

**HITACHI**  
Inspire the Next

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

SEPTEMBER 2023

Vol. **66** No.2

September 2023  
Vol.66 No.2

◀研究報文

5786

EEM-PARAFAC解析を活用した医薬品の光分解過程の可視化

神野 伸一郎

5793

燃料電池触媒インク中のアルコール分率がアイオノマー吸着と燃料電池性能に与える影響

藤ヶ谷 剛彦

5801

薬剤部薬物血中濃度測定を臨床現場で活かす

—病院での運用に至るまで—

河村 剛至

◀技術解説

5806

120 kV TEM HT7800における自動粒子検索機能の特長と応用

和久井 亜希子, 野寺 康行

5812

業務効率化に貢献するイオンミリング法

稲木 由紀

5819

熱分析装置 示差走査熱量計 NEXTA<sup>®</sup> DSCシリーズ

西村 晋哉

5823

マルチ ICP発光分光分析装置 SPECTRO ARCOSの特長と測定例

添田 直希

◀トピックス

5828

DS3000 Compact CE DNA Sequencerを用いたゲルシフトアッセイ

隅田 周志, 大坪 嘉行

◀コラム

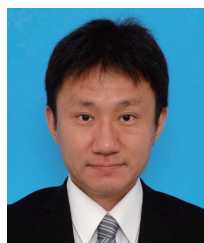
5832

多次元HPLCを用いる宇宙試料中のキラルアミノ酸分析

浜瀬 健司

# EEM-PARAFAC解析を活用した 医薬品の光分解過程の可視化

Visualization of the Photodegradation of a Therapeutic Drug by EEM-PARAFAC



愛知学院大学薬学部  
生体有機化学講座  
教授

神野 伸一郎 博士(薬学)

## 1. はじめに

医薬品は多様な構造をもった有機化合物であるため、光などの外的因子により変化が生じるものが多く、色調変化による薬効や生活の質(QOL)の低下のみならず、分解物の生成によって副作用が発現するなど、適正な薬物治療を実施する上で問題となっている。医薬品の原薬や製剤の光安定性は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議(ICH)で合意された新原薬及び新製剤の光安定性試験ガイドラインに基づいた試験を実施することで評価されている。その試験に要求されるデータ取得には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)など、多種多様な分析手法が利用され重要な役割を果たしているが、分解の経時的な変化を可視化することは難しい。

蛍光指紋は、励起蛍光マトリックス(EEM)と呼ばれ、励起波長、蛍光波長、蛍光強度の情報を三次元的にプロットした測定法で、指紋のような等高線マップは成分特有となる。また本測定法に多変量解析のParallel Factor Analysis(PARAFAC)を組み合わせたEEM-PARAFAC解析は、多成分が重なり合ったEEMを、個別の成分スペクトルに分離することができるケモメトリクス的手法である<sup>1)</sup>。農産物や食品の品質評価、水質のモニタリングへ応用が進んでいる反面<sup>2,7)</sup>、医薬品の安定性評価にはこれまでほとんど活用されてこなかった<sup>8)</sup>。本稿では、医薬品の光分解過程の可視化を目的とし、EEM-PARAFAC解析による光安定性評価法の開発に取り組んだ<sup>9)</sup>。

## 2. フェノチアジン系抗精神病薬の吸収・蛍光スペクトル

EEM-PARAFAC解析の適用に向けて、光安定性が低いことが知られているフェノチアジン系抗精神病薬を研究対象として用いた。まずメタノール中におけるchlorpromazine hydrochloride(1)の濃度と蛍光強度の線形性を確認した結果、5~25  $\mu\text{M}$ の範囲において良好な直線性を示すことがわかった。そこで10  $\mu\text{M}$ の1メタノール溶液に対し、365 nmのLED光を照射し、酸素雰囲気下、25°Cにおける吸収、蛍光スペクトルを経時的に測定した(図1)。1は紫外域に吸収帯が観測され、260 nm付近の吸収帯は、フェノチアジン環の $\pi-\pi^*$ 遷移、310 nm付近の弱い吸収帯は、硫黄原子の $n-\pi^*$ 遷移に由来することがDFT計算よりわかった。また450 nm付近をピークトップとする青色蛍光を示した。LED光を照射すると、吸収帯の形が変化し、長波長側にテイルが見られ、溶液は無色からオレンジ色に変化した。また1の蛍光波長は大きくブルーシフトし、極大波長は375 nm付近を示した。これら光照射による吸収、蛍光のスペクトル変化は、溶媒間(ジクロロメタン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、水)で、ほとんど差はみられなかった。

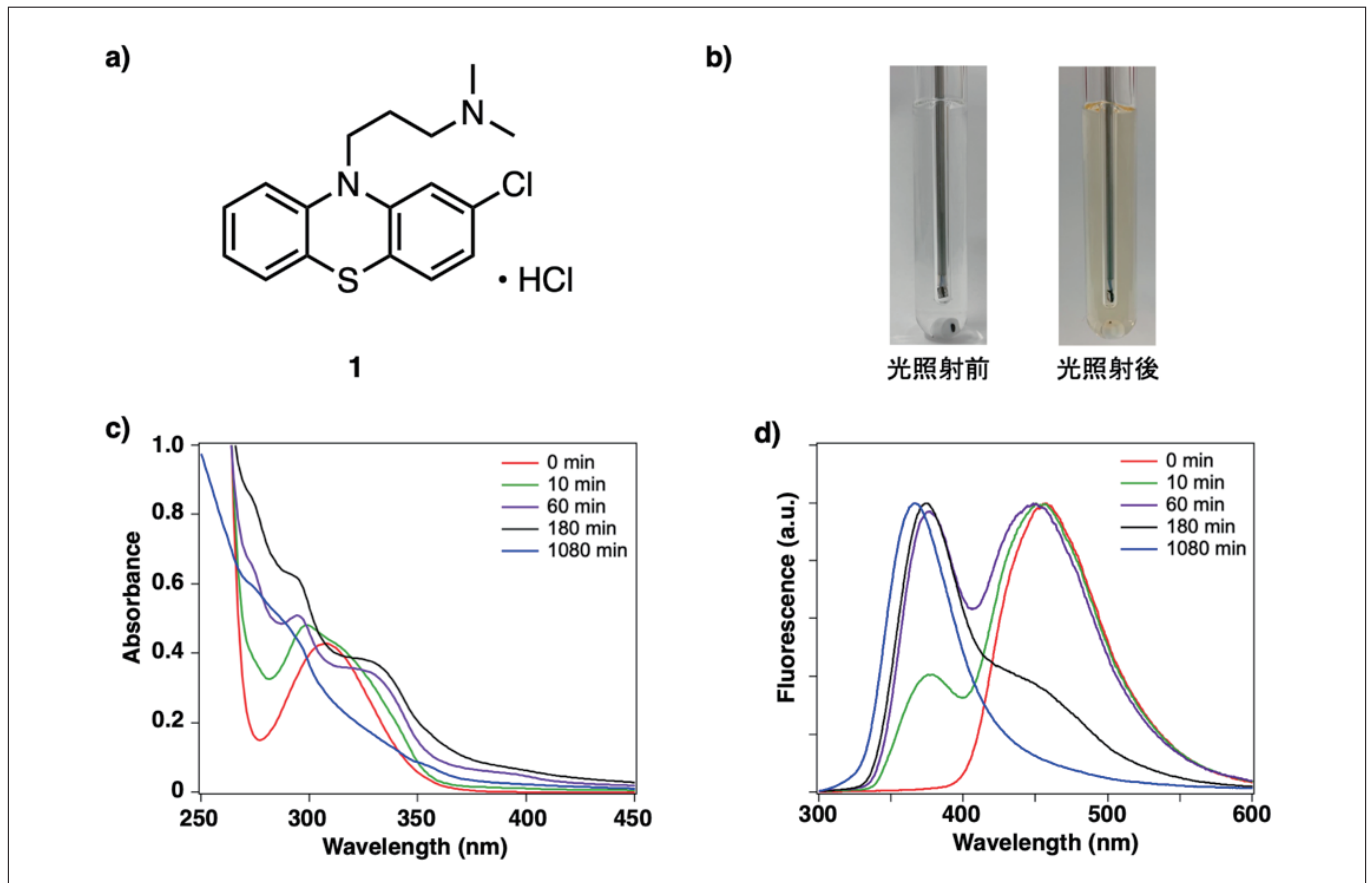


図1

- a) Chlorpromazine hydrochloride (1)の構造  
 b) 無色透明の照射前後の1は、照射によりオレンジ色に呈色する。  
 c) 1メタノール溶液の吸収スペクトル変化。時間 (min) は照射時間を示す。  
 d) 1メタノール溶液の蛍光スペクトル変化。時間 (min) は照射時間を示す。

### 3. EEM-PARAFAC解析

メタノール溶液における1の光分解過程をEEMで経時的にモニタリングした。照射時間の延長に伴い、1に帰属される蛍光波長(em)450 nm / 励起波長(ex)260 nm, 310 nmの等高線マップの強度が減少し、em 300-450 nmとex 200-350 nmの範囲に及ぶ新たな等高線マップが出現した。続いて、PARAFAC解析により成分スペクトルの分離を行った結果、1のem 450 nm/ex 260, 310 nm (C1)の強度が照射30分で減弱し、em 375 nm/ex 250, 275, 335 nm (C2)とem 355 nm/ex 240, 290 nm (C3)の等高線マップが時間依存的に出現した(図2)。C3はC2より遅れて生成することがわかった。また本EEM-PARAFACモデルのCore consistency(成分数の妥当性を示す指標)は91%を示した。



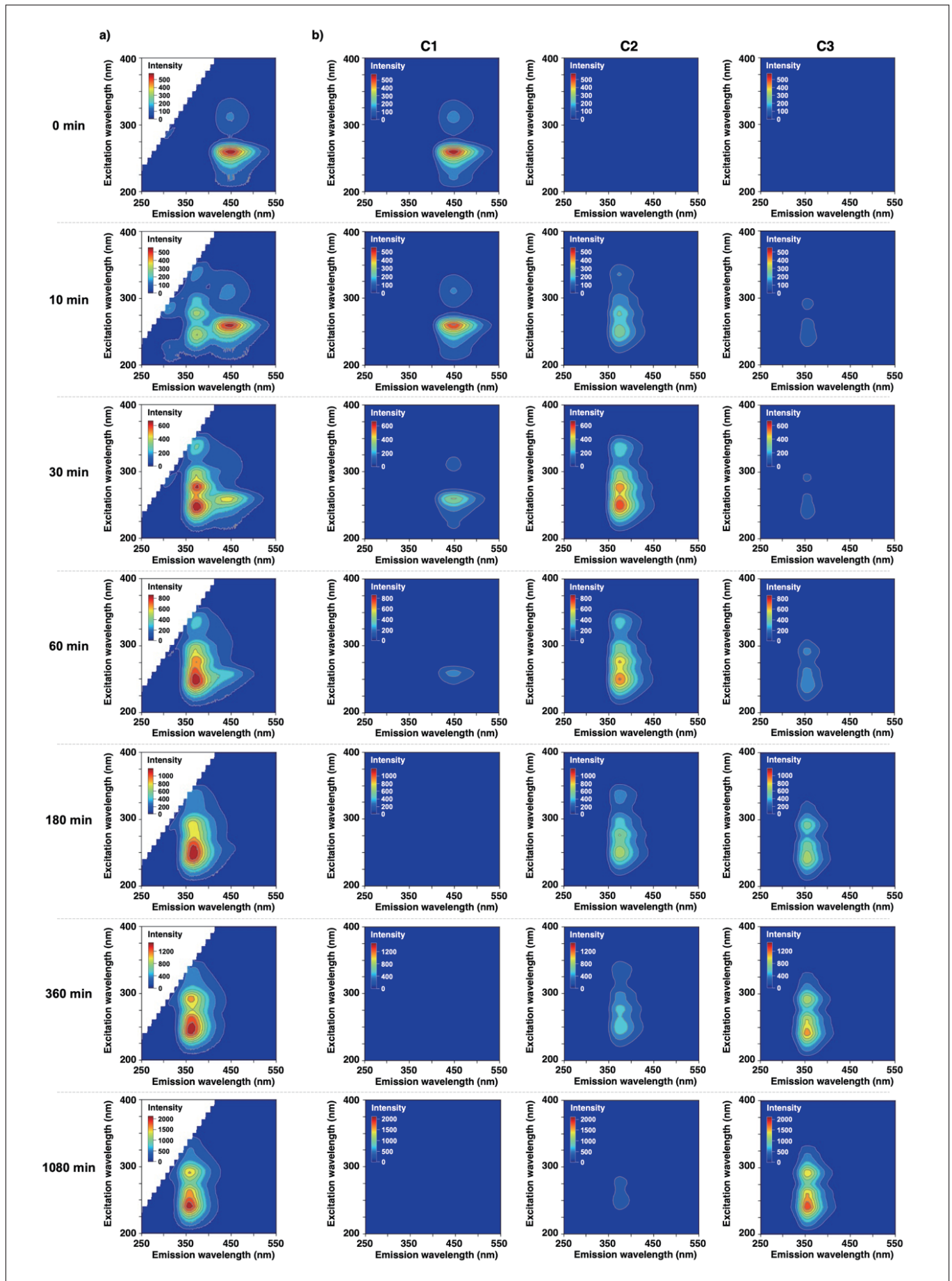


図2  
 a) 1メタノール溶液のEEMスペクトルの変化。時間(min)は光照射時間を示す。  
 b) PARAFAC解析。本モデルは3成分にスペクトル分離できた。

## 4. 光分解物の同定と光分解反応の速度論的解析

EEM-PARAFAC 解析で分離された成分数の妥当性を更に検証するため、**1**の光分解反応の生成物を捕捉し、分解物の化学構造と EEM の関係を明らかにした。まず 10 mM の **1**メタノール溶液に対して、酸素雰囲気下、365 nm の LED 光を照射しながら 18 時間反応させ、得られた反応混合物をシリカゲルクロマトグラフィーで分離精製した。その結果、**1**が酸化された phenothiazine hydrochloride sulfoxide (**2**) が主生成物として得られ、単結晶 X 線構造解析により、**2**の結晶構造を同定することに成功した。副生成物の 2-chloro-*N,N*-dimethylcarbazole (**3**) は、NMR を用いて構造決定した。更に  $C_{17}H_{19}ClN_2SO$  と  $C_{17}H_{19}ClN_2SO_3$  の分子式に相当する微量の酸化物がそれぞれ生成することがわかった。

続いて、単離された光分解物 **2** と **3** をメタノールに溶解させ EEM を測定し、PARAFAC より成分分離された C2 と C3 の等高線マップの帰属を行った。その結果、C2 の等高線マップは、**2** の em 375/ex 275, 335 nm と一致し、C3 の等高線マップは、**3** の em 355/ex 240, 265 nm, 290 nm の EEM とそれぞれ一致した (図3)。上記の結果を踏まえて、本 EEM-PARAFAC 解析は、3 成分モデルでフィッティングできることが明らかとなった。

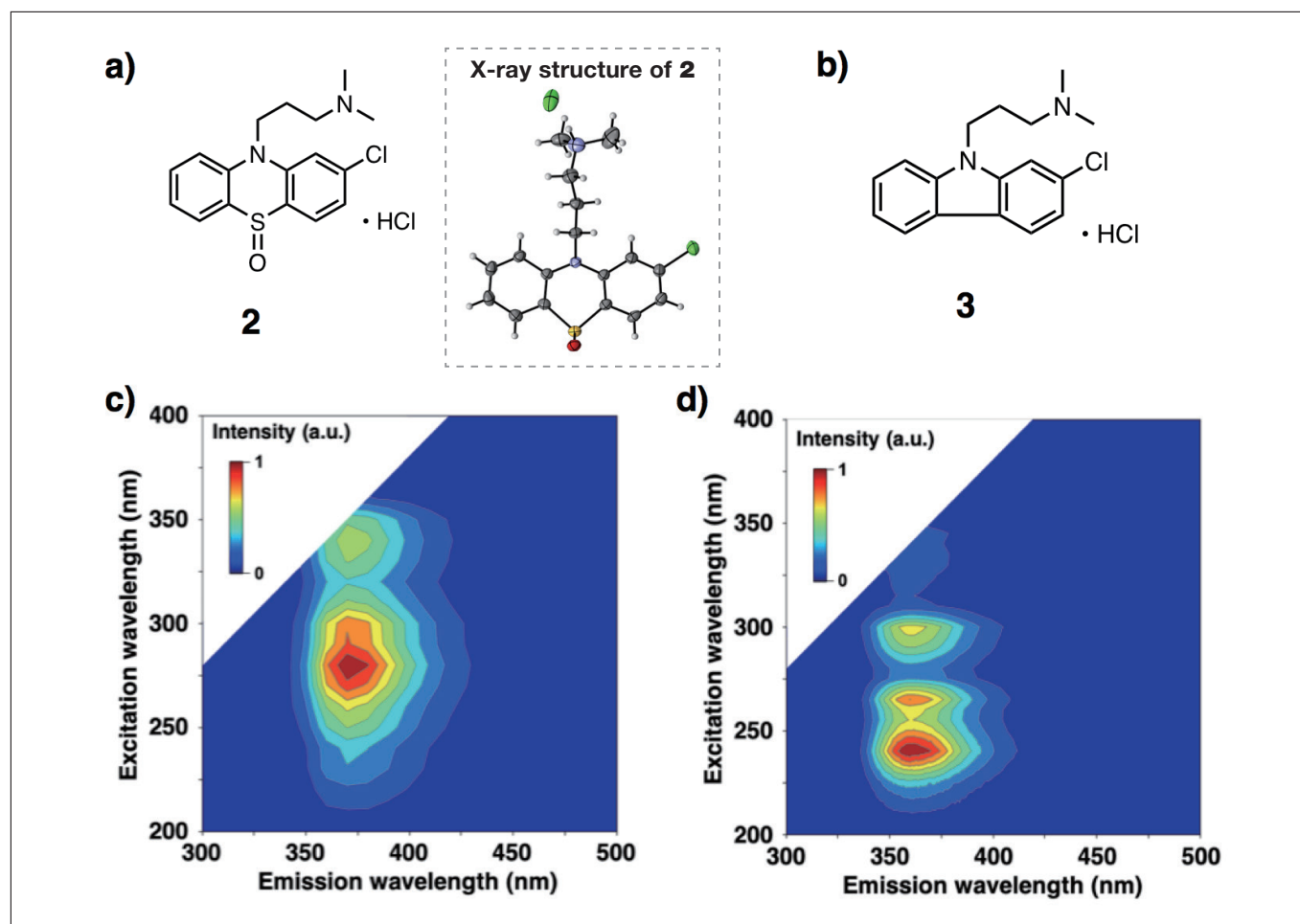


図3  
 a) phenothiazine hydrochloride sulfoxide (**2**)の化学構造と結晶構造  
 b) 2-chloro-*N,N*-dimethylcarbazole (**3**)の化学構造  
 c) **2**メタノール溶液のEEMスペクトル  
 d) **3**メタノール溶液のEEMスペクトル

続いて、**1**の光分解反応を定量的に把握するために、速度論的解析を行った。 $[1]_0$ は**1**の初濃度、 $t$ は光照射時間 (min) を示した。また em 450 nm/ex 260 nm の C1 スコア値に着目し、光照射時間  $t$  のスコア値 ( $I_t$ ) と  $t = 0$  のスコア値 ( $I_0$ ) から式1に基づいて、スコア変化率 ( $Q_{em}$ ) を求めた。各光照射時間における **1** の残存濃度は、 $[1]_0$  に  $Q_{em}$  を乗ずることで算出した。

$$Q_{em} = \frac{I_0 - I_t}{I_0} \quad (\text{式1})$$

図4は、**1**の時間-濃度変化曲線を示す。このプロファイルから、**1**は一次反応に従って分解することがわかった。続いて、式2の速度式を入力したカーブフィッティングプログラムを Matplotlib で作製し、Levenberg-Marquardt 法を用いて非線形フィッティングを行った結果、反応速度定数 ( $k_1$ ) は、 $8.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ を示し、光分解反応の半減期 ( $t_{1/2}$ )は80分となった。

$$[1] = [1]_0 e^{-k_1 t} \quad (\text{式 2})$$

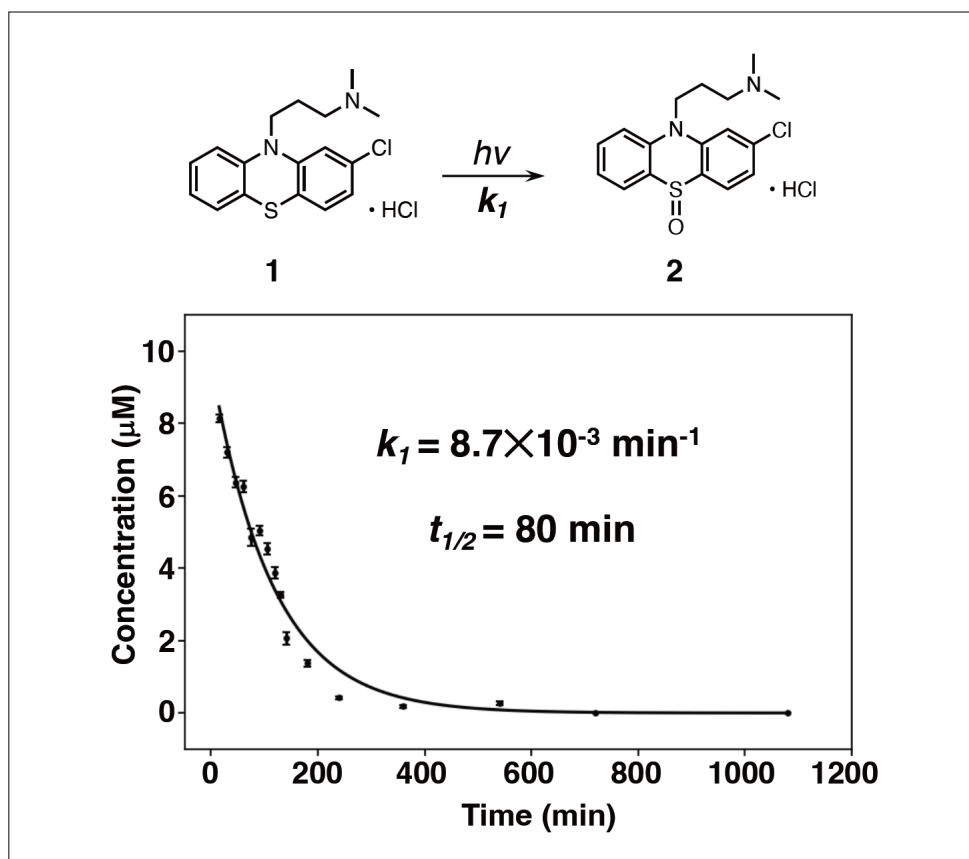


図4 光分解反応の速度論的解析

## 5. フェノチアジン系抗精神病薬の光安定性評価

最後に、本 EEM-PARAFAC 解析を、側鎖構造が異なるフェノチアジン系抗精神病薬の levomepromazine maleate (**4**)と prochlorperazine Maleate (**5**)の光安定性評価に適用した。化合物間で光分解の程度に大きな差は見られなかったが、いずれにおいても、照射後速やかに原薬 (**C1**)の等高線マップが消失し、sulfoxide 体 (**C2**)と carbazole 体 (**C3**)に相当する等高線マップが現れ、光分解の経時的変化を可視化することに成功した。続いて、3成分の相対濃度を求め、濃度分布の時間的変化を調べた結果、10分間の照射で50%以上の原薬が分解した。また carbazole 体は、sulfoxide 体より遅れて生成し、照射180分後には、55%程度の濃度分布を示すことがわかった(図5)。

以上より、EEM-PARAFAC 解析によるフェノチアジン系抗精神病薬の光安定性評価法を構築した。本法は、原薬の光分解過程を等高線マップで可視化でき、HPLC や GC-MS と比較して、カラムクロマトグラフィーによる成分分離を行うことなく、原薬の光分解過程に関する定量的な情報を得ることができた。また原薬サンプルや溶媒等の使用量も大幅に低減できた。

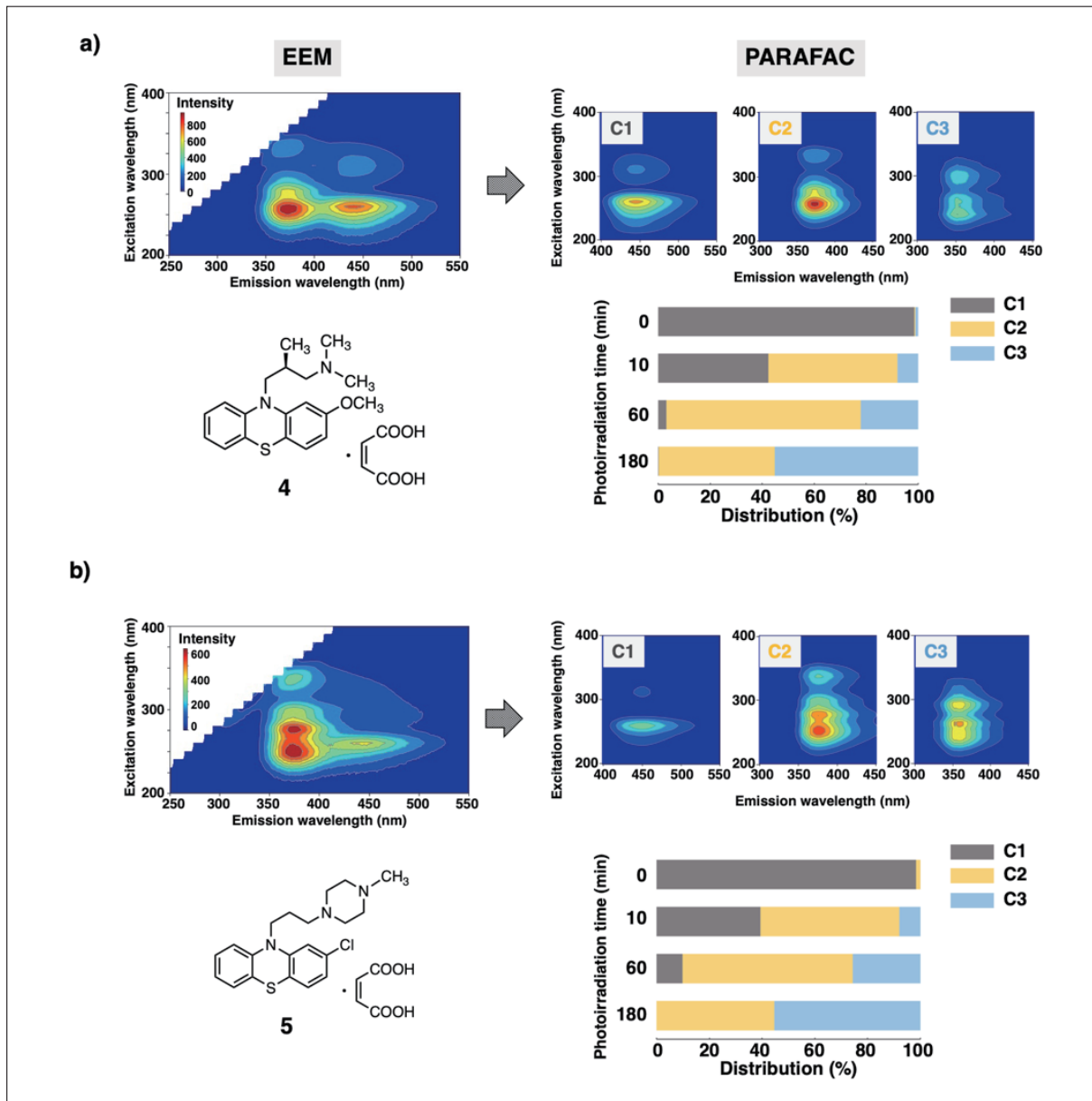


図5

a) Levomepromazine maleate (4) の光安定性  
b) Prochlorperazine Maleate (5) の光安定性

## 6. おわりに

医薬品の原薬や製剤の光安定性の評価には、多種多様な分析手法が利用され重要な役割を果たしているが、いずれの手法も分解の経時的な変化を可視化することは難しい。本稿では我々が開発した EEM-PARAFAC 解析による医薬品の光安定性評価法について紹介した。本手法は、原薬の光分解の時間的変化をマッピングで可視化でき、光分解反応の速度論的解析やスコア値から個別の成分の相対濃度を算出することで、分解過程に関する定量的な情報を得ることができた。

