

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

MARCH
VOL.43

2001
No.2

目次

巻頭言

環境ルネッサンス

深海 浩……………1

報文

同位体希釈質量分析法の新しい展開

井村久則……………3

アブラナ科植物の受粉過程における

乳頭細胞と花粉の元素の変動

岩野 恵 磯貝 彰……………8

エッセイ

能と質量

藤森 嶺……………13

解説

S-5200形超高分解能インレンス

FE-SEMの紹介

佐藤 貢 景山甲子男

渡邊俊哉……………14

新製品紹介

- ・ ELV-2000形 実時間軽元素分布像
観察装置 (エレメントビュー)…17

学会発表ミニファイル……………18

トピックス

- ・ 分析機器展開催さる……………20
- ・ 日本分析化学会第49年会
開催さる……………20
- ・ 第23回日本分子生物学会年会
開催さる……………20

巻頭言

環境ルネッサンス

Environment Renaissance

深海 浩*



いまほど、環境という言葉が巷を横行している時代はない。それほど、深刻で重要な問題なのである。しかし、その割には、同じ「環境」という言葉で語りながら、ときと場合によって、意味するところに大きな差があつて戸惑いを感じることが多い。ここで、僭越ながら、自分なりの「環境」感を整理してみても、参考に供したい。

まず、「自然」と「環境」をごっちゃにして話が進んでいる場合が多い。両者の違いを端的に表現するのはたいへん難しいので、やむなく2つの具体例をあげてみよう。

最初の例は、わが国最南端の沖縄県八重山諸島のアゲハにまつわる奇妙な話。そこには、もともとシロオビアゲハがいた。オスもメスも、その名のとおり、黒地の後翅に横一線に白い斑点が並んでいて、大いに目立つ存在である。そこへ1968年ベニモンアゲハという毒蝶が侵入してきた。多分、台湾か、あるいはもっと南の島からたどり着いたのであろう。よほど住み心地が良かったのか、八重山諸島に定着して、繁殖し始めた。このアゲハも、名前のとおり、黒地の翅に独特の赤い斑点があつて、いかにも毒々しい。幼虫時代に食草から毒成分を食って貯え込み、成虫まで持ち越すので、毒々しい姿との相乗効果で、鳥など捕食者からの攻撃を免れているといわれる。いずれにしても、シロオビとは素人でも直に見分けることができるほど歴然とした違いがあるアゲハである。

ところが、ベニモンの渡来が引き金になって、八重山諸島のシロオビに異変が見られ始めた。メスが毒蝶のベニモンそっくりの姿に変身し出したのである。オスには何の変化も見られないというのも奇妙だが、メスも全部が全部ベニモンの擬態をとるわけではなく、ある一定の比率にまで達するとそれ以上は増えないというののもまた不思議な話である。もちろんシロオビのオスは、本来のシロオビの姿のメスも、ベニモンの擬態をしたメスも、交尾の相手としては同じように選択し、間違ってもベニモンそのもののメスを追いかけるような間抜けな真似はしない。シロオビのメスがベニモンの擬態をとる比率は、八重山諸島のそれぞれで異なっているが、その島のベニモンの生息密度と密接な相関がある。どのようにして、シロオビのメスがベニモンの生息密度を識別し、また、どのようにして、擬態する個体の比率を決めているのだろうか、不思議なことだ。

もう一つの例は、イギリスのマンチェスター近辺で起こったガの黒化現象であ

* 京都大学名誉教授 農学博士

る。たとえば、オオシモフリエダシャクの成虫はもともと淡色型の個体ばかりであったものが、19世紀半ばころから、黒色型が増え始め、ある地域では1950年代に90%以上を占めるに至った。この変化は家庭や工場での石炭の消費量と密接に関連していた。樹木の樹皮につく灰白色の地衣類が石炭の煤煙で黒ずんできたのにつれて、ガモまた黒い個体が増え出した。その後、燃料の主役が石油になって、最近では再び淡色型の個体が復活してきた事実は石炭の煤煙が主犯であることを示している。

これら2つの例は、前者が「自然」の話で、後者が「環境」に関するものだと言い切ることができる。要するに、人間が介在してもその成り行きがどうにもならないのが自然であり、人間の所作が主要な原因となった事象が環境である。とはいえ、現実には話はそう簡単ではない。われわれ日本人にとって景観としての自然の代表格は、燦々と太陽が照りつける真夏の水田をそよ風がみどりの波をたてて渡る情景であろう。そこには確かに自然そのものの趣がある。しかし、水田は人間の所作の産物である。だから自然ではないというのもどうも腑に落ちない。水田の情景は永年にわたる人間の所作が自然に溶け込むまでになったもので、やはりすでに自然の域に達したもののなのであろう。

地球の歴史を振り返ると、自然は変化の連続で、決して不変ではなかった。しかし、人間の一生という短い時間尺度では、あたかも不変であるかのように見える。あらゆる生物を含めて、自然の森羅万象は非常にたくさんの因子からなる動的平衡系をなしている。これが自然の姿なのであろう。動的平衡のゆらぎの幅とゆらぎの速度の範囲内で加えられたやさしい歪みは、自然には何の影響も残さないように見えながら、その積み重ねが自然を変えていったのであろう。少なくとも、産業革命までの人間の所作はすべてこの程度の範囲内の歪みであった。ところが、それ以降、とくに20世紀後半の先進国の産業活動は自然の動的平衡のゆらぎの幅も速度をも超えたインパクトを自然に与えるまでになってしまった。これが現在の環境問題である。

話はがらりと変わるが、次は「小さな環境」と「大きな環境」について考えてみよう。われわれの生活や健康にまつわる身の回りの環境を「小さな環境」、それと対比する意味で、大気圏を含む地球そのものと、そこに生息する自然生物相全体（もちろんヒトをも含む）を抱擁する諸々の状態を「大きな環境」と呼ぶことにしよう。さて、現在の先進国に関する限り、小さな環境はどんどんよくなっている。生活必需品はもちろんのこと、過剰なほどの利便性供与の品物と設備とシステムに満ち溢れている。利便性の過

剰や氾濫はどこにでもみられる現状である。利便性が問題なのではなく、利便の過剰性が問題なのであり、それが資源と化石エネルギーの大量消費のうえに成り立っている。その結果が「大きな環境」に大きな負荷を与えている。小さな環境の向上が大きな環境の劣化を促進している。これが現時点での環境問題である。

ここらあたりの総合認識が根底にあって、「小さな環境」の向上を図りながら、少なくとも「大きな環境」が劣化する傾向を食い止めるのがいま人類に課せられている大きな責務である。いままでの常識とはまったく異なったパラダイムの構築を迫られている。これを「環境ルネッサンス」と呼んで、人類共通の「心」の進化を遂げなくてはならない時機にさしかかったと思う。「環境に優しい」とは、「ヒトに厳しい」ことを認識すべき新世紀が到来した。

著 者 略 歴

深海 浩（1928年5月13日生）

[専門]

農芸化学・化学生態学

[学歴・職歴]

1952年3月	京都大学農学部農芸化学科卒業
1955年3月	京都大学大学院研究奨励学生修了
〃 年6月	京都大学農学部助手
1963年10月	京都大学助教授（農学部）
1966年4月	京都大学教授（農学部付属農業研究施設）
1981年5月	京都大学農学部部長併任
1983年4月	
1992年3月	京都大学定年退官 京都大学名誉教授
1992年4月	立命館大学教授（理工学部）
1999年3月	立命館大学退職
1999年4月	立命館大学総合理工学研究機構客員教授（現在に至る）

[受賞歴]

1966年4月	農芸化学賞受賞
1990年4月	日本農学賞・読売農学賞受賞
1995年3月	日本農薬学会功労賞受賞

報 文

同位体希釈質量分析法の新しい展開

Recent development of isotope dilution mass spectrometry

井村久則*

1. はじめに

近年、国際的な商取引や地球規模での環境保全・公衆衛生等に関わる分析法の信頼性と国際標準化が重要な課題となっており、その分析法には、高い正確さとSIトレーサビリティが求められる。このような観点から、検量線も比較標準も使用せずに物質質量(モル)の測定が可能な基準分析法(あるいは絶対定量法)の重要性が広く認識されるようになってきた。現在のところ、そのような要求を満たす分析法としては、重量分析、滴定、電量分析、同位体希釈質量分析(IDMS)の四つが知られているが、この内、IDMSは目的元素(あるいは目的化合物)の定量的な回収も回収率の補正も要しないという優れた特徴を有しており、環境試料や生物体試料のような複雑なマトリックス中の微量成分分析においてはIDMSに代わる方法はない。

同位体希釈分析法は、まず放射性同位体を利用した方法が考案され(Hahn, 1923及びHevesy, 1932)、遅れて安定同位体の利用が始まり(Rittenberg, 1940)、その理論(Gest, 1947)、一般的な定量式の検討(Hintenberg, 1956)がなされ、その後は質量分析装置とともに発展してきた。¹⁾しかし、この優れたIDMSもプラズマイオン源が開発されるまでは、時間のかかる、しかも熟練したオペレーターが必要な高コストの分析法であり、標準物質の保証値の決定など限られた目的にしか利用されてこなかった。近年、誘導結合アルゴンプラズマ(ICP)やマイクロ波誘導窒素プラズマ(MIP)などを用いたプラズマイオン源質量分析装置が登場して、溶液試料をそのまま装置に導入できるようになり、またコンピュータによる制御とデータ処理によって測定の容易さ、迅速性が飛躍的に向上し、現在ではIDMSが無機元素のルーチン分析にも利用されるようになってきている。

本稿では、IDMSの原理とその定量式を再検討し、基準分析法としての問題点について考えてみたい。また最近、筆者らが研究している不足当量分離法とIDMSとの結合に関して、その特長と二三の研究例について紹介する。

2. 原理

2.1 安定同位体希釈

試料に目的元素の濃縮同位体をスパイクして同位体平衡とし、その同位体存在度の変化に基づいて目的元素量を決定するのが基本原理である(Fig.1の鉄の例参照)。原子モル分率で表される同位体存在度は、試料及び濃縮同位体中のj番目の同位体について、それぞれ次のように表される。なお式中の略号はTable 1を参照していただきたい。



$$a_{jx} = \frac{q_{jx}}{\sum_{i=1}^n q_{ix}} = \frac{q_{jx}}{Q_x} \quad (1)$$

$$a_{js} = \frac{q_{js}}{\sum_{i=1}^n q_{is}} = \frac{q_{js}}{Q_s} \quad (2)$$

試料と濃縮同位体の混合物中では

$$a_{jm} = \frac{q_{jm}}{\sum_{i=1}^n q_{im}} = \frac{q_{jm}}{Q_m} = \frac{a_{jx} Q_x + a_{js} Q_s}{Q_x + Q_s} \quad (3)$$

となり、基本定量式(4)が得られる。

$$Q_x = Q_s \frac{a_{js} - a_{jm}}{a_{jm} - a_{jx}} \quad (4)$$

すなわち、目的元素量 Q_x は、スパイク量 Q_s と任意の同位体の存在度から算出され、検量線も比較標準も必要なく、また試料からの目的元素の定量的な回収も必要としない。しかし、一般に同位体存在度を実験的に正確に決定することは容易ではなく、以下のような誘導がなされる。なお、元素量を質量で表すと、(4)式は(5)式となる。

$$M_x = M_s \left(\frac{A_x}{A_s} \right) \frac{a_{js} - a_{jm}}{a_{jm} - a_{jx}} \quad (5)$$

Table 1 Symbols used in the equations

Quantity and unit	Sample	Spike*	Mixture
Mass of element/ g	M_x	M_s	$M_m (= M_x + M_s)$
Atomic weight/ g mol ⁻¹	A_x	A_s	—
Amount of element/ mol	Q_x	Q_s	$Q_m (= Q_x + Q_s)$
Amount of i th isotope/ mol	q_{ix}	q_{is}	$q_{im} (= q_{ix} + q_{is})$
Abundance of i th isotope	a_{ix}	a_{is}	a_{im}
Counting rate for i th isotope/ cps	C_{ix}	C_{is}	C_{im}

* Enriched isotope.

