

■ ● 目 次 ■

卷 頭 言

卷 頭 言

- 染色体と偕老同穴  
ベネット夫人をボストンに訪ねて  
飯野晃啓 ..... 1

報 文

- 水溶性高分子プライマーを用いた酵素的糖鎖合成方法について  
西口 進 西村紳一郎 ..... 3  
EELSとEXAFS, そのナノスペーステクノロジーへの応用  
田路和幸 ..... 7

解 説

- HPLC/MSによる合成オリゴヌクレオチドの分析と分取  
出口喜三郎 石川昌子  
横倉武文 緒方いずみ  
伊藤伸也 三村忠男 ..... 11  
日立新形高速液体クロマトグラフLaChromEliteシリーズ  
本田俊哉 ..... 15  
FIBマイクロサンプリング法によるピンポイント材料解析  
上野武夫 矢口紀恵  
小池英巳 大西 毅 ..... 20

ラウンジ

- 生き物と科学者とアーティスト  
長島孝行 ..... 23

学会発表ミニファイル ..... 25

新製品紹介

- S-3600N形 走査電子顕微鏡 ... 14
- FB-2100形 集束イオンビーム加工観察装置 ..... 19
- S-4800形 日立超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 ..... 22
- L-8800A形 高速アミノ酸分析計... 24
- U-7000形 真空紫外分光光度計 ... 28

染色体と偕老同穴

ベネット夫人をボストンに訪ねて

Chromosome and Venus's flower basket

-Visiting Mrs.Bennett in Boston-

飯野 晃啓\*

2002年3月、ノッtinghamガムというロンドンの北150キロにある中都市を訪れた。ノッtinghamガム大学と私共の大学との間で交流協定を結ぶためであった。私共の大学の3倍近くありそうな広大なキャンパスに6つの学部と付属病院が配置されている。先方の学長と協定書の交換をした後、国際課の職員にキャンパスの一部と文系の図書館を案内してもらう。図書館は植木鉢の様に上のほうが広がった形をした5階建てのガラス張りのビルである。内部に階段ではなく中心部のエレベーターと建物の周囲を緩やかに廻るらせん状の広い通路が入口から最上部まで通っており、車椅子でも不自由なくどこの書架にも閲覧室にも行ける様設計されている。らせんを生かした構造だ。

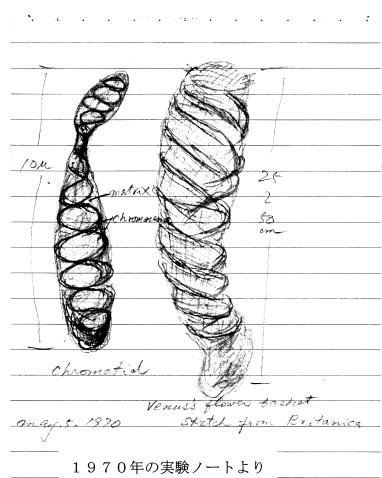
その日の午後、医学部遺伝学教室の招きで「染色体とらせん構造～光線顕微鏡と電子顕微鏡による観察～」と題して1時間の講義を50人の研究者や医学生の前でさせてもらった私は、図書館で見学したらせん通路の巧みな設計の感想を述べて話の切り出した。

染色体とは植物や動物の細胞が分裂する時に現れてくる棒状の物体で、遺伝子の本体であるDNAと、ヒストンと呼ばれる蛋白質とから主として構成されている。植物細胞の染色体が美しいらせん構造をしていることは光線顕微鏡によって100年以上も前から観察され、やがて染色体らせん説へと発展していくが、動物細胞では典型的ならせん染色体は長い間観察されなかった。

1960年代クリーンベンチも精度の高い恒温器も私たちの研究室にはなかった。しかし手製の無菌箱と温度調節の不安定な孵卵器を使っても血液中のリンパ球を分裂させ、染色体が観察できることがわかった私たちは、ヒト染色体のらせん構造解明に挑戦し始めた。培養細胞から染色体を観察するまでの過程でいくつかの処理をするのだが、その過程の中で酵素を使ったり、pHを変化させたりして、ヒト染色体も植物同様らせん構造であることを明らかに



\* 鳥取大学副学長 鳥取大学医学部ゲノム形態学分野（教授）



した。

ノッチンガム大学での調印を終えた私共はロンドンからボストンに飛んだ。ボストン郊外に暮らしておられるベネット夫人を訪ねるためにある。3月のボストンは春までは少し遠く冷たい風が頬をさし

た。Cabot Park

VillageというActive Senior Living Communityに夫人を訪ね、今年92歳になられるお元気な夫人の姿に接し、私共は無性に感激した。夫人は私共を強く抱きしめてくれ「Akhiro, Kayokoよく来ましたね」と言って心からの喜びを表して下さった。スタンレー・ベネット先生は丁度10年前1992年夏、82歳で永眠された。日本の電子顕微鏡開発に尽力され、数え切れない日本人研究者を育ててくださった先生にはいろいろな思い出をお持ちの読者方が多いと思う。

チャペルヒル(ノースカロライナ大学)に留学できた私はベネット先生に、それまでに観察できたヒト染色分体(染色体が縦裂して2本になった1本)の姿を絵に描いて説明した。野球のバットのような棒状の物体の中にらせん糸が見え、時には2本のらせん糸がしめ縄のように絡まって見えることがあると説明した。先生は染色体構造についていろいろ聞いてくれた後DNAの二重らせんと染色体の大らせんとの構造関係を解析するための電子顕微鏡的応用のいくつかのヒントを語ってくれた。「それにしてもこの絵はとてもVenus's flower basketに似ていますね」「ビーナスの花籠……」美しいものだと想像できても何のことか分からずになると先生はEuplectellaと学名を書かれ「海綿動物です。東京湾あたりにも住んでいます。日本名は何ですか分かりません」。私は日本から持参していた岩波生物学辞典を自宅で調べ、それが偕老同穴であることを知り、漢字に書いて翌日ベネット先生に見せた。先生は大きな漢英辞典とBritanicaで確かめた後、「いい名前ですね。エビの夫婦がこの中に住んでいることがありますからね。夫婦仲良くですね」と大きな声で笑われた。事実BritanicaにはVenus's flower basketの項にIn Japan it is regarded as a symbol of eternal love.と書かれていた。

ベネット先生の博識は学者仲間たちのあまねく知るところである。専門の細胞学は言うに及ばず、植物学、

動物学、物理学、化学、歴史学、言語学、日本文化等々、実に豊富な知識量を持たれていた先生に、当時我々若い弟子達は“walking encyclopedia”とあだ名をつけたほどである。

染色体と偕老同穴とは直接何の関係もないが、私が描いた長さ10μmの染色体の絵が長さ50cmほどの海綿動物に似ていたことで、Venus's flower basketという美しい響きの英語と、偕老同穴の本当の意味をベネット先生の博識から知ることが出来た。

ベネット先生は夫人を大事にされ、家族を大切にされた。ベネット夫妻が米子に来られた折、年老いた両親を紹介すると、「お二人お元気ですね。偕老同穴ですね。私たちも偕老同穴になります」と言われたので皆で大笑いしたことがあった。

ボストンには5日間滞在し、4回も夫人のお部屋を訪ねた。何度も会っても話は尽きなかった。「大学を引退したらまた必ず参ります」「まだまだ人の手を借りずに生活できますから必ずいらっしゃい。Stanleyが愛した日本の大勢の皆様によろしく伝えてください」別れ際夫人は又、私共を強く抱きしめてくれた。

染色体のらせん構造の仕事は電子顕微鏡を使ってDNA二重らせんがヌクレオソームへ、そしてソレノイドへとらせんがらせんを巻いて染色分体の大きならせん構造を作っていることが分かりだした。最近は田中SEM研究所との共同研究で、水を含んだ試料を低真空SEMで観察し、動物染色体のらせん糸を観察できるようになつた。1つの細胞核中には引き伸ばすと150cmのDNAが入っていると言われるが、らせんにつぐらせんで遺伝子を染色体の中にパッキングするのが最も賢明な方法であることを細胞は知っているのであろう。

### 著者略歴

飯野晃啓(1938年6月17日生)

[専門] 解剖学、細胞遺伝学

[学歴、職歴]

1964年3月 鳥取大学医学部卒業

1965年4月 鳥取大学医学部解剖学教室助手

1967年4月 ジュネーブ大学医学部形態学教室助手

1970年4月 ノースカロライナ大学医学部生殖生物学教室  
客員助教授

1976年8月 鳥取大学医学部教授

1995年4月 鳥取大学遺伝子実験施設長

2001年4月 鳥取大学副学長(現在にいたる)

医学博士、染色体学会理事、日本解剖学会評議員、日本電子顕微鏡学会評議員

[受賞] 1998年 インド ビシュワ・ナート記念財団

ゴールドメダル

## 報 文

## 水溶性高分子プライマーを用いた酵素的糖鎖合成方法について

Chemo-enzymatic synthesis of glycoconjugates using water-soluble primer polymer

西口 進\* 西村紳一郎\*\*

## 1. はじめに

糖は、蛋白質・核酸・脂質とともに生体内で重要な機能を果たす物質であるが、これまでエネルギー貯蔵物質あるいは生体構造物としての機能ばかりが論じられてきた。しかし、糖鎖が細胞認識、免疫、受精、発生、分化、老化、悪性化、細菌あるいはウィルス感染など種々の生命現象において極めて重要な役割を演じていることが明らかになってくるにつれ、「核酸、蛋白質に次ぐ第三の鎖」として注目を集めている。糖鎖のもつ様々な機能について詳細な研究を進めていく上で、構造が明確で純粋な糖鎖化合物を大量に調製することは必要不可欠である。

近年、糖鎖有機合成化学の飛躍的な進歩により、かなり複雑な構造のオリゴ糖やその誘導体の合成が可能となったが、保護基の選択あるいは反応部位の活性化条件などを綿密に考慮した合成計画が要求される。このように知識と経験が必要なこの手法は、特に有機合成の経験に乏しい研究者にとっては依然としてかなり困難な課題が含まれており、簡単で汎用性のある方法論とは言い難い。

一方、酵素を用いた糖鎖合成も有効であることがわかってきた。酵素合成法の利点は、保護基が必要ないこと、水溶液中で穏和な条件で反応できること、酵素の基質特異性に立脚して高度な位置・立体選択性的に反応を進行させることができる点である。しかしながら、まだ次のような課題が残されている。一般に糖転移酵素による糖鎖伸長反応の効率はそれほど高くない。これは、酵素と糖受容体である低分子オリゴ糖との結合定数があまり小さいとは言えないことに起因してい



る。未反応原料である糖ヌクレオチドや反応副生物であるヌクレオチドあるいは各種金属イオンなど種々の補助的因子などを含む反応系から目的とする反応生成物を分離・精製するのに負担がかかる。必要とされる糖転移酵素のうち実際に入手利用できる酵素は限られている。については、一研究室で解決できるようなものではなく、多くの研究者の活躍が期待される。筆者らは および の問題点を解決すべく、新たな糖転移酵素を用いた糖鎖の合成法を研究しており、その概略を簡単に紹介したい。

## 2. クラスター効果

酵素を利用した糖鎖合成について述べる前に、糖質とこれを特異的に認識する蛋白質(レクチンや糖転移酵素など)の親和性を規定している因子について少し考えてみる。

Leeにより提唱された「クラスター効果」は、糖質とレクチンの相互作用を明快に説明した極めて重要な発見である<sup>1)</sup>。例えば、化学合成によってデザインされた低分子糖鎖リガンド(例えば図1)を用いて、哺乳動物の肝レクチンとの相互作用を調べると、ガラクト-

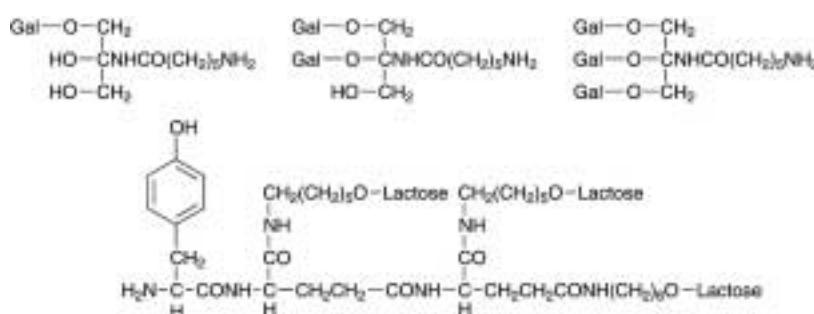


図1 低分子糖鎖リガンドの例

\* (財)バイオインダストリー協会、東洋紡績(株)総合研究所  
\*\* 北海道大学大学院理学研究科 教授

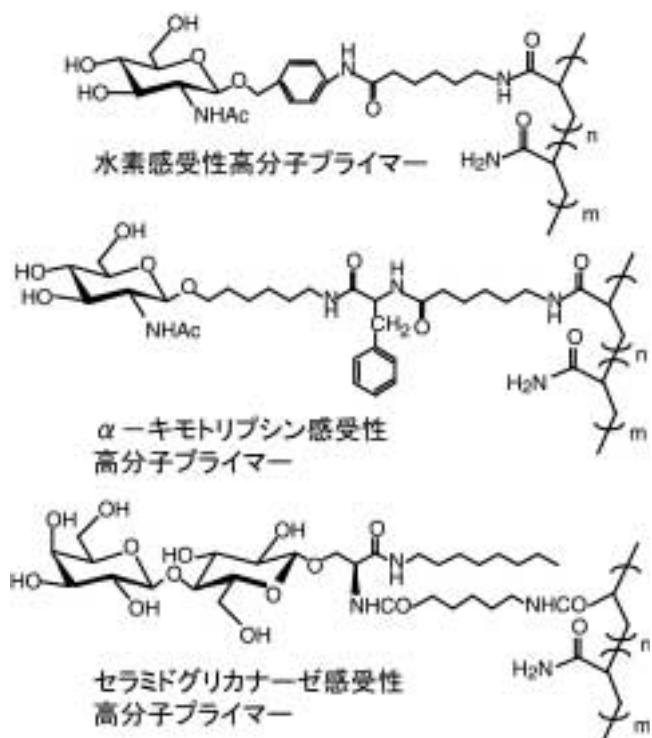


図2 水溶性高分子プライマー

スあるいはラクトースが 1 本鎖， 2 本鎖， 3 本鎖と増加するにつれて親和性が向上し，その割合はほぼ  $1 : 10^3 : 10^6$  にもなる。ただし，この効果を増強させるには，3 つのガラクトース残基の立体的な位置関係が非常に重要であり，このトポロジーにフィットする糖結合部位が，肝レクチン分子上には存在する。別の例として，マンノース結合蛋白質の場合，このような低分

子の糖鎖合成リガンドでははっきりとしたクラスター効果はみられず、むしろランダムにマンノースを共有結合させた多価リガンドと比較的高い親和性を示す。このように糖との結合特異性あるいは親和性は、レクチンの糖結合部位の精緻な構造が作り出すミクロ環境と、それらが蛋白質のどのサブユニットのどのドメインにどのように分布しているかによって決まると考えられている。すなわち、糖鎖どうしのミクロなトポロジー(空間的配置)に依存するクラスター効果と高分子側鎖としての密度に依存するクラスター効果が存在する。

糖質と蛋白質との相互作用における「クラスター効果」をもう少し単純化した系で、しかも糖鎖構造とその密度を意図的にコントロールして調べるためには、合成糖鎖高分子(ネオグリコポリマー)を利用するは有效な手段であることが予想される。比較的シンプルな情報を発現できるいくつかの单糖あるいはオリゴ糖を選び、これらのアノマー位に適切な距離をおいて重合性基を導入したのちアクリルアミドなどと共に重合すれば、水溶性ネオグリコポリマーが調製できる。この水溶性ネオグリコポリマーはアグリコンの構造、リンカーパートの長さ、さらに共重合比などを制御することにより、糖鎖のトポロジーあるいは密度のコントロールが可能であり、これまで困難とされてきた高分子次元における糖鎖と蛋白質との相互作用の基礎研究が一気に進展した。予期したように、様々なレクチンとネオグリコポリマーとの親和性は、概して対応する低分子糖鎖に比べ、数千から数万倍強い親和性が観察され、さらにこの親和性は糖鎖密度に大きく左右されること

