

**HITACHI**  
Inspire the Next

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

MARCH 2020

Vol. **63** No. 1

March 2020  
Vol.63 No.1

5522

## 《コラム

## キャピラリー電気泳動による糖鎖プロファイリング

鈴木 茂生

## 《研究報文

5527

## ナノプローブ技術標準化の動向

井藤 浩志

5533

## MirrorCLEM：シームレスな光-電子相関顕微鏡システム

豊岡 公德

## 《技術解説

5539

## 異物検知自動化システム「EM-AI」

坂上 万里, 陳 偉健

5544

高機能熱分析装置NEXTA<sup>®</sup> STAシリーズ

高橋 秀裕, 柴田 健一

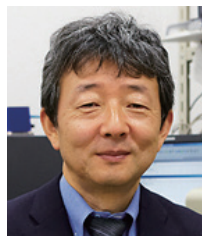
5549

## 日立ハンドヘルド型・モバイル型元素分析装置のご紹介

鍋島 貴之

# キャピラリー電気泳動による糖鎖プロファイリング

Profiling of Glycans by Capillary Electrophoresis



近畿大学 薬学部  
薬品分析学研究室  
教授

鈴木 茂生 博士(薬学)

## 1. 生体を構成する糖鎖の世界

糖鎖はタンパク質や脂質などと結合し、組織や細胞表面に分布して、様々な生理機能を担っている。近年、オミックス情報が医療や創薬に活用されているが、その全てに糖鎖が関わっている。

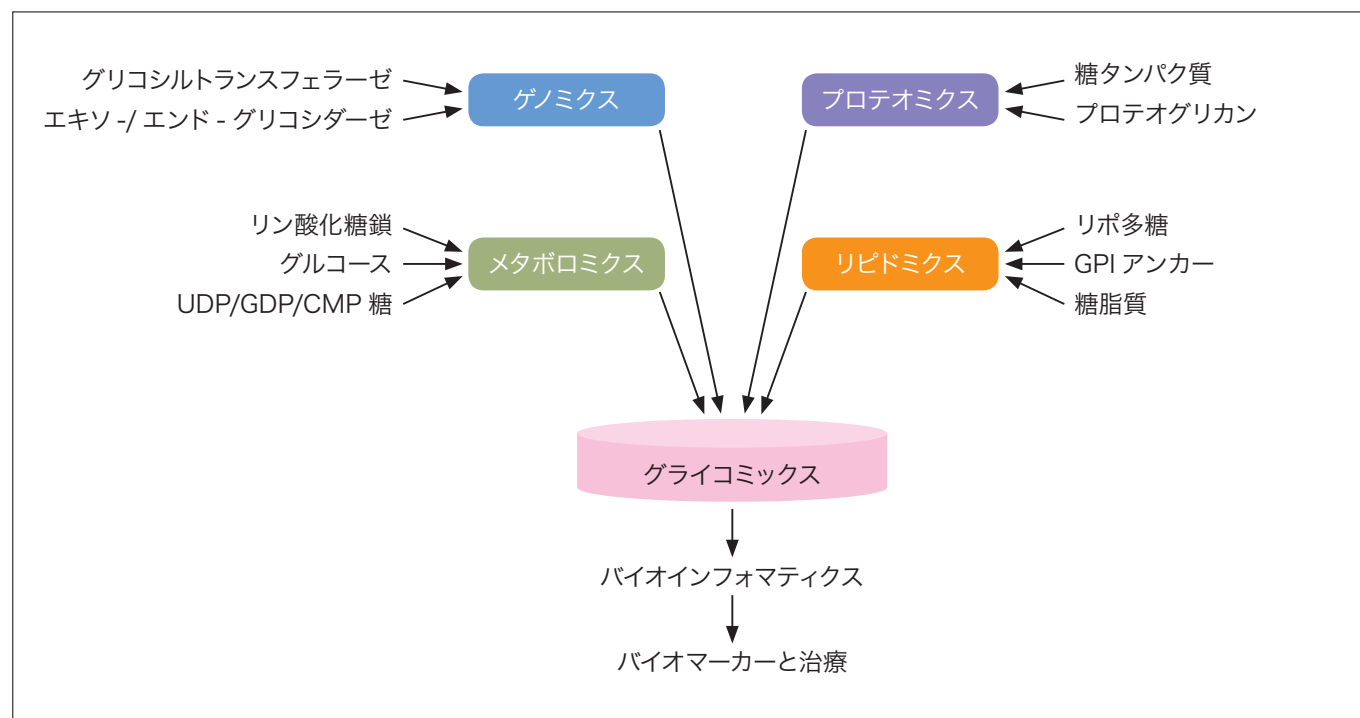


図1 オミックスと糖鎖情報(Hart, G. W.; Copeland, R. J. *Cell* 2010, 143, 672–676.より)

生体内で糖鎖や多糖複合体がどのような形で存在しているかを図2に示す。二糖単位の繰り返し構造をもつグリコサミノグリカンの多くはコアタンパク質と結合し、関節や皮膚の細胞外マトリックスとして身体の柔軟性を維持している。糖脂質は細胞膜の重要な構成要素である。さらに GPIアンカーは酵素などを細胞につなぎ止める役割をもつ。

