

巻頭言

イノベーションと電子顕微鏡

Innovation in Electron Microscopy



(株)日立製作所 中央研究所 所長
長我部 信行

経済成長がイノベーションによってもたらされるというシュンペーターの言説は、現在では社会を動かす基本原理になっているといっても過言ではない。シュンペーターが元々論じたようにイノベーションは、新たな販路、新たな供給源、新たな組織の実現などによってもたらされる価値の創造、社会の変化であって、科学技術の革新に基づくものだけではないことは広く認識されている。しかし、政策的に科学技術を推進する大きな目的の一つが科学技術によってイノベーションを引き起こす事にあることは論を待たないだろう。

電子顕微鏡の開発から事業化の歴史は、光の顕微鏡を圧倒的に波長の短い電子で置き換えるという技術上の革新が製品となり、それによって物質や生命現象に関する知が飛躍的に深まることによって様々な技術開発を加速したり、半導体検査装置に代表されるように、従来には無い分解能で構造を検査することによって生産技術を革新し経済的な価値に変えていくイノベーショ

ンそのものであった。その過程を辿ることは、今日議論される技術開発をイノベーションにつなげるという行為に対していささかの参考になると考え、ここにその歴史を辿ってみたいと思う。

電子顕微鏡の発明は、1937年ドイツのシーメンス社で、エルンスト・ルスカとボリエスによってなされた。10万ボルトの加速電圧で2,3万倍の倍率を持つ装置であった。しかし、当時示された像は、ぼやけていて多くの人たちにとって将来性を感じさせるものではなく、世界中にニュースが流れたにもかかわらずドイツ以外に注目する国が無かった。

日本でいち早く電子顕微鏡の持つ可能性に着目したのは、当時東大第二工学部の教授であった瀬藤象二である。瀬藤は、変圧器、ダイナモやモーターといった電気機器学が専門であったが、アルマイトの発明や東京芝浦電機での研究マネジメント、原子力利用の推進ときわめて幅広く活躍している。瀬藤は電子の波長が光

C O N T E N T S

■巻頭言

- ・イノベーションと電子顕微鏡
長我部信行…………… 1

■報 文

- ・Towards Sugarcane Proteomics:
Methods Establishment & Sugarcane
2-DGE Proteome Reference Map
Nagarathinam Selvaraj, Ramesh Sundar
Amalraj, Viswanathan Rasappa, Ganesh
Kumar Veluswamy, Rahul Pathirickal
Ramanujan, Raveendran Muthurajan,
Malathi Palaniyandi, Ganesh Kumar
Agrawal, and Randeep Rakwal…………… 3

- ・カラムスイッチング-超高速LC/MS/MS
システムによる唾液中药物の分析
平林由紀子…………… 8
- ・哺乳類精子形成細胞における
ヌアージュ・タンパク質の局在
横田貞記 小野原侑子……………12

■解 説

- ・日立高速液体クロマトグラフ
『Chromaster 5000シリーズ』の特長と測定例
丸岡幹太郎 豊崎耕作 久保晋太郎
和田宏之 富田将司 丹羽宏昌
福田真人 鈴木裕志……………17
- ・透過電子顕微鏡HT7700の特長と応用
和久井亜希子 田中弘之 中澤英子……………20

- ・SU8000形FE-SEMによる
リチウムイオン電池材料の観察
檀 紫 伊藤寛征 竹内秀一
武藤 篤 重藤訓志……………23

■学会ミニファイル……………27

■テクニカルデータ発行ミニファイル……………31

■新製品紹介

- ・日立超高分解能電界放出形
走査電子顕微鏡 SU9000……………33
- ・日立透過電子顕微鏡
HT7700用走査透過像観察(STEM)装置……………34
- ・吸光グレーティングマイクロプレートリーダSH-1200……………35
- ・クロマトデータ処理装置
「Chromaster System Manager」……………36

の波長に比べてきわめて短く原理的に高分解能になることがわかっている事と、将来ナノの世界が重要になるとの認識を持っていて、この技術開発を是非推進すべきと考えた。瀬藤は当時日本学術振興会の学術部第10常設委員会の委員長を委嘱されていた。学術部長は、原子物理で有名な長岡半太郎であった。瀬藤は長岡に電子顕微鏡の開発を進言する。長岡は直ちにその重要性を認め瀬藤の進言をいれ、1939年第37小委員会を特別委員会として発足させた。長岡は瀬藤を委員長に指名したが、瀬藤は当初専門が異なるからと固辞した。しかし、長岡の説得が実を結び瀬藤は委員長を務めることになった。瀬藤は、早速13名からなる以下のような委員会のメンバーを決めた。

東京大学	山下(電気), 谷(物理)
	清水(物理)
京都大学	加藤(電気), 笹川(医学)
東北大学	大久保(精密機械工学)
大阪大学	菅田(電気)
電気試験所	笠井(電気), 鈴木(電気)
陸軍第八研究所	竹下
東京芝浦電気	浅尾(物理)
日立製作所	豊田のちに笠井(電気)
横河製作所	多田(電気)

その後、京都大学から小林(化学)が加わるなど委員の入れかわりもあった。また、新たな組織として名古屋大学、島津製作所が加わり、戦争終結後には日本電子光学、明石製作所から委員が加わった。特筆すべきは、電子顕微鏡の理論(物理)、設計試作(電気、精密機械工学)に加えて、医学・生物および化学といった応用面からの専門家も含む学際的な構成をしたことである。

委員会は月1回くらいの割合で開かれたが、瀬藤は毎回専門に応じて厳しい宿題を出したそうである。日立から加わった只野文哉には、日立で試作したHU-1型電子顕微鏡で一日も早く高倍率の写真を撮り、その詳細を委員会に報告することが求められた。只野によると瀬藤の厳しい態度に何が何でもという張り詰めた気持ちで課題に立ち向かったそうである。

議論はオープンを目指し、大学といわずメーカーといわず研究データはすべて委員会資料として公開し討論するという姿勢をとった。このため知見は共有され成果は急速にあがったという。

一見順調にみえる委員会も当時の情勢にあっては、責任者である瀬藤には重い責任がかかったようである。

委員会のメンバーであった只野によると、国家存亡の折に不急の電子顕微鏡の研究をやるなどもってのほかだ、という反対論もあったようである。資材や工作力を使うのを中止しようという動きもあったという。瀬藤はこうした外圧に何とか対処し、のがれ厳しい時代の中で研究を継続し委員会は機能し続けた。

こうした努力により戦後に入ってきた各国の状況に比べても、日本の技術レベルは遅れることなく各社での事業化につながっていった。また市場の立ち上げ時期における調達に関しても、戦後文部省から財源を各大学に配賦した時に、各大学はユーザーとして委員会に加わっていたため、日本のメーカーの開発製品を購入する事となった。その後は、順調に発展しメーカー間の競争領域に入り輸出も早期に行われたが、初期の市場開拓においてユーザーとメーカーが一体となった開発が大いに貢献したと思われる。

以上のように初期の電子顕微鏡開発の開発史をたどると科学技術によるイノベーションに必要な要件が見えてくる。

オープンな議論と企業間の競争のバランス、ひとつの装置を仕上げる学際的なチーム構成、ユーザーと機器開発者の一体チーム、外圧から開発チームを守ること、市場の形成における調達の課題の解決、などであろう。こうしたイノベーションの歴史は、われわれの大いなる資産として引き継がれるべきものだと思う。

【参考文献】

- [1] 瀬藤象二先生の業績と追憶(瀬藤象二先生追悼記念出版会、1979年)非売品

著者略歴

長我部 信行 (おさかべ のぶゆき)

所 属：(株)日立製作所 中央研究所 所長

略 歴：

学 歴

1978年 東京工業大学理学部物理学科 卒業

1980年 東京工業大学大学院理工学研究科物理学専攻修士課程 修了

1995年 博士(理学)(東京工業大学)

職 歴

1980年 4月 (株)日立製作所 中央研究所 入社

2001年 4月 (株)日立製作所 基礎研究所 所長

2011年 4月 (株)日立製作所 中央研究所 所長

委 員：

総合科学技術会議 評価専門調査部会 委員

第6期科学技術学術審議会

ナノテクノロジー・材料委員会 委員

先端計測分析技術・機器開発小委員会 委員

産学官連携推進委員会 委員

Towards Sugarcane Proteomics: Methods Establishment & Sugarcane 2-DGE Proteome Reference Map

Nagarathinam Selvaraj¹, Ramesh Sundar Amalraj¹, Viswanathan Rasappa², Ganesh Kumar Veluswamy¹, Rahul Pathirickal Ramanujan¹, Raveendran Muthurajan², Malathi Palaniyandi¹, Ganesh Kumar Agrawal³ and Randeep Rakwal^{3,4,5,6}

Introduction

Sugar is a prized commodity essential in human nutrition with sugarcane being one of the most important commercial crop cultivated for its stalks to produce the sweetener in our daily food (**Fig. 1**). Proteomics of sugarcane is in its infancy, and there is no study on the stalk tissues, except on which it is based. A systematic proteome analysis of stalk tissue was investigated in sugarcane; it should be noted that the stalk tissue is well known for its rigidity, fibrous nature, and presence of oxidative enzymes, phenolic compounds and extreme levels of carbohydrates, making the protein extraction complicated [1-5]. To investigate proteome of stalk tissue, five methods of protein extraction were compared for their suitability in two-dimensional gel electrophoresis (2-DGE). Trichloroacetic acid (TCA)/acetone followed by solubilization in LB plus Thiourea (LBT) extraction method and the phenol method were found as suitable approaches for the stalk proteome analysis. Representative sugarcane stalk proteome reference 2-D gel map was established. Standardization of optimum protocol for efficient protein extraction suitable for 2-DGE analysis and creation of a partial but first sugarcane reference map will help in further characterizing stalk proteome of sugarcane not only under normal but abnormal growth conditions affecting our planet and thus crop productivity.

Materials and Methods

Healthy stalk (cane tissue) samples of five-month-

old Sugarcane cv. CoC 671 crop were collected from the Institute Plant Pathology Experimental Farm at the Sugarcane Breeding Institute, Coimbatore (Tamil Nadu, India). Three biologically replicated samples were prepared for stalk tissue protein extraction; each biological sample consisted of tissue from three independent plants. Five different protein extraction methods in sugarcane stalk tissues were evaluated [6,7]: direct extraction using lysis buffer (LB) [LB: 8 M (w/v) urea, 4 % (w/v) 3- [3- (Cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate (CHAPS), 2 % (w/v) Pharmalyte (v/v) pH 3-10, and 0.3% (w/v) dithiothreitol (DTT)], trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation followed by solubilization in LB, LB plus Thiourea (LBT) [7 M (w/v) urea, 2 M (w/v) thiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 and 0.3 % (w/v) DTT], and LBT plus Tris (LB-TT) [7 M (w/v) urea, 2 M (w/v) thiourea,



Randeep Rakwal

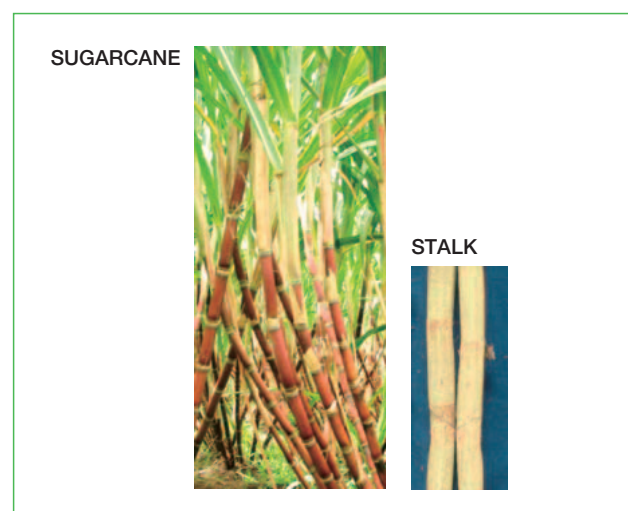


Figure 1 Sugarcane in the field in India. Stalk is given in inset. Figure is modified from Amalraj et al., 2010, *Electrophoresis* 31, 1959-1974.

- 1 Plant Pathology Section, Sugarcane Breeding Institute, Indian Council of Agricultural Research, Coimbatore, Tamil Nadu 641007, India
- 2 Centre for Plant Molecular Biology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Tamil Nadu 641003, India
- 3 Research Laboratory for Biotechnology and Biochemistry (RLABB), GPO Box 13265, Kathmandu, Nepal
- 4 Department of Anatomy I, Showa University School of Medicine, Tokyo 142-8555, Japan
- 5 Graduate General Education Courses, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan
- 6 International Plant Proteomics Organization (INPPO), <http://www.inppo.com/>
Correspondence: Professor Randeep Rakwal -plantproteomics@gmail.com

4 % (w/v) CHAPS, 18 mM (w/v) Tris-HCl (pH 8.0), 14 mM (w/v) Trizma base, 0.2 % (v/v) Triton X-100 and 50 mM (w/v) DTT], and phenol extraction [8]. Prior to 2-DGE, a 2D clean-up was used (ReadyPrep 2-D clean-up kit, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

Protein spots in analytical gels were visualized by staining with silver nitrate [9-11]. Protein pattern on gel was recorded as digitalized images with a digital scanner (Image scanner III, GE Healthcare, resolution 300 dpi), and saved as TIFF file following which the images were analyzed by Image Master platinum 2D software (ver.6; GE Healthcare). Out of all the detected protein spots, we selected 30 common spots from LB, LBT and phenol methods digested with trypsin, and analyzed by tandem mass spectrometry on a NanoFrontier *e*LD-IT-TOF-MS/MS (Hitachi High-Technologies Corporation, Hitachi, Japan). Some protein spots were also analyzed on an Agilent nESI-LC-MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Tandem MS spectra were searched against the National Center for Biological

Information nonredundant (NCBI nr) and Swiss Prot protein databases.

Results and Discussion

Quantitative comparisons of protein extracts using the 5 extraction protocols revealed phenol method to give considerably greater protein yield than other methods. Among these 5 protocols, direct LB method showed lesser spots with highly streak background. Other 4 protocols resulted in many hundreds of protein spots with a unique distribution pattern in both dimensions. Generally speaking, phenol and LBT methods revealed higher number of protein spots (390 ± 4 and 360 ± 2 spots, respectively) than LB and LB-TT methods (230 ± 3 and 214 ± 6 spots, respectively). Commonly used and the well-established LB method showed least streaks on 2-D gel but with comparatively low number of spots compared to LBT and phenol methods (Fig. 2). LBT method gave more intense and higher number of proteins (360 ± 2) over the LB method with discrete spots distributed uniformly more towards the pI 7.0.

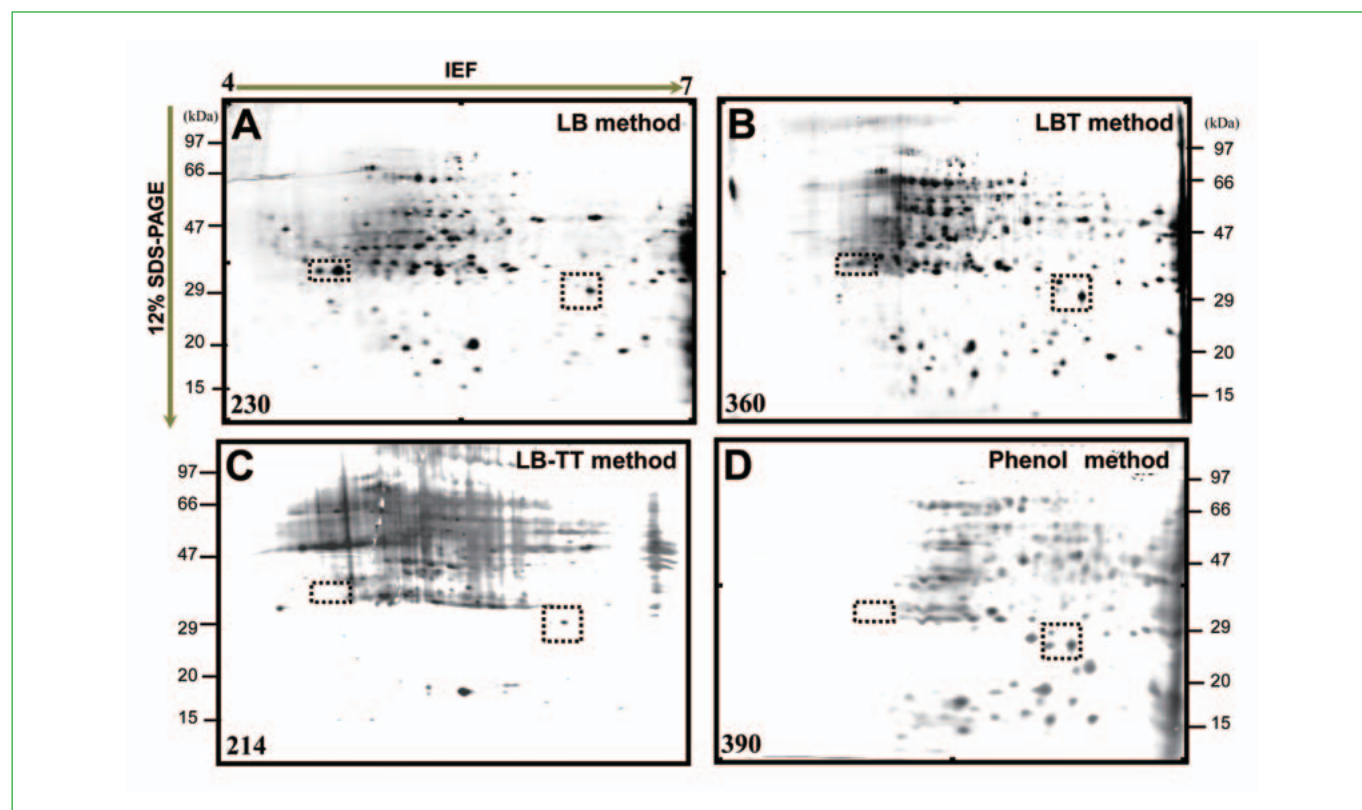


Figure 2 2-DGE of proteins from sugarcane stalk tissues extracted using four protocols under comparison. A, TCA/acetone precipitation and LB extraction. B, TCA/acetone precipitation and LBT extraction. C, TCA/acetone precipitation and LB-TT extraction. D, Phenol extraction. Rectangular boxes indicate some method specific protein spots. 100 μ g isolated proteins were subjected to 2-DGE using linear IPG strips (pH 4-7; 18 cm) followed by SDS-PAGE (12 %). Proteins were visualized with silver nitrate staining. Total number of proteins in gel is mentioned on the lower left corners of each gel image. Figure is modified from Amalraj et al., 2010, Electrophoresis 31, 1959-1974.

