

HITACHI

SCIENTIFIC
INSTRUMENT
NEWS

APRIL
2025

Vol. 68 No. 1

5951

«コラム

電子顕微鏡とデータ科学が拓くこれからの物質材料研究
木本 浩司

5953

**卓上低真空走査電顕は新たな医学研究・臨床診断のステージへ
～光顕パラフィン切片を電顕標本に進化させる電子染色法の開発～**
澤口 朗

5960

日本産ジュゴンの生息状況の解明
小澤 宏之

5967

新たな液中観察手法 Vitro検出器の原理と観察事例
吉原 真衣, 中村 光宏

5971

卓上顕微鏡 TM4000PlusIIIのご紹介
後藤 健

5975

蛍光X線分析のリサイクル材料への活用
山田 充子

5978

**SEMとの出会い、「現象の可視化」がすべての軸
～TOTOの製品開発を支えてきた分析のスペシャリスト～**
青島 利裕

5985

骨軟部腫瘍の遺伝子異常を解析し、正確な診断と正しい治療の確立をめざす
岩崎 健

電子顕微鏡とデータ科学が拓く これからの物質材料研究



物質・材料研究機構 マテリアル基盤研究センター

センター長

木本 浩司 博士(理学)

1. 物質材料研究と電子顕微鏡

物質材料中の微細構造が巨視的な物性や性能を決定する例は数えきれないほどある。電子顕微鏡は多様な微細構造解析手法¹⁾を提供し、物質材料研究に大いに貢献してきた。例えば構造材料の機械的特性が超高压電子顕微鏡などによる結晶欠陥のその場観察などにより解明され、半導体素子の微細化は集束イオンビームとマイクロサンプリングによる局所断面観察により評価され、測長用走査電子顕微鏡は重要な半導体検査装置となり、超電導材料等における量子力学的現象は電子線ホログラフィーにより可視化され、たんぱく質等の生体分子はクライオ電子顕微鏡法(2017年ノーベル化学賞)により構造と機能が明らかにされ、リチウム二次電池関連材料の評価のため嫌気性試料の雰囲気制御搬送システムも普及してきた。これまでの電子顕微鏡の開発経緯を見れば、材料開発のニーズが計測手法の進歩を促し、先端的な計測手法が材料研究開発を推進していると言える。上にあげた中でも、超高压電子顕微鏡・集束イオンビーム・マイクロサンプリング・測長用走査電子顕微鏡・電界放出型電子銃・電子線ホログラフィーなどでは、日立製作所・日立ハイテクの寄与が国際的にも極めて大きい。

電子顕微鏡は物理的に小さな物を見る装置であるが、概念的に大きな物が観察結果から見えてくることがある。予想していなかった超微細構造や原子配列を目の当たりにすることで、物質科学や材料工学などにおいてより本質的なものが見えてくることがある。予想外に見出した物質・構造・現象は、論文として発表する場合には、「それを目指して研究開発に成功」「新しい概念を提案」などとなる。自分に都合良く解釈しているように思えるが、これこそセレンディピティの本質であり、材料イノベーションの典型的な一例とも言える。

2. 電子顕微鏡データの大容量化とデータ科学

1990年代初頭まで電子顕微鏡画像は写真フィルムに露光し、例えば20枚ごとに暗室で現像していた。その後、画像検出器、電子銃、球面収差補正装置、電子分光器、モノクロメーター、X線検出器、その場観察ホルダー等々で技術開発が進み、装置の自動化が進むとともに、取得データが大容量化・マルチモーダル化した。計測データを構造化して保存活用する試み(例えばRDE²⁾)も進んでいる。研究者は、データ取得条件をプログラムし、得られた大容量のデータから、意味のある情報を抽出する必要がある。実験・解析・解釈のすべての場面において、ソフトウェア・データ科学が求められていると言える。ハードウェアや生データを尊ぶ姿勢は私自身も受けた教育だが、データ科学や数値解析の裏付けが無いことの言い訳としては——自戒を込めた私見であるが——今日通用しない。

研究者にとって電子顕微鏡などの先端計測機器は、研究開発のためのプラットフォームでもある。計測機器メーカーが、装置と共にオープンなソフトウェア開発環境をユーザーに提供することで、世界中の高い志を有する研究者やベンチャー企業が、将来素晴らしい計測解析手法を開発してくれると思う。

3. 研究者リテラシーとして求められるデータ科学

私が学生時代所属した研究室では、技官の方が装置開発をしていた。学部では図面を描く講習を受け、私の落第レベルの図面でも超真空部品を作り上げる工作室組織もあった。サイエンスとエンジニアリングが融合し、先端研究が成立していた。大小さまざまなアイデアをすぐに検証することで、研究開発を加速できる。試料作製や観察だけでなく、装置やその制御あるいは解析ソフトウェアについても、アイデアを早期に実装して検証できる研究組織が、今後生き残っていくと思う。

電子顕微鏡とデータ科学との融合の一例として小職の研究を紹介したい。走査透過電子顕微鏡で入射プローブを走査しながら回折図形を取得する手法(4D-STEM)が近年用いられている³⁾。我々は多数の回折図形を非負値行列因子分解(次元削減する機械学習の一つ)で解析した⁴⁾。実験で得られた回折図形群を再現できる少数の回折図形を次元削減で求ることで、例えば金属ガラス中に析出したナノ結晶を検出し、結晶構造と平均粒径を推定できる⁵⁾。その研究開始当初は所内の共同研究者にプログラムコードを書いてもらっていた。企業に外注することと比べれば、コストは低く時間は速い。しかし試してみたいアイデアが増え、またその試みの多くが失敗に帰するうちに頼むのが申し訳なくなり、自分でコードを書きはじめた。アイデアを実装・検証して次の発想につなげる Plan-Do-Check の研究サイクル速度は大きく改善された。自分でコードを書くことで、既存の機械学習ライブラリ(例えば Scikit-learn)に関する理解も深まり、現在は電子顕微鏡学上の拘束条件を追加する研究を進めている。それらのプログラムコードは GitHub 等のアーカイブサービスにてオープンにし、他の研究者の糧とされるべきであろう。機械学習の分野では我々のような異分野の者が持つ知識を domain-knowledge と呼ぶが、その知識を機械学習に組み込んでゆく研究開発は、今後様々な分野で進んでいくと思われる。

ちなみに非負値行列因子分解は 1999 年の Nature 論文⁶⁾から研究が加速しており、還暦の私にとっては比較的最近の事に思える。他方、その基本となる線形代数は 40 年前に学んだはずの大学教養科目であるが現在復習中である。10 年ほど前、「関連論文が多すぎて追いかけていられない」とぼやいたところ、尊敬する先生から「一生勉強だよ」と言われ、「天才が一生勉強しているなら自分は死んでも勉強だ」と反省した。また信頼できる同僚からは「最近の研究者は勉強しなすぎです」と言われたこともある。研究者が勉強をおろそかにしているようでは、研究成果の創出も持続可能ではないだろう。現在私は、先端計測研究者とマテリアルズインフォマティックス研究者が集まったセンターに所属しているが^{7,8)}、計測研究者も分野横断的なリテラシーとしてデータ科学を身に付ける必要性を強く感じている。

4. おわりに

2024 年のノーベル物理学賞と化学賞は、いずれも人工知能(AI)に関連するものとなった。物質材料研究や計測研究においても、どのように AI を取り入れるかが鍵である。先端的な計測手法では今後も多次元大容量の計測データが創出されていくことから、機械学習との連携は一過性のブームではなく、より深化が進むと思われる。電子顕微鏡は先端的な科学計測機器として重要な位置を占めているが、正しい結果を得るために精密な調整が必要で、AI との融合は今後さらに進むと期待される。エルнст・ルスカ(1986 年ノーベル賞)が 1931 年に電子顕微鏡を発明して以降、現在もさまざまな技術革新が進んでいる。その先端電子顕微鏡法とデータ科学が融合し、オープンな研究開発環境で異分野が融合することで、予期せぬ発見が新たな材料革新につながっていくことが期待される。

参考文献

- 1) 木本浩司, 三石和貴, 原徹, 三留正則, 長井拓郎, 物質・材料研究のための透過電子顕微鏡, 講談社, 2020 年 (ISBN 978-4065203866).
- 2) Research Data Express (RDE), <https://dice.nims.go.jp/services/RDE/>
- 3) K. Kimoto and K. Ishizuka, Spatially resolved diffractometry with atomic-column resolution, *Ultramicroscopy*, **111**, 1111-1116 (2011).
- 4) F. Uesugi, S. Koshiya, J. Kikkawa, T. Nagai, K. Mitsuishi, K. Kimoto, Non-negative matrix factorization for mining big data obtained using four-dimensional scanning transmission electron microscopy, *Ultramicroscopy*, **221**, 113168 (2021).
- 5) K. Kimoto, J. Kikkawa, K. Harano, O. Cretu, Y. Shibasaki, F. Uesugi, Unsupervised machine learning combined with 4D scanning transmission electron microscopy for bimodal nanostructural analysis, *Scientific Reports*, **14**, 2901 (2024).
- 6) D.D. Lee and H.S. Seung, Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization, *Nature*, **401**, 788-791 (1999).
- 7) 著者情報 https://samurai.nims.go.jp/profiles/kimoto_koji
- 8) 研究グループ情報 <https://www.nims.go.jp/AEMG/index-j.html>

卓上低真空走査電顕は新たな医学研究・臨床診断のステージへ ～光顕パラフィン切片を電顕標本に進化させる電子染色法の開発～

Uranium-free Metal Staining Allows Application of Compact Low-vacuum SEM to Medical Research and Clinical Diagnosis



宮崎大学医学部解剖学講座
超微形態科学分野
教授
宮崎大学フロンティア科学実験総合センター
バイオイメージングラボ
主任
澤口 朗 博士(医学)

1. はじめに

生命を営む心臓や腎臓、肝臓をはじめとする各臓器は、それぞれに特有の生理機能を果たす細胞や結合組織が織りなす精緻な立体構造を有しており、これが破綻すると生理機能が損なわれ、正常な生態は異常な病態に転じて様々な症状をもたらす。その因果を形態変化に求める病理組織診断は光学顕微鏡が主体をなすが、微細な形態変化の追究には電子顕微鏡が必要とされながら、煩雑で長時間をする試料作製法と、規制が厳しいウラン化合物を要する電子染色法によって阻まれていた。また、再生臓器の開発研究では立体構造の再現が喫緊の課題とされており、培養細胞の微細構造や器官内部の立体構造を高精細に捉える簡便で迅速な電顕試料作製と、再生臓器の品質評価スクリーニングにも利用できる顕微技術が待望されていた。

これらの問題を解決すべく、長年の課題であったウラン化合物を必要としない新たな電子染色法の開発に取り組んだ結果、器官を構築する細胞や組織の微細形態を簡便かつ迅速に、電子顕微鏡レベルで高精細に捉えるプロトコールの確立に成功した。本稿では、病理組織診断や再生臓器の形態品質評価など幅広い医学研究・臨床応用も視野に、卓上低真空走査型電子顕微鏡が向かう新たなステージをご紹介したい。

2. 便利なスライドガラス専用ホルダーと帶電を軽減する低真空モード

卓上走査型電子顕微鏡 TM4000PlusII は、その名の通り事務用デスクに設置できるコンパクトサイズで、パラフィン切片を載せた光顕用スライドガラス専用のホルダーを装着することができる(図1)。この専用ホルダーはスライドガラスの着脱が容易であり、厚さ5～30 μm のパラフィン切片であれば面倒な高さ合わせも不要である。また、撮影した画像ファイルには撮影された位置情報が付随して保存されるが、専用ホルダーを使用すると毎回、定位置に据えて観察できるため、一度、ホルダーから外したスライドガラスでも、後日、保存された位置情報を呼び起して、撮影された定点に自動で位置合わせができる。



図1 (左)卓上走査型電子顕微鏡：TM4000Plus IIの外観。(右)スライドガラスの着脱が容易で、高さ合わせを必要としない便利なスライドガラス専用ホルダー。

低真空走査型電子顕微鏡は30～50 Paの低い真空度で稼働でき、入射電子によって非導電性のパラフィン切片やスライドガラスに蓄積するマイナス電荷が、低い真空度で残留するガスから生じるプラス電荷のイオンによって中和されるため、観察を阻害する帯電が軽減される特性を有する(図2)。

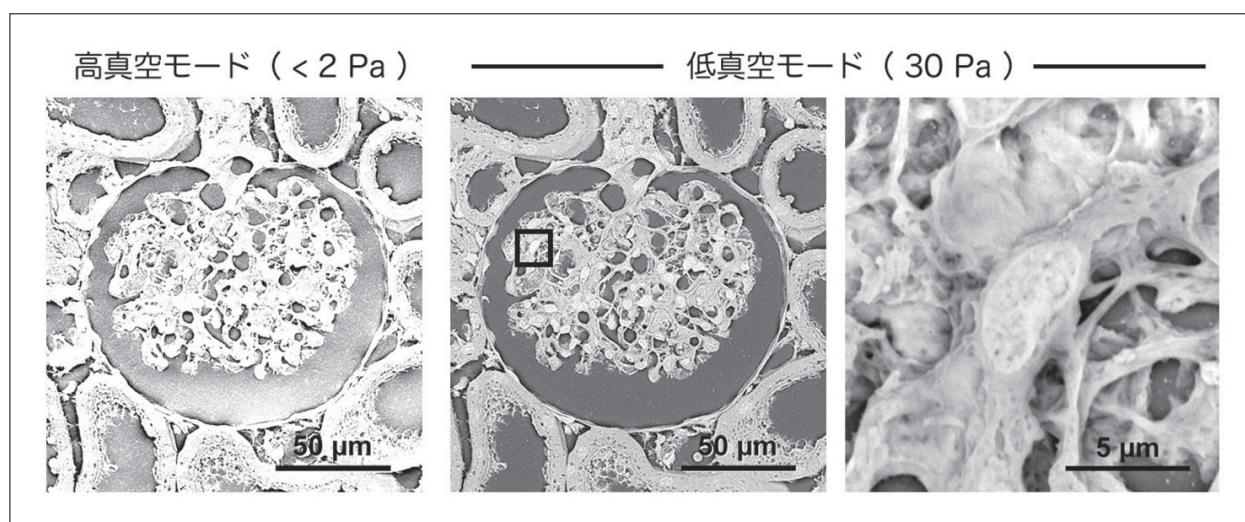


図2 高真空モードと低真空モードの比較画像。ラット腎小体。(左)高真空モード(<2 Pa)。帯電が著しく、解析不可。(中央・右)低真空モード(30 Pa)。帯電が大幅に軽減され、中央写真的四角で囲まれた部分を高倍率(右)で解析が可能。

3. 光顕パラフィン切片を電顕標本に進化させる電子染色法の開発

従来の電子染色法は1958年にワトソンが開発した酢酸ウラニウム—鉛染色法^{1,2)}であるが、ウラン化合物は規制が厳しく、購入から保管、使用から廃液まで、その取り扱いは困難を極めるため、ウラン化合物を必要としない新たな電子染色法が待望されて久しい。開発に成功した「過マンガン酸カリウム—鉛染色法³⁾は、光顕用パラフィン切片を0.2%過マンガン酸カリウム水溶液で5分間処理し、水洗した後、レイノルド鉛染色液で3分間処理、水洗・乾燥後に観察可能な簡便かつ迅速なプロトコールである(図3)。従来法との違いは2%酢酸ウラニウムを0.2%過マンガン酸カリウムに換えたのみで、所要時間は変わらず約10分間で電子染色が完了する。

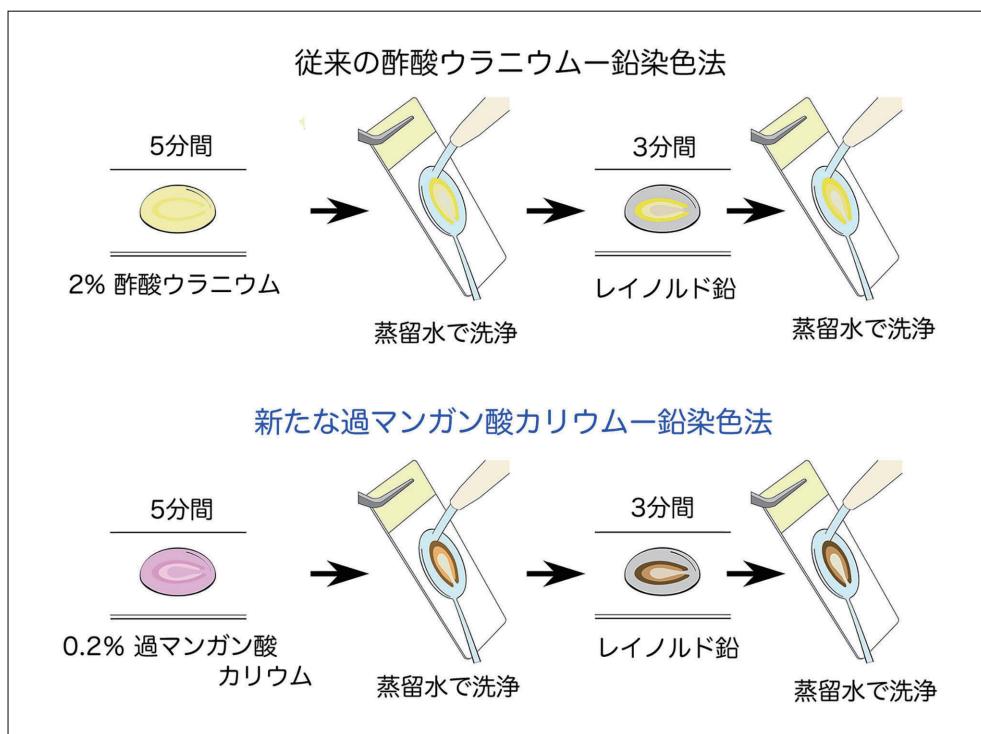


図3 従来の酢酸ウラニウム一鉛染色法(上段)と新たに開発した過マンガン酸カリウム一鉛染色法(下段)。

新たな「過マンガン酸カリウム一鉛染色法」は、従来の酢酸ウラニウム一鉛染色法と同等にコントラストの高い染色結果をもたらし、光顕用に作製された試料を電顕試料に進化させる過マンガン酸カリウム一鉛染色法の魅力と低真空走査型電子顕微鏡の威力は誰の目にも明らかであろう。元素分析で検証した結果、過マンガン酸カリウム特有の酸化作用によって鉛の沈着が向上し、細胞や組織の微細構造を可視化するに十分な反射電子が得られることが確認された³⁾。

