

HITACHI
Inspire the Next

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

MARCI
2010

Vol. 62 No. 1

5421

«コラム

**タンパク質間相互作用に基づくアフィニティー反応のための新規プラットフォーム
—アフィニティークロマトグラフィー用スponジモノリス固定相—**

大塚 浩二

5423

有機金属ハライドペロブスカイト太陽電池観察におけるFIBとTEMの役割

内田 聰, Tae Woong Kim

5430

Biクラスター TOF-SIMSによる無機・有機材料表面の可視化

宍戸 理恵, 三ツ石 方也, 鈴木 茂

5439

多様なSEM情報を高スループットで取得するショットキー FE-SEM, SU7000

立花 繁明

5442

120 kV透過電子顕微鏡HT7820の特長と応用

矢口 紀恵, 許斐 麻美

5449

三次元形式の分析データに対応した多変量解析ソフト3D SpectAlyze[®]の紹介と応用例

佐藤 拓哉, 伊藤 千晶, 藤宮 仁, 堀込 純, 坂元 秀之

5455

ChromSwordを用いたAIによるHPLCメソッド開発法の紹介

清水 克敏

タンパク質間相互作用に基づく アフィニティー反応のための新規プラットフォーム —アフィニティークロマトグラフィー用スポンジモノリス固定相—

New Platform for Protein-Protein Interaction-Based Affinity Reactions: Spongy Monolith Stationary Phases for Affinity Chromatography



京都大学 工学研究科
材料化学専攻
教授
大塚 浩二 工学博士

1. はじめに

バイオ医薬品、特に抗体医薬品は、特異的な治療効果、低い副作用、体内での高い安定性などの利点を有することから、近年急速に開発が進められている。2018年ノーベル生理学・医学賞を受賞された本庶佑博士らによって開発されたニボルマブは、悪性黒色腫(非小細胞肺癌・腎細胞癌)治療に適用される抗体医薬品(商品名:オプジーボ)として脚光を浴びている。

通常細胞培養によって得られる抗体は、煩雑な前処理と複数の精製過程を経て単離されるが、抗体医薬品開発においては、年間数百kg以上のターゲット抗体が必要とされ、大量精製に対応した高速技術が求められている。また、新薬開発段階における抗体のスクリーニングでは、多検体の迅速分析が必要になる。精製、分析のいずれについても、一般にタンパク質間の特異的相互作用を利用したアフィニティーコロマトグラフィーが分離手法として用いられている。架橋アガロースに protein A を固定化した分離剤を用いる免疫グロブリンG(IgG)の分離はその代表例であるが、現行以上の高い通水性や低コスト化を実現するのは難しい。すなわち、開発途上にある分離・精製過程の簡便化、高速化、低コスト化が、抗体医薬品の急峻な普及に対するボトルネックになっていると考えられる。

2. アフィニティ分離用新規スポンジモノリス固定相の開発

我々は、汎用の比較的安価な合成樹脂を用いて、超高通水性の多孔性樹脂であるスポンジモノリス(SPM)を利用した新規アフィニティクロマトグラフィー用カラムの開発を目指した研究を進めてきた。通常の粒状充填剤とは異なり、柔らかい素材であるSPMを用いることで操作性が格段に向上し、簡便なカラム作製が可能となる。さらに、SPMは連続する大きな貫通孔(10マイクロメートル以上)を有するため、低い負荷圧を保ったままで通常の10倍以上の通水速度が実現できる。

ここでは、タンパク質が結合可能なエポキシ基を含む新規SPMとしてエチレンーグリシジルメタクリレート共重合体(PEGM)基材のSPMを開発した。このSPMを液体クロマトグラフィー(LC)用カラムに充填した後protein Aを固定化(ProA-SPM)し、IgGの高速分離を試みた。同様に、pepsinを固定化したSPMカラム(Pep-SPM)も作製し、抗体のオンライン消化への適用を検討した。



図1 スポンジモノリスカラムの概念図 原材料・SPM外観・SPM内部・充填カラム・タンパク質相互作用イメージ

3. ProA-SPM, Pep-SPMによるアフィニティ分離

標的タンパク質である IgG を用いて ProA-SPM を評価した結果、グラジエント溶出条件において、中性から酸性に移動相を変化させることで、IgG のピークを得ることに成功した。牛血清アルブミン (BSA) を試料とした場合、BSA は溶媒ピークと同時に溶出したことから、protein A-IgG の特異的相互作用が発現したと考えられる。作製した ProA-SPM の有用性を評価するために、高流速下における評価を行ったところ、市販の LC 用 protein A カラム (ProA-Column) では、流速の増加とともにフロースルーピークが出現したのに対し、ProA-SPM では、9.0 mL/min の高流速条件下においても良好な回収率が得られた。さらに、Pep-SPM においては、比較的高流速条件 (100 mL/h) においても、良好な抗体の消化が確認された。以上のことから、今回開発した新規スponジ材料は、アフィニティ反応の新規プラットフォームとして有効であることが示唆された。

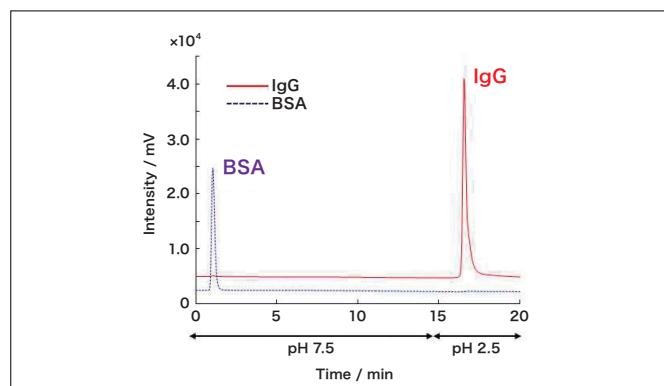


図2 ProA-SPMカラムによるIgGの特異的保持

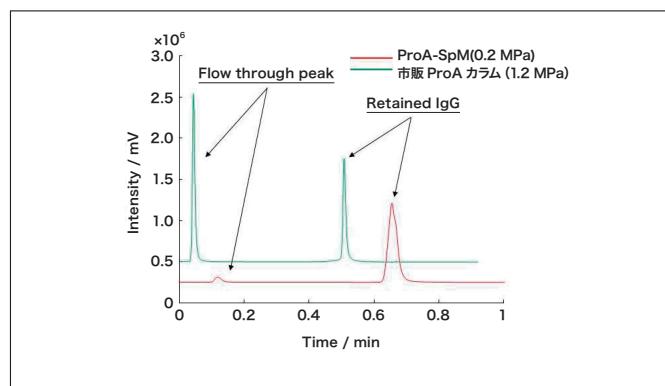


図3 ProA-SPMカラムによるIgGの高速分析(流速9.0 mL/min)

4. おわりに

本研究の成果は、急速に開発が進む抗体医薬品の分離・精製プロセスの簡便化、高速化、低コスト化に寄与することが期待される。また、タンパク質間反応の新規プラットフォームとしての可能性も示唆されたことから、バイオ医薬品開発の迅速化や新規抗体の構造解析にも有用であると考えられる。

本研究は、筆者の研究室の久保拓也准教授を中心に展開されたものである。

参考文献

K. Kubota, T. Kubo, T. Tanigawa, T. Naito, K. Otsuka, *Sci. Rep.*, **7**, 178 (2017).

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/>

有機金属ハライドペロブスカイト太陽電池観察におけるFIBとTEMの役割

Role of FIB and TEM in Organo-Halide Perovskite Solar Cell Observations



東京大学先端科学技術研究センター
特任教授

内田 聰 博士(工学)



東京大学先端科学技術研究センター
研究員

Tae Woong Kim 博士

1. はじめに

有機金属ハライドペロブスカイト太陽電池は、次世代の革新的低製造コスト太陽電池の一つとして、世界中で大きな期待を集めている。2019年1月現在、変換効率はNRELチャート¹⁾で23.7%を記録し、CIGS(22.9%)や多結晶シリコン(22.3%)を超え、ここ数年で著しく性能を上げてきた。有機系太陽電池が、その性能において無機系太陽電池に遠く及ばなかった時代を思い返すと隔世の感がある。しかしながら効率を上げるための研究報告は非常に沢山ある一方で、肝心のペロブスカイト太陽電池そのものの解析、すなわちナノスケールの結晶構造に関わる微細観察は技術的な困難を伴うことから、関心が高いにもかかわらずこれまであまり追求されてこなかった。本稿では有機金属ハライドペロブスカイト太陽電池の観察に置いて、集束イオンビーム(Focused Ion Beam : FIB)装置による試料の加工と透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope : TEM)が非常に有効であることを報告する^{2,3)}。

2. ダメージコントロール

ペロブスカイト太陽電池の観察結果を議論する時は、試料の物理的な脆弱性から電子線照射に伴うダメージの懸念が常に付きまとう。しかしながらそのダメージの中身を1つずつ吟味・対処していくには、観察した映像が試料そのものをありのままに見ているのか、それともダメージを受けた後なのかを区別することはそれほど難しくはない。釈迦に説法になるが、電子線ダメージとその結果には大きく分けて以下の3様態が存在する⁵⁾。

- (1) 放射線分解(Radiolysis)：化学結合の破断・再配列による新しい結晶相の出現、結晶性の喪失、予期せぬ化学反応
- (2) ノックオン(Knock-on, sputtering)：原子の置き換えによる点欠陥の発生、小さな空隙クラスターの発生
- (3) 加熱：フォノンによる試料温度の上昇

図1は実際にペロブスカイト太陽電池を電界放出形透過電子顕微鏡FE-TEM(Hitachi, HF-3300)で観察時の様子を記録した結果である。観察開始から10秒後の映像では電子線回折像に変化は無いものの、4分後にはスポット状の電子線回折像がハローリング状に変化し、非晶質物質が出現する様子を捉えている。これらはいずれも放射線分解もしくはノックオンによる影響と考えられる。

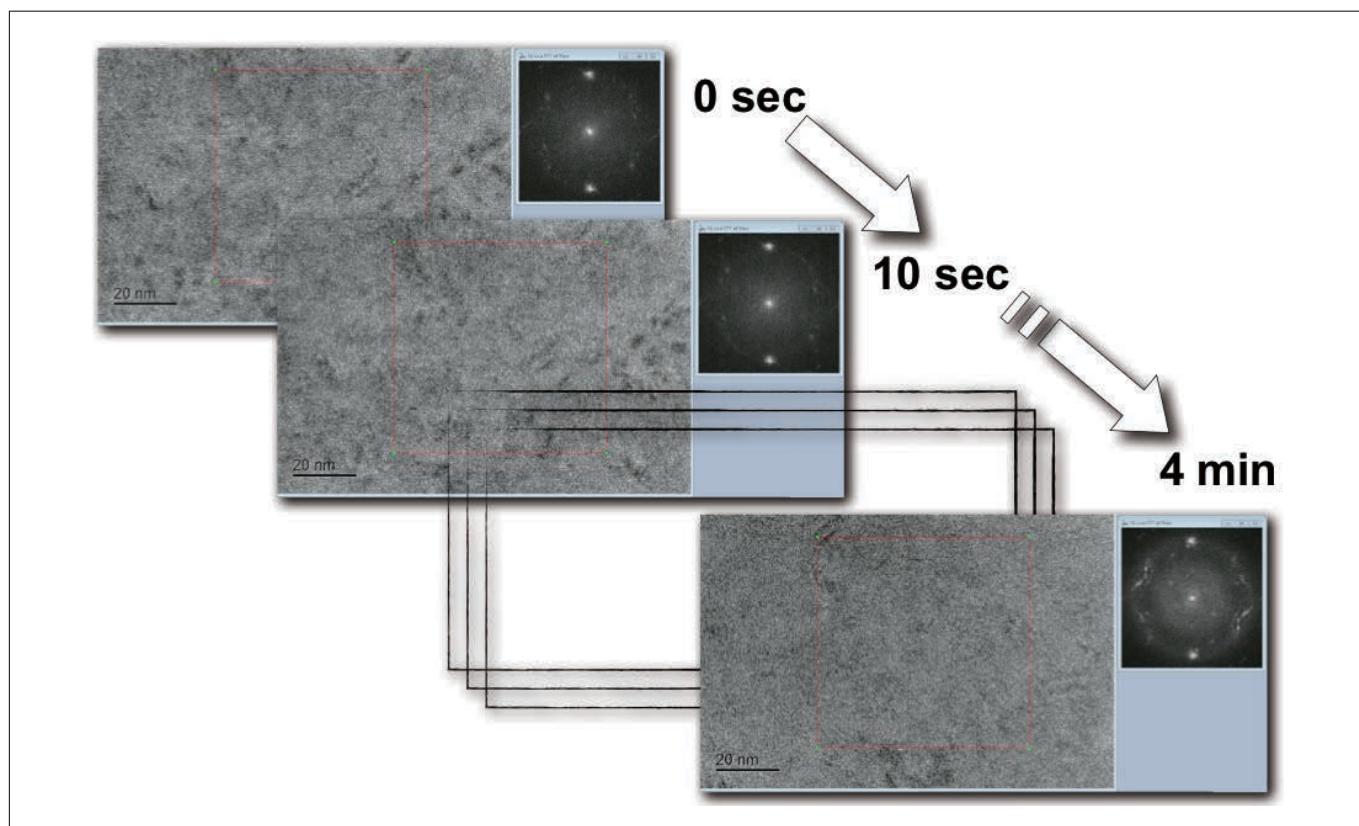


図1 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイトに及ぼす放射線分解(Radiolysis)・ノックオン(Knock-on, sputtering)ダメージの観察像の経時変化

また熱ダメージも気になるところで、図2はビーム電流と試料温度上昇の一般的な関係をプロットしたものである⁴⁾。我々の観察試料 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ (MAPbI₃) の熱伝導率⁵⁾を外挿してある。グラフの交点から読み取ると、本試料は理論上約1°C/secの速度で温度上昇することが読み取れる。MAPbI₃は相転移温度(Tetragonal → Cubic)が55°C付近に存在するため⁶⁾、仮に観察時の試料温度が室温25°Cとすると相転移まではΔT=30Kで、30秒以内に観察を終えないとダメージとは違う別の議論が始まってしまう。

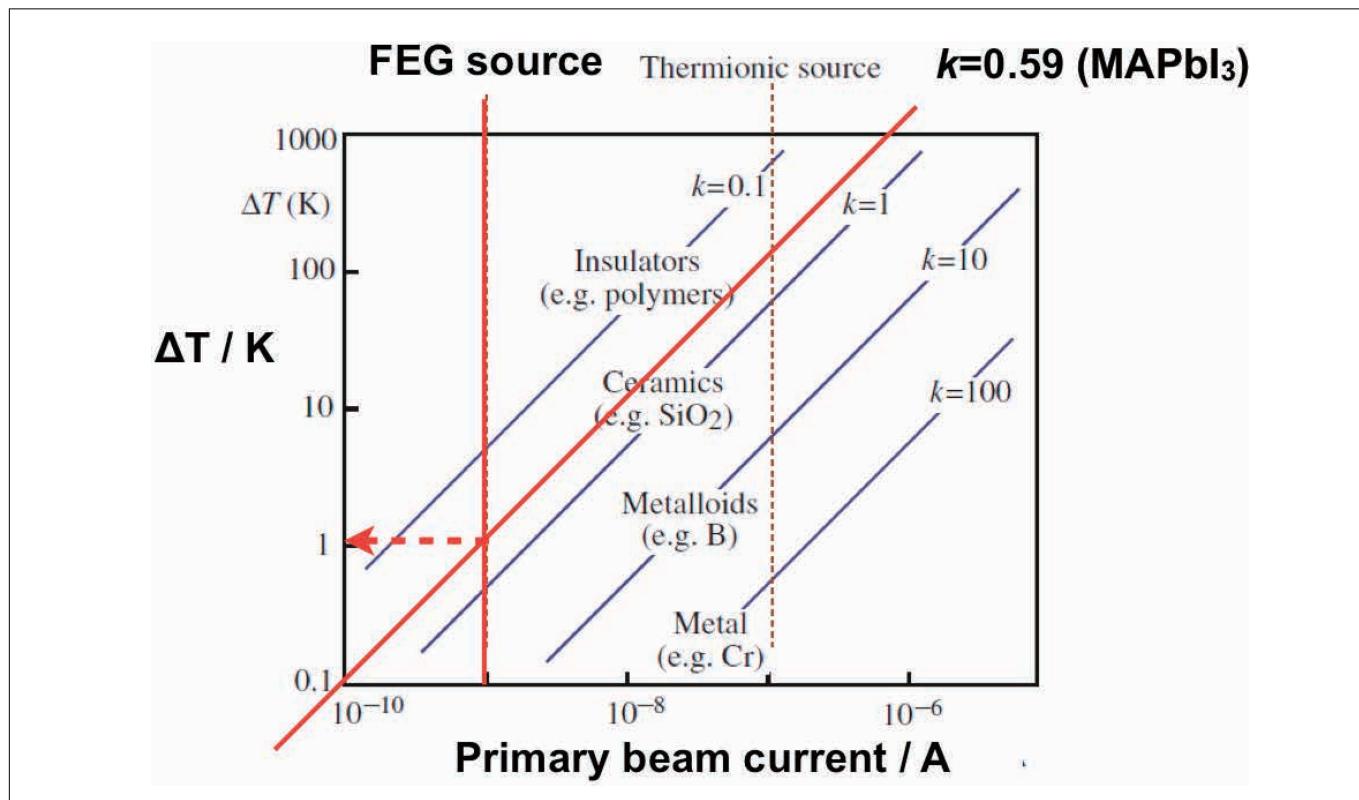


図2 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト観察における試料の加熱予測

実際、敢えて視野を固定したまま MAPbI_3 試料の観察を続けると平坦な画像の中から黒い粒子が結晶成長して現れる様子を捉えることができた(図3)。EDXによる組成分析から、この粒子は有機分子のメチルアミン分子(CH_3NH_3^+)が抜け残った PbI_2 であることが確認された。

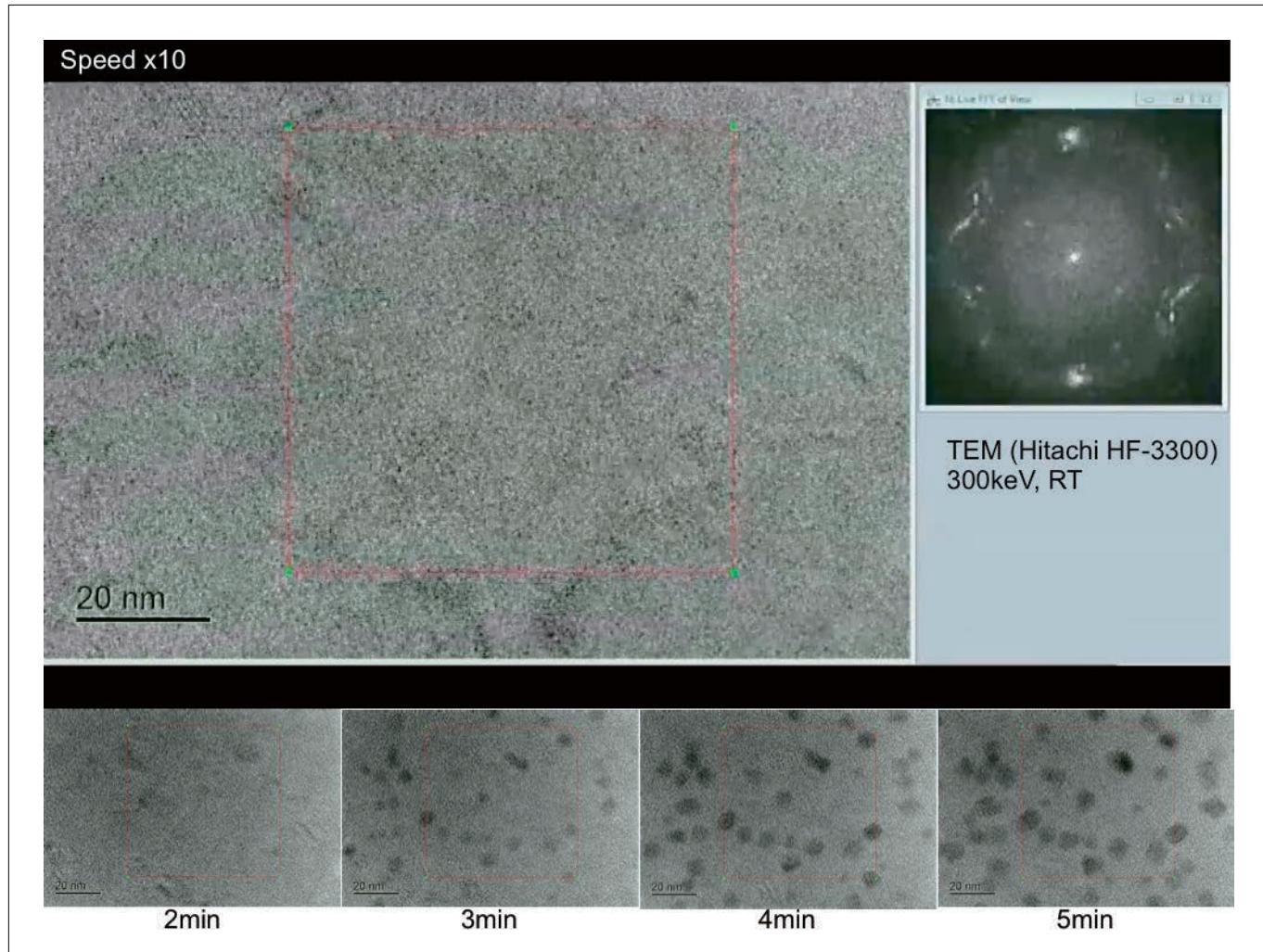


図3 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト観察における試料の経時変化例

以上のいろいろな電子線ダメージに関わる制約に鑑みて、ペロブスカイト太陽電池を観察するときは可能な限り手早く見て、フォーカスを合わせて記録し、(通常5秒以内で)次のエリアに移動することを心掛けた。またFIB加工により試料を薄片化する時に懸念されるダメージの影響については、加速電圧を落とすなどビーム条件を適切に選定することで出来るだけ最小限に止める必要がある。後述の我々のTEM観察像がFIBダメージによるものでないとの証明については、試料をガラス基板から削り落とした粉末の観察結果と比較することで、その特徴に違いが無かったことから確認された。

