

巻頭言

基礎研究の重要さを考える

Some thoughts concerning importance of basic medical sciences

順天堂大学医学研究科

内山 安男



先日、ロンドンで周産期の脳傷害に関する研究会に参加した。長期にわたる研究が必要であるが、周産期における低酸素脳傷害が様々な精神障害の原因になることが次第に分かってきた。大変勉強になる研究会であった。短期的な傷害と長期的な傷害との両方を考慮する必要がある変化が起こり得る時期の話である。私達は、短期的な脳の虚血状態が脳、特に海馬に起こす障害について研究してきた。人では周産期に起こってくる障害が、後の生活に非常に多くの障害を起こしてくると考えられているが、その一つ一つを解剖して調べることは、当然出来ない。しかし長年にわたる研究の点と線から脳全体に障害が広がる経過も分かってきた。これらの研究の補助手段として小動物を用いた実験系が必要となる。

私達の研究を紹介する前に、ロンドンの体験談を紹介する。ロンドンに着いた日が、丁度、エリザベス女王の在位60年を祝う馬車によるパレードが行われた日にぶつかった。水上パレードにはウエストミンスター橋や

両岸に広がる歩道にたくさんの人が集まり女王の信頼度が如何に厚いかを見る思いがした。26歳で女王になられたわけだから今年は86歳になる。誕生日は私と同じ6月10日だ。新聞やテレビのニュースは連日女王とそのファミリーの動向に向けられていた。そんなロンドンの喧騒とは、離れた郊外のLatimer Placeという所で、研究会は行われた。3日間全くの缶詰での会合で勉強になった。この会場には、ヒースロー空港からタクシーが便利である。イギリスの伝統のあるタクシーに乗るのは良いが、道が良く分からない上に、タクシーの運転手と乗車前に交渉をする必要がある。スイスの友人達は、3人で70ポンド、日本人は、一人で80ポンドと、もう一人は、105ポンドを取られている。安い所では、40ポンドで来たという人もいた。日本では全く考えられないことであるが、これが自然に受け入れられているようだ。

少し横道にそれ過ぎた。私達は、低酸素負荷を7日齢の新生仔マウス(B6マウスを使う)にかける実験を行

CONTENTS

■巻頭言

- ・基礎研究の重要さを考える
内山安男……………1

■報文

- ・バイオ医薬品の構造解析(特性解析)
—超高速LCシステムの糖鎖分析への応用—
水野保子……………3
- ・酢酸ウラン染色機序とCCDカメラ
朴杓允……………11
- ・走査電子顕微鏡試料作製と
観察時におけるアーティファクト
村中祥悟……………17

■解説

- ・日立高速液体クロマトグラフ
Chromaster 5000シリーズ
反応LCシステムの紹介
豊崎耕作 河原井雅子
石川昌子 蛭田多美……………27
- ・HT7700のトータルシステムの紹介
久保貴 近藤正樹 馬見新秀一
仲野靖孝 白井学 小林弘幸……………33
- 学会ミニファイル……………37
- テクニカルデータ発行ミニファイル……………42

■トピックス

- ・IEEEマイルストーン認定と
日立ハイテックミュージアムのオープン……………43
- 新製品紹介
- ・日立走査電子顕微鏡
Natural-SEM SU3500……………44
- ・IM4000形イオンミリング装置に
新機能追加……………45
- ・日立UH5300形ダブルビーム分光光度計……………46
- ・日立偏光ゼーマン原子吸光度計
ZA3000シリーズ……………47
- S.I.naviのご紹介……………48

なってきた。低酸素負荷をかける前に、片側の総頸動脈を2カ所で結紮(けっさつ)してその間を切断しておく。術後、1時間くらい親のそばに戻し、その後、そのマウスをケージに入れて、低酸素状態(温度37度、8%酸素:92%窒素に調節した容器)に約30分間放置する。取り出したマウスを0時間、3時間、8時間、12時間、24時間、3日、7日の各時点で、脳の海馬の錐体細胞の状態を形態的に、あるいは分子生物学的な手法を用いて解析する。興味あることには、負荷をかけた早期から海馬錐体細胞にはオートファジーが誘導される。オートファジーとは、1)飢餓を初め多くの病的な刺激に反応して、細胞内の構成要素(オルガネラを含む高分子構造)を隔離膜という二重膜で包み込んでしまい、2)ここにリソソームの酵素を送って、生物学的に活性のあるモノマーにまで分解して、3)細胞で再利用できる形にする機構である。細胞が生きていくために必須な現象である。このようにオートファジーが誘導されるが、低酸素負荷後8時間くらいをピークにして錐体細胞は、アポトーシス(カスパーゼ-3の活性の上昇、活性型カスパーゼ-3の出現、核や細胞体の縮小化が死に行く錐体細胞にみられる)に陥る。しかし、その割合は最大に見積もっても30%強に過ぎない。他の多くの細胞は、その後3日位して死に至り、7日位になると海馬全体の大きさがもとの大きさの4割くらいまで縮小化してしまう。それでは、大部分の細胞の死に方はどのようなになっているのか。

前述したように、低酸素負荷を受けた神経細胞にはたくさんのオートファゴソームが見られるようになる。即ち、オートファジーが誘導されている。実際に、オートファジーのマーカータンパク質で調べてみると(LC3と呼ばれるタンパク質)、オートファゴソームの膜にのるタイプ(膜型LC3)が有意に増えていることが分かる。もし、細胞がアポトーシスで死ぬのであれば、その因子であるカスパーゼ-3あるいはCADと呼ばれるDNaseを発現しないマウスに低酸素脳虚血負荷をかければ神経細胞は死なずにすむことになる。そこで、これらのノックアウトマウスに低酸素脳虚血負荷実験を行ってみたが、海馬の錐体細胞は見事に死んでしまった。次に、中枢神経系でオートファジーができないマウスを使って同様の実験を試みた所、かなりの率で神経細胞は保護されていることが分かった。即ち、低酸素負荷で死んで行く細胞の多くは、オートファジー性細胞死で死ぬことが明らかとなった。オートファジーで細胞が死ぬと考えるから10年以上の月日が経ったが、遺伝学的方法を取り込むことで初めて直接にオートファジー性細胞死

の存在を示すことができた。

今度のロンドンの学会では、私達が次にどのようにしたらこの低酸素脳虚血負荷による細胞死を抑制できるのかを調べた結果を報告した。簡単な物質を投与するだけで、細胞死のかなりの所が抑制された。その経路は、Toll-like receptorという、菌体毒素に由来する多糖類LPSやヒアルロン酸の受容体であり、これを抑制することに繋がっていることが分かった。それ故、この受容体のないマウスを使えば細胞死も抑制されるはずと考え、同様に実施してみた所、見事に細胞死が抑制された。周産期の神経障害は非常に重要な課題である。もしこれが、薬剤で助けられるのであれば、それにこしたことはない。私達が、長年かけて明らかにしてきた実験結果が、最近になって遺伝学的手法を使うことでかなり直接的にその現象を説明できるようになった。このような研究の中で、最近とみに感じることは基本的な現象の解析の重要性である。電子顕微鏡を用いた形態学の確固とした解析があれば、遺伝学的な解析の信頼度も増す。近年は、その形態学的な解析が不十分な研究が多いことに不安を感じる。その一方で、私達に電子顕微鏡像の解析を依頼してくる研究者もたくさんいることも事実である。その意味で、真に必要とされる研究者の育成が重要であることを痛感している。

著者略歴

内山 安男 (うちやま やすお)

学 歴

1972年 3月 群馬大学医学部医学科卒業

職 歴

1972年 6月 群馬大学医学部付属病院研修医(小児科)

1991年 6月 岩手医科大学医学部教授(解剖学)

1995年 2月 大阪大学医学部教授(解剖学第一)

2008年 4月 順天堂大学医学研究科(神経生物学・形態学講座)教授
現在に至る

学 会

日本解剖学会(2008 常任理事, 2009~2011 理事長),

日本組織細胞化学会(2005~; 2008~; 2011~ 理事),

国際組織細胞学会(2002~ 理事長),

International Committee of Symposia on Morphological Sciences
(2010-2015 President)

賞 罰

2008年 日本電子顕微鏡学会 瀬藤賞

2010年 日本組織細胞化学会 高松賞

2010年 Internatinal Symposium on Morphological Sciences in Sicily
Anatomist Excellence Prize

バイオ医薬品の構造解析(特性解析) — 超高速LCシステムの糖鎖分析への応用 —

Structural Characterization of Biopharmaceuticals
— An approach to high-throughput analysis of *N*-glycan —

水野 保子*

はじめに

近年、抗体医薬品及びバイオ後続品などのバイオ医薬品(バイオテクノロジー応用医薬品)の開発が加速している。また、薬効をあげるためや効果を持続させるために、既存バイオ医薬品のPEG(ポリエチレングリコール)化及び糖鎖やタンパク質部分の改変なども積極的に行われている。今後のバイオ医薬品市場の伸びは低分子医薬品をしのぐと言われており、このうち抗体医薬品は2010年代後半には新薬の30%を占めるとの予測もある¹⁾。抗体医薬品は25年ほど前に、癌細胞に発現している抗原特異的なモノクローナル抗体を利用した治療法が考案され、大きな期待が持たれたが、臨床試験で副作用など思わしくない結果が続き、開発が下火になった。しかし、その後の研究で標的分子の生体内での機能や分布がわかってきたことや、ヒト化抗体技術の確立などによって、より安全な抗体を作製できるようになり²⁾、再び抗体医薬品の開発が活発になり、現在数百以上が開発中といわれている。

これらのバイオ医薬品を世に出すためには、申請までにその構造を正確に決定する必要がある。タンパク質やペプチドなどの高分子の医薬品は、低分子の医薬品とは異なり、その構造決定には多くの分析を駆使しなければならない。また、バイオ医薬品の中には抗体医薬品をはじめ糖鎖を持つタンパク質も少なくない。糖タンパク質の糖鎖はその生理活性、安定性、溶解性、体内動態などに大きく関与しているが、その構造は通常不均一であり、さらに産生細胞や培養条件などにより様々な構造に変化することが知られている。これらのことから、糖タンパク質を医薬品として開発する場合には、その糖鎖構造も明らかにすることは必須であるが、糖鎖は複雑な構造をもつため解析には非常に時間がかかる。これが微量かつ迅速にできるようになれば医薬品の開発だけでなく、診断にも役立つ可能性がある。数年前から実用化された超高速LC(液体クロマトグラフ)を糖鎖構造解析に適用できれば、迅速化に対しての解決策のひとつになると考えられる。

バイオ医薬品の構造解析 (特性解析)

バイオ医薬品の開発にあたり、当局が求める構造解析・構造確認については、ICHガイドラインQ6B及び医薬審発第571号「生物製品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」を参照されたい。医薬審発第571号の「6. 付録」には、「新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取入れるべきである」としつつ、構造解析や構造確認の評価に際して技術的にどのようにアプローチしていけばよいかという例を示している。ここに挙げられている項目を表1に列挙した。弊社では、表1に記載したタンパク質医薬品の特性解析業務を、10年ほど前から申請資料の信頼性の基準(薬事法施行規則第43条)に従い受託している。本稿ではこれらのうち、アミノ酸組成分析法について簡単に述べた後、*N*-グリコシド結合型糖鎖の構造解析について現在実施している方法と将来に向けた方法について記載する。



水野 保子

アミノ酸組成分析

アミノ酸分析法とはタンパク質やペプチドを塩酸などで構成アミノ酸に加水分解し、HPLC(専用の測定機器であるアミノ酸分析計がよく用いられる)で測定する方法であり、タンパク質医薬品のアミノ酸組成の確認、アミノ酸含量、タンパク定量、構造解析などに利用される。また、異常アミノ酸の検出にも用いられる。

一般的にタンパク質を構成するアミノ酸は20種であるが、アミノ酸の種類により加水分解に対する反応性が異なる。塩酸に不安定なものや、加水分解に対する抵抗性が強いものなどがあるので、予想アミノ酸配列をもとに各アミノ酸の理論値との差が10%程度を目標に加水分解条件を決定する^{3),4)}。最もよく用いられる加水分解方法はチロシンのハロゲン化を防ぐ目的で0.1~1%程度のフェノールを添加した6 mol/L塩酸中で110℃、24時間である。イソロイシンやバリンが連続している場合のペプチド結合は切断されにくいので、正確に定量する場合には加水分解時間を長くする。トリプトファンは

* ㈱東レリサーチセンター 品質保証部 主席研究員 マイスター

表1 バイオ医薬品の物理的・化学的特性解析について

6.1 物理的・化学的特性解析に関する付録
6.1.1 構造解析・構造確認
a) アミノ酸配列((b)～(e)の結果より目的物質をコードする遺伝子配列から推定した配列と比較)
b) アミノ酸組成(適切な条件で加水分解後、アミノ酸分析し、理論アミノ酸組成と比較)
c) 末端アミノ酸配列(N及びC末端のアミノ酸の種類及び均一かどうかの確認)
d) ペプチドマップ(酵素等でペプチドに断片化後、クロマトグラフィーで分離、各ペプチドを質量分析やアミノ酸配列解析などで同定)
e) スルフヒドリル基及びジスルフィド結合(遊離スルフヒドリル基及びジスルフィド結合の数と位置)
f) 糖組成・糖鎖構造(糖含量、糖鎖構造解析、オリゴ糖パターン、糖鎖結合位置の解析など)
6.1.2 物理的・化学的性質
a) 分子量・分子サイズ(ゲルろ過、SD-PAGE、質量分析など)
b) アイソフォームパターン(等電点電気泳動など)
c) 比吸光度(又はモル吸光係数)
d) 電気泳動パターン(SDS-PAGE、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動など)
e) 液体クロマトグラフィーパターン(ゲルろ過、イオン交換、逆相、アフィニティなど)
f) 分光学的性質(UV, CD, NMRなどのスペクトル測定)

医薬審発第571号より引用

塩酸分解では酸化され、ほとんど回収されないのでアルカリやメタンスルホン酸などによる加水分解法を用いる。また、システインは塩酸分解で壊れやすいので、システイン酸やカルボキシメチルシステインなどに変換して測定することが多い。

アミノ酸の検出法には種々のプレカラム標識法とポストカラム標識法があるが、医薬品の場合には信頼性の高いデータが得られるニンヒドリンによるポストカラム標識法を用いることが多い。筆者らも、専用装置であるアミノ酸分析計を用いて実績のあるニンヒドリンによるポストカラム標識法で実施している。

アミノ酸組成分析については、数年前からWaters、島津製作所、日立ハイテクノロジーズなど複数の機器メーカーが冒頭で触れた超高速LCを適用した分析例を提案している。これらはいずれもプレカラム法で誘導体化したアミノ酸を超高速LCで分析する方法であるが、近い将来バイオ医薬品にも適用されるだろう。

N-グリコシド結合型糖鎖の構造解析への超高速LCシステムの応用

糖タンパク質の糖鎖は、大きく分けてアスパラギンに結合するN-グリコシド結合型糖鎖(以下N-型糖鎖と記載)とセリンあるいはトレオニンに結合するO-グリコシド結合型糖鎖がある。また、N-型糖鎖には高マンノース型、複合型、混合型の3種類が存在する。各タイプの糖鎖は多くのバリエーション(ミクロ不均一性)がある

ので、糖タンパク質に結合している糖鎖の種類は非常に多い。さらに、個々のタンパク質に結合している糖鎖は均一ではなく、多種多様であるため、構造解析をより困難なものにしている。

現在、筆者らはN-型糖鎖の構造解析は、主として図1に示したような手法を用いている。糖タンパク質からヒドラジン分解あるいはN-グリコナーゼによる酵素分解により糖鎖を遊離し、2-アミノピリジンで蛍光標識し、PA化糖鎖(ピリジルアミノ化糖鎖)を調製する。調製したPA化糖鎖は陰イオン(DEAE)カラムで分析し、シアロ糖鎖の有無の確認やシアル酸の数による糖鎖のパターンを調べる。DEAEカラムで分析後、PA化糖鎖を逆相(ODS)カラムで構造の違いにより分離し、MALDI-TOF/MSによる質量分析(MS^n も含む)を行い、解析している(新2次元糖鎖マップ法⁵⁾)。ODSカラムでの分析時には、実験ごとの保持時間の変動を補正するため、重合度のわかったPA化グルコースオリゴマーを試料とともに毎回測定している。これにより、各PA化糖鎖のODSカラムでの保持時間を、PA化グルコースオリゴマーの重合度(グルコース単位)で示すことができるので、種々のPA化糖鎖の溶出位置を標準化できる。従って、糖鎖の同定は標準PA化糖鎖及び構造を決定したPA化糖鎖などのグルコース単位と比較することで行える⁶⁾。実際にはこれに質量分析で得た質量情報を加えた新2次元糖鎖マップのデータベース(図2)と照合することにより、確実に同定している⁷⁾。

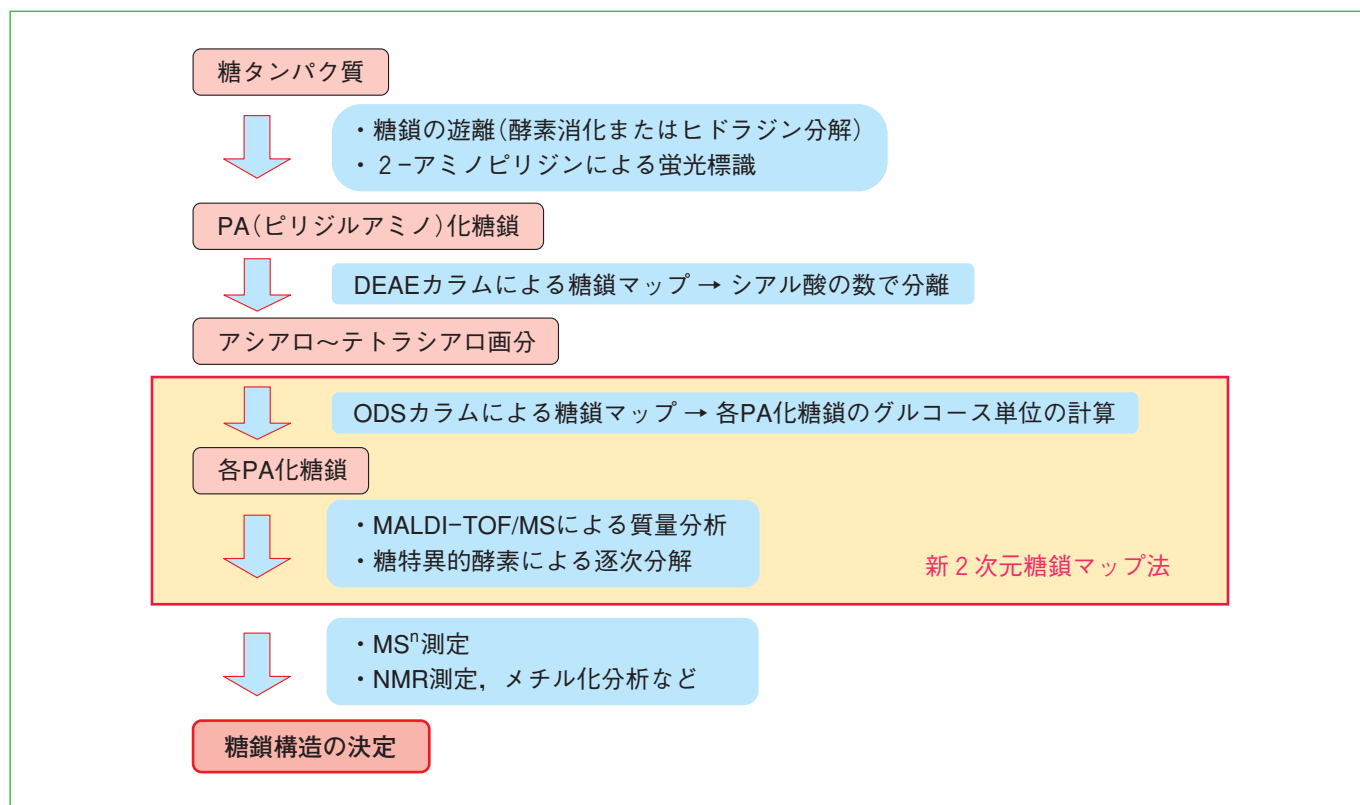


図1 N-グリコシド結合型糖鎖の構造解析の流れ

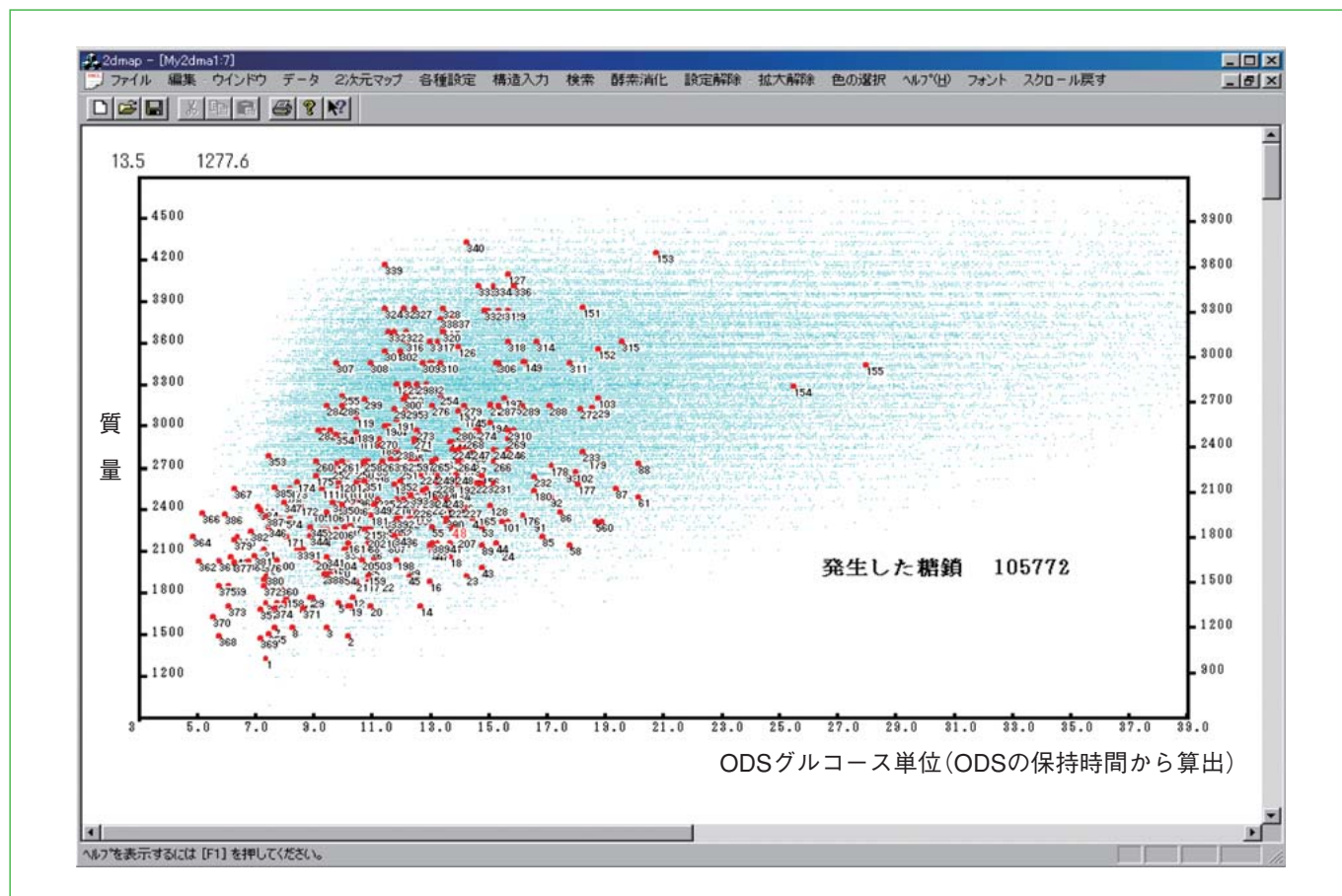


図2 質量及びODSカラムで得たグルコース単位を用いた新2次元糖鎖マップ
実測マップ(赤)と予測マップ(青)
N-グリコシド型糖鎖のデータベースをもとに作成

ヒトIgG (Sigma-Aldrich) から調製したPA化糖鎖を、筆者らが通常実施しているODSカラムの条件で分離した結果を図3に示した。PA化グルコースオリゴマー及びヒトIgGから得た各PA化糖鎖の分離は非常に良好である。また、図3の主な糖鎖の構造を質量分析とODSの保持時間(グルコース単位)から同定した結果を図4に示した。しかしながら、この方法は分析時間が2時間程度とかなり長いことから、弊社では以前より分離を維持したままODSカラムを用いた糖鎖マップの高速化を考えていた。そこで、目をつけたのが数年前より複数の機器メーカーにより開発された超高速LCである。超高速LCを用いた分析例は多くの分野で報告されているが、糖鎖解析に応用された例はまだ少ない。糖鎖解析に向いていないのかどうかも含め、超高速LCを糖鎖マップに応用できないか検討したので、本稿ではその一端を紹介する。

