

HITACHI
Inspire the Next

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

Vol. **60** No. 1

MARCH 2017

March 2017
Vol.60 No.1

5230

《コラム

キャピラリー液体クロマトグラフィーにおけるポリオキシエチレン固定相の開発

竹内 豊英

《研究報文

5233

温度波熱分析とは

橋本 壽正

5239

燐光発光性ポリイミドの低温・真空下における発光特性評価

鹿末 健太, 安藤 慎治

5246

腎生検光顕組織標本の低真空走査電子顕微鏡による検索

山中 宣昭

《技術解説

5255

プローブ顕微鏡“AFM5500M”による微小領域の三次元形状計測

脇山 茂

5265

走査電子顕微鏡FlexSEM1000の特徴三次元形状計測

小室浩之, 坂上万里

《新製品紹介

5271

透過電子顕微鏡HT7800シリーズ**卓上サンプルクリーナZONE II for SEM****イオンミリング装置 ArBlade 5000**

キャピラリー液体クロマトグラフィーにおける ポリオキシエチレン固定相の開発

Development of Polyoxyethylene Stationary Phases in Capillary Liquid Chromatography



岐阜大学工学部 教授

竹内 豊英 (工学博士)

1. はじめに

筆者らはC30などの疎水性固定相に物理的にコーティングしたポリエチレングリコールによって疎水性陰イオン（硝酸イオン、ヨウ化物イオンおよびチオシアン酸イオン）の保持を観察した¹⁾。溶離液の濃度を増加させると試料陰イオンの保持が増大することから、高濃度の溶離液を用いることによって海水中のヨウ化物イオンおよびチオシアン酸イオンの定量に成功している²⁾。陰イオンはポリエチレングリコール相への分配により保持されていると推定している。ここでは固定相の安定性を改善するためにポリオキシエチレン基の化学結合型固定相の開発を試みた。

新しい固定相の開発による新規な機構に基づく分離の発現を期待して本研究を行った。C18を代表とする従来の固定相と比較して固定相にエーテル性酸素原子が複数含まれることから、その酸素原子の効果を期待することができる。

2. 固定相の調製

アミノプロピルシリカ (0.2 g) およびメチルポリエチレングリコール*N*-ヒドロキシコハク酸 (NHS) イミドエステル試薬 (0.1 g) をリン酸緩衝溶液 (pH7.0) に加えて室温で30分間放置した後、水、メタノールで洗浄後フューズドシリカキャピラリーに充填した。期待される反応スキームを図1に示す³⁾。反応に用いるNHSイミドエステル試薬は高価なので少量の固定相でカラムの調製が可能なキャピラリーLCは有利である。

環状ポリオキシエチレンであるクラウンエーテルの化学結合型固定相は下記のように調製した。シリカゲル (0.2 g) にグリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン (0.2 mL) および乾燥トルエン (1.2 mL) を加え110℃で20時間反応させグリシジル基を導入後、2-アミノメチル18-クラウン-6-エーテル (60 mg) および乾燥トルエンを加えて90℃で18時間反応後、メタノールおよび水で洗浄した。残存グリシジル基を開環する目的で10 mM硫酸の20%アセトニトリル水溶液を加えて40℃で4時間反応させた後、フューズドシリカキャピラリーに充填した。期待される反応スキームを図2に示す⁴⁾。

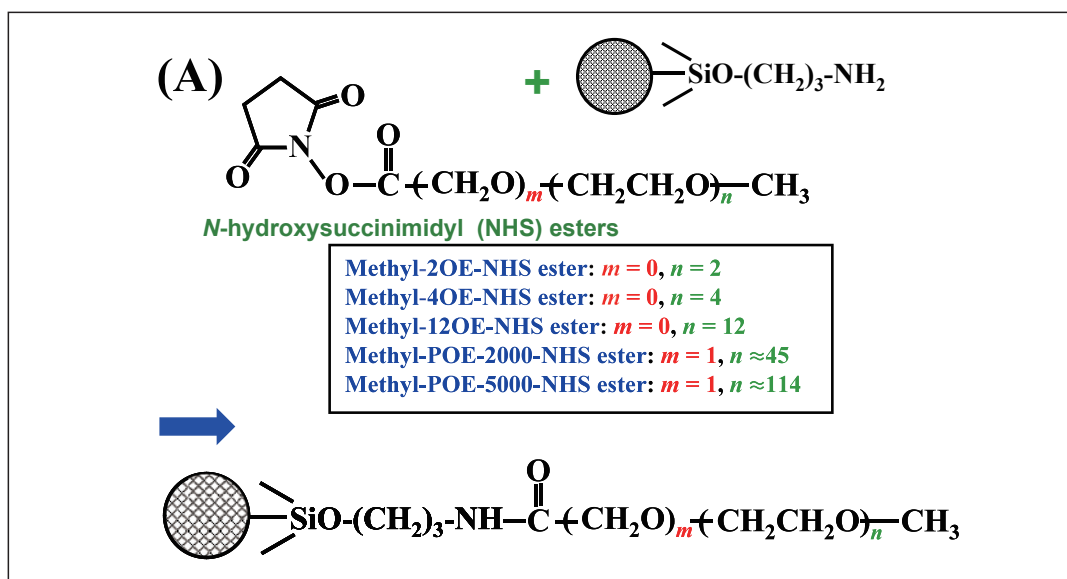


図1 ポリオキシエチレン固定相の調製

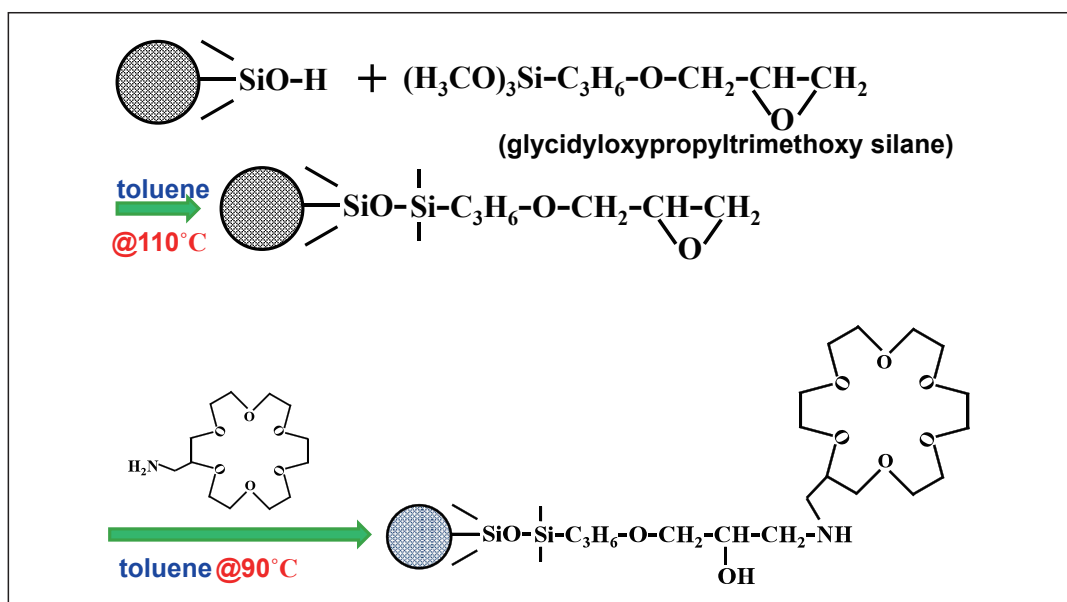


図2 クラウンエーテル固定相の調製

3. 結果と考察

ポリオキシエチレン基を結合させた固定相によって、溶離液の濃度が高くなると保持が減少したことおよび間接吸収検出が可能なことより陰イオンがイオン交換モードで分離できることがわかった⁵⁾。オキシエチレンユニット数が2の固定相においてもイオン交換モードで陰イオンが分離できたことより、溶離液中の陽イオンが複数のポリオキシエチレン基に配位して陰イオン交換サイトとして働いていることが推定された。分離例を図3に示す³⁾。亜硝酸イオンと臭化物イオンの分離ができなかったが、溶出順は通常のイオン交換モードと同じであった。唾液中の硝酸イオン、ヨウ化物イオンおよびチオシアン酸イオンの定量が可能であった。また、溶離液として高濃度(70%)のアセトニトリルを用いると、ポリオキシエチレン固定相はHILICモードで作用することがわかった³⁾。さらに、溶離液にドデシル硫酸ナトリウムを加えると、ナトリウムイオンがポリオキシエチレン基に配位し、ドデシル硫酸基が対イオンとして結合するため、固定相の疎水性が増加し、逆相系分離が達成できることがわかった³⁾。以上のようにポリオキシエチレン固定相は溶離液を選択することによって分離モードを選択できることがわかった。

一方、18-クラウン-6-エーテルを結合した固定相においても、クラウンエーテルに溶離液中の陽イオンが錯形成され、トラップされた陽イオンが陰イオン交換基として作用することが考えられた⁴⁾。この場合、溶離液中の陽イオンの種類によって保持の大きさが異なり、クラウンエーテルと安定な錯体を形成する陽イオンほど大きな保持を与える傾向があった。

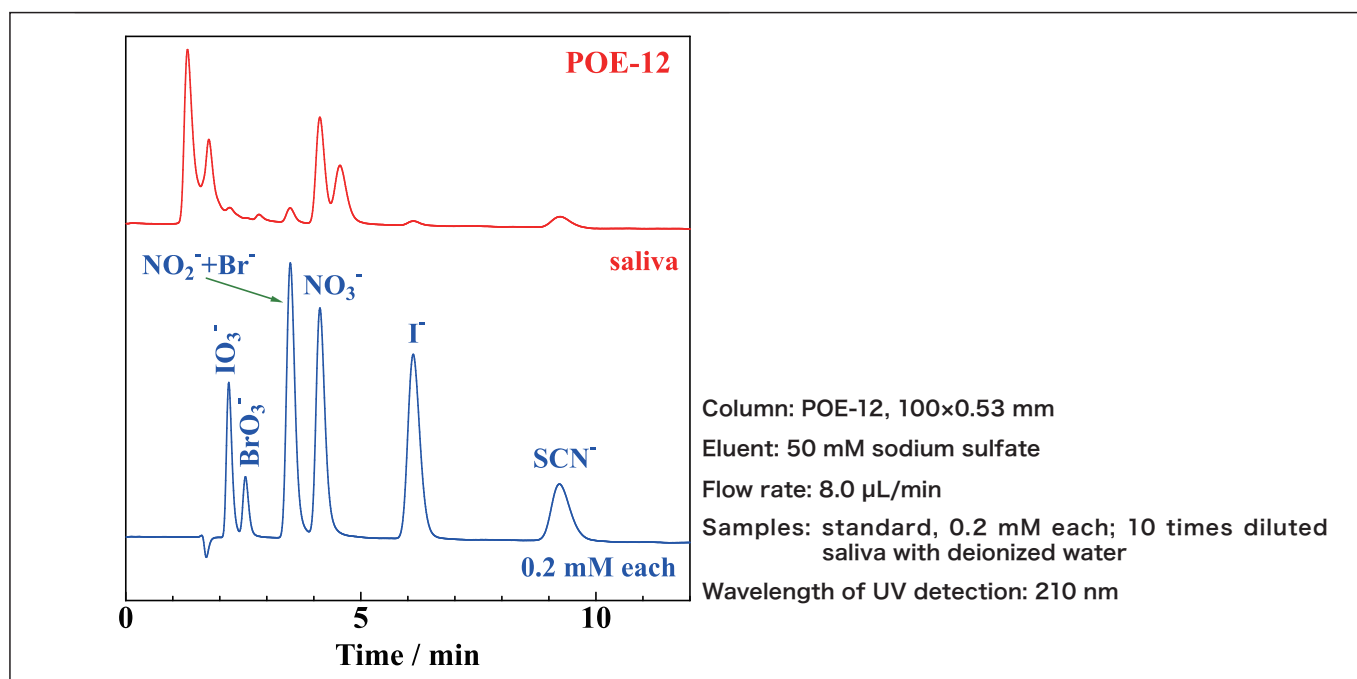


図3 ポリオキシエチレン固定相による陰イオンの分離

4. 今後の期待について

以上のように、開発したポリオキシエチレン固定相はイオン交換モードにより無機陰イオンの分離定量に、また、HILICモードによって極性化合物の分離に応用できるものと期待される。

参考文献

- 1) L. Rong and T. Takeuchi, *J. Chromatogr. A*, 1042, 131-135 (2004).
- 2) L. Rong, L. W. Lim and T. Takeuchi, *Chromatographia*, 61, 371-374 (2005).
- 3) T. Takeuchi and L.W. Lim, *Anal. Sci.*, 26, 937-941 (2010).
- 4) T. Takeuchi, K. Tokunaga and L.W. Lim, *Anal. Sci.*, 29, 423-427 (2013).
- 5) T. Takeuchi and L.W. Lim, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 1267-1272 (2009).

温度波熱分析とは

Temperature Wave Analysis



株式会社アイフェイズ 代表取締役
東京工業大学名誉教授

橋本 壽正

1. はじめに

熱物性に関する測定法には、重量あたりで求めるものと、長さあたりで求めるものがある。DSCなどの熱分析機は前者で、精密天秤は必帯の付属品となる。一方で、熱伝導率測定では試料の厚さが問題となり、サンプル重量は必要とされない。両者は伝統的に別の道を歩み、教科書での扱いも学会も別になっていることが多いが、実際の材料熱物性には、この両方の性質が反映されることはいままでのない。熱エネルギーは、格子振動や電子振動などの運動エネルギーが本質である。ただし、エネルギーが直接測定できない点では、どちらの測定法でも同じである。比熱容量と熱伝導率は共に熱エネルギーに関する物性値で、測定されるのはあくまで熱刺激を与えられたときの温度の時間変化である。では、温度とはなにか。国際会議で決められたスケールで、古くは水の融点と沸点間を100等分した摂氏温度のように定点を決めて定義される測定可能な示強量である。繰り返しになるが、実質として意味を持つのは熱量移動であるが、これはポテンシャルである温度差で生じ、熱エネルギー差（エンタルピーの分布など）で流れるわけではない。温度と熱量の換算は、物質という実体を介して行われ、その変換係数が比熱容量と呼ばれる物性値である。測定法上は、熱刺激の与え方として、パルスの（フラッシュ法）、ステップ的（熱線法）、交流的（温度波法）、一定昇温（DSC）など力学物性や電気物性の測定方法と同様である。

筆者らは、高分子材料薄膜を中心に少量かつ薄い材料の熱拡散率測定に温度波熱分析法が有効であることを提唱してきた。振幅で1℃以下の微弱な温度波を試料に与え、その伝搬を解析し、温度振幅減衰から熱伝導率 λ が、位相遅れ計測からは熱拡散率 α が求められる方法である。具体的な測定装置を産業界へ提供する目的で大学発ベンチャー（株式会社アイフェイズ）を2002年に立ち上げた。温度波法の市販装置はテスター感覚で、サンプリング不要、経験不要、省エネルギー、かつハンディで小型なものとし、現場での測定を可能とした。

2. 物性値と機能値

比熱容量や熱伝導率などは、物質の大きさや質量に依存しない固有値であり物性値と呼ばれる概念値である。一方、実際の測定時や実用上は、決められたサイズでの性質が問題となる。たとえば、断熱材では、低い熱伝導率の材料を選択するほかに、材料を厚くすることでも断熱性向上の目的は達成できる。熱抵抗（その逆数の熱コンダクタンス）などの機能値が現実系では意味を持ってくる。表1は熱物性値の単位を示す。それに対応した熱機能値は表2のようになる。実測では熱容量や熱抵抗を求めて、質量や厚さで規格化して物性値へ変換する。熱量を必要とする融解エンタルピーや熱拡散率は、値が既知の標準物質を必要とする。物性値は理論的考察や材料間の比較には必要であるが、実際の製品設計は機能値で評価が行われていることに留意する必要がある。実用面では、さらにコスト制限が入って来るために、もっとも良い物性値を持つ材料が選択されるとは限らない。通常の電線に銀が使われないことなどがその典型例である。

熱物性の中で熱伝導率と熱拡散率の区別がもっとも判りにくい。熱物性の定義としては、比熱容量と熱伝導率が一義的であるが、先にのべたように熱量を直接測定することができない。実際は、熱量は体積当たりの比熱を使って温度に換算され、熱伝導率は熱拡散率に換算されて、温度の拡散方程式として解かれる。熱伝導率が熱量の移動速度とするなら、熱拡散率は温度の移動速度とすることができる。これらの関係をまとめると以下の式になる。

$$\lambda = \alpha \cdot C_p \cdot \rho$$

この四つの物性値を熱の4定数と呼ぶことがある。物性として扱う場合は、均一物質を前提としていているので、多層系などの複合材料で機能値があっても、厳密な意味での物性値が存在しないことになる。

表 1

物性値とは		
<ul style="list-style-type: none"> ● ある物質固有の性質 ● 試料サイズによらない ● 加成性はない 		
● 熱伝導率 λ	$J = -dT/dX$	$J \cdot m^{-1} \cdot K^{-1} \cdot s^{-1} (W/m \cdot K)$
● 熱拡散率 α	$\lambda = \alpha \cdot C^*$	$m^2 \cdot s^{-1}$
● 体積当たりの比熱 $C^* = C_p \cdot \rho$		$J \cdot m^{-3} \cdot K^{-1}$
● 定圧比熱 C_p	$(\partial H / \partial T)_p$	$J \cdot kg \cdot K^{-1}$
● 密度 ρ		$kg \cdot m^{-3}$
● 熱浸透率 e	$C \cdot \sqrt{\alpha} = \sqrt{\lambda \cdot C}$	$J \cdot m^{-2} \cdot K^{-1} \cdot s^{-1/2}$

表 2

計測値とは		
<ul style="list-style-type: none"> ● 実際に測定できる値 ● 実用製品で機能を決定する量 ● 線形応答を原則として加成性が成り立つ ● 大きさ・量に比例する（断面積一定の一次元で考える） 		
● 熱抵抗	$R = d / \lambda$	$J^{-1} \cdot m^2 \cdot K \cdot s$
● 温度抵抗	$R_t = d / \sqrt{\alpha}$	$m^{-1} \cdot s^{1/2}$
● 体積熱容量	$C^* = C_p \cdot \rho \cdot d$	$J \cdot K^{-1} \cdot m^{-2}$
● 均熱化時定数 $\tau = R \cdot C$		s
● 熱拡散長 $\mu = \sqrt{\alpha / \pi f}$		m

3. 熱拡散長・熱的に厚い条件と薄い条件

物質中のある面（一次元の数式上はある点）に交流的な発熱を与えると、全方向に波として拡散するので、熱波と呼ばれる。地表の太陽による日較差も熱波の典型である。計測の立場からは、温度変化が観測可能量なので温度波と呼ぶことが多い。弾性波などと異なり非常に減衰が速いが、温度がどこまで伝わるかの指標として熱拡散長 μ が定義される。正弦波形の温度波では、ある点から出た温度波の振幅は指数関数的に減衰して拡散していくが、振幅が $1/e$ になる距離を熱拡散長という。熱拡散長 μ は、 $(\alpha / \pi f)$ の平方根で定義される。高分子材料では、1 Hzの温度波でおよそ数百 μm 程度になる。試料の厚さ d と熱拡散長 μ と同じとき（ $d / \mu = 1$ ）を中心に、周波数を変化させて熱拡散長を変化させることが可能である。高周波数では熱拡散長が短くなり、表面近くで減衰するために熱的に厚い条件といい、外乱の少ない状態で熱拡散率測定に適する。反対に低周波数では、熱的に薄い条件となり、表裏の温度差がつきにくい反面、その外側の物質など環境の影響を受けやすくなり、接した材料の熱伝導率を求めることができる。

4. 温度波法の原理と市販装置

4-1 温度波の位相と角周波数の関係から熱拡散率を求める方法

筆者らが、アイフェイズ・モバイル1として上市した装置は、図1のように全体的にコンパクトで軽量で、現場への持ち込みが可能となっている。サンプル設置部とアンプ部の2つからなり、サンプル部をデシケータやグローブボックスなどの容器に入れることもできる。アンプ部は、シグナル発生用発振器、ADコンバータ、ロックインアンプ、マイコン、温度コントローラなどを内蔵し、外部機器を必要とせず単独でも熱拡散率測定を可能としている。

図2は、試料部分の断面模式図であるが、マイクロヒーターと温度センサーを対抗して取り付け、その間に試料を挟む構造となっている。ヒーターへは微弱な正弦波電力が供給され、試料表面に温度波を発生させる。センサーは高感度抵抗型で、微弱シグナルはプリアンプで増幅された後、デジタルロックインアンプへ導かれる。観測される温度シグナルは、室温などの環境温度と刺激温度波のミックスである。交流測定では、ロックイン増幅の利点でもある指定した周波数成分の変化分のみを抽出して解析できるため、大きなオフセット成分である室温の寄与、ノイズ成分などがキャンセルでき、高感度化が達成できる。実際に与える温度波の振幅は 1°C 以下と、対流や輻射を極力抑え、また試料に与えるダメージはほとんど無い。またセンサーサイズを $0.25 \times 0.5 \text{ mm}$ とし、非常に微細な部分の熱拡散率が求まるようになっている。



図1 アイフェイズ・モバイル（薄膜・熱拡散率測定型）

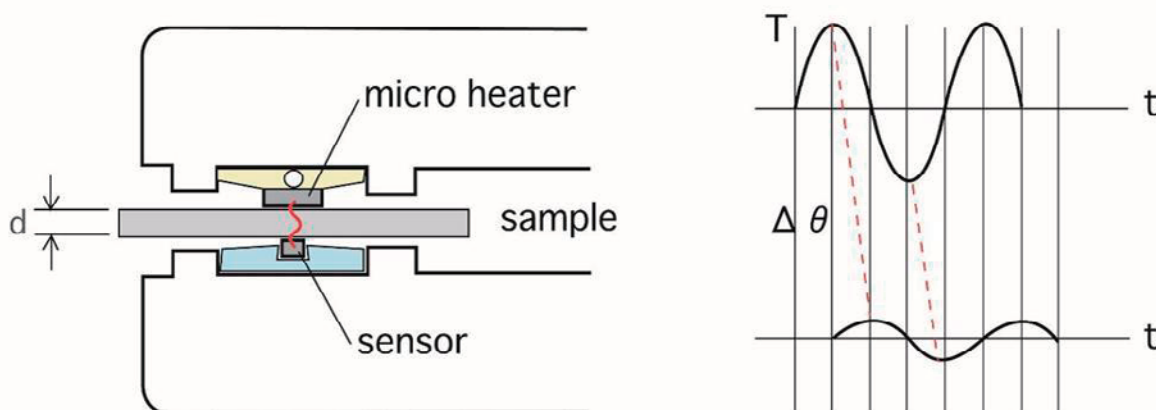


図2 試料部分の断面模式図

このうち表裏の位相遅れに着目すると、厚さ / 熱拡散長が 3 ～ 4 程度になる周波数領域では、周囲の状況に関係なく、

$$\Delta\theta = -\sqrt{\frac{\pi f}{\alpha}} \cdot d - \frac{\pi}{4} \quad (\Delta\theta : \text{位相}, \alpha : \text{熱拡散率}, f : \text{周波数}, d : \text{試料厚さ})$$

という関係になる。すなわち周波数の平方根に対して位相の遅れをプロットし、別途計測した厚みを用いて熱拡散率が算定できる。本装置では、可動アームに取り付けた差動トランスで逐次試料厚さを測定し、測定中の変形もモニターしている。

図 3 は、厚さの異なる純銅試料（約 2 mm と 0.1 mm）について、周波数の平方根と位相差の測定結果を示す。実線は試料のない状態で測定したブランク曲線で、特に低周波数側で環境（センサーヒータ自体の熱容量、リード線への逃げなど）の影響が現れる。測定値からブランク分を差し引き、 \sqrt{f} と $\Delta\theta$ の関係が直線となる周波数帯で傾きを求める。この例では厚さが異なるものの、適切な周波数が異なっているものの、熱拡散率は同じ値になっていることがわかる。ただし、輸送熱量が関係していないため、熱伝導率は直接求まらないので、熱拡散率から上記の関係式によって換算することになる。位相測定は厚さや熱拡散率の異なるものについて、周波数を 0.02 Hz から 2 kHz まで変化させ、熱拡散長と試料厚さをマッチングさせることで、ダイヤモンドから絶縁体まで、同一装置で対応できるのである。導体では、厚さ 3 mm 程度まで、絶縁体でも 1 mm 程度を上限として、ミクロンオーダーの厚みのあらゆる物質材料へ適用可能である。測定は温度抵抗（図のプロットの傾き）であり、均一系物質は厚さを用いて、物性値である熱拡散率が確定される。なお傾きの二乗を均熱化時定数 τ と呼び、本装置での実測値である。 τ は時間の次元で、試料表裏の伝搬にかかる時間的目安となる。

