

# THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 WINTER 1986  
VOL.29 NO.4

U.D.C. 543.064

## 目次

### 超微量分析特集II

#### 巻頭言

極限を追求する分析化学……………酒井 馨… 1

#### 報 文

 フローインジェクション法による  
トリウム蛍光分析……………鳥居一義 打木英夫… 3

 SIMSによるエピタキシャル成長さ  
せた砒化ガリウム層中のアルミ  
ニウムの分析……………三谷英介 志知広康 山根綾子… 6

 ムギうどんこ病菌の侵入によって  
誘導されるオオムギ子葉鞘内の  
パピラのX線微小部分分析 ……久能 均… 9

 走査電子顕微鏡によるコイの鯉弁  
の融合の観察……………福田芳生…14

#### 解 説

 L-8500形日立高速アミノ酸分析計  
の開発……………高田芳矩 藤井芳雄  
出口喜三郎 鴈野重威……………18

 IMA-3形日立イオンマイクロアナ  
ライザ用DIG装置 ……泉 栄一 有馬義雄 岩本 寛  
飛田一政 田村一二三……………24

#### トピックス

 M-80LCAPI形日立二重収束LC質量  
分析計……………2  
D-2200形日立GPCデータ処理装置  
……………17

 第I回日立ゼーマン原子吸光技術  
交流会開催さる……………27

 第II回国際電子顕微鏡学会開催さ  
る……………13

 第23回国際会議：クロマトグラフ  
ィーの進歩 開催さる……………28

 日本分析化学会第35年会開催さる  
……………2

## 超微量分析特集II

### 巻頭言

## 極限を追求する分析化学

### Analytical Chemistry— Pursueing to the Limit of Analysis

酒井 馨\*

(昭和61年10月3日受理)

微量試料中の目的成分を超高感度法で迅速簡便に分析し、しかもその成分の存在状態をも的確に解析することは、分析化学に従事する人たちの長年にわたる大きな悲願である。

第二次大戦後、各種の分光光度計や高感度発色試薬などが急速に開発されて、吸光度法によるppmオーダーの高感度分析が可能となったとき、主として重量分析や容量分析に依存していた分析化学者は、機器分析の威力に驚異の目を見張ったものである。1 ppmという単位は、約1,000万人の東京都民の中から約10人の特定条件の人を探し出すのに相当し、容易な仕事ではない。

ところがその後、環境問題がクローズアップされ、医学、薬学、地球科学、電子応用技術なども急速に進歩し、それに伴いppbオーダーから時にpptオーダーの分析法の開発が要求されるようになった。1 ppbは約10億人の中国人民の中から特定条件の1人を探し出すのに相当し、1 pptとなると、更にその1,000分の1であるから、正確なデータを出すのは至難なことである。

しかも、環境分析に例をとると、ppbレベルの無機水銀が有機水銀に変換する過程の追跡とか、有害なAs (III)、Cr (VI) と無害なAs (V)、Cr (III) との分別定量などに、高度の分析化学技術が適用されている。最近、発ガン物質の代表的化合物であるベンツピレンの地球上でのバックグラウンドレベルを求めるため、高濃縮技術とレーザー蛍光分光法との併用により、ppq (1,000兆分の1) オーダーの分析までなされるようになった。

限られた微量の試料を用いて、前述のような超高感度分析や状態分析を行うとなると、従来の分析化学の常識では考えられないような厳密な管理対策が必要となる。使用する試薬、水の高純度化はもちろん、試料の保存方法、容器類の洗浄方法、分析室のクリーンルーム化、作業者の作業手順など徹底的な吟味が要求される。また、分析機器の検出下限に十分達するように、試料中の目的成分だけを濃縮して共存妨害成分から分離する技術も、従来の1,000倍程度の濃縮技術レベルで満足することは許されないであろう。

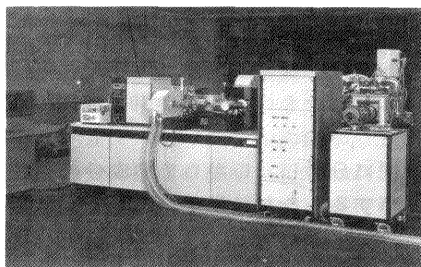
\* ㈱日立製作所 那珂工場 理博

一方、分析機器そのものも、今後はよりいっそうの高感度化、高性能化が要求される。従来、例えば紫外・可視・赤外分光光度計、フレイム・フレイムレス原子吸光光度計、蛍光分光光度計、発光分光分析計、ガスクロマトグラフ、液体クロマトグラフ、GC-MS、電気化学分析計などが、時にレーザー光や新検出器などとの組み合わせで果したマイクロ化や高感度化などへの貢献度は計り知れないものがあり、今後もそれらの改良が意欲的に続けられるであろう。

また、今後は、エレクトロニクス、バイオ・メディカル、ニューセラミックスなど新分野の急速な進歩が期待され、そのために、上記の機器のほかにも、電子顕微鏡、質量分析計(IMA, LC-MSなどを含む)、核磁気共鳴装置、X線応用機器なども大きな活躍の場を与えられるであろう。このように、分析化学が極限を求めて絶えず進歩しつつあることは心強い限りである。

## Topics

### M-80LC-API形 日立二重収束 LC質量分析計



M-80LC-API形日立二重収束LC質量分析計

熱的に不安定であったり、難揮発性である化合物の分析のため液体クロマトグラフ(LC)と質量分析計(MS)の結合は、LCの持つ高い分離能力とMSの持つ高い定性定量能力を結び付けるものとして、多くの研究者から長い間出現が切望されてきました。しかし、質量分析計が高真空装置であるため、液体のMSへの直接導入にはGC/MSの場合のMSへのガスの導入に比べて多くの技術的な困難さがありました。そのため、実用的意味でのLC/MSの発表はされてきませんでした。日立では、長年にわたり日立基礎研究所により、この困難な手法の克服を目指して研究を続けてきました。その研究成果を踏まえ、今回M-80LC-API形LC/MSを完成しました。日立独自の大気圧イオン化(API)を採用し、多量の溶媒の除去と高いイオン化効率による高信頼化、高感度化を実現しました。これによりGC/MSで測定不可能であった生体関連物質からオリゴマーまで分析

領域を一気に拡大することができました。

#### ■特 長

- (1) 広範囲の化学種の分析が可能です。  
ペプチド、糖、核酸、脂質、抗生物質など生体関連物質、更に種々のオリゴマーなどが無修飾で分析が可能です。LCの検知器UVやRIで検出できない化合物も、高感度に分析ができます。
- (2) 大気圧イオン(API)を採用しました。

イオン源部が大気圧のAPIイオン源を採用しました。イオン化に無関係な溶媒は大気圧下で排気され、排気系への負担がありません。イオン化部は針を用いたコロナ放電形(日立特許)であるため、移動相が100%水でも長時間安定に測定ができます。APIのイオン化は大変ソフトで、多くの場合分子イオン種を強度高く出現させます。構造解析、定量分析への応用が広がります。

- (3) 広範囲なLC流量と移動相を用いることができます。

LC移動相流量は最大2 ml/minまで可能です。そのため、汎用のLCの使用に適應できます。また、移動相としては無極性有機溶媒、極性有機溶媒ばかりでなく、揮発性緩衝液が使用可能です。

- (4) GC/MSの共用も可能です。

GC及びGC/MSインタフェース(オプション)をLC/MSと独立して接続し使用ができます。

### 日本分析化学会 第35年会開催さる

本年は岡山大学で開催され約1,500人の参加者があつた。研究発表は10会



場に及び早朝から熱心に討議が行なわれた。日程は10月11日(土)～10月14日(火)の4日間で、特に12日(日)には、創立35周年記念式典及び学会賞講演が行なわれた。本年から新たに技術功績賞が設けられ、計測器事業部主管技師長 保田和雄氏ほか2名が受賞された。荣誉ある初受賞の一人に日立から選ばれたことは大変意義あることと思う。

目新しい発表としては、日立からFIA(フローインジェクション)と原子吸光の組合せにより、溶媒抽出の自動化が行なわれ高い関心が寄せられた。付設展示会にはFIA及び液体クロマトグラフを展示し、デモは学会発表したものと同一にし学会発表者が説明に当たったため、展示会場で活発な議論が行なわれ、学会展示会としては最高の盛り上がりが見られた。(神道千秋 記)

## 報 文

## フローインジェクション法によるトリウムの蛍光分析

## Fluorescence Analysis of Thorium by Flow Injection Analysis

鳥居 一義\* 打木 英夫\*\*

(昭和61年7月3日受理)

## 1. はじめに

微量トリウムの分析には、フラボノールを用いた蛍光分光分析法がよく用いられるが、検出感度は極めて高いにもかかわらず、再現性が異常に悪く、特に数十ppb以下においては全く実用にならない。一方、1975年デンマークのRuzicka及びHansenらにより、Flow Injection Analysis (FIA) と命名された新手法は、その優れた再現性、迅速性等々、数々の特長により、最近急速に注目を浴びてきている。今回このFIA法をトリウムの蛍光分析に応用し、特にサンドイッチ法用の16方バルブを用いて、サンプル中に一定量の化学的バイアス（いわゆる下駄をはかせる）を添加することにより、異常現象を示す0点近くを逃げ、数ppbのトリウムを再現性よく分析することが可能となった。以下その詳細について述べる。

## 2. 装置および試薬類

下記の装置を使用した。

F-3000形日立分光蛍光光度計（フローセル付き）

K-1000形日立フローインジェクション装置（耐酸ダンパ付き）

なお、フローセルは、付属の金属パイプを外し、FIAよりのテフロンチューブを直結した。

流路構成は図1に示すとおりで、標準的なサンドイッチ流路へ、側路を通じて試薬流を合流させるようにした。

各部の諸元は図1中に記載したとおりであるが、3本のサンプルループのうち中央の0.1mのものは、バイアス用トリウム添加用で、ここから標準液を導入することにより、毎回正確に一定量のトリウムを自動添加することができる。

キャリア液及び試薬の組成は次のとおりで、希釈率及び合流比から逆算して、フローセル内での濃度が文献記載値に近くなるように設定してある。

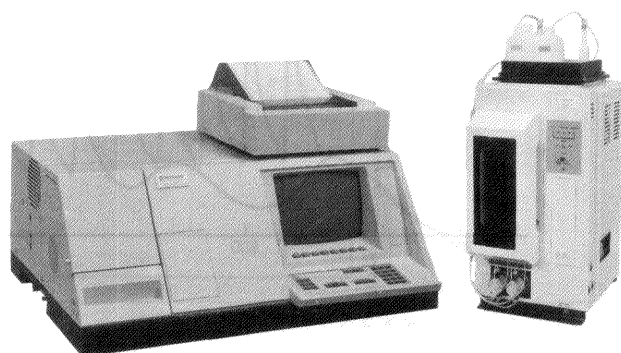
キャリア液

|      |             |
|------|-------------|
| HCl  | 0.01M       |
| NaCl | 0.1M        |
| Brij | 0.05%（次項参照） |
| 流速   | 0.5ml/min   |

発蛍光試薬

|          |           |
|----------|-----------|
| フラボノール   | 0.02%     |
| エチルアルコール | 50%       |
| 流速       | 0.5ml/min |

蛍光スペクトルは図2のとおりで、これから



K-1000形 日立フローインジェクション装置を組合せた  
F-3000形 日立分光蛍光光度計

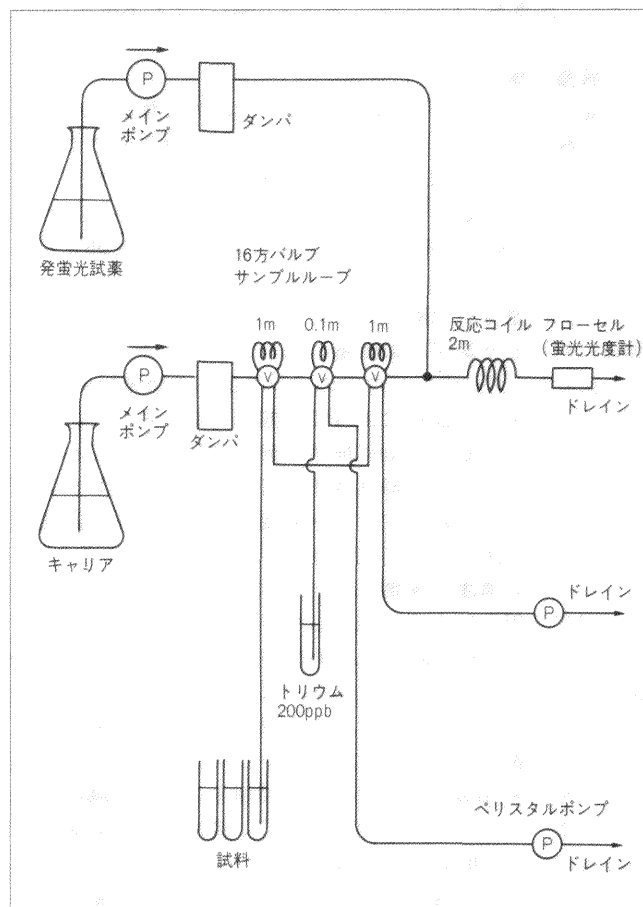


図1 サンドイッチ法の流路系統図

\* 日本化学工業㈱

\*\* ㈱日立製作所 那珂工場

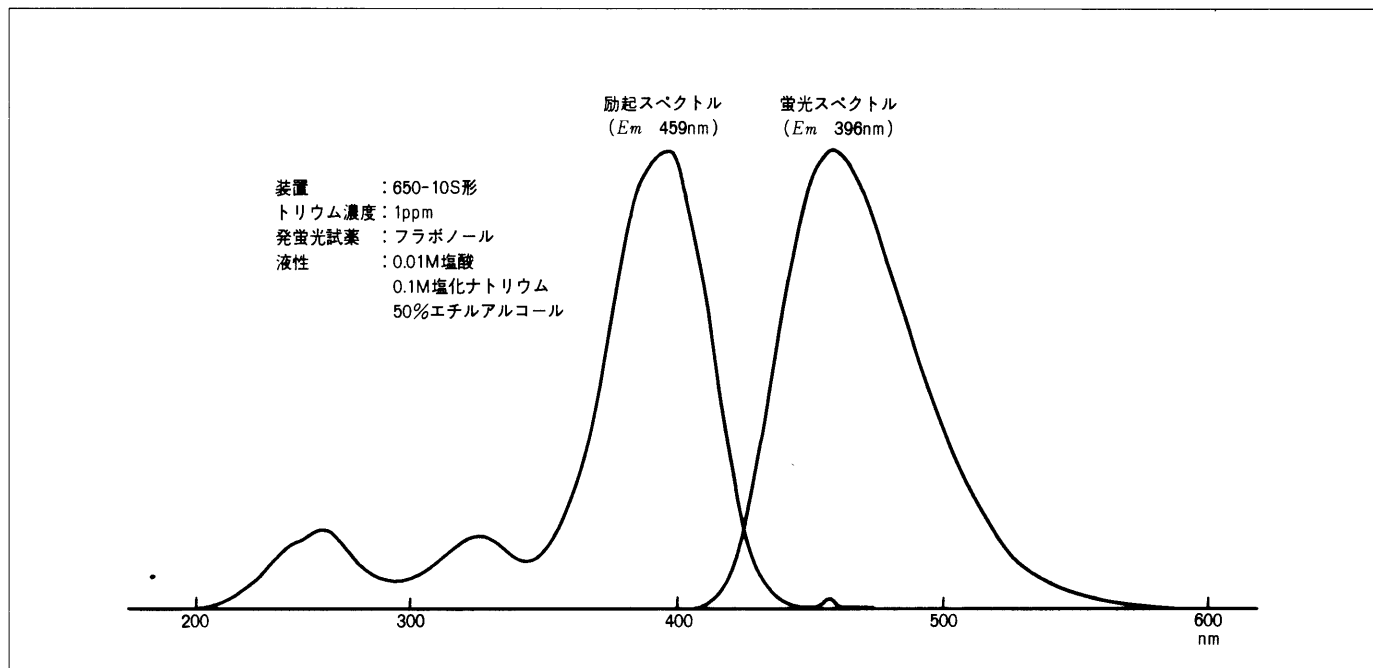


図2 トリウムの励起/蛍光スペクトル

Ex 396nm

Em 459nm

とし、感度を上げるため、スリット幅は、Ex, Em共20nmと広げた。

### 3. 吸着対策

微量トリウムの分析に際し表面活性剤の添加が再現性および直線性の向上に著しい効果を示すことは、すでに日立テクニカルデータFL シートNo.20「フローインジェクション法による微量トリウムの蛍光分析」で明らかにされているとおりである。今回の実験においてもBrij 0.05%をキャリア中に添加した。

また、微量分析に際しての常識的な注意であるが、使用器具に対するサンプルの吸着には十分留意する必要がある。特にppbオーダーのトリウムのガラス面への吸着は著しく、また、その度合も器具によって大幅に異なるらしく、ガラス器具を使用すると、全く使用に耐えないデータしか得られない。したがって、器具はすべてプラスチック製を使用し、念のため同一器具で、同一濃度のサンプルを2回作成し、これを使用した。

### 4. バイアス濃度の決定

バイアス用トリウムを添加しない状態で、微量部分の検量線を求めてみると図3のようになり、30ppb付近までは検量線はリニアに下がってくるが、これ以下では大きく曲がりしかかも再現性も悪化する。この現象は活性剤の濃度を増加しても改善されなかった。同図から明らかなように、試料中に常に30ppb以上のトリウムが含まれていれば問題なく分析できることが分かる。したがって、数ppbの含有量の試料に対しては、意識的に30ppb程度のトリウムを添加し、濃度を異常範囲外に持ってゆけば、このように含有量の少ない試料の分析が可能になるはずである。

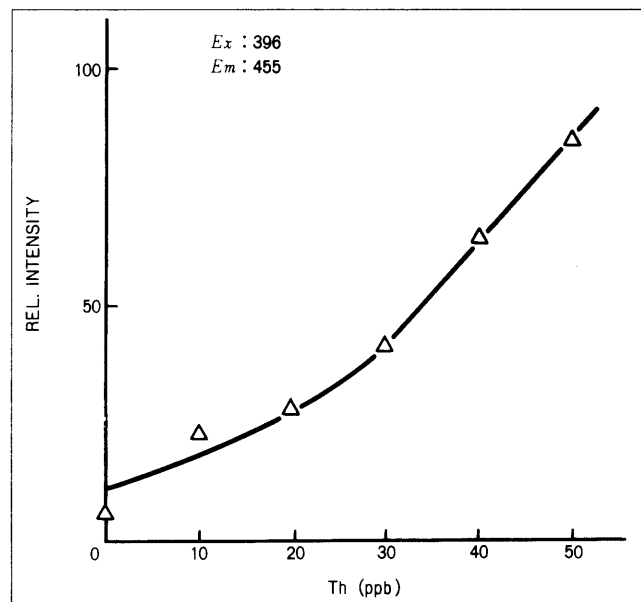


図3 微量トリウムの異常検量線

このために、試料調製時に、マニュアルで一定量のトリウムを添加すればよいが、操作が増える上に、誤差の混入も避けられない。

本法の骨子はこのバイアス用トリウムを、サンドイッチ流路を応用し毎回正確に一定量を自動注入するようにしたことである。

あらかじめ濃度の分かっている色素溶液を使用し、本システムでの希釈率を測定し $D \approx 5$ を得たので、これより30ppbを超えるのに必要なバイアス量として、Th 200ppbを $0.5 \phi \times 0.1m$  (約25 $\mu$ l)使用することにした。

