

HITACHI
Inspire the Next

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SEPTEMBER 2014

Vol. **57** No.2

September 2014
Vol.57 No.2

4870

«Column

一生涯の夢を求めて60年!!

大野 伸一

4872

«S.I.Report

直交配置型FIB-SEMを用いた微細組織解析

原 徹

4878

次世代生命科学超微形態解析技術への扉 ― 反射電子像と電子線トモグラフィー法 ―

遠山 稿二郎

4886

電子線ホログラフィーによるスキルミオン格子の磁束観察と三次元構造

朴 賢洵 / 于 秀珍 / 会沢 真二 / 谷垣 俊明 / 明石 哲也 / 高橋 由夫 / 松田 強 / 金澤 直也 / 小野瀬 佳文 / 進藤 大輔 / 外村 彰 / 十倉 好紀

4894

考古資料・歴史資料の元素分析

西本 右子

4901

超高速HPLCを用いた医薬品配合剤の複数成分同時迅速分析法の開発

金澤 秀子

«技術解説

4907

雰囲気遮断冷却ホルダーの紹介

長久保 康平 / 東 淳三

4911

日立電子顕微鏡用イオン液体HILEM® IL1000の特長と応用例

坪井 秀樹 / 二村 和孝 / 許斐 麻美 / 坂上 万里 / 塩野 正道 / 設楽 宗史 / 嶋守 智子 / 立花 繁明 / 富澤 淳一郎 / 佐藤 賢一

4915

マイクロプレートリーダーMTP-900Labを用いた蛍光測定による 抗酸化物質測定法(ORAC法)

橋本 真一

4919

蛍光X線分析装置EA1000VX/AIIIによる環境規制物質管理の業務効率化の提案

田村 浩一 / 的場 吉毅 / 篠原 圭一郎

4923

«学会発表ミニファイル

«TOPICS

4926

HD-2700形FE-STEMと2台のX-Max^N 100 TLEによる立体角 2 srのEDXシステム

橋本 隆仁 他

«New Products

4927

新型ショットキー FE-SEM SU5000

トリプルビーム® FIB-SEM-Ar 複合装置 NX2000

卓上顕微鏡 Miniscope® TM3030Plus

F-7000形蛍光光度計用 自動フィルタ付属装置

超高速液体クロマトグラフ用 蛍光検出器 ChromasterUltra Rs 6440

示差熱重量同時測定装置 STA7200RV

4933

«編集後記

一生涯の夢を求めて60年!!

Search for my dream in one life of 60 years



山梨大学大学院医学工学総合研究部
解剖分子組織学教室 教授
日本顕微鏡学会第56代会長

大野 伸一 (医学博士)

1. 私の生い立ちと夢を抱いた幼少期

この度、日立ハイテク SI NEWS に寄稿する機会をいただきましたので、自分の人生を振り返りながら、顕微鏡学への思いを述べさせていただきます。

私は、終戦後間もない1949年(昭和24年)、東京都三鷹市に生まれ育ちました。当時私が通った市立第二小学校は、百年以上の歴史があり、亡父実(大正生まれ)と祖父金次郎(明治生まれ)はともに同窓生ですし、多くの親族がお世話になりました。さて、半世紀以上前の桜花咲く4月、姉たちに連れられて校門をくぐったのが、つい昨日のように思い出されます。小学校に喜んで通いはじめて数か月後、突然に熱を出してしまいましたが、学校が好きであった私は、父親の自転車に乗せてもらい無理して通い続けました。数日すると倦怠感もでてきたので近くの開業医の診察を受けたところ、結核性肋膜炎という診断で、学校を半年間欠席しなければならませんでした。その後、病状は回復したのですが、数年にわたりレントゲン検査で異常陰影があり、清瀬市の専門病院を訪れたのを覚えています(小学校4年生頃になり、その必要はなくなりました)。このような事があり、小学生時代より将来の夢は「お医者さんになる事」になりました。その後、この夢を実現するために一生懸命に勉学をしましたが、昔のことですから今ほど塾通いもなく、学校の勉強をしっかりやれば良かったのです。当時の小学校卒業記念誌には「僕の夢は医者になり、生き返る薬を開発する事」と書いてあります。中学、高校時代とその夢を持ち続け、1970年(昭和45年)に東京を離れ、長野県松本市にある信州大学医学部に入学しました。

2. “ある人との出会い”と電顕HS-8に魅せられて

「これからが夢に向かう本当の勉強だ!」と燃えていました。当時の教養学部2年が終わり、医学部専門課程1年生になり、解剖学、生理学、生化学等の授業がはじまり、なお一層のこと基礎医学の勉学に燃えました。そんな時に begegnete 人物が、解剖学教室のN助教授(後に教授に昇任された)でした。私が解剖組織学(顕微解剖学)を一生やることになった理由を簡単に言えば、“この人との出会い”だったことになります。蝶ネクタイをしめて、聞き取れない声でしゃべりながら、医学生を詰問し、返答に困ると微笑を浮かべる。どれをとっても、当時の我々医学生仲間には、奇異に思われました。しかし、どういうわけか、その年の夏休みにN助教授の所へ行き「何か研究をやらせて下さい」と言うと、すぐに「電子顕微鏡観察でもやってみないか」と言われました。当時は電子顕微鏡が形態学的研究分野で最も注目されていましたが(1974年にG.E.Palade博士らがノーベル医学生理学賞と1986年にはE.Ruska博士が電顕開発でノーベル物理学賞を受賞)、私には何でもよかったのです。なにしろ学生時代に医学研究というものをやってみたかったのです。その時より、長期の夏・冬・春休暇中や授業の合間をぬって電子顕微鏡(HS-8)との付き合いが始まりました。暗室の中で、細胞組織を1つ1つのぞく楽しみは、夜空に輝く星を見る楽しみに似ていると思いました。そんな具合にしてこの電顕HS-8の魅力にとりつかれてしまい、それから夢中で基礎・臨床医学的研究テーマに挑戦して、医学生時代から約45年が過ぎました。

3. 独自の生体内凍結技法開発と“生きた動物臓器”のミクロ新世界への旅路

さて、1976年に信州大学医学部卒業後、すぐに解剖学教室に助手(現在の助教)として入り、1981年～1983年まで米国NIH(ベセスダ市)に出張して、急速凍結ディープエッチング(QF-DE)法を習得しました。帰国後は1984年から1992年までQF-DE法により「ヒトおよび実験動物の種々細胞組織の超微形態学的研究」を行ない、従来の化学固定・脱水・包埋した超薄切片上では解析が困難であった超微形態学的変化を多くの国際誌に発表しました。さらに山梨医科大学(旧名)に移動後の1994年頃より、新鮮無固定試料の切除に伴う虚血と酸欠の影響をおさえるために、独自のアイデアに基づき、循環血流を遮断せずに生きた動物生体内臓器をミリ秒単位で凍結し、その超微形態像を電顕解析する「生体内凍結技法」を開発しました(Virchows Arch.1996, 2007年瀬藤賞)。この生体内凍結技法により、種々の血行動態下における形態学的変化を保持したままで、電顕や光顕で検索することができるようになりました。特に、この生体内凍結技法と凍結置換固定法を併用すると、生きた動物生体内細胞組織の形態学的解析のみならず、膜リセプターやチャネル等の機能蛋白分子のダイナミックな機能と局在を解析できます(2008年10月日本臨床分子形態学会安澄記念賞)。最近では、蛍光量子ドット血管内注入法および蛍光蛋白遺伝子導入細胞の蛍光イメージング法と免疫組織化学法を併用して、移植癌細胞組織の血行動態変化を解析しております(Microvasc. Res., 2014)。この新しい生体内凍結-蛍光イメージング法および免疫組織化学法は、基礎および臨床医学分野での応用範囲が広く、21世紀のポストゲノム時代に大いに貢献するものと考えております。特に現在は、「臨床診断用クライオバイオプシー装置」というヒト臨床診断応用可能な生体内凍結器具を開発しております(特許権保有)。

4. 日本顕微鏡学会の御紹介と皆様への御願い

現在の日本顕微鏡学会は、1949年に日本電子顕微鏡学会として設立され、その後は1991年に正会員約2,870名のピーク期を迎えました。一方、当時の学会での活動範囲は、透過型電顕と走査型電顕だけでなく、原子間力顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、近接場光顕微鏡、X線顕微鏡などを含めた分野へと広がっており、徐々に会員数は減少していきました。そこで、2002年度には日本電子顕微鏡学会から「電子」をとって日本顕微鏡学会に学会名称を変更し、さらに顕微鏡学の発展に取り組んできました。また前理事会が公益社団法人への移行に重点的に取り組まれて、2012年4月1日よりその認可を受けて、公益性、学術性、国際性を目指した新たな学会活動を展開しています。最後になりますが、日本顕微鏡学会員主体の運営を通じて、社会基盤の一翼を担う学際的研究者集団として努力いたしますが、皆様の御支援を改めてお願い申し上げます。

職歴および研究歴

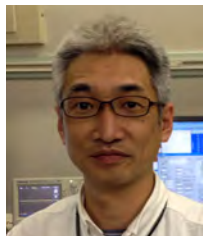
1976年4月信州大学医学部助手(解剖学講座)。1979年講師昇任。1981年医学博士修得。1981年7月助教授昇任。1981年9月米国NIHに出張。1983年8月帰国(凍結技法によりヒトおよび実験動物の超微形態学的研究を開始)。1992年5月山梨医科大学教授(解剖学)就任。1995年～独自の生体内凍結技法の開発。2002年山梨大学教授(国立大学統合により)。2005年～クライオ(凍結)生検法の開発と試行。2007年4月国立大学法人山梨大学教授(解剖分子組織学教室)。2008年～クライオ生検装置の設計と製作(ヒト臨床応用を目指す。シーズ発掘研究採択)。2011年～極低温下クライオ生検装置の設計と製作(2012年A-STEP採択)。2013年5月～日本顕微鏡学会第56代会長就任。

主な受賞等

①米国NIH Fogarty International Fellowship(1981年9月から2年間)。②日本顕微鏡学会瀬藤賞(2007年5月)。③日本臨床分子形態学会安澄記念賞(2008年10月)。④平成25年度「科研費」審査員表彰(日本学術振興会・2013年11月)。

直交配置型FIB-SEMを用いた微細組織解析

Microstructure analysis by means of the orthogonally-arranged FIB-SEM



独立行政法人 物質・材料研究機構
表面構造・物性ユニット
主席研究員 博士(工学)

原 徹

1. はじめに

組織観察を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で行う場合、反射による表面観察であっても、あるいは透過による投影観察であっても、基本的に二次元像の記録がもとである。しかし、材料・生物を問わずごく一部の例外を除いて組織は本来三次元の構造を持つ。そのため、三次元的な観察を実現するための工夫が古くからなされてきた。

我々が研究対象としている金属やセラミクスなどにおいては、サブナノメートルからマイクロメートル、ミリメートルまでの広い範囲のスケールでの組織観察が必要となっており、その中を比較的広くカバーできるものとして集束イオンビーム-走査型電子顕微鏡複合装置(FIB-SEM)を用いたシリアルセクションングによる三次元再構築像観察に注目している。

本稿では、材料組織の高精度な三次元的観察を実現するために導入した、直交配置型 FIB-SEM (日立ハイテクサイエンス製 SMF-1000) の装置の概要と、それを用いた観察実施例を紹介する。我々は 2011 年 2 月にこの装置を導入し、それ以来「微細組織三次元マルチスケール解析装置」として文部科学省の「低炭素研究ネットワーク」や「ナノテクノロジープラットフォーム」事業において装置と観察技術を広く公開している。それらの事業による種々の研究分野の観察実施例の一部も併せて紹介する。

2. 手法と装置の特徴¹⁾

FIB と SEM の機能を一台に備えた FIB-SEM によるシリアルセクションングは、これまでも広く応用されてきた。この方法は FIB による表層の研削と、その研削面を SEM で観察することを繰り返し、取得した SEM 像のシリーズをコンピュータで積層し三次元像を再構築する。そのため SEM 像の像質が、観察と解析の結果のクオリティを大きく左右する。

FIB-SEM のシリアルセクションング観察の際に留意すべき点は、この場合は SEM 観察といっても、表面の凹凸を見る形態観察ではなく、FIB によって切削した平面を観察する点である。つまり、試料の外形は観察しない。ほぼ完全な平面を作って、その平面内の内部組織のコントラストを二次電子あるいは反射電子で観察する。そのため、観察するコントラストは、構成元素の種類や密度によるもの、結晶性試料の場合には構造やチャネリング(方位)によるものなどであり、基本的にはトポグラフィックなコントラストは対象とならない。目的とする観察のためにどのようなコントラストを利用するか、という条件(検出器と検出条件)を探ることが重要になる。

従来、この目的では、一般的な FIB-SEM 装置を応用していた。つまり、図1(a)に示すように FIB と SEM の光軸が互いに 60 度程度の角度で交わっているものである。これは、FIB と SEM とで同じ点を観るためには最良の配置で、例えば SEM で場所探しをして TEM 観察のための試料を FIB で加工して取り出すことなどに適している。しかし、シリアルセクションング観察に目的を限定すると、この配置は必ずしも最適とは言えない。その理由は以下の 2 つである：

- (1) 図1(a)に示すように、FIB で切削を繰り返すと SEM 像に視野ズレが生じる。SEM 像の中心(図中一点鎖線)から切削領域がずれていくため補正が必要となる。
- (2) FIB 切削面は SEM 光軸に対して垂直にはならない。傾斜した面の SEM 観察となるため、例えば二次電子像を使って観察しようとするときには、コントラストのダイナミックレンジの大部分が高低差に起因するものに消費される。さらに、傾斜面を見ているために一枚の SEM 画像の中でも縦横のスケールが異なり補正が必要となる。以上のことから、シリアルセクションングの目的では、FIB による切削面が SEM 光軸に対して垂直な、図1(b)のような機器配置が理想的と言える。

そこで、その実現を目的として、FIB と SEM とが直交した配置を持つ観察装置（日立ハイテクサイエンス製 SMF-1000）を導入した。本装置の外観写真を図 2 に示す。この装置では、切削面の高低差によるコントラスト変化が無い、内部組織観察に適した配置になっている。さらに本装置では、一度の観察でできるだけ多くの情報を得られるように、エネルギー分散型 X 線分光分析装置（EDS）や後方散乱電子回折（EBSD）といった検出器やプラズマクリーナー、アルゴンイオンガン、ガスデポジションガンといった試料調製装置を配置している。また、像の検出器としては、SEM が持つインレンズタイプ（SEM 鏡筒内の光軸と同軸上に配置）の二次電子検出器、反射電子検出器、E-T 検出器のほか、試料直下に走査透過型電子顕微鏡像（STEM）検出器を装備している。

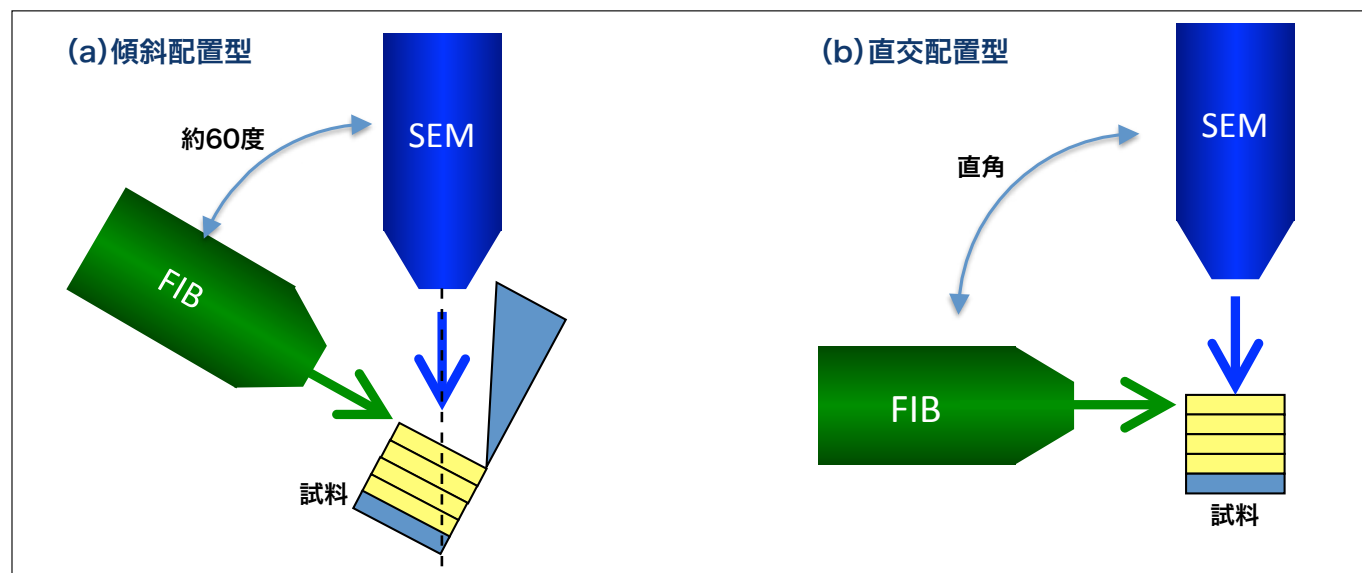


図1 FIB-SEMにおけるFIBとSEMの配置

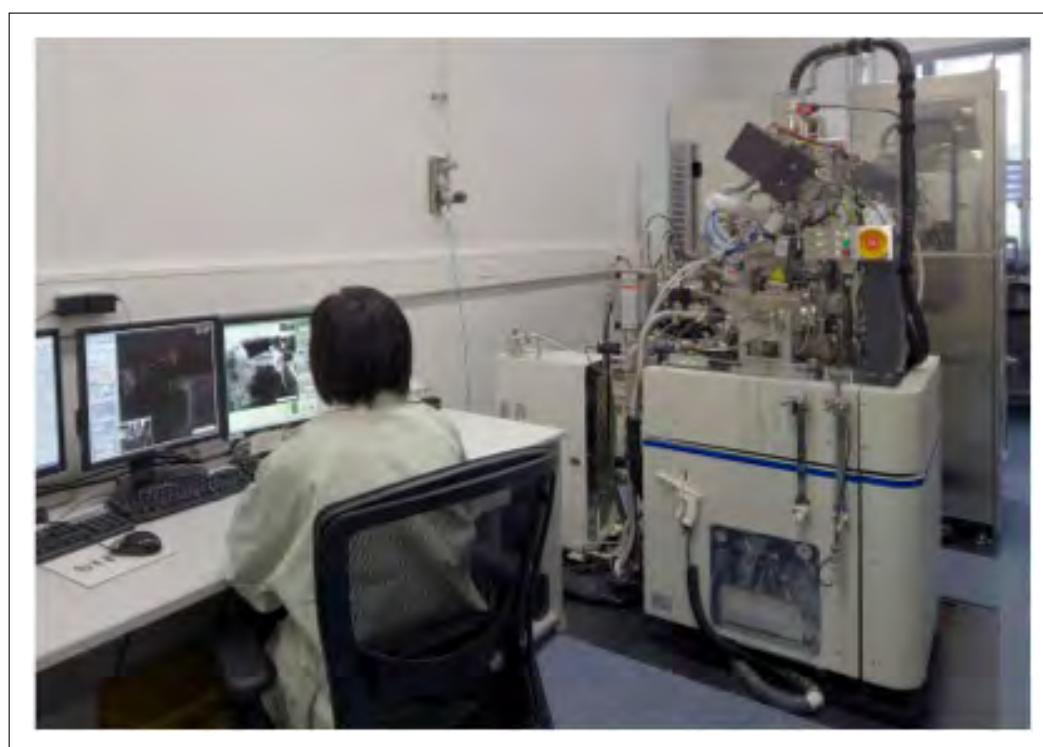


図2 直交配置型FIB-SEM装置の外観

3. 組織観察への適用例

3-1 清浄表面の二次元像観察

三次元再構築像の観察例の紹介に移る前に、通常の二次元像（SEM 像）そのもののクオリティが高いことに触れておく。試料表面は表面層や酸化膜等で内部微細構造が見えないことがあるが、FIB での切削によってそれを除去したフレッシュな面の観察が可能になる。例えば図3は電解研磨で表面を平滑に仕上げた鉄鋼材料の試料である。電解研磨時に表面酸化膜が形成され、内部組織のコントラストよりも表面酸化膜の凹凸しか観察できなくなってしまう。図3の左半分がその状況を示している。そこで FIB（紙面上側にある）で表面酸化膜を除去したものが図中右半分であり、この部分は試料の組織のコントラストが現出していることがわかる。大気に出ただけで表面が酸化するような金属材料にとっては、SEM のチャンバ内で新生面を作ることができることは大きなメリットである。

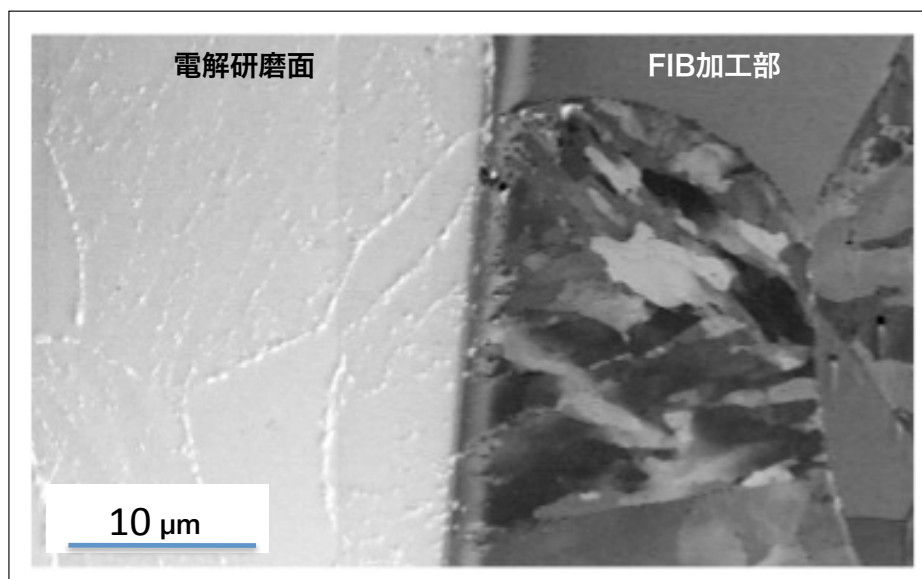


図3 電解研磨によって表面を仕上げた鉄鋼材料。左が電解研磨面、右はその表面をFIBで研削したもの。

3-2 SEM像の「深さ」分解能

FIB-SEM シリアルセクションニングによる三次元再構築像の空間分解能を考えるうえでは、プローブ径のほかにスライスの厚さ方向（z 方向）の空間分解能を考慮する必要がある。z 方向の空間分解能は、基本的には FIB によるスライスのピッチによって決まるので、当然 FIB の性能に依存する。しかし、SEM 観察の加速電圧が高くなると電子線が試料内に深く浸入し、像に深さ方向の情報が含まれてしまい、小さなスライスピッチは無意味となる。つまり、加速電圧をできるだけ低く抑えて、試料内部での電子線の拡がりを小さくすることが、実質的な空間分解能を上げるために重要となる。本装置では、低加速電圧での SEM 観察と高い精度の加工が可能な FIB によって、実質的な三次元的空間分解能として 2 nm 程度の三次元再構築像観察が可能となっている。

3-3 三次元像再構築観察の例

上述したように、FIB での切削面はトポグラフィックなコントラストを排除できるので、試料の内部微細構造を強調できる。それを元にしたこれまでの観察の例をいくつか挙げる。

図4は、Ti-Mo 合金中のオメガ相と呼ばれる析出物の形態と分布、体積率等を求めた例である²⁾。オメガ相はβチタン合金の機械的特性に大きく影響を与えるが、非常に微細かつ高密度に析出するため、その定量評価は困難であった。図4(a)に示した SEM 像は、加速電圧 2 kV、インレンズタイプの二次電子検出器で観察したものである。オメガ相は、マトリクスに対して 5% 程度モリブデン含有量が少ないため、その濃度差が暗いコントラストとして観察できている。この像をスライスする厚さを 2 nm に設定して 260 枚の SEM 像を取得して三次元再構築したものが図4(b)である。この結果、オメガ相粒子の体積率やサイズ、形態などを定量的に評価することができた。このように、FIB 切削面が SEM 光軸に対して垂直なので、ベースのコントラストが均一になり、わずかな組成差でも強調して観察できる。図5(a)は、Fe-12Cr 耐熱鋼中のデルタフェライトー焼戻しマルテンサイトの二相界面付近の析出粒子分布の観察例である³⁾。像のコントラストが高いため、一度 EDS で析出物の種類がわかれば、コ

ントラストのみから複数の種類の析出物の判別が可能である。図 5 (b) はバナジウム主体の炭窒化物（黒色）と灰色のクロム主体の炭化物（灰色）が相界面上でどのように分布しているかを観察したものである。相界面上の析出物分布は、TEM での投影像観察でも、SEM での表面観察でも正確に把握することはできないため、コントラストの高い三次元像観察は非常に有効な手段となる。また、材料系試料だけでなく、生物系試料についての観察も進めている。図 6 は、骨組織のシリアルセクションングを行った時の観察例である。包埋されたニワトリ胚頭蓋骨の表層から深部までを観察した。この場合は観察したい部位をサンプルのエッジに持ってきて、それを直接横から FIB でスライスした。加速電圧は 1 kV で良好な像を得ることができている⁴⁾。その他にも例えば電池の電極材料のように空隙を多く持つ試料の空隙の形状や体積率を計測する場合、空隙を樹脂等で埋めて観察することが望ましいが、それができない場合も多い。そこで、樹脂埋めせずに元の形状や状態を保ったままシリアルセクションング観察を行い、その際にスライスごとに異なる観察条件で複数枚の画像を撮影しておき、画像処理で空隙と試料を二値化するなど、観察条件と解析方法を工夫して、空隙の形状や割合を求める工夫もなされている⁵⁾。

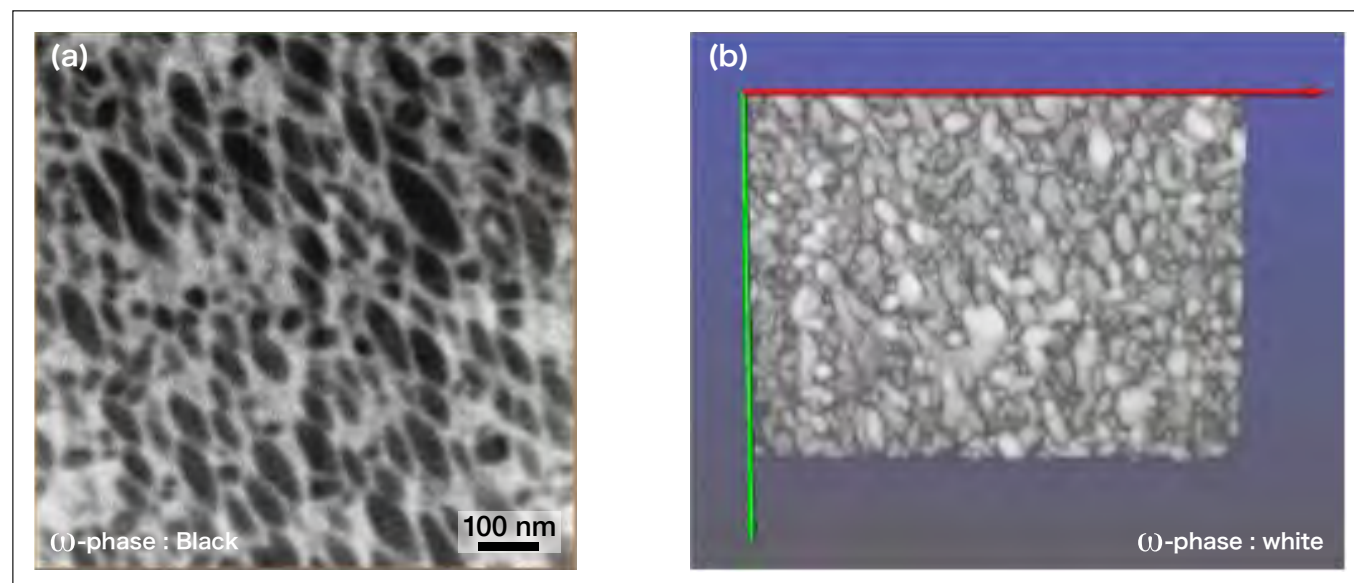


図4 Ti-Mo合金中の ω 相の観察
(a)シリアルセクションングに用いた二次元像 (b)三次元再構築像

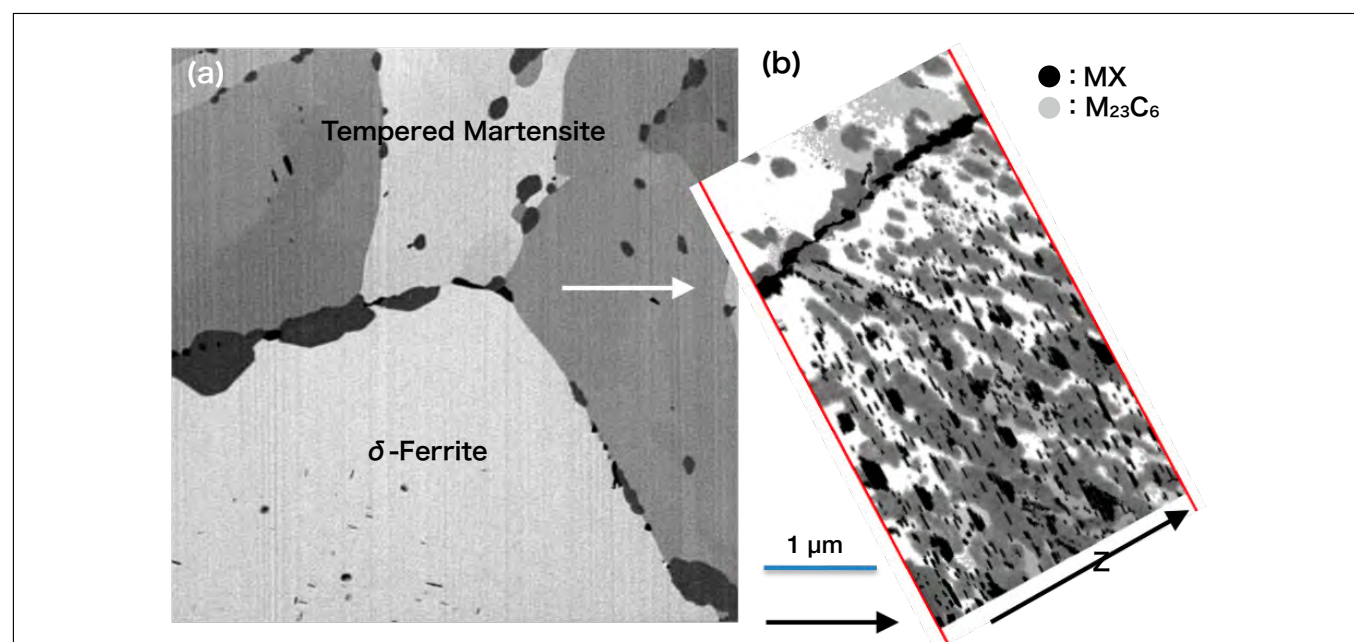


図5 耐熱鋼中の析出物分布の観察例
(a)シリアルセクションング観察時のSEM像 (b) δ フェライト-焼戻しマルテンサイト界面上(紙面奥行方向)の析出物分布

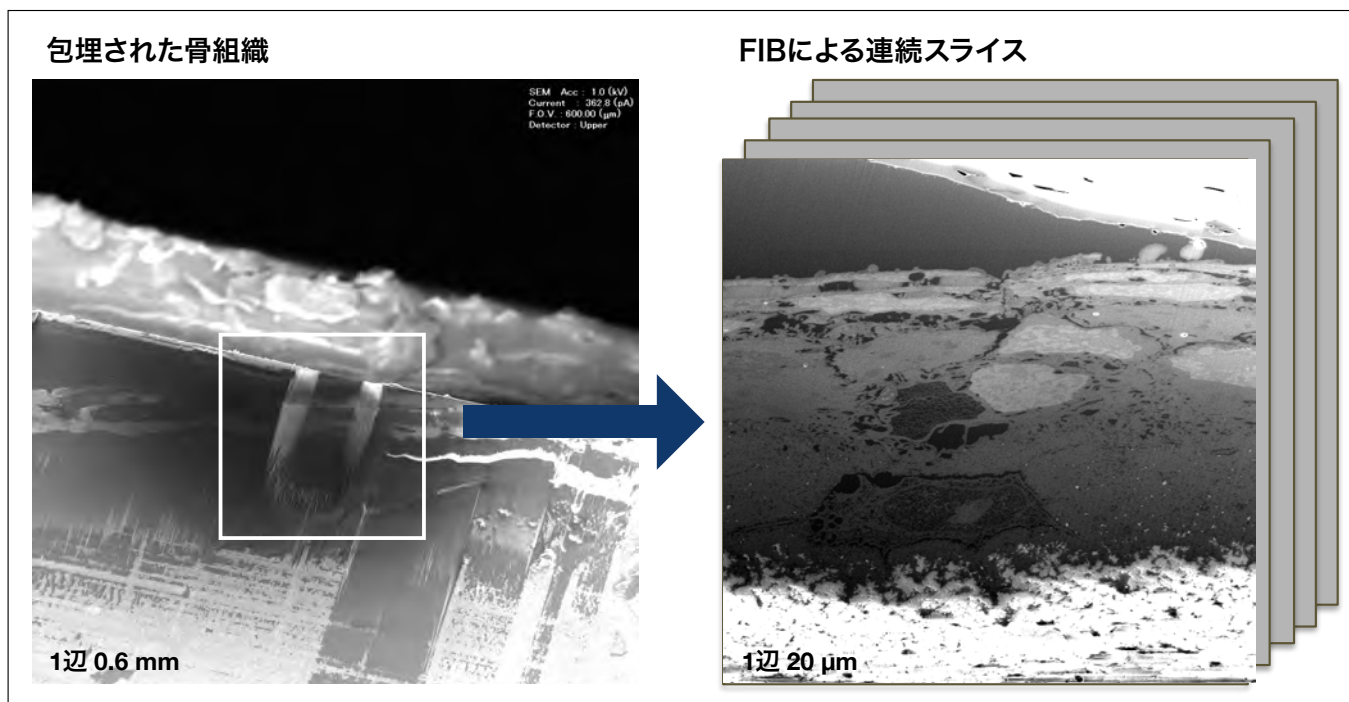


図6 骨組織のシリアルセクションング観察

4. 今後の展開と期待

これまで述べてきたように、FIBとSEMを直角に配置した本装置は、シリアルセクションングによる三次元像再構築の観察に適しているだけでなく、FIBによる切断面を観察することによって組織の内部微細構造を観察することにも有効である。これまでに多種多様な試料の観察を行ってきたが、より高い精度・感度での観察のためには、今後さらに工夫すべき点も多い。現状では困難だがユーザーからの希望が多い項目は大部分が共通している。それは超高分解能化というよりむしろ、「より広範囲のスケールの観察」「適用可能な試料種類の拡張」「より多様な情報を得たい」という汎用化・多機能化の要求である。直交配置がもたらす特徴を損なわずに、さらに先のレベルの組織解析を目指すためには、次のような点での進展を期待したい。

