

卷頭言

×線顕微鏡の発展と私の関わり

My participation in the development of X-ray microscope

東北大名誉教授
矢田 慶治



顕微鏡の分解能が光の波長で制限され、波長の約半分にしかならないことを理論的に示したのはドイツの光学者E. Abbeで、1970年のことである。それまでレンズを精密に研磨すればもっともっと細かいのもが見えると当時の人は思っていた。Abbe自身も発見してみていたく失望したという[D.Gabor "The Electron Microscope" Electronic Engineering 出版社 1948, Londonによる]

一方、1895年11月にRöntgenが指輪を着けた夫人の手の有名なX線写真を発表した。当時その正体は不明で、放射線の新種「X線」といわれたが、この報告は驚くべき速さで世界に伝えられ、我が国でも数々所で実験が行われた。なかでも京都の第三高等学校の村岡為馳教授は国内企業と共同実験を行い、僅か1年に満たない1896年10月にRöntgenと同様なX線写真撮に成功した。1912年頃にX線の波としての性質が発見され、波長が短く、物質に対する吸収特性に特徴があることから超顕微鏡の可能性が論じられた。Röntgen自身も

試したが、光のように屈折効果はなく断念したそうである。

また、X線発見の2年後、電子がJ.J.Thomsonによって発見された。実はそれ以前に電圧をかけることによって何らかの粒子線が真空管の中を走ることは知られていたが、その電荷と質量を決めるためにThomsonが成功したのである。1927年にはH.Bushが軸対象の電場や磁場で電子用のレンズができる事を示し、1934年頃から電子顕微鏡が作られ始めた。その性能は、電子光学の確立と電子工学など科学技術の発達に伴い、僅か半世紀あまりで非常な速さで向上し、現在は単一原子まで可視化できるところまで進歩したことはよく知られるところである。我が国でも具眼の先人たちが産官学をあげてこの分野に参画し、世界の一流国としての地位を保ち続け、我々ユーザもその恩恵を享受できるのは誠に有り難いことである。

これに対し、X線の方は、その大きな透過力を活かした医学応用が進み、X線写真を光学的に拡

CONTENTS

卷頭言

- ・X線顕微鏡の発展と私の関わり
矢田慶治 1
- 報文
- ・近年の超高分解能FE-SEMを用いた触媒観察
高田 剛 / 堂免一成 3
- ・PLD法により作製した超低抵抗透明導電膜
鈴木晶雄 10
- ・水酸ラジカルのHPLCによる定量法
阿部芳廣 / 李 林香 15
- ・生体試料のリン酸化プロテオーム解析へのチタニアカラムの応用

本間里美 / 堀米恒好 19

解説

- ・タンパク質解析用液体クロマトグラフ
質量分析計 NanoFrontier
照井 康 / 永井伸治 / 伊藤伸也
石井公彦 / 山下絵理
師子鹿司 / 吉岡信二 25
- ・H-7650透過電子顕微鏡の特長
長沖 功 / 渡部 明 / 近藤正樹
橋本隆仁 / 中澤英子 28
- ・最新機能を搭載したS-3400Nの紹介
伊東祐博 / 川俣 茂 / 檀 紫
二村和孝 29

学会発表ミニファイル 32

新製品紹介

- ・日立超高分解能電解放出形
走査電子顕微鏡S-5500 35
- ・日立走査電子顕微鏡S-3400N 35
- ・日立微小デバイス特性評価装置
「ナノ・プローバ」N-6000 35
- ・タンパク質解析用液体クロマトグラフ
質量分析計NanoFrontierのご紹介 36
- ・MTP-800AFCコロナマルチマイクロ
プレートリーダーのご紹介 36

大することはやられたが、光学顕微鏡を凌駕するようなX線顕微鏡はなかなか実現しなかった。そんななかで、ターゲットに電子線を絞って当て、微小X線源を作れば拡大したX線像が得られることを提案した(1940年頃と思われる)のは、ドイツの電子顕微鏡研究家のvon Ardenneで、光学顕微鏡以上の分解能を実現したのはケンブリッジのV.E.Cosslett一派である。なかでもW.C. Nixonは薄い透過型のターゲットを用い、またレンズの収差の小さいものを用いて1950年代の後半に0.1~0.2μmに分解能を向上させた。同様な透過型のX線顕微鏡はGEのS.P.Newburyも行い、製品化もされた。

この透過型に至るまでの厚いターゲットを用いる投影型X線顕微鏡は日本でも、阪大、日立中研など何カ所かで試みられており、私のいた東北大科研でも日立HU-6型電顕を使って試みてみた。その後、私の研究室でSEM(走査電顕)を購入できることになった。私はNixonとCosslettの透過型ターゲットを使った仕事の論文(J.Appl.Phys.24 616(1953))を読んで、強い感銘を受けていたこともあり、投影X線顕微鏡をやってみようと思った。SEMを使うとNixon達が苦労したであろうターゲット上への正確なピント合わせと非点収差補正が容易と考えたからである。この狙いは的中したが当初はなかなか像にならなかった。それともう電子線のX線への変換効率は小さく0.1%程度であることを知らなかったからであった。私の研究室で試行錯誤の末、絞りを何倍か大きくすることにより、数分の露出で済むようになり、ポイントカソードを使ってやがて0.1μmを切る分解能を得ることができた。チャンピオンデータとしては75nmが得られたがNixonが1953年頃に得た0.1μmから20年以上掛かったことになる。波長1nm程度の軟X線で細胞や筋肉などの生物試料のX線像を撮ることにも成功した。この投影型X線顕微鏡は、工業的にも電子部品の内部検査、食品の異物検査などに大きな用途を見いだした。特に最近は、極微細化しつつあるICチップ内部を非破壊でサブμmの分解能で検査できる装置として威力を発揮するようになった。電子源の輝度がさらに2桁向上すれば、Nixonも夢見た分解能10nmに近づき更に有用な装置になるであろう。

他方、長いことX線レンズはできないでいたが、1962年ドイツのG.Möllenstedtは光学用のFresnel zone plate(FZP)を電子光学的に縮小して屈折ではなく干渉によるX線レンズを実現した。この最

初のFZPレンズは、直径1.16mm、輪帯の数784、最外郭の輪帯の幅0.38μm、焦点距離40mmと寸法が極めて小さいもので、開き角も小さいので強度の点でも分解能の点でもそれ程期待できそうになかった。しかし、1970年頃からsynchrotron orbital radiation(SOR)の研究が進み、世界で何カ所かSOR光施設が建設され、数桁輝度の高い単色の軟X線光源が出現したおかげでFZPが使えるようになった。同時に、microfabrication技術の進歩でFZPの性能が向上し、X線光学素子を使った顕微鏡の研究が本格的に始まった。特に、酸素を良く通す波長のX線を用いると水の中の生物試料が見られる、つまり、生きたままの状態で見られるであろう大きな期待が寄せられた。私は、電子顕微鏡の研究が中心であったが、その後も細々と投影型X線顕微鏡の研究を続けていた。1987年から3年間文部省の科学研究費・総合研究(A)「X線顕微鏡の開発と生物・医学への応用に伴う諸問題の検討」の研究代表者を仰せつかり、20数名の日本を代表する研究者と知り合う機会を持つことができ、また1989年には栃木県の自治医大で小規模ながら国際会議を開催することができた。

以上述べたように、X線顕微鏡はその潜在能力に対する期待から種々の試みが行われたが、その発展の歩みは、電子顕微鏡のそれに比べれば、誠に遅々としていた。しかしながら、最近のシンクロトロン放射光科学の発展とX線結像光学用素子にも反射鏡など幾つかのものが考案され、世界的に分解能は20~30nmに達していて、興味ある結果もかなり報告されるようになった。今年7月に日本で最初の第8回国際X線顕微鏡会議が姫路で開催されるが上述の科研費の研究班が呼び水になったことを思うにつけ、これぞX線顕微鏡の成果といえるものが日本から発信されることを心から祈る次第である。

著者略歴

矢田 廉治(やだ けいじ)

現住所 仙台市泉区北中山4-25-11
 1950年 東北大学・工・電気卒
 1950年 東北大学科学計測研究所 文部技官 電子顕微鏡の研究に従事
 1955年 東北大学科学計測研究所 助手
 1964年 東北大学科学計測研究所 助教授
 1975年 東北大学科学計測研究所 教授
 1990年 定年退官(東北大学名誉教授)
 1992年 青森公立大学 教授
 1997年 退職
 1997年 株東研 技術顧問 現在に至る

受賞

1967年 日本電子顕微鏡学会 濑藤賞
 1988年 日本電子顕微鏡学会 論文賞
 1991年 日本電子顕微鏡学会 論文賞

近年の超高分解能FE-SEMを用いた触媒観察

Application of Recent Ultra High Resolution Field-Emission Scanning Electron Microscope for the Observation of Catalyst

高田 剛* 堂免 一成**

1. はじめに

分野を問わず科学の世界では“小さな物を見る”ということに対して多大なる関心と願望があり、見ることに対する挑戦は常に止まない。これは人間が視覚を主な受容器官として行動しているからである。人間の脳の大部分は視覚に深くかかわっており、見ることの行為は無意識のうちに頭脳を存分に活用していることになる。

研究を行う上でも見ることによって得られる情報は多く、シンプルかつ重要な分析手段となる。より小さな構成ユニットを見ることの助けとなるツールは顕微鏡に他ならない。なかでも電子顕微鏡は高い空間分解能をもつ観察用ツールとして欠かすことのできない汎用分析手法である。

電子顕微鏡は透過型(TEM)と走査型(SEM)に分かれるが、ここで筆者らが取り上げて紹介したいのはSEM、その重要性と近年の機種でどこまで見ることができるかについて解説する。

2. SEMについて

電子顕微鏡の基本原理は電子線を電磁レンズを用いて試料の微小領域に照射しそこから出てくるシグナルを検出し画像化するものである。図1に各種シグナルとそれらに対応する像の種類を示す。高エネルギーの電子線を試料に照射した際に、透過する電子の他に二次電子や特性X線が発生する。試料の裏側に出てくる透過電子もしくは回折電子を電子レンズによって結像させるのがTEMである。一方、径を絞った収束電子線で試料上をスキャンし試料の各部分から試料の表側に出てくる二次電子もしくは反射(後方散乱)電子を計測して画像化するのがSEMである。また試料の小領域に電子線を照射し、そこから放出される特性X線を測定し構成元素を調べるのがEDXであり付属の分析機器として併用される。

TEMの特徴としては、極めて高い空間分解能



高田 剛



堂免 一成

が得られることであり、透過波と回折波の干渉による、回折コントラストにより格子像(原子)まで観測でき、また試料内部の結晶状態などの構造が観測できる。しかし得られる像は影絵であり試料の薄い部分のみしか見えない。また得られた像の解釈には注意が必要となり、実際の構造はわかりにくい場合がある。

これに対してSEM、特に二次電子像では表面の微細な凹凸形状がわかり、人間の“見る”感覚に極めて類似したものが得られ、解釈が容易である。顕微鏡による観察は本来“観る”と書くがSEM観測では人間の見る行為に近いため、ここではあえて“見る”と表記させていただく。

他の手段としてSTMやNC-AFMなどの走査プロープ顕微鏡は原子レベルの分解能で試料表面の形状を調べができるものの、特殊な試料調製と複雑な観測条件を要するため制限が多く汎用性に欠けること、また実際に使用しているサンプルとは状況が異なるという点で問題が残る。SEMでは原子レベルの分解能を得ることは当然不可能であり、これら二つの顕微鏡やTEMに比べて分解能は低くなる。SEMの情報でTEMに近い倍率(分解能)での観察が可能なものが顕微鏡の一つの理想形であろう。

SEMの分解能に関しては、一般には数十ナノメートルの構造が見える程度と認識されているかも知れないが、近年のFE-SEMを用いればさらに一桁小さい領域まで見ることができる。特にイン

* 東京大学大学院工学系研究科 助手
** 東京大学大学院工学系研究科 教授

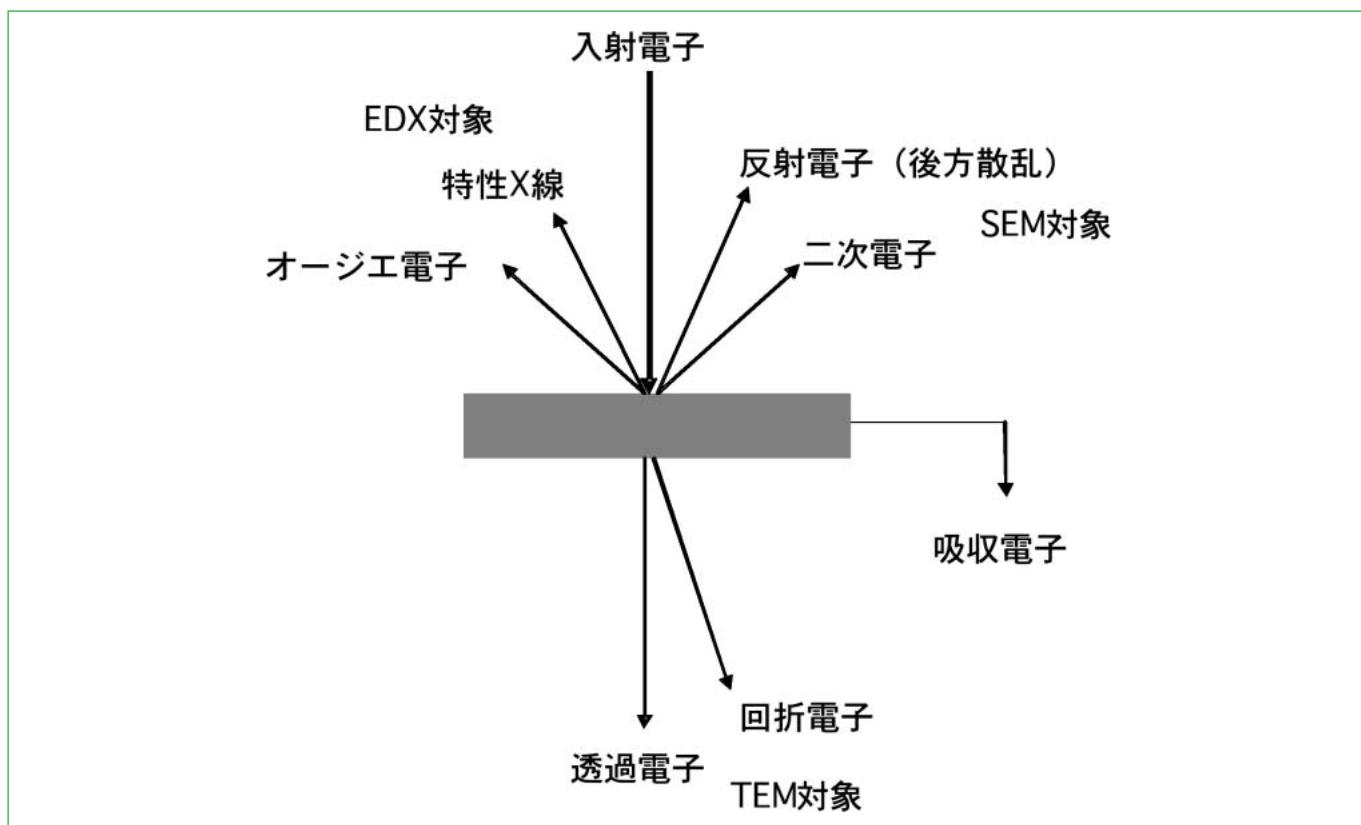


図1 各種シグナルと対象機器

レンズSEMの開発により焦点距離の短縮化を図り分解能は1ナノメートルを切り、最新機種では4オングストロームを記録している。個々の原子は見えないが、最高(最小)では一边に原子が3個程度並ぶ大きさなら見えるところまで進歩しているのが現状である。記載されている装置のスペック上の数値からはどの程度見えるかというのは正確には伝わらない。また構成元素やサンプルの形状によって見える限界は異なる。筆者の研究対象である無機固体をベースとした触媒材料では1-5nmは十分観察可能な範囲である。新しい機種では100万倍での観測も可能であり、十分に高い分解能が得られ、TEMにかなり近いレベルでの観察が可能なのが現状であり、研究者の願望を十分満たしてくれるものである。ただしユーザー側にはその性能はまだ十分に理解されておらず、ナノメートルオーダーの微細構造を観察するための唯一の手段はTEMと認識されがちで、学会や論文での発表ではTEM写真が出されるケースがほとんどである。ここでは近年のFE-SEMを存分に活用することにより触媒の構造がどのように見えるか、またどこまで見えるかを紹介する。観察に用いた機種は日立製作所のインレンズタイプの

S-5200とセミインレンズタイプのS-4700である(現在同社のそれぞれのタイプの最新機種はS-5500とS-4800であるため、真の最先端のものはお見せできないのは残念である)。

3. 担持金属の観察例

触媒では反応効率を上げるために活性な成分を担体上に分散させて用いる場合が多々ある。これらの担持金属の状態は触媒活性に大きく影響し、特に担持金属の粒子径が5nmを下回るあたりから、従来にはない特殊な性質が発現することがある。そのため、担持金属の構造観察は触媒機能を理解する上で重要である。担持金属の構造は一般的にはガス吸着やTEM観察により調べられているのが現状である。図2にTEMによる観測例を示す。担体上(TaON)にRuを特殊な方法により0.05wt%担持した試料(a)であるが、直径1-2nm程度の微粒子が半球状で存在しているのがわかる。担持量を0.15wt%と増やした場合(b)は0.05wt%の時と同様に1-2nm程度の粒子が二次的に凝集して塊となっている。担持量の増加により粒子径ではなく分散度に変化が見られることがわかる。TEM観測により構造を観察し、担持金

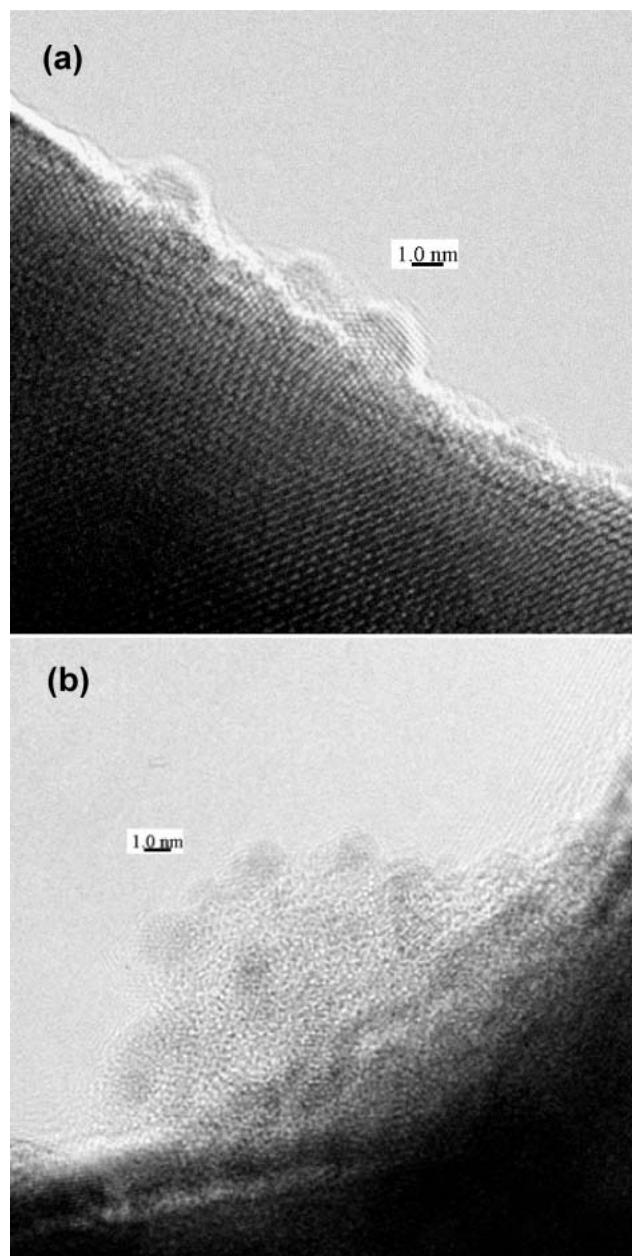


図2 Ru/TaONのTEM像
(a)Ru0.05wt%,(b)Ru0.15%

属の状態を推測することができるがTEMでは試料の薄い部分しか観測できないため、イメージしたもののは実際の形状とは異なる場合がある。次に同試料をSEM(S-5200を使用)により観測した結果を図3に示す。観測倍率は30万倍(a)および100万倍(b)である。Ru粒子が見られるのは試料の限られた所であり局所的にしか担持されていないことがわかる。100万倍の観測では個々のRu粒子が確認でき、そのサイズは1-2nmであることも確認できる。担持量を増やした場合(c)、Ruが密集して見られる場所はあるが、Ru粒子が全く存在しない場所も残っている。このような分散具