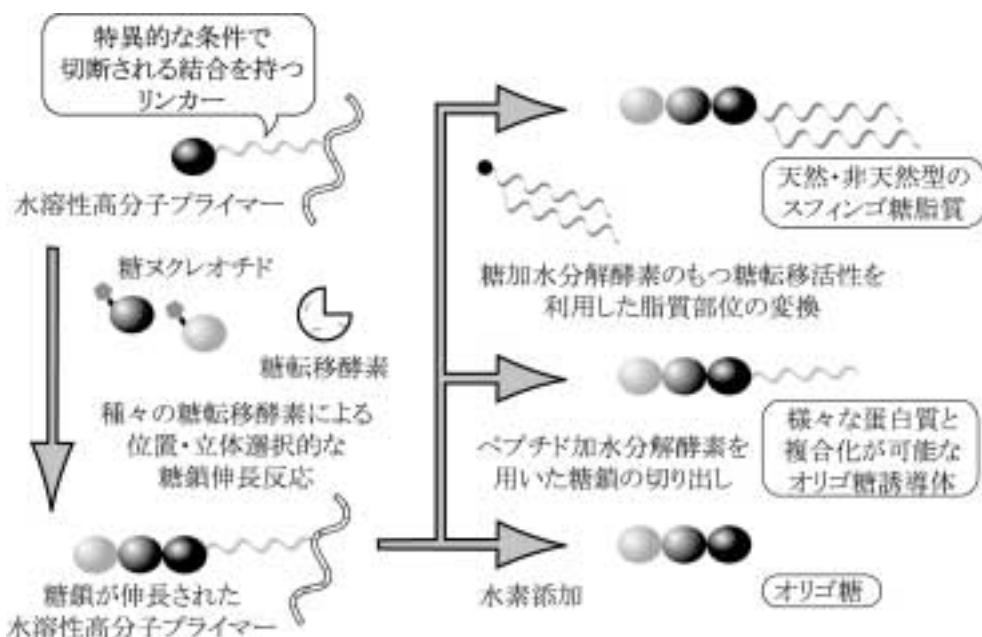
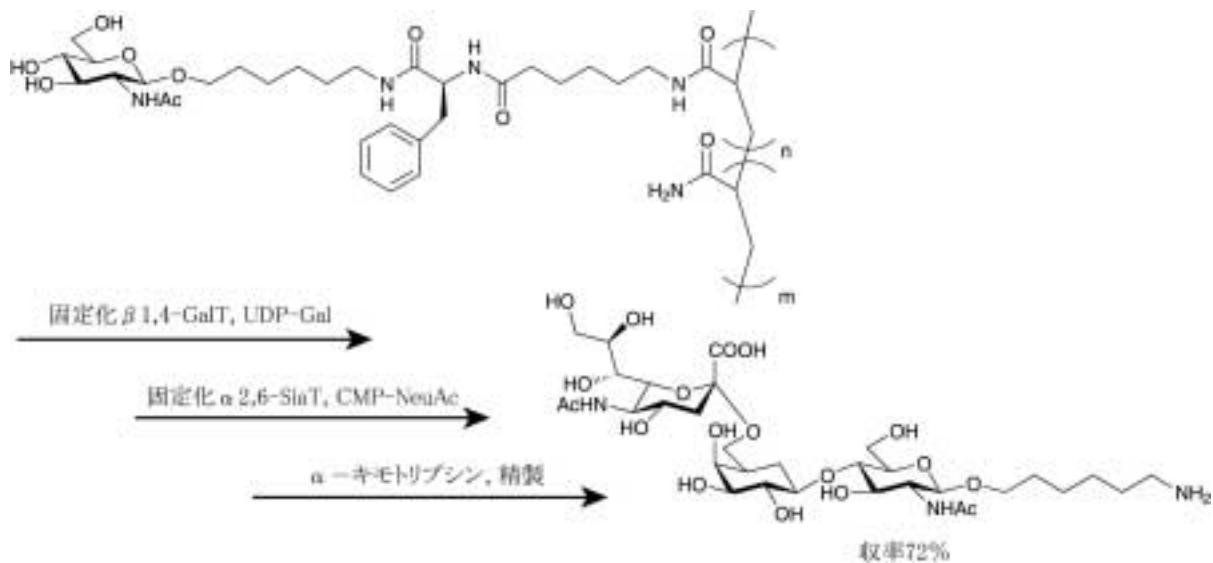


図3 水溶性高分子プライマーを用いた糖鎖合成の概略



などが明らかになった。高分子としての糖鎖密度を高めると、相手分子との最初の結合・脱離の後、引き続き起こる次の相手分子との結合の頻度が増大し、その結果として親和性が向上すると考えられている。しかし、1つの結合部位に対応する1つの精緻なオリゴ糖鎖構造単位が厳密に結合するタイプの相互作用の場合には、逆に糖鎖密度が必要以上に高いと、立体障害のため効果的な結合はできない。これらの現象は相当する低分子基質では到底実現できないであろう。

### 3. 高性能水溶性高分子プライマーの設計

筆者らは図2に示した3種類の高性能水溶性高分子プライマーを設計し、合成した。これらのプライマーは、構造的にはポリアクリルアミド主鎖上に酵素の糖鎖伸長反応の開始点となる糖残基が温和な条件で開裂させることのできるリンカーを介して結合しているという共通点を持っている。これらプライマーは、上述したようなクラスター効果が期待されるとともに、高分子量であるためゲルろ過や透析などにより、反応後、反応液中に共存する糖ヌクレオチドをはじめとする低分子成分と簡単に分離精製できる。また、これらプライマーは水溶性であるために、核磁気共鳴スペクトル法などの分光学的なスペクトルを用いて、途中の反応ステップを追跡あるいは定量することも可能である。

第一のプライマーは、高分子上で糖転移酵素により伸長された糖鎖を水素添加により還元末端が遊離のオリゴ糖としてリリースするタイプのものである<sup>2)</sup>。第二のプライマーは、リンカー部位に含まれるフェニルアラニンのカルボキシル末端側で - キモトリプシンの作用により加水分解されて、伸長された糖鎖がアミノアルキル配糖体としてリリースするタイプのものであ

り、このプライマーにより合成されるアミノアルキル配糖体は、このアミノ基を利用して種々の蛋白質への糖鎖の複合化が可能になる<sup>3)</sup>。第三のタイプは、スフィンゴ糖脂質であるラクトシルセラミド模倣型のポリマーであり、セラミド共存下でヒル由来のセラミドグリカナーゼの作用により、プライマー上で伸長された糖鎖がセラミドへ転移され、スフィンゴ糖脂質としてリリースされる<sup>4)</sup>。

### 4. 水溶性高分子プライマー上での酵素的糖鎖伸長反応

筆者らが開発した糖鎖合成方法の概略を図3に示した。3種類のプライマーはいずれも糖転移酵素(例えば、1,4-ガラクトース転移酵素、2,3-シアアル酸転移酵素、2,6-シアアル酸転移酵素、1,3-フコース転移酵素など)により、ほぼ定量的に糖転移反応が進行することが確認された。表面プラズモン共鳴法を用いて、糖転移酵素とプライマーとの結合を詳しく観察することにより、果たして期待したクラスター効果が発現したかを調べた。その結果、ポリマー上に担持された糖残基は低分子状態(遊離の单糖)で存在するときよりも酵素に対する親和性が100倍以上向上しており、クラスター効果が発現されていることが判明した<sup>5)</sup>。また、種々の糖鎖密度をもつプライマーに対して糖転移反応を行ったところ、酵素反応に適した密度が存在することも明らかになった<sup>6)</sup>。さらに、糖転移酵素は遊離の状態でのみではなく、固定化しても同様に糖転移反応が効率的に進行することも確認された<sup>5)</sup>。固定化酵素は繰り返し使用することが可能であり、まだまだ糖転移酵素が高価であることを考えると経済的に非常に有利である。また、固定化酵素を用いることにより、糖鎖伸長させたプライマーの分離をより容易に完全に

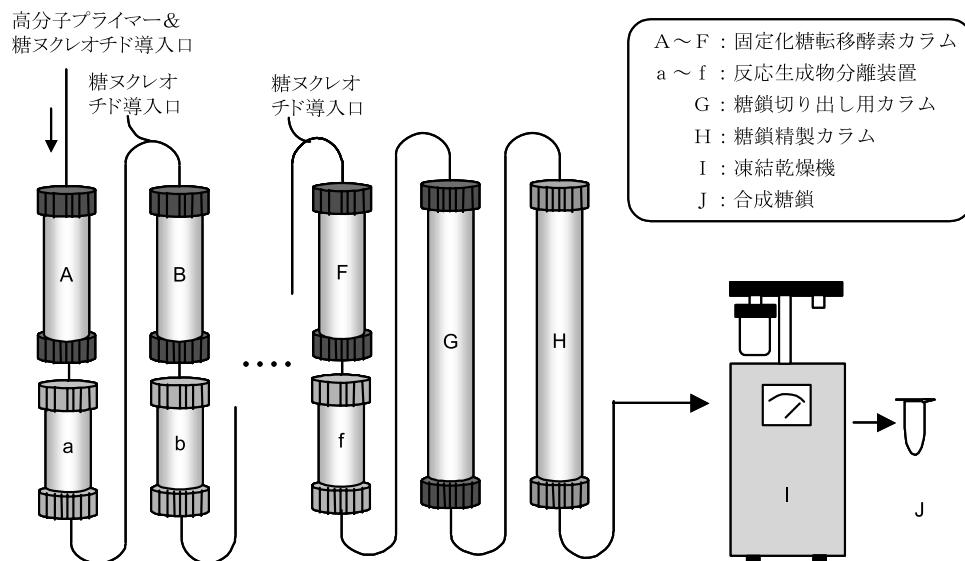


図5 糖鎖自動合成装置の概念図

行うことができる。固定化糖転移酵素と水溶性高分子プライマーを用いた糖鎖合成例を図4に示す。収率72%で目的とする3糖誘導体をわずか4日間で調製することができた。

## 5.まとめ

これまで述べてきたように、筆者らの開発した水溶性高分子プライマーを用いた新規糖鎖合成方法は、従来の方法に比べ、合成工程を大幅に簡素化することができる。本方法は、酵素法の無保護で位置・立体特異

的なグリコシル化を温存な条件で行えるという長所と生成物の分離を容易に行うことができるという固相法の長所を併せ持つ優れた糖鎖合成方法であると言える。筆者らは、図5に示すような概念図に基づき、日立製作所(現日立ハイテクノロジーズ)と共同で図6に示すような糖鎖自動合成装置(プロトタイプ機)を製作し、この方法論を実用化すべく、現在様々な検討を行っている。今後、種々の糖転移酵素がクローニングされることが期待され、近い将来、複雑な構造をもつ糖鎖が誰でも容易に実験室で調製できる日がくるであろう。

## 参考文献

- 1)Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.*, 1978, 67, 509
- 2)S.-I. Nishimura, K. Matsuoka, and Y. C. Lee, *Tetrahedr. Lett.*, 1994, 35, 5657
- 3)K. Yamada and S.-I. Nishimura, *Tetrahedr. Lett.*, 1995, 36, 9493
- 4)S.-I. Nishimura and K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 10555
- 5)S. Nishiguchi, K. Yamada, Y. Fuji, S. Shibatani, A. Toda and S.-I. Nishimura, *Chem. Commun.*, 2001, 1944
- 6)K. Yamada, E. Fujita and S.-I. Nishimura, *Carbohydr. Res.*, 1997, 305, 433



図6 糖鎖自動合成装置(プロトタイプ機)

# EELSとEXAFS,そのナノスペーステクノロジーへの応用

## EELS and EXAFS, Its Application to Nano Space Technology

田路和幸\*

### 1. EXAFSについて

X線吸収端微細構造( Extended X-ray Absorption Fine Structure : EXAFS )は、図1に示すように、物質を構成する元素の内殻電子の特性吸収端の高エネルギー側、数10から数100eVの範囲に観測される振動構造のことを言う。この振動構造を解析すると、吸収原子の周りの局所幾何構造が求められる。この方法は、原子の規則的な周期構造を必要としないため、気体、液体、固体のどのような状態の物質であってもその構造が決定できることから、回折法の利用できない触媒に担持されたナノ金属微粒子や固体表面、液体中のイオン、結晶化できない生体分子などの局所構造の決定に適用された<sup>1),2)</sup>。

このEXAFSの詳細な理論は、専門書<sup>1),2)</sup>に詳細に記載されているため、ここでは、簡単にその原理を紹介することにする。さて、物質を構成する元素の内殻電子の結合エネルギーより十分大きいX線が入射した場合、それにより励起された電子は、励起エネルギーに比例した運動エネルギーをもった光電子として吸収原子から飛び出して行く。このとき、光電子の波動関数 $\psi_c$ (cは中心原子の意味)と、これが周囲の原子のポテンシャルによって散乱されることによって生じる外向きに広がっていく光電子は、 $\psi_{sc}$ の重ね合わせで、次式のように記述できる。

$$\psi_f = \psi_c + \psi_{sc}$$

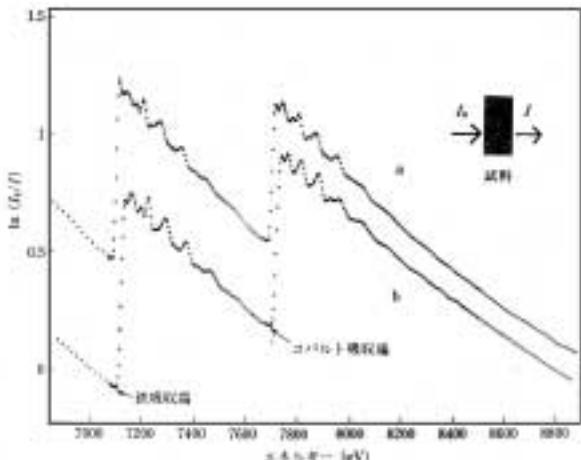


図1 Fe/Co触媒のEXAFSスペクトル。Fe K吸収端とCo K吸収端にEXAFS振動が観測される。

すなわち、EXAFSは、内殻電子の終状態の一電子の波動関数を吸収原子から放出される光電子の進行波と周囲の原子による散乱波の和で記述することに他ならない。言い換えれば、吸収原子の連続体の状態密度は、吸収原子の周りの原子配置の情報を持ち、その状態密度を精密に測定し、それを解析して吸収原子の周りの局所構造を決定するのがEXAFSである。

### 2. EXAFSとEELS

EXAFSの手法がStern, Lytle, Sayersにより報告されたころから、電子線を利用したエネルギー損失スペクトル( Electron Energy Loss Spectroscopy ; EELS )からX線吸収スペクトルに対応する情報を与えることが知られていた<sup>3)</sup>。このEELSという手法は、適応元素が軽元素に限られることや軽元素EXAFSと同様に測定できるスペクトル範囲が狭いために、正確な局所構造情報を取り出せないといった困難がある。さらに、汎用電子顕微鏡の電子源のエネルギー幅が数eVと広く、また電子線強度の弱さから、放射光を利用して測定する軽元素のEXAFSから得られる情報に比べ劣っていた。さらに、透過電子顕微鏡にエネルギー分析器を取り付けて行うために、透過電子顕微鏡の専門家に取っては、補助的情報という認識が強かった。すなわち、X線分光と電子顕微鏡という分野の壁のために、EELS測定の技術は進まなかったと言える。

