

**HITACHI**  
Inspire the Next

**S** CIENTIFIC  
**I** NSTRUMENT  
**NEWS**

SEPTEMBER 2019

Vol. **62** No.2

September 2019  
Vol.62 No.2

«研究報文

5472

「見えた」太古の植物細胞の姿—超高分解能FE-SEMが明らかにした  
灰色植物の真の微細形態と多様性

高橋 紀之, 野崎 久義

5479

サイズ排除クロマトグラフ  
—有機物分析のための新しい検出器—

山村 寛

5486

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)のためのホウ素キャリア開発研究における  
LC-DAD-MSDの活用

永澤 秀子

5492

分光蛍光光度計を用いた蛍光を有する物体の光学的画像解析  
—反射・蛍光の画像分離と分光スペクトルの面内分布の推定—

佐藤 いまり, 鄭 銀強, 堀込 純, 大川 拓樹

«技術解説

5500

日立走査型電子顕微鏡「SU3800」・「SU3900」  
—大型・重量のある試料に対応した試料室を搭載し、  
さらなる操作性向上を実現—

振木 昌成

5504

ナノ3D光干渉計測システム VS1800による特長ある3D表面形状・粗さ測定  
—線から面へ, 走査型レーザ顕微鏡方式から光干渉計測方式へ—

桑原 順治

5513

分光蛍光マイクロスコープ「EEM<sup>®</sup> View」  
—反射光・蛍光画像の分離表示による可視化観察を実現—

堀込 純

5517

紫外可視近赤外分光光度計 UH5700

和久井 隆行, 岩谷 有香

# 「見えた」太古の植物細胞の姿—超高分解能FE-SEMが明らかにした灰色植物の真の微細形態と多様性

The Ancient Plant Cell Now “Visible” — Native Ultrastructural Feature and Diversity of Glaucophytes Unveiled by Ultra-High Resolution FE-SEM

高橋 紀之<sup>\*1</sup>, 野崎 久義<sup>\*2</sup>

## 1. はじめに

植物の姿と聞いて、何を思い浮かべるであろうか。我々の身の回りには陸上植物が繁茂しており、我々は日々これらを利用しながら生活している。この陸上植物は緑色植物と呼ばれるグループの1つである(図1)<sup>1)</sup>。アサクサノリなどで人との関わりも深い紅藻は広く海洋に分布しているが、こちらは紅色植物と呼ばれるグループである(図1)。これらの植物は複雑な多細胞の体制が進化しており、肉眼で直接その姿を捉えることができるため、馴染み深い生き物である。このような植物の共通祖先、すなわち「最初の植物」の姿は一体どのような形態であったのであろうか。これを紐解く鍵となる植物が知られている。それは灰色植物と呼ばれる生物で、緑色植物・紅色植物と並んで植物の3大グループを構成している(図1)<sup>1-3)</sup>。灰色という名前を冠しているが、実際には青緑色～碧色を呈する美しい植物である(図1)。しかし他の2グループとは対照的に、単細胞～群体性の淡水産微細藻の稀産種が20種程度知られているに過ぎない<sup>3,4)</sup>。

## 植物界

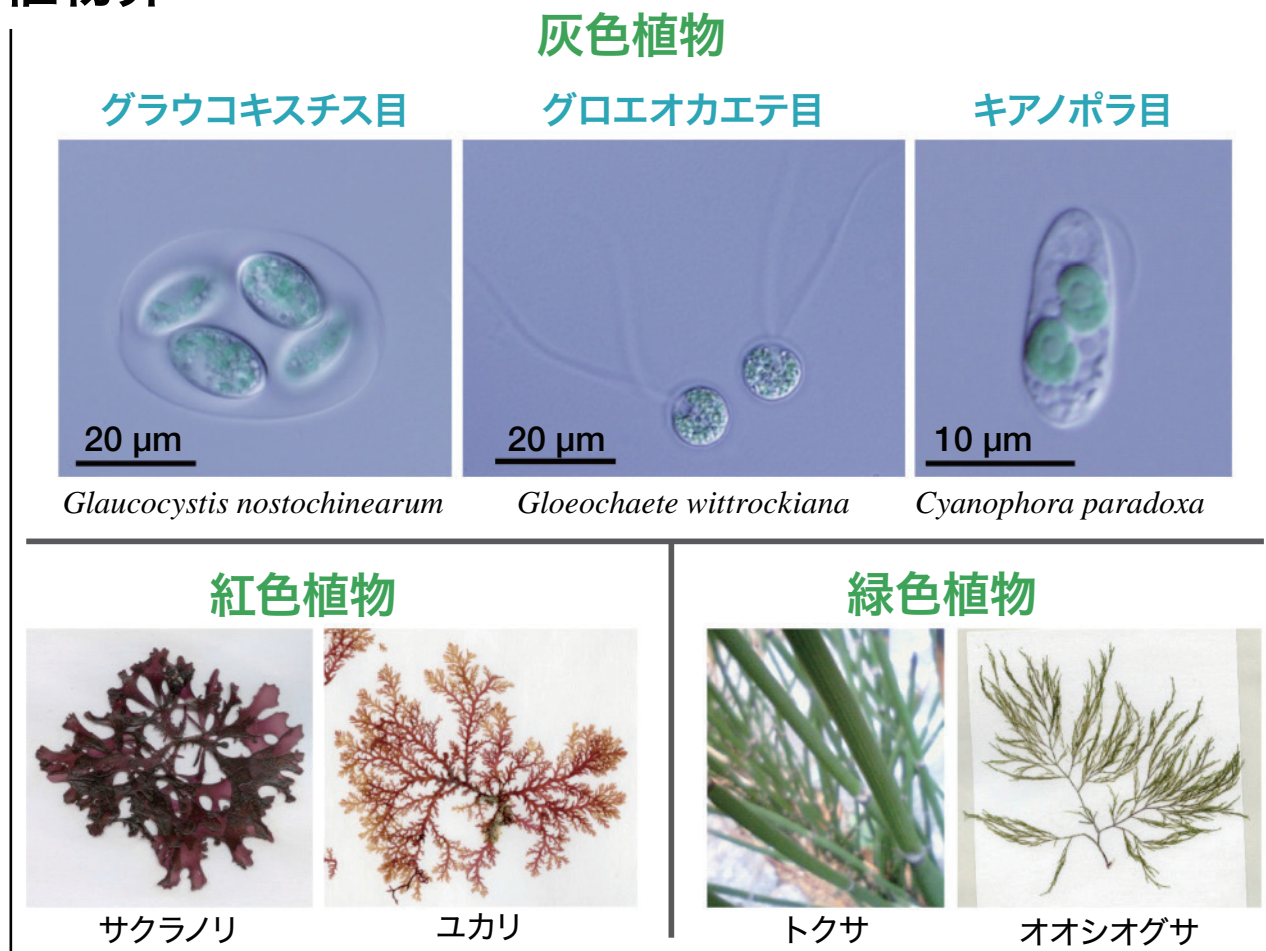


図1 植物の主要な3系統群：緑色植物・紅色植物・灰色植物。3目よりなる灰色植物は青緑色～碧色の淡水産微細藻稀産種しか知られていないが、試験管内の培地で培養可能である。文献<sup>1)</sup>より転用した。

植物の始まりである10-20 億年前は先カンブリア時代であり、我々動物の祖先がまだ単細胞生物として泳いでいた頃である<sup>1)</sup>。当時の植物の祖先はまだ光合成能力はなく、2本の鞭毛によって自由に泳ぎ回り、餌を捕食していたと考えられている。このような従属栄養性の鞭毛虫がシアノバクテリアを細胞内に取り込み、光合成によって得られた産物を利用する見返りにシアノバクテリアに光の当たる棲息場所を与えるという共生(細胞内共生)を始めた(図2)。

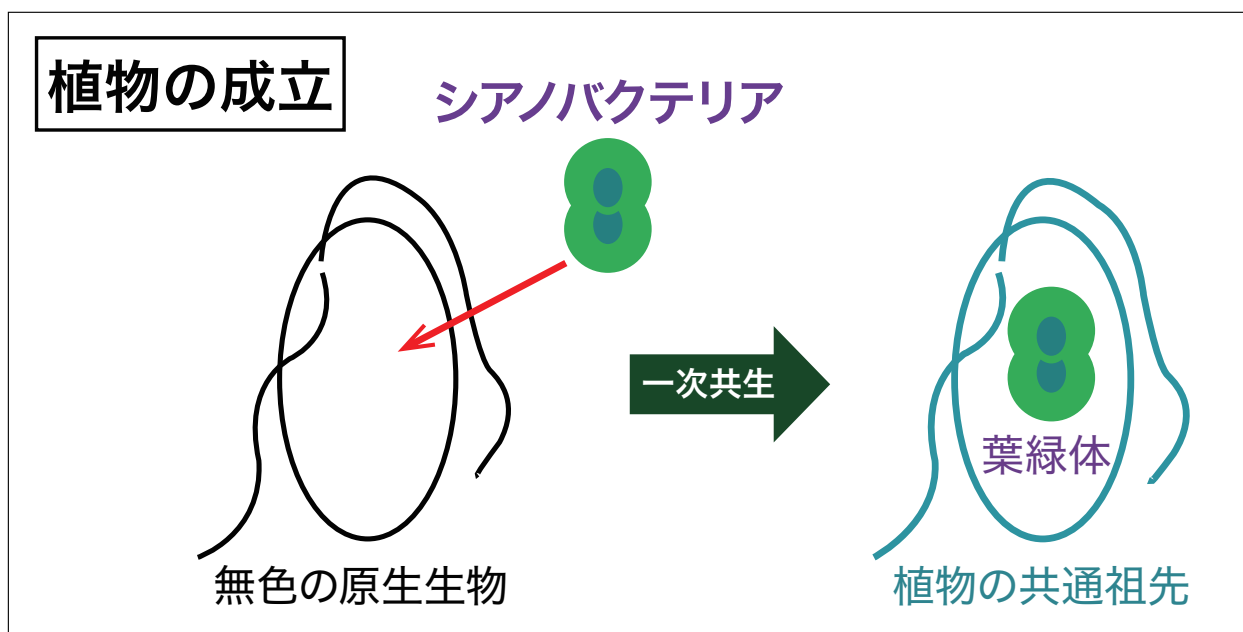


図2 細胞内共生による植物成立の模式図。10-20 億年前、光合成をしない原生生物が光合成細菌シアノバクテリアを取り込み、葉緑体を有する最初の植物細胞が誕生した。文献<sup>1)</sup>より転用した。

両者は徐々に一体となって、統制のとれた1つの生物へと進化し、シアノバクテリアは現生の植物の葉緑体となった。このような細胞内共生による植物細胞成立のシナリオは細胞内共生説として広く受け入れられている<sup>5)</sup>。しかし、シアノバクテリアを取り込んだ従属栄養性の鞭毛虫の系統についてはほとんど分かっていない。一方、色素体の色素組成や形態がシアノバクテリアに極めて類似していることが特徴である、現生の灰色植物、中でも単細胞遊泳性のキアノポラ(*Cyanophora*)はこの当時の植物の姿を未だに留めている生きた化石と考えられ(図1)、全ゲノム解析を含めた様々な研究に用いられている<sup>6)</sup>。最近の研究によれば特異な細胞外被構造を有するキアノポラは最初の植物の姿、あるいはシアノバクテリアを取り込んだ鞭毛虫そのものの姿を留めていると示唆されている<sup>7, 8)</sup>。この姿を走査電子顕微鏡(SEM)によって直接捉える試みはこれまでも行われていた<sup>9)</sup>にもかかわらず、従来の汎用SEMではこの真の姿を明らかにできていなかった。

## 2. 微細藻類としての灰色植物の観察手法

近年、様々な微細藻類で培養が可能となってきたため、野外試料を直接観察に用いる必要がなくなってきた。灰色植物では、試験管に入れた培地に1個体を接種し明所条件で培養すると、クローン細胞で構成された培養株が得られ、順次新しい培地に接種してゆくことで継体培養による維持が可能である。このようなクローン培養株は遺伝的に均質な生物から構成されるため、野外試料を直接用いるのに比べ、再現性のある実験材料として広く用いられている。灰色植物は稀産であり、このような培養株の数は限られていることから、我々は世界各地の保存培養機関より保存培養株を取り寄せ利用しており、さらには野外採集試料から新たに新規培養株を確立することで、クローン株レベルでの細胞微細形態の観察を行っている<sup>3, 10)</sup>。



### 3. 原始的植物細胞のFE-SEM観察

陸上植物の細胞は細胞膜で包まれた原形質体(プロトプラスト)とその外側をとり囲む細胞壁で構成されている。一方、微細藻類では必ずしも細胞壁は存在せず、細胞壁とは独立に細胞原形質体の表層に細胞膜以外の構造(細胞外被構造)が存在する場合がある。灰色植物キアノポラ属は細胞壁を持たず、プレートを含んだ扁平小胞であるプレート小胞が細胞膜を裏打ちする特異な細胞外被を持つことは知られていた<sup>9)</sup>が、これを反映した表面の微細構造は知られていなかった。

我々はまず汎用 SEM を用いて酸化オスミウムで単固定したキアノポラ・パドクサ(*Cyanophora paradoxa*)の細胞の観察を行った<sup>10)</sup>。本種はキアノポラ属の中で最も普通に利用されている種であり、灰色植物を代表するモデル生物でもある(図1)。加速電圧15 kV では従来の報告<sup>9)</sup>と同様に細胞表面に外被の構造が観察されなかった。ところが、電子線が透過せず細胞表面構造が観察可能となる低加速電圧で細胞外被表面に微細構造が存在することが明らかとなった(図3)<sup>10)</sup>。

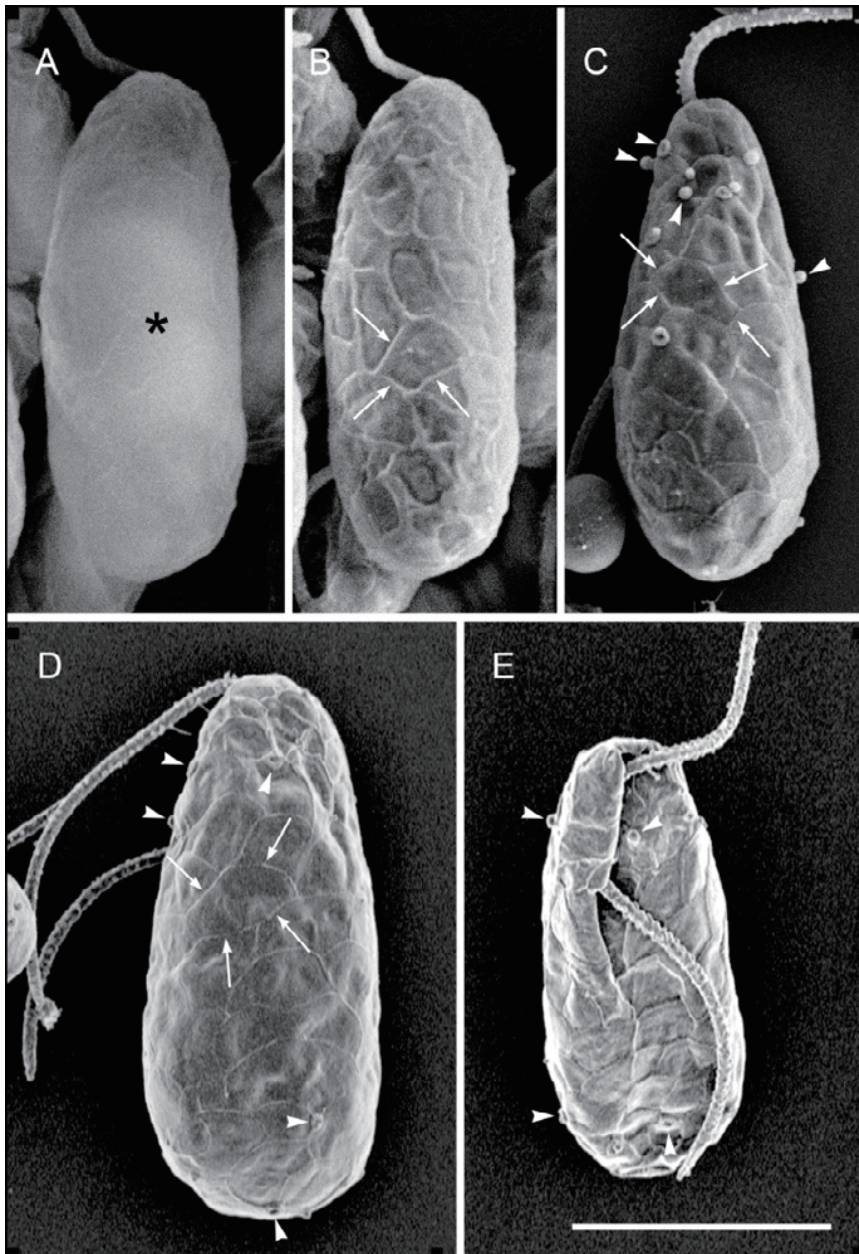


図3 灰色植物キアノポラ・パドクサ(*Cyanophora paradoxa*)を用いた走査電子顕微鏡(SEM)法の比較。Bar = 5  $\mu$ m。

- (A)四酸化オスミウム単固定, 汎用SEM 像, 加速電圧 15 kV。
- (B)四酸化オスミウム単固定, 汎用SEM 像, 加速電圧 5 kV。低加速電圧で表面構造が現れた。
- (C)四酸化オスミウム・グルタルアルデヒド二重固定, 汎用SEM 像, 加速電圧 5 kV。固定法をよりマイルドなものとすることでアーティファクトの少ない構造が観察できた。
- (D, E) 四酸化オスミウム・グルタルアルデヒド二重固定, 電界放出形(FE-) SEM 像, 加速電圧1 kV。低加速電圧FE-SEM 法によって、嶺で囲まれた模様が鮮明に観察できた。文献<sup>10)</sup>より転用した。日本メンデル協会の転載許可による。



しかし、キアノボラの細胞外被の微細な模様を捉えるには汎用 SEM の分解能では不十分であった。そこで超高分解能電界放出形 SEM (FE-SEM) による表面観察を実施した (日立ハイテクデモルーム SU8020 を利用させて頂いた)。近年の超高分解能 FESEM は電界放出銃の印加電圧に比べても低い照射電圧が可能となっており、低加速電圧超高分解能観察が可能な FE-SEM であれば外被表面の微細構造の詳細が明らかになると期待したのである。この結果、キアノボラ・パラドクサの細胞表面全体を覆う、嶺により縁どられた模様が認められた<sup>10)</sup> (図3)。キアノボラの細胞膜表面全体がこのような緻密な微細な模様で覆われているとは思ってもよらなかったもので、観察している我々にとっては驚きであった。そしてこの嶺構造を解明するため、超薄切片透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行ったところ、嶺は細胞膜を裏打ちするプレート小胞の境界における反り上がりによって形成されていることが分かった<sup>10)</sup>。キアノボラの細胞は細胞壁を欠くため、このような強固なプレートを包んだ扁平小胞が隙間なく細胞膜を裏打ちすることで細胞の支持機能を担っていると考えられる。その結果プレート小胞同士に重なりが生じ、細胞膜表面に嶺や模様という緻密な構造が生じていたのだ。超高分解能 FE-SEM が、細胞膜の表面全体にちりばめられた裏打ちする扁平小胞がもたらす緻密な微細模様を捉えたのであった。我々のその後の研究成果によれば、この「細胞膜の内側で小葉状の扁平小胞が密に裏打ちする細胞外被構造」を有するキアノボラ様の鞭毛虫が灰色植物ひいては植物の共通祖先であったと推測されている<sup>8)</sup>。FE-SEM によって 10-20 億年前の最初の植物の姿を微細構造レベルで「見た」瞬間であった。

## 4. 原始的植物の種の多様性

さてキアノボラ属と一口で言っても、キアノボラ・パラドクサ 1 種だけが存在する訳ではない。本属の種多様性が分からなければその共通祖先、最初の植物の姿にまで遡る共通の特徴も分からない。緑色植物・紅色植物と同じ時間進化してきたのだから、灰色植物においてもそれなりの形態の多様化があつて然るべきであると考え、我々は灰色植物の種分類学的研究を実施している<sup>2)</sup>。キアノボラ属には従来 3 種が記載されていたが、多くのクローン株を用いた微細形態の多様性に着目した研究は実施されていなかった<sup>3)</sup>。そこでキアノボラ・パラドクサで認められた細胞外被構造などの微細形態に着目した比較形態観察を開始した。最新の電子顕微鏡機器を用いることで、微細な灰色植物であっても巨視的な植物と同じように形態による種分類ができると期待したからである<sup>2)</sup>。

我々が独自に確立した新規株を含む培養株 8 株全株を用いて、低加速電圧 FE-SEM と超薄切片 TEM による形態比較を行った (図4)。

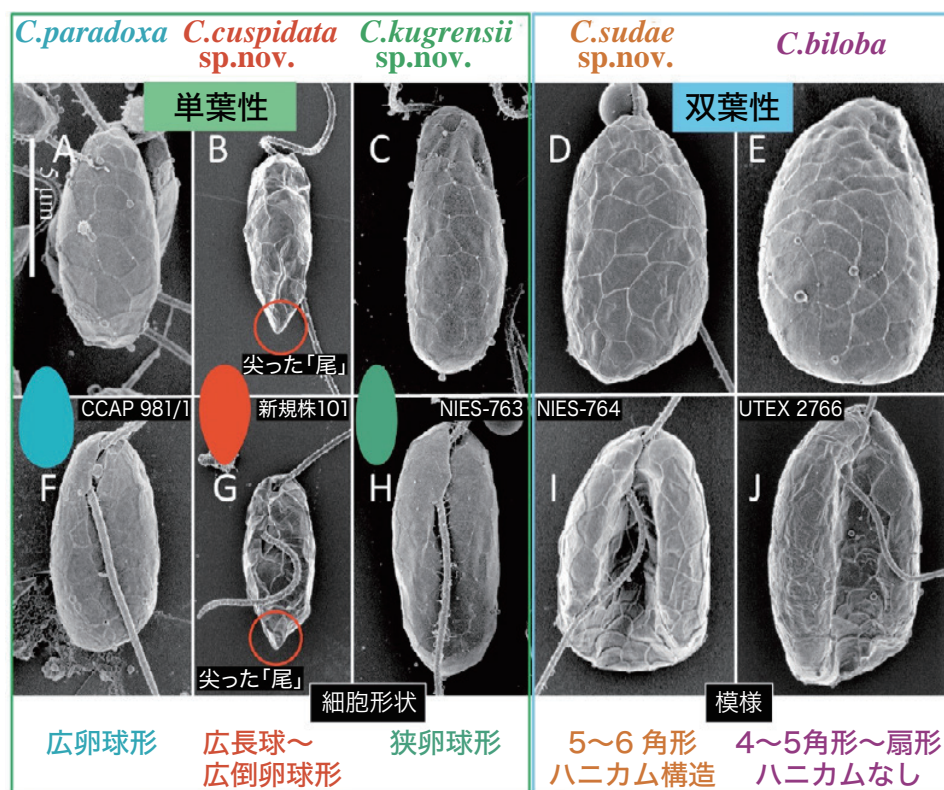


図4 Cyanophora 属5種の低加速電圧電界放出形走査電子顕微鏡写真。Bar=5 μm。(A, F)キアノボラ・パラドクサ(*Cyanophora paradoxa*)。(B, G) 新規キアノボラ・クスピデータ(*Cyanophora cuspidata*)。細胞後端は時に非常に尖った尾を形成していた。(C, H) 新規キアノボラ・クグレンシー(*Cyanophora kugrensis*)。(D, I) 新規キアノボラ・スダエ(*Cyanophora sudae*)。模様は5～6角形でハニカム構造様。(E, J) キアノボラ・ピロバ(*C. biloba*)。模様は4～5角形～扇型。文献<sup>3)</sup>より引用・改変した。John Wiley and Sonsの転載許可による(License Number: 3790920895102)。



その結果、先述のキアノポラ・パロドクサで判明した、細胞膜を裏打ちするプレート小胞が重なりあって細胞全体を覆うという外被微細構造は本属に共通する特徴であることが分かった<sup>3)</sup>。一方、本属は腹側から見て細胞の中央に深い溝が走り左右の両葉に分かれる双葉性の種と、このような葉の分化の見られない単葉性の種とに大きく分類された(図4)。

双葉群において嶺で囲まれた細胞表面の模様を細胞背側で比較したところ、キアノポラ・ビロバ(*Cyanophora biloba*)で4~5角形~扇型であるのに対し、新種キアノポラ・スダエ(*Cyanophora sudaе*)では5~6角形のハニカム構造様であり、両種をこの表面の模様によって識別することができた(図4)<sup>3)</sup>。フリーズフラクチャ(凍結切断)TEMによって細胞膜を剥がして観察した結果、低加速電圧FE-SEMで観察される模様が内部のプレート小胞の形態を反映していた(図5)。

