

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

SEPTEMBER
VOL.41

1998
No.1

目次

巻頭言

..... 1

報文

電子分光顕微鏡による蛋白質結晶の
解析

豊島 近 小川治夫

谷 一寿 3

農産物中残留農薬の多成分スクリー
ニング法の紹介

横倉武文 河原井雅子

栗石賢一 谷川健一

照井香織 中川勝博 6

解説

アミノ酸代謝異常スクリーニング
システム

三浦順吉 平田源蔵 高木正徳

石川昌子 12

ラウンジ

熱帯雨林の林冠生物研究に“夢”をか
けるII

山岡亮平 11

学会発表ミニファイル 18

新製品紹介

日立走査電子顕微鏡 S-3000Nおよび
S-3000H 15

ナノメートルレベルの薄膜を高スル
ープットで評価するHD-2000 17

U-1500形レシオビーム分光光度計の
紹介 20

マルチキャピラリDNAシーケンサ
CS1000形を開発 20

トピックス

日本分析化学会第59回分析化学
討論会開催 2

日立ユーザーズルーム開設のお知ら
せ 2

第54回電子顕微鏡学会が開催されま
した 14

Natural SEMがとらえたクリプトス
ポリジウム・オーシスト 16

巻頭言

科学技術立国を目指す日本に期待する

Aiming at further promotion of science and technology in Japan

澤田 嗣郎*



今や我が国は不況といわれて久しい。不況馴れというか、最近はこの状況を不況というのかと感ずる程度で、そういう意味で不感症気味となっているのは筆者の置かれている立場を幸せと思うべきであろうか。確かに、こんなことを言うと、給料カットなどされているサラリーマンにお叱りをうけるだろう。企業の立場から見ると、深刻だ。しかし個人レベルでは、すでに購入時より著しく値下がりした住宅、土地、株などはとにかく売れる時期がくるまで忘れていたい、と思うだけであろう。数ヶ月前イタリアの学会に参加したが、参加費は日本円にして7万円と高額であった。しかし、参加者の多くは日本人であったし、観光地で徘徊している旅行者の1/3は日本人だった。個人レベルでは、10年前とそれほど生活に変化はないと思うのは私自身もっと過去の生活レベルを知っている年寄りの部類に入ったためだろうか。

日本人は個々を尊重して生きる習慣が乏しく、集団で行動する規範が身にしみついてしまっているので、一人一人の人生の幸福の為にどの様にお金を使ったらよいのかよくわからないように思う。バブルの時代のように、皆で長期耐久消費物などに投資しているときは、それなりの幸せ感を味わった。皆で横並びしている幸福感、それが日本人の幸福感というものだった。それは今は無いに久しい。政治家、官僚はもとより、国民も今何をしたらいいのかよくわからなくなってしまった。

具体的な不況脱出作戦は、後手後手となっている。政府の無策ぶりは責任重大だ。科学における我が国独自の発展や展開に対する我が国の取り組みも改善すべき余地がある。もっと民間の競争原理に裏打ちされた生き残り作戦を、国は管理、運営を含めて民間に学び国策に取り入れるべきであろう。我が国は実力相応の評価が世界から与えられるようもっと努力すべきと思う。

現在の利便あふれた、また健康的なライフに科学技術の果たした役割は測り知れない。日本の科学技術は、先進欧米諸国と比較してもはや劣るとはいえない。多くの分野でむしろリードしているといっている言い過ぎではないだろう。特に基礎技術、基礎分野といわれる学術分野には目を見張るものがある。例えば光技術一つをとっても、多くの潜在する優れた技術が我が国には先行している。すでにいくつかのそのような基礎技術が国家的プロジェクトとして力を入れられつつある現状は好ましいことと思う。

しかし、そのような大型プロジェクトは採択されるに至るまでのチェック機構

* 東京大学 大学院 工学系研究科 教授

の厳しさに比較して、スタート後のチェックの甘さがよく指摘される。これは大学に入る為の入学試験の厳しさに比較して、入学後の卒業試験は比較的易しいという我が国の教育の一貫したシステムと類似していて、これらは欧米と比較して大いに異なるところである。

科学技術振興策も、提案プロジェクトの採択ばかりを厳しく審査するのではなくて、スタートした後の中間チェックで厳しくふるいにかければよいのではないだろうか。要するに、入り口は広く、出口は狭くするほうが、間違いが少ないはずだ。これらシステムを変革するためには、そのような環境づくりはもとより、我が国100年の体型を変革せねばならないだろうが、今がチャンスだ。すでに述べたように、我が国には優れた科学技術はたくさんある。基礎技術も他の諸国と比較して遜色は無い。ただ、それらを真に社会に役立つ技術にまで立ち上げるシステムが我が国は遅れている。

2～3週間前に筆者は、タイの有名大学に集中講義に出かけるチャンスがあった。ご多分にもれず、タイでも経済危機に直面し、至る所で建設続行中止となったビルディングが見られた。タイはほぼ100パーセント国民の食料を自給自足できると聞く。これだけでもいかにタイ国が恵まれているか想像できよう。肥沃な土地に恵まれたタイも、最近、真に地についた科学技術の獲得に力を注ぎはじめた。小生の集中講義もそのプロジェクトの一環である。少なくとも21世紀前半までは、各国の主要目標は、科学が先導する社会造りになるであろう。

とくに資源を持たない我が国は、真に独自の科学技術とそれらを創出できるノウハウを一日も早く確実なものとし、アジアにおける先導的役割を果たさねばならない。そのためには、解決せねばならない課題は山積しているが、やればできることなのである。

Topics

日本分析化学会第59回 分析化学討論会開催

'98年5月23、24日の両日、日本分析化学会第59回分析化学討論会が、小樽商科大学にて、およそ700名の参加者を集めて開催されました。討論の主題は、①地球環境と分析化学、②界面機能と分析化学、③生体と分析化学の3テーマが取り上げられ、12件の特別講演が多くの聴講者を集めたなか行われました。また、一般講演、ポスターあわせて369件の発表が行われ、各会場とも活発な討論が繰り広げられていました。日立グル

ープからは、原子吸光、ICP-AES、MIP-MS、LC-MSに関する7件の発表を行いました。

(白崎 俊浩 記)

日立ユーザーズルーム 開設のお知らせ

このたび、日立製作所計測器事業部では日頃当社の製品をご愛用くださっているお客様を対象にしたインターネット会員制サービスとして「日立ユーザーズ・ルーム」を開設しました。

(平成10年9月1日より開始)

当ユーザーズルームは以下のコンテンツから構成されています。展示会・ユーザセミナーなどをご紹介します「お知らせ」、新製品情報をいち

早くお知らせする「新製品ニュース」、お客様から比較的よくいただく質問内容をまとめた「FAQ集」、各地で実施いたしておりますセミナー・講演会等で使用したスライドを掲載した「インターネットセミナー」および最新の技術情報やアプリケーション情報をご提供する「テクニカルデータ」など会員の皆様のお役に立つ情報を満載してお届けいたします。さらに「ご意見・お問い合わせ」では、いつでもお気軽にお問い合わせいただけるようになっています。是非ご入会いただきますようよろしくお願いいたします。

なお、入会方法等の詳細については、担当営業までご連絡ください。入会申込書をお送りいたします。

(本田 俊哉 記)

報 文

電子分光顕微鏡による蛋白質結晶の解析

Energy-filtering electron crystallography of proteins

豊島 近* 小川 治夫* 谷 一寿*

(平成10年7月21日 受理)

要 旨

新開発になる電子分光顕微鏡EF-1000を蛋白質の電子線結晶解析に応用することを検討してきた。非弾性散乱を起こした電子は照射損傷を起こし、電子顕微鏡像や回折パターンに悪影響を与える。エネルギーフィルターは電子に対するプリズムであり、非弾性散乱された電子を弁別し(分光し)、像や回折パターンに寄与しないよう除去してしまいうことが出来る。蛋白質の電子線結晶解析に応用した場合、その効果には唖然とするものがある。

1. はじめに

電子線結晶解析は今や生体高分子の構造決定のための有力な手段の一つとなっている。特に膜蛋白質に関しては、目覚ましい成果を上げている。過去15年間ほどを振り返ってみると、電子線結晶学の分野では幾つかの技術的な革命があった。その第1のものは低温技術の確立であり、特に氷包埋試料の作製・観察技術の開発が重要な貢献を果たした。第2の革命は電界放射型電子銃の導入である。これは現在まさに浸透しつつある技術である。第3の革命はおそ

らく電子分光、またの名をエネルギーフィルターの導入となるであろう。

現在のところ、生物試料の構造を最もよく保存できる方法は試料をガラス状の氷に包埋することである。氷をガラス状に保つためには、試料を液体窒素温度近くまで冷やす必要がある。それは試料の照射損傷を低減させることに役立つし、しかも試料は水和している。しかし、この方法にも重大な欠点がある。よく知られているように、電子が物質と相互作用して散乱されるときにはエネルギーのやりとりの有無によって弾性散乱と非弾性散乱とがある(図1)。このうち、規則的構造からの回折スポットや高分解能の像形成に寄与するのは弾性散乱のみである。非弾性散乱は試料にエネルギーを付与して、照射損傷を起こすし、連続的なバックグラウンドを作成し像を劣化させる。注意すべきことは、蛋白質を作っているような軽元素の場合、非弾性散乱される電子の方が弾性散乱されるものよりもずっと多いこと、また、非弾性散乱の散乱断面積は原子番号が小さくなくても大して減るわけではないことである。

蛋白質を氷が取り囲んでいるからこそ氷包埋試料は秀れているのだが、その氷は非弾性散乱の極めて重大な発生源なのである。従って、S/N比(信号対雑音比)の観点からは氷の厚さは薄ければ薄いほど良い。しかし、表面張力による試料の変形を防ぐためには、氷(溶液)の層は十分厚くなければならない。要するに、「適当な氷の厚さの試料を作るのは易しくない」ということである。しかるに、もし非弾性散乱を気にしなくていいのなら、事態は一変するに違いない。勿論、非弾性散乱が起こることそれ自体を防ぐのは無理な話である。しかし、非弾性散乱電子を回折パターンや像の形成に寄与しないようにすることなら、可能性はある。エネルギーフィルターは(少なくとも理論的には)それを可能にするものである。エネルギーフィルターは電子に対するプリズムとエネルギー選択スリット(分光器のスリットに相当する)からなる。電子分光顕微鏡はある特定のエネルギー損失を起こした(あるいは全く起こしていない、いわゆるゼロロス)電子のみによる像や回折パターンの観察を可能にする顕微鏡である。

日立製作所はγ型エネルギーフィルターを備えた電子分光顕微鏡(EF-1000 [1])を開発してきた。私たちは、この新型電子顕微鏡が蛋白質の電子線結晶解析に有用であるかをテストしてきた。ここではその結果をごく簡単に述べる。用いた試料は電子線蛋白質結晶学の標準試料ともいべきカタラーゼの板状結晶[2]と、現在我々が最も力を注いでいる、筋小胞体のカルシウムイオンポンプ(カルシ

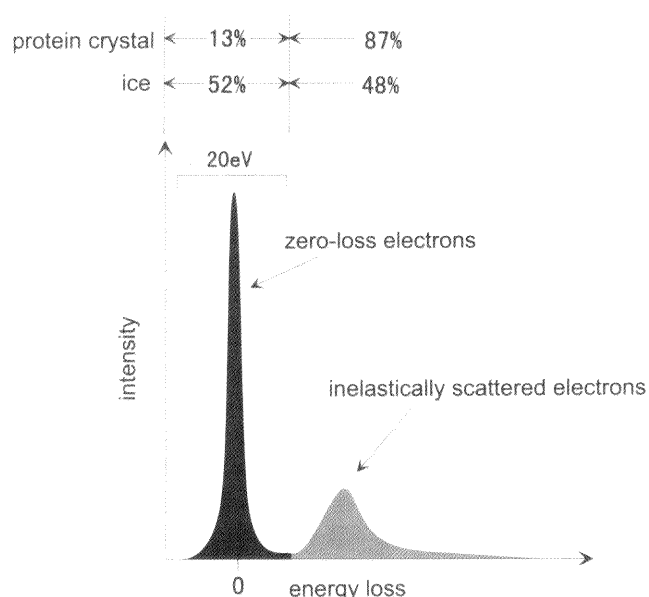


図1 電子のエネルギー損失スペクトルの概念図。

氷に包埋された厚め(～0.1 μm)の蛋白質結晶を通してくる電子に関し、ゼロロス電子(エネルギー損失<10eV)と、非弾性散乱電子の割合を上を示す(入射電子の加速電圧は125KV)。ゼロロス電子は散乱されなかった電子と弾性散乱された電子とからなる。