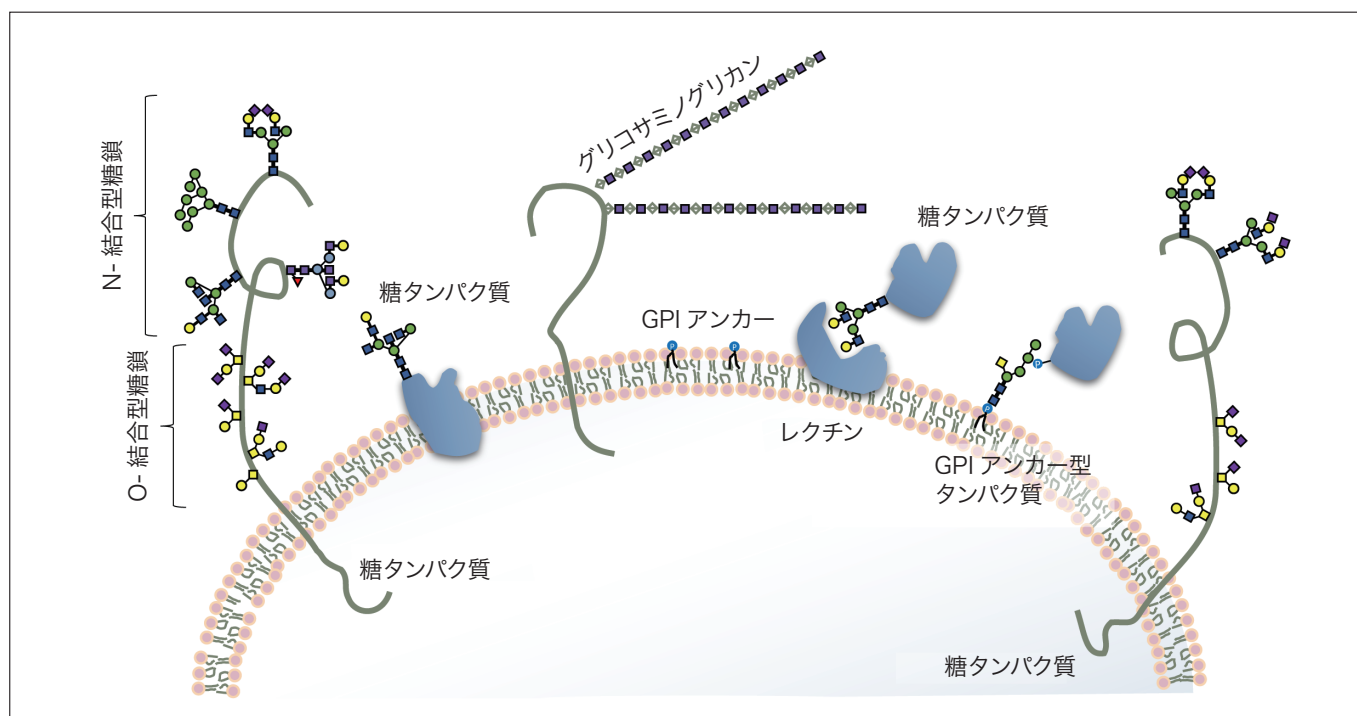


図2 細胞に存在する糖鎖の存在状態

ここで話す糖タンパク質の糖鎖はタンパク質のアスパラギン、またはセリンやトレオニンに結合し、それぞれ多様な構造を有する。糖タンパク質糖鎖の種類は数百種類と言われ、糖鎖と生理機能との関連は興味深い。

癌、アルツハイマー型認知症やハンチントン病など、重篤な疾患では病態の進行に伴って糖タンパク質の糖鎖構造が変化する。特定の糖鎖の出現や量的な変動はバイオマーカーとして診断の指標となる。近年ではバイオ医薬品が開発され、癌やリウマチ、C型肝炎、糖尿病など、様々な難治性疾患の治療薬として、その市場規模は拡大しつつある。これら糖タンパク質製剤に付加する糖鎖の構造を制御することは難しく、細胞の選択や培養条件を糖鎖からも注意深く選抜する必要がある。特に非ヒト型糖鎖に含まれるN-グリコシルノイラミン酸や $\alpha$ -結合ガラクトースはヒトでは遺伝的に欠損している。これら人体にとって免疫原性となる糖鎖の付加は生物製剤の価値を損なう危険性がある。

抗体医薬品が薬理効果を発揮するためには、本来の結合親和特異性に加えて、作用発現に重要なエフェクター機能として抗体依存性細胞障害活性(ADCC活性)や補体依存性細胞障害活性(CDC活性)が必要である。これらエフェクター活性と糖鎖の構造が関連している。したがって、抗体医薬品開発では、糖鎖構造の制御が重要な要素である。

糖タンパク質医薬品の有効性及び安全性を確保するためには、糖鎖の恒常性を確保することが重要である。しかし、糖鎖は小胞体からゴルジ体に分布する一連の糖関連酵素が協奏的に作用して合成されるので、糖鎖の生合成を制御することは極めて困難である。

## 2. グライコプロテオミクスとグライコミクス

糖タンパク質に結合している糖鎖の構造は多様で、結合部位によって糖鎖が異なることがある。さらに糖鎖構造は類似しているものが数多く存在し、その糖鎖の含量は4桁の幅があるといわれる。したがって、糖鎖解析を行う場合に、含量の下限をどこに設定するかで、データの質や作業効率は大きく異なる。

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動などを用いて試料中のタンパク質を分子サイズや等電点に従って分離する。糖タンパク質のバンドを適切なプロテアーゼで消化し、得られた糖ペプチド混合物を液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS)等により糖鎖結合部位ごとの糖鎖プロファイルを解析する。質量分析における糖ペプチドの感度は低く、イオン化条件にも依存する。そこで、通常は糖ペプチドから酵素<sup>(\*)1</sup>や化学的手法<sup>(\*)2</sup>によって糖鎖を遊離させる。また、糖含量が低い場合は、糖鎖を特異的に抽出<sup>(\*)3</sup>する操作を加えることが多い。得られた糖鎖混合物は質量分析で解析することもあるが、糖鎖によって感度が異なる。そこで蛍光標識化を行って蛍光性の糖鎖誘導体に導き、HILICモードのHPLCなどで分析する(図4)。分離した糖鎖はピーク毎に回収され、エキソグリコシダーゼとMS<sup>n</sup>解析やレクチンアフィニティー分析を組み合わせた構造推定ならびに<sup>1</sup>H-NMRや完全メチル化分析などを用いて、糖鎖構造を決定する。質量分析や蛍光検出の感度は高く、ピコ( $10^{-12}$ )モルオーダーの解析が可能である。一方、NMRは信頼性の高いデータを与える反面、マイクロ( $10^{-6}$ )モル量の精製した糖鎖を必要とする。