This is due to addition of thiourea that might have raised the solvent capacity of LB ^[12].

LB-TT method showed less number of spots when compared to the other two methods (214 ± 6). The LB-TT protocol displayed greater vertical and horizontal streaks and under-representation of proteins. However, this was not the case when dealing with LB-TT extraction in rice, maize, wheat and cucumber ^[13]. Therefore, to overcome this problem, phenol extraction procedure was used as an alternate having high clean-up capacity. Disadvantage of phenol extraction procedure is due to time-consuming steps and toxic nature. Phenol method produced largest number of protein spots (390 ± 4) with greater spot intensities amongst all methods (Fig. 2). Although good quality protein spots were seen, all the protein spots were clumped around the 5-7 pI value. The reason may be due to the fact that phenol has a tendency to dissolve polysaccharides and nucleic acids, which interfere in IEF running resulting in a shift in protein pI values. Though all extraction methods produced unique number of protein spots, ~ 100 protein spots were found to be commonly present among the 4 methods showing similarity irrespective of pI values. However, due to presence of horizontal and vertical streaks in LB-TT method we did not consider it for further analysis.

Phenol method produced higher number and good quality of protein spots but gave a shift in the protein pI values. Therefore, we used a 2-D cleanup kit and the interfering substances such as salts and carbohydrates could be eliminated from the protein extract. Clean up of sample resulted in increased number of spots (445 ± 5) and high-quality proteins. When compared to without cleanup, a negligible shift in pI or molecular mass of the protein spots was observed. It can be seen that with 2-D clean up many proteins in the acidic region were resolved, indicating that removal of contaminants is crucial for resolving proteins by 2-DGE (Fig. 3). In all, by optimization of the protein extraction protocols, good downstream 2-DGE analysis can be performed.

Commonly Identified Proteins-An Overview

From three 2-D gel profiles obtained using LB, LBT, and phenol protocols, 30 common protein spots (from 136 total common spots) were randomly selected for MS/MS analysis. These proteins are marked on 2-D gel reference map (Fig. 4) and discussed below according to their functional categorization.

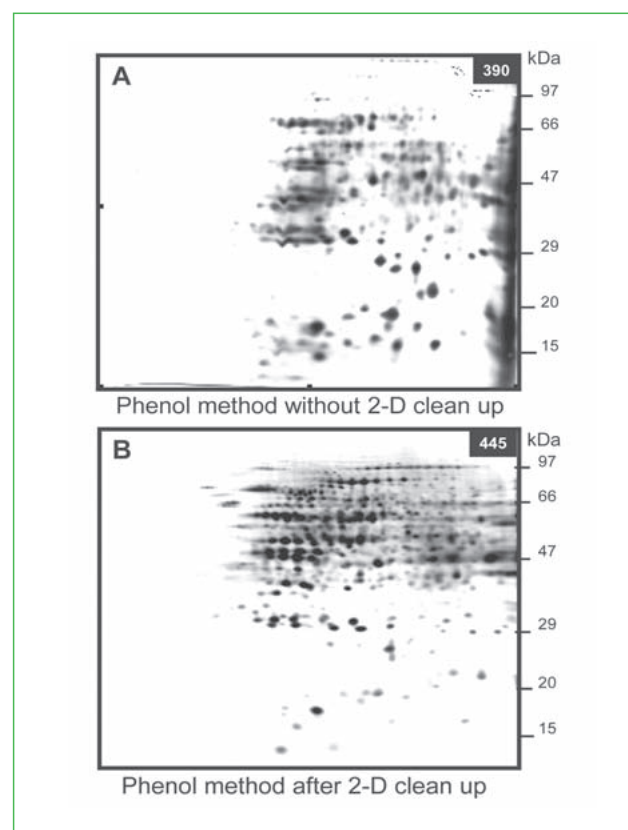


Figure 3 Comparison of sugarcane stalk proteins extracted by phenol method. A, Stalk protein extraction by phenol method without 2D cleanup. B, Stalk protein extraction by phenol method with 2D cleanup. Details are the same as in Figure 2. Figure is modified from Amalraj et al., 2010, Electrophoresis 31, 1959-1974.

Plant defense mechanisms: Many proteins identified here were related to defense response. Protein spots 1, 2, 5, 8, 9, 16, and 25 corresponded to glutathione S-transferase (GST) 9, quinone reductase 2, superoxide dismutase (SOD-Mn) mitochondrial precursor, L-ascorbate peroxidase (APX) 1, GST 1, Cu/Zn-SOD and APX 2, respectively. GSTs (EC 2.5.1.18) are soluble, cytosolic proteins that are involved in catalyzing conjugation of glutathione to various electrophilic compounds ^[14]. Quinone reductases (QR), cytosolic FAD-containing flavo-proteins, are involved in drug detoxifying mechanisms ^[15]. Cu/Zn- or Mn-SOD (EC 1.15.1.1) are important antioxidant enzymes expressed in nearly all cells exposed to oxygen, and induced by abiotic and biotic stress factors in plants ^[16,17]. APX (EC 1.11.1.11) is a key enzyme responsible for removal of hydrogen peroxide (H_2O_2) in chloroplasts and cytosol of higher plants ^[18].

Protein metabolism and cell growth and development: Protein spot 6 was a maize 20S proteasome α subunit. Proteasomes are large group of proteins involved in

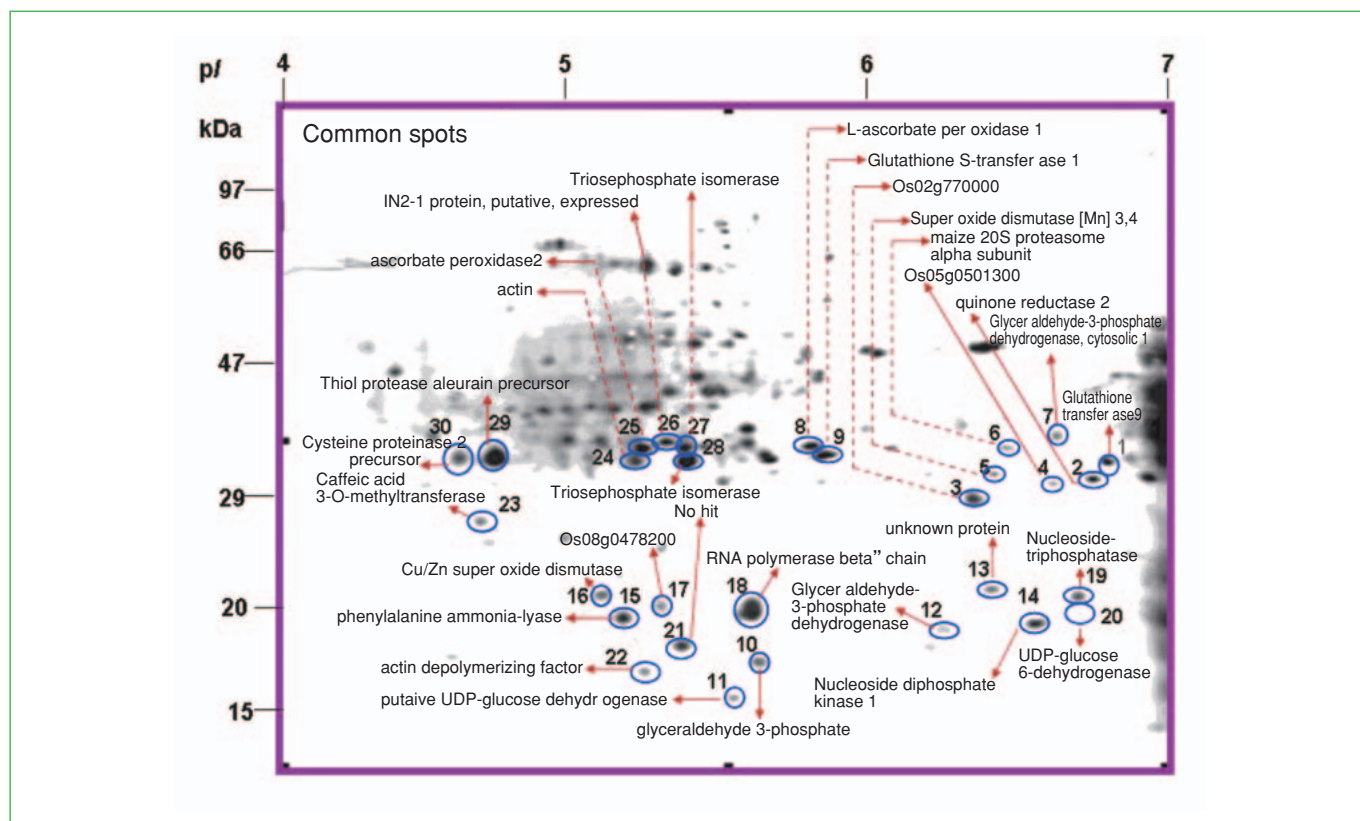


Figure 4 2-D gel reference map of sugarcane stalk tissue. High-quality protein spots successfully assigned by tandem MS/MS (Hitachi *e*LD-IT-TOF-MS/MS) and database searches are circled. Details are the same as in Figure 2. Figure is modified from Amalraj et al., 2010, Electrophoresis 31, 1959-1974 (see also for the total list of identified proteins).

degradation of unwanted or damaged proteins^[19]. Protein spot 29 was identified as a thiol protease aleurain precursor. This protein is localized in vacuole and involved in hydrolysis of proteins, acting as an aminopeptidase (notably, cleaving Arg-I-Xaa bonds) as well as an endopeptidase^[20]. Cysteine proteinases (spot 30) also called thiol proteases play essential role in plant growth and development and also in senescence and programmed cell death, in accumulation of storage proteins such as in seeds, and also in storage protein mobilization^[21].

Sugar metabolism: Six proteins were categorized to sugar metabolism. Protein spots 7, 10, 11, 12, 20, and 28 matched with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glyceraldehyde 3-phosphate, putative UDP-glucose dehydrogenase, GAPDH, UDP-glucose 6-dehydrogenase and triosephosphate isomerase, respectively. All of these proteins are well known enzymes involved in sugar phosphate metabolism^[22-24].

Secondary metabolism: Two proteins were identified, namely, phenylalanine ammonia-lyase (PAL, spot 15) and caffeic acid 3-O-methyltransferase (COMT, spot 23). PAL (EC 4.3.1.5) catalyzes the first reaction in

biosynthesis from phenylalanine of a wide variety of phenyl-propanoid natural products including lignin, flavonoid pigments, and phytoalexins^[25]. COMT is a bispecific enzyme and catalyzes methylation of caffeic acid to ferulic acid that may subsequently be converted to corresponding alcohols that are incorporated in lignins^[26]. Apart from their role in secondary metabolism, these two proteins play very crucial role in plant defense mechanisms.

Structural organization and nucleic acid metabolism: Protein spots 22 and 24 were actin and actin-depolymerizing factors (ADFs)/ cofilins, respectively. ADFs/cofilins are regulated by multiple mechanisms; the Rho small GTPase-activated phosphorylation at a terminal region Ser residue plays an important role in regulating their actin binding and depolymerizing activity, affecting actin reorganization^[27]. Proteins also involved in nucleic acid metabolism were identified, which include nucleoside-triphosphatase (spot 19), nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK) (spot 14), RNA polymerase β chain (spot 18), and ATP synthase α subunit (spot 27).

Unknown: Proteins spots were also found with no known function. Protein spots 3, 4, and 17 were

found to have similarity with Os02g0770000 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)], Os05g0501300, and Os08g0478200. Protein spot 13 is an unknown protein identified from *Zea mays*, and protein spot 26 was found to have similarity with the IN2-1 protein putative, expressed [*O. sativa* (japonica cultivar-group)].

Conclusions

This study is the first report of protein extraction from sugarcane stalk tissues for proteome analyses. Here we compared 5 protein extraction methods for their suitability in 2-DGE. Two protocols namely, phenol and TCA/acetone precipitation followed by solubilization in LBT extraction were found to be most suitable for sugarcane proteome analysis. Creation of sugarcane proteome reference 2-D gel map for the first time marks an important milestone forward in the direction of studying various proteome-based analyses in sugarcane^[28]. We hope that future work on sugarcane stalk tissues will open a new door to sugarcane proteomics and sugarcane database creation revealing stress proteome, defense (disease interaction in specific) proteome and comparative proteome analyses in sugarcane.

Acknowledgements

The research was supported by AP cess fund, Indian Council of Agricultural Research and Department of Biotechnology, Government of India, New Delhi, India. We appreciate the support of Dr. N. Vijayan Nair, Director of SBI for providing facilities and encouragement. Part of this work was done at Health Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki, Japan. Authors greatly appreciate the excellent MS analysis by Noriko Kobayashi and Kimiyoshi Koda of Hitachi High-Technologies Corporation (Naka Application Center, Science Laboratory, Hitachinaka, Ibaraki, Japan).

References

- [1] Calsa, T., Figueira, A., *Plant Mol. Biol.* 2007, 63, 745-762.
- [2] Viswanathan, R., Samiyappan, R., *Sugarcane* 1999, 17, 5, 9-15.
- [3] Poutanen, M., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., Penttilä, M., Kalkkinen N., *Rapid Commun. Mass Spec.* 2001, 15, 1685-1692.
- [4] Agrawal, G.K., Rakwal, R., *Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications*, (Agrawal G.K., Rakwal R., Eds.), 2008, Wiley, pp 808.
- [5] Suokko, A., Poutanen, M., Savijoki, K., Kalkkinen, N., Varmanen, P., *Proteomics* 2008, 8, 1029-1041.
- [6] O'Farrell, P. H., *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007-4021.
- [7] Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., de Vienne, D. In: *Advances in Electrophoresis* (Chrambach A, Dunn M.J., Radola B.J., Eds.), 1988, VCH, Weinheim, Germany, pp. 265-280.
- [8] Hurkman, J.W., Tanaka, C.K., *Plant Physiol.* 1986, 81, 802-806.
- [9] Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- [10] Blum, H., Beier H., Gross, J.H., *Electrophoresis* 1987, 8, 93-99.
- [11] Agrawal, G. K., Jwa, N. S., Iwahashi, Y., Yonekura, M., Iwahashi, H., Rakwal, R., *Proteomics* 2006, 6, 5549-5576.
- [12] Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J., *Electrophoresis* 1997, 18, 307-316.
- [13] Cho, K., Torres, N.L., Subramanyam, S., Deepak, S.A., Sardesai, N., Han, O., Williams, C.E., Ishii, H., Iwahashi, H., Rakwal, R., *J. Plant Biol.* 2006, 49, 413-420.
- [14] Cohen, R., Suzuki, M.R., Hammel, K.E., *Appl. Environ Microbiol.* 2004, 70, 324-331.
- [15] Jaiswal, A.K., *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 29, 254-262.
- [16] Del Rio, L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A., Zilinskas B.A., *J. Exp. Bot.* 2003, 54, 923-933.
- [17] Alschér, R.G., Ertürk, N., Heath, L.S., *J. Exp. Bot.* 2002, 53, 1331-1341.
- [18] Noctor, G., Foyer, C.H., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998, 49, 249-279.
- [19] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., *et al.*, In: "3". *Molecular cell biology* (5th Ed), 2004, W.H. Freeman and Co., New York, pp. 66-72.
- [20] Holwerda, B.C., Galvin, N.J., Baranski, T.J., Rogers, J.C., *Plant Cell* 1990, 2, 1091-1106.
- [21] Grudkowskal, M., Zagdańska, B., *Acta Biochimica Polonica* 2004, 51, 609-624.
- [22] Fothergill-Gilmore, L. A., Michels, P.A.M., *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 1993, 59, 105-235.
- [23] Onen, A.K., Murigneux, A., Martinant, J.P., Pepey, E., Tatout, C., Dudley, B.J., Fry, S.C., *Biochem. J.* 2005, 391, 409-415.
- [24] Pichersky, E., Gottlieb, L.D., *Plant Physiol.* 1984, 74, 340-347.
- [25] Kao, Y.Y., Harding, S.A., Tsai, C., *J. Plant Physiol.* 2002, 130, 796-807.
- [26] Poeydomenge, O., Boudet A.M., Crima-Pettenati J., *Plant Physiol.* 1994, 105, 749-750.
- [27] Chen, C.Y.-H., Cheung, A.Y., Wu, H., *Plant Cell* 2003, 15, 237-249.
- [28] Amalraj, R. S., Selvaraj, N., Veluswamy, G. K., Ramanujan, R. P., Muthurajan, R., Palaniyandi, M., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Viswanathan, R., *Electrophoresis* 2010, 31, 1959-1974.

