皮細胞内の方がKを集積しており,この細胞がK^+イオンを外界から高濃度に濃縮する機能をもっていることを示している。根が成熟するにつれ，表皮細胞は生理的活性を失ない，土壌中にあるときはやがて崩壊消滅していくが，本図の場合も既に表皮細胞の活性は低下し，Kを濃縮・集積する能力を失なっているのであろう。

K^+は植物細胞内に非常によく濃縮されるイオンであるが，その吸収は根の代謝活性に依存しており，植物根を各種の代謝阻害剤や呼吸阻害剤で処理すると K^+の吸収は急激に低下する[7]。従って，K^+の集積状況をみると細胞の活性をある程度推定できるわけである。また本図で指摘される，もう1つの特徴はK^+が外皮細胞の内部に集積し，細胞壁ではないということである。細胞壁というのは簡単にいえばペクチン質やセルロース，リグニンなどを含有し，ほとんど死んでいる部分だが負に帯電しているのでカチオンを吸着する。事実，Ca^{2+}などはこの部分に吸着・集積されるのであるが，K^+は壁にも存在するであろうが，細胞内にも同じ程度含まれており，K^+が活性の高い細胞内にとりこまれやすいイオンであることを如実に示している。

図6は土壌(田無火山灰土壌表土)中に生育しているコムギの種子根の横断面である。**図6(a)**の土壌をよくみると大



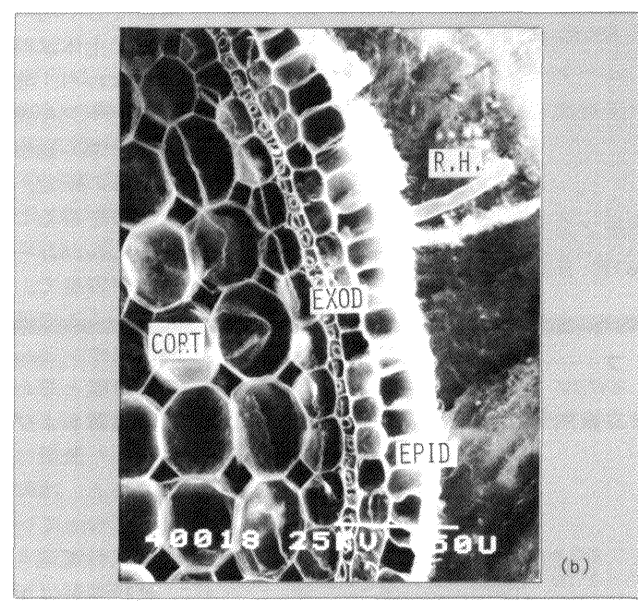
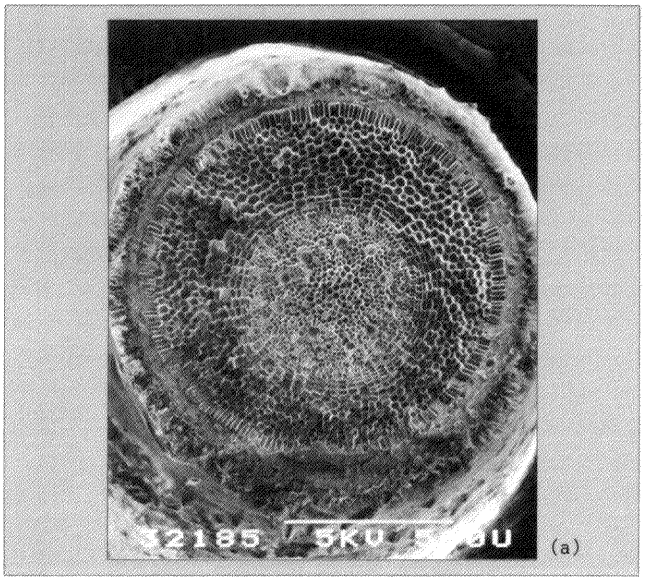


図1(a)(b) イネの根の横断面(根毛発生領域)。(b)は(a)の拡大図。R.H.：根毛，EPID：表皮細胞層，EXOD：外皮細胞層，CORT：皮層細胞層。



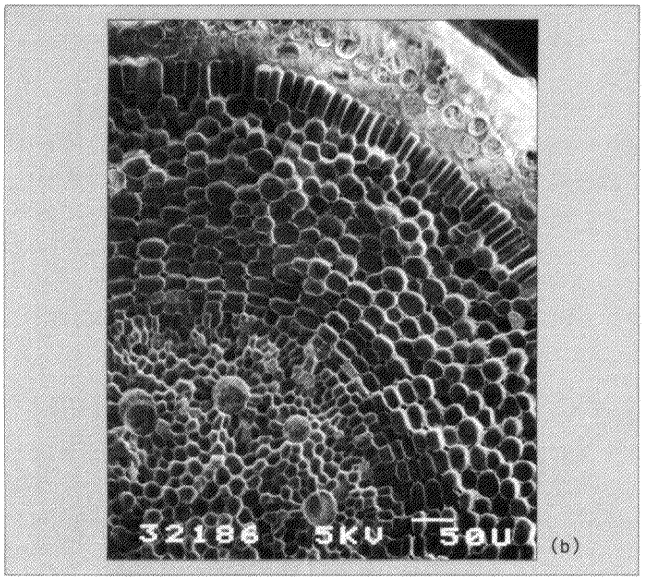
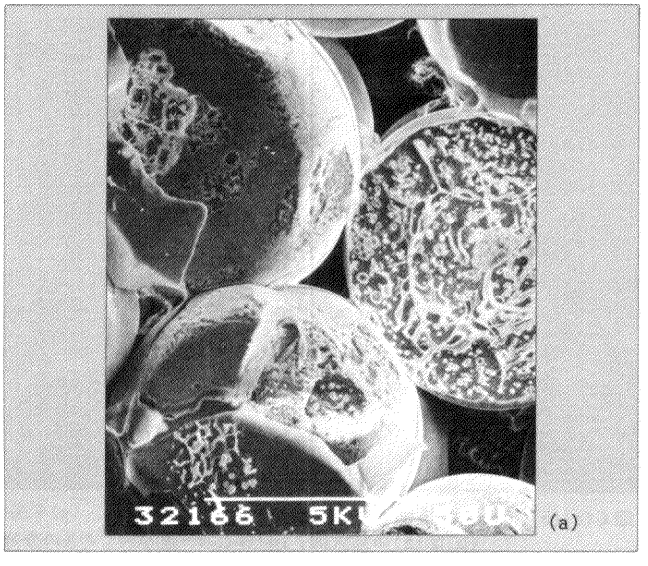


図2(a)(b)　トウモロコシ根，根端部の横断面（根冠細胞の存在がわかる）。(a)は(a)の一部拡大図。
R.C.：根冠，STEL：中心柱。



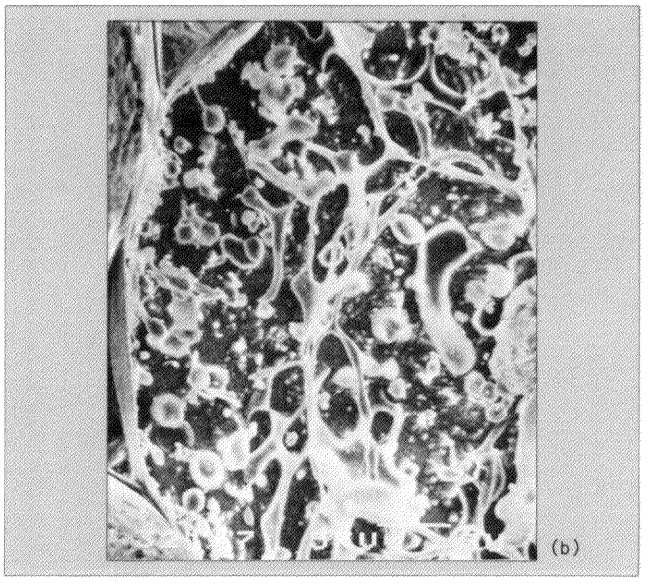
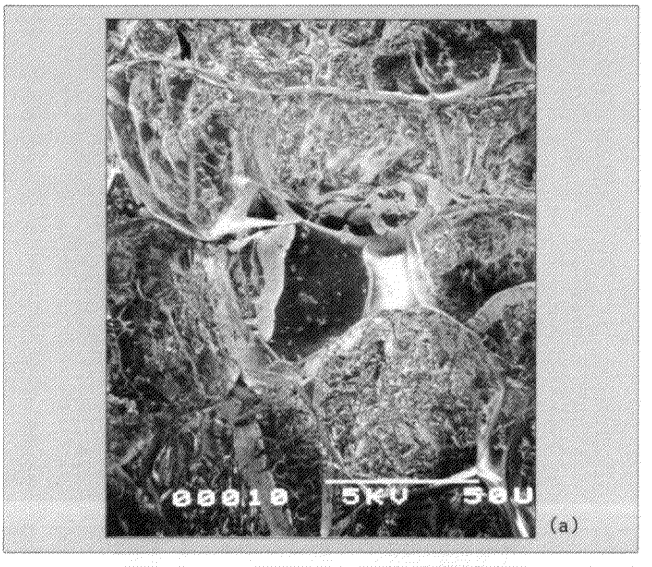


図3(a)(b)　ダイズ根の皮層細胞。
(b)は(a)の拡大図。細胞内に膜状粒状物質がみえる。



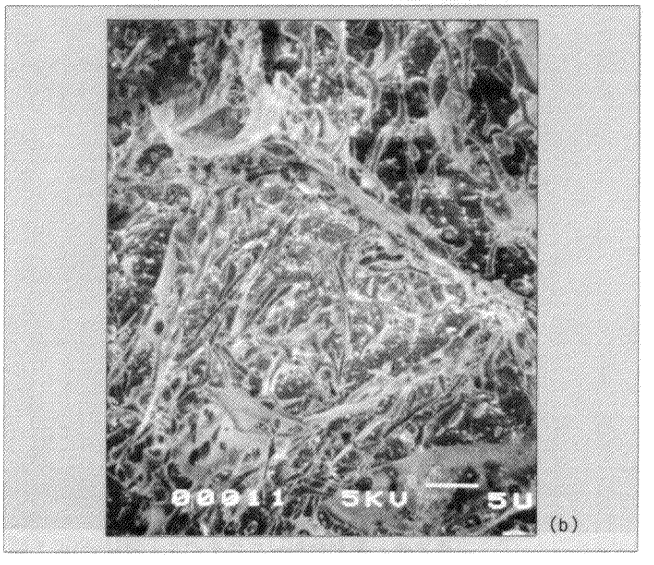
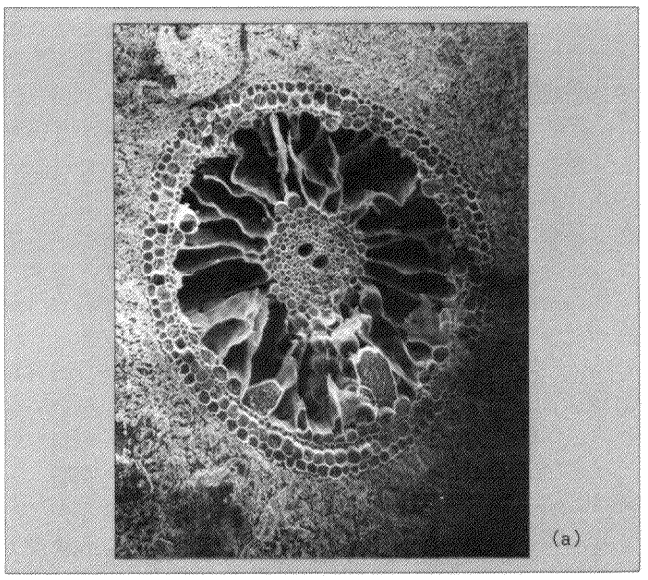
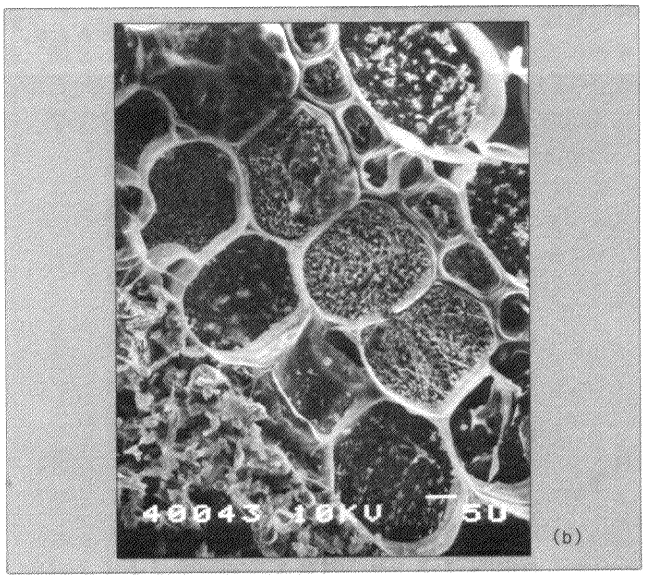