- (1) スライスするためのFIBの別の方法として、より広い範囲、例えばミリ単位の領域をナノスケールのピッチで切削する手法。観察面積の拡大あるいは観察時間の短縮は要望としては大きい。
- (2) SEMでのチャージやFIBでのダメージが入りやすい試料など、FIB-SEMが苦手とする試料は多い。また、冷却・加熱や雰囲気制御が必要なものなど、多様な試料条件への対応。
- (3) 多彩な像検出器に加えて、マイクロカロリメータEDS等の高精度組成分析等のこれまでなかった検出器も搭載して、多種の情報を同時に取得して効果的に連携させる手法。
- (4) 多様な情報を同時に取得した上で、必要な情報のみを取り出せるような優れた解析手法があると、これまで取り逃していた情報が得られるようになる。

組織解析を必要とするユーザーとして、これらのことの実現を今後期待したい。

謝 辞

本文中、骨組織の観察データは、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科、上岡寛教授、高宮留美子博士に提供いただきました。また、本装置を用いた解析手法は、多くのユーザーの方々との実験と討論の成果です。ここに記して謝意を表します。

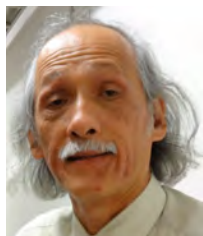
本装置は、文部科学省「低炭素社会構築に向けた研究基盤ネットワーク」のNIMSハブ拠点 (<http://www.nims.go.jp/lcnet/about/index.html>) で導入し、その事業および文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業NIMS微細構造解析プラットフォーム (<http://www.nims.go.jp/nmcp/>) で公開しています。

参考文献

- 1) 原 徹:「FIB-SEMシリアルセクションニングによる材料組織の三次元観察」顕微鏡, 49-1, (2014) ,53-58.
- 2) T. Hara, K. Tsuchiya, K. Tsuzaki, X. Man, T. Asahata, A. Uemoto : “Application of orthogonally-arranged SEM-FIB to microstructure analysis of martensite” *J. Alloy. Compd.* 577S (2013) 717-721
- 3) K.Tsuchiya, T.Hara, S.Emura, X.Min, S. Ii, K.Tsuzaki, X.Man, K.Tanaka, A.Uemoto : “3D observation of isothermal omega phase in beta-Ti alloy by novel orthogonal FIB/SEM system”12th World Conference on Titanium (Ti-2011) Proceedings of the 12th World Conference on Titanium 1 (2012) 593-596
- 4) 上岡 寛, 保崎留美子, 原 徹, 原 由佳, 張 偉珠, 今井裕一, 長岡紀幸, 山城 隆: “直交配置型FIB-SEMで観察した骨コラーゲンネットワークの立体構築” 第69回日本顕微鏡学会学術講演会予稿集
- 5) 寺尾 剛, 横山浩司, 徳永友美, 大山淳平, 久保則夫, 井上 元, 河瀬元明, 原 由佳, 原 徹: 第50回日本伝熱シンポジウム (2013.5.) 予稿集A231

次世代生命科学超微形態解析技術への扉 — 反射電子像と電子線トモグラフィー法 —

The gateway to next generation of ultrastructural analysis for life science:
Back-scattered beam imaging and electron beam tomography



岩手医科大学医歯薬総合研究所
前バイオイメーjingセンター長
同 超微形態科学研究部門 前教授
医学博士 獣医師

遠山 稿二郎

1. はじめに

透過電子顕微鏡 (TEM) による生物試料解析法は新たな時代を迎えた。これまで、透過像を得るための電子顕微鏡観察ではグリッドに載った厚さ約 100 nm 前後の切片が出発点であった。つまり、「グリッド」と「厚さ約 100 nm 前後」という二種類の「縛り」によって観察できる広さ、厚さ方向の精度および深さには、限界があった。分野を問わず、試料を、「広く」、「深く」そして、「精査に」解析することは究極の夢である。近年、機器開発が進んだ結果、ついにこの「縛り」から解き放される時がやってきた。

近年、広く活用されはじめた二つの技術がこれに対する答えを出してくれた。電子線トモグラフィー法と反射電子像の活用である。ここでは、これらの解析技術について、私達の経験を基に、具体的なデータに触れながら、今後の生命科学分野における電子顕微鏡解析の方向性について考えてみたい。

2. 超薄切片法の限界

半世紀以上、超薄切片法は TEM 観察の出発点であった。ウルトラミクロトームおよびダイヤモンドナイフはここ 30 年で長足の進歩を遂げ、超薄切片作製は「神業」から「一般的技術」へと変化した。現在でも短期間の熟練は必要であるが、極めて安定した技術となった。

超薄切片は水を張ったダイヤモンドナイフポートに連続して得られる (図1左)。厚さは干渉色で判断できる (図1右)。しかし、研究・検査においてはより高精細な解析が要求されるようになり、次の諸問題点が明らかになってきた。通常の TEM では切片厚全体の情報が投影され、切片内で異なる位置に存在する小器官を重ねた影絵を見ている。ナノ、サブナノでの超微細形態解析にとって 100 nm の切片は「厚すぎる」ことになる。一方、ミクロン単位の構造全てをカバーするためには多くの連続切片が必要となり、厚さ方向に広がる構造の解析には「薄すぎる」。また、超薄切片の大きさは通常 1 ミリから 2 ミリ角以内のため、この範囲を越えた観察領域が研究・検査上必要な場合、試料が「小さすぎる」。幸い、現在ではこれら 3 つの限界を突破する方法が開発され、一部は、一般的なユーザーにも手が届く環境になってきた。

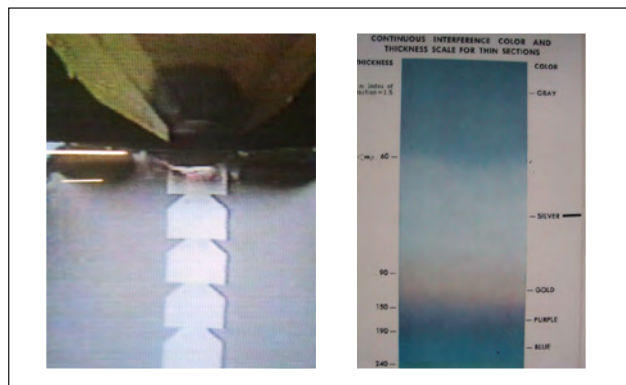


図1 超ミクロトームで得られた連続超薄切片(左)と干渉色と厚さの関係を示す表(右)ここで得られた切片は80-70 nmである。

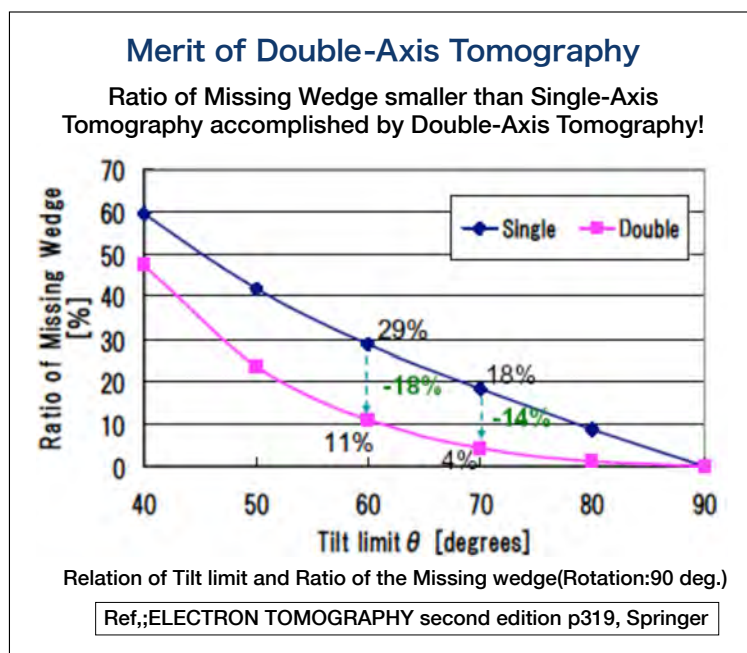


図2 超電子線トモグラフィー法における傾斜軸(1軸と2軸)による欠損領域の違いを示す。

3. 超薄切片内を三次元的に捉える電子線トモグラフィー法

「厚すぎる」を克服する有効な手法である。切片を載せたグリッドを電子ビームに対してプラス・マイナス 60°傾斜し、1°から 2°おきに連続傾斜画像を得る。私達は通常、試料をグリッド内で 90°回転し、同様な操作を繰り返し、同一画像に対して2組の連続傾斜像を用いる2軸トモグラフィー法(DA-ET)を実施している。これにより、三次元構築に際して1軸で約30%あった情報欠損領域を2軸では約10%程度に押さえることができる(図2)。

図3はラット小脳のシナプスをDA-ETで撮像して得られたデータに基づく三次元再構築像である。詳細は未発表なため説明は省略するが、X軸・Y軸・Z軸による解像度のばらつきは殆ど見られない。この時の解像度はピクセル当たり 0.58 nmである。また、図4は凍結超薄切・免疫電顕の結果をDA-ETで解析したものである。銀増感用の極小金粒子(2 nm)の標識で、増感処理をせずに観察した。神経軸索内の神経細線維蛋白(neurofilament protein 200)に対する抗体(RT-97)による免疫染色である。同視野を撮影した、通常の透過電顕像(左)とDA-ETにより得られた1ピクセル厚(0.58 nm)の像(右)を示す。

切片厚全体の情報(左)では各金粒子が何とか判別できるが、右の画像では、明瞭に把握できる。それぞれの金粒子のline profile(下図)を比較すると、その差は明らかである。また、厚さ1ピクセルの画像を切片表面から深部に移動し連続的に観察すると、各深さで神経細線維のみ特異的に標識されている様子がわかる。一般的には、最少でも5 nm粒子が免疫標識用として使用され、2 nm以下の粒子は銀増感用のため、そのまま、観察することはない。サイズが小さくなると他の構造との識別が困難になるためである。しかし、DA-ETを活用することで、明瞭に金粒子を識別できるため、より正確な分子局在を把握することができる。この検索により、5 nmの金粒子は切片表層にと留まるが、2 nm以下の金粒子は、凍結超薄切片内全域(70 nm)に浸透することが判明した(未発表)。標識画像の解像度は1ピクセルあたり 0.88 nmである。



図3 ラット小脳のシナプスをDA-ETにより解析し、三次元再構築した画像。

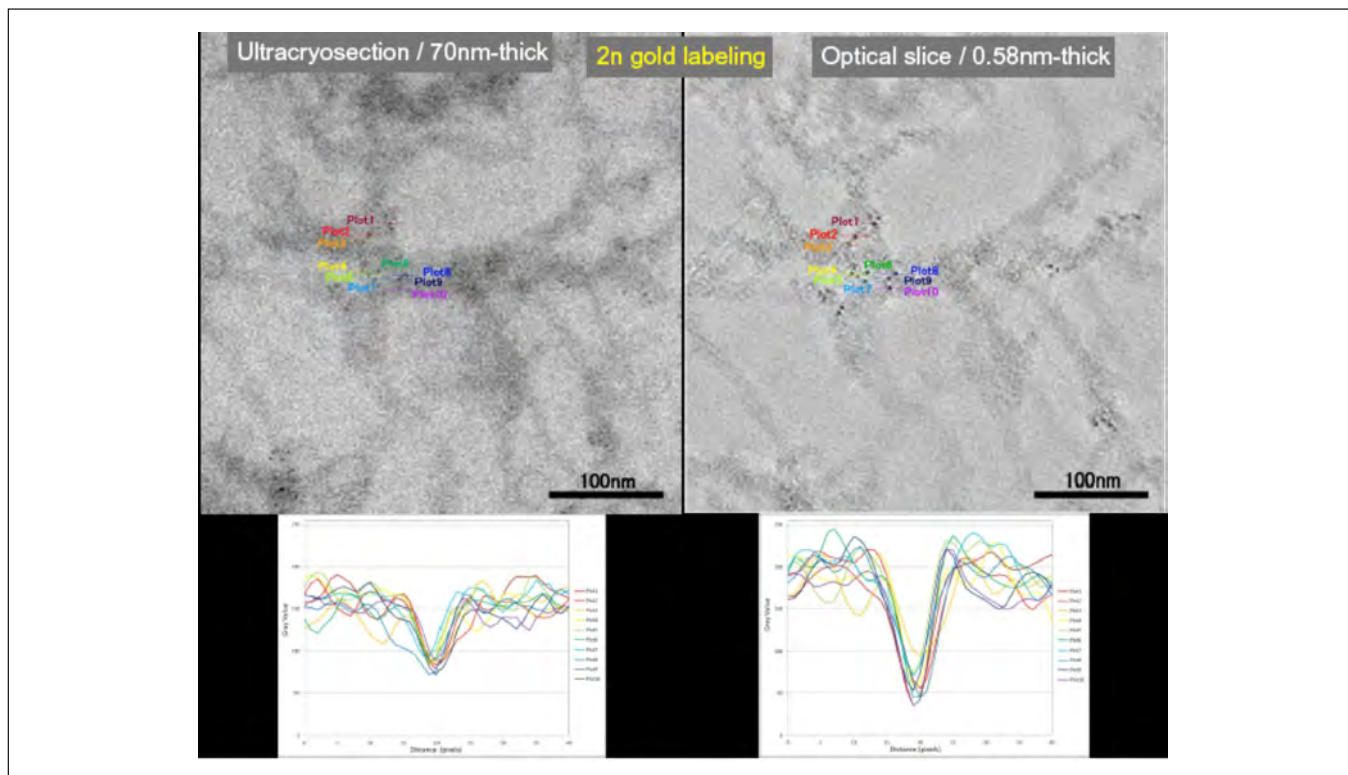


図4 各金粒子(色別)のline-profile を下段に示す。
切片厚により小径金粒子の判別しやすさが異なり、DA-ETにより得られる情報の有効性が明らかである。

4. 三次元再構築の基礎となる同一軸の連続画像取得：ブロック面連続切削法

「薄すぎる」を克服するためには、これまでは連続切片法しか利用可能な方法は無かった。連続切片法の弱点は「軸合わせ」とよばれる取得された画像の「軸」のずれにあった。同時に各切片のゆがみも大きな問題点である。そこで、切片を撮影するのではなく、試料面の画像を削りながら連続的に画像を取得する方法 (Serial block-face scanning electron microscopy : SB-SEM) が考えられ、実用化された。ブロック (試料) — 多くの場合、樹脂包埋された試料 — を走査電子顕微鏡 (SEM) 内に設置し、機械的、あるいはイオンビーム (Ga) によりブロック面を切削する。画像の取得は主に反射電子像を活用する。機械的に切削する場合は、小型のマイクロームを SEM 鏡筒内に設置する。切削のためのイオンビームを備えている高真空 SEM は Dual beam FE-SEM (DB-SEM) と呼ばれ、既に、半導体・IC メーカーの品質管理に活用されてきた。DB-SEM で三次元解析のためのデータを取得する原理を図5に示す。この方法で得られた三次元画像が図6である。ラット小脳、プルキンエ細胞層を中心とした皮質の構造である。各 XYZ 面の厚さ1ピクセルの画像を組み合わせる表示しているが、最終的に得られている情報はボリュームデータであるので、理論的には任意の面における断面像を得ることができる。しかし、元データが、非連続画像であるため、切削方向の解像度は切削ステップ (この場合 50 nm) が限界であり、同じボリュームデータであるトモグラフィー情報と異なる点である。とは言え、本画像でも通常の TEM 用切片のほぼ半分の厚さが基本となっているため、精度は高い。勿論、数ナノメートルで切削すれば、高精細な情報をえることができる。一方、目的とする構造がブロックに埋まっている状態で切削しなければならないため、特定の部位でしか観察されない構造については、正確に対象の位置を割り出すことが難しい。また、切削後、試料は消失するため、繰り返しの観察、再検索はできない。したがって、頻度の低い構造の解析には不向きである。また、現時点では、一般の研究者にとって、容易に利用できない点も課題である。

そこで、グリッドを使用しない方法—グリッドレス法—を用いれば、連続的に観察できる範囲が広がる。超薄切片をスライドガラス・合成樹脂フィルムなど支持板上に載せ、前項で触れた SEM の「反射電子像」で観察する。例として約幅2ミリの連続切片(4枚)について従来のメッシュグリッドとグリッドレス法を活用した場合の違いを図8に示す。格子に隠れる部分は全く無い。切削可能な超薄切片の横幅は使用するダイヤモンドナイフの幅に規定されるので、現時点では、市販されている最大のものが8ミリであるため、数ミリまでは可能となる。これに対し、縦長は超ミクロトームのストローク範囲に限定され、私達の経験 (Leica:EM-UC6) では10ミリ弱が限界である。とはいえ、現在可能な大きさ(数ミリ角)であっても、従来の電子顕微鏡法に比べ、比較にならない広大な領域が観察可能範囲となる。具体的には、これまで、単孔グリッド使用時では1 mm² 程度であった観察可能範囲が、本手法により、約50倍の領域を連続的に観察できることになる。勿論、これまで行っていた「トリミング」についても、広めに試料を確保できるのは大きな利点のひとつである。幅数ミリ以内であれば、そのまま電子顕微鏡観察ができる。この時、通常、行っている準超薄切片のトリイジン・ブルー染色(TB染色)した同一切片でも電子顕微鏡観察に使用できる。私達は、多くの試料について、TB染色時、バーチャルスライド化(浜松ホトニクス: NanoZoomer)し解析に活用している。

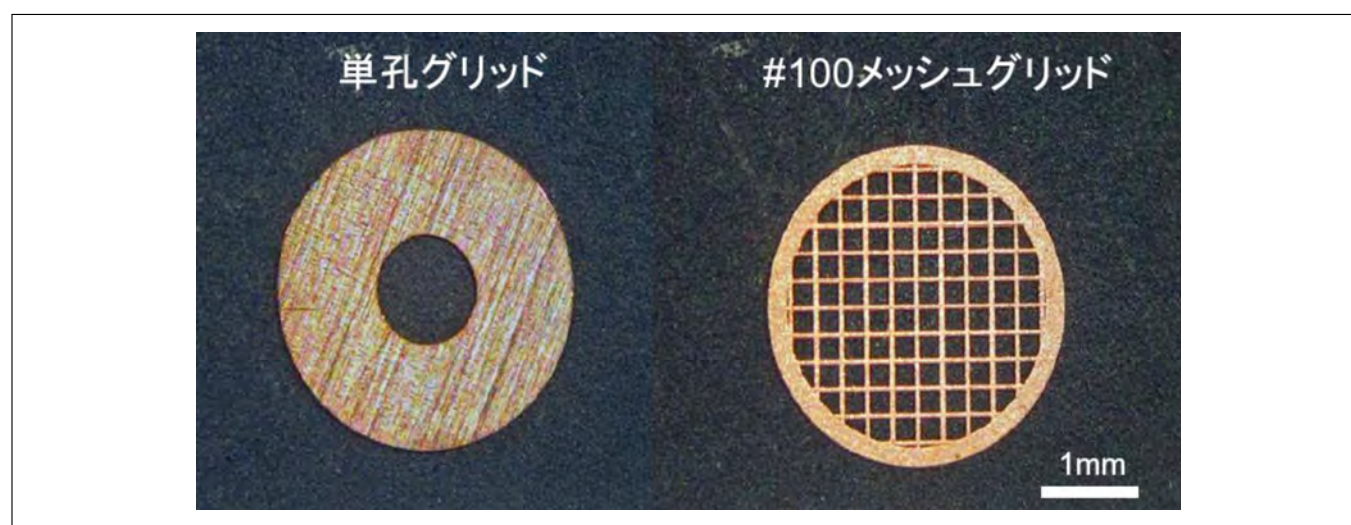


図7 単孔グリッドとメッシュグリッド

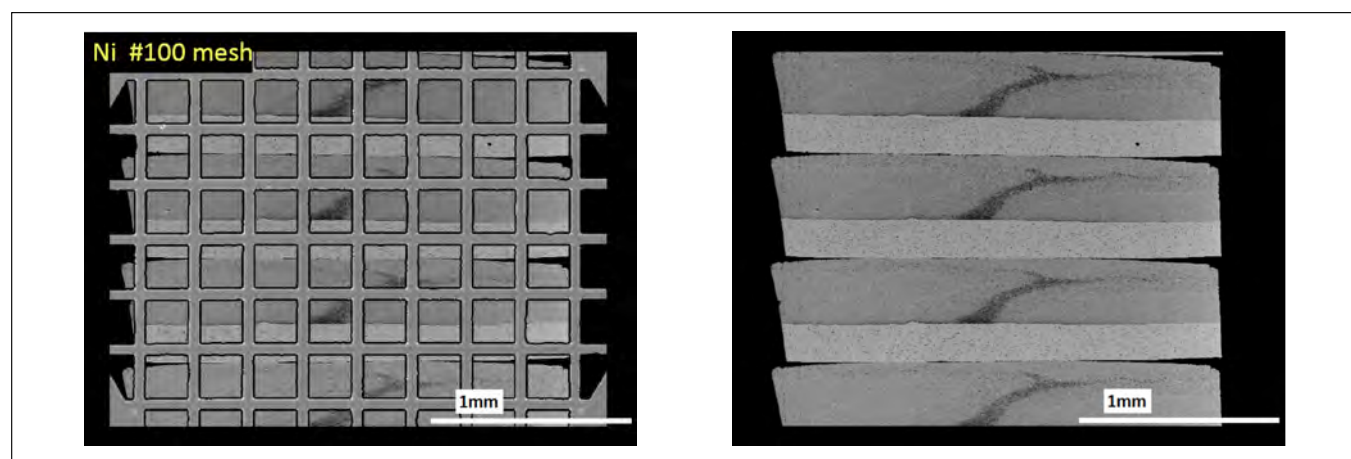


図8 メッシュグリッド上(左)とスライドガラス上(右: 反射電子像)での連続切片(2 mm幅)4枚の画像の比較。右ではグリッドの格子に隠れる場所は無く切片全体が観察できる。

5-1 大型切片観察の実際

得られた大型切片は、電子染色後、SEM(日立 SU8010)で反射電子像を得た。撮影条件は、加速電圧:1.5 kV;エミッション電流:20 μ A;WD:8.0 ~ 2.0 mm;画素数:2560x1920 pixel である。

反射電子像は通常、透過像と陰陽が逆に表現されるため、ここでは反射電子像について画像を反転してある(図9)。本図では、仮に、一部の拡大像を示してあるが、試料の範囲内であれば任意の部位について拡大できる。本標本では、単純計算すると、従来の単孔グリッドで観察できる領域の約10倍の領域が解析可能となった。画像の分解能については、細胞膜の脂質二重膜構造が明瞭でない点、など不十分な点もあるが、特殊な目的を除き、基本的な電顕解析には有効である。特に、得られたデジタルデータは、研究者間での情報の共有が容易で、特に試料が貴重な場合極めて有効である。これまで、電子顕微鏡の情報は

論文になっている場合でも、著者が主観で選択した部位のみの情報であるため、科学的データの透明性という点では、形態以外のデータと比べ、必ずしも高いとは言えなかった。しかし、将来、全世界から研究者がアクセス可能な科学的形態データベースができれば、大幅に高まる。その一歩として、本手法の活用を提案したい。

私達は、広領域試料について、1万倍から2万倍の連続画像を取得し、タイリングすることで、領域内の任意の部位を元画像の拡大まで観察できるデータの作製を試みている。実際、2～3ミリ角の領域をカバーした画像データを作成した(2.46 nm/pixel)。閲覧には、フリーで入手可能な画像ソフト、ImageJ (NIH) , NanoZoomer などで見ることができる。電子顕微鏡の前に居なくても、各自のPCで電子顕微鏡観察が可能となる、という事である。これを、「バーチャル電顕」と呼ぶ事を提案したい。

この方法を活用すれば、特定の領域、例えば、小脳の矢状断切片で、プルキンエ細胞層のみを連続的に数ミリに亘って電顕画像データとして取得することも可能である。実際、私達はマウス脳梁の比較的広範囲での微細構造の検索に活用した。(文献3)

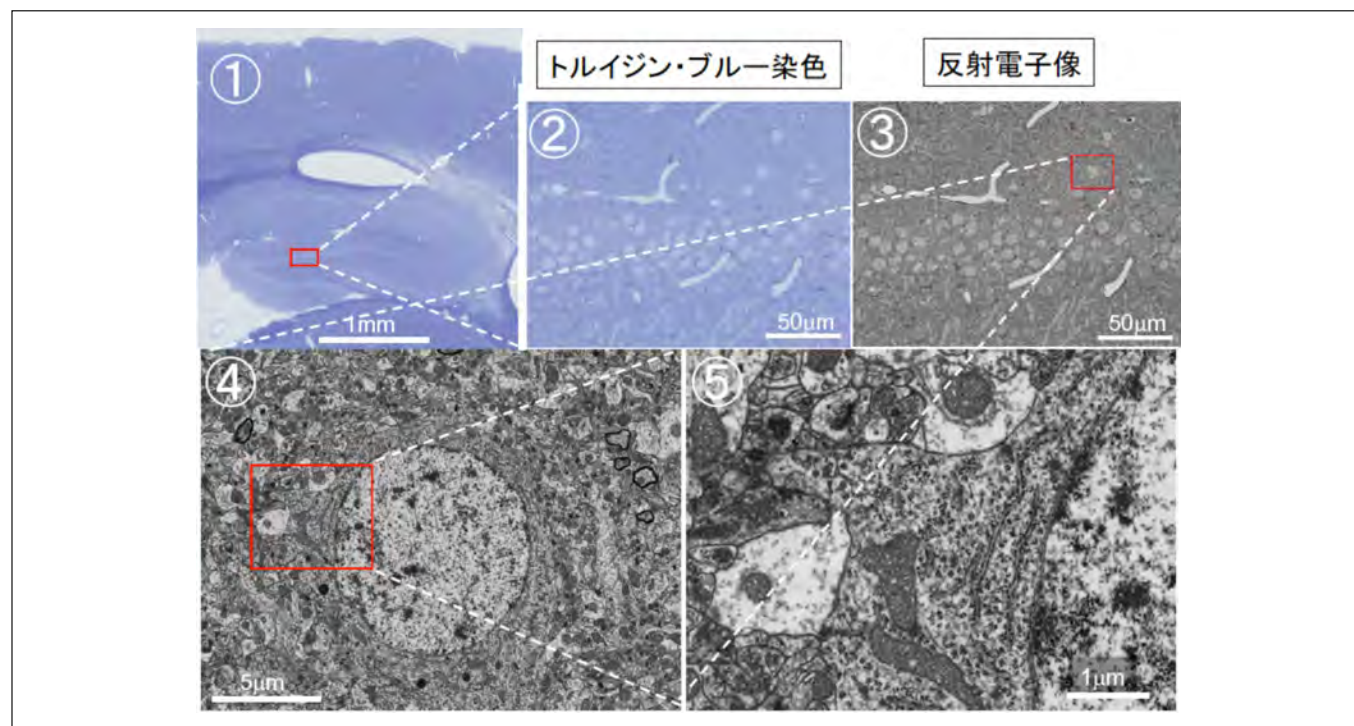


図9 大型超薄切片観察の一例。ラット歯状回における反射電子像を活用したシームレス電顕解析

図①：TB染色した大型超薄切片の一部(約3ミリ四方)の光顕像。赤枠の拡大を図②に示す。

同一切片・同一部位のTB染色像(図②)と電顕像(図③)。図③の赤枠の拡大像を図④に、また、図④の赤枠の拡大を図⑤に示す。

図⑤ではシナプス、リボソーム、粗面小胞体など細胞内小器官の超微形態が把握できる。

5-2 連続切片観察の実際

近年、コンピュータ技術の発達に伴い、連続画像の軸合わせが比較的容易に行われるようになった、しかし、連続切片をグリッドに載せ観察する従来の方法で生じるグリッドによる画像の歪み補正についてはなかなか難しい。そこで、連続切片を支持板に回収し反射電子で観察する方法が広がっている。最も尖端的なグループの一つであるハーバード大学の Lichtman 教授らは、特殊なテープ上に超薄切した連続切片をリボンのまま回収する、膨大な切片数を解析できるトータルシステムを開発・実用化し、新しい事実を報告している(文献1)。切片厚が通常の透過電顕用切片の三分の一程度なので、連続画像を再構築した時のZ軸方向の解像度は高い。また、千枚単位の画像を取得し、解析している。

一方、目的の構造によっては、これほどの枚数を必要としない場合がある。希な構造であれば、むしろ、広い領域を観察することが、求められる。ランビエ絞輪がその一例である。絞輪部は神経軸索に沿って解析した場合、約3～4ミクロンの範囲に収まる。従って必要な連続切片は、30～40枚である。

そこで、私達は、中枢神経の絞輪部を三次元的に解析するため、ラット視神経全体の横断面を対象に119枚の連続切片を一枚の導電処理したスライドガラス上に回収し(図10)、絞輪部を含む連続画像の反射電子像を取得した(40箇所以上)。その結果、教科書的には中枢神経の絞輪部を被っているはずのアストログリアは本研究では13%に留まり、約76%は細胞間基質で囲まれていることが明らかになった(図11)。未発表のため、詳細なデータについては省かせて頂く。神経細胞体周囲を含め、細胞間基質の重要性は注目されつつあり、絞輪部周囲での研究成果も報告されているが、40を越える絞輪部の超微形態的検索はなされてこなかった。

以上のように、私達の研究にとって、比較的容易に、信頼できる例数のデータを得ることができた。方向の揃った、必要枚数の連続切片をSEMの反射電子を活用したことで可能となったと考えている。

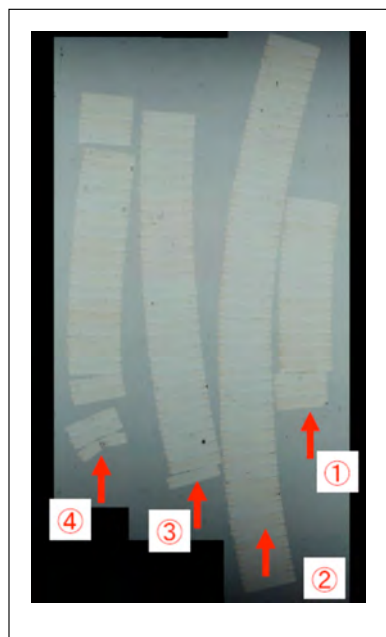


図10 同スライドガラス上の119枚の連続切片。一枚の切片は1 mmX2 mm。切片厚は100 nm。比較的方向が揃っている。また、順番にも不安が無い。

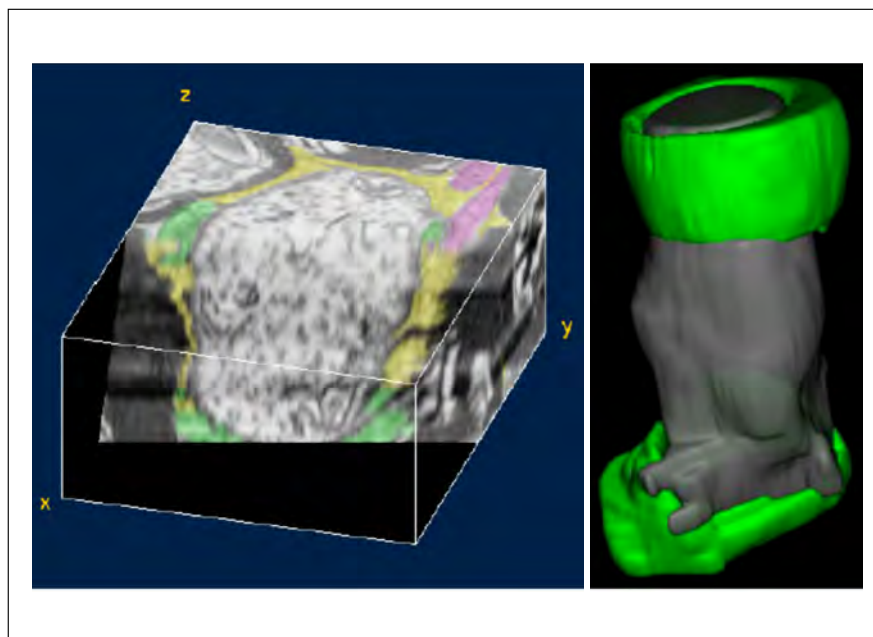


図11 反射電子像を元に三次元構築した画像の一例。 緑＝オリゴデンドログリア；ピンク＝アストログリア；黄色＝細胞間基質。 左図：絞輪部での軸索の横断面と縦断面を示す。この絞輪部の軸索表面は、主に、細胞間基質により被われ一部、アストログリアによって囲まれている。 右図：絞輪部軸索表面は全面、細胞間基質で囲まれる。

6. まとめ

反射電子像を活用したいいくつかの解析技術と、2軸トモグラフィー法によって、生物試料の3次元解析は、「より細かく、より広範囲にそして、三次元的に」という半世紀を越える難題を克服しつつある。私達は、同一試料を用いた、2軸電子線トモグラフィー法によるサブナノスケールから、超広範囲グリッドレス電顕法による数ミリを越えるスケールまで、シームレスに観察可能な「マルチスケール・シームレス電顕観察法」も夢ではないと考えている。

実際、著者らは病理標本について、SB-SEMとDA-ETを活用し、形質細胞と樹状細胞間の特殊な融合現象を明らかにした（文献2）。

さらに、電顕画像がデジタル化された現在、電子顕微鏡による解析は必ずしも電子顕微鏡の前でなければならない、という縛りも解けつつある。このような「バーチャル電顕」の確立は、科学的透明性を担保できる電顕データの蓄積と活用を可能にする。さらに、貴重な試料の科学者・研究者間での共有・継承というこれまで行われてこなかった研究データベースの構築にも扉を開いた。現在でも、著名な神経科学の祖、カハールの鍍銀標本は顕微鏡観察可能な状態に保たれていると聞いたが、このシステムが確立すれば、優れた研究の基礎となった原標本、ここでは元の電子顕微鏡像を全世界的に共有できることになる。また、貴重な実験動物を使う研究においては、研究者・グループごとに、動物を固定し、基礎データを得るまでもなく、信頼できる実験方法に則って得られた形態画像を広く活用できる場合もあると考えられ、研究リソースの不必要な浪費を避けることができる。加えて、研究内容に疑義が生じた場合、原データへのアクセスが広く可能であることは、研究結果の透明性の確保に繋がり、科学研究の信頼も大きく向上する。

「論文リバイスのための電顕データ解析を実際の電顕画像をみながら続けた。新幹線の中である。2時間後、目的地に到着。何とか要求される電顕データの三分の一が終わった。その後、国際便に搭乗。小休止をはさみ、4時間あまりで、目的のデータ取得は終了。」という話しも夢ではない。