* 東京大学 分子細胞生物学研究所

ウムATPase [3])である。両者とも染色固定することなく急速凍結・氷包埋して低温で観察した。

2. 氷包埋蛋白質結晶の電子分光電子線回折

私達がこの仕事を始めた頃には「蛋白質の氷包埋試料では弾性散乱・非弾性散乱がどの程度の割合で起こるのか」といった基本的な事柄にすら、定量的データはなかった。ここで用いた蛋白質結晶は十分大きなものであるから、その測定はごく簡単で、エネルギー選択スリットを入れた時とはずした時で蛍光板に達する電子がどれだけかを測定すれば事足りた。中程度の厚さ(～0.1 μm)の結晶について測定してみると、いわゆるゼロロス(エネルギー損失10eV未満)の電子は結晶のところではわずかに13%、結晶に隣接した(カーボン支持膜と水しか含まない)領域でも52%に過ぎなかった。こういう数字を見ると、非弾性散乱を除去できるエネルギーフィルターの効果は絶大なものかもしれないと予想された。その効果を定量的に測定するためには、まず電子線回折を試すのが良い。そうすればフィルターの効果を回折スポットのS/N比として精確に、かつ広い分解能の範囲で評価できるからである。

結論から言えば、電子線回折における電子分光の効果は素晴らしいの一語に尽きる。普通の電子顕微鏡を用いた場合、氷に包埋された蛋白質結晶の電子線回折パターンでは、7 Å分解能付近まではバックグラウンドの方が信号よりも強い(図2a)。従って、バックグラウンドの除去が必須であり、そのためのプログラムも幾つかあるのだが、満足できる程うまく行くことは滅多にない。ところがエネルギーフィルターを(電子プリズムは常に作動しているので、正確にはエネルギー選択スリットを)挿入した場合(図2b)、一次の回折スポットから3 Å分解能を越えるものまで、ものの見事にみえるではないか!バックグラウンド処理などという難しいことはいらないのである。

このように、電子分光の御利益は低分解能領域では明らかである。それでは高分解能領域ではどうか。フィルター無し(図2a)でも高分解能領域では回折スポットがはっきり観察されるから、その効果は自明ではない。我々の測定結果から、S/N比にして少なくとも2倍の改善が3 Å分解能付近でも得られることが判明した。当然のことながら試料の厚さが増大した場合、非弾性散乱による悪影響はもっと深刻なものとなり、電子分光の効果はより顕著になる。このような場合、計算でバックグラウンドを除くことはより難しくなり回折点の強度のS/N比は極端に低下する。そのような場合でもフィルターを用いれば、氷が薄い場合と殆ど同一の結果が得られた。従って、電子分光法を電子線回折に適用することには二重のメリットがあると結論されよう。S/N比が著しく向上するのは勿論のことだが、氷の厚さの影響を受けにくくなるため試料の調製がずっと楽になる。

3. 氷包埋蛋白質結晶の電子分光電子顕微鏡像

それでは氷包埋試料の実像(電子顕微鏡像)に対しては、何か電子分光の利点があるだろうか。定量的な評価をしようとするところでも結晶を使わざるを得ない。実際、見え方だけを問題にしたなら、DCレベル(一定のバックグラウンド)を差し引くだけでも見えないものが見えてくる。このことは、ビデオカメラを利用した光学顕微鏡観察ではよく知られていることだし、電子顕微鏡像でも数値化してし

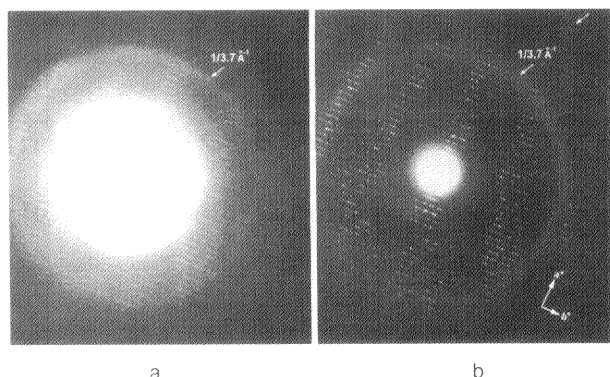


図2 氷に包埋された蛋白質結晶の電子分光電子線回折。

(a) 電子線回折にすべての電子が寄与する場合。(b) ゼロロス電子(エネルギー損失<10eV)のみが寄与する場合。二つの電子線回折パターンは同一の領域からこの順で連続的に撮影し、一枚のイメージングプレートに記録したもの。試料はカタラーゼのごく薄い板状三次元結晶[2]。結晶の対称性は $P2_12_12_1$ 、単位胞の大きさは $a=68\text{ Å}$ 、 $b=170\text{ Å}$ 、 $c=185\text{ Å}$ である。試料は液体エタンで急速凍結し、ガラス状の水に包埋したものをガタン626クライオホルダーに載せ、～170℃で観察した。電子顕微鏡は日立EF1000を加速電圧125KVで使用。(a)に示すようにフィルターが無い場合は分解能7 Å付近までは、バックグラウンドの方が信号よりも強い。しかし、エネルギーフィルターを通すと(b)に示すように何も処理しなくても3 Å分解能を越えるスポットまで明瞭に観察される。特に、対数表示した場合には一次のスポットから観察できる。1/3.7 Å⁻¹と1/2.14 Å⁻¹の同心円はガラス状の水の回折によるものである。イメージングプレートは最高感度で読みだした。

まえば簡単に実証できる。そこで、我々は蛋白質結晶を用い、同じ視野をフィルター有り無しで2度続けて撮影することにした。記録は読み出し時の誤差を最低にするため、2つの写真を一枚のイメージングプレートにハーフサイズで記録した。数値化した像はバックグラウンド(先のDC成分)を差し引いた上でフーリエ変換を行った。これによって計算機上で回折パターンを得ることができたことになる。電子分光の効果は回折スポットのS/N比から定量的に評価できる。

しかしながら、電子分光の効果はデフォーカス量が小さいときには、画像処理などしなくても明らかである。図3(a, b)に示した写真は約5,000 Åのアンダーフォーカスで撮影したものである。このデフォーカス量は氷包埋試料としてはかなり小さい量である。実際、フィルター無しの像(図3a)では結晶が写っていることすらぱっと見には判らない。しかし、計算機による回折パターン(図4, -filter)からは結晶格子が写っていることは確かだし、写真を斜めにして左下隅から右上隅に見通すように見れば、結晶が写っていることは、納得できるはずである。一方、エネルギーフィルター有りの像(図3b)では、結晶格子は明瞭に写っているし、計算機による回折パターン(図4, +filter)は雑音の殆ど無いごくきれいなものである。デフォーカス量がもっと大きい場合には、フィルター無し(図3a)でも結晶格子はよく見える。しかし、例えば脂質二重膜の縁(図3cの矢印)のように、コントラストの低いものはフィルター有りの像でないと認識できない。一方、回折スポットの振幅の統計的処理からは、図3のデフォーカスの小さい場合で3.2倍、大きい場合で2.3倍S/N比が改善される

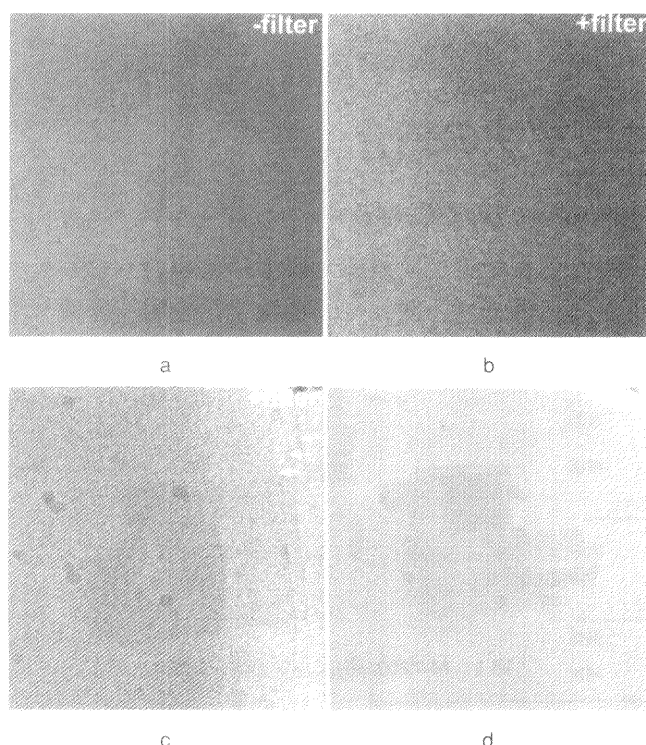


図3 氷に包埋された蛋白質結晶の電子分光顕微鏡像。

エネルギーフィルタリング無しの像 (a, d) とゼロロス電子のみによる像 (b, c)。(a, b) に示した像は $\sim 5,000 \text{ \AA}$ 、(c, d) は $\sim 22,000 \text{ \AA}$ アンダーフォーカスしたもの。試料は筋小胞体カルシウムポンプ (分子量110Kの膜蛋白質) の薄い三次元結晶 [3] を急速凍結しガラス状の氷に包埋したもの [5]。この結晶は脂質二重膜中に組み込まれた蛋白質がつくる二次元結晶がさらに $\sim 164 \text{ \AA}$ 間隔で積層したもの。脂質二重膜の縁がゼロロス像では見える (cの矢印)。斜めおよそ45° (左下から右上) に走っている縞模様は84 $\text{\AA}$ 間隔であり、結晶の格子に対応している。(a, b), (c, d) の組はこの順に新開発のロードスシステムを用い、同一のイメージングプレートにハーフサイズで記録した。倍率は4万倍、他の条件は図2の場合と同一。どの顕微鏡像もバックグラウンドを差し引いた後で同じコントラストでプリントしてある。

事が判った。

氷に包埋した蛋白質を直接ネガで見たかったら、相当大きな ($> 1 \mu\text{m}$) デフォーカスが必要だとされてきた (というか経験的にそうであった)。このことは無染色試料では振幅コントラストが殆ど無いために、試料の概形を決める低空間周波数領域でコントラスト伝達函数がごく小さい値をとる [4] ことの反映と考えられてきた。ここでの実験結果から、大きなデフォーカス量が必要だったのは氷による非弾性散乱が大量の雑音を発生していたためであることがはっきりした。信号が弱くても、雑音がより少なければ、信号は検出できるはずなのである。生物試料による散乱は弱い (つまり信号は小さい) のであるから、電子分光が保証する低雑音性は定量的な仕事にとって極めて重要であるに違いない。

4. 結論

我々が行った実験では、蛋白質結晶の電子顕微鏡像の分解能はフィルター有りでも20 $\text{\AA}$ を大きく越えることはなかった。結晶それ自体は電子線回折から判るように、遥かに良い規則性をもっているのだが。しかし、高分解能の電子顕微鏡像を得ることは、高分解能の電子線回折パターンを

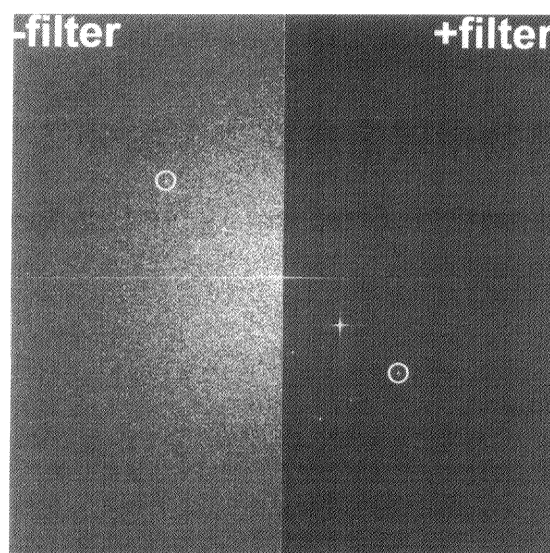


図4 電子分光電子顕微鏡像のフーリエ変換パターン。

+filter, -filterはそれぞれ図3(a), 3(b)に対応。この結晶はC2の対称性を持ち、ここで見えている格子の格子定数は $168 \text{ \AA} \times 56 \text{ \AA}$ [3]。フィルタの有無によるバックグラウンドのレベルの違いに注意。中心点 (フーリエ変換像の原点) に関し、スポットは対称の位置に出る。対応するスポットの一つを丸で囲んである。

得ることよりずっと難しいので、何が原因であったかを突き止めることはできなかった。何はともあれ、電子分光電子顕微鏡が大変な潜在能力を有していることは、ここに記した結果だけからも理解していただけたことと思う。特に、単分子解析や電子線回折では目覚ましい成果を直ちに期待できる。しかしながら、蛋白質の本格的な構造解析のためにはEF-1000では若干物足りない。是非とも200KVの電界放出型電子顕微鏡に積んで欲しい。実際、日立の計測器事業部ではHF-2000にエネルギーフィルターを組み込む仕事が進んでおり、一年以内には試用できるようになると思われる。大いに期待しているところである。なお本稿は [6] に発表したものを翻訳、加筆したものである。

参考文献

- 1) S. Taya, Y. Taniguchi, E. Nakazawa and J. Uskura: Hitachi Instrument News, 29th EM edition 18-23 (1996).
- 2) D.L. Dorset and D.F. Parsons: Acta Cryst. **A31**, 210-215 (1975).
- 3) D.L. Stokes and N.M. Green: J. Mol. Biol. **213**, 529-538 (1990).
- 4) C. Toyoshima and N. Unwin: Ultramicroscopy **25**, 279-292 (1988).
- 5) C. Toyoshima: Ultramicroscopy **30**, 439-444 (1989).
- 6) C. Toyoshima, H. Ogawa and K. Tani: Hitachi Instrument News, 33rd EM edition 3-7 (1998).

