

S CIENTIFIC I NSTRUMENT NEWS

日立ハイテク
HITACHI

SEPTEMBER 2004
VOL.47 No.1

● 目 次 ●

卷 頭 言

卷 頭 言

「我が国自前の先端的研究基盤を創ろう」
二瓶好正 1

報 文

遺伝子トランジスタによる分子認識の電気的検出
宮原裕二 3
キャピラリ高速液体クロマトグラフィ - 質量分析用ナノフローグラジエント装置
出口喜三郎 8
カソードルミネッセンスの生物研究への応用
木村英二 山田貴穂
牛木辰男 14

ラウンジ

摩周湖の長期的モニタリングについて
厚谷郁夫 18

解 説

日立偏光ゼーマン原子吸光光度計
Z-2000シリーズ
戸辺早人 20
H-9500高分解能TEMの特長とその応用
植木泰光 谷口佳史 23
新規ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂を用いた固相抽出剤の紹介
山本和子 坂元秀之
白崎俊浩 小野哲義
世津育明 小沼哲昭 25
U-4100形分光光度計用アプリケーションのトレンド
株木耕平 29

学会発表ミニファイル 32

新製品紹介

・ H-7650型透過電子顕微鏡の紹介 36
・ 3D解析ホルダーの紹介 36

「我が国自前の先端的研究基盤を創ろう」

Let us Start the Research for Creation of Advanced Research Foundation in Japan

二瓶 好正*

本年度より文部科学省において85億円の予算規模で「先端計測分析技術・機器開発プロジェクト」が発足した。このプロジェクトは知的基盤整備の一環として実現したものであるが、分析化学および分析機器関係者にとっての長年の念願がかない、誠に慶賀にたえない。本プロジェクトの実現のためにご努力頂いたご関係の諸氏に心より感謝申し上げたい。



本年は「先端計測分析機器開発元年」と言ってよい年になったが、我が国の「先端的研究基盤科学技術」の現状を観ると、必ずしも楽観してよい状態ではないことに気がつく。科学技術に関して、世界の中で我が国が占めるべき位置を考えると、今こそ抜本的な改革の端緒を開くべき時であることがご理解いただけるのではないかと思う。

我が国の政府は現在、平成18年度から始まる第3期科学技術基本計画の立案の準備を開始している。これは、平成7年11月に制定された「科学技術基本法」に基づいて平成8年7月に策定された第1期科学技術基本計画と、平成13年からの第2期科学技術基本計画を引き継ぐものである。

先に発表された来年度の政府予算編成の基本方針では、予算総額の抑制が大きく謳われたにもかかわらず、科学技術関係予算だけは2パーセントの増額を予定した。科学技術基本法の精神を政府が重視していることの証左である。

ところで、第1期と第2期の科学技術基本計画では、研究開発投資の大幅拡充を重要政策として掲げ、10年程度を見通した直近5年の具体的な方針・施策を2度にわたって定めてきた。いわゆる、人材育成、研究評価の重視や、競争的資金の拡充等研究開発システムに関することと、ライフサイエンス分野、情報通信分野、環境分野、ナノテクノロジー・材料分野の重点四分野等を重視した政策である。

第3期科学技術基本計画における「先端的研究基盤」の新たな枠組みを考えるために、従来の科学技術政策におけるその位置付けの変遷を振り返ってみたい。

まず、第1期科学技術基本計画の基本的方向を定めるに当たって、踏襲すべき重要な文書として挙げられている答申がある。それは、平成4年1月に出された科学技術会議諮問第18号「新世紀にむけてるべき科学技術の総合

的基本方策について」に対する答申である。

本答申の第3章に重要分野の研究開発の推進についての記述があるが、その中で、物質・材料系科学技術、情報・電子系科学技術、ライフサイエンス等と並んで、「先端的基盤科学技術」の項目がある。その中に、下記のような極めて示唆に富んだ記述があることにご注目頂きたい。

「超高精度な計測・分析技術、マイクロエンジニアリング技術、ナノ技術等、異なる科学技術分野で共通的に利用される先端的な手法は、各分野の更なる発展の牽引力となり、異分野間の相互乗り入れを促進し、新しい応用分野を開拓したり、従来の発想では解決が困難であった課題に、新たな解決の手段を提供するものであり、これらの研究開発を推進する。」政府は、以上のような重要な分野の研究開発を適切な研究評価の下に、精力的かつ効果的に実施し、又は支援する必要がある、と述べている。

ところが、このような答申を踏まえて起草されたはずの第1期科学技術基本計画では、その記述に大きなニュアンスの違いが生じていた。すなわち、第1章の「望ましい研究開発基盤の実現」の中では、「美しいキャンパス、静穏でゆとりのある研究室の整備」や「我が国の大学・国立試験研究機関等における施設・設備の老朽化、狭隘化を改善し、高度な研究施設と最先端の研究設備の整備」を推進する、と記述されている。また、「研究開発等の効率的な推進のためには、試験・計測・調査法等の改良・標準化、計量標準、研究開発に使う材料の質・量両面での安定供給及び安全性・信頼性の確保等が必要である。このため、各種計量標準・試験評価方法の充実整備、遺伝資源等の研究材料の円滑な供給を図る等研究開発に係る知的基盤の整備を推進する」と述べられている。これでは研究基盤というより、社会基盤整備に近い。

以上のような第1期科学技術基本計画における「ボタンの掛け違い」はその後に大きな影響を及ぼすことになってしまった。さすがに第2期基本計画では、以下に示す通り、若干の軌道修正が施されたとはいえる。前述の「答申」の精神から離れた事項が混在し、本来の重点研究分野の項目として十分に顕在化していない、と言わざるを得ない。

第2期科学技術基本計画の第2章 項の「7. 科学技術振興のための基盤の整備」においては、(1) 施設・設備の計画的・重点的整備、(2) 研究支援の充実、(3) 知的基盤の整備、(4) 知的財産権制度の充実と標準化への積極的対応、(5) 研究情報基盤の整備、(6) ものづくりの基盤の整備、(7) 学協会の活動の促進等が記載されている。この中で、(3)において以下のように述べられている。

「研究者の研究開発活動、さらには広く経済社会活動を安定的かつ効果的に支える知的基盤、すなわち、研

究用材料（生物遺伝資源等）、計量資源、計測・分析・試験・評価方法及びそれらに係る先端的機器、並びにこれらに関連するデータベース等の戦略的・体系的な整備を促進する。」

幸いに平成12年から平成14年までの3年間に、白川、野依、田中三先生によるノーベル化学賞の受賞があり、特に田中先生の業績が分析化学の分野であったことから、世の中の見方が大きく変わった。すなわち先端機器開発が科学技術の趨勢を変えるほどのインパクトを有する重要な研究課題であることが示されたのである。

第3期科学技術基本計画では、原点に戻って、「超高精度な計測・分析技術、マイクロエンジニアリング技術、ナノ技術等異なる科学技術分野で共通的に利用される先端的な手法は、各分野の更なる発展の牽引力となり、重要な研究分野である」との認識の下に、「先端的研究基盤の充実強化」を、我が国の戦略的重点研究課題とするための議論を巻き起こすべきではないか、と考える次第である。

我が国は、自前の先端的研究基盤を創りだすための研究を全力を挙げて開始すべきなのである。

著者略歴

二瓶 好正（昭和15年7月1日生）

「所属・専門」
東京理科大学理工学部 教授
東京理科大学総合研究所 所長
工業分析化学、物質情報工学、環境計測化学

「学歴・職歴」
昭和38年3月 東京大学工学部工業化学科卒業
昭和43年3月 東京大学工学系大学院博士課程工業化学専攻 単位取得後退学
昭和43年4月 東京大学工学部 助手
昭和49年7月 東京大学工学部 講師
昭和51年12月 東京大学生産技術研究所 助教授
昭和62年3月 東京大学生産技術研究所 教授
平成10年4月 東京大学環境安全研究センター センター長
平成13年4月 東京理科大学理工学部 教授
平成13年5月 東京大学 名誉教授
平成16年4月 東京理科大学総合研究所 所長

「受賞歴」
昭和63年4月 日本化学会学術賞
平成8年3月 日本鉄鋼協会技術論文賞
平成8年9月 日本分析化学会学会賞
平成12年9月 日本表面科学会技術賞
平成15年5月 日本表面科学会学会賞
平成15年9月 環境科学会学会賞

報文

遺伝子トランジスタによる分子認識の電気的検出

Electrical Detection of Molecular Recognition Using Genetic Field Effect Transistor

宮原 裕二*

きる技術として期待されている。従来のDNAチップ/DNAマイクロアレイの多くは蛍光検出方式であるが、近年電流検出方式も報告されており、様々な手法が考案されている⁽⁹⁾。我々の研究グループでは、従来の方式とは異なり、電界効果トランジスタ（Field Effect Transistor, FET）を用いた電位計測方式DNA検出技術（遺伝子トランジスタ）を提案している。遺伝子トランジスタはFETのゲート表面にDNAプローブを固定化する構造であり、試料溶液を導入することによりターゲットDNAとゲート上で二本鎖を形成させる。DNAは水溶液中で負電荷を有しているため一本鎖（DNAプローブ）から二本鎖の形成による電荷密度変化を遺伝子FETにより直接電気信号に変換して検出することが可能である。

本報告では、まずゲート上で起こる分子認識反応を遺伝子FETにより検出する原理について述べ、この方式に基づきアレル特異的ハイブリダイゼーション、インターラーション、プライマー伸長反応と遺伝子FETとをそれぞれ組み合わせて、遺伝子の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）解析へ応用する試みについて紹介する。

2. 遺伝子FETによる一塩基多型検出の基本原理

遺伝子FETを用いたDNAの電位測定系を図1に示す。遺伝子FETのゲート絶縁膜表面にオリゴヌクレオチドプローブを固定化し、Ag/AgCl参照電極と共に試料溶液中に浸漬する。溶液の電位は参照電極により制御・固定され、ハイブリダイゼーションなどの分子認識反応に伴う電荷密度変化を電界効果を利用して検出する。図2には、オリゴヌクレオチドプローブを固定化した遺伝子FETと3種類の分子認識反応、即ちハイブリダイゼーション、インターラーション、プライマー伸長反応との組み合わせによる表面電荷密度変化の概念図を示す。まず、図2(a)に示すように、ターゲットDNAを含有する試料溶液を導入するとハイブリダイゼーションによりゲート上で二本鎖DNAが形成される。DNA分子は水溶液中でリン酸イオンに起因する負の電荷を有しているため、約150nmの厚さのゲート



1. はじめに

近年、マイクロ・エレクトロ・メカニカル・システム（Micro Electro Mechanical Systems, MEMS）技術を分析化学、分子生物学、医療、化学工業などの分野に応用する研究が活発に行われ、マイクロ化学分析システム（Micro Total Analysis System, μ-TAS）あるいはLab-on-a-chipという新しい分野が形成されている。これは、半導体微細加工技術により製作される流路・ポンプ・バルブなどの流体制御素子と、分析のための検出部、センサ、エレクトロニクスとを集積化した化学分析システムである⁽¹⁾。化学、バイオ、医療分野の分析において、試料の前処理から試薬との混合、化学反応、検出など必要とされるすべての機能をワンチップに集積化し、各工程を一貫処理することがその基本的な概念である。このようなシステムは、従来のバイオ・化学分析装置に比べて(1)小型・低価格、(2)試料や試薬の微量量化によるランニングコストや環境への負荷の低減、(3)化学反応場の局所化による分析時間の短縮、などの特長を有する。さらに小型化およびマイクロセンサや信号処理回路との集積化を通じ、並列処理による高スループット分析、ベッドサイドにおける臨床検査、オンライン環境モニタリングなど新しい利用形態をも可能にするものと考えられる。マイクロTAS分野の技術開発は日進歩であり、シリコンの他、ガラス、高分子などの材料、マイクロからナノメートルの加工技術を基盤として、電気泳動、DNAチップ、クロマトグラフ、フローインジェクション、生化学分析、蛋白質分析・細胞分析などを始めとする、広範囲のバイオ・化学分析技術への応用が研究されている。特に小型化、並列処理というマイクロTASの特長を生かすことができる分野への応用、あるいは新しい分野の開拓が重要である。

2003年4月、ヒトゲノムの全塩基配列解読が完了し、その成果を基盤とする遺伝子機能解析が活発に行われている⁽¹⁾⁻⁽²⁾。DNAチップ/DNAマイクロアレイはその中で主に遺伝子発現解析に有効な技術として普及している⁽³⁾⁻⁽⁸⁾。さらに将来のテラーメイド医療を目指して、遺伝子検査用DNAチップの開発も進められており、ゲノムDNA配列の個人差を簡便に調べることがで

* (独立行政法人)物質・材料研究機構 生体材料研究センター
バイオエレクトロニクスグループ ディレクター

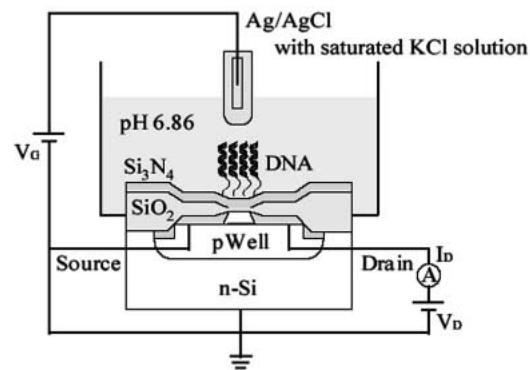


図1 遺伝子FETの電気的特性の測定

絶縁膜を挟んで電荷を持つDNA分子（サンプル中）と電子（シリコン中）が静電的に相互作用する状態を実現することができる。ゲート絶縁膜表面のDNA分子の電荷密度変化に応答してシリコン表面（チャネル）の電子密度が変化するため、ドレイン電流を測定することにより、原理的にDNAのハイブリダイゼーションを検出することができる。

次に、図2(b)には、インターラーニングによるゲート表面の電荷密度変化を示してある。インターラーニングは通常蛍光試薬としてDNAの検出に用いられているが、本研究ではインターラーニングが正電荷を有することに着目した。インターラーニングは二本鎖DNAとのみ反応するので、ターゲットDNA分子の非特異吸着による信号の影響を受けずに、ハイブリダイゼーションに基づく二本鎖DNAの信号のみを検出することができる。

さらに、ゲート絶縁膜表面でのDNA伸長反応による表面電荷密度の変化の様子図2(c)に示す。ターゲットDNAより塩基長の短いオリゴヌクレオチドプローブをゲート表面に固定化し、ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼ、dNTPの導入により伸長反応を行

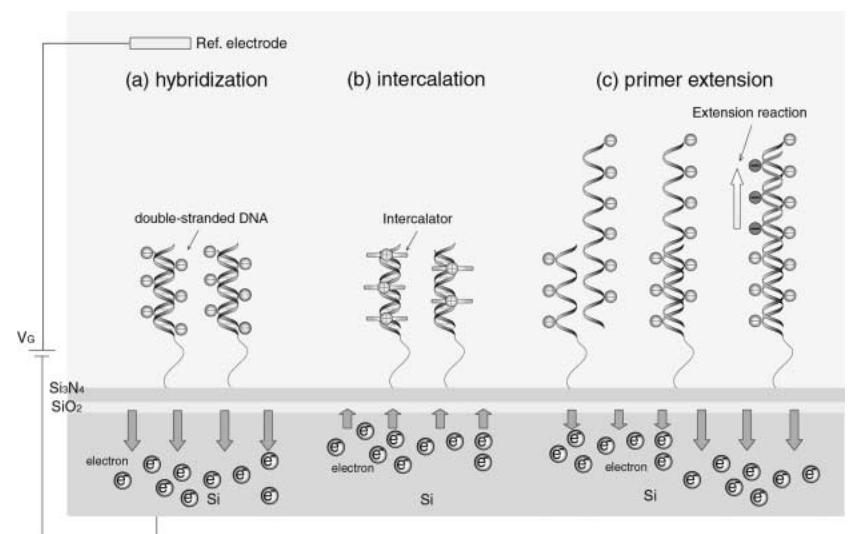


図2 遺伝子FETによるゲート絶縁膜表面での各種DNA認識反応の検出

わせるとオリゴヌクレオチドが合成される。伸長合成されたオリゴヌクレオチド分だけ負の電荷が増加することになる。その変化を遺伝子FETにより直接電気信号に変換することで、DNAプローブ末端の塩基の違いの検出を行うことが可能である。特に、図3(a)に示すように、5'末端側をゲート絶縁膜表面に固定化し、3'末端側がSNP部位となるようにDNAプローブを設計すると、ターゲットDNAが末端のSNP部位で相補的であれば、その後のDNAポリメラーゼ導入による伸長反応により電荷密度が増加し電気シグナルが得られる。それに対して、図3(b)に示すように、末端のSNP部位がミスマッチの場合、DNAポリメラーゼを導入しても伸長反応は起きず電気シグナルは得られない。即ち、DNAプローブの塩基配列を設計することにより、DNA伸長反応を利用した一塩基多型の電気的検出が可能になる。

3 . 実験方法

3-1 FETチップ

本研究で実験に用いたFETチップの写真を図4に示す。ゲート絶縁膜は $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ であり、nチャネルデプレッシャン型のFETである。5mm角のチップに16個のFETが集積化されており、オリゴヌクレオチドプローブの最適化により複数SNPの並列解析を行うことができる。

3-2 DNAプローブの固定化

本研究ではFactor 遺伝子を用いて遺伝子FETを評価した。オリゴヌクレオチドの塩基配列（血液凝固因子のFactor 遺伝子；R353Q, -122), 5'末端の化学修飾、解離温度 (Melting Temperature, Tm) は参考文献(10)を参考にした⁽¹⁰⁾。FETのゲート絶縁膜表面 (Si_3N_4)へのDNAプローブの固定化方法にはアミノシラン法を用いた。