図4(a)(b)　ダイズ中心柱内柔細胞。(b)は(a)の拡大図。





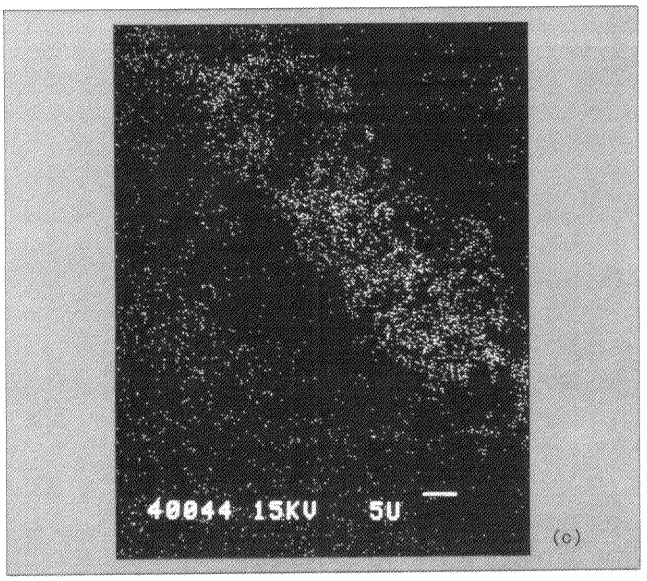
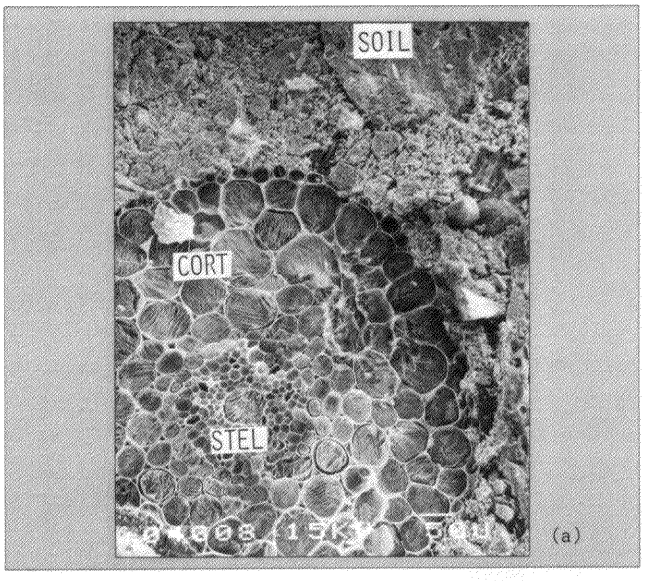
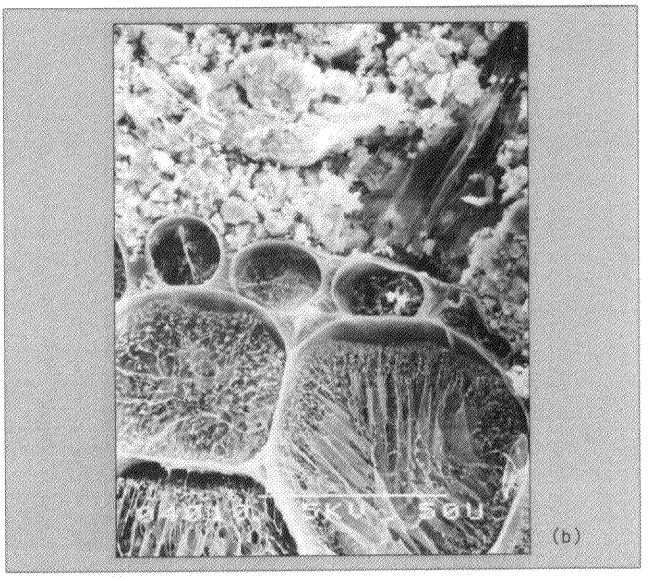


図5(a)(b)(c)　荒川沖積土壌中に生育しているイネの根。
(b)は(a)の拡大図。(c)は(b)の部分でのKの分布。





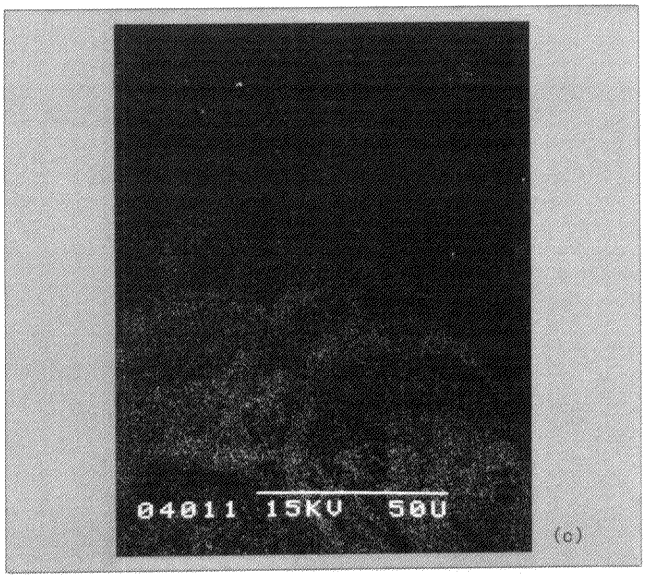


図6(a)(b)(c)　田無土壌中のコムギ種子根。
(b)は(a)の拡大図。(c)は(b)の黒枠内でのKの分布。

小無数の粒子からなりたっている。大きな粒子も試料室内で時間が経つにつれ水分が昇華し，やや乾いてくると小さな粒子にわかれていく(**図6(b)**)。即ち小さな粒子が集って大きな粒子（固粒構造）をつくっている。このような構造は水田土壌（**図5**）では観察できなかった。固粒構造は畑土壌の通気性と保水性を高め根に酸素や水を供給するのに必要であるという。図(**a**)(**b**)は(**a**)の拡大図であるが，右端の表皮細胞が崩壊しているが，これは土壌の圧力によるものであろう。図の(**b**)の右半分，黒ワク内におけるKの分布をみると**図6(c)**のようになる。K^+は表皮細胞より，皮層細胞内に多い。とくに崩壊した表皮細胞には少ないが，これは前述のように生理的活性が低い細胞だからであろう。

図7の(**a**)は水耕培養で育てたトウモロコシの根の横断面である。根の周辺にみえるのは氷である。この像の表皮部分を拡大すると図の(**b**)になる。この部分におけるKの分布とCaの分布を調べたのがそれぞれ図の(**c**)と(**d**)である。

Kは表皮細胞には少なく，皮層細胞に多い。Caは表皮細胞にむしろ多い。またCaは細胞壁に多く集積しているが，Kは細胞内にも集積している。KやCaは根の表皮細胞から入って皮層細胞を通りぬけ，内皮細胞に至り，中心柱に入り，中心柱内の導管によって地上部へ運ばれる。表皮細胞から内皮細胞に至る移動経路には2種類あり，一つは細胞内を通る経路（*symplasm*）であり，他は細胞壁や細胞間隙を通る経路（*apoplasm*）である。この図ではKは主として前者の経路を，Caは後者の経路を経ることが示される。Kの吸収や移動が代謝阻害剤によって大巾に阻害されるのに，Caの吸収は阻害されにくい，この違いもKが細胞内を通る，すなわち膜透過があるのにCaでは細胞壁を通るという経路の違いと関係があろう。

図7(e)は(**a**)の中心柱の部分の拡大図であり，ここでのKの分布が図(**f**)に示してある。ここでのCaの分布は検出できなかった。図(**e**)のほぼ中央部を左上隅から右下隅にかけて内皮細胞層が存在する。この細胞の壁はカスパリ帯とい

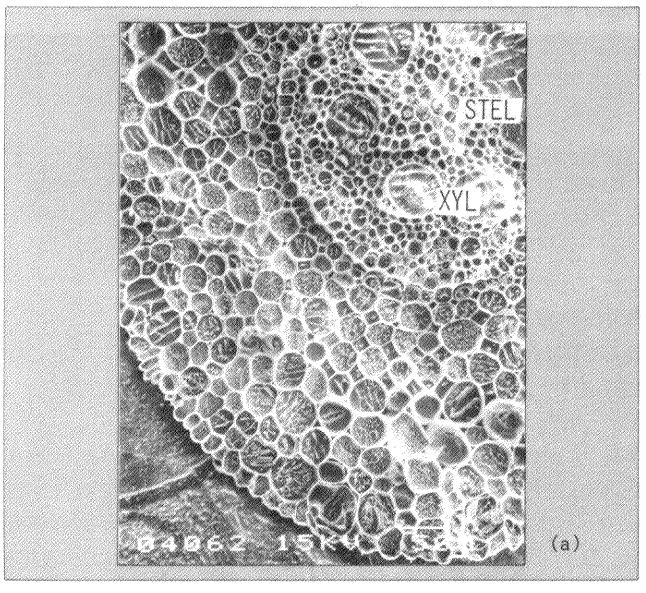
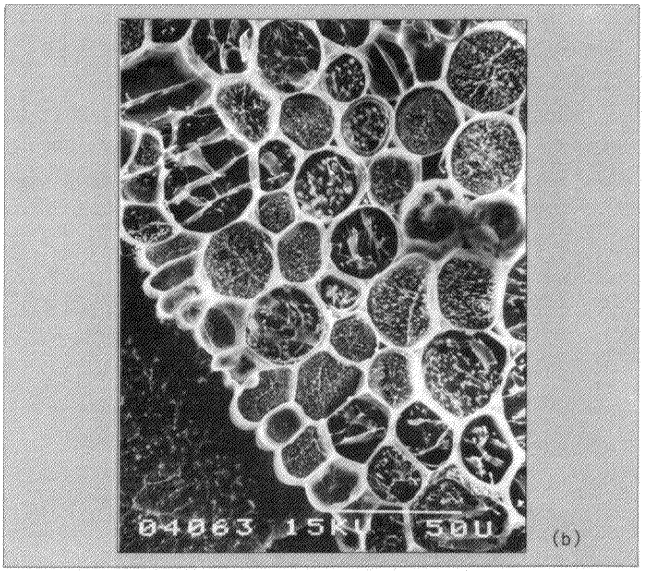
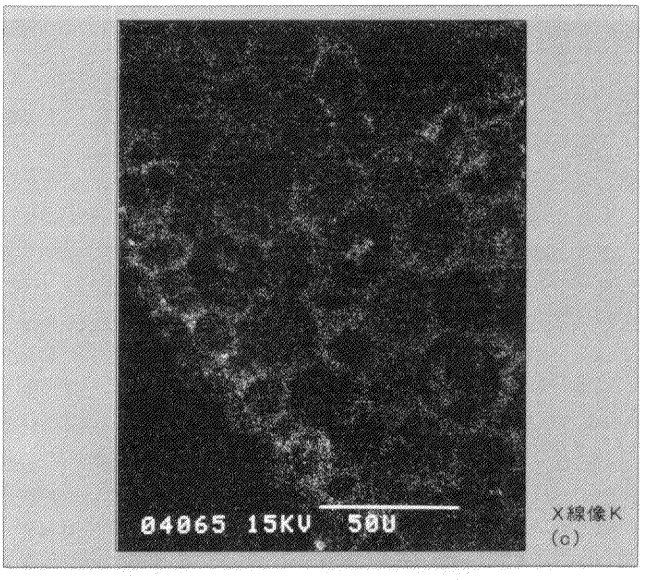