3. 超格子構造の発見

図4は代表的なペロブスカイト太陽電池 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ 薄膜の高解像度 TEM 観察結果である。予想とは異なり、観察部位によって正方晶(tetragonal)と立方晶(cubic)が混在している部位が見られた。本来、室温では存在しない高温相の cubic が観察されたのは大きな驚きであるが、本太陽電池は 300 ~ 500 nm という超薄膜であり、図5に示す通り製造時の都合で加熱状態から室温へ冷却される過程で一部の cubic が凍結された形で取り残された結果と推察される。

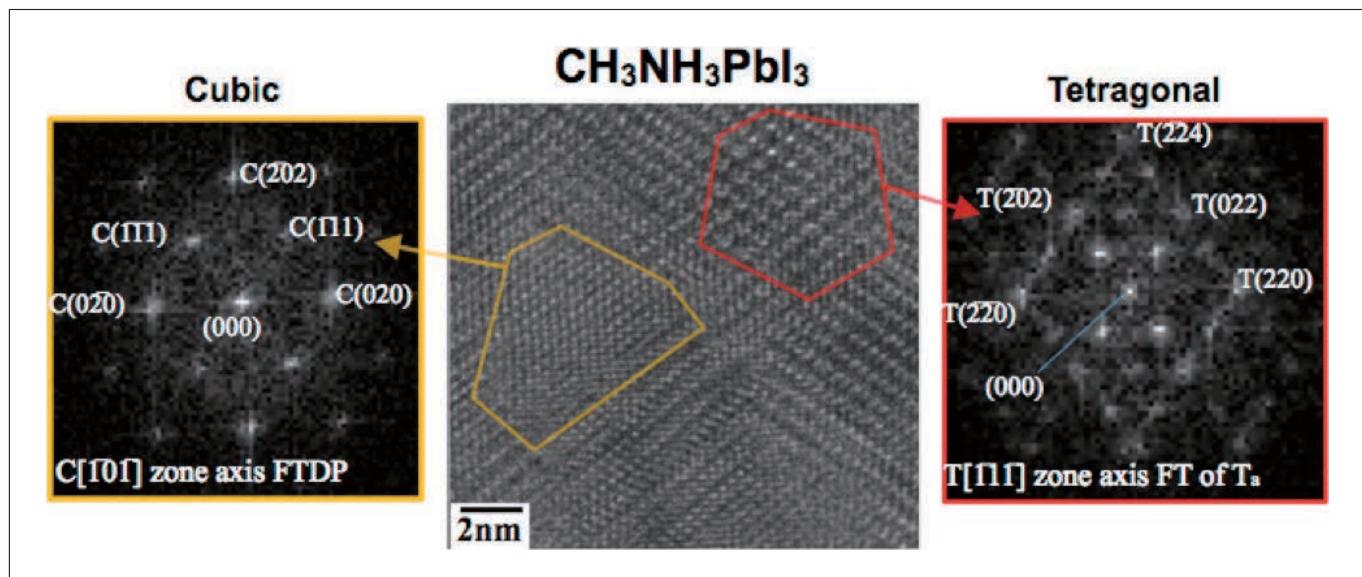


図4 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト薄膜中の室温での tetragonal 相と cubic 相の共存例(Hitachi, HF-3300)

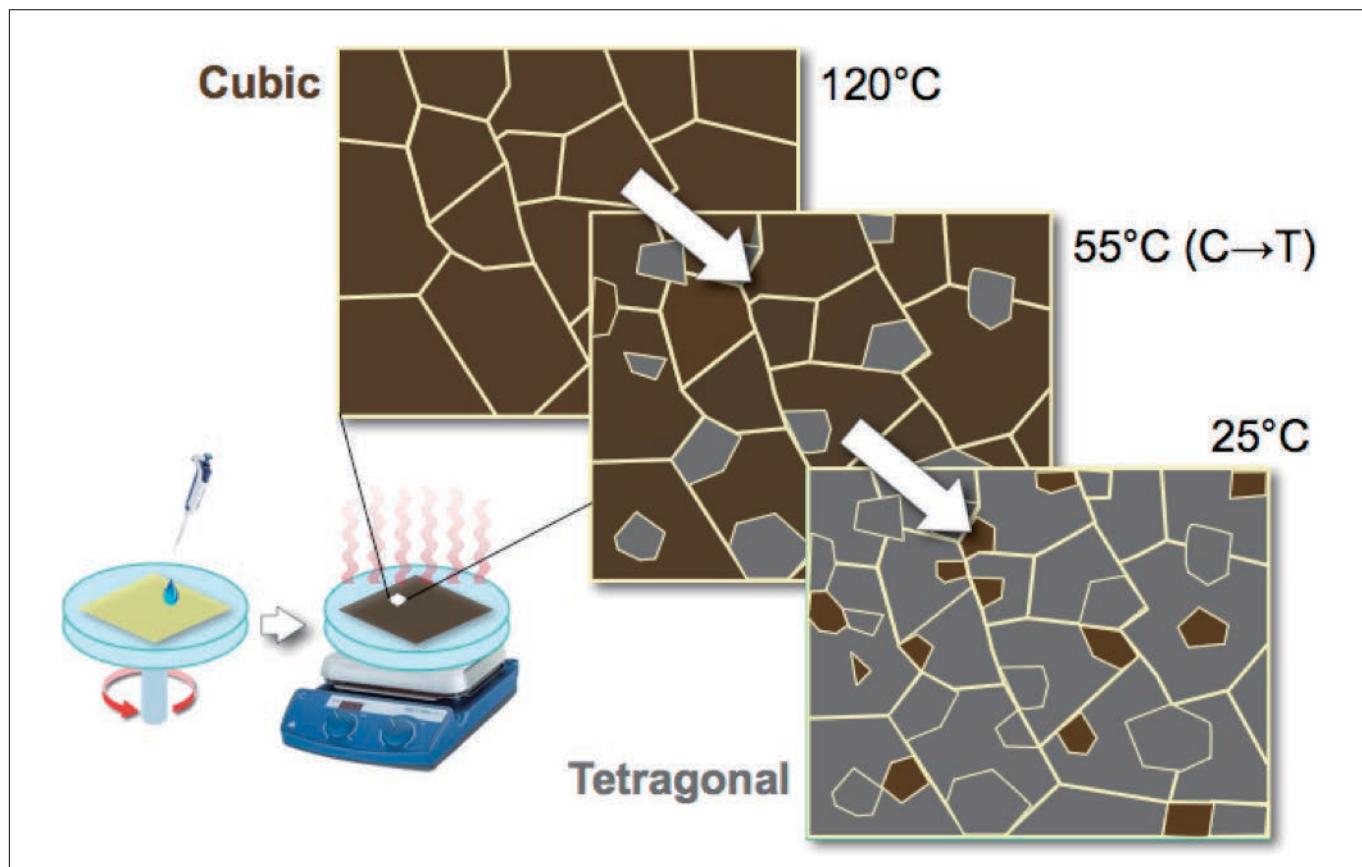


図5 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト薄膜中に tetragonal 相と cubic 相の共存が生じる予測モデル

更に観察を進めると、超格子構造も散見された。図6はTEM像(a)電子線回折像(b)およびこれらからフーリエ変換した像(c)の例で、格子の面間距離は10.989Åであることを示している。この大きなd値は本来 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイトには存在しないが、紛れもなくペロブスカイト由来のものである。今回のTEM観察から導かれる結果はあくまでも距離情報しかないため以下は推測になるが、tetragonal-cubic-tetragonalの3相が1つの大きな長周期を形成してこのような超格子構造を得たと考えられる。また超格子の存在場所であるが、tetragonalのドメインとcubicドメインを繋ぐ間や下地基板の TiO_2 相とペロブスカイト層を繋ぐ間に見られ、いずれも僅かな格子ひずみを緩和する形でこうした位置に必然的に存在していると考えられる(図7)。

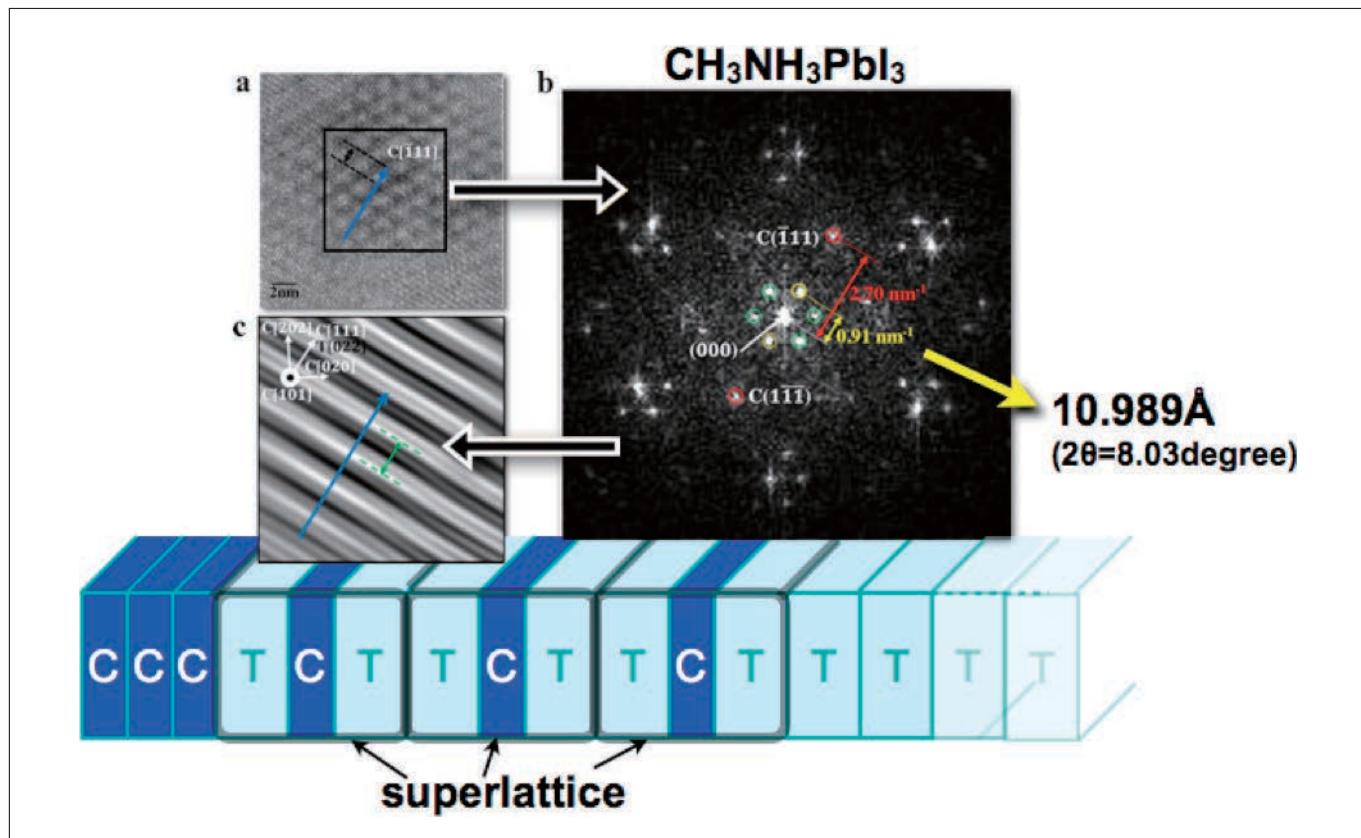


図6 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト薄膜中に観察された超格子のTEM像(a)、EDS像(b)及びフーリエ変換像(c)

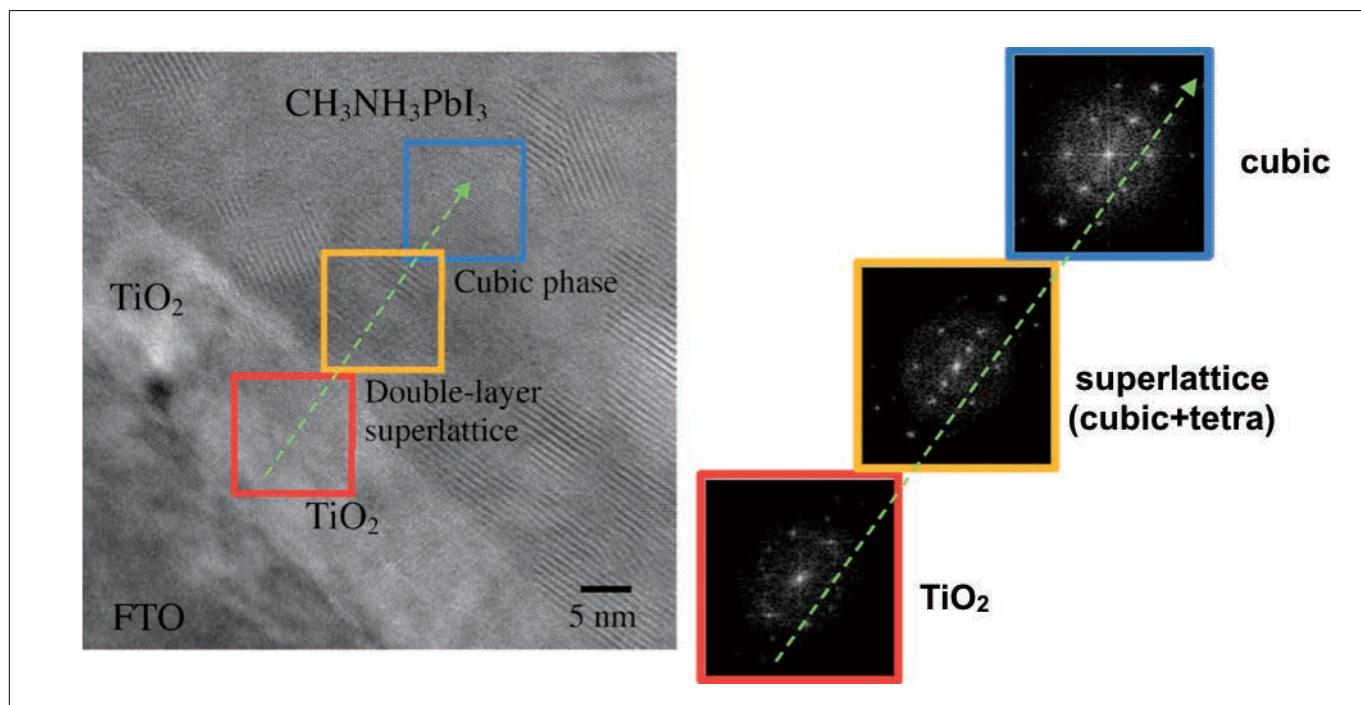


図7 $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{PbI}_3$ ペロブスカイト薄膜中に観察された超格子のTEM像

参考までに比較実験として1 mm角の単結晶からFIBで切り出した試料には、こうしたcubic相や超格子構造は確認されなかった。厳密には“無い”ことは証明できないため、低倍率でのTEM観察で試料全体の情報を上げ、diffractionの角度の異なる4方向の深さ(濃淡)分析において信号強度の波形が全て中心から対称形であることを確認した。すなわちcubic混在時に見られるピークの偏りやショルダーが無かったことから、tetragonal単一相であると判断した(図8,9)。

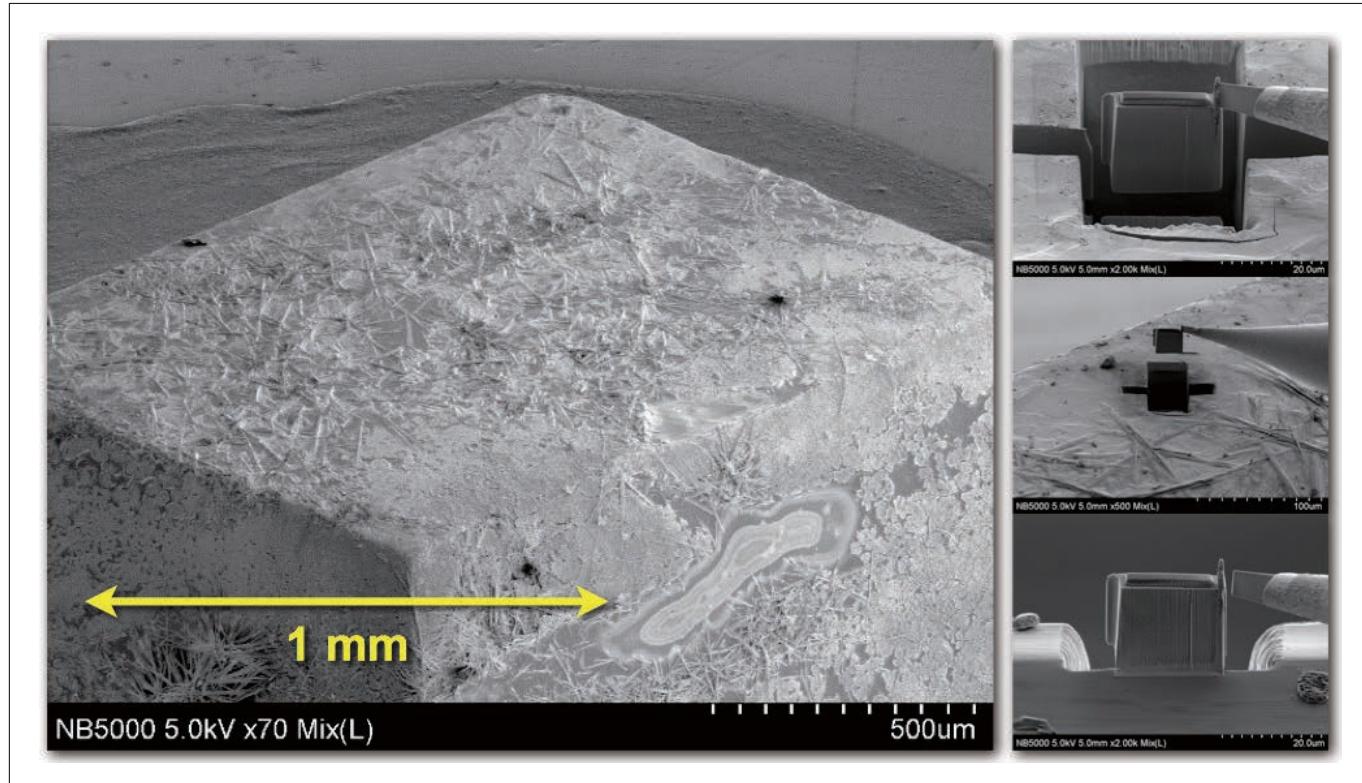


図8 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ペロブスカイト単結晶とFIB加工工程

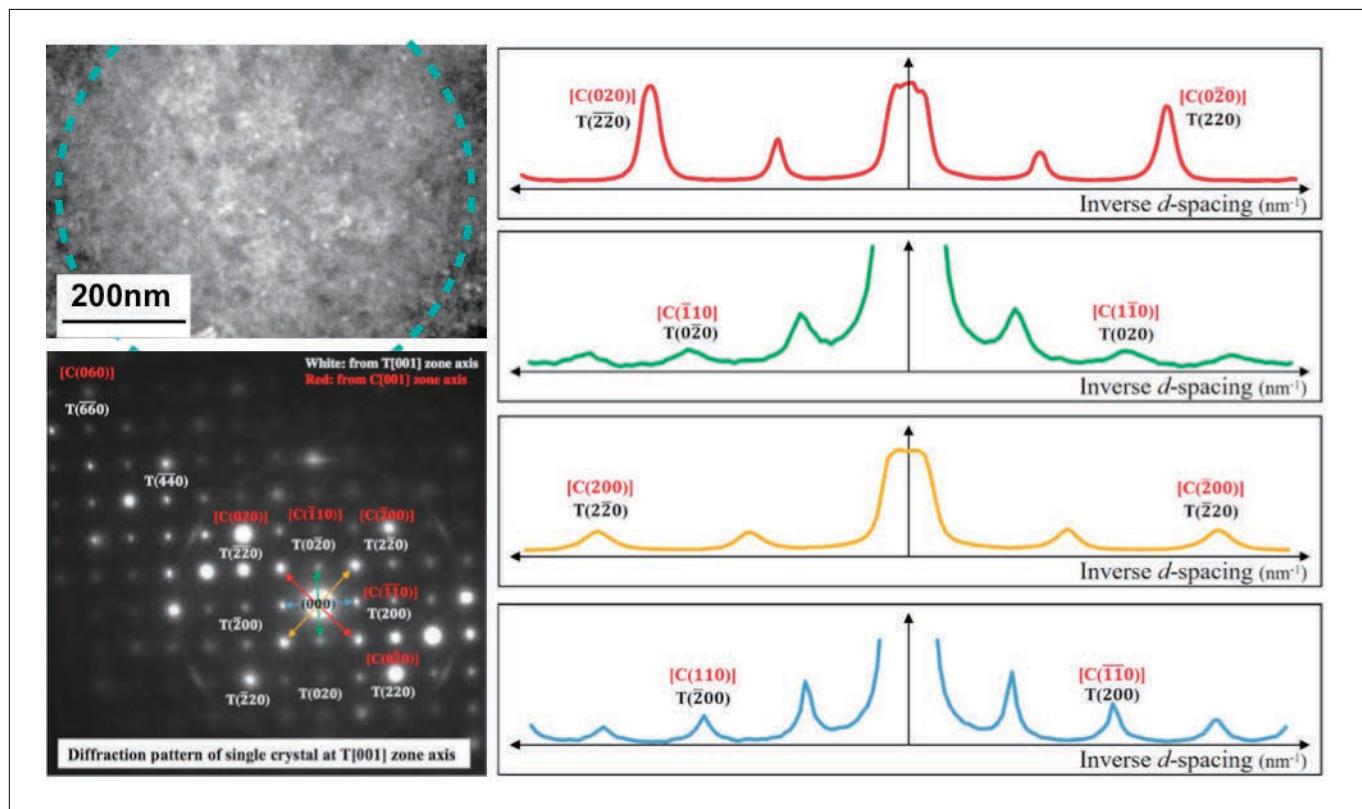


図9 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ 単結晶のTEM像、EDS像及び深さ方向におけるシグナル強度の比較

