

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 SPRING 1982
VOL.25 NO.1

目 次

報 文

 スフィンゴ糖脂質のFD-MS……………
……………飯田静夫 楠 泰典…1

 反射電子線像によるTiC基サーメッ
トの組織観察……………
……………松原秀彰 林 宏爾 鈴木 寿…6

 日立SEM用クライオシステムによ
る生きた植物細胞の観察……………
……………金子康子
……………松島 久 和田正夫 山田満彦…10

 高速アミノ酸分析計による Car-
nosineおよびHomocarnosine の
分別定量……………
……………菅原明子 村山季美枝…15

解 説

 X-650形日立微小部X線分析装置…
……………大高 正 神田公生…21

 ゼーマン効果を応用した原子吸光
分析法……………小泉英明…25

トピックス

 S-800形日立電界放射形走査電子
顕微鏡……………9

 228形日立ダブルビーム分光光度計
……………14

 655形日立高速液体クロマトグラフ
……………20

報 文

U.D.C.543.51.087.9:547.952

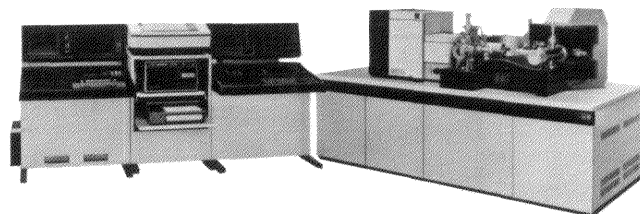
スフィンゴ糖脂質のFD-MS

飯田 静夫* 楠 泰典**

(昭和57年1月10日受理)

1. はじめに

糖脂質は糖と脂質が結合した化合物で、脂質の部分にグリセロールを含むか、スフィンゴシンを含むかによって、グリセロ糖脂質とスフィンゴ糖脂質に分けられている。一般に


 M-003形日立データ処理装置を装着した
M-80A形日立GC質量分析計

哺乳動物ではスフィンゴ糖脂質が主で、グリセロ糖脂質は量的に少ない。糖脂質の含量は動物の種属や臓器によってことなるが、普通は全脂質量の数%以下である。スフィンゴ糖脂質の化学構造は図1に示すように、長鎖塩基のスフィンゴシンと脂肪酸が結合したセラミドと呼ばれる部分に糖が1ヶまたはオリゴ糖の形で結合している。糖脂質はこの糖鎖部分の構造で分類されることが多く、現在およそ100種類もの構造が報告されている。糖脂質の分布パターンは種属、臓器、細胞の種類などに特異的で、細胞表面の特異的なマーカーであることが知られており、ヒト赤血球のABO式血液型物質などがその代表的なものである。最近、免疫系の各種の細胞、リンパ球やマクロファージなど、の表面構成成分としても注目されている。また細胞の分化や癌化に伴う糖脂質パターンの変化についても多くの報告があり、コレラ菌毒素など微量活性物質の細胞表面でのレセプターとしての活性を示すものや、細胞間の相互作用に働くものなど多様な生物活性を示すことが知られてきた。一方、糖脂質代謝系の酵素の先天性異常による疾患も古くから知られておりよく研究されている^{1)~4)}。

これらの糖脂質の化学構造の研究に際しては上述のように存在量が極めて少なく、また類似の構造のものが非常に数多く存在するので、微量の試料で構造研究の可能な方法の開発が重要な問題である。質量分析計による分析は微量の試料で得られる情報量が多いのでよく用いられている。一般に糖脂質をメチル、アセチル、またはトリメチルシリルなどの誘導体としてGC-MSや直接導入系で測定し、分子種や糖の配列順序、セラミド部分の構成を知り、また構成成分に分解し誘導体とした後各々の成分をGC-MSで同定するのが普通である^{5)~8)}。FDイオン化法は難揮発性-熱不

* 東京医科歯科大学 医学部 第2生化学教室、教授、医博

** 東京医科歯科大学 医学部 第2生化学教室、

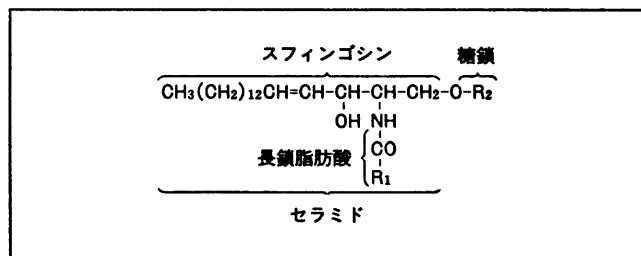


図1 スフィンゴ糖脂質の化学構造

安定物質に有用であることが示されているが、糖脂質の研究に用いられた報告は極めて少ない^{9),10)}。われわれはスフィンゴ糖脂質の分析にFD法を応用し、基礎的検討を行った結果、以下に述べるようにこの方法が構造研究に有力な手段であることを明らかにした¹¹⁾。

2. 方法

糖脂質は前述のように糖部分の構造で分類されているが、脂質部分は脂肪酸、スフィンゴシンの同族体の集合であるため、天然の糖脂質では糖鎖部分の構造が同一でもセラミ

ド部分の構造はことなるものの混合物であるのが普通である。従って得られたスペクトルの解釈を容易にするために、先ずそれぞれの糖脂質を逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでできるだけ単一の脂肪酸、スフィンゴシンの構成をもつ分子種に分離して、基礎的データを得るための試料として用いた。試料はクロロホルム-メタノール混液に溶かし、カーボンエミッターにマイクロシリンジで塗布した。装置は日立M-80質量分析計と日立M-003データ処理装置を使用した。イオン加速電圧3kV、対向電極電圧-1~-4kV、エミッター電流を0から40mAまで1.25mA/分の割合で増加させて測定した。図に示したデータはすべてエミッター電流を増加させて測定中に得られたスペクトルを積算したものである。

3. 結果と考察

糖鎖が単糖から五糖までの種々の糖脂質について測定した結果を図2から図7に示す。 $(M+H)^+$ 、 $(M+Na)^+$ 、 $(M+K)^+$ などの分子イオン種が顕著であり、またそれからの脱水イオンも認められる。エミッター電流を増加させるとグリコシド結合の部位で開裂したセラミド側のフラグメント

図2 グルコシルセラミド(GL_{1a})
構成脂肪酸C16:0のFD-MS

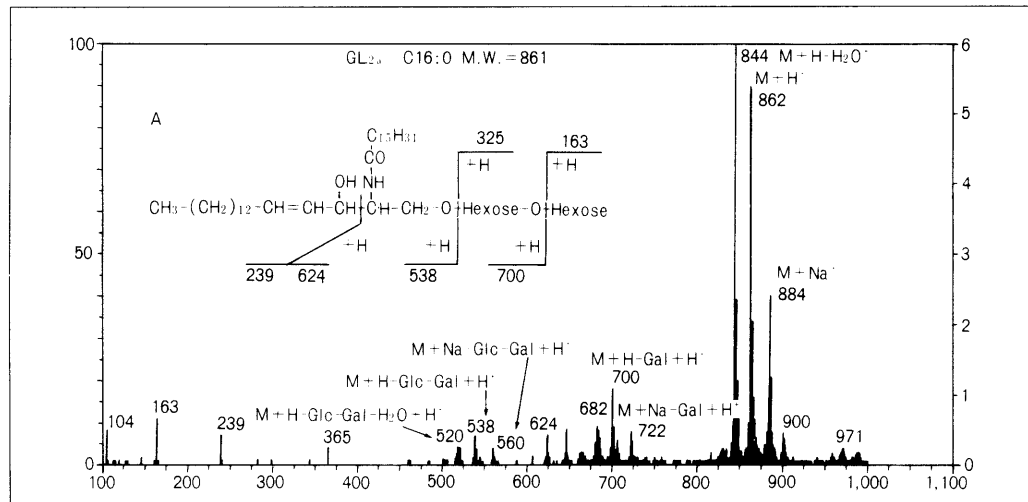
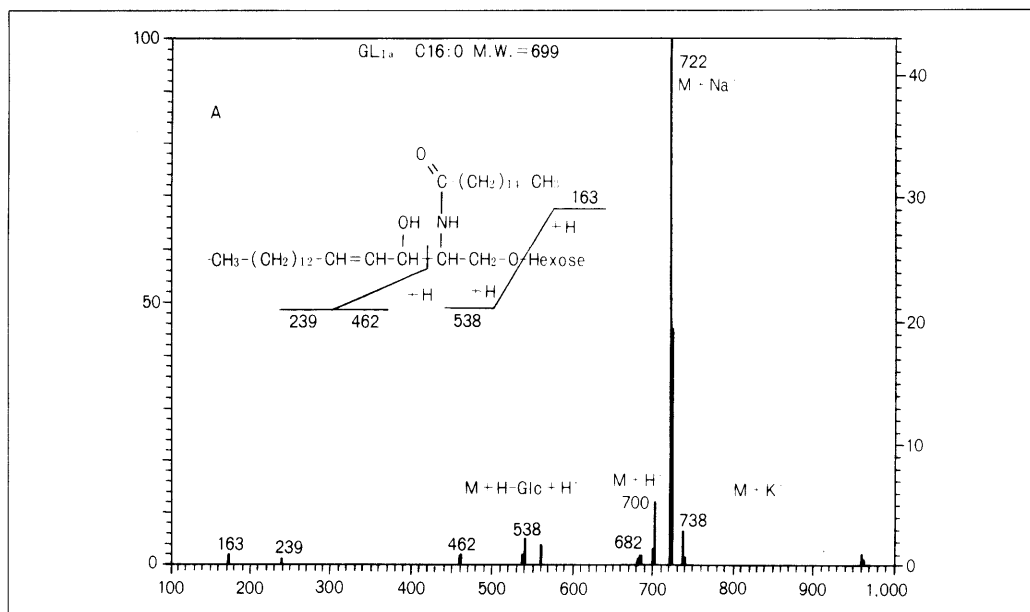


図3 ラクトシルセラミド(GL_{2a})
構成脂肪酸C16:0のFD-MS

イオンが認められる。また、その他にスフィンゴシン塩基の3位の水酸基と2位のアミノ基の間で開裂したイオンや $(M+2Na)^{2+}$ に相当するイオンの認められるものもある。しかし、これら以外のイオンはごく僅かなのでイオンピー

クの同定が容易である。セラミド側に由来するイオンピークは同一糖鎖をもつ糖脂質でちがった構成脂肪酸やスフィンゴシンをもつ試料のスペクトルを比較することによって同定できる。例えば構成糖鎖、スフィンゴシン塩基が同じ

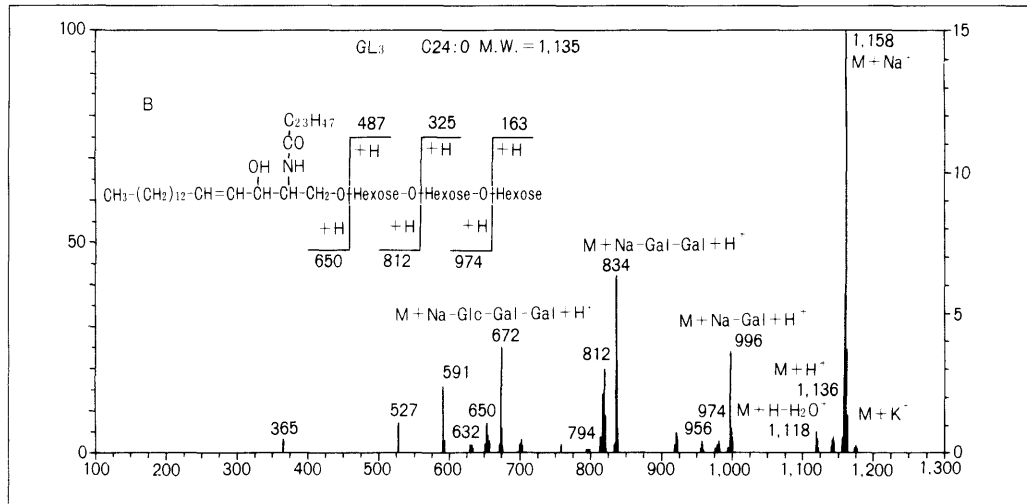


図4 トリヘキシシルセラミド(GL_3)
構成脂肪酸C24:0のFD-MS

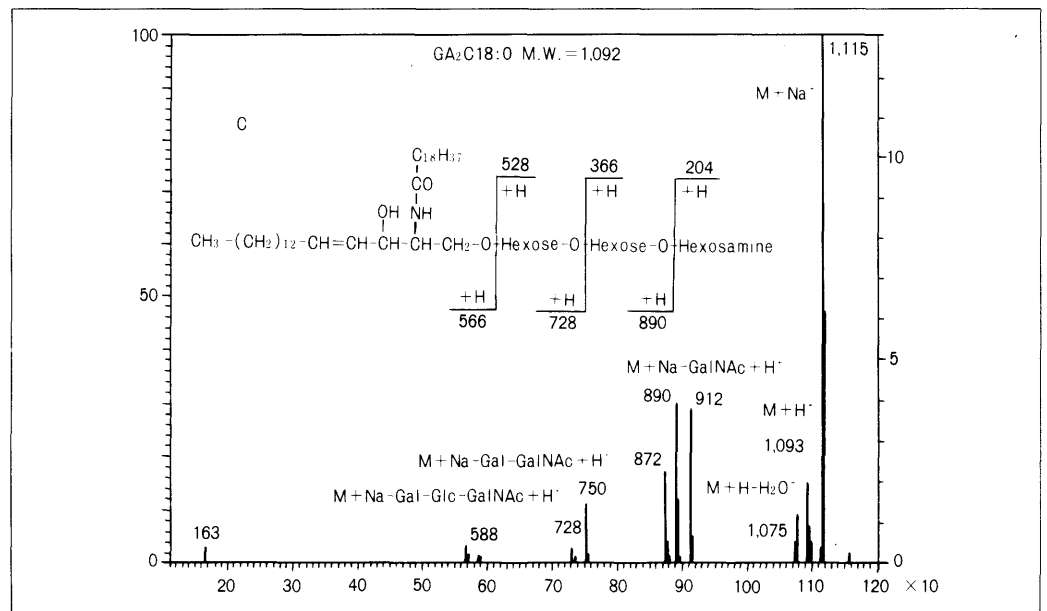


図5 アシアロGM₂(GA_2)構成脂肪酸
C18:0のFD-MS

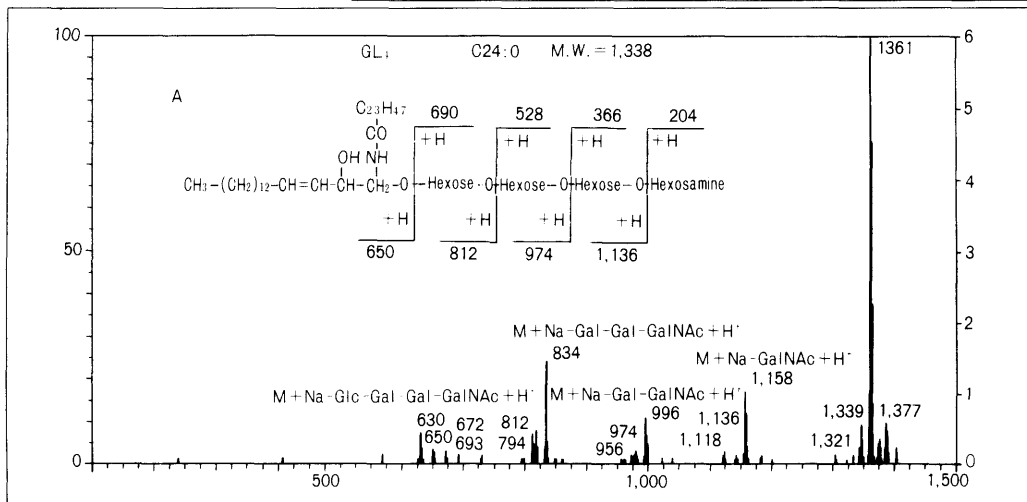


図6 グロボシド(GL_4)構成脂肪酸
C24:0のFD-MS

で脂肪酸がC16:0とC24:0とことなる試料では、脂肪酸の鎖長の差に相当する質量数112ちがったフラグメントイオンが検出される(表1)。また、グリコシド結合の部位で開裂して生じたイオンの質量数の差から開裂した糖が、ヘキソースかヘキソサミンかが分かり、糖の配列順序も決定することができる。

例えば、トリヘキソシルセラミドGL₃(図4)では、(M+Na)⁺: m/z 1158と(M+Na-G+H)⁺: m/z 996の差が162で、非還元末端がヘキソースであることを示し、N-アセチルヘキソサミン1モルとヘキソース2モルを構成糖とするアシアロGM₂(GA₂)では、(M+Na)⁺: m/z 1115と(M+Na-GNAc+H)⁺: m/z 912の差が203で、末端がN-アセチルヘキソサミンであることが分かる、以下同様にフラグメントイオンの考察から、GL₃はセラミド・ヘキソース・ヘキソース・ヘキソース、GA₂はセラミド・ヘキソース・ヘキソース・N-アセチルヘキソサミンと糖の配列順序が決定される、というように糖の配列順序が決められる。勿論このような情報はEIやCIによっても得られるが、FDの場合はイオン化のためにメチル化物などの誘導体にする必要がな

いので、誘導体調製時の反応副産物の除去やそのための試料の損失、誘導体にしたための質量数の増加などを気にせずに済み、また分子イオン種の強度が強いため同定が容易な利点がある。エミッター電流を増加させると構造解析に有用なフラグメントイオンを生ずるが、一方、分子イオンが減少し、その兼合がむづかしく、またフラグメントイオンパターンは再現性に乏しいことがFDの欠点ともされていたが、測定データーをコンピューターにとり込み、積算して表示することによって、分子イオン、フラグメントイオンの両方について再現性のよいスペクトルを得ることができる。この積算表示の有用性はLinscheidらも報告している¹²⁾。

以上のデーターを基礎として構成脂肪酸別の分子種に分ける前の試料についてもイオンピークの帰属を行うことができる。図8に示したものはグルコシルセラミド(GL_{1a})とラクトシルセラミド(GL_{2a})の等モル混合物のFDスペクトルであるが、そのイオンピークは表1のように同定され、更にそのピーク強度はガスクロマトグラフィーで分析した脂肪酸組成(表2)とよく一致することが分かり、FDスペクトルから分子種分布を知ることも可能である。また図9の

図7 フォルスマン活性糖脂質構成
脂肪酸C24:0(GL₅)のFD-MS

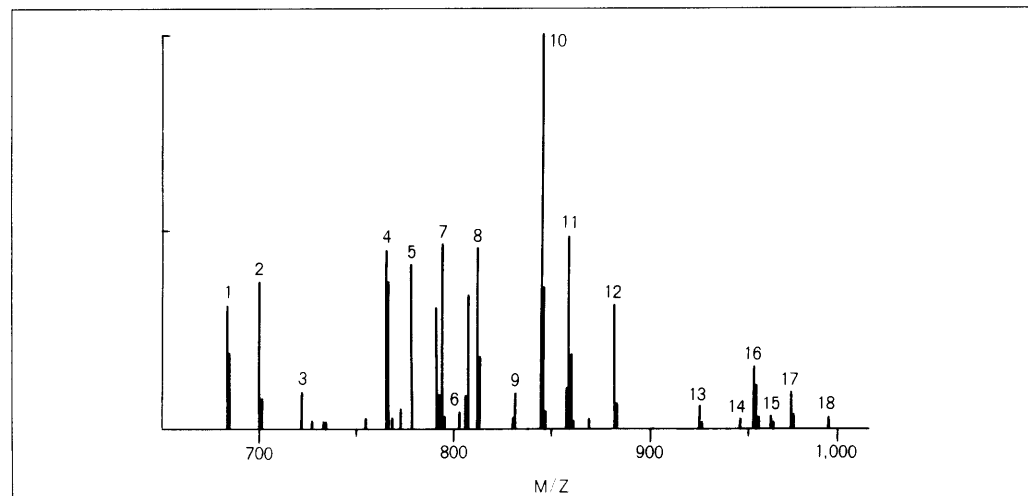
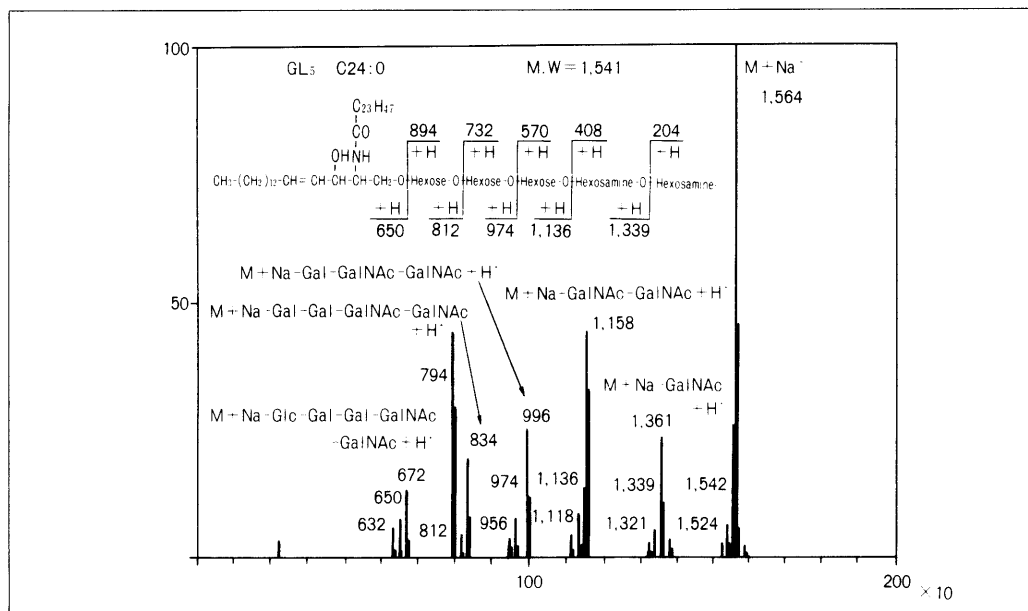


