

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

WINTER 1980
VOL.23 NO.3/4

目次

ごあいさつ……………小沢重樹… 1

報 文

反射電子像の医学、生物学への応用……………田中敬一
満島 明 齊藤尚武 永谷 隆… 2

STEM-EDX システムの金属材料への応用……………
竹山太郎 大貫惣明 望月 進… 5

解 説

S-450LB形日立走査電子顕微鏡……………齊藤 稔 齊藤尚武… 10

F D イオンの衝突解離…神原秀記… 14

パターン認識による白血球分類と806形日立血液像自動分析装置……………松下 甫… 18

トピックス

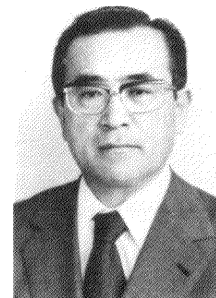
H-600 形日立高性能電子顕微鏡 the 1980 IRI100 Winners に入選 … 4

705形日立自動分析装置 ……………13

RA-101 日立縮小投影露光装置 ……………22

ごあいさつ

小沢 重樹 *



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上げます。

日立製作所の計測器専門工場として、那珂工場が設立されて以来、早くも20年を経過致しました。その間、電子顕微鏡、電磁分析装置、分光光度計、クロマトグラフを中心とする理化学機器の開発、供給を通じて微力ながら科学技術の進歩に役立てよう努力を重ねてまいりました。その中から生まれた臨床用自動分析計も、電解質分析計、血液像自動分析装置と展開して、病院に於ける検査の自動化高度化に貢献する大きな柱に成長しつつあり、ひとえに皆様のご支援の賜物と深く感謝しております。

最近の理化学機器の利用される分野は、ますます多様化し、広範囲に亘っています。従って、今後の製品開発はハードウェアとしての性能の追求は当然のことながら、ユーザの目的に合ったアプリケーションに基礎を置いたものでなければなりません。

利用分野の多様化に伴って、装置に要求される性能、機能はますます高度化、複雑化しています。又、使い易さが重要であります。価格の上昇を避けて、このニーズを満たすためには、コンピュータや半導体の基盤技術が必須であり、積極的にこの問題と取り組んでいます。

周知のように、我が国の多くの製品、テレビ、自動車、半導体などが、海外でも高く評価されるようになったのは、その信頼性によるところが大きいとあります。私どもの製品についても、信頼性の提供が第一であると考えます。しかもそれはユーザのアプリケーションの基礎のうえに立った信頼性が重要であります。

理化学機器には、多岐にわたる新技術がもり込まれています。したがって長期間の生産で得た技術を基礎に、新しい製品分野に展開することが可能です。前述の医用機器への拡大のほか、電子線やイオン光学の技術の延長として半導体製造装置の製品化を進めております。最近、縮小投影露光装置を発売しましたが、この装置は、高密度LSIの生産性、信頼性向上に大きく寄与することが期待されてきます。

理化学機器をはじめとするこれらの高度の技術が要求される機器は、我が国からの輸出の対象として大いに伸ばして行かねばならないと考えます。そこで、世界的な視野に立って製品開発、販売体制の確立を進めて行きたいと思っております。

私どもは、ご利用者のご要求にお応えするため、製品開発と合わせて、販売、アフターサービスの体制整備に積極的に取り組んでまいります。今後とも日立理化学機器の発展のため、何とぞ格段のご指導ご援助を賜りますよう衷心よりお願い申し上げます。

*株式会社 日立製作所 理事 計測器事業部長

報 文

U.D.C 57.086.3:537.533.71:621.385.833.28

反射電子像の医学生物学への応用

田中 敬一* 満島 明** 斉藤 尚武*** 永谷 隆***

電子線を試料に当てると、各種の情報が得られる。二次電子、反射電子、オージェ電子、カソードルミネッセンス、X線等である。この内、医学生物学に用いられているのは主として二次電子で、他のものはあまり応用されていない。これは二次電子像が、立体的なわかり易い像を与えるだけでなく、分解能的に最も優れているからである。したがって、走査電子顕微鏡（SEM）が医学生物学に応用されてから今日迄の10年間、二次電子像がもっぱら用いられ、そのための技術の開発が進められてきた。しかし、一方では立体像を与える方法としてフリーズレプリカ法があり、しかもこの場合は透過電子顕微鏡（TEM）を用いるため、分解能的に大変すぐれている。そのためSEMも立体像だけを特徴としているだけではその存在価値が薄くなってしまふ恐れがある。さいわい、SEMには一度に各種の情報を得ることのできる長所がある。したがって、これを生かすことが必要で、それぞれの情報を別々に扱うのではなく、これを総合的に一つの研究に用いることを考えるべきであろう。その一つの方法として、最近諸外国では反射電子の生物学への応用が盛んに行われている。^{1)~7), 10, 12)} 我々も、新しく開発した高感度の反射電子検出器を用い、生物試料を観察し、その有用性を確かめ得た。^{14) 15)}

1. 反射電子検出器

最近、各種の高感度反射電子検出器が開発されているが、著者らも今回高感度のScintillator-photomultiplier type（蛍光体と光電子増倍管の組合せ方式）の検出器を製作使用した図1。これは日立電界放射型走査電子顕微鏡HFS-2STに取りつけるよう製作したものである。

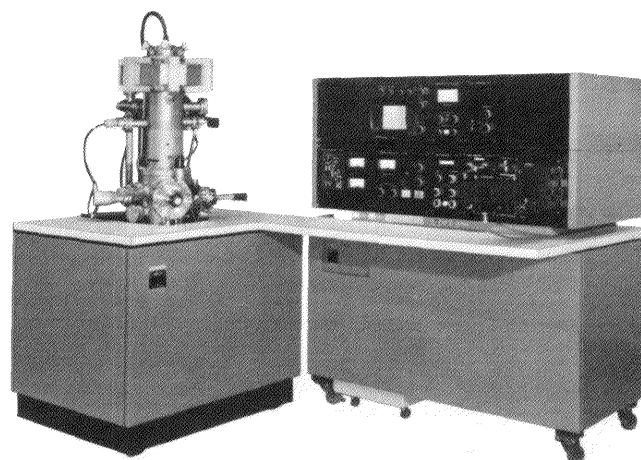
普通型のSEMでも、二次電子検出器のシンチレータ表面に印加してある後段加速電圧を切ることにより、ある程度の反射電子像を観察できるが、この方法は反射電子の収量が非常に悪い。しかも、後段加速電圧を切ることによりビームが振れ、視野が二次電子像と反射電子像でずれてくる欠点がある。したがってどうしても生物学用には高感度の検出器が必要である。

著者らの用いた反射電子検出器の二次電子検出器に対する関係位置は、図2のようである。そして、反射電子検出器は必要に応じて、出し入れできるようになっている。

この2つの検出器により、二次電子像と反射電子像を全く同じ条件で写真撮影することができた。尚、試料電流は $2 \sim 5 \times 10^{-11} \text{A}$ である。

2. 材料および方法

2.1 ウサギ外眼筋 動物より組織を摘出し、10%Formalin



HSF-2 ST形日立電界放射形走査電子顕微鏡

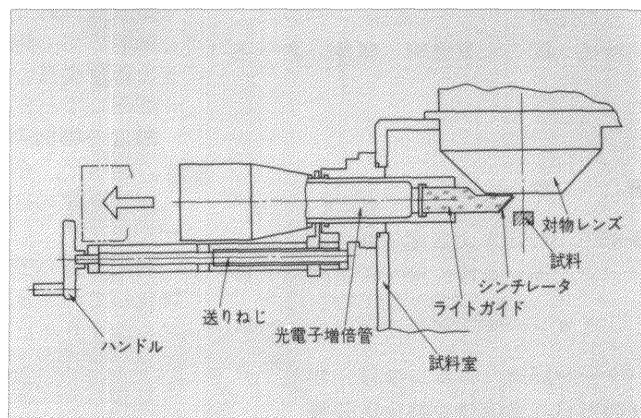


図1 高感度反射電子検出器

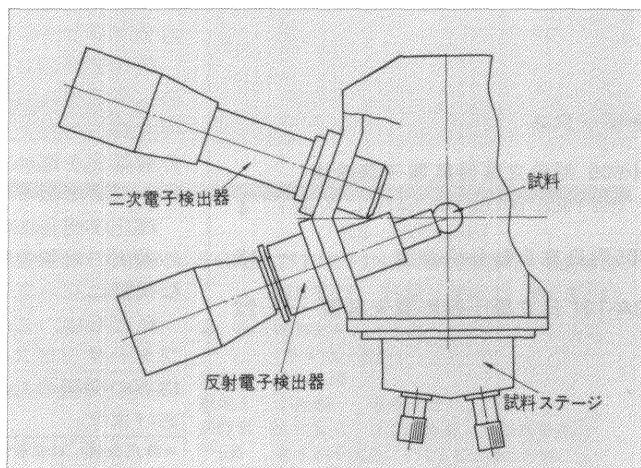


図2 試料室の中の2次電子検出器(上)と反射電子検出器(下)との関係位置

* 鳥取大学医学部教授、医博

** 鳥取大学医学部助手

*** 日立製作所 那珂工場

液にて固定し、上昇エタノール列にて脱水後Celloidin に包埋する。約30 μ の切片をつくり、Bielshowsky氏銀染色鈴木氏変法にて染色、エーテルアルコールにてCelloidinを溶解除去する。そして酢酸イソアルミを通した後、ドライアイスを用いて臨界点乾燥する。

2.2 ラット精巣上体細胞 動物を生理的食塩水にて灌流脱血後、試料を摘出、硝酸コバルトを加えた15%フォルマリン液にて固定する。水洗後1.5%硝酸銀液にて30時間処理し、ハイドロキノン、フォルマリン、硫酸ナトリウム混液にて還元する。水洗後、上昇エタノール列にて脱水し、酢酸イソアルミに浸漬する。酢酸イソアルミを満たしたカプセルに試料を入れ、エイコーTF-1凍結割断装置を用いて試料を割断する。ついでドライアイス臨界点乾燥を行う。

2.3 ラット肝臓細胞 動物を生理食塩水にて灌流後、肝臓片を摘出、10%フォルマリンにて固定、Bielshowsky氏銀染色、鈴木氏変法を行なう。水洗、エタノール列にて脱水の後上記と同様にエイコーTF-1を用いて酢酸イソアミル割断(Amyl-acetate cracking)を行い、臨界点乾燥をする。

乾燥した標本はすべて、回転ステージをもったスパッターCoater(EIKO-VX10R)にて白金を蒸着し、電界放射形走査電子顕微鏡(日立HFS-2ST形)にて観察した。加速電圧は25KV、試料傾斜角20°である。

3. 観察所見および考察

ウサギ外眼筋では、反射電子modeにおいて、筋線維(muscle fiber)の横紋を明瞭に観察することができた(図4)。この横紋は2次電子像図3では全く見られないものである。その他、筋細胞(muscle cell)の核(nucleus)も銀に染まるため反射電子像で明るく観察された。

次にラットの精巣上体細胞(epididymal cell)図5, 6では、反射電子像で、核上部にあるゴルジ野が明るく観察された。しかしこれらの明るく輝く部がTEMで観察されるGolgi complexのどの部に相当するかは明かにできなかった。

ラット肝細胞では核が反射電子像で明るく輝くのを観察した図7, 8。

上述のように重金属染色をほどこした生物試料を反射電子モードで観察すると、2次電子像では見られない像を得ることができる。

その点、今後大いに利用し得る価値がある。

しかし、この方法が今後更に広く用いられるためには、1, 2の問題があるように思う。その一つは反射電子検出器の分解能の問題である。我々が今回用いたものはかなり高感度の検出器であったがまだ不十分で、更に高感度のものが望まれる。

次は試料作製上の問題である。細胞の特殊な部分を選択的に重金属で染める方法は従来からいろいろあるが、反射電子の収量が良いという理由から銀が良く使われている。ところが銀化合物は組織を強く障害する。特に細胞の割断面はそうである。従って弱拡大の時はそれ程でなくても、強拡大の時は組織の破壊が目立ってくる。したがって今後は組織を傷めない重金属染色法が開発される必要がある。

もし、これらの事柄が解決されるならば、反射電子像は今後生物学に広く用いられることになるだろう。

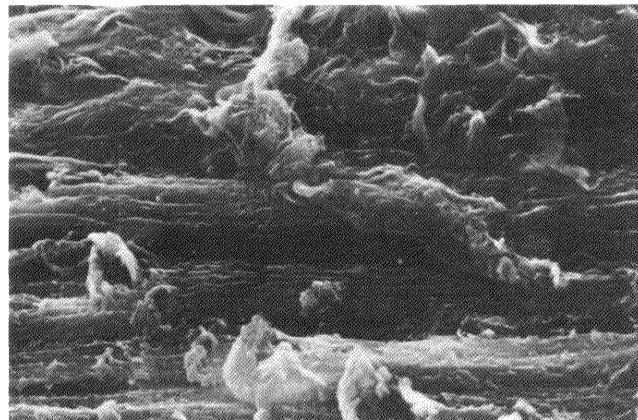


図3 ウサギ外眼筋の2次電子像。×1100

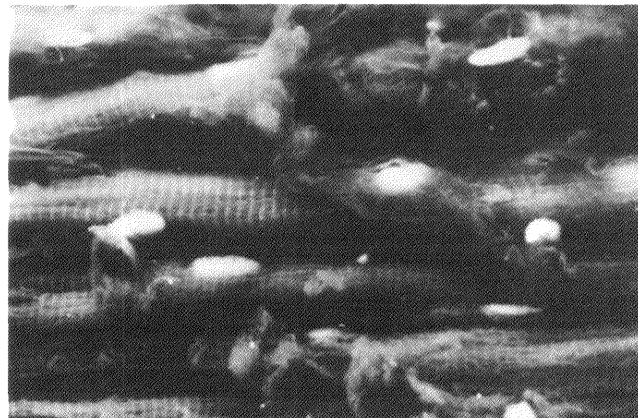


図4 同、反射電子像、横紋が明瞭に見られる。×1100

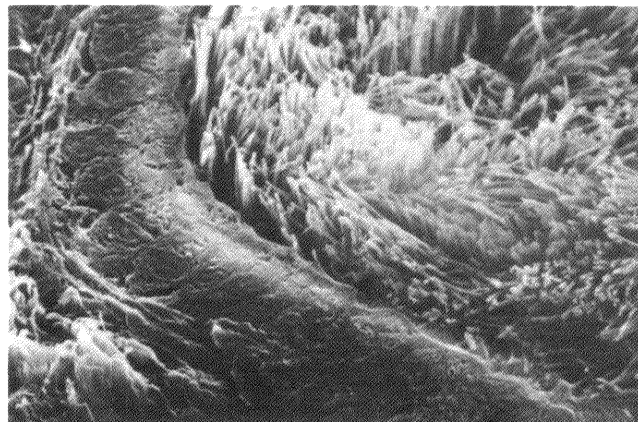


図5 ラット精巣上体管の2次電子像。×700

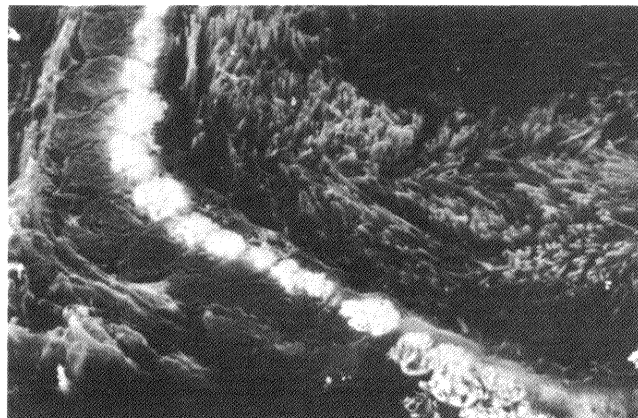


図6 同、反射電子像、ゴルジ野が明るく見られる。×700

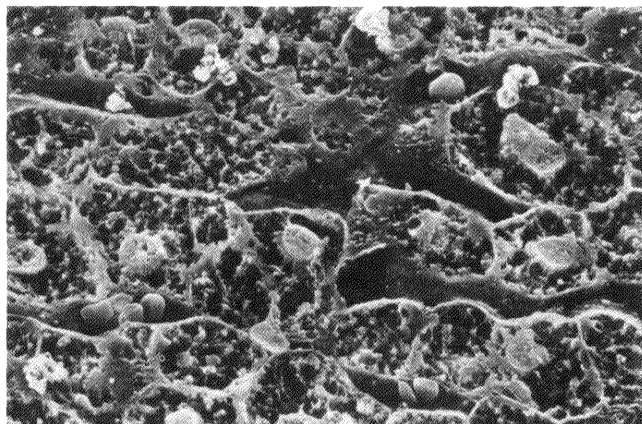


図7 ラット肝細胞の2次電子像。×750

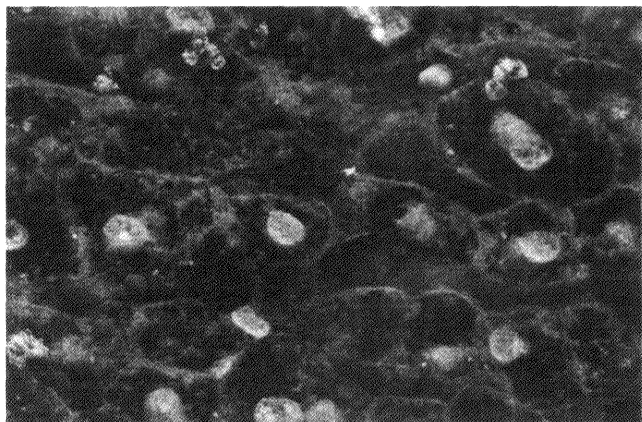


図8 同、反射電子像、核が光って見える。×750

4. 結 語

新しく開発した高感度反射電子検出器を用い、重金属染色をした生物試料を観察して、反射電子像が、生物学的に興味ある像をしめすことを確かめた。

■参考文献

1. Abraham, J.L. & DeNee, P. B. :
Lancett, May, 19, p. 1125, 1973.
2. Abrahm, J. L. & DeNee, P. B. : Scanning electron

microscopy/1974, IITRI, Chicago, pp. 251-258, 1974.