報 文

農産物中残留農薬の多成分スクリーニング法の紹介

Multi-pesticide Screening Method for Agricultural products by GC/MS

横倉 武文* 河原井 雅子* 雫石 賢一*
谷川 健一** 照井 香織** 中川 勝博**

(平成10年7月7日 受理)

1. はじめに

食品中に残留する農薬による健康危害を防止するため、厚生省では従来より農産物ごとに残留する農薬の量の許容限度を定める残留農薬基準の設定を進めており、1992年10月に従来より残留基準値が設定されていた26農薬（53農産物）に加えて、34の農薬が追加されて以来、順次、食品衛生法の改正が行われ、1997年9月1日に161農薬について約130の農産物ごとに約8,000の基準が設定された。現在、世界中で使用されている農薬は約700種類、国内で登録されている農薬は約300種類あるといわれており、今後、2000年までに、少なくとも200の農薬についての基準策定が当面の目標とされている。一方、食の安全性に関しては環境ホルモンの問題等もあって、消費者の関心と不安は急速に高まっており、特に「野菜や果実中の農薬の残留」、「食品添加物の安全性」に不安を感じ、その理由として「情報が少ない」、「自分の知識不足」等の報告^{1) 2)}がある。厚生省からは1996年秋に初めて輸入食品も含め残留農薬の実態調査結果（1991～1994年）が公表され、それによると農薬の検出率は0.77%、基準値を超える件数（検査件数：171, 021件）は0.02%であり、1995年度（検査件数：254, 857件）もほぼ同様の傾向である。

農産物中の残留農薬の分析法については、非常に複雑なマトリックス中の極微量な農薬を精度良く測定する必要があることから、公定法では、原則として一農薬に対して一つの測定法（各個分析法）が採用されており、161の農薬に対して86種類の試験法が定められている。このような現状から実態調査や監視業務の効率化のために、多種類の農産物に適用できる簡便なスクリーニング法の開発が望まれている。1994年度に残留農薬迅速分析法開発検討委員会（厚生省食品化学科）が発足し、誘導体処理をせずにGCで分析することが可能な農薬およびポストカラムHPLCで分析可能なN-メチルカーバメイト系農薬を対象に迅速分析法の開発に着手し、1997年4月にその方法が通達された。また各都道府県でも独自にスクリーニング法の開発を進めてきており、これまでいくつかの方法が報告されている^{3) 4)}。

そこで、高感度でマススペクトルの取得が可能なM-7200A形ガスクロマトグラフ質量分析計（図1）を農産物中の残留農薬のスクリーニングに適用したので報告する。

2. 試料の前処理

農産物中からの農薬の抽出にはアセトン、アセトニトリルや酢酸エチルなどの有機溶媒が使用されることが多い

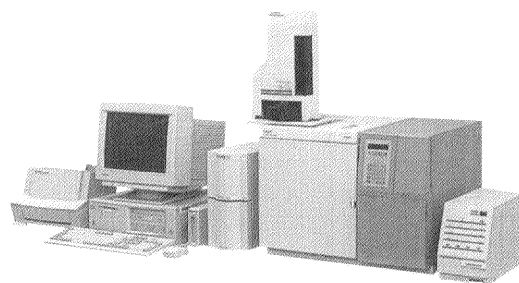


図1 M-7200A形GC/3DQMSシステム

が、同時に色素や脂肪などの夾雑成分も抽出されるため、GC/MSによる残留農薬分析においては、これらの夾雑物の効率的な除去が重要な課題になっており、従来から下記のようないくつかの方法が提案されている。

1) 凝固剤法：抽出液中の色素や脂肪を沈殿させて除去。凝固剤としては酢酸鉛、塩化アンモニウムとりん酸および硫酸亜鉛とホウ砂などが用いられている。

2) カラムクロマトグラフィー：C₁₈、イオン交換、シリカゲル、フロリジル、アルミナなどを充填したカラムを単独で、あるいは組み合わせて用い、農薬との吸着性の差を利用して夾雑成分を除去。

代表的な方法として、Luke II法⁵⁾がある。

3) ゲル浸透クロマトグラフィー：色素や脂肪の大部分は農薬の分子量（500程度）よりも大きいことを利用して、農薬と夾雑成分を分離^{6) 7)}。

単純な手法で高分子物質の除去効率もよく、自動化（装置化）が可能な優れた方法であるが、1)、2)の方法に比べ有機溶媒の使用量が多いのが欠点である。

厚生省が提案しているのは2)と3)を組み合わせた方法（図2）であり、農薬を系統別に分け（表1）、N-メチルカーバメイト系農薬はHPLCの特異的検出器を使用して、スクリーニングする方法である。

3. 実験方法

1) 対象農産物：ほうれん草

2) 前処理：図2に示した方法で、2、4および5の工程を省略、他は同条件

3) 標準試料：表1に示した農薬40成分

4) ガスクロマトグラフ質量分析計：日立M-7200A形GC/3DQMSシステム

測定条件

カラム DB-5MS 30m x 0.25mm x 0.25 μm
50℃(1min)-20℃/min-150℃-10℃/min-280℃(12min)

Inj. Temp. 250℃

* 日立計測エンジニアリング（株）テクノロジーサーチセンタ

** （株）日立製作所 計測器事業部

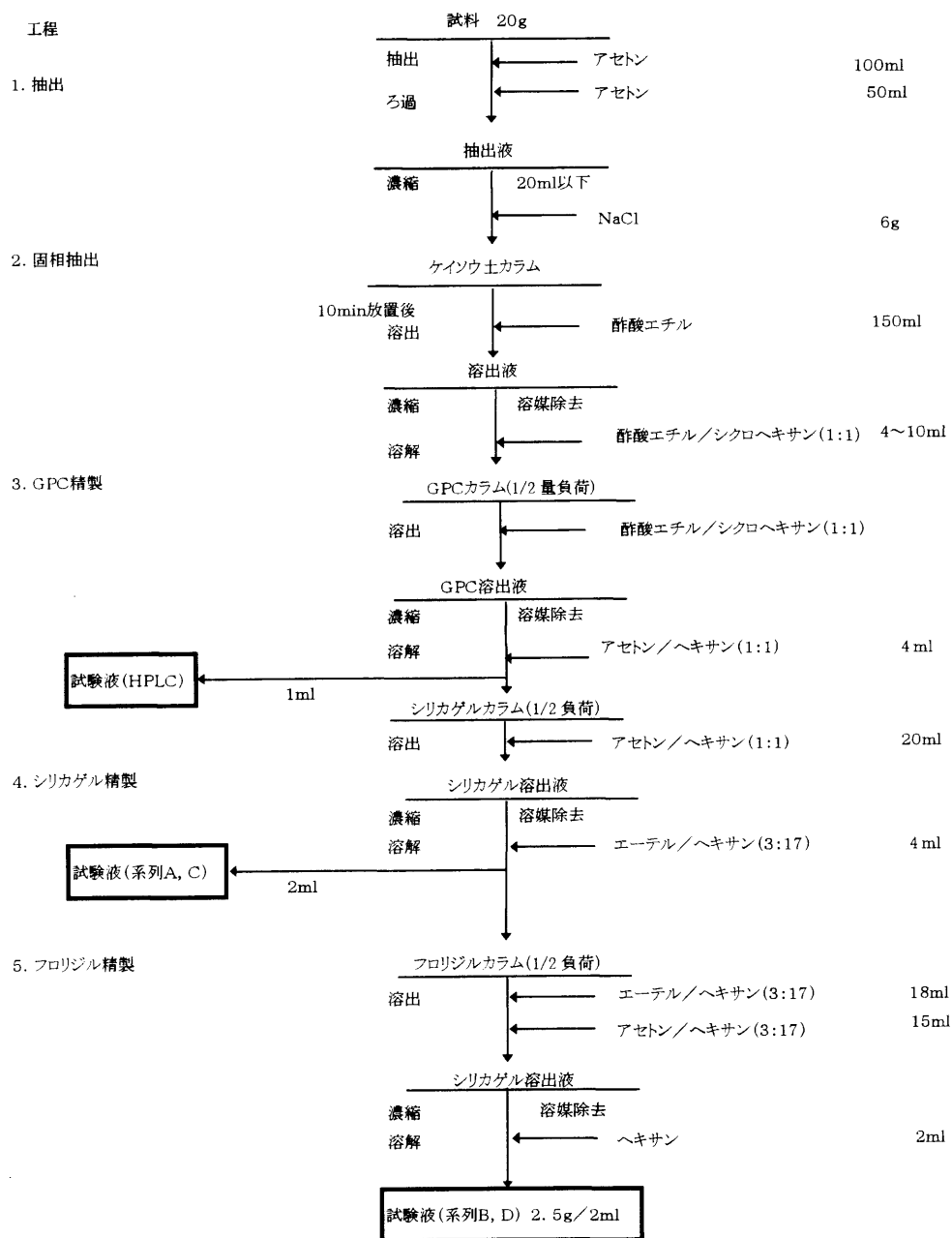


図2 残留農薬迅速分析法のフローシート

イオン化 : EI

Scan Range : 35~550amu

4. 結果

1) 試料の前処理：多成分農薬のスクリーニングに適するように、図2に示した方法よりもさらに簡便な方法で行った結果、ほうれん草の場合は図3に示すようなクロマトグラムが得られ、農薬の定性・定量を妨害するような高濃度の夾雑成分は出現せず、簡便で有効な前処理法である。

2) ガスクロマトグラフ分離条件：微極性の汎用性の高いカラムを用いた結果、BHCとエトリムホスの分離が不十分ではあるが、他の農薬に関しては良好な分離が得られた。高沸点成分であるピレスロイド系の農薬も良好なクロマトグラムを示しており、残留農薬分析に適したシステムである。また、トラロメトリンはGC分析では熱分解し、デル

タメトリンとして検出されることが知られているが、GC/MS分析でも同様の結果であった。

3) 検出下限：標準添加を1, 0.1および0.01ppmの濃度で行った結果を表1に示した。ほとんどの農薬で、数pg以下で検出が可能である。ピレスロイド系農薬の10pgのマスクロマトグラムを図4に示した。感度の悪い農薬としては、DCIP、DEP、エトリムホスなどがある。DCIPは蒸気圧が低く通常の抽出工程が行えないため、ディーン・スターク蒸留装置を用いなければならず、各個分析法で対応する必要がある。また、DEPはGCの注入口で熱分解、エトリムホスはBHCとの分離が不十分であるためGCの条件を変更する必要がある。