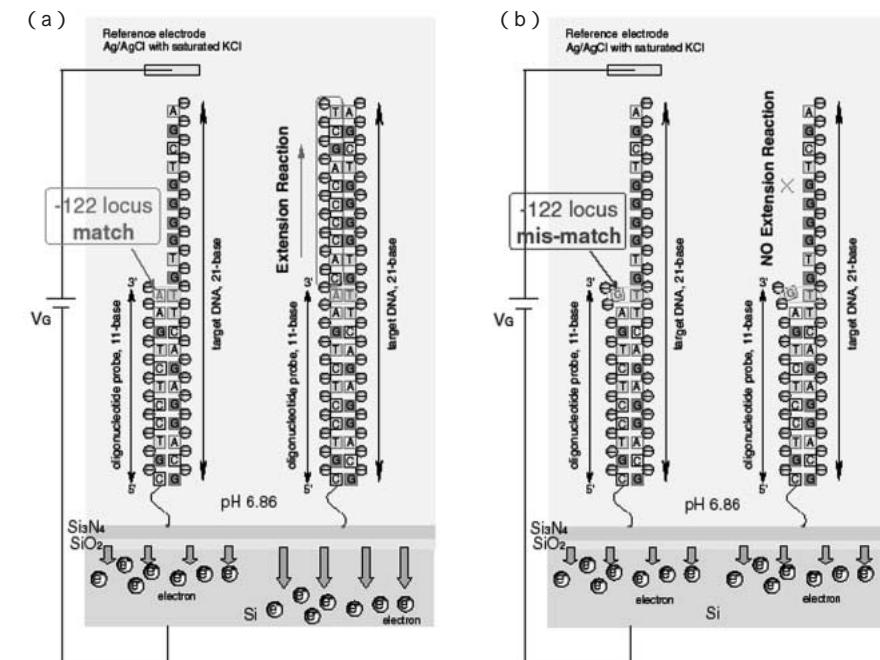


図3 DNA伸張反応による一塩基多型検出法

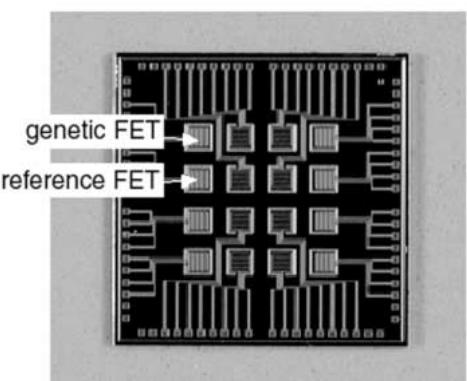


図4 集積化遺伝子FETチップの写真

3-3 ハイブリダイゼーション

一塩基多型の高精度検出にはハイブリダイゼーション及び洗浄時の温度を塩基配列にあわせて制御することが重要である⁽¹⁰⁾。そのため、normal型DNA及びmutant型DNAの検出にはそれぞれの解離温度である60°及び57°に温度を制御してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、各々前記の温度で洗浄し、りん酸緩衝溶液 (pH 6.86) 中にて電気的特性の評価を行った。

3-4 インターカレーショ

本研究ではインターラーニングとしてHoechst33258, Hoechst33342, DAPI, Ethidium Bromide (EB), Propidium Bromide (PI)を用いた。各インターラーニングは、溶液中で正電荷を有し、二本鎖DNAと結合することが知られている。

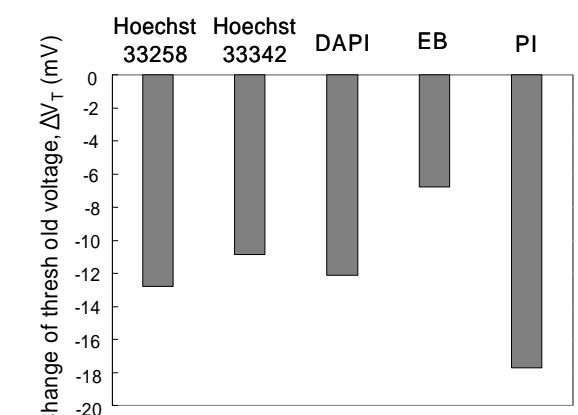
3-5 DNA伸長反応

DNA伸長反応を利用した一塩基多型検出には、-122SNP (21塩基) サイトをモデル試料として用いた。DNAプローブとして3'末端側がSNP部位となるような11塩基の合成オリゴヌクレオチドを用いた。ターゲットDNAとのハイブリダイゼーション後、dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各5mM) を含む混合溶液を72°で保持し、その中に遺伝子FETを浸漬後、DNAポリメラーゼを導入することでゲート絶縁膜表面で伸長反応を行わせた。

4 . 分子認識反応の検出

4-1 遺伝子FETの電気特性変化

R353Q遺伝子 (17塩基) におけるnormal型DNAプロ

図5 各種インターラーニング導入による V_t 変化

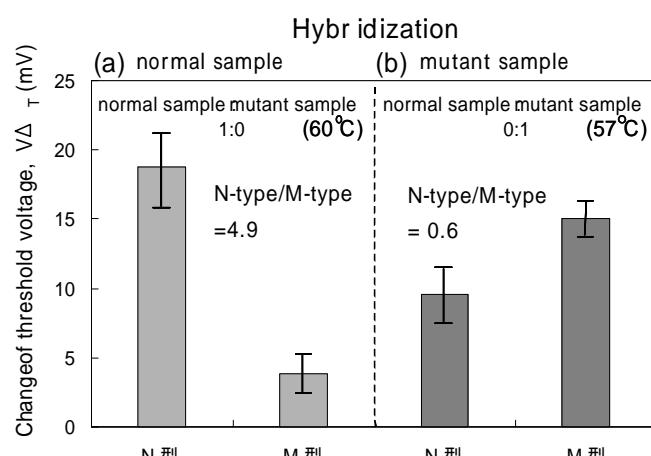


図6 遺伝子FETによる一塩基多型の検出

ロープの固定化による遺伝子FETの伝達特性(V_g - I_d 特性)変化を測定した。 I_d 一定(600 μA)条件下では、DNAプローブの固定化により、しきい値電圧 V_t が正方向に約+32mVシフトした。この V_t 変化はアミノシラン処理、DNAプローブの固定化、さらにはグリシンによるブロッキングの工程の電荷が加算されて生じたものである。正方向へのシフトからゲート絶縁膜表面には負電荷が誘起されたことがわかる。この遺伝子FETを用い、ターゲットDNAとのハイブリダイゼーション、インターラーカレーター導入の各工程におけるFETのしきい値電圧 V_t の変化を調べた。ハイブリダイゼーションの後、 V_t がさらに正方向にシフト(+12mV)した。引き続き、インターラーカレーターとしてHoechst33258を導入すると V_t は負の方向にシフト(-14mV)することが明らかとなった。このような電気特性の変化は、ターゲットDNAが負電荷を有していること、及びHoechst33258インターラーカレーターが正電荷を有していることを考慮すると説明することができる。図5には種々のインターラーカレーター導入による V_t 変化を示す。

各インターラーカレーターは溶液中で正電荷を有するこ

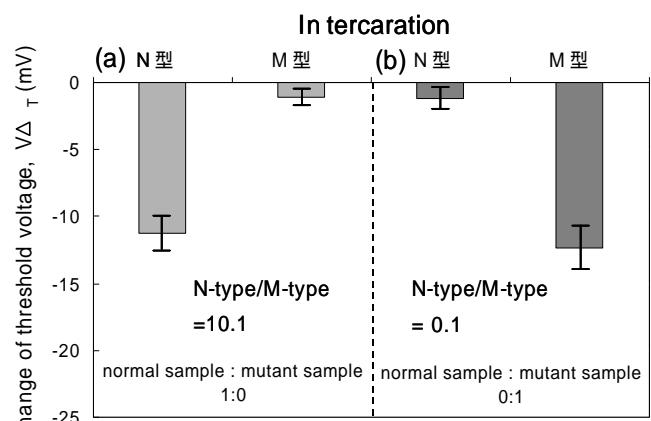


図7 インターカレーターによる一塩基多型の検出

とから、 V_t はいずれも負の方向にシフトすることがわかる。変化量に違いが見られるのは各インターラーカレーターの電荷数や二本鎖DNAとの吸着様式が異なるためであると考えられる⁽¹¹⁾。

以上のように、遺伝子FETを用いることにより、ゲート表面で起こるDNAのハイブリダイゼーション及びインターラーカレーターとの反応をしきい値電圧の変化として検出できることが確認できた。

5. 遺伝子FETによる一塩基多型の検出

5-1 アレル特異的ハイブリダイゼーション

遺伝子FETを用い、解離温度の違いを利用して一塩基多型(SNP)検出について検討した(図6)。Factor

遺伝子R353Qのnormal型に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブを固定化したN型遺伝子FETとmutant型に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブを固定化したM型遺伝子FETの2種類の遺伝子FETを準備した。normal型の合成オリゴヌクレオチドを含む試料溶液と60°でハイブリダイゼさせたときの V_t の変化を図6(a)に示す。normal型試料DNAと完全相補鎖であるN型遺伝子FETでは大きな V_t 変化が得られ、一塩基だけ異なるM型遺伝子FETの V_t 変化は小さかった。各遺伝子FETにおける V_t 変化の比(N型遺伝子FETの V_t 変化/M型遺伝子FETの V_t 変化)は、4.9であった。これより、遺伝子FETのしきい値 V_t の変化を測定することにより一塩基の違いを検出できることがわかった。図6(b)にmutant型の合成オリゴヌクレオチドを含む試料を57°で導入したときのN型、M型各遺伝子FETの V_t 変化を示す。完全相補鎖であるM型遺伝子FETの V_t 変化は大きく、一塩基異なるN型遺伝子FETの V_t 変化は小さかった。したがってこの場合も一塩基の違いの検出を確認することができた。しかし、図6(a)に比べて、N型とM型の遺伝

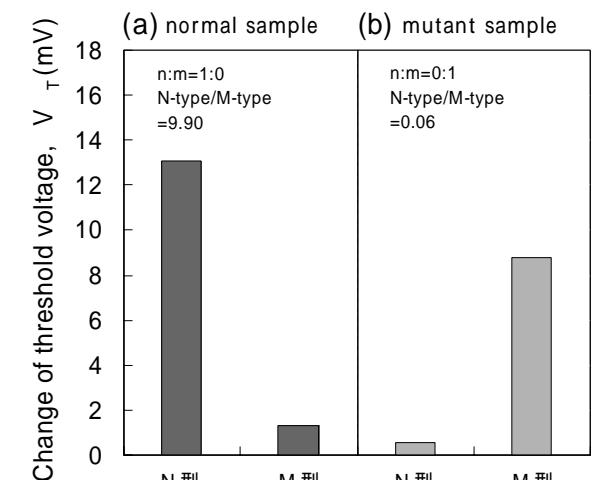


図8 DNA伸張反応を組み合わせた遺伝子FETによる一塩基多型の検出

子FETの V_t 変化の差が小さかった。これはmutant型試料DNAは一塩基異なるN型遺伝子FETにもある程度ハイブリダイゼーションしているためと考えられ、より明確な差を得るにはハイブリダイゼーション温度の最適化が必要であると考えられる。

5-2 インターカレーションによる高精度化

図6に示したN型及びM型の各遺伝子FETにおいて、ハイブリダイゼーション後にHoechst33258を導入したときの V_t 変化を図7に示す。各遺伝子FETの V_t はHoechst33258の正電荷に基づく負方向の変化を示し、図6のハイブリダイゼーション後の V_t 変化と類似のパターンが得られた。変化量はハイブリダイゼーションに基づく変化より小さいものの、 V_t 変化の比がnormal型試料DNAを用いた場合が10.1、mutant型試料DNAとの反応では0.1と、S/N比の高い一塩基多型の検出が可能であることがわかる。

5-3 プライマー伸長反応によるSNP解析

ゲート絶縁膜表面でのターゲットDNAとのハイブリダイゼーション後、プライマー伸長反応させたときのFETのしきい値電圧変化について調べた。伸長反応により遺伝子FETの V_t が、正方向にシフトした。この V_t の変化は、伸長反応に伴うDNA分子固有の負電荷の増加に起因すると考えられる。Factor 遺伝子-122SNP部位を3'末端に有するnormal型及びmutant型のオリゴヌクレオチドプローブ(11塩基)を固定化した2種類の遺伝子FET(N型遺伝子FET及びM型遺伝子FET)を製作した。normal型及びmutant型試料DNA(21塩基)とのハイブリダイゼーション、それに続く伸長反応後の V_t の変化を図8に示す。ハイブリダイゼーション後、伸長反応させると完全相補鎖となる遺伝子FET(図8(a)のN型及び図8(b)のM型)では V_t が9mV~13mV変化するのに対して、末端部位で一塩基のみ異なる遺伝子FET(図8(a)のM型及び図8(b)のN型)では V_t の変化が見られなかった。 V_t 変化の比を見るとnormal型試料DNAを用いた場合が9.90、mutant型試料DNAとの反応では0.06と、S/N比の高い一塩基多型の検出が可能であることがわかる。このような電気特性の変化は、SNP部位の塩基の違いに起因した伸長反応の有無を確実に検出できることを示しており、遺伝子FETはSNPタイピングに有効であると考えられる。

6. おわりに

本報告では遺伝子FETを用いたポテンシオメトリック計測による種々の分子認識検出法を提案した。ハイブリダイゼーション、インターラーカレーション、さらにはプライマー伸長反応を利用することにより、S/N比の高い一塩基多型の検出が可能であることがわかった。

本研究で提案した遺伝子FETを温度制御型DNAチップ⁽¹⁰⁾と組み合わせることにより、高精度なSNP検査技術を確立できると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたりご助言をいただいた物質・材料研究機構 生体材料研究センター 田中順三博士、堀池靖浩博士、大塚英典博士、丸山純夫博士、坂田利弥博士、John Hulme博士に感謝します。

参考文献

- P.P. Zarrinkar et al., "Arrays of arrays for high-throughput genetic expression profiling", Genome Res. 11, pp. 1256-1261, (2001)
- T.A. Carter et al. "Chipping away at complex behavior: transcriptome/phenotype correlations in the mouse brain", Physiol. Behav. 73, pp. 849-857, (2001)
- P. Stephen et al., "Multiplexed biochemical assays with biological chips", Nature 364, pp. 555-556, (1993)
- C.C. Xiang et al., "Amine-modified random primers to label probes for DNA microarrays", Nat. Biotechnol. 20, pp. 738-742, (2002)
- X. Zhao et al., "Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles", J. Am. Chem. Soc. 125, pp. 11474-11475, (2003)
- D.J. Cutler et al., "High-throughput variation detection and genotyping using microarrays", Genome Res. 11, pp. 1913-1925, (2001)
- J. L. David et al., "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", Nat. Biotechnol. 14, pp. 1645-1680, (1996)
- S. Takenaka et al., "DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenyl-naphthalenediimide as the electrochemically active ligand", Anal. Chem. 72, pp. 1334-1341, (2000)
- Park, S. J., Taton, T. A. & Mirkin, C. A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticles probes. Science 295, 1503-1506 (2002)
- Kajiyama, T. et al. Genotyping on a thermal gradient DNA chip. Genome Research 13, 467-475 (2003)
- Boger, D. L. et al., A simple, high-resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity. J. Am. Chem. Soc. 123, 5878-5891 (2001)

キャピラリ高速液体クロマトグラフィ - 質量分析用 ナノフローグラジエント装置

Nanoflow Gradient Generator for Capillary High-Performance Liquid Chromatography
-Mass Spectrometry

出口 喜三郎*

1.はじめに

キャピラリ(マイクロ)高速液体クロマトグラフィ(HPLC)は、1970年代後半に日米欧の3グループによりスタートし、約30年の歴史がある⁽¹⁻³⁾。なかでも、名古屋大学の石井大道先生率いるグループの果たした役割は大きく、しばしば国際学会において“マイクロHPLCの父”と賞賛されていたと記憶している。当時のUV吸収検出器や蛍光検出器を用いたマイクロHPLCを“第一世代”とすれば、汎用性の高いエレクトロスプレイイオン化法(ESI)⁽⁴⁾が開発されて後にスタートした、質量分析計(MS)とマイクロHPLCを結合させたHPLC-ESI MSは“第二世代”と言えるだろう。後者は、いまや複雑で極微量の生体成分(核酸、タンパク、ペプチド、糖鎖、脂質など)の分析には必要不可欠になりつつある。しかし、ルーチン的に使用できる成熟した分析装置の域にはまだ到達しておらず、幾つかの解決すべき技術的課題が残っている。その一つが本報告で述べるナノフロー領域(即ち, nL/min)での安定したグラジエントの実現であると思う。

低マイクロ流量やナノ流量域でのグラジエント溶出をどのように行うかは、“第一世代”からの懸案であった。当時幾つかの原理的方法が提案され、“第二世代”でもそれらの方法がそのままの形や、また少し改良された形で使用されている。それらは大体次のように分類できる⁽⁵⁾：

(1) スプリット法、(2) シリンジポンプによる高圧グラジエント法、(3) 指数関数型希釈(シグモイダル)法、(4) バルブ&ループ法。

(1)のスプリット法は最も簡単な方法として現在でも多用されており、最近、高性能のフローメータと組み合わせて安定なナノフローを実現しようとの試みもなされている⁽⁶⁻⁸⁾。しかし、キャピラリカラム等の圧力変動がそのまま流量変動となるため、再現性の良いデータを連続して収集するには不安がある。(2)の高圧グラジエント法も低マイクロ流量域では実用化されているが、ナノ流量域ではまだ課題がある⁽⁶⁻⁹⁾。(3)の指数関数型希釈法も簡便であり、古くから使用されてき

た方法である。しかしグラジエント形状がS字(シグモイダル)型に限定されてしまうという欠点がある⁽¹⁰⁻¹²⁾。(4)のバルブ&ループ法も、石井らによって提案された方法であり⁽¹³⁾、最近、更に改良発展させた方法が提案されている⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。我々も、原理は(4)のバルブ&ループ法であるが、ナノ流量域でどんなグラジエント形状も再現性良く実現できる方法を考案し、最近発表した^(5,17,18)。本報告では、その原理と特長、性能、キャピラリHPLCおよびHPLC-ESI MSへの応用について紹介する。また、今後の展望についても述べたい。

2.ナノフローグラジエント装置の原理と特長

図1はナノフローグラジエント装置を用いたキャピラリHPLCの構成を示している。点線枠で示された部分がAT10PV(Asymptotic Trace 10-Port Valve)ナノグラジエント装置と呼んでいるものである。本装置は4個のユニットから構成されている：(1)マイクロ流量の低圧(または高圧)グラジエントポンプ、(2)ナノ流量のイソクラテック(シリンジ)ポンプ、(3)10方バルブ(2インジェクションループおよび背圧用コイルも含む)、(4)コントローラ。これら全て市販されているものであり、容易に入手可能なものである。本実験では、2台のポンプには日立L-2100形セミマイクロポンプ(ナノ流量用ポンプは一部改造を行った)を、10方バルブにはUpchurch社製の10-Port NanoPeakバルブを使用した。10方バルブの切り替えはポンプからのイベント信号で行ったので、(4)のコントローラは不要であった。

次にナノフローグラジエント送液がどのように実現されるかについて説明する。グラジエントはマイクロ流量の低圧グラジエントポンプで作製され、ミキサー(M)で十分混合されてから10方バルブに送られる。図1の流路では、インジェクションループAにロードされた後、背圧用コイルを通ってドレインに排出される。この間、インジェクションループBにロードされてい