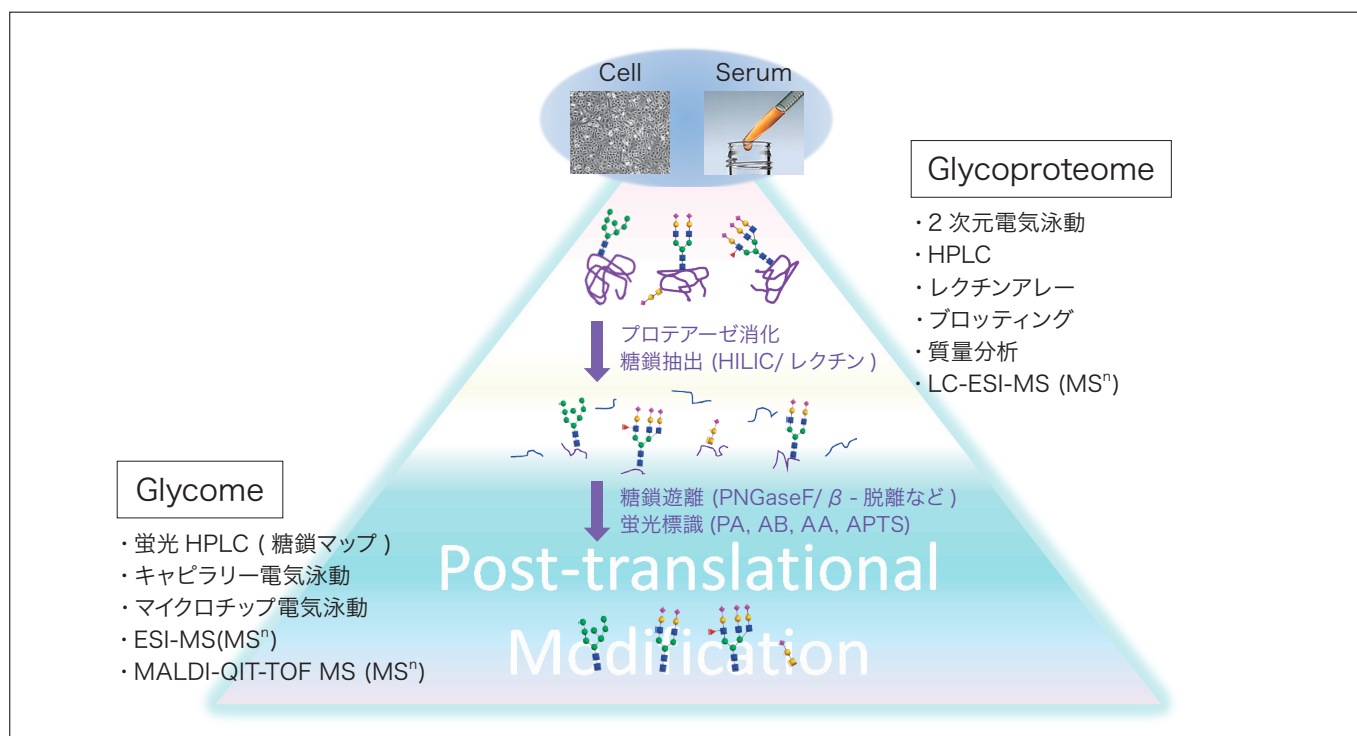


図3 グライコプロテオミクスの解析の流れと使用される分析技術

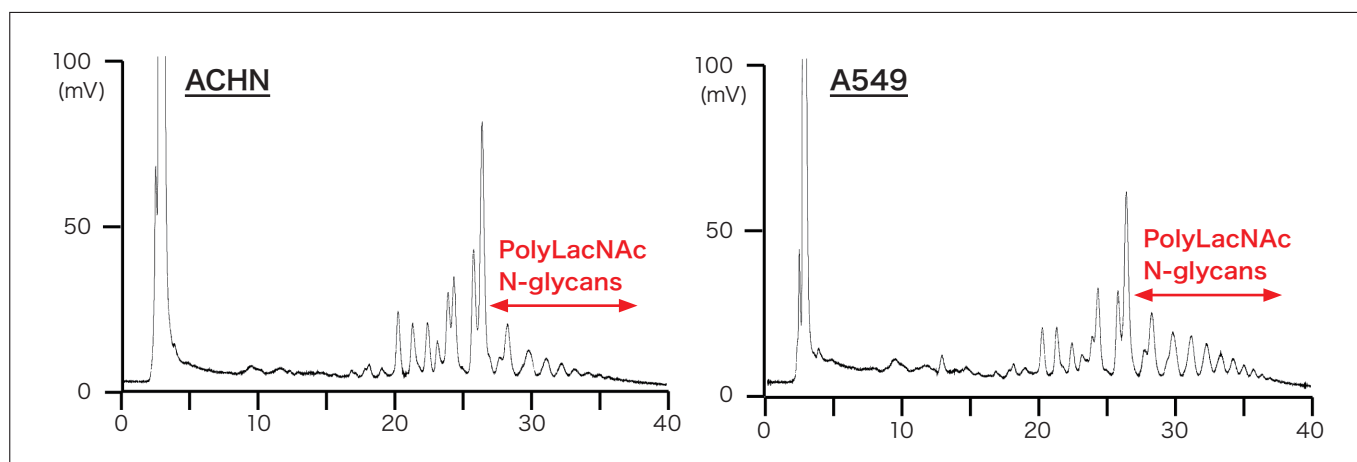


図4 2種類のがん細胞より調製したオリゴ糖の違い。糖鎖パターンは類似しているが糖鎖含量は異なる。

### 3. グライコプロテオミクスとキャピラリー電気泳動

LC-MS をベースとする糖鎖プロファイル解析では個々の糖鎖構造を明らかにするために、糖鎖の特異的な濃縮、レクチン結合解析、エキソグリコシダーゼ消化などを組み合わせる必要がある。通常、存在量の大きな糖鎖だけを選んだとしても、数十種類の糖鎖をそれぞれ分画し、酵素反応をかけては分離という操作を繰り返さなければならない。また、質量分析における糖鎖の検出感度は低く、酸性糖鎖と中性糖鎖では測定モードを変える必要がある。