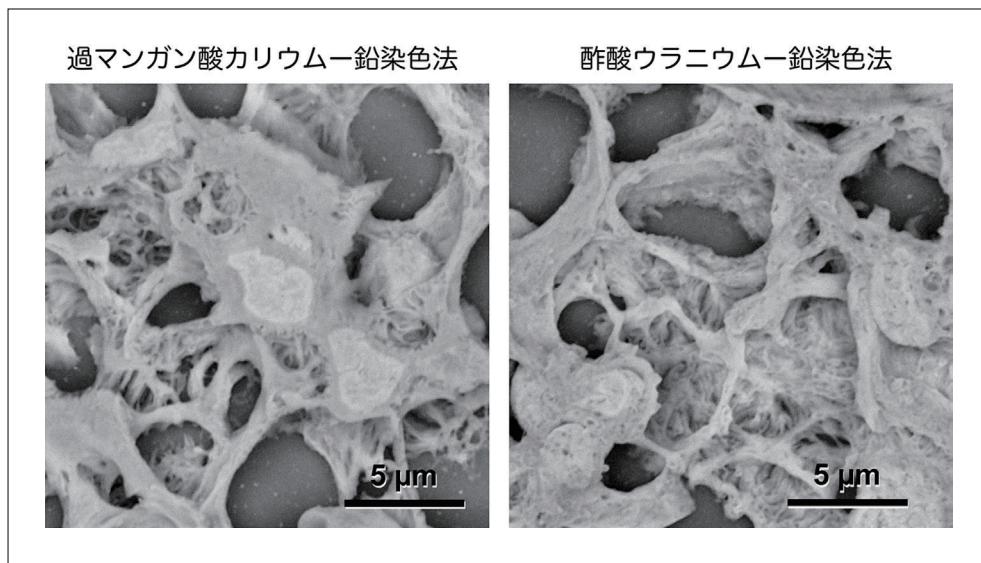


図4 ラット腎糸球体。新たな過マンガン酸カリウム一鉛染色法(左)と従来の酢酸ウラニウム一鉛染色法(右)の比較画像。光顕用に作製された試料を電顕試料に進化させる過マンガン酸カリウム一鉛染色法の魅力と低真空走査型電子顕微鏡の威力に注目。固定液=2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド混合液。切片厚=5 μm。

パラフィン切片の観察は反射電子モードを基本とするが、加速電圧の高低によって得られる画像情報が異なるため、観察目的に応じた加速電圧の使い分けが必要となる。加速電圧を5～20 kVの4段階に分けて撮影した図5に示される通り、加速電圧が低いとコントラストは低下するが細胞表面の形態が明瞭に、加速電圧が高いとコントラストは上昇するが細胞表面の形態が不明瞭になることに注意されたい。これまでの経験に基づき、全体像を明瞭に映し出すことを目的とする500倍未満の低倍率は15～20 kV、細胞表面の微細な形態を映し出すことを目的とする500倍以上の高倍率は5～10 kVに使い分けた観察を推奨したい。

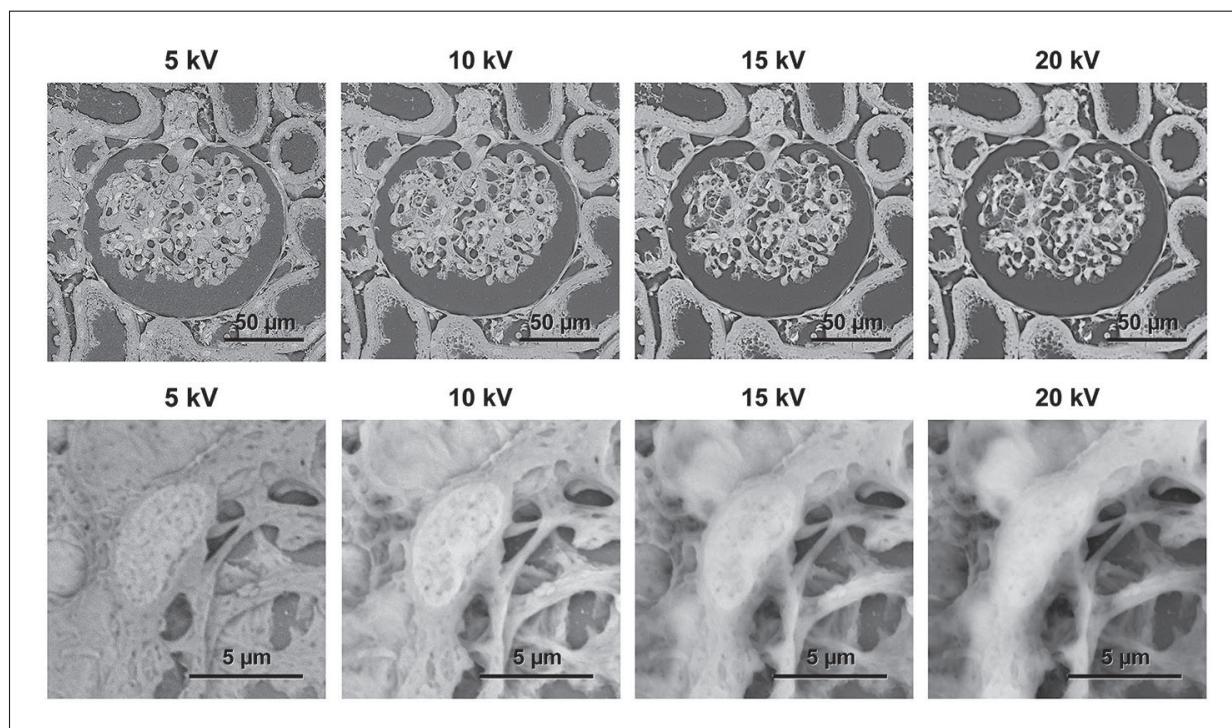


図5 加速電圧によって異なる画像情報を比較。加速電圧が低いとコントラストは低下するが細胞表面の形態が明瞭に、加速電圧が高いとコントラストは上昇するが細胞表面の形態が不明瞭になることに注意。500倍未満の低倍率は15~20 kV、細胞表面を映し出す500倍以上の高倍率は5~10 kVで観察することを推奨。

4. 厚切りパラフィン切片観察法で細胞・組織が織りなす立体構造を明らかに

通常、光顕用パラフィン切片の厚さは光で透見しやすく、細胞核などが重なり合わない5 μm前後に薄切される。一方、切片表面をスキャンして得られた反射電子を利用する低真空走査型電子顕微鏡の特性を活かして、厚さ15~30 μmに薄切する「厚切りパラフィン切片観察法」を先行研究で確立した²⁾。厚切り切片は奥行きが深まり、細胞が織りなす組織の立体構造が明瞭に映し出される利点があり、過マンガン酸カリウム-鉛染色法で観察したラット腎糸球体、腎尿細管、細気管支線毛上皮の例を図6に示す。いずれも光顕レベルでは捉え難い、微細な線毛などが卓上走査型電子顕微鏡によって立体的に捕捉されていることを確認されたい。

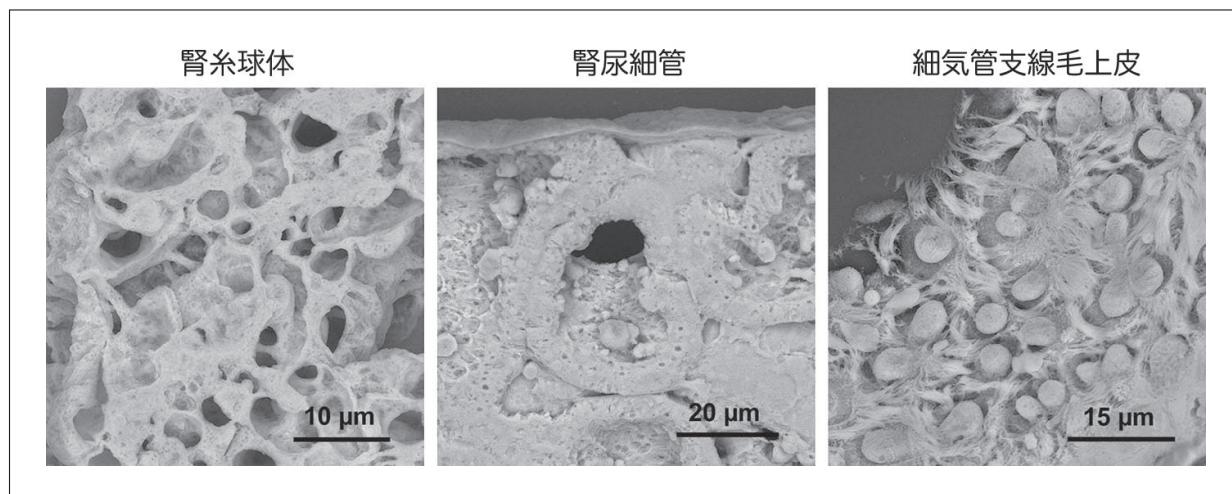


図6 厚切りパラフィン切片観察法。通常の5 μmより厚い20 μmに薄切することで奥行きが深まり、細胞が織りなす組織の立体構造が明瞭に映し出される。ラット臓器。固定液=2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド混合液。切片厚=20 μm。

5. 病理組織標本作製用のホルマリン単独固定でも美しい微細形態

これまでに提示した画像は電顕試料作製で標準的な1/2 Karnovsky固定液(=2%パラフォルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒドの混合溶液)で固定された標本から採取された切片であるが、通常の病理組織標本は10%ホルマリン溶液(=4%パラフォルムアルデヒド単独)で固定される。そこで、10%ホルマリン溶液で固定したラット細気管支の観察例を図7に示すが、線毛上皮や縦横の層状構造を呈するコラーゲン線維の微細な形態が明瞭に観察され、本法が病理組織標本の観察に適することがお分かりいただけるだろう。

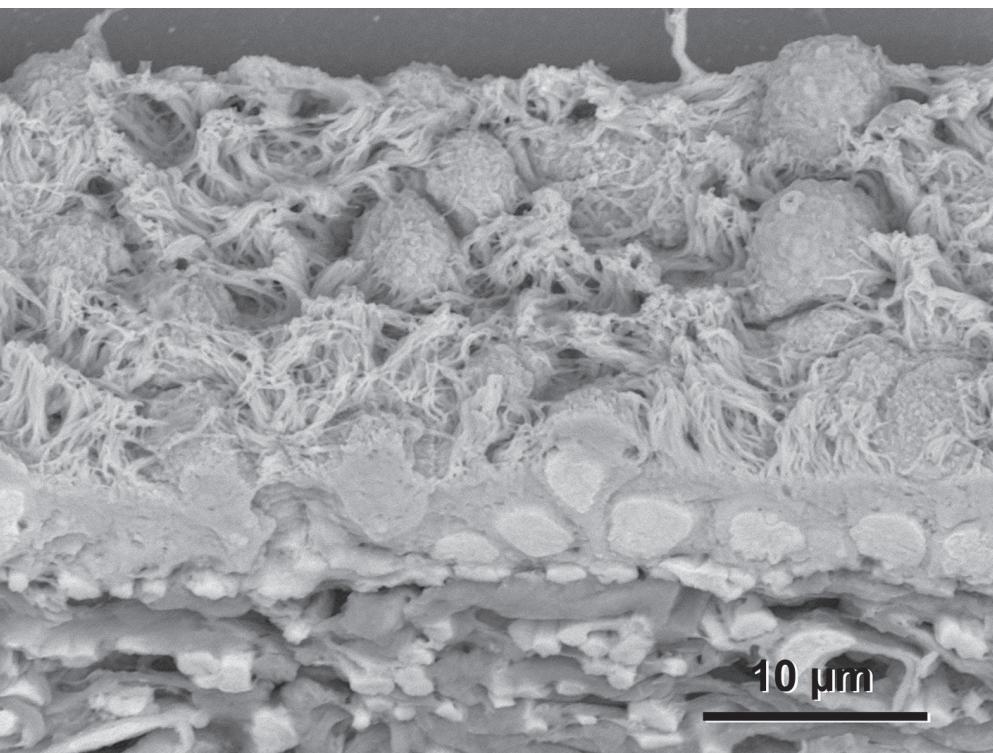


図7 通常の光顕用病理組織標本で用いられる10%ホルマリン溶液(4%パラフォルムアルデヒド単独)で固定したラット細気管支。線毛上皮(上部)や縦横の層状構造を呈するコラーゲン線維(下部)の微細な形態が明瞭に観察される。切片厚=20 μm。

6. 光顕／電顕相関観察法(CLEM)の応用で観察画像の科学的確度が向上

電顕画像の科学的確度を向上させる一つの手段に「光顕／電顕相関観察法」(CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy)がある。これは光顕で撮影した同一対象を電顕レベルで高精細に映し出す手法で、「木を見て、森を見ず」あらため『森を見て木を選び、その葉を観察する』手法で、本法に光顕／電顕相関観察法を応用したラット腎小体の観察例を図8に示す。常法のヘマトキシリン・エオジン染色で光顕観察した後、カバーガラスを除去して過マンガン酸カリウム—鉛染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡で観察した結果、光顕で撮影した同じ部位の足細胞の突起(矢印)を、光顕レベルでは確認できない微細構造まで可視化されている。

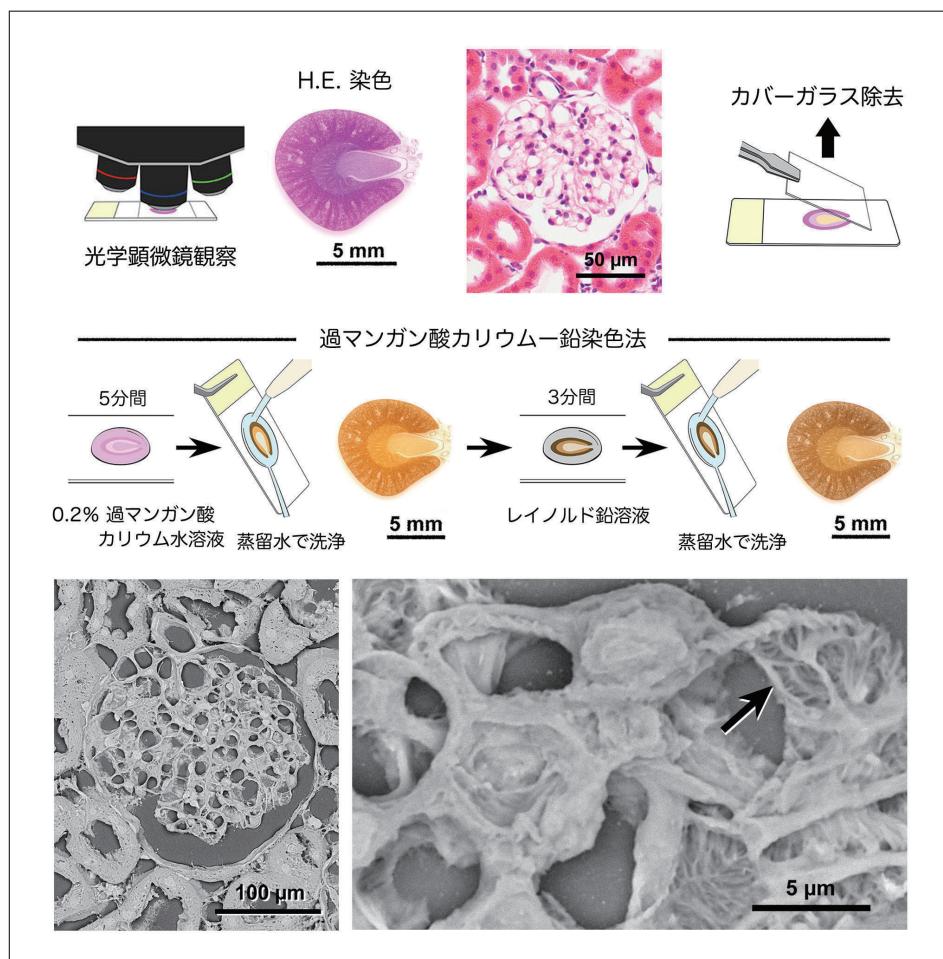


図8 光顕一電顕相関観察法(CLEM)によるラット腎小体の観察例。常法のヘマトキシリン・エオジン染色で光顕観察後、カバーガラスを除去して過マンガン酸カリウム一鉛染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡で観察。光顕で撮影した同じ部位を高精細に観察することができる、光顕レベルでは確認できない微細構造が可視化され、足細胞の突起(矢印)を判別することができる。

TM4000PlusIIの場合、本体に内蔵されたCCDカメラで映し出される切片のライブ映像を参照しながら、目的の観察部位を電顕レベルでライブ観察することができる、光顕一電顕相関観察の作業効率を格段に向上させる便利な機能が標準搭載されている(図9)。正しく「森を見て木を選び、その葉を観察する」が如く、『切片を見て組織を選び、その細胞を観察する』助けとなる。



図9 TM4000PlusIIの操作画面。本体に内蔵されたCCDカメラで映し出される切片のライブ映像(画面右下)を参照しながら、目的の観察部位を電顕レベルでライブ観察(画面左側)することができる、光顕一電顕相関観察の作業効率を格段に向上させる便利な機能が標準搭載されている。

7. 再生医療研究に応用可能な培養細胞の微細構造解析

本法を応用することで、光学顕微鏡用のスライドガラス表面に接着性を有する細胞を培養し、培養された細胞の三次元微細形態を電顕レベルで高精細に可視化することも可能である。図10に示す膵臓癌由来細胞株：SUIT-2の観察例では、光顕レベルでは捉えることが不可能な細胞間の微細な接着・連絡形態を明瞭に確認することができる。