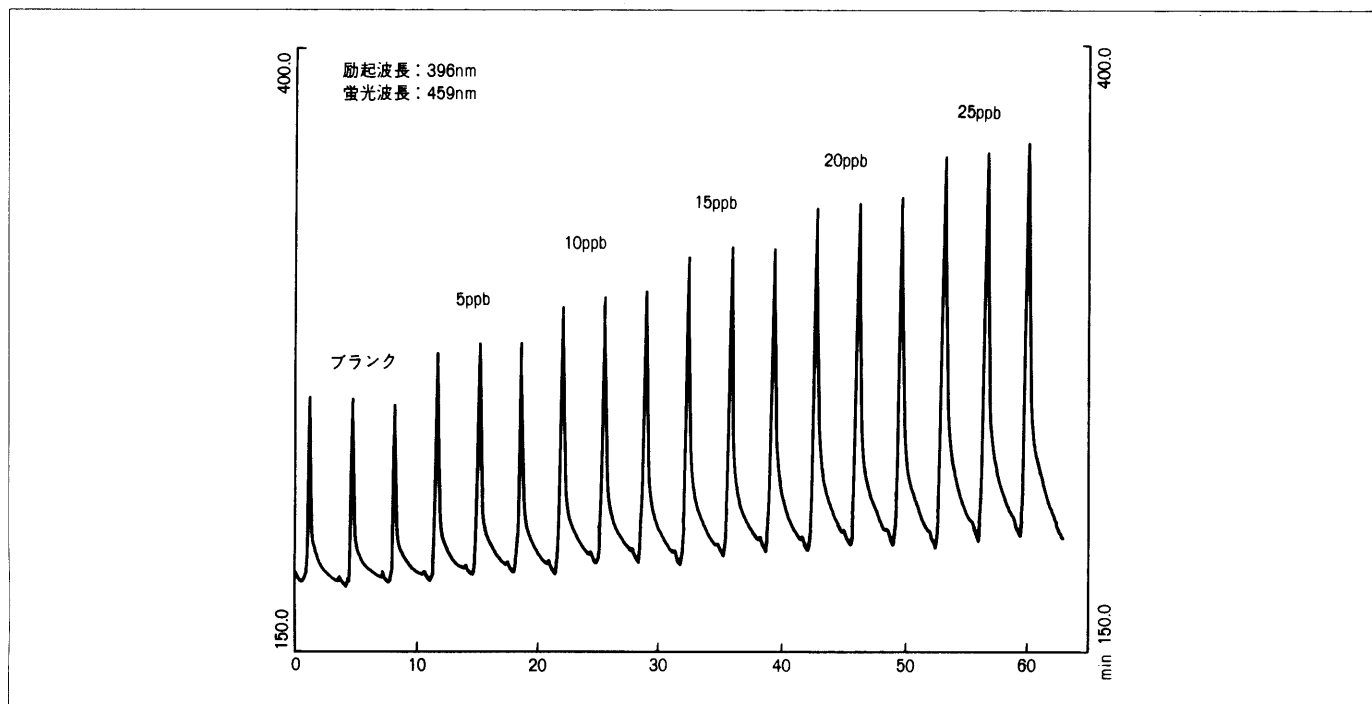


図4 測定チャート

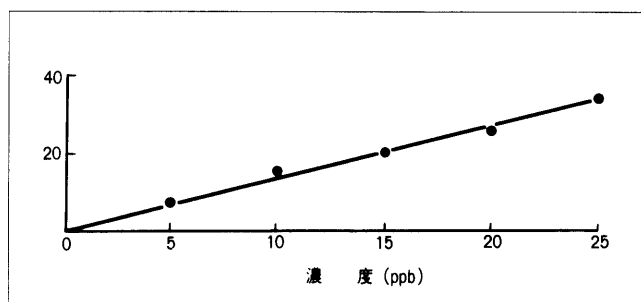


図5 検量線

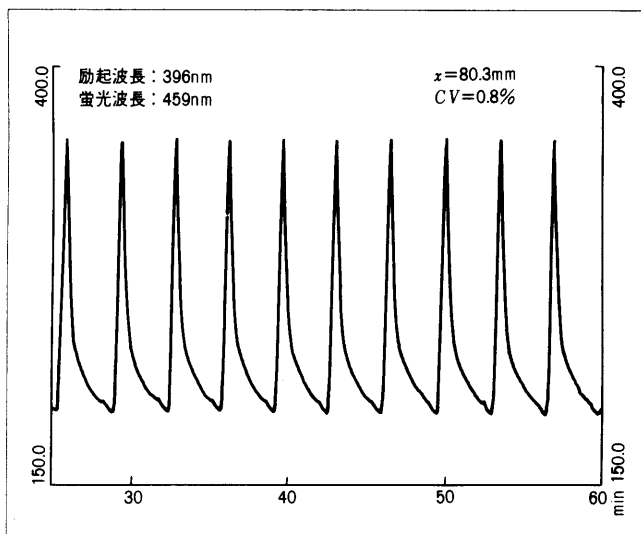


図6 再現性

## 5. 実験及び結果

以上の予備検討を踏まえた上で、25ppb以下のトリウムの測定を行い図4の記録を得た。

これより求めた検量線は、図5のように原点を通るリニアなものを得られた。

また、再現性は図6のとおりで、従来この濃度域では全く得ることができなかった。

CV=0.8%を示した。

なお1回当たりの測定所要時間は約3.5分であった。

## 6. まとめ

以上のとおりサンドイッチ方式によるバイアス添加手法により、従来できなかった25ppb以下の微量トリウムの分析が可能となった。

最近の半導体工業の発達に伴い、微量のトリウム、ウラニウムの分析の必要性が高まってきているが、FIA法はこの要求にこたえる強力な手段と考えられる。

最後に、本研究の推進に当たり、技術面で多大の御協力をいただいた日立製作所那珂工場の嶺岸久子、黒石忠文の両氏に対し厚く感謝の意を表す次第である。

## 参考文献

- 1) J. Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta **78**,145(1975)
- 2) 同上 CHEMTECH, **9**,756(1979)
- 3) 無機応用比色分析, 5, p.240, 無機応用比色分析編集委員会, 共立出版(株)
- 4) 日立テクニカルデータ, FL No.20, フローインジェクション法による微量トリウムの蛍光分析
- 5) 日立テクニカルデータ UV/VIS No.50, 52, 54

# SIMSによるエピタキシャル成長させた砒化ガリウム層中のアルミニウムの分析

## Analysis of Aluminium in the Epitaxially Grown Gallium Arsenide Layer by SIMS

三谷 英介\* 志知 広康\* 山根 綾子\*

(昭和61年6月18日受理)

### 1. はじめに

半導体関連の分析においては、製造プロセスにかかわる問題を解析、評価することが多い。今回報告するSIMSによる測定結果もその範疇に属するものである。深さ方向の測定精度を上げることによって、材料中の不純物の分布を詳細にとらえ、製造装置に起因する不純物の混入プロセス、及び混入状況を明らかにすることができた。

測定に用いた装置は日立IMA-3形イオンマイクロアナライザである。比較的低エネルギーの酸素イオンを一次イオンとして用い、スパッタ速度を遅くしてエピタキシャル成長させた砒化ガリウム（以下GaAsと略記）層に含まれる不純物アルミニウムの微細な分布構造を測定した。また、その結果に対して筆者らが検討を行なっているデータ補正法を適用した。その結果、アルミニウムの濃度変化とGaAs層形成時間との相関が更に明確になった。

### 2. 測定法

#### 2.1 試料

測定に用いた試料は図1に示すような断面構造をしたGaAs素子である。下部GaAlAs層を形成後、同層の形成の際に使用したトリメチルアルミニウム  $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$  の供給を止め、排気後GaAsウェーハを回転 (1.4rpm) させながらその上にGaAs層を形成したものである。測定部分は同図に矢印で示した領域、すなわち表面のGaAs層である。

#### 2.2 測定条件

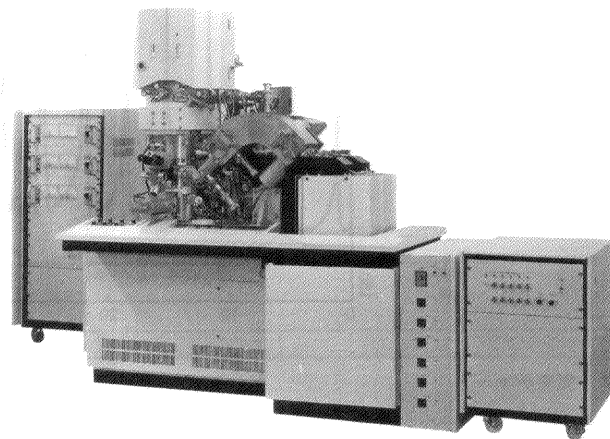
通常の測定条件による測定において、表面のGaAs層中にアルミニウムが存在し、それが複雑な分布形状をしていることが確認された。このため、スパッタ速度を遅くし、その部分の測定をより精度良くできるように条件設定を行なった。

一般に深さ方向の分析精度を上げるためには、一次イオンのエネルギーを低くするほうが良いと言われている。しかし測定効率、検出感度などの点を考慮するとあまり極端な条件設定はできない。そこで過去の測定結果を参考にし、表1に示すような条件を用いることにした。本条件によると5nm程度の分解能は比較的容易に得ることができる。

### 3. 測定結果

#### 3.1 実測値

測定結果を図2に示す。横軸はスパッタ時間、縦軸はイオン強度で任意単位である。アルミニウムが内部から表面にかけて指数関数的に減衰し、しかも、その上に周期的な濃度変化の重畳していることが分かる。下部GaAlAs層の



IMA-3形 日立イオンマイクロアナライザ

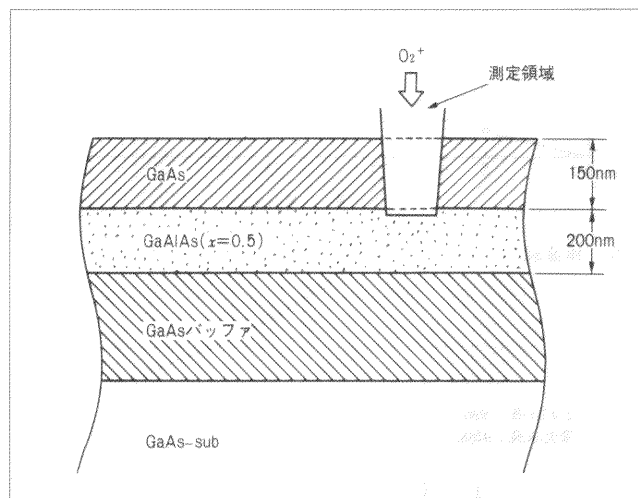


図1 試料断面構造及び測定部

表1 測定条件

|                                 |                                      |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| 一次イオン種                          | $\text{O}_2^+$                       |
| 一次イオン加速電圧                       | 10kV                                 |
| 一次イオン電流                         | 0.15~0.2 $\mu\text{A}$               |
| ビームスポット径                        | ~60 $\mu\text{m}$                    |
| ラスタサイズ                          | ~0.5 $\mu\text{m}^2$ (平面投影: 試料傾斜45°) |
| 二次イオン加速電圧                       | 3kV (照射エネルギー: 7keV)                  |
| エレクトリックアパーチャ使用 (ラスタ中央10%の面積を測定) |                                      |

\* (株)日立製作所 中央研究所 第4部

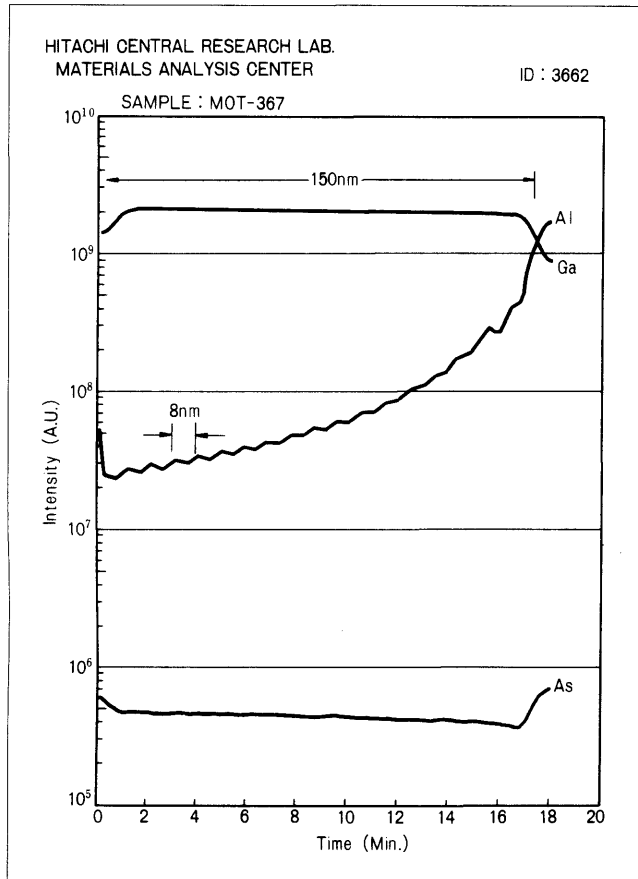


図2 エピタキシャル成長させたGaAs層中の不純物アルミニウムのDepth profile (1)

ルミニウムの濃度が50%であるから、表面でも約0.5%の濃度のアルミニウムが残存していることになる。また表面GaAs層の厚さが約150nmであるから、アルミニウムの濃度変化の周期は約8nmである。このような周期性を持った濃度変化の生ずる原因を調べるため、更に幾つかの試料について測定した結果、これが表面GaAs層を形成するときの試料の回転数と一致することが明らかになった。すなわち、下部GaAlAs層を形成するときには供給したトリメチルアルミニウムが、供給停止後も十分排気されずに装置内壁に吸着残留し、更にトリメチルアルミニウムの偏流によって高濃度の部分が形成されていたようである。このため、回転させられている試料がその付近を通過するたびにGaAs層中へのアルミニウムの混入がその量を増したものと思われる。

上記アルミニウムの濃度分布の周期構造を更に明確に見るため、図2の結果を線形座標に表示し直したものを図3に示す。イオン強度の関係でスパッタ時間12分までのデータを示した。アルミニウムの濃度変化の振幅は図2と比較すると明りょうになるが、振幅自身は全域にわたって大きな変化はなく、かなり均一になっている。しかし残留トリメチルアルミニウムの分圧が表面GaAs層の形成時間の経過とともに減少してゆくことを考えると、この結果は必ずしも正しいとは言えないように思われる。この点を考慮して先に述べたデータ補正を、この測定結果に適用することにした。

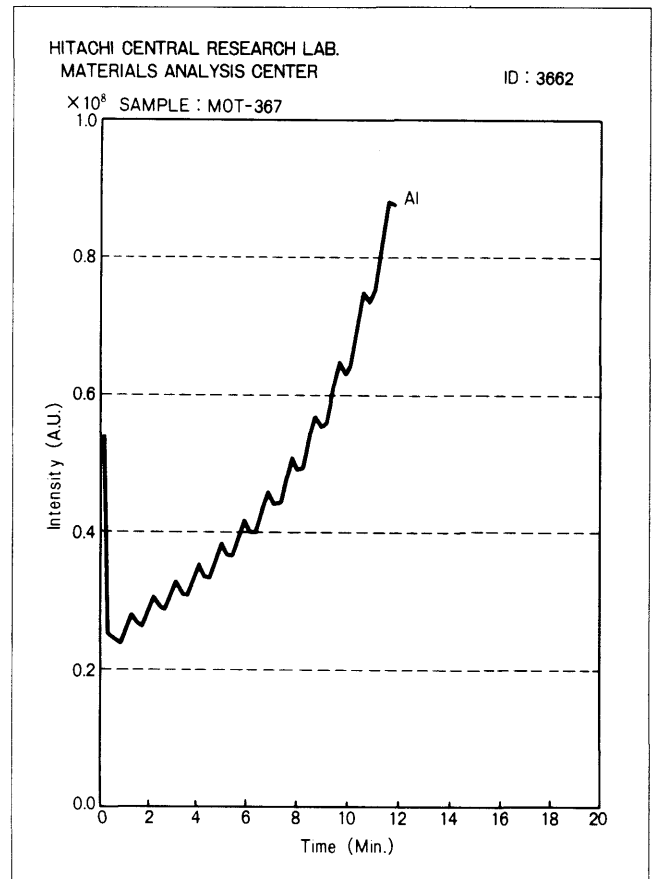


図3 エピタキシャル成長させたGaAs層中の不純物アルミニウムのDepth profile (2)

### 3.2 測定値の補正

データの補正法についてはすでに報告<sup>1)</sup>しているが、この方法は現在一般的に認められている方法ではない。しかし筆者らが適用した幾つかのデータ<sup>1),2)</sup>において、その妥当性が高くなると思われる方法であり、かつ実測定への適用が比較的容易な方法である。

理論の詳細な説明は省略するが、本方法に従うと濃度の測定値 $Q$ と真値 $P$ は次のように対応づけられる。

$$Q_i = \alpha Q_{i-1} + (1 - \alpha) P_i \quad \dots\dots\dots(1)$$

ここに $i$ は測定時刻に対応する量であり、 $\alpha$ は残留係数と名づけた係数で、スパッタで放出される粒子のうち、それ以前のイオン脱射においてなんらかの衝突反応を起している粒子の割合である。この係数はその性質上スパッタ条件、試料などによっても異なるが、多くの場合実験的に決めることのできる値である。本試料の場合この値はおよそ0.99である。 $Q_{i-1}$ ,  $Q_i$ は共に濃度の測定値であるから、(1)式を変形して、

$$P_i = \frac{1}{1 - \alpha} (Q_i - \alpha Q_{i-1}) \quad \dots\dots\dots(2)$$

より直ちに真値を求めることができる。

図4に補正結果を示す(縦軸は便宜上 $8 \times 10^{-6}$ 倍してある)。同図中実線が実測定値であり、点線が補正值である。なお本補正計算はオフラインで行なったもので、データ入力

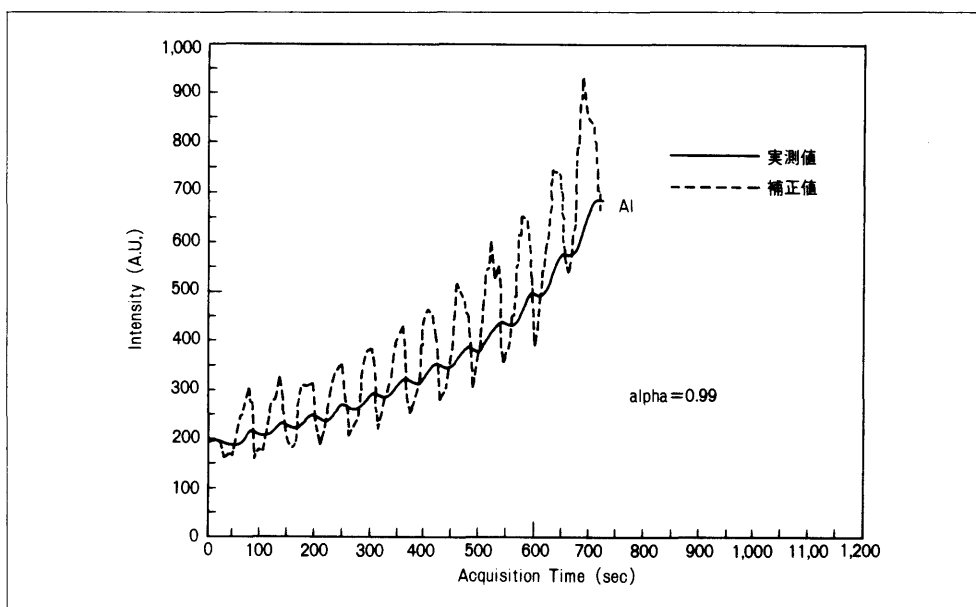


図4 アルミニウムのDepth profileの実測値と補正値の比較

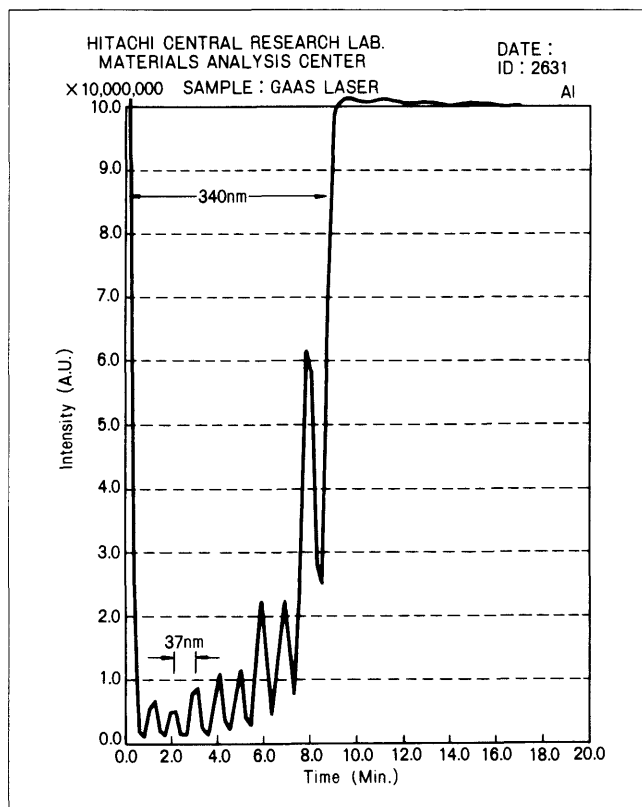


図5 長周期構造のアルミニウムのDepth profile

間隔が大きすぎることによる補正値のばらつきが若干生じている。また図2, 3に見られる表面におけるアルミニウムのイオン強度の特異値は除いて平滑化している。

本図から特徴的な事項として、

- (1) 指数関数的なアルミニウムの変化についてみると、補正後のほうが内部で急峻になる傾向を示す。
- (2) 周期的なアルミニウムの濃度変化が補正によってより

