

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

MAR.
VOL.39

1997
No.2

目次

巻頭言

- Here, The Future猪俣 博 -1
報 文
最近の遺伝子解析技術 …柴 忠義 -2
300万ボルト超高压電子顕微鏡への
新技術開発 …鷹岡昭夫 松井 功
林聰一郎 勝田禎治 -8
フリーズレプリカ装置FR-7000応用例
.....吉川尚男 -14

解 説

- 新型BIO-TEM (H-7500) の開発
.....小林弘幸 中澤英子 -18
Z-5000形原子吸光光度計
一高感度と使いやすさを追求して—
.....平野義博 森谷一夫
原田勝仁 米谷 明 -20
半導体製造分野向け光学装置—微小
有機異物分析システム, 成膜条件評価
システム—
.....江島佳定 松井 繁 -22
大気分析用GC/MSシステム…谷川建一
安田昭善 中川勝博 横倉武文 -24

学会発表ミニファイル.....30

新製品紹介

- Windows®95対応GUIを使用した
新型走査電子顕微鏡 2 機種発売.....32

トピックス

- 96分析機器展, 第26回全日本科学
機器展開催.....12
環境ISO (ISO14001) 認証取得13
SEMICON Japan96に
U-6500ほかを出展23
日本分析化学会第45年会開催.....29
日本電子顕微鏡学会第41回
シンポジウム開催.....29

巻頭言

Here, The Future

Here, The Future

日立のTVコマーシャルなどに使われているキャンペーンスローガンで、「未来を今ここに引き寄せる日立」のイメージを感じとって頂ければ幸いです。「技術の日立」「世界の日立」といった、これまでのスローガンに比べて、私はこのHere, The Futureが気に入っています。日立製作所のLSI、電気冷蔵庫から原子力発電まで数有る製品の中で、私どもの計測器ほどこのスローガンにぴったりの製品は無いと思っているからです。

計測・分析という技術は地味ですが、社会の発展を支える基盤技術であり、何よりも未知の世界を切り開くロマンがあります。クロマトグラフ・質量分析装置、原子吸光分光光度計などによる有機・無機の超微量分析技術の確立が、大気・水質の規制強化、環境の保全に結びついていったことは、一般の方々に理解されなくとも社会への貢献は明らかです。ロマンの象徴は大阪大学で稼動中の超高压電子顕微鏡です。世界最高常用加速電圧300万ボルトが、物質本来の性能をnmの極微スケールで動的に調べることを可能にしました。新素材、半導体素子、生体試料など新しい分野で、見えなかった物が見えてくる夢が膨らみます。

我が国では国際的経済競争の激化、人口の高齢化、産業の空洞化、さらに地球規模では環境・食料・エネルギーなど、内外の諸課題への対応に科学技術が果たす役割に大きな期待がかけられています。一方、日本の研究開発投資は平成5年度、6年度と2年連続して減少しています。この現状から、科学技術創造立国を目指して17兆円（平成8年～12年）の投資を含む科学技術基本計画が発動されたことは科学に関係する人達にとって大きな喜びです。計測・分析大好き人間の私どもも、是非その一翼を担わせて頂きたいと願っています。また、これを契機に活発化してくる研究開発に携わる「未来を引き寄せる」ユーザーの皆様との共同開発、あるいは御指導をお願い申し上げます。

このHitachi Scientific Instrument Newsがユーザーの皆様とのコミュニケーションの場として、小さいけれど充実したものに、そしてHere, The Futureの一ステップとして役立つことを願っています。

猪俣 博*



* (株)日立製作所 計測器事業部 計測器事業部長

報 文

最近の遺伝子解析技術

New techniques in gene analysis

柴 忠義*

(平成9年1月13日受理)

1993年のノーベル化学賞はキャリー・B・マリス、マイケル・スミス両博士に与えられた。2人の受賞理由は、DNAの増幅法であるPCRの発明と遺伝子への人工的な突然変異の誘発法技術に対するものである。1970年代に開発された遺伝子の操作技術やDNA塩基配列の決定技術からおおよそ15年後に、現在の遺伝子工学にはなくてはならないPCR法が開発された。ヒトをはじめあらゆる生物の遺伝子情報は同じ手法で解析が可能であり、生命現象の解明が進められる昨今、省力化、自動化、安全性等を考慮した解析技術の開発も重要なテーマの1つである。上記2人の発明は、このテーマを包含した遺伝子工学技術における新たな時代の幕開けに値すると評価されたものである。

1. はじめに

生命の不思議さは有史以来の謎である。現在地球上に生存している生き物に何故寿命があるのか、ではその“生”はなにを持ってして言うのか、ひいては“生”の意味とは等、科学的に説明の不可能と思われる生命現象は無数にある。

ヒトは1日のうち約1/3を睡眠時間として生活している。ところが食物の無くなる期間、冬眠というスタイルをとる生き物や、セミのように一生の大半を地中の中で暮らした後、数日間地上生活を行う等、現存している生物には種々固有の“リズム”がある。今、我々はこのようなりズムを事象的に捕らえることはできる。現在遺伝子の解析は21世紀に向け着々と進行しつつある。このリズムをはじめ、様々な生命現象も、遺伝子解析が終わる頃には科学的な説明ができるかもしれない。その時、我々はより良く生きることができるようになるのであろうか。ここでは、その解析技術の進歩の過程を紹介しながら、これからの技術開発に求められるものは何かについて考えてみたい。

2. 遺伝物質・DNAの発見

遺伝の情報を伝える物質がDNAであることは1944年O. AveryとF. Griffithらにより証明された¹⁾。その後、1953年J. WatsonとF. Crickによって、DNAの2重らせん構造が発見され、基本的な性質等も明らかにされた²⁾。

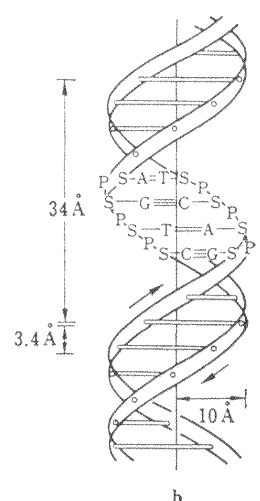
DNAはアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) と呼ばれる4つの塩基が連続的に配列したらせん状の2本鎖で構成されている (図1)。この時、2本鎖はランダムな塩基配列の鎖が絡まっているのではなく、必ずAはT、CはGとの水素結合によって対をなしている。

この関係はDNAの複製に重要な意味を持っている。DNAが倍化 (複製) する際、2重らせんを維持している水素結合が、複数の酵素により切断され、今まで2本鎖だった鎖は各々1本鎖となり、新たなDNA鎖を形成するための鋳型としての役割を果たす。次に、合成酵素の働きによって、AにはT、CにはGとなるように鋳型の塩基に対応したデオキシヌクレオチド (A、C、G、T：基質) があてがわれ、新たな2本鎖 (DNA鎖) が合成されていく (図2)。このA-T、C-Gは相補的塩基対と呼ばれ、各々の鎖は相補鎖と呼ばれている。

このようにDNAの複製には、多くの酵素が必要な時に応じて働いている。現在の遺伝子工学は、これらの酵素の機能や効果を突き止めることによって発展を遂げてきている (表1)。

3. 塩基配列解析技術の原理

1977年、A. M. MaxamとGilbertによって化学的な修



S: デオキシリボース
P: リン酸
A: アデニン
G: グアニン
C: シトシン
T: チミン

図1 DNAの構造

* 北里大学理学部教授 医学博士

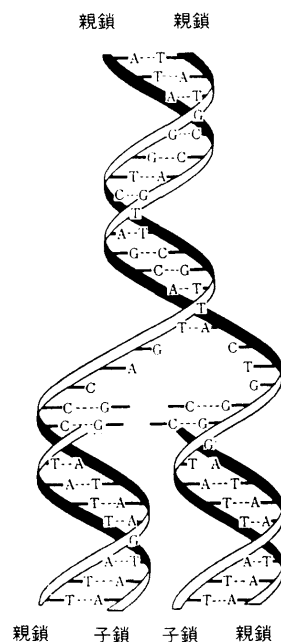


図2 DNA鎖の複製

表1 遺伝子解析に貢献した主な研究

年	人 名	内 容
1865	Mendel	エンドウマメの交雑実験結果を発表
1940	Delbruck	“バクテリオファージ”の研究グループを結成
1944	Averyほか	肺炎双球菌の遺伝形質を伝える物質は、DNAであることを証明
1952	Hershey, Chase	ファージを用いて遺伝物質がDNAであることを証明
1953	Watson, Crick	DNAの二重らせん構造モデルの提案
1958	Meselson, Stahl	DNAの半保存的複製の証明
1965	Nirenberg, Ochoa, Khorana	遺伝子コードの概念の確立
1970	Smith	制限酵素の精製に成功
1973	Berg, Cohen	2種のプラスミドに由来するDNAの試験管内結合に成功
	Kohler, Milstein	モノクローナル抗体の産生に成功
	Maxam, Gilbert	新しいDNAの塩基配列法の確立
1975	Sanger	ダイデオキシ法による塩基配列法の確立
	Southern	DNAのフィルタ上でのハイブリダイゼーション法による遺伝子検出法の確立
1979	Sharp	遺伝子の介在配列の存在の証明（本年のノーベル医学・生理学賞）
	Tonegawa	免疫グロブリン遺伝子の再編メカニズムの証明
1978	Maniatis	遺伝子ライブラリーの作成
1985	Saiki, Mailis	PCR法の発明（本年のノーベル化学賞）

飾と酸，アルカリ処理により各塩基に特異的な切断を起こさせ，電気泳動にて各断片を分離し並び順を明らかにする，DNAの「配列解析技術」が開発された³⁾。その数年後（3年），F. Sangerらによって，2本鎖DNAの一方を鋳型にし，DNA合成酵素であるDNAポリメラーゼを用い，1塩基ごとに大きさ（長さ）の違うDNA断片を合成させ，電気泳動にて分離し並び順を明らかにする技術が開発された⁴⁾。

これら2つの方式は各々開発者の名に由来し，前者はマクサム・ギルバート法（MG法），後者はサンガー法（別名：ダイデオキシ法）と呼ばれている。

マクサムギルバート法は，1）シーケンスするDNA断片の5'端のラベル，2）ラベル化された鎖の分離，3）塩基の特異的な修飾と切断，4）ゲル電気泳動による分離，5）分離されたサンプルの読み取り，から成る（図3）。一方サンガー法は，1）1本鎖の作製（鋳型となる鎖の作製），2）プライマーの付加，3）1本鎖を鋳型とした合成反応，4）ゲル電気泳動による分離，5）分離されたサンプルの読み取り，から成る。サンガー法の特徴は3）のステップにある。DNAを合成する酵素であるDNAポリメラーゼを用いて鋳型であるDNAに対し，一方向に相補的な鎖を合成する。この時，4つの基質以外に適量のダイデオキシ体を加えておく。鎖を合成中にダイデオキシ体を取り込むと，3'端に水酸基がないため，その先に合成が進まなくなる。各塩基種ごとに分けて反応を行えば，合成される鎖の末端を知ることができる。その合成産物を電気泳動にかけると，合成された長さに応じて分離され，配列を知ることが可能となる（図3）。

このようにMG法では，ポリヌクレオチドキナーゼ，T4DNAポリメラーゼ，制限酵素，化学物質，あるいは電

気泳動（バンドセパレーション法），サンガー法では，アルカリ変性，DNA合成酵素，ダイデオキシ体，というように，優れた遺伝子工学の技術は，これらの方法が開発されるまでに得られたDNAの基本性質の上に，新たな役割を示す事象が明らかにされた時，生まれてきている。

4. PCR法の躍進

PCRはシーケンス解析に限らず，現在の遺伝子工学に必須の技術となっている（図4）⁵⁾。試薬との組み合わせによっては，調べたいDNAさえ準備すれば，自動的にシーケンス反応を終了した（後は電気泳動を行えばよい）サンプルを調整することが可能となる⁶⁾。

その工程を以下に紹介する（図5）。

1）目的領域のDNA増幅，2）PCR産物の精製，3）シーケンス反応，4）電気泳動のサンプル準備，5）電気泳動・蛍光の検出，6）解析，から成っている。

まず1）では，サンプリングしたDNAを装置にセットする（手動）。次いでPCR反应用バッファー，酵素等のカクテルを分注する（この作業も含め，4）の作業が終了するまで全自動）。サンプルの増幅に適した条件でPCR反応を開始する。2）は，PCR増幅終了後，反応チューブ（ウェル）に2種類の酵素（Exonuclease I & Alkaline phosphatase shrimp）を分注し，至適条件（37℃×15分）にて反応，次いで高温（80℃×15分）で失活させ，精製過程を終了する。3）は，各PCR産物を適量反応ウェルに分注し，シーケンス反応に必要なカクテルを分注後，サンプルに適した条件にてサイクルシーケンス反応を行う。4）は，シーケンス反応終了後，各サンプルにローディング液を分注し，熱処理（90℃×1分×4℃）を行いサンプルの調整を行う。5）は，蛍光式自動DNAシーケンサにて，1）～4）で調整されたサンプルを電気泳動し，蛍光の検出を行う。最終的に6）では，自動的に蛍光

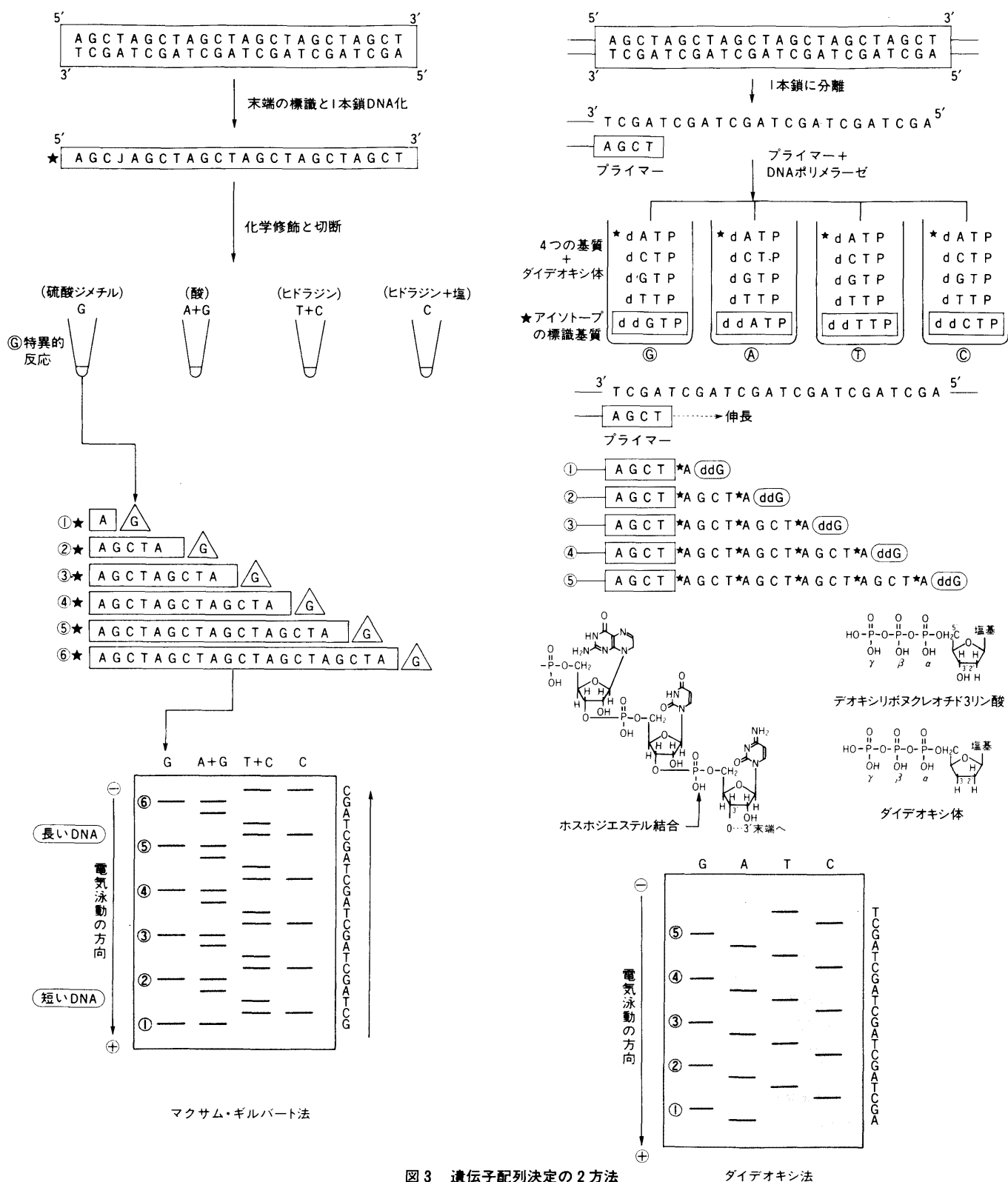


図3 遺伝子配列決定の2方法

信号を配列情報に解析する、という仕組みである。

この工程で特徴となっているのは、2)のPCR産物の精製技術である。従来は精製過程において遠心機が必須であったが、役割の異なる2つの酵素を発見したことで、温

度刺激を行うだけで、精製自体が行える手法へ結び付いた。

このように、PCR技術を利用してシーケンス反応を行えば、一連の操作工程を1台の反応ロボット上で自動的に行うことも可能となる。

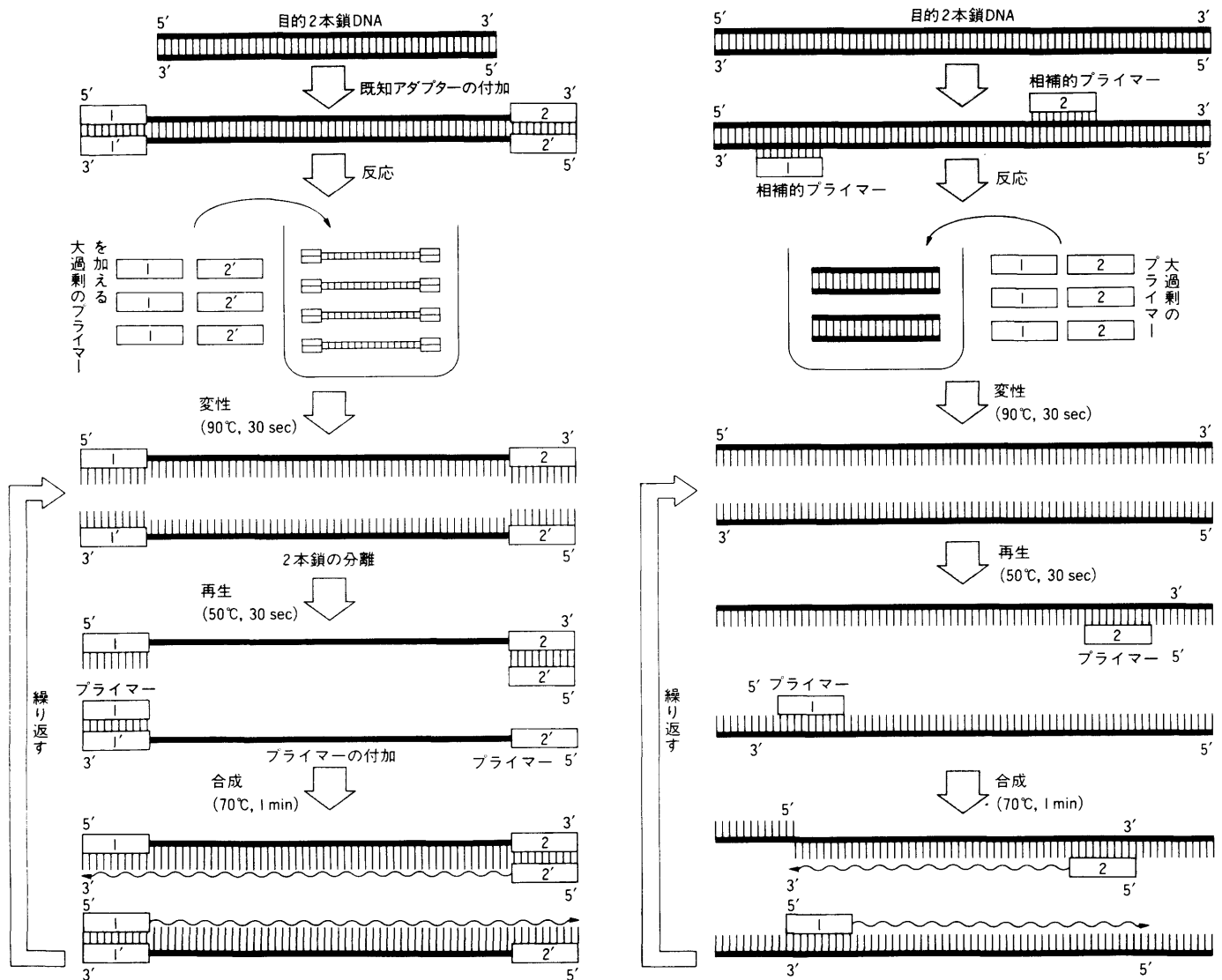


図4 PCR法

5. 電気泳動の技術進歩

近年の塩基配列解析技術に大きな革命を起こしたのは、電気泳動と泳動情報の解析を自動的に行うシーケンサの開発ではないだろうか。1986年頃からいくつかのグループにより蛍光法による自動シーケンサが開発された^{7)~9)}。大別し2種類のタイプが考案された。1つは、蛍光体を塩基種A、C、G、Tに合わせ4色用い、電気泳動の際1サンプルあたり1レーンのローディングで済むようなタイプ。もう1つは、アイソトープで行っていたのと同じように、1色の蛍光体により1サンプルあたり4レーン使用するタイプである（現在も、この2種類のタイプがそれぞれ長所、短所を持ち合わせながら現存している）。1992年には電気泳動を微小なガラス細管（直径：20–200 μm ）を用いて行うキャピラリー型のシーケンサの報告がされた^{10),11)}。この開発によりこれまでに開発されたシーケンサの1/4時間で配列結果が得られることとなった。現在は、米国のABI社が製品化している。このABI社の310型キャピラリーDNAシーケンサの特徴は、サンプルの分離に用いるゲルの作製

