

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 AUTUMN 1982
VOL.25 NO.3

目次

報 文

ヒトのエナメル質と象牙質の結晶の微細構造と齲蝕によるエナメル質結晶の溶解について……
一條 尚 山下靖雄 赤堀 宏…1

電子線エネルギー損失分光法(ELS)による固体電子構造の解析法……
………齊藤伸二 市ノ川竹男…4

X線エネルギーのスペクトル解析と鉱物の微小部元素分析……
森 健 高井憲二 兼平慶一郎…8

日立走査電子顕微鏡(S-450形)によるコイ科魚類の寄生性原生動物の観察………福田芳生…12

ベンゾイン蛍光法を利用した生体グアニジノ化合物の分析システム
大倉洋甫 黄 耀麟 能田 均…16

解 説

228形日立ダブルビーム分光光度計とその応用(パーソナルコンピュータを内蔵した分光光度計)
小森律夫 合田淳子 田島活利 秋友信雄 根本 勲 遠山恵夫…21

850形日立分光蛍光光度計……
野上太郎 広瀬 弘 塚田正道 木村光良 滝 正弘 大和田実…26

トピックス

日立XYサンブラ………7

806形日立血液像自動分類装置用日立白血球像レビュー装置………11

661形日立グラフィックレコーダ………20

報 文

U.D.C. [611.314+616.314-002]:548.74:621.385.833.22

ヒトのエナメル質と象牙質の結晶の微細構造と齲蝕によるエナメル質結晶の溶解について

一條 尚* 山下 靖雄** 赤堀 宏***

(昭和57年6月30日受理)

1. はじめに

ヒトの歯は象牙質が主体となっており、歯冠の象牙質表面はエナメル質によっておおわれている。

ヒトの歯のエナメル質は人体中最も硬い組織で、その硬さはちょうど長石が水晶の硬さに相当する。エナメル質は、有機成分がわずかに2~3%含有されているのみで、その大部分が無機成分から成り、非常に硬い組織である。

一方象牙質は歯を構成する組織の主体をなすもので、象牙質には無機成分が約70%、有機成分が約30%含まれている。したがって、その硬さはエナメル質よりもやや軟かいものである。象牙質はエナメル質と異なり、密なコラーゲン線維が下地となり、それに無機の結晶が密に沈着しており、その基質は基本的に骨と同様な構造を有している。

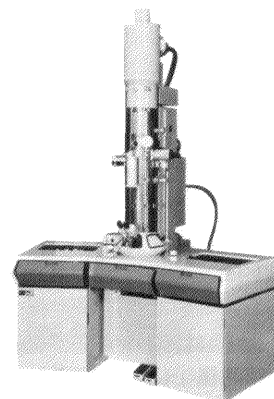
以上のように、エナメル質ならびに象牙質は非常に硬い組織であるために、切片作製が非常に困難であることなどが原因して、それらの微細構造やその性格などについては今なお不明な点が多い現状である。

骨や歯の研究法として、光学顕微鏡による観察のほか、古くからX線回折法が導入され、エナメル質や象牙質が骨と同様、アパタイトの結晶によって構成されていることが認められている。

ヒトのエナメル質および象牙質の結晶は微細な結晶で、エナメル質の結晶は象牙質や骨の結晶に比べてかなり大きな結晶であり、象牙質と骨の結晶は非常に小型の結晶からなる。しかしそれらの結晶は六方晶形の結晶で、基本的に hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ の結晶からなることが明らかになっている。

一方 hydroxyapatite に関しては、1964年Kay氏らにより、X線回折法と中性子回折法とを併用することによってはじめてその結晶構造が明らかにされ、今日では hydroxyapatite の結晶構造がほぼ完全に解明されている。

我々は形態学的な立場からエナメル質や象牙質など、歯の本質的な構造上の特徴や



H-700H形日立電子顕微鏡

* 東京医科歯科大学 歯学部 解剖学教室、教授、医博

** 東京医科歯科大学 歯学部 解剖学教室、教授、歯博

*** 日製産業株式会社 科学機器営業本部 マーケティング部、工博

性格を究明するための研究の一端として、透過電子顕微鏡を用い、ヒトの正常なエナメル質と象牙質の結晶の超微細構造について、それらの結晶を構成する hydroxyapatite の結晶構造を原子配列のレベルで直接観察を行うとともに、それらの所見をもとに蝕蝕によるエナメル質の結晶の溶解についても同様な方法で観察を行った。

2. 材料と方法

ここに掲載した電子顕微鏡写真は、いずれもヒトの歯を材料としたもので、機能を営んでいる永久歯から得たものである。正常な結晶の観察には全て健全な歯から得たエナメル質(図1, 2)と象牙質(図6)を用い、蝕蝕による結晶溶解の観察には、蝕蝕エナメル質(図4, 5)から得た材料を用いたものである。

歯を抜去後、エナメル質と象牙質をそれぞれ歯科用ダイヤモンドディスクを用いて一辺約1mmの立方体となし、それらを常法にしたがって glutaraldehyde, OsO₄ (pH7.4 cacodylate buffer) で固定、epon812で包埋を行った。それらの試料を、ダイヤモンドナイフを用い、Porter-Blum MT-2B 形ミクロトームを使用して、未脱灰のまま超薄切片を作製し、切片に染色その他何ら処置を加えることなく、結晶が真の横断面として出現しているものをとくに選んで観察を行った。

電子顕微鏡による観察には、日立H-500H, H-700H形電子顕微鏡を使用し、加速電圧100kV~200kV、直接倍率30万倍で撮影を行い、さらに最終倍率最高約1,500万倍に拡大して観察を行った。

3. 観察結果

図1はエナメル質の切片で、結晶が横断されたもののことから1個の結晶を選び、拡大したものである。結晶の内部には互いに120°の角度で交差し、8.17Å間隔で配列する3方向の結晶格子像が観察される。

結晶の内部に観察される結晶格子像は、拡大を上げるにしたがって徐々に点状構造の連鎖として観察されてくる。それらの点状構造は結晶格子に一致して非常に規則的な配列状態を示している。

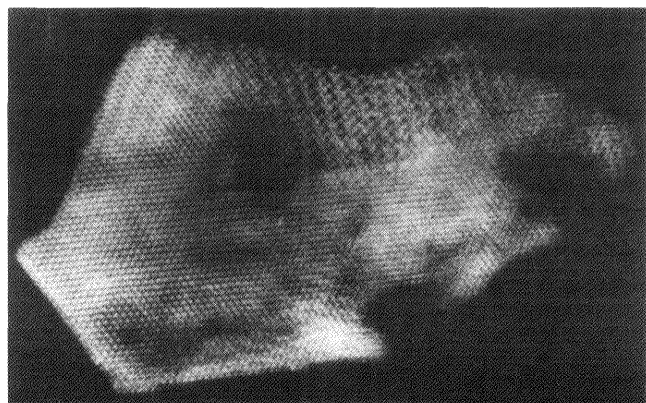


図1 横断された1個のエナメル質結晶を拡大したもの。結晶内には互いに120°の角度で交差する3方向の格子(100)がみられる。

図2は結晶の一部をさらに拡大して示したもので、約1,500万倍の拡大になっている。結晶内に観察される点状構造は、径約2~3Åの非常に微細なもので、それらの大きさも比較的均一な状態を示している。それらは全体として正六角形を連ねた状態で非常に規則的に配列し、正六角形の中心にも1個の点状構造が観察される。

そこで図3に示したhydroxyapatite構造の原子配列模型図を作製して、それを図2のごとく電子顕微鏡に見られる点状構造の配置と重ね合わせて見た(図2)。

図3は、hydroxyapatiteの結晶構造を結晶のC軸に垂直な平面(100)に投影した原子配列を示したもので(M.I. Kay, et al., Nature, 1964, をもとに作製)、煩雑さを省くためにPO₄のOを除き、簡略化し、Ca, P, OHのみを記したものである。

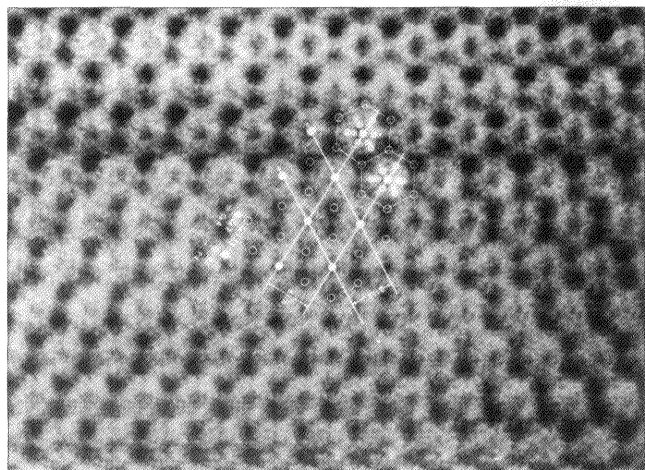


図2 エナメル質結晶横断面の一部を拡大したもので、それに図3のhydroxyapatiteの構造模型図を重ねたもの。約1,500万倍の拡大となっている。微細な点状構造が規則的な配列をなし、OHを中心にしてそのまわりにCa原子が六角形に配列して六角胞の単位を形成し、結晶はそれらの六角胞の連鎖によって構成されている。

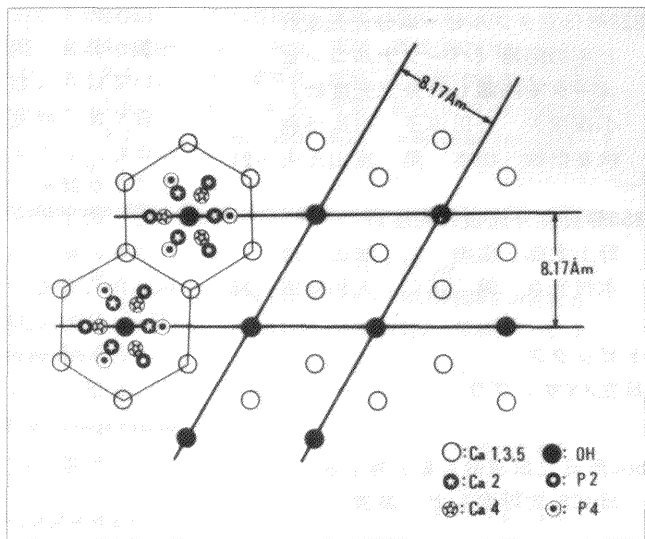


図3 hydroxyapatiteの結晶におけるC軸に平行方向からC軸に直角な面に投影した原子配列模型図(Ca, P, OHのみ記す)。

それらの結果、点状構造はcolumnar CaとOHの位置に出現していることが理解される。

以上のように、1個のOHを中心に、そのまわりをとりまいて、columnar Caが正六角形を形成するように配列している。我々は便宜上、これらの単位を六角胞とよんでいる。このように結晶は六角胞の連鎖によって構成されている。

次いで図2に示した結晶の中に、3方向に配列する8.2Å間隔の結晶格子像(100)のほか、一部に4.7Å間隔の結晶格子像が観察される。4.7Å間隔のstriationは図2に示したhydroxyapatiteの(110)面のもので、図4に示すごとく3方向に配列する8.2Å間隔の(100)面のもとそれぞれ30°と直角に交差することが知られている。

図4は蝕蝕エナメル質の結晶横断面で、蝕蝕によって結晶の一部が溶解しているものを拡大して示したものである。

蝕蝕によって溶解した部分を観察すると、蝕蝕によって、結晶が深部に向かって階段状にステップを形成して溶解しており、溶解部の最深部で面積が最も小さくなっている。このように結晶の溶解は、結晶のC軸(長軸)方向に進行すると同時に、結晶の辺縁に向かっても拡大されている。

図5は図4の結晶で溶解した部分を拡大したものである。

図4、5の結晶で溶解が最も進んだ最深部では(図4、5の矢印の部分)、1個の六角胞のみが溶解している。このように、結晶の溶解は六角胞の単位で溶解することが理解され、結晶の溶解は1個の六角胞が溶解すると、それらが発端となって次々と同じく六角胞の単位で溶解が周囲に拡大されていくことが理解される。このように、結晶の溶解は常にこの六角胞の単位で溶解し、六角胞の単位で溶解が拡大されることが理解される。

また、図4の丸印で示した領域にdislocationが観察され、これらが発端となって結晶が溶解している状態がみられる。さらに矢印で示した1個の六角胞が選択的に、優先して溶解していることから、この部分の六角胞に原子の欠落か置換があったために、その部分が優先的に溶解したものと推測される。

図6は正常な象牙質の結晶の一部を拡大したもので、図

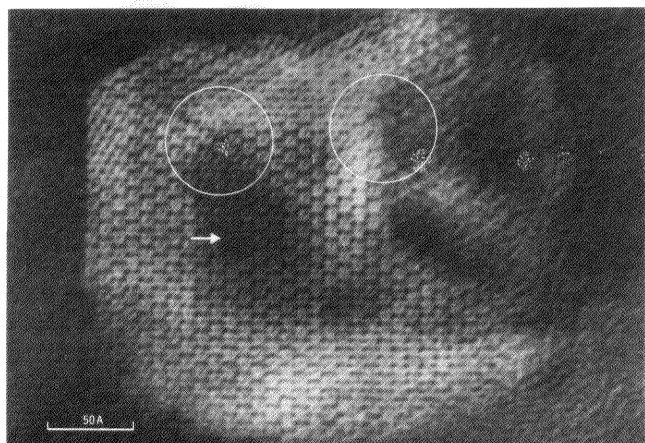


図4 蝕蝕エナメル質における1個の結晶の横断面。結晶が階段状をなして溶解し、丸印で示した部分にはdislocationが観察され、その部分に沿って結晶が溶解している。矢印で示した部分では1個の六角胞の単位で結晶が溶解している。

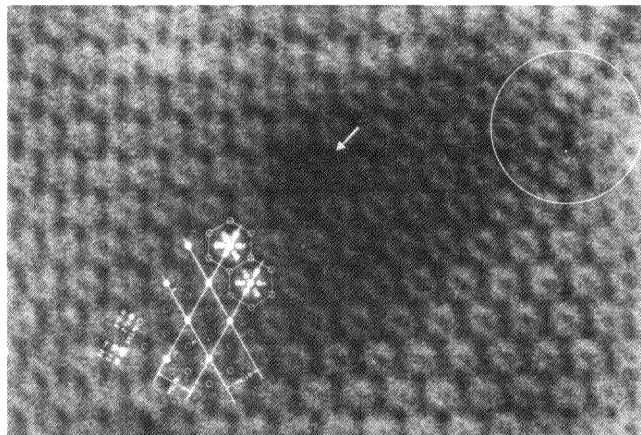


図5 図4の一部拡大で、矢印の部分では1個の六角胞の単位のみが選択的に溶解している(約1,000万倍の拡大)。

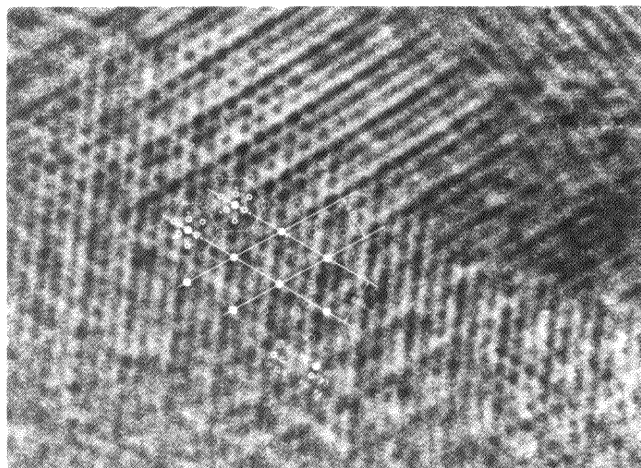


図6 正常な象牙質結晶横断面の一部拡大(約1,500万倍の拡大となっている)。

2に示したエナメル質の結晶と同様、結晶格子の位置に、規則的に配列する点状構造が多数観察される。これらの点状構造はhydroxyapatiteの構造模型図と対象すると、hydroxyapatiteの単位胞におけるCa、PO₄、OHの位置に出現していることが理解される。

4. まとめ

ヒトの正常なエナメル質と象牙質の結晶について、透視電子顕微鏡を用い、それを構成するhydroxyapatite構造を原子配列の単位で、直接観察を行うことができた。

さらに蝕蝕エナメル質の結晶を用い、結晶の溶解について観察した結果、結晶は六角胞の単位で溶解し、拡大されることが明らかとなった。

本研究を遂行するにあたり、写真作成にご協力をいただいた日立製作所那珂工場応用技術センタ・鶴田忠正氏に深くお礼申し上げる。

参考文献

- 1) Kay, M.I., Young, R.A. and Posner, A.S. : Nature, 12: 1050-1052, (1964)
- 2) 一條 尚, 山下靖雄, 赤堀 宏 : 歯基礎誌, Vol. 23, No. 1, 101~114, (1981)

電子線エネルギー損失分光法(ELS)による固体電子構造の解析法

齊藤 伸二* 市ノ川 竹男**

(昭和57年6月4日受理)

1. はじめに

透過形電子顕微鏡(TEM)と組み合わせた電子線エネルギー損失分光法(ELS)は、分析電子顕微鏡法として広く利用されている。この分光法は薄膜試料に電子線を照射し、透過した電子線をエネルギー分析する方法で、次の2通りの実験方法があり、それぞれの特長を生かした研究がなされている。

(I) TEMのスクリーン上に拡大像を作り、試料上の位置 r を透過した電子線をエネルギー分析する。この方法は物質の元素分析の研究に利用される^{1)~6)}。元素分析は通常内殻電子励起の数値及び収量に注目して行うが ELSでは軽元素に対して収量が大きく、しかも微小領域(〜数100Å)の分析が可能であることに優れた特長をもっている。

又内殻励起スペクトルから広域X線吸収微細構造(EXAFS)が観測出来、結晶構造に関する和見も得られる^{7)~11)}。

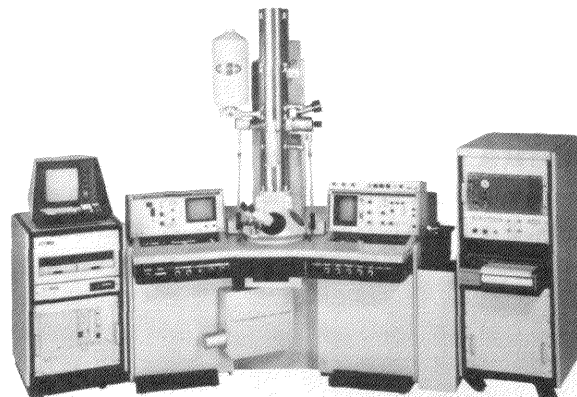
(II) TEMのスクリーン上に回折図形を作り、運動量 q 失って散乱された電子線をエネルギー分析する。この方法はプラズモンの様な素励起過程^{12,13)}の他に、固体のバンド構造の研究^{14)~18)}に利用される。バンド構造の研究では図1に示す様に $q=0$ の場合は垂直の、又 $q \neq 0$ は非垂直のバンド間遷移を得ることが出来、バンドの曲率、電子構造の異方性などを見出すことも可能である。又内殻電子励起スペクトルから得られる伝導帯状態密度と合わせて、より詳しい電子構造の議論も出来る¹⁹⁾。