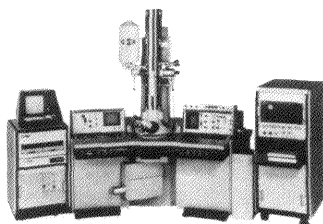
3. Adler, K. B., Davis, G. S., Woodworth, C. W. & Brody, A. R : Scanning electron microscopy/1979 (III), SEM Inc., AMF O'Hare, pp. 921-928, 1979.
4. Albrecht, R. M. & Bleier, R : Scanning electron microscopy/1979 (III), SEM Inc., AMF O'Hare, pp. 55-62, 1979.
5. Becker, R. P. & DeBruyn, P. H. : Scanning electron microscopy/1976 (II), IITRI, Chicago, pp. 171-178, 1976.
6. Becker, R.P. & Sogard, M. : Scanning electron microscopy/1979 (III), SEM Inc., AMF O'Hare, pp. 835-870, 1979.
7. DeNee, P.B., Frederickson, R.G. & Rope, R.S. : Scanning electron microscopy/1977 (II), IITRI, Chicago pp. 83-92, 1977.
8. Gedcke, D.A., Ayers, J.B. & DeNee, P.B. : Scanning electron microscopy/1978 (I), SEM Inc., AMF O'Hare, pp. 581-594, 1978
9. Kikuchi, M. & Takashima, S. : Proc. 9th. Int. Congr. Electron Microscopy, Tronto, (I), p. 82, 1978.
10. Lin, P.S.D. & Becker, R. P. : Scanning electron microscopy/1975, IITRI, Chicago, pp. 61-70, 1975.
11. Moll, S.H., Healey, F., Sullivan, B. & Jhonson, W. : Scanning electron microscopy/1978, SEM Inc., AMF O'Hare, pp. 303-310, 1978.
12. Vogel, G. & Becker, R.P. : Scanning electron microscopy/1976 (II), IITRI, Chicago, pp. 409-415, 1976.
13. Robinson, V.N.E. : J. Phys. E. Sci. Instrum., (8), pp. 650-652, 1974.
14. 田中敬一, 永谷 隆, 齊藤尚武 : 第35回日本電顕学会講演予稿集, 宝塚市 昭和54年5月 (1979)
15. 永谷 隆 : 図説走査電子顕微鏡 (田中敬一, 永谷隆編) P. 25 (朝倉書店) (1980)

Topics

H-600形
日立高性能電子顕微鏡

the 1974
IR 100
Winners

に入選



このたび、H-600形日立高性能電子顕微鏡は、米国のIndustrial Research誌が行った1980 I-R 100 Awards Competition に入選いたしました。

(同誌10月号)

H-600形は、電子線通路のみを真空とする高真空鏡体構造とし、試料汚染のない状態で長時間の試料観察が可能です。X線分析機能と電子像速度分析機能を備えており、軽元素(Li)から重

元素(U)までの元素分析が可能な、総合分析電子顕微鏡です。照射系に3段レンズ系を採用し、試料面上のスポットサイズを1.5nm (15Å)にまで絞ることができます。照射系、結像系合せて7段のレンズ系を効率よく働かせるためマイクロコンピュータを内蔵しています。

I-R 100は、その年に開発された100種の最も優れた新製品を選ぶことにより、優れた技術革新に成功した技術者と組織を表彰すると共に、科学者、技術者に関心ある重要な技術的進歩を確認することを狙いとして、Industrial Research 誌が18年来行っている行事です。

日立グループでは、この他に、イオン打込装置IP-815形、および、MOSメモリHN48016が、入選しています。

STEM-EDXシステムの金属材料への応用

竹山 太郎* 大貫 惣明** 望月 進**

1. 諸 言

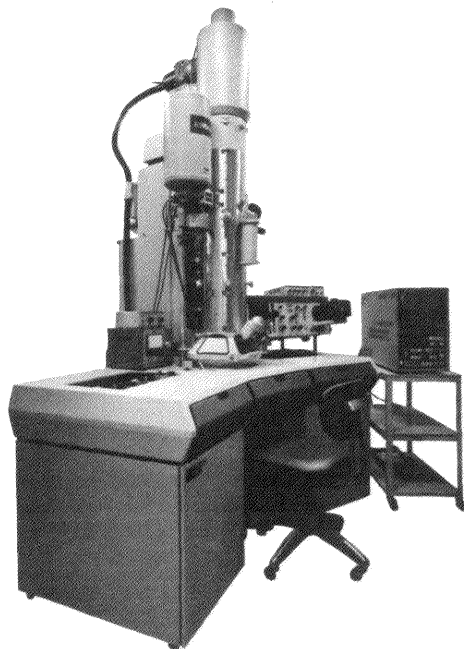
エネルギー分散型X線分析(EDX)を用いた透過型電子顕微鏡(TEM)の研究は、生物試料への応用⁽¹⁾についてすでに多くの顕著な成果が得られている。しかし、金属材料に対しては走査型電子顕微鏡(SEM)による表面分析⁽²⁾にとどまり、TEMによる金属薄膜への応用はごく最近^(3,4)までほとんど報告されてはいなかった。これは(a)〔厚さ効果〕薄膜試料の厚さは通常均一でないため、試料ごとに得られるX線の量が変化する、(b)〔体積効果〕微細組織の分析の場合、たとえば結晶内部の析出粒子などは膜厚に比べて非常に小さいため、目的のX線収率が低下する、(c)〔吸収効果〕試料のX線の吸収を考慮しなければならず定量化が難しい、(d)〔散乱効果〕試料に入射する電子線の散乱により分析領域が拡大する、などが原因として考えられる。EDXはこれまで、100kVの走査透過型電子顕微鏡(STEM)に応用されたが、著者らはH-700H、200kVのSTEMに堀場製EMAX1500を装着し、金属薄膜への応用について検討を進めてきた。加速電圧を従来より高くしたことに伴う種々の問題を解決し、より厚い試料について、とくに上記の散乱効果の改善により、良い結果が得られつつある。本報告は鉄鋼材料およびエネルギー材料の基礎的研究にSTEM-EDXシステムを適用した例を紹介する。

2. Fe-Ni合金の α 相および γ 相⁽⁵⁾

鉄鋼材料の延性、強度および靱性を高めるため2相混合組織に関する研究として、Fe-Ni合金の加工熱処理による超微細粒組織の形成が注目されている。この合金は熱処理によりオーステナイト(γ)からマルテンサイト(α')への変態が生じ、複雑な組織となるためTEM観察のみでは明らかにできない事項が多い。著者らはFe-20%Ni合金の熱処理によって形成されるいくつかの組織について、EDX分析と極微小回折による同定を行なった。

本合金を773Kで保持すると28%Niを含む準安定(γ)相と10%Niを含むフェライト(α)相の2相が混粒する組織を得ることができる。この($\gamma+\alpha$)組織のSTEM像を図1(A)に、同一視野で行なったNi-K α 線によるEDXの面分析の結果を図1(B)に示す。STEM像の暗いコントラストの結晶粒に対応して面分析による白点が多いことから、これはNi濃度の高い γ 粒であることが明らかになった。さらに、 γ 粒の中でNiはほぼ均一に分布していることを示している。

本合金を1273Kから焼き入れるとラス状のマルテンサイトとなるが、これを773Kで焼鈍すると大きい結晶粒中に層状の γ 相を含む($\alpha+\gamma$)組織を得る。 γ 相を α' マルテンサイトに変態させると、図2(A)に示すごとく多数の転位を含んだ組織となる。得られた α および α' 相はいずれも結晶構造が体心立方格子型であり、図2(B)に示すごとく電子線回折斑点からの識別は困難である。図2(B)の左側の斑点



EMAX-1500形堀場X線分析装置を装着したH-700H形日立電子顕微鏡

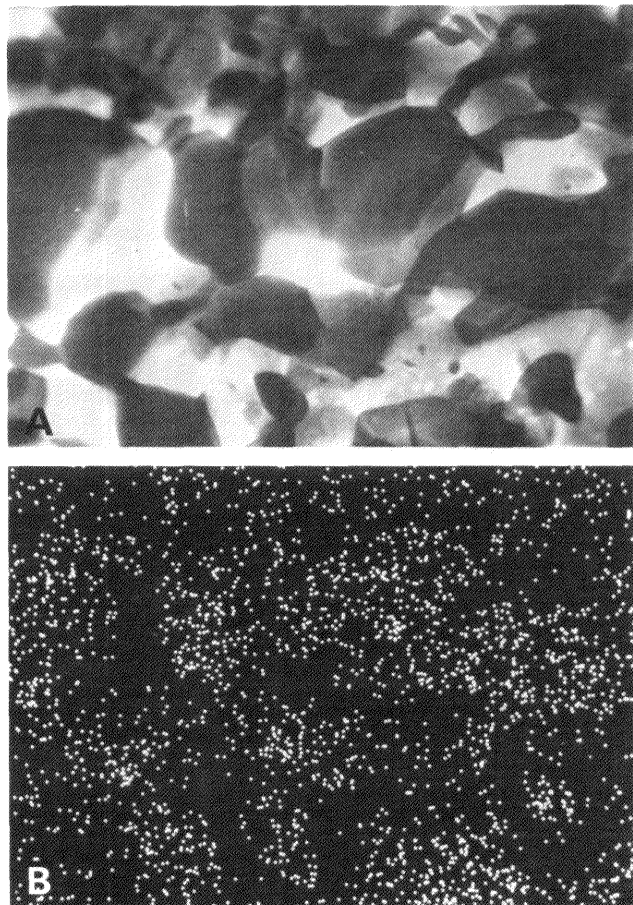


図1 Fe-20%Niの($\alpha+\gamma$)相。(A)STEM像、(B)NiK α の面分析

* 北海道大学工学部 教授・工博

** 北海道大学工学部

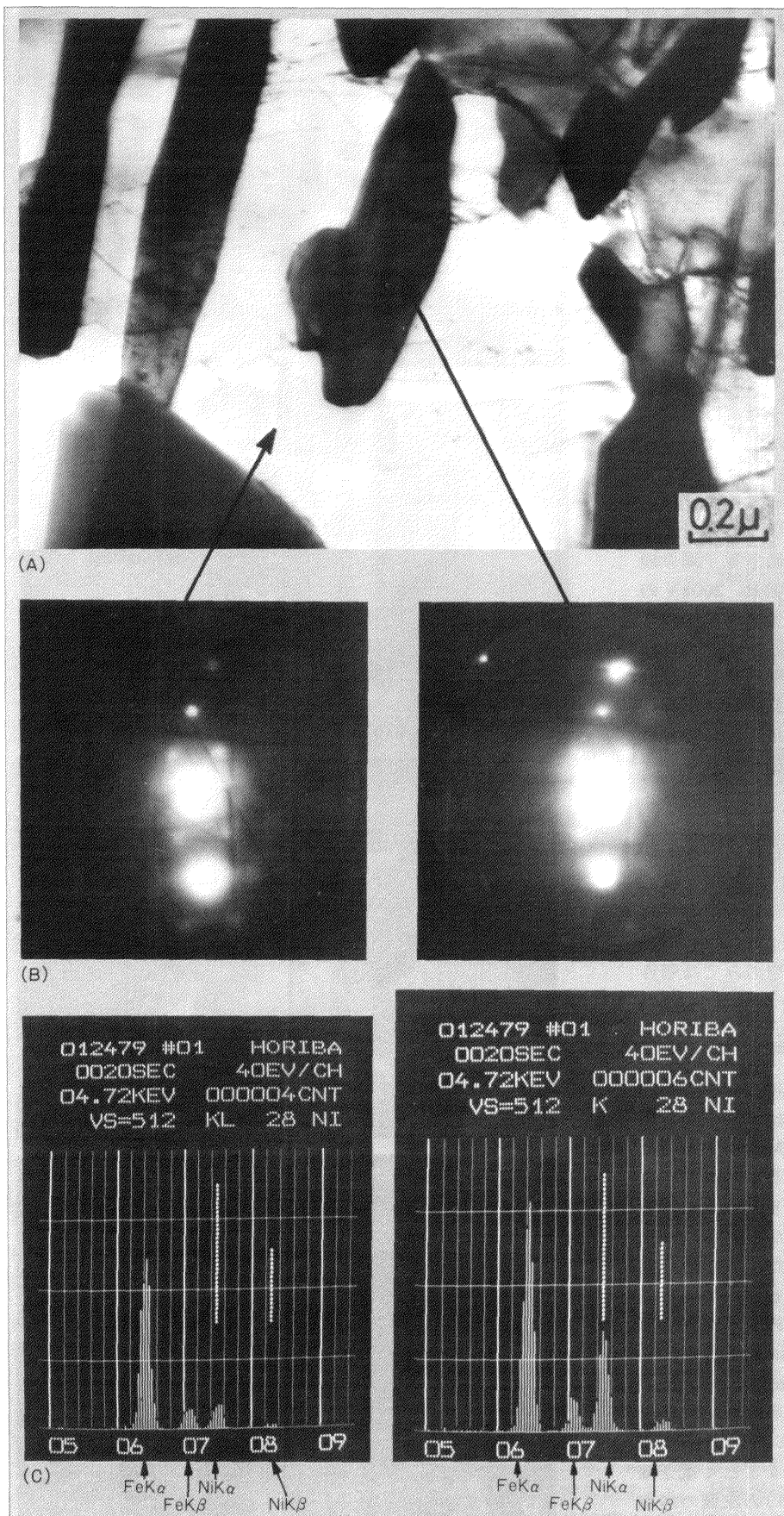


図2 Fe-20%Niの(α+α')相。(A)STEM像、(B)両相の微量回折像、(C)EDX分析

はSTEM像の明い部分の回折像であり、右側は暗い部分の回折像である。それぞれの部分に対応するEDXによる点分析の結果を図2(C)に示す。Ni-Kα線に注目すると、暗いコントラストの部分はNi濃度が高く、γ相の変態により生じたα'マルテンサイトと同定された。一般にマルテンサイトを含む組織のTEM像は転位の発生などにより複雑であるが、EDX分析による合金元素の濃度差を検討することにより、組織をより詳細に知ることができる。

3. HVEMの電子線照射により生ずる微小偏析

高速炉の炉心構成材料や核融合炉の第1壁材料の開発における問題点は、材料が高温環境で高エネルギーの中性子による重照射を受けるため結晶格子中に原子空孔および自己格子間原子などの照射欠陥が多数形成され、これらの欠陥が集合して転位ループおよびボイドを形成し、材料の性質を著しく阻害することである。このため、この種の研究にはイオン加速器および超高压電子顕微鏡(HVEM)などによるシミュレート研究⁶⁻⁸⁾が盛んに行なわれて来た。しかし合金材料の場合、照射欠陥と溶質原子が相互作用し、材料表面、結晶粒界、ボイド、転位などに合金元素が偏析することが最近認められ、この機構の解明が新合金開発上重要な問題となって来た。従来、この照射誘起偏析はAuger分析による表面偏析の研究が行なわれてきたが、⁶⁾著者らが行なっているSTEM像の微細組織とEDXによる偏析⁹⁾の研究はより詳細な手法として注目されている。Cu-2%Fe、およびCu-2%Ag合金について加速電圧650kVのHU650型超高压電子顕微鏡で照射した場合の1例を示す。照射量は10dpa^{*}(2.4×10^{26} e/m²)であり、照射領域は結晶粒界をはさんだ直径約10 μm場所である。EDX分析した領域およびビーム径など研究手法を図3に示す。