とゲルへの試量のアプライが自動化されている点にある。これまでのゲルは、2枚のガラス板の間隙（約0.3 mm）に、ポリアクリルアミドゲル溶液を流し込み、化学重合させることによって作製していた。この310型キャピラリーシーケンサでは特殊なポリマーを開発したことによりこの部分の自動化が可能となっている。現装置は、キャピラリーが1本であるため1日に処理できるサンプル数は少ないが、これまで不可能と言われていたゲル作製とサンプルローディングの自動化を果たした装置として大変意義がある。

6. 配列解析技術のこれから

塩基配列を明らかにするには、基本的にこれまで紹介した2手法が用いられている。しかし1980年代の末に、従来からあるハイブリダイゼーション法という技術を利用して配列解析を試みる方法が考案された。本方式はSBH（Sequencing by Hybridization）法、あるいはSHOM（Sequencing by Hybridization with Oligonucleotide Matrix）法と呼ばれている^{12~14)}。

簡単に原理を説明すると、オリゴヌクレオチドと呼ばれ

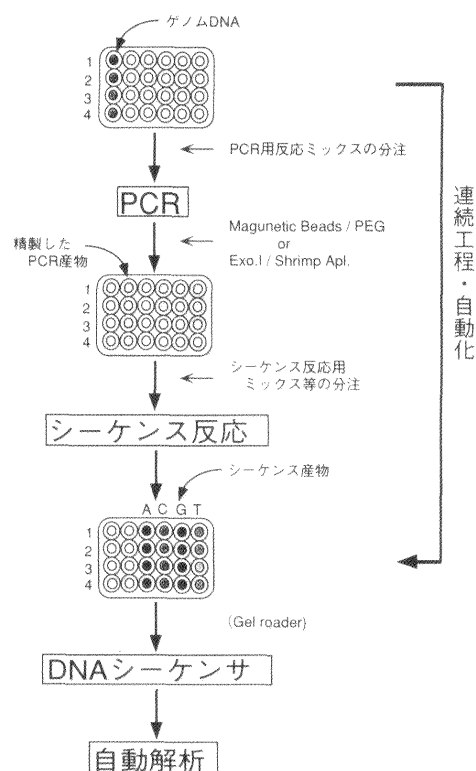


図5 PCR機能を搭載したシーケンス反応ロボットを利用して行った全自動シーケンス反応の工程図

る、短い1本鎖のDNA断片を半導体産業で使われる標準的なシリコンチップに貼り着け（通称：オリゴチップ）、調べたいDNA鎖は蛍光色素で標識し、先のチップとハイブリダイズさせる。オリゴチップには10万個以上ものDNA断片が貼り着いており、調べたいDNA鎖の配列の一部がオリゴチップの配列に対応していればハイブリダイゼーションにより、蛍光標識したDNA鎖が結合する。そのチップ上の蛍光を検出し、10万もの分画から得られるパターンをコンピュータにより解析し、配列を明らかにする。配列を明らかにするには、図形の解析に用いられる、グラフのEuler circuit（オイラー回路）と呼ばれるグラフ理論の、一筆書きの問題を解き明かすアルゴリズムを用いることにより行われる。図6には4塩基からなるオリゴヌクレオチドの256通り（ 4^4 ）の組み合わせが列記されており、そこには5'-ACTTGAAAACGATTTTTCAGC-3'から成る配列のパターンが描かれている。

図7のAには、オイラー道の基本原則を基に、4塩基のオリゴヌクレオチドから最終的な配列を求めて行くための理論解説を示した。説明にある頂点とは、隣接するオリゴヌクレオチド配列の重なる3塩基の配列部分を指す。入辺とは頂点の頭側の辺（頂点の左の1塩基）、出辺とは頂点の尾側の辺（頂点の右の1塩基）を意味している。図7のBにはオイラー道の縦型探索のアルゴリズムを用いて解析したグラフを示してある。各頂点を書き示し、辺には数字

AAAA	1	AGAA	0	CAAA	0	CGAA	0	GAAA	1	GGAA	0	TAAA	0	TGAA	1
AAAC	1	AGAC	0	CAAC	0	CGAC	0	GAAC	0	GGAC	0	TAAC	0	TGAC	0
AAAG	0	AGAG	0	CAAG	0	CGAG	0	GAAG	0	GGAG	0	TAAG	0	TGAG	0
AAAT	0	AGAT	0	CAAT	0	CGAT	1	GAAT	0	GGAT	0	TAAT	0	TGAT	0
AACA	0	AGAA	0	CACA	0	CGCA	0	GACA	0	GGCA	0	TACA	0	TGCA	0
AACC	0	AGCC	0	CACC	0	CGCC	0	GACC	0	GGCC	0	TACC	0	TGCC	0
AACG	1	AGCG	0	CACG	0	CGCG	0	GACG	0	GGCG	0	TACG	0	TGCG	0
AACT	0	AGCT	0	CACT	0	CGCT	0	GACT	0	GGCT	0	TACT	0	TGCT	0
AAGA	0	AGGA	0	CAGA	0	CGGA	0	GAGA	0	GGGA	0	TAGA	0	TGGA	0
AAGC	0	AGGC	0	CAGC	1	CGGC	0	GAGC	0	GGGC	0	TAGC	0	TGGC	0
AAGG	0	AGGG	0	CAGG	0	CGGG	0	GAGG	0	GGGG	0	TAGG	0	TGGG	0
AAGT	0	AGGT	0	CAGT	0	CGGT	0	GAGT	0	GGGT	0	TAGT	0	TGGT	0
AATA	0	AGTA	0	CATA	0	CGTA	0	GATA	0	GGTA	0	TATA	0	TGTA	0
AATC	0	AGTC	0	CATC	0	CGTC	0	GATC	0	GGTC	0	TATC	0	TGTC	0
AATG	0	AGTG	0	CATG	0	CGTG	0	GATG	0	GGTG	0	TATG	0	TGTG	0
AATT	0	AGTT	0	CATT	0	CGTT	0	GATT	1	GGTT	0	TATT	0	TGTT	0
ACAA	0	ATAA	0	CCAA	0	CTAA	0	GCAA	0	GTAA	0	TCAA	0	TTAA	0
ACAC	0	ATAG	0	CCAC	0	CTAC	0	GCAC	0	GTAC	0	TCAC	0	TTAC	0
ACAG	0	ATAC	0	CCAG	0	CTAG	0	GCAG	0	GTAG	0	TCAG	1	TTAG	0
ACAT	0	ATAT	0	CCAT	0	CTAT	0	GCAT	0	GTAT	0	TCAT	0	TTAT	0
ACCA	0	ATCA	0	CCCA	0	CTCA	0	GCCA	0	GTCA	0	TCCA	0	TTCA	1
ACCC	0	ATCC	0	CCCC	0	CTCC	0	GCCC	0	GTCC	0	TCCC	0	TTCC	0
ACCG	0	ATCG	0	CCCG	0	CTCG	0	GCCG	0	GTCC	0	TCCG	0	TTCC	0
ACCT	0	ATCT	0	CCCT	0	CTCT	0	GCCT	0	GTCT	0	TCCT	0	TTCT	0
ACGA	1	ATGA	0	CCGA	0	CTGA	0	GCGA	0	GTGA	0	TCGA	0	TTGA	1
ACGC	0	ATGC	0	CCGC	0	CTGC	0	GCGC	0	GTGC	0	TCGC	0	TTGC	0
ACGG	0	ATGG	0	CCGG	0	CTGG	0	GCGG	0	GTGG	0	TCGG	0	TTGG	0
ACGT	0	ATGT	0	CCGT	0	CTGT	0	GCGT	0	GTGT	0	TCGT	0	TTGT	0
ACTA	0	ATTA	0	CCTA	0	CTTA	0	GCTA	0	GTTA	0	TCTA	0	TTTA	0
ACTC	0	ATTC	0	CCTC	0	CTTC	0	GCTC	0	GTTC	0	TCTC	0	TTTC	1
ACTG	0	ATTG	0	CCTG	0	CTTG	1	GCTG	0	GTTC	0	TCTG	0	TTTG	0
ACTT	1	ATTT	1	CCTT	0	CTTT	0	GCTT	0	GTTT	0	TCTT	0	TTTT	2

図6 単鎖DNA5'-ACTTGAAAACGATTTTTCAGC-3'の組成パネル図

各分画には4オリゴヌクレオチドの配列が示され、数字はハイブリダイゼーションの結果を数値的に示してある

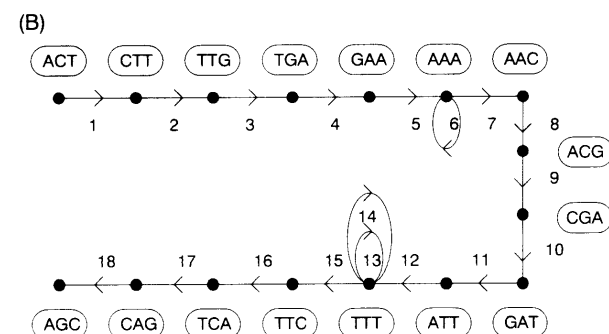
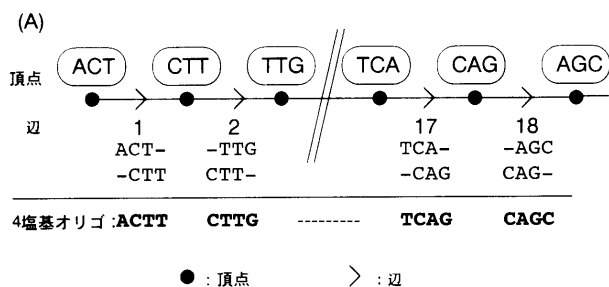


図7 (A)：オイラー道の始点、終点、それ以外の頂点を示した図
4塩基のオリゴヌクレオチドをどのような順番で配列するかは入辺数：1 (incoming degree)，出辺数：0 (outgoing degree) とした場合、始点：1-0=-1 終点：1-0=1 その他：1-0=0が、満たされることが原則となる。上図では、この原則に従い考えられる4オリゴヌクレオチドを下に示し、頂点にあたる3オリゴヌクレオチドの配列を上記式に記した。その間に2段で示した配列の-は、上記式の辺を意味している。

(B)：図7のパネルを理論に従いグラフ化した図

を書き添えてある。このグラフから図7のオイラー道は2つあることが分かる。この13と14は同じオリゴヌクレオチド配列を示しており、得られた塩基配列は5'-ACTT-GAAACGATTTTTCAGC-3'であることが理解される。

表2には、オリゴヌクレオチドの長さに応じた組み合わせの数と解析可能であると考えられる塩基長を示してある¹³⁾。

本技術は米国のアフィメトリクス社（グラクソが買収）により遺伝子診断チップとしても製品化され始めており、診断用チップ（エイズウィルスチップ等）は安い、信号読み取り装置は高価なものとなっている。技術的には半導体産業で培った、フォトリソグラフィー技術等を利用し、20ミクロンの解像度を得ている。もし1ミクロンの解像度が得られれば、100万個以上の単鎖DNAを貼り着けられることが可能となり、診断用、配列解析用等ますます価値が高まるものと思われる。

7. まとめ

遺伝子工学の歴史を顧みながら、その技術の過程を辿ってきた。PCRに代表されるように、革新的な技術の開発とは、1) 扱うものの基本性質を熟知すること、2) それに伴う現象の究明を行うこと、3) 人工的な手法に置き換えが可能かどうかを推測できること、にある。つまり、生物学的な面、化学的な面、そして工学的な面という、あらゆる側面からアプローチができるのかにかかっている。

表2 オリゴヌクレオチドの長さに応じた、配列決定(95%)可能な塩基数

オリゴヌクレオチドの長さ (bp)	チップのサイズ (組み合わせ総数)	識別可能と考えられる塩基数 (bp)
7	16 K (16384)	80
8	64 K (65536)	180
9	256 K (262144)	260
10	1 M (1048576)	560
11	4 M (4194304)	1300
12	16 M (16777216)	2450

今、我々が生命現象の機構を知りたいと思う時、その問題を解き明かすために、多大なエネルギー（情熱）をその問題解明に注ぎ込んでいる。このエネルギーこそ、新たな現象の発見、新たな技術の開発の源となっている。単になにか発見をしようとか、良い装置を作ろうといったところで、このエネルギーがどれだけのものかによって、でき上がるものも自ずと想像できてしまう。

新たな現象の発見、革新的な技術の開発は、豊富な知識力と膨大な想像力に委ねられていると考える。

今後、遺伝子の解析が進むにつれ、新しい技術の開発も相乗的に進んで行くであろう。我々は、その時代のリズムに合わせて我々自身についてもよく知ることができるようになってくるに違いない。この理解されてくる膨大な情報をうまく使いこなせるかどうか、これから我々がうまく生きて行くための鍵となっているのではないだろうか。

原稿執筆にあたり、資料をはじめ多大のご協力をいただいた、日立電子エンジニアリング研究開発の萩原久氏に心から謝意を表します。

参考文献

- 1) O. T. Avery, ほか; J. EXP. Med. 79. 137 (1944)
- 2) J. D. Hershey, ほか; Nature. 171. 954 (1953)
- 3) A. M. Maxam, ほか; Proc. Natl. Acad. Sci. 74. 560 (1977)
- 4) F. Sanger, ほか; J. Mol. Biol. 143. 161 (1980)
- 5) R. K. Saiki, ほか; Science. 230. 1350 (1985)
- 6) 萩原久; 検査と技術. 24. 539 (1996)
- 7) L. M. Smith, ほか; Nature. 321. 674 (1986)
- 8) W. Ansorge, ほか; J. Biochem. Biophys. Methods. 13. 315 (1986)
- 9) H. Kambara, ほか; Biotechnology. 6. 816-821 (1988)
- 10) Huang, X. C. ほか; Anal. Chem. 64. 967 (1992)
- 11) H. Kambara, ほか; Nature. 361. 565 (1993)
- 12) Drmanac, ほか; Genomics. 4. 114 (1989)
- 13) P. A. Pevzner, ほか; J. Biomol. Struct. Dyn. 9. 399 (1991)
- 14) 陶山明; 蛋白質核酸酵素. 38. 647 (1993)

300万ボルト超高压電子顕微鏡への新技術開発

Development of new technology for 3 MV ultra-high voltage electron microscope

鷹岡 昭夫* 松井 功**
林 聡一郎** 勝田 禎治**

(平成8年12月20日受理)

1. 緒 論

大阪大学・超高压電子顕微鏡センターに、常用加速電圧3 MV最高3.5 MVの新しい超高压電子顕微鏡が開発設置された。この電顕自身が新しい技術の開発の結果といえる。常用加速電圧を2 MVから3 MVにアップする場合、大きさを単に1.5倍にして済むものではない。我々はスケールリング則と呼んでいるが、各部を大きくすると、全体として長く重く遅く、不都合なファクタを含めてすべてが大きくなる。これに対処するには種々の工夫と改良が必要である。加えて、新しい電顕には新しい機能の性能向上が要求されている。装置の構成や仕様についてこれまでいくつか報告しているので^{1,2,3)}、ここでは超高压電子顕微鏡に採用した革新的な技術を中心に紹介する。

2. 設計指針

新しい3 MV超高压電子顕微鏡H-3000の外観写真を図1に示す。装置の全長が13.5 m、総重量が140トンある。この電顕開発の技術的基礎は従来の2 MV超高压電子顕微鏡HU-2000であるが、加速電圧、消費電力、電顕寸法、部品数、安定度、安全性、信頼性、設定パラメータ数などすべての面でこれまでより高水準の技術を必要とする。これに対処する〈設計指針〉が次の5項目である。

〈設計指針〉

- ①加速電圧に関するスケールリング則の適用
- ②部品信頼性向上のための消費電力の低減
- ③安定度向上のための打ち消し補償法の活用
- ④全パラメータの数値化とソフトによる設定
- ⑤汎用電子顕微鏡並みの操作性と応答速度

従来の2 MV電顕を基準としたとき、各設計パラメータに要求されるスケールアップ率を示したのが図2である²⁾。多くの項目が1次以上のべきで増加する。これは、従来技術を単純に積み増すだけでは達成できないことを意味する。たとえば、X線発生量→遠隔観察、軌道の振れ→振り戻し、高圧リップル→打ち消し補償、レンズ応答→原因と対策、加速管長→インナータンク収納、レンズ重量→固定軸電磁軸調、軌道拡がり→加速管電極レンズ、などに新しい対策が取り入れられた。

〈新規開発項目〉

- ①加速管の防振・妨害電磁界遮断のインナータンク
- ②低電力損失のCW回路コンデンサー
- ③高圧超高安定化のためのリップル補償回路
- ④負イオンを完全除去するイオントラップ

- ⑤多機能化されたトップ・サイド両用試料室
- ⑥強励磁対物レンズと3 MV・STEM機能
- ⑦軸固定結像レンズ系とビーム軸合わせ機構
- ⑧像と回折の同時表示機能
- ⑨コンピュータ制御による遠隔操作・観察
- ⑩高解像度観察用の蛍光板・TVカメラ系