また走査形透過電子顕微鏡(STEM)と組み合わせたELSでは、微小電子線プローブを用いて視野制限し、しかもスクリーン上に回折図形を作り、その1部をエネルギー分析することから、2通りの方法を組み合わせることが可能で、且TEMでのELSよりS/Nに関して有利な特長をもつ²⁰⁾。

しかしELSは光学的反射や吸収の測定と異なりエネルギー分解能が約1eVと劣り、更にスペクトルがバンド間遷移を直接与えてくれない欠点を有する。元素分析、EXAFSの方法に関しては過去に多くの報告があるので^{1)~11)}本報告では、低エネルギー損失スペクトルから固体のバンド間遷移の情報を得るための解析方法をグラファイトを例にして述べる。^{14),21),22)}

2. 実験方法

実験装置の概略を図2に示す。LaB₆陰極の透過形電子顕微鏡(日立H-600)に磁界分散型エネルギー分析器(日立H-6020)を取り付けたもので、加速電圧は50kV、エネルギー分解能1.2eVである。又試料照射電流は約10nAである。検出系はS/N向上のためパルス・カウンターを使用し、且マ



電子線速度分析装置を装着したH-600日立電子顕微鏡

イクロ・コンピューターで制御される。試料は天然グラファイトを使い粘着テープで約500Åにはく離され、C軸と平行に入射ビームを照射する。

図3はグラファイトの回折パターンで、測定は $\langle 100 \rangle$ 方向のA点($|q|=0.3\text{Å}^{-1}$)で行なわれた。この q は図1で ΓQ 方向を向いたベクトルを示すが、 $|q|$ の値からほぼ $|q| \approx 0$ と近似出来る。

実験で得られた損失スペクトルを図4に示す。スペクトルの測定時間は約15分で、約60Vを1024チャンネルで測定

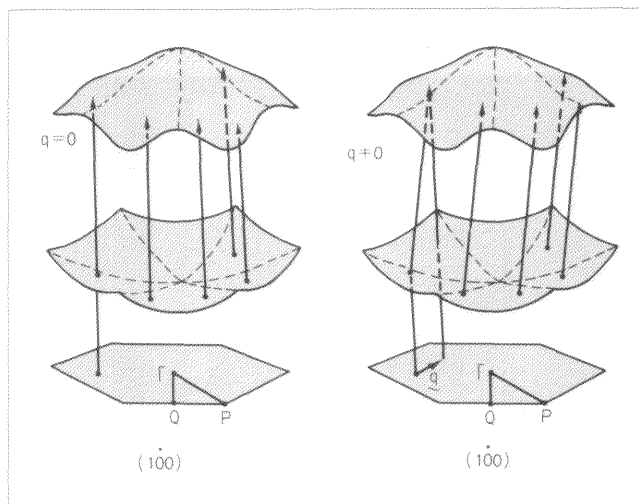


図1 バンド構造と異なる q のバンド間遷移との関係。バンド構造は、六角形のBrillouin zone (B.Z.) 中の2つの価電子帯、伝導電子帯を示す。 $q=0$ では、B.Z.内のすべての点から垂直に遷移する。 $q \neq 0$ では、 q の波数変化を満たす様な遷移が起こる。ここで (100) は、逆格子点である。

* 早稲田大学 理工学部

**早稲田大学 理工学部、教授

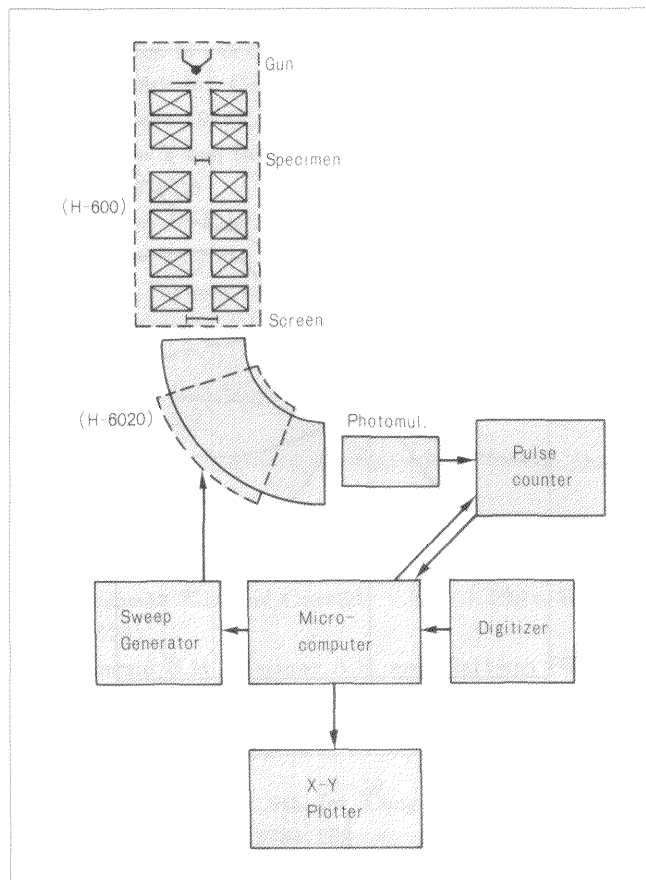
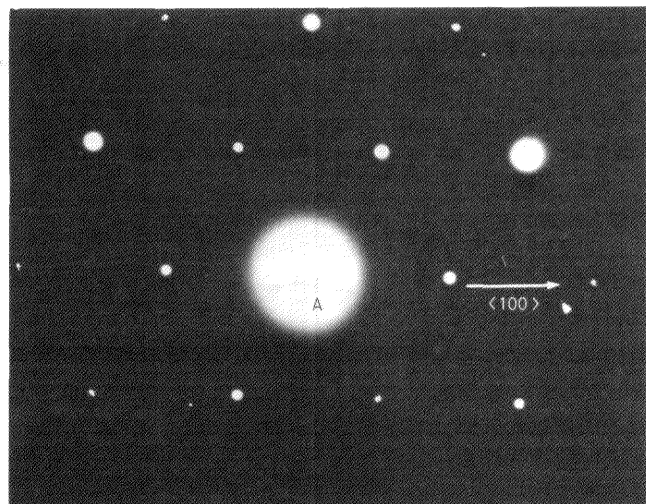
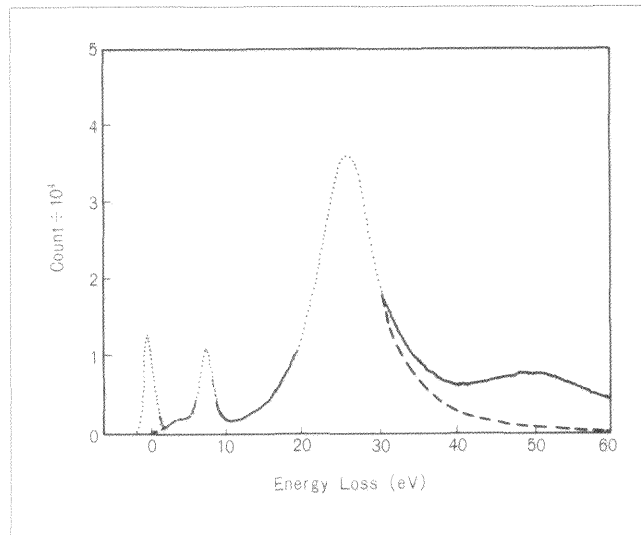


図2 実験装置の概略


 図3 グラファイトの回折像。エネルギー損失スペクトルは $\langle 100 \rangle$ 方向のA点($|q| = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$)で測定された。

された。7, 27eVの顕著なピークは、 π 電子及び $\pi + \sigma$ 電子によるプラズマ励起であり、又54eVのピークは $\pi + \sigma$ プラズモンの2回散乱による。弾性散乱と多重非弾性散乱の寄与を除いたスペクトルを図4に破線で示す。バンド間遷移からの寄与は約4, 13及び16eVに微細構造として現われているが、


 図4 エネルギー損失スペクトル。破線は多重散乱の寄与を除いた一回散乱強度 $I(q, E)$ を示す。

詳しい議論は次節の解析法に頼らざるを得ない。

3. バンド間遷移の解析

プラズモン励起が顕著なエネルギー損失領域では多電子効果より、バンド間遷移の情報はエネルギー損失スペクトルに直接現われず、複素誘電関数 $\epsilon(q, E)$ の虚数部 $\epsilon_2(q, E)$ に現われる²³⁾従って、固体のバンド間遷移を研究するには、エネルギー損失スペクトルから ϵ を導く必要がある。この節では、その導出方法が最初に議論される²¹⁾又バンド間遷移をより詳細に調べる目的で、 ϵ_2 から結合状態密度(JDOS)を導き²²⁾理論で求められた電子構造との比較がなされる。

実験より得られた1回散乱強度 $I(q, E)$ は、エネルギー損失関数 $Im\{-1/\epsilon(q, E)\}$ と次の関係で結ばれている。

$$Im\{-1/\epsilon(q, E)\} = \beta(q) \cdot I(q, E) \dots \dots \dots (1)$$

ここで“ Im ”は虚数部を示し、 β は q に依存する規格化因子である。 β が決定されると ϵ は $Im\{-1/\epsilon\}$ から次のKramers-Krönig分散関係を使って導き出される：

$$Re\{1/\epsilon(q, E)\} = 1 - \frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{E' \cdot Im\{-1/\epsilon(q, E')\}}{E'^2 - E^2} dE' \dots \dots \dots (2)$$

ここで P はCauchyの主値を示し、 Re は実数部を表す。 β は $Im\{-1/\epsilon\}$ と ϵ_2 が同じ総和則を満たすことから²³⁾次の関数 $F(\beta)$ を定義し、 $F(\beta) = 0$ の根から決定された：

$$F(\beta) = \int_0^\infty E \cdot Im\{-1/\epsilon(q, E, \beta)\} dE - \int_0^\infty E \cdot \epsilon_2(q, E, \beta) dE \dots \dots \dots (3)$$

ここで $Im\{-1/\epsilon(q, E, \beta)\}$ 、 $\epsilon_2(q, E, \beta)$ は(1),(2)式より β をパラメーターとして数値計算される。

この様にして導かれた ϵ_2 を図5に実線で示す。なお比較の為、図4の一回散乱強度 $I(q, E)$ も図5に破線で示す。 ϵ_2 のピーク位置(4.4, 13.5, 14.8eV)は、バンド間遷移のエネルギーを与える。図5において注目すべき事は、 $I(q, E)$ の微細構造のピーク位置は、 ϵ_2 のピーク位置とは必ずしも一致しないことである。

バンド間遷移をより詳しく議論するには、 ϵ_2 からJDOSを導く必要がある。JDOSは等エネルギー面 $E_{vc}(\mathbf{K}) = E$ 上に存在する状態 $\mathbf{K}$ の数として定義される²⁴⁾ここで E_{vc} は

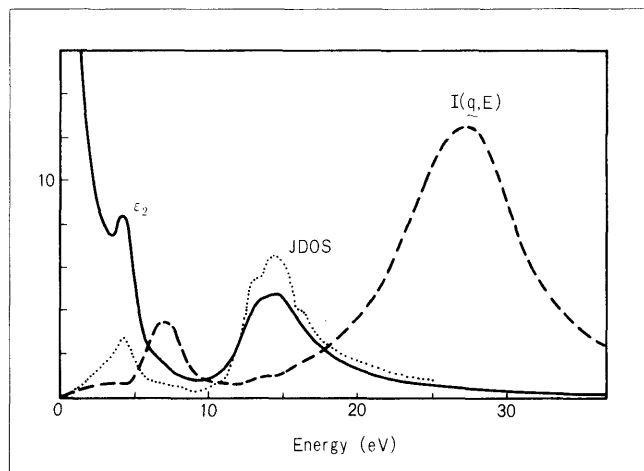


図5 $Im\{-1/\epsilon\}$, ϵ_2 及びJDOSの関係。それぞれ、破線、実線、点線で示される。縦軸は ϵ_2 のもので、他は任意スケールである。

伝導帯及び価電子帯間のエネルギー差で、 $\mathbf{K}$ は図1のBrillouin Zone内の結晶波動ベクトルである。遷移確率に関係した振動子強度を、遷移エネルギーに関して一定と近似すると、¹⁸⁾JDOSのピーク位置はそのままバンド間遷移のエネルギーを与える。 ϵ_2 はJDOSと近似的に次の関係式で結ばれる。²²⁾

$$\epsilon_2(E) \propto \int \frac{\gamma E}{(E^2 - E'^2)^2 + \gamma^2 E^2} \cdot J(E') dE' \dots \dots \dots (4)$$

ここで J はJDOS、 γ は減衰因子(緩和時間の逆数)で遷移エネルギー E' と共に増加することが知られている。ここでは $\gamma = \alpha E'$ (α はパラメーター)と近似し、(4)式を E, E' における $\epsilon_2(E)$ 、 $J(E')$ の連立一次方程式群とみなし、 ϵ_2 から $J(E')$ が数値計算される。 $\gamma = 0.07 E'$ とし計算されたJDOSを図5に点線で示す。グラファイトの ϵ_2 は3つの顕著なピークしか与えないのに対して、JDOSはさらに8, 16.5 eVのバンド間遷移を示す。これは(4)式で示される様に、励起状態の緩和効果の結果、JDOSの構造が鈍化されて ϵ_2 に現われ、且JDOSの弱いピークは ϵ_2 では消失してしまうことがありうることを示している。

4. 議論

実験から得られたJDOSを、バンド計算からのJDOSと比較する。図6はTight-Binding法で計算されたグラファイトのバンド構造とJDOSを示す。²⁵⁾バンド構造内の破線は π 電子のエネルギーバンドを、又実線は σ 電子のエネルギーバンドを示す。0 eVはFermi準位である。JDOS中の破線及び実線は、それぞれ π, σ バンド間のJDOSを示す。一致はすこぶる良く、実験的JDOSでの4.4, 8 eVのピークは π バンド間遷移に、又13.5, 14.8, 16.5 eVのピークは σ バンド間遷移に帰着される。

ここでは $\mathbf{q} \approx 0$ 近辺のスペクトルについて議論したが、異なる $\mathbf{q}$ でのバンド間遷移結合状態密度と、内殻電子励起スペクトルからえられる伝導帯状態密度との比較から、理論的に未知な物質の電子構造の解析が期待される。

最後に実験上の注意点を述べる。第1に、多重非弾性散乱の寄与を少なくするために、試料厚を十分に薄くし、又電子線照射によるコンタミネーションを出来るだけ避けて

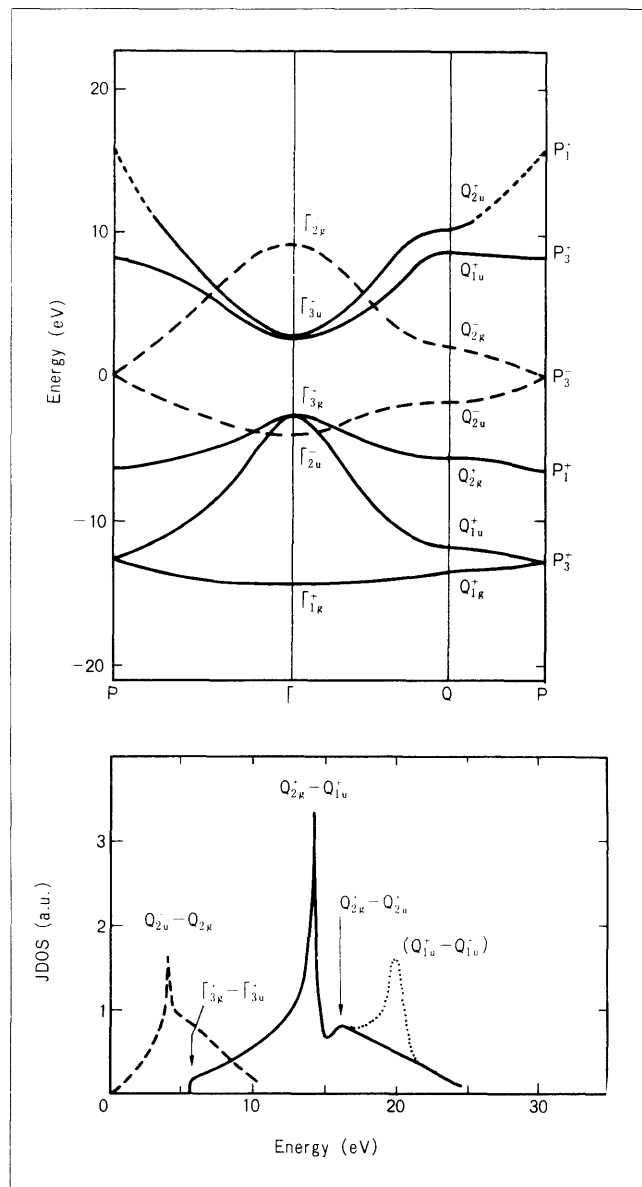


図6 グラファイトのバンド構造と理論的JDOS(Bassani et al. 1967)。JDOS中の文字はバンド構造中での遷移を示す。

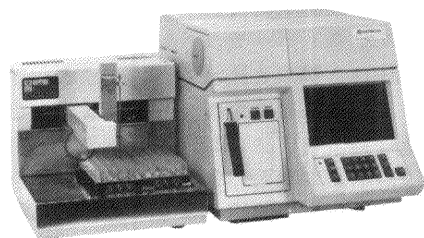
測定する必要がある。²⁶⁾厚い試料による多重非弾性散乱はプラズモンによる影響が大きい。プラズモンの平均自由行程は、加速電圧50 kVで数100 Åであることから、試料厚はこれ以下に制限される。又JDOSの構造は $Im\{-1/\epsilon(\mathbf{q}, E)\}$ の微細構造から生じる為、損失スペクトルの精度を十分上げる必要がある。この目的の為にパルス計数法による検出、及びコンピューターによるスペクトルの加算処理、平滑化処理を施し、S/Nのよいスペクトルを測定することが望ましい。ポイント・カーソードや電界放射型電子銃を用いて、更に分解能の向上もはかれる。又スペクトルの微細構造を明瞭に観測する為に、信号の一階微分又は二階微分をとることも必要な処法である。