カラムスイッチング-超高速LC/MS/MSシステムによる 唾液中药物の分析

Analysis of Drug in Human Saliva using Column-switching Ultra-fast LC/MS/MS

平林 由紀子*

1. はじめに

唾液は、血液とほぼ同成分を含むことが知られており^[1]、患者に負担をかけずに簡単に採取できるため、診断用の検体として期待されている^[2]。内分泌性ホルモン^[3]や、投与された薬物も^[4]血液から唾液に移行する。採血せずに血中药物濃度をモニターできれば、採血が困難な小児や比較的軽症の通院患者にも薬物濃度モニタリングを適用しやすくなると考えられる。血液や唾液等の生体試料中のホルモンや薬物を分析する場合、イムノアッセイ法が良く用いられているが、近年は液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)が使用されるようになってきた^[5]。

生体試料中の物質を分析する場合、除タンパク、濃縮等の前処理を行った試料をLCに導入し分離分析を行う。これらの前処理を、複数のカラムと六方バルブを用いて自動化したカラムスイッチング法が広く行われている^[6]。自動化により、前処理から分析までのスループットが上がり、多検体の分析に有効である。一方、近年直径2ミクロン程度の微粒子を充填したカラムを用いる超高速LCが普及しつつある。超高速LCを用いると、高い理論段数が得られ、分離時間を大幅に短縮することが可能である。そこで、この超高速LCを用いたカラムスイッチング法により自動で前処理を行い、生体試料中の微量成分を高スループットに定量分析するカラムスイッチング-超高速LC/MS/MSシステムを開発した^[7]。今回は、血中药物濃度のモニターが推奨されている抗てんかん剤バルプロ酸ナトリウム^[8]を、ヒト唾液に添加した場合の分析例を紹介する。

2. システムの構成

システムの構成を Fig. 1 に示す。超高速液体クロマトグラフLaChromUltra (LCU, 日立ハイテック)には、グラジエントポンプ1台、オートサンプラ、およびUV検出器が含まれる。除タンパク用の補助ポンプにL-7100低圧グラジエ

ントポンプ(日立ハイテック)、カラムスイッチングの流路切替に高圧切替六方バルブ(資生堂)を用いた。質量分析装置には、AB SCIEX製トリプル四重極型質量分析装置3200Q TRAP[®]を用い、イオン化法はエレクトロスプレー法(ESI)を用いた。3200Q TRAP[®]の制御用コンピュータ

に、ドライバソフトLaChromUltra AAO(資生堂)を導入することにより、制御ソフトAnalyst[®]からLCUの制御とデータ収集が可能になったので、LCUのグラジエント条件と3200Q TRAP[®]の測定条件はAnalyst[®]上で設定した。システムの制御の方法は以下の通りである。LCUのオートサンプラがサンプルインジェクションを行うと同時に、LCUはトリガー信号を発し、3200Q TRAP[®]とL-7100に同時にスタート信号が入力される。この信号により、3200Q TRAP[®]はデータ取込みを開始し、L-7100は予め内部入力してあったグラジエントプログラムをスタートさせる。六方バルブのポジション切替は、L-7100のグラジエントプログラム上で設定し、



平林 由紀子

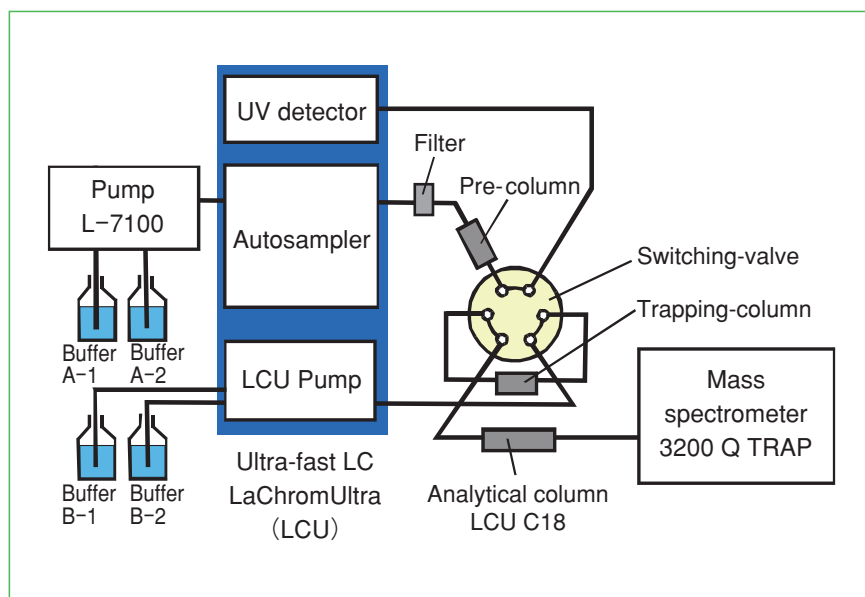


Fig. 1 システムの構成

* 株式会社日立製作所 中央研究所 主任研究員 理学博士

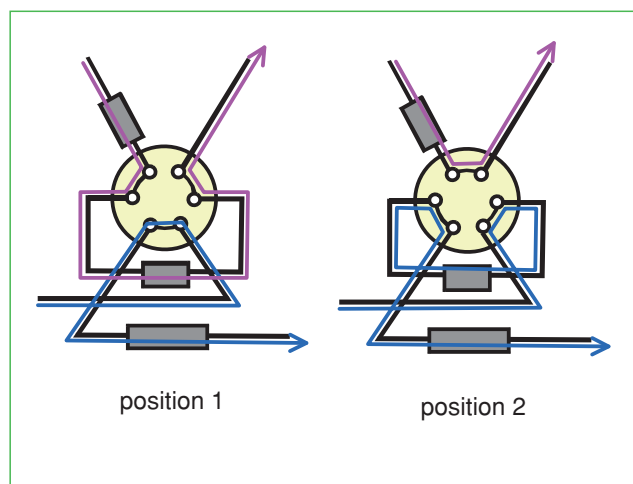


Fig. 2 六方バルブポジション

L-7100からのトリガー信号入力により行われる。

最初六方バルブはFig. 2に示すポジション2の位置にしておき、オートサンプラから導入された唾液試料を除タンパク用プレカラムに導入する。低分子はプレカラムに保持されるが、タンパク質等の大きな分子はカラムを通り抜け、UV検出器に導入されてモニターされた後、システム外に廃棄される。タンパク質を除去した後、六方バルブをポジション1に切替え、唾液中の低分子をトラップカラムに導入する。低分子がトラップカラムに吸着された後、六方バルブをポジション2に切替えて試料導入と逆の方向から有機溶媒濃度の高い移動相溶液をトラップカラムに流して低分子を溶出させ(バックフラッシュ法)、分析カラムに導入する。分析カラムで分離された試料は、MS/MSに導入されてMRMモードで分析される。

3. 実験条件

使用したカラムの種類および分離用の移動相溶液の組成、およびMS/MSの条件をTable. 1に示す。除タンパク用の移動相溶液(L-7100, A-1液)には10 mMギ

酸アンモニウム水溶液を用い、トラップカラムから試料を溶出し分析カラムで分離する移動相溶液(LCU, B-1液)には10 mMギ酸アンモニウム溶液(水/メタノール=30/70 %, v/v)を用いた。L-7100のA-2液は、カラム洗浄用のアセトニトリルである。六方バルブの切替え、および溶液流量や溶液比などのグラジエントプログラムをFig. 3にまとめて示す。1試料あたりの分析時間は10分である。

使用したバルプロ酸ナトリウム標準品は、シグマアルドリッジより購入した。唾液は、健康な成人ボランティア1名から採取した。唾液は、採取後冷凍保管しておき、使用する前に室温にて解凍した。唾液と、バルプロ酸ナトリウム標準品を添加した20 mMギ酸アンモニウム水溶液を1対1で混合し、小型卓上遠心分離機にて遠心分離し、固形成分と上清に分離して、上清30 uLを分析した。

4. 測定例

Fig. 4に、唾液にバルプロ酸ナトリウム標準品を添加して作成した検量線を示す。横軸がバルプロ酸ナトリウム濃度、縦軸がマスキロマトグラムのピーク面積である。濃度0.001 $\mu\text{g/mL}$ (絶対量0.03 ng)から10 $\mu\text{g/mL}$ (同300 ng)までの4桁で良好な直線性が得られた。検出下限および定量下限は、0.001 $\mu\text{g/mL}$ (絶対量0.03 ng)および0.01 ng/mL (同0.3 ng)、そのときのCV値は1.6 %および1.7 %だった。

Fig. 5は、唾液に添加した濃度0.1 $\mu\text{g/mL}$ (絶対量3 ng)のバルプロ酸ナトリウムのマスキロマトグラムである。横軸は保持時間、縦軸は信号強度である。バルプロ酸ナトリウムは溶液中でバルプロ酸イオンとナトリウムイオンに乖離するが、質量数143.1のバルプロ酸イオンはMS/MSで分解することが困難である。そこで、1段目と2段目のMSで同じ質量数チャンネル(MS/MSチャンネル: 143.1/143.1)を設定することによりイオンを壊さずにモニターした。サンプルインジェクションから6.8

Table. 1 測定条件

イオン化	ESI ネガティブモード
イオン化電圧	-4500 V
MS/MSチャンネル	143.1/143.1
プレカラム	CAPCELL PAK MF C8カートリッジカラム, 4.6 mm I.D. \times 10 mm, 5 μm (資生堂)
トラップカラム	Oasis HLBステンレスカラム, 2.1 mm I.D. \times 20 mm, 5 μm (Waters)
分析カラム	LaChromUltra C18, 2.0 mm I.D. \times 50 mm, 2 μm (日立ハイテック)
移動相溶液	L-7100 A-1 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液(100 : 0 水/メタノール, v/v) A-2 アセトニトリル(カラム洗浄用) LCU B-1 10 mM ギ酸アンモニウム溶液(30 : 70 水/メタノール, v/v)

Time (minutes)		0	0.4	5.0	5.7	7.0	10.0
Valve position		2	1	2	1	1	1
L-7100 pump	A-1 (%)	100	100	0	0	100	100
	A-2 (%)	0	0	100	100	0	0
	Flow rate (mL/min)	0.4	0.4	0.8	0.8	0.6	0.6
LCU pump	B-1 (%)	100	100	100	100	100	100
	B-2 (%)	0	0	0	0	0	0
	Flow rate (mL/min)	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Pre-column		Pre-separation (Protein removal)		Cleanup		Conditioning	
Trapping column		Trapping		Flush	Cleanup	Conditioning	
Analytical column		Conditioning		Separation		Conditioning	

Fig. 3 カラムスイッチングの手順

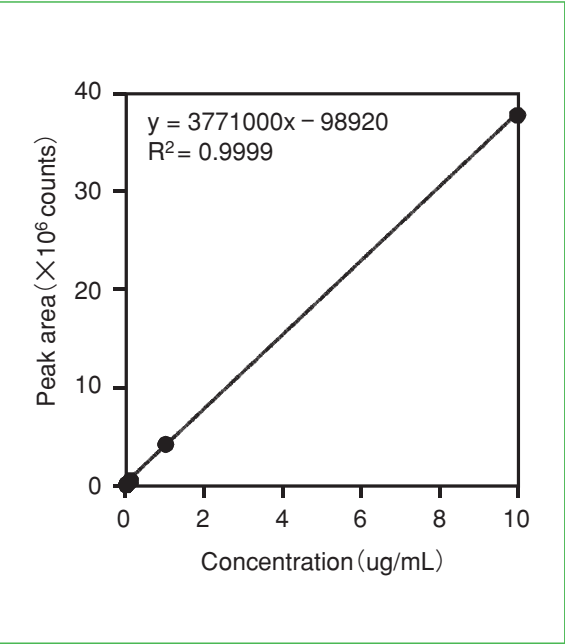


Fig. 4 唾液に添加したバルプロ酸ナトリウムの検量線

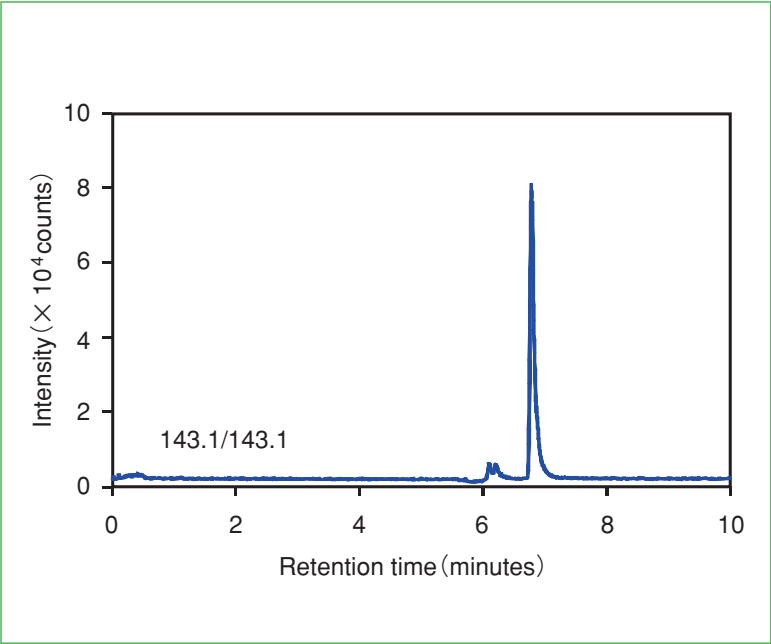


Fig. 5 唾液に添加したバルプロ酸ナトリウムのマスククロマトグラム

分後(トラップカラムから溶出し1.8分後)にバルプロ酸イオンのピークが検出された。0.1 µg/mL (絶対量3 ng) および10 µg/mL (同300 µg) において回収率を評価したところ、115 %および111 %だった。

バルプロ酸ナトリウム製剤(デパケン[®]、協和発酵キリン株式会社)投与時のバルプロ酸最高血中濃度は、投与条件により約30-100 µg/mLである^[8]。また、唾液中には、血中の遊離成分が移行すると言われている^[1]。最高血中濃度付近におけるバルプロ酸ナトリウムの血漿蛋白結合率は約90 %^[8]、従って遊離成分は約10 %なので、唾液中のバルプロ酸濃度は最高でも10 µg/mL以下と予想される。以上により、実際の唾液中薬物濃度の範囲内で良好な直線性、再現性が得られていると考えられる。

5. おわりに

今後は、実検体の分析を行い、さらに唾液中と血中濃度の関係を検討する予定である。唾液が血液の代替になれば、採血困難な患者への適用や、もっと気軽な健康チェックにも適用されることが期待できる。また、本システムでは、除タンパクおよび濃縮には従来のセミマイクロLCを用い、分離にのみ超高速LCを用いている。そのため、分析時間10分のうちの大半は、除タンパクおよび濃縮処理と、これらに使用するカラムの洗浄および平衡化に費やされており(**Fig. 3**)、分離には2分程度しか要していない。今後、除タンパクカラム等前処理部も超高速LC対応になれば、システム全体のさらなる高速化を図ることができ、より多くの検体の高スループット分析が実現できると考えられる。

参考文献

- [1] 石川達也, 高江洲義矩 監訳, 唾液の科学, 一世出版(1998).
- [2] Eliaz Kaufman, Ira B. Lamster, Crit Rev Oral Biol Med, 13 (2), p197-212 (2002).
- [3] Michael Gröshl, Clinical Chemistry, 54 (11), p1759-1769 (2008).
- [4] Olaf H. Drummer, Clin Biochem Rev, 27, p147-159(2006).
- [5] K. R. Allen, R. Azad, H. P. Field, D. K. Blake, Ann Clin Biochem, 42, p277-284 (2005).
- [6] Akira Motoyama, Taketoshi Kanda, Ryujiro Namba, Rapid Commun. Mass Spectrom., 18, p1250-1258 (2004).
- [7] 平林由紀子, 山本由香里, 品川 隆, 鈴木丈司, 加地利雄, 第58回質量分析総合討論会/第1回アジア・オセアニア質量分析会議要旨集, p352 (2010).
- [8] 協和発酵キリン株式会社 デパケン[®]インタビューフォーム, http://www.kksmile.com/yakuzai/interv/dpa_in.pdf.

哺乳類精子形成細胞におけるヌアージュ・タンパク質の局在

Localization of nuage proteins in mammalian spermatogenic cells.

横田 貞記* 小野原 侑子**

1. はじめに

精子細胞には、古くから塩基性色素に濃染される構造が知られ、さまざまな名称で呼ばれると共に、その起源や運命が論じられていた¹⁾。この構造は、1955年に、はじめて電子顕微鏡の舞台に登場し^{2), 3)}、その後、ドイツ語Chromatoide Körperの英語訳chromatoid body (CB)と呼ばれ、詳細な電顕的研究が行われた⁴⁾。1950～70年の電顕研究は、さまざまな動物の生殖細胞に、電子密度の高い物質からなるミトコンドリアと密接に結び付いた構造を次々に発表した。この構造には、限界膜がなく、細胞質に雲のように浮かんでいることから、nuage (仏語・雲)と呼ばれ、今日も用いられている。Eddyは生殖系列細胞の分化に伴うnuageの形態と分布を観察する中で、CBをnuageに属する構造としてとらえた⁵⁾。この考え方に立ってRussell and Frankはラット精子形成細胞の分化とnuageの形態、分布、他の構造との関連を詳細に観察し、nuageを6つのタイプに分類した⁶⁾。一方、精子細胞には、他の体細胞には見られない構造が、細胞の発達に伴い、出現しては消えていく⁷⁾。それらの構造とnuageと関係は明らかではなかった。1970～80年代のnuageの研究は、純粋に形態的な観察に基づいていた。つまり、nuageに含まれるタンパク質はほとんど知られていなかった。しかし、現在、30を超えるタンパク質がnuageに見つかっており^{1), 8)}、それらの多くに対する抗体が入手できる。この小文では、精子形成細胞においてnuageに分類された構造、また、分類されていない構造とnuageタンパク質の関連について、免疫電顕法で調べたわれわれの研究を紹介したい。

2. nuage構造のダイナミズム

— 免疫蛍光染色による観察

精子発生サイクルは、ラットの場合、IからXIVのステージに、さらに精子形成は1から19のステップに分けられている。DDX4の免疫蛍光染色で観察すると、電顕的にはミトコンドリア間セメント(IMC)に相当する微細顆粒状の染色は、精母細胞に分布し、細胞の分化に伴い、ステージVIIから目立ちはじめ、VIIIから



横田 貞記



小野原 侑子

XIにかけてもっとも強くなる。また、電顕的には60～90 nmの粒子の凝集体であるひも状の染色も、精母細胞に分布し、染色のピークはステージXからXIIに見られる。これらの染色は減数分裂で中断される。精子細胞では、CBの形成が始まり、ステップ4から8にかけて、不整形の大きな形態を維持するが、やがて消滅する。3種類のタンパク質、DDX4、DDX25、MAELを組み合わせると、これらのタンパク質はすべてnuage構造に局在する。しかし、精母細胞や精子細胞の分化に伴い、その発現に大きなずれがみられた(図1)。例えば、ステージVIIIでは、パキテン期精母細胞の微細顆粒(IMC)が、DDX4に強く染まるが、DDX25には殆んど染まらない。一方、精子細胞の顆粒(CB)は両タンパク質に強く染まる(図1A～C)。また、ステージXでは、精母細胞のひも状構造がDDX25に陽性であるが、MAELには陰性である(図1D～F)。しかし、ステージXIIでは、精母細胞のひも状の構造がDDX4に濃染されるが、MAELには陰性である(図1G～I)。このような二重染色を強拡大で、注意深く観察すると、比較的大きな顆粒で、融合と分裂を示唆する画像が頻繁にみられる。これらの事実は、nuageが、精子形成過程で、形成・消滅、融合・分裂をダイナミックに繰り返していることを示唆する。