* 1dpaはすべての原子が1回の変位をおこなうために必要な照射量。

3.1 結晶粒界上の偏析

照射したCu-Fe合金の粒界をはさんだ線分析の結果を図4に示す。照射領域の粒界にFe-Kα線のピークが観察されるが、未照射領域に変化は認められなかった。これは照射により粒界偏析が生じたことを示している。

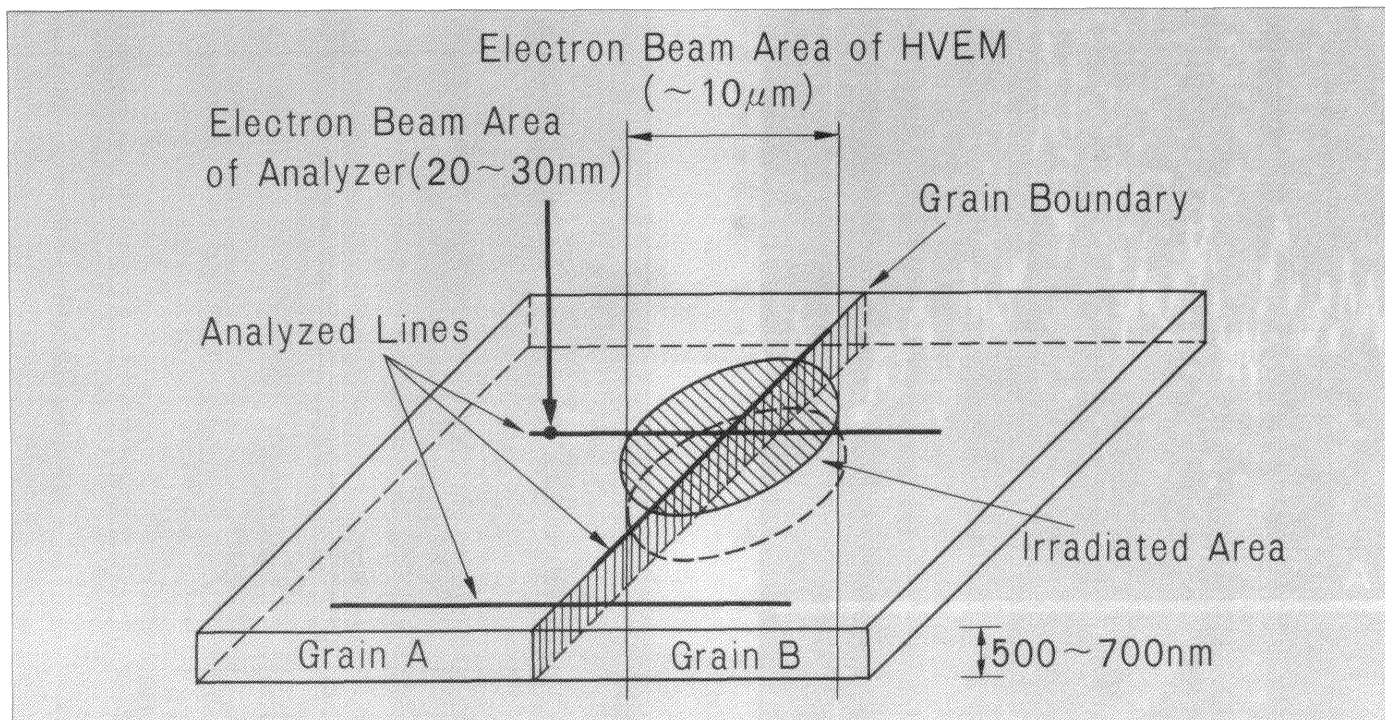


図3 HVEMによる照射およびEDX分析

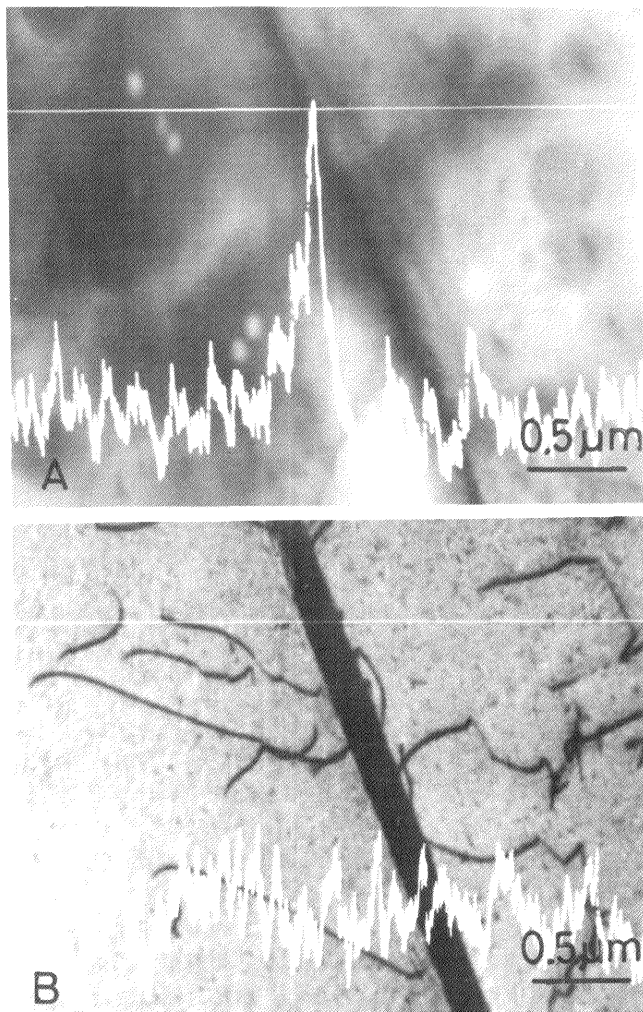


図4 Cu-Fe合金の線分析, (A)照射領域, (B)未照射領域

同様にCu-Ag合金を照射した場合、図5に示すように、粒界をはさんで二重ピークが観察されるが、未照射領域には観察されない。

線分析の場合、シグナル量は薄膜試料の厚さに依存し変化するため、偏析した溶質の分布を求める目的でFe-K α /Cu-K α , Ag-La/Cu-K α のカウンtr比法(count ratio method)を採用し解析した。このカウンtr比法は既知の濃度の合金の薄膜試料による濃度と対比することにより、線分析より正確な測定を可能にする。図6はCu-Fe合金の照射領域粒界からの距離とカウンtr比の関係を示している。Feは粒界に強く偏析し、この偏析領域は粒界の両側にそれぞれ300nmの幅で認められ、さらに外側ではFe濃度の減少領域が存在した。未照射領域のカウンtr比は 3×10^{-2} であるから、Feは粒界上ではほぼ2倍以上に濃縮された。さらに粒界から2 μ mの距離にサブピークが観察された。このピーク存在はHVEMで照射した場合、電子線束が中央部で高く周辺部で低くなることにより、約2 μ mの距離に転位の集合した領域が形成され、それにFeが偏析した結果であろう。

図7は照射したCu-Ag合金の粒界からの距離とカウンtr比の関係を示している。粒界から300~500nmの距離に2重ピークが存在する。ピーク高さの相異は結晶方位により形成される照射欠陥量が異なることに対応している。粒界は両ピークの谷間にあり、Ag濃度はピーク領域より低いので、照射により粒界で減少すると考えられる。未照射領域でのカウンtr比は 3.5×10^{-2} であるから、この合金の負偏析の絶対量はCu-Fe合金に比して小さいことがわかる。

照射誘起偏析について現在次の2つの機構が提唱されている。⁹⁾(1)母相原子に比して小さい溶質原子は照射による自己格子間原子と相互作用し、格子間原子と同一の方向に移動する。(2)大きい溶質原子は照射による原子空孔と相

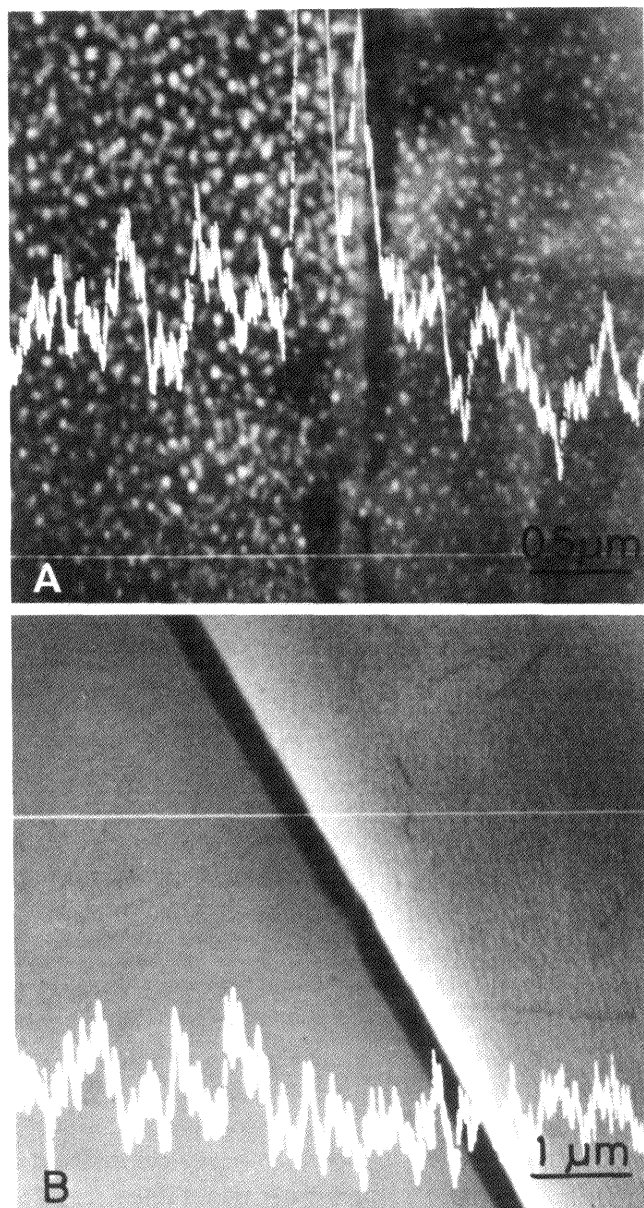


図5 Cu-Ag合金の線分析、(A)照射領域、(B)未照射領域

相互作用し、空孔と逆方向に移動する。本研究の場合、Cu中のFeは小さい溶質原子と考えられ、Agは大きい溶質原子である。また先に示したごとく、粒界での偏析挙動は前者がシングルピーク、後者がダブルピークである。これらの結果は照射誘起偏析の機構に電子顕微鏡的実証を与えるものである。

3.2 ボイド近傍での偏析

HVEMの電子線照射により金属合金中に原子空孔の集合体であるボイドが形成される。このボイドは材料の体積増加をもたらすと同時に脆化を起すため、照射をうける材料では最も緊急解決を要する問題である。上記の照射誘起偏析はこのボイドの形成に大きく影響することが知られているため、^(7,10)ボイド近傍の偏析について詳細に検討が必要である。

図8にボイド近傍でのEDX分析により得られたFeの濃度分布を示す。Feはボイドの中心から100nmまでの距離に

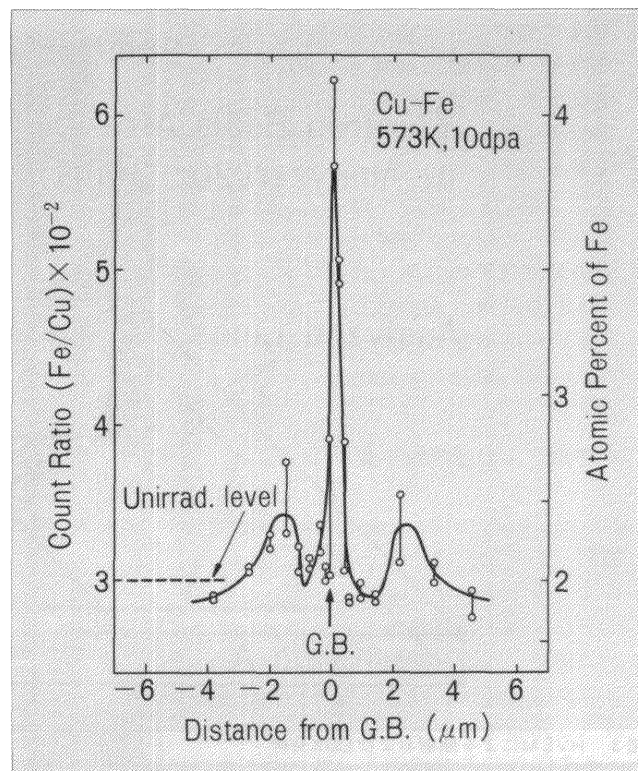


図6 Cu-Fe合金の粒界近傍のFeの濃度分布

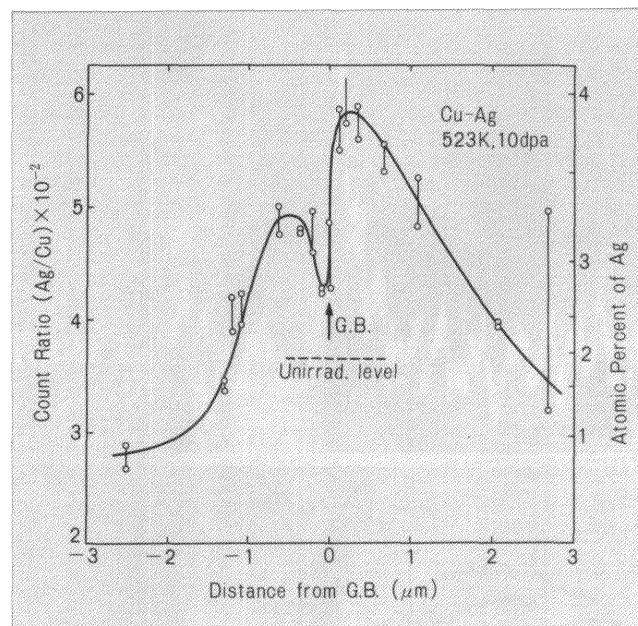


図7 Cu-Ag合金の粒界近傍のAgの濃度分布。

偏析し、その外側約400nmの領域で減少した。したがって、前述の結晶粒界近傍と同様、ボイド近傍でもFeは正の偏析を示した。いっぽう、Agはボイド近傍で減少し負の偏析挙動を示す。ボイド近傍でFeとAgの偏析挙動は異なるが、FeとAgに富んだ球状の領域がボイドの周辺部に形成されることが示唆される。図9にボイド近傍での溶質濃度分布のモデルを示す。ここで、ボイドおよびその近傍での偏析領域は薄膜試料中に含まれているため、ボイド領域では他の領域に比べて分析ビームの行程が短いために、ボイド近傍で