鷹岡 昭夫

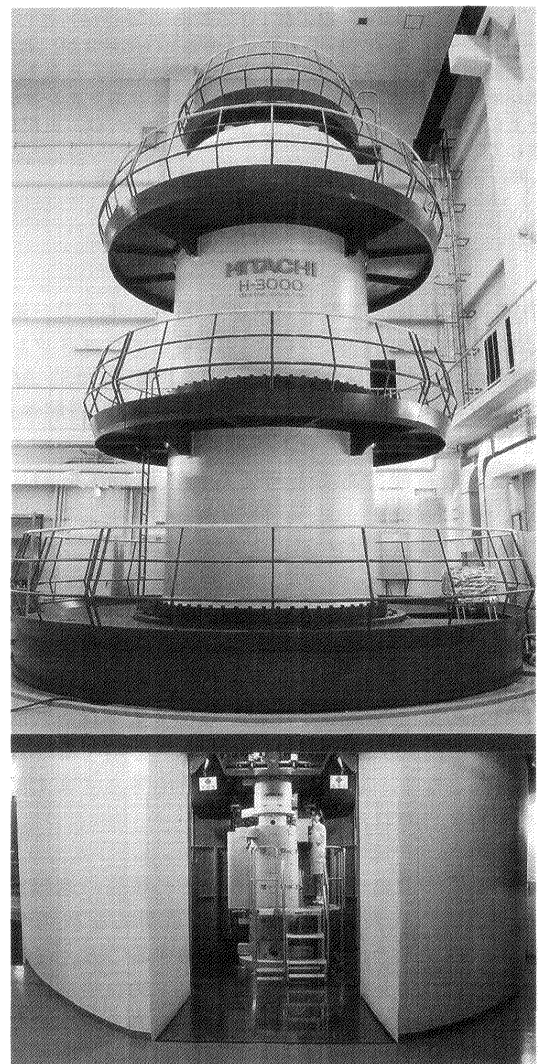


図1 3 MV超高压電子顕微鏡の外観

* 大阪大学 超高压電子顕微鏡センター 工学博士 助教授
** (株)日立製作所計測器事業部 ビームテクノロジーセンター

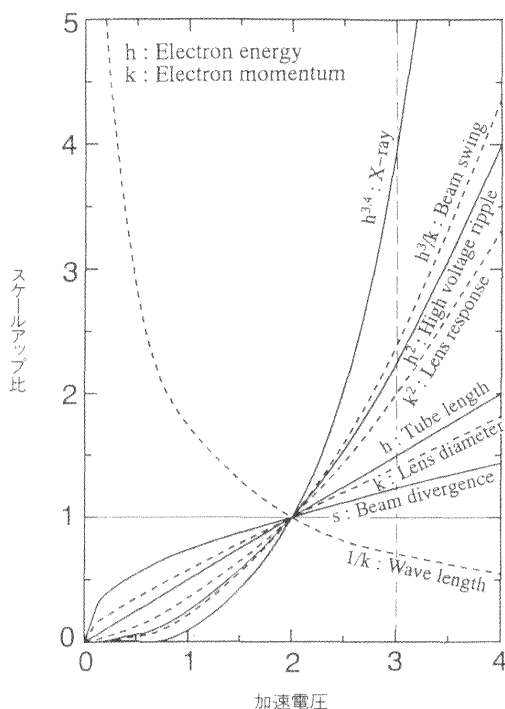


図2 電子光学系のスケーリング則

3. 高压発生回路と電子加速系

3.1 高压発生回路

超高压電子顕微鏡にとって、安定高压の供給は最大課題の1つである。最高3.5 MVを発生させるため、35段の対称型コッククロフトワルトン回路（CW回路）を使用している。もし、回路構成をそのままにして、2 MVから3 MVに加速電圧を上げると消費電力は約2倍となる。これは構成部品の温度上昇が2倍になることを意味し、活性化エネルギーの低い材料を用いた部品では指数関数的に寿命が減少し、信頼性において致命的な欠陥となる。CW回路の損失の1/3を占めていたコンデンサー損失を、その渦電流損失を減らすことで、約1/10に低減させた。タンク内での電力損失を1 kW以内に抑えることができ、タンク内のすべての部品温度が40℃を超えないことがサーモラベルにより確認された。

段数の増加は電圧効率を低下させ、リップルを増大させる。前者に対しては浮遊容量を2/3に減らして効率を逆に上昇させ、後者に対しては任意波形発生器で合成した打ち消し波形を低压側から重畳し、高压側でのリップル低減を計った。

3.2 電子加速管

図3に示す加速管は138段の電極間隙より構成され、ブリーダ抵抗やフィルターコンデンサーと共にインナータンク内に納められている。すなわち、高压タンクは2重構造になっている。インナータンクは外乱を遮断すると共に、加速管を支持固定して振動を防止する役目を果たす。加速管では、真空シールド、電極材料と脱ガス処理、沿面放電3重点の構造改良、全電圧効果防止のディカップラー電極の挿入、浮遊磁界遮蔽シールドなど、HU-2000電顕で行

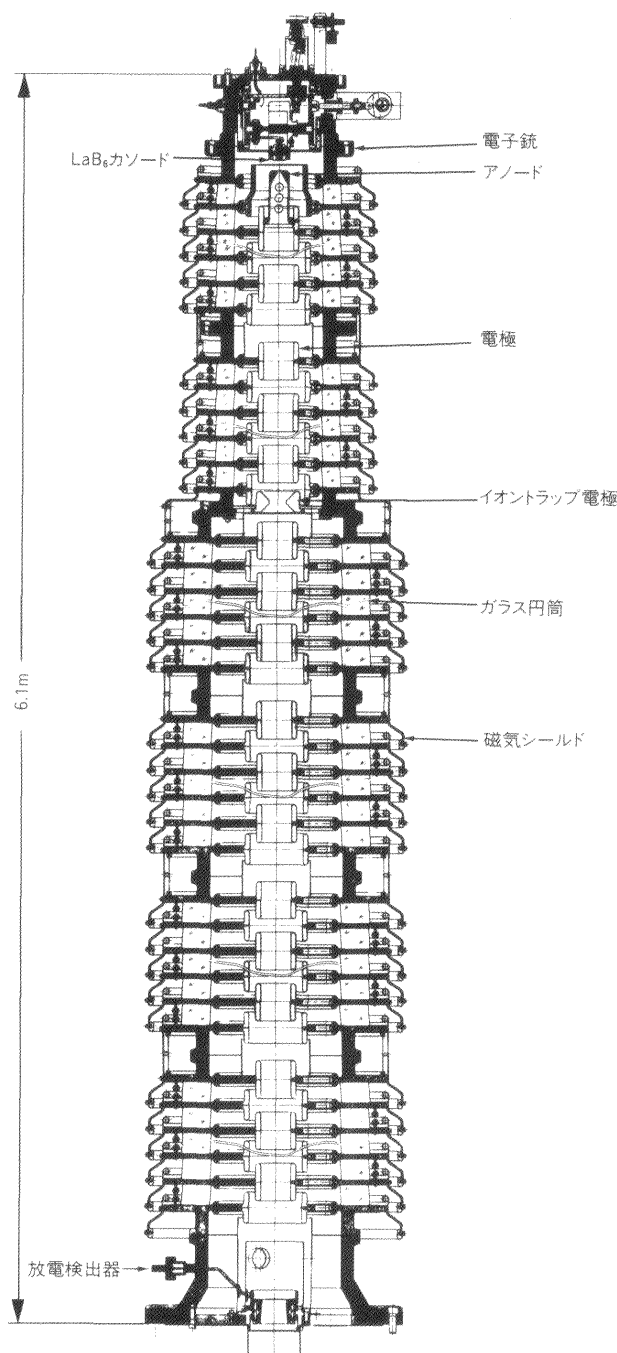


図3 加速管の断面図

った改良を含めて、対策が強化されている。

その場観察でのビームの明るさ（プローブ電流）および長い加速管の特性（光源の振動）を考慮し、電子銃陰極としてLaB₆熱陰極を採用した。また、加速管内の残留浮遊磁界によるビームの振れを補償するため、振り戻しコイルが第2コンデンサーレンズ上部に取り付けてある。妨害成分自体の低減はもちろんであるが、残留成分に対して、打ち消し補償を積極的に活用しているのがこの装置の特徴である。

4. 鏡体コラム

4.1 電子光学系

超高压電顕鏡筒部の構造を図4に示す。加速管部で発生した負イオンは電子と共に加速され、試料に照射損傷を与えることが知られている。これを避けるため、加速管と鏡体レンズの光軸をずらし、電子線軌道のみを2段の偏向コイルで光学的に接続する一種の質量フィルタ（イオントラップ）を挿入した³⁾。これにより、電子線からイオンが完全に除去できる。その際、ビームの軸合わせを容易にするため、軸調専用小型のCCD TVカメラを取り付けた。

電子光学系は2段の照射レンズと6段の結像レンズで構成されている。拡大像は200倍から100万倍まで可変であり、回折像に対するカメラ長は最高14 mまで大きくできる。6段レンズ系の自由度を生かし、拡大像と回折像を倍率とカメラ長の変化に対して無回転に設定してある。さらに、拡大像と回折像を高速に切り換える目的で、中間レンズの励磁切換で対物絞りか制限視野絞りの役目をする共通絞り⁵⁾を導入した。

レンズ個々の重さは1～2トンある。また、鏡筒周辺はX線管理区域に設定され動作中に近づくことが許されない。このため、レンズ軸を固定とし、ビームを電磁式にレンズ軸に合わせる手法を採用した。組み立て時には各レンズの軸を10 μm オーダーまで精密に合わせる。各レンズのポールピースの下に組み込んだ偏向コイルを用いて、次段レンズの励磁変化に対して像が移動しないように合わせる。加速電圧や倍率に連動させて偏向コイル電流を設定する必要があるが、これを制御コンピューターで関数制御する。

4.2 対物レンズ

対物レンズは、図5に示すように、トップとサイドエントリーが共用できる構造とした。これによって研究目的に適した専用試料ホルダーが使い分けられる。対物レンズの試料周辺スペースをできるだけ大きくするため上極口径が22 mm、磁極ギャップが22 mmのポールピースを採用した。励磁強度は最大79 kA・turn ($IN/\sqrt{V^*}=23$) であり、

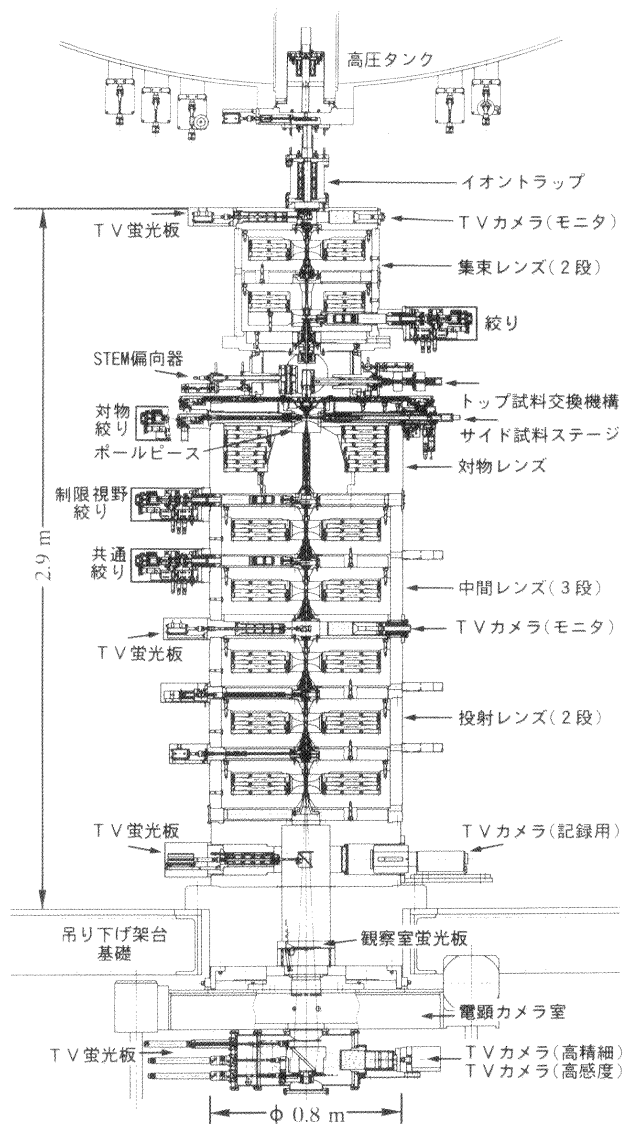


図4 鏡体（レンズ系を含む）及び観察系

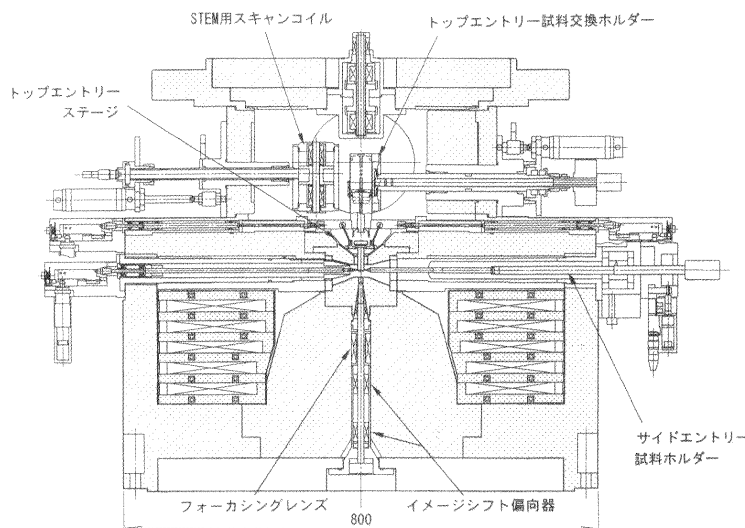


図5 対物レンズの断面図

焦点距離は11 mm, 球面・色収差の計算値は共に約10 mmである。位相コントラスト伝達関数の計算からは、対物レンズは0.1 nm以下の光学的分解能を持つ。

レンズコイルには従来型の絶縁銅線を用いず、銅帯を薄いマイラーと共に巻き、その両端から直接冷却板に放熱する高励磁用コイルを利用した。この構造により放熱効率が3倍向上し、励磁強度の割にはコンパクトな設計が可能となった³⁾。この結果、最大励磁条件において温度上昇を20℃以下に押さえることができ、試料の熱ドリフトも大幅に緩和された。しかし、コイルと冷却板の磁気結合により冷却板に環状誘導電流が流れ、励磁電流に対する磁束の応答速度が低下する現象が生じた。誘導電流を遮断するため、冷却板を円周方向に切断した。これにより、応答速度が汎用電子顕微鏡並みに改善できた⁹⁾。なお、非常に遅い磁束ドリフトが理論的に予想されるので、これに対処するため独立磁路のフォーカシングレンズが挿入してある。

5. 制御システムと観察系

5.1 制御システム

図2から分かるように、3 MVの電子ビームは強烈なX線を発生させる。従来の電子顕微鏡のように、鏡体脇で操作しようとする非常に重厚なX線シールドが必要となる。これを回避するのが遠隔観察の原点であったが、コンピュータ制御は操作の自動化やデータ記録、画像の処理や転送など多岐にわたる発展性が付加された。本システムは、試料およびフィルムの交換以外は、図6に示す遠隔観察室においてTV画像を見ながら操作できるシステムに構築された。

操作卓には、従来の操作パネルにある機能の中で主要なもののみを配置し、操作頻度の低い機能、設定値の表示や変更、プログラムによる自動操作、画像を含むファイルの管理などをホストコンピュータに担当させた。この電顕では、加速電圧や観察倍率に依存するパラメータの設定数は、電子光学系（レンズ、偏向器、スティグメータなど）だけ

でも約10,000ある。この数字は従来の電顕より1桁多いが、ソフト設定によって精密な調整が可能となった。

5.2 観察記録系

遠隔観察では、目の役割をするTV観察系が特に重要となる。その必要条件として、

- ① 感度と解像度が高いこと
- ② 耐電子線・耐X線特性に優れていること
- ③ 低雑音でダイナミックレンジが広いこと
- ④ 動画記録が可能なこと

が挙げられる。1台でこれらの条件をすべて満たすTVカメラはない。そこで、複数のカメラを用意し目的に応じ切り換える。

- ① 光軸調整用に超小型CCDカメラ：2台
- ② 一般観察用に高精細のハービコンカメラ：1台
- ③ 動画記録にNTSC信号のハービコンカメラ：1台
- ④ 高倍ピント調節用にMCP/ファイバー結合の視野拡大高感度CCDカメラ：1台
- ⑤ 電子記録用にスロースキャン冷却CCDカメラ：1台

の計6台が設置されている。

カメラと共に、電子強度を光強度に変換する蛍光板も重要なポイントとなる。すなわち、

- ① 波長感度特性を含めて高感度
- ② シンチレータ寸法を含めて高解像度
- ③ 結像光学系を含めて低照射損傷

である必要がある。本システムでは、透明性、波長感度、製作寸法を考慮して、CCDカメラにはCWO結晶蛍光板、ハービコンカメラには電子線照射に強いYAG結晶蛍光板および波長感度特性が一致するGSO結晶蛍光板を選択した。蛍光板の厚さは、明るさと分解能に対して相反関係を持つため、高加速電子に対する特性測定の結果から厚さを200 μmとした⁷⁾。また、P22粉末蛍光体では、薄いサファ

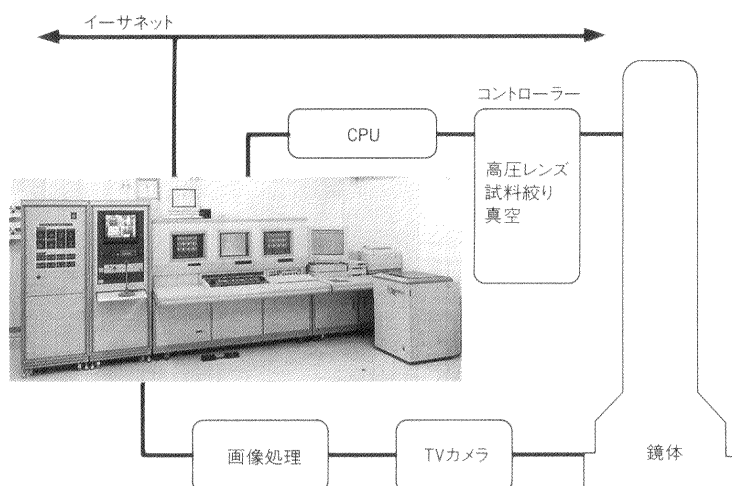


図6 遠隔操作系

イヤ基盤上に100 μm 以下の厚さに塗布したものが良い分解能を持つことが示された。

撮像した画面は直接モニタに表示できるが、オンライン画像処理装置で画質を改善したのち表示することもできる。また、画像データは図6に示すようにEthernetなどのネットワークに接続することにより転送が可能である。

6. 観 察 例

本装置はその場観察を目的に設計されており、高分解能専用の装置ではないが、高電圧安定度を含めて電顕性能を確認する1つの目安は格子分解能である。図7は3 MVにおける金粒子の格子像であり、0.24 nmの間隔が観察できる。また、コントラストは低いが0.12 nmの格子縞も確認できる。

7. む す び

世界最高加速電圧、コンピュータ制御による遠隔観察など新しい機構と機能を取り入れた高性能超高压電子顕微鏡が完成した。装置の開発・研究の観点からは、さらに発展させる努力が必要である。この新しい電顕に付加した機能と優れたその場観察性能は、超高压電顕法を一段と躍進させ、画期的な応用分野を開く可能性をユーザーに提供したといえる。

参考文献

- 1) K. Ura and H. Nishihara, Proc. 13th Int. Cong. EM, Paris (1994), vol.1, 181.
- 2) A. Takaoka, Lecture Meeting in Celebration of New 3 MV Electron Microscope at Osaka Univ. June 20, 1995
- 3) T. Katsuta, S. Hayashi and A. Takaoka, Hitachi Review, 45, 1, 41 (1996)
- 4) H. Zhang and A. Takaoka, Rev Sci. Instrum. 65, 3194 (1994)
- 5) R. Nishi, A. Takaoka and K. Ura, Proc. 13th Int. Cong. EM, Paris (1994), vol.1, 178.
- 6) A. Takaoka, R. Nishi and K. Ura, Proc. 13th Int. Cong. EM, Paris (1994), vol.1, 171.
- 7) R. Nishi, K. Yoshida and A. Takaoka, Ultramicroscopy, 62, 271 (1996).