4) 添加回収率：標準溶液1ppmを添加した場合の回収率

表1 標準添加農薬のリテンションタイムとターゲットイオン

成分名	Rt(min)	MW	ターゲットイオン	検出下限	回収率	RN	系列
1 DCIP	4.35	171	121	25	84	108-80-1	E
2 DDVP	5.93	220	185	1	123	62-73-7	A
3 Acephate	7.58	183	136	5	88	30560-19-1	A
4 DEP	7.87	257	109	10	86	52-68-6	A
5 Fenobucarb(BPMC)	9.29	207	121	0.2	81	3766-81-2	C
6 Chloropropham(Chloro IPC)	9.83	213	213	2.3	76	101-21-3	C
7 BHC(1)	10.28	290	183	1.4	94	319-84-6	D
8 Thiometon	10.45	246	88	2.4	81	640-15-3	A
9 BHC(2)	10.78	290	183	1.2	108	319-85-7	D
10 BHC(3)	10.94	290	183	1.2	100	58-89-9	D
11 BHC(4)	11.49	290	183	1.8	119	319-86-8	D
12 Etrinfos	11.51	292	292	6.8	93	38260-54-7	A
13 Metribuzin	12.12	214	198	0.7	73	21087-64-9	C
14 Tolclofos-methyl	12.27	301	265	0.7	94	57018-04-9	A
15 Pirimiphos-methyl	12.71	305	290	0.4	92	29232-93-7	A
16 Dichlofluanid	12.91	333	224	3.1	105	1085-98-9	D
17 Malathion	12.96	330	173	1	100	121-75-5	A
18 Chlorpyrifos	13.08	350	314	1.3	92	2921-88-2	A
19 Diethofencarb	13.14	267	267	2.5	80	871730-20-9	C
20 Pendimethalin	13.74	281	252	1	93	40487-42-1	C
21 Phenthoate(PAP)	14.07	320	274	0.6	79	2597-03-7	A
22 Triflumizole	14.21	345	218	0.8	78	68694-11-1	E
23 Flutolanil	14.86	323	281	0.5	89	106917-52-6	C
24 Isoxathion	15.51	313	177	2	99	18854-01-8	A
25 o,p-DDT	16.01	354	235	0.4	100	-	D
26 Mepronil	16.24	269	269	1.9	104	55814-41-0	C
27 Lenacil	16.63	234	153	1.9	142	2164-08-1	C
28 p,p-DDT	16.71	354	235	0.7	85	50-29-3	D
29 Iprodion	17.49	330	314	0.8	122	36734-19-7	C
30 Cyhalothrin(1)	18.51	449	197	1.1	109	68085-85-8	B
31 Cyhalothrin(2)	18.72	449	197	1.02	102	68085-85-8	B
32 tans-Permethrin	19.77	391	183	0.9	95	61940-77-7	B
33 Cypermethrin(1)	20.74	416	181	5.1	102	52315-07-8	B
34 Cypermethrin(2)	20.91	416	181		128	52315-07-8	B
35 Flucythrinate(1)	21.01	451	199	1	117	70124-77-5	B
36 Flucythrinate(2)	21.33	451	199		139	70124-77-5	B
37 Fenvalerate(1)	22.23	419	225	2	112	51630-58-1	B
38 Fenvalerate(2)	22.64	419	225		104	51630-58-1	B
39 Deltamethrin	23.8	505	253	4	114	52918-63-5	B
40 Tralomethrin	23.8	665	253	4	114	66841-25-6	B

検出下限: pg, S/n=3、異性体が含まれる成分は合計値で算出

回収率: %, 1ppm 標準添加

系列 A:有機リン系農薬、B:ピレスロイド系農薬、C:有機窒素系農薬、D:有機塩素系農薬、E:その他の農薬

注: ピレスロイド系農薬の標準試料(32、39、40以外)は、cis、transの混合物

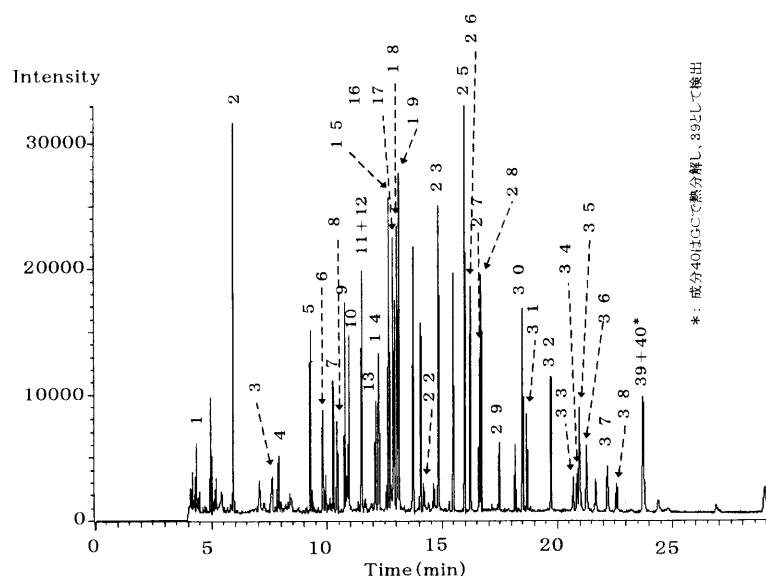


図3 標準添加法での農薬40成分 (1 ppm) のTIC

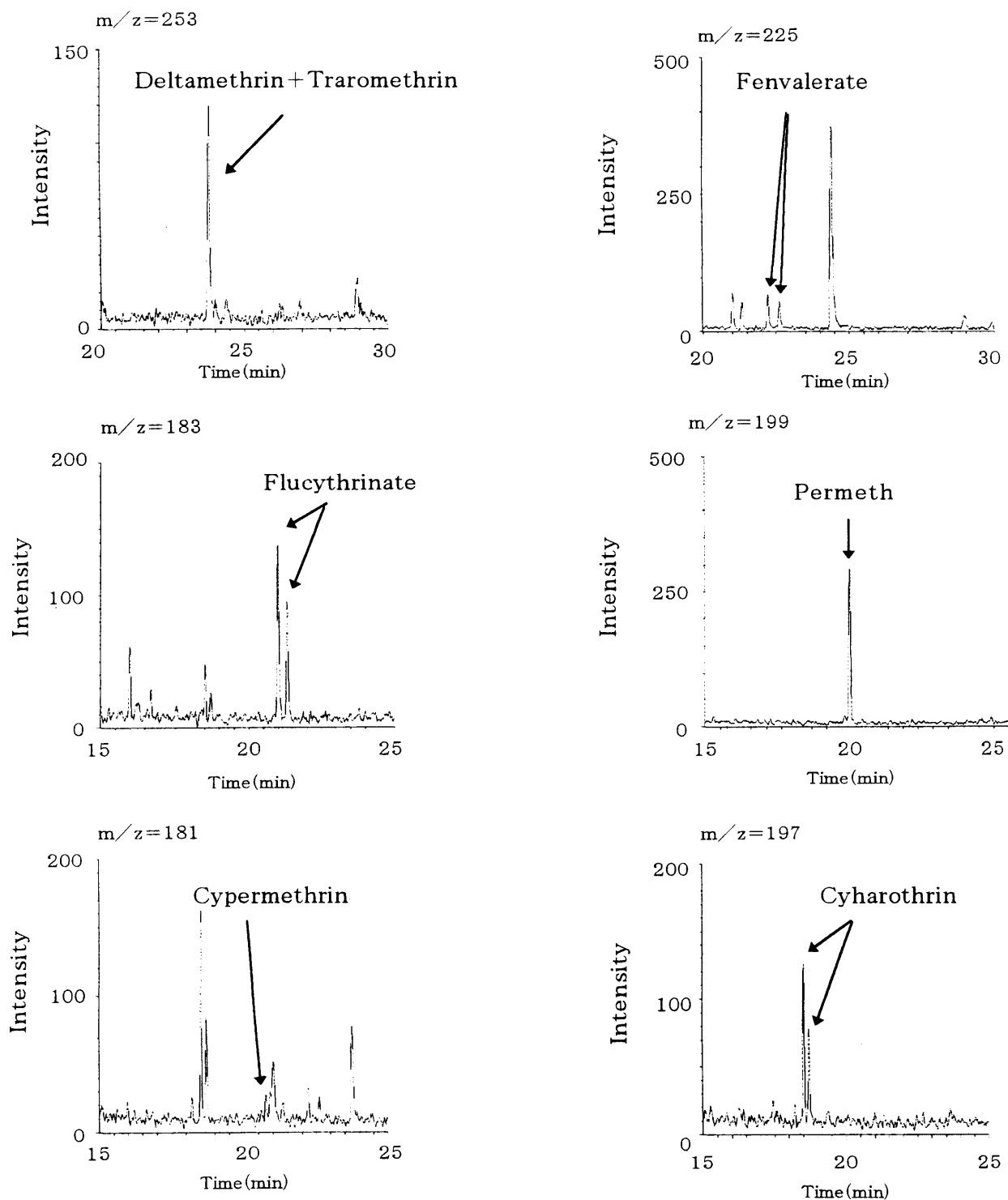
を表1に示した。レナシル、DDVP、およびピレスロイド系農薬の一部で高い回収率になっているが、その他の農薬については、80～110%の回収率が得られている。

5) ライブラリー検索：図5にピレスロイド系農薬1 ngのマスペクトルを示した。検出下限の数倍（定量下限）程度の濃度でのライブラリー検索の結果を図6に示した。10pgのフェンバレートで、若干バックグラウンドの影響はうけているが、十分定性可能なスペクトルが得られている。

5. まとめ

溶媒抽出とGPCによる精製のみの簡便な前処理で、M-7200A形GC/3 DQMSにより、定量下限値程度の低濃度でも十分定性でき、残留農薬の多成分スクリーニングが可能である。

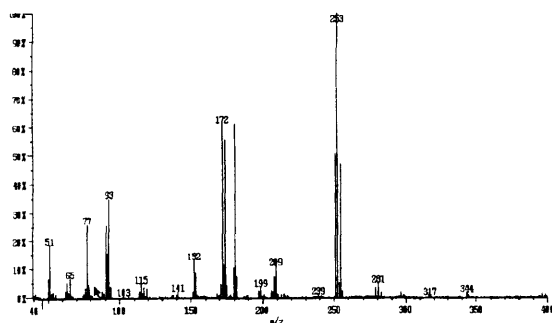
今後、増加する規制農薬に対応し、さらに適正なカラムの選択、分離条件の検討を加え、より信頼性の高いシステムの構築を図る。



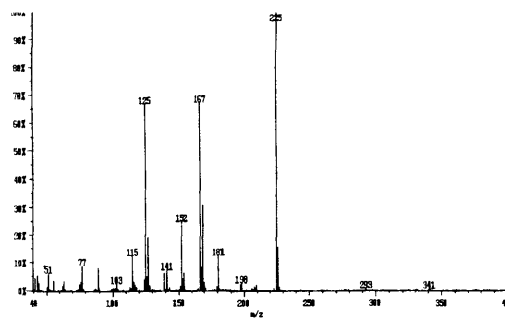
注) 二成分検出されている農薬はCis, transの混合物

図4 ピレスロイド系農薬 (10pg) のマスペクトログラム

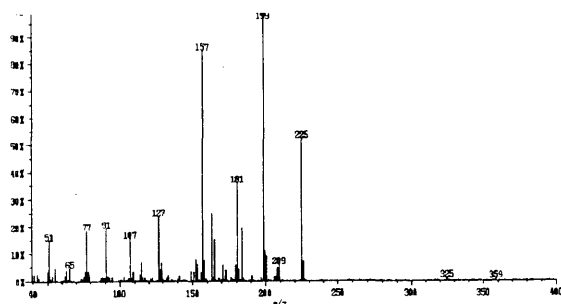
Deltamethrin, Tralomethrin



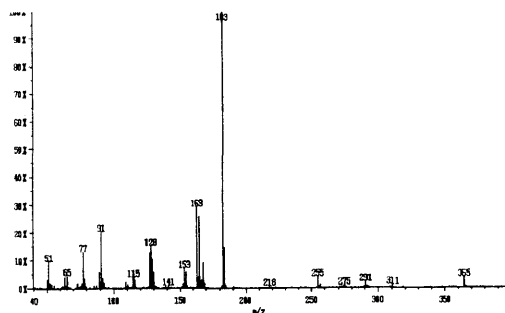
Fenvalerate



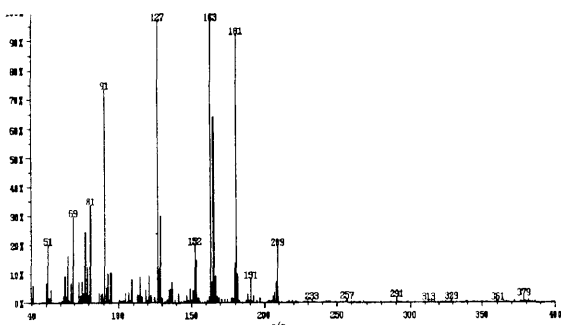
Flucytrinate



Permethrin



Cypermethrin



Cyhalothrin

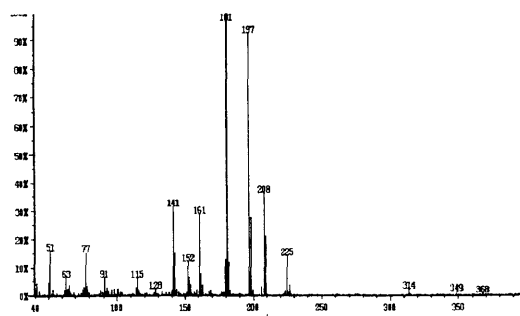


図5 ピレスロイド系農薬 (1 ng) のマススペクトル

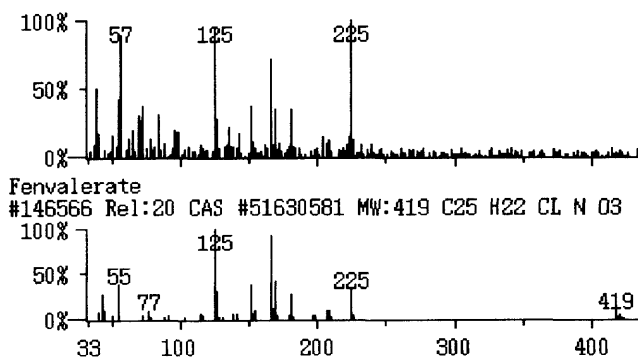
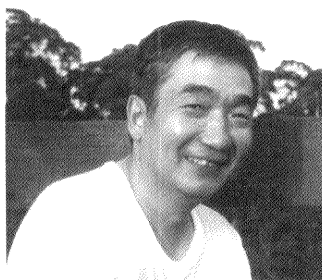