薬剤師をはじめとした医療従事者は、光に不安定な医薬品を取り扱う際、原薬の光感受性に関する情報を事前に把握し、医薬品の保管、製剤の調製から治療提供に至るまで、品質を維持することが求められている。例えば、研究対象としたフェノチアジン系抗精神病薬の医薬品インタビューフォーム内には、「光によって分解変色するため、開封後は遮光して保存すること。着色の認められるものは使用しないこと」と記載され、取り扱いに関する注意が情報提供されている。一方、EEM-PARAFAC 解析により、本医薬品の光分解における主生成物は、無色透明な外観をもつ酸化体であることを見いだした。医薬品の安定性を確認する際、色などの外観や性状は着目しやすいため目安となるが、適正な薬物治療を実施する上で、分解物や分解経路を正しく同定することは必須である。EEM-PARAFAC 解析は、それらを迅速かつ簡便に把握、理解できる有用な手法となるであろう。また医薬品等の品質管理分野におけるレギュラトリーサイエンスの実践にも貢献できることが期待される。

## 参考文献

- 1) K. R. Murphy, C. A. Stedmon, D. Graebera and R. Bro, *Anal. Methods* 2013, **5**, 6557-6566.
- 2) X. Wang and F. Zhang, *Sci. Rep.* 2018, **8**, 1-13.
- 3) I. Duran Meras, J. Dominguez Manzano, D. Airado Rodriguez and A. Munoz de la Pena, *Talanta* 2018, **178**, 751-762.
- 4) M. Sgroi, P. Roccaro, G. V. Korshin and F. G. A.Vagliasindi, *Environ. Sci. Technol.* 2017, **51**, 4306-4316.
- 5) L. Lenhardt, I. Zekovic, T. Dramicanin, B. Milicevic, J. Burojevic and M. D. Dramicanin, *Food Chem.* 2017, **229**, 165-171.
- 6) V. Trivittayasil, M. Tsuta, Y. Imamura, T. Sato, Y. Otagiri, A. Obata, H. Otomo, M. Kokawa, J. Sugiyama, K. Fujita and M. Yoshimura, *J. Sci. Food Agric.* 2016, **96**, 1167-1174.
- 7) C. Coelho, A. Aron, C. Roullier-Gall, M. Gonsior, P. Schmitt-Kopplin and R. D. Gougeon, *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 2015, **87**, 8132-8137.
- 8) I. Sciscenko, H. Thi My Hang, C. Escudero-Onate, I. Oller and A. Arques, *ACS Omega*, 2021, **6**, 4663-4671.
- 9) M. Tanioka, T. Ebihana, M. Uraguchi, H. Shoji, Y. Nakamura, R. Ueda, S. Ogura, Y. Wakiya, T. Obata, T. Ida, J. Horigome, S. Kamino, *RSC Advances*, 2022, **12**, 20714-20720.



# 燃料電池触媒インク中のアルコール分率が アイオノマー吸着と燃料電池性能に与える影響

Effect of Alcohol Content on the Ionomer Adsorption of Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell Catalysts



九州大学大学院工学研究院  
教授

藤ヶ谷 剛彦 博士(工学)

## 1. はじめに

固体高分子形燃料電池 (PEMFC) は、水素をエネルギー源とすることから持続可能な低炭素社会の実現に向けた重要な電源として期待されている<sup>1,2)</sup>。さらなる普及に向けて、PEMFC のコスト削減は重要な課題であるが、特にコスト削減効果が大きい触媒層に含まれる白金量の削減技術の確立が急務である。そのためにまずできることは白金 (Pt) の利用効率向上であり、多くの研究が展開されている<sup>2-5)</sup>。触媒層は一般的に白金ナノ粒子が担持されたカーボン (Pt/C) とプロトン伝導性のポリマー (アイオノマー) からなる3次元多孔質構造である<sup>6)</sup>。アノードで生成されたプロトンと電子が外部から供給される酸素ガスと白金ナノ粒子上で反応して水を生成するカソード触媒層の酸素還元反応 (ORR) が電池反応の律速反応である。触媒層内のアイオノマー分布と空孔の接続性がプロトン拡散と酸素拡散を支配し、これらの拡散が ORR の過電圧を生じることから、特にカソード触媒層の構造制御が重要とされる<sup>7)</sup>。このようなプロトンと酸素の拡散を有利にするような構造の作製に、Pt/C とアイオノマーと分散溶剤からなる溶液 (=「インク」と呼ぶ) の組成や作製法の最適化が重要であり<sup>8)</sup> 標準化のために推奨されたプロトコルもあるものの、各研究グループ、各メーカーによって秘伝の条件が存在する (はず)。

インク組成の中でもアイオノマーの相対量 (炭素対アイオノマーの重量比 = I/C) は制御が容易であることから、しばしば最適化の対象となる<sup>9-18)</sup>。一般的には I/C を小さくすると酸素拡散性が向上する一方で、プロトン伝導ネットワークの切断によりプロトン伝導度が低下するトレードオフの傾向を示す<sup>10)</sup>。また、インク溶媒の種類も PEMFC の性能に影響を与えることが知られ、特に、メタノール、エタノール、2-プロパノールなどのアルコールと水の二元混合溶媒を中心に広く研究されている<sup>19-31)</sup>。

アルコール/水の混合比を制御したいいくつかの研究を紹介しよう。Van Cleve らは、水分率が高い (水分率 83 wt%) インク中では、Pt とアイオノマー中のスルホン酸との強い相互作用が働き、結果として ORR 活性の低下を招く一方で、低水分率 (24 wt%) のインクでは大きなアイオノマー凝集体が生成し、触媒層において酸素拡散の妨げとなり、結局、中程度の水分率 (62 wt%) のインク溶媒を使用した場合において PEMFC 性能が最も優れることを報告した<sup>30)</sup>。一方で Orfanidi らは、水分率の多い (65 wt%) インクの方が水分率の少ない (16 wt%) インクより性能が低いとする逆の結果を報告した。彼らの考察によると、高水分率インク中で形成されるアイオノマー凝集体が触媒層中において空孔を閉塞し、酸素拡散を妨げた一方、低水分率 (高アルコール分率) 条件下では、アイオノマーはより均一に分布し、Pt 表面での連続的なプロトン伝導パスが形成された結果、良好な性能を与えたとしている<sup>29)</sup>。これらの研究から、インク中のアイオノマー、溶媒分子、およびカーボン表面との相互作用が、触媒層内でのアイオノマー分布や空孔構造の連続性を制御する上で重要であることを示している。しかし、溶媒組成に応じた触媒に対するアイオノマー吸着の体系的かつ定量的な分析はまだ行われていなかった。

そこで我々は、高水分率 (80 wt% : 「水リッチ溶媒」と呼称) および低水分率 (13 wt% : 「アルコールリッチ溶媒」と呼称) の2種類のエタノール水溶液インク中でのカーボン担体および Pt/C へのアイオノマーの吸着挙動を吸着等温解析により評価した。また、それぞれのインクから作成した触媒層を組み込んだ燃料電池セルを作成し、電池性能との比較も行った。

## 2. 結果と考察

アイオノマーとしては最も広く使用され、優れたプロトン伝導性を持つ PFSA (フッ素化ポリエチレンベースのポリマー) であるナフィオンを用い<sup>32)</sup>、カーボンとしてはこちらも汎用の Vulcan (CB) を用いた。図 1 a は水リッチ溶媒 (青線) およびアルコールリッチ溶媒 (黒線) におけるナフィオンの CB への吸着挙動を示す吸着等温線である。ナフィオンの吸着量の定量は重量法<sup>33)</sup>、密度測定<sup>34)</sup>、と比較し定量性の高い<sup>19</sup>F-NMR により行った。本研究はアルコール/水混合溶液で行ったが、水単一溶媒でのナフィオンの吸着等温測定は<sup>19</sup>F-NMR を用いて報告されている<sup>35-37)</sup>。ナフィオンの平衡濃度 ( $C_e$ ) に対してプロットしている 2 種類 (水リッチ・アルコールリッチ) の溶媒いずれの場合においても 2 段階の吸着プロファイルが観察され、水単一溶媒の際<sup>35-38)</sup>と同様に多層吸着が示唆された。CB 表面の化学構造は均一ではなく、理論的にはこのような不均一な表面への吸着はラングミュアモデルに従わないはずであるが、ラングミュア式を適用した際のフィッティングの  $R^2$  値は 0.95 以上であり、有意な解析であると判断した。ラングミュア式を用いたフィッティングから、ナフィオンの CB への第一層吸着の平衡吸着定数 ( $K_L$ ) を求めたところ水リッチ溶媒で  $K_L=89$  とアルコールリッチ溶媒の  $K_L=32$  より大きく、水リッチ溶媒中ではより強く相互作用することが明らかとなった。さらに、第一層目吸着の最大吸着量 ( $\Gamma_{max}$ ) は、水リッチ溶媒で  $\Gamma_{max}=0.043$  mg/mg とアルコールリッチ溶媒中での  $\Gamma_{max}=0.024$  mg/mg より大きく、水リッチ溶媒は相互作用のみならず吸着量においても有利であった (表 1)。水リッチ溶媒中では、疎水性の  $CF_2$  主鎖が疎水性相互作用により CB 表面に優先的に吸着している一方、アルコールリッチ溶媒では、ナフィオンはアルコール分子により溶媒和しているため、吸着が有利に進行しないと考えられる。興味深いことに、水リッチ溶媒における第一層吸着は  $C_e$ = 約 0.04 mg/mL 付近から始まるのに対し、アルコールリッチ溶媒の場合においてはより低濃度の  $C_e$ = 約 0.02 mg/mL 付近から立ち上がっている。ナフィオンは、 $CF_2$  主鎖間の強い疎水性相互作用により、水リッチ溶媒中でバンドルを形成する一方で、アルコールリッチ溶媒中では、アルコール分子による  $CF_2$  主鎖への溶媒和により、孤立分散に近いことが知られており<sup>39-40)</sup>、水リッチ溶媒では見かけの濃度が下がっているために、このような逆転現象が起きていると考えている。吸着等温測定だけでも様々な効果が垣間見えて興味深い。このような、ナフィオンのバンドル形成も加味すると、水リッチ溶媒中で見られたより大きな  $\Gamma_{max}$  には、吸着力の強さ以外にもバンドル形成の効果も含まれているだろう。

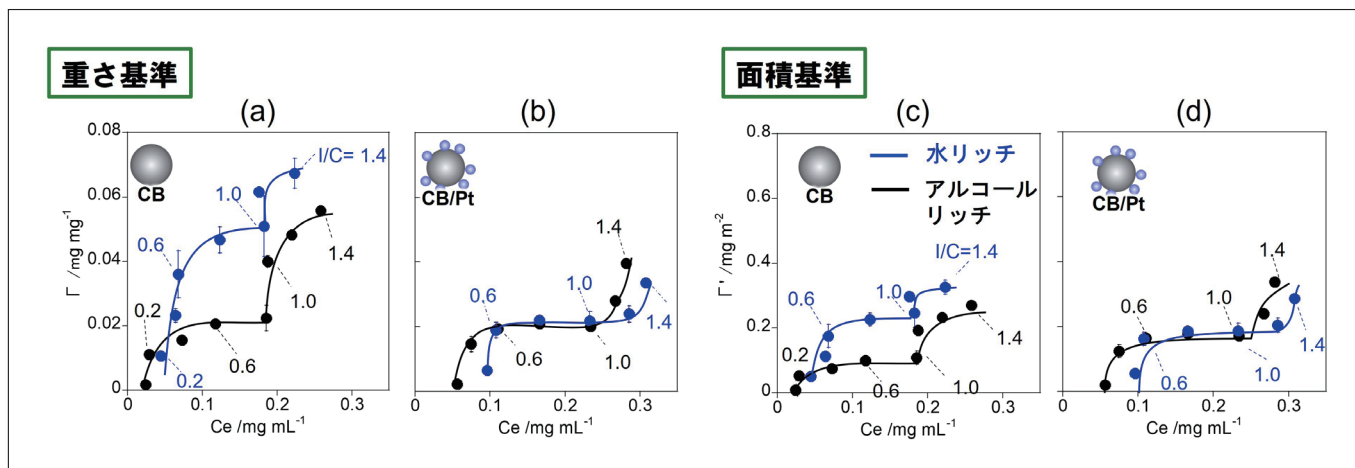


図1 (a, c) CBに対するナフィオンの吸着等温曲線および(b, d) CB/Ptに対するナフィオンの吸着等温曲線。(a, b)重量および(c, d)比表面積で規格化した水リッチ(青線)ならびにアルコールリッチ(黒線)の等温吸着曲線

表1 CBおよびCB/Ptに対するナフィオン吸着の  $K_L$ ,  $\Gamma_{max}$ , および  $\Gamma'_{max}$

	CB		CB/Pt	
	水リッチ	アルコールリッチ	水リッチ	アルコールリッチ
$K_L$	89	32	29	25
$\Gamma_{max}$ [mg/mg]	0.043	0.024	0.022	0.021
$\Gamma'_{max}$ [mg/m <sup>2</sup> ]	0.209	0.116	0.188	0.179



また、同様のナフィオン吸着挙動の解析を Pt 担持 CB (CB/Pt, 白金担持率 46 wt%) に対しても行った (図 1b)。水リッチおよびアルコールリッチ溶媒における  $K_L$  はそれぞれ  $K_L=29$  と  $K_L=25$  と、CB に対する  $K_L$  より大幅に小さかった (表 1)。この結果は、アルコール含有量に関係なく、Pt 表面に対するナフィオンの相互作用が CB 表面への相互作用よりも小さいことを示唆している<sup>38)</sup>。一方、CB/Pt に対する  $\Gamma_{\max}$  (mg/mg) は、CB に対する値と比較し、水リッチ溶媒において特に減少した (図 1b)。白金という重い原子を含むことによる過小評価があることも考慮し、重量当たりではなく表面積当たりのナフィオン吸着量を比較するため、窒素吸着測定から算出した BET 表面積 ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) で規格化した新たな指標  $\Gamma'$  ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) を定義し、改めて  $\Gamma'$  を用いて比較したところ、水リッチ溶媒において CB では  $\Gamma'_{\max}=0.209 \text{ mg}/\text{m}^2$ 、CB/Pt では  $\Gamma'_{\max}=0.188 \text{ mg}/\text{m}^2$  と傾向は変わらなかった。従って、ナフィオンは水リッチ溶媒中においては Pt 表面よりも CB 表面に優先的に吸着すると考えている。一方、アルコールリッチ条件では、CB/Pt において  $\Gamma'_{\max}=0.179 \text{ mg}/\text{m}^2$  と CB の時の  $\Gamma'_{\max}=0.116 \text{ mg}/\text{m}^2$  よりも大きく、ナフィオンはアルコールリッチ溶媒中では Pt 表面に優先的に吸着することを示唆する結果が得られた。

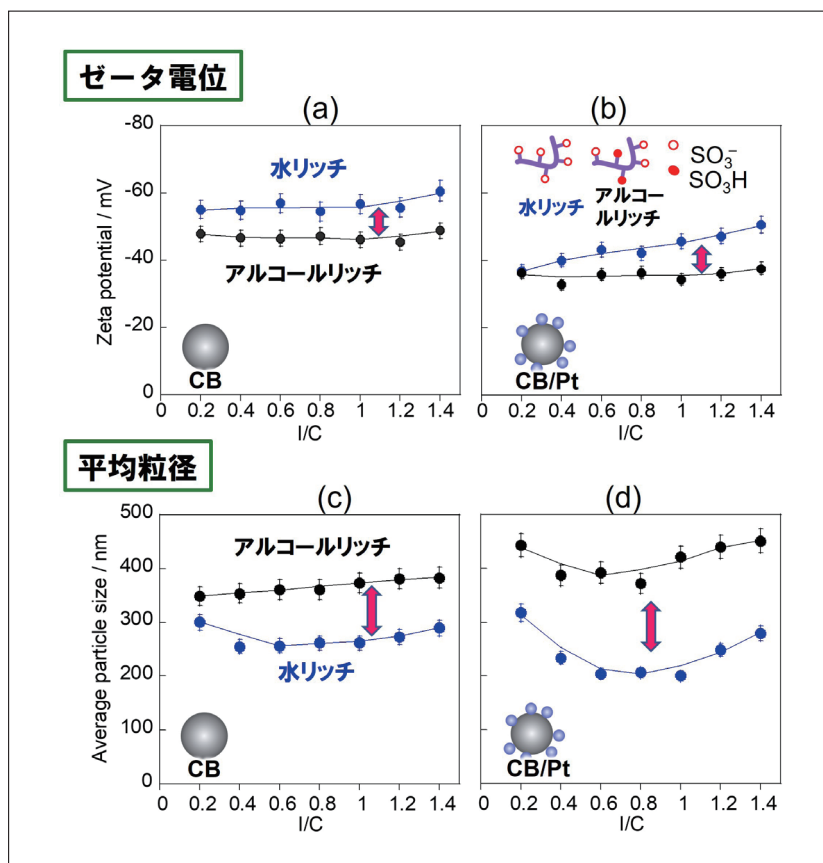


図2 水リッチ(青線)ならびにアルコールリッチ(黒線)溶媒における(a) CBおよび(b) CB/Ptのゼータ電位。水リッチ(青線)ならびにアルコールリッチ(黒線)溶媒における(c) CBおよび(d) CB/Ptの平均粒径。

上記の等温吸着測定において、I/Cの増加に伴いナフィオンの吸着量が増加することが明らかになったが、このような変化がCBまたはCB/Ptの分散性にどのように影響するかを調べるために、吸着等温実験と同じインクを用いてゼータ電位、粒径分布および分散安定性を調べた。ナフィオンが存在しない場合 ( $I/C = 0$ )、粒子の凝集と沈降が即座に起こるため、ゼータ電位や粒径の測定は困難であった。分散に対するナフィオンの役割が明確に理解できる。一方、図 2a, b に示すように  $I/C > 0.2$  ではゼータ電位は負であり、イオン化して負電荷をもつスルホン酸基の効果より安定したコロイド分散が得られたことを明確に示している。ゼータ電位の値は I/C 値に依存せずほぼ一定であった。これは、CB または CB/Pt 表面では表面吸着したナフィオンとそれを緩く囲むナフィオン層が存在し、吸着等温測定では吸着ナフィオンのみが推定されたのに対し、ゼータ電位測定ではそれより外側まで囲む弱吸着性のナフィオン層表面を捉えていると考えている。ゼータ電位の絶対値が水リッチ溶媒においてより大きいのは、より大きな誘電率によりスルホン酸基のイオン化が進行していることを反映している<sup>21)</sup>。一方、CB/Pt のゼータ電位の絶対値は、いずれの溶媒においても CB の絶対値より小さかった (図 2b)。Pt の存在下では、スルホン酸基が Pt 表面と相互作用し、正味の負電荷が減少したと考察している。

また、同じインクを用いて動的光散乱測定により水リッチ溶媒 (青色) およびアルコールリッチ溶媒 (黒色) 中の CB (図 2c) および CB/Pt (図 2d) の平均粒径を測定した。CB および CB/Pt では、水リッチ溶媒において平均粒径サイズがより小さく、さらに直径分布がより狭いことが分かった。これは、水リッチ溶媒中ではナフィオンの吸着が強く、さらにスルホン酸のイオン化が進行しているために帯電量が大きく、粒子の分散性が高いことに起因している。一方、アルコールリッチ溶媒では、

特に CB/Pt で 1.0 μm を超える大きな粒子が存在するなど、分散性は劣っていた。インクの沈降実験により 14 日間にわたり分散安定性を観察したところ、CB/Ptインクの水リッチ溶媒においては安定に分散状態を維持したのに対し(図3左)、アルコールリッチ溶媒では凝集が大きく、沈降が観察された(図3右)。水リッチ溶媒ではナフィオンの吸着とスルホン酸基のイオン化の効果で安定分散の目安とされる 50 mV<sup>41</sup> に迫る大きなゼータ電位の絶対値であった一方、アルコールリッチ溶媒中ではスルホン酸基のイオン化とアイオノマーの吸着量は十分でなく、そのためにゼータ電位の絶対値が小さく、結果として凝集を引き起したのであろう(図4)。

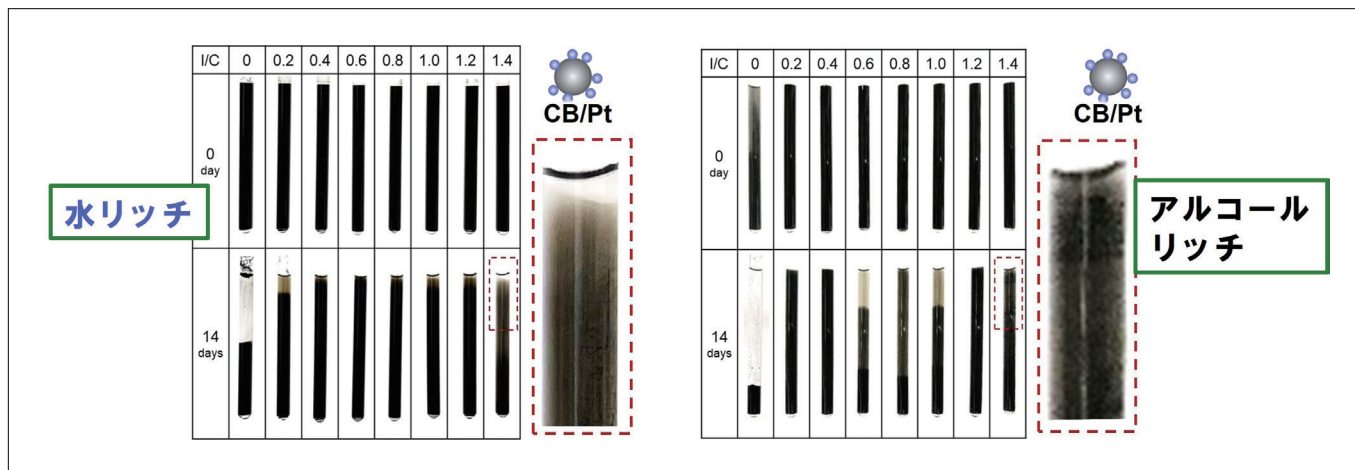


図3 (左)水リッチ溶媒と(右)アルコールリッチ溶媒におけるCB/Ptインクの沈降実験の様子

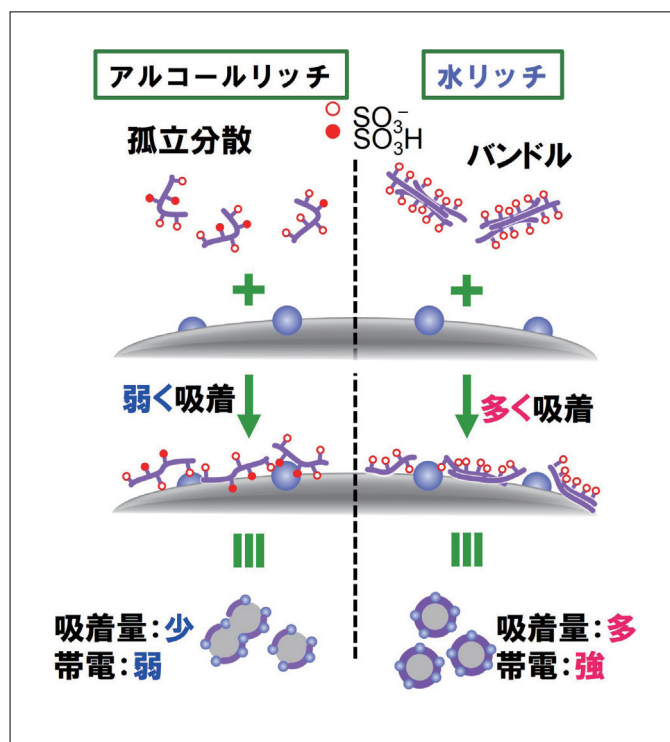


図4 (左)アルコールリッチ溶媒と(右)水リッチ溶媒におけるCB/Ptに対するナフィオン吸着挙動

表2 触媒層表面のゼータ電位

I/C	水リッチ	アルコールリッチ
0.6	-8.3 ± 0.9	-3.3 ± 1.2
1.0	-10.7 ± 0.3	-4.5 ± 0.3



インク中での触媒表面スルホン酸基の量とイオン化状態が実際の触媒層にどのように反映するか調べるために、水リッチ溶媒とアルコールリッチ溶媒のインク ( $I/C = 0.6$  および  $1.0$ ) を PET 基板上に塗布し、触媒層表面のデータ電位を測定した。 $I/C = 0.6$  および  $1.0$  の水リッチ溶媒からスプレーされた触媒層の表面ゼータ電位は、それぞれ  $-8.3$  mV および  $-10.7$  mV であったのに対し、アルコールリッチ溶媒から塗布した場合、それぞれ  $-3.3$  mV と  $-4.5$  mV であった(表2)。これらのゼータ電位測定は全て水溶媒で行っていることからスルホン酸基のイオン化状態には差はなく、得られた差は触媒層表面に存在するスルホン酸基の数を反映している。すなわち、水リッチ溶媒から調製された触媒層表面ではアイオノマー量がより多いことが明らかとなった。水リッチ溶媒ではアイオノマーが触媒表面に強く吸着して乾燥後も表面にとどまったのに対し、アルコールリッチ溶媒では表面吸着が弱く、スルホン酸の残存が少ないと考えている。それでは、アルコールリッチ溶媒においては、アイオノマーはどこに行ったのだろうか？ おそらくより毛管力により深い側に溜まり、乾燥後は CB/Pt 凝集間の空孔を閉塞していると予想している。