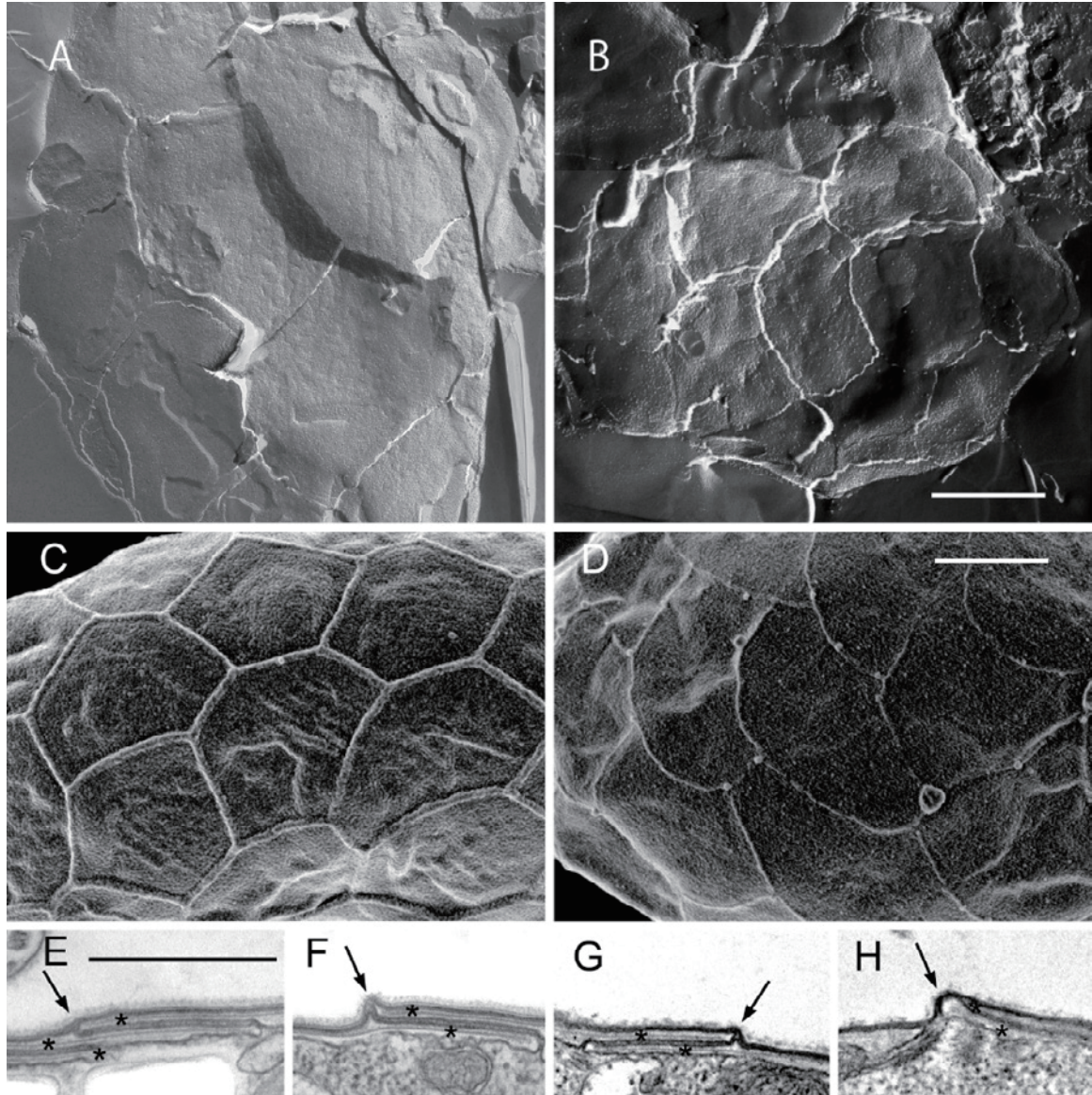


図5 フリーズフラクチャ透過電子顕微鏡(TEM) (A, B), 電界放出形走査電子顕微鏡写真(C, D)と超薄切片TEM(E-H)。細胞表面全体を覆う模様は嶺により縁どられるが、嶺はプレート小胞の境界における反り上がりによって形成され、模様は内部のプレートの形態を反映していた。Bar=1  $\mu$ m。(A, C, E, F)新種キアノポラ・スダエ(*Cyanophora sudaе*)。(B, D, G, H)キアノポラ・ビローバ(*C. biloba*)。文献<sup>3)</sup>より引用・改変した。John Wiley and Sonsの転載許可による(License Number: 3790920895102)。

単葉群では、新種キアノポラ・クスピダータ(*Cyanophora cuspidata*)がしばしば細胞後端に非常に鋭く尖った尾を形成する点で区別できた(図4)<sup>3)</sup>。この尾は低加速電圧FE-SEM法によって初めて非常に鋭利であり本種に固有であることが明瞭に示された。さらに細胞の輪郭が明瞭なSEM写真上では詳細な細胞形状が測定でき、種間の統計的な形態差が判明した。キアノポラ・クスピダータでは細胞前端の方がより膨らむ(頭でっかちな)広長球~広倒卵球形であった。一方、キアノポラ・パロドクサではずんぐりした卵のような広卵球形であり、新種キアノポラ・クグレンシー(*Cyanophora kugrensi*)では細長い卵のような狭卵球形であった(図4)。

以上の分類学的研究<sup>3)</sup>によって3新種が明らかとなり(図4)、本属には従来の2倍にも相当する種が存在することが判明した。このことからこれまでは非常に小さな系統群と考えられてきた灰色植物にも光学顕微鏡のみでは判別が難しい未記載種がかなり存在することが示唆された。この中で低加速電圧 FE-SEM 観察による形態比較は種を識別する分類形質を発見するのに有効であり、細胞全体を観察できる利点を活かし微細構造レベルの識別点を明らかとした。より高倍率の観察も可能な FE-SEM では、細胞膜表面のナノスケールのざらつきに種間差が認められたのだが、現状では分類形質として採用していない<sup>2)</sup>。近い将来本属の利用可能な培養株が増えることで、このスケールでの分類形質によって更なる新種を識別できるようになるかもしれない。

## 5. 微細藻類の分類学と形態学のこれから

これまで概観したように低加速電圧 FE-SEM 法による形態比較は微細構造レベルの分類形質を明らかにし、微細藻類の種を識別するのに威力を発揮した。さらに現在を生きる我々が直接観察することのできない10-20億年前の植物の最初の姿を「見る」ことができた。より多くの灰色植物や真核生物で微細構造レベルの種分類が進めば、これらの過去の姿や進化の過程を推測することができるかも知れない<sup>2,8)</sup>。現在我々はキアノポラとは別の灰色植物であるグラウコキスティス(*Glaucocystis*)属(図1)の種レベルの分類学研究を実施している<sup>1)</sup>。本属ではキアノポラとは異なり厚い細胞壁を持つので<sup>8)</sup>、低加速電圧 FE-SEM による細胞外被の直接観察は困難である。このため我々は超高压電子顕微鏡(H-3000)を用いたトモグラフィーによる外被構造の立体微細構造レベルの観察を行っている。また、超高分解能 FE-SEM(SU8220)を用いた細胞壁表面の微細構造観察も実施している。超高压電子顕微鏡による比較形態学的な観察は微細藻類の分類に用いられたことはいまだにないが、細胞壁の内側の原形質体の3次元構造が直接観察できるので、今後細胞微細構造の多様性を用いて微生物を分類するのに非常に有用であると考えられる。

2015年はずいぶん故外村彰博士の悲願でもあった原子分解能・ホログラフィー電子顕微鏡が完成した年となった<sup>11)</sup>。生物試料についても昨今の技術革新によって FE-SEM や走査型プローブ顕微鏡(SPM)による表面構造全体の詳細な超高分解能観察が可能となり、細胞表面の凹凸のような3次元情報も容易に得られるようになっている。一方、超高压電子顕微鏡や集束イオンビーム(FIB-)SEMを用いることで細胞内部の3次元情報も丸ごと得られるような時代が訪れた。これらの次世代の超微形態観察は、断片的な情報しか得られなかった従来の電顕観察に取って代わって今後の微生物分類の主流となると期待される。分類学と次世代微細形態学が融合することで、現生の生物と祖先的生物の3次元レベルの微細な姿が明らかとなっていくことであろう。この分野からも電子顕微鏡の益々の技術革新が期待される。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、共同研究として低加速電圧 SEM 観察法・固定法を丹念に御教授下さった佐藤繭子、豊岡公德両博士(理化学研究所)には非常に御尽力頂いた。また、フリーズフラクチャ TEM 観察に関しては、高知大学において川村真依氏、奥田一雄教授の親切な御指導の下、共同研究を行った。FE-SEM は日立ハイテクのデモルーム SU8020 を利用させて頂き、観察に際しては檀紫氏、渡邊俊哉氏に御助力を頂いた。藻類試料では川船かおる博士(東京工業大学)にお世話になり、松崎令博士(東京大学)には微細藻類の取扱いから分子実験まで様々な面で大変面倒をお掛けした。



## 参考文献

- 1) 高橋紀之, 東京大学博士論文 (英文), 東京 (2016).
- 2) 高橋紀之, 野崎久義, *Plant Morphology* **29**, 49-54 (2016).
- 3) T. Takahashi *et al.*, *J Phycol.*, **50**, 1058-1069 (2014).
- 4) L. Kies, in *Algae and symbioses*, Reisser W (ed.), Bristol, **353-377** (1992).
- 5) L. Sagan, *J Theor Biol.*, **14**, 225-274 (1967).
- 6) D. C. Price *et al.*, *Science*, **335**, 843-847 (2012).
- 7) F. W. Spiegel, *Science*, **335**, 809-810 (2012).
- 8) T. Takahashi *et al.*, *Sci Rep.*, **5**, 14735 (2015).
- 9) P. Kugrens *et al.*, *J Phycol.*, **35**, 844-854 (1999).
- 10) T. Takahashi *et al.*, *Cytologia.*, **79**, 119-123 (2014).
- 11) T. Akashi *et al.*, *Appl Phys Lett.*, **106**, 074101 (2015).

## 著者紹介

<sup>\*1</sup> 高橋 紀之

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 博士後期課程修了 博士 (理学)

<sup>\*2</sup> 野崎 久義

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 准教授 博士 (理学)



# サイズ排除クロマトグラフ —有機物分析のための新しい検出器—

Size-Exclusion Chromatography: A New Type of Detector for Organic Matter Analysis



中央大学 理工学部  
人間総合理工学科  
准教授

山村 寛 博士(工学)

## 1. HPSEC-OCDの登場

川や湖など、自然の水には様々な有機物が含まれているが、これらの有機物はどこからくるのだろうか？有機物の排出源として、大きく動物由来と植物由来に分類できる。動物由来のものは生活排水、し尿や死体など、動物の身の回りから排出され、腐食したものが主な発生源となる。一方で、植物由来のものは植物の腐食に伴って排出される成分が主な発生源となる。動物由来と植物由来の有機物は共に、排出された時には数百万 Da (Da：ダルトンは分子量の単位) の巨大分子であるが、日射や微生物の活動などにより物理的・化学的・生物的に酸化、分解されることで数千 Da の分子へと変化する。この自然の分解過程において、タンパク質や多糖類を起源とする高分子の親水性有機物は、不飽和度(二重結合などの割合)を増し、疎水性が高い茶褐色の有機物へと特性が大きく変化することになる。

分解によって生成される数千 Da の不飽和度の高い有機物は“フミン質”と呼ばれており、ある意味、自然界の有機物の多くはフミン質を主体として構成されている。このフミン質は、土壌中では貴重な有機物源となり、さらには金属と錯体を形成しやすい性質があることから、森から海まで鉄を運搬するなど、自然界の物質循環にとって、重要な役割を担っている。一方で、水道水を作る浄水過程では、消毒のために加えた塩素とフミン質が反応して発ガン性物質であるトリハロメタンを生成することも知られており、濃度が高い地域ではイオン交換などにより、フミン質を除去して消毒している地域も存在する。このように、自然科学分野および工学分野においてフミン質の挙動や特性の解明は重要であり、これまでも南極からアマゾンの奥地に至るまで、世界中の様々な水域を対象にフミン質の量や物理化学的特性に関する研究が進められている<sup>1)</sup>。

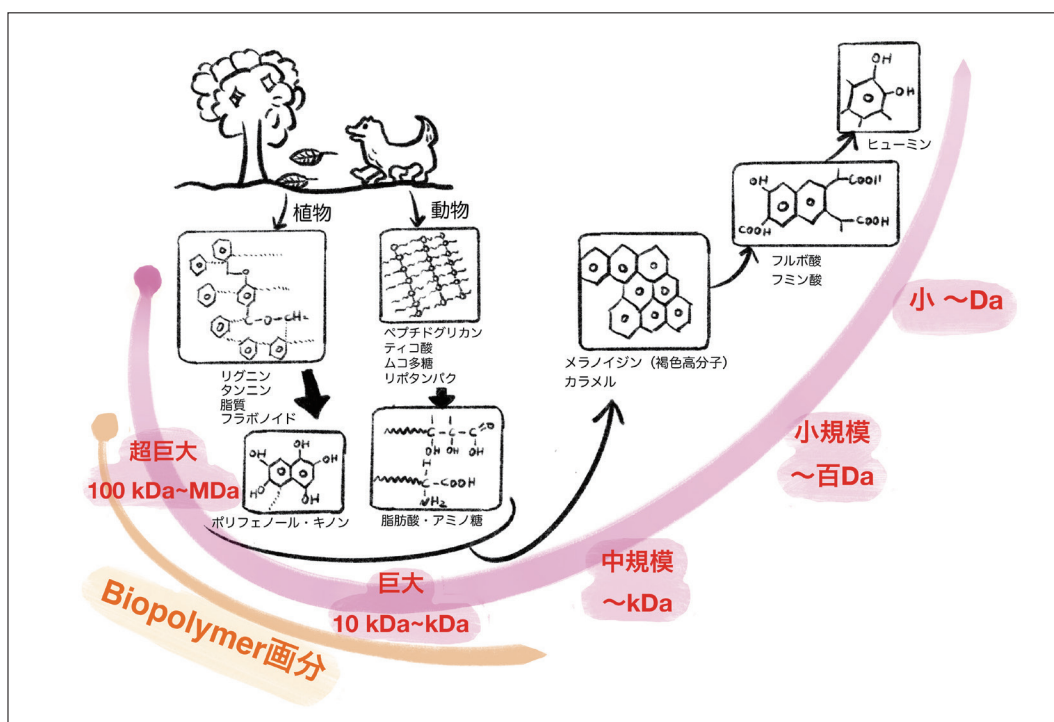


図1 自然水中の有機物の分解過程

フミン質は自然界の有機物が分解された結果生成する成分の総称であるため、幅広い分子量を持った多種多様な成分で構成され、かつ季節や水域によってその構成成分は七変幻する<sup>2)</sup>。さらに、非常に複雑な化学構造を有していることから、化学構造を一様に決定するのは難しく、一般的にはクロマトグラフィーなどにより類似した物理化学的特性に応じて分画した後に、定性・定量分析されることが多い。特に、サイズ分画クロマトグラフィー (HPSEC: Size exclusion liquid chromatography) は、数千 Da から数百万 Da までの非常に広範なフミン質を複数の画分に一度で分画できることから、自然水中の有機物分析手法として昔から利用されてきた。2000年以前は、UV-Vis を用いた波長256 nm の紫外外部吸光や蛍光を検出器とした構成が多かった。これは、フミン質の不飽和度が高い性質や蛍光分子を有する特徴を利用している。一方で、紫外外部吸光や蛍光では多糖類など、一部の有機物が検出できないことから、親水性の高い高分子有機物や低分子有機酸などの挙動を捉えるのは難しいという課題があった。これらの課題を解決するために開発されたのが、検出器として全有機炭素計 (OCD: Organic carbon detector) を接続した HPSEC-OCD である。

OCD は、有機物を完全酸化した際に発生する CO<sub>2</sub> 量を定量することで有機炭素量を定量する手法であり、基本的にすべての有機炭素を高精度で定量できる。現在、全有機炭素計は、有機物を高温の触媒で酸化する「乾式酸化法」と有機物を酸化剤と UV 照射で酸化する「湿式酸化法」の2種類が存在する。乾式酸化法は数百 ppb から数百 ppm までの広範囲な濃度の有機物を定量できる一方で、湿式酸化法は数 ppb から数 ppm までの範囲の低濃度の有機物を高感度で測定できるという特徴を有している。さらに、湿式酸化法はインラインで測定ができることから、HPLC への接続も簡単にできる。Sievers により開発された TOC-800 型は4秒毎に TOC を測定できるターボモードを搭載しており、2000年には TOC-800 型と HPLC を接続した分析装置を用いたフミン質の分析手法が *Environmental Science and Technology* 誌に発表された<sup>3)</sup>。紫外外部吸光や蛍光検出器では検出されないピークが検出できることから、HPSEC-OCD の登場により、これまで確認できなかった高分子親水性の検出が可能となった。

## 2. 湿式酸化型OCDの測定原理

湿式酸化型 OCD は、送液ポンプ、サンプルや溶離液の無機炭酸を抜く脱気装置デガッサー、酸化剤と緩衝液を注入するシリンジポンプ、酸化反応を促進する UV ランプ、CO<sub>2</sub> ガスを定量するガス透過膜式導電率セルが1本のラインで接続された構成となっている。国内ではセントラル科学株式会社が代理店となって TOC-800 型の後継機である M9e シリーズが販売されている。分析フローは以下の図に示した通りである。

1. 約 1 mL/min に調整されたペリスタリックポンプにより、サンプルが連続的に吸引される
2. サンプルにリン酸緩衝液を添加し、pH を低減することで水中に溶解した無機炭酸を CO<sub>2</sub> ガスに変換する
3. 発生した CO<sub>2</sub> ガスを脱気装置で除去する
4. サンプルに一定量の酸化剤を注入する
5. UV ランプを照射し、有機物を完全に酸化・分解・無機化する
6. 無機化で発生した CO<sub>2</sub> ガスをガス透過膜式導電率セルで定量する
7. 測定後のサンプルは装置外に排出される

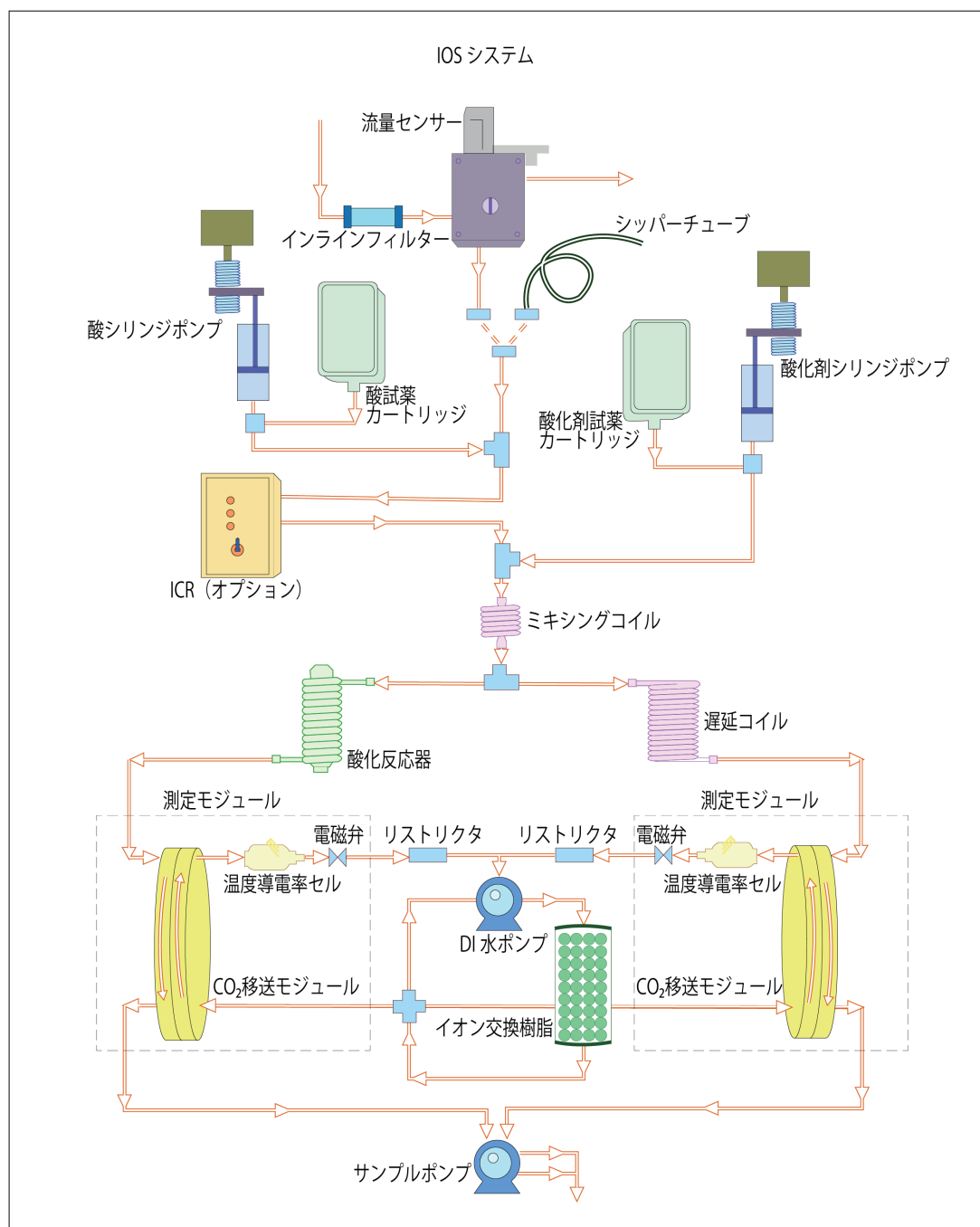


図2 OCD計の測定フロー図

### 3. HPSEC-OCDの測定条件<sup>4)</sup>

**流量**…OCD を HPLC と接続する際に特に気をつける必要があるのが、OCD 計の流量である。Sievers の OCD は送液流量が固定されており、この流量に合わせて HPLC のカラムで分離した溶液を供給しなければならない。送液量が不足する場合には、OCD が空気を吸引してしまい、最悪、故障の原因となる。一方、送液量が過剰な場合には OCD の送液ラインが加圧され、液漏れが発生する原因となる。OCD の送液量はチューブポンプの劣化などにも影響されるため、厳密には一定流量付近を増減していることから、実際には HPLC と OCD の間に流量調整用のバッファが必要となる。我々は OCD と HPLC との間に三方コネクターを接続し、HPLC の流量 > TOC の流量の際には廃液し、HPLC の流量 < TOC の流量の場合には廃液を一部 OCD に取り込むように工夫している。分析にあたっては、廃液を取り入れることがないように、常に HPLC の流量が TOC 計の流量よりも若干多くなるように、HPLC の送液流量を調整している。この辺は、装置を接続した際に、試行錯誤が必要となる。

**カラムの選択**…カラムの選定にあたっては、(1)無機系の溶離液が使用できる、(2)1 mL/min 以上の高流量で使用できる、(3)数百 Da から数百万 Da までを分画できる、という条件をすべて満たす必要がある。特に、1 mL/min 以上の流速で広範な分子を分画するには、樹脂サイズが比較的小さく、カラム内滞留時間がある程度確保する必要がある。そのため、既往の研究を含め、多くの場合で直径20 mm、長さ25 cmの極太カラムに東ソー製の樹脂 Toyopearl<sup>®</sup> HW-50s を封入したものを使用している。Toyopearl<sup>®</sup> HW-50s は排除限界 $8 \times 10^4$  Da であり、より大きな分子量まで分画したい場合には、排除限界 $5 \times 10^6$  Da の Toyopearl<sup>®</sup> HW-65s を使用する場合もある。20 mm × 25 cm のカラムを使用して、1 mL/min 以上で送液した場合、カラム内滞留時間が長いため、1 サンプルの分析に120分以上かかり、分析のスループットは低い(1日で12サンプルしか分析できない)。我々は、Toyopearl<sup>®</sup> HW-65s と TSKgel<sup>®</sup> G3000SW<sub>XL</sub> をそれぞれ封入した直径7.8 mm、長さ30 cm のカラムを連結させることで、より高速に高分子有機物とフミン酸を定量する技術を確認している。これにより、従来の半分以下の時間(約50分)で分析できるため、大量のサンプルを分析できるようになった。このように、カラムの選定にあたっては分解能が必要な分子量域を明確にすることで、複数のカラムを連結するなどにより、高速に分析できる条件を見出すことができる。

**サンプル注入量**…サンプル注入量は、検出器の感度に依存する。溶離液を OCD で計測した際に 20 ppb 程度を示すことから、この値以下の場合にはピークが検出されない。極太カラムを使用する際には、滞留時間が長く、注入したサンプルが希釈されてしまうため、一般的には 1 ~ 5 mL 程度の大量のサンプルを注入する必要がある。一方で、我々が開発した 2 本連結カラムを使用する場合には、サンプル注入量は 1/3 程度にまで低減できるため、通常は 500  $\mu$ L ~ 1 mL 程度の試料を注入することが多い。

**TOC 計の酸化剤と pH 緩衝液**…サンプルの種類によって OCD の pH 緩衝液量や酸化剤量を増減する必要があるが、対象とする水や有機物濃度がある程度決まっている場合には、最適化した後に調整する機会はほとんどない。河川水や湖沼水の場合には、通常リン酸緩衝液を 0.75  $\mu$ L/min、酸化剤を 2.5  $\mu$ L/min に設定している。

## 4. HPSEC-OCDの測定例

まずは、Toyopearl<sup>®</sup> HW-65s と TSKgel<sup>®</sup> G3000SW<sub>XL</sub> を連結したカラムを装着した HPSEC-OCD の分子量と保持時間の関係を図3に示す。

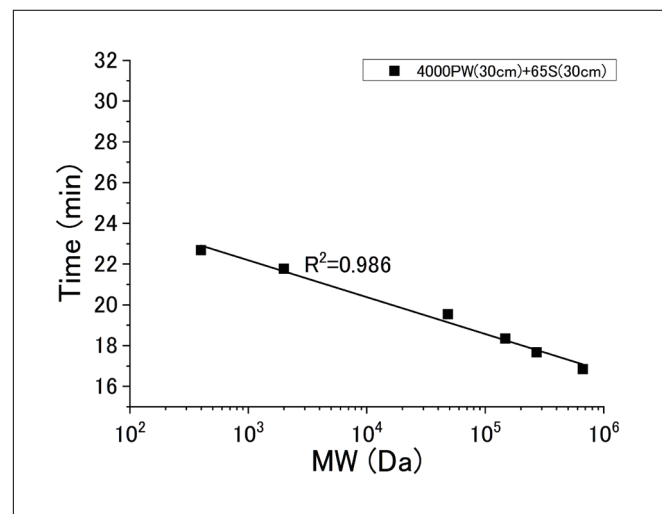


図3 分子量と保持時間の関係

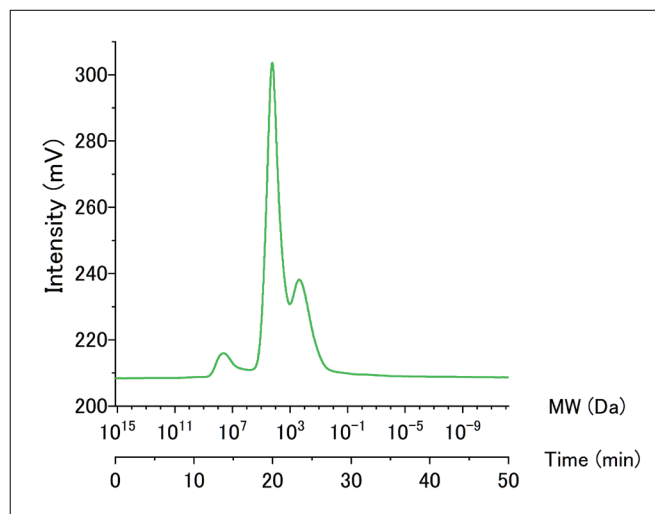


図4 HPSEC-OCD計の測定例  
HPLCとして日立高速液体クロマトグラフChromaster<sup>®</sup>を使用。



このカラムでは数百 Da から数十万 Da までの範囲で線形関係が得られており、2 本のカラムを連結することで、幅広い分子を分画できるようになっていることがわかる。特に、10 万 ( $10^5$ ) Da 以上の高分子については、数千 Da のピークと重なり合うことなく完全に分離されており、ピーク面積から濃度も定量できる。続いて、河川水の分子量分布を分析した結果を図 4 に示す。これは北海道江別市を流れる千歳川を採水して分析した結果であり、3 つの顕著なピークが検出されている。2 つめの大きなピークは UV 検出器でも検出できていたが、1 つめの小さなピークについては UV 検出器では検出できなかったため、1 つめのピークは UV 吸光度を持たない、多糖類様の成分の存在を示すものであると推測される。このように、HPSEC-OCD を利用することで、これまでの検出器では検出できなかった高分子多糖類成分を検出・定量できるようになる。