バーチャル電顕のおかげで、電子顕微鏡の前に居る必要がなくなった。研究室のオフィス、自宅、移動中、出張先のホテル、いつでも電顕解析が可能である。こんな、バーチャルデータの可能性が見えてきた。外国メーカーのこの分野での挑戦の開発は目覚ましいものがある。61ビームの走査電顕が現実の物となっている。勿論、収益を望める技術ではない。しかし、かつての日本企業・技術者集団は「夢」を追い求め、独創的な物を開発し世界中を驚かせた。願わくは、この経験を活かし、生命科学・形態解析の最先端を見据えた研究機器の開発に一石を投じて頂きたい。

謝 辞

本小論の研究内容は、岩手医科大学医歯薬総合研究所バイオイメージングセンター・石田欣二技師長、はじめ、花坂智人、松浦絵里、小笠原勝利、野崎貴介の各技術員、浅田千架子事務員の皆様の全面的な支援により得られたものです。また、日新 EM (株) 代表取締役丸田節雄氏には、スライドガラス固定用 SEM 試料台の改良にご協力頂きました。さらに、(株) 日立ハイテクノロジーズのご厚意によりいくつかの機器を利用する機会を与えて頂くと共に、技術的課題について積極的な協力を頂き、機器・ソフトを改良して頂きました。あらためて感謝いたします。

また、研究内容については、Prof AR Lieberman, Prof WD Richardson, Prof P Anderson, Prof D Attwell (以上 University College London), 早稲田大学・杉田陽一教授, 理化学研究所 BSI・平林義雄チームリーダー, 東京都医学総合研究所・星英司研究主幹との共同研究です。

なお、本研究の一部は文部科学省科学研究費 (25650181 挑戦的萌芽; 25245069 基盤 A) および文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の支援により実施されました。

参考文献

- 1) GS Tomassy, DR Berger, H-H Chen, N Kasthuri, KJ Hayworth, A Vercelli, HS Seung, JW Lichtman, P Arlotta*: Distinct Profiles of Myelin Distribution Along Single Axons of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Science* 344:319-324, 2014
- 2) T Sawai, A Kamataki, M Uzuki, K Ishida, T Hanasaka, K Ochi, T Hashimoto, T Kubo, A Morikawa, T Ochi, K Tohyama*; Serial block-face scanning electron microscopy combined with double-axis electron beam tomography provides new insight into cellular relationships. *J. Electron Microsc.* 62:317-320, 2013
- 3) I McKenzie, D Ohayon, H Li, J Paes de Faria, B Emery, K Tohyama, WD Richardson*: Motor skills learning requires new central myelination. *Science, in press*, 2014

電子線ホログラフィーによるスキルミオン格子の磁束観察と三次元構造

Observation of the magnetic flux and three-dimensional structure of skyrmion lattices by electron holography



独立行政法人 理化学研究所
創発物性科学研究センター (CEMS)

朴 賢洵

現所属:
Department of Materials
Science and Engineering,
Dong-A University,
Republic of Korea

協同執筆者

于 秀珍*1, 会沢真二*1, 谷垣俊明*1,2, 明石哲也*2, 高橋由夫*2, 松田 強*3, 金澤直也*4, 小野瀬佳文*5,
進藤大輔*1,6, 外村 彰*2, 十倉好紀*1,4

1. はじめに

スキルミオンは将来の低消費電力スピントロニクスデバイス¹⁻³⁾における情報伝達媒体として有望視されるナノスケールの渦状スピントクスチャである。これまで中性子散乱^{4,5)}と電子顕微鏡⁶⁻¹¹⁾によりスキルミオンの観察が行われてきたが、薄膜試料の厚さ方向の定量的なスピン構造の解明には至っていなかった。電子顕微鏡による実空間イメージングはスピン構造を解明する直接的な手法であり、試料の電磁場による透過電子波の波面の変位(位相シフト)を検出することにより試料の電磁場をナノスケールで定量的に計測することの出来る電子線ホログラフィーは、スピントロニクスデバイスの研究において有効な手法である。電子線ホログラフィーを用い、 $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ 薄片試料のスキルミオン格子の磁場および三次元スピン構造を初めて解析した結果が、2014 年 5 月号の Nature Nanotechnology の表紙として掲載¹²⁾されたので、以下にその結果を紹介する。

近年、トポロジカル・スピントクスチャの量子輸送研究での使用や、スピントロニクスへの応用の可能性が注目されている。特に、極めて低い電流密度($\sim 1 \times 10^6 \text{ Am}^{-2}$)^{2,3,13,14)}でのスピントランスファートルクの出現により、メモリやロジック装置の情報媒体としてのスキルミオンへの注目度は大きくなっている。トポロジカル量子数を有するスキルミオンは三次元的に様々な方向を向いた磁場を有する。この磁場に誘発された仮想磁場(fictitious magnetic field)により、スキルミオン結晶上を流れる電子は偏向し、トポロジカルホール効果が生じる^{15,16)}。スキルミオンを実際のデバイスに応用するには、室温でのスキルミオンの実現、スキルミオンの三次元構造の解明、スキルミオンを含む薄膜の加工など、研究すべき課題がいくつかある。最近の理論研究¹⁷⁻¹⁹⁾にもかかわらず、スキルミオンの三次元構造はいまだ解明されていない。スピントロニクスデバイスへのスキルミオンの応用には、微視的なスキルミオンの三次元構造の解析が必須である。

ローレンツ電子顕微鏡法(LEM)のフレネル法を用いて金属、半導体および絶縁体の薄片試料のスキルミオン格子の実空間イメージングがこれまでに行われている^{6-8, 20)}。また、超伝導体中の磁束量子、磁性体中の磁壁およびスキルミオンなどの特異的な磁気構造体の動的な挙動を直接観測するためにも、フレネル法はミリ秒からナノ秒領域までの時間分解能で活用されている^{14, 21-24)}。しかし、デフォーカス状態による空間分解能の低下と試料表面の凸凹や汚染による不均一なコントラストにより、スキルミオンにおける磁束の定量解析はフレネル法ではかなり困難である。

最近、磁気力顕微鏡法(MFM)により空間分解能 $\sim 20 \text{ nm}$ で $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ バルク結晶の表面のスキルミオン格子が観察された¹⁰⁾。MFMは試料表面から漏出した漂遊磁界のみ検出するため、スキルミオン自体の磁束の解明にはすぐには結びつかない。更に、試料の磁性状態はプローブチップの形状や表面状態の影響を受けやすく、正確に試料の磁性を調べることは難しい。

電子の波動性を利用した電子線ホログラフィー²⁵⁾を使用すると、試料による電子波の波面の変位(位相シフト ϕ)を実空間でインフォーカスの状態で直接検出し、スキルミオンの磁場を視覚化出来る可能性がある。実際には、位相像を平均化して位相計測精度を上げたり、静電ポテンシャルおよび磁気ベクトルポテンシャルを分離したりする必要があるため、スキルミオンの様に弱位相物体の正確な位相測定は極めて困難である。しかし、インフォーカス計測である電子線ホログラフィーはLEMやMFMに比べ空間分解能的に有利であり、ナノメートル単位の解像度で量子化磁束の視覚化が可能になるほか、スキルミオンの磁束密度を決めることもできる。本研究では高電圧ホログラフィー電子顕微鏡により、らせん磁性体である $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ 薄片試料のスキルミオン格子の二次元磁束密度を計測し、らせん(ヘリカル)およびスキルミオンの三次元構造を評価した。

2. 実験方法

$\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ 単結晶 (B20 型) はフローティングゾーン法により作製した。FIB (FB-2100, 日立ハイテクノロジーズ製) とマイクロサンプリング機能を用い、厚さ 55 nm から 510 nm までの薄片試料を作製した。加速電圧 300 kV (電子波長 1.969 pm) ホログラフィー電子顕微鏡 (HF-3300S, 日立ハイテクノロジーズ製) および 1,000 kV (0.872 pm) の超高圧ホログラフィー電子顕微鏡 (H-1000FT, 日立ハイテクノロジーズ製) は、高輝度・高干渉性を実現する冷陰極電解放出型の電子源を備えている。入射電子による薄片試料の損傷は正確な結果を得る上で障害となるため配慮が必要である。電子照射損傷によるらせんまたはスキルミオン格子のコントラスト (または位相シフト) 減少が起これないように、複数の試料を使用し観察ごとに試料を交換した。顕微鏡観察時の試料の位置は、磁場フリー位置と対物レンズ位置の 2 つの位置がある。電子線ホログラム (磁場印加有無それぞれ) は、残留磁場が ~ 0.01 mT (測定値) となる磁場フリー位置で観測した。試料への磁場印加には磁場フリー位置に搭載した外部磁場印加装置²⁶⁾を用い、試料面に直角に磁場 (最大 50 mT) を印加した。ホログラムの記録には、 $4,096 \times 4,096$ (15 μm /画素) のスロースキャン CCD カメラ (UltraScan4000, Gatan 製) を使用した。スキルミオン格子の位相計測における位相分解能を上げるため、同じ条件で連続して取得した 64 枚のホログラムから再生した位相像の平均化処理を行った。各ホログラムの露出時間は 10 秒とした。ネール温度 T_N 以下での相転移状態を観察するため、液体ヘリウム冷却 2 軸傾斜ホルダー (ULTDT, Gatan 製) を使用した。

3. 実験結果

図 1a に集束イオンビーム (FIB) 法により作製した薄片試料の画像と概略設計を示す。図 1a の画像における回折パターンは入射電子ビームが $[001](z)$ 方向に平行な場合の単結晶パターンを示している。画像のコントラスト (図 1a) は試料の厚さが変わると、明白に変化している。厚さ 510 nm の数値はらせん周期の 5 倍以上である。試料の厚さを変化させた目的は、 z 方向のらせんおよびスキルミオンの三次元構造を解明することである。これらの磁気構造による位相シフト ϕ が試料厚さに対しどう変化するかを調べ比較した。

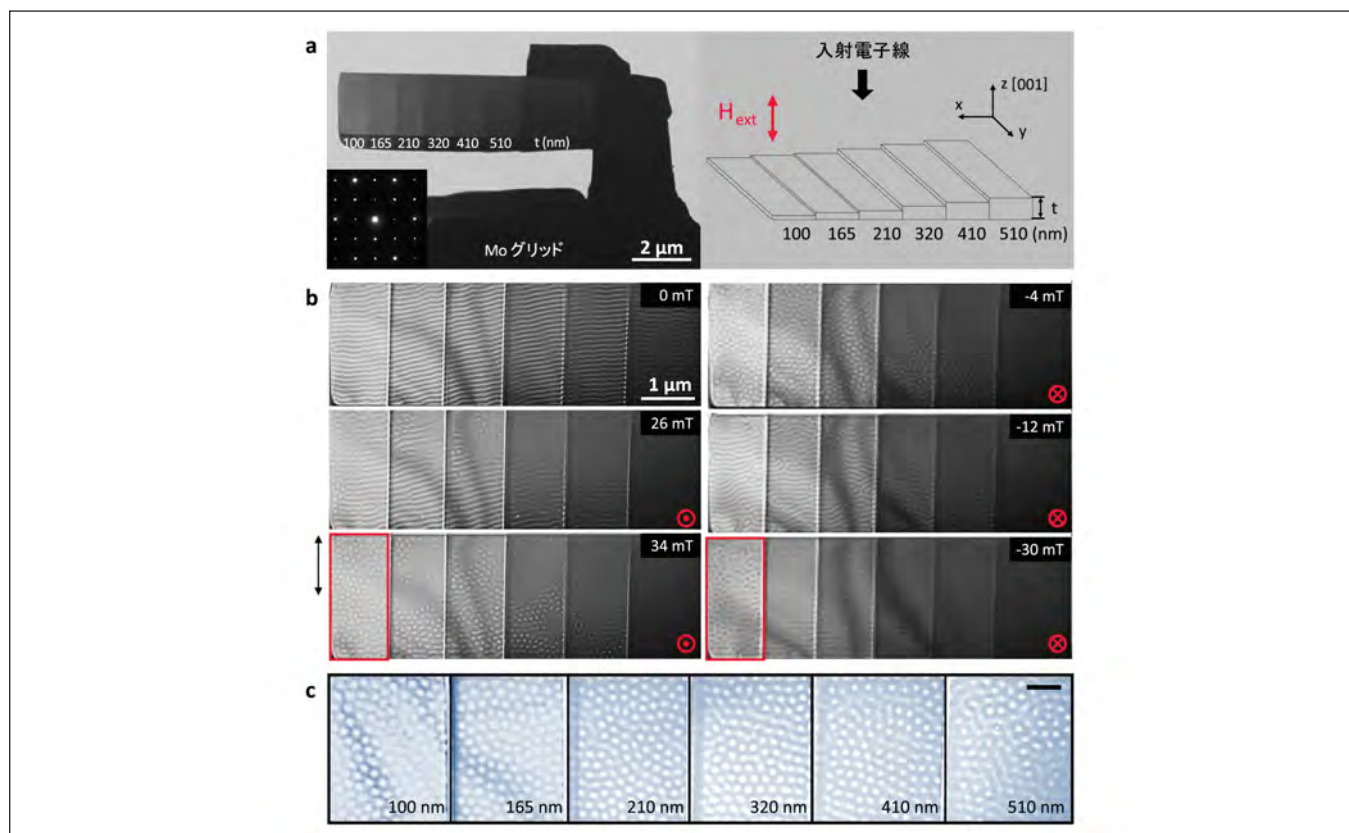


図1 $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ 薄片試料のローレンツ電子顕微鏡像

a. FIB法により作製した薄片試料の画像と概略図。コントラストの差は異なった厚さを示す。

H_{ext} は印加した磁場を示す。(左下)[001]晶帯軸に沿って入射した電子回折像。

b. $T = 12$ Kで薄膜(画像)面に垂直に印加された磁場の増加による磁場配位の変化。画像ごとに印加した磁場を示す。赤い記号は磁場の方向を示す。全ての画像はローレンツ電子顕微鏡フレネル法によりオーバーフォーカス状態(デフォーカス値 ~ 1.4 mm)で撮った。赤い四角で示したパネル内のスキルミオン格子のコントラストの逆転がはっきりわかる。両矢印はcの領域に対応した試料のエッジを示す。

c. 25 mT磁場冷却による12 Kでのスキルミオン格子の厚さ依存性。スキルミオン格子を明らかに示すため、画像コントラストは画像ごとに調整した。スケールバーは300 nm。

1,000 kV のローレンツ顕微鏡による顕微鏡写真 (図 1b, 1c) は、磁気構造が $T = 12$ K の薄膜面に垂直に印加した磁場によって変化することを示している。ここで、薄片試料の局所温度は試料の形状により異なる点に留意する必要がある。図 1b の濃淡のラインで示される縞模様の領域は、ゼロ磁場冷却により全試料ではっきり見ることができる。磁区の方法は [100] 方向に平行であり、らせん周期は試料の厚さによらず ~ 90 nm だった。

26 mT の磁場を印加したところ、ストライプ模様の磁区が白点に変化し、スキルミオン格子になったところがあった。白点は主に領域境界付近に集中し、厚さは 100 nm, 165 nm および 210 nm だった。34 mT の磁場を印加すると、スキルミオン格子が試料全体で観測され、白点は厚さが増すにつれ小さくなった。厚さが 300 nm 以上になると試料境界付近でスキルミオン格子は見られなくなった。-4 mT 印加時に白点の磁区が残ったことは興味深い。最終的に、磁場が -30 mT に達すると、白点のスキルミオン格子は黒点に変化した (図 1b の赤い三角形)。磁場を冷却することにより (25 mT, 12 K, 図 1c), 34 mT の領域に対応した両矢印で示すように、スキルミオン格子が試料境界付近でも観測されたことに留意すべきである。

次に電子線ホログラフィーによるスキルミオン格子における磁束の視覚化を考える。真空を通る電子波と試料を通る電子波が存在する off-axis 電子線ホログラフィーでは、ホログラムから位相差がわかる。x-z 面に 2 つのビーム経路により作られる閉路があることが想定される (図 5c)。厚さ t の薄膜と面内磁化 (y 方向) については、磁場の真空への漏れが極わずかである場合、位相変化 $\Delta\varphi$ は以下の式で表すことができる。

$$\Delta\varphi = C_E V_0(x, y) t(x, y) - \frac{2\pi e}{h} \iint B_n(x, y) dx dz \quad (1)$$

ここで、 C_E は相互作用定数 (300 keV の電子に対しては $0.00652 \text{ rad V}^{-1} \text{ nm}^{-1}$, 1,000 keV の電子に対しては $0.00538 \text{ rad V}^{-1} \text{ nm}^{-1}$), $V_0(x, y)$ は平均内部電位, $t(x, y)$ は投影厚さ, h はプランク定数, e は素電荷, B_n はビーム路により定義される面に垂直な磁場の成分、即ち y 方向である。電子線ホログラフィーの詳細については資料^{25,27,28)}を参照のこと。

図 2a に $T = 10.6$ K および 25 mT で得られたホログラム (干渉縞) を示す。電子バイプリズムを用い真空を通過する参照波と薄片試料を透過した物体波を干渉させホログラムを得た。複数の位相像を位置合わせし平均化しやすいように、FIB により直径 100 nm 程度の穴を作製した (図中黄色の円)。ホログラムから再生した位相像 (図 2b) はスキルミオン格子を示す。電子の位相シフトは式 (1) で与えた電気・磁気ベクトルポテンシャルの足し合わせである。以後、これら電気・磁気ポテンシャルによる位相シフトをそれぞれ、 φ_E , φ_M とする。スキルミオンのような弱位相物体の正確な位相を測定するため、 φ_E と φ_M を区別して、試料の不均一性など不要な要素を除去した。図 2b にネール温度 T_N 以下の位相像 $\varphi_E - \varphi_M$ を、図 2c に T_N 以上で常磁性状態となり φ_E のみとなった状態を示す。これら 2 つの位相像 (図 2b, 2c) を除去すると、図 3a に示す等位線 (白線) 間の差が 0.1 rad に対応する φ_M のみ残る。本研究における 300 kV および 1,000 kV 電子顕微鏡を用いた観察結果から、薄片試料の T_N を評価したところ両方とも ~ 35 K と見積もられた。これは、バルク $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ より 8 K 低い。 T_N の減少は前回の報告⁸⁾におけるらせん磁性体 MnSi でも見られた。

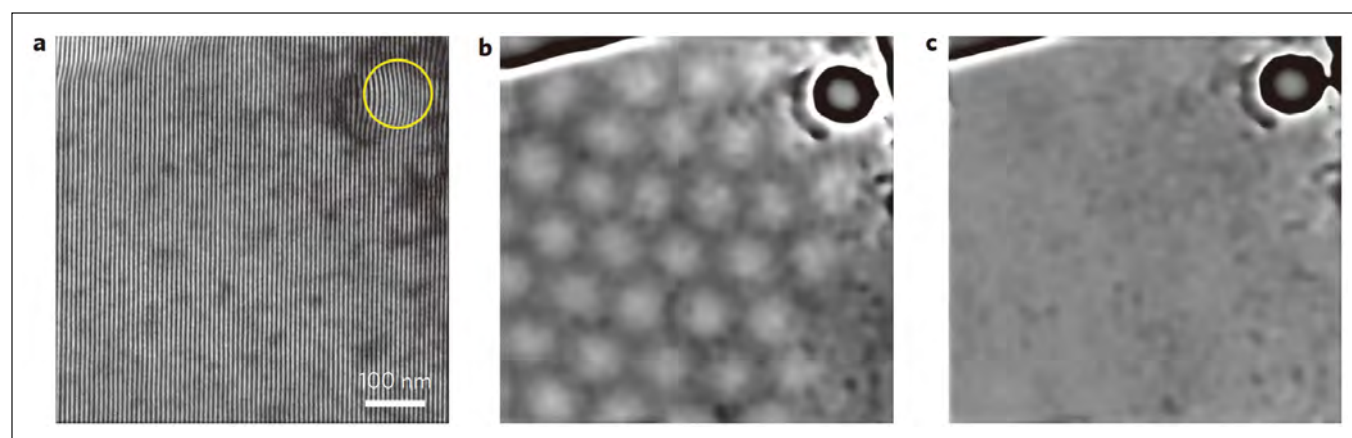


図2 スキルミオン格子と常磁性状態を示す位相マップ

- a. 25 mT および $T = 10.6$ K のスキルミオン格子のホログラム。黄色い円は64枚の位相像を平均化する際位置合わせをするために目印としてFIBで作製した穴である。
- b. スキルミオン格子の電気 (φ_E) および磁気 (φ_M) ベクトルポテンシャルによる位相シフトを示す、($T = 10.6$ K, ネール温度 T_N 以下) のホログラムから再生した位相像。
- c. 25 mT および $T = 41.6$ K (T_N 以上) における、 φ_E のみ示す常磁性状態の位相像。

再生された位相像(図 3b) には, $\cos 50 \varphi(x, y)$ により表されるスキルミオン格子の二次元磁束マップが見られる。図 3b の白と黒の輪郭線は電子ビーム方向に投影した磁束線を示す。図 3c (図 3b の赤線で囲った部分の拡大図) の赤い矢印は磁束内面成分の方向を示す。各スキルミオン内では反時計回りの磁束の流れが観測された。図 3b および 3c それぞれにおける黒い等位相線間の位相差は $\Delta \varphi_M = \pi / 25$ である。この位相差により, 試料の厚さ方向に積算した磁束密度(y 方向)の内面成分 $B_n(x, y)$ を直接測定することができる。式 (1) から, 2 つの位相像 (図 2b および 2c) を引いた後の位相 $\Delta \varphi_M(x, y)$ の x 方向の傾きは以下の式で与えられる。

$$\frac{\partial \Delta \varphi_M(x, y)}{\partial x} = -\frac{2\pi e}{h} B_n(x, y) t(x, y) \quad (2)$$

ここで, h/e は磁束量子 (4.1×10^{-15} Wb) の 2 倍である。例えば, 試料の厚さ 290 nm の図 3 場合, 図 3c のアスタリスクを付けた領域の位相シフトは $0.0174 \text{ rad nm}^{-1}$ であった。式 (2) を用いて, この領域の磁束密度の内面成分 $0.040 \pm 0.005 \text{ T}$ が得られた。ここで観測した磁束は実際に存在する磁束であり, スキルミオンが伝導電子に対して与える仮想磁場 (fictitious magnetic field) ではない。

図 3a の直線 A-B の位相変化を図 3d に示す。正弦波形 (赤い曲線) に対応しており, らせん周期に $2/\sqrt{3}$ ^{29, 30)} を乗じたスキルミオン格子周期は $120.8 \pm 0.2 \text{ nm}$ である。観測では試料厚さ方向に積算した位相シフト φ の変化が正弦波形だったが, これは, 図 3d のスキルミオン格子周期でスピンの角度が一定の角度で 360 度回転することを示す。原子のカラムごとの磁気イメージングの達成に向けた原子分解能による電子線ホログラフィー観測は, Dzyalosinsky-Moriya (DM) 相互作用の局所測定, およびスピントポロジーを決める際の DM 相互作用の役割を評価する上で非常に重要となると期待される。

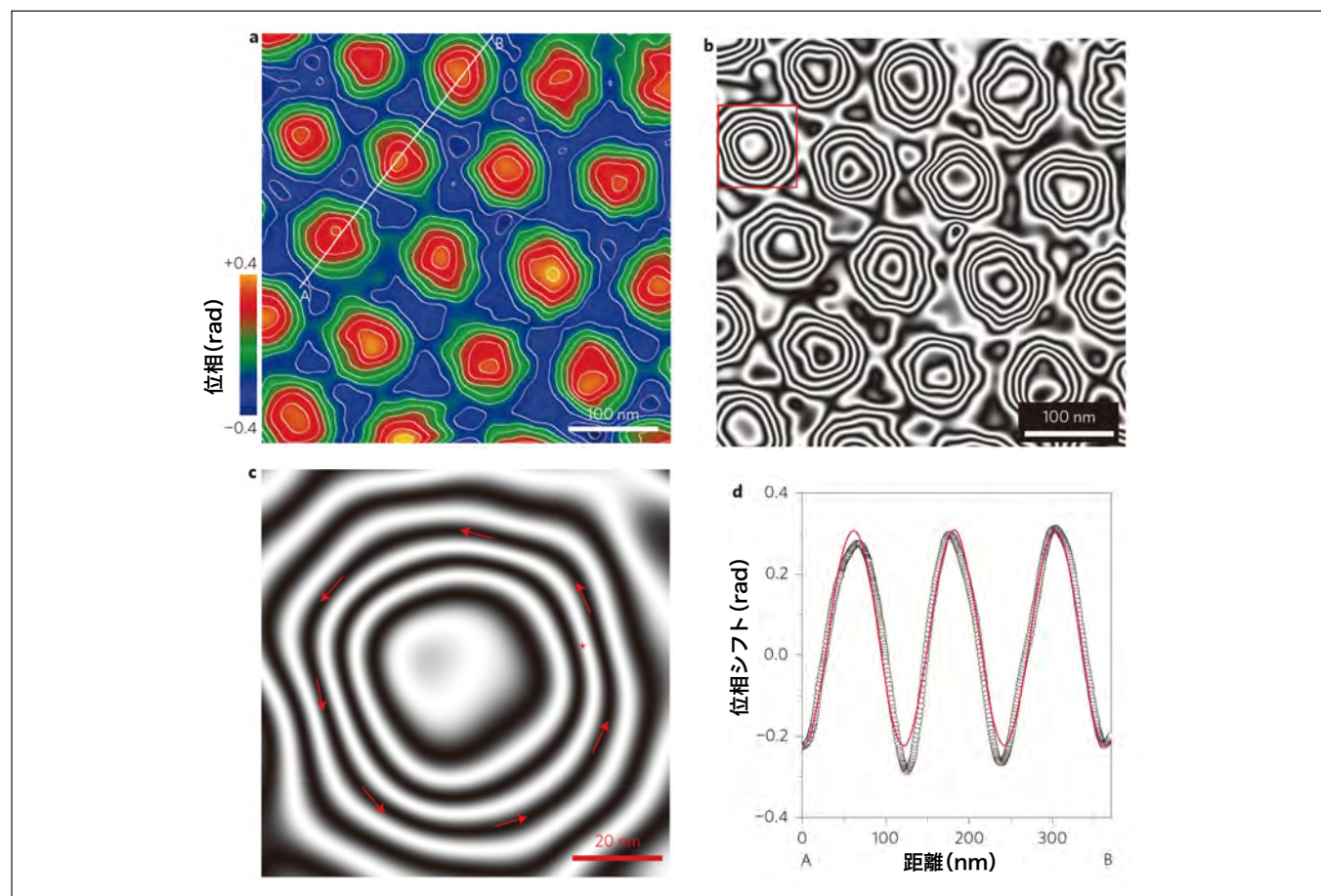


図3 スキルミオン格子の磁束マップ

- a. 磁気ベクトルポテンシャル φ_M による位相シフトを示す二次元マップ。等位相線の差は 0.1 rad である。d に A-B に対応したプロファイルを示す。
b. スキルミオン格子内の磁束の流れ。白線と黒線は磁束線を示す。
c. b の赤い四角で示す領域の拡大画像。赤い矢印は磁束線の方向を示す (反時計回り)。黒線間の位相差は $\pi/25$ となる。赤いアスタリスクは磁束密度の内面成分を決定した領域を示す。
d. a の直線 A-B に対応する位相シフトの分析結果。赤の曲線は正弦波形を示す。スキルミオン格子の間隔は 120.8 nm であった。

スキルミオン格子の磁束の流れる方向は、印加する磁場の方向に依存する。ある方向に磁場を印加したところ、位相シフトの分布が図 4a に示すように膨らんだ。磁場の印加方向を反対にすると、膨らみも反対方向になった(図 4b)。これは、磁束の方向が反時計回りから時計回りになったことを示す。位相シフト φ は三角格子の中心部において最小値であった。図 4c の円と矢印が示すように、この領域に流れる磁束の方向はスキルミオンのスピン回転方向とは逆になっていると思われる。電子顕微鏡法では入力電子ビームに平行な磁化は検出しないが、以前の報告⁶⁾にもある通り、最小位相シフトと最大位相シフトを示す 2 つ磁心の磁化方向が反対であるという仮定は妥当であると思われる。

次に、らせん(ヘリカル)とスキルミオンにおける三次元的な z 軸方向のスピン構造を検討する。1,000 kV のホログラフィー電子顕微鏡の透過能を活かし計測した、らせんおよびスキルミオンにおける位相シフト φ の試料厚さ依存性を図 5a に示す。図 3d と 5c に示すように、位相シフト φ を正弦曲線の最大値と最小値の差として計測した。スキルミオン計測データにおける近似線で示すように、位相シフト(図 5a)は試料厚さ t と直線関係になった。傾きは $0.00173 \text{ rad nm}^{-1}$ だった。さらに、図 5a では、スキルミオンによる位相シフトがらせんスピン構造による位相シフトと極めて類似していることがわかる。図 5c にスキルミオンの三次元スピン構造と、直線 A-B (x-z 面) 部分において試料厚さ t 方向に位相シフトを積算した結果得られる x 方向の位相シフトプロファイルを示す。図 5c 中の各色の矢印は各点における磁化方向を示す。実験では、直線 A-B 部分の位相シフトが正弦曲線への対応を示すだけでなく、試料厚さ $55 \text{ nm} \sim 510 \text{ nm}$ の線形関数、即ち、 $\varphi = 0.00173t$ に対応している点に留意されたい。スピン構造による位相シフトが試料厚さに対して線形に変化することから、図 5b および 5c に示すらせん磁性体 $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ の磁気構造に見られるように、スキルミオンの三次元スピン構造は円筒状であるという結論に達した。

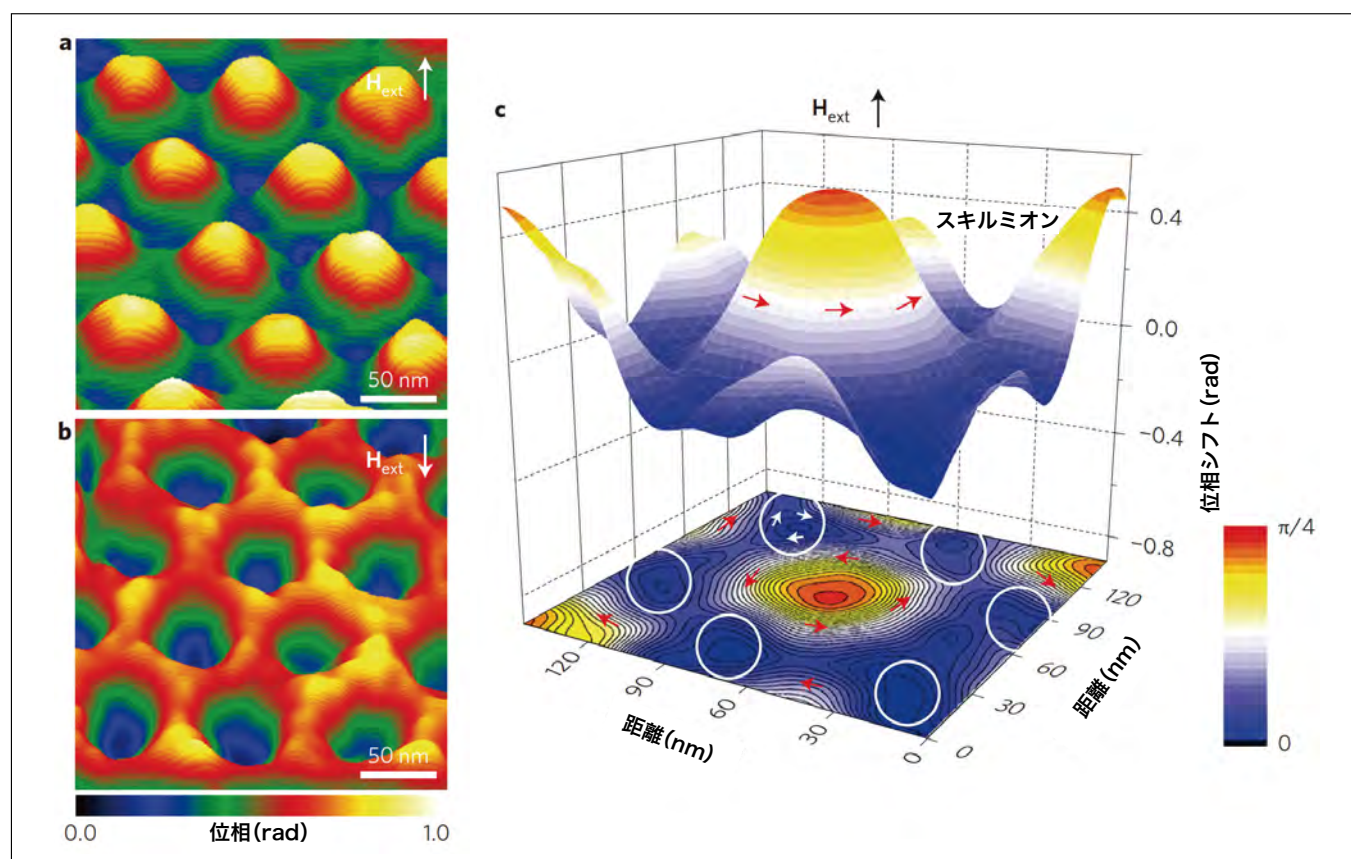


図4 磁場印加方向の変化による磁束の反転

a. b. 位相像の表面図。画面ごとに磁場 H_{ext} の印加方向を示す。印加方向の変化による位相シフト記号の反転は明らかで、磁束の流れる方向が反転したことを示す。

c. スキルミオンによる位相シフトの拡大図。赤と白の矢印は磁束の方向を示す。白円で示した領域では位相シフトの最小値が見られる。

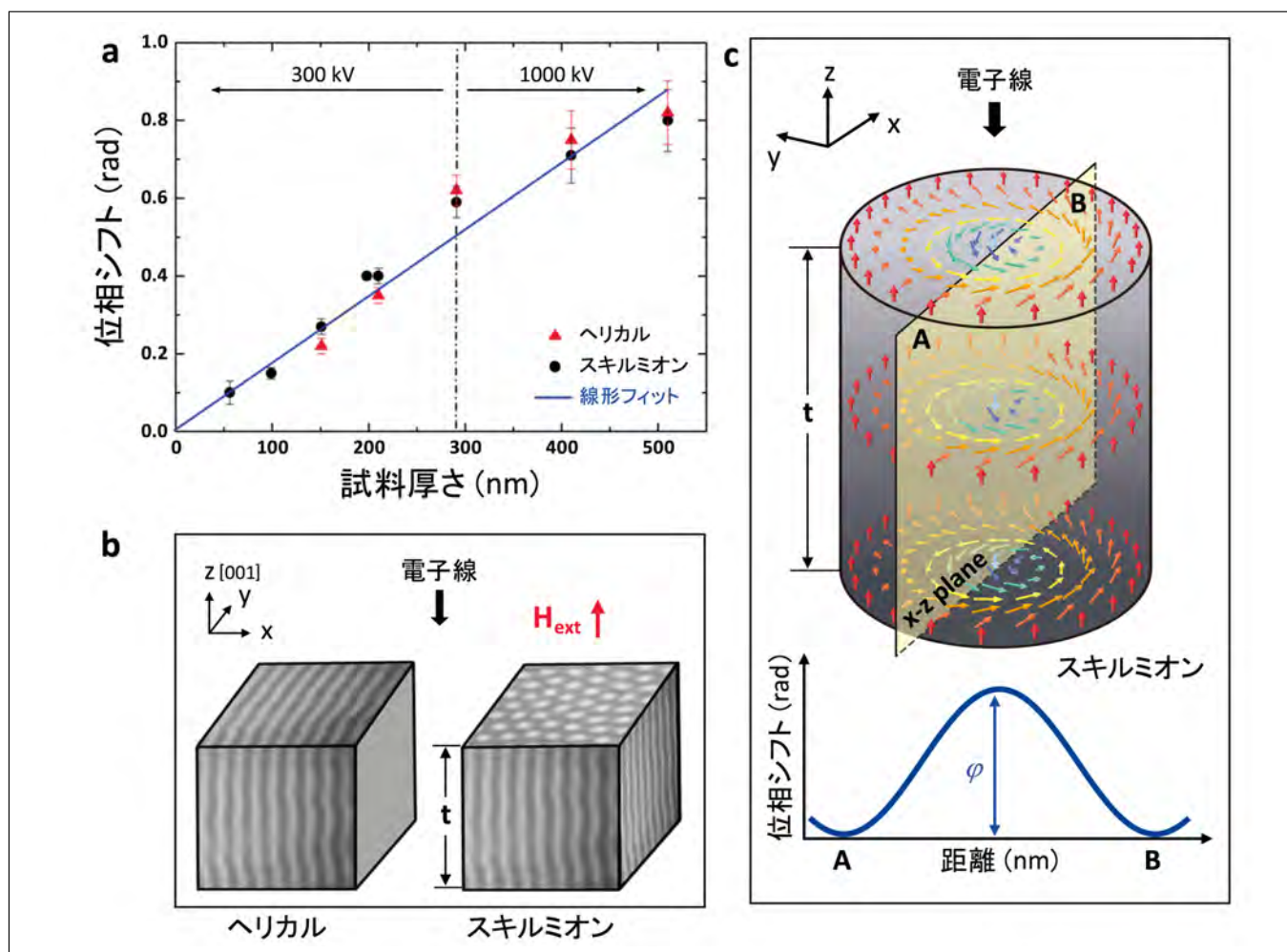


図5 スキルミオンの三次元構造

a. 試料の厚さに対する、らせん(ヘリカル)およびスキルミオンによる位相シフト。位相の測定には6個の試料を使用した(300 kVおよび1,000 kVホログラフィー電子顕微鏡による)。位相シフト ϕ と試料厚さの関係の線形適合線の傾きは $0.00173 \text{ rad nm}^{-1}$ である。エラーバーは標準偏差を示す。

b. らせんおよびスキルミオンの三次元構造の概略図。黒の矢印は入射電子ビームの方向を示し、赤の矢印は印加した磁場の方向を示す。

c. スキルミオンの三次元スピン構造の概略図と、直線A-B(x-z面)に対応する箇所での試料厚さ t 方向に積分したx方向の位相シフト曲線。直線A-Bに対応する位相シフト ϕ は、正弦曲線の最大値と最小値の差として測定した。