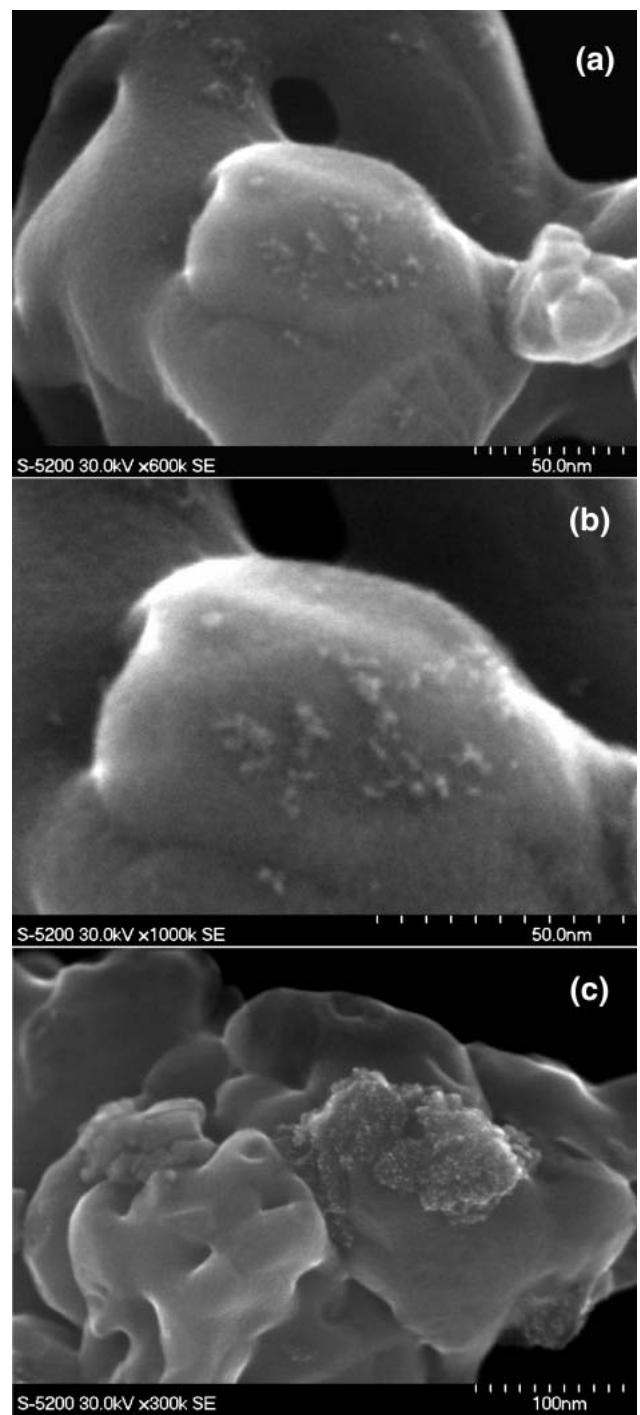


図3 Ru/TaONのSEM像
(a)60万倍,(b)100万倍,(c)Ru担持量が多い場合

合に関する情報はTEMやガス吸着からは得ることができず、SEM観測の重要性がこれらの写真からわかるであろう。

ここで観測上のテクニックを紹介する。SEM観測で常に懸念されるのが、絶縁試料における帯電現象とそれに伴う二次電子像のゆらぎ(チャージアップ)により観測が困難なことが挙げられる(本説で紹介する筆者の研究材料は全て絶縁性の

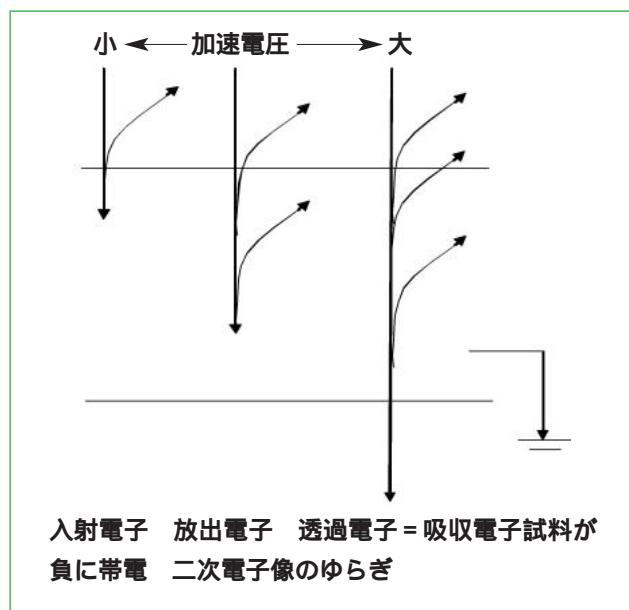


図4 加速電圧とチャージアップ

試料である。負の電荷を持つ入射電子線は試料中で、透過、反射、二次電子などの様々なシグナルに変わるが、それらの差し引き分だけ絶縁試料の場合は電荷が蓄積されることになる。これが試料帯電の原理であり、これを回避しなければ正当な画像は得られない。これを回避するための一般的な手法は、試料表面に導電性の金属微粒子をコートし試料台と接地させることにより電荷を放すことである。ただしこの場合、コートした金属はいかに工夫しても1nmオーダーの大きさとなり、近年のFE-SEMの性能をフルに発揮するところは見えてしまう。金属コートなしで観察する場合は加速電圧を非常に低くして二次電子の大半が試料外に脱出できるようにする方法もある。しかしこの場合には走査電子線のプローブ径が大きくなり必然的に分解能は上がらない。高加速電圧で金属コートなしに絶縁試料を見ることはできないと一般的な認識があるがこれは大きな間違いであり、逆に加速電圧をさらに上げることによりチャージアップはほぼ完全に回避できる。この理由を図4により解説する。低加速電圧では入射電子は試料表面近傍でその運動エネルギーを失うため二次電子も試料表面付近で発生するためそのほとんどが試料から脱出するため帯電量は少ない。これより加速電圧を上げると入射電子は試料の奥深くまで進入する。試料内部で発生した二次電子は試料内でトラップされるためこの分の負電荷がたまりチャージアップの原因となる。さらに加速電圧を上げた場合は入射電子の大部分は試料を貫通するこ

とと一つの入射電子がはじき出す二次電子の割合が増えるため負電荷はたまなくなりチャージアップは抑制される。一般的な装置の最高加速電圧である30keVでは数十ミクロンの粒子でも入射電子は貫通するためチャージアップはなく、また小さいプローブ径でスキャンできるため最高分解能を引き出すことができる。担持金属触媒のサンプルの大半は加速電圧30keVで観測したものである。

次に担持金属触媒の観察における反射電子の用途を例を挙げて紹介する。反射電子は入射電子が原子核で跳ね返ってきたものであり、重たい元素ほど反射量が多く像の中での輝度は高くなる。図5にTaONにRuおよびPtを担持したものの二次電子像と反射電子像を示す。Taより軽いRuの場合は暗く陥没したようなかたちで写る(もともと窪んでいる部分は暗く陥没して写るが)。それに対して重たいPtでは下地より明るく写る。形状ではなく成分の違いによりコントラストができるのが反射電子像である。

図6にPtとRuを共担持したもののSEM像及び反射電子像を示す。二次電子像(a)ではPtとRuのサイズが同程度であるため見分けはつかない。次に加速電圧4.0keV(b)および2.0keV(c)で撮影したものの反射電子像を示す。4.0keVでは担持金属粒子は検出できないものの2.0keVは二次電子像と対応した場所にそれぞれの粒子が明暗のコントラストとしてかろうじて浮かび上がる。二次電子像と同じ場所で輝点として残っているのがPtで(破線丸)、暗く陥没して見えるのがRuである(実線丸)。反射電子と二次電子の物理的な性質の主な違いは運動エネルギーの大きさである。二次電子はせいぜい数十eV程度であるのに対し反射電子は入射電子のエネルギーに依存するためkeVオーダーの運動エネルギーをもつ。運動エネルギーの小さな二次電子は平均自由行程が小さく試料表面近傍で発生したもののだけが検出されるのに対して反射電子は試料内部で発生したものも試料外に脱出し検出される。よって反射電子では加速電圧が高いときは試料の奥深くまで進入し、内部構造も積み重ねた像になるため表面の微細な粒子の情報は埋もれて見えない。それに対して低加速電圧では表面近傍の情報のみを取り出すことができるため担持金属微粒子の明暗のコントラストを取り出すことができる。低加速反射電子により数ナノメートルオーダーの担持金属の成分を見分けることができる新しい手法である。反射電子像では二

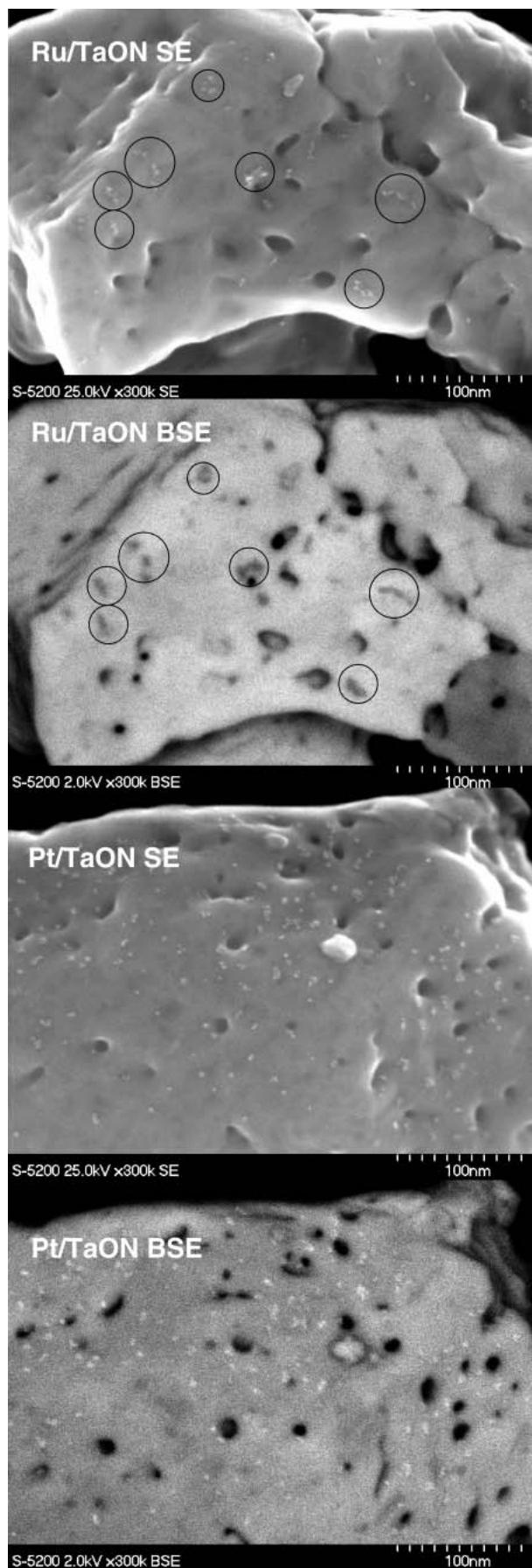


図5 Ru / TaONとPt / TaONの二次電子像(SE)と反射電子像(BSE)

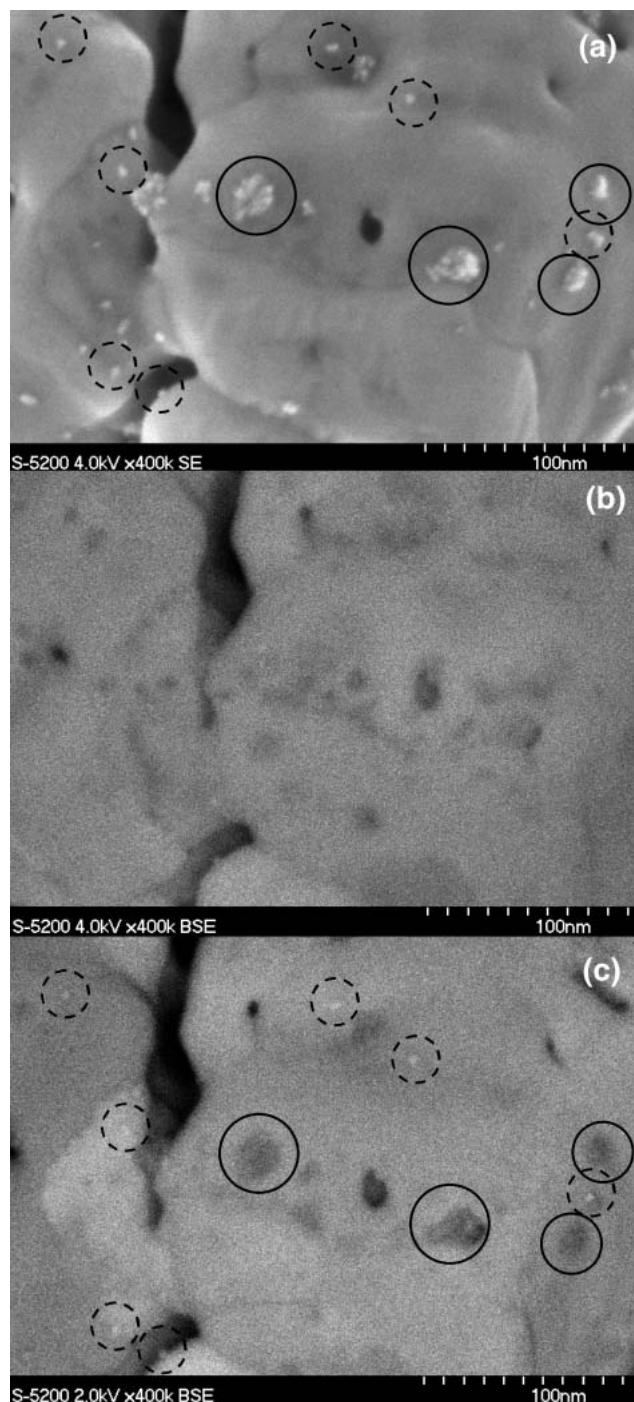


図6 Ru / TaONの(a)二次電子像,(b)反射電子像 $V_{acc} = 4.0\text{keV}$, (c)反射電子像 $V_{acc} = 2.0\text{keV}$

次電子像のように明確な形状はでてこない。当然、高倍率での観測は非常に困難となる。ここで用いたHitachi S-5200では一つの検出器で二次電子と反射電子シグナルを選択的に使い分ける(ExB機能)ことができる。従来では反射電子検出のためには検出器の入れ替えおよびそれに伴う試料台の移動といった作業が含まれ反射電子での観察は大きな制限を伴い、ここで紹介するような領域での観察例はなかった。S-5200の高い分解能とExB機



図7 SBA-15のTEM像

能といった装置のアドバンテージによりこのような反射電子による高倍率での微細構造観察が可能となった。ナノメートルサイズの構造観察にも十分にSEMを適用することが可能で、TEMよりも真の形状を知るのに適した場合があることがわかるであろう。

4. 規則性多孔質材料の観測例

ナノメートルオーダーの細孔構造を有する多孔質材料は、触媒の分野でもよく用いられる。規則的な細孔の配列をもつメソポーラス材料は様々な手法で新規に合成されているが、その構造確認においても顕微鏡の活躍する舞台となる。X線回折やガス吸着により構造に関する情報を得ることはできるがそれらの情報のみでは構造に対する理解は推測の域である。顕微鏡を用いて直接的に観察したほうがより多くの情報が得られる。図7にSBA-15のTEM像を示す。蜂の巣状に規則配列した細孔の入り口と筋状の奥行きを示す部分があるのがわかる。明視野像では試料密度の高いところは暗く、逆に低いところは明るくなるため、薄く見える部分から細孔の存在が推測できる。TEMの場合は試料の内部の構造も重なって写るため細孔の入り口を正面から撮影しなければその構造は写らない。また試料が厚い場合はなおさら困難である。この粒子の断面、もしくは細孔の入り口を正面から見るのがベストアングルであろう。しかし実際正面を向いている粒子はそれほどなく、そのような粒子を探す、もしくは試料を傾けるような作業は至難の業である。それに対してSEMでは表面の構造のみを取り出すので場所を選ぶ手間はそれほどかからない。次に同試料のSEM像を

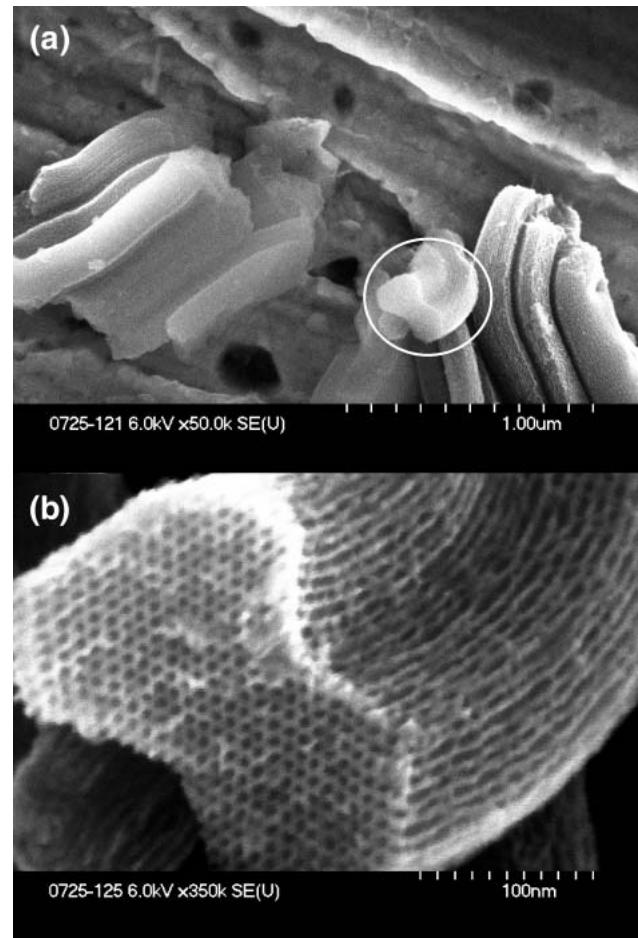
図8 SBA-15のSEM像
(a)6万倍,(b)35万倍

図8に示す。低倍率での観測(a)では棒状の粒子が幾つか横たわっているのが見える。この中で一つ直立している棒状の粒子、つまりエッジの部分が上を向いているものがあり、細孔の入り口らしきものが確認できる。これを倍率を上げて見ていくと規則的に細孔が配列した蜂の巣状の構造がはっきりと見える(b)。このようにSEMではTEM像からは判別できない構造情報を得ることができる。しかしSEMでは内部構造は観測できないのでTEMと併用することが望ましい。ここではお見せできないが透過像も見ることができるSTEM機能も兼ね備えたSEMも同社からリリースされている。

ここでこの材料の観測を行う上でのテクニックを紹介したい。図9に加速電圧20keV(a)および6keV(b)で撮影したSBA-15(メソポーラスシリケート)のSEM像を示す(S-4700を使用)。20keVでの撮影では透けた像になり粒子の輪郭さえ確認できない。これに対して6keVでは試料の形状が見えてくる。加速電圧を6keV以下にするとチャー

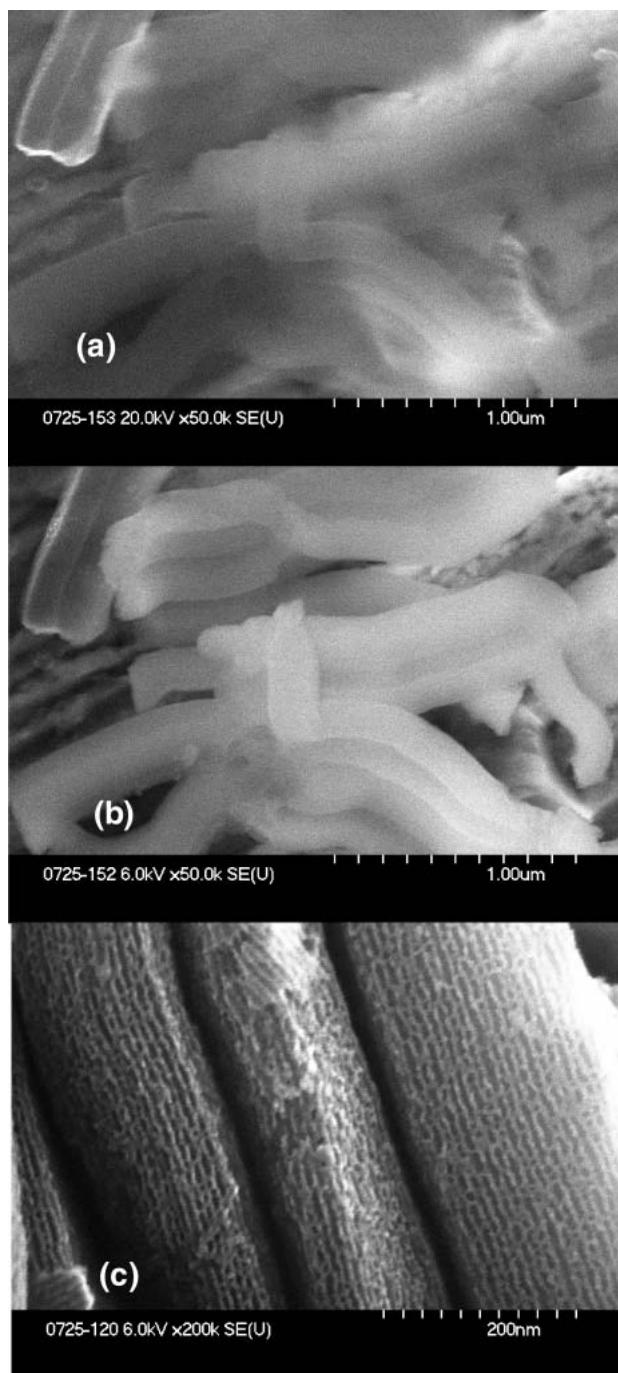


図9 様々な条件での撮影

(a) $V_{acc} = 20\text{ kV}$, (b) $V_{acc} = 6\text{ keV}$, WD = 6mm,
(c) $V_{acc} = 6\text{ keV}$, WD = 3.5mm