4. おわりに

ペロブスカイト太陽電池は途上の技術であり、研究室レベルでの高い効率は確認できたものの、実用化に向けては耐久性を初めとして解決すべき課題も多く残されている。課題があることが開発意欲をかき立てている面もあり、今後多くの研究者が参入し、更なる研究開発競争の激化が予想される。その一方で基礎的な動作機構の解明はまだまだ不十分であり、デバイス構造を理解するためには電子顕微鏡観察が欠かせない。特に上述の超格子など特殊なナノ構造の存在は光電変換特性と密接に関連しており、更なる効率向上に対して大きな知見を与えると考えられる。

以上、本項では FIB 加工による試料の薄片化と TEM 観察の組み合わせが微細構造を観察する上で非常に有効であることを紹介させて頂いた。

謝辞

本測定に置いては株式会社日立ハイテクノロジーズのスタッフ皆様方の全面的な支援を頂きました。この場を借りて心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Best Research-Cell Efficiencies, Rev. 01-03-2019, <https://www.nrel.gov/>
- 2) T.W. Kim, S. Uchida, T. Matsushita, L. Cojocaru, R. Jono, D. Matsubara, M. Shirai, K. Ito, H. Matsumoto, T. Kondo and H. Segawa, "Self-organized superlattice and phase coexistence inside organometal halide perovskite solar cell", *Advanced Materials*, **30**, 1705230 (2018).
- 3) T.W. Kim, M. Kim, N. Shibayama, L. Cojocaru, S. Uchida, T. Kondo and H. Segawa, "Real - Time In Situ Observation of Microstructural Change in Organometal Halide Perovskite Induced by Thermal Degradation", *Advanced Functional Materials*, **28**, 1804039 (2018).
- 4) David B. Williams, C. Barry Carter, *Transmission Electron Microscopy A Textbook for Materials Science* (Springer US, 2009).
- 5) Xin Qian, Xiaokun Gu, and Ronggui Yang, "Lattice thermal conductivity of organic-inorganic hybrid perovskite $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ ", *Appl. Phys. Lett.*, **108**, 063902 (2016).
- 6) I.P. Swainson, R.P. Hammond, C. Soullière, O. Knop and W. Massa, "Complete structure and cation orientation in the perovskite photovoltaic methylammonium lead iodide between 100 and 352 K", *J. Solid State Chem.*, **176**, 97-104 (2003).

BiクラスターTOF-SIMSによる無機・有機材料表面の可視化

Bi Cluster TOF-SIMS Imaging of Inorganic and Organic Materials



東北大多元物質科学研究所
技術職員
共同執筆者
三ツ石 方也¹
鈴木 茂²

宍戸 理恵

I. はじめに

二次イオン質量分析法(Secondary ion mass spectrometry, SIMS)は、産業応用を目指した新規材料開発のための重要な評価手段として位置づけられており、その分析の対象は、金属、半導体、セラミックからポリマー、生体組織と多岐にわたる。スパッタリングやイオン励起など、固体表面と一次イオンとの相互作用により生じた二次イオンの質量を計測することで、表面や界面を構成する成分の評価・解析を行う本手法は、バックグラウンドが低く、感度が高いという特徴を有する(図1(a))。元来SIMSは、半導体中の不純物同定など無機材料を分析の対象として発展してきた技法で、その質量分析計には、磁場偏向型(Magnetic Sector, MS)や四重極型(Quadrupole, Q)が採用されていた^{1,2)}。1960年代にStatic SIMS法が確立されると、分析の対象は有機材料へと広がりを見せる³⁾。一次イオンのドーズ量を表面の原子密度を遙かに下回る量(Static limit: $1 \times 10^{12} - 1 \times 10^{13}$ ions/cm²)に止める本手法により、表面構造の損傷が抑制され、分子状態でのイオン化が可能になった。Au_n⁺やBi_n⁺などの金属クラスターイオンやC₆₀⁺、さらにAr_n⁺などの巨大クラスターイオン源の開発⁴⁻⁷⁾により、Static SIMSは表面の組成を調べるための手法から、有機分子の二次元、三次元分布の情報を得る手段へと応用範囲を広げる。一次イオン源の発展に伴い、質量分析計も改良され、高質量側の分子まで計測することができる飛行時間型(Time of Flight, TOF)が採用されるようになった。現在では、TOF-SIMSは、Static SIMSと同等の意味を持つものとなり、材料工学、生命科学、基礎医学など幅広い分野の研究活動に貢献する評価手法として利用されている。

東北大多元物質科学研究所 Central Analytical Facility(多元CAF)⁸⁾として管理・運用されているTOF.SIMS5(ION-TOF GmbH)は、大学の共通機器として、研究所内外から分析依頼を受け、測定データの提供を行っている(図1(b))。Biクラスターイオン源を搭載する本機種は、分析条件の設定により、無機から有機まであらゆる材料の評価・解析を行うことが可能な装置である。一方で、このような大型装置を所有する大学研究機関は限られており、装置の共同利用を推進する試みが全国的に行われている。物質・デバイス共同研究拠点は、多元物質科学研究所を始めとする、5つの附置研究所からなる全国規模のネットワーク型研究拠点で、大学の枠を超えた共同研究への取り組みを推進する支援を行っている⁹⁾。本稿では、共同研究拠点研究を通して、他大学と共同で得た成果について紹介するとともに、TOF-SIMSの特性、応用範囲の可能性をお伝えしたい。

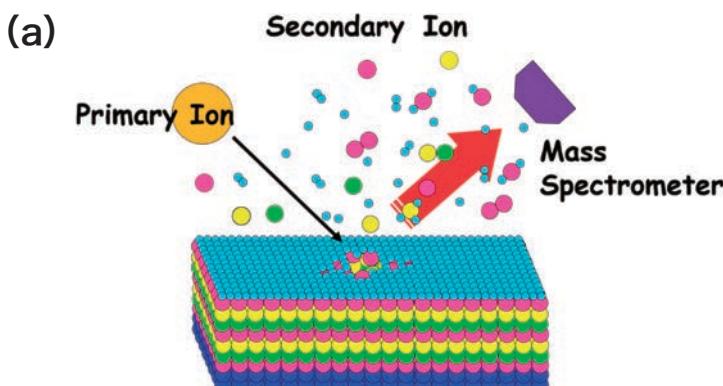


図1 SIMS原理の模式図(a)および多元CAF装置として管理・運用されているTOF.SIMS5(b)

2. 無機材料の分析(二相ステンレス鋼中の微視的領域における重水素分布評価)

2-1. 背景

鉄鋼材料は、自動車部品や建築加工製品、化学プラントなど様々な用途に利用されているが、その機械的特性には結晶構造において格子間位置を占有している微量の軽元素の存在が大きな影響を及ぼしている。その中でも水素は、鋼材への溶解度が低い一方で、室温での拡散速度が非常に大きいため、その挙動を解析することは困難とされている^{10,11)}。TOF-SIMSは、水素検出が可能な数少ない分析手法で、さらに高感度・高空間分解能を有する特徴から、鉄鋼中に含まれる微量の炭素やホウ素等の挙動を調査する手段としても利用されている^{12,13)}。一次イオンで分析とスパッタリングを同時に行う Dynamic SIMS とは異なり、TOF-SIMSによる深さ方向分析では、プローブと併用して、スパッタリング専用のビームを用いるデュアルビーム法が採用されている¹⁴⁾。TOF型の分析計では、その引き出し電極に断続的に電圧を印加させるため、低加速でのエッチングが可能でありながら、高い透過率も達成される。本章では、デュアルビーム法を用いて、二相ステンレス鋼微小領域における軽元素の濃度分布に関する評価を行った結果について紹介する。

2-2. 実験方法

評価試料は、オーステナイト相とフェライト相を有する二相ステンレス鋼 (22.4Cr-5.3Ni-3.2Mo-0.35Si-1.0Mn-0.16N-0.013C; in mass%) とし、重水素水(²H₂O)の陰極チャージ法により重水素を24時間導入させた後、電解研磨を行うことで作製した。

TOF-SIMSによる分析では、一次イオン種に Bi₁⁺を選択し、その加速電圧は25 kVとした。分析モードには、高い空間分解能でイメージングを取得することができる Burst Alignment mode を使用し、二次イオンの質量分析は Negative mode で行った。スパッターアイオン源には加速電圧500 V の Cs⁺を選択し、二次イオンの質量計測と同時にスパッタリングを行う Interlaced mode を用いて質量スペクトルを取得した。さらに分析室内の真空中度は、< 2.0 × 10⁻⁷ Pa とした。

2-3. 結果と考察

²H₂O導入直後の二相ステンレス鋼表面のイメージング結果を図2(a)に示す。²H⁻はC⁻およびCN⁻と異なる相において、高濃度に分布していることがわかる。そこで、EPMAによりTOF-SIMSの分析領域を含む部分を観察し、Ni, Cr および Mo の分布情報を取得した(図2 (b))。その結果、Cr および Mo の濃度が高い領域がフェライト相、Ni の濃度が高い領域がオーステナイト相であることが示され、C および N はオーステナイト相において、²H はフェライト相において、高濃度で分布していることが明らかとなった¹⁵⁾。

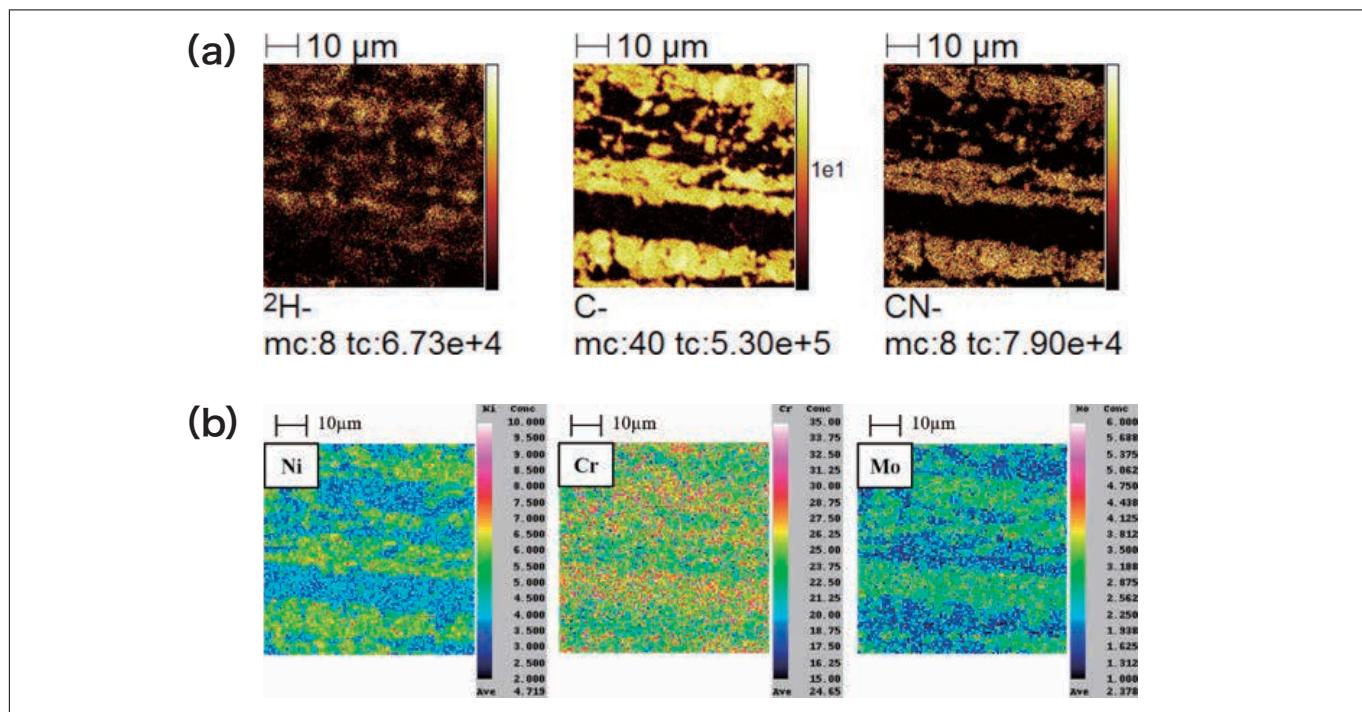


図2 ²H₂O導入後の二相ステンレス鋼表面のイメージング(a)およびEPMAによる金属組織学的分布(b) [15]より引用]

TOF-SIMS では、1ピクセルごとに質量スペクトルを取得することができる。そこで、さらに微小領域における軽元素の濃度分布を調査するため、各ピクセルから得られた二次イオンのシグナルカウントを用いて相対濃度に関する定量評価を行った。二相を区別する指標として、C の二次イオンカウントを用い、ピクセルごとに Maximum counts/pixel (mc) に対するパーセンテージを算出した。その値を基に分析領域を 15 分割し、それぞれの領域から取得された²H, FeN, Cr および Ni のピーク積分値を算出して、Fe のピーク積分値により規格化をした。本手法を用いて、C の濃度に対する各元素の濃度分布を示した結果が図3である。C の濃度增加とともに Cr および Ni の濃度が緩やかに変化し、さらに、これらは逆相関を示すことが明らかとなった。また C および Ni の濃度が高い領域をオーステナイト相と定義すると、相内的一部に、Cr 濃度の高い領域が存在することが示唆された。オーステナイト相において、高濃度を示す FeN に着目してみると、C の濃度増加とともに、その値も増加する一方で、同相内において C とは異なる濃度分布を示す領域が存在することが示された。導入した²H については、Cr と類似した推移が確認されたが、フェライト相では、²H 濃度が C 濃度とともに増加するのに対し、Cr 濃度は低下することが明らかとなった。

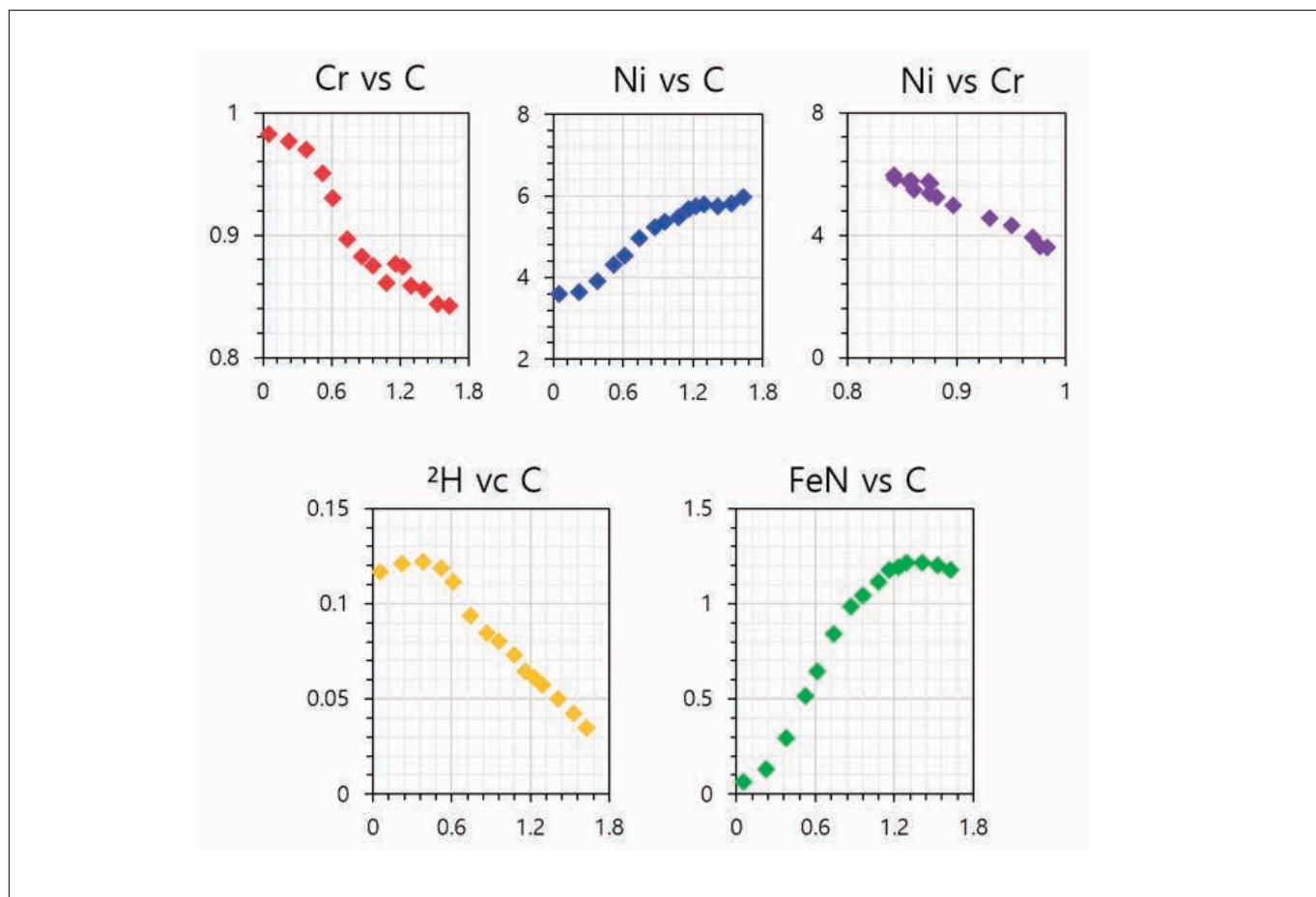


図3 二相ステンレス鋼構成元素および導入²H濃度のC濃度に対する相関図

各元素の濃度が特徴的に変化する領域を組織学的に調査するため、相関図をもとに分析領域を6分割し、Cのイメージングに緑色の領域としてオーバーレイで表示した(図4)。フェライト相では、Crおよび²Hの濃度が高く、特に²Hは、オーステナイト相との界面付近に高濃度で分布していることが明らかとなった。一般にオーステナイト相は、fcc結晶構造を有するため、bcc構造を有するフェライト相と比較し、軽元素が固溶されやすいとされている。しかしながら、本手法では、オーステナイト相内においても、CおよびN(FeN)の濃度に偏りが確認された。またCrとCの濃度が相関を持たない領域が存在することが明らかとなった。このようなオーステナイト相内における偏析形成は、ステンレス鋼製造プロセスにおける熱処理の影響と推察される。

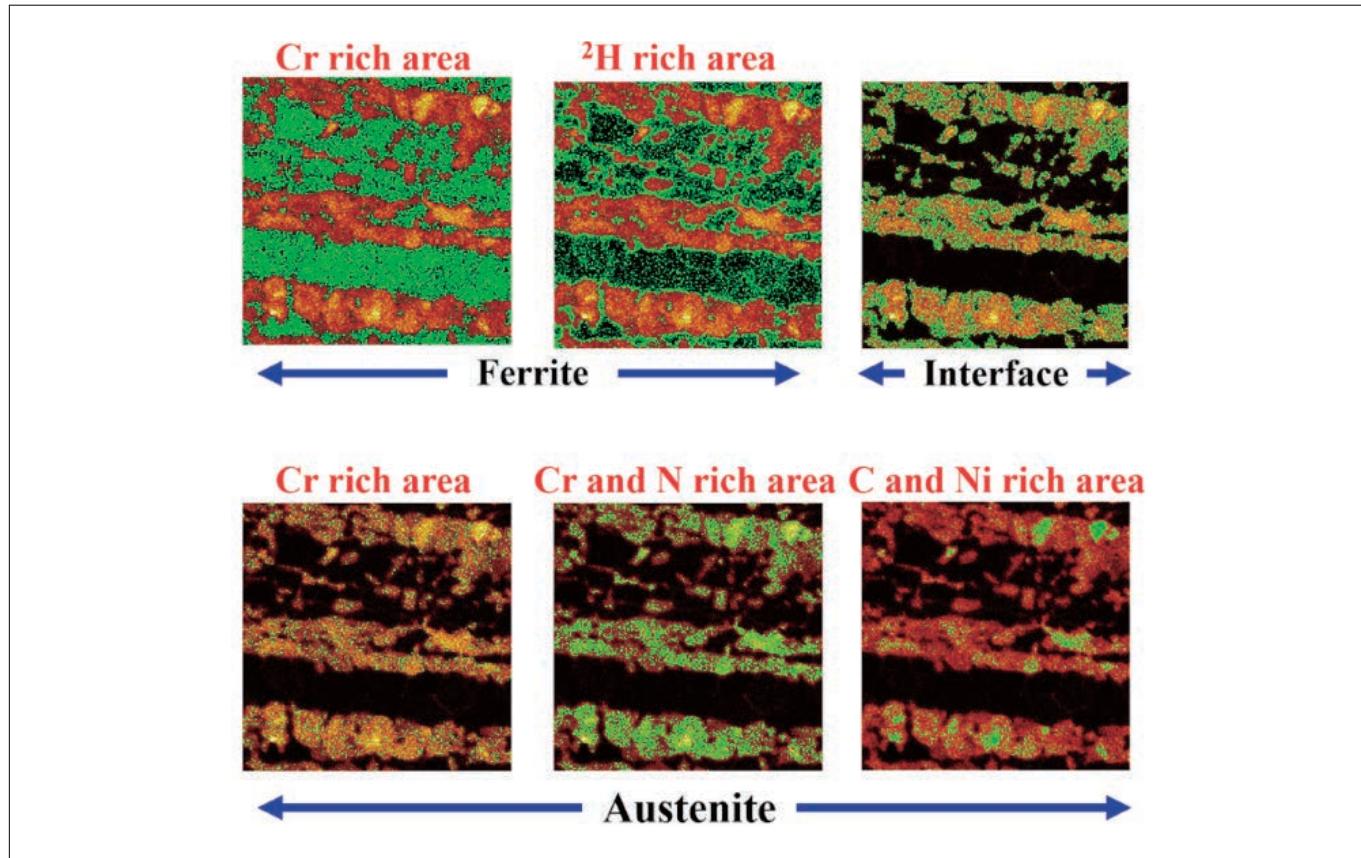


図4 分析領域を二相ステンレス鋼構成元素および導入²Hの濃度変化により6分割し、Cの分布にオーバーレイで表示した。イメージングの緑の領域がこれにあたる。

TOF-SIMSの歴史は比較的新しく、装置開発分野においては勿論のこと、分析技術や解析手法の観点からも、未だ未開発な領域が存在する。膨大なデータを必要に応じて、適切に処理する手法の確立が求められている現在、本評価法は、微小部における軽元素の濃度分布を組織学的に調査する手段として、有用なものと結論付ける。