明りょうに現われる。

(3) 同じく、アルミニウムの周期的な濃度変化の振幅が内部から表面へかけて減衰してゆく傾向が明りょうに現われる。

などの点が指摘できる。特に(3)は実測値のうえではあまりはっきりしないが、アルミニウムの混入する過程から推定すると、当然こうなるべきものと思われる。このことはまた濃度変化の周期の大きい試料において、実測値そのものが減衰振動を示すことから裏づけられる。(図5)。

以上、極めて定性的な検討を測定結果に対して加えたが、データ補正によって得られた結果は、実測値と比較すると、かなり真値に近い状態を示しているように思われる。今後更にデータ数を増やし、被検元素の相対検出感度などの点を考慮することによって定量的な解析が可能になろう。

#### 4. 結 言

半導体製造装置は、時としてブラックボックス的に使用されることがある。今回測定した試料もその産物の一つと言えなくもない。今後、素子機能の高度化あるいは素子構造の複雑化に伴い、製造プロセスの管理という面で分析の重要性が更に増してゆくものと思われる。

今回の測定は濃度的にはSIMSとして容易に対応できるものであったが、深さ方向の分解能という点では見落としかねない分布構造であった。また、データ補正によって得られた結果は実測値と比較すると、実際の濃度分布構造により近いものになっているように思われる。そうして、このようなデータ補正法を併用することによって、更に微細な層構造の定量的な評価が可能になるものと思われる。

本測定に際して、プロセス上の問題について種々御討論いただいた中央研究所小野佑一主任研究員に対し感謝の意を表する。

#### 参考文献

- 1) 三谷英介：質量分析, 31, No. 4, 297—300(1983)
- 2) 三谷英介, 志知広康：質量分析, 32, No. 3, 315—318(1984)

# ムギうどんこ病菌の侵入によって誘導されるオオムギ子葉鞘内のパピラのX線微小分析

## X-ray Micronalysis of Barley Papillae Induced by Penetration of Powdery Mildew Fungus

久能 均\*

(昭和 61 年 8 月 19 日受理)

### 1. はじめに

植物の生細胞は、外部からの刺激、たとえば傷や病原菌の侵入などに対して様々な抵抗反応を示す。病原糸状菌が植物細胞壁を酵素的または機械的に破壊して侵入しようとする、侵入点には図 1 に示すような半球形の構造が形成される。電子顕微鏡観察によって、この構造は細胞壁と細胞膜の間に形成され、かなり異質の重合物質から構成されていることが明らかにされている<sup>1)</sup>。同じような構造は、物理的・

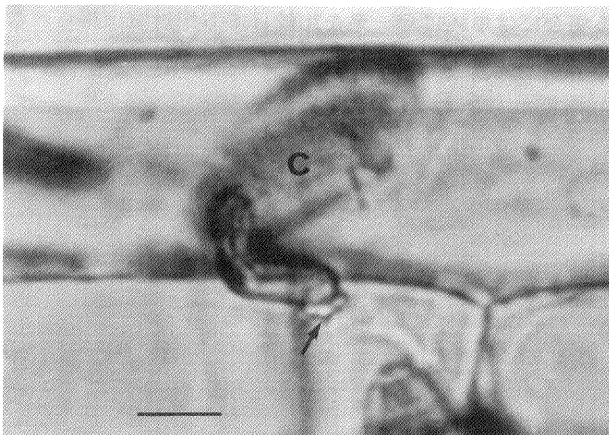


図 1 Erysiphe graminis の分生孢子 (C) を接種したオオムギ子葉鞘に形成された小型パピラ (矢印)、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  処理 接種後 24 時間 スケール =  $10\mu\text{m}$

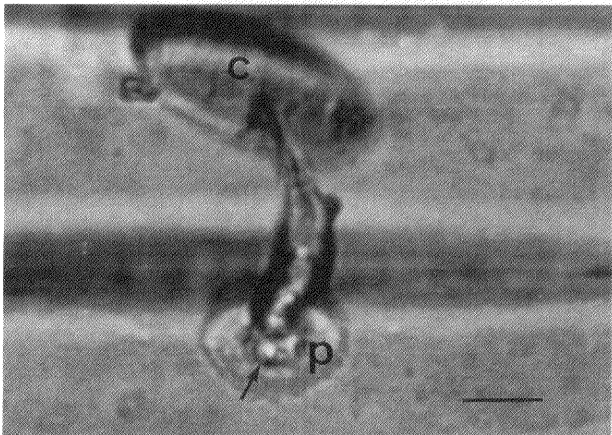
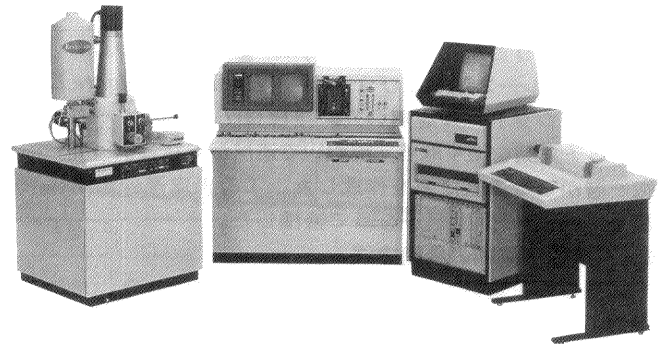


図 2  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  処理したオオムギ子葉鞘に形成された大型パピラ (P)。矢印はパピラ中心部 接種後 24 時間 スケール =  $10\mu\text{m}$



S-650 形日立走査電子顕微鏡

化学的傷に対する癒傷構造として様々な植物で一般的に形成されることが明らかにされているが、糸状菌の侵入に対して形成される構造は特にパピラと名付けられている<sup>1)</sup>。

パピラは病原菌の侵入に伴って形成されるので、植物細胞の抵抗反応の一つと推定されているが、あまりにも小さな構造で細胞壁に密着しているために、その機能的解析は十分ではない。

ムギのうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis*) はムギ類の表皮細胞にのみ侵入する絶対寄生菌であるので、パピラの観察には好都合な実験材料である。オオムギの子葉鞘を実体顕微鏡の下で解剖すると、一層の細胞層からなる表皮系が得られる。この表皮系に本菌の分生孢子を接種して適当な培養液に浮かべておくと、生きている子葉鞘上での菌の行動を観察することができる。我々は過去の一連の研究によって、接種した子葉鞘を  $0.01\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  または  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  上で培養すると小型のパピラ (以下小型パピラ) (図 1) が形成されるが、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  を用いると大型のパピラ (以下大型パピラ) (図 2) が形成されることを見出した<sup>2),3)</sup>。さらに、本菌は小型パピラを約 70—80% の確率で貫通するが、大型パピラを貫通することはできないことを明らかにした<sup>3)</sup>。その後、音響顕微鏡 (acoustic microscope) を用いた実験<sup>5)</sup>によって、後者は前者よりも粘性が高いことを示すデータが得られたが、本菌が大型パピラを貫通できない理由をこのような物理的性質のみで説明することは難しい。

小型パピラと大型パピラは、病原菌を接種した子葉鞘を異なった培養液で処理することによって誘導されるので、当然のことながらそれらの成分は異なっていると推定されるが、前にも述べたように、パピラは極めて小さく、子葉

\* 三重大学 農学部 植物病理学講座 助教授、農博

鞘細胞壁に密着しているの、化学的に単離することは難しい。このような場合の無機成分分析にはX線微小部分分析が有利であることはよく知られている。事実、パピラのX線分析が病原菌を接種した葉に対して行われている<sup>7),8),9)</sup>。しかしながら、過去に報告されたデータは、植物葉表面からの分析結果を示しているの、細胞壁とパピラとの成分を分けることはできず、得られたデータからパピラの無機成分を推定したにすぎない。そこで、今回、我々の研究室では、機械的に単離したパピラをX線分析し、小型パピラと大型パピラの無機成分比較を試みた。

## 2. 材料および方法

### 2.1 材 料

オオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* D.C.f. sp. hordei) のレースB7およびオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の品種プロクトールを用いた。接種後7日目のオオムギ子苗から子葉鞘を切り取り、前報<sup>10)</sup>で述べた方法によって、細胞一層からなる表皮系を作成した。この表皮系の表面に、*E. graminis*の分生孢子を筆で接種した。

### 2.2 接種子葉鞘の培養方法

接種した子葉鞘を、次の方法によって処理した。

#### (1) 小型パピラの誘導

接種子葉鞘を小型シャーレ中の0.01M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 上に浮かべ、24時間、18°C、暗黒下で培養した。本菌は接種後9—11時間で侵入を開始し、その侵入地点に小型パピラが形成される。

#### (2) 大型パピラの誘導

接種子葉鞘を上と同じように0.01M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 上で培養し、菌が侵入を開始する接種後9時間目に、0.01M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ と0.01M ナーリン酸緩衝液(pH7.5)との等量混合液上に移し、さらに15時間培養した。この処理によって形成されるパピラは、直径10—20 $\mu\text{m}$ の大型になる。

### 2.3 パピラの単離およびX線微小部分分析

上記のそれぞれの子葉鞘をスライドガラスに載せ、前報<sup>6)</sup>の方法によって光学顕微鏡マニプレーターを用いて、それぞれのパピラを機械的に単離し、ニッケルグリッド上のフォルムパール膜に静かに載せた。(図2)に示すように、大

型パピラは中心部と周縁部とからなっているが、マニプレーターで単離できるのは中心部のみであった。単離後デシケーターに保存して十分に乾燥させた後、真空蒸着装置でカーボン蒸着した。グリッドをカーボンペーストでカーボン試料台に取り付けた。試料台の中央部は、グリッドの直径よりやや小さい直径の孔がくり抜いてあり、この孔の上にグリッドを固定することによって、試料台からのコンタミネーションをできる限り小さくした。X線微小部分分析は、日立走査電子顕微鏡S-650—堀場EMAX2200システムによって行われた。測定時の加速電圧は15kV、プローブ電流は $1 \times 10^{-10}\text{A}$ 、分析時間は200秒とした。得られたデータの補正は、次の標準試料を用いてZAF法<sup>10)</sup>によって行われた。Na—K $\alpha$ にはNaF, Mg—K $\alpha$ にはMgO, Al—K $\alpha$ にはAl, Si—K $\alpha$ にはSi, P—K $\alpha$ には燐灰石, S—K $\alpha$ には $\text{FeS}_2$ , Cl—K $\alpha$ およびK—K $\alpha$ にはKCl, Ca—K $\alpha$ には $\text{CaF}_2$ がそれぞれ用いられた。

## 3. 結 果

本研究の主目的は、小型パピラと大型パピラの無機成分を比較することにあるが、両者の大きさや成分が極端に異なる場合には単純にデータを比較しても相対値は得られな

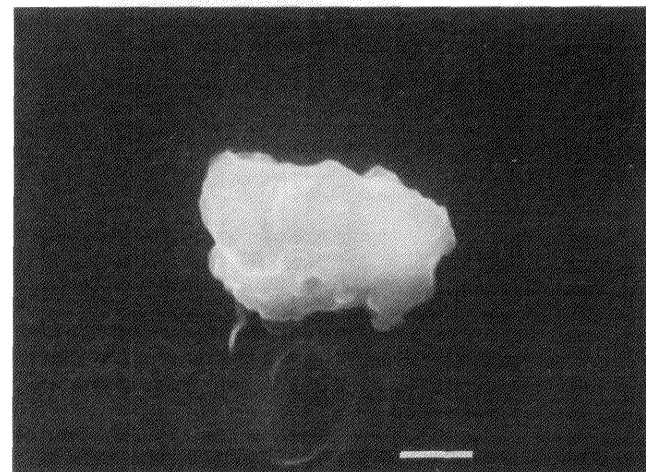


図4 単離された小型パピラの二次電子像 スケール=2 $\mu\text{m}$

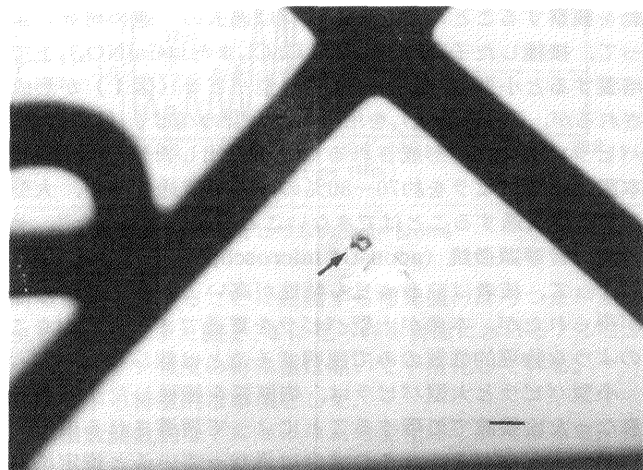


図3 単離され、フォルムパール膜上に静置されたパピラ (矢印)。

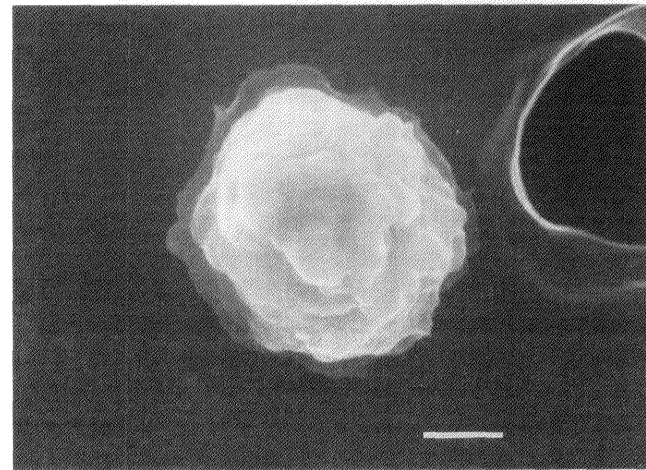


図5 単離された大型パピラ中心部の二次電子像 スケール=2 $\mu\text{m}$

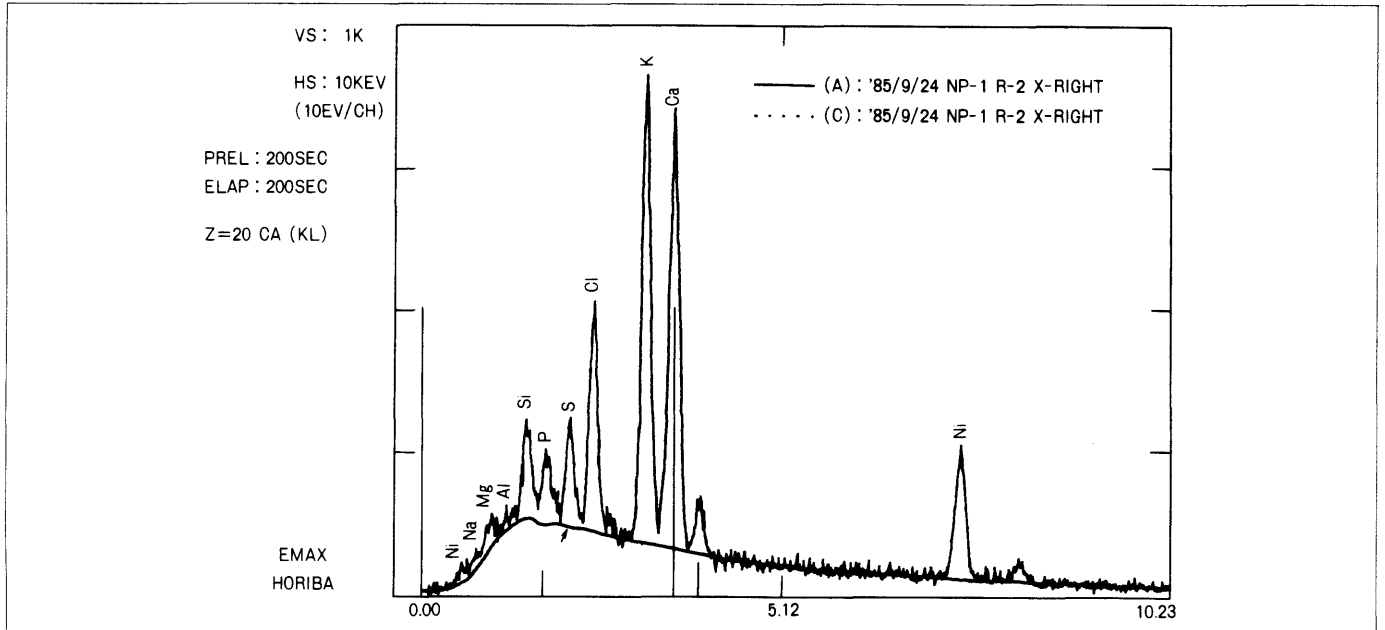


図6 小型パピラの特性X線スペクトル 矢印はバックグラウンドレベル

い。光学顕微鏡によって小型パピラと大型パピラ中心部の平均の厚さを求めたところ、それぞれ  $4.9 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 、 $6.3 \pm 2.6 \mu\text{m}$  になった。予備試験によって上記の条件でX線測定中の試料電流を求めた結果、いずれの場合も  $0.95 - 0.99 \times 10^{-10}$  Aの範囲内にあったので、両タイプのパピラの平均原子番号はほぼ同様であると推定された。したがって、一定条件下で測定すれば、両タイプのパピラのほぼ同じ深さから発生する特性X線を検出できると考えられたので、得られたデータを単純に比較しても大きな誤りはないであろうと推定された。

(図4) および(図5)は、それぞれ単離された小型および大型パピラ中心部の二次電子像を示している。両者の表面には凹凸が見られたが、大型パピラの表面の方が凹凸がやや激しい傾向が見られた。これらのパピラは単離操作中にマイクロマニプレーターの接触によって変形することなく、硬い構造であると考えられた。

(図6)は小型パピラの分析結果の一例を示している。23個の小型パピラを分析したところ、Ca、Kの重量濃度はそれぞれ1.24—3.07%、0.46—2.51%の範囲内にあった。一方、Clの濃度は23個中11個で1.01—1.18%の値を示したが、残りの小型パピラでは0.01—0.09%の値を示した。Na、Mg、Al、Si、P、Sはほとんどすべての小型パピラで検出されたが、それらの濃度は0.13—0.64%の範囲で、いずれも微量であった(表1)。これらの結果から、Ca、Kは濃度的に変異はあるものの、すべてまたは大多数の試料で1.00%以上の重量濃度を示しており、小型パピラの主要無機成分と考えられた。

大型パピラの分析結果を示す(図7)から明らかなように、大型パピラではPとCaが極めて多いにもかかわらず、他の元素は微量に含まれているにすぎなかった。20個の大型パピラを分析したところ、PとCaの重量濃度はそれぞれ3.20

表1 うどんこ病菌接種オオムギ子葉鞘の $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ または $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 処理によって形成される小型パピラまたは大型パピラから検出される無機元素

| 処 理                                  | 検 出*<br>レベル | 元 素 |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------------|-------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                      |             | Na  | Mg | Al | Si | P  | S  | Cl | K  | Ca |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$           | ND          | 0** | 0  | 8  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                                      | T           | 23  | 23 | 15 | 23 | 23 | 23 | 12 | 5  | 0  |
|                                      | L           | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 11 | 10 | 10 |
|                                      | H           | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 5  | 5  |
|                                      | EH          | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 8  |
|                                      | 計           |     |    |    |    | 23 |    |    |    |    |
| $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ | ND          | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                                      | T           | 20  | 20 | 20 | 20 | 0  | 20 | 20 | 20 | 0  |
|                                      | L           | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                                      | H           | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                                      | EH          | 0   | 0  | 0  | 0  | 20 | 0  | 0  | 0  | 20 |
|                                      | 計           |     |    |    |    | 20 |    |    |    |    |

\* 重量濃度：ND=0%、T=0.01—0.09%、L=1.00—1.99%、  
H=2.00—2.99%、EH=3.00%以上

\*\* 検出されたパピラ数

—4.01%、5.16—6.98%の範囲内で、小型パピラのいずれのP、Ca濃度よりもはるかに高かった。一方、他の元素はいずれも1.0%以下の濃度であった(表1)。

#### 4. 考 察

うどんこ病菌を接種したオオムギ子葉鞘を $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ で処理すると、形成されるパピラは高濃度のPとCaを含むようになるが、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ で処理すると、CaとKを多量に含むことが明らかにされた。この結果によって、パピラが細胞膜と細胞壁の間に形成されるときには元素が選択的に取り込まれると考えられる。これは次の3点によって支持される。(1)  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 液は0.01M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ と0.01M Na—リン酸緩衝液との等量混合液であるので、0.01M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ に含まれるCaの半量を含んでいるにすぎないが、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$