本稿の最初に述べた有機物の起源の話に戻るが、動物由来の有機物は特に高分子成分が高いことが明らかになっており、他にも生物活性が高い下水処理水や富栄養化した湖などでも同様に高い値となることが多い。一方で、植物由来の有機物は、一般には十分な時間をかけて分解されるため、高分子成分の濃度は低い。これらのことから、HPSEC-OCD で検出される高分子成分の濃度を測定することで、水の生物活性度や人的汚染度が評価できるとする研究も報告されている<sup>5)</sup>。

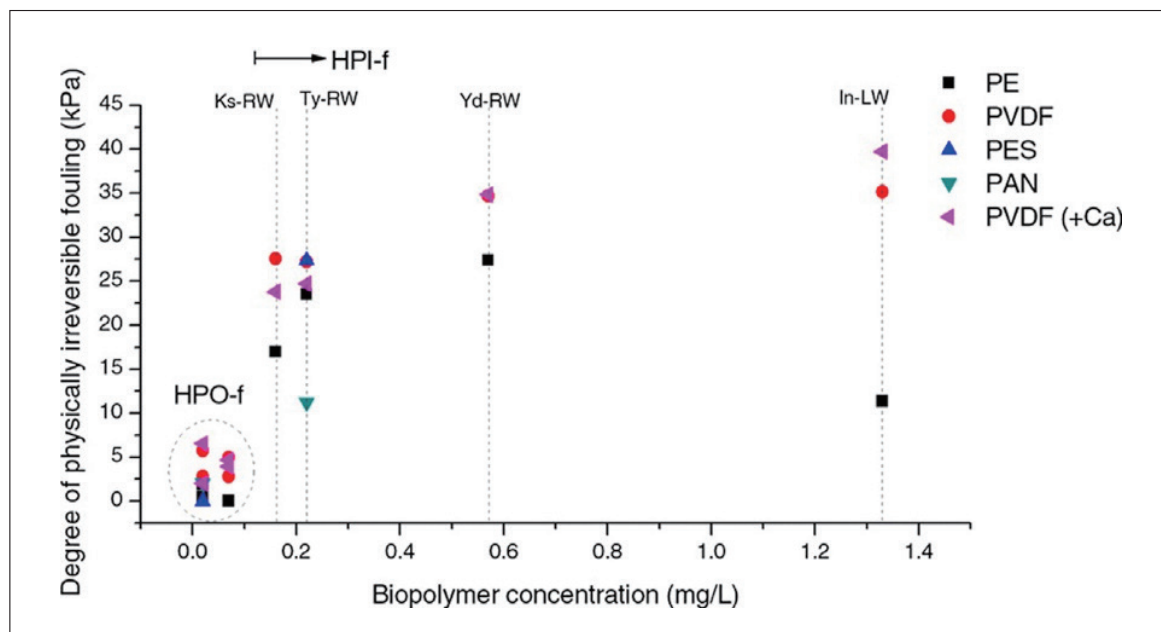


図5 膜ファウリングと高分子有機物濃度との関係<sup>5)</sup>

また、膜を使った用排水処理においては、この高分子成分が膜細孔を閉塞される成分であることも明らかになっており、高分子成分の濃度と膜閉塞速度に明確な線形関係が得られている。このように、HPSEC-OCD による分析は、河川水や湖沼水中の分析だけでなく、食品工業やバイオプロセス管理においても広く利用できる可能性を秘めており、今後の益々の用途拡大が期待されている。

これまで、HPSEC-OCD の利点を中心に述べてきたが、解決すべき欠点も多数存在する。いちばんクリティカルな課題は「OCD 計のダウンタイム」である。シリンジポンプで酸化剤と pH 緩衝液を注入している以上 (図2参照)、一定時間毎にシリンジに溶液を補充する時間が必要であり、その間はデータが欠損することになる。ダウンタイムがピークに被らなければ全く問題ないが、ピーク検出中にダウンタイムが到来した際には、そのサンプルを再度計測しなければならない。この点については、TOC 計のモデルチェンジごとに改善が行われている。また、オイルなどの疎水性が高い成分を多く含むサンプルは、カラムにこれらの成分が吸着するため、前処理を施した後に分析する必要がある。さもなければ、高価なカラムの寿命を大幅に縮める結果となる。

## 5. HPSEC用新検出器の展望

HPSEC の検出器として OCD の有用性をこれまで説明してきたが、現在、HPSEC に分光蛍光光度計を接続した、HPSEC- 三次元励起蛍光分析 (Excitation Emission Matrix) の開発にチャレンジしている。EEM は簡易かつ高感度にフミン質などを検出できることから、これまで河川・湖沼・海域の水質分析などで多く利用されてきた。特に、近年では多変量解析の一種である PARAFAC (Parallel factor analysis) 分析<sup>8)</sup>により、重複したピークを分離する技術が開発されて以降、浄水処理や下水処理のプロセス管理、水環境での汚染源特定など、様々な用途が開発されている。一方で、PARAFAC により重複したスペクトルを分離するには、多種多様かつ大量のサンプルを収集する必要があるため、実際にはサンプル数の不足や、多様性が小さなサンプル群では分離が難しい場合も多々遭遇してきた。我々は HPSEC でまずサイズ毎に有機物を分画した後に EEM 分析に供することで、より少量のサンプルでも正確に PARAFAC できる手法を開発している。



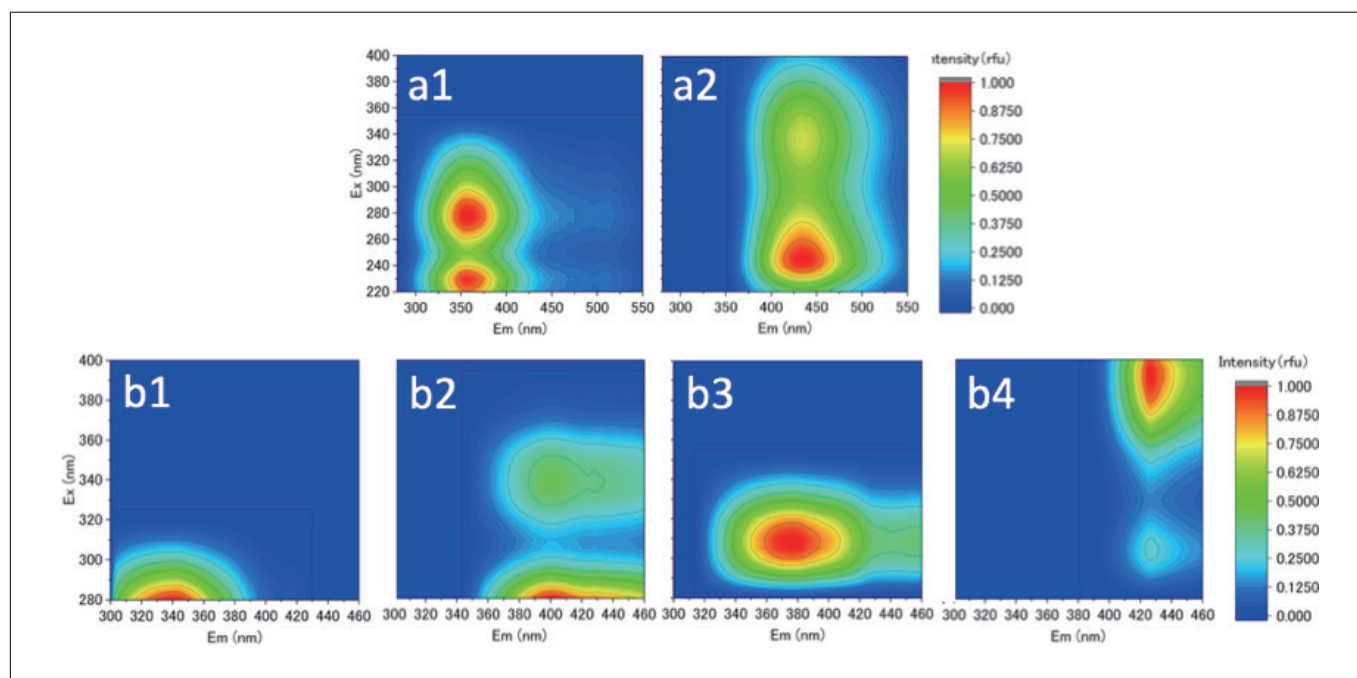


図6 4種類のサンプルをPARAFACにより分離した際のコンポーネント成分：(a) 得られたスペクトルを直接PARAFACした際の結果，(b) サンプルをLCで分画・分取した後にEEM測定したスペクトルをPARAFACした際の結果

具体的には、HPSECで分画した後にマイクロプレートに分取し、マイクロプレート付属装置を装着した日立分光蛍光光度計 F-7100 形で三次元励起蛍光分析測定することで、1 サンプルあたり、29 個の EEM スペクトルを得ることに成功している。下水処理水など、4 種類の試料についてそのまま EEM-PARAFAC を実施したところ、2 成分にしか分離することができなかった。一方で、HPSEC 後に EEM 分析したものを対象として PARAFAC した結果、2 成分多い 4 成分が分離できた。これらの結果は、これまでサンプル数が限られていたために、PARAFAC が活用できなかった場合に極めて有効な手法となりうる。さらに、HPSEC と EEM を連結した状態で分析できるようになれば、より簡潔かつ高速に水中の有機物の挙動を解明できるようになると期待している。現在、フローセル付属装置を装着した分光蛍光光度計に HPSEC を連結した装置を開発しており、測定条件や分析条件などの最適化を実施しているところである。結果が得られたところに、再度、本誌において紹介したい。

## 参考文献

- 1) 石渡良志, 米林甲陽, 宮島徹, 環境中の腐植物質 その特徴と研究法, 三共出版 (2011).
- 2) J. A. Leenheer, Systematic Approaches to Comprehensive Analysis of Natural Organic Matter, *Annals of Environmental Science*, Vol. 3, pp. 1-130 (2009).
- 3) N. Her, G. Amy, D. Foss, J. Cho, Y. Yoon, P. Kosenka, Optimization of method for detecting and characterizing NOM by HPLC-size exclusion chromatography with UV and on-line DOC detection, *Environmental Science & Technology*, Vol. 36, No. 5, pp. 1069-1076 (2002).
- 4) H. Yamamura, K. Kimura, Y. Watanabe, Mechanism involved in the evolution of physically irreversible fouling in microfiltration and ultrafiltration membranes used for drinking water treatment, *Environmental Science & Technology*, Vol. 41, No. 19, pp. 6789-6794 (2007).
- 5) H. Yamamura, K. Okimoto, K. Kimura, Y. Watanabe, Hydrophilic fraction of natural organic matter causing irreversible fouling of microfiltration and ultrafiltration membranes, *Water Res.*, Vol. 54, pp. 123-36 (2014).
- 6) S. A. Huber, A. Balz, M. Abert, New method for urea analysis in surface and tap waters with LC-OCD-OND (liquid chromatography-organic carbon detection-organic nitrogen detection), *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, Vol. 60, No. 3, pp. 159-166 (2011).
- 7) S. A. Huber, A. Balz, M. Abert, W. Pronk, Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography - organic carbon detection - organic nitrogen detection (LC-OCD-OND), *Water Research*, Vol. 45, No. 2, pp. 879-885 (2011).
- 8) C. A. Stedmon, R. Bro, Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial, *Limnology and Oceanography-Methods*, Vol. 6, pp. 572-579 (2008).

1. “Toyoparl<sup>®</sup>”, “TSKgel<sup>®</sup>” は東ソー株式会社の日本における登録商標です。
2. “Chromaster<sup>®</sup>” は株式会社日立ハイテクノロジーズの登録商標です。

# ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)のための ホウ素キャリア開発研究における LC-DAD-MSDの活用

Applications of LC-DAD-MSD in The Development of Boron Carriers for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)



岐阜薬科大学  
薬化学研究室  
教授

永澤 秀子 博士(薬学)

## 1. はじめに

ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、あらかじめがん細胞に選択的に取り込ませた $^{10}\text{B}$ 原子と比較的エネルギーの低い熱中性子との核反応によって生じる強力な粒子線( $\alpha$ 線と $^7\text{Li}$ 粒子)によって、がん細胞を選択的に損傷する放射線療法である<sup>1)</sup>。ここで発生する $\alpha$ 線と $^7\text{Li}$ 粒子は、X線やガンマ線と異なり、発生してから止まるまでの距離(飛程)がほぼ $5\sim 9\ \mu\text{m}$ と非常に短く、細胞1個分の長さ程度なので、うまく腫瘍細胞だけに $^{10}\text{B}$ 原子を取り込ませることができれば、真の意味でピンポイント照射が可能になる。また、BNCTは1968年に世界に先駆けて日本で初めてがん治療に用いられた画期的な放射線療法であり、世界で唯一の原爆被災国である我が国でこのような核反応の有効利用法を確立することは大変重要な意義を持つと考えられる。一方、中性子源として、これまで巨大な実験用原子炉が用いられてきたが、近年、実験室や医療施設に設置できる規模の小型BNCT用加速器(サイクロトロン)が国内で開発され、2012年から前臨床試験が全国的に展開しており、一気にその実用化への機運が高まっている<sup>2)</sup>。このようにBNCTは副作用の少ない理想的ながん治療法となり得るが、そのためには、 $^{10}\text{B}$ 原子を含むホウ素キャリアを腫瘍選択的に送達し、集積させなければならない。現在、臨床適用されているホウ素キャリアは、sodium borocaptate (BSH) および L-p-boronophenylalanine (BPA) に限られ、これらの腫瘍への集積は十分とは言えず、がん組織に選択的に高濃度の $^{10}\text{B}$ 原子を集積できる、新たなホウ素キャリアの開発が強く求められている。

このような背景のもと、我々はペプチド化学に基づく腫瘍選択的ホウ素キャリアの開発に取り組んできた<sup>3,4)</sup>。最近、膜透過性リポペプチドを利用した化学的分子送達システムを基盤とするホウ素キャリアの開発を行った<sup>5)</sup>(図1)。本研究において、分子設計したホウ素キャリアは、膜透過性リポペプチドヴィークルに、リンカーを介して積荷の陰イオン性ホウ素クラスターのBSHを搭載した構造を有する(図2)。陰イオン性ホウ素クラスターには膜透過性がないため、リポペプチド部分を構造最適化することによってBSHを細胞内に効率的に送達、集積させることを目指した。

リポペプチド部の構造展開のため、様々なアミノ酸配列のペプチドと種々の脂質を組み合わせて多様なヴィークル分子を合成した。リポペプチドの合成は固相法で行ったが、分子量が1,000以上と比較的大きく、親水性も高いため、通常の有機合成反応のように簡単にTLCによる確認を行うことができなかった。そこでLC-DAD-MSDによる反応追跡を行うことによって、効率的に研究を進めることができた。その実例を一部紹介する。

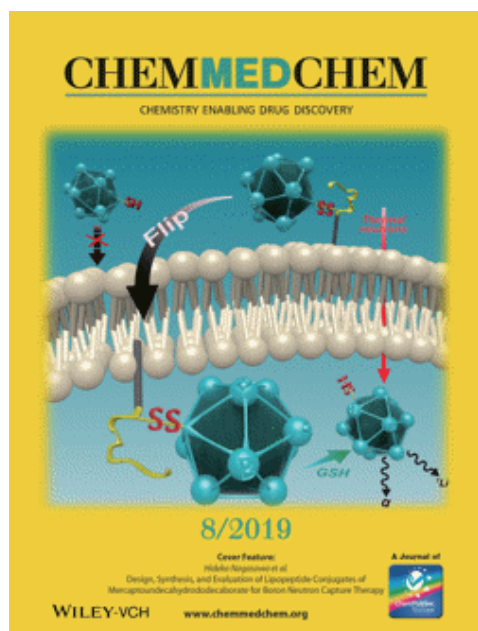


図1 ChemMedChemのバックカバーを飾った辻美恵子助教制作のカバーアート

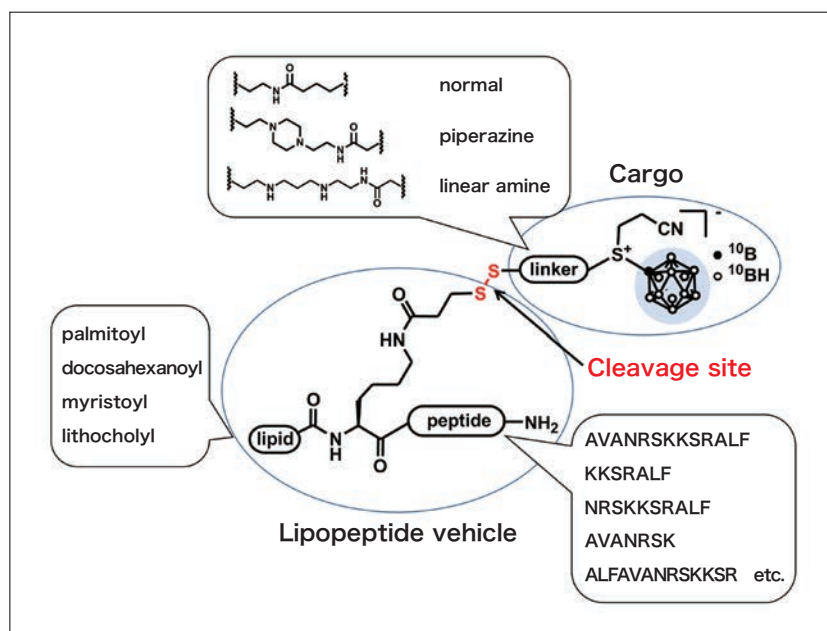


図2 膜透過性ホウ素キャリアの分子設計

## 2. 実験

### 2-1. ホウ素キャリアの合成

リポペプチドヴィークル部は, pepducin として知られる GPCRモジュレーター<sup>6)</sup>の P1pal-13<sup>6)</sup>をリードとして, ペプチド配列と脂質構造について, それぞれ図2のように構造展開したホウ素キャリアを設計・合成した。リポペプチドは Fmoc 法によるマイクロウェーブ固相合成によって調製した。ペプチド合成は, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH および, NovaSyn TGR resin (0.24 mmol/g)を用い, 0.05-0.5 mmolスケールで行った。積荷部分として, BSH につないだリンカーをジスルフィド結合でリポペプチドに結合させるため, ピリジルジスルフィド基を導入した誘導体を合成した。リンカー部としては, アルキレンリンカー, ピペラジンリンカー, 直鎖状アミンリンカーをそれぞれ合成し, 以上の3つのパーツを縮合して種々の候補化合物を得た。以上のうち, 固相合成の場合は, 固相から一部切り出した反応物について, また縮合反応の場合は粗抽出物について LC-MS または直接注入による MS 解析を行って反応の進行状況を追跡した。

サンプルの調製:

ペプチド固相合成の場合, 数残基縮合するごとに, 次のように一部を固相から切り出して反応の進行状況を確認した。樹脂担持ペプチド 20 mg を測りとり, *m*-cresol/H<sub>2</sub>O/TFA (10:10:80 (v/v))を加え, 3時間室温にて攪拌した。ろ過後, Et<sub>2</sub>Oを用いてペプチドを沈降させ, 乾燥させた。得られた粗ペプチドを MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1) 約 1 mL で溶解し, フィルターろ過して LC-MS 分析または direct MS 分析を実施した。化合物 1 から 2 へのジスルフィド交換反応では, 経時的に反応液を一部採取し, MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1) で希釈し, フィルターろ過して LC-MS 分析を行った。

使用機種: 高速液体クロマトグラフ Chromaster<sup>®</sup>

- ・ 5110 ポンプ
- ・ 5210 オートサンプラー
- ・ 5310 カラムオープン
- ・ 5430 ダイオードアレイ検出器
- ・ 5610 質量検出器





図3 高速液体クロマトグラフ Chromaster®

分析条件：

- ・カラム：Symmetry C18 (Waters 社)
- ・サイズ：4.6 × 75 mm
- ・カラム温度：40℃
- ・移動相：0.05% HCOOH in CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (20 min リニアグラジエント 10-80%)
- ・流速：0.5 mL/min
- ・UV 検出：DAD：190-400 nm
- ・MS 検出： $m/z$  100 ~ 1,000
- ・インジェクション量：20  $\mu$ L

## 2-2. 細胞内取込の評価

神経膠芽腫細胞 T98G 細胞に 10 または 20  $\mu$ M のホウ素キャリアを 12 時間処理した後、PBS で洗浄し、細胞を集めた。集めた細胞を硝酸で溶解させ、水で希釈後、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) によってホウ素濃度を測定した。

## 2-3. 中性子線増感効果の評価

T98G 細胞に 20  $\mu$ M の BSH、ホウ素キャリア **2** および **3** を 24 時間処理し、PBS で洗浄後、細胞を集めテフロンチューブに移した。京都大学原子炉重水施設にて 1 MW の強度で室温で中性子ビームを照射した後、コロニー形成アッセイで生存率を求めた。これより線形回帰分析により生存曲線を得て、10% 生存率を与える物理照射線量の D<sub>10</sub> 値を求めた。

# 3. 測定結果

図4A に、ペプチド固相合成反応における、中間体 (5 残基縮合段階) の粗生成物 (上段) および、化合物**1** の反応粗生成物 (下段) の分析データを示す。前者において、目的化合物の予想分子量 592 のピークがメインピークとして観察されたことから、縮合反応が収率よく進行していることが示唆された。このようにペプチド固相合成では、数残基毎に固相の一部から生成物を切り出して LC-MS または direct MS にて確認しながら反応を進めることで、最終生成物を収率よく得ることができる。一方、後者は、化合物**1** の粗抽出物のマスペクトルで、 $m/z$  634.4 のピークがメインで観察され、これは、目的物 (MW1900.2) の 3 価イオンであることが示唆された。ついで、図4B には、化合物**1** から **2** へのジスルフィド交換反応の LC-MS による経時的な反応追跡のデータを示した。反応溶液を一部とって、粗抽出物を分析したところ、原料**1** と目的物**2** のピークがブロードで重なっており、LCチャートだけでは判断が困難だったが、それぞれのピークのマスペクトルを調べたところ、反応開始 15 分後のピーク **a** では、原料**1** の 2 価イオン ( $m/z$  951.7) および 3 価イオン (634.7) が検出されたが、8 時間後のピーク **b** からは、目的物**2** の 3 価イオン (783.9) および 4 価イオン (587.4) が検出されたことから、反応が進んだことがわかった。



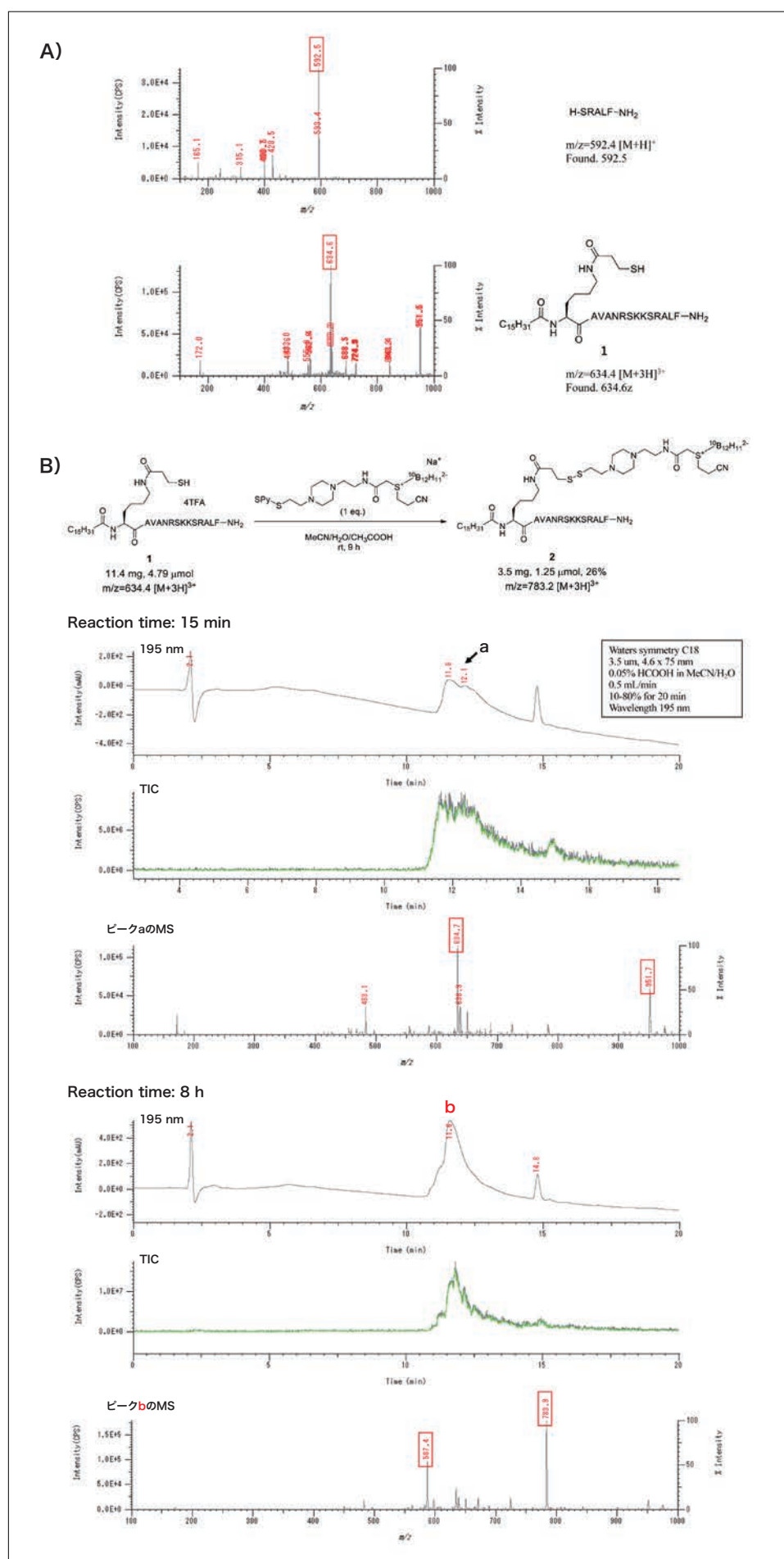


図4 A) 反応の粗生成物のdirect MS分析データ B) 化合物1から2への変換反応のLC-MSモニタリング

## 4. 結果と考察

ペプチド配列と細胞内取り込みの相関解析の結果、P1pal-13由来のオリジナルの13残基とパルミトイル基を有するホウ素キャリア **3** が最大の取り込み量を示した。この配列から N 末端を除いた C 末端側の7残基や10残基の場合、細胞内への取り込みはほとんど認められなかった。一方、N 末端側の7残基および10残基のペプチドでは中程度の取り込みが見られた。これらの結果から、N 末端側の配列が細胞内取り込みには重要であることが示唆された。また、C 末端側の3つの疎水性残基を N 末端側に移動した配列は、中程度の取り込みを示した。ペプチド配列を無秩序に並び替えたペプチドや C 末端側と N 末端側を逆にした逆向き配列のペプチドでは、ほとんど取り込まれなかった。脂質の構造展開として、パルミトイル基をアセチル基に変えると全く取り込まれなくなった。ステロイド骨格を持つリトコール酸では細胞内への取り込みは見られなかった。直鎖不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸および直鎖飽和脂肪酸であるミリストイル基は、中程度の取り込みを示した。結果としてパルミトイル基が最大の取り込み量を示し、直鎖脂肪酸の構造も重要であることがわかった。さらなる細胞内取り込みの向上を目指して、生理的条件下でカチオンとなって細胞膜への親和性を高めることが期待されるアミンリンカーを導入した誘導体の評価も行った。10  $\mu$ M、12時間処理の場合、ピペラジン型リンカーを持つ誘導体 **2** は化合物 **3** と同程度の取り込みを示した。一方、直鎖状アミンリンカーでは有意に取り込み量が減少した。