図7(a)　トウモロコシ根横断面。
XYL：導管，STEL：中心柱。





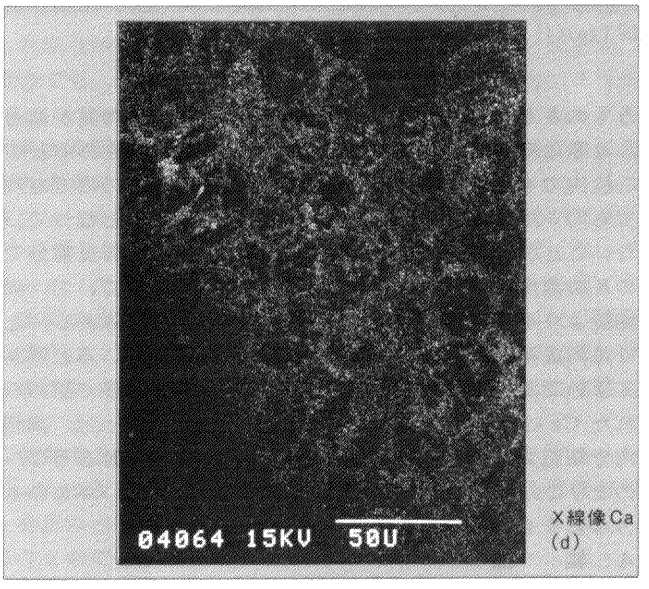
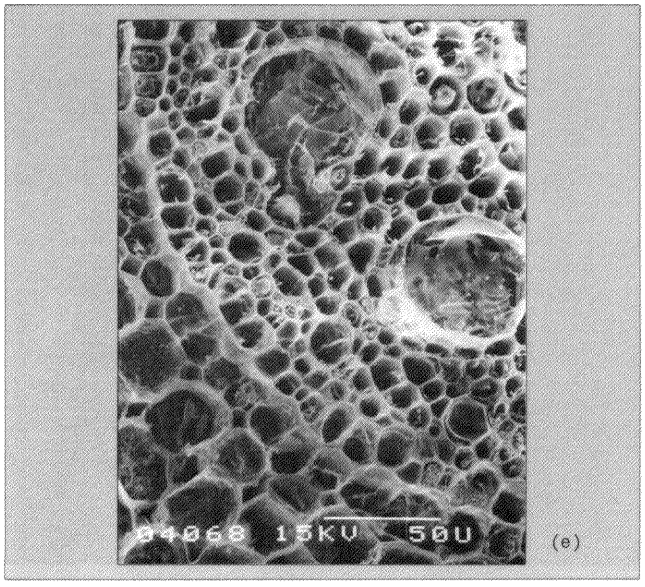


図7(b)(c)(d)　トウモロコシ根横断面～表皮系。
(b)は(a)の表皮部分拡大図。



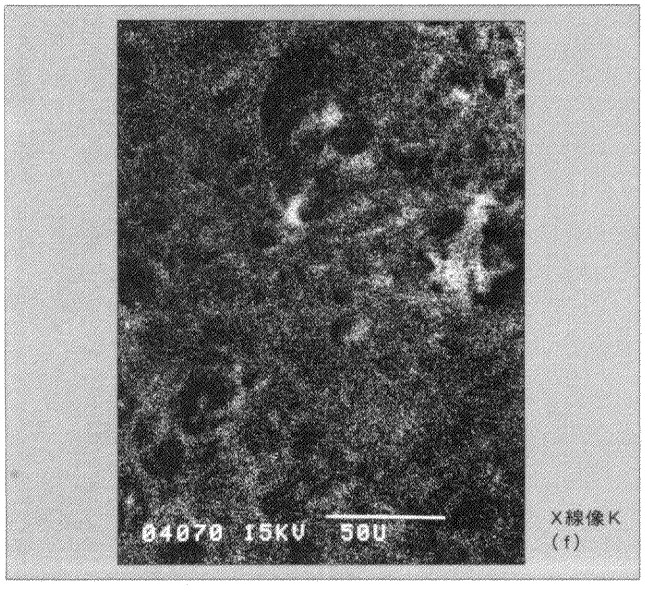


図7(e)(f) トウモロコシ根横断面—中心柱系。
(e)は(a)の中心柱部分拡大図

うものをもち不透水性であるとされ，この層を物質が通過する際は細胞内に入らざるを得ない。Kの分布をみると中心柱内でも皮層細胞にも，すなわち内皮細胞層の内でも外でも均一に存在し，この層がKにとっては障壁となっていないことを示している。しかも図(c)，すなわち表皮部分でのKの濃度よりも，中心柱部分の方が高くなっていて，細胞壁よりも細胞内に均一に分布しているようにみえる。とくに内皮細胞層のところでは細胞内に分布していると考えてよいであろう。これにひきかえ，表皮細胞に多く認められたCaは中心柱近傍や内部には検出できなかった。細胞内を細胞質流動と細胞間連絡を通って移動するKとそこへのとりこみが少なく，細胞壁に集積するCaの違いがこのような差をもたらしたのであろう。

4．結　論

以上，X線マイクロアナライザによる凍結試料分析法を用いての植物根の像観察と元素とくにK^+分析を行なったが，土壌中の根の観察や根内でのK，Caの分析に容易に利用でき，諸々の知見を与えてくれることがわかった。とくにKの分布はこれまで他に方法がなかったので，根内でのKの分布像がこのような形で得られたのははじめてであろう。そしてKがCaと異なり細胞内を優先的に移動していることが示された。もっともこの事実はトウモロコシ根の場合にあてはまるので，植物の種類が変ると様相がやや異なったものになるという事実も得ている。これらはまとめて別途報告する予定である。

また，本誌によって生体内の水の分布がある程度知ることができた。**図1**，**図2**，**図3**で示したように細胞間隙での氷の存否が水の有無を指示する。**図8**はコムギ葉鞘部の通導組織である。太い導管内が黒いのは，そこに氷がない(従って水が存在しない)ことを物語り白くみえるのは氷があることを示す。未熟な組織では太い導管が水の道として役割を担っているが成熟すると一部分のものは水の道とし

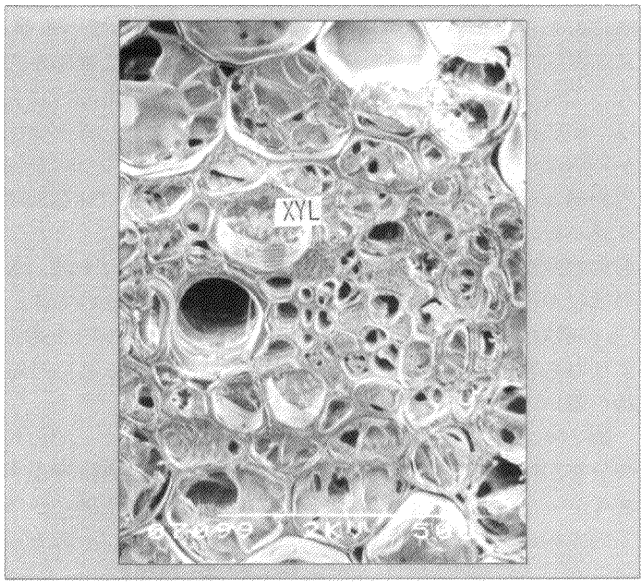


図8　コムギ葉鞘通導組織—空中放置時間0hr。XYL：導管。

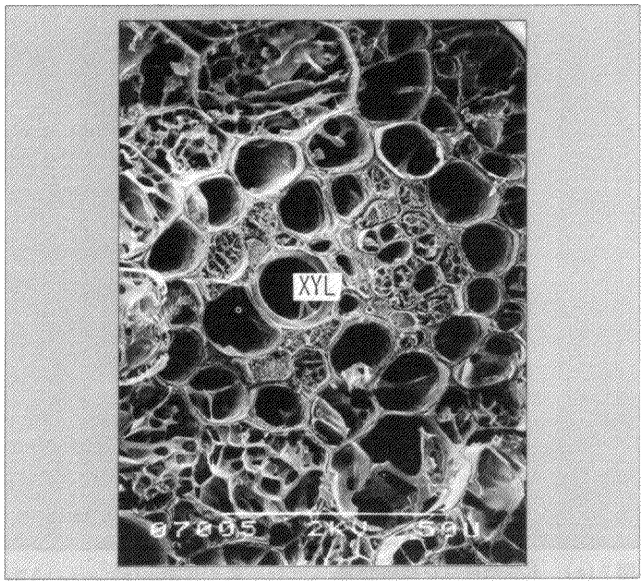


図9　コムギ葉鞘通導組織—空中0.5hr放置。XYL：導管。

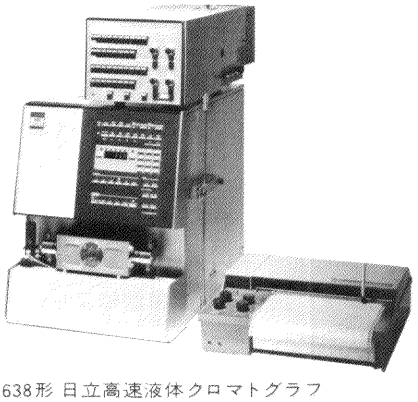
ての役割を果さないようである。このコムギを30分間根をつけたまま空気中に放置して葉鞘の通導組織（成熟度はほぼ図8と同じ）をみると図9のようになる。導管はもちろん各所の細胞から水がぬけ空洞化していることがわかる。雑ぱくな検討結果だが本法が植物体内での水の動きを知るのにも役立つのではないかと著者らは期待している。

■参考文献

1) Läuchli, A.：Electron probe analysis, in "Micro-auto radio graphy and Electron Probe Analysis" (ed. U. Luttge) pp191～236 (Springer-Verlag, Berlin) (1972)
2) Rasmussen, H. P. and Knezek, B. D.：Electron microprobe, techniques and uses in soil and plant analysis in "Instrumental Methods for Analysis of Soils and Plant Tissue" (ed. L. M. Walsh) pp201～223 (Soil Sci. Soc. Am., Inc., Madison) (1971)
3) Chino, M.：Calcium Localization with Plant Roots by Electron probe X-ray Microanalysis, Commun. in Soil Sci. and Plant Anal., **10**, 443～457 (1979)
4) O Yeo, A. R., A. Läuchli and D. Kramer：Jon Measurements by X-ray Microanalysis in Unfixed, Frozen, Hydrated Plant Cells of Specier Differing in Salt Tolerance, Planta, **134**, 35～38 (1977)
5) Chino, M. and H. Hidaka：Direct Observation and X-ray Microanalysis of Frozen Specimens of Plant Root in Soil, Soil Sci. Plant Nutr., **23**, 195～200 (1977)
6) Chino, M. and A. Baba：Electron Microprobe Analysis of Zinc and Other Element within and around Rice Root Grown in Floaded Soil, Soil Sci. Plant Nutr., **22**, 445～457 (1976)
7) 熊沢喜久雄・西沢直子：植物の養分吸収, pp77～79 (東京大学出版会 UP Biology) (1977)

Topics

マイクロコンピュータ制御による 638形 日立高速液体クロマトグラフ



638形 日立高速液体クロマトグラフ

本装置は，データ処理，グラジェント装置を標準で内蔵し，マイクロコンピュータで制御する高速液体クロマトグラフです。すでに好評を得ている，635形 日立高速液体クロマトグラフ，835形 日立高速アミノ酸分析計に続く最新鋭機で，種々の特長があります。

■特　長

(1)再現性がよく，脈流のない定流量送液ができます。

マイクロコンピュータによるプランジャ速度の制御により，ダンパなしで再現性のよい脈流のない送液ができます。

(2)3溶媒の自由な混合比がえられる溶媒プログラミングができます。

3溶媒の混合ができますので，2溶媒では困難であった分離の改善ができます。また溶媒のひとつに再生液を用いれば，毎回カラム再生が可能で，カラムに試料が残りません。

(3)2チャンネルのデータ処理機能を内蔵しています。

2台の検出器を使用した場合や多波長UVモニタを用いた場合でも，同時処理ができます。

(4)データ処理条件，分析条件を記憶でき，メモリーは保護されます。

10個のデータ処理条件ファイル（1個は固定）および複数個の分析条件（プログラム）を記憶させておき，任意の条件を即座に呼び出し，実行することができます。記憶させた条件は，電源を切っても消えません。またファイル，プログラムの修正は簡単にできます。

(5)分析，分取の両目的に使用できます。

広い流量範囲（最大20ml/min）の送液能力がありますから，分析から分取まで，1台で使い分けることができます。また流路内のデットボリュームが小さいので，リサイクルクロマトグラフィも有効に行なえます。

(6)圧力プログラミングができます。

カラム充てんに有効な圧力プログラミングができますので，再現性の高い高性能のカラムが作成できます。

(7)コンパクトで使いやすい装置です。

溶媒プログラミング機能，データ処理機能など，数多くの機能を組み込みながらも，ボディはコンパクト。しかも，流量，濃度，圧力などワンタッチ操作でディジタル表示される使いやすい装置です。

(8)豊富なプログラミング能力をもっています。

グラジェントの途中で流量を変えることができます。なお流量はステップワイズに何段にも切りかえられます。

グラジェントの途中で圧力リミットの値（最高，最低圧力）を変えることができますので，カラムや装置の保護に役立ちます。

異ったプログラムへの接続ができます。同じプログラムをくり返し用いて分析することは勿論のこと，1回ごとに異ったプログラムで分析したい場合，実行したいプログラムを指定しておけば，自動的に実行プログラムに切換えられます。