4. まとめ

電子線ホログラフィーを用いた正確な位相計測による位相シフトの実空間イメージングにより、 $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ 薄片試料のスキルミオン格子内の磁束の可視化と定量化が可能になった。スキルミオンの磁束の流れは、磁場の印加方向を反対にすると逆転した。らせんおよびスキルミオンによる位相シフトの試料厚さ依存性を直接計測することにより、スキルミオンの三次元スピン構造が円筒状であることを明らかにした。この様に電子線ホログラフィーは、らせん磁性体 $\text{Fe}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Si}$ のスキルミオン格子の三次元スピン構造を理解する上で有効な手法である。また、高精度磁場計測を可能とする高電圧ホログラフィー電子顕微鏡が、創発物性システムやスピントロニクスデバイスにおける磁場の定量解析、三次元解析など、多方面で応用されることを期待する。

謝 辞

本研究は総合科学技術会議 (CSTP) により制度設計された最先端研究開発支援 (FIRST) プログラム「原子分解能ホログラフィー電子顕微鏡の開発と応用」および「強相関量子科学」により、日本学術振興会 (JSPS) を通して助成されたものです。

参考文献

- 1) Fert, A., Cros, V. & Sampaio, J. Skyrmions on the track. *Nature Nanotech.* 8, 152–156 (2013).
- 2) Iwasaki, J., Mochizuki, M. & Nagaosa, N. Universal current-velocity relation of skyrmion motion in chiral magnets. *Nature Commun.* 4, 1463 (2013).
- 3) Rosch, A. Skyrmions: moving with the currents. *Nature Nanotech.* 8, 160–161 (2013).
- 4) Pfleiderer, C. et al. Partial order in the non-Fermi-liquid phase of MnSi. *Nature* 427, 227–231 (2004).
- 5) Muhlbauer, S. et al. Skyrmion lattice in a chiral magnet. *Science* 323, 915–919 (2009).
- 6) Yu, X. Z. et al. Real-space observation of a two-dimensional skyrmion crystal. *Nature* 465, 901–904 (2010).
- 7) Yu, X. Z. et al. Near room-temperature formation of a skyrmion crystal in thinfilms of the helimagnet FeGe. *Nature Mater.* 10, 106–109 (2011).
- 8) Tonomura, A. et al. Real-space observation of skyrmion lattice in helimagnet MnSi thin samples. *Nano Lett.* 12, 1673–1677 (2012).
- 9) Heinze, S. et al. Spontaneous atomic-scale magnetic skyrmion lattice in two dimensions. *Nature Phys.* 7, 713–718 (2011).
- 10) Milde, P. et al. Unwinding of a skyrmion lattice by magnetic monopoles. *Science* 340, 1076–1080 (2013).
- 11) Romming, N. et al. Writing and deleting single magnetic skyrmions. *Science* 341, 636–639 (2013).
- 12) Park, H. S. et al. Observation of the magnetic flux and three-dimensional structure of skyrmions lattices by electron holography. *Nature Nanotech.* 9, 337–342 (2014).
- 13) Jonietz, F. et al. Spin transfer torques in MnSi at ultralow current densities. *Science* 330, 1648–1651 (2010).
- 14) Yu, X. Z. et al. Skyrmion flow near room temperature in an ultralow current density. *Nature Commun.* 3, 1–6 (2012).
- 15) Lee, M., Kang, W., Onose, Y., Tokura, Y. & Ong, N. P. Unusual Hall effect anomaly in MnSi under pressure. *Phys. Rev. Lett.* 102, 186601 (2009).
- 16) Neubauer, A. et al. Topological Hall effect in the A phase of MnSi. *Phys. Rev. Lett.* 102, 186602 (2009).
- 17) Binz, B. & Vishwanath, A. Theory of helical spin crystals: phases, textures, and properties. *Phys. Rev. B* 74, 214408 (2006).
- 18) Park, J. H. & Han, J. H. Zero-temperature phases for chiral magnets in three dimensions. *Phys. Rev. B* 83, 184406 (2011).
- 19) Kanazawa, N. et al. Possible skyrmion-lattice ground state in the B20 chirallattice magnet MnGe as seen via small-angle neutron scattering. *Phys. Rev. B* 86, 134425 (2012).
- 20) Seki, S., Yu, X. Z., Ishiwata, S. & Tokura, Y. Observation of skyrmions in a multiferroic material. *Science* 336, 198–201 (2012).
- 21) Tonomura, A. et al. Motion of vortices in superconductors. *Nature* 397, 308–309 (1999).
- 22) Park, H. S. et al. Direct observation of magnetization reversal in thin Nd₂Fe₁₄B film. *J. Appl. Phys.* 97, 033908 (2005).
- 23) Junginger, F. et al. Spin torque and heating effects in current-induced domain wall motion probed by transmission electron microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 90, 132506 (2007).
- 24) Park, H. S., Baskin, J. S. & Zewail, A. H. 4D Lorentz electron microscopy imaging: magnetic domain wall nucleation, reversal, and wave velocity. *Nano Lett.* 10, 3796–3803 (2010).
- 25) Tonomura, A. *Electron Holography* 2nd edn (Springer-Verlag, 1999).
- 26) Harada, K., Endo, J., Osakabe, N. & Tonomura, A. Direction-free magnetic field application system. *J. Surf. Sci. Nanotech.* 6, 29–34 (2008).
- 27) Cowley, J. M. & Spence, J. C. H. *Principles and Theory of Electron Holography, Introduction to Electron Holography* (eds Volkl, E., Allard, L. F. & Joy, D. C.) (Kluwer Academic/Plenum, 1998).
- 28) Park, H. S. et al. Nanoscale magnetic characterization of tunneling magnetoresistance spin valve head by electron holography. *Small* 8, 3640–3646 (2012).
- 29) Shibata, K. et al. Towards control of the size and helicity of skyrmions in helimagnetic alloys by spin-orbit coupling. *Nature Nanotech.* 8, 723–728 (2013).
- 30) Nagaosa, N. & Tokura, Y. Topological properties and dynamics of magnetic skyrmions, *Nature Nanotech.* 8, 899–911 (2013).

協同執筆者

*1于 秀珍 会沢真二 谷垣俊明 進藤大輔 十倉好紀
理化学研究所 創発物性科学研究センター(CEMS)

*2谷垣俊明 明石哲也 高橋由夫 外村彰
日立製作所 中央研究所

*3松田 強
科学技術振興機構

*4金澤直也 十倉好紀
東京大学大学院 工学系研究科附属量子相エレクトロニクス研究センター(QPEC)

*5小野瀬佳文
東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 相関基礎科学系

*6進藤大輔
東北大学 多元物質科学研究所

‡外村 彰
故人

考古資料・歴史資料の元素分析

Elemental Analysis of Historical and Archaeological Resources



神奈川大学
理学部 化学科 教授

西本 右子

1. はじめに

出土遺物などの考古資料・歴史資料を科学的な手法によって研究する「文化財科学」は①産地・年代・古環境に関する研究、②劣化機構を含めた材料の特性に関する研究、③保存・修復を目的とする研究の3分野に分けて考えることができる。いずれの場合も非破壊分析が優先され、試料を採取する場合も最小限に抑えることが望まれる。一方で、考古資料・歴史資料は成分組成が不均一であることが多く、劣化が進んでいる試料が大半である。そのため分析によって得られた結果が試料全体を表すかに疑問が残る場合も少なくない。破壊分析が許された試料では、できる限りの測定を行い、情報を積み重ねることが重要となろう。ここでは、江戸時代後期に流通した銀貨、銅銭である寛永通寶、刀剣研磨に用いられる天然砥石をとりあげ、位置情報を伴った元素分析の結果について述べる。

2. 銀貨の元素分析

江戸時代後期に流通した銀貨のうち、天保一分銀、安政一分銀、嘉永一朱銀を取り上げた。これらの銀貨は公称質量品位は記されているものの化学分析値が公表されていない^{1, 2)}。また部位によって金属組成が異なることも予想される。表1に用いた銀貨について示した。

表1 銀貨試料

銀銭	品位 ^{1,2)}	初鑄年
天保一分銀	位最上之銀 98.86%	1837年
安政一分銀	洋銀と同品位 89.3%	1859年
嘉永一朱銀	南鐐上銀 98.71%	1853年

部位による組成の違いを検討するため、はじめに波長分散型蛍光X線分析装置により、銀貨各2枚を洗浄乾燥後、試料全面(表裏)及び安政一分銀と天保一分銀については上下の10 mm φの部分についても測定した。天保一分銀では測定した2枚共にAg:96%, Cu:0.3%, Si:1%, 表裏共に部位によってCuの含有量が異なり、最大で1%, 最小で0.2%であった。安政一分銀では試料による差異もみられ、Ag:92~96%, Cu:3~5%, Si:0.2~2%, Cuは部位によっても異なり最大で6.5%, 最小で2.1%であった。嘉永一朱銀も試料全面のみの測定結果で試料による差異がみられ、Ag:95~97%, Cu:0.5~0.7%, Si:0.5~1.5%であった。次に測定径を2.5 mm φに絞リエネルギー分散型蛍光X線分析装置であるマイクロエレメントモニタ(日立ハイテクサイエンスSEA 5200A)によってマッピング測定を行った。Cu, Ag, Si, Sn, Pb, As含有量に部位による差異が観測された。特にAgとSiに相関がみられ、Agが少ない部位ではSiが多いことがわかった。図1~3に各試料のマッピング測定結果の例を示した。さらに安政一分銀と天保一分銀各1枚より試料内部の0.2 gを削り、硫酸・硝酸で加熱溶解後、酒石酸を添加して溶解試料とし、嘉永一朱銀1枚も同様に0.2 gを削り、硝酸で溶解後残さを王水で溶解し、それぞれICP発光分析装置(日立ハイテクサイエンスSPS3500)により定量した。これらの試料は試料全面の蛍光X線分析によるAgの含有量がそれぞれ、天保一分銀(表:95.9%, 裏:97.7%), 安政一分銀(表:93.8%, 裏:91.4%), 嘉永一朱銀(表:96.4%, 裏:97.1%)である。微量元素であるCu, Sb, Si, As, Znにおいて差異がみられ、いずれも安政一分銀の含有量が多いことがわかった。表2に測定結果を固体中の濃度で示した。

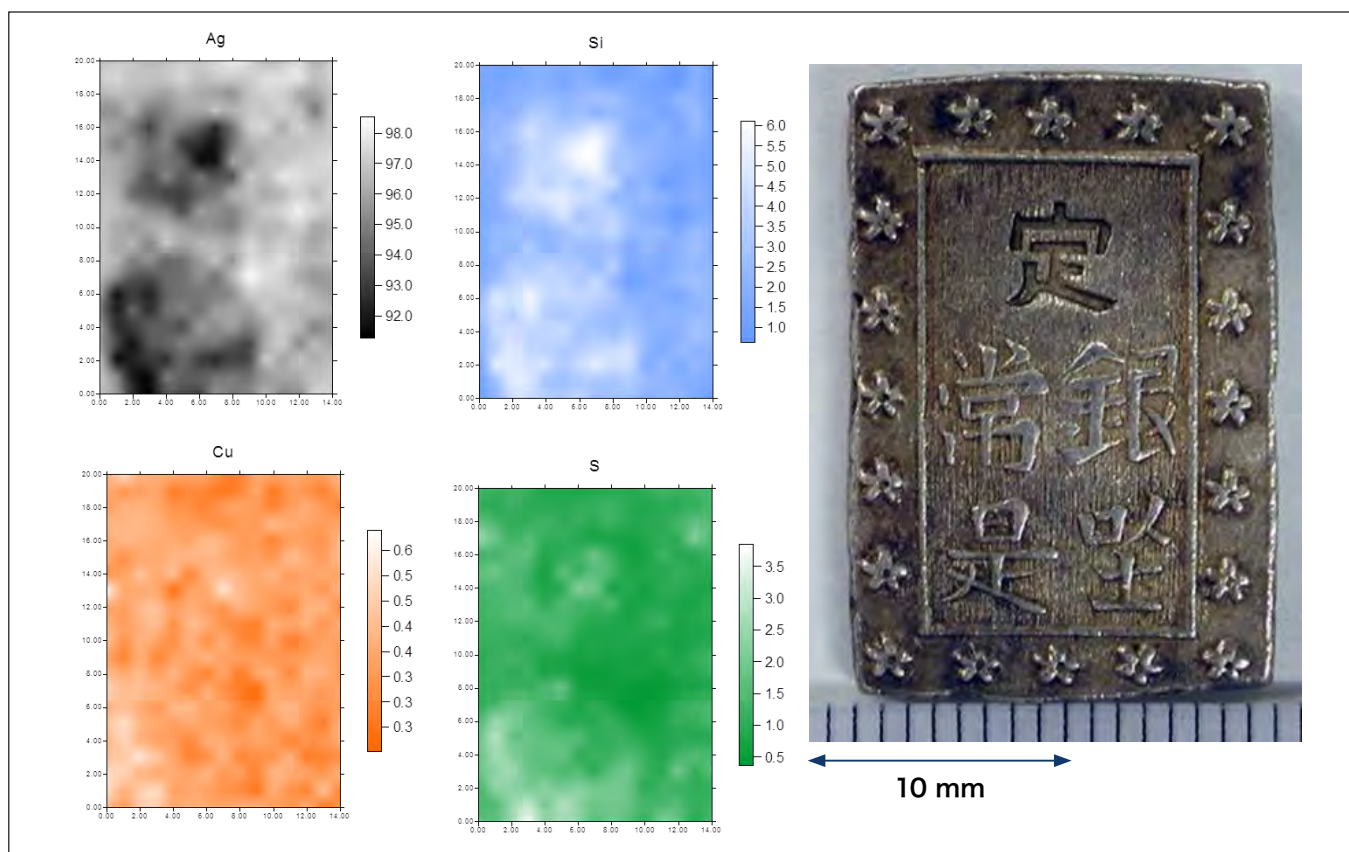


図1 天保一分銀(裏)のEDSマッピング測定(2.5 mmΦ)

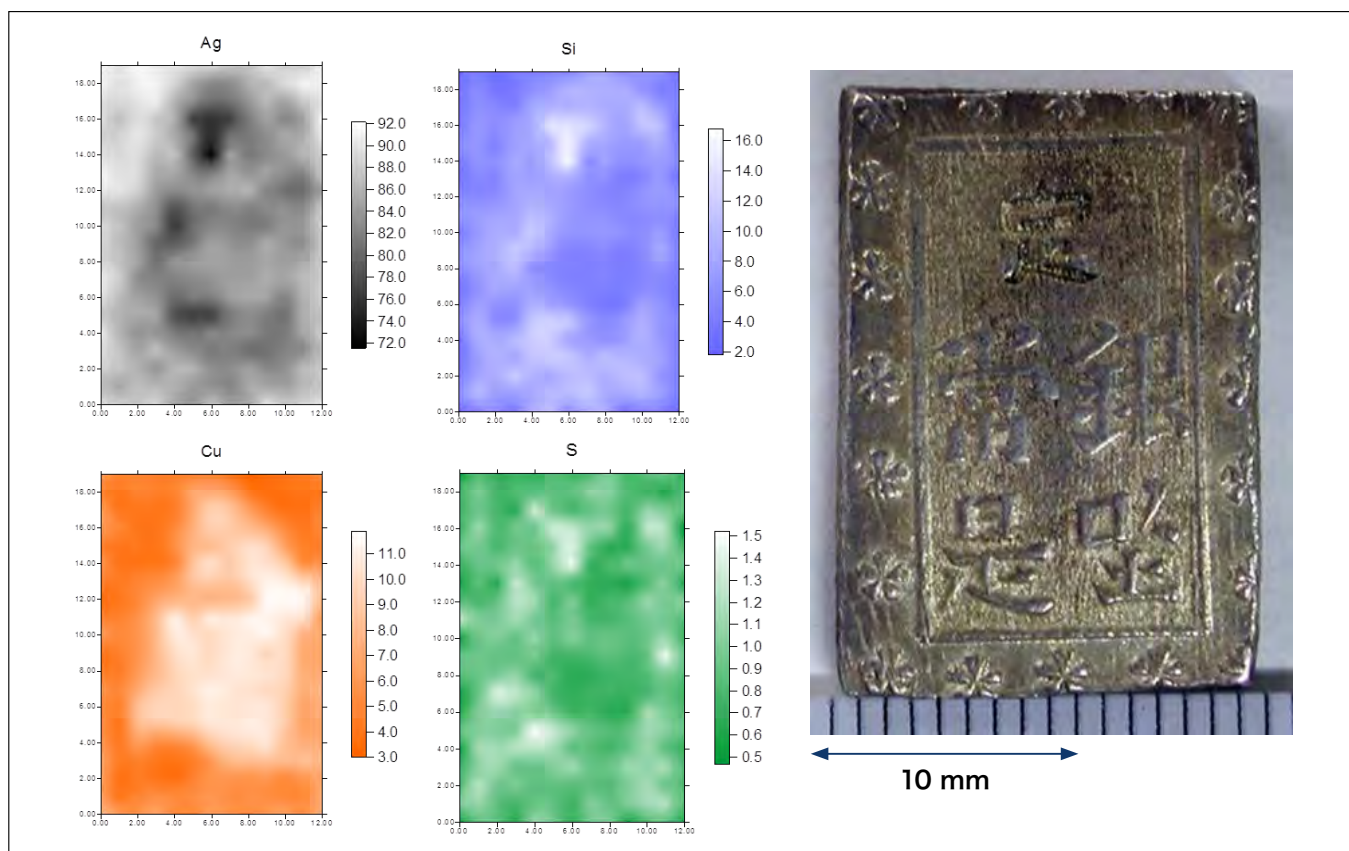


図2 安政一分銀(裏)のEDSマッピング測定(2.5 mmΦ)

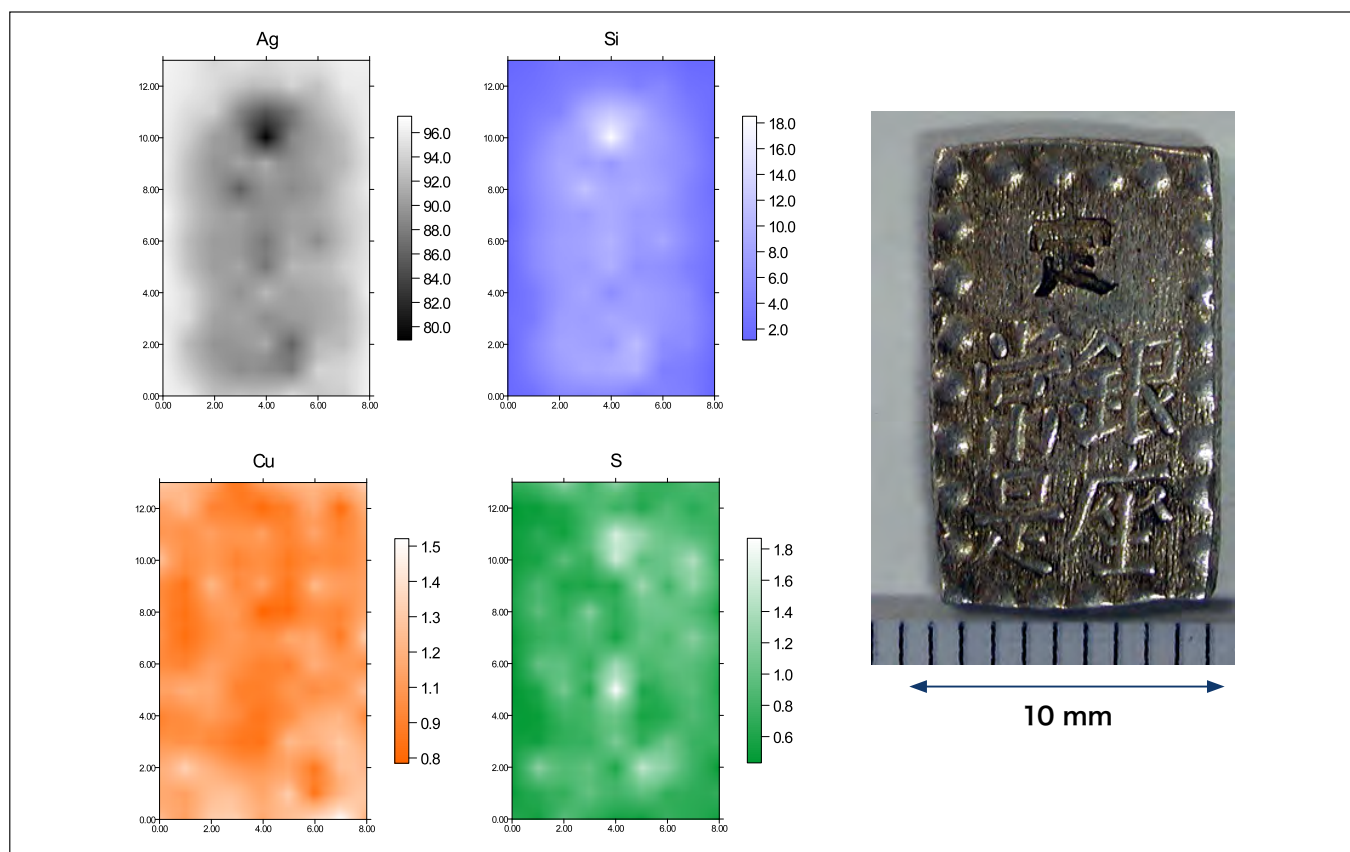


図3 嘉永一朱銀(裏)のEDSマッピング測定(2.5 mmΦ)

表2 ICP-AESによる定量結果(μg/g)

元素(定量下限)	安政一分銀 [銀以外計10.1%]	天保一分銀 [銀以外計0.4%]	嘉永一朱銀 [銀以外計1.4%]
Cu (0.5)	96192	1578	6895
Pb (0.07)	2072	1853	3211
Zn (0.8)	731	12	17
Au (1.8)	330	260	3017
Sn (6.8)	160	130	31
Sb (10)	430	20	2
Al (2.4)	38	40	20
Ti (0.4)	0.4	<0.4	6.6
As (18)	180	<18	ND
Si (3)	168	76	119
Ca (1.3)	89	101	133
Mg (0.2)	<0.2	<0.2	7.2
Sr (0.02)	<0.02	<0.02	ND
Mn (0.07)	<0.07	<0.07	0.3
Na (0.6)	110	116	311
K (2.1)	118	115	180

いずれの測定結果においても天保一分銀の純度が高く、安政一分銀の純度が低いことが確認された。安政一分銀においては10%近くを占めるCuが内部に多く、表面でも偏析がみられた。銭貨の測定においては一部を用いて行うことが多いが、特に微量元素については試料全体の測定とマッピング測定の併用が望ましいと考えられた。

3. 銅銭の元素分析

銅銭は最も多く流通した銭貨であり、組成は Cu, Sn, Pb の 3 元合金である。中世においては渡来銭が通貨として用いられたが、国内各地で大量の模鑄銭・私鑄銭が造られ、併せて流通していた。公鑄銭では、表面硬度・耐摩耗性・強度・靱性などの物性を一定の水準に維持するために、原材料である Cu, Sn, Pb の地金を適正な組成範囲に調整し、溶融して青銅合金として銭貨に鑄造されたと考えることができる。一方模鑄銭では Sn の含有量が著しく低い銭貨が多い³⁻⁵⁾。Cu, Pb は中国大陸および日本国内において比較的多い鉱床が広く分布しているが、Sn は著しく偏在しており、近世以前においても Sn の生産量は充分ではなく、製造コストも他の金属に比べて高かったものと考えられる。本研究では試料は小倉城三の丸出土の寛永通寶 7 点、No.1 (古寛永)、No.2 (新寛永一元字銭)、No.3 (古寛永)、No.4 (古寛永)、No.5 (古寛永)、No.6 (新寛永)、No.7 (新寛永一文銭) を使用した。慶長 13 年 (1608 年) に永楽通寶の通用が停止され、寛永 11 年 (1634 年) に寛永通寶の鑄造が開始されたとされている。小倉城は、模鑄銭の鑄銭場も発見されている慶長 9 年築城の黒崎城⁶⁾に近い。

表3 銅銭試料：小倉城三の丸出土 寛永通寶

試料番号	銭貨	試料番号	銭貨
No. 1 (古寛永)		No.5 (古寛永)	
No. 2 (新寛永一元字銭)		No.6 (新寛永)	
No. 3 (古寛永)		No.7 (新寛永一文銭)	
No.4 (古寛永)			

はじめに測定径を 1 mm ϕ に絞りエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置であるマイクロエレメントモニタによってマッピング測定を行った。No.4 及び No.6 の測定結果を図 4, 5, 6 に示した。No.4 では Cu, Zn の 2 元素, As, Pb, Fe の 3 元素の濃度分布が類似しており、さらに微量元素である Co, Ti, Si の 3 元素の濃度分布も傾向が類似していた。No.6 では Cu, Fe, Zn の 3 元素, As, Pb, S の 3 元素の濃度分布がそれぞれ類似していた。As, Pb, S については Sn が検出された模鑄銭においても類似した濃度分布を示したことから元素分布の測定が有用な情報を与えることがわかった。次に試料各 25 mg を削りとり、塩酸 2 mL, 硝酸 0.5 mL 添加、テフロン密封容器でマイクロ波加熱処理後、残さを No.5C のろ紙でろ過し 50 mL または 100 mL に定容後希釈し、ICP 発光分析により定量した。結果を表 4 に示した。測定結果の総量が 100% にならない No.1~4 については、No.3 は溶解後に生じた白色沈殿、No.4 は溶解残さ (1.6 mg) が主要因であり、No.4 の蛍光 X 線分析で検出された硫黄が測定されていないことも影響している。

各試料共に主要成分が銅である銅銭であり、No.4, 5 は銅 - スズ - 鉛の三元合金、No.2, 3 は鉄、鉛を含みヒ素、スズも少量含まれる。No.1 は銅、鉛以外の元素をほとんど含んでいないことがわかった。

表4 酸溶解後のICP-AESによる分析値 (%)

試料	Cu	Pb	Fe	As	Sb	Sn	Ag	Al	Zn	計
No.1	62.6	16.4	0.0	<0	0.0	0.0	0.0	<0	0.0	79.0
No.2	63.8	6.6	3.8	1.7	0.3	0.7	<0	<0	0.0	76.9
No.3	62.5	4.2	3.2	0.5	0.1	1.4	0.0	<0	0.0	71.9
No.4	40.5	12.4	0.9	0.0	0.0	7.8	0.1	0.8	0.0	62.5
No.5	73.3	15.7	0.1	0.2	0.1	8.2	0.1	<0	0.0	97.7
No.6	81.1	17.8	1.2	0.9	0.0	0.0	0.0	<0	0.1	101.1
No.7	69.2	24.3	0.1	0.1	0.0	7.3	0.1	<0	0.0	101.1

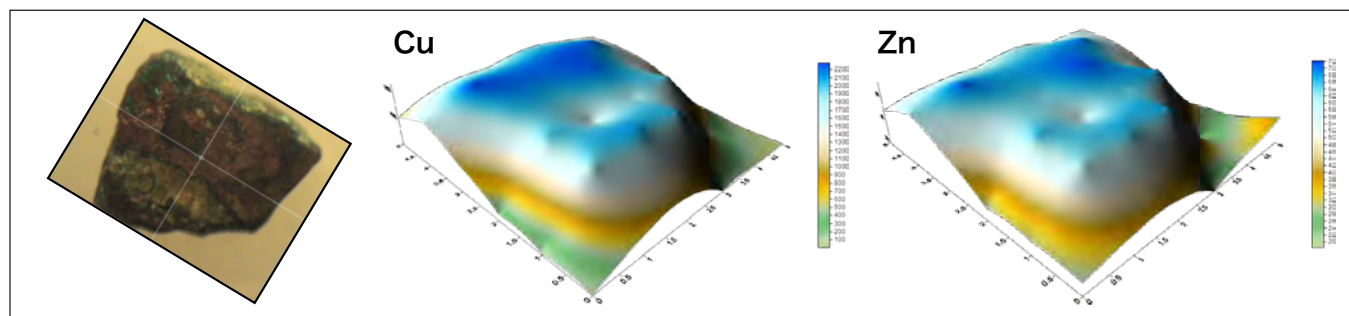


図4 銅銭試料No.4(古寛永)の測定結果

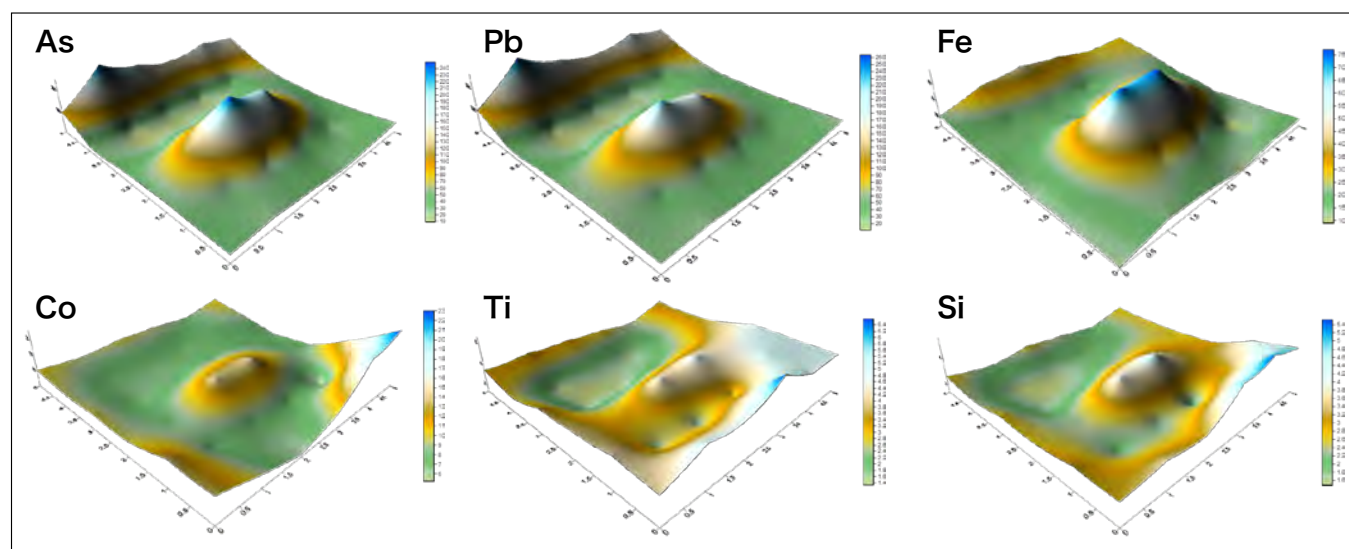


図5 試料No.4の測定結果

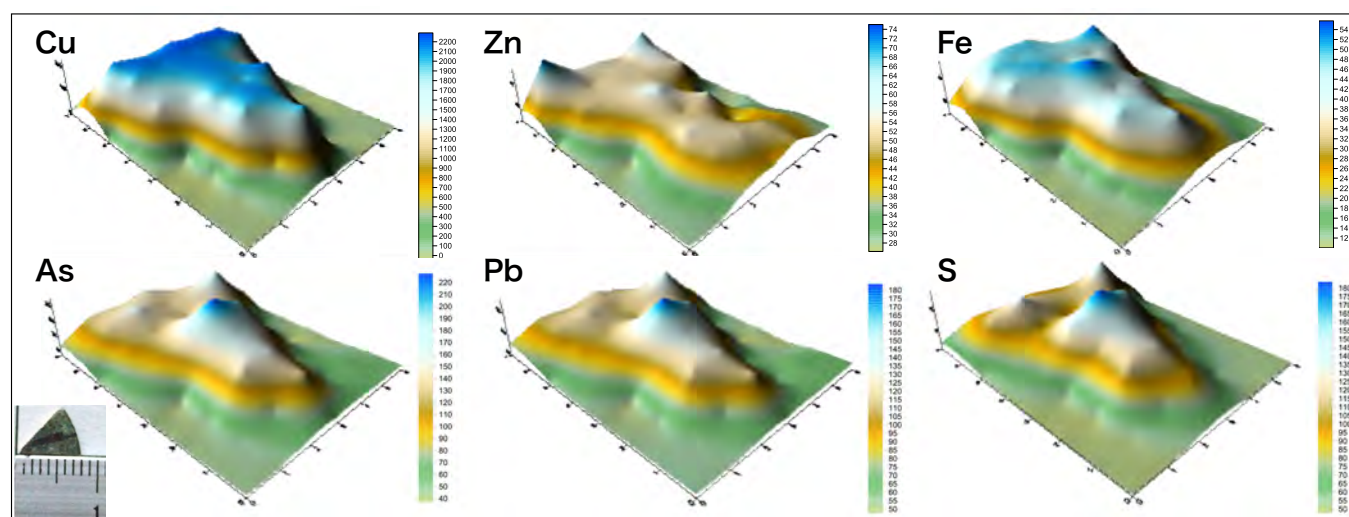


図6 試料No.6の測定結果

4. 天然砥石の元素分析

天然砥石は研磨に適した岩石を採掘し、適当な大きさに加工し、表面を研ぎ面に整えて使用される。粒度により荒砥、中砥、仕上げ砥に分類され、粒度の異なる砥石を組み合わせることで、効率よく研磨することができる。主として刀剣研磨に用いられる砥石 26 試料を蛍光 X 線分析により測定した。試料はいずれも Si が 28~42% と含有率で最大であり、Al、Fe、Ca、K が含まれ、微量元素としては、Ti、Mn、Ba、Zr、Cr、V、Cl を含む。測定値の再現性は各測定値に対して Si で 0.5%、Fe で 1%、Ca で 0.8% 程度と見積もられた。青砥 5 試料（1 試料は色の異なる 2 カ所）の計 6 測定結果より、%濃度で Fe は 3.4~4.8%、Si が 32~37%、Ca が 0.03~0.2% であった。対馬砥 3 試料（1 試料は色の異なる 2 カ所）では、Fe は 4.3~5.1%、Si が 28~30%、Ca が 2~4.3% であり、Ca 濃度に大きな違いがみられた。一方鳴滝砥 3 試料では Fe は 2.8~3.2%、Si が 39~40%、Ca が 0.03~0.05% であり、Si が多い。以上より砥石の種類によって成分濃度に違いがみられた⁷⁾。微量元素が砥石を見分ける鍵になること、さらに部位による偏在もみられることがわかってきた。そこでマイクロエレメントモニタによって 1 mm φでのマッピング測定を行った。Al と Si の分布が類似していること、鳴滝の茶色や黒色の「皮・付け」とよばれる部分、備水砥の紫鼠色の点々、内曇砥の「金筋」などの部分については Fe や Mn が多いことがわかった。蛍光 X 線分析の結果が天然出土砥石の銘柄・特徴と関連していることがわかる⁸⁾。