しかし、電界放出型電子銃を備える透過型電子顕微鏡の出現は、EELS測定に飛躍的な進歩を与えたと考える。この電界放出型電子源は、高エネルギー加速器を用いたシンクロトロン軌道放射光から得られる超強力X線に匹敵する能力を備えていると言える。すなわち、電子放出を常温で出来、電子源の輝度が高く、電子放出源が小さいことから、電子線のエネルギー分解能、強度、さらにナノ焦点の収束ビームの達成と全く新しい次元の電子線を提供した。これにより、放射光と同様の高精度スペクトルが得られるようになった。さらに、この電子線の特徴を生かした、収束電子線を用いたEELSによるイメージング技術の開発などによ



\* 東北大学大学院工学研究科 教授 理学博士

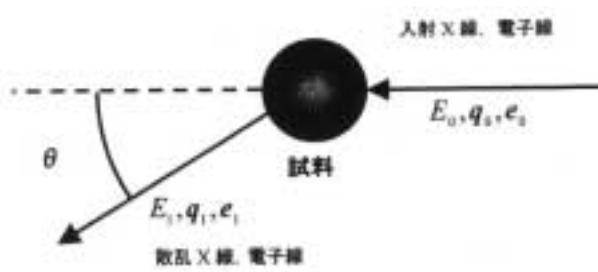


図2 X線と電子線の非弾性散乱。この過程においてエネルギー $E = E_f - E_i$ 、運動量 $q = q_f - q_i$ が物質に移行する。移行運動量が大きくない場合、 $|q| = 2 \sin \theta / \lambda$ （ $\lambda$ ：X線波長）である。

り、EELS技術が透過電子顕微鏡の専門家の間で注目されるようになった。さらに、高分解透過像と観測部の電子構造、すなわちX線では不可能なナノ領域のスペクトロスコピーが可能になった。具体的に電界放射型透過電子顕微鏡の能力を示すと、電子の加速電圧200keVに対して実用的なエネルギー分解能は、0.5eVで、そのとき得られる電子線強度約1nAである。そして、電子線収束サイズは、試料上で0.5nmである。これは、通常利用されているLaB6フィラメントから得られる電子線強度の100倍以上、分解能にして5倍以上に相当する。

### 3. 吸収測定と非弾性散乱

吸収測定と非弾性散乱、それは赤外吸収に対する可視光を利用したラマン散乱の関係と同じである。当然、X線のエネルギー領域に対しても同様な原理が成り立つはずであるが、ほとんど知られていない。<sup>4), 5)</sup>そこで、図2に示すようなX線と電子線の非弾性散乱によ

るEXAFS測定について考えてみる。

二次の光学過程であるX線の非弾性散乱強度を表す動的構造因子 $S(q, \omega)$ は

$$S(q, \omega) = \sum_{i,f} \left\langle f \left| \sum_j \exp(iqr_j) |i\rangle \right| i \right\rangle^2 \delta(\hbar\omega - E_f) \quad (1)$$

によって与えられる。 $\hbar\omega$ は入射X線エネルギー、 $i$ と $f$ とは初期状態と終状態を示し、 $q$ は移行運動量、 $r_j$ は電子 $j$ の座標である。一方、電子の非弾性散乱(Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS)の強度を支配する一般化された振動子強度もほぼ同じ形

$$\frac{df(k, E)}{dE} = \sum_f E_f \left\langle f \left| \sum_j \exp(iqr_j) |i\rangle \right| i \right\rangle^2 \delta(E_f - E) / q^2 \quad (2)$$

で表される。この場合も $q$ は移行運動量である。どちらも $\exp(iqr) = 1 + iqr$ と近似(双極子近似)できる場合、主なマトリクス要素は $\langle f | r | i \rangle$ となり、吸収・発光といった一次の過程と全く同じ形をとるのでEXAFSの理論を適用することにより構造情報と結びつけることができる。波長1nm程度のX線の場合、初期状態の電子が1sのような内殻電子とすると、その広がりは非常に狭いので散乱角(すなわちエネルギー移行)があまり大きくなきぎり $|qr| \approx 1$ としてよい。この場合、 $q$ は吸収の際の偏光ベクトルと同じ働きをする。また、電子線の場合も100keVの電子の波長は0.036nmであるが、散乱角が0に近い場合には双極子近似が成り立つ。この理論から分かるように、EXAFS(X線吸収スペクトル)と同じ情報が、X線や電子線を利用した非弾性散乱の実験から得られることが分かる。そこで、EELSとX線ラマン散乱を比較すると先にも述べたように

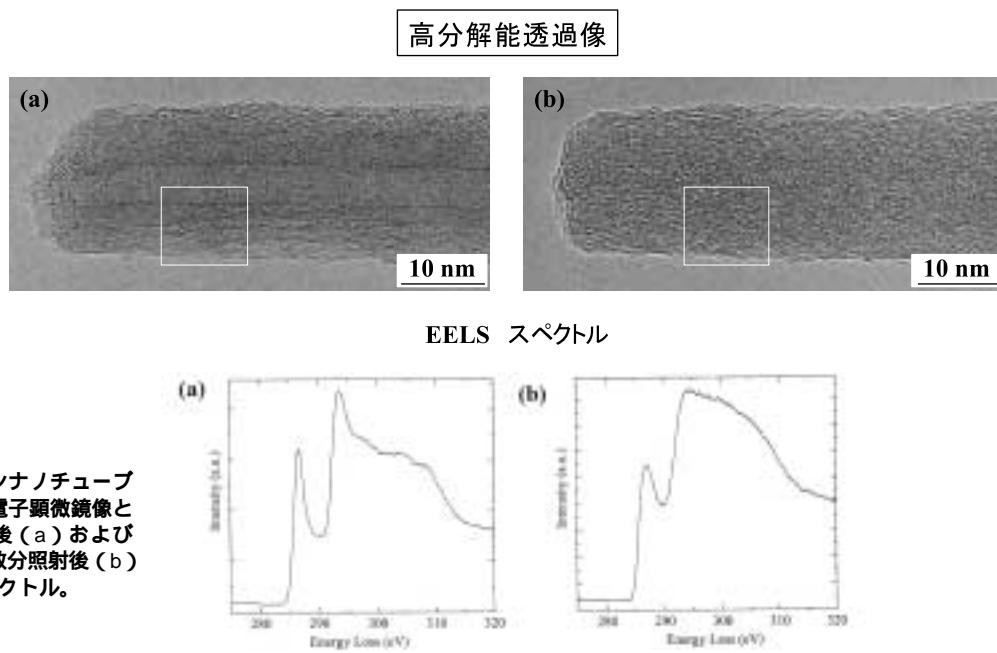


図3 多層カーボンナノチューブの高分解能電子顕微鏡像と試料観察直後(a)および電子ビーム数分照射後(b)のEELSスペクトル。

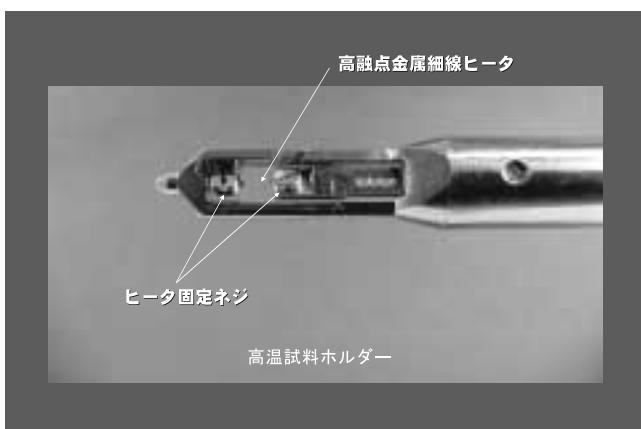


図4 高温試料ホルダー。1200 度まで加熱できる。

EELSの利点は、その空間分解能にある。透過型電子顕微鏡と組みあわせることにより、いかにマイクロビームを使ってもX線ではおそらく不可能であろうナノ領域のスペクトロスコピーが可能になる。すなわち、ナノ領域のEXAFSスペクトルを得ることができる。

#### 4. 電子エネルギー損失スペクトル(EELS)測定

##### 4.1 測定装置および測定条件

測定は、日立冷陰極電界放出形透過電子顕微鏡(HF-2000)を用い、試料を透過した電子のエネルギー分析は、ガタン社製model666/パラレルEELSシステムにより行った。この電子分析装置は、1次元検出器であるために、ある範囲のスペクトルが同時に測定できる。当然、エネルギー分解能を上げれば、測定範囲は狭くなり、分解能を下げれば、測定範囲は広くなる。電子顕微鏡は、加速電圧200kVを標準とする透過電子顕微鏡であるが、必要に応じて加速電圧を100kVまで下げることができる。透過電子顕微鏡の本来の性能を引き出しつつEELS測定を行うには200kVを利用するのが望ましい。EELSの測定には、入射電子のエネルギーを固定してエネルギーアナライザーのエネルギーを掃引する方法と、電子アナライザーの分析エネルギー範囲を固定して入射電子のエネルギーを掃引する方法があるが、最近では顕微鏡の電子レンズ系の制御がコンピュータ化され容易になったことと一次元検出器の発達のため、後者、すなわち1次元検出器のエネルギー範囲を固定し、対象元素により入射電子のエネルギーを適当に設定する測定が主流になりつつある。

電界放出型電子顕微鏡の電子銃部分は、安定な電子線を得るために、 $10^{-9}$  Paという超高真空に保たれている。また、試料導入部は、排気速度の大きいターボ分子ポンプにより $10^{-6}$  Paの真空を保っている。そして、最下部にEELS測定のための電子エネルギー分析器が装着されている。試料としては、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて行った。

図3-a,bにMWCNTの高分解能電子顕微鏡像とXANESに対応するEELSスペクトルをそれぞれ示した。図3-aは、試料を観察し、その直後に測定したEELSスペクトルであり、図3-bは、電子ビームを数分あてた後に観察したTEM像および試料のEELSスペクトルである。このように、常温でEELS測定を行う場合、図3-aと図3-bの変化からわかるように、電子線ダメージによる状態の変化を生じてしまう。特に、強度の強い電界放出型電子源を有する透過電子顕微鏡の場合、この現象が顕著に現れる。さらに、試料のチャージアップにより、試料へのゴミの付着が起こるという、電子顕微鏡特有の問題がある。このことから、X線の場合のように、長時間の積算によりスペクトルの質を向上させることは、困難である。すなわち、EELS測定は、短時間で測定を完了できない試料には適用できない。

この困難を克服するため、日立テクノリサーチセンターの上野と矢口は、高温試料ホルダーを開発して、電子線ダメージを小さくし、かつゴミの付着がなく、安定にEELS測定のできることを報告している<sup>6)</sup>。図4に上野らが開発した高分解能像観察とEELS測定の困難を克服した高温マニピュレータを示す。写真からわかるように、長さ2mm程度のコイルヒータが取り付けられた簡単な形状であるが、温度制御法の工夫により、原子レベルの高分解能像測定とEELS測定の両方において、満足できる安定性を確保した。この加熱ホルダーを用いて測定した高分解能透過電子顕微鏡像は、20分を超える測定においても試料ダメージはなく、さらに付着していたゴミも取り除かれることがわかった。そして、EELSスペクトルも安定に測定可能となった。図4に示す高温マニピュレータは、試料温度1200以上での高温を作り出せるが、EELSを安定に測定するという目的には、300度で、良質のEELSスペクトルが測定できることが判明した。この高温マニピュレータは、表面が汚れやすく、かつダメージの受けやすいナノ材料のEELSスペクトルを高精度で測定するには、不可欠であると考える。

次に、エネルギーシフトのさらに大きな領域の測定例として、CeのL吸収に対応するEELSスペクトルを図5に示した。図5-aの矢印で示す粒子に電子ビームを集光して測定した。その測定結果を図5-bにそれぞれ示す。図5-b-Iは、直径約1nmのCeO<sub>2</sub>超微粒子1個からのEELSスペクトルであり図5-b-IIは、少し大きい直径約5nmの超微粒子1個からのEELSスペクトルである。この二つのスペクトルを比較すると、1nmの超微粒子のスペクトル幅が広がり、かつピークが約2eV高エネルギー側にシフトしていることがわかる。このようにナノメータ領域からのEELSスペクトルが充分な分解能とS/N比で測定可能であり、粒子によるスペクトルの違いが明瞭に区別できることがわかる。

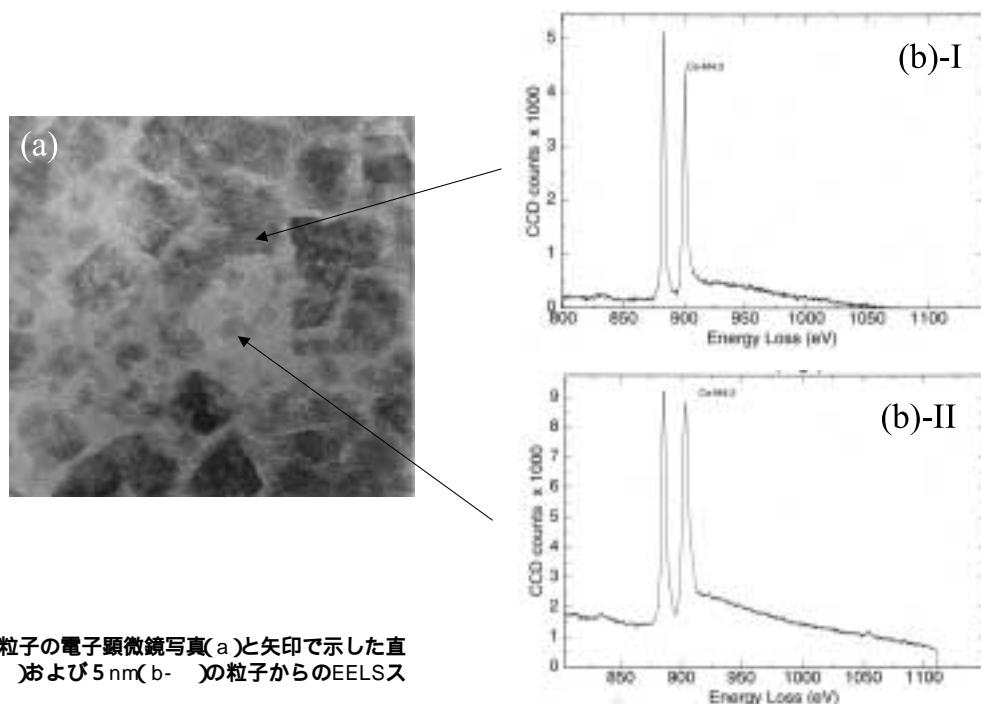


図5 CeO<sub>2</sub> 超微粒子の電子顕微鏡写真(a)と矢印で示した直徑1nm(b-I)および5nm(b-II)の粒子からのEELSスペクトル

このように、電界放出形電子銃と試料を安定に保つ高温マニピュレータの開発により、従来は不可能と考えられていた局所領域のEELS測定をX線吸収スペクトルとほぼ同じ分解能・S/Nで測定できるようになったと言える。これにより、微量試料や試料中の局所領域に限定して存在する物質の電子構造や元素の同定、そして、EXAFSの解析手法を導入すれば幾何構造の決定に応用できるものと考える。このように、EELSとEXAFSとを相補的に利用することにより、ナノ材料開発を強力に進めることができるであろう。

#### 参考文献

- 1) 宇田川康夫編：X線吸収微細構造、XAFSの測定と解析、学会出版センター(1993年初版)
- 2) 大田俊明編：X線吸収分光法、XAFSとその応用、IPC出版(2002年初版)

- 3) B.M. Kincaid, A.E. Meixner, and P.M. Platzman, : Carbon K Edge in Graphite Using Electron-Energy-Loss Spectroscopy, Phys. Rev. Lett., 40( 19 ) 1296-1299( 1978 )
- 4) K. Tohji and Y. Udagawa x-ray Raman scattering as a substitute for soft x-ray extended x-ray-absorption fine structure, Phys Rev. B. 39( 11 ) 7590-7594( 1989 )
- 5) K. Toshi, Y. Udagawa, T. Matsushita, M. Nomura, T. Ishikawa Anisotropic effects in x-ray Raman scattering from graphite, J. chem. phys., 92( 5 ) 3233-3235( 1990 )
- 6) T. Yaguchi, T. Sato, T. Kamino, Y. Taniguchi, K. Motomiya, K. Tohji, A. Kasuya : A method for characterizing carbon nanotubes, J. Elec. Microscopy, 50( 4 ) 321-324( 2001 )