一方、糖鎖の還元的アミノ化による蛍光標識反応では糖鎖に1か所しか存在しない還元末端を蛍光剤で標識する。糖鎖の還元末端の構造は共通しているため、分離分析におけるピーク強度は糖鎖のモル分布を反映しており、定量的である。このことは、糖鎖の量やその増減を評価する上で極めて重要な特徴である。

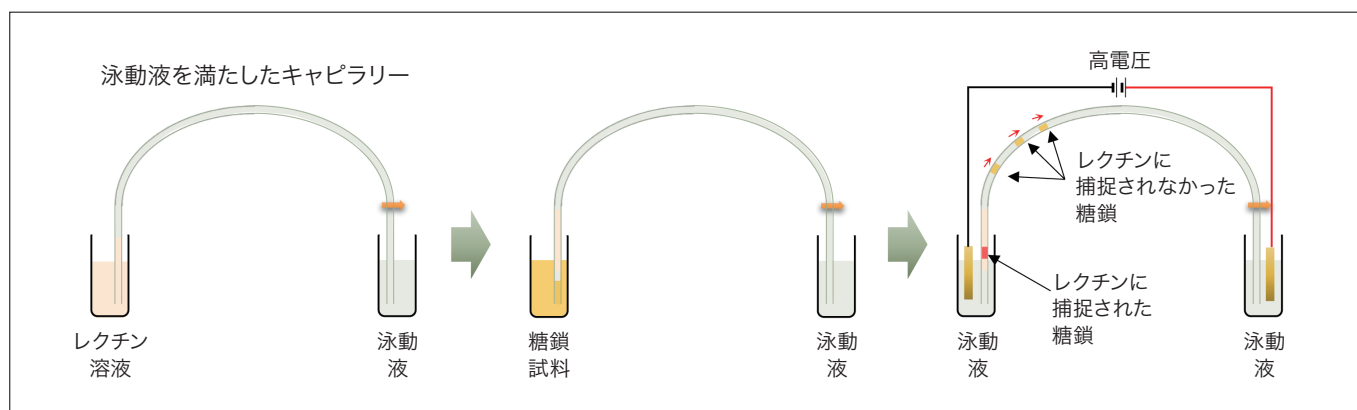


図5 レクチン部分導入キャピラリー電気泳動法の原理。レクチン溶液に続いて糖鎖試料を導入し、電圧を印加すると、マイナスの電荷をもつ糖鎖はレクチン層を通過し、一部の糖鎖が特異的にレクチンに捕捉される。

レーザー励起蛍光検出-キャピラリー電気泳動 (LIF-CE) は高感度でハイスループットな糖鎖の定量的プロファイリングを可能にする。キャピラリー電気泳動の特性として高分離能を上げることが多いが、むしろ、その長所は中性の緩衝液でも良好な分離が得られるのでオンラインの酵素反応を併用できることに加え、試料が電荷当たりの分子サイズに応じて分離されるので、結果の解釈が容易な点にあると考えられる。例えば部分導入法(図5)では、キャピラリーの入口側(全長の1/10程度)に酵素や試薬の溶液を注入し、その後で試料を導入して、試料成分が酵素や試薬層を通過するように泳動させることで、反応生成物の分離パターンが得られる。我々は今までにレクチン<sup>(\*)3)</sup>やエキソグリコシダーゼ<sup>(\*)4)</sup>を本研究に用いたところ、レクチンごとの分離パターンから糖鎖構造の確認が可能であった。また、エキソグリコシダーゼを用いると、糖鎖は非還元末端側から消化されるので、反応後のオリゴ生成物を分離・検出できる。得られた分離パターンを標準糖鎖の分離データと比較すれば、かなり正確に存在する糖鎖を言い当てることができる。糖鎖分析では、糖鎖の含量分布が問題であるが、これに対して大規模濃縮法を応用することができる。すなわち、注入プログラムを変更するだけで、同じ試料を1,000倍近い感度で分析することができた。この方法を用いることで、キャピラリー電気泳動では0.1%未満の微量の糖鎖でも特異的に観察することができる。