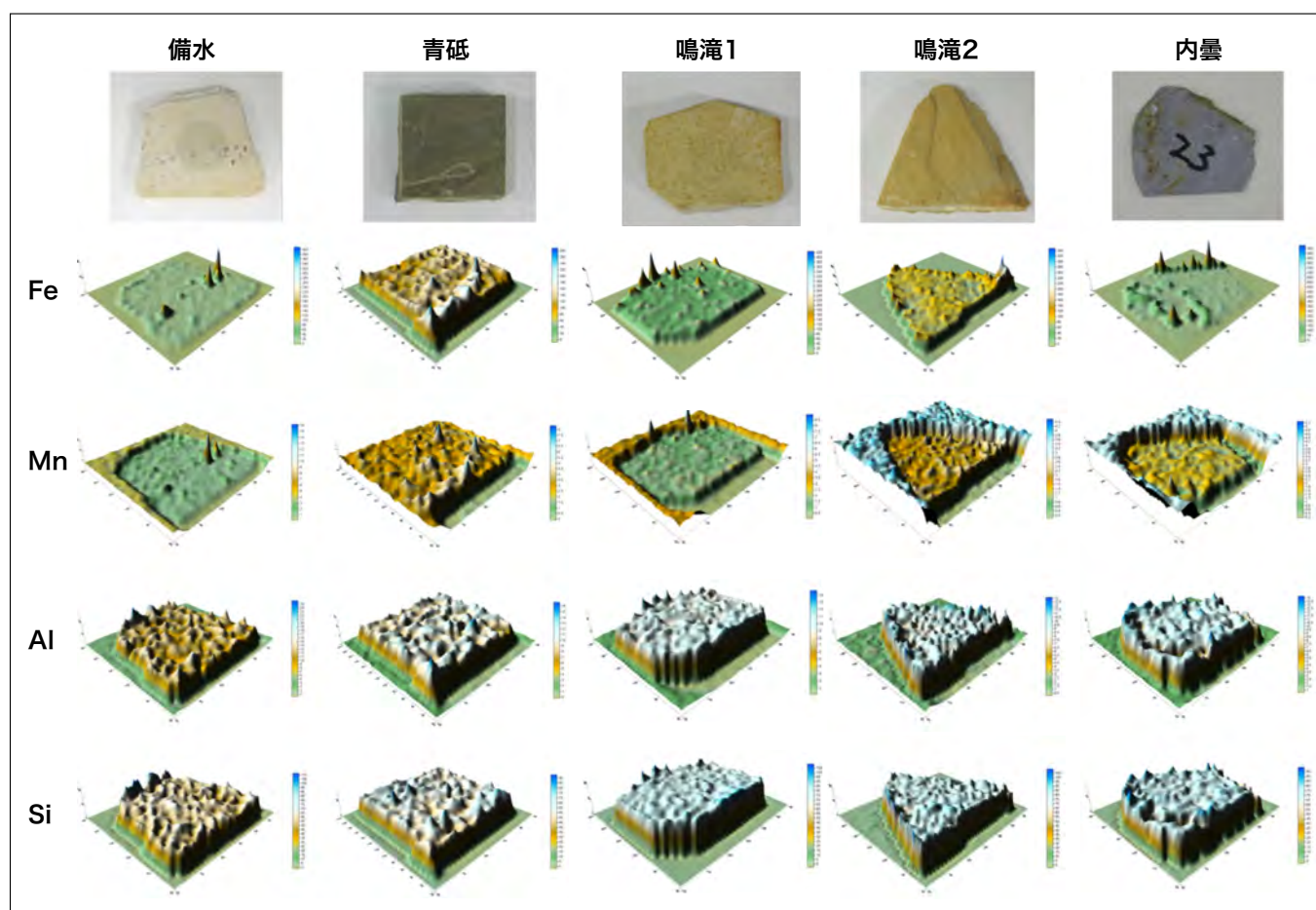


図7 天然砥石の測定結果

5. おわりに

銀貨、銅銭、天然砥石の元素分析を行った例を示した。位置情報を伴った元素分析の結果が試料の特徴と関連があり、出土試料・考古資料における種類や産地推定に有効な手段と考えられた。実際、昨年7月に完成した埼玉稲荷山古墳出土金錯銘鉄剣の復元に際し、稲荷山出土砥石の分析を行った結果 Fe 濃度から考えて、青砥か対馬砥、Ca 濃度より、青砥の可能性が高いと判断した。この結果と象嵌文字表面に残る研ぎ跡の検討から、研師の藤代興里氏は最終研磨に使用する砥石を青砥とされた。また溜池遺跡出土砥石の鳴滝砥の分類・調査においても蛍光 X 線分析による元素分析とマッピング測定の結果が有効であることが示された⁸⁾。破壊分析による詳細な分析データとの相関が充分検討された上での非破壊・非接触分析の結果の有効利用が重要である。分析機器のさらなる精度の向上と測定時間の短縮が期待される。

本研究は銅銭をご提供いただいた梅崎恵司氏、銀貨をご提供いただいた西脇康氏、砥石試料をご提供いただいた藤代興里氏、高岡真美氏との共同研究であり、本学の研究室の学生諸氏の研究の成果である。銀貨試料の溶解法に関して(株)日立ハイテクサイエンスのご協力をいただきました。深謝いたします。

参考文献

- 1) 滝澤武雄, 西脇康編, 「日本史小百科貨幣」(p283-288) (東京堂)(1999)
- 2) 西脇康, 計量史研究, 27, 1-13(2005)
- 3) 西本右子, 佐々木稔, ぶんせき, 2002, 585(2002)
- 4) 西本右子, 目次謙一, 佐々木稔, 出土銭貨, 2006, 3(2006)
- 5) 佐々木稔, 西本右子, 出土銭貨, 2006, 4(2006)
- 6) 梅崎恵司, 北九州市芸術文化振興財団埋蔵文化財調査室研究紀要, 23, 15(2009)
- 7) 高岡真美, 古代文化研究, 21, 17(2013)
- 8) 高岡真美, 西本右子, 青柳佑希, 古代文化研究, 22, 75(2014)

超高速HPLCを用いた医薬品配合剤の 複数成分同時迅速分析法の開発

Rapid and Simultaneous Analysis of Combination Drugs by Ultra-High-speed HPLC



慶應義塾大学
薬学部 教授

金澤 秀子

1. はじめに

近年、製薬企業においては、候補薬物が開発後期段階でドロップアウトしたり、承認要件が厳格になるなど新薬の創出が困難な状況になってきている。薬価改定などあらゆる情勢変化の中で、既存製品の価値を最大化し、製品寿命を延ばし、いかに長期間にわたって収益を上げていくかのライフサイクルマネジメント (LCM) が、企業戦略のうえでも重要なポイントになっている。このような背景の中で、従来のような単一成分からなる医薬品開発は限界にきているという見方もある。2種類以上の薬効成分を1つの製剤中に含有する配合剤は、2006年に降圧薬の配合剤が発売されて以降、ジェネリック対策、LCMの一環として医療用医薬品市場において急増している。このように新たな創薬アプローチとして配合剤が注目されており、作用機序の異なる薬物の組合せからなる配合剤は単剤中心の開発をブレイクスルーする治療薬として期待されている。多くは、高血圧や糖尿病、喘息などの慢性疾患の治療薬であり、従来の概念では、配合剤は既承認薬の組合せが圧倒的に多いが、今後は既承認薬と未承認薬、あるいは未承認薬と未承認薬との組合せからなる画期的な医薬品が開発されてくる可能性が十分にある。

既存の医薬品を組み合わせた配合剤は、服用する薬剤数の減少、服用アドヒアランスの向上、利便性の増加、薬剤の値段の抑制などのメリットがある。デメリットとしては、副作用が発生した場合の原因の特定が困難であること、量の調整が出来ないことなどが挙げられるが、これらのデメリットに勝る有用性により処方数が増えている。一方で、配合剤は市場に出るようになって間もないため、多成分系における各成分の定量や製剤の安定性及び生体中濃度のモニタリングに必要なHPLCの分析条件が確立されてないのが現状である。また、多様な投与方法において配合剤の成分間や、他剤と併用した際の成分変化の有無に関するデータはまだ充実していないことから、必要情報がない場合は臨床現場で処方中の薬剤の組み合わせの妥当性について検討する際にも苦慮しているのが現状である。したがって、これらの薬剤の混合使用の妥当性や安定性に関する情報の必要性が増加している。日本薬局方では、収載薬品の確認試験や定量法が、個々の医薬品について規定されている。しかし、2種以上の成分が混合されている配合剤についての規定はない。第16改正日本薬局方で一般試験法のクロマトグラフィーの項の規定が改正された。HPLC法を確認試験に用いる場合、検出器としてフォトダイオードアレイ検出器(PDA)を利用する場合を想定して、「被検成分の化学構造に関する知見が同時に得られる検出器が用いられる場合、保持時間の一致に加えて、化学構造に関する情報が一致することにより、より特異性が高い確認を行うことができる」旨が規定された。本研究では超高速LCと合わせてPDA検出器を用いることにより配合剤中の有効成分の定量と確認を同時に迅速に行う方法について検討した。

2. 超高速LCによる経口糖尿病治療薬の複数同時分析と配合剤への応用

近年、ライフスタイルの著しい変化や超高齢化社会を背景に、糖尿病や糖尿病予備群の患者が増加傾向にある。糖尿病は1型糖尿病と2型糖尿病に分類される。前者は膵臓のランゲルハンス島のβ細胞の破壊・消失がインスリン作用不足の主な原因であり、後者はインスリン分泌低下やインスリン抵抗性をきたし、過食、運動不足、肥満、ストレスなどの環境因子および加齢が加わり発症する。日本人患者の9割は2型糖尿病であり、2型糖尿病患者の診療はますます大きな比重を占めていくと予想される。2型糖尿病の治療では、食事療法や運動療法で血糖値をコントロールできない場合には、薬物治療を行う。薬物治療では、しばしば重篤な低血糖の副作用が問題となる。最近低血糖を起こしにくい薬として、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作

動薬やジペプチジルペプチターゼ 4 (DPP-4) 阻害薬が開発された。GLP-1 受容体作動薬は自己注射製剤であるが、DPP-4 阻害薬は経口薬であり利便性に優れることから、特に注目が集まっている^{1)~6)}。ただし、他の糖尿病治療薬との併用時には、血糖コントロール改善の併用効果により、低血糖症のリスクが増加するため注意が必要である。糖尿病の薬物治療では患者に合わせた治療を行うため、薬剤を併用することもしばしばある。

最近では DPP-4 阻害薬の有効成分を含んだ経口糖尿病治療薬の配合錠も発売されるようになってきた。HPLC による配合錠の 2 種類の有効成分の同時分析に関しては、既に報告のある組み合わせもある⁷⁻⁹⁾。しかし、日本で発売されている配合錠に含まれる有効成分を中心とした多成分同時分析の報告はない。そこで本研究では、まだ日本薬局方にも収載されていない DPP-4 阻害薬などの新しい経口糖尿病治療薬を中心に、一元的な経口糖尿病治療薬の同時分析を HPLC、超高速 LC により試み、ソニマス[®] (武田薬品工業株式会社) とリオベル[®] (武田薬品工業株式会社) の 2 種類の配合錠へ応用した。

経口糖尿病治療薬の有効成分の構造式を Fig. 1 に示した。

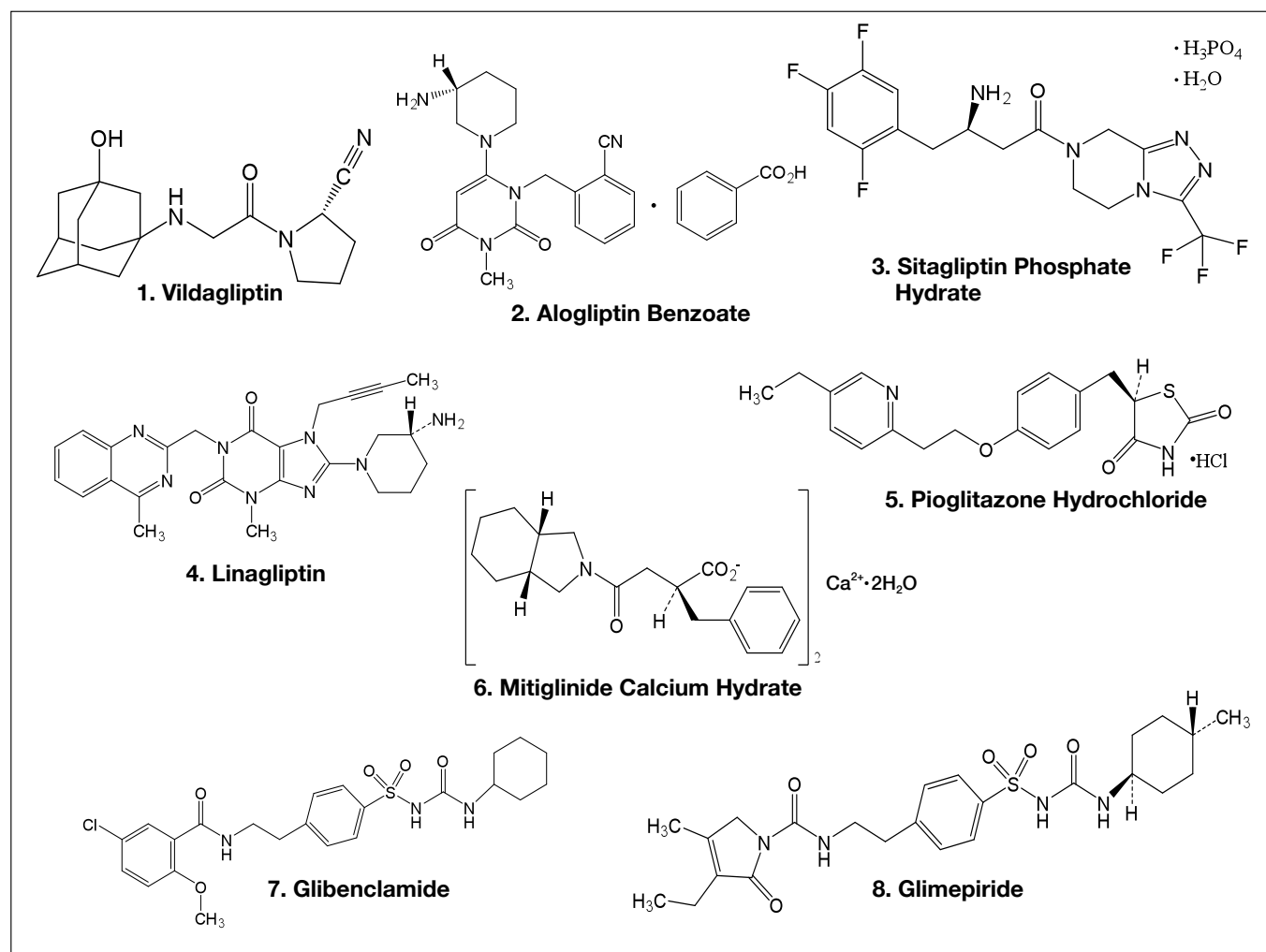


Fig. 1 経口糖尿病治療薬の有効成分の構造式

HPLC は、ポンプ (HITACHI L-7100), 検出器 (HITACHI L-7405), カラムオープン (SSC-2120), オートサンプラー (HITACHI L-2200), データ処理 (D-2000 Elite), カラムは HITACHI LaChrom C18, 5 μm (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm) を用い、超高速 LC システムは、ポンプ (HITACHI L-2160U), PDA 検出器 (HITACHI L-2455U), カラムオープン (HITACHI L-2300), オートサンプラー (HITACHI L-2200U), データ処理 (HITACHI EZChrom Elite), カラムは HITACHI LaChromUltra C18, 2 μm (2.0 mm I.D. $\times$ 50 mm) を用いた。

配合錠は粉碎後、それぞれメタノールに溶かし、超音波 30 分照射後、遠心分離し上清を、標準品は、メタノールで溶解した後、0.2 μm のメンブランフィルターでろ過し、1 mg/mL の溶液を調製した。その後、各溶液をメタノールで希釈し、試料溶液とした。混合溶液は、各 1 mg/mL 溶液を混合して、各試料溶液濃度になるように調製した。

8種類の経口糖尿病薬の有効成分（ビルダグリプチン、アログリプチン安息香酸塩、シタグリプチンリン酸塩、リナグリプチン、ピオグリタゾン塩酸塩、ミチグリニドカルシウム水和物、グリベンクラミド、グリメピリド）のHPLCと超高速LCによる分析を行った。HPLC分析により得られたクロマトグラムをFig. 2に、日立LCUによるクロマトグラムをFig. 3にそれぞれ示した。HPLC分析も超高速LC分析もアログリプチン安息香酸塩は2つのピークになったが、前半のピークがアログリプチンであり、後半のピークは安息香酸であることを確認している。一方、超高速LCを用いることで、HPLCと比べ、分析時間を約1/5にすることが出来た。超高速HPLCを用いることにより分析時間を短縮でき、測定に必要な試料量も少量で、さらに移動相を節約できるため、効率的な分析が可能となった。LCUを用いて配合錠への応用について検討した結果、いずれの製剤ともそれぞれ2種類の経口糖尿病薬の有効成分が短時間に良好に分離された。ピオグリタゾンとグリメピリドの配合錠であるソニアス[®]配合錠のクロマトグラム、及びピオグリタゾンとアログリプチンの配合錠であるリオベル[®]配合錠のクロマトグラムをFig. 4に示した。この配合錠は、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全という2型糖尿病の病態を1剤で改善する可能性のある薬剤であり、長期的な膵β細胞保護効果も期待される。どちらも1日1回の服用でよいから、配合錠にすることで患者のアドヒアランスの向上につながることも期待できる。

多成分同時分析法の構築は、今後益々増大する配合錠の分析や、臨床現場における副作用低減のための薬物モニタリングへの応用が可能であり、また、DPP-4阻害薬は低血糖を起こしにくい薬として注目が集まっていることから、DPP-4阻害薬を中心とした経口糖尿病治療薬の分析¹⁰⁾は有用であると考えられる。

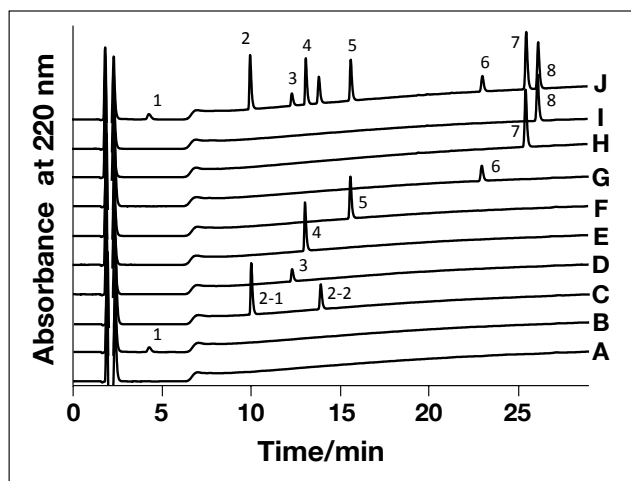


Fig. 2 汎用型HPLCによる経口糖尿病治療薬のクロマトグラム
CH₃OH (A), Vildagliptin (1,B), Alogliptin Benzoate (2,C), Sitagliptin Phosphate Hydrate (3,D), Linagliptin (4,E), Pioglitazone Hydrochloride (5,F), Mitiglinide Calcium Hydrate (6,G), Glibenclamide (7,H), Glimepiride (8,I), mixed solution (J)Column, HITACHI LaChrom C18, 5 μ m (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm); eluent, a) 10 mM HCOONH₄/CH₃CN/HCOOH = 900/100/1, b) CH₃CN/HCOOH = 1000/1; gradient, a/b = 0 min 100/0 $\rightarrow$ 2 min 100/0 $\rightarrow$ 27 min 30/70; flow rate, 1.0 mL/min; column temp., 30°C; detection, UV220 nm; pressure, 10.6 Mpa; inj.vol., 10 μ L

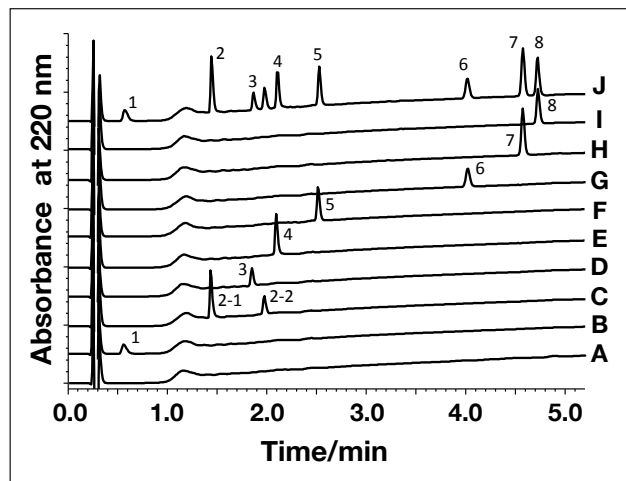


Fig. 3 超高速HPLCによる経口糖尿病治療薬のクロマトグラム
CH₃OH (A), Vildagliptin (1,B), Alogliptin Benzoate (2,C), Sitagliptin Phosphate Hydrate (3,D), Linagliptin (4,E), Pioglitazone Hydrochloride (5,F), Mitiglinide Calcium Hydrate (6,G), Glibenclamide (7,H), Glimepiride (8,I), mixed solution (J)Column, HITACHI LaChromUltra C18, 2 μ m (2.0 mm I.D. $\times$ 50 mm); eluent, a) 10 mM HCOONH₄/CH₃CN/HCOOH = 900/100/1, b) CH₃CN/HCOOH = 1000/1; gradient, a/b = 0 min 100/0 $\rightarrow$ 5 min 40/60; flow rate, 0.6 mL/min; column temp., 30°C; detection, UV220 nm; pressure, 33.0 Mpa; inj.vol., 1 μ L

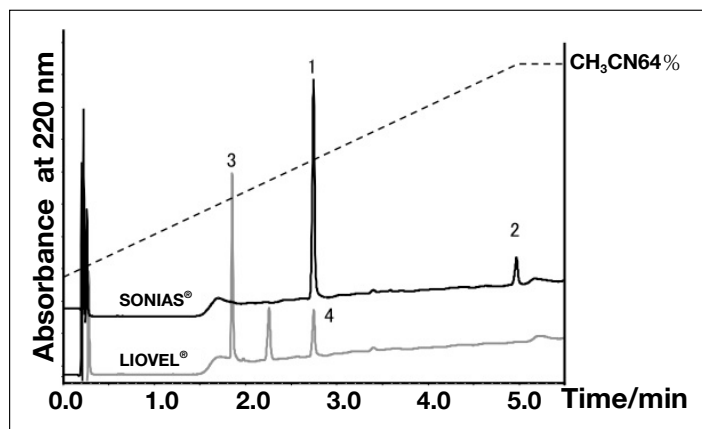


Fig. 4 ソニアス[®]配合錠とリオベル[®]配合錠のクロマトグラム

3. 降圧剤配合錠成分の超高速HPLC-PDA法への適用

降圧剤には、カルシウム拮抗薬（ジヒドロピリジン系、ベンゾチアゼピン系）、アンジオテンシンⅡ受容体（AT₁受容体）拮抗薬（ARB）、ACE阻害薬、利尿薬（チアジド系、ループ利尿薬）、β遮断薬、α遮断薬、配合剤（利尿薬＋ARB、カルシウム拮抗薬＋ARB）がある。高血圧症は複数の成因により発症する疾患であることから、降圧目標を達成するためには、作用機序の異なる高血圧症治療剤の併用療法が有用である。そのため、複数の治療薬を1つの薬剤に組み合わせた配合剤には、複数錠を服用する患者の治療費負担の軽減と治療効果の向上への寄与が期待される。高齢社会の我が国において高血圧を含む生活習慣病の予防は国家的な課題となっているといっても過言でない。

ARBには、降圧作用に加え多面的な効果がある。現在、日本では7種類のARB（ロサルタン、バルサルタン、カンデサルタン、テルミサルタン、オルメサルタン、イルベサルタン、アジルサルタン）が臨床応用されているが、最近のARB同士を比較検討した研究において降圧効果や臓器保護効果に違いがあることが示唆されている。

レザルタス[®]配合錠（第一三共株式会社）の配合成分であるオルメサルタンは速やかに活性型に変換される。強力な非競合的な阻害様式を示し、作用がピークに達する時間はカンデサルタンより早い。オルメサルタンはバルサルタンやカンデサルタンと同様にカルボキシル基を持つのに加えて、ヒドロキシル基も持つため、この2カ所がAT₁受容体に結合する部位と考えられる。

レザルタス[®]配合錠の配合成分であるオルメサルタン メドキシミルおよびアゼルニジピンは2つとも日本薬局方で分析方法が定められていない。

本研究では、レザルタス[®]配合錠の配合成分についてPDA検出器を有する超高速HPLCを用いた迅速かつ効率的な分析法を検討した。レザルタス[®]配合錠HDの配合成分（オルメサルタン メドキシミルとアゼルニジピン）の同時分析条件を検討し、得られたクロマトグラムをFig. 5に示した。保持時間が14.18 minにアゼルニジピン、7.50 minに内標準物質のピークが検出された。1.85 minと4.26 minのピークはオルメサルタン メドキシミルと由来成分であると予想される。レザルタス[®]配合錠HD（オルメサルタン メドキシミルとアゼルニジピン）と同様の分析条件により、単一成分製剤であるオルメテック[®]錠20 mg（オルメサルタン メドキシミルのみ；第一三共株式会社）、カルブロック[®]錠16 mg（アゼルニジピンのみ；第一三共株式会社）を分析した結果をFig. 6に示した。この結果より、②のピークがオルメサルタン メドキシミルであると考えられる。しかし、レザルタス[®]配合錠HDでは、1と2のピークがほぼ同様のピーク強度で含まれており、オルメテック[®]錠においてもわずかではあるが1のピークが検出された。

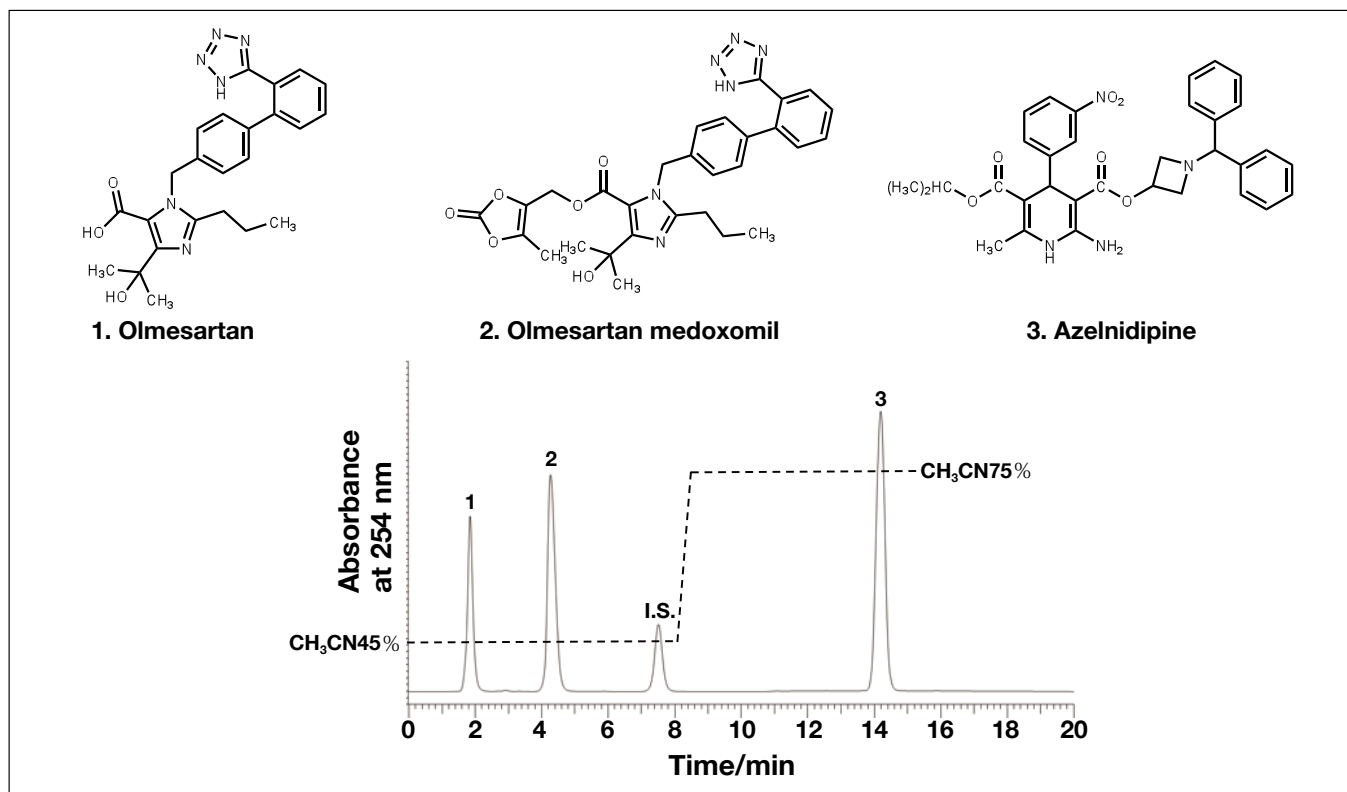


Fig. 5 レザルタス[®]配合錠HD（オルメサルタン メドキシミルとアゼルニジピン）のクロマトグラムと構造式

Column : HITACHI LaChromUltra C18, 5 μm (4.6 mm I.D.×150 mm), eluent : a) KH₂PO₄ (41→10000) : CH₃CN=55 : 45, b) KH₂PO₄ (41→10000) : CH₃CN=25 : 75, gradient : a / b=0 min ; 55/45→8.0 min ; 55/45→8.1 min ; 25/75→15 min ; 25/75, flow rate : 1.0 mL/min, column temp. : 25°C, detection : 254 nm, pressure : 6.2 MPa, inj.vol. : 20 μL

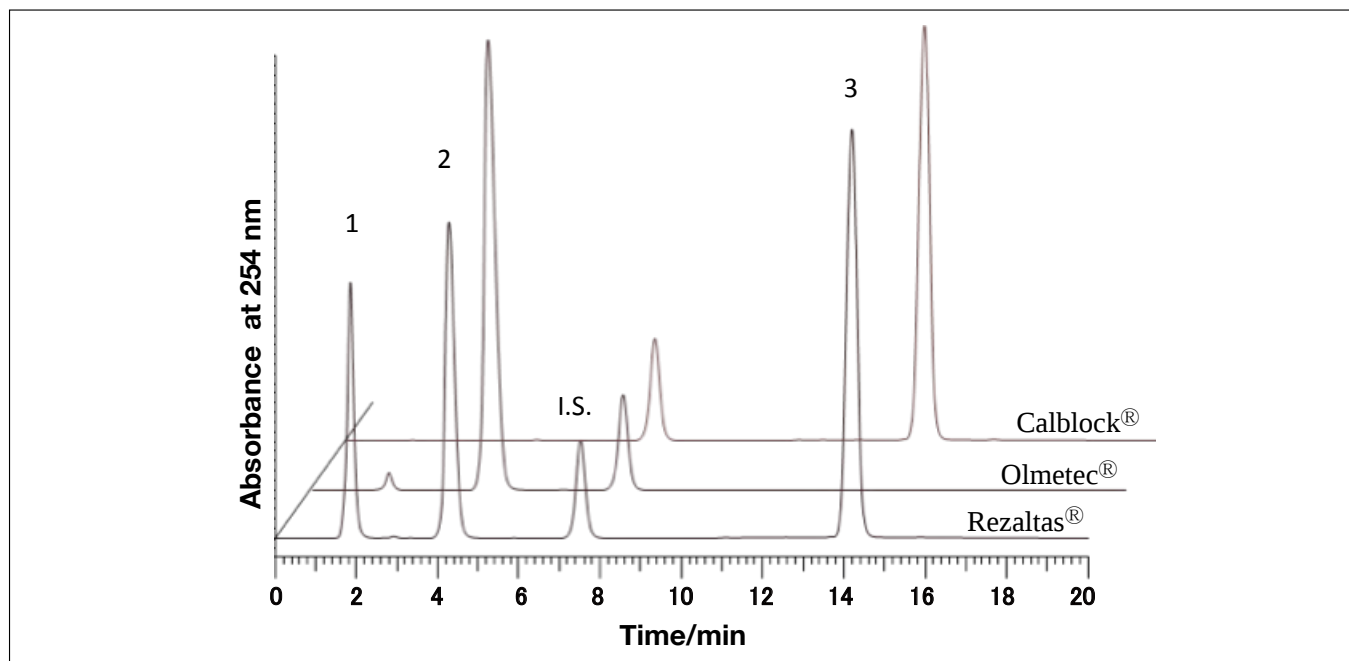


Fig. 6 レザルタス® 配合錠HD(オルメサルタン メドキシミルとアゼルニジピン)の分析条件における各製剤のクロマトグラムの比較検討

2 の成分を特定するため、超高速 LC-PDA を用い、スペクトルの比較を行った (Fig. 7)。分析時間は、2 分以内と良好であった。Murakami ら¹¹⁾により報告されているスペクトルと Fig. 8 に示した PDA 検出器によるスペクトルが一致したことから、それぞれピーク 1 がオルメサルタンであり、ピーク 2 がオルメサルタン メドキシミルであることを確認した。