## 解 説

# HPLC/MSによる合成オリゴヌクレオチドの分析と分取

## Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides using HPLC/MS

出口 喜三郎\* 石川 昌子\* 横倉 武文\*  
緒方 いづみ\*\* 伊藤 伸也\*\* 三村 忠男\*\*

### 1. はじめに

遺伝子テクノロジーの目覚しい発展に伴い、PCR (Polymerase Chain Reaction), DNAチップ, 遺伝子治療などの分野において, 合成オリゴヌクレオチド (DNA) の需要が高まりつつある。一般に, オリゴDNAは, ホスホアミダイト法に基づいて自動合成された後, カートリッジによる簡単な脱塩処理やPAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)/HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)で分離精製して使用されている。しかし, 塩基数の増加, 修飾基の付加といった高付加価値の合成オリゴDNAへの需要の高まりに伴い, 高い品質が要求されている。その結果, PAGE/HPLCでの分離精製に加えて, MS (質量分析計)による合成DNAの確認が, 一層重要になっている。また, これら分離精製とMS確認操作の簡便化, ハイスループット化の要求も強まっている。これらの要求に対しては, HPLCとMSのオンライン化が有望な方法である。しかし, オリゴDNAをHPLC/MSで分析する上の問題は, HPLCでの最適分離条件とMSでの最適検出条件が相容れない点である。即ち, 逆相ODS (octadecylsilan)カラムでオリゴDNAを分離するには, 通常, 100mmol/L位のTEAA (triethylammonium acetate) や TEBA (triethylammonium butylate) をイオンペーパー剤として用いる。しかし, これがMSの検出感度を著しく損なう結果となる。これは, オリゴDNAに限らず, 一般に, HPLC/MSでしばしば遭遇する, いわゆる, “分離とMS検出のジレンマ”である。



図1 日立HTP-MSシステムの外観

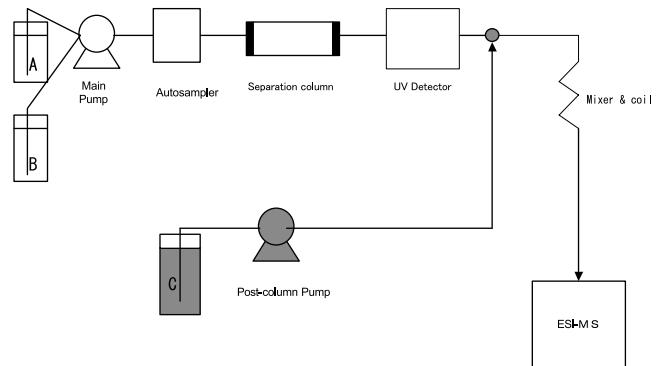


図2 オリゴDNA分析用ポストカラムHPLC/MSシステムの流路

この問題解決のために, これまでに種々の方法が提案されてきた。これらは, 以下の4つに分類できるだろう。

- (1)溶離液そのものを見直す。つまり, TEAAバッファーからTEA + HFIP (hexafluoro-isopropanol)に変更する<sup>1)</sup>。
  - (2)有機溶媒等をシースフローで添加し, MSイオン化室でのバッファー溶媒の霧化を促進する<sup>2)</sup>。
  - (3)ポストカラム反応(添加)法で, カラムでの分離後に溶離液組成(pH含む)をMS検出用に変更する<sup>3)</sup>。
  - (4)透析膜やイオン交換カラムでMSへの導入前に脱塩する<sup>4)</sup>。
- (1)以外は, カラムでの分離条件を変更せずに, MSでの検出感度を向上させようとする方法である。即ち, クロマトグラファーよりの立場から, 上記“ジレンマ”を何とか回避しようとしている訳である。(2)と(3)は原理的には良く似ているが, 応用性での違いから, ここでは, 一応分けてある。これら4つの方法は, オリゴDNA分析に限らず, タンパク, ペプチド, オリゴ糖, などの他の分析でも使用されているものである。最近, 我々は(3)のポストカラム反応(添加)法が, 合成オリゴDNAのHPLC/MS分析および精製(分取)に有効であることを見出したので, 以下に報告する。図1は, 本実験で使用した装置の外観である。

\* (株)日立サイエンスシステムズ 那珂カスタマーセンタ

\*\* (株)日立ハイテクノロジーズ バイオシステム設計部

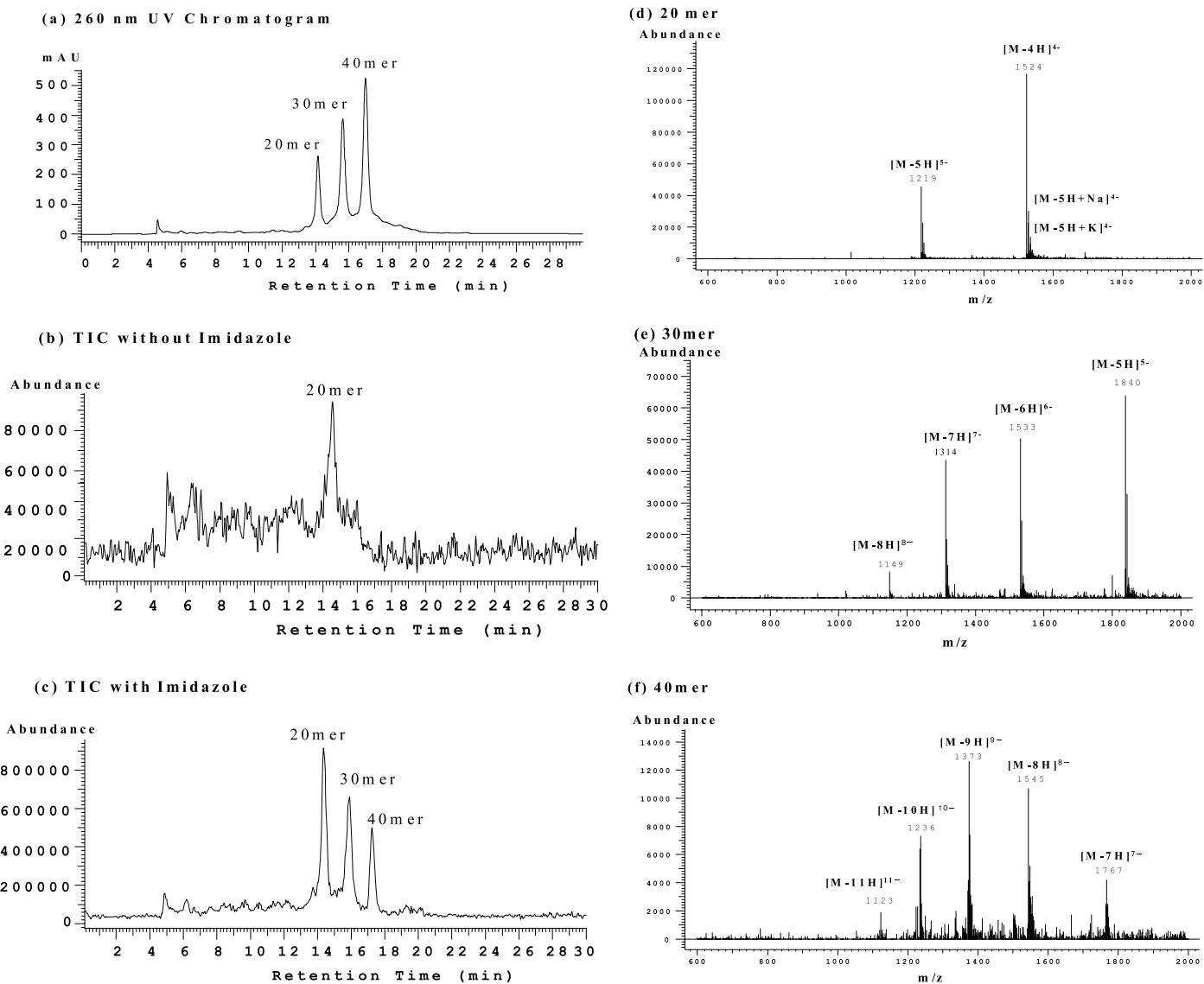


図3 ポストカラム反応 (Modifier添加) の効果

(a) 260nmUVクロマトグラム (b) Modifier無しでのTIC  
(c) Modifier有りでのTIC (d)-(f) TIC (c)の20mer , 30mer , 40mer  
ピークのMSスペクトル

詳細は、2.2節で説明する。

## 2. ポストカラム反応 (Modifier添加) 法によるMS検出感度の向上

図2は、本方法で採用したポストカラム反応法の流路図である。HPLCは日立LaChromシリーズ、MSは日立M-8000形3DQMS(イオントラップMS、ESI(Electrospray Ionization)イオン化法)、分離カラムは関東化学社製のMightysil RP-18E(4.6×150mm)である。合成オリゴDNAは、100μmol/LのTEAAバッファー(pH=7.0)およびアセトニトリル(10-20%)溶離液を、流量0.5mL/minでグラジエント送液しながら、ODSカラムで分離されUV検知器で検出される。分離された各

成分は、MS感度向上を目的とした添加溶液(Modifier: 0.1mmol/L Imidazole&100%アセトニトリル、流量1.0mL/min)と混合した後、ESI-MSに導入される。本方法は、上記(2)のシースフロー法と同様に、すでに広く採用されているHPLCの分離条件をそのまま使用できるのがポイントである。

図3は、本ポストカラム法の効果を示している。3種の塩基数の異なるオリゴDNAの混合サンプル(20mer: 28μmol/L, 30mer: 31μmol/L, 40mer: 27μmol/L)を30μL注入し、分離した時のUVおよびMSクロマトグラムである。(a)は260nmで検出されたUVクロマトグラムである。(b)は、ポストカラム添加無しのTIC(Total Ion Chromatogram), (c)はポストカラ

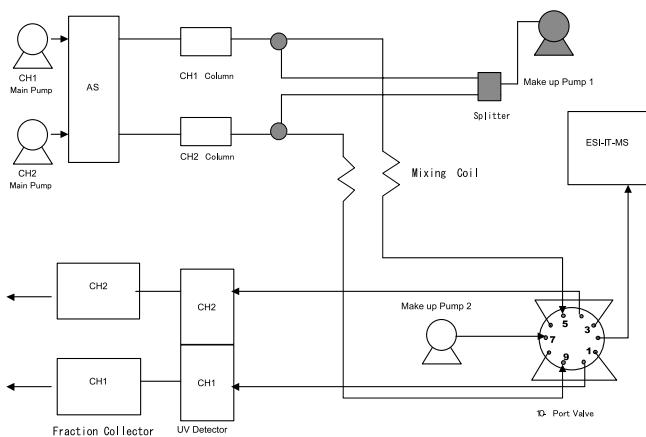


図4 オリゴDNA分取用HTP-MSシステムの流路

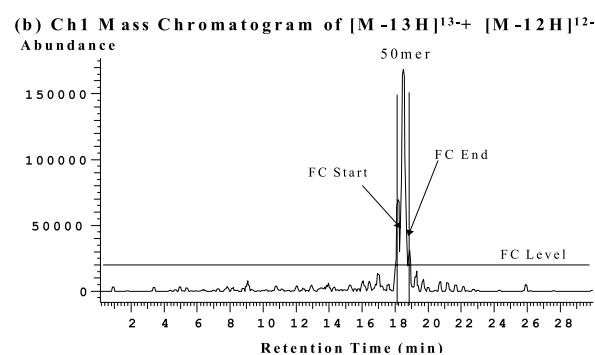
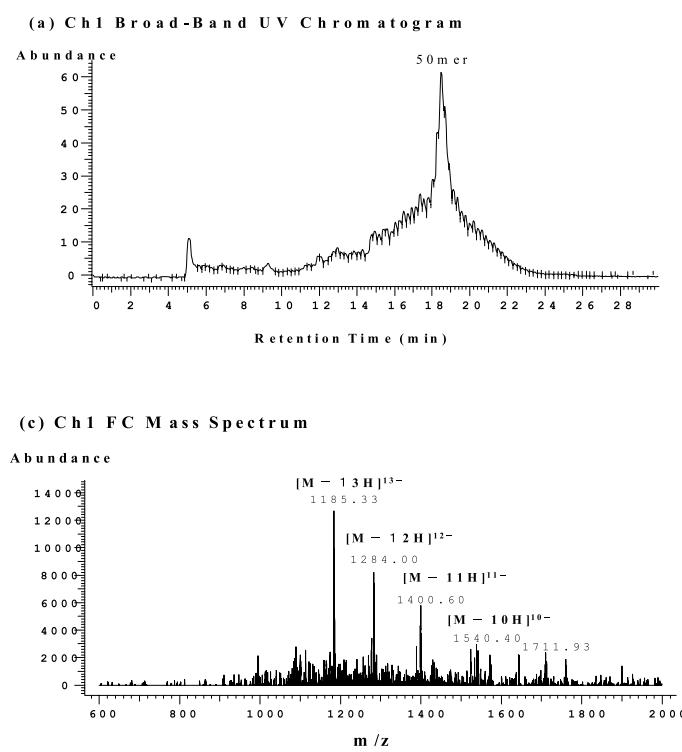
ム添加有りのTICである。(b)では、20merのピークがかろうじて検出されているが、他のピーク(30mer, 40mer)は識別困難である。単純なピーク高の比較から、20merで、約10倍の感度向上が見られた。また、このポストカラム法による感度向上は、塩基数が増加するに従い大きくなり、50merでは約30倍であった。(d)(f)は(c)のTIC上の20mer, 30mer, 40mer各ピークのMSスペクトルである。オリゴDNAは、通常負の多価イオン $[M-nH]^-$ として検出される。20merのMSスペクトルでは、この負の多価イオンに $Na^+$ ,  $K^+$ イオンが付加し価数を減じた擬分子イオンピークも識別されている。30mer, 40merでは、多数の $Na^+$ ,  $K^+$ 付加

擬分子イオンピークによりMSスペクトルが複雑になっているが、 $H^+$ 解離による多価イオンの識別および解析が可能である。ここでは示していないが、“Modifier(添加液)”なしの条件では、30mer, 40merのMSスペクトル解析は不可能であった。

## 2.2 MSトリガーによる合成オリゴDNAの分取

図4は、今回用いた日立HTP(High-Throughput Purifier)MS分取(フラクションコレクション(FC))システムの流路を示している。また、図1はその装置概観である。2チャンネルのHPLC部で分離されたサンプルは、その一部がスプリットされ、Rheodyne社製のMS用10ポートバルブおよびメイクアップポンプを介して、一台のMS(日立M-8000 3DQMS + ESIイオンソース)に導入される。分子量既知の成分、即ち、合成オリゴDNAのMSクロマトグラムをモニターしながら、その成分のみを分取することができる。これは、MSトリガー分取機能と呼ばれているもので、たとえ不完全な分離でも、目的成分を効率良く分取するのに有効な機能である。

図5は、50mer合成オリゴDNAを、このシステム分取した例である。プロードバンドUVクロマトグラム(a)から分かるように、このサンプルにはかなりの夾雑物が含まれている。(b)は( $[50\text{mer}M-13H]^{13-}$ + $[50\text{mer}M-12H]^{12-}$ )のマスピークに対応するMSクロマトグラムである。フラクションコレクション(FC)はこれらのMSクロマトグラムをモニターしながら行われ



(a) プロードバンドUVクロマトグラフ  
(b)( $[50\text{mer}M-13H]^{13-}$ + $[50\text{mer}M-12H]^{12-}$ )のMSクロマトグラフ  
(c) 分取ピークの平均MSスペクトル