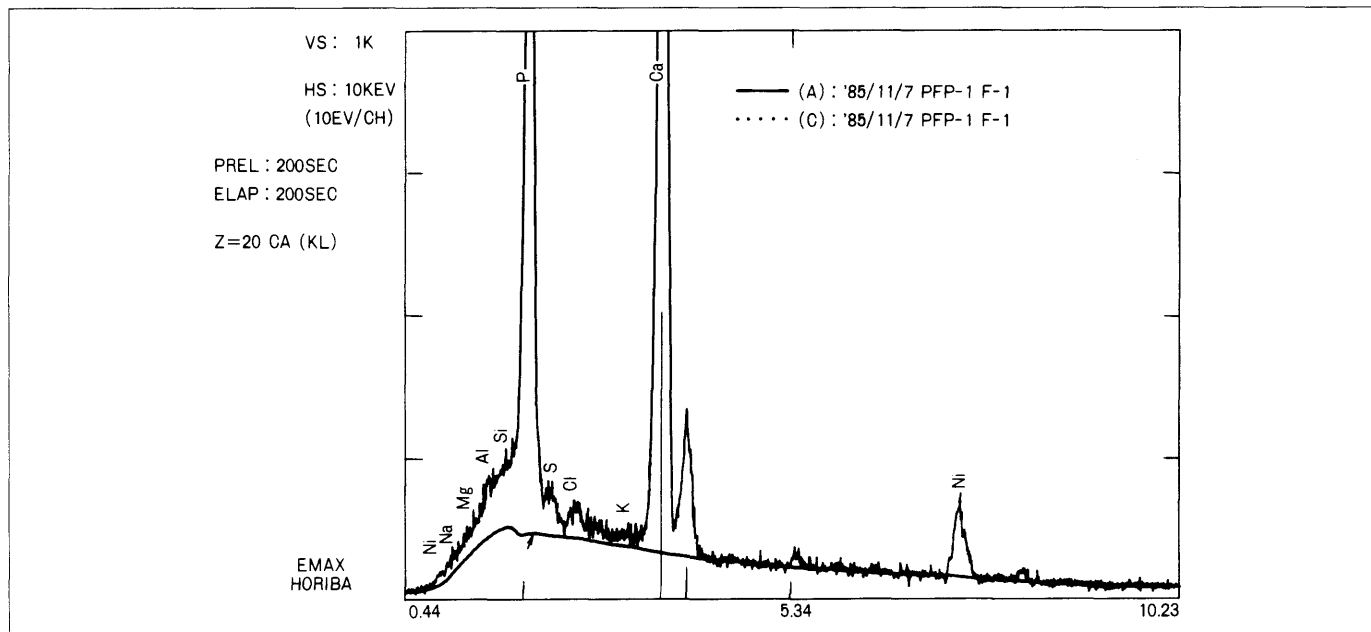


図7 大型パピラの特性X線スペクトル 矢印はバックグラウンドレベル

で処理した方がより高濃度のCaがパピラから検出される。(2) Naは、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 液に含まれているが、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 液には含まれていない。しかし、これらいずれの液によって処理してもパピラにはNaの顕著なピークが得られない。(3) Kはいずれの処理液にも含まれていないが、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ で処理するとパピラにKの高いピークが現われる。これは子葉鞘の細胞質にもともと含まれていたKに由来すると考えられる。

Kunoh et al.<sup>7),8),9)</sup>は、うどんこ病菌を接種したオオムギ葉をタンニン酸固定し、走査電顕によるX線分析を行い、本菌の侵入部位の周辺、特にパピラにCa, SiおよびMnが顕著に集積すると報告した。これらの結果は、今回の測定結果と異なるが、この違いは本葉と子葉鞘の材料の差に帰因すると考えられる。さらに今回の結果が示すように、元素は選択的にパピラに取り込まれるので、液に浮かべた子葉鞘とパーミキュライトに植えられた本葉とでは細胞の無機成分が異なり、必然的にそこに形成されるパピラの成分も異なると考えられる。同様に、Akutsu et al.<sup>4)</sup>も、本菌に感染したオオムギ葉を固定し、透過電顕によるX線分析を試みたところ、PとCaはすべてのパピラで検出できたと述べている。本実験の結果も、子葉鞘の処理に無関係にCaがパピラの組成元素であることを示していることから、Caは宿主の器官・組織やそれらに対する処理にかかわらず集積する主要無機成分とみなしてよいと思われる。

今回の分析結果のみによって、本菌が大型パピラを貫通し得ない理由を説明することは難しい。しかし、Aist et al.<sup>2)</sup>が報告したように、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ は宿主への本菌の侵入に対して阻害的に作用するので、侵入地点に $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ が高濃度に集積すれば、本菌の侵入はパピラ通過時に阻止される可能性は高い。 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 処理によって形成されるパピラにCa, Pの特に高いピークが得られることは、この大型パピラにCaとPが $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ の形で集積する可能性を示唆してい

る。

今回の供試材料のように微小な構造を単離、分析する場合には、試料の支持台の選択が重要なポイントとなる。本実験に供試したフォルムパール膜は、(1) 膜に粘着性があり、微小試料を保持できる、(2) 夾雑物が少なく、バックグラウンドからのピークが低い、(3) フォルムパール膜の支持に用いたNiグリッドからのピークは、Ni自身が植物体内に少ないので試料からのピークと競合しない、などの利点をもっている。

前述のように、パピラのX線微小部分分析は、化学固定した感染葉を用いて行われてきたが<sup>4),7),8),9)</sup>、この方法では固定操作中の元素の流出、移行の危険性を否定することはできない。また、固定試料の走査電顕微小部分分析では、パピラのみ分析結果を得るのは難しく、宿主細胞壁とパピラを併せた分析結果が得られるにすぎない。今回用いた単離パピラの分析では、このような問題点はほぼ解決されたと考えられる。

終りに、本研究を行うにあたり、X線マイクロアナライザーを使用させていただき、さらに技術的な援助をいただいた日立製作所那珂工場応用技術センターおよび堀場製作所の方々に深謝の意を表する。

#### 参考文献

- 1) Aist, J. R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annual Review of Phytopathology* 14 : 145-163.
- 2) Aist, J. R. and H. W. Israel. (1977). Papilla formation : timing and significance during penetration of barley coleoptiles by *Erysiphe graminis hordei*. *Phytopathology* 67 : 455-461.
- 3) Aist, J. R., H. Kunoh and H. W. Israel. (1979). Challenge appressoria of *Erysiphe graminis* fail to

- breach preformed papillae of a compatible barley cultivar. *Phytopathology* 69 : 1245-1250.
- 4) Akutsu, K., Y. Doi and K. Yora. (1980). Elementary analysis of papillae and cytoplasmic vesicles formed at the penetration site by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in epidermal cells of barley leaves. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 46 : 667-671.
  - 5) Israel, H. W., R. G. Wilson, J. R. Aist and H. Kunoh. (1980). Cell wall apposition and plant disease resistance : Acoustic microscopy of papillae that block fungal ingress. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 77 : 2046-2049.
  - 6) Kunoh, H., J. R. Aist and H. W. Israel. (1979). Microsurgical isolation of intact plant cell wall appositions for microanalysis. *Canadian Journal of Botany* 57 : 1349-1353.
  - 7) Kunoh, H. and H. Ishizaki. (1976). Accumulation of chemical elements around the penetration sites of *Erysiphe graminis hordei* on barley leaf epidermis. II. Level of silicon in papilla around the haustorial neck. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 42 : 30-34.
  - 8) Kunoh, H. and H. Ishizaki. (1976). Accumulation of chemical elements around the penetration sites of *Erysiphe graminis hordei* on barley leaf epidermis (III) micromanipulation and x-ray microanalysis of silicon. *Physiological Plant Pathology* 8 : 91-96.
  - 9) Kunoh, H., H. Ishizaki and F. Kondo. (1975). Composition analysis of "halo" area of barley leaf epidermis induced by powdery mildew infection. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 41 : 33-39.
  - 10) Marshall, A. T. (1975). Electron probe x-ray microanalysis. In *Principles and techniques of scanning electron microscopy*. Volume 4 (Ed. M. A. Hayat). Van Nostrand Reinhold Company. New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne. pp 103-173.
  - 11) Takamatsu, S., H. Ishizaki and H. Kunoh. (1978). Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. V. Effects of calcium on the infection of coleoptiles of barley by *Erysiphe graminis hordei*. *Canadian Journal of Botany* 56 : 2544-2549.

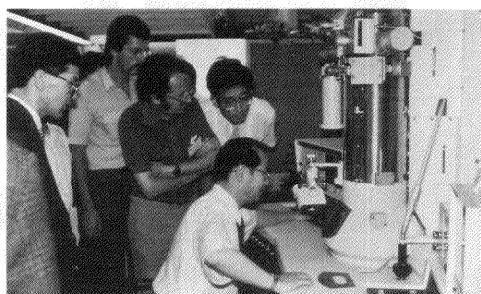
## Topics

### 第11回国際電子顕微鏡学会 開催さる

最先端の科学技術分野で電子顕微鏡を利用する側の立場と作る側の立場の人々が一同に会して話し合う、第11回国際電子顕微鏡学会が8月31日から9月6日まで、京都市京都会館及び京都勧業館で開催された。

4年ごとに世界各国で開催されるこの学会も我が国での開催は昭和41年(1966年)の第6回以来20年ぶりのことであり、海外から約1,000人、国内から約2,000人の研究者、技術者が参加し、それぞれのテーマをめぐって熱心な討論が行われた。

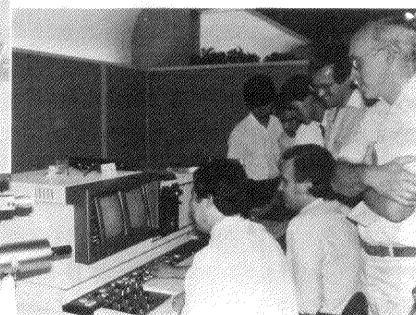
日立からは、基礎研究所の外村主管研究員の特別招待講演、演題「電子線ホログラフィー」をはじめ、大阪大学、日本女子大学、名古屋大学などの諸先生との共同発表を含め17件の発表が行われ、参加者の注目を集めた。



新製品300kV透過電子顕微鏡H-9000の説明を聞く外国の研究者たち

SEMの世界を大きく広げた8Åの分解能をもつ走査電子顕微鏡S-900

同時に開催された商業展示会場では、国内外の有力メーカー46社から、日々の研究開発の成果を具体的な形にした新製品が多く展示された。日立からはH-9000をはじめ最新の5機種(H-7000, H-800NA, S-900, S-800)を展示し、「A Challenge to The NANO WORLD」をテーマに、大形高精細テレビジョンシステムによる原子像の観察、OVDRによるTEMテレビジョンシステム、世界最高分解能(8Å)を誇るS-900Å SEMによるデモは、世界トップレベルの研究者らの注目を集め、極



めて好評であった。

また、9月4日夜は、京都の名勝地嵐山の「嵐亭」で内外のVIP約200人を招待し、ガーデンパーティ「日立イブニング」が催された。

日本情緒あふれるガーデンパーティでは、電子顕微鏡を利用する研究者、提供する立場の技術者の間に、国境やそれぞれの専門を越えたコミュニケーションが広がり、そこには、次世代へ向けて進む「NANOワールドに挑む電子顕微鏡」の世界があった。

(渡部忠雄 記)

## 走査電子顕微鏡によるコイ鰓弁の融合の観察

### SEM Observation on Hyperplasia of Carp's Gill Filaments

福田 芳生\*

(昭和61年2月4日受理)

#### 1. はじめに

閉鎖的な小型の池沼で生活する魚類は、水質の悪化によって直接・間接に種々の影響を受けることになる。この水質の悪化は水温の変化、溶存酸素量の低下、pH値の変動、有害な化学物質の混入など、多くの要因が複雑に絡み合うことによって成立する。特にアンモニア化合物を含んだ家畜飼育場のし尿が絶えず流入するような条件下において、長期間飼育されたコイでは、魚類の呼吸器官として重要な意義を持つ鰓に、しばしば重篤な鰓薄板の融合が引き起こされる。

それは鰓の呼吸面積を減少させるため、ガス交換の効率が著しく低下する。そのため魚体は衰弱し、わずかな水質の変化に対しても抵抗力を失い死亡する原因となる。

そこで、し尿中のアンモニア化合物による鰓薄板の融合を、走査電子顕微鏡で観察した際、一体どのような像が得られるのか、大きな期待を寄せるのは魚病学を専門とする者にとって、極めて当然の事と言えよう。以下に走査電子顕微鏡による観察の結果について述べることにする。

#### 2. 材料と方法

今回、走査電子顕微鏡による観察の対象とした野生種のコイは、体長40cm前後の雄の成魚である。このコイは一定の成長段階に達した後、約2年間にわたって家畜飼育場（牛・豚）のし尿が流入する池沼で飼育されていたものである。

鰓は肉眼的にも赤褐色を呈し、強いうっ血状態にある。この鰓の一部を鋭利な解剖用の鉋で切除し、10%中性フォルマリン溶液中に投入した。十分固定された時点で、走査電子顕微鏡用の試料として、片刃のカミソリを用いて

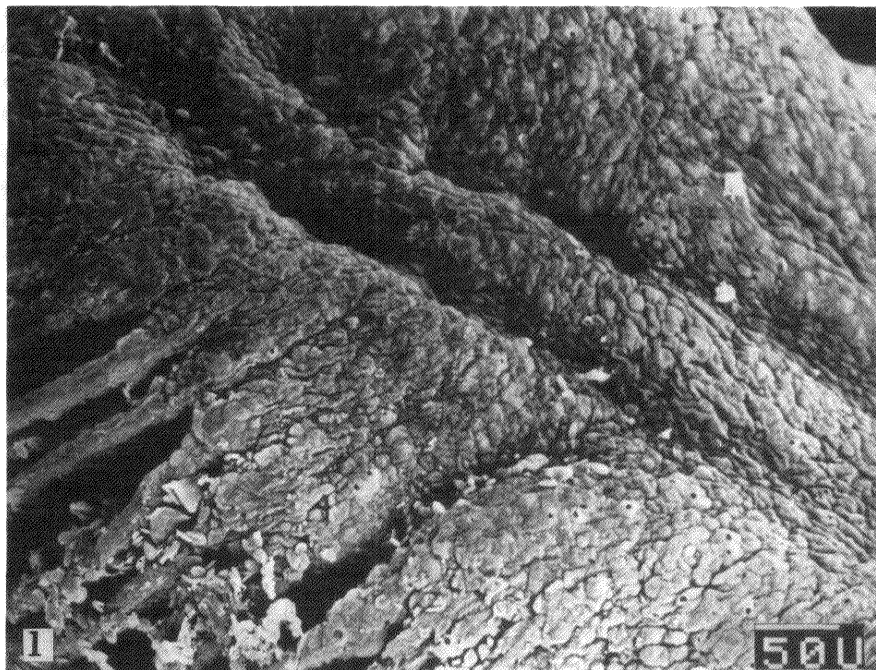


図1 鰓薄板の融合によって棍棒化した鰓弁を示す。外側は細胞性の偽膜によって被覆される。

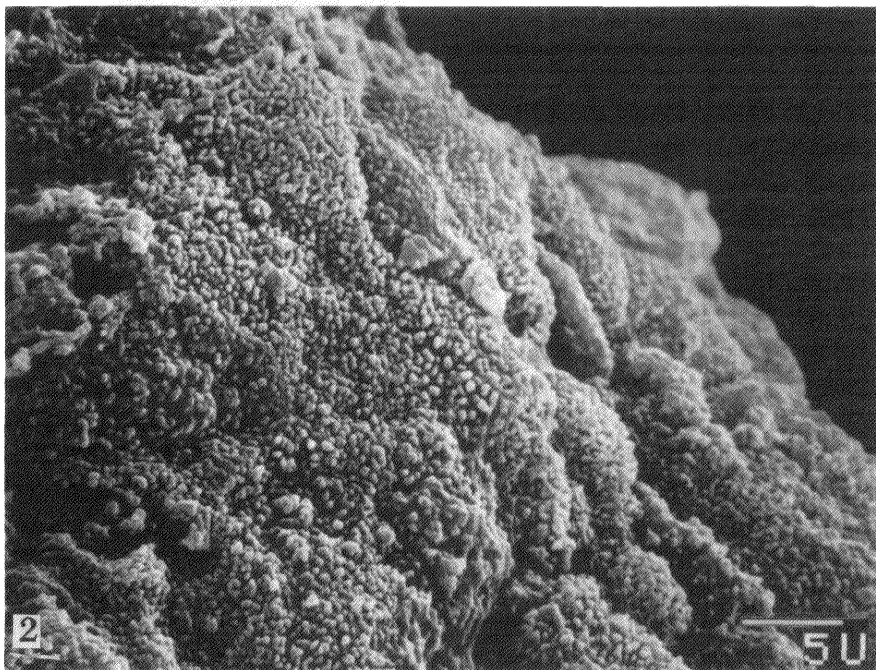


図2 図1の細胞性の偽膜表面を一部拡大して示す。細胞境界は不明確であり、微細な顆粒様構造が認められる。それらは微絨毛の病的な変型と考えられる（図中のUはμmを示す）。

\* 千葉県衛生研究所 病理研究室 研究員 医博

鰓弁 (gill filaments) の縦断および横断面を作製した。試料の大きさは10mm×15mm大である。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た。

完全に脱水されたことによって赤褐色から白色に変わった試料をイオンコーター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。その際の加速電圧は20kVである。

### 3. 観察および論議

低倍率像では、鰓弁先端部から中央部にかけて通常では分離している舌状の鰓薄板 (gill lamellae or secondary gill lamellae) が融合し、あたかも棍棒のような観を呈する (図1)。このことから、鰓弁の棍棒化という呼称が提唱された。棍棒化した鰓弁表面は、多数の顆粒状の突起を伴う膜状構造によって被覆される (図2)。この顆粒状の突起は細胞性のものであり、魚の表皮表面や口腔上皮表面に存在する指紋様構造 (Brown and Wellings, 1970 ; Whitear, 1971) とは著しく異なる。これは鰓弁が棍棒化することによって形成された細胞性の偽膜 (cellular pseudo-membrane) 特有の病的な構造と考えられる。また、この偽膜を構成する細胞の境界は不明確である。

Cd曝露によって棍棒化した鰓について、走査ならびに透過電子顕微鏡で調べたKarlsson-Norrgrénら (1985) は、細胞性の偽膜表面に筆者の観察したものと同様な顆粒様構造を認め、それが微絨毛の特殊化したものであることを指摘している。

アンモニア化合物による鰓の棍棒化は、鰓薄板の呼吸上皮が異常に増殖し、多層化することによって形成される。この種の現象を過形成 (hyperplasia) と呼ぶ。まず、正常な個体のものでは2層前後の呼吸上皮よりなるが、次第に棍棒化に向いつつある鰓では4層ないし6層の厚さに達する。(図3) 鰓薄板の毛細血管中には、赤血球が充満する。呼吸上皮は多層化しても、内部の柱細胞 (pillar cell) には変化は認められない (図4の矢印)。

