

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

MARCH
VOL.45

2003
No.2

目次

巻頭言

分析と分析機器

廣川吉之助.....1

報文

デュアルカラム、デュアル検出器付
ガスクロマトグラフィーの食品中残留
農薬分析への応用

斎藤 勲 上野英二.....3

細胞膜機能の凍結割断レプリカ法による解析

佐々木博之.....7

マウスの胎生期から出生後に至る硝子
体血管系の鋳型観察

近藤俊三11

ラウンジ

明治維新からの環境汚染

山崎秀夫15

解説

HPLC-ICP-MSによる牡蠣中のヒ素
化合物の化学形態分析

清水克敏 坂元秀之 山本和子 ...17

日立真空紫外分光光度計 U-7000

株木耕平20

大型ステージを搭載したS-3600Nの紹介

伊東祐博 田中隆一

西村雅子 山田満彦23

電界放出形走査電子顕微鏡S-4800

小柏 剛25

マイクロチップ電気泳動装置コスモア
イSV1210の紹介とその応用例

長谷見通子27

OURSTEX 150 RoHSエネルギー分散
型蛍光X線分析装置を用いた電子材料

中の有害重金属の分析

永井宏樹 宇高 忠29

学会発表ミニファイル32

新製品紹介

・日立標準メゾスケールのご紹介...16

・U-1800/2800形分光光度計の紹介
.....36

お知らせ

・サイエンスラボラトリが誕生しました
.....24

巻頭言

分析と分析機器

Analytical Chemistry and Instruments for Analytical Use

廣川吉之助*



しばらく前に同じような題目で拙文を載せて頂いたことがあり、そこで述べたことが、幸か不幸か数年を経た現在、現実に進行中であることが、今回読み返してみても確認する羽目になった。しかも当時より、さらに生体関連など広い範囲における分析が要望され、その分野でも生体情報が各種物質変化や物質移動として原子、分子レベルで捉えられるようになって、その情報出現や伝達にかかわる微量物質の計測が医療、生物分野でも要求されている。そして取得される各種物質情報の質、量、情報取得時間、再現性、適用性と、それらの情報の組み合わせによる事象の映像化などが要求されるようになり、分析はほとんど機器に頼らざるを得ない現実がある。そのため“分析”は物理、化学、生物、材料、環境...などの情報と、それらの時間、空間の静的、動的現象の測定に関する原理、技術とそれらのinstrumentationに関する研究をし、それを応用するべくシステム化することということが出来る。

物創りでは新しい性質の材料との遭遇、それから更なる材料の改質、改善、そして近未来に実用化が予測される材料、物質の開発、研究のために必要、あるいは必要となるであろう分析法が前もって準備されているか否かが研究、開発や企業業務の進展に大きくかかわってくる例がある。それにもかかわらず、ある面では当然と受取られているが、研究所や企業の物創りの人達から「物がなければ分析は不要」、「分析がなくとも物は創れる」と言われたり、またかなり成熟した製造業では「計測や分析は価値を生まず、コストの元凶」で「プロセスならびに出荷品の信頼性確保以外に無用」と言われることがある。そのためもあるのか分析化学教育にも問題があるのか、大学にあった分析化学講座は分析という名は陳腐といわれて予算がつかなくなったり、講座名称を変更したりして減少している。そして分析機器として市販装置があり general procedure が、すでに一応提案されている分析手法を研究手段としてデーターを集めて、ある研究集会では環境問題や材料などの研究報告を行

* 東北大学名誉教授、工学博士

っている一方、他の研究会などでは分析の研究を標榜しているような例が時々認められる。

これらのことが一因かもしれないが、数十年前からの分析化学の講義や教科書で述べられている水溶液中の反応を主体とする分析方法は最終的基準の方法として非常に重要であるにもかかわらず現実には、ある場合以外応用される事が少なくなっているのが現状である。

しかも、あいかわらず[分析機器の特性は基準物質で定期的に検査、規定されなければならない] ことが知られていない。すなわち[分析は物質基準であるという原則] で “Each instrument has each characteristic ” のため同一メーカーの同一仕様機種で同一試料を同一条件で測定しても必ずしも同一結果を与えないことに留意する必要がある。そこには“ 不確定性 ” すなわち誤差やばらつきが入り込む。今や分析装置は操作上、電算機の採用が普通となり分析法や分析操作の欠点や不確定部分がblack boxに入ることは現実の所やむをえないと考えている。

また、エレクトロニクスをはじめ装置の構成部品などの進歩によりすでに実用化されている分析装置のなかで、測定信号の出現過程が原理的にかなり明確な分析機器類は小型化されて来ている。そこでは目的性能(単一機能でも) を十分に満たせば小型、単純操作性、高再現性そして高速稼動が可能で適当に安価な装置が要求され、出現することになり、装置のセンサー化や分析手法の簡便化へと繋がる。そのためもあるが、分光光度計を使用する吸光光度法などは機器分析と言われない場合がある。しかし装置の調製、規格化にはやはり基準物質や認証標準試料群を必要とする。この対極にある機器分析法が発光分析や質量分析などで、そこで使用されるかなりの機器が、その例に入るが、分析試料からの試料採取が破壊的で物質情報を示す信号の発生過程が複雑かつ多数同時進行型の分析である。これらの分析法の一部では測定試料採取と情報信号の採取を別過程にし、定量性の向上が図られてきたりしている。そのためここでも定量測定などのために基準

物質や認証標準試料群の調製、確保などが必要である。

このようなことから、分析機器メーカーは以前にも増して各種分野で必要な装置の開発とともに分析の基本となるgeneral procedureと、それとともに各種材料や生体、環境試料など各種状態や形態の試料群に応用できるanalytical procedureを創案してCPUソフトとして装置に組み込み、必要な基準物質や認証標準試料群と共に分析機器ユーザーに供給せざるを得ない時代となっている。そのために分析機器メーカーは必要分析機器の開発と同時に分析する各種試料に対するanalytical procedureを開発、作製そして応用ができる人材の教育、育成と、ユーザーの要請によるそれら人材の派遣も必要であろう。そしてある一部の機器分析はTVやCPUを通じて遠隔操作あるいは無人操作で行われることも視野に入れておく必要がある。大学などにおける分析化学の教育、研究も変化すべき面があるはずであるが、今後数年間でどのように分析と分析機器類そしてその間の係わりあいは変わっているであろうか。

著 者 略 歴

廣川 吉之助(ひろかわ きちのすけ)
現住所 仙台市泉区高森三丁目 4 番地23号
1957年 東北大学大学院工学研究科金属工学専攻修士課程修了
1960年 東北大学大学院工学研究科金属工学専攻博士課程修了
1960年 文部教官 東北大学助手(金属材料研究所)
1964年 文部教官 東北大学助教授(金属材料研究所)
1964年 ~ 1965年 フンボルト財団留学生としてドイツ連邦共和国, ドルトムント分光化学研究所に滞在
1975年 文部教官 東北大学教授(金属材料研究所)
1996年 同上 定年退官(東北大学名誉教授)

受賞
1966年 日本化学会進歩賞
1973年 科学計測振興会賞
1975年 日本金属学会功績賞
1986年 日本分析化学会学会賞
1994年 日本鉄鋼協会浅田賞

報 文

デュアルカラム、デュアル検出器付ガスクロマトグラフィーの食品中残留農薬分析への応用

Application of Dual Column, Dual Detector-Gas Chromatography for Pesticide Residues Analysis in Foods

齋藤 勲* 上野英二**

食品衛生法の残留農薬基準は、昭和43年に4作物5農薬について食品規格の告示、法的規制がなされた後、平成4年までに53作物26農薬に基準が設定されてきた。しかし、実際には500を超える農薬登録があり、食品衛生法の規制外農薬の増大、輸入農産物の増大等の実情を背景として、平成4年食品衛生法が大幅に改正、新規基準設定が行われ、55農薬130農産物となった。その後順次基準値が設定され平成14年度には229農薬となった。最近10年間の増加は劇的であり、将来的には400を超える農薬に残留基準が設定される予定である。

当所でも食品中残留基準の増加に伴い、種々の検体について多数の農薬分析を行う一斉分析法の開発に取り組んできた。従来の分析法では、有機塩素系農薬、有機リン系農薬等のグループ分析は行われていた。塩素系農薬はヘキサン、有機リン系はアセトン等と対象農薬の性状に合わせた抽出・精製方法で分析を行ってきた。しかし、多数の農薬を一斉に分析するためにはアセトンやアセトニトリルのような極性の高い溶媒で抽出する必要があり、農薬とともにクロロフィル、カロチノイド、脂質など多数の植物成分も抽出されてくる。このため種々の精製操作が必要となり、さらに定量手段としてのガスクロマトグラフィーの分離カラムが従来のパックドカラム(液層を珪藻土等にコーティングしたものをガラスカラムに充填) から高分離能、吸着分解が少ないキャピラリーカラムに進歩してきた。しかし、パックドカラムではカラム入口付近のグラスウールや充填剤がクロロフィル、脂質などを吸着し一種の精製操作の役目もはたしていたが、高分離能のキャピラリーカラムになってからは、従来吸着していた化合物もカラム内で分離され検出器まで到達するようになった。このため従来の精製方法ではクロマトグラム上汚れがひどく、解読不十分なためさらなる精製が必要となってきた。現在当所では精製方法の基本としてGel Permeation Chromatography (ゲル浸透クロマトグラフィー, GPC) を導入し、脂肪成分やクロロフィルなどの色素を農薬成分と分離精製する方法を採用している¹⁻⁴⁾。

食品中残留農薬の定量は主にガスクロマトグラフィー



が用いられ、従来は確認に最低2本の性質の異なる分離カラムを用いて標準品との比較を行う必要があった。パックドカラムを用いて定量する場合は、農薬ピークの相対保持時間や面積値の再現性が悪く、多いときには分離カラムを3本、4本と代えて確認する必要があり、確認作業にはかなり時間を要した。キャピラリーカラムになってからは相対保持時間の再現性などが飛躍的に向上し、擬似ピークの判断が以前より容易にはなったが、確認には2本の異なるカラムでの定量は必要である。キャピラリーカラムの場合は、パックドカラムと比べて高分離・高感度化しているためカラム交換・分析条件の安定化等良好な分析条件を維持するには大変な労力を要する。人員や機器整備で制約を受けるなか、平成4年以降の残留農薬基準の大幅な増大に伴う分析業務の増大につれて、効率的な業務を遂行するため定量操作で1回の分析で2つの情報を得られ、多くの農薬の確認定量が可能なデュアルカラム・デュアル検出器方式を選択せざるを得なかった。

キャピラリーカラムによるデュアルカラム・デュアル検出器方式は15年位前に米国EPAが塩素系農薬やPCBsの定量確認には2本のカラムによる確認を決めた際、一回注入、デュアルカラム、デュアルECD検出器での確認方法が紹介された⁵⁾。その後塩素系農薬の定量にECD、ELCD検出器を用いる分析法、FPD、NPD (FTD) を用いる分析法などが発表された⁶⁻¹⁰⁾。しかし、日常での残留農薬分析での応用はあまり進まなかった。

食品中残留農薬分析へのデュアルカラム・デュアル検出器方式の具体的な応用を以下に紹介する。

* 愛知県衛生研究所化学部、環境化学科、科長、博士 (医学)

** 愛知県衛生研究所化学部、環境化学科、主任

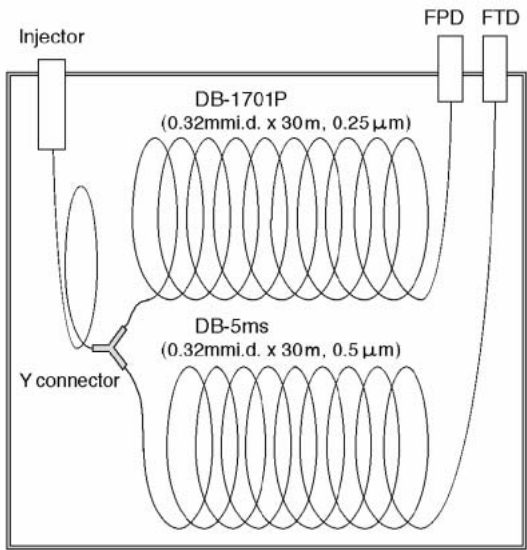


図1 デュアルカラム・デュアル検出器付ガスクロマトグラフ

1．デュアルカラム・デュアル検出器FPD，FTDによる有機リン系農薬の分析

デュアルカラム・デュアル検出器の仕組みを図1に示す。DDT，BHC，ディルドリン等の有機塩素系農薬の使用禁止後の殺虫剤の中心は有機リン剤であった。炎光光度型検出器（Flame Photometric Detector，FPD）は，燃焼で生成するリンやイオウの発光をフォトマルチプライヤーで増幅感知する検出器であり，非常に選択性の高い検出器である。フィルターをスズ用に交換することにより有機スズ化合物の測定も可能である。Flame Thermionic Detector（FTDまたはNPD）は，窒素，リンに特異的に感度を持っており，特にリンには感度が高い。この2つの検出器を用いてそれぞれ性質の異なるカラムを接続した。一回の注入で2つのデータを取るために，注入口からガードカラム（リテンショ

ンギャップ）でYスプリッターを介して，それぞれのキャピラリーカラムに接続した。パックドカラムの後には，有機リン系農薬等の分析は内径0.53mmのメガボアカラムで分析を行っていたので，出来るだけ近い形で分析が行える内径0.32mmのキャピラリーカラムを選択した。ガードカラムには0.53mmを使用した。FTDは窒素を検出する検出器のため，分離カラムは窒素化合物を含まない方がカラムブリードがなく望ましい。このためDB1，DB5などを使用した。FPDはシアノプロピル基を含むDB1701などを選択して，異なる分離が得られるようにカラム選択を行った。ヘリウム流量は注入口で約10ml/分，それをYスプリッターで1/2に分岐して各カラムに導いている。各カラムの流量はほぼ同量であったが，極性の大きいカラムのほうが少ない傾向はみられた。当初心配されたのが，スプリットレス

表1 有機リン系農薬18種類の相対保持時間、面積値のデュアルカラムによる再現性

	FPD（DB-1701P: 0.32mmx30m）				FTD（DB-5ms: 0.32mmx30m）			
	相対保持時間 (min)		面積		相対保持時間 (min)		面積	
	平均 ± 標準偏差	変動係数%	平均 ± 標準偏差	変動係数%	平均 ± 標準偏差	変動係数%	平均 ± 標準偏差	変動係数%
Dichlorvos	9.689 ± 0.0007	0.008	127176 ± 9237	7.26	9.462 ± 0.0064	0.067	24183 ± 3418	14.13
Acephate	14.024 ± 0.004	0.031	165577 ± 18216	11.00	12.140 ± 0.0000	0.000	53125 ± 6488	12.21
Ca d usafos	14.661 ± 0.001	0.010	354980 ± 10069	2.84	15.353 ± 0.0000	0.000	231368 ± 2971	1.28
Mnicrotophos	16.914 ± 0.001	0.009	420029 ± 23209	5.53				
Dimethoate	17.071 ± 0.001	0.006	309330 ± 9996	3.23	15.846 ± 0.0000	0.000	122287 ± 4879	3.99
Pirimiphos-methyl	17.460 ± 0.0003	0.001	346285 ± 3141	0.91	18.086 ± 0.0000	0.000	90772 ± 1286	1.42
Chlorpyrifos	17.754 ± 0.0007	0.004	321232 ± 2702	0.84	18.486 ± 0.0000	0.000	90889 ± 1411	1.55
Malathion	18.254 ± 0.0008	0.002	221160 ± 5563	2.52	18.326 ± 0.0000	0.000	100149 ± 1226	1.23
Parathion	18.785 ± 0.0005	0.003	369918 ± 5863	1.58	18.646 ± 0.0000	0.000	112652 ± 2909	2.58
Quinalphos	19.048 ± 0.0008	0.004	348530 ± 8194	2.35	19.526 ± 0.0000	0.000	112409 ± 1510	1.34
Prothiophos	19.505 ± 0.0007	0.004	285065 ± 7668	2.69	20.460 ± 0.0000	0.000	149894 ± 2618	1.75
Methidathio	19.918 ± 0.0009	0.004	240741 ± 10388	4.32	19.846 ± 0.0000	0.000	123337 ± 3046	2.47
Isoxathion	20.985 ± .0005	0.002	398322 ± 9974	2.50	21.081 ± 0.0067	0.032	169600 ± 1986	2.94
Sulprophos	21.305 ± .0005	0.002	268676 ± 15779	5.87	23.060 ± 0.0000	0.000	65752 ± 2164	3.29
Triazophos	22.345 ± .0007	0.003	200942 ± 13174	6.56	22.046 ± 0.0000	0.000	220466 ± 2743	1.24
TPP (IS)	22.616 ± .0019	0.008	276616 ± 10404	3.76	-	-	-	-
EPN	23.926 ± .0012	0.005	285683 ± 10794	3.78	23.900 ± 0.0000	0.000	108879 ± 2115	1.94
Azinphos methyl	25.318 ± .0020	0.008	90675 ± 12322	13.59	24.994 ± 0.0041	0.002	68035 ± 3981	5.85
Pyraclofos	25.937 ± .0018	0.007	121455 ± 11875	9.78	26.163 ± 0.0055	0.021	64265 ± 2099	3.27

で2μLを注入し，分岐させたとき分配率はきちんと一定なのか，相対保持時間の再現性は大丈夫かなどの問題であった。有機リン系農薬標準品を10回注入したときの相対保持時間，面積の変動を表1に示した。

相対保持時間，面積ともシングルキャピラリーカラムと同様の良好な再現性を示しており，当初心配されたYスプリッターでの分配のバラツキはなく，日常分析に十分応用可能であった。

有機リン，含窒素系農薬の標準品溶液を注入して2本のカラムで得られた相対保持時間を表にしたのが表2で

表2 残留農薬のデュアルカラム分析による相対保持時間一覧

No.	Pesticides	DB-5ms		DB-1701P	
		R.Time	R.R.Time	R.Time	R.R.Time
35	malathion	18.393	0.745	18.264	0.755
43	chlorpyrifos	18.593	0.753	17.600	0.728
63	thiobencarb	18.620	0.754		
41	fenthion	18.713	0.758	18.218	0.754
34	parathion	18.806	0.761	18.948	0.784
154	triadimefon	18.873	0.764		
302	fosthiazate-1	19.273	0.780	19.880	0.822
302	fosthiazate-2	19.340	0.783	19.958	0.825
129	pendimethalin	19.500	0.789		
44	-CVP	19.793	0.801	19.380	0.802
39	phenothoate	19.993	0.809	19.510	0.807
377	TBZ	20.032	0.811		
209	quinalphos	20.033	0.811	19.343	0.800
64	captan	20.060	0.812		
61	procymidone	20.073	0.813		
9	methidathion	20.446	0.828	20.507	0.848
6	chinomethionat	20.540	0.832		
174	butamifos	20.966	0.849	20.939	0.866
125	imazaryl	21.233	0.860		
28	prothiophos	21.326	0.863	19.990	0.827
210	pretilachlor	21.326	0.863		
237	profenofos	21.460	0.869	20.585	0.851
424	kresoxim-methyl	21.793	0.882		
389	chlorfenapyr	22.033	0.892		
17	isoxathion	22.180	0.898	22.045	0.912
191	fensulfotion	22.686	0.918	23.645	0.978
162	oxadixyl	22.780	0.922		
40	ethion	22.913	0.928	22.316	0.923
132	mepronil	23.313	0.944		
419	triaazophos	23.393	0.947	23.820	0.985
401	sulprofos	23.433	0.949	22.475	0.930
5	cyanofenphos	23.806	0.964	24.072	0.996
262	propiconazole-1	23.846	0.965		
12	edifenphos(EDDP)	23.860	0.966	23.379	0.967
262	propiconazole-2	24.033	0.973		
365	tebuconazole	24.526	0.993		
-	Triphenyl phosphate	24.726	1.001	24.177	1.000
10	captafol	24.813	1.005		
376	acetamiprid	25.313	1.025		
72	iprodion	25.390	1.028		
29	pyridaphenthion	25.406	1.029	25.745	1.065
13	EPN	25.740	1.042	25.715	1.064
398	fenpropathrin	26.060	1.055		
332	tebufenpyrad	26.233	1.062		
25	phosalone	26.860	1.087	27.083	1.120
286	azinphos methyl	26.980	1.092	27.311	1.130
367	acrinathrin	27.922	1.130		
149	bitteranol1	28.860	1.168		
149	bitteranol2	29.060	1.177		
152	cyfluthrin1,2	30.070	1.217		
152	cyfluthrin3,4	30.266	1.225		
255	fenvalerate1	32.437	1.313		
170	fenvalerate2	32.923	1.333		