本検討で用いた超高速LCは日立超高速液体クロマトグラフLaChromUltraであり、その装置構成は、L-2160U形高压グラジエントポンプシステム、L-2200U形オートサンプラ、L-2300形カラムオープン、L-2485U形蛍光検出器及びEZChrom Elite for Hitachiデータ処理システムである。本システムは、高性能なカラムを用いるこ

とで高速かつ高分離なデータを得ることができるだけでなく、高感度な分析が可能なシステムである。

複数のODSカラムについて、PA化グルコースオリゴマー及びヒトIgG由来PA化糖鎖を用いて移動相条件などを検討した。カラムはいずれも長さ100 mmで、内径は2 mmあるいは2.1 mmのものを使用した。移動相には酢酸アンモニウムと有機溶媒(n-ブタノール、メタノール、アセトニトリル)を用い、グラジエント条件を種々検討した。また、流速は0.2から0.5 mL/minの範囲で、カラム温度は40℃から55℃の範囲で測定した。励起波長は320 nm、蛍光波長は400 nmを用い、試料の注入量は1 µLとした。PA-Glucose Oligomer (DP=3~22)の注入量は、最もピーク強度が強いDP=6のオリゴマーで0.2 pmol/µL相当である(図5参照)。通常の分析では20 pmol相当注入していることから(図3参照)、従来法より100倍程度高感度な分析が可能と考えられる。

図5に測定例を示したように、検討したカラムはいずれもPA化グルコースオリゴマーについては短時間で良好な分離が得られた。しかしながら、図5の①、②のカラムのように、PA化グルコースオリゴマーの溶出時間と比べて、ヒトIgG由来PA化糖鎖の溶出時間がかなり遅く、グルコース単位を指標に使うことが難しいカラム

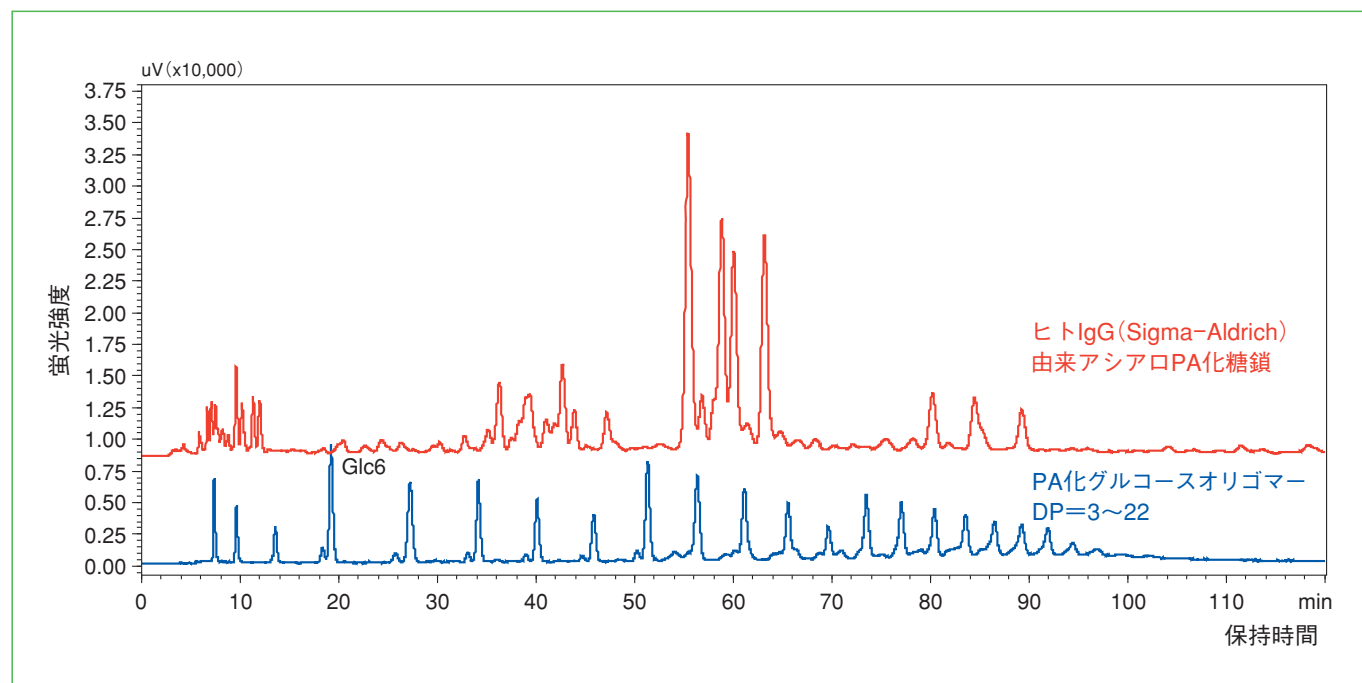


図3 ODSカラムによるヒトIgG (Sigma-Aldrich) 由来PA化糖鎖のマップ

移動相A: 10 mM酢酸アンモニウムpH 4.0, 移動相B: 移動相A + 0.5 % n-ブタノール
 グラジエント溶出: A / B = 95 / 5 (0分) → 35 / 65 (120分)
 カラム: PALPAK Type R 250 mm × 4.6 mm I.D. (タカラバイオ)
 流速: 1 mL/min
 カラム温度: 55℃
 検出: 励起波長320 nm, 蛍光波長400 nm
 注入量: PA-Glucose Oligomer (DP=3~22): 10 µL (Glc 6: 20 pmol相当)

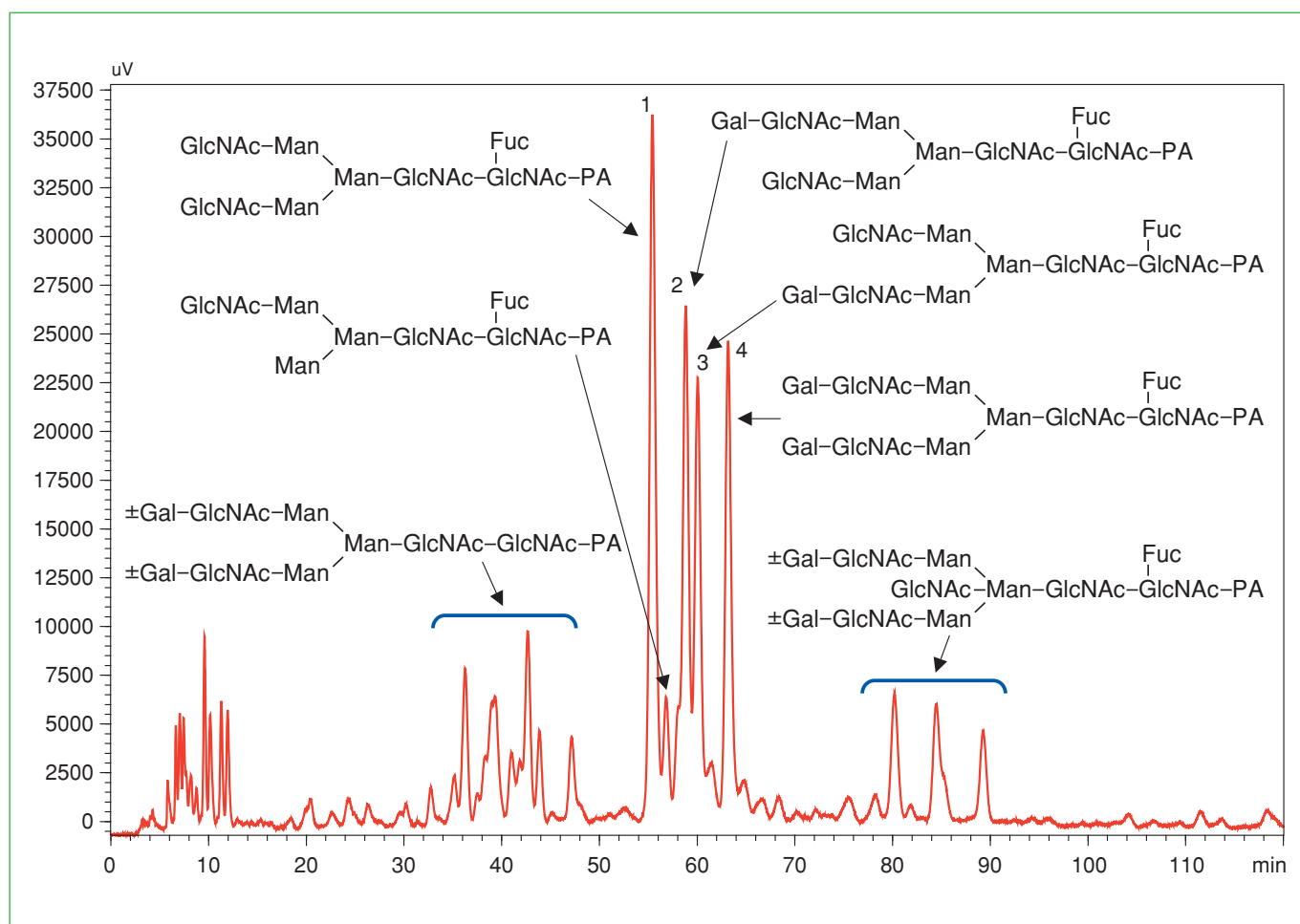


図4 図3の主なピークの糖鎖構造

もあった。一方、図5の③、④のカラムのように、グルコース単位を指標に使いそうなカラムもあった。グルコース単位を指標に使いそうなカラムは、図4のヒトIgG由来PA化糖鎖の主要な4成分が十分分離しており、糖鎖マップ作成に有望なカラムと考えられた。そこで、ヒトIgG由来PA化糖鎖がより良好に分離できる条件をさらに検討し、最も分離が良かった結果を図6に示した。10 mM酢酸アンモニウム(pH 4.0)と粘性の低い溶媒であるアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出し、カラム温度は50℃で分析した。従来法より5倍程度速い分析が可能となった。検討したカラムでPA化糖鎖を測定した場合、従来のカラムのグルコース単位とずれが生じると、先に述べた新2次元糖鎖マップのデータベースが利用できない。そこで、中性糖鎖の標準品20種(タカラバイオ)を検討したカラムで測定し、グルコース単位を

算出し、新2次元糖鎖マップのデータベース中のグルコース単位との相関を求めた。一例として図6の条件で測定してグルコース単位との相関を求めた結果を図7に示した。図7からわかるように、非常に良好な直線性が認められたことから、カラムに応じた補正式を作成することで、従来のデータベースを利用した解析が可能と考えられる。しかしながら、検討した条件ではシアル酸を含む酸性糖鎖は保持が強すぎることで、及びシアル酸の数の少ない順に溶出するため、従来のデータベースとの相関がほとんどなかった(紙面の都合上データは省略した)。現在、酸性糖鎖の測定条件を検討中であり、まもなく酸性糖鎖と中性糖鎖が同時に分析できる条件を確立できる見込みであるが、これについては別の機会に紹介したい。以上より、超高速LCをN-型糖鎖の構造解析に適用できる日も近いと思われる。

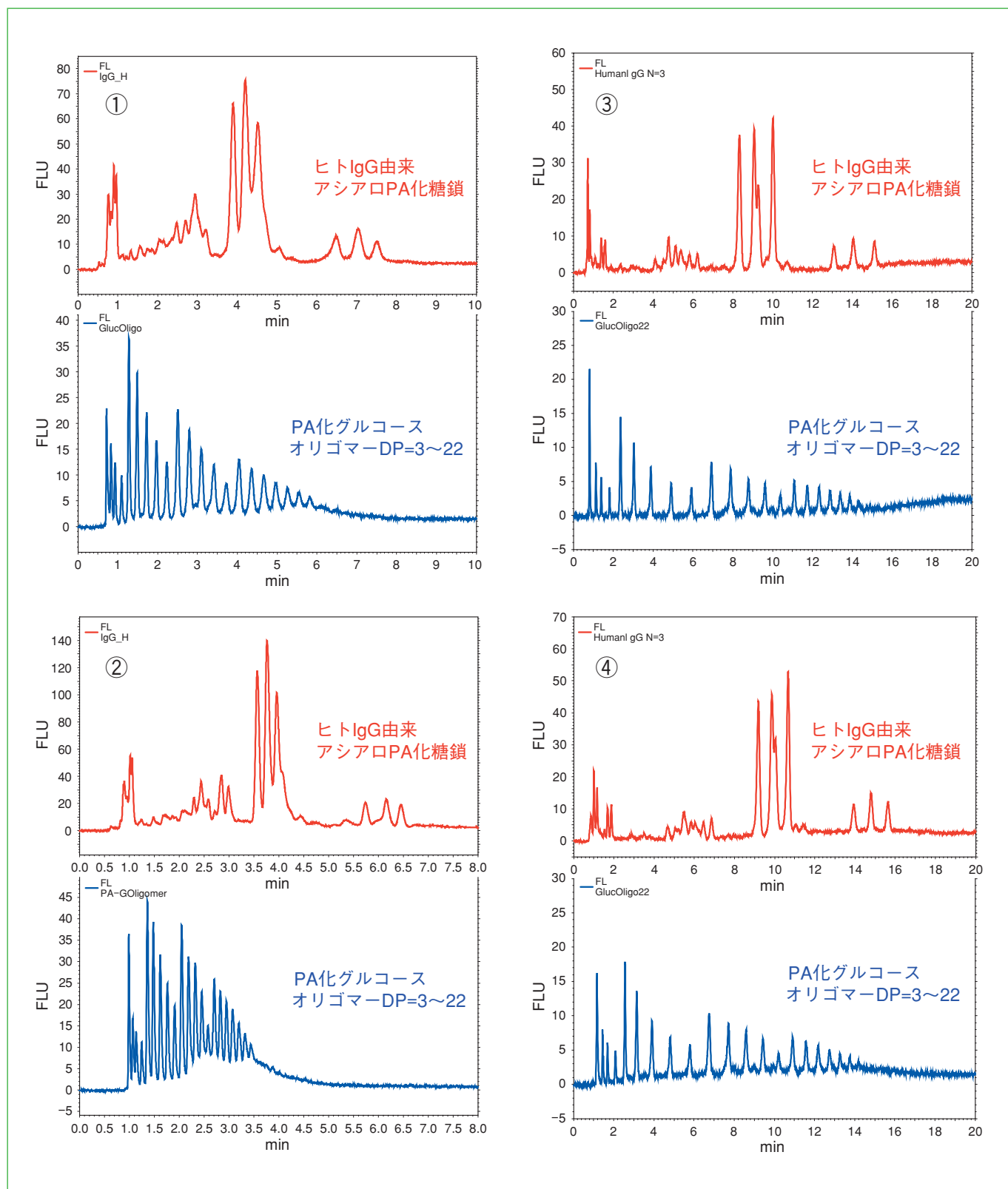


図5 各種超高速用ODSカラムによるPA化糖鎖の分離

装置：日立超高速液体クロマトグラフLaChromUltra

移動相A：10 mM酢酸アンモニウムpH 4.0, 移動相B：移動相A+10 %アセトニトリル

検出：励起波長320 nm, 蛍光波長400 nm

注入量：PA-Glucose Oligomer (DP=3~22)：1 μ L (Glc 6：0.2 pmol相当)

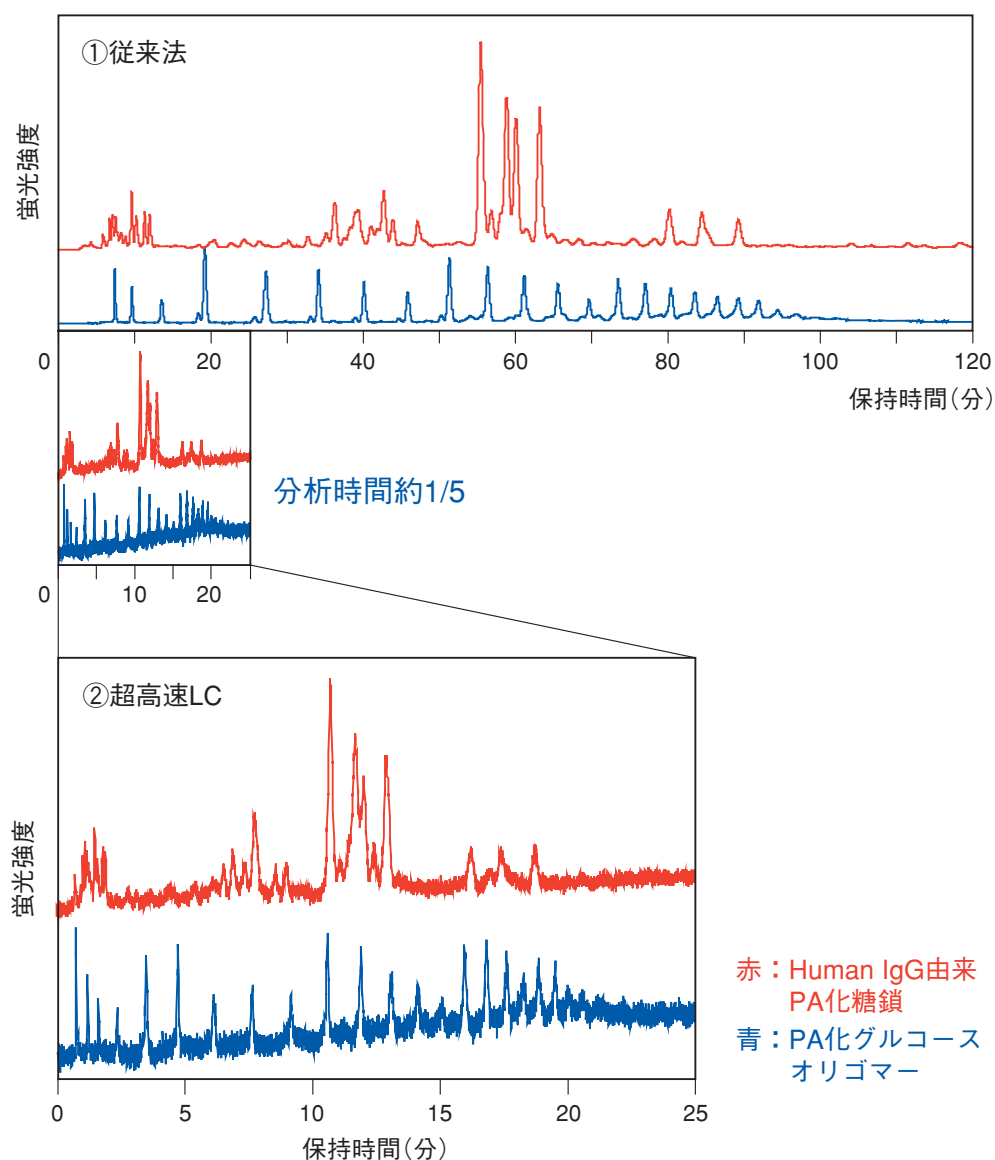


図6 従来法と超高速LCによるPA化糖鎖の分離の比較

①従来法の測定条件は図3参照

②超高速LCの測定条件

装置：日立超高速液体クロマトグラフLaChromUltra

移動相A：10 mM酢酸アンモニウムpH 4.0

移動相B：移動相A+10 %アセトニトリル

グラジエント溶出：A / B=97 / 3 (0分) → 67 / 33 (30分)

カラム：LaChromUltra C18-AQ 100 mm×2 mm I.D. (日立)

流速：0.4 mL/min

カラム温度：50℃

検出：励起波長320 nm, 蛍光波長400 nm

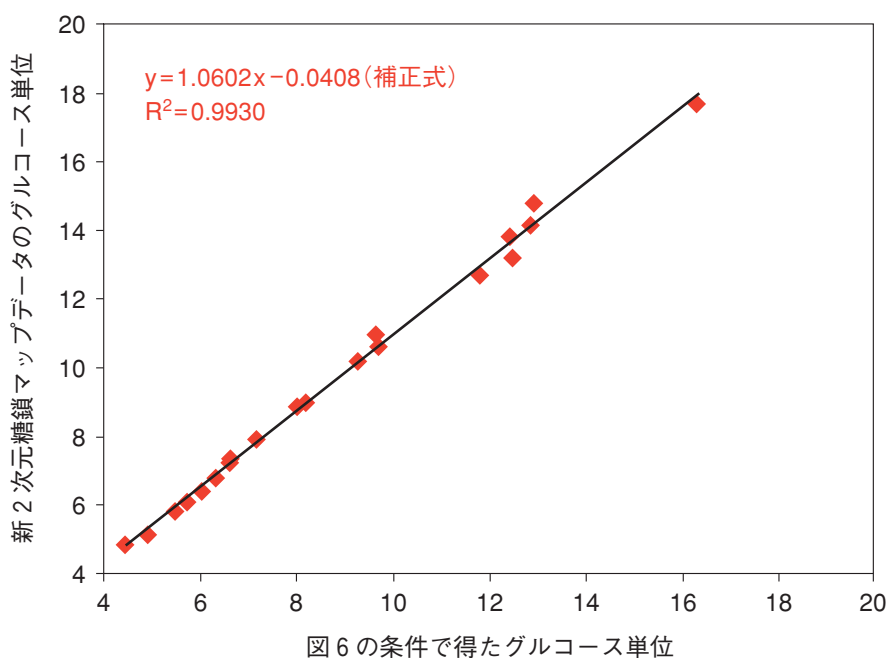


図7 グルコース単位の補正式の例
 糖鎖標準品20種を用いて補正式を作成
 直線性が確認された

終わりに

低分子医薬品の開発がやや低調なため、冒頭に記載したように今後も抗体医薬品やバイオ後続医薬品の開発は活発に進むと予想される。しかしながら、表1にあげたようにタンパク質医薬品の構造解析は多数の分析が必要で、時間と手間がかかる。また、個々のタンパク質により、その前処理法、測定方法、測定条件などが大きく異なるので、最適化するための検討にも時間を要する。さらに、抗体医薬品などの糖鎖を持つタンパク質医薬品では、糖鎖部分も含めて解析しなければならない。バイオ医薬品の開発が加速すれば、今後ますます信頼性が高く、迅速な解析手法が求められると考えられる。本稿では、そのひとつとして糖タンパク質のN-グリコシド結合型糖鎖の構造解析に超高速LCを適用し迅速化できる可能性を示した。また、超高速LCと質量分析計の接続により、オンラインでの2次元糖鎖マップを作成・解析することも進めており、筆者らはこのためのLC/MS及びMS/MSデータの解析プログラムの開発にも着手している。また、バイオ医薬品の構造解析には、最新の機器の導入だけではなく、そのための技術開発やノウハウの蓄積なども必要であろう。

参考文献

- 1) 山口照英：先端バイオ医薬品の評価技術(2010)
- 2) 西本憲弘ら：抗体医薬の現状と未来，細胞工学，26(3)，250-252(2007)
- 3) 第16改正日本薬局方，参考情報G3. 生物薬品関連，アミノ酸分析法，2036(2011)
- 4) 高橋禮子：タンパク質の化学Ⅱ(生化学実験講座1)，日本生化学会編，30-40，東京化学同人(1979)
- 5) 水野保子，二見直美，笹川立：第68回日本生化学会大会要旨集(1995)
- 6) 高橋禮子：糖蛋白質糖鎖研究法，45-72，学会出版センター(1989)
- 7) Mizuno Y., Sasagawa T.: 19th International Carbohydrate Sym.(1998)
- 8) 太田里子，森脇有加，古木健一郎，水野保子：第82回日本生化学会大会要旨集(2009)

酢酸ウラン染色機序とCCDカメラ

Staining mechanism of uranyl acetate and CCD camera

朴 杓允*

1. 酢酸ウラン染色

生物組織をグルタルアルデヒド(GA)と四酸化オスミウム(OsO_4)で固定した後、エタノールで脱水し、エポン樹脂に包埋・重合すると、透過電子顕微鏡(TEM)用試料ブロックを作製できる。樹脂ブロックから超薄切片を作製して酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色することによりコントラストのある細胞が観察できる。これまでは電子染色した細胞像はネガに保存されてきた。現在、ネガ技術とは別のCCDカメラで、重金属染色あるいは無染色像を撮影して画像として使えるようになってきた。TEMネガ画像の優れた点は、重金属修飾による細胞構造の高コントラストと微細性の表現にある。質の高い画像表現の確保のため、ネガ画像の優れた点はCCDカメラでもネガと同様に追及されなければならない。そのためCCDカメラの有用性を考える前に、ネガ画像に必須であった電子染色法を再評価することに意味はあると思う。ここでは電子染色の効能を考えたいのでCCDカメラの新規有用性について考察する。

生物組織は軽元素で構成されているため、100 KV電頭の電子線の多くは超薄切片を透過するだけでコントラストの確保につながらない。無染色エポン切片で像が少し確認できるのは細胞成分への OsO_4 の結合と厚さ効果による。エポン切片の低コントラストを改善したのは、酢酸ウランをTEM分野に導入したWatson, M. L. の功績である¹⁾。ウランは電子染色剤の中で最も重い金属であるためウランは切片の細胞成分と結合すると、電子線を散乱させてコントラストを細胞に賦与できる。ウラン染色に引き続いて鉛染色を行うと、ウラン単染色より更に増強したコントラストを得ることができる。ここでは酢酸ウランの染色機序について説明し、鉛染色機序は別の機会に紹介する。