以上の結果をもとに、ホウ素キャリア **2** および **3** を T98G 細胞に作用させて、一定時間後に細胞を洗浄し、新しい培地に交換してから中性子照射実験を行った。図5の表に非照射におけるコロニー形成率、 $D_{10}$  値および増感率を示した。BSH 処理における  $D_{10}$  値およびコロニー形成率が、コントロールとほぼ同等であったことから、BSH は細胞内にほとんど取り込まれないことが明らかになった。さらに、増感率として、コントロールの  $D_{10}$  値に対するホウ素キャリア処理群の  $D_{10}$  値の比を求めると、**2** および **3** の増感率はそれぞれ5.79と7.69であり、強い増感効果が認められた。

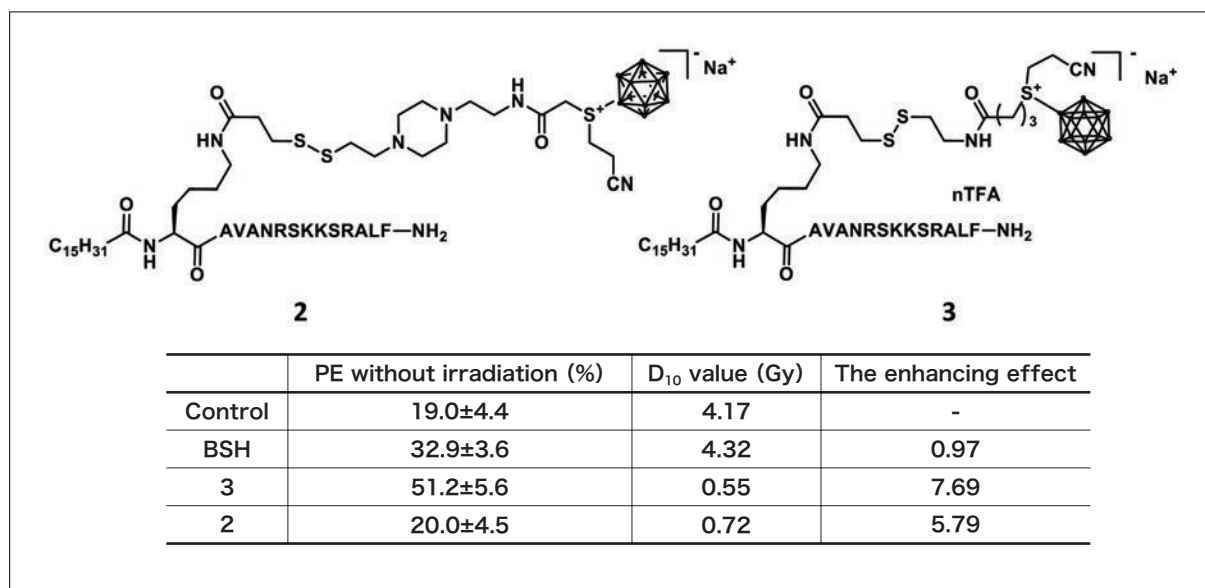


図5 新規ホウ素キャリアの構造および中性子増感作用

## 5. まとめと展望

BNCTのためのホウ素キャリアとしてリポペプチド結合型ホウ素クラスター **2** および **3** を開発した。これらは、現在臨床試験されている陰イオンホウ素クラスター BSH に比べて、細胞膜透過性が大きく向上し、細胞に処理した場合、中性子線感受性を大幅に増感させることがわかった。今回開発したリポペプチド結合型膜透過性分子の設計指針は、他の膜非透過性薬物にも応用でき、薬物の細胞内送達のための有用な戦略となるものと期待される。

## 参考文献

- 1) R. F. Barth *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3987-4002 (2005).
- 2) M. Suzuki *et al.*, *Radiother. Oncol.*, **92**, 89-95 (2009).
- 3) S. Kimura *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 1721-1728 (2011).
- 4) S. I. Masunaga *et al.*, *World J. Oncol.*, **3**, 103-112 (2012).
- 5) A. Isono *et al.*, *ChemMedChem*, **14**, 823-832 (2019).
- 6) L. Covic *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 643-648 (2002).

## 謝辞

今回紹介した研究は、博士課程学生の磯野蒼さんが中心に行った成果です。中性子照射実験は、京都大学複合原子力科学研究所・増永慎一郎教授、真田悠生助教のご指導のもとに実施しました。また、ホウ素濃度定量のための、ICP-AES 測定については、岐阜大学工学部・櫻田修教授にご指導いただきました。この場を借りて皆様に感謝申し上げます。

1. “Chromaster<sup>®</sup>” 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。

# 分光蛍光光度計を用いた蛍光を有する物体の 光学的画像解析

## —反射・蛍光の画像分離と分光スペクトルの面内分布の推定—

Spectral Analysis and Visualization of Fluorescent Materials Using Fluorescence Spectrophotometer Equipped with CMOS Camera

—Estimating spatial and spectral distribution of reflective-fluorescent scenes—



国立情報学研究所 教授  
東京工業大学工学院情報通信系 特定教授  
東京大学情報理工学系研究科コンピュータ科学専攻 教授

佐藤 いまり 博士(学際情報学)



国立情報学研究所 准教授  
総合研究大学院大学 准教授

鄭 銀強 工学博士



(株)日立ハイテクサイエンス

堀込 純



(株)日立ハイテクサイエンス

大川 拓樹

### 1. はじめに

蛍光材料は、白色LEDや衣服の蛍光増白、有価証券偽造防止のためのセキュリティインクなど生活に密着した製品に応用されている。これら蛍光試料の分光特性は、一般的に分光蛍光光度計を用いて分光スペクトルを評価することが多い。分光スペクトルは、蛍光波長を固定して励起光(照射する光)の波長を走査することで励起波長における蛍光強度の関係を表す励起スペクトルと、励起波長を固定して、蛍光の波長を走査することで蛍光波長における蛍光強度の関係を表す蛍光スペクトルがある。このスペクトルの形状が試料の色味を反映することになる。励起波長、蛍光波長および蛍光強度をまとめて測定する三次元蛍光スペクトルは、波長走査速度の高速化に伴い評価方法の一つとして浸透してきた。この三次元蛍光スペクトルを取得すると、蛍光物質の波長特性を網羅的に把握することが可能である。三次元蛍光スペクトルは、試料に含まれる有機物質の蛍光特性を反映し、種類や状態などを識別する指標となることから、蛍光指紋と呼ばれることがある。身近な応用例として、エキストラバージンタイプとピュアタイプの異なるグレードのオリーブオイルの三次元蛍光スペクトルを測定すると、その違いが蛍光パターンとして検出される。

しかしながら、これまでの分光蛍光光度計による測定は、励起光が照射された部分(単点)の平均的な蛍光スペクトル情報を得るに留まっていた。そのため、蛍光成分が不均一に含まれている試料の場合、試料面内の蛍光発光の分布を把握することは不可能であった。

そこで、分光蛍光光度計に新たにCMOSカメラユニットを搭載し、蛍光スペクトルの測定と試料画像を同時取得し、光学的画像解析により蛍光の面内分布推定を試みることにした。

## 2. 実験

### 2-1. 装置構成と取得データ

今回検討した装置構成を図1に示す。従来の分光蛍光光度計(F-7100形)の試料室に積分球を配置した。試料は積分球の上部のポートに設置した。分光蛍光光度計からの励起光は、励起光入射ポートより積分球内部に取り込み、一旦積分球内部で拡散させることで均一化させ試料に照射させた。励起光入射ポートと90度の位置に設けた蛍光出射ポートより試料からの光を蛍光側分光器に取り込み、分光スペクトルを測定した。CMOSカメラは積分球の下部のポートに設置し、励起光を照射した試料を撮影することとした。

分光蛍光光度計の励起波長を0次光とすることで得られる白色光を試料に照射し、白色光下における試料画像を取得した。その後、励起波長を一定間隔で照射し、蛍光側分光器では、各励起波長における蛍光スペクトルを測定し、三次元蛍光スペクトルとした。同時に、CMOSカメラにて各励起波長における試料画像を取得した。

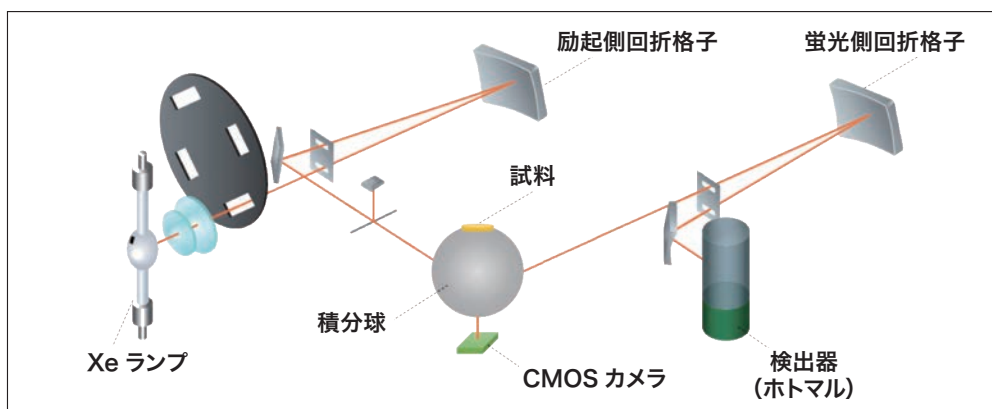


図1 装置構成図

### 2-2. 反射と蛍光発光のメカニズムの違いに基づく画像解析

蛍光を発する試料(対象物体)に光を照射した際、観測される光は試料からの蛍光成分と照射した光の反射成分からなることになる。ここで、反射光は入射光と同じ波長であるのに対し、蛍光の波長は入射光よりも長波長となる。このような入射光に対する蛍光と反射のメカニズムの違いを積極的に活用することによって、対象物体の蛍光成分と反射成分を画像解析から分離・観察することができる。

図2に蛍光のスペクトル概念図と蛍光を含んだシーンの分離例を示す。図2上に示されるように蛍光素材に単波長の光が入射したとき、観測される光は同じ波長の反射光だけでなく、より長い波長にスペクトルを持った発光を行うことが知られている。この性質を用いることで、観測された画像の反射・蛍光成分の分離を行う様々な手法が開発されている。

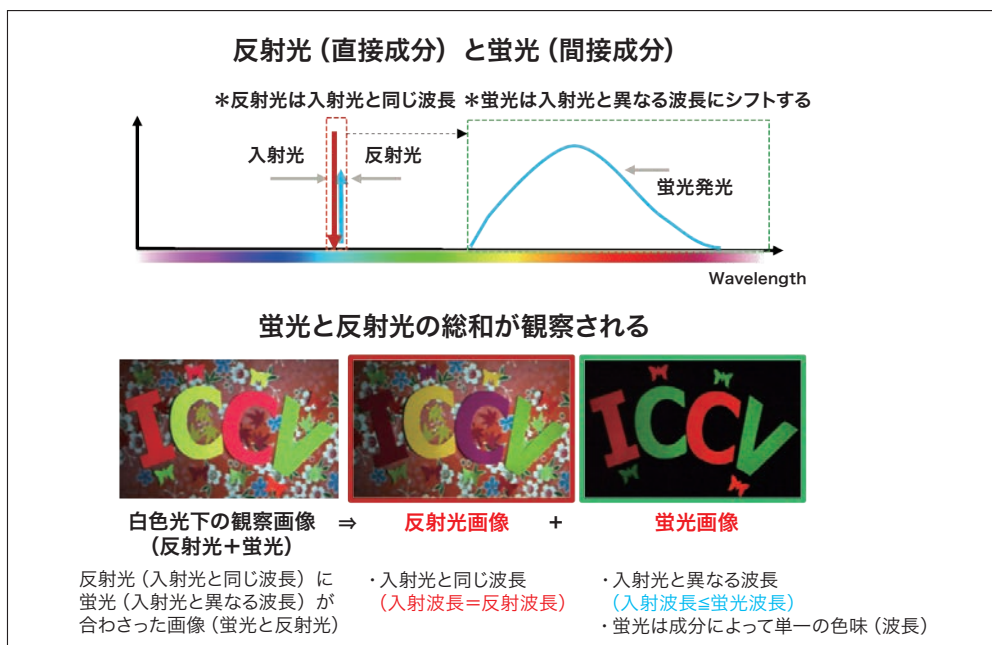


図2 観察画像とスペクトルにおける蛍光と反射光の関係図(蛍光と反射光の総和が観察される)



図2 下に分離手法の一例を示している。試料である対象物体から観測される R/G/Bチャンネルの画像にはそれぞれ、反射成分と蛍光成分の両方が含まれている。これら対象物体の蛍光特性をモデル化することで、成分の分離や反射・蛍光スペクトルの面内分布推定を画像から行うことが可能となる。

次に、分離に用いられるモデルについて紹介する。対象物体から観測される光は、式 1 のように反射成分の光と蛍光成分の光の総和として表すことができる。

$$I = I_R + I_F$$

$$I_R = R(\lambda)L(\lambda), \quad I_F = aF(\lambda) \quad (1)$$

$I$ : 試料のカメラ観測値	$R(\lambda)$ : 試料の分光反射スペクトル
$I_R$ : 試料の反射成分の値	$a$ : 試料の吸収係数
$I_F$ : 試料の蛍光成分の値	$F(\lambda)$ : 試料の蛍光スペクトル
$L$ : 照明の分光強度	

ここで、 $I$  は対象物体から観測される光を示す。なお、 $I_R$  は対象物体からの反射光、 $I_F$  は対象物体からの蛍光である。 $L$  は照明の分光強度、 $R$  は分光反射率、 $a$  は素材の吸光度、 $F$  は素材の蛍光スペクトルをそれぞれ示している。対象物体から観測される反射光  $I_R$  は、照明の分光強度  $L$  と分光反射率  $R$  の積として表すことができる。一方、対象物体から観測される蛍光  $I_F$  は、素材の吸光度  $a$  と素材の蛍光スペクトル  $F$  の積として表すことができる。

カメラは、R/G/Bチャンネルで構成されているため、ある画素の観測値  $I$  は R/G/Bチャンネルのそれぞれの観測値 ( $I^r, I^g, I^b$ ) として観測される。ここで、カメラの R/G/Bチャンネルには図3に示すような分光感度特性 ( $C^r, C^g, C^b$ ) がある。そのため、R/G/Bチャンネルのそれぞれの観測値 ( $I^r, I^g, I^b$ ) に対して、カメラの分光感度特性 ( $C^r, C^g, C^b$ ) を補正する必要がある。ある画素の R/G/B 観測値は式2のようにそれぞれのチャンネルの分光感度を畳み込み積分したものとなる。

$$I^r = \int I(\lambda)C^r(\lambda)d\lambda = \int R(\lambda)L(\lambda)C^r(\lambda)d\lambda + a \int F(\lambda)C^r(\lambda)d\lambda$$

$$I^g = \int R(\lambda)L(\lambda)C^g(\lambda)d\lambda + a \int F(\lambda)C^g(\lambda)d\lambda$$

$$I^b = \int R(\lambda)L(\lambda)C^b(\lambda)d\lambda + a \int F(\lambda)C^b(\lambda)d\lambda \quad (2)$$

$I(\lambda)$ : 試料のカメラ観測値
$I^r, I^g, I^b$ : 試料のR/G/Bチャンネルの観測値
$C^r, C^g, C^b$ : カメラのR/G/Bチャンネルの分光感度
$R(\lambda)$ : 試料の分光反射スペクトル
$L(\lambda)$ : 照明の分光強度
$a$ : 試料の吸収係数
$F(\lambda)$ : 試料の蛍光スペクトル

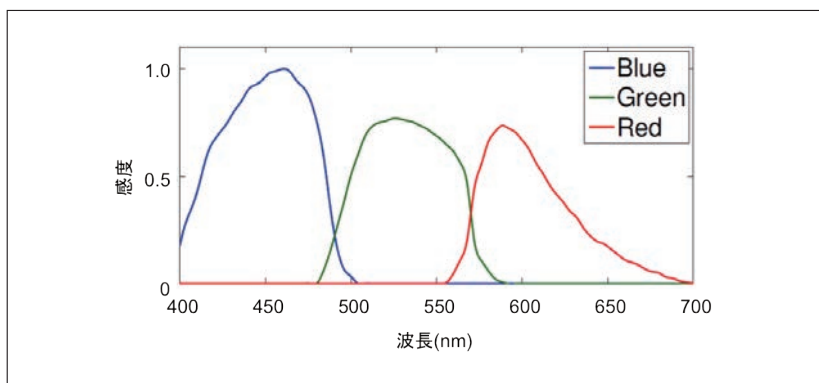


図3 カメラの各チャンネルの分光感度特性

このモデルを解くためには、対象物体の分光反射率または蛍光特性（吸光度を示す励起スペクトルと発光の分光分布を示す蛍光スペクトル）のいずれかが既知である必要があり、RGB 画像では詳細な波長情報が記録できない課題があった。

分光蛍光光度計では単波長の光を励起光として対象物体に照射し、そのときに放射される光の波長情報を測定しており、励起波長を変化させながらそれぞれ記録することで対象物体の蛍光特性を網羅的に計測している。励起波長は一定の波長間隔で設定された  $N$  個の励起波長まで順次設定されるため、 $k$  番目 ( $k=1, 2, \dots, N$ ) の励起波長下での反射蛍光モデルは式2より次のように求められる。

$$\begin{aligned} I_k^r &= R_k(L_k C_k^r) + a'_k F^r \\ I_k^g &= R_k(L_k C_k^g) + a'_k F^g \\ I_k^b &= R_k(L_k C_k^b) + a'_k F^b \end{aligned} \quad (3)$$

$R_k$  :  $k$  番目の波長における試料の分光反射率

$L_k$  :  $k$  番目の波長における照明の分光強度

$a'_k$  :  $k$  番目の波長における試料の蛍光強度の係数

$F^r, F^g, F^b$  :  $k$  番目の波長における試料のR/G/Bチャンネルの蛍光換算値

$I_k^r, I_k^g, I_k^b$  :  $k$  番目の波長における画像のR/G/Bチャンネルの観測値

$C_k^r, C_k^g, C_k^b$  :  $k$  番目の波長におけるカメラのR/G/Bチャンネルの分光感度

$k$  番目の波長における反射成分の値は、反射率  $R_k$  と照明の分光強度  $L_k$ 、カメラの分光感度特性 ( $C^r, C^g, C^b$ ) の積として表される。 $k$  番目の励起波長における蛍光成分の値は、強度に関わる係数  $a'_k$  と蛍光分布 ( $F^r, F^g, F^b$ ) の積として表される。式1より、蛍光成分の値は素材の吸光度  $a$  と素材の蛍光スペクトル  $F$  の積として表されるが、蛍光スペクトルの測定値  $F$  を R/G/B の値である蛍光分布 ( $F^r, F^g, F^b$ ) に変換するため、素材の吸光度  $a$  を強度に関わる係数  $a'_k$  として置き換えた。

推定モデルと手法の概念図を図4に示す。式3におけるは ( $L_k C_k$ ) 標準白色板を用いた撮影によって測定され、蛍光分布 ( $F^r, F^g, F^b$ ) は分光蛍光光度計を用いて測定した蛍光スペクトル  $F$  と既知のカメラの分光感度特性 ( $C^r, C^g, C^b$ ) より得ることができる。これにより式3における未知数は波長  $k$  での反射率  $R_k$  と蛍光成分の係数  $a'_k$  のみとなり、任意の手法で解くことができる。

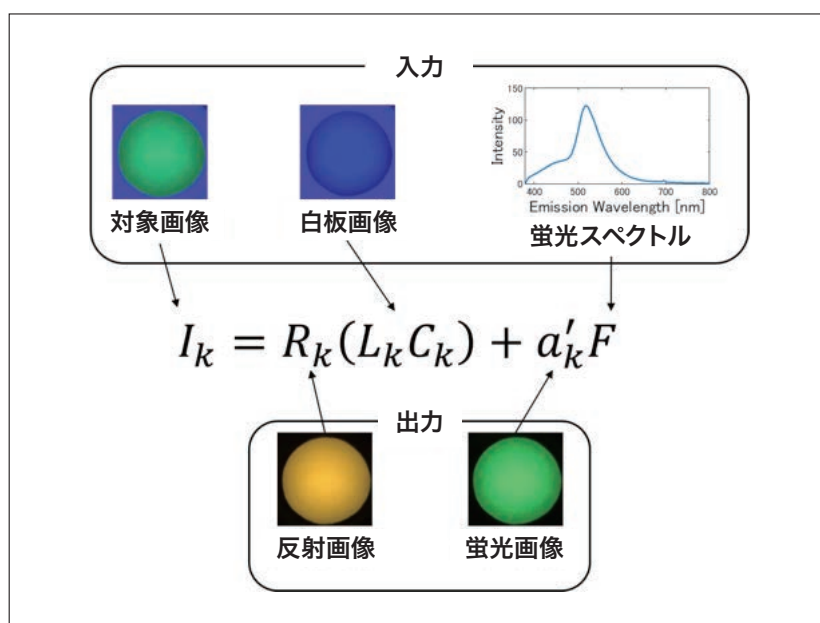


図4 推定モデルと手法の概念図(入力画像は励起光波長400 nmでの例)

これを全ての励起波長（波長  $k$ ）について計算することで、反射・蛍光の分光特性、全ての画素で計算することで面内分布を得ることができる（図5・図6）。

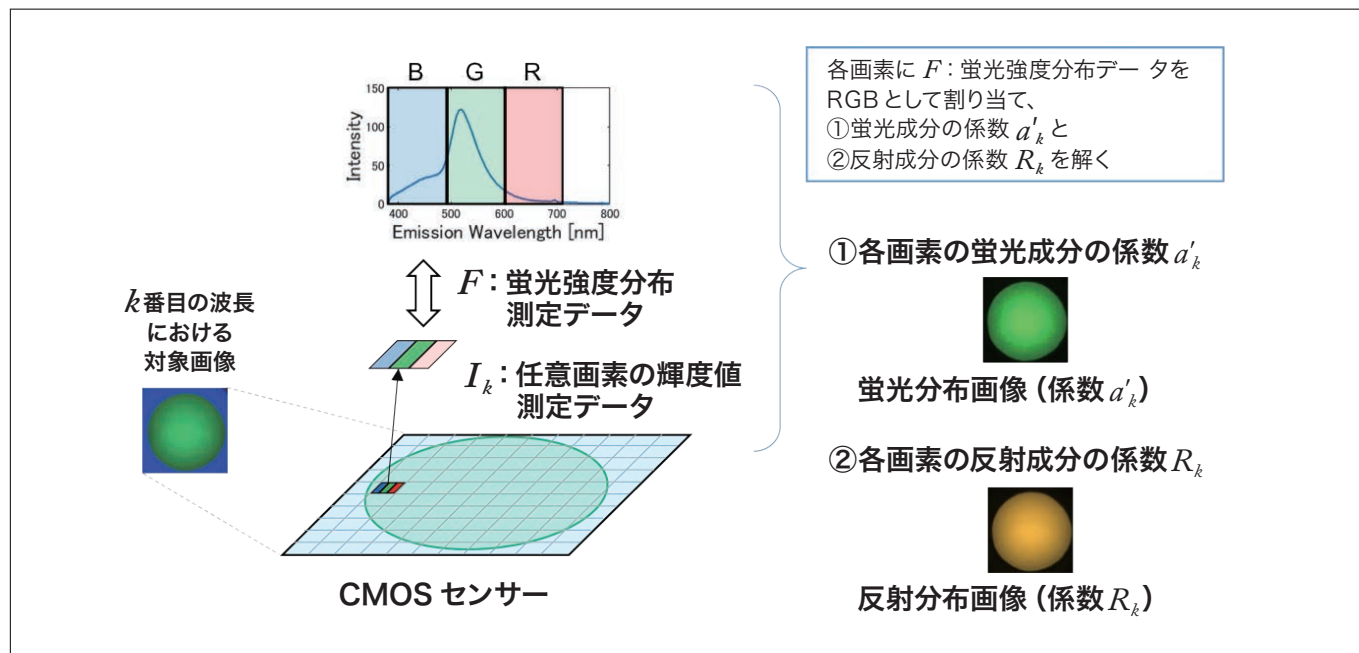


図5 対象物体の反射・蛍光特性の面内分布画像化

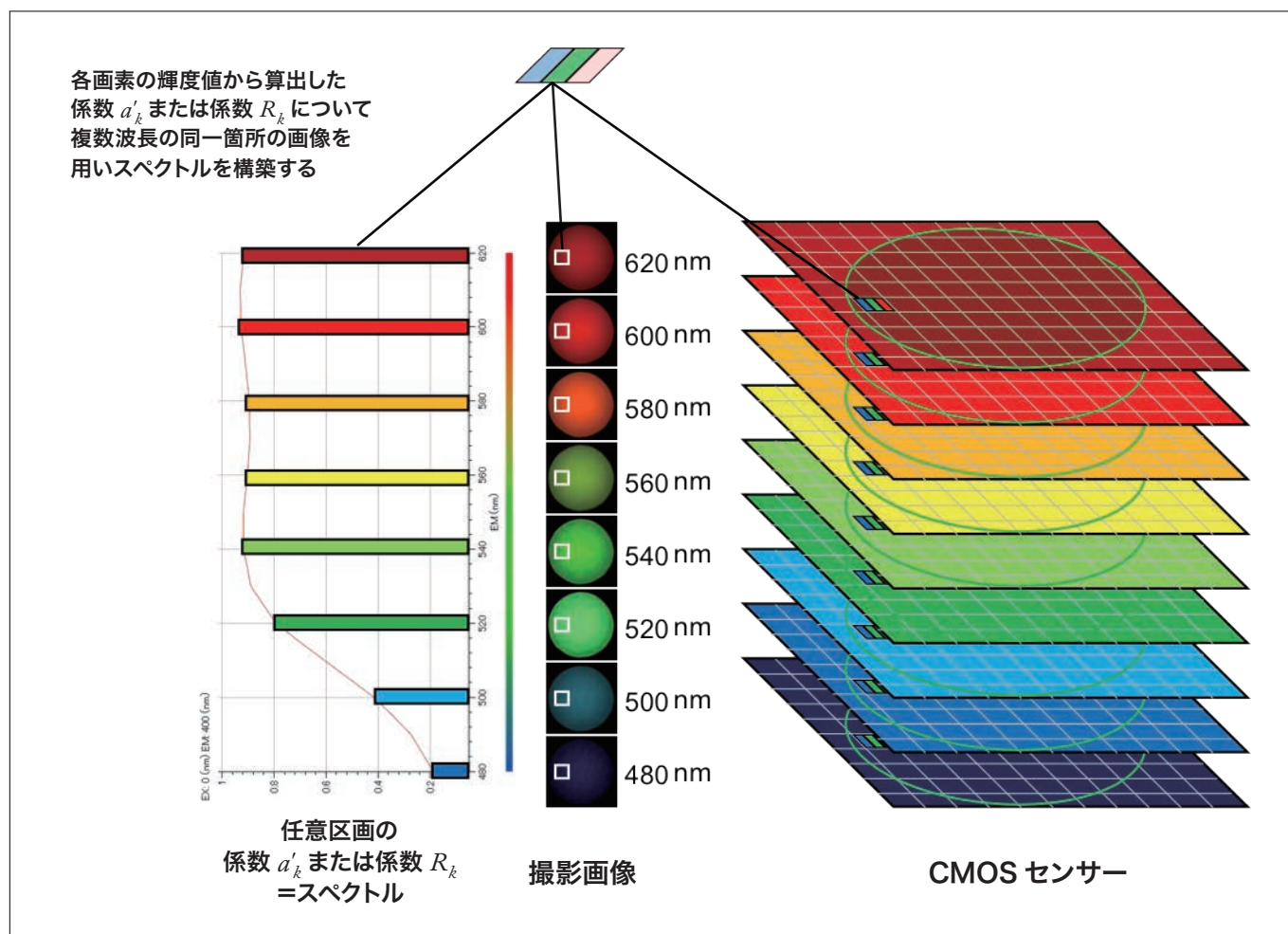


図6 対象物体の反射・蛍光特性の各領域のスペクトル化

## 3. 結果

### 3-1. データの検証

#### ・分光反射率：反射スペクトル

分光光度計で予め反射スペクトルを測定した試料を用い、モデルより算出した分光反射率の妥当性を確認した。面内分布の無い均一で反射スペクトルの分布が異なる4種類の試料を用意した。測定結果を図7に示す。それぞれの試料で既知の反射スペクトルと良好な一致を確認することができた。