ある。こういった形で測定中でも2本のカラム，2つの検出器で未知ピークが標準品と同一であれば，実際の日常分析の農薬はほぼ確認出来る。含窒素系農薬も保持時間の再現性が良いためかなり狭い範囲で擬似ピークかを判断可能である。カラムが異なる同一機器がもう1台あれば精度はさらに高くなる。

実際のバセリの検体からEPNとダイアジノンが検出されたFPD，FTDのクロマトグラムを図2に示す。内部標準物質のトリフェニルリン酸で相対保持時間を計算しているが，図からも明らかなように2つの農薬が容易に確認できる。

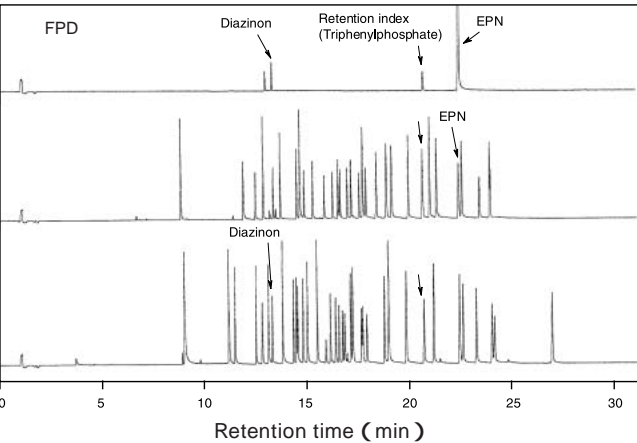
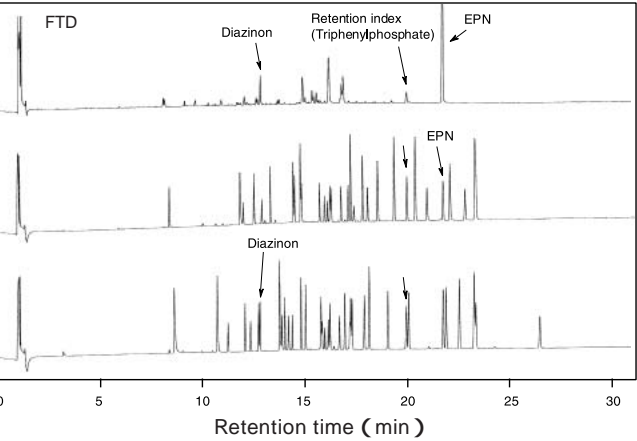


図2 バセリに残留するダイアジノンとEPNのFTD及びFPDによる分析例
上段：バセリ抽出物 中段：標準品混合液B 下段：標準品混合液A

2．デュアルカラム・デュアル検出器ECDによる有機塩素系農薬の分析

従来からECD検出器を用いた有機塩素系農薬の分析にはデュアルカラム方式の報告は多い。ハロゲンやニトロ基等電子吸引力のある化合物は高感度を有するため，例えキャピラリーカラムでピークがシャープになり分離能が向上しても1本のカラムでは同定は出来ない。最低2本のカラムによる確認は必要であるが，別のカラムにつなぎ代えて分析をする場合，高感度高分離

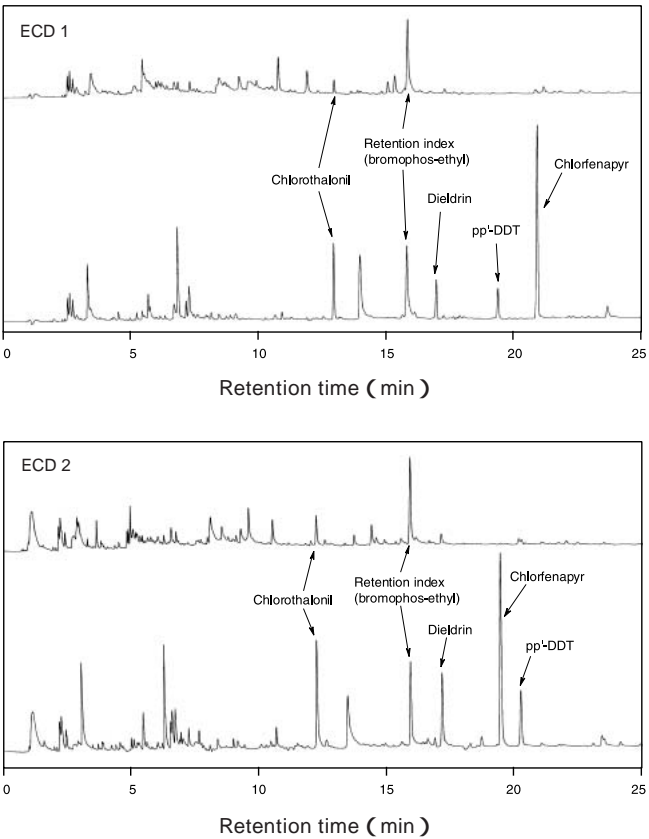


図3 キュウリに残留するクロロタロニル、ディルドリン、pp'-DDT、クロルフェナビルのデュアルカラムECDによる分析例
下段：Fr1、上段：Fr2
Fr1、Fr2はフロリジルミニカラムによる分画（Fr1：10%ジエチルエーテル/石油エーテル、Fr2：10%アセトン/石油エーテル）

条件で測定するキャピラリーカラムの場合最高の分析条件がすぐには再現出来ず時間がかかってしまう。その面からもデュアルカラムとECDとの結合は早くから実施されたものと思われる。

デュアルカラム・デュアルECDの分析事例として、キュウリから検出された4農薬クロロタロニル（TPN）、クロルフェナビル、ディルドリン、pp'-DDTの分析事例を図3示す。

当所ではアセトニトリル抽出、GPC精製、ミニカラム精製後デュアルカラムGC分析を行っているが、ルーチン検査で連続測定した後でも注入口やカラムの汚れによるGC - ECDの感度の低下や、保持時間のずれなどは見られず、多数の検体を連続的に測定するモニタリングには有用であると思われる。食品中の残留濃度が微量の場合、GC/MS（SIMモード）による測定では夾雑物の影響から選択イオンの強度比が一致せず確認定量が困難な場合もある。しかし、その検体でもデュアルキャピラリーカラム・デュアルECDを用いることにより高感度に分離定量は可能な場合もあり、相互補完的な使用が可能である。

デュアルカラム・デュアル検出器の応用例として、

高橋等はGC/MSとECDの検出器を用いて、同一保持時間になるようにカラム条件を設定し、未知微量成分の分析同定に用いている¹¹⁾。同様な方法でAmirav等はGC/MSとパルス型FPDをデュアルカラムに接続して高感度分析を行っている¹²⁾。

今回は紙面の都合上触れなかったが、含窒素化合物の中でイオウを含有する農薬も多くそれらを対象としたデュアルカラム・FPD（Sモード）/FTDによる分離分析も行っている。またパルス型FPD/FTDによる高感度検出器の性質を応用して、ネギなど硫黄化合物の多い検体中の有機リン剤の分析を、溶液の希釈のみでリンと硫黄の感度低下の差を利用して硫黄の妨害を劇的に減少させ分析する方法も検討している。

デュアルカラム/デュアル検出器を用いた食品中残留農薬分析への応用は、その利便性からますます評価されるものと期待している。

参考文献

1. 斎藤勲, 山田貞二, 大島晴美, 早川順子, 日本農薬学会誌20, 109 - 118 (1995)
2. 上野英二, 大島晴美, 斎藤勲, 松本浩, 食品衛生学雑誌41, 178 - 187 (2000)
3. 上野英二, 大島晴美, 斎藤勲, 松本浩, 食品衛生学雑誌42, 385 - 393 (2001)
4. 上野英二, 大島晴美, 斎藤勲, 松本浩, 食品衛生学雑誌43, 80 - 89 (2002)
5. Anon, Supelco - Rep.& 5), 1 - 3 (1989)
6. G.S.Durell, T.C.Sauer, Anal.Chem. 62, 1867 - 1871 (1990)
7. M.L.Hopper, J.Assoc.Off.Anal.Chem.74, 974 - 981 (1991)
8. A.R.Najam, M.P.Korver, C.C.Williams, V.W.Burse, L.L.Needham, J.Assoc.Off.Anal.Chem.Int.82, 177 - 185 (1999)
9. M.Saitta, G.Di Bella, F.Salvo, S.Lo Curto, G.Dugo, J.Agric.Food Chem.48, 797 - 801 (2000)
10. 田村康宏, 永山敏廣, 小林麻紀, 橋本常生, 羽石奈穂子, 伊藤正子, 友松俊夫 食品衛生学雑誌 39: 225 - 232 (1998)
11. 高橋京子, 田中康夫, 細井志郎, 日高利夫, 臼井進, 食品衛生学雑誌 43, 127 - 132 (2002)
12. A.Amirav, H.Jing, J - Chromatogr, - A.814, 133 - 150 (1998)

細胞膜機能の凍結割断レプリカ法による解析

Functional Analysis for Cell Membrane using Freeze Fracture Replica Methods

佐々木博之*

1. はじめに

透過型電子顕微鏡観察ための生物試料作製法の一つである凍結割断レプリカ法は、生体膜の微細構造解析法として1900年代半ばに考案された方法で、超薄切片法と同じように古い歴史がある。1900年代後半に入り実用性の高い装置の開発や手技手法の発達と確立に伴って、生物試料における細胞間接着装置や特殊化された生体膜の構造解析の強力な手法となり、その観察結果が数多く報告されてきた。

生体膜の構造情報をもたらず凍結割断レプリカ法は、試料を凍結状態で高真空の下で割断(フラクチャー)して、白金と炭素で鋳型に転写(レプリカ)する方法である。この方法で凍結割断・転写することによって、これまでにない大きなメリットがもたらされる。すなわち生体膜を凍結割断すると、生体膜は膜リン脂質の疎水性部分にそって劈開され、その劈開面には多種多様な内在性膜蛋白質が小粒子として二次元的配置をもって露出されることである。これにより、割断面に現れる膜蛋白質の小粒子・膜内粒子(intramembrane particle)の動態研究が大きく進展した。さらに最近では、レプリカ膜に残る分子を免疫細胞化学的手法により同定する方法、すなわち凍結割断レプリカ免疫標識法も確立され、膜蛋白質の二次元的動態解析が可能になってきた。

凍結した試料は凍結割断レプリカ装置の高真空・低温下で割断した後、表面に金属蒸着をすることにより極めて薄い転写膜(レプリカ膜)を作る。蒸着された試料は家庭用漂白剤でレプリカ膜の下に付着している細胞・組織を溶解除去した後、レプリカ膜として電顕観察用グリッドに回収し、透過型電子顕微鏡で観察する。試料を割断の後に真空中で試料中の水分子を昇華(エッチング)させると、割断面直下の構造を浮き立たせることが出来、特にディープエッチングレプリカ法と呼ぶ。この方法では、細胞内の氷を昇華させることで割断面直下の細胞膜面や構造物を露出させ、そこに金属蒸着を施してレプリカ膜を作り三次元的な微細構造観察が行われる。

本稿では、生体膜の動態研究法として近年その重要性が再認識されている凍結割断レプリカ法について簡単に解説する。

2. 凍結法

細胞は一般的に70から80%の水を含んでおり、機能発現過程は常に水のある環境の中で生じている。したがって、細胞機能の研究のために微細構造を凍結割断レプリカ法で観察しようとするとき、水を含んでいる生きた細胞に出来る限り近い状態で試料を作製する事が望ましい。このために最も理想的な方法と考えられているのが急速凍結法である。しかし、この手技手法は難しく、試料作製にあたっては凍結時における細胞内の水の挙動をよく理解し、研究目的にあった工夫が必要である。

急速凍結法の基本は、凍結時に細胞内に出来る限り氷の結晶を作らせないようにする事である。水の結晶化による体積増加が細胞の微細構造の変形や破壊をもたらすからである。一般に、生物試料では10nm以下の氷の結晶は微細構造観察の大きな障害にはならないと考えられており、この状態の凍結状態は硝子状の氷または無定形の氷と呼んでいる。この凍結状態を得るには10⁴/秒以上の冷却速度が必要とされている。

一方、グリセリン、DMSO、エチレングリコール、ショ糖、ポリヴィニールピロリドン、デキストランなどの水の結晶化防止剤(凍結保護剤)を使用すると、氷の結晶の無い凍結が可能となる。これは、凍結保護剤が細胞内外に浸潤する事により溶質濃度の増加と含水量の減少を引き起こすためである。これらの凍結保護剤は、有効な濃度では生きた細胞に障害を与える。したがって、凍結保護を施す前に細胞をアルデヒドで化学固定しなければならないが、凍結の再現性が優れている事から研究目的によっては非常に有効な方法である。

これまでに開発されている凍結法は次の3法に分類される。浸漬凍結法、金属圧着凍結法、および加圧凍結法である。

浸漬凍結法では試料を冷媒に直接浸漬して凍結する。浸漬速度は速いほど良い。この方法では融点と沸点間の温度差が大きい冷媒を選択する事が重要である。試料の冷却中に冷媒は試料によって暖められ、融点と沸点間にあまり大きな温度差が無い冷媒は試料近傍で気

* 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所分子細胞生物学研究部門 講師、医学博士

化する。気化ガスは試料を取り囲み、試料と冷媒間の熱交換を妨げて冷却速度を著しく低下させるからである。液体窒素、プロパン、およびエタンなどが良く用いられている。

金属圧着凍結法は予め熱伝導率の高い金属、例えば高純度の銅や銀のブロックを液体ヘリウムや液体窒素などの冷媒で冷却し、これに試料を接触させて凍結する方法である。凍結結果に信頼性があることから一般的に広く利用されている。

高圧凍結法の歴史は古く、その技術的コンセプトは1960年代後半にRiehleら^{1,2)}により確立された。高圧凍結法は、高圧下では水の融点が降下し氷晶形成が常圧よりも起こりにくいことに基づいており、結果として高圧凍結による硝子様凍結の範囲が従来の金属圧着法や浸漬法などの凍結法に比べ著しく広がるのである^{3,4)}。

凍結割断レプリカ法、特にディープエッチングレプリカ法や凍結割断レプリカ免疫標識法では、細胞・組織の急速凍結法として従来から金属圧着法が多用されてきたが、この方法では観察に耐えうる良好に凍結された領域である数十 μm の深さの部分で割断しなければならない。これにより実際の割断部位が厳しく制限されることになり、観察範囲が著しく狭くなるという難点がある。さらに、微妙な凍結不良による人工産物を観察してしまうという危険性をも含んでいる。高圧凍結法における硝子様凍結領域の深さ(広さ)は、ディープエッチングレプリカ法や凍結割断レプリカ免疫標識法においても、その簡便性や効率性のみならず多くの可能性を秘めた強力な手法になると思われる。

現在市販されている高圧凍結装置はBalTec社のHigh Pressure Freezing Machine(HPM-010)とLeica社のEM-PACTの2機種である。我々は凍結の際に用いる試料キャリアがそのまま同社のフラクチャー装置に持ち込める利点や装置自体の信頼性から、高圧凍結にはBalTec社製HPM-010、凍結割断とレプリカ膜作製にはBalTec社製BAF-060を使用している。装置の取り扱いについては、メーカーの説明書等を参考にしていたきたい。

3．凍結割断レプリカ法

本法では、試料を割断してその割断面に薄い金属膜で鋳型を取り、その鋳型を観察する事より、他の生物試料観察法と異なり、電子線に対して安定な観察が可能である。もし、試料の超微構造が忠実に転写されたレプリカを観察できるなら、科学的に大変意義深いものとなるだろう。したがって、形態をいかに忠実にレプリカとして転写するかが重要な意味を持つようになる。凍結割断レプリカ装置によりその取り扱いや操作方法は異なるが、基本的な手順はほぼ同じなので、こ

こではBalTec社製BAF-060 Freeze-Fracture Systemについて述べる(図1参照)。

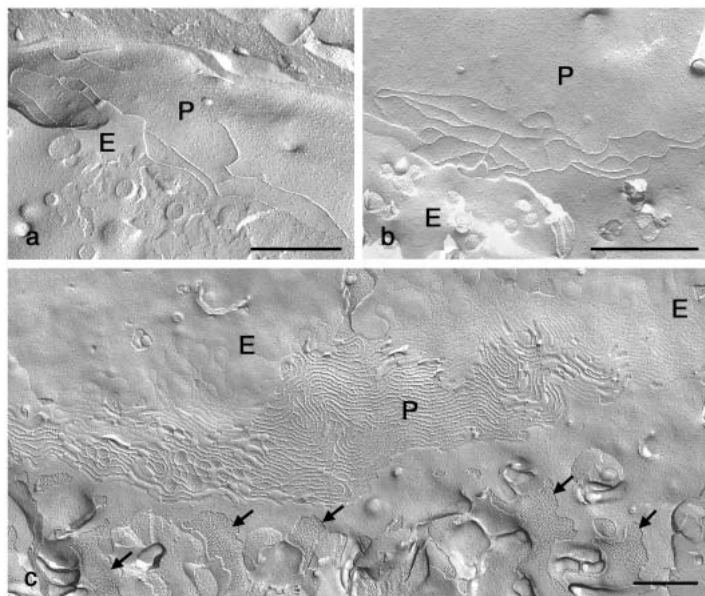


図1 マウス腎臓のフリーズフラクチャーレプリカ像。
(a)近位尿細管, (b)遠位尿細管, (c)集合管
E:E面 P:P面 矢印:集合管基底部の特殊膜内顆粒 Bar:0.5 μm

1. 割断装置の試料ステージおよびナイフを液体窒素で予め最大限低い温度まで冷却しておく。
2. 蒸着源の白金カーボンとカーボンを装置内に装着して、白金カーボンを45度およびカーボンを90度にそれぞれ設定し、次いでテスト蒸着を行い蒸着が正常に進むことを確認しておく。
3. 試料テーブルを付属の液体窒素dewar vessel内で窒素温度まで冷却する。
4. 凍結試料が載っているキャリアを、試料テーブルに挿入する。
5. 試料テーブルを、試料マニピュレーターを用いて割断装置の試料ステージに挿入する。
6. 試料温度を $-100\sim-120$ に設定し、ステージおよび試料が設定温度になるまで15分程度待つ。
7. 試料の適当な位置に割断面ができるようにナイフの上下動を調整する。
8. ナイフを廻して、一気に試料を割断する。
9. 白金カーボンを加熱して、試料面に白金カーボンを蒸着する。膜厚は2nm程度にするが、BAF-060の場合は膜厚計と連動して設定膜厚になると自動的に蒸着が止まる。これは、次のカーボン蒸着でも同様である。
10. カーボンを加熱し、さらにカーボンを蒸着する。膜厚は20nm程度である。
11. 試料マニピュレーターを装置内に挿入し、試料テーブルごと試料を取り出す。
12. 実体顕微鏡の下で、試料キャリアから試料を注意