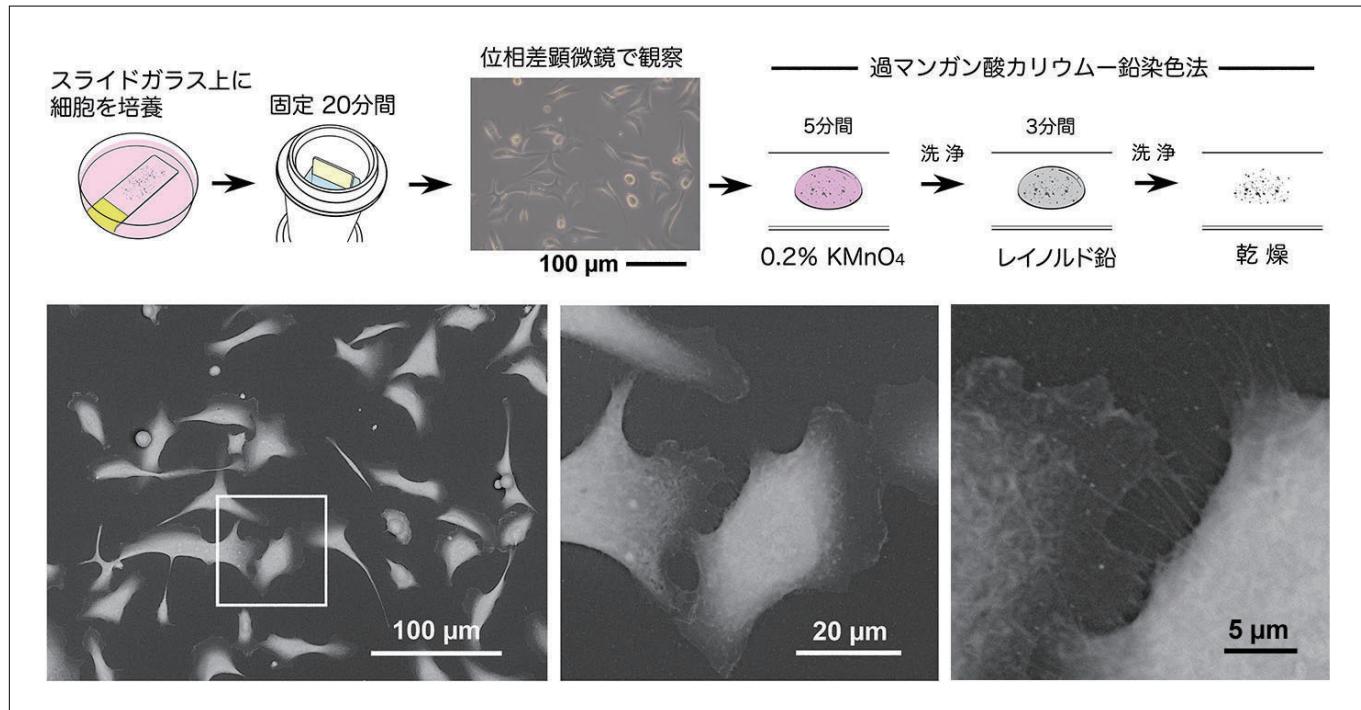


図10 培養細胞(膵臓癌由来細胞株：SUIT-2)の観察例。位相差顕微鏡で最適な観察領域を選定した後、過マンガン酸カリウム一鉛染色を施し、低真空走査型電子顕微鏡で観察。光顕レベルでは捉えることが不可能な細胞間の微細な接着、連絡形態が可視化されている。

8. 卓上低真空走査電顕は新たな医学研究・臨床診断のステージへ

本稿では、冒頭に記した長年の課題、ウラン化合物を必要としない新たな電子染色法の開発に成功した概要を紹介した。生体の器官を構築する細胞や組織の微細形態を簡便かつ迅速に、電子顕微鏡レベルで高精細に捉えるプロトコールの確立で、病理組織診断や再生臓器の形態品質評価など幅広い医学研究・臨床応用も視野に、卓上低真空走査型電子顕微鏡は新たなステージへと向かっている。

参考文献

- 1) Watson, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 475-478 (1958).
- 2) Sawaguchi, A. *et al.* Informative three-dimensional survey of cell/tissue architectures in thick paraffin sections by simple low-vacuum scanning electron microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 7479, doi:10.1038/s41598-018-25840-8 (2018).
- 3) Sawaguchi, A., Kamimura, T., Kitagawa, K., Nagashima, Y., Takahashi, N. KMnO₄/Pb staining allows uranium free imaging of tissue architectures in low vacuum scanning electron microscopy. *npj Imaging* **2**, 40, doi: 10.1038/s44303-024-00045-z (2024).

日本産ジュゴンの生息状況の解明



一般財団法人沖縄県環境科学センター
理事・総合環境研究所 所長

小澤 宏之 博士(学術)

1. はじめに

ジュゴン (*Dugong dugon*) は海牛目 (Sirenia) ジュゴン科 (Dugongidae) に属し、アフリカ西岸からインド西太平洋の熱帯域の浅海に生息する海産哺乳類の1種で、南西諸島はその分布域の北限にあたる。成獣で全長約3 m、体重500 kg 未満で、浅瀬に発達する海草藻場で海草類 (アマモ類) を専食する (図1)。なお、現生の海牛目には大西洋に生息するマナティー類 (アマゾンマナティー、アメリカマナティー、アフリカマナティー) がおり、それらの生息域はジュゴンと被らない。ジュゴンの寿命は最大で73年と推定されている。本種の妊娠期間は14.5ヶ月、出産間隔は3-7年前後と推定される。新生児は、泌乳期間は13.6ヶ月から17.6ヶ月とされ、その前後で海草類を摂食すると考えられる¹⁾。

本種は全世界で絶滅が危惧され、IUCNのレッドリストでは本種を VU (絶滅危惧 II 類) に指定し (IUCN Red List <https://nc.iucnredlist.org/redlist/amazing-species/dugong-dugon/pdfs/original/dugong-dugon.pdf>)、また国際条約 (ワシントン条約) で取引などが規制されている。国内では、文化財保護法、鳥獣保護法、水産資源保護法、沖縄県希少野生動植物保護条例などで保護や捕獲規制の対象となっている。近年の報告によれば、世界の分布域の東側にあたる日本を含む東アジアのジュゴン個体群 (中国大陸、台湾周辺海域、南西諸島等) は、最も絶滅の危険性が高い状況にあることが報告されている²⁾。



図1 ジュゴン(鳥羽水族館飼育個体)

日本産ジュゴンの衰退については、沖縄県の漁獲統計や当時の新聞記事などから、明治時代以降のダイナマイトを用いた乱獲により個体群の回復が望めないレベルになったと推定されている³⁾。しかしながら、1970年代以降も沖縄島 (沖縄本島) 周辺ではジュゴンの目撃情報や混獲などが断続的にあり、2000年頃までは日本産ジュゴンは沖縄島周辺にわずかに生息していると考えられていたが、2020年前後に先島諸島 (八重山諸島、宮古諸島) にもヒアリングや潜水調査から現在も生息している可能性が確認されている。南西諸島に生息するジュゴン個体群は奇跡的に維持され、その機構は現在も謎であるが、黒潮を通じたフィリピンなど南方からの移動個体が個体群の維持に寄与していることも示唆されている⁴⁾。実際に沖縄産ジュゴンとフィリピン産ジュゴンは遺伝的に非常に近縁であるとの報告もある⁵⁾。

環境省や沖縄県は、日本産ジュゴンの保護対策として、平成13年より (沖縄県は平成28年から) ジュゴンや海草藻場の調査を継続している。調査が開始される以前は、日本産ジュゴンの生態については、分布域を含め生態的知見は乏しい状況にあった。当時は混獲や座礁などの情報から、沖縄島周辺にのみ生息していると考えられていたが、現在までに、ジュゴンは沖縄県の広範囲に現在も生息すること、餌場として利用されている海草藻場に関する情報などが得られている⁶⁾。また

保護対策の事業では、漁網による混獲事故の低減を目的とした漁業者を対象としたジュゴンのレスキュー手法の普及などの活動が継続的に実施されている。生態解明の手立てとなる目撃情報については、漁業者からの情報提供が多く、沖縄県が収集している目撃情報では、現在までに約550件の情報が寄せられている(沖縄県環境部自然保護課ジュゴンポータルサイトおきなわ <https://biodiversity.okinawa/dugong/>)。ここでは、沖縄県内における2010年以降に確認されたジュゴンや喰み跡(feeding trails)の状況を図2⁴⁾に示す。

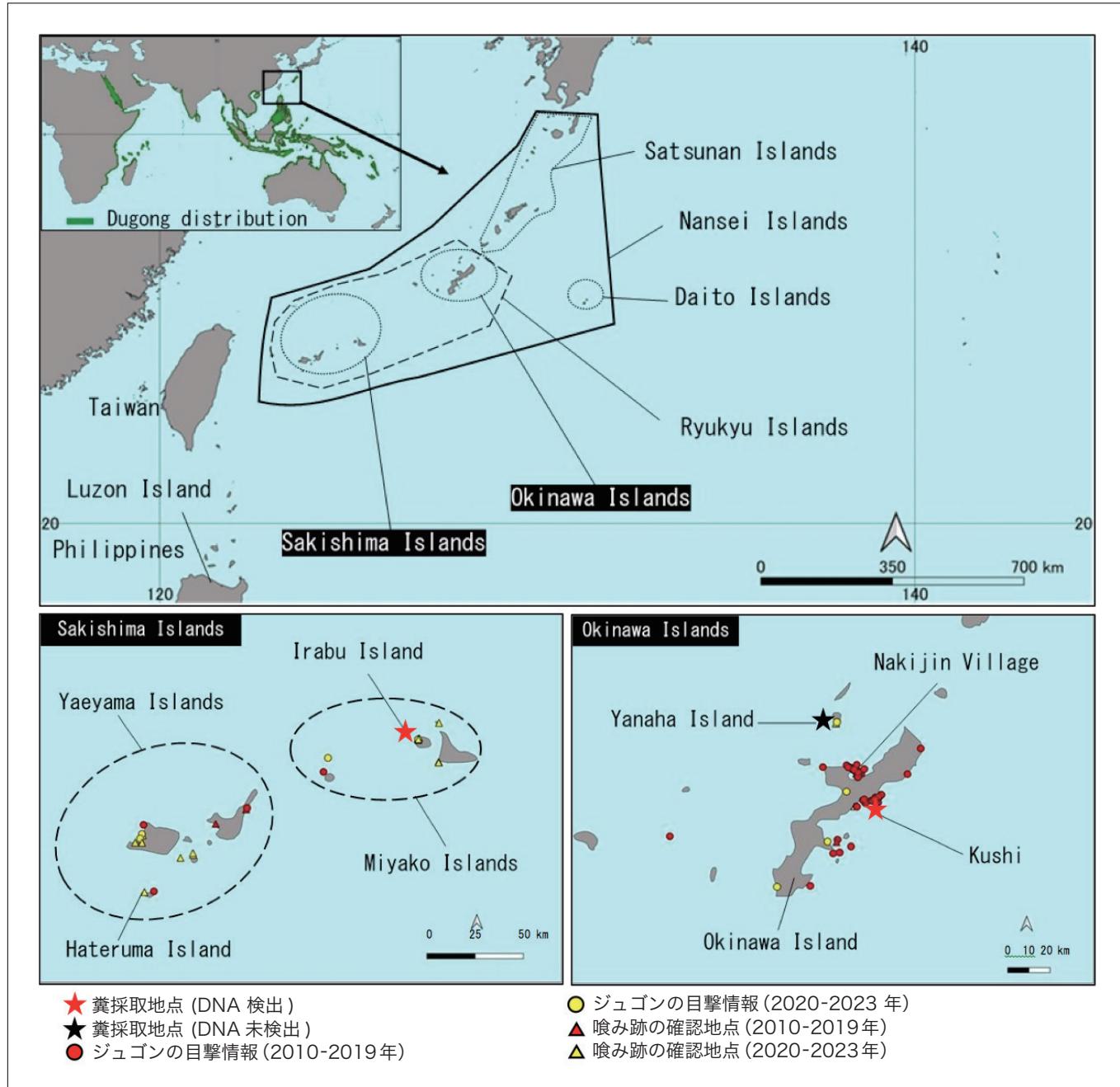


図2 大型草食動物の糞が採取された場所、ジュゴンと考えられる動物が目撃された場所、ジュゴンの喰み跡が確認された場所。世界のジュゴン分布図は、Marsh & Sotzick, 2019⁷⁾に基づいて作成した。

ここまで、ジュゴンの基礎的な生態や、国内での保護に関する状況について紹介してきた。現在も日本産ジュゴンの分布や生息頭数など基本的な情報が不足している状況にあるが、2022年より海草藻場や砂浜などに打ち上げられた形で稀に見つかる大型海産草食動物(ジュゴンやオオウミガメ [*Chelonia mydas*])の糞を対象にジュゴンのDNAの有無を検出する調査に着手した。これまでの調査では、主に海草藻場に残されたジュゴンの喰み跡からジュゴンの分布域を推定していたが(図3)、より直接的な科学的エビデンスとしてDNAの検出から、より直近のジュゴンの分布把握が可能となると考えた。DNAに関しては、水生生物を対象とした環境DNAの手法があげられる。環境DNAは、ターゲットの生物の生息(生育)地の水を採取し、試料水に含まれるDNAの有無から生物の生息(生育)状況を解析する方法で、分析機器の進歩なども合わせ近年の発展は目覚ましい。



図3 海草藻場に残るジュゴンの喰み跡

著者等は、2020年より環境DNAの手法による沖縄島周辺海域での海水からのジュゴンのDNAの検出を目指し、鳥羽水族館の協力のもと対象種のDNAのみを増幅させるジュゴンのプライマーの開発に着手した⁸⁾。開発したプライマーを用いて、沖縄県内の各海域で海水に含まれるジュゴンDNAの検出に取り組んだが、残念ながら現在まで検出には至っていない。その要因は未だ特定されていないが、水塊中のジュゴンのDNAが極めて微量であることや、分解されやすいなどの要因が推察された。そのような状況下で、2021年にオーストラリアのジュゴンとアオウミガメの糞からのDNA抽出に関する論文が公開された⁹⁾。糞便からのDNAの抽出に関しては陸上哺乳類でも実施されていたが、ジュゴンやアオウミガメの自然下で採取された糞を対象とした試みは衝撃的であった。新鮮な糞便が得られれば、水塊からのDNA検出よりも確度が上がり、それで直近のジュゴンの生息状況が把握できるのではないかと考えた。

ここで、「なぜジュゴンの生息確認に航空機調査を実施しないのか」と疑問に思われる読者も多いかと思われる。網羅的な航空機調査を高頻度で実施すれば、個体数推定など日本産ジュゴンの生態解明に寄与することは明白である。しかしながら、四方を大海で囲われ、沿岸域の広範囲に発達する海草藻場を有する沖縄県の全域を調査対象とすれば、その調査経費は莫大となる。また極めて生息個体数が少ないジュゴンを対象とする場合、見落としは致命的で、またジュゴンは外洋では存在が確認しやすいが、サンゴ砂を起源とする浅瀬にいる場合には目視確認は非常に難しい。そのため、現在は目撃情報などから調査対象を絞り込み、ドローンを用いた海草藻場の撮影を実施し、撮影画像から生息の痕跡となる喰み跡の探索と、それらの情報に基づく潜水調査を中心とした調査を実施している。

ここでは、2022年より新たなジュゴンの生息域の特定に向けた調査手法として野外で採集したジュゴンと思われる糞からのDNA抽出による取り組みに関して、2024年に公開した沖縄県内(伊良部島及び沖縄島)で採取された糞からのジュゴンのDNAの確認に関する論文をベースに紹介する⁴⁾。

2. ジュゴンの糞

ジュゴンが排泄したと思われる糞は、海草藻場や周辺の波打ち際で見かけることがある。著者はこれまでに海草藻場の海底に沈んだ大型の糞を見かけることが稀にあったが、2022年に伊良部島で確認され、後にジュゴンのDNAが検出された糞は、すべて海面を漂うものであった。糞の浮き沈みに関しては、おそらくは排泄からの時間経過、摂餌した海草種やジュゴンの体調など消化の状態に左右されるものであろう。糞の形状は人糞大の暗緑色で、匂いは牛馬に酷似し、試料によつては未消化の海草類の纖維質(地下茎部など)が僅かに確認できる。ジュゴンの糞と酷似したものとして、同所的に生息するウミガメ類のアオウミガメの糞があげられる。アオウミガメも海草類を摂餌し、糞の形状もジュゴンのそれと酷似するため、

それらの採取時の識別は困難である。そのため、ジュゴンの糞の可能性が高いと予想した大型の糞でも、実際の分析ではアオウミガメのDNAが検出されるケースも少なくない。なお、著者が関わった伊良部島のジュゴンに関する特集番組「沖縄の海 幻のジュゴンを追う¹⁰⁾」の中で、採取された糞からジュゴンのDNA抽出の紹介がなされて以降、沖縄県内の各地から糞の目撃事例や試料提供が飛躍的に増加している。

3. 糞からのジュゴンDNAの抽出と分析

3-1. 試料採取からDNA抽出

現地で糞を採取した場合、DNAの分解を防ぐために出来るだけ早くエタノールなどに保存し冷蔵する必要がある。しかしながら沖縄県内の離島で地域住民の方が糞試料を採取した場合など、手元にエタノールの備蓄がない場合がほとんどであり、そのような場合は市販の消毒液であるオスバン(10%塩化ベンザルコニウム溶液、アリナミン製薬株式会社)を、糞を含む海水試料1リットルに対し0.5 ml滴下し冷凍保存する。なお、現在は糞の採取事例が多い島々には、予め保存容器やエタノールなどを配布するなどの体制を取っている。採取試料については、出来るだけ早く沖縄島の研究所に冷凍空輸し、到着後速やかにDNAの抽出に着手した。DNAの抽出には、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(Qiagen社)を用い、糞試料の固体部分の表面約100 mgを滅菌スパチュラで採取し、50 µLの溶出液を得た。糞試料には、通常PCR阻害物質が多く含まれ、それら阻害物質がPCR反応を抑制することから、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kitを用い、それらを効率的に除去することが重要である。

3-2. PCR

ジュゴンの種特異的なプライマーに関しては、オーストラリアでの先行研究に従った⁹⁾。プライマー配列は、F: 5'-CGCGCGCTATGTACTTCGT-3', R: 5'-GGGGTAAGTAGTGTAATGCACG-3', 産物サイズは110 bpである。抽出したDNAサンプルは、1サンプルにつき1ウェルで2段階PCRを行った。PCR溶液の組成は、iProof HF Master Mix(Bio-Rad) 12.5 µL, 10 µMプライマー各0.5 µL, DNA溶液1 µL, 滅菌水10.5 µLで、総量は25 µLである。PCRサーマルサイクラーとしてBiometra TOne(Analytik Jena社)を用いた。PCRは98°Cで45秒間保持し、98°Cで10秒間、65°Cで30秒間、72°Cで15秒間のサイクルを35回繰り返した後、72°Cで5分間伸長反応を行った。陰性コントロールとして超純水を用い、陽性コントロールとして2019年3月に沖縄本島今帰仁村沿岸付近で発見されたジュゴンの死骸の筋肉から抽出したDNAを用いた。陰性コントロールと陽性コントロールの両方のサンプルを各PCRランに含めた。