図6 ライブラリー検索結果

参考文献

- 1) コープ生活文化研究所 (コープさっぽろ) : 「健康と食の安全に関する調査」結果 (1996. 10.)
- 2) 札幌市市政モニター調査 (1996. 10. 実施: 北海道新聞 1997. 1. より)
- 3) M. Ogawa et al., 食衛誌, 38,48(1997)
- 4) Y. Akiyama et al., 食衛誌, 38,363(1997)
- 5) T. Cairns et al., Rapid Commun. Mass Spectrometry, 7,1070(1993)
- 6) K. Adachi et al., J. Assoc. Off. Anal Chem., 67,798(1983)
- 7) K. Adachi et al., J. Assoc. Off. Anal Chem., 70,460(1987)

ラウンジ



熱帯雨林の林冠生物研究に“夢”をかけるⅡ

Dreaming on Canopy in Tropical Rain Forest in Borneo

山岡 亮平*

友人で共同研究者でもあった京大大学生態学研究センター熱帯生態学研究部門教授、故井上民二君は昨年の9月6日に、ボルネオ島マレーシア、サラワク州ミリ近郊ランビル山付近で飛行機の墜落事故にあい49歳の生涯を閉じた。

彼とはそのちょうど2週間前に、共通の友人の栄転祝いをやり、アリとハチとはどちらが“エライ”か論議で大いに盛り上がった。ちなみに彼はハチ屋さんで、私はアリ屋さんである。

今回は私がなぜ、彼の言を借りれば、“地球上で唯一生物進化上の1億年の歴史が残っており、これからの人類の生き残りのための手本となるであろう生物達のさまざまな共生の姿が観察出来る”、「熱帯雨林」における生物間相互作用の化学的研究にのめり込んでいったのか。について述べてみたいと思う。

話は9年ほど前にさかのぼる。井上君に「山岡さん、熱帯雨林はおもしろいので、あんたみたいなケミ屋さんでもリラックスして仕事が出来るところを作ることから、出来たら来てくれるか。」と聞かれ、「ああ、いいよ。おもしろそうだから、出来たらいつでもいったるで。」と答えたが、正直なところ“ほんまにそんなもの出来るんかいな”と軽く考えていた。

彼の言によると、「テントや掘立て小屋に寝泊まりし、粗食に耐え、蚊と戦いながらやるような熱帯雨林研究の時代は終わった。これからは実験着を着たバケ屋さんやDNA屋さんでも現地で研究が出来るような、しっかりしたインフラを整えなければ世界と勝負が出来ない。」とのことであった。これは彼が10年程前に、パナマのパロコロラド島にある有名なアメリカのスミソニアン熱帯研究所で過ごした一年間で悟ったものらしい。

ところが5年前に突然「ボルネオ島にあるマレーシアサラワク州のランビル国立公園にフィールドラボを作ったので、一回見に来てくれないか。往復はビジネスでうや。」の甘い言葉に誘われて熱帯雨林に足を踏み入れた。

行ってみるとおどろいた。現地の人たちがジャパンエンバシーと呼んでいる、木造ではあるが2階建の立派なフィールドラボ（宿泊棟兼研究棟）が建っているではないか。管理人もおり、宿泊室2、実験室2、植物標本庫、台所、食堂もある。そこに二人で一週間ほど泊まって彼の案内で8ヘクタールの調査区域を見て回った。

そこから15歩程歩くと熱帯雨林に足を踏み入れたことになるほどアクセスにめぐまれている。さらに噂には聞いていたが森に入ってびっくりした。砂利を敷いた幅1.5メートルほどの道が、山裾から尾根筋を伝って売り物の“

第一タワー”まで伸びており、私でも自由に歩き回れる今はここまでは不可能だが、私のフィールドラボとそこでの生活についての理想像はこうなる。午前中、学生を伴いジャングルに入っておもしろい生物間相互作用を見つけ、十二分にその様子を観察した後、もし可能ならばラボに持ち帰る。

シャワーを浴び、広いダイニングでみんなと今日の収穫についてワイワイ言いながら、昼食の冷えたソーメンをすする。冷房の効いた個室に帰り、一時間ほどのお昼寝の後、冷房完備のケミラボに入り、ただちに分析を開始する。ラボ内にはGC/MS、LCなど基本的な分析機器は全てそろっている。“アイデアは熱い内に試せ”“知りたい時が研究が進む時”なのである。

分析をするのはもちろん自分のサンプルだけでなく、みんなが持ちかえて来た、植物よりの昆虫に対する報酬である花蜜や花粉や花の香りなどもある。

夕食は2階の広いバルコニーから川の流れや夕暮れの空を眺め、冷えたビールを飲みながらみんなで楽しく食べる。夕食後のバラエティーに富んだフリーデスカッションから、新しいアイデアが次々に飛び出してくる。

話が一段落したところで、必要があればラボへ引き返す。なければ熱いシャワーを浴びて個室へ引き返し、データー整理、読書、就寝で一日をおえる。

現在彼の熱帯雨林の林冠研究用のインフラ整備構想の一貫として、文部省の新プログラムと呼ばれる大型科学研究費「地球環境攪乱下における生物多様性の保全及び生命情報の維持管理に関する総合的基礎研究」より予算を得て、サラワク州の州都クチンの近くクバ国立公園内に彼や私の理想に近い研究区画を整備し、宿泊棟とラボを建てようとしている。

クバ国立公園はクチンから一時間の距離にあり、オランウータンのリハビリセンターも出来る予定である。2、3年後には皆さんに来てもらっても十分に“熱帯雨林”を見もらえるものになっているはずである。



* 京都王芸繊維大学繊維学部 応用生物学科 生物有機化学分野
助教授 農学博士（京都大学）

解 説

アミノ酸代謝異常スクリーニングシステム

Screening System of Inborn errors of Amino acid Metabolism for Neonate

三浦順吉*

平田源蔵*

高木正徳*

石川昌子**

(平成10年8月4日 受理)

1. はじめに

新生児マススクリーニングは1977年から国家的事業として開始された。最初はフェニルアラニンなど4種のアミノ酸代謝異常症とガラクトース血症が対象となっていたが、その後、クレチン症、副腎過形成症、および神経芽細胞種が加えられ、さらに、4種のアミノ酸のうちヒスチジンが1992年に打ち切られて、現在に至っている。アミノ酸代謝異常スクリーニングで対象となっているのはフェニルケトン尿症(フェニルアラニン代謝酵素の欠損により血中フェニルアラニンが異常に高くなる、以下同様)、楓糖尿症(血中ロイシン、イソロイシン)、ホモシスチン尿症(血中メチオニン)である。それぞれ一次検査ではガスリーのBIA(bacterial inhibition assay: 枯草菌の成長の有無で判断法が、二次検査ではアミノ酸分析計(HPLC法)などが採用されている。最近では、ガスリーのBIA法の欠点(肉眼判定、非定量性など)を改善したマイクロプレート法への移行も見られるが、マイクロプレート法は複数のアミノ酸を同時分析できない、ロイシンを単独で定量することができずバリンおよびイソロイシンを加えたアミノ酸となる、といった難点もある。

これらのことからHPLC法による分析が一次スクリーニングでも注目されてきており、いくつかの施設では一次スクリーニングをHPLC法にすべく検討段階に入っている¹⁾。最近の日本での新生児の出生数は年間約120~130万人であり一次スクリーニングからHPLC法で行うとすれば、相当数のHPLCが必要となる。また、このシステムには、①多数の検体を処理するため迅速な分析法、②検査施設で一般的に使用されているマイクロプレートの採用、③微量検体へ対応するための高感度検出、といった要素が必要となる。今回、筆者らはこのアミノ酸代謝異常スクリーニング用にL-7600形日立臨床用液体クロマトグラフを開発したので紹介する。

2. 本システムの特長

(1) イオン交換カラムの採用

溶離液にイオンペア剤を使用する逆相カラムの場合、分析時間は短いものの溶出成分の保持時間の日差変動が大きくなることやカラム寿命が比較的短いという欠点がある。そのため、本システムでは安定した分析結果が得られ、かつ、カラム寿命の長いイオン交換カラムを採用した。イオン交換カラムは、逆相カラムを使用した場合に比べてメチオニン付近の再現性が良くなるほかに溶離液に有機溶媒を

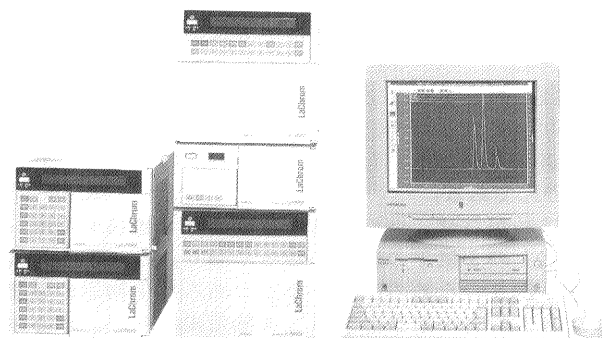


図1 アミノ酸代謝異常スクリーニングシステム概観

使用しないため、廃液処理は中和だけですむという利点もある。一方、逆相カラムでは有機溶媒を使用するため廃液処理には、有機溶媒処理施設を準備するか、専門の処理業者に依頼する必要がある。本システムでは、溶離液、反応液はメーカーから購入できるため調製の煩わしさから解放される。

(2) マイクロプレート用ラックを使用

オートサンプラ上にマイクロプレートがそのままセットできる。マイクロプレート上に血液ろ紙をセットし、抽出等の前処理から分析までの作業を一貫してマイクロプレート上で行うことができるので作業効率の向上が図れる。また、本システムではマイクロプレートが2枚までセットできることから2日間連続して分析することも可能である。この場合、分析が長時間になるためマイクロプレートの冷却が必要になる。本システムではマイクロプレートがそのまま冷却できるため試料溶媒蒸発や試料の分解を抑えることができる。さらに、内標準物質としてグリシルノルバリンを採用し、長時間分析による試料の濃縮や前処理時における誤差の補正も可能としている。

3. システムの概要

本システムは、マイクロプレートが2枚セット可能で、2日間連続して測定できるシステム1とマイクロプレートは1枚のみのシステム2とがある。システム1は多量にサンプルを処理する場合に有効で、システムの制御とデータ処理がPC1台で最大4システムまで可能なD-7000形マルチシステムマネージャを採用している。システム2は、少量のサンプルを処理する場合のものでこのシステムの場合は、PC1台で1システムを制御する。本システムの概観を図1示す。

* (株)日立製作所 計測器事業部

** 日立計測エンジニアリング(株)

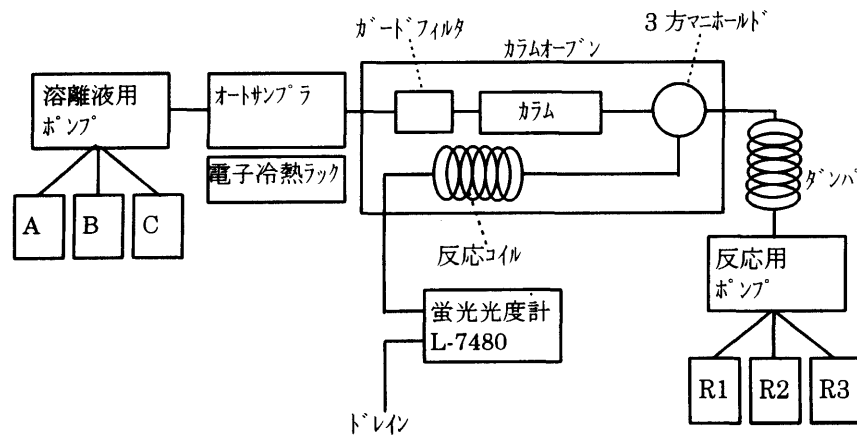


図2 流路図

なお、このデータ処理装置を使うと①報告用のレポートを自由な構成で作成できる、②試験成績の一覧表をサマリーレポートとして出力できる、③装置の適合性、動作情報の確認が一検体毎に可能、といったメリットがある。

