

**HITACHI**  
Inspire the Next

# SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

MARCI  
2018

Vol. 61 No. 1

March 2018  
Vol.61 No.1

5316

## «コラム

**抗体をこえるか？—分子インプリンティングの新展開**

竹内 俊文

5319

**ヒト由来ノロウイルスの現状と今後の課題**

宇田川 悅子

5325

**透過型電子顕微鏡による溶液試料の観察**

木村 勇気

5332

**LC-DAD-MSDと蛍光指紋分析を融合した微生物代謝産物のハイブリッド解析**

内田 龍児

5340

**フタル酸エステルのスクリーニングシステム構築**

北原 武夫

## «技術解説

5350

**高性能FIB-SEM複合装置「Ethos NX5000」**

鈴木 秀和

5355

**紫外可視近赤外分光光度計UH4150自動測定システムの紹介**

岩谷 有香

5360

**LA8080高速アミノ酸分析計**

伊藤 正人, 成松 郁子, 裴 敏伶, 森崎 敦己, 鈴木 裕志, 福田 真人, 八木 隆, 大月 繁夫, 関 一也, 豊崎 耕作

5365

**全自動核酸抽出機器「magLEAD 6gC/12gC」および****専用試薬「MagDEA Dx SV」について**

宮下 雪子, 上田 哲也

## «新製品紹介

5371

**日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM® IL2000**

## «トピックス

5372

**低加速電圧の走査型で次世代型クライオ電子顕微鏡開発に挑む**

臼倉 治郎

# 抗体をこえるか？ —分子インプリンティングの新展開

Beyond Natural Antibodies?

- Novel Synthetic Antibodies Emerging from Molecular Imprinting -



神戸大学 大学院工学研究科 応用化学専攻  
教授

竹内 俊文 (薬学博士)

## I. はじめに

抗体は、抗原（標的分子）に対して高い選択性をもち、生体の防御をつかさどる免疫システムにおいて大きな役割を担う。この高選択性的な抗原抗体反応は、各種酵素免疫測定法（ELISA）に活用され、病気の診断、食品分析、環境アセスメントなどに適用されている。最近は、抗体を用いた医薬品も開発され、がん細胞をピンポイントで狙い撃ちして高い治療効果を挙げている。

抗体は、高い性能をもつ反面、生体成分であるがゆえにその製造は容易ではなく、また、安定性にも問題がある。もし、人工高分子で抗体と同様の機能が再現できれば、容易に製造が可能な上に、高い安定性も実現できる。1950年ぐらいから、標的分子の鋳型を高分子に取ることで、抗体のような標的分子に対する分子認識能が発現するという発想の下、人工抗体を獲得しようとする挑戦が始まった。この挑戦は、1970年代後半に「分子インプリンティング」<sup>1,2)</sup>として結実し、分子の鋳型を高分子内に取る技術として確立された。分子インプリンティングは、鋳型を取り分子（鋳型分子）と機能性モノマーの複合体を形成させ、架橋剤と共に共重合した後、鋳型分子を除去することで、鋳型分子に対して相補的な結合空間をもつ分子インプリントポリマー（MIP）を得る手法である（図1）。MIPは、簡便に合成できることから、抗体に代わる人工抗体として期待されているが、残念ながら、これまで報告してきたMIPは、基本的には1970年代に確立された技術をもとに作製されていることから、分子認識能などの単一機能しかもたず、天然の抗体や酵素がもつ多様な機能にまったく及ばない。

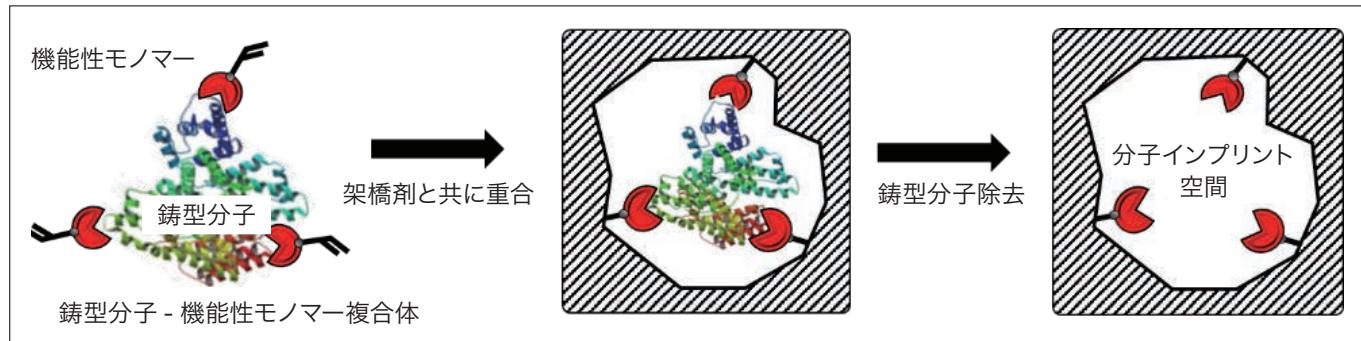


図1 分子インプリンティングの概念図

最近、著者らは、生体におけるタンパク質生合成の最終過程である翻訳後修飾を参考に、MIP作製後、そのインプリント空間内に部位特異的化学修飾を行うことで、MIPに機能の付与・変換・調整を行うことに成功し、これをポストインプリンティング修飾（PIM）と名付けた<sup>3,9)</sup>。本稿では、結合情報を蛍光変化に変換する機能をもつMIP<sup>4)</sup>を例に取り、PIMによって導かれる、天然抗体を超える勢いで発展しているMIPの新展開について概説する。

## 2. PIMを用いたMIPによるバイオマーカータンパク質センシング

天然の抗体は、抗原に対して高い特異性と親和性を示し、ELISAなどの酵素免疫測定法に用いられている。ただし、東工大・上田らが報告している抗体断片 Q-body<sup>10)</sup>を除けば、結合情報を可視化できる抗体は調製が困難で、捕捉抗体と検出抗体を併用したサンドイッチアッセイが主流である。このような洗浄と試薬添加を繰り返す手法では、迅速な定量は望めず、またリアルタイムモニタリングは不可能である。一方、MIPは、人工材料ゆえに、蛍光性の機能性モノマーを用いれば、蛍光性インプリントポリマーが調製可能で、結合挙動を蛍光測定によって検出可能である。ただし、MIPに蛍光分子の一部がランダムに配置されてしまうと、バックグランド蛍光が高くなり、検出感度が低下するなどの問題がある。

我々の開発したPIMで、MIPのインプリント空間のみに、相互作用部位や蛍光レポーター分子を部位特異的に導入することができれば、非特異的吸着が抑制される上に、インプリント空間に対する結合情報を、蛍光変化で読み出すことが可能となる（情報発信型MIPの創製）。分子インプリンティングの際、可逆結合をもつ機能性モノマーを標的タンパク質に共有結合で導入し、重合後、可逆結合を切断して標的タンパク質を除去すれば、インプリント空間内には、切断された可逆結合の片方の官能基が残る。この官能基は、原理的にインプリント空間内にしか存在しないことから、この空間内官能基に相互作用部位や蛍光レポーター分子を導入することにより、MIPのインプリント空間のみに相互作用部位と蛍光レポーター分子を導入することができる。

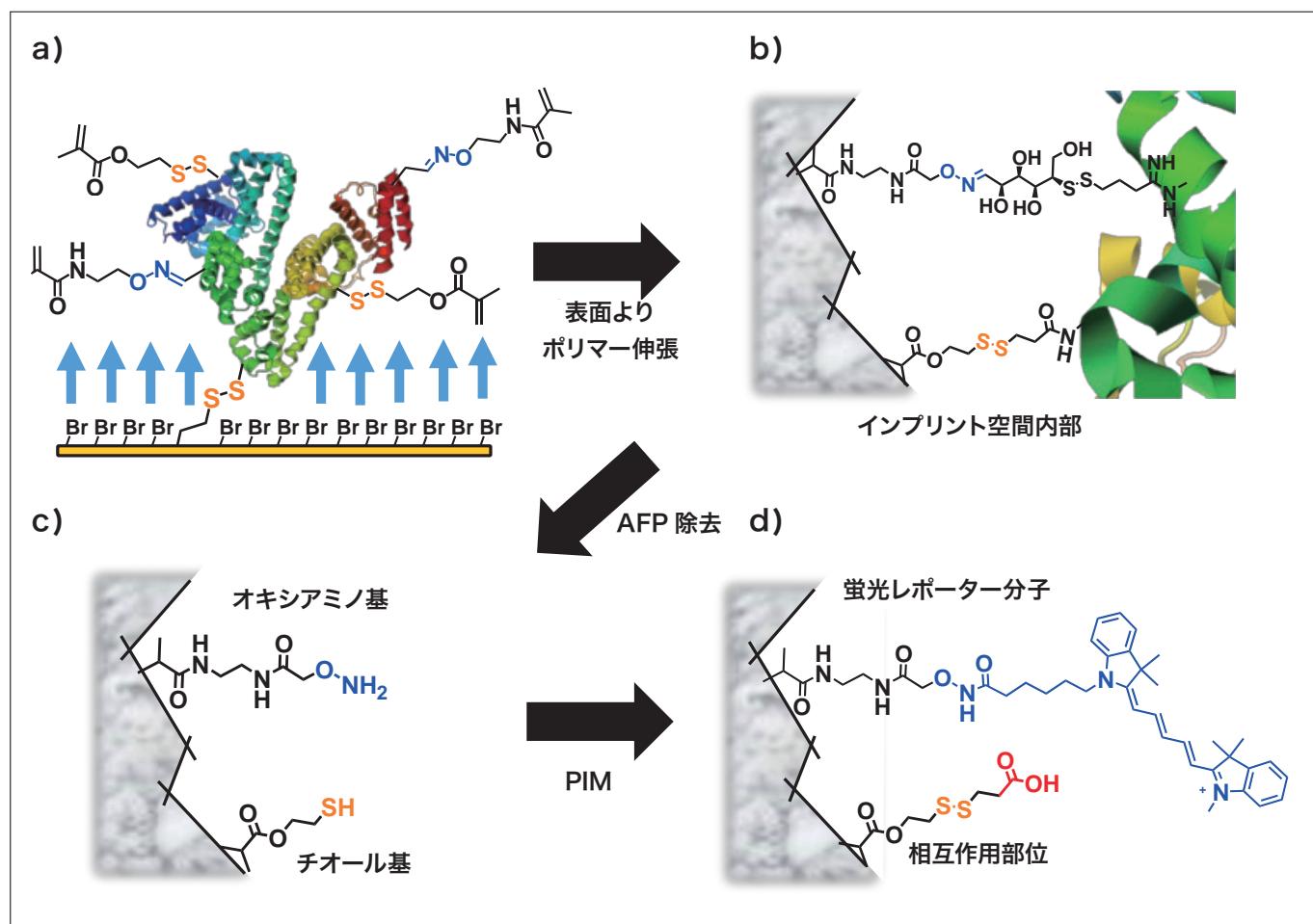


図2 AFPインプリント空間の形成とPIMによる相互作用部位と蛍光レポーター分子の導入<sup>4)</sup>

本稿では、PIMを利用したMIPによる、肝がんや肝疾患のバイオマーカータンパク質 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)の高感度・高選択的なセンシングを紹介する<sup>4)</sup>。まず、PIM可能な可逆結合(オキシム結合、ジスルフィド結合)を有する2種の機能性モノマーを新たに設計・合成し、これらを共有結合で AFP 表面に導入した AFP 複合体を、鋳型分子としてセンサ基板上に固定化し(図2a)，ポリマー膜厚を重合時間で調整可能な表面開始原子移動ラジカル重合により、基板上からポリマー薄膜を約10 nm 成長させた(図2b)。ジスルフィド結合およびオキシム結合を切断して AFP をポリマー薄膜内から除去することで、 AFP の形状にフィットするインプリント空間を形成した。この空間内には、ジスルフィド結合およびオキシム結合を切断した後の遊離のチオール基とオキシアミノ基が残存する(図2c)。ここで強調したいことは、この2種類の官能基は、 AFP に共有結合されたままポリマー内に導入された可逆結合由来であることから、原理的に、インプリント空

間のみにしか存在しない。従って、インプリント空間の形成後に行うPIMは、空間内選択的な修飾となる。今回は、チオール基には AFPに対する相互作用基(カルボキシ基)，オキシアミノ基には蛍光レポーター分子(Cy5)を導入した(図2d)。これにより、相互作用部位や蛍光レポーター分子がインプリント空間のみに配置され、非特異的吸着やバックグラウンド蛍光による感度の低下が防止できることから、高感度かつ高選択的に AFPを認識・検出可能なMIPが合成可能となる。

実際、同じMIPを成膜したセンサチップを用いて、高感度バイオセンサとして汎用されている表面プラズモン共鳴センサBIACORE 3000と、蛍光顕微鏡によるセンシングの検出限界を比較してみた。その結果、BIACORE 3000では20 ng/mL(280 fM)であった一方、蛍光センシングでは1 ng/mL(14 fM)と、同じMIP薄膜を用いているにもかかわらず、検出限界が20倍向上し、市販のELISAと遜色ない検出感度を達成した。これは、BIACORE 3000は、MIPに結合する物質すべてを検出してしまうが、蛍光センシングでは、PIMによりインプリント空間のみに蛍光を導入しているので、インプリント空間に対する AFPの結合を、より選択的に検出した結果といえる。また、ヒト血清アルブミンや前立腺特異抗原(前立腺がんのバイオマーカー)はほとんど検出されず、高い選択性をもつことも実証した。PIMの効果を確かめるため、インプリント空間内のチオール基に、相互作用基(カルボキシ基)に代えてヒドロキシ基を導入したところ、蛍光変化はほとんど観察されず、確かにPIMの足場となる空間内にはチオール基が残存し、PIMにより、 AFPとの結合に都合のよいチオール基の位置に、 AFPと相互作用するカルボキシ基が導入されていることが明らかとなった。

### 3. 将来展望

以上示したように、可逆結合をもつ複数の機能性モノマーを用いた分子インプリンティングと多段階PIMにより、標的タンパク質に対して、優れた結合親和性と検出感度を有する人工抗体が構築可能であった。また、その検出感度はELISAに匹敵し、臨床応用可能なほど良好であった。このMIPによる蛍光センシングは、試薬添加など煩雑な操作が必要ないのも特徴で、操作性は圧倒的にELISAに勝る。また、PIMにより、部位特異的な官能基変換が容易にできるから、相互作用基および蛍光レポーター分子のインプリント空間内のin-cavityスクリーニングも可能となり、高感度・高選択的検出を達成するための最適化を行うことにより、更なる高感度・高選択的人工抗体が得られる。最近、MIPナノ粒子によるドラッグデリバリーシステムも報告しており<sup>11)</sup>、分子インプリンティングは、画期的な手法に変貌しつつある。ライフサイエンスやバイオテクノロジーなど抗体を多用する分野に対して、大きな影響と波及効果を与えつつあり、MIPも含めた生体機能性人工材料研究において、抗体を超えることは、ある意味夢のような達成目標であったが、Beyond Natural Antibodiesが、そろそろ視野に入り始めたことを強調したい。乞うご期待である。

#### 参考文献

- 1) 竹内俊文, 分子インプリンティング, ラジカル重合ハンドブック, NTS, 723-740 (2010).
- 2) T. Takeuchi, T. Hayashi, S. Ichikawa, A. Kaji, M. Masui, H. Matsumoto, R. Sasao, *Chromatography*, 37, 43-64 (2016) [Open Access].
- 3) 竹内, 砂山, 高分子論文集, 73, 19-29 (2016).
- 4) R. Horikawa, H. Sunayama, Y. Kitayama, E. Takano, T. Takeuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 13023-13027 (2016).
- 5) T. Takeuchi, T. Mori, A. Kuwahara, T. Ohta, A. Oshita, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Ooya, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 12765-12770 (2014).
- 6) H. Sunayama, T. Takeuchi, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 20003-20009 (2014).
- 7) H. Sunayama, T. Ooya, T. Takeuchi, *Chem. Commun.*, 50, 1347-1349 (2014).
- 8) Y. Suga, H. Sunayama, T. Ooya, T. Takeuchi, *Chem. Commun.*, 49, 8450-8452 (2013).
- 9) K. Takeda, A. Kuwahara, K. Ohmori, T. Takeuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 8833-8838 (2009).
- 10) R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hohsaka, H. Ueda, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17386-17394 (2011).
- 11) T. Takeuchi, Y. Kitayama, R. Sasao, T. Yamada, K. Toh, Y. Matsumoto, K. Kataoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 7088-7092 (2017) [Hot Paper].

# ヒト由来ノロウイルスの現状と今後の課題

Contemporary Condition and a Subject in Future of Human Noroviruses



国立感染症研究所 客員研究員  
北里大学 生命科学研究所  
大学院感染制御科学府  
ウイルス感染制御学研究室 I

宇田川 悅子 博士(医学)

## I. 歴史

ノロウイルス(図1)は米国オハイオ州ノルウォークの小学校で発生した集団嘔吐下痢症の患者から、当時非常に高価な透過型電子顕微鏡(TEM)を使って米国NIHのカピキアン博士が検出したウイルス様粒子(SRSV: Small Round Structured Virus)である。便中にこのSRSVを排出していた患者から急性期と回復期に採血を行い、このペア血清で免疫電子顕微鏡法(IEM)による確定診断を行っている。当時、現在頻繁に使用されているPCR法等による遺伝子検査法がなく原因追及が困難な時代であった。この発見により世界各国でTEMを使用した検査方法が普及していった。

これ以前から、細菌が原因ではなく発生する数多くの嘔吐下痢症や急性胃腸炎がわが国でも頻繁に報告されていたが、原因となるウイルスを検出する方法がなく、また日本語での報告であったために諸外国から注目されることがなかった。明治以降、わが国では小児虎列刺、小児吐瀉症、仮性小児虎列刺などの数々の症例が報告されてきている。

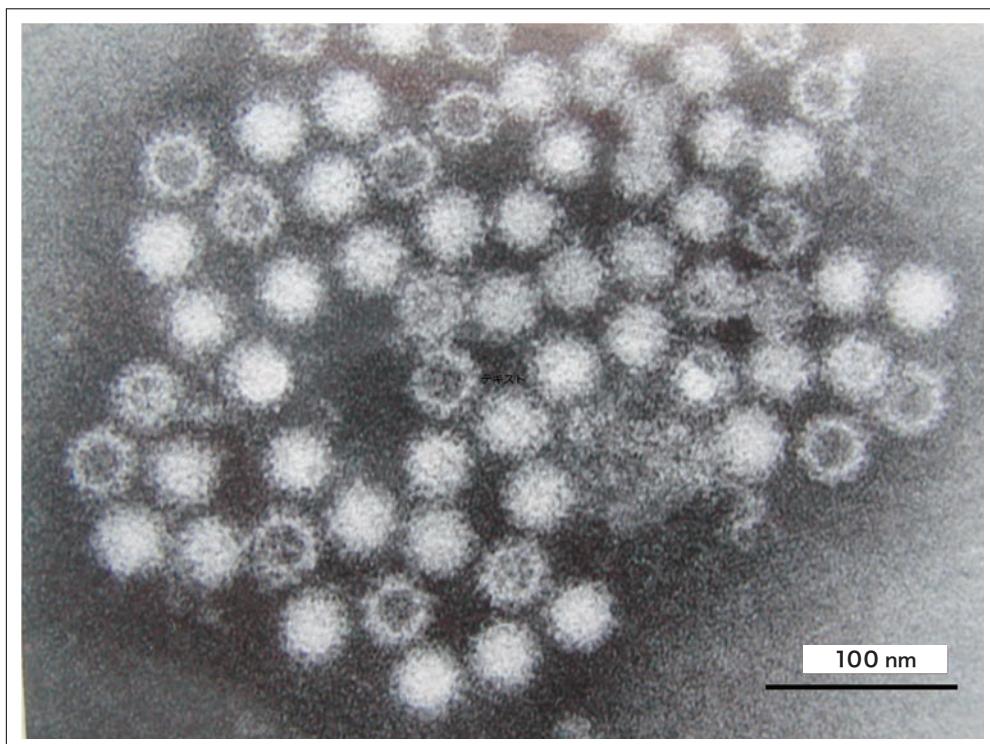


図1 ヒトノロウイルス粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)写真  
酢酸ウラン染色 Bar: 100 nm

また、特筆すべき出来事として、昭和28年(1953年)、千葉県茂原市で7,000人を超える大規模な集団下痢症いわゆる茂原下痢症<sup>1)</sup>が発生している。原因は下水処理場の汚水栓が破損し、そこから漏れ出した汚水が上水施設の飲料水に混入、また同時に起こった上水施設の塩素消毒不具合により集団下痢症が発生した事件であった。茂原市は厚生省へ原因究明等の依頼を行い、国立予防衛生研究所(予研:現・国立感染症研究所)が原因追及を行った。予研細菌部の検査で、細菌性の下痢症ではなく濾過性病原体(ウイルス)であることが明らかとなった。事件解明のために、検査に従事した医療関係者らが患者便材料を服用して同じ症状が出るかどうかを検査するボランティアによる人体実験を行った。フィルター濾過滅菌した患者便材料が2次感染、3次感染を起こすことを証明し、その感染経過観察報告等によりウイルスであろうと結論付け厚生省の報告書で発表した。しかし残念ながら、当時使用可能な種々の検査方法では実際にウイルス粒子そのものを検出することはできなかった。同様に世界各国でもウイルス性と考えられた急性胃腸炎事件が多数発生していた記録が残っている。

前述のように、1969年米国 NIHカピキアン博士が、当時最新鋭のTEMを用いた観察で患者便材料中に直径凡そ27 nmのウイルスを検出し論文として1972年に報告している。その論文では、SRSVをフィルター濾過滅菌後ボランティアに服用させ同様の感染を起こすことに成功し、感染した患者便材料中に電子顕微鏡観察で同じSRSVを確認、さらに患者ペア血清を用いたIEM法で確定診断を行ったことが明記されている。これらの結果から、SRSVが事件の原因であると報告している。この後、TEMによるSRSVの検索は、世界各国でも、またわが国でも活発になり、他の検査法がまだ確立していないためにウイルス検索の主な検査法として地方衛生研究所や大学等で使われてきた。札幌因子(札幌市内の養護施設で発生した乳児嘔吐下痢症集団事件の原因ウイルスで今現在はサポウイルスと呼ばれている)、大阪因子(大阪府内で発生した嘔吐下痢症患者から分離)等々、検出された地域名が名前の由来となっているSRSVが多数報告された。TEM観察によるSRSV検出が多数になるにつれ、TEM観察法の標準化を望む声が起き、1987年東京都立衛生研究所において全国から地方衛生研究所の検査担当者が集まり、TEM観察のための患者便材料処理方法、ネガティブ染色液、免疫電子顕微鏡法の標準化等々、種々の検討が行われ現在に至っている。

## 2. ノロウイルスとは?

前述の通り、1972年米国 NIHカピキアン博士がTEMを使用してSRSVを検出し、このウイルスが流行の原因であることを明らかとした。その後世界各国でSRSVの報告がなされてきたが、残念ながら培養ができない状態が続いていた。

1990年、SRSVの全塩基配列が報告された。これによりPCR法による遺伝子検査法等を行うことで同一性検定が可能となった。近年は、PCR法等による遺伝子検査法等が主流であるが、ノロウイルスの感染性などが未だに解明されていないために遺伝子検出と感染性の関連が未知である。数値として報告されてきているノロウイルス遺伝子の1コピーの意味するところはまだ不確かなもので、厚生労働省の見解は、TEM法と遺伝子検査法との併用が必要であるとしている。

ノロウイルスは直径約30~40 nmの小型球形ウイルスで、分類学上ノロウイルス属にはノーオークウイルス(*Norwalk virus*)種の1種類のみが存在する。しかし、世界で最初に検出されたノーオークウイルス(種)の株名がノーオークウイルスであることから、ノーオークウイルスと記載した場合、種名を意味するのか株名を意味するのか混同されやすいこと、またウイルス学的な学術属名はラテン語を使用する慣習があり今現在ではノロウイルスと呼ばれている。

ウイルスの命名法は国際ウイルス命名委員会(ICTV)が決定している。ノロウイルスはICTVのウイルスデータベース; ICTV dBのカリシウイルス項目にカリシウイルス科(*Caliciviridae*)に属する1つのウイルス属(*genus*)として定義されている。カリシウイルス科には、ノロウイルス属(*Norovirus*)、サポウイルス属(*Sapovirus*)、ベジウイルス属(*Vesivirus*)、ラゴウイルス属(*Lagovirus*)、ネボウイルス属(*Nebovirus*)などの現在5つのウイルス属(*genus*)が存在する。なお、ノロウイルスの代替えウイルスとしてよく使用されるネコカリシウイルス(*Feline calicivirus*)はカリシウイルス科のベジウイルス属に含まれる。

今現在、通常使用している“ノロウイルス”という呼び名は、ウイルス属性を示すものであり、ウイルス種名を示すものではない。ノロウイルス属に新しいウイルス種名が発見されると、この名を改める必要が出てくるが、マウスに感染するノーオークウイルスをマウスノロウイルス(*Mouse Norovirus*)と呼ぶことやノーオークウイルスを表す言葉として、ノロウイルスが多くの論文に使用されていることなどから、この慣習に従い、本稿ではノロウイルスを使用することにする。

ノロウイルスは約7,500 kbの一本鎖(+)RNAを有しているがエンベロープを持たないウイルスで、そのゲノムには3つの蛋白質コード領域(open reading frame; ORF)が存在している。ORF1はウイルスの複製に関与する非構造蛋白質を、ORF2はウイルス構造蛋白質VP1を、ORF3は構造蛋白質をそれぞれコードしている。ORF2でコードされているVP1はウイルス粒子を構成する主要な蛋白質で、その粒子表面に位置するP-ドメインのアミノ酸配列は多様性に富み、流行の中で変異を繰り返している。また、ノロウイルスはORF1とORF2のジャンクション領域で、ゲノムの組み替えを起こすことが知られている。組み替えを起こしたウイルスはキメラウイルスと呼ばれる。

ノロウイルスのゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、その遺伝子の塩基配列の相同性により GI ~ GV の5群に分類されている。このうち、人に感染性を有する群は GI, GII 及び GIV の3遺伝子群のウイルスである。

人から人への感染事例や食中毒事件から検出されるウイルスの大半は GI, GII 群に属している。GIII 群はウシ由来のウイルスで、GV に属するマウスノロウイルスはヒトノロウイルスが2016年培養可能になるまで唯一細胞培養可能なウイルスであった。なお、従来報告されていた遺伝子型に関して2015年新たに株間の読み替えを行っているので参考までに表に示す(表1)。

表1 ノロウイルス遺伝子型比較表(IASRより抜粋)

旧→新読み替え

**Genogroup I**

旧表記	新表記
GI/1	GI.1
GI/2	GI.2
GI/3	GI.3
GI/4	GI.4
GI/5	GI.5
GI/6	GI.6
GI/7	GI.7
GI/8	GI.6
GI/9	GI.5
GI/10	GI.8
GI/11	GI.3
GI/12	未定 NA
GI/13	GI.9
GI/14	GI.3

新→旧読み替え

**Genogroup I**

新表記	旧表記
GI.1	GI/1
GI.2	GI/2
GI.3	GI/3
	GI/11
	GI/14
GI.4	GI/4
GI.5	GI/5
	GI/9
GI.6	GI/6
	GI/8
GI.7	GI/7
GI.8	GI/10
GI.9	GI/13

**Genogroup II**

旧表記	新表記
GII/1	GII.1
GII/2	GII.2
GII/3	GII.3
GII/4	GII.4
GII/5	GII.5
GII/6	GII.6
GII/7	GII.7
GII/8	GII.8
GII/9	GII.9
GII/10	GII.10
GII/11	GII.17
GII/12	GII.12
GII/13	GII.14
GII/14	GII.13
GII/15	GII.16
GII/16	GII.21
(GII/17=GIV)	—
GII/18	GII.22
GII/19	GII.15
—	GII.11
—	GII.18
—	GII.19
—	GII.20

**Genogroup II**

新表記	旧表記
GII.1	GII/1
GII.2	GII/2
GII.3	GII/3
GII.4	GII/4
GII.5	GII/5
GII.6	GII/6
GII.7	GII/7
GII.8	GII/8
GII.9	GII/9
GII.10	GII/10
GII.11	—
GII.12	GII/12
GII.13	GII/14
GII.14	GII/13
GII.15	GII/19
GII.16	GII/15
GII.17	GII/11
GII.18	—
GII.19	—
GII.20	—
GII.21	GII/16
GII.22	GII/18

— : 該当なし

**IASR**

GI 及び GII の各遺伝子群は、それぞれ少なくとも GI 群が9種類 (GI/1 ~ GI/9), GII 群は22種類 (GII/1 ~ GII/22) に分類されている。異なる遺伝子型は基本的に抗原性が異なる。近年全世界に流行しているノロウイルスの遺伝子型は GII/4 に属するものが多いが、2015年ノロウイルスの流行株に大きな変動があり、GII/4 が減少し、代わりに GII/17 が主要な遺伝子型になった。しかし、現在ではまた GII/4 が主流となってきており、年によって流行する遺伝子型に変化が見られる傾向にある。

ノロウイルスはエンベロープを持たないためエタノールには比較的耐性であるので、吐物などに含まれる感染性ノロウイルスの消毒にアルコール消毒は効果がない。ノロウイルスの消毒には、次亜塩素酸ナトリウムが推奨される。但し、次亜塩素酸ナトリウムの多用は環境中の生物に悪影響を及ぼす可能性(環境破壊、環境汚染など)が指摘されており、これに代わる消毒薬の開発研究が求められている。