多層化した鰓薄板の呼吸上皮が隣接する上皮と接触することによって、各鰓薄板は融合し、棍棒化が促進する。界面活性剤の主剤となっている

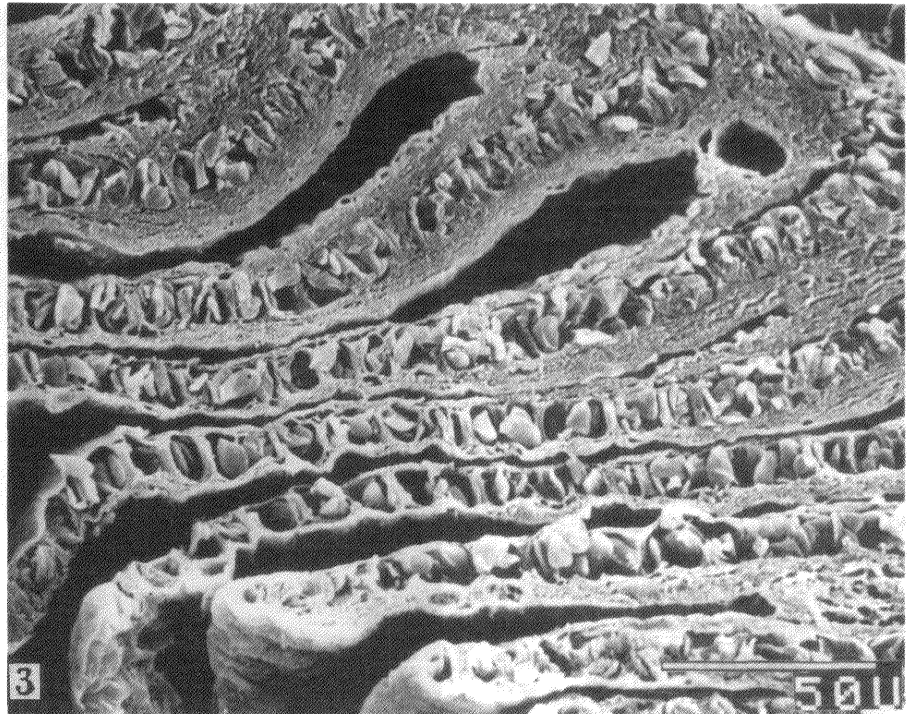


図3 鰓薄板の呼吸上皮の増殖 (hyperplasia) の様子を低倍率像で示す。

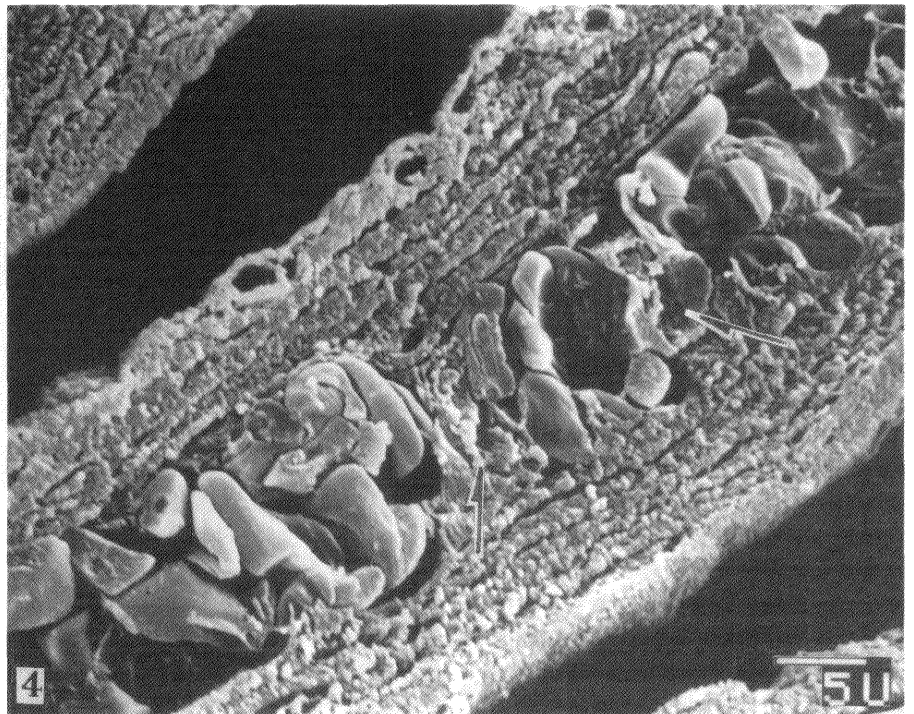


図4 多層化した鰓薄板の呼吸上皮、中央の毛細血管内に血球が充満している。矢印の柱細胞は正常である (図中のUはμmを示す)。

(Linear Alkylbenzenesulfonate) は、鰓薄板の呼吸上皮表面に吸着し、鰓の棍棒化を最も招きやすい化学物質として知られている (Fukuda, 1983)。この界面活性剤の曝露による場合は、鰓薄板基部から上皮の増殖が起り、そこに小型の上皮性の細胞塊が形成される。時間の経過とともに、上皮性の細胞塊は次第に大型化し、遂に各鰓薄板の間隙を完全に埋め尽す。

この界面活性剤によって誘導された鰓の棍棒化は、明調な粘液様細胞によって構成される。一方、塩化メチル水銀曝露のマス (*Salmo gairdneri*) では、本論のアンモニア化合物と同様、鰓薄板の呼吸上皮に端を発する増殖 (棍棒化) が起る (Wobeser, 1975)。それらは粘液様細胞の形をとらない。

本論の鰓薄板の融合に陥った部位において、しばしば大型の腔所が観察される (図5)。この腔所の内側は多層化した呼吸上皮によって被覆されている (図6)。この種の腔所は、鰓薄板基部より上皮の増殖が起る界面活性剤やCd曝露の魚には認められないものである。(Bilinski and Jonas, 1973 ; Fukuda, 1983 ; Karlsson-Norrgren et al., 1985)。この腔所は、鰓薄板の融合が部分的に不完全であったことによるものであり、腔所形成後は一種の貯気槽として機能していることが推測される。

この魚の鰓に観察される上皮の増殖発現の様子は必ずしも一様ではなく、水中の化学物質の性状と関連のあることを示唆している。この鰓の棍棒化は、水中の環境汚染物質に対する魚の防禦反応と考えられるが、その反面、ガス交換の効率が低下することが指摘されており (Hughes, 1972 ; Mayer and Kramer, 1973)、障害像の一種ともみなすことができる。

微量の環境汚染物質に長期間曝露されることによって引き起された鰓の棍棒化は、環境の改善によっても容易に常態に復帰し得ないが、比較的短期間の後に棍棒化したものでは、常態 (鰓本来の構造) に復する能力を維持している (Solangi and Overstreet, 1982 ; Fukuda, 1983)。

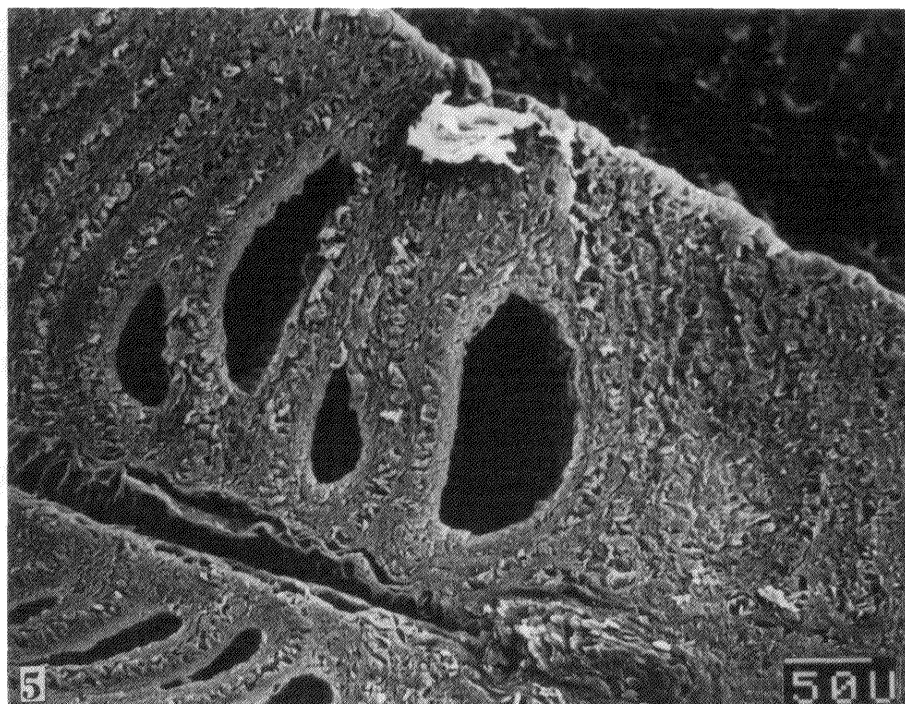


図5 鰓薄板の呼吸上皮の増殖によって、棍棒化した鰓弁の縦断面を示す。中央に大型の腔所が見える。これは呼吸上皮の融合が部分的に不完全であったことによる。

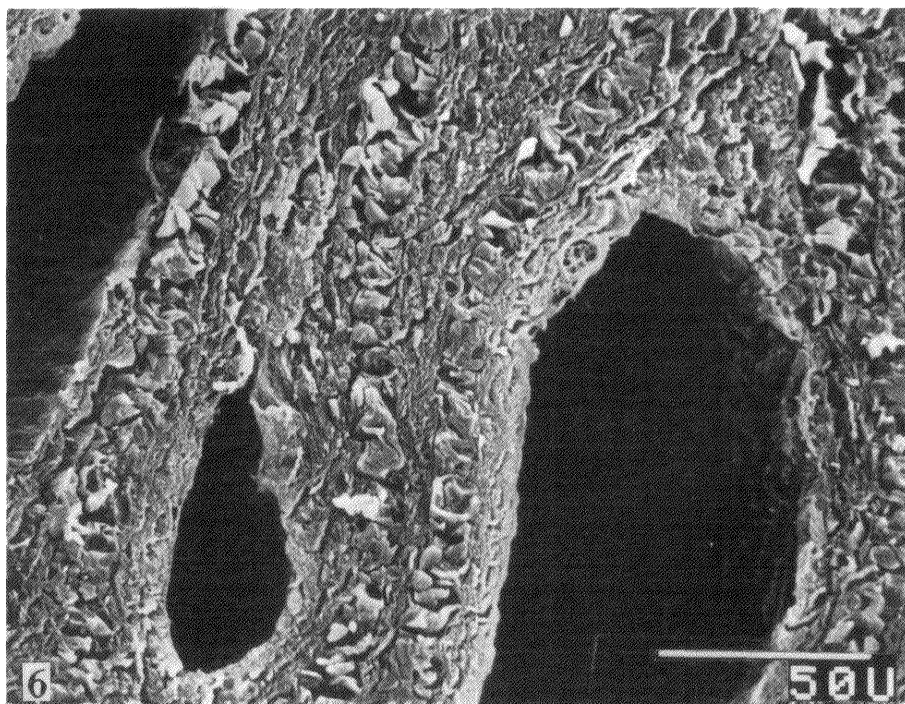


図6 図5の腔所の一部拡大を示す。この腔所内側は増殖した呼吸上皮によって被覆される (図中のUはμmを示す)。

## 4. 終りに

走査電子顕微鏡の出現によって、魚の呼吸器系の疾病に関する研究が飛躍的に進展した。特に、鰓の疾病は魚の生息域の水質を忠実に反映しているものであり、そのモニタリングに欠く事のできない情報源となっている。

水中の化学物質によって引き起される鰓の棍棒化は、走査電子顕微鏡を適用することによって、表面のみならずその内部の異常な構造まであますところなく、鮮明な立体像としてとらえることができるようになった。

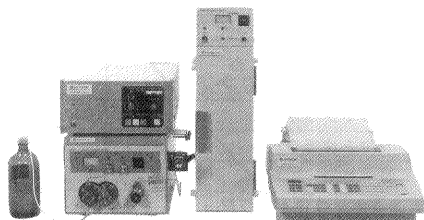
湖沼の浄化が叫ばれている昨今、魚の鰓の疾病はますます重視される傾向にある。その際、走査電子顕微鏡が大きな威力を発揮することは疑いあるまい。

## 参考文献

- 1) Abel, P. D. : J. Fish Biol., 9, 441~446(1976)
- 2) Baker, J. T. P. : J. Fish. Res. Bd. Can., 26, 2785~2793(1969)
- 3) Bilinski, E. and Jonas, R. E. E. : J. Fish. Res. Bd. Can., 30, 1553~1558(1973)
- 4) Brown, G. A. and Wellings, S. R. : Z. Zellforsch., 103, 149~169(1970)
- 5) Fukuda, Y. : Japan. J. Ichthgol., 30, 268~274(1983)
- 6) Hughes, G. M. : Resp. Physiol., 14, 1~26(1972)
- 7) Hughes, G. M. and Perry, S. F. : J. exp. Biol., 63, 447~460(1976)
- 8) Karlsson-Norrgren, L. et al. : J. Fish Biol., 27, 81~95(1985)
- 9) Mayer, F. L. and Kramer, R. H. : Prog. Fish. Cult., 35, 9~10(1973)
- 10) Solangi, M. A. and Overstreet, R. M. : J. Fish Diseases, 5, 13~35(1982)
- 11) Whitear, M. : J. Zool. (Lond.), 163, 237~264(1971)

## Topics

### D-2200形 日立GPC データ処理装置



GPC分析装置と接続のD-2200形  
日立GPCデータ処理装置

GPC (Gel Permeation Chromatography) 分析用のデータ処理装置D-2200形を開発しました。この装置は従来の液体クロマトグラフ用やガスクロマトグラフ用のデータ処理装置D-2000形を母体とし、GPC分析として高分子成分の分子量、分子量分布の測定などを可能にしたものです。このD-2200形はGPCのデータ処理の他に液体クロマトグラフやガスクロマトグラ

フのデータ処理もでき、更にD-2000形のオプション装置も共用で使用できます。

## ■ 主な特長

- (1) 液クロ・ガスクロのデータ処理モード/GPCデータ処理モードを切り替えてどちらでも使用できます。
- (2) GPC計算を2チャンネルタイプで使用し、2台分の働きをさせることができます (オプションで2チャンネルアダプタ使用)。
- (3) 校正曲線は、標準と汎用の2種類を選択して使用することができ、また、折線近似、最小二乗法による3次近似の2種類を選択して、使用できます。
- (4) 各分子量による感度補正を行って計算することができます。
- (5) RI検出器などによる負信号は、反転して正信号として処理、又は負信号除去のいずれかの方法を選択して使用できます。
- (6) 分子量分布曲線(微分及び積分)は、重ね書きをさせることができます。
- (7) 分析データを記憶させることができますので、ベースライン補正や分子量計算区間を変更し、何度でも再計算することができます。
- (8) GPC計算結果をフロッピーディスクに記憶したり、外部コンピュータへ転送し、データを管理することも可能です (オプション使用)。

## ■ 適用分野

- (1) 高分子 (ポリマー) 化学関連  
石油化学、機能性材料、化粧品、繊維、製薬、塗料、触媒、接着剤、ゴム、染料など
- (2) バイオ (タンパク) 関連  
食品、医薬品など

## ■ 主な仕様 (ソフトウェアの部)

- (1) 平均分子量の計算
  - ① 数平均分子量 (MN)
  - ② 重量平均分子量 (MW)
  - ③ Z平均分子量 (MZ)
  - ④ 粘度平均分子量 (MV)
- (2) 分散度の計算
  - ① MW/MN, ② MZ/MN, ③ MV/MN
- (3) GPC校正曲線
  - ① 標準校正曲線
  - ② 汎用校正曲線
- (4) ピーク分割
  - ① 最大分割 1,000点
  - ② 分割間隔 0.01~100分の任意
- (5) ベースライン補正
  - ① 時間指定2点直線補正
  - ② 時間指定水平固定補正

## 解 説

## L-8500形日立高速アミノ酸分析計の開発

## Development of HITACHI Model L-8500 High Speed Amino Acid Analyzer

高田 芳矩\* 藤井 芳雄\*\* 出口 喜三郎\*\*\* 鷹野 重威\*\*\*\*

(昭和61年10月1日受理)

## 1. 緒 言

アミノ酸は、蛋白質やペプチドを構成し、あるいは遊離状態や包含状態で生体内に存在して重要な役割を果たしている。それゆえ、アミノ酸分析は、蛋白質のアミノ酸組成や一次構造を決定する手段として生化学、生物学等の分野の研究に欠くことができない。また、医薬品や食品の品質管理にも広く実施されている。特に最近では、遺伝子工学などのバイオテクノロジーの分野に、また、臨床化学にアミノ酸分析が利用されるようになり、分析感度の向上と分析時間の短縮が要求されている。これらのニーズに対応するため3 $\mu$ mのイオン交換樹脂を開発し、更に自動脈流補正機構を備えた少容量ポンプの開発によりノイズの低減を図り、より高感度で迅速に分析することを可能にしたL-8500形高速アミノ酸分析計を商品化したのでその内容を解説する。

## 2. 日立のアミノ酸分析計の歴史

日立の液体クロマトグラフの歴史を表1に示したが、これはまさにアミノ酸分析計の歴史である。1958年に液体クロマトグラフの開発に着手して以来、アミノ酸分析計の開発と改良に力を注いできた。

一方、アミノ酸分析計の性能を比較して図1に示した。分析時間は $\frac{1}{10}$ に短縮され、検出下限は、 $\frac{1}{100}$ になり著しく高感度化された。

この性能向上の結果は図2に示した。1958年にSpackman, Stein及びMoore<sup>1)</sup>によってアミノ酸の自動分析法が開発されて以来、上記プロットは、おおむね直線的関係にあることが分かる。図2には分離カラム充填剤として用いられたイオン交換樹脂の粒径も示したが、当初40 $\mu$ mあったものが微粒子化されたことと、粒度分布が均一化されたことで、分析時間が短縮されたことが分かる。特に835形では5 $\mu$ m、そしてL-8500形では3 $\mu$ mのイオン交換樹脂が、業界で初めてアミノ酸分析計に採用されたが、同じ充填剤を用いても分析条件の改善によって当初より高速化され、3 $\mu$ mイオン交換樹脂を用いれば、将来更に分析は迅速化されることも予想される。

## 3. L-8500形アミノ酸分析計の原理

アミノ酸分析計の流路の概略を図3に示した。この図はL-8500形アミノ酸分析計のモニタ用CRTに表示される画面である。Bは溶離液(バッファ)を示すが、B5はアルカリ



L-8500形高速アミノ酸分析計

表1 日立液体クロマトグラフの歴史

|      |                                                                          |
|------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1958 | KLF-1形液体クロマトグラフの開発に着手                                                    |
| 1960 | KLF-1形アミノ酸分析計(試作機)                                                       |
| 1962 | KLA-2形アミノ酸分析計                                                            |
| 1964 | KLA-3形アミノ酸分析計                                                            |
| 1965 | KLA-3A形アミノ酸分析計                                                           |
| 1966 | KLA-3B形アミノ酸分析計(リガンド法;'68)                                                |
| 1967 | 034形汎用液体クロマトグラフ                                                          |
| 1970 | 034形耐薬品性液体クロマトグラフ                                                        |
| 1971 | KLA-5形アミノ酸分析計                                                            |
| 1972 | 630-N(核酸分析)液体クロマトグラフ<br>630-C(クーロメトリックモニタ付)<br>日立ゲル #3010(日立ゲル 3000シリーズ) |
| 1973 | 634形高速液体クロマトグラフ<br>034-2UA形全自動液体クロマトグラフ                                  |
| 1974 | 635形高速液体クロマトグラフ                                                          |
| 1976 | 633形高速液体クロマトグラフ                                                          |
| 1977 | 835形高速アミノ酸分析計                                                            |
| 1978 | 635A/633A形高速液体クロマトグラフ                                                    |
| 1979 | 638形高速液体クロマトグラフ                                                          |
| 1980 | GPC用充填カラム「GELCO」(日立化成)                                                   |
| 1981 | 655形高速液体クロマトグラフ                                                          |
| 1983 | 655-15形セミマイクロポンプ<br>水系GPCカラム(日立化成)                                       |
| 1984 | 655A形高速液体クロマトグラフ                                                         |
| 1985 | LC周辺機器の充実<br>D-2000形データ処理装置ほか                                            |
| 1986 | L-8500形アミノ酸分析計                                                           |

溶液で主にカラムの再生に使用される。溶離液は高速で作動する電磁弁、 $V_1 \sim V_5$ の開閉によって切り替えられるが、バルブの開閉時間を制御することで各溶離液を一定割合で混合し、あるいは時間とともに混合比を変えて送液ポンプ

\* 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部 主任技師 工博

\*\* 日立製作所 那珂工場 技師

\*\*\* 日立計測エンジニアリング(株) 技師 理博

\*\*\*\* 日立製作所 那珂工場 副技師長 理博

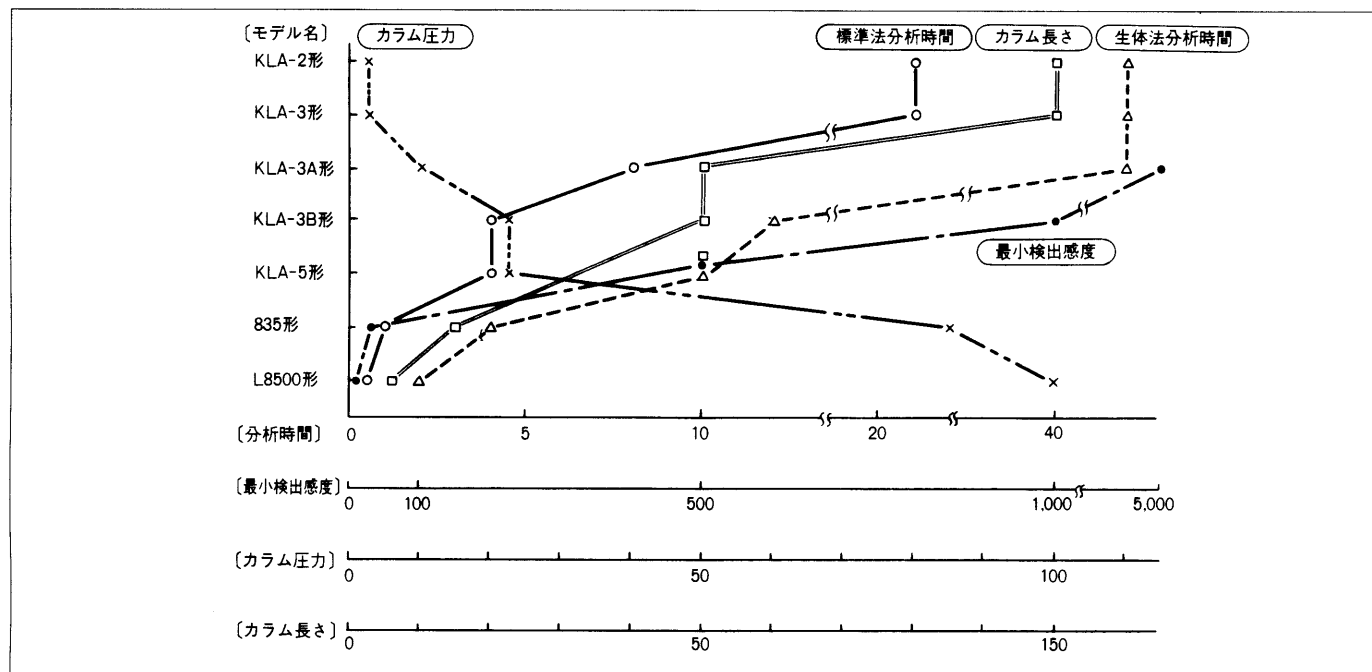


図1 アミノ酸分析計の性能来歴

1に導くことができる。ポンプ1から排出された溶離液が分離カラムに導かれる流路の途中で、オートサンプラにより一定量の試料がその流路内にバンド状に挿入される。

蛍光法によりアミノ酸を検出する場合にはR1に次亜塩素酸溶液を、R2にアルカリ水溶液を、そしてR3にはO-フタルアルデヒド水溶液を入れ、R1とR2はポンプ2で送り、あらかじめプロリンなどそのままでは反応しにくいものを酸化したのち、R3をポンプ3で送ってO-フタルアルデヒ