図8 グルコシルセラミド(GL_{1a})
とラクトシルセラミド(GL_{2a})
の等モル混合物のFD-MS



	m/z		
	(M+H-H ₂ O) ⁺	(M+H) ⁺	(M+Na) ⁺
GL1a			
16 : 0	1 ; 682	2 ; 700	3 ; 722
22 : 0	4 ; 766	5 ; 784	6 ; 806
24 : 0	7 ; 794	8 ; 812	9 ; 834
GL2a			
16 : 0	10 ; 844	11 ; 862	12 ; 884
22 : 0	13 ; 928	14 ; 946	15 ; 968
24 : 0	16 ; 956	17 ; 974	18 ; 996

	GL1a	GL2a
16 : 0	21.8	52.4
18 : 0	8.5	10.8
20 : 0	7.9	0.7
22 : 0	26.2	7.1
23 : 0	5.8	0.3
24 : 0	18.1	21.4
24 : 1	11.7	7.4

- 1) 山川民夫：「糖脂質物語」(1981) 講談社学術文庫
- 2) Yamakawa, T., Nagai, N. : *Trends Biochem. Sci.* (1978) 3, 128-131
- 3) Hakomori, S-I. : *Annu. Rev. Biochem.* (1981) 50, 733-764
- 4) Stannury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, (1978) McGraw-Hill Book Co., New York
- 5) Ledeen, R. W., Kundu, S. K., Price, H. C., Fong, J. W. : *Chem. Phys. Lipids* (1974) 13, 429-446
- 6) Karlsson, K-A., Pascher, I., Pimlott, W., Samuelsson, B. E. : *Biomed. Mass Spectrom.* (1974) 1, 49-56
- 7) Hanfland, P., Egge, H. : *Chem. Phys. Lipids* (1975) 15, 243-247
- 8) Ariga, T., Murata, T., Oshima, M., Maezawa, M., Miyatake, T. : *J. Lipid Res.* (1980) 21, 879-887
- 9) Costello, C. E., Wilson, B. W., Bieman, K., Reinhold, N. V. : in *Cell Surface Glycolipids*, ACS Symp. (1980) Series 128, 35-54
- 10) Hanfland, P., Egge, H., Darbrwski, U., Roelke, D., Dabrowski, J. : *Biochemistry* (1981) 20, 5310-5319
- 11) Kushi, Y., Handa, S. : *J. Biochem.* (1982) 91, 923-931
- 12) Linscheid, M., D'Angona, J., Burlingame, A. L., Dell, A., Ballou, C. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1981) 78, 1471-1475

反射電子線像によるTiC基サーメットの組織観察

松原 秀彰* 林 宏爾** 鈴木 寿***

(昭和57年1月20日受理)

1. はじめに

サーメット(Cermet)とは、Ceramicsを金属(Metals)によって結合した焼結複合材料を総称する語であるが、現在では特性が最も優れるTiC-Ni系のサーメットを指すとしてよいと思う。TiC-Ni系のサーメットは、戦後間もない頃、ジェット・エンジン用ブレード材料として研究されたが実用にならなかったこともあり、1956年以降はTiC-Mo₂C-Ni系サーメットとして生まれ変わり、もっぱら切削工具用材料として発展を続けて来ている。切削工具用材料と言えば、古くからWC-Co系超硬合金があり、その特性は抜群と言ってもよいほど、極めて優秀であることはよく知られている。しかし、昨今の資源事情を考えると、超硬合金用のW、CoなどはサーメットのTi、Niに比べて必ずしも有利とは言えず、我が国の場合とはくにそのような感が深い。

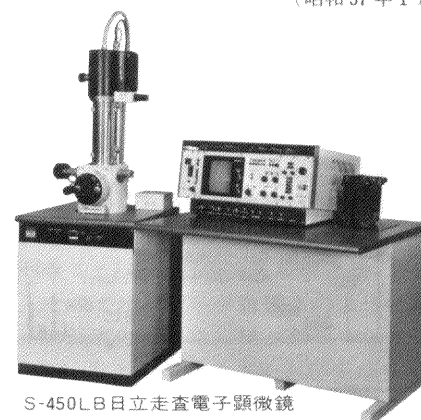
こうした理由により、サーメットは次世代の工具材料として重視されており、既に多くの研究がなされて来ている。著者らも長い間サーメットの研究を行って来ているが、研究目的は靱性改良を主体に高温強度、耐酸化性を改良し超硬合金に匹敵する材質を持つサーメットを得ようとするにある。そこで現時点のサーメットはどのようになっているのかと言うと、我が国では窒素を含むTiC-Mo₂C-Ni系サーメットが全体のほとんどを占め、その生産量は年々増加の傾向にある。これは、窒素添加サーメットは従来の無添加サーメットに比べて靱性が優れ、切削性も良好であるためと言われている。そうすると、窒素添加サーメットでは何故にこれらの特性が優れるのか、さらに高性能材料を得るにはどのようにすべきかが、大きな課題となる。

このような場合、金属材料の分野では、その材料の諸物性をまず定量的に抑え、次にそれらと、目的とする特性値とのかかわりあいを解析すると言うのが、普通とられてきている手法である。こうした物性を抑えるには材料の微視組織の検討がとくに重要であり、それには分解能の高い電子顕微鏡が必要となる。著者らは最近、反射電子線像(以下RE像と略す)を用いて、窒素添加サーメットの組織解析を行ったところ、他の観察手段(光学顕微鏡像、2次電子線像)では得られない貴重な情報を得ることが出来たので、ここではその例を二、三示すことにする。

2. 反射電子線像によるサーメットの組織解析

2.1 Ti(C,N)-Mo₂C-Niサーメットの微視組織

TiC-Mo₂C-Niサーメット(合金)への窒素添加は、一般にTiNあるいはTi(C,N)粉末を用いて行われるが、混合粉末



S-450LB日立走査電子顕微鏡

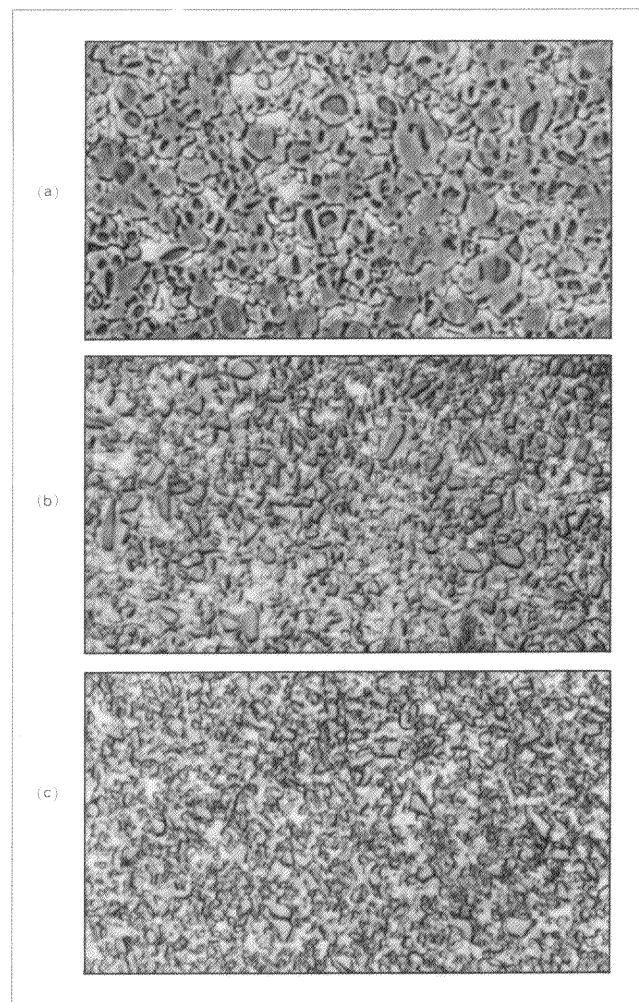


図1 TiC基サーメットの光学顕微鏡像(×1,500)試料断面を鏡面仕上げ後、村上氏試薬で食刻。(a) TiC-19%Mo₂C-24%Ni, (b) TiC_{0.7}N_{0.3}-19%Mo₂C-24%Ni, (c) TiC_{0.5}N_{0.5}-19%Mo₂C-24%Ni

* 東京大学工学部金属材料学科、大学院

** 東京大学工学部金属材料学科、助教授、工博

*** 東京大学工学部金属工学科、教授、工博

を成形後、真空焼結すると窒素はTiN添加の場合もTi(C, N)の形となり、Ti(C, N)-Mo₂C-Ni合金が得られる。窒素量を変化させた時の合金の光学顕微鏡組織を図1に示す。これより、合金の組織は窒素添加量の増加と共に微粒化することが分かるが、その微視組織は細かすぎて詳しいことは分からない。そこで図1と同じ合金について、その拡大組織をSEMによる2次電子線像およびRE像によって求め、これらを図2、図3、図4に比較して示した。これらに示されるように、RE像は2次電子線像に比べ鮮明であり、光顕では得られなかった多くの事柄を教えてくれる。すなわち、

図2からTiC-Mo₂C-Ni合金の硬質相は2重構造をなし、中心部にはTiC(黒色)があり、周辺部にはTiC-Mo₂C固溶体相(灰色)が存在することがよく分かる。この固溶体相は周辺組織(Surrounding Structure, SS)と呼ばれるものである。硬質相粒子間に白く見える相はNi結合相であるが、硬質相粒子であれ結合相であれ、この写真を用いると、これらの分布状態などが直ちに解析できる。ここで各相のコントラストは、各相の構成元素の相違によって反射電子量が変化することに基づくことは言うまでもない。他方、図3、図4のTi(C, N)-Mo₂C-Ni合金においては、TiC-Mo₂C-

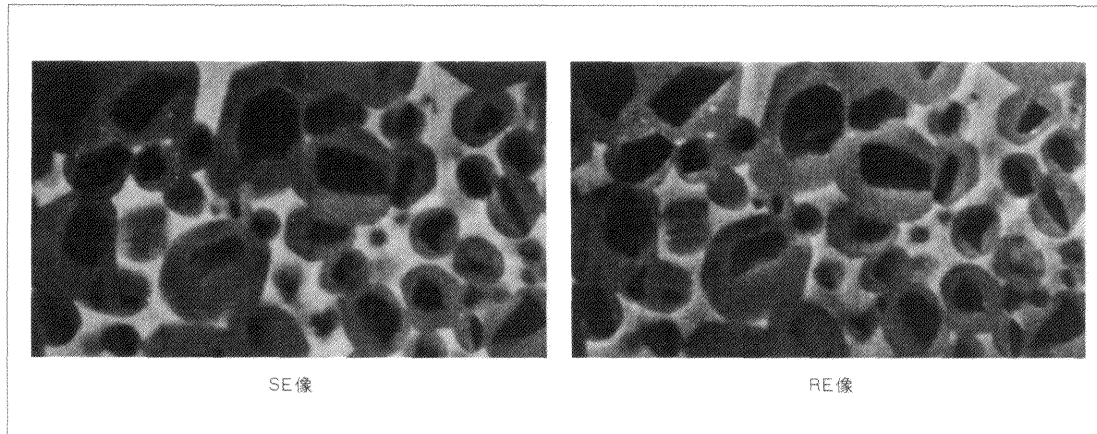


図2 TiC-19% Mo₂C-24% Ni合金の2次電子線(SE)像および反射電子線(RE)像(×5,000)

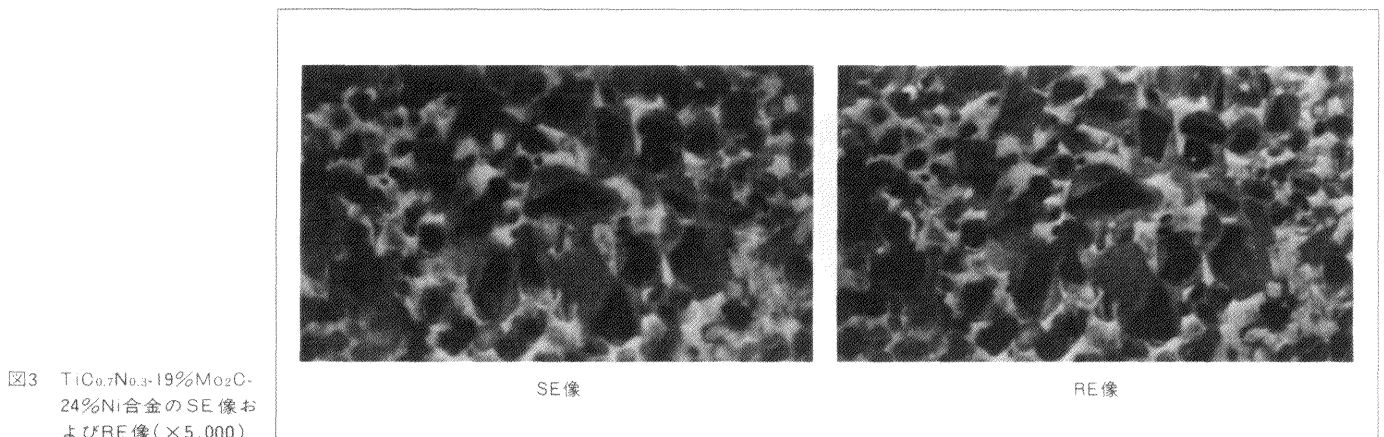


図3 TiC_{0.7}Nb_{0.3}-19% Mo₂C-24% Ni合金のSE像およびRE像(×5,000)

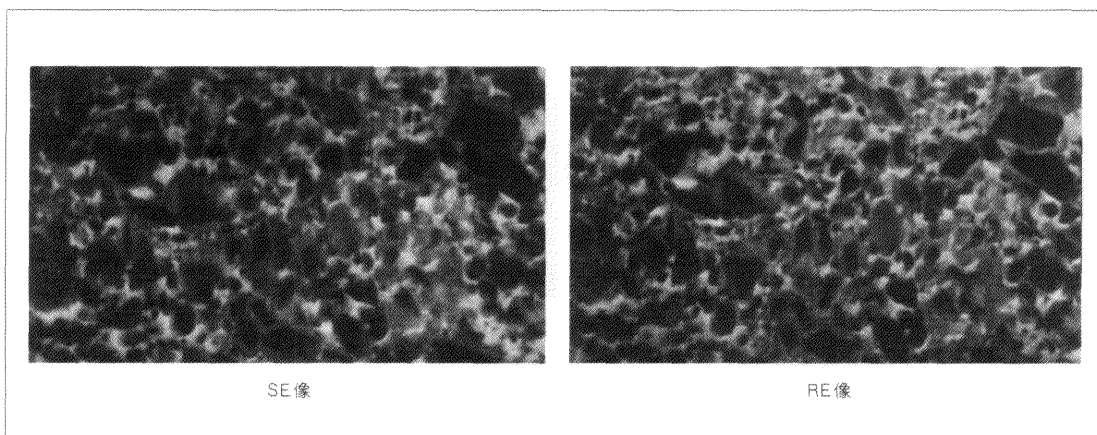


図4 TiC_{0.5}Nb_{0.5}-19% Mo₂C-24% Ni合金のSE像およびRE像(×5,000)

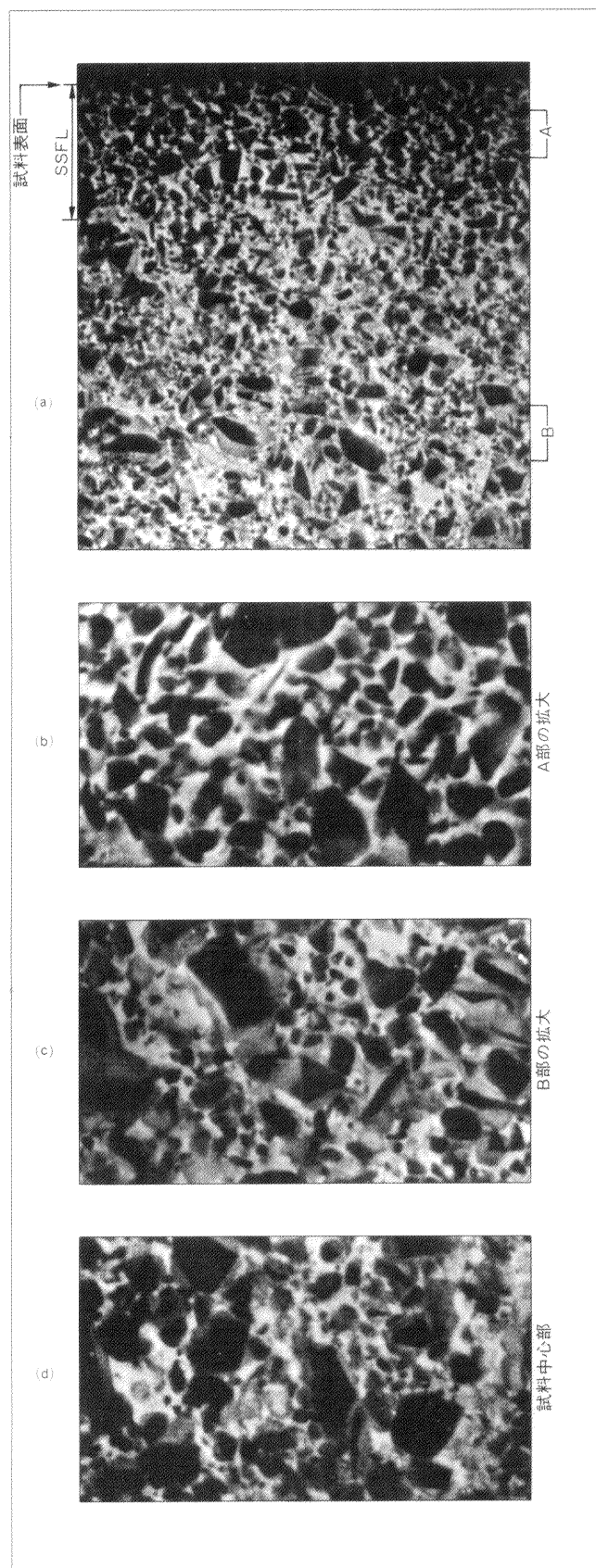


図5 $\text{Ti}_{0.5}\text{Ni}_{0.5}$ -19% Mo_2C -24% Ni 合金の焼結体表面部に生じるSS Free Layer 1, 420°C × 1hr, 真空焼結
(a): 断面組織 (×2,000), (b)~(d): 各場所における拡大組織 (×7,000)