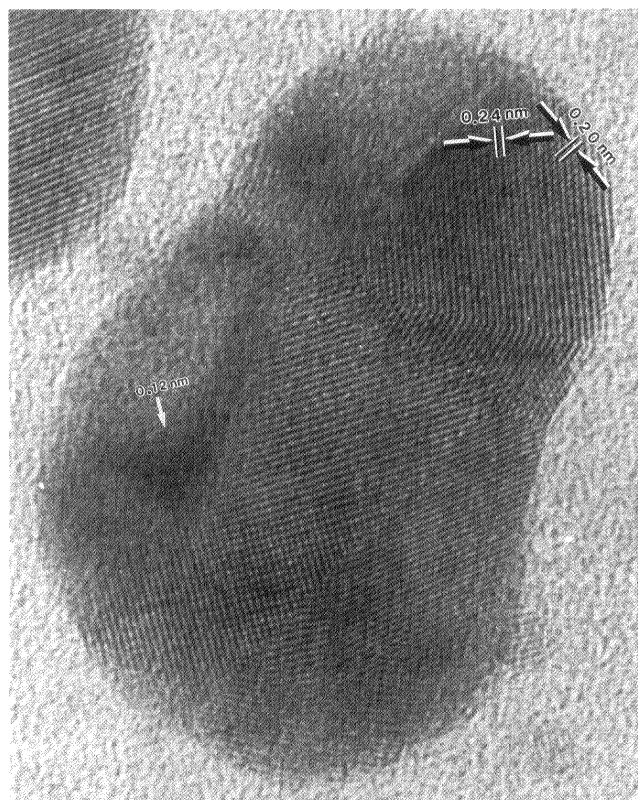


図7 金粒子の結晶格子像 (3 MVにて撮影)
格子間隔は0.24 nm (200) 面

Topics

96分析機器展, 第26回 全日本科学機器展開催

96年9月3～6日幕張メッセで分析展が、10月22～25日東京ビッグサイトで全科展が開催されました。日立グループからは、新製品の原子吸光度形Z-5000、分光光度形U-2010、走査電子顕微鏡、液体クロマトグラフLa-



Chromシリーズなど多数の製品展示を行いました。また食品分析のアプリケーションの紹介や、インターネットホームページを活用したコミュニケー

ションコーナーを設け、開催前には展示会の情報発進を、会期中は来場のお客様さまにアンケート形式で情報をいただきました。(山本秀雄 記)

Topics

環境ISO (ISO14001) 認証取得

水の惑星—地球。この美しい地球が、オゾン層の破壊、地球温暖化など、多くの環境問題にさらされています。このため、国際標準化機構 (ISO) では、環境保全のために取り組むべきルールを「環境マネジメントシステム規格」(ISO14001) として、3年越しの議論と手続きを経て'96年9月1日発効しました。

当事業部の工場では、かねてより本ISO14001の認証を取得すべく準備を進めてきましたが、'96年9月24日に認証機関である(株)日本環境認証機構(JACO)より、認証を取得できました。なお、科学機器業界では、本事例が国内初の認証取得となります。

これにより、すでに取得済みの品質(ISO9001)に続いて環境に関しても世界の一流工場として認められたことになり、今後は全従業員で「みずみずしい地球のために」を合言葉に、さらに環境に優しい工場づくりと、環境配慮型製品化設計などに向けた継続的な取り組みを続けていきます。

■ISO14001の概要

今回発効されたISO14001とは、環境パフォーマンスの改善(企業活動、製品、サービスの環境負荷の低減)を

継続的に進めていくための仕組みを組織の経営方針のなかに構築することであり、組織の最高経営層が自ら環境方針を作り、①それに基づく計画を立て(PPLAN)、②それを実施運用し(DO)、③監査などにより点検および是正措置をし(CHECK)、④それを見直す(ACTION)というサイクル(PDCAサイクル)を構築し、それを繰り返していくことで継続的改善を行うというものです。

■ISO14000シリーズ規格の全体像

環境マネジメントISO14000シリーズ規格の構成は図1の通りとなっています。この中で、'96年9月1日に発効されたのはISO14001とISO14004の2規格で、続いて'96年10月1日に環境監査に関する3規格(ISO14010、ISO14011、ISO14012)が発効されました。

このため規格化の審議は、今後第2フェーズに入り、「環境ラベル」(環境保全の認定マーク)や「ライフサイクルアセスメント」(製品の原料調達、生産、物流、使用、リサイクル、廃棄までの全ライフサイクルを通じ環境に与える負荷を分析評価する)規格など製品の環境側面に関する規格の審議へ重点が移ることになります。

なお、日本は上記発効済のISOに対応した5規格について、'96年10月20日に日本工業標準(JIS)を制定しました。

■日立の環境問題への取り組み

当工場における環境問題への具体的な取り組みとして、環境方針を①省エネ推進により地球温暖化防止を図る、

②再資源化・減容量化により廃棄物を削減する、③大気・水質を維持し地球環境汚染を防止する、④騒音・振動・悪臭を防止し地球環境を確保する、⑤環境配慮型製品と技術を提供し続ける、など全7項目を定めました。

次に、この環境方針を達成するために各項目について各活動部門単位ごとに目標値を定め、全従業員の理解の下、重点的な活動を展開しています。例えば「省エネ」に関して'96年度は'90年度比で電力を5%削減、「廃棄物」は汚泥を58%削減などに取り組んでいます。

■環境問題に関する動向の紹介

地球が環境容量的に限界に近づきつつある今、世界的に様々な環境保全への取り組みがなされています。

以下にその例を紹介します。

(1) グリーン購入・調達

環境配慮型製品の普及を目的として優先購入するもので、日本では企業・自治体・消費者団体などが集まり「グリーン購入ネットワーク」を組織して「購入ガイドブック」の作成などを進めています。今後、公共調達を中心としてこのグリーン購入・調達の動きが加速されて行くものと思われます。

(2) ライフサイクルアセスメント(LCA)

環境への優しさ(環境負荷)を定量的に評価しうるツールとして、LCAは不可欠のものになってきています。このためISOの規格化を待たないで、家電製品などを中心に、製品開発へ本LCAの導入が開始されてきています。

(青木通彦 記)



「認証登録証を受け取る本川副事業部長と認証登録証」

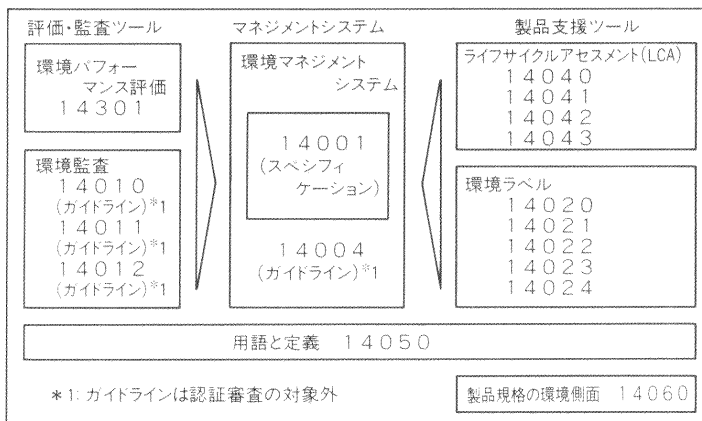
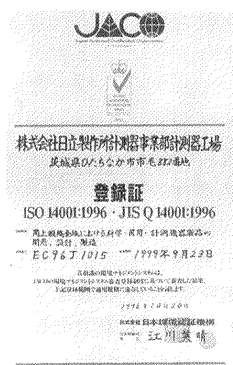


図1 ISO14000シリーズ規格の構成

フリーズレプリカ装置FR-7000の応用例

Applications for a freeze-replica apparatus FR-7000

吉川尚男*

(平成8年12月20日受理)

1. はじめに

日立サイエンスシステムズの御好意により、新しいコンセプトを導入したフリーズレプリカ装置FR-7000を使用する機会が与えられたので、著者の他の装置の経験も交えて本装置との比較ならびに実際の使用要領と我々の成果について紹介する。なお、本装置の性能については、S.I. NEWS 1995. VOL37. NO.2に詳しく説明されているのでそちらを参照されたい。

2. フリーズレプリカ法とは

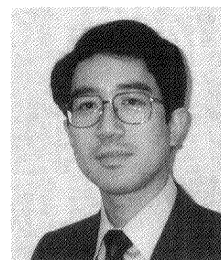
フリーズレプリカ法の原理を簡単に説明すると、水を含んだ生物試料を液体窒素(−196℃)あるいは液体ヘリウム(−269℃)などを用いて極低温で物理固定することにより、水の分子運動を止め、次にその試料を低温のまま高真空内に移し、装置に附属したナイフなどで切断する。この切断操作により生物試料は物理的にもっとも弱い部分で割れることになる。通常この部分は脂質二重層の単位膜の疎水部に当たる。したがって、単位膜は2枚の半膜に二分されることになり、膜内のタンパク質が小さな粒子として露出する。次に、この切断面に通常45度の角度から粒子の細かい白金やパラジウムなどの金属を蒸着し、切断面の微細構造に凸凹の影をつける。さらに試料の真上からカーボンを薄く均等に蒸着し、金属膜を補強することによりレプリカ膜を作製する。最後に高真空中から試料を取り出し、組織を溶解させてレプリカ膜だけをメッシュに回収し、これを透過型電子顕微鏡で観察するわけである。

この原理では、まず試料を凍結するため試料内に氷の結晶を作らないようにしなくてはならない。そのために、氷晶形成防止剤として20~40%グリセリンを含む緩衝液に固定試料を浸漬処理するか、あるいは急速凍結法を用いる。次に、切断に際して、従来のフリーズレプリカ装置では切断部を任意に設定できないため、偶然に割れた部位のレプリカしか作製できなかった。しばしば、その部位は試料深層部の氷晶形成部位にあたり、正常な膜構造が観察できない。このような欠点を補うべく切断部位を正確に調節できる装置が望まれていた。FR-7000には、ミクロトームが内蔵されており、凍結試料の表面を冷却ガラスナイフでミクロン単位に連続的に切断することが可能である。そのため、急速凍結試料を用いて氷晶形成のない薄い部分を選択的に切断することも可能である。

このようにして得られたレプリカ膜には、単位膜のさまざまな切断面が存在し、その半膜面上には細胞膜内に存在するタンパク質が直径7~8nmの膜内粒子として観察で

きる。同時に、単位膜構造からなる細胞小器官の立体構造も観察可能である。このような特徴から、フリーズレプリカ法は、膜の立体的な微細構造の解析のために医学・生物学の分野で広く用いられている。

日本におけるフリーズレプリカ装置の開発は、当時京都大学医学



部皮膚病特別研究施設長の西占 貢氏により行われ¹⁾、それはコールドメタルブロック式のHFZ-1形フリーズレプリカ装置として日立製作所から1972年発表されている。この装置は、HUS-4形・HUS-5形などの日立製真空蒸着装置内に装着して用いるように開発された。これにはFE-1エッチングユニットを取り付けることにより、フリーズエッチングが可能となり、これらの装置は現在でも我々の教室で現役で活躍している。同様のコールドメタルブロック式のフリーズエッチング装置は、現京都府立医科大学電子顕微鏡室森岡宏行博士によっても開発されている²⁾。両者の大きな相違は、前者は従来の真空蒸着装置に組み込み使用するため、メタルブロックの自重により試料の切断を行う、いわゆるギロチンタイプであるのに対し、後者は蒸着装置の外部から手で切断できるように改良してある点で、その結果、1回の操作で切断可能な試料数が1~2個の前者に比べ、後者は5~6個となり、一度に多くの試料を処理できる点で有利である。どちらも、低温メタルブロックのトラップ効果によるコンタミネーションの防止、蒸着時の試料への熱ダメージの防止には優れている。しかし、切断部位を正確に調節できない点や操作のたびに真空蒸着装置の真空を破らなければならないという欠点がある。

FR-7000では、真空系にターボ分子ポンプを使用したことにより、蒸着チャンバー内のコンタミネーションが著しく低減したこと、試料の交換・回収の際にチャンバーの真空を破らなくてすむように予備排気室を設けたこと、内蔵ミクロトームによるミクロン単位の切断が可能となったこと、冷却トラップと試料ならびにナイフなどの冷却に必要な液体窒素の消耗が著しく低減したことなどが特筆される。著者らの経験では、メタルブロック方式は、熱容量の大きなメタルブロックの冷却に多量の液体窒素を必要とする(1回の操作で約3L)とともに、試料の装着と回収のたびに真空チャンバーを破るため、1日にせいぜい5回程度の切断操作が限界である。一方、FR-7000ではすべての操作を含め液体窒素の使用量は10L以下であり、1日に15回以上の試料の切断が可能である。

* 奈良女子大学理学部生物科学教室 医学博士 助教授

3. 実際の使用要領

我々の研究テーマである原生動物の細胞膜の構造と機能について、マウスの胃腺細胞に寄生するクリプトスポリジウム³⁾ならびに種々の動物の盲腸内から見いだされる嫌気性のプラストシスチス⁴⁾を材料とした例について述べる。どちらの材料も他の装置での成果が得られているので本装置との比較に用いるのに都合が良い。

胃腺細胞の場合は、取り出したマウスの胃を2.5%グルタルアルデヒドで15分程度固定後、片刃のカミソリで1×1×2 mm程度のブロック状に細切り、さらに1～2時間固定する。膜コレステロールの検出には、フィリピンと呼ばれるポリエン系抗生物質を混合した固定液を用いる⁵⁾。

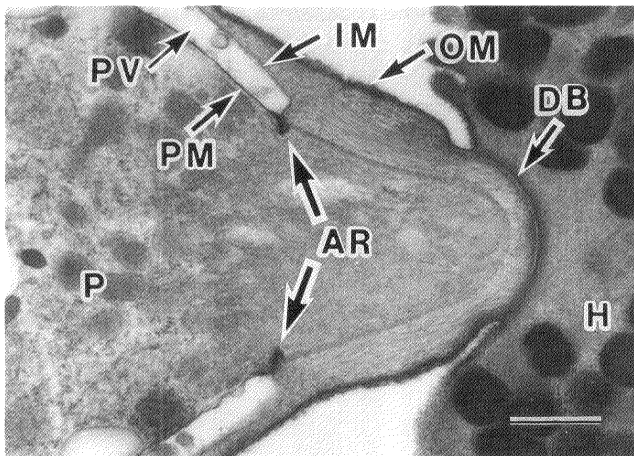


図1 クリプトスポリジウムの切片像

寄生により宿主細胞 (H) の細胞膜は虫体 (P) を取り囲むように伸長し parasitophorous vacuole (PV) を形成する。それ故、虫体を取り囲む PV 膜の外膜 (OM) と内膜 (IM) は宿主細胞膜由来と考えられている。IM と虫体の細胞膜 (PM) は anular ring (AR) で膜接着している。宿主との接着部には膜構造のように見られる dense band (DB) が形成されている。Bar=0.5 μm

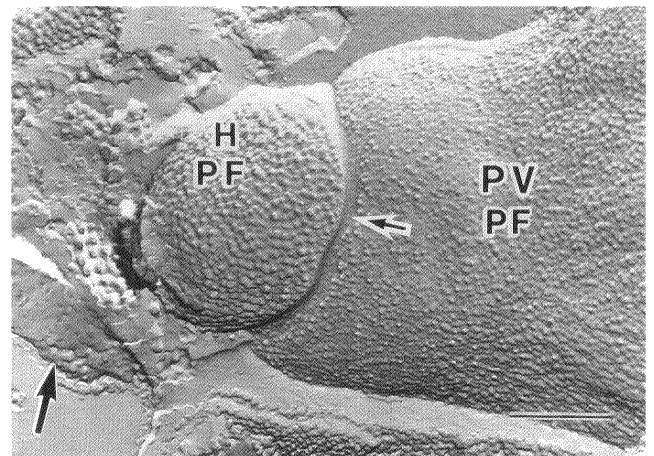


図3 フィリピン処理した材料のレプリカ像

フィリピンと膜コレステロールとの複合体の形成を示す突起構造が宿主側と PV 膜の PF 面共に多数観察されるが、dense band に相当する接着部位のみ複合体の形成が認められない (矢尻)。Bar=0.5 μm

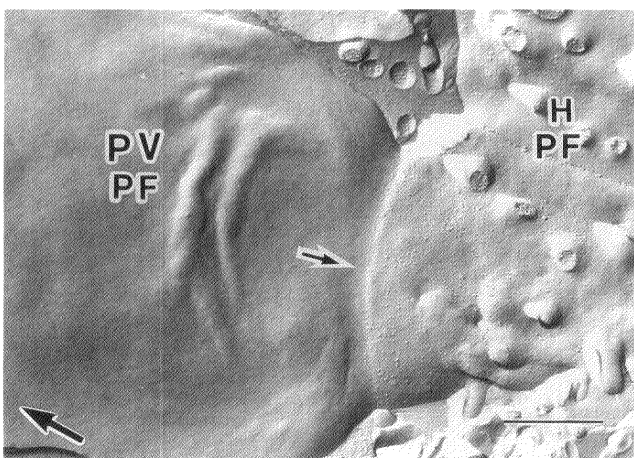


図2 寄生部位のフリーズレプリカ像

宿主細胞 (H) の膜面 (PF) には、微絨毛の突起と多くの膜内粒子が認められる。虫体の接着部位、すなわち dense band に相当する部分 (矢尻) から膜内粒子の減少が顕著である。虫体を取り囲む PV 膜の膜面 (PF) には、微絨毛は見られない。Bar=0.5 μm (左下の矢尻は白金の蒸着方向を示す)

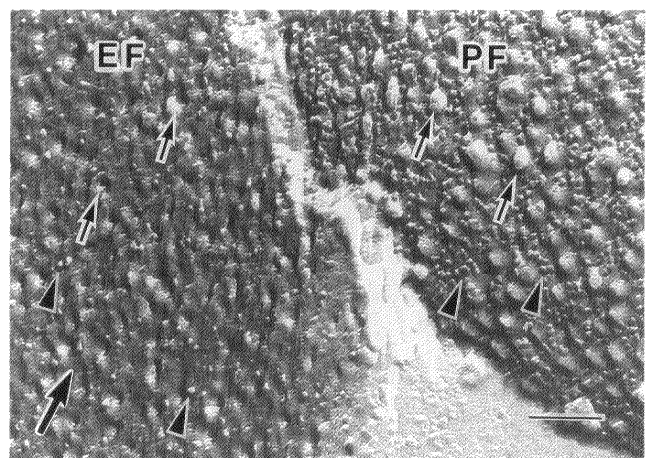


図4 フィリピン処理した赤血球の細胞膜の拡大像

細胞質側の半膜 (PF) には、直径7～8 nmの膜内粒子 (矢尻) と、直径25～30 nmのフィリピン・コレステロール複合体 (矢尻) が共に突起構造として観察される。一方、細胞質外側の半膜 (EF) には、膜内粒子 (矢尻) は突起として、複合体 (矢尻) は陥没構造として観察される。Bar=0.1 μm