* 茨城大学理学部、教授、理学博士

2.2 一般的なIDMS

(3)式はk番目の同位体についても成立するので、それらの比 (a_{jm}/a_{km}) をとって整理すると

$$Q_x = Q_s \left(\frac{a_{ks}}{a_{kx}} \right) \left(\frac{\frac{a_{js}}{a_{ks}} - \frac{a_{jm}}{a_{km}}}{\frac{a_{jm}}{a_{km}} - \frac{a_{jk}}{a_{kx}}} \right) \quad (6)$$

が得られる。(1) - (3)式の関係から、存在度の比は次のようになる (スパイクについてのみ示す)。

$$\frac{a_{js}}{a_{ks}} = \frac{q_{js}}{q_{ks}} = f_{jk} \frac{c_{js}}{c_{ks}} = f_{jk} R_{jk, s} \quad (7)$$

ここで、 $R_{jk, s}$ は質量分析計から得られるj及びk番目の同位体の計数率の比、また f_{jk} はjとk同位体に関する質量分析計の質量差別効果(同位体の感度差)に対する補正係数である。同様の式が試料と混合物についても成り立つので、(6)式は、よく知られた(8)式となる。

$$Q_x = Q_s \left(\frac{a_{ks}}{a_{kx}} \right) \left(\frac{R_{jk, s} - R_{jk, m}}{R_{jk, m} - R_{jk, x}} \right) \quad (8)$$

この式においては f_{jk} は消去されるが、依然としてk番目の同位体の存在度を知る必要があり、さらに質量分析計のバックグラウンドシグナルが無視できない場合には、j,k同位体それぞれの計数率からバックグラウンドを差し引かなければならない。もちろん試料中の目的元素が天然同位体組成を保ち、また濃縮同位体スパイクとして適当な標準物質が利用できるなら、当該同位体の存在度としてそれらの文献値あるいは保証値を用いることも可能であるが、その場合には、得られた定量値にはそれらの存在度の不確かさを含むことになる。また(6)式は次のように変形することもできる。

$$Q_x = Q_s \left(\frac{a_{js} - a_{ks} f_{jk} R_{jk, m}}{a_{kx} f_{jk} R_{jk, m} - a_{jx}} \right) \quad (9)$$

(8)式は、さらに次のように書き直すことができる。

$$Q_x = Q_s \left(\frac{f_{1k} R_{1k, x} + \dots + f_{nk} R_{nk, x} + 1}{f_{1k} R_{1k, s} + \dots + f_{nk} R_{nk, s} + 1} \right) \left(\frac{R_{jk, s} - R_{jk, m}}{R_{jk, m} - R_{jk, x}} \right) \quad (10)$$

(10)式ではすべての同位体存在度が消去され、独立した実験によって目的元素のモルが決定できるが、質量分析計による同位体の質量差別効果を補正するため、少なくとも1種類の同位体組成標準が必要である。また、依然として質量分析計からのバックグラウンド補正も別途必要である。Table 2に最近のIDMSによる定量例を挙げるが、ほとんどの場合試料マトリックスからの目的元素の前分離が不可欠であり、また目的に応じて定量式が選択されているようである。

2.3 不足当量分離法とIDMSの結合^{11,12)}

不足当量分離法は、目的元素の一定量を分離するための方法であり、通常は目的元素と化学量論的に反応する試薬を用い、その使用量を目的元素の当量以下にして目的元素の一部を分離することによって達成される。この分離法は、元々、放射性同位体希釈や放射化分析と組み合わせられて発展してきたものであり、詳細については文献を参照されたい。¹³⁾

Fig.1に鉄を例に不足当量同位体希釈質量分析法(SIDMS)の原理を示す。同位体希釈の基本定量式(4)式は、次のように書き直すことができる。

$$Q_x = Q_s \frac{\frac{q_{js}}{q_{jm}} - \frac{q_{im}}{q_{ix}}}{\frac{q_{jm}}{q_{im}} - \frac{q_{jx}}{q_{ix}}} \quad (11)$$

ここで、試料、濃縮同位体スパイク、それらの混合物から、それぞれ目的元素の一定量を $\bar{Q}$ 不足当量分離し、そこに含まれているj番目の同位体の計数率($\bar{C}_{jx}$, $\bar{C}_{js}$, $\bar{C}_{jm}$)を測定すると、

$$Q_x = Q_s \frac{\bar{q}_{js} - \bar{q}_{im}}{\bar{q}_{jm} - \bar{q}_{jx}} \quad (12)$$

Table 2 Some examples of recent application of IDMS

Element	Eq. used	Separation method	Sample	Determined values	Ref.
BrO ₃ ⁻	10	ion chromatography	drinking water	0.6-23.0 ng g ⁻¹	2
Cu	9	chelating resin	plant	2.995-9.990 µg g ⁻¹	3
Cu, Zn, Cd, Pb	9	solvent extraction	fish otolith	0.742, 0.471, 0.0028, 0.0234 mg kg ⁻¹	4
Fe	13	solvent extraction	seaweed	185 µg g ⁻¹	5
Fe	13, 15	cation exchange	river water	7.2-57.1 ng ml ⁻¹	6
Hg	8	gas chromatography		403 ppb	7
Mo	9	solvent extraction	seawater	9.178 µg l ⁻¹	8
Tl	9		soil, sediment	2.470, 0.446 µg g ⁻¹	9
(CH ₃) ₂ Tl ⁺	9	anion exchange + extraction	ocean water	0.67-3.02 ng Tl l ⁻¹	10

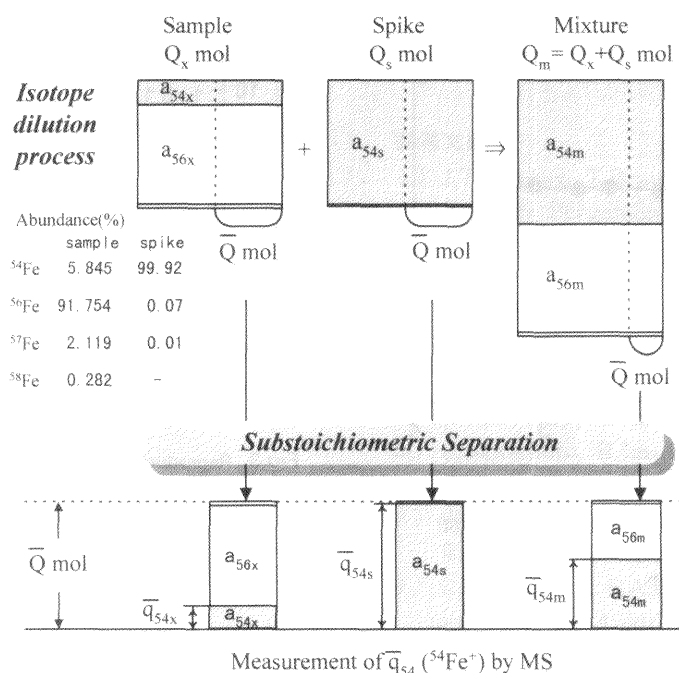


Fig.1. Principle of substoichiometric isotope dilution mass spectrometry (SIDMS)

$$= Q_s \frac{\bar{c}_{js} - \bar{c}_{jm}}{\bar{c}_{jm} - \bar{c}_{jx}} \quad (13)$$

となる。ここで $\frac{q_{jx}}{Q_x} = \frac{\bar{q}_{jx}}{\bar{Q}}$, $\frac{q_{js}}{Q_s} = \frac{\bar{q}_{js}}{\bar{Q}}$, $\frac{q_{jm}}{Q_m} = \frac{\bar{q}_{jm}}{\bar{Q}}$ である。

従って、不足当量分離された部分に含まれるj同位体の計数率を測定するだけで、質量差別効果の補正の必要もなく、また検量線も比較校正標準も使用することなく目的元素のモルを決定できる。さらに、それらの計数率に含まれるバックグラウンドは、(13)式においては相殺され補正の必要もない。現在のところ質量分析計のシグナル安定性はそれほど高くなく、測定時に適当な内標準元素(同位体)の添加が必要である。その場合には(13)式の各計数率は内標準の計数率との比となるが、(13)式の優れた特徴は維持される。

一方、通常のIDMS式を用いる場合においても、不足当量分離の利用は極めて有効である。(8)式は次のように書き直すことができる。

$$Q_x = Q_s \left(\frac{q_{ks}/Q_s}{q_{kx}/Q_x} \right) \left(\frac{R_{jk,s} - R_{jk,m}}{R_{jk,m} - R_{jk,x}} \right) \quad (14)$$

ここで、試料と濃縮同位体溶液に対して上と同様の不足当量分離を行い、k同位体の計数率を求めると

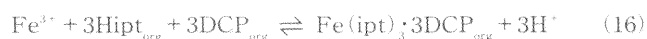
$$Q_x = Q_s \left(\frac{\bar{c}_{ks}}{\bar{c}_{kx}} \right) \left(\frac{R_{jk,s} - R_{jk,m}}{R_{jk,m} - R_{jk,x}} \right) \quad (15)$$

となり、同位体存在度を知る必要もなく、また質量差別効果の影響も受けない。

3. 不足当量同位体希釈質量分析法の適用例

3.1 溶媒抽出を用いた鉄の不足当量分離と定量

生物体中の μg レベルの鉄を対象とした新規な不足当量抽出系を研究した。鉄(III)と安定なキレートを生成する4-イソプロピルトロポロン(Hipt)と強力な水素結合供与体である3,5-ジクロロフェノール(DCP)を同時に用いると、ヘプタンやシクロヘキサンなどの非極性溶媒への鉄(III)の抽出が著しく増大すること(協同効果)を見出した。Hiptは弱酸であり、水相に分配して $\text{Hipt} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{ipt}^-$ のように電離するので、全体の抽出反応は次のように表せることが分かった。¹⁴⁾



ここで、下付orgは有機相、下付のないものは水相の化学種を示す。(16)式の抽出平衡定数は $10^{19.47}$ (ヘプタン)にも達し、鉄(III)の極めて効率の高い抽出系である。そこで、この系を用いて微量の鉄(III)の不足当量抽出を行うこととし、過剰のDCP共存下、低濃度のHiptによる鉄(III)の抽出を検討した。

Fig.2に $8 \times 10^{-3} \text{M}$ のDCP共存下、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ のHiptによる鉄(III) (全濃度 $1 \times 10^{-4} \text{M}$)の抽出曲線を示す。pH2から3の範囲で、(16)式の当量関係から期待されるように約30%の鉄(III)が抽出されている。なおMIP-MSへの有機溶媒試料の導入に際して、マイクロ波出力、キャリアガス量、酸素流量などの影響を詳細に検討し、¹⁵⁾ 溶媒としては低いバックグラウンドを与えるキシレンを使用することにした。

所定濃度のHiptとDCPを含む有機相を用いて様々な濃度

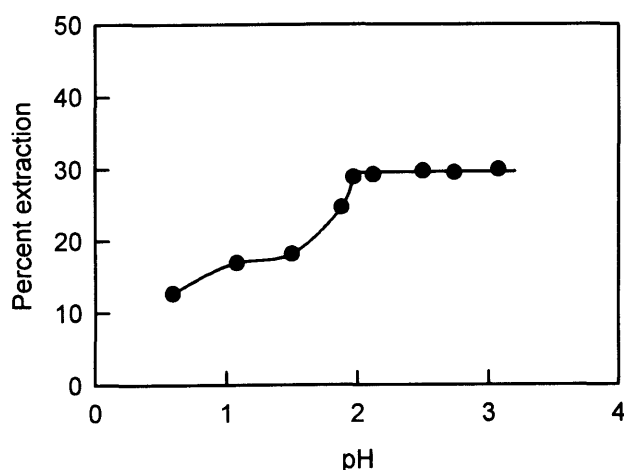


Fig.2. Effect of pH on the substoichiometric extraction of Fe (III)
 1×10^{-4} M Hipt - 8×10^{-2} M DCP in xylene,
 1×10^{-4} M Fe(III), Shaking time 2 h.

の鉄(III)を含む水相から抽出を行い、MIP-MSにより ^{54}Fe 並びに ^{56}Fe の計数率を測定した。Fig.3に示すように、鉄(III)とHiptの当量点(モル比で1:3)を越えると、不足当量の条件となって常に一定量の鉄(III)が抽出されている。得られた計数率の相対標準偏差(RSD)は、 ^{54}Fe 、 ^{56}Fe について1.2-1.4%であり、内標準として試料にコバルト(III)-アセチルアセトン錯体(^{59}Co)を加えると、いずれも0.7%となり、より高精度の定量が期待される。

一般に生物体中に多く含まれるアルカリ土類金属、及び鉄と同レベルのアルミニウムや銅、亜鉛などの金属が上記の不足当量抽出を妨害しないことを確かめた上で、実試料としてNIES生物体標準試料No. 9、ホンダワラ中の鉄の定量に本法を適用した。高压テフロン容器に試料と既知量の濃縮同位体を取り、濃硝酸を加えて150℃で4-5時間分解した。蒸発乾固と再溶解後、Fig.3の条件で鉄(III)をキシレンに不足当量抽出し、内標準を加えMIP-MSにより質量/電荷比54と59の計数率を測定した。天然同位体存在度の鉄(III)溶液、並びに用いた濃縮同位体溶液からも同条件で不足当

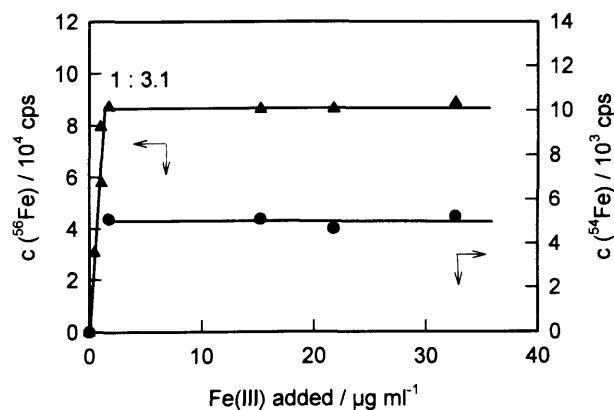


Fig.3. Reproducibility of the substoichiometric extraction/ MIP-MS
 1×10^{-4} M Hipt - 8×10^{-2} M DCP in xylene,
pH 2.5 - 2.6, shaking time 1 h.