3. 有機材料の分析(一次イオン種と有機分子の可視化に関する評価)

3-1. 背景

TOF-SIMS の一次イオン源として、現在、最も利用されている Bi クラスターイオンは、電界放射により生成されることから、高いビーム収束性を有する。一方で、 Ar_n^+ などの巨大クラスターイオンと比較すると、高質量側の分子は、ビームダメージを受けやすく、感度が低下するという難点がある¹⁶⁾。イメージング分析において、空間分解能を決定する因子は、プローブのビーム径と分析対象の感度である。無機元素とは異なり、有機分子の場合、一次イオンのドーズ量が Static limit を超えると表面損傷の影響が大きくなることから、発生する二次イオンの数は低下する。微小領域において有機分子の分布情報を取得するためには、複数の分析条件を最適化することが求められる。一方で、一次イオンの種類や対象分子により、その最適値が異なることから、エンドユーザー間において測定条件の統一化がなされていないのが現状である。本章では、有機分子の二次イオン収率と損傷断面積が空間分解能に与える影響について、一次イオン種間の分析結果の差異に着目し、評価を行った結果について紹介をする。

3-2. 実験方法

評価分子として、*N,N'-Di(1-naphthyl)-N,N'-diphenylbenzidine* ($\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_2$, NPD) および *4,4',4''-Tris[2-naphthyl(phenyl)-amino]-triphenylamine* ($\text{C}_{66}\text{H}_{48}\text{N}_4$, 2-TNATA) を用いた。一次イオン種には、 Bi_1^+ , Bi_3^+ および Bi_3^{2+} の3種類を選択し、その加速電圧を 25 kV に設定した。また二次イオンの質量分析は、Positive mode で行った。二次イオン収率と損傷断面積の計測には、Si 基板上有機分子を真空蒸着により成膜したものを用いた。分析モードには、高い質量分解能が得られる Bunching mode を使用し、 $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ の領域を 128×128 ピクセルでランダムにビーム照射した。また一次イオンのドーズ量は 4.2×10^{12} ions/cm² に設定した。空間分解能の評価には、Si 基板上に NPD を堆積させた後、2-TNATA を格子状のパターン (787 lines/cm) ができるよう堆積させた試料を用いた。分析モードには、Burst Alignment mode を用い、 $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ の領域を 128×128 ピクセルで一方向にビームを照射した。またそのドーズ量は、 2.0×10^{12} ions/cm² とした。

3-3. 結果と考察

一次イオン種に Bi_3^+ を用いて分析を行った結果、得られた NPD および 2-TNATA の質量スペクトルを図5((a), (b))に示す。 $\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_2^+$ ($m/z = 588$) および $\text{C}_{66}\text{H}_{48}\text{N}_4^+$ ($m/z = 896$)、さらに両分子に共通のフラグメントイオンである $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($m/z = 217$) のスペクトルが確認できる。また NPD 由来の $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{N}^+$ ($m/z = 371$)、2-TNATA 由来の $\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_3^+$ ($m/z = 602$) および $\text{C}_{50}\text{H}_{37}\text{N}_3^+$ ($m/z = 679$) が検出されたことがわかる。NPD, 2-TNATA および両分子由来のフラグメントイオンのピーク積分値から、二次イオン収率を算出した結果を表1に示す。ドーズ量の増加に伴い、収率の値が低下していくことがわかるが、これは、一次イオンのエネルギーにより表面構造が破壊され、分子状態でイオン化、検出される確率が低下していることを示している。Static limit (1.1×10^{12} ions/cm²) の条件下では、NPD および 2-TNATA の最大収率値は Bi_3^{2+} による分析により得られた。一方、Static limit を大きく超える 4.2×10^{12} ions/cm² では、NPD の最大収率値は、 Bi_3^+ を用いたときに得られる結果となった。表1に示した収率値から算出した損傷断面積を表2にまとめた。全ての有機分子において、 Bi_3^{2+} を用いた時に損傷断面積が最大となることが明らかとなり、その値は、分子の質量数に依存する傾向があることが示唆された。さらに、この結果から、一次イオンのドーズ量の増加とともに、最大収率値をとるイオン種が Bi_3^{2+} から Bi_3^+ へと変わることが示された。

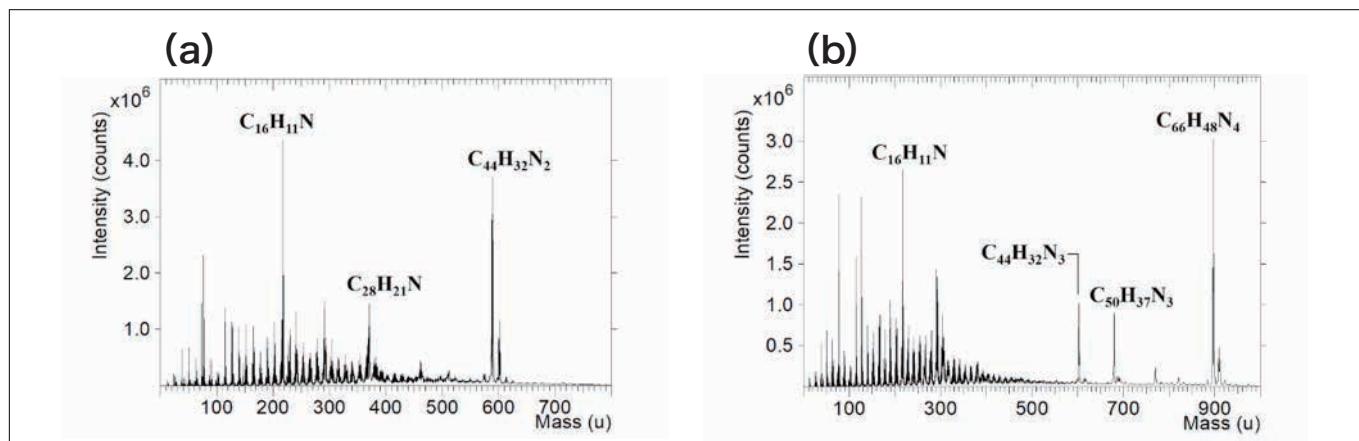


図5 一次イオン種に Bi_3^+ を用いて分析を行った結果、得られた NPD(a) および 2-TNATA(b) の質量スペクトル [17]より引用]

表1 NPD(a), 2-TNATA(b)および、それらのフラグメントイオンの二次イオン収率 [17]より引用]

(a) Bi_1^+

PIDD (ions/cm ²)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-5}$)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-5}$)	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_2^+$ ($\times 10^{-5}$)
1.1×10^{12}	7.3	4.7	16
2.1×10^{12}	6.8	4.1	13
3.2×10^{12}	6.2	3.6	11
4.2×10^{12}	5.8	3.2	9.8

Bi_3^+

PIDD (ions/cm ²)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-3}$)	$\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{N}^+$ ($\times 10^{-3}$)	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_2^+$ ($\times 10^{-3}$)
1.1×10^{12}	2.8	1.3	4.1
2.1×10^{12}	2.5	1.1	3.0
3.2×10^{12}	2.2	0.89	2.3
4.2×10^{12}	2.0	0.75	1.8

Bi_3^{2+}

PIDD (ions/cm ²)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-3}$)	$\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{N}^+$ ($\times 10^{-3}$)	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_2^+$ ($\times 10^{-3}$)
1.1×10^{12}	3.6	1.7	4.4
2.1×10^{12}	3.0	1.3	2.8
3.2×10^{12}	2.5	0.98	2.0
4.2×10^{12}	2.1	0.79	1.6

(b) Bi_1^+

PIDD (ions/cm ²)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-5}$)	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_3^+$ ($\times 10^{-5}$)	$\text{C}_{50}\text{H}_{37}\text{N}_3^+$ ($\times 10^{-5}$)	$\text{C}_{66}\text{H}_{48}\text{N}_4^+$ ($\times 10^{-5}$)
1.1×10^{12}	5.0	2.8	3.0	13
2.1×10^{12}	4.7	2.4	2.6	11
3.2×10^{12}	4.3	2.1	2.2	9.1
4.2×10^{12}	4.0	1.8	1.9	7.9

Bi_3^+

PIDD (ions/cm ²)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-3}$)	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_3^+$ ($\times 10^{-4}$)	$\text{C}_{50}\text{H}_{37}\text{N}_3^+$ ($\times 10^{-4}$)	$\text{C}_{66}\text{H}_{48}\text{N}_4^+$ ($\times 10^{-3}$)
1.1×10^{12}	2.0	8.9	9.2	3.2
2.1×10^{12}	1.8	6.8	7.0	2.3
3.2×10^{12}	1.5	5.3	5.4	1.8
4.2×10^{12}	1.3	4.3	4.4	1.4

Bi_3^{2+}

PIDD (ions/cm ²)	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}^+$ ($\times 10^{-3}$)	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_3^+$ ($\times 10^{-4}$)	$\text{C}_{50}\text{H}_{37}\text{N}_3^+$ ($\times 10^{-4}$)	$\text{C}_{66}\text{H}_{48}\text{N}_4^+$ ($\times 10^{-3}$)
1.1×10^{12}	2.5	11	12	4.0
2.1×10^{12}	2.0	7.6	8.0	2.6
3.2×10^{12}	1.7	5.6	5.9	1.9
4.2×10^{12}	1.4	4.5	4.7	1.5

表2 NPD(a), 2-TNATA(b)および、それらのフラグメントイオンの損傷断面積 [17]より引用]

(a)

	$C_{16}H_{11}N^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)	$C_{28}H_{21}N^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)	$C_{44}H_{32}N_2^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)
Bi_1^+	3.3	5.3	6.7
Bi_3^+	5.1	7.7	12
Bi_3^{2+}	7.8	11	14

(b)

	$C_{16}H_{11}N^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)	$C_{44}H_{32}N_2^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)	$C_{50}H_{37}N_3^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)	$C_{66}H_{48}N_4^+$ ($\times 10^{-14} \text{cm}^2$)
Bi_1^+	3.0	5.9	6.3	6.4
Bi_3^+	6.0	10	10	11
Bi_3^{2+}	7.8	12	13	14

図6は、NPD/2-TNATAのイメージングを取得した結果である。モノマーイオンに比べて、クラスターイオンを用いることにより、明瞭な分布情報を得られることがわかる。 Bi_1^+ では、空間分解能を評価するに足りる十分なシグナルカウントを得ることができなかったため、その評価は、 Bi_3^+ と Bi_3^{2+} の結果を用いて行った。空間分解能はNPDと2-TNATA境界部で計測し、NPDおよび2-TNATAの強度プロファイルの16-84%のラインから算出をした。その結果、 Bi_3^{2+} を用いた方が高い値を得られる傾向にあることがわかり、その結果は約1 μmであった(表3)。

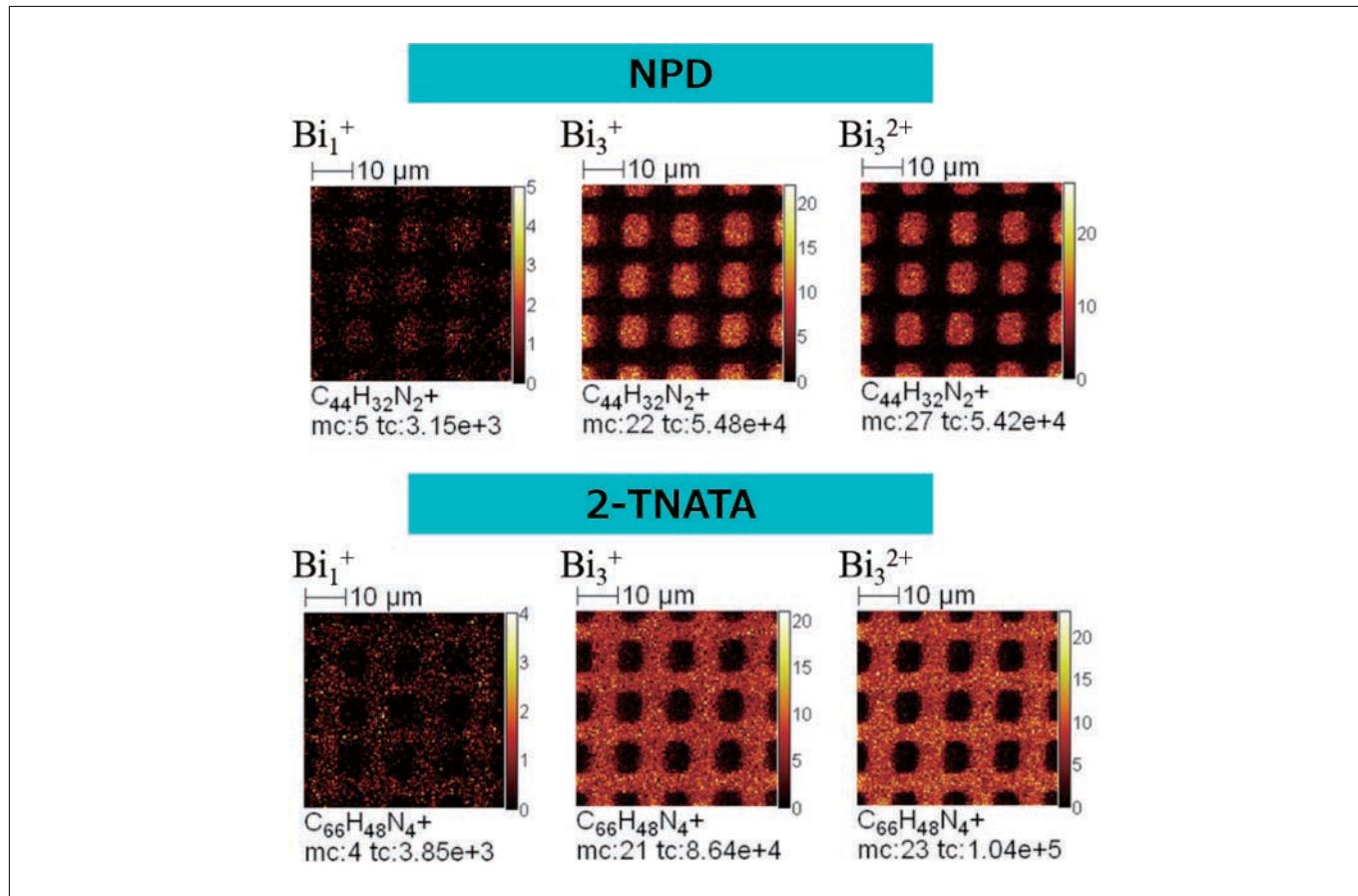


図6 NPD/2-TNATA表面のイメージング [17]より引用]

表3 NPDおよび2-TNATAの空間分解能 [17]より引用]

	NPD	2-TNATA
Bi_1^+	unmeasurable	unmeasurable
Bi_3^+	1.8 μm	1.8 μm
Bi_3^{2+}	1.3 μm	1.1 μm

二次イオン収率が最大値をとるイオン種は、一次イオンのドーズ量により変化することが明らかとなり、損傷断面積の値は、分子の質量数と相関があることが示唆された。またクラスターイオンを用いることにより、二次イオン収率は数十倍程度向上したのに対し、損傷断面積は、モノマーイオンと比較して数倍程度の増大であった。これは、クラスターが表面構造の破壊を大きく拡大することなく、有機分子を固体表面上から脱離イオン化させる効果が高いことを示している。さらに明瞭なイメージングを取得するためには、対象分子の感度が必要となることから、分析には、クラスターイオンを用いることが必要であるが、一定のシグナルカウントを取得できる条件下では、空間分解能を決定する因子はビーム径であることが示唆された。以上の結果から有機分子のイメージング分析において、対象の分子に応じて、適切な一次イオン種を選択することが重要であると結論付ける。

4. まとめ

無機材料および有機材料表面のイメージング(可視化)に関するTOF-SIMSの最近の研究事例を紹介した。分析技術が進歩することにより、これまで解明することが困難とされていたことが明らかになる可能性が高まる。検出されないことや、分布が確認できないことが、イコール存在しないこととはならない。原理、特性を理解した上で、装置を適切に利用することがTOF-SIMSの応用範囲を広げる前提条件と考えている。大学の枠を超えて、装置が有効に活用され、研究活動に貢献できれば幸いである。

参考文献

- 1) R. Castaing, G. J. Slodzian, *J. Microscopie*, **1**, 395 (1962).
- 2) K. Wittmaack, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **7**, 39 (1975).
- 3) A. Benninghoven, *Phys. Status Solidi.*, **34**, K169 (1969).
- 4) N. Davies, D.E. Weibel, P. Blenkinsopp, N. Lockyer, R. Hill, J.C. Vickerman, *Appl. Surf. Sci.*, **203**, 223 (2003).
- 5) F. Kollmer, *Appl. Surf. Sci.*, **231**, 153 (2004).
- 6) N. Winograd, *Anal. Chem.*, **77**, 142A (2005).
- 7) S. Nishinomiya, K. Ikichi, H. Yamada, Y. Nakata, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo, *Nucl. Instrum. Methods Phys. B.*, **256**, 493 (2007).
- 8) <http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/research/caf.html>
- 9) <http://five-star.tagen.tohoku.ac.jp/>
- 10) A.R. Troiano, *Trans. ASM*, **52**, 54 (1960).
- 11) R. A. Oriano, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **76**, 848 (1972).
- 12) T. Tanaka, K. Kawakami, S. Hayashi, *J. Mater. Sci.*, **49**, 3928 (2014).
- 13) O. Sobol, F. Straub, T. Wirth, G. Holzlechner, T. Boellinghaus, W. E. S. Unger, *Sci. Rep.*, **6**, 19929 (2016).
- 14) K. Iltgen, C. Bendel, A. Benninghoven, E. Niehuis, *J. Vac. Sci. Technol.*, **15**, 460 (1997).
- 15) R. Shishido, M. Uchikoshi, S. Sato, H. Todoroki, S. Suzuki, *ISIJ Int.*, **57**, 1425 (2017).
- 16) 藤井麻樹子, 宍戸理恵, 鳥居聰太, 中川駿一郎, 濑木利夫, 青木学聰, 鈴木茂, 松尾二郎, 表面科学, **35**, 351 (2014).
- 17) R. Shishido, M. Fujii, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo, S. Suzuki, *Rap. Commun. Mass Spectrum.*, **30**, 476 (2016).