報文：キャピラリ高速液体クロマトグラフィ - 質量分析用ナノフローグラジエント装置

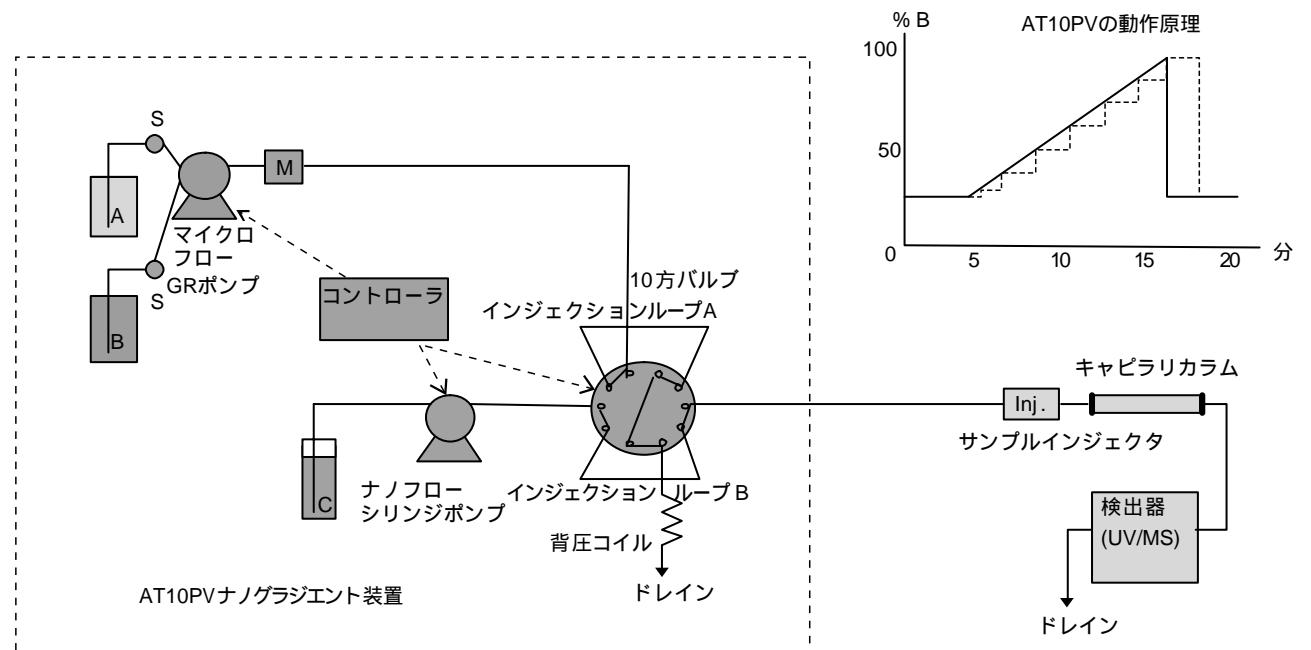


図1 ナノフローグラジエント装置を用いたキャピラリHPLCの構成(点線枠で示された部分がAT10PV(Asymptotic Trace 10-Port Valve)ナノグラジエント装置)

右上部はAT10PVナノグラジエント装置の動作原理の説明図であり、元のマイクロ流量のグラジエントカーブ(実線)とそれをステップ状で追隨するナノ流量グラジエントカーブ(点線)を模式的に示している。

た混合液はナノ流量のイソクラテック(シリンジ)ポンプによりキャピラリカラムに送り出されている。ここで10方バルブを切り替えれば、今までインジェクションループAにロードされていた混合液が送り出され、インジェクションループBには、新たな混合液がロードされる。10方バルブの切り替えを一定時間(例えば、1-2分)毎に繰り返すことによりナノ流量でのグラジエントが実現できる。図1右上のカーブは、その様子を模式的に示している。実線はマイクロ流量の低圧グラジエントポンプで作製されるグラジエントカーブであり、点線はナノ流量でキャピラリカラムに送り出されるグラジエントカーブである。つまり、10方バルブの切り替え時間(この図では2分)毎にステップ状で元のグラジエントカーブに追隨していくことになる。もし、切り替え時間間隔を更に短くすれば、元のグラジエントカーブに“漸近的に(Asymptotically)追隨(Trace)”していくことは容易に理解できると思う。一方、背圧用コイル(またはカラム)の役割は、10方バルブの切り替え時の圧力ショックによるナノ流量の変動を最小限にするためである。ここでもう一つ強調しておきたい点は、イソクラテック(シリンジ)ポンプが送る溶液Cは、実際にはカラムに流れていかず、10方バルブ切り替え時にループに残っていた混合液とともにドレインに排出されることである。従って、グラジエント溶液(A, B)と無関係に選択できる。例えば、ナノ流量イソクラテックポンプとして電気浸透流

ポンプを用いる場合には、キャピラリカラムでの分離とは無関係に電気浸透流に最適な溶液Cを使用することも可能である。また、一定圧力でのナノ流量送液の場合には、ガスピボンベでも良いことになる⁽¹⁵⁾。

3.ナノフローグラジエント装置の性能

それではどの程度、元のグラジエントカーブへの追随性があり、再現性があるのかを、次に実際のデータで示したい。

図2は低圧グラジエントポンプが流量100 μL/minで作製したグラジエントカーブと流量500nL/minと200nL/minで追隨したナノグラジエントカーブを重ね比較したものである。また、挿入部分は30min付近を拡大したものである。500nL/minのカーブには上述の“ステップ”が見えるが、200nL/minの低流量では拡散効果により“ステップ”は完全に消失し、元のグラジエントカーブ並みにスムーズである。しかし、この“ステップ”も、10方バルブ切り替え時間を1分から0.5分に早めることで完全に消失することは確認済みである。また、この実験ではキャピラリカラムを使用していないが、実際のカラム使用時では、切り替え時間1分でもベースラインはスムーズである。

図3は、流量50nL/minでのナノグラジエントカーブの再現性を調べた結果である。また、挿入部分は50min付近を拡大したものである。6回の連続したデータを重ねたものであるが、流量50nL/minにおいてもグラジエ

* 北海道大学 大学院理学研究科 特任助教授(理学博士)

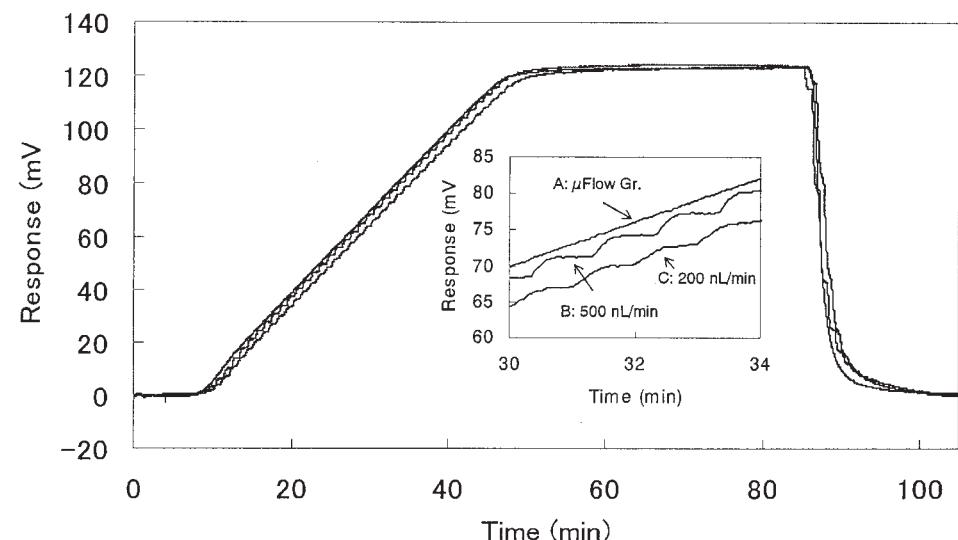
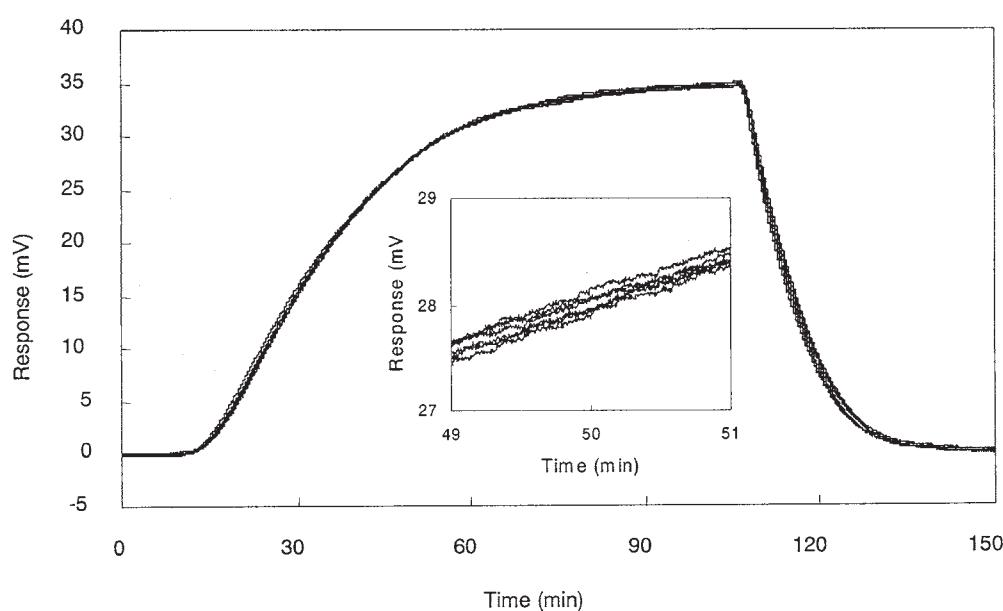


図2 ナノフローグラジエントの追随性と性能

A : マイクロフローGRポンプが流量 $100\mu\text{L}/\text{min}$ で作製した元のグラジエントカープ； B , C : AT10PVナノグラジエント装置で作製された流量 $500\text{nL}/\text{min}$ (B), $200\text{nL}/\text{min}$ (C)でのナノフローグラジエントカープ； 溶離液A : 水, B : 0.2% アセトン溶液； グラジエントプログラム (%B) : 0 (0.0min) 100 (40 min) 100 (80 min) 0 (80.1 min) 0 (105 min)； 検出波長 : 250 nm (センシュー社製SSC-5430検出器)； 10万バルブ切り替え周期 : 1 min.

図3 流量 $50\text{nL}/\text{min}$ でのグラジエントカープの再現性 (N=6)

溶離液A : 水, B : 0.2% アセトン含む80%アセトニトリル溶液。他の条件は図2と同じ。挿入図は50 min付近の6回のナノフローグラジエントカープの拡大を示す。

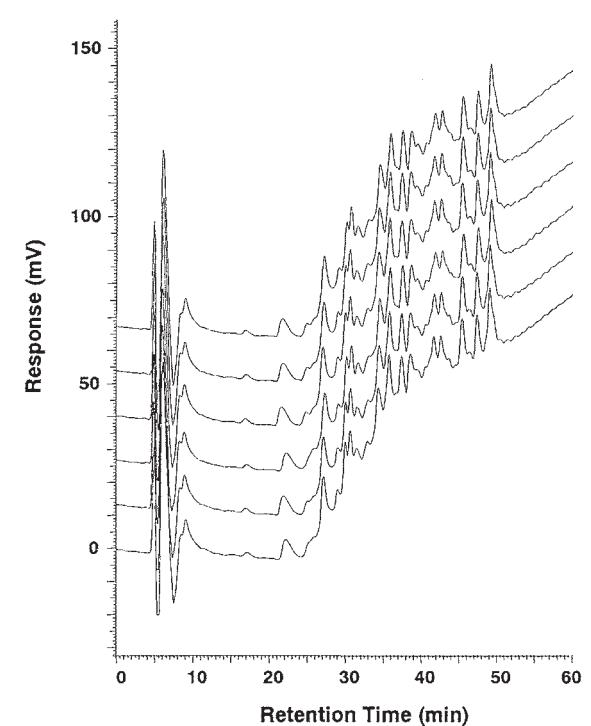
ント再現性が非常に良いことが分かる。

図4は、BSA (Bovin Serum Albumin) (150fmol) のトリプシン消化ペプチドをキャピラリカラム (ODS, 75 μm × 150mm) を使用し、流量 $200\text{nL}/\text{min}$ で分析したクロマトグラムを示している (分析条件は図下に記述)。ここでも連続6回のデータを重ね比較しており、表1には主なピークの保持時間の再現性がまと

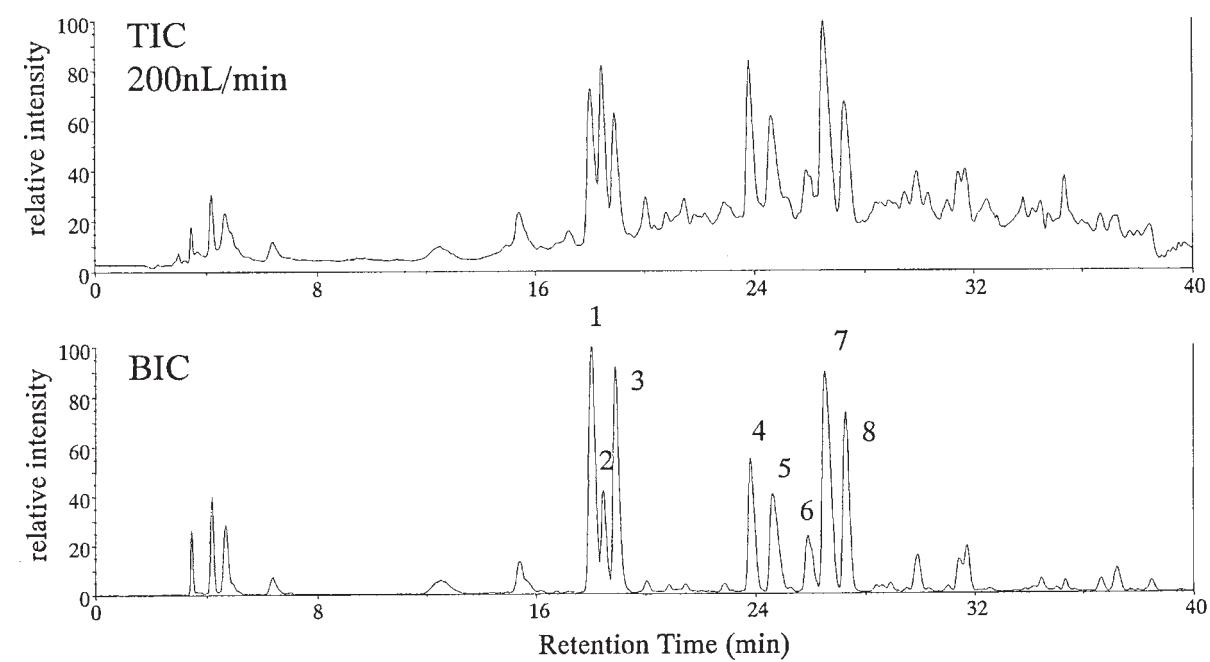
められている。流量 $200\text{nL}/\text{min}$ での相対標準偏差 (RSD) 0.3%以下は、通常のマイクロ流量での再現性結果と比較してもまったく遜色がないと言える。

4. キャピラリHPLC-ESI MSへの応用

“はじめに”にも述べたが、1984年に山下とFennおよびAleksandrov等によりESIが開発されてすぐに、

図4 BSAトリプシン消化ペプチド分析の再現性 (流量 $200\text{nL}/\text{min}$)

キャピラリカラム : Micro-Tech Scientific社製 VC-15-C18W-75 (ODS, 75 μm × 150mm)； 検出波長 : 214nm； 溶離液A : 0.1% ギ酸水溶液, B : 0.01% TFA (トリフロロ酢酸) 含む95%アセトニトリル溶液； グラジエントプログラム (%B) : 0 (0.0min) 100 (60 min) 100 (70 min) 0 (70.1 min)。

図5 BSA (150 fmol) トリプシン消化ペプチドのマイクロHPLC-MS分析 (流量 $200\text{nL}/\text{min}$)

MS : AB社製Mariner； キャピラリカラム : NewObjective社製ProteoPep C18 (ODS, 75 μm × 50mm; 15 μm Tip)； 溶離液A : 0.1% ギ酸水溶液, B : 0.1% ギ酸水溶液含むアセトニトリル溶液； グラジエントプログラム (%B) : 0 (0.0min) 0 (4.0 min) 50 (40 min) 100 (40.1 min)。

ESIIはLCとMSを結ぶ有力なインターフェイスになるであろうと期待された⁽⁴⁾。つまり，“第二世代”の幕開けである。ちょうど時を同じくして，Karas, Hillenkampf, 田中ら^(19,20)によって開発されたMALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) 法と共に，現在最も汎用的なソフトイオン化法として使用されるに至っている⁽²¹⁾。またこの間に，一層の高感度化を目指してマイクロ/ナノESIが開発され^(22,23)，マイクロHPLC-MSの主流になりつつある。次に，上述のナノフローグラジエント装置をマイクロ/ナノESI MSに応用した例を示したい。

図5はBSA (150fmol) をトリプシン消化後，キャピラリHPLC-ESI MSで分析した例である。使用したキャピラリカラムはESIニードルを一体化させたNew Objective社製ProteoPep C18 (ODS, 75 μm × 50mm; 15 μm Tip) である。TIC (Total Ion Chromatogram) やBIC (Base Ion Chromatogram) から分かるように，UVでは検出できない多くのピークが見られる。図6は主なピークの質量 (MS) スペクトルとペプチドシーケンス帰属を示している。このように感度 (S/N) の良いMSスペクトルが得られるのと同時に，1価イオンよりも2, 3価イオンが強く検出されるのもナノESIの特徴である。この例は流量200nL/minでの測定であるが，流量50nL/minでも，ピーク保持時間の再現性の良い

(RSD1%以下) データが得られている⁽¹⁸⁾。

5. 今後の展望

2003年は，“ヒトゲノムシーケンス”が解明され生命科学にとって記念すべき年となった。また，その翻訳により生体内で合成されるタンパク質や代謝系を網羅的に解析する“プロテオーム（グライコプロテオームやメタローム含む）”や“メタボローム”的新たな幕開けともなった。ハイスクレットDNAシーケンスがゲノム解析に大きな役割を果たしたのと同様に，複雑で，極微量サンプルを対象とするプロテオーム解析やメタボローム解析におけるキャピラリ（マイクロ）HPLC-ESI MSへの期待は，今後一層高まって行くであろう。特に，ダイナミックレンジが5桁以上にも及ぶ多成分サンプルを分析対象とするこの分野では，キャピラリカラムのみならず分離システム全体の性能向上が一層重要になる。従って，一種の分離モードから複数の分離モードを組み合わせた“多次元HPLC & HPCE”が分離分析科学の分野で盛んに議論されている所以であり，また近い将来，“第三世代”的到来を予感させるような勢いもある。ここで報告したナノフローグラジエント装置が，多少なりともそれに貢献できればと願っている。