げの量が多いと凍結操作時に浮遊液が動き、変形した形で凍結されてしまうので少しテクニックが必要である。いずれの材料でも、試料台は液体窒素中で試料ホルダーに装着し、このホルダーを試料交換棒にすばやく取り付け、予備排気室を経てマイクロームに装着する。この状態で割断可能となるが、試料を真空チャンバー内に入れると余分なガスが生じ、一時的に真空度が低下するので、真空度が回復するのを待ってから割断する。我々の経験では、試料を入れた状態でも装置の公表数値以上の 10^{-6} Pa台の高真空度に達する。割断操作はマイクロームに装着したガラスナイフステージをミクロン単位で送ることにより行う。割断操作は通常マイクローム薄切と同様に、試料によって割断スピードを調節する必要がある。一般的に、ある程度早いスピードで行った方が良い結果が得られる。反対にゆっくり行くとナイフのメスマークが試料表面に入りやすい。通

常のレプリカ作製には、割断後ただちにカーボン棒に装着した白金を45度の角度から蒸着する。蒸着膜厚の決定には少し熟練を要するが、本装置にはタイマーが内蔵されており、自動的に蒸着が停止する。

次に、試料の真上からカーボンのみを蒸着し、試料表面全体にレプリカ膜を作製する。FR-7000では、蒸着操作により減少する後者のカーボン棒は装置外部から送り操作が可能であるが、蒸着操作によりあまり減少しない前者の白金・カーボン棒の送り、さらに蒸着方向の外部調整はできない。試料数が多い場合に必要とされる白金・カーボン棒の送りや蒸着角度を変更する場合には、装置全体の真空を破らなくてはならない。この場合、他の装置と同様に液体窒素で冷却されている内部に霜が付着し、再び装置を運転するまでに数時間要することになる。そのため、次世代のFR-7000Aでは、この点に改良が加えられ、真空チャンバ

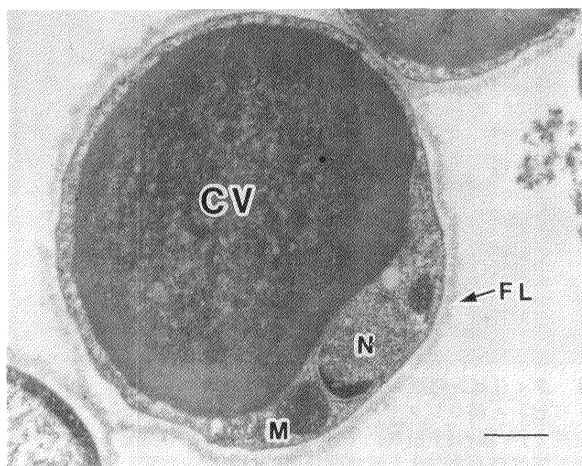


図5 ブラストシスチスの切片像

球状の生物体で、体積の80%以上を占めるcentral vacuole (CV) が細胞の中央に存在する。それ故、核 (N) および、ミトコンドリア (M) などを含む細胞質は細胞の周縁部に位置する。細胞の周囲には、線維状の構造物 (FL) が見られる。CV内には顆粒や均質無構造の物質が充満している。Bar=1.0 μ m

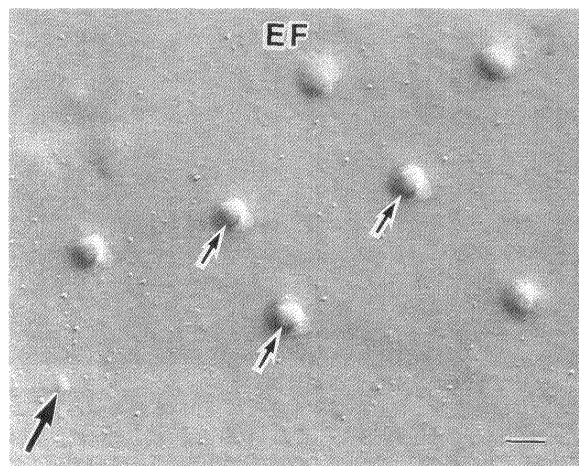


図7 ブラストシスチスの細胞膜のEF像

EFの膜内粒子は少なく、反対に直径100 nmの膜内粒子のない突起構造 (矢尻) が認められる。Bar=0.1 μ m

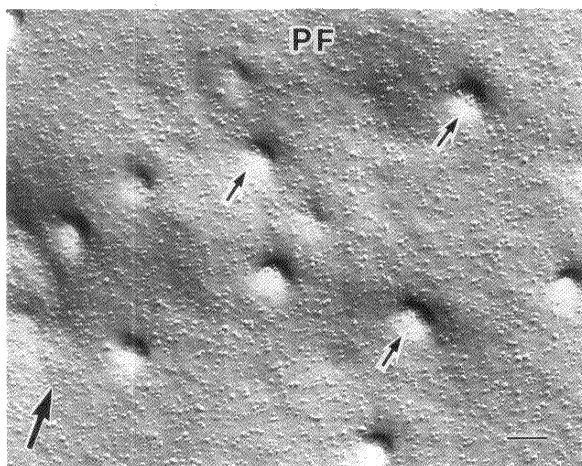


図6 ブラストシスチスの細胞膜のPF像

PFには多数の膜内粒子が認められ、粒子が凝集した直径100 nmのpinocytosisを示す陥入構造 (矢尻) が多数見られる。Bar=0.1 μ m

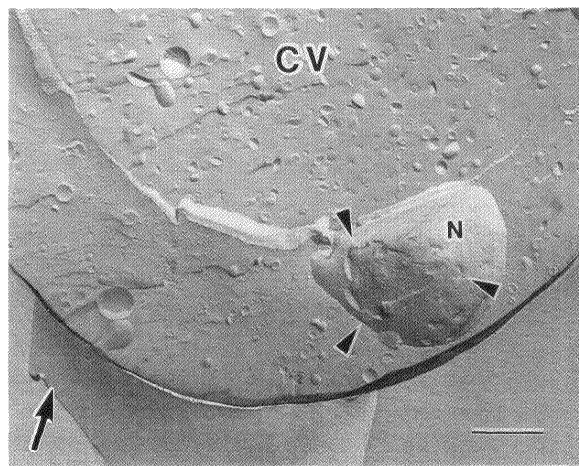


図8 細胞質の部位で割断されたレプリカ像

細胞周縁部の核 (N) とCV内の顆粒が観察される。特に、二重膜からなる核膜と核膜孔 (矢尻) が明瞭に認められる。Bar=0.1 μ m

一外から両蒸着源のカーボン棒の送りと白金の蒸着源の角度調整が0～60度の範囲で可能となっている。

蒸着が完了した試料は、試料ホルダーと共に再び試料交換棒により予備排気室を経由して取り出す。試料ホルダーから試料台をすばやく取りはずし、試料は試料台ごと次亜塩素酸ソーダ（市販の漂白剤）に直接入れ、組織を溶解させてレプリカ膜を回収する。この操作が一番テクニックを要するところであり、試料の種類によってもかなり異なっている。例えば、動物細胞では漂白剤が有効な場合が多いが、植物細胞ではセルロースの溶解のために濃硫酸などを用いなければならない。組織溶解後、レプリカ膜を蒸留水で洗浄するが、この場合も小さなループや金属メッシュでレプリカ膜を移動させる方法がある。最後に、透過型電子顕微鏡で観察するために金属メッシュにレプリカ膜を載せる。この場合もメッシュの大きさ（我々は300または400番を用いる）やホルムバルあるいはコロジオン膜をはったメッシュを用いた方がよい場合などがあり、一連のレプリカ膜の回収には試行錯誤が必要かもしれない。

4. 成 果

マウスの胃に寄生するクリプトスポリジウムは、図1に示すように細胞内寄生に分類されるが、宿主細胞質内に侵入しないために細胞質外寄生と呼ばれる特殊な寄生状態を示す。クリプトスポリジウムの寄生に伴って胃腺細胞（H）の細胞膜が虫体（P）を取り囲むように伸長し、最終的に虫体の先端部と膜接着した部位を除いて宿主の細胞膜が虫体を被ってしまう。その結果、虫体の周囲にはparasitophorous vacuole（PV）が形成され、その内側と外側のPV膜は宿主由来と考えられている。

一方、クリプトスポリジウムの細胞膜（PM）は、annular ring（AR）と呼ばれる部位で内側のPV膜と接着しており、宿主（H）の細胞質との間にはdense band（DB）と呼ばれる構造が出現し、宿主の細胞質と虫体（P）を境している。このような特殊な寄生状態の膜構造を調べるためにはフリーズレプリカ法が適している。

図2～4はFR-7000で得られたレプリカ像である。微絨毛を持つ胃腺細胞（H）の細胞膜と連続したクリプトスポリジウムを取り囲む外側のPV膜が観察される（図2）。この膜面は、細胞質側の半膜（PF面と略）であり、膜面には直径7～8 nmの膜内粒子が観察される。矢印で示す接着部位は、切片像のdense bandに相当し、この部分から微絨毛の消失と膜内粒子の減少が観察される。切片像では、dense bandは一見膜構造のように見えるが、図2のように宿主細胞の細胞膜とPV膜とは連続しており、dense bandは膜構造ではないことが判明した。

一方、膜コレステロールの分布を調べるためにフィリピン処理を行った材料では、フィリピンと膜コレステロールが反応して複合体を形成する。この複合体は、結果として膜に形態的变化をもたらし、それらは直径25～30 nmの突起構造として観察できる（図3）。宿主細胞膜とPV膜のPF面に多数の複合体が観察されるのに対し、dense bandに相当する部位には複合体が観察されない（図3矢尻）。

参考までに、フィリピン処理した赤血球膜のPF面とEF面（細胞質外側の半膜）の拡大写真を図4に示す。図の左

下矢尻の方向から白金を蒸着した結果、PF面の膜内粒子（矢尻）と複合体（矢尻）は、それぞれ突起構造を示すが、EF面では膜内粒子のみ突出しており、複合体は陥没している。すなわち、膜内タンパク質である膜内粒子は、二分された半膜の内側に突出して観察されるが、フィリピン・コレステロール複合体は膜内粒子よりも大きく、細胞質側に形成されるために、PF面では突起状に、EF面では陥没状に観察されるわけである。

このように、レプリカ像では金属の飛来方向に面し厚く蒸着された側は、電子線が通過しにくいいため黒く見え、反対に蒸着されていない側が明るく観察される。このような陰影のイメージは我々の実生活とは反対になっている。

一方、単細胞微生物のプラストシスは、図5のように球状の形態を示し、細胞の周囲は線維状構造物（FL）で被われている。細胞の中央には、限界膜で包まれたcentral vacuole（CV）と呼ばれる巨大な細胞小器官が位置し、その周囲に核（N）と細胞質が存在する。CV内にはさまざまな顆粒が認められる。このような細胞をフリーズレプリカ法で観察すると、細胞膜部で切断された場合、細胞質側の半膜（PF・図6）あるいは、細胞質外側の半膜（EF・図7）が観察できる。細胞膜のPF面には、多数の膜内粒子が見られ、さらに小さな陥没部が観察される（図6矢尻）。この陥没部にはcytosisの特徴としての膜内粒子の凝集像が明瞭に認められることから、プラストシスが活発にpinocytosisを行っていることを示している。

一方、EF面では膜内粒子は著しく少なく、反対に小さな突起が多数観察できる（図7矢尻）。この突起構造がPF面の陥没部と対応しており、EF面の突起部には膜内粒子がほとんど見られない。これらの結果は、マクロファージやアメーバなどのcytosisのレプリカ像の特徴と一致している。細胞質の部分で切断された場合、核膜・CV膜やその内容物の構造が観察できる（図8）。

5. おわりに

FR-7000を実際に使用し、従来のブロックタイプと大差ないレプリカ膜がコンタミネーションもなく容易に作製できた。短期間ではあったが、本装置のすばらしい点や改良すべき点がいくつか感じられた。改良型のFR-7000Aでは、これらの問題点を克服されていると伺っているので、生物試料だけでなく種々の材料で応用し、新たな分野での活用が期待される。

本装置を使用するにあたっては日立サイエンスシステムの牧原 正氏、ならびに装置のメンテナンスと技術的指導には木村政司、野中裕貴両氏に大変お世話になりました。ここに感謝の意をこめてお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 西占 貢 科学, 42, 431 (1972)
- 2) H. Morioka, A. Suganuma, Y. Yokota and K. Tawara, J. Electron. Microsc., 22: 255 (1973)
- 3) H. Yoshikawa and M. Iseki, J. Protozool., 39, 539 (1992)
- 4) H. Yoshikawa, M. Yamada and Y. Yoshida, J. Protozool., 35, 522 (1988)
- 5) P. M. Elias, D.B. Friend and J. Goerke, J. Histochem. cytochem., 27, 1247(1979)

解 説

新型BIO-TEM (H-7500) の開発

Development of a new TEM(H-7500) for biological applications

小林弘幸* 中澤英子**

(平成9年1月10日受理)

1. はじめに

近年、透過形電子顕微鏡（以下、TEMと略す）は、医学・生物学をはじめ農学・薬品・食品などのバイオテクノロジー分野において、微細構造の形態を観察できる手段として必要不可欠なツールとなっている。

特に医学・生物学における病理学の分野では、光学顕微鏡像のマクロ情報と電子顕微鏡像のミクロ情報との対応が必要であり、低倍率で広視野像が高コントラストで観察できるTEMが要求されている。

H-7500形透過電子顕微鏡は上述のようなニーズにこたえるべく新形BIO-TEMとして、斬新なデザインであると同時にPC（パソコン）を搭載した新世代にふさわしい製品コンセプトで開発・製品化した。

以下に、装置の特長と撮影例（データ）をご紹介します。

2. 装置の概要と特長

H-7500の外観写真を図1に示す。本装置は、加速電圧40～120 kV、倍率が $\times 50 \sim \times 1,000$ （Low Mag Mode）、 $\times 700 \sim \times 600,000$ （Zoom Mode）の範囲で、加速電圧・レンズ・排気系・偏向系・ステージ及び種々の機能は、すべてコンピュータにより制御されている。本装置は4つの主な特長を有している。

(1) 低倍・広視野・高コントラスト

新設計の対物レンズの採用によって、倍率 $\times 700$ の低倍率においても直径160 mmの広視野を実現すると同時に、対物絞り10 μm を挿入しても視野カットのない結像レンズ系を実現した。これにより、画質を劣化させることなく、高コントラスト像で一度に広い領域を観察・記録することが可能である。

(2) イージーオペレーション

Windows®搭載のPCを採用し、充実したGUI（グラフィック・ユーザー・インタフェース）により非常に分かりやすく電子顕微鏡の条件・状態表示および設定ができる。また、加速電圧の印加から所定のエミッション電流に設定する操作や対物絞りのIN/OUTおよび撮影視野サイズ切り替えなどワンタッチで操作可能となるように自動化している。さらに、オペレーターの好みに操作位置を合わせることのできる移動形の操作パネルやフットスペースを確保した架台構造により、無理のない操作姿勢で長時間の観察を可能とした。

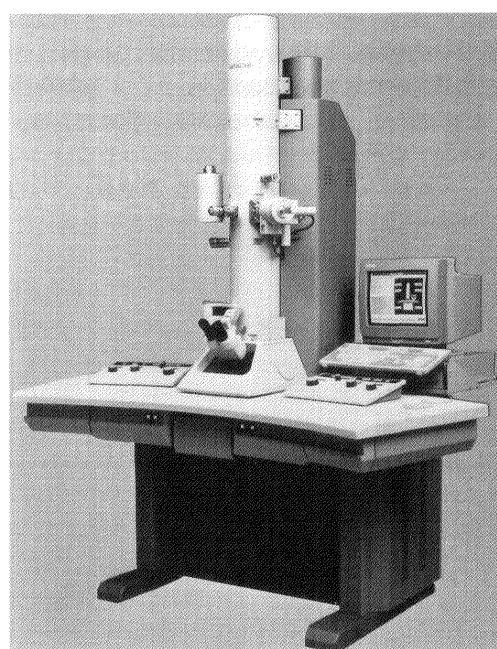


図1 H-7500外観写真

(3) 多機能化

バイオ分野に必要な自動予備照射機能・スティグモニター・ロードス・オートモンタージュなど種々の機能を装備し、様々なニーズに対応できる。

(4) ダウンサイジング

鏡体・電源・架台などコンパクト化設計され、ダウンサイジングが図られている。

また、本装置ではWindows搭載のPCを採用しているので、TEMの条件・状態表示および設定はPCのモニター画面を通して行う。図2～4にPCのモニター画面の表示例を示す。図2は電源立ち上げ時の標準の画面レイアウトで、TEMの観察条件を表示する部分（左上）と種々の機能を行うためのファンクションリスト部分（左下）と使用頻度が比較的高い機能に対応する6つのボタンアイテムになっている部分（右側）の3つの部分から構成され、分かりやすい表示になっている。

図3はステージ情報に関する画面を呼び出したときの表示で、試料の現在の座標位置の表示および位置記憶・記憶位置への自動送り機能や、観察した試料位置の軌跡表示（マイクロトレース）機能などを行うことができる。

図4は排気系情報に関する画面を呼び出したときの表示

* (株)日立製作所 計測器事業部 科学システム本部 第1設計部

** 日立計測エンジニアリング(株) テクノリサーチセンタ

1) Windows®は米国Microsoft Corp.の商標です。

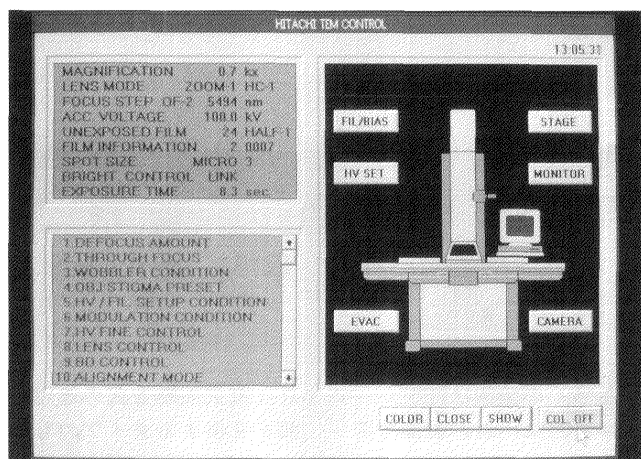


図2 画面表示例1

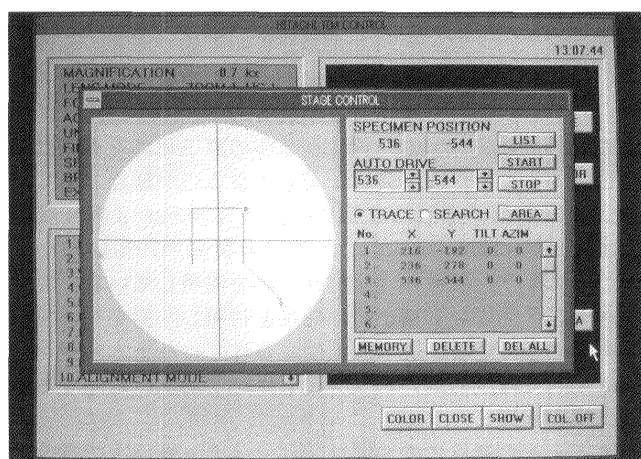


図3 画面表示例2

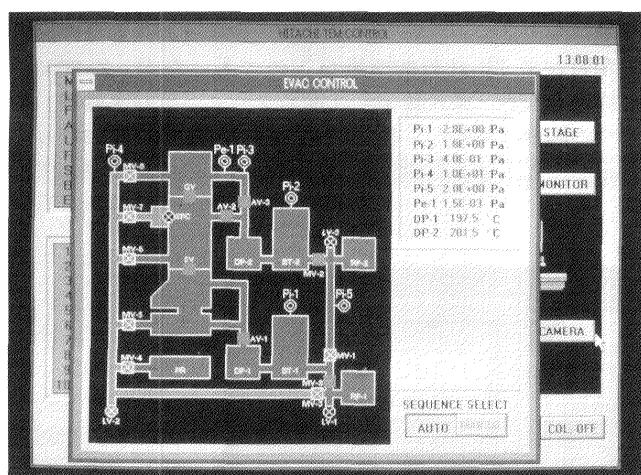


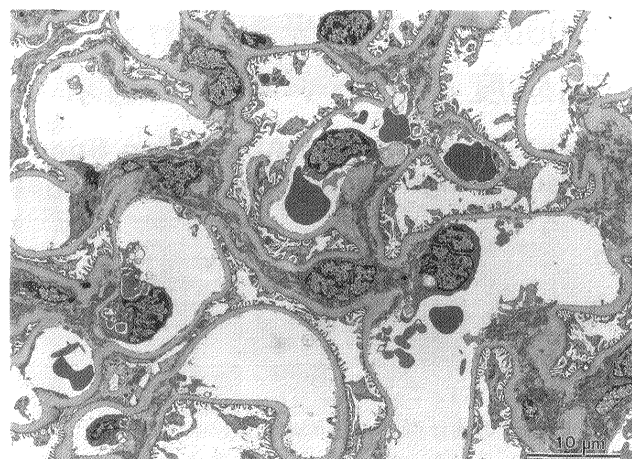
図4 画面表示例3

で、排気系統図が真空状態により色別でグラフィック表示される。

3. 応用データ

H-7500にて写真撮影した例を以下の図5～6に示す。

図5は低倍率におけるラット腎臓糸球体の断面の撮影例

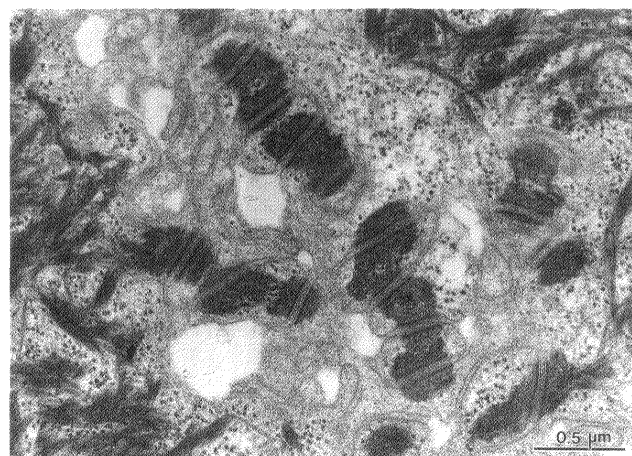


試料名：ラット腎臓の樹脂包埋超薄切片

加速電圧：100 kV 撮影倍率：1,000倍

試料ご提供 岩手医科大学電子顕微鏡室 高塩 稔先生

図5 撮影例(1)