### 3. 食中毒と吐物処理

食中毒事件の場合、吐物の処理が必要不可欠である。この吐物を処理する際に処理方法を誤ると2次感染を引き起こし、広範囲に広がりを見せる食中毒事件が容易に起き易い。我々は、色素及びノロウイルスの代替ウイルスとして *Bacteriophage Q $\beta$*  (*phage Q $\beta$* ) を添加した模擬吐物を用いて嘔吐時吐物落下実験を行った<sup>2)</sup>。この実験では、色素による目視確認嘔吐物飛散状況の観測及び飛散物をキャッチしたプラスチック板上のウイルス感染価測定でウイルス検出を行った。我々の研究結果で、高さ1.6 m より落下した色素を含む擬似吐物は同心円状に拡散し、垂直方向に0.8 ~ 0.9 m、水平方向に3.1 m まで色素で着色した飛散物を目視確認できた(図2)。この実験で使用した擬似吐物は約8 log<sub>10</sub>PFU/ml の *phage Q $\beta$*  ウィルスを含んでおり、吐物落下地点から同心円状に5 m 離れた場所では色素着色による目視では飛散が確認されなかった。しかしながら、設置していたプラスチック板上に0.9 log<sub>10</sub>PFU/100cm<sup>2</sup> のウイルスを検出できた。これらの結果から、目視では限界があることが明らかとなった。即ち、吐物落下地点から同心円状に5 m 離れた場所では色素着色による目視で飛散が確認されなかったが、一方、感染価で見ると従来報告されている2 m の距離よりもはるかに長距離に渡り吐物が飛散していることを明らかとした。嘔吐物が、落下地点を中心にして半径5 m(従来報告されている落下範囲は2 m程度)以内に吐物中に排泄されたノロウイルスが散乱している可能性が高いことが明らかとなった。現在、各県・地方衛生研究所などの嘔吐物処理法に関する記載を見ると、半径2 m 以内のウイルス散乱を想定しており、2 m から5 m の間にある床面などの清掃は行われていないのが現状である。このため、消毒作業が行われなかった床面に拡散した吐物が存在し、この吐物を靴底面で踏みつけ、更に吐物が散乱していない場所へ拡散し感染症を引き起こす可能性が高くなる。これが2次感染の大きな要因の一つと考える。嘔吐物処理後に生じる感染事例は後を絶たないが、吐物処理において靴底などを介した拡散があることを考慮すべきである。我々はこの仮説を証明するために、靴底に付着したウイルスの拡散方法について、靴裏に付着した模擬吐物が床との接触によりどの程度床面へスタンプされるのかを靴裏及び床面の擦過物の感染価で判定した<sup>3)</sup>。

*Phage Q $\beta$*  を用いた実験結果では、一旦靴底に付着したウイルスは歩行距離49 m 歩いた後でも靴底に付着したままであった。実験結果から、床面にウイルスがスタンプされた距離は最初に吐物が落下した地点から凡そ50 m となる。今回は50 mまでの結果であるが、靴底には付着したままなので、さらに遠距離までウイルスを運ぶ可能性が否定できない。このように、靴底で運ばれるウイルスはかなりな遠距離まで運ばれていくことが明らかとなった。これらの床面にスタンプされた吐物には感染性のウイルスが含まれており、乾燥後に空気中へ拡散し2次感染の大きな原因となる可能性が強く示唆された。以上の結果から2次感染防御には、かなり広範囲の消毒作業が必要不可欠であることが明らかとなった。また、今までの報告によると、加熱による不活化は中心温度85°Cで1分以上の加熱が必要であることが判明している。

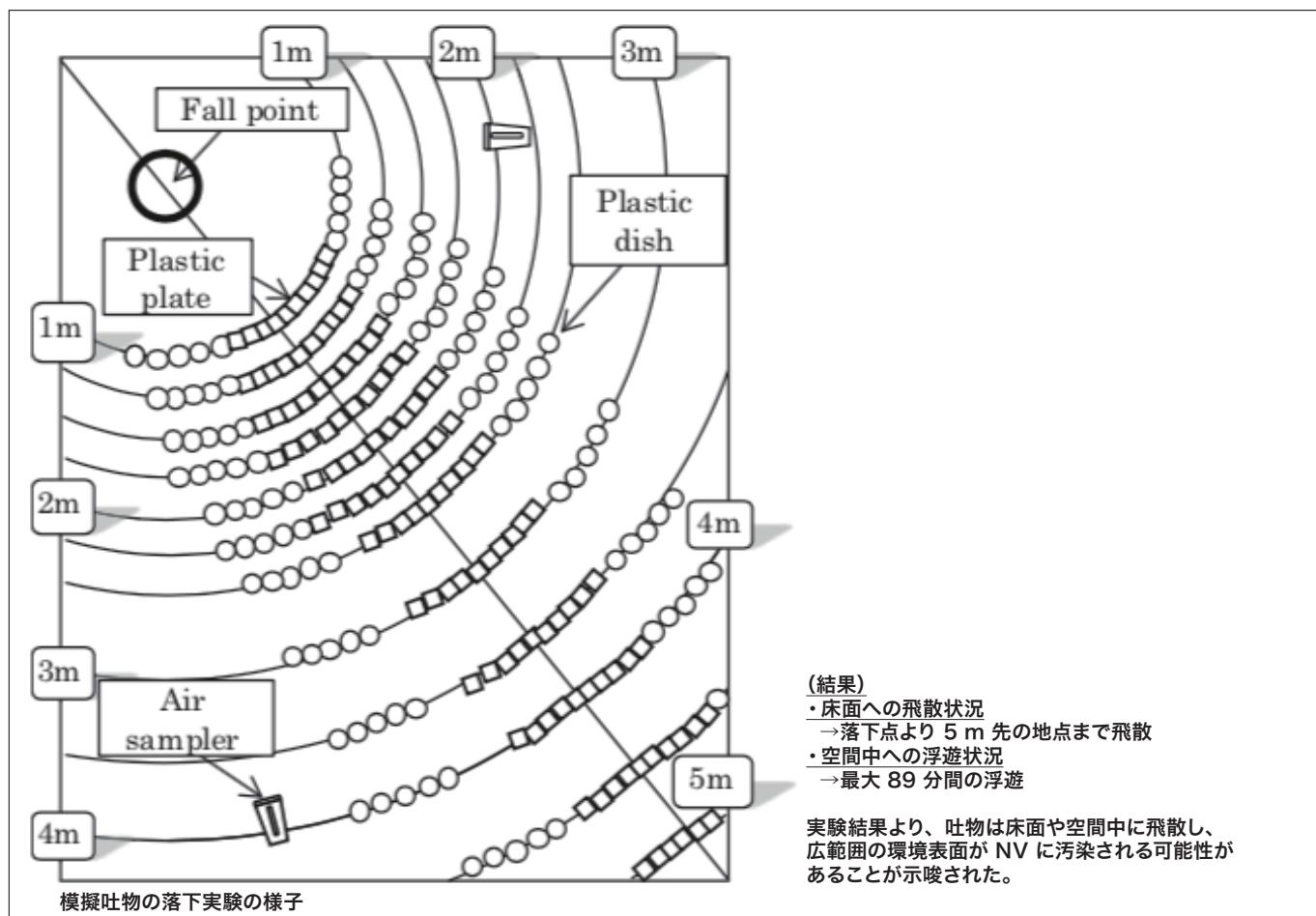


図2 模擬吐物 (phage Q $\beta$  添加) を用いた飛散状況の評価

## 4. 症状と免疫状況

ノロウイルスに対するヒトの防御免疫は、感染性を検査する中和反応のような検査法が確立していないために、持続期間や多様な遺伝子型に対する交差反応など解明されていない点が多い。個体レベルでもっとも直接的に研究した例として、ボランティアに対するノロウイルスの暴露実験がある。その結果、免疫の持続期間は同一のウイルスに対して6カ月～2年程度と考えられる。一方で、数理モデルによる解析ではそれよりも長い期間が推定されている。

ノロウイルス感染後の症状は、成人は下痢症状が多く、小児や老人は嘔吐症状が多いのが特徴である。また、免疫力の弱い小児や老人と成人の症状を比較すると、予後に差が生じてくる。免疫力が低下している老人や子供はノロウイルス感染が引き金になって病態が悪化し最悪の場合死に至ることがある。特に低開発国における下痢症患者の死亡数は毎年100万人を超えており、ノロウイルス感染は他の下痢症ウイルスと同様、原因ウイルスの一つと考えられている。

## 5. 流行状況

ノロウイルスの流行状況は、例年10月後半から報告が上がって翌年3月まで流行が続く傾向にある。2016年から2017年の最新のIASR報告を見ると、例年同様11月初めから年が明けた翌年3月初めまで全国各地で検出報告されている。

## 6. 今後の課題

さて、ノロウイルスのワクチン開発について見てみよう。米国ベイラー医科大学メアリー・エステス教授らは1990年代組み換えバキュロウイルスを利用した昆虫細胞発現系を用いてヒトノロウイルスのウイルス様中空粒子(VLP)作製に成功した。以来、VLPは、株化培養細胞で増殖させることができないヒトカリシウイルス抗原性の研究、特異的抗体の作製、抗原検出システムの構築、ウイルス粒子形状の研究などに用いられてきた。今までに種々のノロウイルス株に関しVLPの作製が世界各国で行われてきた。VLPはヒトノロウイルスの感染性粒子と同じ外部構造を有し、同じ抗原性を持つと信じられてきたが、実際はVLPと感染性粒子の比較は行われていない。しかし、今までに報告された種々の研究から類似性が認められているとするならば、VLPをワクチン成分として使用することでヒトノロウイルスに対するワクチン開発は可能であろうと考えられてきた。

この観点から、第一世代ワクチン開発として、武田薬品工業は米国リゴサイト社を合併し、ノロウイルス GI.1, GII.4 VLPを含む2価のワクチン開発を行っている。これらのワクチンは筋肉注射で接種され、接種対象者体内にこれらの種類のVLPに対する抗体を誘導する。ボランティア研究で、誘導された抗体は、GI.1, GII.4 VLPがHBGAに結合することを物理的に阻害し、結合効率を低下させることが判明した。しかし、遺伝子の異なるヒトノロウイルスに効果があるかどうかはこれから検討課題である。このように、VLPを抗原として用いる第一世代ワクチンに関し、複数の国内外の企業が参入に関する発表を行っており、今後の実用化に向けた研究開発に期待がかかる。

2016年米国エステス博士らのグループがヒトノロウイルスの培養に成功したとサイエンスに報告している<sup>4)</sup>。即ち、ヒトノロウイルスをヒト由来のStem Cellで培養が可能となったことが報告された。VLPを使用した第一世代ワクチン開発が始まったばかりではあるが、実際には自然界で流行しているヒトノロウイルスとの抗原性に違いがある可能性を否定できないことから、今後は第二世代ワクチンの抗原候補として、VLPに取って代わり培養可能なヒトノロウイルスが台頭していく可能性が大きい。どちらにしてもワクチン開発に関し世界各国で凌ぎを削っている現状から、近い将来ヒトノロウイルスの流行を阻止できるワクチン作成の可能性が出てきたことは大いに期待したい。

### 参考文献

- 1) 茂原下痢症：昭和二十八年六月千葉県茂原市における下痢症の集団発生記録、厚生省、千葉県、茂原市(1953).
- 2) 林伸行、野島康弘、高塚威、柳沢昌行、宇田川悦子、病院・介護施設におけるノロウイルス感染症の拡大防止対策を目的とした吐物の飛散状況に関する研究、感染症誌、91, 399-404 (2017).
- 3) 林伸行、野島康弘、高塚威、柳沢昌行、宇田川悦子、ノロウイルスの院内感染対策を目的とした靴裏に付着した模擬吐物の床面への伝播状況の評価、第91回日本感染症学会学術講演会(2017/4/6～8、東京、新宿京王プラザホテル).
- 4) K.Ettayebi et al., Science, 10, 1126/science.aaf 5211 (2016).

# 透過型電子顕微鏡による溶液試料の観察

Observation of Solution Samples by Transmission Electron Microscope



北海道大学 低温科学研究所  
准教授

木村 勇氣 博士(理学)

## I. はじめに

1931年にベルリン工科大学のルスカ等を中心として開発された透過型電子顕微鏡(TEM)は、「より小さな物体を観察したい」、「より細かい情報を得たい」という我々の欲求を満たしてくれた。その後、当然のように「動的なプロセスを時間を追って直接観察したい」、「より現実に近い環境で観察したい」という次の欲求が生まれた。前者は、加熱ホルダーや冷却ホルダーなどの登場によって実現され、近年のカメラの発展により、分解能を保ったまま高速で現象を捉えられるようになってきた。後者に対しては、上野ホルダーに代表されるようなガスをTEMに導入する仕組みが開発され、2003年にはついにWilliamson等によって自家製のセルを用いてTEMへの溶液の導入が成功した<sup>1)</sup>。一般的に、TEMを用いた観察では、電子線を通すために観察対象の厚みを100 nm程度まで薄くし、鏡筒内は高真空中に保つ必要がある。試料室も強い磁場や空間的制約があり、複雑な機構を組み込むことは難しい。この制限に対し、Williamson等は薄い隔膜を用いることでTEMに溶液を導入し、電子線でその内部を観察することに成功した。

その後、溶液ホルダーが米国のProtochips社やHummingbird Scientific社から市販されると、例えば我々の分野では“微結晶が方位をそろえて接合する成長過程”<sup>2)</sup>や“炭酸カルシウムの結晶化前の非晶質粒子の出現”<sup>3)</sup>が示されるなど、溶液中での結晶化過程をTEM観察する研究が世界的に盛んに行われるようになった。また、リボソームやロタウイルスなどの生物試料の観察報告も増えており<sup>4)</sup>、研究分野を広げている。特に、これまでTEM観察には凍結や染色が必須であった生体試料においては、溶液TEMは実環境下でのサイズや形を評価できる強力な手法であるといえる。溶液サンプルに対してTEMの強力な機能を適用できるようになり、材料科学、自己組織化、電気化学や触媒作用、ナノ粒子の成長、流体物理学、放射線物理学、粘土やエアロゾルを含む地質学および環境学、複雑な生体材料やポリマー、生物学、創薬、食品、塗料や化粧品などの非常に多くの分野でブレークスルーが起こる可能性を秘めていると考えている。我々のグループでも、金属ナノ粒子、光触媒粒子、コロイド粒子、塩、タンパク質、粘土鉱物、セメント、リボソーム、大腸菌など様々な試料の観察をしてきており、その大きな可能性を実感している<sup>5-8)</sup>。

現在は、DENS solutions社からも溶液ホルダーが販売されており、また、既存のホルダーを利用できるK-kit(Materials Analysis Technology Inc.)と呼ばれる溶液セルも登場し、利用しやすくなってきた。我々は、2012年にProtochips社の溶液ホルダーを日立の加速電圧200 keV, LB<sub>6</sub>フィラメントのH-8100に導入し、試行錯誤しながら手法を確立しつつ(身内ではフルイド反応TEMと呼んでいる)、Protochips社と意見交換を続けてきた。そのため、ここではProtochips社のPoseidonと名付けられている溶液ホルダーに関して述べる。特に、溶液ホルダーの導入を検討する際に知りたいと思われる情報をできるだけ盛り込むよう努めた。

## 2. 溶液セルの概要

溶液は、シリコン製の窓付き板2枚(製品名:E-chips)の間に封入することで、TEMの真空環境に導入できる(図1)。窓付き板の中央には切欠きがあり、30-50 nm厚の非晶質窒化シリコン膜が窓として用意されている。静止(Static)や混合(Flow)と名付けられた小さな窓付き板( $2.0 \times 2.0 \times 0.3$  mm)には、図1Bに金色で見られるようなスペーサーが用意されており、この厚みを選ぶことで、異なる溶液厚さ(50 nm-5  $\mu\text{m}$ )を準備できる。我々は普段、試料の数密度とコントラストの関係から、150 nm、または500 nmのスペーサーを用いている。電子線はこの窓を透過することで溶液を観察できる。また、スペーサーが四隅に柱のように用意されているFlow E-chipsを用いれば、TEM観察下で二種類の溶液を混合したり、異なる溶液を流して反応条件を変化させたりできる。マイクロウェルと呼ばれるE-chipsは、窓の中央に井戸がいくつも掘られたような構造をしている。スペーサーはなく、この井戸の中に溶液を封入して観察することになる。井戸の底だけが薄い非晶質窒化シリコンであるために、TEMの真空による溶液層の膨らみを低減でき、よりクリアな像を得ることができる。また、加熱用の窓付き板(大)( $6.0 \times 4.5 \times 0.3$  mm)を用いることで、室温から100°Cまで温度制御も可能である。溶液は、特殊な形状をしたガスケットによりTEMの真空から隔離される。ガスケットは、耐薬品性を考慮して、バイトン、EPDM、パーフロから、試料に応じて選択できる。現在のPoseidonホルダーは、TEMの傾斜機能を用いることで、エネルギー分散型X線分析(EDS)にも対応している。

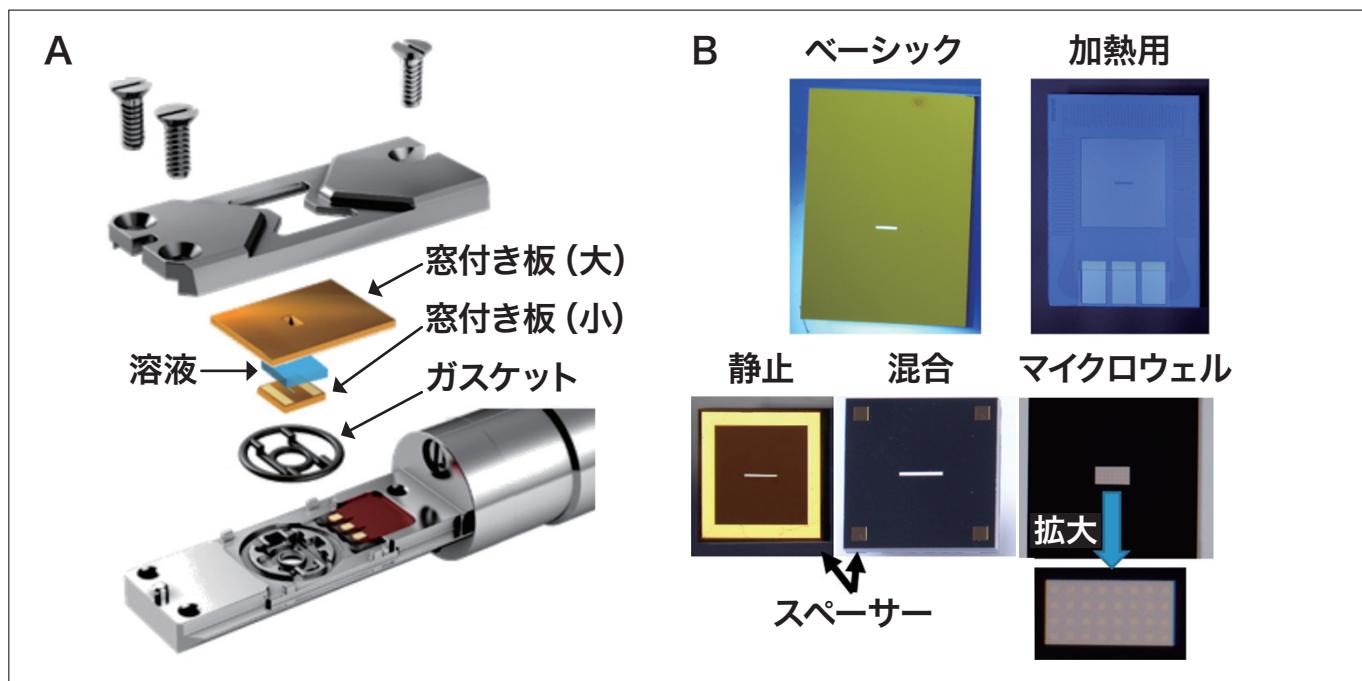


図1 Protochips社(米国)の加熱機構付き溶液ホルダー(製品名:Poseidon)先端の模式図(A)と、非晶質窒化シリコンの薄膜を窓に持つシリコン製の板(E-chips)の光学顕微鏡写真(B)

大小の窓付き板にはいくつかの種類があり、用途に応じて使い分けることができる。現在、400を超える組み合わせが可能である。溶液内部は、電子線がこの窓を透過することで観察できる。

### 3. 溶液セルの組み立て方法

購入時の E-chips には、非晶質窒化シリコンの膜上に保護膜が貼ってあるので、アセトンとメタノールを用いて洗浄した後にエアダスターで乾燥させる。その後、溶液を均質に E-chips 上に載せたり、スムースに流したりできるように E-chips の親水化処理を行う(図2)。すると、水溶液の場合、図2C に示すように、非常に濡れが良くなる。非極性溶媒を使うときなど、窓付き板を 150°C で 1.5 時間加熱することで疎水処理もできる。

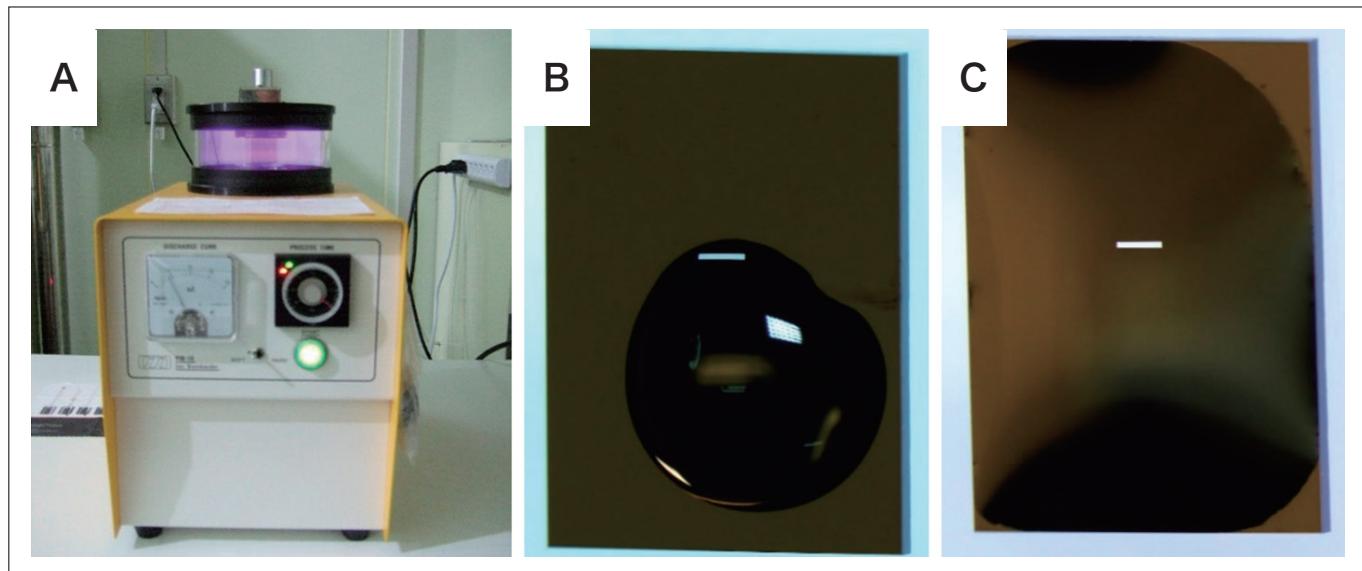


図2 溶液セルを組み立てる前に行う親水化処理の様子(A)、および30秒間親水化処理する前(B)と後(C)で同量の水を滴下した様子  
親水化後には、窓付き板が一様に濡れていることが分かる。

図3に溶液セルを組み立てる様子を実体顕微鏡写真で示す。A に見られる特殊な形状のガスケット上に窓付き板(小)を載せ(図3B), 溶液を 0.5 - 1  $\mu\text{L}$  程度滴下する(図3C)。上から窓付き板(大)をかぶせて(図3D), チタン製の蓋で覆い, トルク管理をしながらネジ止めする(図3E)。窓の長手方向を 90°異なる向きで設置すると、図3F の中央に明るく見られるように、 $50 \times 50 \mu\text{m}$  の観察領域が準備できる。窓が割れていったり、異物が挟まっていたりすると、実体顕微鏡で拡大して観察した際に、窓が不均一な干渉縞を示すために、直ちに分かる。最終的な溶液量は、500 nm のスペーサーの場合 2 nL 程度である。

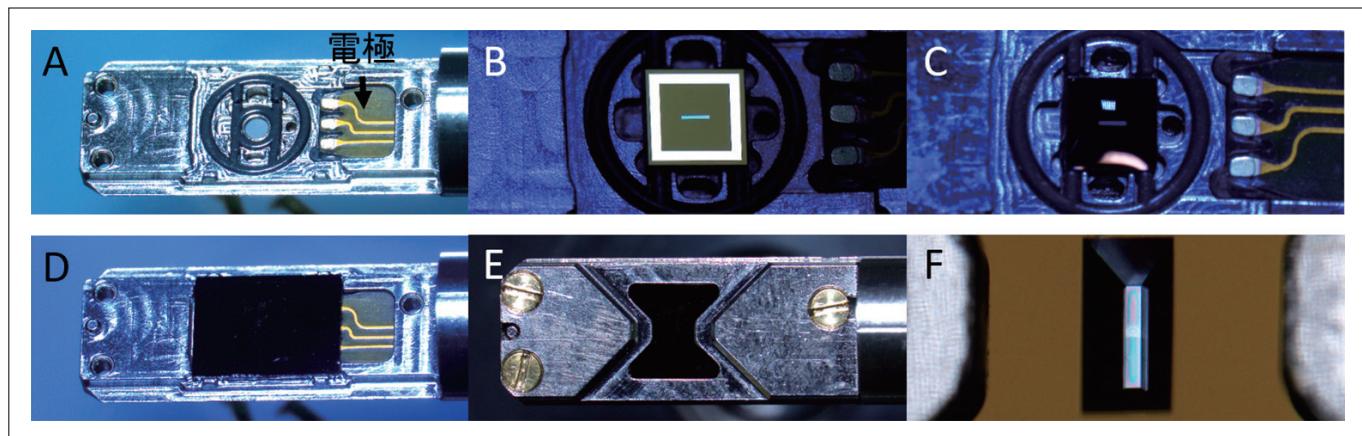


図3 Poseidon用の溶液セルの組み立て手順

TEMの鏡筒内に溶液をまき散らさないために、観察前に必ずリークチェックを行う(図4A)。但し、TEM内で溶液がセルからリークしても、真空計の針はほとんど振れず、混合セルを用いて溶液を流し続ければ、TEM本体に与える影響も限定的であると感じている。溶液を流す場合には、内径100 μmのPEEKチューブでシリングポンプとつなぐ。廃液は内径150 μmのPEEKチューブを通してビーカーなどに排出する。図5に溶液セルの観察窓領域のTEM低倍率像を示す。四隅が明るいことが分かる。これは、TEMの真空により非晶質窒化シリコン膜が引っ張られているため、中央ほどその影響が大きい。そのため、通常の観察は四隅を中心に行うことになる。

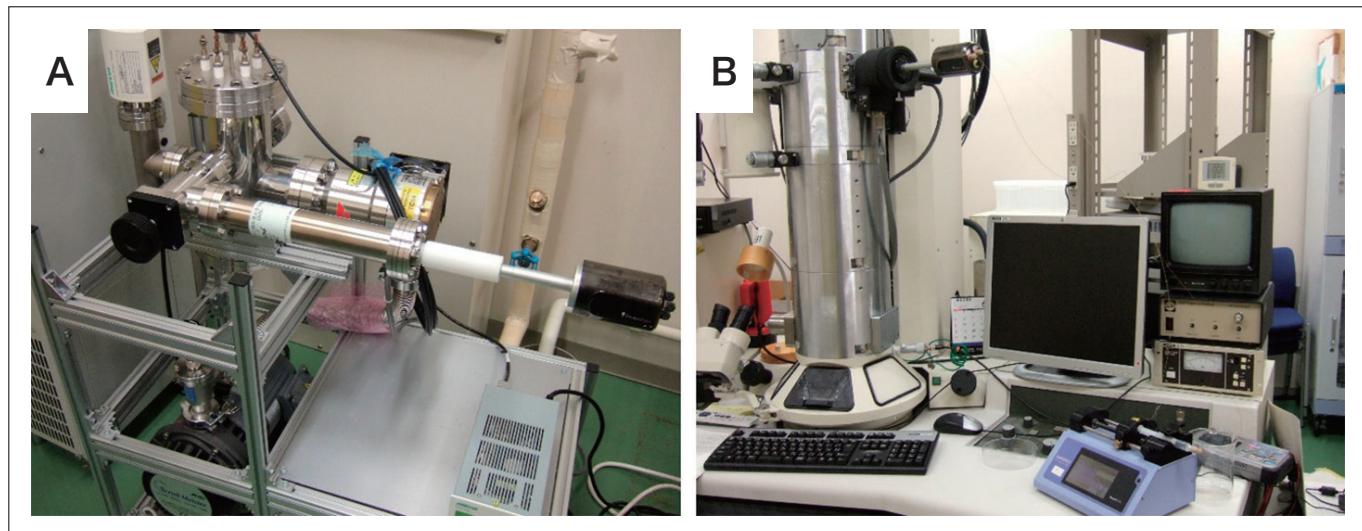


図4 観察前に行うリーク(水漏れ)チェックの様子(A)とTEMに導入した様子(B)  
溶液を流す場合にはPEEKチューブでシリングポンプとつなぐ。

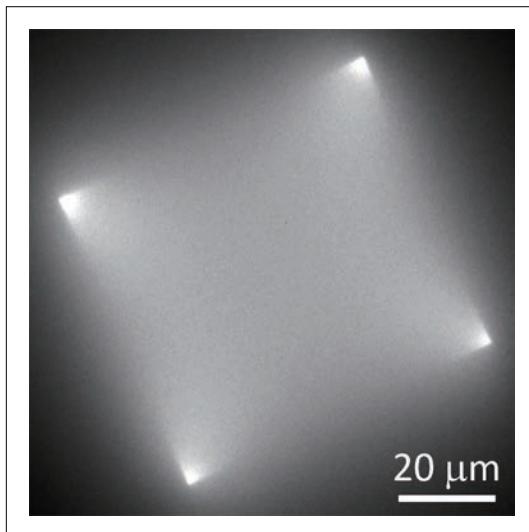


図5 溶液セルの観察窓領域のTEM低倍率像

## 4. 観察例

図6に水を金のコロイド溶液で置き換える様子を示す。スペーサー 150 nm の Flow E-chips を用いて、金コロイド溶液を  $2 \mu\text{L min}^{-1}$  で流すと、水が徐々に金コロイド溶液に置き換わる様子が見られた。その際、図6の B や C に顕著に見られるように3つの異なるコントラストを持って、それぞれが同じ速度 ( $\sim 40 \text{ nm s}^{-1}$ ) で右上から左下に移動した。この3つのコントラストの違いは、メニスカスが原因であると考えている(図6D)。金コロイド溶液を拡大すると、金ナノ粒子を観察することができる。これは、当たり前のように聞こえるが、実は水中の金ナノ粒子のブラウン運動による移動速度を見積もると、カメラの露光時間内に視野の端から端まで容易に動けるほどである。それにもかかわらず観察が可能であるということは、薄い水の層に存在するナノ粒子の拡散速度(移動速度)は、バルク液体から予想されるよりもはるかに小さいことを示している。その不一致は、7 - 9桁にものぼる。これは、細孔内の水中のナノ粒子の拡散を予想する計算でも説明できない。しかし、このような非常に大きく減衰された拡散運動のために、我々はナノ粒子の液中“その場”観察が可能なのである。