ジアップが起こる。6keVという設定値は、入射電子がこの試料を貫通しはじめ、電荷が溜まらなくなる条件であろう。一般的には加速電圧が高いほうが照射電子線のプローブ径は小さくなり分解能は上がる。しかし比較的軽い元素で構成された多孔質材料のような試料密度の低いものの場合は加速電圧が高すぎると、内部の情報も重なって透けたイメージになることがある。そこで少し加速

電圧を下げるといい表面の形状が浮かび出てくる。さらに明瞭なイメージを得るために試料を対物レンズに近付けて観察することである。より明瞭な表面形状が見えてくるのがわかるであろう(c)。低加速電圧では高加速電圧の場合と比べて焦点距離(WD)の最小値が小さくなる。このため試料を対物レンズにより近づけることができる。セミインレンズタイプの機種では、この試料高さの調整が容易である。SEM観測での分解能向上の要因は加速電圧の増大と焦点距離の短縮にある。これら二つの要素に注意して観測条件を探していくればSEMでも数ナノメートルレベルの構造を見ることは十分可能である。

5. おわりに

SEMを用いてナノメートルオーダーの微細な構造を直接見ることにより他の手法では得ることのできない意外な発見と重要な証拠に遭遇することは多々ある。SEMでは結果の解釈が容易で万人に対して平等な理解が得られると思う。容易といえどもその中に含まれている情報は非常に多い。これは視覚を介した情報処理には人間の脳の大部分が無意識のうちに作用するため多くの情報も瞬時に解釈できる。近年のFE-SEMが予想以上に良く見え、直感的な理解に役立つ手法であることをお分かりいただければ幸いである。

本説の執筆にあたりご協力いただきました方々を以下にご紹介するとともに感謝の意を表したい。

S-5200による担持金属触媒の撮影：日立サイエンスシステムズ物性評価部表面評価グループ、渡邊俊哉氏。

SBA-15の試料ご提供：東京工業大学資源化学研究所、野村淳子先生。

TEMによる撮影：東京工業大学資源化学研究所、魯大凌博士。

U.D.C.621.397.46.032.2.028.2 : 535.376 : 539.23

PLD法により作製した超低抵抗透明導電膜

Super Low Resistivity Transparent Conducting Oxide Films Prepared by Pulsed Laser Deposition

鈴木 晶雄*

1. はじめに

現在、透明導電膜は主として液晶ディスプレイやプラズマディスプレイの透明電極として多く使われている。また次世代のフラットディスプレイの候補として有機ELディスプレイが有望視されているが、これにも透明導電膜は不可欠である。特に、液晶ディスプレイは従来困難とされていた大型化、応答速度の高速化の問題がブレークスルーされ、携帯電話の小型画面から液晶プロジェクター、パソコン用モニター、そして大型液晶テレビまで対応できる技術が確立され実用化に至っている。電子顕微鏡など計測・分析装置の種々モニターにも省スペース、省エネルギー、長寿命などの利点を活かし液晶ディスプレイが多く使われるようになった。このようなフラットディスプレイに使われる透明導電膜に要求される性能は、可視光領域での光の透過性と電気的な導電性が高いことが基本特性として挙げられる。さらに表面形態が平坦で、耐プラズマ特性が高く、加工工程においてエッティング特性が優れていなければならぬ。また、生産レベルにおいては大面積化および均一(均質)化技術が必須条件となり、コスト面では材料が豊富で安価、製造コストが低いことが挙げられる。一方、環境面では毒性が皆無でリサイクルが可能な材料を使用し、さらには製造工程においても汚染物質などが生み出されないと環境保護の観点に立ち開発し生産しなければならない。

今までに実用化に至った透明導電膜の材料としては酸化インジウム系のITO(Indium Tin Oxide)がほとんどを占めるが、古くからタッチパネルや太陽電池などに使われてきた酸化スズ系(SnO_2)があり、最近ではITOの主原料のインジウム元素が枯渇の危機に瀕しているためITOの代替材料として酸化亜鉛系(ZnO)が大きい注目を浴び、これら三種類は透明導電膜材料の三本柱と位

置づけられている。

著者は、以前より透明導電膜の研究に取り組んできたが、1995年頃からはPLD(Pulsed Laser Deposition)法を用いて極めて抵抗率の低い(電気的な導電性が高い)高品質な透明導電膜の作製に関する研究を中心にを行ってきた¹⁻⁴⁾。

2000年頃からは、著者が開発した独自の工夫を施したPLD法で 10^{-5} · cmオーダーの世界的にもトップクラスの抵抗率の値が得られたスーパーITOおよびスーパーAZO(Aluminum doped Zinc Oxide)と呼ばれる超低抵抗透明導電膜の研究に取り組んできた⁵⁻⁷⁾。

2. PLD法による透明導電膜の作製

PLD法に用いられる代表的な実験装置の概略図を図1に示す¹⁻⁷⁾。レーザー光源には、安定して高出力なパルス光が得られるArFエキシマレーザー(波長193nm)を用いた。レーザー出力としての1パルスあたりのエネルギーはターゲット材料により異なるが、数10mJ~数100mJとし、繰り



鈴木 晶雄

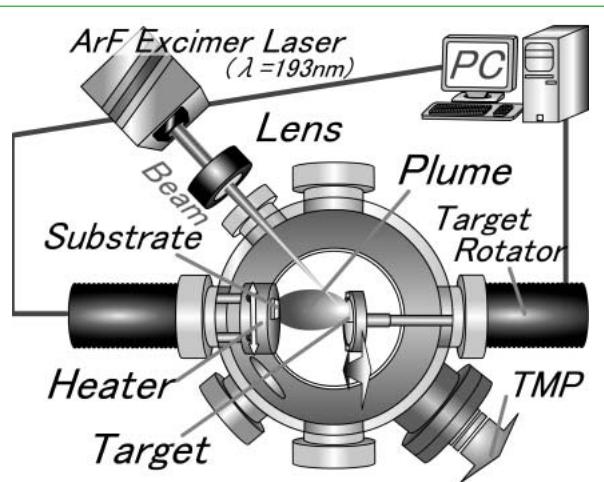


図1 PLD法で用いられる代表的な実験装置の概略図

* 大阪産業大学工学部電気電子工学科 教授(副学長) 博士(工学)

返し周波数は、数Hz～数10Hzとした。排気速度・到達真真空度は、一般的なターボ分子ポンプ仕様程度とした。ターゲットホルダーおよび基板ホルダーのステージはターゲットの損傷集中・利用効率を考慮し、さらに均質な膜を得るために自由自在にパソコン等で移動可能な機構とした。基板ヒーターは400～600℃程度まで加熱可能で、ガス導入(主として酸素ガス)はチャンバー全体および基板付近に集中して導入した。ターゲットには2インチ径の市販のITOおよびAZOの焼結体を用いた。

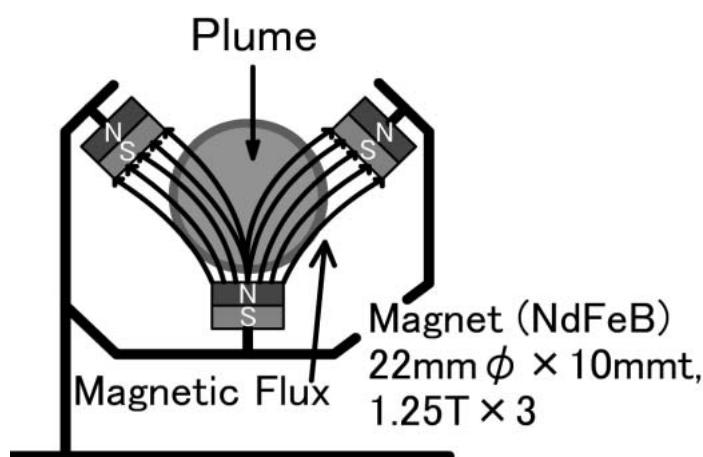
3. PLD法で作製した超低抵抗酸化インジウム系透明導電膜の特性

現在までに、基板に単結晶基板(YSZ)を用いる方法⁸⁾、レーザービームを二つに分けて基板照射用のアシストレーザーで結晶化を促進させる方法など独自の工夫が施され⁹⁾、スーパーITOまたはUHQ(超高品质)ITOと呼ばれる $10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ オーダーの抵抗率を有する透明導電膜が報告されている。著者はArFエキシマレーザーを使用したPLD法を用い、プルームに対して垂直に磁場を印加することで $10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$ 以下の抵抗率を初めて達成し⁵⁾、その後ターゲット基板間距離を極端に近づけて成膜する方法を開発し再現性よく $10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ オーダーの抵抗率を有する超低抵抗ITO透明導電膜を得ることができた⁶⁾。

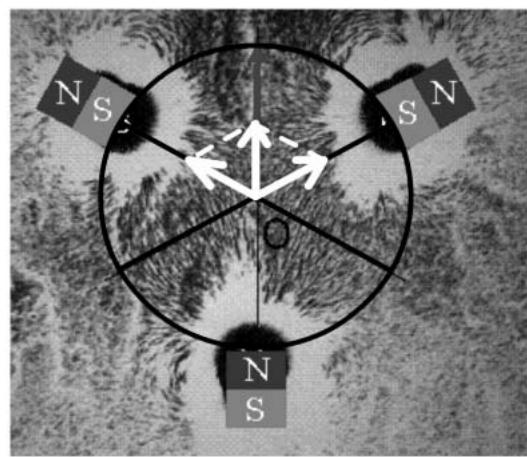
PLD法で発生したプルームの形状・大きさは、主にレーザー出力とチャンバー内圧力に大きく依存する。ITO透明導電膜を成膜する場合、レーザー出力の増加に伴いプルームは縦横に大きくな

り、酸素導入によるチャンバー内圧力の増加に伴いプルームの広がりは横方向が抑制され縦長形状となる。また、成膜された透明導電膜の膜厚はこのプルーム形状・大きさを反映しプルーム中心付近で増加し、周辺部が減少する。この膜厚分布の問題はターゲット基板間距離を大きくとるか、あるいは基板を移動しながら成膜することである程度解決できるがプルームの形状・大きさを制御する試みはあまりされていなかった。そこで著者はマグネットロンスパッタリング法と同様にプラズマを磁場で制御する実験を行った⁶⁾。ここで実験に用いたマグネットは強力な磁場が簡単に得られる希土類磁石のNdFeB永久磁石(磁束密度は約1.25T)である。マグネットの個数・配置・極性でプルームの形状は大きく異なるが、良好な実験結果が得られたときの代表的なレイアウト例を図2(a)に示す。このときの磁力線を鉄粉で可視化したときの様子を同図(b)の写真に示す。

次に、この手法で作製したITO透明導電膜の電気的・光学的特性を図3に示す。同図(a)は電気的特性の基板温度依存性を、(b)には透過率スペクトルを示す。電気的特性では磁場を印加した場合、各基板温度でキャリア密度nと移動度μともに増加し、そのため抵抗率ρが大きく減少している。この傾向は基板温度が高いほど顕著となる。ここで最小抵抗率としては基板温度300℃で $7.2 \times 10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ の値(図中の矢印：著者の研究室ではチャンピオンデータ)が膜厚約30nmで得られた。一方、透過率スペクトルは磁場を印加して作製した場合、若干低い値を示したが透明導電膜の定義(400～700nmの可視光領域で透過率の平均値が



(a)



(b)

図2 プルームに対して垂直な磁場を印加した場合の磁石のレイアウト図(a)と可視化した磁力線図(b)

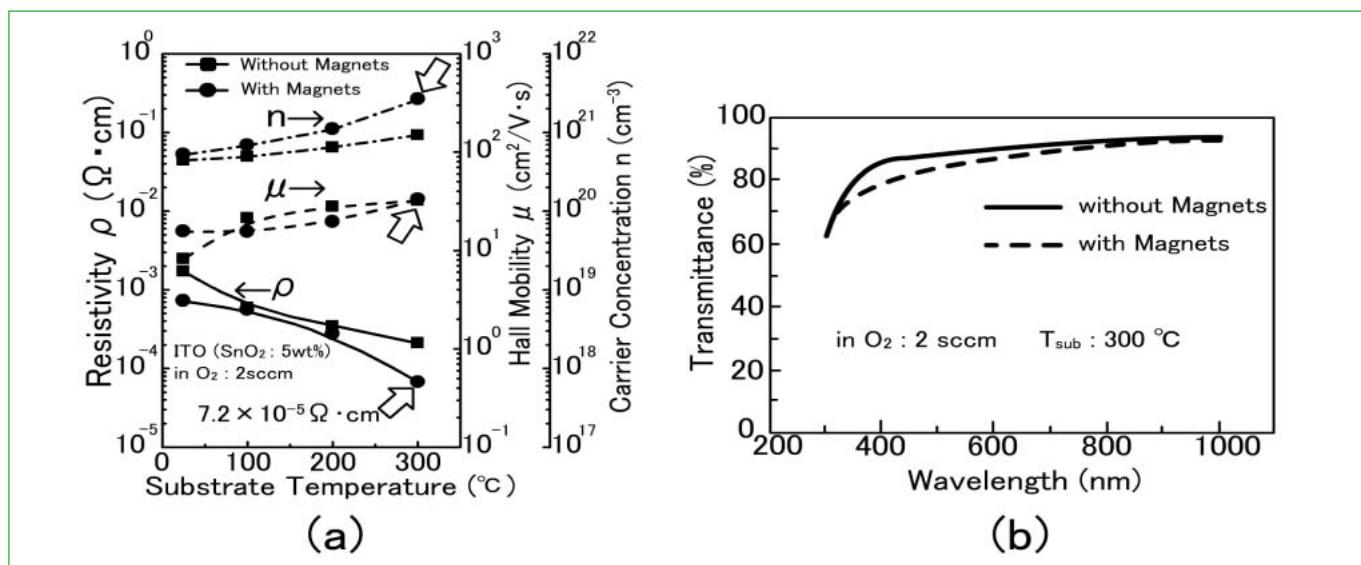


図3 ブルームに対して垂直な磁場を印加して作製した超低抵抗ITO透明導電膜の電気的特性(a)と光学的特性(b)

80%以上)は十分に満たしている。

PLD法においてブルームに対して垂直な磁場を印加して 10^{-5} · cmオーダーの超低抵抗ITO透明導電膜が得られたことについて述べたが、この方法では再現性に若干問題があった。

そこで著者は再現性良好(70~80%以上の確率)スーパーITOと呼ばれる超低抵抗ITO透明導電膜を作製する手法を考案した⁶⁾。通常、PLD法においてはターゲットと基板の位置関係は膜厚分布を抑えるためブルームの発光部分の先端付近に基板を配置する。このターゲット基板間距離は著者が使用しているArFエキシマレーザーを用いたPLD装置でITO透明導電膜を作製する場合、レーザー出力が50mJ程度では40mm前後、300mJ程度では80mm前後必要となる。このとき10Hz程度のパルス繰り返し周波数で、10~20分程度の成膜時間で約100nmの膜厚が得られる。これ以上近づける場合は、堆積レートは増加するが光学的特性および表面形態が悪化する。但し、ターゲット基板間距離を極端に近づけると、たとえば10mmでは電気的特性の抵抗率が 1×10^{-4} · cm程度まで下がることがわかった。しかしながら透過率が70%以下に低下し、さらに表面形態は極端に悪化し透

明導電膜の定義からは逸脱した。そこで、著者はこれらの現象は酸素不足に大きく起因していると予測を立て酸素分圧を通常より数桁以上高い10Paと極端に大きく増加させて実験を行った。

その結果、表1に示すように最小抵抗率が 8.45×10^{-5} · cmの値が得られ、再現性も改善され約75%の確率(実験4回で3回達成)で抵抗率 10^{-5} · cmオーダーのスーパーITOの作製が可能となった。

4. PLD法で作製した超低抵抗酸化亜鉛系透明導電膜の特性

AZO(ZnO : Al₂O₃)およびGZO(ZnO : Ga₂O₃)などの酸化亜鉛系の透明導電膜は資源および環境面で(インジウムフリーのため)大きな優位性を示し以前より、南らにより詳しく報告されてきた¹⁰⁾。PLD法では著者がAZOおよびGZOで低抵抗な透明導電膜が得られたことをすでに報告しているが^{4, 5)}、最近、磁場印加型のPLD法でスーパーAZOと呼ぶことができる 10^{-5} · cmオーダーの抵抗率の値がAZO透明導電膜で得られたことについて報告している^{8, 9)}。

図4に前項で述べた超低抵抗ITO透明導電膜を

表1 ターゲット基板間距離10mm、酸素分圧10Paで作製した超低抵抗ITO透明導電膜の電気的・光学的特性

Sample number	Resistivity (Ω·cm)	Hall Mobility (cm ² /V·s)	Carrier Concentration (cm ⁻³)	Average Transmittance (%)	Thickness (nm)
1	8.45×10^{-5}	53.5	1.38×10^{21}	84.7	315
2	9.72×10^{-5}	58.9	1.09×10^{21}	83.7	321
3	8.78×10^{-5}	51.6	1.38×10^{21}	91.7	281

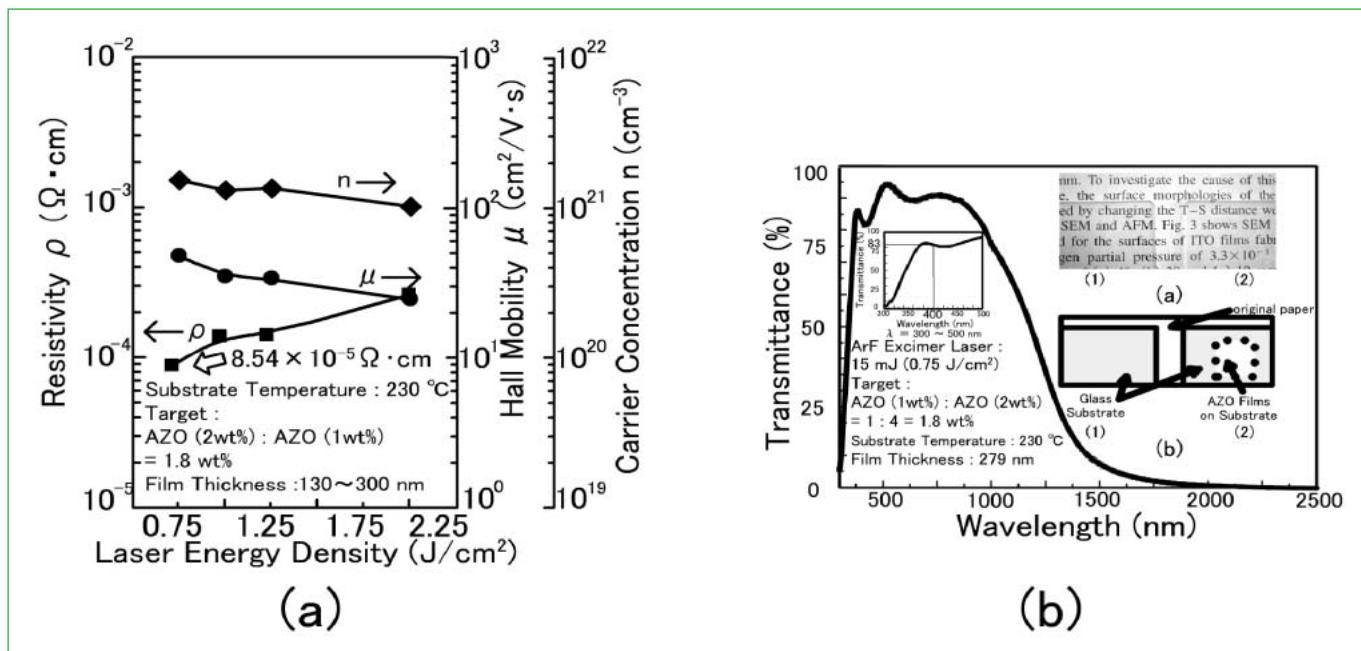


図4 磁場を印加して作製した超低抵抗AZO透明導電膜の電気的・光学的特性

作製したときと同様の方法でプルームに対して垂直な磁場を印加し、さらに成膜条件の最適化をはかって作製した超低抵抗AZO透明導電膜の電気的・光学的特性を示す。ここで成膜の最適条件は、不純物の Al_2O_3 のドーパント量はスプリットターゲット(Al_2O_3 が1wt.%と2wt.%を半分づつ組み合わせる)を用い1.8wt% (従来は2wt.%), レーザー出力は15mJ (従来は40mJ以上), 基板温度は230 (従来は300) であった。