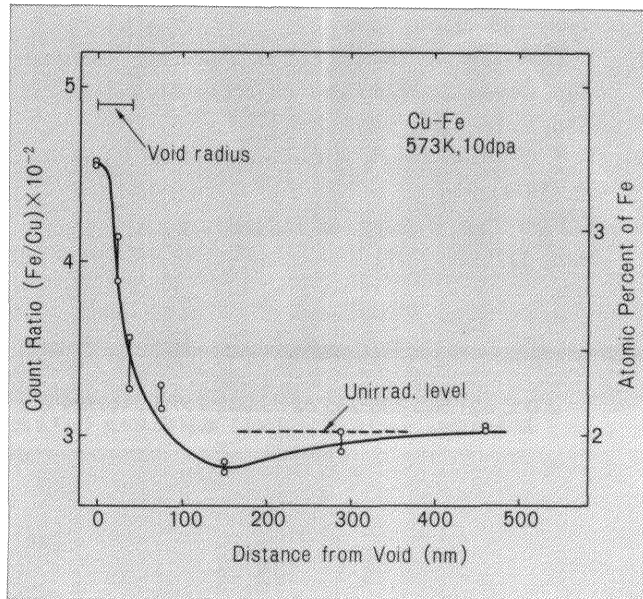


図8 Cu-Fe合金のボイド近傍の濃度分布

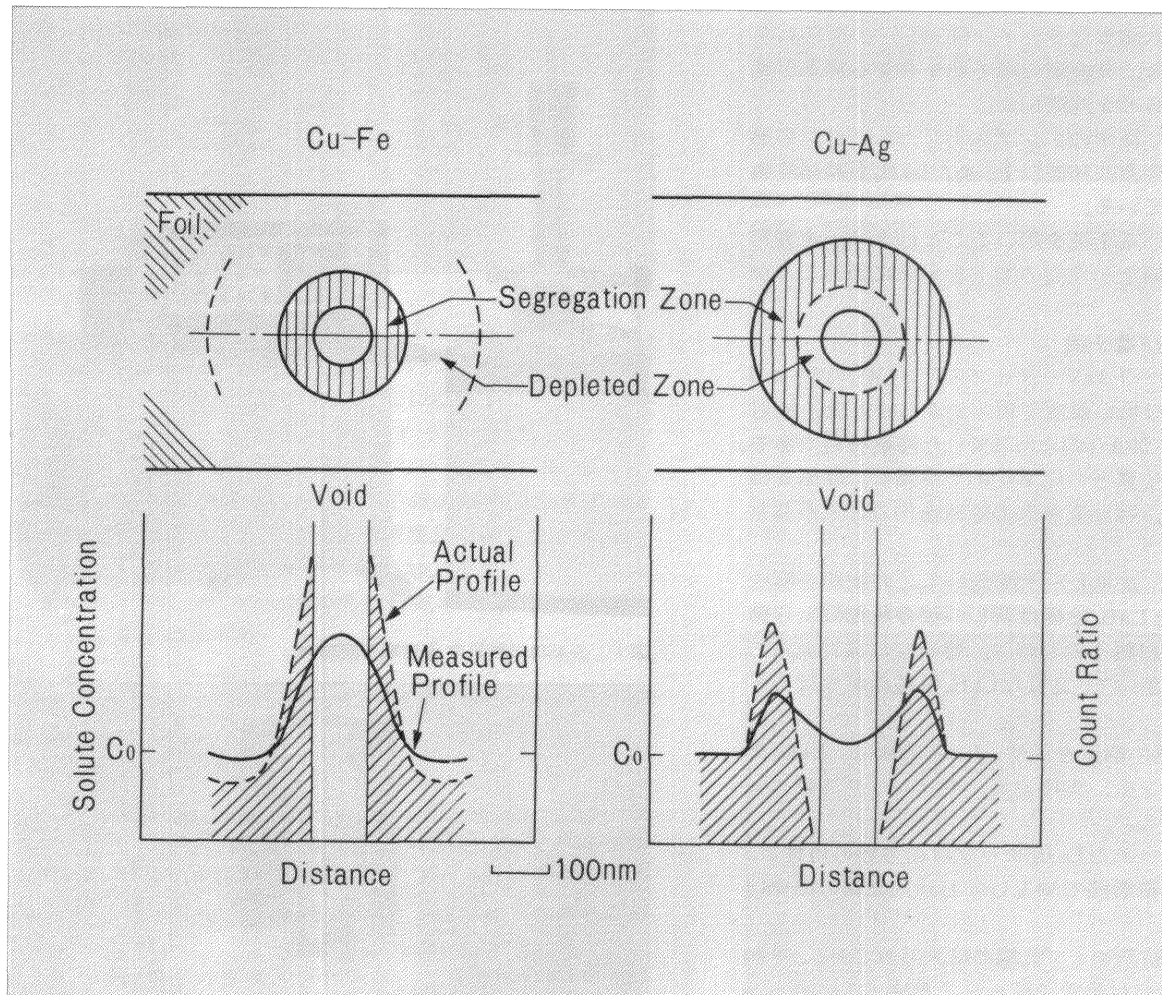


図9 ボイド近傍での溶質濃度分布のモデル

の実際の濃度は測定値より高く見積られることに注意されたい。

ボイド近傍の偏析はボイドの核形成および成長に大きく

影響し、ボイドを防止する鍵となるであろう。本研究によるCu-Fe, Cu-Ag合金のボイド体積分率はCu-Fe合金のほうが低かった。⁸⁾このようなボイド挙動と偏析挙動によるとボイド近傍の偏析領域は照射による点欠陥がボイドへ移動するのをさまたげ、結果としてボイドの成長に対して抑制効果を有することが示唆される。

4. まとめおよび今後の課題

合金薄膜に対してSTEM-EDXシステムを応用し次の結果を得た。

4.1 Fe-Ni合金中の $(\alpha + \gamma)$ の2相構造に対し、Ni濃度の差により容易に相の同定ができる。また $(\alpha + \alpha')$ のように結晶構造が類似した場合であってもNiの濃度差が存在する場合には識別が可能である。

4.2 Cu-Fe合金のHVEMで照射した領域の結晶粒界でFeが強く偏析し、シングルピークを示した。Cu-Ag合金では、逆に粒界で減少し、周辺領域でAgの濃度が増加しダブルピークとなった。

4.3 照射により薄膜中に形成されたボイドの近傍では、Fe

が偏析し、Agは減少した。これらの結果は金属薄膜中の微細組織の偏析に対してEDXが有用な好例である。

今後の課題として、すでに検討されつつある薄膜試料の定量化はもちろんのこと、より微小領域を精度よく分析するために、分析電流の増加、あるいはより高性能のX線検出器の開発がのぞまれる。また、ボイド近傍の分析で述べたごとく、金属試料では微細組織が試料中に含まれている場合が多く、さらに組織と分布の対応が望まれるため、この点についてのソフト面での改良が期待される。

参考文献

- 1) 水平敏知, 電子顕微鏡, 12 (1977) 107
- 2) 黒澤文夫, 田口勇, 谷野満, 松本龍太郎, 日本金属学会誌, 44 (1980) 677

- 3) D. B. Williams, J. Metals, 5 (1980) 16
- 4) P. B. Hirsch, J. Electron Microsc., 28 Supplement (1979) 25
- 5) T. Takeyama, H. Takahashi and K. Matsushashi, to be published.
- 6) T. Takeyama, H. Takahashi and S. Ohnuki, Proc. Fifth Int. Conf. on HVEM, Kyoto. (1977) 571
- 7) T. Takeyama, S. Ohnuki and H. Takahashi, J. Nucl. Mater., 89 (1980) 253
- 8) T. Takeyama, S. Ohnuki and H. Takahashi, Scripta Met., to be published, and Electron Microscopy 1980, Vol.4 (1980), 208
- 9) P. R. Okamoto and H. Wiedersich, J. Nucl. Mater., 53 (1974) 336
- 10) K. Farrell, J. Bentley and D. N. Braski, Scripta Met., 11 (1977) 771

解 説

U.D.C 621.385.833.28:(621.3.032.269.1:546.654'27)

S-450LB形日立走査電子顕微鏡

1. はじめに

日立製作所では、六ほう化ランタン(LaB_6)の単結晶を用いた高輝度、長寿命、高安定の電子銃を有する走査形電子顕微鏡、S-450LB形を開発した。

LaB_6 単結晶陰極は、従来のタングステン-ヘアピン形熱陰極に比べ、輝度、寿命共10倍以上、また LaB_6 多結晶陰極に比べ3倍以上優れている。

この優れた、明るい電子源を用いることにより、走査形電子顕微鏡の画質の向上と性能の向上を大幅に図ることができた。

2. LaB_6 熱陰極および電子銃

LaB_6 は仕事関数 $\Phi \sim 3.1\text{eV}$ でタングステン(W)の $\Phi \sim 4.5\text{eV}^{(1)}$ と比較して、より低い温度で使用できることと、放射電子流密度が高く($\sim 50\text{A}/\text{cm}^2$)とれる優れた陰極材料である。しかし高温で多くの金属との化学反応⁽⁴⁾が強く、陰極支持加熱法が困難であり、特に直熱形の陰極を作ることが非常に困難であった。

日立製作所⁽²⁾では、炭素ヒータを用いてこの問題を解決し、かつ炭素ヒータと LaB_6 陰極は新しい接合技術により結合された。また陰極材料そのものは、特殊な結晶育成法である金属融剤法⁽²⁾を用いて、良質な LaB_6 単結晶が作製できるようになった。

図2に LaB_6 熱陰極の構造を示す。 LaB_6 陰極は、 LaB_6 チップ、炭素フィラメント、支持金具、セラミックス製ベースより構成されている。

金属融剤法で作製された LaB_6 チップは正方形の角柱で、先端を半球状に電解研磨法で加工しており、先端の曲率は任意に研磨できる。

図3(a)は LaB_6 単結晶チップ先端の拡大写真である。単結晶チップの場合は表面が非常に滑らかであり、この滑らかな表面からは、均一で安定した電子ビームを得ることができる。

図3(b)は LaB_6 多結晶チップの先端拡大図である。単結

斎藤 稔* 斎藤 尚武*

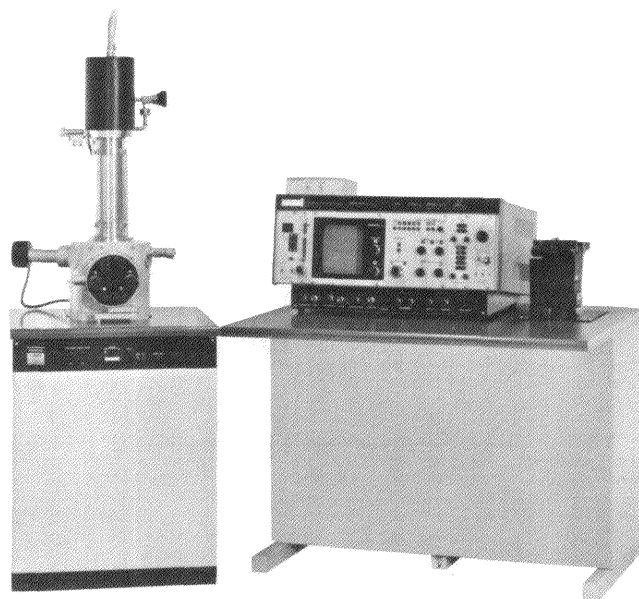
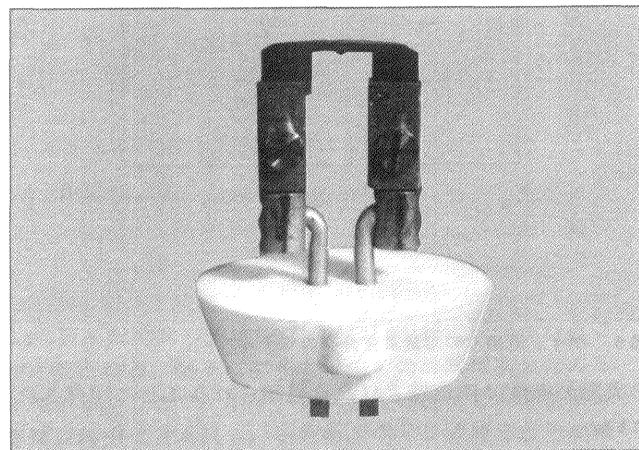


図1 S-450LB形日立走査電子顕微鏡

図2 LaB_6 陰極

*日立製作所 那珂工場 電子装置設計部

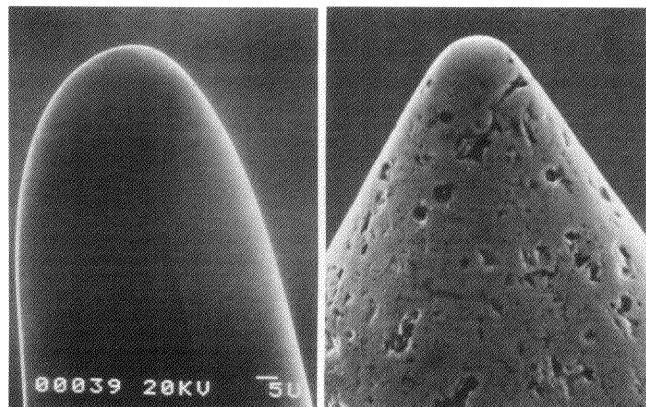
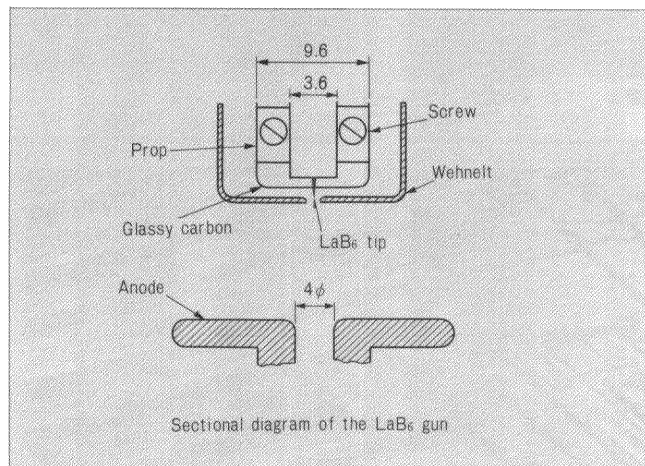

 図3(a) LaB₆単結晶 (100) 図3(b) LaB₆多結晶


図4 電子銃断面図

晶チップ表面とは対照的に、表面に多くの凹部が散在し、この凹部からは電子放射が得られないことと、加熱されるに従って大きく変化するため、定安した電子ビームが長時間得られないこと、また図3-(a)のチップと比較して輝度、寿命とも1/3以下の性能しか得られない欠点がある。

図4はLaB₆熱陰極に組込んだ電子銃の断面図を示す。LaB₆熱陰極はウェーネルトに対して精度良く軸合せされ、セットされている。また電子銃室全体は、イオンポンプにより 5×10^{-7} Torr以下の高真空中に排気されている。

3. LaB₆電子銃の特性

3.1 輝度

図5はLaB₆とタングステンヘアピンフィラメントの輝度の比較を加速電圧を変えて測定したものである。

走査形電子顕微鏡で通常用いられる加速電圧25kVにおいて 2×10^8 A/cm²・Srの輝度が得られタングステンヘアピンフィラメントに比べ約10倍大きい。したがってこの特性を用いると、走査形電子顕微鏡の画質(S/N)の大幅な向上が図れ、フリッカーフリー像の観察が可能となってきた。

3.2 寿命

10^{-7} Torr以下の高真空中で使用すればLaB₆の酸化の影響はさけられ、陰極の寿命は主としてLaB₆チップ自体の蒸発による消耗によって決まる。図6はLaB₆チップ温度に対する輝度と寿命の依存性を調べたものである。

加熱温度の上昇にともない電子ビームの輝度も上昇するが、1600℃付近でやや飽和する。一方寿命は温度上昇にと

もない急激に減少する。したがって、輝度と寿命を考慮した実用上の適性温度は1550℃～1600℃でありこの条件下では、タングステンヘアピンフィラメントと比べ、輝度・寿命とも10倍以上の特性が得られ、長時間安定して使用できることを示している。

3.3 加熱電力

図2の構造で示した如く、LaB₆チップの加熱は日立独自の直熱形構造であるため、1550℃～1600℃を得る加熱電力は、図7に示す如く7W程度の小電力で十分である。