3. ラット精子形成細胞における6タイプのnuage構造

Russell and Frankは次の6つのタイプのnuageを記載した⁶⁾。

(1) 70～90 nm粒子(図2A)。ステージVIIIからXIIのパキテン精母細胞にみられ、核膜に接して存在する。顆粒は数珠状に連なっていることが多い。また顆粒には限界膜がない。したがって、顆粒構造は構成物質が互いに結合し合っつけられていると思

* 長崎国際大学薬学部 薬学科機能形態学研究室 教授、医学博士
** 長崎国際大学薬学部 薬学科機能形態学研究室 助教、薬学博士

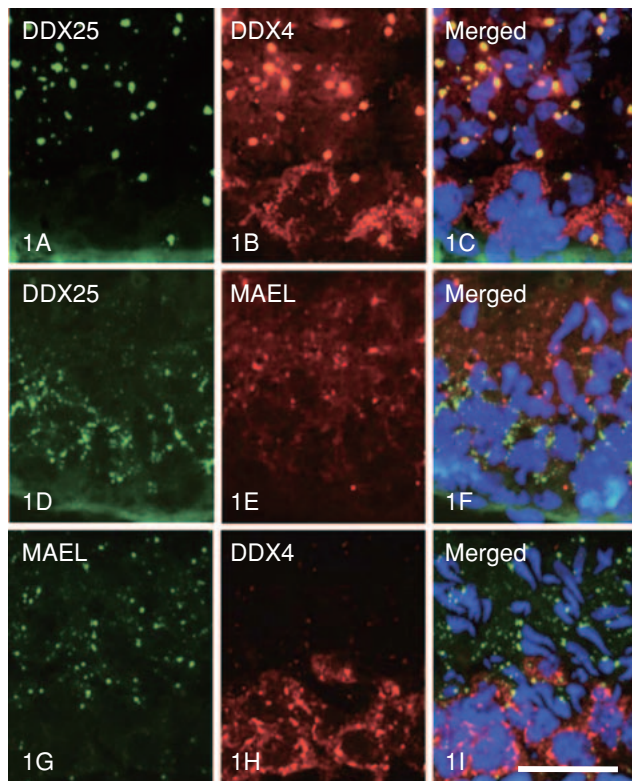


図1. 免疫蛍光二重染色。A-C：ステージVIIIの精細管におけるDDX25（緑）とDDX4（赤）の二重染色。微細顆粒状のIMCはDDX4に染まるがDDX25には染まらない。D-F：ステージXの精細管におけるDDX25（緑）とMAEL（赤）の二重染色。ひも状構造はDDX25に陽性であるが、MAELには陰性。さらにMAELに陽性の顆粒はDDX25に陰性である。G-I：ステージXIIの精細管におけるMAEL（緑）とDDX4（赤）の二重染色。MAEL陽性の顆粒はDDX4に陰性、DDX4に陽性のひも状構造はMAELに陰性である。Bar = 20 μ m.

われる。減数分裂期には消滅する。

- (2) satellite body (SB) (図2B)。この構造は初めてFawcettらによって記載された構造で、CBの近くに存在することからその名が与えられた⁴⁾。SBは中期の精母細胞に多くみられるが、初期の精子細胞にも存在し、やがて消滅する。
- (3) IMC (図2C)。この構造は集合したミトコンドリア間を埋める電子密度の高い物質からなり、ほぼすべての生殖系列細胞に存在する⁵⁾。精巣では、精母細胞に顕著であるが、精子細胞には殆んどみられない。減数分裂中の細胞では、分散したミトコンドリアに付着したものや小顆粒として存在する。
- (4) 30 nm粒子の集塊 (図2D)。減数分裂時にだけ現れるが、数は少ない。小さな粒子はその大きさからみて、遊離リボソームのようにみえる。
- (5) 60-90 nm粒子の集塊 (図2E)。この構造は、中・後期の精母細胞にみられ、粒子は互いに密着する傾向にあり、CBの前駆体のようにみえるが、減数分裂時には存在しないので、精子細胞に受け継がれるとは考えにくい。核よりもミトコンドリアと位置的な関係が深いようにみえる。IMCの一部と連続した像は頻繁にみられる。
- (6) クロマトイド・ボディ (CB) (図2F)。最も古くから知られている精子形成細胞特異的な構造で、電子密度の高い微細線維・粒子状の物質によって構成され、内部に蜂の巣様に細胞質が入り込んでいる。また、部分または全体が小胞や短い細管に囲まれている。精子細胞の初期から出現し、成長して、

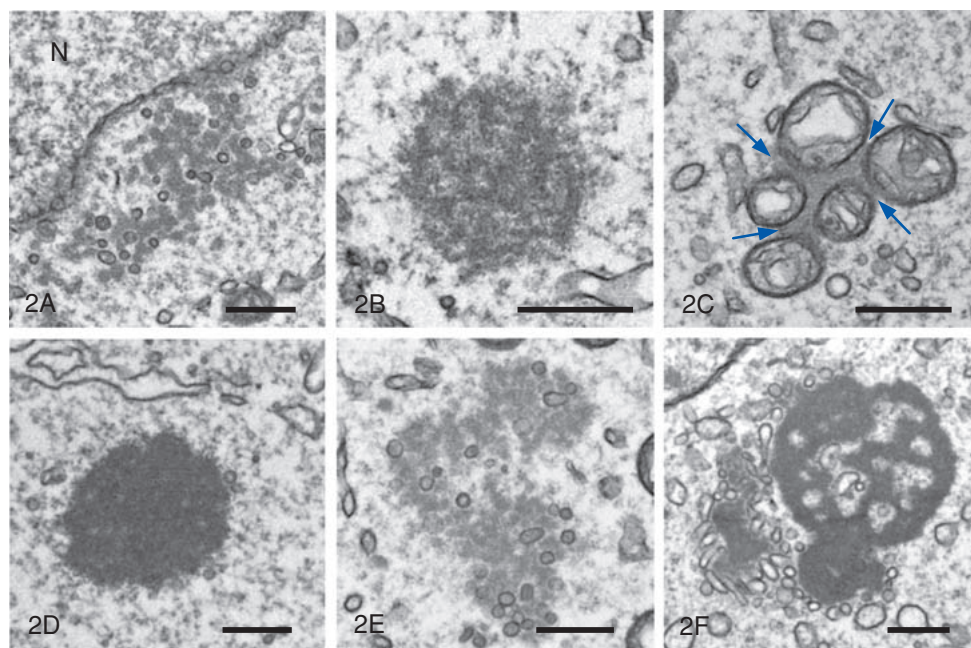


図2. ラット精子形成細胞におけるnuage構造。A：70-90 nm粒子。核(N)に接して存在する。B：satellite body (SB)。C：IMC。ミトコンドリアの間を埋めている（矢印）。D：30 nm粒子の凝集体。E：60-90 nm粒子の凝集体。IMCと連絡していることがある。F：CB。Bar = 0.5 μ m (A, B, C, D, E), = 1 μ m (F)。

徐々に後部細胞質に移動して、鞭毛基部でステップ11には消滅する。最後まで、多数の小胞に囲まれる。この小胞は、リソソーム膜タンパク質Lamp1およびLamp2をもっており⁹⁾、リソソームと関連すると思われる。(3)と(4)を除く構造には、この小胞が共存する。

4. 免疫電顕によるnuageタンパク質の精子形成細胞における局在

上述の6つのタイプに分類された構造にnuageタンパク質は、微細構造レベルでどのように分布するのだろうか。われわれは、3種のnuageタンパク質の抗体を調製して免疫電顕法で観察した。

4-1 DDX4(mouse VASA homolog, MVH)

DDX4は、(2)と(4)を除いたすべてのタイプのnuageに局在する(図3A-E)。SBと30 nm粒子におけるシグナルは弱く、反応陰性のものも見られる(図3B, C)。70-90 nm粒子では、DDX4部位を示す金粒子の多くは、この構造の表面に一致して局在する(図3A)。IMCは、強くラベルされ(図3B)、強拡大すると、ミトコンドリア外膜とIMCの間にシグナルがみられる¹⁰⁾。30 nm粒子の集塊は希に標識されるが(図3C)、多くは陰性である。CBは最も強く染色されるが、陰性が弱いラベルしか入らない部分をもつものがしばしば観察される(図3E)。

4-2 DDX25

DDX25はDDX4と同じように、70-90 nm粒子、60

-90 nm粒子、CBに強く染色される(図4A, B)。しかし、IMCには、認められても、極めて弱い染色であり、免疫蛍光染色にみられるように、DDX25はIMCにはあまり発現していないと思われる。30 nm粒子の集塊は染色されない。SBはDDX4よりは強く染色される。ステップ9-11にみられる鞭毛基部のCBはDDX4より強く染色される。

4-3 MAEL

MAELは30 nm粒子の集塊を除くすべてのnuage構造に強く染色される(図5A, B, D)。特に、MAELのSBにおける染色は、DDX4やDDX25のそれに比べて強い。SB内のMAELの分布をみると、金粒子は粗い網目構造をつくる電子密度の高い部分に存在するが、明るい網目の中にはない(図5D)。このことは、MAELのSBにおける機能部位は限られていることを示唆する。

5. nuageに属しない精子形成細胞特異的構造

- (1) radial body。この構造は、ステップ12以後の精子細胞の細胞質にみられる。滑面小胞体様の膜系が放射状に並んでいる。精子形成の成熟期における小胞体膜の吸収をしている像と考えられている¹¹⁾。
- (2) reticulated body (RB)。これはステップ14-16の精子細胞の細胞質にみられる吻合したひも状の構造。ひもの直径80-100 nm。小胞体に囲まれていることが多い。ステップ18で消滅する⁷⁾。機能は不明。
- (3) granulated body (GB)。ステップ15-17の精子細胞に出現する。密度の高い粒上の物質が密に集まったもので、限界膜はない。鞭毛のouter dense

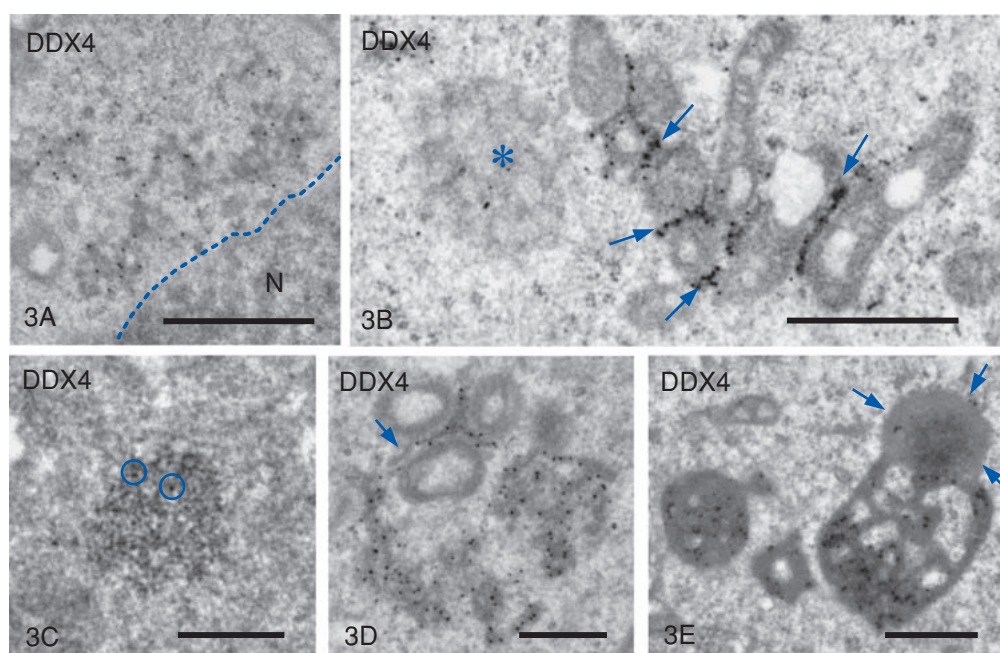


図3. nuage構造におけるDDX4の免疫電顕的局在。A: 70-90 nm粒子。破線は核膜、Nは核質。B: SB(*)とIMC(矢印)。C: 30 nm粒子の凝集体。金粒子は円内にある。D: 60-90 nm粒子の凝集体。IMCに続いている(矢印)。E: CB。一部にラベルがない(矢印)。Bar = 0.5 μ m。

fiberのポリペプチドが検出されている¹⁰⁾。機能は不明。

(4) mitochondria-associated granule (MAG)。ステップ9-17の精子細胞にみられる直径1-2 μm の比較的大きな構造である。ミトコンドリアが顆粒に密に

付着する。ミトコンドリアの顆粒に接した凹面の外膜には、鞭毛のouter dense fiberと同じ密度の物質が付く⁷⁾。

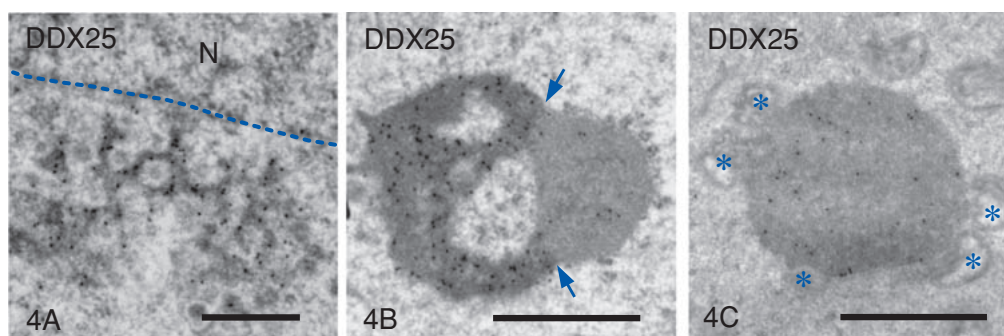


図4. DDX25の局在。A：70-90 nm粒子の凝集体。破線は核膜，Nは核質。B：CB。一部が陰性(矢印)。C：MAG。5個のミトコンドリアが付着している(*)。Bar = 0.5 μm 。

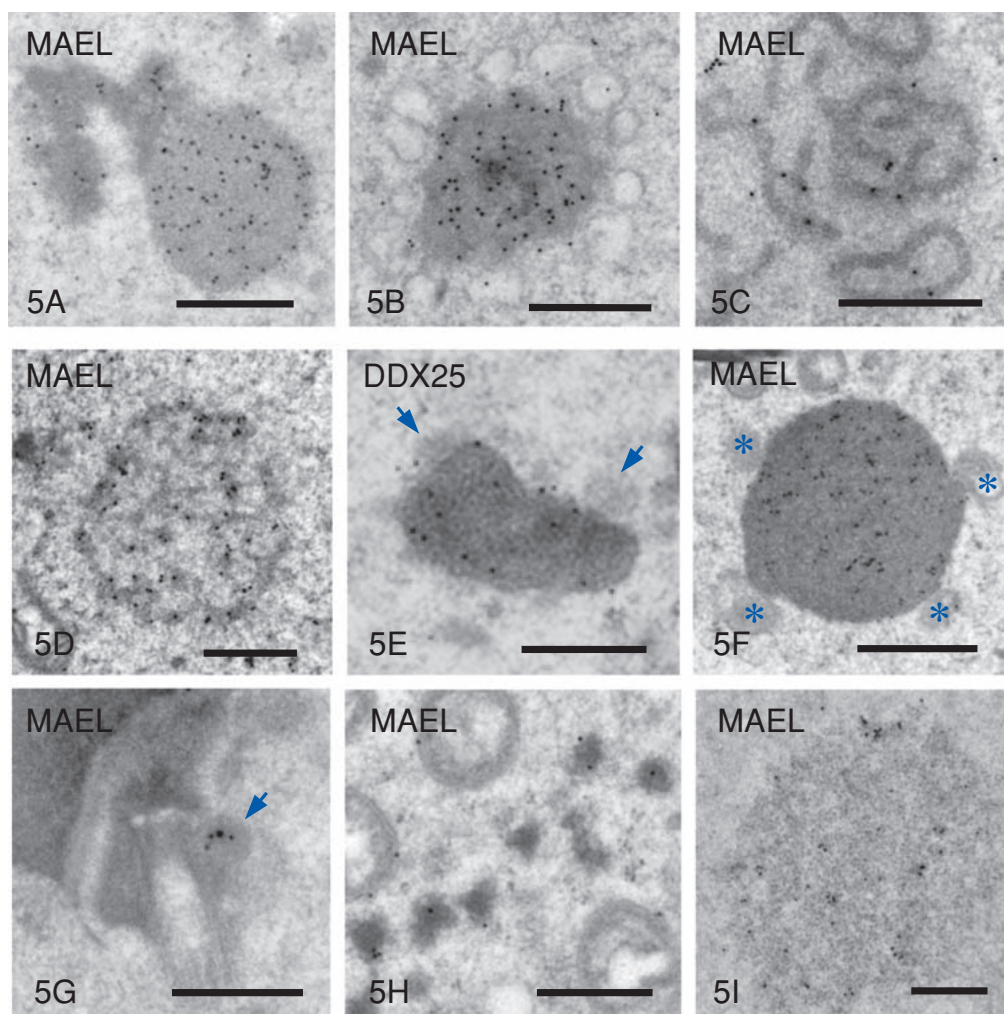


図5. MAELの局在。A：CB。明るい部分のラベルが高い。図3Eと図4Bとは逆である。B：後期のCB。小胞に囲まれている。C：RB。D：SB。DDX4(図3B)より強く染まっている。E：GB。接着する明るい粒子は陰性(矢印)。F：MAG。4個のミトコンドリアが付着する(*)。G：鞭毛基部の粒子(矢印)。H：精子細胞頸部の小顆粒。I：residual bodyのリボソームの集塊。Bar = 0.5 μm 。