試料名：ヒト皮膚の樹脂包埋超薄切片

加速電圧：100 kV 撮影倍率：20,000倍

試料ご提供 北里大学医学部 電子顕微鏡センター 宮沢七郎先生

図6 撮影例(2)

です。毛細血管の密に絡み合ったようすが広視野で観察でき、また血管間膜細胞の核や足細胞の突起も高コントラストで観察されます。

図6はヒト皮膚基底層の断面の撮影例です。デスモゾームによる細胞間の接着が発達していて、2つの細胞の細胞膜が平行に並び高電子密度の付着板、多数のマイクロフィラメントが鮮明に観察される。

4. おわりに

以上にH-7500形透過電子顕微鏡の特長の簡単な紹介と撮影例を示してきたが、H-7500はバイオ分野における多岐にわたる要求にこたえ、研究・開発に大きく貢献していくことが期待される。

最後に、本報告の写真撮影に際し試料をご提供いただいた北里大・宮沢先生、岩手医科大・高塩先生に厚く御礼申し上げます。

Z-5000形原子吸光光度計

—高感度と使いやすさを追求して—

Model Z-5000 Atomic Absorption Spectrophotometer

—Persuing high sensitivity and user-friendlim—

平野 義博* 原田 勝仁*
森谷 一夫* 米谷 明**

(平成8年12月24日受理)

1. はじめに

原子吸光分析法は微量の金属の定量法として、幅広い分野で利用されている。特に近年は、水道水や環境水・排水の各基準が改正され、基準値の引き下げと電気加熱（フレイムレス）原子吸光法などの新しい分析法が採用されたことから、水質分析における利用が目立って増加している。これにともない、原子吸光分析の経験の少ない分析担当者が、金属分析を行う機会も多くなっている。これは、水質分析に限らず、高感度化と自動化が進む近年の分析室の傾向であると考えられる。

Z-5000形原子吸光光度計（以下Z-5000形と略す）は、このような背景から、新しい水質基準にも対応できる高感度と、分析経験の少ない担当者でも容易に操作できるという使いやすさを追求した装置である。本報では、装置の特長と応用例について紹介する。

2. 装置の特長

(1) 装置構成

Z-5000形の外観を図1に示す。装置は、試料の測定を行う装置本体と、これを制御するパーソナルコンピュータより構成される。

一般に原子吸光光度計の原子化部には、燃料ガスによる炎（フレイム）を用いるフレイム方式と、炭素炉などを用いた電気加熱方式の二種類がある。フレイム方式は比較的高濃度（mg/lレベル）の測定に用い、電気加熱方式は低濃度（ $\mu\text{g/l}$ レベル）の測定に用いられる。現在市販されて

いる多くの装置は、フレイムまたは電気加熱方式の専用機か、または一台の装置で原子化部を交換するタイプのものである。

Z-5000形はフレイム原子化部と電気加熱原子化部を直列に配置したタンデム形と呼ばれる装置であり、1台の装置でフレイムと電気加熱方式の分析が可能である。しかもその切り替えは、コンピュータ上で設定を替えるだけですみ、わずらわしい交換作業も不要である。

従来のタンデム形の装置は、2つの原子化部を直列に配置していることから、横幅が大きくなるのが難点であった。Z-5000形は電気加熱用電源の内蔵と光学系の3次元配置により、横幅を115 cmと、当社従来製品の70%に縮小することにより、装置のコンパクト化を実現している。

バックグラウンド補正には磁場を利用した偏光ゼーマン法を採用している。従来広く用いられていた重水素ランプ法に比べて精度の高いバックグラウンド補正が可能である。

(2) 操作画面

ほとんどの装置の操作はコンピューター画面上で行う。画面構成の例として条件設定画面を図2に示す。ソフトウェアはWindows® 95¹⁾対応で、グラフィックスを用いた見やすい画面になっている。原子吸光光度計の画面操作は設定項目が多く、比較的煩雑なものであったが、Z-5000形は操作画面を「条件設定」「モニター」「データ処理」の3つの画面に集約し、初心者でも扱いやすい構成になっている。たとえば条件設定画面では、図2の中央に並ぶアイ

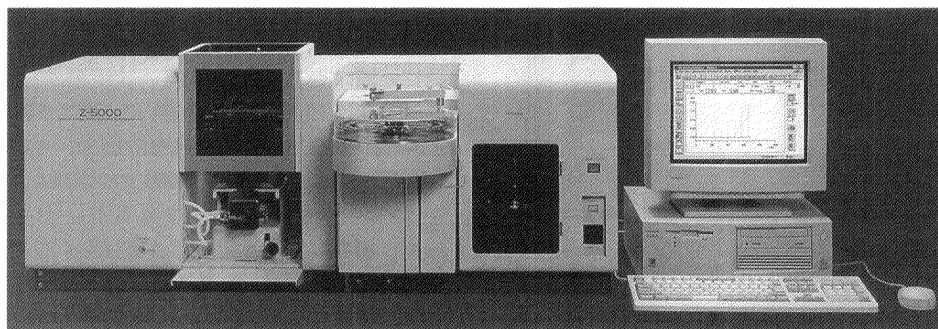


図1 Z-5000形原子吸光光度計の外観

* (株)日立製作所 計測器事業部 科学システム本部
** 日立計測エンジニアリング(株) テクノリサーチセンタ

1) Windows® 95は米国Microsoft Corpの商標です。



図2 条件設定画面

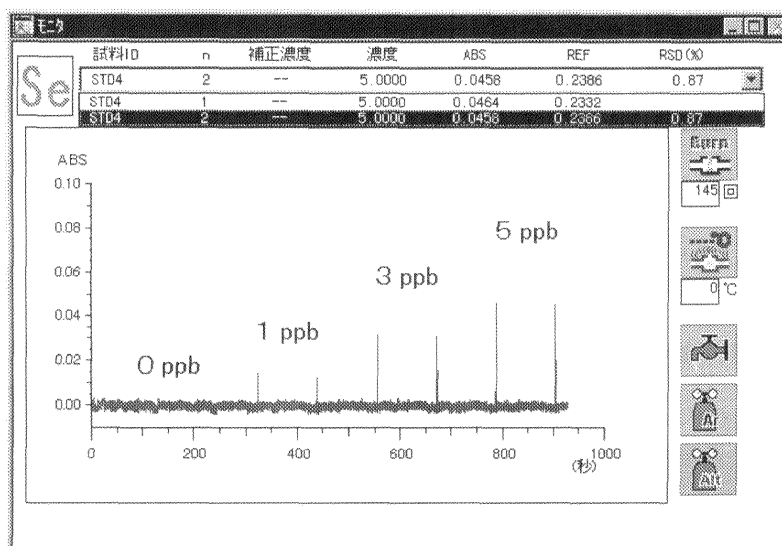


図3 Seの測定結果（モニター画面）

コンを左から順番にクリックしてパラメーターを入力していけばよく、入力の手順を覚える必要もない。

3. 応用データ

分析で必要とされる感度は年々高感度になっている。水質分析を例に挙げると水道水および環境水のAs、Seの基準値は $10\mu\text{g/l}$ であり、実際の分析では基準値の $1/10$ すなわち $1\mu\text{g/l}$ までの定量が要求されている。

従来製品の電気加熱方式ではAs、Seのベースラインノイズが高く $\mu\text{g/l}$ レベルの定量が困難であった。この測定には通常使用するホローカソードランプの代わりに、オプションの高輝度ランプ（無電極放電ランプ）を用いてノイズを低減することが必要であった。

Z-5000形では、光学系と信号処理回路の改良により大

幅なノイズ低減を実現した。これによりAs、Seのホローカソードランプでのベースラインが、高輝度ランプを使用した従来装置と同等レベルになり、高輝度ランプが不要になった。例としてSeの測定結果（モニター画面）を図3に示す。これはホローカソードランプ使用によりSeの標準液0、1、3、 $5\mu\text{g/l}$ を2回ずつ測定したものであり、 $\mu\text{g/l}$ レベルの測定が十分可能であることがわかる。

4. まとめ

以上に述べたようにZ-5000形は、高感度化と操作性を向上させた装置であり、水質管理などの分析への応用が期待される。今回は水質分析に絞って紹介したが、高感度化と自動化が望まれる他の分野においても、もちろんその性能を十分に発揮できるものと考えられる。

半導体製造分野向け光学装置

—微小有機異物分析システム，成膜条件評価システム—

Optical equipment for Semiconductor industry

江島 佳定* 松井 繁*

(平成8年12月28日受理)

1. 微小有機異物分析システム

従来，ウェーハ上に付着した異物を同定するための定性分析手段としては，走査電子顕微鏡と組み合わせたエネルギー分散型X線分析装置による方法が一般的に採用されている。この方法では，金属分析をはじめとする無機系異物の分析には多大な威力を発揮している。しかし，有機化合物の場合には，その物質が特長的な元素を含んでいない限り，元素組成が分かってもその物質の特定は難しい。微小領域における有機定性分析法の中で，感度，測定時間，操作性に優れ，非破壊分析が可能な顕微蛍光法を用いたウェーハ上有機異物分析システムを開発したので紹介する。

図1に本システムの全体図を示す。本システムはカセットtoカセット対応のウェーハ搬送系と自動XYステージを備え，異物検査装置などの座標軸を元にした対象異物の位置出しにも対応可能となっている。

〈特長〉

- ①SEM+EDXの元素分析では手がかりのつかめない有機系異物の同定が可能。
- ②カセットtoカセット対応の自動化により大幅な省力化を実現。
- ③レジスト，ポリイミドなど有機異物の極薄残膜の検出にも適用可能。

図2にポジ型レジストの検出感度の測定例を示す。0.8 μ m角のレジストパターンからの微弱な蛍光スペクトルも感度よく測定できることが分かる。

2. 成膜条件評価システム

高集積度化が進む半導体デバイスでは，ウェーハ上に形成された各種の薄膜の品質管理，プロセス管理が重要となっている。例えば，ステッパの露光時間決定には，露光波長での金属薄膜の絶対反射率測定が必要である。また，各種薄膜諸特性の，ウェーハ上の分布測定も欠かすことができない。従来，ウェーハの分光光度計への導入や，測定位置の移動などは，測定者が，手動にて行っていた。今回，自動化をすすめたカセットtoカセット対応の成膜条件評価システムを開発したので紹介する。図3に本システムの全体図を示す。ウェーハ搬送ロボット，オリフラ合わせ，自動X-Yステージを備え，全自動測定が可能である。

〈特長〉

- ①分光反射率測定により，各種成膜プロセス条件の評価が可能。
- ②ウェーハ1枚/分の高スループット測定が可能。（反射

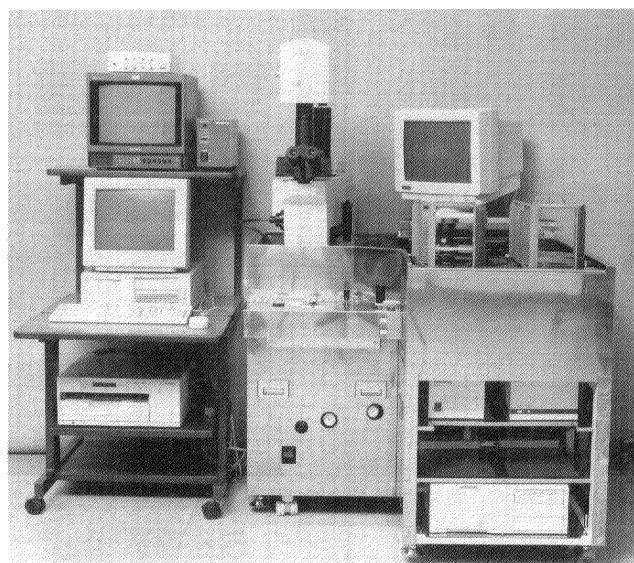


図1

率5点/ウェーハ測定時)

- ③クリーンルーム対応の省フットプリント設計。（間口1200mm）
- ④付属装置の交換で，マスクブランクス等の透過率測定も

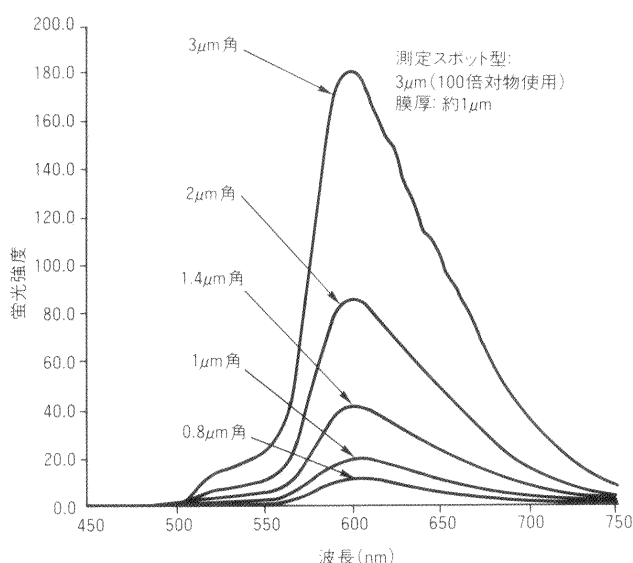


図2 ポジ型レジストの検出感度

* (株)日立製作所 計測器事業部 科学システム本部 第二設計部

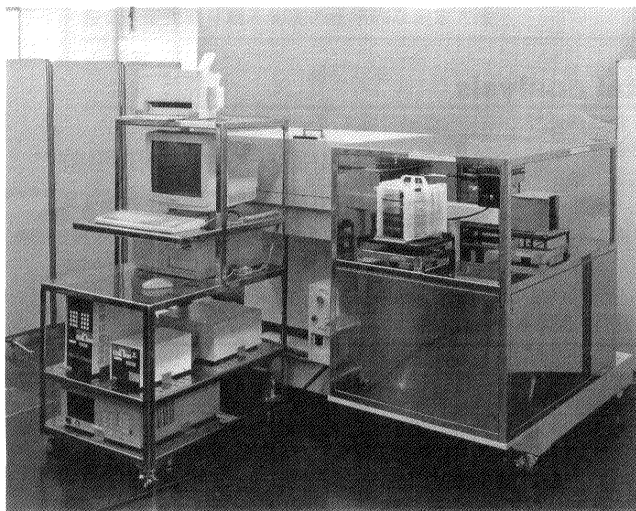


図 3

可能。

図 4 に Si ウェーハ上の SiN 膜の 12 度絶対反射率測定例を示す。干渉縞より，SiN 膜の膜厚計算，反射率の値から膜質の評価が可能である。

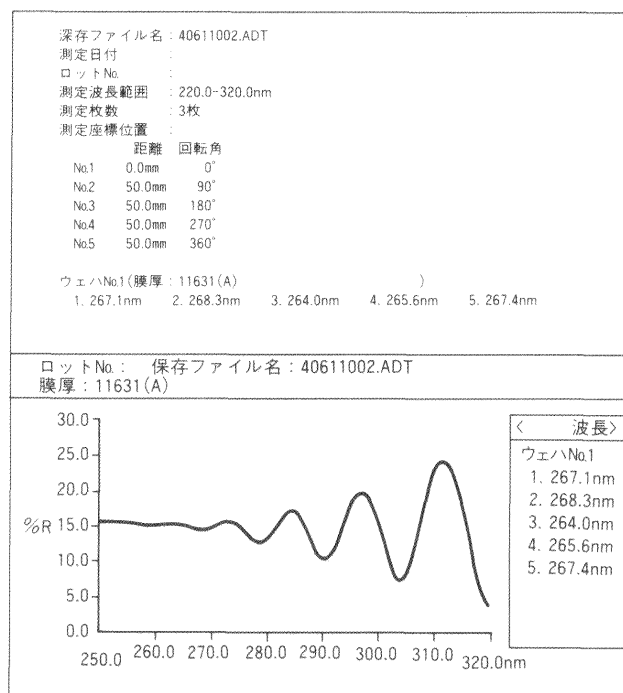


図 4

Topics

SEMICON Japan96に U-6500ほかを出展

平成8年12月4日（水）～6日（金），幕張メッセにて開催されたSEMICON Japan96に，計測器事業部からも日立グループブースに出展しました。

SEMICON Japanは，半導体製造機器や材料に関する世界最大のトレードショーで，国内のみならず広く海外からの来場者が最新の機器の情報やマーケティングに訪れることでも知られています。

当計測器事業部では，測長SEMや

電子線描画装置のほかに，今回初めてU-6500形有機微小異物分析システム（顕微分光光度計）やU-4000形膜厚評価システム（分光光度計）を実機展示し，多くの来場者の方々にご覧いただ

きました。

これらの装置が大口径化，ディープサブミクロンへと続く微細デバイスの研究や生産に生かされることが期待されます。〔高垣直人 記〕



大気分析用GC/MSシステム

GC/MS system for atmospheric environmental analysis

谷川建一* 安田昭善**
中川勝博*** 横倉武文****

(平成9年1月20日受理)