同図(a)は電気的特性のレーザーエネルギー密度依存性を示す。これよりレーザーエネルギー密度を減少させるほど抵抗率が下がる傾向を示し、 $0.75\text{J}/\text{cm}^2$ のとき $8.54 \times 10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ の最小抵抗率が得られた。尚、このレーザーエネルギー密度の値は成膜可能な最小限の値でこれ以下では成膜されない。同図(b)に、このAZO透明導電膜の透過率スペクトルと実際に成膜したAZO透明導電膜の写真を示す。長波長側では大きなキャリア密度のためプラズマ共鳴現象で900nm付近から透過率が急激に低下し、一方、拡大挿入図の短波長側ではBurstein-Moss効果のため吸収端波長が酸化亜鉛のバンドギャップ(3.37eV : 370nm)より若干短波長側にシフトしていることがわかる。次にキャリア密度同様に超低抵抗に寄与した高い移動度が得られた理由を解明するためにAZO透明導電膜の結晶構造解析を行った。

図5にX線回折パターンと基板界面付近の断面TEM像を示す。同図(a)より磁場を印加して作製した場合、印加しないときより ZnO の(0002)面と

(0004)面が明確に現れ、ガラス基板より強くC軸に配向していることがわかる。これより、磁場を印加して作製した超低抵抗AZO透明導電膜は、薄膜全体が高い結晶性を有していることがわかる。また同図(b)より、磁場を印加して作製した場合、ガラスとの界面より結晶配列に乱れが少ないことがよくわかる。この現象は、薄膜とガラスの界面以外のあらゆる部分で観察された。

これらの結果より、超低抵抗の $10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ オーダーの抵抗率に大きく寄与した高い移動度が得られた理由は、ガラス基板との界面付近から結晶が成長し薄膜全体にC軸配向の結晶面が広がったことに起因し、磁場を印加することで薄膜全体の結晶性が大きく改善され低抵抗化につながったと考えられる。

5.まとめ

独特の工夫を施したArFエキシマレーザーを使用したPLD法を用いてスーパーITOおよびスーパーAZOと呼ばれる超低抵抗透明導電膜を作製したことについて述べてきたが、超低抵抗($10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ オーダーの抵抗率)を得るための要点を以下にまとめた。

- 1) 強力な磁束密度(1.25T)を有する希土類磁石(NdFeB)を用いプルームに垂直に磁場を印加することでアブレーション粒子群にローレンツ作用を生じさせ基板への衝突エネルギーの緩和をはかり結晶性の良い膜を堆積させることにより低抵抗化が実現でき

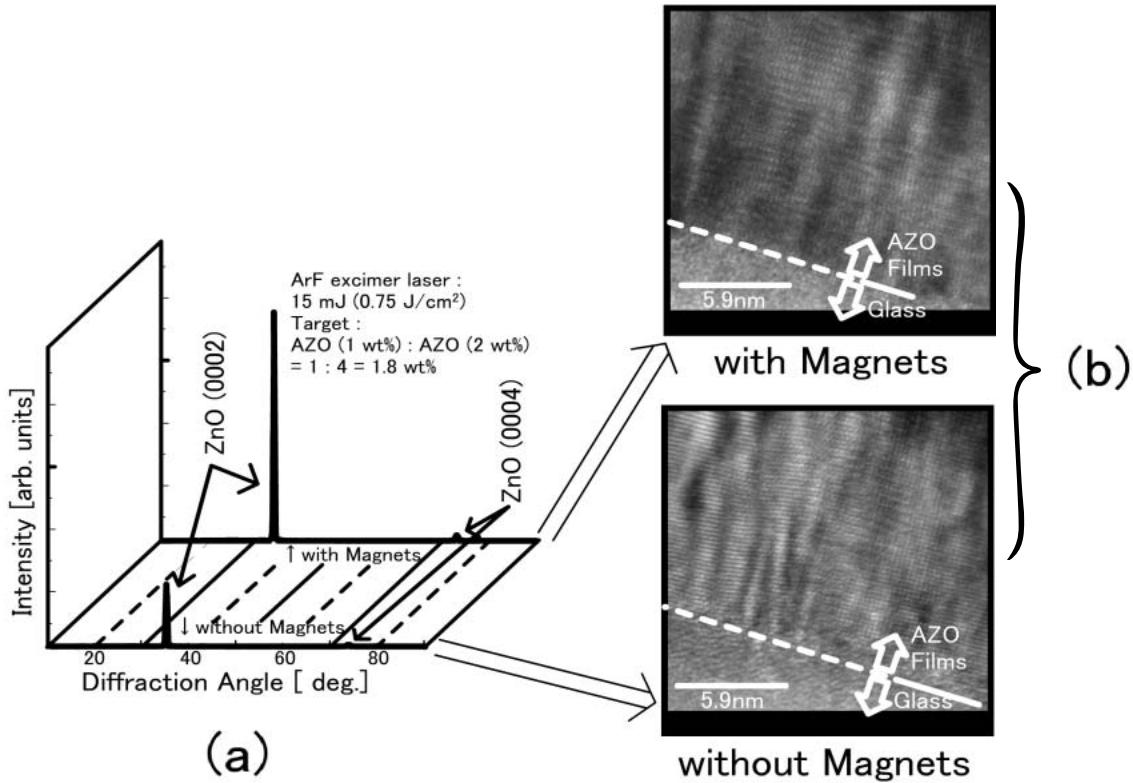


図5 磁場を印加して作製した超低抵抗AZO透明導電膜のX線回折パターンと断面TEM写真

た(スーパーITO,スーパーAZO)。

- 2) 高出力・高繰り返しのレーザーパルスを用いてターゲット基板間距離を極端に近づけ(10mm), さらに酸素分圧を極端に上げ(10Pa), プルーム内のプラズマの高エネルギーとレーザーの相互作用で基板温度を瞬間に上昇させ結晶性の良い膜を堆積させ低抵抗化が実現できた(スーパーITO)。
- 3) 徹底的に成膜条件を最適化し(主にターゲット組成, レーザーエネルギー密度, 基板温度), 磁場を印加して1)同様の方法・効果で低抵抗化が実現できた(スーパーAZO)。

参考文献

- 1) A. Suzuki, T. Matsushita, N. Wada, Y. Sakamoto and M. Okuda, Jpn. J. Appl. Phys., 35, L56-L59 (1996)
- 2) A. Suzuki, T. Matsushita, Y. Sakamoto, N. Wada and M. Okuda, Transactions of the Material Research Society of Japan, 20, 526-529 (1996)
- 3) A. Suzuki, T. Matsushita, Y. Sakamoto, N. Wada, T. Fukuda, H. Fujiwara and M. Okuda, Jpn. J. Appl. Phys., 35, 5457-5461 (1996)
- 4) A. Suzuki, T. Matsushita, T. Aoki, Y. Yoneyama and M. Okuda, Jpn. J. Appl. Phys., 38, L71-L73 (1999)
- 5) A. Suzuki, T. Matsushita, T. Aoki, Y. Yoneyama and M. Okuda, Jpn. J. Appl. Phys., 40, L401-L403 (2001)
- 6) A. Suzuki, T. Matsushita, T. Aoki, A. Mori and M. Okuda, Thin Solid Films, 441, 23-27 (2002)
- 7) H. Agura, A. Suzuki, T. Matsushita, T. Aoki and M. Okuda, Thin Solid Films, 445, 263-267 (2003)
- 8) H. Ohta, M. Orita, M. Hirano, H. Tanji, H. Kawazoe and H. Hosono, Appl. Phys. Lett., 76, 2740-2742 (2000)
- 9) F. O. Audurodija, H. Izumi, T. Ishibashi, H. Yoshitake, M. Motoyama and K. murai, Jpn. J. Appl. Phys., 39, L377-L379 (2000)
- 10) T. Minami, H. sato, H. Nanto and S. Takata, J. Appl. Phys., 24, L781-L784 (1985)

水酸ラジカルのHPLCによる定量法

An HPLC assay for hydroxyl radicals

阿部 芳廣* 李 林香**

はじめに

活性酸素（スーパーオキシド（ $O_2^{\cdot\cdot}$ ）, 過酸化水素（ H_2O_2 ）, ヒドロキシラジカル（ HO^{\cdot} ）, 一重項酸素（ 1O_2 ））やフリーラジカルは現代病と言われるガンや心筋梗塞・糖尿病・リウマチを始め, 脳梗塞・白内障・種々の虚血および自己免疫疾患の引き金となっており, これらを消去する化合物を摂取すると健康に良いと言われるようになった。しかし, 活性酸素を消去するという活性がどの程度あるかを知るために, 活性酸素の量を正確に定量する方法, ならびに活性酸素の消去を測定する方法がなければならない。活性酸素の中でも反応性の高いヒドロキシラジカルは直接に測定するよい方法がなく, ESR-スピントラップ法による半定量法が汎用されている。このESR法により得られた結果を評価するためには他の測定法が必須であり, ヒドロキシラジカルの新しい定量法の開発を目的として研究を行なってきた。

水酸ラジカルをHPLCによって定量する方法としては, 水酸ラジカルが芳香環を水酸化する反応を利用する方法を用いて, 水酸化体をHPLCにより分離定量する方法が一般的で, 中でもサリチル酸の水酸化反応を用いる方法が最も受け入れられたものである^{1,2)}。しかし, サリチル酸を用いる方



阿部 芳廣



李 林香

法では, 水酸化反応がカルボキシル基のオルト位とパラ位に起こるので, これらを同時定量する必要があることが難点である。また, サリチル酸は蛍光性であるが, これらの水酸化体は蛍光性を示さないので電気化学検出器によって検出を行っている。そこで, 対称性のよいテレフタル酸（TPA）の水酸化反応を利用することにした。TPAは蛍光性ではないが, その水酸化体が蛍光性になると, 水酸ラジカルに対して高濃度にTPAが存在すれば, 水酸化体は一種だけが生じると考えればよく, サリチル酸のように2種の反応成績体を同時に定量する必要はなくなるなどの利点がある。TPAが水酸ラジカルのマーカーとなること, 蛍光法による定量の試みがすでに知られていたが, HPLCで分離定量する方法としてESR-スピントラップ法との比較を行った。

1. テレフタル酸を用いるHPLC・蛍光検出法による水酸ラジカルの定量法

水酸ラジカルは反応性がきわめて高いので, TPAとの反応も芳香環の水酸化だけが起こるというわけではなく, サリチル酸と同様に脱炭酸を伴う生成物やさらに反応した分解物もあると思われる。しかし, それらは水酸化体の生成よりも量的には少ないと思われ, また, 生成物も蛍光性ではない。図2に示したように, 水酸化反応により生じるHTPAは, TPA濃度が水酸ラジカル濃度に対してきわめて高い条件下では, モノ水酸化体

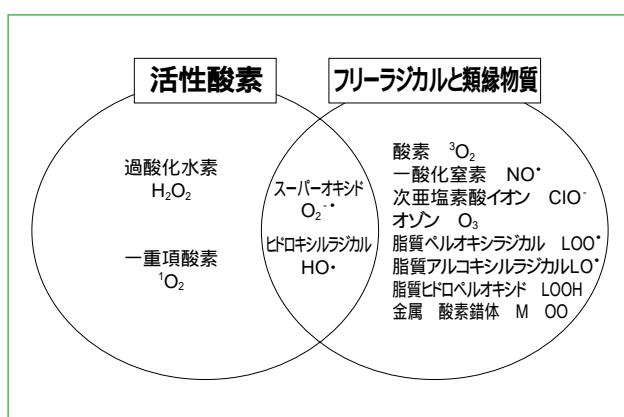


図1 活性酸素、酸素を含むフリーラジカルと類縁物質

* 共立薬科大学 基礎実験薬学講座 教授 薬学博士
** 共立薬科大学大学院 博士後期課程2年 修士(薬学)

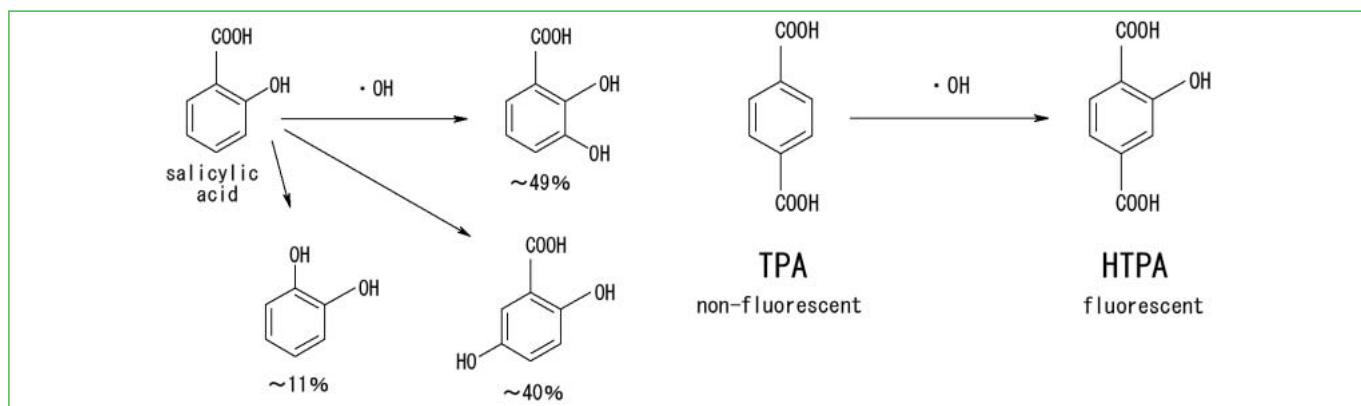


図2 水酸ラジカルのHPLCによる定量法(サリチル酸法とTPA法)

のHTPA一種と考えてよいことから、水酸ラジカルの定量法としてTPAを利用できると考えた。

他の活性酸素種に対する反応性については、Fenton反応の対照として行った実験で、1 mM以下の濃度の過酸化水素ではHTPAの生成は無視できること、キサンチン・キサンチンオキシダーゼにより生じるO₂^{•-}ではわずかにHTPAが生じたが、これは、マンニトールを添加すると消失することから、O₂^{•-}が異性化して生じた水酸ラジカルによるものと推定された。溶存酸素との反応は遅いので、TPA溶液を調製して10時間以内であればTPA溶液中に生じるHTPAは無視できる。ただし、Fe(II)が存在すると溶存酸素によってHTPAが速やかに生じるので、Fenton反応を水酸ラジカルのソースとする実験では、アルゴン置換した水を使用した。

1.1 実験

[試薬]

テレフタル酸は水に溶けにくいので、2ナトリウム塩を用いた。市販のTPA・2Naは空気酸化を受けたHTPAを含むことがある。そこで、5gを46mLの水に加熱(70-75)溶解し、活性炭を加えてろ過したものに70にあたためたエタノール30mLを加え、放冷して析出する沈殿をろ取した。これを真空下に室温で乾燥したものを使用した。TPAは冷凍庫(-20で数ヶ月にわたり安定である)。水酸化体であるHTPAの標品は報文に従って調製した³⁾。また、反応に用いる水は、ミリQで精製したものを、アスピレーターで減圧下に脱気、アルゴン置換した水を使用した。

[HPLCの条件]

HTPAの蛍光は、pHの影響を受け、pH3.5以下ではきわめて弱くなる。一方、HTPAのODSカ

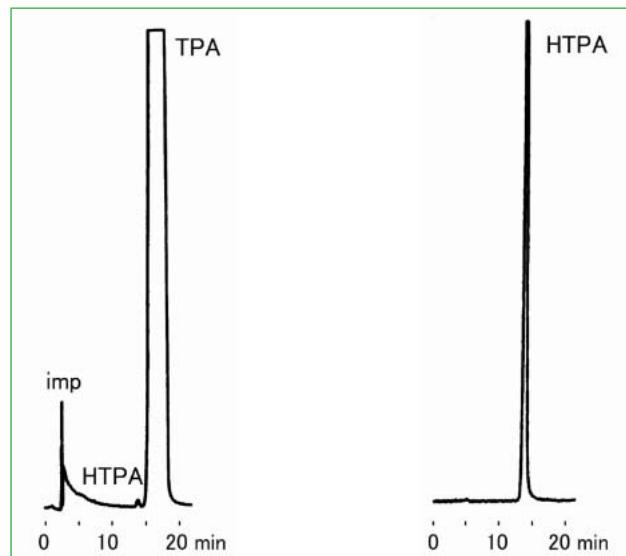


図3 TPA(4.25mM)とHTPA(1μM)混合物のクロマトグラム：UV検出(290nm 左)と蛍光検出(Ex 306nm, Em 412nm 右)

ラムでの保持はpHが高いと弱くなるので、溶離条件としてpH4.2のリン酸緩衝液にKClを添加したものを使用することにした。カラムは、Develosil ODS-UG5(4.6mm i.d. × 250mm, 野村化学)を使用し、溶離液には2%KClを含む200mMリン酸二水素カリウム溶液(pH4.37), 流速; 1 ml/min, 検出はUV検出器(750-UV; 290nm)と蛍光検出器(FP1520-S; Ex309nm, Em412nm)とを直列につないで用いた。UV検出されるTPAを内部標準物質として利用した(図3)。

[ESRの測定]

ESRの測定条件は, field; 336mT ± 5mT, power; 8mW, sweep time; 30 sec, field modulation; 0.200mT, time constant; 0.1 sec, amplitude; 500である。マンガンのシグナルを外部標準として利用した。ESR法ではリン酸緩衝液では後述するように低濃度域でシグナルが全く観察されなく

なるので、リン酸緩衝液のかわりに200mM トリフルオロ酢酸ナトリウム溶液を用いた。

[Fenton反応]

次のA, B, Cの溶液を混合し、最後にD液を加えて、その1分後にESRで測定、あるいはHPLCに注入した。A: 5 mM TPA二ナトリウム水溶液(1.7mL), B: 100mM リン酸、酢酸緩衝液、あるいはトリフルオロ酢酸ナトリウム水溶液(pH6.15, 0.1mL), C: 過酸化水素水溶液(0.05~1.5mM, 0.1mL), D: 1 mM 硫酸アンモニウム鉄(II)水溶液(0.1mL)。鉄(II)の終濃度は50 μMになる。

1.2 結果

良好な検量線が得られ(図4)検出限界は20nMである。本法によってFenton反応により生じる水酸ラジカルを過酸化水素濃度を変えて測定した結果が図5である。同じ反応をDMPOを用いるESR-スピントラップ法で観察したが、当初、リン酸緩衝液では、低濃度域でシグナルが観察されないという現象に遭遇した。酢酸緩衝液ではシグナルが観察されたので、リン酸がFenton反応に何か関与していることを想定し、また、水酸ラジカルの反応性が高いことから、酢酸緩衝液をさらにトリフルオロ酢酸ナトリウム溶液に代えたところ、良好なシグナルが見られた⁴⁾。図5のESRのデータは、トリフルオロ酢酸溶液中のものである。その結果は本法とよい一致を示し、本法が水酸ラジカルのHPLC定量法として有効であることが明らかとなった⁵⁾。

リン酸緩衝液でDMPO-OHシグナルが観察されないということについては、後述する。

この実験ではODSカラムを用いた。カラムの洗浄にはアセトニトリル:水(3:7)を用いたが、分析には有機溶媒を全く混合しない溶離液を用いるため、クロマトグラムの再現性に心配があった。しかし、実際には保持時間に変化はなく、良い再現性があった。現在は、有機溶媒を含まない溶離液でも分析に支障のないという野村化学のC30カラムを使用している。

2. DMPOを用いるESR-スピントラップ法の問題点について

水酸ラジカルの消去活性を測定する方法として、ヒドロキシラジカルを発生する系としてFenton反応を利用し、DMPO用いるESR-スピ

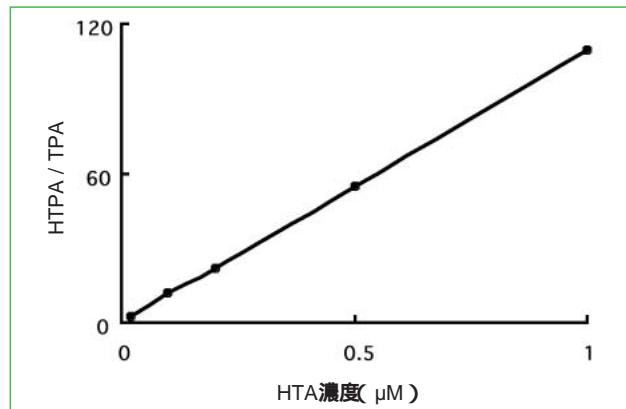


図4 検量線：蛍光検出は、Ex:309nm, Em:412nmで行った。相関係数0.99997。UV検出されるTPAを内標準物質として利用した(注入量の変化に対応)が、蛍光強度だけでも検量線が得られる。