参考文献

- 1) Isaacson M : J. Chem. phys. **56** 1813(1972)
- 2) Proc. 8th. Int. Cong. on Electron Microscopy (Canberra 1974) 368~
- 3) Kokubo Y and Iwatsuki M : J. Electron Microsc. **25** 123(1976)
- 4) Jouffrey B, Kihn Y, Perez J. PH, Sevely J and Zanchi G : Proc. 9th. Int. Cong. on Electron Microscopy (Toronto 1978) 292
- 5) Ichinokawa T : J. Electron Microsc. **28** suppl. S17 (1979)
- 6) Joy D.C. and Maher D.M. : J. phys. E : Sci. Instrum. **13** 260(1980)
- 7) Lytle F.W., Sayer D.E., Starn E.A. : Phys. Rev. **B11** 4825(1975)
- 8) Stern E.A., Sayer D.E. and Lytle FW : Phys. Rev. **B11** 4836(1975)
- 9) Leapman R.D. and Cosslett V.E. : J. Phys. D : **9** L29 (1976)
- 10) Kincaid B.M., Meixner A.E. and Platzman P.M. : Phys. Rev. Lett, **40** 1296(1978)
- 11) Batson P.E. and Craven A.J. : Phys. Rev. Lett. **42** 893(1979)
- 12) Silcox J : Proc. 9th. Int. Cong. on Electron Microscopy (Toronto 1978) 259
- 13) Raether H : Excitation of Plasmons and Interband Transitions by Electrons (Springer-Verlag, Berlin, New York 1980)
- 14) Daniels J, Festenberg C.V., Raether H and Zappenfeld K : Springer Tracts in Modern Physics **54** 77 (1970)
- 15) Tosatti E and Bassani F : Nuovo Cimento **65B** 161 (1970)
- 16) Zeppenfeld K : Z. Physik **243** 229(1971)
- 17) Büchner U. : Phys. stat. sol. (b) **81** 227(1977)
- 18) Brangan R.D. : J. Phys. C. : Solid State Phys. **14** 1053(1981)
- 19) (*但しImage-Modeで) Egerton R.F. and Whelan MJ : Phil. Mag **30** 739(1974), Feldkamp LA, Stearns M.B. and Shinozaki S.S. : Phys. Rev. **B20** 1310(1979)
- 20) Groves T : Ultramicroscopy **1** 15(1975)
- 21) Saito S, Majima H, Higeta K and Ichinokawa T : J. Phys. Soc. Jpn **50** 3075(1981)
- 22) Saito S, Majima H, Higeta K and Ichinokawa T to be published
- 23) Pines D : Elementary Excitations in Solids (Benjamin, New York, Amsterdam 1963) Chap. 3
- 24) Phillips J.C. : Solid State Phys. **18** (Academic, New York 1966) 55
- 25) Bassani F and Pastori Parravicini G : Nuovo Cimento **50B** 95(1967)
- 26) Hren J.J. : Ultramicroscopy **3** 375(1979)

Topics

日立XYサンブラ



このたび、日立分光光度計の付属装置として、XYサンブラを発売いたしました。この装置は、用手法で発色させた多数の標体試料を自動的にサンプリングするもので、特に105-40/50形分光

光度計と接続し、日常の臨床検査の能力を一段と高めることができます。

■特長

- (1) 最大100本までの試験管をセットできます。

試験管(外径15mm, 長さ105mm)を2個の50本掛の専用ラックにあらかじめセットしておき、ラックごとXYサンブラに装着します。

分析時間は、分光光度計側のパラメータにより多少変わりますが、100本当たり約12分です。

- (2) 分析終了は自動化されています。

分析に必要な数の試験管を並べます。試験管の有無を検知する機能を持っており、分析は自動的に終了します。そしてオペレータにはブザーで知らせます。

- (3) 検量線を自動的に作成することができます。

ラックに試薬ブランク、標準溶液を

セットしておけば、まず検量線を作成し、次に引き続き検体の濃度値演算を行ないます。

また、必要に応じて検量線曲り補正を最大5点まで行なうことができます。

- (4) 検体ブランク補正も自動化できます。

分析項目によっては検体ブランクの補正をしなければなりません。ラックに、検体ブランクA—検体A—検体ブランクB—検体B—……と並べるだけで充分です。勿論、検量線曲り補正を併用できます。

- (5) 検体試料を恒温に保つことができます。

市販の恒温水循環装置を接続します。温度管理を必要とする項目分析の場合、便利です。

また、この装置は105-40/50形の他に100-25/26形, 220A形, 320/330形各分光光度計に接続できます。

X線エネルギーのスペクトル解析と鉱物の微小部元素分析

森 健* 高井 憲二** 兼平 慶一郎***

(昭和57年7月5日受理)

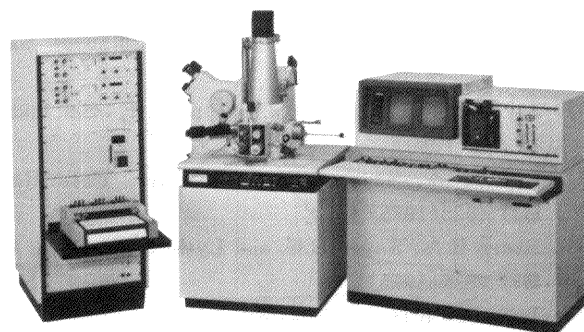
1. はじめに

エネルギー分散形マイクロ・プローブによる定量元素分析は、(1) X線エネルギースペクトルの採取、(2) 元素の特性X線の抽出、(3) 標準物質のスペクトルとの比較、という3段階から成っている。波長分散法の対応する段階と比較すると、X線計測の容易さと強度の安定性の故にエネルギー分散法は第1段階において優れ、低分解能および検出器とX線との間の相互作用の故に第2段階で劣る。第3段階は両者に共通である。したがって、第2段階にまつわる問題を解決出来れば波長分散法と同等か、それ以上の定量精度が実現されるはずである。以下の報文は、我々のそのような試みを紹介し、分析事例を示しながら問題点がどのように解決されたかを解説するものである。使用機器は日立S-550走査形電子顕微鏡にKEVEX7000Q分析装置とDEC11/03ミニコンとを接続したシステムである。

2. 分析法

化学組成が既知の標準物質と、未知試料の特性X線強度がひとたび求めれば、ZAF補正法が有効に定量結果を与えることは、波長分散法によるマイクロ・プローブ分析の実績を通じて広く理解されている。エネルギー分散法の場合、X線と固体検出器との相互作用などのために、実際のエネルギースペクトルは特性X線と連続X線の和からの偏差を見る。原因の主たるものは、イスケープ・ピーク、電子雑音、サム・ピーク、および固体検出器による電荷捕捉の不完全さに起因するピークの変形である。KEVEX社の使用説明書などにある通常の定量分析法では連続X線強度の除去とイスケープ・ピークの補正のみを行なうことになっている。しかし、我々が要求する分析精度を実現するには、これでは充分ではない。電子雑音は低エネルギー部のバックグラウンドを強め、Naの過大評価に帰結する。固体検出器による電荷捕捉の不完全さは、隣接元素を過大評価させる。例えば、多量のMgを含みNaが存在しない試料の場合でも、無視出来ない程のNaが算出されてしまう。

我々は、最初の問題に関して、井上と中塚⁽¹⁾に習い、補正を行なっている。ただし、補正量は天然の珪灰石(理想構造式は CaSiO_3)を用いて実測により決定した。図1の(a)に示すように、珪灰石のスペクトルと算出された連続X線強度との間に低エネルギー部で不一致がある。これが電子雑音と称するものであり、モデル化すると(b)のようになる。NaKα線のエネルギーは電子雑音内にあり、Naの定量のため



X-650 日立微小X線分析装置

にはまずこの雑音を除去しなければならない。未知試料の分析にあたっては、モデルの平坦部をスペクトルの対応エネルギー域で規格化し、スペクトルから差し引く。このようにして、スペクトルのバックグラウンドを全エネルギー領域にわたり連続X線の強度でもって表現することが可能

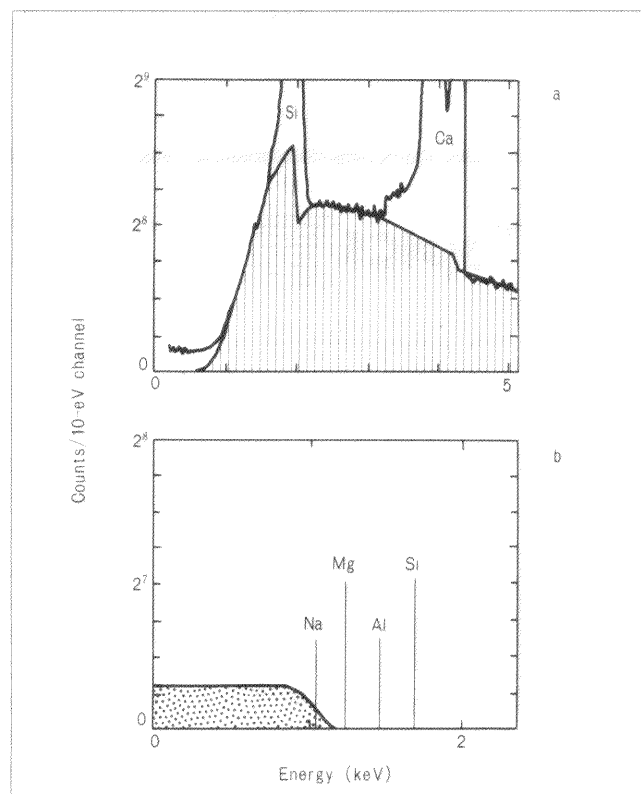


図1 (a) 珪灰石試量のスペクトルにイスケープ・ピーク補正を施し、電子雑音を除去したもの。陰影部は算出した連続X線強度。両者間で低エネルギー域に強度差が見られる。(b) 実測した強度差をモデル化したもの。垂線は特性X線の位置を示す。

* 千葉大学理学部 地学教室、助教授 Ph.D.

** 千葉大学理学部 地学教室、助手

*** 千葉大学理学部 地学教室、教授、理博

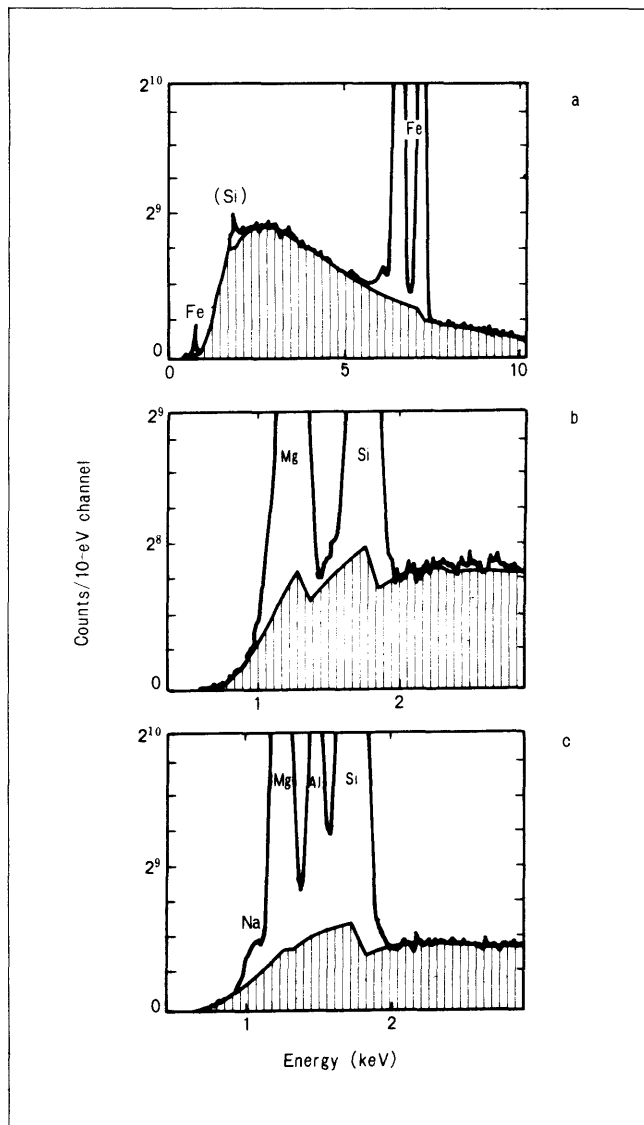


図2 a, b, cの試料はそれぞれ鉄、オリビン、単斜輝石。陰影部は連続X線強度。

となった。その様子を、金属鉄、オリビン、単斜輝石の3例について示したのが図2である。

不完全な電荷捕捉によるX線ピークの変形を補正する方法は、ReedとWare⁽²⁾から学んだ。すなわち、我々のやり方は、この補正を他の要因に由来するピークの重なりと一括して補正する彼らのオーバーラップ法のうち、今問題にしている部分のみを独立させたものである。補正には単体もしくはX線ピークの重なりが無いような化合物のスペクトルと、それにあてはめたガウス曲線との差を実測し、これを未知試料の特性X線強度で規格化して補正量を求めた。補正量は各チャンネル毎にスペクトルから差し引く。我々はこの補正をcomplete charge collectionの頭文字をとり、CCC補正と称している。

その他の測定法は、他の多くの実験室とほとんど変わらないので解説は概略にとどめる。加速電圧は20kV、ピーム電流は 2×10^{-10} A、実計数時間は200秒である。標準物質は表1に掲げた。主として珪酸塩である鉱物を分析するのに、

表1 標準物質の選択

アステリスクを付したものは天然の鉱物。その他は合成物。

Na	albite*	NaAlSi ₃ O ₈
Mg	periclase	MgO
Al	corundum	Al ₂ O ₃
Si	metal	Si
Ca	wollastonite*	CaSiO ₃
Ti	rutil	TiO ₂
Cr	metal	Cr
Mn	rhodonite	MnSiO ₃
Fe	metal	Fe
Ni	olivine	Ni ₂ SiO ₄

標準として金属を多用している点に異和感を覚える読者もおられるかも知れない。結合様式に応じて特性X線のエネルギーは異なり、今のような場合に金属を使用することは不可とされているからである。しかし、このようにしたのには理由がある。エネルギー分散法は波長分散法に比べて分解能が劣る。そこでエネルギー変化は1チャンネル内に収まり、分析精度には実用上影響がない。このようにして標準物質の選択の幅が広がった。

上記のように測定条件を設定すると、ごく僅かながらサム・ピークが見える場合がある。補正処理を計算機で行なうことは可能ではあるが、計算時間がかかる。サム・ピークを特性X線のピークと誤認しなければ定量分析としての実害は無いので、我々は補正処理を行っていない。

以上の分析手順をまとめると次のようになる。

- (1) 未知試料のX線スペクトルの採取
- (2) イスケープ・ピークの補正
- (3) 電子雑音の除去
- (4) 連続X線の除去
- (5) CCC補正
- (6) ピーク分離と特性X線強度の確定
- (7) 計算機のメモリーに在る標準物質の強度と比較し、

ZAF補正計算により分析値を算出。

分析操作は簡単になり、最初に測定元素などの初期パラメーターを設定すると、後は、スペクトル採取を開始するだけで、待っていれば分析結果が印字される。

3. 電子雑音除去とCCC補正の効果

表2にオリビン（宝石名はペリドート）の分析値を示す。このオリビンはダイヤモンドと共に地球深部から地表にもたらされたものである。理想構造式はMg₂SiO₄。3番目の分析値が前述どおりの方法で測定したものである。それに対し、1番目と2番目は、それぞれ電子雑音の除去とCCC補正を怠った場合の結果である。

1番目ではNa₂Oが検出されている。オリビンにはNa⁺のような大きなイオンはほとんど入らないので湿式分析では普通Na₂Oを定量しない。実際、波長分散法でこの試料を定量すると0.02wt%程度のNa₂Oが検出されるにすぎない。生のスペクトルにNaのピークは見られず、電子雑音強度を誤認しているのである。

CCC補正はさらに重要である。2番目の分析値に見られるNa₂Oの過大評価は主として強いMgピークによるものだ

し、AlはSiピークのせいである。その結果、分析値の合計は100%を超え、構造式も理論値からずれる。4番目は、O'HaraとMercy⁽³⁾による湿式分析値である。参考にして頂きたい。

4. 鉱物の定量分析

マイクロ・プローブ分析の精度を論ずるには、湿式化学分析により組成が既知である試料を測定して、その差異を検討するのが常である。例えばReedとWare⁽⁴⁾や井上と中塚⁽¹⁾があるし、さらに最近では藤巻と青木⁽⁵⁾のように理解を超えるほど高い分析精度を主張する報告もある。しかし、ここでは敢えてこの方法を採らない。かわりに、分析結果が鉱物の理想構造式をどの程度実現しているかに着目したい。この目的に沿って、結晶構造と電荷の中和から要請される構造式の定比が成立していると考えられる鉱物を選び、分析を行なった。その中から表3には何らかの理由で分析が容易ではないような試料の分析結果を載せた。以下に、各各について、第2章で述べた分析法が分析上の困難をいかに克服しているかを解説する。表3を参照しながら読んで頂きたい。

4.1 カヤナイト

四国の三波川帯を構成する変成岩中の鉱物である。理想構造式は Al_2SiO_5 。固溶体としては単純である。 Fe^{3+} がAlの一部を置換し、他の元素は一般にほとんど存在しない。分析結果では、5個の酸素に対しSiが1個、AlとFeの合計が2個という特徴が良く現われている。しかし、普通ではこのようにうまくはいかない。CCC補正を怠ると、強いAlとSiの強度の影響で MgO が検出され、 Al_2O_3 が多く出る。このことはZAF補正計算の結果、 SiO_2 の過大評価に結びつくだろう。分析値の合計は100%を大きく超え、構造式も理論値からずれることになる。Si検出器の分解能が充分ではなく、隣合う元素の特性X線が完全には分離出来ない低エネルギー

表2 オリビンの分析結果

1 電子雑音の除去を怠った場合、2 CCC補正を行なわなかった場合、3 全ての補正を施した通常分析法による結果、4 湿式化学分析の結果、n.d.: 検出限界以下、n.a.: 測定せず、構造式は酸素を4個として計算したもの。

	1	2	3	4
Na ₂ O	0.11	1.14	n.d.	n.a.
MgO	50.09	50.80	50.00	50.24
Al ₂ O ₃	n.d.	0.11	n.d.	0.04
SiO ₂	40.94	41.23	40.91	n.a.
CaO	n.d.	n.d.	n.d.	0.08
TiO ₂	0.05	0.05	0.05	0.03
Cr ₂ O ₃	n.d.	n.d.	n.d.	0.01
MnO	0.13	0.13	0.13	0.10
FeO	8.19	8.19	8.19	8.05
NiO	0.47	0.47	0.47	0.43
Total	99.98	102.12	99.75	—
Na	0.005	0.053	—	—
Mg	1.821	1.815	1.820	—
Al	—	0.003	—	—
Si	0.998	0.988	0.999	—
Ca	—	—	—	—
Ti	0.001	0.001	0.001	—
Cr	—	—	—	—
Mn	0.003	0.003	0.003	—
Fe	0.167	0.164	0.167	—
Ni	0.009	0.009	0.009	—
Total	3.004	3.036	2.999	—

表3 鉱物の分析結果と構造式

MnとFeの酸化状態は、各鉱物の結晶化学的知識に基づいて判断した。

	カヤナイト	ガーネット	オンファサイト	石英	紅簾石
Na ₂ O	n.d.	n.d.	5.20	n.d.	n.d.
MgO	n.d.	20.20	11.29	n.d.	0.26
Al ₂ O ₃	62.16	21.86	8.13	n.d.	17.30
SiO ₂	37.13	41.00	55.82	99.30	37.06
CaO	n.d.	4.74	14.13	n.d.	22.39
TiO ₂	n.d.	n.d.	0.25	n.d.	n.d.
Cr ₂ O ₃	n.d.	2.66	0.17	n.d.	n.d.
MnO	n.d.	0.40	0.12	n.d.	—
Mn ₂ O ₃	—	—	—	—	16.02
FeO	—	8.39	4.35	n.d.	—
Fe ₂ O ₃	0.41	—	—	—	3.79
NiO	n.d.	0.02	n.d.	n.d.	n.d.
Total	99.70	100.27	99.46	99.30	96.82
Na	—	—	0.361	—	—
Mg	—	2.146	0.603	—	0.064
Al	1.984	1.836	0.344	—	3.361
Si	1.006	2.993	2.002	1.000	6.110
Ca	—	0.362	0.543	—	3.955
Ti	—	—	0.007	—	—
Cr	—	0.150	0.005	—	—
Mn	—	0.024	0.004	—	2.010
Fe	0.008	0.500	0.130	—	0.470
Ni	—	0.001	—	—	—
Total	2.998	8.012	3.999	1.000	15.970
O	5	12	6	2	25