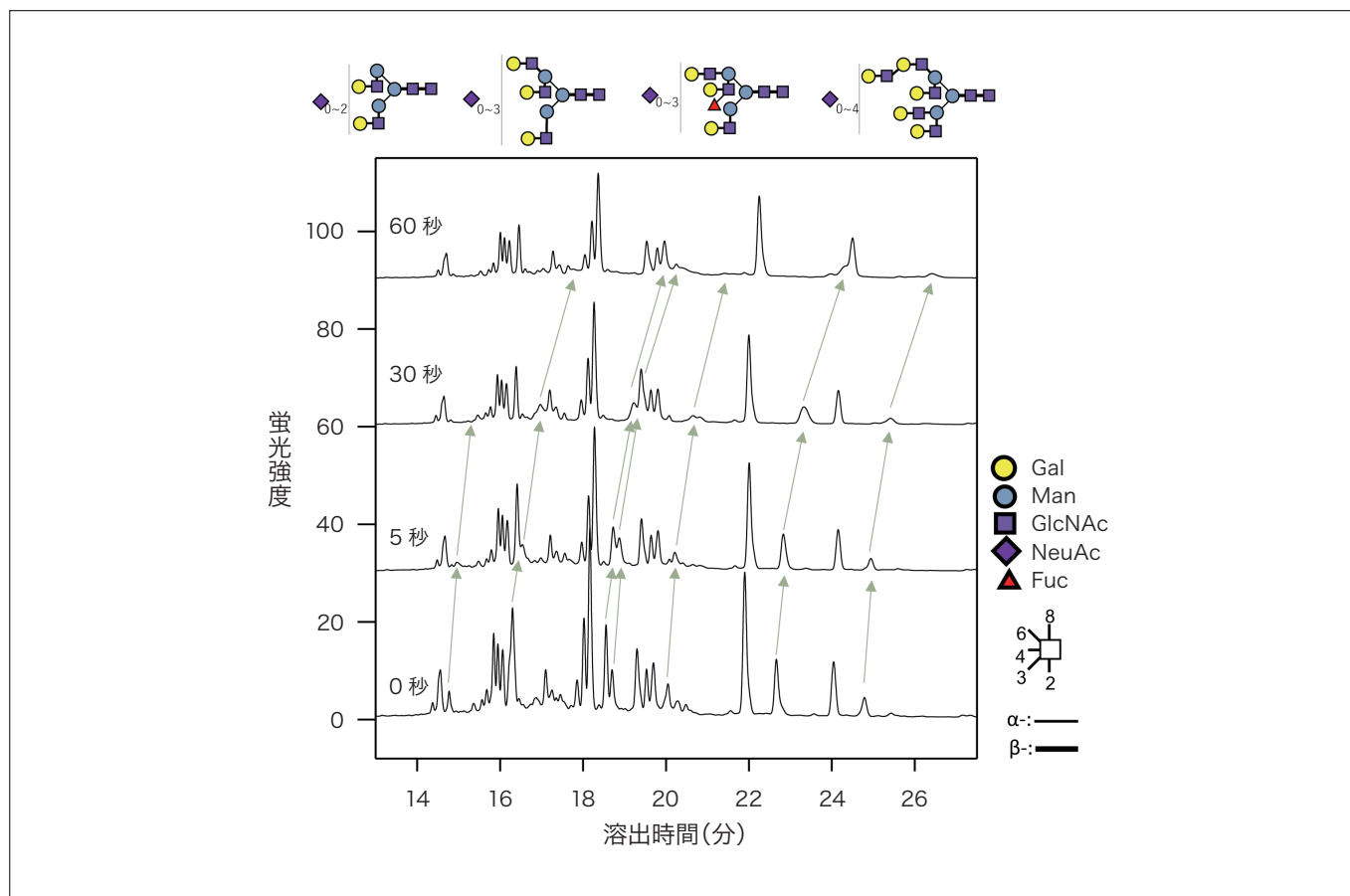


図6 部分導入キャピラリー電気泳動法でフコース認識レクチンの濃度を変えながら分析した例、レクチンの注入時間の増加とともにフコースが結合した糖鎖の保持時間が遅延している。



## 4. おわりに

キャピラリー電気泳動は優れた糖鎖プロファイリング技術であることを述べた。ところが市販の装置はどれもキャピラリーの入口部分の温度制御ができない。そのため、予想されるよりも多量の酵素が必要であり、さらに糖鎖が酵素層を通過する間、電圧を下げて接触時間を増やすなど工夫が必要であった。部分導入法に適した装置が開発されれば、キャピラリー電気泳動の応用範囲が拡大し、糖鎖分析に限らず、様々な用途への適用が可能となる。是非、機器メーカーとして、本分野への参画を願っている。

### 脚注

- (※ 1) ガラクトシダーゼやマンノシダーゼのようなエキソグリコシダーゼ、ペプチド N-グリカナーゼのような糖鎖結合アミノ酸アミダーゼ、糖鎖を還元末端残基を残して加水分解するエンドグリカナーゼなどが知られる。O-結合糖鎖遊離酵素は基質特異性が高く、糖鎖遊離酵素としては利用できない。
- (※ 2) 糖鎖の化学的遊離反応として、ヒドラジン、アンモニア分解などがある。それぞれ特徴があり、オールマイティーといえる方法がないのが現状である。
- (※ 3) レクチンとは糖鎖と特異的に結合する性質を有するタンパク質の総称である。還元末端残基のみを認識するものや、糖鎖の分岐構造を認識するものもあり、現在 40 種類ほどが市販されている。
- (※ 4) エキソグリコシダーゼとして、 $\alpha$ -N-アセチルノイラミニダーゼ、 $\alpha$ -フコシダーゼ、 $\alpha$ -/ $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -/ $\beta$ -マンノシダーゼ、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼなど、糖鎖解析に必要なエキソグリコシダーゼはすべて購入可能である。

# ナノプローブ技術標準化の動向

## Standardization of Nanoprobe Technology



産業技術総合研究所  
計量標準総合センター 分析計測標準研究部門  
主任研究員

井藤 浩志

### 1. はじめに

ナノプローブ技術は、トンネル顕微鏡から始まったが、原子間力による制御技術が発明され、多彩な材料計測が可能になってきた。それとともに産業界でも徐々に利用されるようになり、2000年頃から標準化の要請が高まってきた。初期の標準化は、米国の標準化団体 ASTM (E42) で開始されており、1996年に ASTM E1813-96 (Standard Practice for Measuring and Reporting Probe Tip Shape in Scanning Probe Microscopy, 2007年に改定され2016年に廃止) が発行されている。この時点で、基本的な探針形状の基本要素は網羅されている。また、探針先端が横に広がる探針をもつ、フレアプローブ等が記載されていることから、線幅の測長をはじめとした半導体微細加工分野での利用が想定されていることがうかがえる。その後、2004年に ISO の表面分析分野の標準化技術委員会の中に、プローブ顕微鏡に関する標準化委員会 (ISO TC201 SC9) が作られ、本格的な規格化が開始された<sup>1-9)</sup>。ここでは最初に用語集の作成が行われ、その後、校正技術、測定技術の順に標準化が進みつつある。用語については、電子分光に関する用語集 ISO18115-1 に続く形で、ISO18115-2としてプローブ顕微鏡用語集が作られ、日本規格協会 (www.jsa.or.jp) から販売されるとともに、WEB でも公開されている。走査型プローブ顕微鏡 (SPM) に関連する規格の多くは、ISO TC201 (表面化学分析の技術委員会) 内の SC 9 (プローブ顕微鏡小委員会) で行われている。現在、審議されている規格は、下記の WEB ページ

<https://www.iso.org/committee/354756.html>

<https://www.iso.org/committee/354756/x/catalogue/p/0/u/1/w/0/d/0>

で参照することができる。また、標準化にあたって、国際協力組織である Versailles Project on Advanced Materials and Standards (VAMAS) 等で国際比較が行われることがある。VAMAS のプローブ顕微鏡に関連する Technical Working Areas は、主に TWA2 と TWA29 が該当し、下記の WEB ページ

<http://www.vamas.org/>

<https://www.nims.go.jp/vamas/>

には、標準化の経緯等に関する有用な資料が、一部、公開されている。本文では、代表的な走査型プローブ顕微鏡技術に関する規格を紹介する。スペースの都合で、SPM で重要と思われる規格をピックアップして紹介したい。