6. 精子形成細胞特異的構造とnuageタンパク質の局在

radial bodyにはnuageタンパク質は局在しない。DDX4は上述の構造の中でMAGにだけ検出されるが、他の構造は陰性である。MAGには、他に、DDX25とMAELが局在する(図4C, 5F)。MAGとCBは同じ強さでMAELに染まる(図5A, F)。RBはDDX25には弱く、しかしMAELには比較的強く標識される(図5C)。GBはDDX25とMAELに同程度に染色される(図5E)。GBには、密度の低い小顆粒が接しているが、それらは陰性である。

7. その他のMAEL陽性構造

MAELは上述の構造以外にも次のような構造に検出される。鞭毛と精子核をつなぐconnecting pieceについている丸い突起にシグナルがみられる(図5G)。この構造は、この近傍に小顆粒としても存在する(図5H)。中期の精母細胞核のXYボディは他の核質よりラベルが強い。また、陽性反応はステップ19の精子細胞のresidual bodyにあるリボソームの集塊にもみられる(図5I)。

8. nuageタンパク質と精子形成細胞特異的構造

免疫電顕の結果は、nuageタンパク質はnuage顆粒とそれ以外の精子形成細胞特異的構造に局在することが分かった。これらの構造は共通して限界膜をもたない。膜で囲まれることがなく、細胞の中で構造を形成し得ることは、構造に集合しているタンパク質は互いに相互作用して、分子運動に耐えて、分散しないような力で結合していることを意味する。そのような構造が、nuageタンパク質の局在でみただけで10種類もある細胞は体細胞にはない。また、それらが、哺乳動物では共通した特定の形態をとるのは、存在するタンパク質が共通しているためであろう。これまで、nuageに分類されていない構造におけるnuageタンパク質の存在は、それらの構造も、仮定されているnuageの機能を分かちもっていることが予想される。nuageの代表的な構造CBには、現在30種を超えるタンパク質の存在することが知られ、その機能として、mRNAの貯蔵、翻訳遅延、分解、microRNAのプロセッシング、レトロトランスポゾンのサイレンシングがあげられている^{13), 14), 15), 16)}。

9. おわりに

紙数の制限から、局在を検討したnuageタンパク質のDDX4, DDX25, MAELの性質や機能については省略した。これらのタンパク質をコードする遺伝子の欠損は、精子形成不全で雄性不妊になるので、精子形成に必須なタンパク質である。

タンパク質の機能を解明していく上で、免疫電顕などの手法で、そのタンパク質が、細胞内のどの部位に存在するのか、膜のどちら側にあるのか、構造の表面

にあるのか、内部にあるのかなどを知ることは、有用な情報である。しかし、近年、このような電顕の研究は急速に減少している。この小文では、敢えて、1970-80年代の電顕の画像データに免疫電顕のデータを重ね合わせてみた。見えてきたものは、形態的な情報だけでnuageに分類された構造が間違いなくnuageであったことである。先達の画像を読む慧眼に感服するばかりである。

一方、われわれは、後期の精子細胞に現れる特異的な構造がnuageタンパク質を含むことを明らかにした。これらの構造の機能の解明は今後の課題である。

参考文献

- 1) Yokota S. (2008). *Acta Histochem. Cytochem.* 41 (4): 65-82.
- 2) Burgos M. and Fawcett D. W. (1955). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 287-300.
- 3) 佐々昭三. (1959). *千葉医学雑誌* 34: 1698-1721.
- 4) Fawcett D. W., Eddy E. M. and Phillips D. M. (1970). *Biol. Reprod.* 2: 129-153.
- 5) Eddy E. M. (1974). *Anat. Rec.* 178: 731-758.
- 6) Russell L. and Frank B. (1978). *Anat. Rec.* 190: 79-98.
- 7) Clermont Y., Oko R. and Hermo L. (1993). Desjardins C., Ewing L. L. (eds) *Cell and molecular biology of testis*. Oxford University Press, New York, pp 332-376.
- 8) 中馬新一郎, 中辻憲夫 (2007). *蛋白質 核酸 酵素* 152(16): 2102-2108.
- 9) Haraguchi C. M., Mabuchi T., Hirata S., Shoda T., Hoshi K., Akasaki K. and Yokota S. (2000). *J. Histochem. Cytochem.* 53: 455-465.
- 10) Onohara Y., Fujiwara T., Yasukochi T., Himeno M. and Yokota S. (2010). *Histochem. Cell Biol.* 133: 627-639.
- 11) Clermont Y. and Rambourg A. (1978). *Am. J. Anat.* 15: 191-212.
- 12) Clermont Y., Oko R. and Hermo L. (1990). *Anat. Rec.* 227: 447-457.
- 13) Parvinen M. (2005). *Int. J. Androl.* 28(4): 189-201.
- 14) Kotaja N. and Sasson-Corsi P. (2007). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 85-90.
- 15) Dufau M. L. and Tsai-Morris C.-H. (2007). *Trends Endocrinol. Metab.* 18: 314-320.
- 16) O'Donnell K. A., Burns K. H. and Boeke J. D. (2008). *Dev. Cell* 15(2): 179-181.

日立高速液体クロマトグラフ『Chromaster5000シリーズ』の特長と測定例

Hitachi High Performance Liquid Chromatograph Chromaster 5000

丸岡 幹太郎* 豊崎 耕作* 久保 晋太郎* 和田 宏之* 富田 将司* 丹羽 宏昌* 福田 真人* 鈴木 裕志*

1. はじめに

バイオ分析分野では、新薬の研究開発が活発に行われている。また食品の安全に対する意識の高まりから、食品関係の分析ニーズも増加している。

2011年2月より発売された日立高速液体クロマトグラフChromaster5000シリーズ(以下、CM5000シリーズ図1)は、製薬、食品、化学、環境分析をはじめとした、研究・開発・品質管理などのあらゆる分析シーンにおいて、幅広く利用される汎用液体クロマトグラフである。

本システムは、液体に溶解可能な物質の組成や含有量を高精度で測定する分析装置であり、基本性能、簡単操作と容易なメンテナンス性、堅牢性といった性能・特長が求められている。

本稿では、CM5000シリーズの主な特長と、CM5000シリーズを用いた測定例を紹介する。

2. Chromaster5000シリーズの特長

2-1 基本性能

(1) ポンプ

日立独自の高速フィードバックリアルタイム制御方式及び、バルブの倍速切替機能により、移動相の混合能

力を向上させた。これにより、ミキサ無しでも安定したデータ収集が可能になるとともに、システムディレイボリュームを低減させた。移動相の切替から、その移動相が実際にカラムに到達するまでの遅れ時間を最低限に抑えることが可能である。

(2) オートサンブラ

オートサンブラ内部のデッドボリューム低減、ニードル構造の改善により、キャリアーオーバーの低減を図った。(0.003%以下(規程条件にて))

(3) 検出器

可変風量ファンや特殊分光器カバー採用により、低ノイズ、低ドリフトのダイオードアレイ検出器を達成した。(ノイズ： 0.5×10^{-5} AU, ドリフト： 0.4×10^{-3} AU/hr)。更なる高感度検出が可能になった。またUV検出器/UV-VIS検出器では、2波長測定機能を新規採用した。これにより、不純物測定において効果を発揮する。

2-2 簡単操作と容易なメンテナンス

(1) Graphical User Interface (GUI Controller) の採用

タッチパネル付きカラー液晶モニターを採用した、GUI Controllerを新規開発した。本コントローラにより、全モジュールの操作が可能であるとともに、タイマ機能を使用することにより、分析前の準備運転(Wake Up)、分析後の終了運転(Sleep)の設定を行うことが可能である。

(2) 自動化・省力化

オートパージバルブやプランジャ自動洗浄などの機能を設けることにより、装置立上げ、分析後の洗浄作業を自動化・簡便化を図った。またカラム管理システムを使用することにより、使用回数・カラム圧力変動などのカラム履歴を記録・管理することが可能である。

(3) カラム管理システムによるカラム管理

ランプなどの消耗品や、カラム・配管などの交換頻度が高い部品については、装置前面から操作可能な構造を取っている。また、システム高さを低減することにより、溶媒瓶の設置がより容易になった。

(4) フロントアクセスによるメンテナンス性向上

ランプなどの消耗品や、カラム・配管などの交換頻度が高い部品については、装置前面から操作可能な構造を取った。また、システム高さを低減することにより、



図1 日立高速液体クロマトグラフChromaster5000シリーズ外観

* 株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学・医用システム設計開発本部 分析システム設計部

移動相やオートサンブラ用洗浄液等の溶媒瓶の設置がより容易になった。

2-3 堅牢性

外観カバーには耐熱、耐薬品、また長期間の紫外線照射でも劣化のしにくい材質を使用した。また装置内部には、耐薬品、腐食防止効果が高いステンレス鋼を使用している。

3. 測定例

3-1 アスピリン製薬中分解物の分析

Chromaster5410 (UV検出器)では、リアルタイム波長切替による、2波長同時測定が可能であり、不純物や分解物の測定に有効です。図2にアスピリン製薬中分解物の分析例を示す。

アスピリンの重要な作用として、プロスタグランジン

生合成を抑制し、鎮痛作用、解熱作用、抗炎症作用を現すことが報告されている。アスピリンは、解熱鎮痛剤として処方薬をはじめ、一般薬としても繁用され、総合感冒薬にも含有されている。

3-2 カテキン類の分析

茶の主要成分であるカテキン類の効果・効能は、多岐にわたっており、その機能が注目されている。市販されているペットボトル緑茶飲料には、茶葉由来カテキン類の他に、殺菌工程で生じる熱異性化体^{*1}が無視できない濃度で含まれており、その生理作用が注目されている。カテキン類の効果効能は、発ガン抑制作用、抗腫瘍作用、突然変異抑制作用、活性酸素の消去、抗酸化作用、血中コレステロール低下作用、抗菌作用など、様々とされており、このような背景から、茶カテキンの研究が盛んに進められている。図3に分析例を示す。

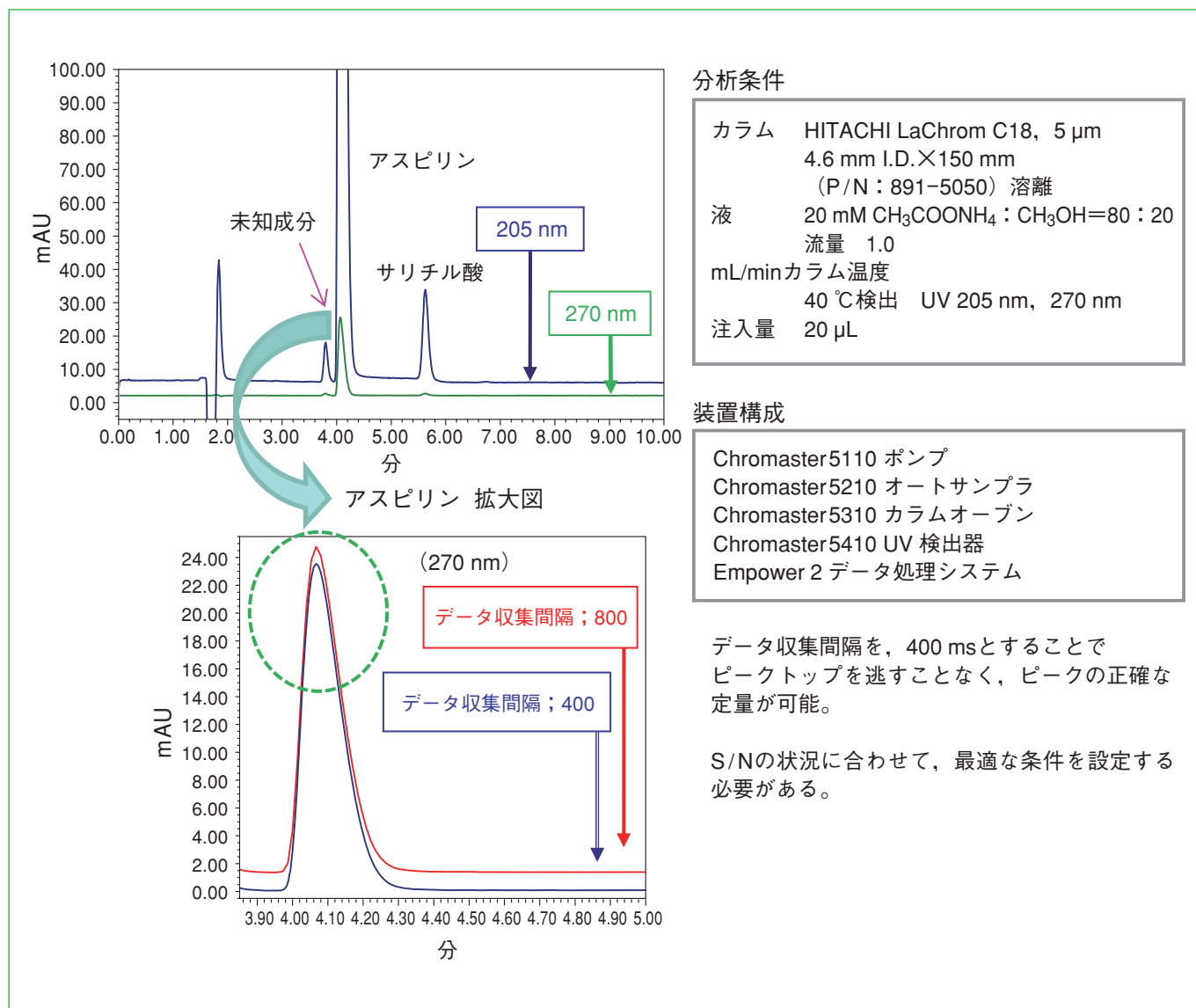
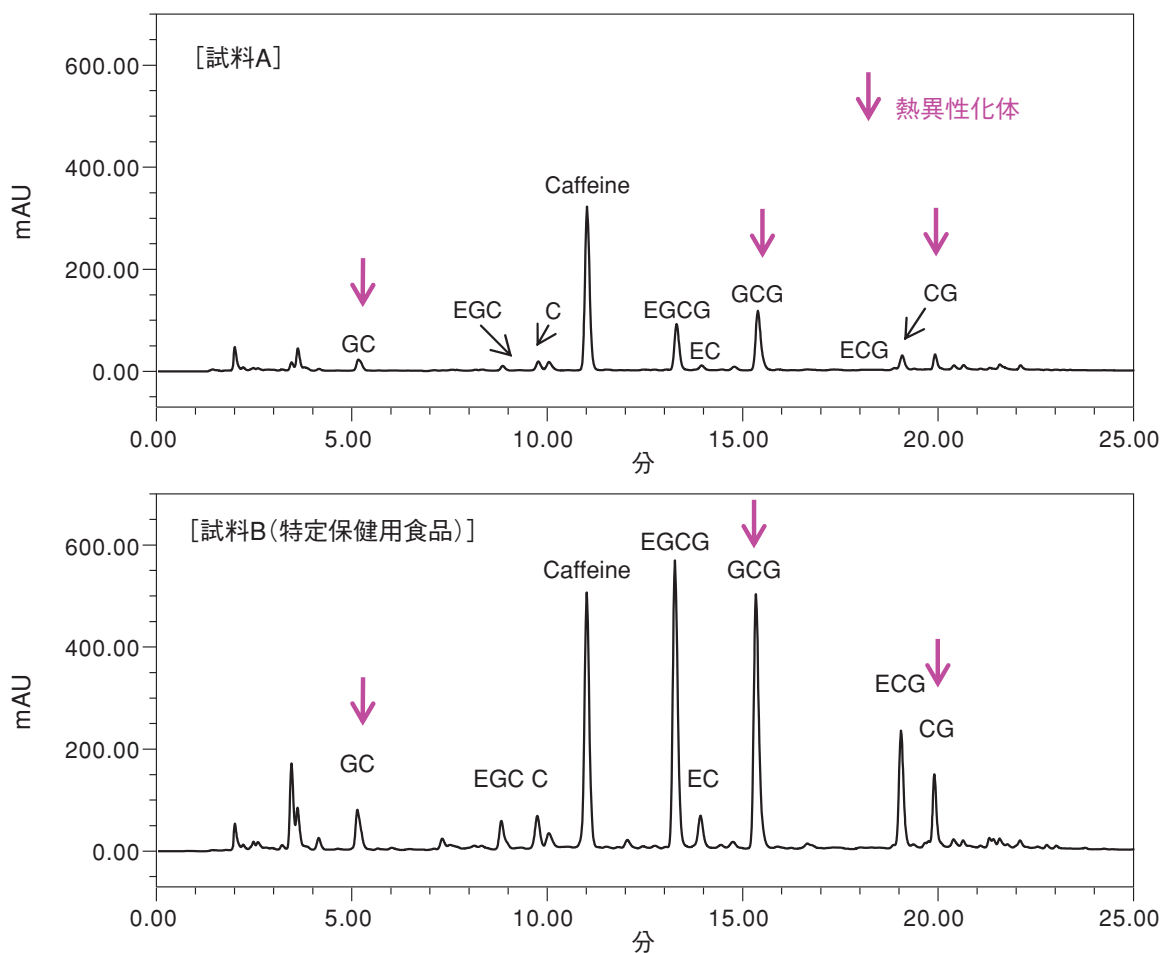


図 2



分析条件

カラム HITACHI LaChrom C18 (5 μ m)
4.6 mm I.D. \times 150 mm
溶離液 (A) 0.05 % H_3PO_4 (pH 2.4)
(B) $CH_3OH/CH_3CN=3/2$
*Gradient:
(0 min) B10 % \rightarrow (15 min) B25 % \rightarrow
(25 min) B60 % \rightarrow (25.1–40 min) B10 %
流量 1.0 mL/min
カラム温度 40 $^{\circ}C$
検出 UV 280 nm
注入量 10 μ L

装置構成

Chromaster5110 ポンプ
Chromaster5210 オートサンブラ
Chromaster5310 カラムオープン
Chromaster5420 UV-VIS 検出器
Empower 2 データ処理システム

図 3

4. まとめ

以上、日立高速液体クロマトグラフCM5000シリーズの特長と試料の測定例を紹介した。

今後とも、日立高速液体クロマトグラフは、ハードウェアモジュール、データ処理ソフトウェア、及びカラム技術の改良・新規開発に取組み、高速・高分離・高感度を特長とした分析アプリケーションの開発を目指す。