1. 大気汚染防止法改正による規制物質とその測定方法

環境汚染と人間の健康への意識の高まりから、有害汚染物質に対する規制が近年急速に強化されている。平成4年から平成5年にかけて水質（上水、環境水、排水、地下浸透水など）に関する基準が相次いで制定された。また、平成6年には土壤汚染に係る環境基準が定められた。平成8年には水質、土壤に引き続き、私達が毎日呼吸する空気（大気）に対しても新たな基準が設けられることになった。これが“大気汚染防止法の一部を改正する法律”（環境庁）である（平成8年5月9日に公布、1年以内に施行される。“大気汚染防止法”は昭和43年に公布。）。昭和48年二酸化いおう、一酸化炭素、浮遊粒子状物質、光化学オキシダントの濃度を規制した環境庁告示以後23年ぶりの環境基準の改正である。今回の大気汚染防止法の改正の主な内容は次の4点である^{1), 2)}。

- (1) 有害大気汚染物質に関する制度の創設
- (2) 自動車排出ガス規制対象への原動機付自転車の追加
- (3) 建築物の解体等に伴うアスベスト汚染防止のための制度の創設
- (4) 事故時の措置の充実

これらの中で特に重要なのは(1)有害大気汚染物質対策に関する制度の創設である。主な内容は次の4点である^{1), 2)}。

- ①基本的な考え方として、長期間暴露した場合に発癌等の健康影響が懸念される有害大気汚染物質の排出を抑制するため、これらを排出する事業者の自主的・積極的な取り組みを引き出す制度を構築する。
- ②有害大気汚染物質に係るリストを明らかにした〔有害大気汚染物質の可能性のある物質234種類および優先取り組み物質22種類（表1を参照）をリストアップした〕。
- ③②項の内ベンゼン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンを早急に抑制しなければならない指定物質とした。
- ④ベンゼンの大気環境指針値を年平均3 µg/m³以下とした。

有害大気汚染物質モニタリングのための標準的な測定方法を表2に示す。優先取り組み物質22種類のうちアクリロニトリル、塩化ビニル、クロロホルム、1,2-ジクロロエタ

表1 優先取り組み物質

	物質名
1	アクリロニトリル
2	アセトアルデヒド
3	塩化ビニルモノマー
4	クロロホルム
5	クロロメチルエーテル
6	酸化エチレン
7	1,2-ジクロロエタン
8	ジクロロメタン
9	水銀およびその化合物
10	タルク（アスベスト繊維を含むもの）
11	ダイオキシン類
12	テトラクロロエチレン
13	トリクロロエチレン
14	ニッケル化合物
15	ヒ素およびその化合物
16	1,3-ブタジエン
17	ベリリウムおよびその化合物
18	ベンゼン
19	ベンゾ [a] ピレン
20	ホルムアルデヒド
21	マンガンおよびその化合物
22	六価クロム化合物

ン、ジクロロメタン、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、1,3-ブタジエン、ベンゼンの揮発性有機化合物（以下VOCと略す）9成分の測定にはGC/MS法が用いられる。またヒ素・ニッケルの測定には原子吸光、ICP、ICP-MS（MIP-MS）が、アルデヒド類の測定にはHPLCが用いられる。

本解説では大気汚染防止法改正に伴い、優先取り組み物質にリストアップされたVOC分析に用いられる大気分析用GC/MSシステムについて述べる。

2. 大気分析用GC/MSシステム

大気分析用GC/MSシステムは、大気を捕集する大気試料捕集部、大気試料の中のVOC成分をGC/MSに導入する試料導入部および試料の定量・定性を行う日立M-7100/7200形GC/三次元四重極型質量分析計（GC/3DQMS）により構成される。システムを大気試料捕集部・試料導入部・GC/3DQMS部に分け、各部の機能について説明する。

2.1 大気試料捕集部

大気試料捕集方法には大きく分けて、数リットルの真空容器に大気を捕集するキャニスタ法と吸着剤を充填したチューブに大気試料を捕集するチューブ法の2種類の方法が

* (株)日立製作所 計測器事業部 カスタマーサポートセンタ
** (株)日立製作所 計測器事業部 品質保証部 第一品質保証課
*** (株)日立製作所 計測器事業部 科学システム本部 第二設計部
**** 日立計測エンジニアリング (株) テクノリサーチセンタ

表2 優先取り組み物質の標準的な測定方法

測定方法	測定方法	適用可能な調査対象物質	試料採取および測定に要する主な機器など
1	ステンレス容器捕集 ↓ 低温濃縮 ↓ GC/MS分析 (キャピラリカラム)	アクリロニトリル 塩化ビニルモノマー クロロホルム 1,2-ジクロロエタン ジクロロメタン テトラクロロエチレン トリクロロエチレン 1,3-ブタジエン ベンゼン	ステンレス製容器 定流量装置 気体試料前処理装置
2	固体吸着捕集 (カーボンモレキュラシーブ) ↓ 溶媒 (CS ₂) 抽出 ↓ GC/MS分析	クロロホルム 1,2-ジクロロエタン ジクロロメタン テトラクロロエチレン トリクロロエチレン ベンゼン	・カーボンモレキュラシーブ充填捕集管 ・除湿管 (Mg (C104) 2) ・吸引ポンプ ・積算流量計 ・GC/MS
3	固体吸着捕集 (カーボンモレキュラシーブおよびグラファイト化カーボンブラック2層充填) ↓ 加熱脱着 ↓ GC/MS分析	塩化ビニルモノマー クロロホルム 1,2-ジクロロエタン ジクロロメタン テトラクロロエチレン トリクロロエチレン ベンゼン	・カーボンモレキュラシーブおよびグラファイト化カーボンブラック2層充填捕集管 ・抵抗管もしくは定流量装置 ・吸引ポンプ ・積算流量計 ・試料前処理装置 ・GC/MS
4	化学反応 (DNPH) ↓ 溶媒抽出 ↓ HPLC分析, GC (FTD) 分析またはGC/MS分析	アセトアルデヒド ホルムアルデヒド	・DNPH含浸シリカカートリッジ ・オゾンスクラバ管 (または吸収液, インピンジャー) 吸引ポンプ ・積算流量計 ・HPLC (またはGC (FPD) GC/MS)
5	フィルター捕集 ↓ 原子吸光分析, ICP発光分析, 電気加熱原子吸光またはICP-MS (MIP/MS)	ニッケルおよびその化合物	・ハイボリュームエアサンプラー ・ローボリュームエアサンプラー ・原子吸光, ICP発光またはICP-MS (MIP-MS)
6	フィルター捕集 ↓ 原子吸光 (水素化物発生), ICP発光 (水素化物発生) またはICP-MS (MIP-MS)	ひ素およびその化合物	・ハイボリュームエアサンプラー ・ローボリュームエアサンプラー ・原子吸光, ICP発光またはICP-MS (MIP-MS) ・水素化物発生装置

ある。

キャニスタ法の試料採取方法を図1に示す。キャニスタには、VOC成分が内面に吸着するのを防ぐために内面を不活性化したステンレス容器を用いる。採取方法として、①採取場所でキャニスタの入り口を開放するグラブサンプリング、②あらかじめ減圧状態のキャニスタにマスフローコントローラで一定流量で採取する減圧採取法、③加圧ポンプにより大気圧以上に加圧する加圧採取法、の3つの方法がある。グラブサンプリングは瞬時の大気成分の変化を観測するのに有効な方法である。一方、減圧採取および加

圧採取は長時間の平均化採取が可能であり、観測地点での1日の平均化採取にはこの方法が用いられる。

チューブ法の試料採取方法を図2に示す。大気試料を定流量ポンプで吸引し、VOC成分をチューブに詰められた吸着剤 (TENAXと呼ばれるポリマーおよび活性炭がよく用いられる) に吸着捕集させる。

この2つの方法の比較を表3に示す。

キャニスタ法は揮発性の高い成分の捕集に優れているとともに、1回のサンプリングで複数回分析ができることが特徴である。一方、チューブ法はチューブ自体が長さ200

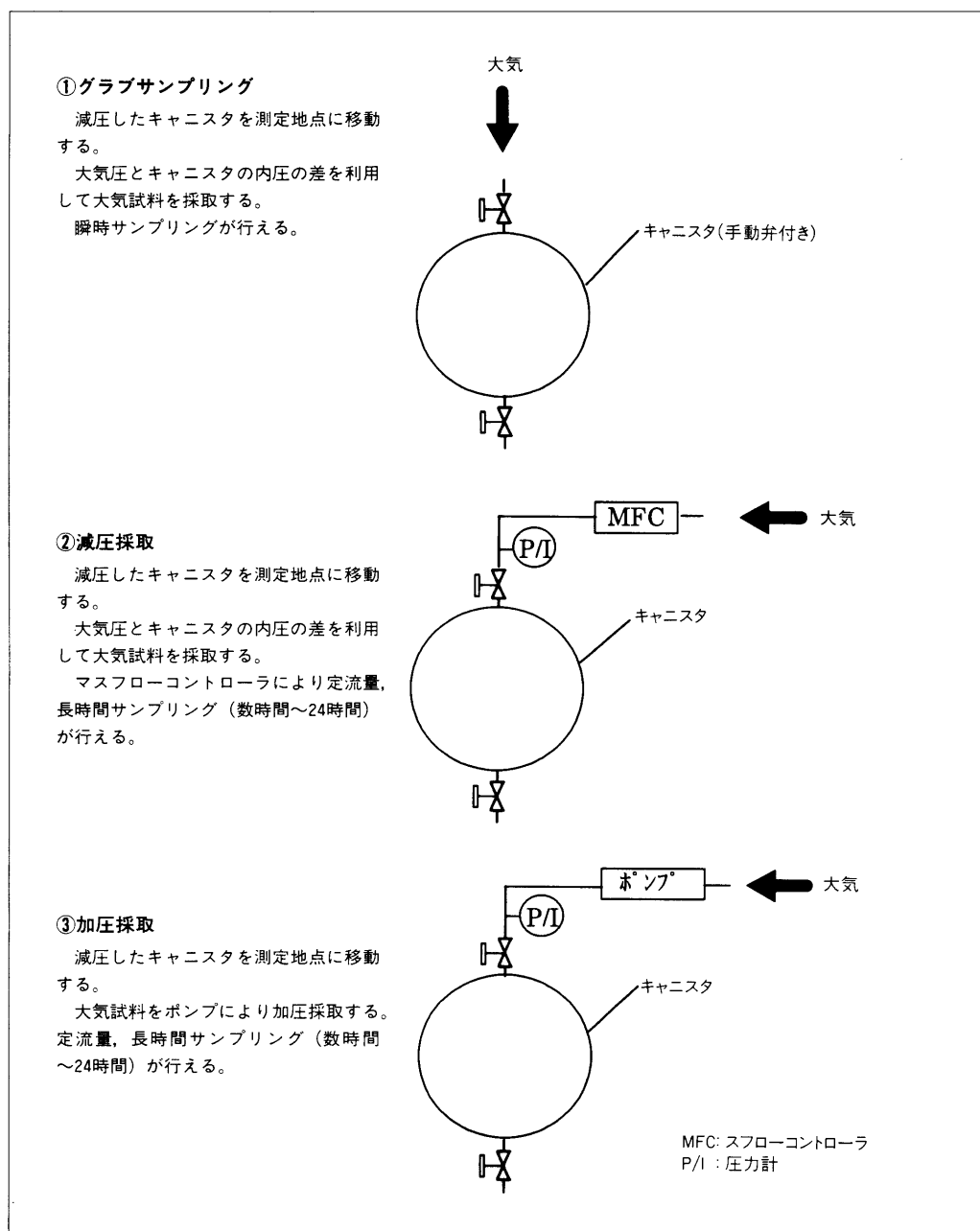


図1 キャニスタ法試料採取方法

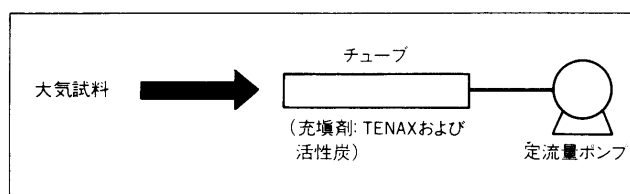


図2 チューブ法試料採取方法

表3 キャニスタ法とチューブ法の比較

項 目	キャニスタ法	チューブ法
1. 測定対象有機化合物	揮発性・有機塩素系	高・中揮発性
2. 捕集器具	ステンレス製真空瓶	吸着剤を充填した吸着管
3. 一斉分析による定性	◎	△(吸着剤依存)
4. 分析回数	○(複数)	△(一回)
5. ポータブル性	△	◎

mm程度でかつ軽量であることから持ち運びに便利であり、中揮発性の成分にも対応できる。反面、揮発性の高い成分については破過する恐れがあり、吸着剤の選択などに注意

が必要となる。優先取り組み物質の一斉分析という点からはキャニスタ法がより一般的な方法と言えるが、分析対象・目的に応じた2つの方法の使い分けにより最適化を図

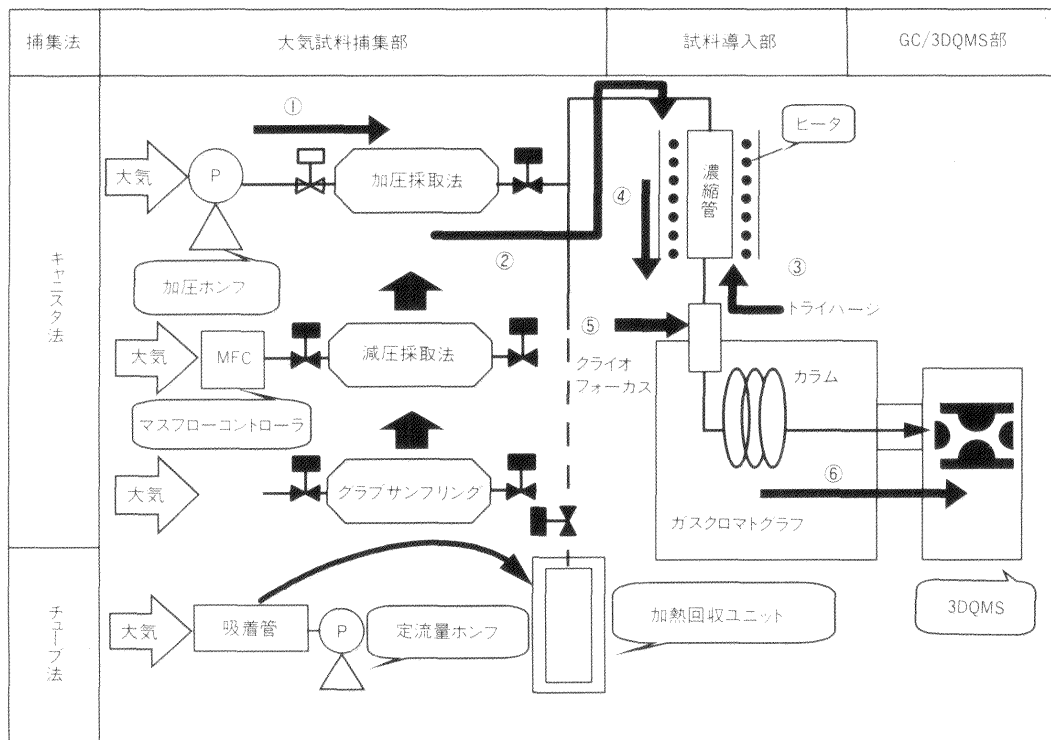


図3 試料導入部の構造

ることも有効である。

2.2 試料導入部

試料導入部の構造を図3に示す。分析行程は以下のとおりである。

①大気試料を捕集後、②キャニスタまたはチューブから濃縮管へ大気試料を導入し、VOC成分を濃縮管に濃縮する。チューブ法の場合はチューブを加熱回収ユニットに装着しVOC成分を濃縮管に濃縮する。③濃縮管をドライバージすることにより分析の妨害となる水分を除去する。④濃縮

管を加熱し、VOC成分をクライオフォーカスに導入する。⑤クライオフォーカスは液体窒素で冷却されており、カラムへ試料を導入する際ピークの広がりを抑える役割を果たす。⑥クライオフォーカスを加熱してVOC成分をカラムへ導入し、GC/MS分析を行う。

2.3 GC/3DQMS部

日立GC/三次元四重極型質量分析計の外観および分析部の構造を各々図4、図5に示す。分析部はフィラメント、2枚のエンドキャップ電極、リング電極、検出器から構成

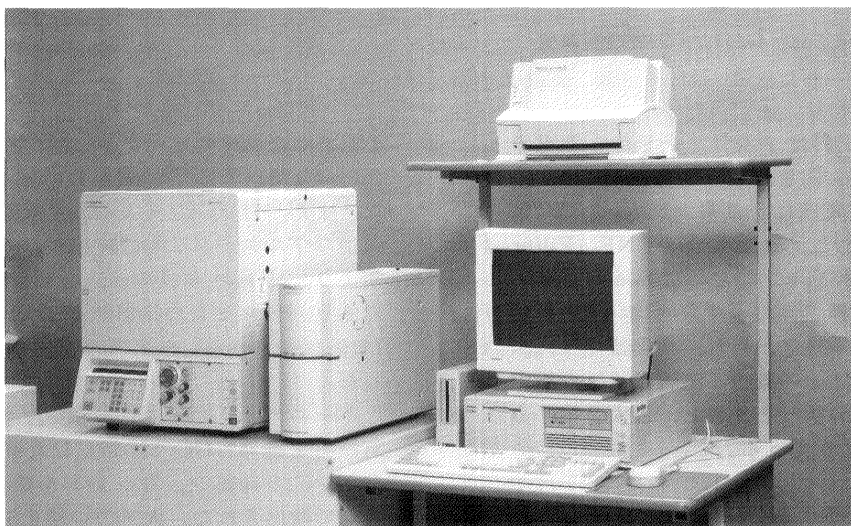


図4 日立GC/三次元四重極型質量分析計の外観

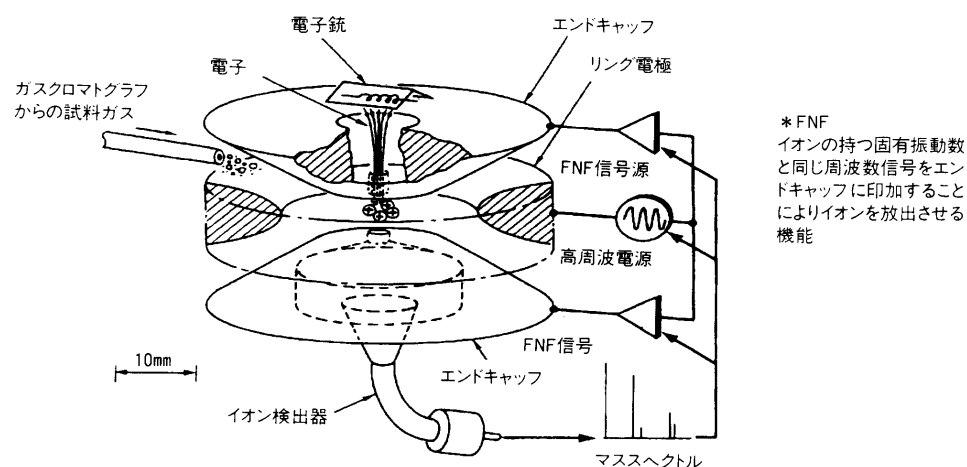


図5 日立GC/三次元四重極型質量分析計の分析部の構造

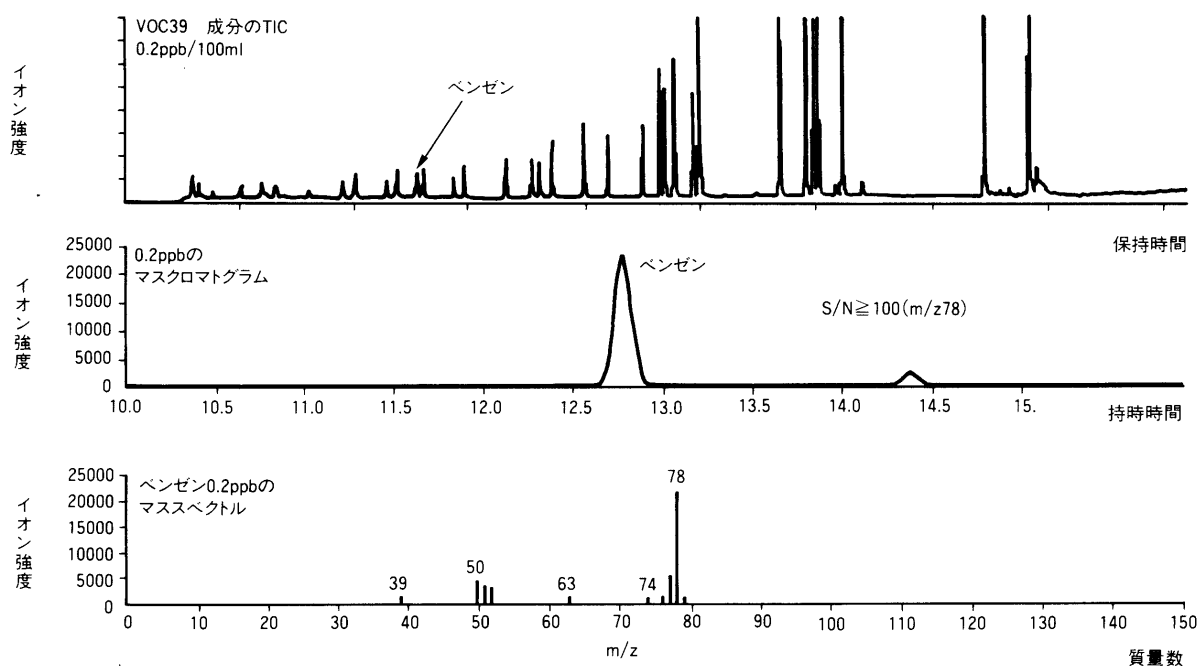


図6 標準ガス39成分0.2 ppb (v/v) /100mlの測定結果

される。GCで分離した試料はフィラメントからの電子と衝突することによりイオン化される。生成したイオンは電極間に印加された高周波電圧により最大25 msの間、電極内に蓄積される。このとき、日立独自のFNF (Filtered Noise Field) 法により水イオンなどの夾雑イオンをイオン源から排除した後、蓄積されたイオンはリング電極に印加する高周波電圧により系外に出され、検出器でマススペクトルを与える。このイオンの蓄積と夾雑イオンの排除により従来の四重極型質量分析計と比較し、最大2桁の高感度化が可能なGC/MS分析ができる。