量抽出し、同様に計数率を測定し定量値を算出した(Table 3)。値は保証値ともよく一致しており、簡単な抽出操作を組み合わせるだけで、正確な同位体希釈分析が可能である。⁵⁾

3.2 イオン交換を用いた超微量鉄の不足当量分離と定量⁶⁾

超微量の鉄の分析においては、コンタミネーションコントロールが最も重要であり、より簡便な操作で不足当量分離が可能なイオン交換法を検討した。鉄(III)は水溶液中でシクロヘキサン-1,2-ジアミン四酢酸(CyDTA)と極めて安定な陰イオン性の1:1錯体を生成する。そこで、鉄(III)に対して不足当量のCyDTAを加えて錯形成させた後、強酸性陽イオン交換樹脂カラムに通すことによって未反応の鉄(III)イオンを樹脂に吸着させ、一定量の鉄(III)をCyDTA錯体として溶出分離した。Fig.4に、 4.9×10^{-7} MのCyDTAによる一連の鉄(III)溶液からの不足当量イオン交換分離の再現性を示す。内標準としてヘキサシアノコバルト(III)酸イオンを分離前に加えておくことによって、16-110 ng ml⁻¹の鉄(III)に対し、RSD0.5%以下の再現性が達成できた。

Table 3 Determination of iron in a seaweed sample (NIES No.9, sargasso)^a by SIDMS

Sample taken (W)/g	Enriched iron spiked ^b (M _s)/μg	R _s ^c from natural iron	R _s ^c from enriched iron	R _m ^c from test solution	Iron content (M _s /W) ^d /μg g ⁻¹
0.4945	116.8	0.3061	0.0077	0.1345	185 ± 7
		0.3025	0.0078	0.1397	(n=27)
		0.2982	0.0079	0.1378	
0.5072	74.9	0.2924	0.0045	0.1636	184 ± 2
		0.2935	0.0042	0.1641	(n=27)
		0.2902	0.0041	0.1644	

Average of iron content = $185 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$; %RSD = 3 (n=54).

^aCertified value by NIES = $187 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$.

^bIsotopic abundance (%): ^{54}Fe , 0.05; ^{56}Fe , 99.87; ^{57}Fe , 0.07; ^{58}Fe , 0.006.

^cRatio of the counting rate of ^{54}Fe and that of ^{59}Co .

^dCalculated by $M_s = M_s (A_s/A_e) (R_s - R_m) / (R_m - R_s)$.

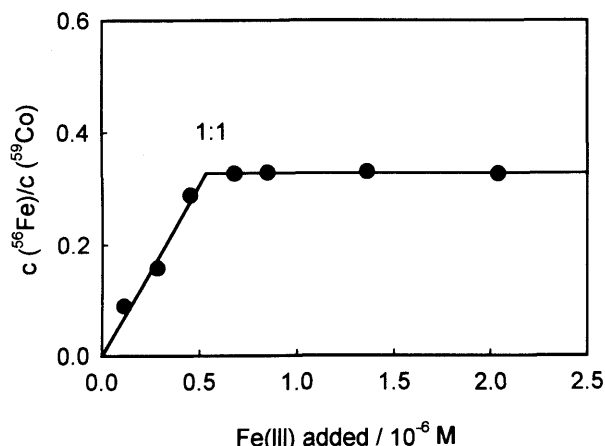


Fig.4. Reproducibility of the substoichiometric ion-exchange separation/ MIP-MS
 4.9×10^{-7} M CyDTA, pH 1.8-2.1, strongly acidic cation exchange resin (Na⁺ form).

本法を河川や湖沼などの環境水に適用するに当たって、多量に含まれるアルカリ、アルカリ土類金属、その他の金属イオンが鉄(III)の不足量分離の妨害にならないことを確認した上で、日本分析化学会河川水標準物質JAC0031, 0032に適用した。定量結果の一例をTable 4に示す。ngレベルの鉄が簡単な分離操作を加えるだけで、精度よく正確に定量できた。

4. まとめ

IDMSは基準分析法として化学計測において重要な位置を占めており、天然に複数の安定同位体(あるいは長寿命放射性同位体)を有する62元素とそれらを含む化学種が定量の対象となる。また応用分野も、従来からの核科学や地球科学から環境科学、生命科学等へと広がっている。そのほとんどの場合、化学分離法の併用は必然的であり、質量分析計の進歩とともに分離法における工夫発展もまた、本

稿で示したように分析原理に関わる新たな展開に結びつくものと期待される。

参考文献

- 1) J.Tögyessy, T.Braun and M.Kyrš, Isotope Dilution Analysis, Pergamon, Oxford, 1972.
- 2) J.T.Creed and C.A.Brockhoff, Anal.Chem., **71**, 722 (1999).
- 3) R.Koplik, O.Mestek, H.Fingerova and M.Suchanek, J.Anal.At.Spectrom., **14**, 241 (1999).
- 4) J.Yoshinaga, M.Morita and J.S.Edmonds, J.Anal.At.Spectrom., **14**, 1589 (1999).
- 5) H.Sakamoto, H.Imura and K.Ohashi, J. Radioanal. Nucl. Chem., **243**, 737 (2000).
- 6) 内田, 井村, 大橋, 坂元, 白崎, 日本分析化学会第49年会, 岡山, 2000 (一部未発表部分を含む)。
- 7) C.M.Barshick, S.A.Barshick, E.B.Walsh, M.A.Vance and P.F.Britt, Anal.Chem., **71**, 483 (1999).
- 8) 白崎, 坂元, 中口, 平木, 分化, **49**, 175 (2000)。
- 9) O.Mestek, R.Koplik, H.Fingerova and M.Suchanek, J.Anal.At.Spectrom., **15**, 403 (2000)。
- 10) O.F.Schedlbauer and K.G.Heumann, Anal.Chem., **71**, 5459 (1999)。
- 11) H.Imura, H.Sakamoto, K.Ohashi, T.Shirasaki and K.Oishi, J.Radioanal.Nucl.Chem., **220**, 191 (1997)。
- 12) H.Imura, Y.Oda, K.Ohashi and H.Kawamura, CITAC '99 Japan symposium on practical realization of metrology in chemistry for the 21st century, Tsukuba, Abst. p.99, 1999.
- 13) 鈴木, 井村, ぶんせき (進歩総説), **1987**, 106.
- 14) H.Imura, K.Ishimori and K.Ohashi, Anal.Sci., **16**, 1297 (2000)。
- 15) H.Imura, H.Sakamoto, K.Ohashi, T.Shirasaki and T.Okumoto, Anal.Sci., **13** (supplement), 11 (1997)。

Table 4 Determination of iron in a reference material (JAC 0032, river water)^a by SIDMS

Spike ^b (M _s)/ ng	R _s ^c from natural Fe	R _s ^c from spike	R _m ^c from mixture	Fe found (M _x) ^d / ng	Concentration / ng ml ⁻¹
346	0.09000	1.493	0.8098	343 ± 3	57.2 ± 0.5
	0.08976	1.495	0.8105	(n=27)	
	0.09014	1.507	0.8092	%RSD=0.9	

^aSample taken = 6 ml, certified value of Fe = 57 ± 2 ng ml⁻¹

^bIsotopic abundance (%): ⁵⁴Fe, 99.92; ⁵⁶Fe, 0.07; ⁵⁷Fe, 0.01

^cRatio of the counting rate of ⁵⁴Fe to that of ⁵⁹Co

^dCalculated by $M_x = M_s (A_s/A_m) (R_s - R_m) / (R_m - R_s)$.

アブラナ科植物の受粉過程における乳頭細胞と花粉の元素の変動 —低真空走査電顕による直接観察とX線分析—

X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in Brassica using variable-pressure scanning electron microscope

岩野 恵* 磯貝 彰**

はじめに

春になると野原や河原で咲き乱れる菜の花は、アブラナ科植物の花の総称である。この花は、雌しべの先端が乳頭細胞でおおわれ(図1)、この乳頭細胞に昆虫によって運ばれてきた他個体の花粉が付着すると(他家受粉)、花粉は吸水し、花粉管を発芽させ、乳頭細胞に侵入し、雌しべの中を通過して子房の胚珠にある卵細胞と受精する。しかし、不思議なことに、同じ花の雄しべの花粉が付着しても(自家受粉)、受精は抑制される。このようなしくみを自家不和合性という。自家不和合性は、多くの被子植物に見られ、近親交配を回避することにより、種内の遺伝的多様性を増し、被子植物の種の繁栄に貢献してきた(1)。

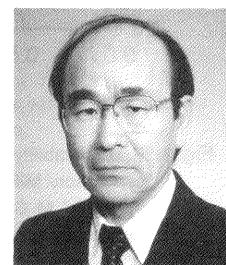
アブラナ科植物の自家不和合性はS遺伝子座により支配され、雌しべの乳頭細胞のS遺伝子産物である膜貫通型プロテインキナーゼ(SRK)と、花粉のS遺伝子産物であるリガンド型タンパク(SP11)が関与する(2)。しかし、他家受粉時と自家受粉時に乳頭細胞と花粉との間にどのような情報伝達経路が存在するのかについては不明な点が多い。

生物一般において、 Ca^{2+} が情報伝達物質として機能する例が多く報告されている。受粉過程においても、 Ca^{2+} が重要な働きをしている可能性があり、受粉時における乳頭細胞と花粉でのカルシウムなどの元素の変動を調べることは重要である。

Ca^{2+} の変動を調べる方法としては、カルシウム濃度依存的な蛍光指示薬をマイクロインジェクションにより細胞内に導入するのが一般的である。しかし、アブラナ科植物の乳頭細胞はクチクラで覆われており、インジェクションが難しく、また物理的刺激が大きいため、このような方法での解析は困難である。

最近開発されたクールステージを搭載した低真空走査電子顕微鏡(以下VP-SEM)では、前処理なしに、生物試料を直接観察することができる(3)。さらにエネルギー分散型X線分析装置(以下EDX)を組み合わせると、観察と同時に、含有元素の定性分析や元素マッピングができる。この方法を用いると、従来と異なり、固定液による元素の混入や、脱水・乾燥の過程で生じる含有元素の移動・流出などの障害が防げるため、より生体に近い状態で、生物試料の元素分析を行うことができる。

本報では、アブラナ科植物の他家、および自家受粉過程における花粉と乳頭細胞の形態をVP-SEM(Hitachi, S-



3500N)で観察すると同時に、元素の変動を、EDX(Horiba, EMAX-7000)により調べた。さらに、これら受粉過程における乳頭細胞と花粉の微細構造を透過型電顕(以下TEM)により観察した(4)。

材料と方法

*Brassica campestris*のS²ホモ系統株とS⁹ホモ系統株を材料として用いた。開花当日で、葯の開裂していない花を採取後、葯を取り除いて寒天ゲルにさした。他家受粉のためには、開裂直後のS²ホモ系統株の花粉を、S⁹ホモ系統株の雌しべの柱頭に受粉させた。一方、自家受粉のためには、S⁹ホモ系統株の花粉を柱頭(S⁹ホモ系統株)に受粉させた。受粉前、受粉後30分および3時間のものについて以下の実験を行った。

VP-SEMでの観察とX線分析のためには、上記の花から雌しべを切り出し、木工用ボンドでアルミニウム製の試料台に固定した。花粉は、カーボンコートした両面テープを

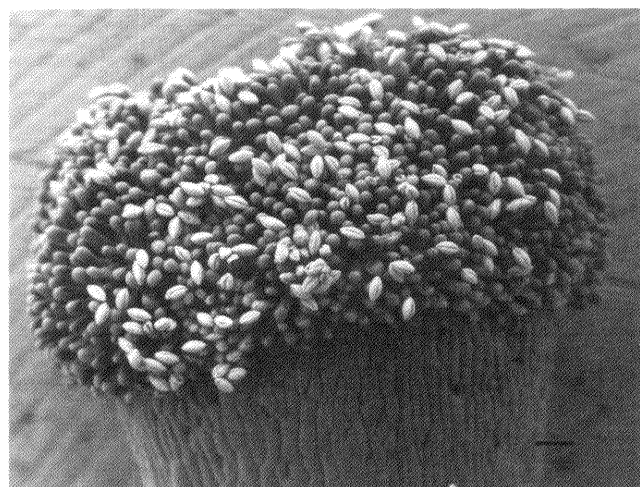


図1 受粉した*Brassica campestris*の柱頭。
スケールは50 μ m。

* 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・細胞間情報学講座 教務職員・博士(理学)