水リッチ溶媒とアルコールリッチ溶媒で見られたナフィオン吸着挙動の違いが PEMFC の性能にどのように影響するかを調べるため、それぞれのインク(固体分率6 wt%)を塗布した電極触媒層(白金目付量  $0.3$   $\text{mg}/\text{cm}^2$ )を含む2種類の膜電極接合体(MEA)を作成した。水リッチ溶媒から作成したMEAをw-MEA、アルコールリッチ溶媒から作成したMEAをa-MEAとし、インクにはナフィオンの第一層吸着濃度領域である  $I/C = 0.72$  を選択した<sup>42)</sup>。触媒層表面の走査型電子顕微鏡(SEM)画像を図5a～fに示した(SU9000にて撮像)。まず、いずれの溶媒条件においても触媒層表面に大きなクラック構造は観察されず均一な構造であった。興味深いことに、w-MEAにおいては直径  $1 \sim 2$   $\mu\text{m}$  程度のポイド構造が均一に分布する様子が低倍率観察において確認できた(図5a, b)。このマイクロサイズのポイド構造は、水滴がテンプレートとして生じたと考えている<sup>26)</sup>。一方、a-MEAにはそのような構造は観察されていない。

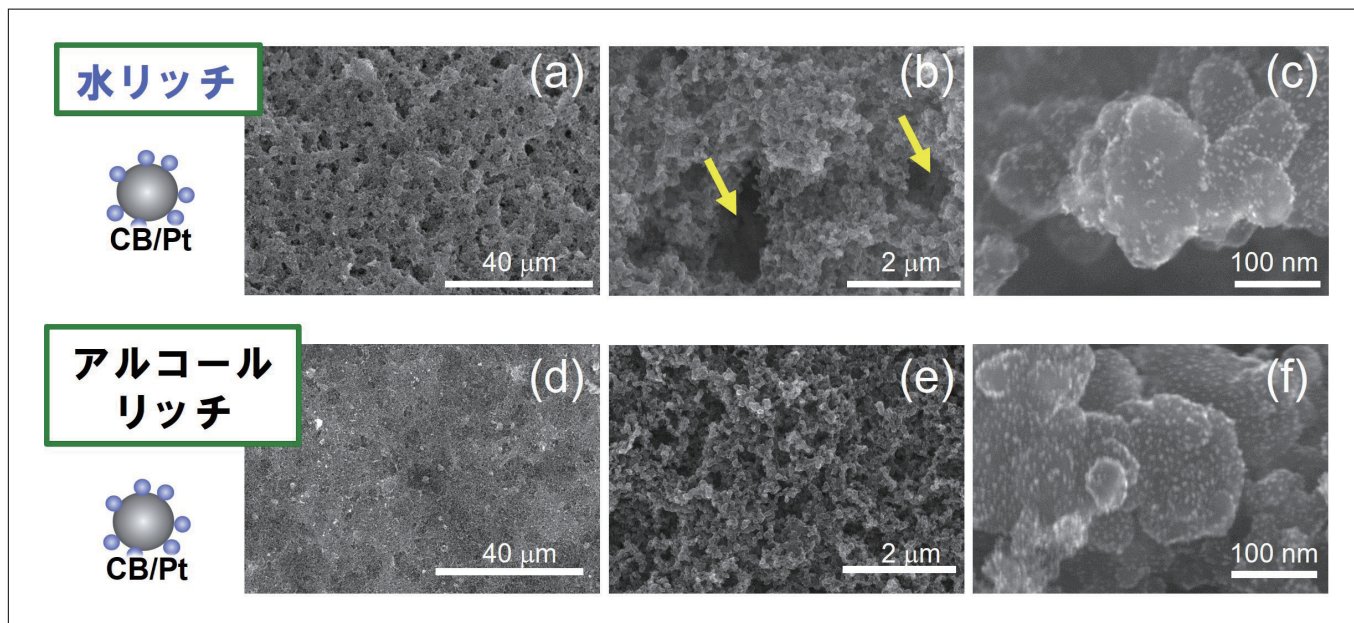


図5 (a～c)w-MEAおよび(d～f)a-MEAの触媒層表面SEM写真。(a, d)1,300倍、(b, e)20,000倍、(c, f)300,000倍。

図6aにはアノードに水素、カソードに空気を供給した際のw-MEAとa-MEAの分極(I-V)曲線を示した( $80^\circ\text{C}$ , 相対湿度100%)。青線で示したw-MEAは、全ての電流密度領域において黒線で示したa-MEAより高い起電力を示し、最大出力密度はw-MEAで  $750$   $\text{mW}/\text{cm}^2$ 、a-MEAで  $580$   $\text{mW}/\text{cm}^2$  であった。MEAを用いた交流インピーダンス解析から求めた、w-MEAのプロトン抵抗は  $0.35$   $\Omega/\text{cm}$  と、a-MEAの  $1.26$   $\Omega/\text{cm}$  より小さいことが分かり、高い活性の理由の一つはw-MEAの触媒層においてプロトン拡散に有利な構造が構築されているためであることが明らかとなった。図6bには、w-MEAとa-MEAのカソードに窒素、アノードに  $\text{H}_2$  を流して測定したサイクリックボルタモグラムを示した。 $0.1 \sim 0.3$  Vに明確に観察された水素吸脱着ピークから電気化学的活性表面積(ECSA)を評価し、電気化学的にアクセス可能なPt表面積を求めたところ、w-MEAとa-MEAでそれぞれ  $75.1$   $\text{m}^2/\text{g}_{\text{Pt}}$  および  $49.3$   $\text{m}^2/\text{g}_{\text{Pt}}$  であった。w-MEAの方がプロトン拡散に有利で、さらにECSAが大きいことは、アイオノマーネットワークがよく発達し、Pt表面へのプロトンの送達を促進する構造が形成されているためと考えられる。吸着等温実験等から明らかになったように、水リッチ溶媒ではCB/Pt表面へのナフィオン吸着が有利で、結果的にプロトン伝導パスの発達につながったのであろう(図7左)。一方、アルコールリッチ溶媒中ではナフィオンはCB/Ptに吸着しづらく、インクの塗布時に空孔中に凝集したことで、アイオノマーネットワークは不均一化し、結果的にプロトン拡散抵抗の増大とECSAの低下へとつながったと考えている(図7右)<sup>20-21, 43)</sup>。

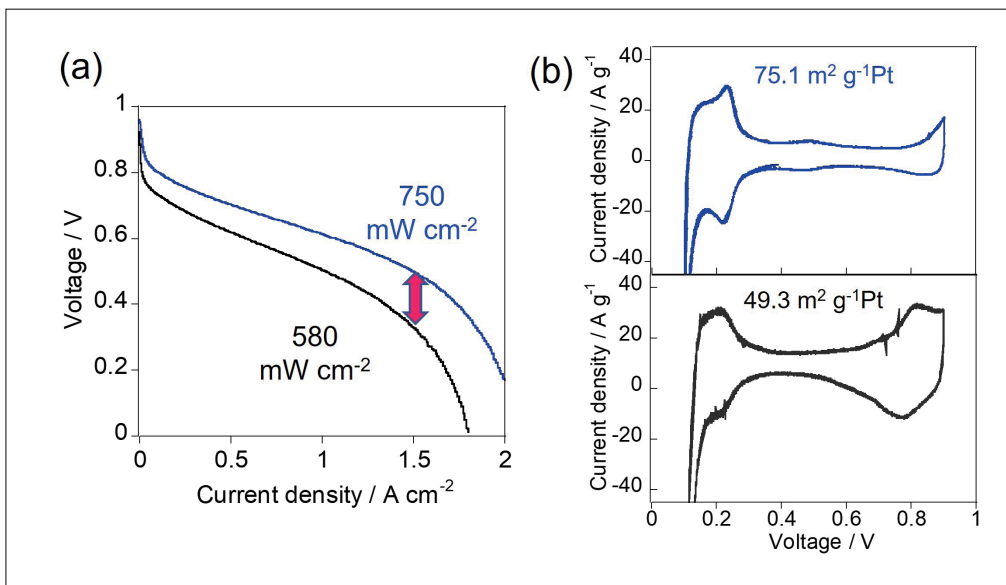


図6 w-MEA(青線)とa-MEA(黒線)の(a)分極曲線および(b)in-situ CV

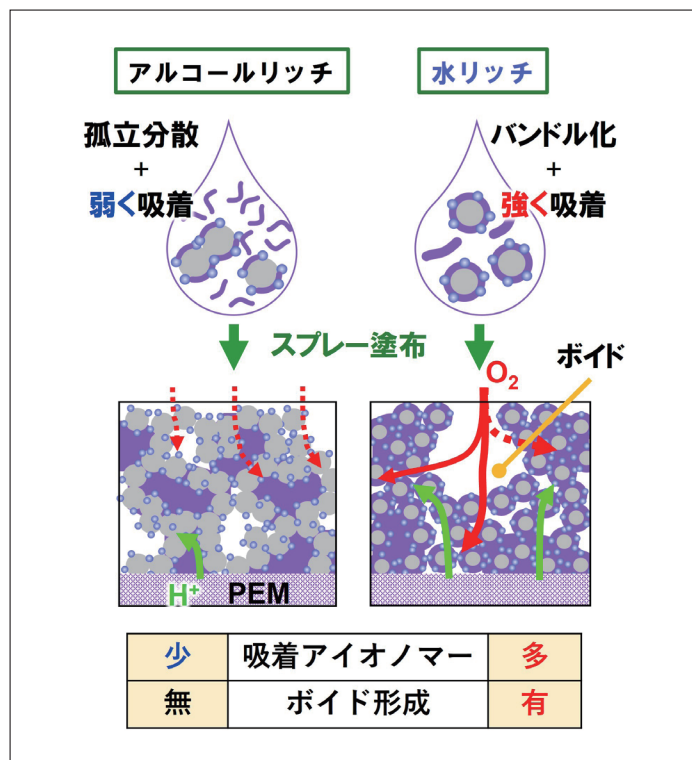


図7 (左)アルコールリッチ溶媒と(右)水リッチ溶媒からの触媒層形成挙動

カソードでの酸素還元反応 (ORR) では、プロトンの拡散だけでなく、酸素拡散抵抗も関与しており、酸素拡散には Pt 表面に吸着したアイオノマー中の拡散と、触媒層内のバルク空間での拡散の両方が影響することが知られている。MEA を用いた交流インピーダンスの解析結果から、w-MEA の方が酸素拡散抵抗も小さいことが明らかとなっている。アルコールリッチ溶媒では、アイオノマーの触媒表面への吸着力が小さいために、触媒層内のバルク空間に溜まることでバルク中の酸素拡散の抵抗になった一方 (図7左)、水リッチ溶媒では触媒表面へアイオノマーが強く吸着し、バルクの空孔は保持され、さらにその細孔同士がマイクロポイドで接続されており、バルクの酸素拡散に有利な構造を形成したと考えられる (図7右)。Pt 表面上に吸着したアイオノマーは、Pt 表面への酸素分子の吸着を抑制することで ORR を阻害することも知られているため、重要なファクターである<sup>26,44,45)</sup>。吸着等温測定で得られた結果からは、水リッチ溶媒中ではアイオノマーは Pt 表面よりカーボン表面への吸着が有利で、アルコールリッチ溶媒においては Pt 表面への吸着が有利であった。しかし、これはインク中における吸着を捉えて考察したに過ぎず、過剰のアイオノマーが存在し、さらに乾燥過程という非平衡な状態を経る中で実際の吸着状態にどのように反映しているかに関しては、触媒層の電気化学的な解析など、より詳細な解析で明らかにしていきたい。



### 3. おわりに

等温吸着測定から燃料電池インクの溶媒組成の違いによりアイオノマーの吸着状態が異なることを突き止め、水の割合が多い際はアイオノマー吸着が有利になることで、プロトン伝導パスが形成され、酸素拡散パスの確保にも有利に働くメカニズムを明らかにできた。触媒層表面に対するアイオノマーの吸着を制御することができれば、燃料電池性能を制御できる可能性を示しており、燃料電池性能の制御に対して新しい方法論を示したと言える<sup>46)</sup>。

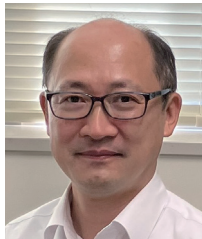
#### 参考文献

- 1) Shao, M.; Chang, Q.; Dodelet, J.-P.; Chenitz, R., *Chem. Rev.* **2016**, *116* (6), 3594-3657.
- 2) Ma, Z.; Cano, Z. P.; Yu, A.; Chen, Z.; Jiang, G.; Fu, X.; Yang, L.; Wu, T.; Bai, Z.; Lu, J., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59* (42), 18334-18348.
- 3) Deng, X.; Zhang, J.; Fan, Z.; Tan, W.; Yang, G.; Wang, W.; Zhou, W.; Shao, Z., *Energy Fuels* **2020**, *34* (8), 9175-9188.
- 4) Kongkanand, A.; Mathias, M. F., *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (7), 1127-1137.
- 5) Chung, D. Y.; Yoo, J. M.; Sung, Y.-E., *Adv. Mater.* **2018**, *30* (42), 1870316.
- 6) Shahgaldi, S.; Hamelin, J., *Carbon* **2015**, *94*, 705-728.
- 7) Iden, H.; Mashio, T.; Ohma, A., *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *708*, 87-94.
- 8) Suter, T. A. M.; Smith, K.; Hack, J.; Rasha, L.; Rana, Z.; Angel, G. M. A.; Shearing, P. R.; Miller, T. S.; Brett, D. J. L., *Adv. Energy Mater.* **2021**, *11* (37).
- 9) Qi, Z.; Kaufman, A., *J. Power Sources* **2003**, *113* (1), 37-43.
- 10) Sasikumar, G.; Ihm, J. W.; Ryu, H., *J. Power Sources* **2004**, *132* (1), 11-17.
- 11) Antolini, E.; Giorgi, L.; Pozio, A.; Passalacqua, E., *J. Power Sources* **1999**, *77* (2), 136-142.
- 12) Jeon, S.; Lee, J.; Rios, G. M.; Kim, H.; Lee, S.; Cho, E.; Lim, T.; Jang, J. H., *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 9678.
- 13) Liu, Y.; Ji, C.; Gu, W.; Jorne, J.; Gasteiger, H. A., *J. Electrochem. Soc.* **2011**, *158* B614.
- 14) Alink, R.; Schüßler, M.; Pospischil, M.; Erath, D.; Gerteisen, D., *J. Power Sources* **2016**, *327*, 526.
- 15) Uchida, M.; Aoyama, Y.; Eda, N.; Ohta, A., *J. Electrochem. Soc.* **1995**, *142* (12), 4143-4149.
- 16) Passalacqua, E.; Lufrano, F.; Squadrito, G.; Patti, A.; Giorgi, L., *Electrochim. Acta* **2001**, *46* (6), 799-805.
- 17) Suzuki, T.; Tsushima, S.; Hirai, S., *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36* (19), 12361-12369.
- 18) Lee, M.-R.; Lee, H.-Y.; Yim, S.-D.; Kim, C.-S.; Shul, Y.-G.; Kucernak, A.; Shin, D., *Fuel Cells* **2018**, *18* (2), 129-136.
- 19) Kumano, N.; Kudo, K.; Suda, A.; Akimoto, Y.; Ishii, M.; Nakamura, H., *J. Power Sources* **2019**, *419*, 219-228.
- 20) Kishi, M.; Tanaka, M.; Mori, T., *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2019**, *127* (12), 942-951.
- 21) Ngo, T. T.; Yu, T. L.; Lin, H.-L., *J. Power Sources* **2013**, *225*, 293-303.
- 22) Shin, S. J.; Lee, J. K.; Ha, H. Y.; Hong, S. A.; Chun, H. S.; Oh, I. H., *J. Power Sources* **2002**, *106* (1), 146-152.
- 23) Zamel, N., *J. Power Sources* **2016**, *309*, 141-159.
- 24) Fernández, R.; Ferreira-Aparicio, P.; Daza, L., *J. Power Sources* **2005**, *151*, 18-24.
- 25) Doo, G.; Lee, J. H.; Yuk, S.; Choi, S.; Lee, D.-H.; Lee, D. W.; Kim, H. G.; Kwon, S. H.; Lee, S. G.; Kim, H.-T., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (21), 17835-17841.
- 26) Takahashi, S.; Mashio, T.; Horibe, N.; Akizuki, K.; Ohma, A., *ChemElectroChem* **2015**, *2* (10), 1560-1567.
- 27) Shukla, S.; Bhattacharjee, S.; Weber, A. Z.; Secanell, M., *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164* (6), F600-F609.
- 28) Huang, D. C.; Yu, P. J.; Liu, F. J.; Huang, S. L.; Hsueh, K. L.; Chen, Y. C.; Wu, C. H.; Chang, W. C.; Tsau, F. H., *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6* (7), 2551-2565.
- 29) Orfanidi, A.; Rheinländer, P. J.; Schulte, N.; Gasteiger, H. A., *J. Electrochem. Soc.* **2018**, *165* (14), F1254-F1263.
- 30) Van Cleve, T.; Khandavalli, S.; Chowdhury, A.; Medina, S.; Pylypenko, S.; Wang, M.; More, K. L.; Kariuki, N.; Myers, D. J.; Weber, A. Z.; Mauger, S. A.; Ulsh, M.; Neyerlin, K. C., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (50), 46953-46964.
- 31) Van Cleve, T.; Wang, G.; Mooney, M.; Cetinbas, C. F.; Kariuki, N.; Park, J.; Farghaly, A.; Myers, D.; Neyerlin, K. C., *J. Power Sources* **2021**, *482*, 228889.
- 32) Kusoglu, A.; Weber, A. Z., *Chem. Rev.* **2017**, *117* (3), 987-1104.
- 33) Mizukawa, H.; Kawaguchi, M., *Langmuir* **2009**, *25* (20), 11984-11987.

- 34) Thoma, M.; Lin, W.; Hoffmann, E.; Sattes, M.-M.; Segets, D.; Damm, C.; Peukert, W., *Langmuir* **2018**, *34* (41), 12324-12334.
- 35) Andersen, S. M.; Borghei, M.; Dhiman, R.; Jiang, H.; Ruiz, V.; Kauppinen, E.; Skou, E., *Carbon* **2014**, *71*, 218-228.
- 36) Andersen, S. M.; Borghei, M.; Dhiman, R.; Ruiz, V.; Kauppinen, E.; Skou, E., *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (20), 10814-10823.
- 37) Andersen, S. M., *Appl. Catal., B* **2016**, *181*, 146-155.
- 38) Ma, S.; Chen, Q.; Jørgensen, F. H.; Stein, P. C.; Skou, E. M., *Solid State Ionics* **2007**, *178* (29), 1568-1575.
- 39) Berlinger, S. A.; McCloskey, B. D.; Weber, A. Z., *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (31), 7790-7796.
- 40) Yamaguchi, M.; Matsunaga, T.; Amemiya, K.; Ohira, A.; Hasegawa, N.; Shinohara, K.; Ando, M.; Yoshida, T., *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (51), 14922-14928.
- 41) Salou, M.; Siffert, B.; Jada, A., *Fuel* **1998**, *77* (4), 339-341.
- 42) Jayawickrama, S. M.; Wu, D.; Nakayama, R.; Ishikawa, S.; Liu, X.; Inoue, G.; Fujigaya, T., *J. Power Sources* **2021**, *496*, 229855.
- 43) Kishi, M.; Moriyama, S.; Mori, T., *Journal of the Society of Powder Technology, Japan* **2018**, *55* (7), 366-374.
- 44) Ohma, A.; Fushinobu, K.; Okazaki, K., *Electrochim. Acta* **2010**, *55* (28), 8829-8838.
- 45) Kodama, K.; Shinohara, A.; Hasegawa, N.; Shinozaki, K.; Jinnouchi, R.; Suzuki, T.; Hatanaka, T.; Morimoto, Y., *J. Electrochem. Soc.* **2014**, *161* (5), F649-F652.
- 46) Wu, D.; Kayo, N.; Jayawickrama, S. M.; Phua, Y. K.; Tanaka, N.; Fujigaya, T., *Int. J. Hydrogen Energy* **2023**, *48* (15), 5915-5928.

# 薬剤部薬物血中濃度測定を臨床現場で活かす —病院での運用に至るまで—

Clinical Application of Drug Blood Concentration Measurement in the Hospital Pharmacy Department: Up to the Operation in Hospitals



帝京大学薬学部  
病院薬学研究室  
准教授

河村 剛至

## 1. はじめに

医療現場において、時間はとても重要なファクターである。チーム医療において各職種が専門性を生かした正確な判断や情報を共有するだけでなく、協力して迅速に物事を進めるように院内内のシステムが構築されている。特に、検体に関する検査や測定には時間がかかることが多く、できる限り迅速に測定結果を現場にフィードバックし、患者の状態把握と治療に役立てることが要求される。薬物治療において、患者の薬物血中濃度測定値は、薬物の効果、副作用の危険性を把握して適切な薬物治療に導くための重要な情報である。薬物血中濃度測定値を早く得ることができれば、より適切な薬物治療に導くことが可能となり、遅ければ意味を成さないことにもなりうる。

また、薬物血中濃度の測定値は、薬物を投与後、いつ採血したかという情報とともに次回以降の投与量が設計されるため、当然のことながら測定値の正確性が要求される。患者の最適な薬物治療に貢献するため、薬剤部において迅速、かつ正確に薬物血中濃度を測定し、適切な投与設計につなげるのが最良であると考え、帝京大学医学部附属病院薬剤部に HPLC (LM1010) を導入した。今回、病院内での運用に至るまでの取り組みを紹介する。

## 2. 医療現場からの要望

発端は、当院において医師からポリコナゾールの血中濃度測定結果の迅速な現場へのフィードバックが可能にならないか、という要望であった。それまでは外部測定委託業者に測定を依頼して測定結果を得ていた。個々の患者におけるポリコナゾールの過量投与による肝障害は、投与開始1～2週間後に好発することが報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら、外部測定委託業者に測定を依頼すると採血から測定結果を得るまで4日～1週間程度かかってしまい、血中濃度を測定する意味が薄れるため、測定依頼は少なかった。そこで、医療機器として認証を受けている HPLC システム LM1010 を薬剤部に導入し、ポリコナゾール血中濃度測定の実施を検討した。

また、HPLC システム LM1010 が測定できる薬物のリストに、副作用のモニタリングのために薬剤師が測定を提案したミコフェノール酸モフェチルが存在した。当院においてミコフェノール酸モフェチルは、臓器移植後の患者への使用の実績はないため、特定薬剤治療管理料の診療報酬は見込めないが、適応外使用として数多く用いられている。

そして、救命救急病棟の薬剤師は、患者の血漿から GC-MS を用いた薬物中毒測定を薬剤部で行っているが、カフェインの正確な濃度を測定できる HPLC 機器の必要性があった。GC-MS を用いた測定は、数多くの使用薬剤を一度にスクリーニングできるため、意識障害等の患者が使用した薬を知ることができ、臨床上非常に有用である。しかしながら、測定値は半定量であるため、カフェイン中毒症例において正確な血中カフェイン濃度を測定すべき場面に GC-MS は不向きであった。

これらのことから、薬剤部では HPLC システム LM1010 (日立ハイテクサイエンス社製) を導入し、薬剤部においてポリコナゾール、ミコフェノール酸モフェチル、カフェインの血中濃度を迅速に測定し、医療現場にフィードバックして患者の治療に貢献することを目標とした。ポリコナゾール、ミコフェノール酸モフェチルに関する LM1010 を用いた測定は、測定値を高精度で算出することができ、臨床業務において活用できることが報告されている<sup>2,3)</sup>。そこで、測定環境の整備、測定部員の確保と測定部員による測定値の安定性等を調べ、院内での運用に向けて準備を行った。



### 3. 薬剤部内における測定への取り組み

#### 3-1. 薬物血中濃度測定ワーキング会議を開催

まずは、薬剤部内で薬物血中濃度測定ワーキンググループを立ち上げた。会義のメンバーはGC-MSの測定を実施している薬剤部員、感染制御部所属の薬剤師、薬剤部業務と研究担当の副部長とした。共通の認識を持って進めるため、上記の「医療現場からの要望」について話し、HPLCを導入する意義について目的を共有した。

近年、高速液体クロマトグラフィーをベースとした医療機器(LM1010)が開発され、臨床使用が許可された。日立ハイテクサイエンスのLM1010高速液体クロマトグラフは、一般医療機器(特定保守管理医療機器)として製造販売届出番号を取得しており、日常的な装置の性能確認を自動で実施し、特殊な技能がなくとも安定した測定結果を得ることができる。また、正確、かつ迅速に測定でき、臨床に活用できることが論文や学会等を通じて報告されている。

測定に関して、毎日測定依頼があるわけではないため、測定専属で薬剤師を配置することはできないが、測定依頼に対しては迅速に対応しなければならない。当院では救急救命病棟担当の薬剤師が、平日当番制で依頼に応じてGC-MSによる測定を行っている。救急救命病棟担当の薬剤師がLCによる薬物濃度測定を行うのが測定技術にも慣れているため望ましいが、緊急時にGC-MSに加え、LM1010による測定を行うことは不可能な事態も考えられる。そこで、他病棟の薬剤師も測定チームに入り、運用実施に向けて測定者4名で立ち上げることにした。

#### 3-2. 測定環境の整備 (ゾーンニングとサンプルの保存)

試験を実施するにあたり、感染制御観点から薬剤部内へのLM1010の設置とゾーンニングを行い、測定環境を整えた。患者血清あるいは血漿を用いたカラム操作等の前処理は、すべてを救命病棟で行い、前処理後のサンプルを薬剤部へ運びLM1010にアプライする。測定結果が異常値、または妥当でない場合に再度測定を行うため、冷蔵庫を購入して薬剤部内測定室に置くことにした。また、血清あるいは血漿を一時保存することについて、薬剤部内責任者会議、薬剤部員会議を通じて、測定環境と測定方法とその安全性等の理解を求めた。

#### 3-3. 測定者の技術と測定値の安定性

迅速に対応するためには複数の測定者が必要であり、その複数の測定者は、操作を誤ることなく正確に測定する技術を持ち、同じ結果が得られなければならない。そこで各測定者が測定トレーニングを経て、各薬剤について2種類の試験を実施した。結果を表1に示す。1つは、既知濃度の薬物の測定(再現性試験)、ミコフェノール酸モフェチルとカフェインについては、血清に既知濃度の薬物を添加してフィルターを通した検体を用いた測定(血清添加回収試験)を行い、それぞれ適切な濃度が測定できるかを調べた。

#### 3-4. 測定技術の確認 (再現性試験)

2.5 µg/mLポリコナゾール、5.0 µg/mLミコフェノール酸モフェチル、50 µg/mLカフェインの試料を調製し測定を行った。各薬剤について真値±20%誤差の範囲内に収まっていることを合格基準とした。また、測定者の操作性に関しても、各測定が真値±20%誤差の範囲内に収まっていることを測定操作の合格とした。

2.5 µg/mLポリコナゾール試料、5.0 µg/mLミコフェノール酸モフェチル、50 µg/mLカフェイン用いたHPLC(LM1010)による測定において、再現性試験の結果、測定値はそれぞれ2.6±0.1 µg/mL、4.4±0.2 µg/mL、51.1±5.3 µg/mLであった。調製した濃度と測定値の差の割合(平均絶対パーセント誤差)は、それぞれ5.4%、11%、4.4%であった。すべての値において真値との濃度差の割合がそれぞれ±10%以内、±15%以内、±15%以内に入っていた。