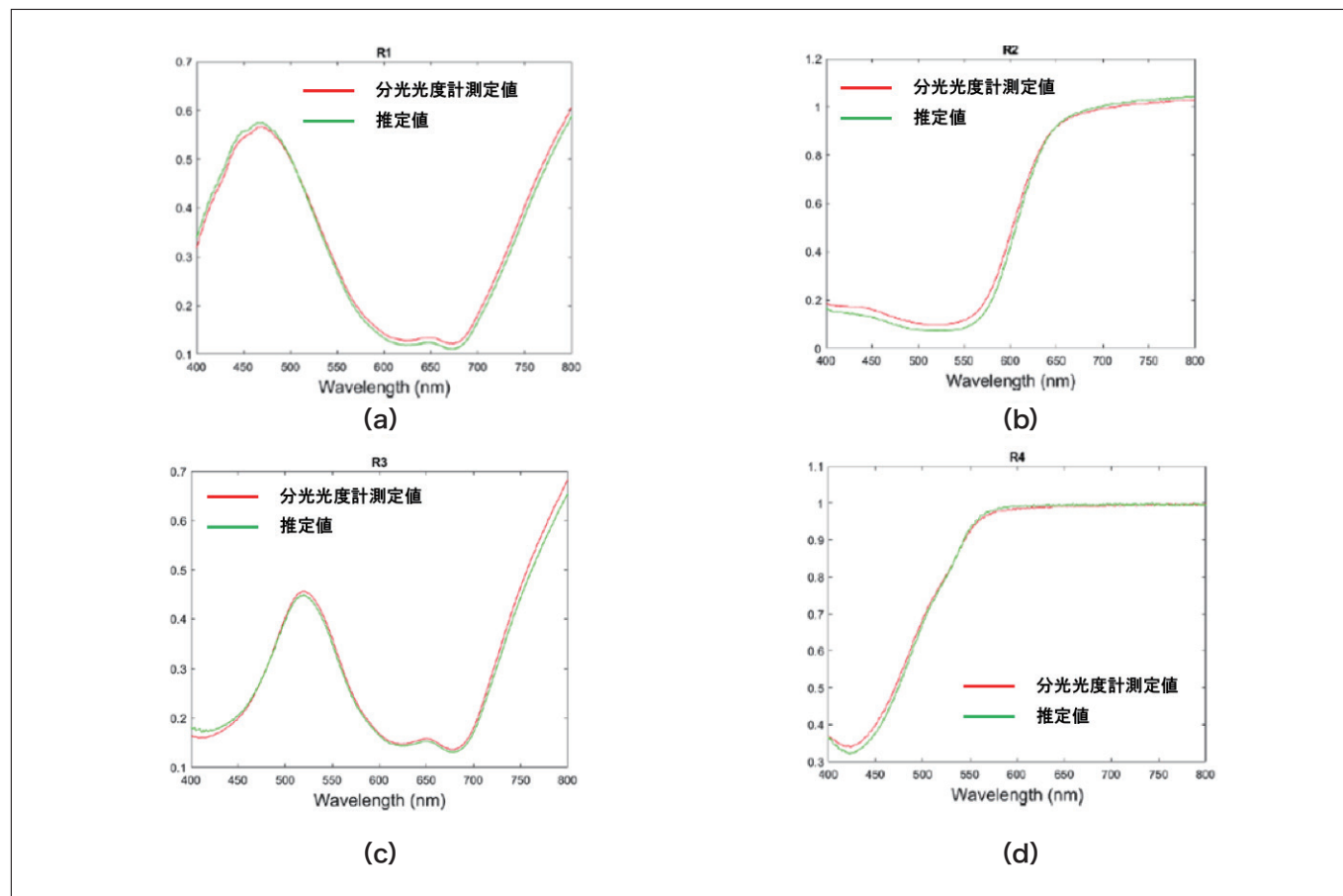


図7 反射スペクトルの妥当性確認結果

#### ・蛍光特性：蛍光スペクトル

同様に、分光蛍光光度計でアーティファクトが重複しない標準的として表面測光が可能な固体試料ホルダを用いて蛍光スペクトルを測定し、算出した蛍光スペクトルの妥当性を確認した。面内分布の無い均一で蛍光スペクトルの分布が異なる3種類の試料を用意した。測定結果を図8に示す。蛍光波長が異なる試料においても既知の蛍光スペクトルと良好な一致が確認された。

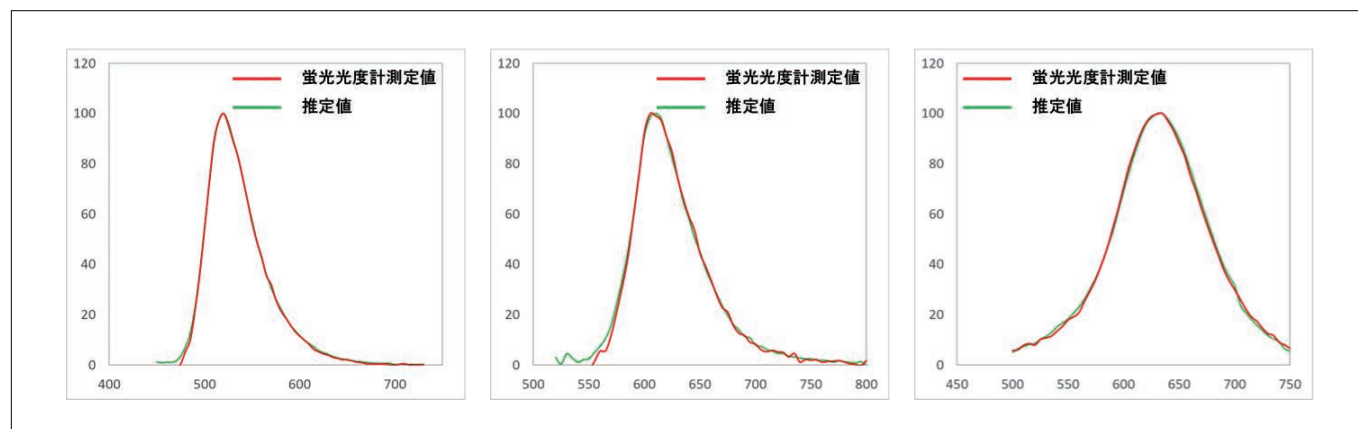


図8 蛍光スペクトルの妥当性確認結果



### 3-2. 実試料の測定

実試料として、蛍光反射シートを測定した。蛍光反射シートは蛍光を有すると共に視認性を向上させるために微細構造が施されている。

試料に入射光として、400 nm ～ 700 nm の単波長の光を 25 nm 間隔で照射し、三次元蛍光スペクトルと各波長の画像を得た(図9)。試料はφ20 mm のスポットに観察される。周辺部は白色の硫酸バリウムで塗布された積分球の内壁面に相当する。三次元蛍光スペクトルより、本試料は 400 nm ～ 500 nm の波長で励起されることが分かる。各撮影画像に着目すると、この間の励起波長における試料の画像は緑色の蛍光発光が確認される。一方、500 nm よりも長い励起波長においては、試料は周辺部と同様の色味であり、蛍光を含まない反射成分が主体であると推測される。蛍光が発している励起波長 460 nm および 500 nm の試料画像では、緑色の蛍光が試料全面より発していることが見て取れる。一方、蛍光発光が無くなる 520 nm および 580 nm の試料画像では、反射光が強く明るい領域と反射光が低く暗い領域に分かれていることが分かった。蛍光は方向依存性が少なく、試料全面から放出されるが、反射は方向依存性があり、構造に由来する反射分布を反映していると推測される。

次に、画像分離アルゴリズムにより、撮影した画像を反射成分と蛍光成分に分離した結果を図10に示す。画像を拡大すると反射板の微細構造はおよそ 200 μm 周期であることが分かった。反射成分は橙色であり、蛍光成分は緑色の画像となった。それぞれ反射スペクトルと蛍光スペクトルに相当する分光色と一致している。本試料は、橙色の反射光と緑色の蛍光が合算して黄色に見えていると思われる。また、分離をしていない観測画像において蛍光が無くなる 520 nm 付近を境に画像パターンが変化した。今回分離した反射画像と蛍光画像で同様のパターンの画像が得られた。単色光照射時に波長によって画像パターンが異なる際には、反射成分と蛍光成分が寄与し、面内分布がある試料の場合、分離された反射画像と蛍光画像を確認する有効性を見出すことができた。

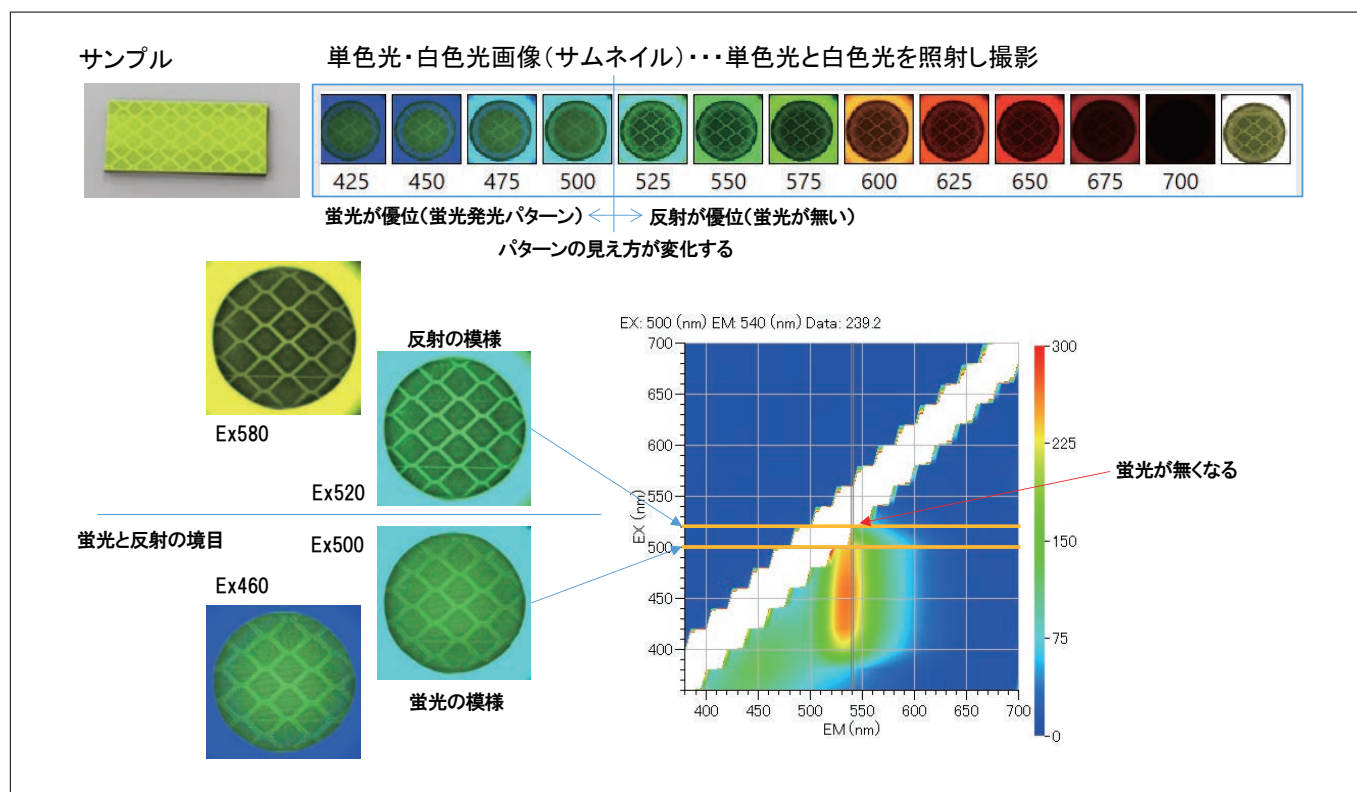


図9 各励起波長における取得画像と三次元蛍光スペクトル



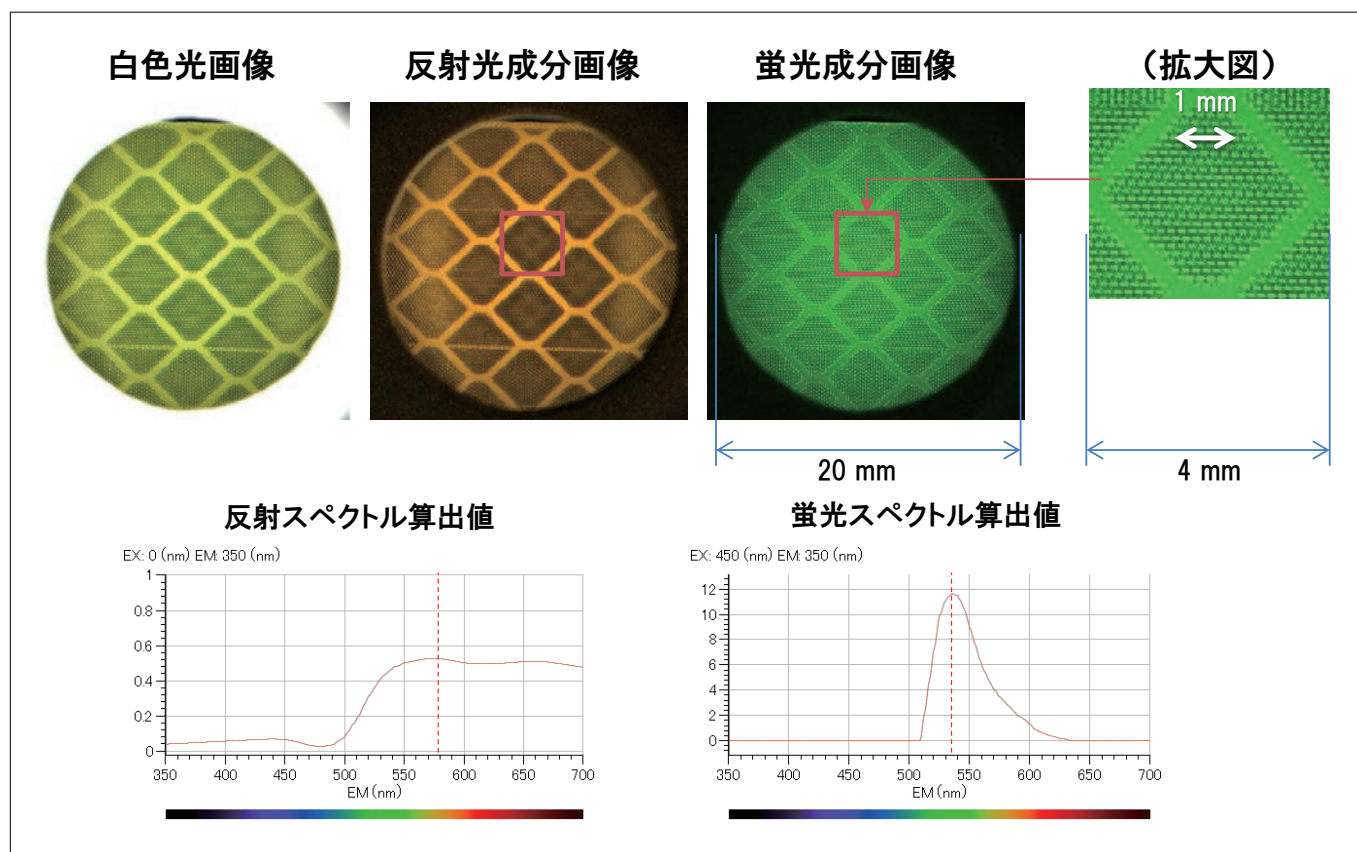


図10 微細構造素材の反射スペクトルと蛍光スペクトル分離

## 4. まとめ

分光蛍光光度計は、励起・蛍光スペクトルにて波長特性など試料の蛍光特性を把握するのに有効な分析機器である。従来行われていたスペクトル評価は試料の特定箇所における平均的な光学特性を把握するに留まっていたが、近年ではCMOSカメラを搭載し、試料の蛍光発光の面内分布の観察が可能となった。更には画像分離アルゴリズムを用いることで、反射画像と蛍光画像の分離、領域ごとのスペクトル構築など多彩な解析が可能となった。

# 日立走査型電子顕微鏡「SU3800」・「SU3900」 — 大型・重量のある試料に対応した試料室を搭載し、 さらなる操作性向上を実現 —

SU3800/SU3900 Feature Both Operability and Expandability  
- Equipped with Extra-Large Chamber and Heavy-Sample Stage -

振木 昌成

## 1. はじめに

大型で重量のある試料に対応するとともに、計測作業の自動化と広域カメラナビゲーションにより操作性を向上した走査電子顕微鏡 (SEM) の中型機「SU3800」、大型機「SU3900」を発売しました。



図1 日立走査型電子顕微鏡「SU3800」「SU3900」(左: SU3800 右: SU3900)

SEM はナノテクノロジーやバイオテクノロジーをはじめ、あらゆる産業分野において、物質の微細構造から組成まで多岐にわたる観察・分析に活用されています。こうした SEM の活用分野・用途が広がる中、鉄鋼などの工業材料や自動車関連部材といった、大型で重量のある試料は、設置するステージの試料対応サイズや重量に制限があり、観察には切断等の加工が必要となるなど課題がありました。

また近年では、各種材料の高機能化や高性能化を図るため、微細構造の制御が必要なことから、SEM の活用用途が従来の研究開発に加え、品質保証や生産管理にも広がり、活用の頻度は高まっています。そのため、操作性のさらなる向上によるオペレーターの負担軽減も求められていました。

「SU3800」と「SU3900」は、大型で重量のある試料の観察に対応し、かつ操作性を向上した製品です。特に大型機「SU3900」は、日立ハイテクの SEM 大型機として最大クラスの 300 mm 径<sup>(\*)1</sup>、搭載可能重量 5 kg (従来比 2.5 倍<sup>(\*)2</sup>) の試料ステージを備えており、大型試料でも切断などの加工を施すことなく観察することが可能です。さらに、試料セット後の電子ビーム照射から画像調整まで自動化することにより、観察開始後すぐに SEM 像を取得でき、スピーディーな観察を実現しています。

また従来、CCD カメラの単一カラー画像で対応していた視野探しについては、試料ステージを回転させ試料全体を分割撮影した後、各画像をつなぎ合わせることで、大型試料の広域観察における視野探しをサポートするカメラナビゲーションを実現しています。

## 2. 主な特長

### 2-1. 大型で重量のある試料に対応

- 最大搭載可能試料サイズについて、「SU3800」は200 mm 径の試料室を搭載し、高さ80 mm、重量2 kgの試料まで対応可能。「SU3900」は日立ハイテクのSEM 大型機として最大クラス300 mm 径の試料室を搭載し、高さ130 mm、重量5 kg(従来比2.5倍<sup>(※2)</sup>)の試料まで対応可能



図2 大型試料(130 mm高さ)観察例

### 2-2. 広域観察に対応

- 最大観察可能範囲について、「SU3800」は130 mm 径、「SU3900」は200 mm 径を実現
- ガイド画面で観察目的位置を指定するだけで視野移動ができる「SEM MAP」を搭載
- 複数枚の高倍率画像を異なる視野で自動的に撮影し、取得した画像を繋ぎ合わせて広域画像を作成するシステム「Multi Zigzag」を搭載

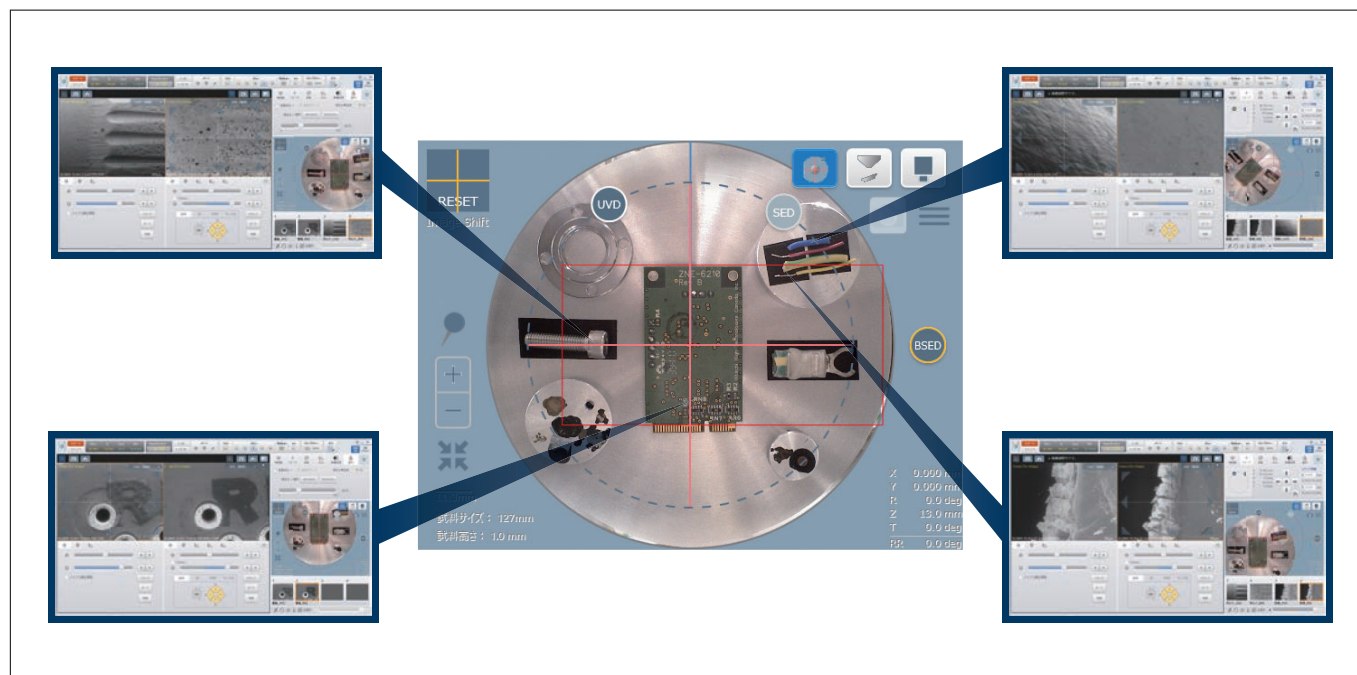


図3 広域SEM MAPによる視野選択



### 2-3. 自動化により操作性を向上

- ・電子ビーム照射から各種画像調整までを自動化し、試料セット完了後すぐに観察を開始することが可能。画像調整については、オート機能実行時の待ち時間を従来機比<sup>(※3)</sup> 1/3以下に短縮
- ・フィラメントの状態を自動で監視・制御し、交換時期の目安を示すソフトウェア「Intelligent Filament Technology (IFT)」を搭載。長時間の連続観察や粒子解析などの広域分析時も、フィラメント寿命切れによる観察作業の中断を避けることが可能

### 2-4. 多目的大型試料室と豊富なアクセサリ対応

- ・加熱ステージや冷却ステージ、引張 / 圧縮ステージといった外部ステージを活用し、In-Situ での動的変化観察が可能
- ・新型 STEM Holder により、透過散乱電子を光に変換し UVD で検出することで、簡便に切片の STEM 観察が可能