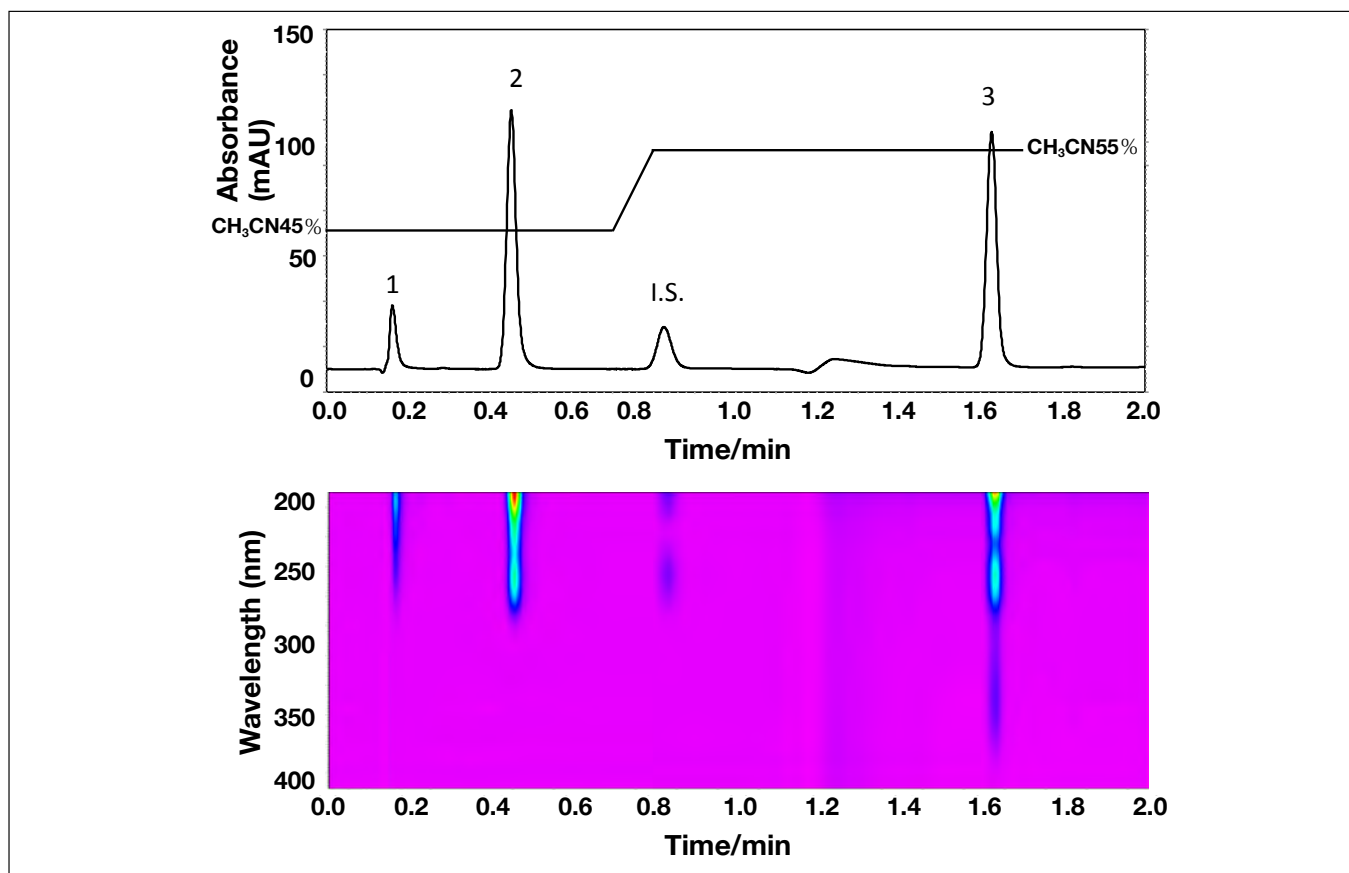


Fig. 7 超高速HPLCによるレザルタス® 配合錠HD(オルメサルタン メドキシミルとアゼルニジピン)のクロマトグラムと等高線図
Column : HITACHI LaChromUltra C18, 2 μ m(2.0 mm I.D.x50 mm), eluent : a) KH_2PO_4 (41 $\rightarrow$ 10000) : CH_3CN =55 : 45, b) KH_2PO_4 (41 $\rightarrow$ 10000) : CH_3CN =25 : 75, gradient : a / b=0 min ; 100/0 $\rightarrow$ 0.7 min ; 100/0 $\rightarrow$ 0.8 min ; 0/100 $\rightarrow$ 1.7 min ; 0/100, flow rate : 0.8 mL/min, column temp. : 30 $^\circ$ C, detection : 254 nm, 200-400 nm (PDA) pressure : 40~49 MPa, inj.vol. : 1 μ L

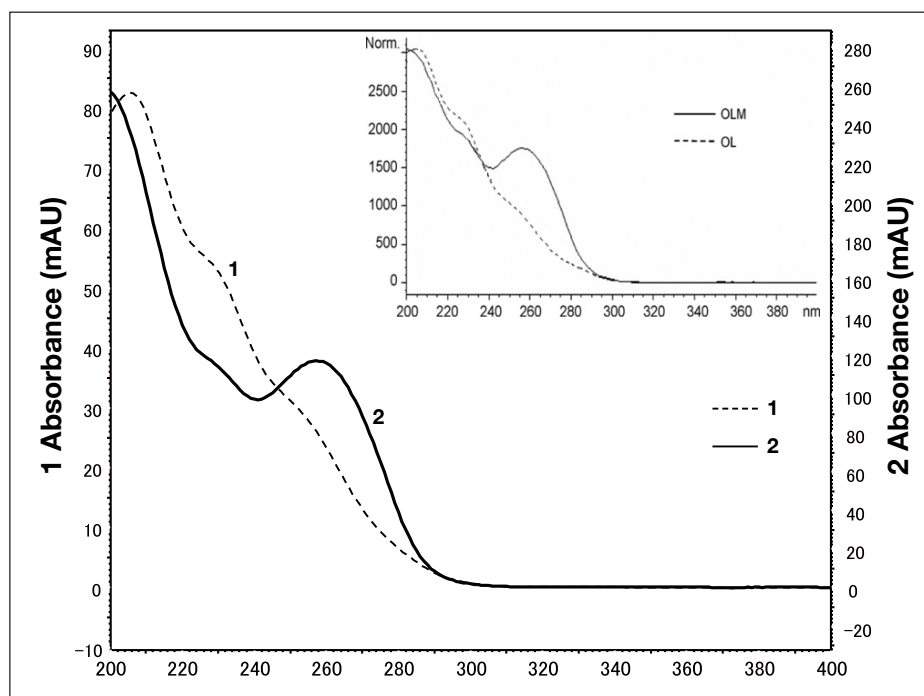


Fig. 8 超高速HPLCのPDA検出器によるピーク1と2のスペクトル
(枠内は参考文献11に記載されていたオルメサルタン メドキシミルとオルメサルタンのスペクトル)

4. 結語

以上のように降圧剤配合剤中には溶解性や極性の大きく異なる2成分が含まれるため、配合剤成分の溶出試験や安定性の検討の際に同時迅速分析する場合には、汎用型HPLCによる測定と比較し超高速LCでは測定時間の大幅な短縮が可能である。PDA検出器を有する超高速LCを用いることで、日本薬局方で定められている確認試験と成分定量を1回の分析で行うことが期待できる¹²⁾。

参考文献

- 1) 植木浩二郎: 日本臨床, 69(5), 877 (2011).
- 2) CM. Chwieduk: *Drugs*, 71(3), 349 (2011).
- 3) M. Choy, S. Lam: *Cardiol. Rev.*, 15(5), 264 (2007).
- 4) J. Rosenstock, S. E. Inzucchi, J. Seufert, P. R. Fleck, C. A. Wilson, Q. Mekki: *Diabetes Care*, 33, 2406 (2010).
- 5) Y.-L. He, J. Valencia, Y. Zhang, S. L. Schwartz, M. Ligueros-Saylan, J. Foley, W. P. Dole: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 70(1), 34 (2010).
- 6) C.J. Bailey, B.D. Green, P.R. Flatt: *Expert Opin. Investig. Drugs*, 19(8), 1017 (2010).
- 7) J. Martín, W. Buchberger, J. L. Santos, E. Alonso, I. Aparicio: *J. Chromatogr. B*, 94, 895 (2012).
- 8) R. I. El-Bagary, E. F. Elkady, B. M. Ayoub: *Int. J. Biomed. Sci.*, 7(3), 201 (2011).
- 9) R. I. El-Bagary, E. F. Elkady, B. M. Ayoub: *Talanta*, 85, 673 (2011).
- 10) 柄本圭弘, 石川 謙, 伊藤 一, 平出園絵, 永田佳子, 金澤秀子. 分析化学, 62(8), 725-730 (2013).
- 11) T. Murakami, H. Konno, N. Fukutsu, M. Onodera, T. Kawasaki, F. Kusu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47(3), 553-559 (2008).
- 12) 宮野弘之, 金澤秀子, 永田佳子. 分析化学, 62(8), 743-750 (2013).

雰囲気遮断冷却ホルダーの紹介

Introduction of Air protection cryo holder

長久保康平*1, 東 淳三*1

1. はじめに

集束イオンビーム加工装置（以下FIB）での試料加工において、熱伝導率の低い試料（例えば有機物や樹脂など）によっては試料温度の上昇が起こる。また、透過電子顕微鏡（以下TEM）や走査電子顕微鏡（以下SEM）で試料を観察する場合、電子線の影響で試料温度が上昇し、試料本来の形態、状態解析が困難な場合がある。材料分野において、熱に弱い樹脂、低融点金属、低温相変化物などに対し、荷電粒子装置を用いての加工および観察は、試料の温度上昇が懸念される大きな課題である。また、試料によっては、大気中の水分と過敏に反応するものもあり、加工から観察までの装置間移動も考慮すべき課題である。こうした課題に対応して、雰囲気遮断機構を備えた試料冷却ホルダーを開発した。本稿では、雰囲気遮断冷却ホルダーの概要と特長および応用例を紹介する。

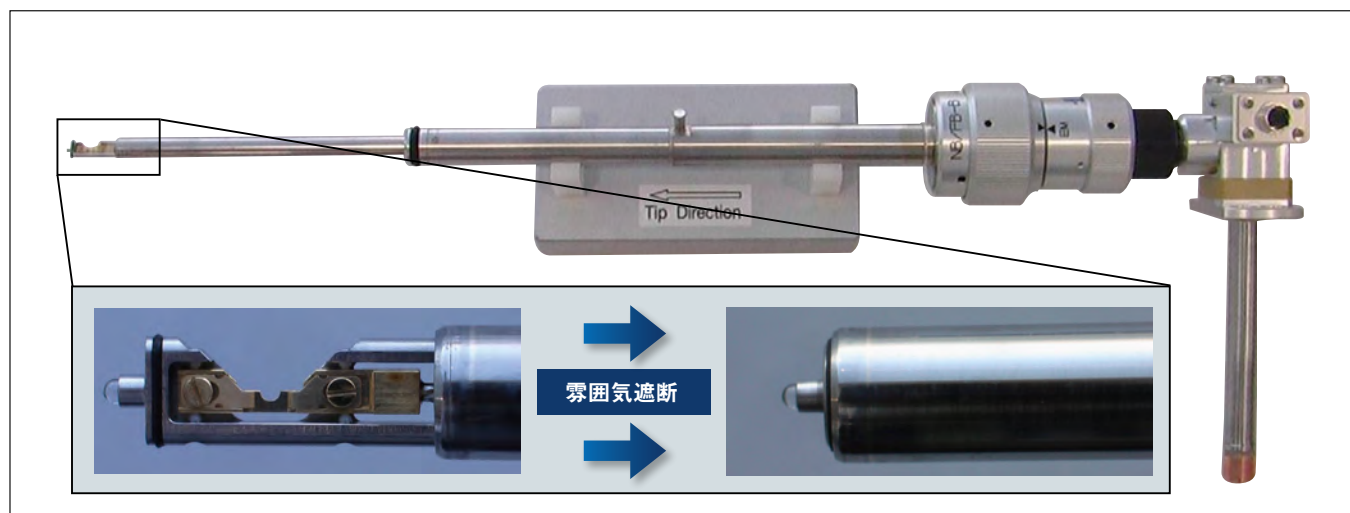


図1 雰囲気遮断冷却メッシュホルダー



図2 雰囲気遮断冷却ホルダー装着図(@NB5000)

2. 雰囲気遮断冷却ホルダーの概要

雰囲気遮断冷却ホルダーは、試料の形態によりマイクロサンプル用（メッシュ用）およびバルクサンプル用の2種類がある。メッシュ用はアダプタの付け替えにより、すべての日立製 FIB/ (S) TEM に共用可能である。NB5000 用アダプタを装着した雰囲気遮断冷却メッシュホルダーの外観図を図 1 に示す。また、ホルダーの構造概略を図 3-1、ホルダー先端部の開閉構造を図 3-2、図 3-3 に示す。

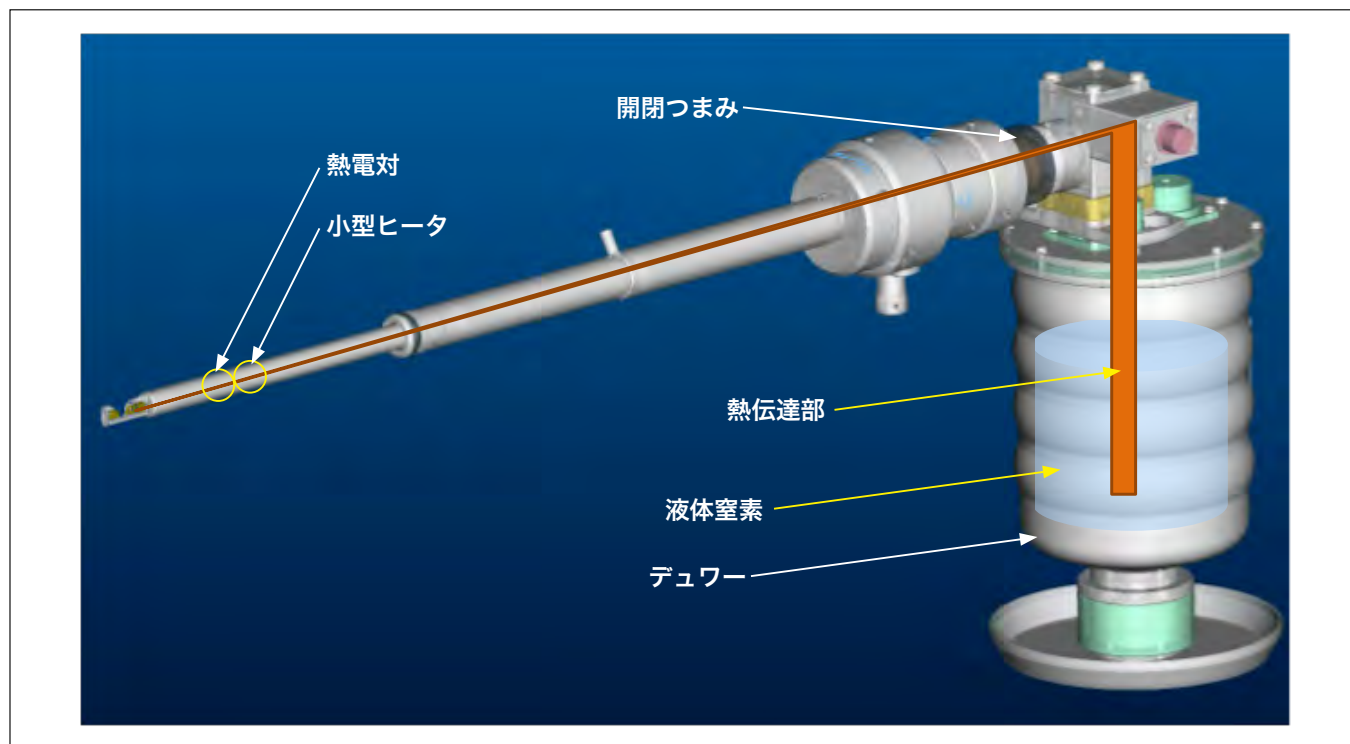


図3-1 雰囲気遮断冷却メッシュホルダー構造概略図

試料を冷却するための冷却媒体は液体窒素を使用し、ホルダーに備え付けたデュワーの液体窒素を介して試料を冷却する。デュワーは真空断熱構造のため、冷却温度を維持しかつ結露の心配はない。また、ステージを傾斜した場合、デュワーの自重により垂直状態を保つためデュワー内の液体窒素がこぼれる心配はない。液体窒素（-196℃）は、ホルダーグリップ部の伝熱部（無酸素銅製）を介し、試料近傍まで熱伝達する。試料近傍では、振動を防止するための軟質な銅編線を介しメッシュ装着部に熱伝達する。また、銅編線部近傍に温度を測定するための熱電対および温度調整用の小型ヒータが搭載されている。

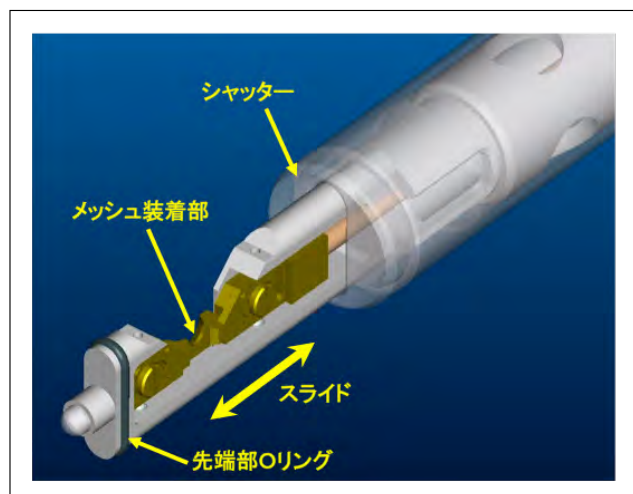


図3-2 先端部OPEN（加工・観察時）

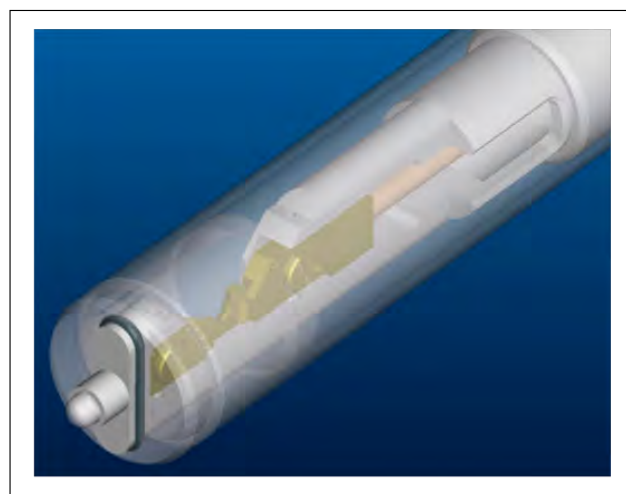


図3-3 先端部CLOSE（雰囲気遮断時）

ホルダーグリップ部の開閉つまみを操作することでホルダー先端部がスライドし試料近傍と周辺雰囲気とを隔離する。

3. 雰囲気遮断冷却ホルダーの特長

主な特長は、①試料に熱ダメージを与えることなく冷却しながら加工可能、②加工後試料の載せ替えをすることなく装置間搬送が可能、③搬送時、試料を大気暴露することなく搬送可能なことである。試料は、ホルダーに備えたデュワー内部の液体窒素からの熱伝導により約 -140°C 以下まで冷却可能である。また、付属の温度調整ユニットにより試料温度を調整することも可能である（冷却限界温度から -90°C まで）。

4. 応用例

図4はポリエステル樹脂をFIBにて常温加工したもの(a)と冷却加工したもの(b)の例である。ポリエステル樹脂はガラス転移点が 60°C で、常温加工した場合加工部に大きく熱ダメージが入ってしまう。一方、試料を -130°C にて冷却加工した場合、加工エッジ部分がきれいに加工されている。

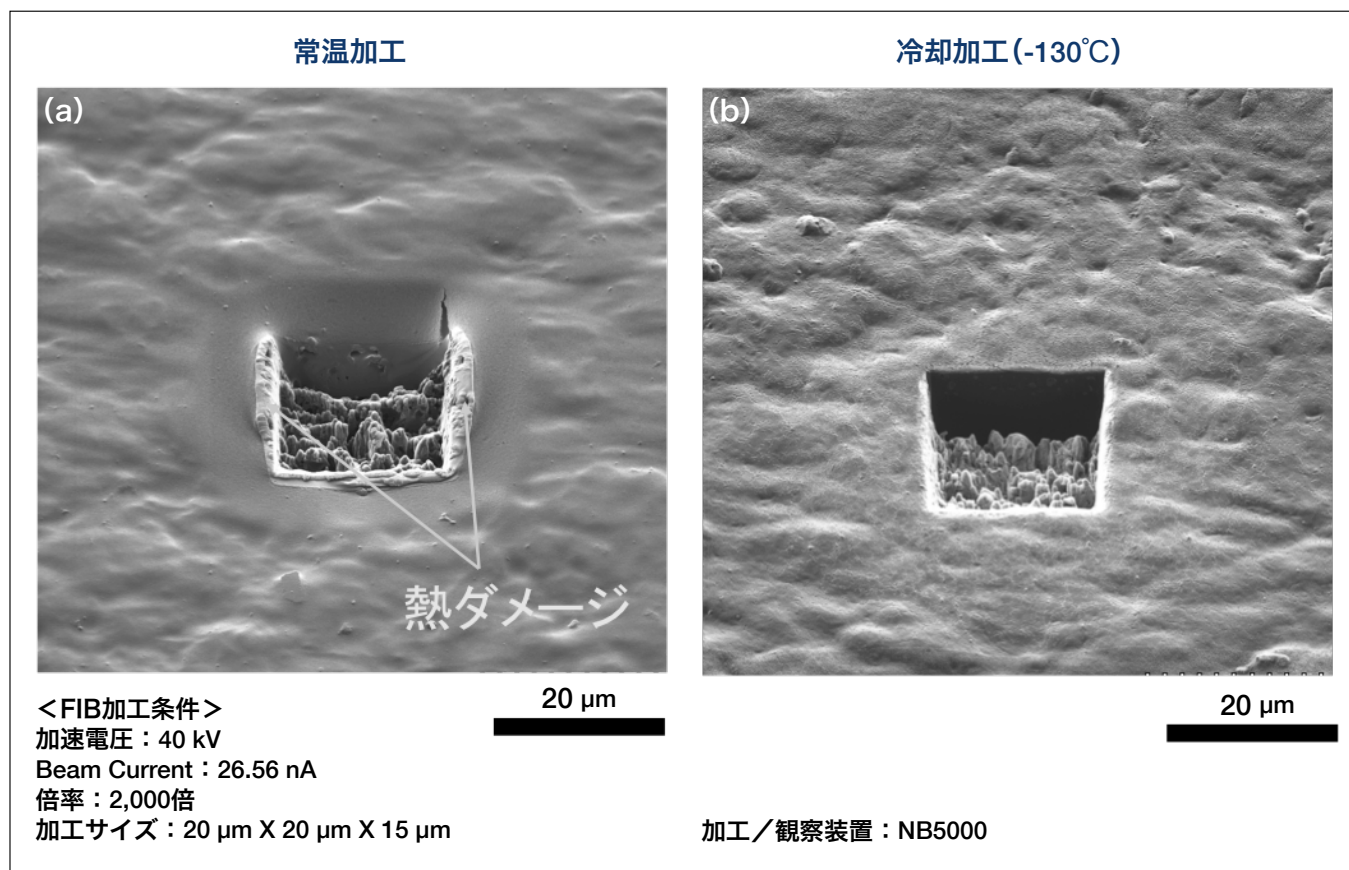


図4 ポリエステル樹脂のFIB加工例

有機膜であるレジストはイオンビームや電子ビームの熱ダメージに弱く、常温での加工や観察では、膜構造の低密度化や形状変化などのダメージが生じる。図5はレジストをFIBにて常温／冷却加工後、それぞれSTEM観察した結果(BF-STEM像)である。冷却状態で加工／観察した場合、冷却効果により大きくダメージが軽減される結果が得られた。

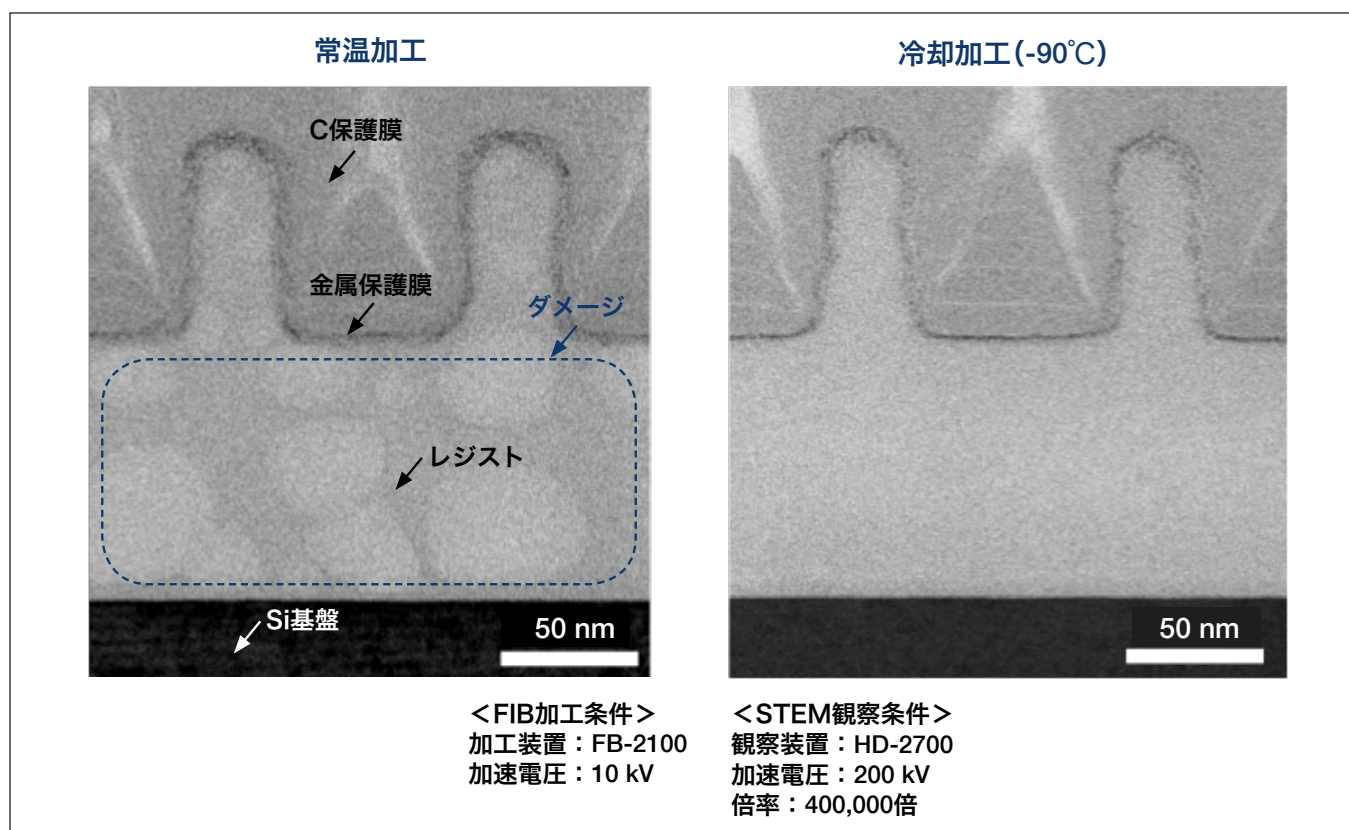


図5 レジストのFIB加工およびSTEM観察例

5. 終わりに

試料を冷却しながら加工および観察できる雰囲気遮断冷却ホルダーの概要および特長を中心に紹介した。微小試料の加工および形態観察が熱ダメージなく実現するもので、材料解析などの分野に大きく貢献できるものである。また、試料を大気に暴露することなく冷却加工から観察までの一連の作業をすべて一つのホルダーで可能となることで、加工から観察までの作業時間を大幅に短縮でき材料解析および研究に急速な発展をもたらすことが期待される。

著者所属

*1長久保康平 東 淳三

(株)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 先端解析システム設計部

日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM[®] IL1000の特長と応用例

Features and application example of Hitachi
HILEM[®] IL1000 Ionic Liquid for SEM

坪井秀樹*1, 二村和孝*2, 許斐麻美*1, 坂上万里*3, 塩野正道*3, 設楽宗史*3, 嶋守智子*3, 立花繁明*1, 富澤淳一郎*4, 佐藤賢一*1

1. はじめに

SEM(Scanning Electron Microscope: 走査電子顕微鏡)で水分を含んだ試料や絶縁物試料を観察するには、固定、脱水、置換、乾燥、金属コーティングなど、煩雑かつ手間のかかる試料前処理が必要である。

日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM[®] IL1000 は、蒸気圧がほとんどゼロで、高イオン導電性と高親水性を有することから、帯電付与剤として利用できる上、表面が入り組んだ凹凸の激しい試料でも全体に浸み込み、真空状態での水分の蒸発による試料形態の収縮や変形を防ぐことが可能である。さらにその構造は、生体関連物質コリンを模倣しているため、安全性も高い。

本稿では、日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM[®] IL1000 (図1) の特長と応用例について紹介する。

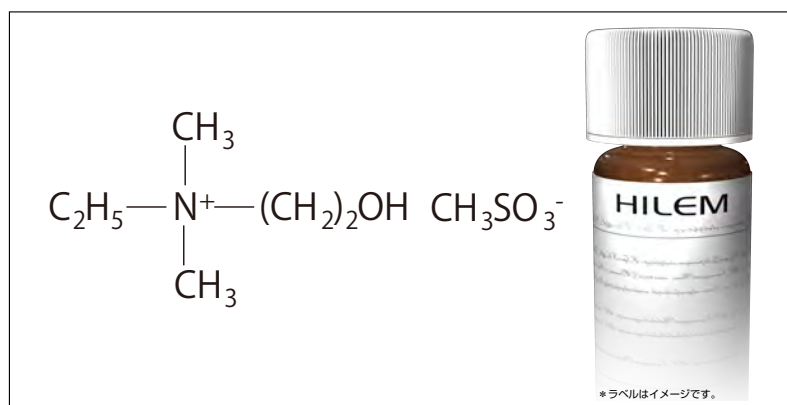


図1 日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM[®] IL1000

2. HILEM[®] IL1000の特長と応用例

2-1 帯電防止剤としての適用

5 mm 角に切ったろ紙を、直径 15 mm のアルミニウム試料台にカーボン製の両面テープで貼り付け、HILEM[®] IL1000 の 10% 水溶液を滴下し、10 分ほど放置して SEM 観察した (図2)。ろ紙のように、試料表面が入り組んだ凹凸の激しい絶縁物試料でも、IL1000 が全体に浸み込み、帯電することなく観察可能である。

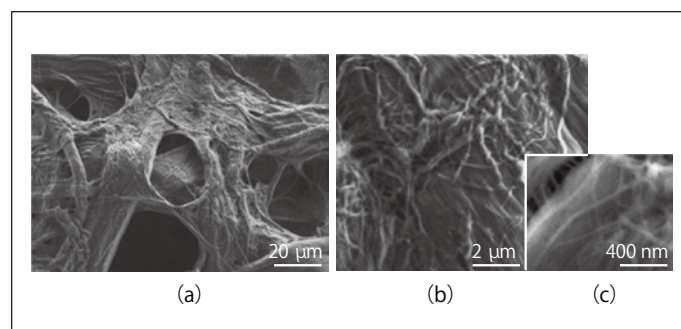


図2 ろ紙(IL1000処理)のSEM像
イオン液体処理により、帯電を制御し、ろ紙の繊維構造を観察できた。
挿入にはセルロース繊維が確認できている。
[観察装置:SU8020, 加速電圧:1 kV, 観察倍率:1,000倍(a), 10,000倍(b), 25,000倍(c), 信号:SE(Secondary Electron: 二次電子)(L)]

2-2 水分蒸発による形態の収縮や変形の防止

海洋微小甲殻類であるカマキリヨコエビの外骨格は脆（ぜい）弱で、自然乾燥では収縮や変形が生じ易い（図4）。当然、真空中では形態が保持できないが、固定液などの試薬も浸透しにくいため、通常のSEM観察用の前処理（図3）でも収縮や変形を免れない場合が多い（図5）。

一方、HILEM[®] IL1000を用いた前処理（図6）は、試料にHILEM[®] IL1000を滴下し、4時間放置後に余分な液滴をろ紙で除去してSEM観察と、短工程且つ短時間で収縮や変形を抑えた観察が可能となっている（図7）。このSEM像は、乾燥しないで水に浸漬した状態で取得した光学顕微鏡像（図8）と比べてみてもその変形が少ない様子が示されている。