図5 合成50merオリゴDNAのMSトリガー分取

た。即ち、分子量既知の合成50merのみを、MSトリガーで分取したことになる。(c)は分取区間(FC Start&End)における平均化されたMSスペクトルである。これは、MSトリガーによるフラクションコレクションの例であるが、UVクロマトグラムに基づく通常のフラクションコレクションおよびFCピークのMSスペクトルでの確認(同定)も、このHTP-MSシステムでは可能である。

### 3.まとめ

合成オリゴDNAのHPLC/MS分析と分取を例にしながら、しばしばHPLC/MSで遭遇する“分離条件とMS検出条件のジレンマ”とその解決手段について述べた。結論として、

- (1) HPLCでポピュラーなポストカラム反応(添加)法は、オリゴDNAのカラムでの分離を損なうことなくMSの感度向上に役立つ。即ち，“分離とMS検出のジレンマ”的一つの解決方法になり得る。
- (2) 本方法は、カラムで分離された成分の一部をスプリットし、分子量既知のターゲット成分のみをMS

トリガーでフラクションコレクションする分取LCにも適用できる。したがって、合成オリゴDNAの分離、精製(分取)、および、MSによる確認までがオンラインで可能となり、ハイスループットである。この方法は、ここで述べたオリゴDNAに限らず、タンパク、ペプチド、オリゴ糖分析等にも応用可能である。それぞれについて、どのような添加剤(Modifier)が適切か、またどれ位の効果があるかについては、今後の検討課題である。

### 引用文献

1. A. Apffel, J.A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W.S. Hancock, Anal. Chem. 69, 1320 (1997); J. Chromatography A, 777, 3 (1997)
2. C.G. Huber, A. Krajete, Anal. Chem., 71, 3730 (1999); J. Chromatography A, 870, 413 (2000)
3. K. Deguchi, M. Ishikawa, T. Yokokura, I. Ogata, S. Ito, T. Mimura, C. Ostrand, ASMS 2002.
4. C. Liu, S.Q. Wu, A.C. Hatms, R.D. Smith, Anal. Chem., 68, 3295 (1996)

## 新製品紹介

### S-3600N形 走査電子顕微鏡

日立走査電子顕微鏡のラインアップによる競合力強化のため、大型試料が観察可能なS-3600N形走査電子顕微鏡を発売しました。

S-3600Nは従来機と比較して、微動装置(ステージ)の可動範囲を大型化し、より大きく厚い試料の観察ができるナチュラルSEMです。

#### 主な仕様は

- (1) 二次電子分解能：3.0 nm
- (2) 反射電子分解能：4.5 nm (低真空モード 1Pa)
- (3) 試料ステージ：150 mm × 110 mm  
5軸モータドライブステージ

#### 主な特長として

##### 1. 新形ステージの開発と大型試料室の採用により大型試料観察を実現

従来機種を超える大型ステージを開発しました。これにより、最大10インチ(254mm)径の試料を搭載さ

せることができ、8インチ(203mm)径の全面観察が可能です。また最大試料厚さが70mmや、試料重量2kgにも対応可能となり、幅広い分野でSEM観察が可能となります。

#### 2. 操作性の向上を追求

使いやすいGUIを採用することで、簡単なSEM操作が可能です。また5軸ユーセントリック・モータステージを標準搭載することで、視野移動がSEM画面を見ながら簡単にできます。更に、観察した画像はファーリング機能とレポート作成機能によりデータの管理・活用が容易になっています。

#### 3. 高性能ナチュラルSEMを継承

電子ビームを増やすことが可能なデュアルバイアス機能と低収差レンズにより、加速電圧3kVで分解能30nmを実現しました。また、低真空モードを選択することで、水分を含んだ試料や絶縁試料の無蒸着観察も行えます。

#### 4. 多目的SEMに拡張可能

EDXやEBSPなどの分析装置を最適条件で同時配置可能です。これにより分析SEMとしての拡張も可能です。

((株)日立サイエンスシステム

伊東 祐博 記)



S-3600N形SEMの外観

# 日立新形高速液体クロマトグラフLaChromEliteシリーズ

LaChromElite series Hitachi High Performance Liquid Chromatograph

本田俊哉\*

## 1.はじめに

'94年7月から販売をしてきたLaChrom(ラクロム)シリーズの後継機として、約8年ぶりに2種類の新しいコンセプトの高速液体クロマトグラフLaChromElite(ラ・クロムエリート)を発売した。

LaChromEliteは、2つのコンセプトを有したシステムとして提供される。一つは、将来、一般分析からセミミクロ分析への移行がスムーズに行えるような流量範囲及び性能を持ったSMASH(Semi-Micro Applicable Standard HPLC)システムである。二つめは、多量検体を高速・短期間で分析するための機能・性能を有したHTA(High Throughput Analyzer)システムである。それぞれのシステムは、特徴ある各モジュールの組み合わせから構成される。特に今回は、それぞれのコンセプトを最大に引き出すために基本モジュールである送液ポンプを2種類開発した。SMASH専用送液ポンプのL-2100形及びHTA専用送液ポンプL-2130形である。

以下に各システムの特長を示す。

## 2. SMASHシステム(図1)

### 2.1 L-2100形ポンプ

このシステムで使用するポンプ(L-2100形)は、流速「 $50\mu\text{L}/\text{min}$ 」というセミミクロ領域での精度・安定性を追及したポンプである。さらに、流速「 $1.0\text{mL}/\text{min}$ 」のコンベンショナルな領域でもその性能を発揮するように設計されている。即ち、ミクロ分析からコンベンショナル分析にも対応したシステムになっている。煩雑な部品交換を行わずにミクロ分析とコンベンショナ

ル分析に対応できるシステムである。

現在、環境問題、廃液処理コストの問題から溶媒使用量の少ないミクロシステムへの関心が高くなってきた。このSMASHシステムを採用することにより、セミミクロ分析への移行がスムーズにできるようになる。事実、1日に必要な溶媒量はわずか $24\text{mL}$ ( $50\mu\text{L}/\text{min}$ , 8時間)で済むため、溶媒の使用・廃棄のコストの低減が、 $1/20$ とはっきりわかる。また、薬物動態分野などにおける少量サンプルでの高感度分析にも必要なシステムである。

本SMASHシステムにおける推奨流量範囲は $0.05 \sim 1.0\text{mL}/\text{min}$ である。

次にSMASH高圧グラジエントシステムの高再現性のデータを以下に紹介する。

図3で解説されているようにSMASHシステムはグラジエント再現性(ピークの保持時間再現性)を飛躍的に向上させた。以下にその技術について紹介する。

### (1)日立独自の予測式倍速制御方式を採用

日立のHPLC用ポンプは、脈流補正の方法として倍速制御方式を採用してきた。新形ポンプでは、倍速スタートのタイミングを早期化することにより、さらに脈流を小さくすることに成功した。また、新形チッ



図1 SMASHシステム構成例

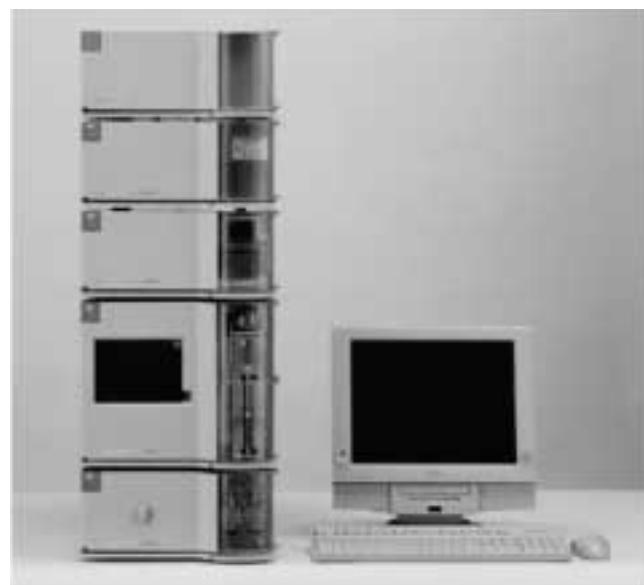


図2 HTAシステム構成例

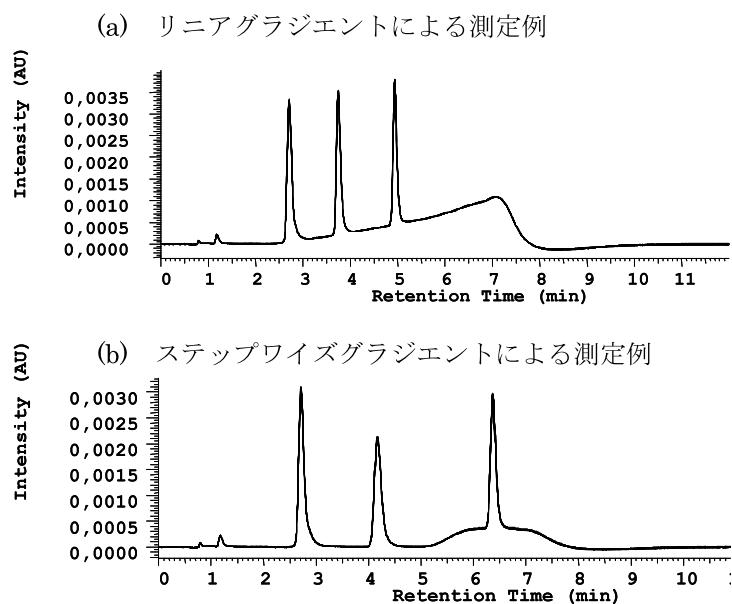


図3 SMASHシステムによるデータ例

クバルブを採用しており、ミクロフロー領域での高精度な送液が可能になった。

#### (2)サンプル注入タイミングのリアルタイム制御方式の採用

グラジエント分析を行う際、L-2200形オートサンプラー(後で詳細説明)と組み合わせた時には、オートサンプラーの注入タイミングとポンプの制御をコントロールすることにより、保持時間の再現性を向上させた。保持時間間隔の小さい分析に最適である。

#### (3)高圧グラジエント分析時のEPIC(Electronic Pressure Isolation Compensation)機能の採用

高圧グラジエントシステムでは、2台のポンプに、通常の圧力センサに加え、サブ圧力センサを増設する。この合計4つのセンサの働きにより、2台のポンプの圧力変動を最小限にすることに成功した。これにより極めて安定した混合比で溶媒を送液できるようになり、再現性の優れた高精度なグラジエント分析を実現できる。

#### 2.2 L-2200形オートサンプラー

次にSMASHシステム(特にセミミクロ分析時)に最適なL-2200形オートサンプラーを紹介する。セミミクロ分析の利点として、「貴重な微量サンプル」に対応可能ということであるが、それに対応したオートサンプラーが必要になる。また、キャリーオーバーの低減が重要な問題となっている。即ち、高感度分析の場合、前回のサンプルによる「汚染」は定量性を著しく悪くする。そこで、「微量サンプルへの対応」、「低キャリーオーバー」及び「再現性」が新形オートサンプラーの重要なファクターになる。

図4にオートサンプラーの流路図を示す。

#### 図3のデータ解説

左のデータはSMASHシステムの高圧グラジエントシステムにおける「保持時間再現性」を示したものである。図3(a)がリニアグラジエントで測定したもの及び図3(b)がステップワイズグラジエントで測定したものである。左図は、サンプルをそれぞれ6回測定したものを重ね書きしたものである。ピークが良く重なっており、極めて高い再現性が得られている。

#### 図3(a): 測定条件

流量: 0.25ml/min, カラム: 2.0mm I.d. × 125mm  
溶離液: Water/Methanol = 50/50 (0min) - > 20/80 (5.0min)  
試料: メチルパラベン, エチルパラベン, プロピルパラベン

#### 図3(b): 測定条件

流量: 0.25ml/min, カラム: 2.0mm I.d. × 125mm  
溶離液: Water/Methanol = 50/50 (0min) - > 40/60 (3-5min)  
試料: メチルパラベン, エチルパラベン, プロピルパラベン

L-2200形オートサンプラーにはサンプリングニードルが分析流路に組み込まれるダイレクトインジェクション方式を採用した。これにより、吸引したサンプルを無駄なく注入できるので、微量サンプルの測定に威力を発揮する(最小必要試料量: 7μL)。ニードル内壁は分析時に移動相でフラッシングされる。また、ニードル外壁は注入毎に溶媒洗浄する専用機構により、キャリーオーバーを極限まで抑えることに成功した。

次に注入量再現性のデータを図5に示す。サンプルの計量に使用するシリジング駆動部のモーターの高精度化、計量ラインの最適化などの技術により、メチルパラベン(芳香族)の10μLの20回の注入でRSD 0.13%という高い再現性のデータが得られた。

#### 3. HTAシステム(図2)

##### 3.1 L-2130形ポンプ

このシステムで使用するポンプ(L-2130形)は、高流量域(5mL/min)においても安定した送液が可能である。そのため、高速分離を目的としたシステム、短時間でハイスループットな分析を行うシステムに最適なポンプである。このハイスループット分析に最も適したカラムの一つにクロモリスカラム(Merck社製)がある。クロモリスカラムは従来のような粒子充填形カラムではなく、円柱状に成型されたシリカロッド(Silica Rod)を分離に利用する。空隙率が大きいため、高流量で溶媒を流しても背圧が上がらない。その結果、高流量での高速分析に適したカラムである。このカラムとHTAシステムを組み合わせることにより、高速分析が可能になる。医薬品開発の短期化、試験項目の増加などにより迅速な分析が要求されている分野に適したシステ

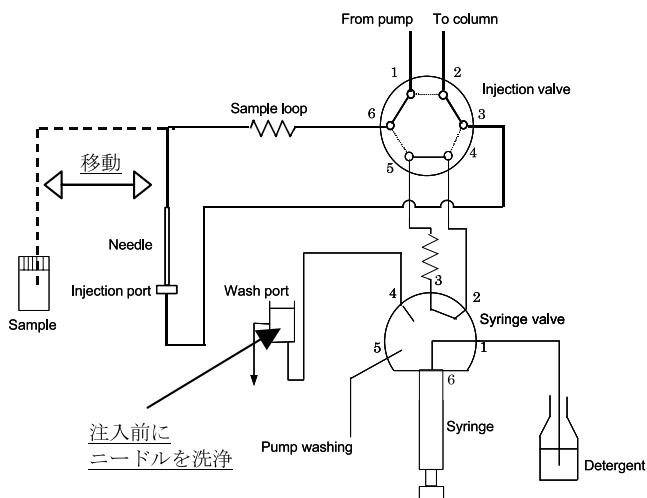


図4 オートサンプラーの流路図  
(直接注入方式)

ムである。本HTAシステムの推奨流量範囲は0.5~8mL/minである。

図6にクロモリスカラムとHTAシステムでの高速分析例を示す。

### 3.2 L-2400形UV検出器

次にHTA分析に適した高速データ収集機能を有するUV検出器による分析例と、UV検出器の特長について紹介する。

一般に、UV検出器のデータ収集時における時定数(レスポンスタイム)の設定は重要なファクターになる。時定数を大きく取りすぎると、ノイズは小さくなるがピークは幅広くなる。逆に、時定数を小さくするとピークはシャープになるがノイズは大きくなる。

ところで、高速分析では、ピークの出現が極めて早く、時定数を小さくしないとそのピークを的確に補足

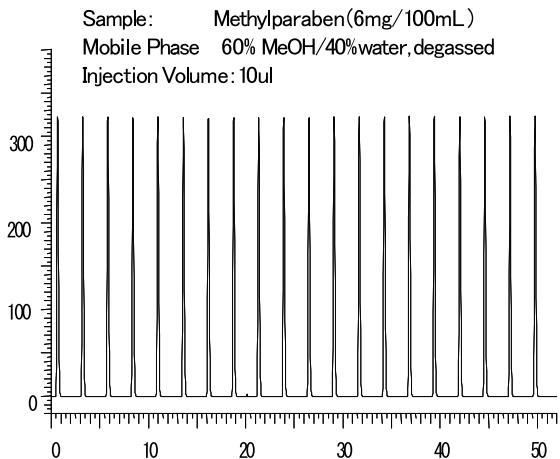


図5 注入量再現性

することができない。そのために時定数を小さくしなければならなかつたが、一方でノイズが高くなるという欠点があった。今回、開発したUV検出器(L-2400形)は、高速デジタルフィルターを採用することにより、時定数0.05秒においても低いノイズを得ることができる。図7に、時定数が各々2.0秒及び0.05秒におけるクロマトグラムを示す。時定数が0.05秒の場合、クロマトグラムピークがシャープでありながら、ノイズが低いことがわかる。この高速デジタルフィルターの採用により、高速・高分離・高感度の分析が可能になる。