** 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・細胞間情報学講座 教授・農学博士

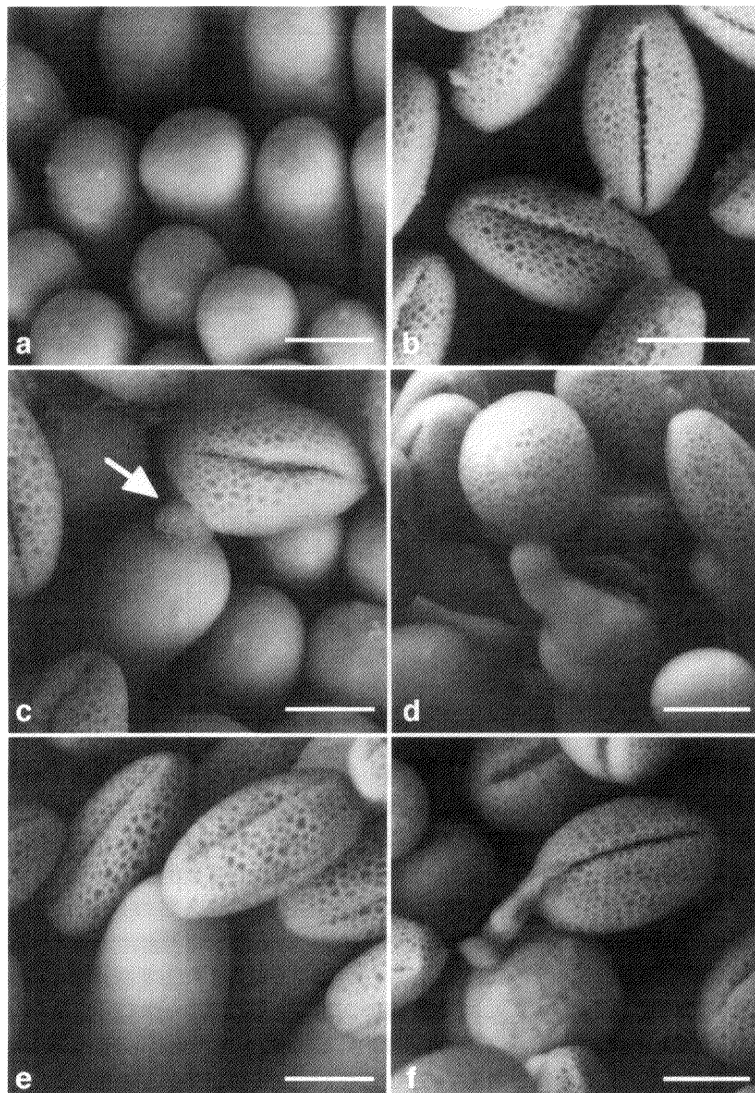


図2 VP-SEMによる他家受粉および自家受粉過程の直接観察。
矢印はfoot構造。スケールは10 μ m

用いて試料台に固定した。VP-SEMの試料台の温度は-10℃に決定し、各実験でのX線強度の比較は、バックグラウンド値に対するピーク値 (P/B) で行った。

透過電顕での観察のためには、受粉前、受粉後の柱頭について、急速凍結・凍結置換法により試料を作製し (5)、TEM (Hitachi, H-7100) により観察した。

結果

1) X線分析

受粉前の柱頭をVP-SEMで観察した像を図2aに示す。柱頭表面は乳頭細胞と呼ばれる一層の細胞層で覆われている。乳頭細胞はボウリングのピンのような形をしており、表面はクチクラで覆われている。これら乳頭細胞の先端部分のX線分析を行った。分析に当たっては、X線検出器に対して一定の角度を持つ細胞のみを選び、約7 μ m平方の矩形範囲を測定した。そのX線スペクトラムを図3に示す。CやOなどの主要な生体構成元素の他に、P, S, K, Caの特性X線が検出され、常にSのX線強度が高かった。受粉前の花粉はラグビーボール型で、縦にのびた花粉管溝がみられ、表面には網目状のエキシンが見られた (図2b)。花粉のX線分析でも、P, S, K, Caの特性X線が検出されたが、乳

頭細胞とは異なり、常にPのX線強度がS, K, Caよりも高かった。これらの乳頭細胞と花粉でのX線分析について、独立した実験を7回以上繰り返し、合計35個以上の細胞について分析を行い、再現性が得られることを確認した。X線分析の結果は図4に示すようにP/B値で以後示す。

他家受粉の過程をVP-SEMにより観察したところ、受粉後30分で、吸水してやや膨らんだ花粉は、3時間後には球形になり、花粉管が発芽・伸長して乳頭細胞に侵入した (図2d)。また、花粉と乳頭細胞の間には“foot”構造が見られた (図2c)。Footは花粉の花粉表層物質が移動して形成されるもので、花粉の乳頭細胞への接着に関係する。これらの受粉過程での花粉と乳頭細胞のX線分析の結果を図4に示した。乳頭細胞では受粉後30分から3時間にかけて、CaのX線強度の著しい増加がみられた。P, S, K についても30分後にX線強度の増加が見られたが、3時間後には元のレベルに戻った。一方、花粉については、CaやPの増加は見られず、S, KでX線強度の増加が見られた。さらに、図5に示すように、受粉前には検出レベル以下であったClが受粉後3時間で増加した。

自家受粉の場合には、受粉後30分でも花粉の形は変化せず吸水は見られなかった (図2e)。また、花粉管が発芽し

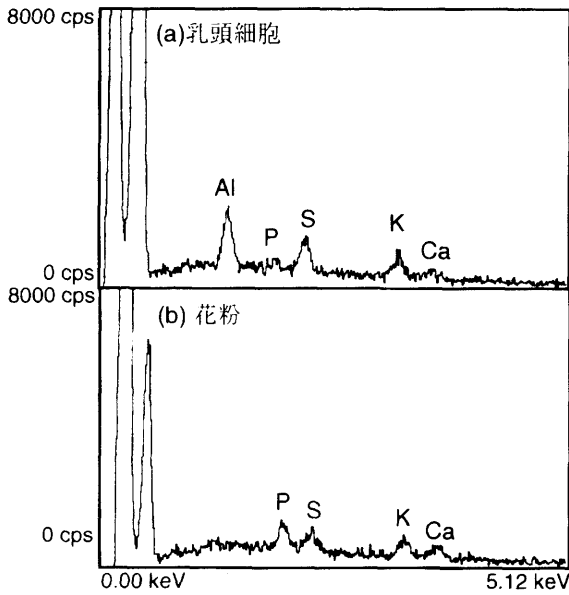


図3 受粉前の乳頭細胞と花粉のX線スペクトラム。

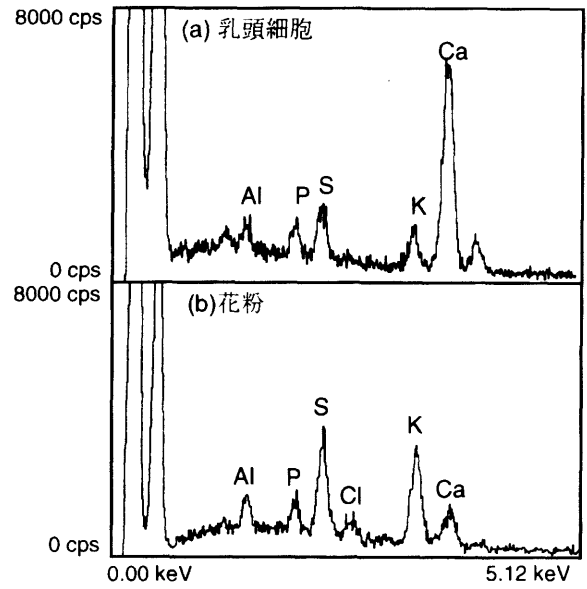


図5 他家受粉後3時間の乳頭細胞と花粉のX線スペクトラム。

でも、図2fに示すように乳頭細胞への侵入は阻害されていた。これらの乳頭細胞と花粉のX線分析を行ったところ、乳頭細胞で、Ca強度の増加がみられたが、P、S、Kの変動は見られなかった。また、花粉でのこれらの元素の変動は観察されなかった（図6）。

2) TEMによる観察

他家受粉および自家受粉時における乳頭細胞と花粉の元素の変動が、細胞内の微細構造とどのように関係しているかを調べるために、受粉前と受粉後の乳頭細胞をTEMにより観察した。図7aに受粉前の乳頭細胞を示す。細胞壁は

厚く、外側の電子密度の高いクチクラ層と内側のペクチンセルロース層からなっており、細胞質には、多数のゴルジ体、小胞体、ミトコンドリアと液泡が観察された。

他家受粉後30分では、図7bに示すように、乳頭細胞の細胞壁でペクチンセルロース層の外層では膨潤が見られ、また内層ではベシクル様の電子密度の低い構造が見られるようになった（図7b）。図8は受粉後3時間の乳頭細胞先端の横断面である。乳頭細胞の細胞壁のペクチンセルロース層の内層と外層の間を花粉管が伸長しているのが観察できる。そして花粉管と乳頭細胞との間のスペースは、繊維

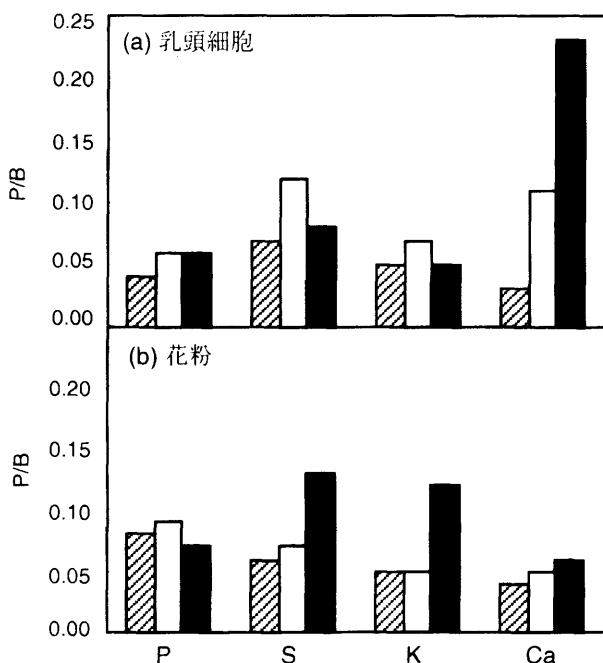


図4 他家受粉時におけるP、S、K、Caの相対的X線強度。
▨：受粉前，□：受粉後30分，■：受粉後3時間

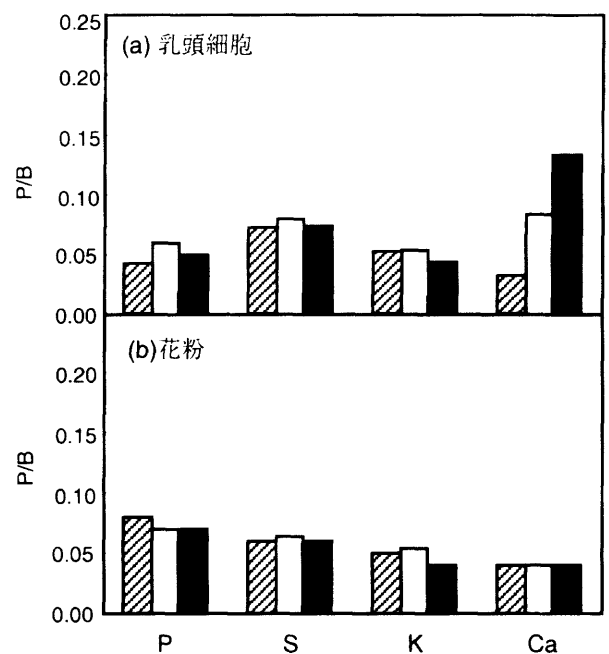


図6 自家受粉時におけるP、S、K、Caの相対的X線強度。
▨：受粉前，□：受粉後30分，■：受粉後3時間

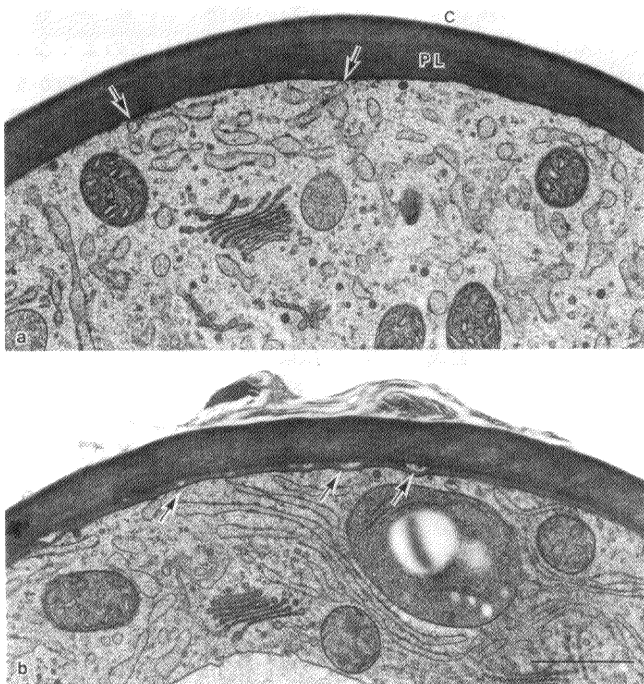


図7 a. 受粉前の乳頭細胞。スケールは $0.5\mu\text{m}$ 。C：クチクラ、PL：ペクチンセルロース層
b. 他家受粉後30分の乳頭細胞。スケールは $0.5\mu\text{m}$ 。