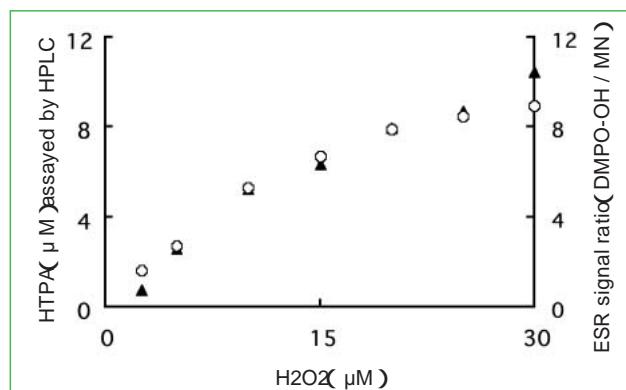


図5 定量法の比較：TPAを用いるHPLC法(○)とDMPOを用いるESR-スピントラップ法(●)

トラップ法がよく利用される。図5の実験を行ったときに、最初はHPLC法がESR法と比較してはるかに低濃度の水酸ラジカルを測定できるという結果を得た。ESRの感度を考えると何か原因があると思われたので、緩衝液系を変えてみた。その結果、リン酸緩衝液ではESR法のシグナル強度が酢酸緩衝液系よりも弱くなることがわかり、トリフルオロ酢酸ナトリウム中では極めて強いシグナルが観察されることを見出した。この理由を考察すると、Fenton反応とスピントラップ法との組み合わせによるラジカル消去活性測定法には次のような問題が存在することがわかる。即ち、測定される見かけのヒドロキシラジカル消去活性は、次の3つの活性の総合として測定されるものである、ということである(図6)。

- (1) Fenton反応そのものを抑制する活性
 - (2) 生成したヒドロキシラジカルを消去する活性
 - (3) トランプして生じたDMPO-OHラジカルが消去される活性
- そこで、これらを区別する方法、特に(3)の

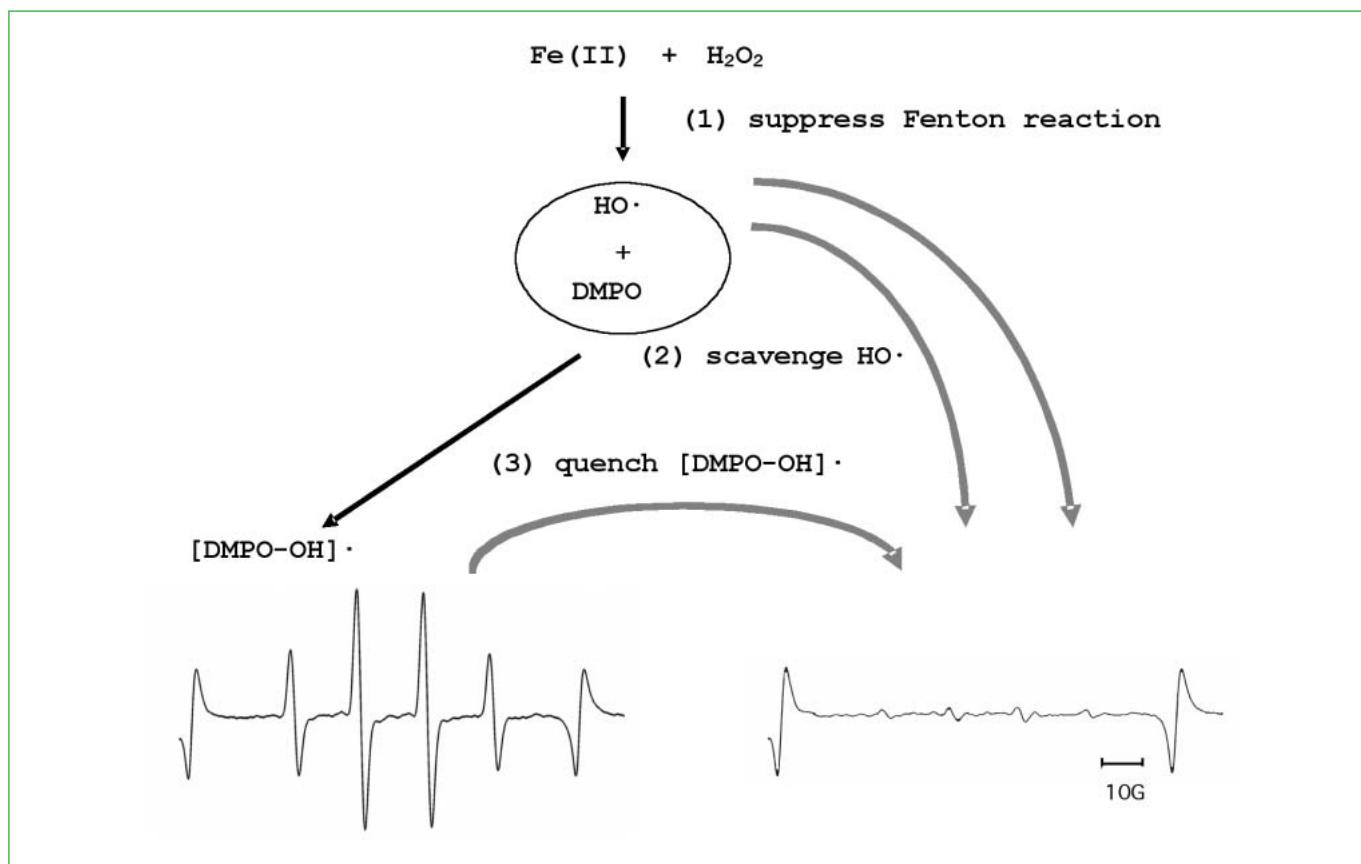


図6 スピントラップ法によりDMPO-OHラジカルが減少する3つの可能性

DMPO-OHラジカルの安定性を測定する実験系を考案することによって、DMPO-OHラジカルが、Fenton反応で用いている $\text{Fe}(\text{II})$ によって消失すること、その消失速度がリン酸イオンによって加速されることを明らかにした⁶⁾。

3. おわりに

ESR・スピントラップ法とテレフタル酸によるHPLC・蛍光法との測定結果に違いが生じたときに、どちらの結果が正しいか？を判定するためには、これらとは異なる測定原理に基づく水酸ラジカルの定量法が必要である。現在は、新しい第3の定量方法を検討している。

文献

- 1) H. Kaur, B. Halliwell, Methods in Enzymology, 233, 67-82 (1994)
- 2) I.N. Acworth, M.B. Bogdanov, D.R. McCabe, M.F. Beal, Methods in Enzymology, 300, 297-313 (1999)
- 3) L. Field, P.R. Engelhardt, J. Org. Chem., 35, 3647-3655 (1970)

- 4) Li L., Y. Abe, T. Mashino, M. Mochizuki, N. Miyata, Anal. Sci., 19, 1083-1084 (2003)
- 5) Li L., Y. Abe, Y. Nagasawa, R. Kudo, N. Usui, K. Imai, T. Mashino, M. Mochizuki, N. Miyata, Biomed. Chromatogr., 18, 470-474 (2004)
- 6) L. Li, Y. Abe, K. Kanagawa, N. Usui, K. Imai, T. Mashino, M. Mochizuki, N. Miyata, Anal. Chim. Acta, 512, 121-124 (2004)

U.D.C.577.112 : 572.5 : 546.18.31 : 546.82 : 543.51

生体試料のリン酸化プロテオーム解析へのチタニアカラムの応用

Application of titania column method to phosphoproteome analysis of biological samples

本間 里美* 堀米 恒好**

1. はじめに

生物は細胞内の情報伝達の多くをタンパク質のリン酸化により可逆的に制御していることが知られており、リン酸化についての研究は細胞機能の調節機構を理解する上で重要である。中でもタンパク質のリン酸化部位の同定についてはこれまで多くの方法が用いられてきたが、現在はタンパク質を酵素消化などにより断片化してペプチドにし、リン酸化ペプチドを分離・濃縮した後質量分析装置(MS)で分析する方法が主流である。MS を用いることでリン酸化ペプチド、およびその配列が迅速に同定でき、さらにMS装置の急速な高性能化もありこの方法が多用されている。

しかし、タンパク質の酵素消化物をそのまま MSで分析してリン酸化ペプチドを検出するのは実際には難しい。それは、タンパク質は多くの場合化学量論的にはリン酸化されていないということ、リン酸化ペプチドの存在量の問題、またリン酸基によるペプチドのイオン化抑制の問題などに拠るところが大きい。そこでこれらの問題を克服するため重要なのはMSで分析を行う前のリン酸化ペプチド分離・濃縮の段階である。リン酸化ペプチドを特異的に分離できればMSでの解析が容易になるため、これまでいろいろな分離・濃縮法が試みられてきた。しかし、どの方法も分析の速さ、汎用性、リン酸基の選択性などにおいて問題があり¹⁾、未だ画期的な方法は開発されていない。

こうした中で最近、酸化チタン(チタニア)がリン酸基を特異的に保持するという報告があった。そこで本研究ではチタニアカラムを利用した生体試料からのリン酸化ペプチドの分離・濃縮を試みた。チタニアカラムは従来の方法の問題点をカバーできる可能性があり、もしチタニアカラムが生体試料の分析に利用できれば、簡便で費用もかからず誰でもできるリン酸化ペプチド分離法に



本間 里美



堀米 恒好

なるのではないかと考えたのである。そのためチタニアカラムを用いてリン酸化ペプチドを分け取り、HPLCで分離後、MSで分析することにより生体試料から直接リン酸化ペプチドを検出できるシステムを確立することを目的として研究を始めた。本報告では、システム概要を述べた後、生体試料に適用するための改良、他の方法との比較、そして実際に適用した例を示す。

2. システム構成図

図1に生体試料からのリン酸化ペプチド分離システムの概要を示した。高圧グラジエント用のポンプA、Bに加え、チタニアカラムからの溶出液用としてポンプCを用いている。さらに、本研究で確立した条件をもとに、ポンプCにはチタニアカラム洗浄液が切り替えバルブでつないである。

バルブ1とバルブ2を切り替えることにより、サンプルの全ペプチド画分、チタニアカラム素通り画分、およびチタニアカラム保持画分をそれぞれ逆相カラムでグラジエント分離できるシステムになっている。

3. チタニアカラムについて

チタニアをクロマトグラフィーの充填剤に応用する試みは1980年代末から行われていた²⁾。以前からリン脂質を特異的に保持することは報告されていたが³⁾、リン酸化ペプチドに応用され始めたのは最近になってからである^{4,5)}。私たちもこのチ

* 新潟大学 大学院自然科学研究科 生体機能専攻 大学院生

** 新潟大学 理学部 化学科 教授 理学博士

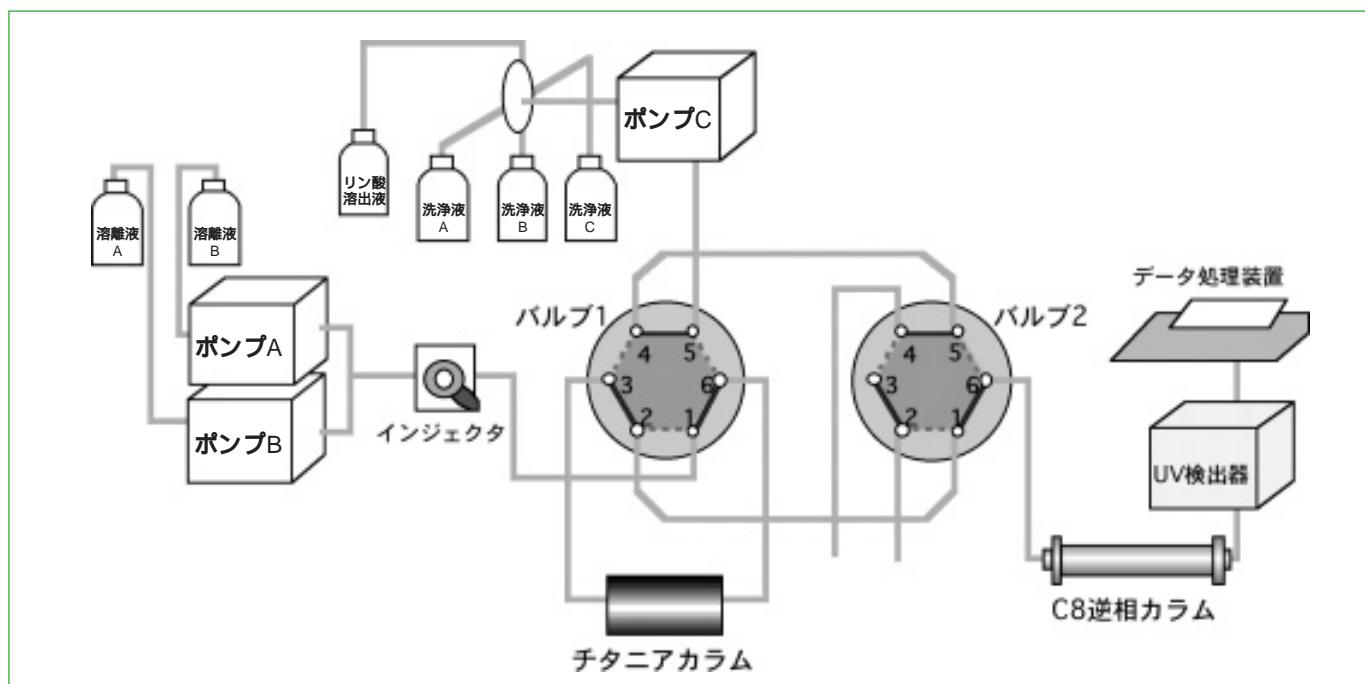


図1 チタニアカラムと逆相カラムを用いた生体試料からのリン酸化ペプチド分離システム構成図

ポンプA, B, C: L2100形、UV検出器: L2400形(日立); バルブ1, 2: 自動切替EVバルブ、チタニアカラム: Titanisphere TiO 4.0mm I.D. × 10mm(GLサイエンス); C8逆相カラム: CAPCELL PAK C8 SG300 4.6mm I.D. × 150mm(資生堂)

チタニアカラムを用いて標準タンパク質ではリン酸化ペプチドのみが特異的に保持、溶出されることを確認し(図2), 更には組み換えタンパク質を用いたリン酸化部位の同定にも成功している。そこで今回初めてチタニアカラムを組成の複雑な生体試料に適用してリン酸化ペプチドの検出を試みたが、これまで報告されていた条件ではリン酸化ペプチドをMSで検出することはできなかった。そこで生体試料由来のリン酸化ペプチドの分析を可能にするため、様々な条件の改善を行つことにした。またIMAC法と比較し、チタニアカラムの有効性を示した。

4. チタニアカラムによるリン酸化ペプチドの分離条件の検討

本研究でこれまでに、単一のリン酸化タンパク質由来のリン酸化ペプチドは逆相グラジエントと同じ流速でチタニアカラムを通して、高回収率(約90%)で分離できることを確認した。

そこで次に、生体試料でも同様の条件で高回収率が得られるかどうかを調べた。

³²P標識したツメガエル卵抽出液の消化物を試料として用いた。試料をチタニアカラムに通し、カラムの素通りと溶出画分それぞれの放射線量を測定してカラムに保持されるリン酸化ペプチドを定量的に比較した。図3にはチタニアカラムの素

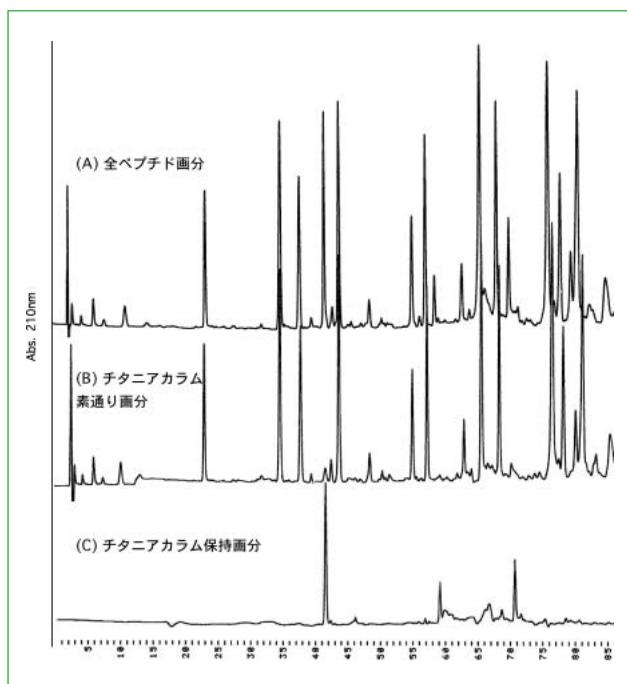


図2 -カゼイントリプシン消化物の逆相グラジエントHPLC分離

試料: -カゼイントリプシン消化物、25 μgタンパク質由来
C8逆相カラム: CAPCELL PAK C8 SG300 4.6mm I.D. × 150mm(資生堂); 溶離液A: 0.1% TFA in H₂O; 溶離液B: 0.081% TFA in CH₃CN; 流速: 1.0ml/min; グラジエント: (B%) 0/0min 0/9.9min 0/10min 45/100min; 検出: UV210nm

チタニアカラム保持画分のピークは全てリン酸化ペプチド由来のものであり、-カゼイントリプシン消化物に含まれる1リン酸化ペプチド、4リン酸化ペプチド両方が検出できることをMALDI-TOF-MSにより確認した。

通り画分と保持画分に含まれるリン酸化ペプチドの割合を示した。図3の“条件改善前”的グラフより、単一タンパク質の場合と同じ条件ではリン酸化ペプチドの回収率が約36%であった。これより、多量の非リン酸化ペプチド存在下において、通常の条件ではリン酸化ペプチドの回収率が減少することがわかった。

この問題の改善のため種々の検討を行った。その結果、チタニアカラムに試料を保持、溶出する際の流速を小さくし、更に溶出の際のリン酸の濃度を高くすることなどによりリン酸化ペプチドの回収率を大幅に改善することができた(図3“改善後”)。

そこで次にMSによるペプチド検出を試みた。しかしリン酸化ペプチドと考えられるピークは全く検出されなかった。これはタンパク質4 mg由来のペプチドをチタニアカラムに通したこと、非特異的吸着がおこってリン酸化ペプチドのピーク検出を抑制したためであろうと推察された。そこで、チタニアカラムに試料を通した後カラムを洗浄することで非特異的に保持されるペプチドを除くことを試みた。後に“生体試料への応用”的ところで示すが、カラム洗浄の操作を加えることでリン酸化ペプチドと考えられるピークを多数検出できるようになった。さらに洗浄液としてNaCl水溶液、水、アセトニトリルを順に用いるのが最適であることがわかった。

また、図3の“洗浄条件を追加”に示したように、チタニアカラムを洗浄してもリン酸化ペプチドの回収率は全く減少しなかった。これらの結果より、カラム洗浄の操作中のリン酸化ペプチドの溶出はほとんどなく、非特異的ペプチドのみを効果的に除くことができたと考えられる。

5. 他の方法との性能比較

チタニアカラムで合成リン酸化ペプチドおよび標準タンパク質消化物中のリン酸化ペプチドを特異的に分離できることは知られているが、生体試料でどれだけの性能が発揮できるのかを定量的に示した例はなかった。そこで現在一般的にリン酸化ペプチド分離に使用されているIMAC法との比較をアフリカツメガエル卵抽出液消化物を用いて行うことで、チタニアカラムの有効性を調べた。図4にチタニアカラムとIMACカラムにおけるカラム素通り画分と保持画分のリン酸化ペプチド回収率を示した。方法は“分離条件の検討”と同様である。そこでも触れたが、チタニアカラムでは