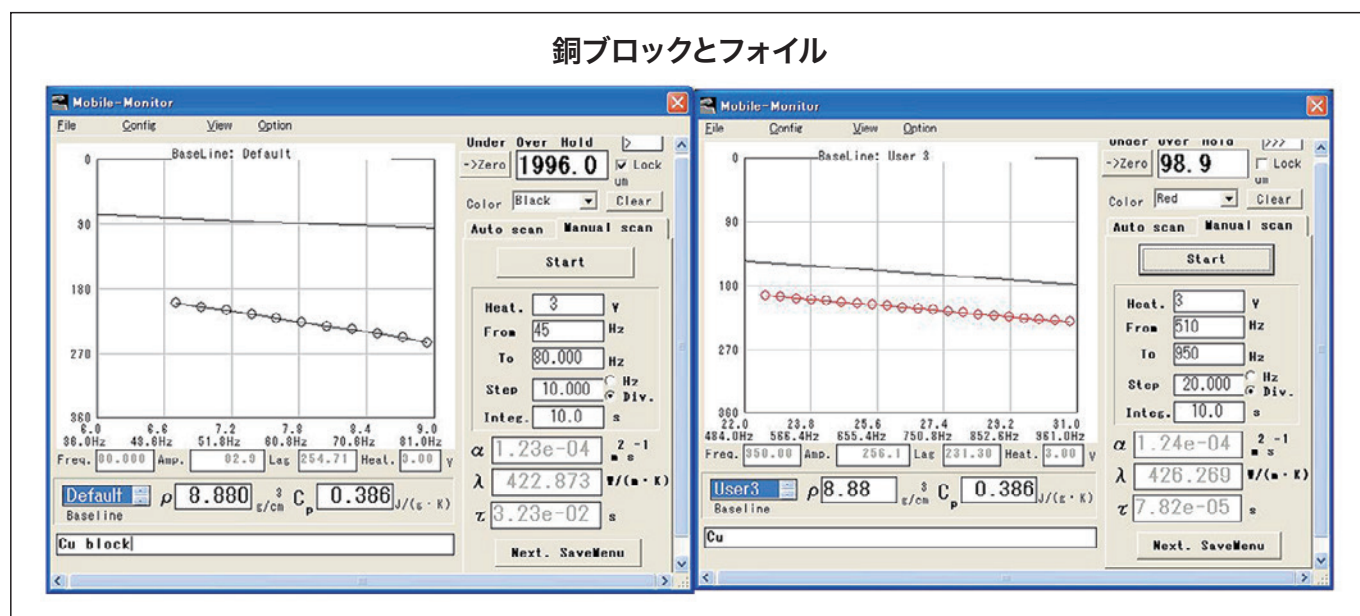


図 3 純銅試料（約 2 mm と 0.1 mm）周波数の平方根と位相差の測定結果

4-2 振幅の減衰から熱伝導率を測定する方法

温度波伝搬解析で、振幅には熱量変化が含まれる。前法とは反対に低周波数すなわち熱的に薄い条件では、測定系の外側に設置した物体の熱伝導率が強く反映される。この振幅減衰の変化を利用した方法を紹介する。

図5は、開発した装置のヒーター・センサーの構成を模式的に示したものである。ヒーターとしてペルチェ素子を用い、一方の面を熱容量の大きなアルミブロックのヒートシンクに密着させている。もう一方は、温度センサー、参照試料(0.5 mm アクリル板など)、温度センサーの順に取り付け、薄い保護フィルム(密着性を向上させる役割を含む)を介して被測定物に圧着させる方式である。この温度波プローブ全体は、30 mm 角の面積で積層されているが、温度センサーは、その中心部に面積約 $1 \times 5 \text{ mm}^2$ の狭い範囲に5本熱電対を配置しサーモパイルとしてある。センサー周囲はガードヒーターとしての役割を持たせている。ヒーターへの交流を供給する発振器と、温度出力を増幅するロックインアンプ等は前項の方法と同様である。

装置の概観は図6に示したようにアンプ部と試料プローブからなっている。測定は参照試料の両面の温度波伝搬を熱的に薄い条件で測定している。参照試料の裏面(ヒーター側から見た)に被測定試料を密着させ、中心部分では一元的な交流定常熱流を仮定できるとすると、参照試料を通過する温度波の振幅は、裏面に接した測定検体の熱伝導率に敏感に影響される。

測定は、ヒーターへ供給する交流の電圧、周波数を固定し、参照試料の表裏の振幅減衰比を求める。このときの周波数は、振幅が表面の約50%程度の減衰となるような周波数を選択する。参照物質を通過して被測定サンプルに流れ込む温度波は試料内のどこかで振幅がゼロ(実用上は0.1%程度)になる。実際に厚さを変えた発泡材では、0.05 Hzの周波数では1 mm程度以上で厚み依存性がなくなり、減衰比は一定値になることを確認している。この減衰比は、温度波の周波数、参照試料の熱抵抗、さらにその外に接した物体の熱的性質に依存する。言い換えると基準熱抵抗体の両端の温度変化を用いて一元方向へ流れていく熱流をモニターすることに相当する。減衰比からは、被測定物の熱インピーダンス(熱容量と熱抵抗の比に相当すなわち熱浸透率に関係した量)が求まるが、熱伝導率既知の物質の減衰比と比較することで、熱伝導率へ換算することもできる。

適用対象は、無機物を含む発泡体、粉体ならびにその圧縮体、紙束、布、ポリマーブロック、ゴム、水・油脂などの液体等々、0.02-5 W/mKの材料である。粉体や液体は図6のように袋に入れたまま測定し相互比較することもできる。相対変化であれば、真空断熱材の内部の情報も検討可能である。また参照試料の熱抵抗を変化させることで適用範囲は可変となっているので、伝熱ゴムなどにも適用できる。本方法は、簡便でかつ測定時間が数分以内という画期的な方法である。

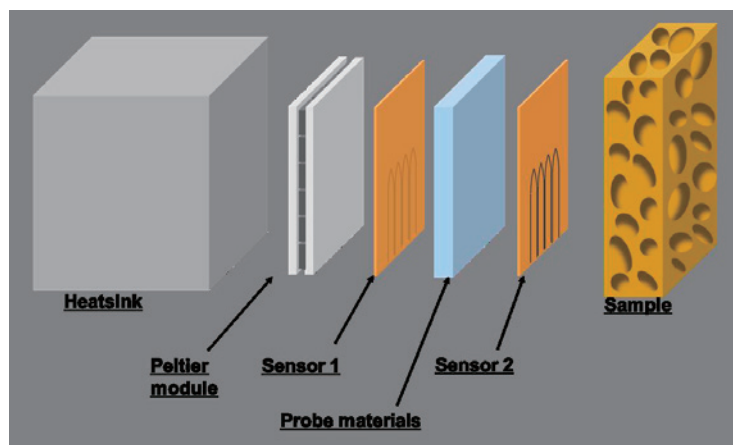


図5 ヒーター・センサー構成模式図



図6 アイフェイズ・モバイル(バルク材・熱伝導率測定型)装置全体と袋入り粉体の測定状況

5. まとめ

熱エネルギーは特定の場所にとどめておくことが出来ないエネルギーであり、それらの移動速度（熱伝導率）を測定することは非常に困難とされてきた。このため、測定試料の熱環境を規定するなどの工夫した測定方法が多数考案されてきた。温度波法は、微弱な交流刺激を与えて、振幅減衰と位相遅れを測定する方法である。安定な方法である位相観測法は、あらゆる薄膜試料に適用できることを示してきた。測定の簡便性および迅速性から、10～100回の測定も容易であり、熱拡散率データを統計学的に扱うことを可能としている。このことは、試料の状態に強く依存する熱物性を分布として捉えることを意味している。一方振幅減衰を利用した方法は、低周波数を用いることで、厚い絶縁物に適用でき熱伝導率が直読できることを示した。このように温度波法は、周波数を選択することで幅広い材料熱物性測定に適用できることを明らかにした。

測定法の普及には標準化は避けられないが、会社の設立と同時に ISO へ温度波法を提案し、幾多の試練を乗り越え日本発の提案として認められ ISO22007-3（位相解析型薄膜用）として 2008 年にプラスチックの熱伝導分野（TC-61）で認定されている。さらに ISO-22007-6 として振幅解析型も認定された。熱伝導に関する測定法は多数存在するが、ラウンドロビンテストなどを経て制定される標準化された手法を用いるのが最も効率的で、ときとして複数の測定法での相互比較も必要となる。ともすれば、測定値に、期待値が込められることにもなりかねないが、複雑な材料の正しい評価は、安全性にも直結するので、多数のデータ収集が必要となろう。熱の問題は古くて新しい問題であり、現在の材料開発において「熱を制するものは材料を制す」時代の到来と考えている。我々の開発した方法と装置群が材料開発の支えになることを願っている。

燐光発光性ポリイミドの低温・真空下における発光特性評価

Analysis of Luminescence Properties of Phosphorescent Polyimides under Low Temperature and Vacuum Conditions



東京工業大学大学院 理工学研究科
物質科学専攻 博士課程
(博士(工学) H29年3月取得見込み)

鹿末 健太



東京工業大学 物質理工学院 応用化学系 教授
(工学博士)

安藤 慎治

1. はじめに

ポリイミド (PI) は、剛直な化学構造と分子間の相互作用に起因する稠密な凝集状態や特異な高次構造を形成することから、高い耐熱性や耐寒性、優れた機械特性、長期の耐光・耐放射線性を有するスーパー・エンブラとして、半導体産業や航空宇宙産業などで幅広く応用されている¹⁾。近年、高分子薄膜が紫外線を吸収して可視光を発光する「波長変換特性」が注目を集めており、波長変換膜 (ダウンコンバータ) への応用が期待されている²⁻⁴⁾。ダウンコンバータは、市販のシリコン系太陽電池などの最表面に設置することで、分光感度の低い紫外線を感度の高い可視光に変換できるため、素子全体の光電変換効率を向上させることができる。発光性 PI がこの波長変換用途として実用化できれば、高い耐久性を有する高効率の太陽電池の実用化が期待できる。

ダウンコンバータに求められる主要な発光特性として、可視域における高い透明性、高い発光量子効率、そして大きなストークスシフト (Stokes shift) が挙げられる。ストークスシフトとは、光吸収波長と発光波長のエネルギー差であり、この値が大きいほど紫外線を長波長の可視光線や近赤外線に変換する効率が高くなる。最近われわれは、これらの特性を満たす新規 PI 薄膜の開発を行うため、「室温での燐光発光」(以降、室温燐光と呼ぶ) に着目し、研究を行っている。われわれがこれまでに開発してきた“高蛍光性 PI 薄膜”は、蛍光のストークスシフトが相対的に小さいため、無色透明な薄膜では可視短波長域の紫～青色発光しか示さず、また長波長側の緑～赤色発光を示す薄膜については黄色や赤色の着色が避けられなかった (図1)^{5,6)}。一方、燐光は蛍光と異なり項間交差を経由したエネルギー準位の低い励起三重項状態からの発光であるため、一般にストークスシフトの大きな発光が得られる。従来、有機化合物の燐光は、重金属や希土類錯体を含む化合物における重原子効果を利用した系や、高結晶性マトリックス中や液体窒素温度 (77 K) 条件下など、分子運動が凍結あるいは抑制された環境でしか観測されないと考えられてきたが、近年、臭素やヨウ素などの重ハロゲン基を有する有機カルボニル化合物が室温付近において燐光発光を示すことが報告されている⁷⁾。最近われわれは、酸二無水物部に臭素またはヨウ素を有する低分子イミド化合物や半芳香族 PI が、ストークスシフトの極めて大きな ($\approx 10,000 \text{ cm}^{-1}$) 室温燐光を示すことを明らかにした⁸⁾。今後、室温燐光を用いた太陽電池用ダウンコンバータへの応用に適した PI 材料開発を行うためには、実用化を視野に入れた様々な環境下での燐光特性の評価が必要である。特に、燐光特性は測定温度および測定環境下における酸素濃度に強く依存することが知られているため、温度可変および脱酸素条件下での発光測定による燐光特性の解析が極めて重要である。

そこで本稿では、われわれがこれまでに開発した燐光性低分子イミド化合物 (粉末) および基板上に製膜した PI 薄膜について、低温および真空下における発光スペクトル測定を行った結果を紹介する。

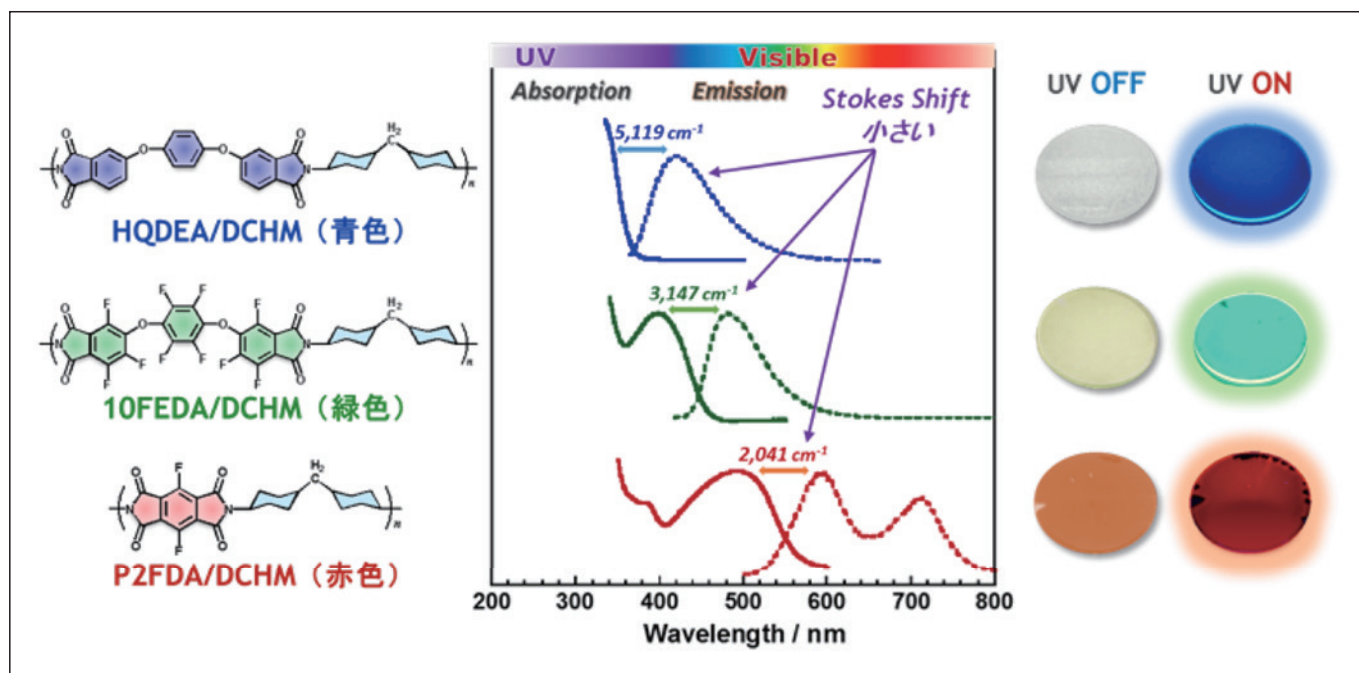


図1 高蛍光性ポリイミド (PI) の分子構造, PI 薄膜の光吸収・蛍光発光スペクトル, および PI 薄膜の外見 (UV 未照射) と蛍光色 (UV 照射下)

2. 温度可変・真空条件下における発光測定

試料の発光スペクトル測定には、F-7100 蛍光分光光度計 ((株) 日立ハイテクサイエンス) を用いた。温度可変発光スペクトルは、蛍光用固体サンプルホルダー ((株) ユニソク, CS-KF-H07-42) を装着した小型温度可変ユニット ((株) ユニソク, CoolSpek UV USP-203-B) を F-7100 の試料室内に取り付けて測定した (図2a)。試料と試料室の冷却には液体窒素を用い、窒素ガスが試料室の周囲を循環することにより試料が液体窒素に浸漬することなく冷却される。測定温度域は $-175 \sim 100^\circ\text{C}$ であり、試料室内および石英窓の内外の結露を防ぐため、試料室内部は窒素置換され、また外部は装置内蔵のヒーターにより加熱される設計となっている。一方、真空下における発光スペクトルは、研究室仕様の真空チャンバー (赤田工業 (株) 製) を F-7100 の試料室に取り付け (図2b)、真空ポンプ (PFEIFFER 社, XtraDry 150-2) によりチャンバー内を1時間、脱気した後に測定を行った。

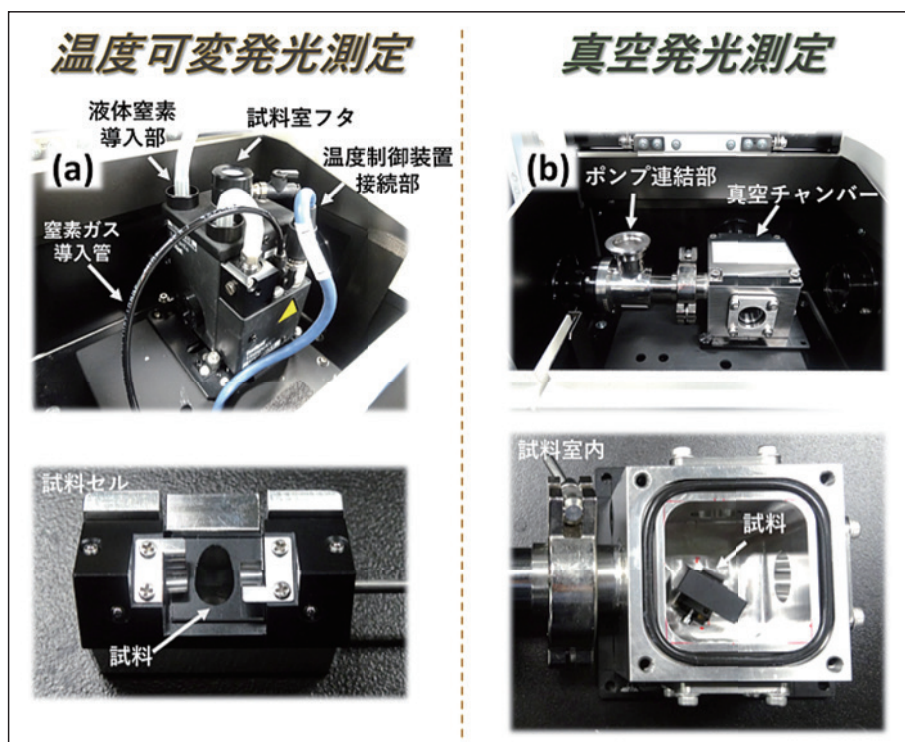


図2 (a) 温度可変発光スペクトル測定装置 (ユニソク社製)
(b) 真空条件下における発光スペクトル測定装置 (安藤研究室仕様, 赤田工業社製)

3. 燐光性イミド化合物およびPIの室温・大気圧下における発光特性

固体状態における燐光性イミド化合物（粉末）および燐光性ポリイミド（PI）薄膜の室温・大気圧下における発光スペクトルを図3に示す。イミド化合物で330 nm, PI薄膜で315 nmの光励起により、それぞれ510 ~ 530 nmにストークスシフトの極めて大きな（ $\nu > 10,000 \text{ cm}^{-1}$ ）緑色の室温燐光が観測された。また、イミド化合物では450 nm付近、PI薄膜では400 nm付近にそれぞれ蛍光由来の発光ピークが観測された。イミド化合物の蛍光と室温燐光のピーク位置は、PI薄膜と比較するとともに長波長シフトしている。これはイミド化合物の微結晶において分子が高密度に充填されており、強い分子間相互作用に起因して励起状態の安定化が生じるためと考えられる。イミド化合物とPI薄膜の発光量子収率（ Φ ）はいずれも約2%と見積もられた。一般に室温・大気圧下では、固体（結晶）状態であっても励起三重項状態の長い寿命の間に局所的な分子運動による無輻射失活や酸素分子へのエネルギー移動が生じるため、高効率の燐光を得ることは難しい。しかし今後、高効率の燐光性PI薄膜開発に向けた分子設計指針を獲得するためには、分子運動や酸素が燐光特性に与える影響を詳細に調査することが重要である。

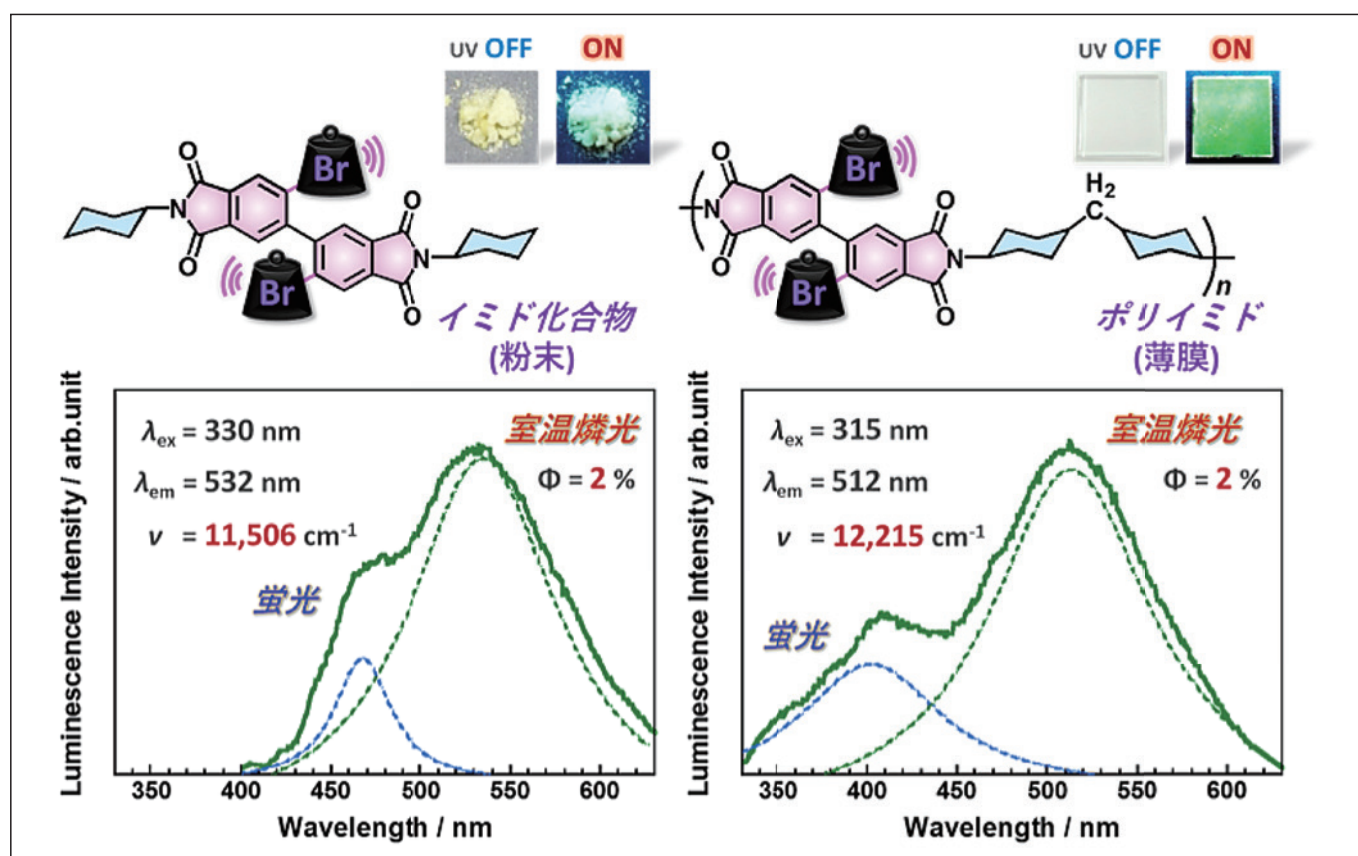


図3 燐光性イミド化合物（粉末）とPI薄膜のUV未照射時および照射時における外見，および室温・大気圧下における発光スペクトル

4. 燐光性イミド化合物およびPIの温度可変発光スペクトル測定

有機化合物や高分子物質の局所的な分子運動は温度により大きく変化することから、発光スペクトルを温度可変（高温～低温）で測定することにより、分子運動が燐光特性に与える影響を調査することができる。室温燐光性イミド化合物（粉末）および基板上に製膜したPI薄膜の温度可変発光スペクトルを図4に示す。試料温度を +100℃から -175℃まで冷却しながら 25℃ごとにスペクトルを測定した。100℃では、活発な分子運動による無輻射失活により、燐光はほとんど観測されなかった。一方、低温下ではいずれの試料においても分子運動の抑制により燐光強度が顕著に増大し、-175℃における燐光強度は、室温下に比べてイミド化合物で約 26 倍、PI 薄膜では約 46 倍に増大し、液体窒素温度におけるPI薄膜の発光量子収率は 76%と極めて高い値を示した。-175℃付近ではいずれの試料においても分子運動はほぼ凍結していると考えられるため、冷却による燐光強度の増大幅は、室温における局所的な分子運動性を間接的に反映していると言える。イミド化合物は、精製時の結晶化により三次元的な秩序構造を有する結晶相として存在し、分子の局所運動は室温下でもかなり抑制されていると考えられるが、PI 薄膜は非晶相を形成し、かつPI分子鎖が複雑に絡み合って自由体積を増大させることから、室温下における分子鎖の局所的運動性は相対的に高いと考えられる。これがPI薄膜において、冷却による燐光強度の増大幅が相対的に大きいことの原因と考えられる。また、いずれの試料においても燐光のピーク位置は室温下における 510 ～ 530 nm 付近から、-175℃では 500 nm 付近に短波長シフトした。これは分子運動が低温下で強く抑制され、励起状態での構造緩和によるエネルギー安定化（内部転換）の確率が低下したためと考えられる。一方、400 ～ 450 nm に観測される蛍光は低温下でも顕著な強度増大を示さず、分子運動性には敏感ではない。これは励起一重項状態からの蛍光発光の寿命が極めて短いことに由来する。