参考文献

- 1) 津田孝雄 著「クロマトグラフィー第2版 ―分離のしくみと応用―」丸善(1995)

透過電子顕微鏡HT7700の特長と応用

Introduction of the HT7700 TEM and its application

和久井 亜希子* 田中 弘之** 中澤 英子*

1. はじめに

近年、透過電子顕微鏡(以下、TEM: Transmission electron microscope)は、様々な分野において微細構造の形態を観察するための必要不可欠なツールとなっている。今回、バイオからナノテクノロジーやソフトマテリアルまで、幅広い研究分野で使用可能な最高加速電圧120 kVのHT7700形TEMを開発した。HT7700は、操作卓・モニタをTEM本体と切り離した、これまでのTEMに無い、新しいデザインを採用した。HT7700では、蛍光板観察用のスクリーンカメラを搭載し、明るい部屋でのTEM操作を実現している。本稿では、HT7700の特長とその応用例を紹介する。

2. HT7700の概要と特長

HT7700の外観写真を図1に示す。HT7700は、加速電圧40 kVから120 kVまで可変することができ、倍率は、50~1,000倍(Low Magモード)、200~600,000倍(Zoomモード)に対応している。本装置は以下の4つの主な特長を有している。

(1)スクリーンカメラを搭載することによりTEMの像観察をモニタに一元化し、明るい部屋で観察や操作が可能である。

蛍光板に投影された試料のTEM像をスクリーンカメラで撮影し、その画像をモニタ上に映し出す機構を採用している。これにより、オペレータはモニタ上の画像を観察しながら、操作パネル近傍に配置されたトラッカーボールを動かし、視野探しを行うことができる。これまでのように蛍光板を直視する必要が無く、明るい部屋でのTEM操作を行うことが可能となっている。また、スクリーンカメラはゲインを調整することができる。さらに、HT7700はデジタルカメラをメインカメラとして採用している。

(2)複合対物レンズを搭載し、低倍率・広視野・高コントラスト観察、高倍率・高分解能観察が可能である。

図2に複合対物レンズの概略図を示す。このレンズは、下部ポールピースの直下に設置されたミニレンズコイルとメインレンズコイルの極性を切り換えるこ

とにより、焦点距離を変更することができるようになっていて、長焦点レンズを用いた高コントラストモード(HCモード: High Contrast)と短焦点レンズを用いた高分解能モード(HRモード: High Resolution)の2つの観察モードを備えている。HCモードでは、生物試料などの観察に適した低倍率・広視野・高コントラスト観察、HRモードでは、結晶格子像などの観察に適した高倍率・高分解能観察が可能である。

(3)多様な機能を有している。

HT7700は、オートフォーカス機能、オートステイグマ機能、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管理機能などが装備されている。さらに、今回、新たに日立独自のアルゴリズムによるつなぎ写真作製のための機能を標準搭載しており、連続視野撮影から1枚のつなぎ写真完成まで自動的に行うことが可能となった。また、新たにダブルアクシストモグラフィー^{*1}と日立独自の再構成アルゴリズムによりミッシングゾーンの影響を低減した高精度な三次元再構成像の作成が可能となった。(※1 オプション対応)



図1 透過電子顕微鏡HT7700の外観

* ㈱日立ハイテクノロジーズ モノづくり統括本部 那珂地区生産本部
グローバルアプリケーションセンタ

** ㈱日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学・医用システム設計開発本部 先端解析システム第二設計部

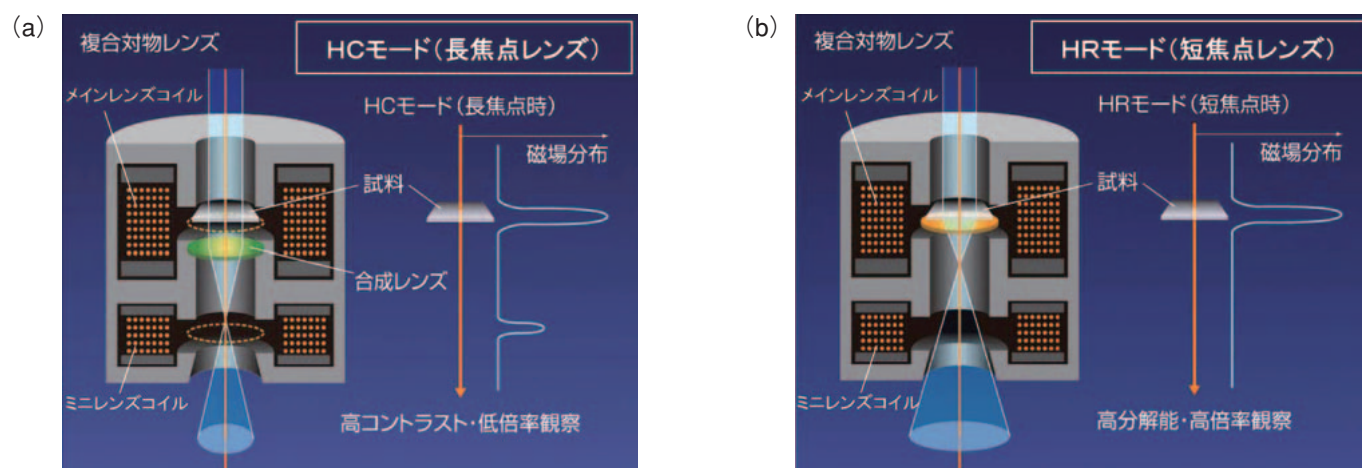


図2 複合対物レンズの概略図
(a) HC (High Contrast) モード (b) HR (High Resolution) モード

(4)ターボ分子ポンプを搭載し、クリーンな真空環境を実現している。

HT7700ではメイン排気系にターボ分子ポンプを採用することにより、クリーンな真空環境を実現した。これにより、CO₂排出量を30%削減することが可能である(当社比：H-7650との比較)。

3. 応用例

3.1 無染色生物切片の高コントラスト観察

図3は樹脂包埋ラット坐骨神経の無染色切片を加速電圧80 kV、HCモード、直接倍率8,000倍、ボトムマウントカメラ(2k×2kピクセル)で撮影した画像である。無染色切片においてもラット坐骨神経内のミエリンがコントラスト良く観察されている。さらに、図3(a)の□部分を拡大して観察した結果を図3(b)に示す。ミエリンの層状構造が明瞭に観察されていることがわかる。このように、HCモードとデジタルカメラを用いることにより、無染色切片を観察することが可能である。

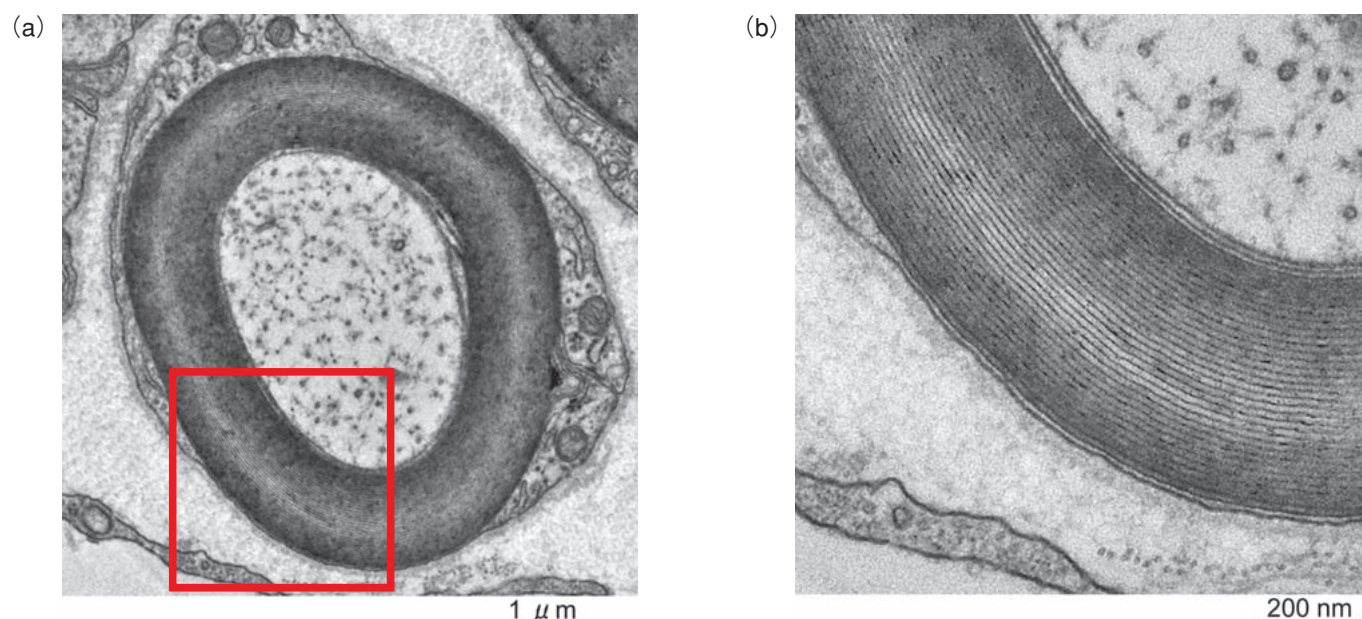


図3 無染色生物切片の高コントラスト観察例
観察倍率：(a)8,000倍 (b)25,000倍(3a□部分の拡大)
試料：樹脂包埋ラット坐骨神経、加速電圧：80 kV

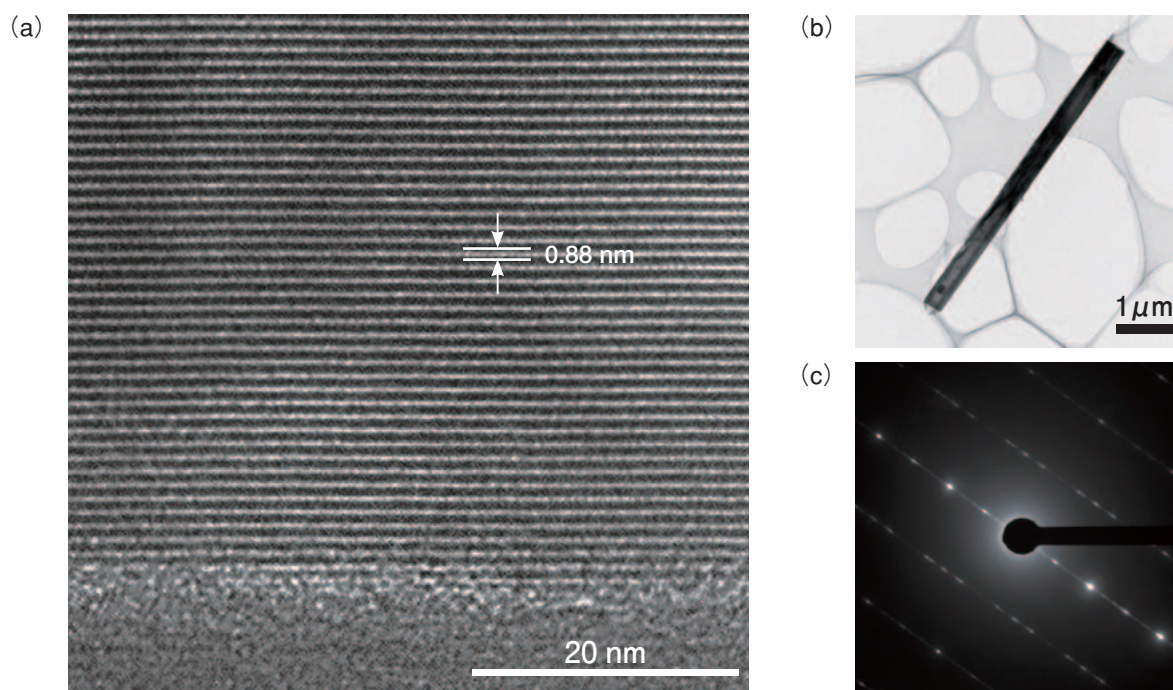


図4 アスベストの高分解能観察例
 (a)アンソフィライトの高分解能像 (b)制限視野電子回折像を観察したアンソフィライト (c)制限視野電子線回折像
 加速電圧：120 kV，観察倍率：(a)300,000倍 (b)25,000倍

3.2 アスベストの高分解能観察

図4にアスベスト(アンソフィライト)の高分解能観察例を示す。加速電圧120 kVにてHRモード，ボトムマウントカメラ(2 k×2 kピクセル)を用いて観察した。図4(a)は直接倍率300,000倍で撮影した画像で，アンソフィライトの基本構造(ケイ素と酸素の四面体から成る一本鎖が平行に並んだ複鎖)である0.88 nmの間隔を持つ結晶格子像¹⁾が鮮明に観察されている。また，図4(b)および4(c)は，アンソフィライトの制限視野像とその電子線回折像である。アスベスト繊維に特徴的な電子線回折像のストリークを明瞭に観察することができる。このように，アスベストのような電子線損傷を受けやすい試料もデジタルカメラを用いて高分解能観察することが可能である。

4. まとめ

複合対物レンズにより高コントラスト観察と高分解能観察を両立し，蛍光板観察用スクリーンカメラと高精度デジタルカメラを併用することで，明るい環境でのTEM操作を可能としたHT7700は，バイオメディカル，ナノテクノロジー，ソフトマテリアルなどの幅広い分野での研究用ツールとしての適用が期待される。

参考文献

- 1) 中澤英子 他，透過電子顕微鏡によるアスベスト分析：テクニカルデータシート TEM No.123(2008)

SU8000形FE-SEMによるリチウムイオン電池材料の観察

Observation of surface structure of lithium-ion battery materials
by using SU8000 Ultra High Resolution FE-SEM

檀 紫* 伊藤 寛征* 竹内 秀一* 武藤 篤* 重藤 訓志**

1. はじめに

近年、リチウムイオン電池や燃料電池、太陽電池など、地球環境に配慮したクリーンエネルギー関連の研究開発が活発に行われている。なかでもリチウムイオン電池(LIB: lithium ion battery)は、その高エネルギー密度の利点を活かして、情報通信機器・家電機器、特に携帯用電源として広く活用されている。また、ハイブリットカーなどのバッテリーとして開発が積極的に進められ、それらを活用することにより大幅な環境負荷低減が期待されている¹⁾。LIBは、図1に示すように、負極活性物質、正極活性物質、セパレータ、電解液などの部材から構成される²⁾。LIBは電気化学反応を利用しているため、その部材の表面や界面状態により電池性能が大きく左右される。また、その特性評価や劣化の程度、不具合解析などにおける形態評価は、その寿命に関連するため重要な研究課題となっている³⁾。

本稿では、超高分解能と多様な信号検出機能を併せ持つSU8000形FE-SEM(図2)を用いて、LIBに用いら

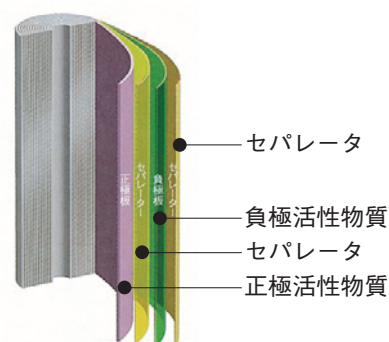


図1 リチウムイオン電池構造

れる各種部材の表面形態の観察例を紹介する。また、最近、LIBの製造や使用状態を保持したまま観察するために、雰囲気遮断下での試料加工や観察が求められている。本稿では、雰囲気遮断による観察例についても紹介する。



図2 超高分解能FE-SEM SU8000

* 株式会社日立ハイテクノロジーズ モノづくり統括本部 那珂地区生産本部 グローバルアプリケーションセンタ 電子顕微鏡グループ
** 株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム設計開発本部 先端解析システム第一設計部

2. リチウムイオン電池部材の観察

2.1 正極材の最表面観察

正極材は数 μm の金属酸化物、カーボンブラック、樹脂バインダーなどを混合した炭素材料が一般的に用いられている。これらの最表面構造の評価には、組成、密度差による電位由来のコントラストが得られるTop検出器と、ナノオーダーの凹凸情報が得られるUpper検出器を用いた観察が有効である⁴⁾。

図3は、正極材の表面を照射電圧100 V、倍率2万倍で観察した結果である。(a)のTop像では、5 μm の金属酸化物と、200 nmのカーボンブラック集合体、それらを結合するバインダー成分を明瞭なコントラストで観察することができる。また、同視野のUpper像(b)では、金属酸化物のステップ構造やカーボンブラックとの混合状態が立体的に観察されている。

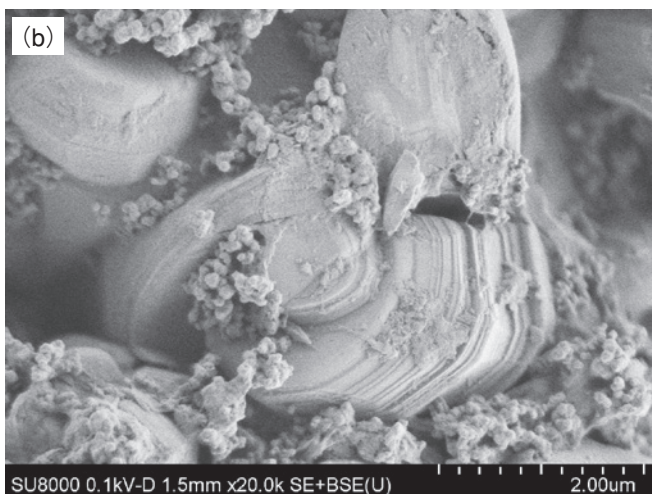
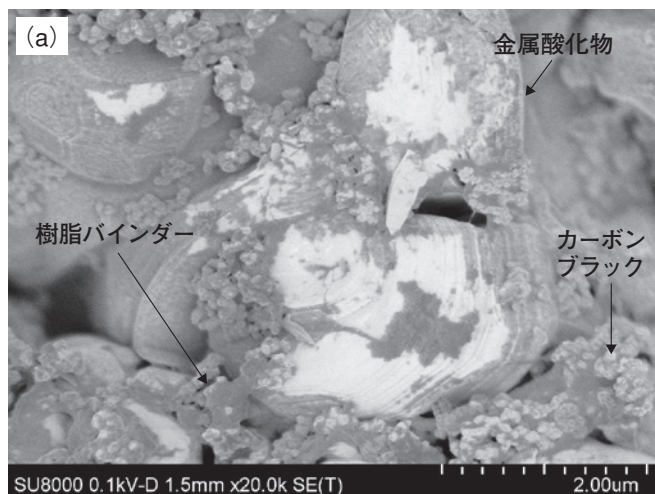