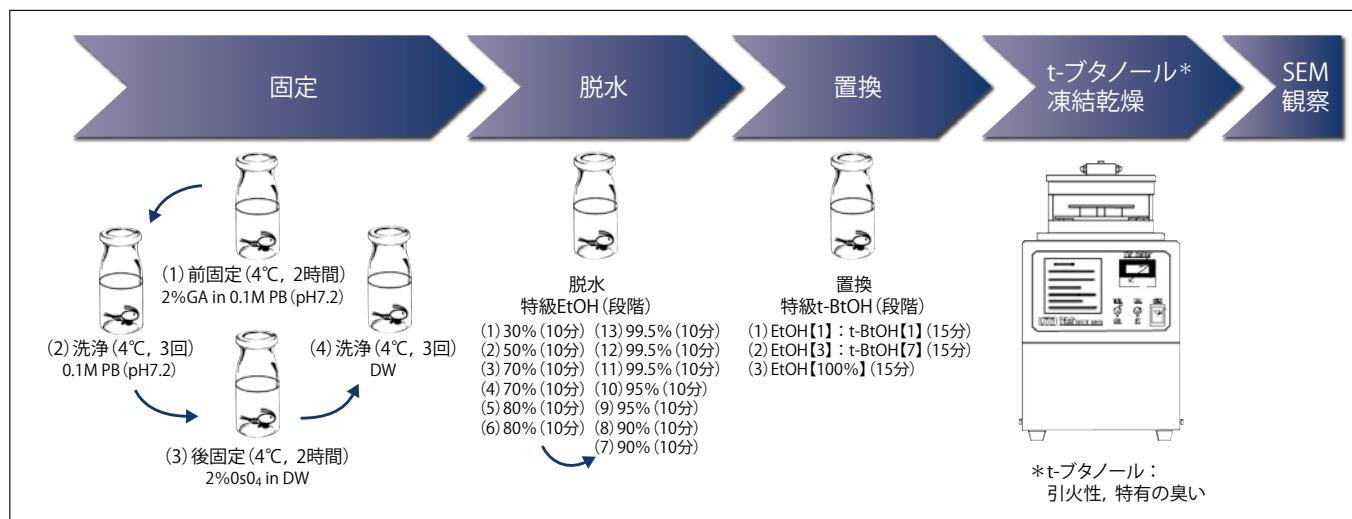


図3 SEM観察での生物試料の通常の前処理手順

通常の前処理手順は、固定、脱水、置換、t-ブタノール凍結乾燥という手順で行われる。

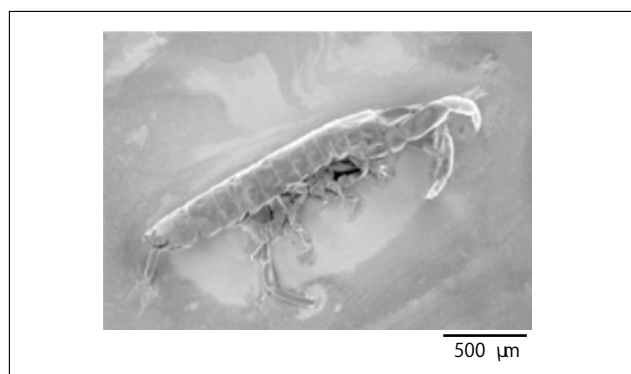


図4 カマキリヨコエビの自然乾燥(無処理)のSEM像
乾燥の影響で収縮や変形が起きている。

【観察装置:SU1510, 加速電圧:1.5 kV, 観察倍率:100倍, 信号:SE】

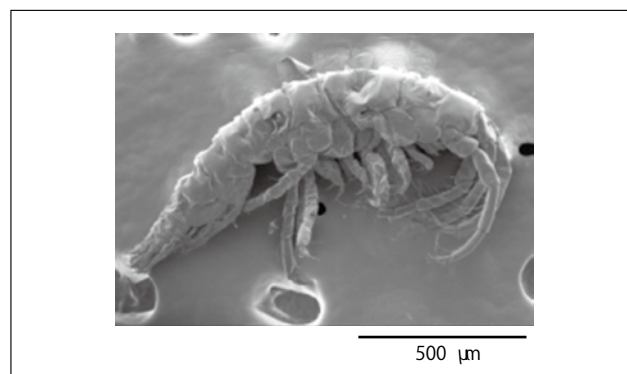


図5 通常のSEM観察用前処理をしたSEM像

通常の前処理でも一部収縮や変形が起きている。

【観察装置:S-3400N, 加速電圧:1.0 kV, 観察倍率:100倍, 信号:SE】

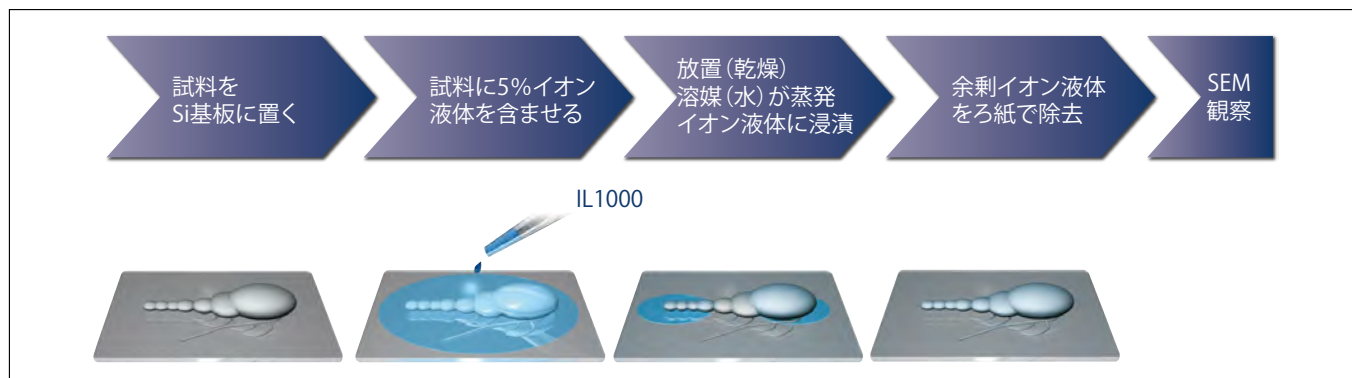


図6 SEM観察での生物試料のイオン液体 (HILEM[®] IL1000) 処理の手順

SEM観察でのイオン液体HILEM[®] IL1000処理の手順は、試料をSi基板に置き、手早く試料に5%希釈のHILEM[®] IL1000を含ませ、4時間ほど放置すると、水が蒸発し、試料がHILEM[®] IL1000に浸漬する。余剰なイオン液体をろ紙などで除去し、SEM観察する。

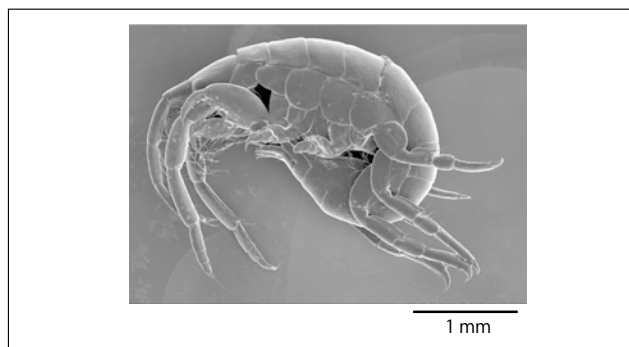


図7 イオン液体処理をしたカマキリヨコエビのSEM像
イオン液体処理の場合、収縮や変形がなく甲や脚肢なども明瞭に観察できる。
[観察装置:S-3400N, 加速電圧:5.0 kV, 観察倍率:32倍, 信号:SE]



図8 カマキリヨコエビの生物顕微鏡（正立）像（暗視野照明）
ホールスライドガラス上で、水に浸漬させた状態で光学顕微鏡観察した。
形状が保たれ、色の情報も捉えられる。

2-3 EBSD分析への応用

EBSD (Electron Backscatter Diffraction pattern) 分析は原理上、高加速電圧かつ大電流を必要とするためチャージアップの影響を受けやすく、特に絶縁物試料において顕著である。

今回、通常の高真空条件下でのEBSD分析に、導電性付与剤としてHILEM[®] IL1000の適用を試みた。

日立イオンミリング装置IM4000で断面加工を施したジルコニアセラミックスを、未処理（図9（a））、白金コーティング処理（図9（b））、HILEM[®] IL1000処理（図10（c））の3条件でEBSD分析を行い、それぞれのIPFマップ（z）および、EBSDパターン強度マップを求めた。その結果、未処理（a）と比べて、白金コーティング（b）ではチャージアップが低減されるが、パターン強度が低下してしまう（図10）。一方、HILEM[®] IL1000処理（c）では、チャージアップの低減とパターン強度の維持の両立が可能となっていることがわかる（図10）。

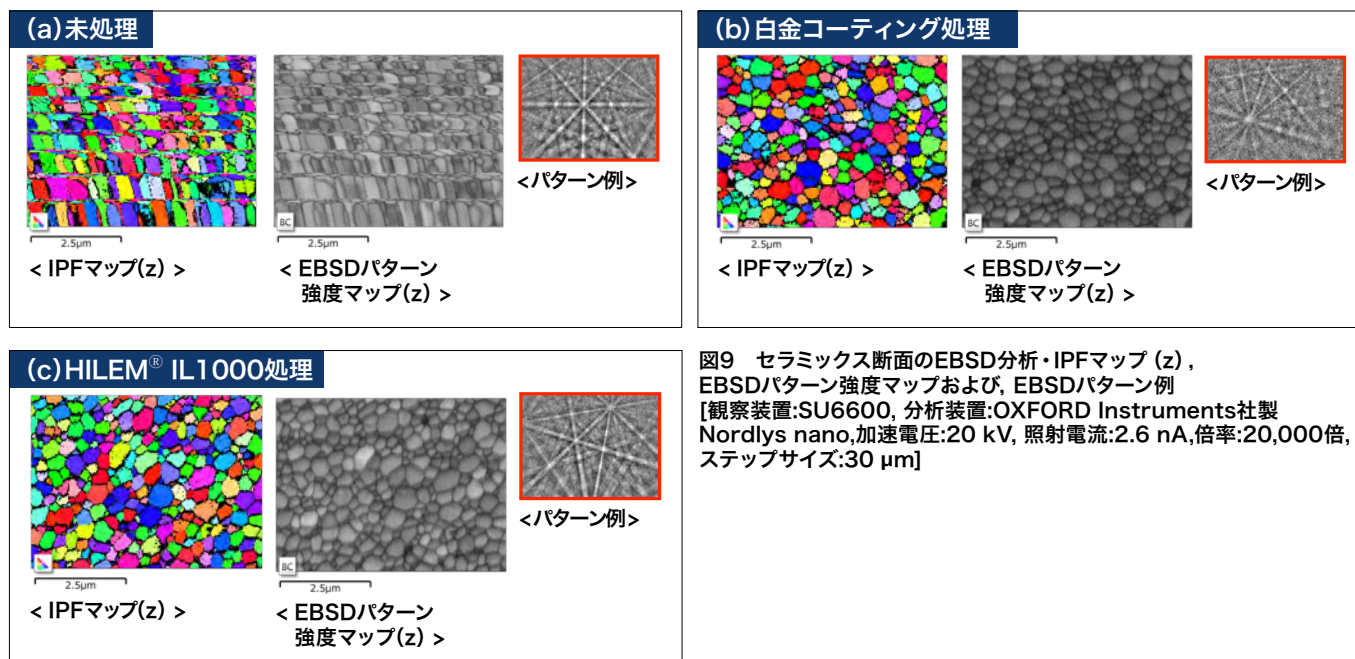


図10 処理毎の平均EBSDパターン強度と測定点数率

	(a) 未処理	(b) 白金コーティング処理	(c) HIREM [®] IL1000処理
平均EBSDパターン強度	231	160	230
測定点数率(%)	80.54	73.5	80.78

3. 終わりに

ここでは、HILEM[®] IL1000 を用いた各種試料の SEM 像の観察手法について述べた。SEM 観察の前処理は、SEM が開発された 1969 年ごろから、さまざまな手法が試みられてきた。その目的は、いかに実際の試料形状を忠実に観察するかに重きが置かれてきたが、いかに簡単に素早く像を取得するかも重要なニーズとなってきた。

今後もさまざまな顧客のニーズに応えられるように、電子顕微鏡本体だけでなく、試料前処理や観察技法などの工夫や改善も試み、最適なソリューションを提供していく考えである。

文 献

- ・Kuwabata S. et al: *Chem. Lett.*, 35, 600-601, 2006
- ・桑畑,他: イオン液体の電子顕微鏡観察, 表面科学, Vol.28, No.6 (2007)
- ・桑畑,他: イオン液体の電子顕微鏡応用, 顕微鏡, Vol.44, No.1 (2009)
- ・河合,他: コリンに似た分子構造を持つ高親水性イオン液体の特異物性とその電子顕微鏡用可視化剤への応用, 表面, Vol.49, No.12, 423~431 (2009)
- ・Kawai K. et al: *Langmuir*, 27, 9671-9675, 2011, 2011
- ・許斐,他: 日本顕微鏡学会第63回学術講演会発表要旨集, p131
- ・塩野,他: イオン液体を用いた微小甲殻類のSEM観察, 日本顕微鏡学会第68回学術講演会発表要旨集 (2012.5)
- ・坂上,他: イオン液体を用いた柔組織のSEM観察, 日本顕微鏡学会第69回学術講演会発表要旨集 (2013.5)
- ・設楽,他: 日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会発表要旨集, p182

著者所属

*1坪井秀樹 許斐麻美 立花繁明 佐藤賢一

(株)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 科学システム営業本部 マーケティング部

*2二村和孝

(株)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 事業戦略本部 科学システム事業戦略部

*3坂上万里 塩野正道 設楽宗史 嶋守智子

(株)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 アプリケーション開発部

*4富澤淳一郎

(株)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 先端解析システム設計部

マイクロプレートリーダーMTP-900Labを用いた蛍光測定による抗酸化物質測定法(ORAC法)

Oxygen Radical Absorbance Capacity

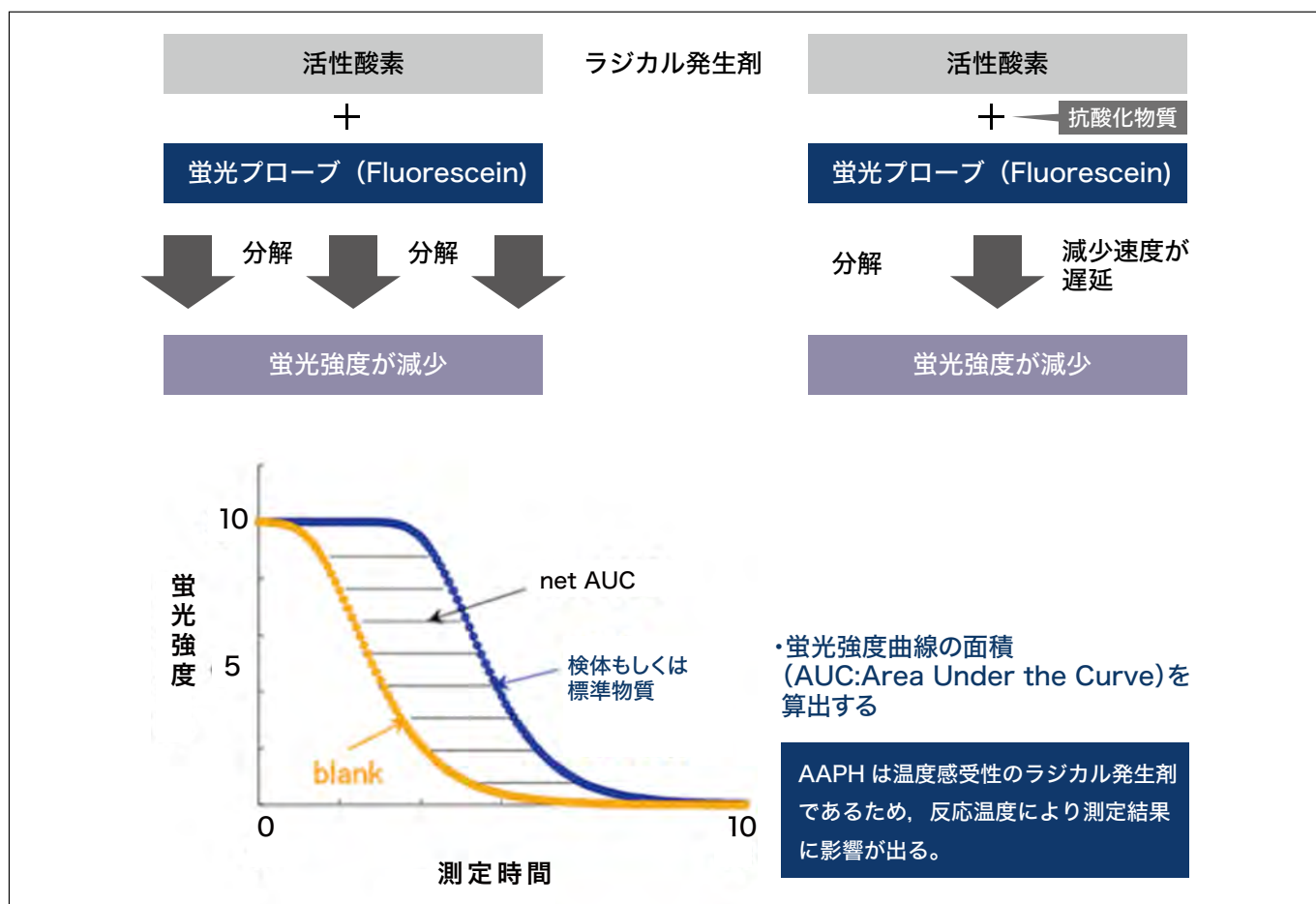
橋本真一*1

1. はじめに

ORAC法 (Oxygen Radical Absorbance Capacity) は、食品などに含まれる種々の抗酸化物質 (カテキン、フラボノイド、ビタミンEなど) の抗酸化能力 (機能性) を分析する方法です。米国農務省が開発した指標で、農産物、加工食品やサプリメントにORAC抗酸化力が表示され、消費者の評価を得て市場が急拡大した事例があります。日本でも農水省が農産物の普及及び付加価値化推進にむけ、公定法化の動きがあります。本事業の推進には食品大手100社がAOU研究会を立ち上げ、ワーキンググループが中心となり米国と異なる日本独自の分析法の確立を急いでいます。

2. 測定原理

検体 (もしくは標準物質) 存在下での蛍光強度の曲線下面積 (AUC: Area Under the Curve) と非存在下 (ブランク) でのAUCとの差 (net AUC) を算出する。



3. アプリケーションデータ

プレート配列の設定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	B	S1	S2	S3	S4	S4	S3	S2	S1	B		
C		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	
D		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	
E		20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	
F		19	17	15	13	11	9	7	5	3	1	
G	B	S1	S2	S3	S4	S4	S3	S2	S1	B		
H												

濃度(μM)
 S1 48.44 4 ウェル (1~4)
 S2 24.22 4 ウェル (1~4)
 S3 12.11 4 ウェル (1~4)
 S4 6.06 4 ウェル (1~4)

サンプル数 20 件 (1~90)
 サンプル総ウェル数 40 ウェル

量り取ったTroloxの重量 (mg) 100

B ... ブランク
 S1 ... スタンダード (Trolox)
 S2 ... スタンダード (Trolox)
 S3 ... スタンダード (Trolox)
 S4 ... スタンダード (Trolox)
 数字 ... サンプル
 空白 ... 未使用ウェル

<<配列の状況>>
 ブランク 4 ウェル (1~4)

* ブランク, Trolox, サンプルを対角線上に配置する。
 * プレートの外周ウェルを使用しない。

図1 プレート配列

サンプル名と希釈倍率を入力してください。

サンプル数 = 10

サンプルNo.	サンプル名	希釈倍率
1	リンゴジュース(1) 400	400
2	リンゴジュース(1) 800	800
3	リンゴジュース(2) 400	400
4	リンゴジュース(2) 800	800
5	リンゴジュース(3) 400	400
6	リンゴジュース(3) 800	800
7	リンゴジュース(4) 400	400
8	リンゴジュース(4) 800	800
9	リンゴジュース(5) 400	400
10	リンゴジュース(5) 800	800

図2 サンプル名, 希釈倍率の設定

ORAC値 結果シート

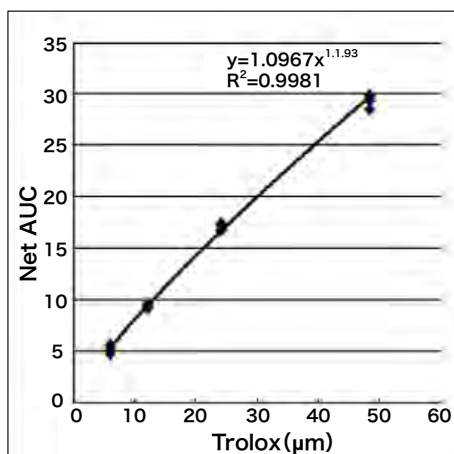
測定日時 : '2014-06-13 12:06:28

コメント :

測定者 : corona

No.	サンプル名	AUCblank						
		1	2	3	4	average	SD	CV
B	BLANK	6.50	6.42	6.02	6.06	6.251	0.2439	3.90%

No.	サンプル名	net AUC (AUCtrolox - AUCblank)						
		1	2	3	4	average	SD	CV
S1	Trolox 48.44	29.59	28.43	29.33	29.92	29.316	0.6381	2.18%
S2	Trolox 24.22	17.38	16.72	16.79	17.25	17.035	0.3296	1.93%
S3	Trolox 12.11	9.56	9.56	9.17	9.20	9.372	0.2164	2.31%
S4	Trolox 6.06	5.57	5.56	4.68	5.24	5.262	0.4187	7.96%



No.	サンプル名	net AUC (AUCsample - AUCblank)							濃度	希釈倍率	ORAC値 μ mol TE/L
		1	2	3	4	average	SD	CV			
1	リンゴジュース(1) 400	21.30	21.47			21.388	0.1226	0.6%	32.638	400	13055
2	リンゴジュース(1) 800	11.93	11.97			11.951	0.0329	0.3%	16.183	800	12946
3	リンゴジュース(2) 400	20.89	22.03			21.464	0.8060	3.8%	32.777	400	13111
4	リンゴジュース(2) 800	12.62	11.57			12.093	0.7424	6.1%	16.414	800	13131
5	リンゴジュース(3) 400	20.90	21.83			21.365	0.6526	3.1%	32.596	400	13038
6	リンゴジュース(3) 800	12.94	11.74			12.341	0.8456	6.9%	16.820	800	13456
7	リンゴジュース(4) 400	21.14	22.02			21.580	0.6228	2.9%	32.992	400	13197
8	リンゴジュース(4) 800	11.54	11.91			11.721	0.2622	2.2%	15.808	800	12647
9	リンゴジュース(5) 400	19.63	20.53			20.081	0.6381	3.2%	30.248	400	12099
10	リンゴジュース(5) 800	10.87	11.05			10.962	0.1279	1.2%	14.582	800	11666

図3 ORAC解析ソフト(オプション)による測定結果

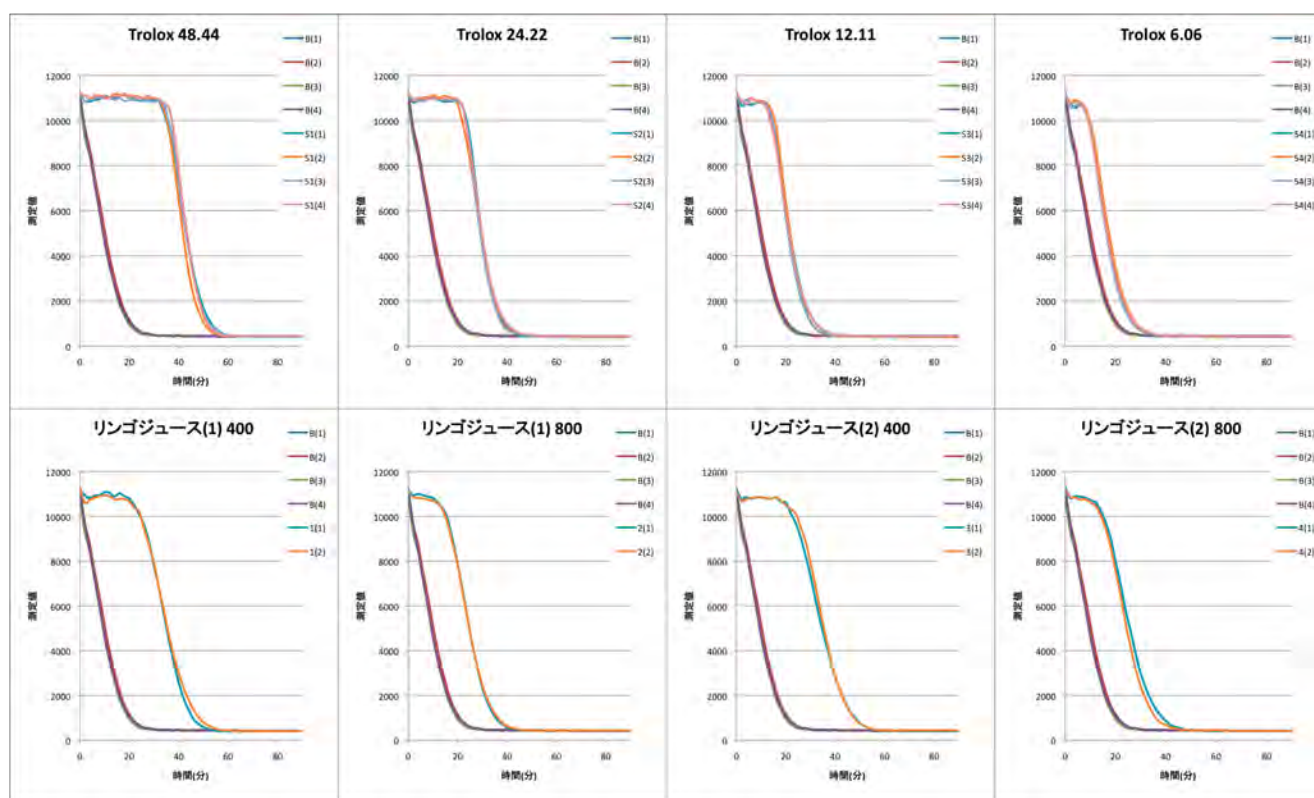


図4 グラフ

4. 装置概要



測定条件

測定方式：蛍光強度（下方蛍光測定），1 Ex - 1 Em
測定法：カイネティック（Plate）
フィルタ：Ex1：490 nm，E m1：530 nm
フラッシュ回数：80
測定感度：× 10（フォトマル高圧：High）
プレート：96 ウェル（透明）
ミキシング：レベル：強
モード：直線
時間：30.0 秒
温度：37℃
カイネティック：繰返し回数：45 回
測定間隔：120 秒（ミクシングは初回のみ）

システム構成

- ・ MTP-900Lab（下方蛍光測定）
- ・ 恒温機能（オプション）
- ・ ORAC解析ソフト（オプション）

*上記の表示結果は，すべてORAC解析ソフト（オプション）で測定したものです。

*本資料の測定結果（再現性，感度，正確性等）はすべての装置の仕様をお約束するものではありません。

著者所属

*1橋本真一

コロナ電気(株) R&D部 設計グループ

蛍光X線分析装置EA1000VX/AIIIによる 環境規制物質管理の業務効率化の提案

Efficiency improvement for the environmentally hazardous substances management using Hitachi X-ray fluorescence analyzer EA1000VX/AIII

田村浩一*1, 的場吉毅*1, 篠原圭一郎*2

1. はじめに

蛍光X線分析装置 EA1000VX/AIII は、RoHS 指令に代表される環境規制物質管理の専用機であり、検査時間の大幅な短縮、操作性向上による検査コスト削減をめざして開発された(図1)。この小文では、環境規制物質管理における蛍光X線分析の役割と EA1000VX/AIII による業務効率改善の提案について解説する。

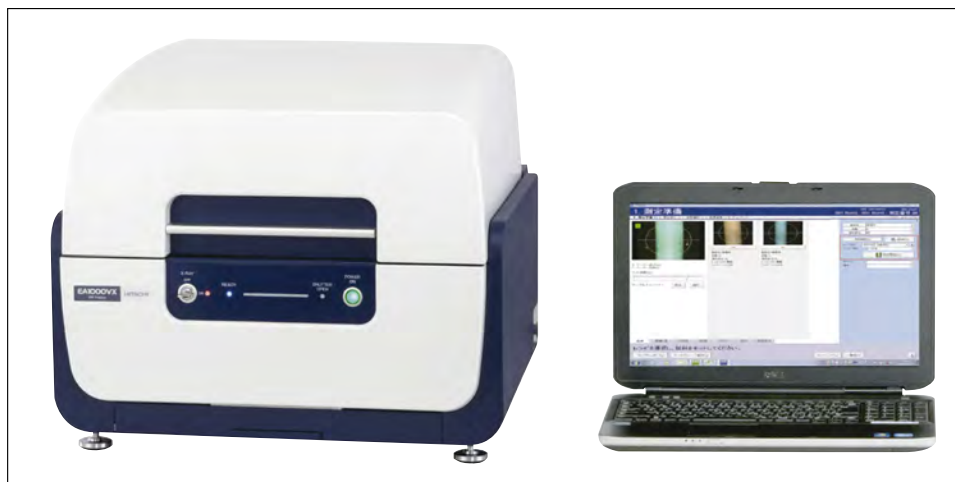


図1 日立蛍光X線分析装置EA1000VXの外観図

2. 環境規制物質管理における蛍光X線分析の役割

蛍光X線分析装置が、環境規制物質管理でスクリーニング分析法として広く用いられているのは、

- ①他の手法に比べて測定が簡便
- ②前処理などによるヒトの誤差が少ない
- ③多量の部品検査に要する時間とコストが小さい

ことが主な理由である。私たちはかねてより、液化窒素不要の高スループットの検出器の採用、濃度判定に十分な精度を自動判定して測定を打ち切る精度管理測定機能の搭載、分析の知識が不要な簡単ソフトウェアの搭載などにより市場の要求に応えてきた。

EA1000VX/AIIIの開発にあたっては、環境規制物質管理を行っているユーザの課題や要望を把握し、業務効率化を図るための様々な機能を搭載した。

3. 業務効率化のための新機能

ユーザが蛍光X線分析装置で環境規制物質のスクリーニング分析を行う際の測定の流れを図2に示す。ユーザは、毎日多品種多量のサンプルの測定を行っている。サンプルごとに測定部位や濃度管理基準、測定条件について最適な条件をあらかじめ決めてあることが多い。測定者は、サンプルごとにその条件を設定する必要があるが、選択ミスのおそれがあった。そこで、以前に測定した結果をデータベース化し、サンプル情報を入力するだけで、過去の「測定実績参照」ができる機能を搭載した。同

一製品においても、部品や測定部位の違いがあるが、過去の実績から、図3に示すように測定位置の画像が表示されるので、測定部位の判断ミスや迷いを軽減することが可能である。

過去に測定実績のないサンプルの場合は、最適な測定条件を作成しなければならない。たとえば金属と樹脂では適切な条件に切り替えないと正しい測定が行えなかった。そこで EA1000VX/AIII では、「材料判定機能」を開発した。サンプルを短時間予備測定して、試料の材質を樹脂・Al 合金・Fe 合金・Cu 合金・Sn 合金・その他金属の6種に分類し、分析レシピ[※]が自動選択される。従来は測定者が分析レシピを選択していたが、この機能により選択ミスや測定者による判断ばらつきを避けることができる。

※分析レシピとは、分析を行うための測定条件や、環境規制物質の濃度基準値などを試料の材質ごとに設定したものである。

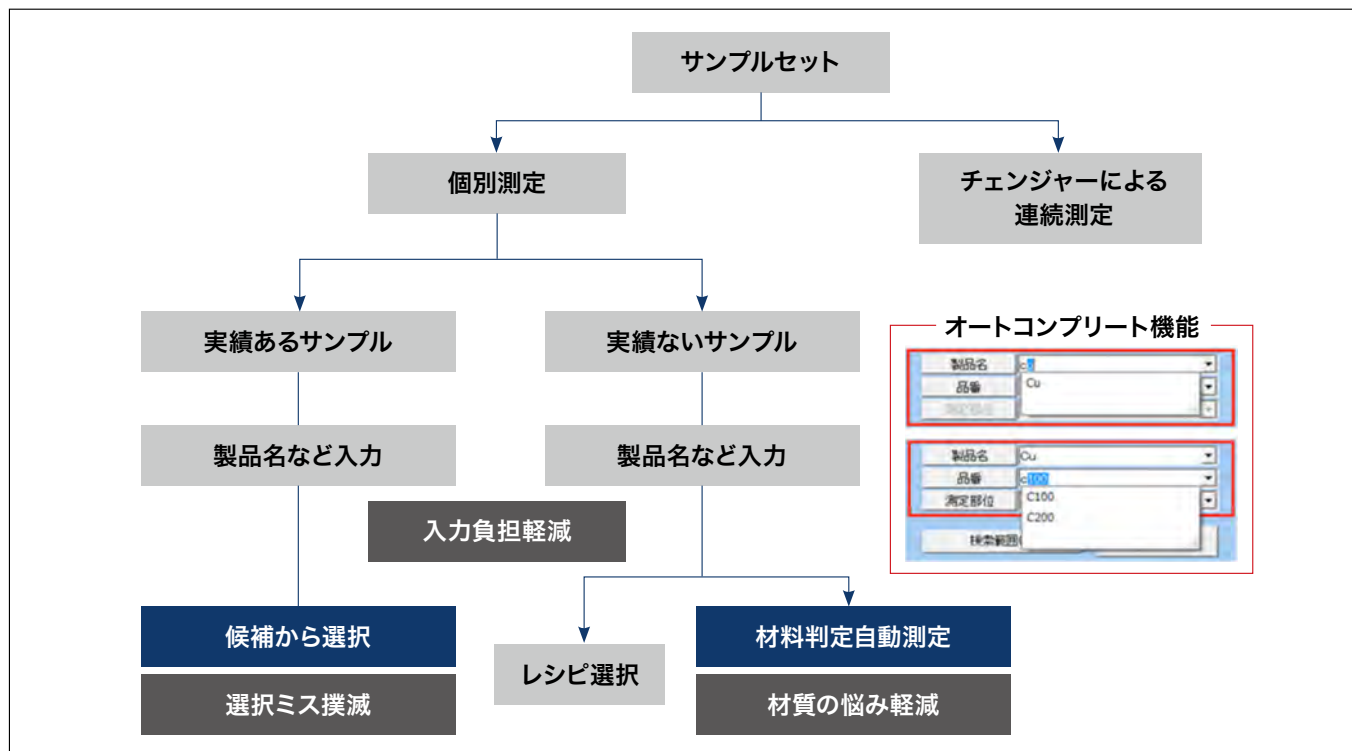


図2 蛍光X線分析装置を用いたスクリーニングの流れ



図3 測定実績参照機能

操作性向上は、ハードウェアによっても実現している。図4に装置の前面パネルを示す。この中央にあるLEDがプログレスバーである。プログレスバーは、測定を進捗を5段階で表示する。測定者は、測定中にサンプルの準備などを行うために装置を離れることが多い。測定者は操作用のパソコンを見なくても、プログレスバーをみるだけで、離れたところから測定状況を把握することが可能となり、スループットの向上に貢献する。