謝辞

本研究の遂行にあたり、茨城大学の佐藤成男教授、京都大学の松尾二郎准教授、横浜国立大学の藤井麻樹子講師には、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました。また東北大学の釜谷隆技術職員には、EPMA分析において技術支援をいただきました。ここに感謝の意を表します。

共同執筆者

^{*1}三ツ石 方也

東北大学多元物質科学研究所 教授

^{*2}鈴木 茂

東北大学多元物質科学研究所 教授

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/>

多様なSEM情報を高スループットで取得する ショットキー FE-SEM, SU7000

Various Information from SEM with High Throughput, Schottky FE-SEM SU7000

立花 繁明

1. はじめに

走査電子顕微鏡(SEM)は、二次電子・反射電子・X線など多様な信号を取得できることから、幅広い分野において活用されており、その用途も多岐にわたっています。

SEMの性能・機能の向上・発展により様々な情報が得られるようになってきた反面、その使い方の複雑化、データ取得に要する時間の増加という課題も現れてきました。

2018年7月に(株)日立ハイテクノロジーズが発表したショットキーFE-SEM, SU7000はこれらの課題に対応するため、電子光学系や検出系を新たに設計し、高性能活用とスループット向上の両立を図りました。

また近年注目されつつあるIn-Situ観察をはじめとするダイナミック観察・測定のため、多様な試料やアクセサリーが搭載できる試料室や試料ステージを備え、多様化する観察・測定手法に対応する装置です。

2. 概要

- (1) ショットキーエミッターを搭載した電子銃を採用し、
 - ・低加速高分解能
 - ・大電流分析／長時間測定
 - ・低真空環境下観察など多様な観察条件に対応。
- (2) 二次電子・反射電子像観察およびEDX測定が単一WD(6 mm)で実施可能。
- (3) 横方向最大φ200 mm、高さ最高80 mm、重量は2 kgまで(試料台含む)の試料を搭載可能な大型試料室／試料ステージを装備。
- (4) 最多で5検出器、6チャンネルの信号を同時表示／保存可能な表示系。

3. 電子光学系

電子線源はショットキーエミッターを搭載しています。高分解能像を得る以外にも、獲得できる照射電流量が多いことから大電流EDX分析や高速EBSD測定などに適しています。また動作可能真空度に比較的余裕があることから低真空条件観察・測定にも適用可能です。

二段のコンデンサーレンズにより照射電流量は数 pA から 200 nAまでの範囲で調整可能です。

対物レンズは一般的なタングステンSEMに適用されているコニカル型レンズ(アウトレンズ)に静電界を組み合わせた構成になっています(図1)。

低加速電圧観察時に分解能を低下させる要因としては色収差の影響があげられます。

色収差はレンズに入射する電子線のエネルギーのばらつきによって起こりますが、これはエミッターの持つエネルギー幅(ΔE)と加速電圧(E)の比($\Delta E/E$)が大きいほど影響するため、特に低加速電圧観察時に顕著になります。

SU7000の光学系では、電子線照射時に加速電圧(Vacc)に加えて対物レンズの静電界(Vb)がエミッターから放出された電子線を加速し、上述の $\Delta E/E$ を鏡筒内で低減させます。電子線は対物レンズ下端を通過する時点での減速されて指定した加速電圧値で試料に照射されます。

この静電界の持つ効果により、特に低加速電圧条件での観察で分解能を維持した観察が可能になっています。

図2はリチウムイオン電池などに使用されるセパレータを観察した事例で、100 Vの加速電圧、倍率5万倍で観察しています。セパレータは高分子材料からなり、電子線照射によるダメージを受けやすい試料ですが、加速電圧を100 Vまで下げることでダメージを軽減し、かつ10 nm程度の纖維の状態まで確認できる像質で観察されています。

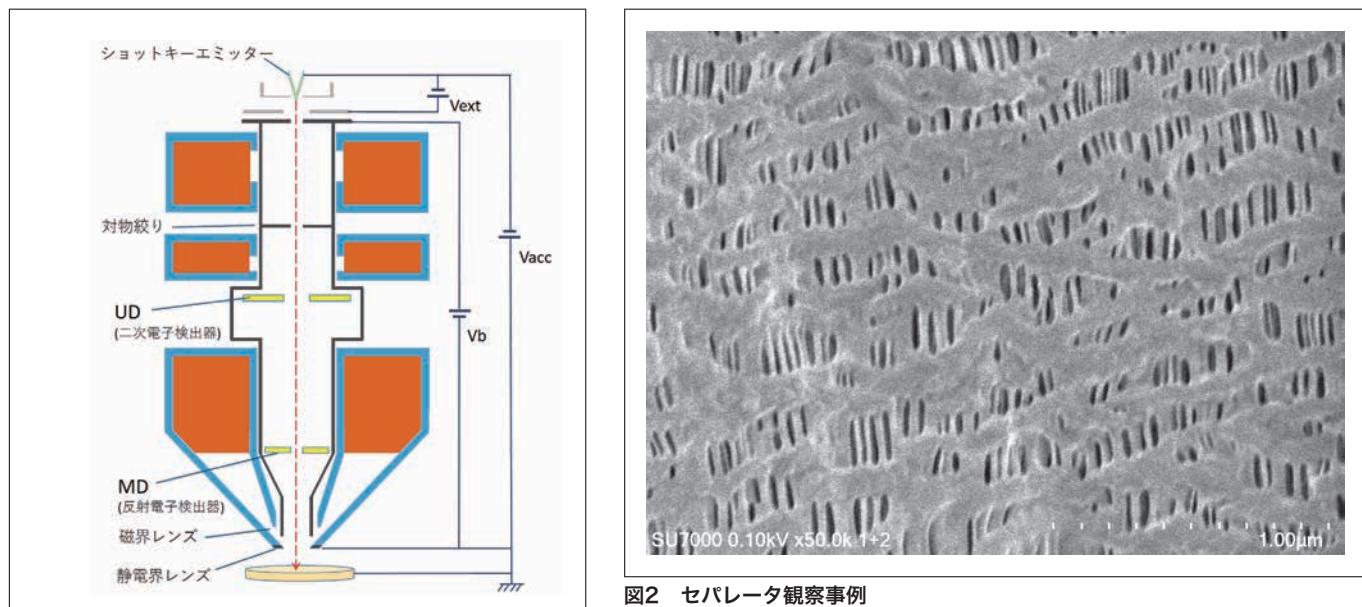


図1 SU7000光学系概略図

図2 セパレータ観察事例
加速電圧：100 V
倍率：5万倍

4. 検出系

近年のSEMでは複数の二次電子・反射電子検出器の搭載が一般化してきています。それぞれの検出器特性に応じた有益な情報が取得できる利点がありますが、各検出器ごとにWDなどの最適条件を設定する必要がありました。そのため複数信号の同時取得を高いスループットで行うことは簡単ではありませんでした。

SU7000では各検出器の信号取得が同一WD(=6 mm)で行えるよう、光学系・検出系を設計しており、スループットの向上を図りました。図3は検出器配置を示しています。

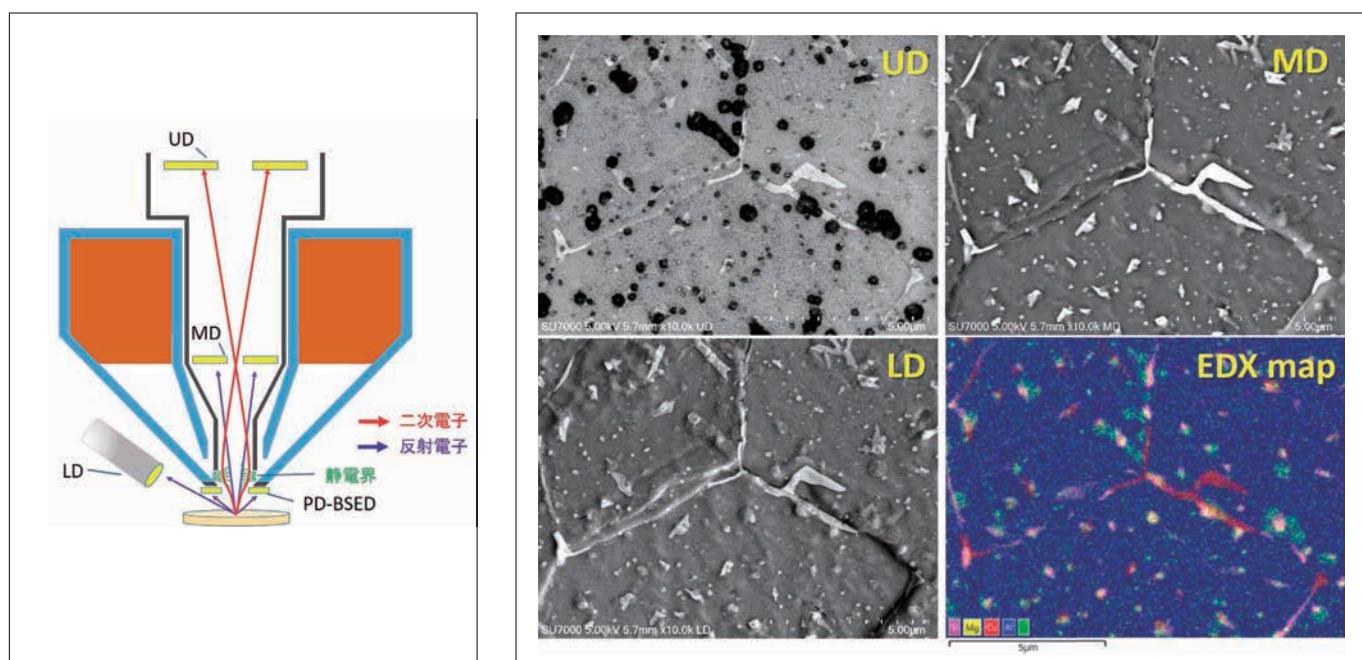


図3 SU7000検出系概略図

図4 アルミ合金の3検出器、EDXマップ同一条件取得事例

試料から発生した二次電子、反射電子信号の一部は対物レンズの静電界および磁界によってエネルギーに応じた軌道を取り、それぞれUDおよびMDで検出されます。

また対物レンズ内に取り込まれない角度で放出された電子はLDやPD-BSEDで検出されます。これらが同一WDで取得されることで試料からの情報をより短時間で取得可能になりました。また、EDX分析も同じくWD=6 mmで取得できるような設計がなされており、観察位置決定から組成分析もより迅速な手順で実施できるようになりました。

図4は研磨後に熱処理したアルミ合金をWD=6 mm条件でUD、MD、LD各検出器の像およびEDXマップを取得した事例です。

MD像(反射電子像:右上)では析出物が粒界および粒内に分布している様子が把握できます。UD像(低エネルギー二次電子像:左上)ではMD像では現れていなかった暗い箇所がコントラストとして確認され、LD像(高エネルギー二次電子・反射電子像:左下)ではその箇所の形状が確認できています。

この視野を条件変更せずにEDXマップ(右下)を取得した結果、暗い箇所はマグネシウムおよびシリコンからなる酸化物であることが確認できました(黄緑部分)。マグネシウムやシリコンの酸化物は素地のアルミと比較的平均原子番号が近いため、MD像では高いコントラストを示さない一方、UDが低エネルギー二次電子に敏感な性質を持つため、金属と酸化物との二次電子放出効率の差により高いコントラストを示したと推測されます。

このように異なる検出器の情報を一度に取得することで、多面的な情報を迅速に取得することが可能になりました。

材料のプロセス中の挙動を把握する観点目的から、その場観察など動的観察への要望は従来から求められていました。組成や結晶学的情報を取得する上では反射電子信号の高速取得が必要ですが、SU7000で新規開発した半導体型反射電子検出器:PD-BSEDは応答特性を向上させて動的観察中の高速走査条件での像質向上を図っています。

図5はシリコン基板上の異物粒子をPD-BSEDで観察した事例です。

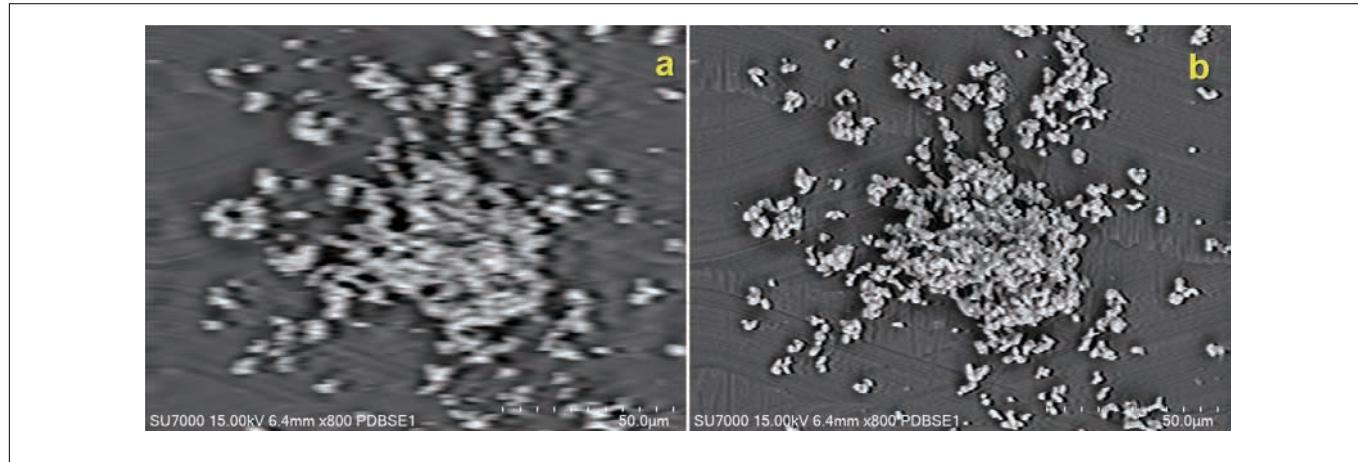


図5 PD-BSED(反射電子検出器)応答性比較

従来の方式(a)では像が流れていて粒子の形状が不明瞭ですが、新開発方式(b)では粒子の形状が明瞭に観察できます。

本検出器の高速応答性に加え、引張ステージなどの重量物を搭載可能な試料室およびステージ設計により、In-Situをはじめとする動的挙動観察への可能性を拡張しています。

試料室は合計18のアクセサリーポートを備え、様々なアクセサリー装着に備えています。

5.まとめ

SU7000はFE-SEMにこれまで要求されていた

- ・低加速観察能力や
- ・信号分離機能に加え、
- ・同一WD条件でEDXデータまで取得

することでデータの質およびスループット向上に寄与します。

さらに従来の静的SEM像取得・マイクロアナリシスに加え、動的観察をも視野に入れたデザインと機能は、SEMの可能性をさらに拡張することが期待されます。

著者紹介

立花 繁明

(株)日立ハイテクノロジーズ 科学システム営業本部 マーケティング部

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/>

120 kV透過電子顕微鏡HT7820の特長と応用

Introduction of the HT7820 120 kV TEM and Its Application

矢口 紀恵^{*1}, 許斐 麻美^{*2}

1. はじめに

120 kV 透過型電子顕微鏡(以下、TEM: Transmission electron microscope)は、バイオ・メディカルからナノ材料などの幅広い分野において微細構造の形態観察や解析に活用されています。そのような幅広い分野へ対応するため、120 kV TEM HT7800シリーズを開発しました¹⁾。

バイオ・メディカル分野向けバージョンHT7800では、高コントラストレンズを搭載し、広視野・高コントラスト観察を実現しました。また、試料傾斜範囲は±70度で3D用画像取り込み、並びに再構成機能を標準装備としました。

ナノ材料分野向けバージョンHT7830は、TEM 分解能0.19 nm(軸上), STEM 分解能1 nmを実現し、制限視野回折パターンを自動で複数取得する Nano Analysis 機能²⁾を持たせました。

また、HT7800/HT7830両機種に視野探しをサポートする Image Navigation 機能³⁾を搭載し、直感的な視野探し、画像上のエリア指定と画像自動取得が可能です。

今回、バイオ・メディカル分野とナノ材料分野両方を観察対象とするニーズに応え、前記2種バージョンの間の仕様を持つ多目的対物レンズを搭載した HT7820 を開発しました。

本稿では、HT7800シリーズ共通の機能を含めた HT7820 の特長とその応用例を紹介します。

2. HT7820の概要と特長

HT7820の外観写真を図1に示します。HT7820を含む HT7800シリーズは、蛍光板観察用スクリーンカメラによる明るい部屋での TEM 操作を実現しています。高精細高速 CMOSスクリーンカメラにより、迅速な視野探索と視野探し時の試料損傷の低減を実現しました⁴⁾。このスクリーンカメラ搭載により蛍光板上でのライブ測長や動画記録、画像保存も可能としました。



図1 HT7820の外観

さらに、従来からの省スペース[本体サイズ：199 cm (H) × 191 cm (D) × 120 cm (W)]、省電力のコンパクト設計というコンセプトも踏襲しています。

表1にHT7800シリーズの主な仕様を示します。HT7820を含むすべての機種で加速電圧を20 kVから120 kVまで印加することができます。無染色切片の高コントラスト観察やカーボン系材料などの低ダメージ観察など目的に合わせた加速電圧の選択が可能です。

表1 HT7800シリーズの主な仕様

	HT7800	HT7820	HT7830
加速電圧		20 kV – 120 kV	
格子分解能	0.20 nm @100 kV (Off-axis)	0.14 nm @120 kV (Off-axis)	0.19 nm @120 kV (On-axis)
倍率	×50 ~ ×600,000	×50 ~ ×800,000	×100 ~ ×1,000,000
最大傾斜角 (標準ホルダ使用時)	±70°	±30°	±10°
レンズ構造	複合対物レンズ		
	広視野・高コントラスト 観察	多目的観察	高分解能観察

HT7820では格子分解能0.14 nm (off-axis)を保証、試料傾斜範囲±30度とし、主に半導体分野や、ポリマー、軽量化材料などのソフトマテリアル分野を対象としています。図2にAu単結晶の高分解能像観察例を示します。Au(220) 0.14 nmの格子像が明瞭に観察されています。

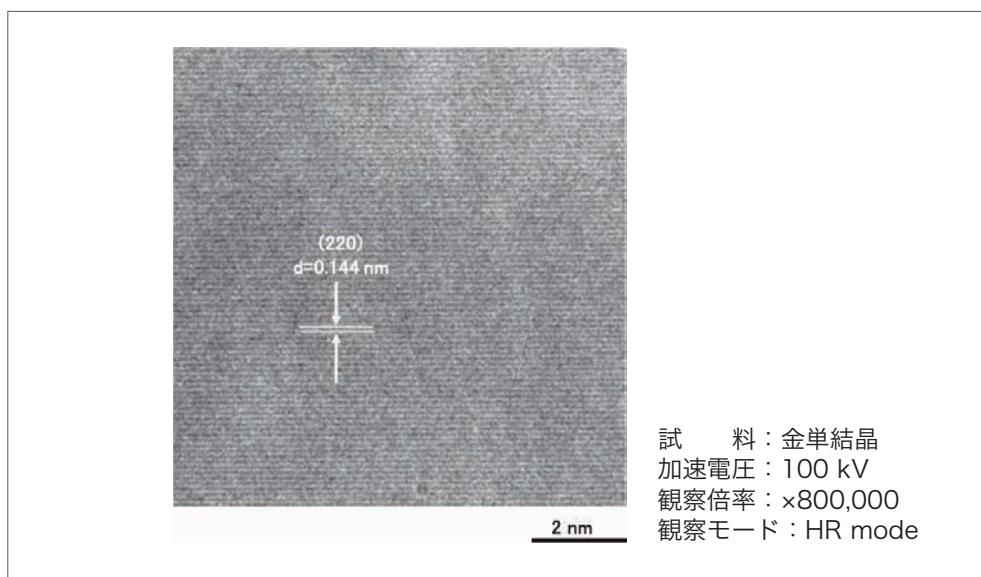


図2 金单結晶の高分解能像観察例

HT7820の対物レンズにおいても、日立独自の複合対物レンズの構成とし、目的に応じて高コントラスト(HC)モード、高分解能(HR)モードを選択することが可能です⁵⁾。図3に複合対物レンズの模式図を示します。対物レンズを二段とし、対物磁路をダブルギャップ構造としています。OBJ2(下段)レンズ用コイルの極性を切り替えることで、OBJ2レンズのON/OFFを可能とし、長焦点のHCモード、短焦点のHRモードを1台で実現しています。HC/HRモードの切り替えは、コイル極性の切り替えのみのため、コイル電流値は一定で、温度変化による熱ドリフトが生じないという特長もあります。

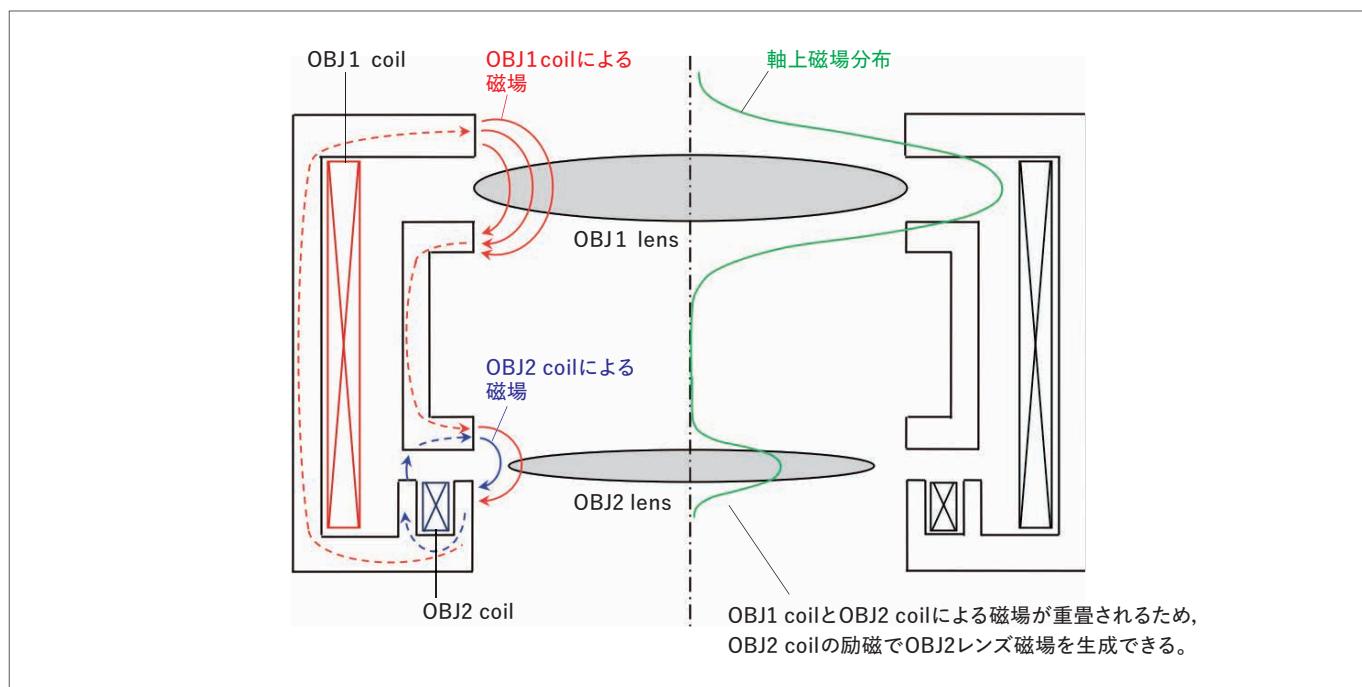


図3 複合対物レンズの模式図

加えて Image Navigation 機能, Nano Analysis 機能などの各種オート機能を HT7820 にも搭載しました。自社製 16MピクセルCMOSカメラRC16を含めた各種カメラにも対応しています。