一部ではCCC補正の重要性は大きい。

4.2 ガーネット

1月の誕生石である。理想構造式は、 $\text{Mg}_3\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{12}$ 。3価のイオンがAlを、2価のイオンがMgを置換する。定量の難しい低エネルギー部に、隣接するMg, Al, Siが多量に入っている厄介な試料である。にも拘らず、構造式は理論値に近い。カヤナイト以上にCCC補正が効果を発揮した例である。

4.3 オンファサイト

この試料も第3章で述べたオリビンと同じく、溶岩の噴出により地球深部から上昇して来たものである。 $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ の理想構造式を有する単斜輝石の一種であり、多量のNaがCaの位置に入っている。強い $\text{MgK}\alpha$ の影響、低い計数効率、他の多くの元素ほど良い標準物質が無い等の理由により、 Na_2O の定量は容易とはされていない。しかも、 Na_2O は陽イオンと陰イオンの比がオンファサイト全体での比からかけ離れているため、 Na_2O の分析精度が低ければ構造式が顕著に悪くなる。しかし今の場合、比は2/3に近く、理論値を満足していることが判る。 $\text{MgK}\alpha$ からの影響をCCC補正で解決出来たのであろう。

4.4 石英

今ではクォーツと言った方が判り易いかもしれない。宝石のアメジストも鉱物学的には石英である。試料は30cm大の無色透明な単結晶の中心部であり、 SiO_2 以外の元素の存在は期待されない。事実、他の元素は検出されなかった。したがって、陽イオンの個数が丁度1であることについて分析精度を論ずる上での意味はない。興味深いのは、金属Siを標準として石英中の SiO_2 がこの程度まで測定出来るという点である。結合様式の違いにもとづく特性X線のエネルギーの差異にも拘らず、エネルギー分散法の低い分解能

という欠点を逆に活用して、分析誤差を最少限に抑えた例である。

4.5 紅簾石

嶺岡産の試料である。その名のとおりピンク色を呈す。含水鉱物であり、約2%の H_2O の存在が期待されるが、それにしてもこの分析値の合計は少し低いかもしれない。但し、理論構造式は25個の酸素に対して陽イオンが16個であるから、分析値はさほど悪くはなからう。スペクトルでは $MnK\beta$ のピークと $FeK\alpha$ のピークとが重なって1つのピークを作っている。それにも拘らず、Feの定量値がおかしくないのは、エネルギーのカリブレーションの定点として $FeK\alpha$ を使用していることによるのかもしれない。

5. あとがき

X線エネルギーのスペクトルから、特性X線強度以外のものを、それらが生じる機構に従い1つずつ除去するように努めた。その結果、分析精度を向上させることが出来た。そして、マイクロ・プローブ分析は、試料作製以外、あまり技術を要しなくなった。言い換えれば、機械を文字通り機械的に機能させ得るようになったと言える。

とはいえ、改良すべき点が無いわけではない。中でも最も重要なのは、X線強度の安定性に関してである。現状でも、標準物質を測定して計算機に記憶させておくと、相当長期間その値を使用し得る。しかし、電子顕微鏡と分析装

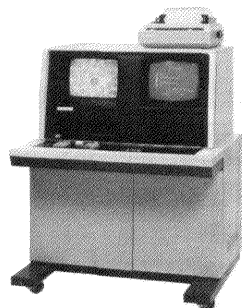
置がさらに安定になれば、標準物質の読み込みはひとつの実験室で1回だけ行なえばよいはずである。この改良がもたらす利益は大きい。

参考文献

- 1) 井上勝彦・中塚敏郎：エネルギー分散型EPMAの定量精度の評価, 学振141委員会25回研究会資料269, 15-20(1980)
- 2) Read, S.J.B. & Ware, N.G.: Quantitative electron microprobe analysis using a Lithium drifted Silicon detector, X-ray Spectrometry, 2, 69-74(1973)
- 3) O'Hara, M.J. & Mercy, E.L.P.: Petrology and petrogenesis of some garnetiferous peridotites, Trans. Roy. Soc. Edinburgh, 65, 251-314(1963)
- 4) Reed, S.J.B. & Ware, N.G.: Quantitative electron microprobe analysis of silicates using energy-dispersive X-ray spectrometry, Jour. Petrology, 16, 499-519(1975)
- 5) Fujimaki, H. & Aoki, K.: Quantitative microanalyses of silicates, oxides and sulfides using an energy-dispersive type electron probe, Science Rep. Tohoku Univ. III, 14, 261-268(1981)

Topics

806形日立血液像自動分類装置用 日立白血球像レビュ装置



臨床検査に血液中の白血球を分類する検査があります。分類は一般に杆状核好中球、分葉核好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球の6分類と異常球の分類を行います。これ等の検査は白血病等血液疾患の発見にはなくてはならない検査項目であります。従来この検査はスライドガラスの上に血液を

塗布し、特定の染色をした後、顕微鏡で技師が目視分類を行ってきました。しかし、ここ数年コンピュータ技術の進歩により血液像自動分類装置が出現し、日立においても55年806形血液像自動分類装置を開発し発売して来ました。このたび、さらに検査の効率向上をはかるため白血球像レビュ装置を開発しました。

この装置は806形で白血球分類を行い、分類不能とした血球（不明球と云う）をVTRに録画し、この録画カセットを白血球像レビュ装置にかけ、不明球をモニタ画面に再生することにより技師が目視確認を行い、その結果をシステムに転送すると共に、プリンタに出力する装置であります。このように806形で分類を行い、不明球をレビュ装置にて見直すことで処理能力の向上を計ることができます。さらに806形は、不明球をVTRに録画後はレビュ装置での不明球見直しと並行し、網赤血球の計数が可能となりました。

不明球の録画方式は音声トラックに、サンプルNOと正常6分類の分類結果、そして画像トラックに不明球を録画します。サンプルNOと結果はキャラクタ

ディスプレイ、不明球はカラーディスプレイに再生し、検査技師が目視確認を行い結果データの修正を行います。

■特 長

- (1) 不明球見直し時間を0.5~2.5秒まで変えられるため、初心者から熟練者まで幅広く使用できる。
- (2) 一時停止機能により、VTR録画血球像を長時間止めて、不明球の確認を行うことができます。
- (3) 血球名のキー入力か再生画面表示と非同期で行えるため、操作性が良好です。

■仕 様

処理速度	450検体/時間
分類結果	分類結果ヒスト表示： 12インチキャラクタディスプレイ 成績表：ドットプリンタ(80桁) システムへの転送：調歩同期カレントループ(RS-232C)
再生表示	12インチカラーディスプレイ
外形寸法	940(W)×1,145(H)×705(D)mm

日立走査電子顕微鏡 (S-450形) によるコイ科魚類の寄生性原生動物の観察

福田 芳生*

(昭和57年7月16日受理)

1. はじめに

一生を水中で送る魚類の体内外には、特殊化した多種多様な寄生虫が存在し、そこを主要な生活の場としている。魚体は寄生虫によって種々の障害を受けるため、寄生虫は動物学ばかりか水産増殖学の重要な課題となっている魚病学の領域においても、看過できない研究項目となっている。それらの寄生虫を駆除するための解決の糸口は、寄生虫の本体を正確に把握することから始まると言ってもよいであろう。

その有効な手段として走査電子顕微鏡を挙げることができ。この走査電子顕微鏡を使用することによって、従来の光学顕微鏡によっては知り得なかった寄生虫の微細な構造を画像の上に鮮明に捕えることが可能となった。そこで、今回はコイ科魚類の鰓に寄生する原生動物の走査電子顕微鏡による観察結果を以下に述べることにする。

2. 材料と方法

走査電子顕微鏡による観察の対象とした寄生性の原生動物はChlamydomontidae科に属する*Chilodonella cyprini*、Urceolariidae科に属する*Cydochaeta domerguei*、Myxobolidae科に属する*Myxobolus koi*の胞子である。これらの原生動物は、体長50cm前後あるニシキゴイの成魚(♀)の鰓耙、鰓血管および細胞性の偽膜によって被覆された鰓薄板表面に認められたものである。

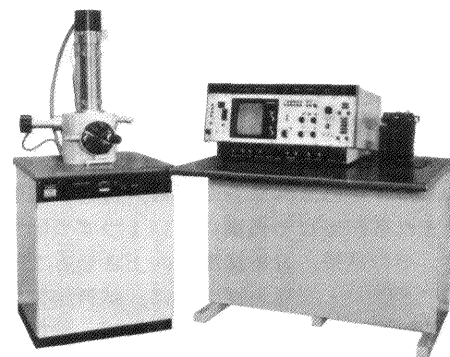
研究試料としたニシキゴイは2.5%ウレタン溶液中に放置し、魚の動きが停止した時点で断頭屠殺した。その後、鰓および鰓耙の部分を鋭利な解剖鋏により切除し、10%フォルマリン固定とした。

走査電子顕微鏡のための試料として、鰓耙および鰓弁の部分を10×10mmの大きさに切断した。それらの試料はアルコール系列を通して臨界点乾燥装置に掛け、脱水を完全なものとした。試料は更にイオンコーターIBIIにより金をコーティングし、日立S-450形走査電子顕微鏡による観察と写真撮影に供した。その時の加速電圧は20kVである。

3. 観察および論議

観察の対象としたニシキゴイ成魚は、鰓の主要部分を構成する鰓弁の鰓薄板は完全に融合し、あたかも棍棒状を呈して見える。また鰓耙は、その表面を被覆する上皮が部分的に剥落している。この両者は表面を被覆する上皮に由来する大量の不定型の粘液物質や細胞の崩壊産物(いわゆる偽膜)によって厚く覆われる。

*Chilodonella cyprini*は、この様な鰓耙の付着物表面や融合した鰓薄板の窪みや表面に集合あるいは散在して認め



S-450日立走査電子顕微鏡

ることができる(図1~4)。*Chilodonella cyprini*の虫体は背腹方向に扁平であり、葉状を呈している。体の前方および後方は鈍円、体側縁部はほぼ直線状であり、細胞口の位置する腹側縁が一部弓状に窪み、それに続く体後側縁部に溝を伴う弧状の突出部がある。虫体の大きさは20×30μm前後あり、全体として腹側の細胞口を頂点とする三角形に近い。背面は平滑であり、特別な構造は認められない(図1~4)。細胞口は体腹側前方の内側中央部に位置し、直径3μm前後の円形を呈した結節状の突起物として認めることができる(図6の矢印)。細胞口開孔部の周囲は限界明瞭な環状構造からなる。細胞口内側の咽頭部には、14~26個のクチクラ性の桿状体があり、補強の役割を果している(江草, 1978)。

腹面には、体側に沿って弧を描いて走行する5~9列の線条群が認められる(図5~6)。各線条の間隔は0.5μm前後あり、そこに浅い溝を形成している。線条の数は体の一方側では5本、他方では9本を数え、それらの線条群は合流することがない。線条表面には、等間隔で並列する0.1μm前後の微細な果粒状構造が認められる。この線条は基本的には細胞口前方を半周する突起列と同一のものと考えられ、体側のものでは果粒状構造の間隔が詰まっていることが挙げられる。この*Chilodonella cyprini*の体表には、主要な原生動物の運動器官となっている線毛が存在しない。このことから考えるに、おそらく体を律動的に収縮することによって、魚体表面を移動するのであろう。鰓の壊死病(いわゆるカラムナリス病)を伴う個体では、崩壊した鰓薄板の上皮内に*Chilodonella cyprini*が侵入していることがあり、魚体組織の分解産物や微生物を摂取すると同時に、組織の崩壊をも助長していることを示唆している。

次にUrceolariidae科に属する*Cydochaeta domerguei*について述べることにする。この*Cydochaeta domerguei*は

*千葉県衛生研究所 病理研究室 研究員、医博

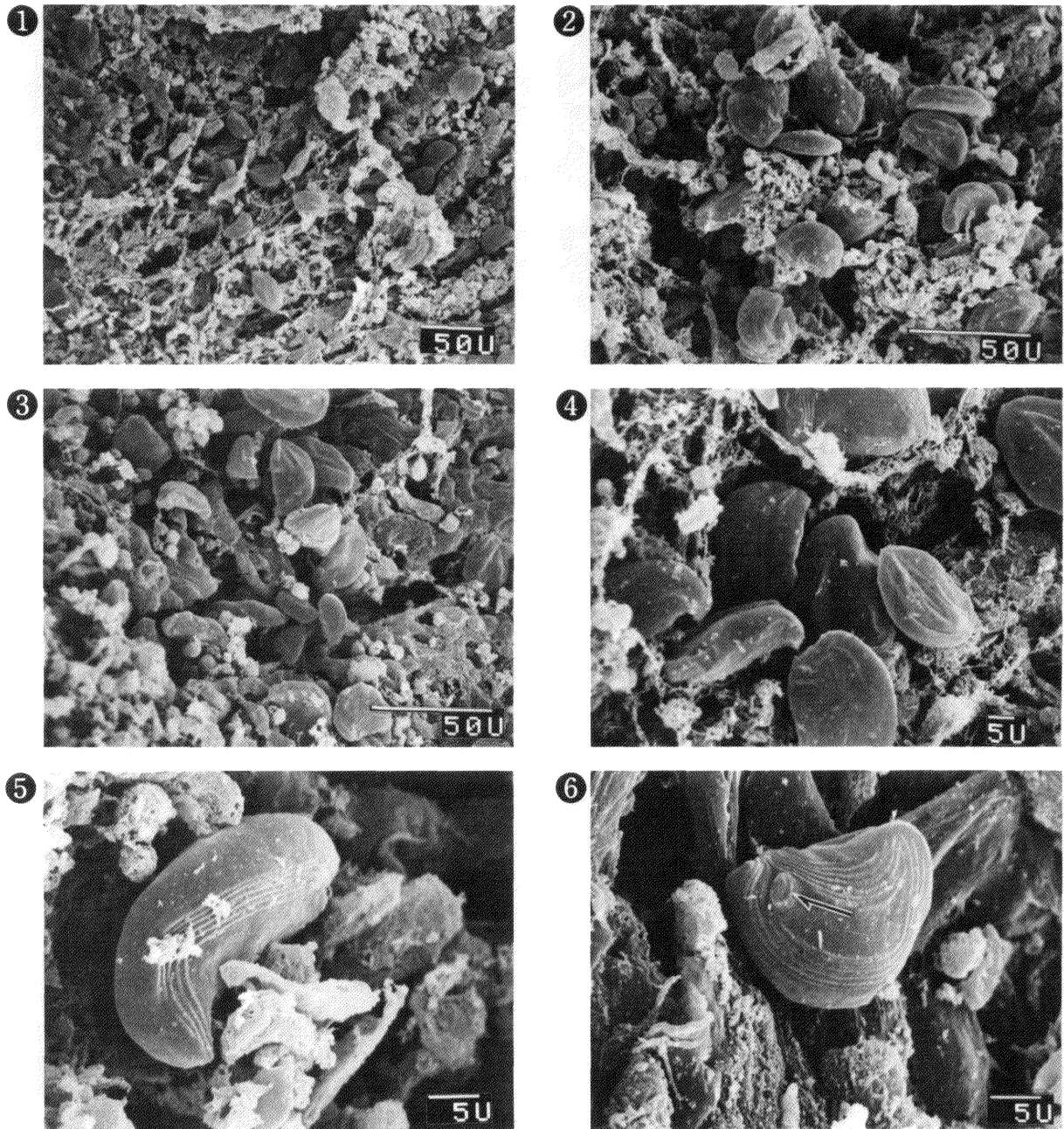


図1～6：融合し、偽膜に覆われた鰓薄板表面に密に分布する *Chilodonella cyprini* を示す。大部分は平滑な背面を向けている。図5～6は特異な線条を有する腹面を示す。図6の矢印は細胞口を示す(図中のUは μm を表わす)。

*Chilodonella cyprini*と同様、鰓耙や融合した鰓薄板表面に観察されたもので、虫体は直径 $45\mu\text{m}$ 前後の円盤状を呈する(図7～8)。背面は平滑で膨隆し、外側縁に2列の線毛環を有する(図9～10)。腹面には鋸歯状の外質性突起からなる特別な付着環がある(図11)。本論の *Cydochaeta domerguei* の付着環は22個を数えることができる。この付着環を構成する各突起は鋭い鎌状を呈し、隣接する突起と関節様の構造により接続し、その基部から体の内側に向って針状の突起が放射状に配列する(図12)。食性は *Chilodonella cyprini*と

同様である。

この *Chilodonella cyprini* および *Cydochaeta domerguei* は、常時魚体表面や体腔内に認められるものであるが、水質の悪化によって魚が弱り、表皮や鰓の粘液分泌能の亢進、組織の崩壊、細菌感染という一連の悪条件が揃った時、その活躍の場が与えられる。従って、上述の原生動物は厳密に定義するならば、環境の変化によっては、寄生に転ずる能力を潜在したものと言うことができる。しかし、幼魚や卵に *Cydochaeta domerguei* が高密度で付着した場合、それ