図3 正極材の最表面観察例
(照射電圧100 V、測定倍率2万倍)
(a)Top像 (b)Upper像

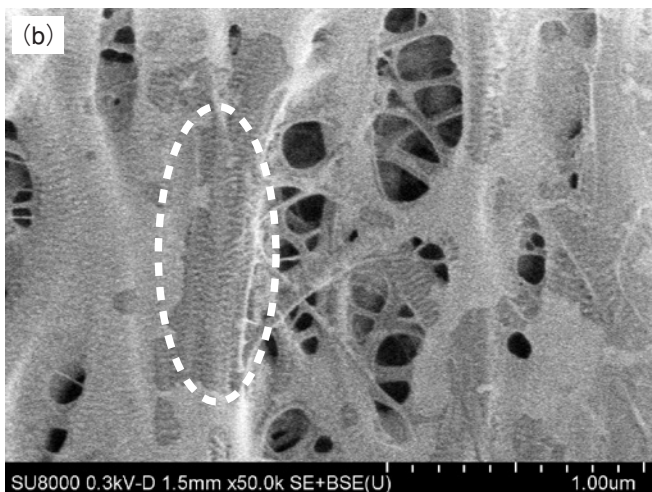
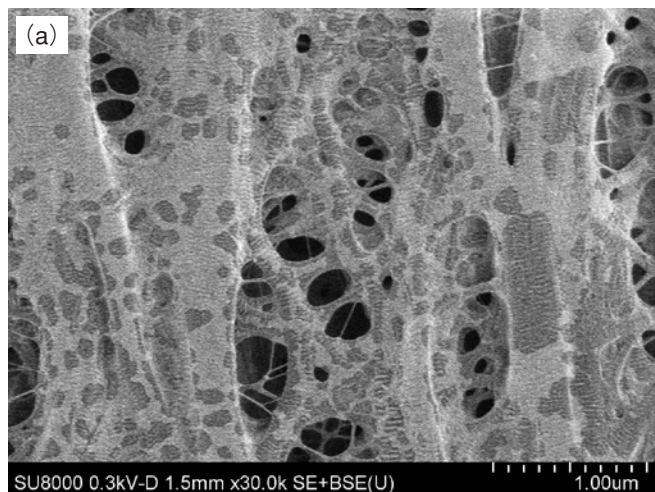


図4 セパレータ(未洗浄)表面のSEM観察例
(照射電圧300 V)
(a)測定倍率 3万倍 (b)測定倍率 5万倍

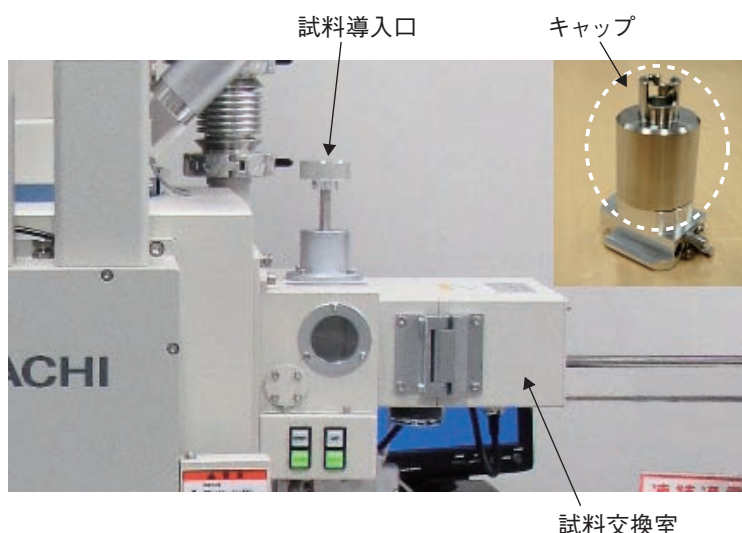


図5 雰囲気遮断システム概観
(中央：試料交換室，右上：専用試料ホルダー)

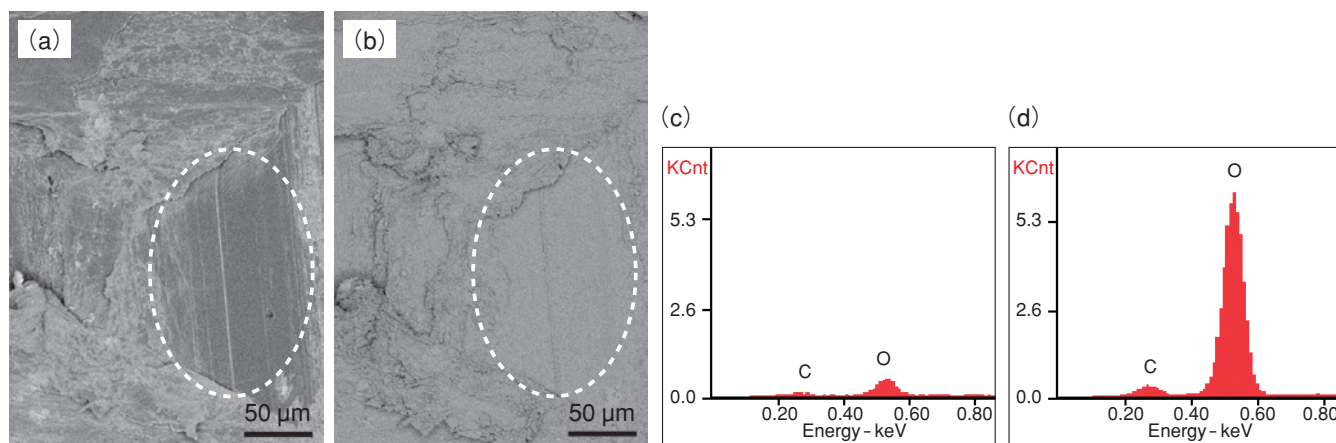


図6 大気暴露前後の負極材表面観察/EDX分析例
(同視野，測定倍率250倍)
(a) (c)大気暴露前 (b) (d)大気暴露10分後

2.3 雰囲気遮断システムを用いたリチウムイオン電池の観察

2.3.1 SU8000の雰囲気遮断システム概要

LIBに用いられる材料の多くは、大気と反応し容易に変成してしまう可能性がある。SU8000ではこのような部材評価のため、試料を大気雰囲気と遮断してSEM試料室内に搬送できる雰囲気遮断システムを搭載することができる。図5に専用ホルダーとシステム概観を示す。アルゴンなどの不活性ガス雰囲気内で観察試料を専用試料台に搭載し、Oリング付きキャップを閉め密封したまま試料をSEMまで搬送する。雰囲気遮断システムの試料導入口から専用試料ホルダーを試料交換室に挿入した後、不活性ガスで置換した試料交換室内でキャップをはずす。これにより大気に暴露することなく観察、分析を行うことができる。

2.3.2 雰囲気遮断システムを用いた負極材形態評価

アルゴンガス雰囲気下のグローブボックス内でLIBから負極を取り出し、雰囲気遮断システムを用いてSEM内に搬送した。加速電圧800 Vにて観察し、加速電圧3 kVでEDX分析を行った後、負極材を大気に10分間暴露し、同視野を観察、分析を行い、大気暴露の前後で比較した。図6は大気暴露前の負極表面画像(a)、暴露後の画像(b)と、大気暴露前のEDXスペクトル(c)、暴露後のスペクトル(d)である。

大気暴露前の○部に見られる黒コントラストが、大気暴露後の表面では消滅し、さらに凹凸構造が増加している。また、暴露後のEDX結果は、酸素(O)が暴露前と比較して高く検出され、大気接触により表面が酸化し変成したことを示している。

3. 終わりに

LIBは、環境負荷低減やレアアース代替品、コスト低減などを目的とした新しい素材研究が積極的に進んでいる。これら最先端の部材評価ニーズに対応するため、SU8000では多種の信号検出系を設け、凹凸、組成、結晶、電位信号を選択して可視化することにより、材料を多角的に評価することが可能である。微細化とともに、複合化、多様化の進む各種電池材料の解析ツールとして、SU8000シリーズのさらなる貢献が期待される。

参考文献

- 1) 河本 洋, 「自動車用高出力・大容量リチウムイオン電池材料の研究開発動向」, 科学技術動向, 2010年1月号
- 2) 「電池の知識」, 社電池工業会
- 3) 金村聖志, 「リチウム電池における電解質・電極活性物質界面の観察と制御」, 第30回 表面科学セミナー(2009)
- 4) A Muto et al., SEM Study of signal characteristics in ULV condition from the experiments of environmentally friendly material observation : PITTCON(2010)
- 5) 小柏ほか, “リターディング法を用いた低加速SEMの分解能向上”, 日本顕微鏡学会第61回学術講演会発表要旨集(2005)

学会発表 ミニファイル

1. 第234回液体クロマトグラフィー研究懇談会例会(2011/10/28 東京)

伊藤 正人(日立ハイテクノロジーズ): LaChromUltra

2. 2010年液体クロマトグラフィー研修会(LC-DAYs2010)(2011/11/26 静岡)

伊藤 正人(日立ハイテクノロジーズ): イオン交換クロマトグラフィーの基本

3. 日本薬学会第131年会(2011/3/28~31 静岡)

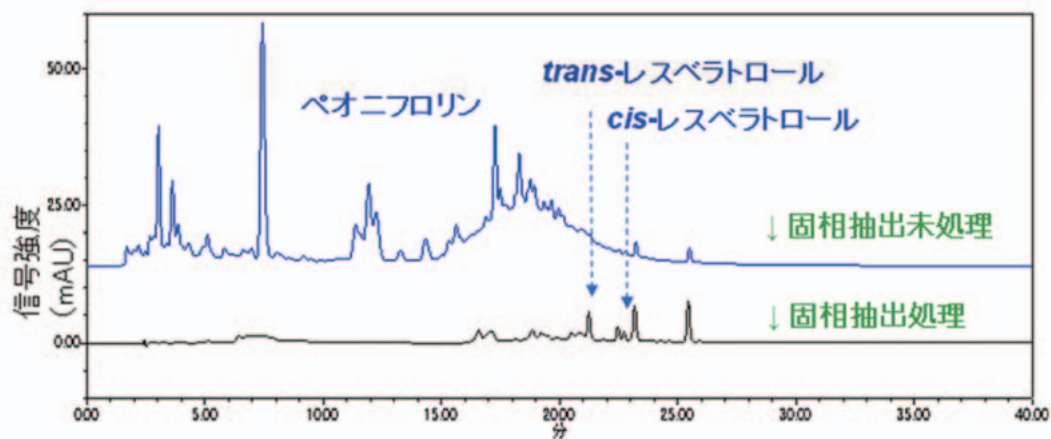
井上 陽子(日立ハイテクノロジーズ)他: 抗体医薬品製造を目的とした細胞培養におけるアミノ酸モニタリング

4. 第16回LCテクノプラザ(2011/5/12~13 東京)

吉岡 千尋(日立ハイテクノロジーズ)他: HPLCを用いた食品機能性成分ポリフェノールの分析

【要旨】 ポリフェノールは複数のフェノール性ヒドロキシ基を持つ化合物の総称であり、抗酸化作用が期待できる成分として注目されている。ポリフェノールは、主に植物の色素や苦味成分として、その数は5,000種以上存在する。ポリフェノールの研究開発で食品中に含まれる多様な成分中から目的成分であるポリフェノールを分

離定量することが必要であるため、HPLCを用いた分析条件を検討した。本報告では、食品機能性成分として着目されているポリフェノールの中から、カテキン、レスベラトロールについて、固相抽出による前処理や分離の検討を行い良好な結果を得たので報告する。



5. ICAS JAIMA Special Session: JAIMA Symposium 2011(2011/5/14 京都)

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ)他: Applications of High Performance Liquid Chromatography to Pharmaceuticals and Foodstuffs

[Summary] High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is one of the most commonly used analytical Systems. HPLC has been extensively used in the separation and isolation of all kinds of materials in Liquids through variations in equipment, reagents and accessories. The variety of analytical methods allows the most suitable method for the customer's needs to be selected by variations in columns, elution solvents and detectors. For example, several analytical methods are provided for organic acids.

UV, CD and UV-VIS detectors with post-column methods can be used for organic acid analysis, and reversed phase or ion-adsorption mode separation columns are generally selected.

User's needs in terms of analyte components, concentrations, contaminants, needed reproducibility, analytical time, cost and skill of operator can also be met.

Robustness, ease-of-operation and moderate cost are also great benefits of HPLC. The excellent reproducibility and high precision are of the greatest importance to HPLC users, particularly those in quality control, as the reproducibility of quantitative analysis directly affects the cost of materials in foodstuffs and the safety of pharmaceutical product. Here we would like to present the applications of HPLC to pharmaceuticals and foodstuffs.

1. 日本顕微鏡学会関東支部会(2011/3/8 東京都)

森川 晃成(日立ハイテクノロジーズ): 雰囲気遮断システムを用いたLiイオン電池構造解析

2. 日本顕微鏡学会第67回学術講演会(2011/5/16~18 福岡県)

鈴木 裕也(日立ハイテクノロジーズ)他: 収差補正STEM/SEMによる半導体材料の高精度測長
 黒田 靖(日立ハイテクノロジーズ)他: 特定回折スポットを用いたSTEM暗視野法の開発
 佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ)他: FIB-STEMによる細胞内微細構造の3D観察
 今野 充(日立ハイテクノロジーズ)他: STEM-EELSによるリチウムイオン電池負極材料の解析
 工藤 美樹(日立ハイテクノロジーズ)他: FIB/(S)TEM用クライオ雰囲気遮断試料ホルダーの開発
 松本 弘昭(日立ハイテクノロジーズ)他: 位置分解型EELSによる固相合成BaTiO₃の反応機構解析
 許斐 麻美(日立ハイテクノロジーズ)他: イオン液体を用いた遊離細胞のSEM観察法の検討
 橋本陽一郎(日立ハイテクノロジーズ)他: イオン液体を用いた金属粒子のSEMによるIn-situ観察
 西村 雅子(日立ハイテクノロジーズ)他: イオン液体を用いたヒカリモ浮遊相のSEM観察
 矢口 紀恵(日立ハイテクノロジーズ)他: H-9500 In-situ TEMの機能向上とその応用
 砂押 毅志(日立ハイテクノロジーズ)他: 多孔質シリカ細孔配列の高分解能SEM観察
 田中 弘之(日立ハイテクノロジーズ)他: 新型透過電子顕微鏡HT7700の開発
 大西 崇(日立ハイテクノロジーズ)他: 磁場界浸型C-FE電子銃の開発(4) 200 kV STEM用電子銃の最適化設計
 佐藤 貢(日立ハイテクノロジーズ): SEMの像シャープネスとその評価法の国際標準化
 揚村 寿英(日立ハイテクノロジーズ)他: SEMにおけるBSE検出の新手法

小柏 剛(日立ハイテクノロジーズ)他：次期インレンズFE-SEMの開発

重藤 訓志(日立ハイテクノロジーズ)他：エネルギーフィルターを用いた低エネルギー損失反射電子像

細谷幸太郎(日立ハイテクノロジーズ)他：極低真空ホルダーの開発

岩谷 徹(日立ハイテクノロジーズ)他：新型イオンミリング装置での試料冷却の試み

松本 弘昭(日立ハイテクノロジーズ)他：位置分解型EELSによる固相合成BaTiO₃の反応機構解析

【要旨】 筆者らは積層セラミックコンデンサの主材料BaTiO₃の固相合成反応機構の解析において高分解能TEM法を適用した。BaCO₃とTiO₂粒子を700～900℃で反応合成後に構造凍結し、樹脂包埋してFB-2100 FIBにて薄片加工し、位置分解EELS搭載の300 kV FE-TEM HF-3300を用いて観察及び状態分析を行った。

図1(a)は反応初期段階(700℃)でのBaTiO₃のTEM観察結果である。□で示した部分を位置分解EELS分析を行った結果を図1(b)に示す。粒子表面から28 nmおよび13 nm深さのEELSスペクトルはTiO₂(rutile), 7 nmおよび5 nm深さではanataseやorthorhombic BTOに近い構造, 3 nmではtetragonal

BaTiO₃, 1 nmではamorphous-likeなcubic BaTiO₃を示している。これらより, rutileとBTOの界面近傍では格子歪や酸素欠損の影響によるPseudomorphic growthが起これ, BaTiO₃ precursorが形成され则认为られる。温度上昇とprecursor成長に伴い積層欠陥が導入されて格子歪は緩和されるが, precursorがBaの拡散パスであるため, rutileからの歪を受けたまま接合してtetragonal BaTiO₃が成長する则认为られる。高いtetragonalityは固相反応合成BaTiO₃が強誘電性を有することを示唆している。本研究はBaTiO₃の固相合成プロセス及びその物性評価において高分解能TEM観察及び位置分解EELS分析が有用であることを実証した。

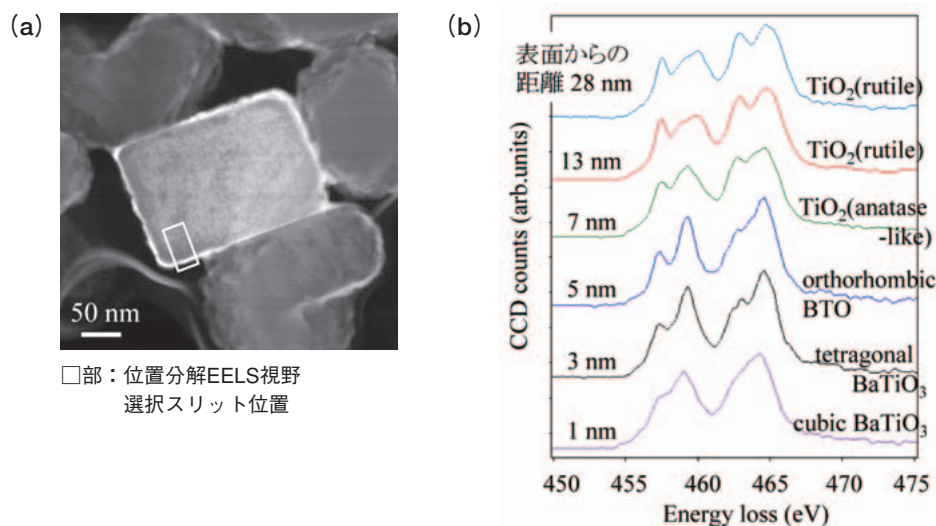


図1 700℃合成した粒子の暗視野STEM像(a)と表面から各深さにおけるTi-L2, 3位置分解EELSスペクトル(b)