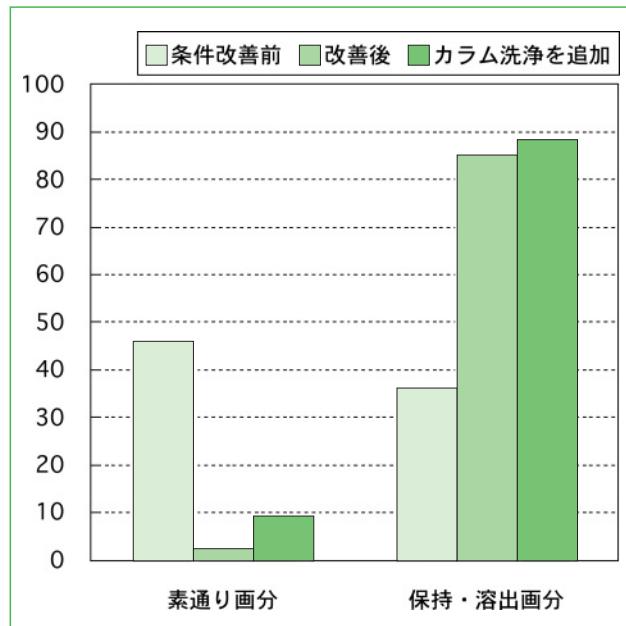


図3 シメガエル卵抽出液トリプシン消化物中のチタニアカラムに保持・溶出されたリン酸化ペプチドの定量

³²P標識したアフリカツメガエル卵抽出液トリプシン消化物を使用し、チタニアカラムに保持されるリン酸化ペプチドを定量した。
 条件改善前：カラム保持流速1.0ml/minなど、標準リン酸化タンパク質由来リン酸化ペプチドの分析条件と同じ。
 条件改善後：カラム保持流速0.1ml/minなど検討の結果最適であった条件に変更した。カラム洗浄を追加：条件改善に加えチタニアカラムの洗浄を行った。洗浄液もカラム素通り画分として測定した。

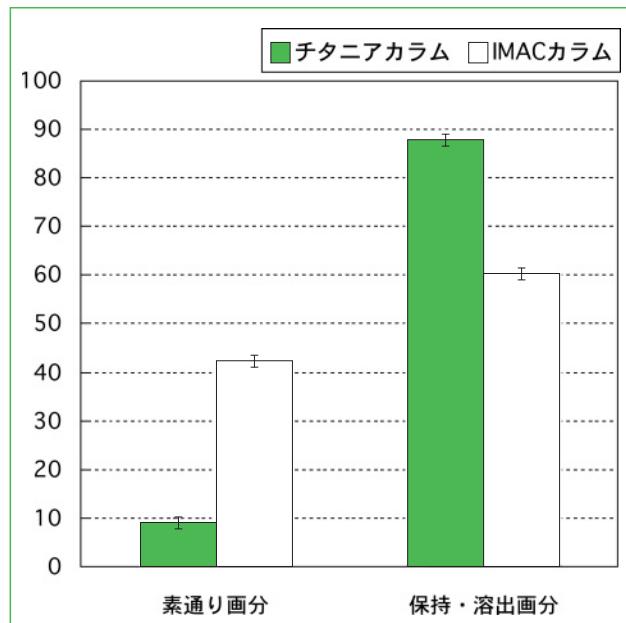


図4 チタニアカラム、IMACカラムに保持されるリン酸化ペプチド量の比較

³²P標識したアフリカツメガエル卵抽出液トリプシン消化物を使用した。
 カラム大きさ、カラム保持流速、溶出流速は統一した。IMAC担体にはNi-NTA agarose (QIAGEN)を用いた。 Fe^{3+} - IMACビーズを作成し⁶⁾、カラムに詰めて酢酸で平衡化後試料を保持させ、リン酸緩衝液で溶出した。

約88%のリン酸化ペプチドが保持・溶出されたのに対し、IMAC法では³²Pカウントの保持・溶出は約60%に留まり、42%は素通り画分に回収された。³²Pのカウントが素通り画分に現れたのは、単に試料の添加量が多過ぎたためではないことは、いずれのカラムでも素通り画分を再度それぞれのカラムに通すことで確かめている。

これらの結果より、チタニアカラムはIMAC法よりもリン酸化ペプチドの回収率においてたいへん優れていることがわかった。

IMAC法は酸性のペプチドも保持してしまうことが知られており、その改善のためペプチドをあらかじめメチル化させる方法が取られてきた⁷⁾。しかしこの結果からわかるように、IMAC法は生体試料では元々IMACカラムに保持されにくいリン酸化ペプチドの存在が示唆された。他の報告で、IMAC法を用いて同定できたリン酸化ペプチドは1リン酸化ペプチドの割合が非常に少ないことが指摘されている^{7,8,9)}。チタニアカラムはIMAC法よりも網羅的、効率的にリン酸化ペプチドを結合できると考えられ、今後研究が進めばIMAC法よりも優れた分離法として広く用いられるようになるであろう。

6. 生体試料への応用

IMAC法とMSを用いたリン酸化ペプチド分析は現在マウス肝、ヒト細胞など生体試料にも応用されている^{10,11)}。リン酸化プロテオーム解析にチタニアカラムを適用するための第一歩として、このシステムを用いて実際に生体試料からMSでのリン酸化ペプチドの検出を試みた。

ツメガエル卵抽出液タンパク質4mgの消化物を用い、チタニアカラムを通す前と後のペプチド存在量の変化を見た。全ペプチド画分とチタニアカラム保持画分をHPLCで逆相グラジエント分離した結果を図5に示した。これにより全ペプチド画分に含まれる多量のペプチドのうち、チタニアカラムに保持されるのは非常にわずかな量であることがわかる。図の右のグレーで示す部分の溶離液を1分ごとに分取し、それぞれMALDI-TOF-MSで分析した。

図6はチタニアカラム保持画分を逆相カラム分離したうちの1つの画分をMALDI-TOF-MSで分析した例である。上段はそのまま、下段は同じ画分をHFにより¹²⁾脱リン酸化処理を行った後MSで分析したスペクトルである。図6の(a)~(e)で示す範囲を拡大したものを次の図7に示す。これより、リン酸化ペプチドからリン酸基(-HPO₃)

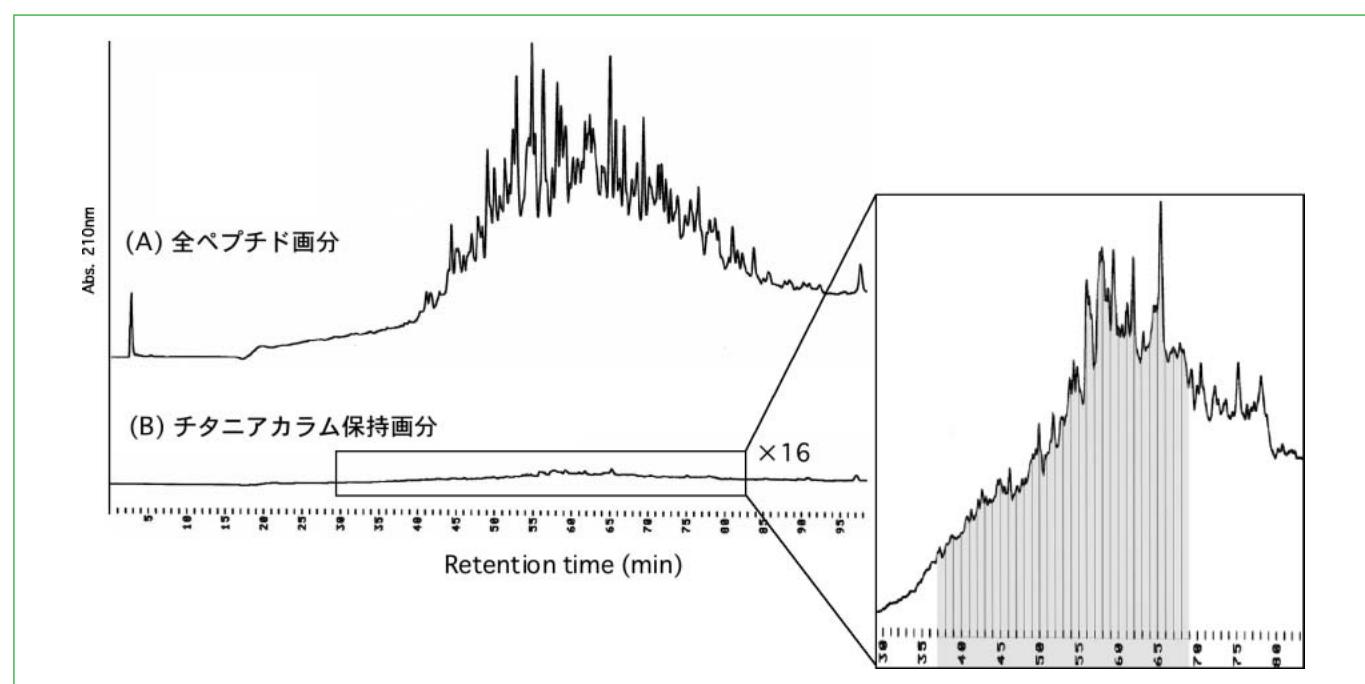


図5 ツメガエル卵抽出液トリプシン消化物の逆相グラジエントHPLC分離

試料：アフリカツメガエル卵抽出液トリプシン消化物、4mgタンパク質由来、C8逆相カラム：CAP-CELL PAK C8 SG300 4.6mm I.D. × 150mm(資生堂)、溶離液A：0.1% TFA in H₂O；溶離液B：0.081% TFA in CH₃CN；流速：1.0ml/min；グラジエント：(B%) 0/0min 0/9.9min 0/10min 45/100min；検出：UV210nm

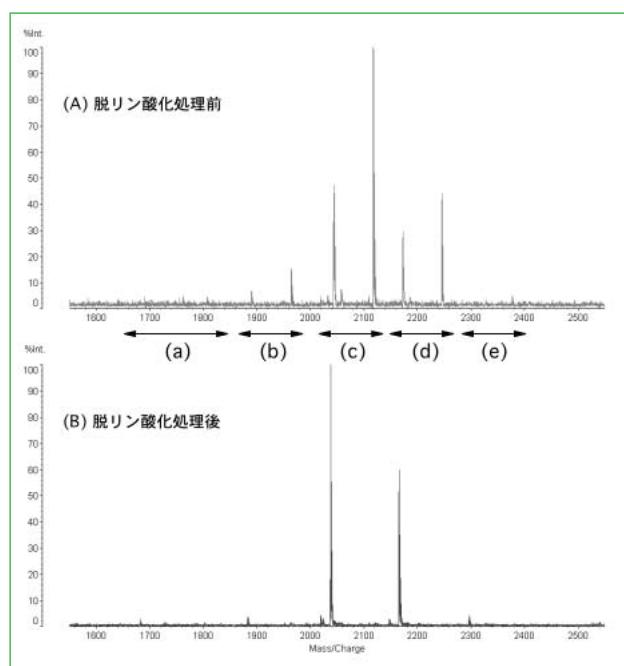


図6 チタニアカラム保持画分のMSスペクトルの例

グラジエント分析結果(図5)における41分から1分間(1ml)の画分を乾固し、脱リン酸化処理を行わないものと行ったものについてそれぞれMALDI-TOF-MSで測定。他の画分も同様に分析した。

が外れたことによる質量-80Daのシフトが確認できた。なお強度の高いリン酸化ペプチドのピークにおいては、標準タンパク質由来か生体試料由来かにかかわらず、リン酸化ペプチドと考えられるピークから72~3Da小さい位置に目的のピークと対をなすようにして検出されるピークが存在した。これはペプチドがイオン化されて真空中を飛行している間にリン酸基が脱離する結果現れるピークと考えられる。逆にこの位置にもピークが検出されれば、目的のピークがリン酸化ペプチドである可能性がさらに強められる。

表1に今回検出できたリン酸化ペプチドのピークのリストを示す。目的のピークからリン酸基が脱離したときの理論値とのずれが0.5Da以下のものと、それは0.5Daより大きいが1Da以下であり、かつピーク強度が強いもののみを示した。今回は32の画分を分析し、計32個のリン酸化ペプチドと考えられるピークを検出した。

以上より、チタニアカラムを通すだけで生体試料からリン酸化ペプチドが非常に特異的に濃縮でき、MSで検出可能であることが示された¹³⁾。

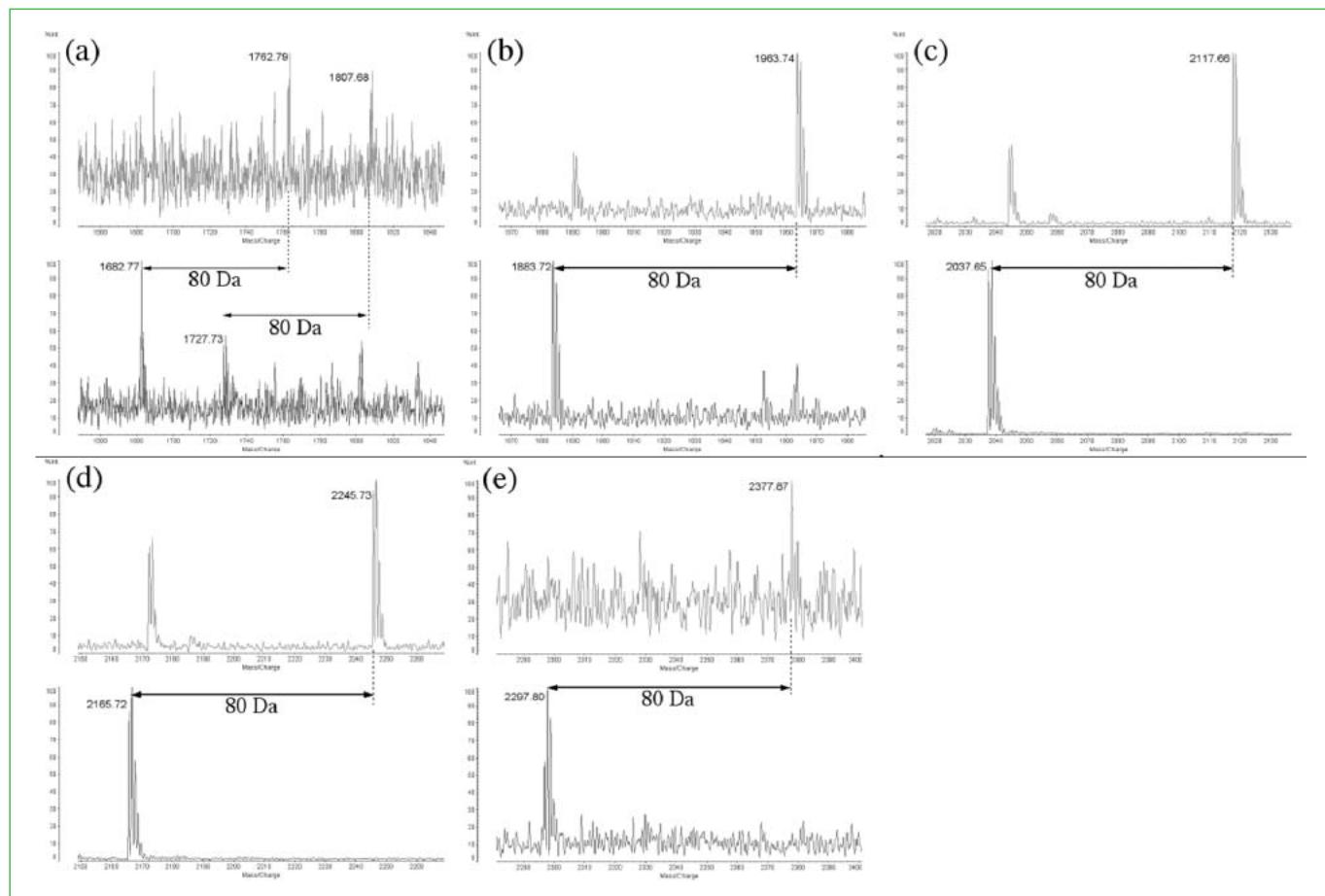


図7 チタニアカラム保持画分のMSスペクトル(図5)(a)~(e)の範囲を拡大した結果

上段：脱リン酸化処理前、下段：脱リン酸化処理後。脱リン酸化処理によりリン酸基が脱離して生じた80Daの質量のシフトが観察された。

表1 ツメガエル卵抽出液トリプシン消化物のチタニアカラム保持画分から得られたリン酸化ペプチドのピークの詳細

今回の分析では32個のリン酸化ペプチドと考えられるピークが検出された。

溶出時間 (分)	非処理 Mass	脱リン酸化処 理後 Mass	$\Delta 80 \times n$	リン酸基数
37	1406.16	1326.49	-0.33	1
39	2417.46	2337.47	-0.01	1
40	2376.73	2296.76	-0.03	1
	2418.56	2338.6	-0.04	1
41	1762.79	1682.77	0.02	1
	1807.68	1727.73	-0.05	1
	1963.74	1883.72	0.02	1
	2117.66	2037.65	0.01	1
	2245.73	2165.72	0.01	1
	2377.87	2297.80	0.07	1
42	1390.55	1310.54	0.01	1
	1406.60	1326.49	0.11	1
	2495.78	2415.60	0.18	1
	2688.09	2527.82	0.27	2
43	1973.67	1893.90	-0.23	1
44	1971.42	1891.82	-0.40	1
	2087.63	2008.01	-0.38	1
46	1955.36	1875.52	-0.16	1
	2529.55	2369.76	-0.21	2
47	2358.37	2278.59	-0.22	1
	2544.39	2464.76	-0.37	1
49	1417.49	1337.58	-0.09	1
51	1858.69	1778.24	0.45	1
54	2695.93	2615.71	0.22	1
	3459.20	3379.70	-0.50	1
56	2377.12	2297.20	-0.08	1
59	2286.98	2207.16	-0.18	1
	4031.74	3950.99	0.75	1
61	3111.85	3032.17	-0.32	1
62	1754.87	1674.92	-0.05	1
	2186.92	2106.90	0.02	1
66	2839.87	2759.99	-0.12	1

7. 今後の展望

本研究により、通常の分析用カラムで容易に生体試料からリン酸化ペプチドを検出できることが示された。チタニアカラムをLC-MS/MSに適用すれば、微量量化、高感度化に伴い生体試料からでも飛躍的に多くのリン酸化ペプチドのアミノ酸配列が同定できるようになると想られる。

MSを利用した効率的なリン酸化部位の解析には、高性能の装置が必要であるのは勿論であるが、加えて優れたリン酸化ペプチド濃縮法、データの効率的な解析法が必須である。MSシステムの高性能化によって、データ解析法の問題も一緒に解決されるであろう。しかし、"はじめに"でも述べたように、それ以前のリン酸化ペプチドを分離する技術はまだ発展の余地がおおいにある。チタニアカラムと高性能の装置を組み合わせることで

これまで以上の成果が得られると考えられ、その結果今後リン酸化部位の解析が誰にでも容易に行えるようになることを期待している。

謝辞

本研究において使用したHPLCは日立ハイテクノロジーズにご協力をいただいた。深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 小田直哉 (2002) 実験医学 20, 23-27
- 2) Kawahara, M., Nakamura, H., and Nakajima, T. (1988) Anal. Sci. 4, 671-3
- 3) Ikeguchi, Y., and Nakamura, H. (2000) Anal. Sci. 16, 541-3
- 4) Sano, A. and Nakamura, H. (2004) Anal. Sci. 20, 565-66
- 5) Kuroda, I., Shintani, Y., Motokawa, M., Abe, S., and Furuno, M. (2004) Anal. Sci. 20, 1313-19
- 6) Hart, S. R., Waterfield, M. D., Burlingame, A. L., and Cramer, R. (2002) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 1042-51
- 7) Ficarro, S. B., McCleland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and White, F. M. (2002) Nat. Biotechnol. 20, 301-5
- 8) Nuhse, T. S., Stensballe, A., Jensen, O. N., and Peck, S. C. (2003) Mol. Cell Proteomics 2, 1234-43
- 9) Metodiev, M. V., Timanova, A., and Stone, D. E. (2004) Proteomics 4, 1433-8
- 10) Jin, W. H., Dai, J., Zhou, H., Xia, Q. C., Zou, H. F., and Zeng, R. (2004) Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 2169-76
- 11) Brill, L. M., Salomon, A. R., Ficarro, S. B., Mukherji, M., Stettler-Gill, M., and Peters, E. C. (2004) Anal. Chem. 76, 2763-72
- 12) Kuyama, H., Toda, C., Watanabe, M., Tanaka, K., and Nishimura, O. (2003) Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 1493-6
- 13) Honma, S. and Horigome, H. 投稿準備中

タンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier

Nano LC-Trap TOF for Proteomics NanoFrontier

照井 康^{*} 永井 伸治^{*} 伊藤 伸也^{*} 石井 公彦^{*}
山下 紘理^{*} 師子鹿 司^{*} 吉岡 信二^{**}

1. はじめに

近年ヒトゲノムの解析が終了しポストゲノム解析として、生体中の発現タンパクを網羅的に解析するプロテオーム解析が注目されている。プロテオーム解析は生命現象の解明、創薬等、多岐にわたり有効である。その中で質量分析計の役割は大きく、2003年度のプロテオーム解析用質量分析計の市場は550億円(全世界)、年率14%の伸び¹⁾を示している。

プロテオーム解析では測定試料が微量であり、また測定対象の存在率が低いことから、極微量試料を高感度に測定できる分析装置が求められている。2004年10月に発売したタンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計NanoFrontier(以下NanoFrontier)は、このニーズに対応した分析計である。試料分離用の液体クロマトグラフ部にはスプリットレス方式で試料流量nL/min領域のグラジエント送液が可能なNanoLCを搭載してい