糞便から抽出したDNAの検出率を高めるため、2段階PCRを行った。2段階PCRは、1回目のPCR産物を滅菌水で100倍希釈し、2回目のPCR鑄型として用いた。2回目のPCRで使用したプライマー、PCR条件とともに1回目のPCRで使用したものと同じである。

3-3. 電気泳動及び増幅産物の精製

2回目のPCR後の各反応液を、電気泳動により増幅産物の確認を行った。電気泳動装置はMupid-exU(株式会社ミューピッド)を用い、アガロースゲルは、Agarose S(錠)(株式会社ニッポンジーン)を2 g, DNA蛍光染色試薬としてミドリグリーンアドバンス(日本ジェネティクス株式会社)を6 µL, 1×TAE緩衝液を100 mL加えて作成した。電気泳動緩衝液は1×TAE緩衝液を用いた。DNA分子量マーカーは、100 bp DNA Ladder(タカラバイオ株式会社)を使用した。トランスイルミネーターは Illuminator UltraSlim UV(Gel Company社)を用い、増幅産物の確認を行った。シーケンス解析に用いるDNAを得るために、ジュゴンのDNA特有の配列と推察される産物(110 bp)を切り出し、アガロースゲルからのDNAの抽出はNucleoSpin Gel and PCR Clean-up(MACHEREY-NAGEL)を用い、キットの操作方法に従った。抽出されたDNAはQuantus Fluorometer(プロメガ株式会社)とQuantiFluor dsDNA System(プロメガ株式会社)を用い濃度を測定した。

沖縄県の伊良部島や沖縄島などで採取された糞の分析結果であるが、図4⁴⁾に示すように伊良部島や沖縄島久志で採取された糞からジュゴンと思われる増幅産物が検出された。

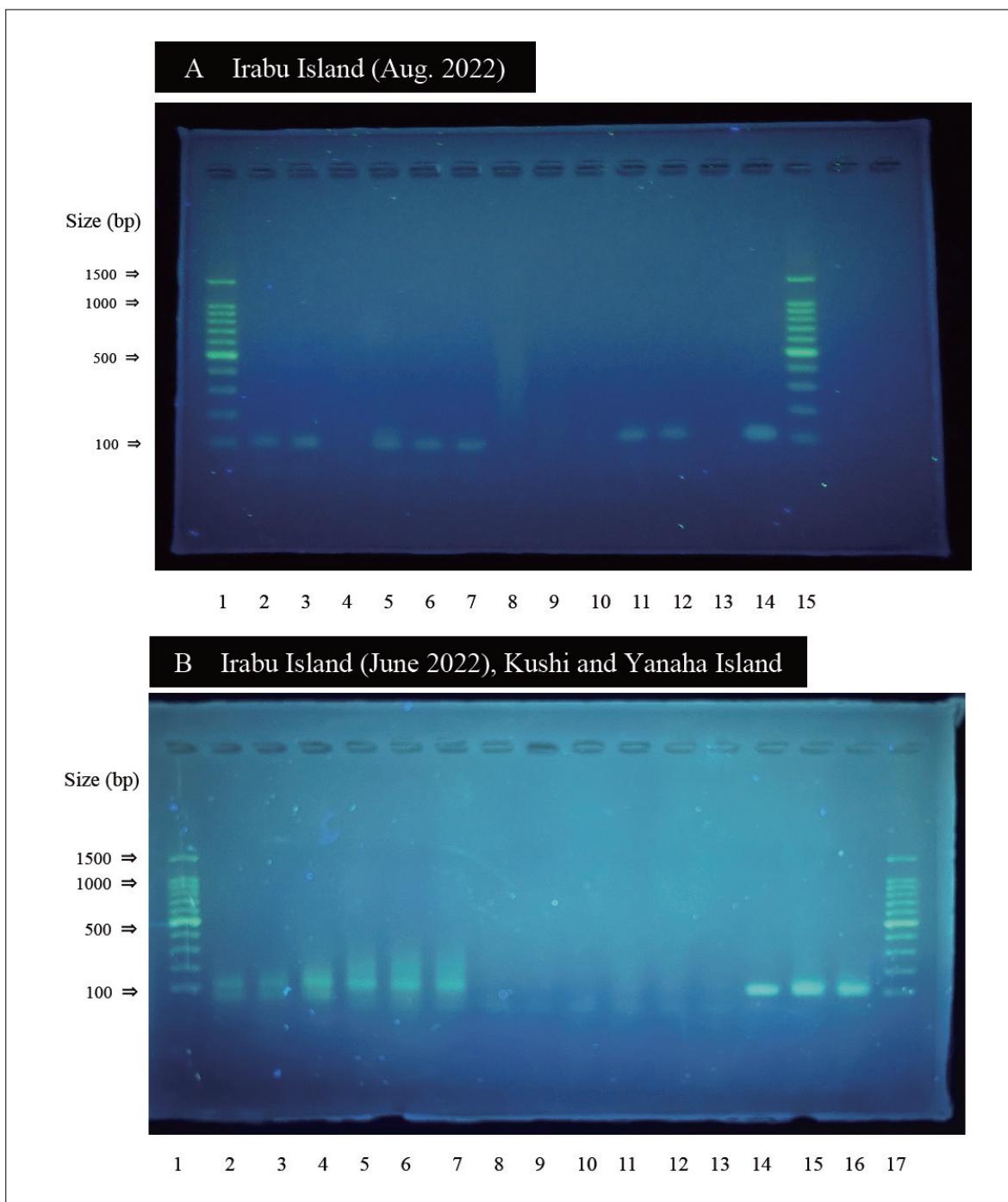


図4 ジュゴンの特異的プライマーを用いた糞のPCR後のアンブリコンのアガロースゲル電気泳動パターンの写真。レーンA1及びA15:DNAラダー, A2-12:2022年8月に伊良部で採取した糞, A13:陰性コントロール, A14:陽性コントロール, B1及びB17:DNAラダー, B2-4:2022年6月に伊良部で採取した糞, B5-7:沖縄島名護市久志で採取した糞, B8-10:屋那覇島で採取した糞, B11-13:陰性コントロール, B14-16:陽性コントロール。各レーンは糞便サンプルから抽出したDNAの各レプリケートを示す。A及びBの各糞サンプルのDNA抽出は、それぞれ1回及び3回の反復を行った。

3-4. 塩基配列の読み取り及びデータベースとの照合

增幅産物については、塩基配列を決定したのち BLAST 検索を行った。DNA の蛍光標識は、SupreDye v3.1 Cycle Sequencing Kit(EdgeBioSystems)を用い、サイクルシーケンス後の精製は SupreDye XT Purification Kit(EdgeBioSystems)を用いた。DNAシーケンス解析は、小型キャピラリー電気泳動シーケンサー DS3000(株式会社 日立ハイテク)を用い、得られた塩基配列を Blast(National Center for Biotechnology Information)において、ジュゴンの塩基配列データと比較した(図5)。その結果、増幅産物は BLAST で登録されているジュゴンDNAの塩基配列と完全に一致し、伊良部島や沖縄島久志に現在もジュゴンが生息することが確認された。

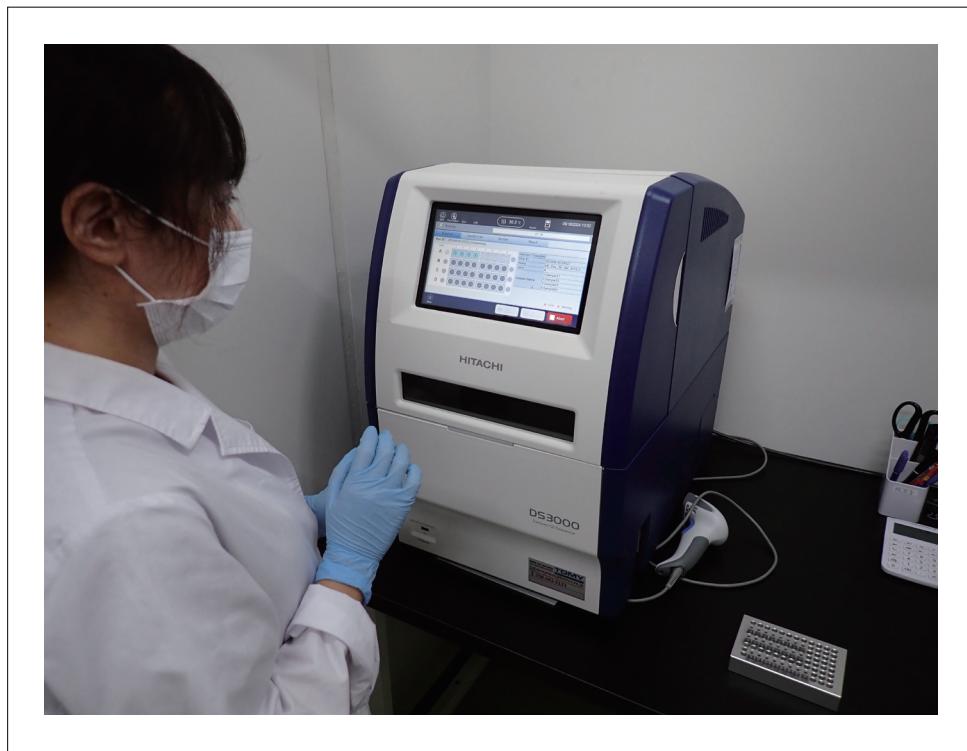


図5 小型キャビラリー電気泳動シーケンサー DS3000(株式会社 日立ハイテク)によるDNAシーケンス解析

4. おわりに

ジュゴンは熱帯性海草藻場生態系において、生物多様性の維持に大きく関与するアンブレラ種であり、本種の絶滅は沿岸生態系の劣化に直結する。今まで沖縄の沿岸にこれほどの大型動物が密かに生き残っていたのは奇跡的であり、この事実は沖縄の沿岸生態系の豊かさが残されていることを示している。NATURE POSITIVE(自然再興)の分岐点である時代に、ジュゴンや海草藻場を含む沿岸生態系の保全は私達世代に課された大きな課題である。

糞の解析は、これまで推定されていたジュゴンの生息状況に科学的エビデンスを付加するものとして有効な手法である。今後は近年報告があった糞からの核DNAの抽出にも取り組み¹¹⁾、未だ謎の多い日本産ジュゴンの個体判別や生息個体数、さらに島嶼間の移動などの行動解明に取り組んでいきたい。

参考文献

- 1) Marsh, H., O'Shea, T. J. & Reynolds, J. E. (eds). 2011. *Ecology and Conservation of the Sirenia: Dugongs and Manatees*. Conservation Biology 18, Cambridge University Press.
- 2) Lin, M., Turvey, S. T., Liu, M., Ma, H. & Li, S. 2022. Lessons from extinctions of dugong populations. *Science* **378**: 148. <https://doi.org/10.1126/science.ade9750>
- 3) 当山昌直 2015. 近代沖縄史料(統計・新聞)にみるジュゴン. *海洋と生物* **37** (4) : 351-356.
- 4) Ozawa, H., Yoshihama, T., Gishitomi S., Watanabe, N., Ichikawa, K., Sato, K., Watanabe, K., Takano, K., Ochiai, Y., Yamanaka, H. & Maruyama, A. 2024. Fecal DNA analysis coupled with the sighting records re-expanded a known distribution of dugongs in Ryukyu Islands after half a century. *Scientific Reports* **14** (1): 7957. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58674-8>
- 5) 環境省 2003. 平成14年度ジュゴンと藻場の広域的調査報告書. 環境省. 308pp.
- 6) 沖縄県 2024. 令和5年度ジュゴン保護対策事業報告書. 沖縄県環境部自然保護課. 71pp. https://www.pref.okinawa.jp/_res/projects/default_project/_page_/001/004/859/r5_zenbun2.pdf
- 7) Marsh, H. & Sobtzick, S. 2019. *Dugong dugon* (amended version of 2015 assessment). in *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T6909A160756767 (International Union for Conservation of Nature, 2019).
- 8) 平石優美子, 小澤宏之, 若井嘉人, 山中裕樹, 丸山敦, 2020. 海棲哺乳類ジュゴンの環境DNAを定量するためのプライマーセットの開発. 保全生態学研究 **25** : 57-64. <https://doi.org/10.18960/hozen.1914>
- 9) Tol, S., Harrison, M., Groom, R., Gilbert, J., Blair, D., Coles, R., & Congdon, B. C. 2021. Using DNA to distinguish between faeces of *Dugong dugon* and *Chelonia mydas*: Non-invasive sampling for IUCN-listed marine megafauna. *Conservation Genetics Resources* **13**: 115-117. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01187-z>

- 10) NHK. 2022. 沖縄の海幻のジュゴンを追う. 日本放送協会. https://www2.nhk.or.jp/archives/movies/?id=D0009051588_00000
- 11) Ooi, V., McMichael, L., Hunter, M. E., Takoukam Kamla, A. & Lanyon, J. M. 2023. A new DNA extraction method (HV-CTAB-PCI) for amplification of nuclear markers from open ocean-retrieved faeces of an herbivorous marine mammal, the dugong. *PLoS ONE* **18** (6): e0278792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278792>

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

新たな液中観察手法 Vitro検出器の原理と観察事例

A Novel Liquid Sample Observation Technique with the “Vitro Detector”

吉原 真衣^{*1}, 中村 光宏^{*2}

1. はじめに

走査電子顕微鏡(以下, SEM)は、試料を配置した試料室内部を真空引き後、電子線が試料表面上を走査することにより発生する二次電子や反射電子等の信号を検出し画像化する装置である。水分を含む試料をSEMにより観察する場合は、真空引きによる試料の変形を防ぐため、試料の乾燥または凍結等の前処理が必要である。一方で、様々な理由や背景から乾燥や凍結状態ではなく液中における材料の分散性や形態、生きた状態の微生物や細胞の形態観察などをSEMレベルの分解能で観察したいニーズがある。そのため、試料の溶液を維持しつつ観察が可能な手法としてカプセル型のホルダーを用いた液中観察法が開発されてきた。この手法では、電子線が透過する窒化ケイ素隔膜をホルダーに用いており、ホルダー内に液体試料を封入することで、試料を大気圧下に保持することができる。観察の際は高加速電圧と大電流の電子線が隔膜を通して試料に照射され、検出器で透過電子や反射電子を検出し画像化する。しかし、電子線照射により試料ダメージが発生する可能性があることや、軽元素からなる試料は明暗コントラストが付きにくいなどの課題があった。

上述の課題を解決するために、加速電圧や大電流の電子線を試料に照射せずに液中試料を画像化する観察手法が国立研究開発法人 産業技術総合研究所 小椋俊彦博士によって開発された。日立ハイテクは小椋博士との共同研究によって液中試料観察システムを開発し、2023年からVitro検出器として発売している。本稿では、Vitro検出器の原理と観察事例を紹介する。

2. Vitro検出器とは

2-1. 検出器の構造

Vitro検出器は、Vitroホルダーとステージ上のコネクターユニットから成る。図1は、Vitroホルダーの外観図と断面模式図である。液体試料を挟み込む2枚の隔膜のうち、上側の隔膜は、重金属がコーティングされている。試料は上側の隔膜とOリングによって真空環境から隔離され、大気圧下に保持できるため、液体の乾燥を防ぐことができる。また、下側の隔膜の直下に配置された検出電極はプリアンプに繋がり、プリアンプに接続されたコネクターユニットから信号を取り出すことができる。上述の構造により、液体試料を上側の窒化ケイ素隔膜に滴下し上下反転後、下側の隔膜で挟み込み、Vitroホルダーにセットすることで、試料が真空引きによって乾燥することなく液体状態での観察が可能となる。

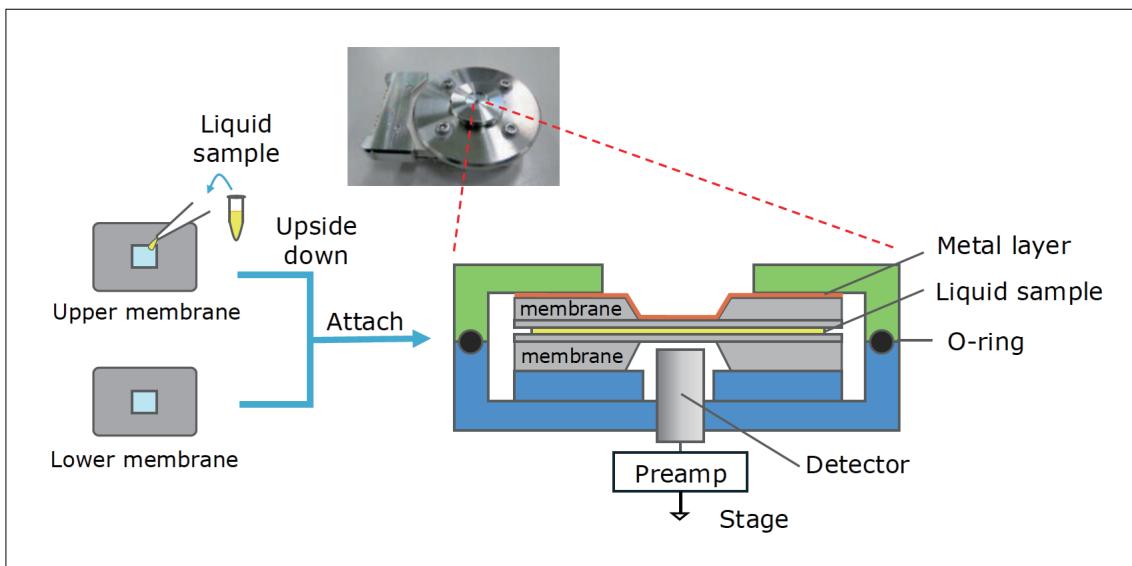


図1 Vitroホルダーの外観図と断面模式図

2-2. 原理および特徴

Vitro 検出器の原理を図2に示す。重金属がコーティングされた上側の窒化ケイ素隔膜の裏面に試料が密着した状態で、重金属層にバイアス電圧を印加すると、試料の形体を反映した電界強度の分布が窒化ケイ素隔膜の内部に形成される。そこに低エネルギーの電子線を重金属層側から照射すると、電子線は重金属層内で散乱し、エネルギーの大部分を失う。散乱した電子が窒化ケイ素隔膜に到達すると、局所的な電位変化が生じる。生成された電位変化は、液体試料を透過し、下側の電極で電気信号として検出される。このとき電気信号の強度は、上側の窒化ケイ素隔膜の内部の電界強度に依存しており、窒化ケイ素隔膜に挟まれた試料の形状を反映する。