深く取り出す。

13. 試料を家庭用漂白剤を満たしたペトリ皿に浮かべる。この時、試料はできるだけ漂白剤の水面に浮かべるようにする。
14. レプリカ膜から組織が完全に溶けたら(1時間から一晩)、蒸留水を満たしたペトリ皿に移し、水面に静かに浮かべ洗浄する。この蒸留水による洗浄を3, 4回繰り返す。
15. レプリカ膜をフォルムバルやコロジオンなどの支持膜を張った電顕観察用グリッドに掬い上げて風乾した後、透過型電子顕微鏡で観察する。

4．ディープエッチングレプリカ法

ディープエッチングレプリカ法では、使用する凍結割断レプリカ装置の到達真空度やステージ温度の測定・制御精度などによりエッチング条件が異なるが、ここでは現在我々が使用している凍結割断レプリカ装置(BalTec社, BAF-060)での条件を記す。

急速凍結された細胞や組織を凍結割断レプリカ装置に持ち込み、 $-120\sim-110$ で割断した後、直ちに試料温度を -100 に上げて5~10分間放置して組織細胞内の氷を昇華(エッチング)させる。次いで、白金カーボンを低角度で回転蒸着してレプリカを作製する。蒸着した試料をフラクチャー装置から取り出し、通常の凍結割断法と同様に家庭用漂白剤で組織を溶かし、水洗後に支持膜付き電顕用グリッドに回収する(図2参照)。

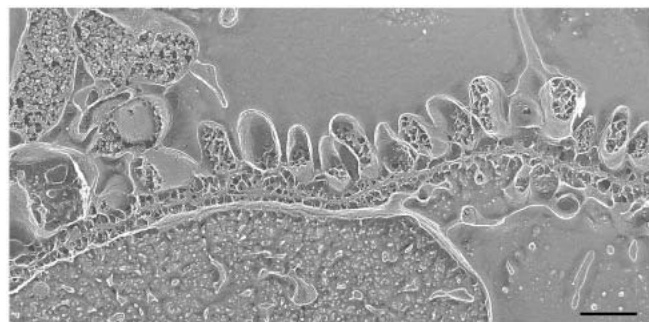


図2 マウス腎臓のディープエッチングレプリカ像。
糸球体の硝子細胞などが観察される。Bar: 0.5 μm

以下に、手順を示す。

1. 試料割断温度を $-130\sim-110$ で行う以外は、3の1~8を行う。
2. 試料を割断後、ナイフを試料割断面の直上に置く。
3. 試料ステージ温度を -100 に設定する。
4. ステージ温度が上昇して設定温度になったら、5~10分間放置し、エッチングを行う。この間に白金カーボンの蒸着角度を15度に設定する。
5. エッチングが終了したら、試料ステージを回転しながら白金カーボンを1~2nmの膜厚で蒸着する。

6. カーボン蒸着角度を90度に設定し、試料ステージを回転しながらカーボンを2~5nmの膜厚で蒸着する。
7. 試料ステージの回転を止め、試料マニピュレーターで試料を試料テーブルごと取り出す。
8. 以下の操作3の12~15を行う。

加圧凍結法により急速凍結した試料のディープエッチングレプリカの報告はまだ多くはないが、今後の加圧凍結法の広まりとともに、ディープエッチングレプリカ法による微細形態解析が進むであろう。さらに、高圧凍結装置の試料ホルダーなどに細胞や組織の機能状態をモニターできるような工夫がなされれば、細胞膜や細胞内構造物のダイナミックな微細構造変化が一層明らかになるものと期待される。

5．凍結割断レプリカ免疫標識法

凍結割断レプリカ法で観察される多種多様な膜蛋白質も、レプリカ膜上では大きさがほぼ均一な膜内粒子として観察されるのみであり、個々の粒子における物質の同定とその機能解析という点では困難な面があった。この点を克服する目的で、藤本和氏は凍結割断レ

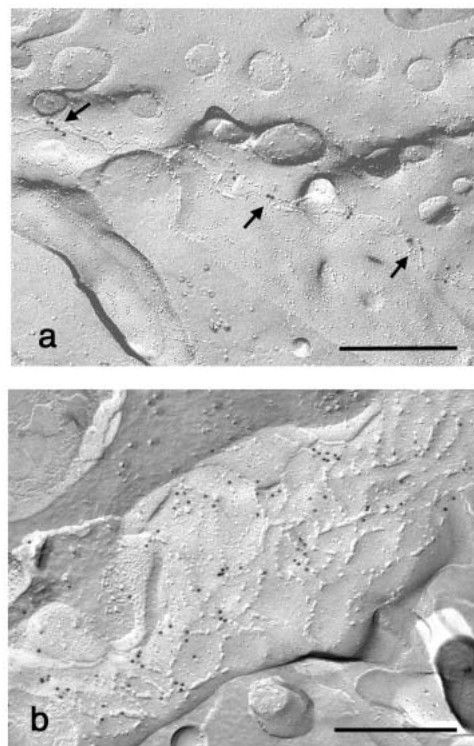


図3 高圧凍結法とフリーズフラクチャーレプリカ免疫標識法によるイヌ腎臓由来の上皮系培養細胞のタイトジャンクション(TJ)構成分子の検出。
(a)クロードイン1(Cln-1)の局在。Cln-1(15nmコロイド金)はTJストランドに局在しているのが観察される。
(b)Junctional adhesion molecule (JAM)の局在。JAM(20nmコロイド金)はTJストランドに近接して局在しているのが観察される。Bar: 0.5 μm

ブリカ法を用いて免疫細胞化学的標識を行う方法，すなわち凍結割断レプリカ免疫標識法を考案し，レプリカ膜上で物質の同定や二次元的分布状態を解析することを可能にした⁵⁻⁷⁾。原法では試料の凍結には液体ヘリウムを用いた金属圧着法が用いられているが，我々は高圧凍結法を凍結割断レプリカ免疫標識法に応用し良好な結果⁸⁻¹³⁾を得ている（**図3**参照）。

凍結割断レプリカ免疫標識法は，凍結試料に割断とそれに続く金属蒸着を施し作成したレプリカをsodium dodecyl sulfate(SDS)で処理することによって，レプリカ膜に残る分子に免疫細胞化学的標識を行いレプリカ膜上で物質の同定や局在を解析する方法である。方法論の根拠は，藤本氏が明らかにしているように，割断によって露出し金属蒸着された生体膜疎水性面（membrane halves）は物理化学的に安定であるということにある⁵⁻⁷⁾。以下に，簡単にその手順を示す。本法の詳細については藤本和氏の総説や解説などを参照されたい⁵⁻⁷⁾。

1. 試料の割断からレプリカ膜作製までは，3の1～12の操作を行う。
2. 蒸着した試料を装置から取り出し，リン酸緩衝生理的食塩水中でレプリカ試料を回収する。
3. レプリカ試料をSDS処理液（2.5% SDS，10mM トリス緩衝液，30mM ショ糖，pH8.3）に漬けて，スターラーで攪拌しながら，細胞・組織成分を可溶化する。
4. 細胞や組織成分が取り除かれたレプリカ膜を5～10%牛血清アルブミンを含む0.1Mリン酸緩衝液で3-4回，各10分間洗浄するとともに，ブロッキングも併せて行う。
5. 通常のコロイド金免疫標識法に従って一次抗体反応および二次抗体反応を行った後，免疫標識を行う。
6. 標識の終わったレプリカ膜を蒸留水で洗浄する。
7. 支持膜付き電顕観察用グリッドに回収し，電顕観察を行う。

細胞成分の可溶化にかかる時間は細胞や組織の種類によってまちまちであるが，培養細胞，遊離細胞，肝臓などは室温で12～24時間かけて可溶化している。可溶化はそこに含まれる結合組織成分の量によって決まるようで，結合組織の多い試料では完全に可溶化するのは困難である。このような組織の場合，急速凍結の前やSDS処理の前に細胞分離用のコラゲナーゼで組織やレプリカ試料を処理すると，良好な結果が得られることがある⁹⁾。しかし，検出したいタンパク質がコラゲナーゼやコラゲナーゼ標品に含まれているプロテアーゼにより分解されて抗原性が失われ免疫標識できない場合もあり，コラゲナーゼの濃度や消化時間などに試行錯誤が必要となる。レプリカ試料の可溶化の際に加温すると，可溶化の時間が著しく短縮する。実際には，ヒートブロックなどでレプリカ試料が沈んでいるSDS

処理液を50～95℃で数分間加温する。加温の温度と時間は細胞や組織，検出したい蛋白質，用いる一次抗体の種類などによって異なるので条件検討が必要であるが，加温による可溶化の大幅な時間短縮と得られる結果の再現性は良好である。

凍結割断レプリカ免疫標識法で処理したレプリカ膜の電顕像は通常の凍結割断レプリカ法のもものと変わらず，金粒子の局在はそのレプリカ像と対応して観察される（**図3**）。厳密には，金粒子はP面（protoplasmic fracture face，生体膜二重膜の内膜を細胞外側から見た面）が割断によって露出し，金属蒸着された膜の裏側に存在する抗原と反応し結合している。ただし，隣接する細胞間でホモフィリックな結合を示すような膜蛋白質，例えばギャップジャンクションのコネキシン，タイトジャンクションのオクルーディンやクローディンなどはE面（extra-cellular fracture face，生体二重膜の外膜を細胞内側から見た面）にも観察される。このE面への抗体の結合は，E面のレプリカ膜裏側に存在していた隣接する細胞膜の分子がSDS処理後も残存し，それに抗体が結合したと考えられている。このトポロジーに関しては藤本和氏が明瞭に解析しているので参照されたい⁶⁾。

参考文献

- 1) Riehel, U.: Chem. Ing. Tech.,40:213 (1968)
- 2) Riehel, U. and Moor,H.: Proc. 4th European Reg. Conf. Electron Microsc., Rome, 2:33-34 (1968)
- 3) 村田長芳, 菅沼龍夫, 峰雪芳宣：電子顕微鏡, 35, 109-110 (2000)
- 4) 菅沼龍夫：第11回電顕サマースクール実行委員会（編）,電子顕微鏡基礎技術と応用2000,学際企画，東京，2000, pp.123-131
- 5) Fujimoto, K.: Histochem. Cell Biol., 107, 87-96 (1997)
- 6) 藤本和：電子顕微鏡，32，48-51 (1997)
- 7) Fujimoto, K.: J. Cell Sci., 108,3443-3449 (1995)
- 8) Morita, K., Sasaki, H., Fujimoto, K., Furuse, M. and Tsukita, S.: J. Cell Biol., 145, 579-588 (1999)
- 9) Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S.: J. Cell Biol., 147, 185-194 (1999)
- 10) Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, et al.: J Cell Biol., 147 : 195-204 (1999)
- 11) Furuse M, Sasaki H, Tsukita S.: J Cell Biol., 147 : 891-903 (1999)
- 12) Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S.: J. Cell Biol., 153 : 263-72 (2001)
- 13) Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S.: J. Cell Biol., 154 : 491-497 (2001)

マウスの胎生期から出生後に至る硝子体血管系の鋳型観察

Generation and degeneration of hyaloid vessels during pre- and postnatal development of mice using casting-SEM methods

近藤俊三*

はじめに

血管系は胎生早期に発生し，酸素や栄養あるいは老廃物などの輸送路として機能し，胎仔や出生仔の生存に直接関わる大変重要な器官である。マウスでは，胎生10～11日にかけて器官形成に伴い血管構築も急速にすすむ。その一方で，硝子体血管でみられるように，眼の構築と共に著しく発達した血管が出生後は急速に退縮消滅する系もみられる。この血管系は一過性の血管として大変興味が持たれ，種々動物を用いて報告されている。これらの多くは，出生後の血管退縮を主体とした報告である。試料作製や観察法においては，光学顕微鏡（光顕）的解析が主体であるが透過電子顕微鏡（電顕）も用いられている。走査電子顕微鏡（電顕）による三次元的や微細形態解析，および胎生期における血管情報は極めて少ない。

今回，血管樹脂鋳型法を用いてマウスの胎生期から出生仔における硝子体血管構築と成熟や退縮過程をSEMで観察したので報告する。

1. 目的

硝子体血管系は，眼動脈の延長として視神経乳頭から網膜に入り，硝子体動脈（Hyaloid arteries : HA）となり硝子体に達する。硝子体に入った動脈は，網膜に沿うように分岐する硝子体固有血管（Vasa hyaloidea propria : VHP）と，水晶体後極に達した後に分岐して水晶体を被う水晶体血管（Tunica vasculosa lentis : TVL）を派生する（**図2**）。これらの血管は胎生期の眼球形成過程において硝子体や水晶体，網膜などの発達に関与していると考えられている。この血管は出生後，急速に退縮する一過性の血管として興味が持たれ，多くの報告をみるが，胎生期に関する報告はあまりみられない。これまで眼内血管の発達や退縮に関する研究は，ラット¹⁾，マウス⁵⁾，ウサギ⁹⁾サル³⁾，ヒト¹¹⁾などで報告をみる。観察には，切片法²⁾や墨汁などの色素注入法¹⁾，血管鋳型法⁴⁾などの光学顕微鏡観察，切片を用いた電子顕微鏡観察あるいは走査電顕観察⁷⁾がある。これらの報告から，血管退縮の過程やその時期，動物種による差，アポトーシス，血管増殖因子その他多くのことが報告された。これらの報告は，胎仔出生

後の硝子体血管の退縮・消滅を対象とした報告が主体である。胎生期の血管網に関する報告，特に血管鋳型を用いた報告はみられない。

走査電顕を用いた三次元的解析として血管鋳型法は大変有効な方法である。しかし，小型哺乳動物胎仔への応用は極めて困難であったことから，鋳型法による報告は皆無といっても良い。著者は，これまでにマウス胎仔の全身血管鋳型作製を可能にした経緯を持つ^{6,7)}。そこで，胎生期から出生に至る硝子体血管系の構築と退縮開始，ならびに退縮過程を三次元的且つ微細形態的に走査電顕で解析することを試みた。

2. 装置の改良

従来の血管鋳型作製法は，成熟組織を対象としたもので樹脂を注射筒に吸引した後に金属の注射針を血管に穿刺して手圧で樹脂を注入するものであった。この方法を，そのままマウスなどの小型哺乳動物胎仔に用いるといろいろな弊害を生ずる。先ず，金属針が血管よりも太いことから血管への穿刺が困難である。また，手圧による樹脂の注入は圧力の調整が困難なため血管の破綻を来す。さらに，胎仔の心臓は小さく針の穿刺が困難である，あるいは開胸すると流出した血液で心臓や血管の確認がしにくいなどの弊害を生じる。そこで，注入圧の軽減や金属の注射針よりも細いガラス針を用いることや樹脂注入に臍帯血管を利用する工夫をした。用いた装置を**図1**に示す。装置は，樹脂を吸引・注入するインジェクターと内径1mm長さ30～40cmのシリコンチューブ，血管に穿刺するガラス針と固定するマニピュレータ，胎仔を観察する実体顕微鏡で構成

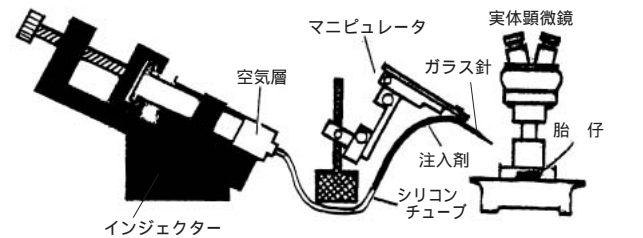


図1 装置の概要を示す模式図。

* 三菱化学(株)生命科学研究所微細形態解析室室長、技術統括

される。胎仔は緩衝液中に浮遊させることで余分な負荷を除いた。本装置の特長は、インジェクターに空気層を設け、この空気層を圧縮する事で樹脂を注入した。ガラス針を用いることで血管径が100 μm以下でも穿刺でき、胎仔を緩衝液に浮遊させることで臍帯血管が自由に操作できた。

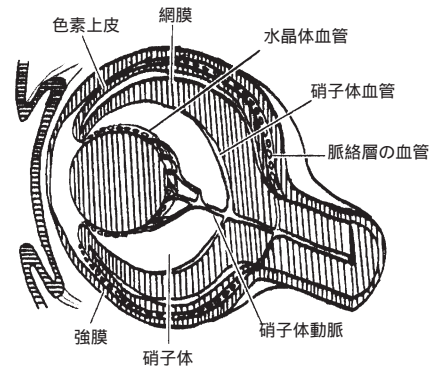


図2 発生途上の眼球を示す模式図。

3. 材料と方法

1) 動物の準備

用いた動物は胎生15.5日～出生後12日のICR系マウスを用いた。胎仔齢は、交配翌日膈栓の確認されたものを0日とし、生後の日齢は出生日を0日とした。

2) 鋳型作製法

(1) 胎仔血管鋳型作製

胎仔眼球組織の血管鋳型作製は、大変困難であったが胎生15.5日から出生前の胎生18.5日にいたる日齢で鋳型を得ることができた。その手順は、胎仔は胎盤を付け、卵黄嚢に包まれたまま母胎から摘出して4リン酸緩衝液中に保存した。注入装置の準備が整った時点で、マウス胎仔を40リン酸緩衝液中に戻し、実体顕微鏡下で卵黄嚢と羊膜を除去し、臍帯を露出した。この間に心臓の拍動が再開し、血液の循環から臍帯血管が確認できた。シリコンチューブ内にメルコックス樹脂を吸引してガラス針を接続し、マニピュレータに固定した。ガラス針を臍帯血管に穿刺し、インジェクターを操作して樹脂を注入した。胎仔を40リン酸緩衝液に移し樹脂の硬化を促進させる(1時間以上)。胎仔を30%NaOH溶液に移し、3～4日放置し組織を腐蝕させた。鋳型を緩い流速の水道水で十分に洗浄した。鋳型を乾燥させた後、実体顕微鏡下で解剖して硝子体血管系を露出した。金属をコーティングしてS-800, S-4500で観察した。

(2) 幼若仔血管鋳型作製

出生後における血管鋳型作製は、胸部から頸部の皮膚組織を開いて心臓、あるいは内頸動脈にガラス針を穿刺し、樹脂を注入して鋳型を得た。

4. 結果

硝子体血管系の観察は、実体顕微鏡下で頭部血管網を解剖して硝子体血管を露出しSEM試料とした。胎仔血管鋳型は、胎生13.5日齢まで得ることができたが眼内血管の構築を詳細に解析する事のできた鋳型は胎生15.5日齢からであった。

図3に胎生15.5日の硝子体血管系の鋳型を示す。硝子体動脈(HA)は硝子体に達したのち、分岐して網膜に沿って血管網を構築する硝子体血管(VHP)と水晶体後極に達して血管網を構築する水晶体血管(TVL)を派生する。胎生15.5日の硝子体血管は縦方向の直線的な走行を主体とし、それらと連絡する横方向の血管の構築は余りみられない。水晶体血管網では横に連絡する血管がみられ、その血管網は網目構造として観察された。脈絡層血管網(CH)は網膜の外側に観察される。図4は胎生16.5日の硝子体血管系の鋳型である。硝子体血管(VHP)では縦方向の血管と連絡する横の血管がみられ、血管走行は蛇行しているように観察される。図5aは胎生17.5日の硝子体血管系の鋳型を示している。硝子体血管(VHP)と水晶体血管(TVL)の構築を比較するために血管網の一部をピンセットで削除した。硝子体血管と水晶体血管のどちらの血管網も明瞭な網目構造を呈している。図5bは硝子体血管網の一部を拡大した図である。血管内皮核の刻印は核内構造を反映した凹凸が観察される(矢印)。図5cは水晶体血管内皮核の刻印を示しているが、硝子体血管内皮の核ほど明確には観察されない。図6は胎生18.5日の硝子体血管系を示す。硝子体血管網(VHP)において縦方向の血管と連絡する横の血管が減少している。水晶