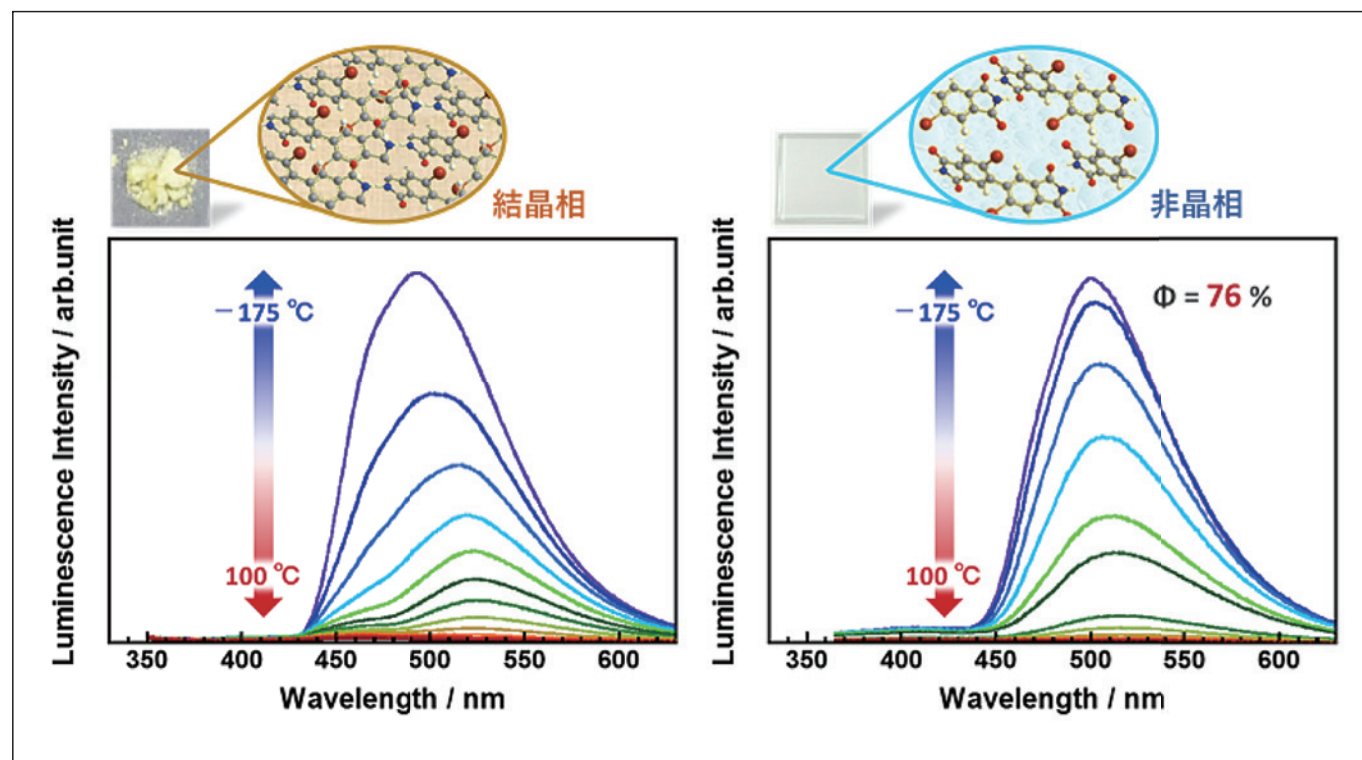


図4 燐光性イミド化合物（粉末、微結晶）と非晶質PI薄膜の分子鎖凝集状態の模式図と温度可変発光スペクトル

5. 燐光性PI薄膜の真空条件下における発光特性

燐光は一般に基底状態で三重項状態をとる酸素分子によって強く消光される。そこで、酸素分子がPI薄膜の燐光特性に与える影響を調査するため、真空中における発光スペクトル測定を行った。燐光性PI薄膜の室温・大気圧下および真空中において測定した発光スペクトルを図5に示す。大気圧下において520 nm付近に観測された室温燐光は、真空中でその強度が約2倍に増大した。これは大気圧下での燐光の発光効率が、PI薄膜表面および内部に存在する酸素分子へのエネルギー移動により抑制されていたことを示している。一方、400 nm付近に観測された蛍光は、酸素分子へのエネルギー移動を生じないため、真空中においても強度は変化しなかった。

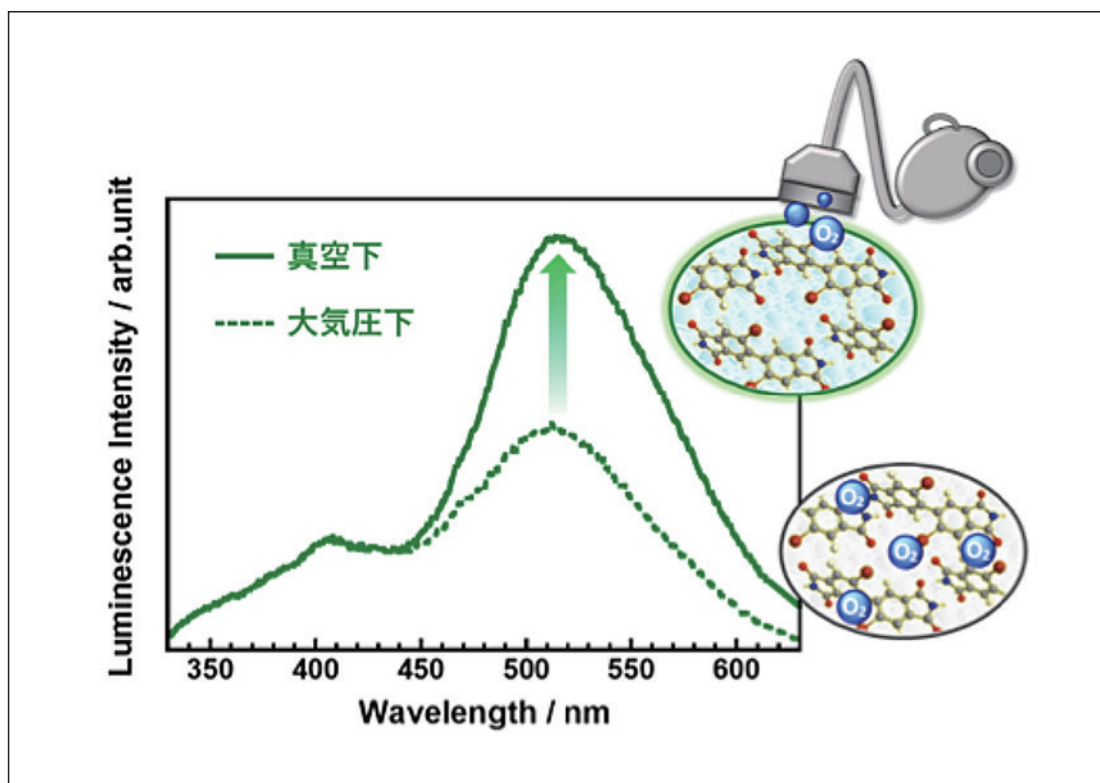


図5 燐光発光性PI薄膜の大気圧下及び真空条件下における発光スペクトル
燐光の強度のみが大きく増加している

一般に、燐光はマイクロ秒やミリ秒などの長い発光寿命を示すことが知られている。そこで、酸素分子がPI薄膜の燐光寿命に与える影響を調査するため、真空中における燐光スペクトル測定および燐光短寿命測定を行った。燐光スペクトルの測定は、F-7100に内蔵された燐光モードを用いて行った。燐光モードは、光源からの連続波光を40 Hzの周波数を有する光学チョッパーを用いてパルス幅が約2 msの擬似パルス光に変換し、これを試料に照射した後、励起光がカットされると同時に検出器にて約1 msの遅延時間を設け、蛍光が消光した後の燐光などの発光成分のみをスペクトルとして検出する測定手法である(図6)。燐光短寿命測定もF-7100に内蔵された燐光の時間変化測定から行った。燐光短寿命モードでは、検出器側で蛍光消光のための遅延時間約1 ms後の約23 msデータ取得し、20 ms間の燐光の減衰を測定する。励起/発光波長をそれぞれ315, 515 nmに設定し、0～20 msまでの燐光寿命を測定した。PI薄膜の室温・大気圧下および室温・真空中で測定した燐光スペクトルを図7に示す。大気圧下では、3次元燐光スペクトルには明確なピークは観測されず、315 nmの光励起によっても発光ピークは観測されなかった。一方、真空中では、315 nmの光励起により500～600 nmに明確な燐光ピークが観測された。PI薄膜の室温・大気圧下および真空中における燐光短寿命測定の結果を図8に示す。大気圧下では、ミリ秒の時間スケールを有する発光寿命成分はほぼ観測されなかったが、真空中では、約20 msで減衰する燐光に特徴的な減衰挙動が観測された。酸素雰囲気気がPI薄膜の燐光寿命を大きく低下させることから、今回開発した発光性PIが室温燐光性PIであることが確認された。

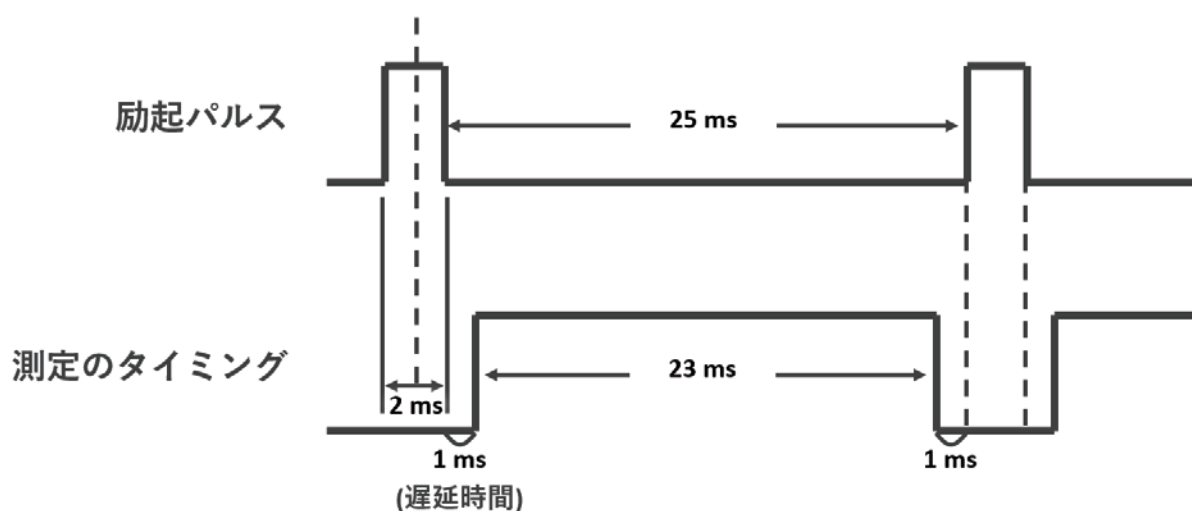


図6 燐光モードにおける測定タイミングチャート

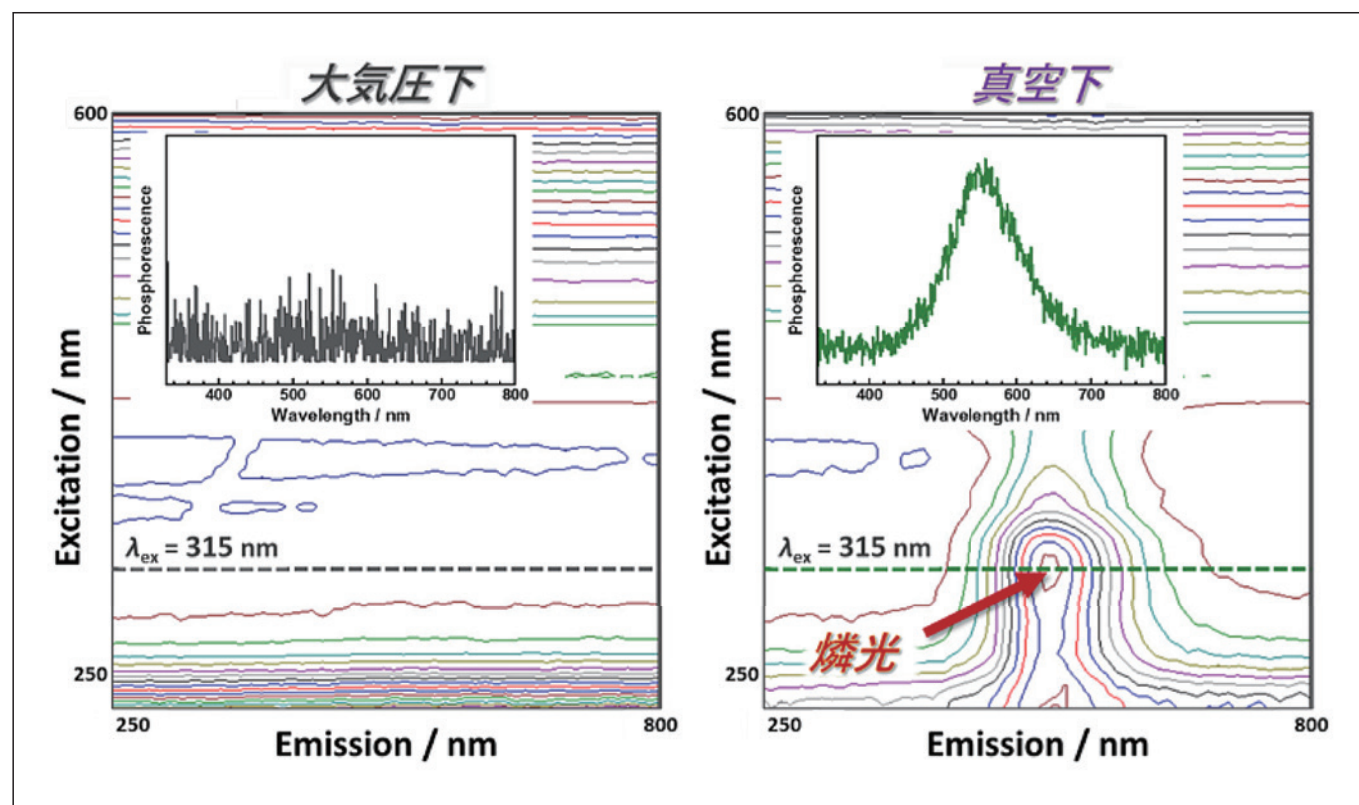


図7 燐光発光性PI薄膜の大気圧下および真空条件下における3次元燐光スペクトル
内部のスペクトルは励起波長を固定(315 nm)した場合

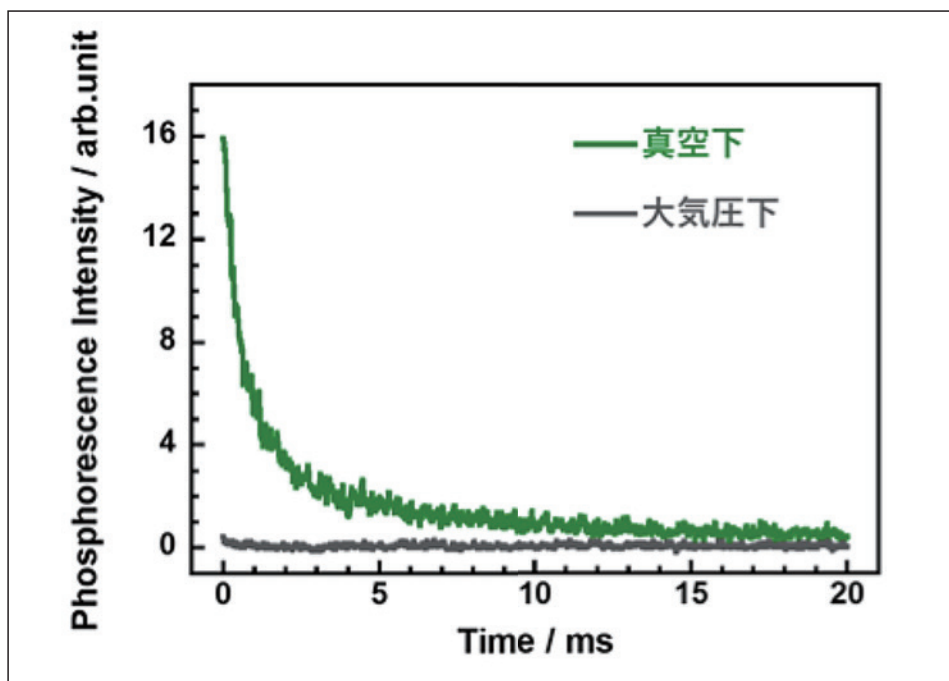


図8 燐光発光性 PI 薄膜の大気圧下および真空条件下における燐光短寿命測定の結果

6. まとめと将来展望

本稿では、室温燐光性のイミド化合物とポリイミド (PI) の発光特性の特徴を解明するため、温度可変および真空下での励起・発光スペクトルの測定と解析の結果を紹介した。温度可変発光スペクトル測定では、イミド化合物 (粉末) と PI 薄膜の立体構造・秩序構造の違いに起因する室温下での分子運動性の違いが、これらの燐光特性に及ぼす影響を明らかにすることができた。PI 薄膜の真空下における発光スペクトル測定では、PI 薄膜の表面付近および内部に含まれる酸素分子が燐光を消光することを明らかにした。燐光性 PI 薄膜は、温度や酸素濃度に敏感に反応して発光特性が変化することから、波長変換膜 (ダウンコンバータ) のみならず、温度や酸素センシングへの応用も可能である。また、同時に耐熱耐寒性・耐光性・耐環境性が高く、かつ低温および真空下において高い発光強度を示すことから、宇宙空間で利用可能なダウンコンバータへの応用も期待される。今後、各種センシング材や宇宙空間での応用を視野に入れた、波長変換効率と耐候性・耐光性の向上などを合わせて行っていく予定である。

参考文献

- 1) 横田力男, 安藤慎治, 上田充, 柿本雅明, 古知政勝, 竹市力, 長谷川匡俊 編, “新訂 最新ポリイミド - 基礎と応用 -”, 日本ポリイミド・芳香族系高分子研究会編, 株式会社 NTS, (2010).
- 2) J. Wakita, S. Inoue, N. Kawanishi, S. Ando, *Macromolecules*, **43**, 3594 (2010).
- 3) K. Kanosue, T. Shimosaka, J. Wakita, S. Ando, *Macromolecules*, **48**, 1777 (2015).
- 4) K. Kanosue, R. Augulis, D. Peckus, R. Karpicz, T. Tamulevičius, S. Tamulevičius, V. Gulbinas, S. Ando, *Macromolecules*, **49**, 1848 (2016).
- 5) J. Wakita, H. Sekino, K. Sakai, Y. Urano, S. Ando, *J. Chem. Phys. B*, **113**, 15212 (2009).
- 6) K. Takizawa, J. Wakita, K. Sekiguchi, S. Ando, *Macromolecules*, **45**, 4764 (2012).
- 7) S. Mukherjee, P. Thilagar, *Chem. Commun.* **51**, 10988 (2015).
- 8) K. Kanosue, S. Ando, *ACS Macro Letters*, **5**, 1301 (2016).