チャートやポンプの停止，アラームの設定が任意にでき能率よく分析ができます。

U.D.C. 〔543.544.4.084.82:543.426〕:547.781.5.062:612.129-08

高速液体クロマトグラフィー・けい光検出による血漿ヒスタミンの高感度測定

大倉洋甫* 小橋一弥** 鶴田泰人***

1．はじめに

ヒスタミンは動植物界に広く分布し，ホ乳動物では硬組織以外のすべての組織や体液中に含まれており，血中の濃度は組織に較べて非常に低い。ヒスタミンは古くからは即時型アレルギーなどにおける *Chemical mediator* として知られており，最近では *Neuromediator* としての研究も行なわれている。その貯蔵，遊離機構，作用機序などに関しては不明な点も多い。組織を用いる研究では，同一実験系内においてヒスタミン濃度を相対的に比較することが多いので，必ずしも厳密な測定法を必要としないが，医薬品開発の際，投与薬物によるヒスタミンの血中（血漿）濃度を知るためには高感度で，精密な方法が必要である。

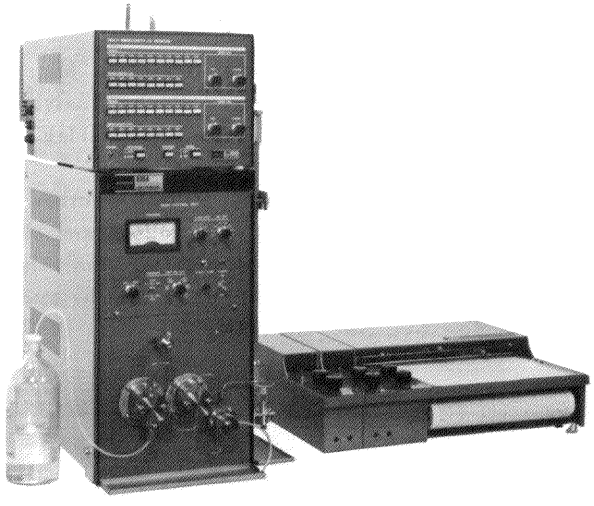
従来，生体中のヒスタミンの測定法として，モルモットの腸管を用いる生物学的方法;[1] 2，4-ジニトロフルオロベンゼンを試薬とする吸光光度法;[2] 0-フタルアルデヒドやダンシルクロリドを試薬とするけい光法;[3)4)] およびヒスタミンN-メチルトランスフェラーゼでヒスタミンをメチル化することに基づく方法[5] などが報告され，そのうち0-フタルアルデヒドによるけい光法がもっとも広く利用されているようである。いずれの方法も測定値に影響を及ぼす生体試料中の妨害物質を除くために繁雑な前処理を必要とし，しばしばヒスタミン以外の物質を同時にはかり込み高い測定値を与える。また，微量の試料には感度の点で利用できない場合もある。微量の物質の検出測定にはけい光法が有効であり，これと高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を結びつけた場合にはさらに特異性が高い高感度分析法となる。

筆者らの研究室では，数年来，生体試料中の種々の微量生理活性物質のHPLC—けい光分析に関する研究を行なっているが，その研究の一環として0-フタルアルデヒドを試薬としたけい光プレラベル法による，HPLC—けい光検出（203形日立分光けい光光度計）による血漿ヒスタミンの定量法[6] を報告した。この方法は0-フタルアルデヒドをけい光プレラベル化剤として用いたはじめてのHPLCである。今回，最近市販された650-10形日立高感度分光けい光光度計（角型フローセル装着）を利用するとさらに高感度に血漿ヒスタミンが定量できることがわかったので，前法[6] とあわせてその概要を紹介する。

2．装置と分析条件

635-A日立液体クロマトグラフを用いた。検出部は650-10形日立分光けい光光度計に，その附属品の角型フローセル（セル容量18μl）を装着し，励起波長を350nm，けい光波長を450nmとし，056形日立卓上記録計に接続して用いた。

カラムはステンレススチールチューブ 4ϕ×150mm に *LiChrosorb* RP-18（5μ）（E. *Merck Japan, Tokyo, Japan*）を次のような平衡スラリー法で充てんして使用した。



635A 日立高速液体クロマトグラフ

650-10LC 日立分光けい光光度計

日立充てん用パッカに充てん剤1.5gをジオキサン，テトラクロルエチレンおよびテトラブロムエタン（40：40：20）の混合溶媒10mlで懸濁しスラリー状にしたものを入れる。クロロホルムを加圧溶媒として，150～300kg/cm^{2}で約1時間送液して充てんする。このとき圧力はできるだけ高くする。さらにメタノールを約15分間送液してクロロホルムを除去する。

溶離液は0.2M塩化ナトリウム溶液とメタノールの混合液（55：45）を0.1M塩酸でpH 3に調整した。常法により脱気して用いた。流速は0.5ml/minとした。

3．試薬類

n-ブタノール，ベンゼンおよびメタノールは市販品を，また蒸留水は精製水を，それぞれ2回蒸留して使用した。塩化ナトリウム飽和水酸化ナトリウム溶液は，1M水酸化ナトリウム100mlに塩化ナトリウム約30gを加えて飽和溶液とし上清を用いた。標準ヒスタミン溶液は二塩酸ヒスタミン（和光）184mgを蒸留水に溶かし全量100mlとしたものを原液（1×10^{-3}M）とし，用時希釈した。原液は－20℃で凍結保存しておくと少なくとも1ヶ月は安定であり，用時解凍し，希釈して使用できる。1％0-フタルアルデヒド溶液

* 九州大学 薬学部 薬品分析化学講座，教授，薬博
** 九州大学 薬学部 薬品分析化学講座，助教授，薬博
*** 九州大学 薬学部 薬品分析化学講座

は0-フタルアルデヒド(東京化成)10mgをメタノール1ml に溶かしたものを用時調製した。

ガラス器具類は水洗したあと40～50％硝酸に1夜以上浸し，蒸留水で十分洗浄後，乾燥したものを使用した。

4．血漿ヒスタミンの測定

血漿の一定容量(200～500μl)を10ml遠沈管にとり，0.2M過塩素酸2.0mlを加えよく振りまぜたのち，1200×gで10分間遠心分離する。上清1.0mlを5M水酸化ナトリウム0.3ml，塩化ナトリウム0.4gおよびn-ブタノール4.5mlを入れた遠沈管に入れ，5分間振とうする。遠心分離後，水層を除去し，塩化ナトリウム飽和水酸化ナトリウム溶液1.5mlを加え，再び3分間振とうする。遠心分離後，有機層4.0mlを0.1M塩酸0.25mlおよびベンゼン4.0mlを入れた遠沈管に入れ，3分間振とうする。遠心分離後，有機層を吸引除去し，塩酸層を次のけい光反応に用いる。

塩酸層0.1mlを小試験管に入れ，1M水酸化ナトリウム20μlを加え，これに1％0-フタルアルデヒド溶液5μlを加えよく振りまぜる。正確に4分後，0.95M硫酸10μlを加え反応を停止する。この反応液100μlをHPLCの注入試料とする。標準として，血漿の代りに標準ヒスタミン溶液(5×10^{-8}M)を用いる。血漿ヒスタミン濃度は次式により求める。

$$\text{血漿ヒスタミン(p mol/ml)}^{*} = \frac{\text{血漿ヒスタミンのピーク高さ}}{\text{標準ヒスタミンのピーク高さ}} \times 50$$

＊ng/mlで表わす場合には，係数として111/1000を掛けて求める。

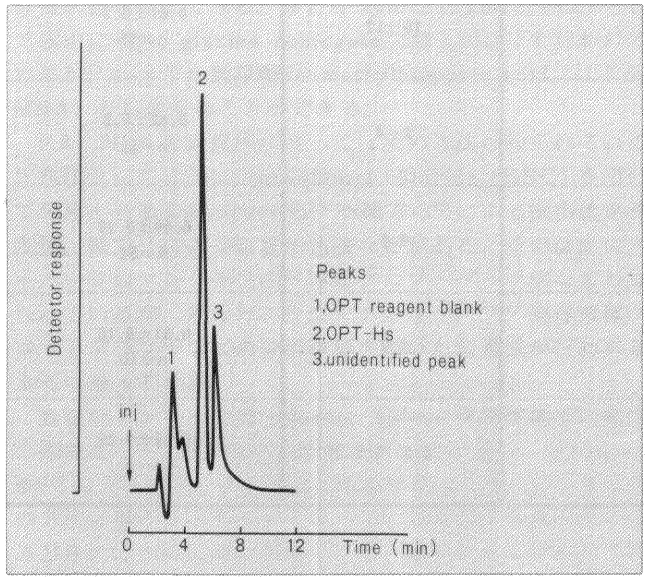


図1　血漿ヒスタミンのクロマトグラム

5．結果と考察

0-フタルアルデヒドと第一級アミンはアルカリ性で反応しけい光を発するが，反応液を酸性にすると大部分のアミンによるけい光は消失する。しかし，ヒスタミンやスペルミジンおよび一部のアミノ酸のけい光体は酸性溶液中でも安定なけい光を与える。本法では，血漿中のこれらの物質をあらかじめ除くためにn-ブタノールによる溶媒抽出を行なった。n-ブタノールには血漿中のヒスタミン以外のアミンおよび一部のアミノ酸も抽出されるが，抽出液を塩化ナトリウム飽和水酸化ナトリウム溶液で洗浄すると，アミノ酸類は完全に除去することができる。

カテコールアミン，インドールアミンおよびポリアミン類は，健常人血漿における濃度の少なくとも5倍の濃度を標準ヒスタミン溶液に添加して全操作を行なったが，ヒスタミン測定には全く影響を与えなかった。

血漿中のヒスタミンのクロマトグラムを**図1**に示した。ヒスタミンの0-フタルアルデヒドによるけい光体(OPT-Hs)は保持時間5分に溶出する。2～4分に溶出するピークは0-フタルアルデヒドによる試薬ブランクであり，6分に溶出するピークは抽出溶媒中に存在する不純物であるが，その本体は不明である。この際，溶離液のメタノール濃度を減らすと，各ピークの保持時間は大きくなり，また，幅広いピークとなる。逆に，メタノール濃度を60％以上にすると各ピークはシャープになるが，分離が不良となる。溶離液中に塩化ナトリウムを添加しない場合，またはpHを中性付近にした場合，OPT-Hsのピークはテーリングする。

標準ヒスタミン溶液(0～50p mol/ml)を用いて全操作を行なって得た各クロマトグラム上のピーク高さと濃度の間には直線関係(相関係数0.999)があり，これらの値をプロットして得た検量線は原点を通る直線となる。また，ピーク高さと濃度の間には相関があるので，統計的に処理して得た回帰式も90％信頼限界で原点を通る直線とみなすことができる。

プール血漿を用いて，除たんぱくの際に，既知量のヒスタミン(5～50p mol)を過塩素酸溶液として添加した場合の回収試験の結果を**表1**に示す。回収率は108～98％であった。

表2は，健常人血漿ヒスタミン濃度および測定に必要な血漿量について，本法と今までに報告されている方法とを比較したものである。本法で得られた健常人5人(26～31才)の血漿ヒスタミン濃度は0.68±0.09ng/mlであり，これは他の方法で得られた値とよく一致している。203形日立分光けい光光度計を検出器として使用したときの感度は0.2p mol/ml(S/N＝2)であったが，[6] 今回の650-10形日立分光けい光光度計ではベースラインにおける短周期ノイズが著しく小さいことと，けい光量が増大するため感度が数10倍も向上し(S/N＝2での感度は10 *femto mol/ml*)，使用する血漿量は前法に比べさらに少量(200～500μl)でよいことがわかった。

サンプリングの際，血球成分中のヒスタミン濃度が高いので，血漿中にそれらが混入しないように注意しなければならない。さらに，前処理操作における器具類のヒスタミンによる汚染には充分注意すべきである。使用するガラス器具の洗浄において，重クロム酸硫酸を使用すると，原因は不明であるが，ブランクのヒスタミンピークが非常に大きくなる。市販の蒸留水を器具洗浄に用いたときも同様である。上記のように40－50％硝酸につけておき，蒸留水で洗うとこのようなブランクの影響はない。

分析終了後，連続してカラムを使用しない場合は，水とメタノール(50：50)の混合液を約15分間送液しておく。新たに使用するときは前もって分析用溶離液で約15分間送液してから使用する。

本法では，市販の *Packed Column* は使用せず，当研究

室で充てんして作製したカラムを使用しているが，カラムの再現性はよく，試料注入回数にして300～500回使用できる。なお，分離能が落ちたり，OPT-Hsのピーク幅が広がった場合は，送液による洗浄のみではもとにもどらないので，充てん剤をカラムから出し，メタノール洗浄（数十秒間超音波洗浄器にかけた後，静置し，上清をすてる）を数回くり返した後，風乾し，これを前述の方法に従ってカラムに再充てんすれば，再び使用できるようになる。

本法は，全血中のヒスタミンの測定にも応用できる。この場合は，血液を20～30倍に希釈して同様に行ない，良好な結果が得られている。

本法はラジオアセイ[5]に匹敵する感度を有し，迅速簡便に血中ヒスタミンが測定できる。現在さらにヒスタミンの代謝産物の分析についても検討中であるが，従来の方法より短時間で感度よくこれらの分析ができることがわかっている。

表1 回収試験

Added* (p mol／ml)	Expected** (p mol／ml)	Found*** (p mol／ml)
5	11.0	11.4
10	16.0	16.5
25	31.0	30.5
50	56.0	55.0

* Histamine was added as 0.4M $HClO_4$ solution.
** The pooled plasma contained initially 6.0 p mol／ml histamine.
*** Mean value from duplicate determinations.