4. 原理

本システムでは、分析目的成分のアミノ酸を高感度で測定するために、血中のアミノ酸をイオン交換カラムで各アミノ酸に単離後、オルトフタルアルデヒドと反応させて蛍光物質に誘導体化するOPAポストカラム誘導体化法を採用している。試薬の組成、濃度、反応温度等を検討することで1 pmolの高感度分析を可能にしている。

本システムの流路を図2に示す。動作は以下のようである。まず、マイクロプレートにセットした試料はオートサンブラから注入され、注入された試料は溶離液用ポンプか

らの溶離液Aによりイオン交換カラムへ送られる。カラムで分離された試料は、反応ポンプから送られるOPA試薬と反応し、蛍光物質に誘導体化され蛍光検出器で検出される。

5. 応用データ

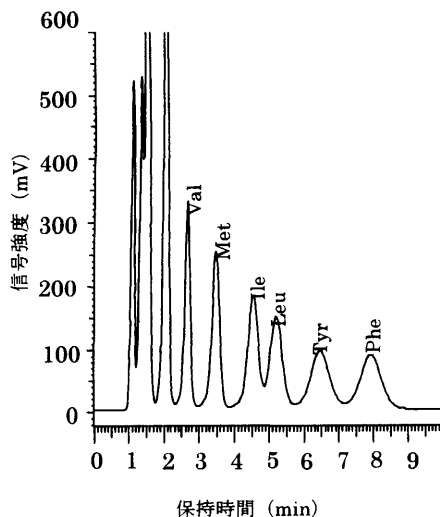
5.1 クロマトグラム

本システムにより得られた混合アミノ酸標準液のデータを図3に示す。このデータは内標準を含まない例であり15分/サイクルの分析ができる。

図4に内標準物質としてグリシルノルバリンを添加した時のクロマトグラムを示す。この場合は17分/サイクルの分析となる。

5.2 安定性

クロプレート2枚に標準試料（100pmol/10 μ l）を設置



標準試料濃度：100pmol/10 μ l

成分名	ng	mg/dl
Met	14.921	9.952
Leu	13.118	8.750
Phe	16.519	11.018

溶離液流量：0.6mL/min

反応液流量：0.6mL/min

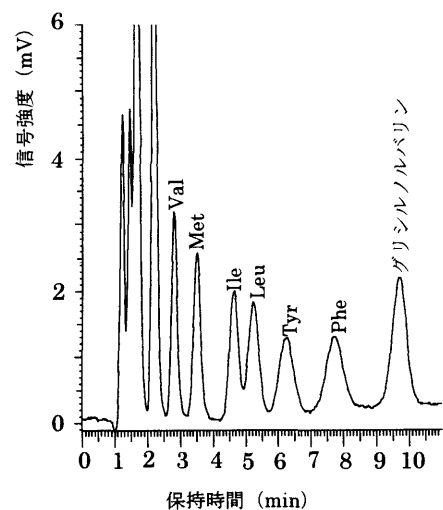
カラム：CCMpack Neonatal22
(4mmID $\times$ 60mmL)

カラム温度：62 $^{\circ}$ C

注 入 量：10 μ l

検出：Ex：340nm, Ex：450nm

図3 混合アミノ酸標準液のデータ



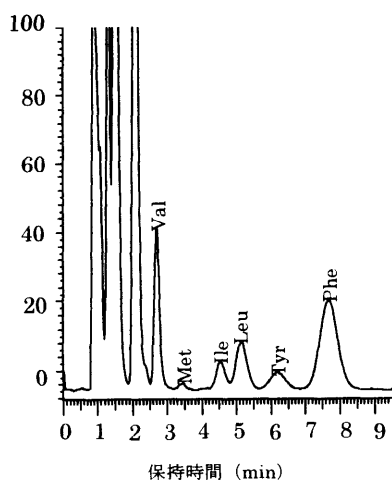
標準試料濃度：100pmol/10 μ l

内標準物質濃度：5pmol/10 μ l

成分名	pg	mg/dl
Met	149.21	0.0995
Leu	131.18	0.0875
Phe	165.19	0.1102

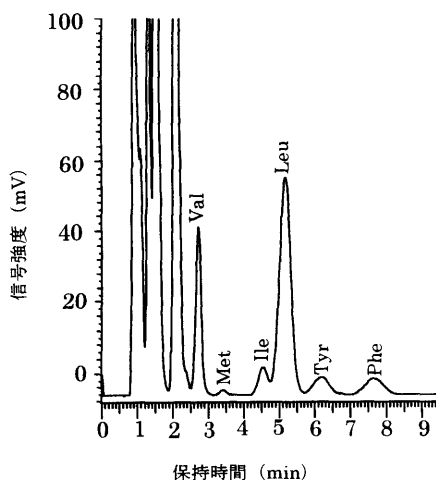
分析条件は
図3と同じ

図4 内標準物質を含む場合の分析例



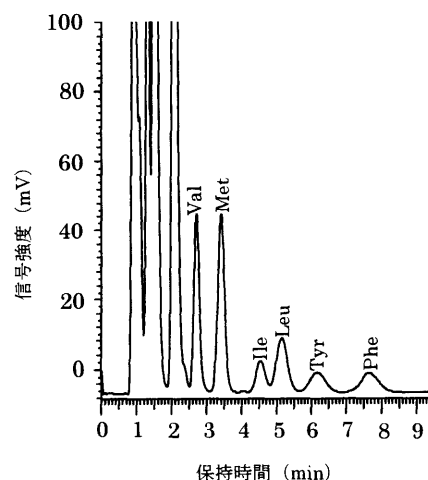
成分名	ng	mg/dl
Met	0.1669	0.111
Leu	1.7316	1.155
Phe	6.9072	4.607

(1) Pheがカットオフ値より高い場合の例
(フェニルケトン血症)



成分名	ng	mg/dl
Met	0.1550	0.103
Leu	7.8852	5.259
Phe	1.2602	0.841

(2) Leuがカットオフ値より高い場合の例
(楓糖尿症)



成分名	ng	mg/dl
Met	4.9427	3.296
Leu	1.9558	1.305
Phe	1.3814	0.921

(3) Metがカットオフ値より高い場合の例
(ホモチスチン血症)

図5 標準濾紙血の分析例 (このデータは、財団法人化学及血清療法研究所殿よりご提供いただきました)

表1 定量値の安定性

	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe
面積平均値	3651139	3962029	3828946	3815732	3578104	3849664
SD	34309	33103	34532	33243	34254	33375
RSD%	0.94	0.84	0.90	0.87	0.96	0.87

して192サンプルを連続分析し、定量値の安定性を調べた結果を表1に示す。

この結果により、連続分析時における経時変化(試料の蒸発、分解、測定装置の安定性)が小さく安定した結果が得られていることがわかる。

6. おわりに

日立アミノ酸代謝異常スクリーニングシステムについて紹介したが、どうしても分析時間の短いことを優先したい方には、今回紹介したイオン交換カラム以外に逆相カラムによる分析法も確立している。

現在、医薬品を初めとして、分析データの信頼性確保の

ために種々のガイドラインが施行されてきている。スクリーニングにおいても被験者の立場からは、同様の施策が必要でありHPLCを応用した本システムはこれにかなうものと考えられる。おわりに、本システムによるデータを提供いただいた財団法人化学及血清療法研究所 田崎隆二殿に対し感謝する次第である。

参考文献

- 1) 例えば、M. Shibata, K. Hattori, A. Abe, H. Takano :
日本マス・スクリーニング学会誌 第7巻, 2号
(1997年8月)

Topics

第54回電子顕微鏡学会 が開催されました。

5月13日(水)から15日(金)までの3日間、仙台国際センターにおいて第54回電子顕微鏡学会が開催されました。大学の先生方をはじめ約600名の内外

の電子顕微鏡技術者が一堂に会し、最新の技術について講演会・討論会が繰り広げられ、熱気に包まれた3日間となりました。併設された展示会には日立グループをはじめ、内外のメーカー合わせて24社が参加、日立ブースでは、(株)日立製作所計測器事業部をはじめ日立計測器サービス(株)等8社が22品目を出品しました。今回は話題のO-157の挙動を確認したアプリケーションデータ等を中心に広くユーザーサイ

ドに立った展示を展開、また、前処理関連の技術・装置を発表し、現場のユーザーの方からも大きな注目を集めました。

今回は特別に文部省の科学研究費に関わる方にもご来臨いただき、最近の電子顕微鏡関連技術がどのように貢献しているかについてご理解をいただきました。

次回は来年、名古屋で開催の予定です。
(君島 隆之 記)

新製品紹介

日立走査電子顕微鏡 S-3000Nおよび S-3000H

必要十分な機能を厳選，使いやすさを追求しました。

時流に乗ったパソコンでのSEM操作環境（Windows95）*から，複雑な機能を取り除き，シンプルなSEMとなっています。また，目的に応じてオプション機能を追加することにより，上位機種並みの応用性のある操作環境にすることが可能です。低真空観察モードを持つNタイプおよび高真空観察モード専用のHタイプを用意しました。

特 長

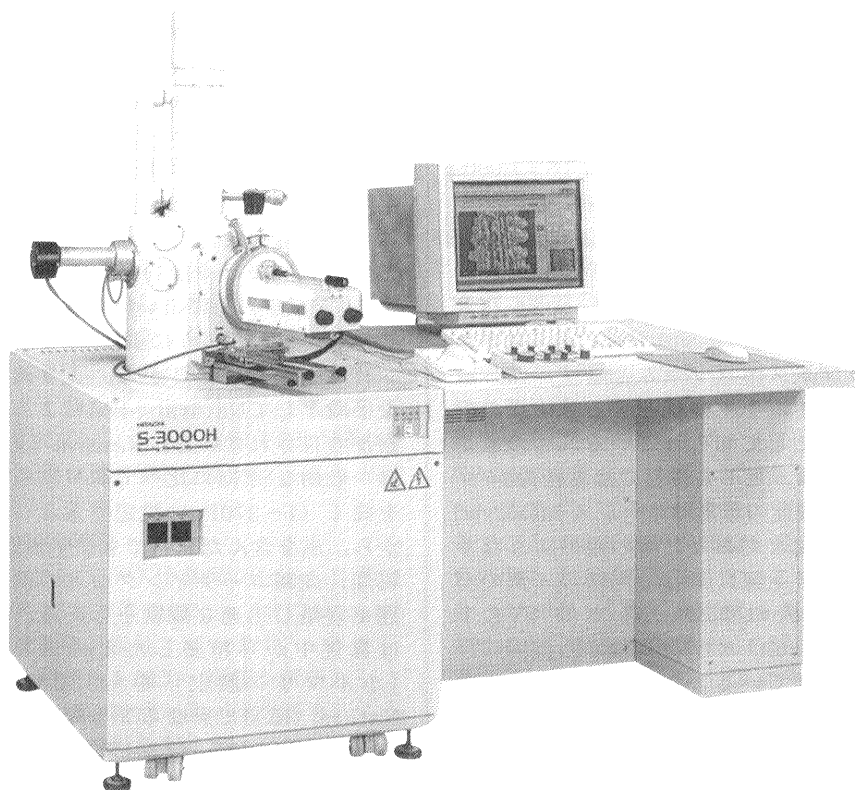
- ・ S-3500/S-4700シリーズの操作環境（GUI）を継承。
- ・ SEM観察の簡単さへの配慮を優先して開発しましたので必要十分な機能が厳選されております。
- ・ 観察ニーズに合わせた機能のグレードアップが可能。
- ・ EDXとのインテグレートが可能。
- ・ 観察用途に合わせ高真空観察モード専用のHタイプおよび低真空観察モードを持つNタイプを用意。
- ・ Nタイプには，新開発の半導体検出器を採用しました。