表1 再現性試験と血清添加回収試験(n=3)

測定薬物	再現性試験		血清添加回収試験	
	測定値(µg/mL)	平均絶対パーセント誤差(%)	測定値(µg/mL)	平均絶対パーセント誤差(%)
2.5 µg/mLポリコナゾール	2.6±0.1	5.4	—	—
5.0 µg/mLミコフェノール酸	4.4±0.2	11	4.5±0.6	12
50 µg/mLカフェイン	51.1±5.3	4.4	49.8±0.4	0.8

### 3-5. ミコフェノール酸モフェチルの血清添加回収試験

ミコフェノール酸モフェチルは個体間のバイオアベイラビリティの変動が大きいこと、併用される薬剤にカルシニューリン阻害薬があり、薬物相互作用が報告されているため、TDMを行う必要性がある。以前までミコフェノール酸モフェチルに関して、中央検査部を介した測定依頼の実績がないため、ヒト標準血清にミコフェノール酸モフェチルを添加した試料を調製して、血清添加回収試験を行った。

5.0 µg/mLミコフェノール酸モフェチル含有血清試料を用いたHPLC(LM1010)による測定(血清添加回収試験)の結果、測定値は4.5±0.6 µg/mLであった。調製した濃度と測定値の差の割合(平均絶対パーセント誤差)は、平均12%であった。すべての値において5.0 µg/mLとの濃度差の割合が±20%以内に入っていた(表1)。

### 3-6. カフェインの血清添加回収試験

カフェイン濃度を50 µg/mLと25 µg/mLの2点において、カフェイン含有血清試料を用いたHPLC(LM1010)による測定(血清添加回収試験)を行った。測定値は、それぞれ49.8±0.4, 24.3±1.4 µg/mLであった。調製した濃度と測定値の差の割合(平均絶対パーセント誤差)は、それぞれ平均0.8%, 4.6%であった。すべての値において50 µg/mLとの割合がそれぞれ±5%以内、±10%以内に入っていた(表1, 表2)。

## 4. 院内での運用に向けて

### 4-1. 全診療科からの測定依頼への対応

ポリコナゾールとミコフェノール酸モフェチルに関しては、全診療科からの依頼を受けて対応する必要がある。電子カルテ上に測定依頼ボタンを作成し、他の血液検体と同様に、採血管を中央検査部に集める形で実施に協力していただくよう中央検査部へお願いした。また、医事課と協議の上、ポリコナゾールに関して外部への測定依頼はなくし、薬剤部で測定することになった。

### 4-2. 依頼受付時間と結果報告期限の設定

薬剤部受付時間は、平日(月～金)9時～15時とし、原則、当日に測定結果をフィードバックすることとした。ただし、当日に薬剤部測定部員の休日や緊急対応等で測定不可能な事態も考慮し、最終期限は当日含め、3診療日17時までとした。中央検査部への報告は、中央検査部の結果入力に対応可能な平日8:30～17:00、土曜8:30～12:30とした。

### 4-3. 採血管種の選定

血漿採血、血清採血のどちらにするかという問題について、現状の運用とできるだけ変更がないよう、ポリコナゾールは、外部依頼測定と同様に血清採血とした。また、ミコフェノール酸モフェチルは外部依頼測定がEDTA血漿採血であるため、EDTA血漿採血とした。血漿で測定が可能かどうかを確かめるため、ヒト標準血漿を購入し、ミコフェノール酸モフェチルやカフェインを添加して、血漿添加回収試験を行った。ところが、ヒト標準血漿は、孔径0.45 µmのフィルター(フィルター径: φ13 mm)を通すことができなかった。そこで、同じ素材親水性PTFEの孔径0.45 µmのフィルター(フィルター径: φ33 mm: 有効濾過面積: 5.1 cm<sup>2</sup>)を試したところ、血漿を孔径0.45 µmのフィルターに通すことが可能となった。測定値も±15%の誤差範囲以内であり、カフェインにおいても同様に確認した(表2)。その結果、ミコフェノール酸モフェチルやカフェインの測定は、血漿採血を行い、孔径0.45 µmのフィルター(フィルター径: φ33 mm)を用いることにした。

表2 各種薬剤を添加した血漿と血清の測定値の比較(n=3)

測定薬物	血漿中の測定値		血清中の測定値	
	測定値(µg/mL)	平均絶対パーセント誤差(%)	測定値(µg/mL)	平均絶対パーセント誤差(%)
5.0 µg/mLミコフェノール酸	4.3±0.1	13	4.5±0.6	12
25 µg/mLカフェイン	23.1±0.1	7.7	24.3±1.4	4.6

#### 4-4. 病院内全体における測定値の利用

院内における検査の運用が変更となるため、臨床検査適正委員会での審議が必要であった。薬剤部は、要望書を作成し、薬物血中濃度測定の手順と運用を提案した。迅速に結果を知りたいという医療現場の期待に応えるために、ポリコナゾールとミコフェノール酸モフェチルの血中濃度を薬剤部で測定し、結果をお伝えしたいということ、それに伴いポリコナゾールの外注はなくなることを要望内容とした。要望書には、要望内容、手順、採血の種類と処理、電子カルテの依頼画面の変更、受付時間、結果報告と期限、開始希望日程等を記述した。

臨床検査適正委員会での審議において、薬剤部における薬物血中濃度測定に承認を得られたが、医療従事者が必要な時に情報が得られるよう病院全体で結果を共有できる状態にすべき、という意見をいただいた。電子カルテの検査項目結果として測定値を載せるのが最良ではあるが、そこには1つ問題点が存在した。中央検査部は国際認証であるISO 15189を取得しており、審査要求の関連で電子カルテ上の検査値結果の欄に入力している。外部の測定委託先はISOを取得しているので結果を入れることができるが、薬剤部で測定した結果を入れることはできない、ということであった。中央検査部から解決策を提案いただき、検査値結果の欄に新しく項目を作成し、薬剤部ポリコナゾール等として今までと別の項目とした。また、印刷される報告書の欄外に、「薬剤部と記載のあるものはISO 15189対象外」と入れることとした。これにより、検査値結果欄への記載が可能となり、病院全体で検査値の閲覧が可能となった。

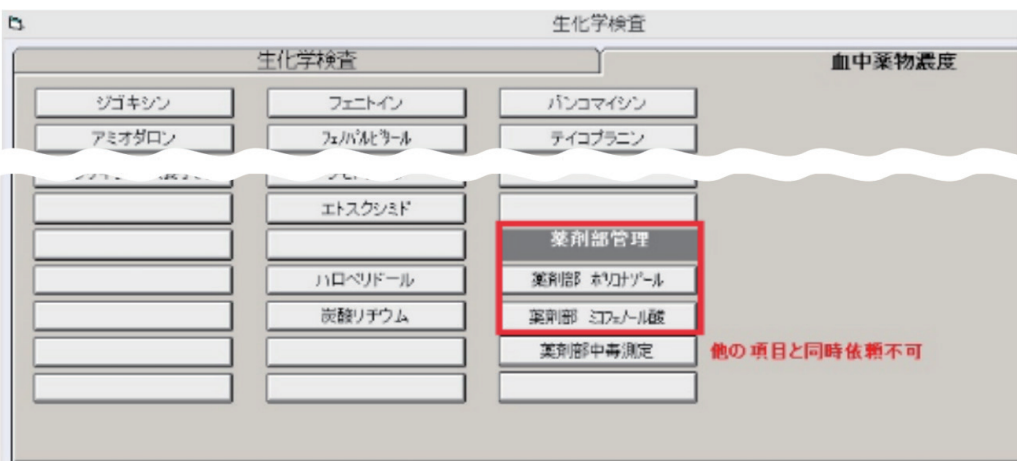
#### 4-5. 測定依頼方法

測定依頼について、電子カルテの検体検査／生化学検査 血中薬物濃度、右下の薬剤部管理／薬剤部中毒測定との間にポリコナゾールおよびミコフェノール酸モフェチルのボタンを作成した(図1)。しかしながら、医師から薬剤部での測定とわかることが必要であり、さらにミコフェノール酸モフェチルは文字数が多いため、依頼ボタンの文字数制限により、短くまとめる必要があった。測定項目に、医薬品名表記か、測定物質表記にするかなどの議論の末、間違いが起こりにくいと考えられる「薬剤部 ミコフェノール酸」と表記することにした。

#### 4-6. 院内への周知

検査内容を変更として下記の通り、検査部から職員メールに発信していただいた(図1)。

—検査内容変更のお知らせ—  
検査センターに委託しておりますポリコナゾール血中濃度測定においてTDMの必要性があり迅速対応の要望がありました。検討の結果、ポリコナゾール、ミコフェノール酸の薬剤部での測定が可能となりましたのでお知らせいたします。



提出方法：他の採血と同様にラベルが出力されますので、ラベル添付で採血後、中央検査部検体検査室へ提出  
結果：結果も今までと同様確認できます。

図1 院内への周知



#### 4-7. 院内における測定依頼から結果報告までの流れ

測定依頼から結果報告までの流れは、以下の通りとなった。各診療科医師が、電子カルテ上で薬物血中濃度の測定を依頼する。適切な日時に採血を行い、採血管が中央検査部に届く。中央検査部は、届いた採血管を遠心し、血漿あるいは血清処理を終えたことを薬剤部血中濃度測定代表薬剤師に連絡する。その後、代表薬剤師は当日の測定担当薬剤師に連絡する。当日測定を担当する薬剤師は、中央検査部に検体と結果を記入するための用紙（検体に貼られているものと同じラベルが貼られている用紙）を受け取りに行き、その後、検体のフィルター処理、Spinカラムの前処理後、薬剤部にてLM1010を用いて測定を行う。測定値を用紙に記入し、気送管で中央検査部に送る。中央検査部では、届いた結果を電子カルテに入力する。薬剤部測定者は、その電子カルテ入力結果が正しいことを確認し、血中濃度が適正領域に入っているかどうかを踏まえて病棟薬剤師に報告する。病棟薬剤師は、病棟スタッフと情報共有し必要に応じて投与設計を行う、という運用方法で開始することができた。

## 5. おわりに

振り返ると、病院内の薬剤部における薬物血中濃度測定を薬剤部業務の運用に載せるまでにはいろいろな問題点が挙がったが、チーム医療を目指してきた帝京大学医学部附属病院では、病院全体の協力を得て実施することが可能となった。患者の幸せのために貢献したいと願う医療従事者同志の協力する体制があったため、測定運用を開始できたと感じる。現在も特に問題を生じることなく測定と結果報告ができ、測定結果を測定当日に伝えられることから、特にポリコナゾールの測定依頼件数は、以前と比べ格段に増加している。今後も新たな取り組みに対する医療の連携は、ますます重要になっていくと思われる。しっかりと医療従事者間における信頼関係を築いていきたい。

### 謝辞

今回紹介した薬剤部におけるLM1010の測定と運用は、帝京大学医学部附属病院中央検査部古川泰司部長、奥藤由紀子技師長、薬剤部安野伸浩部長、光永義治副部長を始め多くの先生方のご協力により遂行しました。また、薬剤部測定チームとして今中翔一、桑原達朗、Mensah Joshua 薬剤師に多くのご協力をいただきました。株式会社日立ハイテクサイエンスのスタッフの皆様方にはLM1010に関する情報等をいただき、ご協力をいただきました。この場を借りて心から感謝申し上げます。

### 参考文献

- 1) 花井雄貴, 松尾和廣, 横尾卓也, 大谷真理子, 西村功史, 木村伊都紀, 平山忍, 植草秀介, 草野歩, 小杉隆祥, 西澤健司, ポリコナゾールによる肝機能障害の臨床経過と危険因子に関する検討, 医療薬学, **41** (1), 1-10 (2015).
- 2) Oda K, Uchino S, Kurogi K, Horikawa M, Matsumoto N, Yonemaru K, Arakaki H, Katsume T, Matsuyama K, Katanoda T, Narita Y, Iwamura K, Jono H, Saito H, Clinical evaluation of an authorized medical equipment based on high performance liquid chromatography for measurement of serum voriconazole concentration, *J Pharm Health Care Sci.*, 2021 Nov 9; **7** (1) : 42.
- 3) 赤嶺由美子, 松下美由紀, 森川悟, 三浦昌朋, 腎移植患者におけるミコフェノール酸血中濃度に対する高速液体クロマトグラフLM1010の精度評価, YAKUGAKU ZASSHI, **143**, 377-383 (2023).  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/143/4/143\\_22-00182/\\_article/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/143/4/143_22-00182/_article/-char/ja)

# 120 kV TEM HT7800における自動粒子検索機能の特長と応用

## Features and Applications of the Automatic Particle Search Function for the Hitachi 120 kV TEM HT7800

和久井 亜希子\*1, 野寺 康行\*2

### 1. はじめに

透過電子顕微鏡(以下、TEM: Transmission electron microscope)のワークフローではその視野から観察目的の試料を探索する作業に時間がかかる。特に、あまり見慣れない試料や観察の経験が少ない場合などは見逃すことも多い。そこで、日立 Bio-TEMシリーズでは、こうした課題を解決するために、自動で試料検索するシステムを開発し、夾雑物や類似の構造物が多く含まれるネガティブ染色試料へ適用し、目的のウイルスの自動検索を進めてきた<sup>1)</sup>。最新型120 kV TEM HT7800は用途に応じたデジタルカメラを用いることで、観察から画像取得まで一連のワークフローの効率化を図っている。HT7800の自動粒子検索機能では、マッチング手法などの新技術を採用し、より精度良く目的のウイルスを探索することを可能とした<sup>2)</sup>。本稿では、新しい自動粒子検索機能の特長とその応用例を紹介する。

### 2. 最新型120 kV TEM HT7800の概要

最高加速電圧120 kVのHT7800は、日立独自の複合対物レンズを搭載し、HCモードによる広視野・高コントラスト観察と、HRモードによる高解像・高分解能観察が可能であり<sup>3)</sup>、バイオ・メディカルからナノ材料など幅広い分野で活用されている(図1)。蛍光板観察用の高感度スクリーンカメラは、肉眼ではほとんど観察できない無染色試料や氷包埋試料のような電子線損傷を受けやすい試料も容易に観察できる。加速電圧は、20 kVから120 kVまで可変することができ、観察目的に合わせた加速電圧の選択が可能である。また、予め指定した箇所を自動撮影するImage navigation 機能を搭載し、オートフォーカス機能やドリフト補正機能など各種オート機能を充実させ、簡単オペレーションを実現した<sup>4)</sup>。



図1 最高加速電圧 120 kV TEM HT7800の外観

### 3. HT7800の自動粒子検索機能の特長

自動粒子検索機能の動作フローを図2に示す。本機能をスタートすると、試料ステージが自動的に移動して、その視野内に目的とする粒子があるか否かを判定する。「YES」と判定したら、自動的に像を記録するが、「No」であれば、次の視野へ移動し、粒子の有無を判定する。なお、「YES」判定で記録された像には、検索した粒子にそれぞれ個体番号が付記されている。

HT7800の自動粒子検索機能では、テンプレートマッチングを採用している。この手法では各種のパラメータを個別に変更することが可能であるので、粒子のヒット率を改善することができるだけでなく、ネガティブ染色以外の試料への適用が期待できる。

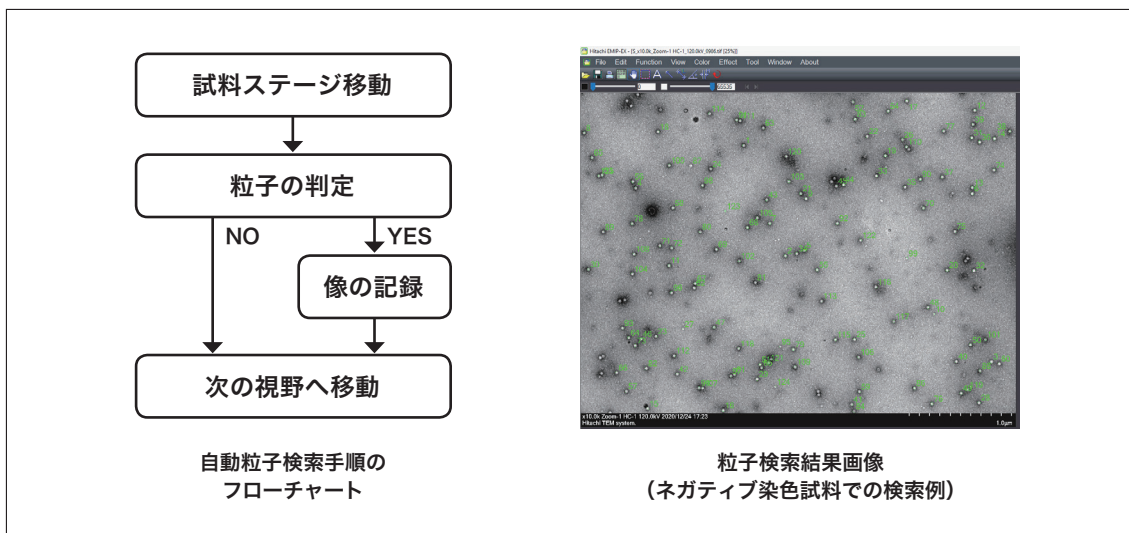


図2 自動粒子検索機能の動作フロー

### 4. 自動検索機能の適用事例

#### 4-1. ネガティブ染色したノロウイルス

ヒト便材料から抽出したノロウイルスを試料として用いた。試料懸濁液をカーボン補強済コロジオン支持膜貼付の400メッシュに滴下し、2%酢酸ウラニルでネガティブ染色した。加速電圧100 kV、撮影倍率20,000倍で自動粒子検索を行った結果、36枚の画像を自動取得した。図3はノロウイルスの自動検索結果である。図3(a)に示すように、自動取得した画像では、検出したノロウイルス粒子には個体番号が付記されているので、個別の定量解析も可能である。図3(b)は画像解析ソフトウェアImage Pro Premier 2D (Media Cybernetics Inc.)を用いて、粒子の直径および面積を計測した結果の一例である。検出されたノロウイルス粒子全体の平均粒径や粒子直径の粒度分布を作成することもできる。今回の事例では、4,069個のノロウイルスを検出し、平均粒径は25.2 nm、平均面積は532.3 nm<sup>2</sup>の定量解析結果を得た。図3(c)は、検出したノロウイルスの粒度分布である。粒度分布より直径24 nmから26 nmの範囲に48%のウイルス粒子が存在することが分かった。

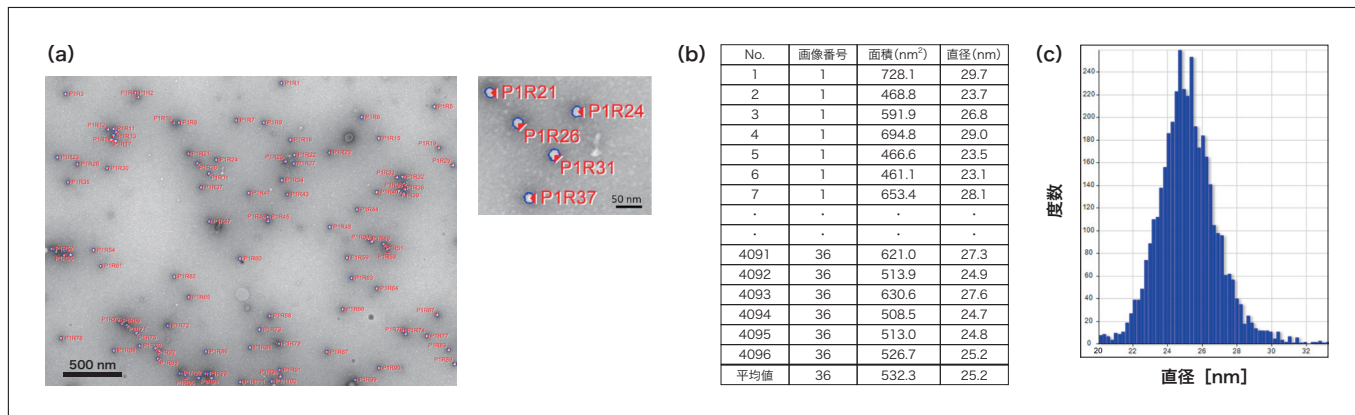


図3 ネガティブ染色を施したノロウイルスの自動粒子検索結果  
(a)粒子解析画像, (b)定量解析結果, (c)粒度分布



## 4-2. 樹脂包埋組織切片中のコロナウイルス

HT7800の自動粒子検索機能にはテンプレートマッチングの手法を採用している。この手法では各種のパラメータを変更できることから、複雑な組織中から特定のウイルス粒子の自動検索を試みた。

試料にはコロナウイルス(ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス)に感染したラット大脳皮質を用いた。アルデヒド系固定液と四酸化オスミウムによる二重固定後、エタノール系列での脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋した組織ブロックからウルトラマイクロームにて厚さ80 nm程度の超薄切片を作製した。超薄切片はクエン酸鉛と酢酸ウラニルで電子染色を施した後、加速電圧100 kVにてTEM観察を行った。図4はブタコロナウイルスに感染した大脳皮質のTEM像で、核(N)やミトコンドリア(M)などの細胞小器官が密に詰まった細胞質に電子密度の高い小胞状の構造が確認できる(図4(a))。その一部を拡大すると、50 nmから90 nm径のウイルスの断面が観察できる(図4(b))。今回はこのウイルスをターゲットとして自動粒子検索を実施した。

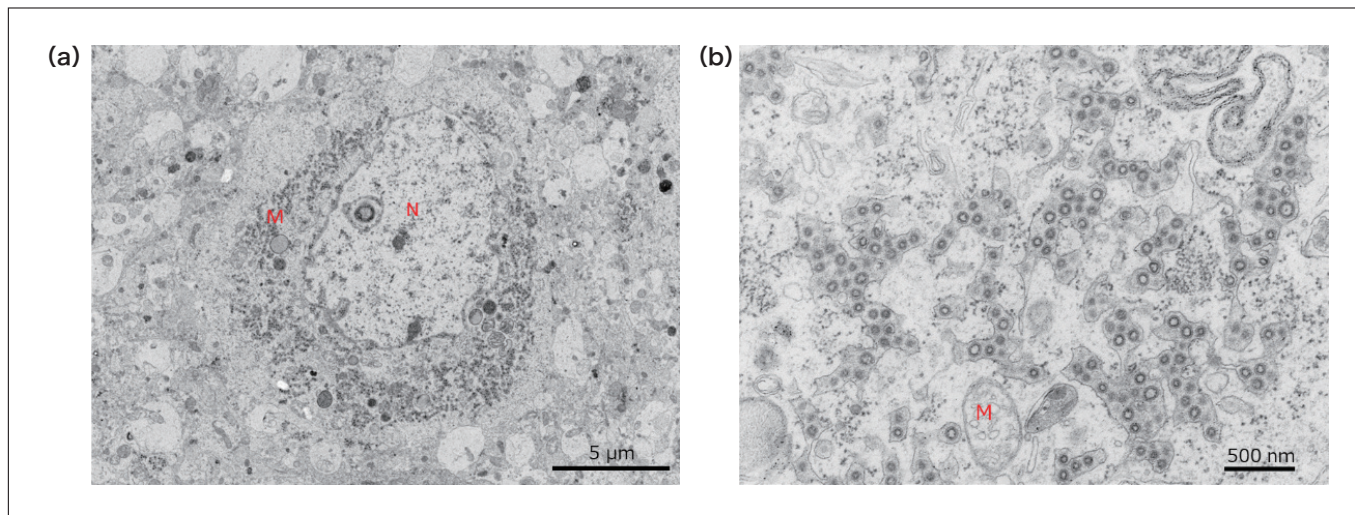


図4 ブタコロナウイルスに感染したラット大脳皮質樹脂包埋超薄切片のTEM像

(a)観察倍率2,500倍, (b)観察倍率15,000倍  
(加速電圧100 kV, N:核, M:ミトコンドリア)

### ①パラメータの検証

自動粒子検索機能の各種パラメータを表1に示す。それぞれのパラメータには標準試料を用いて実験的に求めたデフォルト値が設定されている。図5に示した視野について約90 nm径のコロナウイルスをターゲットとしてパラメータを最適化した。この視野には94個のウイルス粒子が存在していることを予め確認しているため、パラメータを変更して自動粒子検索を行った際のヒット率(%)<sup>(\*)</sup>を指標として、パラメータの最適化を図った。

<sup>(\*)</sup>ヒット率 = (ヒット数 / (ウイルス総数: 94個)) × 100

表1 各種パラメータとその概要

パラメータ	概要	デフォルト値
Template rate (%)	テンプレートマッチング処理のテンプレートサイズ。	147
Search range (%)	検索する粒子サイズの範囲	0
Matching rate (%)	粒子検索時の正解率の閾値。本値以上の相関を得たもののみ該当物と判定する。	50
Area rate (%)	該当物にさらに面積判定を加えるときに用いる閾値	50
Set Search step	Search range で設定した検索する粒子サイズの範囲におけるマッチングのステップ数	3
Optimal size search	本項にチェックを入れた場合、検索相関値が上位10個のテンプレートサイズの平均サイズを算出し、その後該当サイズのテンプレートを使用し、再度検索を行う。	ON



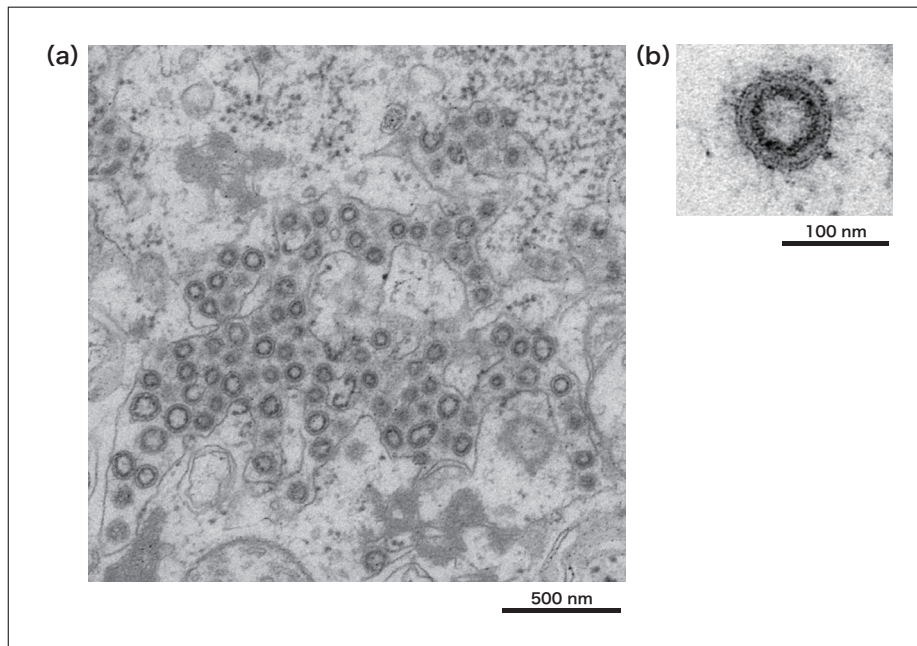


図5 パラメータ検証に用いたブタコロナウイルスに感染したラット大脳皮質のTEM像  
(加速電圧100 kV, 観察倍率10,000倍)