ウランの理解のため本元素の3つの危険性について説明する。天然ウランには ^{235}U と ^{238}U のウラン同位体が含まれる。 ^{235}U は熱中性子を吸収して核分裂しやすい同位体で、 ^{238}U は核分裂しにくい。ウラン ^{235}U の含有率を基準にすると、ウランは高濃縮ウラン(20%以上)、低濃縮ウラン(20%以下)、天然ウラン(0.7%)、劣化ウラン(0.2%)の4種に分類できる。高濃縮ウランは核分裂物質の材料であり、酢酸ウランは劣化ウランである。

核分裂物質である ^{235}U は世界で最も規制されるべき元素の1つである。酢酸ウランにも核分裂性 ^{235}U が含まれるが、微量すぎて脅威の対象とは考えにくい。2つ目の危険因子はウランの放射性(γ 線放射)にある。放射線は ^{235}U と ^{238}U の両方から放出される。劣化ウランは14.8 Bq/mgの放射性を持つが、容器や金属板で遮蔽すると γ 線は防止できる。3つ目はウランの長い半減期にある。傷口や人体の自然開口部からの侵入、誤飲による体内被曝が起こった時、長い半減期は憂慮される因子となる。 ^{238}U の半減期は45億年、 ^{235}U のそれは7億年である。ウランは色々な意味でバイオハザード物質にあたるためできれば使用を控えたい。しかし、酢酸ウランに代わるほど高いコントラストを安定的に細胞に与えるほどの優れた物質は今までなかった。

日本では法律上ウランは核燃料物質の1つに分類される。核燃料物質の使用規制が進む日本の自然科学領域ではウラン物質の使用は将来制限されることが予想される。現在でも新規に設立された研究室では酢酸ウランを購入できないが、規制のない米国では酢酸ウランを自由に購入できるそうだ。また、昔から電顕解析を行ってきた教室でもウランの使用は心理的に制限されるため、電顕形態学の進歩が抑制される事態も起こりつつある。ウランの使用制限が行われた場合、電顕解析者には3つの対応がとれる。1つはウラン代替剤を利用する。2つ目は無染色でも画像を保存できるCCDカメラを使用する。ウラン代替剤とCCDカメラの2つを併用する、の3つである。現在、数種の代替剤が報告されているが、高水準で安定的な結果にはまだほど遠い。代替剤の開発は継続されるべきであるが、開発にウランや鉛染色機序の理解が必要となる。

2. 酢酸ウランと結合する細胞成分

TEMで使われる化学固定剤は細胞成分との間で架橋反応を起こす^{1, 5)}。GAのアルデヒド基はタンパクの遊離アミノ基と反応してSchiff塩基を形成する。この塩基に多数のGA分子が縮合反応してタンパクと多量体GAの複合体をつくる。これ以外にSchiff塩基には別のタン



朴 杓允

* 神戸大学名誉教授、農学博士、医学博士

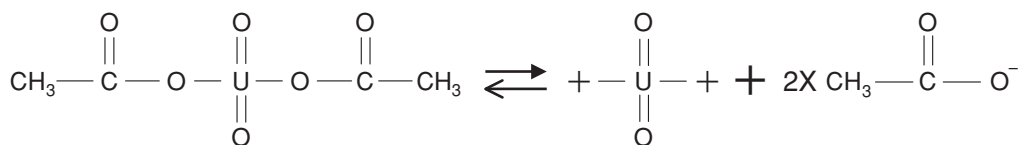
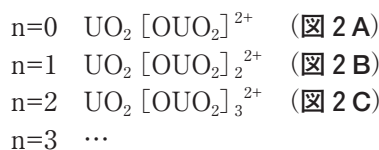


図1 陽イオンウラン分子(UO_2^{2+})と酢酸基
+ 陽電荷, - 陰電荷

パク分子が付加反応して複合体を形成する。GA固定後の OsO_4 固定では、 OsO_4 は膜リン脂質の不飽和脂肪酸の二重結合部にエステル結合して膜脂質を不溶化させる。これら成分と化学固定剤の架橋反応が継続すると細胞成分は化学的に不溶化し細胞に保存される。細胞に保存される物質は4つの高分子物質だけで、ペプチド、アミノ酸、脂肪酸、単糖、少糖類、ヌクレオチド、低分子有機物質、イオン、アニオンは固定されずに細胞外に流出する。保存されるのはタンパク、核酸、脂質、多糖類である。この保存された物質の原子団に各種のウラン化学種がイオン結合してコントラストが得られる。

3. 水に存在する酢酸ウラン化学種

ウラン染色機序の概略はすでに報告されているが、不明なことも多い¹⁾。その機序は電顕従事者に周知されていないので以下に説明する。ウランと細胞成分の結合を理解するためには、水に実在するウラン化学種の種類と電荷を知る必要がある。酢酸ウランは水に最大7.7%ほど一晩経過して溶ける。水に分布するウラン化学種の形成に関わる影響因子は濃度とpHである。ウラン化学種の形成には高ウラン濃度(0.5~4%)とpH4前後が必要となる¹⁾。この条件で弱電解質のウラン塩は水中ですべてイオン化しない。そのため陽電荷の二酸化ウラン(UO_2^{2+} 、陰電荷の酢酸基(CH_3COO^-))、酢酸ウラン分子($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$)が水に共存する(図1)。その他のウラン化学種も存在するが、(UO_2^{2+} 以外に $\text{UO}_2[\text{OUO}_2]_{n+1}^{2+}$ の構造をもつ陽イオンウラン複合体も生じる。一般式のnの値が大きくなると、Uを多く含んだ複合体となる(図2A, 2B, 2C)。n値がどれくらい大きくなり、どのような機構で陽イオンウラン複合体が形成されるかについては分からない。この複合体に含まれるウラン原子が多いほど高コントラストを細胞に与えられる。



上記の陽イオンウラン複合体以外に分子状酢酸ウランも存在する。酢酸基をAcと略すると、酢酸ウランは

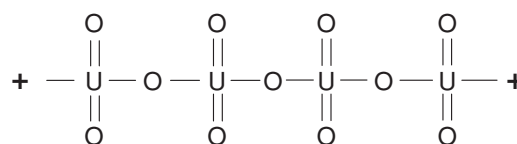
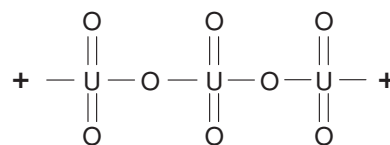
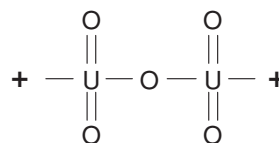


図2 陽電荷したウラン複合体 $=\text{UO}_2[\text{OUO}_2]_{n+1}^{2+}$
+ 陽電荷, - 陰電荷

UO_2Ac_2 (図1)と表現できる。2個のAcを有する酢酸ウランは更に1個のAcと余分に結合できる。Acの結合部位は二酸化ウラン $[(\text{O}=\text{U}=\text{O})^{2+}]$ のUである。このウラン種は $(\text{UO}_2)\text{Ac}_3^-$ と表すことができ、マイナスに荷電している(図3A)。2個のAcが酢酸ウランに結合できると予想されるが、実証はされていない(図3B)。また、酢酸ウランからAcが1個取れた陽電荷の $[\text{UO}_2]\text{Ac}_1^{1+}$ も水に存在する(図3C)。水と反応して水酸化ウラン($\text{UO}_2(\text{OH})_2$)が生じると総説で記述があるが、不明確な記述で終わっている。酢酸ウラン水溶液に存在する各種のウラン化学種について表1にまとめた。

4. ウラン化学種と細胞成分の結合

染色時に ^{235}U と ^{238}U の両方のウラン同位体とも細胞成分に結合できる。陽電荷ウラン種は細胞成分の陰電荷物質(核酸のリン酸基、酸性ムコ多糖の硫酸基、タンパクのカルボシル基、SH基、チロシル基)に結合する

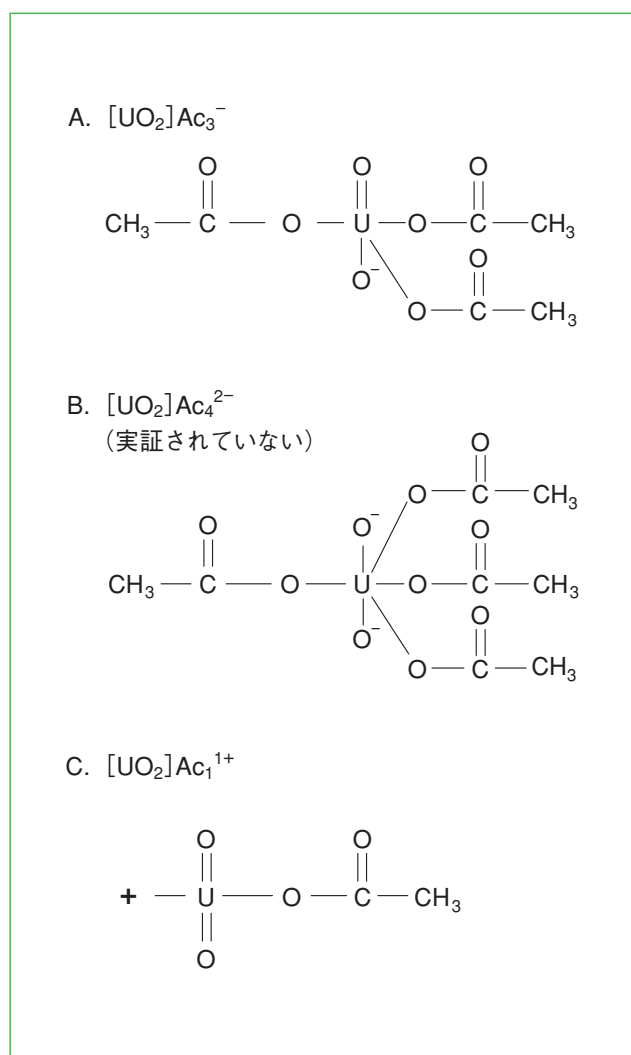


図3 陽陰電荷した分子状酢酸ウラン
+ 陽電荷, - 陰電荷

(表1)。特によく結合する部分は、DNAが凝集したヘテロクロマチンであると云われる。プラス荷電のウラン種はマイナス荷電のリン酸に結合すると理解されている(図4)。しかし、DNA鎖を巻きつけているヒストンタンパクにウランが多く結合するという主張もある。一方、陰電荷したウラン種は細胞成分の陽荷電物質(タンパクやリン脂質の遊離アミノ基)に結合できる(表1, 図5, 図6)。

イオン結合を基本としたウラン染色機序には矛盾点もある。各種のウラン化学種が結合することが想定されている遊離アミノ基は固定時にGAのアルデヒド基と反応するため、消費されて細胞内に残っていないはずという疑問である。タンパクのリジン残基の遊離アミノ基はGAにより半分ほどは未固定のままであるという情報がある。

酢酸ウランに酸を添加してプロトンが増えてpH 2.5以下になると、水溶液では二酸化ウラン(UO_2)²⁺のみが優勢となり、他のウラン種は存在しにくくなる¹⁾。このため切片の細胞成分の陽電荷と陰電荷物質とウランの間での結合量が減少してコントラストは低下する。

表1 水に存在する各種のウラン化学種と結合できる細胞成分

ウラン化学種	ウラン化学式	結合できる細胞成分
プラス電荷したウラン化学種	$[\text{UO}_2]^{2+}$	1) 核酸のリン酸基(PO_4^{3-})
	$[\text{UO}_2]\text{Ac}_1^{1+}$	2) タンパクのカルボシル基(COO^-)
	$\text{UO}_2[\text{OUO}_2]^{2+} \quad n=0$	3) タンパクの SH基(SH)
	$\text{UO}_2[\text{OUO}_2]_2^{2+} \quad n=1$	4) タンパクのチロシル基
	$\text{UO}_2[\text{OUO}_2]_3^{2+} \quad n=2$	5) 硫酸基(SO_4^{2-})
	$\dots\dots \quad n=3$	
マイナス電荷したウラン化学種	$[\text{UO}_2]\text{Ac}_3^{1-}$	1) タンパクの遊離アミノ基(NH_3^+)
	$[\text{UO}_2]\text{Ac}_4^{2-}$ (実証されていない)	2) リン脂質の遊離アミノ基(NH_3^+)

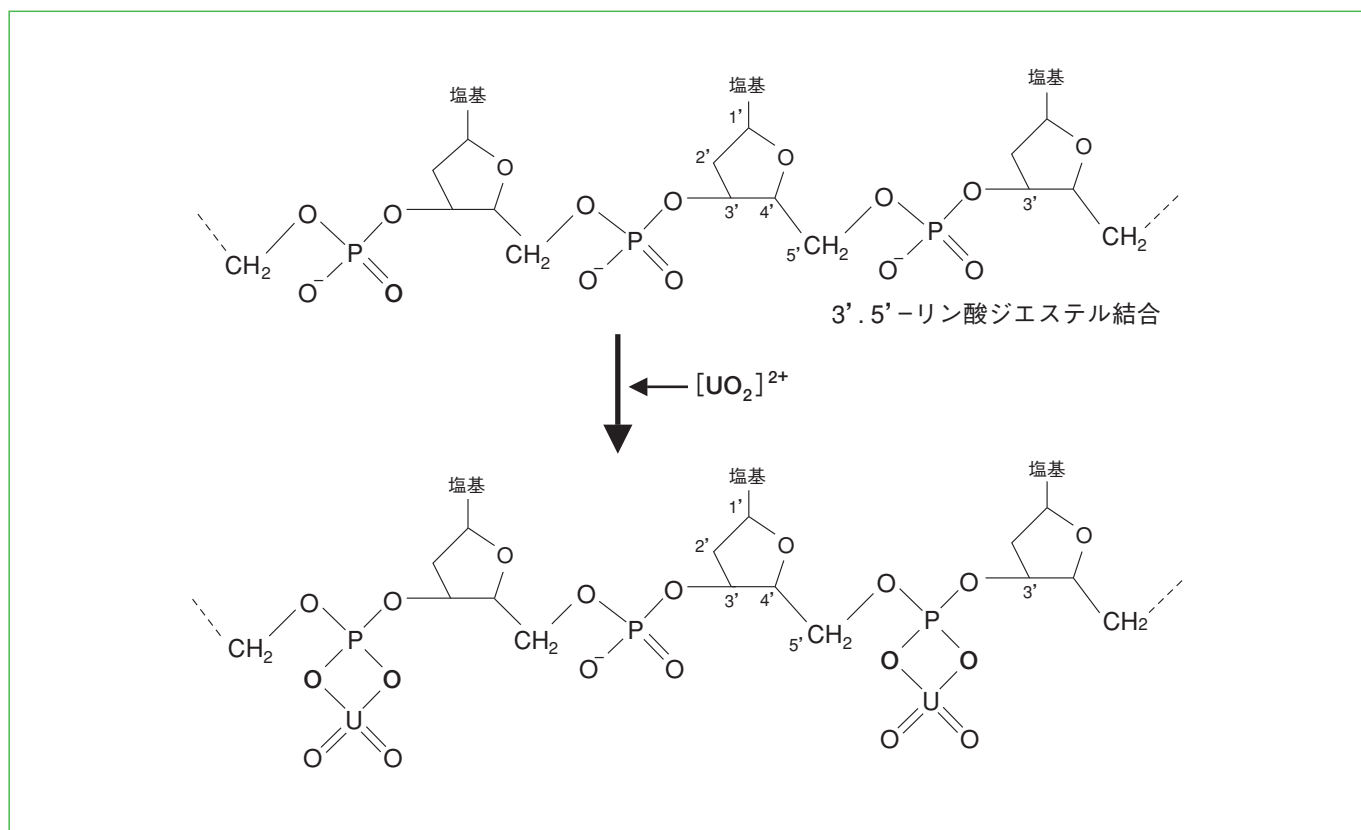


図4 核酸のリン酸基と陽イオンウラン化合物の反応

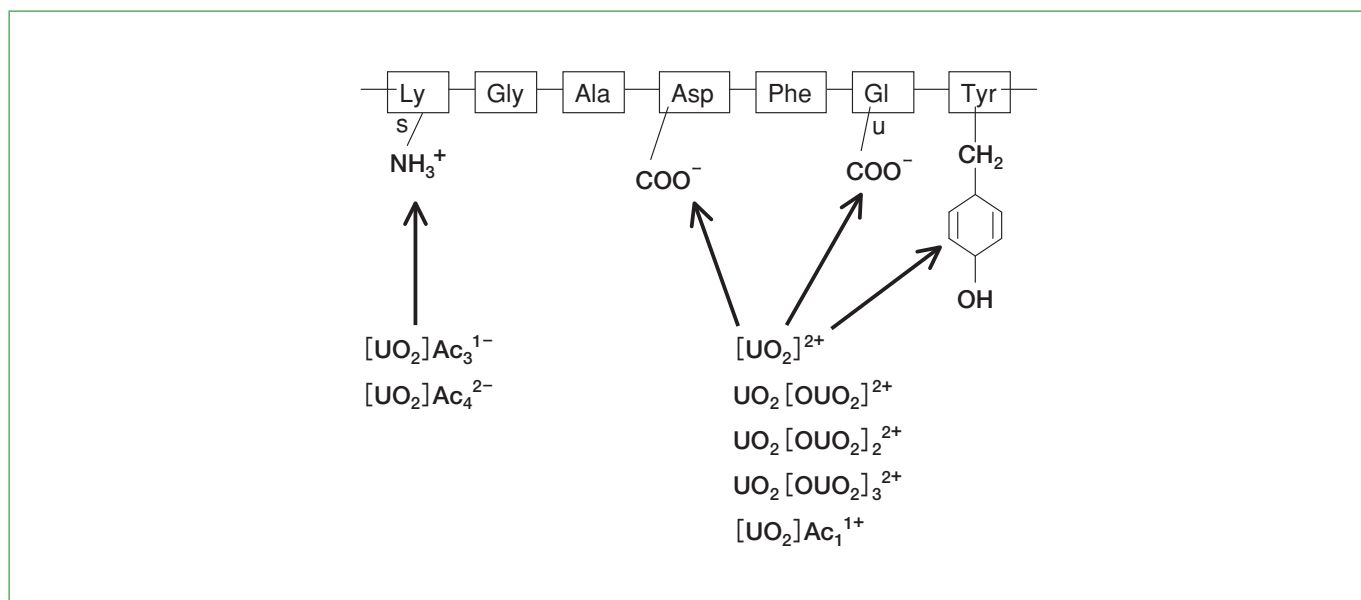


図5 タンパク質へのウラン化合物の結合

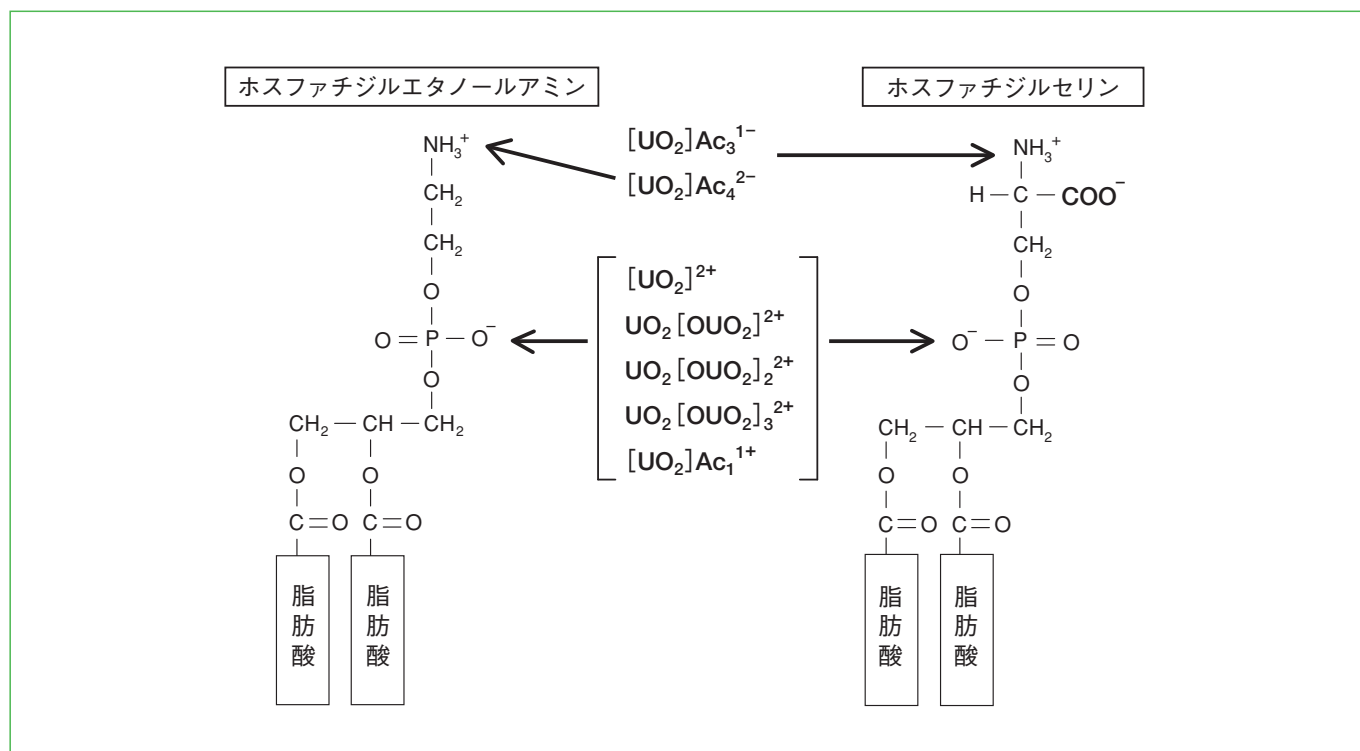


図6 生体膜のリン脂質とウランの反応

5. 非放射性重金属染色

数種のウラン代替染色剤の報告があるが、原著は塩化ハフニウム (HfCl₄)^{2, 4)} と白金ブルー³⁾ の3つに過ぎない。陰陽電荷のウラン種や分子状ウラン種と細胞成分がイオン結合することで細胞にコントラストがつく。この原理を利用して水の中でイオン化するHfCl₄をウラン代替剤として考えた。4% HfCl₄水溶液を作製したが、1日で染色性を失った。染色効果の無くなったHfCl₄液のpHは0.1であった。HfCl₄水溶液が極端な酸性になったのは、加水分解して塩酸ができたためである。この強酸性により染色効果が無くなったと現在では考えている。染色剤のpHが重要な染色因子であるという主張の1例である(A式, B式)³⁾。



塩酸形成を阻止するためメタノールに試薬を溶かして、この液で染色を施した。調べた生物種は腎臓²⁾、肝臓、葉⁴⁾、カビ菌糸⁴⁾と胞子である。HfCl₄の染色効率を客観的に評価するために、相対的コントラスト比を生体膜、基質、細胞成分、細胞壁で調査して数値化した^{2, 3)}。調査の結果、塩化ハフニウム—鉛染色は酢酸ウラン—鉛染色に遜色のない染色結果を得た。HfCl₄は、細胞壁、葉緑体グラナ、デンプン、グリコーゲン、ペルオキシゾーム基質をよく染めたため、多糖類とタンパクの染色剤として優れているのかもしれない。メタノール

中のHfCl₄はイオン化しないので、細胞成分の原子団に接近したHfCl₄分子の間で交差反応が生じたと考えられる。しかし、その機序については不明である。

ウラン代替染色剤の開発には調べるべき内容は多い。多様な生物種(動物、植物、昆虫、原生動物、微生物)のすべてで染色液が有効であるのかどうかは分かっていない。固定条件によっても染色結果は左右されるように思う。コントラストを評価する際に、相対的コントラスト比のような客観的な基準を用いなければ他の研究結果と比較検証できない。コントラスト評価は電顕解析者の有する技術でずいぶんと変わるため、主観的なものであると云わざるを得ない。ウラン代替剤の研究ではポジティブ染色しか行っていないので、ネガティブ染色の調査も行うべき分野として残っている。

6. CCDカメラの有用性

電顕ネガを情報媒体として使うと、オリジナル画質を低下させずに5～8倍まで引伸ができる。画像をネガに保存すると、電子染色は必須となり、現像処理に技術と費用を要する。そのため写真作成までのコストは高くなる。一方、CCDカメラを使用すると、暗室と現像費が無用となり写真作成までのコストは低くなる。CCDカメラではオリジナル画像を拡大できないが、その利点はbrightnessとcontrastを補正できるため、無染色でもコントラストをつけた画像を表現できる(図7A)。電子染色のよさはヘテロクロマチンや生体膜に高コントラストを賦与できることにあるが、結合組織の礎質や液胞の