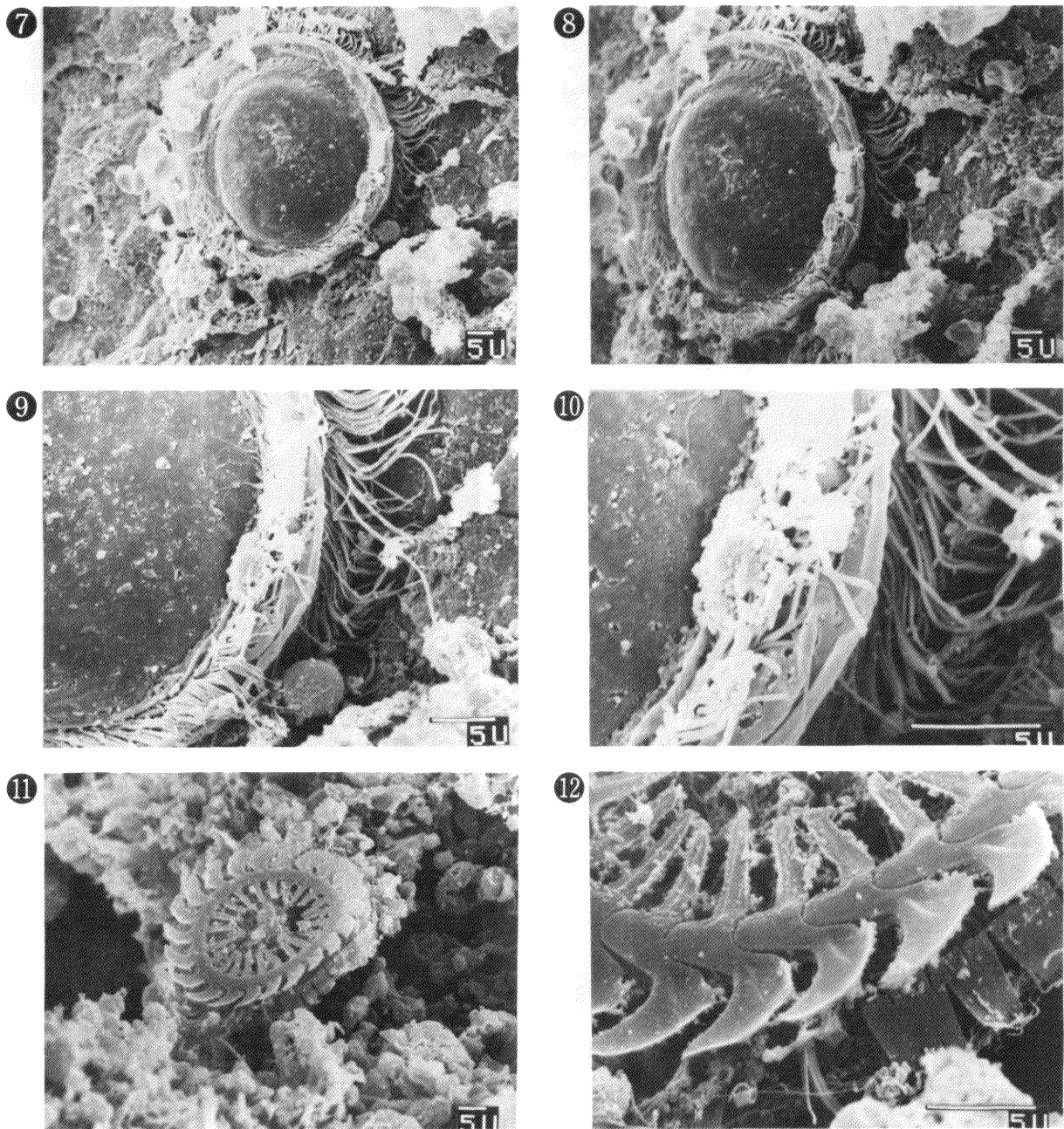


図7～8は、鰓耙表面に観察された*Cydodochaeta domerquei*の円盤状の背面を示す。図9～10は、背面外側縁に存在する2列の線毛環を示す。図11～12は、腹面にある車輪状の付着環を示す。付着環を構成する各突起は外側に向かって鎌状に突出し、内側では針状構造が放射状に並ぶ（図中のUは μm を表す）。

を食い尽すため、養魚家にとっては危険な寄生性原生動物として注意を怠るわけにはいかない。

最後の*Myxobolus koi*は、いわゆる鰓粘液胞子虫症の原因となるもので、経口的に摂取された胞子によって感染する。鰓薄板を被覆する呼吸上皮の基底膜と中心部の毛細血管網との間にある結合織中に大形の栄養体が形成され、そこから無数の胞子が血管中に遊走して行く。そして、鰓の部分に出血や血行障害、上皮の異常な増殖を招来し、このため魚は衰弱し遂には死亡することがある。図13～18は、鰓

血管腔内に充満する*Myxobolus koi*を示す。胞子は長径 $10\mu\text{m}$ 、短径 $7\mu\text{m}$ 前後の両端尖鋭な紡錘状を呈し、表面は平滑であり、*Myxobolus koi*の胞子の特徴を良く捕えている。

(図8)

4. 終りに

魚類の寄生虫に関する研究は、かなり以前から各国で行なわれてきた。しかし、走査電子顕微鏡の出現によって、その分類、微細構造、生活史の詳細な再検討が開始され、全く新たな展望が開けたと言っても過言ではない。そして、

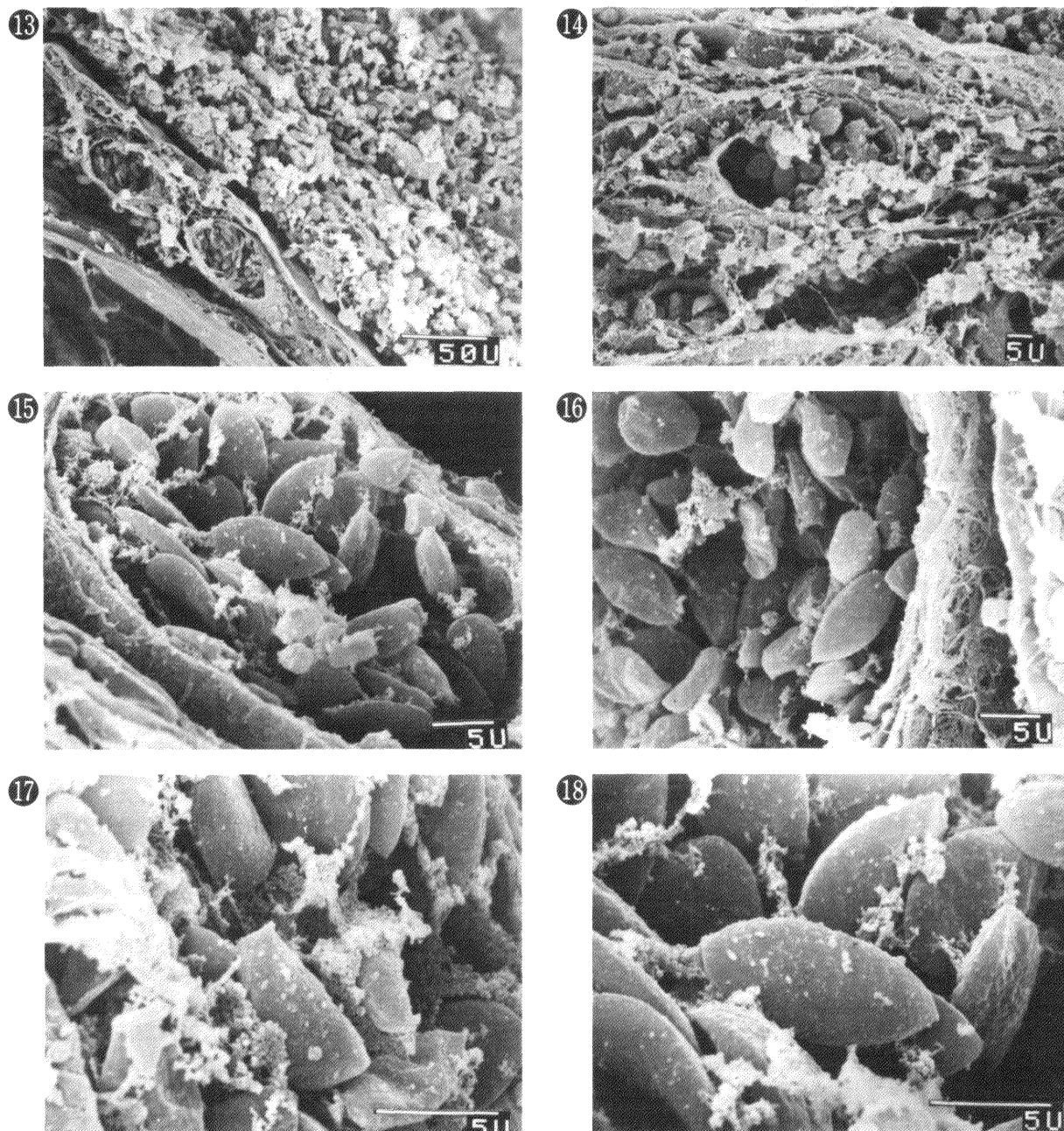


図13～18は鰓血管腔内に充満する *Myxobolus koi* の紡錘状の孢子を示す。これは鰓粘液孢子虫症の原因となる（図中のUはμを表わす）。

比較的近い将来、魚類の寄生虫対策が飛躍的に進歩することが期待される。

参考文献

- 1) 江草周三(1978)：魚の感染症，恒星社厚生閣，東京，pp.554.
- 2) Duijn, C.V. (1973)：Diseases of Fishes, Iliffe Books, London, pp.372.
- 3) Lom, J.(1973)：The adhesive disc of *Trichodinella epizootica*-Ultrastructure and injury to the host tissue.

Folia parasit.,20, 193～702.

- 4) Roberts, R.J.(1978)：Fish Pathology, Bailliere Tindall, London, p p .318.
- 5) 佐野徳夫訳(バイコフスキー編)，(1976)：魚類寄生虫(原生動物篇)，pp.195, 東京, 恒星社厚生閣(第二版)
- 6) Wales, J. and Wolf, H.(1955)：Three protozoan diseases of trout in California. Calif. Fish Game, 41, 183～187.

ベンゾイン蛍光法を利用した生体グアニジノ化合物の分析システム

大倉 洋甫* 黄 耀麟** 能田 均**

1. はじめに

生体中には、グアニジノ化合物として相対的に多量存在するクレアチニンやクレアチンの他に、アルギニンの代謝によって生成すると考えられているメチルグアニジン、グアニジノコハク酸など多種類の物質が微量ずつ存在する。これらの化合物は構造が互いに類似しており、その性質も酸性から塩基性に亘っているため、各個の化合物を定量するには、高度の分離技術と高感度な検出法を必要とする。

最近、分離分析の方法として液体クロマトグラフィーが著しく発展するにつれて、新しいグアニジノ化合物も生体中に見いだされてきた。

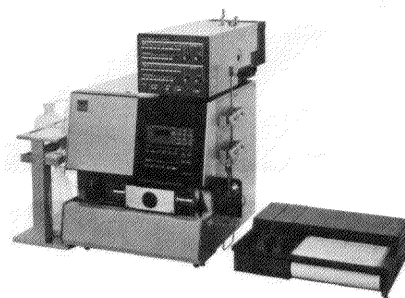
これらのグアニジノ化合物のうち、メチルグアニジン、グアニジノコハク酸、タウロシアミンなどが腎不全やそれに伴う尿毒症の患者体液中に正常人のそれよりも多量に見いだされ、腎不全患者で蓄積されていることがわかってきた。これらの生体グアニジノ化合物は尿毒症発症物質(Uremic toxins)と呼ばれる物質のうち、低分子量のものに相当するものである。メチルグアニジンはてんかんと関連する可能性が示されている。また、グアニジノ化合物がニトロ化されて生成する物質が変異原性や発癌性を有することも示唆されている。したがって、今後ますますグアニジノ化合物の臨床化学的研究が盛んになるものと予想される。

2. 従来の方法

生体グアニジノ化合物の分析における分離には、主に液体クロマトグラフィーが広く用いられてきた。クロマトグラフィーにおける溶出液中のグアニジノ化合物の検出には、9,10-フェナンスラキノンやニンヒドリンを用いた蛍光反応を利用する方法が広く行なわれてきた。これらの蛍光反応を応用したポストカラム誘導体化による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)がグアニジノ化合物の分析システムとして活用されている。^{1),2)}従来の分析法については著者らの総説³⁾を参照戴きたい。

3. ベンゾインによるグアニジノ化合物の蛍光反応

著者らはベンゾインがグアニジノ化合物と選択的にアルカリ性下、常温から100℃で反応して、蛍光物質、2-置換アミノ-4,5-ジフェニルイミダゾールを生じることを見出した^{4),5)}(図1)。蛍光物質の構造は反応するグアニジノ化合物によって異なる。しかし、蛍光励起および発光スペクトルは各化合物でほとんど変わらず(励起極大波長、約325nm; 発光極大波長、約435nm)、またpH9.2付近で最も強い蛍光を発する。これはこの反応をHPLCにおける蛍光検出に適用



638形日立高速液体クロマトグラフ

する場合に好都合であり、蛍光プレカラム誘導体化法(分析試料を予め蛍光物質に変えたのち、HPLCに付す方法)および蛍光ポストカラム誘導体化HPLCで分離後蛍光反応を行なって検出する方法)のいずれへも適用可能なことを示す。

この反応を活用した生体グアニジノ化合物のプレカラム誘導体化HPLCについては既に報告した^{3),6)}本稿では生体グアニジノ化合物のポストカラム誘導体化HPLCについて述べる。

4. ベンゾインによる蛍光ポストカラム誘導体化HPLC

(1) 分析システム

最近のアミノ酸自動分析計の場合と同じように、微量の生体試料中のグアニジノ化合物をイオン交換HPLCによ

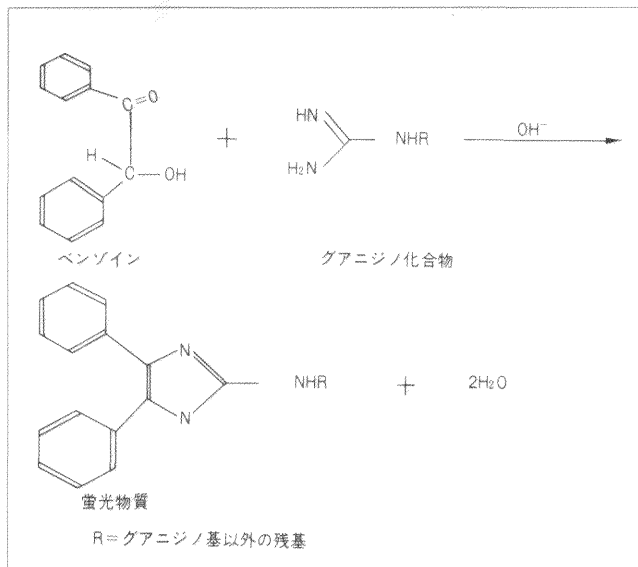


図1 ベンゾインとグアニジノ化合物の蛍光反応

* 九州大学薬学部 薬品分析化学教室、教授、薬博

** 九州大学薬学部 薬品分析化学教室

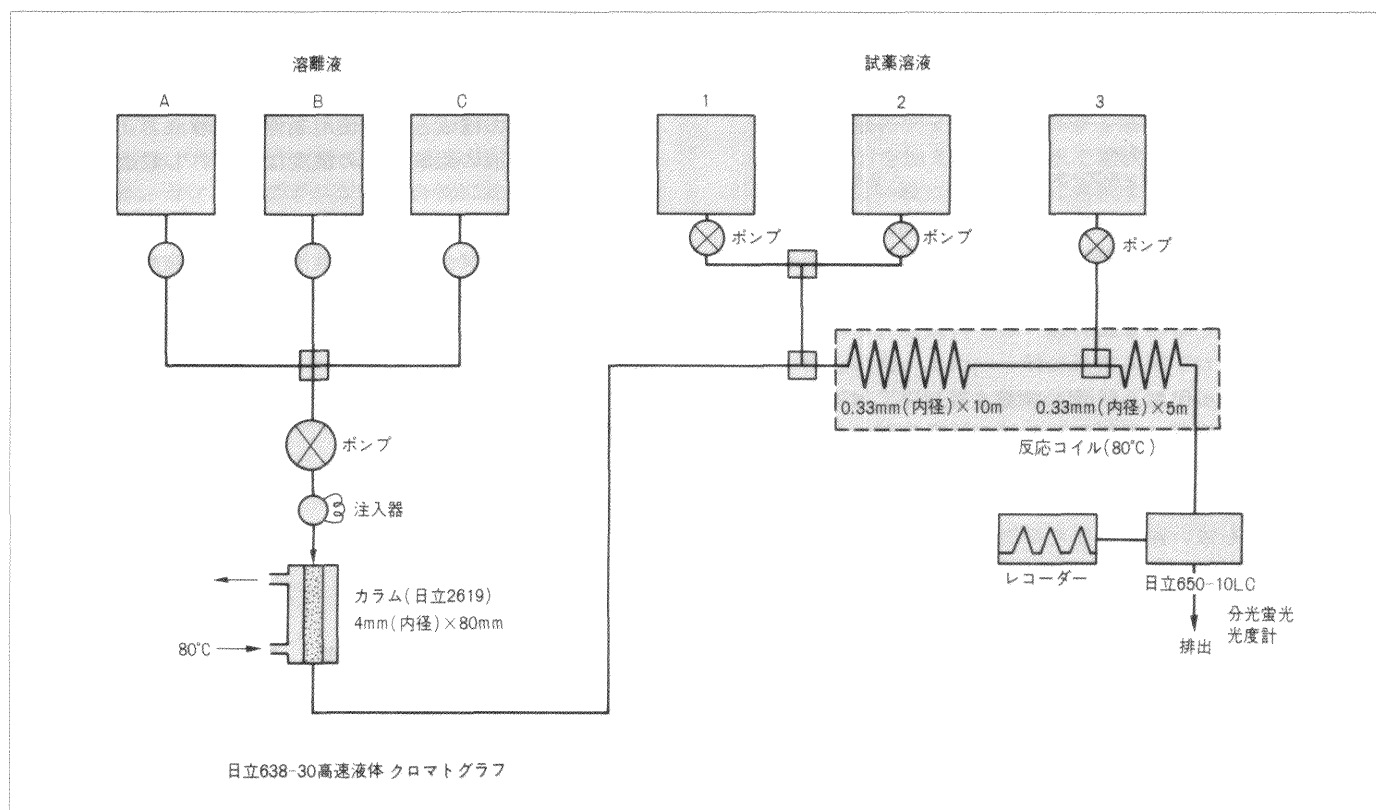


図2 生体グアニジノ化合物の分析システム

て分離し、ベンゾインで蛍光ラベルし、蛍光検出するものである。分析システムの流路図を図2に示す。

HPLCの装置として移動相溶媒プログラマーを内蔵する日立638-30高速液体クロマトグラフを用い、分離用カラムには日立アミノ酸分析計にも使用されている強酸性イオン交換体、日立2619(粒子径、 $5\mu\text{m}$)を内径4mm、長さ80mmのステンレスチューブに充填して用いた。カラムの分離効率は約70℃以上の高温において高いので、カラム温度は80℃とした。HPLC注入試料液(化合物の濃度に応じて100 μl まで)をクロマトグラフに注入し、表1に示す3種の溶離液A、BおよびC(流速、0.5ml/min)を用いる段階溶離法によって各グアニジノ化合物を酸性の強いものから分離溶出させる。試料には内部標準物質として生体には存在しないフェニルグアニジン1.0–20nmol/mlを加えておく。段階溶離プログラムを図3に示す。

溶離液A(pH3.4)により酸性の強いタウロシアミンとグアニジノコハク酸を、溶離液AおよびB(pH5.0)の等量混液によりクレアチンを、溶離液Bにより順次グアニジノ酢酸、アセチルアルギニン、アルギニン酸、グアニジノプロピオン酸、クレアチニン、グアニジノ酪酸、アルギニンを、溶離液Cにより塩基性の強いフェニルグアニジン、グアニジン、メチルグアニジン、アグマチンを32分間に溶離する。なお、図3に示すように、溶離液Aを25分から45分まで流してカラムを平衡化し、次の試料液の注入ができるようにする。