状或いはベシクル状の構造で充たされていた。

一方自家受粉の場合には、細胞膜と細胞壁の間、或いはペクチンセルロース層の内部に電子密度の低いベシクル様の構造が見られた（図9）。これは、アニリンブルーで染色されるカロースに相当すると考えられる。また、細胞膜直下には、多数のミトコンドリアみられ、粗面小胞体が細胞膜と接触している像もしばしば観察された。

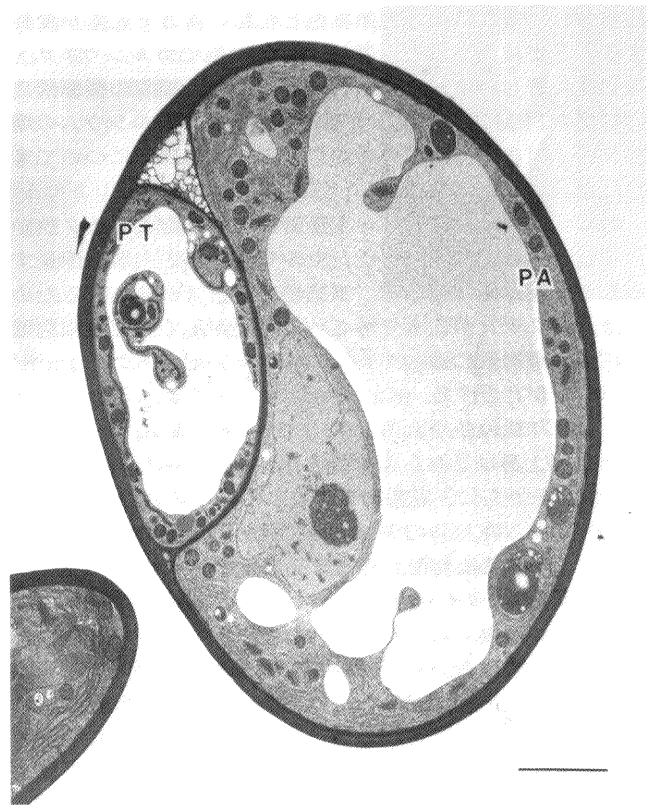


図8 他家受粉後3時間の乳頭細胞の横断面。スケールは $2.5\mu\text{m}$ 。

考察

本研究では、アブラナ科植物の受粉時における元素の変動をVP-SEMにより観察すると同時に、乳頭細胞および花粉での元素の分析を行い、受粉に伴うP, S, K, Caの各元素の変動を検出することができた。

まず、他家受粉の過程では、受粉後30分で花粉の吸水が

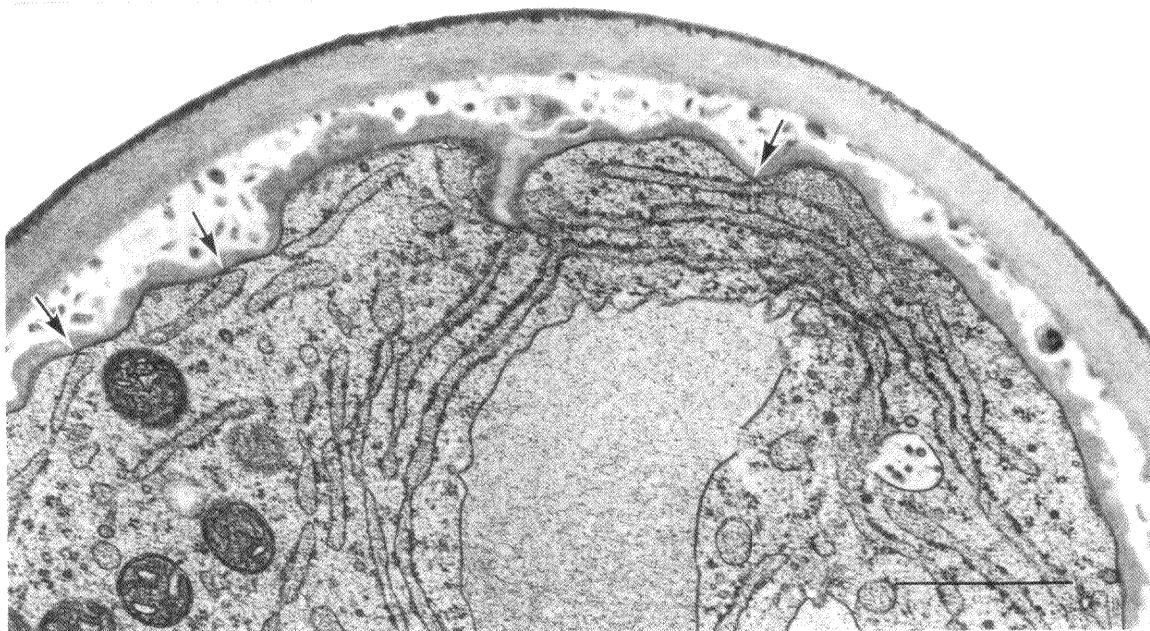


図9 自家受粉後3時間の乳頭細胞。スケールは $0.5\mu\text{m}$ 。

観察され、それに伴い乳頭細胞と花粉の両方で元素が変動することが検出された。特に、乳頭細胞でカルシウムのX線強度の著しい増加が見られた。そこで、細胞の微細構造の変化をTEMにより観察することにより、カルシウムの増加を引き起こす乳頭細胞や花粉での生理的反応について考察した。

他家受粉では、発芽した花粉管は乳頭細胞のクチクラから細胞壁に侵入し、ペクチンセルロース層の内層を伸長することが明らかになった。細胞壁を花粉管が伸長するためには、ペクチンが加水分解される必要がある。乳頭細胞壁や花粉表層物質にはペクチンエステラーゼやペクチナーゼ等の酵素が存在する(6)。また、ペクチンエステラーゼは Ca^{2+} により活性化される。従って、X線分析により検出されたCaの上昇はこれらの酵素の活性化と関係していると考えられる。さらに、花粉の発芽には Ca^{2+} が必要であること、また伸長する花粉管の先端部分では外部からの Ca^{2+} の流入による Ca^{2+} の濃度勾配が存在することが明らかになっている。他家受粉でのCa強度の上昇は、これら花粉管内のCa濃度の上昇に起因する可能性もある。

一方、自家受粉でも、受粉後30分および3時間で、乳頭細胞のCa強度の増加がみられた。このような乳頭細胞では、細胞壁内層に、電子密度の低いベシクル様の構造からなるカロースが形成されていた。カロース合成酵素は Ca^{2+} により活性化されるという報告があり、自己花粉が付着した部位で Ca^{2+} 濃度の上昇がおこり、それがトリガーとなって、カロースの形成がおきるのかもしれない。乳頭細胞の細胞膜直下には小胞体が多数観察された。動物細胞と同様Caストアが小胞体であるとする、乳頭細胞での Ca^{2+} 濃度の上昇はこの小胞体に由来する可能性もある。

他家受粉の場合には、花粉でK、SおよびClのX線強度の増加がみられた。これらの元素の変動は、乳頭細胞から花粉への水の移動とそれに続く花粉管の伸長によるものである。K⁺に関しては、花粉管の細胞膜にK⁺チャンネルが存在することが知られているが、植物細胞における SO_4^{2-} やCl⁻などのアニオンチャンネルについては報告が少ない。VP-SEMでのX線分析は、種々の軽元素を同時に検出することができるので、これらのイオンチャンネルの解析にも有用な情報を与えるものと考えている。

他家受粉の場合でも、自家受粉の場合でも、Caが関与していることが明らかになった。Caがそれぞれどのような反応経路で機能して、受精を抑制或いは促進しているのかを明らかにすることが今後の課題である。そのためには、細胞内の微細構造レベルでのCaの変動を明らかにする必要があると考えている。

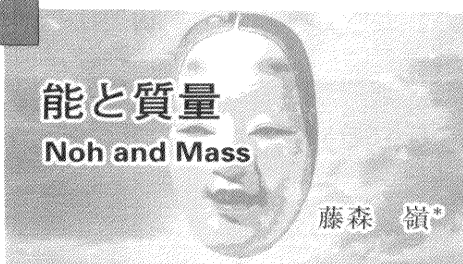
謝辞

本研究では、日立サイエンスシステムズの和田正夫氏と株式会社堀場製作所の森田洋二氏に多大なご指導をいただいた。ここに、感謝をこめてお礼申し上げます。

参考文献

1. de Nettancourt D : Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plant pp. 1-230, (Springer Verlag, Berlin) (2001)
2. Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F.S., Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, and Isogai A, The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97 : 1920-1925 (2000)
3. Iwano M, Wada M, Morita Y, Shiba H, Takayama S, and Isogai A, X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in *Brassica* using variable-pressure scanning electron microscope., J. Electron Microsc., 48 : 909-917 (1999)
4. Kuboki K and Wada M, Scanning electron microscopy of food items using a variable-pressure SEM., Hitachi Review, 45 : 31-34 (1996)
5. Kishi-Nishizawa N, Isogai A, Watanabe M, Hinata K, Yamakawa S, Shojima S and Suzuki A Ultrastructure of papillar cells in *Brassica campestris* revealed by liquid helium rapid-freezing and substitution-fixation method., Plant Cell Physiol. 31 : 1207-1219 (1990)
6. Elleman C and Dickinson H G, The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L., New Phytol., 114 : 511-518 (1990)

エッセイ



とある秋の夕暮れ、新宿御苑の薪能を観に行った。舞台は日頃見慣れたものより一回り大きく、背景には松の鏡板にかわって大振りの木がゆさゆさと風に揺れていた。それだけでも何かおどろおどろしいものを感じるのに、さらに舞台や橋掛かりの前には篝火がしつらえられ、パチパチと音まで立てている。少しひやとする冷気の中で、今演じられているのは「恋重荷（こいのおもに）」。シテは観世榮夫、ワキは宝生 閑。

世の中にはいくら思ってもかなわぬ恋というものがあるというが、これはまさにその通り。この物語の主人公“山科の莊司”という菊作りの上手な老人は、こともあろうに自分の勤務する“白川院の女御”に恋をしてしまった。もちろん叶うはずとてなく、引きこもっていると、周囲のものは老人を引きだし、庭に置かれた荷を負って歩けば、女御がお姿を現すかもしれないとそそのかした。錦に包まれた華麗な荷は、一見軽そうだがとても持ち上がる重さではなく、老人は力を使い果たし、息絶えてしまう。さて、後半は老人を弔おうと庭に出た女御を、後シテの老人の霊が打ち据えるが、やがておさまり女御の守護神になろうと言って立ち去るもの。女御の立場から言えば、勝手に片思いをしたくせに恨むなんて冗談じゃないというのかもしれない。

新能の大きな舞台での動きは、いつもと異なった気持ちの高ぶりを感じさせる。特に後シテ（老人の霊）がシテツレの女御を打ち据える鹿背杖の唸りは、能楽堂にはないマイクに拾われ、妙に生々しい迫力を感じる。能の物語は最後に救われる形をとるものが多いといわれるが、後シテの供養の言葉も、本当にそんなに割り切れるものなのかなとの思いを抱きつつ眺める。確かに亡霊となってから苦悩し続けられても困る。

ところで舞台に置かれた錦に包まれた重荷は、天秤棒みたいなもので左右に振り分けられ、いかにも軽そうに舞台へ運ばれてくる。能舞台には緞帳がないので、あの軽いのが重荷？とどうしたって思ってしまう。それでも舞台が進むうちにはシテの心持ちになり、一緒に渾身の力を込めて持ち上げようとしていたりする。軽いものを重いように見せるのは難しいだろう。どんなに目を凝らしても張り子にしか見えない舞台だってありそうだ。つくづく、演じる方の技量と見る側の感性の問題と思ってしまう。