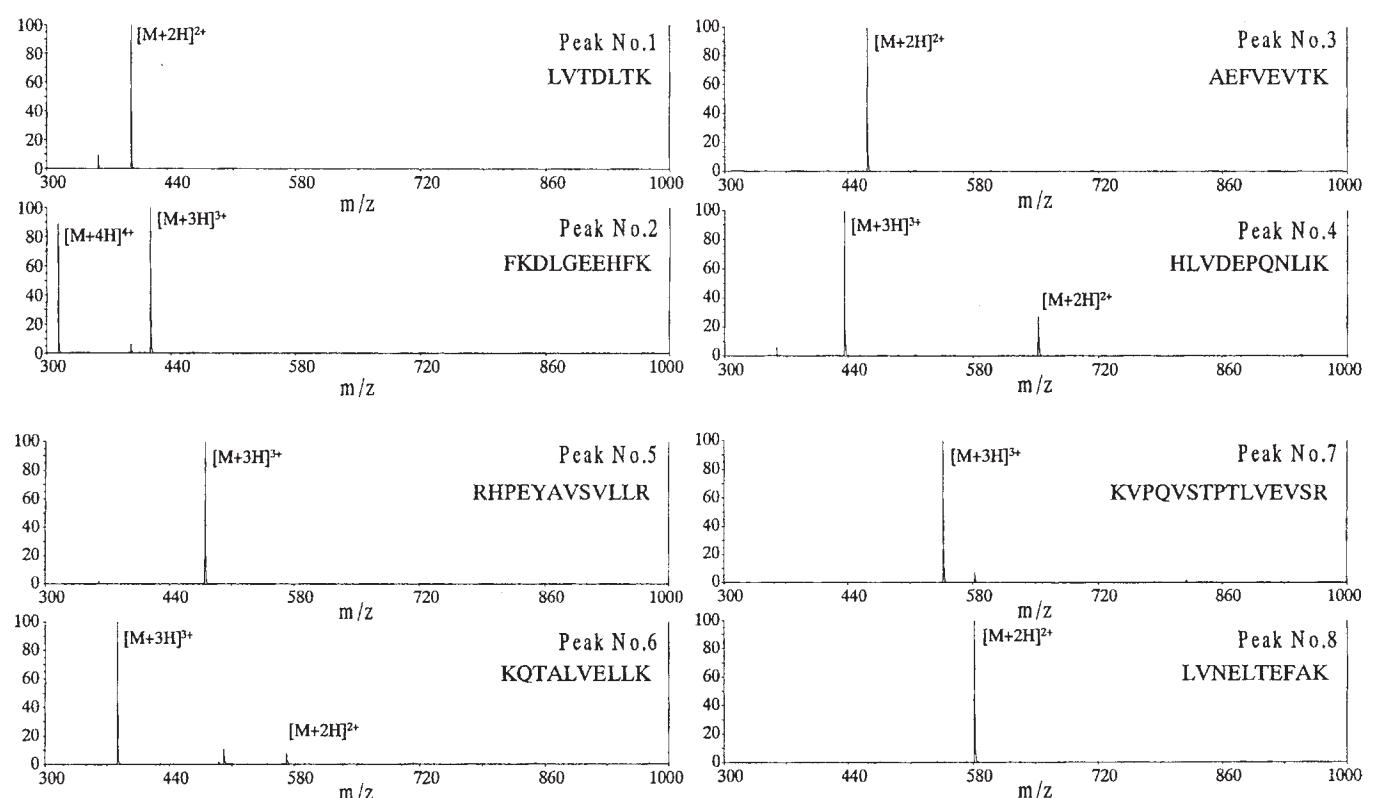


図6 BSA (150fmol) トリプシン消化ペプチドのMSスペクトルと同定(図5の8ピーク)

謝辞

本研究は(株)日立ハイテクノロジーズの方々と共同で行ったものであり，また，日立中央研究所の内田氏のグループと日立機械研究所の高尾氏のグループの協力を得て行われたものである。心から感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Scott R P W ; Kucera P, J. Chromatogr. 1976, 125, 251.
- (2) Ishii D ; Asai K ; Hibi, K ; Jonokuchi T ; Nagaya, M, J. Chromatogr. 1977, 144, 157.
- (3) Tsuda T ; Hibi K ; Nakanishi T ; Takeuchi T ; Ishii, D, J. Chromatogr. 1978, 158, 227.
- (4) (a) Whitehouse C M ; Dreyer R N ; Yamashita M ; Fenn J B, Anal. Chem. 1985, 57, 675.
(b) Aleksandrov M L ; Gall L N ; Krasnov N V ; Nikolaev V I ; Shkurov V A, Zh. Anal. Chem 1985, 40, 1227.
- (5) Deguchi K ; Ito S ; Yoshioka S ; Ogata I ; Takeada A, Anal. Chem. 2004, 76, 1524.
- (6) Hirata Y ; Novotny M, J. Chromatogr. 1979, 186, 521.
- (7) Van der Wal S ; Yang F J, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 1983, 6, 216.
- (8) Chervet J P ; Ursem M ; Salzmann J P, Anal. Chem. 1996, 68, 1507.
- (9) Takeuchi T ; Ishii D, J. Chromatogr. 1982, 239, 633.
- (10) Takeuchi T ; Ishii D, J. Chromatogr. 1982, 253, 41.
- (11) Ishii D ; Hashimoto Y ; Asai H ; Watanabe K ; Takeuchi T, J. High Resolut. Chromatogr. 1985, 8, 543.
- (12) Bihan T L ; Pinto D ; Figeys D, Anal. Chem. 2001, 73, 1307.
- (13) Takeuchi T ; Niwa T ; Ishii D, J. Chromatogr. 1987, 405, 117.
- (14) Davis M T ; Stahl D C ; Lee T D, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995, 6, 571.
- (15) Takeuchi T ; Lim L W, Bunseki Kagaku, 2001, 50, 825.
- (16) Natsume T ; Yamauchi Y ; Nakayama H ; Shinkawa T ; Yanagida M ; Takahashi N ; Isobe T, Anal. Chem. 2002, 74, 4725.
- (17) Ito S ; Yoshioka S ; Ogata I ; Takeda A ; Yamashita E ; Deguchi K, J. Chromatogr. A. 2004, in press.
- (18) Ito S ; Ogata I ; Yamashita E ; Yoshioka S ; Deguchi K, Proceeding of 52nd ASMS (Nashville, USA) 2004.
- (19) Karas M ; Hillenkamp F, Anal. Chem, 1985, 57, 2935.
- (20) Tanaka K ; Waki H ; Ido Y ; Akita S ; Yoshida Y ; Yoshida T, Rapid Commun. Mass Spectrom, 1988, 2, 151.
- (21) Pramanik B N ; Ganguly A K ; Gross M L Eds. Applied Electrospray Mass Spectrometry ; Marcel Dekker : New York, 2002.
- (22) Wilm, M. S ; Mann M, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, 1994, 136, 167.
- (23) Emmett M R ; Capriori, R M, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994, 5, 605.

カソードルミネッセンスの生物研究への応用

Application of cathodoluminescence to biological studies

木村 英二^{*1} 山田 貴穂^{*2} 牛木 辰男^{*3}



1.はじめに

走査電子顕微鏡(SEM)は、物質の表面形状を三次元的に観察できることから、材料分野のみならずライフサイエンス分野においても広く利用され、種々の生体組織の立体微細構造の解明に役立ってきた。しかしつ従来の二次電子を用いたSEM観察法では、細胞や組織の化学的性状や物質を立体形状とともに解析することはできない。そこでこの問題を克服するために二次電子とは異なる信号(反射電子やカソードルミネッセンス)による観察がこれまで試みられてきた。ここでは、私たちが最近(株)日立サイエンスシステムズや物質材料研究機構と共同で研究を進めてきた、カソードルミネッセンスの生物研究への応用について紹介する。

2.研究の経緯

私たちは(株)日立サイエンスシステムズと共同で超高分解能低真空SEMの開発を行ってきた。これにより、金属コーティング等の導電処理を施さなくても標本の高分解能観察が可能となった。またこの研究開発の過程で、超高分解能低真空SEMとカソードルミネッセンス(CL)検出法を組み合わせた新しいSEMを開発すれば、生物試料の蛍光SEM観察が可能になるのではないかという発想が生まれた。

カソードルミネッセンス(陰極蛍光;CL)は、電子線が試料に照射された際に、物質から発せられる微弱な光である。従来の高真空SEMでは、標本から発せられるCLが金属コーティングにより隠されるという難点があったが、低真空SEMではこの問題が解決されることになる。その際、蛍光SEM観察法を実現するには、低真空SEMに適したCL検出法の開発が必要であり、生物試料の微弱蛍光に適した高感度化も重要である。そこでまず超高分解能低真空SEMにCL検出法を組み合わせた新しいSEMの開発を行った。

3.装置の概要(図1)

高真空SEMでは二次電子像を用いて立体形状像を得るが、低真空SEMでは、反射電子像、吸収電流像を用いて無コーティング試料の立体構造情報を得るのが一

般的である。したがってこうした像と同時に高感度のCL像が得られるCL検出器が必要である。CL検出装置はCLを集光するための集光ミラーと集光したCLを分光部に導くための光ファイバーからなる集光部、CLの分光と検出を行う分光部、および検出した信号を画像として表示する画像処理部から構成される。そこで、生物試料からの微弱なCLを検出するために、集光部に短い作動距離(10mm)に対応した高効率集光ミラーと低損失光ファイバーを採用し、分光部では、ダイクロイックミラーによる分光後、フォトンカウンティング方式で光情報を検出する方法をとった。これにより、生物試料から発生する微弱なCLを分光し検出することが可能となった。また、電子線照射による試料や染色材料へのダメージを軽減するため、電子線の走査速度、走査点数を適切に設定できる機能、さらに二次電子像や反射電子像と同一視野のCL像を同時に取込む機能を開発した。この新しいCL検出器を、低真空SEM(日立S-4300SE/N)に組み合わせたもので生物試料への応用を試みた。

4.生物試料への応用

4-1 伊東細胞の脂肪滴

肝臓の伊東細胞は、ビタミンAを細胞内の脂肪滴に貯蔵することが知られている。このビタミンAは、特有の自家蛍光を発することが知られているが、同時にCLを発することも過去に報告されている¹⁾。私たちは、この伊東細胞の反射電子(BSE)像とCL像を低真空状態で観察した。その際、ラットに事前にビタミンAを過剰に投与して伊東細胞内の脂肪滴を増加させ観察しやすいうようにした。標本は、ホルマリンで固定した後、厚さ100μmに薄切りシリコン板上に載せた。その後、蒸留水に濡れた状態で試料室に入れ、冷却ステージで0℃に冷却しながら、300Paから250Paの状態で乾燥さ

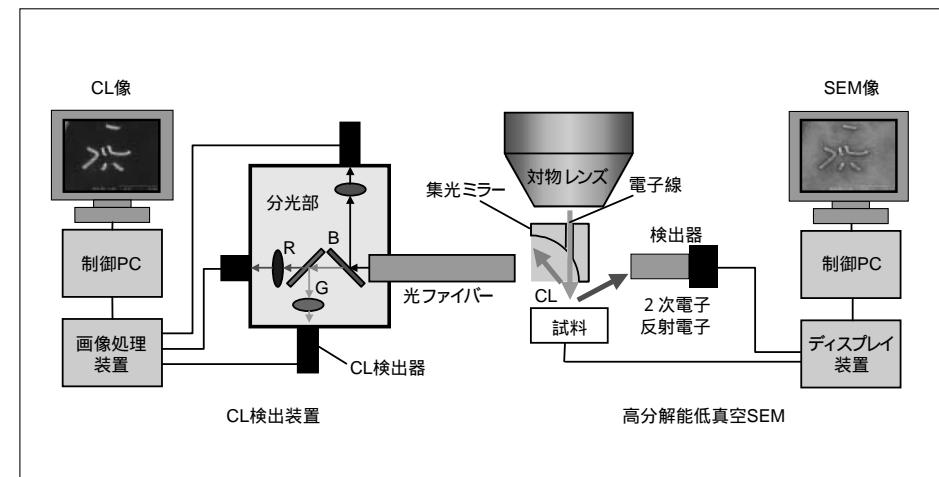


図1 蛍光SEMの模式図

せ、40Paの低真空状態でBSE像とCL像を観察した。その結果、伊東細胞に貯えられた脂肪滴はCL像で明るく発光して観察された(図2)。肝臓の伊東細胞のビタミンAのCL像は、かつてクライオSEMにCL検出器を組み合わせた装置を用いた報告があるが¹⁾、あえてクライ

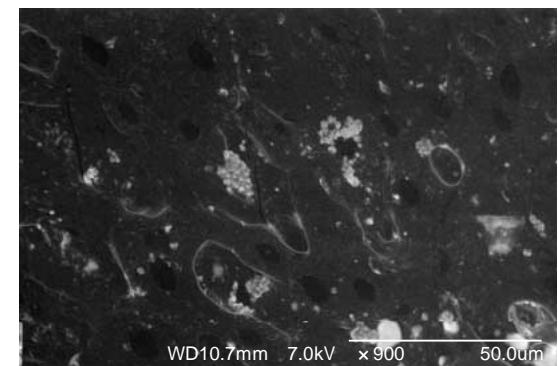


図2 ラット伊東細胞の反射電子像(左)とCL像(右)

伊東細胞内の脂肪滴がCLを発しているのが観察された。(加速電圧:7kV, 観察倍率:900倍, 温度:0度, 真空度:40Pa)

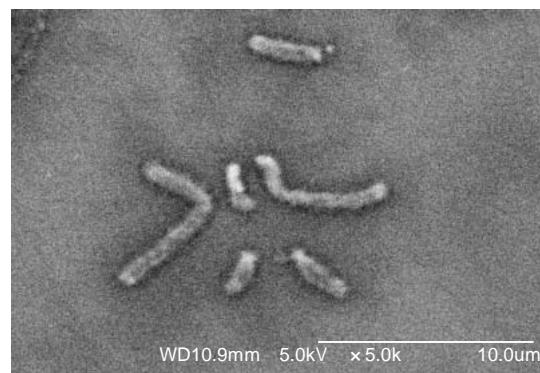


図3 ヒト染色体の二次電子像(左)とCL像(右)

染色体自体がCLを発しているのが観察された。(加速電圧:5kV, 観察倍率:5,000倍, 温度:10度, 真空度:高真空下)

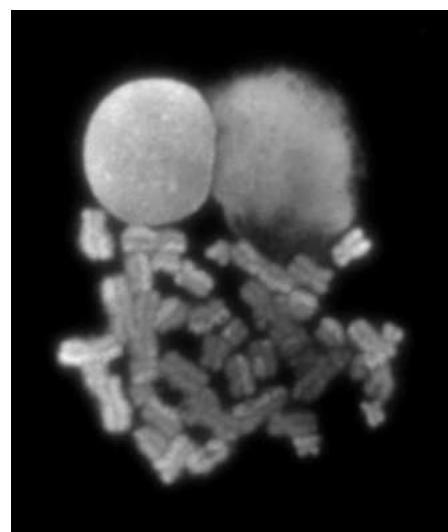


図4 BrdUをもちいて分染した染色体

左: YOYO1により染色体全体が緑に染められている。
右: BrdU取り込み部位がQdot605により赤く染められている。

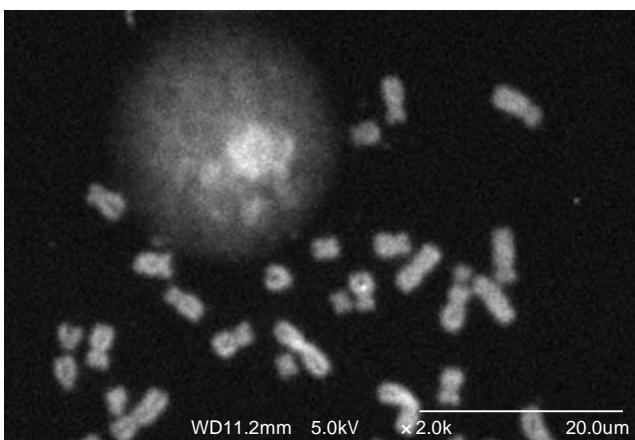
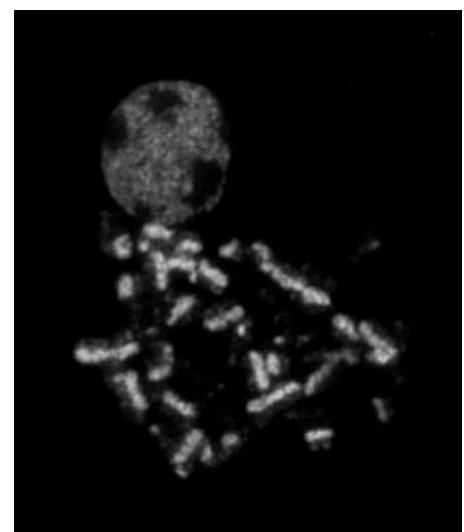


図5 Rhodamine Red-Xにより分染した染色体のCL像

光学顕微鏡では分染が観察されたが、CL像では観察することはできなかった。(加速電圧: 5kV, 観察倍率: 2,000倍, 温度: 室温, 真空度: 高真空中)

4-2 ヒト染色体

培養したヒト正常リンパ球から作製した染色体の展開標本を空気乾燥し、二次電子(SE)像とCL像を高真空中で観察した。その結果、染色体自体が固有のCLを発していることが確認された。染色体を展開する素材として、炭素板とシリコン板を比較したが、炭素板を用いた場合はSE像による染色体の表面形状がより明瞭となり(図3)、同一部位のSE像とCL像を一万倍の高分解能で観察することができた。スペクトル分析では、染色体自体のCLの発光ピークは550nmあたりで、200~800nmの広い範囲にわたってみとめられた。染色体自体がCLを発することは、すでにHoughら(1976)がハムスターの染色体のCL観察により報告していたが、彼らの報告では400nmにピークが認められ、発光波長

の幅も狭く違いが認められた²⁾。これらの違いが何によるのかについては、今後の検討課題となっている。

4-3 既存の蛍光色素により分染した染色体

つぎに、既存の蛍光色素のCL観察における有用性を確認するため、免疫染色を施した生体試料のCL像を観察した。ヒト染色体にBrdUを取り込ませたのち免疫染色を施すことで、それぞれの染色体を構成する2本の染色分体の一方のみを染め分ける(分染する)ことができる³⁾。この標本の光学顕微鏡像(図4)とCL像を比較することで、既存の蛍光色素がCL像の観察に利用可能かどうかを調べた。FITC, Rhodamine-Red X, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Qdot605など主要な蛍光色素で分染した標本を観察したが、意外なことに蛍光色素からのCL像を観察することはできなかった(図5)。そこで色素単体でのCL観察を行ったところ、単体ではこれらの色素は微弱ながらそれぞれのフォトoluminescenceに近い波長でCLを発していることがわかった。以上の結果から、染色したさいに色素のCL像が観察されなかつたのは、染色体自体のCL強度が蛍光色素から発せられる微弱なCLを上回っているためと推察された。

4-4 新たなCL観察用蛍光色素の開発

この問題を克服するためには、生体のもつCLをはるかに上回るようなCLを発する新たな標識色素が必要と考えた。そこで物質材料研究機構(関口隆史・及川英俊主席研究員)と共同で種々の色素単体のCL強度の比較を試み、有機錯体と無機蛍光体がもっともCL強度の高い物質であることを明らかにした。有機錯体はそのサイズが小さく、またビオチン化などの処理により免

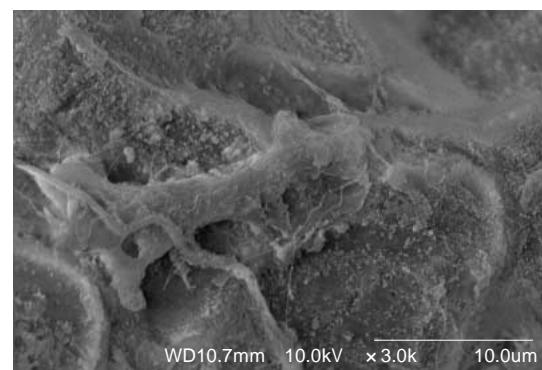


図6 無機蛍光体P43を取り込んだクッパー細胞 反射電子像(左)とCL像(右)

クッパー細胞内の蛍光体がCL像では明瞭に観察された。(加速電圧: 10kV, 観察倍率: 3,000倍, 温度: 室温, 真空度: 50Pa)

能観察も夢ではなくなるのではないだろうか?