る。また質量分析部にはイオントラップ質量分析計(以下イオントラップ)と飛行時間質量分析計(以下TOFMS)のハイブリット型質量分析計(以下Trap-TOFMS)を搭載しており、MSⁿ分析と高質量精度計測を両立している。

NanoFrontierの外観を図1に示す。図1の左側がコントロールPCおよびNanoLCで、右側がTrap-TOFMSである。本解説ではNanoFrontierの特長と測定例を紹介する。

2. NanoLC部特長

試料分離を行うNanoLCには、試料流量nL/min領域で安定したグラジエント送液が求められる。そこでスプリットレス方式、さらにDual Exchange Gradient System(以下DEGS方式)を採用することで高い保持時間再現性を実現した。図2にDEGS方式の概要を示す。グラジエントポンプで生成したグラジエント溶液を10方バルブ



図1 NanoFrontier外観

*(株)日立ハイテクノロジーズ
**(株)日立サイエンスシステムズ

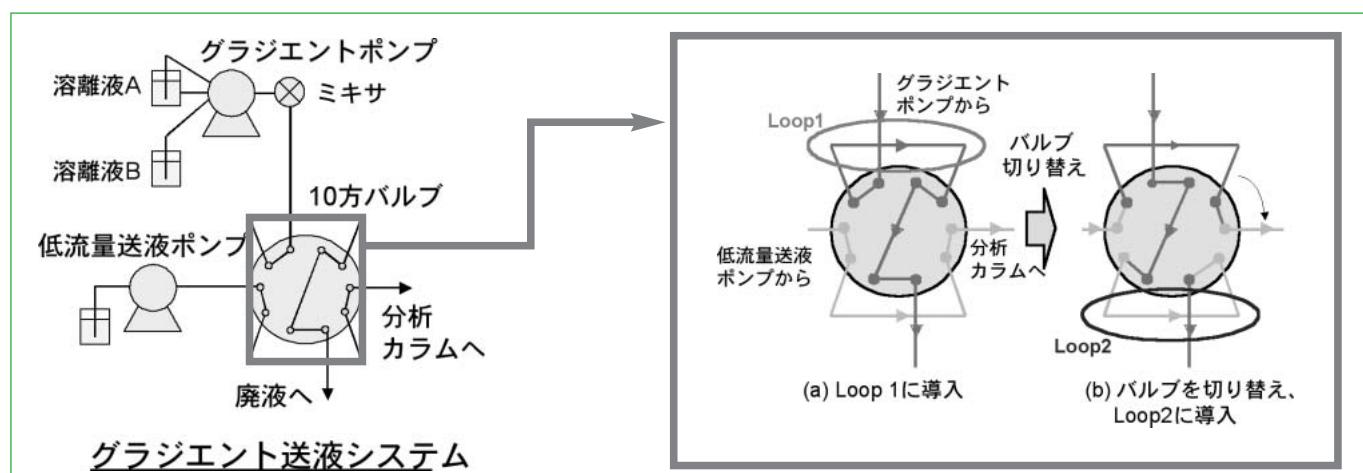


図2 DEGS方式の概要

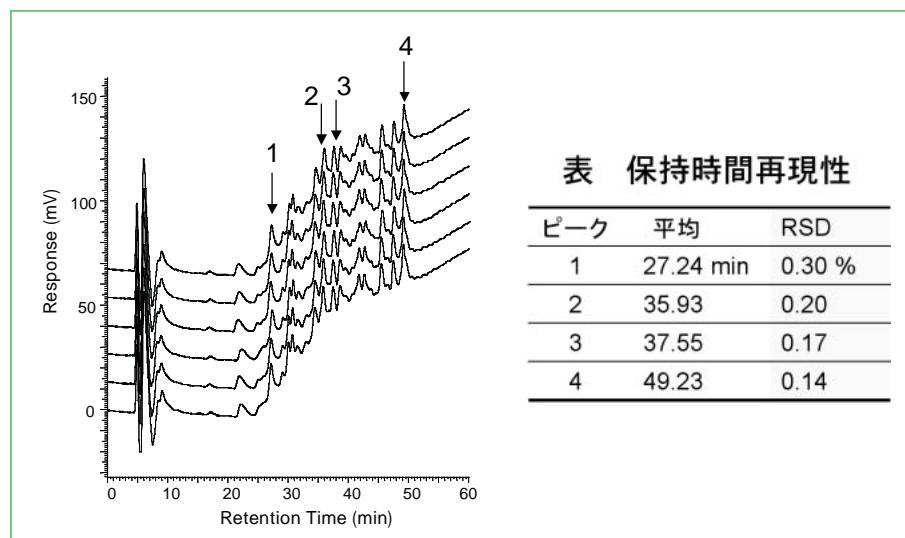


図3 BSA消化物のUVクロマトグラムと保持時間再現性(流量200nL/min.)

に導入しLoop1に充填する。一定時間経過後10方バルブを切替え、Loop1に充填したグラジエント溶液を分析カラムへ送液する。その際、同時にグラジエントポンプで生成したグラジエント溶液をLoop2に充填する。一定時間経過後10方バルブを切替え、Loop2に充填したグラジエント溶液を分析カラムへ送液、同時に次のグラジエント溶液をLoop1に充填する。この繰り返しを行うことでグラジエント溶液を生成している。このようにDEGS方式とは外部に接続したグラジエントポンプで生成したグラジエント溶液の一部を切り出す方式である。また低流量送液ポンプは50~200nL/min.が送液可能なポンプを新規開発した。(本機構の詳細は、SINEWS Vol47, No.1に記載済み)

図3にNanoLCを用いてBSAの消化物を測定した場合のUVクロマトグラムと保持時間再現性を

示す。クロマトグラムの4点について抽出し保持時間の再現性を確認したところ、6回の測定回数において、再現性が0.3%以下という結果を得た。

4. 質量分析部特長

質量分離およびイオン検出を行う質量分析部には、MSⁿ分析と高質量精度計測が両立するハイブリット型質量分析計Trap-TOFMSを搭載している。

図4にTrap-TOFMSの概要を示す。NanoLCで分離した測定試料をNanoESIにてイオン化しイオントラップに導入する。イオントラップではイオンの閉じこめ、選択、開裂を行い、このシーケンスを繰り返すことでMSⁿ分析が可能となる。次にイオントラップから排出したイオンをTOFMSに導入し質量分離を行う。TOFMSの特長の一つに高質量精度測定が可能であることがあげられる。

図5にReserpineのMS²、MS³分析の結果を示す。Reserpineの濃度は100 μg/Lで溶媒はMeOHである。MS¹分析では質量数609(m/z)にピークが観測されている。このピークはReserpineのプロトン付加分子イオンである。609(m/z)のピークを親イオンとしてMS²分析を行ったところ、397,448(m/z)にフラグメントイオンが観測された。さらに448(m/z)を親イオンとしてMS³分析を行うと195と236(m/z)にフラグメントイオンが観測された。またそれぞれの質量スペクトルの分

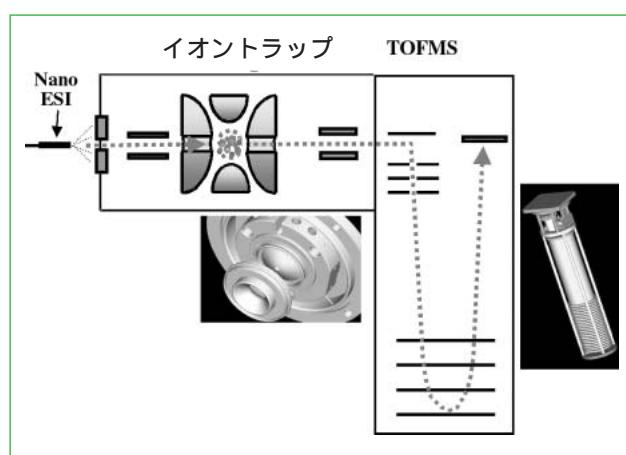
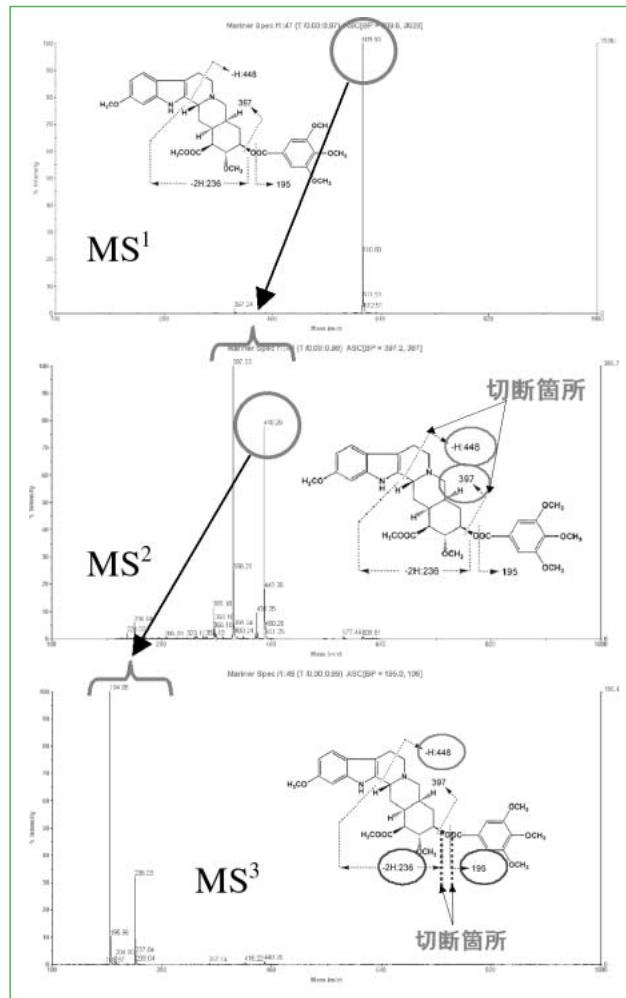


図4 Trap-TOFMSの概要



U.D.C.621.385.833.22(4-7650) : 621.397.44 : 681.3.02

H-7650透過電子顕微鏡の特長

The features of H-7650 TEM

長沖 功* 渡部 明* 近藤 正樹*
橋本 隆仁* 中澤 英子**

1. はじめに

医学、生物学、および医薬品や高分子材料の研究開発分野において、H-7500は低倍率広視野と高コントラストで、H-7600はオートフォーカス機能で好評を博しておりました。これらの分野も画像情報のデジタル化のニーズが高まり、今回、高感度のデジタルカメラシステムを標準搭載し、本体制御PCでデジタルカメラ一体化制御するインテグレーションを実現したH-7650を開発しました。

2. システムの構成

図1にH-7650の外観を示します。カメラ室下部にデジタルカメラが標準で取り付いており、観察室を中心に左右に可動できる操作パネルが配置されています。

3. 主な特長

図2に制御画面を示します。インテグレーションされたデジタルカメラより、TEM像は制御PCの液晶ディスプレイ(LCD)画面上に表示されます。デジタルカメラは、写真フィルムと比較して約40倍高感度で1024×1024pixelの画像で、最大18フレーム毎秒まで表示できます。また、LCD上の像を見ながら焦点、非点合わせを行うことができ、確認した像をそのまま記録することができます。その他、オートフォーカス、オートスティグマに加えてデジタル画像の撮影、保存までを自動化したオートフォト機能や、デジタルデータを効率よく扱うため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ています。

4.まとめ

以上より、高感度カメラにより、電子線損傷を受けやすい試料を少ないドース量で観察、記録す

ることできるようになりました。また、これらの機能に加え3次元再構築対応の自動試料傾斜システムや自動粒子検索機能も搭載することが可能となり、自動的にデータ収集が行えるようになり、あらゆるニーズに対応できるシステムとなっています。



図1 H-7650の概観写真

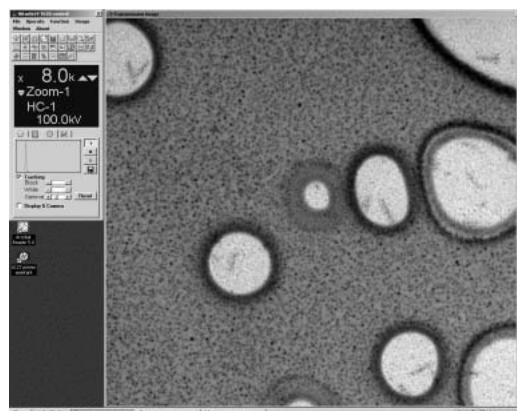


図2 H-7650の制御画面

* 日立ハイテクノロジーズ
** 日立サイエンスシステムズ

U.D.C.621.385.833.28 : 621.397.4 : 681.3.02 : 537.533.3

最新機能を搭載したS-3400Nの紹介

S-3400N SEM equipped with the latest function

伊東 祐博* 川俣 茂* 檀 紫** 二村 和孝***

1. はじめに

走査電子顕微鏡は物質表面の微細構造を観察する装置として、ナノテクノロジー分野やバイオテクノロジー分野をはじめ、主な産業分野の研究・開発から品質管理など、多方面でその有用性が認められてきた。試料室を低真空に保った状態で反射電子像の観察が可能な低真空SEMは、非導電性試料の前処理が不要なため観察対象が広く主流となってきている。

近年、その低真空SEMにおいて、簡単な操作で観察することができるSEMのニーズが増えてきている。このニーズに対応するために、高性能で操作性の良い次世代標準機S-3400N形走査電子顕微鏡を開発した。



図1 S-3400N形走査電子顕微鏡(タイプ)

本稿ではS-3400N形SEMの概要と特長および応用例を紹介する。

2. S-3400Nの概要

S-3400N形SEMタイプ の外観を図1に示す。装置は本体部とディスプレイ部とで構成される。

本装置の開発では、電子光学系の自動化や検出器の改良のほか、最新制御技術を搭載し、同時に省電力、省スペース化を実現させた。また各種分析装置の同時搭載が可能な上、分析位置で最適な幾何学的配置を確保できる。EDXとWDXを同時搭載したS-3400Nの外観を図2に示す。

3. S-3400Nの特長

本装置の特長を以下に述べる。

(1) 電子光学系の自動軸調整を実現

新型電子光学系の開発と最新の画像処理技術を使いワンタッチ自動軸調整を実現した。従来はマニュアル操作であった軸調整も自動化した。操作者の熟練度に依存せず、良質な画像データを得ることができる。

(2) 低加速電圧で反射電子検出像観察が可能

低真空モードで使用する検出器に半導体型の反射電子検出器を採用した。半導体検出素子の製造プロセスを変更し、検出素子感度を向上させ低加速電圧3kVでの観察も可能とした。

(3) 大型ステージを採用し厚い試料の観察と分析を実現

ステージは、X軸、Y軸の移動が80mm×40mmのタイプ

* (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ー物性評価部
*** (株)日立ハイテクノロジーズ 製品戦略部



図2 EDXとwdxを装着したS-3400Nの外観

と100mm×50mmのタイプの2種類を用意、最大200mm径の試料が搭載でき、タイプでは5軸モータドライブを標準装備し、最大80mm厚試料の観察・分析が可能になる。

(4) ターボ分子ポンプを用い省電力、省スペース化を実現

主排気系ポンプにターボ分子ポンプ(TMP)を標準装備し、従来の油拡散ポンプ搭載製品に比べ、省電力(約34%削減)・省スペース(約25%削減¹⁾)化を実現。さらに、装置の立ち上げ時間を1/4に短縮し、かつ試料交換時間も短縮させることでスループットの改善を図った。

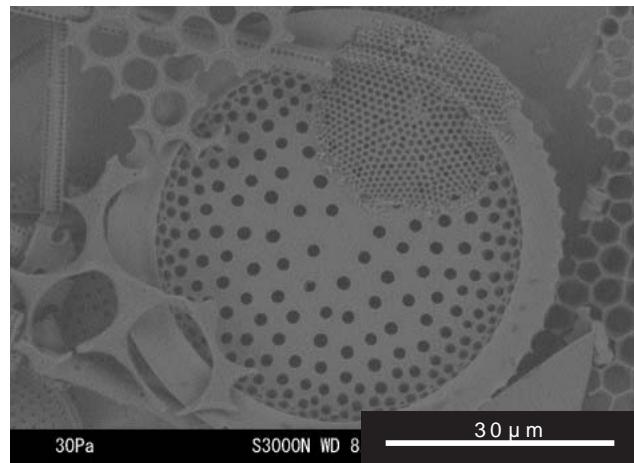
(5) 多機能な画像表示が可能

画像表示機能では、新開発のデュアルスクリーン機能やシグナルミキシング機能、超高精細画像メモリー機能(5,120×3,840画素)により、二次電子検出像と反射電子検出像を使い分けることにより多彩な画像情報を取得でき、観察試料の多角的な評価が可能となる。

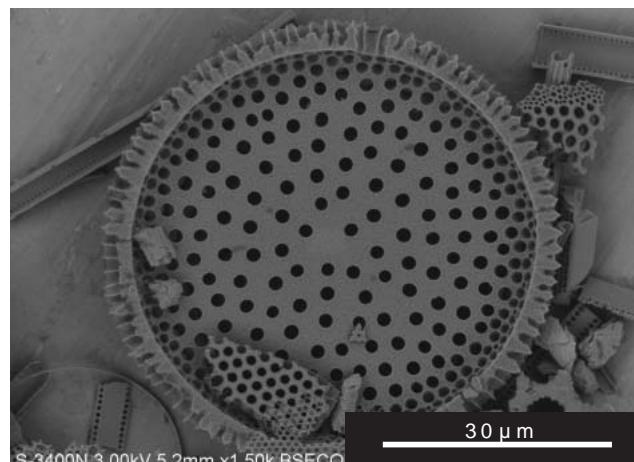
4. 応用例

低加速電圧3kV、低真空モード30Paでの珪藻を使った画像比較を図3に示す。従来機では図(a)のようにコントラストが十分に得られないが、S-3400Nでは図(b)のように明瞭なコントラストを得ることができる。

S-3400Nを用いたドリル刃の観察例を図4に示す。S-3400Nはこのような試料高さ80mmサイズまで加工することなく挿入することができる。観察は低倍率(×5倍)から行え、図4のような大



(a)従来機での観察例(試料:珪藻)



(b)S-3400Nでの観察例(試料:珪藻)

図3 低真空反射電子検出像による観察例

型試料の視野探しが容易に行える。また、2画面同時表示機能を使用して、異種信号(この例では二次電子検出像と反射電子検出像)をリアルタイムに表示させることができ、各信号のミキシングも行える。ミキシング画像例を図4(b)(c)(d)に示す。ドリル刃の先端部を同一視野で撮影した。

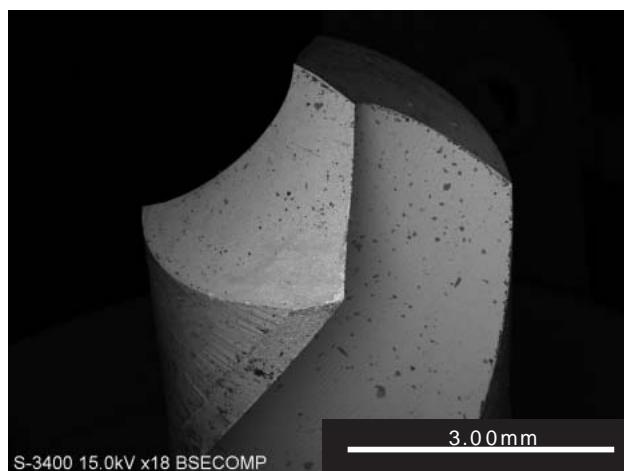
(b)は試料表面近くから発生する二次電子を検出した画像であり、試料の表面構造を反映した像が得られる。

(c)は試料を構成している原子に当たり跳ね返された反射電子を検出した画像であり、試料表面の組成(平均原子番号、結晶の方向)情報を反映した像が得られる。

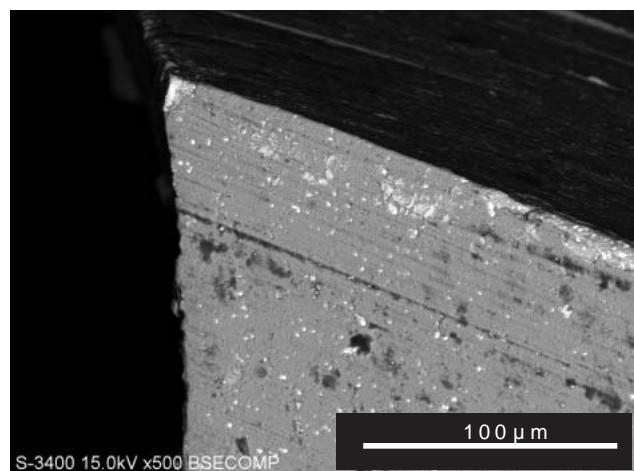
(d)は(b)と(c)をミキシングした画像で、それぞれ特長がある検出信号の同時組合せが可能である。ドリル刃の欠けている様子や組成の違う異物の付着状態など1画像で確認でき、ドリル刃の磨耗状態の評価を行うことができる。