## 2. SPMに関連する主要な国際規格

### 2-1. 用語集 ISO 18115-2:2013

規格作りに際して、最初に用語集が作られることが多い。これは、ISO の技術委員会で規格作りを進める上で、用語が定義されていないと誤解を招くからである。すでに、分光分析分野の用語集があり、これに続く形で Part 2 として、SPM 用語集が作成された。下記のような光学界面分析に関する用語集 (Part 3) も整備されつつある。

・ Surface chemical analysis — Vocabulary —

Part 1: General terms and terms used in spectroscopy

Part 2: Terms used in scanning-probe microscopy

Part 3: Terms used in optical interface analysis

ISO の規格書は日本規格協会 (www.jsa.or.jp) から購入可能であるが、用語に限り下記の WEB で公開されている (下記以外にも、NPL, AVS, EMSL 等でも公開されている)。



<https://standards.iso.org/iso/18115/>

[https://www.aist.go.jp/aist\\_e/dept/iso.html](https://www.aist.go.jp/aist_e/dept/iso.html)

また、ISO 用語集の Part 1、および、Part 2については、JIS K 0147-1:2017、JIS K 0147-2:2017として翻訳 JIS 化も行われている。上記の用語集は、学術論文を含む広範囲の用語を含むため、SPM 用語の辞書としても有用である。

## 2-2. 計測システムの校正 ISO 11952:2019

### Determination of geometric quantities using SPM: Calibration of measuring systems

スキャナーの校正については、ISO 11952に記載がある。これは、50 ページを超える大型の規格書であることと、ユーザー向けではないため、詳細は省略するが、二次標準試料 (Transfer Standard Material) を利用して、機器を校正する方法の詳細が記載されている。上記に関連して、PTB の研究者が市場にある標準試料をまとめたページが国際会議 Nanoscale の HP に掲載されている。

<https://www.nanoscale.ptb.de/nanoscale-standards.html>

<https://www.nanoscale.ptb.de/fileadmin/documents/nanoscale/techniques.pdf>

(※国際会議の URL のため、変更や削除の可能性あり)

## 2-3. カンチレバーのばね定数の測定 ISO 11775:2015

### Determination of cantilever normal spring constants

ISO 11775には、Dimensional 法、標準カンチレバー法、ナノインデント法、サーマル法の4つが列記されている。これらの中で、① Dimensional 法と②サーマル法について詳しく解説する。

#### ① Dimensional 法

規格書内では、短冊型とV字型のレバーについて記載されているが、ここでは短冊型について説明する。この方法は、図1のように、カンチレバーの形状からばね定数を導出する。カンチレバーの長さとは幅は光学顕微鏡観察で容易に求めることができる。

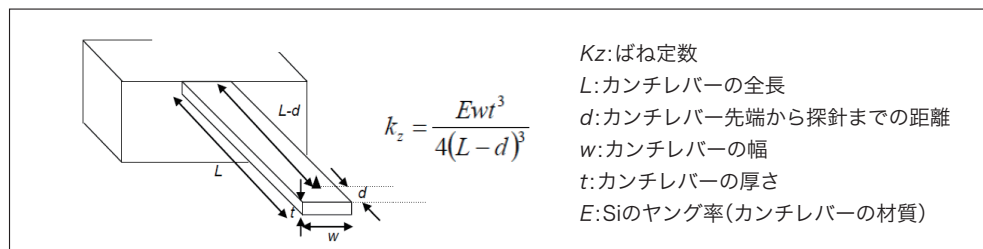


図1 Dimensional法によるカンチレバーのばね定数測定

一般的なカンチレバーの長さで必要な部分は  $(L-d)$  であるから、ほぼ探針位置までの長さの短冊として簡易的に計算することが多い。ここで問題になるのは、カンチレバーの厚さの測定である。カンチレバーの厚さは、数  $\mu\text{m}$  程度であるため、光学顕微鏡では計測できない。走査型電子顕微鏡 (SEM) を利用すると、計測可能であるが、カンチレバーの反射面と側面の角度や探針先端の保護等に十分に注意する必要がある。しかしながら SEM の利用ができない場合は、分光膜厚計を利用することも可能である。図2は、市販の分光膜厚計を利用して、カンチレバーの膜厚を求めた例である。本用途では、カンチレバーの幅が狭いため、光を絞れるタイプの装置が適する。多くの装置で標準的にサポートされている、フィッティングや FFT 法で膜厚を求めることができる。図2(b)は、膜構造を

空気/1 nm のシリコン酸化膜/Si/1 nm のシリコン酸化膜/空気

とし、Si の膜厚を分光スペクトルに合うように最適化して求めた例である (厚いカンチレバーでは、シリコン酸化膜厚は省略可)。この結果を利用して、ばね定数を図1中の式で計算すると (光学顕微鏡で求めたカンチレバーの幅を  $30\ \mu\text{m}$ 、長さを  $215\ \mu\text{m}$ 、Si のヤング率  $E$  を  $1.69 \times 10^{11}\ \text{N/m}^2$  とする)、

$$k_z = (1/4) \times 1.69 \times 10^{11} \times 30 \times 10^{-6} \times (2.52 \times 10^{-6})^3 / (215 \times 10^{-6})^3 \\ = 2.04\ [\text{N/m}]$$

と求めることができる。分光膜厚計を利用する方法は、反射コートのあるカンチレバーには適さないが、市販のカンチレバーをケースから出さずに測定できるため、非常に便利である (反射コート膜厚を測定し、簡易検量線を作成して Si の膜厚に換算することも可能な場合もあるが、汎用性が低い)。