ドと反応させ、蛍光物質に変え蛍光光度計で検出する。

検出器の出力はデータ処理装置に送られ、演算されて保持時間及び保持時間より同定されるアミノ酸名、ピーク高さ、ピーク面積、成分量 (nmol, ngなどで表示)、RATIO (標準試料ではピーク面積/ピーク高さ×100、未知試料では標準試料のRATIOに対する未知試料のRATIOの比×100)、ピーク同定ミス判定マーク (未知試料のRATIOが100±10の範囲外にある場合に\*印を打ち出すもので、同定ミス、データ処理の不正確さ、ピークの重なり等が分かる) などが打ち出される。

#### 4. アミノ酸分析の高速化と高感度化の手法

##### 4.1 カラム効率の向上

一般に、液体クロマトグラフィーにおいて2つの成分の分離度 $R_s$ は、

$$R_s = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{(W_2 + W_1)} = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \sqrt{N} \quad \dots (1)$$

で表わされる。ここに $V_{R1}$ と $V_{R2}$ は成分1と2の保持容量、 $W$ はピーク幅、 $\alpha$ は分離係数 ( $\alpha = k'_2/k'_1$ )、 $N$ はカラムの理論段数を示す。例えば、スレオニン (Thr) とセリン (Ser) 及びグリシン (Gly) とアラニン (Ala) の場合は、溶離液の組成と分離係数 $\alpha$ の関係は表2に示すようになる。(1)式に $k'=13$ を入れて計算すると表3を得る。

溶離液Aを用いてThr/Serを90%の分離率 ( $S$ =ピーク谷間から平均ピークトップまでの高さ/平均ピーク高さ×100%) で分離するには、 $R_s=1.25$ すなわち理論段数5,300段以上が必要であるが、Bの溶離液では、2,500段のカラムでよいことになる。しかし、この場合にはGly/Alaの分離が $R_s=0.66$ となり、よく分離できないのでGly/Alaの分離のみ溶離液Aで分離すればよい。このように $\alpha$ を大きくすれば特定の成分対に関しては理論段数 $N$ を小さくしても分離でき

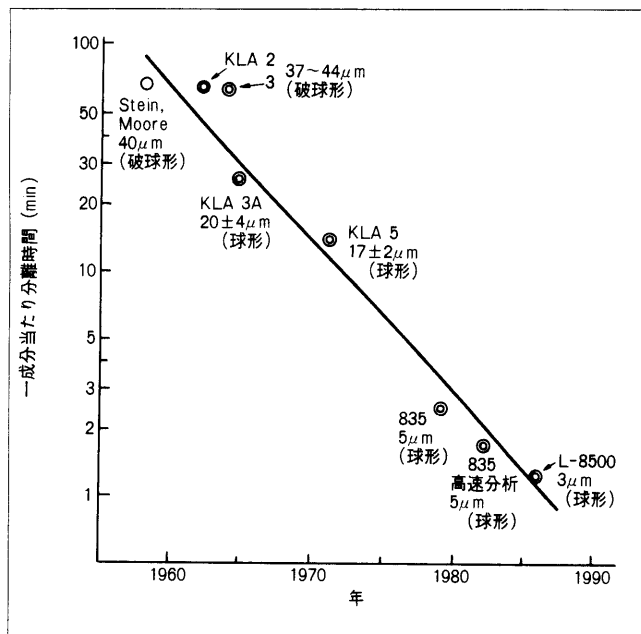


図2 アミノ酸分析の進歩

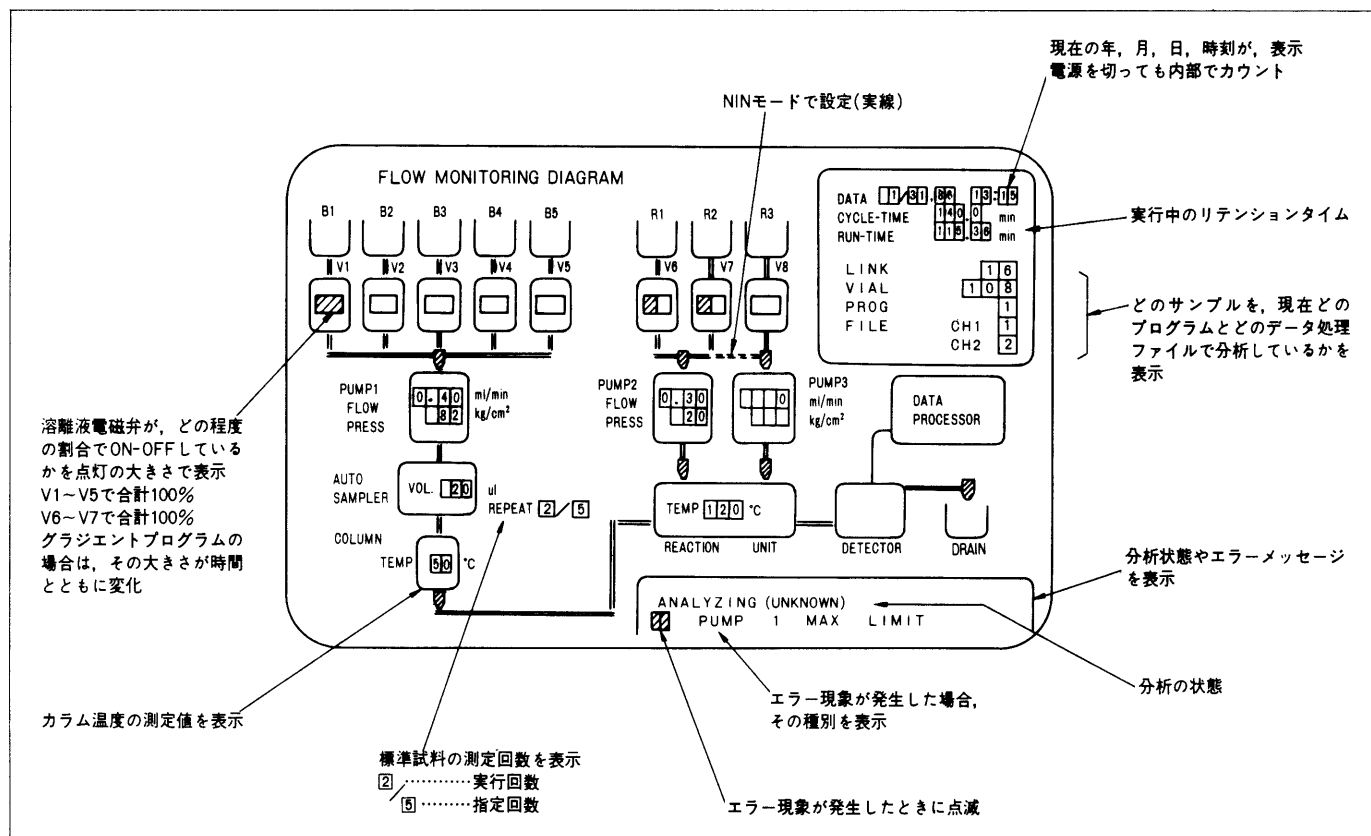


図3 モニタ画面(流路図)

ることになるが、一方の $\alpha$ を大きくすると他の成分対の $\alpha$ が小さくなって不都合を生じることもある。したがって、まず理論段数の高いカラムを用いて、それでも分離の不十分なところは溶離液組成を変えて $\alpha$ を大きくするという手段をとる。

一方、理論段数 $N$ は、

$$N = 16 \left( \frac{V_R}{W} \right)^2 = \frac{L}{H} \quad \text{.....(2)}$$

で表わされる。カラム長さ $L$ が一定ならば、一理論段数当たりのカラム長さ $H$ を小さくすれば $N$ の値は大きくなる。ここで $H$ と溶離液の線速度との関係式<sup>2)</sup>にイオン交換樹脂の径

を $10\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 及び $3\mu\text{m}$ を代入して計算してみたが、粒子が細かいほど最適流量下における $H$ の値は小さくなり、カラム効率は向上すること及び粒子径が小さいほど高流速側での $H$ の増加の割合が少なく、より高流速下で使用してもカラム効率の低下の少ないことが分かった。すなわち微粒子ほど高流速下でも理論段数が高く、高速分離に適することになる。しかし、粒径を小さくすれば当然カラム圧力も上昇するので、装置及びイオン交換樹脂それ自体の耐圧の問題を生じる。また、液体が粒子間を高速で流れるときの摩擦熱の発生による液の乱れも影響を及ぼすようになろう。したがって、通常のイオン交換樹脂の耐圧が $200 \sim 260\text{kg/cm}^2$ であることも考え合わせると、カラム充填剤の粒径は $2 \sim 3\mu\text{m}$ が限界であると考えられる。

#### 4.2 カラム外でのピークの広がり

カラム効率を向上させても、カラム外すなわち①試料注入部、②接続部及び配管、③反応コイル、④検出器でのピーク広がりを抑えなければ、カラムの性能を十分に生かすことができない。ゆえに、カラム外のピーク広がりには最小限になるよう考慮する必要がある。アミノ酸分析の場合にはポストカラム反応を用いるため、カラムを出てから数 $\sim 20\text{m}$ もの反応コイル内でのピークの広がりを無視できない。L-8500形高速アミノ酸分析計では $4.6\text{mmID} \times 60\text{mm}$ のカラムを用いているが、ピークの広がり $\sigma^2$ は、 $6,000$  (Asp) から $16,000$  (Val) である。またカラム外の広がり $\sigma_{\text{ext}}^2$ は、 $20\text{m}$ の反応コイルを用いたときに約 $1,800\mu\text{l}^2$ であった。すなわち、反応

表2 溶離液の組成と分離係数の変化

| 溶離液                      | A) $[\text{Na}^+] = 0.2\text{N}$ , pH3.25<br>クエン酸バッファ | B) A)にエタノールが12V/V%<br>になるように調製したバッファ |
|--------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| $\alpha(\text{Thr/Ser})$ | 1.08                                                  | 1.12                                 |
| $\alpha(\text{Gly/Ala})$ | 1.13                                                  | 1.06                                 |

表3 分離係数及び理論段数と分離度の関係

| $\alpha$ | $R_s$ | 1.0   | 1.25  | 1.5    |
|----------|-------|-------|-------|--------|
| 1.06     |       | 5,800 | 9,060 | 13,000 |
| 1.08     |       | 3,400 | 5,300 | 7,600  |
| 1.12     |       | 1,620 | 2,530 | 3,640  |
| 1.20     |       | 670   | 1,040 | 1,500  |

コイルを20mにすると全体の10～30%は反応コイルだけでカラム効率を低下させることになるので改良の余地がある。特にL-8500形では3 $\mu$ m粒子を用いてカラム効率を向上しているため、カラム外でのピークの広がりを少なくすることは特に重要となる。ここでは反応コイルの温度を従来の100℃から120～140℃に加熱することで反応コイルの長さを7mと短くし、更に、各ユニットの配管の長さが最短になるよう考慮している。

#### 4.3 高感度検出の方法

ニンヒドリン発色法により、従来以上に高感度に検出するためには、ニンヒドリンとアミノ酸との反応をより完全に進行させることも有効であるが、以下の方法がより一般的でその効果は大きい。

- (1) カラム内及びカラム外でのピーク広がりを抑え、よりシャープなピークとして高感度を向上させる。
- (2) ポンプの性能を向上させ、流量の安定化によりベースラインのノイズとふらつきを低減させてSN比を向上させる。
- (3) 溶離液に高純度なものを使用し、また、ステップワイス溶離法に変えてグラジエント法を採用し、不純物によるバックグラウンドを最小限とし、溶離液切換時の異常なベースラインの浮き上がりを抑える。
- (4) データ処理によりシグナルを積算してSN比を向上させる。

ここでは前記(2)のポンプの高性能化によるベースラインの安定化が最も有効であった。すなわち、従来の835形アミノ酸分析計ではシングルプランジャポンプが用いられ、脈流防止にダンパを用いて流量の安定化が図られている。したがって、分析プログラムに従って溶離液やカラム温度が段階的に変わるとカラム負荷が変動する。しかし、カラム圧はダンパによりゆっくりと変わることになるので、結果的に溶離液の流量が一時的に低下又は増加することになる。一方、ニンヒドリンは分離カラムの下流で混合されるので、ポンプ2の流量は変化しない。それゆえに、カラム流出液とニンヒドリンの混合比が一時的に変化し、ベースラインの変動として現われる。このベースラインの変動がピークの位置に重なると、その成分を高感度に検出することが難しくなる。L-8500形では脈流ダンパなしで835形のダンパ付きポンプと同等の安定した流量を得られるポンプを開発しているため、ベースラインはより安定している。

#### 5. 応用例

蛋白構成アミノ酸（標準アミノ酸）の分析例を図4に、また生体液アミノ酸のクロマトグラムの例を図5に示した。標準アミノ酸は正味30分、生体液アミノ酸は2時間以内で分析できることを示している。しかし、カラムの再生を含めた全分析時間は更にこれより15～30分間長くなる。いずれもステップワイス溶離法を用い、ニンヒドリン発色法を採用している。検出下限は標準アミノ酸で10pmolを保証している。図6は20pmolの標準アミノ酸をグラジエント溶離法で分離し、蛍光検出法で分離した例を示す。ここでは溶離液の調製に超純水を用いているが、17分から現われるベースラインの浮き上がりは不純物によるものである。また、図7にはノルロイシン及びシステインを含む標準アミノ酸

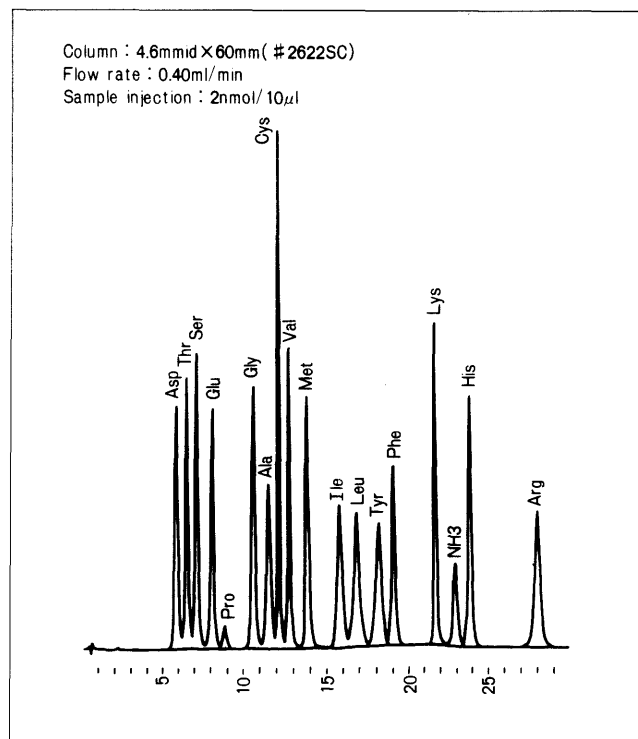


図4 標準アミノ酸のクロマトグラム

のクロマトグラムの例を示したが、アミノ糖（グルコサミン及びガラクトサミン）の分析も可能である。

ピーク位置の再現性については表4に、またピーク面積の再現性については表5にその例を示したが、保証値はピーク位置がAlaでCV0.5%，Argで0.3%，また面積はGlyとHisについてCV1.5%である。蛍光法の再現性もポンプの流量の安定化により向上され、面積でGlyとHisについてCV3%を保証している。

#### 6. L-8500の特長

以上、L-8500形高速アミノ酸分析計の原理と開発に当たった考え方の概略を解説したが、これらの結果として開発された装置の主な特長は以下のとおりである。

##### (1) 対話画面により操作性向上

入力はいすべてガイド表示による対話方式で、基準のプログラムは既に内蔵されているので、初心者にも取扱い容易。運転状態も流路のグラフィック表示によりひと目でモニタ可能。

##### (2) 多様な分析にこたえる豊富なプログラム機能で、徹底した自動分析

プログラム9種類記憶、16種の異なった分析条件を接続できるリンク機能、5種のバッファのグラジエント混合、カラム温度及びポンプ流量のプログラミングなど多様な機能を満載している。