本研究は、平成14、15年度地域新生コンソーシアム研究開発事業(経済産業省 関東経済産業局)の助成により行われた。また共同研究を行った(株)日立サイエンスシステムズの皆さんと(独立行政法人)物質材料研究機構の関口隆史・及川英俊氏に深謝いたします。

参考文献

1. Fujimoto T, Itoh T, Yamamoto K, Fujimoto K, Sakai M, Inoue T, Koike H, Sakai T, Ogawa K : Cathodoluminescence electron microscopy for cytochemical studies at the organelle level. *Acta Histochim. Cytochem.* 16 : 374-380(1983)
2. Hough PV, McKinney WR, Ledbeter MC, Pollack RE, Moos HW : Identification of biological molecules *in situ* at high resolution via the fluorescence excited by a scanning electron beam. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73 : 317-321(1976)
3. Kimura E, Hitomi J, Ushiki T : Scanning near field optical/atomic force microscopy of bromodeoxyuridine-incorporated human chromosomes. *Arch Histol Cytol.* 65 : 435-444(2002)
4. Broecker W, Schmidt E. H, Pfefferkorn G, Beller F K : Demonstration of cathodoluminescence in fluorescein marked biological tissues. *Scanning Electron Microscopy/1975.* pp243-250(1975)
5. Cavellier JF, Berry JP, Lagrue G : Cathodoluminescence applied to immunofluorescence: present state and improved technical prospects by prism spectrometer light selection. *Histochemistry.* 57 : 313-322(1978)

ラウンジ

摩周湖の長期的モニタリングについて

Lake Mashu as the long-term monitoring station

厚谷 郁夫*

摩周湖と言えば、神秘的ともいえる紺碧の湖水の美しさを思いつかべる人が多いと思います。湖水と湖上の気温との温度差のためか、北からの冷たい気流が吹き込むためかは分かりませんが、摩周湖は霧に覆われることが多いため霧の摩周湖として有名です。たまたま天候に恵まれ、摩周湖の美しさを一望の下に見渡せたときは本当に幸運な感じにさせられます。

摩周湖は観光名所としての役割のほかに、環境科学の立場からは我が国における唯一の陸水ベースラインステーションとしての役割を担っていることを知って頂きたいと思います。「摩周湖の長期的モニタリング」とは何かについての理解を深めるために環境汚染問題について少し述べます。

環境汚染状況の追跡は、従来は局地的、短期的な変動に注目して行われてきました。一方国規模さらに地球規模の汚染の進行も同時に予想され、環境変化は規模が大きいほど対応も困難になることは当然であります。国際的には1970年代ころから地球規模の環境汚染問題に対しても注目されはじめ、各方面からその対応が開始されるに到りました。例えばWHO(世界保健機関)とUNEP(国連環境計画)はUNESCO(国際連合教育科学文化機関)およびWMO(世界気象機関)と協力して世界中の表層水と地下水の汚染状況を把握するための陸水モニタリングを行う計画を立ち上げました。これが地球環境モニタリング計画/陸水プロジェクト(Global Environmental Monitoring System/Water, GEMS/Water)なのです。

*財団法人オホーツク地域振興機構 理事長
北見工業大学名誉教授・前学長 理学博士

GEMS/Waterプロジェクトの一環として、日本国内の陸水の人為的環境汚染の状況を評価するためには、日本国内で汚染物質が存在しないか、もしくはそれに近い比較参考地域(ベースラインステーション)を設ける必要があります。ベースラインモニタリングステーションの必要条件は水質変動が無く、かつ環境汚染物質が混入した場合にその濃度が鋭敏に変動する湖沼水が適すると考えられます。1980年代、国立公害研究所(現、国立環境研究所)は日本国内における陸水ベースラインステーションとしての湖沼の選定に関する研究を行って、阿寒国立公園内の摩周湖が国内ベースラインステーションとして最適であることを明らかにしました。我々の研究グループ(北見工業大学)は、1982年からこの調査研究に参加してきた経緯があり、1994年からは国立環境研究所地球環境研究センターのGEMS/Waterプロジェクトの一環として、摩周湖の「長期的モニタリング」に取り組むことになり、摩周湖水の採水および水質調査を行うことになりました。

ここにベースラインステーションとしての摩周湖の特徴についてのべます。

摩周湖は北海道弟子屈町の東部に位置する貧栄養のカルデラ湖であります。約7000年前の摩周火山の噴火によって形成されたと考えられる摩周カルデラ内に水が蓄えられ、再噴火を経て現在の摩周湖が形成されたのは約1000-1500年前と考えられています。現在の摩周湖は最大深度212 m、平均深度137 m、湖面積19.6 km²であります。湖の周囲を高低差200-300 m程のカルデラ壁が囲んでおり、湖岸への道路はありません。また湖全体が国立公園特別保護地区であり、湖

岸及び湖面への立ち入りは厳しく規制され、集水域内に人為的な活動が無いのが特徴です。

摩周湖には流入／流出河川が無く、湖水の主な供給源は湖面(集水域の約60%を湖面が占める)およびカルデラ壁に降った雨と雪などであります。従って、もし湖水中の汚染指標元素および化合物の濃度増加が観察された場合は、それらが雨水および大気(浮遊粉塵等)経由であることが容易に理解できるなどベースラインステーションとして最適の条件を備えているのです。

すなわち「摩周湖の長期的モニタリング」を行うことは、日本の水環境の監視、我が国の環境汚染の把握に貢献する調査・研究であると密かに自負しているところです。

本年10月には、この20年余の調査結果が国立環境研究所の研究成果を中心にデータベースとしてまとめられます。我々の研究グループ(北見工業大学)のデータもここに生かされることになり感無量の思いです。しかもデータベース出版記念講演会も北見工業大学で開催される予定であることを付け加えさせていただきます。

最後に摩周湖に関して一つだけ苦いエピソードを記します。それは1997年9月放映のNHKのテレビ番組作成に協力したときのことです。摩周湖を主題としたこの番組の制作に当たって、我々北見工業大学の研究グループが全面的に協力することになりました。ディレクターの方の説明では、当初は“水の科学”が目的であり、

人為的汚染の最も少ない摩周湖水を水の典型例としていろいろデータを示して欲しい等々、水質調査・環境分析が中心的課題であるかの如き依頼であったため安易に同意したのが失敗でした。数多くの要望に応えていろいろな録画撮りに協力しましたが、いざ放映されたテレビの内容を見て我々は啞然とさせられました。テレビの内容は摩周湖の神秘的美しさと周辺の素晴らしい景色を紹介しただけと言っても過言ではないものでした。

ディレクターの依頼に応じて測定したデータは全く没、国立環境研究所から提供した資料・説明も一部だけ取り上げ他は殆ど没にされました。何のために我々はあれだけ時間と労力を無駄に費やしたのか、未だに許し難きこととして記憶しております。ただ美しい摩周湖周辺の景色を放映したかったのならば、我々に關係なく、勝手に録画し放映すれば良かったのにと今でも思い出すと怒りが込み上げてきます。あとになってテレビの番組に詳しい人からいろいろ言わされた発言の中の一つになるほどと思い当たる発言がありました。摩周湖は国立公園特別保護区内にあるため摩周湖に立ち入るには環境庁などの許可が必要で、摩周湖周辺の景色をテレビ撮影するだけのためには許可がないので、北見工業大学に許可をとらせることが一義的目的だったのではないかと。教訓！“後悔先にたたず”でした。

解説

日立偏光ゼーマン原子吸光光度計 Z-2000シリーズ

Z-2000 Series Hitachi Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer

戸辺 早人*

1.はじめに

日立ハイテクノロジーズでは、2004年3月、Z-5010シリーズ原子吸光光度計の後継機種として、一層の高感度・高精度分析を可能にしたZ-2000シリーズを発売した。シリーズのラインアップは、フレーム・ファーネス両用機（Z-2000）と専用機化して小型化を図ったフレーム専用機（Z-2300）、ファーネス専用機（Z-2700）の3機種。全機種とも偏光ゼーマン法にデュアル検知方式を採用することにより高感度・高精度化を実現した。

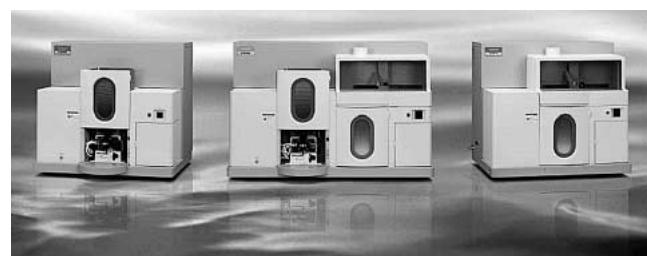


図1 Z-2000シリーズ原子吸光光度計の外観

2. デュアル検知方式の採用により高精度・高感度化

偏光ゼーマン法の測定原理は、試料の原子に磁界を加えると、磁場に平行な偏光成分の光は原子に吸収され、磁場に垂直な偏光成分の光は原子によりわずかしか吸収されない。一方、分子や粒子などのバックグラウンド成分は磁界が加えられても変化はない。これにより2つの偏光成分を演算することでバックグラウンドによる吸収を除き、原子吸収信号だけの値が得られる。

従来はこの2つの偏光成分を時分割で平行偏光成分と垂直偏光成分を交互に信号を取り込んで演算処理をしていたが、Z-2000シリーズでは2つの偏光成分の光に対して、各々に検知器（光電子増倍管）を有する。これにより、時分割での取り込みが不要となるため、信号の取り込み時間が2倍、かつ同一時間に取得した両偏光成分の演算処理が可能となる。図2にZ-2000の光学系を示す。

図3に当社従来装置とZ-2000のグラファイトファ

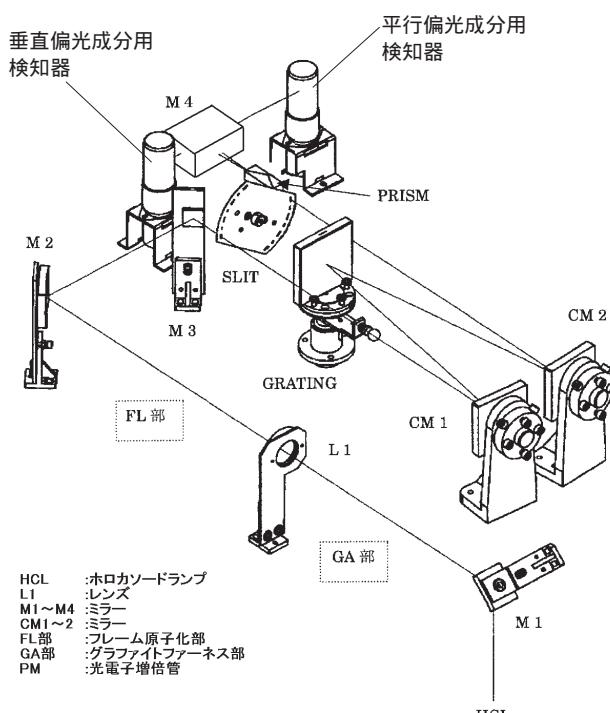


図2 Z-2000の光学系

ネスで、As（波長193.7nm）1 μg/Lの標準液を40 μL注入し、同一条件で測定した結果を示す。ノイズ幅が従来比50%となったため、測定信号のピークがより明確となり高感度分析が可能となる。

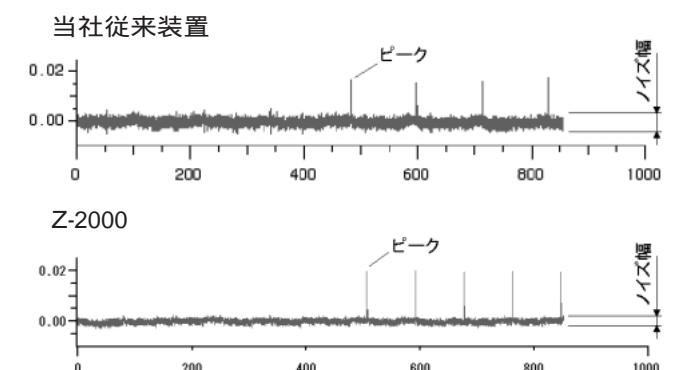


図3 Z-2000ノイズレベル

*株日立ハイテクマニファクチャ&サービス 設計部

3. 高精度・高感度分析

原子吸光光度計は原子が固有の波長の光を吸収する現象を利用して溶液サンプル中の微量金属成分の含有量を測定する装置である。飲料水、湖沼・河川水、工場排水などの環境分野や、食品、石油化学、半導体などの産業分野、血液、薬品などのバイオ分野で幅広く利用され、近年は、とくに環境分析に数多く用いられており、高精度・高感度が要求されている。

3-1 フレーム分析

フレーム偏光ゼーマン法は安定したベースラインが得られるため、Pb（波長217.0nm）の0.1mg/L [排水基準値]レベルも精度の良い測定が可能である。図4に河川水中に含まれるPbの分析例を示す。

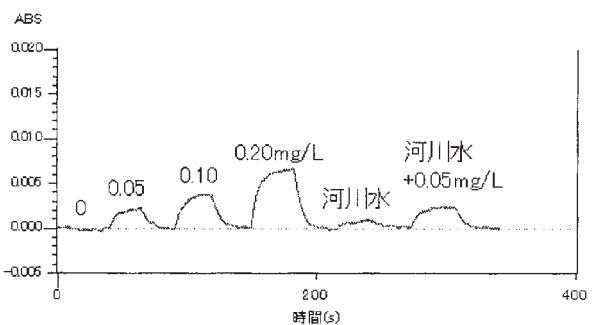


図4 フレームによる河川水中Pbの定量

3-2 グラファイトファーネス分析

デュアル検知方式による同一時間に取得する両偏光成分の演算処理により、高精度のバックグラウンド補正が可能である。加えてオートサンプラの炉内濃縮機能により、Sb（波長217.6nm）の2 μg/Lレベル [環境水基準値]も精度の良い測定が可能となった。図5に河川水中に含まれるSbの分析例を示す。

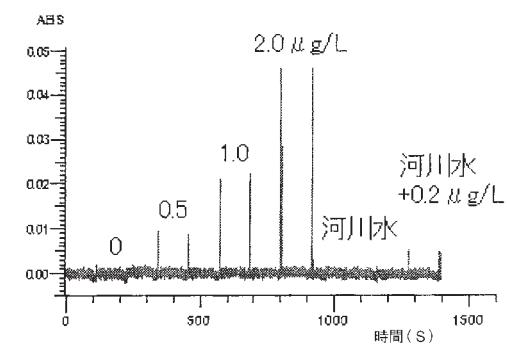


図5 ファーネスによる河川水中Sbの定量

4. 分析アシストで簡単操作・測定

分析中に測定の進行状況に応じて、操作画面にメッセージ表示と音声ガイダンスによる測定進行のサポー

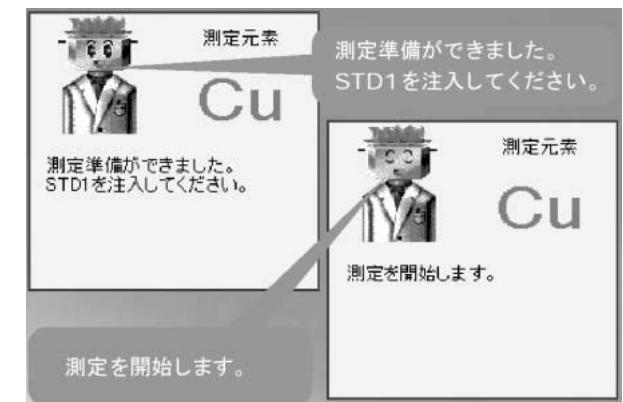


図6 操作画面上のメッセージ表示例

トが可能である。図6にフレーム分析時のメッセージ例を示す。

また、フレーム分析において、試料を注入すると装置が適切な測定タイミングを判断して測定自動スタートを可能としている。このため分析者は操作画面に表示される吸光度モニターを見ながら測定タイミングを監視するという作業から開放され、簡単に測定ができる。また、適切な測定タイミングで測定ができるので、分析者の個人差による測定結果の差を抑えられる。

測定自動スタートの処理順序

装置が分析元素、光源、時定数により異なるベースラインのノイズデータを予め記憶。

測定モードに入ると常時、原子吸収信号を監視、ノイズより大きい信号を検出して原子吸収の有無を判断。

原子吸収が有ることを判断後に、原子吸収信号の安定度を1000ms（55データ）間の原子吸収変動幅より判定（時定数に応じて判定基準を補正）。判定基準内に入った時に測定を開始。