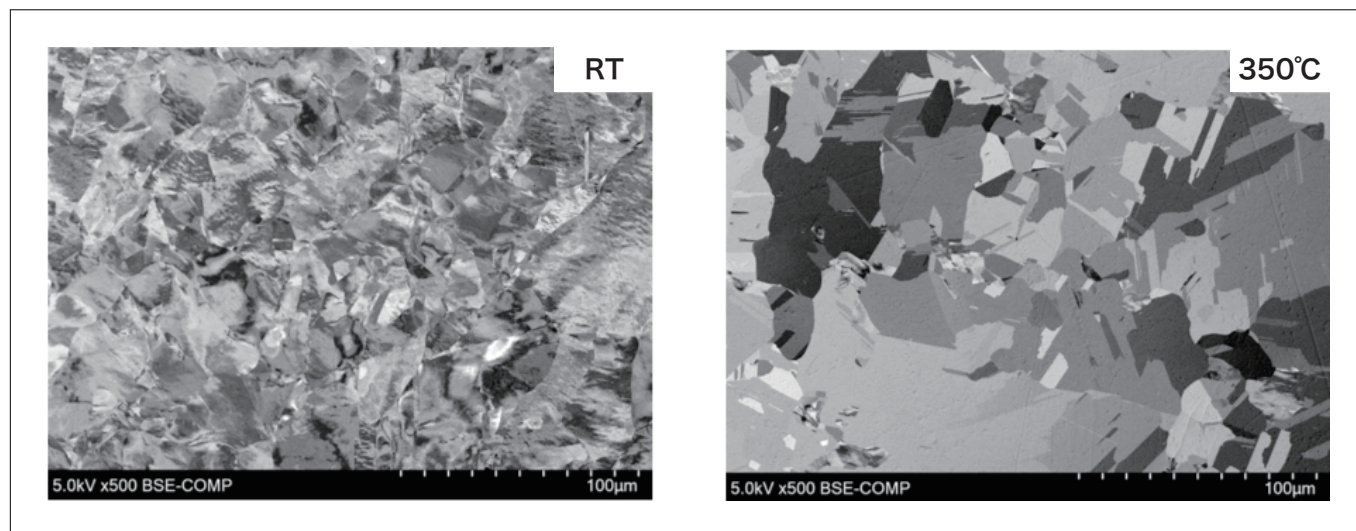


図4 加熱ステージによる銅板の観察例(左：室温 右：350℃)

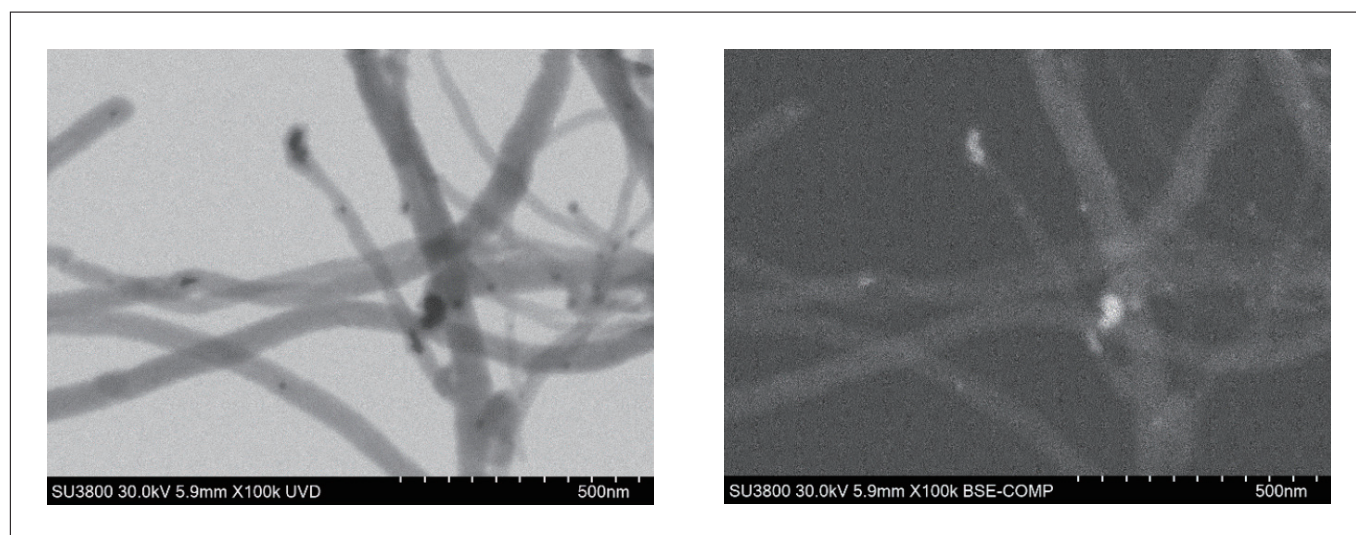


図5 新型STEM HolderによるCNTの観察例(左：明視野STEM像 右：反射電子像)



### 3. 主な仕様

仕様	SU3800	SU3900
二次電子像分解能	3.0 nm (加速電圧：30 kV, 高真空モード) 15.0 nm (加速電圧：1 kV, 高真空モード)	
反射電子像分解能	4.0 nm (加速電圧：30 kV, 低真空モード)	
加速電圧	0.3 ～ 30 kV	
倍率	×5 ～ ×300,000 (写真倍率), ×7 ～ ×800,000 (実表示倍率)	
試料ステージ	X : 0 ～ 100 mm, Y : 0 ～ 50 mm, Z : 5 ～ 65 mm, T : -20° ～ 90°, R : 360°	X : 0 ～ 150 mm, Y : 0 ～ 150 mm, Z : 5 ～ 85 mm, T : -20° ～ 90°, R : 360°
最大搭載可能試料サイズ	200 mm 径	300 mm 径
最大観察可能範囲	130 mm 径 (R 併用)	200 mm 径 (R 併用)
最大試料厚さ	80 mm (WD=10 mm)	130 mm (WD=10 mm)
最大試料重量	2 kg	5 kg (T/R 無し)

(※ 1) 従来機である SEM 大型機「S-3700N」と同一。

(※ 2) 従来機「S-3700N」との比較。ただし比較内容は、試料ステージの平面移動時における重量制限に限る。

(※ 3) 従来機「S-3700N」との比較。

#### 著者紹介

振木 昌成

(株) 日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジーソリューション事業統括本部 評価解析企画部

# ナノ3D光干渉計測システム VS1800による 特長ある3D表面形状・粗さ測定 — 線から面へ、走査型レーザ顕微鏡方式から光干渉計測方式へ —

Characteristic 3D Surface Shape and Roughness Measurement by Nano 3D Optical Interferometry System VS1800

(From Line to Plane, from Scanning Laser Microscope to Optical Interferometry)

栗原 順治

## 1. はじめに — 「線から面へ、走査型レーザ顕微鏡方式から光干渉計測方式へ」の変化の背景

表面形状・粗さ測定技術と加工技術の関係は、お互いのバランスを保ちながら産業界のニーズに向かって進む「自動車の両輪」に例えられることが多く、それぞれの技術は、様々なアーキテクト技術の革新を取り入れることで日々進化している。

最初に、近年急速に開花したレーザ光学技術を柱としたレーザ変位計を利用した「非接触」での表面形状・粗さ測定技術の革新は、従来から用いられてきた触針型での測定手法からの変化を誘い、触針型測定方式が従来抱えてきた諸題点を改善するきっかけを芽生えさせた。そして、レーザ変位計と電動式のX-Yステージを組み合わせることで、変位計からの高さ情報データをX-Y座標毎にプロットすることを可能にして、線(ライン)測定から面(エリア)測定を実現させたことにより、

- ①「針先の接触荷重(測定圧)に起因する試料の変形問題」
- ②「針を支えるレバーの剛性に起因する横逃げ問題」  
(測定中の針先が測定面の突起などで横方向に弾かれてずれる現象)
- ③「測定に使用する触針の先端径(R)に起因する形状トレースの限界問題」
- ④「線(ライン)測定における走査方向に起因する出力形状の差異問題」

を改善するに至る。

さらには顕微鏡の光学系筐体を利用して、レーザを面内走査させながら詳細なデータを取得する手法の(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式の登場により、表面形状測定技術は、線(ライン)測定方式から非接触型の面(エリア)測定方式へと3D表面形状計測における表面形状・粗さ測定の評価手法が飛躍的に広がることとなった。

当初、非接触型の面(エリア)測定方式の実用化が始まった黎明期の産業界ニーズは、マイクロメートル単位での測定精度・加工仕上げ精度を満たせば十分であり、ニーズに適合した(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式が産業界にて普及することにつながった。しかし近年における表面処理・加工技術においては要求される単位が変わり、ナノメートル単位の測定精度・加工仕上げ精度へと向上したことに對して、(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式の測定能力が追いつけないという新たな問題が起り始めた。それと同時に、従来よりも広い範囲における「ナノメートル単位での表面ウネリ測定」という新しいニーズが顕在化してきたことにより、産業界では徐々に従来の(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式から新しい世代の(CSI)光干渉計測方式への使用装置の置換が始まり、

- ①「高分解能化」
- ②「測定再現性の向上」
- ③「測定範囲の広域化」

といった産業界の新しいニーズに対する技術的な対策が拡がりを見せている。

一例をあげると、機能性フィルム・フラットパネルディスプレイ・各種デバイスなどの研究開発や製造工程分野では、面内100マイクロメートル程度の狭い測定範囲における粗さ測定テーマだけではなく、面内1ミリメートルを超えるような広い測定範囲においても垂直方向でナノメートル単位の粗さ・ウネリ量の測定が求められている。このような場合、(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式では十分な分解能・データ再現性を得ることが困難であるため、次世代の測定器として(CSI)光干渉計測方式を用いることで多角的な表面形状・粗さの評価を実現している。

このように測定器は、その時代の加工技術と産業界ニーズの大きな変化に合わせて、線(ライン)から面(エリア)へ、(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式から(CSI)光干渉計測方式へと、最適な測定手法へと日々進化してきた。本稿では、CSI(光干渉計測システム)「ナノ3D光干渉計測システム VS1800」(図1)の計測技術・アプリケーション事例について紹介する。



図1 ナノ3D光干渉計測システム VS1800

## 2. 装置の概要と仕様

「ナノ3D 光干渉計測システム VS1800」は、白色光を光源に用いた顕微鏡筐体に、モータ・PZT 素子を用いて垂直方向に駆動するミラウ型やマイケルソン型などの二光束干渉対物レンズを装着して、観察の際に生じる干渉縞をカメラでとらえる機構を備えた、3D 表面形状・粗さ計測が行えるシステムである。

はじめに測定原理を(図2)に記す。面内測定視野範囲に該当する受光素子であるカメラは、二光束干渉対物レンズを用いることで発生する光干渉縞の存在を捉え、モータ・PZT 素子の垂直駆動による二光束干渉対物レンズの垂直走査で変化が生じる光干渉縞の動きを、カメラの各画素(ピクセル)における干渉強度の変化として面内一斉に捉えたのち、この変化をアルゴリズム解析処理することによって高分解能な3D 表面形状・粗さ計測を実現している。

その測定モードは、位相シフトに着目した「Phaseモード」、Z軸を垂直走査する際に順次現れる干渉縞を接続することで視野全体の干渉縞情報を取得する「Waveモード」、干渉強度が最大になるZ軸上の点の位置をその点の高さとする「Focusモード」、多層膜厚測定に使用する「膜厚計測モード」の各種測定モードを有している。

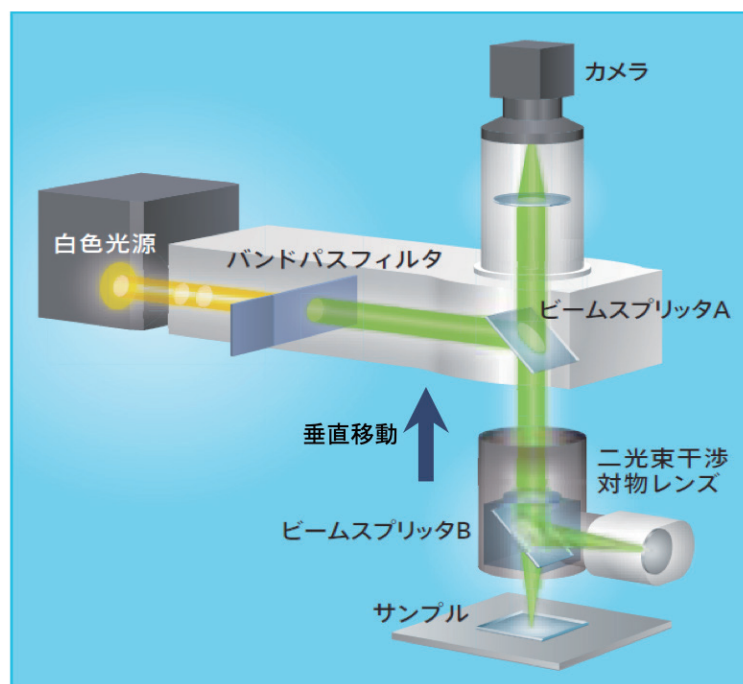


図2 装置の概念

次に「ナノ3D 光干渉計測システム VS1800」と各種測定方式（走査型レーザ顕微鏡方式・触針型の測定方式）との比較を交えてその主な特長を（表1）に示す。

「ナノ3D 光干渉計測システム VS1800」は、非接触式の面（エリア）測定が可能な装置である。そのため触針型の測定方法が抱えていた接触圧による試料へのダメージや、データ取得方向による測定結果の影響を受けることがない。また同じ面（エリア）測定を実現する（LSM）走査型レーザ顕微鏡方式と比較しても「ナノ3D 光干渉計測システム VS1800」は垂直分解能・段差測定再現性が高く、その測定時間はモータ・PZT 素子の垂直走査（秒単位）のみで極めて短いというだけでなく、（LSM）走査型レーザ顕微鏡方式に代表される垂直方向の焦点位置の変化を捉える計測方式（測定に使用するレンズ倍率により異なる焦点深度の影響を受ける）ではないことから、面内測定範囲（測定に使用するレンズ倍率）に起因する垂直分解能への影響を受けることがない。

表1 VS1800と各種測定方式（（LSM）走査型レーザ顕微鏡方式・触針型の測定方式）との比較

	VS1800	走査型レーザ顕微鏡方式	触針型の測定方式
データ取得方式	光干渉縞を利用	レーザの焦点位置を利用	触針の動きを利用
取得データ	面（エリア）	面（エリア）	線（ライン）
測定スピード	垂直走査のみ 早い	面走査と垂直走査を繰り返す 時間がかかる	線（ライン）走査 早い
データ取得方向の影響	面（エリア）測定 問題なし	面（エリア）測定 問題なし	線（ライン）測定 影響を受ける
試料へのダメージ	非接触 問題なし	非接触 問題なし	接触式 影響を受ける
測定位置合わせ	顕微鏡像にて 位置確認が可能	顕微鏡像にて 位置確認が可能	目視での位置合わせ 位置確認が困難
面内（X-Y）測定範囲	広い	狭い	広い（但しラインである）
垂直分解能（表面形状）	◎	—	—
面内測定範囲 （測定に使用するレンズ倍率） による垂直分解能への影響	測定範囲の影響なし	広い測定範囲になると 垂直分解能に影響を受ける	測定範囲の影響なし
段差再現性（Z）	◎	—	—
多層膜厚測定機能	層断面解析機能	不可	不可

（\*）◎は、3つの測定原理中で最も優れていることを示す。



最後に「ナノ3D光干渉計測システム VS1800 Type3」の仕様を(表2)に示す。「ナノ3D光干渉計測システム VS1800」は、面内方向(X-Y)ステージと、試料面の傾斜を行うゴニオステージが手動である“Type1”, 面内方向(X-Y)ステージは電動で、試料面の傾斜を行うゴニオステージが手動である“Type2”, 面内方向(X-Y)ステージと、試料面の傾斜を行うゴニオステージが全て電動である“Type3”という3種類のベース仕様が設定されている。そのなかでも、電動ステージが搭載された“Type2”“Type3”を選択すると、電動ステージに付帯する画像連結機能により、一層の広範囲測定が可能となる。

さらにこれらのベース仕様に対して、レンズとカメラの組み合わせや、Z軸の駆動デバイスに使用するPZTの有無、大型試料対応のかさ上げキットや各種解析機能等の有無などを選択することによって、多岐にわたる各種測定テーマに柔軟な対応ができるように設計されている。なかでも特筆すべき項目として「高傾斜測定モード」での測定角度特性は最大傾斜86°(400マイクロメートルのSUS球を測定した場合)に達しており、従来の(CSI)光干渉計測方式を用いた測定方式では苦手とされていた急峻な斜面の測定を改善し、(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式と比較しても遜色がなくなったことで、測定対象テーマの幅が大きく広がったことがあげられる。

それ以外の注目すべき機能である「ISO 25178パラメータ支援機能」「層断面解析機能」に関しては、次項にて測定事例を交えながら記すこととする。

表2 ナノ3D光干渉計測システムVS1800 Type3仕様

Z 駆動デバイス・ 垂直分解能	モータ駆動・Sq 分解能	0.1 nm (Wave モード使用時)
	PZT 駆動・Sq 分解能	0.01 nm (Phase モード使用時)
最大 Z スキャンレンジ		モータ駆動 10 mm
		PZT 駆動 150 $\mu$ m (※オプション選択)
X-Y ステージ	駆動方式	電動
	稼働範囲	$\pm 75$ mm
	ステージサイズ	W225×D225 mm
ゴニオステージ	駆動方式	電動
	移動領域	$\pm 5^\circ$
測定用カメラ画素		640×480 または 1,024×1,024 (※必要カメラ装着)
鏡筒		×1 または ×0.5 (※必要鏡筒装着)
ズームレンズ		×0.7 レンズ (追加オプション)
最大 Z スキャンレンジ		10 mm
対物レンズ		×2.5 ×5 ×10 ×20 ×50 ×110 (※必要レンズ着)
サンプル高さ		0 ~ 50 mm (標準)
		100 mm (※オプションのかさ上げキット使用時)
段差再現性 (1 $\sigma$ )		< 0.1% (Phase モード使用時)
最大傾斜角度		86° (※オプションの高傾斜測定モード使用時)
ISO 25178 パラメータ支援機能		標準対応
層断面解析機能		※オプションのプラグインソフトで対応可能
画像連結機能		対応可能
面内 (X-Y) 測定範囲		43×32 $\mu$ m ~
		(対物レンズとカメラの組み合わせによる) 画像連結機能で 150×150 mm

### 3. 測定事例

#### 3-1. ウエハの常温接合分野での活用（広い測定範囲をナノメートル単位の垂直高分解能で測定する）

常温接合技術とは接着剤などを用いずに「常温」で熱膨張係数が異なるウエハなどの接合などに有用とされ、次世代の高機能デバイス・パワーデバイス・光学デバイスを作成する際に重要視される新しい技術である。常温接合では、接合する試料それぞれの表面が平滑であるほど接合強度が増すとされており、接合の可否・強度に大きな影響を与える要素として、CMP 研磨や原子拡散などで超平滑化処理を施された接合面の表面粗さの数値管理が重要視されている。そこで従来は、接合に使用するウエハ表面の粗さ測定には、(AFM) 原子間力顕微鏡を用いることで、面内 (X-Y) 数マイクロメートルという局所的な測定範囲の測定が行われてきた。

しかし、研究が実用化段階へと進むにつれ、試料が大きくなり (AFM) 原子間力顕微鏡での粗さ管理を行っても、同じ粗さであるはずの同一ウエハでも場所によって接合強度に差が生じるという現象が確認されはじめた。そこで粗さとは別な要素の一つとして、面内 (X-Y) 数百マイクロメートル以上という測定範囲に生じているナノメートル単位の粗さを含めた“ウネリ”量の測定が着目されたのであるが、そのような広い測定範囲における安定したナノメートル単位での測定は (LSM) 走査型レーザ顕微鏡方式では困難であるため、新しい測定技術として (CSI) 光干渉計測方式が用いられることになった。現在では、表面状態の数値管理を行う上で、局所的な測定範囲では (AFM) 原子間力顕微鏡、広い測定範囲では (CSI) 光干渉計測方式の双方が欠かせない測定器として重宝され、多角的な解析を行うことに寄与している。その参考測定データを (図3) に示す。

原子拡散を用いて超平滑化処理を施したウエハ表面を面内 (X-Y) 約470×350マイクロメートルの測定範囲で形状測定を行った結果、表面粗さ・ウネリが低下するほど接合強度が増大することが確認された事例である。

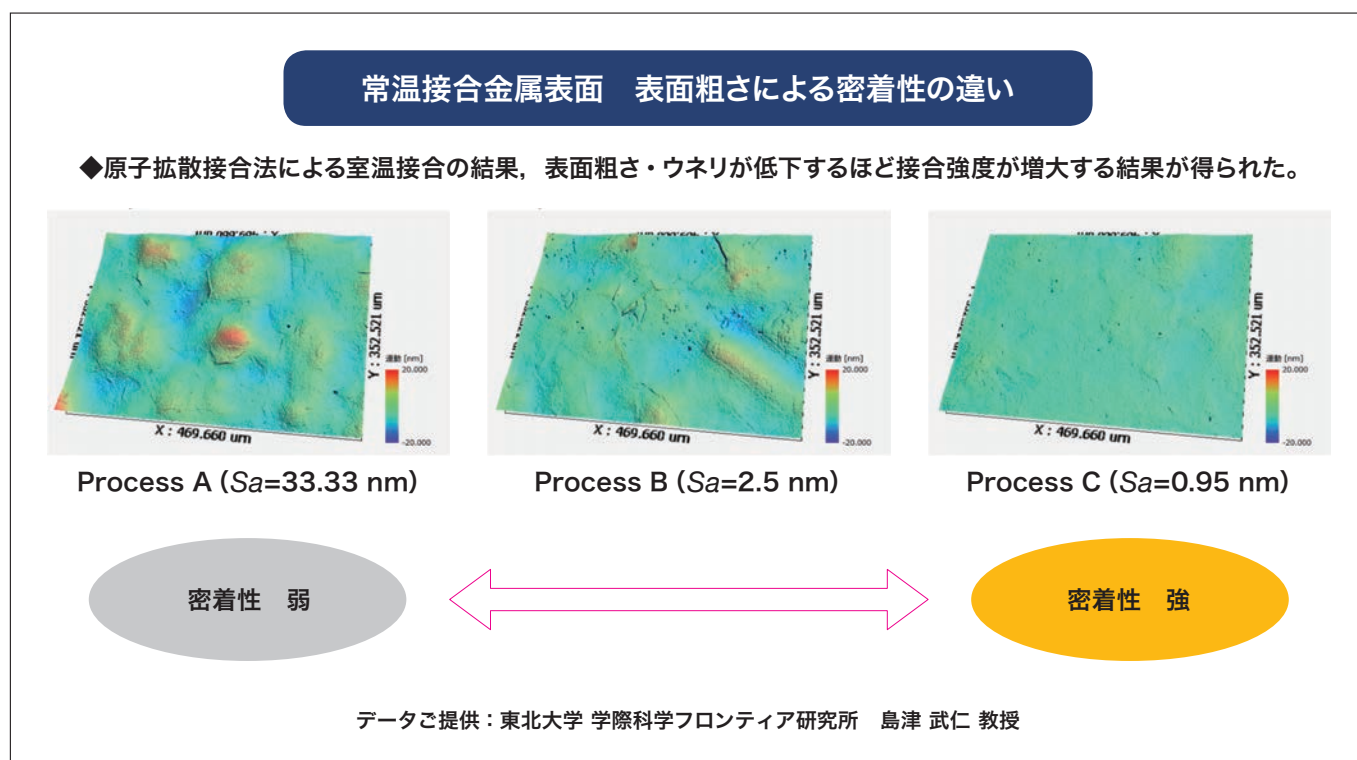


図3 ウエハ常温接合分野での測定事例(表面粗さの違いによる密着性の違い)

### 3-2. 差が出にくい表面形状の違いを数値化する (ISO 25178 パラメータ支援機能の活用)

ここでは VS1800 に標準搭載されている ISO 25178 パラメータ支援機能について、事例を交えながら説明する。

従来、粗さの管理は日本工業標準調査会によって定められた「表面粗さの定義と表示」として JIS 規格が用いられてきたが、線 (ライン) 計測から面 (エリア) 計測と進化を続ける測定器の登場によって「表面粗さの定義と表示」も線 (ライン) 計測から面 (エリア) 計測へと進化している。ISO 25178 は、従来の JIS 規格や ISO 規格が触針型の線 (ライン) 測定器を用いた「線粗さ評価」を前提としたものであったのに対して、面 (エリア) 計測が行える測定器を用いた「面粗さの評価」を対象とした規格である。

以下、(図4) に記した試料は、写真印画紙で使用される超光沢紙である。この試料は目視では表面状態が異なるにもかかわらず、従来の JIS 規格である線 (ライン) 計測ではその差を明確に数値化できない試料の一例として取りあげた。このような試料の場合、一般的には ISO 25178 における Sa (算術平均高さ) という表面粗さのパラメータに着目することで、線 (ライン) 計測では困難な試料間の粗さの数値差を明確にすることが可能であるが、残念なことに今回の試料では (図5) からは、Sa (算術平均高さ) パラメータを用いても試料間には明確な数値差が生じていないことがうかがえる。

そこで、ISO 25178 の他のパラメータを用いることで、その差を明確にしたいところであるが、多岐にわたるパラメータのなかから最適なパラメータを選択するためには、パラメータ毎に試料間の数値を求め、さらにはその中から差分が大きく特長あるパラメータを見つけ出すという膨大かつ複雑な作業が必要とされる。特に、データの利用者間で事前に取り決めがなされたパラメータに着目をすればよい試料ではなく、未知の試料間の比較を行うためには、この作業が欠かせないものとなってくる。

そのような場合、(図6) に示した「ISO 25178 パラメータ支援機能」が有効である。この機能は、比較試料のデータをそれぞれ取得することで、試料間の違いが大きな順番にパラメータを順位付けする機能である。この機能を用いた結果、(図7) に示されるように、この試料間の差異は Sdr (界面の展開面積比) というパラメータを用いるとよいことが短時間で判明した。