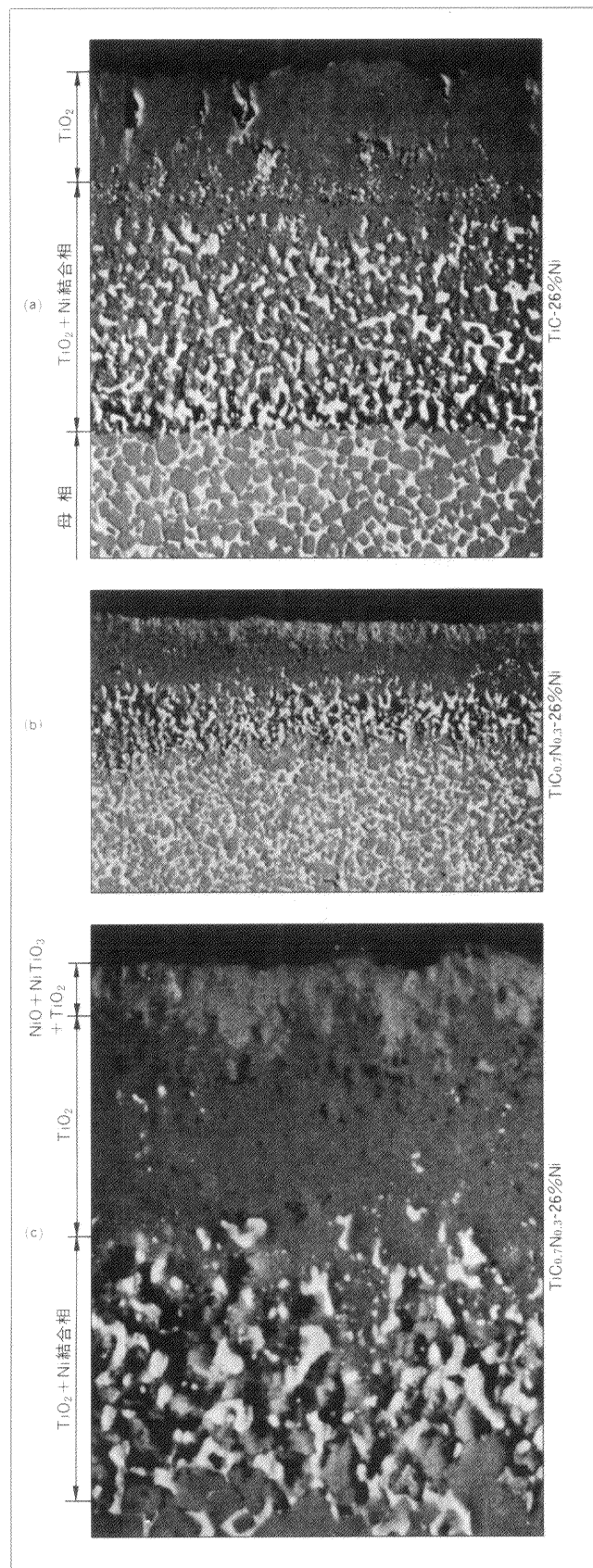


図6 TiC -26% Ni および $\text{Ti}_{0.7}\text{Ni}_{0.3}$ -26% Ni 合金の酸化層組織
1, 1,000°C × 1hr, 大気中で酸化
(a)および(b): ×500, (c): ×2,000

Ni合金と同様に、Ti(C, N)のまわりにSSが形成されているが、N量の多い合金ほどSSの厚さが減少している。これより、窒素添加サーメットはSSが薄くなる故に微粒組織となることが分かる。さらに、この微粒組織は、焼結中の溶解・析出の機構によって生じる粒成長¹⁾が、窒素添加によって抑制された結果として現われたものであることも分かる。これらの事は一見何でもないように見えるかもしれないが、実は極めて重要な内容を含んでいる。硬質相粒子が微粒化するほど、サーメットの靱性は向上するからである。これについては関係報文²⁾を参照されたい。

2.2 Ti(C, N)-Mo₂C-Ni合金の焼結体表面部の組織変化³⁾

窒素を含むサーメットを真空焼結法によって調製すると、焼結中、炭窒化物は不安定となり、試料表面から脱窒素現象を起こし、表面部の組織が変化すると考えられる。表面組織が変化すれば、このことはサーメットの応用に当たってとくに注意すべき事柄となる。そこで図5には、真空焼結試料における表面部組織(RE像)の例を示す。これより表面部には予想通り組織変化が認められ、表面部(A)にはSSの消失した層(SS Free Layer, SSFL)が形成されていることが分かる。またSSFLよりも内部(B)では中心部に比べてSSの厚さが増加している。ここで、このような組織変化はRE像を求めることによって初めて明らかとなったものであるが、この組織から、SSFL形成の原因は、表面部からの脱窒素に起因して、SSの構成元素であるMo、Tiなどが合金内部に向かって質量移動したことにあると言う、確たる証拠が得られたことになる。また、SSFLが生じると表面部が軟質となり、応用面で問題となるが、上記の形成機構を考慮すると、その対策は容易となる。

2.3 Ti(C, N)-Niサーメットの酸化層組織⁴⁾

窒素添加により、本系合金の組織は微粒化し、靱性が改良されることについては上述したが、ここでサーメットの耐酸化性に及ぼす窒素添加の効果を調べてみる。耐酸化性の優れる材料ほど、切削時の損傷が少なくなり、安定な工具材料となるからである。図6には、TiC-NiおよびTi(C,

N)-Ni合金の酸化層の組織(RE像)を示す。TiC-Ni合金の酸化層はTiO₂の外層と(TiO₂+Ni結合相)の内層の2層から成る。一方、Ti(C, N)-Ni合金の酸化層は表面から順に、(NiO+NiTiO₃+TiO₂)の層、TiO₂の層および(TiO₂+Ni結合相)の層の3層から成り(各相の同定はX線回折による)、このうち最内層には、N₂ガスによるものと思われる多数のポアが生じている。これよりサーメットに対する窒素添加は酸化機構を本質的に変化させることが分かる。そしてTi(C, N)-Ni合金の酸化層の全体の厚さはTiC-Ni合金に比べ著しく小となり、窒素添加はサーメットの耐酸化性を向上させることが組織学的に立証されることとしてよい。こうした知見はRE像による詳しい組織観察によって得られたものであることは言うまでもない。このようにRE像による観察は、サーメットの微視組織ばかりでなく酸化などによる合金組織の変化を調べるにも、極めて有効な手段であることが分った。

3. おわりに

著者らが、これまでに行って来たTiC基サーメットのRE像観察結果をここで簡単に紹介したが、得られたいくつかの結果は、この分野の研究では極めて重要なものとなっている。窒素添加サーメットは歴史が浅いだけに、なお多くの問題が残されており、今後とも多彩な研究が望まれている。そして新しい成果が得られるためには、まず微視組織の観察がどこまで可能になるかにかかっているが、ここで述べた反射電子線像による組織観察法は、限りなくそれを可能にしてくれるものと、期待する。

■参考文献

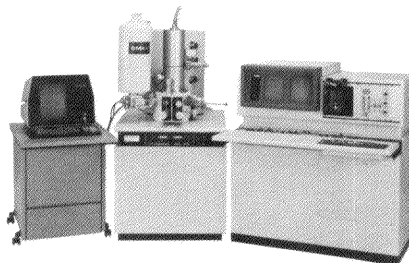
- 1) 鈴木, 林, 寺田: 日本金属学会誌, 35 (1971), 936.
- 2) 鈴木, 林, 久保, 松原: 粉体および粉末冶金, 28 (1981), 147.
- 3) 鈴木, 林, 松原: 粉体および粉末冶金, 29 (1982), 58.
- 4) 鈴木, 松原, 林: 日本金属学会誌, 投稿中.

Topics

S-800形日立電界放射形走査電子顕微鏡

電界放射形電子銃を搭載した超高分解能走査形電子顕微鏡を製品化しました。次図に装置の外観を示します。本装置は、物体の微細表面構造の観察や分析を行なう走査形電子顕微鏡の中で、最高の分解能2nmを保証する装置です。

電子源には高輝度、長寿命の電界放射形電子銃



X線分析装置を装着したS-800形日立電界放射形走査電子顕微鏡

を用い、高倍率での観察(最高×250,000)が容易であることや凹凸のはげしい試料を深い焦点深度で観察できる特長を有しています。

試料は最大50mm径×20mm高さのものまで観察で

き、大形試料ステージによりX、Y移動(25mm)、傾斜(−5°~45°)、回転(360°)やZ移動(ワーキングディスタンス:5~30mm)が可能です。

電気系にはマイクロコンピュータを内蔵し、電子銃操作の自動化、レンズ系の最適値制御、自動焦点合せ(約50,000倍まで可能)、電子レンズの収差補正、各種データの画像上への自動表示/記録など数多くの新機能を織り込み、性能と操作性の大幅な向上を図った装置です。

■仕様

分解能	2nm
倍率	20~250,000倍
加速電圧	1~30kV(1kVステップ)
CRT	観察用2ヶ(9インチ)
	撮影用1ヶ(8インチ)

日立SEM用クライオシステムによる生きた植物細胞の観察

金子 康子* 松島 久* 和田 正夫** 山田 満彦**

(昭和57年2月1日受理)

1. はじめに

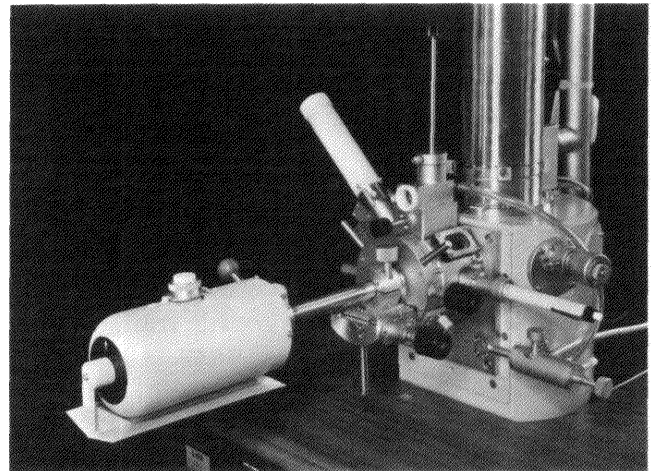
生物試料を電子顕微鏡で観察する人々が望むことは、生きている状態で観察・写真撮影ができ、しかも、試料の作製が簡単なことである。「生きている状態での観察」に近づくために、透過電子顕微鏡の分野ではフリーズ・フラクチャー法が開発され、走査電子顕微鏡の分野ではクライオ走査電子顕微鏡法が導入されている。走査電子顕微鏡によるイメージ構成の力は素晴らしく、光学顕微鏡や透過電子顕微鏡による組織・細胞のイメージが、走査電子顕微鏡により立体的に統合されることを筆者達は期待している。筆者達が走査電子顕微鏡を用いるお主な目的は、迅速で正確な、器官、組織、細胞および細胞内のイメージを構成することである。そのためには、簡単な試料作製法により、生きた状態か、あるいはそれに近い状態で生試料を直接観察・写真撮影ができれば、所期の目的に近づくことができるであろうと考えて、下記の材料を用いて、以下の実験を行った。

2. 材料と方法

筆者達は、細菌、ラン藻、藻類、陸生植物の細胞の観察にはある程度の経験があるので、まず、これらの中から材料を選ぶことにした。ただし、本稿で写真としてご紹介するのは私達の目に最もなじみの深い被子植物にしたことをあらかじめおことわりしておく。観察した範囲は、器官、組織、細胞、細胞内のレベルにわたっている。

まず、これらの試料を従来のクライオ走査電子顕微鏡法と臨界点乾燥法により調整し、検討を行った。前者の方法では、試料表面を覆う霜を、ヒーターで温度を上げて除くまでに時間がかかり、かつ液体窒素に試料を入れる際、元の相互位置関係がかならずしも正確には保たれていない恐れもあった。後者の臨界点乾燥法は、化学固定、脱水、溶剤浸漬、臨界点乾燥、金属蒸着の操作を必要とし、筆者達の望む迅速さとは程遠く、元の相互位置関係を保つのに困難をきたす場合があった。上記のいずれの方法も筆者達の目的には合致しなかったのである。

筆者達は発想の転換をはかった。クライオ・システムを用い、試料ステージの温度を -20°C 前後に保ち、実験室で作製した生試料をそのまま手早く試料台に載せ、試料ステージに装着して、直接観察・写真撮影を試みた。結果は良好で、しかも写真撮影後とり出した試料は活発に原形質流動を続けた。つまり、細胞は生きていたのである。筆者達が試料作製に用いた道具は、試料を切り出すための安全カミソリの刃と汙紙と試料を試料台に接着するための木工用



日立SEM用クライオシステムを装着したS-450形日立走査電子顕微鏡

ボンドだけであった。しかも、試料作製から観察・写真撮影に要した時間は約5分であった。

3. 結 果

上に述べた筆者達の方法により得られた器官、組織、細胞、細胞内の観察結果を簡単に紹介する。図1は、アオシ

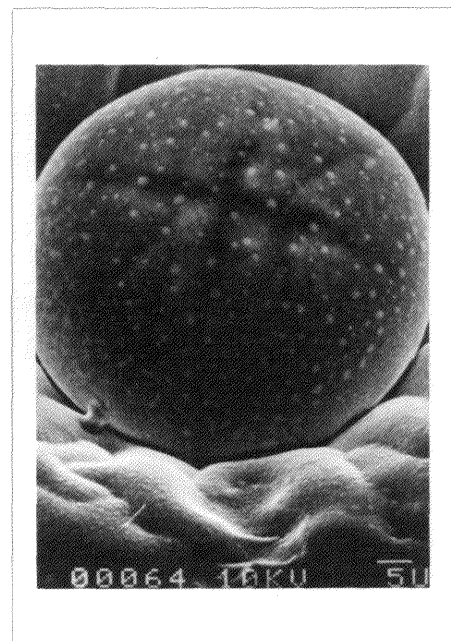


図1 アオシ(*Perilla frutescens*)葉裏面の分泌腺毛

* 埼玉大学理学部 生体制御学教室

**日立製作所 那珂工場 応用技術センタ

ソ(*Perilla frutescens*)の葉の裏面にある分泌腺毛である。浅いみぞにより8個の細胞の存在が観察される。この腺毛は葉の表皮細胞が分化したものであり、左下で表皮細胞と連がっているのがわかる。この細胞で精油(テルペン類)が合成される。シソの芳香の成分はこの精油である。図2は、食虫植物のモウセンゴケ(*Drosera rotundifolia*)の葉とそれに捕えられたオンシツコナジラミ(*Trialeurodes vaporariorum*)

である。図3は、モウセンゴケの分泌腺毛を拡大したものである。分泌腺毛を構成する細胞群の表面構造がよく観察できる。図4は、ダイズ(*Glycine max*)の葉の裏面を観察したものである。気孔が開いているのが観察される。図5は、キョウチクトウ(*Nerium oleander*)の葉の気孔部である。図6は、イネ(*Oryza sativa*)の花の内部構造である。臨界点乾燥法や従来の方式によるクライオ走査電子顕微鏡法

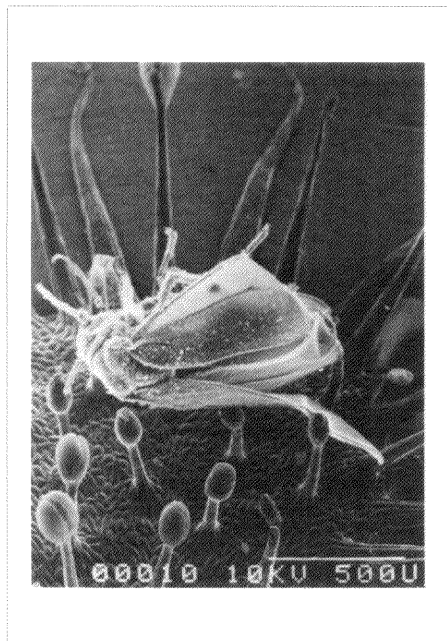


図2 モウセンゴケ(*Drosera rotundifolia*)とオンシツコナジラミ(*Trialeurodes vaporariorum*)

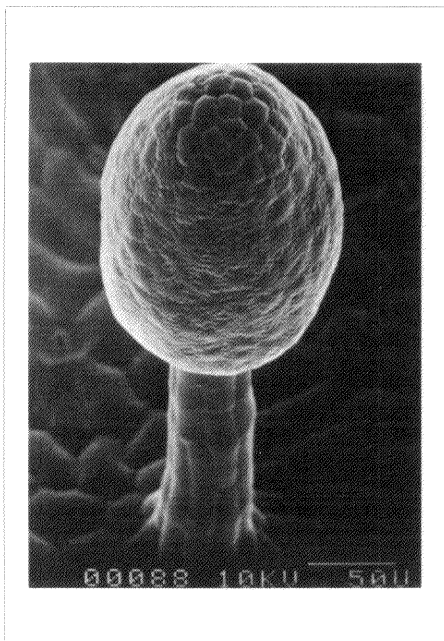


図3 モウセンゴケの分泌腺毛

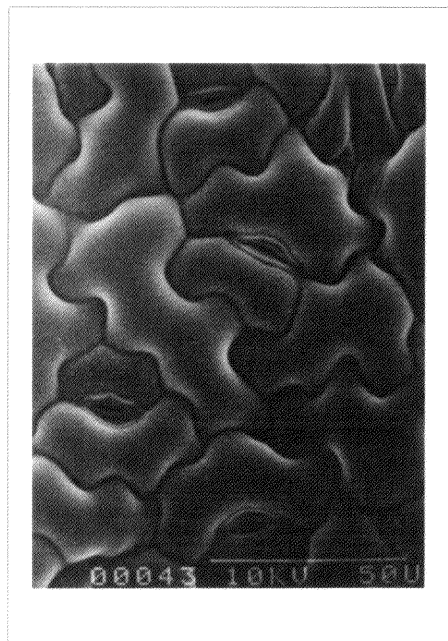


図4 ダイズ(*Glycine max*)の葉の裏面

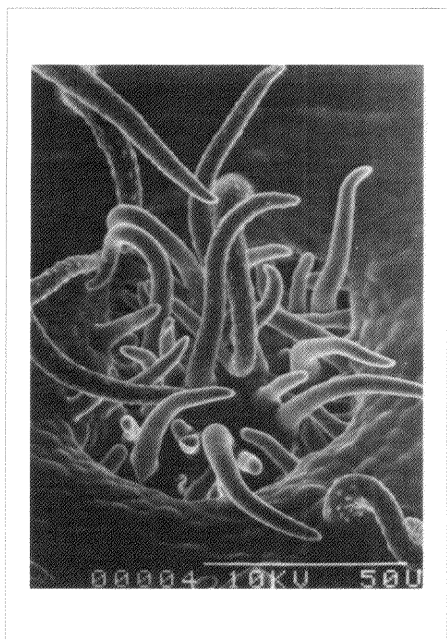


図5 キョウチクトウ(*Nerium oleander*)の葉の気孔部(毛の下に気孔群がある)

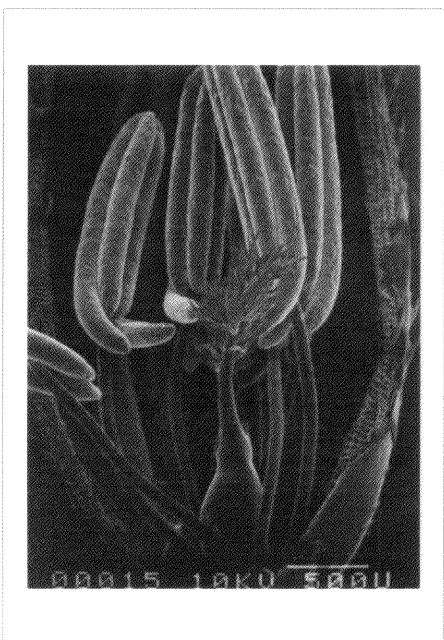


図6 イネ(*Oryza sativa*)の花

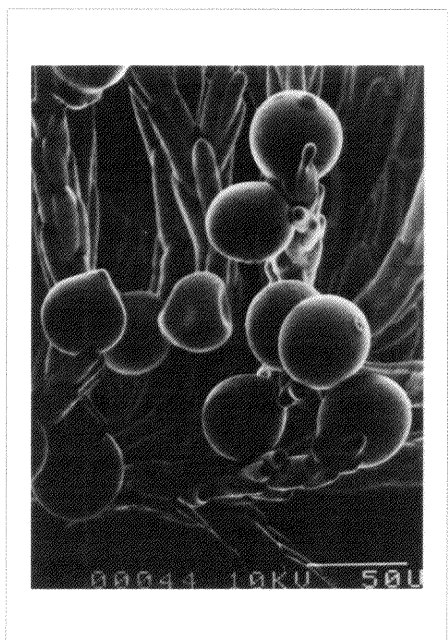


図7 イネの受粉

で、これらの内部構造の相互位置関係を保つには多大の困難が伴う。図7は、イネの受粉の像である。図8は、ヘチマ(*Luffa cylindrica*)の葯の断面像である。タバータム(じゅうたん組織)に花粉がつつまれているのがよくわかる。図9は、ヘチマの花粉の拡大像、図10は、カボチャ(*Cucurbita moschata*)の花粉である。同じウリ科でも品種により花粉の外部形態は著しく異なることがよくわかる。従って、花