溶離されたグアニジノ化合物は、表2に示す試薬溶液に

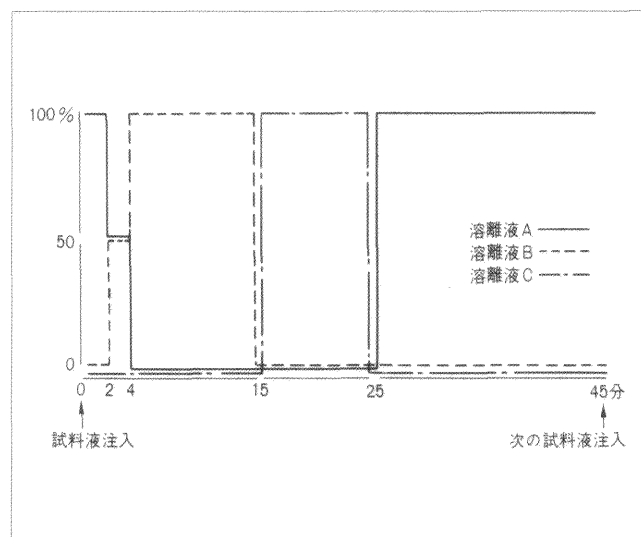


図3 段階溶離プログラム 流速：0.5ml/min

表1 溶離液の組成

溶離液	クエン酸ナトリウム・2水塩 (mM)	塩化ナトリウム (mM)	クエン酸 (mM)	水酸化カリウム (M)
A	36	92	77	
B	91	684	29	
C				1.0

ベースラインにおいて分離されることが分かる。

各グアニジノ化合物の $S/N=2$ における検出限界を溶出順に表3に示す。また、これらの化合物の構造を参考までに図5に示す。検出限界はニンヒドリンを用いる方法²⁾あるいは9,10-フェナンスラキノンをを用いる方法¹⁾のそれらにほぼ匹敵する。モノ置換グアニジノ化合物に比べるとジ置換体のクレアチンおよびクレアチニンの感度は約1/1000である。このことはこれらのグアニジノ化合物が生体試料中にモノ置換体に比してはるかに多量存在するので、グアニジノ化合物を一斉に検出するのに好都合である。

各グアニジノ化合物の定量にはピーク高さをを用い、フェニルグアニジンをを用いる内部標準法によった。検量線はモノ置換グアニジノ化合物ではそれぞれ少なくとも20nmol/HPLC注入量まで、クレアチンでは少なくとも5 μ mol/HPLC注入量、クレアチニンでは少なくとも30 μ mol/HPLC注

入量まで直線であった。

(2) 生体試料への適用

尿は遠心したのち、各グアニジノ化合物の推定濃度によって一定量のフェニルグアニジン溶液(50mM塩酸中;1.0–20nmol/ml)を加え、適当に水で希釈して、その100 μ lをHPLCに付す。一般に水で3倍に希釈するとよい。図6に健康男性(29歳)の随時尿の水3倍希釈液のクロマトグラムを、また図7に比較的多量のグアニジノ化合物が検出された健康男性(35歳)の早朝起床時尿の水3倍希釈液のクロマトグラムを示す。尿試料では一般に図6のようなクロマトグラムが得られた。また、一般に正常人尿ではタウロシアミン、グアニジノプロピオン酸およびアグマチンのピークは極めて小さく、特にグアニジノプロピオン酸とアグマチンのピ

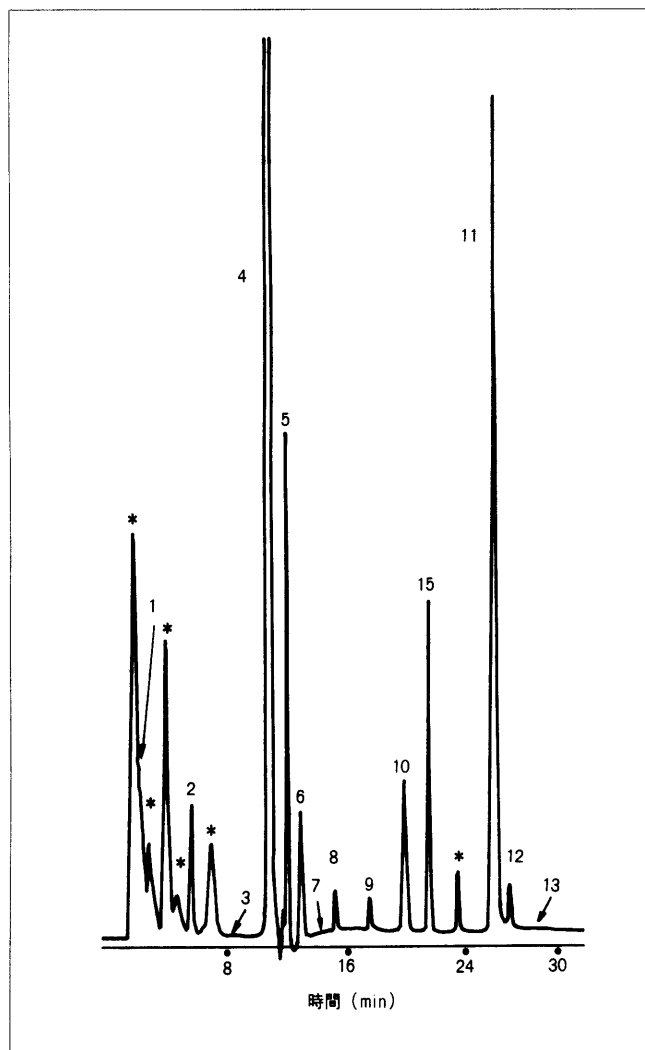


図6 健康人尿(水3倍希釈)のクロマトグラム(その1)
ピーク番号は図4と同じである。
各物質の濃度(nmol/ml): 1. トレース量; 2. 21.9; 3. トレース量
; 4. 280.0; 5. 12.0; 6. 3.9; 7. 不検出; 8. 16800; 9. 3.9; 10. 15.6
; 11. 3.3(内部標準); 12. 13.3; 13. トレース量
*: 未知物質

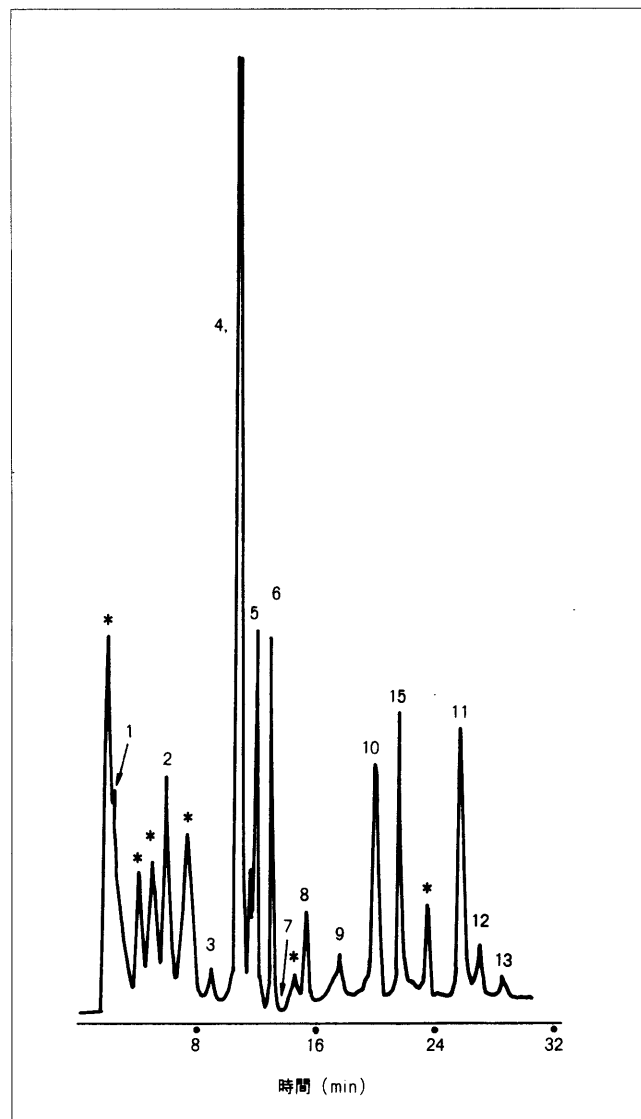


図7 健康人尿(水3倍希釈液)のクロマトグラム(その2)
ピーク番号は図4と同じである。
各物質の濃度(nmol/ml): 1. 約0.4; 2. 38.7; 3. 466.7; 4. 333.3; 5.
19.3; 6. 21.3; 7. 不検出; 8. 22667; 9. 4.7; 10. 26.0; 11. 6.6(内部標準); 12. 14.7; 13. 8.0
*: 未知物質

ークが $S/N=2$ 以上に認められることはなかった。

クロマトグラムには、内因性蛍光物質あるいは未知のグアニジノ化合物によるピークが数個認められたが、これらのピークがグアニジノ化合物の定量を妨害することはなかった。タウロシアミンのピークは未知ピークの肩に出現しているが、タウロシアミンのピークさはベースライン法で確実に測定できるので問題はなかった。

図6あるいは図7における尿にグアニジノ化合物の標準混液を加えて、クロマトグラムを求めると、各ピークの高さが増大する。このようにして、保持時間のみでなく各ピークが対応するグアニジノ化合物に基づくものであることを確認した。尿に添加した各グアニジノ化合物の絶対回収率は95～105%であった。また繰り返し精度も各グアニジノ化合物について良好であって、変動係数3%以下であった。

血清は100～300 μ lを除たんぱくし、pHを1.5～2に塩酸で調整してHPLCに付す。血清の除たんぱくを含む前処理法の詳細とデーターは別稿で報告する。また、血液透析における透析外液などに関するデーターも後日報告する予定である。

5. おわりに

グアニジノ化合物のベンゾインによる蛍光反応を利用して開発した生体グアニジノ化合物のHPLC分析システムは感度が高く、これにより内部標準物質を含めて14種のグアニジノ化合物を32分以内に（アグマチンは通常検出される

試料がないので、メチルグアニジンまでは30分以内に）検出することができる。このように14種ものグアニジノ化合物の迅速分離定量法は本法が初めてである。また、本法は9,10-フェナンスラキノンを用いるHPLC分析システムにおけるように流路に結晶析出が起きることもなく、9,10-フェナンスラキノン法で検出できないクレアチンも検出定量される。したがって、この分析システムは生体グアニジノ化合物の臨床化学的研究に有用であろう。

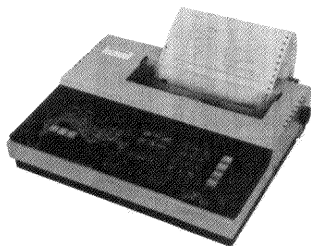
本研究におけるHPLC分析システムの構成に大変お世話になった日立製作所那珂工場の鷹野重威、塚田勝男、伊藤三男の各氏に厚く感謝申し上げる。

参考文献

- 1) Yamamoto, Y., Saito, A., Nanji, T., Maeda, K., Ohta, K.: J. Chromatogr. **162**, 23(1979); Idem: ibid. **162**, 327 (1969)
- 2) Hiraga, Y., Kinoshita, T.: J. Chromatogr. **226**, 43(1981)
- 3) 大倉洋甫, 甲斐雅亮: 化学の領域増刊 **133**(バイオメディカルクロマトグラフィー第2集), p. 113(1981), 南江堂
- 4) Ohkura, Y., Kai, M.: Anal. Chim. Acta **106**, 89(1979)
- 5) Kai, M., Yamaguchi, M., Ohkura, Y.: Anal. Chim. Acta **120**, 411(1980)
- 6) 甲斐雅亮, 小橋一弥, 大倉洋甫: 日本薬学会第100年会講演要旨集, P. 569(1980)

Topics

1台3役のインテリジェント・レコーダ 661形日立グラフィックレコーダ



661形日立グラフィックレコーダは、マイクロコンピュータ内蔵機器の記録端末として、1台で図形・グラフ・文字・アナログ電圧の経時変化などの記録が行なえる感熱記録方式のノンインパクトタイプレコーダです。

661-10形は、プリンタとプロッタ機能をインテリジェント化して備えており、外部コンピュータからJISコードでコマンドを入力すると、各種図形・グラフ・文字などの記録を行なうことができます。661-20形は、さらにレコーダ機能を備えていますので、スタンドアロンのアナログ・レコーダとして、高分解能の記録データを得ることができます。

■特 長

1. 1台3役

同一記録紙上にアナログの計測記録、文字、図形を混在して記録させたい場合、レコーダ、プリンタ、プロッタの三つの機能を外部からのデジタル信号により任意に切換えて動作させることができます。

2. ノンインパクト、インクレス

7×5ドットの感熱記録方式のため低騒音です。また、インクの保守は必要なく、常に鮮明な記録画質を得ることができます。

3. 高分解能の画質

命令できる最小ステップは0.1mm、

実際の記録処理はX軸0.05mm、Y軸0.025mmとなめらかな高品位画質が得られます。

4. 豊富なアナログ記録機能

スタンドアロンのレコーダとして、キーボードからチャート送り速度、ゼロ点シフト、極性反転、繰り返し記録、目盛線書込み、記録線指定(実線、点線、破線、一点鎖線)などを自由に指定できます。

■主な仕様

(1) レコーダ機能

ペン速度	180mm/s
入力	10mV-10V, 10レンジ
チャート速度	1-600mm/min, 69レンジ

(2) プリンタ機能

文字	JIS160種(大小英字・数字・カナ・記号)
印字速度	40字/s

(3) プロッタ機能

ステップサイズ	0.1mm
記録範囲	X軸 180mm Y軸 600mm

(4) インタフェース

8ビットパラレル(標準)又はRS-232-C(オプション)

解 説

228形日立ダブルビーム分光光度計とその応用
(パーソナルコンピュータを内蔵した分光光度計・その1)

小森 律夫* 合田 淳子* 田島 活利** 秋友 信雄* 根本 勲* 遠山 恵夫*

昭和57年7月20日受理

1. はじめに

日立製作所では世界に先駆けて、マイクロコンピュータ制御による340形自記分光光度計を1976年に発表した。それ以来、ほとんどの分光光度計にマイクロコンピュータが内蔵されるようになった。分光光度計の分野でマイクロコンピュータ化が急速に普及した理由は、精度の向上、機能面の拡張性に対する評価が高まったためである。従来のアナログ方式では、0%、100%の調整や、100%のベースラインの補正は、バリオームによる手動調整であった。これら調整用バリオームの設定値は恒久的なものでなく経時変化が充分に考えられる。一方、マイクロコンピュータによる演算処理では、演算プログラムさえ完全であれば、演算誤差が経時的に増大することはない。また、波長設定においても個人差はなくなる。

当初、自記分光光度計にマイクロコンピュータを内蔵した主要な動機は“ベースライン補正の自動化”であり、ベースラインをより一層平坦にすることであった。ダブルビーム形におけるベースラインの平坦度は極めて重要な性能であり、測定結果の良否に直接係わる。マイクロコンピュータは、バックグラウンドを一度メモリに記憶し、以降の測定ではこれをキャンセルする方式をとっており、全領域にわたり良質なベースラインが得られ、信頼性は一段と向上した。このように記憶メモリの活用に着目したのみならず演算能力を利用して吸光度(対数)変換、微分演算、機構面では、光源の自動切換え、リピートスキャンなど省力化に役立つ道が拓けた。

しかし、マイクロコンピュータ内蔵による機能向上は、分光光度計の製作技術からみて大きな貢献はしたが、ユーザー側からみれば、従来の性能の改善や効率化の面では進んだが特に新技術と言うべきものは含まれていないとも言える。特にマイクロコンピュータのプログラム作成という新技術はユーザーには非公開で、いわゆるブラックボックスであり、ユーザーが独自の分析演算法を持っても、プログラムを組みかえる事など全く出来なかった。

即ち、分光光度計を制御する内部のマイクロコンピュータがどのように演算し、どのようなプログラム言語を用いているか、どこに記憶部に何が記憶されているか、など知るすべがなかった。



228形日立ダブルビーム分光光度計

2. 装置の概要

このように従来のマイクロコンピュータ内蔵の分光光度計は、ユーザーが本体を制御するプログラムに手をつけたり、又は独自に変更、作成することは全くできなかった。228形ダブルビーム分光光度計(以下、228形と略す)は、パーソナルコンピュータの機能を合わせもつ紫外可視分光光度計で、波長範囲は190~900nmである。この装置の特色は、通常は従来の分光光度計として使用できるが、必要に応じてプログラムを組み入れて使用できる(ユーザープログラム可能な状態)ことにある。

通常の場合は、表示CRTとの対話により全ての操作が行われ、必要なキースイッチは5個のファンクションキースイッチと数値キースイッチだけである。図1には信号処理系統図を示す。

228形の電源を入れると、ベースライン補正を自動的に引き図2に示すようにCRT面上に選択画面(Select a frame[S]画面と通称する。)を表示する。カーソルの位置をshiftキーで選択して、Enterキーを押せばよい。例えば、Operating conditjon ([O]画面と通称する)画面を表示させると、分光光度計の基本的な諸条件が表示される。カーソルの移動により、それぞれの条件を変更設定できる。Recording画面([R]画面と通称する)にホルミニウムガラスフィルタの吸収曲線を表示した例を示すが、この[R]画面は、また時間変化を表示することもでき、グラフィックプリンタに同時に記録できる。この画面のままで測光スケールや波長間隔などの、変更が可能であり、グラフィックプリンタに記録後、枠取りおよび測定条件の印字ができる。

またMemory readout画面([M]画面と通称する)は、最後に記録した吸収曲線や時間変化を記録し再表示する。一度取りこんだデータのX軸(波長)、Y軸(測光スケール)は伸縮自在であり、部分拡大などに適する。各画面はハー

* 日立製作所 那珂工場

** 日立製作所 横浜工場

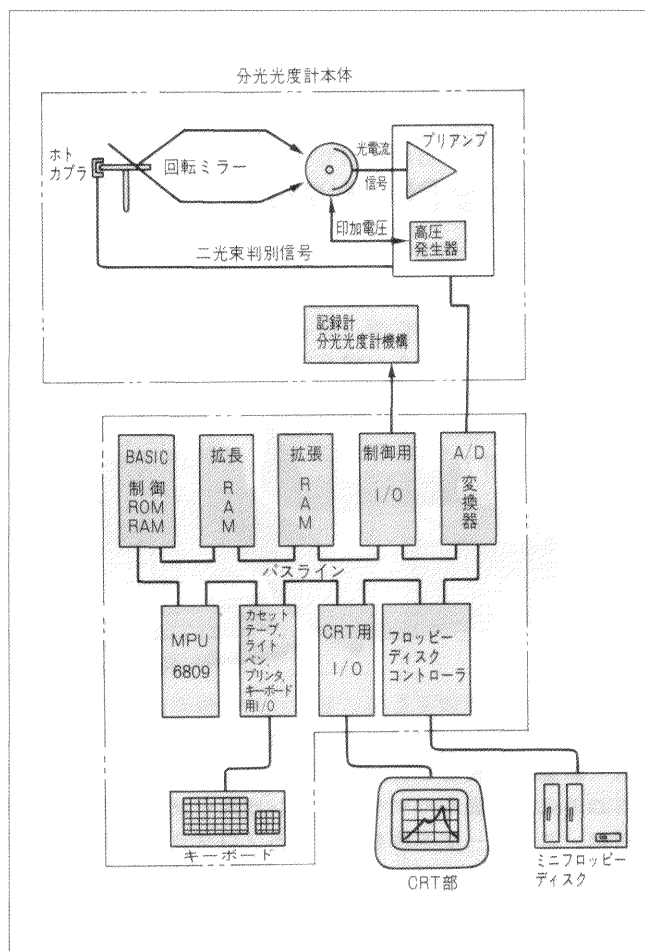


図1 信号処理系統図

ドコピーによりグラフィックプリンタに転写もできる。

228形はアナログ信号も取り出せるので一般の記録計(Y-Tレコーダ、あるいはX-Yレコーダ)も使用できることも大きな特長である。

なお、パーソナルコンピュータは、ユーザー個人が独自に希望のプログラムを組むことができるもので、プログラム言語としてBASIC言語を使用している。ユーザープログラマブルの用法については紙面の都合上、割愛し次回に報告する。