小加熱電力であるため、電子銃の熱的な動きを小さくすることができ、また構成部品からの放出ガスも少ない為に、より高真空が維持され、常に安定した動作が可能となる。

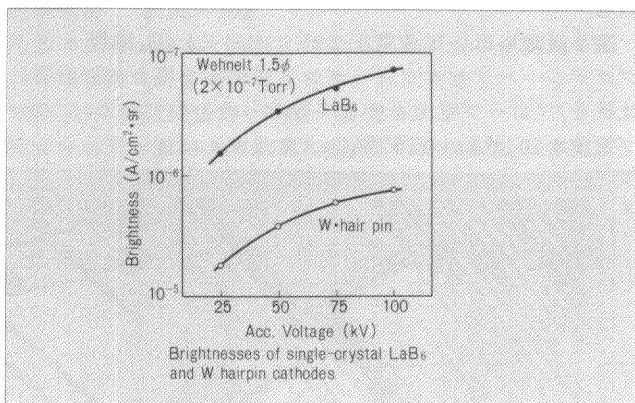


図5 輝度の比較

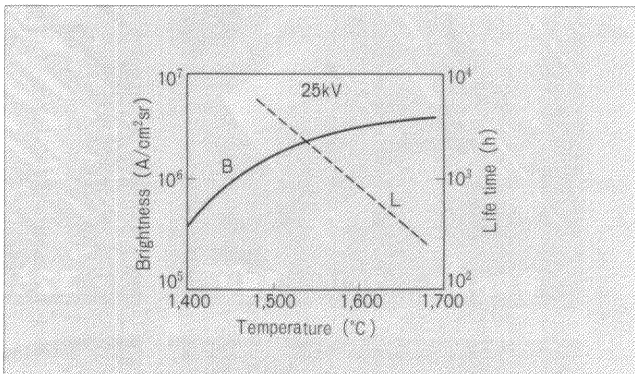


図6 輝度と寿命の温度依存性

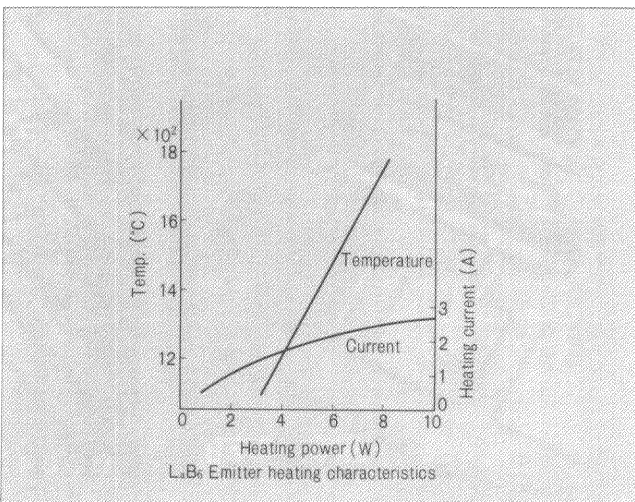


図7 加熱電力

4. 性能

LaB₆陰極とタングステン-ヘアピン陰極との性能を評価するために、S-450LB形日立走査電子顕微鏡を用いて行なった。

図8はプローブ電流を大幅に変えたときに得られるプローブサイズを測定したものである。

プローブ電流の増大にともない得られるプローブサイズ(分解能)に大きな差が生じる。

カソードルミネッセンス像や吸収電子像等を観察する 1×10^{-8} Aにおいては、LaB₆陰極が約7倍良い分解能が得られ、フリッカーフリーの静止像(TV像)・X線分析・反射電子像等を観察する 1×10^{-10} Aにおいても2倍の分解能が得られる。

図9は最も低い加速電圧2 kVにおけるLaB₆陰極とタングステン-ヘアピンフィラメントを用いた場合の分解能の比較を、プローブ電流を変えて行なったものである。プローブ電流を 10^{-10} Aから 10^{-8} Aと大きくするに従って、タング

ステン-ヘアピンフィラメントの場合の分解能の低下は大きく、 10^{-8} Aにおいては数倍の差が生ずる。

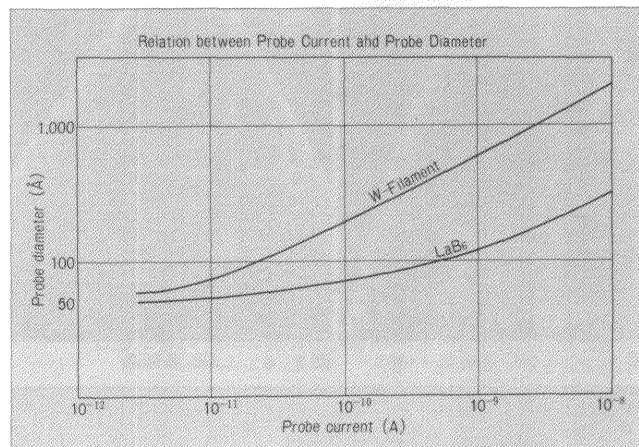


図8 プローブ電流/プローブサイズ

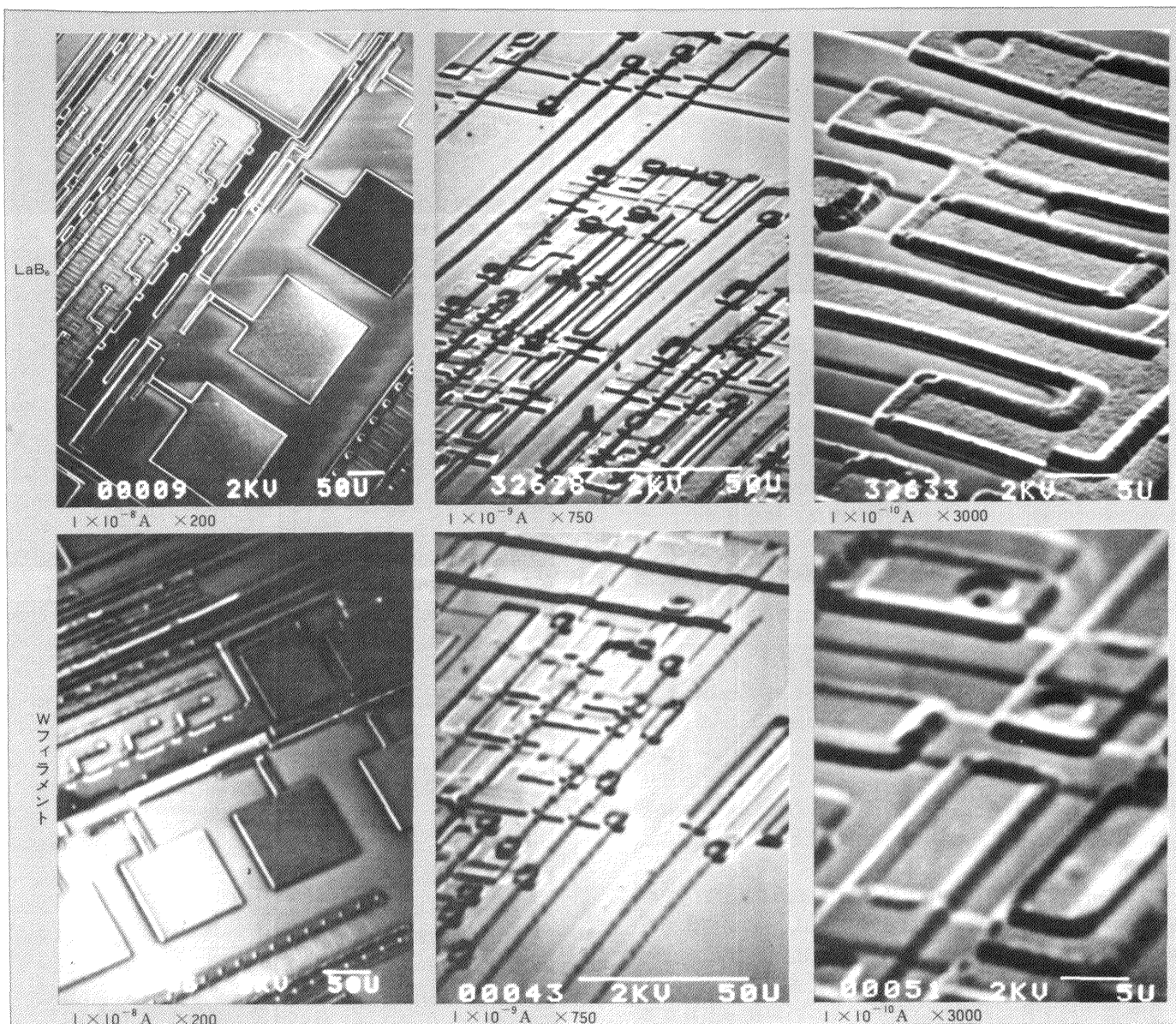


図9 加速電圧2 kVにおけるLaB₆ /タングステン-ヘアピンフィラメントの分解能

5. 結 言

LaB₆電子銃の特性と、それを用いたS-450LB形日立走査電子顕微鏡を簡単に紹介した。本装置は幅広い加速電圧と幅広いプローブ電流との組合せにおいて、今迄にない広い用途が開けてくるものと期待する。また本装置は今まで御好評をいただいているS-450形日立走査電子顕微鏡をベースに、LaB₆電子銃を組合せたものであるため、信頼性、性能とも十分に期待に応える装置と言えよう。最後に本装置の主な仕様と、分解能写真を図10に示す。

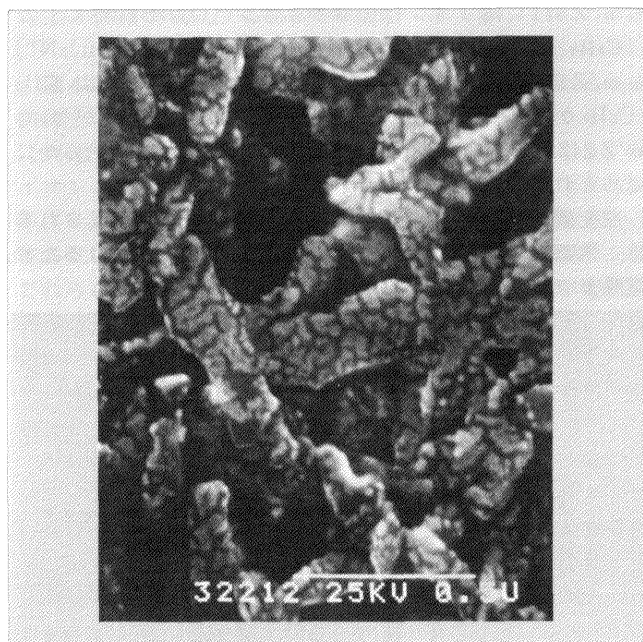


図10 試料：磁気テープ

S-450LBの主な仕様

分解能	50Å
倍率	20～200,000倍
レンズ系	3段縮小系
試料サイズ	最大102mmφ(4インチ)
試料微動	X・Y 40mm
R	360°
T	–20～+90°
Z(ワーキングディスタンス)	5～35mm

参考文献

- (1)岩元・石井・平岡：ランタンボライドの特性と応用，セラミックデータブック(1977～1978)合併号，工業製品技術協会 P.95～102
- (2)川辺・二本・細木・外村：六ほう化ランタン単結晶を用いた高輝度・長寿命の電子線源，日立評論 VOL.61, No.10(1979) P.45～48
- (3)松井・南川・勝田：単結晶LaB₆電子銃の応用，日本電子顕微鏡学会第35回学術講演会予稿集(宝塚)，103(1979)
- (4)G. U. Samsonov and Y. B. Paderno：Brides of the Rare Earth Metals (Izd. Akad. Nauk, Ukr. SSR, Kiev, 1961)

Topics

少数検体多項目測定，緊急検体測定に便利な新しいタイプの自動分析装置
705形
日立自動分析装置



705形日立自動分析装置

検体数の少ない施設での主力機種，緊急検査，あるいは動物実験用自動分

析装置として最適のように，特に設計された自動分析装置を発売いたしました。

本機は，新しい発想に基づく回転形反応ディスク，試薬ピペッティング機構，円盤形サンプルディスク，等の技術を採用し，下記の特長を，産み出しております。

■特 長

(1)1検体ごとに16項目を180テスト/時で分析します。

“試薬ピペッティング技術”を開発することにより，小形ながら検体ごとに最大16項目まで同時分析させることに成功しました。さらに，検体ごとに測定する項目を指定できる項目選択機能も標準装備しております。

(2)緊急検体がいつでも，測定可能です。

保冷庫が内蔵され，試薬はいつも安定状態に保たれております。必要量を吸引した試薬ピペッティング機構は加温後，反応容器中に吐出します。

(3)20mlの試薬で50検体以上分析できます。

“角形反応容器を直接測光する技術”及び“試薬ピペッティング技術”の開発により，反応液量，最少350μℓを達成，さらに試薬による毎日のチューブやシリンジの洗浄を不要にしました。

(4)項目変更が非常に簡単にできます。

分析条件は全て，カセットテープの中に記憶します。カセットテープを読ませ，試薬ビンを入れ換えれば，項目変更完了。洗浄のための試薬交換，液量設定等は一切不要です。

(5)試薬添加前後の差の測定ができますから，酵素法を安心して使用できます。

酵素法の主流は，NAD(P)H₂の測定。しかし，従来の装置では，検体ブランクが（別のチャンネルを使わなければ）差引けませんでした。本装置では，反応ラインの新しい駆動方式を考案し，自己ブランク法を可能にしました。

(6)血清情報を印字します。

検体ごとに血清のにごり，溶血，黄色の度合を測定し，データにそえて印字します。

FDイオンの衝突解離

U.D.C (543.51:548.02):(537.563.7:537.29):537.563.3

神原 秀記*

イオンの衝突解離 (Collision Induced Dissociation; CID) は、有機化合物の構造解析あるいはフラグメンテーションの研究に有力な方法として発展してきた。¹⁻⁷⁾ 近年 CID法が混合物試料の分析にも応用され、その有用性が一層重要視されるようになった。⁷⁻¹⁰⁾

CI, FIあるいはFDによるイオン化は分子イオン (又は擬分子イオン) を優先的に与えるので、分子量あるいは分子式を知るすぐれた方法であるが、反面、フラグメントイオンを殆んど与えないので、有機化合物の構造解析に役立つ情報は少ない。

CID法は、この欠点を補うもので、分子イオン (又は擬分子イオン) を中性分子に衝突、解離させ、種々のフラグメントイオンを得て、有機化合物の分子構造に関する情報を得る方法である。¹¹⁻¹⁴⁾

FDイオン化法は、難揮発性物質あるいは熱に不安定な物質の質量スペクトル測定に欠く事のできない方法であるが、^{15,16)} CID法との組合せにより、マスマススペクトロメトリの適用範囲が著しく拡大された。

FDスペクトルには分子イオン以外に多くのイオンが観測されることがある。これらイオンの中には分子イオンからのフラグメントイオンも存在するが、エミッタ表面における反応生成物、試料中の不純物、試料の熱分解生成物に基因するイオンもあって、信頼できる分子構造情報を得ることを妨害する。CID法によれば、分子イオン (又は擬分子イオン) を選択的に取出し、中性分子と衝突、解離させるので、目的の分子イオンから生成する娘イオンののみを知ることが出来、不純物等に基因するイオンによる妨害を除くことができる。FD/CIDによる最近の測定例について紹介する。

1. 高速イオンと原子あるいは分子の衝突

数kVに加速されたイオン AB^+ が原子あるいは分子と衝突すると振動あるいは電子状態の励起がおこり、解離に必要なエネルギー E^* を得たイオンは開裂をおこす。 AB^+ イオンの加速エネルギーを V_0 とし、衝突解離生成物 A^+ の運動エネルギーを V とすると式(1)が成り立つ。

$$V = \left[\frac{m_A}{m_A + m_B} \right] (V_0 - E^*) + 2 \left[\frac{(m_A \cdot m_B)^{1/2}}{(m_A + m_B)} \right] \cdot [(V_0 - E^*) W]^{1/2} \cos \theta + \left[\frac{m_B}{(m_A + m_B)} \right] W \cos^2 \theta \quad \dots \dots \dots (1)$$

ここで W は AB^{+*} の内部エネルギーの一部が運動エネルギーとして放出された量で、 θ は重心系でみたときの散乱角である。生成イオンの運動エネルギーの分布から E^* , W をはじめ生成物 A^+ の質量を知ることができる。¹⁵⁾

2. 逆配置二重収束質量分析計を用いたFD/CID

FDで生成したイオンの衝突解離の最初の試みは Gierlichらによって四級アミンについて行われた。¹⁴⁾ 四級アミンのFDスペクトルはフラグメントイオンに乏しく分子構造

情報がえられない。彼らは図1に示すように磁場セクタで四級アミンカチオンを選別し、Heと衝突させて得られる娘イオンを電場セクタにより分析している。得られたスペクトルを図2に示す。 $(C_4H_9)_4N^+I^-$, $CH_3(C_5H_{11})_3N^+I^-$ 何れも m/Z 611に陽イオン付加分子イオン $[(C_4H_9)_4N^+I^-]$ $[(C_4H_9)_4N^+]$ 又は $[CH_3(C_5H_{11})_3N^+I^-]$ $[CH_3(C_5H_{11})_3N^+]$ と m/Z 242にフラグメントイオン $(C_4H_9)_4N^+$ 又は $CH_3(C_5H_{11})_3N^+$ を示し、両者のFDスペクトルには差がない。 m/Z 242イオンのCIDスペクトルには両者の差が明らかに認められる。