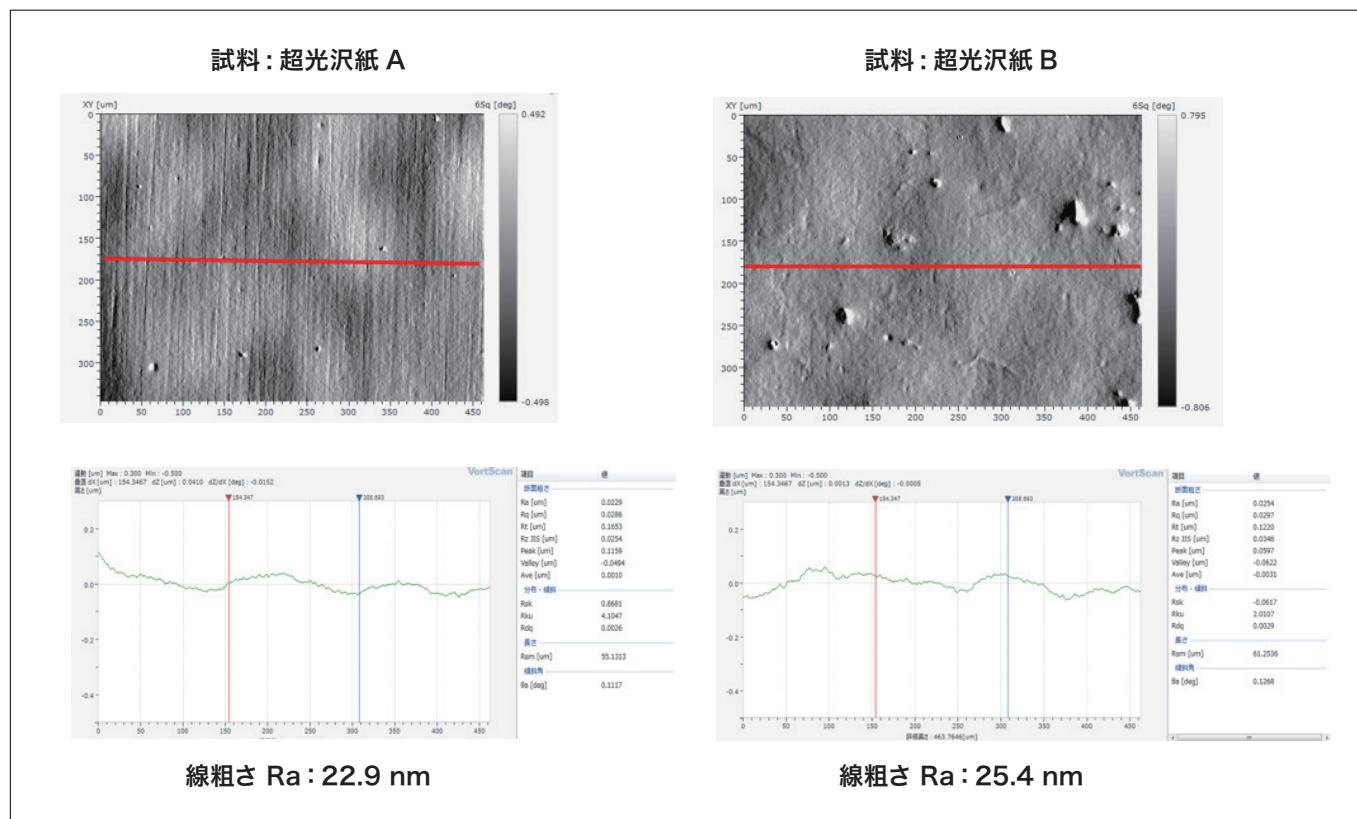
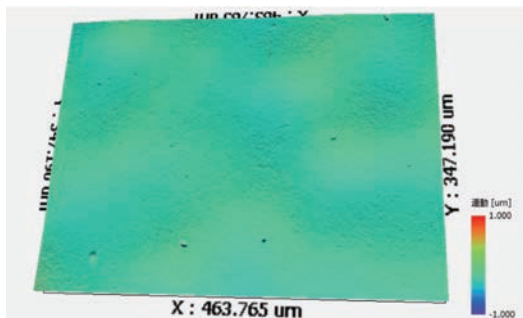
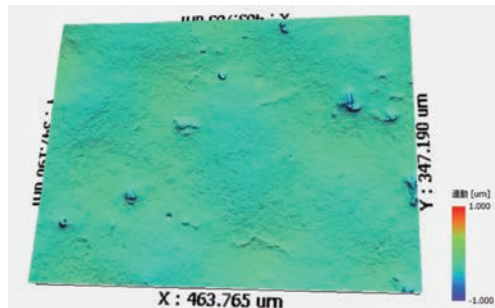


図4 従来の規格では、粗さの差が生じない試料例





光沢紙 A Sa : 49.1 nm



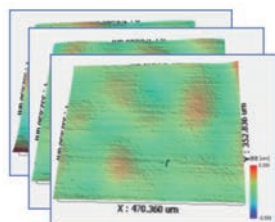
光沢紙 B Sa : 49.3 nm

図5 (図4)の試料を面粗さSaで算出したデータ

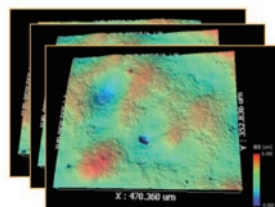
### 多数ある 3D 表面性状パラメータ ISO 25178 適切なパラメータ選択をサポートする機能

線粗さ評価だけでは違いが分かりづらい試料において、  
面全体の評価を行うことで試料間の違いの定量的な評価を可能にする。

超光沢紙 A



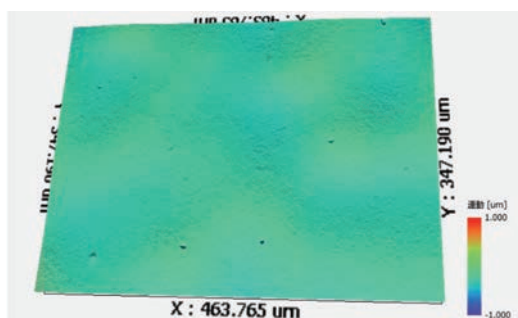
超光沢紙 B



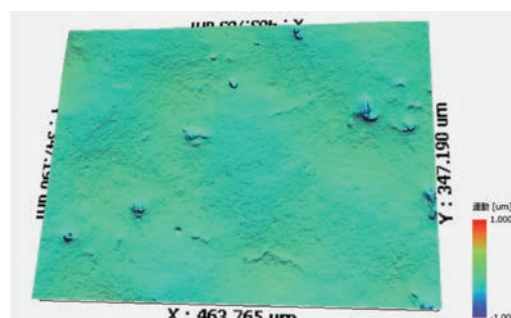
項目	値
S-Filter	自動
Nesting Index(μm)	0.000
Feature Parameters	
Spd[1/mm <sup>2</sup> ]	253.0736
Spd[1/mm]	-7.9210
Ssp[μm]	0.1704
Ssv[μm]	0.2384
S10z[μm]	0.4088
Fractal Parameters	
SRC[μm <sup>2</sup> ]	4531.89
Safc	0.0018
Functions and Related Parameters	
Sk[μm]	0.1725
Spk[μm]	0.0664
Svk[μm]	0.0597
Smmr1[%]	9.206
Smmr2[%]	92.460
Sxp[μm]	0.1280
Height Parameters	
Sk[μm]	0.0515
Sq[μm]	0.0658
Ssk	-0.6035
Sku	8.7321
Sp[μm]	0.2994
Sv[μm]	0.7515
Sz[μm]	1.0509
Hybrid Parameters	
Sdq	0.0067
Sdr[%]	0.0022

ISOパラメータ比較		名前	説明	分布グラフ	グループ	グループ
値	パラメータ	説明	分布グラフ	グループ	グループ	グループ
1.7474	Sdq	二乗平均平方根粗さ (Root mean square gradient)	混合パラメータ (Hybrid Parameters)		0.005	0.000
1.5579	Sdr	表面の発展面積比 (Developed interfacial area ratio)	混合パラメータ (Hybrid Parameters)		0.001	0.000
1.4867	Sv	最大谷深さ (Maximum pit height)	高さパラメータ (Height Parameters)		0.178	0.029
1.3327	Svk	減少谷部平均高さ (Reduced valley height)	機能パラメータ (Function and Related Parameters - 1)		0.041	0.010
1.1468	S10z	10点線粗さ平均高さ (Ten point height of surface)	特徴パラメータ (Feature Parameters)		0.230	0.113
1.1187	Safc	フラクタル複雑度 (Areal fractal complexity)	フラクタルパラメータ (Fractal Parameters)		0.000	0.000

図6 ISO 25178 パラメータ支援機能のイメージ



光沢紙 A Sdr : 0.0010%



光沢紙 B Sdr : 0.0028%

図7 (図4)の試料にて適切なパラメータを求めた例



### 3-3. 粘着多層膜の表面形状と断面解析（層断面解析機能による非破壊解析）

「ナノ3D 光干渉計測システム VS1800」には、他の測定器にはない『層断面解析機能』というユニークな機能がオプション設定されている。この機能は多層膜試料を「非破壊で各層の膜厚を測定」し、「非破壊で異物の深さ位置を測定」するものである。

その概念を(図8)に示す。多層膜試料に対して、二光束干渉対物レンズを垂直方向に走査した際、試料の表面・裏面・境界面において位相干渉が発生する。この位相干渉強度が最大になる座標位置をメモリすることで、表面形状データの取得のみならず、各層の膜厚変化状態をデータ取得するものである。

(図9)は、PET 層と粘着層で構成される粘着性テープの表面形状と断面を非破壊で測定したものである。従来は、テープの断面試料を作成して SEM (電子顕微鏡) による断面観察を行っていたが、観察断面試料作成過程における観察面の破損や SEM (電子顕微鏡) 観察時のチャージアップ・素材組成差に起因する低コントラスト問題が付きまとっていた。しかし、層断面解析機能を利用することで、非破壊での任意座標位置における多層膜各層の厚みの測定や、試料内部の気泡や異物深さの特定が短時間で行えるようになったため、先述の前処理や SEM 観察での問題点などからの開放を実現したものである。

現時点で、この多層膜を対象としたユニークな機能は、他の面(エリア)測定が行える装置には搭載されておらず、「ナノ3D 光干渉計測システム VS1800」独自の機能となっていることを記しておく。

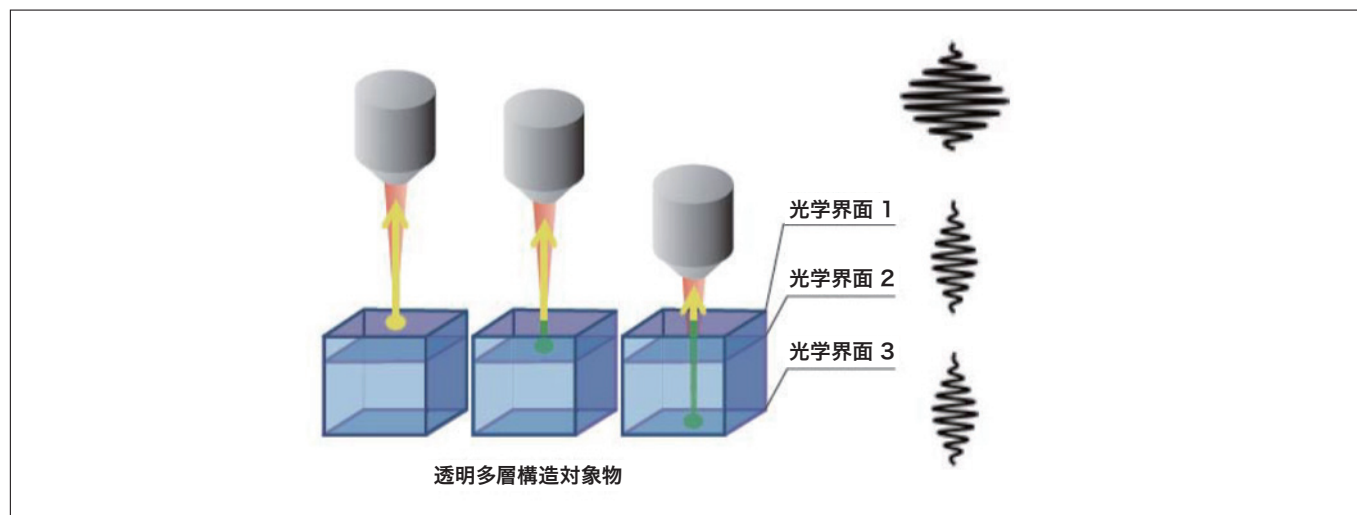


図8 膜厚測定 概念図

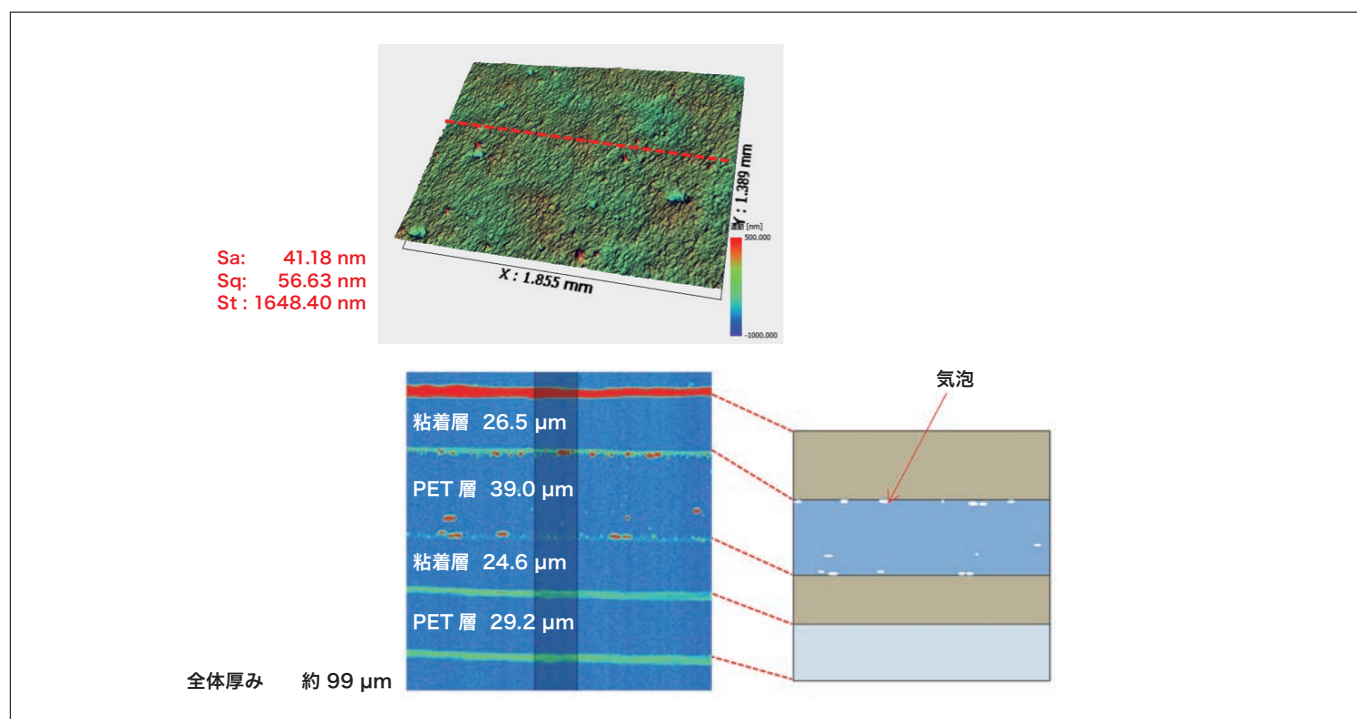


図9 気泡を含んだ粘着テープ表面粗度、層断面構造の解析事例

## 4. おわりに

ここでは、表面測定技術の変遷と最新の測定手法である(CSI)光干渉計測方式を用いた測定器の概要と、測定事例を紹介した。

世の中における表面形状測定器が、触針型の線(ライン)測定方式から非接触型の面(エリア)測定方式へと進み、さらには(LSM)走査型レーザ顕微鏡方式から新しい世代の(CSI)光干渉計測方式への使用装置の置換が脚光を浴びる理由は、非接触の面(エリア)測定を行うことによるデータの多角的解析能力と、短い測定時間で信頼性の高いデータを取得できるという点からも、「生産性」と「信頼性」の高さそれぞれを両立して実現していることがあげられる。

これから(CSI)光干渉計測方式を用いた測定器は、機能性フィルム・FPD(フラットパネルディスプレイ)のみならず、同様に広い測定範囲を高分解能で測定する必要があるトライボロジーをはじめとした素材評価や、表面処理技術の分野においても採用が広がっていくことが予想される。今後も、最先端技術を搭載した装置を最前線場に提供し、表面測定という立場から日本のものづくりの現場に貢献できれば幸いである。

### データご提供

図3: 東北大学 学際科学フロンティア研究所 島津 武仁 教授

### 略語

(AFM) 原子間力顕微鏡  
(LSM) 走査型レーザ顕微鏡方式  
(CSI) 光干渉計測方式

### 著者紹介

栗原 順治

(株)日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジーソリューション事業統括本部 評価解析システム営業本部 評価解析企画部

# 分光蛍光マイクロスコープ「EEM<sup>®</sup> View」 — 反射光・蛍光画像の分離表示による可視化観察を実現 —

Fluorescence Spectrophotometer with CMOS Camera System “EEM View”  
(Simultaneous Reflectance and Fluorescence Analyzer with Sample Imaging)

堀込 純

## 1. はじめに

分光蛍光光度計は、白色光をプリズムや回折格子などで単色光に分けて試料に照射して生じた蛍光をさらに単色光に分けて検出することで、蛍光物質の性質や濃度の測定を行う装置です。

近年、LED 照明やディスプレイなどさまざまな用途に用いられる蛍光材料の小型化・高精細化が進んでおり、分光蛍光光度計による電子材料や工業材料の性能や特性の評価に対し、より高精度な測定へのニーズが高まっています。

今回開発した分光蛍光マイクロスコープ「EEM<sup>®</sup> View」は、積分球と CMOS カメラを組み合わせることで、世界に先駆けて<sup>(\*)1</sup>分光画像とスペクトルデータの同時取得を実現した分光蛍光光度計専用測定システムです(図1)。

分光蛍光光度計から照射される単色光を光源に、積分球で照明を拡散化することでムラ無く試料に均一照射して CMOS カメラで画像を取得し、AI 技術に応用した計算アルゴリズム<sup>(\*)2</sup>により、蛍光成分と反射成分の画像の分離表示を可能としました。さらに、取得した試料画像を 25 分割した際の、区画ごとの拡大表示や蛍光・反射スペクトルデータも取得できます。従来、分光蛍光光度計では、試料全体の平均的なスペクトルデータの取得に留まっていたが、「EEM<sup>®</sup> View」を用いることで反射・蛍光スペクトルを可視化し、画像による蛍光発生部位の把握や特定箇所のスペクトルデータの取得が実現でき、より高精度な蛍光物質の評価が可能となります。

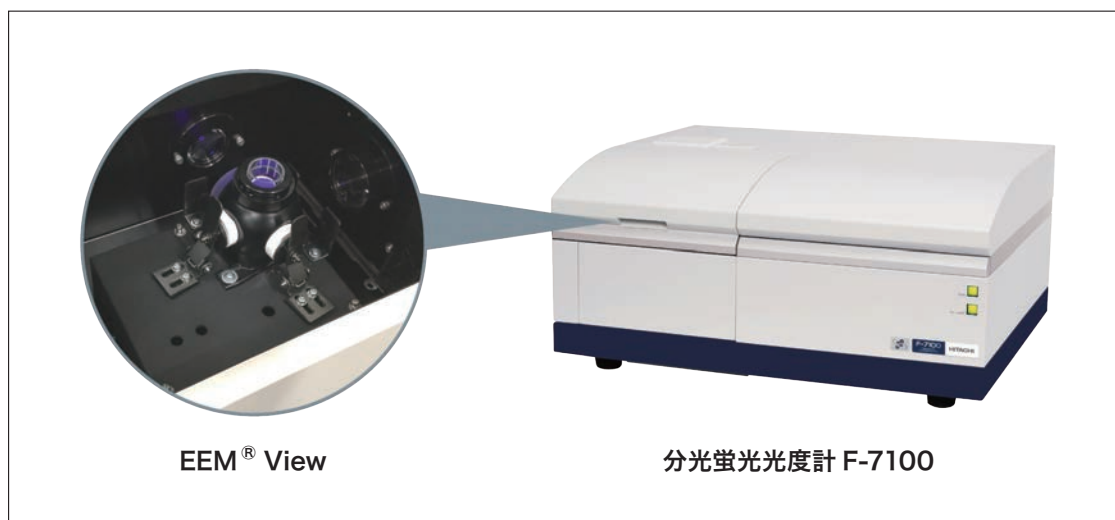


図1 分光蛍光マイクロスコープ「EEM<sup>®</sup> View」システム外観

### 【主な特長】

1. 各照明条件(白色光と単色光)における画像の取得が可能
2. 新開発の解析アルゴリズム<sup>(\*)2</sup>により蛍光画像と反射画像を分離表示可能
3. 画像より、区画(最大25区画)ごとのスペクトル化<sup>(\*)2</sup>(蛍光スペクトル, 反射スペクトル)が可能

### 【主な仕様】

照射波長	360 nm ~ 700 nm
カメラ	カラー (RGB) CMOS センサー
撮影可能波長	380 nm ~ 700 nm
最大有効画素数	1,920×1,200 (H × V)
主な機能	EEM 測定 単色光画像撮影 白色光撮影

## 2. 解析ソフトと応用例

EEM<sup>®</sup> Viewにて測定した試料画像と三次元蛍光スペクトルは、専用の解析ソフトウェアでデータの閲覧・スペクトル解析が可能です(図2)。ファイル一覧より閲覧・解析したいデータを選択するとデータが表示されます。スペクトルデータとしては、三次元蛍光スペクトルおよびトレースバーで切り出された励起スペクトル、蛍光スペクトルが表示されます。画像データとしては、励起波長に合わせて撮影された画像がサムネール一覧で表示されます。画像サムネールで選択した画像は拡大画像として確認できます。表示された拡大画像に対し、5×5の区画領域で蛍光・反射スペクトルの算出が可能です。区画を選択すると、選択した区画のスペクトル重ね書きおよびトレースバーの波長のデータリストの表示がされます。

例えば、図2に示す測定においては、蛍光体の実装された白色LEDでは蛍光体の輝度ムラを画像と蛍光スペクトルにて確認することができます。

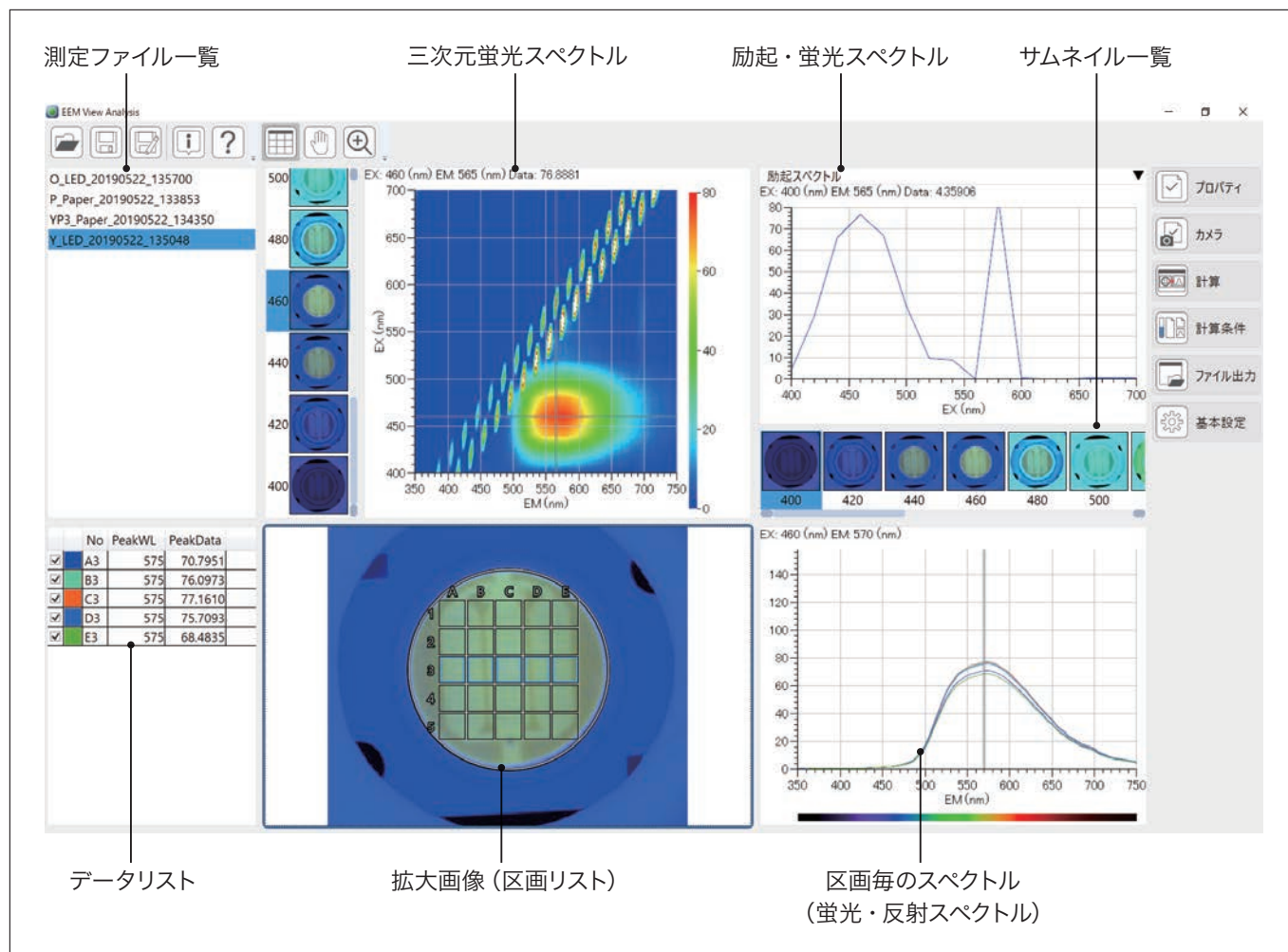


図2 EEM<sup>®</sup> Viewの解析画面

次にLEDによる面発光照明に応用される蛍光体が発布された樹脂シートを測定した例を示します(図3)。この例では、蛍光体の凝集、分散状態を評価しました。サンプルに入射光として、360～640 nmの単色光を照射して試料の蛍光特性を取得しました。EEM<sup>®</sup> Viewモードでは、この時、同時に各照明条件における画像を取得します。蛍光体が発布された樹脂シートの白色光照明下での画像を取得し、反射成分・蛍光成分に分離した画像を算出しました。蛍光成分に分離した画像にて発布状態の確認が可能です。同時に、反射スペクトル・蛍光スペクトルの確認ができます。