表2 本法と従来法との比較

	Method	Sample volume (ml)	Human plasma histamine (ng／ml)
Adam et al. [1]	Amberlite XE-64 column Cellulose column Bioassay (guinia-pig ileum)	5.0	0.6 n=5
Miller et al. [5]	n-BuOH-$CHCl_3$ extraction Enzymatic isotopic method	10－12	0.61±0.2 n=11
Graham et al. [7]	Decalso column n-BuOH extraction OPT fluorometric method	2－4	0.62±0.3 n=62
Lorenz et al. [8]	Dowex 50 W-X8 column n-BuOH extraction OPT fluorometric method	6.0	0.69±0.26 n=54
Tsuruta et al. [6]	n-BuOH extraction OPT fluorometric method HPLC	1.0	0.61±0.16 n=10
Present method	n-BuOH extraction OPT fluorometric method HPLC	0.2－0.5	0.68±0.09 n=5

OPT：o-phthalaldehyde

■参考文献

1) Adam, H. M.：Brit. J. Pharmacol., 12, 397 (1957)
2) Lowry, O. H., Graham, H. T., Harris, F. B., Priebat, M. K., Marks, A. R., and Bregman, R. U.：J. Pharmacol. Exp. Ther., 112, 116 (1954)
3) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H.：J. Pharmacol. Exp. Ther., 127, 182 (1959)
4) Seki, T. and Wada, H.：J. Chromatogr., 102, 251 (1974)
5) Miller, R. L., McCord, C., Sanda, M., Bourne, H. R. and Melmon, K. L.：J. Pharmacol. Exp. Ther., 175, 228 (1970)
6) Tsuruta, Y., Kohashi, K. and Ohkura, Y.：J. Chromatogr., 146, 490 (1978)
7) Graham, H. T., Scarpellini, J. A. D., Hubka, B. P. and Lowry, D. H.：Biochem. Pharmacol., 17, 2271 (1968)
8) Lorenz, W., Reiman, H. J., Barth, H., Kusche, J., Meyer, R., Doenicke, A. and Hutzel, M.：Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 911 (1972)

U.D.C.〔543.432＋543.544.42.084.83〕:547.582.4.062:612.461.266-08

抽出比色法とガスクロマトグラフ法による尿中馬尿酸，メチル馬尿酸の定量

長谷川　憲司*　清治　和則*　塩島　正二*

1．緒　言

toluene および xylene は有機溶剤として広く使用されており，代表的有機溶剤の1つである。toluene は産業現場で印刷，塗装，接着，払拭用などに使われ，また染料，合成繊維など有機合成化学の原料として用いられるほか，樹脂類，セルロースの溶解剤としても大量に使用される。一方 xylene はベンゼン環上のメチル基の位置により o-xylene，m-xylene，p-xylene の各異性体があり，toluene と同様に産業現場で溶剤として使用されるほか，有機合成化学の原料として用いられる。

toluene，xylene の吸収経路は経気道，経皮吸収であり，刺激性があり，中枢神経系には抑制作用をもち，肝障害や腎障害などをおこすことがある。[1]

toluene，xylene は吸入量の約70％が尿中に排泄されるので，暴露量を推定するために尿中の代謝産物を測定する方法が労働衛生学上行われている。[2]

toluene，xylene の生体内代謝経路は図1に示すとおりであり，[3] toluene 暴露では尿中馬尿酸（hippuric acid，以下HA）を，m-(p-)xylene では尿中m-(p-)メチル馬尿酸(m-(p-)methylhippuric acid，以下m-(p-)MHA）を定量すれば吸入量を推定できる。また o-xylene は glucuronide として尿中に現れ，glycine conjugate では1％以下と言われているが，[4] o-メチル馬尿酸(o-methylhippuric acid，以下o-MHA）を定量することができる。

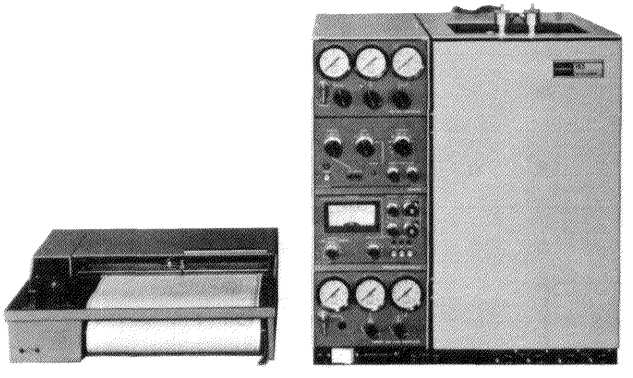
HA，MHA の定量法については次の方法が知られている。比色法としては benzenesulfonyl chloride（BSC）を用いて発色させる Umberger ら，[5] や緒方ら[6] による抽出比色法，友国，緒方[7] による直接比色法などがある。そのほかにペーパークロマトグラフ法，[8] 薄層クロマトグラフ法なども知られているが，最近ガスクロマトグラフ，[9][10][11] 高速液体クロマトグラフ[12] などの分析機器を用いた定量法が行われるようになってきた。

当健診センターでは toluene，xylene 使用作業者の暴露の指標として，尿中HAを酢酸エチルで抽出し，pyridine，BSCにより発色させる抽出比色法を用いてきた。しかしこの方法は操作は簡便であるが，HA と MHA が同時に存在するときには分離定量は困難であり，また尿中に存在して同様に発色する物質により真の値と実測値の間に差を生ずることもあり，測定誤差や精度上の点でも問題があると考えられる。そこで尿中HA，MHA の定量に関して以上の点を検討する目的で，抽出比色法とガスクロマトグラフ法（以下GLC）の比較を行った。

2．実験材料および実験方法

2(1)　被 験 尿

正常者尿として toluene，xylene 非暴露の健康人（男子70名，女子70名）の一時尿を用いた。また暴露者尿としては当健診センター健診者尿を用いた。



163F形 日立ガスクロマトグラフ

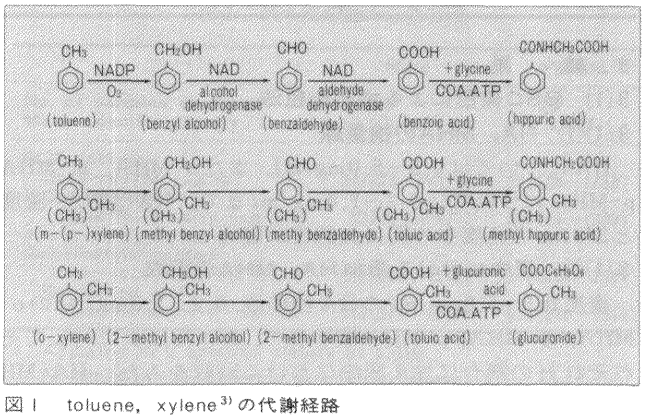


図1　toluene，xylene[3] の代謝経路

2(2)　実験方法

2(2)①　BSC発色による抽出比色法

Umberger ら，[5] 緒方ら[6] の抽出比色法に準じ，共栓試験管に尿または HA 標準液1.0mlをとり，NaCl 約0.3g を加え，濃塩酸2滴を入れ pH 約2.0に調製したのち，酢酸エチル4.0mlを加えて3分間激しく振とうし抽出した。次に酢酸エチル層0.2mlを別の試験管にとり，湯浴中で溶媒を蒸発乾固したものに pyridine 0.5mlを加えよく溶かし，さらにBSC0.2mlを静かに加えて混和したのち室温に30分間放置した。次にクロロホルム4.3mlを加えて全体を5.0mlとし，日立156型二波長分光光度計により 380nm で定量した。なお blank は蒸留水を試料として同時操作した。

2(2)②　GLC法のための試料調製方法

共栓試験管に尿または HA（MHA）標準液1.0ml，内部標準物質としてトリデカン酸（tridecanoic acid）メタノール溶液（2.0mg/ml）を0.2ml入れ，NaCl 約0.3g を加え，濃塩酸2滴を入れ pH 約2.0に調製したのち，酢酸エチル4.0mlを加え3分間激しく振とうし抽出した。次に酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム0.5g により充分水分を除去し，この溶媒を湯浴中で蒸発乾固した。これにジアゾメタン（CH_2N_2）エーテル溶液[13] を加え5分間メチルエステル化を充分行わせたのち加熱乾固した。これにメチルアルコールを加

* 東北労災病院・健診センター

え溶解した液をGLCに注入した。

2(3) GLC分析条件[10)]

GLC分析条件は**表1**のとおりである。

表1 ガスクロマトグラフ分析条件[10)]

使用機器		163型 日立ガスクロマトグラフ
検出器		FID
充填剤		4%, Apiezon grease M, Chromosorb G AW-DMCS, 80/100 mesh
カラム		φ3.0×4m, ガラスカラム
温度	oven temp.	220℃
	injection temp.	250℃
キャリヤーガス		N_2 ガス, 20ml/min

3. 結果

3(1) BSC発色による抽出比色法

3(1)① HA, MHAの検量線

HAについては0.5～5.0mg/ml, またo-MHA, m-MHA, p-MHAについては0.2～1.0mg/mlまで, HA(MHA)濃度と380nm吸光度との間に直線性が認められた。

3(1)② 尿中における添加HA, MHAの回収

濃度0.5～5.0mg/mlのHA標準液, 0.2～1.0mg/mlのo-MHA, m-MHA, p-MHA標準液を, 尿または水に対してそれぞれ¼の割合に加え尿中における回収をみた。HA(MHA)濃度と380nm吸光度との間に直線関係があり, かつ尿と水の検量線は平行となり充分な回収が認められた。回収率は90～106%であった。

3(1)③ HA, MHA測定における同時再現性

HA標準液1.0mg/ml, 3.0mg/ml, MHA標準液0.4mg/ml, 1.0mg/mlの各濃度についておのおの10件同時測定したが, 変動係数(C.V)はそれぞれ2.5～4.0%の範囲内に収まった。

3(2) GLC法

3(2)① HA, MHAの分離

図2にHA, o-MHA, m-MHA, p-MHAおよび内部標準物質であるトリデカン酸(I.S)の各既知物質のクロマトグラムを示した。また正常者尿およびtoluene, xylene暴露者尿のクロマトグラムを**図3**に示した。

3(2)② HA, MHAの検量線

HAについては0.5～4.0mg/ml, o-MHA, m-MHA, p-MHAについては0.2～1.0mg/mlまで, HA(MHA)濃度とI.Sに対するHAのピーク面積の比との間に直線性が認められた。

3(2)③ 尿中における添加HA, MHAの回収

濃度0.5～4.0mg/mlのHA標準液, 0.2～1.0mg/mlのo-MHA, m-MHA, p-MHA標準液を, 尿または水に対してそれぞれ¼の割合に加え尿中における回収をみた。HA濃度とI.Sに対するHAのピーク面積の比との関係は**図4**に示すように直線関係にあり, かつ尿と水の検量線は平行となった。一方, MHA濃度とI.Sに対するMHAのピーク面積の比との関係は**図5**に示すように, GLCによる定量では正常者尿中にはMHAは検出できず, controlとしての水の検量線とほぼ重なることが確認された。回収率は94～104%であった。