3. 測定データ

標準ガス39成分（優先取り組み物質の7成分を含む）0.2 ppb (v/v) 試料量100 mlの測定結果を図6に示す。

TICでは全成分のピークが確認され、マスキングクロマトグラム (at m/z 78) ではベンゼンのピークをS/N ≥ 100で検出した。また、日立GC/三次元四重極型質量分析計の高感度性によりフルスペクトルで検出が可能であった。この測定結果より、VOCの多成分一斉分析がフルスペクトルで可能であり、ベンゼンの指針値 $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (約1 ppbに相当) の1/10 (約0.1 ppb) を余裕を持って測定できることがわかった。

キャニスタを観測地点に運び、グラブサンプリングで大気試料を捕集しGC/MS測定した測定例を図7に示す。ベンゼン、トルエン、キシレンが数ppbから10数ppbの濃度範囲で検出された。大気汚染防止法改正の運用にあたり、VOCの測定ではキャニスタ法が有効な方法であることが

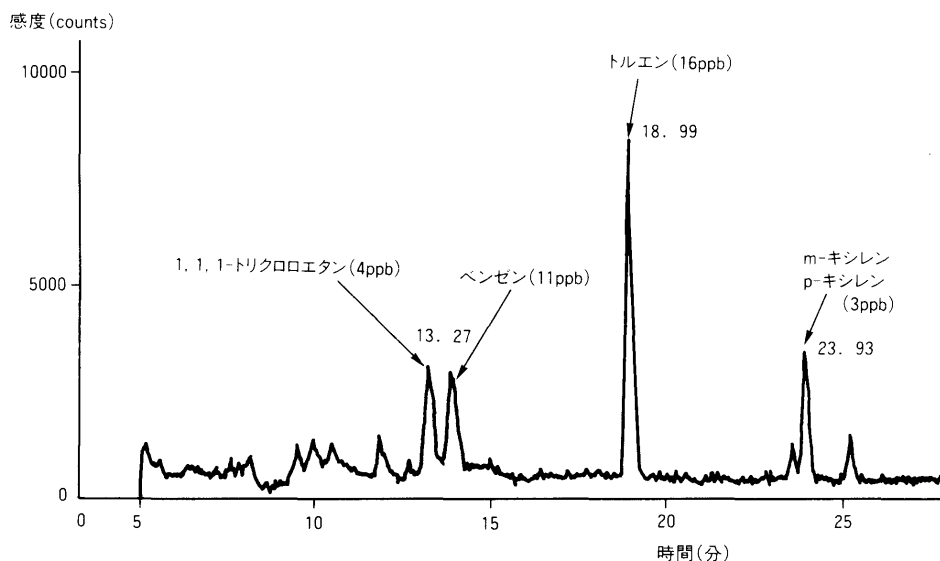


図7 大気試料をキャニスタ法グラブサンプリングで捕集した実測定例

わかった³⁾。

4. まとめ

以上述べてきた大気分析用GC/MSシステムの特徴を以下にまとめる。

- (1) 大気汚染防止法改正に対応し、優先取り組み物質にリストアップされたVOCの一斉分析が可能である。また、分析対象・目的に合わせてキャニスタ法・チューブ法の2つの大気試料捕集方法が選択できる。
- (2) 少ない濃縮時間で0.1 ppb以下の微量なVOC成分をフルスペクトルで検出可能であり、低濃度でも定性・定量

を同時に行うことが可能である。

- (3) 水分などの夾雑成分をドライバージおよびFNFで取り除き、高感度測定ができる。

参考文献

- 1) “大気汚染防止法の一部を改正する法律（法律第三二号）（環境庁）” 官報（号外第113号）平成8年5月9日
- 2) “今後の有害大気汚染物質対策のあり方について（第二次答申）” 中環審第82号 平成8年10月18日
- 3) 谷川建一，中川勝博，市岡耕二，前田恒昭：“大気中微量有機化合物分析システムの検討”，1996機器分析東京討論会講演要旨集，p41（1996）

Topics

日本電子顕微鏡学会 第41回シンポジウム開催

日本電子顕微鏡学会の第41回シンポジウムが平成8年10月24、25日に京都工芸繊維大学で開催され、日立関係では今回瀬戸賞を授賞された大阪大学・鷹岡助教授による新型3MV超高压電

子顕微鏡H-3000形の新技术，FE電子顕微鏡の2つの発表がありました。初秋の古都で、新しい顕微鏡学がテーマとなったシンポジウムでした。

（中山知義 記）

日本分析化学会 第45年会開催

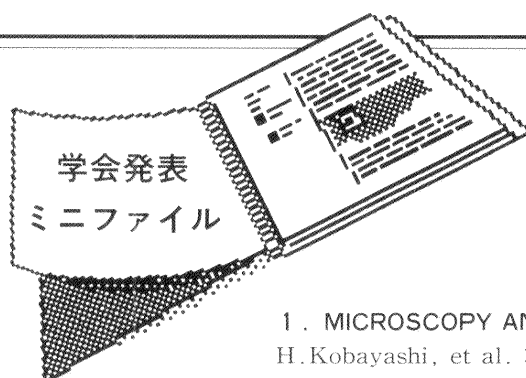
'96年9月19日～21日の3日間、東北大学川内北キャンパスにおいて日本

分析化学会第45年会が開催されました。

一般講演，主題講演，ポスター発表など647件の発表・討論および付設展示会が行われ，非常に盛会でした。

日立グループからは発表を5件行ったほか，新製品のZ-5000形原子吸光度計などの展示をし好評でした。また，日立グループからは和田正夫氏，藤孝之氏，石川勝彦氏，江口欣也氏，浦島誠一氏，山田富士夫氏が有功賞を受賞しました。

（奥本豊治 記）



1. MICROSCOPY AND MICROANALYSIS 1996 (1996. 8. 11~15, Mineapolis, USA)

H. Kobayashi, et al. : Developmennt of a Computer-Conntrrolled 120 kV

High-Performance TEM

T. Yaguchi, et al. : FIB System for TEM Specimen Preparation and its Application

T. Kamino, et al. : Dynamic Observation of a Surface Reconstruction of
Au-Deposited Si Particle

2つの加熱エレメントを備えた試料加熱ホールダを開発し、高温下におけるシリコン表面のin-situ観察に適用した。金の存在によってシリコン表面の結晶構造の再配列が起き、金が多い部分ではシリコンの(001)面に超格子構造が出現することを見出した。

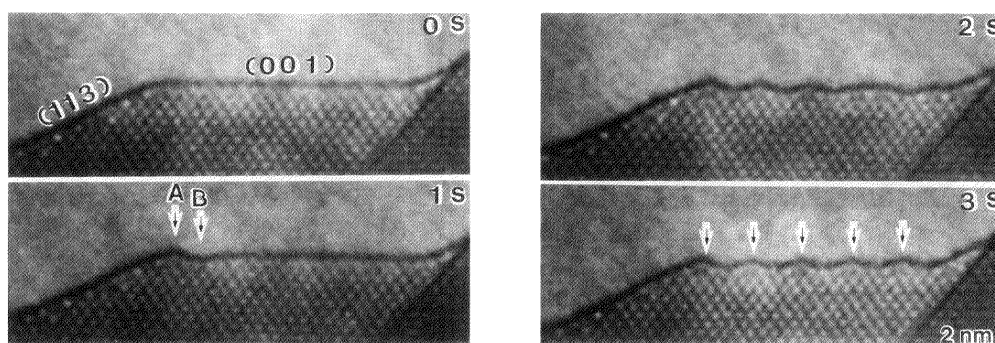


図1 シリコン表面超格子構造の動的観察

2. 14th INTERNATIONAL DIATOM SYMPOSIUM (1996. 9. 4, Tokyo)

Y. Dan, et al. : Observation of the Parmales with High Resolution SEM

T. Akiba, et al. : Direct Microscopy of Epiphytic Diatoms Using
a Variable Pressure SEM

電界放出型高分解能SEM (S-4500形) および高感度ロビンソン型電子検出器搭載SEM (S-3200形) を使用し、珪藻の観察を試みた。前者では低加速電圧で観察し極めて鮮明な表面構造を得た。後者では試料をグルタルアルデヒド固定後、蒸留水で洗浄するだけで鮮明なSEM像が得られることを示した。

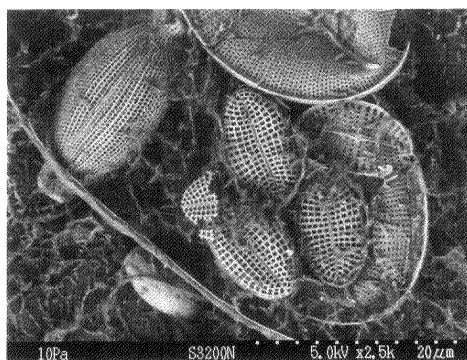


図2 Cladophora sp.のSEM像
(加速電圧 5 kV)

3. 第12回電子顕微鏡討論会 (1996. 9. 5～6, 日本大学)

谷口 (日立・計測器事業部), 他: EF-1000エネルギーフィルタ観察システム

植木 (日立計測エンジニアリング), 他: SUS粒界分析における厚さ依存性の検討

松本 (日立計測エンジニアリング), 他: Siデバイスの高電圧二次電子像観察

矢口 (日立計測エンジニアリング), 他: 分析電顕による光磁気ディスクの観察

FIB加工法は材料の物理的・化学的性質を選ばないことから、特に複合材料の前処理に威力を発揮する。金属多層膜を高分子材料で挟んだ構造を持つ光磁気ディスクのTEM試料作製とその分析電顕による構造と組成の評価を行った。

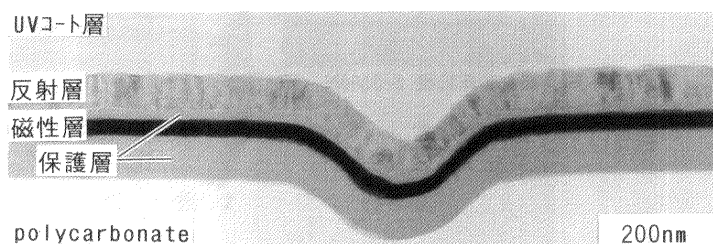


図3 FIB加工法により作製した光磁気ディスクのTEM像

4. 日本分析化学会第45年会 (1996. 9. 19～21, 東北大学)

伊藤 (日立・計測器事業部), 他: 固相抽出法を用いたHPLCによる血中ステロイドの分析

山本 (日立計測エンジニアリング), 他: 高温炉原子吸光分析における有機マトリックス修飾剤の効果

白崎 (日立計測エンジニアリング), 他: マイクロ波誘導質量分析法におけるスペクトル干渉について

マイクロ波誘導質量分析法では測定対象元素の同位体比によって、干渉分子イオンをモニタリングできる。このことを応用して鉄、ニッケル、クロムの測定におけるカルシウムの妨害の特性について調べた。環境水の分析に適用し、好結果を得た。

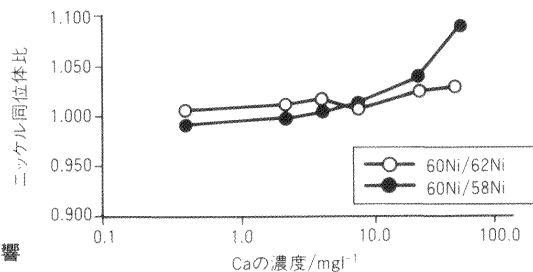


図4 Niの同位体比に及ぼすCaの影響

5. 第7回クロマトグラフィー科学会議 (1996. 10. 23～25, ヤクルトホール)

平林 (日立・中央研究所), 他: 汎用LC/MS対応ソニックスプレイイオン化法の開発

鍋島 (日立・中央研究所), 他: セミマイクロLC/MS対応新規APCIインタフェース

川副 (日立サイエンスシステムズ), 他: 光電離検出器の電子捕獲検出器への適用

岩淵 (日立計測エンジニアリング), 他: 自動濃縮セミマイクロLCシステムによる食肉中抗菌剤の分析

本システムの持つ、高感度と高選択性を活かして食肉中抗菌剤の5成分一斉分析を試みた。自動固相抽出装置で試料200 μ lを注入することにより検出限界0.002 mg/lを得た。これは食品衛生検査指針値の1/10である。また、共存物による影響は3次元クロマト法によって確認した。

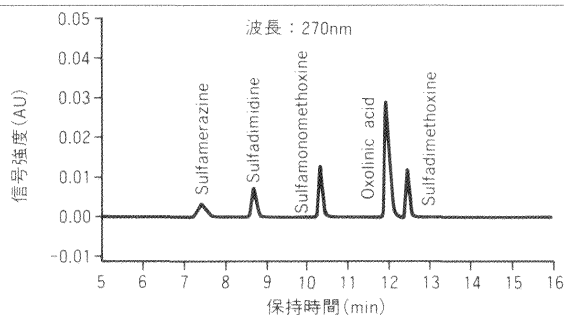


図5 標準試料のクロマトグラム (各成分0.02 ppm)

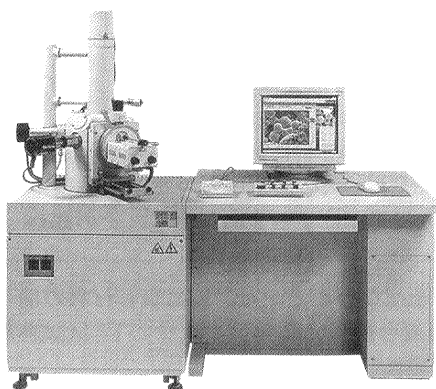
新製品紹介

Windows®95対応GUIを使用した新型走査電子顕微鏡 2機種発売

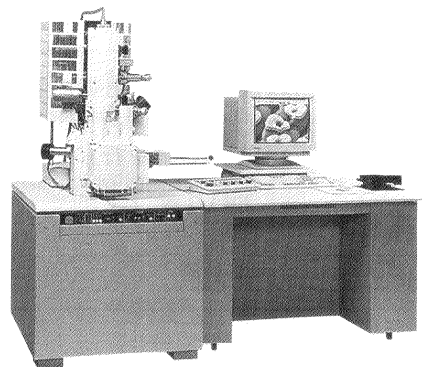
Windows®95*対応のGUIを採用した新型走査電子顕微鏡（低真空対応型（S-3500N）および超高分解能FE型（S-4700）の2機種）をこのたび同時発表し、日立走査電子顕微鏡の豊富な製品ラインナップに加えました。

両機種ともにWindows®95のGUI環境による操作性向上を図っただけでなく、画像ファイリング機能を標準搭載し、取得データの管理・活用を容易にしました。さらに、2560x1920画素の高精細メモリ搭載、ネットワーク対応、EDXとのインテグレート化も実現しました。一方、電子顕微鏡で最も重要な像観察においても、従来製品と比較し、大幅に分解能を向上させ高度なニーズにこたえました。

*Windows®95は米国Microsoft Corp.の商標です。



GUIオペレーションの姉妹機 S-3500N
(Natural SEM)



GUIオペレーションの姉妹機 S-4700
(Cold FE電子銃搭載)

■主な仕様

・S-3500N

電子銃：Wヘアピンフィラメント
分解能：5.0 nm（低真空モード時）
試料寸法：最大200 mm径

・S-4700

電子銃：冷陰極電界放出型電子銃
分解能：2.5 nm（加速電圧 1 kV 時）
試料寸法：最大150 mm径

日製産業株式会社

北海道支店 電話 札幌(011)221-7241
東北支店 電話 仙台(022)264-2211
筑波支店 電話 七浦(0298)23-7391
北関東営業所 電話 大宮(048)653-2341
西関東営業所 電話 八王子(0426)43-0080

本社 電話 東京(03)3504-7211
横浜支店 電話 横浜(045)451-5151
新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011
北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
中部支店 電話 名古屋(052)583-5841
関西支店 電話 大阪(06)366-2551

京都営業所 電話 京都(075)241-1591
四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
中国支店 電話 広島(082)221-4514
九州支店 電話 福岡(092)721-3501
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

<編集後記>

本号では北里大学の柴先生、大阪大学の鷹岡先生、奈良女子大学の吉川先生より3報の報文を執筆いただき大変うれしいです。お陰様でページ数がリミットに近い32ページの多きに達し、編集者一同大感激をしています。今後も同様なページ数になるよう頑張ります。

■インターネットホームページ

- (株)日立製作所計測器事業部
<http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki>
- 日製産業(株)
<http://www.nisseisg.co.jp>

■本ニュースに関するお問い合わせは、下記、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。

- 日立計測エンジニアリング株式会社
テクノロジーサーチセンタ
〒312 茨城県ひたちなか市毛882番地
電話 ひたちなか
(029)273-2111(代)
- 日製産業株式会社
科学システム販売促進部
〒105 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京(03)3504-7811(ダイヤルイン)
FAX (03)3504-7756

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MAR. 1997 VOL.39 NO.2

発行 平成9年3月25日
発行人 大林 秀仁
編集人 塚田 勝男
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
科学システム本部技術部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1(新丸ビル)
電話 東京(03)3214-3122(直通)
印刷所 日立印刷株式会社