表2および表3に検証結果の一例として、Search range および Search step の検証結果を示す。

Search range は、粒子サイズの範囲を設定するパラメータで、30 % のとき粒子径90 nm では、粒子径63 ~ 117 nm の範囲で粒子を検出する。表2に示すようにデフォルト値0 % のヒット率は39 % で、Search range を30%, 40% では、ヒット率は66%であった。Search range 50%では、検出数は81個と最も多かったが、誤検出も多く、ヒット率は49%であった。これは、Search range 50%の条件は、粒径45 ~ 135 nm でのテンプレートマッチングを実施するためである。

表2 パラメータ Search rangeの検証

Search range (%)	0	10	20	30	40	50
検出数 (個)	39	54	63	67	67	81
ヒット数 (個)	37	51	60	62	62	46
ヒット率 (%)	39	54	64	66	66	49

(デフォルト値：0%)

Search step は、検索目的の粒子サイズに対してマッチングするステップを決めるパラメータで、ステップ数が大きいとマッチング回数が増える。Search step 3, 5, 7 および 9 についてそれぞれヒット率を求めた。なお、Search range は30%で自動粒子検索を実施した。表3に示すように、今回、デフォルト値の Search step 3においてヒット率が66%であり、Search step 9の時に最大ヒット率 74%となった。今回の試料の場合、ウイルスの切断面により粒径は変化するので、粒径のばらつきが大きいサンプルでは、Search step を大きくしてマッチング回数を増やす方が良いと結論できる。

表3 パラメータ Search stepの検証

Search step	3	5	7	9
検出数 (個)	67	71	75	76
ヒット数 (個)	62	66	69	70
ヒット率 (%)	66	70	73	74

(デフォルト値：3, Search range 30% で実施)

①適用事例

今回検証したパラメータの最適値による適用事例を図6に示す。図6(a)はコロナウイルスの自動粒子検索結果で、検索粒子が個体識別番号を付記して検出されている。細胞などの複雑な背景の中から目的のコロナウイルスを自動検索することができていることが分かる。また、今回検出されたコロナウイルスの粒子解析を実施したところ、その粒度分布より、コロナウイルスの粒子径にばらつきがあることが分かった(図6(b))。これは、組織切片中のウイルス粒子は、切削部位により、様々な断面となることから、粒子径のばらつきが大きくなるためと推測される。このように粒子径のばらつきのあるサンプルにおいても、探索パラメータを最適化することで精度よく目的のウイルスを検出することが可能であり、TEM 検鏡作業の効率化が期待できる。

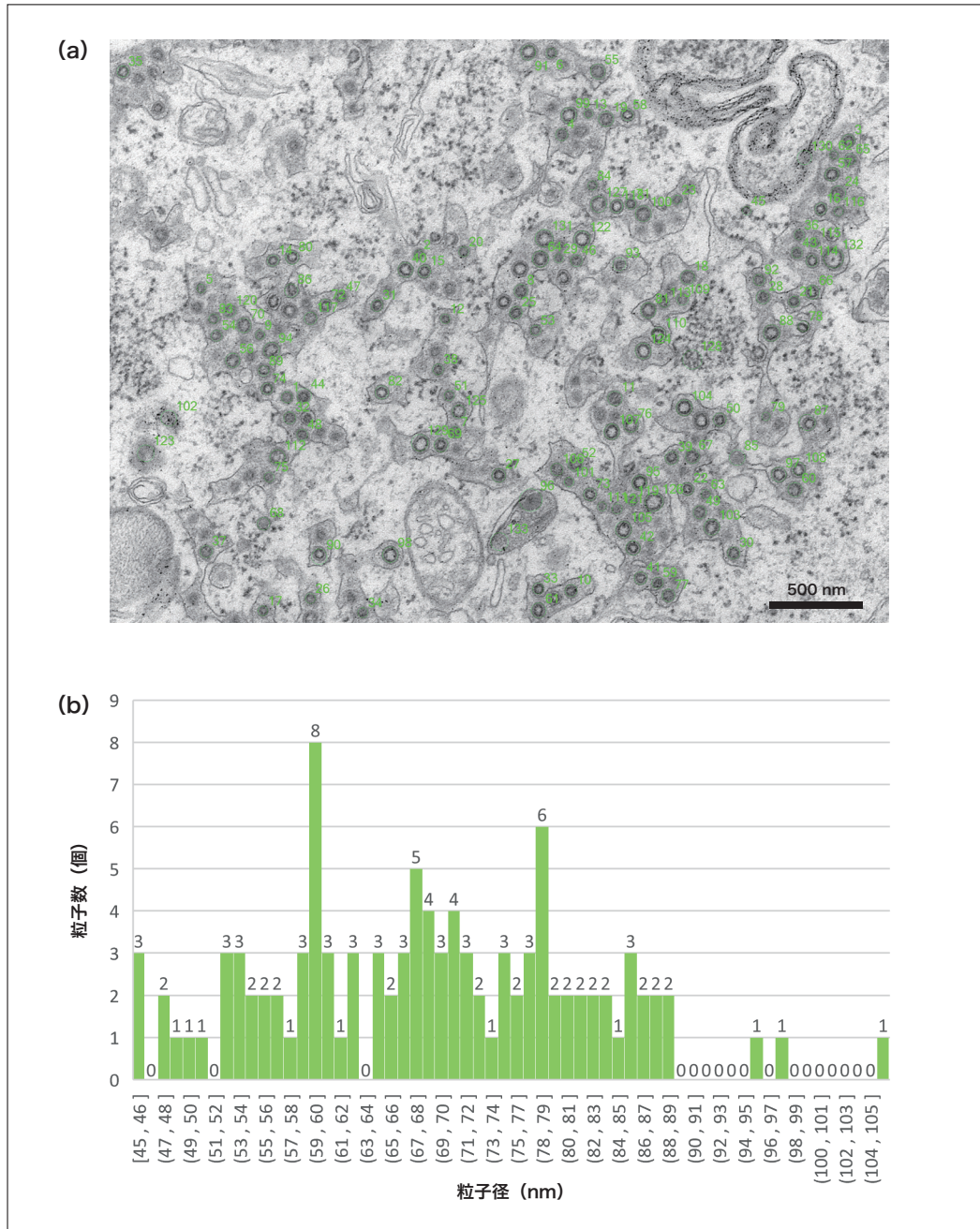


図6 プタコロナウイルスに感染したラット大脳皮質樹脂包埋超薄切片の自動粒子検索結果  
(a)自動粒子検索画像(加速電圧100 kV, 観察倍率15,000倍), (b)粒度分布

## 5. まとめ

HT7800 TEM における自動粒子検索機能の特長とその応用例を紹介した。本機能を用いることによって、ネガティブ染色試料や細胞組織の樹脂包埋超薄切片中から目的のウイルス粒子を精度よく探索することができる。これによって、TEM 検鏡作業の効率化を図り、さらにまた、見落としも少なく高精度で探索することも可能となる。

### 参考文献

- 1) Etsuko T. Utagawa *et al.*, *Journal of Virological Methods*, **100**, 49-56 (2002).
- 2) 川元他, 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第38回学術講演会抄録集, p50 (2022).
- 3) 田村圭司他, 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会 発表要旨集, p4 (2018).
- 4) 矢口紀恵他, 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会 発表要旨集, p35 (2018).

### 謝辞

本研究で用いたノロウイルス試料は, 国立感染症研究所客員研究員 宇田川悦子博士 (サイエンス・ラボ横浜 代表) よりご提供いただいた。また, コロナウイルス (ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス) に感染したラット大脳皮質試料は, 岩手医科大学医歯薬総合研究所 石田欣二先生および元岩手大学農学部獣医学科獣医微生物学研究室 平野紀夫先生よりご提供いただいた。心から感謝申し上げます。

### 著者紹介

\*<sup>1</sup> 和久井 亜希子

(株) 日立ハイテク コアテクノロジー&ソリューション事業統括本部 CT システム製品本部 CT ソリューション開発部

\*<sup>2</sup> 野寺 康行

(株) 日立ハイテク コアテクノロジー&ソリューション事業統括本部 CT システム製品本部 解析ソフト設計部



# 業務効率化に貢献するイオンミリング法

## The Ion Milling Method with Improved Work Efficiency

稲木 由紀

### 1. はじめに

イオンミリング法は走査電子顕微鏡 (SEM) の断面試料作製法のひとつであり、応力を掛けることなく簡便に断面を作製できることから半導体やエレクトロニクス、材料など幅広い分野において多岐にわたり活用されている。近年の SEM 観察対象となる試料構造の複雑化や作業効率改善の要求に伴い、多様な試料への応用や試料作製時間の短縮が求められている。SEM 用試料作製に用いられるイオンミリング法には断面イオンミリング法と平面イオンミリング法<sup>1)</sup>があり、日立ハイテクではこれらの手法を搭載したハイブリッドタイプの ArBlade5000 と IM4000 II の図1に示す2機種を販売している。本稿では、はじめにイオンミリング法の原理について述べ、次に最新のイオンミリング装置の機能と応用例について紹介する。



図1 イオンミリング装置IM4000 II(左), ArBlade5000(右)の装置外観図

### 2. イオンミリング法の概要

イオンガンから集束させないブロードなイオンビームを試料に照射させ、試料の表面の原子を弾き飛ばすスパッタリング現象<sup>2)</sup>を利用して試料を削るイオンミリング法は、ミリメートルオーダーの平滑な観察面を作製することができる。一般にイオン源はほとんどの試料に対して化学変化の小さいアルゴンガスを用いることが多い。

#### 2-1. 断面イオンミリング法

断面イオンミリング法(以下、断面ミリング法とする)は図2に示すように、試料とイオンガンの間に遮蔽板を配置し、試料の先端を遮蔽板から突出させて試料にイオンビームを照射して加工する方法である。遮蔽板から突出した部分を遮蔽板の端面に沿ってスパッタリングすることにより、平坦な加工面を得ることができる。試料は遮蔽板端面から数10 ~ 100  $\mu\text{m}$  程度突出させ、同時に試料ホルダを $\pm 15 \sim 40^\circ$ 程度の範囲でスイングさせることで、イオンミリングの加工痕(筋)の形成を抑える。一般的に、断面ミリング法は材質の異なる複合材料や空隙が多く脆い材料など、機械研磨が難しい試料の断面作製に有効である。

断面ミリング法の例として図3に感熱紙の加工例を示す。カミソリによる切断(a)と断面ミリング法(b)でそれぞれ断面を作製し、SEMで観察した。感熱紙は基材の紙の上に感熱層や保護層などが積層された構造となっているが、カミソリの切断では応力により各層が潰れてしまい構造の正確な確認は困難である。一方、断面ミリング法では応力をかけずに断面を作製できることから各層が潰れることなく厚みやフィラーの分散状態を確認することが可能である。

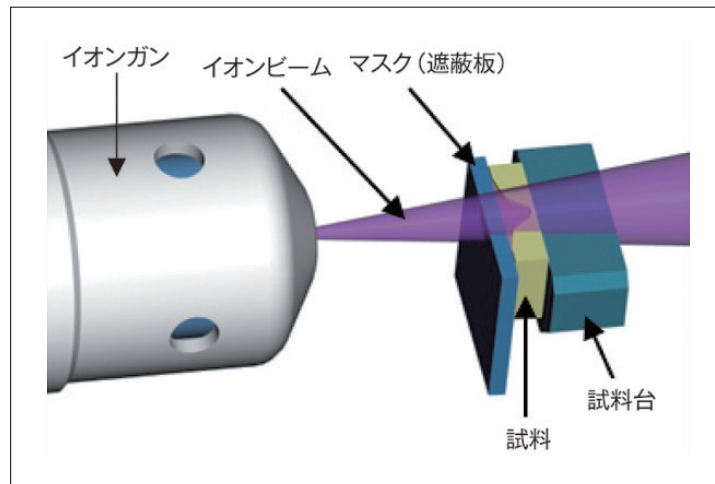
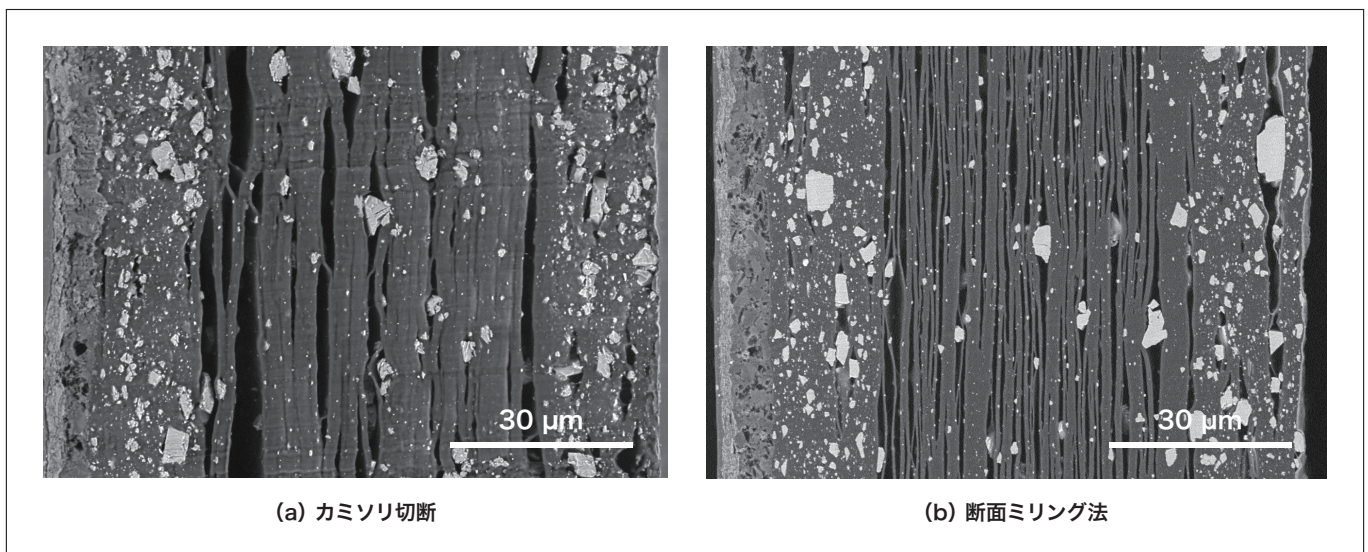


図2 断面ミリング法概略図



(a) カミソリ切断

(b) 断面ミリング法

図3 感熱紙の断面SEM像

## 2-2. 平面イオンミリング法

図4に平面イオンミリング法(以下、平面ミリング法とする)の概略図を示す。平面ミリング法はブロードイオンビームを試料表面に対して斜めに照射し、広い範囲を加工する手法である。イオンビームの照射角度( $\theta$ )は $0 \sim 90^\circ$ に調整でき、 $\theta$ を $80^\circ$ 以上に設定するとイオンビームは試料表面に対して平行に近づくため、結晶方位や組成のエッチングレート差による凹凸形成を抑制した平滑な加工面を作製することができる。これは、機械研磨を行った樹脂包埋試料の研磨傷の除去を目的とした仕上げ加工に用いられる。一方、 $\theta$ を $45^\circ$ 以下の低角度に設定するとエッチングレート差による凹凸を強調した加工が可能である。この凹凸を利用することで粒子の分布形状の把握などに使用することができる。

図5に銅板の機械研磨面(a)および機械研磨した後に平面ミリング法を行った加工面(b)のSEM像を示す。機械研磨のみでは研磨傷の残存と応力により結晶粒の観察が困難であるが、平面ミリング法により仕上げ加工を行うことで研磨傷や応力による歪み層を除去し、明瞭な結晶粒を観察することが可能となった。



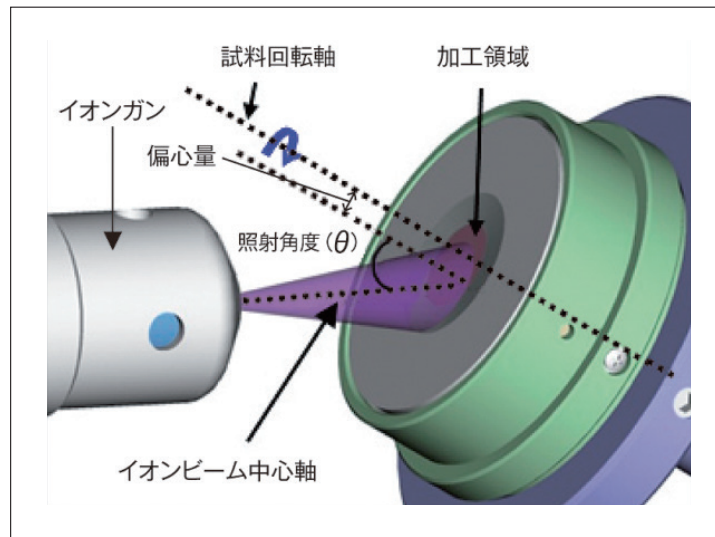
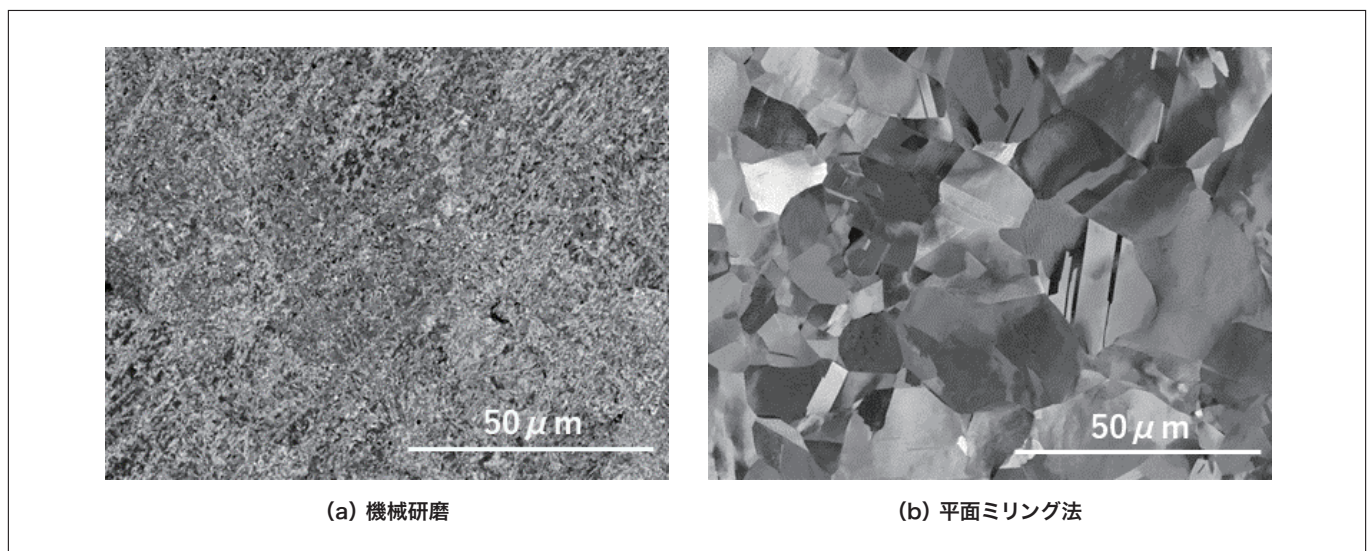


図4 平面ミリング法概略図



(a) 機械研磨

(b) 平面ミリング法

図5 銅板断面のSEM像

### 3. イオンミリング装置IM4000 II, ArBlade5000の特長

#### 3-1. イオンミリング装置共通の特長

当社で販売しているイオンミリング装置は断面ミリング法と平面ミリング法の2つの機能を備えたハイブリットタイプの装置である。そのため様々な材質や多様な用途に対応できる。また操作系はタッチパネルオペレーションにより簡便な操作が可能である。さらに高分子材料などの低融点試料においてビーム照射時の熱ダメージを低減するために試料を冷却しながら加工する冷却機能や、リチウム電池材の解析のため大気に触れることなく加工可能な雰囲気遮断機能などをオプションとして追加したことで、イオンミリング法により加工できる試料が拡充している。

図6に冷却イオンミリング法の加工例として低融点はんたを常温(a)と冷却(b)で断面加工した結果を示す<sup>3)</sup>。試料の冷却は液体窒素を冷却源として間接的に行い、0℃から-100℃まで任意の温度に設定することが可能である。常温の断面ミリングではイオンビーム照射による温度上昇により低融点金属の鉛(Pb)が融解し、空隙ができていることがわかる。これに対し、冷却加工では温度上昇を抑制でき、試料に損傷なく平滑な断面を作製できている。

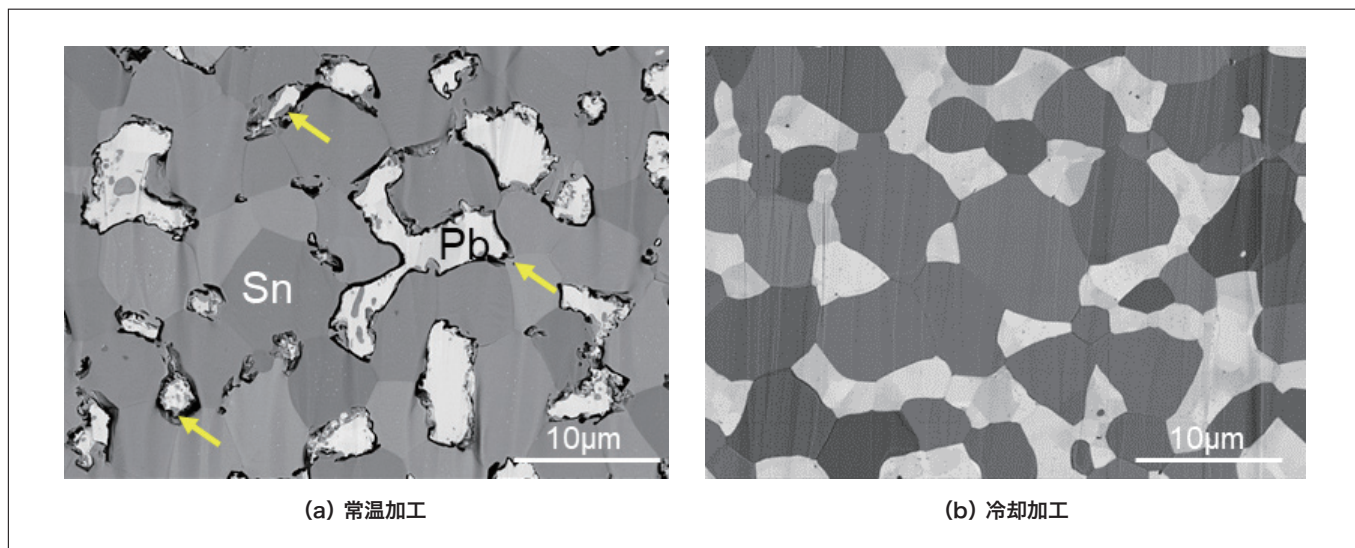


図6 低融点はんだの断面SEM像

大気中の酸素や水分と反応して形状が大きく変化してしまう電池材料などを加工する場合には、密閉可能な雰囲気遮断ホルダを用いてミリング加工を実施する。これにより試料を大気と接触させることなく加工後の断面をSEMや原子間力顕微鏡(AFM)で解析することが可能である。図7にリチウムイオン電池負極材を断面加工した後に雰囲気遮断機能を用いてSEMに搬送し、観察した結果を示す<sup>4)</sup>。雰囲気遮断機能により大気非暴露で観察したSEM像ではグラファイトの周りの導電助剤の状態を明瞭に観察できる。一方、試料を大気にさらした後のSEM像では水分や酸素に接触したことで表面が析出物で覆われており、雰囲気遮断機能の有効性が確認できる。

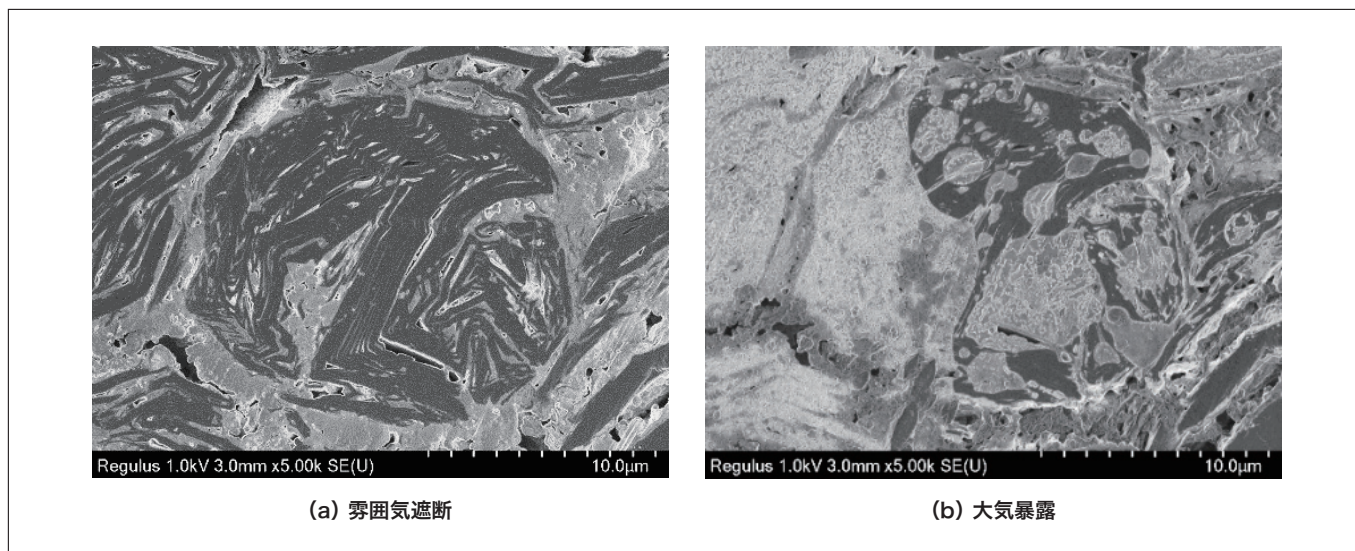


図7 リチウムイオン電池負極断面のSEM像

### 3-2. ArBlade5000 による高効率化加工

従来の断面ミリング法は加工幅が約1 mmであるのに対し、ArBlade5000は広域断面ミリング機能を有し、最大ミリング幅8 mmで断面を作製することが可能である。この機能により、これまで複数回の加工が必要だった試料に対して1回の加工で平滑な断面を作製することができるため、より作業効率を向上させることができる。

図8に広域断面ミリング機能を用いて超硬ドリルを加工した断面のSEM像とエネルギー分散型X線分光法(EDX)の結果を示す<sup>5)</sup>。それぞれ加工面の全体像(a)とコート層の拡大像(b)、拡大領域のEDXマップ像(c)である。約8 mmの範囲が加工でき、ミリングに要した時間は5時間であった。硬く研磨が困難な超硬材料においても高レート加工により短時間で広範囲の断面を作製することが可能である。表面のコート層を拡大した結果、50 nm以下の微細な積層構造が確認でき、EDX分析によりコート層はアルミニウムとチタンを含む積層構造であることがわかった。このように広領域で断面ミリング加工した場合でも高倍率観察や分析が可能な良好な加工断面を得ることができる。