Vitro 検出器による試料の観察は、信号の検出に高加速電圧や大電流の電子線を必要としないため、試料への電子線によるダメージを抑制することができる。また、試料と直接の相互作用を必要としないことから、軽元素からなる試料に対しても固定や染色をせずに高コントラストの画像を取得することができる。

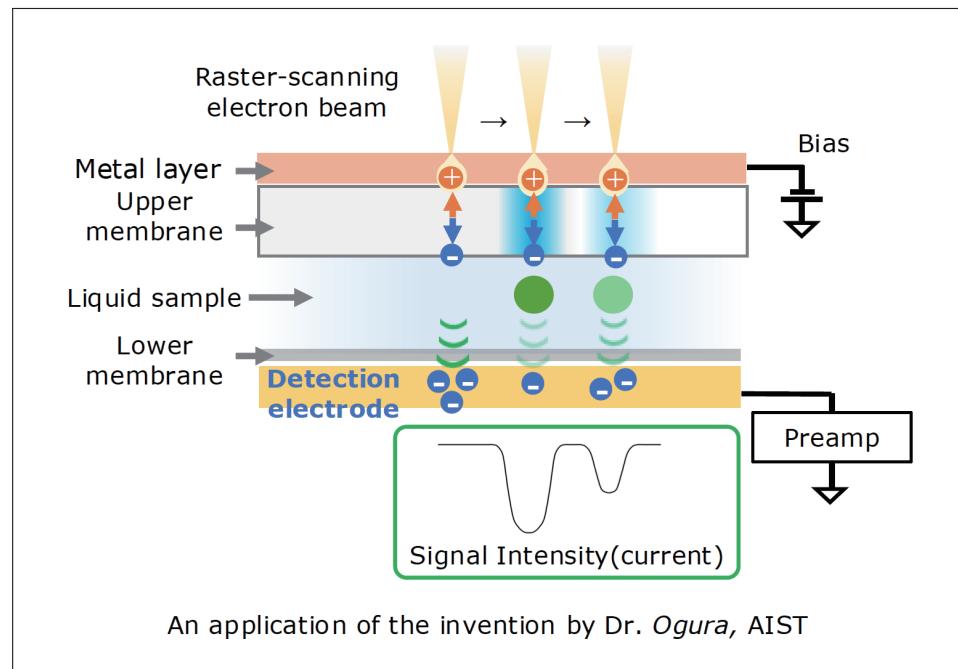


図2 検出原理概略図

3. Vitro検出器を用いた観察事例

以下に、Vitro 検出器を用いて撮影した液体試料の観察事例を紹介する。

3-1. 食品

牛乳などの乳製品をそのままの状態で液中観察する際は、従来までの反射電子等による検出方法の場合、電子線照射によるダメージの影響で走査とともに脂肪成分の構造が変化してしまい、良好な画像を取得することは困難だった。図3は乳製品を液体状態のまま Vitroホルダーに封入し、観察した結果である(A1～2, C1～2: 牛乳, B1～2: 乳児用粉ミルク)¹⁾。A1～2とB1～2のVitro 検出器像で水分(w)の中に150 nm～3 μmの白い球状構造が見られ、これは脂肪成分(f)と考えられる。また、図3 A1～2の牛乳には多量の黒い粒子が見られ、参考文献²⁾と同様の構造であることから、カゼインミセル様粒子(c)と考えられる。図3 B2の粉ミルクにおいても、少量の黒い粒子(p)を確認した。粉ミルクの原料の牛乳中にカゼインたんぱく質が含まれており、粒子(p)もカゼインミセル粒子である可能性がある。本結果は「乳幼児にとってカゼインたんぱく質は消化吸収しづらいために、乳児向け粉ミルクはカゼインたんぱく質の量を母乳と同程度に減らしている」ことを示唆するデータと考えられる^{3,4)}。一方、同時撮影した従来の反射電子等の液中観察像では、脂肪成分やカゼインミセル様粒子を明確に観察することが困難である(図3 C1～2)。

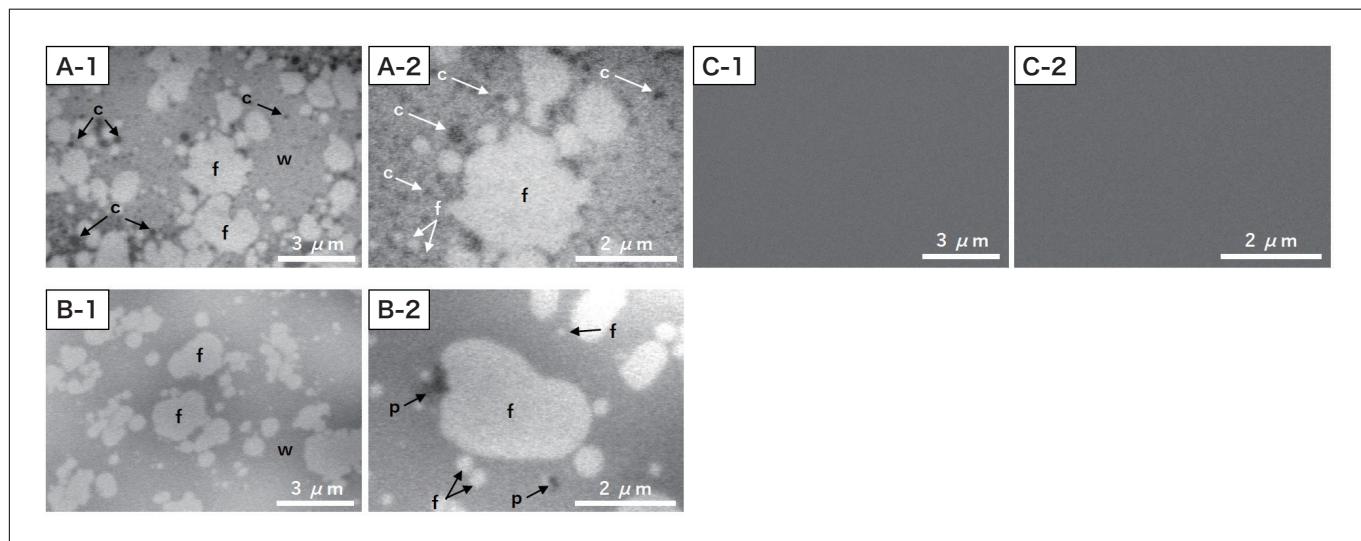


図3 乳製品の液中観察結果

(A-1)-(A-2)：牛乳のVitro検出器像, (B-1)-(B-2)：乳児用粉ミルクのVitro検出器像, (C-1)-(C-2)：(A-1)(A-2)と同時撮影したSE検出器像
装置：SU5000, 加速電圧：5 kV, 倍率：(A-1)(B-1)(C-1) 10 k \times , (A-2)(B-2)(C-2) 20 k \times , f：脂肪成分, w：水分, c：カゼインミセル様粒子, p：粒子

3-2. リポソーム

次に、リポソームの観察事例について説明する。リポソームはリン脂質から構成される小胞で、小胞内に薬剤などの有効成分を内包することでドラックデリバリーシステムに応用することが可能である。リポソームを電顕で観察する手法に、クライオトランスファー法やネガティブ染色法などが用いられてきた⁵⁻⁷⁾。図4にVitroで観察したリポソームの結果を示す。本結果では、バッファー中に分散する数10～500 nmのリポソームを観察することができた。そのほかのバイオ試料では、小椋博士が光合成細菌、タンパク質抗体、培養細胞などを液中観察している^{8,9)}。上述のとおり、Vitro検出器は軽元素で構成されるバイオ試料の場合も無固定や無染色での高コントラスト観察が可能である。

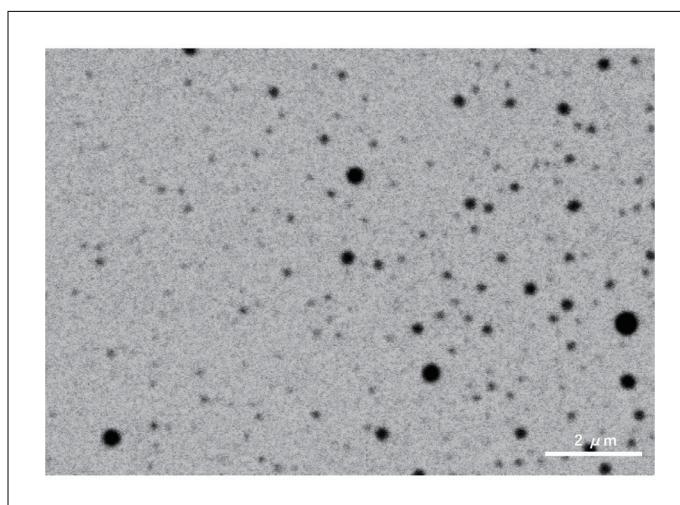


図4 リポソームの液中観察結果

装置：SU5000, 加速電圧：3.5 kV, 倍率：10 k \times

3-3. 化粧品クリーム

次に、化粧品クリームの観察事例について説明する。化粧品クリームのようなエマルジョン試料は、前述した牛乳と同様に、油成分を多く含むため電子線照射による形態変化が生じやすい試料の一つである。図5に、日焼け止めクリームを液体状態のままVitroホルダーに封入し、SEM観察およびEDS分析した結果を示す¹⁰⁾。図5Aに示すVitro検出器像では油成分(o), 水分(w), 微細粒子(sp), 大型粒子(lp)を確認できた。同一視野を試料直上型のEDS検出器(Bruker社製 QUANTAX FlatQUAD)で分析し得られたEDSマッピング像を図5Bに示す。油成分の箇所からは炭素(C), 水分の箇所からは酸素(O), 微細粒子からは亜鉛(Zn), 大型粒子からはチタン(Ti)が検出された。Vitro検出器と試料直上型のEDS検出器を組み合わせることで、電子線の影響を受けやすいエマルジョン試料においても、試料へのダメージを抑制し、液体状態のままSEM/EDS解析が可能である。

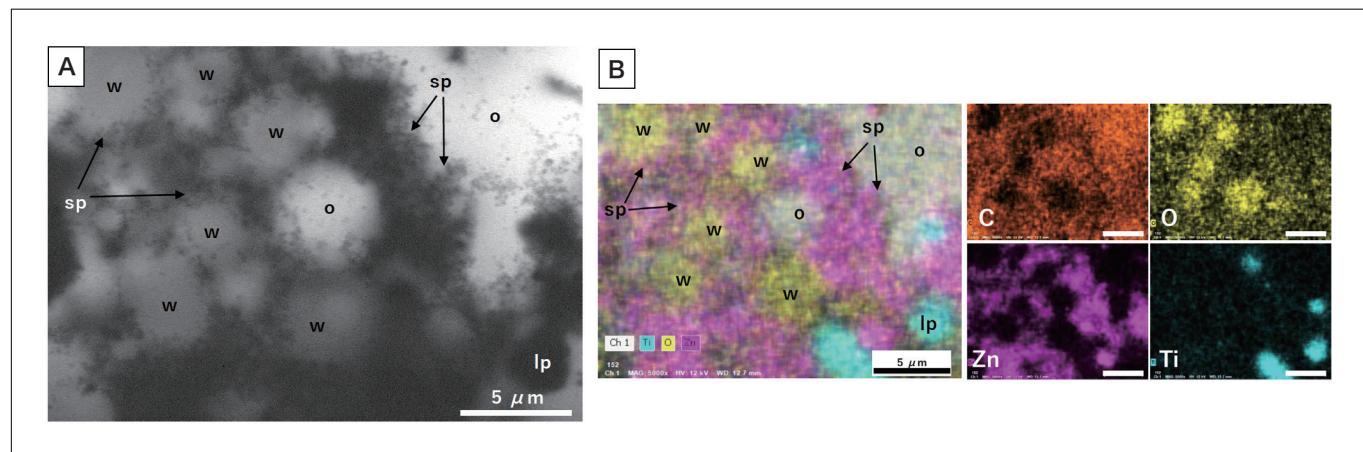


図5 日焼け止めクリームの液中解析結果

(A) Vitro検出器像, (B)EDSマッピング像

装置 SEM : SU5000, EDS : QUANTAX FlatQUAD (Bruker社), 加速電圧 : 12 kV, 倍率 : 5 k \times , o : 油成分, w : 水分, sp : 微細粒子, lp : 大型粒子

4. まとめ

本稿では、日立 SEM に搭載可能な Vitro 検出器の原理と観察事例を紹介した。Vitro 検出器には、以下の特長がある。

- ・液体状態の試料の観察が可能。
- ・電子線ダメージを抑制した液体試料の観察が可能。
- ・軽元素同士からなる試料でも無染色で高いコントラストの画像を取得可能。

今後、Vitro 検出器がバイオ／食品／材料分野の液体試料の観察および分析に新たな知見をもたらすことが期待される。

謝辞

本稿の執筆及びデータ取得にあたり、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 健康医工学研究部門 バイオイメージング研究グループ 小椋俊彦博士に貴重なご助言とご指導をいただきましたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 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-214
- 2) Ogura, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**, 1021-1025 (2017).
- 3) Seto, Y., オレオサイエンス, **23**, 8, 415-421 (2023).
- 4) 一般社団法人日本乳業協会, 乳の知識と情報詳細資料 https://nyukyou.jp/dairyqa/2107_029_444/ (参照日2025年1月)
- 5) 日立ハイテク会員制サイトS.I.navi, 日立テクニカルデータ, SEM No.98
- 6) 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-TEM-066
- 7) 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-TEM-072
- 8) Ogura, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **459**, 521-528 (2015).
- 9) Ogura, T. *et al.*, *Microscopy and Microanalysis*, **29**, 1037-1046 (2023).
- 10) 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-230

著者紹介

*¹ 吉原 真衣

(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

*² 中村 光宏

(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 解析制御システム設計部

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

卓上顕微鏡 TM4000PlusIIIのご紹介

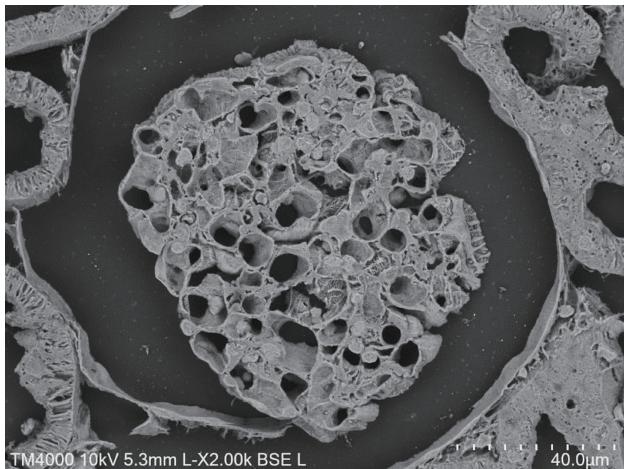
後藤 健

1. はじめに

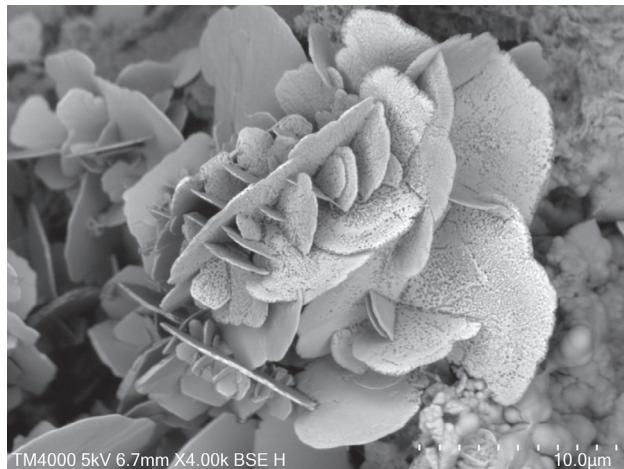
走査電子顕微鏡(以下、SEM: Scanning Electron Microscope)は、物質表面の微細構造を観察する装置として、材料分野やバイオテクノロジー分野をはじめ、あらゆる産業分野において、幅広く利用されている。分野や用途に応じて、世の中にはさまざまな機能を有したSEMが活用されているなか、当社では装置の小型化と操作の簡易化を追求することで、SEMに触れることが初めての方でも手軽に使用できる卓上顕微鏡 Miniscope®シリーズを販売し、研究・開発のみならず、製造現場の品質管理、学校の理科教育などの場で利用されてきた。

「最先端の顕微鏡を、もっと使いやすく、もっと身近に」をテーマに開発したMiniscope®シリーズは、光学顕微鏡の使いやすさを追求した従来の概念を覆す電子顕微鏡として広く受け入れられ、2005年に1世代目であるTM-1000の発売を開始して以来、現在にいたるまで国内外で5,000台を超える出荷台数を達成している。

そして2024年に第7世代目となるMiniscope® TM4000plusIII(以下、TM4000PlusIII)を新たにリリースした。本稿では、その特長と応用例について紹介する。



試料：マウス腎臓 糸球体(脱パラフィン切片)



試料：コネクタ表面銅結晶

図1 TM4000PlusIII 画像取得事例

2. TM4000PlusIIIの概要

昨今、環境に配慮した材料やその製造プロセスの開発、大気・作業環境中の有害物質を分析するなど、Miniscope®は地球環境の保全や人々の健康の維持のために貢献してきた。製造現場においては、試料の微細化や品質管理基準の厳格化及び新たな規制などに伴い、観察箇所が増加傾向にあり、専門知識を持つユーザーだけでなく、さまざまなユーザーが卓上顕微鏡を管理・操作して観察業務を行うケースが増加している。

こうしたなか、専門知識の有無にかかわらず誰が操作してもばらつきのない高精度なデータの取得を実現するため、観察業務の効率化と操作の簡易化をさらに追求したTM4000PlusIIIを開発するに至った。

また、子どもの理科離れを防ぐことを目的とした理科教育支援のための装置というMiniscope®発売当初からのコンセプトもTM4000PlusIIIでは踏襲しつつ、顕微鏡観察だけではない、一步先の教育ツールとして活用できる機能も新たに組み込んだ。