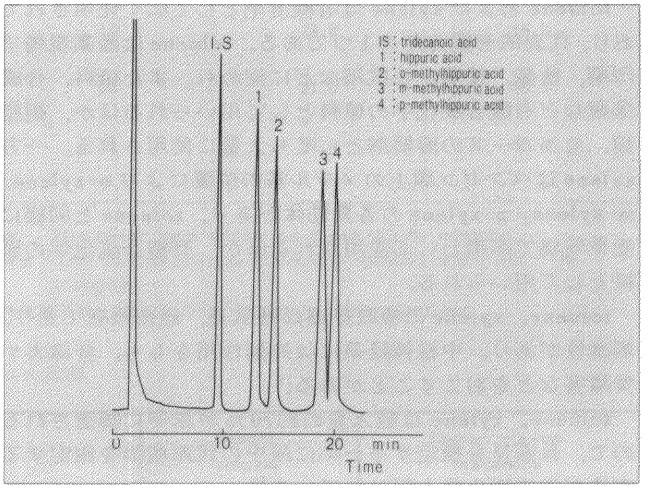


図2 HA, MHAのガスクロマトグラム

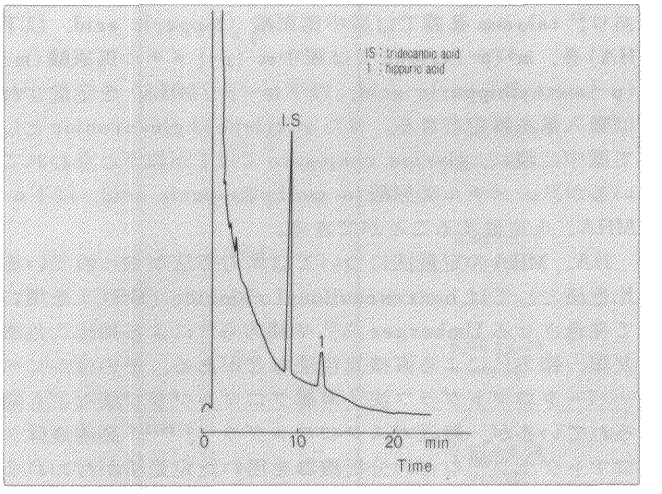


図3A 正常者尿のガスクロマトグラム

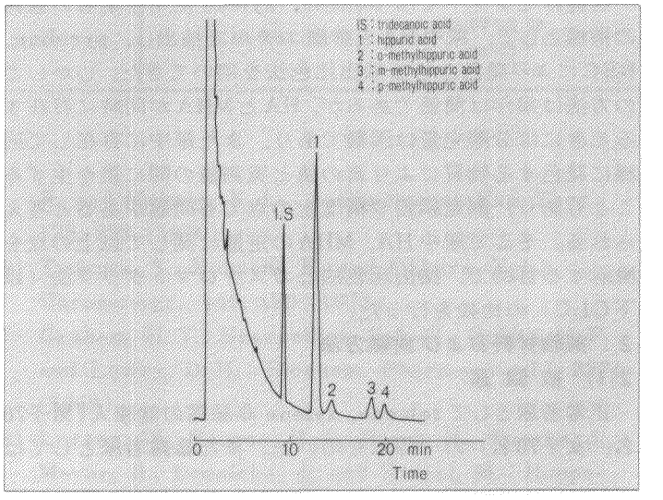


図3B toluene, xylene暴露者尿のガスクロマトグラム

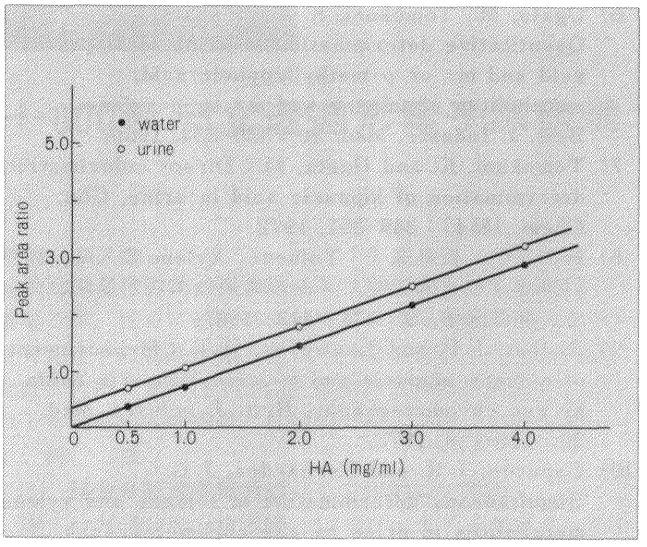


図4 Calibration curve of hippuric acid in water and in urine (GLC method).

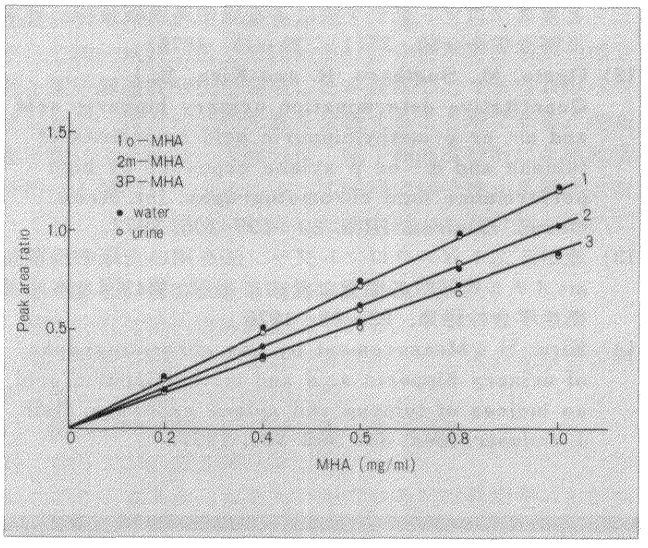


図5 Calibration curves of o-, m-, and p-methylhippuric acids in water and in urine (GLC method).

3(2)④ HA，MHA測定における同時再現性

HA標準液1.0mg/ml，3.0mg/ml，MHA標準液0.4mg/ml，1.0mg/mlの各濃度についておのおの10件同時測定したが，変動係数(CV)はそれぞれ1.2～4.4%の範囲内に収まった。

3(3) toluene，xylene非暴露者尿中HA測定の比較

toluene，xylene非暴露者男子70名，女子70名の一時尿を採取し，抽出比色法，GLC法の二方法でHAを測定した。得られたHA測定値を1.016に比重補正し，その補正値の常用対数をとり度数分布をヒストグラムであらわしたのが**図6**である。男子，女子とも抽出比色法，GLC法において対数正規分布することを確認した。**図6**に示すように分布パターンを比較するとGLC法の方が抽出比色法によるものよりも散布度が広いことがわかる。次にこれをもとに男子，女子のそれぞれの対数値より幾何平均値を求め，正常範囲を平均値±2SDの範囲で示した(**表2**)。なお非暴露者尿中にはo-MHA，m-MHA，p-MHAはGLC法により検出できなかった。

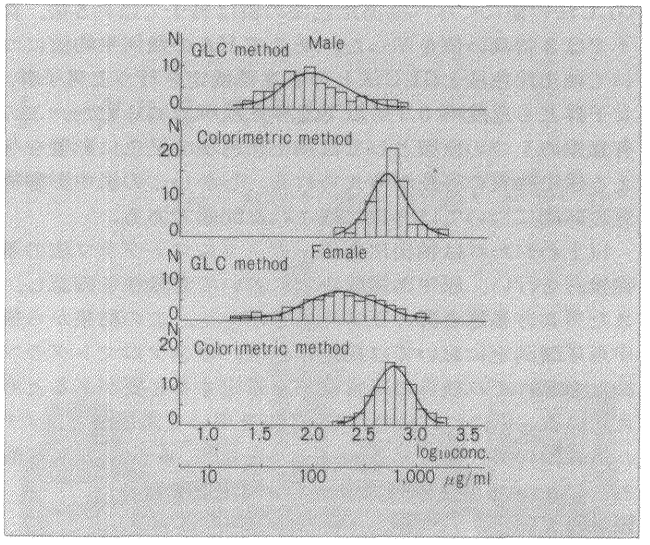


図6 toluene，xylene非暴露者尿中の馬尿酸の分布

表2 尿中馬尿酸の正常範囲

	Male	Female
No. of samples examined	70	70
Mean specific gravity	1.020	1.021
GLC method		
Uncorrected (μg/ml)	117(23－589)	251(36－1738)
Corrected with Specific gravity (μg/ml)[1]	95(19－479)	200(29－1380)
Colorimetric method		
Uncorrected (μg/ml)	646(269－1549)	776(257－2344)
Corrected with Specific gravity (μg/ml)[1]	513(214－1230)	603(240－1514)

1 Adjusted to a specific gravity of 1.016.
Numbers in the table are geometric means.
(mean－2SD～mean＋2SD)

4．考察および結論

われわれはHA測定に抽出比色法を用いてきたが，比色法にはいまだ尿中影響物質の存在など少なからず問題が残っている。そこでGLC法[10]によりtoluene，xyleneの尿中代謝物質であるHA，o-MHA，m-MHA，p-MHAの分離定量を行い，同時に抽出比色法との比較を試みた。抽出比色法においては検量線，尿中におけるHA，MHAの回収はともに良好な結果が得られ，また同時再現性についても満足すべき結果であった。GLC法においても検量線，尿中における回収はともに良好であり，また同時再現性についても充分な精度が得られた。HA，o-MHA，m-MHA，p-MHAのガスクロマトグラムは**図2**，**図3**に示したように分離がよく定量可能であった。

次に非暴露者男子70名，女子70名についてHAを測定し，1.016に比重補正を行い，その常用対数をとり度数分布をヒストグラムであらわしたところ**図6**に示したように抽出比色法，GLC法とも対数正規型を示した。一方Kira[14]はGLCを用い，またOgataら[12]は高速液体クロマトグラフを用いて正常範囲を設定し，その度数分布をヒストグラムであらわすと対数正規型を示すと報告している。また**表2**に示したように男子，女子のそれぞれのHA対数値より幾何平均値を求め，正常範囲を平均値±2SDの範囲で設定すると，

GLC法の値にくらべ抽出比色法の値は男子では約5倍，女子では3倍高い値を示した。そこでHAの幾何平均値について抽出比色法とGLC法との有意差検定を行うと男子群，女子群とも危険率0.1%以下で有意差が認められた。この有意差の1つの原因としては抽出比色法の呈色に影響を与える尿中物質の存在が考えられる。しかしこの尿中影響物質の詳細については今後に残された問題である。

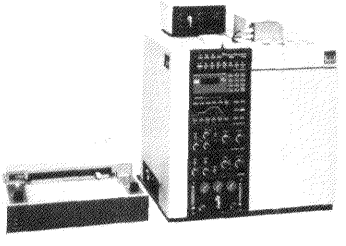
以上われわれは抽出比色法，ガスクロマトグラフ法の基礎検討を行い，尿中馬尿酸測定において定量性を確認し，また男女非暴露者群の正常範囲を求めた。この結果から尿中馬尿酸測定においては抽出比色法，ガスクロマトグラフ法ともそれぞれ独自の正常範囲を設定する必要があると考えている。更にわれわれはGLC法を用いて馬尿酸と，メチル馬尿酸の異性体であるo-メチル馬尿酸，m-メチル馬尿酸，およびp-メチル馬尿酸について分離定量を行った。

■参考文献

1) E. R. Plunkett 編著，牛尾耕一監訳：新産業中毒マニュアル～化学物質等の衛生管理～，東京，メディカルセンター，1978，pp 215－216，pp 230.
2) Ogata, M. Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.：Urinary excetion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. Brit. J. Industr. Med. 27：43-50, 1970.
3) Williams, R. T.：Detoxication Mechanisms, 2nd ed., pp. 194-196, London：Chapman and Hall, 1959.
4) 吉良尚平，佐伯孝雄，緒方正名：尿中グリシン抱合物のガスクロマトグラフによる定量法の検討，第49回日本産業衛生学会抄録集，84－85，1976.
5) Umberger, C. J. and Fiorese, F. F.：Colorimetric method for hippuric acid, Clin. Chem. 9(1)：91-96, 1963.
6) Ogata, M., Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.：Quantitative determination in urine of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m- or p-xylene, Brit. J. Industr. Med. 26：330-334, 1969.
7) Tomokuni, K. and Ogata, M.：Direct colorimetric determination of hippuric acid in urine, Clin. Chem. 18(4)：349-351, 1972.
8) 緒方正名，長尾逸子：Toluene, Xylene吸入時，尿中に排泄される馬尿酸，メチル馬尿酸の新定量法について，産業医学，9：434－442，1967.
9) Buchet, J. P. and Lauwerys, R. R.：Measurement of urinary hippuric and m-methylhippuric acids by gas chromatography, Brit. J. Industr. Med. 30：125-128, 1973.
10) Caperos, J. R. and Fernández, J. G.：Simultaneous determination of toluene and xylene metabolites in urine by gas chromatography, Brit. J. Industr. Med. 34：229-233, 1977.
11) 長谷川憲司，富沢和広，清治和則，塩島正二：比色法とガスクロマトグラフ法による尿中馬尿酸分析，日本災害医学会会誌，27(1)：39－43，1979.
12) Ogata, M., Sugihara, R. and Kira, S.：Quantitative determination urinary hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid as indices of toluene and m- or p-xylene exposure by high performance liqid chromatography, Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 39：199-206, 1977.
13) 池田正之：ガスクロマトグラフ法を用いた尿中馬尿酸，m-メチル馬尿酸の定量とその応用例，第49回日本産業衛生学会抄録集，82－83，1976.
14) Kira, S.：Measurement by gas chromatography of urinary hippuric acid and methylhippuric acid as indices of toluene and xylene exposure, Brit. J. Industr. Med. 34：305-309, 1977.