粉による分類にもこの方法は適している。図11、12は、ムラサキツユクサ(*Tradescantia reflexa*)の花の内部構造、図13は、ムラサキツユクサの雄しべの毛を構成する細胞群で、1つの球が1つの細胞である。この細胞は、原形質流動(細胞の生死の判定によく用いられる)の観察には恰好の材料でよく知られている。これらの細胞は、観察・写真撮影後も活発に原形質流動を行った。図14は、ダイズの生長点

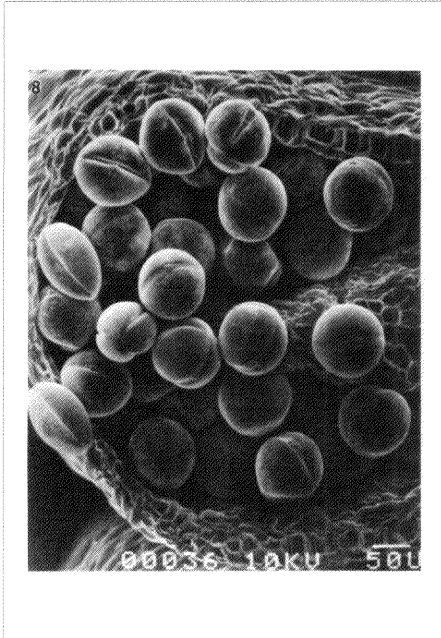


図8 ヘチマ(*Luffa cylindrica*)の葯の断面

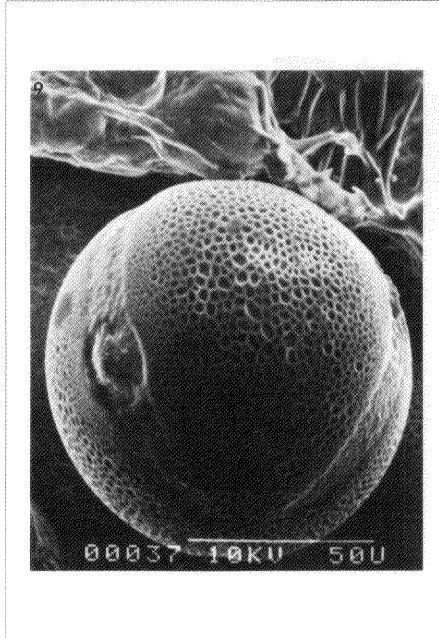


図9 ヘチマの花粉

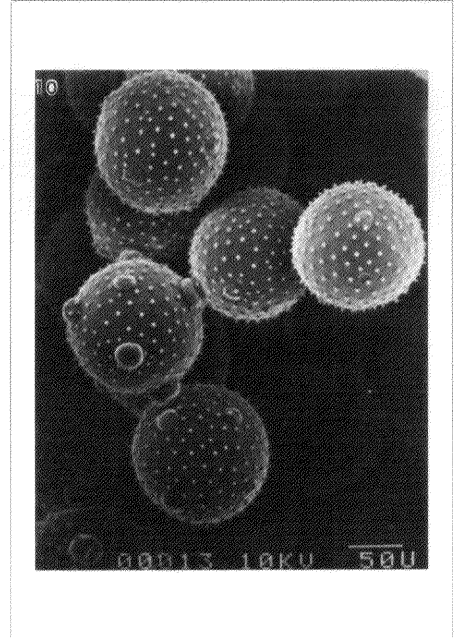


図10 カボチャ(*Cucurbita moschata*)の花粉

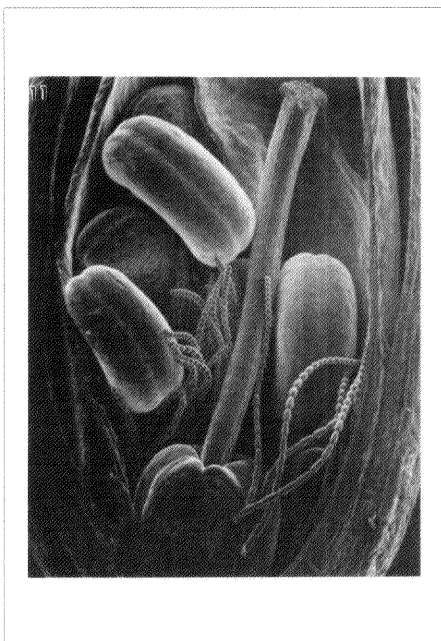


図11 ムラサキツユクサ(*Tradescantia reflexa*)の花の内部

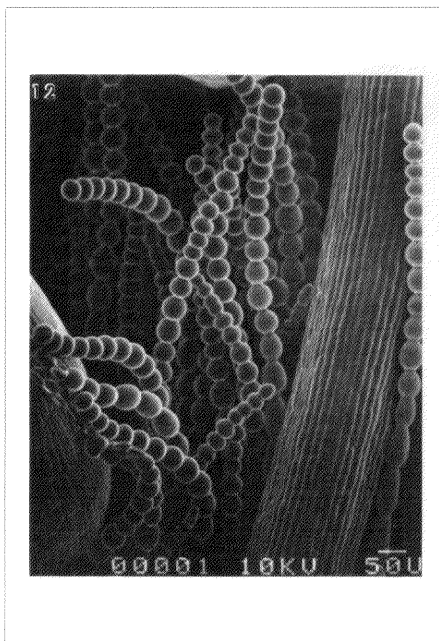


図12 ムラサキツユクサの花の内部
(図11の拡大)

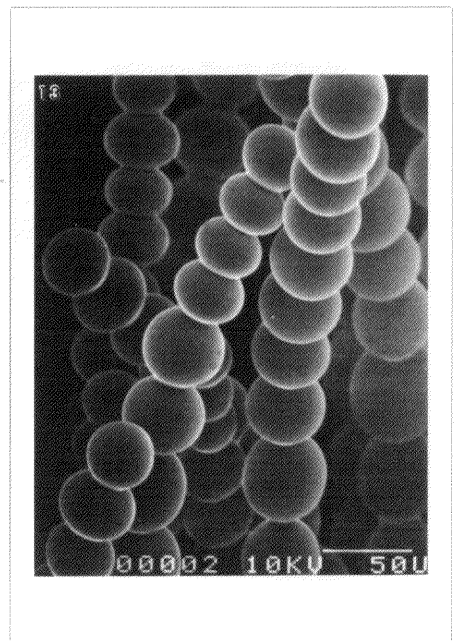


図13 ムラサキツユクサの雄しべの毛を構成する細胞群

で、それを傾斜させて観察したのが図15である。植物の組織、器官形成のもとをたどれば、そのほとんどが生長点から由来しているので、生長点は植物形態形成の要の位置を占めている。しかし、残念ながら、これまで生きた状態の生長点全体の拡大像を得ることができなかった。この方法により、今後、生長点の研究は進展するものと期待される。

図16は、ドクダミ (*Houttuynia cordata*) の茎の横断面像、

図17は、その維管束部の拡大像である。細胞壁の構造の特徴が明確に把握できる。図18、19は、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の若い塊茎のデンプン貯蔵細胞の内部構造・細胞内の表面構造のちがいが認められる。図20は、同じくジャガイモのデンプン粒をもつプラスチドの拡大像である。

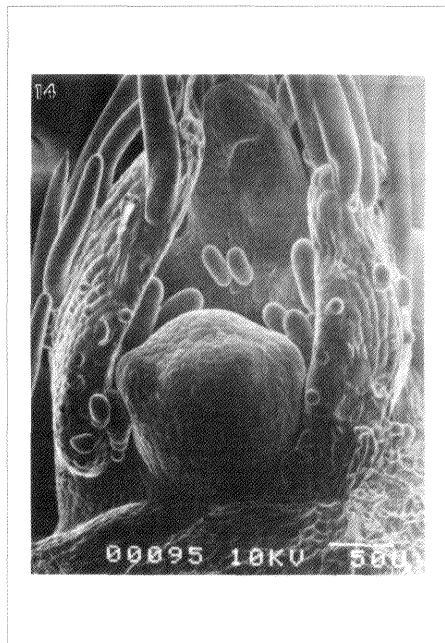


図14 ダイズの生長点

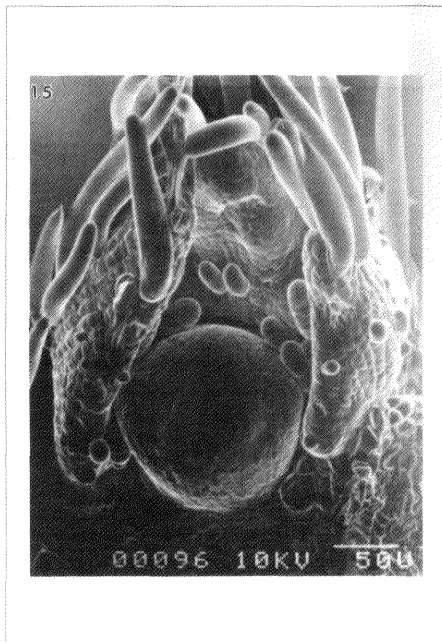


図15 ダイズの生長点
(図14を上方より見たもの)

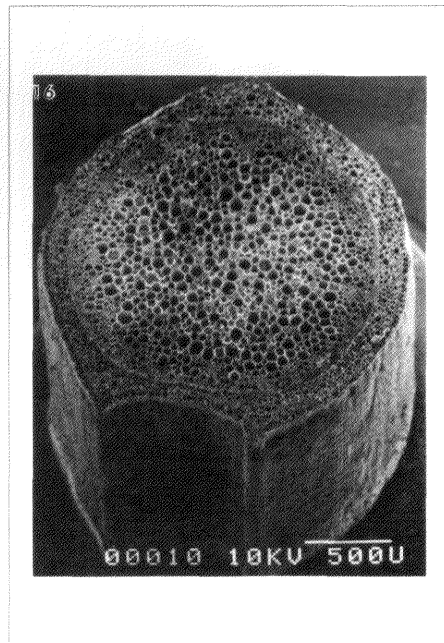


図16 ドクダミ (*Houttuynia cordata*) の茎の断面

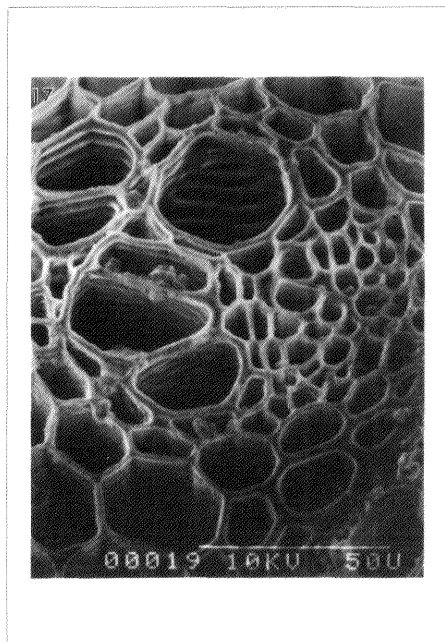


図17 ドクダミの維管束部

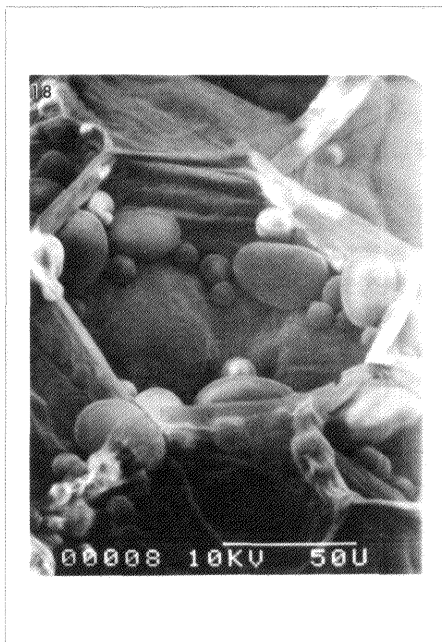


図18 ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) のデンプン貯蔵細胞

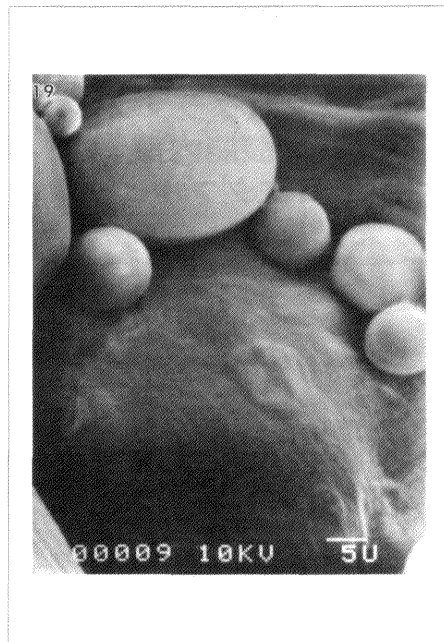


図19 ジャガイモのデンプン貯蔵細胞
(図18の拡大)

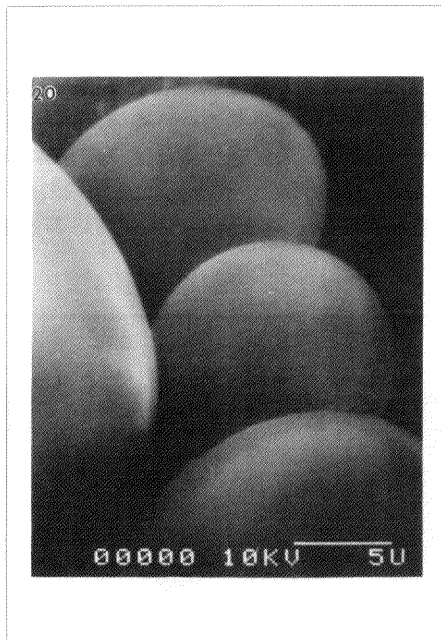


図20 ジャガイモのデンプン粒をもつプラスチック

4. 結 論

筆者達の研究結果から導かれる結論をあげてみると、

- (1) 筆者達が用いた材料の器官、組織、細胞、細胞内の迅速な観察・イメージ構成には、筆者達の考案した方法が非常に有効であった。しかも、この方法の強い支えとなっている

のは、生きた状態か、あるいはそれに極めて近い状態で観察しているということである。

(2) この方法はすべての点で、簡単かつ迅速である。試料作製から写真撮影までに要した時間は約5分である。いわゆる熟練を要せず、初心者にとっても容易である。

(3) この方法は非常に経済的である。試料作製に要した道具はカミソリの刃、汙紙、木工用ボンドだけであった。

(4) この方法には、かならずしも液体窒素は必要ではない。試料台を -20°C 前後に保てればそれで十分であった。

(5) この方法は従来のクライオ走査電子顕微鏡法とは趣が異なっている。筆者達は、さしあたり、この方法を低温走査電子顕微鏡法と呼んでおきたい。

5. おわりに

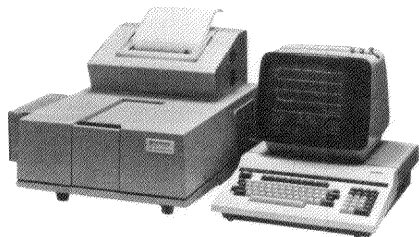
おことわりしておきたいが、筆者達のこの方法は、従来の臨界点乾燥法やクライオ走査電子顕微鏡法の有効性を減ずるものではない。それぞれの方法には、それぞれの長所があることは理の当然とするところである。

筆者達は、ここで紹介したこと以外に、この方法を用いて、水生藻類、生長点、組織培養細胞やプロトプラストにおける細胞分化、形態形成の問題ととも取り組んでいる。それらの研究においても、この方法は大いに効果をあげている。

この研究を行うに際して、日製産業の依田康徳氏、井上雅人氏、森 哲史氏、日立計測器サービスの石黒誠三氏、月野千比朗氏、柴田和美氏、及び日立製作所那珂工場の原行一氏、豊田 孝氏、城戸口輝雄氏、大蔵昭光氏の皆様に大変お世話になった。感謝の意を表す次第である。

Topics

ユーザプログラマブル、
パソコン機能内蔵
228形日立ダブルビーム
分光光度計



124形、200シリーズ、220形の後継機としてパーソナルコンピュータ内蔵の228形ダブルビーム分光光度計を発売いたしました。

■特 長

1. グラフィックディスプレイの採用

スペクトルや時間変化の表示、測光値の表示のほか、測定条件の表示も行ないます。

2. 対話形式の操作

操作方法のガイドはディスプレイに表示され、取扱説明書がなくても操作できます。

3. グラフィックプリンタの採用

スペクトルや時間変化の記録は勿論、XY軸枠の書き込み、測光値の印字、CRT部のハードコピー、BASIC言語で作成したプログラムのリスト打出しなど、多目的用途の感熱式グラフィックプリンタです。

4. ユーザプログラマブル

BASIC言語によりユーザが独自にプログラムを作成することができます。ミニフロピの接続により仕様、機能の拡張、変更も可能です。

5. パーソナルコンピュータとして単独に使用可能

日立パーソナルコンピュータとして使用できます。

6. 高性能グレーティングの採用

定評ある日立製高性能グレーティングの採用により、低速光、高分解を得ました。

7. アナログ信号出力付

波長、測光値ともアナログ信号出力がとり出せます。

228形の分光器部は220形と同一で、試料室は220、320、330形と同等です。既存の付属装置はそのまま使用することができます。

228形は、従来のダブルビーム分光光度計の持つ性能はそのままとし、パソコンを内蔵することでユーザの使用目的に合わせて独自でプログラムが組めるように考えられており、ますます多様化する分光光度計の応用分野に対応できる事を特長としています。

高速アミノ酸分析計によるCarnosineおよびHomocarnosineの分別定量

菅原 朋子** 村山 季美枝*

(昭和56年12月11日受理)

1. 緒 言

CarnosineおよびHomocarnosineは、それぞれHistidine— β -AlanineおよびHistidine— γ -Amino butyric acidで構成されるdipeptidesである。

これらのdipeptidesは、筋肉、脳、髄液中に存在することが報告されているが^{1)~4)}、その生体における役割は明らかではない。近年、Morgolis⁵⁾、Neidle⁶⁾らによりolfactory bulbにはCarnosineが高濃度に存在し、olfactory pathwayに関連したユニークなneuropeptidesであると報告されている⁷⁾。又、先天性代謝異常症において、尿中へのこれらのdipeptidesの排泄が報告されているが、代謝異常症との関連については明らかにされていない^{8)~10)}。

一方、これらのdipeptideはninhydrin陽性物質であるにも拘らず、アミノ酸分析計において、両者の保持時間が完全に一致しているために分離定量が不可能であった¹¹⁾。Perryらの報告¹²⁾にみられるように、20時間を超える分析時間においては、両peptideは分離の傾向を示していた。多くの場合、これらのpeptideの分離同定法としては、カラム分画による前処理後、paper chromatography又はThinlayer chromatographyを用いる方法⁸⁾が主体であった。酸加水分解後、構成アミノ酸の β -Alanine或いは γ -Aminobutyric acidを同定する⁹⁾方法もあるが、いずれの方法も煩雑な操作を必要とした。

著者らは、高速アミノ酸分析計を用い、尿中および髄液中のCarnosineおよびHomocarnosineを、peptide分離の前処理をすることなく、4時間以内で分別定量する方法を確立した。

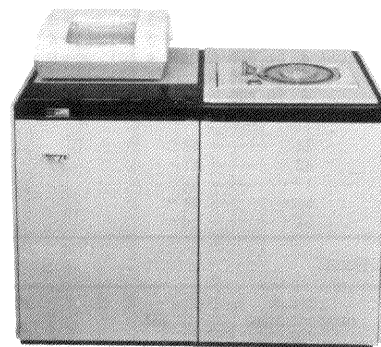
2. 実験材料および方法

2.1 試 薬

L-Carnosineは東京化成、L-HomocarnosineはNakarai Chemicals, Ltd, Titanous(III)chlorideはPierce Chemical Companyの製品を用いた。他のアミノ酸標準物質およびアミノ酸分析計試薬は、Sigma Chemical Company, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Nakarai Chemicals, Ltdから購入した。アミノ酸分析用標準液は、前回の報告と同様に調製した¹¹⁾。