図2 TM4000PlusIII本体

3. TM4000PlusIIIの特徴

3-1. 観察作業の効率化・省力化を実現

TM4000PlusIIIでは、新たに搭載された観察ワークフロー自動化支援機能を使用することで、ステージ移動・観察倍率変更・撮像などの観察手順をレシピとして保存することができ、レシピ化された観察手順は数クリックで自動実行が可能となる。作業の効率化やユーザー間での観察技術平準化を実現し、観察業務以外にもルーチンワークの多いユーザーや観察条件の設定に不安を持たれているユーザーなど、さまざまなニーズに応えられる機能となっている。

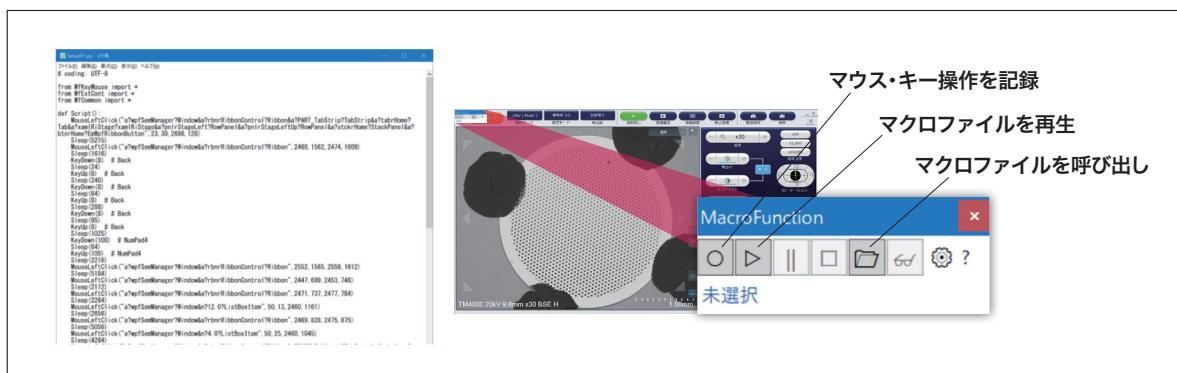


図3 観察ワークフロー自動化支援機能

さらに、TM4000PlusIIIでは安定して高速かつ広範囲の測定を可能にする、大電流モード及び試料への照射電流量の表示機能が搭載されている。これにより測定時間が短縮され、かつ試料へ照射される電流量の安定性チェックを行えるようになったことで、測定点が多く観察に時間を要していた、工業品の洗浄度解析やフィルター補修物等の自動粒子解析業務において、安定した高速・省力分析が行えるようになった。

以下データは、同装置を用いてフィルタ上に捕集された微小異物を解析した結果である。従来の電流モード(mode4)では約16,000個の粒子を2時間強で分析しているが、今回の大電流モード(mode5)で測定を行うと約20,000個の粒子を45分で分析している。

この解析手法は自動車部品の製造現場において行われているISO16232/VDA19に準拠した洗浄度管理の迅速化に期待される。

そして検査工程での繰返し測定を実施する際には、装置UIに表示されている試料電流の値を確認することで、測定中の大きなビーム変動がないか、モニタリングすることも可能となる。

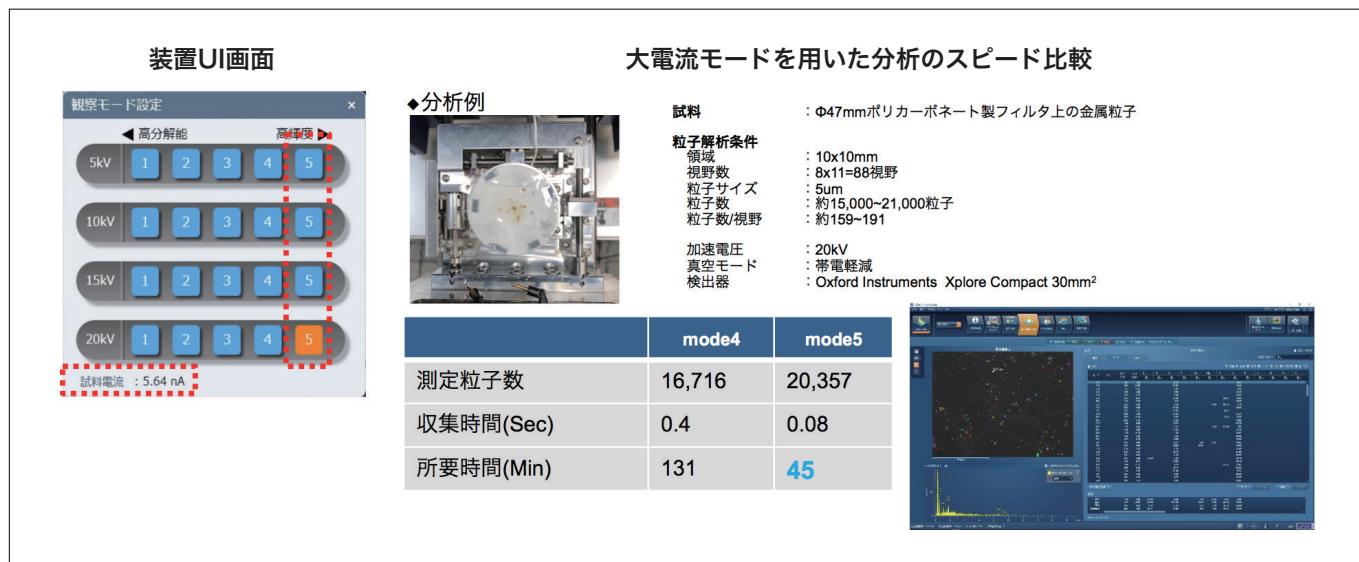


図4 自動粒子解析における大電流化の効果検証

3-2. 計画的な装置運用を支援

いつでも安心して装置を使用できるよう、新たなサポート機能としてフィラメントインジケータ機能及び、AutoOQ (Auto Operational Qualification) 機能を搭載した。

フィラメントインジケータについては、電子顕微鏡の主な消耗部品の1つで電子源として使用するフィラメントの交換時期の目安を画面上で確認することができる機能である。汎用 SEM の電子線源であるフィラメントはその構造上、突然断線する。そしてその兆候を理解するのは熟練者が継続的に使用した場合のみである。そのため今まで、長時間連続観察を実施している中に、フィラメントが突然切れてしまい測定を中断し急遽フィラメント交換作業を行わねばならないケースが散見された。フィラメントインジケータにより観察前にフィラメント交換時期(目安)を確認することで、事前に寿命切れ間近のフィラメントを交換しておくといった対応で、観察を中断するケースを防ぐことができるようになった。

AutoOQについては、装置を動作させることで装置状態の確認を自動で行い、ユーザー及びサービスエンジニアによる装置状態の伝達を簡便化するレポート出力が可能となる機能である。同機能を用いることでユーザーによる装置使用前もしくは使用後の装置状態管理や、トラブル発生時のサービスエンジニアへの装置状態連絡の際に、自動で出力されたレポートを用いて的確な状態把握・共有が可能となり、装置運用の効率化を図ることができる。

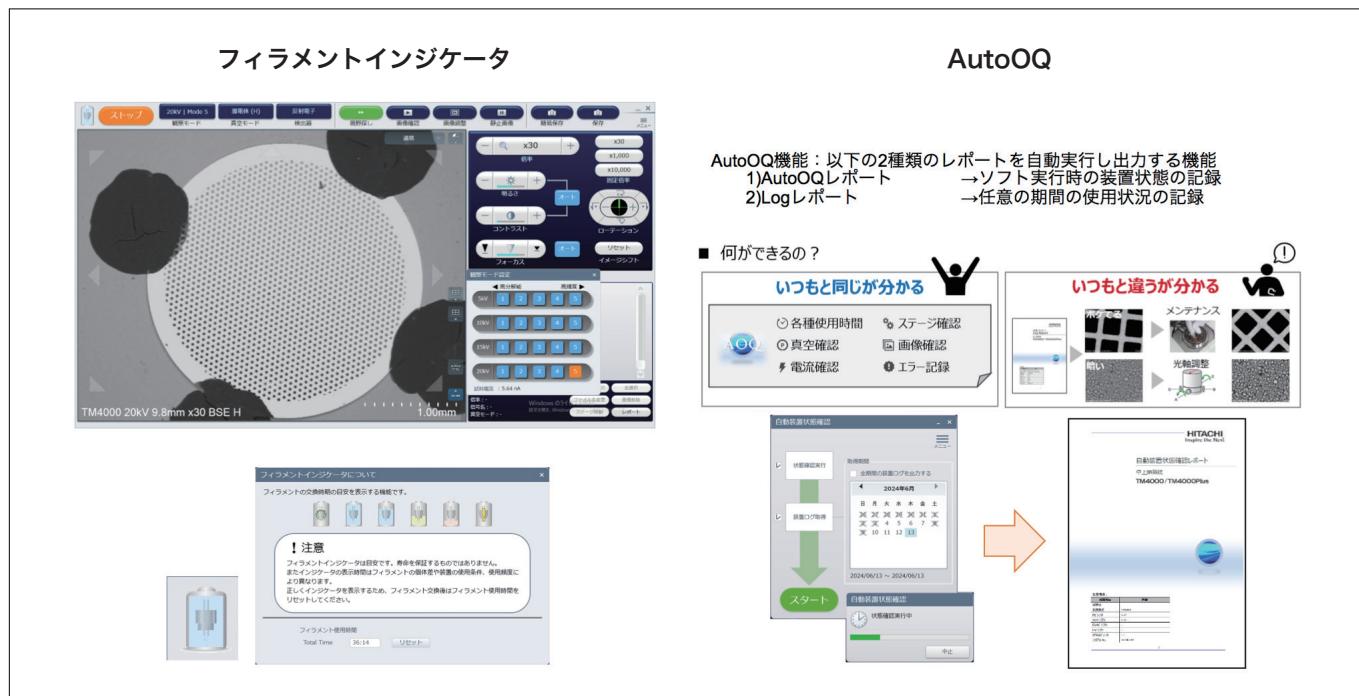


図5 フィラメントインジケータ及びAutoOQ

3-3. 新たなプログラミング教育ツールとしての活用

TM4000PlusIIIは、Miniscope®シリーズ共通の低真空観察機能を搭載しており、試料の前処理工程を簡素化し、簡単に観察を実施できるため、教育現場においても活用することが可能である。

また日本では高等学校の教育課程において「情報I」が必須科目となるなど、デジタル人財の育成が教育現場においても重要な課題とされている。そこで観察ワークフロー自動化支援機能でのPython scriptを用いることで“順次実行”，“繰り返し”，“条件分岐”といったプログラミングにおける重要概念を、TM4000PlusIIIの操作を通じて体感しながら学ぶことができるようになった。

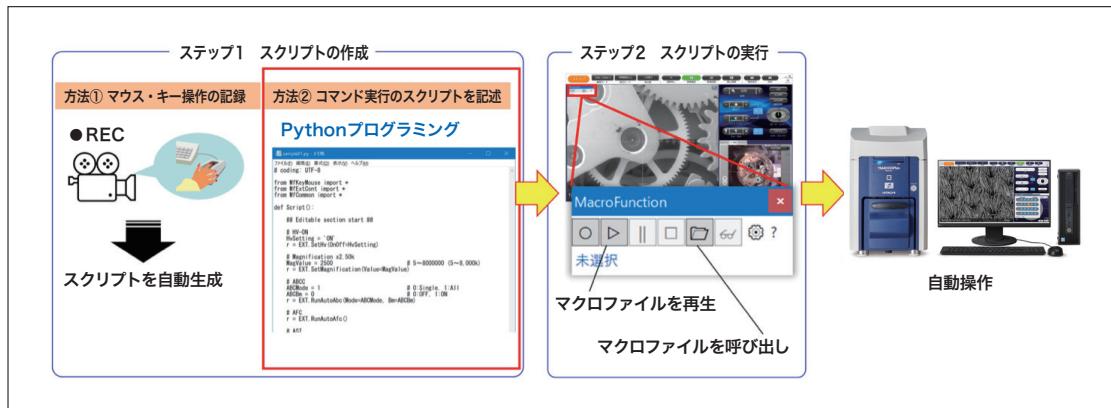


図6 マクロ機能の操作手順

4. まとめ

TM4000PlusIIIは、観察ワークフロー自動化支援機能の搭載によって作業の省力化・技術の平均化を可能にした。また操作コマンドのプログラミング機能を搭載することで、次世代の人財育成のための教育ツールとしての役目も果たすことができ、お客様の多用な観察ニーズに応えられる製品として活用されていくことが期待される。

観察・分析装置としての機能を追求するだけでなく、ますます多様化していく電顕ユーザーの課題解決へ挑戦していくたい。

著者紹介

後藤 健

(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システム営業本部 グローバル営業企画部

蛍光X線分析のリサイクル材料への活用

山田 充子

1. はじめに

現代の大量生産大量消費を行う社会では、不要になった大量の廃棄物が日々捨てられている。廃棄物処理を適切に行わないと深刻な環境問題を引き起こす恐れがあり、廃棄物の発生抑制(Reduce), 再使用(Reuse), 再生利用(Recycle)が求められている。図1は廃棄物の処理工程を示した図である。廃棄物の種類や工程によって有効利用の仕方が異なり、それに伴って必要となる分析も異なる。ここでは灰およびスラグについて取りあげる。

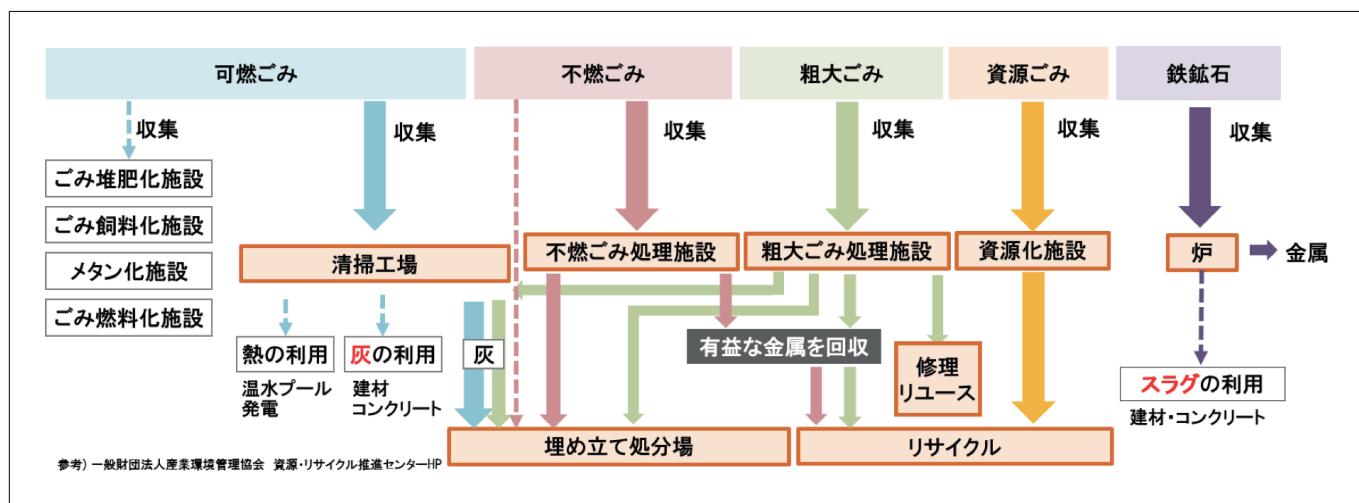


図1 廃棄物の処理工程

灰やスラグは、建材やコンクリートに再利用する際、有害元素の濃度が基準値以下か、建材やコンクリートに使用可能な組成であるかを分析し管理することが求められている。その分析方法は「JIS M 8815-1976. 石炭灰及びコークス灰の分析方法」および「JIS K 0058-2:2005.スラグ類の化学物質試験方法 第2部：含有量試験方法」に定められている。しかし、これらの公定法では操作や前処理が煩雑となるため多数の試料を迅速に分析することが難しいという課題がある。そこで煩雑な前処理不要、固体・液体・粉体を測定可能、非破壊分析および多元素同時測定が可能なエネルギー分散型蛍光X線分析法によるスクリーニング分析がしばしば用いられている¹⁾。

2. エネルギー分散型蛍光X線分析装置EA1400

今回、灰とスラグの分析にエネルギー分散型蛍光X線分析装置EA1400(日立ハイテクサイエンス製)を用いた。EA1400は試料台の下にX線発生部の管球と半導体検出器が配置されている。試料を設置して数分の測定をすることで、試料を構成する元素(₁₁Na ~ ₉₂U)の定性および定量分析を行うことができる。EA1400には高分解能・高計数率の新型シリコンドリフト検出器(SDD)と真空システムが搭載されており、従来のエネルギー分散型蛍光X線装置と比べて、高感度で高スループットな測定が可能である。法規制されている元素のスクリーニングや品質管理などに多く用いられ、その他にも文化財や環境分析など様々な目的で広く利用されている。

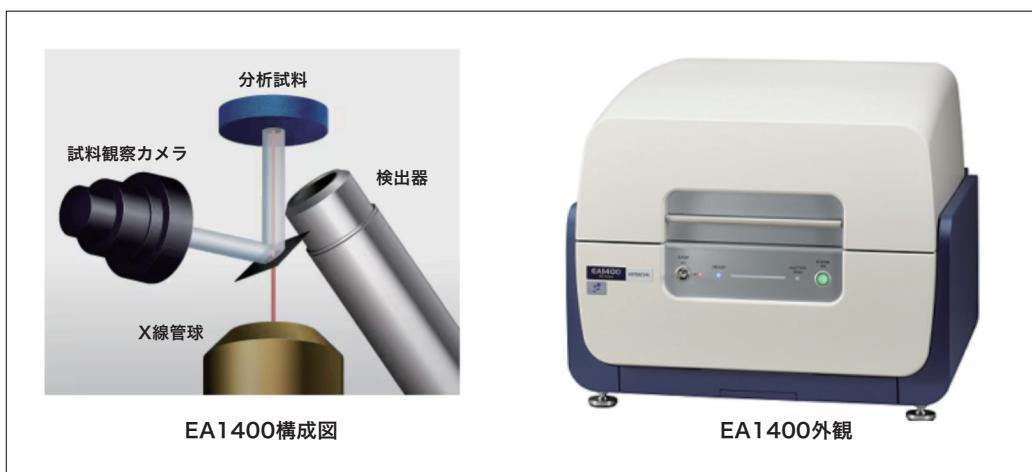


図2 蛍光X線分析装置EA1400

3. 試料および測定条件

灰の試料として石炭灰認証標準物質(JSAC 0522), スラグの試料として独自入手した水碎スラグを粒径 ϕ 0.25 mm 以下に粉碎した試料を用いた。底面にポリエチレンフィルムが貼られた内径 ϕ 24 mm, 高さ 22 mm の分析用カップを二つ用意し, 各試料約 10 g をそれぞれ分析用カップに入れて紙で蓋をした。測定には EA1400 を用いた。原子番号の小さい元素 (\sim_{20} Ca) の蛍光X線の感度を上げる目的で試料室はロータリーポンプで真空雰囲気とし, 測定時間は 400 秒とした。