以上説明してきたようにSMASHシステムはセミミクロ分析を前提にした機能や技術を、またHTAシステムは高速分析に必要な機能や技術を数多く搭載しており、各モジュールを用途に合わせることにより、SMASH、HTAシステムを構築できるようになる。

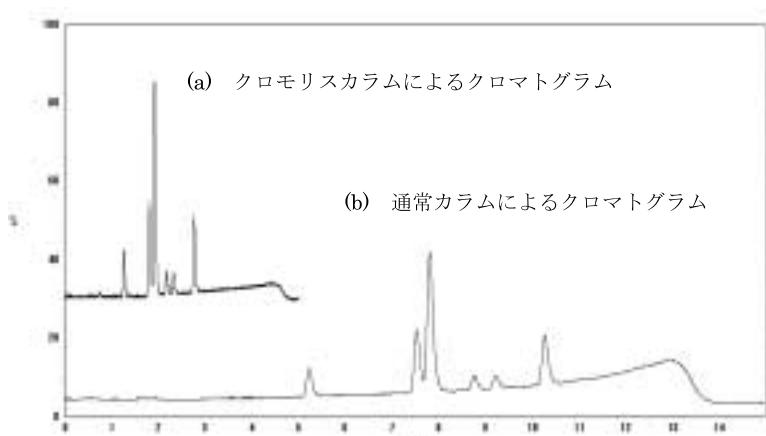


図6 クロモリスカラムと通常カラムによる分析時間の違い

### 図6のデータの解説

左のデータは通常のODSカラムを用い、1.0mL/minで分析したデータと「クロモリスカラム」を用い、2.0mL/minで分析したクロマトグラムを比較したものである。コンベンショナルでは15分かかっていたものが、クロモリスカラムを2.0mL/minで使用することにより、分離能を損なわずに、分析時間が約1/3の5分に短縮することができた。従来より3倍の高速化が図れたことになる。

### 図6(a) : 測定条件

流 量 : 2.0mL/min  
カラム : クロモリスパフォーマンス(4.6mm I.d. x 100mm)  
溶離液 : Water/Methanol の低圧グラジエント  
検 出 : UV254nm  
試 料 : 芳香族炭化水素(ナフタレン、フェナンスレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、クリセン)

### 図6(b) : 測定条件

流 量 : 1.0mL/min  
カラム : Hitachi-Inertsil(4.6mm I.d. x 150mm)  
その他の条件及び試料は同じ

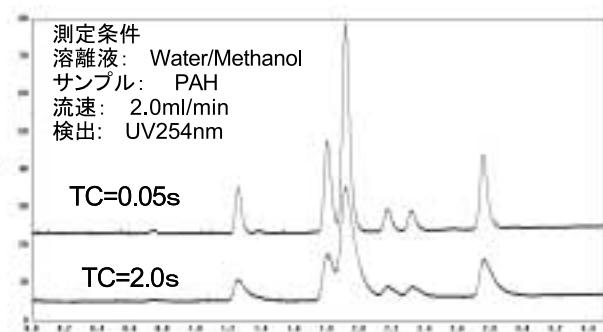


図7 異なる時定数でのクロマトグラム比較



図9 ポンプ前面(パネルを外したところ)

#### 4. SMASH・HTAシステム共通の特長

次にSMASH・HTAシステム共通の特長について説明する。

##### (1)データ処理にEZChromEliteを採用

前回のSIニュース44巻No.1に、FDA Part11対応のデータ処理装置EZChromEliteを紹介した。LaChromEliteもこのデータ処理装置を「データ収集」「機器制御」のソフトとして採用した。最大の特長はこのデータ処理装置から制御を行う場合、LaChromElite側には操作パネルを必要としないことである(図1, 2参照)。これにより、すべての操作をデータ処理装置から行うことができるようになり、各モジュールの操作パネルからの誤動作を防ぐ事ができる。

##### (2)フロントアクセスによる操作性・メンテナンス性の向上

すべてのモジュールは前面から操作できる。さらに配管類も前面に集中しているのでカラムの交換が簡単となり、流路系の取り扱いも簡単である。メンテナンスにも配慮し、ランプ交換やセルの交換も前面から行える。



図8 UVランプの前面からの交換

図8はUVランプの交換時のものである。モジュールを積み重ねたまま、前面から簡単にUVランプの取り替えが可能である。また、図9はポンプ前面のパネルを外したところである。ポンプヘッドのメンテナンスはもちろん、グラジエントユニットのメンテナンスも前面から容易に行うことができる。

##### (3)すべてのモジュールにリークセンサ搭載

流路系に液漏れが発生した場合、各モジュールに搭載されたリークセンサが検知し、システム安全に停止をすることができる。安全性と信頼性を向上させた。

##### (4)GLP/GMPに必要な機能を搭載

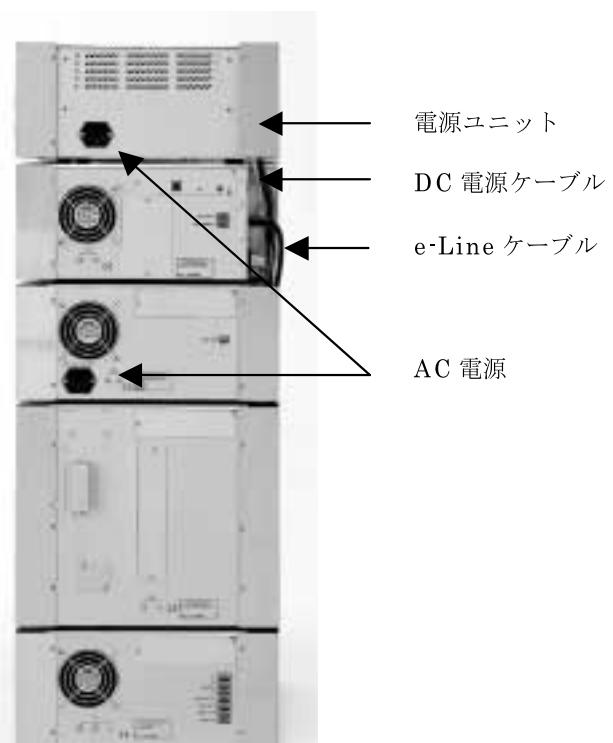


図10 背面からの写真

日立はLaChromを94年に発売以来、常にGLP/GMPに必要な関連機能を搭載してきた。今回はこの機能をさらに充実させた。特にUV検出器の波長校正用として、Hgランプを搭載した。Hgランプは254nmに輝線を持つため、紫外領域での波長チェックに役立つ。D2ランプの2輝線(656nm, 486nm)を加えた合計3波長でのチェックにより、測定可能波長域全体で分光器の波長正確さを確認することが可能である。また、ランプ輝線は波長が経時変化しないので、ホロミウムフィルタ等の波長校正フィルタに必要な定期的な校正作業が不要である。

#### (5)e-Line及びUSBの採用

従来のD-lineを一步前進させたe-lineを採用した。各モジュール間はこのe-Lineケーブルで接続し、すべての通信を集約することができる。さらに、今回の大きな特長は、パソコンとの接続にUSB方式を採用したことである。最近のパソコンには必ずといっていいほどUSB端子が付いている。即ち、ユーザーは新たに面倒なインターフェースを準備する必要がなくなったわけである。これにより、パソコンの通信環境を選ばなくて済むので、ノートパソコンなどと容易に接続ができるようになった。

#### (6)電源部を集中させ、背面がすっきり

主要なモジュールから電源部を除き、システム電源

ユニットにまとめた。この電源ユニットから各モジュールに電源を供給するので、各モジュールごとにコンセントを用意する必要がない。また、この電源ユニットは溶媒びんを置くりザーバとしても利用することができる(但し、カラムオープンを除く)。

図10にLaChromEliteHTAシステムの背面写真を示す。AC電源は電源ユニット及びカラムオープンの2箇所のみである。各モジュールへの電源供給及びe-Lineケーブルは背面のスペースに収納する。写真では、内部の配線が見えるようにカバーの一部を開けているが、実際には、電源ケーブルが2本のみ背面から出るだけである。

#### 5.まとめ

以上、今年の5月に発売したLaChromEliteのSMASH及びHTAシステムについてそのコンセプト及び特長を説明してきた。今回は、大きな2つのコンセプトを持ったシステムとして、製薬分野、食品、環境、化学一般分野においてその威力が発揮できるようなシステムにした。今までのHPLCの方式にとらわれない、まったく新しい技術を大きく取り入れたシステムになっている。今回は紹介できなかったが、カラムオープン、PDA(フォトダイオードアレイ)検出器、蛍光検出器などにも多くの新しい技術が搭載されている。

## 新製品紹介

### FB-2100形 集束イオンビーム加工観察装置

半導体プロセス開発や新素材開発で多用される電子顕微鏡の薄膜試料作製を高速処理する装置として、加工速度を従来比で2倍に高めたFB-2100形集束イオンビーム装置を開発した。

#### 主な特長

##### (1)高速加工

低球面収差光学系の採用と加速電圧40kV化により、最大ビーム電流30nAを実現。

##### (2)マイクロサンプリング

バルク試料から10μmレベルの微小サンプルを直接摘出し、それ

をメッシュに固定して薄膜化できる特別付属品を用意。

(3)ピンポイント加工  
電子顕微鏡との共用試料ホルダ

により試料の再加工が高精度で行え、目的部位の薄膜化が容易。

((株)日立ハイテクノロジーズ  
笹氣 正司 記)



FB-2100形の外観

# FIBマイクロサンプリング法によるピンポイント材料解析

Pinpoint Material Analysis by means of FIB Micro-sampling Technique

上野武夫\* 矢口紀恵\* 小池英巳\*\* 大西毅\*\*

## 1.はじめに

最近、電子半導体をはじめとするハイテクノロジー分野では機能向上を目的とした材料の複合化と構造の緻密化が急速に進んでいる。透過電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope : TEM)はそのような材料の原子レベルの超微細構造とサブナノメーターオーダの局所領域の組成や状態の分析を同時に見えるユニークな解析装置としてますますその役割が重要になってきている。TEMで観察する試料は電子線が十分透過する厚さに薄膜化する必要がある。TEM試料の作製には薬品を用いて試料をエッティングする化学研磨法、電解液を用いて試料をイオン化させて薄くする電解研磨法、ブロードなArイオンビームを照射して試料表面をスパッタするイオンミリング法、集束したGaイオンを用いる集束イオンビーム(Focused Ion Beam : FIB加工法などが多く用いられている<sup>1)</sup>。中でもFIB加工法は、

特定領域を選択的に加工できる、試料の加工状況をリアルタイムで観察できる、必要に応じ、観察個所の追加工ができるなど、緻密な構造を持つ機能性材料の特定個所の薄膜加工に適した特長を有しており、その応用分野は急速に拡大している。FIB加工法は当初、半導体デバイスの構造評価や故障解析にのみ用い

られていたが最近では金属、セラミックスなどの無機質材料はもちろん、高分子材料、生体組織などの有機質材料の薄膜作製にも積極的に用いられるようになってきている。

一般にFIB加工試料はその加工時間短縮のために予め研磨や切削による薄片化を行うが、材料によってはその加工中、破損や汚染などの問題が生じる。また、材料によっては数10μm程度のTEM試料作製のために数10mm～数100mmの広い領域を犠牲にすることがある。それらの問題を解決する手段としてFIBマイクロサンプリング法<sup>2-4)</sup>が開発された。本稿ではFIBマイクロサンプリング法の特長および材料解析への応用例を紹介する。

## 2. FIBマイクロサンプリング法による試料作製手順

図1にFIBマイクロサンプリング機能を備えたFB-2100 FIB加工装置の外観を示す。イオン源としてはGaを用いており、イオン銃の最高加速電圧は40kVである。図2にFIBマイクロサンプリング装置の外観を示す。FIBマイクロサンプリング装置はマイクロサンプルの摘出に用いるプローブを先端に装着したプローブホルダーと、そのホルダーを動かすためのステージにより構成される。FIBマイクロサンプリング法の試料作製手順を図3に示す。(a)薄膜化する領域を選択し、(b)その表面に厚さ約1μmのWデポジション膜を堆積させる。(c)次に、その周辺の溝加工を行う。ここで一個の溝だけは階段状に加工しておく。(d)試料を傾斜し、階段加工した側からイオンビームを入射させ、薄膜化



図1 FB-2100FIB加工観察装置

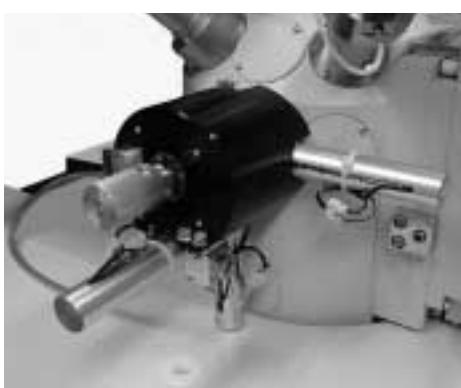


図2 FIBマイクロサンプリング装置

\* (株)日立サイエンスシステムズ  
\*\* (株)日立ハイテクノロジーズ

領域の底部を切り離す。続いて、(e)プローブを挿入、Wデポジションによりその先端をマイクロサンプルの表面に接着する。最後に未加工部を切断し、マイクロサンプルを持ち上げる。摘出したマイクロサンプルは別の試料台に固定し、通常のFIB加工により薄膜化する。以上の作業にかかる時間は材料によって多少の差はあるが約2~3時間である。

### 3. FIBマイクロサンプリング法の特長

FIBマイクロサンプリング法の実用化は従来困難であつたいくつかの試料作製を可能にした。まず、試料回転ホルダーを併用することにより方向を変えた試料の切り出しが容易になった。この技術を例えれば引っ張り試験片の内部構造評価に応用すると材料内部構造変化の引っ張り応力方向依存性を知ることができる。また、試料を広く浅く切り出すことにより平面観察用の試料も摘出することができる。この場合、摘出した平面試料は立てて試料台に固定して薄膜加工するが、薄膜加工の位置を制御することにより材料の任意の深さの平面構造を観察することができる。この技術は多層膜構造を持つ材料の特定の層の構造評価に応用が可能である。従来TEMでの観察が困難な材料のひとつに強磁性体がある。通常の電解研磨法で作製した試料は直径約3mmと大きく、対物レンズ磁場の均一性を大きく乱すため高分解能観察は極めて困難であった。これに対し、FIBマイクロサンプリング法で作製した試料

は幅、高さとも10~20μmと小さいため対物レンズの磁場に影響を与えることはない。そのため通常の非磁性体と同様、非点収差の少ない高分解能TEM像観察が可能である。また、マイクロサンプルの固定に用いるWデポジション膜は熱的に極めて安定であり、真空中の加熱では900まで耐熱性を持つ。この特長は材料の特定個所の摘出とその熱処理における構造変化の観察に応用できる。

### 4. 応用例

図4はFIBマイクロサンプリング法で作製した磁気ディスク断面試料のTEM観察例である。低倍率像(a)にはCrおよびCoの層の厚さと、各層の結晶配向性が、また、高倍率像には0.204nmの間隔を持つCr(110)面の結晶格子像が鮮明に観察されている。