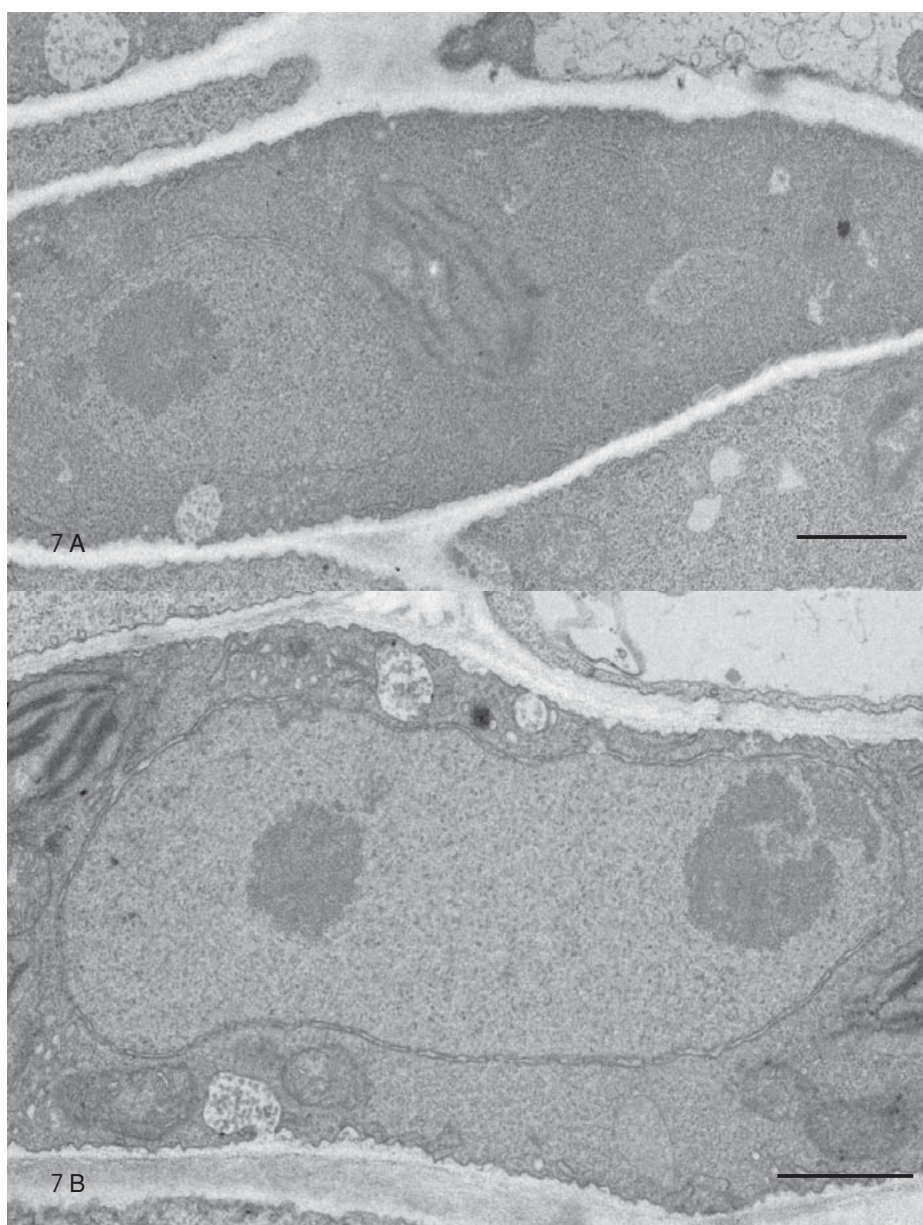


図 7 A. *Arabidopsis* 葉の篩部細胞，無染色，HT7700のCCDカメラ撮影，Bar=1 μm

図 7 B. *Arabidopsis* 葉の篩部細胞，塩化ハフニウムとクエン酸鉛の二重染色，HT7700のCCDカメラ撮影，Bar=1 μm

基質物質のような低電子密度の構造体も同時にコントラストを賦与できることにある。しかし，CCDカメラではlatitude（露光範囲）が低いため低電子密度の構造体は無染色では表現しにくい。以上を勘考すると，現在のところ重金属染色を併用してCCDカメラを利用した方がよい(図 7 B)。

参考文献

1. Hayat, M. A. (1989). Uranyl preparations. *In* Principles and Techniques of Electron Microscopy, 3rd edition, Houndmills, Basingstoke, Hampshire, London, Macmillan Press pp. 305–313.
2. Horiuchi, Y., Okumoto, K., Akahoshi, Y., Minamoto, G., Onoe, T., Ikeda, K., Park, P. (2007). A novel staining method for thin sections and *en bloc* tissue of rat kidney fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide using methanolic hafnium chloride. *J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol.* 21: 21–28.
3. Inaga, S., Katsumoto, T., Tanaka, K., Kameie, T., Nakane, H., Naguro, T. (2007). Platinum blue as an alternative to uranyl acetate for staining in transmission electron microscopy. *Arch. Histo. Cytol.* 70: 43–49.
4. Ikeda, K., Inoue, K., Kanematsu, S., Horiuchi, Y., Park, P. (2011). Enhanced effects of nonisotopic hafnium chloride in methanol as a substitute for uranyl acetate in TEM contrast of ultrastructure of fungal and plant cells. *Microscopy Research and Technique* 74: 825–830.
5. Park, P. (朴杓允) (2011). 透過電子顕微鏡生物試料作製講座 (DVD), 電子顕微鏡, 技術講座シリーズ 1, 監修: 朴杓允, 村中祥悟, 株式会社モルフォバイオイメージング研究所

走査電子顕微鏡試料作製と観察時におけるアーティファクト

The artifacts of sample preparation and observation on the scanning electron microscopy

村中 祥悟*

1. はじめに

走査電子顕微鏡(SEM)観察のための試料作製は、常にアーティファクトの脅威にさらされています。なぜ脅威かという、アーティファクトを含んだSEM像から誤った形態の解釈や結論を引き出してしまうことがあるからです。また、観察条件においても同様の危険性を含んでいます。本稿ではSEM試料作製時とSEM観察時に分け、さらに試料採取時に既にアーティファクトを生じている例、固定、脱水、乾燥時などの各工程で生じる例を紹介しながらアーティファクトの症状、生じる機序、対処(軽減)法について記載しています。

2. 試料採取

試料採取時の刺激によって既にアーティファクトを生じている場合と、試料採取時に組織が損傷あるいは観察面が汚染している場合があります、いずれも表面観察に障害となります。

1) 試料採取時の刺激による変化

リンパ球や血小板などによく生じます。試料採血時の刺激が原因で、リンパ球は表面形態が多様化し、B、T、NK細胞の形態的特徴が失われています。電子顕微鏡レベルで観察するには、培地中に2時間程度浮遊

培養して安定化させてから固定など試料作製操作を開始します(図1)。また、血小板も同様に、ほとんどの場合偽足を伸ばすなどの形態変化を呈しています。血小板の生体内での形態を電子顕微鏡で観察するには、採血方法を工夫することで活性化を軽減することができます(図2)。ただし、これらの試料も固定液に触れることによってアクティブな様相を示すこともあります。



村中 祥悟

2) 試料観察面の隠蔽

試料観察面が何らかの物質に覆われ、観察面が隠蔽される問題です。例えば、上皮細胞では細胞表面に粘液が付着していることが多いのですが、そのまま固定操作に入ると粘液の付着したままの標本ができてしまいます(図3)。また、解剖時などに血液、体液が付着することもあります。これらの試料は、観察目的とする面を、汚さず、壊さずに必要な大きさを露出するようにします。試料表面以外でも、組織の内部にある構造の観察においても観察部位の露出操作を用います。

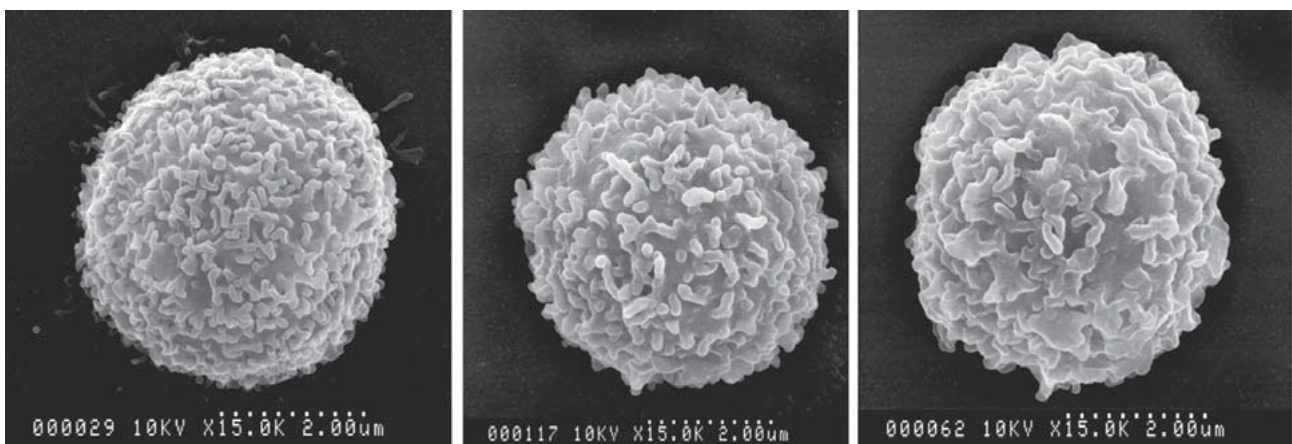


図1 リンパ球の観察

B、T、NK細胞を電子顕微鏡レベルで観察するには、リンパ球が採血、分離の工程で刺激を受けてさまざまなアクティブな形状を示すので、RPMI-1640(FCS10%)中に浮遊させ2時間安定化させて試料作製する。
左：B Cell 中：T Cell 右：NK Cell

* 大阪大学超高压電子顕微鏡センター 嘱託技術員 工学博士

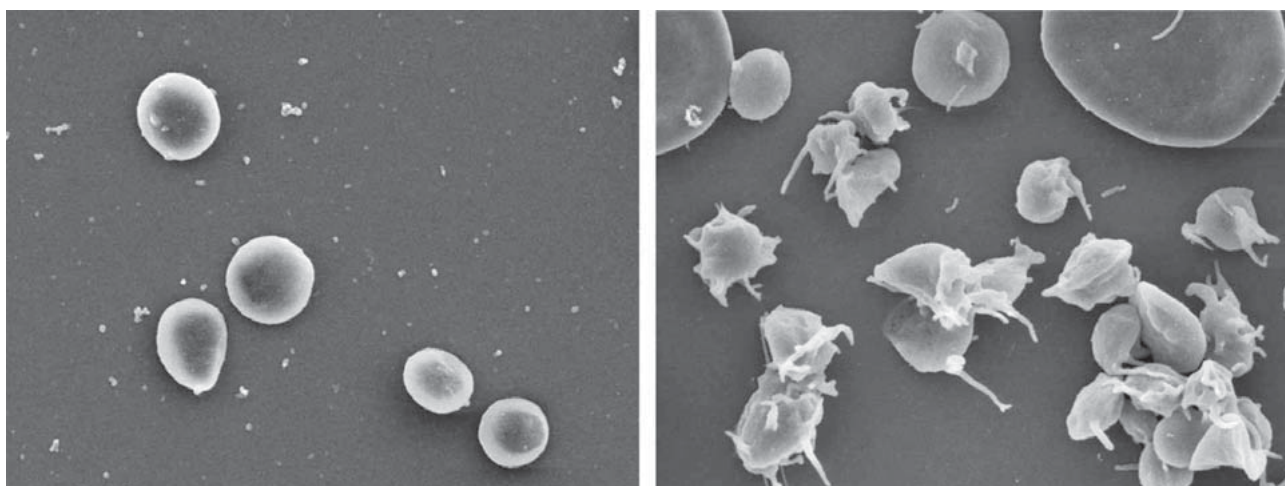


図2 試料採取法による血小板の形状

血小板は採血時の吸引や接触などの外的刺激に反応して偽足を伸ばすなどの形態変化を生ずる。

左：駆血帯をしない成人から固定液中にシリコン化処理翼付静注針18Gの15 cmチューブからの放血滴下。

右：ヘパリン入り真空採血管に21G針で駆血帯なしで採血・固定。

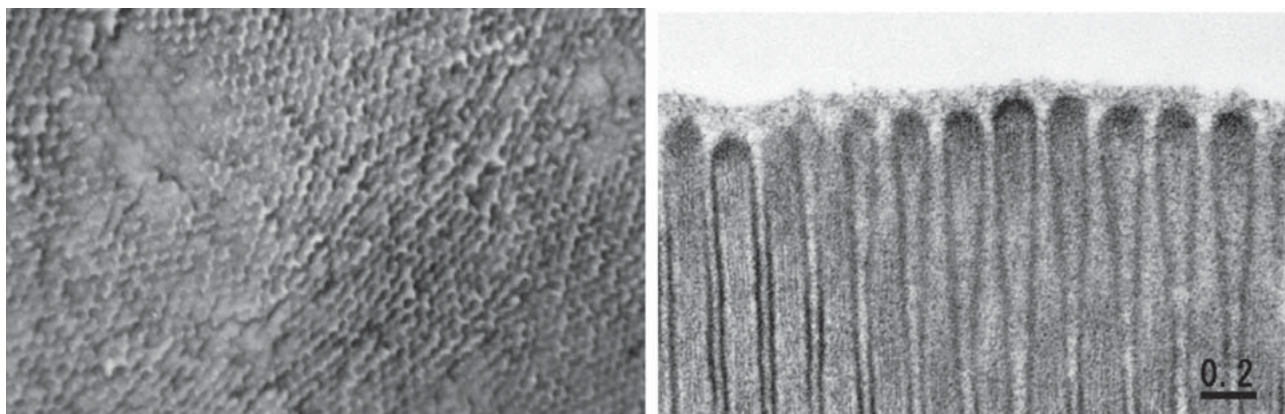


図3 小腸微絨毛表面に付着する糖タンパク

左：内腔側のSEM像。 右：断面TEM像。

(1) 試料表面の露出

固定前に粘液を除去する各種の除去法が考案されていますが、何れの方法も過剰処理による新たな組織破壊を生じる危険性がありますので必要最小限に留めることも重要です。

- a. 強振法：充分な量の生理食塩水(生食)と試料を入れた試料瓶を強く振動を与えます。液を交換しながら繰り返します。簡単な方法で効果は大きいのですが壊れやすい構造の組織には適しません。
- b. ジェット水流吹付法：試料の洗浄面を露出し、生食を注射器で吹き付ける方法で優れた効果があります。しかし洗浄ムラはそのまま付着物の取り残しとなりますので、方向を変えながら丹念に吹きつけて処理します(図4)。
- c. 超音波処理法：生食中の試料を超音波(150 w以上)処理します。組織の破壊が強い割に洗浄効果は低いので限定的に利用します。

- d. トリプシン処理法：トリプシンの0.3 %生食溶液(37℃)で処理します。処理時間は5分を限度とし、過剰な処理は試料を著しく損傷します。また処理後の洗浄を怠ると溶出物残渣が試料に付着してしまい観察面を汚染します(図5)。

- e. EDTA処理法：EDTA1.0 %生食溶液(室温)でトリプシンと同様に処理します。

(2) 内部構造の露出

- a. DMSO凍結割断法：50 % DMSO(dimethylsulfoxide)に浸漬した固定試料を、液体窒素で冷却した金属板の上で凍結・固化し、カミソリ刃で割って内部を露出させます。DMSO以外に100 %エタノールを用いることもできます(図6)。
- b. 膠原線維除去法：2 %グルタルアルデヒドで固定した試料を60℃の6N NaOHで10分程度処理します。膠原線維や基底膜が除去され、結合組織に覆われていた細胞表面が観察できます。

- c. 酵素消化処理観察法：2 %グルタルアルデヒドで固定した試料を酵素処理によって細胞成分を除去し基底膜を残して観察することができます(図7)。
- d. 細胞内構造観察法：二重固定(0.5 %グルタルアルデヒドと0.5 %パラホルムアルデヒドの混合液・

1 %オスミウム)した試料を凍結割断。0.1 %オスミウム処理(20℃, 72時間)で割断面から観察に不要な部分を除去して、細胞内構造を剖出できる。核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置などを立体観察できます(図8)。

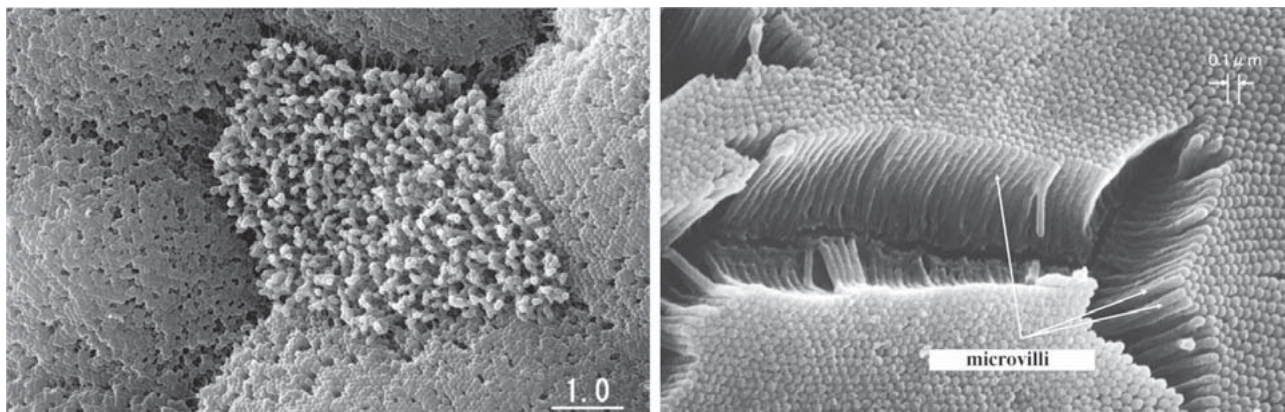


図4 洗浄した微絨毛表面と表面損傷

- 左：糖タンパクを除去し、分泌細胞などの上皮細胞が明瞭になる。
- 右：過剰なジェット水流による洗浄で損傷した上皮細胞微絨毛。

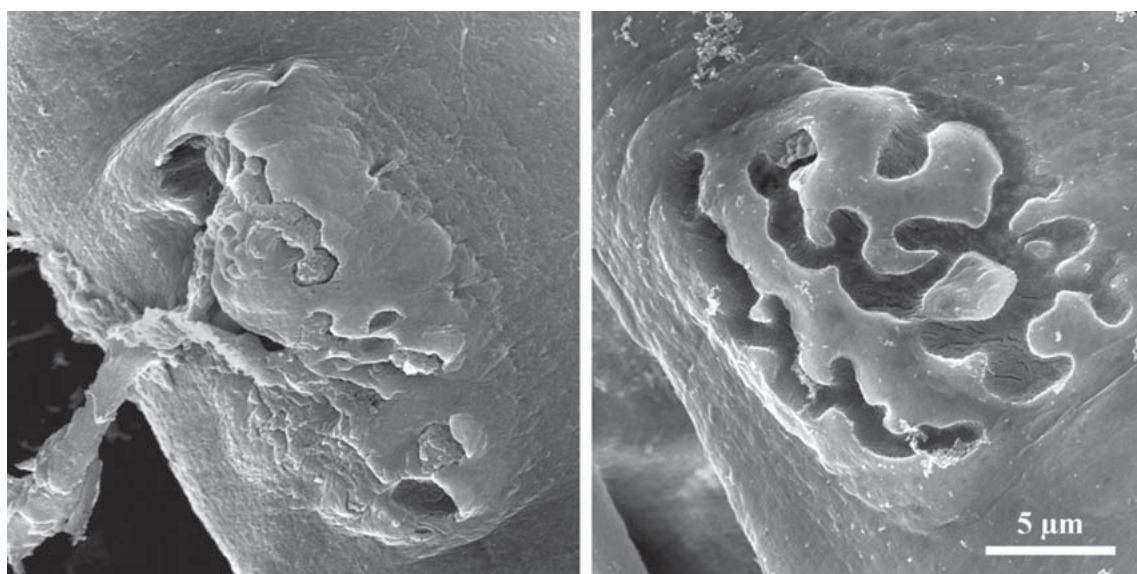


図5 ラット大腿筋の神経筋接合部のトリプシン消化法による露出像

- 左：運動神経神経側からの接合部の露出像。
- 右：筋肉側のレセプターの露出像。

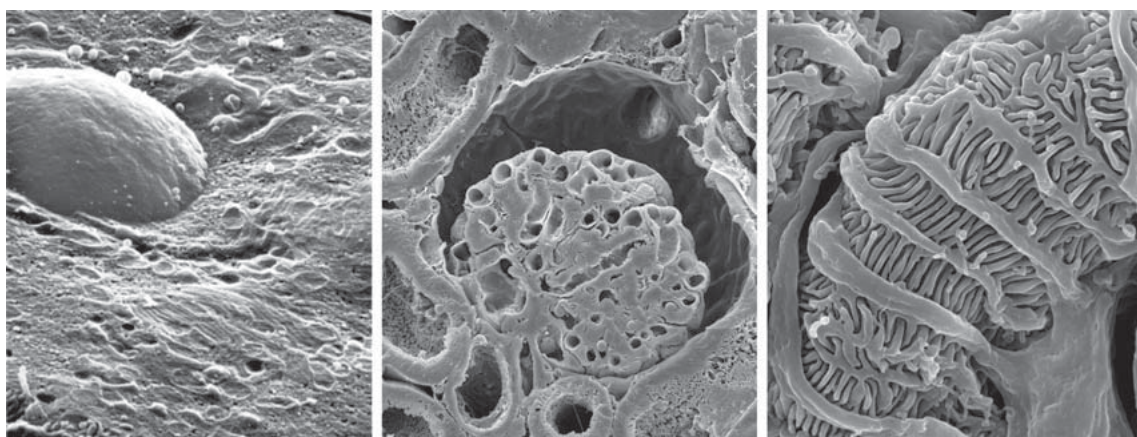


図6 凍結割断による内表面の露出

左：DMSO (dimethyl sulfoxide) 溶液に浸漬したラット肝臓肝細胞の割断面で、細胞小器官の膜面で割断されている部位のSEM像。
 中：アルコール浸漬試料の凍結割断像で、腎臓糸球体の断面観察による毛細血管内の内皮細胞SEM像。
 右：同じく、足突起に覆われた腎臓糸球体表面の露出像。

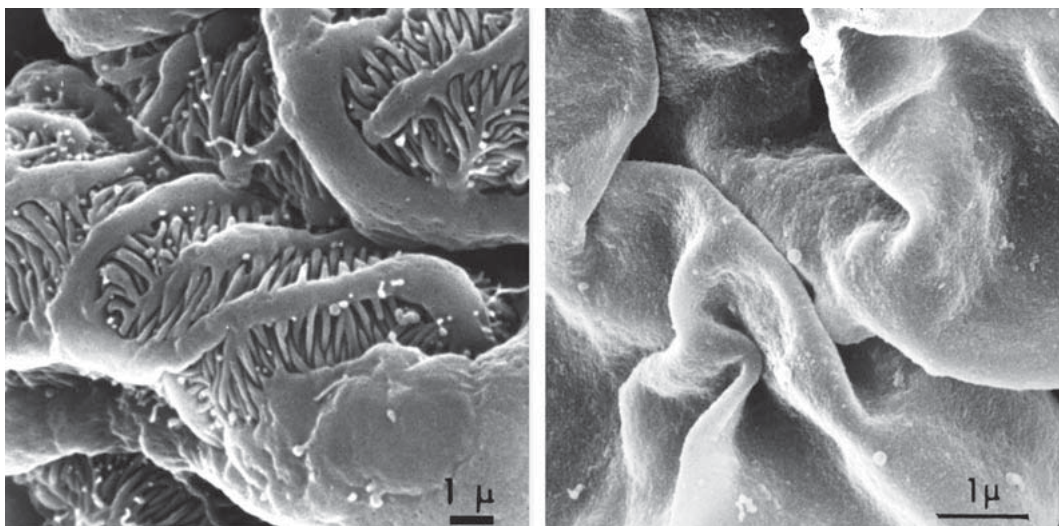


図7 腎糸球体の酵素消化処理による基底膜の露出

左：通常は足突起に覆われていて基底膜は観察できない。
 右：酵素処理にて上皮細胞を除去することによって基底膜全体の表面構造を露出する。基底膜の損傷を研究するには必須の方法。