3. HT7820応用例

3-1. 高コントラスト観察例

HCモード観察例を図4, 5に示します。図4は、耐衝撃性ポリスチレンの観察例です。サラミ構造が高コントラストで観察されています。図5は、マウスの腎臓の無染色切片の観察例です。HCモードを使うことにより、無染色でありながら高コントラストで、腎臓糸球体内の核や足突起構造などの細胞内構造が観察されています。

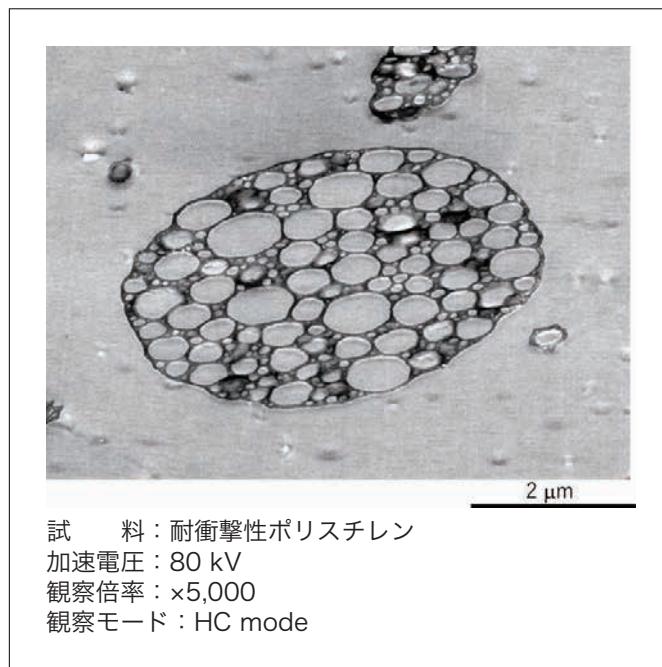


図4 耐衝撃性ポリスチレンの高コントラスト観察例

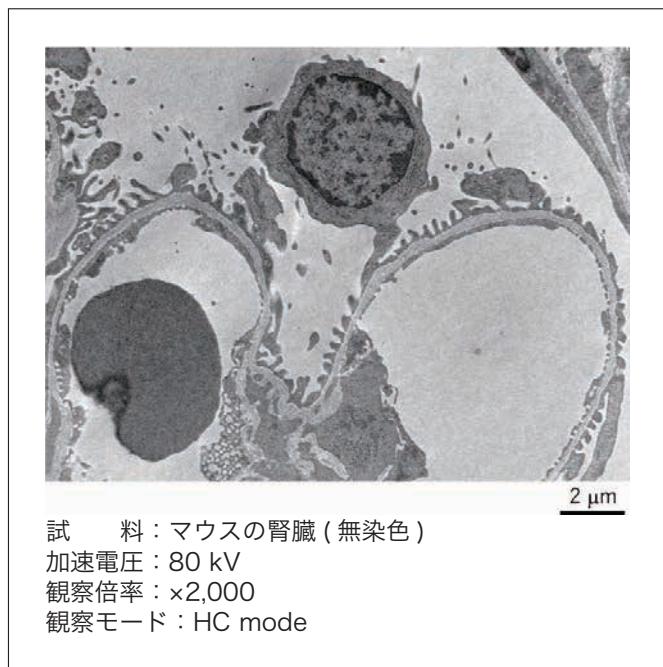


図5 マウスの腎臓の無染色切片の高コントラスト観察例

3-2. 高分解能観察例

HRモードを用いた観察例を図6に示します。図6は、Si 単結晶の高分解能観察例(a)と、その回折パターン観察例(b)です。3方向の格子像が明瞭に観察されています。Si 半導体デバイスの測長の際の、格子像を使ったキャリブレーションに応用可能です。図7は、TiO₂ナノ粒子の観察例です。0.35 nm の格子像が明瞭に観察されています。

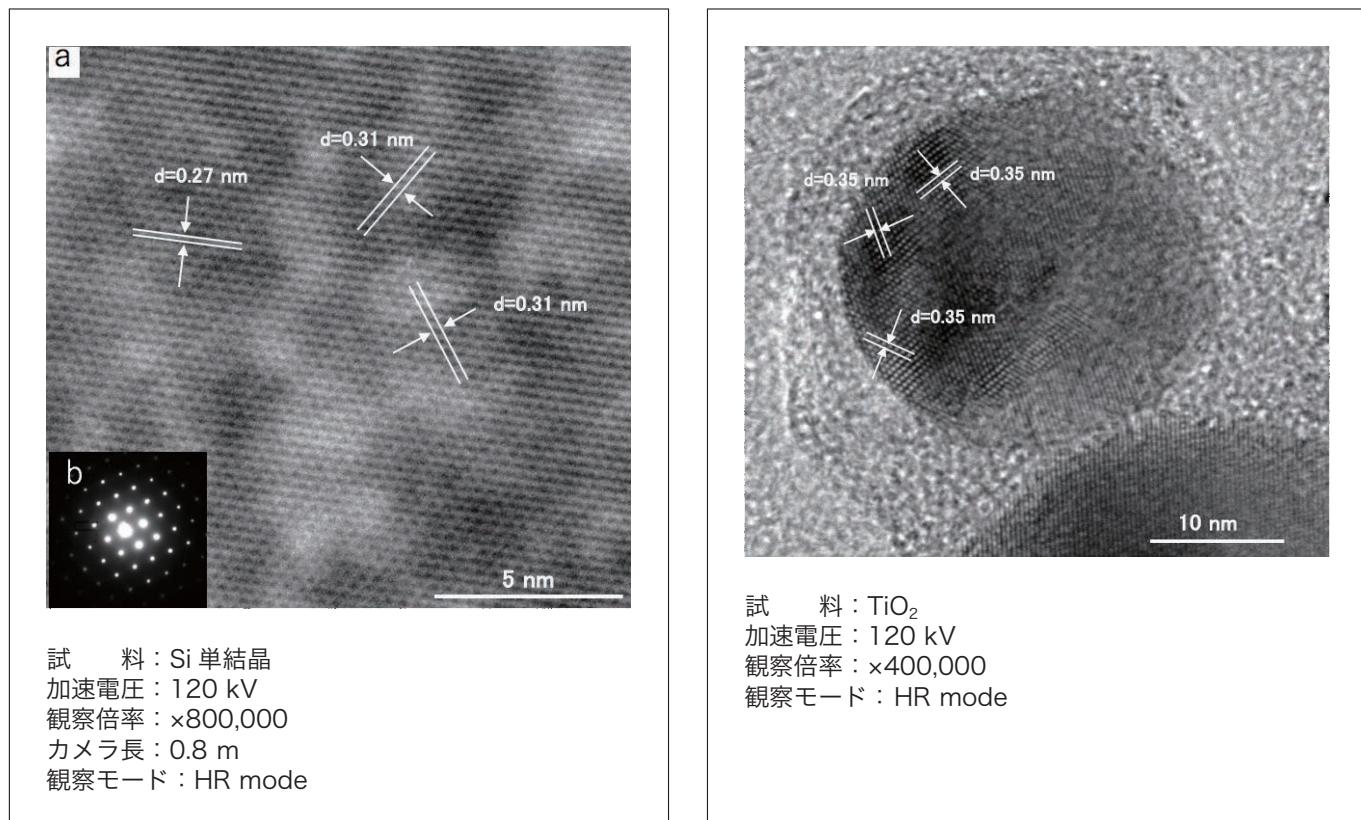
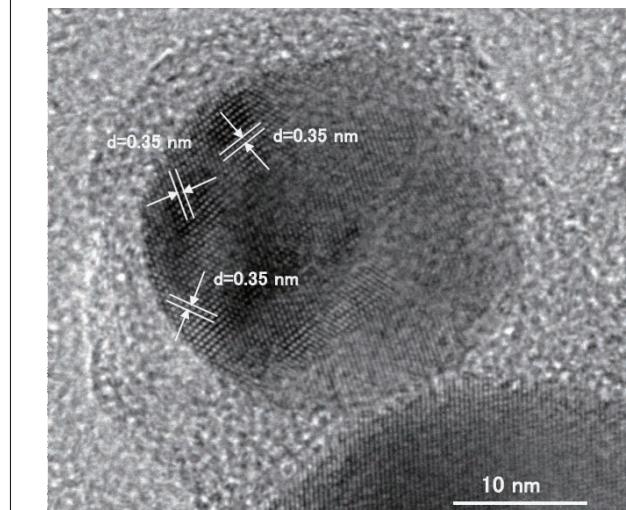


図6 シリコン(Si)単結晶の高分解能観察例(a)および回折パターン(b)
観察例



3-3. 加速電圧の違いによる TEM 像比較

シングルウォールカーボンナノチューブを加速電圧20 kVから120 kVまで20 kVごとに観察した例を図8に示します。低加速電圧で観察することによって、ナノチューブ1本1本がより高コントラストで確認できています。

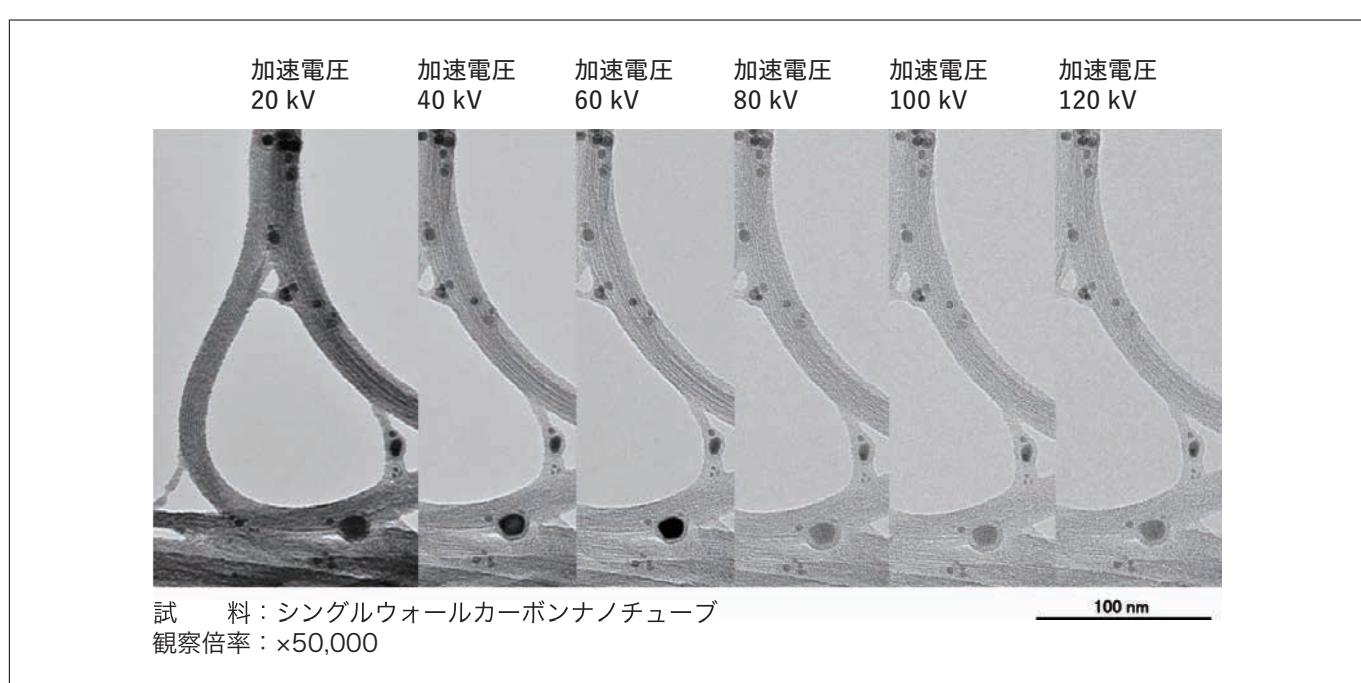


図8 加速電圧によるシングルウォールカーボンナノチューブ観察例

3-4. Image Navigation 機能を用いた自動画像取得例

図9にImage Navigation機能を用いたアスペストの自動画像取得例を示します。まず、ワンクリックでグリッド像をnavigation画面に取り込み、目的のエリアを選択します(a)。次に、目的の撮影エリア(b)を指定した倍率(c)で自動撮影(d)していきます。これによりアスペストが存在するグリッド内の全マス目について自動撮影されます。自動撮影された画像はサムネイル表示できるので、目的の視野の画像を選択し、Auto drive機能でステージ移動することも可能となります(e)。その後、撮影したい視野を複数点設定し、撮影倍率を設定することにより、さらに自動撮影することも可能です。

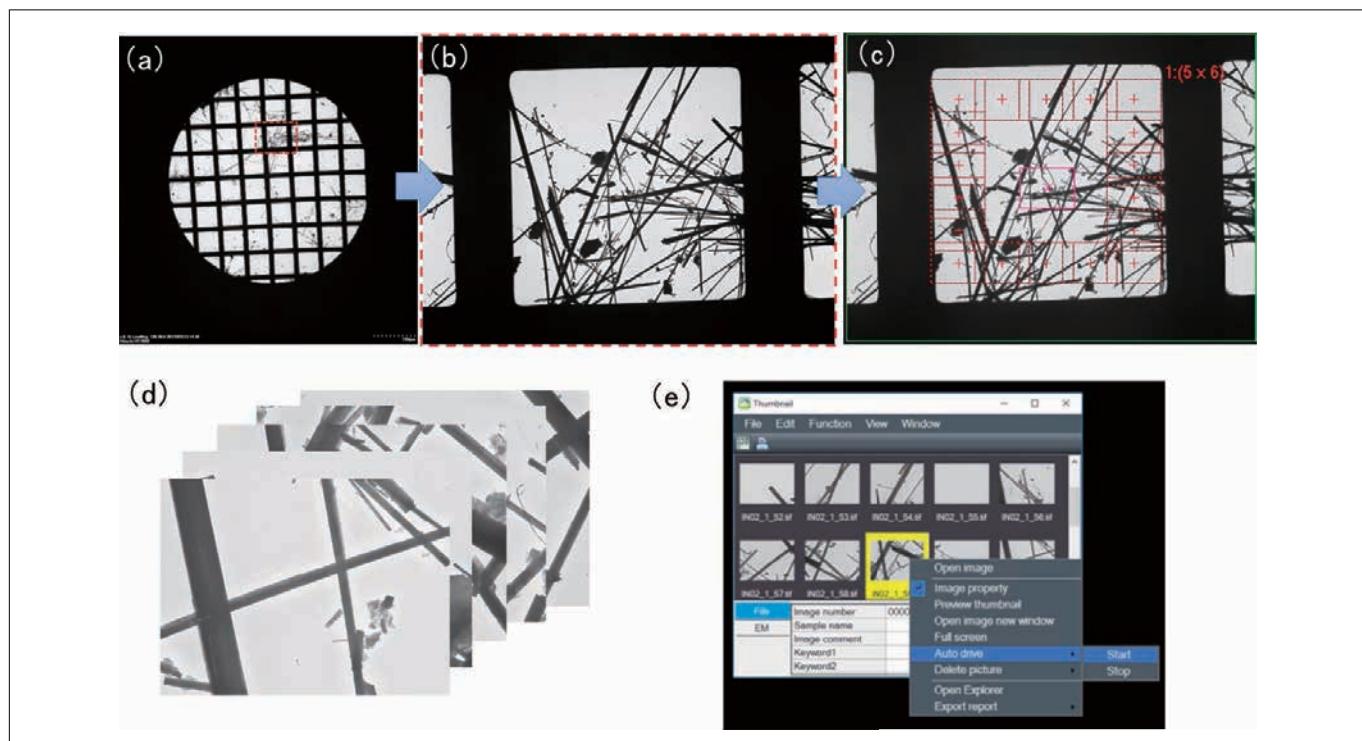


図9 Image Navigation機能を用いたアスペストの自動画像取得例

3-5. Nano Analysis 機能を用いた制限視野回折(SAD: selected area diffraction)パターン自動取得機能例

図10にNano Analysis機能を用いたアスペストの制限視野回折(SAD)パターンの自動取得例を示します。観察視野でSADパターンを取得したいエリア(最大10箇所)を選択すると、TEM像上に絞り径に相当する円が表示されます。その後、対応する制限視野(SA: selected area)絞りを画面中心に入れ、取り込みスタートすると選択した10か所の視野とそれに相当する回折パターンを記録していきます。

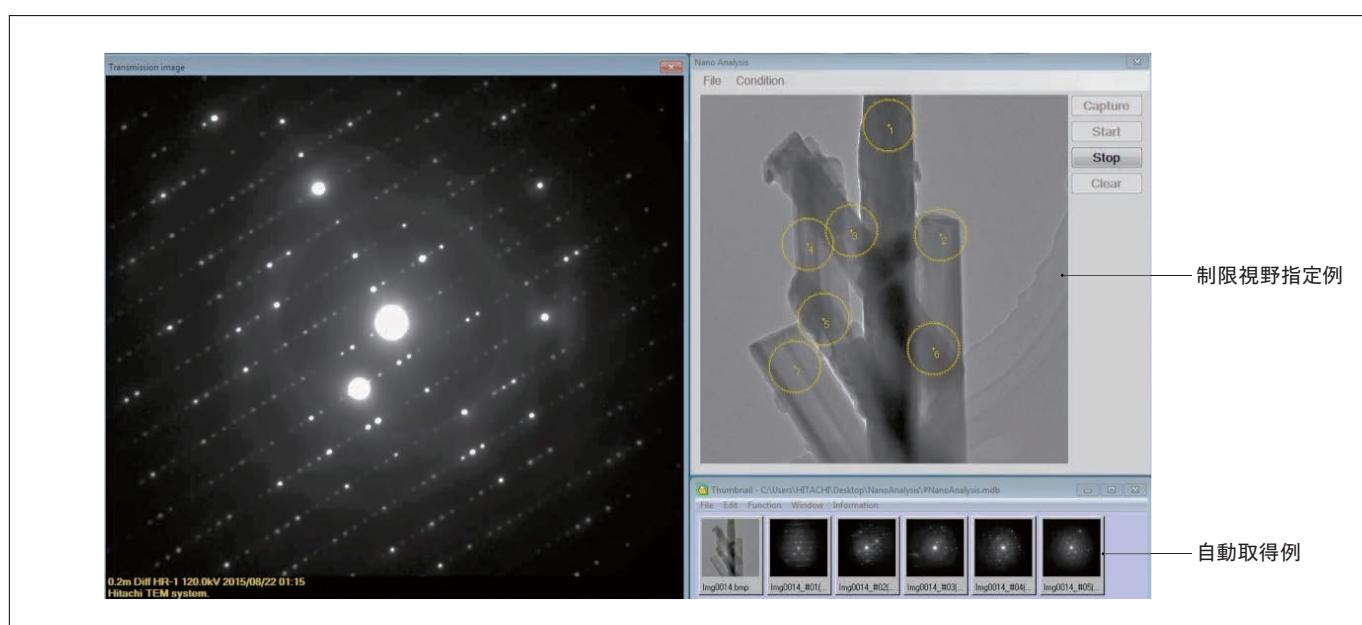


図10 Nano Analysis機能を用いたアスペストの制限視野回折(SAD)パターンの自動取得例

さらに、Diffraction Analysis 機能と併用することにより、データベースと照合して物質の候補をリストアップすることも可能です。

図11にHT7820で取得した各種アスペストのTEM像、SADパターン、EDX分析結果を示します。EDX分析を組み合わせることにより、より確実なアスペストの同定が可能となります。