### 5. おわりに

FIBマイクロサンプリング法の原理、特長を紹介した。電子材料や半導体材料などに代表される高機能性材料の分野では材料内部構造の緻密化と複合化にともないTEMによる構造と組成、状態の解析がますます重要なになってきている。従来、TEM解析では像の分解能や分析時における空間分解能だけが重視され、観察試料の作製は補助的な作業に位置付けられていた。しかし、最近の材料事情はそれを許さなくなってきた。複雑な構造を持つ材料内部の解析位置から正確にしか

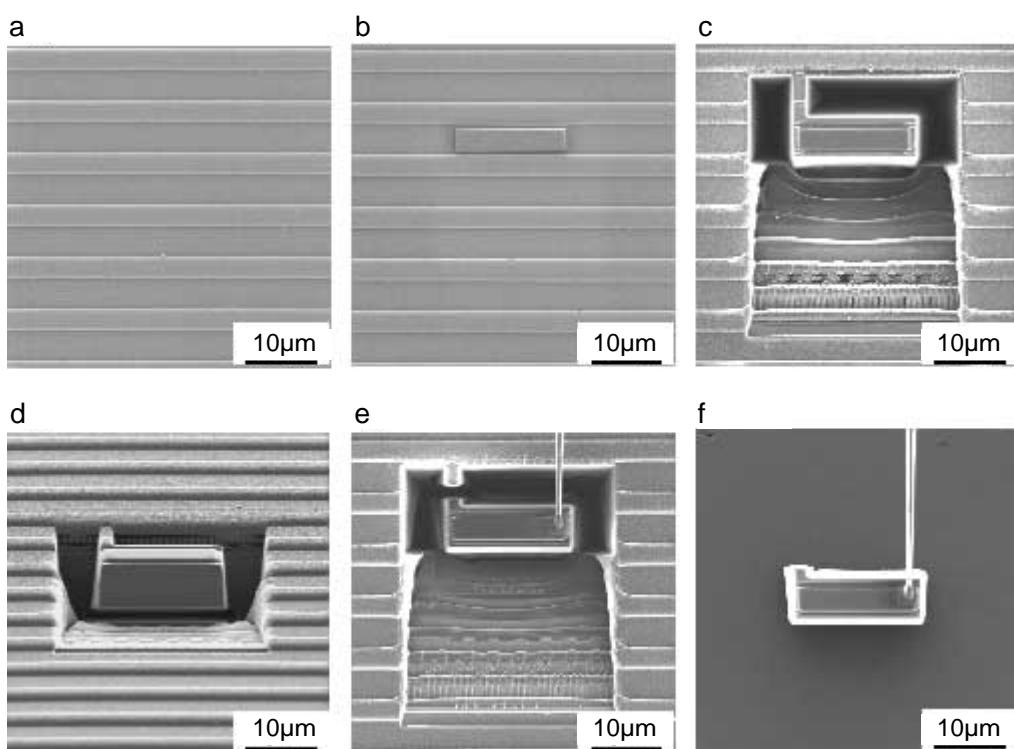


図3 FIBマイクロサンプリング法の試料作製手順

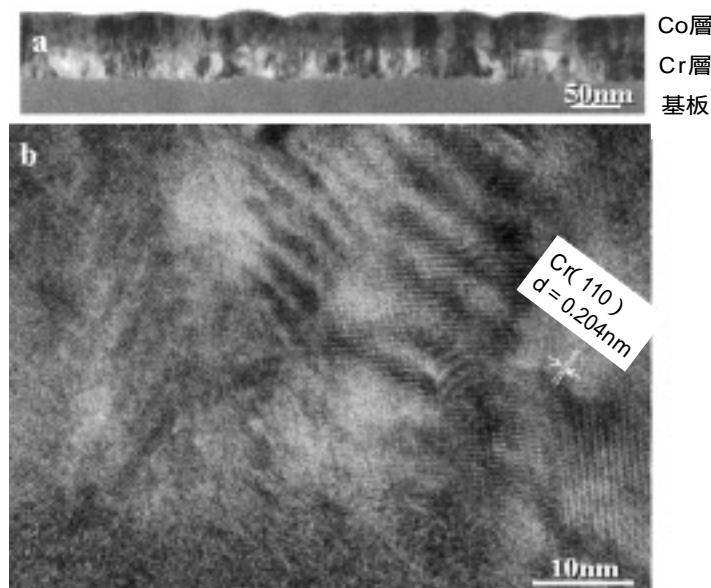


図4 磁気ディスクの断面TEM観察例

も変質させずに試料が作製されているか否かが重要な課題となってきている。FIBマイクロサンプリング法は目的の個所から正確にTEM試料を摘出できる唯一のしかも最近のニーズに合致した試料作製法である。今後の広い材料分野での応用が期待される。

#### (参考文献)

- 1) M.H.F.Overwijk,J.Vac. Sci. Technol. B11( 1993 )  
2021
- 2 ) T.Ohnishi, H.Koike T.Ishitani, S.Tomimatsu, K.Umemura and T.Kamino, Proc. 25th Int. Symp. For Testing and Failure Analysis( 1999 )449
- 3 ) 矢口他 日本電子顕微鏡学会第56回学術講演会予行集 , p184( 2000 )
- 4 ) 上野他 日本電子顕微鏡学会シンポジウム予行集 , p145-148( 2001 )

## 新製品紹介

### S-4800形 日立超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡

半導体の微細化や多層構造化に伴い、その解析用走査電子顕微鏡の高性能化のニーズが高まっている。こうしたニーズに対応して、コストパフォーマンスの高い超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)S-4800形を発売した。

#### 主な仕様

- ( 1 )二次電子像分解能 : 2 nm( at 1kV )/1 nm( at 15kV )
- ( 2 )試料移動量 [ X( mm )/Y( mm )/Z ( mm )/T( deg ) ]: 50/50/30/70( タ

イプ1 ),110/110/40/70( タイプ2 )  
主な特長  
( 1 )試料情報から目的に適した信号を抽出して高画質を得るシグナル可変機能を搭載  
( 2 )試料のコンタミネーションを低減する磁気浮上形ターボ分子ポンプ

プを標準装備  
( 3 )新設計の高耐振ステージにより外部振動の影響を低減  
( 4 )開発のユーザインタフェースにより、機能と操作性を向上  
( ( 株 ) 日立ハイテクノロジーズ  
佐藤 貢記 )



S-4800形( タイプ2 )の外観

## ラウンジ



# 生き物と科学者とアーティスト

長島孝行\*

昨年面白いプロジェクトに参加した。ランデヴーブロジェクトである。これは「基礎研究を行う科学者はさまざまな技術やアイデアを持ちながら、それを役立てるための術を十分に持っていたとはいえないのでは」というユニバーサルデザイン研究所の赤池学氏のナビゲーションによるものである。東京・青山のスパイラルで開催された「ランデヴー展」はこのプロジェクトの立ち上げ式のようなもので、椿昇氏の組み立て式口ボット・キューブ「ソクラテス」や八谷和彦氏による「サンクスティル」(自動車の後部に付けて、道を譲ってくれた後の車にしっぽを振ってアリガトウなどの、運転者の気持ちを伝える)などの製品やプロトタイプが発表された。

この中で私はアーティストであるツムラ・コウスケ氏と「Silky way」と題して3月28日、東京コレクション「KOSUKE TUMURA 2001 2002 AUTUMN/WINTER COLLECTION」を発表した。この一風変わったファッションショーは、アーティストと生物学者の共同作品ということで非常に話題に上った。

基本素材はカイコのシルクや野蚕のワイルドシルクで、およそ20点の作品を発表した。同時にこれは、「シルクの加工技術の進歩と機能性研究」の新しい発表の場でもあることも十分に考慮した。招待客の1人でも

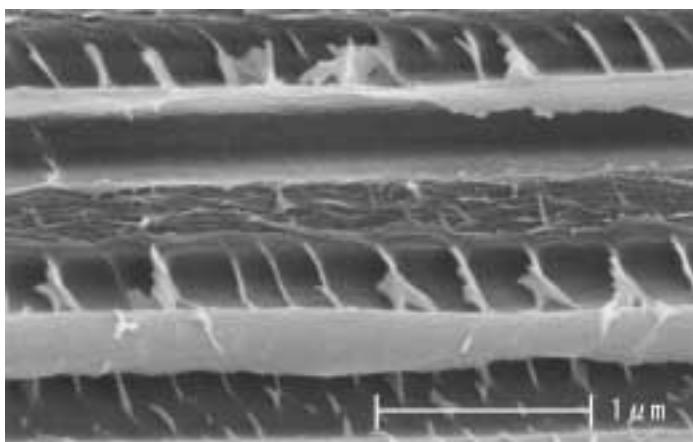
あつた俳優で飛騨・世界生活文化センターの館長の渡辺文雄さんは「一たす一は二になるが、このようなコラボレートは掛算的な効果をもたらす」と絶賛してくれた。

ショーでの具体的な作品としては、横糸にシルクを用いたスカートの裾を溶かしフリル状にしたもの(縦糸は合成繊維なので溶けない)やその溶かしたシルクをフィルム状に加工しドレスの素材にしたものなどがある。またカイコの行動を制御して粗いニットドレス上に繭糸を平面的に吐かせた繭ドレスも話題を呼んだ。

このプロジェクトを通して提案したのは、「シルクの非繊維利用」という新しい分野への可能性である。シルクは塩化カルシウムなどによって簡単に溶け、その後はさまざまな形状に加工できることや機能性研究(生体親和性・静菌性・UV遮蔽性・吸脂性など)によって、化粧品・食品・プラスチック代替え品などあらゆるシーンに利用できる。従って今まで「ゴミ」とされていたくず繭や屑糸さらには着物やネクタイなどのシルク製品ゴミが、上記のような非繊維加工品として生まれ変わり、使い回された後、最終的には自然生態系にフィードバックされるという理想型のリサイクルが可能となる。これを、「生態系循環型リサイクルシステム」と名付けた。



「Silky way」, モデル: 富永愛



ムシがデザインした繭糸内部のナノ構造

\* 東京農業大学農学部 助教授 農学博士  
昆虫機能開発研究室 <http://www.nodai.ac.jp/agri/agri/nag/> Email : nag@nodai.ac.jp

人類が100年という短い期間にオモイッキリ使ってしまった石油資源はまもなく枯渇してしまう。その後は再び19世紀までのように天然纖維時代に否応無しに戻らざるを得ない。であれば、シルクを今までの様にだけ使うのではなく、拡張した、しかも次世代にふさわしい利用法を提案しなければならない。このファッショントレードはそういう意味合いのものであった。

今回、ツムラさんには正直脱帽した。普通なら「シルクが溶けてリサイクルできる」ことをアピールする場合、溶かしたものから完全なモノを作りたがるが、ツムラさんの場合少し違っていた。溶ける途中のもので良いというのだ。こうして出来たのが裾の溶けたスカートであり、これをプロトタイプとした製品が最近やたらと目に付く。

東大の佐倉統氏や名古屋大学の生田幸士氏らは、「科学者はアーティストでなければならない」という。確かにその通りである。逆にアーティストももっとメカニズムを追及しなければならない。今回のショーは正にそれを実践したようなものである。

生き物もまたアーティストである。写真はあるムシの繭内部をFESEMで観察していく発見したユニークな超微細構造である。誰もが想像し得ないようなナノレベルでの不思議な構造をムシが作ってしまっているのである。しかし、生物の作る作品には重要なメカニズムが潜んでいる。最近はこういった生物の作るものを作れる科学技術(Biomimetics)が非常に注目されてきている。この背景には「化石資源から持続可能な資源への転換」という潮流がある。石油はせいぜい後50年、他の化石資源も先が見えてきた。今後は再生可能な動植物資源に依存するような社会を構築していくかないと、地球社会システム自体が持続不能になってしまう。

今まで我々が明らかにしてきたシルクタンパク質の機能性と、このナノ構造がどのような関係になっているのだろうか？

より進んだ構造・機能解析が進めば、また新しいモノ作りが提案できるにちがいない。

## 新製品紹介

### L-8800A形 高速アミノ酸分析計

アミノ酸は、私達生物の体を作っているたん白質の構成成分として20種類存在する。また、血液・尿などの生体液中にも40成分以上が含まれている重要な成分である。このためアミノ酸の分析は生化学や医学の研究分野から医薬品や食品の成分分析、品質管理などに広く用いられている。

今回、発売したL-8800A形は次のような特長を備えた製品である。

(1)生体成分分析のために新規開発の分離カラムを2つ用いるツインカラムを採用した。これにより従来と同じ分析時間(110分)で高分離のクロマトグラム(スレオニン、セリンの分離率で95%以上)が提供可能となった。なお、従来の分離は88%以上であった。

(2)データ処理ソフトASMをバージ

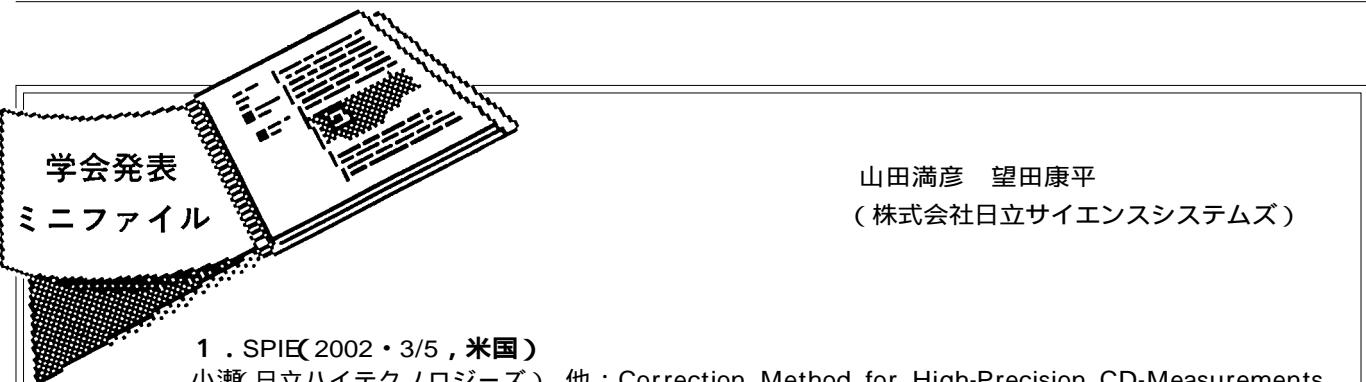
ョンアップし(Windows® 2000対応Ver. 2.0), 2ピークデコンボリューション機能などを搭載した。(3)ASMオートサマリプログラム(オプション)により、分析シリーズごとの定量値データをレポート出力する。またExcel®ファイルを用いることにより表管理もできる。

(4)分析目的や試料に応じて、各種分析方法が選択できる。また、実績ある従来機種のL-8500/L-8500A/L-8800形高速アミノ酸分析計の分析法も継承できる。

((株)日立ハイテクノロジーズ  
伊藤 正人 記)



L-8800A形高速アミノ酸分析計の外観



山田満彦 望田康平  
(株式会社日立サイエンスシステムズ)

### 1. SPIE(2002・3/5, 米国)

小瀬(日立ハイテクノロジーズ), 他 : Correction Method for High-Precision CD-Measurements on Electrostatically Charged Wafers.