重いということから頭の中では分子の質量、そしてそれを測る質量分析計へと展開していく。我が青春のMSは日立M-80GC。姿も美しく、気が合った。分析機器だって惚れ込むようなものでなくては。

今の質量分析計はGC-MSとして使っている人が多数派と思うが、機器の進歩とともにスペクトルが一人歩きし始め、コンピューターによるライブラリーシステムの充実と相まって、測定している人間には化学物質を扱っているという実感がわきにくくなっている。紙の上に書かれたピークにはコンピューターで判定された物質名が書き込まれる



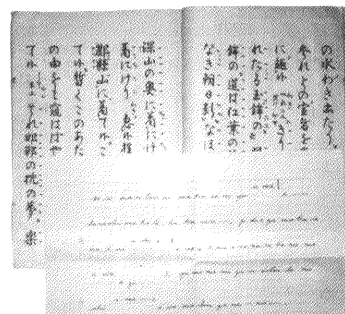
となると、測定者としては楽ではあるがひとつひとつのピークに該当する物質に対する実感はまったく無くなってしまふ。同じ様なことは遺伝学にも起こっているように思う。遺伝学ではなく遺伝子工学という名になった分野では遺伝子の塩基配列は記号の世界になっている。A,T,G,Cというアルファベットが活躍し、遺伝子もれっきとした化学物質であることを忘れさせる。そこに存在する生命をも忘れさせる。化学物質を扱い、生命を扱う者は記号に幻惑されずに、重みのある物質の実感を得る感触というようなものを大切にしていかなければならないと思う。実体を見つめることを忘れたくない。

私が謡曲を習いに、練馬区小竹町の宝生弥一先生のお宅に通いだしたのは東京教育大学付属中学の3年生の春休み。別に誰に勧められたわけでもない。能のことはまったくわからず、下懸り宝生流（ワキ宝生流）がワキ方の流派であることも知らなかった。後に行くことになる早稲田大学が流派の一大拠点であることも知らなかった。弥一先生の先代の宝生新先生の弟子の一人に夏目漱石がいたこともずいぶん後になってから知った。

そして今、先生は弥一先生のご子息 閑先生（第12代宗家）に代わっても、月に3回ほどお宅に通っての稽古という生活は変わらない。弥一先生も閑先生も人間国宝、宝生閑はくだんの「恋重荷」でワキを務めていた方である。入れ物は学生鞆からアタッシュケースに変わったが、いつも扇を持ち歩いて40年、習った曲は124曲にもなった。実はこの扇、ずっと後になって聞いたことなのだが、同級生の女の子には「なんてキザな奴」と映っていたらしい。

惚れたM-80に働いてもらって（片思いではなかった）博士号を戴いたとき、弥一先生が「一日一日が大切」とおっしゃりながら「在平素（へいそにあり）」と書かれた色紙をくださった。継続はやはり力なのだろうか。どんなに迷うことがあっても、扇を構えれば即座に安定感を取り戻すことが出来る。

恋にしても、舞台にしても人の心を揺さぶり動かすことに変わりはない。質量分析計で図れないものを動かすのも面白いことなのかもしれない。



著者が最初に習った「枕草子」の謡本と、宝生弥一先生が書かれたローマ字による説明

* 曾田香料株式会社分析評価センター常勤顧問、日本たばこ産業株式会社調査役、帯広畜産大学地域共同研究センター客員教授、玉川大学学術研究所客員教授、東京農業大学総合研究所客員教授、早稲田大学教育学部非常勤講師、下懸り宝生流弥生会会員 農学博士（北海道大学）

解 説

S-5200形超高分解能インレンズFE-SEMの紹介

Model S-5200 Ultra-High resolution in-lens FE-SEM

佐藤 貢* 影山 甲子男* 渡邊 俊哉**

1. はじめに

IT産業の飛躍的な進歩にともなって、半導体デバイスの微細化と多層化が加速的に進み、現在の走査電子顕微鏡（SEM）の性能ではデバイス評価（特に断面観察）に限界がきている。一方で、バイオ・新素材分野でも超高分解能観察を求めるニーズが増大し、分解能の更なる改善を求める声が出てきている。さらに、デジタル化したSEMの画像データを効率よく運用するために、ネットワークやデータベース機能を兼ね備えたPC-SEMが求められている。こうしたニーズに対応して、世界最高の分解能をもつインレンズ形FE-SEM「S-5200形電界放出形走査電子顕微鏡」を発売した。

SEMの分解能を改善するには、試料上を走査する電子ビームをより細く絞るための電子光学系が不可欠だが、これだけでは不十分である。高分解能観察を行うためには、高倍率（例えば、20万倍以上）で画質を阻害する種々の要因を合わせて改善する必要がある。高倍率観察においては、装置の耐振性、ステージ安定性、コンタミネーション（試料汚染）、検出信号の質（二次電子と反射電子の比率）などによって、SEM像の画質が左右される。S-5200では、こうした要因に対する多面的な改善を図った。本稿では、S-5200の主な特長と超高分解能観察で重要な機能や性能について示す。

2. S-5200の特長

S-5200では、ルーチンワーク環境において高分解能と高スループットの両立を図るために、以下に示す機能と性能を備えている。図1に、S-5200の外観を示す。

- (1) 高分解能対物レンズ（分解能1.8 nm at 1kV, 0.5 nm at 30 kV）
- (2) シグナル可変機能（二次電子と反射電子の検出比率の任意設定）
- (3) 低加速反射電子検出機能
- (4) コンタミネーション低減機能
（高速ビームブランキング、ドライ排気システム、コンタミネーショントラップ）
- (5) 高耐振性（床振動許容値：10 μ m at 5 Hz, 60万倍）
- (6) 絞りの調整が不要な電子光学系
- (7) Windows NT®上のGUIによるSEM操作とネットワーク機能

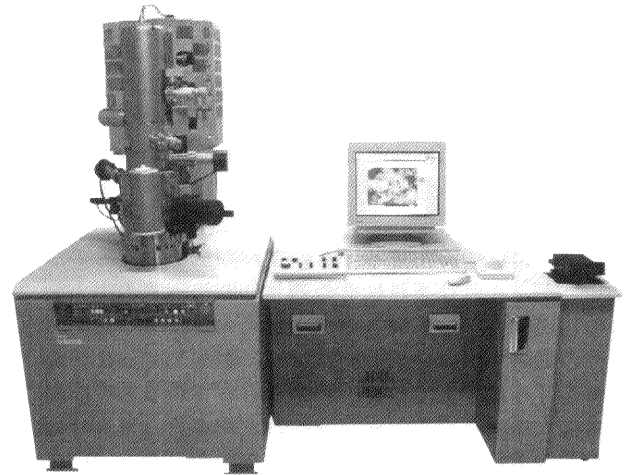


図1 S-5200の外観

3. 高分解能の実効性を向上するS-5200の機能

3.1 シグナル可変機能と低加速反射電子検出機能

高分解能を必要とするアプリケーションでは、試料から発生する二次電子や反射電子の信号から目的に応じた情報を選択的に抽出することが重要である。S-5200では、最適な信号を選択するために、二次電子（SE）の他、試料から低角度で発生する反射電子（BSE-L）と高角度で発生する反射電子（BSE-H）をそれぞれ別々に検出することができる（図2参照）。これらの信号をアプリケーションに応じて選択したり組み合わせることによって、SEM像の画質（コントラスト）を改善できる¹⁾²⁾。これらの信号の内、SEとBSE-Lとを任意の比率で検出する機能がシグナル可変機能である。一方、BSE-Hの検出器は低加速領域で高い感度を有し、シグナル可変機能で最適化された信号と合成することができる。

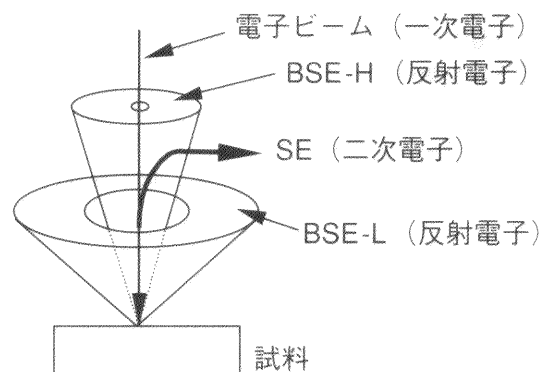


図2 S-5200の検出信号

* 株式会社日立製作所 計測器グループ

** 株式会社日立サイエンス テクノリサーチセンタ

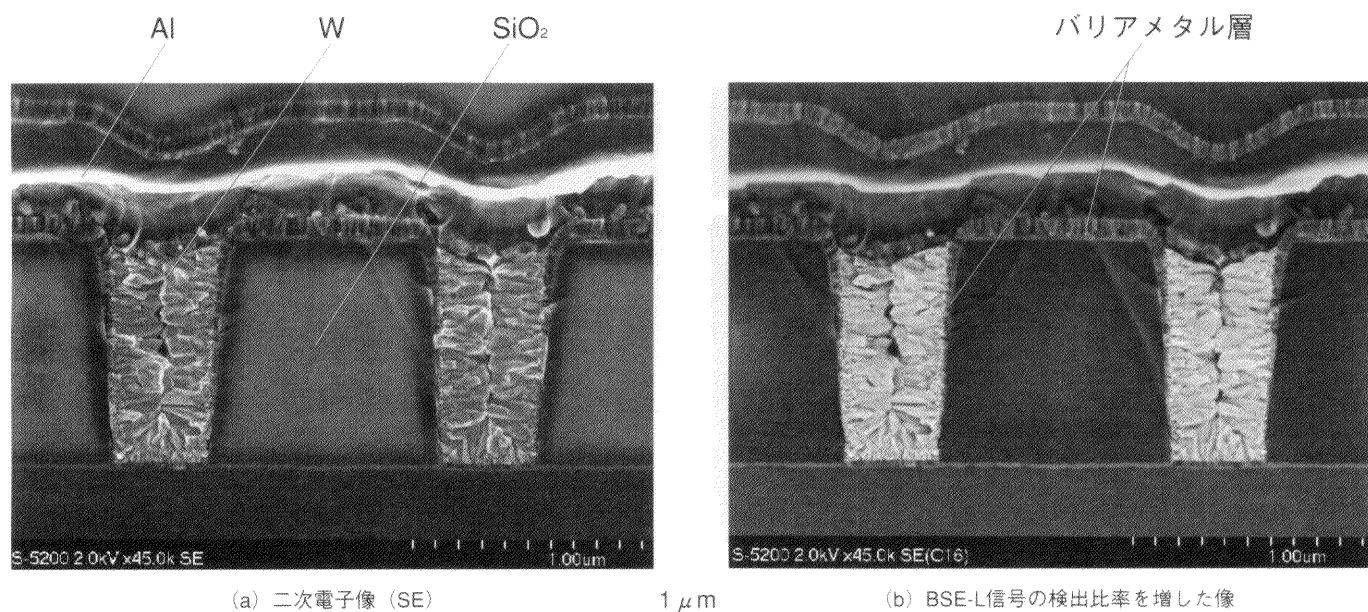


図3 通常の二次電子像とシグナル可変機能でBSE-L信号の検出比率を増した像の違い

次に、これら信号最適化の応用例を示す。図3は、マイコンチップの配線部断面をS-5200で観察したSEM像（加速電圧2kV）である。図3aと図3bは、それぞれ通常の二次電子像とシグナル可変機能でBSE-Lの比率を増した像を示している。二次電子像（a）では、Al部分に強いエッジコントラストやSiO₂とバリアメタル層の境界付近に帯電の影響が認められる。これに対して、BSE-Lの比率を増した像（b）では、帯電の影響もなく、Wやバリアメタル層が良好なコントラストで得られている。

図4に、炭素系材料の内部に白金微粒子が含まれる触媒の観察例を示す。このアプリケーションでは、SE信号（図4a）とBSE-H信号（図4b）とが全く異なる情報（SE：表面情報、BSE-H：内部情報）になっている。これらの信号を合成すると、図4cに示すように、炭素表面とその内部に分布している白金微粒子が明瞭に観察される。

図4は、D-RAMの半球状容量絶縁膜（Ta₂O₅）の観察

例である。この試料を従来の装置（S-5000）で観察するには、比較的高い加速電圧（10kV～15kV）による反射電子を用いる必要があった（図5b）。これを低加速電圧（2kV）のBSE-H信号（S-5200）で観察すると、図5aの像が得られる。一般に、高加速電圧では一次電子が試料内部の広い領域に散乱するため、アプリケーションによっては反射電子像の解像度が低下する。この観察例では、低加速反射電子信号（加速電圧2kV、BSE-H信号）を選択することにより、高加速電圧の場合よりも高解像度で高コントラストな像が得られている。