(評価項目) 凝集、分散状態の把握

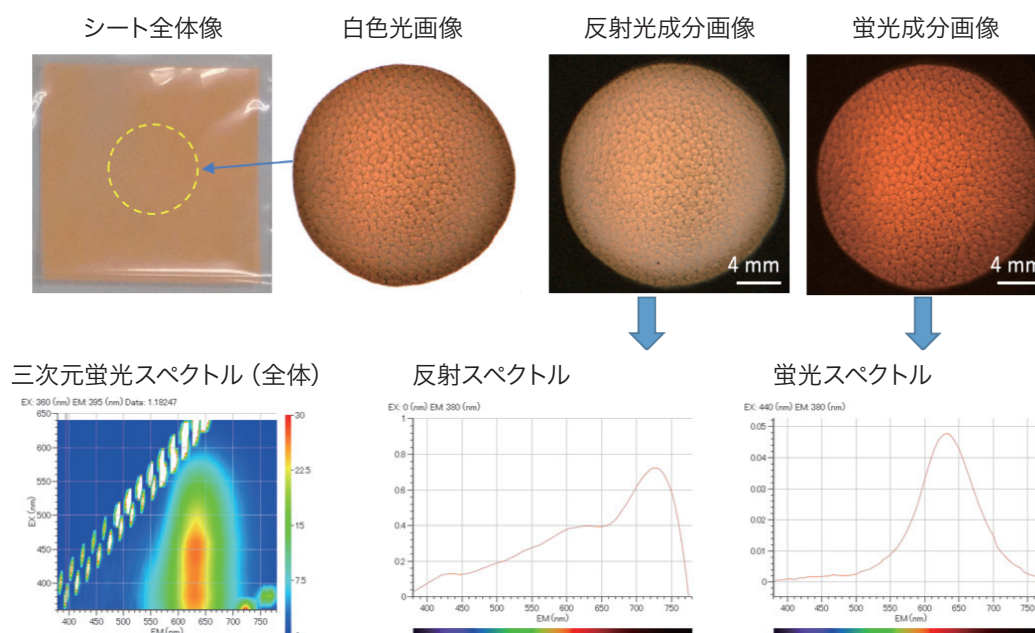


図3 シートの撮影画像と算出スペクトル

図4に塗布状態が異なる箇所の撮影例を示します。蛍光成分に分離した画像にて塗布状態のムラを確認できます。更に、区画ごとに算出された蛍光スペクトルより、強度のばらつきの評価が可能です。今回、ムラが確認された試料では、中央部で輝度が高い画像が取得されました。スペクトルについても、ピーク強度が15%程度高いデータが得られました。

(評価項目) 塗布ムラの把握

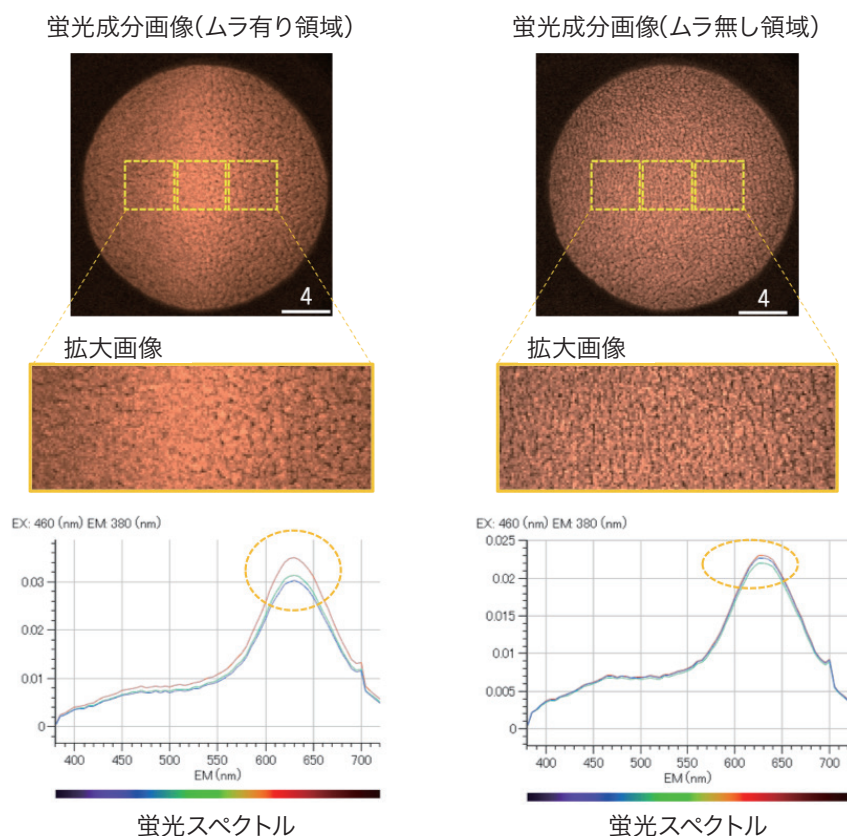


図4 蛍光体塗布樹脂シートの撮影画像と算出スペクトルによる塗布ムラ確認

### 3. まとめ

「EEM<sup>®</sup> View」は、日立ハイテクサイエンスが販売している分光蛍光光度計 F-7100 に搭載し使用します。試料のスペクトルデータと CMOS カメラによる蛍光・反射画像の分離表示データの同時取得を実現し、より高精度な測定が求められている材料・医薬品・食品など幅広い分野における研究開発や品質管理をサポートします。

日立ハイテクサイエンスは、「EEM<sup>®</sup> View」の蛍光分析への活用により、微細測定ニーズが高まる LED やディスプレイなどの電子材料や工業材料分野をはじめ、食品検査分野やライフサイエンス、バイオテクノロジー分野など、幅広い分野での研究開発や品質管理に貢献してまいります。

(※ 1) 日立ハイテクサイエンス調べ (2018 年 12 月時点)。

(※ 2) 計算アルゴリズムは、国立情報学研究所 佐藤 いまり 教授・鄭 銀強 准教授との共同研究により開発したもので、蛍光・反射画像分離および区画ごとの蛍光・反射スペクトルの算出に用いられている。

1. EEM: 励起蛍光マトリックスを指し、励起波長・蛍光波長・蛍光強度を三次元表示し、物質の蛍光特性を表す分析データ。三次元蛍光スペクトル、蛍光指紋と呼ばれることもある。
2. “EEM<sup>®</sup>” は、株式会社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。

#### 著者紹介

堀込 純

(株) 日立ハイテクサイエンス 光学設計部

# 紫外可視近赤外分光光度計 UH5700

UV-Vis-NIR Spectrophotometer UH5700

和久井 隆行, 岩谷 有香

## 1. はじめに

紫外可視近赤外分光光度計は、試料の紫外域、可視域、近赤外域における吸光度、透過率、反射率が測定可能な分析装置で、水質、環境、材料中の6価クロム、リン、窒素などの定量分析に利用されている。また、建築窓ガラス／フィルムや遮熱塗料などの機能性材料関連の光学特性評価および品質管理にも用いられるなど、幅広い分野で活用されている。このような幅広い分野のニーズに応えるべく紫外可視近赤外分光光度計 UH5700を開発した。本稿では、UH5700の特長と測定例を紹介する。

## 2. 特長

- ・ツェルニー・ターナー (Czerny-Turner) マウント シングルモノクロメータ方式の明るい分光器と新開発のグレーティングの採用により低迷光を実現し、クラス最高レベルの測光レンジ(紫外可視域：-5 ~ 5 Abs, 近赤外域：-4 ~ 4 Abs)を実現している<sup>(\*)1)</sup>。
- ・近赤外域では、低光量測定時に自動でスリット幅が広くなり、また高光量測定時には自動でスリット幅が狭くなる連続可変スリットを採用することにより、低ノイズで広い測定波長範囲(最大3,300 nm)を実現している。
- ・紫外・可視・近赤外域に対応した卓上型の分光光度計である。フロアトップタイプと比較して実験台の空きスペースなどに設置することが可能である。
- ・波長駆動にギヤドライブ方式を採用することにより、従来機<sup>(\*)2)</sup>と比較して紫外可視域の高速スキャン(最大5,000 nm/min)を実現している。
- ・新しい制御・データ処理ソフトUV Solutions Plus の採用により、快適な操作環境を実現している。特に従来機<sup>(\*)2)</sup>に採用されている UV Solutions と比較して、データリストやデータ処理結果の表形式表示機能、レポートレイアウト機能、性能確認機能など充実している。



図1 紫外可視近赤外分光光度計 UH5700

### 3. 高測光レンジ

UH5700はクラス最高レベル<sup>(\*)1</sup>の測光レンジを実現している。UH5700の紫外可視域の測光レンジを確認するために、一連の濃度系列の二クロム酸カリウム水溶液と硫酸ニッケル水溶液を調製し、UH5700により吸収スペクトルを測定した。得られた各濃度の吸収スペクトルからピーク波長(二クロム酸カリウム:350 nm, 硫酸ニッケル:721 nm)における吸光度を抽出し、試料濃度に対して吸光度の直線性を確認した。その結果を図2～3に示す。二クロム酸カリウム水溶液, 硫酸ニッケル水溶液のいずれの試料についても濃度に対して5 Abs まで相関係数( $R^2$ ):0.9997以上の良好な相関関係が得られ、吸光度の直線性を確認することができた。

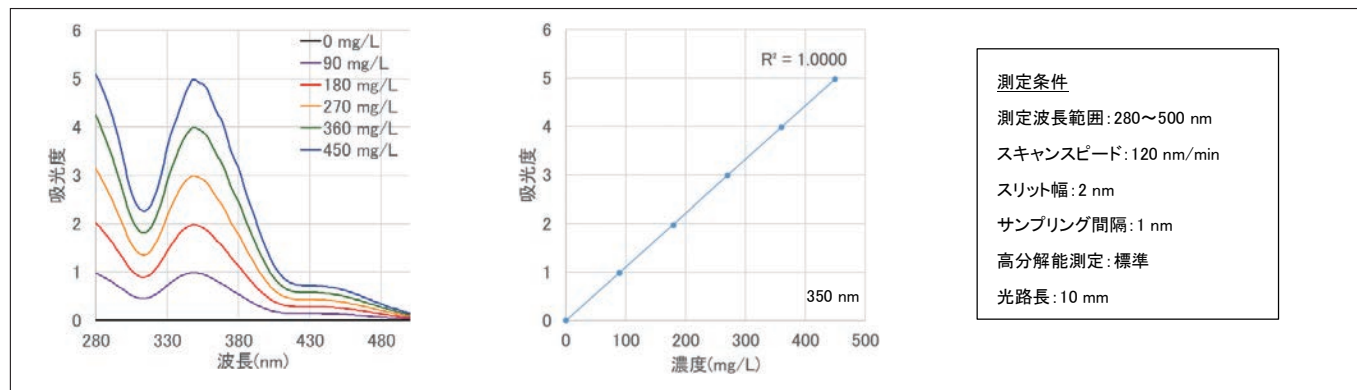


図2 ニクロム酸カリウム水溶液の各濃度系列の吸収スペクトルと検量線

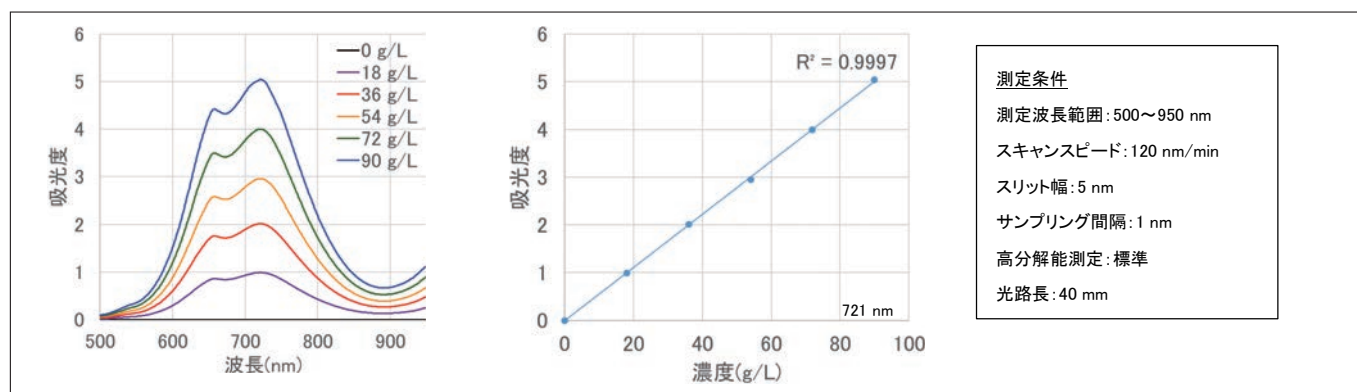


図3 硫酸ニッケル水溶液の各濃度系列の吸収スペクトルと検量線

近赤外域の測光レンジを確認するために、吸光度の異なる2枚のフィルターの吸収スペクトルを測定後、この2枚を重ねて測定し得られた吸収スペクトルと単独で測定した吸収スペクトルの和を比較した。その結果を図4に示す。フィルター1, 2を重ねて測定したスペクトルは4 Abs まで計算値とよく一致していることが分かる。

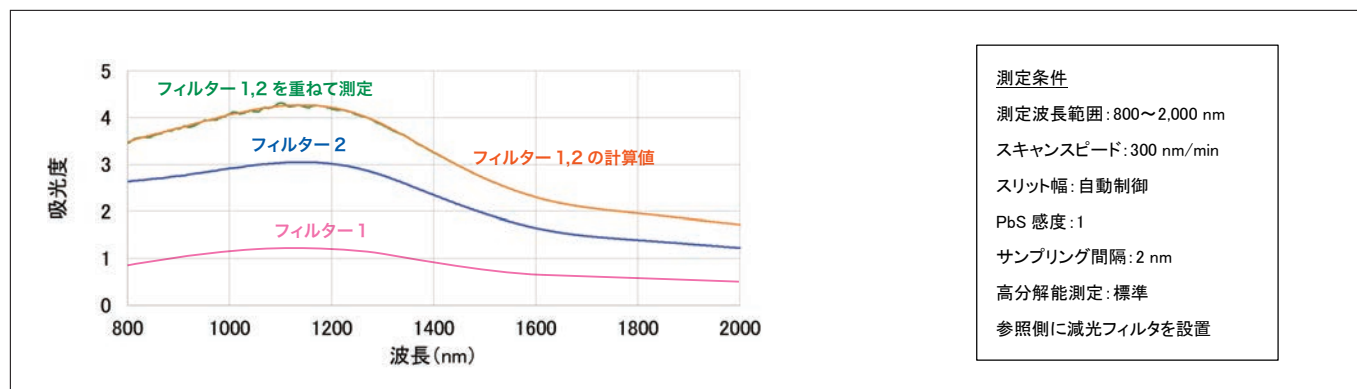


図4 各フィルターの吸収スペクトル

以上の結果から UH5700は紫外可視域, 近赤外域の波長範囲において広い測光レンジが得られていることが分かる。このことから UH5700は明るい波長域と暗い波長域が共存するガラスやフィルムなどの機能性材料の紫外, 可視, 近赤外域の透過率, 反射率を正確に測定することが可能である。



## 4. 広い測定波長範囲と低ノイズ

UH5700は広い測定波長範囲(190～3,300 nm)を実現している。図5にUH5700のベースラインデータの一例を示す。全波長域でベースライン平坦度仕様(190～200 nm:  $\pm 0.0003$  Abs, 200～850 nm:  $\pm 0.0002$  Abs, 850～2,500 nm:  $\pm 0.0002$  Abs, 2,500～3,300 nm:  $\pm 0.002$  Abs)を満たすスペクトルが得られている。特に近赤外域では、連続可変スリットの採用により、低光量測定時に自動でスリット幅が広くなり、高光量測定時にはスリット幅が狭くなるため、低ノイズのスペクトルを得ることが可能である。

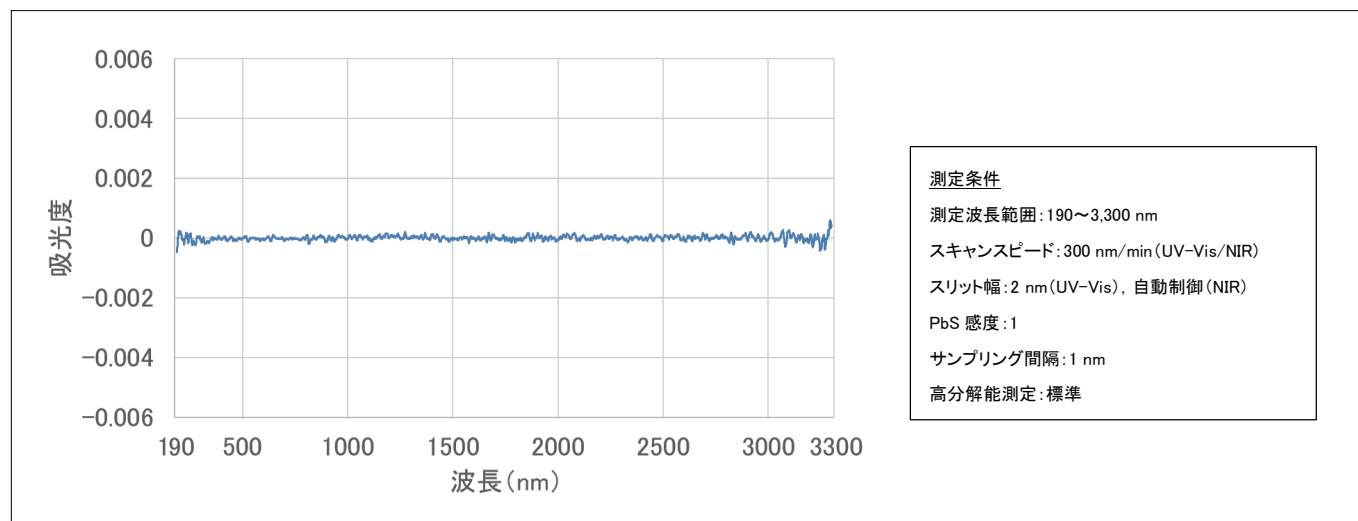


図5 UH5700 のベースラインデータ

## 5. 新しい制御・データ処理ソフト (UV Solutions Plus)

UH5700では、従来機<sup>(\*)2)</sup>のソフト (UV Solutions) を刷新し、新しい制御・データ処理ソフト UV Solutions Plus を採用した。このソフト画面の一例として測定画面を図6に示す。UV Solutions Plus は従来機<sup>(\*)2)</sup>のソフトと比較して、モニター表示部に新たに円グラフによる測定の進捗表示が可能となった。また測定中に分析条件、サンプルテーブルの表示が可能となり、容易に現在の測定状態を確認することができる。微細なスペクトル構造などを視認しやすくするために、スペクトル表示部の画面は大きく確保している。モニター表示部、測定操作ボタンのような確認頻度の高い部分は従来機<sup>(\*)2)</sup>と同じ配置/ボタンイメージを採用し、快適な操作環境を実現している。

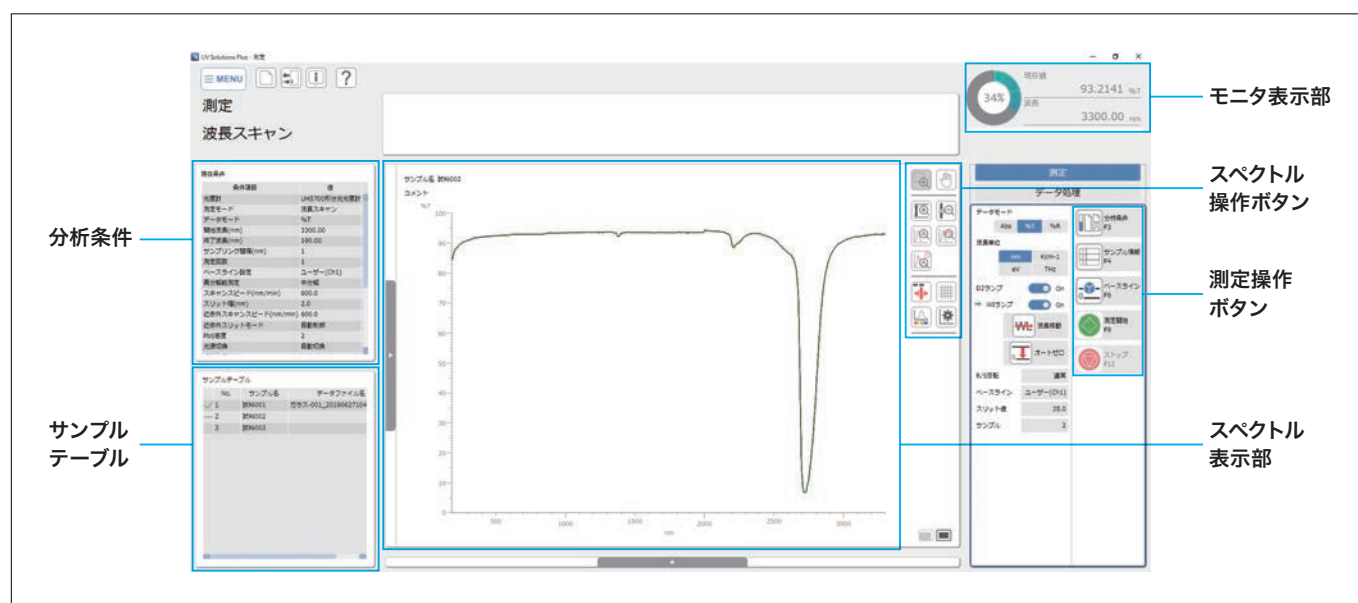


図6 UV Solutions Plus の測定画面

測定画面以外では以下のような特長がある。

#### ・データ処理結果の表形式表示

複数試料間の指定波長データや面積計算データ、半値幅計算データなどを表形式表示することが可能なため、試料間のデータ比較が容易に可能である。

#### ・カスタマイズ可能なレポートレイアウト

分析条件やデータ処理結果、スペクトルなどの印字項目を自由にレイアウトすることが可能で、オリジナルなレポート印刷のレイアウトを作成することが可能である。

#### ・性能確認機能を標準付属

波長正確さ、ノイズレベル、ベースライン平坦度などの性能確認機能が標準付属している。オプションソフトを導入することなく UH5700 の性能の日常管理が可能である。

## 6. 機能性ガラスの測定例

UH5700 の試料室にガラスフィルタホルダを搭載し、ガラス3種類の透過スペクトルを測定した(図7)。JIS R 3106<sup>(\*3)</sup>では板ガラス類の透過率、反射率に関する試験方法を規定している。この JIS を参考に、測定した透過スペクトルに重係数を乗じて加重平均し、可視光透過率(380 ~ 780 nm)、日射透過率(300 ~ 2,500 nm)を算出した。この結果を表1に示す。

試料 A の可視光透過率および日射透過率は、試料 B、C と比較し高い値が得られ、可視光および日射を良く透過することが分かった。また、試料 B の日射透過率は可視光透過率の6割程度と、他の2種の試料と比較して日射透過率が低く抑えられていることが分かる。これは、試料 B のガラスが900 ~ 1,150 nm において低い透過率帯を有し、1,800 nm 以上では近赤外光をカットするなど日射を調整する特性を持つ機能性ガラスであるためと考えられる。

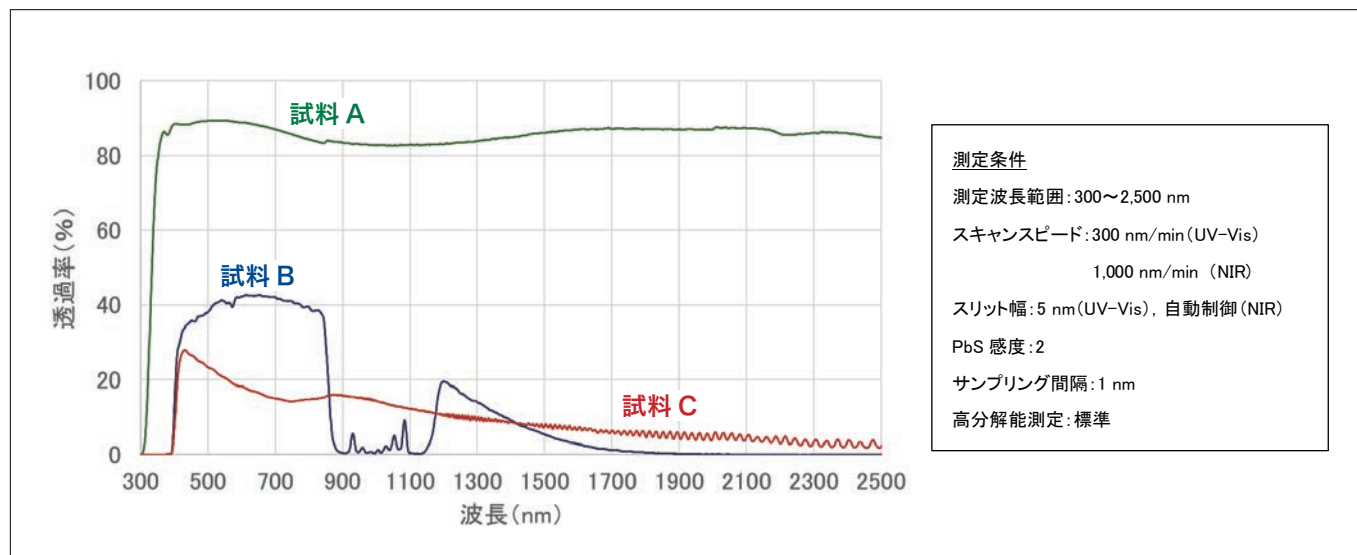


図7 ガラス3種類の透過スペクトル

表1 可視光透過率および日射透過率の算出結果

試料名	可視光透過率 (%) (380 ~ 780 nm)	日射透過率 (%) (300 ~ 2,500 nm)
試料 A	89.1	85.9
試料 B	40.6	24.6
試料 C	20.2	14.9

## 7. まとめ

本稿では紫外可視近赤外分光光度計 UH5700を紹介した。UH5700は紫外域、可視域、近赤外域の広い波長範囲において低ノイズおよび高い測光レンジを実現している。UH5700は明るい波長域と暗い波長域が共存する機能性材料の可視光測定や日射測定の他に、水質、環境関連の定量分析や品質管理、教育を目的とした用途など幅広い分野における利用が期待される。

(※ 1) 日立ハイテクサイエンス調査 日本国内販売機種(近赤外波長域対応、シングルモノクロメータ機) 2019 年 4 月現在。

(※ 2) 紫外可視近赤外分光光度計 UH4150。

(※ 3) JIS R 3106 : 2019. 板ガラス類の透過率・反射率・放射率・日射熱取得率の試験方法。

### 著者紹介

和久井 隆行, 岩谷 有香

(株) 日立ハイテクサイエンス 光学設計部

## 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**    September 2019    VOL. 62    No. 2

発行日 2019年9月30日  
編集人 許斐麻美  
発行人 内田憲孝

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)

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