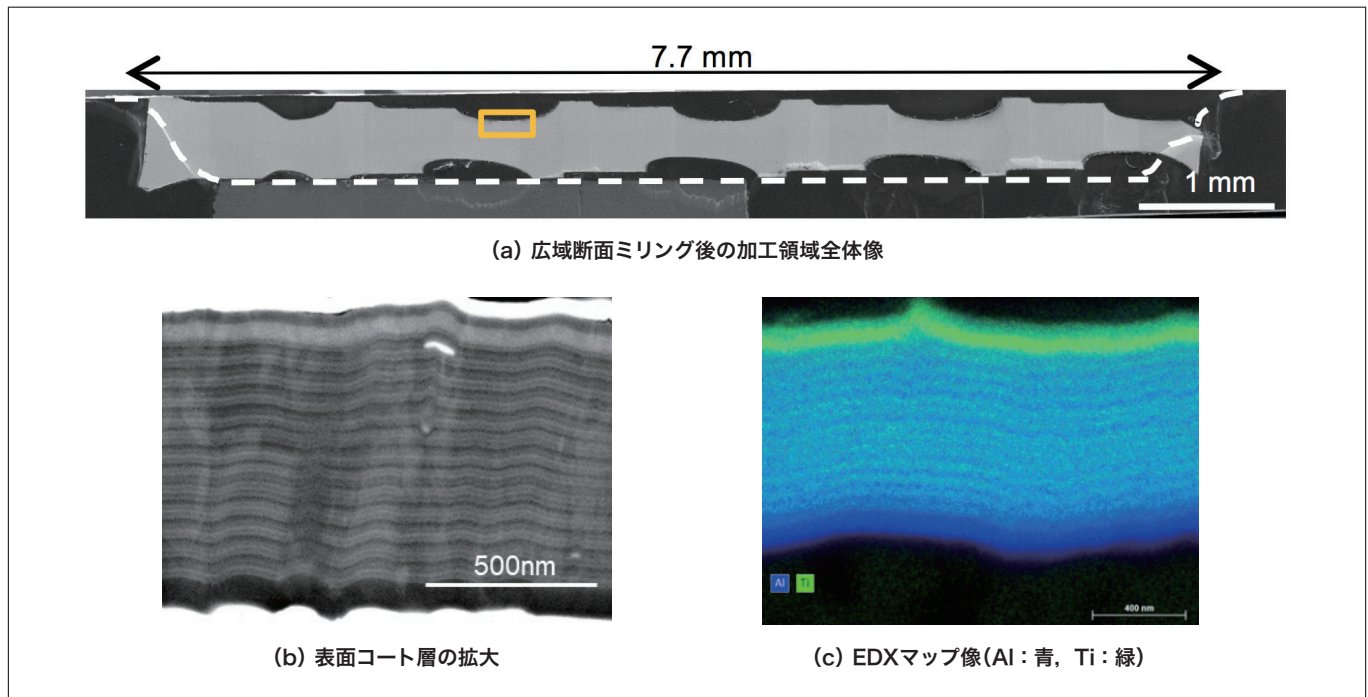


図8 超硬ドリルの広域断面ミリング

ArBlade5000はPCと接続することで専用のソフトウェア(Advance Control Software:ACS)を使い、加工条件の送受信や一連のミリングプロセスを任意に組み立てて保存・実行することが可能である。またACS機能を利用することで複数の加工位置、ならびに複数のミリング条件の加工が可能となる。図9にACS機能を用いて多点加工を行った電子基板の光学顕微鏡像を示す。試料全体を広域断面ミリングで加工した場合、加工には長時間を要するが、多点加工は必要な箇所だけを選択し試料に適した条件で加工できるため、数時間の加工で目的部の断面を作製できる。任意の条件で自動加工できるため全行程終了まで装置の前に戻る必要がなく、加工時間短縮と作業効率の向上が可能である。



図9 多点加工後の光学顕微鏡像

また、ACS機能とともに新開発のマルチサンプルホルダを使用することで、最大3検体の試料を一度のミリング処理で加工することが可能である。試料ごとに加工条件を設定することができ、真空引きや大気開放の手間を削減して複数の試料を全加工終了まで自動で加工できるため、作業者は加工中に他の作業に従事することが可能となる。

図10にマルチサンプルホルダの外観を示す。マルチサンプルホルダは押付け試料台によりホットワックスやペーストを用いることなく、ばねで試料を試料台に固定する。

マルチサンプルホルダを用いて3種類の試料を加工した例を図11に示す。試料はそれぞれ①電子基板、②コート層付き金属板、③感熱紙であり、電子基板や金属板は高加速電圧で短時間加工、感熱紙はダメージを抑制するために低加速電圧での加工など各種材料に適した条件で加工することができる。さらにそれぞれの試料の中で多点加工や広域断面加工を行うこともでき、①電子基板では基板の両端を加工し、さらに左端は幅3 mmの広域加工を実施している。このようにマルチサンプルホルダの使用により、複数試料の複数個所の加工が可能となるため、作業効率の向上が期待できる。

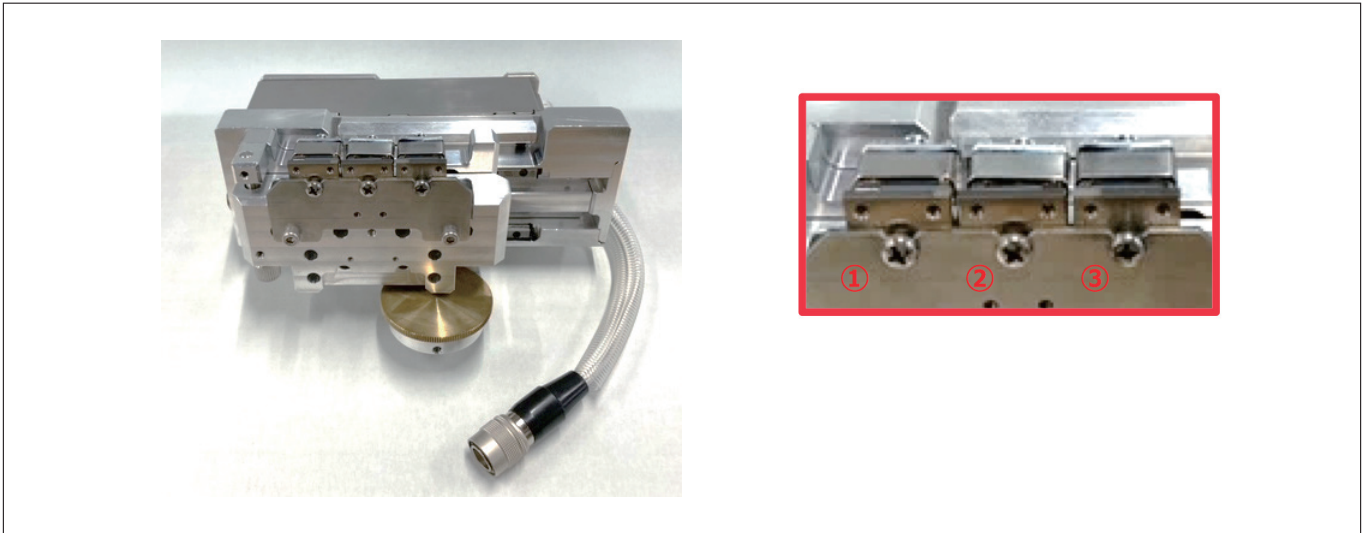


図10 マルチサンプルホルダ外観(左) 押付け試料台部拡大(右)

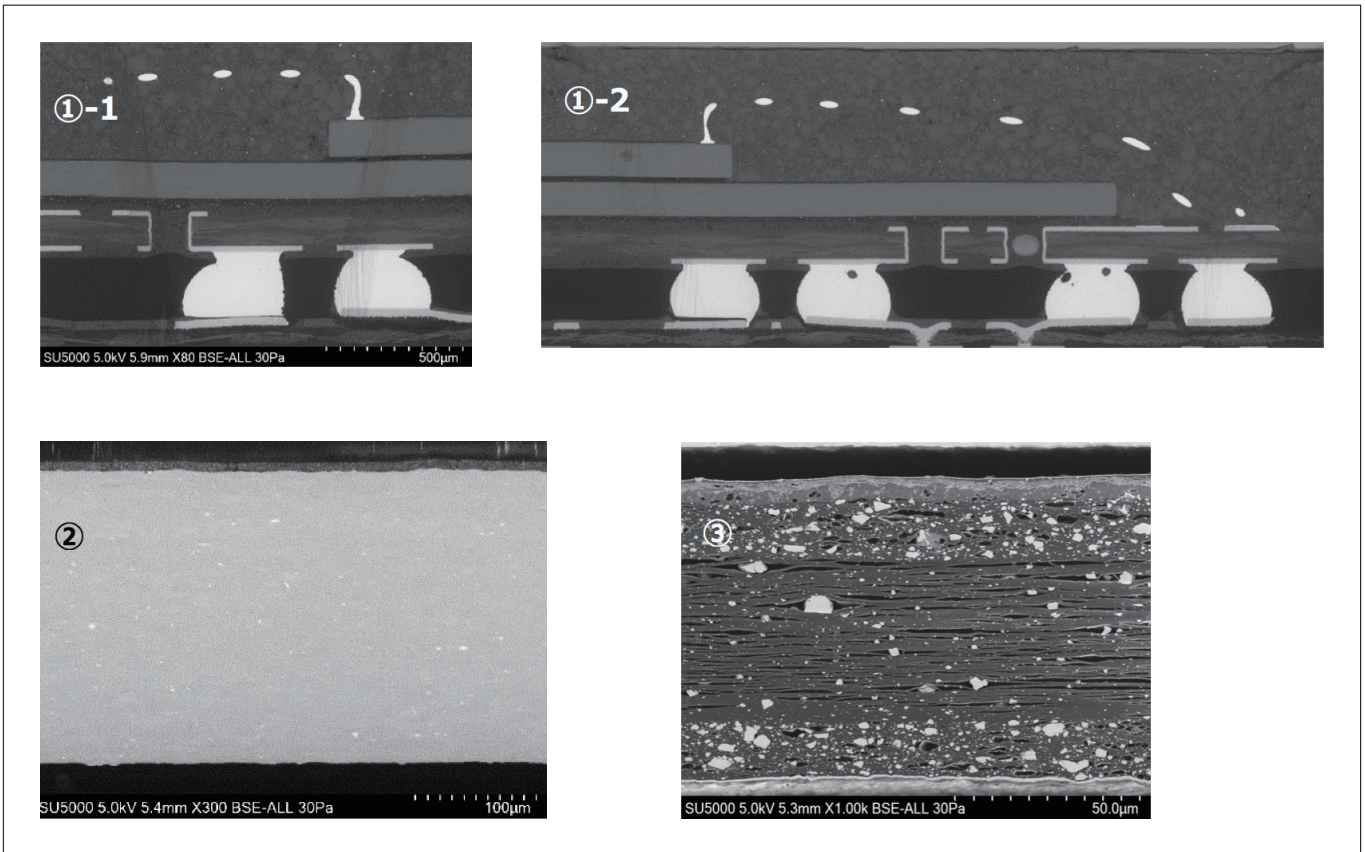


図11 マルチサンプルホルダによる多検体加工  
①電子基板, ②コート層付き金属板, ③感熱紙

## 4. まとめ

イオンミリング法は冷却機能や雰囲気遮断機能により多種多様な試料の断面作製に使用できる。また装置の高レート化による加工時間短縮だけでなく、多点加工やマルチサンプルホルダの使用による複数試料の複数個所の自動加工により断面作製における高効率化が可能となった。本機能が SEM 観察試料における前処理の一助となれば幸いである。

## 参考文献

- 1) 日本顕微鏡学会関東支部編：新・走査電子顕微鏡，共立出版，195（2011）。
- 2) 平坂雅男，朝倉健太郎：FIB・イオンミリング技法 Q&A，アグネ承風社，8（2002）。
- 3) 日立ハイテク会員制サイト S.I.navi, アプリケーションデータシート HTD-SEM - 202
- 4) 日立ハイテク会員制サイト S.I.navi, アプリケーションデータシート HTD-SEM - 124
- 5) 日立ハイテク会員制サイト S.I.navi, アプリケーションデータシート HTD-SEM - 025

## 著者紹介

稲木 由紀

(株) 日立ハイテク コアテクノロジー&ソリューション事業統括本部 CTシステム製品本部 CTソリューション開発部 表面構造解析グループ



# 熱分析装置 示差走査熱量計 NEXTA<sup>®</sup> DSCシリーズ

Thermal Analyzer Differential Scanning Calorimeter NEXTA DSC Series

西村 晋哉

## 1. はじめに

示差走査熱量測定 DSC (Differential Scanning Calorimetry) は、熱分析手法の一つであり、材料の融解、ガラス転移、結晶化、熱硬化などの転移の他、熱履歴の検討から比熱、純度など様々な測定が可能である。それ故に DSC は材料の熱特性を分析するうえで欠かせないもので、国内外を問わず、高分子材料や無機材料、医薬品、石油化学などの研究・開発、品質管理などで幅広く利用されている。

当社では 1970 年代以降、熱流束型の DSC を自社開発し世界中に販売してきた。2020 年には熱分析装置の新世代の NEXTA DSC シリーズとして、ハイエンドモデルの DSC600、スタンダードモデルの DSC200 の 2 機種をリリースした。



図1 DSC600の外観

## 2. NEXTA<sup>®</sup> DSCシリーズの概要

近年、材料や素材の高機能化・複合化に伴い、基礎研究から製品開発における各種材料の機能、効果が温度変化によってどのように変化するかを明らかにする熱分析装置の熱物性評価への要求は、ますます多様化・複雑化している。高性能化と微細化が進むエレクトロニクス製品の故障解析においては、微量な試料の分析や成分の測定を行うため、より高精度な測定を実現する高い感度と、測定における安定性と再現性を示す高いベースライン性能が求められている。また、自動車、航空機などの幅広い分野で活用されている高機能高分子、高機能フィルムの測定においても、高分子の熱特性を精度よく計測するために、より高いベースライン性能が求められている。

このような市場の要求に応えるため NEXTA<sup>®</sup> DSC シリーズには、①高感度測定、②安定したベースライン再現性、③低温領域の試料観察に対応した Real View の 3 点の特徴がある。

## 3. 高感度化

NEXTA<sup>®</sup> DSC600 では示差熱検出 (DSC 信号) の温度センサである熱電対を複数本直列に接続し多重化 (サーモパイル) させた自社開発サーモパイル型 DSC センサを搭載することで、0.1  $\mu$ W 以下という高感度を実現し、母材に対して少ない量の添加材や、ブレンドされた樹脂材料などの測定が高精度に可能となった。

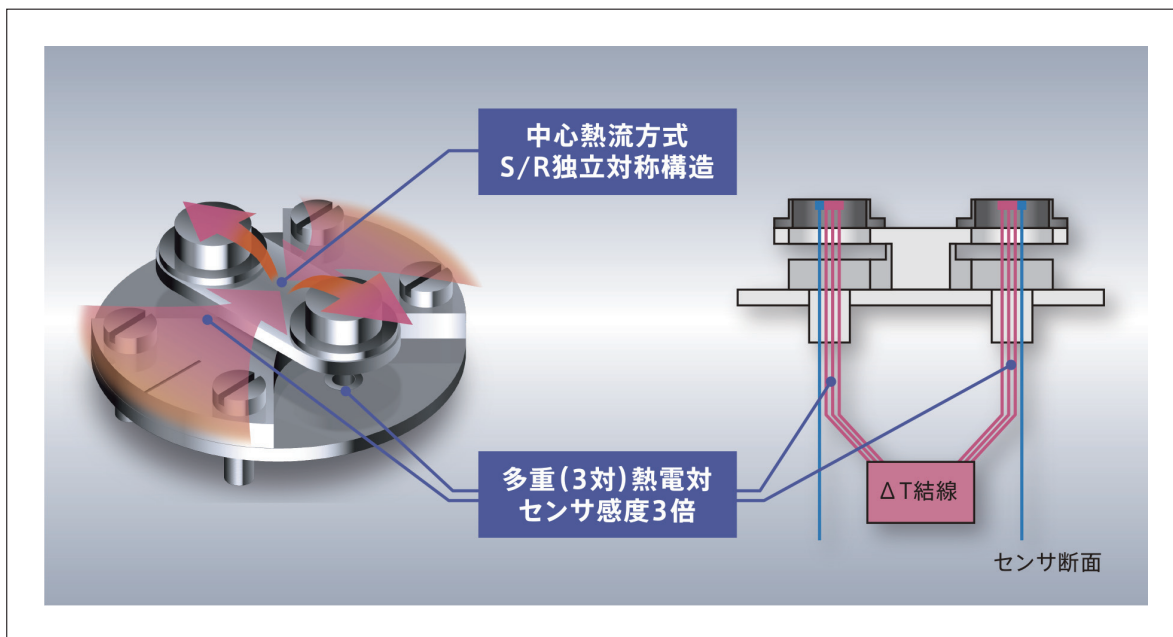


図2 DSC600 DSCセンサの構造

以下に自動車や航空機の躯体として使用されている炭素繊維強化エポキシ樹脂における高感度化の測定事例を紹介する。当該材料は、樹脂材料の機械的強度を高めるために炭素繊維を含んだエポキシ樹脂であるため、エポキシ樹脂単体よりも樹脂成分の割合が少なくなることから、ガラス転移や発熱ピークの検出には、高感度やベースラインの安定性が求められる。

まず図3に直線的に昇温したDSCの測定結果を示す。1回目昇温では50～60℃付近にガラス転移があることが分かる。一方、100℃以上の領域においては126.7℃に吸熱ピークがあるようにも見えたり、150.8℃に硬化による発熱ピークがあるようにも見え、データの解釈が難しい。

このような測定データに対して、より正しく判断する方法の一つとして温度変調DSCの測定方法がある。温度変調DSCとは、温度をサイン波状に周期的に振りながら昇温していく測定方法で、その結果から可逆成分であるガラス転移、不可逆成分である硬化発熱やエンタルピー緩和を分離することが可能である。

温度変調測定後は、(A)総熱流、(B)可逆成分、(C)不可逆成分の3成分へ分離される。分離した結果を図4に示す。(A)総熱流は通常のDSC測定をした場合と同様のものとなる。(B)可逆成分と、(C)不可逆成分 両方の60℃付近に注目すると、(B)では明確にガラス転移が分離され、ガラス転移温度を判断することができる。また(C)ではエンタルピー緩和による吸熱ピークが存在することが、成分分離後に確認できた。通常の測定ではガラス転移と同じ温度域に発生していたため、確認することが不可能であった。

最後に(C)の150℃に注目すると、通常測定では判断に迷っていた現象は、吸熱ピークではなくて発熱ピークと判断でき、未硬化状態のエポキシ樹脂の硬化が起きていると考えることができる。

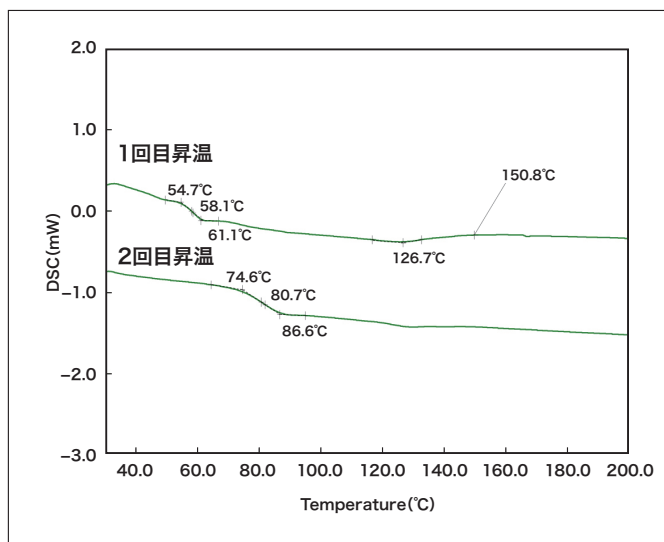


図3 通常のDSC測定

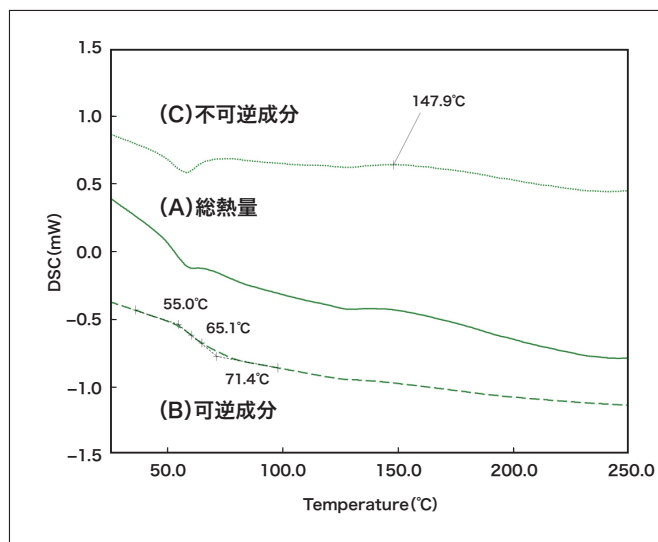


図4 温度変調DSC測定

## 4. 安定したベースライン再現性

NEXTA<sup>®</sup> DSCシリーズは加熱部であるヒートシンクから冷却システム部に至るまでシームレスな接合技術で設計した炉体構造と、低熱容量の金属製3層構造の断熱壁を採用した。この構造によって、電気冷却式冷却システムにおける-50～300℃の測定範囲において極めて高い安定性を示すベースライン再現性 $\pm 5 \mu\text{W}$ を実現し、高い精度で微量成分での熱物性を明確に検出できるようになった。

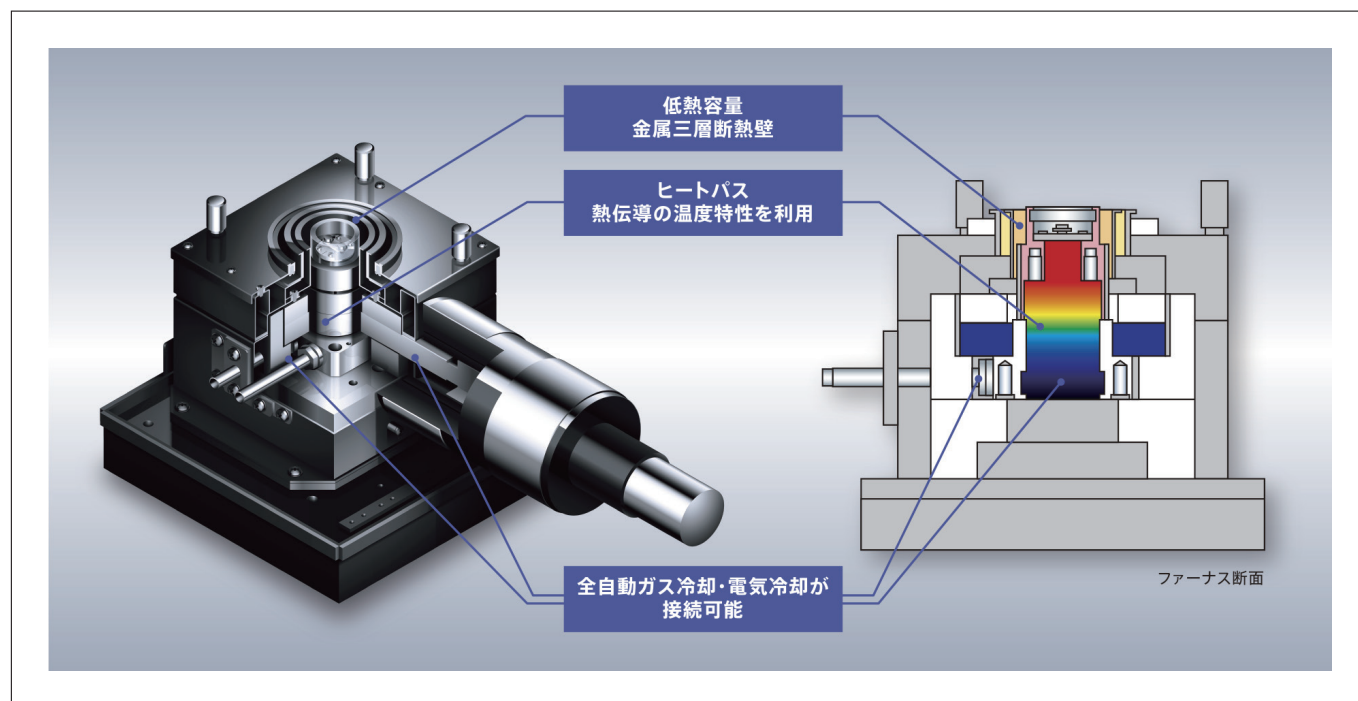


図5 NEXTA DSC の炉体構造

## 5. 低温領域の試料観察に対応したReal View

試料観察熱分析装置 (Real View<sup>®</sup>) は、従来不可能であった熱分析測定中の試料を観察することを可能とした。得られた試料観察画像は、熱分析データと同期しているため、例えば DSCピーク時の試料画像を表示することも容易に可能となった。

NEXTA<sup>®</sup> DSCシリーズでは、200万画素の高解像カメラを搭載することで試料内の局所的な観察にも対応しており、ビューポート (観察窓) にはヒートアップ機構を採用したことで、従来の観察可能範囲が室温以上であった測定範囲を-50℃の低温領域にまで拡張した。これにより、低温領域における試料の観察はもちろん、従来目視で行っていた融点測定や変色に伴う耐熱性評価を定性的に解析できるように色空間解析機能を搭載して、より幅広い測定へのニーズに応えている。

一例として、以下に室温以下の試料観察の測定事例としてエンジンオイルの曇点を紹介する。曇点を境にしてオイル自体の流動性が大きく変化することからオイル業界では重要な因子になっているが、いまだに目視に頼っている所は多い。

エンジンオイルを室温からマイナス温度域へ一定速度で冷却する-15℃付近から発熱ピークが現れる。これは結晶化に伴うピークで曇点に相当する変化である。

目視で画像を確認すると-25℃付近で試料が濁り始めていることを認識できるが、色空間解析によって明度を確認すると、発熱ピークに連動するように明度  $L^*$  が低下していることが分かる。明度の変化をグラフ化できるので、解析が容易になり目視より確度が高い判断が可能となる。