##### (3) 少ない試料で高感度分析

試料のむだを抑えたオートサンブラや蛍光分析法により高感度分析。ニンヒドリンで10pmol、蛍光法で500fmol (Asp) の検出下限を保証。

##### (4) 高速で多検体処理

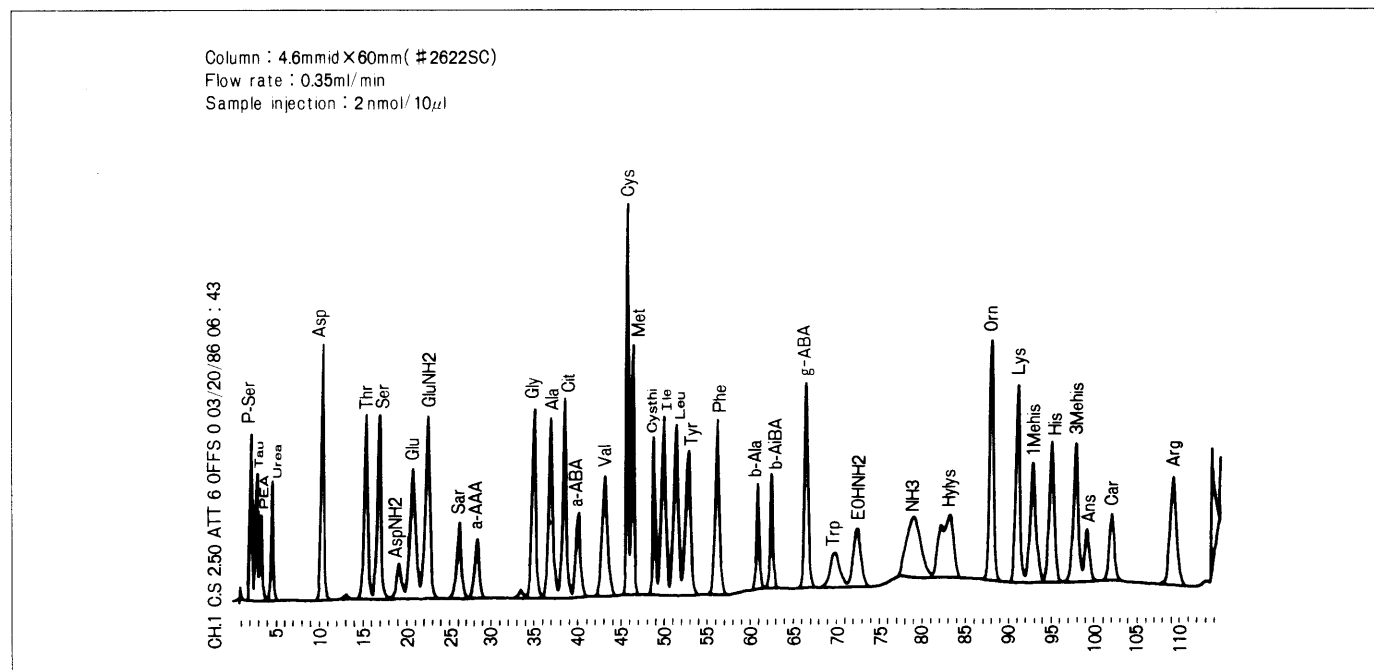


図5 生体液アミノ酸のクロマトグラム

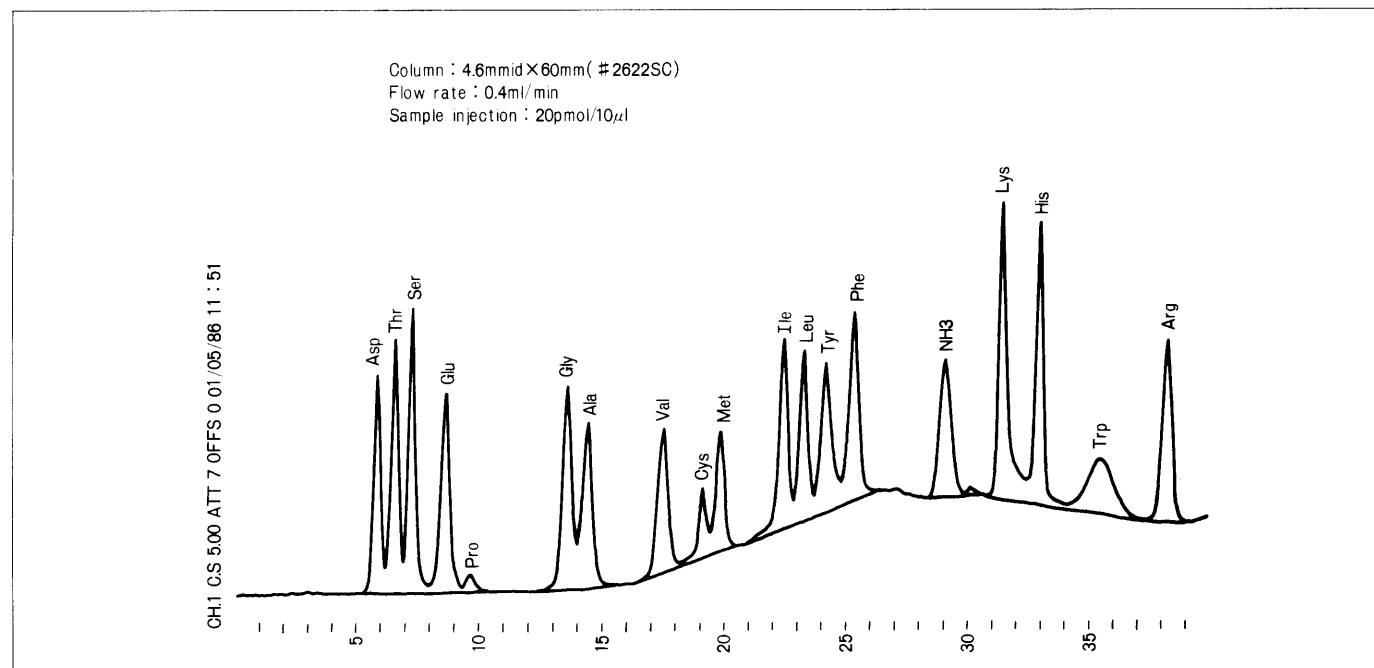


図6 蛍光分析法による20pmolアミノ酸のクロマトグラム例

標準アミノ酸30分（正味）、生体液分析2時間（正味）、オートサンプラには108検体マウント可能。

(5) 優れたポンプ機能で安定した性能と高信頼性

ダブルプランジャによる自動脈流補正機構により、気泡に強くノイズの少ない安定した送液確保。

(6) ニンヒドリンのために冷蔵庫不要

市販のまま2液別々に試薬瓶に入れ、使用時に1:1で自動混合。試薬の安定性、保存性良く冷却も不要。

(7) アミノ酸専用データ処理装置（D-2850形）により最適の分析レポート

アミノ酸名とその分子量が既に登録されているので、成分重量（ng, pg, mg/dlなど）の打出しが容易。基準パラメータも既に登録されていて引き出し、修正使用可。また、ピーク同定ミスを除くため、ピーク形状により判定する機能を備える。更に約40時間の生データを記憶。

(8) フロッピーディスク（オプション）の活用で大容量デ

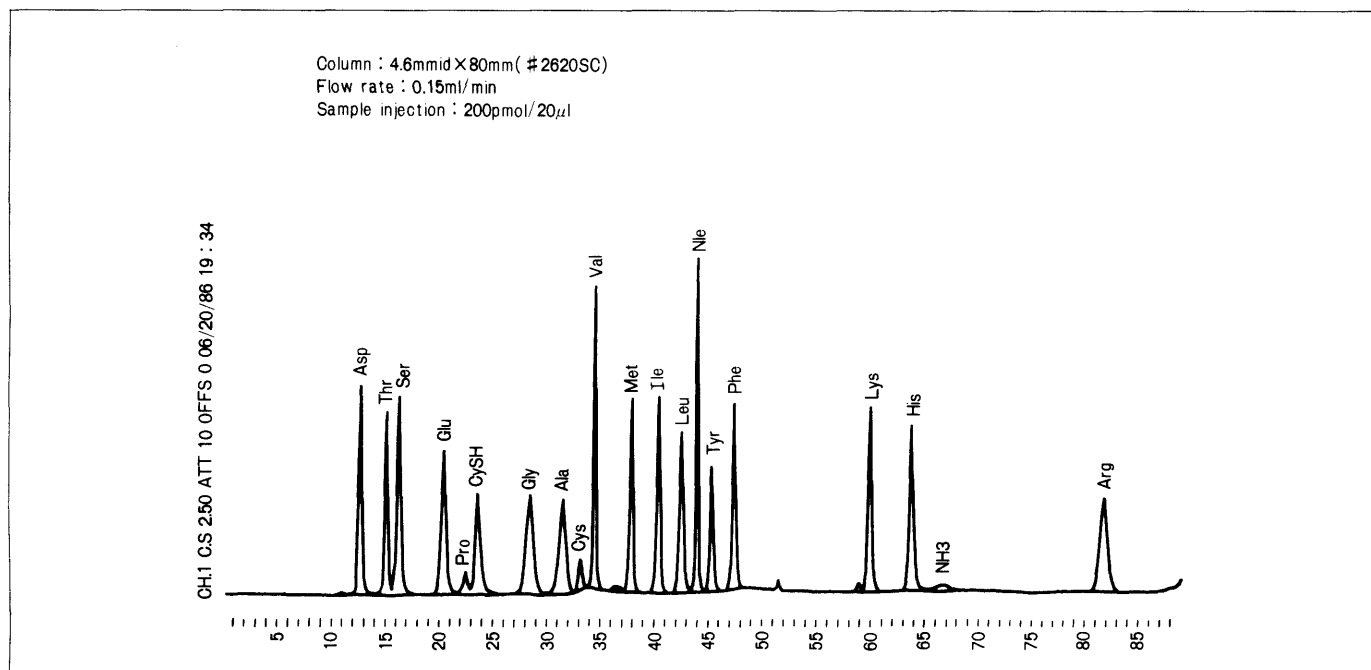


図7 ノルロイシン及びシステインを含む標準アミノ酸のクロマトグラム

表4 標準分析法によるピーク位置の再現性

(単位: min)

|     | ①     | ②     | ③     | ④     | ⑤     | CV%  |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Asp | 5.62  | 5.64  | 5.64  | 5.64  | 5.64  | 0.16 |
| Thr | 6.29  | 6.29  | 6.29  | 6.29  | 6.29  | 0    |
| Ser | 6.94  | 6.94  | 6.93  | 6.94  | 6.94  | 0.06 |
| Glu | 7.86  | 7.86  | 7.84  | 7.86  | 7.85  | 0.11 |
| Pro | 8.61  | 8.61  | 8.60  | 8.61  | 8.61  | 0.05 |
| Gly | 10.54 | 10.56 | 10.53 | 10.54 | 10.54 | 0.10 |
| Ala | 11.40 | 11.41 | 11.38 | 11.41 | 11.41 | 0.11 |
| Cys | 12.57 | 12.54 | 12.48 | 12.52 | 12.52 | 0.26 |
| Val | 13.13 | 13.12 | 13.06 | 13.09 | 13.09 | 0.21 |
| Met | 14.28 | 14.25 | 14.20 | 14.24 | 14.24 | 0.20 |
| Ile | 16.44 | 16.41 | 16.36 | 16.41 | 16.41 | 0.18 |
| Leu | 17.50 | 17.48 | 17.42 | 17.48 | 17.48 | 0.17 |
| Tyr | 18.52 | 18.49 | 18.52 | 18.54 | 18.54 | 0.11 |
| Phe | 19.29 | 19.24 | 19.29 | 19.32 | 19.32 | 0.17 |
| Lys | 21.61 | 21.56 | 21.64 | 21.66 | 21.66 | 0.20 |
| His | 23.74 | 23.72 | 23.77 | 23.80 | 23.80 | 0.15 |
| Arg | 27.69 | 27.66 | 27.72 | 27.77 | 27.74 | 0.15 |

表5 標準分析法によるピーク面積の再現性

(単位:  $\times 10^3$  カウント)

|     | ①   | ②   | ③   | ④   | ⑤   | CV%  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Asp | 588 | 586 | 586 | 580 | 585 | 0.51 |
| Thr | 633 | 634 | 633 | 628 | 632 | 0.37 |
| Ser | 621 | 621 | 618 | 616 | 619 | 0.34 |
| Glu | 619 | 620 | 616 | 613 | 617 | 0.44 |
| Pro | 255 | 253 | 255 | 252 | 254 | 0.51 |
| Gly | 635 | 634 | 633 | 630 | 633 | 0.30 |
| Ala | 562 | 560 | 558 | 556 | 558 | 0.41 |
| Cys | 643 | 643 | 642 | 638 | 641 | 0.32 |
| Val | 603 | 603 | 600 | 598 | 599 | 0.38 |
| Met | 607 | 608 | 607 | 605 | 605 | 0.22 |
| Ile | 580 | 579 | 582 | 577 | 579 | 0.31 |
| Leu | 575 | 576 | 577 | 573 | 575 | 0.26 |
| Tyr | 535 | 536 | 533 | 529 | 531 | 0.54 |
| Phe | 548 | 548 | 547 | 543 | 543 | 0.47 |
| Lys | 641 | 640 | 639 | 636 | 638 | 0.30 |
| His | 625 | 624 | 626 | 622 | 624 | 0.24 |
| Arg | 566 | 563 | 565 | 560 | 562 | 0.42 |

ータ記憶とデータ編集のし直し自由

2個のディスクで連続約112時間(又は160クロマトグラム)の生データの記憶ができ、後日、好適なレポートへの編集し直し可能。

## 7. おわりに

L-8500形アミノ酸分析計は、分離カラムに従来の5 $\mu$ mに代えて3 $\mu$ mのイオン交換樹脂を用いているため、分析時間は理論的にも更に短縮できることは明らかである。しかし、粒径を小さくしたことで逆に圧力上昇や寿命低下などマイナス要因が発生する可能性があるため、今後共注視し、更

にいつその高性能化を図りたい。

また、アミノ糖や生体アミノ酸関連物質の分離など、更に応用例を拡充し、アミノ酸分析に関する幅広いニーズにこたえていきたい。

## 参考文献

- 1) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore; Anal. Chem., **30**, 1190 (1958)
- 2) J. C. Gidding: "Dynamic of Chromatography" Part I Principle and Theory; Marcel Dekker, Inc., New York (1965)

# IMA-3 形日立イオンマイクロアナライザ用DIG装置

## Dual Ion Gun System for HITACHI Model IMA-3 Ion Micro Analyzer

泉 栄一\* 有馬 義雄\* 岩本 寛\* 飛田 一政\*\* 田村 一二三\*\*\*

(昭和61年9月27日受理)

### 1. はじめに

IMAは、高感度で深さ方向の分析のできる表面分析装置であり、半導体及び各種新素材の評価装置として重要な役割を果たしている。これらの材料におけるIMAでの評価対象としては、ドナー及びアクセプタ不純物の濃度膜中並びに界面に存在する不純物の濃度や分布、熱処理における不純物の挙動、ヘテロ界面の急峻性など多岐にわたっている。分析対象元素もHからU、Puまでほとんどすべての元素が対象となる。しかし、IMAでは元素間の感度差が大きく1回の測定で全元素の高感度分析をするのは難しい特性を持っている。一般に、一次イオン種として $O_2^+$ を用いると電気陽性元素の正二次イオンが増加し、一次イオン種として $Cs^+$ を用いると電気陰性元素の負二次イオンが増加する。<sup>1)2)</sup>つまり $O_2^+$ 一次イオンでは電気陽性元素の、 $Cs^+$ 一次イオンでは電気陰性元素の高感度分析ができる。このため $O_2^+$ 一次イオンと $Cs^+$ 一次イオンを使い分けることにより、ほとんどすべての元素の高感度分析ができる。しかし、 $O_2^+$ 一次イオンはホロカソードイオン源で生成し、 $Cs^+$ 一次イオンは表面電離形イオン源で生成するため、電気陽性元素と電気陰性元素両方を分析対象とする場合、イオン源の取付け替え操作が必要となる。

IMA-3では、このたび $O_2^+$ 一次イオンと $Cs^+$ 一次イオンの切替えを正確かつ迅速にするためのDIG装置(Dual Ion Gun System)を開発した。以下、本装置の構成、仕様及び分析測定例について紹介する。

### 2. DIG装置の構成

DIG装置付きIMA-3本体部の外観を図1に示す。DIG装置は、イオン源部、磁場部、電源部から構成する。

#### 2.1 イオン源部

図2にイオン源部の外観を示す。 $Cs$ イオン源(写真左側)と $O_2^+$ イオン源(写真右側)が各々20度傾斜して同時装着されている。 $O_2^+$ イオン源は、改良形ホロカソードイオン源であり、イオン化室に0.5~1 Torrの圧力まで $O_2$ ガスを導入しグロー放電によりプラズマを形成し、そこから $O_2^+$ イオンを引き出すものである<sup>3)</sup>。このため、これら二つのイオン源(Dual Ion Gun)は、 $Cs^+$ 、 $O_2^+$ イオンのみならず、ホロカソードイオン源の印加電圧の極性及び導入ガス種を変えることにより $O^-$ 、 $N_2^+$ 、 $Ar^+$ などのイオンも引き出すことができる。一次イオン加速電圧は $Cs^+$ の場合+1~+15kV、 $O_2^+$ 、 $N_2^+$ 、 $Ar^+$ の場合+1~+20kV、 $O^-$ の場合-1~-10kVの範囲を1kVステップで設定できる。

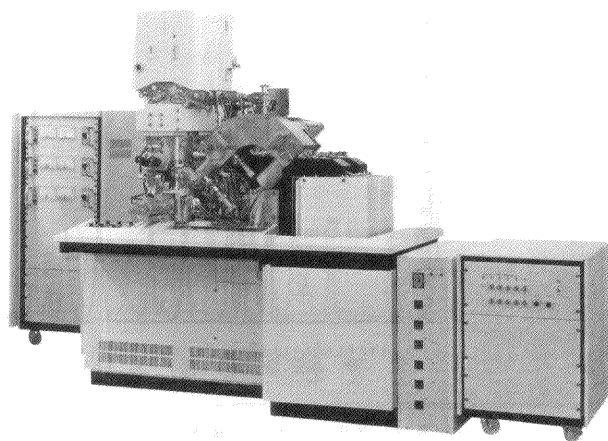


図1 DIG装置付きIMA-3形日立イオンマイクロアナライザ

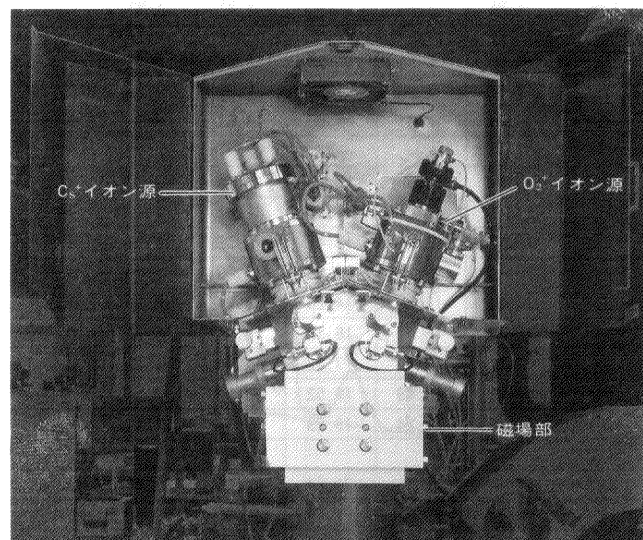


図2 イオン源部

#### 2.2 磁場部の構成

一次イオンの偏向分離を行う磁場部は、図3に示すように、DIG部と収束部の間に位置する。一次イオンが磁場中を飛行するとローレンツ力により下式の軌道を通る。

$$r = \sqrt{mV/eB^2} \quad (1)$$

ここで $m$ は一次イオンの質量、 $V$ は一次イオン加速電圧、 $e$ は一次イオンの電荷、 $B$ は磁束密度を表す。(1)式から磁場に入射したイオンは磁場中で半径 $r$ の円運動をすることが分

\* 株式会社日立製作所 那珂工場

\*\* 日立那珂精器株式会社

\*\*\* 株式会社日立製作所 中央研究所

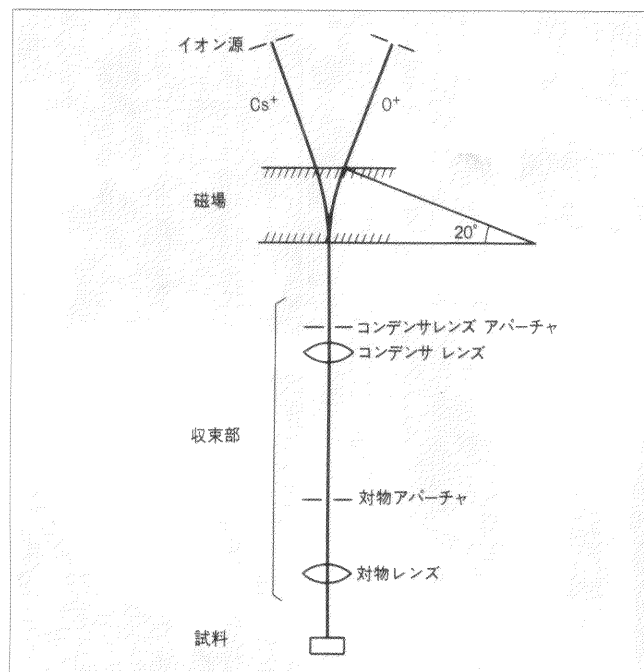


図3 一次イオン光学系

かる。本装置では、軌道半径 $r$ を固定し、磁束密度 $B$ を可変することにより種々のイオン $m$ 及び種々の一次イオン加速電圧 $V$ に対応できる。このため、磁場部は電磁石方式とした。また、電磁石ポールはイオンの入射面との出射面が平行であるため、収束作用がなく、プリズムとして働く。つまり、イオン源から引き出された円形（軸対称）のイオンビームは、変形することなく磁場を通過するため、均一密度のビームの形成やビームの細束化に好適である。

この磁場の極性及び磁束密度を変えることにより、 $\text{Cs}^+$ 一次イオン及び $\text{O}_2^+$ 一次イオンの選択が行える。また、質量 $m$ の異なるイオンは別の軌道を通るため、コンデンサレンズアパーチャ及び対物レンズアパーチャで遮断、除去される。

### 2.3 電源部

図4に示すように、電源部は励磁回路、磁束密度設定器、極性切替器等から構成する。励磁回路は $\text{max.1.1 (T)}$ の磁束密度を発生するための励磁電流を電磁石コイルに供給する。磁束密度設定器は5チャンネルあり、各々磁束密度を0～ $\text{max.}$ 値まで連続可変できる。各々のチャンネルを特定のイオン種、一次イオン加速電圧に対応する磁束密度に設定しておき、セレクトスイッチによりワンタッチでチャンネル選択ができる。このため、一次イオン種の切替選択を瞬時に行うことができる。極性切替器もつまみ操作により行うことができる。

## 3. DIG装置の仕様及び特長

DIG装置は、一次イオン種の正確かつ迅速な切替えと一次イオンビームの高純化を目的としている。このためDIG装置及びDIG装置付きIMAの仕様としては、次の4項目について紹介する。