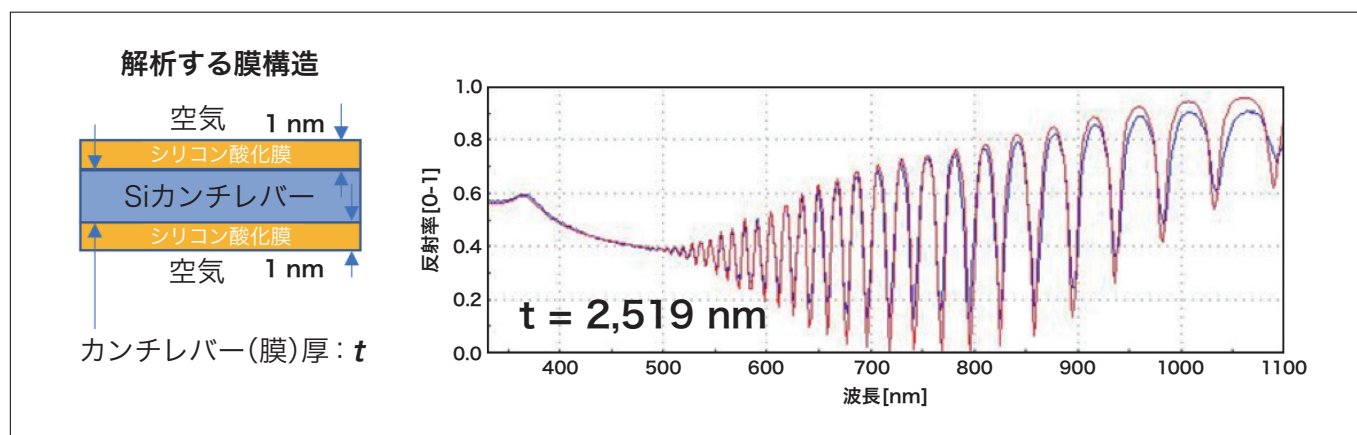


図2 分光膜厚計によるカンチレバーの分光スペクトルの例

異方性エッチングを利用して作成された特定のカンチレバーについては、その断面形状を利用して厚さを求め、ばね定数を求める方法もある。図3(a)は、カンチレバーを劈開した断面の走査型電子顕微鏡画像である。側面はSiの結晶面を反映した形状になっている。図3は断面形状が台形のカンチレバー形状であるが、端の角度が20度であることを利用して厚さを求めた例である。カンチレバーの探針側と反射面側寸法は、図3(b)で示す光学顕微鏡像から実測することができる。図3のケースでは、カンチレバーの厚さ $t$ は、 $(43.9 - 19.6) / 2 \times \tan(20)$ で求めることができ、 $4.42 \mu\text{m}$ である。これを利用して、上記と同様にばね定数を求めることができる。

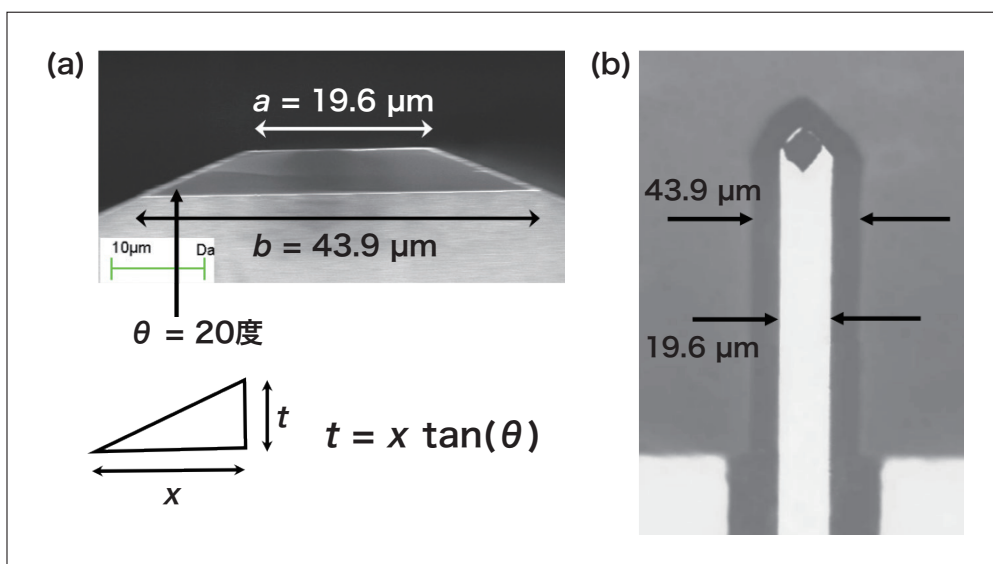


図3 カンチレバー断面の形状を利用した厚さの測定例

(a)カンチレバーの劈開断面の走査型電子顕微鏡画像 (b)カンチレバーの光学顕微鏡像

この場合、カンチレバーの厚さ $t$ と幅 $w$ について、 $t = 1/2 \times (b - a) \tan \theta$ 、 $w = 1/3 \times (a^2 + 4ab + b^2) / (a + b)$ で置き換えた式(台形断面のばね定数の式)

$$K = \frac{E \cdot (b - a)^3 \cdot \tan^3 \theta \cdot (a^2 + 4ab + b^2)}{96 \cdot (L - d)^3 \cdot (a + b)}$$

$K$ : カンチレバーのばね定数

$\theta$ : カンチレバーの断面の台形の鋭角

$E$ : カンチレバーの材質の弾性率

$L$ : カンチレバーの長さ

$a$ : カンチレバーの上底

$d$ : 先端深針間距離

$b$ : カンチレバーの下底

でばね定数を求めることができる。

## ② サーマル法

サーマル法は、カンチレバーの熱振動スペクトルを測定し、理論式とフィッティングして求める方法であり、市販の機器によく実装されている。ISO 11775に測定例が記載されているが、一般的に大気で動作する SPM では、フィッティングエラーが大きく、誤差が大きくなってしまいます。これは、大気の粘性のためにカンチレバーが理想的な振動から外れるためである。理想的な場合のカンチレバーの熱振動は、次の式で記述される。

$$A = A_{\text{white}} + \frac{A_0 f_0^4}{Q^2} \left[ (f^2 - f_0^2)^2 + \frac{f^2 f_0^2}{Q^2} \right]^{-1}$$

$A$  : 振幅       $A$  : 振幅の共振ピーク       $A_{\text{white}}$  : (ホワイト)ノイズ  
 $f$  : 周波数       $f_0$  : 共振周波数       $Q$  : Quality factor