逆配置二重収束質量分析計では、娘イオンは生成される時、内部エネルギーの一部を運動エネルギーとして受けるため、電場セクタのみの分析では質量分解能が不足する。

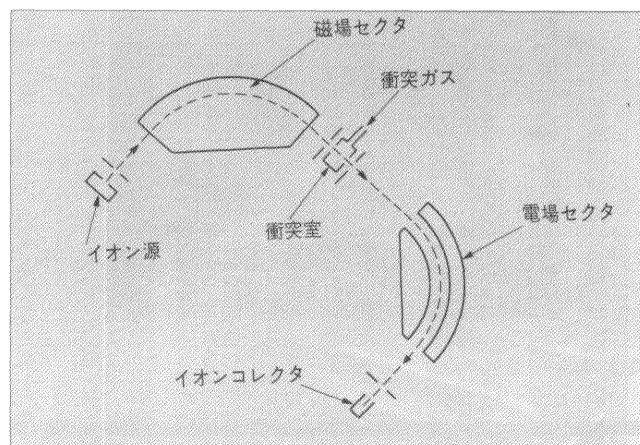


図1 逆配置二重収束質量分析計を用いたCID用装置

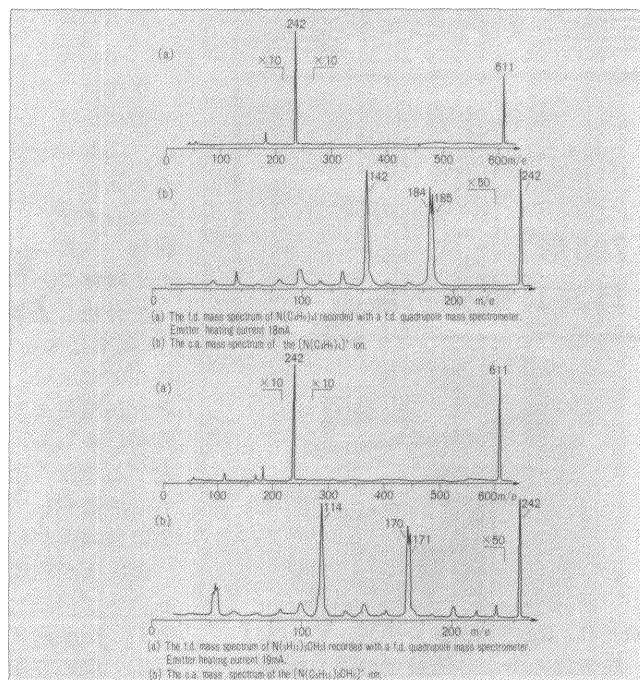


図2 四級アミンのFD/CIDスペクトル (ref. 13)

* 日立製作所 中央研究所

3. B/Eリンクスキャン法

最近, Bruinsらは二重収束質量分析計を正常配置のまま、磁場(B)と電場(E)とを一定の比で同時にスキャンすることにより娘イオンを記録する方法を報告した¹⁷⁾。衝突ガスは図3に示すようにイオン源の直後に置かれた衝突室に導入されるが、磁場、電場が正常配置におかれるので、分解能も高い。

任意の質量 m_0 を持つイオンが電場 E_0 及び磁場 B_0 を通過し、コレクタに到達するにはaを装置に関する定数として式(2)の関係が成立する必要がある。

$$m_0 = aB_0^2/E_0 \quad (2)$$

図4の如くB-E平面を考えると、質量数で定まる二次曲線上にあるBとEとの値を持つ場合にイオンはコレクタに到達する。 $m_0 \rightarrow m_1 + (m_0 - m_1)$ の解離を考えると、娘イオンの運動エネルギーは近似的に $V_{ac} \cdot m_1/m_0$ で与えられる。 $(V_{ac}$:イオン加速エネルギー) このイオンが電場を通過するには $E_1 = E_0 \cdot m_1/m_0$ ……(3) である必要がある。これらの関係式を整理すると親イオンと娘イオンが電場、磁場を通過するBおよびEの間には $B_0/E_0 = B_1/E_1$ の関係がある。すなわち磁場と電場の強度比を一定にしてスキャンすることにより親イオン(m_0)から生成するすべての娘イオンを検出することが出来る。

また親イオンが観測されない、あるいはしにくい場合、フラグメントイオン m_1 から B^2/E を一定とするスキャンを行えば、 m_1 へ解離するすべての親イオンを知ることできる。permethylated sucroseのFDスペクトルでは分子イオンは非常に弱くしか観測されず、 $(M-45)m/Z$ 409のイオンが非常に強く観測される。 m/Z 409のイオンから B^2/E を一定にしてスキャンすると m/Z 454が観測され、 m/Z 454 $\rightarrow$ m/Z 409の開裂を裏付けた。 m/Z 454からB/Eを一定にしてスキャンし、このイオンから生成するすべての娘イオンを観測すると図5のスペクトルが得られた¹⁸⁾。この測定では衝突ガスをを用いないので得られたスペクトルはメタステーブルイオンである。

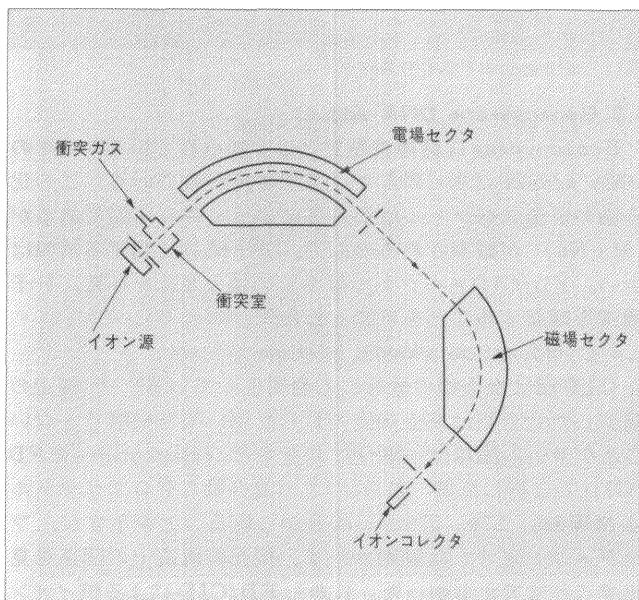


図3 B/Eリンクスキャンを用いたCID用装置

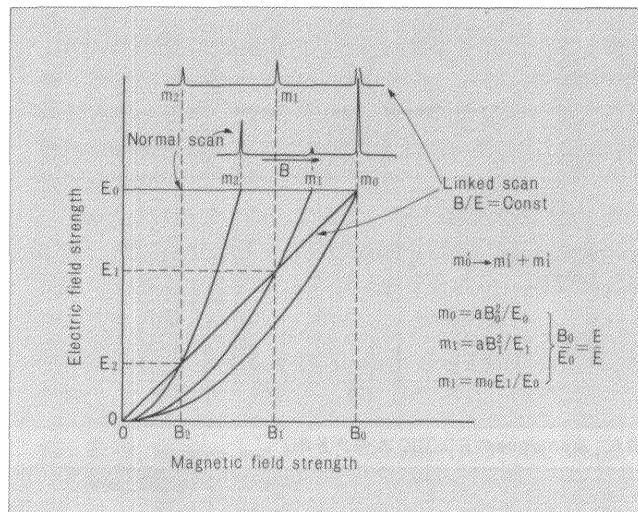


図4 B/Eリンクスキャンの模式図

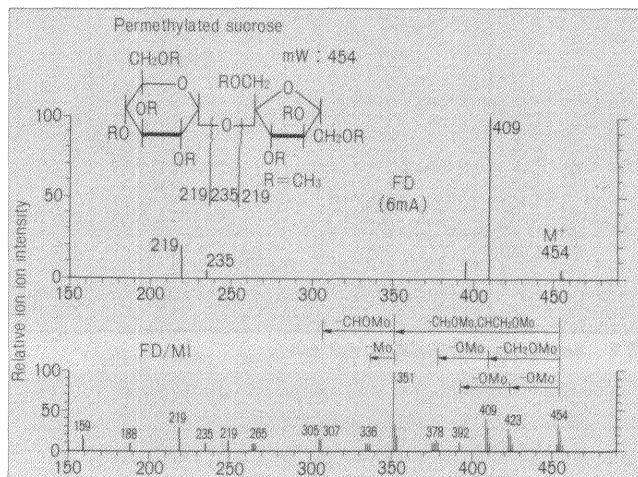


図5 permethylated sucroseのFDおよびFD/MJスペクトル (ref.18)

4. B/EリンクスキャンによるFD/CID測定例

4.1 糖 類

糖類は難揮発性で熱的にも不安定で、気化を前提とするEI, CIなどのイオン化法では有力な分子構造情報を得ることはできない。

FDイオン化法ではスペクトルの再現性向上のため、NaClなどのアルカリ金属塩の添加を行えば¹⁹⁾ $(M+Na)^+$ イオンを効率良く得ることが出来るが、フラグメントイオンは殆んどなく、有用な分子構造情報は得にくい。

著者らはFD/CID法をdisaccharides, trisaccharidesに応用し、フラグメントイオンと分子構造との関係を知ることができた。glucose二分子から構成されるdisaccharidesについて、糖結合位置の違いによる異性体間には、FD/CIDに明らかな差が認められ、結合位置の決定に利用できる²⁰⁾。図6, 7, 8, 9, 10にtrehalose, sophorose, nigerose, cellobiose, gentiobioseのFD/CIDスペクトルを示す。

$(M+Na)^+$ のCIDで観測される娘イオンはいずれも Na^+ を保持している。 Na^+ が $(M+Na)^+$ の何処に保持されているか興味ある問題を提起している。Trisaccharidesもdisaccharidesと同様、グリコシド結合の開裂、官能基の脱落、リング開裂による娘イオンが観測される。図11にRaffinoseのFD/CIDスペクトルを示す。

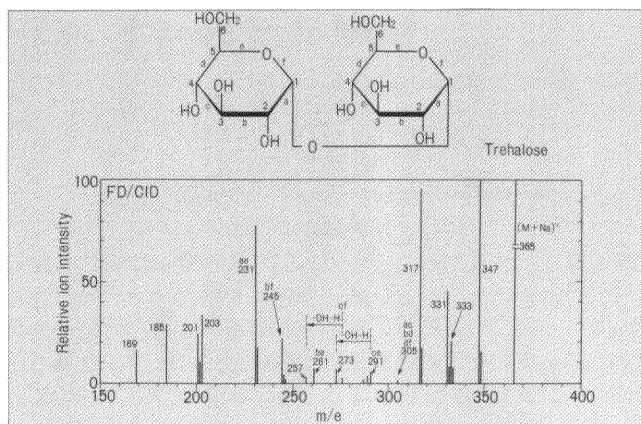


図6 trehaloseのFD/CIDスペクトル

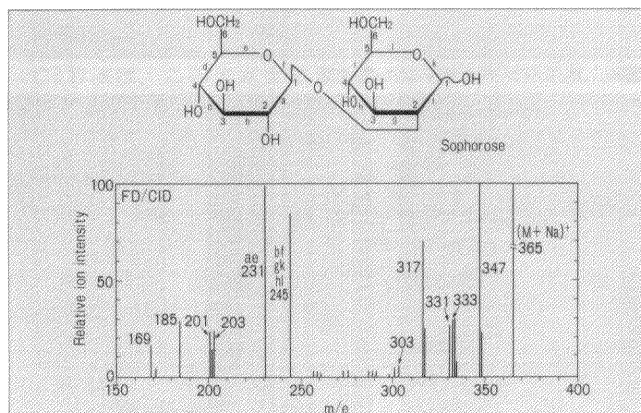


図7 sophoroseのFD/CIDスペクトル

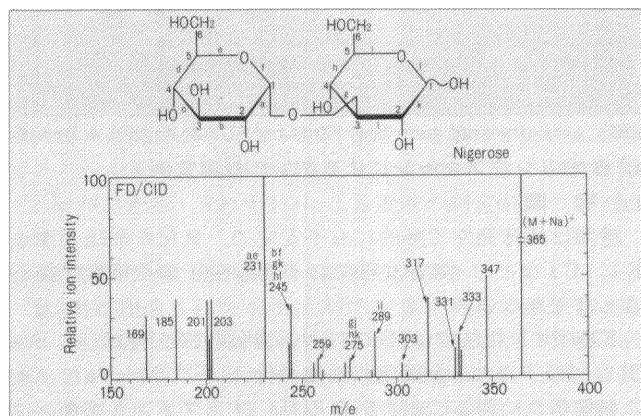


図8 nigeroseのFD/CIDスペクトル

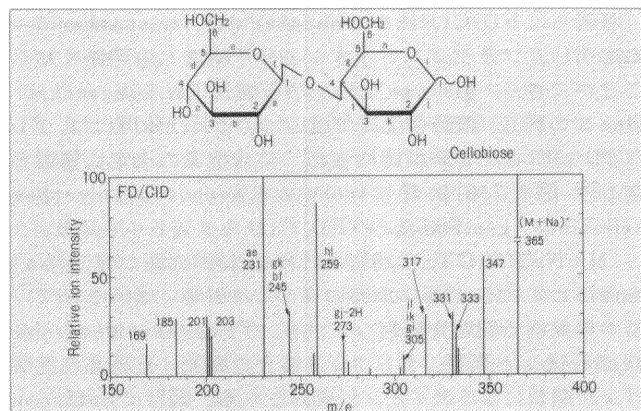


図9 cellobioseのFD/CIDスペクトル

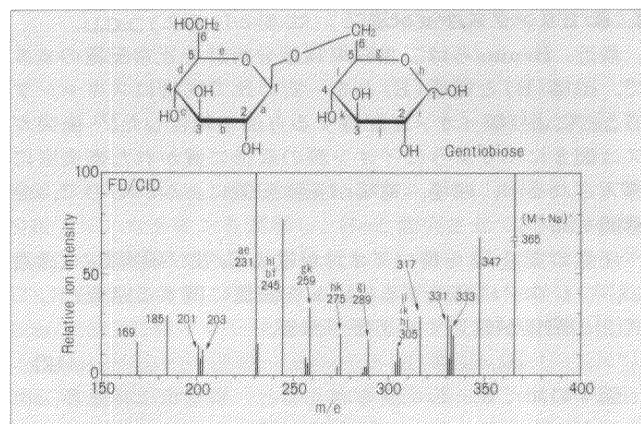


図10 gentiobioseのFD/CIDスペクトル

4.2 Acetaminophene glutathione conjugate

医薬品の代謝物は conjugate として尿中に排泄されることが多く、conjugate のまま抽出、精製することは極めて困難である。図11に acetaminophene glutathione conjugate のFD及びFD/CIDスペクトルを示す²¹⁾ FDスペクトルには目的物の擬分子イオン、フラグメントイオンに加えて二価イオンや構造式からは説明のつかないイオンが含まれ、構造解析を煩雑にしている。FD/CIDスペクトルで観測されるイオンは構造と良く対応し、構造解析が容易となる。

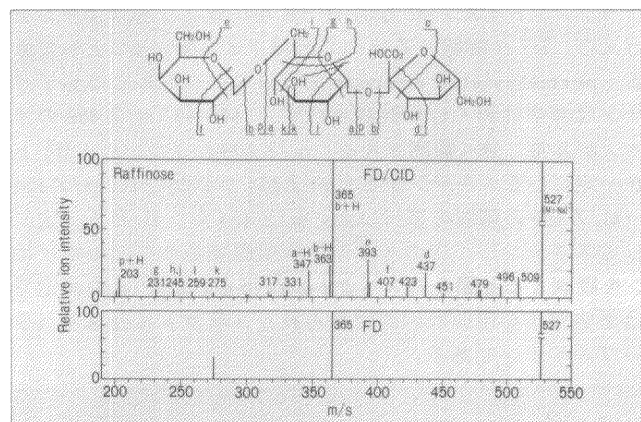


図11 raffinoseのFD/CIDスペクトル

4.3 Benzopyrene DNA adduct

Benzopyrene は発癌性物質として知られているが、そのDNA adduct は多くの人々に興味を持たれている。この化合物の質量スペクトルはFD法によってのみ可能であるが、(M+Na)⁺が観測されるのみで、分子構造に関する情報は少ない。FD/CIDスペクトルは多くの娘イオンを与え、分子構造を確認することを可能とした²²⁾

4.4 Cyclopeptide alkaloid mixture

CID法は混合物の分析にも利用されている⁹⁻¹³⁾ 構造の類似した化合物は高分離能のLCを用いても分離できないことが多い。図13は一面分に共存するcyclopeptidesをFD/CIDで分析した例である。この混合物のFDスペクトルはMW 593, 579, 573の三成分から成ることを示すが、フラグメントイオンは観測されず、相互の構造上の関係を見出すことはできなかった。しかしFD/CIDによる娘イオンの観測から構造情報を得ることができた。