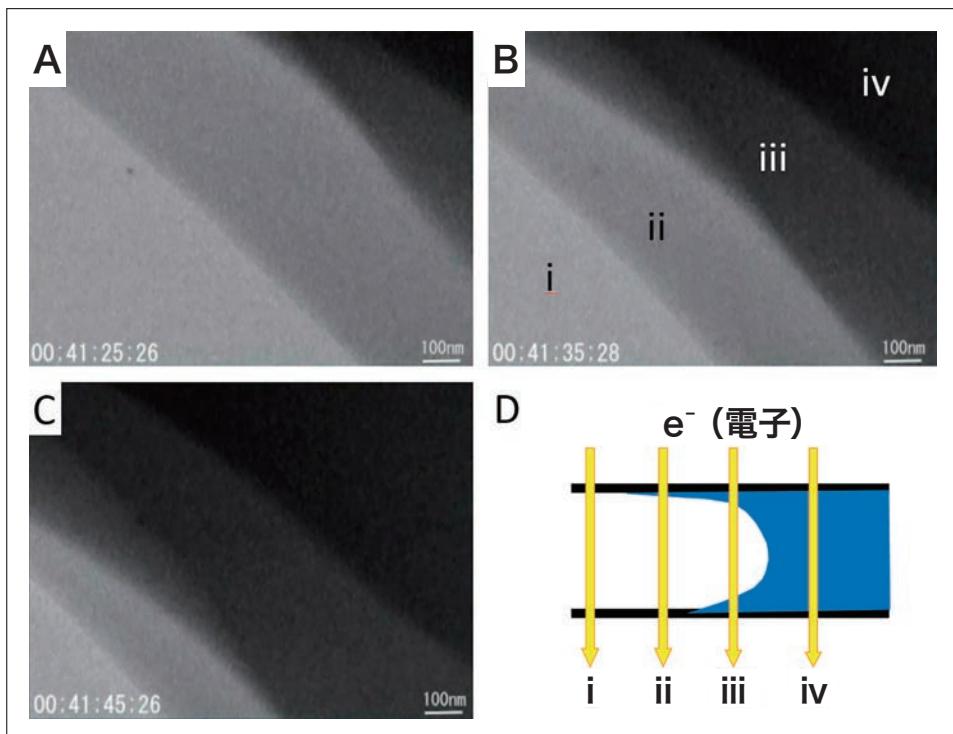


図6 Aの左下半分ほどのコントラストの弱い領域に存在する水が、徐々に右上から流れてくる金コロイド溶液に置き換わる様子

Bに示すような4段階のコントラストの違いは、Dに示すように金コロイド溶液と水との界面に作られたメニスカスが原因と考えられる。窓付き板(小)は、150 nmのスペースを持つ混合(Flow)を用い、流速 $2 \mu\text{L min}^{-1}$ で金コロイド溶液を流した。

我々の研究の一例として、コンクリートの劣化を防ぐために使われるシリカ粒子と  $\text{Ca(OH)}_2$  溶液を用いて単純化したコンクリート化の初期過程の様子を図7に示す<sup>5)</sup>。 $\text{Ca(OH)}_2$  溶液を流速  $1 \mu\text{L min}^{-1}$  で流しながらシリカ粒子を観察すると、シリカ粒子が水和によって大きく膨らんでいく様子が見られた。個々のシリカ粒子のコントラストの積分値から、シリカ粒子は膨潤しながら僅かに溶けていることも分かった。その後、C-S-H と呼ばれるカルシウムケイ酸塩水和物 ( $\text{CaO}\cdot 2\text{SiO}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) が生成した(図7D)。この観察で、C-S-H が形成するよりも前に、シリカ粒子の膨潤によってコンクリート内の細孔が埋められていき、その後、C-S-H が形成して粒子同士をつないでいくことで固化が進むプロセスを捉えた。シリカ粒子が膨潤する典型的な速度は  $\sim 3 \times 10^{-2} \text{ nm s}^{-1}$  であった。溶液セルを用いた実験により、他の手法ではほとんど不可能である個々のナノ粒子の水和による膨潤や溶解、成長の微小な速度を求めることが可能になった。

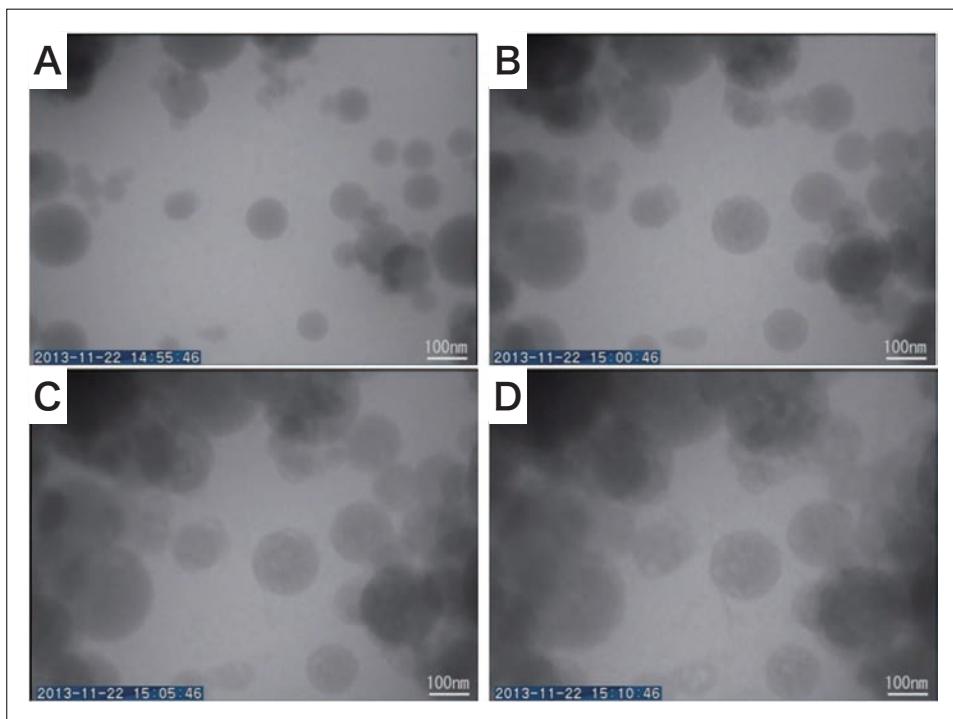


図7 非晶質シリカ粒子を溶液セル内に封じ込め、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液を流すことで実施した、水和の様子とセメント反応の模擬実験のTEM中その場観察結果  
窓付き板(小)は、500 nmのスペースを持つ混合(Flow)を用い、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液は流速 $1 \mu\text{L min}^{-1}$ で流した。

## 5. 観察後

通常の観察を行った後には、膜が正常な状態であったかを、実体顕微鏡で確認している。その後、図3の組み立て手順とは逆の手順でセルを解体する。溶液を流して物質の形成過程を観察するような実験を行った際には、析出物がPEEKチューブ内で生成して、詰まりが生じるのを防ぐ必要がある。一度析出物が生成すると、難溶性の物質でなくとも溶かすのは容易ではない。溶液を流す実験を行った後には、超純水を長時間流し続けることで、乾燥による固体物質の析出を抑えることが重要である。ただし、最新のPoseidonホルダーでは、ホルダー内部のPEEKチューブを自分で交換できるようになつたため、以前ほど気を遣う必要はなくなり、よりチャレンジングな実験が可能になった。

Poseidonを使い始めた当初は、様々な方法で使用後のE-chipsの洗浄を試みたが、例えば超音波洗浄を行うと、観察窓は非常に薄いために直ちに破れてしまうなど、再利用するのは難しいという結論に至り、現在はすべて使い捨てにしている。MEMS技術の進歩により、様々な溶液セルが可能になってきており、価格も下がってきていたため、我慢できるようになってきた。

## 6. おわりに

溶液セルが登場して間もなく15年である。日本の顕微鏡学会での液中発表に関する発表はまだ限られているが、海外の顕微鏡学会では、液中観察のセッションも用意されるなど、ここ数年で大きな賑わいを見せている。ただし、新しいものに飛びつき、取りあえず観察してみたという発表が非常に多い。これに対し、現在最大の課題となっている、電子線損傷の問題に丹念に取り組んでいるグループもある。例えば、加速電圧300 keVのTEMを用いて半径1  $\mu\text{m}$ の領域を1 nAの電子線で観察した時の単位時間当たりの吸収線量は $7.5 \times 10^7 \text{ Gy/s}$ 程度である<sup>9)</sup>。これは、一般的な放射線源が作り出す値よりも7桁も大きい。溶液TEMにおいては、電子線の影響を慎重に評価することが欠かせないのである。今後、電子線の影響の理解が進み、より簡便に評価できるシステムが構築されると期待している。その時、上記で示したような様々な分野におけるブレークスルーがより実現されていくであろう。

## 参考文献

- 1) M. J. Williamson, R. M. Tromp, P. M. Vereecken, R. Hull & F. M. Ross, Dynamic microscopy of nanoscale cluster growth at the solid-liquid interface, *Nature Materials*, **2**, 532–536 (2003).
- 2) D. Li, M. H. Nielsen, J. R. I. Lee, C. Frandsen, J. F. Banfield, J. J. De Yoreo, Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment, *Science*, **336**, 1014–1018 (2012).
- 3) M. H. Nielsen, S. Aloni, J. J. De Yoreo, In situ TEM imaging of CaCO<sub>3</sub> nucleation reveals coexistence of direct and indirect pathways, *Science*, **345**, 1158–1162 (2014).
- 4) F. M. Ross, Opportunities and challenges in liquid cell electron microscopy, *Science*, **350**, aaa9886 (2015).
- 5) Hisao Satoh, Yuki Kimura, Erika Furukawa, Direct Transmission Electron Microscopy Visualization of the Cement Reaction by Colloidal Aggregation of Fumed Silica, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **57**, 79–83 (2018).
- 6) K. Ishii, Y. Kimura, T. Yamazaki, Y. Oaki, H. Imai, Evolution analysis of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·nH<sub>2</sub>O gels for preparation of xerogels having a high specific surface area and their replicas, *RSC Advances*, **7**, 35711–35716 (2017).
- 7) T. Yamazaki, Y. Kimura, P. G. Vekilov, E. Furukawa, M. Shirai, H. Matsumoto, A. E. S. Van Driessche, K. Tsukamoto, Two types of amorphous protein particles facilitate crystal nucleation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, 2154–2159 (2017).
- 8) M. Takasaki, Y. Kimura, T. Yamazaki, Y. Oaki, H. Imai, 1D Oriented Attachment of Calcite Nanocrystals: Formation of Single-Crystalline Rods through Collision, *RSC Advances*, **6**, 61346–61350 (2016).
- 9) N. M. Schneider, M. M. Norton, B. J. Mendel, J. M. Grogan, F. M. Ross, H. H. Bau, Electron-Water Interactions and Implications for Liquid Cell Electron Microscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*, **118**, 22373–22382 (2014).

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/

# LC-DAD-MSDと蛍光指紋分析を融合した微生物代謝産物のハイブリッド解析

The Hybrid Analysis of Microbial Secondary Metabolites with LC-DAD-MSD and Fluorescence Fingerprint Measurements



東北医科薬科大学 薬学部  
天然物化学教室  
教授

内田 龍児 博士(薬学)

## 1. はじめに

放線菌や糸状菌を代表とする微生物、生薬・植物や海洋生物などが生産する二次代謝産物、いわゆる天然物は、抗生物質、抗がん薬、免疫抑制薬、抗寄生虫薬などの様々な医薬品を生み出し、医療の発展とともに人類に多大な貢献をしてきた。Newman と Cragg の報告によれば、現在臨床薬として使われている低分子医薬品の約6割が、天然物のコア構造(ファーマコフォア)あるいはそれを模倣した構造を有しており<sup>1)</sup>、天然物は創薬の重要なシーズとして今なお位置付けられる。しかし、培養液や粗抽出物に新しい構造を有する化合物や有用な生物活性物質が含まれている可能性を、早い段階で見極めることは難しく、天然物創薬研究に従事する者にとっての課題である。この解決手段の1つとして、近年、LC-MS や LC-MS/MS を用いた代謝産物の網羅的な解析やモレキュラーネットワーキング解析<sup>2)</sup>などの手法を取り入れた、探索研究も進められている。また、選別方法の新しい着眼点として、本誌 Vol. 60, No. 2 に掲載された近畿大学・福田 隆志博士が提案した「蛍光指紋分析を利用した分析法」が挙げられる<sup>3)</sup>。蛍光指紋分析は、食品科学の分野で異物の混入や生産地の判定などの品質評価にも利用されている分析法で、化合物が混在するサンプルでもほとんど前処理の必要がなく、短時間で蛍光物質の測定が可能である。

そこで今回は、先に行われた蛍光指紋分析を用いた海洋由来微生物の培養液の主成分解析の結果に、LC-DAD-MSD 分析のデータを系統樹解析した結果を加えた、異種分析統合型解析法(ハイブリッド解析)によって得られた知見について紹介する。

## 2. 実験

### 2-1. 試験菌

東シナ海、瀬戸内海および種子島の海洋環境より採取した、海泥および海洋生物サンプルから分離した海洋由来放線菌および細菌(48株)を試験菌として使用した。分離方法は、本誌60, 5277-5282, 2017を参照<sup>3)</sup>。

### 2-2. 試験菌の培養および抽出

分離した48種の菌(菌株番号 153 ~ 200)の培養は、Soluble starch(1.0%), Bacto<sup>TM</sup> Yeast extract(0.4%), Bacto<sup>TM</sup> Peptone(0.2%), CaCO<sub>3</sub>(0.1%), KBr(0.01%), Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.004%)を天然海水で調製したM1(+)培地と蒸留水で調製したM1(-)培地の2種の培地を用いた。各培地(25 mL)を含む100 mL容三角フラスコに植菌し、ロータリーシェーカー(27 °C, 160 rpm)で14日間培養後、25 mLのエタールを加え1時間振盪し、微生物抽出液(培養サンプル)とした(計96サンプル)。

### 2-3. 測定サンプルの調製

微生物抽出液の上澄み(1 mL)をマイクロチューブに移し、10,000 rpmで15分遠心後、その上清(300 µL)をミニザルトRC4(ザルトリウス社製)でフィルター濾過したものを、LC-DAD-MSD 分析用の測定サンプルとした。

## 2-4. 培養サンプルの測定

マスクロマトグラム( $m/z$ : 200 ~ 1,000)および紫外可視吸収スペクトル(200 ~ 500 nm)は、図1に示す機器を用いて取得した。また、200 ~ 600 nm の励起波長に対して 200 ~ 600 nm の蛍光波長を網羅的に測定する三次元蛍光スペクトルは図2に示す機器を用いて取得した。



図1 高速液体クロマトグラフ Chromaster®



図2 F-7100型分光蛍光光度計

### 使用機種1：高速液体クロマトグラフ Chromaster®

- 5160ポンプ(P/N:892-0120)
- 5260オートサンプラ(P/N:892-0280)
- 5310カラムオーブン(P/N:892-0300)
- 5440ダイオードアレイ検出器(P/N:892-0440)
- 5610質量検出器(P/N:811-0005)

#### 分析条件：

- カラム：Meteoric Core C18 (YMC社)
- サイズ：75 × 2.1 mm I.D. S-2.7 μm. 8 nm
- カラム温度：50°C
- 移動相：5~95% CH<sub>3</sub>CN-0.1% HCOOH (10 minリニアグラジエント)
- 流速：0.2 mL/min
- UV検出：200~500 nm
- MS検出： $m/z$  200~1,000
- インジェクション量：5 μL

## 2-5. 系統樹解析および主成分解析

系統樹解析および主成分解析は、多変量解析ソフトウェア: 3D SpectAlyze™ (株式会社ダイナコム) を用いて行った。

### 3. 測定結果

#### 3-1. LC-DAD 分析による培養サンプルの系統樹解析

LC-DAD の3次元データ(吸収波長, 吸光度, 保持時間)を基に, 3D SpectAlyze<sup>TM</sup>で系統樹解析した結果を図3に示した。M1 (+) 培地と M1 (-) 培地を用いて培養したサンプルは海水の有無の培養に依存せず, 様々な位置に分布しクラスターを形成した。

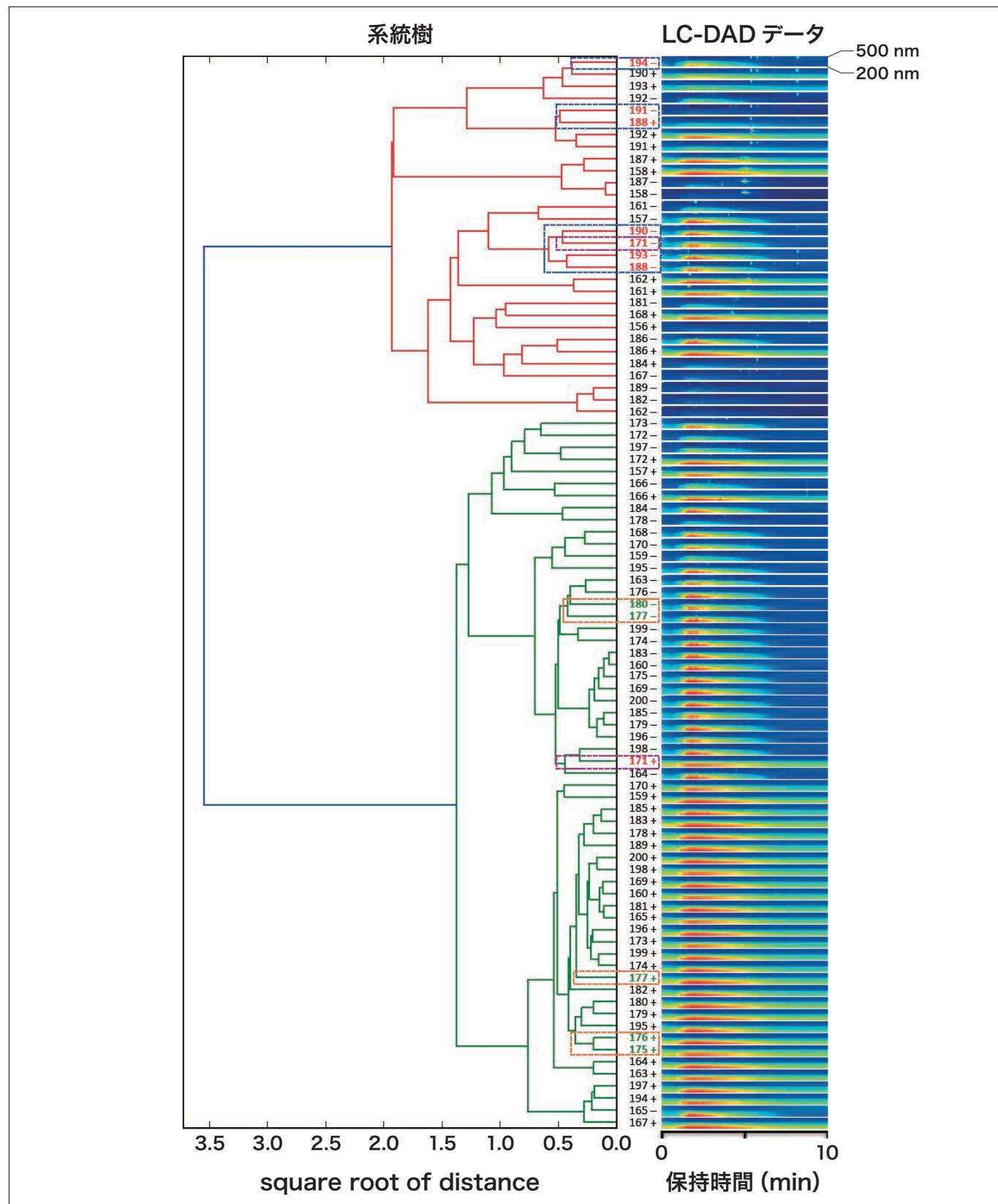


図3 系統樹解析した結果 LC-DADデータ

### 3-2. LC-MSD 分析による培養サンプルの系統樹解析

3-1. と同様に、LC-MSD の3次元データ(分子量： $m/z$ 、強度、保持時間)を基に、系統樹解析した結果を図4に示した。LC-DADでの系統樹解析の結果とは異なり、M1 (+) 培地を用いた培養サンプルは赤線、M1 (-) 培地を用いた培養サンプルは緑線で示した大クラスター中にほぼ位置した(図4)。この中で、M1 (-) 培地を用いた培養サンプル158 (-), 165 (-) と 187 (-)のみが、M1 (+) 培地を用いた培養サンプルの大クラスターに位置し(図4: 紫色破線枠内)，そのうち培養サンプル158 (-)と187 (-)は、M1 (+) 培地を用いた培養サンプル158 (+)と187 (+)と同じクラスターを形成することが明らかになった(図4: 緑色破線枠内)。したがって、培養サンプル165 (-)と生産菌158株と187株が生産する培養サンプル(158 (+), (-)と187 (+), (-))は特徴的であると判断された。

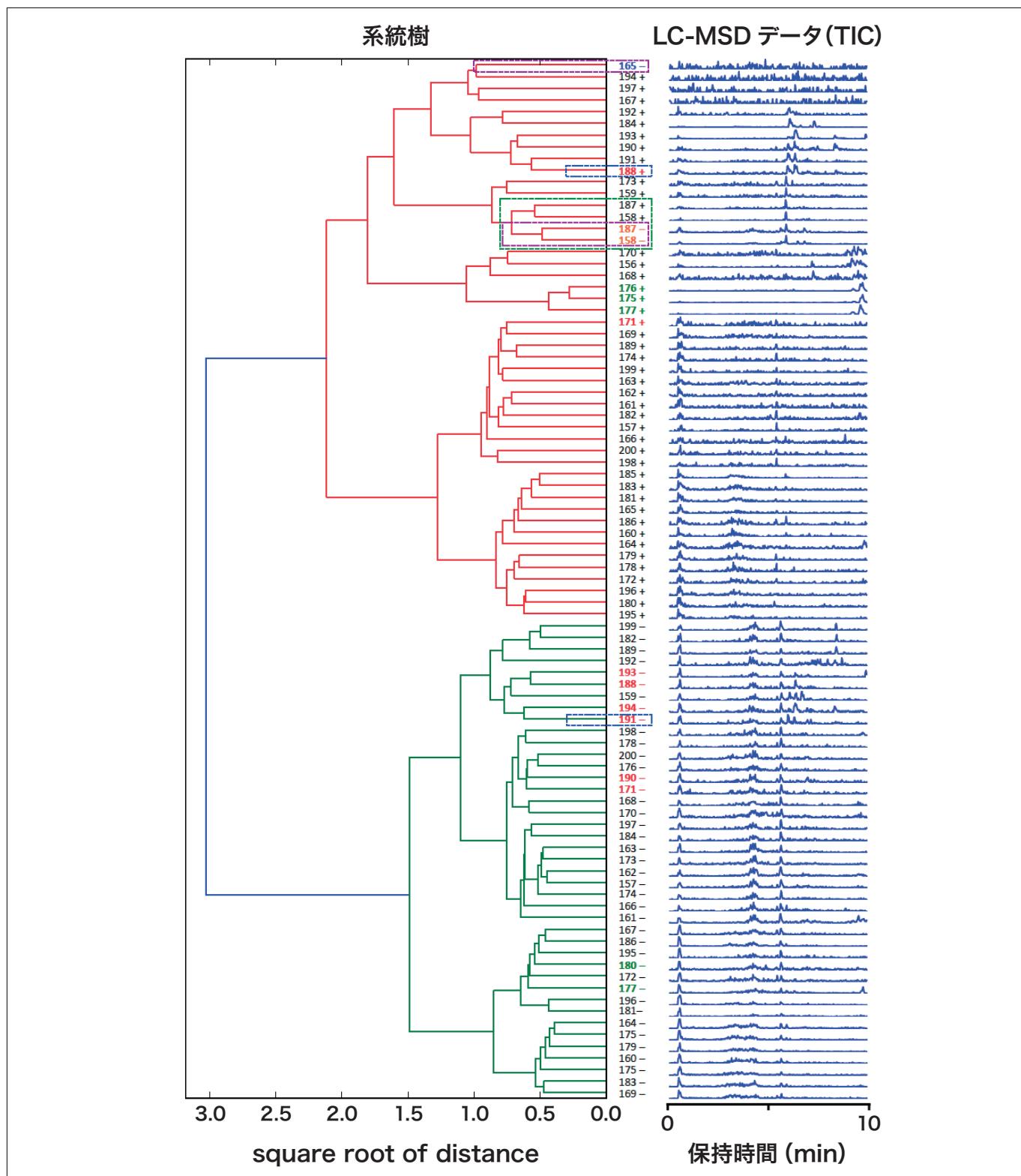


図4 系統樹解析した結果 LC-MSDデータ(TIC)

### 3-3. 蛍光指紋分析による主成分解析

蛍光指紋分析の測定結果を基に、主成分解析した結果を図5に示した<sup>3)</sup>。多くの培養サンプルは中心付近にプロットされたが、390～400 nmの蛍光波長で強い蛍光が見られた培養サンプル(171(+), 171(-), 188(+), 188(-), 190(-), 191(-), 193(-)と194(-))は赤枠内に位置し、これらの中で、生産菌171株と188株の培養サンプルは海水の有無の培養に影響せず同じ群に位置した。また、430 nm以上の蛍光波長で強い蛍光が見られた培養サンプル(175(+), 176(+), 177(+), 177(-)と180(-))は緑枠内に位置し、生産菌177株の培養サンプルのみが海水の有無の培養に影響せず同じ群に位置した。

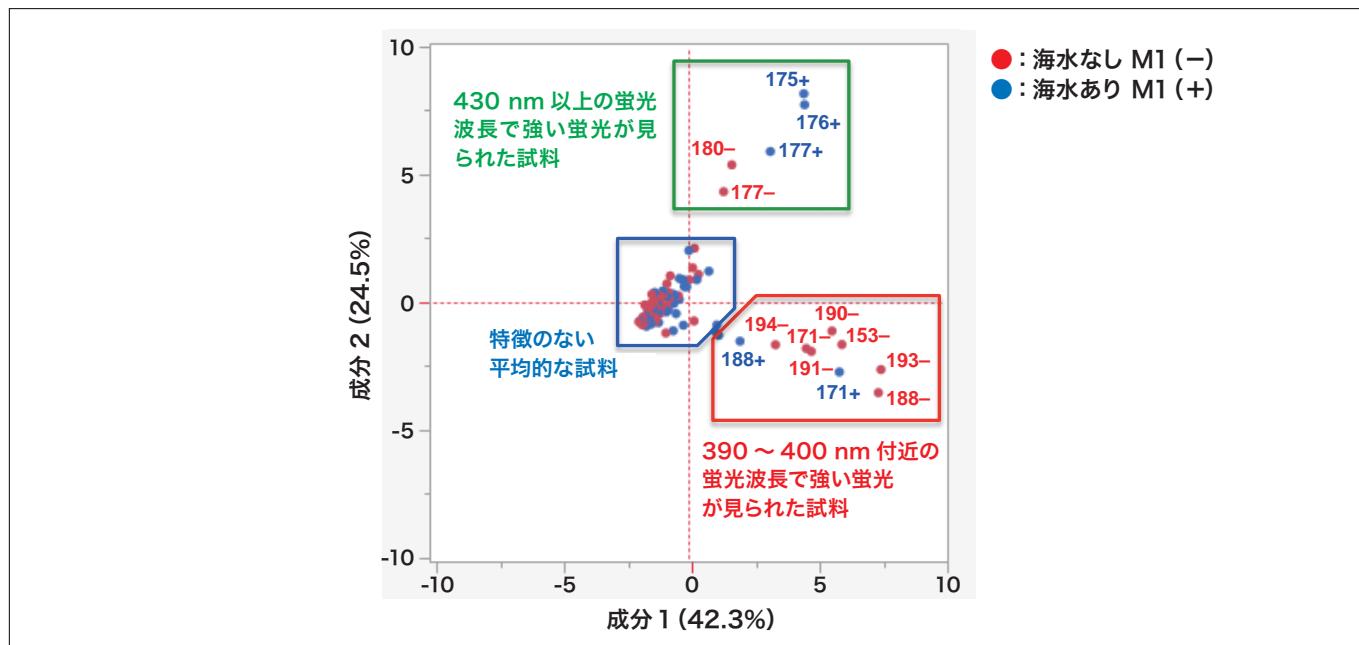


図5 蛍光指紋分析による主成分解析結果

### 3-4. LC-DAD-MSD 分析と蛍光指紋分析を合わせたハイブリッド解析

各測定機器から得られた結果を統合したハイブリッド解析より判断した、培養サンプルの特徴を示す。まず、蛍光指紋分析とLC-DAD分析のデータを合わせてみる。蛍光指紋分析では海水の有無の培養に関係なく同じ赤線枠内(図5: 390～400 nmの蛍光波長で強い蛍光が観察)に位置した培養サンプル171(+)と171(-)は、LC-DAD分析の系統樹解析ではそれぞれ緑線と赤線で示した異なる大クラスター内に存在した(図3: 紫色破線枠内)。また、培養サンプル171(+)以外は全て赤線で示した大クラスター内に位置し、培養サンプル194(-)、培養サンプル191(-)と188(+)および培養サンプル190(-)、171(-)、193(-)と188(-)の3つのグループに分類された(図3: 青色破線枠内)。したがって、唯一、緑線の大クラスターに位置する培養サンプル171(+)はこれらの中で特徴的なサンプルであることが示唆された。

一方、蛍光指紋分析で緑線枠内(図5: 430 nm以上の蛍光波長で強い蛍光が見られた培養液)については、全て緑線で示した大クラスター内に位置し、培養サンプル175(+)と176(+), 培養サンプル177(+)および培養サンプル177(-)と180(-)の3つのグループに大別された(図3: 橙色破線枠内)。