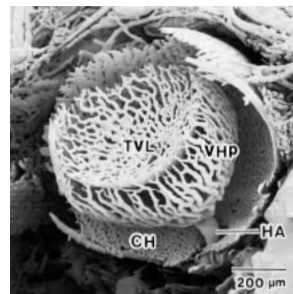


図3 胎生15.5日の硝子体血管系の鋳型。
TVL: 水晶体血管
VHP: 硝子体血管
HA: 硝子体動脈
CH: 脈絡層の血管

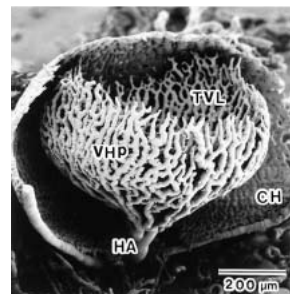


図4 胎生16.5日の硝子体血管系の鋳型。
TVL: 水晶体血管
VHP: 硝子体血管
HA: 硝子体動脈
CH: 脈絡層の血管

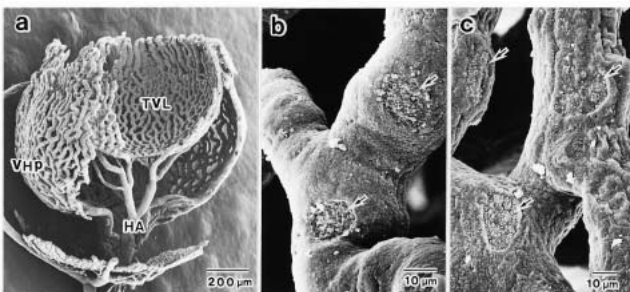


図5 胎生17.5日の硝子体血管系の鋳型。
TVL: 水晶体血管 VHP: 硝子体血管 HA: 硝子体動脈 矢印: 血管内皮の核

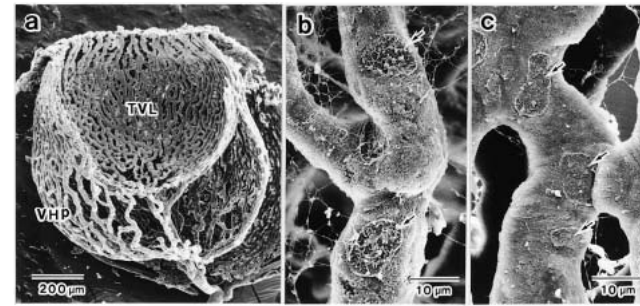


図6 胎生18.5日の硝子体血管の鋳型。
TVL: 水晶体血管 VHP: 硝子体血管 矢印: 血管内皮の核

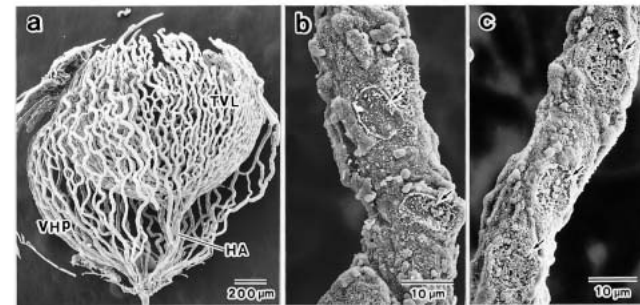


図7 出生2日の硝子体血管の鋳型。
TVL: 水晶体血管 VHP: 硝子体血管 HA: 硝子体動脈
矢印: 血管内皮の核

体血管(TVL)では血管網の乱れはみられない。図6bは、硝子体血管内皮の形状を示す。血管内皮核の刻印形状からクロマチンの凝集を示唆するような構造物の形成が核全体に及んでいることがわかる。図6cは、水晶体血管内皮核の刻印を示す。核の存在は明瞭であるが核内構造物の形成は不明瞭である。図7aは、出生2日の硝子体血管系鋳型を示す。硝子体血管の一部は削除してある。硝子体血管網(VHP)では、横に連絡する血管が殆ど消失し、縦方向の血管のみとなり血管網は粗になっている。一方、水晶体血管(TVL)では横に連絡する血管の減少はみられるものの血管網は比較的密である。図7bは、硝子体血管の内皮細胞と内皮核の刻印を示している。内皮細胞の表面構造に明瞭な凹凸像が観察される。また、内皮核の刻印からは凹凸像が失われている。図7cは水晶体血管の拡大像である。内皮細胞表面には凹凸の形成が観察され、内皮核の刻印から核膜付近にクロマチンの凝集塊と思われる形成が反映されている(矢印)。図8aは、出生8日の水晶体血管網を示す。硝子体血管は消滅し、僅かな水晶体血管が残存するに過ぎない。新たに網膜を栄養する血管が観察される(矢印)。図9は出生12日の鋳型像である。硝子体血管系の鋳型は得られなかった。矢印は硝子体動脈の鋳型を示している。硝子体動脈の基部では平滑筋の存在を示すリング状の刻印を伴った網膜中心動脈(a)の分岐と、その下部で分岐した網膜中心静脈(v)が観察される。

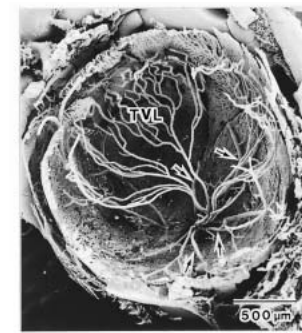


図8 出生8日の硝子体血管の鋳型。
TVL: 水晶体血管
矢印: 網膜の血管

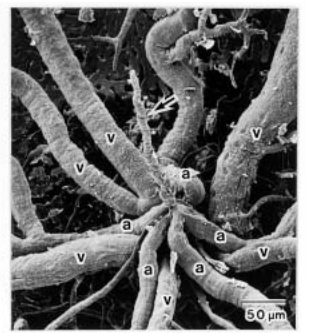


図9 出生12日の硝子体動脈の鋳型。
a: 網膜中心動脈
v: 網膜中心静脈
矢印: 硝子体動脈

これまでの成果を裏付ける目的で、出生2日の水晶体血管内皮の透過電顕像を観察した(図10)。その結果、血管内皮では、核内にクロマチンの凝集がみられた。さらに、血管内皮の形態は隆起して管腔を狭めていた。

5. 考察とまとめ

ラットの硝子体血管では出生11日目には痕跡的¹⁾となり、マウスでは硝子体血管が8～10日で急速に減少し、水晶体血管網は16日においても一定量残存するという⁵⁾。ヒトの場合は、出生前に退縮・消滅することが知られている。これらの眼内血管に関する報告は、主に出生後の成果を報告したものである。その原因は、出生後に急速に退縮・消滅する一過性の血管として興味を持たれていたことにある。観察法として、切片法や色素等の注入法、血管鋳型法などが用いられている。なかでも色素注入法や血管鋳型法は血管構築を三次元的に観察する方法として優れている。しかし、胎生期に応用する適切な技術がなかった。また、光学顕微鏡的観察であったため分解能的にも限界があった。透過電顕では、血管の閉鎖やアポトーシス、あるいはマクロファージの関与などに関する報告されている^{5, 9)}。しかし、切片像から血管構築全体を把握することは困難である。

今回、胎生期の血管鋳型作製法を用いて、硝子体血管の成熟と退縮・消滅過程を三次元的且つ微細形態的に解析した結果、胎生15.5日の硝子体血管の構築は硝子体血管網よりも水晶体血管網が発達し、血管網全体では、胎生16.5～17.5日齢で一番発達していた。出生1日前の胎生18.5日になると、硝子体血管網の退縮を生じた胎仔の出現がみられ、出生2日では血管網の退縮が急速にすすんでいた。その進行は水晶体血管網よりも硝子体血管網が先行していた。この血管の急速な退縮原因として考えられることは、硝子体血管の縦方向血管と連絡する横方向の血管に狭窄と断絶が生じることで、縦方向の血管への血流分布が優位となり、横に



図10 出生2日の硝子体血管内皮のアポトーシス（透過電顕像）
矢印：クロマチンの凝集 *：血管腔

連絡する血管では血流低下を来すことが考えられる。血流の低下がアポトーシスを誘因するとの報告¹⁰⁾もあり、一度生じた血行動態の優劣差が連鎖的反応を誘発して血管の退縮・消滅が加速されるのではないかと考える。硝子体血管は幼弱な網膜を栄養することが主務であるが、その血管網に退縮を生じるということは、網膜を栄養する血管が新たに形成されていることが示唆される。従って、眼動脈の延長として存在する硝子体血管の退縮は周辺組織の成長と関連づけて考えなければならない。硝子体血管系は、出生8日で痕跡的となり網膜を栄養する血管が観察されている。出生12日では硝子体動脈の痕跡的鑄型が観察され、その基部に発達した網膜中心動静脈が形成されている。この網膜中心動静脈の形成と血管数から推察して、出生2日で硝子体血管が急速に退縮した要因は、網膜中心動静脈の形成により血流流動に変動が生じ、その結果、硝子体血管への血液量が全体的に低下し、血行流量の少なくなった血管はアポトーシスを生じ血管の退縮・消滅を併発したことが推察される。

今回、胎仔血管鑄型法を硝子体血管の解析に応用し、走査電顕で観察したことで硝子体血管網の全体像を把握しながら、その成熟が胎生16.5～17.5日、退縮開始は18.5日で生じていること。血管の退縮・消滅の開始の原因に血管内皮のアポトーシスが関与していることが解明できた。本報告は小型哺乳動物の胎生期血管解析に血管鑄型法を用いた初めての報告である。

参考文献

- 1) Cairns, JE. (1959). Normal development of the hyaloid and retinal vessels in the rat. Brit. J. Ophthalmol. 43:385-393.
- 2) Duke-Elder, S., Cook, C. (1963). System of ophthalmology. Vol.3, Normal and abnormal development, Part 1. Embryology. pp190-201. Henry Kimpton: London, U.K.
- 3) Hamming, NA., Apple, DJ., Gieser, DK., Vygantas, CM.(1977). Ultrastructure of the hyaloid vasculature in primates. Invest Ophthalmol. Vis Sci 16:408-415
- 4) Hida, T. (1982). Hyaloid vascular system of the rat: a study on its topography examined by plastic cast. J. Jap. Ophthalmol. Soc. 86, 315-327.
- 5) Ito, M. and Yoshioka, M. (1999). Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. Anat. Embryol. 200, 403-411.
- 6) Kondo, S., Suzuki, R., Yamazaki, K. and Aihara, K. (1993). Application of corrosion cast method for scanning electron microscopic observation of mouse embryo vasculature. J. Electron Microsc. 42, 14-23.
- 7) Kondo, S. (1998). Microinjection methods for visualization of the vascular architecture of the mouse embryo for light and scanning electron microscopy. J. Electron Microsc. 47, 101-113.
- 8) Hollenberg, MJ. and Dickson, DH. (1971). Scanning electron microscopy of the tunica vasculosa lentis of the rat. Can. J. Ophthalmol. 6, 301-310.
- 9) Jack, RL. (1972a). Ultrastructural aspects of hyaloid vessel development. Arch. Ophthalmol. 87, 427-437.
- 10) Meeson, A. Palmer, M., Calfon, M. Lang, R. (1996) A relationship between apoptosis and flow during programmed capillary regression is revealed by vital analysis. Development 122:3929-3938.
- 11) Mikawa, T. (1965). Electron microscopic observations on the lens and the tunica vasculosa lentis of human embryo. Acta. Soc. Ophthalmol. Jap. 69, 1463-1481.

ラウンジ



数年前の夏休みに、慎ちゃんオタク(人気の政治家ではなく幕末の志士、中岡慎太郎のこと)の娘にせがまれて車で何日間か高知県内を回った。学生時代に未舗装の道を友人と走った時には祖谷溪で夜中になり、日程の都合で高知に着くことはできなかった。現在、高速道を利用すれば大阪から瀬戸大橋を経由して高知市まで6時間足らずである。史跡を眺めながら、かつてこの地から幾多の志士たちが自らの脚だけを頼りに旅立ったことを思い、利便性に満ちた現代社会に生きていることに感謝せずにはいられなかった。

明治維新で誕生した新政府の殖産政策はやがて第二次大戦まで続く富国強兵の道へと変わっていく。その過程で私たちは多くの環境破壊や汚染を経験することになる。銅と絹を輸出して稼いだ外貨で軍備を拡張する政策は田中正造によって告発され、足尾鉍毒事件として社会問題化する。明治半ばに起きたこの事件はわが国における公害問題の原点である。一般に、われわれは第二次大戦後のいわゆる高度経済成長期に公害問題が表面化したと認識している。1950年代の水俣病、60年代の四日市喘息、光化学スモッグ、PCBによる油症事件など例をあげたら暇がない。しかし、近代化への道を突き進んできた戦前の環境変遷史についてはあまり知られていない。

大学の図書館を散策して(実際には書庫の中ではなくPCの中を),「大阪砲兵工廠衛生調査報告書」という手書きの資料が目に入った。日露戦争が終盤を迎える明治38年(1905年)に行われた労働環境調査の記録であり、興味深い記述が続いている。現代と労働条件が異なるとはいえ、工員の平均欠勤率が20%に達するのはどういうことなのか(それも怠業が多いようである)。「日本人は手先が器用で勤勉で」といわれてきたが、明治の日本人はあまり勤勉ではなかったようである。最も、10年ほど前に米国の研究室で一時期を過ごしたことがあるが、彼等の器用さと勤勉さにはいささか感心した思い出がある。

そこには工廠内の環境分析の結果が大量に記載されている。粉塵、濁度、蒸発残留物、臭気、味、酸度、

硬度、COD、窒素(NO_2 , NO_3 , NH_3), 塩素、リン酸、硫酸、亜硫酸、重金属(Cu , Zn , As , Sb , Hg , Pb)等々について、分析機器など殆どない時代によくこれだけのデータを揃えたなど敬服してしまう。工場内の浮遊粉塵濃度は $100\text{mg}/\text{m}^3$ を超えることがあり、市中の大気汚染とそれに伴う呼吸器疾患の増加についても記述されている。当時、既に産業活動が自然環境に影響を及ぼしていたことの証拠であろう。

このようなことから、工廠が周囲の環境に及ぼした影響について調べることにした。大阪砲兵工廠は造幣局、堺紡績と共に新政府の直営工場として明治3年(1870)に大阪城三の丸米倉跡に設置された。はじめ造兵司と呼ばれたが同5年に大砲製造所、12年に大阪砲兵工廠と改められた。最盛期にはJR大阪環状線の京橋駅と森之宮駅の間、約 130万m^2 の敷地に工場群が広がり、7万人の労働者が兵器製造に携わっていた。第二次大戦で数回にわたる空襲を受け、終戦前日の大空襲で完全に壊滅した。現在は公園と高層ビルが立ち並びビジネスパークになっているが、破壊されたかつての工廠跡地は開高健氏の「日本三文オペラ」や小松左京氏の「日本アパッチ族」などの小説の舞台にもなった。

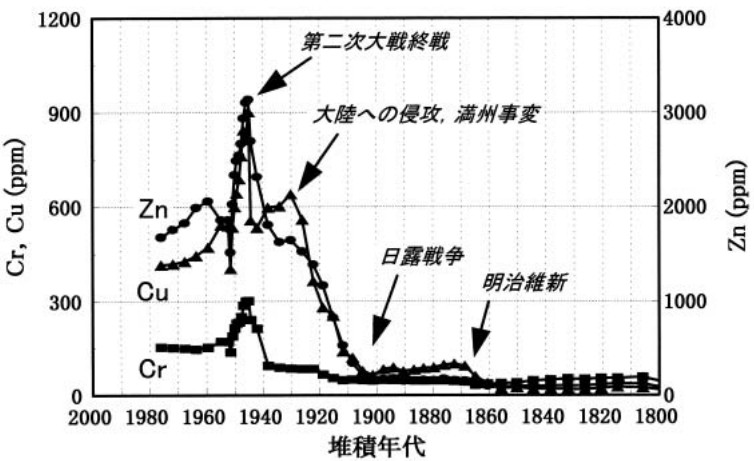
柱状堆積物試料は造兵司が建てられた三の丸前の外濠から採取した。その試料中の汚染物質を分析して、明治維新以降にこの地区が受けてきた環境汚染の歴史トレンドを評価することが目的である。浚渫などで堆積層が乱されていなければ、コアの中には時代に沿った汚染の履歴が記録されているはずである。図には人為的な環境汚染元素であるクロム、銅、亜鉛の鉛直分布を示した。コアの堆積年代は ^{210}Pb 法と ^{137}Cs 法を併用して特定したが、堆積層中に含まれる炭片や微粒煙粒子、珪藻化石なども年代を推定する有力な根拠となる。

図から明らかなように、維新直後から堆積物の重金属汚染が始まっている。少し分かりにくいのが、維新後に濃度が急増するのは銅と亜鉛である。兵器や銃弾の製造に多用される黄銅の影響を受けていると思われる。日露戦争の頃にその汚染は劇的に増大する。この時期、砲兵工廠は5倍以上に拡張され、労働者数も2万人を超える。このような増産体制が汚染拡大の原因になっ

* 近畿大学理工学部生命科学科 講師 理学博士

たと考えられる。日露戦争後も汚染は減少することなく、その傾向は第二次大戦まで続く。銅や亜鉛に比べ、新世代の素材であるクロムについては戦前の著しい汚染は認められなかった。工業原料としての使用履歴の違いが汚染の歴史トレンドの差として表れるのであろう。第二次大戦時に見られるピークは空襲による工廠の破壊で排出された重金属が一気に濠に搬入した結果を反映しているのかもしれない。

このような解析を行う上で、最新の分析機器を利用



大阪城外濠堆積物の重金属汚染とその歴史トレンド

して種々の環境情報を得ることは極めて有意義である。特に、環境試料中の安定同位体の存在比や極低濃度の希土類元素、貴金属元素の分布は環境汚染の起源や歴史トレンドを解明する際に重要な手がかりを与えてくれる。

本稿を執筆するに当たり、大阪砲兵工廠資料集(日本経済評論社)及びその資料解説(大前眞氏、小野芳朗氏)を参考にさせていただきました。記して感謝いたします。

新製品紹介

日立標準メゾスケールのご紹介

多くの分野で、走査電子顕微鏡（SEM）による高精度微小寸法計測の要求が高まっている。このような背景から、汎用形SEMおよび光学顕微鏡に好適な微小寸法校正用標準試料として日立標準メゾスケールを開発した。日立標準メゾスケールの主な特長は、国家標準へのトレーサビリティが確保された二次標準であること、(財)日本適合性協会(JAB)により認定された試験所が実測により標準値と不確かさを付与しているため世界中で通用する