2.2 アミノ酸分析

高速アミノ酸分析は、日立835高速アミノ酸分析計(Data処理, Autosampler付)を用いて、Table. 1に示す条件にておこなった。分析条件のうち、System Aは、日立のInstruction manualに準じているが、分離を改善するために、Buffer切換時間、Column Temp.とその切換時間を一部変



835形日立アミノ酸分析計

更した。又、System Bは、溶離液およびninhydrin溶液の流速を低下させ、その流量に応じて各切換時間を変更した。

従来のアミノ酸分析は、日立KLA-5アミノ酸分析計を用い、既に報告した条件¹¹⁾によりおこなった。

3. Ninhydrin 反応における加熱時間の影響

0.1 μ mole/ml濃度のCarnosine, Homocarnosine, β -Alanine, γ -Amino butyric acidおよびHistidineの各2 mlにNinhydrin試薬1 mlを加え、100℃にて1分、3分、5分、7分、9分、11分の各時間反応させた後、室温に冷却し、Cary17自記分光光度計を用い、440nmおよび570nmの吸収を測定した。

4. Ninhydrin反応における反応温度の影響

上記と同様の反応混合液を、80℃、90℃、100℃の各温度において各10分間反応させた後、上記方法により吸収を測定した。

5. 尿および髄液の前処理

(1) 尿

band-shaped keratopathy患者の24時間蓄尿の一部をBensonらの方法¹³⁾により脱アンモニア処理し、アミノ酸分析の試料とした。

(2) 髄 液

Reye's syndrome患者から腰椎穿刺により得た髄液1 mlにスルフォサリチル酸10mgを添加し、10,000gで10分間遠心分離した上清をアミノ酸分析の試料とした。

6. 結果および考察

(1) 高速アミノ酸分析計におけるSystem AおよびBのchromatogramの比較

高速アミノ酸分析計を用いたSystem AおよびBにおけるクロマトグラムはFig. 1に示す通りである。

System Aは43種のninhydrin 陽性物質を約3時間で分析した。carnosineは170.12分、Homocarnosineが171.52分に溶出し、両peakは、570nmの吸収において約30%、440nm

* 順天堂大学医学部 中央機器分析室 講師 医博

** 助手

Table. I 835 Hitachi High Speed Amino Acid Analyser

Column Size		2.6 ϕ ×250mm	
Resin		Hitachi Custom Ion Exchange Resin #2619	
Analysis Time		System A	System B
		4 hours	6 hours
Flow Rate			
Pump 1 (buffer)		0.275ml/min (190kg/cm ²)	0.180ml/min (120kg/cm ²)
Pump 2 (ninhydrin)		0.300ml/min (30kg/cm ²)	0.200ml/min (20kg/cm ²)
Programme			
Buffer Change (Li-citrate Buffer)			
1 (0.155 N, pH 3.00) → 2		65min (17.88ml)	99min (17.82ml)
2 (0.255 N, pH 3.70) → 3		81 " (4.40 ")	122 " (4.14 ")
3 (0.805 N, pH 3.46) → 4		126 " (12.38 ")	191 " (12.42 ")
4 (1.000 N, pH 4.40) → 5		158 " (8.80 ")	241 " (9.00 ")
5 (1.200 N, pH 7.07) → 6		185 " (7.43 ")	290 " (8.82 ")
6 (0.200 N, LiOH) → 1		197 " (3.30 ")	310 " (3.50 ")
Temp. Change			
34℃ → 43℃		32 min	49min
43 " → 47 "		69 "	105 "
47 " → 66 "		100 "	153 "
66 " → 68 "		176 "	269 "
68 " → 34 "		200 "	310 "

Buffer compositions:

Buffer	Lithium concentration (N)	pH	LiOH (g/l)	Li citrate (g/l)	LiCl (g/l)	Citric acid (g/l)	Ethanol (ml/l)	Thio-diglycol (ml/l)	25% Brij-35 (ml/l)
1st	0.155	3.00	—	9.80	2.12	35	40	5	4
2nd	0.255	3.70	—	9.80	6.36	13	30	5	4
3rd	0.805	3.46	—	9.80	29.67	12	—	—	4
4th	1.000	4.40	—	9.80	38.14	3.3	—	—	4
5th	1.200	7.07	—	47.00	29.68	—	—	—	4
6th	0.200	—	8.40	—	—	—	—	—	4

Ninhydrin reagent:

Ninhydrin 80g
Methylcellosolve 3l
5 M sodium acetate buffer (pH 5.5) 1l
Titanium(III) chloride (15%) 6.8ml

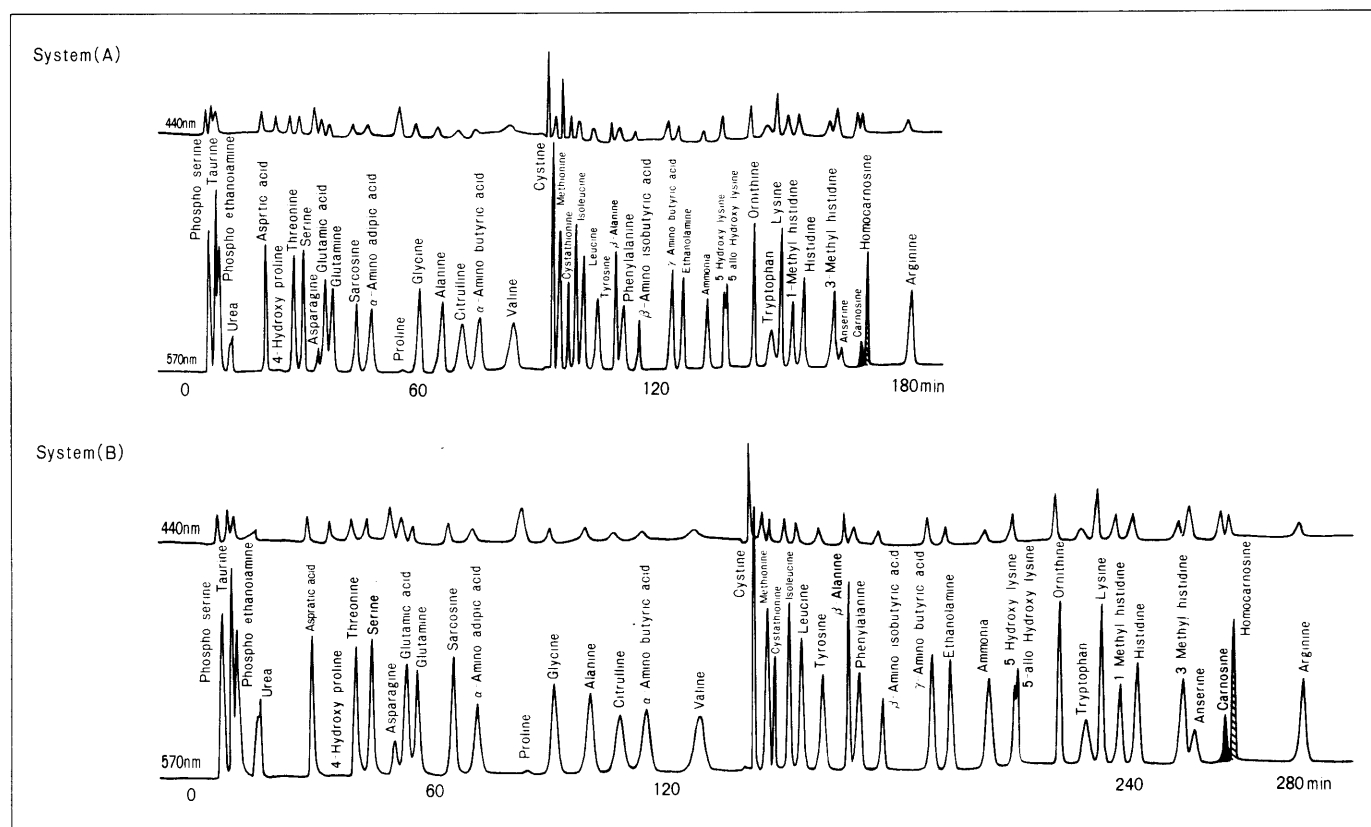


Fig. 1 Typical chromatogram of 43 ninhydrin-positive compounds obtained with a high-speed amino acid analyser. The amount of each amino acid to be analysed was 2.5 nmole. The following amino acids were prepared: cystathionine (1.0 nmole); proline, sarcosine, β -alanine and anserine (5 nmole); and urea (250 nmole).

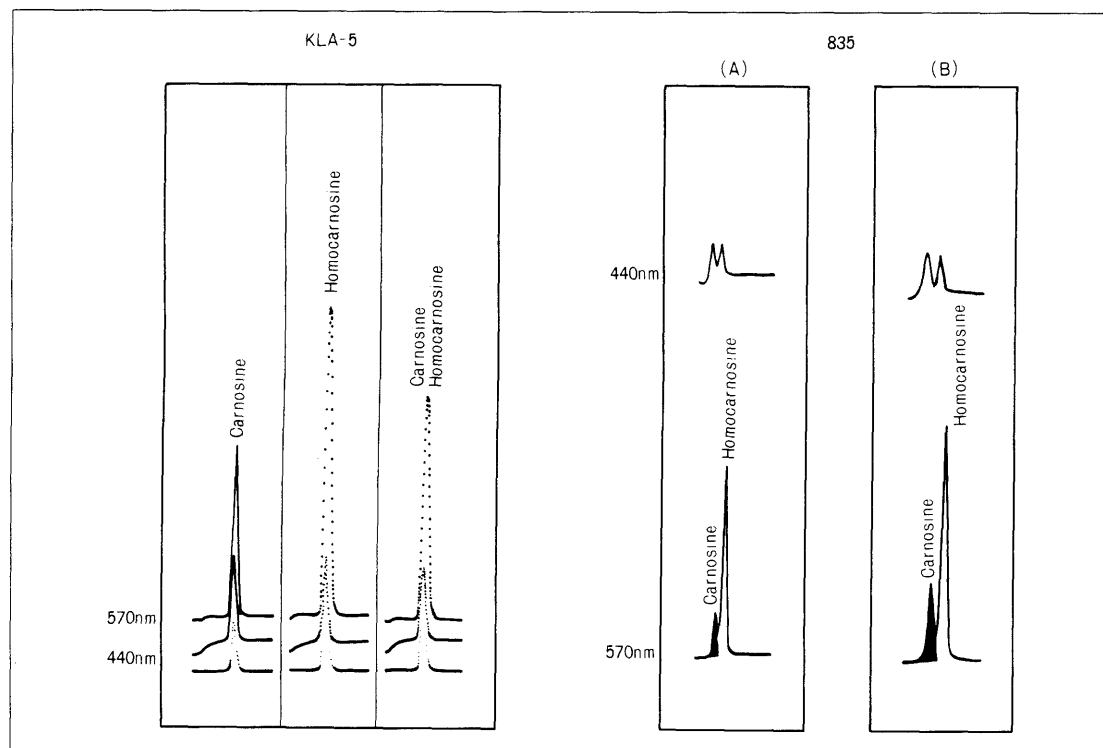


Fig. 2 Chromatograms of carnosine and homocarnosine obtained from KLA-5 and 835 amino acid analyser.

Table. 2 Colour Values of Carnosine and Homocarnosine

System	Peptide	Retention time (min)	Area		Ratio $\frac{440\text{nm}}{570\text{nm}}$	Reaction time (min)	Buffer flow rate (ml/min)	Reaction temp (℃)
			440nm	570nm				
KLA-5								
	Car	245	0.4×10^4	1.1×10^4	0.404	6.3	0.63	95
	Hcar	246	0.5×10^4	2.1×10^4	0.246			
835								
(A)	Car	170.12	3.2×10^5	3.4×10^5	0.94	1.70	0.275	98
	Hcar	171.52	2.9×10^5	13.2×10^5	0.22			
(B)	Car	261.29	5.3×10^5	7.9×10^5	0.67	2.62	0.180	98
	Hcar	263.36	3.9×10^5	21.5×10^5	0.18			

において約80%の分離を示した。System Bにおいては、分析時間が100分延長したが各アミノ酸の分離は一段と上昇し、Peak Areaが平均System Aの約1.6倍を示した。特にGlutamic acidとGlutamineの分離が改善された。System BにおけるCarnosineは261.29分、Homocarnosineが263.36分に溶出し、570nmにおいても70%以上の分離を示し、440nmにおいては100%に近い分離を示した。

(2) CarnosineおよびHomocarnosineの分離同定

日立KLA-5アミノ酸分析計で得たCarnosineおよびHomocarnosineのパターンを高速アミノ酸分析計の両Systemによるパターンと比較し、Fig. 2に示した。

従来の分析において、CarnosineはHomocarnosineに比し570nmの発色率がやや低下したが、440nmではほぼ同一の発色率を示した。一方、高速アミノ酸分析における両peptideの発色率は、440nmで大差がないのに対し、570nmではCarnosineが著しい低下を示した。

これらのPeak Area値および両波長の面積比(440nm/

570nm)をTable. 2に示した。

Homocarnosineにおける440nm/570nmの面積比は、KLA-5で0.246、System Aで0.22、System Bで0.18と著しい変化はなかった。それに対しCarnosineのそれはKLAで0.404、System Aで0.940、System Bで0.67と分析条件により著しい変化を示した。

分析条件の差異の一つにninhydrin反応時間の相違があった。加熱時間はKLA-5で6.3分、System Aで1.7分、System Bで2.62分を要した。

以上の面積比の相違が分析計によるものではなく、反応条件に依存しているか否かを明らかにするために、次の二つの実験をおこなった。

(i) Ninhydrin反応における時間の影響

Carnosine、Homocarnosineおよびそれらを構成するアミノ酸、 β -Alanine、 γ -Aminobutyric acid、Histidineについて、Ninhydrin反応の時間の影響を観察した。Fig. 3に示すように、Homocarnosineにおいては440nm、570nmの吸収

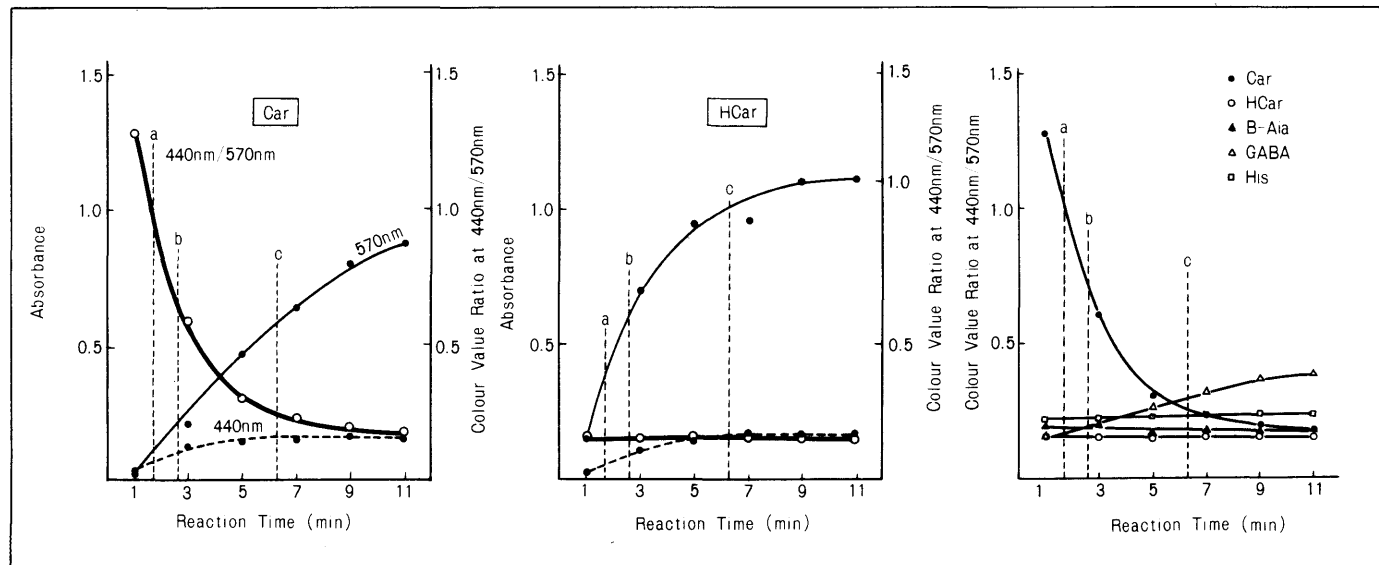


Fig. 3 Effect of ninhydrin reaction time.

が9分で定常状態となり、a (System Aの加熱時間)、b (System Bの加熱時間)、c (KLA-5の加熱時間)の各時間における440nm/570nmの面積比がほぼ一定の値を示した。それに対してCarnosineでは、

440nmが5分で定常状態に達しているのに対し、570nmの吸収は11分を経過してもまだ上昇中であり、反応の遅さを示していた。

その結果、440nm/570nmの面積比は指数関数的に減少し、a, b, c各点において著しい相違を示した。また、構成アミノ酸における440nm/570nmの面積比の時間に対する変化は少なく、上記Carnosineの相違は、構成アミノ酸に直接関連するものではなくdipeptideとしての立体構造に由来するものと考えられた。

(ii) Ninhydrin反応における反応温度の影響

Ninhydrin反応における反応温度の影響は、Fig. 4に示す通りであった。100℃、90℃における各アミノ酸、ペプチドの面積比に大差はなかったが、80℃においては、Carnosine、 β -Alanineに変化がみられた。前者は後者の約4倍の変化を示した。

従来のアミノ酸分析計において、反応温度を80℃に低下することにより、感度の減少はあるが、Carnosine或いはHomocarnosineの同定が可能となることを示唆した。

以上の二実験結果により、CarnosineのNinhydrin反応速度は、構成アミノ酸に起因すると思われるよりむしろ、dipeptideの構造に問題があるのではないかと考えられた。特に440nmの吸収物質の生成速度は速く、Homocarnosineと大差がないことから、Ruhemann's purple形成の段階¹⁴⁾において、Carnosine、Homocarnosineの構造の違いがその速度に影響を与えているのではないかと考えられた。

この現象が高速アミノ酸分析計におけるCarnosineを特徴づけ、Homocarnosineとの分別定量を容易にした。

(3) 尿中および髄液中のCarnosine、Homocarnosine同定

Fig. 5に髄液に含まれる遊離アミノ酸のクロマトグラムを示した。172min付近に溶出したpeakは570nmの吸収が大であることから、Homocarnosineであることは明らかであった。高橋らは、小児髄液中のHomocarnosine量を測定し、疾患との関連を検索した^{15), 16)}。