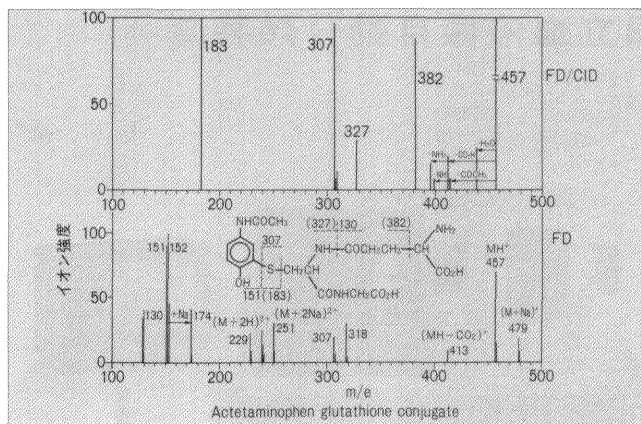


図12 acetaminophen glutathione conjugateのFDおよびFD/CIDスペクトル (ref. 21)

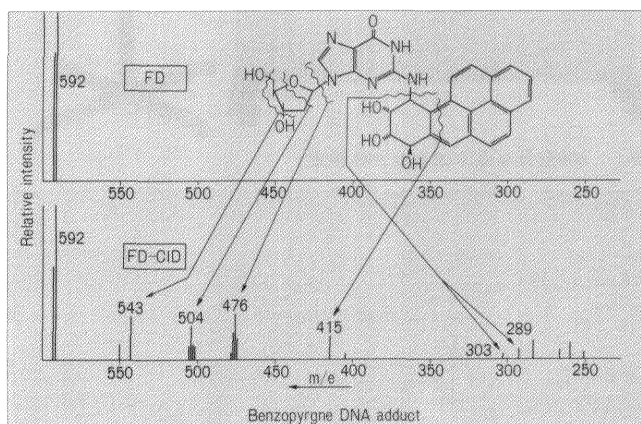


図13 benzopyrene DNA adductのFDおよびFD/CIDスペクトル (ref. 22)

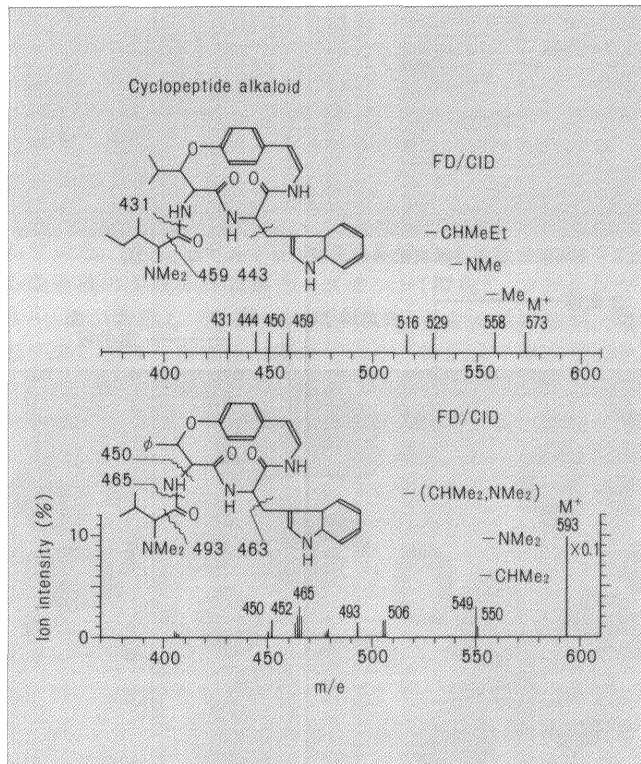


図14 cyclopeptide alkaloid mixtureのFD/CIDスペクトル (ref. 18)

5. おわりに

FD/CID法は難揮発性あるいは熱に不安定な化合物の分析、構造解析に極めて魅力ある手法である。煩雑な分離、精製操作を簡略化して、生体試料中の微量成分をFD法で取扱う必要が増加することを考えれば、FD/CID法の有用性は益々増大するだろう。

しかしCID法で得られる娘イオン強度は親イオンの1~0.01%程度の事が多く、FD/CIDの測定には0.5~1 μ gの試料を必要とするので、FDイオン化法の一層の高感度化がのぞまれる。

参考文献

- 1) K. R. Jennings, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1**, 227 (1968).
- 2) W. F. Haddon and F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 4745 (1968).
- 3) F. W. McLafferty, P. F. Bente III, R. Kornfeld, S-C Tsai and I. Howe, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2120 (1973).
- 4) J. H. Beynon and R. K. Boyd, *Adv. Mass Spectrom.* **7**, 1115 (1978).
- 5) R. G. Cooks, Ed., "Collision Spectroscopy" Plenum Publishing (1978).
- 6) A. L. Burlingame, C. H. L. Shackleton, I. Howe and O. S. Chizhov, *Anal. Chem.* **50**, 346R (1978).
- 7) R. A. W. Johnstone, Ed., "Mass Spectrometry," Vol. 4 Chapter 2. Chemical Society, London (1977).
- 8) F. W. McLafferty and F. M. Bockhoff, *Anal. Chem.* **50**, 2113 (1976).
- 9) T. L. Kruger, J. F. Litton, R. W. Kondrat, and R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **48**, 2113 (1976).
- 10) F. W. McLafferty, *Acc. Chem. Res.* **13**, 33 (1980).
- 11) R. W. Kondrat, G. A. McClusky, and R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **50**, 1222 (1978), **50**, 2017 (1978).
- 12) A. E. Schoen, R. G. Cooks and J. C. Wiebers, *Science* **203**, 1249 (1979).
- 13) M. Youssefi, R. G. Cooks, J. L. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3400 (1979).
- 14) H. H. Gierlich, F. W. Röllgen, F. Borchas and K. Levson, *Org. Mass Spectrom.* **12**, 387 (1977).
- 15) H. D. Beckey, "Principle of FI and FDMS" *Int. Series in Anal. Chem.*, Pergamon Press (1977).
- 16) H. R. Schulten, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **32**, 97 (1979).
- 17) A. P. Bruins, K. R. Jennings and S. Evans, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **26**, 395 (1978).
- 18) A. L. Burlingame, H. Kambara and F. C. Walls, 26th ASMS meeting, St. Louis (1978), p184.
- 19) F. W. Röllgen and H. R. Schulten, *Org. Mass Spectrom.* **10**, 660 (1975).
- 20) H. Kambara and A. L. Burlingame, 27th ASMS Meeting, Seattle (1979), p697.
- 21) T. A. Baillie, H. Kambara, S. D. Nelson, and Y. Vaishnav, 27th ASMS Meeting, Seattle (1979), p370.
- 22) K. Straub, T. Meehan, H. Kambara, A. L. Burlingame, S. Evans, 26th ASMS Meeting, St. Louis (1978), p499.

パターン認識による白血球分類と806形日立血液像自動分類装置

松下 甫*

1. はじめに

現在、病院で行われている臨床検査の中で最も人手と熟練を要する検査に血液像検査がある。この検査は血液標本を顕微鏡で覗きながら白血球や赤血球を観察し、その形態的特徴から6種類の正常白血球と異常血球の識別分類、赤血球の形態異常と染色性異常の検出、網赤血球の計数等を行うもので、この結果により白血病などの血液疾患の外、多くの病気が診断される。

健康人の血液には1 μ l当たり平均7,000個の白血球、500万個の赤血球および20万個の血小板が存在する。これらの血球は骨髓（リンパ球はリンパ腺）で造られ、成熟してから血液中に出てきたものである。成熟した白血球（これを正常白血球という）はその機能と形態学的特徴から杆状核好中球、分葉核好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球の6種類に分類され、それらの分布比率は一定値に保たれている。しかし、身体に疾患があるとこの分布比率が変化し、特に血液疾患などの場合は普通血液中には存在しない幼若な血球（これを異常血球という）が現われる。図3は末梢血液標本の顕微鏡下で観察できる白血球、赤血球および血小板の画像を示し、図4は健康人の正常白血球6種類の分布比率と異常血球の一例を示している。また、赤血球の場合も疾患により形態や染色性の異常が現われたり、網赤血球（幼若な赤血球で血球の中に網目状の構造をもつ）の出現率が増加する。

最近、この血液像検査の自動化がコンピュータとパターン認識技術の発達により急速に進み、自動装置が商品化されるようになった。日立製作所はパターン認識法による血球分類の基礎研究を長年行ってきたが、昭和51年度から昭和53年度まで通商産業省医療福祉機器委託開発制度による委託研究を受け、日本光学工業株式会社と共同して自動化率の高い高性能の自動分類装置を開発した。ここではパターン認識による白血球分類の手法と製品化した806形血液像自動分類装置の概要を紹介する。

2. パターン認識による白血球分類

一般にパターン認識の手順は対象物の画像信号から画像の特徴を表わすパラメータを抽出し、その特徴パラメータで形成される特徴空間の中で既に多数の範例から得られた最適基準値と比較しながら最適識別論理により識別分類の処理が行われる。図5に白血球分類のプロセスを示した。白血球分類の場合は先ず対象とする血液標本を作製する塗抹、染色の前処理があり、次に、顕微鏡とTVカメラによる血球画像入力、白血球の形態および色彩の特徴量を計算する特徴抽出、最適識別関数として二次識別関数などを用いた識別分類、および分類結果の計数記録という手順でパターン認識による白血球の自動分類が行われる。以下、システムの各プロセスをおって説明する。



図1 806形日立血液像自動分類装置

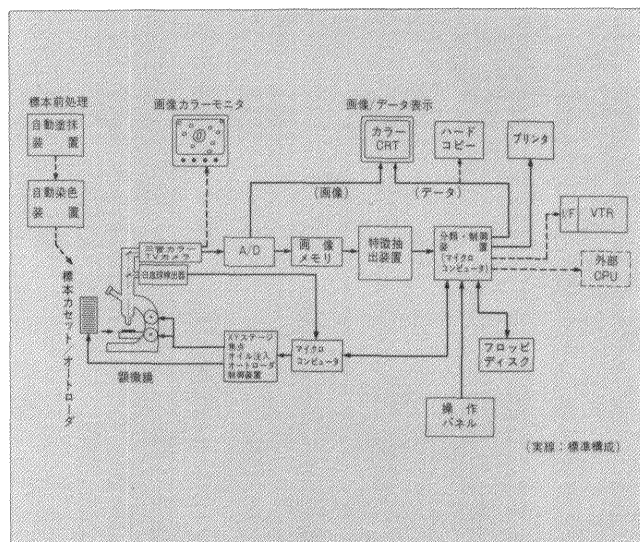


図2 806形日立血液像自動分類装置システムブロック図

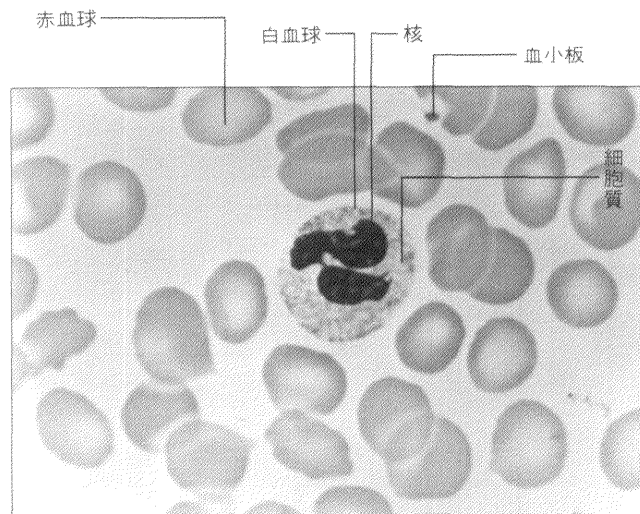


図3 末梢血液像

* 日立製作所那珂工場、医用機器設計部主任技師

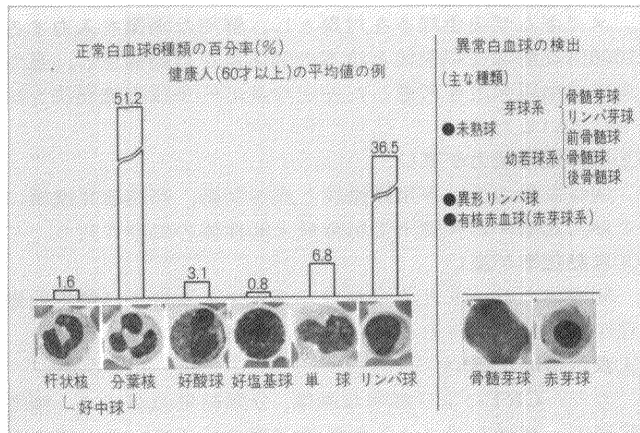


図4 正常白血球の分布比率と異常白血球の主な種類

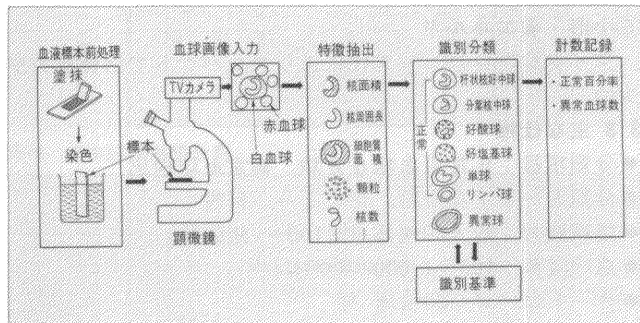


図5 パターン認識法による白血球分類のプロセス

2.1 血液標本前処理

血液標本作製の前処理は図3に示すように耳朶血又は静脈血を採血し、スライドガラス面にその血液を単一層に塗抹した後、染色液で血球を染色する二つの過程がある。血液の塗抹法にウェッジ法とスピナ法があり、前者は2～3 μ lの少量の血液をウェッジガラスを用いて引き伸ばす方法で、後者は200～300 μ lの血液を遠心力で拡散させる方法である。いずれも血球形態の変化を起させないことが重要で、採血から塗抹までの経過時間、抗凝固剤の種類、塗抹乾燥法等が大きく影響する。

染色法にはライト染色、ギムザ染色の単染色法とメイギムザ染色、ライトギムザ染色の二重染色法がある。いずれも染色液の主成分は共通で、エオシン(橙色)、メチレンブルー(濃い青色)、アズール(濃青色)、を含んでいるが、染色の美しさは二重染色が優れている。特にメイギムザ染色は白血球の核内構造を最も鮮明に染めるので、異常血球等の識別に有利である。染色では血球の色彩情報と密接な関係があり、染色液の濃度、pH、染色時間、水洗水の質が大きな影響を与える。このように白血球の特徴となる形態及び色彩情報は標本作製条件に左右されるため、白血球分類には安定な前処理が必要である。

2.2 血球画像入力

図6に示すように白血球は10～20 μ 、顆粒は0.3～2.0 μ の大きさであるため、これらの情報から血球を識別するためには鮮明な画像を取り込める高解像度の顕微鏡及びカメラが必要となる。一般に油浸形対物40倍～100倍の顕微鏡が使用されている。又、白血球の色情報を取り込むため赤、緑、青の3波長のフィルタを通した画像がとられる。

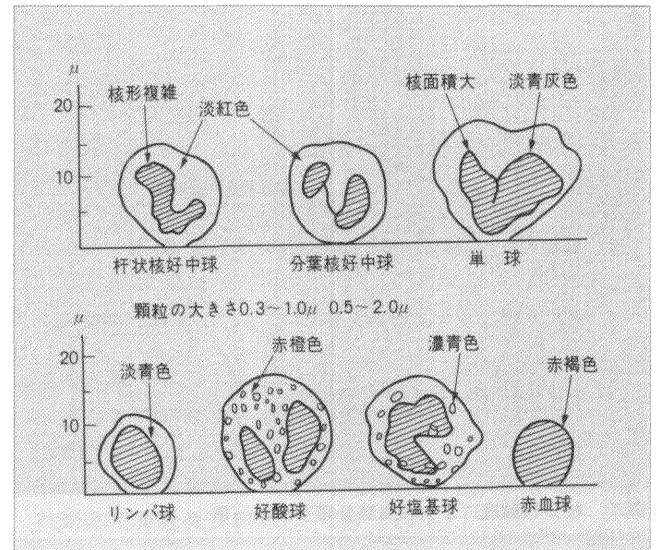


図6 血球の種類と特徴

2.3 特徴抽出

染色した血液標本では白血球は濃青紫色に染まる核と淡く染まる細胞質を有している。図6で示すように好中球は核がくびれ、古い好中球ほどくびれが深くなりついに分節する。また細胞質は淡紅色に染まる。好酸球と好塩基球は共に大きな顆粒をもち前者は赤橙色、後者は濃青色に染まっている。単球は核面積が大きく馬蹄形で細胞質は淡青灰色である。リンパ球は核は丸く、細胞質は淡青色なのが特徴であるが、大リンパ(若いリンパ球)は単球と類似して区別が難しいことがある。このように白血球を特徴づけるパラメータとして核面積、核周囲長、細胞質面積、核、細胞質、顆粒の色および核内構造等が選ばれている。