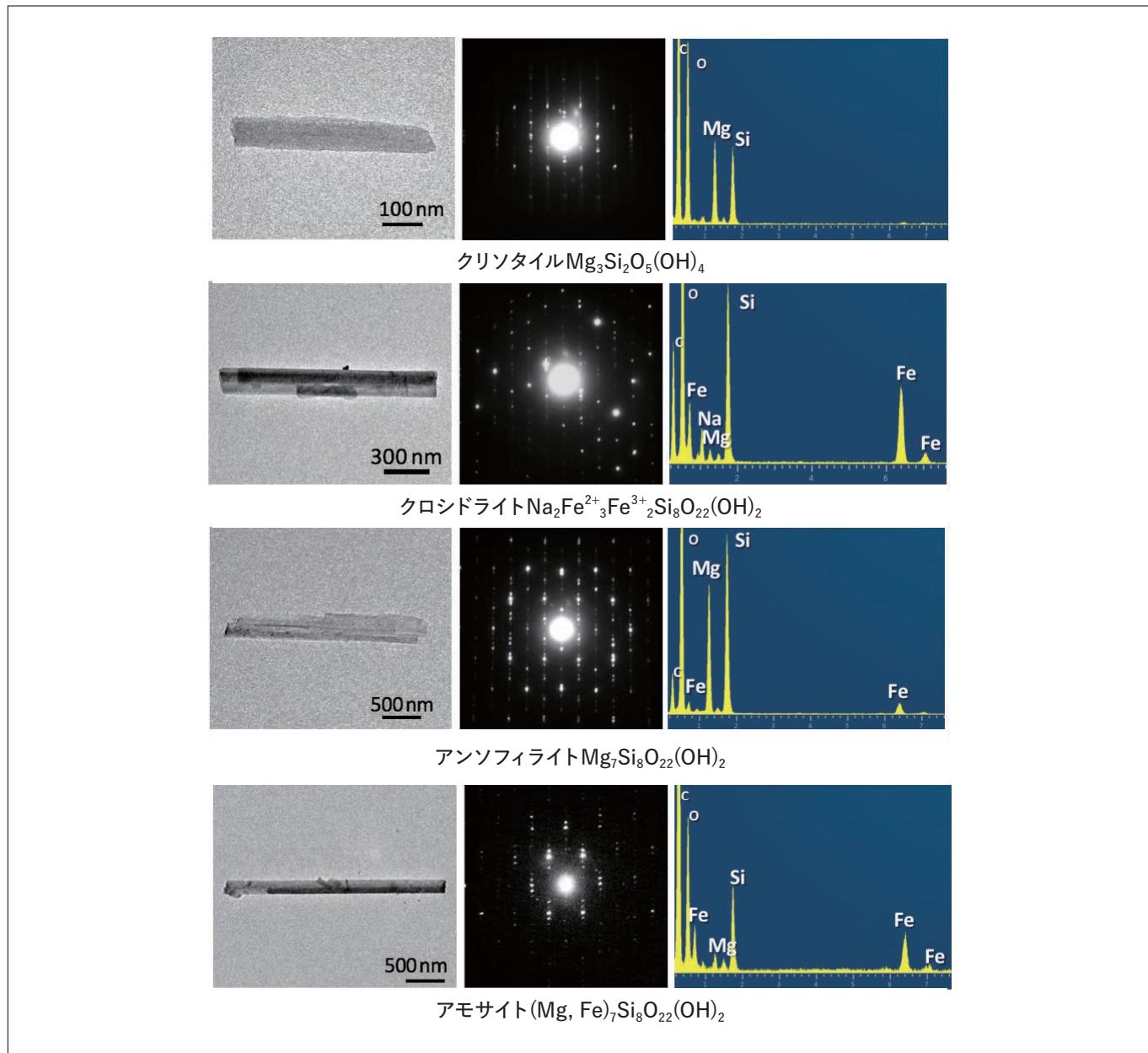


図11 HT7820で取得した各種アスペストのTEM像、SADパターン、EDX分析結果

3-6. グリッドローテーションホルダ(オプション)⁶⁾による多方向観察例

グリッドローテーションホルダを用いることにより、短冊形状のグリッドに搭載した試料を360度回転しTEM像観察することができます。このホルダを用いることにより、HT7820やHT7830など狭いギャップの対物レンズであっても、三次元傾斜像の撮影や再構成を行うことが可能となります。

図12に、マイクログリッド上の酸化モリブデンの3方向観察の応用例を示します。

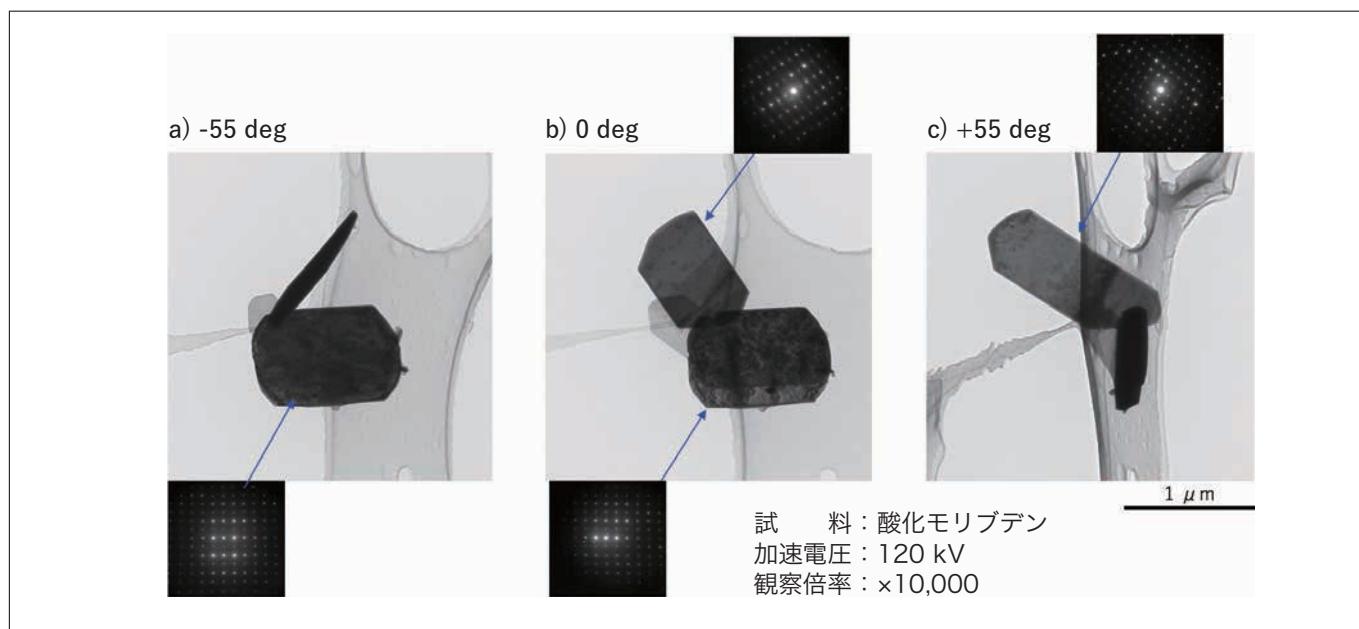


図12 グリッドローテーションホルダを用いた多方向観察応用例

中央の図は0度、左図は、-55度、右図は+55度傾斜させ観察したTEM像と各結晶粒子から得られたSADパターンです。多方向からの観察により、酸化モリブデン結晶の形状およびSADパターンから結晶方位の情報が得られます。

例えば-55度傾斜させた観察例のみでは針状結晶と板状結晶の2種類の形状の結晶があるように観察されますが、多方向の観察により、2つの結晶とも板状であることがわかります。このように、数枚の傾斜像を観察するだけでも、試料形状を正確に捉えることが可能となります。また、傾斜角度を増やして三次元再構成をすることで、より高精度に結晶形状やサイズを把握することも可能です。

4. まとめ

HT7800シリーズに新たなラインナップとして開発したHT7820を中心に、装置の特長と各種材料の解析事例について紹介しました。HT7820は、様々な試料を対象としたスクリーニングや検査分析など、種々の用途にご活用いただけます。

参考文献

- 1) 長沖 功他, THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS, **60** (2), 5291-5294 (2017).
- 2) K.Tamura *et al.*, *Microsc. Microanal.*, **23** (Suppl 1), 62-63 (2017).
- 3) H.Kawamoto *et al.*, *Proc. of IMC I9*, Sydney, Australia, **228** (2018).
- 4) 矢口紀恵他, 日本顕微鏡学会第74回学術講演会発表要旨集, **35** (2018).
- 5) 田村圭司他, 日本顕微鏡学会第74回学術講演会発表要旨集, **4** (2018).
- 6) 和久井亜希子他, 日本顕微鏡学会第74回学術講演会発表要旨集, **217** (2018).

著者紹介

¹ 矢口 紀恵

(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 電子顕微鏡第二設計部

² 許斐 麻美

(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

三次元形式の分析データに対応した多変量解析ソフト 3D SpectAlyze® の紹介と応用例

Multivariate Analysis Software Corresponding to Analysis Data of Three Dimensional Form
Introduction and Application Example of 3D SpectAlyze®

佐藤 拓哉^{*1}, 伊藤 千晶^{*1}, 藤宮 仁^{*1}, 堀込 純^{*2}, 坂元 秀之^{*2}

1. 背景

品質管理の現場では、分析装置から出力された連続的・経時的な測定データをもとに、試料の定量的定性的な評価が行われます。正確な情報を得るために、反復計測や複数条件下での測定が必要となります。測定結果である多変量(多次元)分析データには、成分や量など多くの情報が内在しています。データの特徴によるグループ分けや因果関係の調査のためには、多変量解析によるデータの特徴の把握が不可欠です。

近年、分析装置の高性能・高集積化もあって、多変量解析ソフトウェアの需要が高まっています。ただ、既存の汎用ソフトウェアには様々な手法による解析機能が搭載されていますが、利用者にとっては手法の選択が最初のハードルとなります。

そこで、筆者らは、多次元の分析データに特化した多変量解析ソフトウェア『3D SpectAlyze®』を開発しました。処理する対象を分光蛍光光度計やHPLCの測定データに特化することで、データの取り込みから解析までをシンプルな操作性でユーザーが直観的に利用できることを目指しました。

今回は、3D SpectAlyze®の機能と利用例を紹介いたします。

2. 多変量解析ソフトウェア3D SpectAlyze®について

3D SpectAlyze®は、分光蛍光光度計より得られた三次元蛍光スペクトル(蛍光指紋)や、HPLCのクロマトグラム、またダイオードアレイ検出器(DAD)から得られる三次元クロマトグラム等のデータファイルを取り込み、データの加工やグラフ表示、各種統計解析(多変量解析)を行います。解析結果は画像データあるいはCSVファイルとして出力することができます(図1および図2)。



図1 3D SpectAlyze® 画面構成

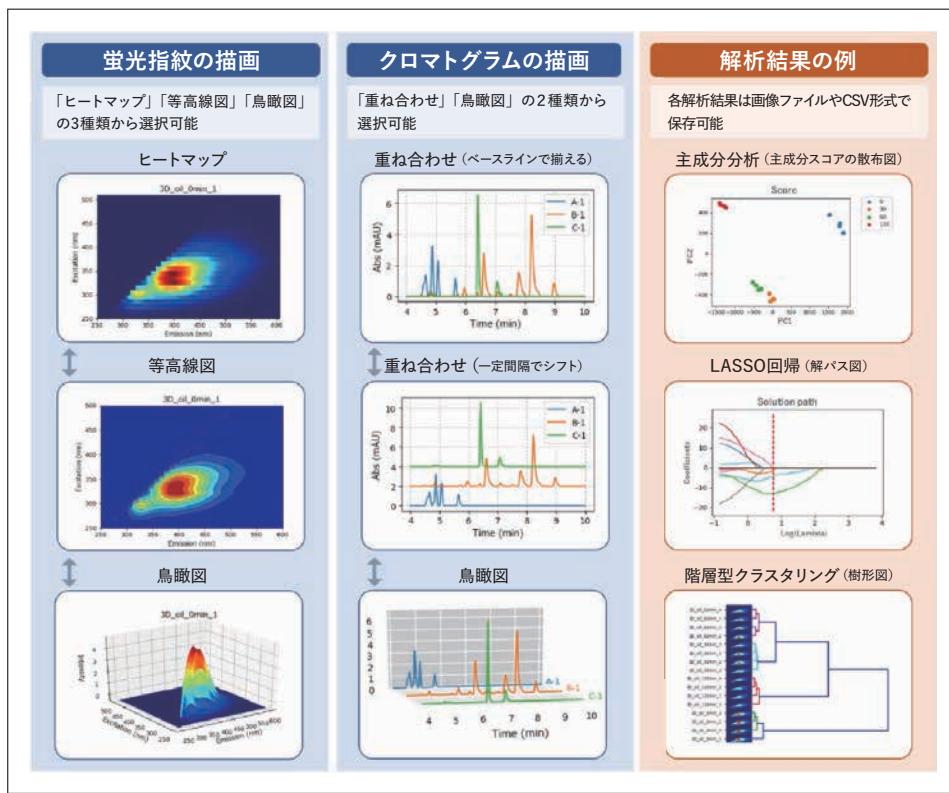


図2 3D SpectAlyze® 出力結果

搭載している主な機能は以下の通りです。

2-1. データ前処理

散乱光の除去・不要領域の除去・正規化など、分光蛍光光度計やHPLCの測定データに特化した前処理機能を搭載しています。前処理後のデータはすぐに各種統計解析画面に反映されます。

2-2. グラフ表示・視覚化

ヒートマップ・等高線図・鳥瞰図・クロマトグラムなど各種グラフ表示機能を搭載しています。

2-3. 多変量解析（教師なし）

(1) 主成分分析：分析データの特徴でグループ分けや産地判別に応用

主成分分析は、情報の損失を最小に抑えつつ、データを縮約する分析手法です。

例えば蛍光指紋の場合、1試料につき数千～数十万もの計測点（蛍光強度データ）を含んでおり、この状態では、試料間の比較が困難です。主成分分析で、項目数を2つあるいは3つにまで縮約し、散布図として描画することで、視覚的に試料間の関係性を把握できます。例えば、産地が既知／不明の試料の計測データを合わせて主成分分析を行うことで、不明試料の産地を判別することが可能です。

(2) PARAFAC：混合試料の成分分離に応用

蛍光物質が混在している試料を蛍光光度計で測定した場合、複数の蛍光物質由来のピークが重なり合った状態で観測されます。PARAFAC (Parallel Factor Analysis) はこの重なり合ったピークを試料中の成分ごとの蛍光データとして分離する手法です。分離後の各ピーク強度を比較することで、試料中の成分と含有量を推測することができます。

(3) 階層的クラスタリング：蛍光指紋の特徴でグループ分類

階層的クラスタリングは、集団の中から性質が似ている試料の分類をする手法です。2試料間で最も距離が近い（=似ている）ものからグループ化し、最終的に1つのグループになるまでグループ同士を連結していきます。連結の過程を樹形図（デンドログラム）で可視化します。

本製品では、デンドログラム上のサンプル名の位置に合わせて、蛍光指紋画像やクロマトグラムを描画するため、グループの特徴が一目でわかります。

2-4. 多変量解析（教師あり）

(1) PLS回帰：予測モデル構築、未知データの予測値算出

全ての測定データを用いて、試料の特徴を説明する項目（種類・濃度など）を予測するモデルを構築します。PLS回帰（Partial Least Squares regression）では、多次元データが持つ情報を少ない次元に圧縮してから予測式を推定するため、蛍光指紋のように測定する波長数が多く、波長間に相関があるようなデータに強いことが特徴です。

(2) LASSO回帰：寄与率の高い波長の選定、予測モデル構築、未知データの予測値算出

LASSO（Least Absolute Shrinkage and Selection Operator）では、試料の特徴を説明する項目（種類・濃度など）と関連の高い特徴点を多次元の測定値の中から自動で選定し、予測モデルを構築します。一般的に、測定したデータを学習し過ぎた（過学習）予測モデルは、未知データへの適応力（予測性能）が低下します。LASSO回帰は、これを回避するため、Cross Validationによって予測性能を確認しながら、予測への寄与率が高い波長の選択を行い、予測モデルを構築できるリーズナブルな手法です。

3. 多変量解析例の紹介

3D SpectAlyze[®]を用いた解析例として、主成分分析・PARAFAC解析による食用油の加熱変化、LASSO解析による蛍光塗料の混合比率の推定を以下に紹介します。

3-1. 食用油の加熱変化における蛍光指紋の主成分分析例

F-7100形分光蛍光光度計を用いて、加熱時間を0, 30, 60, 120分と変化させた際の食用油の三次元蛍光スペクトルを取得しました。この三次元蛍光スペクトルが図1に相当します。加熱時間の変化に伴い、蛍光指紋形状が変化していることが分かります。この変化を3D SpectAlyze[®]の主成分分析法にて解析しました。結果を図3に示します。主成分分析を行うことにより、加熱時間に伴う試料の変化を捉えることができました。図3(a)に示すスコアプロットより、0分から30分にかけて、PC1とPC2の成分の減少が生じ、その後、30分から60分の変化は少なく、60分から120分にかけてPC1の減少とPC2の上昇に伴う変化が確認されました。このとき、PC1の成分は図3(b)に示すPC1のローディングプロットより確認することができました。PC1のローディングプロットは図3(d)に示す三次元蛍光スペクトルの蛍光強度分布と一致していることから、PC1は全体の蛍光強度に相当すると考えられます。つまり、加熱時間の経過と共に、全体の蛍光強度が減少していることを反映しています。一方、PC2は、励起波長320 nm, 蛍光波長400 nm付近の値が負の値となっています。PC2の変化として、0分から30分にかけてPC2のスコアが減少していることからこの成分が増加し、60分から120分にかけてPC2のスコアが上昇していることから、この成分が減少していることが分かります。

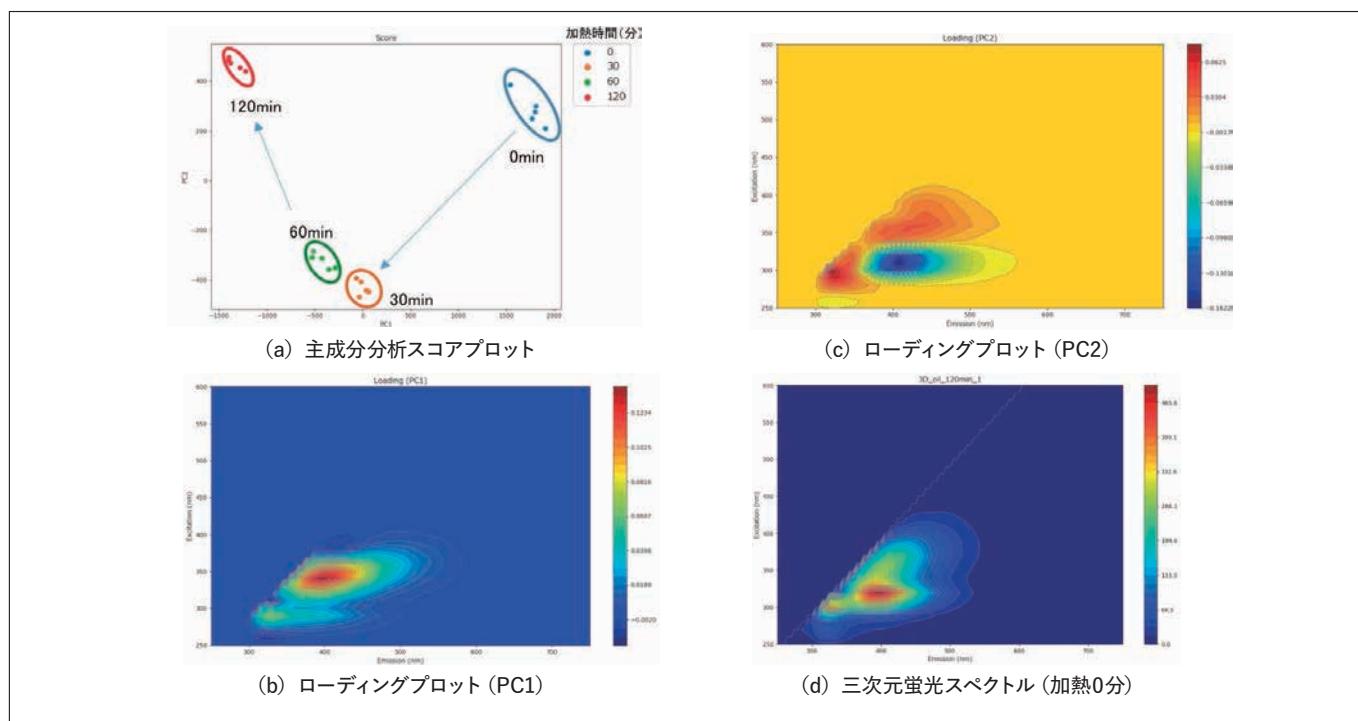


図3 主成分分析結果

このように主成分分析にて算出したスコアを散布図として描画することで、加熱時間による食用油の変化を視覚的にとらえることが可能となります。

3-2. 食用油の加熱変化における蛍光指紋のPARAFAC解析

PARAFAC解析は、蛍光指紋の重なり合ったピークを試料中の成分ごとの蛍光データとして分離する手法です。分離後の各ピーク強度を比較することで、試料中の成分や含有量を推測することができます。食用油の蛍光指紋のPARAFAC解析を図4に示します。3つの成分に分離することができました。文献¹⁾より、Component 1と3は、酸化生成物由来、Component 2はビタミンE由来と推測されました。PARAFAC解析で算出された各成分のスコア値を比較することで、成分の相対的な変化を確認することが可能となります。