これにLC-MSD分析での系統樹解析を組み合わせてみることにした。まず、蛍光指紋分析(図5: 赤線枠内)とLC-DAD分析のハイブリット解析で同じグループにまとめられた培養サンプル171(-), 188(-), 190(-)と193(-)のグループは、LC-MSD分析では培養サンプル171(-)と190(-)および培養サンプル188(-)と193(-)のクラスターの2つに細分された(図6: 青色破線枠内)。また、LC-DAD分析では、やや離れて位置していた培養サンプル191(-)と194(-)は、LC-MSD分析では全く同じクラスターに位置し、さらに培養サンプル188(-)と193(-)のクラスターと近い位置にあった(図6: 橙色破線枠内)。しかし、LC-DAD分析で培養サンプル191(-)と同じクラスターに位置していた培養サンプル188(+)は(図3: 青色破線枠内), LC-MSD分析では異なる大クラスターに位置していた(図4: 青色破線枠内)。したがって、蛍光指紋分析では1つのグループにまとめられていた培養サンプルは、ハイブリッド解析によって3つのグループに細分化された。

次に、蛍光指紋分析(図5: 緑線枠内)とLC-DAD分析のハイブリット解析で、近い位置にあった培養サンプル177(-)と180(-)は、LC-MSD分析でも近いクラスターに位置していた(図7: 青色破線枠内)。逆に、LC-MSD分析では同じクラスターに位置していた培養サンプル175(+), 176(+)と177(+)は、LC-DAD分析では培養サンプル177(+)だけがやや離れた場所に位置していた(図7: 橙色破線枠内)。したがって、このグループも3つのグループに細分化された。

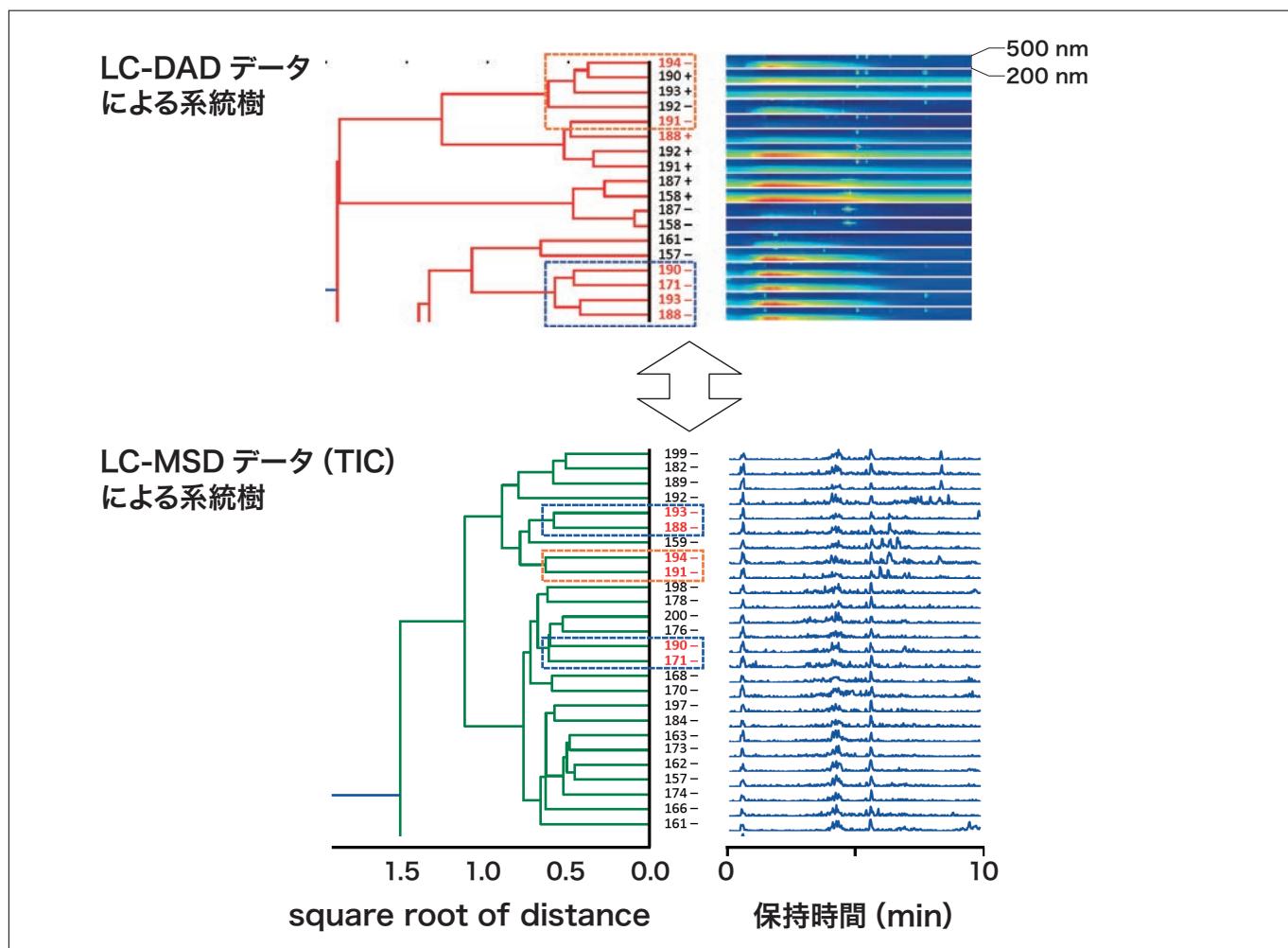


図6 蛍光波長：390～400 nmで強い蛍光が観察された培養サンプルの系統樹解析の比較 LC-DADデータとLC-MSDデータ(TIC)

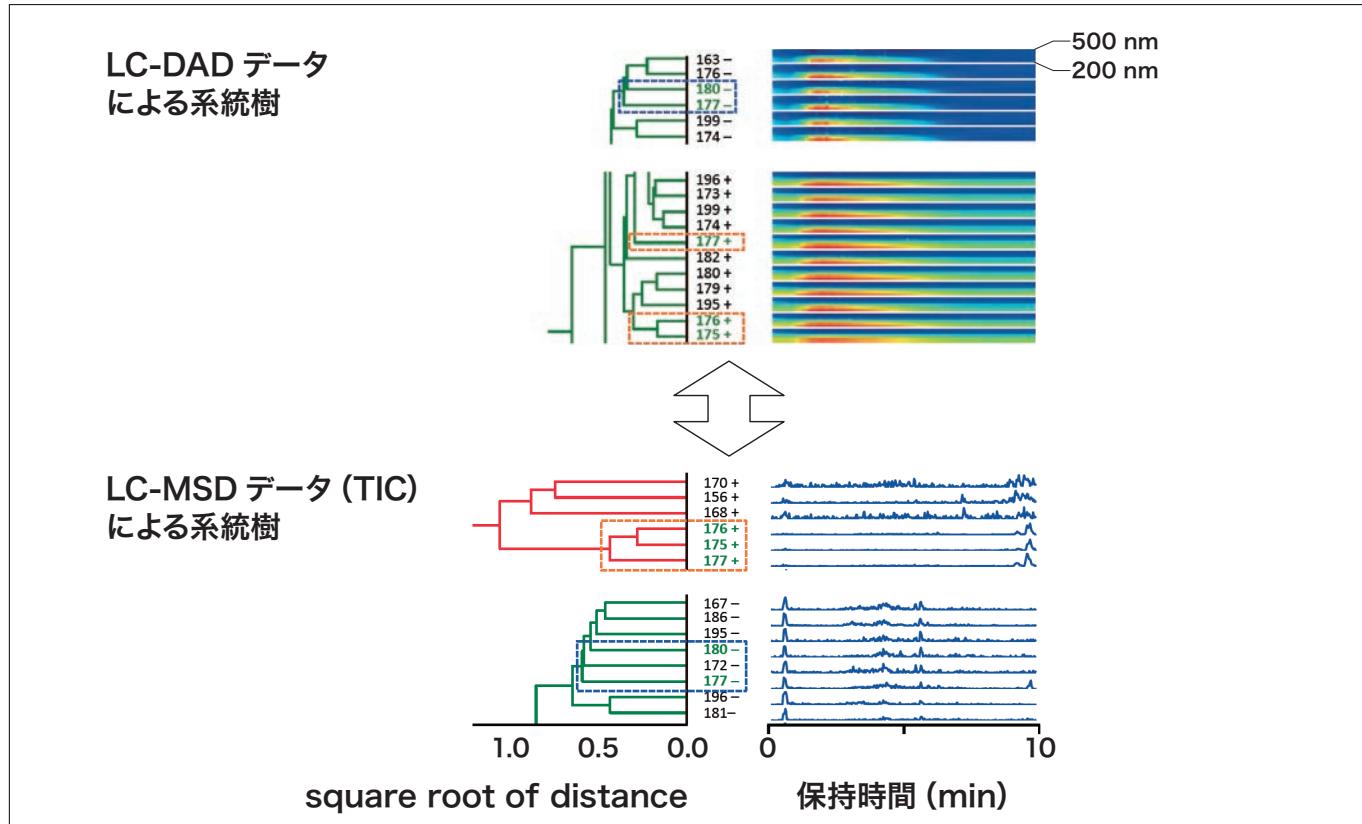


図7 蛍光波長：430 nm以上で強い蛍光が観察された培養サンプルの系統樹解析の比較 LC-DADデータとLC-MSDデータ(TIC)

## 4. 優先順位の決定例

各分析方法で得られた結果をクラスター解析あるいは主成分解析し、単独のデータからでも他とは性質の異なる特徴的な培養サンプルの選択が可能である。例えば、LC-MSD 分析からは、海水なしで培養した培養サンプル 158 (-)と 187 (-) の 2 サンプルだけが、海水有りで培養したサンプルのクラスター内に位置することから(図 4 紫色破線内)、この 2 つは特異的なサンプルの可能性があることは先に述べた通りである。また、蛍光指紋分析からは 2 つのグループが選択され、その中でも生産菌 171 株、177 株と 188 株の培養サンプルは、海水の有無に関係なく同じグループに分類される特異的な生産菌として挙げられる(図 5)。しかし、今回試みたハイブリッド解析では、さらに違った切り口でサンプルの特徴を表し、細分化することで優先順位もつけることが可能である。例えば、蛍光指紋分析(図 6)から特徴的と判断された 171 株、177 株と 188 株のうち、171 株の培養サンプル(171 (+) と 171 (-))は、LC-DAD(図 3)および LC-MSD(図 4)の両分析方法では全く異なるクラスターに位置し、3 株の中で最も有望なサンプルの可能性がある。また、177 株の培養サンプル(177 (+) と 177 (-))および 188 株の培養サンプル(188 (+) と 188 (-))は、LC-MSD 分析(図 4)では海水の有無の培地で異なる大クラスターに位置していたが、LC-DAD 分析(図 3)では同じ大クラスターに位置し、さらに、188 株の 2 つの培養サンプルの方が 177 株の 2 つの培養サンプルより少数の大クラスターにある。したがって、この 3 つの生産菌の優先順位をつけるとすれば、171 株 > 177 株 ≥ 188 株の順と判断される。

## 5. 考察と今後

今回、先に行われた蛍光指紋分析による培養サンプルの結果に、LC-DAD-MSD の分析結果を統合したハイブリッド解析について紹介させていただいた。1 つの分析方法では選択の判断が難しい場合でも、複数の測定方法を組み合わせるハイブリッド解析では、多くの培養サンプルの中から特徴的なものを選別でき、さらにその優先順位をつけることも可能である。著者の研究室では天然資源からの創薬研究として、バイオアッセイによる生物活性を指標としたスクリーニングを実施しており、これにハイブリッド解析を組み合わせても面白いと考えている。バイオアッセイでは、生物活性の強弱だけで判断しているため類似の培養サンプルを選択してしまい、結果的に同じ化合物を活性物質として単離・同定してしまうことがある。しかし、各測定機器から得られる測定データだけで客観的に判断できるハイブリッド解析は、同じ生物活性を示すグループ内の培養サンプルをより細分化でき、偏った培養サンプルの選択を防ぐこともできるのではないかと考えている。現在、約 500 の培養サンプルを解析中で、それに生物活性を加えたデータ処理を進めており、その結果に興味が持たれる。機会があれば、続編として紹介させていただければと考えている。

### 謝辞

今回紹介した研究の一部は、北里大学薬学部 供田 洋 教授のもとで行いました。また、海洋サンプルは、東京海洋大学海洋生物資源学部門 今田 千秋 教授より御提供いただきました。なお、本資料の作成にあたり、近畿大学農学部水産学科 福田 隆志 准教授に御協力および御助言をいただきました。この場を借りて皆様に感謝申し上げます。

### 参考文献

- 1) D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, **79**, 629-661, 2016.
- 2) D. D. Nguyen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **110**, E2611-20, 2013.
- 3) 福田隆志, *The Hitachi Scientific Instrument News*, **60**, 5277-5282, 2017.

1. “Bacto™” は、Becton, Dickinson and Company の日本における登録商標です。
2. “3D SpectAlyze™” は、株式会社ダイナコムの日本における登録商標です。
3. “EEM®”, “Chromaster®” は、株式会社日立ハイテクサイエンスの日本における登録商標です。

## Figure legends

- 図1 測定に使用した機器 (Chromaster® : LC-DAD-MSシステム)
- 図2 測定に使用した機器 (F-7100 : 分光蛍光光度計 (EEM® Auto システム))
- 図3 LC-DAD 分析による培養サンプルの系統樹解析
- 図4 LC-MSD 分析による系統樹解析
- 図5 蛍光指紋分析による培養液の主成分解析
- 図6 蛍光波長：390～400 nm で強い蛍光が観察された培養サンプルのハイブリッド解析
- 図7 蛍光波長：430 nm 以上で強い蛍光が観察された培養サンプルのハイブリッド解析

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/>

# フタル酸エステルのスクリーニングシステム構築

Construction of Phthalates Screening System



プラザー工業株式会社  
製造センター 生産革新部

北原 武夫

## 1. はじめに

EU RoHS 指令において、2015年6月4日の官報にて、2019年7月22日から4種のフタル酸エステル使用禁止が決まりました(表1)。プラザー工業(株)(以下、プラザー工業)では、新規規制物質が追加されることを2013年から予測して削減方法を検討してきました。

今回、(株)日立ハイテクサイエンス(以下、日立ハイテクサイエンス)と協働してスクリーニングシステム構築にチャレンジするために、新規スクリーニング装置を開発した経緯と削減手法について紹介します。

表1 規制の概要

物質名	略称	CAS 番号
フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)	DEHP	117-81-7
フタル酸n-ブチル=ベンジル	BBP	85-68-7
フタル酸ジ-n-ブチル	DBP	84-74-2
フタル酸ジイソブチル	DIBP	84-69-5

上記4種のフタル酸エステルについて、均質材料中0.1%(1,000 ppm)の最大許容濃度で、2019年7月22日以降にEUに上市される電気電子機器への使用を制限されます

\*カテゴリー8、9(体外診断用医療機器及び産業用監視制御機器含む) : 適用開始日2021年7月22日

## 2. 欧州市場の状況<sup>1)</sup>

可塑剤とは柔軟性や加工性を向上するための添加剤であり、その中にフタル酸エステルが含まれています。可塑剤は現在でも非常に多くの量が使用されています。

EUでは、毎年化学物質に関連する違反事例が指摘されており、2016年も400件以上の違反が指摘されています(表2)。2016年の違反事例を解析してみると、製品カテゴリーでは、「玩具」、「衣類・織物・ファッショナブルアイテム」が多くなっています(図1)。「電子機器」は10件と件数は少なくなっています。また、法令別、物質・事象別件数を見てみると、圧倒的に玩具に含まれるフタル酸エステル類に、REACH規則違反となる事例が多く指摘されています(図2、3)。そのため現在は、RoHS指令違反は減少していますが、2019年7月以降、4種フタル酸エステルが規制開始された後、「電子機器」に関しても、RoHS指令違反の増加が懸念されます。

表2 EU Rapid Alert System<sup>(\*)1</sup>における化学物質・環境関連違反件数

年	化学物質・環境関連 <sup>(*)2</sup>		TOTAL 違反件数
	違反件数	率 (%)	
2005	83	11.6	713
2006	137	15.0	915
2007	281	21.1	1,332
2008	339	22.0	1,542
2009	490	29.4	1,668
2010	437	22.2	1,972
2011	337	21.9	1,542
2012	412	21.4	1,923
2013	494	24.4	2,026
2014	632	28.1	2,248
2015	551	29.7	1,855
2016	467	24.7	1,887
TOTAL	4,660	23.7	19,622

(\*)1) Rapid Alert System とは、消費者の健康・安全のために設けられた EU 当局および加盟国が迅速な情報交換を行うためのシステム

(\*)2) RoHS, REACH, CLP 規則含む

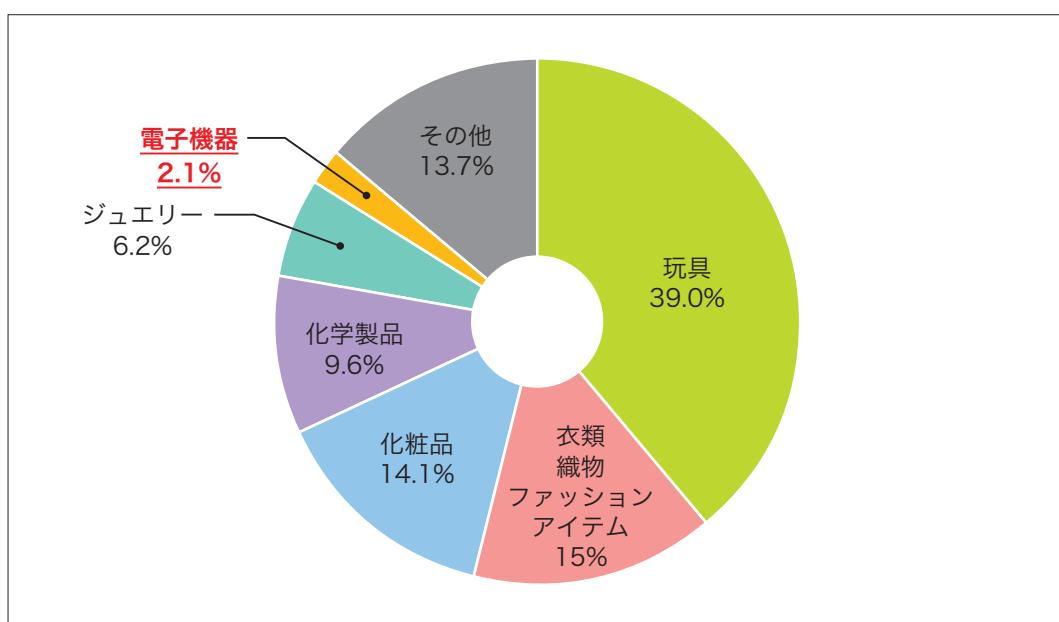


図1 製品カテゴリー別違反件数

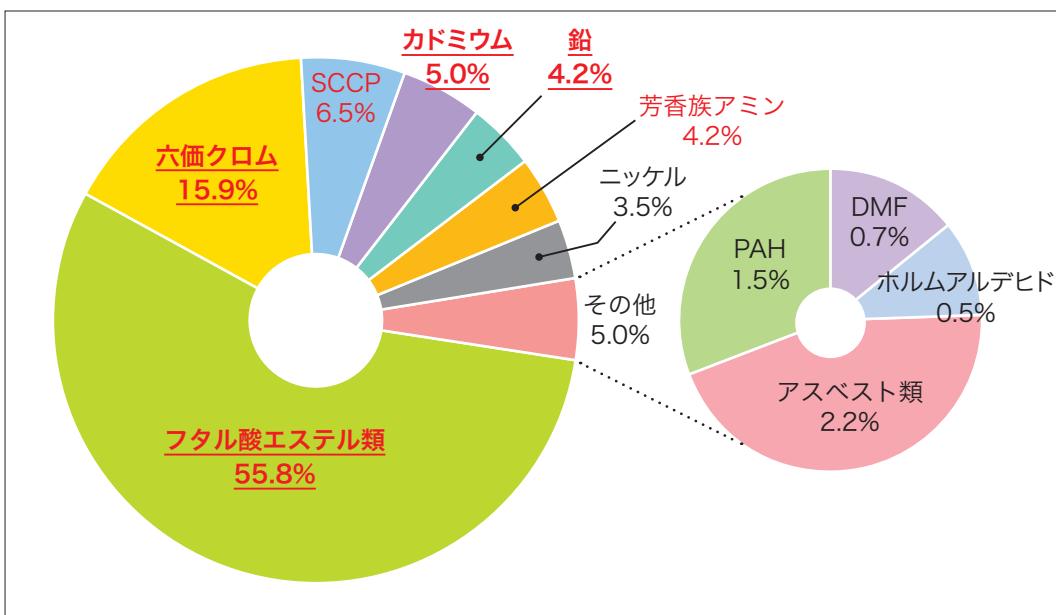


図2 物質・事象別件数(重複あり、代表的なものを抽出)

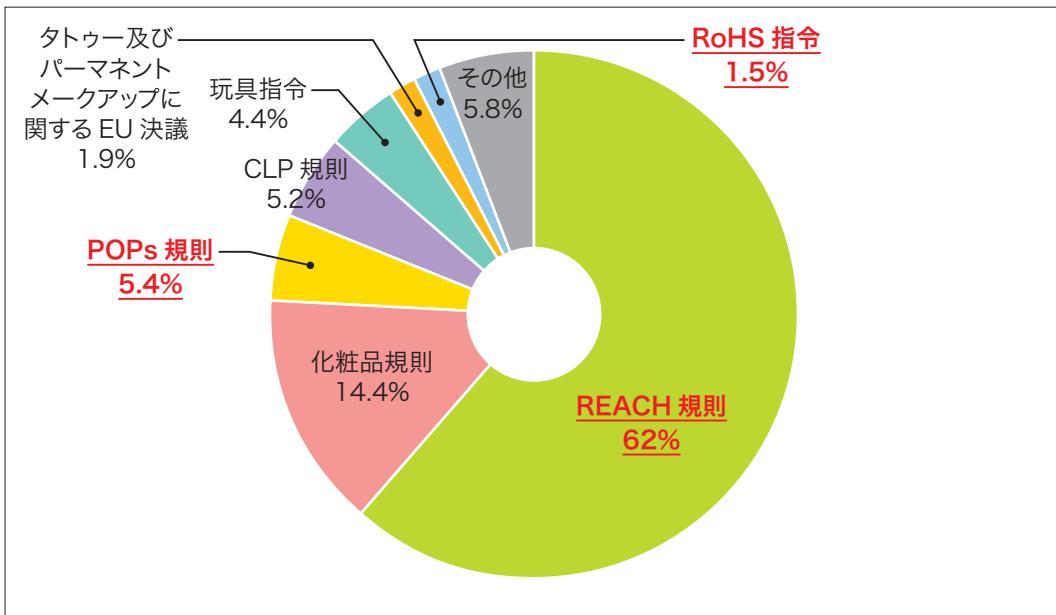


図3 法令別件数(重複あり、一部代表的なもの)

### 3. フタル酸エステルはどこに潜んでいるのか<sup>1,2)</sup>

フタル酸エステルは、様々な製品に含まれており、可塑剤として使用されますので、柔軟性や加工性を向上したい製品に含まれます。特にPVC(塩化ビニル)を軟質化するためによく利用されるためPVC(塩化ビニル)ホースや、電気電子製品ではケーブルのPVC(塩化ビニル)被覆などにも含まれます。EUでは既にREACH<sup>(\*1)</sup>規則<sup>(3)</sup>の認可対象候補物質リスト<sup>(2)</sup>に収載されるSVHC<sup>(\*2)</sup>であるDEHPが、年間1トン以上輸入された成形品としてECHA<sup>(\*3)</sup>に届出されたリストが下記の表(表3)のように公開されており、非常に多様な製品に含有していることがわかります。

(\*1) Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicalsの略(下線部)

(\*2) 高懸念物質: Substances of Very High Concernの略(下線部)

(\*3) 欧州化学物質庁: European Chemicals Agencyの略(下線部)

表3 フタル酸エステル(DEHP)の含有が疑わしい製品例

分野	用途
日用品	テーブルクロス, ノートブック, 筆箱, 時計, 靴, 雨靴, ミシン, 財布, 傘, レインコート, 道具箱, エアベッド, 枕, バスタブ, シャワーカーテン, バスマット, タライ, シャワーキャップ, 衣紋掛け, 書類挟み, 泥落としマット, 虫よけ網, 園芸用品, 椅子, パックパック, ブレスレット, ネックレス, パンプス, スーツケース, 人工皮革, マニキュア, 小銭入れ, 家具, 洗濯機, 掃除機, マッサージ機械, トレーニング機器, ヘアドライヤー
建築材料	床材, 床タイル, コード, フェンス, ランプ, クッション材, カバー, 街灯, ダウンライト, 床カバー
遊具	パビリオン, テント, ターポリン(オートタープ:オートキャンプに使用する日よけ), ダイビングフリッパー, ダイビングマスク, ボート, トーチ
電気・電子	絶縁材, 電源コード, ケーブル, ワイヤー, 電線, アダプター, コネクター, ビデオ, オーディオ機器, パソコン, キーボード, ヘッドフォン, スピーカー, ハブ, 三脚, スキャナー, ファックス, ネットワークカメラ, エアコン, 髭剃り, 空気清浄器
繊維・布	ボタン, ジッパー, ラベル, パイエット(舞台衣装, 婦人服などのぴかぴか光る飾り, スパンブルともいう), 装飾品, パジャマ, プリント布
車両	ワイヤーハーネス, プロテクター, ケーブル, シリンダー, 鍵, モーター, オートバイ, ヒーターセンサー, ホース, プラグ, 伝動機構, キャップ, ベアリング, 換気ホース, ガスケット, カバーホール(cover hole), 灰皿, 喫煙セット, 乗客リフト, 風防ガラスストッパー, 騒音制御, カーマット, スピーカー, ラバーパーツ
医療機器	人工呼吸器, 血液バッグ, 血小板バッグ, 透析装置, 動脈チューブ, 静脈チューブ, 輸血チューブ, 光学フィルム, 診断機器
その他	研磨パッド, ゴーグル, 防護具, 防護メガネ, バルブ, ゴム(金属)補修用PVC製品, 接着剤(ラベル, フィルム)

## 4. スクリーニング装置の開発

EU RoHS指令において、4種のフタル酸エステルが使用禁止になることから、電気電子製品の製造者は期限までに含有部品を特定して削減しなくてはなりません。フタル酸エステルは3項で述べたように、様々な製品に使用されています。そのため従来の分析法では、有機溶媒にフタル酸エステルを抽出させて、その後、ガスクロマトグラフ質量分析装置で分離・定量する方法が一般的でした。近年、樹脂などを直接加熱して分析成分を気化させて、その気化したガスを直接ガスクロマトグラフ質量分析装置で分析する方法も利用されるようになりました。分析にかかる時間と手間は簡易化されましたが、化学分析を専門とする指導者・作業者が必要、またヘリウムガスを使用するため、配管やボンベの設置が必要でした。

プラザ工業では、製造現場でスクリーニングを行い、製品への混入を防止するため、様々な方法を模索してきました。その検討を進める中で、日立ハイテクサイエンスにおいて、製造現場で利用できることを目的としたスクリーニング装置の開発が行われました(図4, 5)。

### <特長>

- 前処理不要: 試料を0.2 mg程度にカットし、セットするのみ
- 高スループット: 1サンプルの測定にかかる時間は10分以下
- 測定負荷の低減: オートサンプラーによる50検体の自動測定
- 低メンテナンスコスト: ヘリウムガスやガスクロマトグラフのカラムが不要

## <概要>

試料の一定量を切り出しサンプル容器にセットし、加熱炉内でフタル酸エステルを気化させる。気化したフタル酸エステルをそのままイオン化し質量分析する。

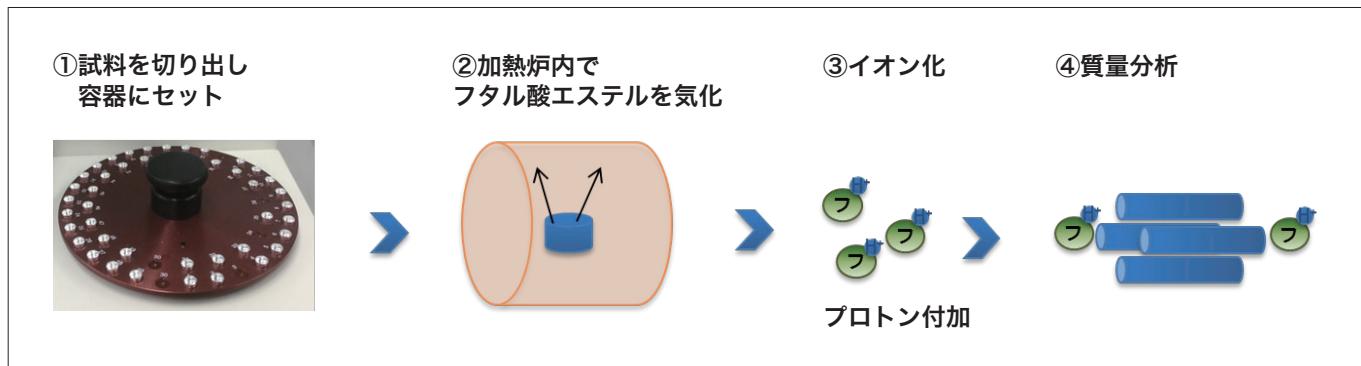


図4 スクリーニング装置 測定手順(概要)