腎生検光顕組織標本の低真空走査電子顕微鏡による検索

Examination of the Light Microscopic Slide of Renal Biopsy Specimens by Utilizing Low-Vacuum Scanning Electron Microscope



東京腎臓研究所 所長
(医学博士)

山中 宣昭

1. はじめに

腎疾患の診断には、一般的な臨床検査に加え腎生検による病理組織診断を行うことが普及している。生検針により採取した組織片はその一部を細切して蛍光抗体法による免疫組織学的検査、透過型の電子顕微鏡による超微形態像の検索に供せられ、残りの組織片をパラフィンに包埋して薄切し、光学顕微鏡用の染色標本を作成して組織病変を観察し、これら3者の情報を総合して腎生検病理診断を行うことが方法論として確立している。

透過型電子顕微鏡による組織の検索が普及しているのに引き替え、走査型電子顕微鏡による腎生検組織の検索は、試料作成の煩雑性や組織の表面像の観察にとどまるなどの制約により日常的な検査法にはなり得ず、研究レベルでの報告が少数散見されるにすぎない。近年、卓上型の低真空走査電子顕微鏡 (Low-vacuum Scanning Electron Microscope, 以下 LV-SEM と略) が開発されたが、これの新たな利用法の一つとして、日常的に用いられている光学顕微鏡用標本を、そのまま直接 LV-SEM で観察し、光学顕微鏡を超える高拡大率と高解像度による電子顕微鏡レベルでの情報を取得することが試みられている。標本の切片の厚さぶんだけの3次元的な組織変化も検討できるので、LV-SEM による検査法の確立は、病理診断の質を向上させる大きな可能性を有している。以下に著者による腎生検組織の検討の結果をいくつか紹介し、今後の発展への参考に供したい。

2. LV-SEMによる光顕標本の観察

日立ハイテクノロジーズにより開発された卓上型低真空走査電子顕微鏡 Miniscope[®] は、暗室不要であり、装置の小型化と操作の容易性という特質により、非常に実用性の高い機器となっている。走査電子顕微鏡の基本的な機能をひととおり備えており、6万倍までの高倍率による試料観察が可能である。「小型の真空ポンプ」、「卓上に設置可能サイズの走査電子顕微鏡本体」、「試料操作の制御と観察画像描出のためのコンピューター」の3点により構成されており、通常の100V電源からの電力供給で可動する(図1)。

この走査電顕の低真空特性に着目し、通常の光学顕微鏡用のガラススライド標本をそのままこの LV-SEM の試料室に挿入し、組織切片を観察するという画期的な方法が、鳥取大学医学部解剖学講座の稲賀すみれ博士により確立されている。光学顕微鏡用の染色標本にカバーガラスをかけず、(あるいはカバーガラスを外し)、これに電子線を照射してその走査電顕像を観察するというものである(図2)。

一般に病理組織標本の光学顕微鏡による検索には、標準染色として Hematoxylin-Eosin 染色 (HE 染色) が広く用いられており、さらに、基底膜をよく染め出す PAS 染色、線維化の評価に有用な Masson 染色などが普及している。腎生検組織の検索においては、この HE, PAS, Masson (あるいは AZAN) の3染色に鍍銀染色である PAM 染色を加えた4種の染色標本を観察することが標準化している。PAM 染色は、基底膜をはじめとする細胞外基質の主構成成分である多糖体蛋白を酸化してアルデヒド基を露出させ、これに銀を反応させたもので、銀結合部が黒褐色に染色され、銀染色陰性である細胞成分と銀陽性の細胞外基質成分とが明瞭に識別される。さらにこれに後染色として HE 染色を加え、PAM-HE 染色標本とするので、これにより銀染色情報に加え標準染色である HE 染色の情報が確認され、光顕組織標本観察のためのきわめて優れた染色法である¹⁾。

卓上型 Low-Vacuum Scanning Electron Microscope (LV-SEM)

- ・ 暗室不要
- ・ 金属蒸着などの前処理不要
- ・ 低真空特性で生物試料観察むき
- ・ 操作簡便，検索迅速性



小型真空ポンプ

Miniscope®



Model TM3030
(330×606×565 mm)
拡大倍率 30倍～6万倍

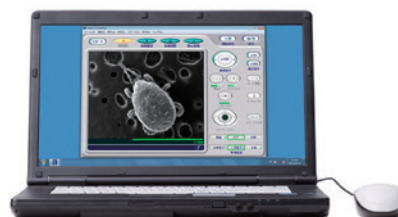
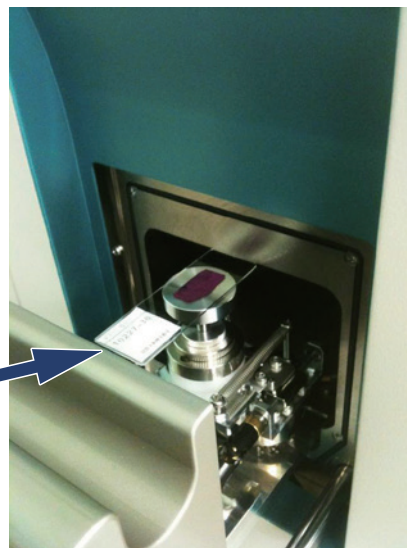


図 1 低真空走査電子顕微鏡 (LV-SEM) の構成

光顕組織標本の LV-SEM 観察への応用

光顕ガラススライド標本のカバーガラスを除去するのみで観察可能

- カバーガラスなしの光顕標本スライドをそのまま試料観察室に挿入 (標本の厚さの範囲の3D画像を30～6万倍の倍率で観察できる)



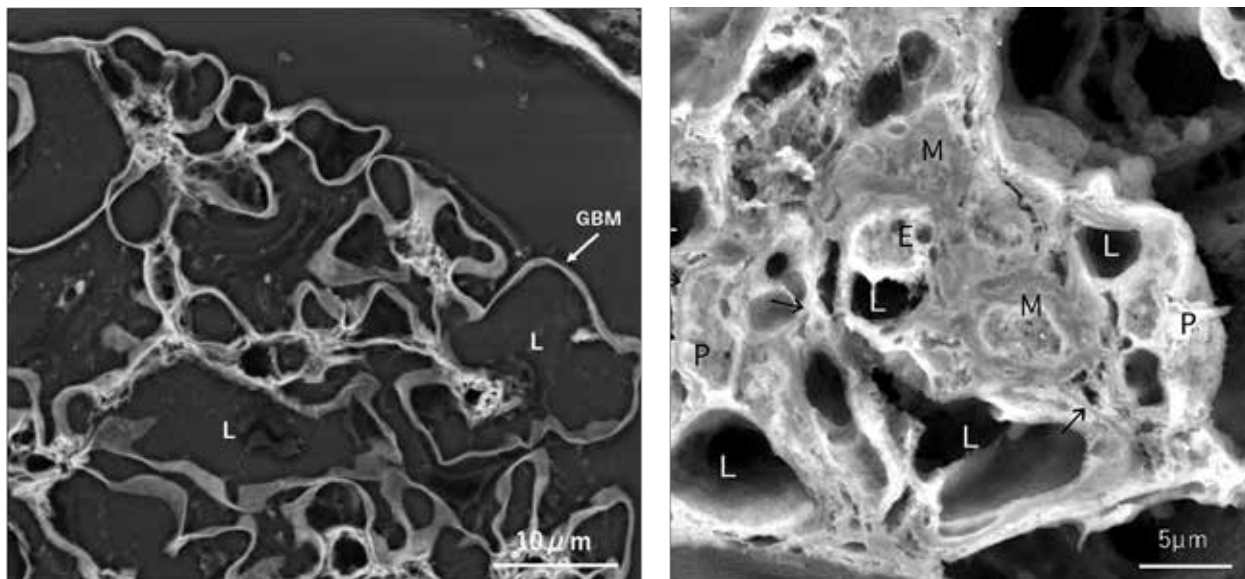
大きな試料観察室

図 2 光顕組織標本の LV-SEM 観察への応用

LV-SEMによる光顕標本の検索には、通常の染色標本ではコントラストの明瞭な画像が得られないが、重金属による染色によりコントラスト良好な反射電子像の観察が可能となる。組織と結合する金属染色陽性反応の強弱による反射電子シグナル放出量の差が明暗のコントラストとして描出され、組織構造のディテールが識別できるようになる。PAM染色は鍍銀染色であるため、そのままLV-SEMによる観察が可能という利点があり、基底膜やその他の銀染色陽性成分が明瞭に描出される。腎臓の疾患は、糸球体病変を主体とするものが多いが、細胞成分のみならず細胞外基質成分である糸球体基底膜やメサンギウム基質の変化がしばしば疾患の診断や病態の評価の決め手となるため、光顕検索ではとらえ得ない微細な変化を観察できるLV-SEMによる検索は、診断の質の向上に大きく寄与することが期待される。ただし組織の主構成成分である細胞などの銀染色陰性構造はコントラスト不良で識別不明瞭となり、細胞成分の評価が困難という難点がある。

これに対し、LV-SEMによる光顕組織標本観察法の実用化を進めてきた鳥取大学の稲賀すみれ博士により、白金ブルー染色と名付けた白金による重金属染色法が考案され、細胞成分の観察が可能となっている²⁾。白金ブルーには細胞組織特異的な染色特異性があり、反射電子シグナルの増強効果により、LV-SEMによるパラフィン包埋組織切片の観察が可能となる。ガラススライドに貼りつけた未染色のパラフィン薄切片に脱パラフィン操作を施したのち、白金ブルー染色液で染色することにより、光顕組織標本の細胞構築像が明瞭に描出される。細胞成分などを描出するこの白金ブルー染色像と、基底膜成分などを描出するPAM染色像は、互いに相補的な染色特性を示すことになるため、パラフィン包埋組織の連続切片によりPAM染色標本と白金ブルー染色標本を作成すれば、両者のLV-SEM観察像を総合することにより、同じ部位の組織変化の超微形態像を詳細に検討することができる(図3)。

PAM染色(銀染色)と白金ブルー染色による腎糸球体LV-SEM像



基底膜などの銀陽性成分を特異的に染めるPAM染色(左)に対し、右の白金ブルー染色(稲賀すみれ博士原図)では細胞成分がよく染まりPAM染色と相補的な所見が得られる(GBM:基底膜 L:血管腔 M:メサンギウム細胞 E:内皮細胞 P:足細胞)

図3 PAM染色とプラチナブルー染色

3. 腎生検組織の観察

腎生検組織診断では、日常的にPAM染色標本が用いられているため、これを直ちにLV-SEMで観察することができる³⁾。1個の腎生検組織の光顕PAM染色標本の全体を示す低倍率の光顕画像と、同じ標本をLV-SEMで見た同倍率の画像とを並べて眺めると、光顕像とLV-SEM像の違いが良く認識できる(図4)。同じ標本を異なった方法により観察しているわけで、LV-SEMでは光顕観察部位と全く同じ部位の電顕レベルでの観察が可能である。透過電顕では同じ生検組織からであっても光顕と同じ部位の所見の比較は不能であるが、LV-SEMの応用により全く同じ部位の光顕像と電顕像の比較観察が可能ということは、組織病変の解析の精度を高めることになり、非常に大きな意義を有している。また光顕組織標本のどの部位でも、任意の拡大倍率で観察ができるということもこの方法の有用性を高めている。光学顕微鏡による観察の最大拡大倍率は600倍ほど、油浸レンズを使っても1,000倍どまりであるが、LV-SEMでは同じ部位を3~6万倍まで拡大可能であり、さらに重要なことは、光顕では解像度が200 nmであるのに対し、LV-SEMの解像度は50 nmほどで著しく高精度である。また標本の厚さ分だけ3次元情報が得られ、病変の詳細をより明確に把握することが出来る。以上のような特性から、光顕PAM染色標本では不明瞭であった所見が、同じ部位のLV-SEMでの観察により、異常が明らかとなることも少なくない。

図5は血尿を呈した症例であるが、光学顕微鏡の600倍の拡大倍率では何か異常があるように見えながらも判然としない部位の所見が、LV-SEMによる拡大を挙げた3次元的観察により、基底膜の小さな破綻とそこから血球成分が漏出しつつある像であることが明確に認識される。

通常の腎生検PAM-HE染色標本のLV-SEMによる観察 (観察には標本の重金属染色が必要)

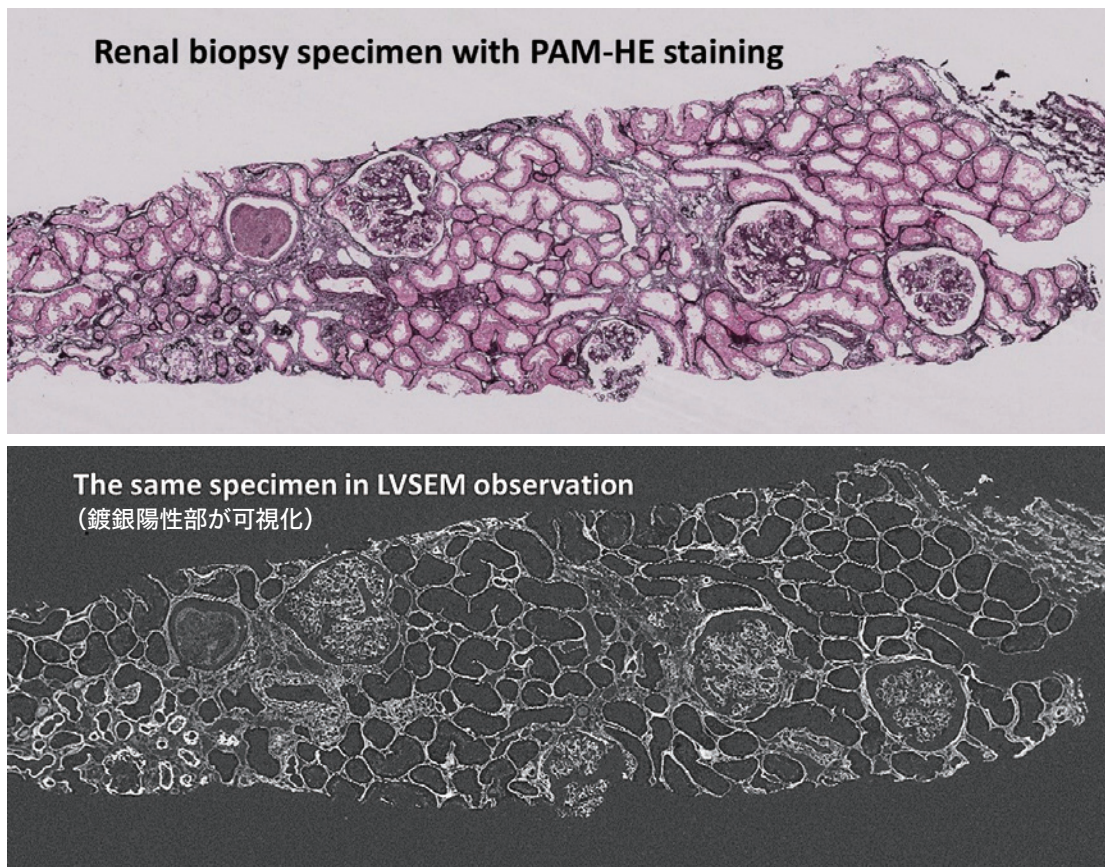
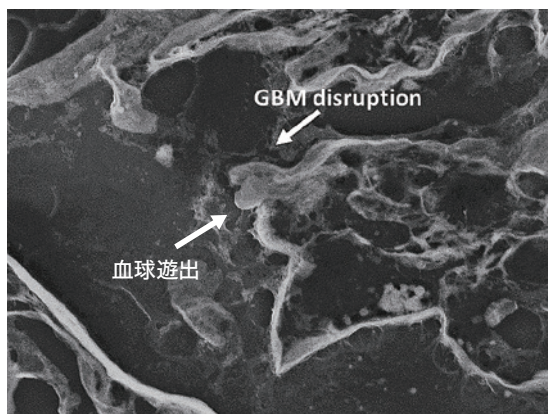
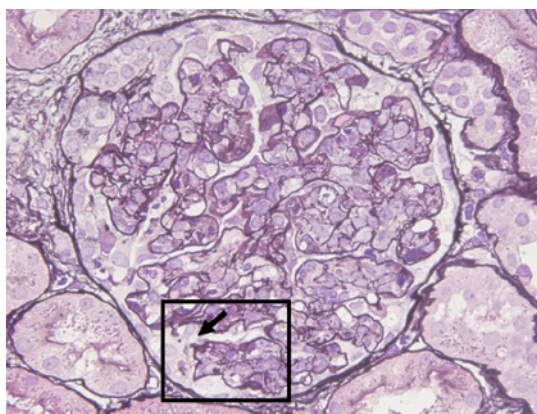


図4 光顕組織像とLV-SEM像の対比

腎糸球体基底膜傷害の検討に極めて有用



LV-SEMの高倍率、高解像度特性により、光顕では把握困難な基底膜変化の詳細を観察できる

図5 LV-SEMによる高精細画像情報の取得

4. 血尿と糸球体基底膜病変

遺伝的腎疾患のひとつとして菲薄化基底膜病 (Thin basement membrane disease) が知られている。基底膜を構成する IV 型コラーゲンの遺伝的異常により糸球体基底膜の菲薄化をきたす疾患で、臨床的に持続的な血尿を呈するのが特徴である。光顕所見でもある程度は基底膜の菲薄化が示唆されるが、IV コラーゲン α 鎖に対する免疫染色所見 (通常は蛍光抗体法による) および透過型電顕画像の基底膜の厚さの計測により診断が確定する⁴⁾。血尿の原因として基底膜の菲薄化との関連が想定されているが、これまで透過電顕による多数例の検索がなされているにもかかわらず、基底膜の破綻などの所見の確認が困難で、いかなる機序により血尿が生じるのかの詳細が不明確なままに残されている。遺伝的検索、免疫染色、透過電顕による検討から菲薄化基底膜病の診断が確定している症例の光顕用 PAM 染色標本を LV-SEM により観察したところ、菲薄化した糸球体基底膜のあちこちに小さな亀裂や小孔の生じていることが確認され、血尿との関連が強く示唆される所見である (図6)。検索範囲が小さく制限される透過電顕観察に比し、LV-SEM では光顕標本組織の広い範囲をくまなく観察することができ、また標本の厚さだけ 3 次元的画像を得ることができるため、このような所見を確認することが可能となる。まだ検索症例数が少ないため、さらなる検討が必要ではあるが、このような基底膜病変の解析には、LV-SEM による検索は極めて有用である。

IgA 腎症は、日本人に多い腎疾患であるが、糸球体に免疫グロブリンである IgA の沈着を示すことを基本的な特徴とし、臨床的に血尿を生じる代表的な疾患の一つである。IgA 腎症の成因や、病態、治療法、予後については世界的に膨大な研究成果が蓄積されているが、この疾患においても血尿の機序については不明確な点が多い。多数の症例の透過電顕による検索から、しばしば基底膜に菲薄化のみられることが報告されており、ごくまれに基底膜の破綻とそこからの赤血球漏出像が確認されているが、日常的な著明な血尿との相関を解明するには至っていない⁴⁾。通常、IgA 腎症の診断には、蛍光抗体法による糸球体への IgA の沈着の証明が必須とされるが、私たちは IgA 腎症と確定された症例の蛍光抗体法標本にさらに PAM 染色を加重し、これを LV-SEM で観察するという新たな検索方法を開発した⁵⁾。その結果、IgA 腎症においても LV-SEM 3 次元像の検討から、糸球体基底膜のここかしこに亀裂像や小孔の形成像が確認され (図7)、血尿の原因の一つとして基底膜の脆弱性による多数の小破綻病変発生による可能性が推定される。

菲薄基底膜病のLV-SEMによる検討

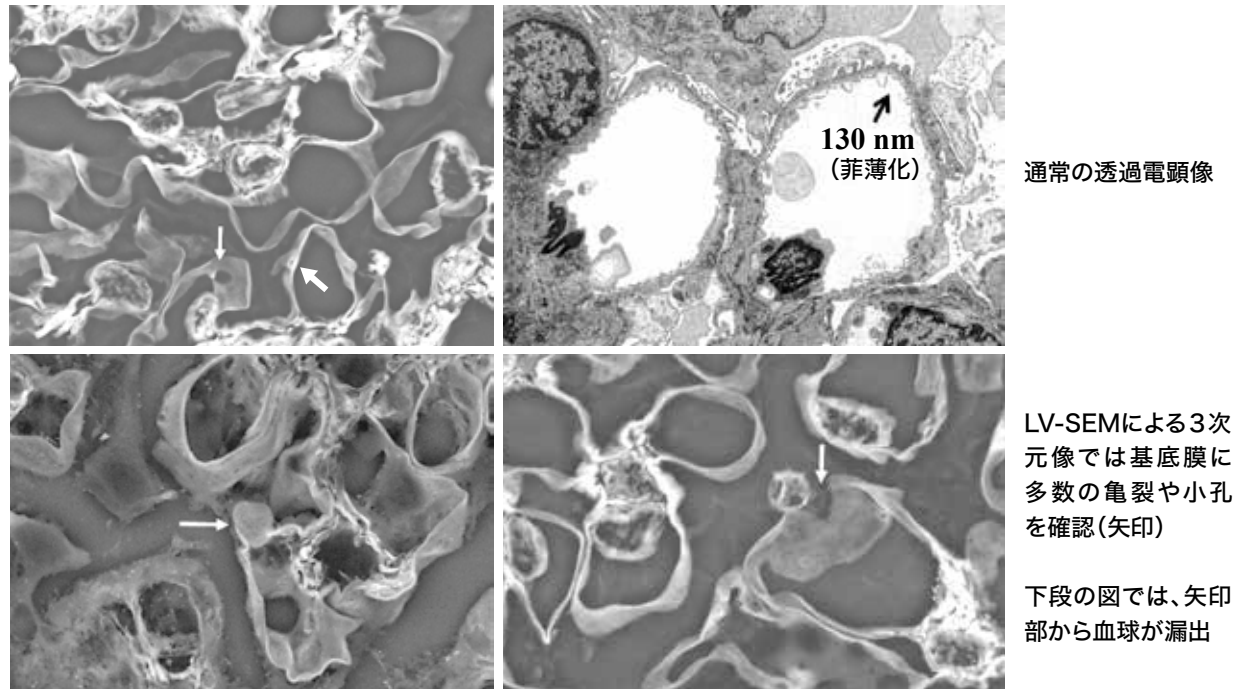
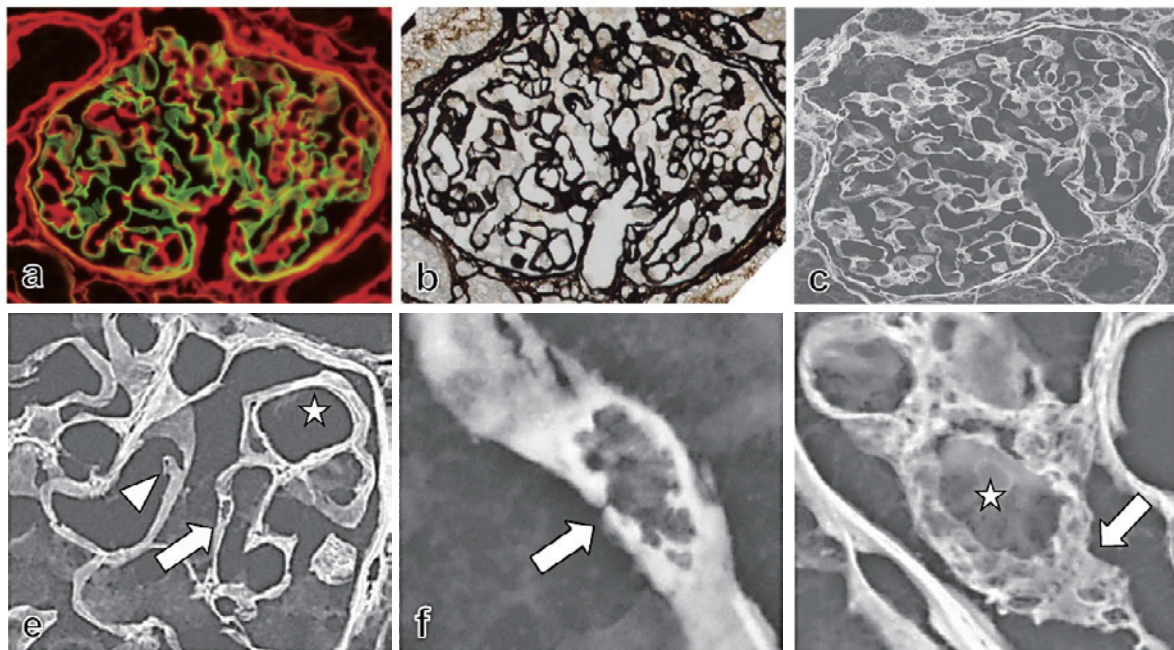


図 6 菲薄基底膜病の糸球体 LV-SEM 画像

IgA 腎症の蛍光抗体標本 (a) にPAM染色を加重染色し (b), LV-SEM像 (c) を観察



(矢印は基底膜の破綻像を示す)

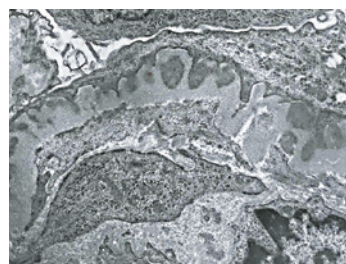
Masuda Y, Yamanaka N, et al : Clin Exp Nephrol 2015;19:427

図 7 蛍光抗体法所見と LV-SEM 像の対応

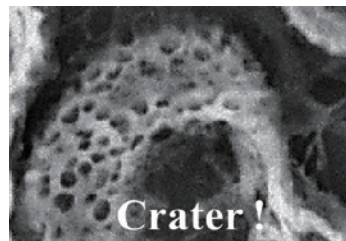
5. 蛋白尿と糸球体基底膜病変

腎糸球体疾患においては、臨床的に蛋白尿が目立つネフローゼ症候群を呈するものが多いが、その原因疾患として膜性腎症 (membranous nephropathy) の頻度が高い。この疾患は、腎糸球体基底膜に沿って広汎に免疫複合物が沈着し、基底膜の構造変化をきたして糸球体からの蛋白漏出が亢進し、著明な蛋白尿をもたらす。診断確定のためには、蛍光抗体法により主として免疫グロブリンの IgG、補体成分である C3 の糸球体基底膜への沈着を確認し、透過電顕像において基底膜の上皮下領域への沈着物およびこれを囲む基底膜成分の棘上突起 (スパイク像) 形成を認めることが原則とされている。膜性腎症典型例の光顕標本の検索では、PAM 染色標本において基底膜の外側面に黒褐色に染まる多数のトゲ状突起が認められ、これをスパイクと称している⁴⁾。病期の進行した典型例の光顕 PAM 染色標本を LV-SEM で観察すると、銀陰性の上皮細胞や基底膜に沈着した免疫複合物は不明瞭化ないし透明化し、銀陽性である基底膜の変化の詳細が明確に示される。LV-SEM による 3 次元像をみると、透過電顕による 2 次元像と異なり、基底膜のスパイク像とされていた所見は、実は沈着した免疫複合物に対し反応性に伸びてきた基底膜成分が、これをクレーター状に取り囲んでいるものであることが見て取れる (図8)。このように、腎生検組織光顕標本の LV-SEM による 3 次元的な検索は、これまで把握し得なかった組織変化の詳細を認識することにより、腎疾患病変に対するこれまでの概念の修正を促すことにもなると思われる。