多層膜試料を観察した例を図5に示す。ガラス

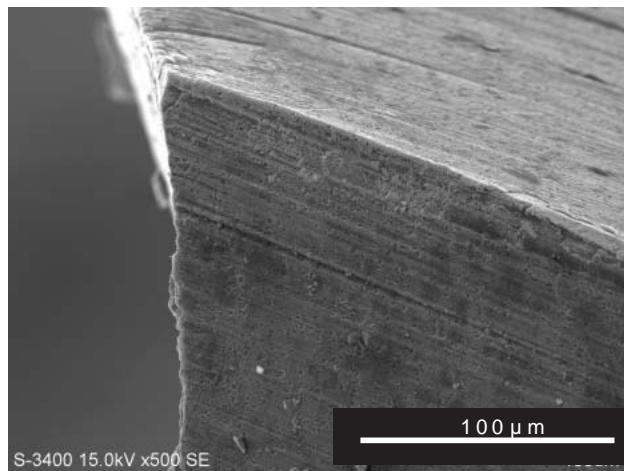
脚注1) 冷水循環装置を含んだ比較



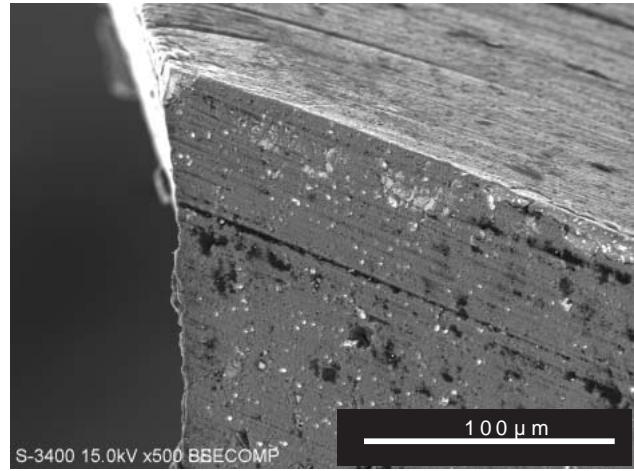
(a)刃先全体の観察(反射電子検出像 撮影倍率：18倍)



(c)刃先の観察例(反射電子検出像 撮影倍率：500倍)



(b)刃先の観察例(二次電子検出像 撮影倍率：500倍)



(d)刃先の観察例(二次電子+反射電子検出像 倍率：500倍)

図4 ドリルの刃先の観察例

基板上にMgF₂(コントラスト黒)とZnS(コントラスト白)が交互に積層された多層膜を用いて、低真空領域で反射電子像を観察した。低真空領域では、絶縁物試料を無処理で観察できるので、MgF₂層とZnS層の平均原子番号に依存した組成コントラストが明瞭に得られ、膜厚やその均一性の評価が可能である。

5. おわりに

最新機能を搭載したS-3400N形SEMの概要と特長を中心に紹介した。S-3400Nは、低真空SEMの性能と操作性を一段と向上させた。できるだけ自然の状態で評価したいというニーズにより生まれた低真空SEMの活用範囲を拡大できた。低真空SEMでの観察は、ますます重要になってきており、今後、幅広い分野での応用が期待される。

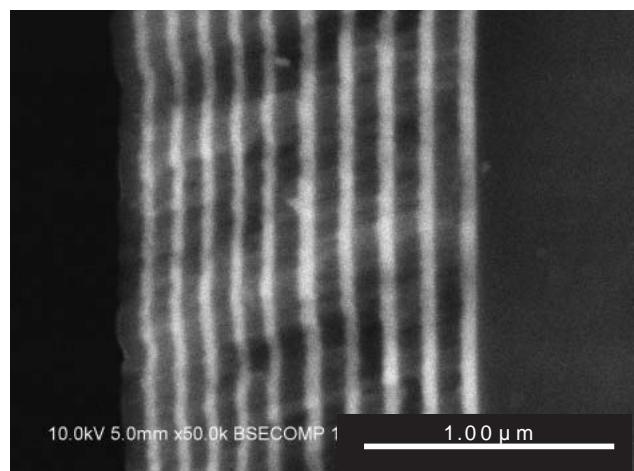


図5 多層膜試料の観察例
(加速電圧：10kV 真空度：10Pa 倍率：50,000倍)

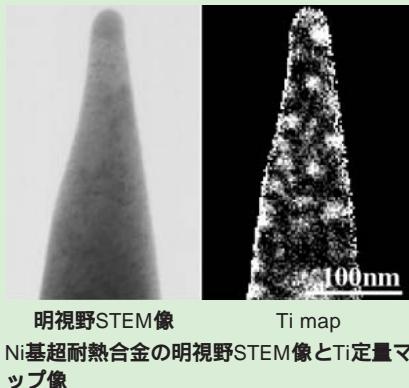
学会発表 ミニファイル

1. Microscopy & Microanalysis 2004(M & M) 2004.8/1-5 Georgia, USA)

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他 : 3D Elemental Mapping using a dedicated FIB/STEM System

【要旨】FIB・STEM共用の三次元解析ホルダーを用い, EDXによる三次元元素分布像観察を試みた。FIBでNi基超耐熱合金のピラー状試料を作製し, STEM + EDXシステムにより試料回転角度0°から180°の範囲で10°ステップのスペクトラムマッピングを実施した。取得データにPrincipal Component Analysis(PCA)法を適用し, スペクトルの特徴成分を抽出し,

ファクター法により定量分析を行った。その結果, 明視野STEM像観察では捕らえられない, 10nm ~ 20nmサイズの析出物の微量元素(例えはTi : 0 ~ 2 at%)分布状態を三次元的に把握することができた。



明視野STEM像
Ni基超耐熱合金の明視野STEM像とTi定量マップ像

石谷(日立ハイテクノロジーズ), 他 : Comparative study of scanning ion microscope and scanning electron microscope images using Monte Carlo simulations

【要旨】Ga集束イオンビーム(FIB)をプローブとした走査イオン顕微鏡(SIM)を用いてのデバイス断面などの観察像において, 試料元素の原子番号Zが大きいほど二次電子信号強度が弱く, 像が暗くなる傾向にあることが経験的に知られている。このZコントラストは, SEM像と逆傾向にある。本発表ではイオン照射下での二次電子生成・放出過程をモンテカルロシミュレーションし, Zコントラストの逆傾向要因を

明らかにした。試料電子に衝突して二次電子に励起する被衝突粒子には, 入射イオン, 反跳試料原子, および励起試料電子の三種類がある。いずれの被衝突粒子による二次電子生成・放出収率もZが大きいほど減少傾向を示すことが要因である。(SEMにおいては, Zが大きいほど反射電子収率が高くなり, これが二次電子収率の増大に大きく貢献している。SIMにおいては, この反射電子は存在しない。)

竹内(日立サイエンスシステムズ), 他 : SE & BSE Information from CNT Containing Fe at Various

【要旨】最新のFE-SEM S-5200, S-4800は二次電子検出器周囲に配置された信号制御電極の印加電圧を変更することにより二次電子(SE)と反射電子(BSE)の割合を制御することができる。また, この手法は, 低加速電圧領域で反射電子信号が検出されるため, 一次電子ビームの試料内散乱が軽減され空間分解能の高い反射電子像が得られる。これら機能を用い, 70nm径のカ

ーボンナノチューブ(CNT)中に存在する鉄(Fe)粒子(25nm)の観察を試みた。これら, 微粒子の高加速電圧観察では, 一次電子が透過するためSE像の収量が低下する。そこで, 観察条件を検討した結果, 加速電圧が3kV ~ 10kVの間で, CNT中に存在する内包物質のFeのコントラストがSE像, BSE像とも明瞭となった。

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他 : Direct 3D(S)TEM observation at Specific-site and high resolution using a FIB micro-sampling technique

2. 15 th International Congress of the IFAA(2004.8/24 京都)

中澤(日立サイエンスシステムズ), 他 : Newly developed Hitachi BIO-TEM H-7650 and its application

3 . EMC 2004(2004.8/24 Belgium)

上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : Development of a site specific sample preparation technique for high resolution 3D TEM observation

4 . 電子顕微鏡解析技術フォーラム(2004.8/27 滋賀)

黒田(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIBによるナノファブリケーション

5 . 第20回分析電子顕微鏡討論会(2004.9/1 東京)

上野(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIBを用いたソフトマテリアルの試料作製
今野(日立サイエンスシステムズ), 他 : ピラー状サンプルの三次元高分解能TEM観察
佐藤(日立サイエンスシステムズ), 他 : FIB/STEM共用試料回転ホルダーの応用

6 . 第19回九州電子顕微鏡技術研究会(2004.9/4 福岡)

多持(日立サイエンスシステムズ), 他 : 低加速電圧による薄膜分析

【要旨】微細化・複雑化する半導体デバイスの解析では, FIBを用いて特定箇所の薄膜試料を作製し, 透過電子を情報として捉えるSTEM(Scanning Transmission Electron Microscopy)観察が注目されている。今回はSTEM観察とEDXを組み合わせ, SEMによる薄膜分析の限界について検討した。試料はSRAMのゲート部を用いFIBを用いて試料を100nmまで薄

膜した。また, 装置はS-5200を用いて, 加速電圧30kVでゲート酸化膜(SiO_2)の分析を行った。その結果, 膜厚4nmレベルのゲート酸化膜の組成分析を実現した。通常, この様な薄膜分析は, 透過電子顕微鏡を用いるが, その事前の検討段階では, SEMを用いた薄膜分析が充分に利用できる。

7 . 第9回日本顕微鏡学会シンポジウム(2004.11/8 ~ 9 名古屋)

中澤(サイエンスシステムズ), 他 : 電子線トモグラフィーのための3D-TEMシステムとその応用
上野(サイエンスシステムズ), 他 : TEM/STEMを用いたナノ材料解析技術の最前線

8 . 2004年度LSIテスティングシンポジウム(2004.11/10 大阪)

今野(サイエンスシステムズ), 他 : ハイスループットLSI三次元微細構造解析技術とその応用
池上(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 試料帯電を考慮した電子線散乱モンテカルロシミュレーション
佐藤(日立ハイテクノロジーズ), 他 : デジタルSEMにおけるジャストフォーカス条件と像倍率の関係
小柏(日立ハイテクノロジーズ), 他 : マルチフォーカス処理で得られるSEM像の焦点深度評価
高内(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 微小デバイス特性評価装置「ナノ・プローバ」の紹介
揚村(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 微小デバイス特性評価装置「ナノ・プローバ」用イメージシフト機能の開発

9 . Separation Science 2004(2004.7/24 千葉)

清水(日立サイエンスシステムズ), 他 : イオンクロマトグラフィーの高感度化

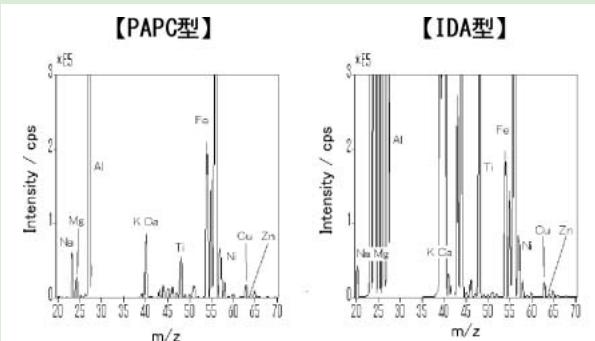
10. 日本分析化学会第53年会(2004.9/1~3 千葉)

山本(日立サイエンスシステムズ), 他: 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微量金属の測定

坂元(日立サイエンスシステムズ), 他: 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天然水中の微量元素の測定

【要旨】元素分析において、マトリクス元素(Na, Caなど)の干渉によって分析値の信頼性が低下することが懸念される。そこでポリアミノポリカルボン酸型(PAPC型)キレート樹脂によりマトリクス元素を除去し分析値の信頼性を向上させることを検討した。図に河川水標準物質(NRC・CNRC SLRS-4)を前処理した試料の定性スペクトルを示す。PAPC型キレート樹脂は従来から用いられているイミノ二酢酸型(IDA型)キレート樹脂よりもマトリクス元素の除去能力に優れており、前処理後のスペクトルで見られるNa, Mg, K, Caのピークの高さも圧倒的に低くなり、定量分析に適用した場合も分析値の信頼性が向上する。本法を河川水標準物質、海水標準物質に適用し、分析した結果も各標準物質の認証値

とも良く一致し、本法がマトリクス元素を多く含む試料に適用できることがわかる。

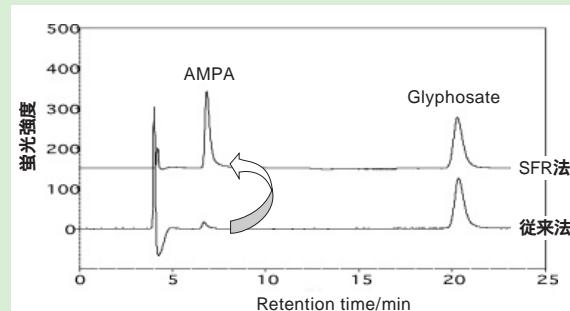


固相抽出後のSLRS-4の定性スペクトル

吉岡(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(グリホサート)分析

【要旨】毒性の低い非選択的な除草剤として幅広く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ている。また、水質基準では管理目標設定項目に指定され、グリホサートとその分解物であるアミノメチルリン酸(AMPA)の同時測定が必要とされた。ポストカラム誘導体化法によるHPLC・蛍光検出法を用い、分解物であるAMPAの夾雑成分との分離と感度を検討した。今回新しい手法として、反応液の添加量を抑制するSFR(Stop and Flow Reaction)法を見い出した。右の図に水質管理目標値の1/100の濃度である20 µg/L標準試料のクロマトグラムを示す。この結果、AMPAの検出限界0.19 µg/L(S/N = 3)が得られ、従来法と比較し

て感度が12倍向上し、河川水などの実試料の測定に応用できた。

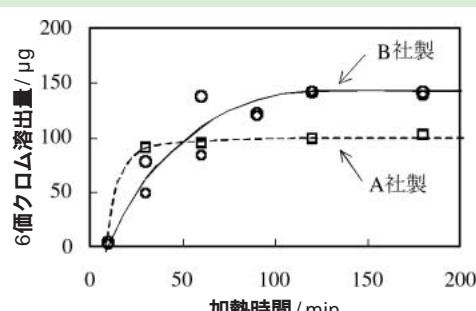


標準試料20µg/Lの測定

和久井(日立サイエンスシステムズ), 他: クロメート処理部品中の6価クロムの分析

【要旨】RoHS指令では、環境や人の健康に及ぼすリスクを最小限にするために、Cr(VI)を特定有害物質に指定し2006年7月1日以降電気電子機器内の使用を制限した。この指令に対応すべく、クロメート処理部品中のCr(VI)の前処理/定量法として沸騰水抽出-ジフェニルカルバジド吸光光度法を取り上げ詳細に検討した。有色クロメート処理されたA, B社製の材料片を沸騰水に浸漬した結果、約2時間の処理によりCr(VI)の溶出量は一定となった(右の図参照)。さらに、X線光電子分光法により、処理2時間におけるCr(VI)の溶出率を算出した結果、溶出率は50%程度であることが分かった。このことから、本法では完全にCr(VI)を溶出できないことが

分かった。現在、さらに効率の良い溶出方法を検討中である。



試験片(有色クロメート)によるCr(VI)溶出試験

新製品紹介 NEW PRODUCTS

日立超高分解能電解放出形走査電子顕微鏡 S-5500

対物レンズの強励磁化により0.4nm(30kV)と世界最高分解能^{*1}を更新するとともに、新たに開発したディスプレイ装置とGUIにより操作性も向上しました。二次電子情報と反射電子情報を可変比率で加算できるシグナル可変モードを標準搭載。さらに、新開発のBF/DF Duo-

STEM Detector^{*2}により明視野像と暗視野像の同時観察が可能です。

- 分解能 : 0.4nm(30kV), 1.6nm(1kV)
 - 倍率 : $\times 60 \sim \times 2,000,000$
- *1: 加速電圧30kV条件, 2004年10月時点
 *2: オプション



日立走査電子顕微鏡 S-3400N

低加速電圧(3kV)の保証分解能を10nmに向上させ、新開発の自動軸調整機能(オートビームセッティング、オートアキシャルアライメント)を採用し、より使いやすいコンセプトで操作性を向上させました。排気系にはTMP(ターボ分子ポンプ)を標準装備し、迅速立上げ、クリーンかつ省電力(当社比)を実現しています。

- 分解能 : 3.0nm(30kV, 高真空モード), 10nm(3kV, 高真空モード), 4.0nm(30kV, 低真空モード)
- 倍率 : $\times 5 \sim \times 300,000$
- 搭載可能試料寸法 : 最大200mm径
- 最大試料厚さ : 80mm厚(WD = 10mm)



日立微小デバイス特性評価装置「ナノ・プローバ」 N-6000

半導体デバイスの配線・コンタクトに直接プローブ(探針)を接触させ、1トランジスタの電気特性を評価できるプローバです。

特長

- 定評のある冷陰極電解放出形電子銃を採用し高倍率で観察しながらのプロービングが可能です。
- 先端半径50nmの微細なタンゲステン製のプローブ(探針)6本を走査電子顕微鏡内に配置し、さまざまな測定ニーズ

に対応可能です。

- プローブ(探針)交換をスピーディに行える様に、プローブ(探針)専用の交換室を別に設けました。

- イメージシフトによる像移動量を $\pm 100 \mu\text{m}$ 以上として、ステージを動かさない高位置精度のプロービングが可能です。



新製品紹介

NEW PRODUCTS

タンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontierのご紹介

生命現象のメカニズムを解明する手法として、プロテオーム解析の需要が拡大しています。この度、タンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontierを発売しました。

特長

- 日立ハイテクノロジーズ独自のDEGS(Dual Exchange Gradient System)システムにより、微小流量(nL/min 領域)でのグラジエント・スプ

リットレス送液を実現しました。

- 多段の衝突解離が可能なイオントラップと高分解能、高質量数精度を持つ飛行時間型の質量分析計を結合することにより、高精度なタンパク質の同定が可能です。



MTP-800AFCコロナマルチマイクロプレートリーダーのご紹介

バイオ、創薬、臨床、環境、食品などの分野で今一番必要とされているのが、多様なアプリケーション(吸光、蛍光、発光測定)を 1 台でこなすマルチマイクロプレートリーダーです。コ

ロナでは 2 励起 2 蛍光測定、温度の均一性機能、2 ウェル最大 81 ポイント多点測定など独自の機能を搭載。さらに 6 ~ 384 プレートだけではなくカスタムプレートも登録して測定するこ

とができ、データ処理には標準付属の日本語版ソフトをご使用いただけます。研究開発のさらなる前進にご活用ください。

詳細は、コロナ電気株のホームページ(<http://www.coronael.co.jp/>)をご覧ください。
(コロナ電気株式会社
営業部 山本 一人)

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 (029) 825-4801

本社 電話 東京 (03) 3504-7211
中部支店 電話 名古屋 (052) 219-1881
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

地球温暖化防止の国際間の枠組みである京都議定書が 2 月 16 日に発効しました。日本は温室効果ガスの排出量を、90 年比 6 % 削減することを約束しています。しかし、発効する今日までに 8 % も増加しており、トータルで 14 % も削減しなければなりません。これをまとめては産業が停滞し、経済が混乱することは必ずです。京都メカニズムの排出量取引、CDM (クリーン開発メカニズム) 及び JI (共同実施) を積極的に行う必要があります。それと同時に我々も省エネ、化石燃料を使わない生活を心がけなければなりません。

この批准にはアメリカが参加していない、中国に義務を負わせられないなど効果に疑問の声もありますが、日本 (世界でも) の最近の異常気象 (台風の異常上陸、夏の豪雨など) も地球温暖化が原因と考えられています。地球シミュレーターによると、2450 年までの地球温暖化の予想をしたところ、二酸化炭素の濃度の増加に歯止め

がかかるとしても 2100 年には倍濃度になり、極地の永久氷が氷解する可能性もあると言われています。

科学の発展による効率化と環境対策を考え、セクションナリズムやナショナリズムの枠を超えて、50 年後、100 年後の地球を考え、適切な対応を切に願うものである。

本号より、デザインの変更、多色刷り、字の拡大化など誌面を改良し、読みやすくなりました。ご意見等ありましたら、ご一報ください。

(原田 記)

インターネットホームページ

株式会社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-hitech.com/science/>

ナノテクノロジー関連

URL: <http://www.hitachi-hitech.com/device/>

本ニュースに関するお問い合わせは右記または、

株式会社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。

株式会社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 FAX (03) 3504-7756
株式会社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

MARCH, 2005 VOL. 48 No. 1

発行 2005年3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