Fig. 6にband-shaped keratopathy patientの尿中遊離ア

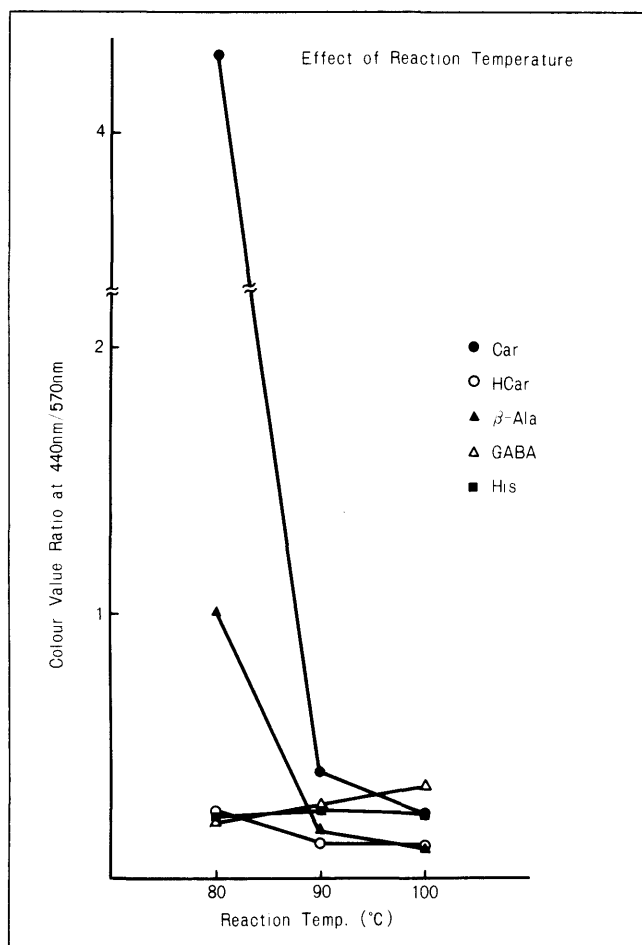
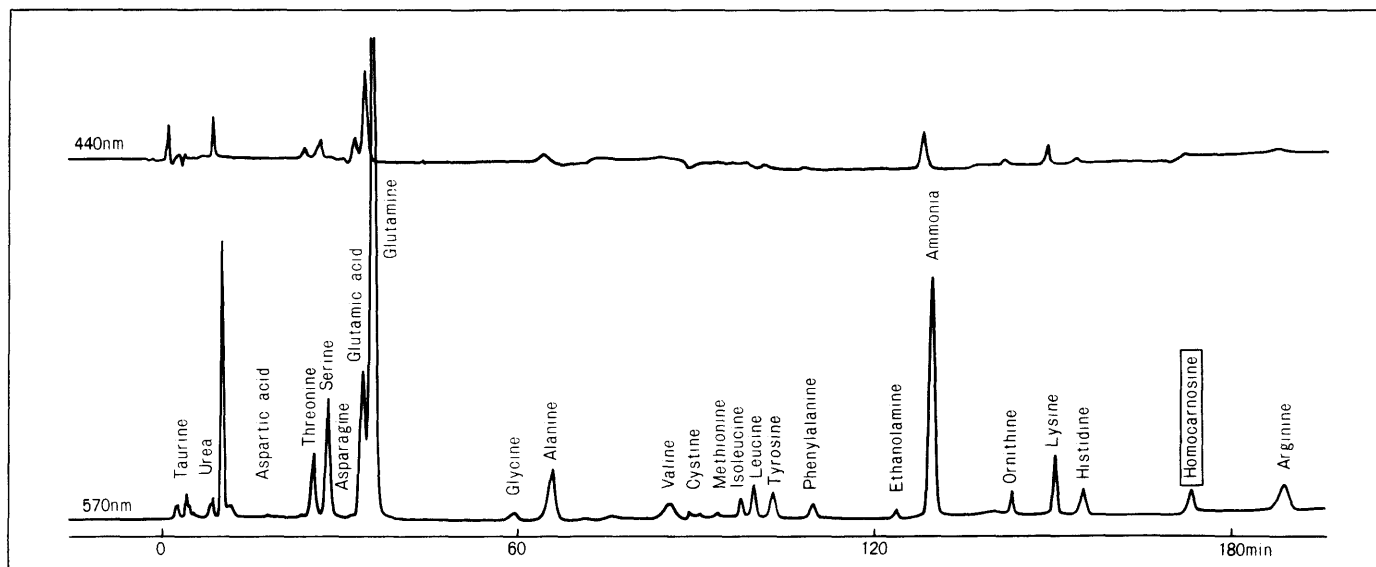
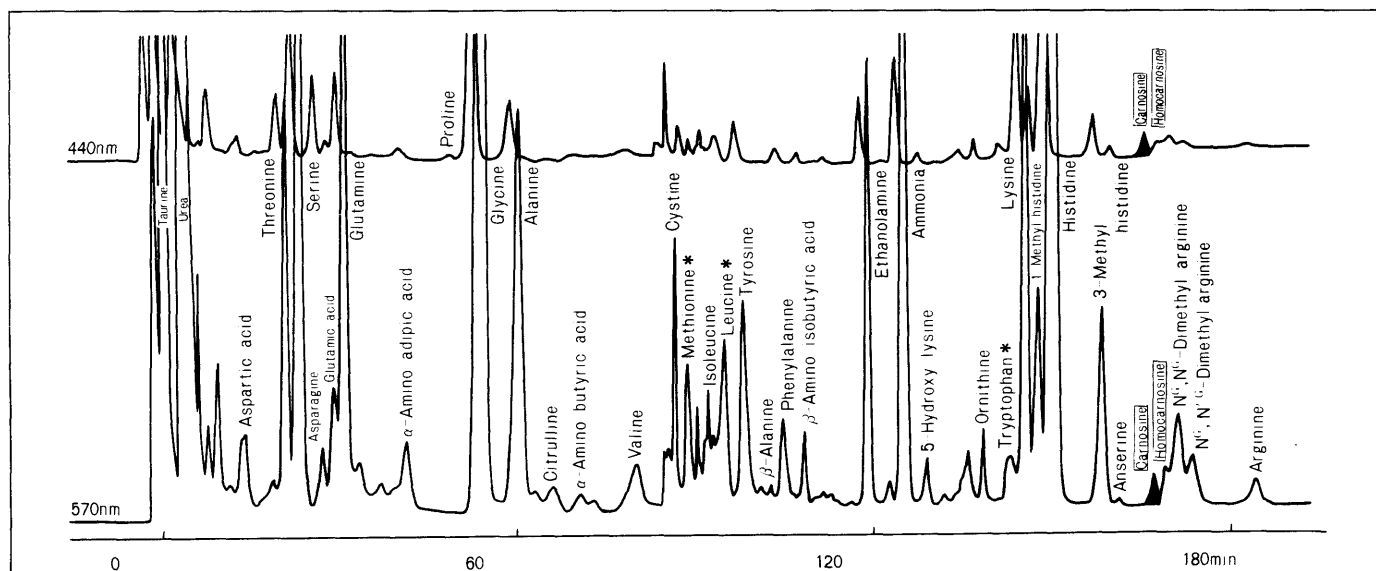


Fig. 4 Effect of ninhydrin reaction temperature.


 Fig. 5 Chromatogram of amino acids in 33.3 μ l of CSF collected from a Reye's syndrome patient.

 Fig. 6 Chromatogram of amino acids in 50 μ l of urine collected from a bandshaped keratopathy patient. The asterisks indicate peaks that seemed to contain other unknown compounds.

ミノ酸のクロマトグラムを示した。

多数の微量の未知peakが観察されるが、Carnosineの明らかなpeakに加え、Homocarnosine peakも観察された。これらの物質の排泄と病因との関係については明らかにされていない。

7. 結 言

CarnosineとHomocarnosineの同定は高速アミノ酸分析計を用い、迅速かつ正確におこなうことが可能となった。高速アミノ酸分析計は、そのNinhydrin反応時間が短縮されていることから、CarnosineのRuhemann's purple形成が著しく低下した。その結果、System Aの分析条件においてCarnosineは170.12分、Homocarnosineは171.52分に溶出した。両peptideの440nm/570nmの面積比は前者が0.94、後者が0.22であった。相互の分離は440nmにおいて約80%を示し、570nmにおいては約30%であった。System Bにお

いて、Carnosineは261.29分、Homocarnosineは263.36分に溶出し、両者の440nm/570nmの面積比は、各0.67、0.18を示した。分離度は両波長共に改善された。いずれの方法においても両peptideの同定および定量が可能となった。

参考文献

- 1) N. Marks, R. K. Datta and A. Lajtha, J. Neurochem. 17, 53 (1970).
- 2) T. L. Perry, K. Berry, S. Hansen, S. Diamond and C. Mok, J. Neurochem. 18, 513 (1971).
- 3) T. L. Perry, S. Hansen and J. Kennedy, J. Neurochem. 24, 587 (1975).
- 4) T. Kitagawa, Metabolism 8, 1412 (1971).
- 5) F. L. Margolis, Science 184, 909 (1974).
- 6) A. Neidle and J. Kander, Brain Research 80, 359 (1974).

- 7) W. A. Klee, Advan. Protein chem. 33, 243 (1979).
- 8) T. L. Perry, S. Hansen, B. Tishler, R. Bunting and K. Berry., The New Eng. J. Med. 277, 1219 (1967).
- 9) S. P. Bessman and R. Baldwine, Science 135, 789 (1962).
- 10) J. Levenson, K. Lindahl-Kiessling and S. Rayner, Lancet 2, 756 (1964).
- 11) K. Murayama and N. Shindo, J. Chromatogr. 143, 137 (1977).
- 12) T. L. Perry, D. Stedman and S. Hansen, J. Chromatogr. 38, 460 (1968).
- 13) J. V. Benson Jr. and J. A. Patterson, Anal. Biochem. 13, 265 (1965).
- 14) P. J. Lamothe, and P. G. Mc Cormick, Anal. Chem. 45, 1906 (1973).
- 15) H. Takahashi, Brain & Development 3, 255 (1981).
- 16) H. Takahashi, Brain & Development 3, 263 (1981).

Topics

655形日立高速液体クロマトグラフ



ダブルピストン方式の無脈流送液ポンプを採用したモジュラータイプの高速液体クロマトグラフです。特に操作の簡便性とメンテナンス個所を最少にした設計で、ルーチン分析に適したHPLCであり、次のような特長をもっています。

■特 長

- (1) 独特のカムに駆動されるダブルピストン方式により、脈流を最小に抑えています。ダンパーを採用していないため、ポンプ流路内のデッドボリュームが極めて小さく、迅速な液の交換が可能です。
- (2) チェック弁は2組です。レシプロ方式のポンプで最もトラブルの起きる個所はチェック弁ですが、チェック弁の数を2組に減らし信頼性を上げています。メンテナンス個所が少ないことは、ルーチン分析用の装置には重要なことです。
- (3) 液体の圧縮率補正は自動的に実行されています。移動相の種類に関係なく、液体の圧縮率補正が自動的に実行されています。

従って、移動相の種類により調節す

る必要がありません。

- (4) 流路系は全て前面に露出しており、液漏れがあっても一目で判ります。また圧力の上、下限リミッターが付いているから異常圧力上昇や、液漏れなどによる圧力低下を検知し、ポンプが自動停止します。

■仕 様

圧力	400kg/cm ² (6,000psi)
圧力リミッター	上限: 0-400kg/cm ² (6,000psi) 下限: 0-100kg/cm ² (1,500psi)
流量	連続可変 0.1-9.9ml/min (0.1ml/min毎に設定可)
流量設定精度	±2.5%又は±0.03ml/min, いずれか大きい方、但し、0.1-5.0ml/minにおいて
流量安定度	±1%又は±0.005ml/min, いずれか大きい方、但し、0.1-5.0ml/minにおいて
溶媒圧縮率補正	自動 但し、0.1-5.0ml/minにおいて
接液部材質	ステンレス、サファイア、ルビー、ふっ化炭素樹脂
大きさ	幅26cm, 高さ20cm, 奥行50cm

■638-41形

日立波長可変UVモニタ

液体クロマトグラフィー用の波長可変UV検出器です。低ノイズで、溶媒の屈折率変化の影響を抑えた設計なので、安定したベースラインが得られます。また、操作を簡単にするためプッシュボタン方式を採用し、ベースラインの零合せもワンタッチで行うことができ、次のような特長があります。

■特 長

- (1) 195-350nmの波長を選択できます。

- (2) 低ノイズです。5mm光路長のフローセルを用いたとき、ノイズレベルは 5×10^{-5} Abs以下です。

- (3) 溶媒の屈折率変化の影響を最小に抑えています。このため、グラジエント分析を行ったとき、ベースラインが安定しています。またポンプの脈流がベースラインに現れません。更に、試料注入時の溶媒のショックが極めて小さくなっています。このように、高感度で分析する場合にも安定したベースラインが得られるため、微量サンプルの分析に威力を発揮します。

- (4) 操作の簡単なプッシュボタン方式です。レンジ切換え、ベースラインの零点合せなどの操作は、プッシュボタンを押すだけでワンタッチで行えます。
- (5) オートゼロ機能が付いているからワンタッチでベースラインの零点合せができます。また、外部からのリモート操作によってもオートゼロが可能です。

- (6) フローセルは、全て石英製で、配管もテフロンチューブを用いているので、耐薬品性に優れています。

■仕 様

波長範囲	195-350nm
波長精度	±2nm
波長幅	10nm
レンジ	R, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56吸光度フルスケール (R: 0.0025吸光度フルスケールに相当)
ノイズ	0.5×10^{-4} Abs (250nm, セル内空気)
オートゼロ	フルスケールの1% (0.005-2.56吸光度フルスケール)
フローセル	石英, 5mm光路長
出力	10mV (記録計用) 1V/Abs及び0.4V/Abs (データ処理用)
レスポンス	0.35秒及び1.1秒 (又は0.7秒及び2秒)
大きさ	幅26cm, 高さ20.5cm, 奥行53.8cm

解 説

X-650形日立微小部X線分析装置

大高 正* 神田 公生*

(昭和57年2月3日受理)

1. はじめに

微小部X線分析装置(Electron Probe X-Ray Micro-Analyzer, 以下EPMAと略す)は、微小部の元素分析の有力な手段として金属・鉱物などの材料の基礎研究、半導体材料分野での物性研究、生産ラインにおける品質管理等、広い分野で用いられている。

最近のEPMAは、高性能走査形電子顕微鏡としての高分解能像観察機能と同時に、微小領域の構成元素の定性・定量分析が正確かつ迅速に行なえる装置が強く望まれている。これらのニーズに応えるX-650形EPMAを製品化したので、以下、本装置の主な特長、仕様の概略について述べる。

2. 特 長

2.1 スルー・ザ・レンズ方式による高精度X線分析

図1は対物レンズ部の断面図である。

X線の取出しは、対物レンズの磁極間隙を通して取り出すスルー・ザ・レンズ方式で、試料からの散乱電子がこのレンズの間隙に生ずる磁場によりトラップされ、低バックグラウンドで精度の高いX線分析を可能にする。エネルギー分散形X線検出器(EDX)に対しても波長分散形X線分光器(WDX)と同様に、磁極間隙を通してX線を取り出す構造でシステムピークのない高精度X線分析を可能にした。

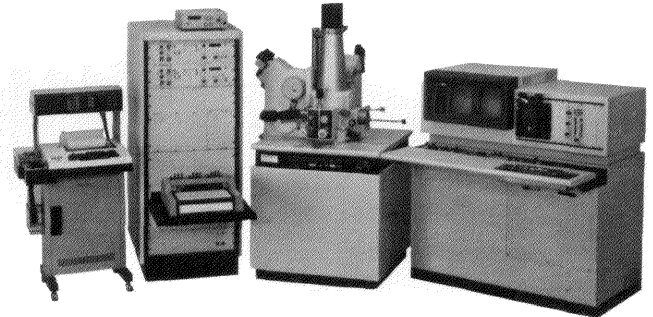
表1にWDXとEDXの特長比較を示す。

高感度X線分析を得意とするWDXと、超高速分析を得意とするEDXの特長を最大限に生かすことにより、高感度で、高速分析ができる汎用性の高いX線分析が可能になった。

2.2 安定な微小電子プローブを形成する電子光学系

図2に電子光学系の構成を示す。

EPMAではX線分析に長時間を要するため、電子ビーム



X-650形日立微小部X線分析装置(X線自動計測システムを含む)

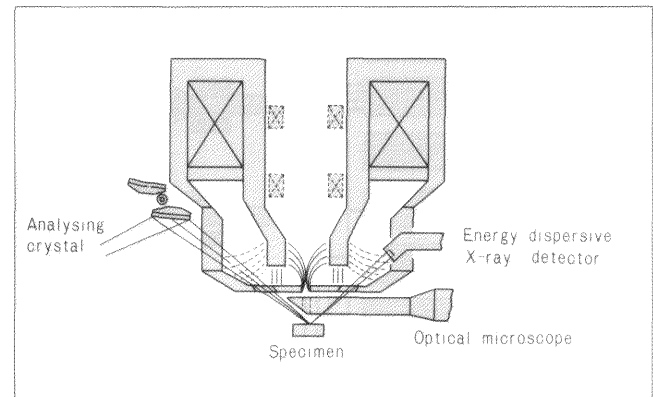


図1 スルーザレンズ方式対物レンズ

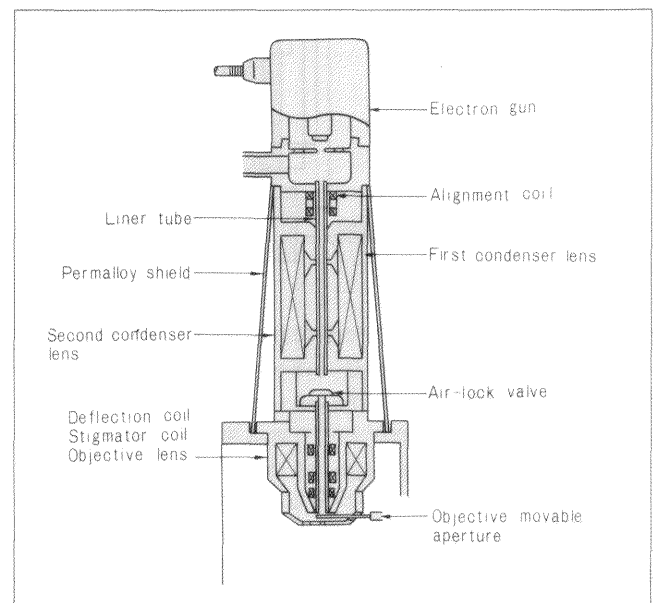


図2 電子光学系の構成

表1 WDXとEDXの比較

	WDX	EDX	備 考
元素分析範囲	${}_{4}\text{Be} \sim {}_{92}\text{U}$	${}_{11}\text{Na} \sim {}_{92}\text{U}$	
スペクトル分解能	$\sim 13\text{eV}$	$\sim 150\text{eV}$	Mn-K α 線の半価全幅
プローブ電流	$10^{-9} \sim 10^{-6}\text{A}$	$10^{-11} \sim 10^{-9}\text{A}$	
検出限界濃度	数100ppm	数1000ppm	但し、均一組成での限界値を示す。
定量分析精度	0.5~1%	0.5~1%*	*極近接スペクトルの場合には精度が悪くなるときがある。
測定時間	20~90分	~200秒	定性分析の場合
最大面分析域	$\sim 0.4\text{mm}$ 角	$\sim 5\text{mm}$ 角	
試料設定許容量	数 μm 以内	数mm以内*	*定量分析の場合には $\sim 0.5\text{mm}$ 以内
操作性	より複雑	タイプライタ同等	
保守性	検出器用ガス要	液体窒素要	

* 日立製作所 那珂工場 電子装置設計部

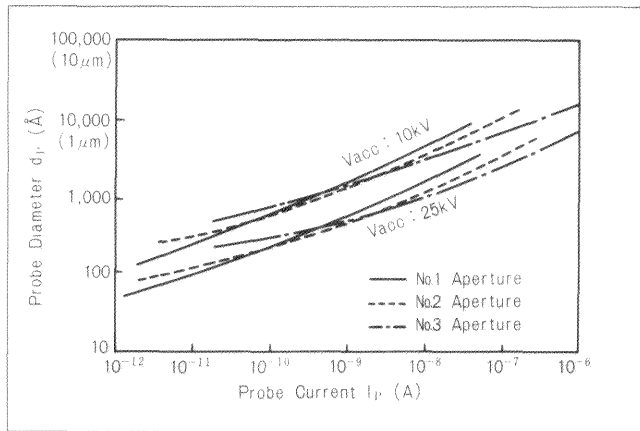


図3 プローブ電流とプローブ径の関係

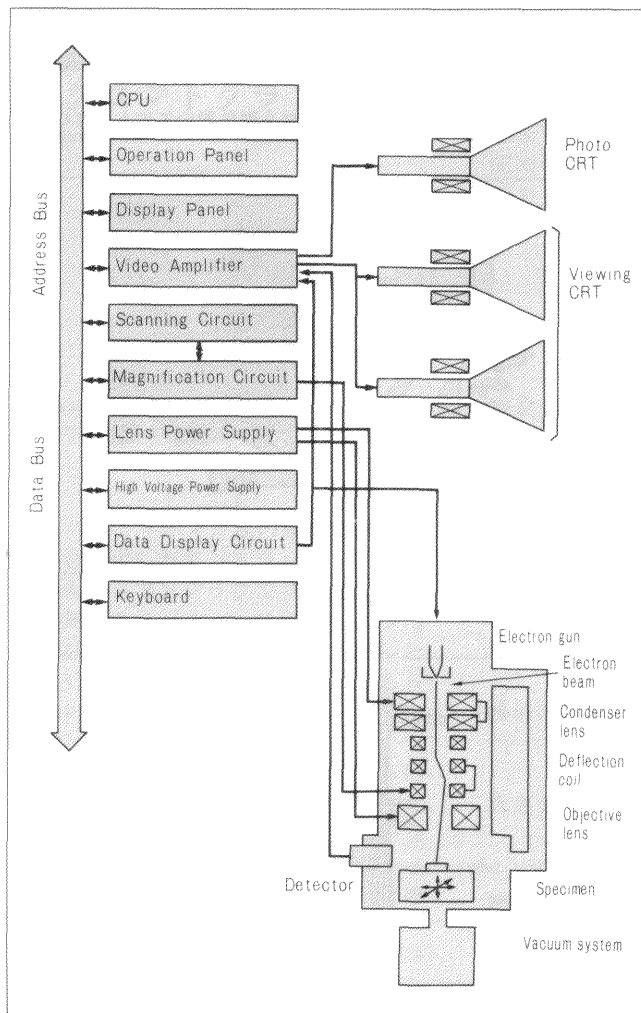


図4 X650の制御系統図

が長時間安定でなければならない。試料への照射電流量は二次電子像観察(10^{-11} A), X線分析時($10^{-7} \sim 10^{-8}$ A)とでは約3桁から4桁異っており、これらの条件を満足させるために、電子光学系は3段電磁レンズ縮小系とし、コンデンサレンズは一つの励磁コイルによる一体化2段レンズで