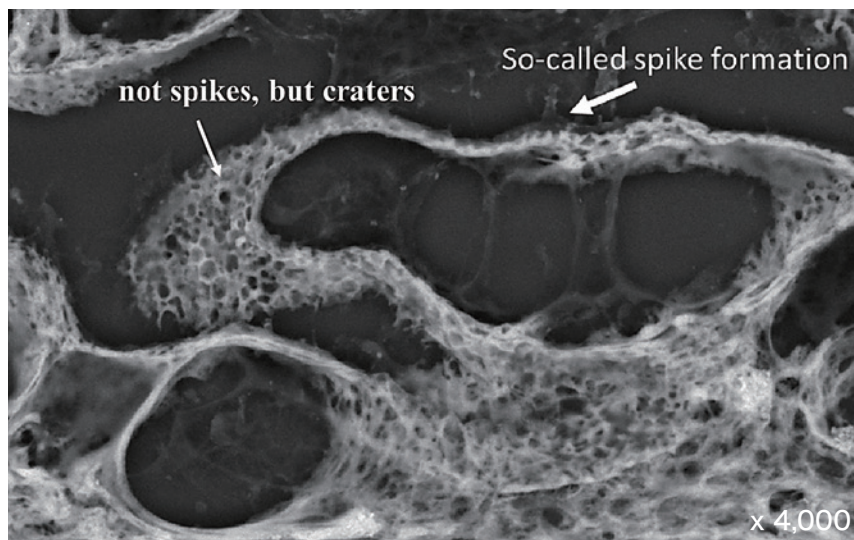
膜性腎症(membranous nephropathy)のLV-SEM像



通常の透過電顕画像



LV-SEM3次元像ではスパイクではなく、クレーター構造と判明



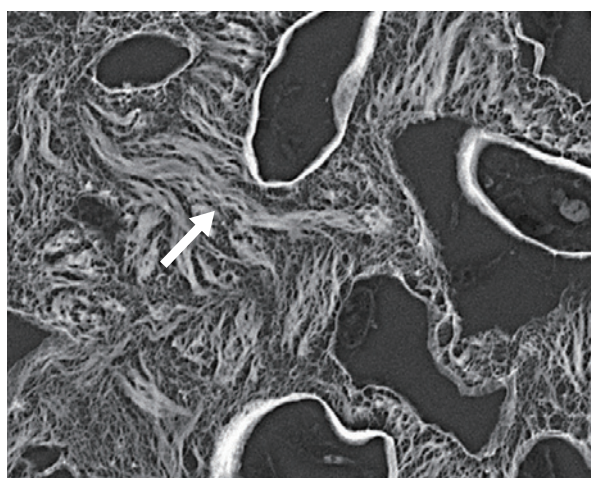
銀染色標本では、銀反応陰性の上皮細胞、内皮細胞、および免疫複合体沈着物は可視化されにくい。銀反応陽性の基底膜の変化は明瞭に把握できる

図 8 LV-SEM 検索による既成概念の修正

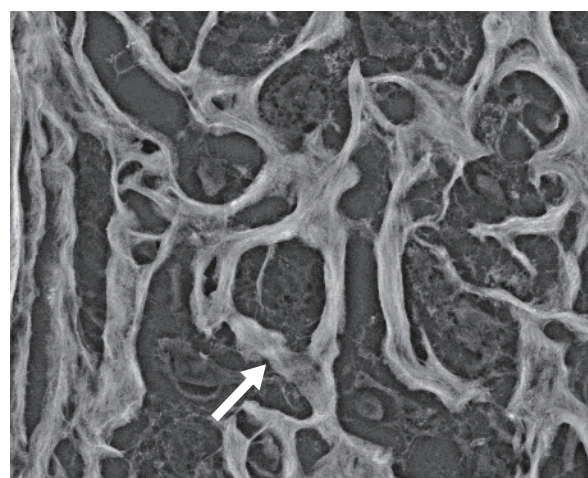
6. 腎間質組織の病変

腎生検組織診断においては、しばしば間質の線維化が問題となる。間質線維化の程度に応じて腎機能の低下が進行するため、その原因の探求と線維化の病態の評価は治療方針や予後の判定に大きく影響する。線維化の評価は、通常 Masson 染色ないし Azan 染色の色調とその広がりによって判定されるが、標本のクオリティによる色調の違いなどが病態の評価に影響する。間質の線維化は膠原線維の増加によるものであるが、膠原線維は PAM 染色陽性であるため、LV-SEM による観察は、線維化の進行につれ膠原線維の形成が目立ってくるといった線維化の病態を精細に把握することができる(図9左)。また、これまで Masson 染色などで線維化とみなされていた変化には、膠原線維の増加ではなく非線維形成性の基質成分の増加である場合のあることが LV-SEM での観察により判明し、顕微鏡による線維化の評価に再考を促すべき結果が示されている(図9右)。

間質線維化(fibrosis)と間質硬化(sclerosis)



Interstitial fibrosis
(膠原線維の増加: 矢印)



Interstitial sclerosis
(非線維性基質の増加: 矢印)

図 9 間質線維化と間質硬化の識別

間質病変の評価に関連して、間質に炎症細胞の浸潤が目立つことがあるが、浸潤細胞の種類の同定が困難な場合も少なくない。プラチナブルー染色のほうが解りやすくなるが、PAM 染色標本でも、血球成分に若干のコントラストが生じるため、LV-SEM の観察によりある程度までその実態をとらえることができ、細胞の識別が可能となる(図 10)。腎生検組織検索のための日常的な標本である PAM 染色標本は、カバーガラスを外せば直ちに LV-SEM による観察が可能であり、浸潤炎症細胞の同定が必要な場合に有用である。

PAM染色標本における浸潤細胞の解析

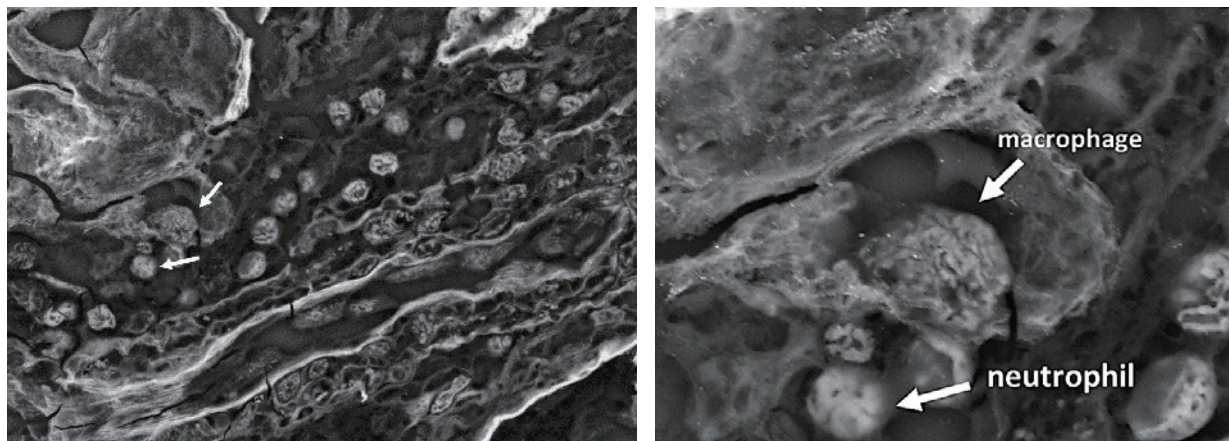


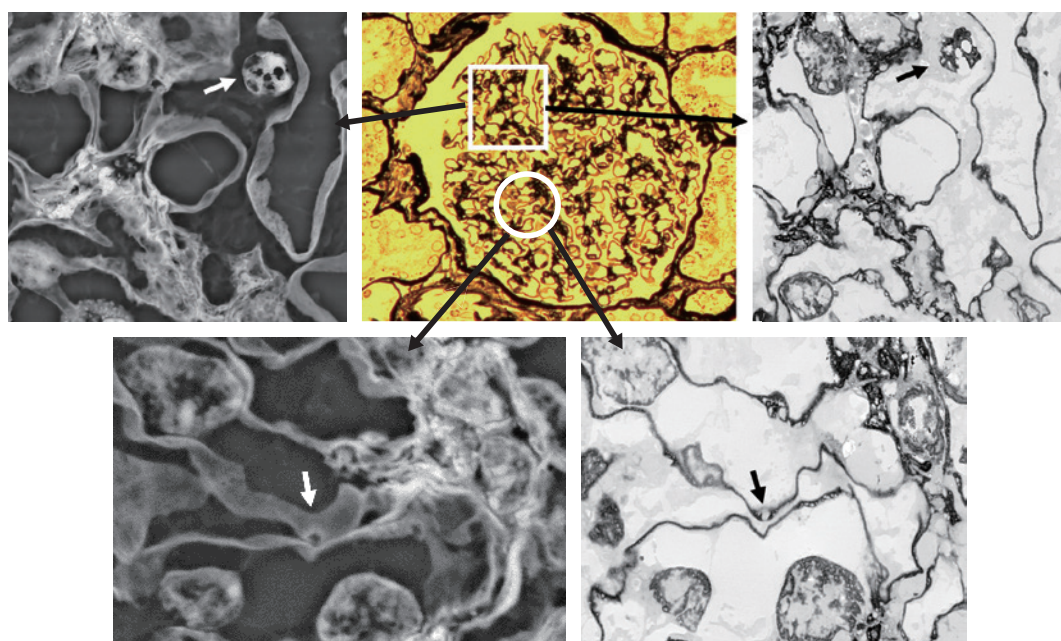
図 10 蛍光抗体法所見と LV-SEM 像の対応

7. LV-SEM像と透過電顕像の比較

光顕標本の LV-SEM による病理診断の実用化のためには、透過電顕による病変の2次元情報と、それに対応する同じ部位の LV-SEM による3次元情報との比較が必須である。

一つの試みとして、光顕標本の LV-SEM による観察を行ったあとで、その標本にエポンをかぶせて重合し、これを超薄切して透過電顕用の標本を作成し、これを透過電顕で観察して LV-SEM と同じ部位の所見について、比較を行った(図 11)。今後、このような方法により、両者の対応による所見の解析を進めていくことが重要な課題である。

同じ切片のLV-SEM像と透過電顕PAM染色像との比較



(LV-SEM PAM染色標本にエポンをかぶせて超薄切し、同じ部位の病変を透過電顕で観察)

図 11 LV-SEM 像と透過電顕像の対比

8. まとめ

光顕組織標本の LV-SEM による観察は、適切な染色を選ぶことにより、腎生検組織に限らず生体のどの組織に対しても可能であり、電顕検索のための組織が得られないような場合や、診断の困難な腫瘍の検討など、さまざまな状況に対応した応用の発展が期待される。LV-SEM が普及すれば、プラチナブルー染色や PAM 染色に限らず新たな染色法の開発や、細胞診への応用、必要に応じての迅速診断法の確立などの工夫がなされるようになり、病理組織診断の精度の向上にも大きく寄与するものと思われる。

光顕標本の LV-SEM による診断を実用的なものとするためには、光顕標本の LV-SEM 像と、同じ標本に対する透過電顕像の比較データの蓄積、および種々の病変に対する多数の検索結果を集約した大掛かりなデータベースの構築が必須である。衆知を集めてこれを築き上げ、日本で開発されたこの新たな方法論を、ぜひ世界に普及させていきたいものである。

参考文献

- 1) 山中宣昭, 腎生検に必要な各種染色法, 腎生検病理アトラス 21-29, 東京医学社 (2010) .
- 2) S. Inaga et al., Low-vacuum scanning electron microscopy for paraffin sections by utilizing the differential stainability of cells and tissues with platinum blue, *Arch. Histol. Cytol.*, **72**, 1012-106 (2009).
- 3) H. Miyazaki et al., Application of low-vacuum scanning electron microscopy for renal biopsy specimens, *Path. Res. Pract.*, **208**, 503-509 (2012).
- 4) Heptinstall's Pathology of the Kidney 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia (2015).
- 5) Y. Masuda et al., Glomerular basement membrane injuries in IgA nephropathy evaluated by double immunostaining for $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ chains of type IV collagen and low-vacuum scanning electron microscopy, *Clin. Exp. Nephrol.*, **19**, 427-435 (2015).

プローブ顕微鏡“AFM5500M”による微小領域の三次元形状計測

脇山 茂

1. はじめに

プローブ顕微鏡は、相対するプローブと試料間に働く様々な物理量を検出し画像化する装置である。1983年 IBM チューリッヒ研究所にて、最初のプローブ顕微鏡の一形態である走査型トンネル顕微鏡 (STM: Scanning Tunneling Microscope) が開発され、Si (111) 7×7 再構成構造を決定する重要な原子像の観察が行われた。開発者の G.Binnig と H.Rohrer は、1986年にノーベル物理学賞を受賞している。

STM は、トンネル電流を利用したプローブ顕微鏡であるが、1986年には絶縁物表面の観察も可能な原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic Force Microscope) が開発され、その後表面科学および関連産業分野で急速に普及してきた。

(株) 日立ハイテクサイエンス (旧・セイコー電子工業 (株)) は、日本において最初に STM の原子像観察に成功した旧通産省・工業技術院・電子技術総合研究所の開発プロジェクトグループに参画し、その後これまで種々の関連装置の開発を行ってきた。

ここでは、測定誤差の排除のための『測定の信頼性向上』、生産性向上のための『測定の自動化』、他検査解析手法とのリンケージのための『測定の親和性』をキーワードに開発したプローブ顕微鏡 “AFM5500M” について紹介する。

2. プローブ顕微鏡の原理

図1に AFM の基本的な測定原理図を示す。代表的な AFM の測定モードには、コンタクトモードとダイナミックモード (振動モード) があるが、ここでは標準的に使用されているダイナミックモードを例に説明する。

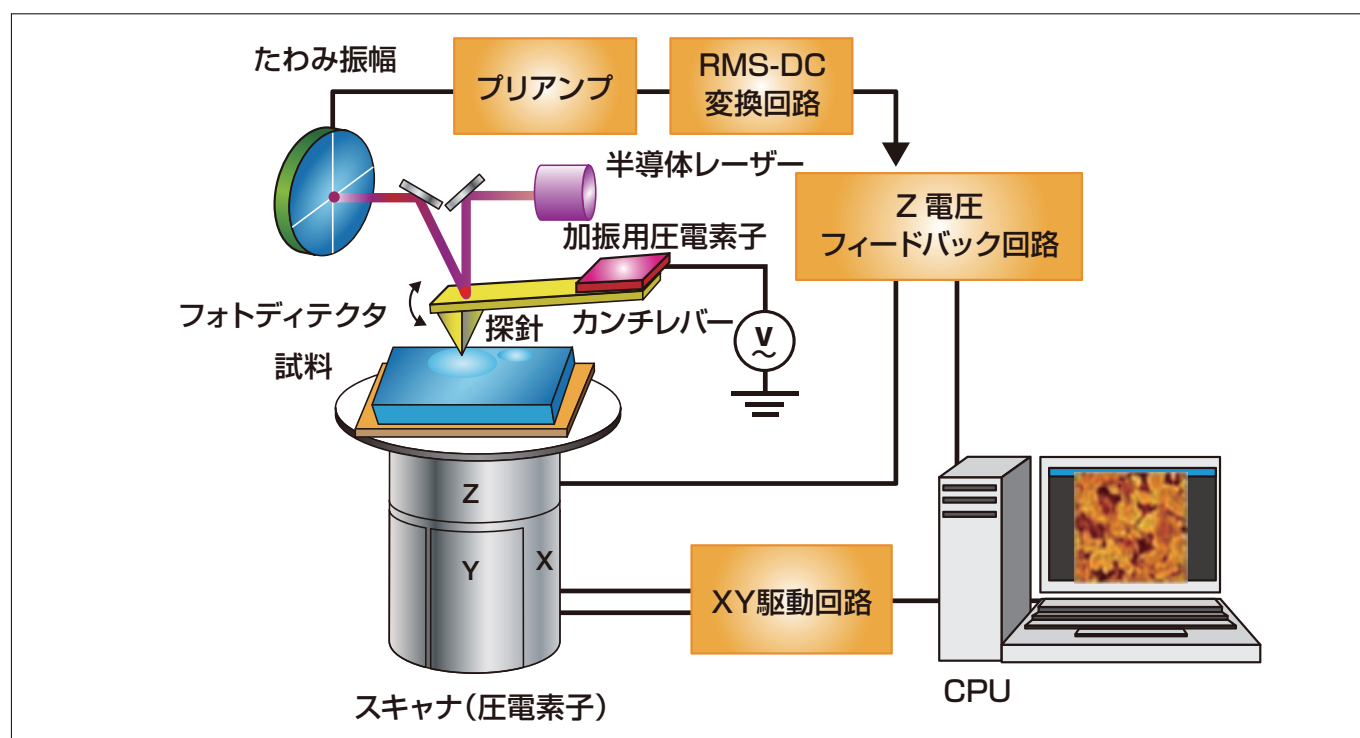


図1 プローブ顕微鏡の原理

測定対象となる試料に対向する位置にカンチレバーが配置されており、このカンチレバーの先端には、鋭い探針が形成されている。カンチレバーはおもにシリコン製でマイクロエッチングにて製造される。このカンチレバーをその共振周波数近傍の周波数で振動させながら探針を試料に近づけると、探針と試料間に生じる物理的な力によってカンチレバーの振幅が変化する。このカンチレバーの振幅変化は、カンチレバー背面に照射したレーザーの反射光をフォトディテクタでとらえることにより検出され（光てこ機構）、RMS-DC 変換回路で、交流信号を直流信号に変換して使用される。

試料は、面内 (X, Y) 方向と垂直 (Z) 方向に微小に駆動可能なスキャナの上に設置される。探針と試料の物理的な力（原子間力など）を検出可能な領域に近づけた状態でスキャナを面内方向に走査すると、試料表面の形状に応じて探針と試料間の距離に対応してカンチレバーの振幅が変化し、その振動振幅が一定になるようにスキャナを垂直方向に制御する。この時、面内走査信号と垂直方向の制御信号を用いて三次元画像を構成することにより試料表面の形状を得ることができる。

3. プローブ顕微鏡の特徴

一般的に、プローブ顕微鏡は、高分解能測定、各種物理量に関する多機能測定、種々の環境下での測定が可能などの特徴があげられる。図 2 にプローブ顕微鏡での観察イメージを例示する。面内観察範囲は、スキャナの移動量で制限され、一般的に数 nm から 100 μ m 程度である。

3-1. 高分解能測定

STM の場合、試料と探針間に流れるトンネル電流が、AFM の場合、試料と探針間に作用する原子間力が、距離に対して高感度に変化する状態を検出することにより、試料表面の高分解能観察が可能となる。

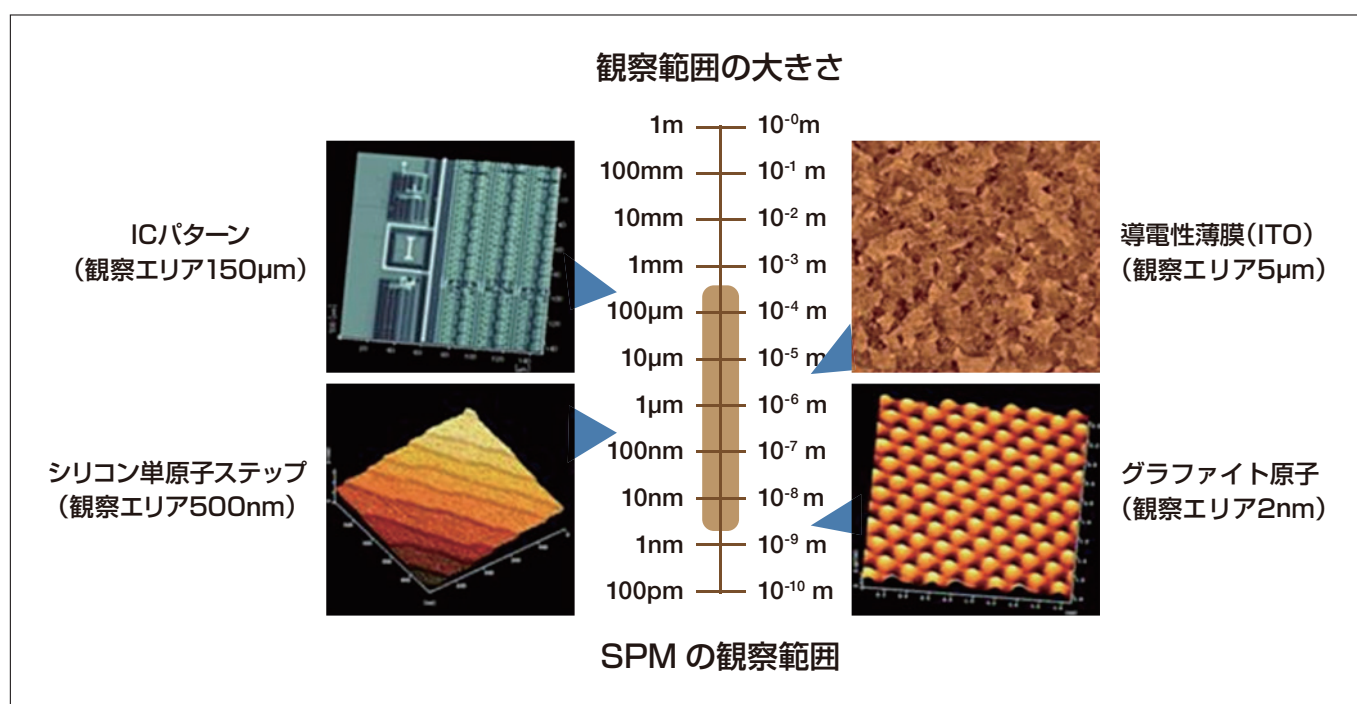


図 2 プローブ顕微鏡の観察例

3-2. 各種物理量に関する多機能測定

プローブ顕微鏡では、試料表面の形状だけでなく、各種の物理量を試料表面の形状と同時に測定、観察することが可能である。各種物理量の測定は多機能測定として、図3に示すように、『機械物性』、『熱物性』、『電気物性』、『磁気物性』などが可能である。また、測定項目ではないが、機械的力あるいは陽極酸化の原理を利用した試料表面の微細加工にも利用されている。

『機械物性』では、試料表面の摩擦力や粘弾性などの測定が、『熱物性』では、試料の温度に対する物性の測定が、『電気物性』では、試料表面の導電性マップ、試料表面の電位マップ、半導体のドーパント マップなどの測定が、『磁気特性』では、ハードディスクなど各種磁気材料の磁場測定が可能である。