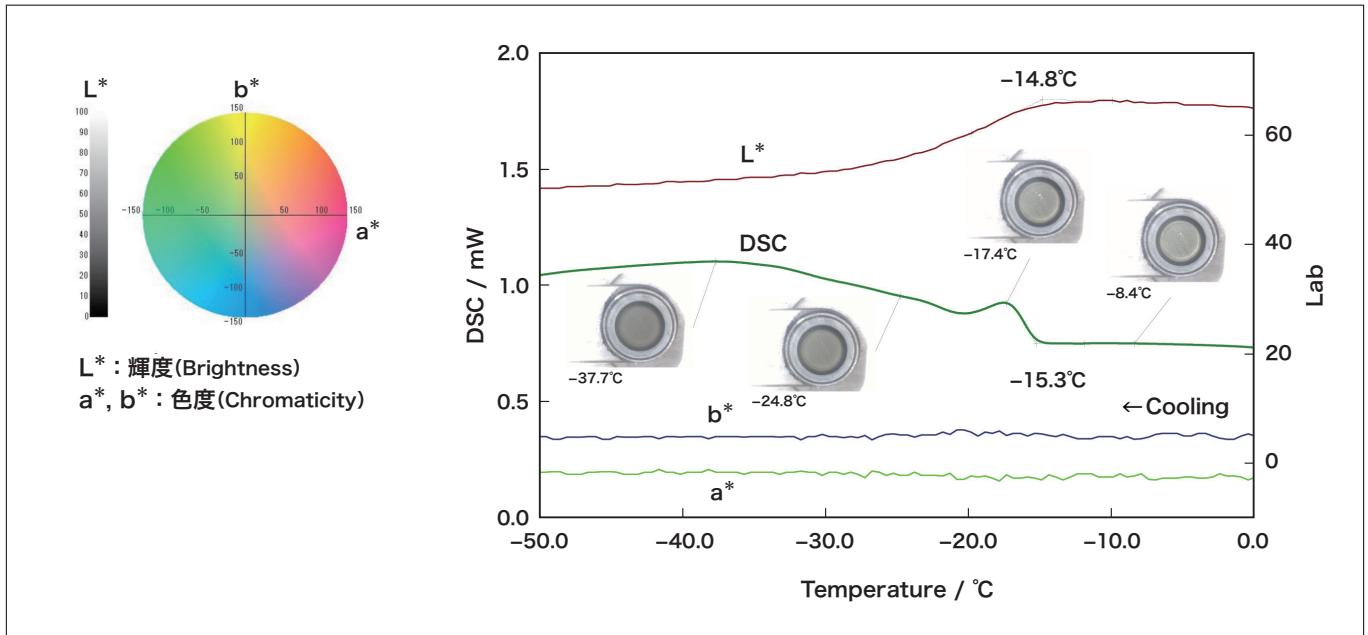


図6 エンジンオイルの曇点測定

## 6. まとめ

NEXTA<sup>®</sup> DSCシリーズは、高感度、ベースライン性能、試料観察機能を搭載した製品である。より高精度な測定や、微量な試料の分析や成分の測定を行うために最適なシステムになっている。

### 著者紹介

西村 晋哉

(株) 日立ハイテクサイエンス 分析開発設計本部 FS 第一設計部

# マルチ ICP発光分光分析装置 SPECTRO ARCOSの特長と測定例

## Introduction of SPECTRO ARCOS ICP-OES

添田 直希

### 1. はじめに

誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-OES) は試料中に含まれる元素をプラズマ内で励起し、放出される光を測定することで定性、定量分析を行う装置である。

ICP-OES は多元素を一斉分析でき、かつダイナミックレンジが広いという特徴を活かすことができる研究開発、品質保証、環境など幅広い分野で使用されている。SPECTRO ARCOS は、ハイエンドの多元素同時型 (マルチ型) の ICP-OES として、従来機より感度、精度、耐マトリクスなどの性能を向上させ、さらに独自のユニークなプラズマ測光方式を搭載している。

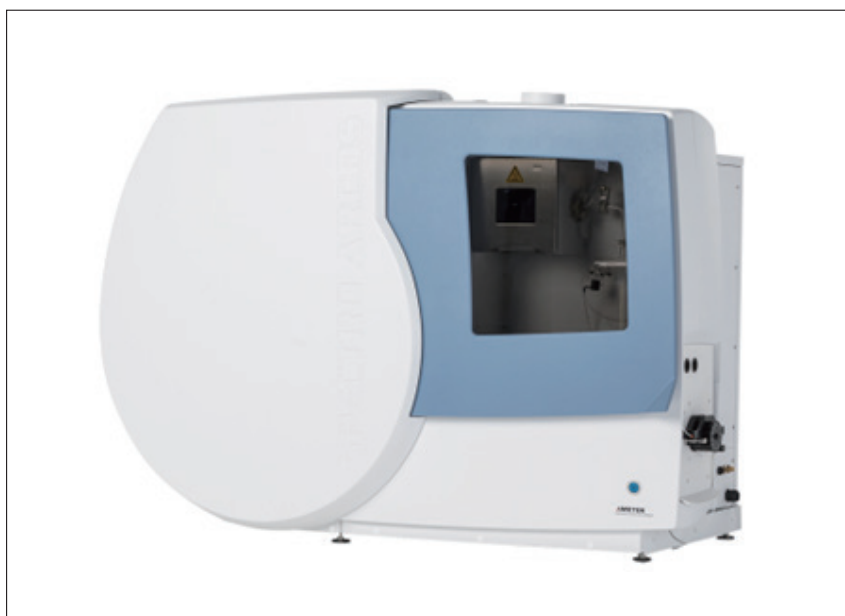


図1 マルチ型ICP発光分光分析装置 SPECTRO ARCOSの外観図

### 2. ICP発光分光分析装置の役割

ICP-OES は、光源にアルゴンガスからなる高周波誘導結合プラズマ (ICP) を用い、元素を測定する分析法の一つである。分析対象は一般に溶液で、試料を霧化して ICP に導入し、ICP のエネルギーにより分析試料中の原子やイオンを励起、発光させる。放出された発光線は各元素固有の波長を持つために、測定された波長の値から元素の定性を、発光の強度から定量分析を行うことができる。ICP-OES で発生するプラズマは、一般に温度が 5000 ~ 8000 K と高温であるため、ほとんどの元素を励起発光させることが可能である。

ICP 発光分光分析法は以下に示す特徴を持つ。

- 1) 約70元素の測定が可能。
- 2) 多元素一斉 (または同時) 分析が可能。
- 3) 高感度である (検出下限はほとんどの元素に対して 10  $\mu\text{g/L}$  以下)。
- 4) 検量線の直線範囲が5から6桁あり、測定ダイナミックレンジが極めて広い。
- 5) プラズマの温度が極めて高く、共存元素による化学干渉やイオン化干渉が少ない。
- 6) 安定性が高く、測定値の繰り返し性が良い。

これらの特徴から ICP-OES は、有機・無機材料、環境、食品、薬品などの幅広い分野の元素分析ツールとして用いられ、多くの公定法にも採用されている。

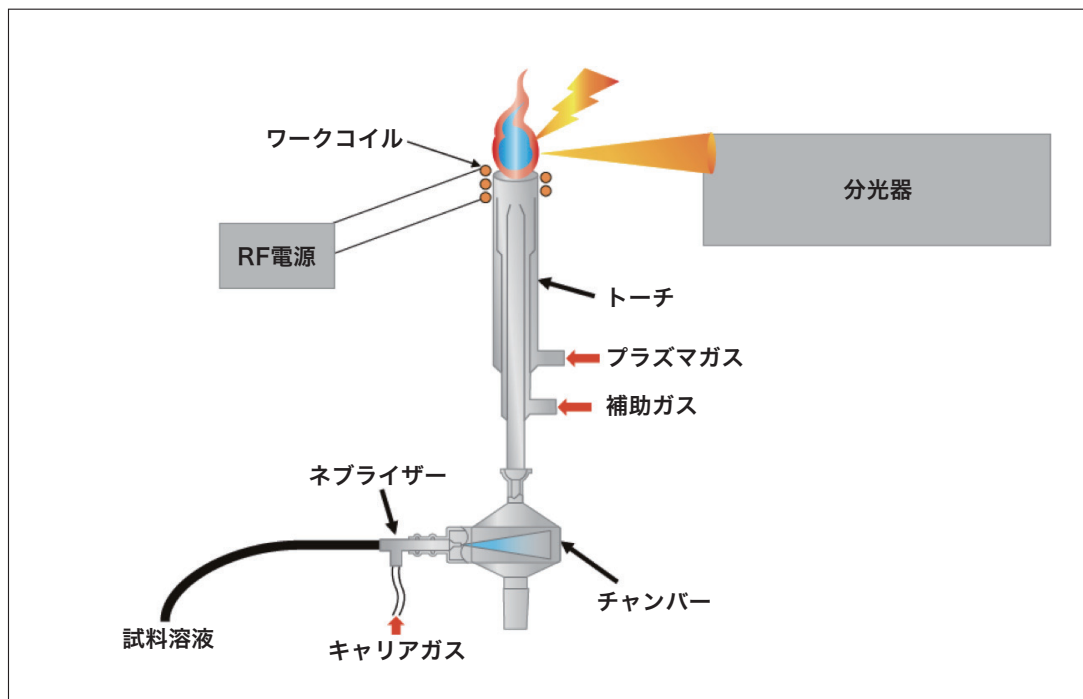


図2 ICP発光分光分析装置の構成例

ICP-OESは、図2のように試料導入部、光源部、分光器、検出器から構成される。分光器、検出器の違いにより、逐次測定の様式型と多元素同時測定の様式型に分類される。様式型は多元素型に比べ2～3倍高い分解能を有しており、材料分析等の分野に多く用いられている。一方、多元素型は、測定元素数にかかわらず一定の時間で測定できるため、環境、材料、石油化学等の分野で多く使用されている。またプラズマを軸方向で観測する方式(アキシヤル測光)とプラズマを側面から観測する方式(ラジヤル測光)とで、得られる検出感度や耐マトリックス性が異なる。

### 3. SPECTRO ARCOSの特長

#### 3-1. パッシェンルンゲ分光器

パッシェンルンゲ方式は多元素同時測定のための分光方式として最も古くから用いられている分光方式である。この方式は、光源から1次光のみの光を利用し、多数のミラーを使用しない単純な構造で、最も明るい分光器として知られている。従来は、回折格子により分光した波長が結像するローランド円上に光電子増倍管を並べて測定していたが、SPECTRO ARCOSはCMOSを敷き詰めることで全波長領域(130 nm～770 nm)の同時測定を可能にした。この検出システムを用いることで、検出器が横一列に並び、一般的に用いられる面検出の半導体検出器より広い検出面積を確保することができるため、広範囲のスペクトル情報を得ることができる。また1次光のみを使用するため、多くの多元素型で使用されているエシェル分光器の複雑な次数分離の概念も存在せず、広い波長範囲において高い分解能を得ることが可能である。

エシェル分光器は、エシェル回折格子とプリズム等を組み合わせて2次元に光を分散し、面の半導体検出器により検出を行う。次数分離により分解能を向上でき、比較的短い焦点距離で構成可能なため、装置を小型化することが可能となる。一方、複雑な光学系を介するため、強度が減感し暗い分光器となる。そのため、次項で解説するアキシヤル測光と組み合わせて使用されることが多い。



### 3-2. マルチ測光方式

ICP-OESの測光方式は、一般に、ラジアル測光、アキシアル測光、デュアル測光の3種類に分類される。ラジアル測光はプラズマの側面から発光を観測する方法で、ICP-OESの開発当初から使用されている測光方式である。この方式は、プラズマ内の発光現象の一部分を観測するため干渉を受けにくく、耐マトリックス性が高い。一方、プラズマを真上から観測するアキシアル測光は、低濃度化する試料の測定に対応するために1990年代に開発された測光方式である。アキシアル測光方式はプラズマの端から端まで観測できることから、得られる強度が高くラジアル測光の5～10倍以上の感度向上が期待できる。しかし、干渉を強く受ける等のデメリットがあり、この欠点を解決する一つの方法としてデュアル測光が開発された。これはアキシアル測光またはラジアル測光を主の測光方式とし、ペリスコープを用いてもう一方の測光方式も観測可能な構造となっている。ペリスコープを用いるとその測光方式の光の強度は減感するが、主とする測光方式の不得意な部分を補うことが可能である。SPECTRO ARCOSでは、ラジアル測光を進化させ、感度向上を実現した新しい測光方式、デュアルサイドオン(DSOI)測光を搭載している。DSOI測光は通常のラジアル測光のインターフェースの反対側にミラーを配置し、プラズマ内で放射状に放出される光を折り返し、分光器へ導くことで、通常のラジアル測光の2倍の光量を得ることができる。これにより、ラジアル測光の特長を活かしつつ、課題となっていた感度の向上を実現した。明るいパッシェンレンゲ分光器とDSOI測光の採用により、ほとんどの元素の測定において、一般的なエシェル分光器のアキシアル測光と同等の感度を得ることに成功した。

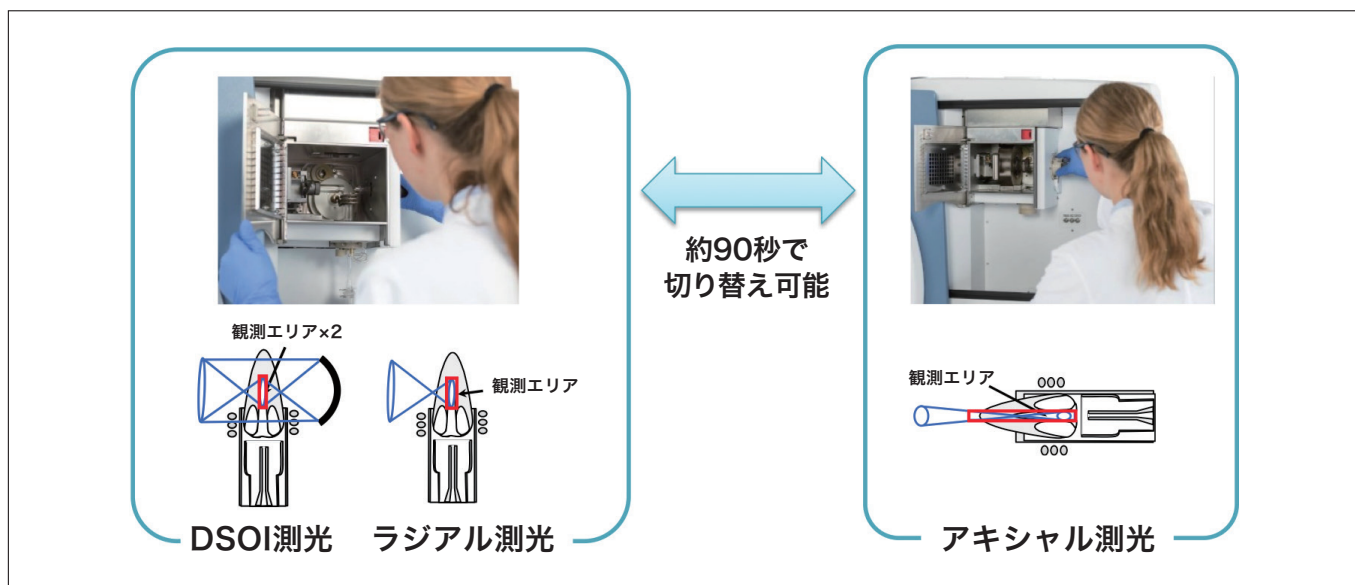


図3 SPECTRO ARCOS測光方式の切り替え

SPECTRO ARCOSのマルチ測光方式ではワークコイルを回転させることでアキシアル専用機、ラジアル専用機、DSOI専用機を切り替え、種々の測光方式を完全に一台で実現できる(図3)。これによりそれぞれの測光方式の特長を活かすことができ、高精度分析にはラジアル測光を、一般分析や有機溶媒の測定にはDSOI測光を、そして微量元素分析が必要な場合はアキシアル測光に切り替えて多角的に測定することが可能になった。

## 4. アプリケーション例：リチウムイオン二次電池の主成分および不純物の測定

リチウムイオン二次電池(LIB)は正極と負極の間をリチウムイオンが移動することで充放電を行うことができる二次電池であり、多くの電子・電気機器や輸送システムのデバイスに利用されている。大容量の電力を充放電できることから、二酸化炭素を排出しない、クリーンな動力源として大きな需要があり、今後もますますの拡大が見込まれる。LIBの元素分析のニーズは、移動イオンであるLi<sup>+</sup>だけでなく、正極材のCo, Ni, Mnといった複数の主成分元素の高精度測定や、LIB中の不純物元素の測定など多岐にわたる。

ラジアル測光を用いて、LIBの主成分元素測定を行った例を表1に示す。ここでは、Ni, Mn, Coが5:3:2で混合されたNMC532と6:2:2で混合されたNMC622を測定対象試料とし、マイクロ波試料分解装置で溶液化して分析を行った。ICP-OESによって得られた濃度をモル濃度に換算し、Ni濃度で規格化して、混合比を算出した。表1の測定結果に示すように、いずれの分析値も既知の濃度値と一致する結果が得られ、繰り返しの相対標準偏差(RSD)が0.1%程度と高い精度で測定できていることも確認できる。

表1 LIB主成分元素の測定結果

試料	元素	Li	Ni	Mn	Co
	波長 (nm)	670.780	341.476	259.373	228.616
NMC532 (n=1)	質量濃度値 (g/kg)	73.27	295.54	166.19	117.11
	モル濃度 (mol/kg)	10.558	5.036	3.025	1.987
	Ni 規格化		(5)	3.003	1.973
	RSD(%)	0.071	0.051	0.068	0.034
NMC532 (n=2)	質量濃度値 (g/kg)	73.18	294.97	166.23	117.02
	モル濃度 (mol/kg)	10.545	5.026	3.026	1.986
	Ni 規格化		(5)	3.01	1.975
	RSD(%)	0.047	0.049	0.006	0.024
NMC622 (n=1)	質量濃度値 (g/kg)	72.23	3357.26	110.53	117.26
	モル濃度 (mol/kg)	10.407	6.088	2.012	1.99
	Ni 規格化		(6)	1.983	1.961
	RSD(%)	0.07	0.076	0.097	0.153
NMC622 (n=2)	質量濃度値 (g/kg)	71.94	356.32	110.07	116.73
	モル濃度 (mol/kg)	10.366	6.072	2.003	1.981
	Ni 規格化		(6)	1.98	1.957
	RSD(%)	0.191	0.053	0.135	0.163

また、NMC532の不純物を測定した結果を表2に示す。測定値で未検出だった元素に関しては検出下限値 (LOD) を算出し、LOD 未満 (< LOD) と記載した。LOD は Blank 溶液の強度のばらつきの3倍に相当する濃度として算出、その値を固体中の濃度に換算した値を表記した。ほとんどの元素において mg/kg 以下の検出下限を得ることができた。

表2 NMC532の不純物測定結果

元素	波長 (nm)	測定値 (mg/kg)	固体中の検出下限 (LOD) (mg/kg)
Al	167.078	17.0	0.031
Ca	393.266	18.2	0.003
Cd	226.502	1.01	0.520
Cr	283.563	1.18	0.060
Cu	324.754	<LOD	0.134
Fe	259.941	7.90	0.131
K	766.896	10.6	1.964
Mg	280.270	46.1	0.014
Na	589.592	200	0.178
Pb	168.215	<LOD	0.884
S	180.731	1523	1.080
Si	288.158	16.6	0.374
Zn	206.200	1.46	0.093

SPECTRO ARCOS は 130 nm の波長から測定が可能な装置である。したがって、200 nm 以下の真空紫外 (VUV) 領域の波長を活用することで、他のマルチICP-OES では得られない拡張性を有する。塩素、臭素といったハロゲン元素を始め、多くの元素が VUV 領域に高感度な発光線を持っている。今回 Pb は 168 nm を使用して測定を行った。従来の測定波長では、マトリックスの干渉を受けて十分な感度が得られないため、VUV 領域の発光線を利用した。このようなケースも多く、真空紫外域の波長における測定が可能となることにより ICP-OES の適用の拡大が期待できる。

## 5. おわりに

SPECTRO ARCOSは測定対象のアプリケーションに応じて測光方式を切り替えることのできるユニークな装置である。また、マルチICP-OESの中でも真空紫外領域の波長測定、高い分解能、高感度、耐マトリックス性を活かすことが可能な装置である。この多彩な機能を発揮することで、これまでは困難だった分析を解決できるトップグレードの装置として様々な分野での活躍が大いに期待できる。

1. SPECTRO, ARCOS は, SPECTRO Analytical Instruments 社の日本およびその他の国における登録商標です。

### 著者紹介

添田 直希

(株)日立ハイテクサイエンス 分析開発設計本部 アプリケーション開発センタ 応用技術一課



# DS3000 Compact CE DNA Sequencerを用いたゲルシフトアッセイ

## Gel Shift Assay Using DS3000 Compact CE DNA Sequencer



株式会社日立ハイテック  
アナリティカルソリューション事業統括本部  
ライフ&メディカルシステム製品本部  
バイオシステム第一設計部  
**隅田 周志**



東北大学大学院 生命科学研究所  
微生物遺伝進化分野  
准教授  
**大坪 嘉行 博士(農学)**

## 1. はじめに

DS3000 Compact CE Sequencer (DS3000) は高感度の蛍光シグナル検出器を備えたキャピラリー電気泳動装置である。現在、DNAシーケンサとして販売されている DS3000 の電気泳動媒体 (ポリマ) や泳動条件などを検討すれば、極めて多用途に利用可能なキャピラリー電気泳動装置として確立できる。特に DS3000 は、ポリマがカートリッジに収められていて、容易に付け外しできるため、分析手法に合わせて容易にポリマを変更できる。さらに分析のたびにポリマを交換しても、廃棄されるポリマがほとんど発生しないという特長がある。この製品特長により、解析用途ごとに用いるポリマを交換して使用するという柔軟な運用が可能となる。DNA や RNA、あるいはタンパク質などを研究対象とする研究者にとって極めて有用な機器となることが期待される。ここでは装置の汎用性を示す一例として DS3000 を用いたゲルシフトアッセイを紹介する。

ゲルシフトアッセイは、特定の塩基配列を持つ DNA と特定のタンパク質の結合を、電気泳動を用いて確認する手法である。DNA がタンパク質と結合して複合体を形成すると、サイズ変化や形状変化などによって電気泳動速度が低下する。本手法はこの原理を利用して結合を検出する手法であり、遺伝子発現や DNA 複製、組換えなど DNA と関連する様々なイベントに関わるタンパク質の結合配列の同定や、結合配列に生じた突然変異の影響を調べることができる重要な方法である。

## 2. 結果

### 2-1. 非変性条件下での電気泳動

DS3000 を含む DNAシーケンサは、変性条件下で DNA を一本鎖にして電気泳動を行う。変性条件とするために、尿素などの変性剤を含むポリマを使用すること、泳動を 60℃ などの高温下で行うことが一般的である。一方、ゲルシフトアッセイでは DNA とタンパク質の結合を維持するために、非変性条件下で電気泳動を行う。そのために変性剤を含まないポリマを選定し、泳動中の温度を 40℃ 以下といった比較的低温に保つ必要がある。

本報告では、ポリマを POP™ Conformational Analysis Polymer (CAP, Thermo Fisher Scientific, 4340379) を使用した。CAP は変性剤を含まないポリマである。さらに電気泳動時の温度を低温 (40℃) に設定した。DS3000 ではキャピラリーをオープンで挟み込んで電気泳動時の温度を制御している。オープン温度は DS3000 の設定画面から変更できる。今回はオープン温度を設定可能な最も低い温度 (40℃) に設定した。

次に CAP の濃度を検討した。CAP の濃度が低すぎると二本鎖 DNA を分離できない。逆に濃度が高すぎるとキャピラリーに充填できなくなる。CAP 濃度を検討した結果、CAP 9% の原液を電気泳動バッファで 6% に希釈すると、二本鎖 DNA の分離とキャピラリーへの充填を両立することができた (図1A)。

## 2-2. 塩を含むサンプルの電気泳動

DNAとタンパク質の結合の解析は、細胞内の環境を考慮して10～150 mM程度の塩が含まれる条件で実施する機会が多い。一方でサンプル溶液中に塩が含まれると、キャピラリーへのサンプル注入効率が低下し、蛍光シグナルの強度が小さくなる(図1B, C)。これは、塩によりサンプル溶液の抵抗値が低下し、サンプル注入時に電圧がサンプル溶液部分に十分に印加されなくなったためと考えられている(参考文献1)。サンプル注入効率は、サンプル注入条件を変更することで改善できる。DS3000ではサンプル注入条件として注入電圧と注入時間を設定できる。注入電圧と注入時間はシグナルの強度に正に相関する。一方で、分解能とは負に相関する(参考文献2)。そのため、シグナル強度と分解能のバランスを考慮してサンプル注入条件を調整する必要がある。ここではサンプル注入電圧を1.6 kVと6.4 kVに設定してシグナル強度を比較した(図2)。注入電圧を6.4 kVにすると、150 mMの塩を含むサンプルであっても良好なシグナルの検出が可能であった。

蛍光シグナルの強度は、ポリマに塩を加えることでさらに大きくなる(図2C)。塩によりポリマの抵抗値が小さくなると、その分、サンプル溶液部分に印加される電圧が大きくなるためである。

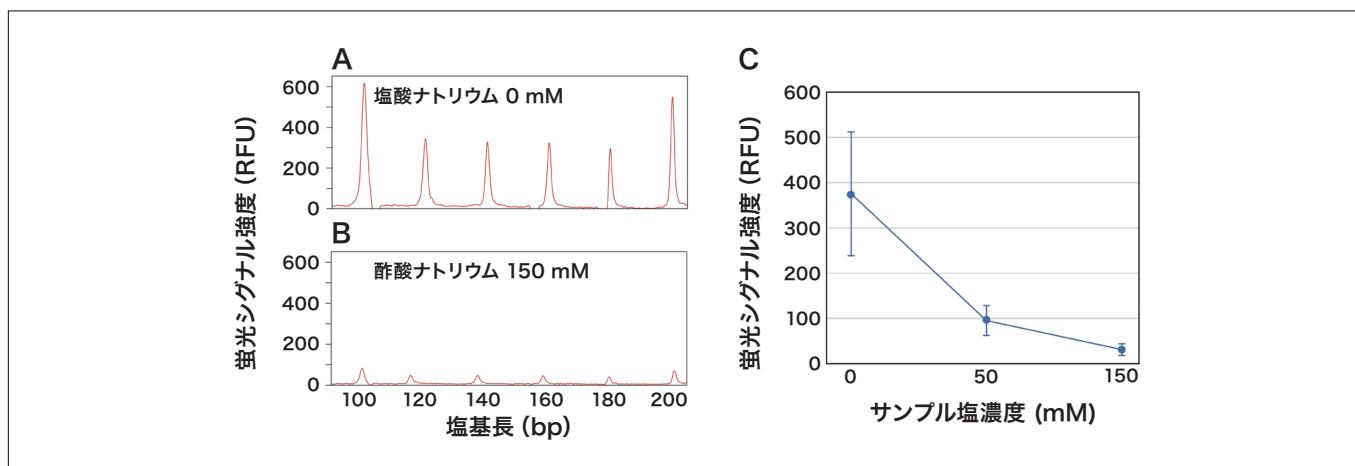


図1 キャピラリー電気泳動による二本鎖DNAの検出と塩濃度が信号強度に及ぼす影響  
 A. 2本鎖DNA溶液を解析して得られた波形図。電気泳動にあたって、CAP原液(9%)を電気泳動バッファで6%に希釈した。  
 B. 2本鎖DNA溶液に150 mM(終濃度)の酢酸ナトリウムを添加したときの波形図。ピークが分離できているものの、蛍光シグナル強度がAよりも低い。  
 C. 蛍光シグナル強度とサンプル塩濃度の関係。データは2回の泳動で得られた44個のピーク強度の平均値。エラーバーは標準偏差を示す。蛍光シグナル強度はGeneMarker v3.0.1(SoftGenetics)で算出されるピーク高さを示す。100-200 bpに相当する波形データの部分のみを示している。