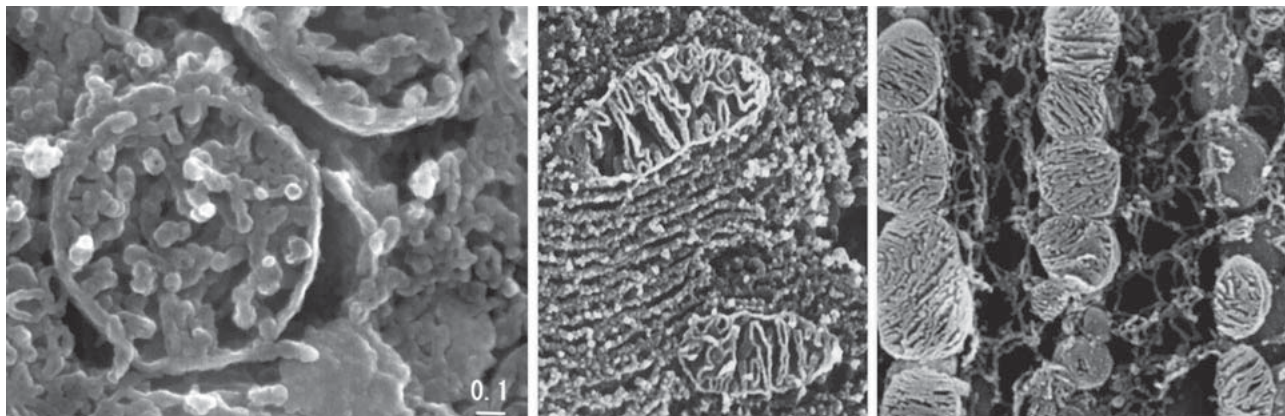


図8 オスミウムマセレーション法による細胞内小器官のSEM観察

左：ラット副腎凍結活断面からの網状体ミトコンドリア。
 中：ラット膵臓外分泌細胞のミトコンドリア。
 右：ラット心筋のミトコンドリア。

3. 試料の固定

試料の固定は透過電子顕微鏡技術に共通するのでここでは割愛します。ただ、固定液の浸透圧については、試料形態への影響が大きいので記載いたします。たとえば赤血球のSEM観察では、正常な赤血球でも多彩な形状をとることがありますが、浸透圧に依るところが大きいようです。血液の臨床試料では赤血球の変形が診

断につながることもあり、浸透圧は重要な要素になります(図9)。また、オスミウムによる後固定は、試料の導電性を高めると共に試料に強度を持たせる効果もあります。さらにこれらの効果を高めるには、タンニン酸とオスミウム酸を交互に作用させる方法も使用されています。

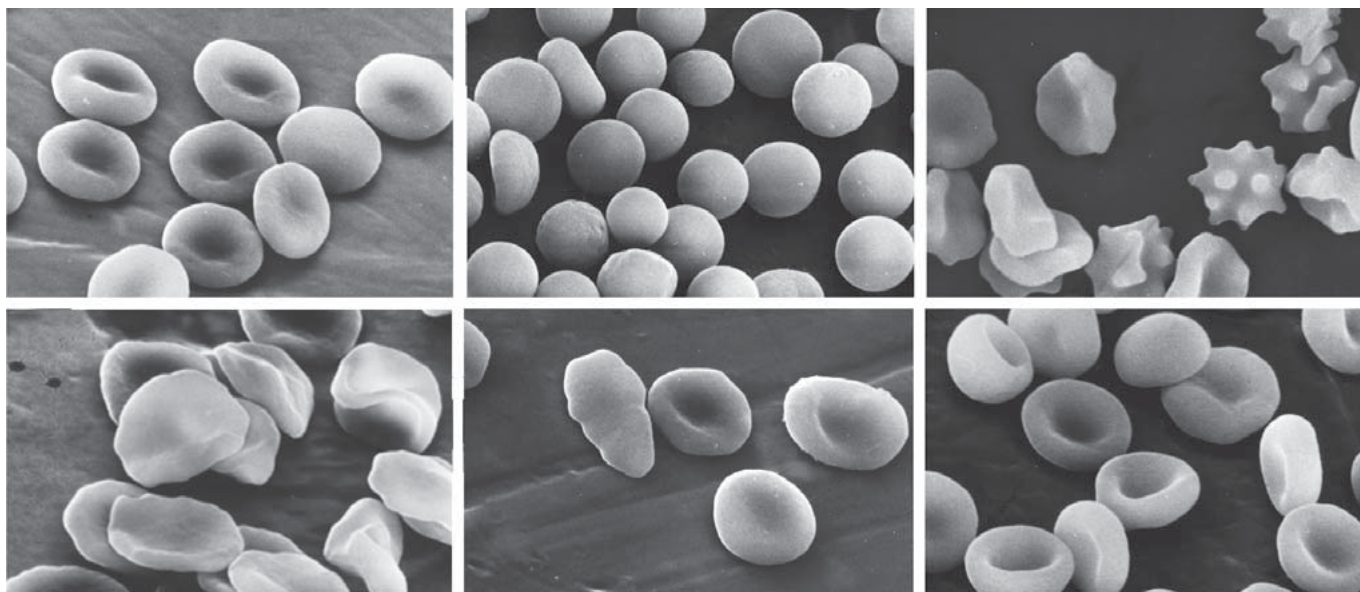


図9 赤血球の固定条件による形態の変化

- 左上：浸透圧 350 mOsm/pH 7.4の固定液によるほぼ正常の赤血球。
- 中上：浸透圧 170 mOsm/pH 7.4の低張固定液による球体状の赤血球。
- 右上：浸透圧 670 mOsm/pH 7.4の高張固定液による金平糖状の赤血球。
- 左下：浸透圧 1,370 mOsm/pH 7.4の超高張固定液による扁平状の赤血球。
- 中下：浸透圧 350 mOsm/pH 6.6の低pH固定液による楕円形の赤血球。
- 右下：浸透圧 350 mOsm/pH 5.9超低pH固定液による椀型の赤血球。

4. 試料の乾燥

ほとんどの生物系のSEM試料は乾燥工程を経乾燥試料となります。乾燥工程では、液体の表面張力の影響、試料収縮などの影響を低減する方法が使用されています(図10)。また、大腸菌などは生体では粘液に覆われていますが、乾燥後にSEM観察すると多くの糸状の物質に変わっていることに気がきます(図11)。ゼラチン様物質も同様の変化を見せます。

1) 乾燥法

医生物試料の乾燥時には表面張力による試料破壊を防ぐために、臨界点乾燥法あるいは t -ブチルアルコール凍結乾燥法を用います。最近は特定の試料以外は t -ブチルアルコール凍結乾燥法が多く用いられています。しかし凍結乾燥法においては、昇華 t -ブチルアルコールの風圧による試料破壊が新たなアーティファクトが問題になることもありますので減圧量に注意を要します。

2) 試料収縮

脱水と乾燥による試料の収縮は免れません。収縮の程度は固定の良否・方法、脱水列の濃度勾配による影響が強く影響します。試料収縮は培養細胞などで見られるように、試料の亀裂、断裂となって試料を破壊することもあります(図12)。実際の試料収縮の程度は、ラットの軟組織である肝臓・腎臓・骨格筋・脳の乾燥後の収縮率の計測で明らかにされています(図13)。軟組織は試料作製後には臨界点乾燥法または凍結乾燥法共に80 %程度まで収縮し、手抜き脱水ではさらに影響が顕著になります。また、管腔の多い試料では収縮が大きく、緻密度の高い試料では影響が小さくなります。全般に、導電染色(タンニン酸による)が試料収縮の防止に効果を発揮します。しかし、後述(導電処理の項)の如く、微細構造の埋没等の新たなアーティファクトを生じる要因ともなるので注意して使用します。

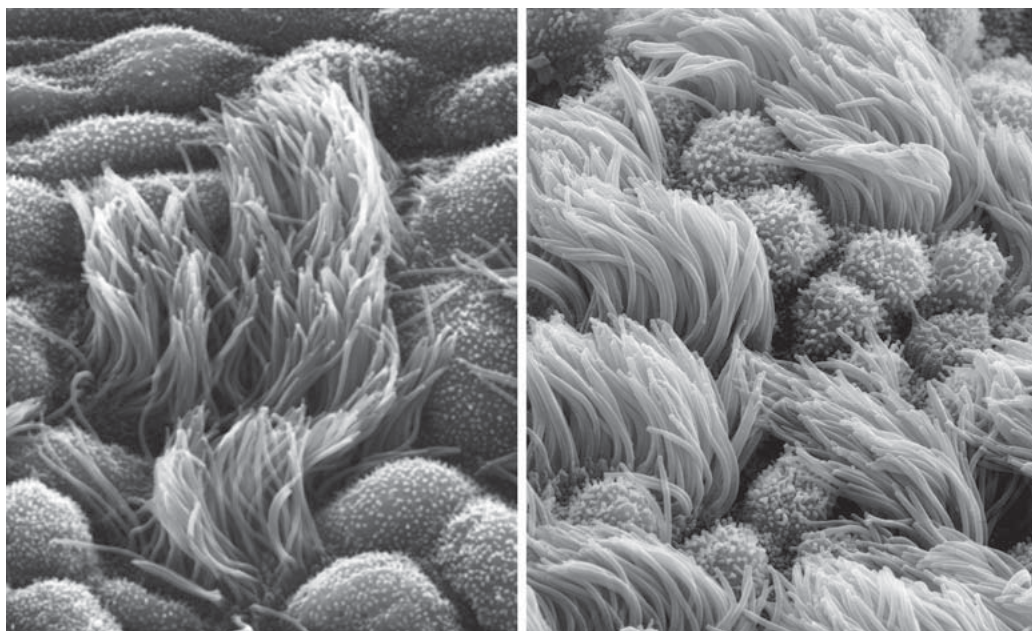


図10 ラット気管線毛の乾燥SEM像

左：*t*-ブチルアルコール凍結乾燥効果によって表面張力の影響を受けない乾燥試料。
 右：表面張力の影響を受け、倒れた繊毛が目立つ試料。

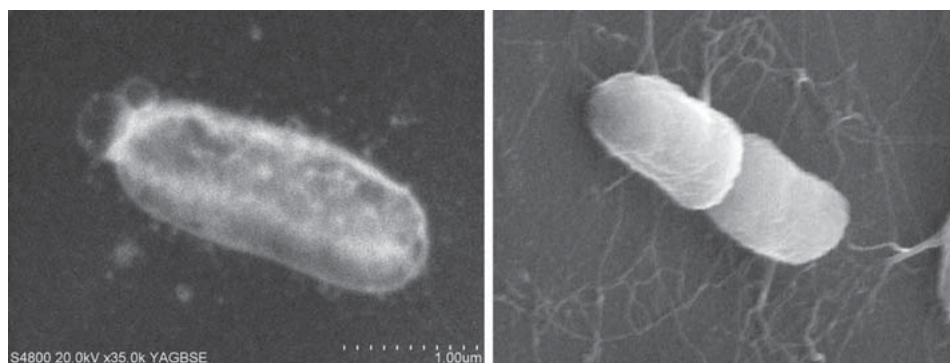


図11 大腸菌の乾燥による粘液の変化

左：QuantMixホルダで撮影した粘液に包まれた生の大腸菌反射電子像。
 右：凍結乾燥後には体表面は網状の繊維が付着している大腸菌SEM像。

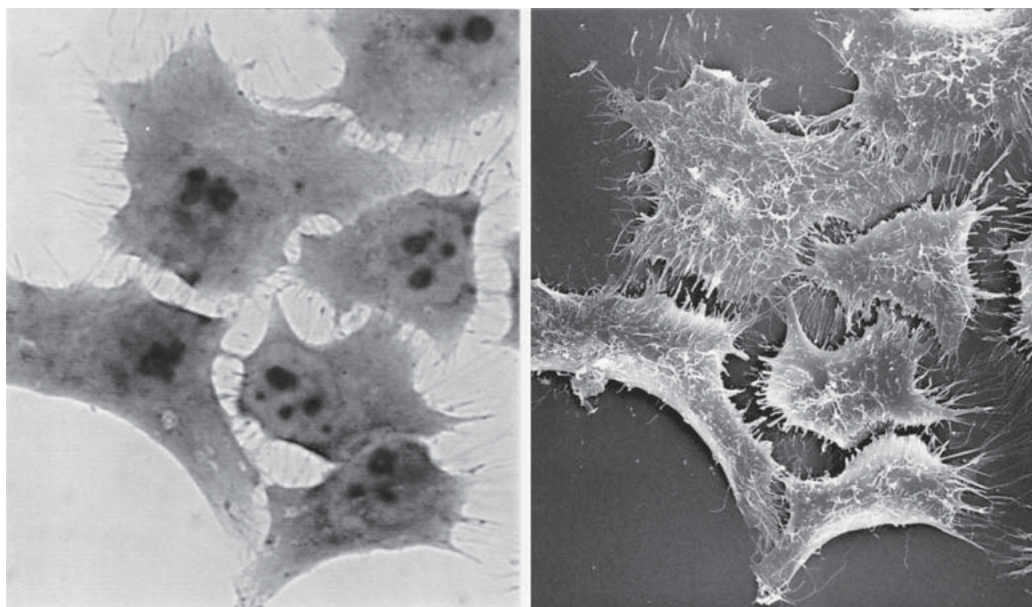


図12 培養細胞の光学顕微鏡とSEMとの画像比較

左：培養細胞の光学顕微鏡像。
 右：同一試料の乾燥後SEM像では試料の収縮と突起の亀裂や断裂が認められる。

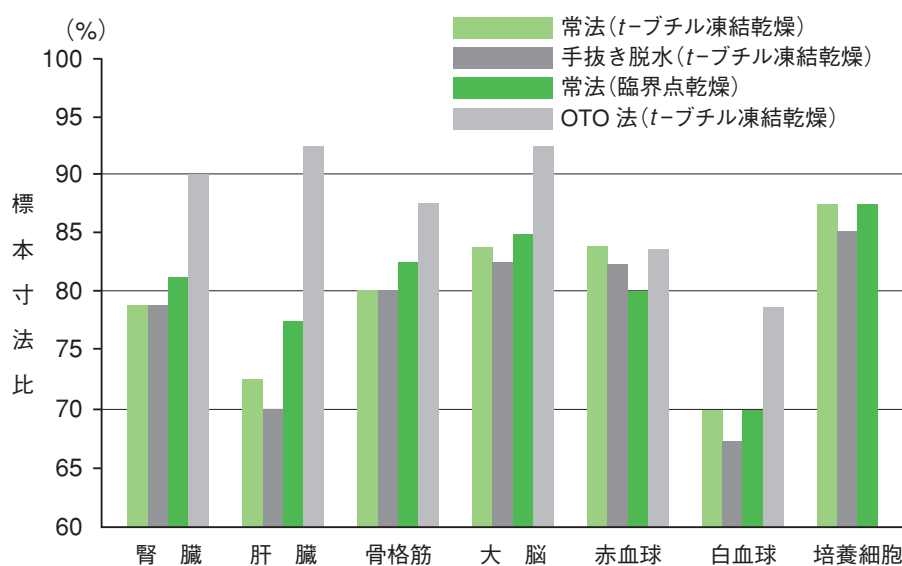


図13 軟組織の乾燥前後の手法別収縮率比較

5. 導電処理

一般に生物試料は導電性に乏しいので、SEM観察時に照射される電子線による試料表面の帯電が観察の障害になります(図14)。そのために金属膜コーティング法、導電染色法などの導電処理法が汎用されています。

1) 金属膜コーティング法

金属膜コーティング法は金属膜による試料の微細構造の隠蔽や金属粒子による実際にはない構造の形成を認めることがあります。金の蒸着粒子を高倍率で観察すると粒子そのものが試料の微細構造に観えることがありますので、観察倍率と試料の構造に適した処方を選択して像解釈を誤らないよう配慮が必要です。しかし金属膜被覆は電子線照射による試料の変形を軽減し、二次電子発生もよいことから最も利用されている方法でもあります。金属コーティング法および使用金属には多くの種類があります。これらの中から目的に最も適した方法を選択します。金属膜の特性で特に問題になるのは金属の粒状性と膜厚です。コーティング膜の金属粒子は、粒子が小さい(粒状性が良い)ほど試料表面の形態を損なわずにコーティングすることができます。観察中にこの粒子が認められる時は、コーティング法をより小さい粒子が得られる方法および金属に切り換えるようにします。特に金は島状構造を形成し、実際にはない表面形態を示すので数万倍以上の観察では使いません。コーティングに汎用される材料を粒状性の良い方から並べると、カーボン(C)、タングステン(W)、タ

ンタル(Ta)、白金(Pt)、クロム(Cr)、パラジウム(Pd)、金(Au)の順となります。また、生物試料の表面は複雑な形態であるため膜厚は決して均一にはなりません。コーティング時に金属がよく回り込み、できるだけ均一に膜を形成する方法が優れています。最近はおスミウムのCVD法が多く用いられています。おスミウムの結晶から蒸気を導入し、イオン化してコーティングする方法で、膜の粒状性、回りこみ、操作の容易さにおいて優れています(図15)。おスミウムCVDコーティング法は低倍率から超高倍率まで対応できます(図16)。

2) 導電染色法

導電染色は試料をおスミウム固定後、タンニン酸(T)とおスミウム酸(O)を交互に作用させて、試料におスミウムを多量に付着させる方法です。試料を硬化させ収縮を緩和する効果もあり試料変形の防止にも役立ちます。しかし、前述のごとく、過度に処理をすると、金属コーティングと同様に試料の観察表面を隠蔽することになります(図17)。タンニン酸(T)とおスミウム(O)を1回処理するごとに最低1.8 nm膨張する像となり、コーティング膜厚は、処理の繰り返しOTOTOで3.6 nm, OTOTOTOで5.4 nmの厚みで膨化し、SEM像でも明らかに表面の微細構造が隠蔽されてきます(図18)。これらの結果は小腸微絨毛の透過像に当てはめると理解できます。各工程での余剰タンニン酸の洗浄を怠るとさらに膨張する結果となります。

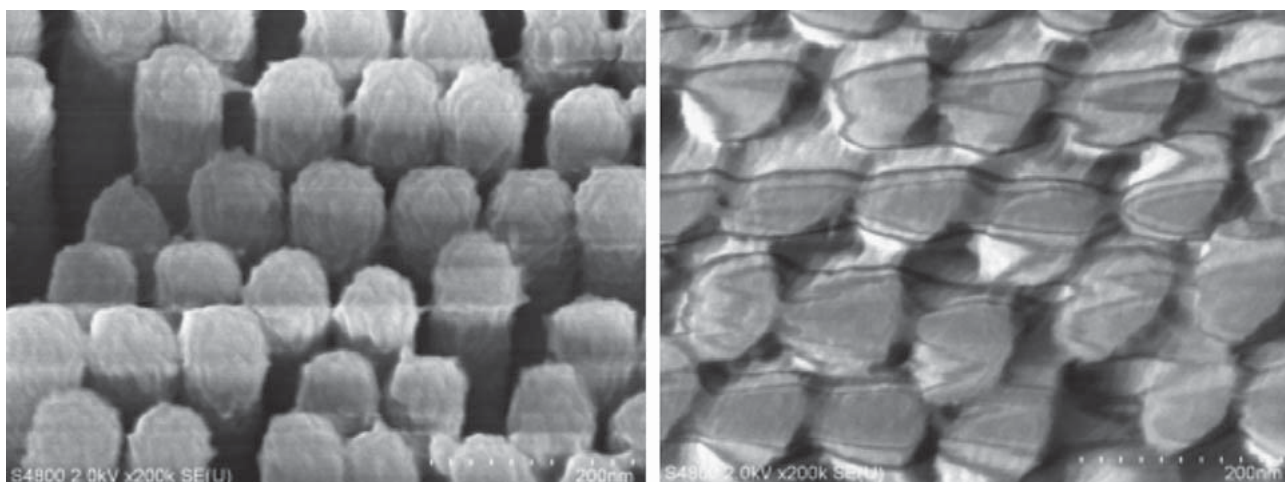


図14 帯電によるSEM像の乱れ
左：輝線，ラスタースキャンに沿った明暗現象。 右：試料表面の帯電電子による試料の歪み。

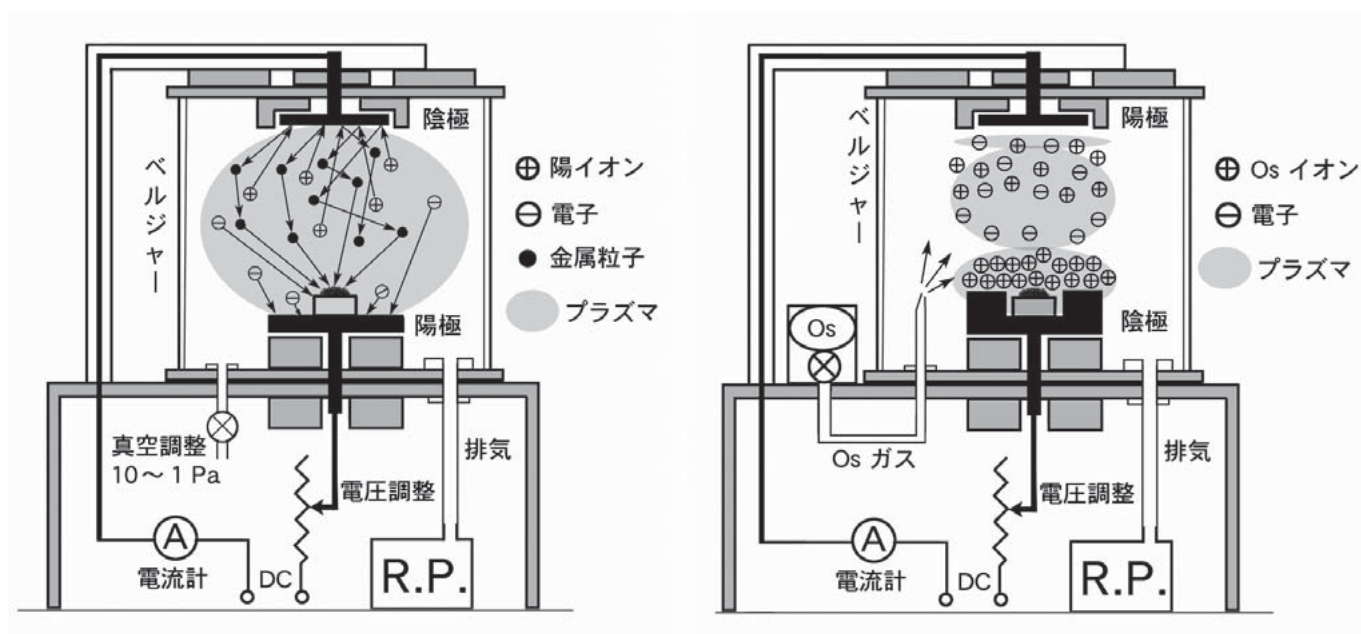


図15 金属コーティング法の原理
左：イオンスパッタコーティングの原理。 右：CVD法の原理。

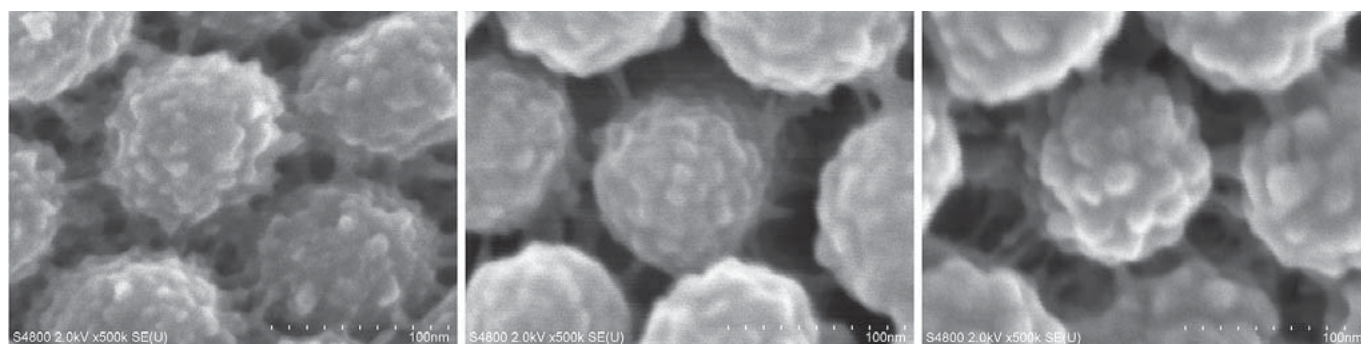


図16 オスミウムコーティング(CVD法)のコーティング量による小腸微絨毛表面の形状変化
グルタルオスミウム二重固定—オスミウム—タンニン酸—オスミウム— α -ブチル凍結乾燥の後、オスミウムコーティング。
左：1 sec 中：2 sec 右：5 sec