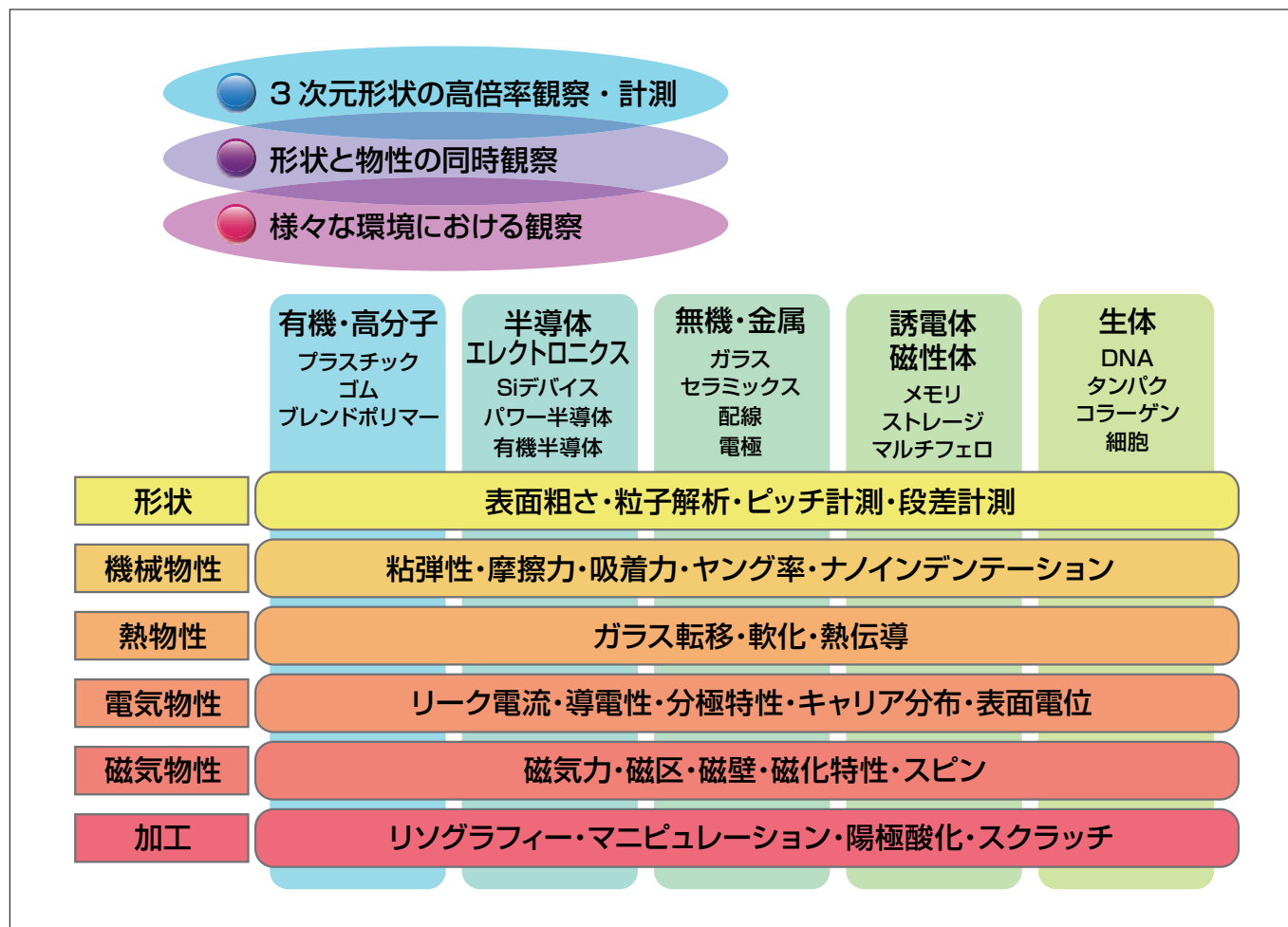


図3 プローブ顕微鏡のアプリケーション

3-3. 種々の環境下での測定

大気環境はもちろん、真空、ガス雰囲気（不活性ガス）、溶液（カンチレバーが反応しない溶液）など、各種環境下での測定が可能である。真空中での清浄な試料表面の観察、ガス導入による試料表面の変化、試料を加熱・冷却することで表面状態の変化などが測定可能である。

4. AFM5500Mの構成

図4はAFM5500Mのシステム写真である。写真左側はAFMユニット外観である。写真右側は防音カバー内にAFMユニットを配置および専用のステーション（コントローラ）を防音カバー下部に配置した外観である。図5はAFM5500Mの構成を示した概略図であり、以降AFM5500Mの各構成要素について説明する。

AFM5500Mの操作はパーソナルコンピュータにより行われ、測定結果はディスプレイに表示される。図5に記載の制御回路、XY駆動回路、Z制御回路などは専用ステーション内に設置されている。プローブ顕微鏡は前述（プローブ顕微鏡の特徴）したように原理的に高分解能であるので、設置床面から伝搬される振動ノイズが測定画像データに含まれることがある。この対策として、通常、除振機構を介してAFMユニットが配置される。除振機構にはパッシブ制御型とアクティブ制御型がある。パッシブ制御型は通常、除振パネ系で数Hzに共振点をもつため数Hzの低周波数域に振動がある設置環境では振動を低減できない。AFM5500Mでは卓上アクティブ制御型の除振機構を採用し、低周波振動にも対応している。また、周囲の音響ノイズも測定画像データに含まれることがある。この音響ノイズに関しては、防音カバー内にAFMユニットを配置することで対応している。防音カバーは金属プレート、遮音シート、吸音シートの多層構造からなり、金属プレートと遮音シートにより外部音響の防音カバーへの通過を低減している（質量効果）。また、吸音シートにより防音カバー内の反響を低減している。



図4 AFM5500M システム写真（左：AFMユニット、右：防音カバーと専用ステーション）

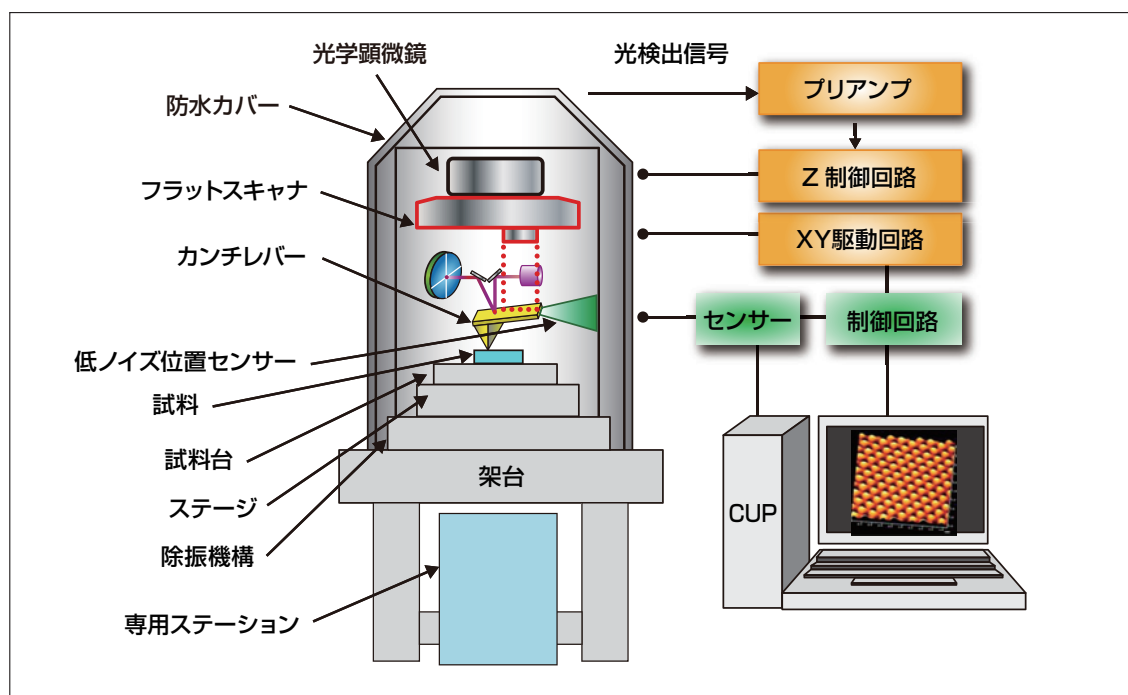


図5 AFM5500M の構成

試料は試料台を介して設置される。試料台は電動ステージ上に配置され、4 インチ (100mm) 試料全面観察が可能である。試料の上部にはカンチレバーが配置されており、そのカンチレバーの変位を検出するための光てこ機構を構成する光源としてのレーザーと検出器としてのフォトディテクタも同様に配置されている。『図 1 プローブ顕微鏡の原理図』では試料側をスキャナにて微小移動する仕組みにて記載、説明したが、AFM5500M では4 インチ試料全面観察仕様とするため、試料側は微小移動させずに、カンチレバーおよび光てこ機構を三次元移動可能な構成としてある。

また、CCD カメラを介した光学顕微鏡機能を有し、ディスプレイ上に試料およびカンチレバーを表示することができる。光学顕微鏡像はカンチレバー交換時の観察および試料の面内 (XY 軸) 位置決めに利用される。光学顕微鏡と光てこ機構の光学系の配置を工夫することで¹⁾、光学顕微鏡像の分解能低下を抑えた設計としている。概略図に記載はないが探針と試料を物理的な力 (原子間力) の検出可能な領域に近づけたための鉛直 (Z 軸) 方向のステージも構成されており、全体として、高剛性のグラナイト製の筐体に設置されている。

5. AFM5500Mの特徴

すでに記載したように AFM5500M の特徴は、測定誤差の排除のための『測定の信頼性向上』、生産性向上のための『測定の自動化』、他検査解析手法とのリンケージのための『測定の親和性』にある。各々の特徴について以下、1. 広走査領域における高い計測精度、2. 測定の自動化による操作性向上、3. 他計測装置との測定の親和性の順に説明する。

5-1 広走査領域における高い計測精度

従来、三次元 (XYZ) 走査のためのスキャナは、図 6 に示すような中空円筒型を使用していた。スキャナの素材は電圧を印加するとひずみを発生する圧電素子にて構成される。中空円筒型圧電素子には内側および外側に Z 走査用と X、Y 走査用 (各 2) の 5 分割された電極が配置されている。内側電極を基準 (GND) に各軸の電極に電圧を印加することにより圧電素子にひずみを発生させる。外側電極に -V 印加で厚み方向が収縮し、軸方向に延びる。また、逆に +V 印加で厚み方向が膨張し、軸方向に収縮する。同様な原理により、鉛直 (Z) 方向は Z 走査電極に電圧を印加することで圧電素子の軸方向変位を発生させる。X 軸走査は X 軸の走査電極に対して一方に +V、他方に -V の電圧を印加し中空円筒型構造に対して曲げ動作を発生させる (Y 軸も同様)。中空圧電素子の肉厚が均等でない場合、軸方向変位 (Z) において平面と垂直のクロストークが発生する。また、面内方向変位 (XY) は中空円筒型構造の曲げ動作によるため平面に対して湾曲状の平面ひずみが発生する。この現象は平坦な試料の計測において測定誤差となる。また、広走査領域を実現するには圧電素子を長くする必要があり、スキャナ部材の剛性低下の要因となる。

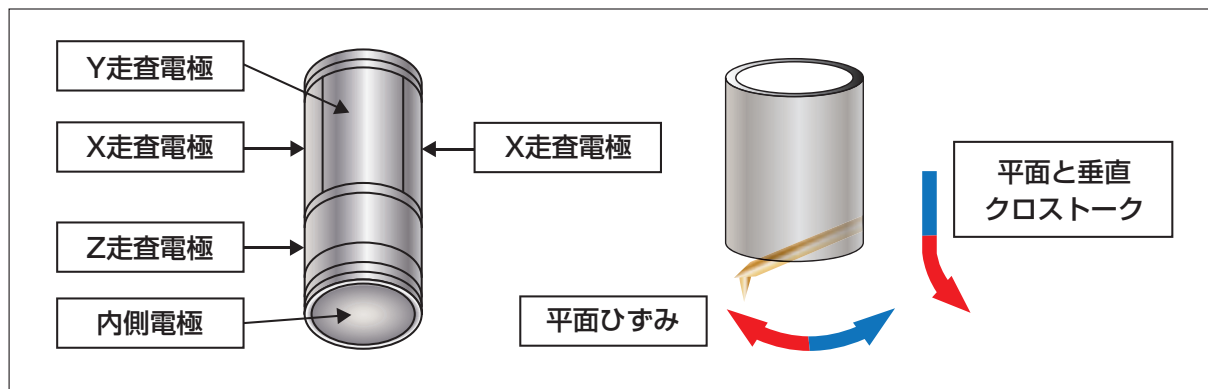


図 6 中空円筒型圧電素子と走査軌跡

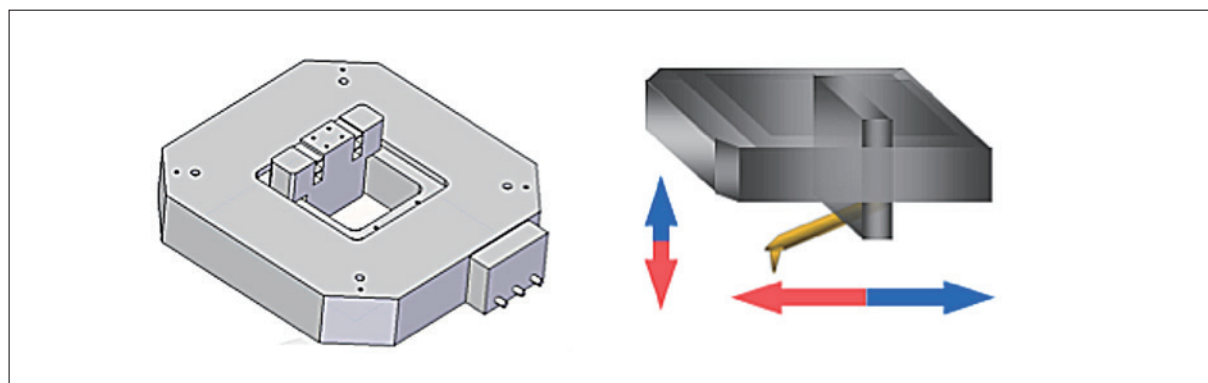


図 7 フラットスキャナと走査軌跡

このような要因を排除するために、AFM5500 M では XY と Z を分離、および、フラットスキャナ (図 7) を搭載することで広走査領域 (面内 200 μ m 鉛直 15 μ m) とスキャナ動作によるひずみを低減した 3 次元微動機構を実現している。また、『図 5 AFM5500M の構成』に示すように光学式の低ノイズ位置センサをカンチレバーの近傍に配置することで、面内 (XY) 走査のクローズドループ制御精度及び鉛直 (Z) 方向の検出精度の向上を図り、またスキャナ構造に起因する平坦な試料の測定誤差の低減を実現した。

5-2. 測定の自動化による操作性向上

プローブ顕微鏡は測定までの準備および測定条件の設定に専門性を必要とし、これまでは、一部の研究者用途の検査機器という印象があった。AFM5500M では、自動化を追求することで操作性向上を図ると同時に測定者起因の測定誤差の排除を実現した。

『図 8 AFM5500M 測定までの流れ』に沿って、AFM5500M における測定までの流れを具体的に説明する。

①カンチレバーセット

AFM5500M ではカンチレバーを三次元に走査する方式を採用している。そのため、スキャナ先端に構成されたカンチレバー固定ブロックにカンチレバーを取り付ける作業が必要である。カンチレバーは一般的にシリコンプロセスで製作されており、幅 10 μ m、長さ数 100 μ m 程度の大きさなので、手動にて取り付けるには操作性および測定の信頼性向上のためにも問題がある。AFM5500M では、カンチレバーの自動交換機構を設置することで、この課題を解決している。

カンチレバーは板材に軽い粘着性を有するゲル材が構成されたカンチレバーカートリッジに固定される (図 8 ①-1)。この状態で XY 軸電動ステージ上に構成されたブロックに配置する (図 8 ①-2)。カンチレバーは図 8 ①-1 のようにプリマウントされての供給とカンチレバー単体での供給がある。単体の場合は、専用の治具を用いてカンチレバーカートリッジに固定する。カンチレバーカートリッジには 5 本のカンチレバーのセットが可能である。5 本のカンチレバーの何番を使用するかを選択 (図 8 ①-3) することで、登録してある座標位置に XY 軸電動ステージによりカンチレバーカートリッジが移動する。次に、光てこ機構のレーザースポットとカンチレバーの外形が光学顕微鏡にて確認できる座標位置まで Z 軸電動ステージが降下する。

②レーザアライメント

レーザースポットとカンチレバーの外形が光学顕微鏡にて確認できる状態で、画像認識により、レーザースポット中心とカンチレバー位置が XY 軸電動ステージにて位置決めされる (図 8 ②-1)。次に、カンチレバーとスキャナ先端のカンチレバー固定ブロックが接する位置まで Z 軸電動ステージが降下する。この状態でカンチレバー固定ブロックに構成された真空吸着機能にて、カンチレバーがカンチレバー固定ブロックに固定される。真空吸着した状態で Z 軸ステージが上昇し、カンチレバー固定ブロックへの受け渡しが行われる。カンチレバー背面に照射されたレーザ光は反射され、4 分割のフォトディテクタに導入される。カンチレバーの個体差や種類の違いによりフォトディテクタに入射される反射光の位置が異なるが、フォトディテクタの 4 分割の信号成分により反射光の位置を算出し、フォトディテクタ側に構成された 2 軸ステージにて位置調整を自動で行う (図 8 ②-2)。

以上の動作により、カンチレバーの装着とカンチレバー背面へのレーザ光源の照射および反射光を検出するためのフォトディテクタの位置決めを自動で行う。

③ Q カーブ測定

測定がダイナミックモード (振動モード) の場合、選択されたカンチレバーに対して Q カーブ測定 (図 8 ③) を行い、共振周波数、振動振幅などを算出する。以上でカンチレバーの準備作業は終了で、①～③の一連の作業は自動で行われる。

④サンプルセット

XY 軸電動ステージを試料交換位置に移動後、試料台に試料をセットする (図 8 ④-1)。試料は試料台に真空吸着が可能である。次に XY 電動ステージおよび Z 軸電動ステージを移動させ、光学顕微鏡像にて測定位置を特定する (図 8 ④-2) カンチレバー先端の探針位置のマーキング機能を用いて位置決めをした場合、約 10 μ m の誤差にて光学顕微鏡中心と AFM 画像中心を位置決めできるので、十分、光学顕微鏡で選定した場所を AFM にて測定可能である。

⑤測定

パラメータ自動調整モード (図 8 ⑤) を選択し、Start ボタンをクリックするだけで、測定者が調整することなく、測定領域へのアプローチ、測定条件の自動調整が行われる。測定者は測定像の走査範囲 (MAX200 μ m) を設定するのみで、システムが形状、表面状態より測定周波数、測定制御ゲインなど、パラメータを調整して測定まで行う。このパラメータ自動調整モードにより、すでに述べたように、従来専門性を有した測定条件の調整が不要となり、プローブ顕微鏡の操作性の向上と測定者起因の測定誤差の排除を実現している。

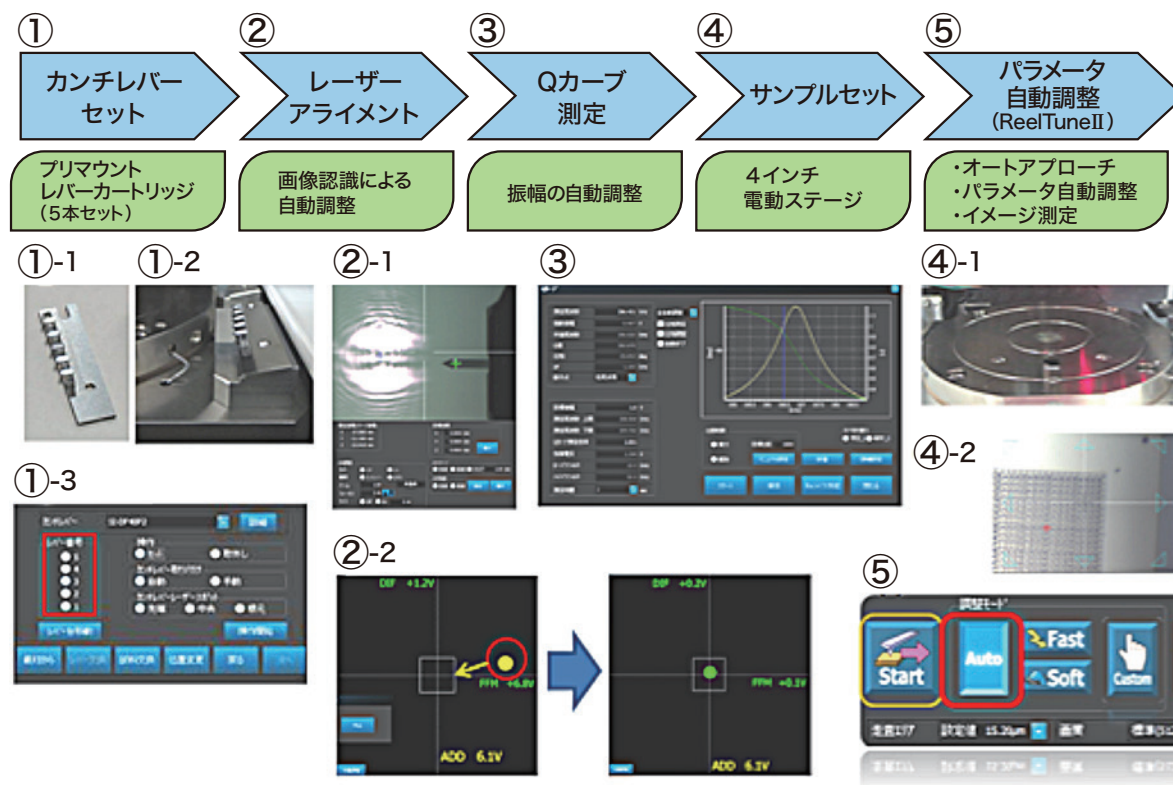


図 8 AFM5500M 測定までの流れ

5-3. 他計測装置との測定の親和性

表面形状の計測および分析装置はプローブ顕微鏡以外にも種々の装置があり、代表的な装置として電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) があげられる。プローブ顕微鏡の最大の利点としては、高分解能でのリアルな高さ情報が得られることがあげられるが、電子顕微鏡は広域測定、各種分析装置と組み合わせることで成分分析などが行える利点がある。ほかの装置と測定情報を共有することで、単独装置だけでは得られない知見が得られることがある。そのような目的のため、AFM5500M では日立ハイテックグループで販売している走査型白色干渉顕微鏡 (CSI: Coherence Scanning Interferometry) および電子顕微鏡 (SEM) とのリンケージ可能な仕組を構築した (図 9)。リンケージのために、各装置に共通の試料台が搭載できるようにした。また、共通試料台にはアライメントマークが構成されており、このアライメントマークの位置と測定位置情報をもとに各装置搭載時にステージ座標変換および測定箇所的位置決めを行うことで、同一カ所の測定を可能とした。

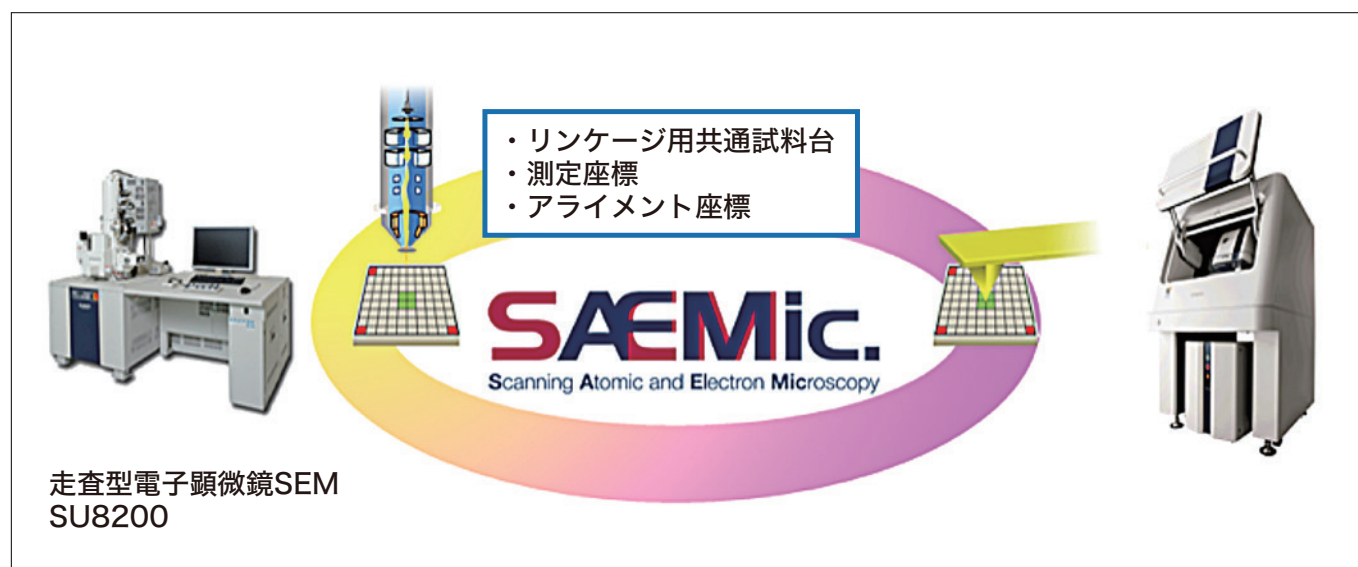


図 9 測定の親和性

6. AFM5500Mによる測定の実際

図 10 はシリコン上に $20\mu\text{m}$ ピッチ、高さ 100nm で構成したパターン試料の測定例である。走査領域 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ で直交した格子構造がゆがむことなく測定できている。