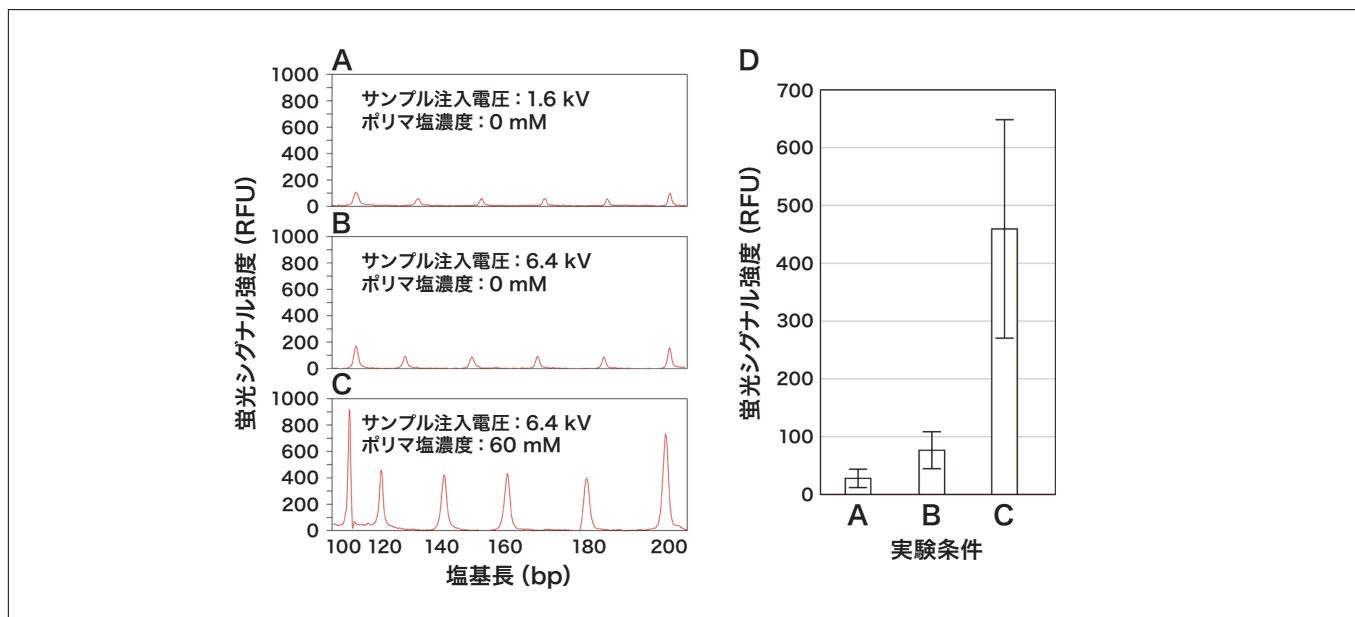


図2 塩を含むサンプルの注入効率  
 A-C. 150 mM(終濃度)の酢酸ナトリウムを添加した2本鎖DNA溶液を解析したときの波形図。サンプル注入電圧とポリマ塩濃度は各パネルに記載した。蛍光シグナル強度はGeneMarker v3.0.1(SoftGenetics)で算出されるピーク高さを示す。100-200 bpに相当する波形データの部分のみを示している。  
 D. 各条件における信号強度について、4回の泳動で得られた88個のピークの平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。実験条件はパネルA-Cに記載されたサンプル注入電圧とポリマ塩濃度に対応する。

### 2-3. BphS タンパク質を用いたゲルシフトアッセイ

BphSタンパク質は、DNA 配列特異的に結合する転写抑制因子である。BphSタンパク質と特定の DNA 配列 (*pE*プロモータ)の相互作用は詳細に検討されているため、優れたモデルシステムとなる(参考文献3)。図3に記載の条件で電気泳動を行ったところ、BphSタンパク質の濃度増加に伴って、2つのシフトピークが観察された。また、シフトピークは BphS 濃度が 45 nM 以上のときに確認された。これらの結果はいずれも参考文献3の報告と一致した。以上から、DS3000を用いて BphSタンパク質と *pE*プロモータの結合を測定できることが示された。

## 3. おわりに

本報告により、DS3000を用いてゲルシフトアッセイが可能であることが示された。ゲルシフトアッセイを DS3000で実施することには次のような利点がある。

- (1) 電気泳動媒体(ゲルやポリマ)の調製が簡単になる。DS3000では、カートリッジに収められた電気泳動媒体を所定の位置にはめ込むだけでよい。有害なアクリルアミドに接触する危険がなく、ゲルを硬化させる必要もない。
- (2) 泳動時間を管理しなくてよい。電気泳動中に検出された蛍光シグナルは全て記録される。ゲル電気泳動のように、目的のシグナルを流しきって失う恐れがない。
- (3) サンプル調製以降の作業を自動化できる。一旦サンプルをセットすれば、あとは結果を待つだけでよい。

## 4. 実験

ポリマには POP Conformational Analysis Polymer (濃度9%, Thermo Fisher Scientific, 4340379)を購入し、ポリマ濃度が6%になるように、水と 310 and 31xx Running Buffer, 10× (Thermo Fisher Scientific, 402824)を添加して使用した (Running Buffer は終濃度1×)。電気泳動バッファには 310 and 31xx Running Buffer (終濃度1×)を使用した。ゲルシフトアッセイに使用した DNA (*pE*プロモータ)と BphSタンパク質は、参考文献3に従って調製した。DNA-タンパク質複合体は 0.1× PBS 中で 0.1 nM の DNA と図3に示す濃度の BphSタンパク質で形成させた。サイズスタンダードには ILS600 (Promega®, DG1071)を使用した。電気泳動は印加電圧13 kV, オープン温度40°Cで実施した。サンプル注入条件は図中に示した。図1, 2のピーク波形図は GeneMarker v3.0.1 (SoftGenetics)で得られる各フレームの数値データを元に描画した。蛍光シグナル強度は GeneMarker v3.0.1 (SoftGenetics)で算出されるピーク高さとした。図3A, Bの電気泳動図は TraceViwerForMolecularBiology (参考文献4)で描画した。

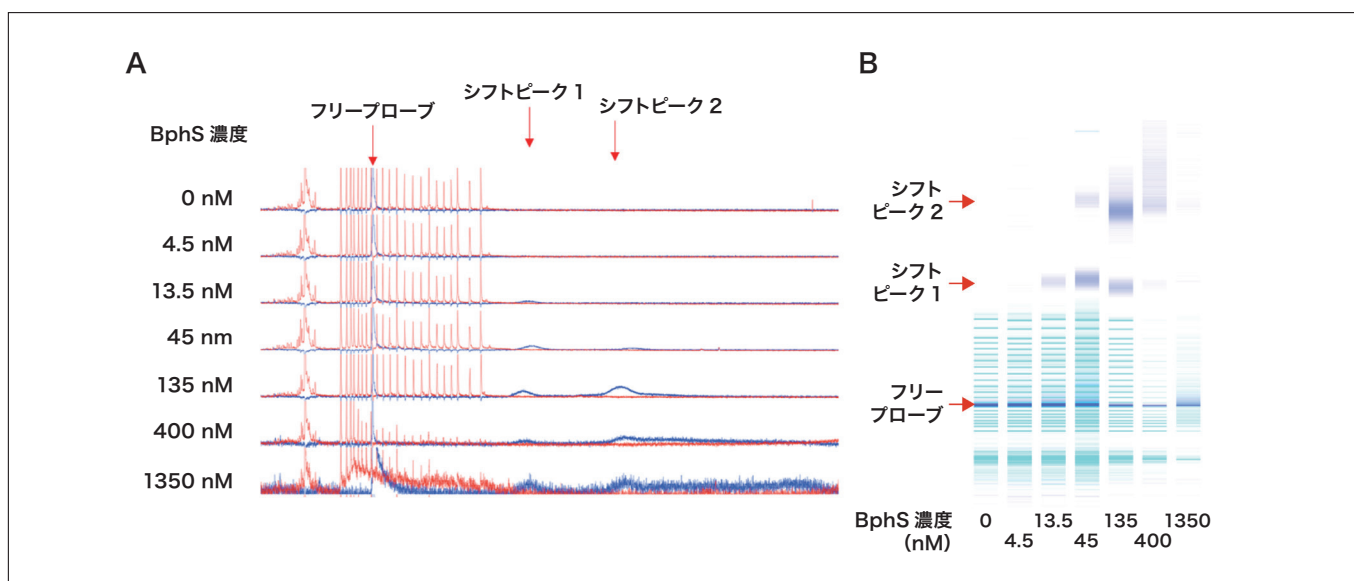


図3 BphSとDNA(*pE*プロモータ)の相互作用の解析

- A. BphSタンパク質と *pE*プロモータの混合溶液を電気泳動して得られたピーク波形図。赤のピークがサイズスタンダードのシグナル、青のピークが *pE*プロモータのシグナルを示す。
- B. Aのゲルイメージ図(gel-like image)。水色のピークがサイズスタンダードのシグナル、青のピークが *pE*プロモータのシグナルを示す。2つのシフトピークが BphS濃度 45 nM以上で確認できる。フリープローブは、BphSに結合していない *pE*プロモータのシグナル、シフトピークは BphSに結合した *pE*プロモータのシグナルである。BphSタンパク質の濃度増加に伴ってサイズスタンダードの減弱が見られる。これはタンパク質溶液中からの塩の持ち込みによるものと考えられる。サンプル注入は印加電圧9.6 kV, 注入時間9秒で実施した。



## 参考文献

- 1) ゲノム微生物学会ニュースレター No. 25  
[https://www.sgmj.org/pdf/newsletter/sgmj\\_no25.pdf](https://www.sgmj.org/pdf/newsletter/sgmj_no25.pdf)
- 2) DS3000 Compact CE Sequencer におけるサンプル注入条件と泳動性能の検証  
[https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/ASI\\_ContentDistribution?viewLanguage=ja&id=a102x000001zOc1AAE&fileId=05D2x0000004wDMEAY](https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/ASI_ContentDistribution?viewLanguage=ja&id=a102x000001zOc1AAE&fileId=05D2x0000004wDMEAY)  
閲覧には登録（無料）が必要です。  
ご登録はこちらからお願いします。  
[https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/ASI\\_TopPage?viewLanguage=ja](https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/ASI_TopPage?viewLanguage=ja)
- 3) Ohtsubo Y., Delawary M., Kimbara K. *et al.*, BphS, a Key Transcriptional Regulator of *bph* Genes Involved in Polychlorinated Biphenyl/Biphenyl Degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102, *J. Biol. Chem.*, **276** (39), 36146-36154 (2001).
- 4) Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M., Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, *Scientific Reports*, **7**, 41769 (2017).

本報告で用いられているゲルシフトアッセイは、DS3000の標準の使用方法とは異なる方法で実施しております。方法の詳細をご希望の方は別途ご連絡をお願い致します。

# 多次元HPLCを用いる宇宙試料中のキラルアミノ酸分析

Analysis of Chiral Amino Acids in Extraterrestrial Samples Using Multi-dimensional HPLC



九州大学大学院 薬学研究院  
創薬育薬産学官連携分野  
教授

浜瀬 健司 博士(薬学)

## 1. はじめに —宇宙試料とアミノ酸—

アミノ酸は生命を形作る基本分子の1つであり、グリシンなど特殊なものを除いて $\alpha$ 位の炭素に不斉中心を有している。この不斉中心に起因し、アミノ酸にはD型とL型の鏡像異性体が存在する。アミノ酸は、原始地球上で化学反応により合成されたと考えられてきたが、このような化学反応において鏡像異性体はD型とL型が50/50のラセミ体として生成する。一方で現在の地球上では生命体のアミノ酸は大きくL型に偏っており(ホモキラリティと呼ばれる)、このようなホモキラリティが生じた原因は未だに不明である。宇宙試料においては、1969年にオーストラリアのマーチソン村に落下したマーチソン隕石から多数のアミノ酸が発見され、地球上のアミノ酸が宇宙空間からも供給された可能性が示された。また隕石中にはL型の割合が多いアミノ酸も存在すると報告されたことから、ホモキラリティが宇宙起源であるという仮説も提唱され、宇宙試料における正確なキラルアミノ酸分析が強く期待されていた。一方、地球上で採取できる宇宙試料では地球上のアミノ酸による汚染が懸念され、宇宙空間で試料を採取して地球に持ち帰るサンプルリターンミッションが計画・遂行されている。しかし、このような宇宙試料は試料量が限られることに加えてラジカル反応に起因する多種多様な有機化合物が共存しており、キラルアミノ酸定量には高い感度と選択性を有する分析法の開発・利用が必須である。本稿では様々な宇宙試料における正確なキラルアミノ酸分析を可能とする多次元HPLC法と、これを用いる隕石・小惑星試料の分析結果を紹介する。

## 2. 多次元HPLC分析法

宇宙試料中のキラルアミノ酸分析に際して分析対象は脂肪族アミノ酸とし、タンパク質構成アミノ酸ではアラニン(Ala)およびバリン(Val)を選択した。非タンパク質構成アミノ酸では2-アミノ酪酸(2AB)、ノルバリン(Nva)、イソバリン(Iva)を選択した(図1)。これらのアミノ酸はホウ酸塩緩衝液(pH 8.0)の存在下で4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-F)を加えて60°Cで2分間加熱し、蛍光誘導体化を行った。ここにトリフルオロ酢酸(TFA)水溶液を加えて反応を停止させ、多次元HPLCで分析した。分析装置は、逆相、陰イオン交換、光学分割の3種の分離カラムを搭載した三次元HPLCとし、各次元における検出は蛍光(励起波長470 nm, 蛍光発光波長530 nm)で行った。三次元HPLC装置の流路図を図2に示す。一次元目の逆相カラムにおいては、測定対象アミノ酸が他のアミノ酸や内在性成分と疎水性の差によって分離される。分離された当該アミノ酸画分のみをD体とL体の混合物としてオンラインで分取し、全量を二次元目に導入する。二次元目の陰イオン交換カラムでは、一次元目で目的アミノ酸と共溶出した成分が静電相互作用によって分離され、当該アミノ酸画分のみを再度D体とL体の混合物としてオンラインで分取し、全量を三次元目に導入する。三次元目では光学分割カラムによってD体とL体を分離し、それぞれの定量を行う。一次元目の逆相カラムとしては微粒子充填型のSingularity RP18カラム(1.0 mm ID x 250 mm)を使用し、移動相は0.025% TFAを含む5-25%アセトニトリル水溶液をグラジエントで送液した。二次元目にはSingularity AXカラム(1.0 mm ID x 150 mm)を使用し、0.03または0.06%ギ酸を含むメタノールとアセトニトリルの混液(50/50, v/v)を移動相として送液した。三次元目にはSingularity CSP-001Sカラム(1.5 mm ID x 500 mm)を使用し、Ala, Val, 2AB, Nvaの光学分割には0.2%ギ酸を含むメタノールとアセトニトリルの混液(50/50, v/v)を、Ivaの光学分割には0.1%ギ酸を含むメタノールとアセトニトリルの混液(90/10, v/v)を使用した。これらのSingularityカラムはいずれもKAGAMI株式会社(Osaka, Japan)と共同で開発した。本三次元HPLCシステムについて標品アミノ酸を用いてバリデーションした結果、検量線はいずれのキラルアミノ酸もインジェクト量あたり5 fmolから5 pmolの範囲で相関係数0.9993以上の良好な直線関係が認められ、精度はRSD値で1.33-8.77%で

あった。また隕石試料における精度は RSD 値で 3.21–7.84%，真度は 96.6–106.8% であり，本三次元 HPLC 法を用いて宇宙試料中のキラルアミノ酸を良好に定量可能であることが示された。

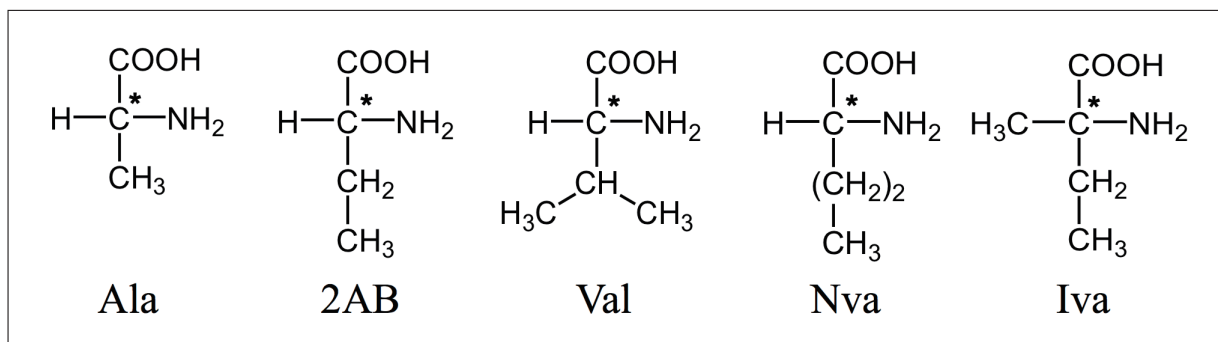


図1 分析対象アミノ酸の構造

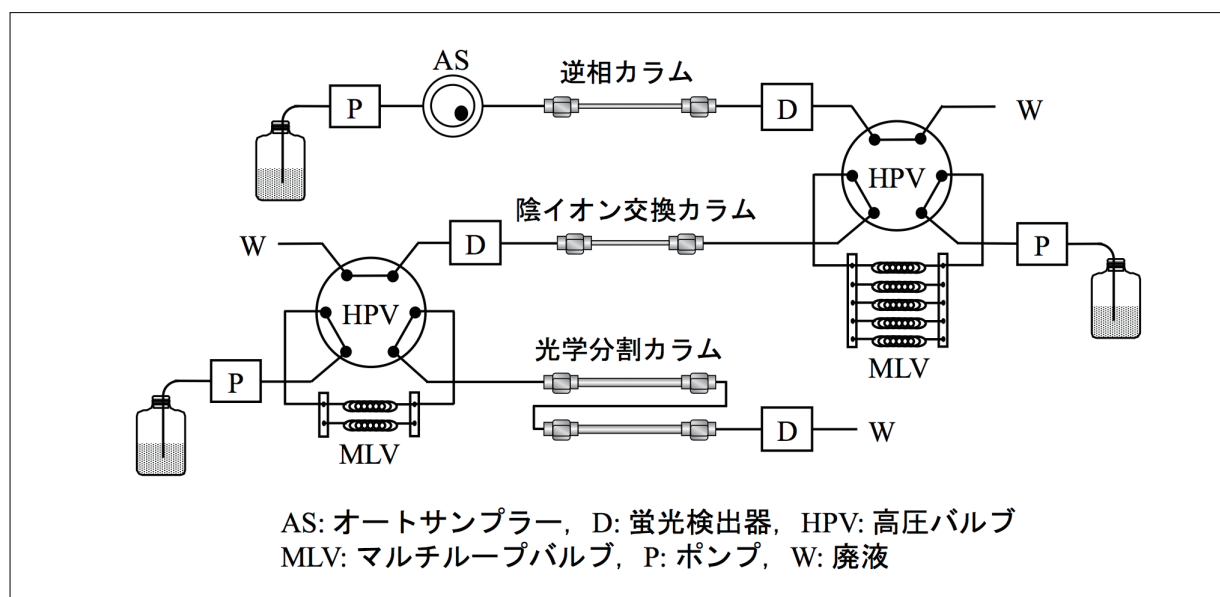


図2 三次元HPLCの流路図

### 3. 隕石・小惑星試料中のキラルアミノ酸分析

隕石などの宇宙試料中の有機物は，熱水で20時間抽出した後，6 M の塩酸で 105°C，20時間加水分解を行い減圧乾燥した。これを水に再溶解して水酸化ナトリウム水溶液で中和し，ホウ酸塩緩衝液，NBD-F を加えて蛍光誘導体化を行った。TFA 水溶液を加えて反応を停止した後，三次元 HPLC で分析した。地球上のアミノ酸による汚染を防止するため，ガラス器具などは全て 500°C で4時間加熱して使用した。図3は南極で採取された「やまと隕石 (Yamato 002540)」の分析結果である。一次元目の逆相分離では分析対象アミノ酸に加えて，様々なピークが認められる。ここから下線で示した画分をオンラインで分取し，二次元目に導入する。二次元目の陰イオン交換カラムでの分離においても，分析対象アミノ酸以外に様々なピークが存在する。ピークに下線で示した画分をさらにオンライン分取し，三次元目に導入する。その結果，三次元目の光学分割においては分析対象の鏡像異性体が共存成分による妨害を受けることなく検出されており，その鏡像異性体比はほぼ 50/50 であった。図4は，はやぶさ2が採取した「小惑星リュウグウ」試料について，三次元目の分析結果を示している。リュウグウ試料においても分析対象アミノ酸5種が良好に認められている。鏡像異性体比については Ala の D 体と L 体がほぼ 50/50 であったのに対し，Val については L 体が過剰に存在した。Ala と Val についてはタンパク質構成アミノ酸であり，地球上のアミノ酸による汚染を受け，宇宙試料中での含量が少ない Val は汚染の影響が無視できないためだと考えられる。一方で非タンパク質構成アミノ酸である 2AB，Nva，Iva については D 体と L 体がほぼ 50/50 のラセミ体として存在していた。非タンパク質構成アミノ酸は地球上には殆ど存在しないため，これらのアミノ酸の分析結果は宇宙空間におけるアミノ酸の鏡像異性体比を正確に示していると考えられる。



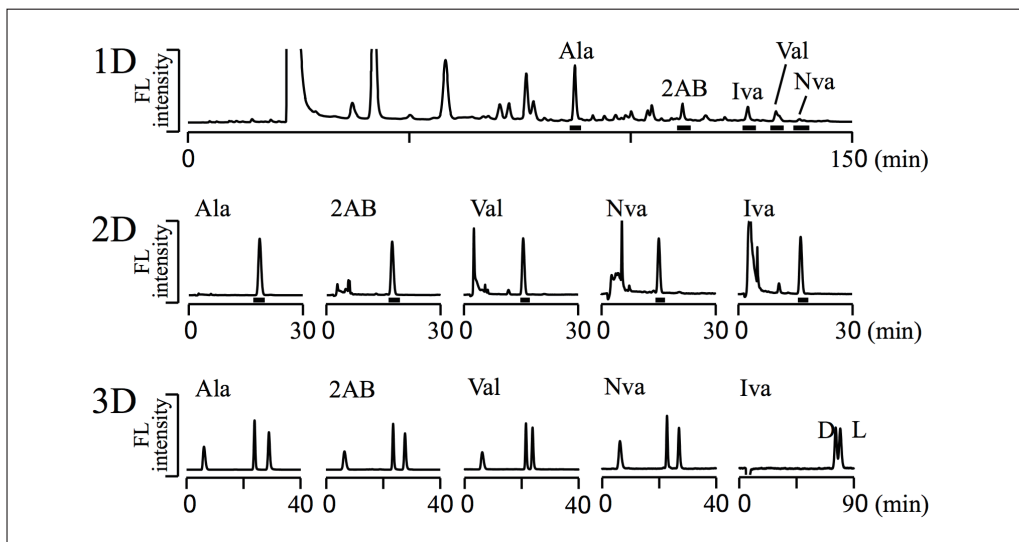


図3 やまと隕石(Yamato 002540)の測定結果

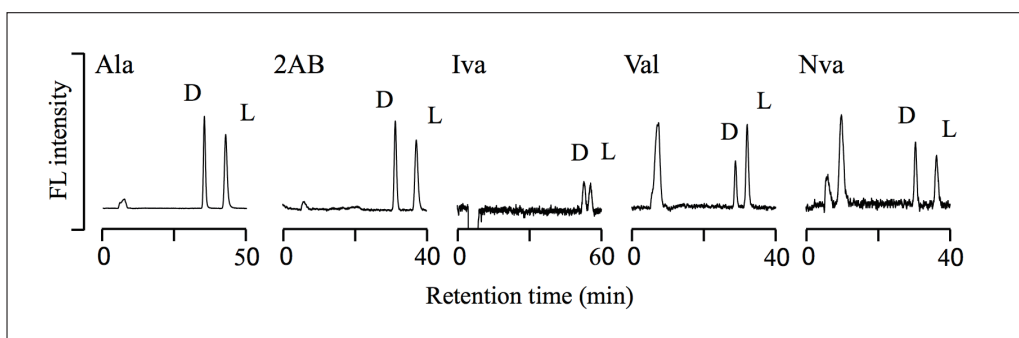


図4 小惑星リュウグウ試料の分析結果

## 4. おわりに

本稿では宇宙試料におけるキラルアミノ酸を正確に測定可能とする、三次元 HPLC 分析法について紹介すると共に、本法を用いた隕石試料(やまと隕石)、小惑星試料(リュウグウ)の分析結果について紹介した。多次元 HPLC 分析法は複数の分離モードを組み合わせることで極めて高い選択性を有しており、宇宙試料のような複雑な実試料分析に有用である。今回のやまと隕石並びにリュウグウ試料の分析結果は、宇宙空間にアミノ酸が存在することを明確に示している。また、宇宙空間におけるアミノ酸鏡像異性体は D 体と L 体がほぼ 50/50 のラセミ体であることも示しており、地球上におけるホモキラリテの起源解明には今後の更なる研究が期待される。

### 参考文献

C. Ishii, A. Furusho, C.-L. Hsieh, K. Hamase, Multi-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of chiral amino acids and related compounds in real world samples, *Chromatography*, **41**, 1-17 (2020).

C. Ishii, K. Hamase, Two-dimensional LC-MS/MS and three-dimensional LC analysis of chiral amino acids and related compounds in real-world matrices, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **235**, 115627 (2023).

A. Furusho, T. Akita, M. Mita, H. Naraoka, K. Hamase, Three-dimensional high-performance liquid chromatographic analysis of chiral amino acids in carbonaceous chondrites, *Journal of Chromatography A*, **1625**, 461255 (2020).

H. Naraoka, K. Hamase, A. Furusho *et al.*, Soluble organic molecules in samples of the carbonaceous asteroid (162173) Ryugu, *Science*, **379**, eabn9033 (2023).

## 株式会社 日立ハイテク

本社(サポートセンター) 東京 (03)3504-7211 中部支店 名古屋 (080)8420-6408  
北海道支店 札幌 (080)8021-5427 関西支店 大阪 (080)8020-3544  
東北支店 仙台 (080)8438-0969 九州支店 福岡 (080)9564-0285

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ー 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 2023 VOL. 66 No. 2

発行日 2023年9月30日 発行 株式会社日立ハイテク  
編集人 許斐麻美 〒105-6409  
発行人 五十嵐真人 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー  
電話 (03) 3504-7211

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