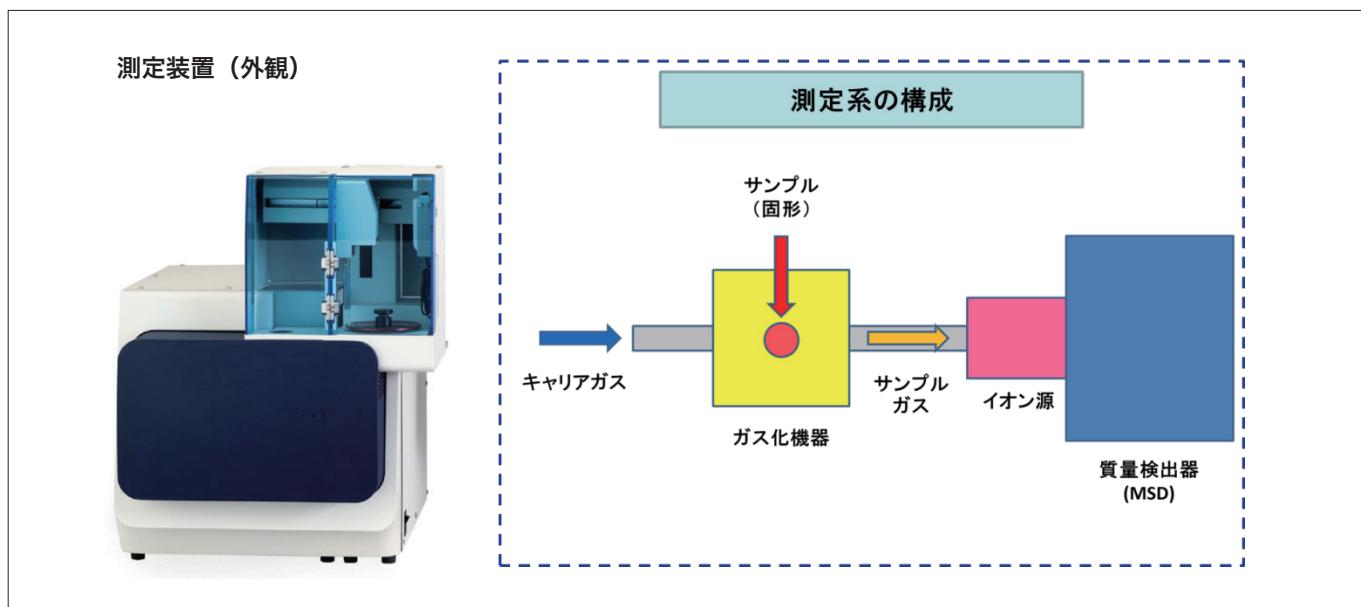


図5 測定装置(外観と測定系の構成)

下記の測定例(図6)を見ると、4種のフタル酸エステルのうち、DBP、BBP、DEHPが非常に感度良く、短時間で測定されていることがわかります。

この装置の特性として、DIBPについては、DBPとDIBPは同重体であるため、それぞれを分離して定量することだけはできません。

しかし、製造製品に規制対象物質を含有させない目的としては、ともに規制対象物質であるため、DBPとDIBPを区別せず、DBP・DIBP総量としてスクリーニングすることで問題ないと考えられます。

同重体の分離はできなくても、短時間でまたヘリウムガス(ボンベ)・カラム不要であることにより、ガス配管も必要がなく、どこへでも設置ができるようになりました。この装置は、製造業において非常に利用価値が高いスクリーニング装置として開発されました。

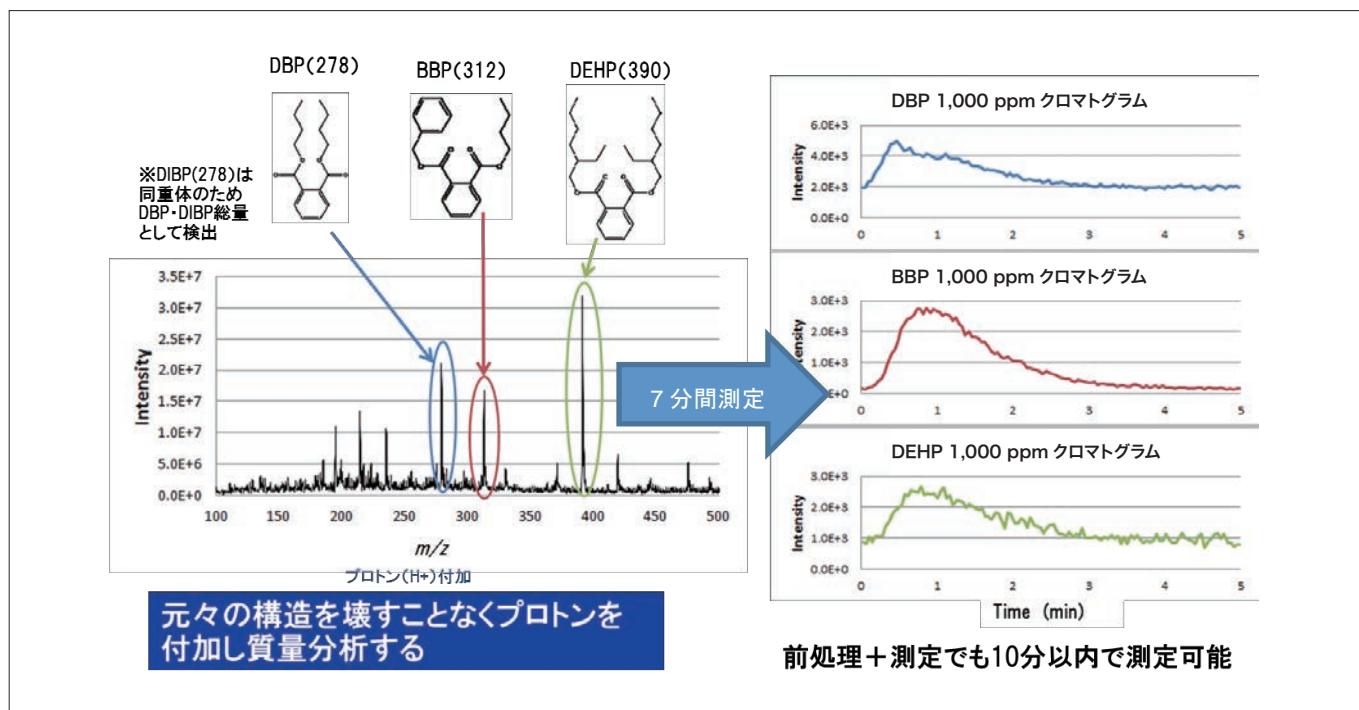


図6 ポリスチレン中のDBP, BBP, DEHP測定例

## 5. 削減への取り組み

プラザー工業では、プラザーグループ グリーン調達基準書<sup>4)</sup>によって4種のフタル酸エステルの含有量調査を行っています。しかし、フタル酸エステルは移行性（接触により他の成形品から物質が移動する性質）を持つ恐れがあることから、移行や混入、コンタミネーション（汚染）などによる外的な意図しない要因により製造工程に入り込む恐れが指摘されています<sup>5)</sup>。そのため含有の疑わしい部品について調査が必要となります。

プラザー工業と日立ハイテクサイエンスは、効率的かつ適正にスクリーニングを行うために、今回開発したスクリーニング装置と、溶媒抽出法、一般的な加熱脱着式もしくは熱分解ガスクロマトグラフ質量分析装置による方法を比較検討しました。その結果が次の事例です（表4）。

日立ハイテクサイエンスが開発したフタル酸エステルスクリーニング装置と、従来の分析法として利用されている溶媒抽出によるガスクロマトグラフ質量分析装置のデータを比較した場合に、両者のデータは、特に遜色がないことがわかり、スクリーニング法として、利用可能であることがわかりました。

またこの事例では、もう1つ重要なことがわかりました。フタル酸エステルであるDEHPは、樹脂モールド部分に数万ppmと多量に含まれており、同じような軟質性がある電線被服部分は、EU RoHS指令の規制値である1,000 ppm以下であることがわかりました。この事例の測定において、溶媒抽出によるガスクロマトグラフ質量分析装置を外部試験機関に依頼した場合、溶媒抽出の手間にも時間がかかるため、結果を得るために数日かかりました。日立ハイテクサイエンスで開発したフタル酸エステルスクリーニング装置では、1サンプル10分以内のため、今回の測定においても20分以内で結果の確認ができており、製造現場で利用するためには、非常に有効であることが実証できました。

EU RoHS指令では、物理的に分離可能な均質材料単位での規制値の遵守を求められます。プラザー工業では、グリーン調達における調査データだけでなく、蛍光X線分析装置を使用したカドミウム、鉛、水銀、クロム、臭素の各元素をスクリーニングしてコンプライアンス遵守に努めています。今後は、新規EU RoHS規制物質削減への取り組みとして、フタル酸エステルスクリーニング装置を活用することで、新規規制のコンプライアンス遵守においても、大きく貢献できることが確認できました。

表4 スクリーニングの比較検討例

測定対象 DEHP (図7)	日立ハイテクサイエンス フタル酸エステル スクリーニング装置 <sup>(*)1</sup>	溶媒抽出による前処理後 ガスクロマトグラフ 質量分析装置 <sup>(*)2</sup>	一般的な加熱脱着式もしくは 熱分解ガスクロマトグラフ 質量分析装置 <sup>(*)2</sup>
樹脂モールド	40,000 ppm 以上	64,000 ppm	1,500 ppm 以上
電線被覆	213 ppm	89 ppm	500 ~ 1,500 ppm

(※1) 日立ハイテクサイエンス測定結果

(※2) 外部分析機関への依頼試験による測定結果

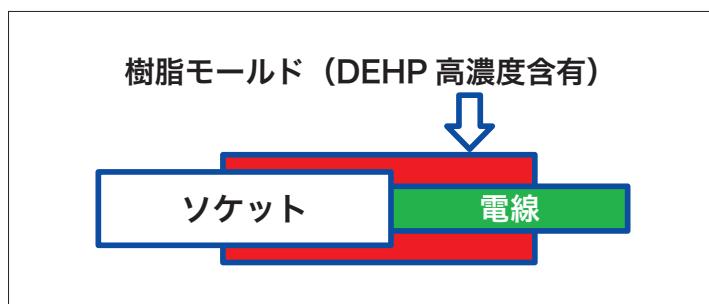


図7 サンプル模式図

## 6. 更なる規制に向けて

EUでは、スウェーデン化学物質局(KemI)が、次回のEU RoHS指令で制限する物質として中鎖塩素化パラフィン(C14～C17、略称MCCP)を提案しました。既に「MCCPをRoHSで制限すべき」とのレポート<sup>6)</sup>が公開されており、近くEU RoHS指令規制物質追加のドシエが公開される可能性があります。このように規制対象は、単一化合物から複雑な質量範囲を含む物質群に拡がり始めています。日立ハイテクサイエンスが開発したスクリーニング装置は、サンプルを直接イオン化して、そのまま質量分析を行うため、複雑な質量範囲を含む物質群の測定においても、各成分を測定することが期待でき、将来更なる規制が増えた場合においても、装置を応用して使用することが可能であると考えられます。

## 7. まとめ(取り組みのポイント)

今後、日立ハイテクサイエンスのフタル酸エステルスクリーニング装置を導入した場合の取り組みのポイントをまとめました。

### ① 環境負荷の削減効果(CO<sub>2</sub>削減など)

3節で述べたように、フタル酸エステルは可塑剤としての機能により、様々な用途に利用されています。今回EU RoHS指令で使用が制限される4種のフタル酸エステルは、EU REACH規則において成形品中の認可対象候補物質リスト(Candidate List)に収載されており、年間1トン以上のEUへの輸入者は届出が必要です。更にDIBPを除く3種(DBP, BBP, DEHP)については、各国で玩具や育児用品への使用が禁止されており、世の中では人の摂取による影響懸念が払拭されていません。今回の取り組みにより4種のフタル酸エステルのスクリーニングシステムが構築されることにより、世界の電気電子製品に含有する4種のフタル酸エステルの削減に貢献することができ、環境負荷の削減効果は極めて高いと考えられます。また今回のスクリーニング装置は、溶媒抽出を行わないため、分析において多量の有機溶剤の使用を行わないことからも、環境負荷の削減効果として大きく貢献しています。

### ② 技術の新規性

プラザー工業と日立ハイテクサイエンスは、EU RoHS指令の新規物質追加の情報を工業会活動などから入手して最新の化学物質含有規制に対応できるよう努めてまいりました。2015年6月4日付で、EU RoHSで4種類のフタレートが禁止されることを内容とする官報が発出され、2019年7月22日以降にEUに上市される電気電子機器への使用が制限されました。官報発出前から既に検討を開始していた点においてテーマの新規性が高いと考えられます(医療機器および監視制御機器は2021年7月22日以降に使用制限)。

そのような状況の中、2017年7月13日から販売を開始した日立ハイテクサイエンスのフタル酸エステルスクリーニング装置(HM1000)は、短時間(1サンプル10分以内)・低成本(一般的な加熱脱着式もしくは熱分解ガスクロマトグラフ質量分析装置との比較)・低ランニングコスト(ヘリウムガス不要、カラム不要、50サンプル連続分析)で世界中の製造現場で使用できる装置であるため、技術的な新規性が極めて高いと考えられます。

### ③ エネルギー消費の削減効果

今回開発したフタル酸エステルスクリーニング装置は、従来の質量分析において一般的に使用されるヘリウムガスを使用せず、窒素ガスを利用します。また窒素ガスは空気中に大量に存在することから窒素ガス発生装置を利用した場合、窒素ガスボンベも不要となります。

したがって、窒素ガスで稼動することを想定した日立ハイテクサイエンス製フタル酸エステルスクリーニング装置は、世界のヘリウムガス削減に絶大な効果が期待できます。

ヘリウムガスは、世界的にも天然ガスの副産物として産出されますが、米国が世界の70%以上を生産しており、また政策により輸出量が制限されることもあります。一方、ヘリウムガスは、その特性から医療や産業用途として欠かせない貴重な資源です。2012年から2013年には世界的にヘリウムガス不足となり、日本国内においても安定した供給が出来なくなる事態も生じました。そのような貴重なヘリウムガスを分析に使用せずに、空気中から分離精製可能な窒素ガスを使用することで、ヘリウムガス製造におけるエネルギー消費の削減効果は計り知れません。

2006年からEU RoHS指令の対応としては、蛍光X線分析装置がスクリーニング装置として利用されています。2010年版ものづくり白書(ものづくり基盤技術振興基本法第8条に基づく年次報告)において、**2008年度の蛍光X線分析装置の国内販売台数は1,000台<sup>7)</sup>**とされています。そのため今回の規制物質追加により、蛍光X線分析装置と同様の台数が年間に導入されると想定した場合、分析用のガスとしてのヘリウムガスは、単純計算で84,000 m<sup>3</sup>となります(ヘリウムガスの使用量は表5参照)。2013年度の日本のヘリウムガス輸入量<sup>8)</sup>が1,100万 m<sup>3</sup>であることから、これは輸入量の約0.8%に相当します。

従来から使用されているガスクロマトグラフ質量分析装置は、基本的に稼動中はヘリウムガスを流し続ける必要があります。もしも世界的にガスクロマトグラフ質量分析装置の使用が増加した場合、ヘリウムガスの不足が懸念されます。貴重な資源であるヘリウムガスを使用しないことは、エネルギー消費のみならず世界の資源消費の削減にも繋がると考えられます。

### ④ 技術の発展性・汎用性

化学物質規制は年々厳しくなってきており、6節で述べたように、単一化合物から複雑な質量範囲を含む物質群にも拡がり始めています。ガスクロマトグラフによる分離は同重体を分離できる利点がありますが、反面、ピークが複雑になり過ぎて炭素鎖毎の同定が困難となります。しかし、今回の装置のように質量分析装置だけを使用した場合、例えば塩素化パラフィンであれば、炭素鎖毎のイオン化ピークが得られることで、短鎖(C10～C13)、中鎖(C14～C17)の確認が期待でき、更に**他の分離困難な化合物のスクリーニングへの技術の発展性**があります。また装置の使用方法としては、0.2 mgをセットするだけで、自動分析ができる、成分は、分子イオンピークだけを確認すればよいので、**化学分析の専門家でなくても利用できるなど、汎用性も極めて高いと考えられます。**

### ⑤ コストダウン効果

今回の装置は、熱分解部分と質量分析装置だけであるため、ガスクロマトグラフが不要です。そのため②技術の新規性の項や、③のエネルギー消費の削減効果の項で述べたように、**低成本(一般的な加熱脱着式もしくは熱分解ガスクロマトグラフ質量分析装置より安価)・低ランニングコスト(ヘリウムガス不要、カラム不要、50サンプル連続分析)**による削減への取り組みが実施可能となります(表5)。

### ⑥ その他

今回の装置では、測定サンプル情報を入力する試料テーブル設定において、インポート機能を備えています。そのため2006年以降EU RoHS指令の対応として使用されている蛍光X線分析装置とデータ連携を行うことで、測定サンプルの情報をフタル酸エステルのスクリーニング装置と共有することが可能です。また蛍光X線分析装置では元素情報しか検出できませんでしたが、今回、特定臭素系難燃剤であるDeca-PBDEの測定も想定しています。

そのため従来の蛍光X線分析装置とセットで使用することで、測定作業の省力化だけでなく、EU RoHS指令に対する含有化学物質規制全体への対応が一括管理可能となることの利点が極めて大きいと考えられます(図8)。また将来の規制においても対応検討が可能であることから、製造業として安心してお客様に安全な製品を届けることが可能となることが最大の効果であると認識しています。

表5 コストの比較

	日立ハイテクサイエンス フタル酸エステル スクリーニング装置	一般的な加熱脱着式もしくは 熱分解ガスクロマトグラフ 質量分析装置
前処理 + 測定時間	10 min/サンプル	約40 min/サンプル
1日当たり測定数 (1日 : 24 h)	144サンプル	36サンプル
オートサンプラー	50サンプル (8時間連続測定)	48サンプル (32時間連続測定)
分析用ガス	窒素ガス *ポンベ不要、窒素発生装置使用	ヘリウムガス
年間の分析用ガス ランニングコスト (1台)	電気代のみ	ヘリウムガス $7\text{ m}^3 \times 43,000\text{円} \times 12\text{本} = 516,000\text{円}$ (84 m <sup>3</sup> ) *参考価格(日本)



図8 日立ハイテクサイエンスの分析装置によるRoHS指令遵守イメージ

## 参考文献

- 1) EU Rapid Alert System.  
[https://ec.europa.eu/consumers/consumers\\_safety/safety\\_products/rapex/alerts/?event=main.search](https://ec.europa.eu/consumers/consumers_safety/safety_products/rapex/alerts/?event=main.search)
- 2) EU REACH における成形品中の認可対象候補物質リスト (Candidate List) 情報 .  
<http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/candidate-list-substances-in-articles-table>  
1 ton／年以上 SVHC である Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を含む輸入品 (成形品) が ECHA に届出されたリスト.  
<https://echa.europa.eu/documents/10162/b3ffe563-f9c7-415f-96b3-6e22d9b3c494>
- 3) 「【環境特集】欧州化学物質庁 (ECHA) と REACH 規制についての Q&A」, NEDO 海外レポート, 1006号, 2007.9.5.  
<http://www.nedo.go.jp/content/100105111.pdf>
- 4) ブラザー工業, 「グリーン調達の考え方」, 「ブラザーグループ グリーン調達基準書」.  
[http://www.brother.co.jp/eco/regulation/green\\_procurement/index.htm#gpsj](http://www.brother.co.jp/eco/regulation/green_procurement/index.htm#gpsj)
- 5) JEITA 環境部会, EU RoHS 関連情報 .  
<http://home.jeita.or.jp/eps/euRoHS.html>  
「RoHS 制限対象フタル酸エステルに関する注意点 詳細版」.  
<http://home.jeita.or.jp/eps/pdf/eu201608092.pdf>
- 6) スウェーデン化学物質局 (KemI), Assessment of the risk reduction potential of hazardous substances in electrical and electronic equipment on the EU market, 4.3項, p.13.  
<https://www.kemi.se/global/pm/2015/pm-7-15.pdf>
- 7) 「第1部 ものづくり基盤技術の現状と課題—第1部付論 II 主要製造業の課題と展望—10 分析機器産業」, 2010年版ものづくり白書, p.255.  
<http://www.meti.go.jp/report/whitepaper/mono/2010/g00601a13j-2.pdf>
- 8) 経済産業省, 平成25年度石油産業体制等調査研究(ヘリウムを含有する天然ガスに関する調査) 報告書 .  
<http://www.meti.go.jp/metilib/report/2014fy/E003867.pdf>

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/>

# 高性能FIB-SEM複合装置「Ethos NX5000」

"Ethos NX5000" High-Performance FIB-SEM

鈴木 秀和

## 1. はじめに

(株)日立ハイテクノロジーズ(以下、日立ハイテクノロジーズ)のコア技術である世界トップレベルの高輝度冷陰極電界放出型電子銃と新開発の電磁界重畠型複合対物レンズ(以下、Dual Modeレンズ)を搭載した、高性能 FIB<sup>(\*)1</sup>-SEM<sup>(\*)2</sup> 複合装置「Ethos NX5000」を開発しました。

FIB-SEM 複合装置は、試料の加工を行う FIB 鏡筒と、高倍率で観察を行う SEM 鏡筒を同一試料室に配置し、試料表面や試料内部の特定箇所の微細構造や組成を高倍率で解析することができます。半導体をはじめ、ナノテク、材料、医学・生物など幅広い分野において、試料の断面観察・分析や TEM<sup>(\*)3</sup>用薄膜試料作製に活用されています。特に近年、微細化が進む最先端デバイスや高機能ナノ材料の研究開発現場においては、その微細構造・組成解析に不可欠となる高品位な TEM 用薄膜試料を作製する装置として重要な役割を担っています。

「Ethos NX5000」の開発コンセプトは「高分解能観察」、「究極の TEM 試料作製」、「多用途」です。そこで、低加速電圧での高分解能 SEM 観察を可能とし、ACE<sup>(\*)4</sup> 技術(FIB による断面加工の際に発生する加工スジ<sup>(\*)5</sup>を抑制する技術)を組み合わせることで、加工ダメージが小さく、加工断面が均一で高品位な TEM 用薄膜試料作製を実現しています。また新開発の大容量試料室には、EDS<sup>(\*)6</sup> や EBSD<sup>(\*)7</sup>などの各種解析オプション用ポートを設置するとともに、直径 150 mm サイズの試料の全面で加工・観察ができる新開発の大型試料ステージを搭載しています。これにより、最先端半導体デバイスだけでなく生物組織から鉄鋼などの磁性材料まで、さまざまな試料の複合解析に対応しています。

本稿では高性能 FIB-SEM 複合装置「Ethos NX5000」の特長について説明します。



図1 高性能FIB-SEM複合装置「Ethos NX5000」

表1 主な仕様

SEM 光学系	
電子源	冷陰極電界放出形
加速電圧	0.1 ~ 30 kV
分解能	1.5 nm@1 kV, 0.7 nm@15 kV (HR モード)
FIB 光学系	
加速電圧	0.5 ~ 30 kV
最大ビーム電流	100 nA
分解能	4.0 nm@30 kV
ステージ	
駆動範囲	X : 0 ~ 155 mm, Y : 0 ~ 155 mm, Z : 0 ~ 16.5 mm, T : -10 ~ 59°, R : 360° * 試料ホルダにより駆動範囲に制約がある場合があります。
試料サイズ	最大 150 mm 径

## 2. 新型電子ビーム光学系

新型電子ビーム光学系の開発コンセプトは高分解能と観察拡張性の両立です。高分解能化を実現するために、高輝度冷陰極電界放出型電子銃と新開発の Dual Modeレンズを実装しました。この Dual Modeレンズはシングルポール(HR) / アウトレンズ(FF)の二つの機能を有しています。HRモードでは試料の高分解能観察ができます。FFモードではFIBによる試料加工の様子をリアルタイムで観察することができます。

また SEM 観察の拡張性を実現するために、SEM 鏡筒内部に SE (U) / BSE (U) / BSE (L) の3つの検出器を実装しました。更に試料室にも SE (L) 検出器が実装されており、同時に4つの検出器の画像を表示することができます。これにより、二次電子による形状コントラストや反射電子による組成コントラストの同時観察が可能になりました。

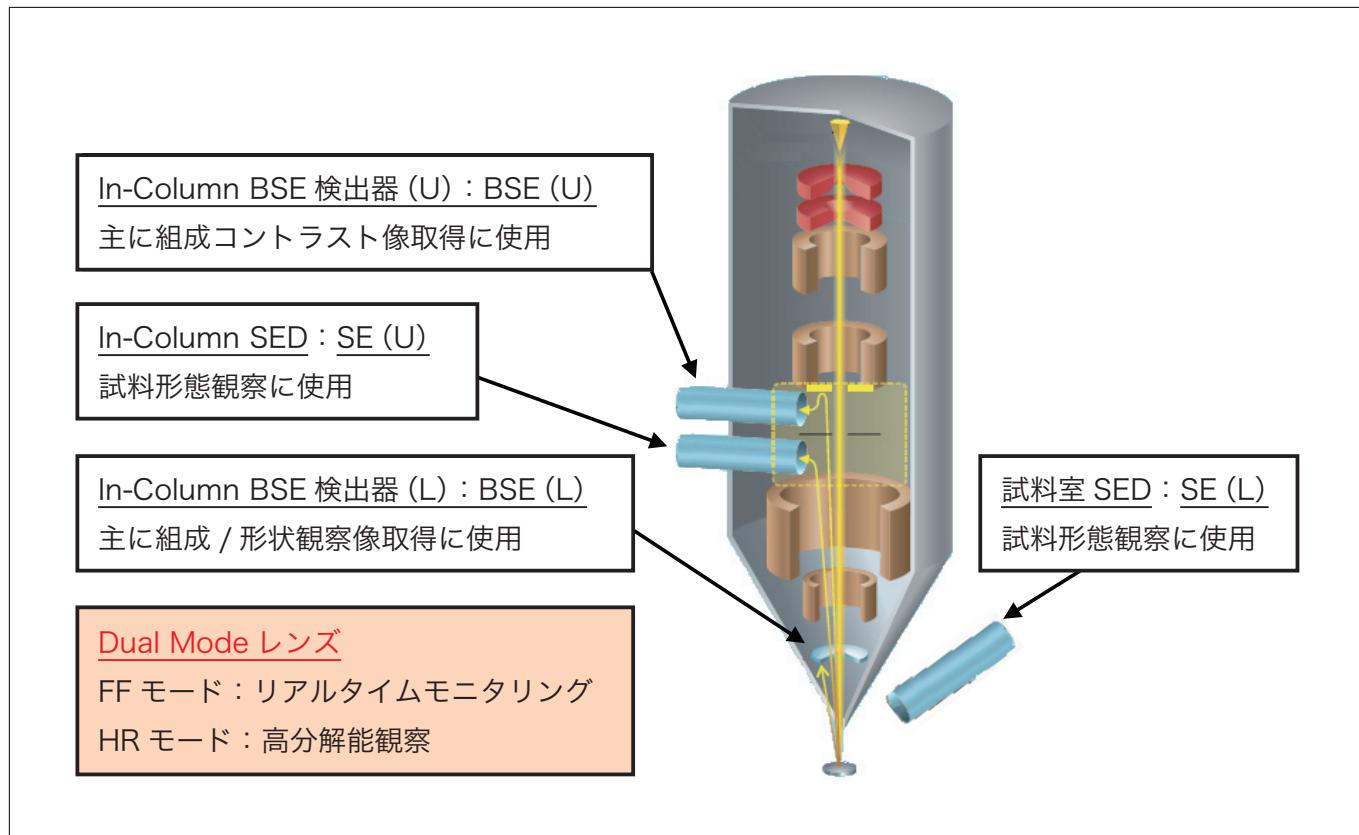


図2 新型電子ビーム光学系の模式図

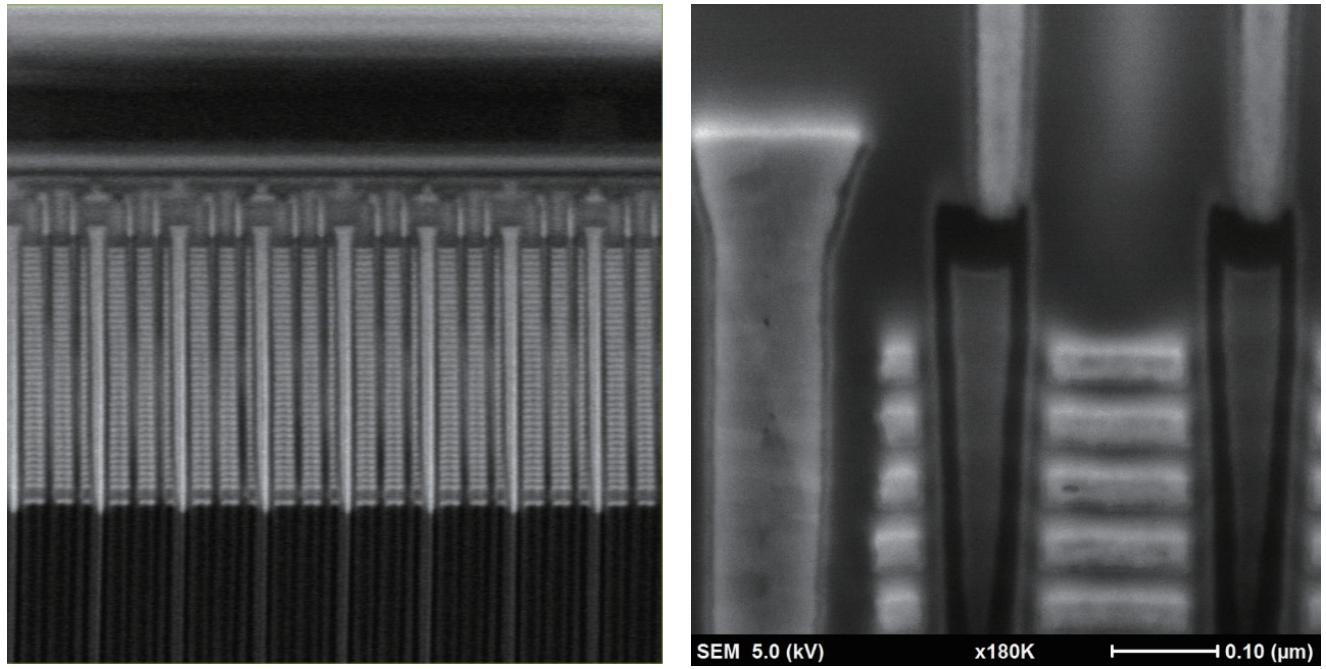


図3 (左)FFモードによるリアルタイム観察像(Acc : 2 kV, 視野サイズ : 6  $\mu\text{m}$ )  
 (右)HRモードによる高分解能観察像(Acc : 5 kV, 視野サイズ : 0.6  $\mu\text{m}$ )  
 試料：市販品の3D-NANDフラッシュメモリ

### 3. トリプルビーム<sup>®</sup><sup>(\*8)</sup>とACE 技術による高品位TEM試料作製

「Ethos NX5000」には、高品位な TEM 試料作製を支援する機能として「トリプルビーム」と「ACE 技術」を搭載しています。本機能は従来機種にも搭載しており、幅広い分野での TEM 試料作製現場で高い評価をいただいています。

日立ハイテクノロジーズ独自の装置構成であるトリプルビームは、FIB 加工によって発生した TEM 試料上のダメージ層を低加速アルゴン・キセノンビーム (ArIB, XeIB) によるエッチング加工で除去する技術です。トリプルビームでは、FIB, EB, ArIB (XeIB) が試料上的一点で交差する構造になっており<sup>1)</sup>、FIB, ArIB (XeIB) 加工の結果をその場で SEM 観察することができます。これによって TEM 試料のダメージ除去の作業効率を大幅に向上させることができます。