計測の信頼性が確保できること、さらにSEM用の非点、焦点合わせ専用パターンが付属しておりSEM調整が簡単、確実に行えることなどである。

ILAC（国際試験所認定協力機構）による相互承認、加盟28ヶ国37機関

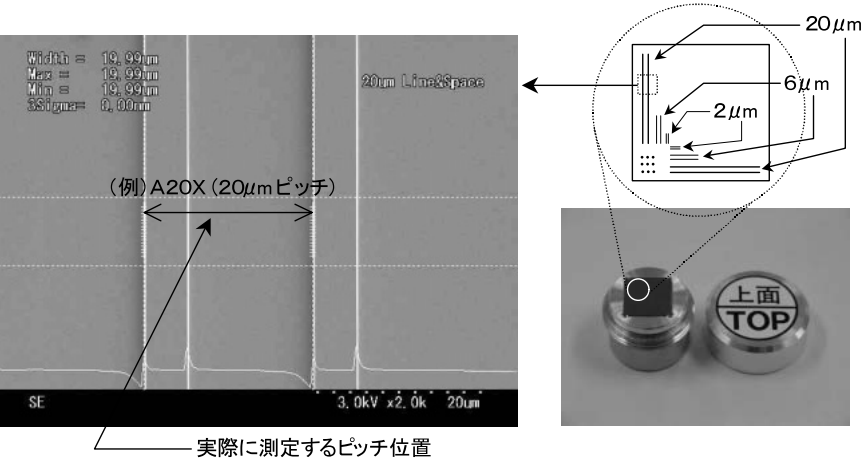


図 日立標準メゾスケール外観及びパターンピッチ測定例

解 説

HPLC-ICP-MSによる牡蠣中のヒ素化合物の化学形態分析

Speciation of arsenic compounds in oyster by HPLC-ICP-MS

清水克敏* 坂元秀之* 山本和子*

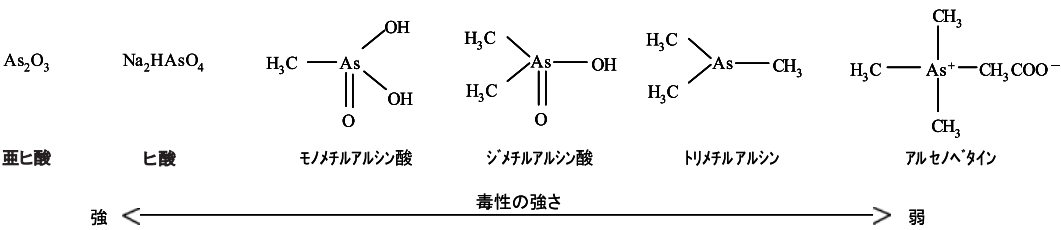
1. はじめに

ヒトを含む多くの生物種の遺伝子とその配列に関する研究分野「ゲノミクス(Genomics)」が過去10年間で大きく進歩し、ゲノミクスによって得られた遺伝情報から、タンパク質及びその関連物質の合成に関する研究分野「プロテオミクス(Proteomics)」へと進展している。この潮流の中で、生体反応や生体物質合成のための特異的生体物質触媒として働く金属タンパク質や金属酵素が多く知られるようになり、名古屋大学の原口は生体中の金属元素の役割と働きを研究する分野として、「メタロミクス(Metallomics)」¹⁾、その機能を発現する金属タンパク質及び金属タンパク群として「メタローム(metallome)」を提案している。このメタロミクスが学問として認知されるには次のような課題があるとしている¹⁾。

- (1) 高感度元素分析法の確立...全元素分析と全元素化学
- (2) 金属含有生体物質の計測法の開発...化学形態分析(スペシエーション)
- (3) 生物機能・生理機能評価法の確立...酵素活性測定とメタルフィンガープリント



図1 HPLC-ICP-MSの外観



強

← 毒性の強さ →

弱

図2 ヒ素化合物の構造式と毒性の強さ

* (株)日立サイエンスシステムズ

わめて少ない。したがって、溶出液中の成分を定量するためには検出器の感度が決定的な要因となる。ICP/MSは分子を原子化した後に質量数で測定するため、元素に対する選択性が高く、分光学的干渉に注意すれば、定量操作は容易である^{3), 4)}。

なお、今回取り上げたヒ素化合物は三酸化二ヒ素(As₂O₃)、ヒ酸水素二ナトリウム七水和物(As₂O₃・7H₂O)、アルサニル酸(AA)、2-ニトロフェニルアルソン酸(NPhA)、2-アミノフェニルアルソン酸(APhA)、フェニルアルソン酸(PhA)、ジメチルアルソン酸(DMA)、モノメチルアルソン酸(MMA)、アルセノペタイン(AB)、アルセノコリン(AC)の10種である。これらヒ素化合物をすべて含む混合標準試料を調製し、測定には超純水で適宜希釈して用いた。

3．検出感度の向上の検討

3.1 アルコール添加による検出感度の向上

HPLCは日立LaChrom Eliteシリーズ(L-2130 ポンプ、L-2200 オートサンプラ、L-2300 カラムオープン)を、ICP-MSには日立P-5000形ICP-3DQMSを用いた。その他の測定条件については表1に示した。なお、移動相に用いている過塩素酸は一般のICP-MSでは、キャリアーガスのアルゴン(Ar)と過塩素酸に由来する塩素(Cl)から塩化アルゴン(ArCl：質量数75)が生成し、同じ質量数の⁷⁵Asにスペクトル干渉を与えるため不適切である。しかし、P-5000形では3DQMSの内部で分子イオンの開裂をすることができるため、ArClの生成を抑制することが可能であり、ヒ素が移動相からの分光干渉を受けることなく分析が可能である。

表1 HPLC-ICP-MS測定条件

HPLC	
カラム	Shodex RSpak NN-814 8.0 x 250mm
カラム温度	40
移動相	10mM HClO ₄ (3% MeOH)
流速	0.8mL/min
ICP/MS	
RF出力	1.1kW
プラズマガス	14L/min
キャリアーガス	1.3L/min
補助ガス	1.2L/min
検知機電圧	- 2.1L/min
イオン取り込み時間	500ms
測定元素(m/z)	As(75)

E.H.Larsenらはヒ素やセレンのような元素の化学種を含む水溶液にメタノールのような炭素が加わると、ICP-MSの信号強度が3～4倍向上することを報告している⁵⁾。これはメタノールによる、ネブライザーの噴霧効

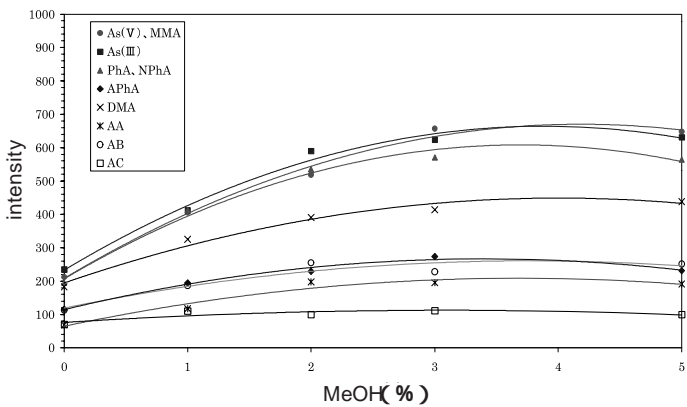


図3 メタノール添加量とヒ素化合物標準試料の関係

率の上昇に加え、炭素イオン、または炭素を含む多原子イオンの生成を促し、炭素よりも低いイオン化エネルギーをもつ化学種のイオン化を助ける働きに由来するとされる。

図3は移動相の10mM 過塩素酸に0, 1, 2, 3, 5%のメタノールを添加した時の各ヒ素化合物標準試料の強度を示したグラフである。メタノール添加量が増加するにつれ、各ヒ素化合物の感度が向上していることがわかる。なお、As₂O₃とMMA、PhAとNPhAはそれぞれ同じ時間に溶出されたためひとつのピークとして求めた。5%の添加量では強度が下がり始めている成分があること、再現性を検討したところ、5%の場合、クロマトグラムに不定期にスパイク状のノイズが検出されたため、メタノールの添加量は3%とすることにした。

3.2 スキャン回数最適化による感度向上

3DQMSは二つのエンドキャップ電極と一つのリング電極から構成されており、これら3つの電極により構成される空間にイオンを閉じ込めることができる(取り込み時間)。このことから感度向上を図るには、低濃度である元素に対して取り込み時間を長く設定するといっ

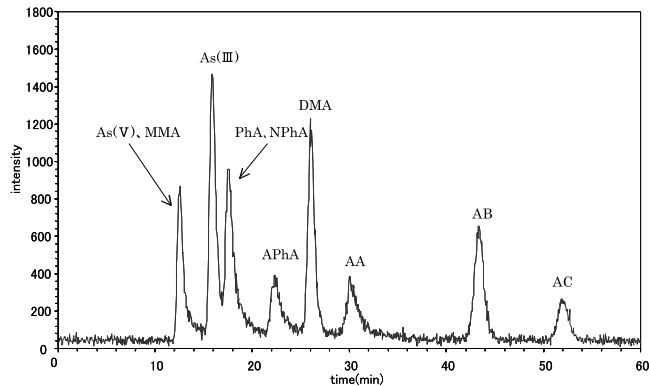


図4 スキャン回数6回としたときのヒ素化合物のマスクロマトグラム(m/z:75)

た機能を使用することができる。

また、イオン信号強度の再現性(ばらつき)も感度向上に大きく影響する。これに関わるファクターとしてはスキャン回数があり、この設定を最適化することにより再現性を向上することが可能となり、結果として感度向上につながる。

図4は移動相を10mM 過塩素酸(3% メタノール添加)、スキャン回数6回としてヒ素化合物混合標準試料 100 µg/Lを測定した例である。この結果からS/Nを3として検出限界を算出したところ、表3のような結果となった。

表3 ヒ素化合物の検出下限値

成分名	検出下限(µg/L)
As(V), MMA	20
As ₂ O ₃	11
PhA, NPhA	18
APhA	42
DMA	15
AA	45
AB	25
AC	60

4．実試料の測定

これらの結果をもとに、実試料としてNIST SRM 1566b (Oyster Tissue)と宮城県産の牡蠣について測定を行った。なおこの場合、移動相の流速を0.8から1.0mL/minとしたため各成分の溶出時間が図4とは若干異なる。

各試料についてメタノール溶液で抽出などの前処理⁶⁾を行い、測定したところ、図5に示すようなクロマトグラムが得られた。それぞれの実試料1g当りに換算した各ヒ素化合物の含有量を表4に示す。As₂O₃と同時に

溶出するMMAについては、今回紹介したものと異なる測定条件で検討したところ、As₂O₃が検出されなかったためMMAとして定量した。検出されたMMA、DMA、ABは代謝作用による生成物であり、いずれもほとんど無毒性のヒ素化合物である。また、どちらの実試料にも今回検討したヒ素化合物以外のヒ素化合物が検出されており、これらについては今後も検討が必要である。

表4 NIST SRM 1566b及び宮城県産牡蠣中のヒ素化合物濃度

ヒ素化合物 \ 実試料	NIST SRM 1566b	宮城県産牡蠣
MMA	0.61	0.56
DMA	1.49	0.45
AB	3.05	20.6

(単位: µg/g)

5．まとめ

今回紹介したHPLC-ICP-MSシステムは、食品中のヒ素化合物に関する栄養学的な評価、代謝機構の解明、また毒性の評価手段として応用することが可能である。MSを検出手段とすることによって、選択性も飛躍的に向上しており、HPLCの応用装置として高く評価できる。

構築したシステムを他の元素の化学形態分析にも応用することが可能と考えられ、多元素を同時にモニターすることによって、より応用性が高まると考えられる。

引用文献

- 1．原口 プラズマ分光分析研究会 第56回講演会 講演要旨集(2002)
- 2．木村修一、左右田健次 微量元素と生体(1987)秀潤社
- 3．寺前紀夫、古田直紀ら 微量元素分析の実際(1985)丸善
- 4．久保田正明 誘導結合プラズマ質量分析法(2000)化学工業日報社
- 5．E.H.Larsen, S.Sturup J.Anal.At.Spectrum. 9 (1994)1099
- 6．J.Alberti, R.Rubio, G.Rauret, Fresenius J.Anal.Chem., 351(1995)420

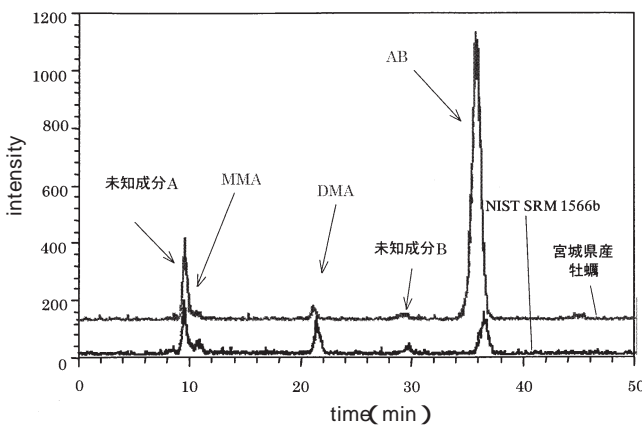


図5 NIST SRM 1566b及び宮城県産牡蠣のクロマトグラム

日立真空紫外分光光度計 U-7000

U-7000 Hitachi Vacuum Ultra Violet Spectrophotometer

株木耕平*

1．はじめに

日立ハイテクノロジーズでは、2002年9月、高まる次世代半導体リソグラフィ材料の光学特性測定ニーズに応えるため、市場より高い評価を受けている日立独自の大型分光器技術を取り入れたU-7000形真空紫外分光光度計（図1）を発売した。



図1 U-7000形 真空紫外分光光度計の外観

2．複数ステップ波長での測定に対応可能

次世代リソグラフィのステップ光源であるF₂レーザは157nmに発振波長を有するが、このような波長域では酸素の大幅な吸収により光路の真空排気、もしくはN₂パージを行わなければ光が透過しないため、真空紫外域（VUV域）と呼ばれる¹。U-7000形の測定波長範

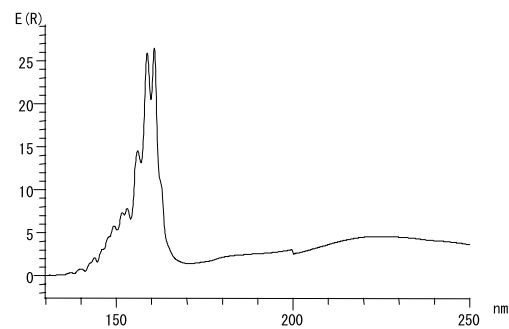


図2 U-7000 エネルギーレベル

1 技術的には真空紫外域とは0.2nm～200nmの波長範囲を指すが、酸素の吸収波長域であるSchumann-Range（115-200nm）を称し、真空紫外域と呼ぶことが多い。

* 那珂インストルメンツ（株）

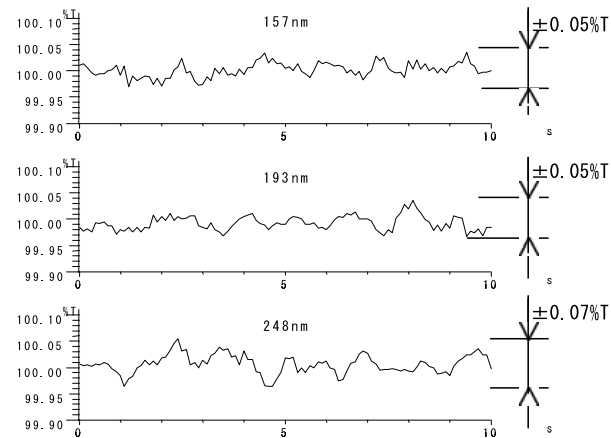


図3 U-7000 ノイズレベル

囲は130-380nmであり、F₂ステップ光源波長（157nm）に加え、従来ステップ光源波長（ArF：193nm, KrF：248nm, i線：365nm）での光学特性測定にも使用可能である。図2にU-7000のエネルギーレベル測定結果を、図3に各ステップ光源波長付近でのノイズレベル測定結果を示す。

3．真空排気とN₂パージの両方式を装備

U-7000は光路の真空排気に加え、N₂パージにも対応可能である。光路が真空排気とN₂パージのどちらであっても、その測定方法や装置そのものの性能に大きな差異はないが、スループットを考えた場合には、真空排気が優位である。これは、光路の真空排気が数分で済むのに比較して、N₂パージを測定可能なレベルまで行うためにかかる時間が、数十分から、場合によっては数時間にもなることが大きな要因である。

一方、真空紫外域においては、大気中に多量に存在する水や炭素化合物による吸収が無視できないレベルとなる。そのため、これらの物質が測定サンプル表面に少量付着しただけでも、見かけ上のサンプル透過率が数%程度も減少する結果となる。これに対して、F₂ステップ市場への参入を考える光学部品メーカーの多くは、ステップ光源波長における光学部品の透過率/反射率の測定再現性が±0.02～0.05%T以内に収まる分光光度計を必要としている。このような要請を考慮すると、コンタミネーションの付着によるサンプルの汚染を防

ぐためにも、真空チャンバ内を可能な限り清浄な状態に保つ必要がある。しかし、サンプル交換時には試料室の大気開放を行わなければならないことを考えると、チャンバ内を常にクリーンな状態に保ちつづけることは非常に難しく、事実、光路の真空排気を行った場合には、サンプルへのコンタミネーション付着が測定結果へ与える影響が無視できないレベルとなる（図4）。一方、N₂パージの場合には、このような雰囲気の変化によるコンタミネーション付着といった問題はほとんど起こらないと考えられている。

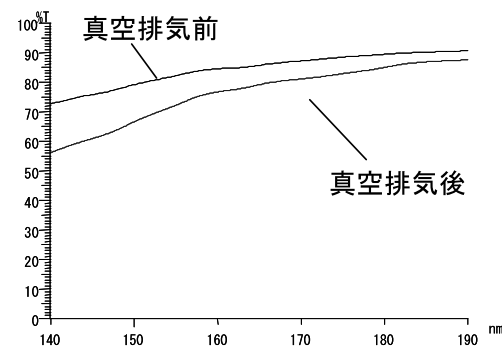


図4 MgF₂透過率（N₂パージ雰囲気下で測定）

そこで、U-7000では光路の真空排気とN₂パージの両方式を装備している。これら2方式の切り替えは本体前面のスイッチにより簡便に行うことが可能である。

また、分光光度計はサンプル側光学系とリファレンス側光学系の透過率を演算することにより、サンプル透過率の測定を行うものであるが、U-7000では両光路の光路長、光束サイズ等のパラメータを完全に一致させることで、光路の違いに起因する測定への影響を極力抑え、最短15分のN₂パージ時間における測定を可能にしている。（図5）

なお、このような欠点を持つ真空排気機能をU-7000に搭載している理由として、

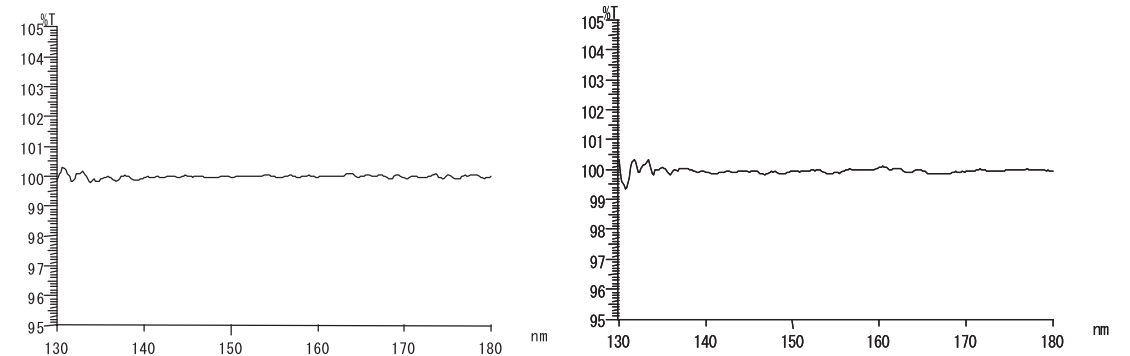


図5 U-7000真空紫外域でのベースライン測定結果
左：真空排気下での測定
右：N₂パージ（パージ開始より15分，流量25 L/min）での測定

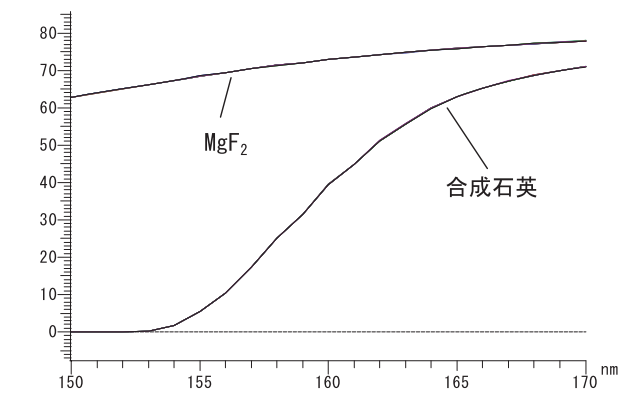


図6 SN優先測定モード時の測定データ

5.1 真空排気（N₂パージ）時間の短縮

U-7000の分光器室と試料室は図6に示すように合成石英に比して真空紫外域に高い透過率を持つMgF₂を窓材に用いて、空間的に仕切られている。そのため、分光器室、試料室を独立で真空排気、N₂パージ、大気開放を行うことが可能となっている。そのため、各測定の合間で行われるサンプル交換時、分光器室を真空排気したまま、サンプル交換が必要となる試料室のみ大気開放し、サンプル交換後に再度試料室を真空排気（N₂パージ）することが可能となる。また、両室を仕切ること真空排気（N₂パージ）を行わなければならないチャンバ容量を減じ、サンプル交換時の真空排気（N₂パージ）を短時間で完了させている。大体の目安としては真空排気完了までの時間が3分以下、N₂パージ完了までの時間は15～30分程度である。