測定終了後は原子吸収信号が規定レベルに下がるのを待って次の測定に進む。

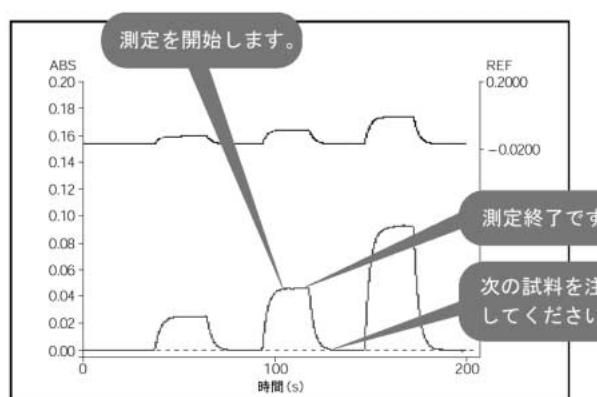


図7 フレーム分析 自動スタートタイミング

図7にフレーム分析の測定自動スタートタイミングを示す。装置は測定自動スタートが働くと、分析者に

「測定開始」、「終了」、「次の試料注入」のタイミングを音声ガイダンスにより案内する。

5 . ゼーマンバックグラウンド補正による水素化物発生装置を用いたAs分析

フレーム分析でのAs分析には水素化物発生法を用いる。図8に水素化物発生法分析の原理図を示す。

測定原理は水素化物発生装置により発生させた水素化Asを加熱吸収セルに導入してフレームによる加熱分解によって生成されるAsの原子吸収を測定する。Z-

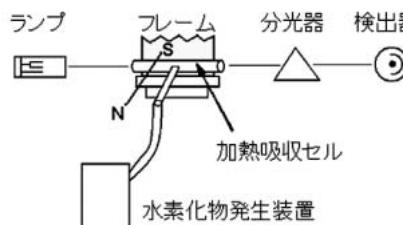


図8 水素化物発生法分析の原理図

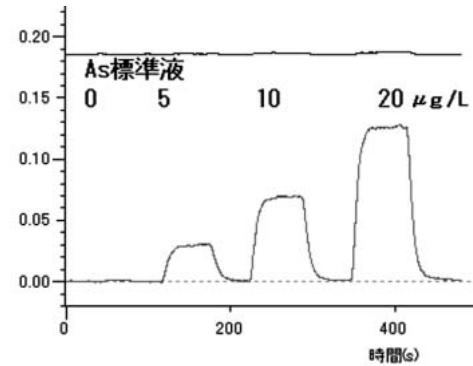


図9 水素化物発生法フレーム分析によるAs測定データ

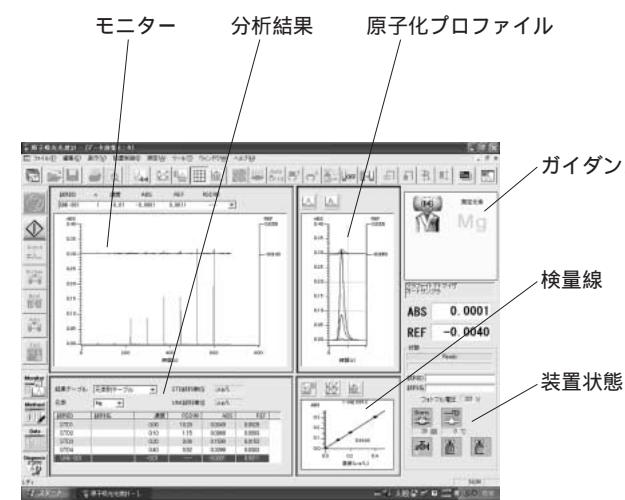


図10 測定画面

2000では加熱吸収セルに磁場を加える構造を開発し、ゼーマンバックグラウンド補正での水素化物発生法の分析を可能とした。図9に水素化物発生法フレーム分析によるAs標準液の測定データを示す。ゼーマンバックグラウンド補正により安定したベースラインが得られるため、10 μg/L [上水、環境水基準値] レベルも精度良く測定が可能。

6 . 操作面での使いやすさを向上

Z-2000では測定中の原子吸収信号とバックグラウンド信号がリアルタイムでモニターできる。また、一つのウィンドウで、モニター・原子化プロファイル・分析結果・検量線が表示されるので、一連の分析操作が画面を切り替えることなく可能である。図10に測定画面を示す。

さらに自動装置診断機能を搭載して、信号安定度、感度等の基本性能の診断が可能であり、これにより稼働性能適格性確認(OQ)に役立つ。

7 . まとめ

以上、Z-2000シリーズ原子吸光光度計の特徴を紹介した。近年の社会の環境への関心の高まりは、元素分析装置の市場に追い風となっている。また、食品分野においても管理・分析のニーズが高まっており、Z-2300形フレーム分析専用機はそういった市場にも合わせた製品となっている。元素分析装置の中での原子吸光光度計の優位点は、夾雑物が多い試料への強さ、微量サンプルへの対応、前処理の簡易さ、省スペース、低ランニングコストであり、この点についても注力した製品となっている。今後は、環境、食品、材料、化学、半導体、血液、薬品など様々な分野の分析アプリケーションの積み上げを行い、市場ニーズへの対応を行う。

H-9500高分解能TEMの特長とその応用

The features of H-9500 high resolution TEM and its applications

植木 泰光^{*1} 谷口 佳史^{*2}

今回は、H-9500の特長とその2,3の応用例について紹介する。

2 . システムの構成

図1にH-9500の外観を示す。操作テーブルは装置本体から右側に湾曲した形状となっており、その上の操作盤は自由に位置を変えられるようになっている。

PCの搭載により操作が格段に容易になった。例えば、加速電圧印加からフィラメント点灯までが自動化され、操作盤上のボタンを押すだけで、5分後には像観察が可能です。また、5軸試料ステージの採用により傾斜角度(θ, φ)と試料位置(x, y, z)記憶や試料の自動移動なども可能になった。

インテグレーションされた高感度CCDカメラを用いると、高倍率でも焦点合わせが容易に行え、高精細なTEM像をデジタル記録することができる。さらに、撮影されたTEM像には撮影倍率、試料位置などの撮影条件



図1 H-9500の外観

*1 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

*2 株日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー製品事業部
那珂事業所 エレクトロニクス第一設計部

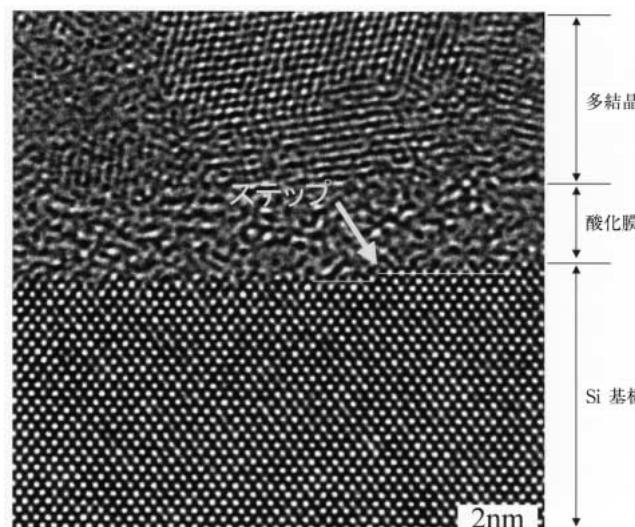
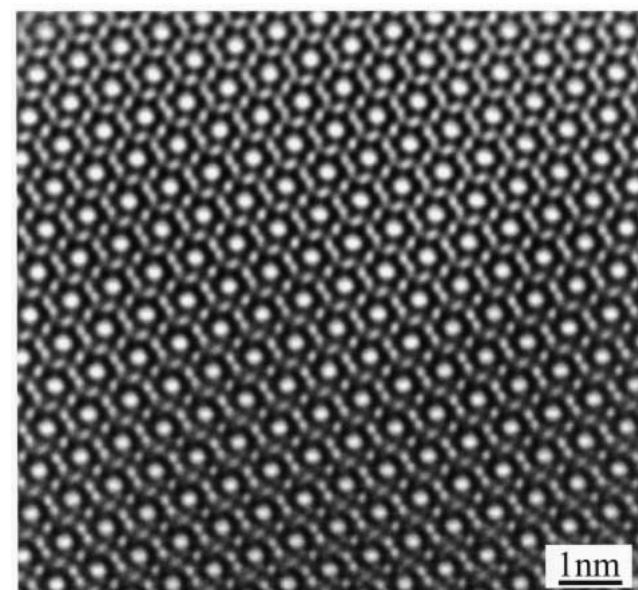


図2 Siデバイスの高分解能観察例

図3 塗化珪素(Si_3N_4)の構造像

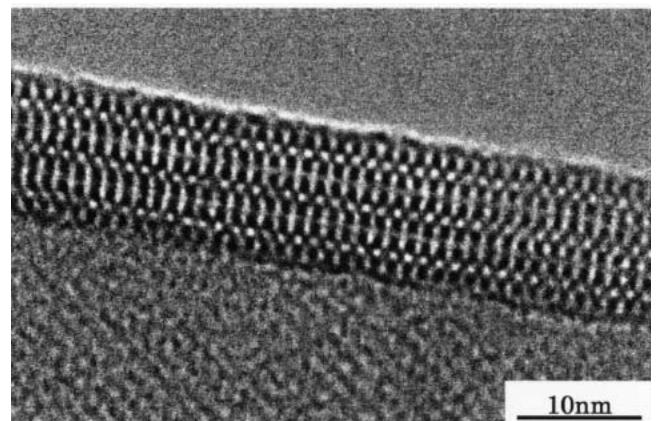
件と一緒に保存される。その撮影条件をもとに保存されたTEM像を検索することも容易に行える。

3. 應用例

図2はSiデバイスの観察例である。下からSi基板、酸化膜、多結晶Siであり、Si基板の最表面には矢印で示したように原子面のステップが観察されている。酸化膜の膜厚が薄くなるにつれこのようなSi基板最上部の原子レベルの観察が重要となってきている。

図3はナノテク材料に用いられる塗化珪素(Si_3N_4)の結晶構造像である。白く見えているところは空間で、それを囲むように6個のSi原子が観察されている。

図4は触媒の観察例で、試料はTiを骨格に含むゼオライト(Ti-YNU-1)である。一般にゼオライトは電子線照射損傷を受け易く、格子像撮影などの高分解能撮

図4 Tiを骨格に含むゼオライトの高分解能TEM像
(試料御提供: 横浜国立大学大学院工学研究院 辰巳 敬先生)

影が困難である。今回の撮影に際しては高感度CCDを用い、電子線照射量を通常のフィルム撮影の約1/10に抑えた。

まとめ

以上のように、H-9500は高分解能観察機能と、高い安定性と操作性を兼ね備えた電子顕微鏡で、半導体やナノテク分野での活躍が期待される。

新規ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂を用いた固相抽出剤の紹介

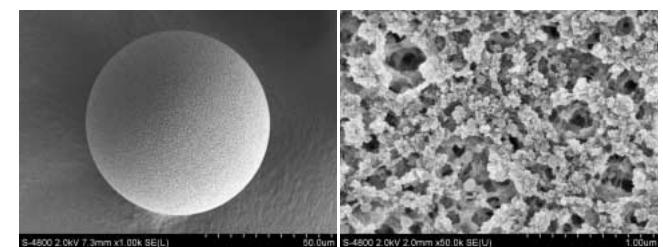
Introduction of the solid phase extraction using new poly-amino poly-carboxylic acid type chelating resin

山本 和子* 坂元 秀之* 白崎 俊浩*
小野 哲義** 世津 育明** 小沼 哲昭***

類金属が残存するという欠点があった²⁾。

今回IDA型官能基の欠点を補い、さらに選択性の高いキレート官能基を持つPAPC型キレート官能基を開発した。

PAPC型キレート樹脂の電子顕微鏡写真を図1に示す。今回開発したPAPC型キレート樹脂固相抽出剤にはNOBIAS Chelate-PA1, NOBIAS Chelate-PA2の2種類がある。基材樹脂にはChelate-PA1は親水性の多孔性メタクリレート系架橋ポリマーを、Chelate-PA2は親水基を持つ多孔性の疎水性架橋ポリマーを用い、何れもポリアミノポリカルボン酸型、つまりエチレンジアミン三酢酸とイミノ二酢酸を導入した混合型官能基構造となっている。今回はPAPC型キレート樹脂固相抽出剤Chelate-PA1による測定データを紹介する。

樹脂全体像
一部拡大像
図1 PAPC型キレート樹脂の電子顕微鏡写真

3. 新規高選択性キレート樹脂固相抽出剤の特長

3-1 PAPC型キレート樹脂固相抽出剤の金属捕捉特性

PAPC型キレート樹脂は、既存のIDA型キレート樹脂と大きく異なる捕捉挙動を示す。PAPC型キレート樹脂固相抽出剤Chelate-PA1とIDA型キレート樹脂固相抽出剤Chelate-PA2の金属捕捉特性を図2に示す。図2からわかるように、PAPC型キレート樹脂では陽イオン性遷移金属の多くがpH3~9程度の間に捕捉されるが、pH7未満ではアルカリ土類金属がほとんど捕捉されない。この点は、IDA型キレート樹脂に大きな特長である。従って試料のpHを7未満に調整し固相抽出を行うと、試料中のアルカリ土類金属を捕捉することなく陽イオン性遷移金属のみを濃縮することが可能となる。

* 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
*** 株日立ハイテクノロジーズ マーケティング部

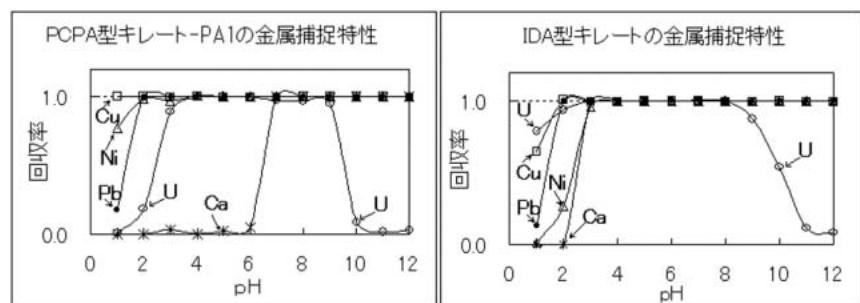


図2 PAPC型キレート樹脂とIDA型キレート樹脂における金属捕捉特性

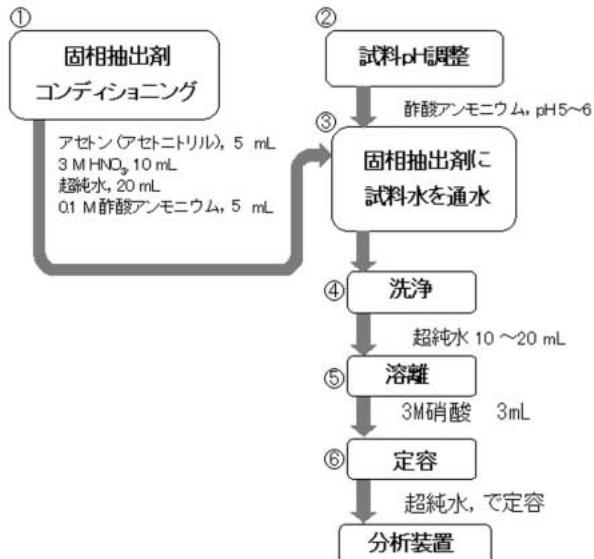


図3 PAPC型キレート樹脂固相抽出

3-2 PAPC型キレート樹脂固相抽出剤の操作方法

PAPC型キレート固相抽出剤の操作手順を図3に示す。操作は次の手順で行う。

固相抽出剤のコンディショニングを行う。アセトンを流して樹脂を膨潤させた後、硝酸を流し樹脂の洗浄を行う。その後0.1M酢酸アンモニウム溶液を流してコンディショニングを完了する。

試料に酢酸アンモニウムを0.1Mになるよう加えた後、硝酸またはアンモニア水でpH5~6になるよう調整する。

固相抽出剤に試料溶液を通水する。

超純水10~20mLを固相に流して樹脂に残った試料

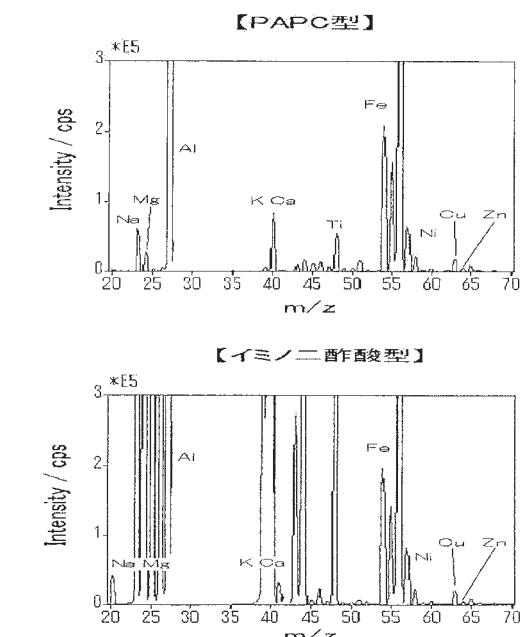


図4 固相抽出後のSLRS-4の定性スペクトル

を洗い流す。pH5~6ではアルカリ土類金属は固相にほとんど捕捉されないため、Ca等を除去するため何度も固相を洗浄する必要はない。

固相に3M程度の硝酸を流し、捕捉された金属を溶離させる。

の溶離液を定容し測定試料とする。

4. PAPC型キレート樹脂固相抽出剤を用いた試料の測定例

4-1 河川水標準試料の測定例

表1 PAPC型キレート樹脂固相抽出剤によるNRC・CNRC SLRS-4 河川水標準試料の測定結果

測定 m/z	51	55	60	63	64	98
元素名	V	Mn	Ni	Cu	Zn	Mo
認証値	0.32 ± 0.03	3.37 ± 0.18	0.67 ± 0.08	1.81 ± 0.08	0.93 ± 0.10	0.21 ± 0.02
測定値	0.34 ± 0.01	3.19 ± 0.02	0.67 ± 0.01	1.77 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.19 ± 0.01

単位: μg/L

表2 NRC・CNRC CASS-4 海水標準試料溶出液中のアルカリ金属、アルカリ土類金属の測定結果

単位: mg/L

	Ca	Mg	Na	Sr
PAPC 型	0.02	0.04	0.00	0.00
IDA 型	35.36	60.04	16.36	0.48

表3 PAPC型キレート樹脂固相抽出剤によるNRC・CNRC CASS-4 海水標準試料の測定結果

単位: μg/L

測定 m/z	55	56	59	60
元素名	Mn	Fe	Co	Ni
認証値	2.78 ± 0.19	0.713 ± 0.058	0.026 ± 0.003	0.314 ± 0.030
測定値	2.68 ± 0.14	0.674 ± 0.058	0.023 ± 0.002	0.319 ± 0.012
測定 m/z	63	64	98	114
元素名	Cu	Zn	Mo	Cd
認証値	0.592 ± 0.055	0.381 ± 0.057	8.78 ± 0.86	0.026 ± 0.003
測定値	0.550 ± 0.023	0.377 ± 0.037	8.42 ± 0.48	0.023 ± 0.006