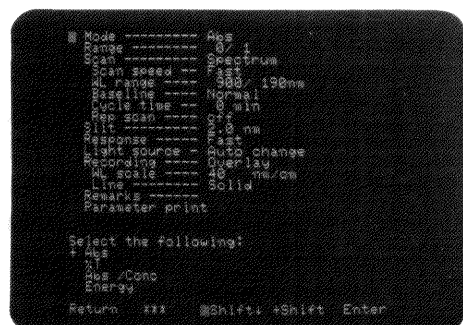
3. 測定値

(1) ピクリン酸、NADH溶液の測定

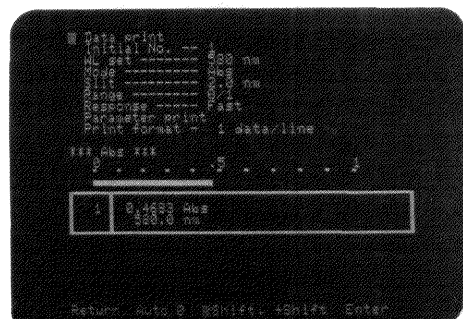
図3に、[R]画面表示にしてピクリン酸の吸収曲線を記録した。波長355nm、210nm付近の吸収ピークでの濃度と吸光度の関係を図4に示した。355nmでは吸光度4、210nmでは吸光度3付近まで直線性が保持されている。高い吸光度ではノイズレベルと信号レベル(例えば、吸光度4は0.01%T相当)の比が近づきその分だけ記録に乱れを生ずる。このような場合にはマイナス吸光度スケールが応用できる。日立製作所が世界で初めて実現したこのディファレンシャル・フィードバック方式は、-2 Absから+3 Absまでの範囲で差スペクトルの記録が可能であり、生化学方面に好評をいただいている。例えば、ミトコンドリアやチトクロームCの差スペクトルなどに有用である。

図5にはNADH溶液の吸収曲線を示した。[a]図には測光スケールを0-4Absに設定した場合、[b]図には-2Abs～+2Absに設定し標準光路に1%減光板(吸光度2相当)を置き、Abs、0ラインをマイナス吸光度2だけ沈めて(記録紙上0%位置)測定した結果を示した。即ち、測光スケール

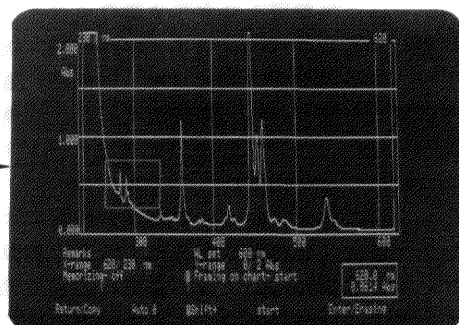
■測定条件読み出し・変更画面



■一定波長での測定画面(測光値印字画面)



■スペクトル、時間変化の表示画面



■記憶したスペクトル(又は時間変化)の再表示 上のRecording画面中の[]部分を拡大表示したもの。



図2 CRT画面への表示

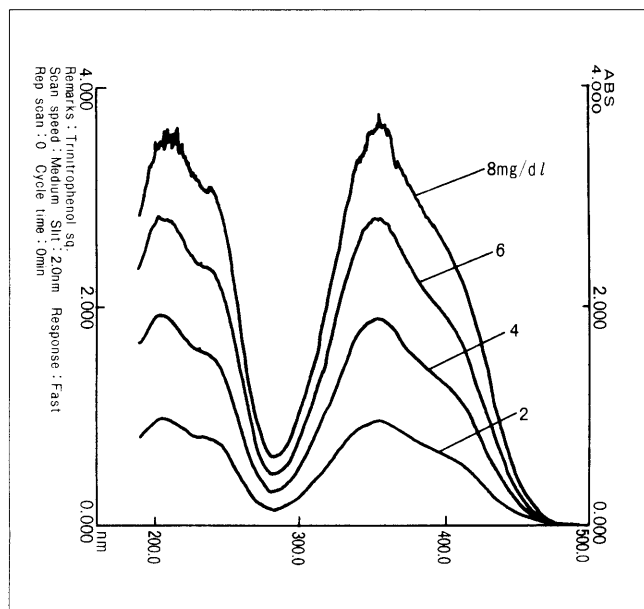


図3 各濃度におけるピクリン酸水溶液の吸収曲線

ル幅はAbs.4であり、かつ上限のノイズレベル信号はAbs.2相当として記録できるため、ノイズの少ない吸収曲線が得られる。高濃度試料の測定に有効である。

(2) パン酵母の測定

測光値の統計計算、検量線作画、測光精度の管理など定量分析で必要とされるプログラムは、ユーザープログラムで全て作成可能であるが、本装置はこれらの標準的な分析プログラムを、ミニフロッピーデスケットに記憶、保存さ

せて供給している。そのほか二波長、三波長演算などのスペクトル解析もミニフロッピーで供給している。

図6には、イースト菌の高濃度混濁試料を段階的に希釈した場合の吸収曲線を示した。“濁り”によるバックグラウンドの上に、cyt.c, b, aなどの生体色素が重畳されてショル

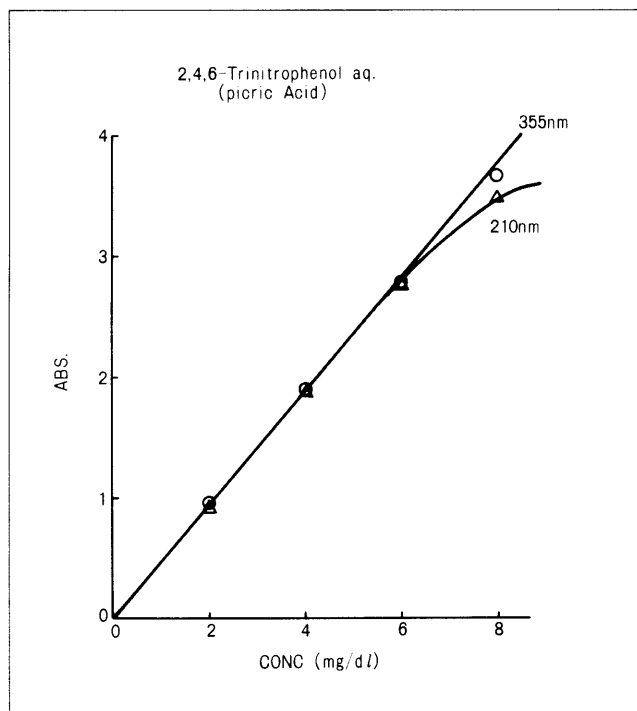
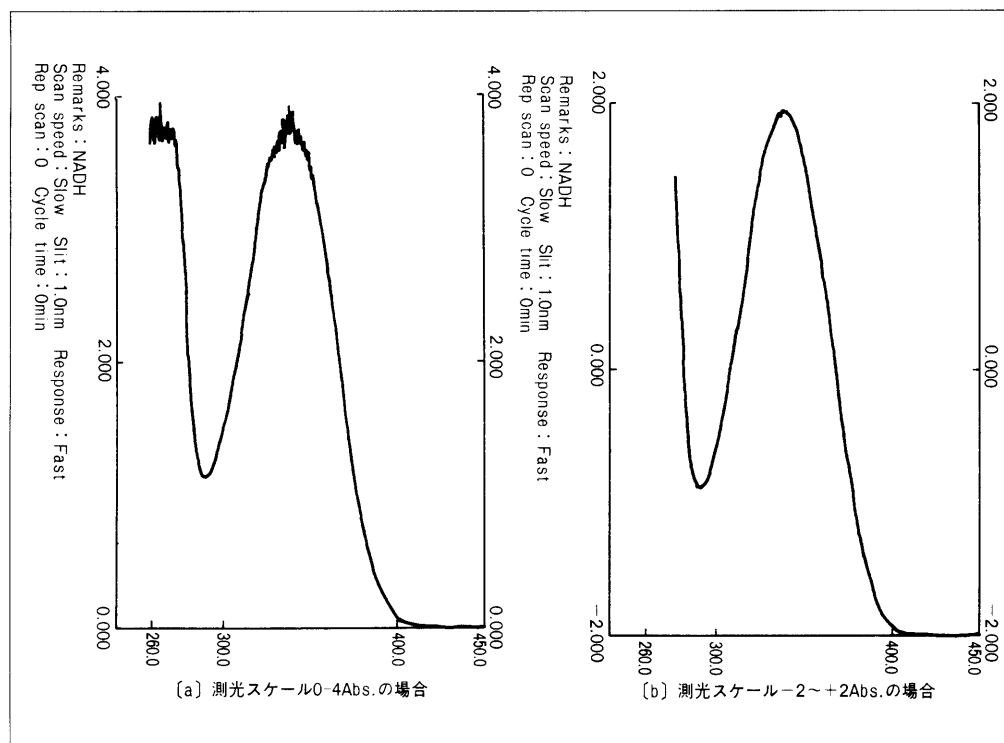


図4 ピクリン酸の検量線



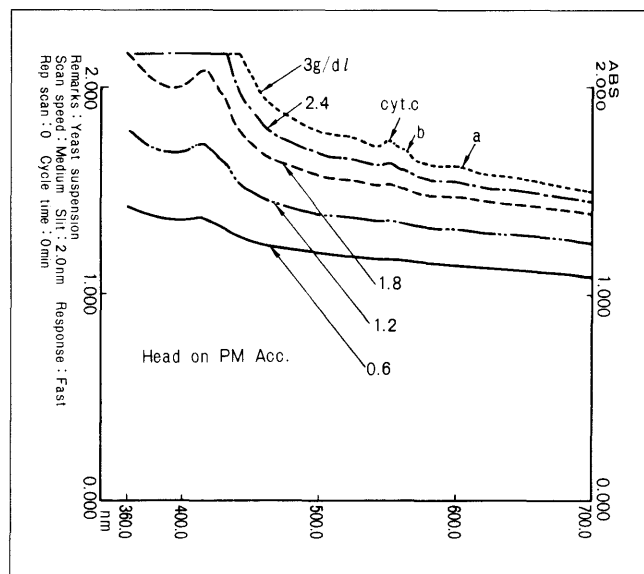


図6 イースト菌の各濃度における吸収曲線

ダーを形成している。従来、この種のショルダー成分の定量は、吸収ピークの前後に接線を描き、ピークから垂線を下ろして交わる点からの高さをチャート上から計り取るという手間を要した。図7のようにあらかじめ3つの波長を指定、入力しEnterキーを押せば、三波長に囲まれた部分の面積を算出する。

また、図8〔a〕は得られた値と濃度をもとに整理して、タイプモードで作表した。濃度と面積 ($\Delta A \times \text{nm}$ 値)、ピーク値との関係線も作画できる。なおYeast suspension,

conc(g/dl), Area, Peakなどはタイプモードで印字したものである。このデータをミニフロッピーデスキットにfileしておけば必要に応じて呼出し定量分析が可能である。検量線は濃度が高くなると上反り傾向になるが、これは粒子による多重散乱の影響である。

3. ネオジウム溶液の吸収スペクトルのピーク検出

吸収スペクトルのピーク波長と、その吸光度あるいは透過率を表示することができる。図6には塩化ネオジウム水溶液を用いて検出能を評価した。900~400nmの波長間に強弱、20本の吸収ピークが存在する。特に620~640nm, 400~450nm間の僅かな吸収ピークも取りこぼしなく検出できる。

(4) テトラヒドロフラン溶媒中のベンゼンの測定

最近、吸光分析法への微分スペクトル測光の応用が注目されている。微分スペクトルは、バックグラウンドの影響を除去し、“吸収スペクトルの肩”の波長位置の確認や定量分析に有用である。図10〔a〕図には市販のテトラヒドロフラン試薬の紫外域の吸収曲線を示す。この溶媒の吸収の立上り部分に、試薬に含まれる不純物であるベンゼンが重畳されてショルダーを形成しているのが判る(矢印の部分)。このようなショルダー成分の定量をする場合はバックグラウンドの部分を直線近似する、いわゆるベースライン法に依った。しかし、実際問題として〔a〕図程度の僅かなショルダーの場合は、正確な測定は断念せざるを得ない。〔b〕~〔e〕図には、〔a〕図の吸収曲線を一次~四次微分で測定した結果を示した。

一次および二次微分では、バックグラウンドは補正しきれず、かつベンゼンのショルダー成分の吸収が確認できないが、三次、四次と高次数になるに従い顕在化する。

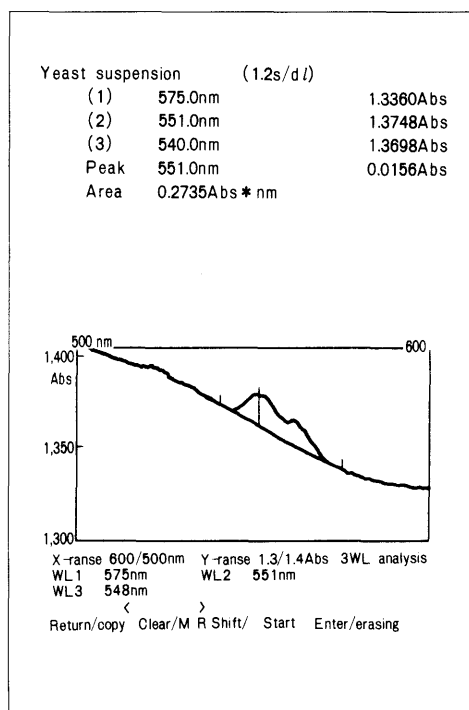


図7 三波長の選択とCRT画面上のハードコピー

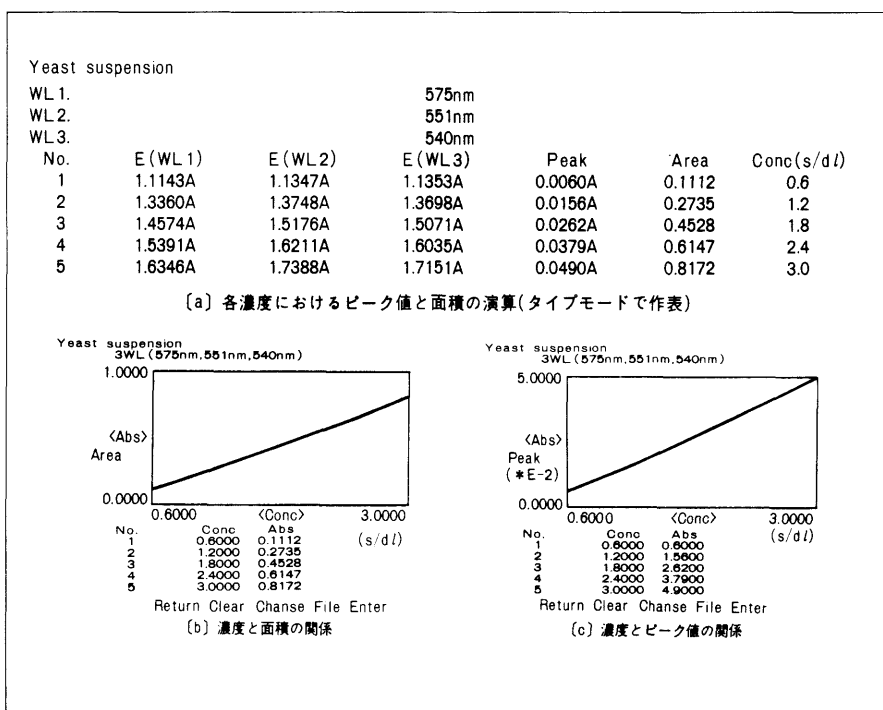


図8 測定値から面積、ピーク値の検量線の作画(CRT画面からのハードコピーとタイプ印字)

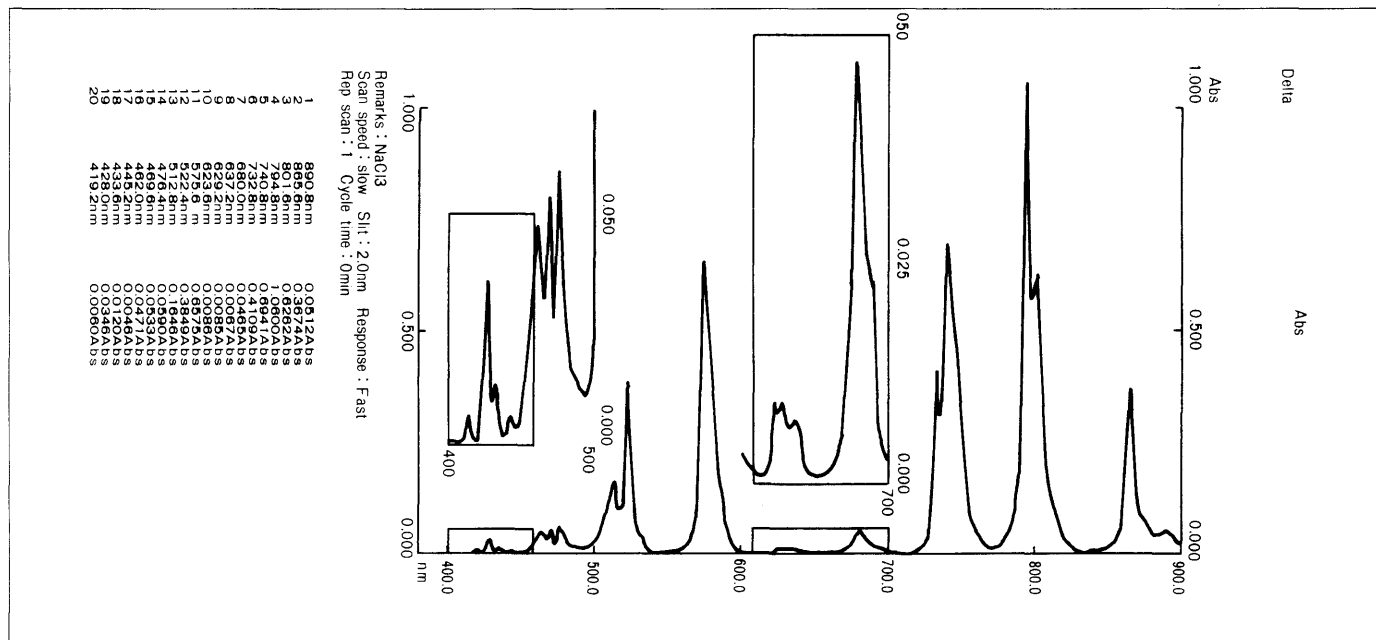


図9 塩化ネオジウム水溶液の吸収曲線とピーク検出

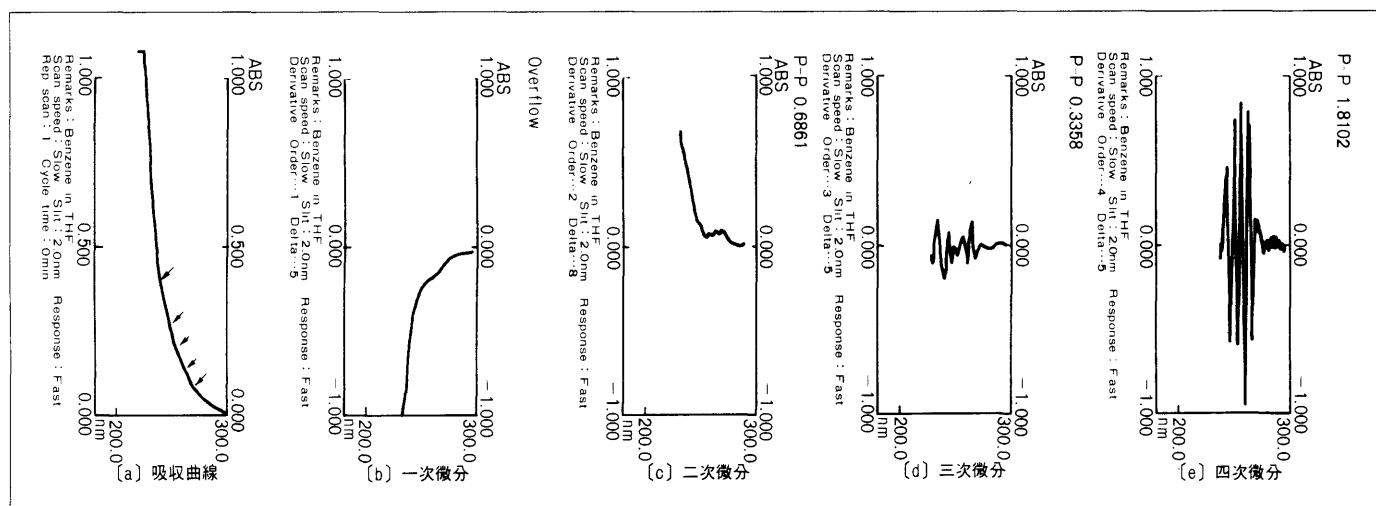


図10 テトラヒドロフラン溶媒の吸収曲線と各次微分スペクトル(一次～四次)