図4 EA1000VX/AIIIの前面パネル
上段EA1000VX、下段EA1000AIII

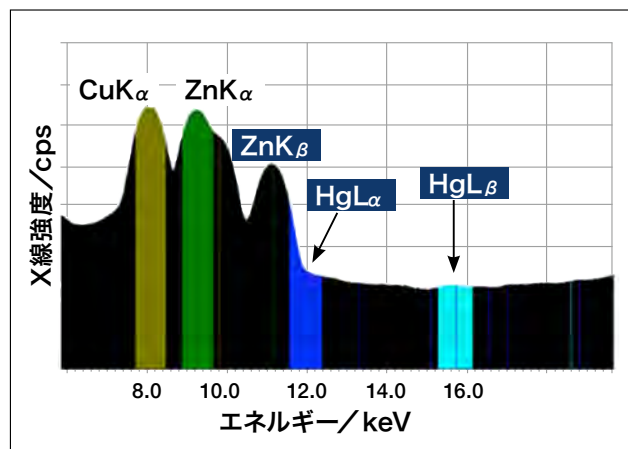


図5 分析線自動切り替え機能

また、操作性向上のため、「分析線自動切り替え機能」・「考察アシスト機能」・「ピーク自動解析機能」を搭載した。図5に真鍮中の微量の水銀を測定した際の蛍光X線スペクトルを示す。水銀の分析線は L_{α} と L_{β} の2種類があるが、デフォルトではより強度の大きい L_{α} を使用する。しかし、真鍮には亜鉛が含まれており、 ZnK_{β} ピークが HgL_{α} ピークに干渉するため、正確な分析が行えない。そこで、含有元素のピークの重なりを自動的に判別し、重なりの影響がない分析線を自動的に選択する「分析線自動選択機能」を搭載した。この例では HgL_{α} を用いた場合に比べて、自動選択された HgL_{β} を用いた時の測定精度は約3倍向上した。

また、ソフトが自動判定した時には、判定の理由を表示する「考察アシスト機能」が搭載されており、環境規制物質管理の熟練者が持つノウハウを測定者に提供している。

蛍光X線のスペクトルは、さらに多くのピークが重なりあうことがある。図6にステンレス鋼中の微量の鉛を測定した時のスペクトルを示す。EA1000VX/AIIIのようなエネルギー分散型蛍光X線分析装置では、蛍光X線ピークに加え、計数回路に由来するサムピークやエスケープピークが現れる。「ピーク自動解析機能」は、これらのピークを解析して、ピークにラベルをつけ、ピーク分離の結果を表示するようにした。この例では、ステンレスの主成分元素である鉄(Fe)、クロム(Cr)、ニッケル(Ni)の複合したサムピークの中から、微量の鉛のピーク(PbL_{α} および PbL_{β})を自動検出して、ピーク分離結果を表示していることがわかる。この機能により、分析結果の詳しい検証を行うことができるようになった。

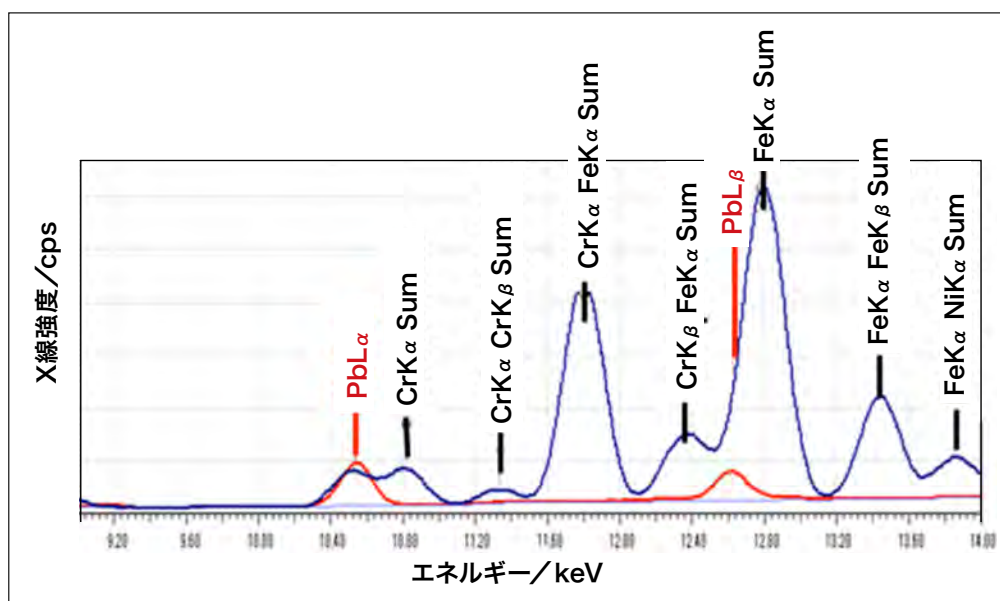


図6 ピーク自動解析機能

4. まとめ

EA1000VX/AIII は、世界中で 3,000 台以上使用されている従来機種 EA1000 シリーズの後継機種として開発された。ここで紹介した機能の他に、環境規制物質管理に特化した強力なデータベース機能も有しており、測定だけにとどまらない総合的なソリューションを提供し、環境規制物質管理の業務効率化に貢献できると確信している。

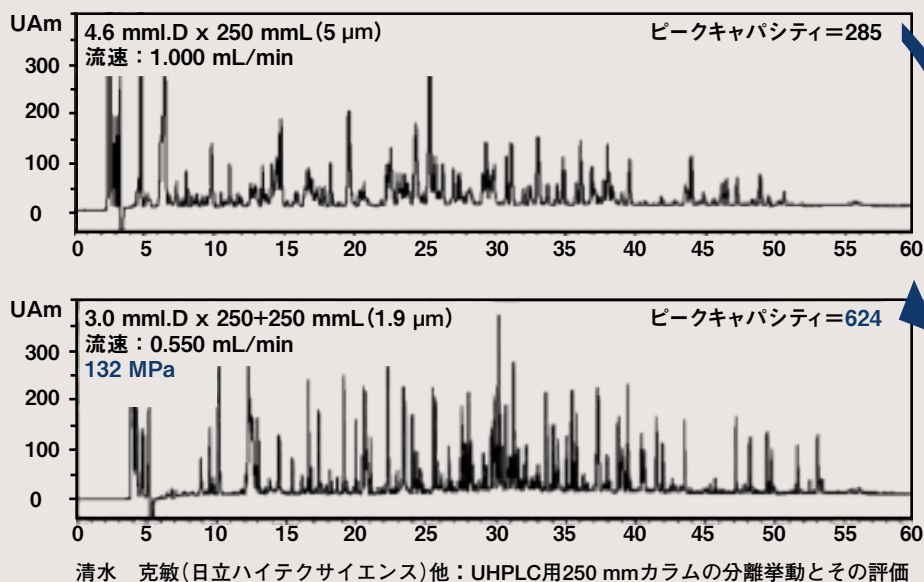
*1田村浩一 的場吉毅
(株)日立ハイテクサイエンス 技術本部 分析技術部

*2篠原圭一郎
(株)日立ハイテクサイエンス 営業本部 分析営業部

1. 第19回 LCテクノプラザ (1/23~24 神奈川県)

宝泉 雄介(日立ハイテクサイエンス)他：140 MPa耐圧 新形UHPLCによる高分離高感度分析

【要旨】抗体医薬品分野で多用されるペプチドマッピングでは、タンパク質のトリプシン消化後に大小様々なペプチド断片が生じることから高分離・高感度分析が求められる。ウシ血清アルブミン(BSA)をトリプシン消化したものを注入試料とし、超高速高速液体クロマトグラフChromaster Ultra Rsに分離カラムとして、オクタデシルシリル(ODS)カラムであるLaChrom II C18 (5 μ m) 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mmならびにLaChromUltra II C18 (1.9 μ m) 3.0 mm I.D. $\times$ 250 mmを使用し、グラジエント溶離分析を行った。グラジエント溶離分析における分離指標として、ピークキャパシティ(Pc)を比較した。粒子径5 μ mのカラムを使用した場合、分析時間60分間におけるPcは285であった(上図)。粒子径1.9 μ mの高分離カラムを使用することで、同分析時間におけるPcは479まで向上させることができた。さらに、カラムを2本連結し、分析時最高圧力132 MPa下にて分析することより、Pcは624まで向上した(下図)



2. 独立行政法人日本学術振興会将来加工技術第136委員会 第6会(第3部会)研究会 (1/31 京都府)

佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ)：FIB-STEMを用いた鉄鋼材料の転位観察

3. 第2回 ソフトマター中性子散乱研究会～散乱法と画像解析～ (3/4 東京都)

生頼 義久(日立ハイテクノロジーズ)：SEMの基礎と装置原理

4. ガラス表面分析研究討論会 (3/5 東京都)

宮木 充史(日立ハイテクノロジーズ)：最新電子顕微鏡技術による薄膜材料の微小部解析

5. 第61回 応用物理学会春季学術講演会 (3/17~20 神奈川県)

生頼 義久(日立ハイテクノロジーズ)他：SiC結晶の表面モフォロジーと転位の関係

6. 科学技術館2014春休み特別展「ミクロの不思議な世界」(3/21 東京都)

中澤 英子(日立ハイテクノロジーズ)：電子顕微鏡のお話

7. 第119回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (3/27~29 栃木県)

許斐 麻美(日立ハイテクノロジーズ)：日立HT7700透過電子顕微鏡のご紹介

8. 日本地球惑星科学連合2014年大会 (4/28~5/2 神奈川県)

佐藤 岳志(日立ハイテクノロジーズ)他：In situ simultaneous SEM/STEM observation of Pt/C catalysts in a gaseous atmosphere

9. 日本顕微鏡学会 第70回 記念学術講演会 (5/11~13 千葉県)

- 佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ)他: KOH低温エッチングを用いた4H-SiCの転位評価
 谷口 佳史(日立ハイテクノロジーズ)他: レンズレス・フーコー法による磁壁の観察
 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ウミホタル(貝虫垂綱)のSEM観察
 矢口 紀恵(日立ハイテクノロジーズ)他: Performance of a gas reaction in situ TEM technique and its application to the characterization of energy-related nano composites
 大南 祐介(日立ハイテクノロジーズ)他: 卓上型大気圧走査型電子顕微鏡によるバルク試料観察
 大南 祐介(日立ハイテクノロジーズ)他: 細胞全載標本観察のための新しい透過電子イメージング技法
 河西 晋佐(日立ハイテクノロジーズ)他: 卓上型大気圧走査型電子顕微鏡の紹介
 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TEM試料支持法の検討
 橋本 陽一郎(日立ハイテクノロジーズ)他: エネルギー選別した極低加速BSE像の像解釈に関する検討
 佐藤 岳志(日立ハイテクノロジーズ)他: 位相シフト電子線ホログラフィーによる有機EL膜層の可視化の検討
 砂押 毅志(日立ハイテクノロジーズ)他: 多様化するソフトマテリアル解析ニーズを実現するSEM観察技術の開発
 松本 弘昭(日立ハイテクノロジーズ)他: FE-ETEMを用いた高湿度雰囲気における電極触媒劣化過程のその場観察
 設楽 宗史(日立ハイテクノロジーズ)他: 非導電性試料のEBSD分析へのイオン液体の適用
 土谷 美樹(日立ハイテクノロジーズ)他: 冷却プローブを用いた含水試料の試料作製
 長久保 康平(日立ハイテクノロジーズ)他: Grid Revolver Holderの機能と応用
 笹島 正弘(日立ハイテクノロジーズ)他: FE-SEMによる透過電子を用いた材料解析
 山澤 雄(日立ハイテクノロジーズ)他: インレンズFE-SEMによる最先端材料解析へのアプローチ
 稲田 博実(日立ハイテクノロジーズ)他: 高速・高感度分析を可能とし自動収差補正機能を搭載した走査透過型電子顕微鏡
 橋本 隆仁(日立ハイテクノロジーズ)他: HD-2700形FE-STEMと2台のX-Max^N 100 TLEによる立体角2 srのEDXシステム
 高鈴 良浩(日立ハイテクノロジーズ)他: アウトレンズ形FE-SEMによる磁性材料の多角的観察
 伊藤 寛征(日立ハイテクノロジーズ)他: セミインレンズ形FE-SEMによるEBSD分析の可能性
 森川 晃成(日立ハイテクノロジーズ)他: Cryo-FIB加工における高効率冷却手法の開発
 白井 学(日立ハイテクノロジーズ)他: イオン液体の電子線ホログラフィー観察

10. 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第30回 学術講演会 (5/23~25 大阪府)

- 坂上 万里(日立ハイテクノロジーズ)他: 大気圧SEMによる生物試料の観察
 振木 昌成(日立ハイテクノロジーズ)他: 柔組織のSEM観察のためのイオン液体処理法の検討
 仲野 靖孝(日立ハイテクノロジーズ)他: イオン液体を用いたTEM試料支持法の検討
 檀 紫(日立ハイテクノロジーズ)他: FE-SEMのリターディング法による生物切片試料の高解像度反射電子観察

11. 日本分析化学会 第74回 分析化学討論会 (5/24~25 福島県)

- 坂本 達弥(東邦大学)他: Al³⁺選択的蛍光リガンドCPCHの開発と酸性医薬品分析への応用

12. 日本家政学会 第66回大会 (5/24 福岡県)

- 西村 雅子(日立ハイテクノロジーズ): 低真空走査電子顕微鏡による食品の観察 —動物性食品および菌類—

13. KOFAS 2014 (6/11~13 韓国)

渡邊 正樹(日立ハイテクノロジーズ): High speed and high resolution UHPLC with 140 MPa maximum operating pressure by using a sub-2 μ m packed 250 mm-length column

[Summary] Current commercially available ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) works within a ultra high operating pressure (max. 100 MPa or more) and it allows utilizing sub-2 μ m particle columns. UHPLC analysis offers a significant reduction in analysis time without degradation of peak resolution. It also allows an increase in sensitivity and high resolution analysis.

Pressure drop ΔP (MPa) is proportional to flow rate u (mm/s), column length L (mm), and mobile phase viscosity η (Pa·s) and inversely proportional to column permeability K_v (m²) (see eq. 1);

$$\Delta P = \frac{u\eta L}{K_v} \quad (1)$$

On this equation, you can find the extension of maximum working pressure provides to enhance those three proportional parameters. Expansion of flow rate leads to analytical time shorter, which leads to high-speed analysis. Expansion of column length means improvement of the theoretical plate, which means high-resolution analysis. And extension of the mobile phase viscosity leads to the extension of the capability of selection of high-viscosity mobile phase. You can choose methanol, which has higher viscosity than acetonitril, if acetonitril-based mobile phase does not provide the preferable separation. Higher maximum working pressure allows you more selectivity for ultra high-performance method development.

We have currently released the brand new UHPLC system ChromasterUltra Rs and a new sub-2 μm particle columns LaChromUltra II series. ChromasterUltra Rs allows the industry's highest operation pressure up to 140 MPa. Additionally, LaChromUltra II has 250 mm-length columns with 1.9 μm particles in the lineup. Here we introduce a peptide map analysis of the tryptic digest of bovine serum albumin by using those system and columns. In the experiment, peak capacity was significantly improved under the high maximum operating pressure of ChromasterUltra Rs UHPLC system.

14. Microscience Microscopy Congress 2014 (6/30~7/3 英国)

松本 弘昭(日立ハイテクノロジーズ)他: Simultaneous in situ SEM and STEM analysis of gas/ catalyst reaction in a cold field-emission environmental TEM

HD-2700形FE-STEMと2台のX-Max^N 100 TLEによる立体角 2 srのEDXシステム

橋本 隆仁(日立ハイテクノロジーズ)他

要旨

HD-2700 200 kV STEM は、特性 X 線を用いた元素分析装置の Oxford Instruments 社製 X-Max^N 100 TLE シリコンドリフト検知器 (SDD) の 2 つ同時搭載を可能にした (図 1)。X 線検出感度は、検出器の X 線取込み立体角に比例して向上する。そこで今回は、対物レンズおよび SDD センサーの形状と配置を最適化し、検出器一つあたりの X 線検出立体角 1 sr 以上を実現しました。2 つ (Dual) の SDD 検出器は試料ホルダーの傾斜軸に対して 90° および 270° の位置に配置し、2 つ合わせた立体角は 2 sr 以上となり、これまでにない高感度 / 高スループット分析を実現した。図 2 は、球面収差補正器搭載 HD-2700 と Dual SDD を用いたガリウムヒ素 (GaAs) 単結晶 <011> 試料の原子分解能 EDX 元素マップ観察例である。加速電圧は 200 kV、画素数は 128 × 96、取得時間は 12 分である。原子カラム間の距離 140 pm の Ga と As の構造を示す EDX マップが明瞭に観察でき、本システムが原子レベルの高分解能 EDX マップに適用可能であることを確認した。

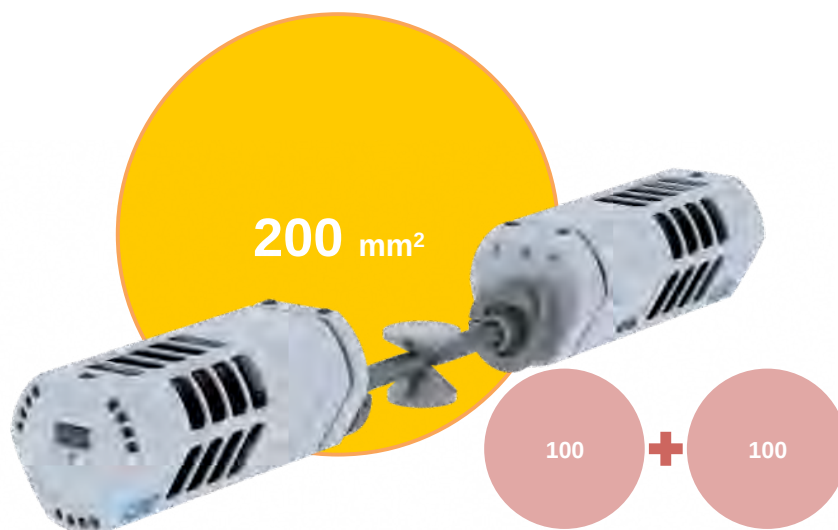


図1 Oxford Instruments社製X-Max^N 100 TLE Dual SDD検出器

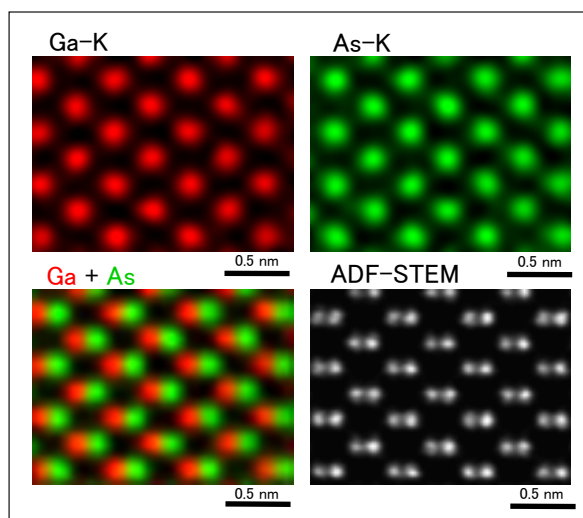


図2 球面収差補正器搭載HD-2700とDual SDDを用いたGaAs単結晶<011>の原子分解能EDX元素マップ

新型ショットキー FE-SEM SU5000

日立ハイテクノロジーズは、新たなユーザーインターフェース「EM Wizard」を搭載したショットキー電界放出形走査電子顕微鏡「SU5000」をリリースしました。

主な特長

- (1) あらゆるユーザーに高分解能・再現性・スループットを提供する、新開発ユーザーインターフェース「EM Wizard」
 - ・必要時に装置をベストコンディションに回復できる自動軸調整機能（オートキャリブレーション）を搭載
 - ・試料位置表示をよりわかりやすく表示する「マルチファインダー」搭載
- (2) サンプルへの制限を極力低減したデザイン
 - ・大型試料（～200 mm φ、～80 mmH）対応のドロアアウト試料室を採用、排気開始から観察までに要する時間は、FE-SEM最高レベルの3分以内
 - ・アウトレンズ型対物レンズにより、大型磁性体試料観察やEBSD測定もよりスムーズに行えます
- (3) 強力な光学系・検出系
 - ・低エネルギー観察時の分解能は2.0 nm@1kV¹⁾
 - ・高真空/低真空にかかわらず照射電流は最大200 nA²⁾
 - ・形状・組成・結晶学的情報を抽出する新開発反射電子検出器搭載³⁾

- 1) リターディングモード+TOP検出器オプション搭載時
- 2) 低真空モードはオプションです
- 3) 反射電子検出器はオプションです(低真空モード構成では標準付属)

イメージ	観察目的	特徴
	標準SEM観察	高加速電圧/高電子検出器で観察します。20分以内の観察が可能です。
	表面構造を強調する観察	低加速電圧/高電子検出器で観察します。材料の凹凸が強調されます。2分以内の観察が可能です。
	材料の形状を強調する観察	高加速電圧/低電子検出器で観察します。電子束の大きい領域が強調されます。5分以内の観察が可能です。
	表面構造と材料分布を強調する観察	低加速電圧/高電子検出器で観察します。表面構造 (EDS) と材料分布が強調されます。電子束の大きい領域が強調されます。2分以内の観察が可能です。
	元素分析による観察	高加速電圧/高電子検出器で高真空状態で観察します。材料の成分が強調されます。電子束の大きい領域が強調されます。2分以内の観察が可能です。

どのような画像を取得するか? そのためにどう SEM 条件を設定するか? 新インターフェース, “EM Wizard” はユーザーが悩む問題をわかりやすいチャートでガイドします。

参考文献: 「SEM高性能化の歩み」, 佐藤真, 「高分子」2014年9月号



トリプルビーム[®] FIB-SEM-Ar 複合装置 NX2000

日立ハイテクノロジーズと日立ハイテクサイエンスのそれぞれの強みを融合し、次世代デバイスに対応したTEM試料作製装置を協同開発しました。

主な特長

- (1) 新たに開発したFIB, SEM, Ar鏡筒により、最先端デバイスにおいても、オペレータのスキルに依存せず、短TATでの均質な高品位TEM試料の作製をめざします。
- (2) 定評のある自動加工機能と新開発の自動マイクロサンプリング[®]機能により、薄片試料のグリッドへの取付けまでをフルオートで実現します。これにより、解析TATの短縮に貢献します。

※トリプルビーム[®]は株式会社日立ハイテクサイエンスの日本での登録商標です。
マイクロサンプリング[®]は株式会社日立ハイテクノロジーズの日本での登録商標です。



装置外観図

卓上顕微鏡 Miniscope® TM3030Plus

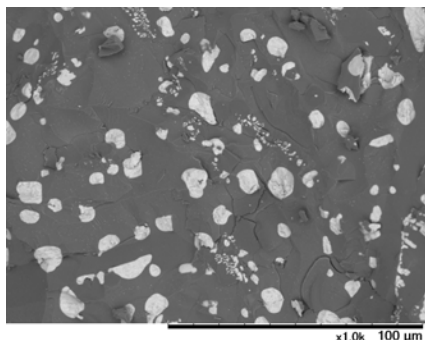
TM3030Plusは、多様化するニーズに対応するため、新たに二次電子検出器を搭載しました。

これまでのMiniscope®は、試料の組成や凹凸情報を得ることができる反射電子像で観察をおこなっていましたが、上位機種で採用している高感度低真空二次電子検出器を搭載することで、試料表面の微細形状が観察できる二次電子像の観察も可能となりました。卓上顕微鏡「Miniscope®」の低真空機能により、試料の前処理をすることなく、二次電子像と反射電子像の迅速な観察・分析が可能となり、幅広い用途に対応した鮮明な画像観察をご提供します。

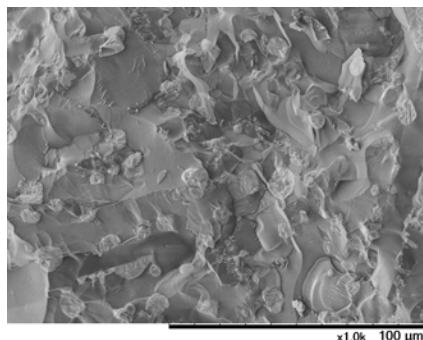
主な特長

- (1) 低真空下で、二次電子像と反射電子像の観察が可能
- (2) 二次電子情報と反射電子情報を合わせた合成像の観察が可能
- (3) オート機能でシンプル操作
- (4) 試料前処理不要の低真空観察
- (5) 電子光学系の最適化でシャープな観察
- (6) 加速電圧、真空度など観察条件はワンクリック切替
- (7) 豊富なオプション品ラインアップ

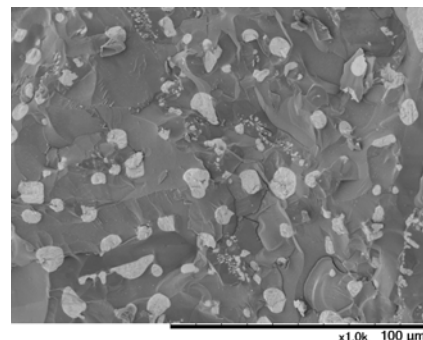
反射電子像



二次電子像



合成像



試料：セラミックス（導電処理なし）
表面（5 kV）、倍率：1,000 倍

アプリケーション事例



装置写真

F-7000形蛍光光度計用 自動フィルタ付属装置

3次元蛍光スペクトル測定において、高次光の影響を簡便・迅速に取り除くことが課題でした。今回開発したF-7000形分光蛍光光度計用の自動フィルタ付属装置は、食品分野で話題の蛍光指紋（3次元蛍光スペクトル）を用いた食品検査、材料分野におけるLED蛍光体の蛍光特性評価などに対応しています。高次光の影響を抑え、質の高いデータを提供いたします。

主な特長

(1) 自動フィルタ制御：

測定条件に合わせて自動でフィルタが挿入され、分光器特有の高次光（2次光，3次光などの不要光）の影響をなくすることができます。

(2) 3次元測定の時短制御：

一般的には、波長スキャン中に一旦停止してフィルタが挿入されますが、フィルタ無しとフィルタ有りのスペクトルを2回に分けて取得し、測定後に合成することで測定時間の短縮化を図ります。



図1 F-7000形蛍光光度計用 自動フィルタ付属装置

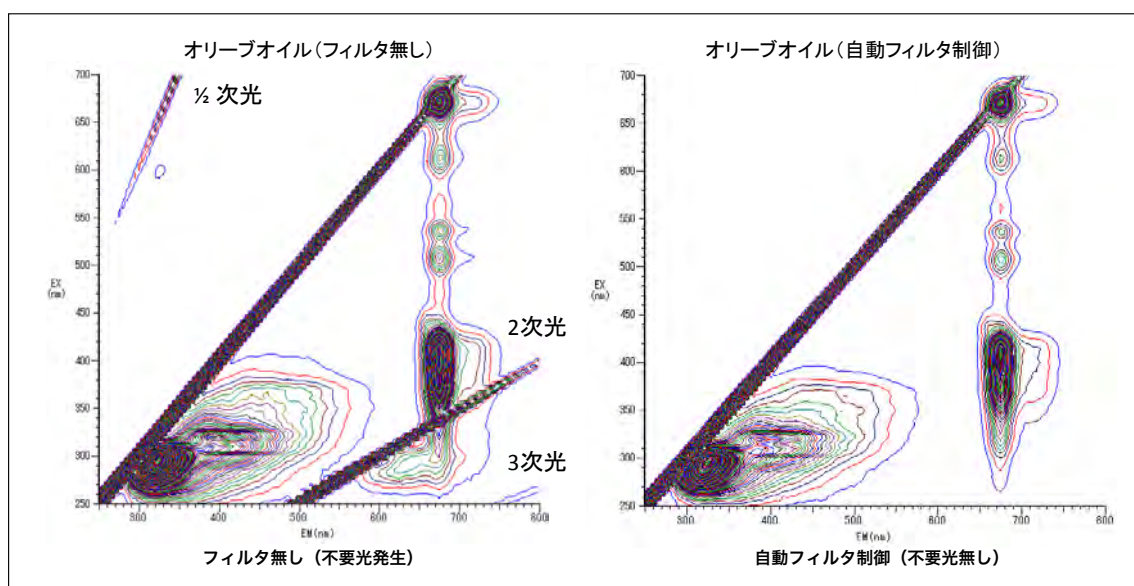


図2 オリーブオイルの3次元蛍光スペクトル（自動フィルタ制御の比較）

超高速液体クロマトグラフ用 蛍光検出器 ChromasterUltra Rs 6440

超高速液体クロマトグラフChromasterUltra Rs シリーズの検出器として、6440蛍光検出器を開発しました。超高速LC用フローセルとの組合せにおいて、水ラマンS/N 550（規定条件）を達成します。

主な特長

(1) シャープなピーク形状

カラムから蛍光検出器までの配管，フローセルの容量を抑えることで，ピーク拡散の要因を低減。シャープなクロマトグラムピークを実現し，高感度分析が可能。

(2) ダイナミックレンジの向上

ダイナミックレンジに，新たにワイドレンジを追加。検量線範囲が従来のレンジよりも約5倍広くなり，蛍光強度の高いサンプルにも対応することによる幅広い分析が可能。



超高速液体クロマトグラフ ChromasterUltra Rs

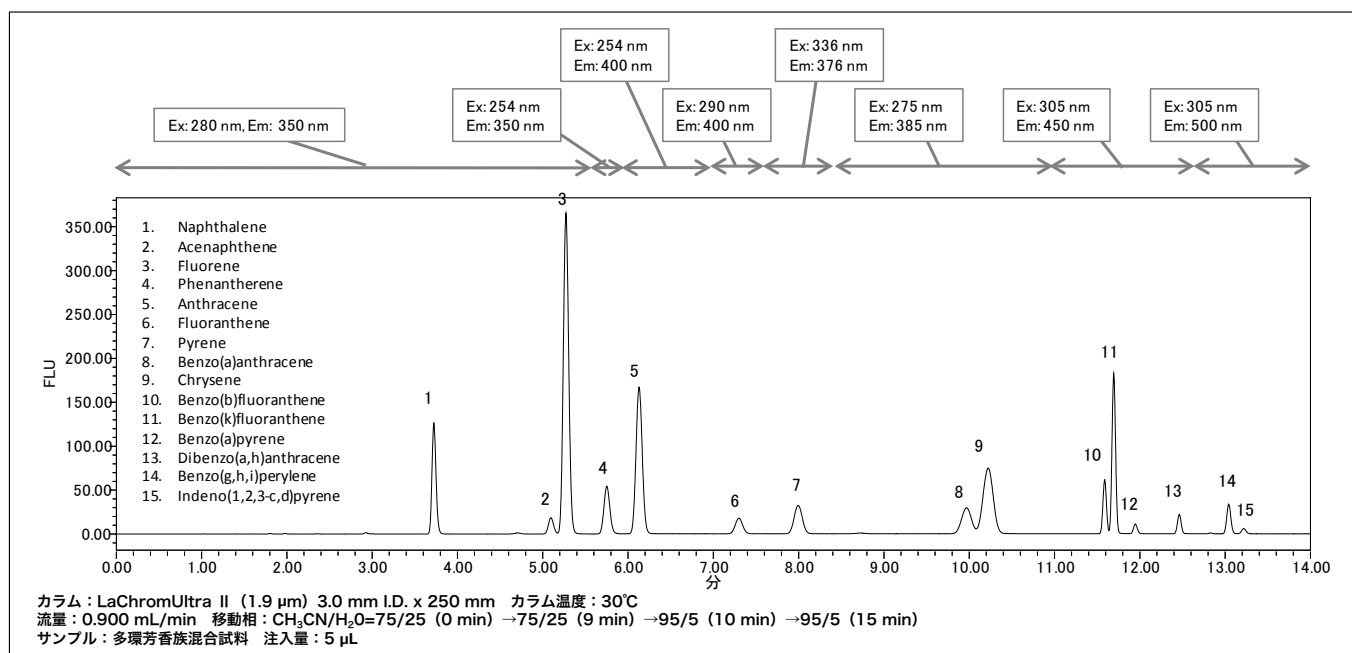


図 タイムプログラムを用いた多環芳香族15成分 分析例

示差熱重量同時測定装置 STA7200RV

示差熱重量同時測定装置 STA7200RV は、重量変化を測る「熱重量測定 (TG)」と「示差熱分析 (DTA)」の測定において試料観察窓を持つ新設計の加熱炉により 1,000℃ までの試料観察に対応しました。

主な特長

(1) 1,000℃ までの試料観察同時測定に対応

試料観察時の測定温度範囲を従来機の 500℃ から 1,000℃ まで拡大し、高分子有機材料などの分解過程や、金属・ガラス等の無機材料の融解、ガラス転移を観察することができます。

(2) 簡単なオプション装着

試料観察オプションをセットし、CCD カメラの焦点を調整するだけで簡単に測定できます。

(3) 測定・解析ソフトウェア

試料観察同時測定用の測定・解析ソフトウェアは、測定中の試料の形態変化を連続した画像で表示、保存し、測定後は保存した画像を呼び出して、温度および各信号とリンクしてスムーズに表示、解析することができます。



装置外観図

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 中部支店 名古屋 (050)3139-4566
北海道支店 札幌 (050)3139-4994 関西支店 大阪 (050)3139-4801
東北支店 仙台 (050)3139-4985 九州支店 福岡 (050)3139-4151

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〉

日立ハイテク東京ソリューションラボ(神奈川県川崎市)では、日立ハイテクミュージアムを開設し、日立ハイテクのコア技術である電子ビームと分光技術(回折格子)を用いた電子顕微鏡、分析装置、自動分析装置の歴史品を展示しています。これら展示品の中で昨年12月に設置された「UHS-T1形超高分解能インレンズFE-SEM」について紹介いたします。

UHS-T1は、1983年に鳥取大学医学部の田中啓一先生が「SEMの分解能はまだ向上する余地があり、そのような高分解能の装置を日本で真っ先に実現したい」という強いご意志により開発がスタートしました。当時は、他の大きなプロジェクトも動いていましたが、電子顕微鏡の設計者たちが寝る間を惜しんで開発に没頭し、1985年に製品化に成功しました。当時は2 nmの分解能が限界と言われていましたが、UHS-T1の製品化により1 nmを超える分解能を実現することができました。その後、田中先生とUHS-T1は、t-2バクテリオファージュやエイズウィルスの観察など数多

くの功績で、世界の医学の発展に貢献されてきました。

2014年6月2日、田中先生とご家族に日立ハイテクミュージアムにご来訪頂きました。その際、田中先生からUHS-T1の操作卓を触りながら「良い場所に設置してもらいよかったな」とこれまで苦勞をともにされた同僚に話しかけているお姿が非常に印象的でした。その時、我々の先人が築かれた日本の顕微鏡技術をさらに向上させていく決心をしました。今後も本誌を通じ、新しい分析、解析技術を発信いたしますので、読者の皆様の、忌憚らないご意見、ご要望など頂ければ幸いです。

○ 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(050)3139-4298 FAX(03)3504-7756

○ 株式会社日立ハイテクノロジーズ
アプリケーション開発部
〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛882番地
電話(029)276-8080(代)

■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、下記または、
株式会社日立ハイテクノロジーズの左記各事業所へご連絡
ください。

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
September, 2014 VOL. 57 No. 2

発行日 2014年9月18日
編集人 多持隆一郎
発行人 飯泉 孝
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(050)3139-4298(ダイヤルイン)