U-7000では真空排気、及びN₂パージ機能はPC上のソフトから操作を行う。ユーザ操作を必要とするのは分光器室・試料室の排気・開放・真空停止操作を行う3種ボタンだけであり、これらはボタンを押すだけという簡便な操作で制御可能である。また、チャンバ内の真空度も常時モニタされており、図7に示すようにPC画面上で真空度をチェックすることが可能である。



図7 真空制御指示部

5.2 測定の自動化

U-7000ではサンプルターレット機構を標準装備している。これは、ディスク形状のサンプルホルダにサンプルを最大5個まで同時に配置し、サンプル切換えを

PC上から制御する機能である。さらに、サンプルターレット機能とサンプルテーブル機能を組み合わせた自動測定機能の他、測定データの自動重ね書き機能を搭載しており、ユーザはサンプルテーブルに測定条件を設定すると、測定ボタンを押すだけでサンプル切換え、測定、さらにデータ重ね書きまでの一連の操作を一括で行うことが可能となる。（図8）

6. まとめ

以上、U-7000形真空紫外分光光度計の特徴を紹介した。2002年12月現在、F₂ステッパ関連市場で求められる分析機器はR&Dユーズが主体である。そして、現在この市場では、真空紫外域という条件の厳しい波長域であるにも関わらず、紫外・可視域の分析機器と同等、もしくはこれを越える高い性能が要求されている。そして将来、F₂ステッパの生産ラインへの投入時期には、市場からの要求が更に高くなると考えられている。

U-7000では、装置の基本性能のみならず、測定のスループットや自動化についても設計段階から注力することで、R&Dユーズからラインユーズへと遷移するにつれ多様化する市場要求も視野に入れた製品となっている。しかし、製品の設計を行った時期と発売時期の間に存在する僅か1年の期間にも、新たな要求が市場から数多く提出されたことも事実である。その例として絶対反射測定用アプリケーション要求やプリズム等の特殊サンプル測定用アプリケーション要求が上げられる。今後は、これら測定アプリケーションの充実が主要な課題である。

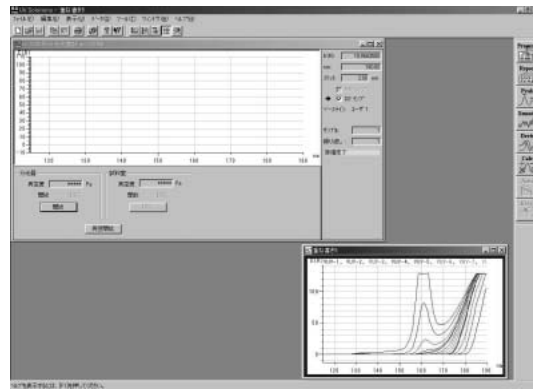


図8 制御ソフト画面
上：モニタ画面（左上）と自動重ね書きウィンドウ（右下）
下：サンプルテーブルウィンドウ

大型試料対応S-3600Nの紹介

Model S-3600N SEM with large stage and extra large chamber

伊東 祐博* 田中 隆一*
西村 雅子** 山田 満彦**

1. はじめに

走査形電子顕微鏡（以下SEM）は、半導体、バイオ、新素材などのナノテクノロジー分野において、表面観察、分析のツールとして、不可欠なものとなっている。特に汎用SEMは低価格で操作性も良いので広い分野で用いられており、試料の形状や大きさは多様である。近年、国内では主に材料分野から、欧米では自動車関連の部品メーカから、大型試料を非破壊で観察したいという要求が増えている。このニーズに対応するため、観察可能な試料サイズと試料可動範囲および搭載試料質量を競合メーカ中最大（2002年8月現在）とした試料ステージを備えたS-3600N形SEMを開発した。

本稿ではS-3600N形SEMの概要と特長および応用例を紹介する。



図1 S-3600N形走査電子顕微鏡

2. S-3600Nの概要

大型ステージを搭載したS-3600N形SEMの外観を図1に示す。主要ユニットである大型ステージと大型試料室の外観を図2に示す。試料の交換時にはステージ全体を引き出し、大きな試料でも簡単に装着できる構造とした。

本装置の開発では、耐振性を向上させるために構造解析ソフトによる数値計算を積極的に用いて試料ステ

ージを構成する部品の形状の最適化を図った。例えば試料室の強度では、真空による圧力および電子銃とレンズの質量から天板や側板のたわみ量を算出して厚みを決めた。また試料ステージでは、構成部品の共振周波数を算出して剛性強化の指針とし、最終的な形状を求めた。



図2 大型ステージと大型試料室の外観
カラー液晶ユニット（250mm×200mm）搭載

3. S-3600Nの特長

本装置の特長を以下に述べる。

（1）大型ステージ、大型試料室による大型試料観察を実現

最大 250mm（ 10インチ）試料を搭載することができ、 200mm（ 8インチ）試料の全面観察が可能となる。また最大試料厚さは70mm、最大試料質量2kgに対応でき幅広い分野でのSEM観察が可能となる。

（2）操作性の向上を追求

使いやすいGUIを採用することで、SEM操作を簡単とした。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、SEM画面を見ながら視野移動を簡単に行うことができる。観察した画像はファイリング機能とレポート作成機能によりデータの管理・活用を容易とした。

（3）低加速電圧の分解能向上

電子ビーム量を増やすことが可能なデュアルパイア

* (株)日立サイエンスシステムズ 電子装置システム設計部

** (株)日立サイエンスシステムズ 那珂カスタマーセンタ物性評価部

ス機能と低収差レンズにより、加速電圧3kVで分解能30nmを実現した。

(4) 高性能ナチュラル（低真空）SEM

試料室を低真空にして試料帯電（チャージアップ）を抑制する低真空モードを選択することで、含水試料や絶縁物試料の無蒸着観察も可能とした。

(5) 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装着可能となった。これにより分析SEMとしての拡張も可能である。

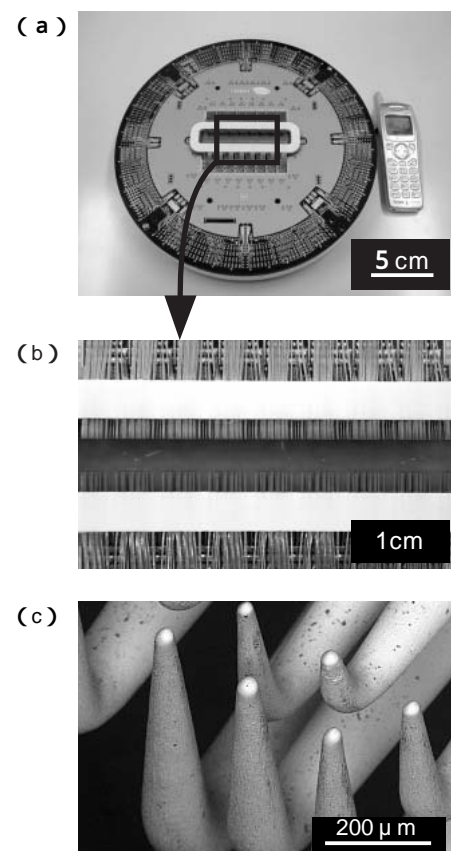


図3 プローブカードの観察例

(a) プローブカード外観 (b) プローブ拡大写真
(c) プローブ先端周辺の低真空反射電子検出像
(試料ご提供：日本電子材料（株）)

4. 応用例

図3(a)は半導体ウェハ製造の最終工程でICやLSIの良否の判断に使用されている探針付き基板（プローブカード）の外観で、直径は10インチ、質量は約1kgである。図3(b)はプローブカードの中心を拡大した像です。本装置でプローブカード中心に多数あるプローブの先端部（図3(a)の印）を非破壊無蒸着で低真空観察/分析することに成功した。従来光学顕微鏡で行っていたプローブ先端の形状評価および異物検査をSEMで行うことができるようになった。

大型試料（サイの骨の化石）の搭載例を図4に示す。従来は見たい部分を小さく分割して観察していたものが、そのままの状態を搭載、観察可能となった。



図4 大型試料搭載例

サイの骨の化石 大きさ：130mm×110mm×65mm
(試料ご提供：英国自然博物館)

5. おわりに

大型試料を観察できるS-3600N形SEMの概要と特長を中心に紹介した。従来、SEMで大型試料の観察をする場合、試料を切断し観察していた。しかし、最近の材料事情はそれを許さなくなっており、できるだけそのままの姿で評価したいというニーズが高まっている。大型試料の非破壊・無処理での観察は、ますます重要になってきており、今後、材料分野を含む広い分野での応用が期待される。

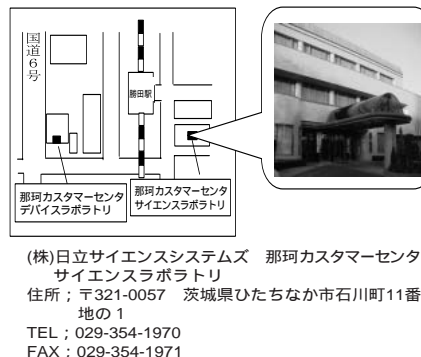
『21世紀の分析ニーズにお応えする 那珂カスタマーセンタ サイエンスラボラトリが誕生!』

電子顕微鏡や各種化学分析装置のデモセンタとしてご活用いただいていた那珂カスタマーセンタが、より快適で広範のアプリケーションに対応できるよう2003年1月20日より新デモセンタ：サイエンスラボラトリとして拡張、スタート致しました。新ラボでは、最新のTEM、SEM、FIB、元素分析装置、分光装置、分離分析装置、質量分析装置をラインアップし、先端素材、バイオ、医薬、

環境等の先端分野でのアプリケーションをご紹介します。館内のネットワークや前処理環境も完備し、試験所認定（ISO17025）取得ラボとして、運営のご相談も承ります。

新施設は交通アクセスも良好で、快適な環境にあり、ご訪問いただいたお客様にゆとりをもってご検討願える空間を用意いたしました。

スタッフ一同、皆様のご来訪をお待ちしております。



電界放出形走査電子顕微鏡S-4800

S-4800 Field Emission Scanning Electron Microscope

小柏 剛*

1. はじめに

エレクトロニクス分野、機能性材料や薄膜などの材料分野、あるいは酵母や製薬などのバイオテクノロジーの分野では、超微細構造を観察するために、高性能な走査電子顕微鏡（Scanning Electron Microscopy、以下SEMと略す）が不可欠になっている。特に半導体デバイスの分野においては、パターンの高集積化・微細化・多層構造化に伴い、それらを解析するためのSEMの高性能・高機能化が必要となってきている。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（タイプ1、タイプ2）を発売した。

図1にS-4800タイプ2の外観を示す。S-4800は、世界最高性能機として好評を得ているインレンズ形の超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡S-5200で開発した最新の電子光学技術を取り入れた。また超高分解能観察のアプリケーションに対応するために、耐振性やドリフトなどに対して抜本的な改良を行った新開発の大形試料ステージを搭載し、さらに磁気浮上形ターボ分子ポンプによるドライ排気系を標準構成として試料のコンタミネーションの抑制を図った。操作性においては、S-5200/S-4700で培ったGUI技術を大幅にブラッシュアップして、高い操作性を実現した。本稿では、これらS-4800の特長について紹介する。

2. 実効分解能の向上

S-4800では新たに対物レンズを開発し、従来（S-4700）より1.2倍の強励磁を実現したことにより、イン

レンズ形SEMに匹敵する超高分解能を得ることができる（二次電子像分解能：2nm（加速電圧：1kV）/1nm（加速電圧：15kV））。図2に加速電圧1kVにおける分解能写真を示す。実際の像観察においては、実サンプルを用いたときの実効分解能が重要となり、これは外部からの振動や試料のコンタミネーションなどが影響する。S-4800ではこの実効分解能を向上させるために、装置の耐振性の向上と、試料のコンタミネーションの低減を図った。

装置の耐振性の向上させるためには、SEM本体と試料ステージの両方の耐振性を向上させる必要がある。このうちSEM本体においては、架台にパイプフレームを採用することにより耐振性向上を実現した。また試料ステージにおいては、耐振性の抜本的な見直しによって新規開発を行い、ステージ剛性を向上させた。その結果、ステージの剛性を表す固有振周波数は、従来（S-4700）と比較して、タイプ1が1.6倍、タイプ2が1.3倍に向上した。

また、試料のコンタミネーションを低減させるために、真空排気系の見直しも行った。メインポンプとしては、磁気浮上形ターボ分子ポンプを標準採用した。また予備排気ポンプはロータリーポンプが標準であるが、オプションであるドライポンプ（スクロールポンプ）への交換も可能であり、オイルフリーの完全ドライ排気系が構成できる。さらに排気系制御においては、ロータリーポンプの油の上昇を防ぐために、試料交換空を低真空で保持するようにした。加えて、アンチコ



図1 S-4800超高分解能SEM（タイプ2）

*（株）日立ハイテクノロジーズ エレクトロニクスシステム第一設計部

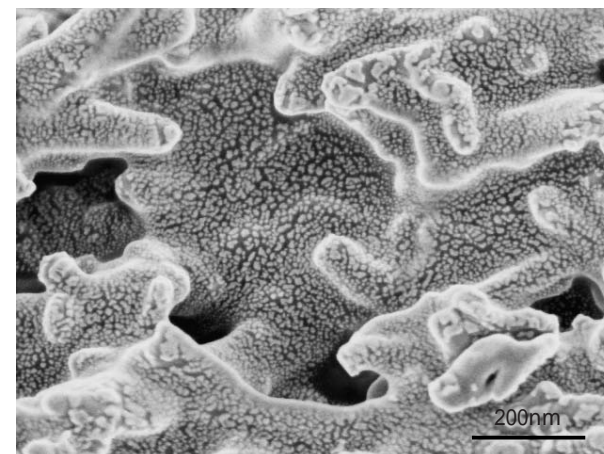
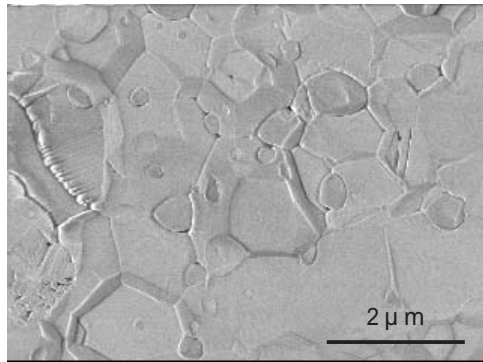
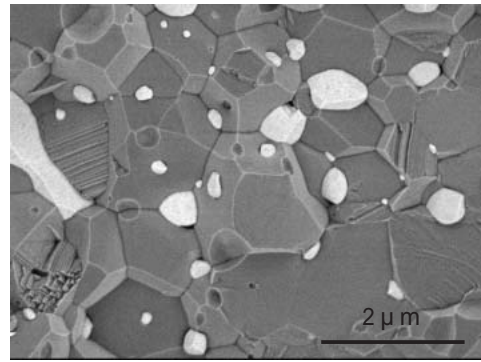


図2 S-4800二次電子分解能写真
(加速電圧1kV、試料：金蒸着磁気テープ)



(a) SE信号



(b) BSE信号

図3 S-4800によるセラミックスの観察例 (SE信号及びBSE信号, 加速電圧1.5kV)

ンタミネーショントラップの面積を従来 (S-4700) の1.3倍と大きくした。これらの効果によりコンタミの発生を大きく減少させることができた。

3. シグナル可変機能

高分解能SEM観察においては、検出信号が弱いためにコントラストが十分得られない場合や、二次電子のエッジ効果やチャージアップによる異常コントラストによって得たい情報が埋もれてしまう場合がある。このとき低加速電圧領域での反射電子信号が、アプリケーション上、有益な情報をもたらすことが多い。従って、二次電子と反射電子を選択的にかつ高効率に検出する機能の実現は、現在の高分解能SEMには不可欠である。

そこでS-4800においては、S-5200で開発した高効率な反射電子検出方式を採用し、Upper検出器による反射電子検出量(検出立体角)を、従来 (S-4700) と比較して約4倍(シミュレーション値)に向上した。この反射電子情報は、シグナル可変機能により二次電子情報と可変比率で加算することができ、アプリケーションに最適な信号を選択して高コントラストなSEM像を得ることができる。

図3にS-4800によるセラミックスの観察例(加速電圧1.5kV)を示す。この試料を二次電子信号で観察すると、(a)のように帯電により正常なコントラストを得ることができない。しかし、この試料の同一視野を、シグナル可変機能によって低加速電圧反射電子の条件で観察することにより、図(b)に示すように良好な凹凸コントラストと組成コントラストが得られている。

4. 操作性の向上

現在のFE-SEMでは、高倍率・高分解能のSEM像を操作性よく容易に観察できるインターフェースが必要不可欠である。S-4800では、S-4700やS-5200で培ったGUI技術を元に、ユーザのニーズを最大限取り入れることによってGUIの全面的な見直しを行い、操作性の大幅な向上を図った。SEM像が表示されるモニタには、18.1インチLCD(液晶モニタ)を標準採用とし、SEM

像表示の標準画像サイズを640×480から1280×960へ拡大した。また、タブ方式によるウィンドウ切替え、アイコンの大型化、日本語対応などを実施し、より快適なSEMの操作環境を実現している。

5. ECO(エコ)モード

近年、社会の環境問題に対する取り組みが著しい。それに伴い、装置においても環境へ配慮が重要となっている。しかしFE-SEMでは、超高真空を保つために昼夜連続運転が原則であり、冷却水循環装置も含め大きな電力を使用していた。そこでS-4800では、装置を長時間使用しないときに、必要最小限に電力使用を抑えることができる、省エネルギーモード(ECO(エコ)モード)を標準装備した。ECOモードの動作タイムチャートを図4に示す。

ECOモードは、夜間や休日など装置を使用しない時には、電子銃のイオンポンプを除いてすべてを停止し、予め設定した時間になると排気系を自動的に立ち上げることができる。この時間の設定は、新規開発したGUI上で行うことができる。

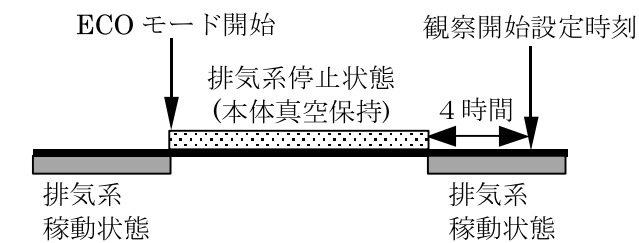


図4 省エネ運転モード(ECOモードの)動作タイムチャート

6. おわりに

S-4800FE-SEMの特長を紹介してきた。S-4800は、インレンズ形SEM S-5200に匹敵する高性能・高機能を大型サンプル上で実現し、さらに高い操作性を備えたFE-SEMである。S-4800を用いることにより、エレクトロニクス、材料、バイオテクノロジーの分野で新たな知見が得られることが期待される。

マイクロチップ電気泳動装置コスモアイSV1210の紹介とその応用例

Microchip Electrophoresis system SV1210 and It's applications

長谷見通子*

1. はじめに

1985年に始まったヒトゲノム計画、塩基対数約30億の解析が2003年の春に終るといわれ、「DNA鑑定」という言葉も、最近では新聞やニュース、その他でよく聞かれるようになりました。DNAの解析には、目的遺伝子の制限酵素による切断片や遺伝子増幅(PCR: Polymerase Chain Reaction)反応を行うことからはじめますが、この解析にはアガロースやポリアクリルアミドによるスラブゲル電気泳動法が用いられています。現在ではDNA解析において、電気泳動は欠くことの出来ない手段といえますが、従来使われてきたアガロース電気泳動法は、操作が煩雑なばかりではなく、泳動後の結果の解析にゲル染色、写真撮影、UV照射装置、