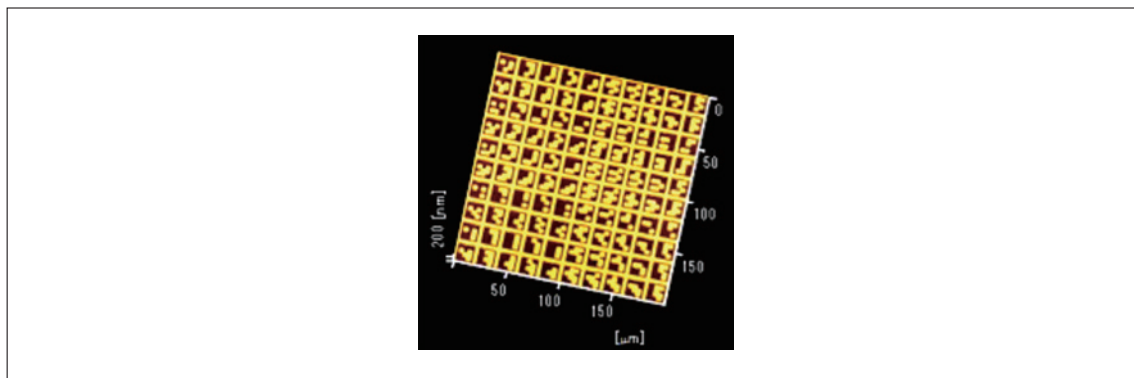


図 10 パターン試料 ($200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$)

図 11 はフラットスキャナの性能を示す測定例で、シリコン基板上的のアモルファスシリコン薄膜の段差の測定例である。AFM5500M の特徴で説明したように、従来のスキャナの構造からくる円弧エラー（左画像）が AFM5500M では $200\mu\text{m}$ の広域にわたり平坦性よく（右画像）、測定が行われている。

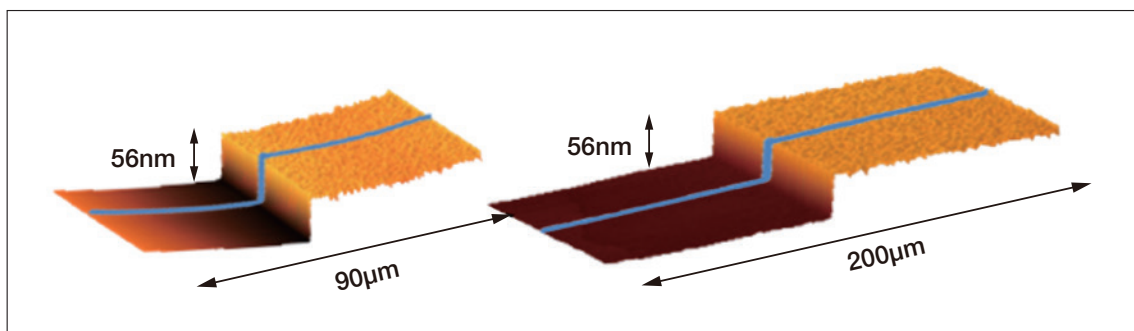


図 11 測定精度向上例 1（フラットスキャナによる平面ひずみの低減）

図 12 は AFM5500M のスキャナ真直性を示す測定例で、太陽電池に使用されるテクスチャ構造の測定例である。従来のスキャナ（中空円筒型圧電素子）では Z 軸方向の真直性が悪いいため左右の角度が非対称に計測されてしまう。一方、AFM5500M では、結晶方位による左右対称な立体構造をより正確に計測できている。

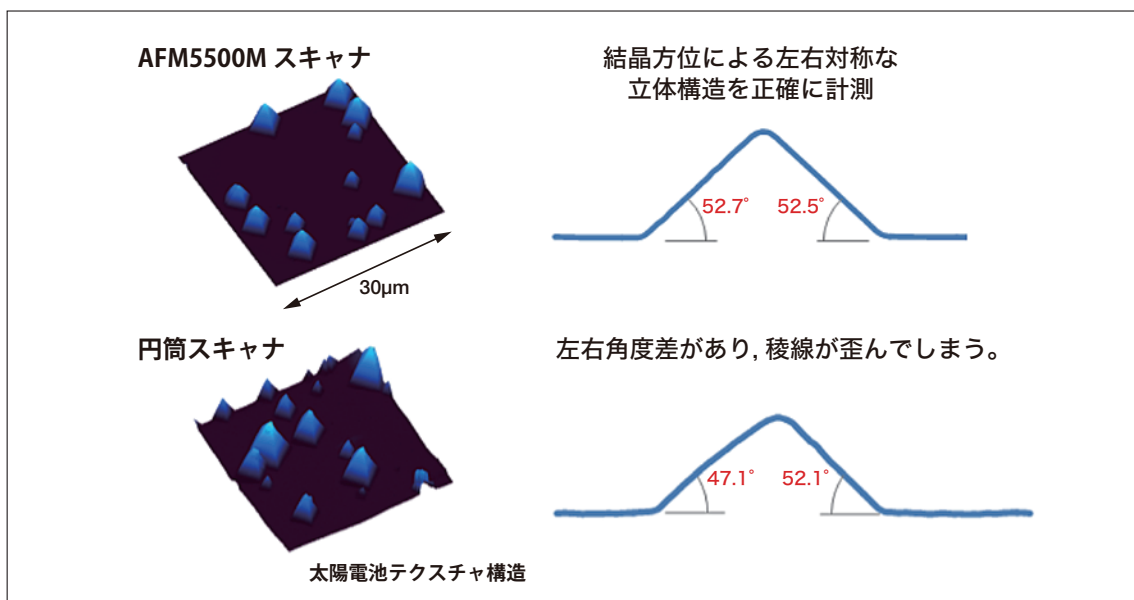


図 12 測定精度向上例 2（平面と垂直方向のクロストロークの低減）

図 13 は測定の親和性を示す測定例で、CVD（Chemical Vapor Deposition）成長単相グラフェン／SiO₂の同一カ所を AFM と電子顕微鏡により観察した例である。電子顕微鏡の観察像にあるコントラストの起源を調べるために、AFM で測定した形状像と電位像を、電子顕微鏡の観察像に重ね合わせた結果、走査電子顕微鏡のコントラストの差は、走査型プローブ顕微鏡で観察されるグラフェン 1 層分の高さに相当しており、また、グラフェンの層数などにより表面電位が異なっていることが明らかになった²⁾。

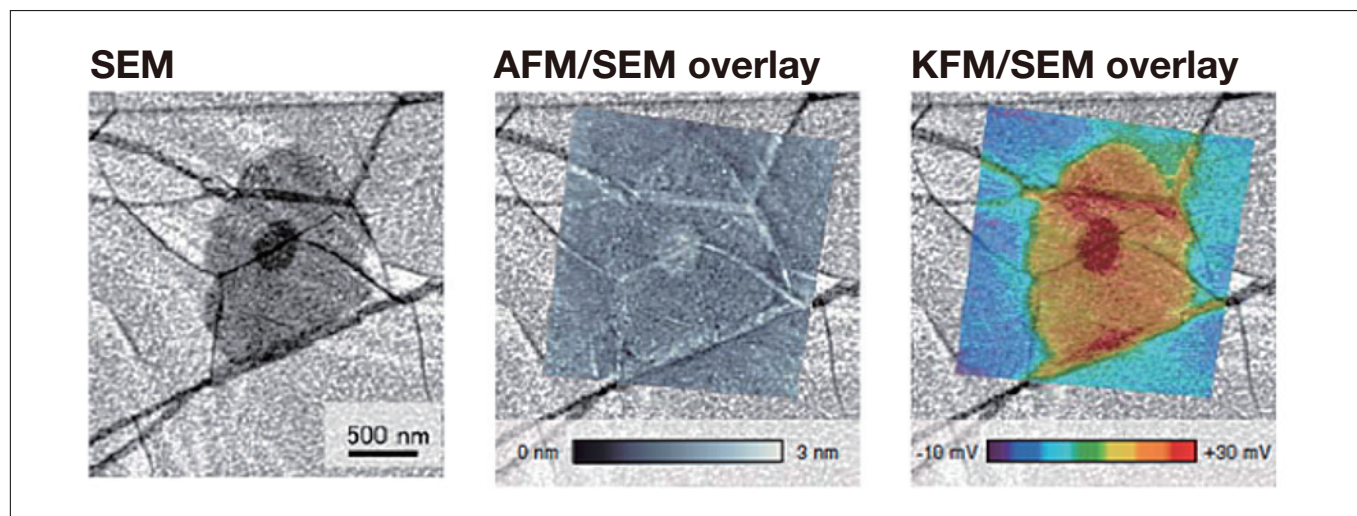


図 13 測定の親和性例（AFM と電子顕微鏡）

図 14 は測定の自動化のための、測定パラメータ自動化の様子を示している。Auto モードにて Start ボタンをワンクリックすることで、Q カープ調整からフィードバックゲインなど測定パラメータを自動的に決定することができる。

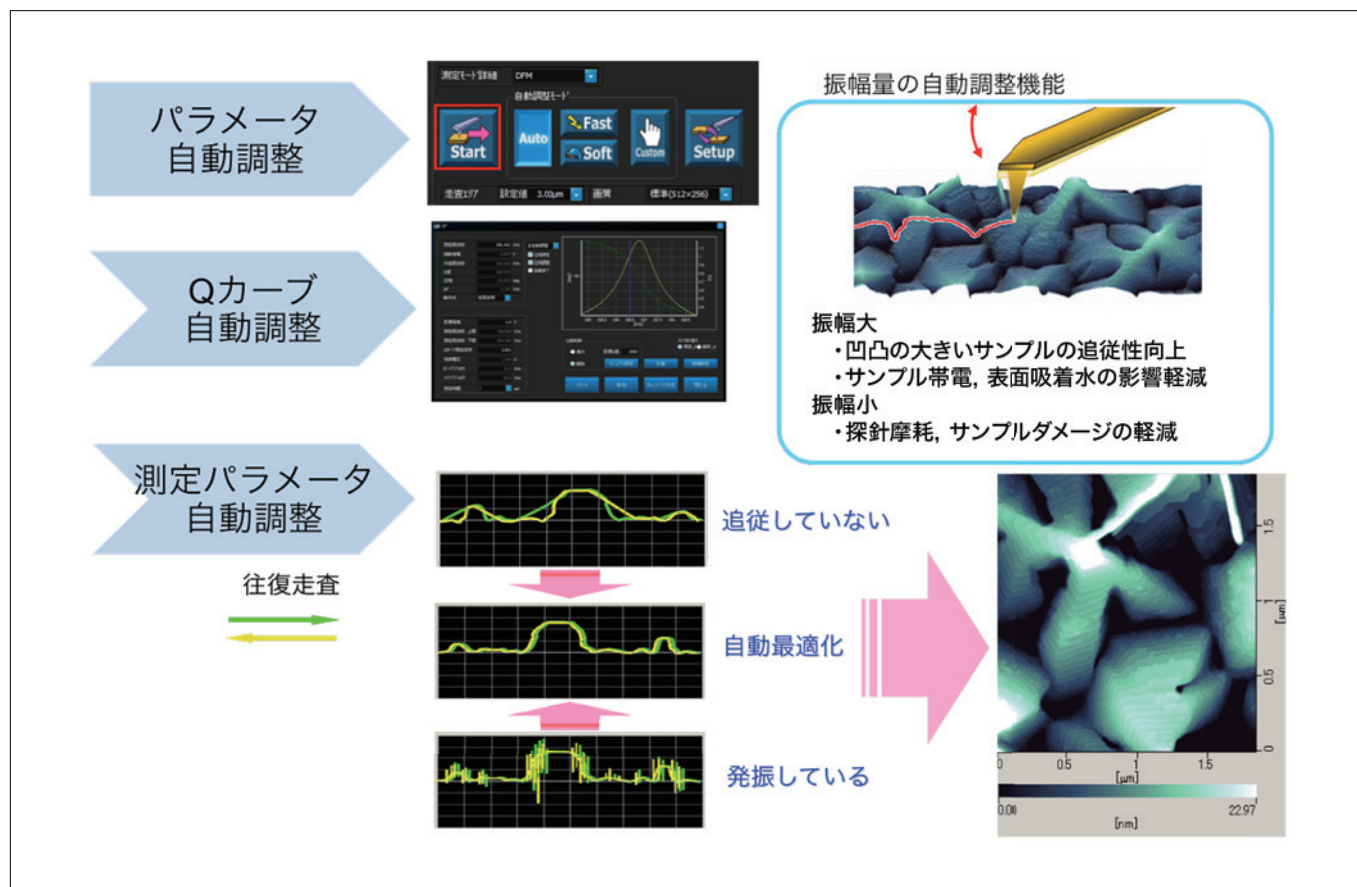


図 14 自動パラメータ調整

7. おわりに

試料表面の観察，計測装置であるプローブ顕微鏡の原理およびその計測用途を紹介するとともに，特に測定の信頼性の向上を目的として開発した AFM5500M の構成，特徴および測定例などについても紹介した。測定の自動化を行うことでプローブ顕微鏡の操作における専門性の必要性が低減され，測定者起因の測定誤差を排除，低減を実現している。また，プローブ顕微鏡の長所（三次元情報，多機能測定）を活かしつつ，ほかの装置との親和性を提案することでプローブ顕微鏡の活用および各種ソリューションの展開がさらに広がることを期待している。

一方，ほかの装置と比較して測定時間が長いというプローブ顕微鏡の欠点に関しても精力的に高速化の開発が進められており，プローブ顕微鏡が表面の検査装置として，今後さらに身近な装置となっていくものと期待している。

参考文献

- 1) 特開 2016-183869
- 2) Y. Hashimoto, T. Yamaoka, S. Takeuchi, T. Sunaoshi, A. Miyaki, M. Sasajima, A. Muto, J. Yu : Correlative Characterization of Graphene with the Linkage of SEM and KFM. : *Microsc. Microanal.* 22 (Suppl 3), 2016 pp.226-227
- 3) 蓮村聡，脇山茂，伊與木誠人，安藤和徳：日立評論 98，5，pp.64-67 (2016)

出典

月刊誌「工業材料」3月号掲載

著者紹介

脇山 茂

(株) 日立ハイテクサイエンス BT 設計部

走査電子顕微鏡FlexSEM1000の特徴三次元形状計測 ～先進のSEMをよりコンパクトに～

小室浩之*、坂上万里**

1. はじめに

微細形態の評価に用いられる走査電子顕微鏡（以下SEM）は、現在、金属、鉱物、セラミックス、セメント、ガラス、プラスチック、ゴム、石油、塗料、半導体、電子部品、医生物など様々な分野の研究や開発において欠かすことのできない重要なツールになっている。

SEMは低倍率から高倍率まで試料の表面の微細形状の観察が可能であること、光学顕微鏡に比べて焦点深度が十分に深いことから、凹凸の大きい試料においてもその全体像を立体的に把握しやすいこと、さらにX線分析装置との組み合わせで、微小領域の組成分析ができることが特徴である。さらに低真空観察では、絶縁物試料や水分・油分を含んだ試料を無処理で観察・分析することが可能なことから、生物分野や食品関連、電子部品の品質管理などへ幅広く利用され、近年急速に普及している。この低真空観察を利用し、光学顕微鏡の延長として使用できる卓上型のSEMが開発された。コンパクトデジタルカメラに類似したGUIにより、誰でも直感的に操作でき、光学顕微鏡よりも高倍率での観察が簡単にできるようになった。

この卓上顕微鏡で得られた小型化技術と、本来の高性能なSEM技術の融合により、高性能をよりコンパクトにした装置であるFlexSEM1000を開発したので、以下に紹介する。

2. 装置構成

FlexSEM1000の外観写真を図1に示す。本装置では、顧客ごとの様々な設置シーンに対応するため、本体部と電源部に分かれるセパレート構造とし、据置きあるいは卓上への選択を可能としている。これを実現するため、SEMの性能を担う電子光学系部位については高分解能を維持しながら極限まで小型化している。真空排気システムについては真空度を可変できる低真空モードと高真空モードを兼ね備えて最適化した。

これら全ての制御系システムの小型・軽量化を図った。

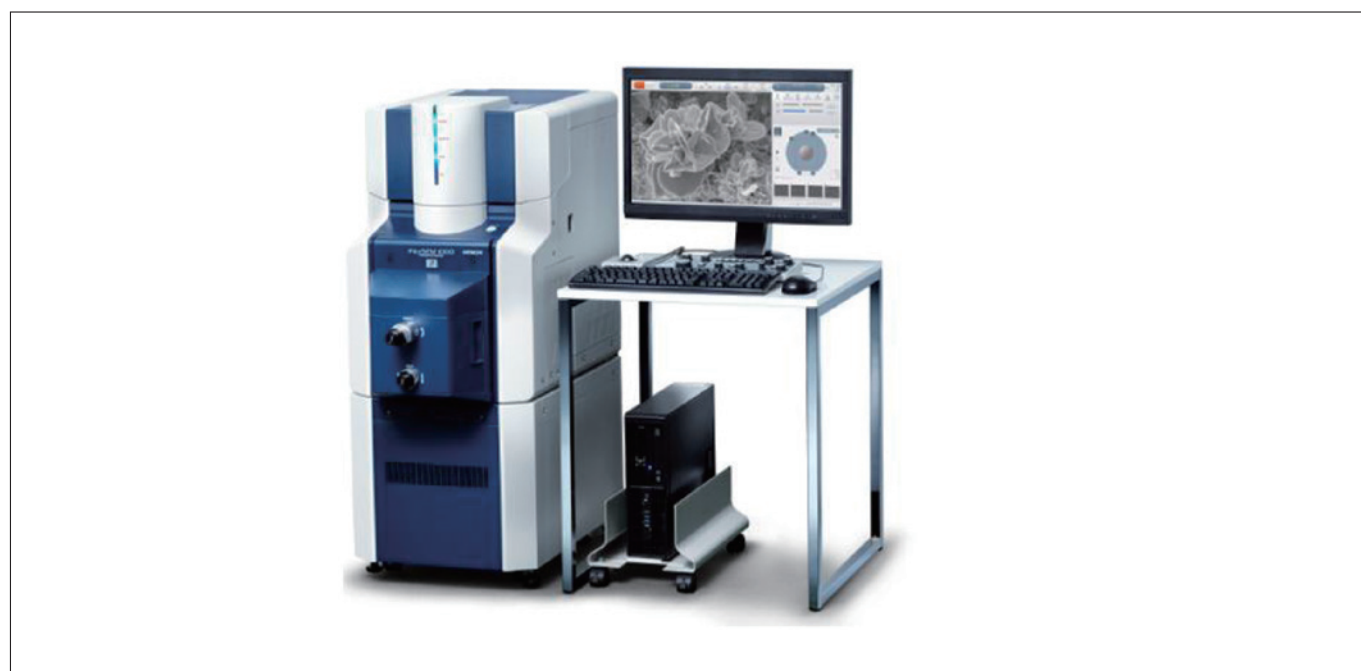


図1 FlexSEM1000の外観写真（本体部および電源部組み合わせ時）

3. 本装置の特徴・機能

ユーザーがSEMの操作をしやすいようにGUI全体をシンプルにし、タッチパネルに対応したボタン配置とした。一般的なSEM観察では、まず観察試料をSEMに挿入して真空排気し、電子ビームを照射する。像が出たら低倍率で明るさとフォーカスを調整した後、光軸などのアライメントを行い、目的の視野に移動して所望の倍率に設定し、再度フォーカスおよび非点を調整する。一連の観察作業の中で時間がかかってしまうのが、視野探し、アライメント、フォーカス・非点調整である。当装置では調整の手間を省くために、SEM像の観察位置を常に把握できるマップ機能、軸ずれの少ない電子光学系と自動アライメント機能、高速なオート機能を搭載した。反射電子像については視野探し改善のため、画像復元フィルターを採用した。それぞれの特徴を次に述べる。

3-1. シンプル GUI

GUI画面を図2に示す。機能は従来のSEMを継承し、GUIは卓上顕微鏡の操作感をベースに、押しボタン操作を主体とした新規のGUIを開発した。操作はマウスのクリックおよびドラッグ操作により可能となっている。操作ボタンは必要最小限に最適化し、直感的に使用できる配置とした。メインの画像表示(①)は1,280×960画素と大型化し、装置情報や機能ボタンを選択可能なセレクトパネル(②)、画像調整やステージ操作を行うオペレーションパネル(③)を配置した。オペレーションパネルやセレクトパネルでは、ユーザー自身で使用頻度の高い機能ボタンをカスタマイズ表示することができ、ルーチンワークなどのスループットが向上する。サブ画面(④)には別検出器の画像を表示することができる。また、サブ画面領域には、新ナビゲーション機能SEM MAPを選択表示でき、試料ステージの位置呼び出しや、試料全域に対する現在の観察位置を確認するナビゲーション操作ができる。(⑤)にはキャプチャー画像をサムネイル表示するイメージリストを配置した構成となっている。

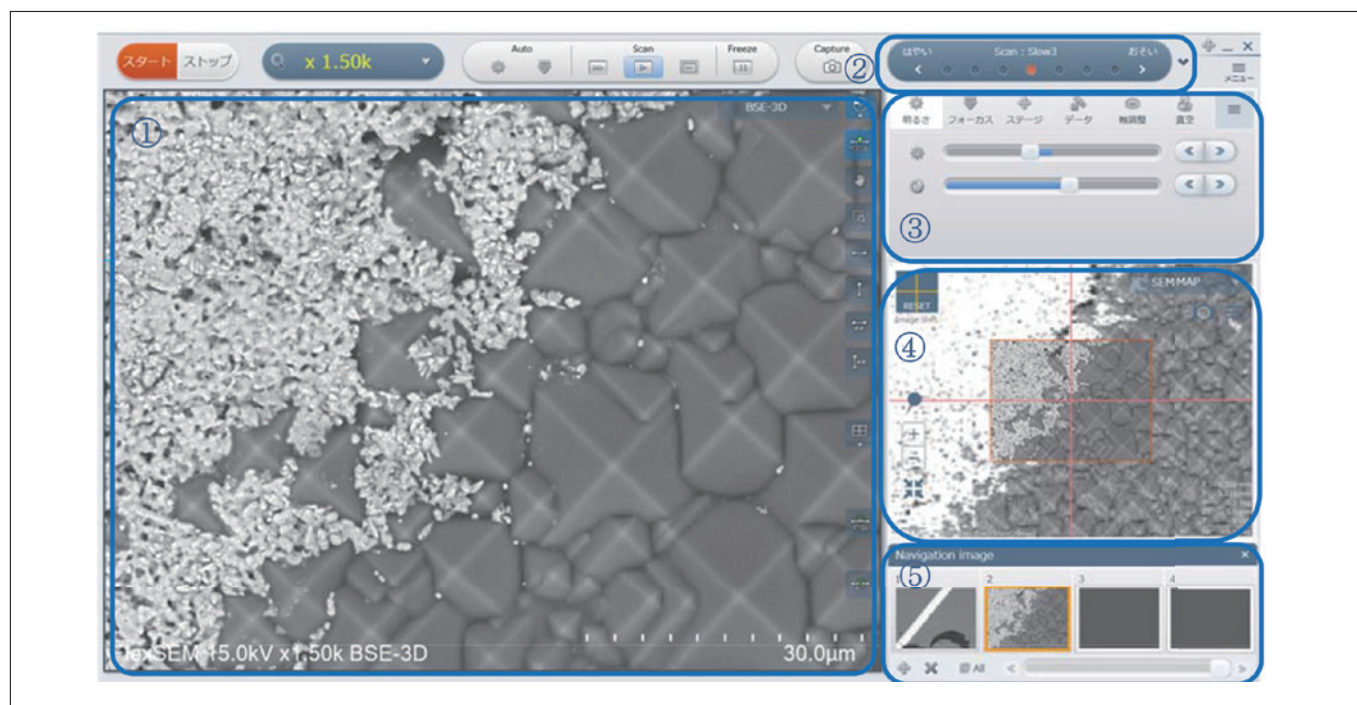


図2 FlexSEMのGUI写真

3-2. SEM MAP

SEM MAP GUIの写真を図3に示す。SEM MAPは従来の電子顕微鏡で困難であった視野探しの手間を大幅に低減し、直観的な観察視野探しを実現する機能である。SEM観察では、サンプルを真空排気された試料室の内部に設置する必要があるため、直接サンプルを見ることはできない。またSEM像は白黒画像であるため、変色部などカラー情報を元に観察するサンプルや、複数の試料を一度に試料台上に搭載した場合、見たい構造に移動するまで時間を要し、スループットの低下の要因となっていた。この問題を解決するためSEM MAPでは、試料室内部を模したマップによって、SEM試料台上のどの領域を現在観察しているか、常にユーザーに提示する機能を有する。当機能では、事前に取得した外部画像（デジカム画像や光顕画像など）や、イメージナビ画像取得ボタンで取得したSEM画像を試料台の模式図に貼り付けることでナビゲーション用マップを作成する。SEMのステージによって視野を移動すると、作成したマップも連動して移動し、本来見ることで見ることができないサンプルを直接目で見て表示される。