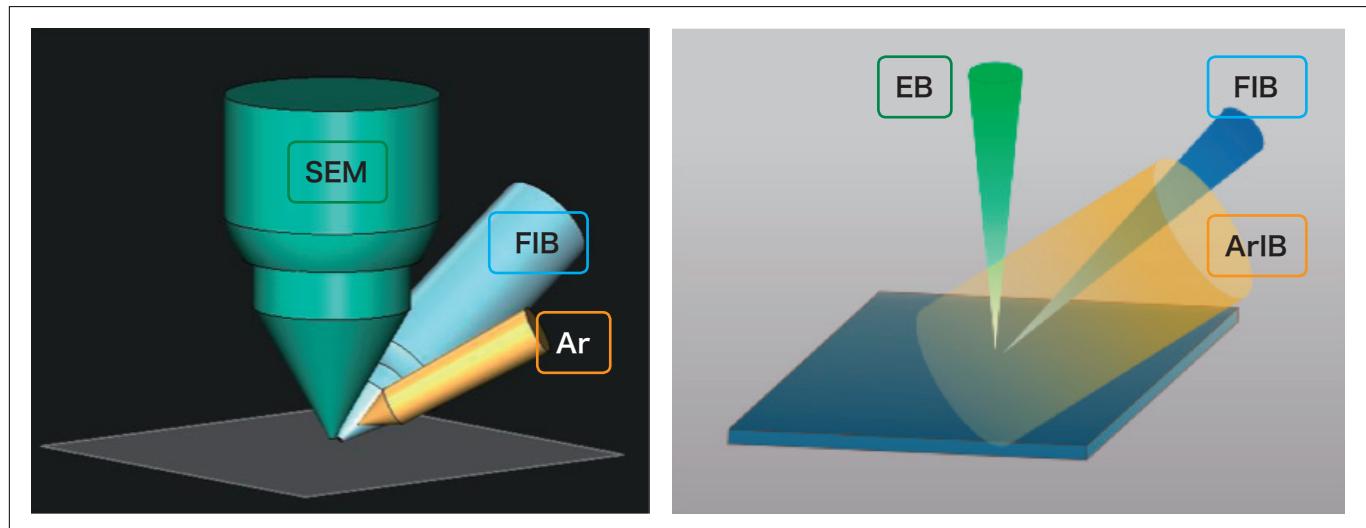


図4 トリプルビーム概要図

ACE 技術とは、TEM 試料の作製過程で発生する試料断面に現れるカーテン効果を抑制する技術です。試料内部にエッティングレートの異なる材料が混在する場合、試料の薄片化に伴って試料断面に加工スジが発生します。これをカーテン効果と呼びます。観察対象領域上にカーテン効果の加工スジが重なると、TEM 観察像に悪影響を及ぼします。そこで Ethos NX5000 には、ACE 技術の一環である回転軸付マイクロサンプリング<sup>®</sup>(\*9) を用いた解析試料の姿勢制御技術<sup>2)</sup>を搭載しています。この技術を用いることで、薄片試料の TEM メッシュへの固定時の姿勢を制御することができます。これによって試料への FIB の入射方向を制御することが可能になり、カーテン効果による影響を抑制することができます。

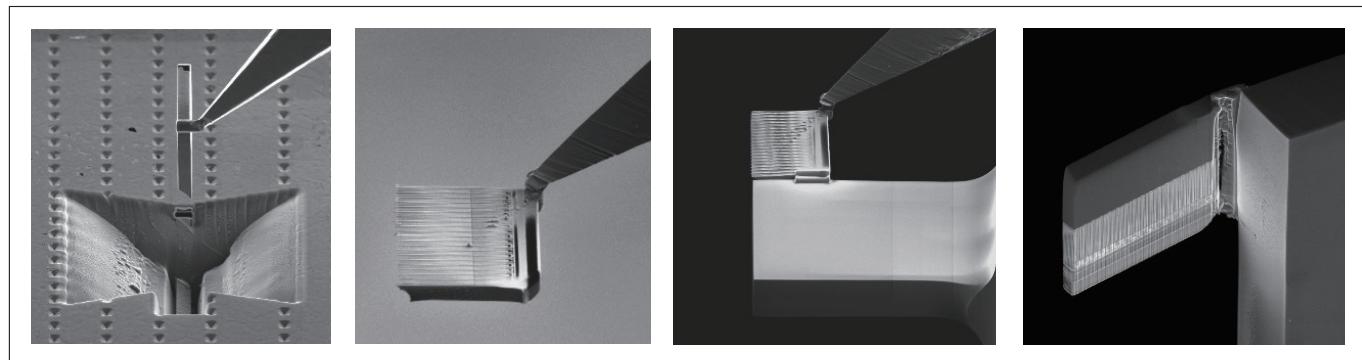


図5 回転軸付きマイクロサンプリングを用いた薄片試料の姿勢制御の様子

#### 4. 新型プラットフォーム

「Ethos NX5000」では SEM による各種解析を可能とするために拡張性の高いプラットフォームを開発しました。従来の FIB-SEM 複合装置「NX2000」では、FIB 鏡筒が垂直、SEM 鏡筒が斜めに試料室上に配置していたため、SEM 鏡筒の周辺に各種オプション用ポートをレイアウトすることができませんでした。新型プラットフォームでは、SEM 鏡筒を垂直に試料室上に配置することで、13 個の各種オプション用ポートを準備することができました。それによって EDS、EBSD、挿入型 CL、挿入型 STEM 検出器、挿入型 BSD 検出器などの SEM による解析用オプションの搭載が可能となりました。

また新開発の 150 mm 対応 5 軸ステージによって、最大 6 インチウェハの全面観察が可能な上、各種試料ホルダによって幅広いサンプルサイズに対応することが可能になりました。

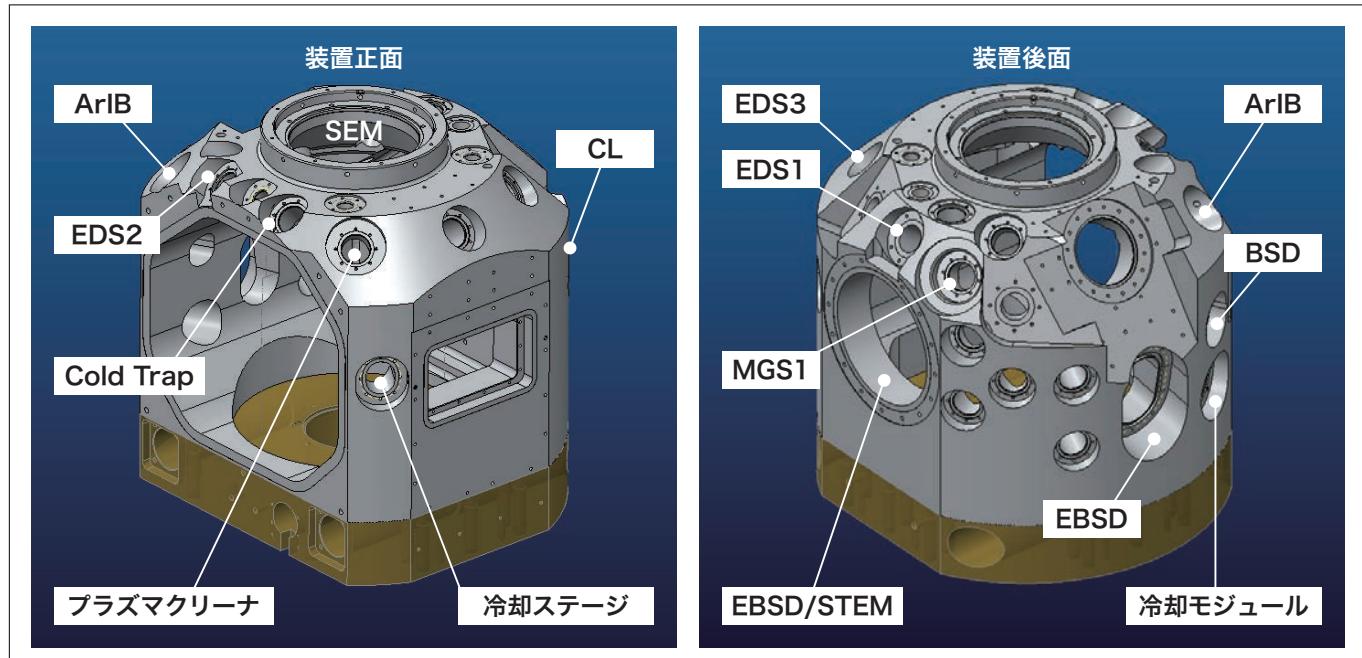


図6 Ethos NX5000 の試料室のポートレイアウト

## 5. まとめ

今回開発した「Ethos NX5000」は、2014年9月発売の「NX2000」、2015年6月発売の「NX9000」に続く、日立ハイテクノロジーズと(株)日立ハイテクサイエンスの共同開発製品です。

今後も両社がこれまでに培ってきた SEM・FIB 技術を融合することで、最先端分野の研究開発に貢献してまいります。

(\*1) FIB : Focused Ion Beam (集束イオンビーム加工装置)

(\*2) SEM : Scanning Electron Microscope (走査電子顕微鏡)

(\*3) TEM : Transmission Electron Microscope (透過電子顕微鏡)

(\*4) ACE : Anti Curtaining Effect : (カーテン効果 (加工スジ) 抑制機能)

(\*5) 加工スジ : FIB で加工を行う際、試料の構造や材質により加工レートが異なることが原因で表面に発生する凹凸。

(\*6) EDS : Energy Dispersive X-ray Spectrometer (エネルギー分散型 X 線分析装置)

(\*7) EBSD : Electron Backscatter Diffraction (電子線後方散乱回折分析装置)

(\*8) トリプルビーム® は(株)日立ハイテクサイエンスの日本国内における登録商標です。(商標登録第5136729号)

(\*9) マイクロサンプリング® は(株)日立製作所の日本国内における登録商標です。(商標登録第4399203号、商標登録第4401176号)

### 参考文献

- 1) 高橋春男 他, 日本顕微鏡学会 第63回学術講演会 (2007).
- 2) 近藤和茂 他, 第28回 LSIテスティングシンポジウム予稿集 (2008).

### 著者紹介

鈴木 秀和

(株)日立ハイテクサイエンス BT 設計部 BT 設計一グループ

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/>

# 紫外可視近赤外分光光度計UH4150 自動測定システムの紹介

Ultraviolet-visual-near-infrared (UV-Vis-NIR) spectrophotometer UH4150 Automatic Measurement System

岩谷 有香

## 1. はじめに

紫外可視近赤外分光光度計 UH4150 は、紫外領域(200 ~ 380 nm), 可視領域(380 ~ 780 nm), 赤近外領域(780 ~ 3,300 nm<sup>(\*)1)</sup>) の光を利用して試料の透過率, 反射率, 吸光度を測定する装置である。主に材料分野において学術, 研究開発, 品質管理等の多岐にわたる測定に利用されている。今回紹介する自動偏光測定システム, 自動角度可変測定システム, 自動 X-Yステージ測定システムは紫外可視近赤外分光光度計 UH4150 をベースとして, 特定の測定法の自動化を図った。これら自動測定システムは従来法<sup>(\*)2)</sup>と比較し, 測定値の再現性向上や高い作業効率を実現した。

次に各自動測定システムについて述べる。自動偏光測定システムは偏光子を自動で測定するシステムである。偏光子はある一方向の光を取り出すことが可能で, 偏光サンガラスや液晶 TV 等広い分野で使用されており, 偏光試料のパラレル(平行), クロスニコル(直交)を測定することにより性能を評価する。クロスニコルの設置を手動で行うと, 偏光試料の僅かな設置角度の違いが測定結果に影響を与える, 設置再現性が低くなることがある。自動偏光測定システムはクロスニコルの状態を自動検出するため, 再現性の高い測定が可能となる。

自動角度可変測定システムは入射角5°~70°における正反射スペクトルおよび入射角0°~70°の透過スペクトルを自動で測定する。品質管理や研究開発において, 多数の入射角度や検体の測定が必要な場合, サンプル入射角や積分球(検出器)角設定の手間を省き, 大幅な実測時間の短縮が可能となる。また, 固定波長における正反射率, 拡散反射(透過)率等の測定も可能である。

自動 X-Yステージ測定システムは測定箇所を予め設定することで, 入射角5°の相対反射スペクトルまたは入射角0°の透過スペクトルを自動で測定する。多くの検体や複数個所の測定が必要な場合, 試料交換の手間を省くことができ大幅な作業時間の短縮が可能である。また, 試料は上置きであるため, フォトマスクやウェハ, ガラス等の大形試料を簡単に設置可能で, 試料の反射 / 透過スペクトルの面内分布測定ができる。



図1 UH4150形分光光度計の外観

## 2. 自動偏光測定システムの特長とアプリケーション

### 2-1. 自動偏光測定システムの特長

- (1) 偏光解消板を内蔵しており、装置の光学特性を含まない測定が可能である。
- (2) 透過率の最も低くなるクロスニコルの状態を最小0.01°単位で自動検出し、再現性の高い測定結果を取得可能である。
- (3) 色彩(X, Y, Z), (L\*, a\*, b\*), (L, a, b), (L\*, u\*, v\*), 色度座標(x, y), 偏光度の算出が可能である。

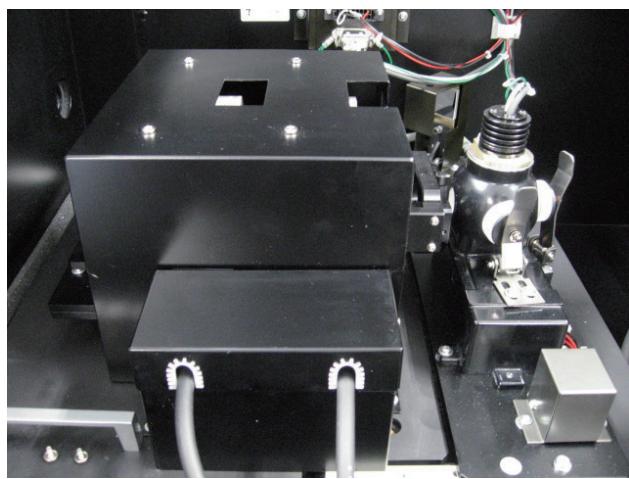


図2 自動偏光測定システムの内部

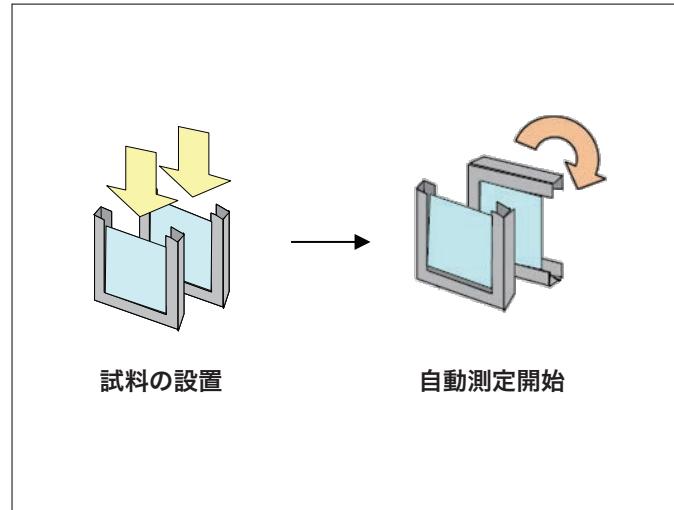


図3 自動測定のイメージ

### 2-2. 自動偏光測定システムのアプリケーション

自動偏光測定システムにて、市販の偏光フィルム2枚を測定した。透過率の最も低くなるクロスニコルの状態を最小0.01°単位で自動検出し(図5)、偏光度を算出した結果、偏光度99.98%が得られた。

また、自動偏光付属装置と従来法<sup>(\*)2</sup>にてクロスニコルの検出を行い、繰り返し5回測定した。その結果、自動偏光付属装置を使用した場合は従来法と比較し高い再現性が得られた(表1)。

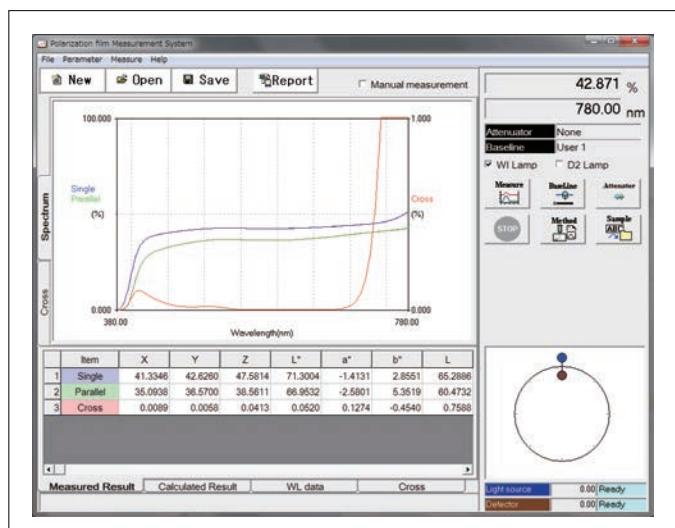


図4 ソフト画面

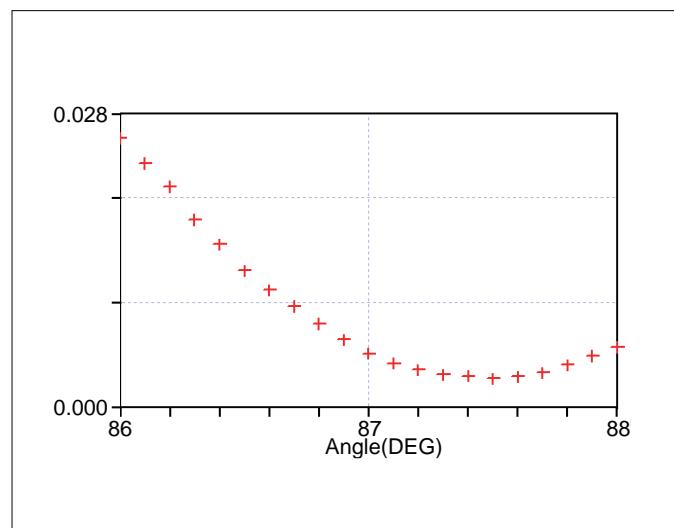


図5 クロスニコル自動検出

表1 繰り返し5回のクロスニコル時の測定結果(波長600 nm)

測定方法	自動偏光付属装置	手動
透過率 (%)	0.0018±0.0002	0.0021±0.0006

### 3. 自動角度可変測定システムの特長とアプリケーション

#### 3-1. 自動角度可変測定システムの特長

- (1) 任意の入射角度における試料の透過(0°～70°)・反射スペクトル(5°～70°)の測定が可能である。
- (2) ベースラインチャンネルを標準で4チャンネル搭載しているため、S, P偏光のベースラインを最初に取得できる。そのため試料の付け替えをせずに、同一箇所のS, P偏光測定が可能である。
- (3) 入射角度を細かく設定する場合は従来法<sup>(\*2)</sup>と比較し、約9割実働時間を短縮することが可能である<sup>(\*3)</sup>。

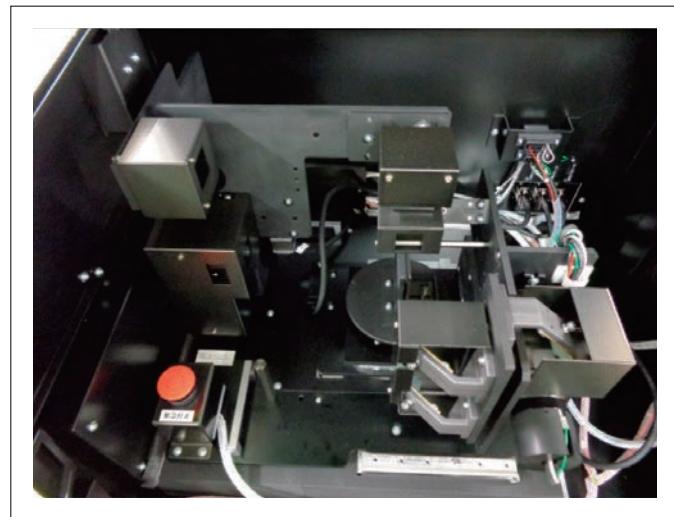


図6 自動角度可変測定システムの内部

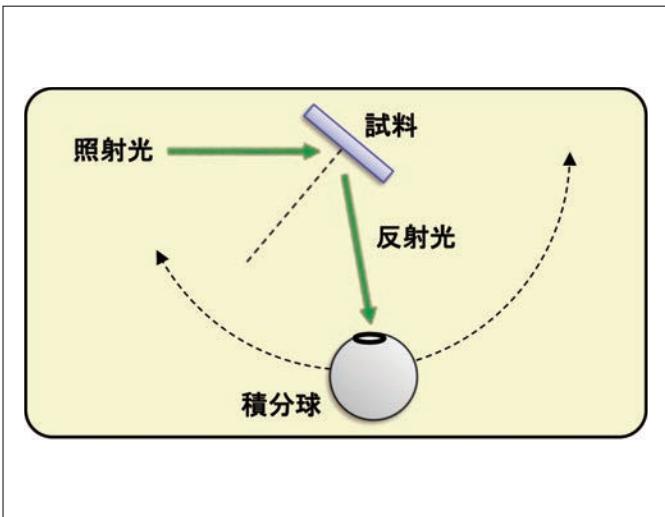


図7 角度可変測定のイメージ

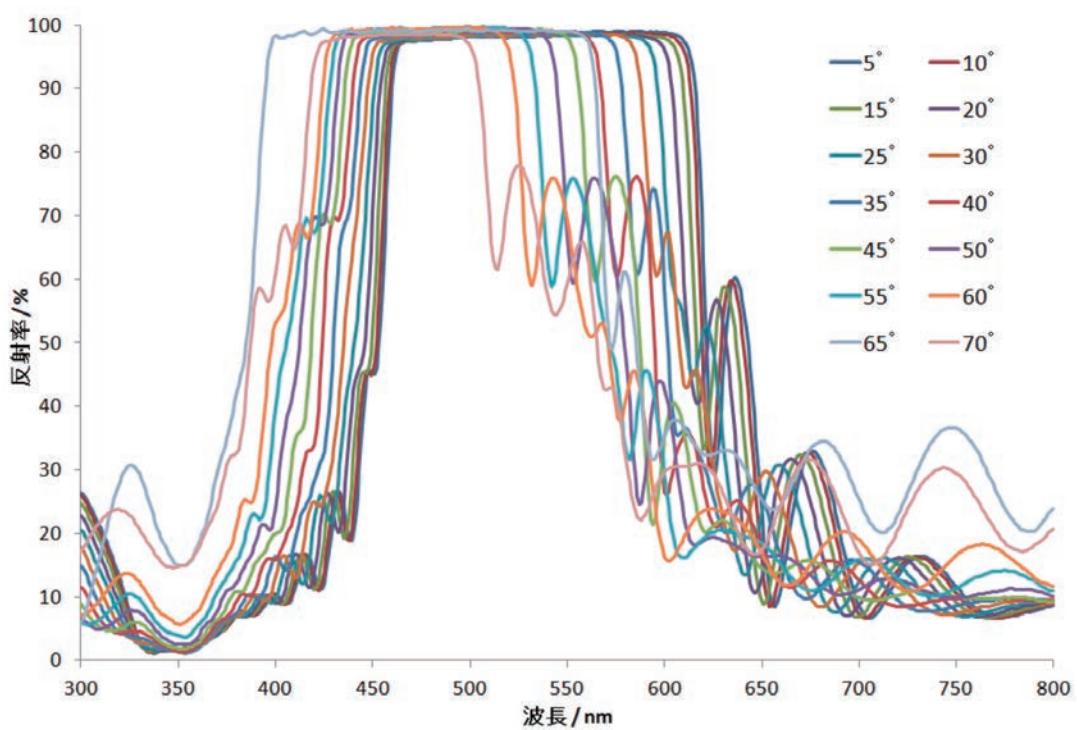


図8 多層膜コートの反射率入射角度依存性測定(S, P偏光の平均)

## 4. 自動X-Yステージ測定システムの特長とアプリケーション

### 4-1. 自動 X-Y ステージの特長

- (1) 自動測定箇所を予め設定することで、入射角5°の相対反射スペクトルまたは、入射角0°の透過スペクトルを自動で測定することが可能である。
- (2) 試料は上置きで設置するため、フォトマスクやウェハ、ガラス等の大形試料を簡単に設置可能で、面内分布を測定できる。
- (3) 複数の試料をサンプル台に設置可能で、サンプルの入替作業を省くことができ、実働時間が約9割削減可能である<sup>(\*)3)</sup>。

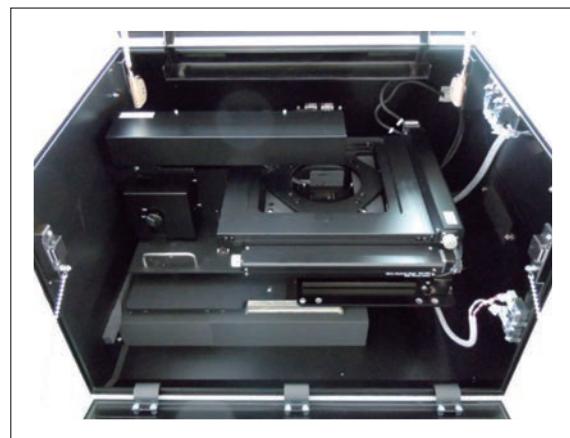


図9 自動X-Yステージ測定システムの内部

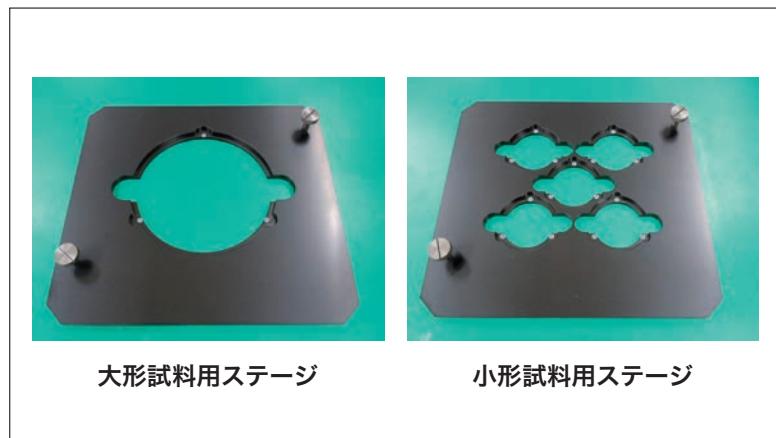


図10 サンプルステージの一例

### 4-2. 自動 X-Y ステージのアプリケーション

同一の誘電体多層膜基板を XYステージ上に25枚並べて透過スペクトルを測定し、再現性を確認した。図11にスペクトル全体、図12では波長620～650 nmの25枚重ね書きした拡大スペクトルを示す。自動 XYステージ測定システムを用いることで、再現性の高いスペクトルが得られることが確認された(表2)。

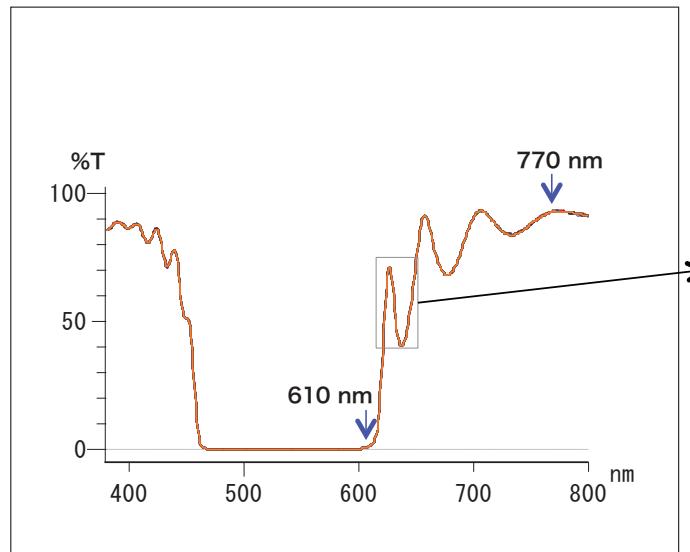


図11 自動XYステージの移動を含む測定再現性(25回)

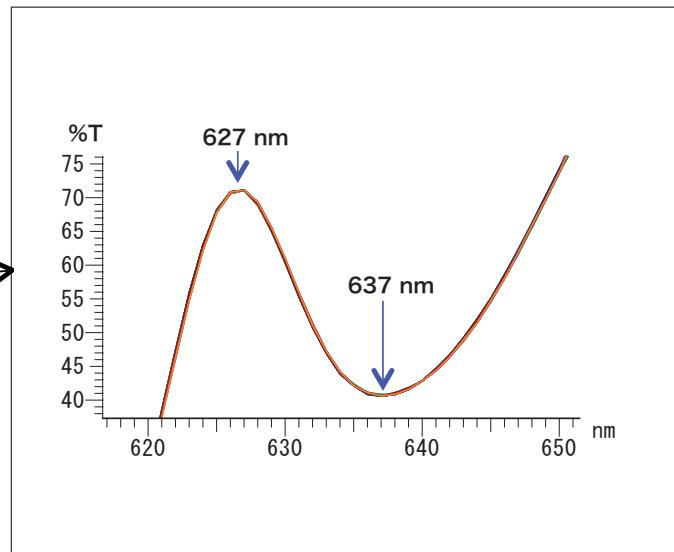


図12 誘電体多層膜の透過スペクトル(拡大)

表2 誘電体多層膜の透過スペクトル

	610 nm	627 nm	637 nm	770 nm
透過率 (%)	1.33±0.01	55.63±0.28	40.70±0.02	92.97±0.12
相対標準偏差 (%)	0.57	0.50	0.06	0.12

## 5. まとめ

紫外可視赤外分光光度計 UH4150を専用装置としてシステム化した自動偏光測定システム、自動角度可変測定システム、自動 X-Yステージ測定システムは特定の測定に注目し、専用機化したシステムである。測定の自動化を図ることにより、測定値の再現性向上や高い作業効率が得られる。

(＊1) 積分球搭載時は 780～2,600 nm。

(＊2) 自動偏光測定システム、自動角度可変測定システム、自動 X-Y ステージの各々の従来法は偏光試料測定付属装置 (P/N:1J0-0207), 角度可変絶対反射付属装置 (任意) (P/N:1J1-0111), 上置き透過 / 反射付属装置 (P/N:134-0107) またはガラスフィルタホールダ (P/N:210-2109)。