表1 石炭灰認証標準物質JSAC 0522と水碎スラグの測定条件

装置	EA1400 (Rh 管球)			
定量方法	バルクFP 法			
測定時間 (s)	100	100	100	100
コリメータ (mm)	Φ5.0	Φ5.0	Φ5.0	Φ5.0
励起電圧 (kV)	15	15	50	50
管電流 (μ A)	自動	自動	自動	自動
1次フィルタ	OFF	Cr 用	Pb 用	Cd 用
分析用カップのフィルム	有	有	有	有
雰囲気	真空	真空	真空	真空

4. 結果および考察

分析結果を表2に示す。石炭灰(JSAC 0522)では分析結果を認証値と比較した。スラグ試料では分析結果を ICP 発光分光分析装置(ICP-OES)の分析値と比較した。

表2 蛍光X線分析値と認証値およびICP-OES分析値の比較

石炭灰認証標準物質(JSAC 0522)の認証値と蛍光X線分析値の比較

	主要成分 質量分率, %							微量元素 mg/kg	
	SiO ₂	Al ₂ O ₃	TiO ₂	CaO	MgO	P ₂ O ₅	K ₂ O	Cr	Pb
認証値	59.4	28.7	1.7	1.3	0.60	0.33	0.29	139	98
EDXRF* (EA1400)	58.4	32.4	1.8	1.4	0.75	0.55	0.33	140	97

*EDXRF : エネルギー分散型X線分析

水碎スラグのICP-OES分析値と蛍光X線分析値の比較

	主要成分 質量分率, %								
	CaO	SiO ₂	Al ₂ O ₃	MgO	S	TiO ₂	FeO	K ₂ O	MnO
ICP-OES	41.0	32.2	14.5	5.8	1.1	0.63	0.33	0.32	0.24
EDXRF (EA1400)	42.9	33.5	15.6	4.5	1.5	0.62	0.52	0.45	0.26

EA1400で認証値およびICP-OES分析値と近い結果を得ることができたのは、表3に示す要点を周到した結果であると考える。

表3 萤光X線分析における主な要点

要点	理想的な試料	理想と異なる試料	今回用いた対策 (灰・スラグ)
試料の均質性	均質	不均質	粉碎
試料の形状・厚さ	平板 (バルク厚さ以上)	粒状 薄いシート状 線状 ⋮	容器充填 (厚さ5 mm以上)
試料含有元素	測定可能元素 のみで構成	樹脂・オイル・水溶液 酸化物・窒化物 ⋮	理論計算(FP法)にて測定された 元素が代表的な酸化物の構造で存 在すると仮定して計算

萤光X線分析では試料が均質であることを前提条件としている。均質な状態にするために今回スラグを粉碎した。試料量を10 gにしたのは試料厚さをバルク領域にするためである。バルク領域とは、試料の厚さを変化させても萤光X線強度は変化しない厚さの領域のことである。バルク領域は測定元素の萤光X線エネルギーと試料の主成分で決まる。灰とスラグのバルク領域の目安は厚さ5 mm以上である。今回、定量方法としてファンダメンタルパラメーター法(FP法)を用いた。萤光X線分析法では、試料の組成(含有元素および含有量)がわかれれば、萤光X線発生の原理に基づき、測定条件とファンダメンタルパラメーター(物理定数)を用いて、萤光X線強度を理論的に計算することができる。FP法とは、この理論強度計算を利用して、測定強度から組成を求める方法である。測定強度から直接含有量に変換することは計算式が複雑で困難であるため、逐次近似計算法を用いる。FP法の計算の流れは、まず試料の組成を初期仮定し推定強度を計算する。次に推定強度と実測強度を比較する。推定強度と実測強度の差が大きければ、組成の仮定を変更して推定強度を計算し、実測強度と比較する。推定強度と実測強度の差が小さくなるまで組成の仮定を変更し続け、推定強度と実測強度が一致したときの仮定した組成を分析結果とする²⁾。灰やスラグ中の主な元素は酸化物として存在することが知られているため、今回、萤光X線で測定された主な元素は代表的な酸化物の構造で試料中に存在すると仮定した。表3の要点を周到して分析した結果、EA1400で石炭灰や水碎スラグの主成分だけでなく石炭灰中の微量元素(Cr, Pb)の同時分析も可能であった。萤光X線分析は簡便な分析でありながら公定法と近い分析結果を得ることが可能であり、リサイクル材料分析においても役立つ分析法であると考えられる。

5. 結言

エネルギー分散型萤光X線分析法は、煩雑な前処理不要、固体・液体・粉体を測定可能、非破壊分析および多元素同時測定が可能であり、多数の試料を迅速に分析することが必要なりサイクル材料のスクリーニング分析に役立つ分析法であると考えられる。萤光X線分析における主な要点を周到することで、公定法に採用されている分析法と近い結果を得ることが可能である。幅広い分野で利用される萤光X線分析がリサイクル材料分析においてもますます広く活用されることを期待したい。

参考文献

- 1) 横石規子、佐藤重臣、永嶋仁、萤光X線分析法による精錬スラグのオンライン迅速分析技術、JFE技報、No.13(2006年8月), p.48-53.
- 2) 中井泉、日本分析化学会X線分析研究懇談会、萤光X線分析の実際 第2版、朝倉書店(2016).

著者紹介

山田 充子

(株)日立ハイテクアナリシス アプリケーション開発センタ

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

S I N E W S
I N T E R V I E W

Vol. 28

SEMとの出会い、「現象の可視化」がすべての軸

～TOTOの製品開発を支えてきた分析のスペシャリスト～

TOTO株式会社(以下、TOTO)の総合研究所は、暮らしに身近な水回り空間を、よりきれいで快適にする研究を重ね、さらにセラミック技術を半導体生産設備に生かす際の開発支援など、幅広い事業に成果を挙げています。今回は同研究所の分析技術部を訪問し、長年分析業務に携わってこられた青島利裕 上席研究員に、TOTOにおける分析業務の成果と、分析データの共有や業務効率化に資するExTOPEの導入などについてお話をうかがいました。

TOTO株式会社
総合研究所
分析技術部
上席研究員

青島利裕 氏



暮らしに欠かせない水回り空間の『困ったを良かった』に

暮らしの中で、誰もが一度は目にしたことがあるだろうTOTOの文字。私たちの日常生活に欠かせない商品群の技術開発において重要な役割を担っているのが、神奈川県茅ヶ崎市に位置する総合研究所だ。

同研究所のミッションは、水回り空間を担うトップ企業の研究所として、毎日使うトイレ、浴室、洗面、キッチンの『困ったを良かった』に変える新しい提案、新しい技術を研究することにある。

TOTOは1917年の創立以来、素材や製品の基礎となる研究を担当事業部で行ってきた。その後、研

究所を設立し、2002年には総合研究所に発展。現在は、オールTOTOの商品研究、人間工学や感性工学の分野、ライフスタイルや生活様式の研究など、その範囲を広げながら、商品のコアになる技術を創出している。コア技術の開発のポイントの一つが、分析技術だ。現在、ナノレベルの材料開発はどの産業分野にとっても重要課題だが、TOTOにおいても水質や材料、臭気、微生物といった見えないものを解明する分析技術は、魅力ある商品の開発と提供に直結している。



技術者人生のスタートは、X-560との出会い

青島氏が入社したのは1978年。翌1979年に発足する研究所の前身である研究室の分析グループに配属されたことが青島氏のキャリアのスタートになった。以来、一貫してTOTOの研究開発や各事

業部の重要課題に取り組んできた青島氏は、次のように振り返る。

「研究所の歴史は、この茅ヶ崎工場の西端にあった小さな建屋から始まり、私はその地下室で、今

思うと運命ともいえる日立 X-560 と出会いました。X-560 は SEM に WDX(波長分散型 X 線分析器)を搭載した観察と元素分析を両立した局所分析装置で、自動化が進んだ現在の装置とは異なり、最高のマニュアル装置として、観察技術と局所分析の感性を磨くことに役立ちました」

続く 1980 年は、温水洗浄便座の代名詞となっているウォシュレット[®]が発売されるなど、同社にとって大きな飛躍につながる時期を迎える。さらに、1984 年にはセラミック事業部が創設され、以降、事業部とも密接な連携をとりながら、さまざまな分析技術を駆使して現象の理解を深めてきた。

分析装置の進化と、研究開発力の向上がリンク

その後、分析グループはスタッフを増やすとともに、最先端の分析装置を次々に導入していった。

「新規の装置導入は、仕事を通じて、分析装置メーカーの開発技術者やアカデミアの研究者と交流する機会にもなり、分析技術者としての成長のチャン

スにもなりました。なかでも大きなターニングポイントになったのが日立 S-800 の導入です」と青島氏。

S-800 は、当時世界最高の分解能 2 nm(加速電圧 30 kV)を実現した高分解能走査電子顕微鏡であり、FE-SEM の操作性を飛躍的に向上したことでユーザーの好評を博し、FE-SEM の急速な普及につながったと言われている機種だ。

「初めて画面に映し出したのは、アルミナ基板に析出した nm サイズのタンゲステン微粒子でした。暗闇の中、CRT のラスター(画面を上から下に動く一本の走査線)がゆっくり移動して、美しい微粒子がピカッと鮮明に光り輝きました。それまで見たことがない鮮烈な画像の出現にワクワクしたことを昨日のことのように覚えています」

S-800 を手に入れたことで、TOTO の研究開発力は大幅に向上したと青島氏は述懐する。



より「きれいで快適」な水回りの提供に貢献

分析技術部の仕事は、TOTO のさまざまな製品開発に貢献している。その一例に、いまも TOTO のトイレの重要な訴求ポイントになっている『セフィオントテクト』がある。トイレの防汚性を飛躍的に高めるという課題に対して、開発メンバーであっ

た青島氏は年数を経て衛生陶器の表面を観察し、その結果、釉薬が溶けて露出したジルコンの凹凸に汚れが蓄積していくことを明らかにした。そこで開発チームは、ジルコンを含まないガラス層をつくることによって課題解決を図った。こうして生まれ

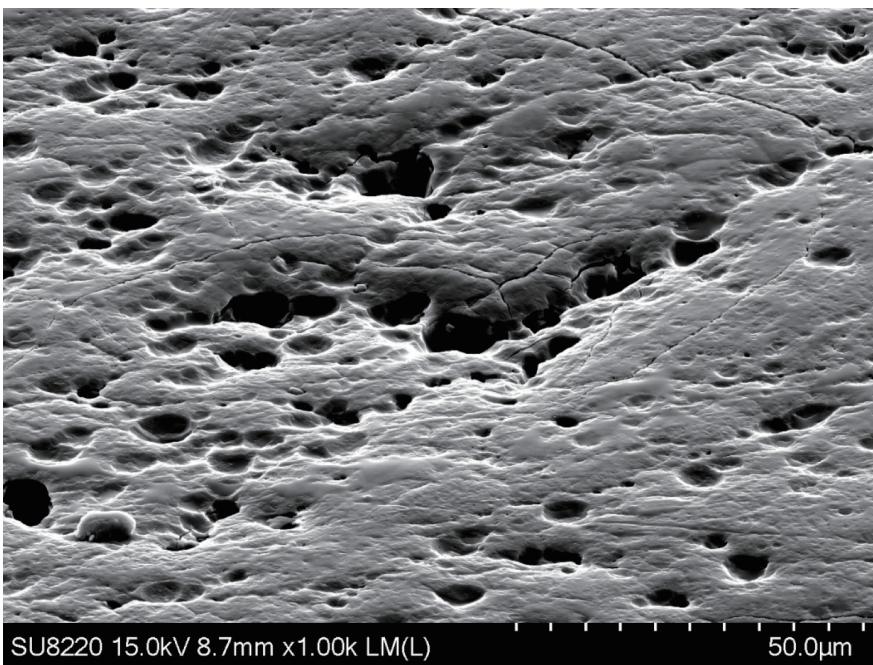
SI NEWS
INTERVIEW

たセフィオンテクトのガラス層は、100万分の1のナノレベルの平滑性を持ち、汚れが付きにくく、落としやすい便器として10年以上の使用に耐えることも顕微鏡画像で裏付けられた。

水道水に含まれる塩化物イオンを電気分解してつくる『きれい除菌水』では、菌が死滅する様子を捉え、耐久性のある電極の表面素材開発にも貢献している。できるだけ少ない水量でトイレの汚物を流す節水便器の開発では、X線CTによって便器全

体を3D化して、流体シミュレーションで水の流れを可視化することで、開発期間の短縮にもつなげている。

これら一連のクリーン技術開発によってTOTOの衛生陶器は30年前の約1/3以下の量まで節水が進んでいる。ユーザーにとっては洗剤や水の使用量の節約になるとともに、貴重な水資源を有効活用するという意味で社会課題への答えにもなっている。



60°傾斜させて観察したアルマイト表面の凹凸形態

セラミックスの研究や、社外での活動にも幅を広げて

分析技術部は製造、品証、研究といったさまざまなフェーズで分析技術に携わり、多様な材料を扱う。その成果を起点に、青島氏の活動は、学会発表やアカデミアとの共同研究にも広がっていった。

「久留米大学医学部の太田啓介教授との共同研究では、防藻メカニズムの解明に取り組み、藻やカビ、菌、バイオフィルムのミクロ構造を明らかにしました」

この研究は光触媒作用を生かした『ハイドロテクト』に展開され、環境浄化作用を持つ素材として建材や建物外壁などに活用されている。

また九州大学大学院では、ものづくり工学教育研究センター主催のセラミック工学コースで、分析技術を駆使した研究開発に関する講義も18年連続で担当している。これは地域企業の若手育成が目的であり、受講者の評価は毎年上位に位置しているという。

ExTOPEによる分析装置の遠隔操作は、いち早く共同研究に協力していただいた事例だ。

茅ヶ崎の高分解能電子顕微鏡を、北九州(本社)、中津、岐阜の事業部から遠隔操作で動かすというプロジェクトは、総合研究所にある分析装置にどんな利用価値があるかを理解してもらうところから始まったと青島氏。当初は通信レスポンスなどの課題もあったが、今ではTOTOの各事業部が、自

部門の課題解決や新しい技術の開発に活用している。電子顕微鏡の操作は熟練度が必要とされ、誰でもボタンを押せば見たいものが見られるというものではない。実際に各事業部の担当者が操作する際、青島氏がひと言ふた言アドバイスするだけで、見違えるような画像が得られることに驚かれるという。更に像解釈や課題解決に向けた議論となれば、その場での指導は大きなポイントになる。熟練技術の伝承、後進育成という意味でも、ExTOPEは大事な役割を担うことになりそうだ。

半導体製造装置のキーパーツである静電チャックも成果の一つに挙げられる。開発の過程で導電メカニズムを解明し、優れた耐プラズマ性を持つ製品としてセラミック事業部の主力商品になっている。

「静電チャックは新領域のセラミックス事業のなかでも、新たな収益源として期待されている商品です。半導体製造分野の生産性向上と低コスト化に貢献したことが評価され、セラミック事業部と研究所のメンバーとで2009年度の日本セラミックス協会の技術賞も受賞しました。何より、半導体メーカーの最先端のニーズに追いつき、未来を先取りした提案を行うためには研究を続けることが欠かせません。そのためにもミクロ、ナノ領域を解明する分析技術は大きな鍵を握ります」

分析の役割とは、真実を示すこと

TOTOでスペシャリスト制度が始まった2004年秋、TOTOスペシャリストの第1号として主席研究員に任命された青島氏。2010年には上席研究員と

なり、事業部の分析技術の向上を目指した「分析技術」「分析設備」への指導アドバイス、「分析人財」の育成にも力を注いできた。

分析装置メーカーとの深い関わりや学会活動、アカデミアとの共同研究など、社内にとどまらない活躍はTOTOスペシャリストとして積み重ねてきた経験によるものに違いない。社内外に数々の貢献を果たしてきた氏は、分析の役割を『真実を示すこと』だと断言する。

「真実は目に見える現象や物性に、実に巧みに紐づいているはずです。私たち分析部門に期待されているのは、この実に巧みな世界を紐解き、明らかにすることです。実に巧みな相手と戦うのですから

当然のように、この技術は奥深いです。そしてそれを進めるためには多くの経験、ノウハウ、何より勘がモノを言います」

また、スペシャリストとは限界を知っている人だとも言う。

「この材料ならばこう見えるはずと分かるし、そこまでたどりつく力も持っています。報告書に添付する写真一枚ですべてを語れるくらい美しいデータを得ることがとても大事だと思っています」

便利になった環境を生かして、成長し続けてほしい

話は少しさかのぼるが、S-800が導入された当初、画像はフィルムで撮影していた。当時の技術者たちはそれを暗室で現像し、焼き付けた写真を報告書にボンドで貼るという、面倒な作業をこなしていたという。しかし、そうした手作業の一つ一つが原理を学ぶ格好の教室であり、デジタル化が進んだ現代の分析環境がいかに恵まれているかを後

世に伝えるエピソードでもあると話す。

「分析装置の進化はSEMだけでなく、新しい手法が次々に開発され、今まで見ることができなかつた、測ることができなかつた世界が、鮮やかに見え、高感度に測れるようになっています。私は、日立さんならできると思い『こんなものが見たい』『こんな機能があるといいな』と伝えてきたわがままなユー