といった特別な装置が必要とされていました。「マイクロチップ電気泳動装置」図1は半導体分野で使われているプラスチック板上への微細加工技術を利用して、溶液のリザーバーや細い流路をチップ上に形成し、電気泳動をチップ上で行うように設計されたものです。電圧を利用して、チップ上の流路で溶液の流れをコントロールできるので、サンプルの注入、分離、反応、検出などの機能をチップ上にて行わせることが可能になっています。従ってこの装置では、従来別々の装置で行われていたゲルの作製、電気泳動、染色、バンドの検出、データの解析すべてを一台の装置で行うことが可能になり、解析の自動化とスピードアップをもたらすことになりました。

2. コスモアイSV1210の特徴

最大の特徴は、マイクロチップ化したことによって使用サンプルの少量化がはかられたことで、DNAの場合約100pg/μl以上、RNAでは約10ng/μl以上で測定可能となります。また、光源に赤色半導体レーザー(中心波長635nm)を用い、検出を冷却CCDにしたことから分離能も5bp(15~100bpDNA)となっています。さらに、12検体を同時に泳動・検出を行い約6分間で測定を終了して解析することが可能で、さらに電圧・泳動時間・温度調節といった泳動条件や校正データの再入力も設定することができます。解析ソフトも鎖長・濃度計算、輝度・面積表示、タイル・オーバーラップ表示、ラベル入力、外部出力はExcel・画像出力、プリントスタイルも3種類から選ぶことができます。



図1 マイクロチップ電気泳動装置 コスモアイSV1210

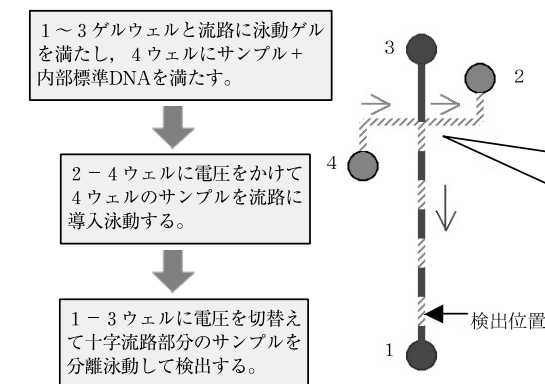
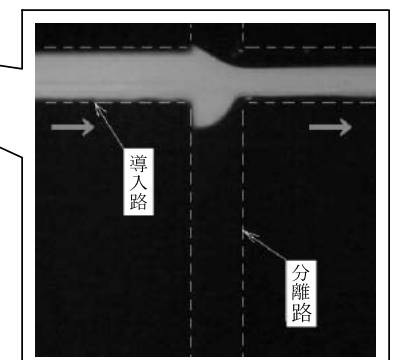


図2 コスモアイ泳動原理(模式図)



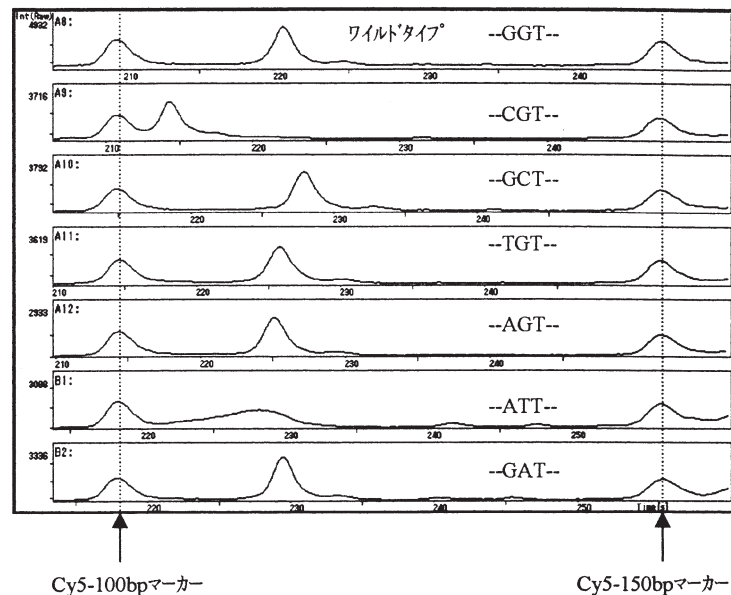
*(株)日立ハイテクノロジーズ 森の里カスタマーセンタ

SSCP法への対応

図3 SSCP法の例

変異のないDNA（ワイルドタイプ）と変異のあるDNA（ミュータント）をCy5でラベルしたものをPCRして、一本鎖状態で泳動を行い泳動パターンの移動度を比較します。

泳動条件：Cy5-108bp
温度15



新RNAキットの紹介

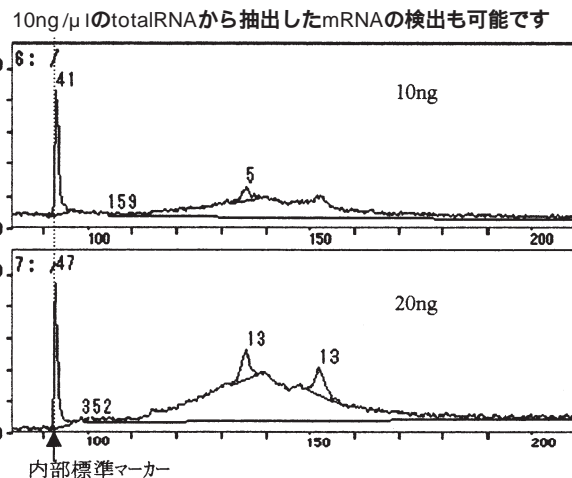


図4 マウス肝細胞から抽出して精製したmRNA

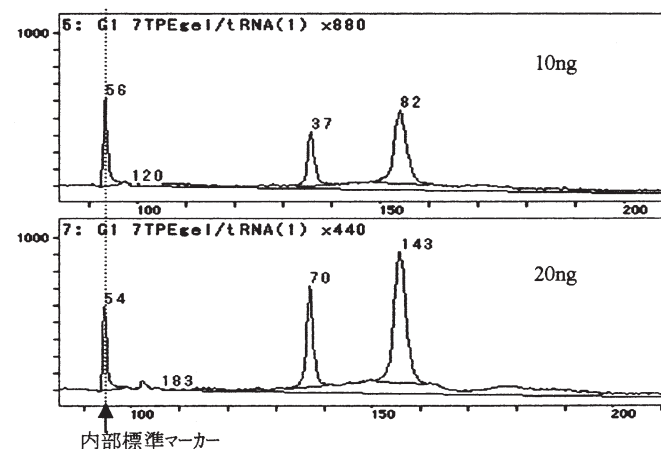
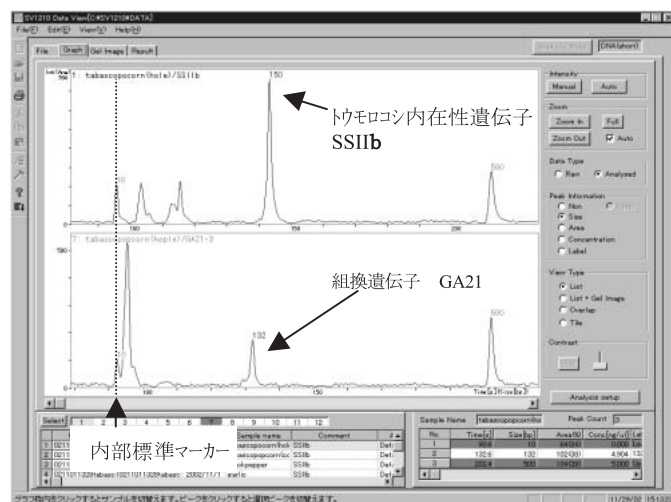


図5 HL細胞から抽出したtotalRNAからのrRNAの検出

遺伝子組換え食品の検出

図6 海外みやげ（ポップコーン）から検出された組換え遺伝子（GA21）

遺伝子組換え食品の検出で、トウモロコシ内在性遺伝子SS b, 組換え遺伝子GA21, P35, NOS, T25, M810, Btl1, E176の検出を行い、GA21に陽性を認めたもの。



OURSTEX 150 RoHSエネルギー分散型蛍光X線分析装置を用いた電子材料中の有害重金属の分析

Harmful Heavy Element Analysis in Electronic Material Using an Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer

永井 宏樹* 宇高 忠**

1. はじめに

近年、環境問題に対する関心が高まってきている。特にプラスチック難燃剤や電線ケーブルの被覆材料などに安定剤等としてCd及びPbが使用されている。EU域内ではWEEE(Waste Electrical and Electronic Equipment)やRoHS(Restriction of the use of certain Hazardous Substances in electrical and electronic equipment)といった規制が設けられており、廃電気電子機器指令に関連した有害物質(水銀・カドミウム・鉛・6価クロム・PBB・PBDE)の使用制限がなされている。

今回、エネルギー分散型蛍光X線分析装置(OURSTEX 150 RoHS)を用いて、特に注目されている低濃度のCd及びPbの分析が簡易に行えたので報告する。

2. OURSTEX 150 RoHSの概要

2.1 装置の構成と主な仕様

エネルギー分散型の蛍光X線分析法は、光源にX線を用いるため非破壊で定性分析や定量分析を容易に行うことができる。また同時分析であるため測定が迅速で、試料調整においてもICP発光や原子吸光等の分析法に比べ容易で測定時間も短い。

装置はCd,Pb分析専用機OURSTEX 150RoHSを用いた(図1)。この装置は、大きさが580(W)×490(D)×390(H)mmで重量が約44kgと非常にコンパクトである。検出器には、シリコンドリフト検出器(SDD)を用いており、ペルチェ素子によって電気的に冷却するため液体窒素が不要である。この検出器は、入射面と反対側の電極面に多重リング状の電極を設けて効率良く電荷収集を行うため非常に高いエネルギー分解能を有している(Mn-K 線 5.9keVでのエネルギー分解能160eV以下保証)。また、計数回路にデジタルシグナルプロセッサ(DSP)を採用することにより、従来のアナログ計数回路に比べ一桁以上も高計数対応が可能である。さらに特殊フィルターを用いているためPb・Cdが同時に短時間で測定できるといった特徴がある。X線管球には空冷で小型のW管球を用いている。W管球は連続X

線強度が強く、カドミウムなどの重金属分析に適している。また、W管球を用いることによるPb-L 線やCd-K 線の特性X線と重なる妨害ピークについての心配がない。光学系として3.5mm のキャピラリーを用いており、試料面での照射径は7.5mm×5.5mmの楕円形状になる。またオプションでCCDカメラによる試料位置観察ができる。

2.2 装置の特徴

本装置は液体窒素や冷却水を使わないため、低コストで測定が可能である。また、校正試料が装置内部に内蔵されており、エネルギー校正と標準化作業が自動で行えるため、試料を置いて単純操作で結果が表示されるといった特徴がある。



図1 OURSTEX 150 RoHSの外観

3. 応用例

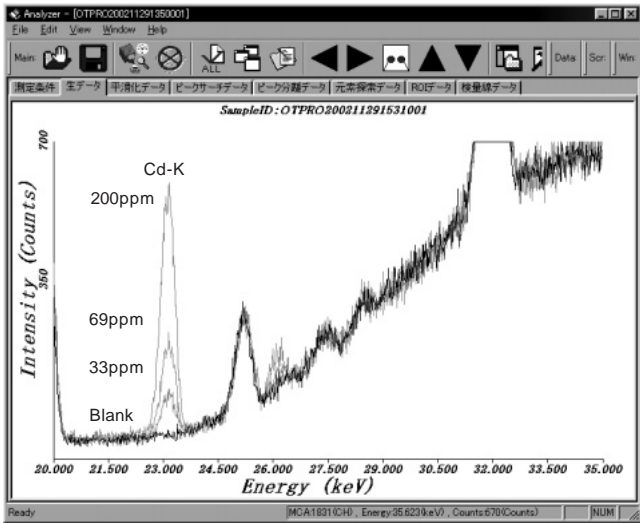
3.1 測定事例

図2にCd, Pbについてのピークプロファイルを示した。用いた試料は、塩化ビニル系樹脂にCd, Pbを添加し、ペースト状にしたものを用いた。なお分析値はICP発光法等であらかじめ分析し含有量を求めている。測定条件は、管電圧：48kV, 管電流：1mAで測定時間は300秒で行った。図3にCd, Pbの検量線を示した。検量線は平滑化を行った後、ROI範囲を設定しバックグラウンドを除去した積分強度を用いた。

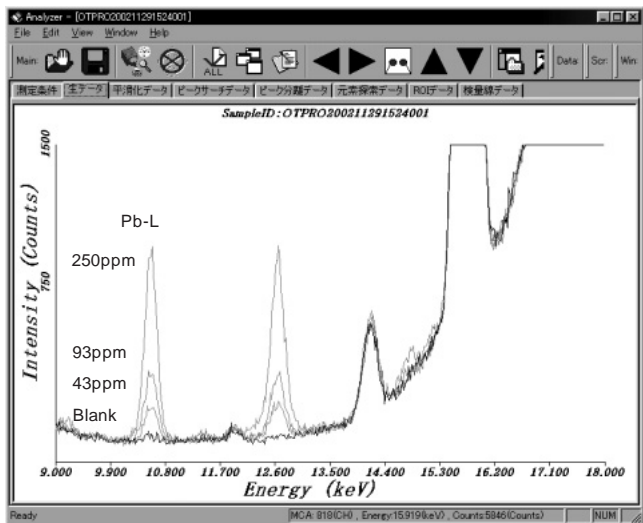
表1に各測定時間に対する検出下限値(LLD)を示し

* アワーズテック株式会社 研究開発部 研究員

** アワーズテック株式会社 代表取締役 工学博士

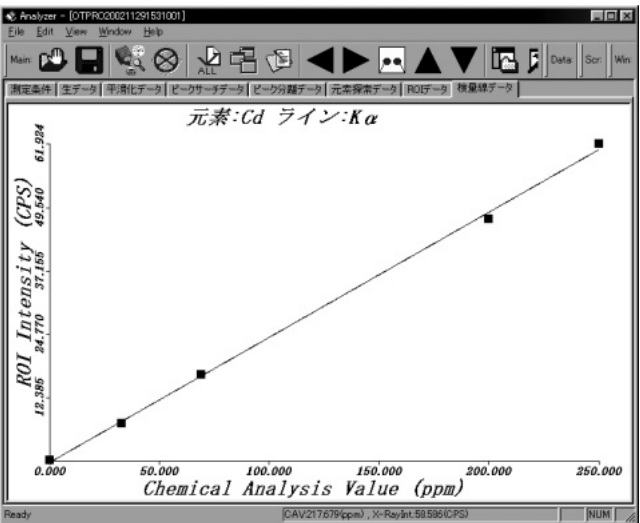


(a) カドミウム

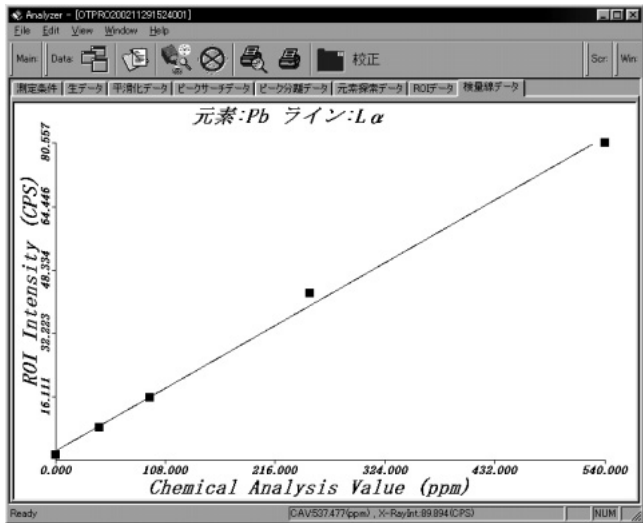


(b) 鉛

図2 塩化ビニル中のカドミウム及び鉛の測定プロファイル



(a) カドミウム



(b) 鉛

図3 塩化ビニル中のカドミウム及び鉛の検量線

た。なお検出下限値は、ブランク値の標準偏差の3倍から求めている。また、表2に装置の精度としてCd 250ppmとPb540ppmでの標準偏差値()と変動率(CV%)を示す。測定条件は48kV・1mA、100秒測定で行った。

3.2 試料形状

蛍光X線分析法において、基本的に定性分析や簡易の定量分析ではサンプルをそのまま測定できる。しかし、微量の定量分析を行う際には、試料の形状、偏析、厚み等による影響を受ける。特にCdはエネルギーが大きく、試料内部まで進入するため、試料の厚みを揃える必要がある。しかしながら、厚み等の試料調整に手間が掛かるため、そのまま測定したいという要求が強

い。そこで、散乱線補正によって試料の厚み補正を行う方法がある。X線管から試料に照射された一次X線が試料と相互作用し発生した散乱線をモニターし、Cdの積分強度と散乱線の積分強度の比を用いて補正する方法である。表3に試料の厚みを変えた場合の定量値と補正後の定量値の比較を示す。検量線は、厚み2mmの塩化ビニル系試料で作成した。測定は、Cd250ppm濃度試料の厚みを増やして行った。

3.3 高感度型

エネルギー分散型蛍光X線分析装置で数ppm以下のCd分析をしたいという要求が強く、高感度仕様として有効面積が10mm²のSDDを用いて測定を行った。その結果、600秒測定において検出下限値0.84ppmが得られ

表1 検出下限値

	測定条件		
	60sec	120sec	300sec
Cd	4.51ppm	3.22ppm	2.15ppm
Pb	6.86ppm	4.78ppm	3.50ppm

表2 装置精度

Cd 250ppm		Pb 540ppm	
n	Cd-K cps	n	Pb-L cps
1	80.781	1	102.907
2	79.639	2	103.395
3	81.226	3	101.061
4	80.406	4	99.649
5	79.450	5	102.834
6	81.767	6	101.435
7	79.441	7	102.074
8	81.765	8	102.395
9	79.730	9	103.117
10	79.805	10	101.659
total	804.010	total	1020.526
平均値	80.401	平均値	102.053
	0.881		1.081
C V (%)	1.10	C V (%)	1.06

表3 試料厚みによる散乱線補正

試料厚み	定量値(分析値:250ppm)	
	補正前	補正後
4mm	307.48ppm	250.62ppm
6mm	327.38ppm	243.15ppm

表4 カドミウム検出下限値(高感度仕様)

測定時間	検出下限値LLD
300sec	1.29ppm
600sec	0.84ppm

た。表4に各測定時間に対する検出下限値を示す。また、Cdの低濃度分析例として図4にCd8ppmの分析結果を示す。測定条件は管電圧・電流49kV・1mA、測定時間600秒で行った。このように8ppmの試料においてブランク試料と比べてはっきりとピークを確認することができる。

4. まとめ

OURSTEX 150 RoHSは小型で、液体窒素や冷却水を使わず、校正作業等も自動で行え簡易に測定ができる。また、高性能であるため低濃度のCd及びPbについて同時に短時間で分析が行える。さらに高感度仕様のSDDを用いる事によってエネルギー分散型蛍光X線分析では難しいとされていたカドミウムの検出下限値1ppmを切ることができた。また、試料の形状や厚みに対しては、散乱線補正法を用いてある程度補正することができる。今後、カドミウム・鉛以外の特定危険物質の測定や土壌中の有害重金属分析については、開発を進めていく必要がある。

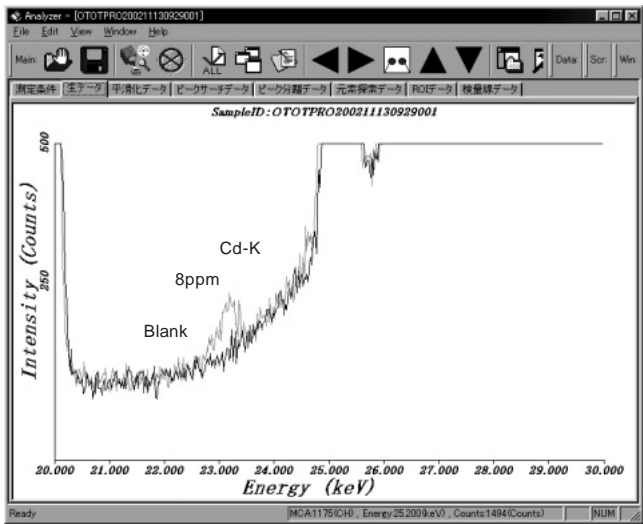
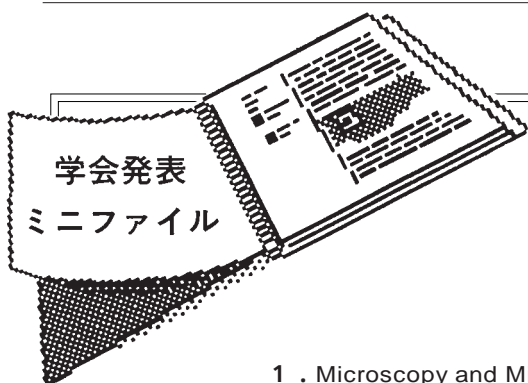


図4 カドミウム8ppm分析例

学会発表
ミニファイル

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. Microscopy and Microanalysis (2002・8/5-8, Quebec, Canada)

矢口 (日立サイエンスシステムズ), 他: High resolution TEM observation and EELS analysis of carbon nano-tubes at elevated temperatures.