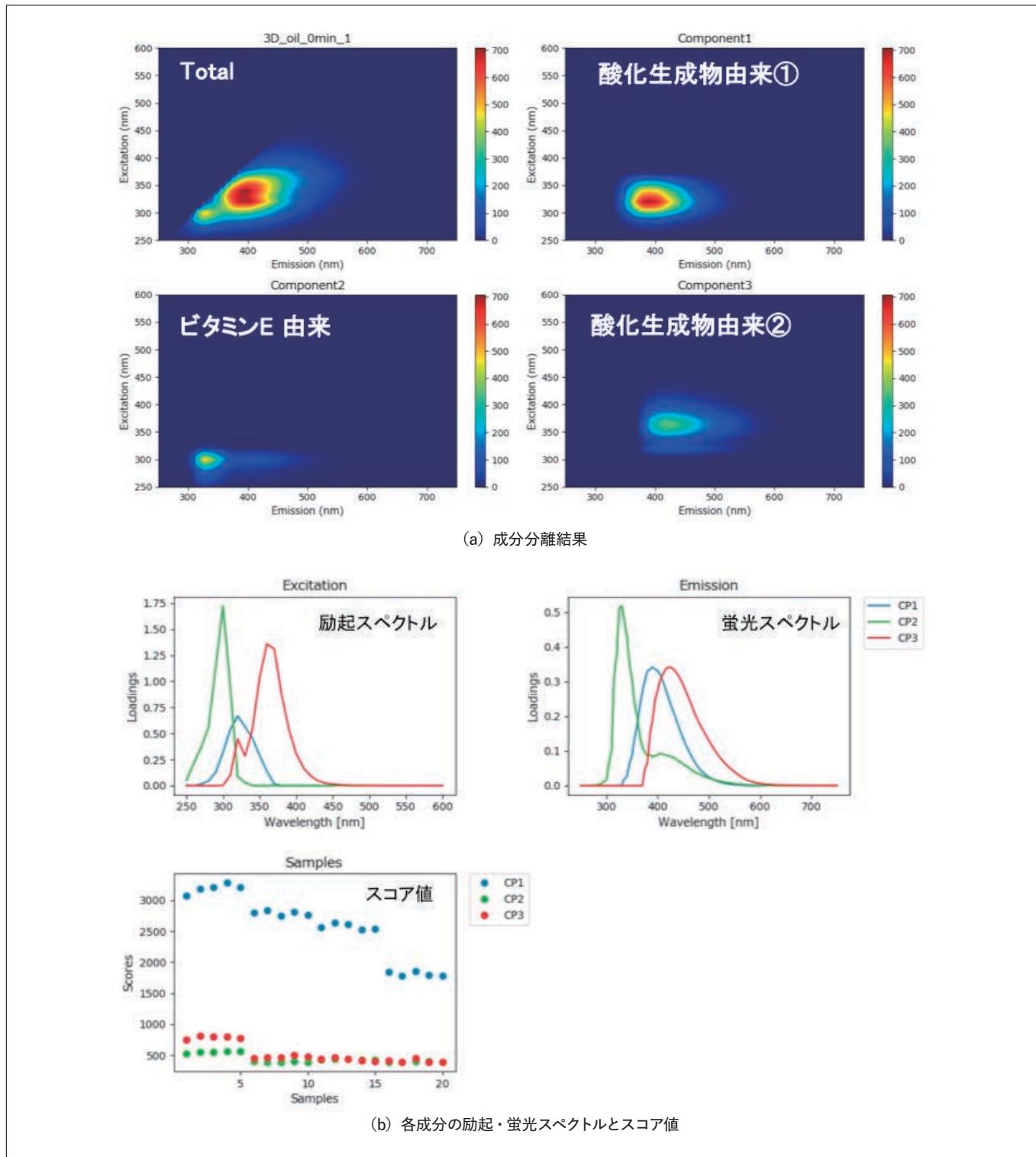


図4 PARAFAC解析結果

3-3. LASSO 解析による蛍光塗料の混合比率の推定

混合比率を変えた2種類の蛍光塗料(黄色:0%~100%, 赤色:100%~0%, それぞれ合計100%となるように混合)の蛍光指紋を測定し、LASSO 法にて混合比率を推定しました。図5に混合比率を変えた際の蛍光指紋を示します。0%は、黄色塗料が0%, 赤色塗料が100%であり、励起波長550 nm, 蛍光波長600 nm付近に赤色塗料由来の蛍光指紋が確認されます。混合比率を変え、100%は、黄色塗料が100%, 赤色塗料が0%であり、励起波長450 nm, 荧光波長515 nm付近に黄色塗料由来の蛍光指紋が確認されます。

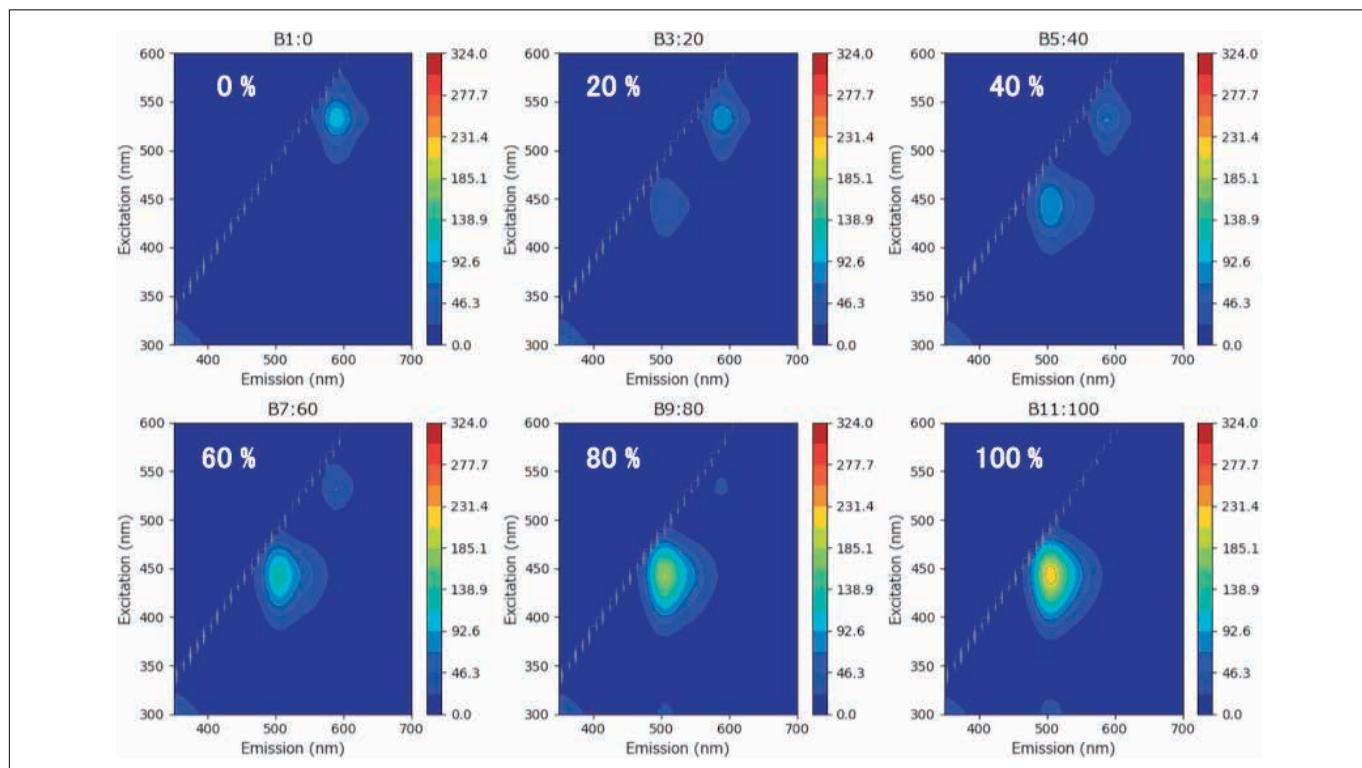


図5 混合比率を変えた蛍光塗料の三次元蛍光スペクトル

続いて、LASSO 解析にて混合比率を推定するため、各試料5回測定、合計55データのうち、3回分をモデル作成のための Calibrationデータ、2回分をモデル検証のための Validationデータに分類しました(図6 参照)。

LASSO では、試料の特徴を説明する項目(種類・濃度など)と関連の高い特徴点(波長)を多次元の測定値の中から自動で選定し、予測モデルを構築します。今回、蛍光指紋の波長数は約7,100波長ありました。LASSO 解析で混合比率を推定するために有効な波長として75波長が抽出されました。3D SpectAlyze®のLASSO 解析では、三次元蛍光スペクトルと同様に励起波長・蛍光波長・抽出された波長の係数を表示することができる、解析に有効な波長を視覚的にとらえることに有効な表示方法を備えています。

抽出された各波長に対して係数が導き出され、モデル式から混合比率を推定します。モデルを作成した既知データでの検証では、既知の値と算出した値の相関性は $R^2=0.9997$ 、モデル未使用のデータでの検証では、 $R^2=0.9992$ と良好な結果が得られました。

通常、定量値を得る際には、1つの波長に対する検量線から算出しますが、LASSO 解析や PLS 解析を用いることで、多波長の検量線を作成し、より精度の高い目的値を得ることができます。

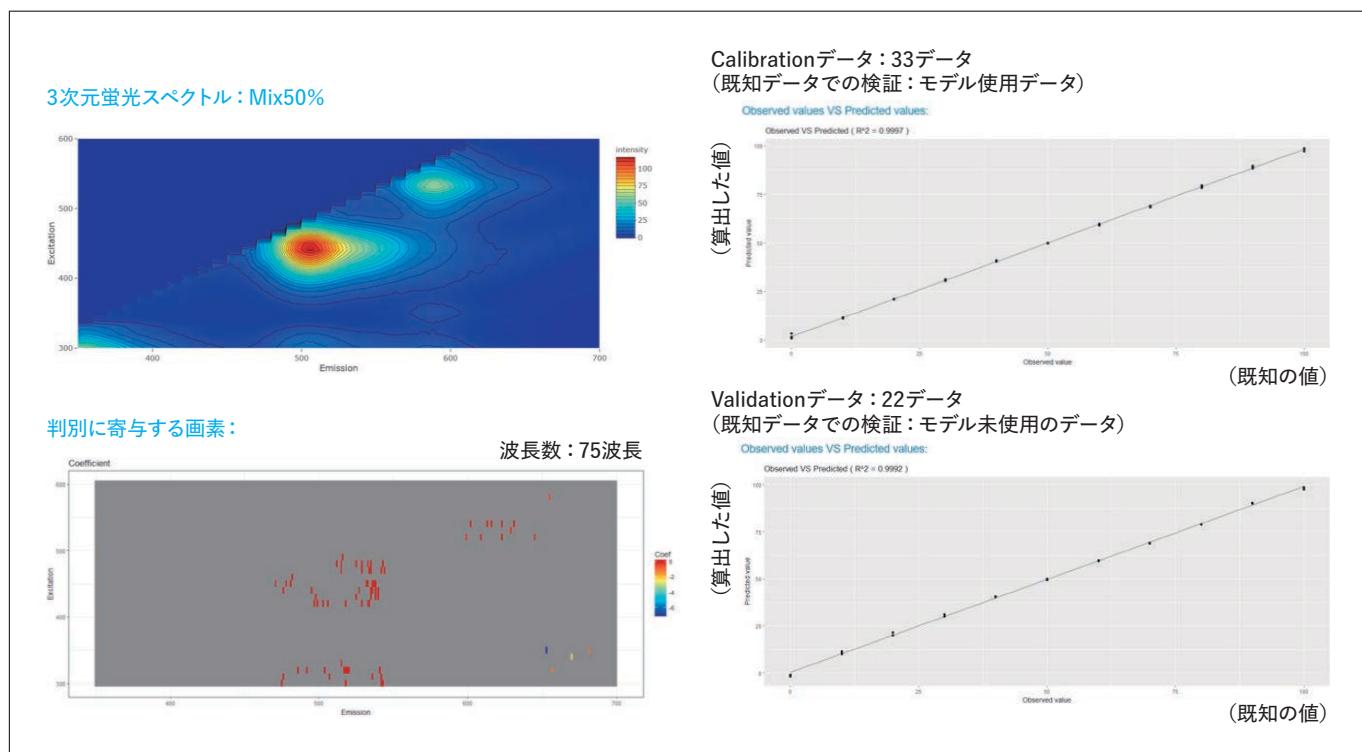


図6 LASSO法による蛍光塗料の混合比率の推定

4. まとめ

分析装置の性能は日々向上し、短時間で多くの情報が得られるようになりました。その反面、データ解析に長い時間を必要としますが、多変量解析は膨大な量のデータを短時間に明瞭にできます。3D SpectAlyze[®]は多変量解析をより簡便に扱うことができる目的としたソフトウェアで、今後幅広い分野で使われる多変量解析をより身近に扱うことができるツールです。

参考文献

- 1) J. Christensen, L. Nørgaard, R. Bro, and S. B. Engelsen, *Chemical reviews*, **106** (6), 1979 (2006).

1. “3D SpectAlyze”は、株式会社ダイナコムの日本国における登録商標です。

著者紹介

¹佐藤 拓哉, 伊藤 千晶, 藤宮 仁
(株)ダイナコム

²堀込 純, 坂元 秀之
(株)日立ハイテクサイエンス

ChromSwordを用いたAIによるHPLCメソッド開発法の紹介

Introduction of the HPLC Method Development by AI Using ChromSword

清水 克敏

1. はじめに

HPLC のメソッド開発には、サンプル特性の把握、目的の対象物質に合わせた前処理方法の検討、分離モードや検出器の選択、さらに測定においては移動相や、流量、カラム温度といったパラメータを最適化するなど、いくつもの検討が必要である。これらは従来、測定者の経験や試行錯誤によるため多くの時間を要している。また分析結果を確認してから次の条件検討を行うため、自動化が難しい。一方、クロムソードジャパン(株)より提供されるソフトウェアChromSwordはAIによるメソッドの自動検討が可能で、人の介在時間を大幅に削減することが期待される。今回、ChromSword を用いてメソッド開発を行う方法について紹介する。

2. 特長

ChromSword は AI がパラメータを自動的に検討し、メソッド開発する ChromSwordAuto、開発したメソッドの頑健性を評価する AutoRobust、測定したデータを閲覧、レポートを作成する ReportViewer、測定対象の構造式からの物性予測もしくは実際の分析結果からメソッドをシミュレーションする Offline といったソフトウェアから構成される。ChromSword には現在、日立高速液体クロマトグラフChromaster® 及び ChromasterUltra® Rs を直接制御することができる Hitachi Edition がラインアップされている。これより各ソフトウェアの特長について解説する。

(1) ChromSwordAuto

ChromSwordAuto では HPLC を制御し、AIアルゴリズムで自動的に HPLC のグラジエント条件を作成することが可能である。グラジエント条件の検討にはいくつかの手法があり、3回程度の測定で検討する迅速最適化、15～25回程度の測定で検討するサンプルプロファイリング、メインピークとの分離に着目して検討する最大ピークの分離といったモードがある。ここでは迅速最適化モードについて評価した結果を示す。試料には DNPH 誘導体化アルデヒド13成分混合標準試料を、カラムは ODS とし、HPLC は日立高速液体クロマトグラフChromaster® のフォトダイオードアレイ検出器を使用して測定した。移動相はアセトニトリルと20%テトラヒドロフラン水溶液を用いた。図1に迅速最適化モードの分析結果を示す。13成分がAIアルゴリズムによりグラジエント条件を検討し、3回の測定で各成分を分離することが可能であった。

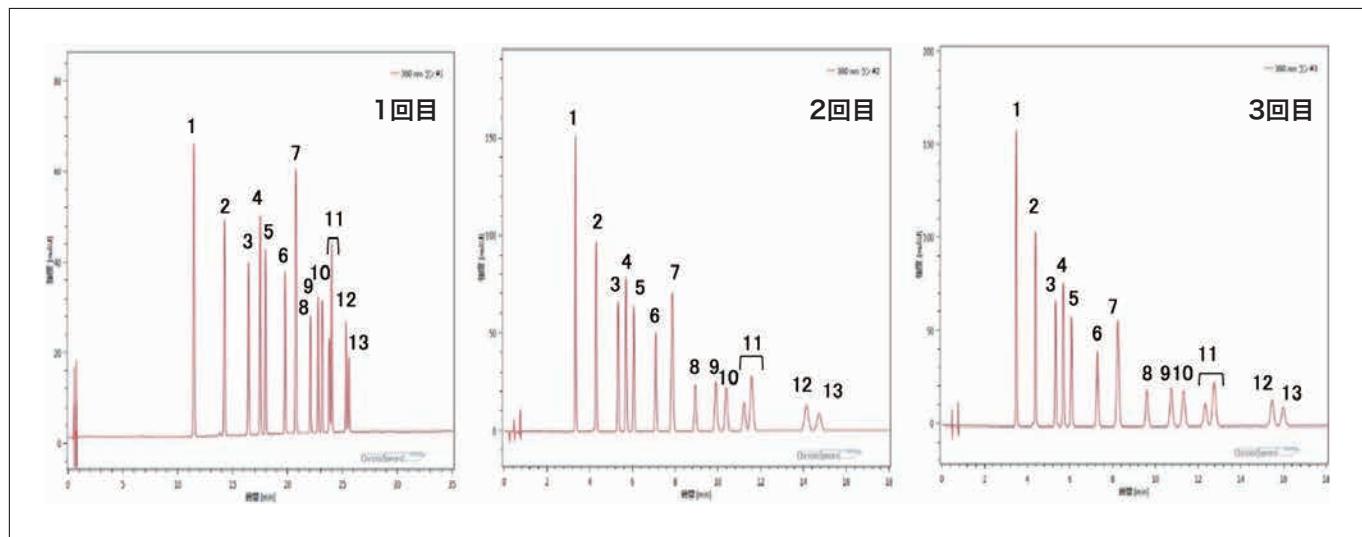


図1 ChromSwordAuto 快速最適化 各ステップのクロマトグラム

(2) AutoRobust

AutoRobust では頑健性評価として、分離性能に影響を与える各パラメータを自動的に変更しながら測定する。測定した結果からピークを確認したのち変化パラメータの統計的処理を行い解析する。解析結果はデザインスペースを構築することによりメソッドの信頼性を瞬時に確認することが可能である。例えば異なる分析装置間で同じ条件で測定しても、システムの容量などの違いにより、得られた分析結果に差異が生じることがある。そのためメソッドの頑健性評価は重要である。

図2はNBDFで誘導体化したアミノ酸の標準サンプルをAutoRobustで測定した結果である。ChromSwordAutoであらかじめ基本メソッドを作成し、AutoRobustで変化パラメータとしてカラム温度と溶媒条件を選択した。デザインスペースでは基本メソッドを中心としてカラム温度と有機溶媒を変化させたメソッドでの分離度を示している。分離度が良好な場合は緑色で表示され、赤く表示された部分は分離度が悪くなる。今回の条件において、基本メソッドは緑色部分にあり、基本メソッドの頑健性が高いことを確認することができた。

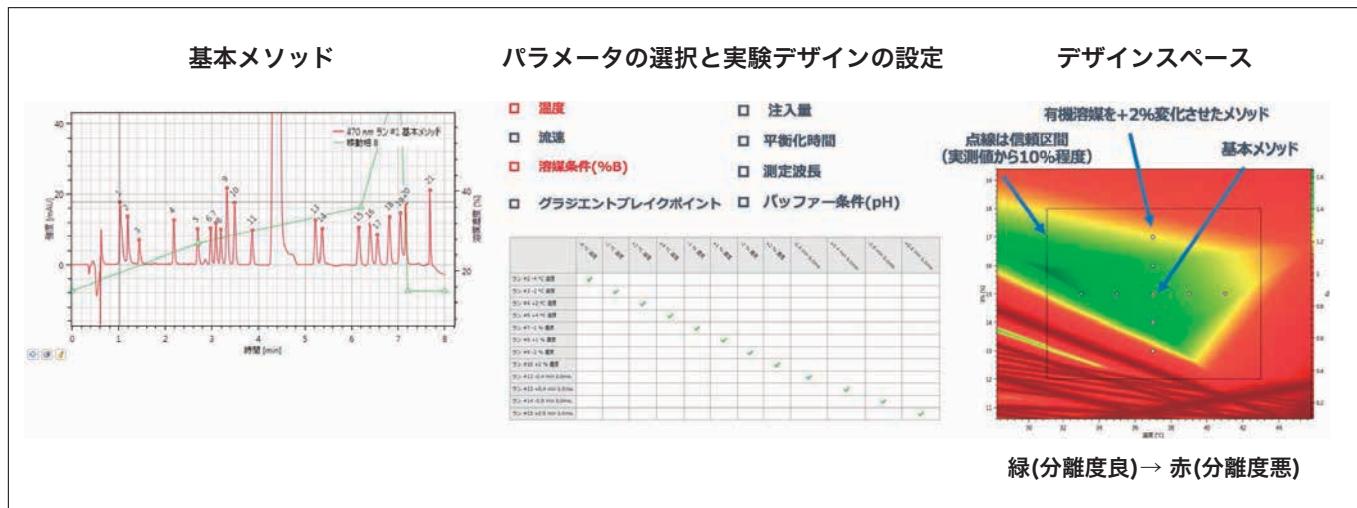


図2 AutoRobustによるHPLCメソッドの頑健性評価

(3) ReportViewer

ReportViewer では得られたクロマトグラムを解析し、レポートを作成することが可能である。図3に示すようにクロマトインドウやピーク詳細など必要な項目が一画面上に表示されたユーザインターフェースとなっている。クロマトグラムやスペクトルの重ね合わせ、データの3D表示が可能であり、AutoRobust の結果は ReportViewer で解析する。



図3 ReportViewerによる分析結果の表示

(4) Offline

Offline では構造式を入力することで物性を予測し、ソフトウェアに登録されたカラムデータベースをもとにカラム、移動相、有機溶媒比率といった条件をシミュレーションすることが可能である。実際に HPLC で分析をする前にクロマトグラムを確認できることから条件検討の時間短縮が期待できる。図4に Offline によるシミュレーションした例を示す。構造式を入力することでカラムと移動相を選択し、予測される結果を確認することが可能である。



図4 Offlineによる分析結果のシミュレーション

なお、構造式が未知な場合は2回以上の実際の測定結果を入力することによりシミュレーションを実施する。

3. まとめ

ChromSword の各ソフトウェアにより AI 支援で HPLC のメソッド開発を自動化する手法を紹介した。ChromSword は日立高速液体クロマトグラフ Chromaster® 及び ChromasterUltra® Rs を直接制御することが可能であり、AI による自動化は人の介在時間を削減し HPLC のメソッド開発をより効率的に実施することが可能である。

1. "Chromaster®", "ChromasterUltra® Rs" は株式会社日立ハイテクノロジーズの登録商標です。

著者紹介

清水 克敏

(株)日立ハイテクサイエンス 応用技術部

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

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 2019 VOL. 62 No. 1

発行日 2019年3月29日 発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ
編集人 多持隆一郎 TEL 105-8717
発行人 内田憲孝 東京都港区西新橋1-24-14
電話(050)3139-4298(ダイヤルイン)

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