3.2 コンタミネーション低減機能

試料に電子線が照射されると、試料から発生、もしくは残留ガスとして存在する有機ガス分子が電子線で分解・重合して試料表面に堆積し、図6に示すように試料の微細形態を覆ってしまう。この現象をコンタミネーション（試料汚染）と言う³⁾。コンタミネーションが発生すると観察対象からの信号（特に二次電子）が遮断されるため、画質が

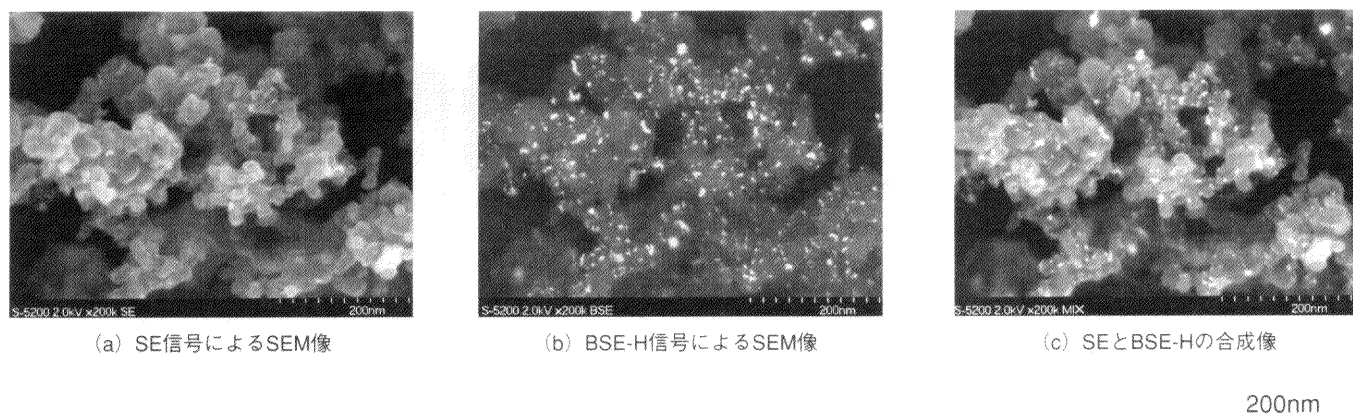


図4 触媒の観察例（加速電圧2kV）

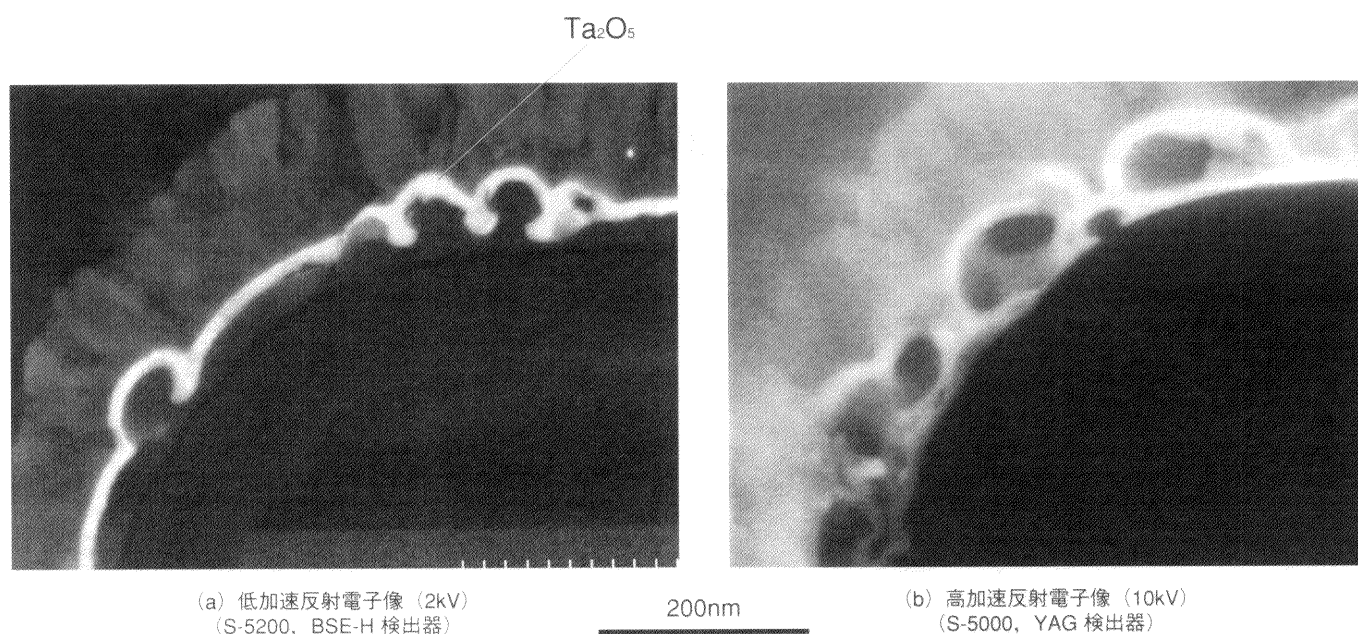


図5 低加速反射電子像と高加速反射電子像の比較 (試料: D-RAM トレンチキャパシタ部断面)

低下したりフォーカス調整が困難になる。コンタミネーションの影響は、観察対象が微細になるほど、そして一次電子の加速電圧が低いほど深刻になる。コンタミネーションを低減するには、①不要な電子線を試料に照射しない、②試料周辺をできるだけクリーン (有機ガス分子を除去) で高真空にする、などの処置が有効である。

SEMにおけるビーム走査は電源周波数 (50Hz/60Hz) に同期しており、各々の水平走査の後に同期をとるための数十 μ sec から数 msec の走査休止時間がある (この休止時間は水平走査時間と異なる)。この間は、高密度のビームが試料上で静止するため、コンタミネーションが特に発生しやすい。S-5200では、走査休止中にビームを高速遮断するビームブランキング機能を搭載し、走査休止中に発生するコンタミネーション (SEM像の左端に現れる) を回避している。一方、クリーンな真空を実現するためにドライポンプとターボ分子ポンプで構成される完全ドライ排気系を採用し、試料室の真空度を 10^{-5} Pa オーダに維持している。また、図7に示すような、試料を取囲むコンタミネーショントラップを液体窒素で冷却することにより、試料周辺の

真空度をさらに改善することができる。

3.3 S-5200の耐振性

観察倍率が高いと床振動や周囲の音でSEM像が影響 (像障害) を受けやすくなる。そのため、高分解能な装置ほど高い耐振性が必要となる。像障害が実用上無視できる床振動の大きさ (床振動許容値) は、観察倍率と床振動の周波数で異なる。図8に、S-5200の振動許容値 (周波数5 Hzの場合) と観察倍率の関係を、他機種と比較して示す。S-5200はインレンズSEMの従来機種 (S-5000) よりも耐振性が改善され、大形試料室の一般的なFE-SEMと比較すると約10倍の耐振性を有している。

4. まとめ

超高分解能インレンズFE-SEM「S-5200形」の特長と主な機能を中心に解説し、いくつかの応用例を示した。SEMの分解能 (ビームサイズ) の改善は目覚しく、特にSnorkelレンズⁱⁱ⁾の実用化により大形試料室を有するSEMの分解能もインレンズSEMとほぼ同等のレベルに達している⁵⁾。

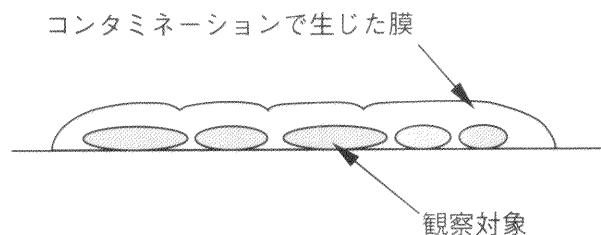


図6 試料のコンタミネーション

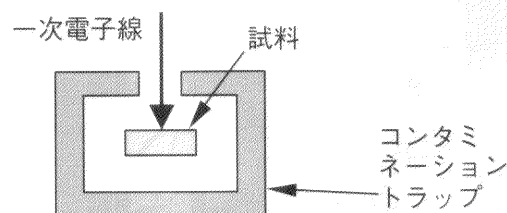


図7 コンタミネーショントラップの構造

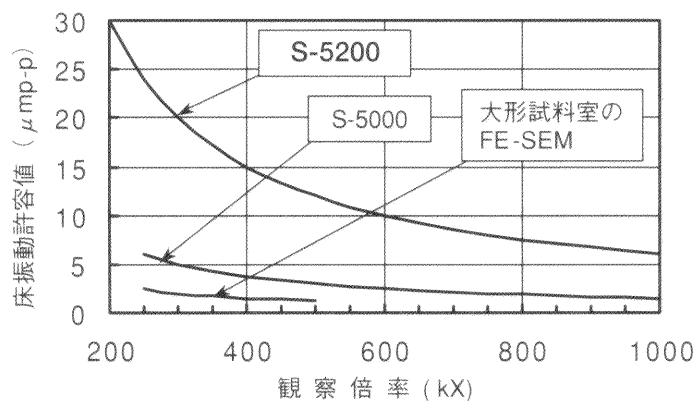


図8 床振動許容値(5Hz)と観察部倍率の関係

一方で、インレンズSEM (S-5200) の場合には、観察できる試料の大きさがmmオーダー（平面試料：9.5mm(長さ)×5.0mm(幅)×3.5mm(厚)、断面試料：6.5mm(長さ)×2mm(厚)×6.5mm(幅)）に制限されるため、一見するとインレンズSEMの利点が見失われがちである。しかしながら、高分解能（高倍率）観察の容易さと実効性を左右する重要な装置要素（ステージ安定性、耐振性、コンタミネーション）を比較すると、インレンズSEM (S-5200) は大形試料室を有するSEMに対して圧倒的に有利であり、この最大の理由は試料サイズが小さいことである。S-5200は、「試料サイズが小さい」というインレンズSEMの利点を最大限に引き出して、高分解能観察の実効性を高めた装置である。今後は、

半導体分野のみならず、材料やバイオ分野など幅広いアプリケーションでS-5200の利用が期待される。

文献

- 1) Sato, M. et al.: Proc. M&M2000, 6, 748, 2000.
- 2) 澤島他：LSIテストングシンポジウム/2000会議録、157, 2000
- 3) 外村編：電子顕微鏡技術、丸善、190, 1989
- 4) Mulvey, T. et al.: Inst. Phys. London Conf. Series, 16, 1973.
- 5) Sato, M. et al.: Proc. SPIE, 2014, 17, 1993.

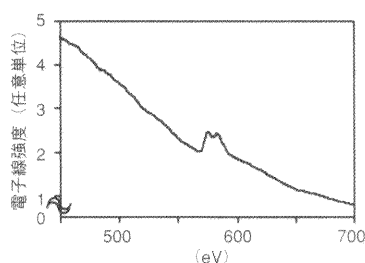
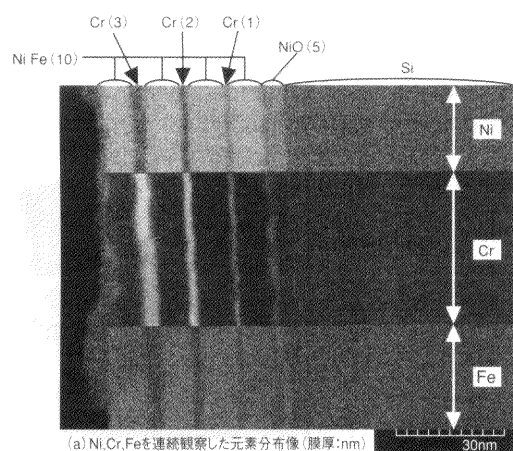
新製品紹介

ELV-2000形 実時間 軽元素分布像観察装置 (エレメントビュー)

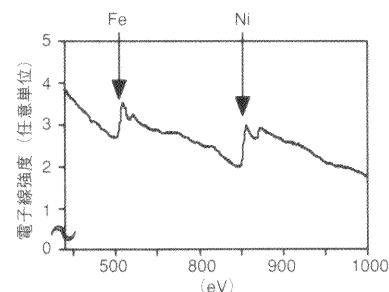
数ナノメートルの金属薄膜の元素分布を分析、観察する装置を製品化した。これはすでに発売中のHD-200形走査形透過電子顕微鏡に取り付け、試料中の特定原子を励起した透過電子のエネルギー損失を検知して、元素の分布像を得る装置である。明るい部屋で、特定元素の鮮明で拡大された元素分布像が

数分で観察することができる。図はNiFe中のCr薄膜を観察、分析した例である。同一の走査画面上でNi, Cr, Feのエネルギー損失電子に切り換えてその分布像を撮影したもので、数ナノメートルのCr膜が鮮明に観察できる。

(田谷 俊陸 記)