PAPC型キレート樹脂固相抽出剤Chelate-PA1とIDA型キレート樹脂固相抽出剤Chelate-PA2を用いて、NRC・CNRC SLRS-4 河川水標準試料を抽出・濃縮後、その抽出液をMIP/MSを用いて測定した。固相抽出液のマススペクトルを図4に示す。Chelate-PA1を用いた固相抽出液に含まれるNa,Mg,K,Caの信号は小さく、数μg/L程度であった。一方、IDA型キレート樹脂を

用いた固相抽出液ではNa, Mg, K, Ca何れの信号も飽和している。この結果から、PAPC型はIDA型に比べ、アルカリ金属、アルカリ土類金属の捕捉性が低く、溶出液中に残存するアルカリ金属、アルカリ土類金属の濃度を極めて低くできることがわかった。

Chelate-PA1を用いて、NRC・CNRC SLRS-4 河川水標準試料中の金属を測定した結果を表1に示す。

表4 新規固相抽出剤の基本特性

ノビアス (NOBIAS) シリーズ

	分離モード	母体	末端基(官能基)	交換容量(金属捕捉)
R P - O D 1	逆相	メタクリレート	オクタデシル基(C18)	-
R P - S G 1	逆相	ジビニルベンゼンメタクリレート共重合体	フェニル基 水酸基	-
ION - S C 1	陽イオン交換	親水性メタクリレート	スルホ基	0.6meq/g (イオン交換容量)
ION - S A 1	陰イオン交換	親水性メタクリレート	四級アンモニウム基	0.6meq/g (イオン交換容量)
CHELATE - PA1	キレート	親水性メタクリレート	*PAPC 基	0.25mmol/g (金属捕捉量)
CHELATE - PA2	キレート	ジビニルベンゼンメタクリレート共重合体	*PAPC 基	0.2mmol/g (金属捕捉量)

*PAPC基: ポリアミノポリカルボン酸型

Chelate-PA1による分析結果はV, Mn,Ni, Cu, Zn ,Moの何れも認証値の範囲内の値を得ることができた。

4-2 海水標準試料の測定例

Chelate-PA1とIDA型キレート樹脂固相抽出剤を用いて、NRC・CNRC CASS-4 海水標準試料を抽出・濃縮後、その抽出液をMIP/MSを用いて測定した。抽出・濃縮操作は、3-2の操作手順に従って行った。海水50mLを固相抽出剤に通水した後、純水10mLにて固相抽出剤を洗浄し、3M硝酸で捕捉された金属を溶出し全量を5mLとした。溶出液中に含まれるアルカリ金属、アルカリ土類金属の濃度を表2に、金属の測定結果を表3に示す。表2からわかるように海水溶出液においてもChelate-PA1では固相を純水10mLで1回洗浄するだけでアルカリ金属、アルカリ土類金属を除去でき、溶出液にほとんど残留することはない。しかし、IDA型キレート樹脂固相抽出剤では多くのアルカリ金属、アルカリ土類金属が固相に捕捉されているため、更に洗浄を重ねる必要があることがわかる。また、表3の溶出液中金属の測定結果においてChelate-PA1による分析結果は認証値の範囲内の値を得ている。特に、海水試料においてIDA官能基では回収率が50%程度に下がると報告¹⁾のあるMnにおいても認証値の範囲内の値が得られる点は注目に値する。また、溶出液中にCaがほとんど含まれないため、Caの分子イオン干渉が問題となる56Fe,60Niにおいても分子イオンの干渉を受けることなく測定が可能である。

5.まとめ

今回紹介した新規高選択性キレート樹脂固相抽出剤は河川水、海水などのようにマトリックスとしてアルカリ金属、アルカリ土類金属が多量に含まれている試料中の陽イオン性遷移金属の測定に有効であることがわかった。

本キレート樹脂固相抽出剤は、今回検討を行った環境水分野の試料のみならず、工業分野、医用分野への応用も可能と考えられる。

今回新規開発したNOBIASシリーズ固相抽出剤の基本特性について表4に示した。逆相型固相抽出剤RP-OD1及びRP-SG1は、主として農薬など一般的な有機化合物の分離・濃縮に、イオン交換型固相抽出剤ION-SC1及びION-SA1は、イオン性の有機物質あるいは無機物質の分離・濃縮に使用される。キレート樹脂固相抽出剤以外の固相抽出剤の詳細は、次の機会に紹介する。

参考文献

- 1) 栗山 清治、欧陽 通、王 寧、古庄 義明：イミノ二酢酸キレート膜による水中重金属類の迅速抽出法、工業用水、481, 29 - 36 (1998)
- 2) 高久 雄一、工藤 友華ら：環境水中の希土類元素のイミノ二酢酸キレート樹脂ディスク予備濃縮／誘導結合プラズマ質量分析法による定量、分析化学、51, 539 - 544 (2002)

U-4100形分光光度計用アプリケーションのトレンド

Application trend for U-4100 Hitachi UV-VIS-NIR Spectrophotometer

株木 耕平*

いる。さらにこうしたカメラレンズは高付加価値デバイスのトレンドにも押され、PDA、ノートPC等様様なデバイスで使用されることが一般的になっている。

また、IT関連市場以外にも高機能性材料評価ニーズは増加している傾向となっている。本稿では3.4項に述べる近赤外反射率測定等が一例として挙げられる。

3.測定用アプリケーション解説

3-1 微小サンプル測定

先に述べたようにDVD・CDのピックアップレンズ評価ニーズが増加傾向である。

U-4100形では同需要への対応として、微小レンズ測定付属装置を準備している。本付属装置は集光レンズ、



図1 U-4100形分光光度計 固体試料測定システム

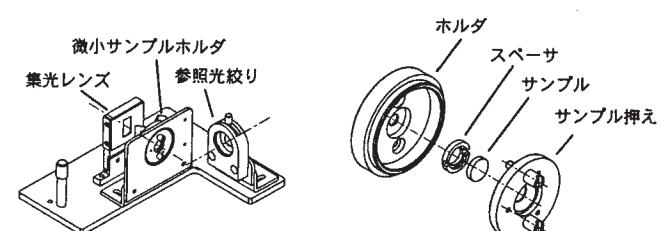


図2 微小サンプル測定付属装置

(左) 微小サンプル測定付属装置。光束をレンズでサンプルに集光、サンプルホルダ背面に全球積分球を配置し、透過光を検知する。
(右) 微小サンプルホルダ。サンプルサイズに合わせて形状・サイズをカスタマイズすることが可能。

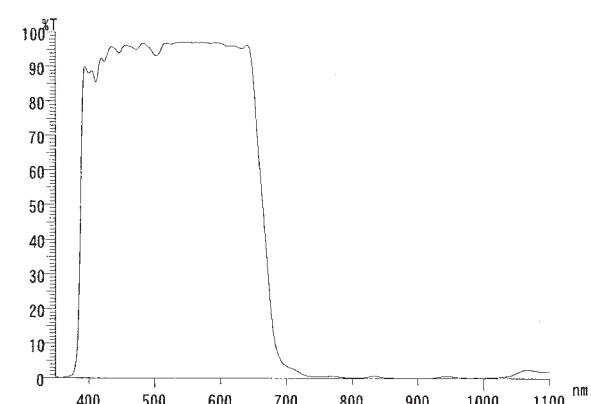


図3 高機能膜付サンプルの測定例

高機能膜付平板サンプルの透過率測定結果。デジタルカメラ用レンズは、可視域では高透過率、近赤外域では低透過率な特性が必要である。

*株日立ハイテクマニファクチャ & サービス 設計部

参考光絞りとサンプルホルダにより構成されており、サンプルホルダ部を測定サンプルに合わせて製作・交換することで、多様化するサンプル形状・サイズに対応することが可能である。なお、本付属装置は顧客によりサンプルサイズ・形状が多岐に渡る為、対象顧客毎の受注生産品である。

3-2 微小プリズム測定

IT関連では主として液晶プロジェクター内部に用いられ、RGBの3色を合成する役目を果たす場合が多い。またDVDプレーヤ内部にも微小プリズムは用いられる。



図4 プリズム測定用付属装置

(左) 微小プリズム測定付属装置(入射角度は45度固定)
(右) 角度可変絶対反射付属装置(プリズム測定は受注対応)

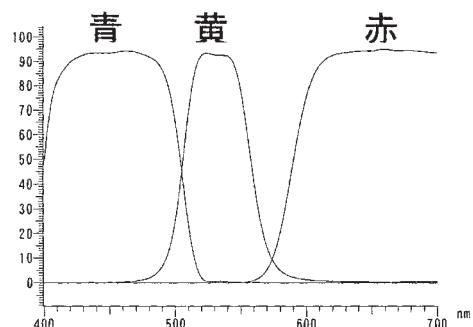


図5 プリズム反射率測定例

赤、黄、青、3種プリズムの反射率を測定、反射されない光はプリズムを透過する。

この場合には光源は単色光であるが、微小プリズムは光路を2つに分けるビームスプリッタとしての役目を果たしており、これらのうち片方の光はデータ読み取りに用いられるが、もう片方の光はDVD光源出力補正のためのフィードバック用参照光として用いられる。

U-4100形では入射角度、出射角度が45度固定となる場合には微小プリズム測定付属装置、それぞれ角度を変えて測定を行う場合には角度可変絶対反射付属装置(プリズム測定は受注対応)を用いることで、微小プリズム測定関連の様々なニーズに対応している。

3-3 偏光測定

液晶デバイスの両端に貼り付けられる偏光フィルムの光学特性評価・管理にも分光光度計は用いられる。液晶用偏光フィルムの評価は偏光特性、透過率測定が主となるが、多機能材料の開発用途ではリタデーション(位相差)測定のニーズもあり、偏光を利用した材 料では多くの工程で分光特性評価の需要がある。

3-4 近赤外域反射率測定

近赤外域では高機能性反射塗料・材料測定のニーズが高まりを見せている。こうした材料は熱を内部に伝えることなく、可視域では通常塗料・材料と同様の色合いを持つ。結果としてこうした材料は、直射日光に晒されており、さらに見た目には黒色であるにも関わらず、表面が熱くなりにくいという一風変わった特性を持つ。こうした材料は、飛行機の表面塗装や、屋外プールのタイル表面にも使用されている。また、ヒートアイランド現象緩和の施策として、道路や高層ビル表面に使用される場合もある。

こうした材料は、その使用用途から様々な方向から視認される必要があるため、拡散反射性を有するものが多い。そのため通常の正反射測定付属装置を用いた反射測定ではなく、積分球背面にサンプルを配置することによる、拡散反射測定を行うことで、特性評価が可能となる。

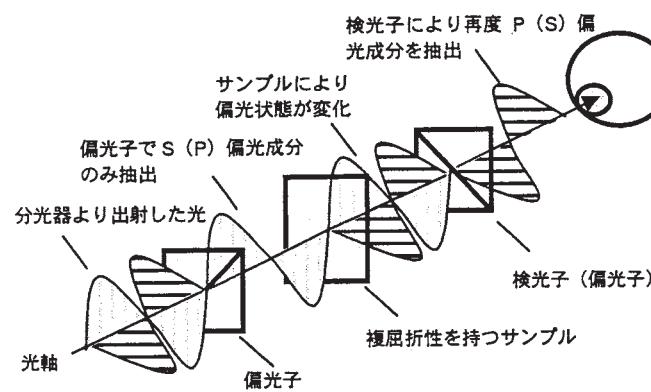


図6 リタデーション測定概念図(透過測定時)

分光器から出射する光は様々な偏光成分を含むため、偏光子を用いることで、S偏光(もしくはP偏光)成分のみを取り出し、サンプルへ照射する。サンプルが複屈折性を持つと透過光の偏光状態が変化するが、サンプル背面に配置された検光子がS偏光状態の場合とP偏光状態の場合に分けて測定を行うことで、複屈折性を持つサンプルのリタデーション(位相差)測定が可能となる。

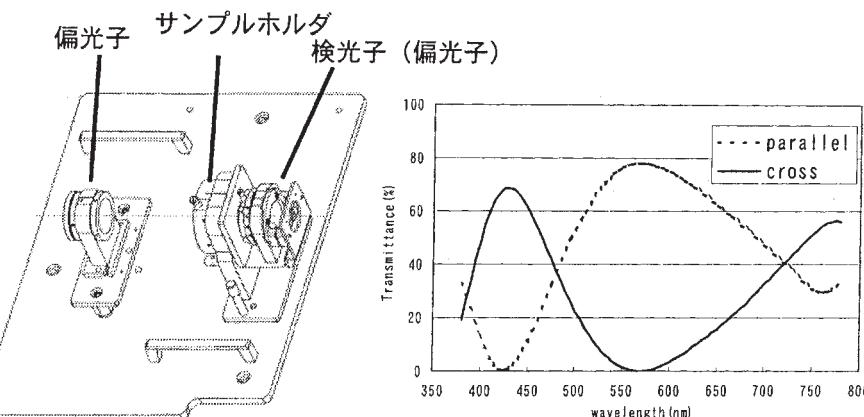


図7 リタデーション

(左) 偏光板測定付属装置(受注生産品)
(右) 複屈折フィルムのリタデーション測定結果

4.まとめ

以上、U-4100形分光光度計を用いた最近のアプリケーション動向について述べた。

U-4100形分光光度計では、標準の大形試料室に特別付属装置を組み合わせることで、従来にない新しいサンプルについて柔軟に測定対応することを可能にしているが、一方、その測定内容は研究・開発用途より、むしろ顧客製品出荷時の品質管理用途となる傾向がより強くなっている。そのため、単純な測定アプリケーション対応だけではなく、品質管理設備としての機能を要求される場合が増えている。従って、今後の製品・アプリケーション開発内容にも、品質管理設備としての需要をどのように取り込んで行くかが今後の製品課題である。

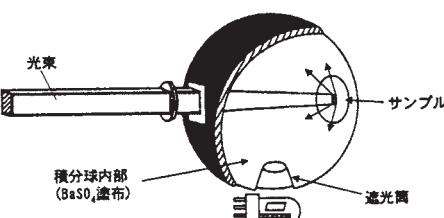


図8 積分球による全反射測定

積分球を用いることで、拡散反射成分も取り込んだ測定が可能となる。

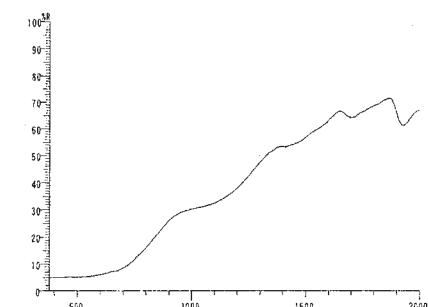
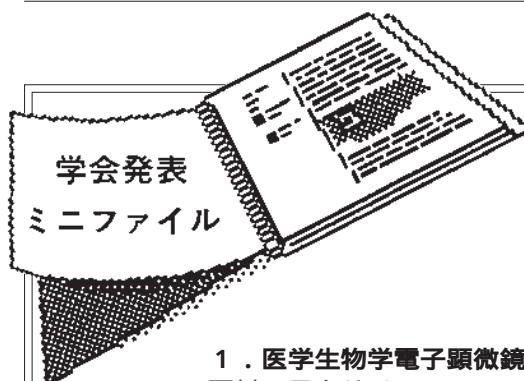


図9 热反射性材料測定例

(左) 高反射塗料の反射スペクトル例。近赤外域で高反射、可視域では低反射率のため、見た目には黒く見えるが、塗布物内部に熱を透過させない。
(右) 高反射道路敷設材料の反射スペクトル。一般的な材料と比較すると、反射特性の違いが明確に分かる。



学会発表
ミニファイル

山田満彦 望月康平
(株式会社日立サイエンスシステムズ)

1. 医学生物学電子顕微鏡技術学会 (2004・4/23-25, 大阪)

西村(日立サイエンスシステムズ), 他: 低真空SEMによる含水試料観察技術と今後の展開

2. The International Society for Optical Engineering (SPIE) (2004・2/23-26, California, USA)

諸熊(日立ハイテクノロジーズ), 他: New technique to reconstruct effective 3D profile from tilt images of CD-SEM

【要旨】LSI構造の縮小/複雑化が進む中で、そのプロセスにおいては測長SEMによる三次元構造計測の重要性が増している。今回は試料表面での二次電子放出が電子ビーム入射角に依存することを利用した逆ステレオマッチング法を用い、図1のように二次電子信号強度プロファイルから三次元形状を再構築するアルゴリズムを考案した。この手法をレジストパターン計測に応用した結果、図2に示すように再構築プロファイルが断面構造と良く一致し、しかも他の手法に比べてS/Nの低い信号に対して極めて安定に動作することを確認した。

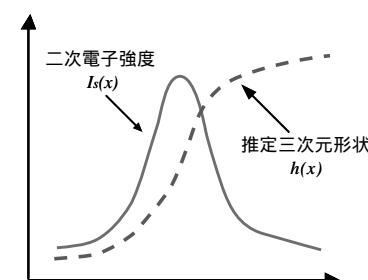


図1 二次電子強度変化とステレオマッチング法で見積もられた三次元形状プロファイル

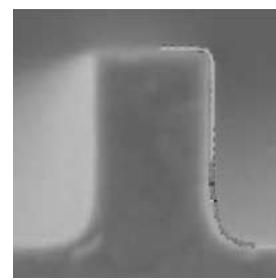


図2 再構築三次元形状プロファイルと同一部位のSEM断面像との比較

3. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (2004・6/7-11, Kanazawa, Japan)

小柏(日立ハイテクノロジーズ), 他: Evaluation of depth of focus expanded by image processing.
稻田(日立ハイテクノロジーズ), 他: Development of automatic adjustment functions for the HD-2300 scanning transmission electron microscope.
中山(日立サイエンスシステムズ), 他: Natural-SEM-CL system for biological application.
中澤(日立サイエンスシステムズ), 他: Automated specimen tilting system of H-7600 transmission electron microscope for three-dimensional tomography and its application.
石谷(日立ハイテクノロジーズ), 他: Limiting parameters of TEM/STEM sample preparation using a focused ion beam: aspects of ion-sample interaction.

今野(日立サイエンスシステムズ), 他:
Site specific sample preparation for high resolution 3D TEM observation.