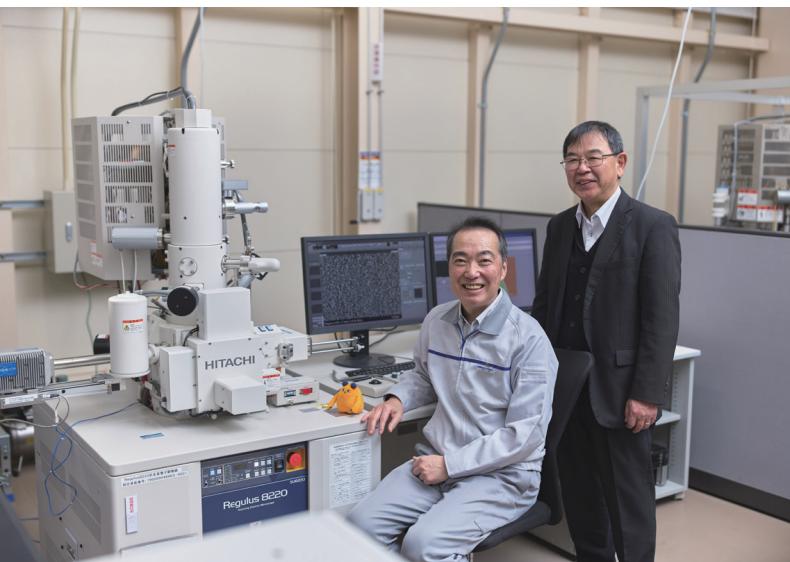


ザーでしたが、それが特許に結びついたこともありました。そして装置が進化するたびに、私たちの分析技術も伸びていったと感謝しています」

青島氏は、自分たちが育った時代と現在とでは仕事のスピード・情報量・働き方も大きく変わったが、根本にある技術者魂はいつの時代も同じはずと思いを込める。

「むしろ昔より圧倒的に便利になったプラスの側面を上手く利用し、TOTOの名刺を存分に活用することで、企業の技術者として成長することを後輩達に期待しています。日立さんには、ぜひ今後もTOTOの分析技術の進歩を支えていってほしいと願っています」と笑顔で語った。

分析のスペシャリストとしてTOTOの発展を支えてきた青島氏には、TOTO女子バスケットボール部のヘッドコーチというもう一つの横顔がある。日本社会人バスケットボール連盟に加盟し、社会人地域リーグに参戦。2024年度女子東日本地域リーグでは悲願の初優勝を果たした。「You be bright this time!～今を輝け～」を旗印に勝利を目指すかたわら、ミニバスクリニックや体験教室などを通して子どもたちとの交流も熱心に行っているとのこと。これもまた地域社会への貢献であり、社内、社外の多くの人と関わり、多くの課題にトライしてきた青島氏らしい一面としてご紹介する。



編集後記

青島様とは、デモ、学会、セミナーなどを通じて約30年のお付き合いをしています。青島様のSEM分析への情熱はすごく、像解釈や装置改善などについて湘南のファミレスで深夜まで議論したことが昨日のことのように思い出されます。また、TOTOと日立ハイテクのバスケットボールチームの練習試合を観戦した時は、監督として指揮する姿がSEMに向かう情熱と同じ雰囲気であることを感じたことも思い出されます。今回のインタビューでは、総合研究所の設立当時や研究開発のエピソードから数々のご功績を知ることができ、スペシャリストに認定されたのは当然のことであると再認識しました。X-560から多くの日立SEMを採用いただいた青島様とお付き合いできたことは私の財産でもあり、今後もお付き合いを続けられたら光栄です。次回は、湘南の海が見えるお店で、お酒を飲みながら昔話と未来について語り合いたいと思っています。

(多持隆一郎)

S I N E W S
I N T E R V I E W

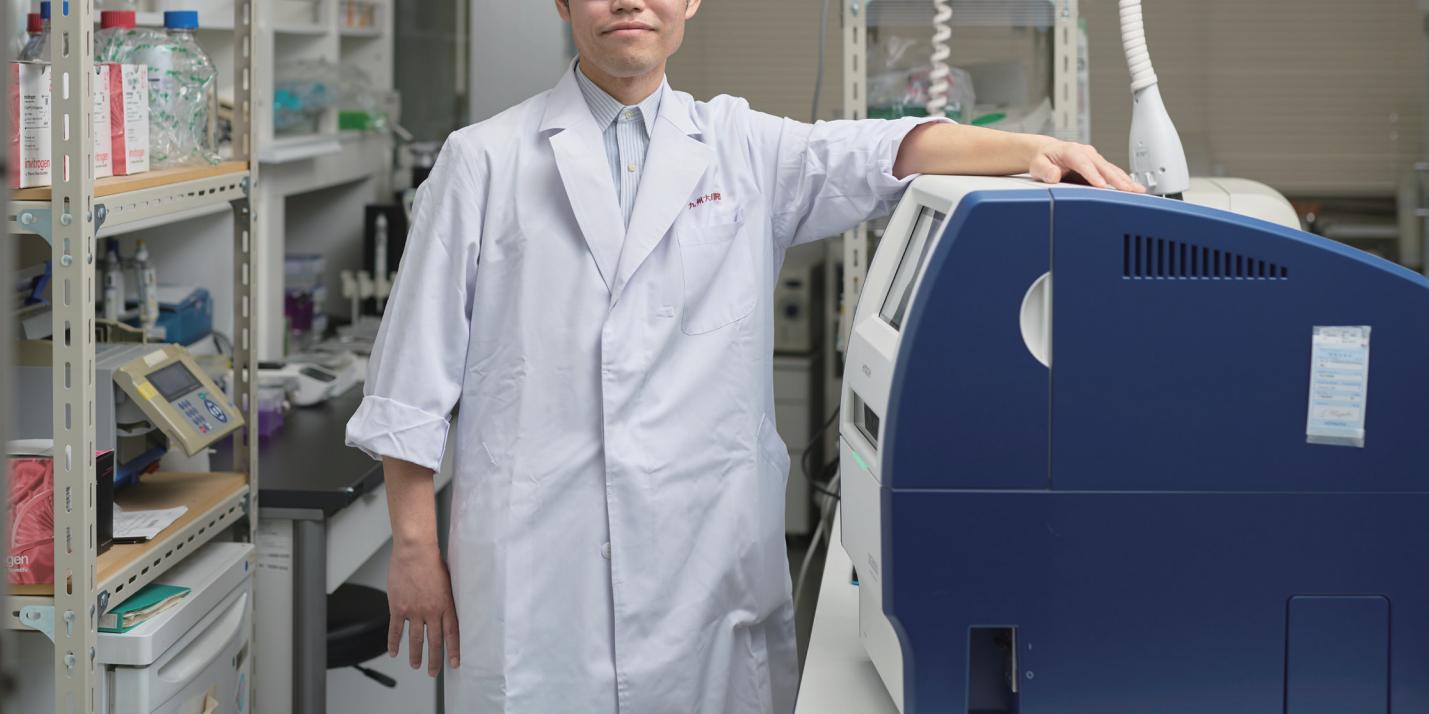
Vol. 29

骨軟部腫瘍の遺伝子異常を解析し、
正確な診断と正しい治療の確立をめざす

九州大学大学院 医学研究院は、最適な治療の提供をめざして、病気の特性を研究し、診断法、治療法の改善に取り組まれています。その一つとして、同院の形態機能病理学教室では、骨軟部腫瘍の研究を行っています。骨軟部腫瘍のうち、悪性のものは「肉腫」と呼ばれ、その希少性に加え、多彩な組織像を示すため、病理診断や治療法の開発には、腫瘍の遺伝子異常を研究することが重要になっています。正確な診断と正しい治療の実現に向けて、実験とデータの抽出に取り組んでいる同教室の岩崎 健准教授にお話をうかがいました。

九州大学大学院 医学研究院
形態機能病理学分野
九州大学病院 病理診断科・病理部
准教授

岩崎 健 博士(医学)



特徴は希少性と多様性

骨軟部腫瘍とは、骨や筋肉、脂肪、神経、血管などの間葉系組織に発生する腫瘍の総称である。一般的に「がん」と聞くと、大腸がんや胃がんなどの上皮性腫瘍を思い浮かべる人が多いが、骨軟部腫瘍はそれとは異なる特徴を持つ。

九州大学大学院 医学研究院 形態機能病理学教室でこの領域を専門とする岩崎 健准教授は「例え

ば、大腸がんであれば、組織を顕微鏡で観察するだけで診断がつくことが多いのですが、骨軟部腫瘍は診断が非常に難しい疾患です」と話す。骨軟部腫瘍は多彩な組織像を示すため、単なる形態観察だけでは正確に疾患を分類するのが難しい。さらに、発生頻度が低いがゆえに、一般的な病院では患者数が少なく、専門家の数が限られるという問題もある。

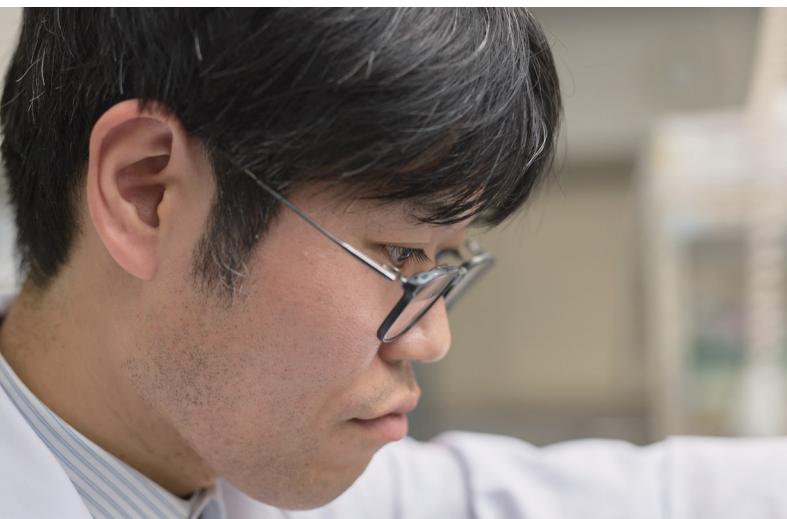
治療の面にも多くの課題が

また、骨軟部腫瘍は治療の面でも課題が多い。胃がんや大腸がんは定期的な健康診断で発見されることが多いが、骨軟部腫瘍は「こぶができる」「足が腫れている」などの自覚症状から病院を受診し、偶然発見されるケースが多い。特に、体の奥深くにできる後腹膜腫瘍などは、外から見えず、非常に大きくなつてから見つかることがある。

「まれな疾患であることから診断が遅れたり、特に肉腫において腫瘍がかなり大きくなつてから気付

いた場合には、より大きな範囲の切除が必要になります、形成外科による再建術(筋皮弁や植皮)などが必要になることもあります。また、発見が遅く切除不能になった場合などは、予後不良のケースも少なくありません」

骨軟部腫瘍は小児から高齢者まで幅広い年齢層に発生し、また脂肪、筋肉、血管などさまざまな場所に発生することも特徴だ。近年、がん治療は分



子標的薬の開発により進化している。例えば、乳がんや大腸がんでは、特定の分子異常を狙った治療薬が広く用いられるようになっている。

「しかし、骨軟部腫瘍は種類が多岐にわたるため、それぞれに特化した治療法の確立には至っていません」

近年は研究の成果として、遺伝子異常に基づく疾患分類が進んでいるが、依然として分類が難しい骨軟部腫瘍が多数存在する。研究の途上で未知の遺伝子異常が次々に見つかっている分野でもあり、いまだ腫瘍特異的な分子標的薬の数は限られている。

最適な遺伝子解析の手法を模索

こうした課題に対し、岩崎准教授は新しい診断法や治療法の開発に貢献するため、骨軟部腫瘍の分子異常の研究に取り組んでいる。

研究において、まず一般的によく使われるのは免疫染色だ。これはタンパク質の発現を確認するのに優れた手法だが、遺伝子の異常を解析することはできない。そのため、最近では次世代シーケンサー(NGS)を活用した遺伝子パネル検査や網羅的なRNAシーケンスも行っているが、全ての研究ニーズに適しているわけではないと岩崎准教授は話す。

「FISH法、RT-PCR、サンガーシーケンス、MLPA法、NGSなどを利用して、より正確な診断方法の確立をめざしていますが、いずれの手法もコストやスピード、操作に要する手間など一長一短があり、何を解析したいか、目的によって使い分けが必要です」

遺伝子解析を行う際、従来は学内の受託共用施

設に依頼していた。しかし、岩崎准教授の研究では特定の遺伝子異常のみを迅速に解析したい場面が頻繁にあり、自分たちのペースで研究を進める上では不便を強いられていた。

もう一つの障壁は、標本の劣化だ。

「九州大学病院は、九州管内の骨軟部腫瘍の診療・研究の拠点にもなっているため、全国的にも有数の症例数を誇ります。私が所属する形態機能病理学教室には過去からのアーカイブ標本がたくさんあり、共同研究先の施設からも提供いただいています。しかし、骨軟部腫瘍は疾患頻度が少ないために、30年近く前の標本を使わざるを得ないケースもあります。DNAが非常に断片化していることも多く、NGSによる解析が困難な場合がありました。こうした状況をなんとか改善したいと考えていたところ、紹介されたのがコンパクトなキャピラリーシーケンサーのDS3000でした」

特定の遺伝子異常を手元で迅速に解析

岩崎准教授にDS3000の導入を決めた経緯についてうかがうと、理由は作業性の高さとコストパフォーマンスだったと話す。

「全体的に使い勝手が良く、スムーズに作業が進

められる点が決め手となりました。また、DS3000の消耗品は一体型ではなく、必要に応じて個別に交換できる設計になっています。消耗品がそれぞれ個別のカートリッジ方式で無駄なく簡単に交換で

き、メンテナンスが楽で、コストを抑えながら柔軟に対応できるというメリットがありました。さらに、長年キャピラリーシーケンサーの開発に実績がある日立の製品であることも安心材料の一つでした」

実際に使用しているテクニカルスタッフの声についても、特に大きな不都合はないとのこと。

「初期の段階では操作に慣れるまで少し戸惑うこともありましたが、現在ではスムーズに作業できます。ただし、波形データの表示方法が従来使用していた機器と異なり、生データに近い形で表示されるため、初期の段階では、解釈に少し時間を要しました」

しかし、この点も別の機器を用いた確認作業を行うことで克服できているという。

「DS3000の導入は2024年12月でしたが、それ以

前のデモ期間中から操作性や性能をしっかり検証できたことも非常にありがたかった点です」

岩崎准教授によれば、デモ期間が長く取られていたことで、短期間では気づきにくい利点や欠点を十分に把握し、購入の決断を下すことができたそうだ。

「特に研究機器は長期間使用するものなので、慎重に選定する必要があります。そのため、デモ期間を通じて十分な検証を行えたことは、導入にあたっての大きな安心材料となりました」

DS3000はコンパクトなサイズも大きな魅力だったと岩崎准教授。

「研究室は機材が増えて手狭になっており、大型機材の導入はスペースの問題がありました。しかし、DS3000は小型で、作業台の上に置いても圧迫感なく設置できました。今後の機材の増加を考えると、このコンパクトさは非常に重要な要素です」



断片化が進んだDNAも解析可能に

先述した通り、研究で扱うホルマリン固定パラフィン包埋標本は、DNAの断片化が進んでいることも多く、解析が困難な場合がある。NGSで解析するケースもあるが、ライブラリー作成に失敗することもしばしばあった。

「そのようなケースでも、キャピラリーシーケンサー DS3000を用いた解析であればギリギリ解析が可能なことが多く、大変助かっています」

また、NGSで得られた結果を確認するためにサンガーシーケンスを活用することもあるそうだが、

特定の変異が本当に存在するかを確かめるには、サンガーシーケンスの信頼性が高く、適しているとのことだ。

「研究費の制約の中で、解析コストを抑えつつ確実なデータを得るために、NGSとキャピラリーシー

ケンサーを適切に使い分けています。研究のスピードとコストのバランスを考えると、キャピラリーシーケンサーは今後も欠かせない技術であると確信しています。特に、迅速な結果が求められる場面では、その有用性が際立ちます」

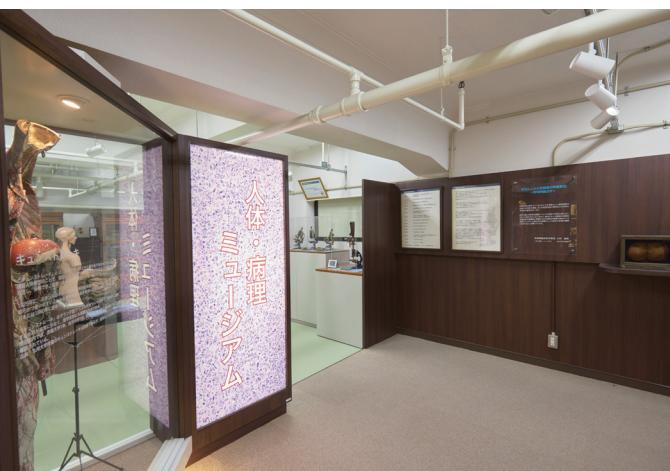
より正確な診断方法の確立をめざして

「今回、新たなキャピラリーシーケンサーを導入したこと、外注に頼らず、自前で解析を進めることができになりました。これにより、従来のような時間的制約が緩和され、より自由度の高い研究が実現しています。受託共用施設では提出時間内に

間に合わせることや配送のための準備が必要でしたが、今では機器にセットすれば、翌日に結果を確認できるようになりました。作業負担が増えることもなく、短いターゲット領域を確実に解析できるため、研究の効率にもつながっています」

骨軟部腫瘍の研究は、まだまだ未知の標的が数多く存在する分野だ。一方で、シーケンス技術の進歩により、解析手法は多様化し、人材の充実やコストの低下が進んでいる。特に、短時間かつ安価に解析ができるキャピラリーシーケンサーは、これからも有効と考えている。例えば、変異解析のみならず、融合遺伝子の検出やベクター構築時の確認、MLPA法を用いたメチル化解析やコピー数解析など、多岐にわたる用途があり、活用の幅はますます広がるだろう。

「これまで、サンガーシーケンスやマルチプレックス解析を用いて細胞群の解析を行うことが主流でしたが、現在ではシングルセル解析の技術が急速に発展しつつあります。一細胞レベルでの解析が可能になることで、より詳細な情報を得ることができます。技術の進歩とともに、骨軟部腫瘍の研究は新たな段階へと進んでいます。未知の領域に挑戦し、より効果的な治療法を見出すために、これからもさまざまな解析手法を駆使しながら研究を発展させていきたいと考えています」



形態機能病理学で100年以上の歴史を持つ九州大学は、構内に「人体・病理ミュージアム」が開設され、希少性の高い標本を160点展示。それに加えて珍しい模型や骨董の価値のある顕微鏡など、教室の枠を超えた医学史的遺産も展示されている。

取材日 2025年3月13日 (取材・記事: 山口としなり, 撮影: 秋山由樹)

株式会社 日立ハイテク

本社(サポートセンタ) 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 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 April 2025 VOL. 68 No. 1

発行日 2025年4月23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/