(b) Crのエネルギー損失スペクトル



(c) FeとNiのエネルギー損失スペクトル

図 Cr/NiFe積層膜のNi, Cr, Feを連続観察した元素分布像と各元素のエネルギー損失スペクトル

学会発表 ミニファイル

山田満彦 望月康平
(株式会社日立サイエンスシステムズ)

1. Microscopy and Microanalysis 2000 (2000・8/13~17, Philadelphia)

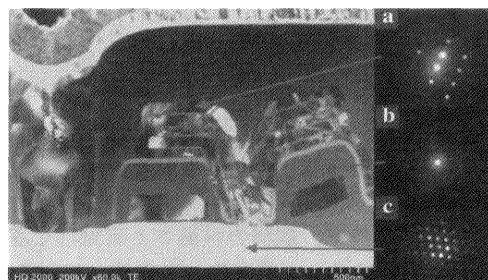
上野 (日立サイエンスシステムズ), 他: Site specific TEM specimen preparation using an FIB/TEM system

田谷 (日立・計測器グループ), 他: Development of a real time elemental mapping system in a scanning transmission electron microscope

上野 (日立サイエンスシステムズ), 他: Recent developments in failure analysis in an ultra thin film evaluation system

超薄膜評価装置HD-2000とマイクロサンプリングシステムを備えた集束イオンビーム加工観察 (FIB) 装置FB-2000Aの組み合わせシステムを開発し、半導体デバイスの特定部位を高い位置精度で薄膜試料作製し、TEMレベルの高精度故障解析がSEM並みの簡単な操作で迅速に行えるようにした。また、このシステムを用いて図1に示すシリコンデバイスの高角度暗視野像および図中矢印で示す微小領域 a), b), c) の電子回折パターンの観察に成功した。

図1 半導体デバイスの暗視野像と微小領域の回折パターン



2. 第16回分析電顕討論会 (2000・9/19~20, 工学院大学)

矢口 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIBマイクロサンプリング法による電子材料の評価

黒田 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIBマイクロサンプリング法によるクリーブ材の評価

今野 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIB加工試料が観察できる試料加熱ホルダー

FIB加工により薄膜化した試料に対して高温その場観察を行うことが可能な試料ホルダーを開発し、ステンレス鋼の酸化皮膜形成過程の観察に応用した。結果として、加熱 (700℃/0.5h) を行ったステンレス鋼表面で直径20~50nmの析出物が確認できるTEM像 (図1) が得られ、電子エネルギー損失分光 (EELS) 分析結果 (図2) からそれらが酸化クロム粒子であることが確認された。

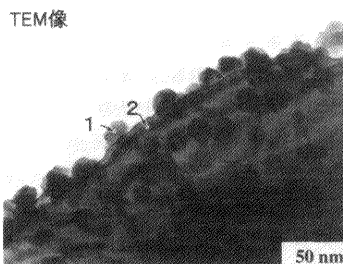


図1 加熱 (700℃/0.5h) 後のステンレス鋼のTEM像

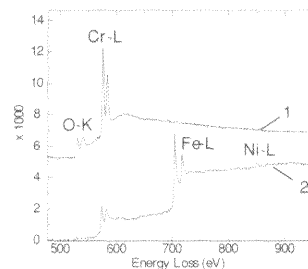


図2 析出物 (1) とステンレス鋼 (2) のEELSスペクトルの比較

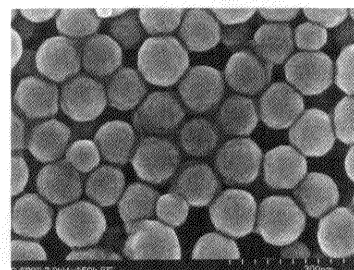
3. SCAN TECH 2000 (2000・9/1, 日本女子大学)

山田 (日立サイエンスシステムズ), 他: SEMによる寸法測定精度を上げるには

中川 (日立サイエンスシステムズ), 他: オスミウムプラズマコーティング法の活用

SEM試料表面に導電性を与えるための新しいコーティング手法として注目されているオスミウムプラズマコーティングについて、高倍率SEM観察のための実用的な処理条件を実験的に求め、従来困難とされていた試料の観察に応用した。図1に示すガラス上の酸化シリコン微粒子 (反射防止膜) の観察などでチャージアップ現象を抑制し微細構造を明瞭に観察できた。

図1 オスミウムプラズマコーティングを施したガラス上反射防止膜の観察例



4. 日本分析化学会 第49年会 (2000・9/26~28, 岡山大学)

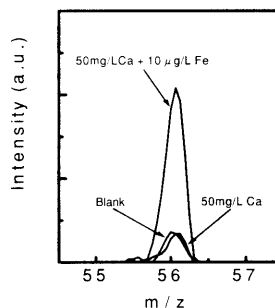
鍋島 (日立中研), 他: LC-ICP-MSの基礎検討

米谷 (日立サイエンスシステムズ), 他: 電気加熱原子吸光法を用いたフッ素系有機溶媒中Al分析における化学修飾剤の効果

岩淵 (日立サイエンスシステムズ), 他: 蛍光検出器および化学発光検出器を用いた有害大気汚染物質ニトロアレーンの分析

坂元 (日立サイエンスシステムズ), 他: ICP-3 DQMSにおける分子イオンの挙動の検討

ICP/MSで分析値の信頼性に影響を及ぼす要因のひとつであるカルシウム由来の分子イオンを3DQMSのMS/MS機能を用いて除去する条件を検討した。100mg/Lレベルのカルシウム溶液中でも $^{56}\text{Fe}^+$, $^{75}\text{As}^+$ について良好な分析結果が得られた。



^{56}Fe に干渉する分子イオン (CaO^+) の除去

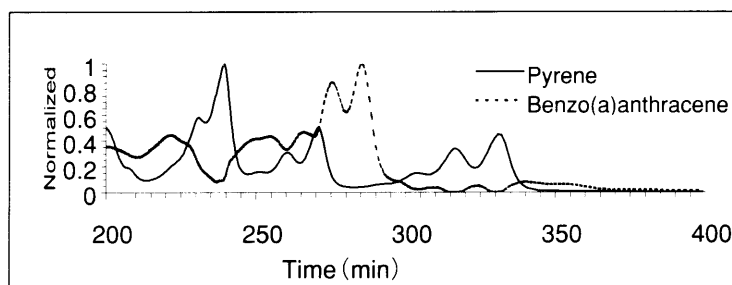
5. 第11回クロマトグラフィー科学会議

(2000・10/26~27, 京都工業繊維大学)

伊藤 (日立・計測器グループ), 他: LC/MSによる合成抗菌剤の分析

甲田 (日立サイエンスシステムズ), 他: HPLCによる重なりピークに対する3Dピークデコンボリューション

クロマトグラム中のオーバーラップするピークを、フォトダイオードアレイ検出器からのデータも含めた3次元のデコンボリューションを用いて分析し、オーバーラップしたピークの純度の算出や、各成分の良好なスペクトルの取得が可能となった。



オーバーラップピークからのデコンボリューションスペクトル

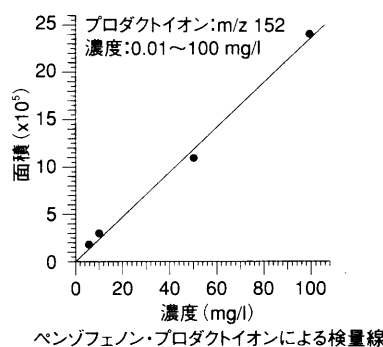
6. 第145回液体クロマトグラフィー研究懇談会 (2000・11/8, 東京理科大学)

甲田 (日立サイエンスシステムズ): ニンヒドリン・ポストカラム誘導体化法によるアミノ酸分析法の高感度化

7. 第242回ガスクロマトグラフィー研究会 (2000・12/1, 薬業健保会館)

望月 (日立サイエンスシステムズ): GC/MS/MS分析の有効性

GC/3DQMSによるMS/MS分析を環境関連物質分析に応用し、定量範囲として 10^4 以上のダイナミックレンジ, MS¹プロダクトイオン/プレカーサイオンが4%以上の高効率MS/MS機能を確認した。



ベンゾフェノン・プロダクトイオンによる検量線

Topics

分析機器展 開催さる



20世紀最後の分析機器展が平成12年8月30日（水）から3日間の日程で、日本コンベンションセンタ（幕張メッセ）にて開催された。今回の分析機器展は「未知への挑戦・未来の創造—新世紀への道しるべ」という統一テーマにふさわしく、期間中の出展企業数は125社、展示小間数は633をかぞえた。また、猛暑にもかかわらず来場者数は31,000名以上に及んだ。

日立グループブースでは「HITACHI Analytical Solution…子供たちの未来を守るために…」をテーマに掲げ展示発表を行った。環境をはじめ医薬品・食品・素材エレクトロニクスの各分野

における分析業務に関するさまざまなニーズに対応した新製品・新技術を中心とした展示を行った。また、展示会場で行われたテーマコーナーではテーマに沿ったアプリケーションを中心に発表を行い、毎回多くの来場者で賑わった。（内田 稔 記）

日本分析化学会 第49年会開催さる

日本分析化学会第49年会が9月26日から28日までの3日間岡山大学津山キャンパスで開催された。参加登録は、約1,400名にのぼり、口頭発表、ポスターあわせて720件の研究成果が発表され熱心な討論が行われた。また、「分析化学未来シンポジウム」、「分析技術シンポジウム」など付設シンポジウムも多く参加者を集めていた。日立からは、蛍光検出器によるニトロアレーン（有害大気物質）の分析、ICP-3 DQMSにおける分子イオンの挙動の解析などを始め、共同発表を含めると11件の発表を行い、多くの研究者と活発な討論が行われた。また永年の分析化学への貢献が認められ日立から鈴木靖久氏、山田英雄氏の2名が有功賞を受賞した。

次回の第50回記念年会は、平成13年11月23日から25日熊本大学工学部で開催が予定されている。（米谷 明 記）

第23回日本分子生物 学会年会開催さる

2000年12月13日から16日、神戸国際会議場にて第23回日本分子生物学会年会が開催された。

本学会は年々規模が大きくなり、今回の演題の最終申し込み数は3,448件にも達したとの事である。また、ポストゲノム研究の時代を迎え、学会付設の商業展示および企業主催によるバイオテクノロジーセミナーも盛況の内に開催された。

日立グループとしては、日立製作所ライフサイエンス推進事業部および日製産業がそれぞれセミナーや商業展示に参加した。今回の目玉製品として米国Nanogen社のNanoChipのパネル展示およびセミナー講演を行い多くの研究者の注目を集めた。この装置はNanogen社、日立製作所計測器グループ、日立計測器サービス、日製産業が協力して製品開発および販売をするものである。電気的にDNAをマイクロチップ上でコントロールして高速かつ精度の高い遺伝子解析を可能にする新たな技術として注目を集めている。現在SNPS解析を中心にアプリケーションを開発中で、さらに遺伝子診断への応用などが期待される。

（川西 航三郎 記）

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) 25-4811
関西支店 電話 大阪 (06) 4807-2511

本社 電話 東京 (03) 3504-7211
横浜支店 電話 横浜 (045) 451-5151
北陸営業所 電話 金沢 (076) 263-3480
中部支店 電話 名古屋 (052) 583-5841
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〉

新世紀最初のSI-NEWSをお手元にお送りいたします。本号の編集作業は大げさに言えば、20世紀から21世紀にかけ2世紀にわたり行われました。新世紀のスタートにあたり、災害や経済不況などネガティブな予測とITや先端技術の発展などポジティブな予測がぶつかり合った年明けでしたが、本年は昨年のようなY2K問題もなく、穏やかな年明けを迎えられたようです。

本号は京大名誉教授深海先生に巻頭言を頂きました。報文として、茨城大学井村先生に安定同位体を用いた定量分析法、奈良先端大学の岩野先生、磯貝先生にSEMによる受粉プロセスの観察について報告していただきました。エッセーでは曾田香料の藤森先生に「能と質量」とのタイトルにて日本の代表的伝統的芸術の能と最新技術の質量分析を結びつけ

て含著あるお話を頂きました。（加藤義昭 記）

- インターネットホームページ
- (株)日立製作所計測器グループ
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。
- (株)日立サイエンスシステムズ
テクノロジーサーチセンター
〒312-0033 茨城県ひたちなか市毛882番地
電話 (029) 273-2111(代)
- 日製産業(株)
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 (03) 3504-7811(ダイヤルイン)
FAX (03) 3504-7756

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MARCH, 2001 VOL. 43 NO. 2

発行 平成13年3月10日
発行人 柴田 史雄
編集人 加藤 義昭
発行 株式会社日立製作所計測器グループ
〒100-8220
東京都千代田区丸の内1-5-1(新丸ビル)
電話 (03) 3214-3122(直通)
印刷 日立インターメディアックス株式会社