Topics

データ処理機能をもつマイクロコンピュータ内蔵の高性能ガスクロマトグラフ
663形
日立ガスクロマトグラフ



663形 日立ガスクロマトグラフ

このたび，新たに663形 日立ガスクロマトグラフを開発しました。

ガスクロマトグラフは測定の簡便さ，迅速性およびすぐれた分離能力のために，生化学，公害等の分野にまで普及していますが，それぞれの分野において装置の自動化，省力化および信頼性の向上が必要となってきています。663形は内蔵するマイクロコンピュータによりデータの解析，計算，分析結果の打出しを行い，更に温度制御，時間制御を行います。これにより操作ミスが減少し，分析精度および処理能力を向上させています。またデータ処理に関しては別の検出器信号出力を接続することにより，同時に2個の検出器信号のデータ処理を行うことも可能です。

■特　長

(1)内蔵マイクロコンピュータによりデータ処理と温度，時間の制御を行う。
(2)カラム恒温槽，注入口，FID，TCDの4個所の温度を独立に制御する。
(3)FIDは，コレクタだけでなくノズルも容易に洗浄できる構造とした。
(4)2チャンネル同時データ処理に拡大可能である。

■仕　様

(1)カラム恒温槽 －50～400℃，多段くり返し昇温可能。
(2)10種類の分析条件（データ処理及びガスクロマトグラフ制御）のファイルを記憶，任意の呼出し使用可能。
(3)処理可能ピーク数最大400ピーク。
(4)4個所独立温度制御。FLS使用ゼロクロスPID制御。
制御感度 0.1℃以下。

解　説

U.D.C. 621.385.833.078::681.323

H-600形 日立透過形電子顕微鏡ニュートータルシステム

上村　昌司*　窪添　守起*　松井　功*

最近の透過形電子顕微鏡は高分解能はもちろんのこと走査電子像，さらに軽元素から重元素に至るまでの元素分析を可能とする装置が要求されている。これらの巾広い研究分野に対応できる透過形電子顕微鏡H-600を開発したので，以下本装置の主な特長，仕様の概略について述べる。

1．特　長

1(1) 総合分析電子顕微鏡としての新しい機能

図1はH-600形分析電顕としてのレイダイヤグラムを示す。試料上部には走査二次電子像検出器，X線分析用検出器，カメラ室下部には走査透過電子像検出器および電子線速度分析用の分析系が装着されている。これらのモードはすべて同一試料位置で検鏡あるいは分析ができる。X線分析と電子線速度分析を装着した本装置ではリチウムからウランまで，ほとんどの元素を分析することができる。走査電子像による検鏡とX線分析，電子線速度分析による元素分析は1個のスイッチによって瞬時に切り換える構成となっており，分析個所に対応した微小部の元素分析が極めて正確に行なえる。

1(2) 新しい構造による超高真空構造

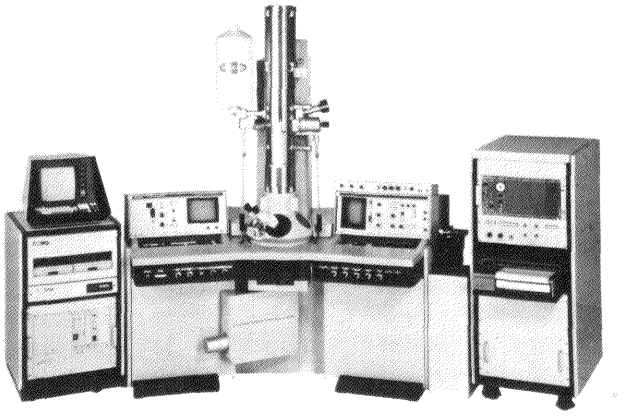
図2はH-600の鏡体断面図である。

超高真空電顕における真空排気系として次の4項目を開発目標として製品化に成功した。

1) 排気容積をできるだけ小さくすること。
2) Oリングの数を減らすこと。
3) アウトガス源になるものをできるだけ真空中におかないこと。
4) 試料室まわりを積極的に排気すること。

排気部分は電子銃，対物レンズ上部，観察室，カメラ室とそれらをつなぐステンレス製のパイプからなりたっている。従来はレンズのポールピース周辺部分が真空内にあったが，このパイプにより第1コンデンサおよび対物を除いたポールピースは真空外に配置され，排気容積を小さくしていると同時にポールピースや非点収差の補正片等を真空外に取り出して，アウトガス源になるものを取り除いた。またパイプによりポールピース間の真空シールが不要となり，アウトガス源の大半を占めるOリングの数を減らしている。

図3はH-600形の排気系を示す。排気系は鏡体を2つに別けて電子銃室から対物レンズと，中間レンズからカメラまでと各々独立した排気系で排気している。試料の周辺は上下左右を積極的に排気する構成としている。上下の排気系は1 mmφと6 mmφの絞りにより分離している。上部の排気系には水冷バッフル付の油拡散ポンプの上にコールドトラップが取り付けられており，油拡散ポンプからのバックストリームを徹底的に除去する構成としている。



H-600形 透過形電子顕微鏡

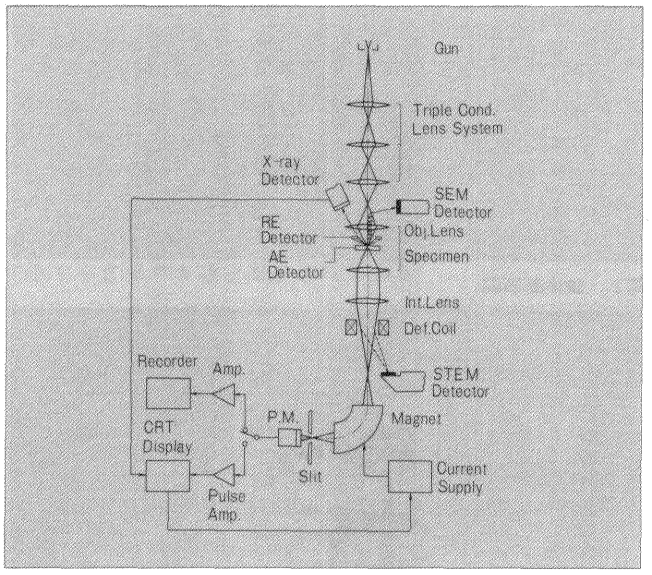


図1　H-600形レイダイヤグラム

図4は以上のような排気系により得られた到達真空度である。横軸に時間，縦軸に到達真空度をとったものである。測定箇所は試料室排管の部分である。鏡体に空気を入れて，約1時間排気後約1×10^{-6} Torr，コールドトラップに液体窒素を入れて2×10^{-7} Torr，コンタミ防止装置により，排気後約2時間で1.5×10^{-7} Torrになる。このように高真空化をはかることにより試料汚染を少なくし，又高真空が要求される単結晶LaB_6フィラメントの安定装着も可能となる。

1(3) ユニークな3段照射系

図5に3段照射系のレイダイヤグラムを示す。透過電顕では第1コンデンサレンズと第3コンデンサレンズを使用

* 日立製作所 那珂工場 電子装置設計部

し，スポットサイズを0.2μmから10μmを得ている。また超高分散の電子回折では第2コンデンサレンズを使用し3段照射系とし0.1μmまでスポット径を絞り，分解能指数を向上させている。またSEM，EDX，EAの場合は対物レンズの強励磁化による前磁場により，さらに電子線を収束し最小スポット径を15Åまでにすることができる。スポット径が絞られると，当然電子線量が減少し，試料照射電流が少なくなるが，LaB_6フィラメントにより輝度を約10倍向上し，スポット径を絞っても充分な輝度が得られ，高分解能が期待できる。**図6**はLaB_6フィラメントを使用したときのSEMにおける分解能撮影例である。