構成した。試料面上での最小プローブ径は60Åである。図3に対物レンズの絞りを変えたときのプローブ電流と、プローブ径との関係を示す。プローブ電流安定度は $5 \times 10^{-3}/\text{hour}$, 試料面上でのプローブ位置安定度は $0.1 \mu\text{m}/10\text{min}$ が得られる。電子線通路には薄肉のライナーチューブを設け、コンデンサレンズ、アライメントコイル、偏向コイル等、ガス放出の多い部材を真空外に配備し、清浄な真空が得られるようにしている。

2.3 コンピュータ内蔵による多機能化と操作性の向上

X-650形は、マイクロコンピュータを内蔵させ、電子光学系の電磁レンズ制御、倍率の自動補正表示、自動焦点合せ、自動的な画像の明るさ・コントラストの調整など、各種の自動化を図った。図4はコンピュータによるX-650形

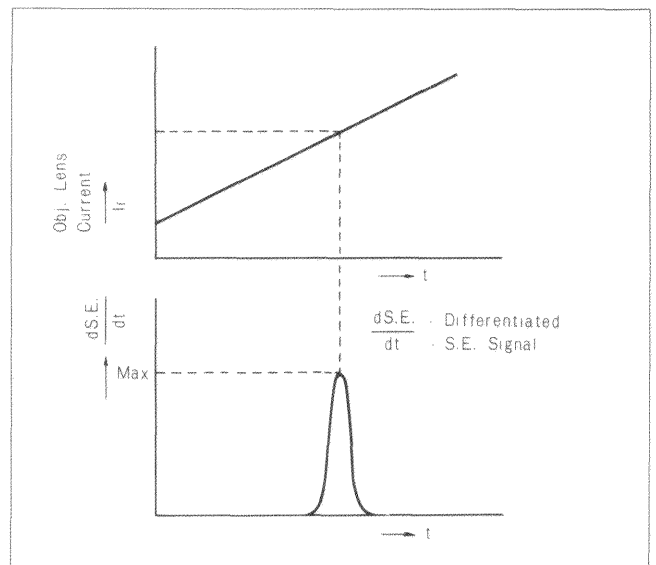


図5 自動焦点検出の原理

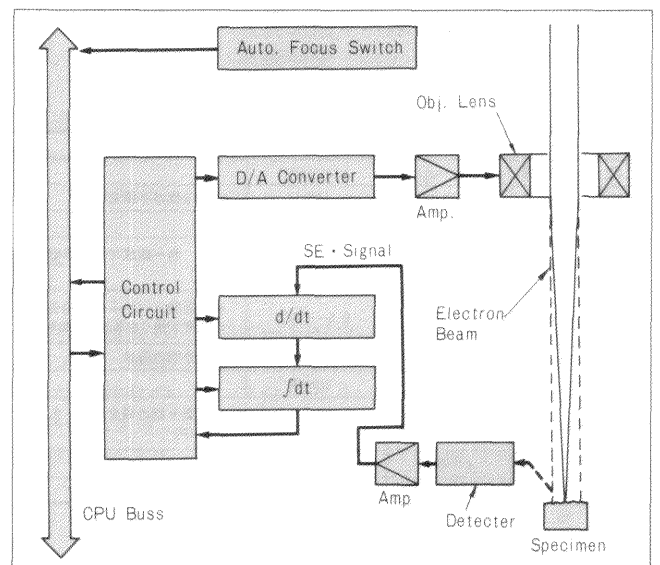


図6 自動焦点システムの構成

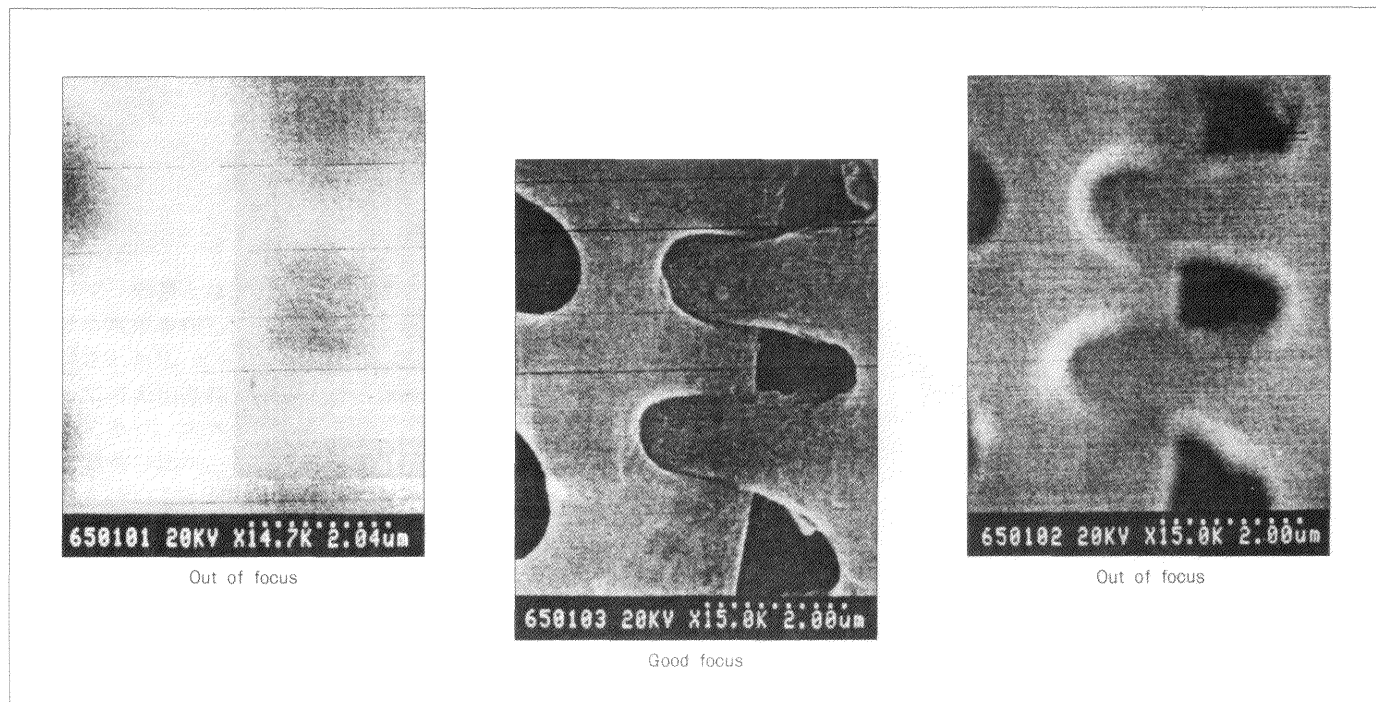


図7 自動焦点合せの例

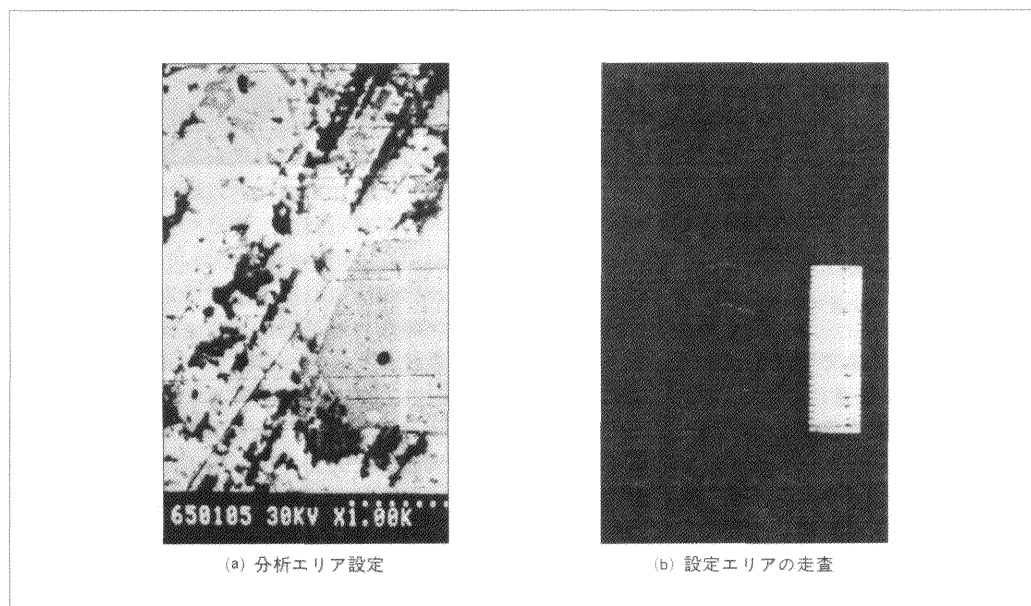


図8 平均濃度分析モード

の制御系を表わしたものである。

コンピュータ内蔵により種々の新しい機能が追加されたが、その中で自動焦点合せ、平均濃度分析について述べる。

2.3.1 自動焦点合せ

図5に自動焦点検出の原理を示す。電子プローブを試料上で走査させた場合、正焦点条件では二次電子(SE)信号はシャープな波形となり、その微分信号波高値は最大となるので、微分値が最大になるように対物レンズ電流を変えてやればよいことになる。

図6は自動焦点システムの構成を示す。

二次電子信号の演算制御及び記憶、正焦点の判断は、コンピュータにより実行され、最適対物レンズ励磁電流がコンピュータの指令により設定される。このような構成により、1ケのスイッチを押すだけで数秒以内で自動的にフォーカスされるので操作性が大幅に向上した。

2.3.2 平均濃度分析モード

元素分析を行なう場合、局所的な元素濃度ではなく、平均濃度として分析したい場合がしばしば生じる。従来は対物レンズで電子プローブをデフォーカスさせて拡大し行っていたが、分析位置、および分析エリアの設定が正確に出

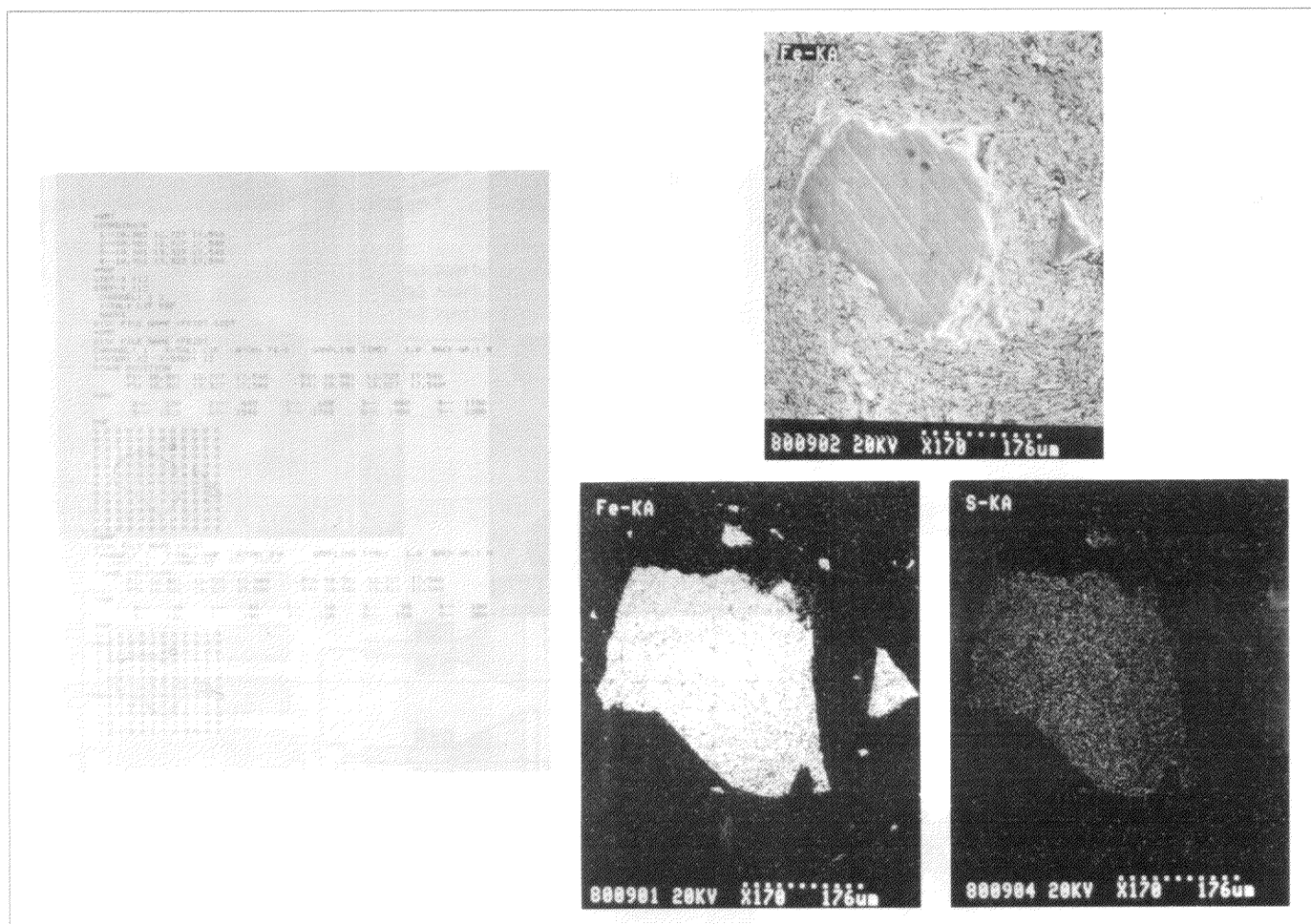


図9 ステージコントロールによる面分析の例

来なかった。

X-650形では、収束された電子プローブのままで平均的に高速走査を行なうモードで分析面積、形状を任意に選択、可変できるようにし、正確な分析領域設定、平均濃度分析ができる。

2.4 コンピュータ制御によるX線自動計測システム

各種広範囲の分析目的に応じて、コンピュータに組込まれた測定命令をプログラムし、X線分光器の駆動、X線計数などを連続的に実行させることにより、迅速なX線の自動測定ができる。

自動測定には、試料中に入っている元素を同定する高速定性分析モード、および元素の含有量を測定する定量分析モードがあり、定量分析モードで得られた測定データは、コンピュータに内蔵されたZAF法、あるいはBence-Albee法により定量補正計算が行なわれ、試料の元素分析に対して大幅な省力化をはかることができる。

さらに試料微動装置の移動に対してもステージコントロール命令により自動的に動作させることができるため、各測定点に対して連続的に分析することができるようになった。図9にステージコントロールによって行なわれたFeS₂の面分析の例を示す。

3. 主な仕様

- | | |
|-------------------------------|---|
| (1) 元素分析範囲 | 5B~92U (4Beオプション) |
| (2) 分析波長範囲 | 0.89~88 Å |
| (3) 加速電圧 | 1~40kV(1kVステップ) |
| (4) 二次電子像分解能 | 60 Å 保証
X線分析位置で100 Å 保証 |
| (5) 倍率 | ×20~×200,000 |
| (6) プローブ電流可変範囲 | 10 ⁻⁶ ~10 ⁻¹² A |
| (7) 試料微動 | X; Y=0~25mm, Z=5~30mm
傾斜: -5~45°, 回転: 360° |
| (8) 試料サイズ | 最大50mm(径)×20mm(高) |
| (9) コンピュータ内蔵ディスプレイ | |
| (a) オートフォーカス | |
| (b) オートブライツネス/コントラストコントロール | |
| (c) 自動データ表示 | |
| (d) 平均濃度分析モード, 点, 線分析設定モード, 他 | |

4. まとめ

以上、特長および仕様について記述したが、像の高分解能観察と高精度X線分析との両立に成功し、しかも、コンピュータ内蔵により操作性の優れた汎用性の高いEPMAが完成したと言えよう。

ゼーマン効果を応用した原子吸光分析法*

小泉 英明**

(昭和57年2月3日受理)

ゼーマン効果とは、磁場によってスペクトル線が数本に分裂する現象を指し、1897年にオランダのZeemanによって発見された¹⁾。ゼーマン効果の発見は、当時まだLorentzによって考え出されて間のなかった電子の存在を決定づけたものであり、スペクトル線のシフトの大きさから電子の質量と電荷の比が、そして円偏光の回転方向から電子が負の電値を持つことが明らかにされた。第2回のノーベル物理学賞は、1902年にZeemanとLorentzに与えられた。ゼーマン効果はこの後、スペクトル線の帰属など基礎物理学の領域で研究されることはあっても、発見後半世紀以上の間、実用装置への応用が試みられたことはなかった。

最初に実用装置への応用を試みたのは、カリフォルニア大学のHadeishiである。水銀の同位体の一つである¹⁹⁸Hgをランプに封入し、同位体シフトとゼーマン縦効果を組合わせた水銀分析計を試作し、1972年にAppl. Phys. Lett. 誌に発表した²⁾。一方、我々は、1972年から独自の研究を開始し、発光線のゼーマン横効果を用いたゼーマン原子吸光法を開発した^{3),4)}。そして、この原理に基づく501形ゼーマン水銀分析計を1974年に完成した⁵⁾。この装置では、毛髪、土壌などの試料を前処理なしに直接装置に導入し、含有される水銀の量を30秒以内に知ることができる。発光線のゼーマン横効果を用いた方法とは、普通の水銀を封入した無極放電ランプに15kGの磁場を印加し、磁場と垂直な方向から取り出した光束を直線偏光に変え吸収セルに導くものである。ゼーマン効果による原子線の分裂の大きさは0.005nm程のわずかなものであり、ゼーマン効果による分裂線を直接分離して観測することは、よほど高分解の大形分光器を使用しない限り困難である。しかし、ゼーマン効果に伴う偏光の性質を利用すると、0.005nmしか離れていないゼーマン成分を容易に分離することができる。ゼーマン効果の横効果を利用するこの方法は、特殊な同位体効果を必要としないので、水銀のみならず一般の元素に拡張できるものであった。しかし、一般の元素に拡張するためには、この方法にも問題点があった。光源に磁場を印加するので、強い磁場の中で、安定して発光する光源が必要となる点である(図1)。強い磁場の中では、ローレンツ力により電子の軌道が曲げられ、いわゆるサイクロトロン運動を起こし安定な放電が困難になる。そのために、種々の特殊な光源を開発したが最終的な実用化には今一步であった。この点を解決し、一般の元素全体に容易に適用できる方法として考