上野 (日立サイエンスシステムズ), 他: A newly developed FIB system for TEM specimen preparation.

2. SCAN TECH 2002 (2002・9/13, 東京)

多持 (日立サイエンスシステムズ), 他: 自動検査SEMの実際と今後の展望

3. 第18回分析電顕討論会 (2002・9/19-20, 東京)

黒田 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIBマイクロピラーによる半導体三次元構造解析

半導体不良解析などでは,しばしば特定部位の三次元構造解析が有用である。そこで集束イオンビーム加工観察装置(FIB)を用いて試料を柱状に加工し,様々な方向からの観察を可能にするマイクロピラー法を実現するためのTEM/FIB共用試料ホルダを開発した。この試料ホルダをFB-2100形FIB装置及びHD-2000形半導体プロセス超薄膜評価装置に適用し,D-RAM断面のマイクロピラー加工を行ってSTEM像を観察した例を図3a)に示す。また図3b)は試料をa)の状態から約45度回転して観察したSTEM像である。

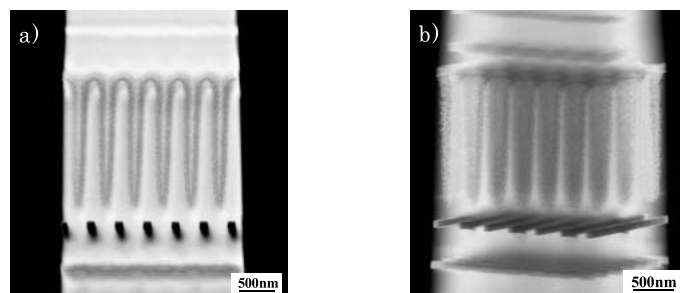


図3 マイクロピラー試料によるD-RAM断面のSTEM像観察例。
b)はa)を約45度回転させて観察したもの。

大西 (日立ハイテクノロジーズ), 他: 日立FB-2100形集束イオンビーム装置

今野 (日立サイエンスシステムズ), 他: STEMを用いたEELS分析とEDX分析の検討

上野 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIBは万能か?

4. 応用物理学会 (2002・9/27, 東京)

矢口 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIB加工試料のEELS分析

5. ウィルス下痢症研究会 (2002・10/14, 東京)

中澤 (日立サイエンスシステムズ), 他: H-7600自動試料傾斜機能とその応用

6. International Symposium for Testing and Failure Analysis (2002・11/8, Phoenix, USA)

矢口 (日立サイエンスシステムズ), 他: Failure analysis using a dedicated FIB-STEM system.

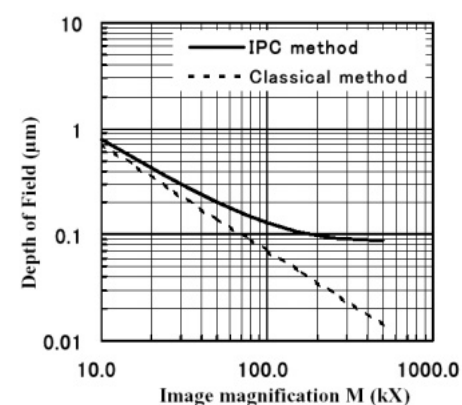
7. Charged Particle Optics (2002・10/22-25, Maryland, USA)

佐藤 (日立ハイテクノロジーズ), 他: Evaluation of depth of field in SEM images in terms of the Information-Passing-Capacity(IPC)method and Contrast Gradient(CG)method.

SEM像の焦点深度不足を補う焦点深度拡大機能が実用段階に入っている。この機能をフレキシブルに活用するには,画素サイズに対応する焦点深度を厳密に把握し,スルーフォーカス画像枚数を最適化する

ることが必要である。ここでは,コントラスト傾斜(CG)法と情報伝達能力(IPC)評価法という2つの異なる方法を相補的に用いて画素サイズの影響を検討した。その結果,従来法に比べて精度の高い焦点深度評価法を確立し,S-5200形SEMにおいて図1に掲げる計算結果を得た。

図1 従来法及びIPC法により算出された
S-5200形SEMの焦点深度



石谷 (日立ハイテクノロジーズ), 他: Contrast-to-gradient method for the evaluation of image resolution in scanning electron microscopy

8. LSI Testing Symposium (2002・11/7, 大阪)

黒澤 (日立サイエンスシステムズ), 他: 半導体デバイス内部欠陥の高スループット解析手法の確立

SEM式ウェーハ検査装置で欠陥部位を検出したのちFIBで断面加工し,TEM/SEMで断面構造の観察/分析を行うことは欠陥発生の原因を明らかにする上で極めて有用である。しかし実際には,ウェーハ上の微小な特定部位をFIBで探索することは一般に困難を伴う。本研究ではSEM式外観検査装置で欠陥部位を特定してから,図2a)に示すようにその近傍にEBマーキングを施すことによって迅速かつ高精度な断面解析を可能にした。図2b)はEBマーキングした欠陥部位をFB-2100でマイクロサンプリング装置により摘出し,薄膜加工後S-5200形超高分解能SEMのSTEM像により欠陥部位の断面構造を観察した例である。

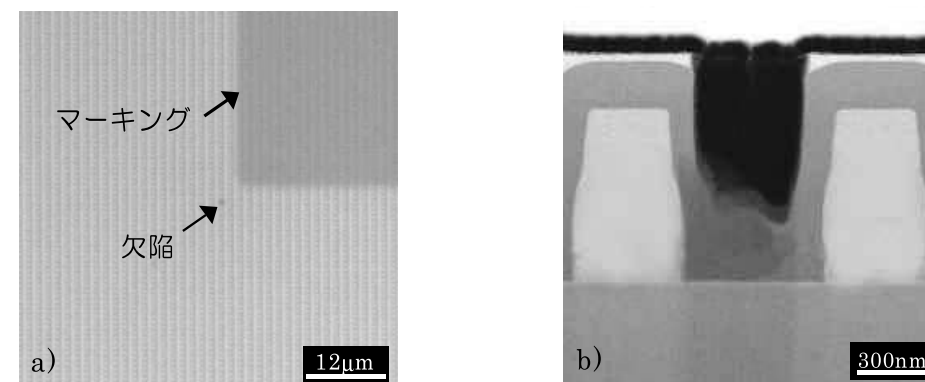


図2
a) FB-2100のSIM像による欠陥近傍のEB マーキング, b) FB-2100で加工した欠陥位薄片試料のS-5200による断面STEM像

戸所 (日立ハイテクノロジーズ), 他: 電子ビームテスト技術の発展

小柏 (日立ハイテクノロジーズ), 他: SEMにおける自動軸調整技術, 焦点深度拡大技術

川田 (日立ハイテクノロジーズ), 他: CD-SEMにおけるArFレジストパターンのシュリンク前CDの測定

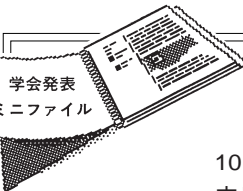
森 (日立ハイテクノロジーズ), 他: 多品種半導体製造におけるレチクルオフセット学習による重ね合わせ精度向上

落合 (日立・中央研究所), 他: レビューSEM対応X線元素分析の高分解能化技術

今野 (日立サイエンスシステムズ), 他: FIBマイクロピラーサンプリングによる三次元構造解析

9. 医学生物学電子顕微鏡技術学会 (2002・11/9, 東京)

鈴木 (日立サイエンスシステムズ), 他: これからの臨床診断用試料作製法と電子顕微鏡観察



10．Microscopic Society of Canada（2002・11/22, Alberta, Canada）
中川（日立サイエンスシステムズ），他：S-4800/S-5200 UHR FE-SEM, Features and its applications.

11．日本顕微鏡学会第47回シンポジウム（2002・11/27，仙台）
中澤（日立サイエンスシステムズ），他：H-7600の自動傾斜機能とその応用

最近バイオサイエンス分野で，コンピュータモグラフィ法によるTEM三次元微細構造解析への期待が高まっている。今回は，高分解能三次元像を得る上で不可欠の自動試料傾斜ステージを開発した。このステージは±60度の範囲を0.5度の最小ステップで自動連続傾斜することが可能であり，傾斜に伴う位置ずれに対しては機械的補正機構に加え位相限定相関法に基づく画像処理によって0.1画素単位の高精度補正を実現した。図4は，低角度シャドウイング処理したヘビームロミオシンを±60度の範囲で連続傾斜した一連の像の一部を示すものである。

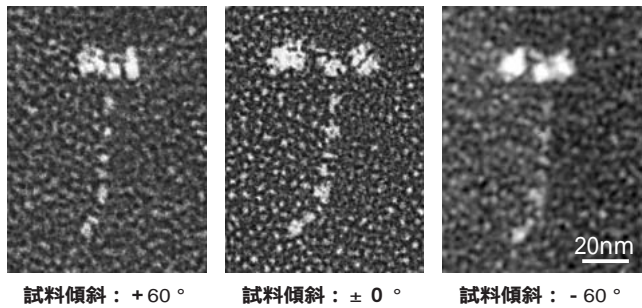


図4 低角度シャドウイング処理したヘビームロミオシンの連続傾斜TEM像

黒田（日立サイエンスシステムズ），他：FIBマイクロピラーサンプリングによる三次元構造解析

12．第29回 BMSカンファレンス；（2002・7/7～10，ハヶ岳ロイヤルホテル）
出口（日立サイエンスシステムズ），他：LC-ESI/3DQMSによる合成オリゴ核酸の分析と精製

DNAチップや遺伝子治療の発展に伴い合成オリゴ核酸の需要は高まりつつある。オリゴ核酸は高い品質が要求され，LCでの高分離とMSでの確認が行われているが，分析条件が異なり，ジレンマが有る。LCでの分離後にModifierを添加するポストカラム法を開発し，ESI-MSへの直接の導入を可能とした。Mod-

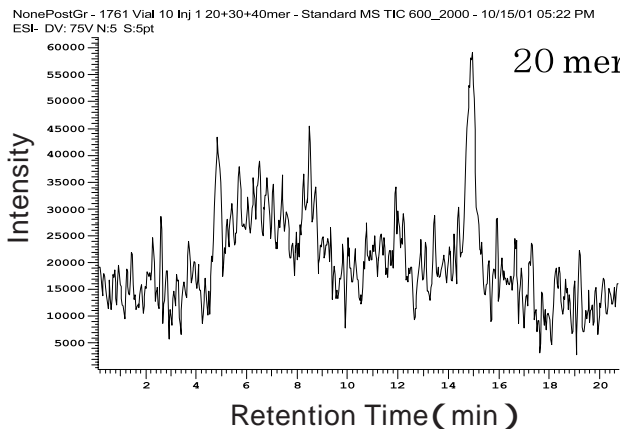


図5 オリゴ核酸分析例 (Modifier無し)

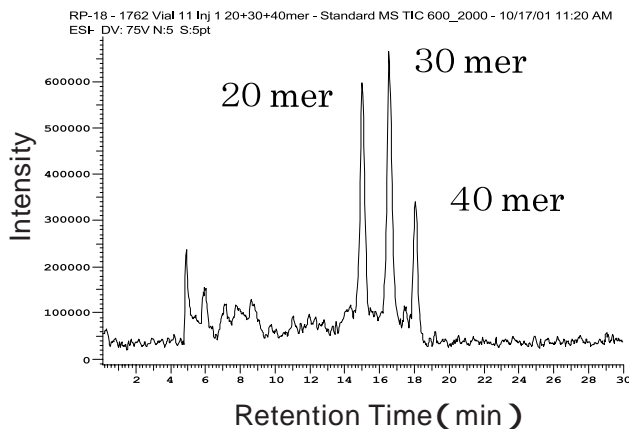


図6 オリゴ核酸分析例 (Modifier有り)

ifierの最適化により，20merで約10倍，50merでは約30倍の感度向上を実現した。

13．Separation Science 2002（2002・7/12～13，東京都立大学）
久保（日立ハイテックノロジーズ），他：HPLCモジュールのバリデーション

14．分析化学会第51年会（2002・9/19～21，北海道大学）
米谷（日立サイエンスシステムズ），他：電気加熱原子吸光によるケイ素分析における高感度化の検討

半導体洗浄工程で用いられる純水，有機アルカリ，フッ酸やフッ素系有機洗浄剤中の微量ケイ素が現像むらの原因となる。化学修飾剤としてロジウムを用い，さらにキュベット表面へのタングステンのコートを実施し、安定かつ高感度な分析法を開発した。

ELタイプ酸	Si分析値(μg/L)
塩酸	3.3
硝酸	27
硫酸	66

n:3

超純水タイプ	Si分析値(μg/L)
Milli-Q SP TOC	1.7
Milli-Q SP ICP/MS	0.09

n:3

図7 酸・超純水中Siの分析結果

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及び周辺河川水中ウランの分析

山本（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生体試料中のヒ素、セレンの分析

ヒ素，セレンは生体中の存在量は低いが，生理作用と密接なつながりがあり，正確に測定することが求められている。ICP三次元四重極質量分析装置を用いて，生体試料分解液を測定する条件を検討し，生体由来の成分による分析イオンを分離して，高精度の分析が可能となった。また，メタノールを添加することで約4倍の感度向上を実現した。

15．液体クロマトグラフ研究懇談会（2002・11/29，東京理科大学）
井上（日立サイエンスシステムズ）：アミノ酸とその関連物質の分析

血清，尿等の生体液中のアミノ酸分析法として，夾雑ピークの影響の少ないニンヒドリン試薬を用いるポストカラム法が用いられる。本法は代謝異常症などへ適用され，対象となるアミノ酸が増加している．そこで，各種のアミノ酸代謝異常症の一斉分析が可能となる様，従来の41成分（120分）に12成分を加えた53成分（150分）の分析法を確立した。また，特定成分の迅速分析用に短時間分析法（11分）も開発した。

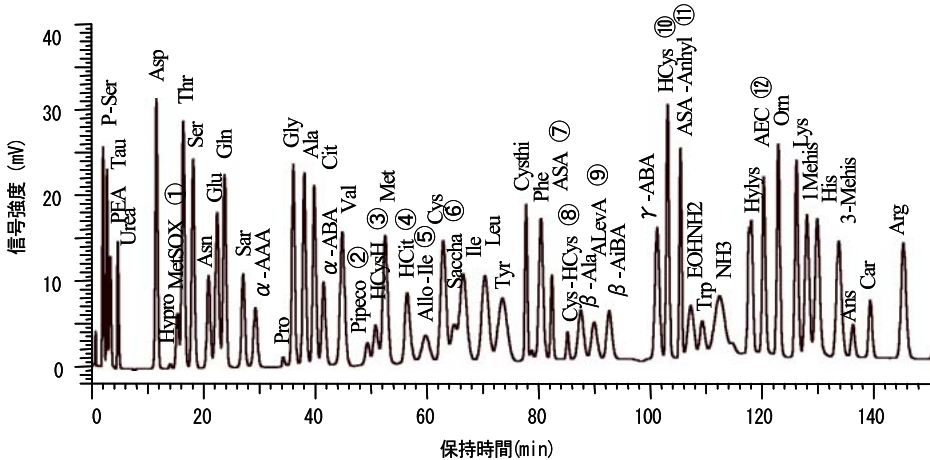


図8 生体液アミノ酸53成分の一斉分析例

新製品紹介

U-1800/2800形分光光度計の紹介

好評をいただいておりますU-1500形分光光度計の後継機としてU-1800形を、U-2001/2010形の後継機種としてU-2800形を発売いたしました。

U-1800形では、大型画面を採用し、スペクトル表示・検量線表示も可能になりました。U-2800形ではスペクトル

バンド幅を1.5nmにし、欧州薬局方にも対応しております。また、両機種ともスタンドアロン制御、PC制御が可能です。

ますます需要のあるライフサイエンス、製薬など幅広い分野での品質管理や教育などに最適な装置です。

((株)日立ハイテクノロジーズ 上妻道成)



U-1800形



U-2800形

主な仕様

項目	U-1800	U-2800
光学系	レシオビーム	ダブルビーム
波長範囲	190 ~ 1100nm	
スペクトルバンド幅	4nm	1.5nm
波長正確さ	±0.5nm	±0.3nm

株式会社 日立ハイテクノロジーズ

北海道支店 電話 札幌 (011) 221 - 7241
東北支店 電話 仙台 (022) 264 - 2219
筑波支店 電話 土浦 (0298) 25 - 4801
横浜支店 電話 横浜 (045) 451 - 5151

本社 電話 東京 (03) 3504 - 7211
中部支店 電話 名古屋 (052) 583 - 5811
北陸営業所 電話 金沢 (076) 263 - 3480
関西支店 電話 大阪 (06) 4807 - 2511
京都営業所 電話 京都 (075) 241 - 1591

四国営業所 電話 高松 (087) 825 - 9977
中国支店 電話 広島 (082) 221 - 4511
九州支店 電話 福岡 (092) 721 - 3511

編集後記

小誌の編集作業は2002年も押し迫った12月に行われました。2002年はワールドカップ、台風の来襲、北朝鮮拉致問題、厳冬、さらにノーベル賞物理、化学賞のダブル受賞など話題の多い年でした。皆様にはどのような年となったのでしょうか。小誌が皆様のお手元に届く頃は2003年も春の息吹が感ぜられる頃となるでしょう。

さて、本号は、廣川先生に巻頭言を頂きました。報文として愛知衛生研究所の斎藤、上野先生に残留農薬分析、慈恵医大の佐々木先生から電子顕微鏡による遺伝子観察、三菱化学生命研の近藤先生に走査型電子顕微鏡によるマウス胎児の形成に関して最新の報告をいただきました。解説には、分子状の砒素の分析が可能な新分析法、新たな分析分野を拓く真空紫外分光光度計、新形SEM、コスモアイ、蛍光X線などを紹介します。ラウンジには近畿大の山崎先生に明治維新からの環境汚染について肩のこらないお話をさせていただきました。

2003年、小誌もさらなる充実に向け邁進してまいります。(加藤 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ー

〒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
MARCH, 2003 VOL. 45 No. 2

発行 2003年3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アックス株式会社