主な仕様

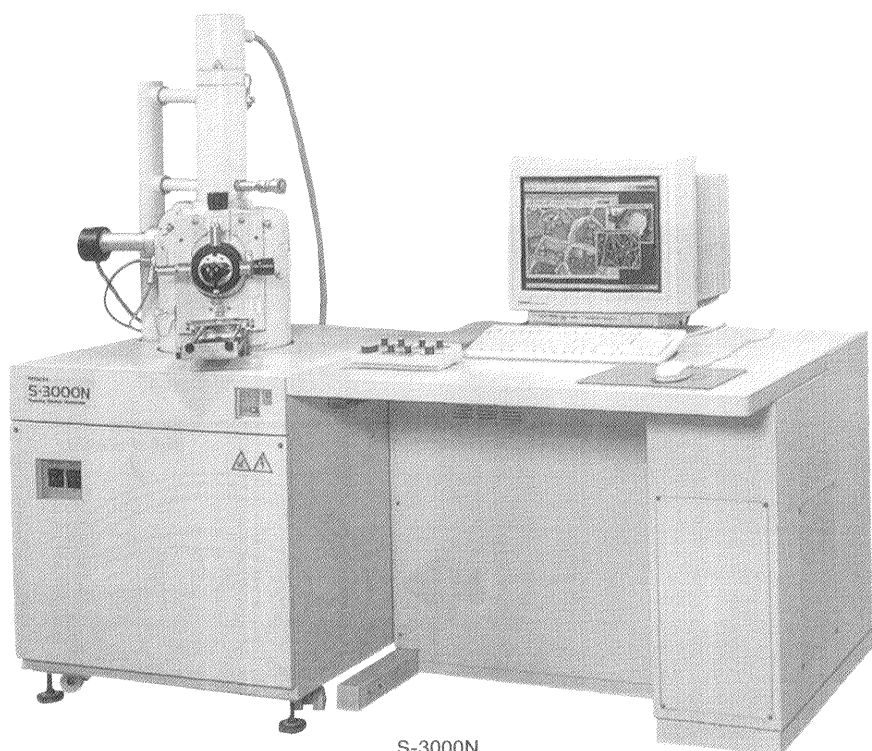
- ・ 分解能：3.5nm/5.0nm（高真空/低真空モード：Nタイプのみ）
- ・ 倍率：x15～x300k
- ・ 加速電圧：0.3～30kV
- ・ 画像データ：1280×960
- ・ 観察モニタ：1024×768画素PCモニタ
- ・ モーターステージ：5軸/2軸制御
- ・ PC：PC/AT互換機
- ・ OS：Windows95*

※Windows95[®]は，米国およびその他の国における，米国Microsoft Corpの登録商標です。

（飯田 一志 記）



S-3000H



S-3000N

Topics

Natural SEMがとらえた クリプトスポリジウム・ オーシスト!

クリプトスポリジウム・パルバム (*Cryptosporidium parvum*, 以下クリプトスポリジウムと略す) は、激しい下痢を主症状とする感染症の病原体として知られている。この原生動物は、ヒトの体外では直径約5ミクロン程度の球形のオーシスト(Oocyst)を形成しており、卵の殻のようなオーシスト壁によって内部の4個のパナナ状の虫体(スポロゾイト Sporozoite)が外的環境から強固に保護されている。したがって、オーシスト壁は塩素などの消毒剤に対しても耐性が高いことから、水や食品などを介して経口感染する可能性があ

り、国内・外において多くの集団感染事例が報告されてきた。

クリプトスポリジウムによる感染を未然に防ぐには、水道水などでオーシストの有無を迅速・確実に検出し適切な措置を行うことが求められる。そのためにはオーシスト壁および内部のスポロゾイトの存在を確認することが不可欠であるが、その手段として蛍光顕微鏡や微分干渉顕微鏡による観察法が主に用いられてきた。しかし、前述のように虫体が5ミクロン程度と小さいことから、より確実な手段としてNatural SEMによる観察が注目されている。Natural SEMは一般的なSEMに比べて試料室圧力を高く(1~270Pa)設定できることから、水を含んだ試料でも化学固定、乾燥、金属コーティングなどの前処理を省略し迅速な観察を行える。図は糞便中から精製したオーシスト(ホルマリン固定)をS-3500N型Natural SEMで異なる3方向から観察した例で、オーシスト壁および内部のパナナ状のスポロゾイトが明瞭

に観察されており、この原生動物がクリプトスポリジウム・オーシストであることが確認できる。

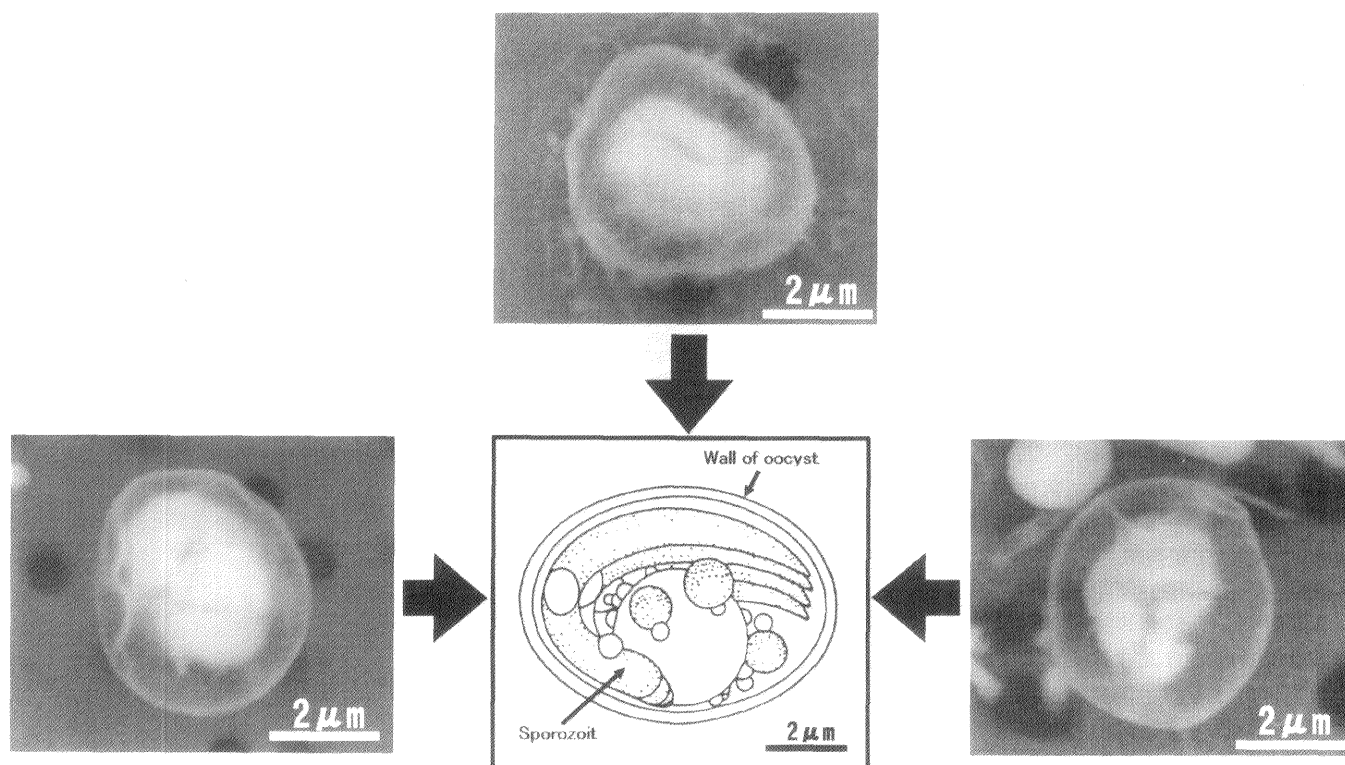
(鈴木猛夫, 西村雅子, 山田満彦
日立エンジニアリング(株) 記)

試料ご提供:

東京都衛生研究所 村田以和夫先生
川崎市水道局 浄水部 田中和明先生

参考文献

- 1) 遠藤, 八木田: 「原虫類と食品汚染」, 食品衛生研究, Vol.48, No.1 (1998)
- 2) 平田: 「水道によるクリプトスポリジウム症の集団発生」, 食品衛生学雑誌, Vol.38, No.2 (1997)
- 3) 鈴木, 村田, 矢野, 古畑: セルロース吸着・凝集法を用いた河川水中クリプトスポリジウム・オーシスト濃縮法に関する検討, 日本食品微生物学会雑誌, Vol.13, No.3 (1996)



クリプトスポリジウムの観察

新製品紹介

ナノメートルレベルの
薄膜を高スループット
で評価するHD-2000

近年、エレクトロニクス製品の中で、とりわけLSI、磁気ヘッド、光素子などでは、高性能化、高密度化にともなってナノメートルレベルの超薄膜の多層化が急速に進んでいます。また、金属やセラミックスへのイオン注入により表面層を制御して耐食性、耐摩耗性、耐熱性、硬度向上などの研究も大いに進展しております。このため、原子の数で数個のナノメートルレベルの超薄膜を均一にしかも精度良い厚さにコントロールすること、それを正確に計ることが緊急の課題となっています。

しかしながら、今まで薄膜の計測に使われてきました分光エリプソメータ、蛍光X線測定装置、探針装置ではナノメートルレベルの薄膜計測には十分な精度を得る事は困難になっています。このために断面SEM（走査電子顕微鏡）法も考案されましたが、分解能の限界に近付きつつあります。そこで分解能に優れたTEM（透過電子顕微鏡）が注目されましたが、複雑な操作や、専門知識を必要とする画像解釈が必要なためエキスパートにしか使いこなしができません。

ユーザーの皆様より「もっとはつきりと、もっと正確に、もっと簡単に、もっと早く計測したい」とのご要望を受けてまいりました。ご要望にこたえ日立は新しいコンセプトでHD-2000を開発いたしました。

研究装置から観察、分析、計測ツールへ

この超薄膜評価装置HD-2000のコンセプトを言い換えると「TEMの性能をSEM並みの簡単な操作性で使える道具」を実現させることでした。蛍光板で像観察するのではなく、CRTモニター上で明るい部屋で観察できます。低倍より5百万倍（オプション）までCRTモニターでハイコントラストで直

接観察、計測できます。そのほかの特長を下記にまとめました。

① 高感度元素分析

従来当社TEMと比較して2.5倍の大きな立体角を持ったX線検出器を装着できますので、2.5倍（当社比）高感度の分析が可能です。従来機種では不可能であった1nm以下の元素マッピングが可能です。

② ハイコントラスト像

試料を透過した時に散乱した電子は原子番号に大きく依存して散乱角が変化します。このため構成元素をコントラスト良く観察できます。

このZコントラスト像でDRAMのゲート酸化膜やONO膜がはっきりと観察できます。

③ 高分解能

Zコントラスト像で0.4nm、位相コントラスト像で0.3nm（オプション）の分解能を保証しています。

ピンポイント加工・評価システム

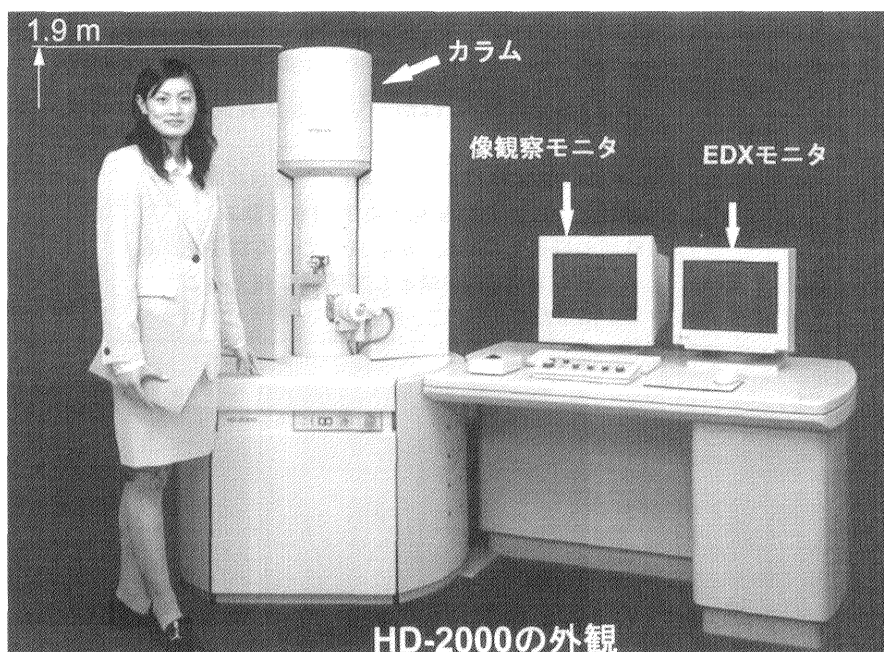
高分解能観察と微小部分分析を行うためには、試料を薄く加工することを避けられません。しかし、多くの場合目的とする部分を保存したまま、数百nmの厚さまで試料を加工することは至難の技であります。またこの行程を従来のイオンミリングなどの試料加工では3日程度かかり、早く結果を知りたいとのご要求にはまったく対応できませんでした。