又、白血球の特徴抽出を行う際、赤血球画像を除く処理が必要である。このため白血球と赤血球の分光特性から青色領域(430nm附近)と緑色領域(555nm附近)の白血球と赤血球のそれぞれの画像の差画像をとることで赤血球のみを除去している。

2.4 識別分類

図7に白血球分類アルゴリズムの一例として簡便な枝分れ論理による分類手法を示した。既ち先ず大きな顆粒の有無を識別し、有りのときは顆粒の色により好酸球と好塩基球に分類する。反対に無しの場合は核の周囲長と面積比の大小から、大であれば核がくびれているとみて好中球と判断しその核数により杆状核、分葉核に分類する。反対に小であれば核が丸みをもつとみてその面積の大小から前者は単球、後者はリンパ球あるいはその核内構造や細胞質濃度から異常球かどうかの識別を行う。また図8は核面積と(核周囲長)²/核面積の二つの特徴パラメータからなる二次元特徴空間における正常白血球6種類の分布状態の例を示した。この分布図から杆状核、分葉核好中球と好酸球のグループ、好塩基球と単球のグループ、およびリンパ球のグループに分かれることわがかる。上述の枝分れ論理は論理の改良を行う上で不利な点があるので、実際の分類ではより血球の性質に適応した多段階識別論理を用いている。

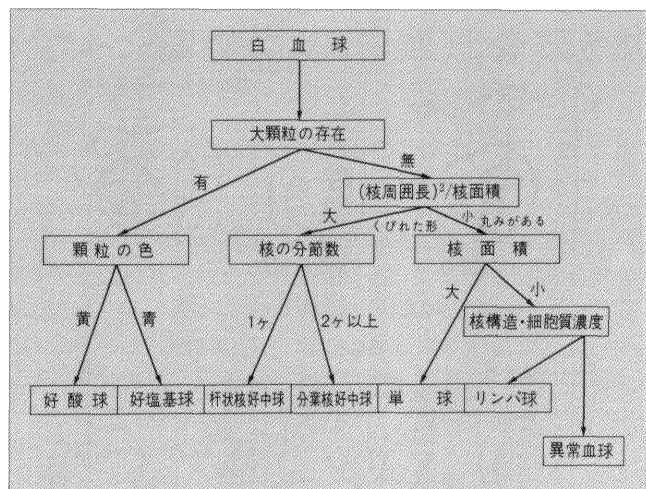


図7 枝分れ論理による白血球分類手順の一例

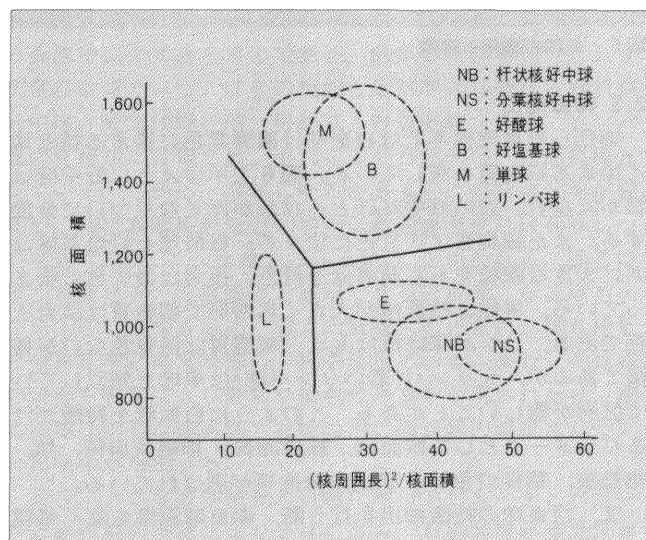


図8 二次元特徴空間における白血球分布

3. 806-20形日立血液像自動分類装置

3.1 構成

図1、及び図2にそれぞれ装置の外観とシステムブロック図を示す。

806-20形のシステム基本構成は次の通りである。まず標本前処理として、手引き又はウェッジ式自動塗抹とメイギムザ染色装置がある。次に自動分類装置は、画像入力部には標本オートローダ、X-Yステージ、焦点、給油の自動駆動機能をもつ1000倍油浸形高解像度顕微鏡、3管カラーTVカメラ、及びマイクロコンピュータによる入力制御装置、特徴抽出部には高速A/D、画像メモリ、及び高速演算機能をもつ特徴抽出装置、識別分類部には16ビット高速マイクロコンピュータとフロッピーディスク、及び血球識別とシステム制御ソフトプログラム、出力部には画像、データ表示用カラーCRTとプリンタなどからなっている。また、画像専用モニター、CRT表示内容のハードコピー、VTRによる画像記録装置、外部コンピュータ等との接続が可能である。

3.2 特長

装置の主な特長は次の通りである。

①血球識別精度が高い

メイギムザ染色標本を対象とし、鮮明な画像を入力する1000倍高解像度顕微鏡と標本の個体差を自動補正し、且つ血球の出現頻度を考慮した安定な適応的多段階識別法を採用しているため。

②検体処理能力が高い

残留振動の少ない専用顕微鏡と高速制御、高速演算機構により、高倍率顕微鏡下で毎時最大80検体の処理を行う。

③自動化率が高い

50検体カセットとオートローダシステムにより標本前処理から分類までカセット単位で自動操作ができる。

④表示機能が高い

カラーCRTにより鮮明な画像、分類結果のグラフ、精度管理表、対話方式による条件設定等の見やすい表示機能をもっている。

⑤小形・省エネルギー

マイクロコンピュータ化によりコンパクトで消費電力が少い。

3.3 主な仕様

- 分類項目：正常白血球6分類、異常血球検出
- 分類モード：全自動、レビュー、目視
- 処理能力：最大80検体/時(100ヶ/検体時)
- 血球計数：100～1,000ヶ/検体
- オートローダ：50検体 毎
- 対象標本：手引き、ウェッジ自動塗抹、メイギムザ染色標本
- 表示機能：12"カラーCRT上で画像とデータ表示を切換える。
白血球分類グラフ、好中球推移分布グラフ、cell by cell
相関表、精度管理データ、他
- 顕微鏡：対物100倍、接眼10倍油浸形
- 寸法：1200w × 1150H × 770D (mm)
- 電源：AC100V, 15A

3.4 測定例

図9及び図10に、病院標本による白血球分類百分率と好中球核推移分布の測定例を示す。図11は健康人標本による装置と人とのcell by cell (血球毎の識別比較)相関例を示す。

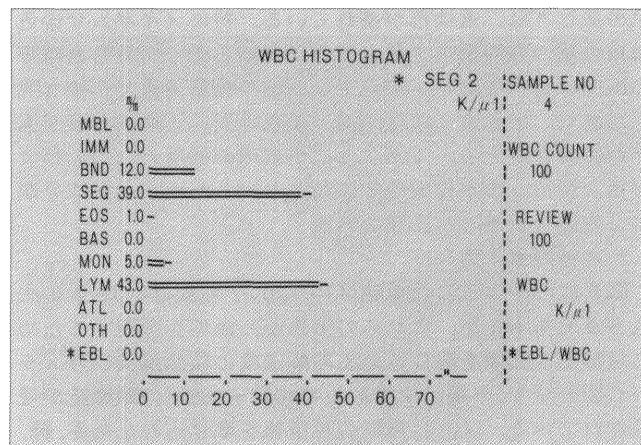


図9 白血球分類グラフ

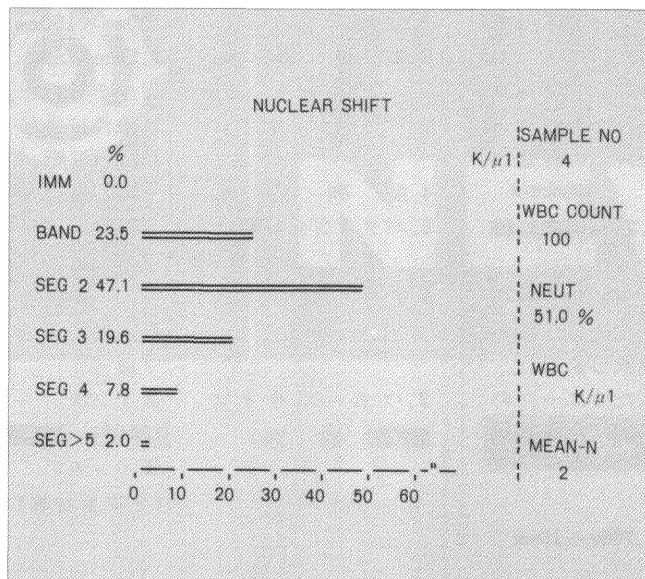


図10 好中球核推移分布

CELL BY CELL ID												SAMPLE NO ↓ 4
AUTO											Σ	
MBL	IMM	BND	SEG	EOS	BAS	MON	LYM	ATL	OTH	EBL		↓ WBC COUNT
MBL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100	
IMM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	
BND	1	1	2	5	1	1	1	1	1	1	40	
M SEG	1	1	8	32	1	1	1	1	1	1	REVIEW	
A EOS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
N BAS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
MON	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	6	
LYM	1	1	1	1	1	1	43	1	1	1	44	
ATL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OTH	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	
EBL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Σ	1	1	10	37	1	5	43	1	4	1	100	

図11 セル／セル相関表

訂 正

過般お送り致しましたH.S.I. NEWS Vol. 23 No.2 (SUMMER 1980) に下記のような誤りがありました。
謹んでお詫びの上、訂正させていただきます。

頁	位 置	訂 正 前	訂 正 後
1	目次の上から7行目	平田妙子	玉田妙子
2～3	図4(2頁)と、図6(3頁)の写真を入れ替える。		
4	脚注の上から1行目	病院長主任	主任
12	右列、上から3行目	図6は健康な男子成人の尿を加水分解したもの	図6はしょう油の分析

Topics

半導体製造用

RA-101

日立縮小投影露光装置

線幅1ミクロンまでのLSIの微細パターンを、0.2ミクロンの高い位置合せ精度で、シリコンウェーハ上に直接転写できる1/10縮小投影形の露光システムです。超LSI開発及び量産用製造装置としてお使いいただけます。

■特長

1. 高い配列精度を保つための新位置決め方式を採用しました。

チップパターンを繰返し転写する際ウェーハをのせるウェーハステージの位置誤差は、ステージの移動によらず、レタイクルの微動修正により自動的に補正されます。

2. レタイクル及びウェーハの自動位置合せ方式の採用で、0.2ミクロンの高精度が得られます。

装着されたレタイクルは、自動的に0.05ミクロン(ウェーハ換算)の精度で所定の位置に固定されます。また、1/10縮小レンズを介して(TTL方式)、ウェーハの装着誤差及びウェーハ自体の変形量は、コンピュータにより、0.04ミクロンという高分解能で自動的に計測されます。

3. 位置合わせモードの自動選定方式を採用しました。

ウェーハの変形が、微小あるいは均一の場合には、ウェーハ毎の位置合わせモード、ウェーハの変形が不均一の場合には、チップ毎の位置合わせモードに自動的に変更されます。

4. ウェーハの位置合わせマークの形成が容易です。

ウェーハの位置合わせマークは通常のプロセスで形成でき、しかもウェーハプロセスに応じて10mm角内の任意の位置に指定できます。

5. ベストフォーカスを0.2μm以内に維持できます。

エアマイクロの原理を用いた自動焦点機構により、ベストフォーカスでの再現性、0.2ミクロンを達成しました。したがってプロセスをへたウェーハの露光に際し、高精度の線幅精度を確保できます。

■主な仕様

1. 最大チップサイズ 10mm×10mm

2. 最大露光サイズ 150mm×150mm

3. 最小線幅 1.5μm(3μmピッチ), ただし条件により1.0μm可能

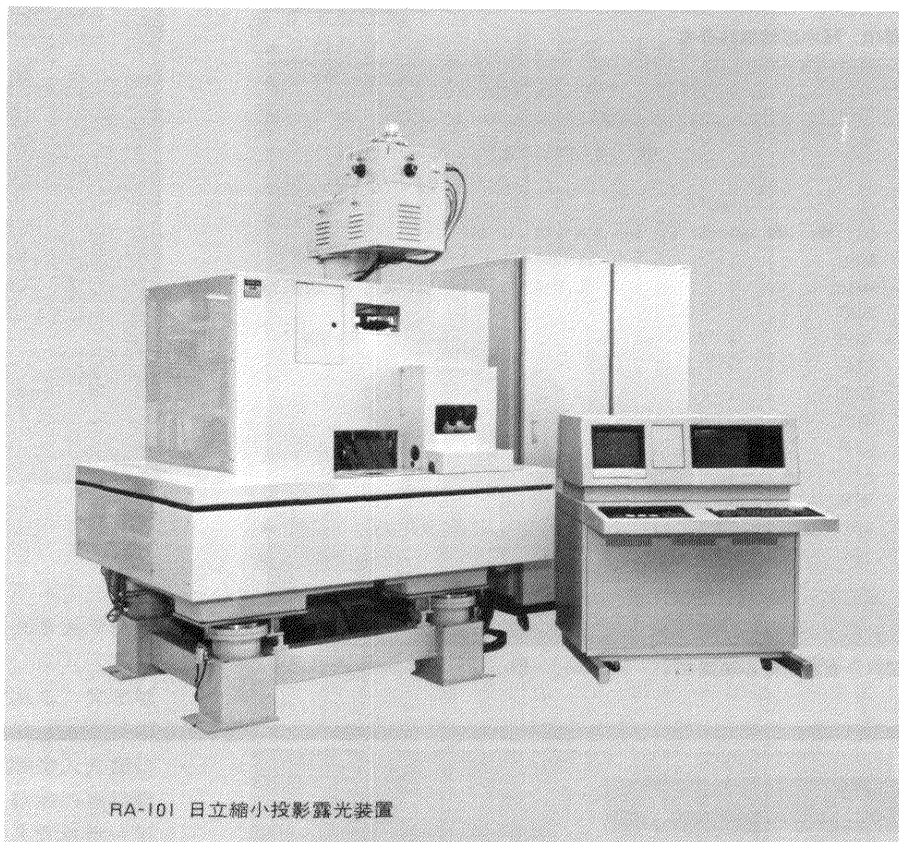
4. 配列精度 ±0.2μm以内

5. パターン合せ精度 ±0.2μm(2σ)以内

6. アライメント方式 ウェーハ毎あるいは、チップ毎

7. ウェーハサイズ 3インチ(標準)

4インチ(オプション)



RA-101 日立縮小投影露光装置

〈編集後記〉

- 本号の報文では、田中先生に、新しく開発された高感度反射電子検出器を装着したFE-SEMによる生物試料の観察について報告して頂きました。
- 本号の報文では、竹山先生に、200KVのSTEM+EDXシステムの金属材料への応用について報告して頂きました。
- 本号は、編集上の都合により、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.24No.1 (SPRING)を、56年4月に発行の予定です。

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

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
WINTER 1980 Vol.23 No.3/4

発行 昭和55年12月1日
(年4回発行)

発行人 湯川 清

編集人 小沢恭一 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 ダイアルイン 東京(03)504-7866

印刷所 日立印刷株式会社

訂 正

過般お送り致しましたH.S.I. NEWS Vol. 23 No.2 (SUMMER 1980) 及びNo. 3/4 (WINTER 1980) に下記のような誤りがありました。

謹んでお詫びの上、訂正させていただきます。

Vol. NO	頁	位 置	訂 正 前	訂 正 後
23 2	10	表 2 題目	アミノ酸析用溶離液, 反応液組成	アミノ酸分析用溶離液, 反応液組成
		表 2 下から 2 行目 Brij-35	19.05g	1.00g
		表 2 下から 1 行目, ホウ酸ナトリウム	1.00g	19.05g
23 3/4	1	ごあいさつ, 上から 3 行目	那河工場	那珂工場
	2	本文上から 1 行目	試料に当てると	試料に当てると
		右側写真説明	HSF-ST	HFS-2ST
	3	左側 上から 4, 11, 行目	酢酸イソアルミ	酢酸イソアミル
	4	トピックス 題目	the 1974	the 1980
	19	左側 本文上から 2 行目	図 3 に示すように	図 5 に示すように