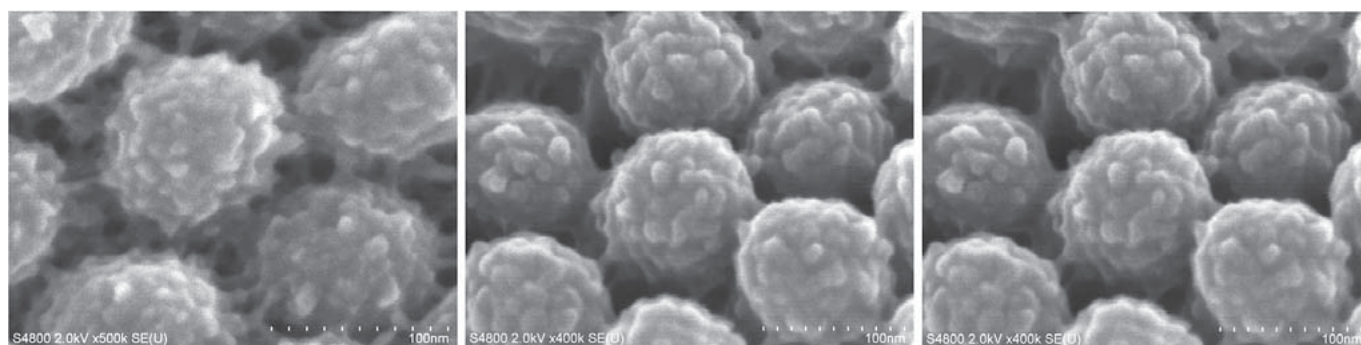


図17 タンニン-オスミウムによる導電染色の回数による小腸微絨毛表面の形状変化
グルタルオスミウム二重固定の後、導電処理。
左：1回(OTO)処理。 中：2回(OTOTO)処理。 右：3回(OTOTOTO)処理。

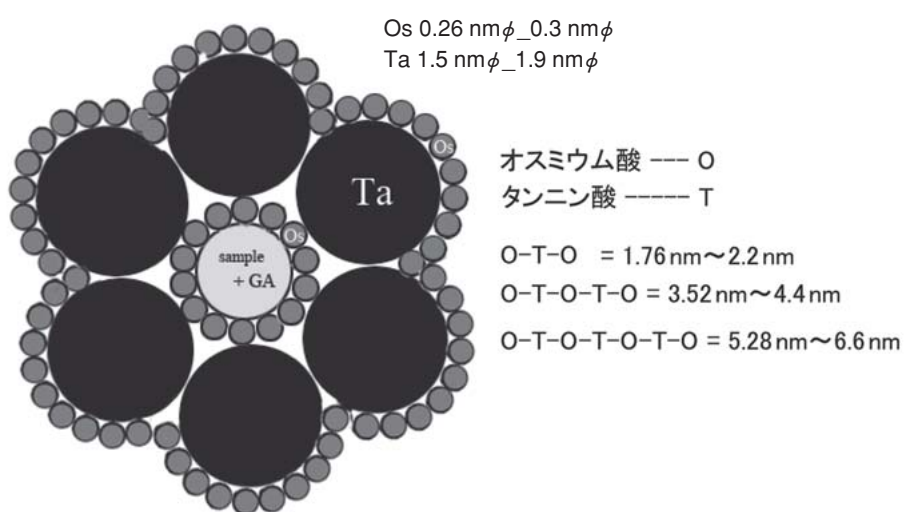


図18 オスミウム・タンニン酸による導電染色の影響
オスミウムは0.26~0.3 nmφでタンニン酸は1.5~1.9 nmφの大きさがあり
一度のOTO導電処理にて1.76 nm~2.2 nmφのコート膜が試料表面を覆う。

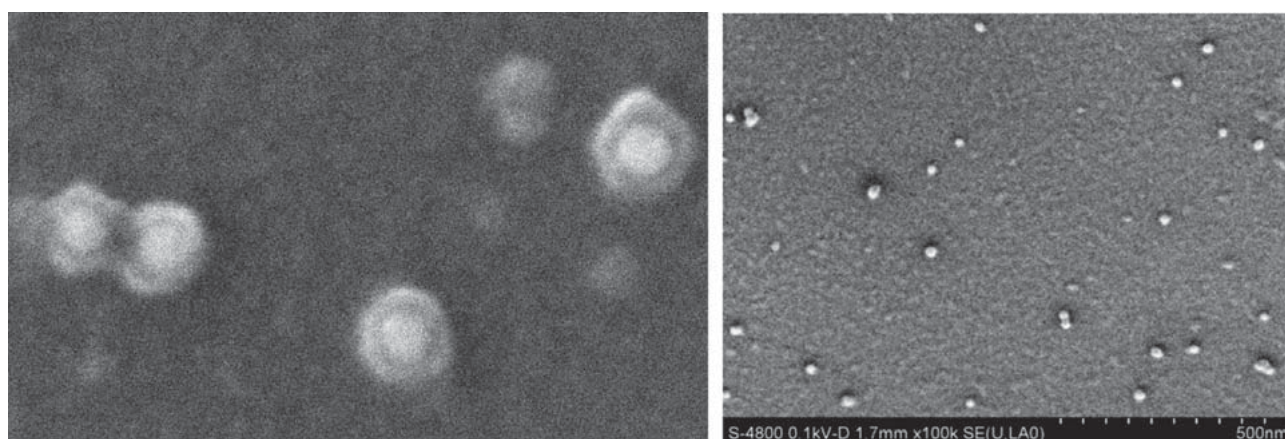


図19 カーボンコート状の支持膜上の15 nm金粒子標識IgGの低加速電圧SEM観察
左：低加速電圧(2 kV)によるSEM像では中央に15 nmの金粒子とその周囲に3~4 個付着するIgG分子が見える。
右：低加速電圧(100 V)においても100,000倍のSEM像が明瞭に得られる。

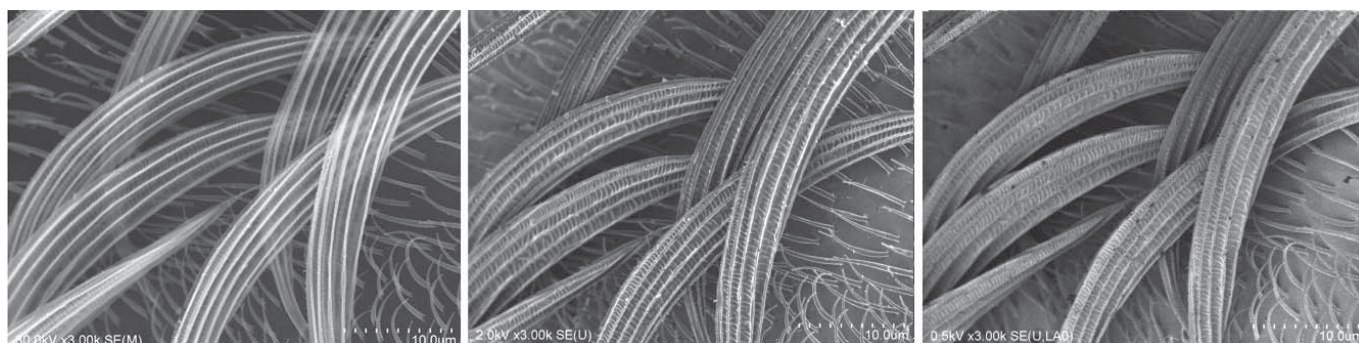


図20 鱗粉観察における加速電圧に依存する二次電子発生部位の比較
 左：加速電圧30 kVでは下にある鱗粉が透けて見えている。
 中：加速電圧2 kVでは標本が透けることはないがエッジの輝度が高い。
 右：加速電圧500 Vではごく表面の構造が描画され、試料表面にチャージアップを認めない。



図21 焦点深度の差によるSEM像の比較
 左：WD15 mm，絞り大，では焦点深度が浅く焦点位置以外のぼけが大きい。
 右：WD30 mm，絞り小，では焦点深度が深く全体に焦点が大きくずれない。

6. SEM観察条件

SEM観察においても正しい像解釈を妨げる因子が数多く潜んでいます。加速電圧，ビーム電流，コンデンサ，作動距離などがあります。基本的にはSEM像の描画原理を理解することによって，最も適した条件で観察することができます。

1) 加速電圧

近年，電界放射型電子銃を備えた低加速電圧でもノイズの少ない高分解能像を観察できる装置が増えました。その効果によって，帯電処理を軽減でき分子の観察などの高分解能観察に対応できるようになっています(図19)。また，特に生物試料の高加速電圧観察では試料表面の形態情報が得られず，低加速電圧による観察が正確な形態情報をもたらします(図20)。

2) 焦点深度

焦点深度は対物絞りと作動距離の双方によって決定され，絞り径が小さいほど，また，作動距離が長いほどSEM像の焦点深度が大きく(深く)なります。焦点深度はSEM像では立体感に影響し，焦点深度が浅くなると立体感が強調され，焦点深度が深くなると立体感が減少します(図21)。

7. あとがき

SEMによる試料観察においては，ほぼ全ての行程に像解釈に関わるアーティファクトが影響を与えています。本稿ではその一部を記載しました。

日立高速液体クロマトグラフ Chromaster 5000シリーズ反応LCシステムの紹介

Introduction to Post Column Derivatization System of
High Performance Liquid Chromatograph Chromaster 5000

豊崎 耕作* 河原井 雅子* 石川 昌子** 蛭田 多美**

1. はじめに

日立高速液体クロマトグラフChromaster 5000シリーズ(以下、CM5000シリーズ)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高速液体クロマトグラフである。

本稿では、CM5000シリーズの応用例として、ポストカラム法を採用した反応LCシステム(図1)について紹介する。ポストカラム法は、目的成分をカラムで分離した成分を目的成分に合わせた反応試薬と、オンラインで誘導体化させることにより、目的成分のみを検出し選択性の高い分析が可能となる。

今回、有機酸分析システム(プロモチモールブルー(BTB法))およびアミノ酸分析システム(ニンヒドリン法(NIN法)、*o*-フタルアルデヒド法(OPA法))の特長と測定例について紹介する。

2. 5510反応ユニット

5510反応ユニット(図2)は、反応コイルカセット方式とし、フロントアクセスにより交換作業が容易になるよ

うにした。また、様々なアプリケーションに対応するために、反応コイルはフッ素樹脂系チューブに対応し、最大20 mまで対応可能であり、50~150℃の範囲で温度制御を可能とした。

また、アミノ酸(NIN法)分析システムへの対応などでは、反応試薬(ニンヒドリン)の酸化による劣化防止を図るため、N₂ガスパージを行う。5510反応ユニットでは、N₂ガス制御ユニットを内蔵(オプション)し、システムの省スペース化を図った。

3. 反応システムの紹介

反応LCシステムの特長および測定例について、各分析システム毎に紹介する。

3.1 有機酸(BTB法)分析システム

本システムは、BTB法を採用しており、夾雑成分の多い試料中の有機酸を選択的に分析できることから高精度の分析が可能である。BTB法は反応液としてpH指示薬(BTB)の塩基性溶液を用い、カラムから溶出した有機酸の解離変化をpH指示薬の吸収スペクトル変化を検出(440 nm)する。そのため、UV検出法や電導



図1 日立高速液体クロマトグラフ アミノ酸(NIN法)分析システム外観



図2 5510反応ユニット写真

* 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
** 株式会社日立ハイテックコントロールシステムズ ナノテクノロジー設計本部 分析機器設計部 アプリケーショングループ

度検出法と比べ有機酸を選択的に分析できる方法であり、成分ごとの感度差が少ない安定した測定が可能である(図3)。特に低級脂肪酸(クエン酸, 酒石酸, リンゴ酸, コハク酸, 乳酸, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, ピログルタミン酸, イソ-酪酸, n-酪酸, イソ-吉草酸, n-吉草酸)の測定に適している。

図4に有機酸(BTB法)分析システム流路図, 図5に標準試料の測定例, 図6に実試料(トマトジュース)の測定例を示す。本法は色素成分やアミノ酸などの妨害を受けにくい信頼性の高い測定が可能である。

有機酸分析法

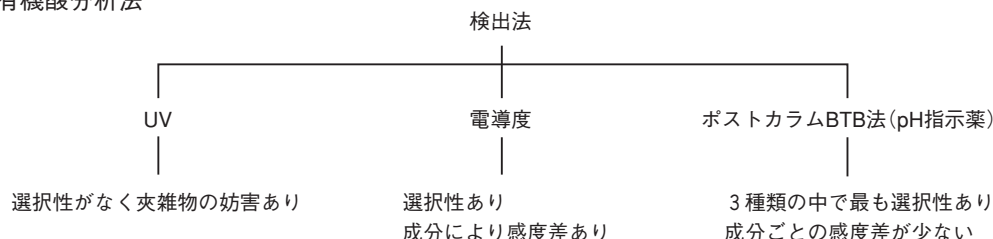


図3 有機酸分析法の概要

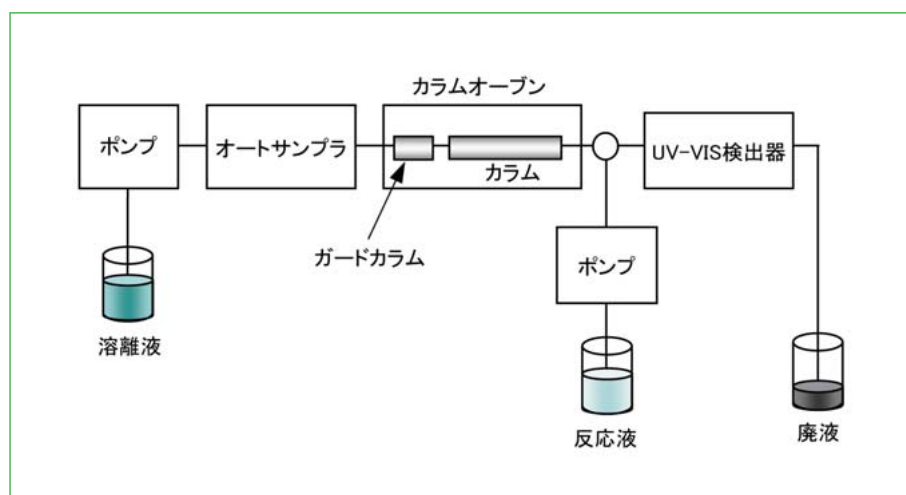
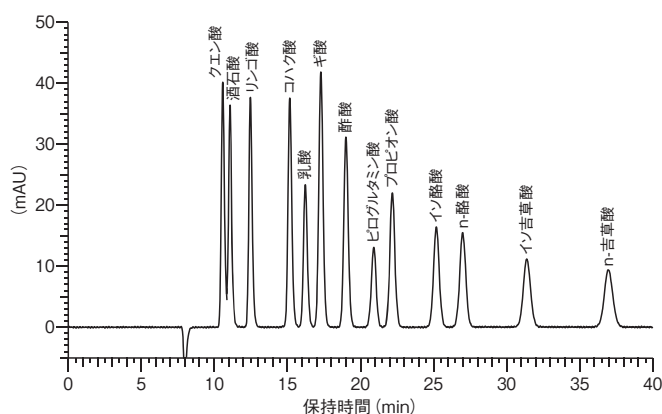


図4 有機酸(BTB法)分析システム流路図



測定条件

- カラム : GL-C610H-S 7.8 mm I.D. × 300 mm
- ガードカラム : GL-G-C600 4.0 mm I.D. × 10 mm
- 溶離液 : 3.0 mmol/L HClO₄ (過塩素酸)
- 流量 : 0.5 mL/min
- カラム温度 : 60 °C
- 反応液 : BTB溶液
- 反応液流量 : 0.6 mL/min
- 検出波長 : VIS 440 nm
- 注入量 : 10 μL

図5 標準試料の測定例

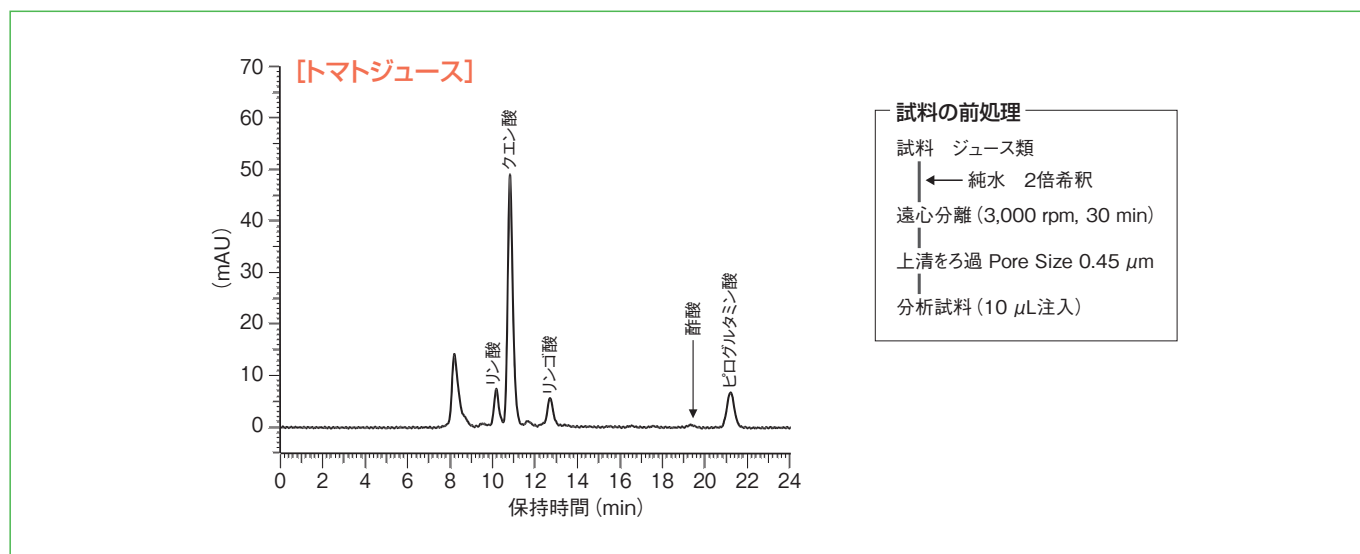


図6 実試料測定例

3.2 アミノ酸(NIN法)分析システム

本システムは、蛋白質・ペプチドのアミノ酸組成の分析、食品の味・栄養の評価や品質管理、栄養剤や輸液など医薬品として用いられる製品の品質管理など、幅広い分野で使用される。ほとんどのアミノ酸は、UV吸収が弱く、そのままでは高感度に測定できないため、アミノ酸成分を誘導体化して検出する(図7)。本システムは、アミノ酸をカラムによって分離したのち、ニンヒドリンと130℃の高温下で反応、誘導体化し、可視吸収(440 nm/570 nm)を検出する。また、本法は、L-8900形アミノ酸分析計を踏襲した分析手法を採用しており、高精度な分析が可能である。

新開発5420 UV-VIS検出器の2波長検出と高温状態における誘導体化反応および反応試薬の酸化防止のため、反応液にN₂ガスを充填させるN₂ガス制御ユニットを内蔵した5510反応ユニットと組み合わせることで、高精度な分析が可能である。

図9に標準試料の測定例、図10に本分析条件で測定した実試料(薄口醤油)の測定例を示す。本分析条件では、他のアミノ酸と同時にGABA(γ-アミノ酪酸)とOrn(オルニチン)も検出されている。

醤油などの発酵食品に含まれる微量のアミノ酸の網羅的測定には、遊離アミノ酸を対象とした別法も選択可能である。

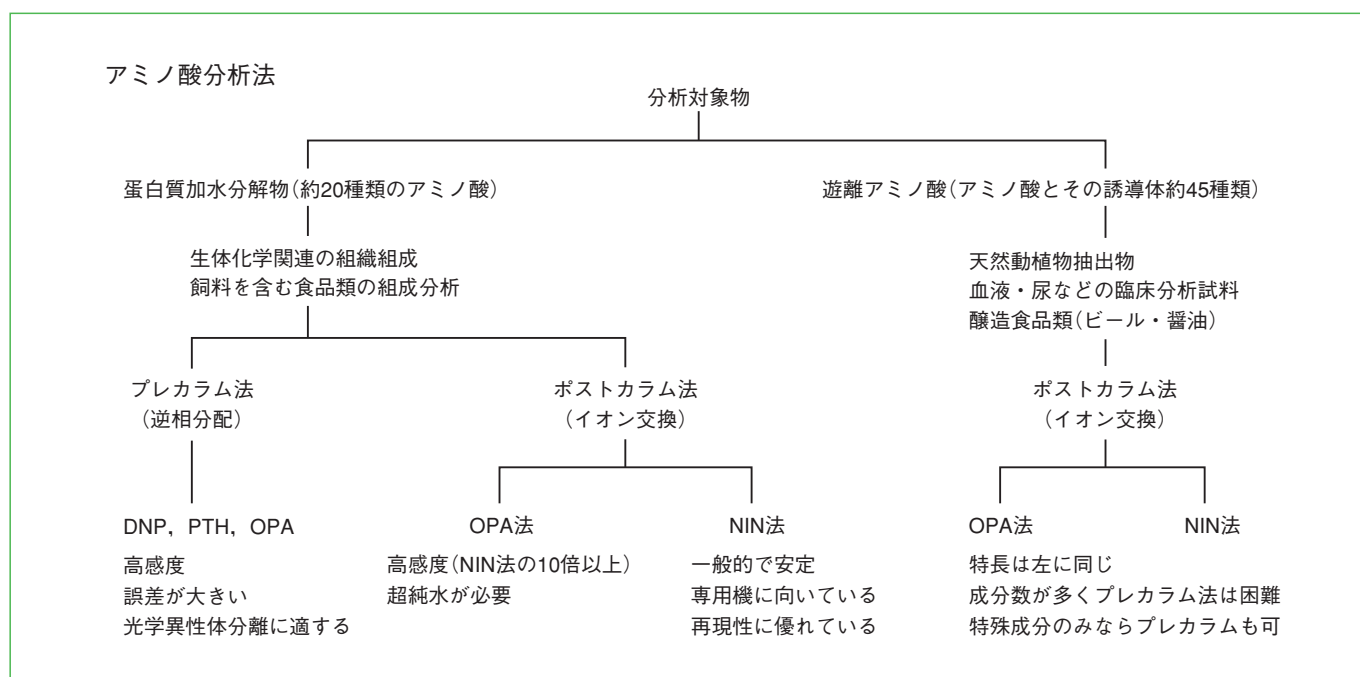


図7 アミノ酸分析法の概要

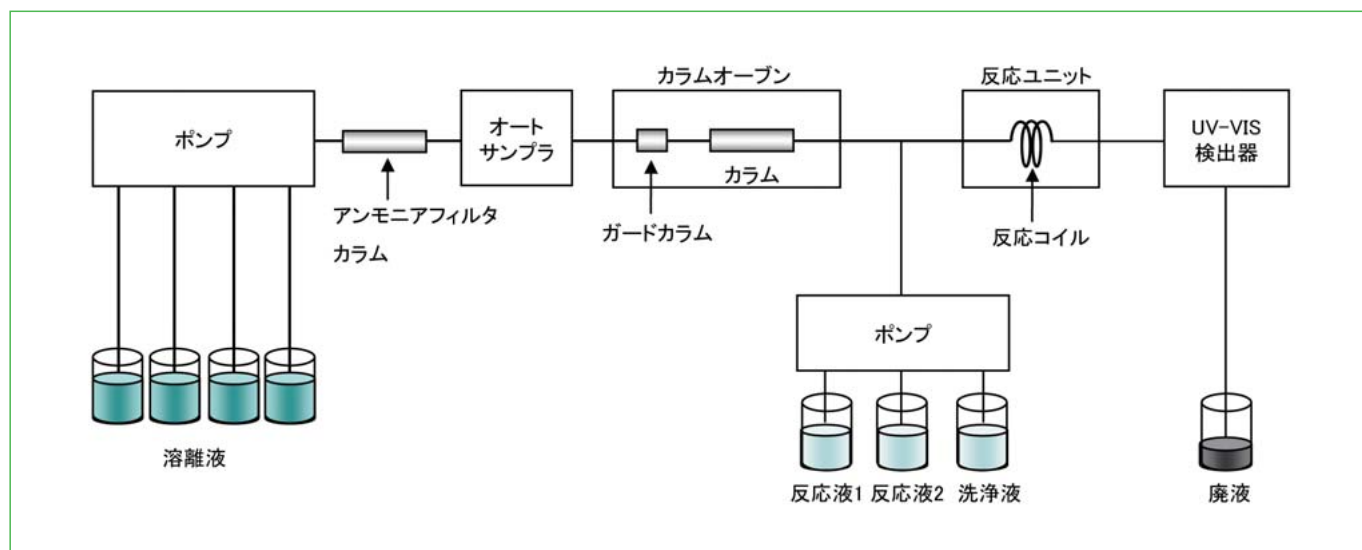


図8 アミノ酸(NIN法)分析システム流路図

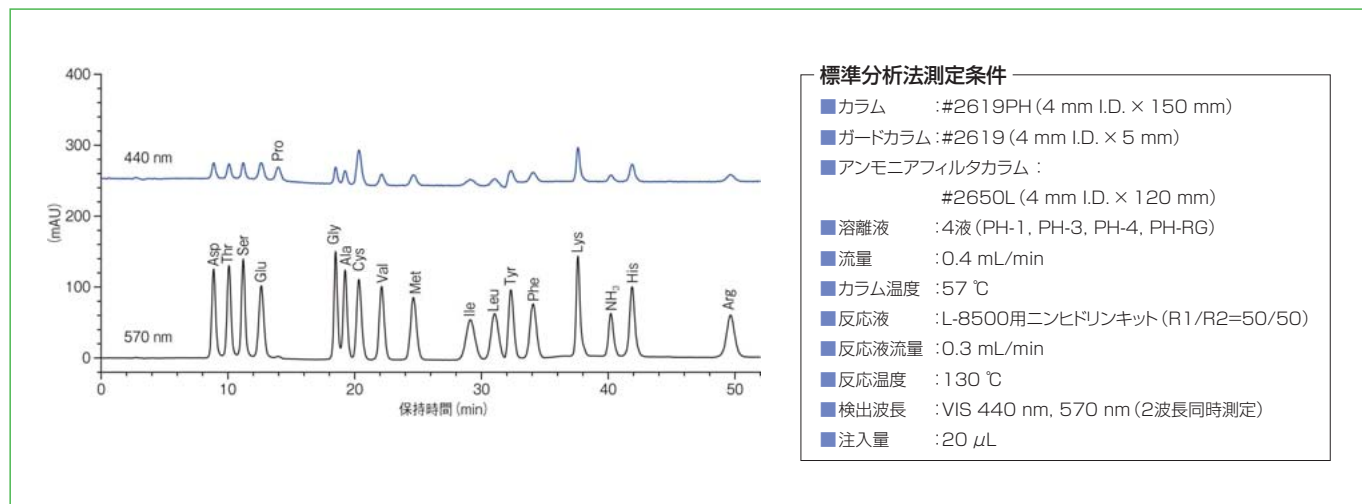


図9 標準試料測定例

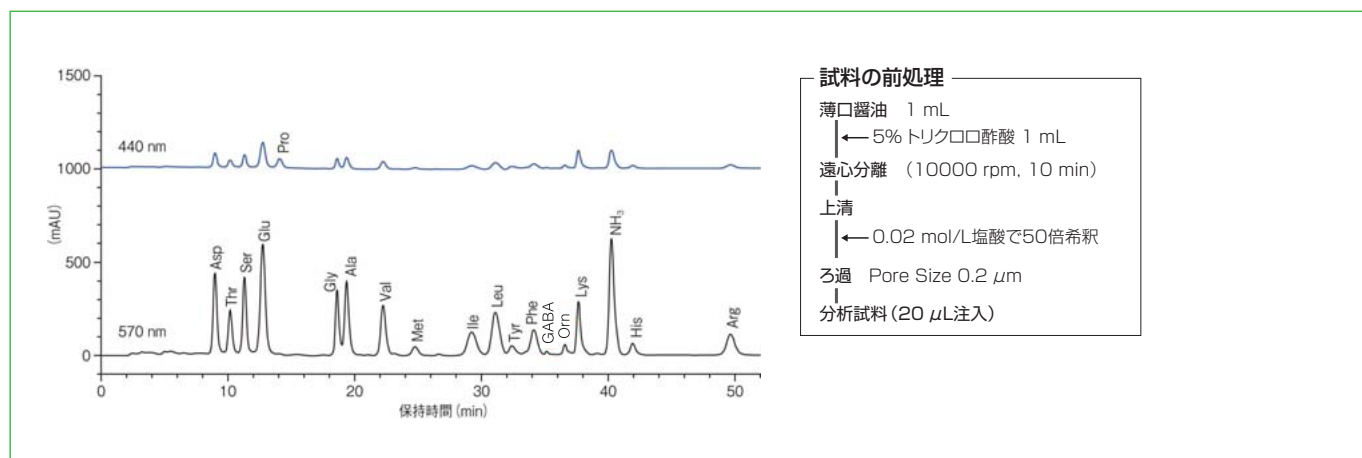


図10 実試料測定例(薄口醤油)