(＊3) 実働時間は測定者が装置・サンプルの操作・測定に必要な時間。測定項目や測定角度点数等の条件により異なる。

### 著者紹介

岩谷 有香

(株) 日立ハイテクサイエンス 光学設計部

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/>

# LA8080高速アミノ酸分析計

Model LA8080 High-Speed Amino Acid Analyzer

伊藤 正人<sup>\*1</sup>, 成松 郁子<sup>\*1</sup>, 裴 敏伶<sup>\*1</sup>, 森崎 敦己<sup>\*1</sup>, 鈴木 裕志<sup>\*2</sup>, 福田 真人<sup>\*1</sup>, 八木 隆<sup>\*1</sup>, 大月 繁夫<sup>\*1</sup>, 関 一也<sup>\*1</sup>, 豊崎 耕作<sup>\*1</sup>

## 1. はじめに

アミノ酸分析計は、1958年のD. H. Spackman, W. H. SteinとS. Moore<sup>1)</sup>の発表以降、たん白質、ペプチドのアミノ酸組成分析や医薬品や生体液などのアミノ酸とその類縁物質の分析に広く利用されている。当時、イオン交換クロマトグラフィーとニンヒドリン反応の最先端技術を駆使することにより選択性高く、かつ高速、高精度にアミノ酸を分析することができた。また、液体クロマトグラフィー分野で自動化に成功し、革新的な発展を遂げたことにより記念碑的な研究としても位置づけられている。

昨今、ペプチド系の医薬品が数多く開発されるようになり、その分析法の価値が改めて見直されている。従来からデータの信頼性を追求する食品・動物飼料・健康サプリメントの研究・品質管理部門や、医薬系や呈味の研究などにも分析ニーズがある。このような背景のもと1962年から現在に至るまで日立のアミノ酸分析計<sup>2)</sup>は進歩を続けてきた(図1)。

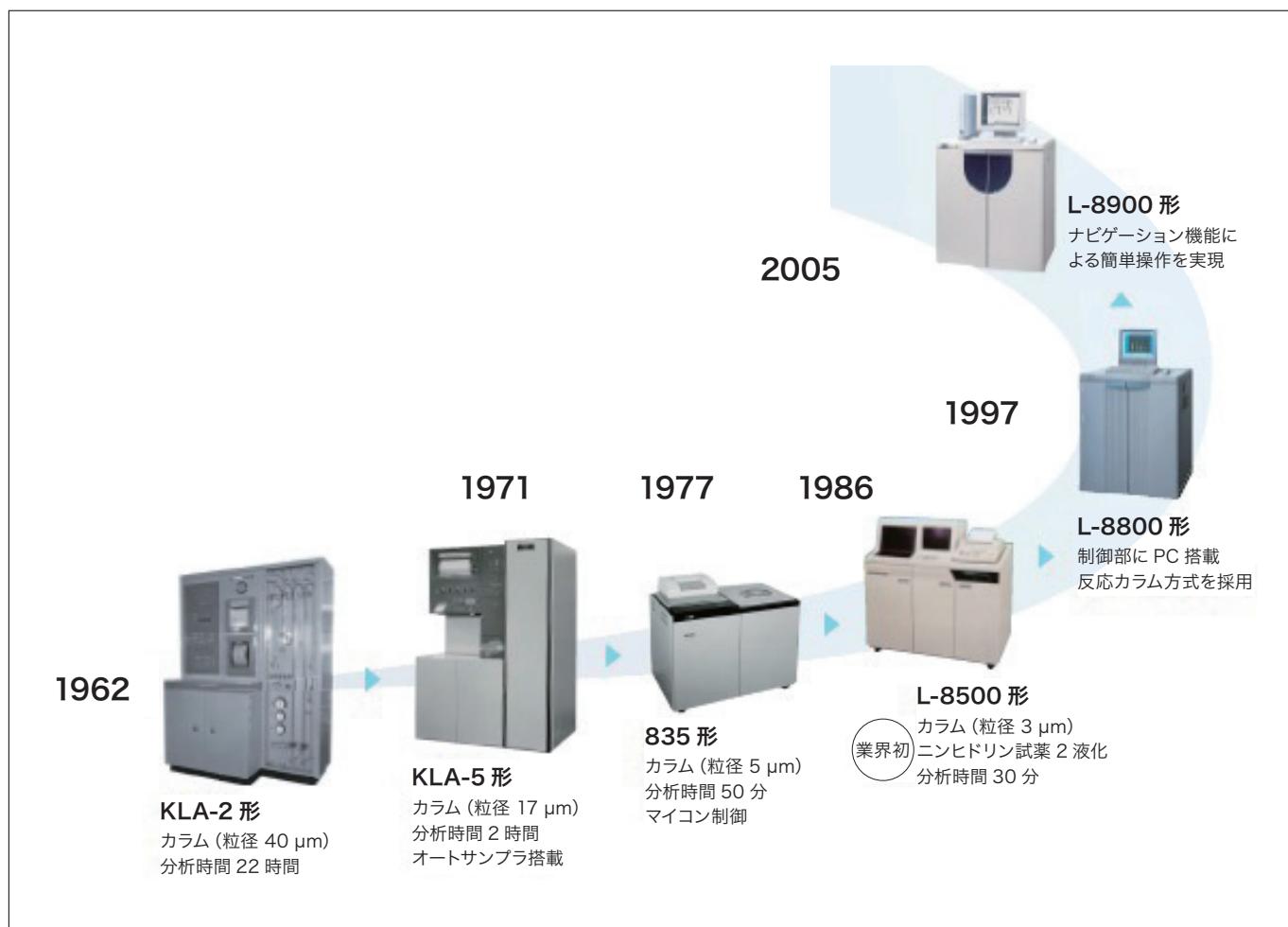


図1 日立アミノ酸分析計の歴史

## 2. 製品の特長

LA8080高速アミノ酸分析計は、ニンヒドリン試薬を用いるポストカラム誘導体化法イオン交換クロマトグラフィーの専用装置であり、製品特長は次の3点である(図2)。

### (1) Comfortable : 快適な操作性

ユーザーの操作目線や動作工程に配慮し、人間工学に基づく配置設計をした。ニンヒドリン試薬は、2液を誘導体化直前に混合する方法を従来通り採用し冷蔵不要とした。緩衝液(溶離液)と反応試薬は市販品をそのままセットできる。

### (2) Compact : コンパクトな設計

卓上型を初めて採用し、今までの床置きデザインを刷新した。設置面積も約3割減の省スペース設計であり、試薬ボトルと試料バイアル用ラックの置き易さや、カラムやシール類の交換作業性なども考慮したフロントアクセス設計となっている。

### (3) Reliable : 高いデータ信頼性

従来機種L-8900やL-8800を継承し、多様なイオン交換クロマトグラフィー分析法の互換性を持たせた。安定性の高いニンヒドリン反応によりたん白質加水分解物および生体液分析法において良好な定量精度を実現する。



図2 LA8080高速アミノ酸分析計の外観

### 3. 製品の概要

カラムにはポリスチレンジビニルベンゼン系ポリマーにスルホン酸基を導入する強酸性陽イオン交換樹脂を充てんする。溶離液として、約20成分アミノ酸にはクエン酸ナトリウム系の緩衝液を、約40成分アミノ酸にはクエン酸リチウム系緩衝液を用いる。溶離液および反応液は市販ボトルをそのまま設置することが可能である。いずれの分析方法も多くの成分を溶出するために、数種類の緩衝液によるステップワイズ溶離法かまたはグラジエント溶離法を利用する。

分析計の流路構成を図3により説明する。各溶離液は、ポンプ1により再生液を含めて電磁弁により切り替え、6液までを送液できる。クロマトグラムのベースラインノイズを抑えるためにワンストローク  $10 \mu\text{L}$  微量ポンプを採用し、脈流(圧力変動)を低減した。

オートサンプラには最大120検体の1.5 mlバイアルがセットできる。また、試料中にアスパラギン( $\text{AspNH}_2$ )や、グルタミン( $\text{GluNH}_2$ )を含む時など冷蔵保存が必要な場合、100本用冷却ラックも用意されている。

カラム恒温装置はペルチ工素子を用いて分離カラムを一定温度に保つ。20 ~ 90°Cの範囲でタイムプログラム設定が可能である。

ニンヒドリン試薬は2液を反応直前に混合する。カラムから溶出されたアミノ酸各成分は、ポンプ2により送られる試薬と混合され、反応装置で135°Cに加熱される。混合液が流れている間のピークブロードニングを極力抑え、かつ効率よく反応させるためにカートリッジタイプのTDE<sup>3</sup>(キューブ)リアクタ方式を採用した。

アミノ酸は、反応生成物ルーエマンパープル<sup>3</sup>となり吸光度極大である可視光570 nmで検出され、クロマトグラムのピークとして測定・定量される。イミノ酸であるプロリンとハイドロキシプロリンは、可視光域に吸光度極大がないため440 nmで検出する。検出レフアレンスには700 nmの可視光を使用し、ハロゲンタンクステンランプの光源ゆらぎなどを補償している。

クロマトグラフィックデータシステム(CDS)にはOpenLAB CDS Ver.2を採用し、データ収集の装置コントロールとクロマトグラムの定性・定量データ解析を実行する。

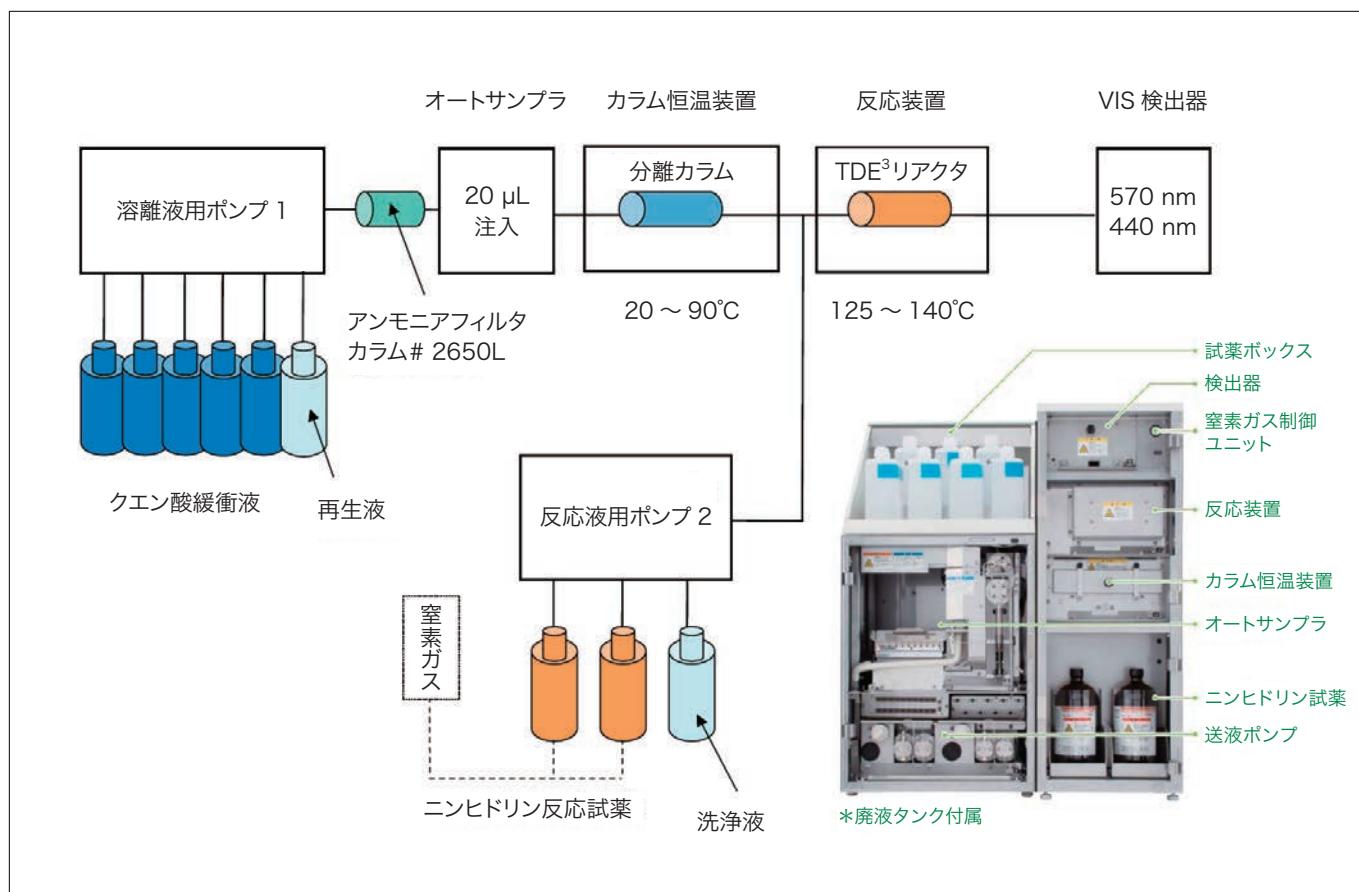


図3 LA8080の流路図と内部構成

## 4. 分析例

標準的な分析法として、図4にたん白質加水分解物のクロマトグラムを示す。クエン酸ナトリウム系の溶離液を流量0.40 ml/minで送液し、粒径3 μmの陽イオン交換樹脂カラム#2622 (i. d. 4.6 mm × 60 mm) を57°Cで恒温する。ニンヒドリン試薬を流量0.35 ml/minで送液・合流し、反応温度135°Cで発色させた後、可視光波長570 nmで吸光度検出する。アミノ酸標準混合液は20 μLを注入する。

分析時間30分で各分離度1.2以上が得られた。また、アスパラギン酸(Asp)で検出限界は2.5 pmol以下(SN比2), ピーク面積再現性(2 nmol)はRSD 1.0%以下と良好であった。

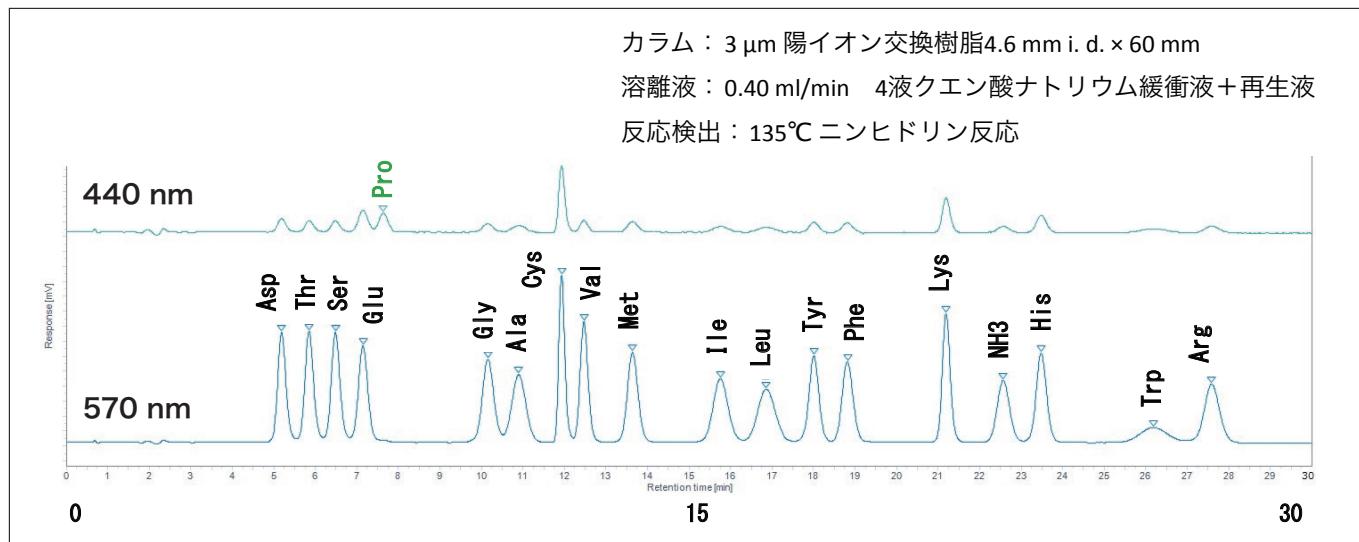


図4 たん白質加水分解物の分析例

一般にたん白質のアミノ酸組成分析には塩酸を用いて加水分解処理が行われるが、システインと、シスチン、メチオニンは酸化されやすい。このため、過ギ酸で酸化した後に塩酸加水分解処理を実施し、システイン酸(CySO<sub>3</sub>H)とメチオニンスルホン(MetSON)を分析する方法も広く用いられている。また CySO<sub>3</sub>H と MetSON のみを短時間に分析した例も併せて示す(図5)。

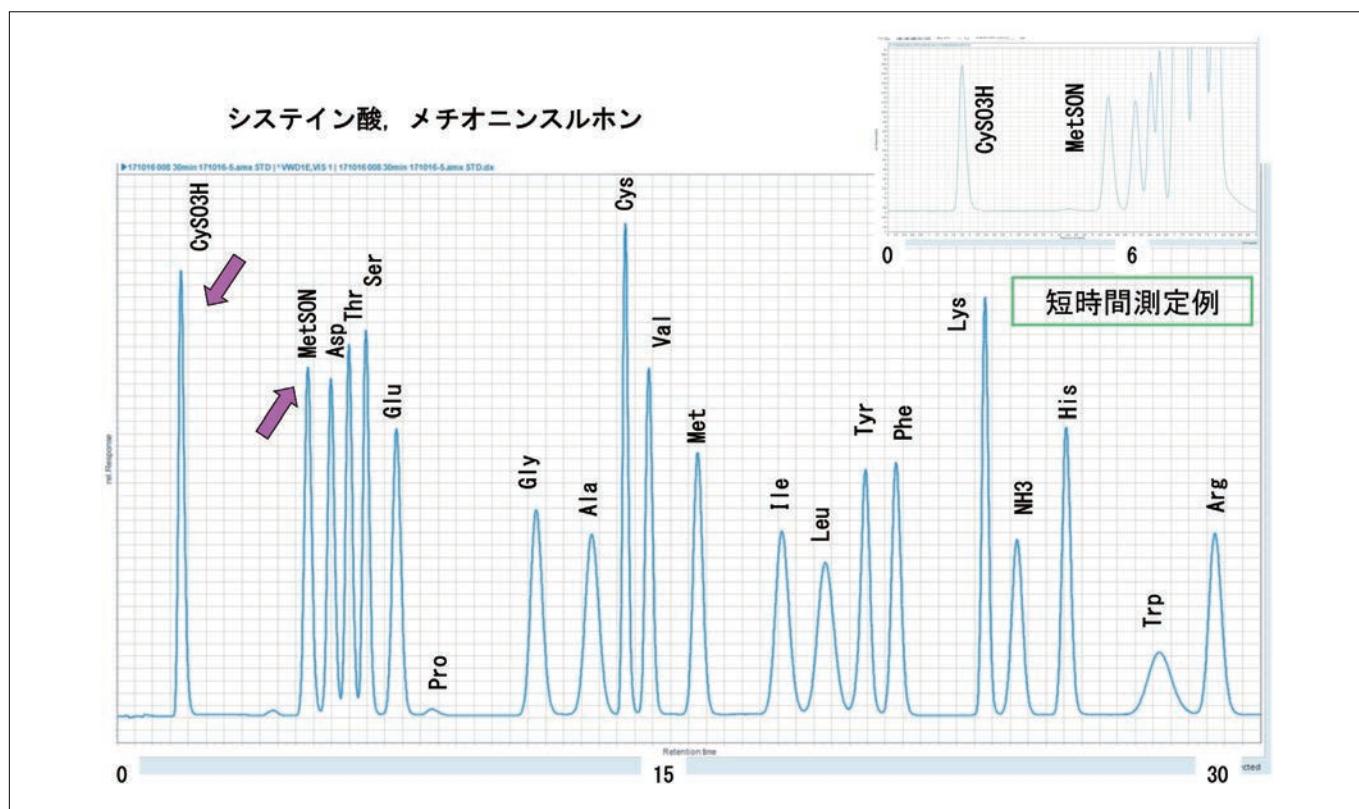


図5 過ギ酸酸化たん白質加水分解物と短時間分析例

## 5. まとめ

Moore らの方法が今なお有効なのは、分離系と反応検出系にそれぞれの理由が考えられる。ポリスチレンポリマーのイオン交換樹脂と多成分のアミノ酸のマッチングが巧妙であり、フェニルアラニンとチロシンなど芳香族系の中性アミノ酸はポリマー基材との疎水性相互作用も寄与することにより良好な分離を実現している。一方、ニンヒドリンを用いるポストカラム誘導体化法は試料中の夾雜物質に対し高い選択性を発揮できる特長を持ち、ユーザーが除たん白処理とろ過さえしっかりしておけば、信頼性の高い分析結果が得られる安心感がある。このような永く利用可能な卓越した分析計を構築した先人たちの功績に深く感謝したい。

### 参考文献

- 1) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.*, **1190**, **30** (1958).
- 2) 伊藤正人, ぶんせき, 2010年3月号, **145-146**.
- 3) 小澤真一, 宮野博, 伊藤正人, S. I. NEWS, Vol. 58 No. 1, **4968-4977** (2015).

### 著者紹介

<sup>1</sup> 伊藤 正人, 成松 郁子, 裴敏伶, 森崎 敦己, 福田 真人, 八木 隆, 大月 繁夫, 関一也, 豊崎 耕作  
(株) 日立ハイテクサイエンス 製品統括本部 開発設計本部 光学設計部

<sup>2</sup> 鈴木 裕志  
(株) 日立ハイテクサイエンス 営業本部 応用技術部

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/>

# 全自动核酸抽出機器「magLEAD 6gC/12gC」 および専用試薬「MagDEA Dx SV」について

Universal and Automated Nucleic Acid Extraction System ‘MagDEA Dx SV’  
and ‘magLEAD 6gC/12gC’

宮下 雪子, 上田 哲也

## 1. はじめに

昨今の著しい遺伝子解析技術の進歩に伴い、遺伝子を対象とする研究や検査が幅広くかつ身近に実施されるようになった。遺伝子検査の対象は、がん、感染症、発症前診断、出生前診断、肥満、老化、生活習慣病、ファーマコゲノミクスなど多岐にわたる。遺伝子検査においては、様々なサンプル種からDNA/RNAを抽出・精製し試験に用いるが、抽出されたDNA/RNAの品質、および量が試験の結果に影響を与える。また、検査結果の報告を行うまでの時間を短くすることも求められており、抽出・精製時間の短縮も求められている。

プレシジョン・システム・サイエンス(株)(以下、PSSと略)では遺伝子検査に用いるDNA/RNAの「品質、量、時間」の要求に対応するために、全自动核酸抽出装置「magLEAD 6gC」、「magLEAD 12gC」に搭載するための核酸抽出試薬「MagDEA Dx SV」を開発し、市場に展開している。

## 2. 「magLEAD 6gC/12gC」、「MagDEA Dx SV」の概要と特長

### 2-1. 核酸抽出方法および機器の概要

本システムでは磁性粒子を担体として核酸の抽出・精製を行っている。磁性粒子をハンドリングする方法は複数存在しているが、PSSの機器においては独自技術である「Magtration法」を用いて行っている(図1A)。Magtration法では、分注チップの側面に磁石をあてて磁性粒子を分注チップ内で捕獲・分散させる。MagDEA Dx SVの核酸の抽出工程は図1Bに示したように、(1)カオトロピック物質の存在下において、サンプル中のタンパク質を可溶化(Lysis)する工程、(2)カオトロピック効果により、水和水を奪われた核酸のリン酸基と、同様に水和水を奪われた磁性粒子担体とが、双極子-双極子相互作用や水素結合といったファンデルワールス力により結合(Binding)する工程、(3)核酸が結合した磁性粒子より不要な物を除去(Washing)する工程、(4)磁性粒子より核酸を溶出(Elution)する工程、からなっている。また、核酸の抽出に必要なすべての試薬はカートリッジ内にあらかじめ封入されており、機器専用の消耗品と組み合わせることで、簡単に核酸の抽出を行うことができる(図1C)。

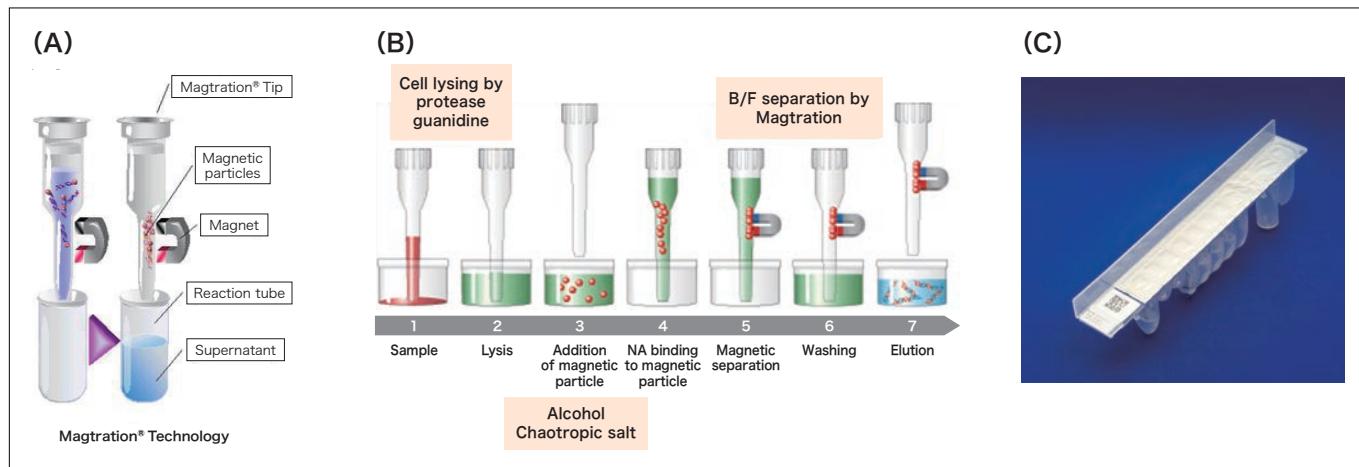


図1 核酸抽出方法および機器の概要

MagDEA Dx SV は magLEAD 6gC/12gC と組み合わせて(図2), 約25分でDNA/RNAの抽出が可能である。

			
機器サイズ	magLEAD 6gC	H600×W300×D550 (mm)	magLEAD 12gC
重量	magLEAD 6gC	Approx. 30 kg	magLEAD 12gC
最大処理サンプル数	magLEAD 6gC	6 samples/run	magLEAD 12gC
電源	magLEAD 6gC	AC100 – 240V, 50/60 Hz, 300VA	magLEAD 12gC
UVランプ	magLEAD 6gC	内部に搭載	magLEAD 12gC
Protocol (application) supply	magLEAD 6gC	Protocol IC Card	magLEAD 12gC

図2 magLEAD 6gC、および、magLEAD 12gCの仕様

## 2-2. 本システムの特長

MagDEA Dx SV の仕様概略を下表にまとめる(表1)。

表1 MagDEA Dx SV 仕様概略

抽出原理	磁性粒子を用いた核酸抽出法
サンプル量	200 µL よりのスタート
溶出液量	50, 100, 200 µL
抽出時間	約 25 min
サンプルタイプ	Whole blood, Serum, Plasma, Urine, CSF, Swab (nasal, throat), Stool*, Sputum*, FFPE* (*は別途前処理が必要)
動作プロトコル	単一のプロトコルで各種サンプルからの抽出が可能
その他(消耗品)	magLEAD 向け消耗品キットが別途必要。magLEAD 6gC/12gC は IC カードが別途必要
保管条件	室温(10 ~ 30°C)で2年間
対応機器	geneLEAD XII plus, magLEAD 6gC, magLEAD 12gC

MagDEA Dx SV では、上に示した全血、血漿、血清、尿、CSF、スワブ、また前処理は必要となるが喀痰、便、FFPEサンプルから、単一のプロトコルを用いて、トータル核酸(DNA および RNA)の抽出が短時間で可能である。

### 3. 使用例

以下に、ヒト全血からのゲノムDNA抽出性能(3-1.)、その他のサンプルからのDNA/RNAの抽出(3-2.)に関して記述する。

#### 3-1. ヒト全血からのゲノムDNAの抽出

2種類のヒト全血(抗凝固剤としてEDTAまたはACDを使用)をサンプルとして、ゲノムDNAの抽出を行った。抽出したゲノムDNAの濃度測定結果を図3(A)に、アガロースゲル電気泳動の結果、および抽出核酸の品質の指標となる吸光度230 nm/260 nm比、260 nm/280 nm比を図3(B)に示す。ゲノムDNAの収量はサンプルの白血球数に依存して異なるが、同一のサンプルから抽出される量と品質に関しては再現良好に抽出されていた。