【要旨】TEMによる原子レベルの高分解能局所領域三次元観察法を開発した。局所領域からの試料摘出にはFIBマイクロサンプリング法を用い、試料はピラー状に加工した。ピラー状試料の仕上げ加工には加速電圧10kVのFIBを用いた。また、観察には試料回転機構を備えたFIB-TEM共用試料ホルダを用いた。今回は図3aのように $150 \times 150\text{nm}^2$ のSi単結晶ピラー状試料を作製し、多方向からのSi(111)面の結晶格子(間隔0.314nm, 図3b)やSi(220)面結晶格子(間隔0.19nm)の観察を行

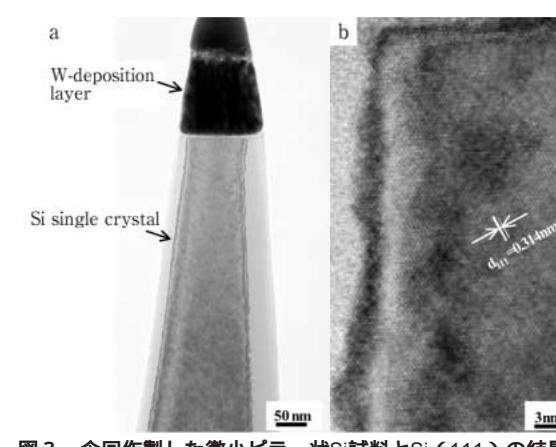


図3 今回作製した微小ピラー状Si試料とSi(111)の結晶格子像

い、本方法の実用性を確認した。

砂小沢(日立ハイテクノロジーズ), 他: A method to measure the image drift from a high-magnification and high-speed online image series with low S/N ratio.

武藤(日立サイエンスシステムズ), 他: PE scattering volume and SE/BSE signal information from CNT containing Fe.

【要旨】ナノテクノロジーの発展に伴って、SEMの観察対象は急速に微細化している。こうした微細構造の観察で、像コントラスト形成要因を把握することは信憑性のある像解釈を行う上で欠かせない。今回はFe含有カーボンナノチューブで得られる像コントラストを様々な観察条件で評価した結果、図4a)~c)に示すようにFe部位のコントラストは入射電子の試料内散乱領域(加速電圧と試料密度に依存)と密接な関係があることが分かった。すなわち、ナノメータオーダの構造ではその大きさと散乱領域がほぼ等しくなる観察条件で反射電子放出数が最大となり、それは二次電子像コントラストにも影響を与える。

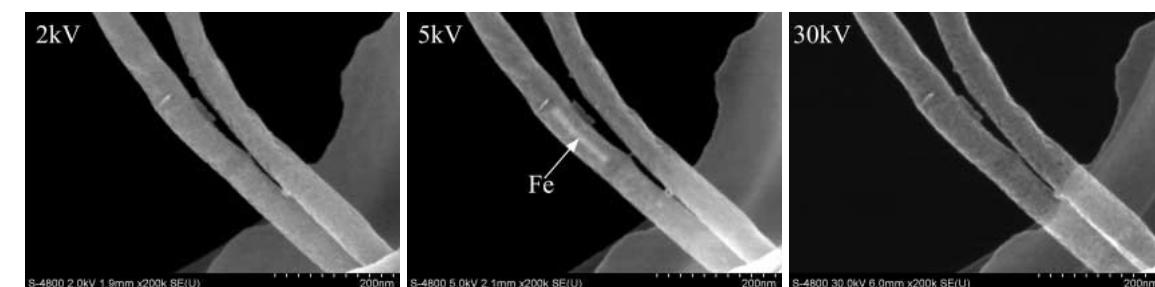


図4 Fe内包カーボンナノチューブ観察における二次電子像コントラストの加速電圧依存性

上野(日立サイエンスシステムズ), 他: Development of specimen holder for in situ TEM observation of the voltage applied nanomaterials.

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他: High temperature in situ electron microscopy using a dedicated scanning transmission electron microscope.

橋本(日立ハイテクノロジーズ), 他: Development of H-7650 digital transmission electron microscope.

多持(日立サイエンスシステムズ), 他: Introduction to Hitachi SEMs: their features, functions, and applications.

4. 第9回LCテクノプラザ (2004・2/2~3, 東京)

井上(日立サイエンスシステムズ), 他: 陽イオン交換樹脂を用いたアミノ酸分析における高分離高速化の検討

石川(日立サイエンスシステムズ) 他: 有機酸分析における高分離化の検討

5. PITTCON 2004 (2004・3/7-12, Chicago, USA)

坂元(日立サイエンスシステムズ), 他: Rapid determination of major and ultra trace elements in terrestrial water by ICP/three dimensional quadrupole mass spectrometer.

井上(日立サイエンスシステムズ), 他: Development of amino acid analysis by the post-column ninhydrin method using new positive ion-exchange resin.

【要旨】アミノ酸分析法としてポストカラムニンヒドリン法は、蛋白質、食品、生体液等の分析に広く用いられている。しかし、内標としてノルロイシンを用いる場合、分析時間の長時間化、分離の悪化が避けられなかった。今回、新規に3μm径の陽イオン交換樹脂を開発し、アミノ酸分析専用機に装着し最適条件を検討した。その結果、ノルロイシンを含む生体液、蛋白質糖の試料において、ノルロイシンを含まない従来法と同等の時間で良好な分析ができる手法を開発できた。

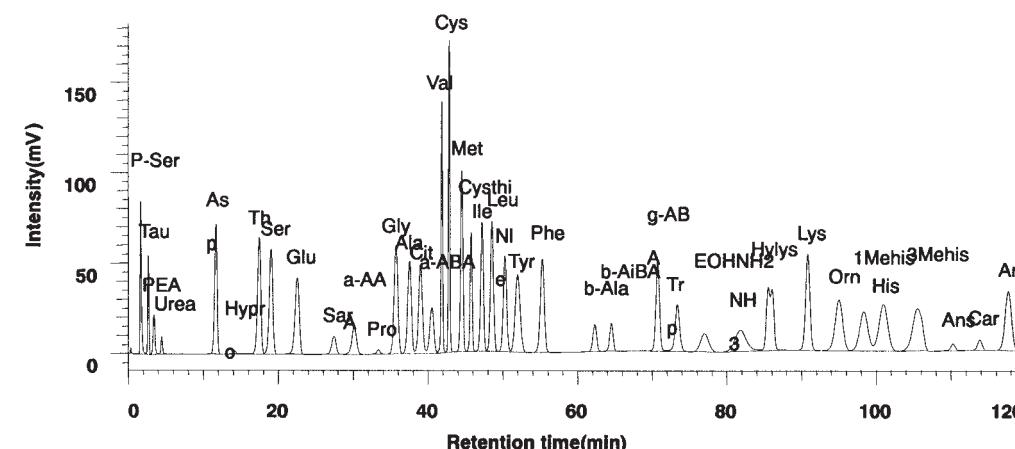


図5 Chromatogram by High resolution physiological fluid analysis

6 . 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2004・5/23-27, Nashville, USA)

伊藤(伸)(日立ハイテクノロジーズ) ; Nanoflow Gradient Generator for Nano Hight-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry.

【要旨】複雑で極微量な生体成分の分離分析には、ナノHPLC-ESI MSが必要不可欠になってきている。ナノ流量域での高効率分離にはグラジェント溶出法が必要である。10万バルブを用いて別途混合した溶離液を順次ステップワイズに送液して良好なナノフローグラジェントを開発した。流量50nL/minにおいても、BSE消化物を分離分析し、保持時間再現性の良好な(RSD1%以下)のデータが得られた。

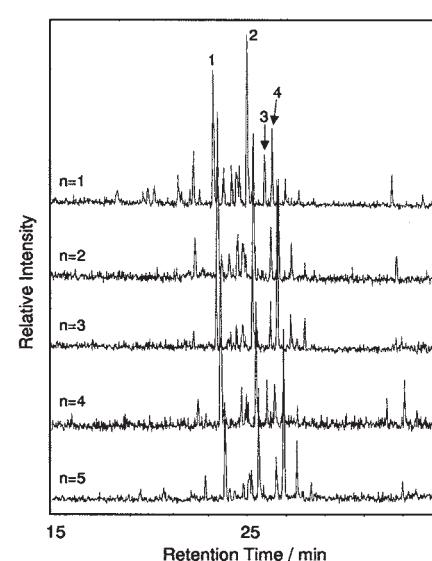


図6 Base ion chromatogram of the tryptic digest of BSA (50 fmol) at a flow rate of 50 nL/min.

馬場(日立製作所) ; Electron Capture Dissociation in a Novel Reaction Cell.

7 . 第52回質量分析総合討論会 (2004・6/2-4, 名古屋)

石丸(日立製作所)他 ; 微量タンパク質の高速酵素消化反応技術の開発

8 . 第65回分析化学討論会 (2004・5/15-16, 沖縄)

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堆積物の鉛同位体比分析とその挙動
平野(日立ハイテクマニファクチャ & サービス), 他 ; 原子吸光分光法におけるヒ素およびセレンの感度向上検討
米谷(日立サイエンスシステムズ), 他 ; 有機溶媒中の分析における化学修飾剤効果の検討

【要旨】塗装原材料や有機溶媒中にコロイド状ケイ素の存在は半導体分野でレジスト塗装むらの原因とされている。前処理無しで直接分析を電気炉加熱原子吸光法で可能にするため、化学修飾剤としてRhを採用した。さらに灰化温度を1400℃とし、有機成分による影響を除去するためオルタネートガス(Ar : O₂ = 8 : 2)を用いた。これらを最適化した結果オイル中のケイ素を測定し、良好な結果を得た。

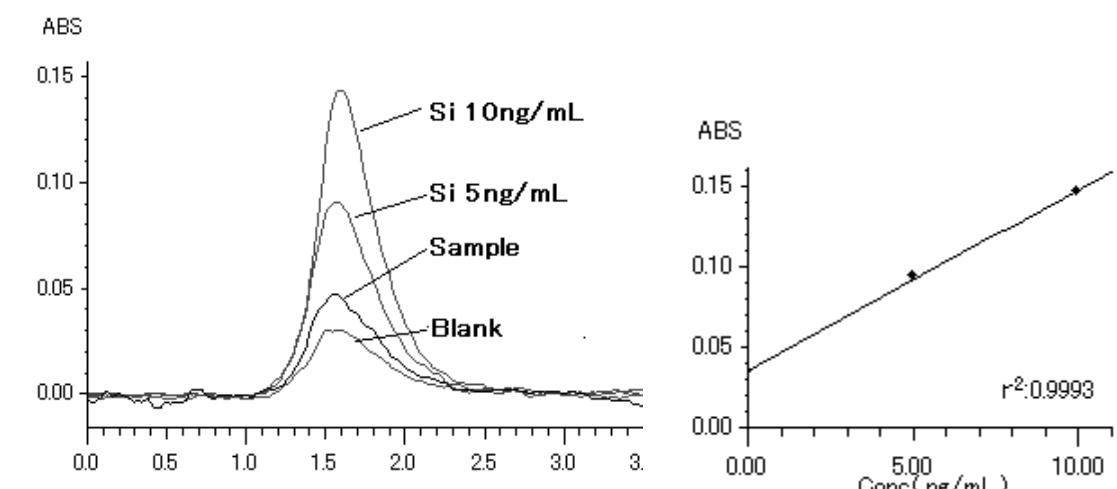


図7 化学修飾剤を用いたオイル中ケイ素の高感度分析

石川(日立サイエンスシステムズ), 他 ; HPLC-ポストカラム法を用いた農薬分析

【要旨】毒性の低い広範な除草剤として使用されているグリホサートは農作物中の残留基準が設定され、水質基準では管理目標設定項目に指定された。ポストカラム誘導体化法によるHPLC-蛍光検出法を用い、分解物と夾雜成分との分離を検討した。新規開発のGL-IC-A27カラムを採用し、良好な分離を得た。この結果、グリホサートの検出限界0.08 μg/L (S/N=3) および良好な再現性が得られた。

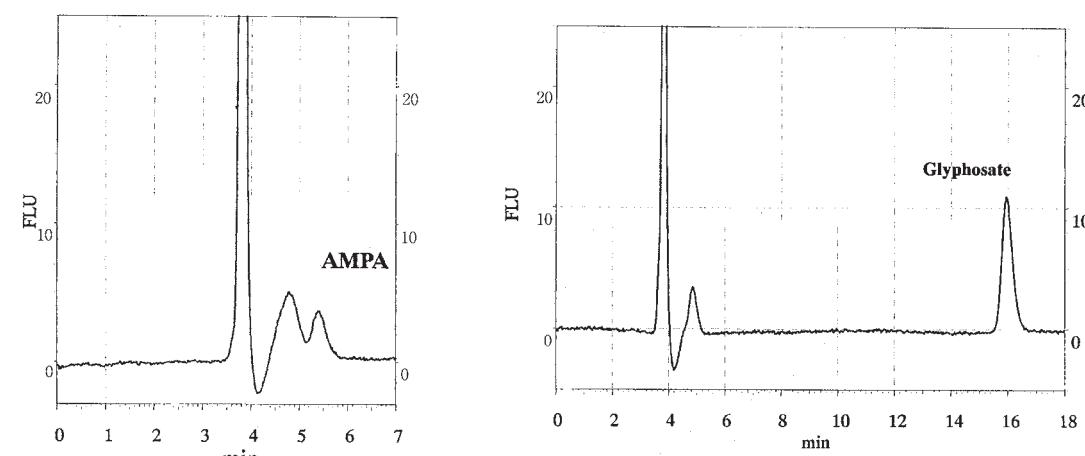


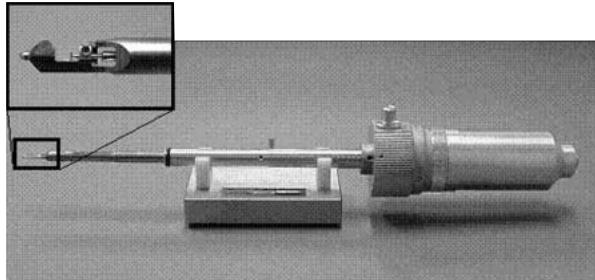
図8 AMPA 5 μg/Lの測定

図9 Glyphosate 2 μg/Lの測定

新製品紹介

3D解析ホルダーの紹介

3D解析ホルダーは,FIB(Focused Ion Beam : 集束イオンビーム)加工観察装置内でピラー状に加工したマイクロサンプルを試料搭載部となるニードルステージ上に固定する機能を備え、そのピラー状のサンプルをSTEM(Scanning Transmission Electron microscope : 走査透過電子顕微鏡)内で360°回転しながら観察するためのFIB / STEM共用試料回転ホルダーです。

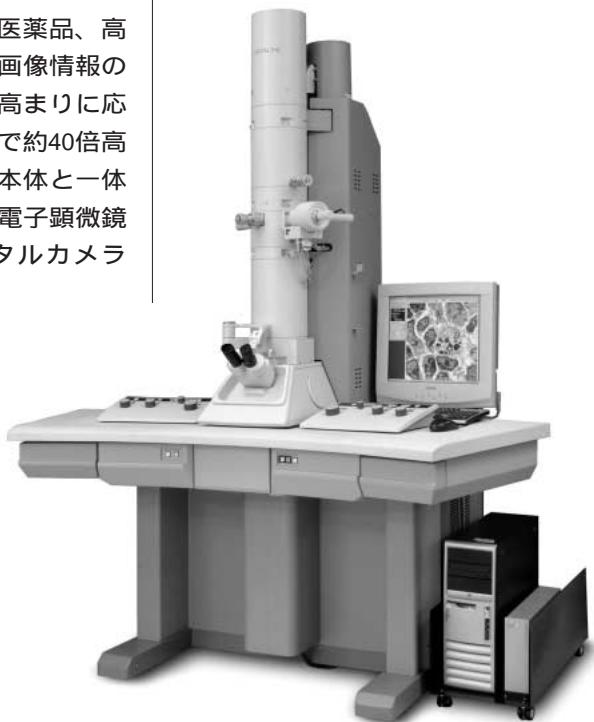


緻密化される電子デバイスなどの構造評価や故障解析に有効にご活用いただけます。

H-7650型透過電子顕微鏡の紹介

医学、生物学の研究や医薬品、高分子材料の開発における画像情報のデジタル化へのニーズの高まりに応えて、対写真フィルム比で約40倍高感度のデジタルカメラを本体と一体化制御したH-7650型透過電子顕微鏡を開発しました。デジタルカメラは、焦点、非点合わせにも記録にも使用が可能です。自動焦

点・非点合わせに加えて、撮影から保存までを自動化したオートフォト機能、画像のデータベース機能、各種フィルターによる画像処理、測長機能を標準で搭載し、幅広いニーズに対応できるシステムとなっています。



◎ 株式会社日立ハイテクノロジーズ

本 社 電話 東京 (03) 3504-7211

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 (029) 825-4801

中部支店 電話 名古屋 (052) 583-5811

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) 862-3391

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

今年も暑い夏が過ぎようとしています。今年の夏は何かとオーバヒート気味であったような気がします。一つは天候です。記録破りの猛暑になり、東京で39.5度を記録し、真夏日も連続40日を記録するなど、新記録となりました。洪水も各地で起こり、台風も当たり年のようにです。被害に会われた方には心よりお見舞い申し上げます。もう一つはオリンピックです。アテネオリンピックでの金メダルラッシュが続いています。まだ、終わっていないのですが、15個くらいは行きそうな勢いです。小誌がお手元に届く頃には結果が出ていると思います。また、この2件の影響からか、エアコンおよびFPD(薄型テレビ)の販売も記録的とのことです。これで少しでも景気回復の糸口になればと期待したいものです。

さて、本号は、巻頭言に東京理科大の二瓶先生(前日本分析化学会会長)に巻頭言を、物質・材料研究機構の宮原先生、北海道大学の出口先生、新潟大学の牛木先生に各報文をいただきました。また、ラウンジにはオホーツク地域振興機構の厚谷先生(前北見工業大学学長)に「摩周湖の長期的モニタ

リングについて」と題するお話をいただきました。いずれも時宜を得た内容で読者の皆様には興味深く読んでいただけるものと思います。

現在、もっと面白く、もっと読みやすくを目標に小誌の内容の見直しを行ってあります。ご意見等ありましたら、ご一報くださいるようお願いします。

(原田 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

販売促進部

〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14

電話 (03) 3504-7811(ダイヤルイン)

FAX (03) 3504-7756

(株)日立サイエンスシステムズ

那珂カスタマーセンタ

〒312-0057 茨城県ひたちなか市石川町11-1

電話 (029) 354-1970(代)

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SEPTEMBER, 2004 VOL. 47 No. 1

発行 2004年9月10日

編集人 原田 勝仁

発行人 小林 紀雄

発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ

〒105-8717

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