写真コンクール

塩野 正道(日立ハイテクノロジーズ)他：ヒカリモの公園

設楽 宗史(日立ハイテクノロジーズ)他：ミクロの惑星探査機，発進

佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ)他：細胞の宇宙 —Space of the cells—



【作品名】ヒカリモの公園

ミクロの木々が植樹された小さな公園。木々の正体は、ヒカリモと呼ばれる微細藻類で、水面上を浮遊する性質を持ちます。今回は真空中でも液体状態を保持するイオン液体を用いることで、液面に浮遊するヒカリモを走査電子顕微鏡で捉えることに成功しました。

撮影対象・条件

試料：ヒカリモ

機種：S-3400N

加速電圧：2 kV

試料室圧力：高真空

信号：二次電子像



【作品名】ミクロの惑星探査機，発進

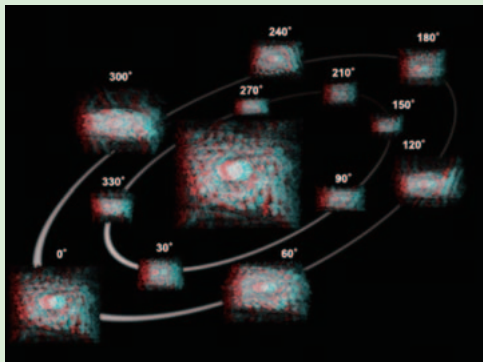
宇宙船が未知の惑星に着陸。この試料は表面・内部にミクロの穴の開けたシリコン粒子です。シリカと塩結晶を混合させ、塩だけ溶解することで立体の形状が作られます。目的のサイズの物質を穴に捕集し、荷物運びのカプセルとして利用されています。未知の物質を手に入れて、またいつの日か地球に戻ってきます。

撮影対象・条件

試料：マクロホーラスシリカ

装置：SU8040形FE-SEM

照射電圧：0.8 kV



【作品名】細胞の宇宙 —Space of the cells—

樹脂包埋した植物組織を50 nmステップで連続FIB加工・SEM観察を行い、取得した400枚のSEM像を三次元再構成しました。そのアナグリフ画像を回転角に対して、宇宙空間に浮かぶ惑星のように配置しました。

撮影対象・条件

試料：植物組織

装置：NB5000集束イオン／電子ビーム加工観察装置

加速電圧：FIB 40 kV SEM 3 kV

テクニカルデータ発行ミニファイル (バックナンバー紹介)

日立ハイテクが製品別に発行しているアプリケーションデータシート“TECHNICAL DATA”のご紹介です。

題目	FE-SEM SU8000における極低加速電圧観察とその応用 Ultra low accelerating voltage observation and its applications by using SU8000 FE-SEM		
機種	超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 SU8000 Ultra-high Resolution Scanning Electron Microscope SU8000		
シートNo	SEM No.143	発行日	2011年 2 月
要約	FE-SEM SU8000では、リターディング機能と複数の検出器を用いることで、試料ごく表面の様々な試料情報を捉える事ができます。これにより電子ビームのダメージを受けやすいソフトマテリアルにおいても多角的な評価が可能となりました。本稿では、リターディング観察時の電位コントラストや微小ステップ構造の観察例を紹介します。		
題目	分光光度計による遮熱塗料の日射反射率の測定 Measurement of Heat Shield Reflectance by Spectrophotometer		
機種	U-4100形分光光度計(固体試料測定システム) Model U-4100 Spectrophotometer (Solid Sample Measurement System)		
シートNo	UN-VIS No.147	発行日	2011年 6 月
要約	都市部の住宅や建造物の過密地帯では、ヒートアイランド現象が観測されます。このヒートアイランド現象の効果的防止策として、遮熱塗料が期待されています。遮熱塗料は通常の塗料と同様の色合いを持ちますが、太陽光からの熱源である赤外線を反射し、輻射熱が建造物の内部に伝わることを抑制する機能を持ちます。この太陽光の反射特性を定量的に評価する試験方法として、JISK5602(塗膜の日射反射率の求め方、2008年)があります。ここでは、U-4100形分光光度計(固体試料測定システム)を用いて、遮熱塗料の日射反射率を算出した例を紹介します。		
題目	薄膜サンプルの透過率、反射率および吸収率の測定例 Measurement of Transmittance, Reflectance and Absorptance for Thin Film Sample		
機種	U-4100形分光光度計(固体試料測定システム) Model U-4100 Spectrophotometer (Solid Sample Measurement System)		
シートNo	UN-VIS No.148	発行日	2011年 6 月
要約	薄膜技術は、私たちの身近なところでさまざまな用途に利用されています。例えばディスプレイでは、画面への映り込みを防ぐために反射防止膜が用いられ、住宅用ガラスでは太陽光からの日射熱を遮るため赤外線をカットする遮熱コートが用いられます。今回は、5°正反射付属装置を用いた反射防止膜の透過・反射・吸収率の測定をご紹介します。本付属装置は、V-N法を用いた入射角5°におけるサンプル同一箇所での透過率、正反射率(絶対値)の測定が可能といった特長を有しています。		
題目	分光蛍光光度計によるLED用蛍光体の蛍光特性評価 Evaluation of Fluorescent Phosphor of White LED by Fluorescence Spectrophotometer		
機種	F-7000形分光蛍光光度計 Model F-7000 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer		
シートNo	FL No.50	発行日	2011年 6 月
要約	白色LEDは、LED照明や液晶テレビのバックライトに用いられるようになり、その省エネルギー性や有害な水銀を含まない点から注目を集めています。白色LEDの現在主流の構成としては、青色光を発する青色LEDと、青色光を吸収して黄色の光を発する蛍光体から構成されています。青色の光と黄色の光が混じることで白い光が作り出されます。したがって、蛍光体の発光色は、白色LEDの色味を左右することから蛍光体の蛍光特性の評価は大変重要です。今回、白色LED用蛍光体の蛍光特性の評価として、F-7000形分光蛍光光度計にて3次元蛍光スペクトル測定および蛍光色彩分析を行いました。F-7000形分光蛍光光度計は、クラス最高レベルの高感度(S/N 800 : RMS)、世界最高速のスキンスピード(60,000 nm/min)、6桁以上のダイナミックレンジを有しており、研究、開発、品質管理など幅広い用途で用いられています。		

題目	原子吸光法によるリチウムイオン二次電池正極材料の評価 Evaluation of Lithium Ion Secondary Battery Anode Materials by the Atomic Absorption Method		
機種	Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計 Model Z-2010 Series Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer		
シートNo	AA No.123	発行日	2011年 5 月
要約	<p>リチウムイオン二次電池は、小型・軽量、高起電力、大電流放電が可能、メモリ効果がないといった特長があり、携帯電話やノートパソコンなどIT機器のバッテリーとして使われています。正極材料に使用されるリチウムイオン含有金属酸化物には様々なものがありますが、IT機器のバッテリーの多くにコバルト酸リチウム(LiCoO₂)が用いられています。正極材料であるコバルト酸リチウムの品質管理において、金属分析ではLi/Coのモル比分析と不純物金属の分析が行われています。なかでも、リチウムは適当な固体測定法がないため、原子吸光などの溶液測定でのみ分析可能です。偏光ゼーマン補正原子吸光法では、ダブルビーム効果によりベースラインが極めて安定なため長時間安定した測定が可能です。また、長波長においてもバックグラウンド補正を行うことができます。ここでは、Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計による、Li/Coのモル比分析と不純物金属の測定結果を紹介しします。</p>		

題目	原子吸光法による『都市鉱山』試料中の希土類元素の測定 Determination of Rare Earth in Urban Mines by Atomic Absorption Spectrophotometry		
機種	Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計 Model Z-2010 Series Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer		
シートNo	AA No.124	発行日	2011年 5 月
要約	<p>希土類元素は、ハイブリットカー、電子機器類のモータ、携帯電話のスピーカー、パイブレータなどを構成する部品の一部の磁石に用いられています。従来、このような磁石は、ほかのものと同様に用済み後は廃棄されていました。しかし、社会的な認識も大きく変化し、『都市鉱山』と称され、有価資源として回収されるようになりました。原子吸光法を用いて希土類元素の分析を行う場合、分析に用いる波長の多くは、400 nmよりも長波長側にあり、共存物による分光干渉を考えるとバックグラウンド補正が懸念され、このような長波長側でも精度良く補正が可能な方法を用いる必要があります。ここでは、希土類元素のような長波長側で分析する元素についても、高精度でバックグラウンド補正が可能な偏光ゼーマン補正方法を用いて、携帯電話に用いられている磁石中のNd, Dy, Sm, ガドリニウム(Gd)、およびプラセオジム(Pr)をフレイム法にて測定した例を紹介しします。</p>		

題目	原子吸光法による高純度モリブデン中アルミニウムおよび鉄の測定 Determination of Al and Fe in Metal Molybdenum by Atomic Absorption Spectrophotometry		
機種	Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計 Model Z-2010 Series Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer		
シートNo	AA No.125	発行日	2011年 5 月
要約	<p>ハイテク製品の更なる機能向上のため、レアメタルの高純度化が求められ、これを評価するために精度の良い分析法のニーズが高まっています。日立ハイテクノロジーズ社製Z-2010シリーズ日立偏光ゼーマン原子吸光光度計は、フレイム法・電気加熱炉法ともバックグラウンド補正方法として偏光ゼーマン補正法を採用しており、精度の良い測定データと安定したベースラインが得られることから、幅広い分野で使用されています。特に、共存物質による分光干渉を正しく補正できるため、高マトリックス中の微量元素の測定で大いに威力を発揮します。ここでは、高純度モリブデンに含まれているAlおよびFeの測定例をご紹介します。</p>		

ここでご紹介するアプリケーションデータの詳細をご希望の場合は会のアドレスよりお申し込みいただき、S.I.navi(会員制サイト)にご入会いただければ直接インターネットで参照することができます。

<http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/>

新製品紹介

NEW PRODUCTS

日立超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 SU9000

次世代の半導体，機能性材料，バイオテクノロジー分野でのSEMによる微細形態観察では，分解能や明るさといった基本性能に加えて，高倍率観察の実現や試料ダメージ低減，さらにはスループットと操作性の向上が求められています。このたび，こうしたニーズに対応できるインレンズタイプの超高分解能FE-SEM SU9000を発売いたしました。

SU9000は，最新の電子光学系と新開発のコールドFE電子銃，排気系，PC制御システム，GUIを搭載しました。世界最高分解能^{*1}0.4 nm（加速電圧：30 kV）に加え，低加速電圧領域でも1.2 nm（加速電圧：1.0 kV）と従来機^{*2}より分解能が向上し，安定した観察が行えます。

【主な特長】

- (1) 試料ダメージの軽減などを目的とした低加速電圧観察時の分解能を向上。
- (2) 低収差と高輝度安定プローブ電流を両立した新開発コールドFE電子銃。
- (3) コンタミネーションの影響を軽減させた超高真空試料室。
- (4) さまざまな設置環境下でも，高いパフォーマンスを実現するための高剛性フレームと耐騒音カバー。
- (5) ユーザビリティを追求した新ユーザーインターフェースと24.1型ワイドモニター。

*1 二次電子像，加速電圧30 kV条件，2011年4月時点

*2 当社製 S-5500



新製品紹介

NEW PRODUCTS

日立透過電子顕微鏡HT7700用走査透過像観察(STEM)装置

最高加速電圧120 kVのHT7700 TEMは、試料の内部構造を高コントラストで観察できるという特長を生かして、バイオ分野から、ソフトマテリアル分野まで幅広く利用されています。このたび、HT7700の分析機能の充実を図るため、走査透過像観察(STEM)装置が発売されました。このSTEM装置は明視野と暗視野STEM像を同時に取得することができます。またWindows7[®]をベースにしたソフトウェアによりTEMとSTEMで必要な操作をすべてGUI上で行うことができるようになっています。さらに、HT7700のSTEM装置は、ネットワークによる各種画像データの共有化を図るなど、操作性、拡張性の面でも優れた特長を持ったシステムです。

【主な特長】

- (1) 高分解能像観察モード(STEM試料位置にて分解能1.5 nm)
- (2) 低倍広視野観察モード(視野径100 μ m)
- (3) 新制御系GUIにより、TEM/STEM機能の中核制御部とGUI部の通信をLANにて行う環境を構築
- (4) 組成コントラスト情報を得るための多彩な信号検出系
- (5) X線分析装置(EDX)と組み合わせた、材料の微小部の組成分析



新製品紹介

NEW PRODUCTS

吸光グレーティングマイクロプレートリーダーSH-1200

ご好評のSH-1000シリーズの新モデルSH-1200を7月に発売しました。

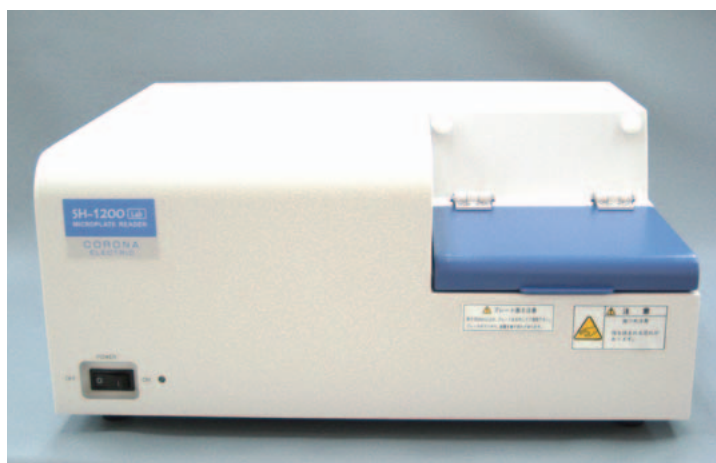
【主な特長】

(1) 基本機能は維持し、PCコントロール専用とすることでお客様に納得いただける価格でグレーティング吸光度リーダーを提供いたします。

(2) 自由に波長設定ができるだけでなく、スペクトル測定も対応するので各種測定に対応し、応用分野も広がります。

(3) 現在、干渉フィルタ方式吸光度リーダーを使用しているお客様、またはこれから購入を検討されているお客様にお勧めです。

「確かな満足を この一台で。」



【主な仕様】

分光方式	グレーティングモノクロメータ方式
波長範囲	200～1,000 nm(1 nm刻み)
測定範囲	-0.5～3.5 Abs
スペクトルスキャンスピード	65秒(96ウェル)／100 nm(1 nm刻み)
測定モード	吸収スペクトル測定 多波長測定(最大4波長) エンドポイント／カインエティック／至適値測定
対応プレート	6～384 well, カスタムプレート ※主要メーカー230種類のプレート登録済み
対応OS	Windows VISTA, Windows 7, MacOS X

クロマトデータ処理装置「Chromaster System Manager」

新形HPLC Chromasterシリーズ用クロマトデータ処理ソフト「Chromaster System Manager」を2011年3月に発売しました。本ソフトウェアは、D-2000Elite形の操作性を継承し、最新版のOSであるWindows 7[®] Professionalを採用しています。

〈新機能〉カラム管理システム(オプション)

カラムに接続した専用の記録媒体に、試料注入回数、送液圧力、温度等の使用履歴を自動記録できるカラム管理システムをサポートしました。この記録媒体は繰り返し使用が可能ですので、カラムの寿命後は新しいカラムに接続して履歴管理を行うことができます。



カラム管理情報の一例

※Windows、Windows Vista、Windows 7は、米国Microsoft Corporation.の米国およびその他の国における登録商標または商標です

株式会社日立ハイテクノロジーズ

北海道支店 札幌 (011)707-3200
東北支店 仙台 (022)264-2219

本社(サポートセンタ) 東京 (03)3504-7211
中部支店 名古屋 (052)219-1881
関西支店 大阪 (06)4807-2511
京都営業所 京都 (075)241-1591

四国営業所 高松 (087)814-9911
九州支店 福岡 (092)778-3000

分析機器に関する各種お問い合わせは…

お客様サポートセンタ 電話(03)3504-7211

受付時間 8:50~11:50 12:45~17:30(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースは会員制情報検索サイト「S.I.navi」でもご覧になれます。

ご入会は無料ですので、下記URLにアクセスください。

<http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/>

〈編集後記〉

このたびの東日本大震災により亡くなられた方々のご冥福を心からお祈り申し上げますとともに、そのご家族の皆様ならびに被災された皆様には、心よりお見舞い申し上げます。

新聞や雑誌、また学会などにおいても、今回の大震災で発生した災害廃棄物の問題がクローズアップされています。その総量は、おおよそ2,500万トンにのぼると推計されています。これは、阪神淡路大地震のおおよそ1.6倍の量になります。廃棄物は、廃棄場所の確保のみならず、アスベストやヘドロ中の重金属の溶出汚染問題など多岐にわたることが指摘されています。このような問題を早急に解決するためには、現状の汚染状況の把握や処理方法の早期検討が

重要です。私どもは、弊社が製造販売している分析機器が少しでもお役に立てないかと日々議論し、アプリケーション開発を行っています。

分析方法や装置に関するお問い合わせがありましたら、是非私どもの営業やホームページへご連絡いただければ幸いです。

(佐藤 記)

■インターネットホームページ

URL : <http://www.hitachi-hitec.com/science/>

■本ニュースに関するお問い合わせは、右記または、(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 事業管理部
〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14
電話(03)3504-5833 FAX(03)3504-7756

○(株)日立ハイテクノロジーズ

那珂事業所グローバルアプリケーションセンタ
〒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, 2011 VOL. 54 No. 2

発行日 2011年9月8日
編集人 佐藤 剛
発行人 小島 正也
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)3504-5833(ダイヤルイン)
印刷 日立インターメディアックス株式会社