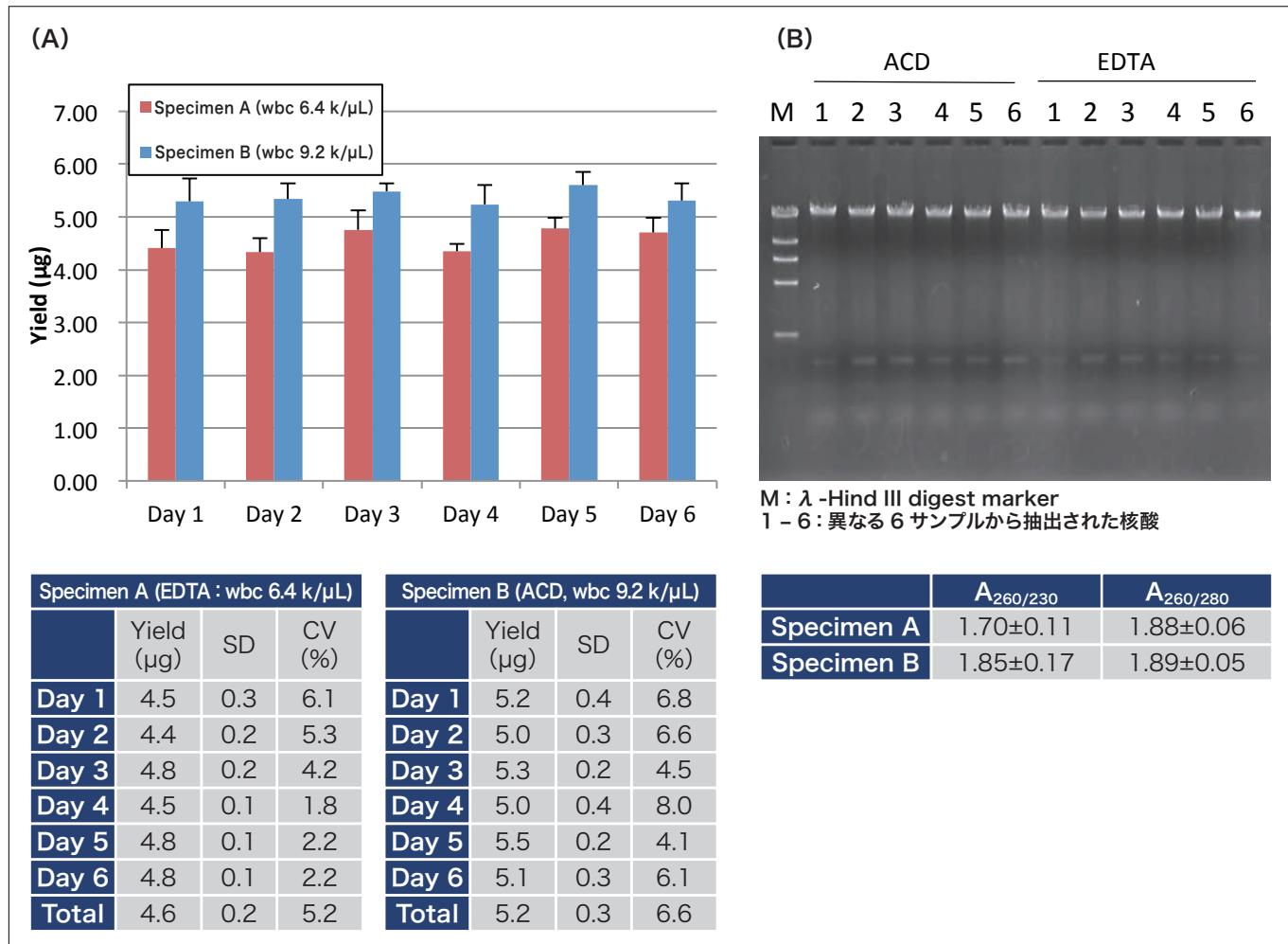


図3 MagDEA Dx SVを用いた全血からのゲノムDNA抽出

(A) 2種類の全血からのゲノムDNAの収量

(B) 抽出したゲノムDNAをアガロースゲル電気泳動像と吸光度

### 3-2. DNA/RNA の抽出

DNAウイルスのモデルとして M13K07 ファージ、RNAウイルスのモデルとして MS2 ファージを用いた。これらをヒト血清に添加し、MagDEA Dx SV を用いて核酸抽出を行い、それぞれを Target とした Real-time PCR を行うことで抽出の効率を評価した。抽出の再現性のデータを図4に示す。同一 Run 中で 6 サンプルずつ、かつ 5 回の異なる Run において、コピー数の違いに依存せずに安定的に Real time PCR での増幅が得られた。

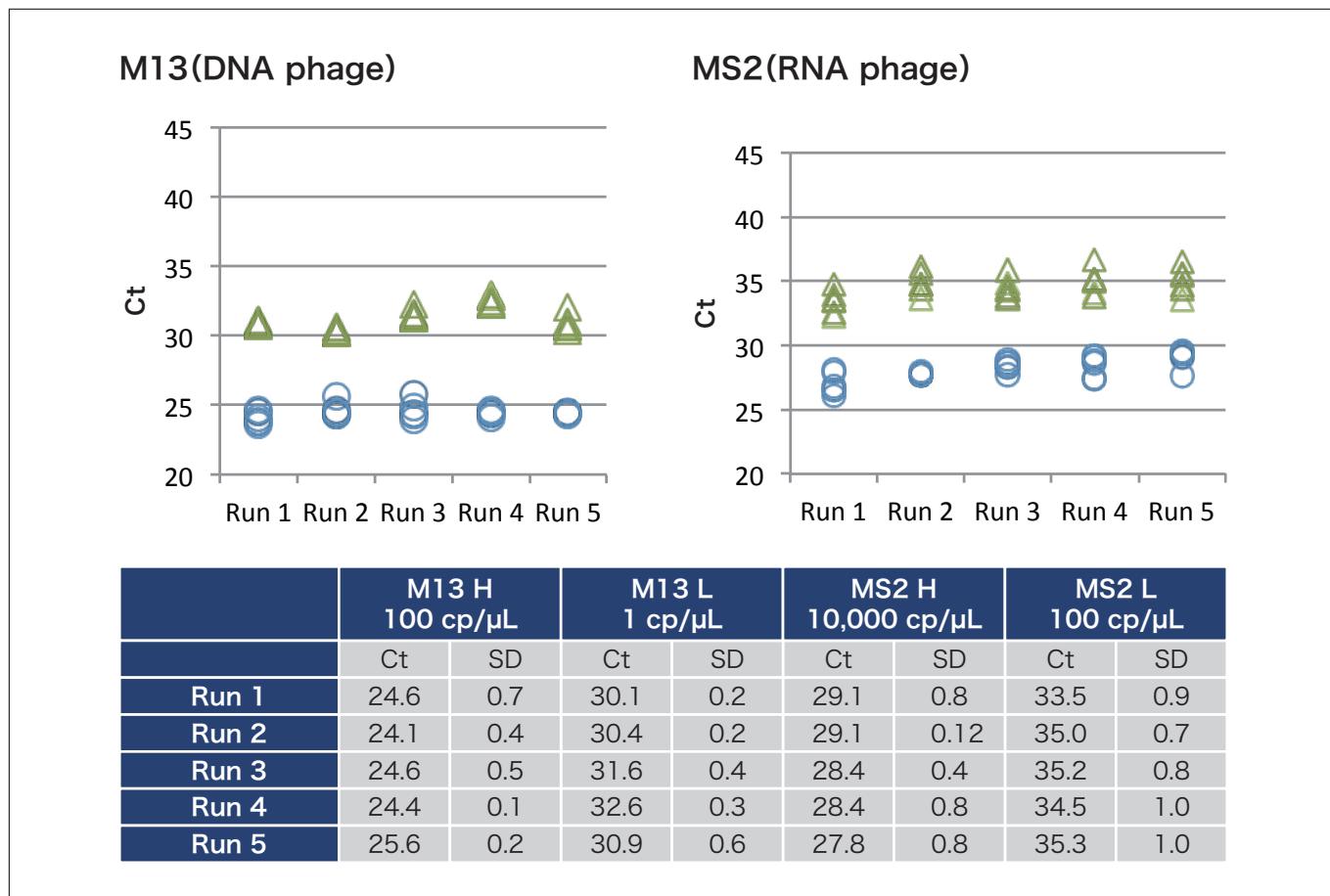
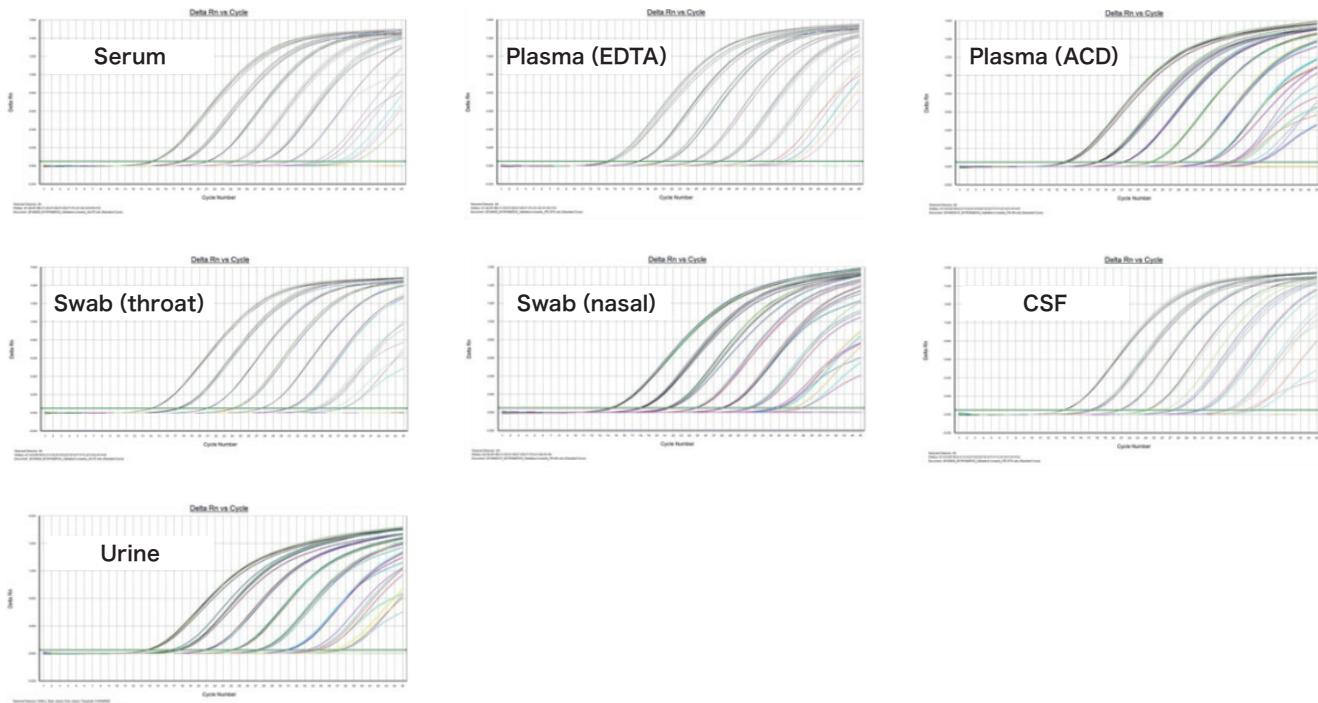


図 4 ウィルスモデル M13、MS2 の血清からの抽出再現性

MagDEA Dx SVの一つの特徴として、試薬、プロトコルを変更することなく、様々なサンプルから核酸の抽出を行うことができるがあげられる。図5に7種のサンプルマトリックス(血清、EDTA 血漿、クエン酸血漿、咽頭スワブ、鼻腔スワブ、CSF、尿)からの抽出結果を示す。

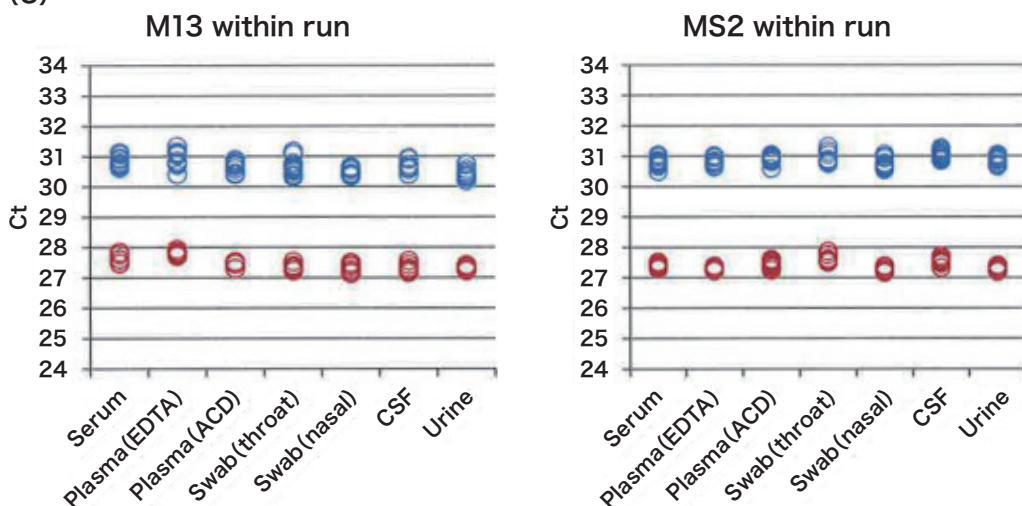
(A)



(B)

	Serum	Plasma (EDTA)	Plasma (ACD)	Swab (throat)
Slope	-3.447	-3.406	-3.415	-3.369
correlation coefficient (R2)	0.995	0.997	0.998	0.999
PCR efficiency (%)	95.0	96.6	96.2	98.1
y-intercept	41.9	41.6	41.8	41.1
	Swab (nasal)	CSF	Urine	Positive control
Slope	-3.391	-3.361	-3.397	-3.382
correlation coefficient (R2)	0.999	0.996	0.998	1.000
PCR efficiency (%)	97.2	98.4	97.0	97.5
y-intercept	41.5	40.9	41.1	41.8

(C)



(D)

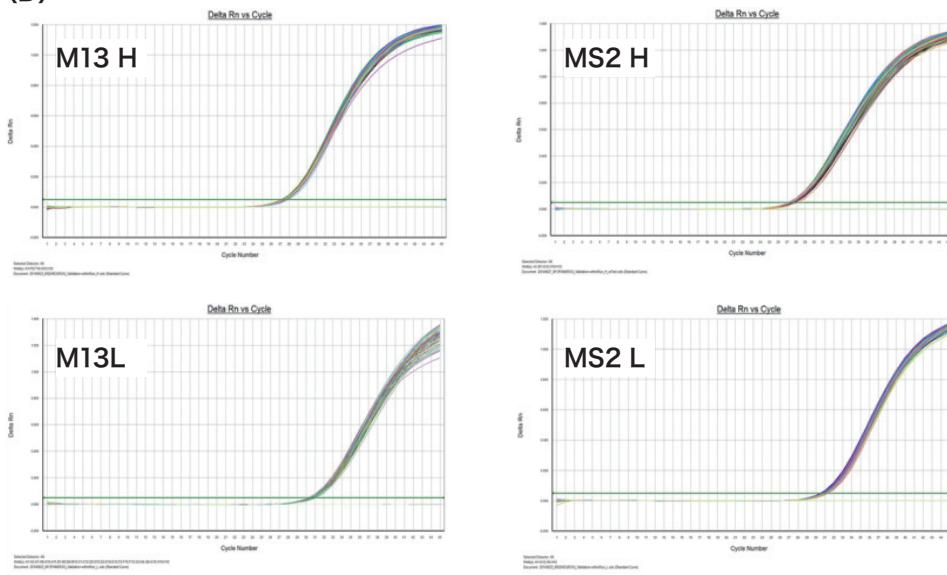


図5 異なるサンプルマトリックスからの抽出結果

(A) : M13 を  $10^8$  コピーから  $10^1$  コピーまで各種サンプルマトリックスに添加して MagDEA Dx SV で抽出し Real-time PCR で評価を行った。  
 (B) : (A)で得られた Ct 値から Slope, 直線性 (R<sup>2</sup>), PCR 効率を算出した。  
 (C), (D) : 異なる 2 濃度の M13, MS2 をサンプルマトリックスに添加し, MagDEA Dx SV で抽出を行った。抽出物は Real-time PCR で評価を行った。

すべてのサンプルマトリックスにおいて、直線性が高く、PCR 効率は 95% 以上となった。また、サンプルマトリックスに依存せず、Real-time PCR の結果においてほぼ同一の Ct 値が得られた。

## 4. まとめ

PSS の全自動抽出機器「magLEAD 6gC/12gC」、および全自动遺伝子検査装置「geneLEAD XII plus」向けに開発された MagDEA Dx SV は、Real-time PCR 法を用いたウイルスDNA/RNA の診断に必要とされる、サンプル中に含まれる微量の核酸の抽出のみでなく、全血からのゲノムDNA の抽出という多量の DNA の回収にも対応している試薬である。また、すべての必要な試薬がカートリッジ化されていること、異なるサンプルマトリックスからもプロトコル、試薬を変更することなく核酸が抽出できることから、少量多品種のサンプルを取り扱うラボにおいては、ラボワークフローの効率化に柔軟に対応できる試薬である。

### 著者紹介

宮下雪子、上田哲也  
プレシジョン・システム・サイエンス（株） 営業部

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/

# 日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM® IL2000

Ionic Liquid HILEM® IL2000 for Hitachi Electron Microscope

イオン液体は、カチオン(陽イオン)とアニオン(陰イオン)のみで構成される常温で液体状態を示す塩であり、蒸気圧が低く、イオン伝導性を有するというユニークな特性を持っています。これまで我々は、ミヨシ油脂株式会社、大阪大学、北海道大学による共同研究のもと、世界に先駆けて日立電子顕微鏡用のイオン液体 HILEM IL1000を2013年5月に発売しました。このIL1000は、高い親水性を示すことから、生物試料の前処理によく利用され、導電性の付与や試料形態の収縮や変形を防いだ観察に有効で、電子顕微鏡の新たな観察手法となりました<sup>1)</sup>。しかし、水との親和性が低い試料には応用することが困難でした。そこで、我々は、ミヨシ油脂株式会社とともに、疎水性を示し、かつ電子顕微鏡観察に利用可能なイオン液体の調査を進め、疎水性イオン液体 IL2000を商品化しました。

IL2000は、N,N,N,N-テトラアルキルアノニウムビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミドを成分とし、カーボン(C)、窒素(N)、酸素(O)、水素(H)およびフッ素(F)から構成され、表1に示す性質を有しています。図1にろ紙の観察例を示します。1% IL2000処理によって、帶電を抑制してろ紙の纖維構造を観察できています。イオン液体は、液体状の導電付与剤として、表面に入り組んだ凹凸を持つ試料や多孔質を示すような試料にも回りこんで、効果を発揮できます。さらに、IL2000は、各種溶媒に溶解可能で、水と親和性を持たない試料に利用可能です。図2には、エタノールに溶解させた10% IL2000溶液を用いたファンデーションの観察結果を示します。また、水に分散しない試料の分散剤としても利用できます。



HILEM® IL2000

表1 IL2000の主な性質

外観	無色～淡黄色透明液状
分解点	301°C (TG-DTA 分解開始温度)
流動点	-50°C
比重	1.30 (25°C, 代表値)
溶解性	水に溶けにくい。アセトン、エタノール、イソプロピルアルコールなどに溶解する。

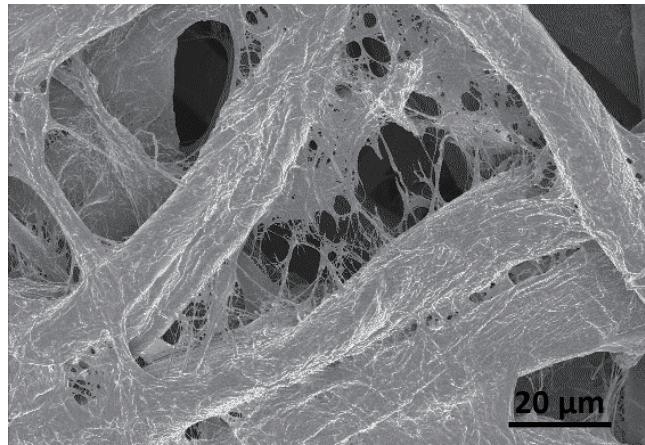


図1 ロ紙観察例  
(加速電圧：1.0 kV, 観察倍率：1,000倍)

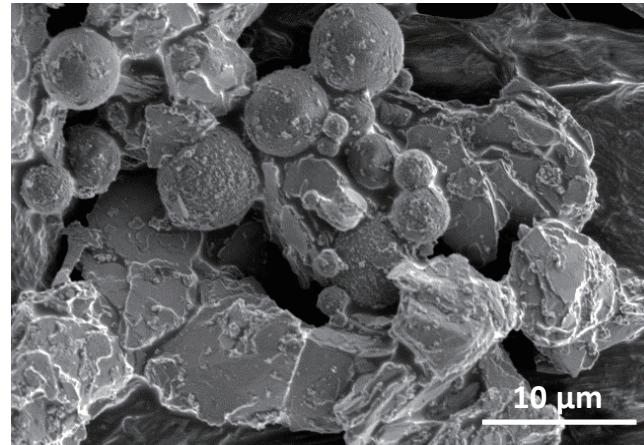


図2 ファンデーション観察例  
(加速電圧：2 kV, 撮影倍率：3,000倍)

## 参考文献

- 1) Nakazawa E., Konomi M., Shiono M., Sakaue M., Nakano K., Kawai K., Kuwabata S., *J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.*, **29** (1), 25-30 (2015).

# 低加速電圧の走査型 次世代型クライオ電子顕微鏡開発に挑む

—生命科学の最前線— 日経サイエンス2018年1月号より転載



名古屋大学 大学院理学研究科  
構造生物学研究センター 名誉教授

臼倉 治郎

## 1. 2017年ノーベル賞の画期的発明

2017年のノーベル化学賞は「クライオ電子顕微鏡」(クライオ電顕)を発明した欧米の研究者3人に贈られた。

クライオ(cryo)は低温を意味し、クライオ電顕は液体窒素並の低温下において溶液中の生体分子の構造を高解像度で観察可能にし、タンパク質の構造が把握できるようになった。

生体内では様々な生命活動を担うタンパク質が合成されているが、その詳細な構造が分かれば他の分子との結合状態や作用を探る手掛かりとなり、多様な生体反応の解明や治療薬開発に役立つと期待される。受賞理由では生化学の新しい時代の扉を開いたことが評価された。

名古屋大学名誉教授の臼倉治郎氏は、受賞者の1人であるリチャード・ヘンダーソン氏(英国MRC分子生物学研究所のプログラムリーダー)を以前から知っており、ノーベル賞受賞が決まった瞬間も英国の研究会に同席していた。

「30年前から多数の粒子を集めて平均化する画像処理を行う構造解析(単粒子解析)によって最終的に原子配置まで迫れると予測していた。ノーベル賞受賞は当然で遅すぎたくらいだ」と、手放しで功績を讃える。

共同受賞者であるジャック・デュボシェ氏(スイス・ローザンヌ大学の名誉教授)は液体窒素などを用いて試料を急速に凍らせる手法(Cryo-electron microscopy of vitreous sections: CEMOVIS)を開発した。これにより非晶質に固定された状態の凍結切片をクライオ電顕で観察できるようになった。

またヨアヒム・フランク氏(米国コロンビア大学の教授)は、様々な方向から撮影した画像をコンピューターで重ね合わせて高解像度の立体画像を作る手法を開発した。

## 2. タンパク質構造の解析は不可欠

ヘンダーソン氏がクライオ電顕のレールを敷き、CEMOVISはその上に乗った将来性の高い手法である。臼倉氏らもその応用に取り組んでおり、日立ハイテクノロジーズとの共同開発によって、新たなクライオ電顕の開発に挑んでいる。

医学生物学分野においてクライオ電顕の必要性は急速に高まっている。生命現象を理解するためには細胞内で機能状態のタンパク質分子やその複合体の構造に加えて、それらが集合した空間構造(いかなる構造でどのような細胞内環境に位置するかという情報)を知る必要があるからだ。

現在のクライオ電顕の主な用途は、精製タンパク質、ウイルス、細胞内小器官(オルガネラ)などの単粒子解析である。

従来の負染色による単粒子解析法では前処理として染色が必要で染色剤による構造変化は完全に防げず、染色剤の浸透具合により像も変化するという欠点があった。クライオ電顕によれば精製タンパク質分子をそのまま急速凍結して電顕の分解能で観察できるので、生物試料であっても前処理が不要になる。また、その分解能も2 Åに迫っており、結晶のX線回折による構造解析のレベルに近づいている。

新鮮状態で観察できるのがクライオ電顕の最大の強みであり、欧米では導入が進んでいる。しかし、1台が数億円という費用は普及のための課題になっている。

### 3. 要素技術を絞り込み小型化を実現

開発中の次世代型クライオ電顕では、要素技術を絞り込み、低加速電圧の走査型透過電子顕微鏡(STEM)を実現し、大幅な小型化に成功している。

白倉氏は「細胞の中にある状態のままの少数の分子について、その構造を容易に解析するための電顕開発を目指した。原子分解能までなくても1 nm程度の分解能で、手軽に単粒子解析ができるようになれば医学生物学に大いに貢献できる」と語る。

2016年度からは日本医療研究開発機構(AMED)から医療分野研究成果展開事業(先端計測分析技術・機器開発プログラム)支援を受けており、着実に実用化への道のりを進めている。

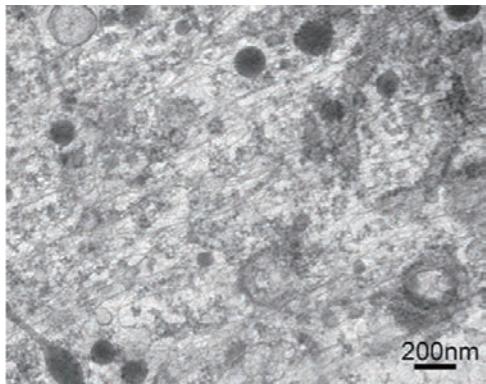


図1 膜剥離標本のクライオ電顕像(無固定)  
アクチン線維や微小管からなる細胞骨格に加え、粗面小胞体、滑面小胞体、リボソームなどが観察される。

### 4. STEMとSEMの同時撮像が可能

技術革新の鍵は、STEM機能を持たせた走査型電子顕微鏡(SEM)をベース機として機能を付加する形で開発したことだ。

SEMでは、細く絞った電子線を試料表面に上部から照射して走査し、2次電子線を検出して撮像する。

これに対してSTEMは、試料中を透過もしくは試料によって散乱した電子線を検出するものだ。その密度分布がそのまま画像になるので、コントラストを補正する必要がなくなる。正焦点での像も観察できるので分解能の低下も抑えられる。透過型電子顕微鏡(TEM)に比べ比較的少ない画像データで済むので、単粒子解析には有利である。

もう1つ、大きな違いは画像の記録法にある。TEMは画像を記録するためのカメラが必要だが、STEMでは電子を捉える検出器があればよいため、高感度なカメラを搭載してコストが膨らんでしまう問題を回避できる。検出器(シンチレーター)に塗布されている蛍光物質を質、量ともに改善することにより、1電子を捕捉できるような高感度化が実現できれば、はるかに安価に同等の像が得られるようになる。

次世代型クライオ電顕は立体的なSEM像と透過像(STEM像)が同時に得られるという大きなメリットがある。

試料中に電子線を透過させるためには、試料を薄片化しなくてはならない。しかし、加速電圧は約30 kVと非常に低加速ではあるが、細胞内構造で厚さが200 nm以上と推定される部分でも支障なく観察・計測できている。一方で低加速電圧が実現できたため、床の上に置けるコンパクトな設計が可能になった。SEMをベース機として開発しているため、現時点ではSEMに付随しているSTEM機能を用いているが、将来的にはSTEMを中心的に設計して、それに高機能SEMを付帯させるのが望ましいと考えている。

また、クライオ電顕で通常の電顕の画質を維持するためには、冷却に伴うドリフト（温度変化などにより観察中の試料がゆっくり動いてしまうこと）が顕在化しないように、さらに走査速度を上げるという技術課題も克服しなくてはならない。

試料を最適な形で持ち込むことも重要であり、細胞膜の裏打ち構造（膜細胞骨格）を観察するための前処理装置として細胞膜剥離装置も同時に開発した。これにより次世代型クライオ電顕の性能を最大限に発揮でき、観察結果の信頼性を向上させられる。

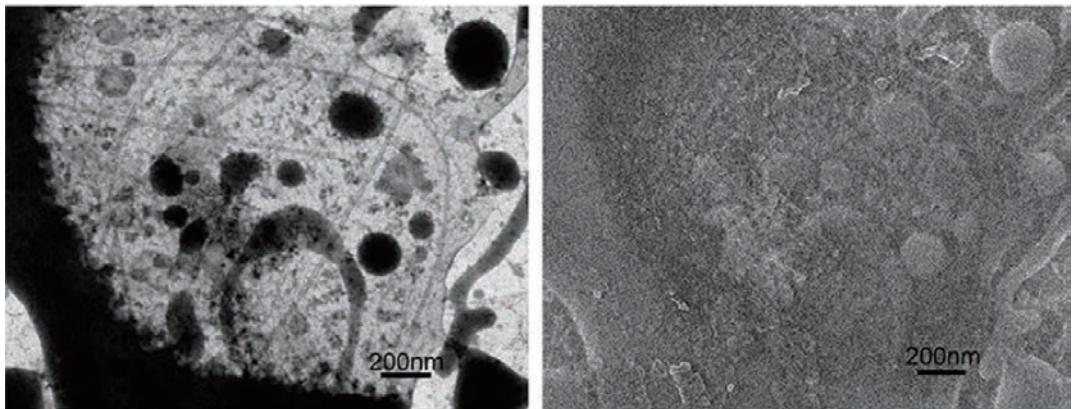


図2 クライオ STEM (左) とクライオ SEM (右) の同時記録 (無固定)  
完全に氷包埋されている時 (最初), SEM 像は氷で覆われているので平坦であるが、電子線照射によるダメージや温度上昇により氷の一部を昇華させると右図のように構造が現れる。

## 5. 病気の根本原因の解明に挑む

電顕の開発においては、その応用法と一体化させた戦略も重要な要素になってくる。最終ゴールは装置としての性能ではなく、結果として何が見えるかであり、それを実現するために生物学者である白倉氏が自ら電顕の開発に乗り出すことになったのだ。

幸い、機器開発と標本作製技術という両輪がうまく回転しており、次世代型クライオ電顕がバールを脱ぐ日は着実に近づいている。今後は解析のソフトウェアの開発も進むはずで、さらに効率化が期待される。

白倉氏が、これを武器として取り組むのは病気の根本原因を解明して治療法の開発につなげることだ。分子レベル、さらには原子レベルで、病気になる過程が明らかになれば、真に有効な新薬開発が可能になる。

「対処療法的な薬効優先の創薬では副作用も不明確となり危険である。病気の成因やメカニズムを明らかにし、薬効の高い新薬の開発を目指すべきである」

例えば、インフルエンザウイルスの細胞内への侵入、増殖、排出機構の形態学的解析などにも応用しており、手応えを感じている。



左から小瀬洋一、多持隆一郎、東淳三、丹波裕介（以上日立ハイテクノロジーズ）、  
白倉英治、白倉治郎、成田哲郎、松本友治（以上名古屋大学）の各氏。  
後ろが次世代型クライオ電顕。

# 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 12:45~17:30  
(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースに関するお問い合わせは、下記へご連絡ください。

## HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS March 2018 VOL. 61 No. 1

発行日 2018年3月28日 発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ  
編集人 多持隆一郎 TEL 105-8717  
発行人 内田憲孝 東京都港区西新橋1-24-14  
電話(050)3139-4298(ダイヤルイン)

ホームページ URL: [www.hitachi-hightech.com/jp/science/](http://www.hitachi-hightech.com/jp/science/)