3.3 アミノ酸(OPA法)分析システム

本システムでは、アミノ酸をカラムによって分離したのち、*o*-フタルアルデヒドと反応させて誘導体化し、蛍光検出(励起波長340 nm, 蛍光波長450 nm)する。本分析法は、検出器に蛍光検出器を用いていることから、NIN法に比べ、約10倍程度の高感度分析が可能である。

本分析法では、溶離液送液用ポンプ、反応液送液ポ

ンプ×2台の合計3台のポンプを制御可能とし、クロマトデータ処理ステーション(以下、CDS)からのフルコントロールが可能である。

図12に標準試料の測定例、図13に実試料(BSA塩酸加水分解物)の測定例を示す。

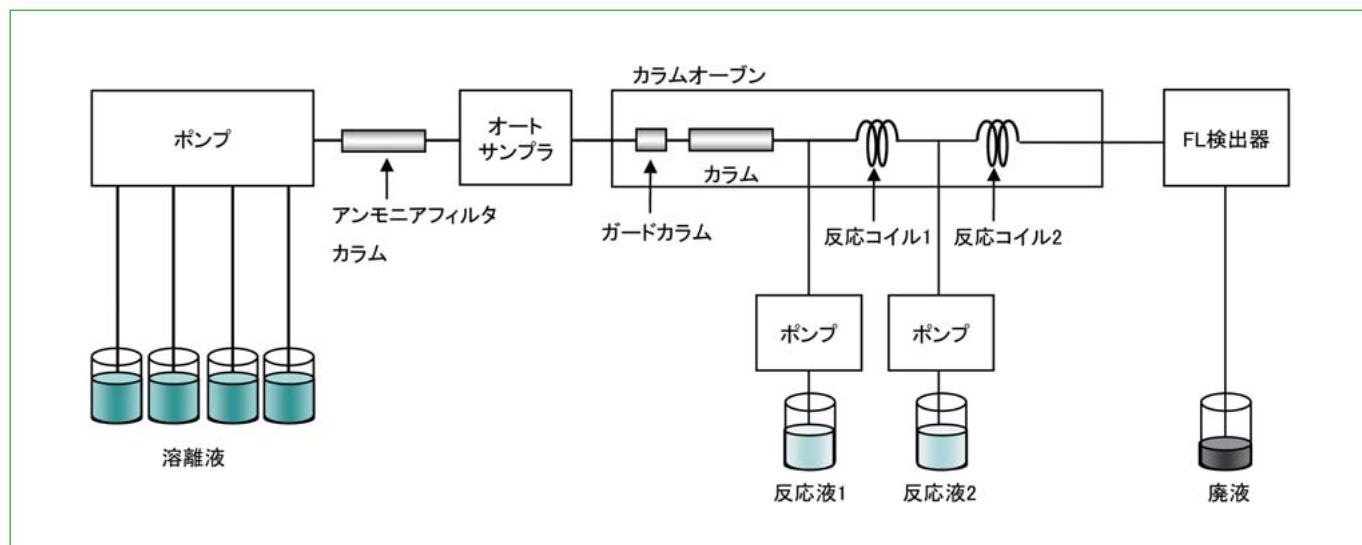


図11 アミノ酸(OPA法)分析システム流路図

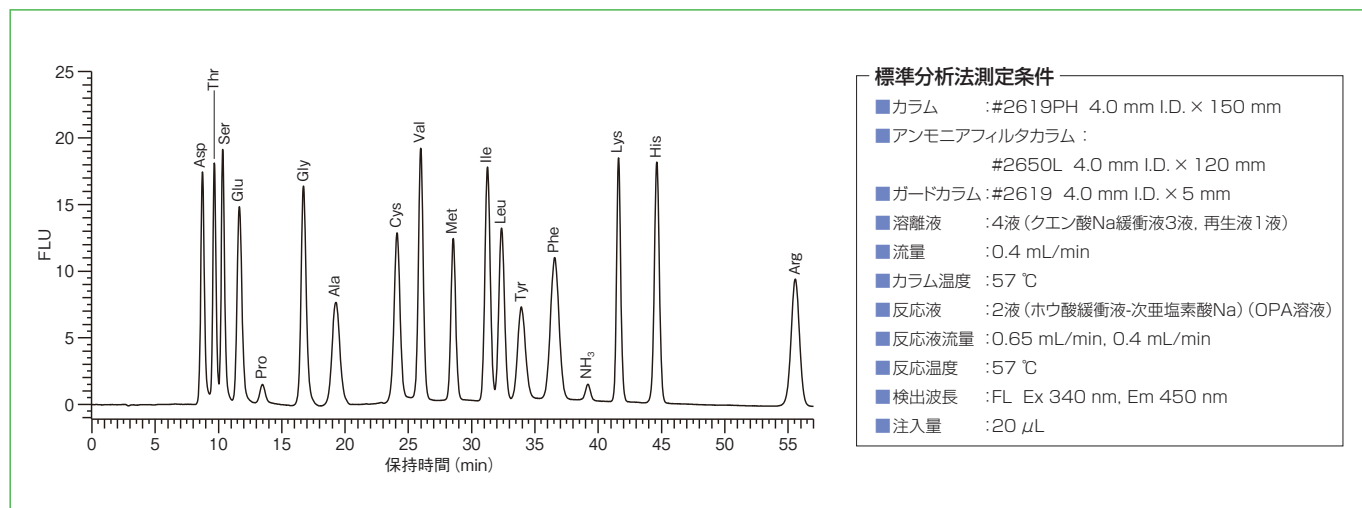


図12 標準試料測定例

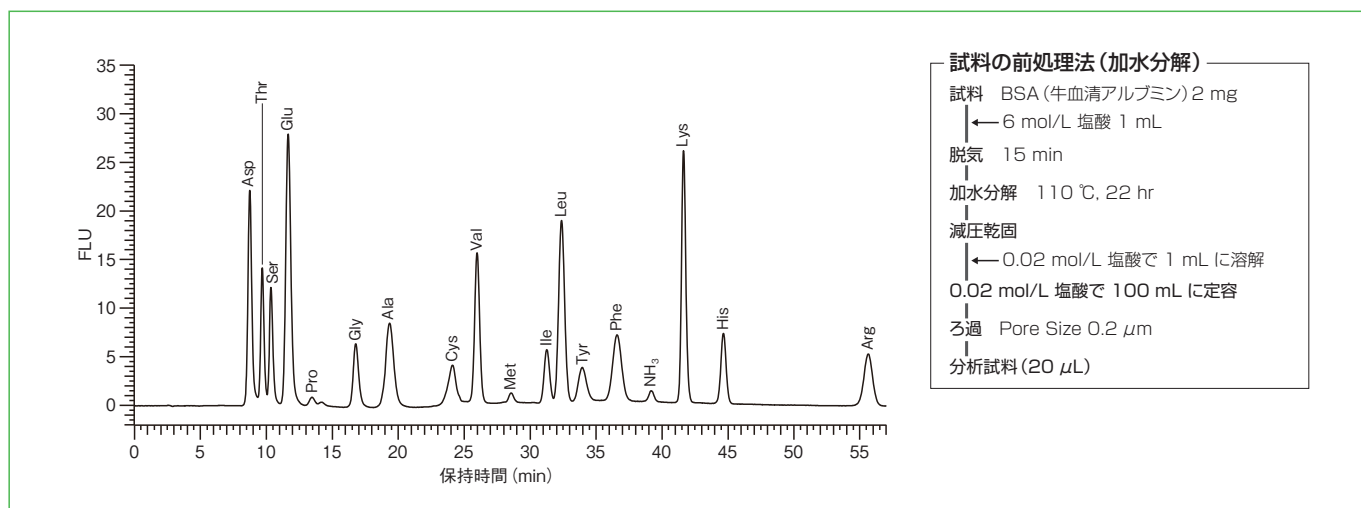


図13 実試料測定例 (BSA 塩酸加水分解物)

4. まとめ

反応LCシステムの特長を紹介した。アミノ酸分析システムでは、L-2000シリーズの課題であった分析条件の改良を図り、高分離分析を実現した。

今後も、CM5000シリーズ反応LCシステムを用いたポストカラム法の応用として、世の中のニーズに合わせた更なる高感度、高精度な分析手法を提案していく予定である。

参考文献

- 1) 丸岡幹太郎 他, 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 SI NEWS September 2011 Vol.54

HT7700のトータルシステムの紹介

Introduction of the HT7700-total system and its application

久保 貴* 近藤 正樹* 馬見新 秀一* 仲野 靖孝** 白井 学** 小林 弘幸*

1. はじめに

2010年、日立ハイテクは新形120 kV-TEM (TEM: Transmission electron microscopy)としてHT7700形透過型電子顕微鏡を開発した。本装置の特長は、ルーペの代わりにリアルタイムスクリーンカメラを使用し、顕微鏡本体と操作を統合することで通常の明るい部屋での観察が行えるようになったことである。そして2012年、HT7700は、オプションのラインナップに新しくSTEM (STEM: Scanning electron microscope) アタッチメントと高分解能ポールピースを加え、トータルシステムとしての汎用性を更に高めた。

本稿では、STEMアタッチメントと、高分解能ポールピースを搭載した高分解能TEMの特長と応用例を紹介する。

2. システムの概要と特長

HT7700の外観写真を図1に示す。外観はHT7700にSTEMアタッチメントと高分解能ポールピースを搭載したものである。また、表1にHT7700の装置構成と主な仕様を示す。尚、STEMと高分解能TEMはそれぞれ以下のような特長を有している。

(1) STEMの特長

TEMを用いた観察は、一般的に試料が厚くなるほど像がぼける。これは試料を透過した電子線を結像レンズで結像するため、レンズの色収差の影響を受けるためである。

これに対し、STEMは電子線を細く絞り、試料の微小領域を照射してそこから得られた信号を画素の輝度値に変換し、ある範囲内を走査することで画像を得る。このようにSTEMは結像にレンズ系を用いないため、色収差の影響を受けずに厚い試料であってもぼけの少ない画像を得ることができる。さらにHT7700のSTEMは、



図1 HT7700の外観写真

* 日立ハイテク株式会社 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 先端解析システム設計部
** 日立ハイテク株式会社 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ー

表1 HT7700の装置構成と主な仕様

	HT7700	
	標準構成	高分解能構成
電子源	Wフィラメント	LaB ₆ フィラメント
分解能		
TEM	0.204 nm (格子像)	0.144 nm (格子像)
STEM	1.5 nm (edge to edge)	1.5 nm (edge to edge)
加速電圧	40 ~ 120 kV (100 V step)	
倍率		
TEM		
LowMag	x50 ~ x1,000	x50 ~ x1,000
HC Zoom	x200 ~ x200,000	x200 ~ x300,000
HR Zoom	x4,000 ~ x600,000	x2,000 ~ x800,000
STEM		
LowMag	x100 ~ x2,000	x100 ~ x2,000
Normal	x1,000 ~ x100,000	x2,000 ~ x100,000
HighMag	x1,000 ~ x800,000	x2,000 ~ x800,000
カメラ長		
HC Diff	0.2 ~ 8 m	0.2 ~ 8 m
HC Diff	0.2 ~ 2 m	0.2 ~ 4 m
試料傾斜角度	±30° (高傾斜オプション：±70°)	±30° (高傾斜オプション：搭載不可)

画像解像度を最大5,120×3,840 pixelに設定して撮影を行えるため、高解像度で画像を撮影することができる。

また、STEMはX線分析装置と組み合わせて元素分析を行うことができる。これにより、試料を構成する元素の同定や分布を観察することができる。

(2) 高分解能TEMの特長

対物レンズのポールピース形状を改良し、低収差対物レンズを開発した。また、電子源にLaB₆フィラメントを採用し、さらなる分解能向上を図っている。これにより、加速電圧120 kVで格子分解能0.144 nm、粒子分解能0.33 nmを実現し、高分解能TEM観察が可能となっている。また、HRモード(HR：High Resolution)は

2,000～100,000倍がSA (SA：Selected area) 観察条件となっており、電子線回折を用いた分析を行うことができる。

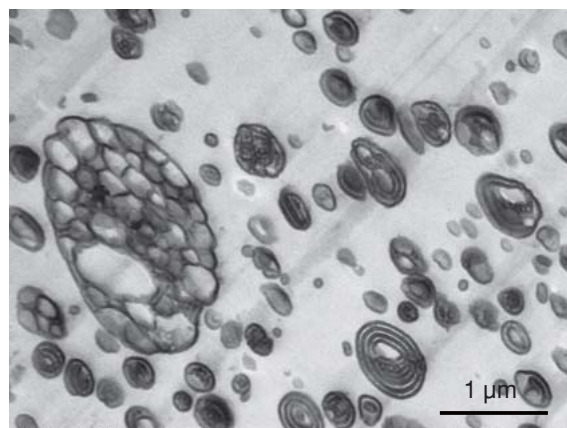
近年、バイオメディカル分野では、無染色試料の観察が行われている。無染色試料は像のコントラストを得にくいいため、よりコントラストを強調できる低加速電圧観察が有効である。しかし、一般的に低加速電圧観察では電子線の波長が長くなるため、分解能が低下してしまう。本システムは低収差対物レンズを搭載しているため、波長が長くなることによる分解能の低下を小さくすることができ、加速電圧を60 kVまで低下させてもパイロフィライトの格子像(格子間隔：0.45 nm)を明瞭に観察することができる。

3. 応用例

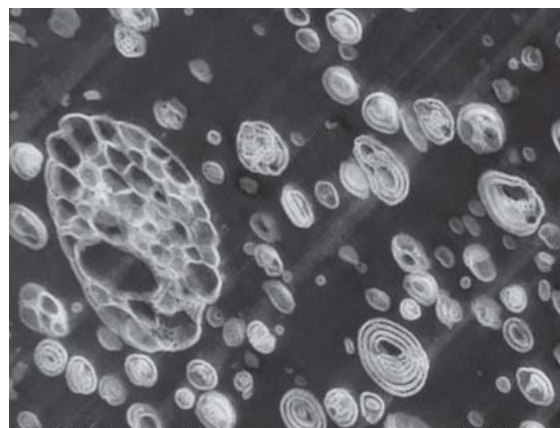
3.1 STEMの暗視野像による高コントラスト観察

図2は耐衝撃性ポリスチレン(HIPS)を加速電圧100 kV, Normalモード, 倍率30,000倍で撮影した明視野STEM像と暗視野STEM像である。明視野STEM像は透過電子線と低散乱角の電子線によって画像を得る

のに対し, 暗視野STEM像は上記電子線を除外し, 試料によって散乱された電子線によって画像を得ている。このため, 暗視野STEM像は明視野STEM像に比べ, 試料内部の微細構造を高コントラストで観察することができる。



a) 明視野STEM像



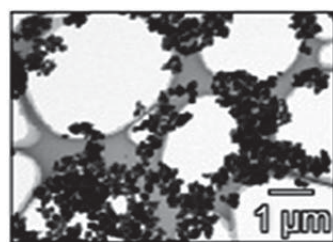
b) 暗視野STEM像

図2 耐衝撃性ポリスチレン(HIPS)

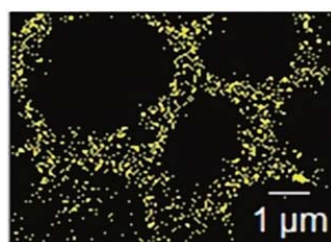
3.2 X線分析装置とSTEMによる元素分布観察

図3は酸化チタンの元素マッピング像である。加速電圧100 kV, Normalモード, 倍率20,000倍で撮影を行った。STEM像より, 酸化チタンはマイクログリット(カーボン)上に分布していることが観察できる。また, 各

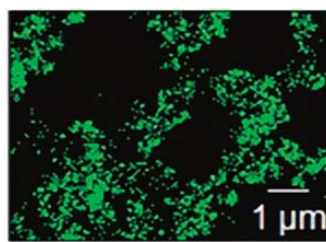
元素マッピング像より, 試料の構成元素であるチタンの分布状態, 酸素の分布状態, 及びメッシュの構成元素であるカーボンの分布状態を観察することができる。



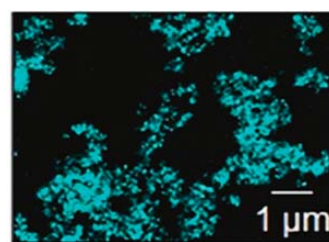
a) STEM像



b) C-K マッピング像



c) O-K マッピング像



d) Ti-K マッピング像

図3 酸化チタンの元素マッピング像

3.3 高分解能TEMによるパイロフィライトの格子像観察

図4は加速電圧を変化させて撮影したパイロフィライトの格子像である。倍率400,000倍, HRモードで撮影した。全ての加速電圧で約0.45 nmの格子間隔をもつ格子像が三方向明瞭に観察できていることがわかる。このように, 高分解能TEMは, 加速電圧120 kV

や100 kVのような高加速電圧観察では格子像をより明瞭に高コントラストで観察することができ, 加速電圧80 kVや60 kVのような低加速電圧観察であっても高分解能観察が可能であることがわかる。

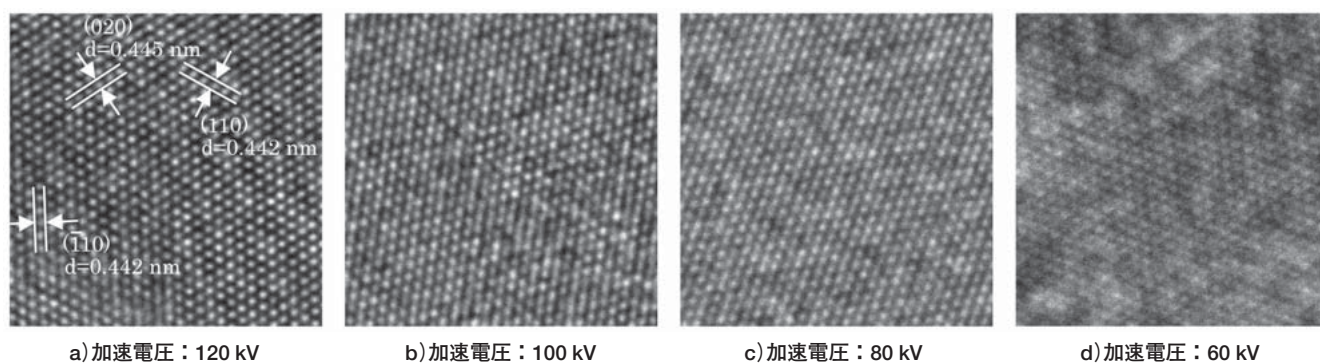


図4 パイロフィライトの格子像

4. まとめ

STEMアタッチメントと高分解能ホールピースを開発し、HT7700はトータルシステムとしての汎用性を高めた。STEMは分析や厚い試料の観察、高解像度の記録で特に有効となり、高分解能TEMは高倍率での形態観察や構造解析、低加速電圧での高分解能観察で有効となる。

これにより、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さらに多くの適用が期待される。

参考文献

- 1) 電子顕微鏡学会 編，電子顕微鏡の理論と応用 I 基礎理論と操作法，丸善株式会社



1. 顕微鏡学会北海道支部会(2011/12/10 北海道)

今野 充(日立ハイテクノロジーズ): 収差補正200 kV-SEMを用いた原子分解能SEM観察

2. 平成23年度「マテリアル電子線トモグラフィ研究部会」講演会(2011/12/16 東京都)

佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ): 三次元構造解析用ピンポイントFIB加工法

3. Symposium on "Frontier in Cell Biology Research"(2012/1/3~7 中国)

中澤 英子(日立ハイテクノロジーズ): Principle of EM and its application to biology and introduction of latest model HT7700.

4. APMC2012(2012/2/5~8 オーストラリア)

土屋 美樹(日立ハイテクノロジーズ)他: Development of a cryo- air protection holder for FIB/(S) TEM.