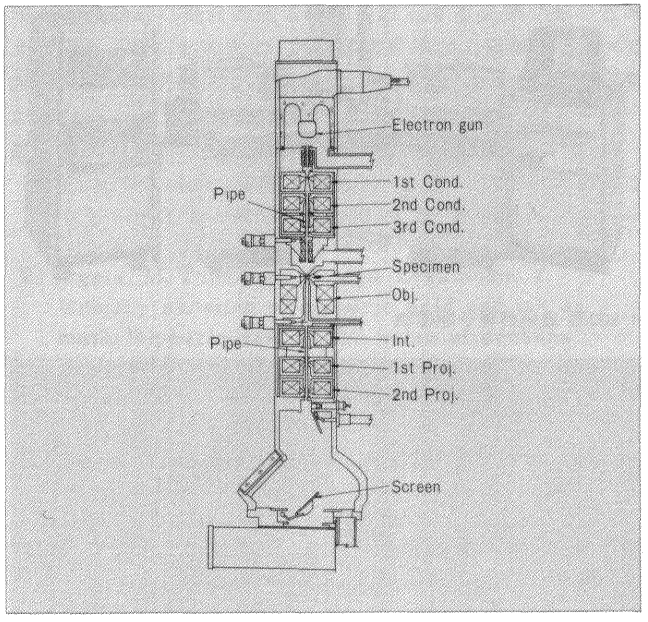


図2　鏡体断面図

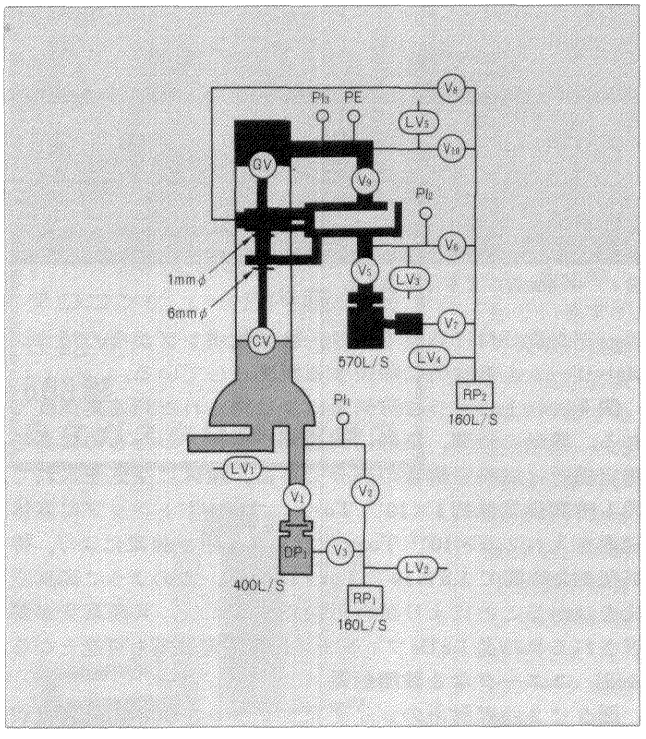


図3　排気系統図

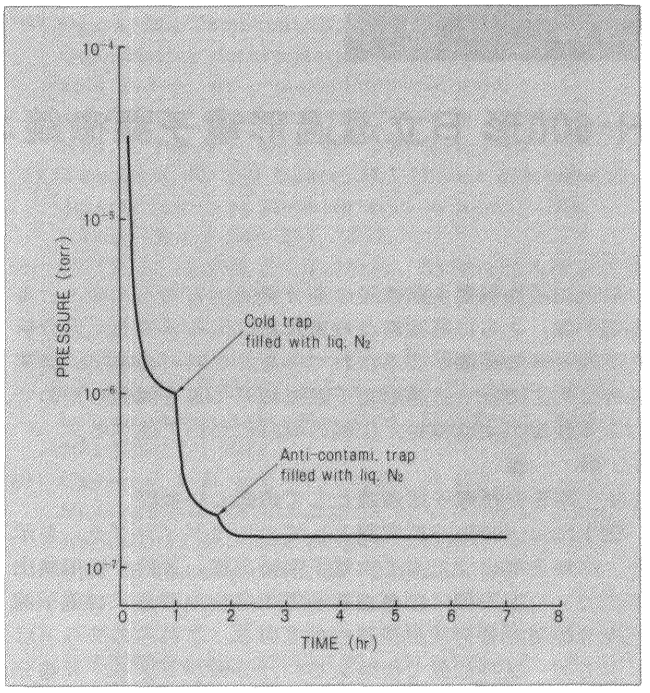


図4　到達真空度

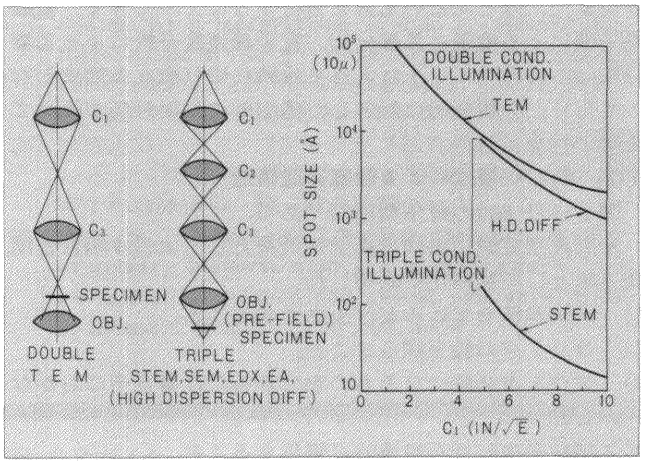


図5　3段照射系

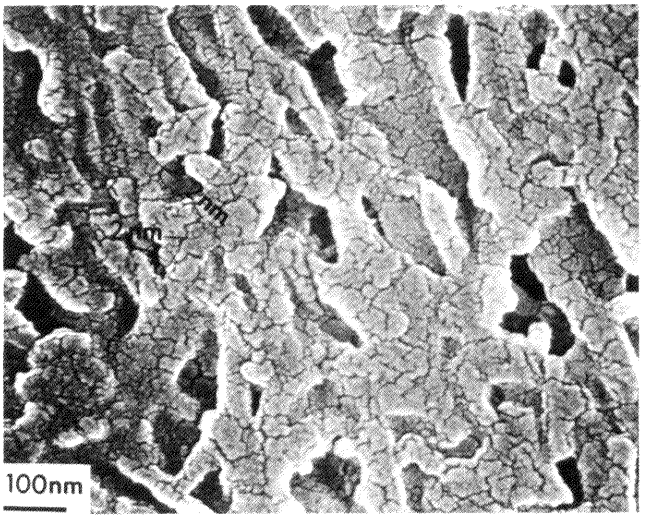


図6　SEM分解能撮影例
試料：金蒸着した磁気テープ　加速電圧 75kV

またTEMにおけるモードでも3段照射系を利用してTEMにおけるマイクロディフラクション等の拡張性を持っている。

1(4) コンピュータ内蔵による多機能化と操作性の向上

照射系が3段，形像系が4段とレンズ系は合計7段と段数が増えるにつれ，組合せが複雑になり操作性も困難となる。H-600形はコンピュータを内蔵して，各レンズ回路に対応する電流値が記憶されるため単純な回路構成となり，操作性も容易にできるようになっている。

図7はコンピュータによるH-600形の制御系を表わしたものである。演算処理を行なうCPUと，各レンズ電流に対応するデータやプログラムが書き込まれたROMと，一時的にデータを記憶するRAMがある。たとえばキーボードの倍率切換え用スイッチをONすると，信号がKEYBOARD I/Oからバスラインを通りCPUへ，倍率に対応するデータがROMから読み出されLENS I/Oを通り各レンズ電流が設定される。また倍率値をはじめ，電子顕微鏡として必要なデータはCRTに一括表示される。コンピュータ内蔵により操作盤上の回転ツマミはキースイッチに変り，5種類の焦点合わせ用回転ツマミは2個のキースイッチに置き換えられイージーオペレーション化をはかっている。

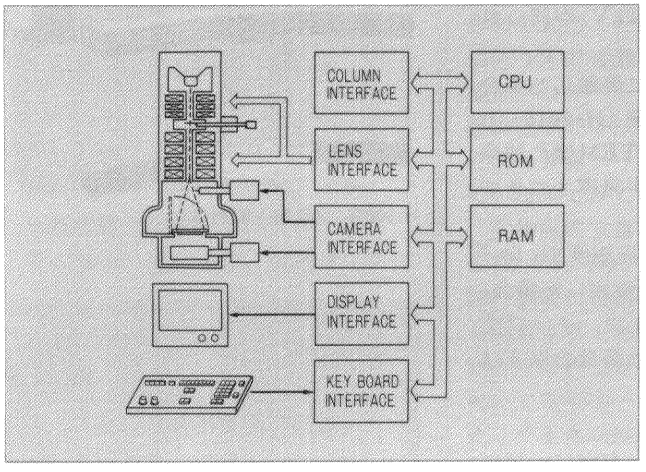


図7 H-600形制御系構成図

コンピュータ内蔵により新しい機能が追加されたが，その中からつぎの2項目について述べる。

1(4)① 倍率と連動した明るさの自動調整

一般に高倍率にすると，電顕像は暗くなり，低倍率にするとその逆に明るすぎ，倍率により著しく像の明るさが変化する。H-600形では倍率を変えても，常に像の明るさを一定にしているため，明るさを調整する必要がない。**図8**は横軸に倍率を，縦軸に第3コンデンサ電流値と螢光板上での電子流密度を取っている。倍率を変えても，螢光板上の電子流密度(I_0)すなわち明るさはほとんど変らない。これは倍率の変化に応じ，適正励磁電流を算出し明るさを一定に保つように第3コンデンサレンズの励磁が自動的に設定されるようになっている。

また第3コンデンサレンズの励磁をある値に設定し，試料上のスポットサイズを限定する機能をもっている。これにより電子ビームで試料を破損することなく像観察することができる。

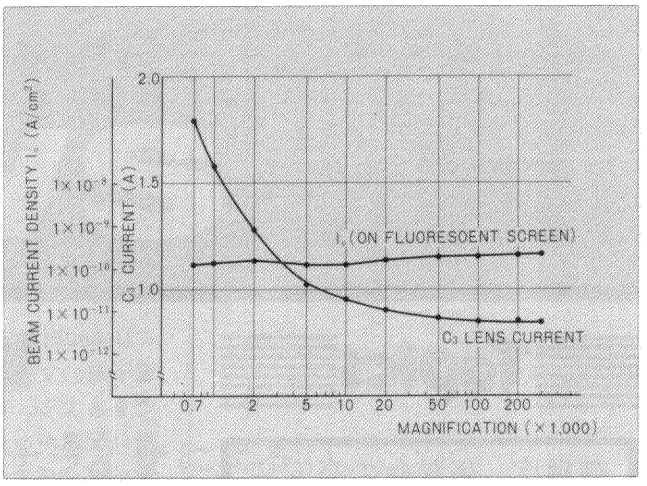


図8 明るさリンク効果

1(4)② オプティマムフォーカス機構内蔵

金属関係をはじめ一般試料は正焦点で写真撮影をする。これはフブラー（焦点合せを容易にする機構）により容易に正焦点が得られる。しかし生物試料関係の像撮影する場合，コントラストをつけるため，少し不足焦点にして写真撮影する方法がある。従来はこの操作を倍率毎にディフォーカス量を焦点ツマミで変えて撮影していた。H-600形は倍率とリンクしてディフォーカス量を記憶しておき，所定のオプティマムフォーカスで，コントラストの優れた写真を撮影することができる。**図9**は横軸に倍率を，縦軸にディフォーカス量をとったものである。ディフォーカス量は加速電圧，位相コントラスト，試料によっても異なるためOF1～3まで3通り用意されている。

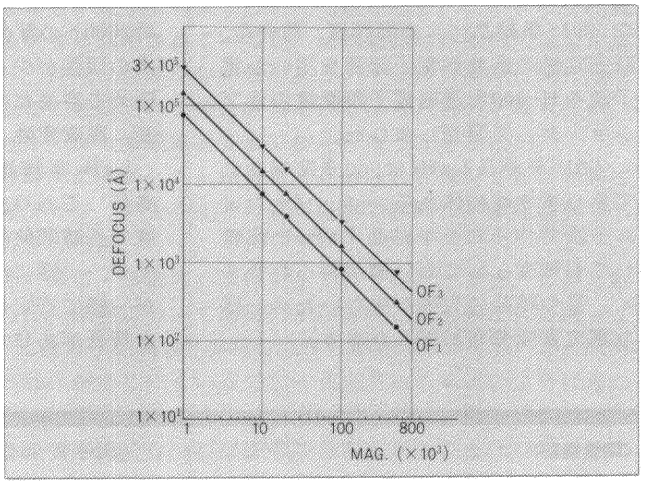


図9 倍率に対するディフォーカス量

2．仕　様

(1) 分解能

TEM 1.4Å（高分解能），2.0Å（±60°TILT）

SEM 30Å（20Å LaB_6付の場合）

STEM 15Å（10Å LaB_6付の場合）

EA 4eV，Li以上の元素分析，軽元素に高感度

(2) 倍率 100×～800,000×（高分解能）

100×～300,000×(±60°TILT)

(3) 電子回折　制限視野カメラ長　200～1600mm
超高分散カメラ長　10～100m

(4) 加速電圧　25, 50, 75, 100kV

(5) コンピュータ内蔵による機能追加

a. オートスルーフォーカス

b. 明るさリンク

c. オプティマムフォーカス

d. 試料損傷対策

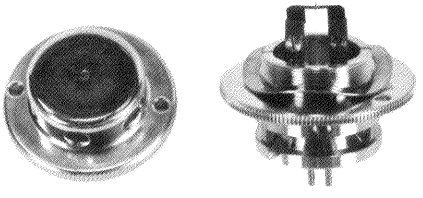
e. アライメント方法CRT表示　他

3. まとめ

以上特長および仕様について記述したが，透過像はもとより走査像の観察がワンタッチで切り換えられ，新たに電子線速度分析が追加され，X線分析装置とあいまってリチウムからウランまでの範囲にわたり元素分析が可能となり，コンピュータ内蔵による操作性の優れた分析電子顕微鏡が完成したと言えよう。

Topics

高輝度，高寿命の高安定電子源
日立直熱形<001> LaB_6電子銃



日立直熱形<001>LaB_6電子銃

先に日立製作所中央研究所において開発された，六ほう化ランタン(LaB_6)の<001>単結晶による高輝度，長寿命，高安定性の直熱形電子線源を用いた電子銃をH-600形透過電子顕微鏡のオプションとして発売しました。

<001>単結晶LaB_6は，従来使用されております焼結体あるいは，ゾーンメルト法で作られた単結晶LaB_6と比較しても輝度として高い値が得られやすく，且つ結晶の欠陥が少ないため一様な電流密度分布が得られます。

H-600形電子顕微鏡は，単結晶LaB_6電子源のすぐれた特長が最大限に発揮できるよう，真空系，操作性において細い配慮がなされておりますので，通常のタングステン・ヘアピン形フィラメントと同等の簡便さで御使用戴けます。

■特　長

(1) 高輝度電子源が得られます。

在来のタングステン・ヘアピン形フィラメントと比較し，約1桁高い輝度($5\times10^6 A/cm^2\cdot st$ at 100kV)が得られます。

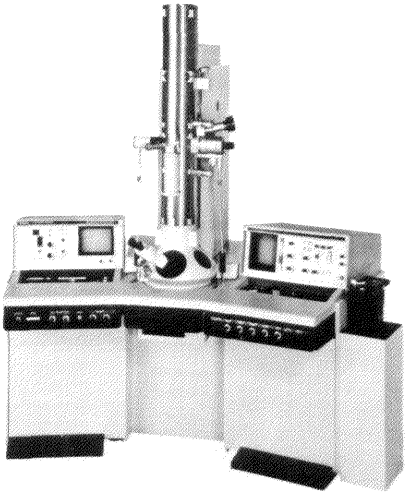
H-600形電子顕微鏡に装着した場合，2次電子走査像観察装置(H-6010)との併用で，SEM像，STEM像の観察において特にその威力が発揮されます。

(2) 長寿命

チップ温度，1550℃，真空度5×10^{-7} Torr($\sim7\times10^{-5}$ Pa)で使用した場合，約2000hの寿命を有します。チップ交換の回数が少くなるため装置の保守は極めて容易になります。

(3) 高安定性

LaB_6単結晶は，<001>方向に一様に成長しておりますので1550℃の動作温度で長時間使用しても表面に凹凸が生せず，一様に消耗するため，電子線束が一様に安定に放出されるという優れた特長がありますので，安心して御使用いただけます。



H-600形 日立電子顕微鏡

<編集後記>

■本号は，諸般の事情により，No.3(AUTUMN)とNo.4(WINTER)との合併号といたしました。ご諒承ください。

■次号は，Vol.23, No.1(SPRING)を，55年4月に発行の予定です。

■「X線マイクロアナライザによる植物体中水溶性イオンの凍結試料の分析」の報文では，茅野先生に，WDXによる，凍結状態の植物根中のK^+の分析について報告して頂きました。

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　マーケッティング部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号　第17森ビル
〒150　電話 ダイヤルイン　東京(03)504－7211

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
WINTER 1979　Vol.22 No.3/4

発　行　昭和54年12月1日
(年4回　発行)
発行人　湯川　清
編集人　菱田眞三郎　岩井孝之
発行者　株式会社　日立製作所　計測器事業部
〒105　東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル
電話 ダイヤルイン　東京(03)504－7866
印刷所　日立印刷株式会社