表示はステージの駆動と連動するだけでなく、ラスタローテーションによる画像の回転にも対応し、SEM画像の表示方向とSEM MAPでの画像の向きは常に一致するように表示される。

マップ上では、現在位置の表示のみでなく、マップ上のクリックした位置に移動することで、観察したい場所へ素早く移動することが可能である。また、ユーザーが記憶しておきたい座標や、キャプチャーで画像取得した位置を記憶し、SEM MAP上に表示することもできる。

取得したSEM画像はカメラナビゲーション画像に重ね合わせて表示される。さらに、倍率の異なるSEM画像も取り込み可能で、図4に示すように、SEM MAP上でマウスホイールを使用し拡大することで、自動で高倍率画像の表示に切り替わり、より正確な観察位置のナビゲーションが可能となる。ステージアシスト機能以外にも、X線分析を行う際に重要となる、サンプルに対する検出器の実装位置の表示や、各検出器ボタンをクリックすることで検出信号の切り替えを行うなどの直観的な操作ができる。

このように、SEM MAPを使用することで、ユーザーが観察したい構造物へ素早く直感的に移動でき、スループットの向上が期待できる。

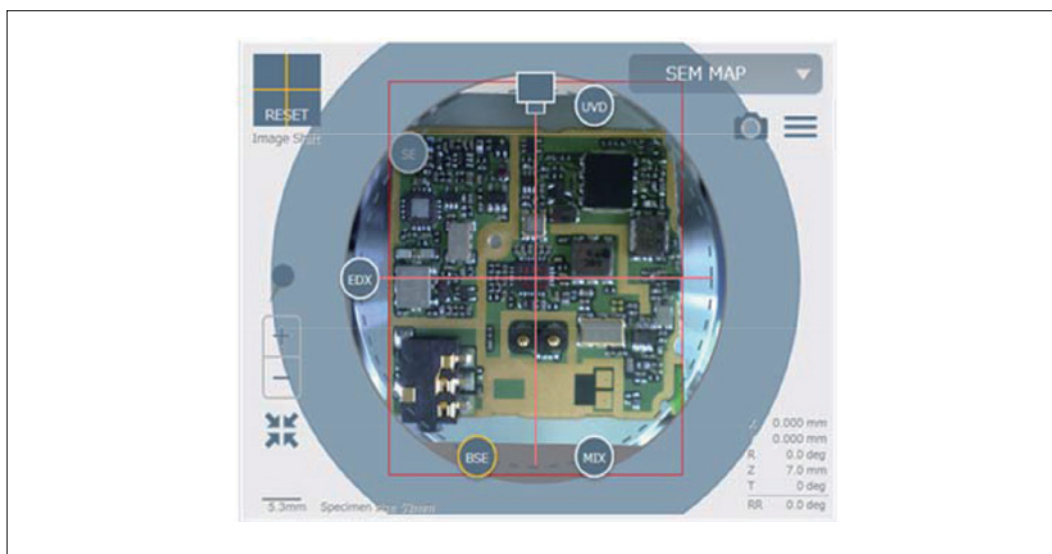


図3 SEM MAPのGUI写真

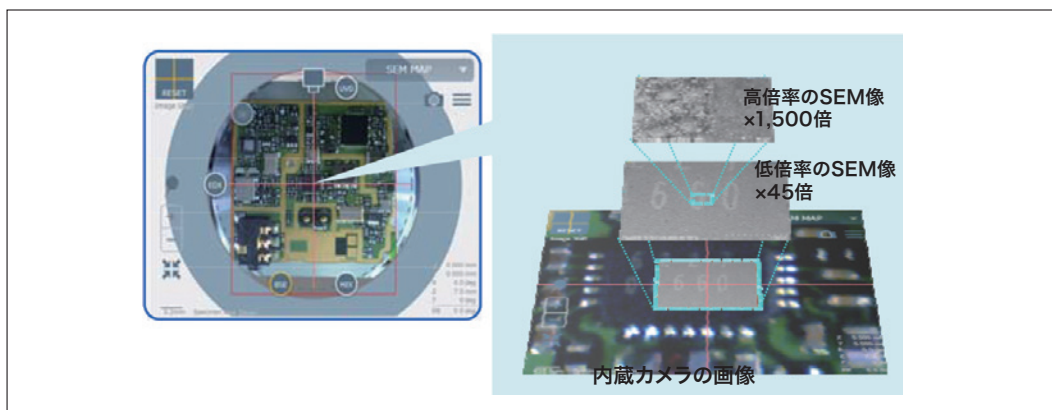


図4 SEM MAP拡大イメージ

3-3. オート機能

上位機種 SU5000 で採用された電子光学系の自動軸調整「オートキャリブレーション」をさらに発展させ、対物絞りのアライメント調整や、フィラメント交換後に実施する光軸や非点収差補正などの各種アライメントを自動化し、従来の煩雑な手動の軸調整を行わなくても分解能のよい像観察が可能となった。また、当自動軸調整では、試料に照射する電子ビーム量を可変させたときや加速電圧の変更時に発生する光軸ずれや視野ずれを抑制するように自動調整される。自動の明るさおよびフォーカス調整は従来機より高速化しおのおの約 2 秒、約 3 秒と従来比 1/3 の時間に短縮した。これにより、フォーカスの合った画像の取得までの時間が大幅に短縮され、ストレスを感じることの少ない SEM 観察を実現している

3-4. 画像復元フィルター

反射電子画像の視野探し改善のため、画像復元フィルターを採用し、高速スキャンでの像流れを改善した。改善前後の画像を図 5 に示す。改善前は図 5 (a) のように像流れがあり、スロースキャンを使用しないと視野探しが困難であった。検出系およびプリアンプの特性に起因した像流れの劣化関数を求め、逆畳み込み処理により復元関数を作成する。像流れのある画像に復元関数をリアルタイムに演算することで、図 5 (b) のように像流れが低減し、高速スキャンにおいても、反射電子像での視野探しを可能にした。

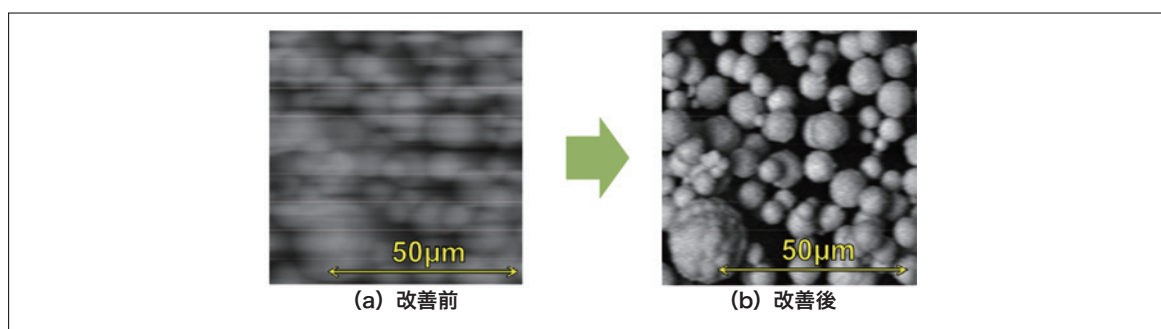


図 5 高速スキャンでの反射電子像

4. 観察事例

FlexSEM 1000 の SEM MAP 機能を用いて、樹脂中異物の観察を行った例を図 6 に示す。

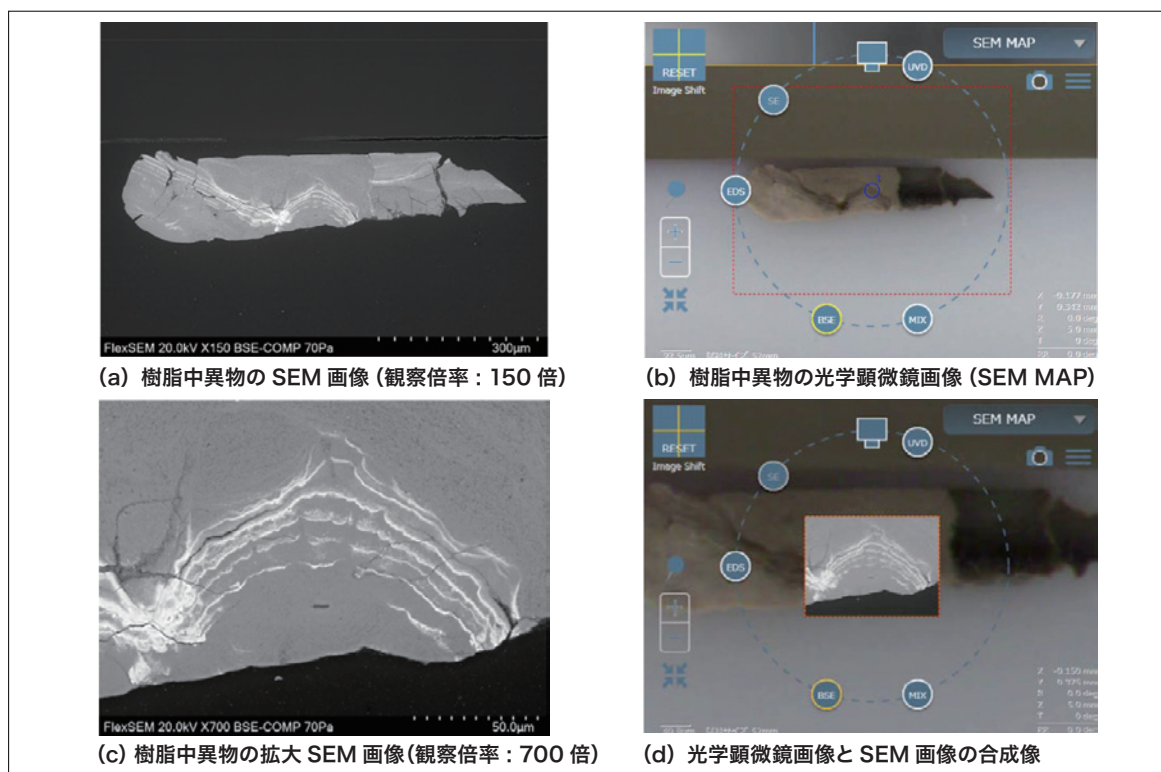


図 6 SEMMAP 機能を用いた観察例

図 6 (a) は樹脂中異物の SEM 像, 図 6 (b) は光学顕微鏡を用いた SEM MAP 像で, リーダー線四角枠が SEM 像の視野である。SEM 画像には色彩情報がないが, SEM MAP 画像を同時に見ることで, 確認できる。SEM MAP を用いて, 異物の一部を異物が白い樹脂の表層付近に含まれていることを高解像度の SEM 像に置き換えることも可能である。SEM 像を重ねた画像を用いて, 詳細な観察位置の指定もできる。図 6 (c) は異物の拡大 SEM 画像で, 図 6 (d) は光学顕微鏡画像に SEM 画像を重ねたものである。異物の中に高コントラストの縞状構造があることが分かった。異物の混入原因究明のため, 異物の組成を調べた結果を次に示す。図 7 は樹脂中異物を X 線分析装置で分析した元素マッピング画像である。当社のイオンミリング装置 IM4000 で処理した試料を無蒸着で低真空 X 線分析を行った。異物からは酸素, チタン, 亜鉛が検出された。反射電子像で高コントラストの縞模様に見える部分には亜鉛が偏析していた。チタンと亜鉛の酸化物(酸化チタン, 酸化亜鉛)はどちらも白色顔料として使われており, 樹脂成型の過程で白色顔料が混入したと推定される。

そのほかのアプリケーション例として, 図 8 に酸化亜鉛の観察画像を示す。FlexSEM1000 では, 高分解能観察のため, 低収差の対物レンズを使用しているため加速電圧 5kV で 5 万倍という高倍率にて 50nm 程度の粒子の形状が観察できる。

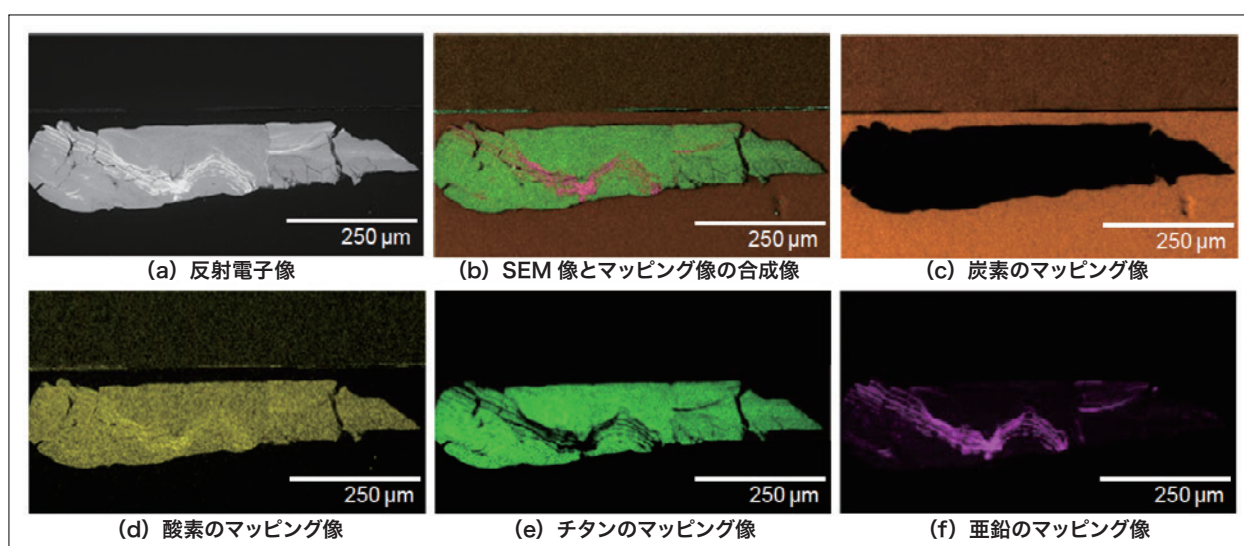


図 7 樹脂中異物の X 線分析画像

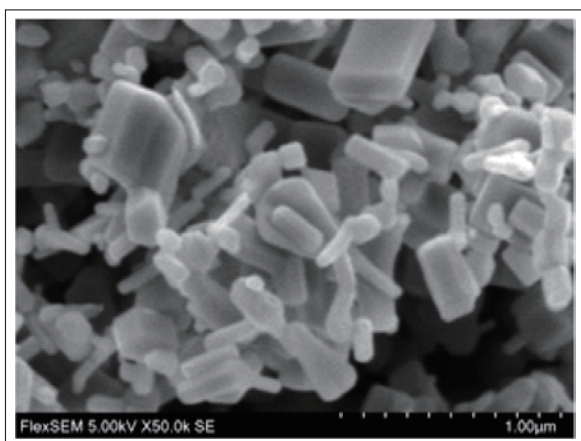


図 8 酸化亜鉛の画像

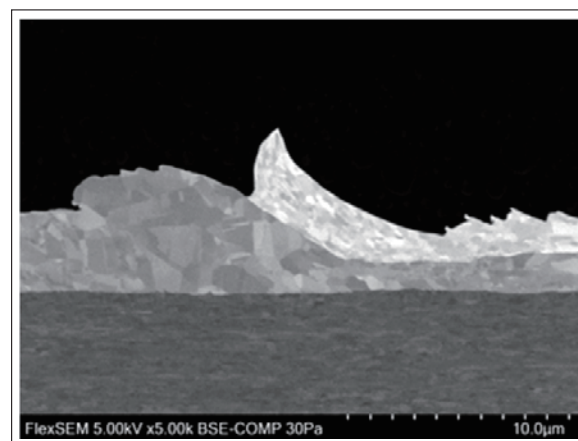


図 9 Au ボンディングの画像

図 9 には Au ボンディングの断面画像を示す。試料はイオンミリング装置で前処理して観察した。高感度反射電子検出器の採用により, 試料のグレイコンラストが明瞭に得られる。図 10 にはタブレット菓子の画像を示す。タブレット菓子表面には, 熱に弱く, チャージしやすい針状結晶が多数存在するが, 低加速電圧にしてもエミッション電流が減少しないビームブライテネス機能や, 積算スキャンを用いることで, チャージやダメージの影響なく, 鮮明な画像が得られている。

図 11 にリレー基板樹脂の観察例を示す。樹脂は絶縁物であるが, 低真空雰囲気下 (50Pa) で, 金属蒸着せずそのまま観察している。図 11 (a) は反射電子像で試料の組成情報が分かる。図 11 (b) は低真空用高感度二次電子検出器 (UVD) を使用した像で, 試料表面の微細な凹凸情報や, より立体的な画像が得られる。同一視野でも検出器により, 異なる情報が得られることが分かる。

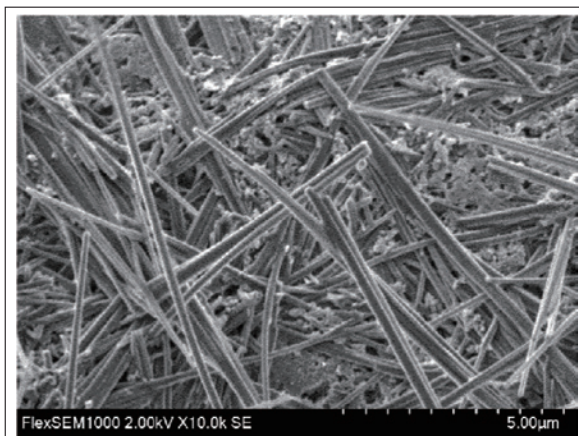


図 10 タブレット菓子の画像

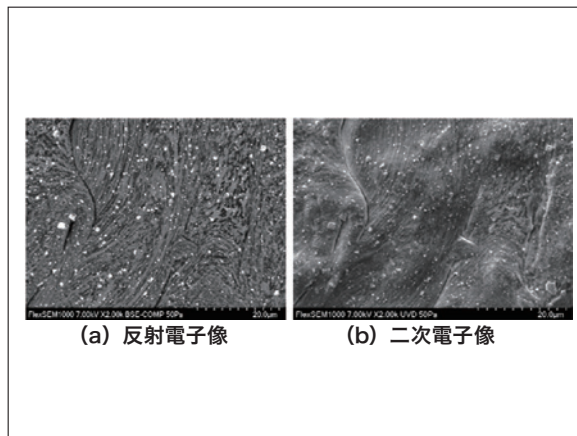


図 11 リレー基板樹脂の画像

5. おわりに

ここではコンパクトで高性能でありながら，初心者から熟練者まで幅広く使用可能な，新開発の FlexSEM1000 の特徴や機能を紹介した。

観察事例として，樹脂および金属材料のアプリケーションデータを使い，装置の使いやすさや性能を紹介した。今後も最先端技術を搭載した装置を最前線場に提供し，材料開発・解析に貢献していきたい。

出典

月刊誌「工業材料」4月号掲載

著者紹介

*小室浩之

(株) 日立ハイテクノロジーズ 科学医用システム事業統括本部 科学システム製品本部 電子顕微鏡ソリューションシステム設計部

**坂上万里

(株) 日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部 科学システム製品本部 アプリケーション開発部

透過電子顕微鏡HT7800シリーズ

The HT7800 Series of Transmission Electron Microscopes

バイオメディカル分野からソフトマテリアル分野まで、幅広い分野の解析を簡単操作で支える装置として日立透過電子顕微鏡“HT7800シリーズ”を開発しました。広視野・高コントラスト観察を実現する“HT7800”と軸上格子分解能 0.19 nm を実現した“HT7830”をラインナップを揃えています。

加速電圧 20 kV から 120 kV まで利用可能で、従来モデルで実現した明るい部屋での操作環境を踏襲しています。モニターに一元化された TEM 操作に、新たにイメージナビゲーション機能を加え、視野探しやルーティン撮影のサポートを充実しました。また、日立独自のアルゴリズムによるつなぎ写真撮影や3Dトモグラフィーのための自動連続傾斜像取得機能^{*}を標準装備するとともに、各種オプションの充実もはかり、多様な観察を提供してまいります。

(^{*} HT7800 のみ)

	HT7800	HT7830
電子源	W または LaB ₆	LaB ₆
加速電圧	20-120 kV	
格子分解能	0.20 nm (Off-axis, 100 kV)	0.19 nm (On-axis, 120 kV)
最大倍率	×600,000	×1,000,000
最大傾斜角度	±70°	±10°



*オプション付

卓上サンプルクリーナ

ZONE II for SEM

電子顕微鏡観察において、コンタミネーションを抑制し本来の試料表面を観察することが重要です。コンタミネーションは観察対象表面に存在するハイドロカーボンと電子線の相互作用に起因し形成され、ハイドロカーボンは試料の前処理時や保管時に試料表面に付着します。

“ZONE II for SEM”は低真空に制御した試料室内にUV光を照射して生成されるオゾンと活性酸素により試料表面に付着したハイドロカーボンを除去し、コンタミネーションの生成を低減します。従来製品と比べタッチパネル制御による簡易な操作、小型化を実現しました。“ZONE II for SEM”は洗浄液が不要な環境負荷の少ないドライクリーニング法を採用しています。



イオンミリング装置 ArBlade® 5000

Ion Milling System ArBlade® 5000

電子顕微鏡の試料前処理用イオンミリング装置の最上位機種として、“ArBlade 5000”を発売しました。SEMの高性能化や従来の機械研磨では困難な前処理ニーズに応え、日立のイオンミリング装置の出荷台数は1,100台を超えました。

“ArBlade 5000”は、当社製品比で約2倍のミリングレートに有する高レートArイオンガン（PLUS IIイオンガン）を搭載し、長時間処理が必要な試料に対して断面イオンミリングの処理時間を大幅に短縮しました。また、タッチパネルによるオペレーションによって自動スタート機能等、操作性も向上しました。さらに、エレクトロニクス分野からのニーズに応えるため、断面ミリングの広領域化を図ったミリングホルダを開発しました。これによりエレクトロニクス分野に限らず、セラミックスや金属などの硬質材料においても高スループットで広領域の断面試料作製が可能です。

主な特長

- (1) 新型高レートミリングイオンガン（断面ミリングレート：1 mm / hr 以上）
- (2) スライドミリングホルダにより加工幅：8 mm に対応。
- (3) 液晶タッチパネルの採用により操作系を一新。
- (4) 断面ミリングと平面ミリングに対応したハイブリットミリング装置。

* ArBlade® は、日本国内における株式会社 日立ハイテクノロジーズの登録商標です。



図1 イオンミリング装置 ArBlade 5000 の外観

株式会社 日立ハイテクノロジーズ

本社(サポートセンタ)	東京	(03)3504-7211	中部支店	名古屋	(050)3139-4566
北海道支店	札幌	(050)3139-4994	関西支店	大阪	(050)3139-4801
東北支店	仙台	(050)3139-4985	九州支店	福岡	(050)3139-4151

分析機器に関する各種お問い合わせは…
お客様サポートセンタ 電話(03)3504-7211
受付時間 9:00~11:50 12:45~17:30
(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースに関するお問い合わせは、下記へご連絡ください。

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS March 2017 VOL. 60 No. 1

発行日 2017年3月27日
編集人 多持隆一郎
発行人 川崎賢司

発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ
〒105-8717
東京都港区西新橋1-24-14
電話 (050)3139-4298(ダイヤルイン)

ホームページ URL: www.hitachi-hightech.com/jp/science/