絶縁体試料表面における帯電現象は, SEM像質の劣化を招くだけでなく微小寸法計測精度にも深刻な影響を与える。報告者らは, 試料全面にわたる固定帯電に対しては電位計により表面電位を直接測定してリターディング電圧を制御する手法や種々のシミュレーション結果から補正式を求めて計測値を補正する方法を試みた。一方, 電子ビーム照射による局部的な帯電に対しては, エネルギーフィルタを用いて二次電子エネルギーshift量を計測して電位を把握し, 同様に補正式を求めて計測値を補正した。この手法をS-9260形測長SEMに採用し, 図1のように計測値の偏差を0.1%以内に抑制できることを確認した。

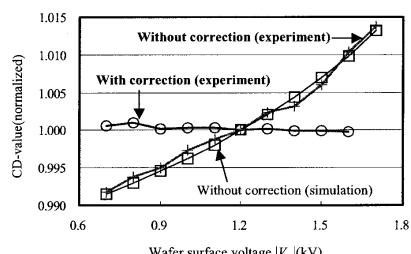


図1 補正前後の計測値偏差の比較

### 2. 表面技術協会第105回講演会(2002・3/15, 茨城)

上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : ナノ材料解析のための前処理と観察法

### 3. 日本電子顕微鏡学会関東支部第26回講演会(2002・3/16, 東京)

中川(日立サイエンスシステムズ), 他 : SEM性能を引き出すテクニックについて

### 4. 日本国金属学会2002年春季講演会(2002・3/28, 東京)

上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : Pt層を中間層に持つ磁性薄膜の構造解析

### 5. 表面技術協会アノード酸化皮膜研究会(2002・4/26, 東京)

上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIBとTEMを用いた材料解析

### 6. 日本電子顕微鏡学会第58回学術講演会(2002・5/14-16, 大阪)

長沖(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 電子顕微鏡における遠隔操作システムの開発

最近は電子顕微鏡を用いた研究分野においても, ネットワークを利用して効率良くデータ取得及び解析を行えるシステムが要求されている。このようなニーズに応えるため, LAN(TCP/IP)を用いたH-7600透過電子顕微鏡の高速遠隔操作システムを開発した。クライアント画面で動画像を見ながらレスポンス良く視野選択や画像調整を行うことができ, また高精細画像取得やウィルス自動探索などを迅速に行えることから, 今後の応用拡大が期待される。



図2 H-7600遠隔操作システムの構成

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIB加工試料のEELS分析に関する検討

集束イオンビーム(FIB)加工法を用いたTEM試料作製技術はイオンビーム照射に伴う試料ダメージの問題を克服しつつ急速な発展を遂げている。しかし, 電子ビームエネルギー損失分光(EELS)分析におけるこの手法の実用性についてはまだ十分な検討がなされていない。今回の実験ではFIB加工条件や試料厚さなどについて最適化を行った結果, 図3に示すようなSiデバイスのバリアメタル層(TiN/Ti)の高分解能像(a)および明瞭なEELSスペクトルが得られ, この手法の高い実用性を確認できた。

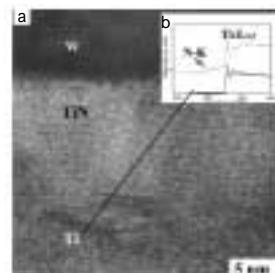
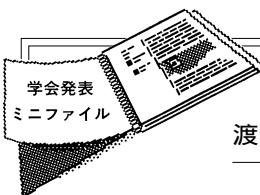


図3 メタルバリア層(Ti/TiN)の高分解能TEM像(a)とEELSスペクトル(b)



### 渡邊(日立サイエンスシステムズ), 他 : In-Lens FE-SEMによる薄膜試料のEDX微小部分析の検討

半導体分野への新たなSEM応用を模索するため、S-5200形超高分解能In-Lens FE-SEMの走査透過(STEM)像観察およびエネルギー分散型X線分析(EDX)機能を用いて組成情報の空間分解能限界の見極めを行った。FB-2000A形FIB装置を用いてSiデバイス(SRAM)や化合物半導体(GaInAs/GaAlAs)などの分析部位を約150nm厚に薄膜化して実験を行った結果、約4nm厚のゲート酸化膜のO-K線(約53重量%)や化合物半導体断面の5nm領域のAl-K線(約9重量%)を用いたマッピング像の取得に成功した。これによって、本手法が半導体デバイスのプロセス評価や故障解析に適用可能なことが判明した。

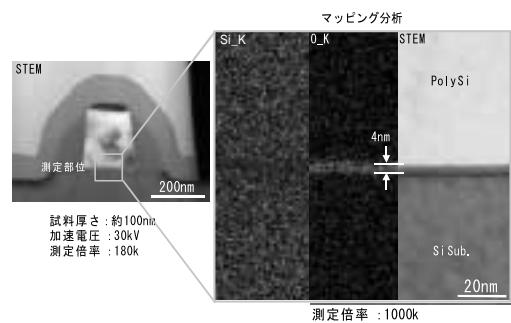


図4 ゲート酸化膜(厚さ約4 nm)のマッピング像

### 大西(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 電子顕微鏡用試料作製を更に高速化する集束イオンビーム装置FB-2100の紹介

小柏(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 画像処理を応用したインレンズ形FE-SEMS-5200の新機能の紹介  
齊藤(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 電子ビームリソグラフィ用電子光学系

石谷(日立ハイテクノロジーズ), 他 : Gaイオン照射と電子照射における二次電子生成素過程の比較  
上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIBによるTEM試料作製

上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : 2軸傾斜試料加熱装置の改良  
中澤(日立サイエンスシステムズ), 他 : H-7600における高角度試料傾斜とその応用

今野(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIB/TEMシステムによる化合物半導体の観察

黒田(日立サイエンスシステムズ), 他 : FB-2100の機能とその応用

多持(日立サイエンスシステムズ), 他 : バルク・薄膜試料のSEM情報の限界と可能性

坂上(日立サイエンスシステムズ), 他 : 低加速STEM像による複合材料観察の試み

鈴木(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIB機能付SEMによる電子材料の断面加工と観察

西村(日立サイエンスシステムズ), 他 : 高分解能低真空SEMの微生物観察への応用

中川(日立サイエンスシステムズ), 他 : 高精細デジタル画像の作成と注意点

武藤(日立サイエンスシステムズ), 他 : 特殊イメージング機能によるSEM像質改善の試み

黒澤(日立サイエンスシステムズ), 他 : 汎用SEM用寸法標準試料の開発

多持(日立サイエンスシステムズ), 他 : インターネットからSEM観察・操作を実現したITラボラトリシステムの紹介

### 7. 第7回LCテクノプラザ(2002・2/1~2, 東京理科大学)

伊藤(日立ハイテクノロジーズ), 他 : アミノ酸分析計を用いた臨床化学に関連するアミノ酸の迅速分析

生体液中の臨床化学に関連したアミノ酸類縁物質の短時間分析法を検討した。3種類の症例(心臓病, 楊糖尿病, フェニルケトン尿症)に利用可能な成分を22分で分析した。また, 栄養管理指標に役立つ成分の迅速分析法も検討した。(図5)

井上(日立サイエンスシステムズ), 他 : アミノ酸分析における不完全分離ピークのデコンボリューション

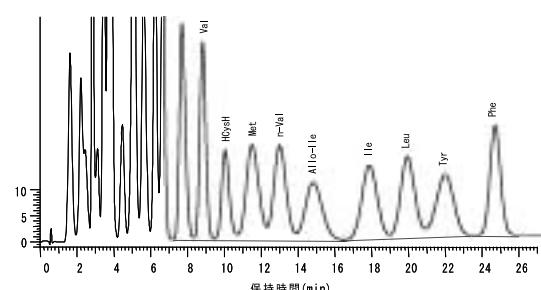


図5 臨床化学対応アミノ酸の迅速分析例

### 8. 2002 Pittsburgh Conference(2002・3/17~22, New Orleans, USA)

原田(日立ハイテクノロジーズ), 他 : The Virtual Assistant for Regulated HPLC Labs ; Auto Validation of a New HPLC System and Documentation of the Results

**9. 第50回質量分析総合討論会(2002・5/15～17, 京都工芸繊維大学)**  
平林(日立中央研究所)；大気圧イオン化法の新展開

**10. 第63回日本分析化学討論会(2002・5/25～26, 姫路工業大学)**  
坂元(日立サイエンスシステムズ), 他; ICP三次元四重極質量分析装置を用いた琵琶湖周辺河川水中ウランの分析

ICP三次元四重極質量分析装置による環境水中のウラン, ナトリウム, カルシウムを高感度に分析する手法を確立した。この手法により, 琵琶湖流入/流出河川におけるウラン濃度を分析し, 濃度が湖西で低く湖東北で高い傾向が示された。(図6)

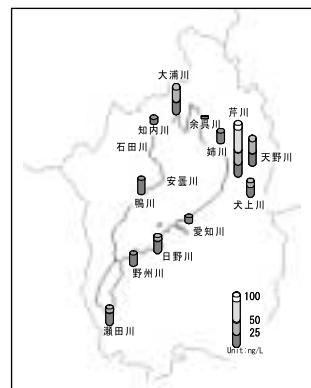


図6 琵琶湖周辺のウラン濃度分布

清水(日立サイエンスシステムズ), 他; HPLC-ICP/3DQMSによる牡蠣中のヒ素化合物のスペシエーション

海産物中に多く含まれるヒ素は, その存在形態により毒性が異なる。HPLC-ICP/3DQMSにより, 6化合物について分離条件, MS条件を確立し, 分離分析が可能となった。実試料として宮城産牡蠣を測定し, 3種の有機ヒ素化合物を検出した。(図7)

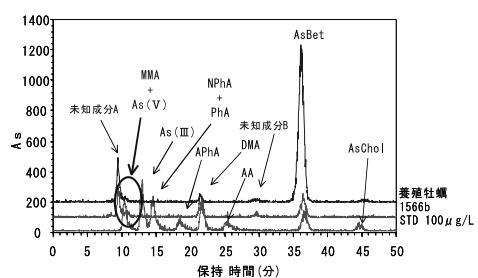


図7 牡蠣中ヒ素化合物の測定例

河原井(日立サイエンスシステムズ)他; ガスクロマトグラフィー/パルス型炎光光度検出器による海水中有機スズ化合物の分析

内分泌搅乱作用が疑われるトリプチルスズ化合物(TBT)及びトリフェニルスズ化合物(TPT)をパルス型炎光光度検出器を用いて測定し, MSと同等の感度で測定が可能となった。海水試料を用いた測定結果は, 検出限界としてTBT 0.078ng/L, TPT 0.087ng/Lが得られ, 従来法の1~2桁の感度向上が確認できた。(図8)

**11. 50th Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**  
(2002・6/2～6,Orland,USA)

出口(日立サイエンスシステムズ)他; Enhanced Mass Detection of Oligonucleotides on Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Ion-Trap Mass Spectrometry

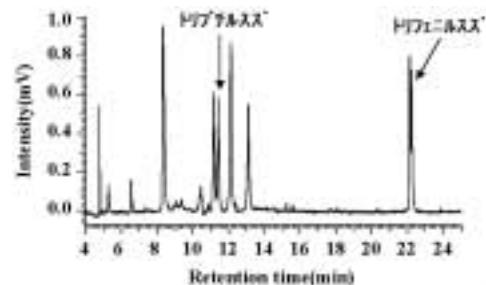


図8 海水標準添加試料(10ng/L each)のガスクロマトグラム 2: トリプチルスズ、5: トリフェニルスズ、1,3,4: 内部標準物質

DNA解析が広く行われるようになり, 高純度の合成オリゴDNAが求められている。

高純度の合成オリゴDNAを確保する手段として, HPLC/Ion-Trap MSにより20merから60merの合成オリゴDNAを分離分析する条件を確立し, さらにMSシグナルを用いた高スループットの分取システムを構築した。(図9)

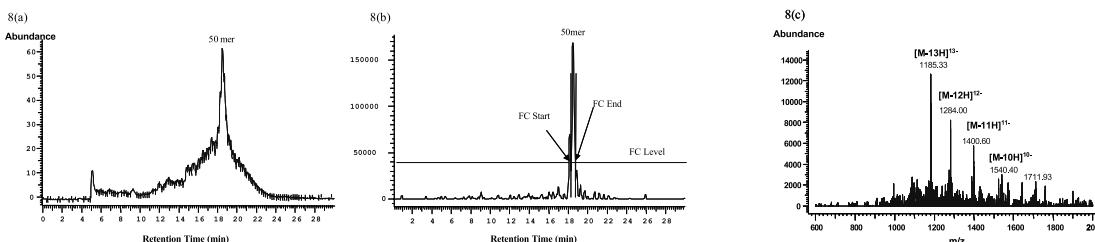


図9 オリゴDNAのクロマトグラムとマススペクトル

**12. 第11回環境化学討論会(2002・6/3～5, 箱根プリンスホテル国際会議場)**  
阪本(日立ハイテクノロジーズ)他; PCBのオンラインモニタリング技術の開発

## 新製品紹介

### U-7000形 真空紫外分光光度計

次世代半導体リソグラフィに用いられるステッパ光源、F<sub>2</sub>レーザの発振波長(157nm)域は、酸素による吸収が非常に大きい。そのため、光路を真空、もしくは窒素によるページを行わなければ光が透過しないことから、真空紫外域(115~185nm)と呼ばれる。こうした真空紫外域の光学特性評価ニーズが高まりを見せてのことから、U-7000形真空紫外分光光度計を発売した。

#### 主な仕様

- (1) 測定可能波長域 : 130 ~ 380nm
- (2) 測光精度 : ±0.3%
- (3) ベースライン平坦度 : ±0.005Abs(130 ~ 185nm)
- (4) ノイズレベル : ±0.001Abs(at 157nm)

#### 主な特長

- (1) 真空排気、N<sub>2</sub>ページの両方式

に標準対応。分光器と試料室を窓材により空間的に独立、さらに光学系を完全対称ダブルビークとすることにより、サンプル交換から測定可能となるまでの待ち時間が非常に短くなっている。

#### (2) サンプルターレット機構を標準

装備、複数サンプルの同時測定可能となっている。

(3) 日立独自のディファレンシャルフィードバック方式による測光が高速スキャン時も高精度の測定を可能としている。

(那珂インスツルメンツ(株))

株木 耕平 記)



U-7000形真空紫外分光光度計の外観

## 株式会社日立ハイテクノロジーズ

本 社 電話 東京 (03) 3504-7211

四国営業所 電話 高松 (087) 862-3391

北海道支店 電話 札幌 (011) 221-7241

東北支店 電話 仙台 (022) 264-2219

関西支店 電話 大阪 (06) 4807-2511

京都営業所 電話 京都 (075) 241-1591

中国支店 電話 広島 (082) 221-4511

九州支店 電話 福岡 (092) 721-3511

中部支店 電話 名古屋 (052) 583-5811

#### 編集後記

日本中いや世界中で興奮と喧騒に巻き込んだサッカーワールドカップは、ブラジルの優勝や韓国、日本の活躍など、観衆に多くの感動を与えてくれました。編集者もにわかサポータとなり、日本チームの活躍に声援を送りました。そのワールドカップも終了した7月には例年に無く多くの台風の来襲をみました。日本列島にワールドカップや台風など熱き風が吹き込んでいるようです。小誌の編集も、日本列島の熱波にも負けず進められました。今話題のテーマとして、田路先生からカーボンナノチューブ、西村、西口先生により糖鎖合成についての論文のご投稿をいただきました。今月号は、バイオ関連の基礎分析手段である液体クロマトグラフィー(HPLC)を小特集いたしました。HPLCの新製品(L-2000)の紹介を行いました。また、DNA分析に不可欠なプライマー合成の純度の決定とDNA分取装置につ

いても紹介します。(加藤 義昭 記)

インターネットホームページ  
(株)日立ハイテクノロジーズ  
ライフサイエンス関連  
URL:<http://www.hitachi-hitec.com/science/>  
ナノテクノロジー関連  
URL:<http://www.hitachi-hitec.com/device/>  
本ニュースに関するお問い合わせは、下記、  
または、(株)日立ハイテクノロジーズの上  
記各事業所へご連絡ください。  
(株)日立ハイテクノロジーズ  
インフォメーションセンター  
〒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

(株)日立サイエンスシステムズ

那珂カスタマーセンタ  
〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛882番地  
電話 (029) 274-5093(代)

HITACHI  
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS  
SEPTEMBER, 2002 VOL. 45 No. 1

発行 2002年9月10日  
発行人 横川 信幸  
編集人 加藤 義昭  
発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ  
〒100-8220  
東京都港区西新橋1-24-14  
電話 (03) 3504-7811(ダイヤルイン)  
印刷 日立インターメディックス株式会社