### 3.1 一次イオン種の切替時間

$\text{O}_2^+$ 一次イオン照射状態から $\text{Cs}^+$ 一次イオン照射状態に切

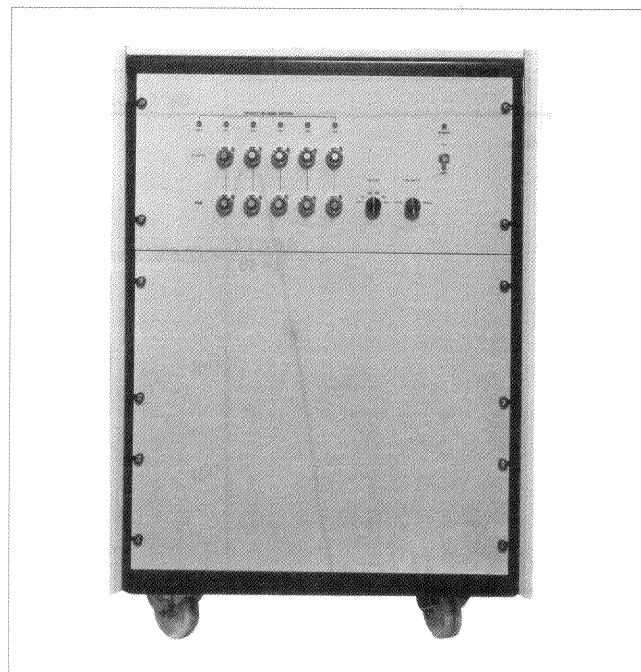


図4 電源部

替える場合、前述の電源において極性切替操作とチャンネル選択操作が必要である。この切替操作及び実際の回路動作を含め15秒で状態切替えが行える。現実には、 $\text{O}_2^+$ 一次イオン照射時には正の二次イオンを、 $\text{Cs}^+$ 一次イオン照射時には負の二次イオンを分析するため、二次イオン質量分析計の極性切替も必要となる。この時間を含めた場合でも60秒以内での状態切替ができる。ただし、各々のイオン源はあらかじめ動作状態にウォーミングアップしているものとして、このように極めて短時間でイオン種の切替えが行えるので、同一の試料をほとんど同時に同一条件で、二つの一次イオン種で評価できる特長を持っている。

### 3.2 一次イオン電流と安定度

DIG装置では、一次イオンビームを20度偏向し、収束して試料に照射する。試料に照射する一次イオン電流は $\text{O}_2^+$ の場合 $\text{max.3}\mu\text{A}$ 、 $\text{Cs}^+$ の場合 $\text{max.1.3}\mu\text{A}$ である。

図5には $\text{Cs}^+$ 一次イオンビームの安定度を測定したデータを示す。一次イオン加速電圧 $10\text{kV}$ 、 $\text{Cs}^+$ 一次イオン電流 $1.15\mu\text{A}$ 時の測定において $\pm 0.6\%/30\text{min}$ が得られている。この値はDIG装置を装着しない場合と同等である。 $\text{O}_2^+$ 一次イオン、 $\text{O}^+$ 一次イオンについても標準IMA-3と同等の値が得られている。

### 3.3 一次イオン分離能（質量分解能）

表面電離形の $\text{Cs}$ イオン源における電離度 $\alpha$ は、金属の温度を $T$ 、仕事関数を $\Phi$ とし、中性原子のイオン化電圧を $I$ としたとき、次式で表わされる。 $K$ 、 $r$ は定数である。

$$\alpha = K \cdot \exp \left[ \frac{e(\Phi - I)}{rT} \right] \quad \cdots \cdots (2)$$

(2)式から $\Phi > I$ の条件を満たす元素を選択的にイオン化するため、 $\text{Cs}^+$ 一次イオンの純度は高い。一方、ホロカソードイオン源の場合、イオン化室へ導入するガスの純度で一次イ

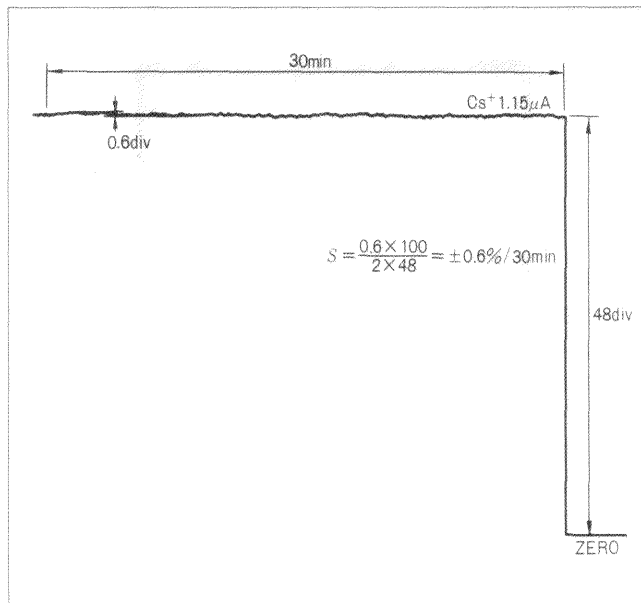


図5 Cs一次イオン電流安定度

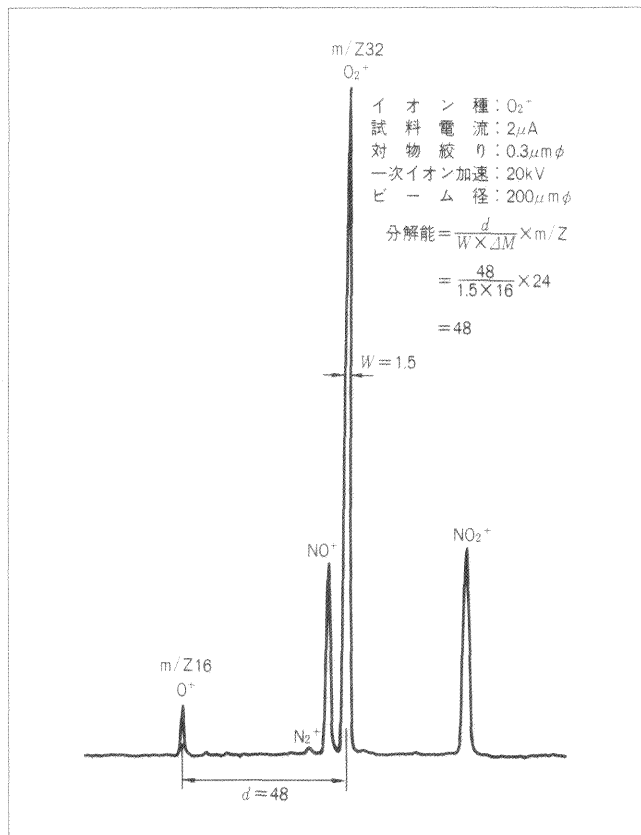


図6 一次イオンビームのマスペクトル

オンの純度が決まる。このため、純度99.995~99.999%の高純度ガスを用いている。図6は工業用O<sub>2</sub>ガス（純度99.99%）を用いた場合の一次イオン電流のマスペクトルである。O<sub>2</sub><sup>+</sup>の他にO<sup>+</sup>、N<sub>2</sub><sup>+</sup>、NO<sup>+</sup>及びNO<sub>2</sub><sup>+</sup>が存在しているのが分かる。質量分解能Rはイオンの質量数をM、質量

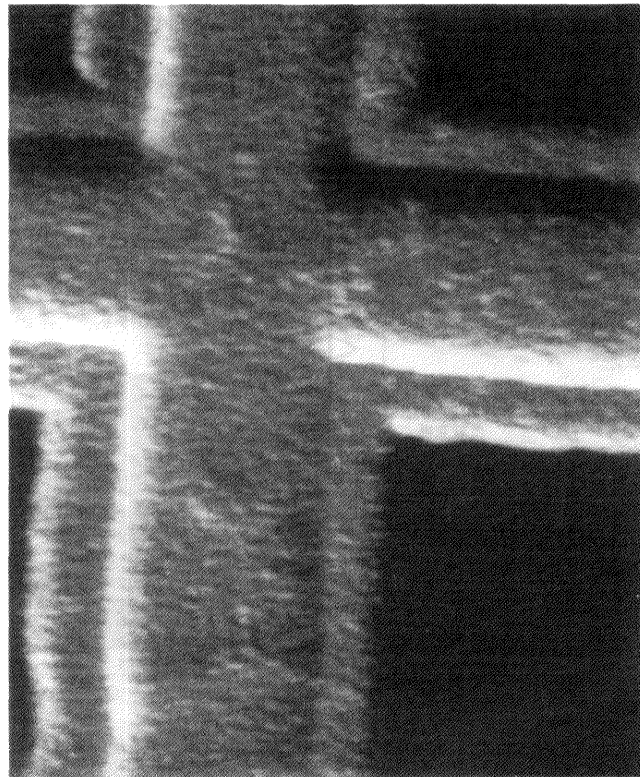


図7 Ni250メッシュ（線幅20μm）の全二次イオン像

差を $\Delta M$ 、イオンピーク間隔を $d$ 、幅を $w$ としたとき、次式で表せる。

$$R = (M / \Delta M) (d / W) \quad \dots\dots\dots(3)$$

図6のマスペクトルから(3)式を用いて計算した結果、質量分解能は48であった。この分解能は質量数32のO<sub>2</sub><sup>+</sup>一次イオンを選択した場合、質量数30のNO<sup>+</sup>イオンを除去できるのみならず、O<sup>-</sup>イオン選択時にはOH<sup>-</sup>イオンを除去できる。分解能48は一次イオンの高純化に十分な値である。

### 3.4 一次イオンビーム径

図7はO<sub>2</sub><sup>+</sup>一次イオンビームによるNi250メッシュ（線幅20μm）の全二次イオン像である。0.5μmの空間分解能が得られている。DIG装置を装着しても一次イオンビーム径は、サブミクロン領域まで細束化できる。

### 4. DIG装置による分析測定

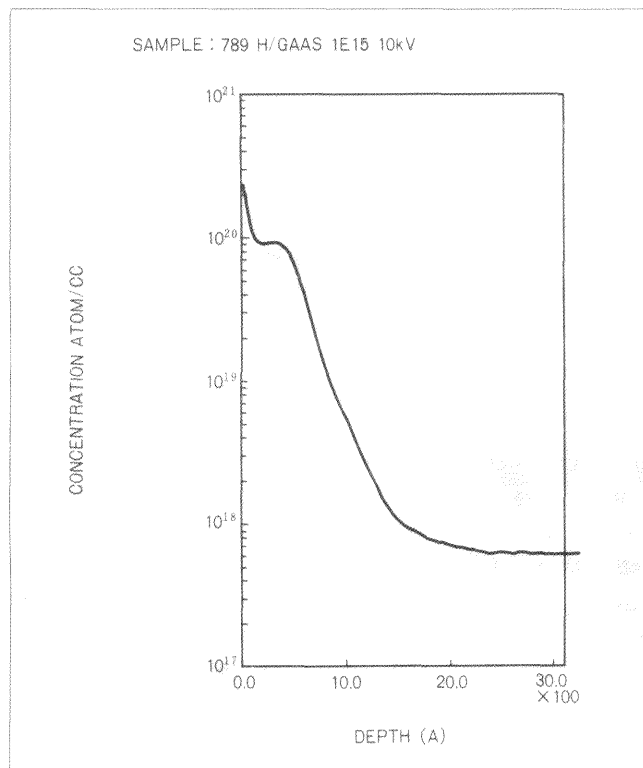
DIG装置付きIMA-3で種々の実サンプルの分析測定を行った。ここではそのうちからCs<sup>+</sup>一次イオンを用いた例とO<sub>2</sub><sup>+</sup>一次イオンを用いた例を紹介する。

#### 4.1 GaAs中のHの分析例

図8にGaAs中にイオン注入（Dose量 $1 \times 10^{15}$ Atoms/cm<sup>2</sup> Energy 10keV）したHの深さ方向プロファイルを示す。このデータは、DIG装置でCs<sup>+</sup>一次イオンを選択して測定したものである。Hの検出限界 $6 \times 10^{12}$ Atoms/cm<sup>3</sup>が得られている。

#### 4.2 Si中のNの分析例

図9はO<sub>2</sub><sup>+</sup>一次イオンを用いSi中へイオン注入（Dose量 $1 \times 10^{15}$ Atoms/cm<sup>2</sup>, Energy 50keV）したNのデプスプロ



ファイルを示す。SiN<sup>+</sup>二次イオンを検出している。Nの検出限界 $1 \times 10^{16}$ Atoms/cm<sup>3</sup>が得られている。

#### 5. おわりに

以上、IMA-3用のDIG装置の構成、仕様と特長及び応用例について述べた。高性能デバイスや新素材の開発における評価装置としてIMAへの期待が大きい。DIG装置を含むIMA-3トータルシステムでこれらの期待にこたえていきたい。

最後に、本装置の磁場設計に際し(株)日立製作所那珂工場電装設部広瀬 博主任技師に御協力をいただいた。本誌を借りて感謝の意を表する。

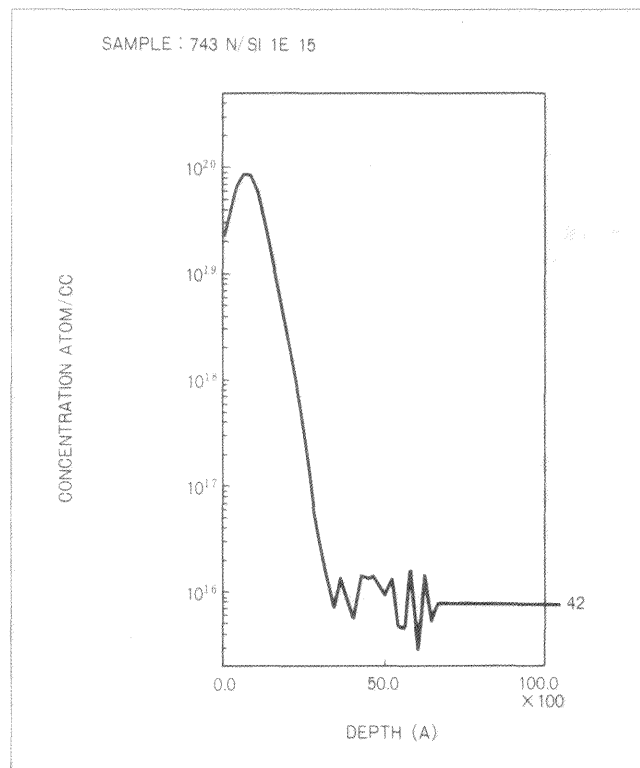


図9 Si中のNの分析例

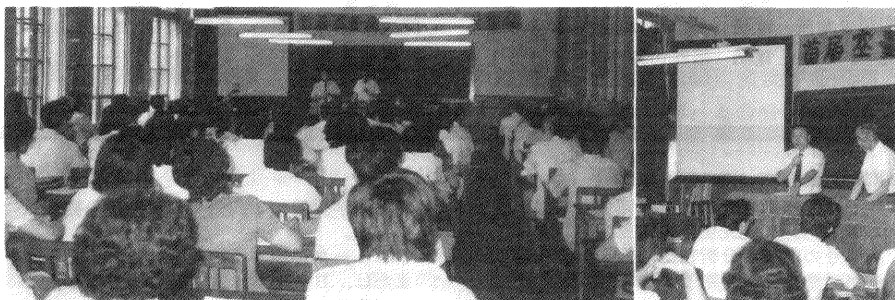
#### 参考文献

- 1) H.A.Storms, et al. : Anal. Chem. 49.2023 (1977)
- 2) 田村一二三：金属，臨時増刊号(1984. 4)
- 3) 泉 栄一，et al. : ISIAT '85.Proc. 9th Symp. 665 (1985. 6)
- 4) 泉 栄一，et al. : The Scientific Instrument News. Vol.29 No. 2 (1986)

## Topics

### 第11回日立ゼーマン原子吸光技術交流会開催さる

さる7月21日から29日の9日間、中華人民共和国大連市で第1回日立ゼーマン原子吸光技術交流会が開催された。この技術交流会は河南省化学会原子吸光技術開発センターと大連市分光学会の共催によるもので、会場には145人（うち113人が日立ユーザー）が詰めかけ、夏の大連市はよりいっそう熱気を増し、熱心な討論が繰り返された。日立から



は、計測器事業部保田主管技師長も参加し、3日間にわたりFIA等日立の最新技術を紹介し好評を博した。これまで中華人民共和国で開催されていた技術説明会は、いずれもメーカー技術者の講演が主体となっていたが、今回は「日立ゼーマン原子吸光」を使った研究成

果を基にした論文発表と、討論会を主体とした交流会で、過去に他メーカーでも実施の例がないものであった。今後このような真のユーザーズカンファレンスが更に増えることにより、日立ユーザーの輪が広がっていくことを確信できる交流会であった。(塚本康博 記)

## Topics

### 第23回国際会議 クロマトグラフィーの進歩 開催さる

第23回国際会議「クロマトグラフィーの進歩」が10月7日から9日の3日間、千葉市千葉港のホテルニューソカモトで開催された。この会議は、1963年から米国ヒューストン大のブラッキス教授を議長として開かれてきた。わが国では第18回(1982年)について2回目の開催となった。今回は、日本薬学会主催ということもあり、クロマトグラフィーに関連する新技術とバイオメディカル・アプリケーションに重点がおかれていた。

参加者は国内外から約300人、特に約50人もの外国人が参加し、60の講演、76のポスターによる研究発表と、密度の濃い討議を行なうための3つのディスカッション・セッションのほか、32社による分析機器の展示も行なわれた。

会議は、池川信夫(東工大)実行委員長の開会の挨拶と、エトレ博士(バ

ーキンエルマー社)が日本語で挨拶したあと、ブラッキス教授から今回のTswett賞を、原 昭二(東薬大)、宮崎浩(日本化薬)及びベイヤー博士(チュービンゲン大)の各氏に賞状とメダルが手渡された。今回もいくつかの特別講演が行なわれたが、米国ペーラ医科大のホーニング教授は、生体内の新しい代謝経路について記念講演を行なったほか、本年9月急逝されたリブスキー教授(元エール大)のメモリアルセッションも行なわれた。

ホーニング教授は、1960年にステロイドやアルカロイドのガスクロマトグラフィーによる分析法を開発し、種々の生体成分のGC-MS分析法に発展させ、生体成分の超微量分析を次々と手がけられた。これらの業績で、本年日本薬学会の名誉会員に選ばれている。

今回の国際会議は、日本薬学会主催ということからも、ガスクロ、ガスクロ-質量分析、液体クロマト-質量分析法などが約半数近くを占め、液体クロマトでは、分離機構に関するもののほか、蛍光、電気化学、化学発光分析法及びそれらの応用例、特に生体成分など、バイオメディカル・アプリケーションなどが発表された。日立製作所か

らは、TLC-MS(薄層クロマト-質量分析)の応用例と、マルチカラム-液体クロマトによる、血清中成分の自動分析による肝患者血清中の特異成分の液体クロマトの応用例を、いずれもポスターセッションで発表した。

3日間の会議中、講演会場・ポスター会場・展示室をはじめ、ロビーでも熱心な討議が行なわれ、クロマトグラフィーやその関連したテーマについての技術的な国際交流が十分なされていた。特に、8日の夜は盛大な懇親会が開かれ、バイキングスタイルの自由な雰囲気でのパーティーで、お互いに親善と懇親を深めるのにいっそう効果があった。なかでも池川実行委員長の計らいによる、元宝塚スター上月 晃女史のみごとなミュージカルの特別出演に、しばし我を忘れて聞き入り、閉会後も立ち去り難い余韻を残した。

本会の次回開催は、62年9月に西ベルリンで開催されるが、また新しい技術と応用例などについて、それぞれの専門分野において、研究を積み重ねて、討論し合うことを約しながら暮れてゆく千葉港をあとにした。

(鴈野重威 記)

## 日製産業株式会社

本社 電話 東京(03)504-7211  
水戸営業所 電話 水戸(0292)32-0112  
新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011  
名古屋支店 電話 名古屋(052)583-5841  
四国営業所 電話 高松(0878)62-3391  
九州支店 電話 福岡(092)721-3501

札幌支店 電話 札幌(011)221-7241  
筑波営業所 電話 土浦(0298)23-7391  
北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386  
京都営業所 電話 京都(075)241-1591  
岡山営業所 電話 倉敷(0864)25-1316  
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

仙台支店 電話 仙台(022)264-2211  
横浜営業所 電話 横浜(045)671-5421  
豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191  
大阪支店 電話 大阪(06)366-2551  
広島支店 電話 広島(082)221-4514

### 〈編集後記〉

- 本号は、超微量分析のオ2回目として編集しました。久能先生、福田先生の報文は、次々号の環境と分析特集に入るべき内容ですが、都合により本号に掲載致しました。ご諒承下さい。
- 微量ナトリウムの蛍光分析は、FIA法を併用することにより高い再現性をもって分析することが可能になりました。今後の応用範囲の拡大が期待されます。
- 半導体関連の試料であるGaAs素子中に混入した不純物のAlの深さ方向の濃度分布の定量が、素子の評価のみならず、製造プロセスの管理の面でも有効なデータを提供するものと思われます

- 日立科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  
茨城県勝田市市毛882番地  
〒312 電話 勝田(0292)73-2111(代)
- 日製産業株式会社  
科学機器営業本部 企画開発部  
東京都港区西新橋1-24-14  
〒105 電話 東京(03)504-7187(ダイヤルイン)

THE HITACHI  
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS  
WINTER 1986 Vol.29 No.4

発行 昭和62年1月1日(年4回発行)  
発行人 岡本匡史  
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  
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル  
電話 東京(03)214-3123(直通)  
印刷所 日立印刷株式会社