5. 環境制御型電子顕微鏡研究部会第2回研究会(2012/3/2 大阪府)

今野 充(日立ハイテクノロジーズ): 雰囲気遮断システムのLi電池材料解析への展開

6. 第36回日本顕微鏡学会関東支部講演会(2012/3/10 東京都)

森川 晃成(日立ハイテクノロジーズ)他: FIB-SEMを用いたリチウムイオン電池正極材の三次元構造解析への応用

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

7. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第28回学術講演会(2012/5/12~13 岩手県)

白井 学(日立ハイテクノロジーズ)他: 120 kV TEMによるリポソームのクライオトランスファー観察法

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ヒカリモ浮遊相の観察

8. 顕微鏡学会第68回学術講演会(2012/5/16~18 茨城県)

◆学術講演会発表

佐藤 貢(日立ハイテクノロジーズ): 走査電子顕微鏡による観察・記録

矢口 紀恵(日立ハイテクノロジーズ)他: 高湿度空気雰囲気下におけるPt/C触媒劣化過程の高分解能その場観察

鈴木 誠(日立ハイテクノロジーズ)他: 環境セルを用いた高分解能ETEM観察: 像形成モデルの構築と検証

稲田 博実(日立ハイテクノロジーズ)他: 球面収差補正器を搭載したSTEMによる原子分解能二次電子像

秋間 学尚(日立製作所)他: 球面収差補正STEMにおける強化学習法を用いた自動収差補正アルゴリズムの開発

森川 晃成(日立ハイテクノロジーズ)他：雰囲気遮断FIB/STEMシステムを用いた磁性材料の微細構造解析
 多持隆一郎(日立ハイテクノロジーズ)他：走査電子顕微鏡
 池田 正樹(日立製作所)他：ベクトル場トモグラフィー(1) — 真空中の3次元磁場再構築 —
 常田るり子(日立製作所)他：ベクトル場トモグラフィー(2) — 磁場再構築と2軸回転システム —
 猩々 智康(日立製作所)他：低加速SEMにおける像シャープネスとビーム径
 揚村 寿英(日立ハイテクノロジーズ)：SEMの検出系とアクセプタンス
 森下 英郎(日立製作所)他：低ペンタセン有機薄膜試料における低加速SEM像のコントラスト解析
 上村 理(日立製作所)他：低加速電子回折顕微鏡
 鈴木 誠(日立ハイテクノロジーズ)他：Monte Carlo法を用いたSEMのチャネリングコントラストシミュレーション
 土屋 美樹(日立ハイテクノロジーズ)他：含水液体試料のクライオFIB加工とSEM観察
 原田 研(日立製作所)：ツインフォーコー法
 原田 研(日立製作所)他：広視野ホログラフィー
 玉置 央和(日立製作所)他：接触電位差を利用した静電型位相板の開発
 小柏 剛(日立ハイテクノロジーズ)他：インレンズFE-SEMにおける結晶格子像の観察方法
 生頼 義久(日立ハイテクノロジーズ)他：30 kV STEMを用いた結晶格子像観察
 小竹 航(日立ハイテクノロジーズ)他：リアルタイムステレオSEMの実用化開発(第3報)
 佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ)他：収差補正原子分解能SEM観察における電子線ダメージの低減
 平山 陽一(日立製作所)他：STEMの球面収差補正器の開発と自動収差補正システムの確立
 西村 雅子(日立ハイテクノロジーズ)他：新型低真空観察用検出器の開発とその応用
 津野 夏規(日立製作所)他：パルス電子線照射法による絶縁材料の全電子放出率解析
 波多野治彦(日立ハイテクノロジーズ)他：イオン液体事前評価装置の開発
 寺田 尚平(日立製作所)他：透過電子顕微鏡用dual stage試料ホルダの開発と価数評価への応用
 塩野 正道(日立ハイテクノロジーズ)他：イオン液体を用いた微小甲殻類のSEM観察
 上野 敦史(日立ハイテクノロジーズ)他：Liイオン電池負極材へのイオンミリングへの適用
 設楽 宗史(日立ハイテクノロジーズ)他：イオンミリング法によるネオジム磁石の広領域断面作製

◆トピックス

設楽 宗史(日立ハイテクノロジーズ)他：イオンミリング法によるネオジム磁石の広領域断面作製

【要旨】ネオジム磁石の磁気特性は、組織構造や組成分布などに関係があり、SEMによる断面解析がその性能評価に用いられている。一般のSEM観察のための断面作製には機械研磨法が適用されるが、酸化による変質や研磨応力による剥離が発生する場合はブロードアルゴンイオンビームによるイオンミリング法が適用される。しかし、この方法においても結晶材料の場合は加工スジの発生がしばしば問

題となっていた。今回、我々は、断面及び平面ミリング処理が可能なIM4000形イオンミリング装置を用いて、ネオジム磁石の平滑断面作製法を検討した。図1はネオジム磁石断面の低真空反射電子像である。断面ミリング処理(a)では、磁石表層のクラックから加工スジ(▼)が発生している。その試料をIM4000内でスウィング動作させながら、平面ミリング処理した結果、加工スジが除去され、ネオジム

リッチ相(←)が明瞭に観察されている(b)。平面ミリング処理では、加工面に対して低角度でビームが照射されるため、断面の組成によるスパッタ収率差

が小さくなり、平滑な断面が作製されたと考えられる。以上のことから本手法は、ネオジム磁石の平滑な断面作製に有用であることが示された。

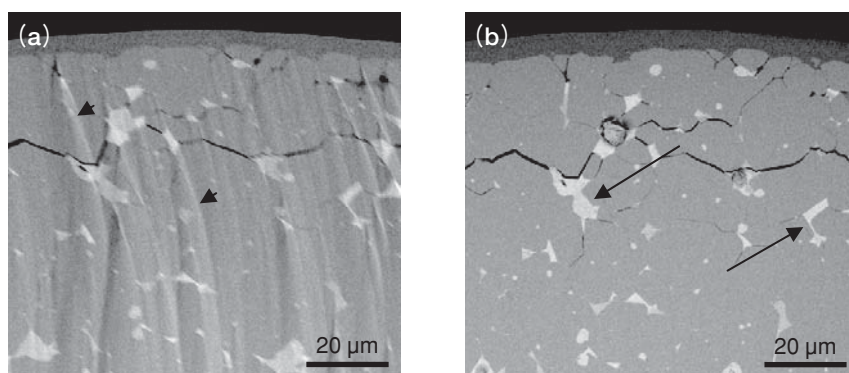


図1 ネオジム磁石断面のSEM観察結果

(a)断面ミリング処理(加速電圧6 kV, 加工時間4 hr)

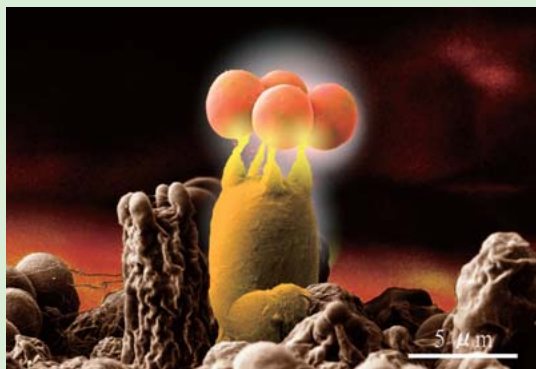
(b)断面ミリング後に平面ミリング処理

(加速電圧6 kV, 加工時間2 min, ビーム照射角度80°, スウィング加工)

観察装置：S-3400N, 観察条件：加速電圧5 kV, 撮影倍率500倍, 低真空反射電子像

写真コンクール

檀 紫(日立ハイテクノロジーズ)他：聖火リレートーチ
鈴木 裕也(日立ハイテクノロジーズ)他：マイクロ ハヤブサ



【作品名】聖火リレートーチ ～引き継がれる生命～

写真はブナシメジ(*Hypsizygus marmoreus*)の担子菌類子実体(キノコ)の傘の裏側部分をSEM観察したもので、中央の菌糸体上に4つの担子胞子が観察できる。この胞子から発芽し、菌糸を成長させ子実体をつくり、また胞子を飛ばし子孫を代々残していく。まるで、聖火リレーの炎のように、絶やすことなく、生命をつなげていくようだ。

撮影対象・条件

装置：SU8010

加速電圧：3 kV

観察倍率：5,000倍



【作品名】マイクロ ハヤブサ

FIB装置を用いて太陽電池パドル材料の結晶シリコンから作製した小惑星探査機「マイクロハヤブサ」である(約1/300,000スケール)。無事に地球へ帰還した「はやぶさ」と電顕のマイクロ世界に思いを馳せ、この「マイクロハヤブサ」を作製した。

撮影対象・条件

加工装置：FB2200(加速電圧：40 kV)

観察装置：SU8040(加速電圧：5 kV, 4,000倍)

1. 第17回LCテクノプラザ(2012/1/26~27 神奈川県)

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ)他：抗体糖ペプチドのプロファイリング

2. 日本薬学会第132年会(2012/3/28~31 北海道)

井上 陽子(日立ハイテクノロジーズ)他：バイオ医療品等製造における培養液中のアミノ酸分析

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ)他：バイオ医療品のHPLCによるペプチド・糖ペプチドのプロファイリング

3. 第72回分析化学討論会(2012/5/19~20 鹿児島県)

三浦 和代(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：原子吸光法による環境・食品試料中セシウムの分析

【要旨】電気加熱原子吸光光度計によりセシウムを分析する際、1,000 mg/Lのタングステン酸カリウム溶液を化学修飾剤として試料へ添加することにより、約2倍感度が向上することを見出した。水道水、海水、土壌などの試料の分析に応用し、回収率を求めたところ100±10%の良好な回収率が得られた。なお、電気加熱炉としては、プラットフォーム形を用いた。

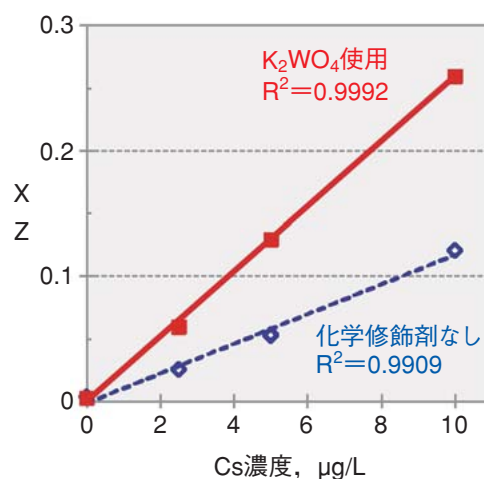


図 Csの検量線の比較
 化学修飾剤：1,000 mg/L K_2WO_4 , 10 μ L
 試料注入量：20 μ L
 原子化時ガス流量：0 mL/分

山本 和子(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：ジルコニウム担持ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂固相カラムを用いるヒ素の固相抽出

【要旨】ポリアミノポリカルボン酸(PAPC)型キレート樹脂でヒ素を固相抽出する場合、キレート捕捉のための最適pH領域が狭い、あるいは捕捉力が弱いといった問題がある。今回PAPC型キレート樹脂に金属を担持することでヒ素を捕捉濃縮することを試みた。その結果、ジルコニウムを担持したカラムでは亜ヒ酸、ヒ酸とも90 %以上の回収率を得たが、鉄

を担持したカラムでは50 %程度しか回収できなかった。そこで、ジルコニウム担持カラムにて詳細な抽出条件を検討した。pHによる捕捉特性を確認するため、pH 5.0とpH 9.4に調製した亜ヒ酸、ヒ酸それぞれヒ素10 µg/L含む溶液をカラムに通液したところ、pH 9.4では亜ヒ酸、ヒ酸とも90 %以上の回収率を得たが、pH 5.0では50-60 %程度の回収率となった。

蝦名 毅(JX日鉱日石金属)他：HPLC—水素化物発生—原子吸光光度法を用いたアンチモンの形態分析

堀込 純(日立ハイテクノロジーズ)他：分光蛍光光度計による溶液試料の高濃度領域における蛍光特性評価方法の検討 ～第2報～

小原 賢信(日立製作所)他：液体電極プラズマと原子発光現象のパラメータ依存性

4. 第251回液体クロマトグラフィー研究懇談会(2012/5/28 東京都)

鈴木 裕志(日立ハイテクノロジーズ)他：装置をより良く使う ～装置の限界や故障と思う前に～

5. 日本アミノ酸学会主催第3回産官学連携シンポジウム(2012/6/4 東京都)

宝泉 雄介(日立ハイテクノロジーズ)他：高速アミノ酸分析計によるバイオ医薬品分野向けアプリケーション

6. Korean Society of Food Science and Technology(2012/6/14 韓国)

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ)他：Problems and solutions in High sensitive analysis using HPLC

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。

ここでご紹介するアプリケーションデータの詳細は下記のURLにアドレスいただき、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/>

題目	HT7700透過電子顕微鏡の材料分野への応用(1) カーボンナノ材料の高解像度観察 Application of HT7700 Transmission Electron Microscope to Material Science Fields. High Resolution Observation of Carbon Nano-Materials.		
機種	透過電子顕微鏡 HT7700 Transmission Electron Microscope HT7700		
シートNo	TEM No.139	発行日	2012年 2 月
要約	<p>ナノテクノロジー分野では、ナノレベルで材料合成することで新しい特性が現れることが知られています。特にカーボン系材料は、サッカーボール形状のフラーレン¹⁾、単層カーボンシートのグラフェン²⁾、筒状のカーボンナノチューブ³⁾で異なる特性を持っています。これら材料の微細構造観察では、透過電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope: TEM)を用いることが多いですが、カーボン系材料は高エネルギーに加速された電子線によって破壊されやすい試料の一つです。今回、120 kV汎用型TEM HT7700(図1)を用いて、多層カーボンナノチューブ(Multi Wall NanoTube: MWNT)と燃料電池の水素貯蔵材として注目されているカーボンナノチューブの一種であるカーボンナノホーンの観察を試みましたので、以下に紹介します。</p>		

題目	フレイム原子吸光法による肥料の成分分析(2) ～汚泥肥料中の主要成分および有害成分の測定～ Determination of Main and Toxic Component in Sludge Fertilizer by Flame 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.127	発行日	2012年 3 月
要約	<p>汚泥肥料とは、排水処理施設やし尿処理施設などから生じる汚泥を原料とした肥料です。汚泥は窒素やリンなどの肥料成分を多く含み、価格が安いことなどから、汚泥肥料の需要は年々増加しています。その一方、汚泥は重金属などの有害成分を含有する恐れが大きく、有害成分の土壌への蓄積や作物への吸収が懸念されます。そのため汚泥肥料は、表1に示すように国の規格によって有害成分の含有最大許容量が定められ厳しく管理されています。また、カリや銅など主要成分の含有量を表示する義務があるため、主要成分・有害成分の測定は欠かすことができません。ここでは、汚泥肥料の主要成分および有害成分のうちフレイム原子吸光法での測定が定められているカリ全量(T-K₂O)、石灰全量(T-CaO)、銅全量(T-Cu)、亜鉛全量(T-Zn)、カドミウム(Cd)、ニッケル(Ni)、クロム(Cr)および鉛(Pb)の全8成分の測定例を紹介します。</p>		

トピックス
TOPICSIEEEマイルストーン認定と
日立ハイテkmミュージアムのオープン

■電界放出形走査電子顕微鏡がIEEEマイルストーンに認定

(株)日立製作所との連名にて、「電界放出形電子顕微鏡(FE-SEM)」の実用化に対する功績が、「IEEEマイルストーン」に認定されました。IEEEマイルストーンは、電気・電子・情報・通信分野の世界最大の学会であるIEEEが、数々の達成されたイノベーションの中で、開発から25年以上が経過し、社会や産業の発展に多大な貢献をしたと認定される製品や技術に贈られるもので、国内で16件目となります。



電界放出形電子顕微鏡HFS-2形

日立電界放出形走査電子顕微鏡「HFS-2形」は1972年、故アルバート・クリュー氏(元シカゴ大学)開発のFE電子源を共同開発し実用化した世界初の商用FE-SEMです。本技術は幅広い分野に応用され、半導体製造プロセス管理に用いられる測長SEMの製品化や、世界初のエイズウィルスのSEM像撮影に成功するなど、医療、バイオ分野の発展にも寄与しました。また、FE電子銃搭載の透過電子顕微鏡による電子線ホログラフィーによりアハラノフ・ボーム効果を実証し、科学技術の検証や発展にも大きく貢献してきました。



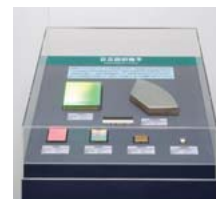
■東京ソリューションラボ内に日立ハイテkmミュージアムを開設

東京ソリューションラボ(かながわサイエンスパーク)内に、「IEEEマイルストーン」認定銘板(レプリカ)と世界初のFE-SEMの商用機「HFS-2形」を展示した「日立ハイテkmミュージアム」をオープンしました。ミュージアムにはこのほか、社会や産業の発展に寄与したエポックメイキングな自社製品も合わせて展示しています。ラボに設置された最新製品を比べながら、技術の発展の様子を体感していただけます。

ミュージアム展示品とその簡単な説明を表1に示します。今後は、さらに世界のヒトゲノム計画を大きく進捗させたDNAシーケンサー装置、モノ作りに関連した「技能五輪」に関する展示なども予定しています。



日立139形分光光度計



日立回折格子

表1 展示品の紹介

製品名	年	製品紹介
日立回折格子	1950年代	日立光学分析装置の高性能を支えてきたコア光学部品。光の回折現象を利用し分光します。日立独自の超精密加工装置ルーリングエンジンにより1 mmあたり3,600本のナノメートルオーダーの溝を作製することができます。
日立139形分光光度計	1962	日立分光光度計の原点となる製品。日立回折格子を分光器に搭載し、種々の付属装置を設置して原子吸光分析法や分光蛍光分析法などへの応用を可能としました。汎用性の高い装置として好評を博し、8,000台を出荷しました。
400形日立自動分析装置	1968	国産初の血液自動分析装置。日本臨床病理学会で発表され、6年間に241台を出荷しました。この製品から臨床検査自動化の幕明けがもたらされました。
電界放出形電子顕微鏡HFS-2形	1972	トピックス本文を参照ください。
705形日立自動分析装置	1980	マイコン、全反応過程測光方式を採用した血液自動分析装置で発売後3,450台生産され、その内約2,100台が欧米各国に輸出され、世界トップシェアの先駆けになりました。今日の血液自動分析装置の基礎を築きました。

新製品紹介

NEW PRODUCTS

日立走査電子顕微鏡 Natural-SEM SU3500

新設計電子光学系と信号処理技術により、高コントラスト画像表示が可能な日立走査電子顕微鏡SU3500を開発しました。これにより、試料表面の微細形状観察や試料ダメージの軽減に有効な低加速電圧領域での分解能を向上することができました。また、試料前処理が不要な低真空観察においては、試料室の真空度範囲を6~650 Paに拡張し、新型低真空観察用検出器(UVD)*¹を用いることにより、鮮明な像観察が可能となりました。さらに、「ライブステレオ観察機能」*¹を搭載することにより、リアルタイムで迫力ある3D-SEM像を観察することができます。

【主な仕様】

二次電子像分解能：

3.0 nm (加速電圧30 kV, 高真空モード)

7.0 nm (加速電圧3 kV, 高真空モード)

反射電子像分解能：

4.0 nm (加速電圧30 kV, 低真空モード)

10.0 nm (加速電圧5 kV, 高真空モード)

倍 率：×5~×300,000 (写真倍率*²)*¹ オプション*² 127 mm×95 mm (4×5写真サイズ)を表示サイズとして倍率を規定

図1 SU3500形走査電子顕微鏡の外観

新製品紹介

NEW PRODUCTS

IM4000形イオンミリング装置に新機能追加

IM4000形イオンミリング装置で要望の多かった冷却ユニット*及び雰囲気遮断試料ホルダユニット**を開発しました。

冷却ユニットは、図1に示すように、試料冷却用温度コントローラ、液体窒素タンク等から構成され、液体窒素による冷却により、イオンミリング処理時に発生する試料の熱ダメージを低減させることができ、高分子材料等への効果が期待できます。雰囲気遮断試料ホルダユニットは、キャップ式試料密閉構造を持たせ、図2に示すキャップ着脱機構部により真空中でキャップを着脱できます。この構造により、試料を大気に暴露させる

ことなくイオンミリング装置での加工からSEM観察まで可能となり、LiB材料分野への応用が期待できます。

(*,**：オプション)

【主な仕様】

冷却ユニット

冷却方式：液体窒素冷却

冷却温度：室温-30℃以下

最大試料搭載サイズ：

W 20 mm×D 12 mm×H 7 mm

雰囲気遮断ホルダユニット

最大試料搭載サイズ：W 5 mm×D 5 mm×H 2 mm

マスクからの試料突出量：100 μm固定



図1 冷却ユニットを搭載したIM4000の外観



図2 雰囲気遮断試料ホルダユニットを搭載したIM4000の外観

新製品紹介

NEW PRODUCTS

日立UH5300形ダブルビーム分光光度計

新時代をイメージした分光光度計，日立UH5300形を2012年JASIS（旧分析展）にて発表します。クラス最高レベルの装置性能に加え，iPad®*1を用いたタッチパネルによる卓越した操作性をぜひご体感ください。また，これまでにはない光源の7年間の長期保証*2の実現や，測定時のみパルス発光する光源の制御により従来機*3より低消費電力を実現し，環境性能を向上させました。まさに，分光光度計の新時代は，日立UH5300形から始まります。

【主な特長】

- (1) 先進のタブレット端末であるiPadを用い，ワイヤレスで装置の操作が可能です。
- (2) 光源の7年間の長期保証を実現し，基本性能はキセノンフラッシュランプ採用機のクラス最高レベル*4を実現しました。
- (3) 自動6セルターレットを標準装備し，試料室ふたの開閉により測定をスタートすることができるインテリジェントスタート機能により，スマートな操作性と測定時間の短縮を実現しました。
- (4) UH5300形はご購入後パソコンのように，お客様ご自身で装置のセットアップを行うことができます。

*1 iPad®は米国およびその他の国々で登録されたApple Inc.の商標です。

*2 光源の7年間保証は，ユーザー登録が必要です。

*3 U-2900形分光光度計

*4 日立ハイテクノロジーズ調査 日本国内販売機種2012年6月現在



新製品紹介

NEW PRODUCTS

日立偏光ゼーマン原子吸光光度計ZA3000シリーズ

ZA3000シリーズはユーザーのニーズに応え、Z-2010シリーズの偏光ゼーマン補正とデュアル検知方式による高精度・高感度分析という基本性能を踏襲。これまでにない独自の新しい技術を採用し、機能性・信頼性を向上させた新しい元素分析装置です。

【主な特長】

(1) フレーム分析，グラファイトファーン分析とも直流磁場を用いた偏光ゼーマン補正法に加えデュアル検知方式を採用。信頼性の高いデータを得ることが可能です。

(2) グラファイトファーン分析においてツインインジェクションテクノロジーを新しく開発。専用キュベットを用いることによりさらなる高精度分析が可能になりました。

(3) グラファイトファーン分析において自動突沸検出機能を搭載し，乾燥ステージの試料突沸を自動に検出することが可能になりました。温度プログラム自動作成機能と組み合わせて使うことにより突沸の起こらない分析条件を容易に作成できます。

(4) キュベットメモリ抑制機能やオートサンプリングの分注高速化，フレーム点火ボタンの誤操作防止機構など新機能を搭載することにより信頼性・操作性・安全性が一層向上しました。



お客様の分析をサポートする日立ハイテク会員制サイト「S.I.navi (エスアイナビ)」

「S.I.navi」は、日立ハイテク取り扱い分析機器に関する会員制サイトです。
お客様の知りたいこと、日々の業務に役立つ情報を
「S.I.navi」がサポートします。

このような方にお勧めです!

- 分析機器をお使いの方
- 分析機器のご購入を検討される方
- 分析でお困りの方

S.I.naviの主な内容

製品情報

以下のようなコンテンツが閲覧可能です。

- ・製品の特長や仕様
- ・カタログ (PDF)
- ・価格表

ご使用製品登録者限定情報

- ・取扱説明書 (PDF)
- ・メンテナンス/トラブル解決情報

アプリケーションデータ

- 「約4,500件」のデータを掲載。
- 2つの検索方法から、ご活用ください。
- ・フリーワード検索
- ・一覧からプルダウンでの絞り込み

展示会・セミナー

申し込みはボタン1クリックで完了
します。

更新情報は、
メールマガジン (2回/月)
でもご案内しています。



*■は、ご使用製品をご登録いた
だいた方への限定情報です。

注目!

もっと知りたい! 活用したい!

弊社主要製品をさらにご活用いた
だいたための情報を集めました。

テクニカルサポート情報

- ・技術解説
製品の原理や使い方のコツ
- ・バージョンアップ情報
装置で使用しているソフトのアップグレード
に関するご紹介

New!

部品/消耗品

消耗品、定期交換部品の情報です。
サイト内で注文も可能です。
*サイト内でのご注文には、会員登録以外に
別途契約が必要です。
*販売中止製品の部品の閲覧には、ご使用
製品のご登録が必要です。

日立電子顕微鏡 (SEM/TEM) をご登録いただくと、ユーザー様限定「Semevolution (セメボリューション)」のコンテンツ閲覧が可能になります!

S.I.naviのご入会

ご入会は無料です。お申し込みは、下記にて承っております。

エスアイナビ

検索

<https://members.hht-net.com/sinavi/>

プライバシーポリシー: お客様の個人情報の取り扱いについては、下記でご説明しております。
<https://members.hht-net.com/public/privacy.html>

株式会社日立ハイテクノロジーズ

本社 (サポートセンタ) 東京 (03) 3504-7211 関西支店 大阪 (06) 4807-2511
北海道支店 札幌 (011) 707-3200 京都営業所 京都 (075) 241-1591
東北支店 仙台 (022) 264-2211 四国営業所 高松 (087) 814-9911
中部支店 名古屋 (052) 219-1881 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 9:00~11:50 12:35~17:30
(土・日・祝日および弊社休日を除く)

〈編集後記〉

今年は、オリンピックイヤー。女子サッカーを始めとして、水泳、柔道、卓球、レスリングなど各競技に出場の多くの選手達が元気な姿で日本を盛り上げてくれました。

さて、オリンピックに出場する選手に限らずアスリートは、筋力・体力の維持強化のために食事に十分な配慮を行っていることは皆さん良くご存じのことと思います。最近では、一般の方たちも、栄養成分の含有率や有害成分の有無に多くの方たちが関心を持たれています。弊社では、このようなニーズにお答えするために、微量の有害金属の分析が可能な新型原子吸光光度計

ZA3000を発売したほか、食品中の有効成分などを分析するためのHPLCなど各種分析装置を取り揃えています。9月初旬に開催のJASIS (旧分析展) でも紹介いたしますが、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お問い合わせください。

(多持 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 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

○株式会社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, 2012 VOL. 55 No. 2

発行日 2012年9月3日
編集人 多持隆一郎
発行人 棚寝 義人
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