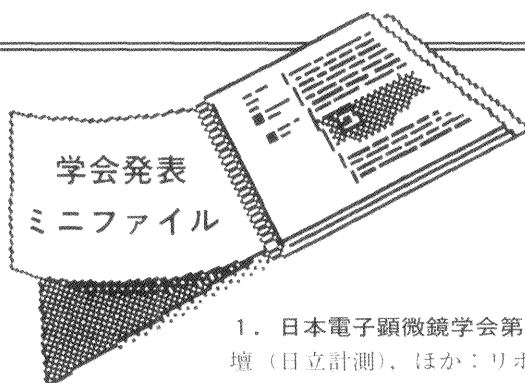
日立は集束イオンビーム加工装置（FB-2000A）とHD-2000とのシステム化により試料ピンポイント加工するノウハウを確立いたしました。まずFB-2000AとHD-2000共用の試料ホルダーに試料を装着し、セミオートのFB-2000Aで0.5μmの厚さにまで加工します。次にこの試料をそのままHD-2000に挿入し200kVの高加速2次電子像で、表面の切り口と内部構造を観察します。試料室の真空を破らずに試料の表面と裏面を試料ホルダーを回転させて両面より観察します。こうすることにより目的とする部分の位置を正確に把握することができます。そして再度FB-2000Aでさらに薄く試料を加工していきます。この行程を2、3回繰り返すことにより目的の部位を残して十分の厚さまで試料を薄くすることができます。また、共用試料ホルダーですので、試料を破損する危険はありません。

この試料加工には2時間程度でできますので、従来の試料作製法と比較して20～30倍のスピードアップが図れます。

このように「日立超薄膜評価装置HD-2000」は強力な製品開発ツールとして、開発のスピードアップと歩留まり向上をお約束いたします。

（田中 取 記）





内野興一（日立計測エンジニアリング株式会社）

1. 日本電子顕微鏡学会第54回学術講演会（1998.5/13～15，仙台）
壇（日立計測），ほか：リボソームの直接断面観察の試み

急速凍結，クライオミクロトーム，クライオトランスファ等の技術を駆使してリボソーム内部構造の直接観察を試みた。超高分解能SEMでの低温，低加速電圧，無蒸着観察を組み合わせることによってリボソームのオリゴメラ構造を観察できた。

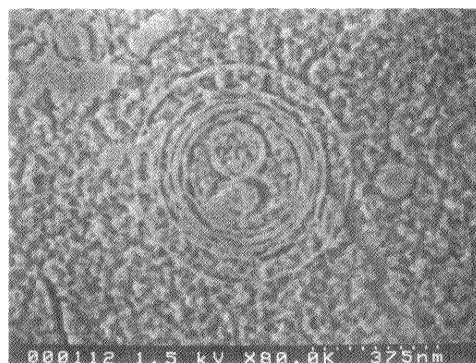


図1 リボソームのオリゴメラ構造

松本（日立計測），ほか：FIB/TEMシステムによるピンポイントTEM試料作成

高加速SEM像とTEM像観察機能を組み合わせて加工箇所探索の高精度・高効率化を試みた。Siデバイス内にFIB照射によりドリリングし，その孔の中にWデポジションを施したものを試料とし，その先端部（直径約 $0.5\mu\text{m}$ ）の正確な薄膜化に成功した。

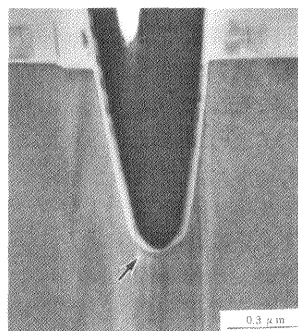


図2 ドリル孔先端のTEM像

今野（日立計測），ほか：SiC結晶成長過程における状態変化の動的観察

Cold FE-TEMとEELSを用い，SiC結晶成長過程における状態変化の動的観察を試みた。時間の経過と共にSiCが成長している様子をイメージングEELS像として明確に捉えることが出来た。

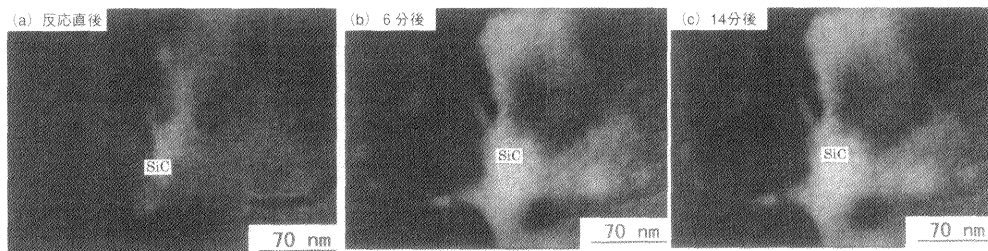


図3 SiC結晶成長過程のイメージングEELS像

中澤(日立計測), ほか: H-7500における試料自動検索機能とその応用
 葛西(日立・基礎研), ほか: ローレンツ顕微鏡法による超伝導体中の磁束量子の対消滅の観察
 上野(日立計測), ほか: 分析電子顕微鏡用二軸傾斜バルク試料高温加熱ホルダの開発
 田中(日立・計測器), ほか: デジタルカメラを用いた電子顕微鏡観察
 高口(日立・中研), ほか: TEM用ハービコンカメラ高感度化のためのCaF₂(Eu)シンチレータの適用研究
 常田(日立・中研), ほか: ワブラーにおける画像間位置ずれ解析法の検討
 矢口(日立計測), ほか: FIB加工TEM試料中のGa濃度の定量に関する検討
 中村(日立・中研), ほか: シリコン 真空界面のHAADF-STEM像郷土の位置依存性
 鈴木(日立計測), ほか: カラーSEM法によるホップの観察
 多持(日立計測), ほか: デバイス内部の微細構造をSEM像で立体観察する試み
 西村(日立計測), ほか: チルドSEMによる生野菜に付着する細菌の洗浄効果の観察
 木本(日立・日立研): 位置分解型EELSによるケミカルシフトの計測

2. 日本分析化学第59回討論会 (1998.5.23~24, 小樽)

保田(日立・計測器), 他: 河川水中のSb分析における化学修飾剤の挙動の原子レベル観察

化学修飾剤としてPdが多用されてきたがAgがより効果的であることを見出した。効果のメカニズムをTEMを用いて調べた。Ag-Sb金属間化合物は特定の温度で数原子層が一気に蒸発するという現象に起因することが解った。

白崎(日立計測), ほか: HPLC-MIP-MSによるセレンアミノ酸の分析

HPLCにより化学種を分離しMIP-MSで高感度検出することによって食品中セレンの化学形態分析を試み、かつお節中に4種類の有機態セレンを見出した。本システムの検出限界は3 μ gSe/lであった。

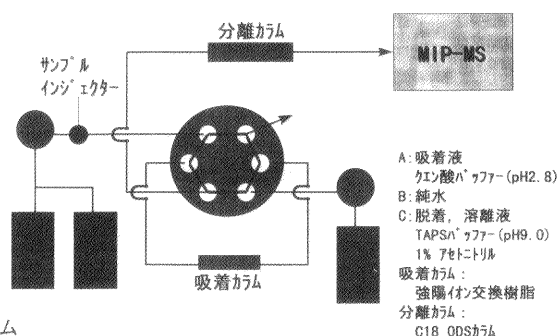


図4 測定システム

黄(日立・中研), ほか: 新型噴霧器を搭載したMIP-MSによる微量元素の分析
 平林(日立・中研), ほか: ソニックスプレーイオン化質量分析法による脳脊髄液の直接分析
 橋本(日立・中研), ほか: プラズマイオン源三次元四重極質量分析計
 鍋島(日立・中研), ほか: 無機化合物の化学形態分析におけるESI-3DQMS
 小嶋(日立・中研), ほか: Siウェーハ中ドーパント元素の深さ方向濃度分布測定法(2)

3. Separation Sciences '98 (1998.6.4~5,)

石川(日立計測), ほか: LC/MSを用いた糖類の分析

音速程度の窒素ガス流によって試料のイオン化を行うソニックスプレーイオン化法が開発され、熱的に不安定な化合物の無修飾・高感度分析に期待が寄せられている。糖類に応用し、従来に比べて10~20倍の高感度が得られた。

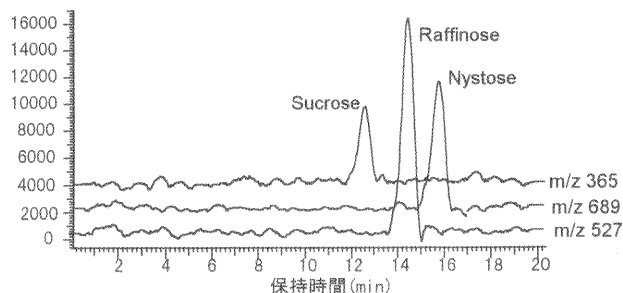
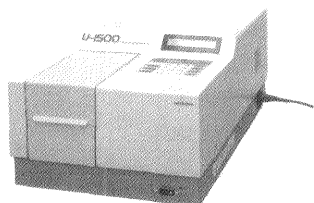


図5 各種の糖類 (5ng) のマスクロマトグラム

新製品紹介

U-1500形レシオビーム 分光光度計の紹介



このたび、U-1000/1100形分光光度計の優れた分光技術を継承した後継機としてU-1500形レシオビーム分光光度計を発売しました。

U-1500形はレシオビームの採用により長時間安定度に優れ、機能別キーの採用によりシンプル＆省スペースで使用できる装置です。最大10点までの多点検量線、DNA分析に適した比演算測定など充実した定量分析に加え、波長スキャン、時間変化測定による定性

分析まで可能です。

ISOやGLP/GMPに対応する装置バリデーション機能も標準搭載しており、簡単に装置診断ができ、常時信頼性の高いデータが得られます。

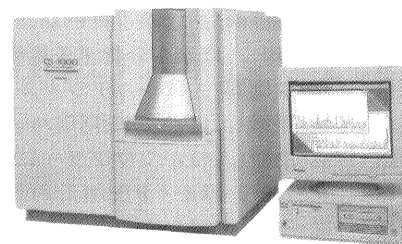
このように、多機能かつシンプル操作のU-1500形分光光度計はバイオ、製薬、環境や品質管理、教育など幅広い分野で活躍する装置です。

主な仕様

- ・波長範囲：200～1100nm
- ・分解：5 nm
- ・波長正確さ：± 1 nm
- ・測光モード：Abs, %T, Conc

マルチキャピラリー DNAシーケンサ CS1000形を開発

CS-1000形は、大規模なDNA配列解析に最適なDNAシーケンサで、省力化と高スループット化に威力を発揮します。



装置の特長

・試料の注入から解析結果の出力までのすべてを自動的に行います。一回の測定で48試料の同時分析が可能で、5回分の試料、合計240試料の注入を自動的に行います。

・ゲルを充填したキャピリカセットを消耗品として供給しますので、ユーザの方々にゲル作製の手間をかけることはありません。

・検出器には新開発のシースフロー技術を用います。この技術の採用により、DNAの高感度検出が可能となり、市販の従来試薬をそのまま用いることができます。

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 土浦 (0298) 23-7391
横浜支店 電話 横浜 (045) 451-5151

本社 電話 東京 (03) 3504-7211
新潟営業所 電話 新潟 (025) 241-3011
北陸営業所 電話 金沢 (076) 263-3480
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

〈編集後記〉

今日は、夏の真只中であるが、窓の外は薄ぐもりでカラッとしない夏空にはなっていない。

今年の関東甲信地方の梅雨明けは遅れに遅れた。気象庁は「8月2日に関東甲信地方が梅雨明けしたとみられる」と発表した。

これは平年より13日も遅く、1982年の8月4日に次ぐ2番目の遅さだという。

しかしこの曇り空を見ると今年は8月5日でもまだ梅雨明けしていない。史上最も遅い新記録になることだろう。統計的には、梅雨明けが遅いとその年は夏が短い、天候が不安定、日照率が悪い、となるそうだ。

また、今年は台風の発生が遅い年でもある。1号の発生が遅くこれも史上最も遅い新記録であり、8月5日現在で2号が北上を始めた状況である。これはエルニーニョの影響にしては逆の現象ではないだろうか。全世界を見てもかんばつがあると思えば大洪水がおこる。何か異変が起こらなければ良いが…。早く日本の景気を良くして、良い話しか聞けるようにしたいものである。

(小西 洋 記)

■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
テクノリサーチセンタ

〒312-0033 茨城県ひたちなか市市毛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

〒105-8717 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

■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>

HITACHI

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SEP. 1998 VOL. 41 NO. 1

発行 平成10年9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
エレクトロニクスシステム本部技術部
〒100-8220 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