また高次微分スペクトルでは、バックグラウンド(テトラヒドロフラン溶媒の吸収)も消去され、ベンゼンの吸収のみ選択的に記録される。

スペクトル解析プログラムのディスクットを用いれば、微分スペクトルのピークと谷の振幅を自動的に捕捉し、p-p値として印字できる。

あらかじめ、微分スペクトルによる検量線を作成しておけば、ショルダー成分の定量分析も可能である。

4. まとめ

今やマイクロコンピュータを内蔵していない理化学装置を探すのが難しいほどマイクロコンピュータは広く普及した。しかし、プログラムの内容や操作手順などは全てメーカーが独自に製作したもので、ユーザーには公開されてい

かった。228形は共通フラグの公開、基本サブルーチンの公開、かつ測光データを変数として扱えるようにしたこと、BASIC言語でユーザーがプログラムの組めることなど、大きな特長を有する分光光度計である。本装置の開発の最大の眼目は装置をユーザープログラマブルな状態にすることであった。最近、パーソナルコンピュータは多方面で実用段階に入ってきており人々の関心も高い。特にBASIC言語を自由にあやつることのできる研究者は日増しに増加する趨勢にある。各研究分野において多様化かつ高度化する分析内容に対応して、ユーザーがプログラムを自ら構築し参画してラボラトリーオートメーション化や、分析精度の向上に役立つことを期待している。

850形日立分光蛍光光度計

野上 太郎* 広瀬 弘* 塚田 正道* 木村 光良* 滝 正弘* 大和田 実*

(昭和57年7月5日受理)

1. はじめに

研究目的に用いられる分光蛍光光度計は、感度に加えて測定対象により様々な性能・機能が要求される。850形日立分光蛍光光度計は、散乱光の多い混濁試料や固体試料を扱う分野、微弱蛍光測定を必要とする分野、分解能を要求する分野、高精度の補正スペクトルまたは目的に応じた各種データ処理を必要とする分野等に適合することを目的とした高性能分光蛍光光度計である。以下に装置の原理・機能・測定例について述べる。

2. 装置の原理

図1に装置の機能系統図を示す。Xeランプから出た光は、励起側複分光器の前置分光器及び主分光器を通して迷光の少ない励起光となり、試料を励起する。前置分光器は、迷光除去を目的とするものであり、光量ロスの少ない無収差凹面回析格子を採用している。主分光器は、高分解を達成するためのもので、高分散の平面回析格子を使用している。試料の発する蛍光は、蛍光側分光器で分光された後、検知器で受光され、A/D変換器によりデジタル信号となり、



850形日立分光光度計

コンピュータに読み込まれる。コンピュータには、測定条件や操作法を表示するCRT及び操作パネル、記録計等が、インターフェースを介して接続されている。装置の電源を投入すると、自動校正用のHgランプの光が、励起側及び蛍光側の分光器に導かれ、輝線により波長校正及びバンドパス校正が行なわれる。このような初期校正は、コンピュータにより自動的に行なわれる。測定時においても、波長・スリット・フィルタ・シャッタ・レコーダのチャート等が、コンピュータ制御される。その他、各種データ処理・定量演算・CRT表示等が、コンピュータにより可能となっている。

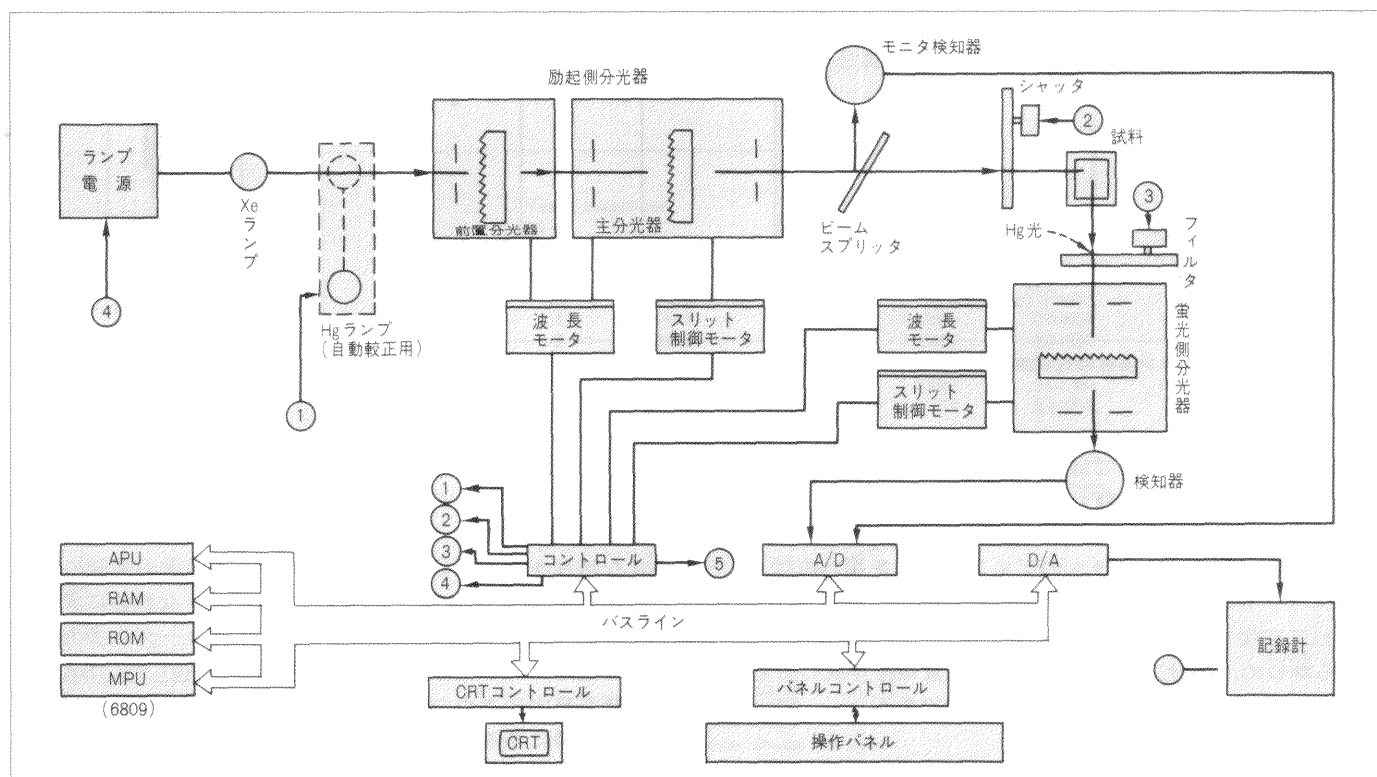


図1 機能系統図

*日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

る。高性能形の装置は、とかく操作が煩雑になりがちであるが、CRT上に操作法や測定条件を表示することにより、この点をカバーしている。

3. 主な仕様

- (1) 励起側分光器 ダブルモノクロメータ
 前置分光器：600本/mm 無収差凹面回折格子
 主分光器：1200本/mm 平面回折格子
- (3) 蛍光側分光器 シングルモノクロメータ
 1200本/mm 平面回折格子
- (3) 分解 0.15nm
- (4) 光源 150W Xeランプ、オゾン自己解消形ランプハウス
- (5) CRT 測定条件表示、項目表示、操作法表示
- (6) データ処理機能
 スペクトル補正、長波長領域スペクトル補正
 波数積分(量子収率算出用)、差スペクトル

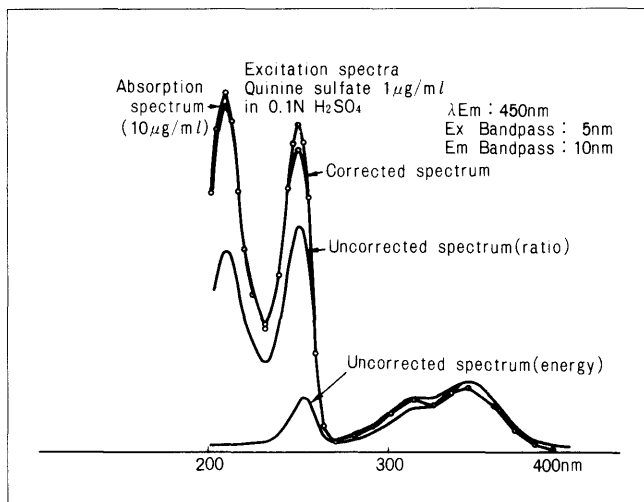


図2 硫酸キニーネの励起スペクトル

1次-4次微分、リピートスキャン、CAT(積算処理)、偏光度スペクトル

(7) 定量演算機能

濃度直読、時間積分、ゼロサプレッション

(8) その他のコンピュータ機能

ピーク自動検知、レコーダスケール自動調整
 記憶波長へのワンタッチ移動

(9) 必要試料量 0.6ml

4. 測定例

図2に補正スペクトルの例として、硫酸キニーネの励起スペクトルを示す。CORRECTED SPECTRUM(補正スペクトル)において、207nm付近のピークが正しく記録されていることが特長的である。

従来の分光蛍光光度計においては、207nmのピークが250nmのピークより低くなったり、場合によっては表われなかったりするのが普通であった。すなわち、Xeランプのエネルギーの低い短波長領域において、迷光の影響のため正しいスペクトル補正が行なわれていなかった。850形においては、このような問題が解決されている。

図3に、蛍光側のスペクトル補正領域を長波長域まで延長した場合の、補正蛍光スペクトルを示す。短波長域は、光量子計(ローダミンB)を用いた補正を行ない、長波長域は、標準タングステンランプを用いた補正を行なっている。2種類の補正関数が接続されて、補正領域は200nmから800nmまでとなっている。図3の例においては、2種類の試料の補正蛍光スペクトルについて波数積分値が求められている。一方の試料が量子収率既知の標準試料の場合、これを用いて他方の量子収率を算出することができる。

図4に、通常の分光蛍光光度計において測定困難な例として、フッ化ナトリウム処理による極微量ウランの測定例を示す。測定時には粉末状となっているため、散乱光レベルがきわめて高い。従来は、散乱光に含まれる迷光にかくれたショールダ状のピークで検知することしかできなかった

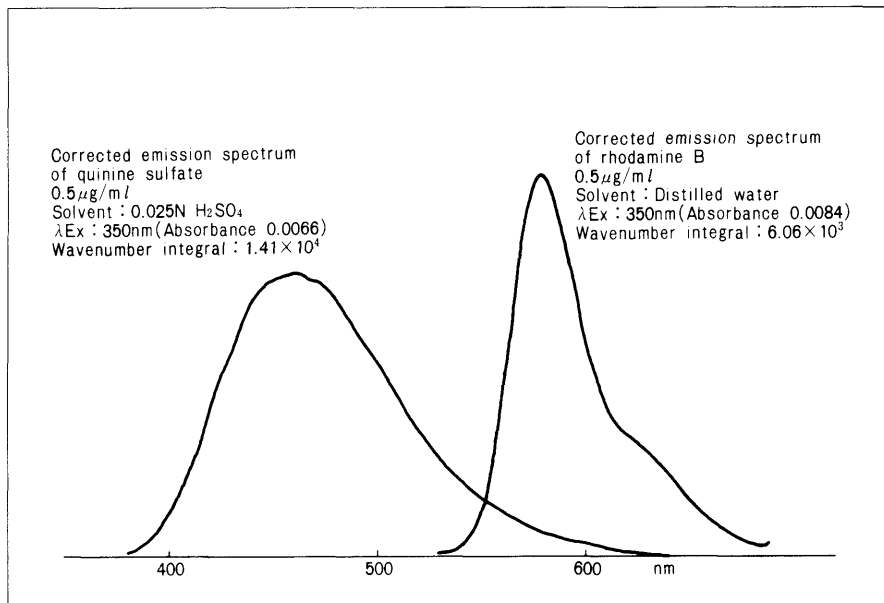


図3 長波長スペクトル補正及び波数積分の例

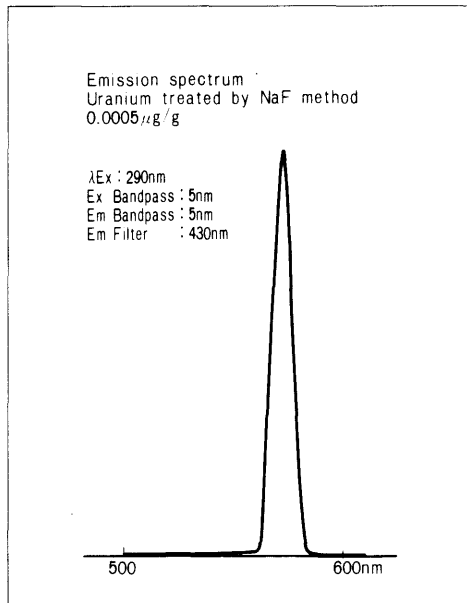


図4 ウラン(フッ化ナトリウム処理)の蛍光スペクトル

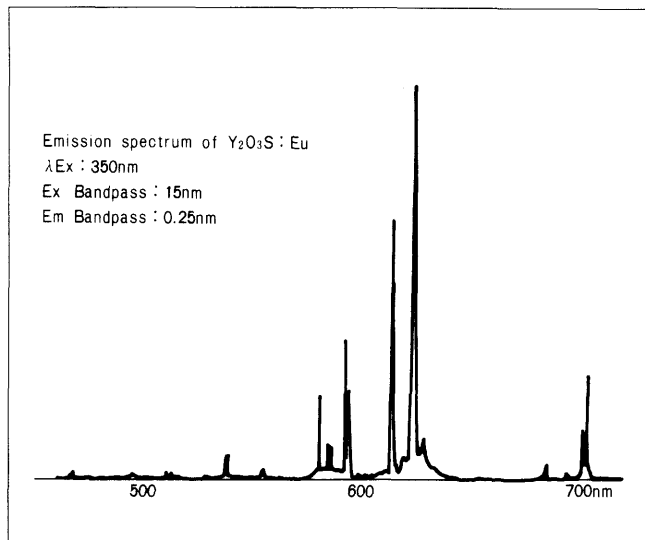
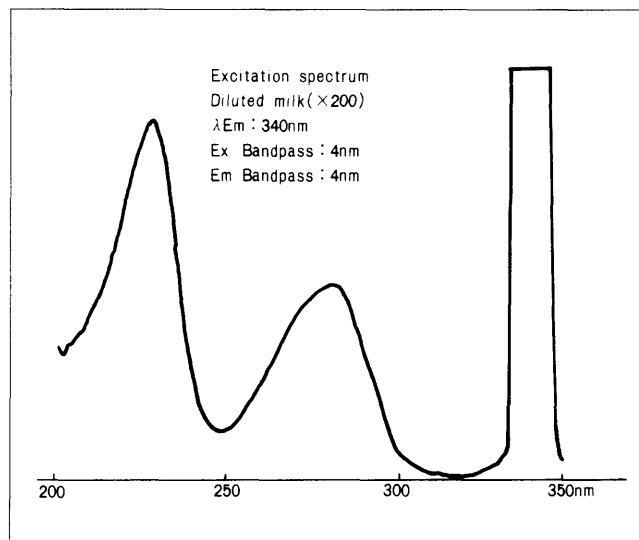
図5 Y₂O₃S:Euの蛍光スペクトル

図6 牛乳の励起スペクトル

た。図4においては、このような迷光の影響がほとんど見られない。

図5は、やはり粉末状試料であるが、低迷光と同時に高分解を必要とする希土類試料の測定例である。

図6は、混濁試料の測定例として、牛乳を200倍に希釈した溶液の励起スペクトルである。散乱光のレベルは高いが、その中に含まれる迷光のレベルが低いため、牛乳中のトリプトファンの励起スペクトルが正しく記録されている。

以上において、従来困難を伴った測定を850形日立分光蛍光光度計で効果的に行なった例について示したが、デ

ータ処理機能を本格的に駆使すると、従来困難であった測定で可能となるものは、さらに大幅に増える。

5. おわりに

今回、個々のデータ処理機能の詳細については触れなかったが、データ処理の効果は、しばしば基本性能と関係を有する。すなわち、基本データが、迷光・スペクトルの歪等の誤差要因を含んでいないことは、データ処理機能を駆使し易いことを意味する。目的に応じた効果的なデータ処理機能の使用法については、別の機会に報告したい。

日製産業株式会社

本社別館 電話 東京(03) 504-7211
新潟出張所 電話 新潟(0252)41-3011<代>
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>

本郷出張所 電話 東京(03) 815-2051
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>

横浜出張所 電話 横浜(045)671-5421
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

<編集後記>

- 本号の報文では、九州大学の太倉先生に、腎機能の、再現性が高くかつ安定した結果が得られる測定法として、ベンゾイン蛍光法を高速液体クロマトグラフィに応用した例について報告して頂きました。
- 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、受取ってお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。
- 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 応用技術センター
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 AUTUMN 1982 Vol.25 No.3

発行 昭和57年10月1日(年4回 発行)
発行人 鶴沼伸充
編集人 永谷 隆 岩井孝之
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部 科学機器部
〒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