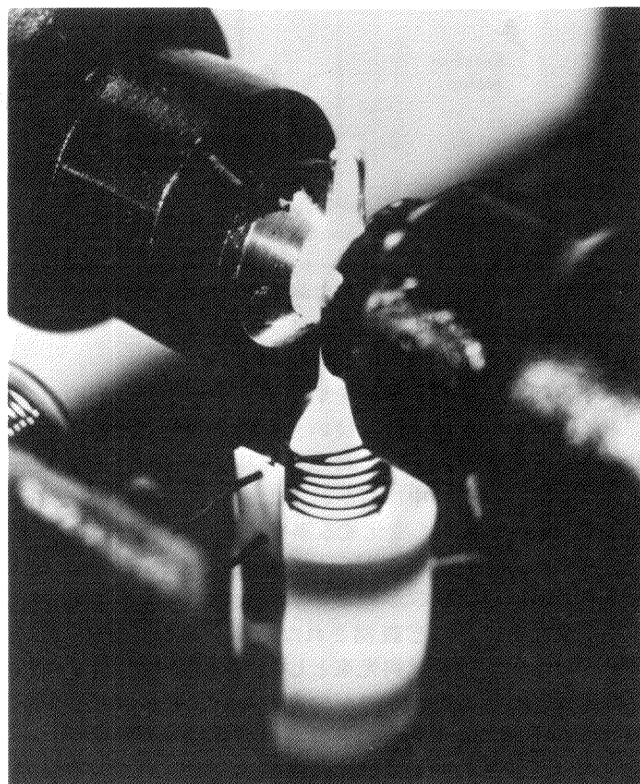


図1 501形ゼーマン水銀分析計の光源と磁石

えつけたのが偏光ゼーマン法であった。

最初の偏光ゼーマン法の実験には図2に示す装置を用いた。電磁石は旧式のマグネトロンのコイルを利用して製作したもので、8mmの間隙に最大18kGの磁場が得られる。試

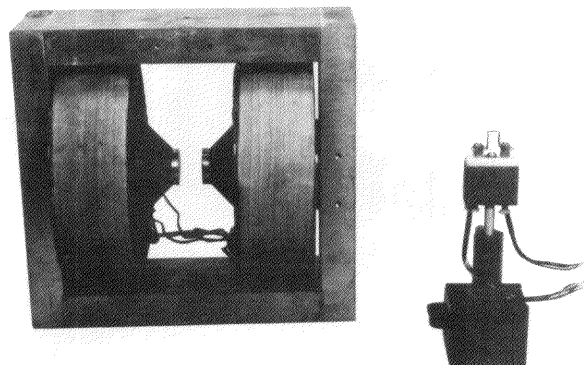


図2 偏光ゼーマン原子吸光法の開発に用いた電磁石、タンタルポートアトマイザと偏光子(ボラコート)

* 本稿は、日本分析化学会30周年記念大会(於：京都、1981年10月)で行なわれた奨励賞記念講演の一部をまとめたものである。

** 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

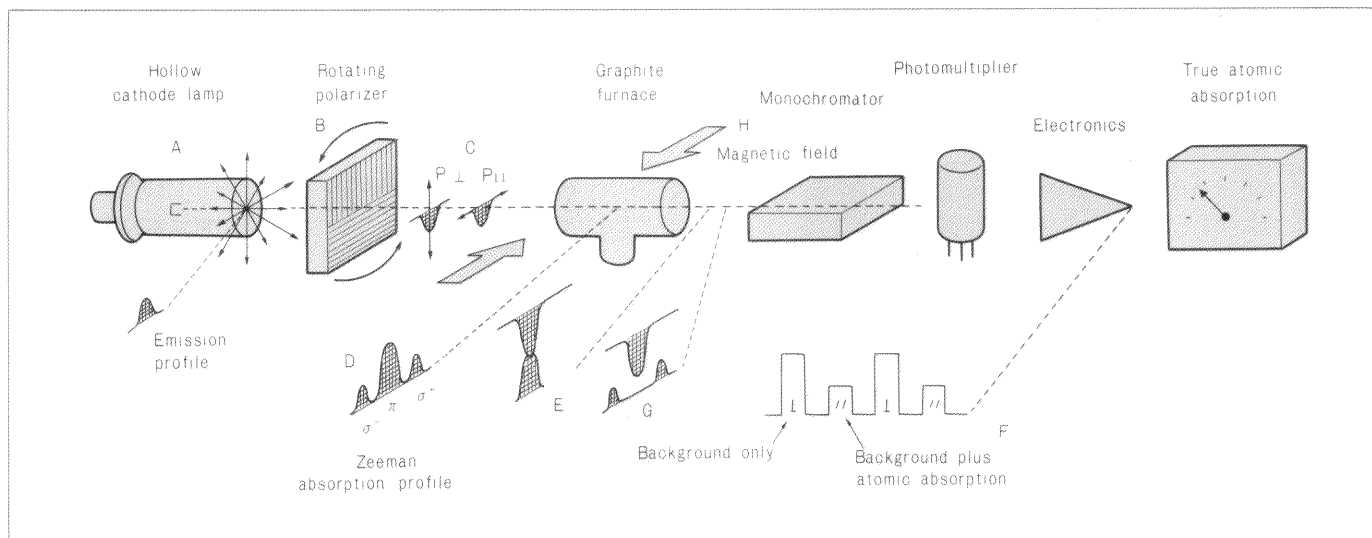


図3 米科学誌Scienceに紹介された偏光ゼーマン法の原理

料原子化部は、タンタル板を切って作ったボート形のものである。偏光子には、分子けい光の偏光測定に用いていたポラコートを使用した。これらの部品を従来の原子吸光度計に装着し、磁場中に置かれた原子蒸気の吸収が偏光面の方向によって大きく変化する事を確認した。Cdについての実験では、15kGの磁場が印加された状態で、磁場に平行な偏光成分は原子吸収が起こるが、磁場に垂直な偏光成分は原子吸収がほとんど観測されない事が分かった⁶⁾。磁場に平行な偏光成分を試料光束とし、磁場に垂直な偏光成分を参照光束として用いるのが偏光ゼーマン原子吸光法の原理である⁷⁾。最初は手作りの装置を用いて細々と始まった研究であったが、最終的には170-70形偏光ゼーマン原子吸光度計として実用化された。偏光ゼーマン原子吸光法は、米科学誌ScienceのResearch Newsに“Zeeman Effect: A Unique Approach to Atomic Absorption”(図3)として紹介され⁹⁾、また、170-70形偏光ゼーマン原子吸光度計は、1977年度の世界100の研究と開発の成果(米国, I.R.100賞)の一つ

に数えられた¹⁰⁾。

図4に、170-70形の光学系を示す。安定した強磁場(11 kG)を簡便に得るために電磁石にかわって小形の永久磁石(8 kg)が使用された。シンプルな装置であるが従来の原子吸光度計では得られない性能を持つ。

即ち、(1)原子吸収以外の吸収(分子吸収、光散乱などのバックグラウンド吸収)を高い精度で補正し除去する(吸光度1.7で誤差0.2%以内)、(2)正確に原子吸収線波長で補正を行う。(3)ベースラインが変動しない。(4)近接線の一部重なりによる妨害を補正できる¹¹⁾。一例として、図5にバックグラウンド補正のデータを示す。このデータは4%のNaCl溶液中のPbを分析したものである。図5(a)に見られる小さなピークは、NaClに含まれるPb不純物による吸収であり、約4 ppbに相当する。この測定においてNaClのバックグラウンド吸収は、Pbの原子吸収の100倍に達しているが妨害を受けていない。確認のため、Pbの吸収線(283.3 nm)に近接する非共鳴線(280.2nm)を用いて測定するとPb

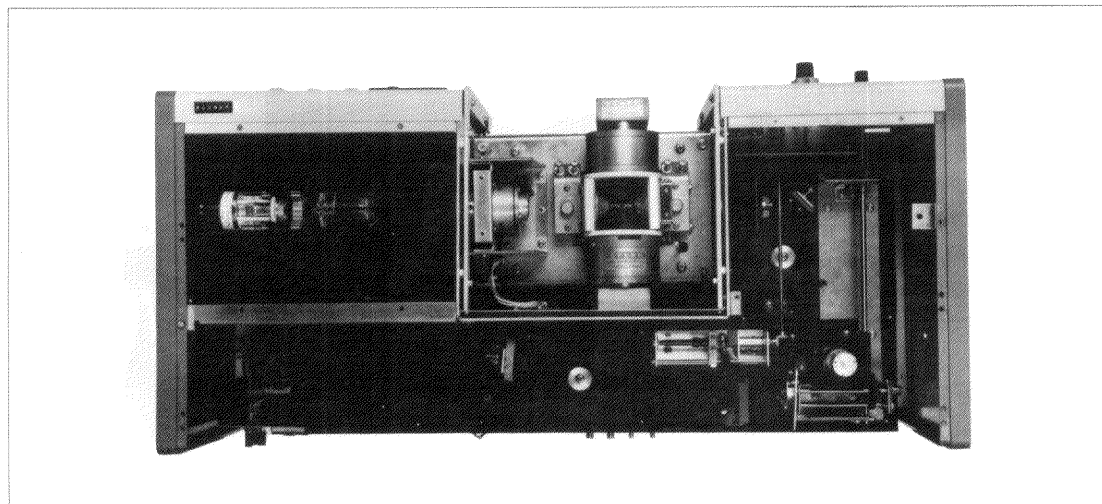


図4 170-70形偏光ゼーマン原子吸光度計の光学系

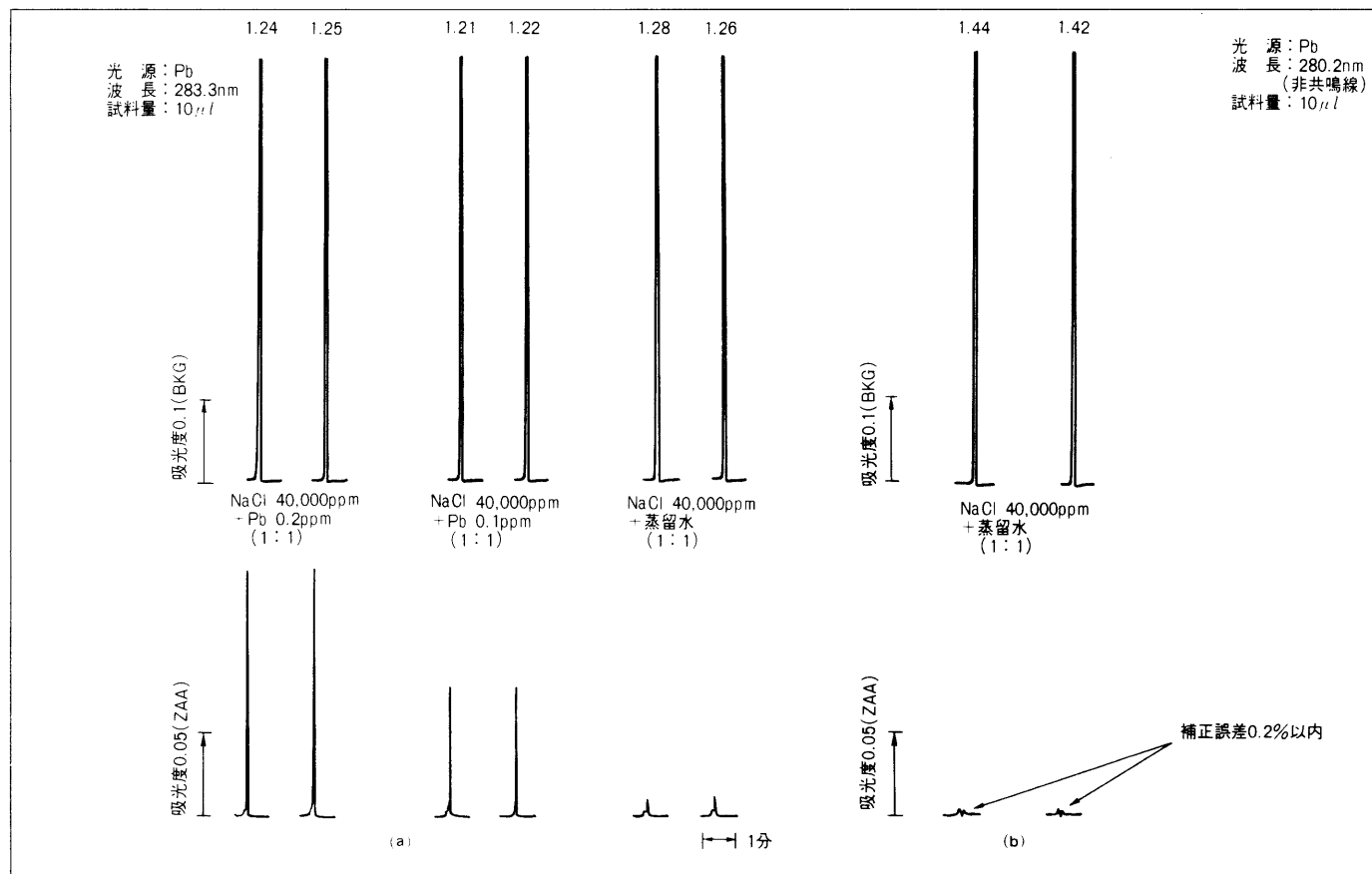


図5 偏光ゼーマン法によるバックグラウンド吸収の補正

の吸収ピークは生じない〔図5 (b)〕。したがって、図5 (a)の小さなピークは誤差によるものでなく、Pbの吸収であることが分かる。一口に4%NaClに含まれる4ppbのPbと言っても、NaClの量はPbの1千万倍も多い。長さ为例えれば、100kmの距離の中の1cm、即ち、水戸と東京の距離の内の指先程の長さに対応している。

偏光ゼーマン法は、バックグラウンドの補正能力を生かし、当初はグラフアイトアトマイザに適用されたが、最近では特殊な磁石を開発してフレームにも適用できるようになった¹²⁾。従来のダブルビーム法は、試料光束だけが原子蒸気中を通り参照光束はフレームを迂回するものであった。偏光ゼーマン法では試料光束のみならず参照光束も試料蒸気中の同じ場所を通過する。このために、ベースラインが安定でドリフトせず、またフレームあるいは光源のふらつきに基づくノイズを軽減できるようになった。また、バックグラウンド補正の精度も高いため、従来、使用が困難と考えられていた特殊な燃焼条件のフレームも用いる事ができるようになり、有機溶媒のマイクロサンプリング法など種々の応用の道が開けた。グラフアイトアトマイザとフレームをタンデムに配置した偏光ゼーマン原子吸光度計は、コンピュータ処理を取り入れた180-80形として実用化された(図6)。

ゼーマン原子吸光法の新しい応用は種々試みられているが、最近注目されているのは生体中の微量金属の分析であ

る。近年、医学の進歩とともに、今まで毒性のみが注目されていた金属、例えばCr、V、Seなども、微量であれば人体に必須の栄養素であることが分かってきた。また、病気と特定の微量金属との関係も少しずつ解明されつつあり、病気の診断、治療にも役立てようとしている。体液、組織中の微量金属の分析には、大量の共存物の妨害に強く、かつ10~20μlの少量の試料でppbレベルを検出できるような分析法が要求される。そこで、病院あるいは付属の研究所でも偏光ゼーマン原子吸光度計を用いた研究が始まっている^{13),14)}。また、ゼーマン原子吸光度計と液体クロマトグラフを結合すれば、目的とする金属がどのような化合物と結合しているかを知る事ができる^{15),16)}。この種の装置が実用化されると、生体中の微量金属の役割を解明するのに有力な手段となる可能性が強い。

偏光ゼーマン原子吸光度計は、現在、14ヶ国で約500台が稼動している。また、最近では米国(Perkin-Elmer社)、西ドイツ(Grün Optik社)、カナダ(Scintrex社)、中国(中国科学院)でも独自にゼーマン原子吸光度計の開発が進められており、さらに将来の発展が期待される。

最後に、終始御指導、御協力賜りましたカリフォルニア大学のDr. T. Hadeishi、東京大学の片山幹郎教授、保田和雄博士をはじめ那珂工場の関係各位に厚く御礼申し上げます。

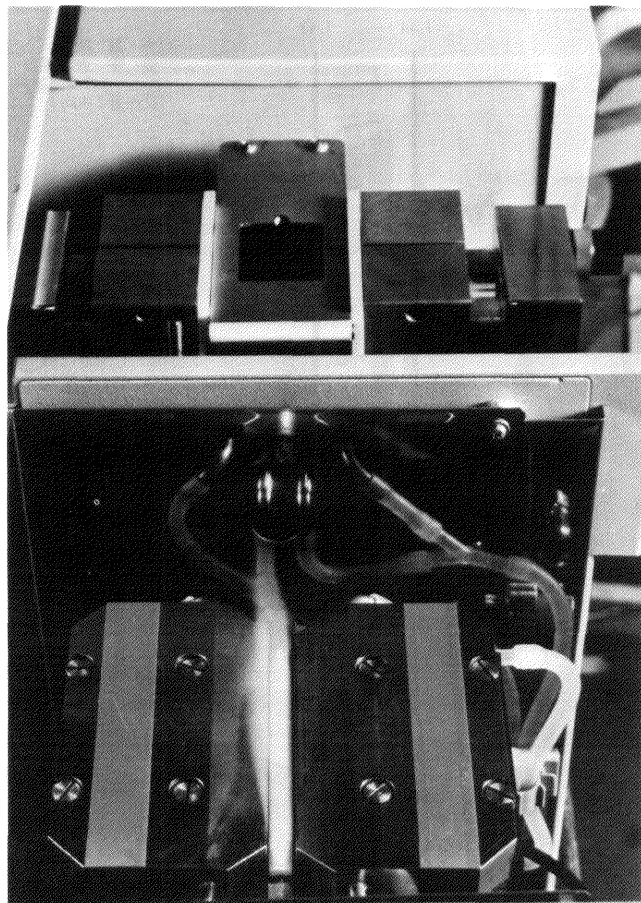


図6 180-80形偏光ゼーマン原子吸光光度計のタンデム配置原子化部

■参考文献

- 1) P. Zeeman : *Phylos. Mag.*, **43**, 226(1897).
- 2) T. Hadeishi : *Appl. Phys. Lett.*, **21**, 438(1972).
- 3) H. Koizumi & K. Yasuda : *Anal. chem.*, **47**, 1679 (1975).
- 4) H. Koizumi & K. Yasuda : *Spectrochim. Acta*, **31 B**, 237(1976).
- 5) 小泉, 関, 水野, 内野 : *Hitachi S.I. News*, **17**, 1453 (1974).
- 6) H. Koizumi & K. Yasuda : *Spectrochim. Acta*, **31 B**, 423(1976).
- 7) H. Koizumi, K. Yasuda & M. Katayama : *Anal. Chem.*, **49**, 1106 (1977).
- 8) 小泉, 保田 : *Hitachi S.I. News*, **19**, 13 (1976).
- 9) *Science*, **198**, 39 (1977).
- 10) *Indust. Res.*, **19**(10) 47 (1977).
- 11) H. Koizumi : *Anal. Chem.*, **50**, 1101 (1978).
- 12) H. Koizumi, H. Yamada, K. Yasuda, K. Uchino & K. Oishi : *Spectrochim. Acta*, **36 B**, 603 (1981).
- 13) P.A. Pleban, J. Kerkay & K.H. Pearson : *Clin. Chem.*, **27**, 68 (1981).
- 14) T. Tanaka, 第17回応用スペクトロメトリー東京討論会招待講演 (1981).
- 15) H. Koizumi, T. Hadeishi & R. D. McLaughlin : *Anal. Chem.*, **50**, 1700 (1978).
- 16) H. Koizumi, R. D. McLaughlin & T. Hadeishi : *Anal. Chem.*, **51**, 387 (1979).

◎ 日製産業株式会社

本社 別館 電話 東京(03) 504-7211
 四国出張所 電話 高松(0878)62-3391<代>
 名古屋支店 電話 名古屋(052) 583-5841
 仙台支店 電話 仙台(0222)64-2211<代>
 沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311~7
 新潟出張所 電話 新潟(0252)41-3011<代>

横浜出張所 電話 横浜(045)671-5421
 京都出張所 電話 京都(075)241-1591
 広島支店 電話 広島(082)221-4514<代>
 秋田出張所 電話 秋田(0188)64-2244
 札幌支店 電話 札幌(011)221-7241<代>

大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
 筑波営業所 電話 土浦(0298)23-7391
 岡山出張所 電話 倉敷(0864)25-1316
 九州支店 電話 福岡(092)721-3501
 富山支店 電話 富山(0764)24-3386<代>

＜編集後記＞

■本ニュースは、本年をもって創刊25周年目を迎えることができました。これも、ひとえに、顧客各位のご愛顧の賜物と、厚く御礼申し上げますと共に、本ニュースに原稿をご執筆頂きました諸先生方に、厚く御礼申し上げます。

■本ニュースは、日立理化学機器をお買上げ頂いた方々には、全てお送りすることになっています。もし、貴殿のお近くに、受取ってられない方がありましたらご一報下さい。直ちに新規に名簿に登録し、以後継続的にお送り致します。

■日立理化学機器による報文のご投稿を歓迎致します。尚、本号より、原稿の受理日を記載しています。

■本ニュースに関するお問合せは、下記へ、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

○株式会社 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ
 茨城県勝田市市毛882番地
 〒312 電話 水戸(0292)73-2111(代)

○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
 〒105 電話 東京ダイヤルイン(03)504-7187

THE HITACHI
 SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
 SPRING 1982 Vol.25 No.1

発行 昭和57年5月1日
 (年4回 発行)

発行人 湯川 清
 編集人 中嶋康雄 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