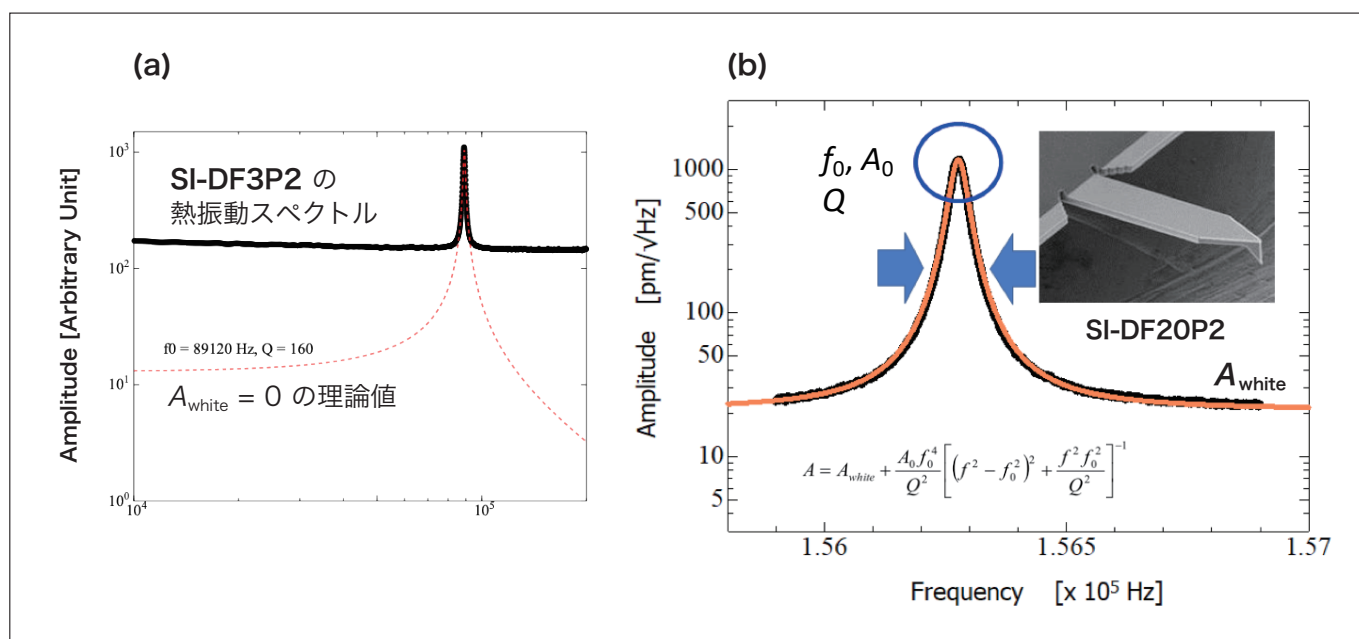


図4 (a)SI-DF3P2の熱振動スペクトル(黒線が実測、赤の点線は変位検出ノイズが0の場合の計算値)  
 (b)真空中でのSI-DF20P2の熱振動スペクトル(黒が実測値、オレンジが変位検出系のノイズを考慮したフィッティング)

図4(a)は、日立ハイテックスサイエンスで販売しているカンチレバー SI-DF3P2の熱振動スペクトルの例である。理想的には赤の点線で示したスペクトルになるが、SPM 装置では、カンチレバーの変位検出系のノイズがあるため、黒線のスペクトルになる。このため、フィッティングには、カンチレバーのスペクトルにノイズが重畳されていることを考慮する必要がある。図4(b)は、真空中( $10^{-3}$  Pa 程度)で得られたカンチレバー SI-DF20P2の熱振動スペクトルの例であるが、(a)と比べて、理想に近いスペクトルが得られている。先ほど述べたように、ノイズ項は、ホワイトノイズで近似しているため、カンチレバーの周波数によっては、装置のノイズと一致しない場合があり、スペクトルのピークと半値幅部分が一致するようにフィッティングするのが良い。その後、次式より、ばね定数を求めることができる。

$$k_z = \frac{2C_1 k_B T Q}{C_2^2 \pi A_0 f_0}$$

$k_z$  : ばね定数       $C_1$  : モードに関する定数(0.9707)  
 $k_B$  : ボルツマン定数       $T$  : 温度  
 $C_2$  : 変位検出系の(光学)感度係数

上記の他に、ISO 11775には記載されていないが、下記 URL で計算できる Sader 法も用いられることがある。

<http://www.ampc.ms.unimelb.edu.au/afm/calibration.html>

ISO 11775に掲載されていない理由は、種々のカンチレバーに対する汎用性がなく(上記の WEB に記載のカンチレバー以外は、一般のユーザーには計算が難しい)、他の方法と比べて最大20%程度ずれる例が報告されていたからである。カンチレバーの外形(厚さが不要)、共振周波数、Q 値のみで計算できるため、非破壊でばね定数を求めることができる。このため、機械物性等の測定において、測定中に概算値を出すために、初期値として機器のパラメータを設定する目的には適している。

## 2-4. カンチレバー先端の断面形状 ISO13095:2014

### Procedure for in situ characterization of AFM probe shank profile used for nanostructure measurement

SPM 画像は、試料形状に探針形状が重畳(正確には Convolution ではなく Dilation)されたものである。このため、寸法の決定やナノ物性測定には、探針形状を決める必要がある。本規格は、ナイフエッジ法を中心に、探針断面・側壁を計測する方法が記載されている。図5にその概略を示す。図5の(a)に示す線幅  $W_0$  (20 ~ 100 nm 程度) が既知の微細な線を AFM で測定する(図5(b))。その後、ラインプロファイルについて、見かけの線幅  $W'$  から測定したテスト試料の線幅  $W_0$  を引くことにより、図4の(c) - (d)のプロセスを経て、探針の外形を得ることができる。多くのアプリケーションでは、断面形状が得られれば、(3次元形状が必要な場合を除いて) 十分であるが、上記の他に探針の幅と長さの関係をグラフ化する方法や、トレンチ深さを計測するための、深さのあるスペース幅を考慮した分解能を計測する方法が記載されている。

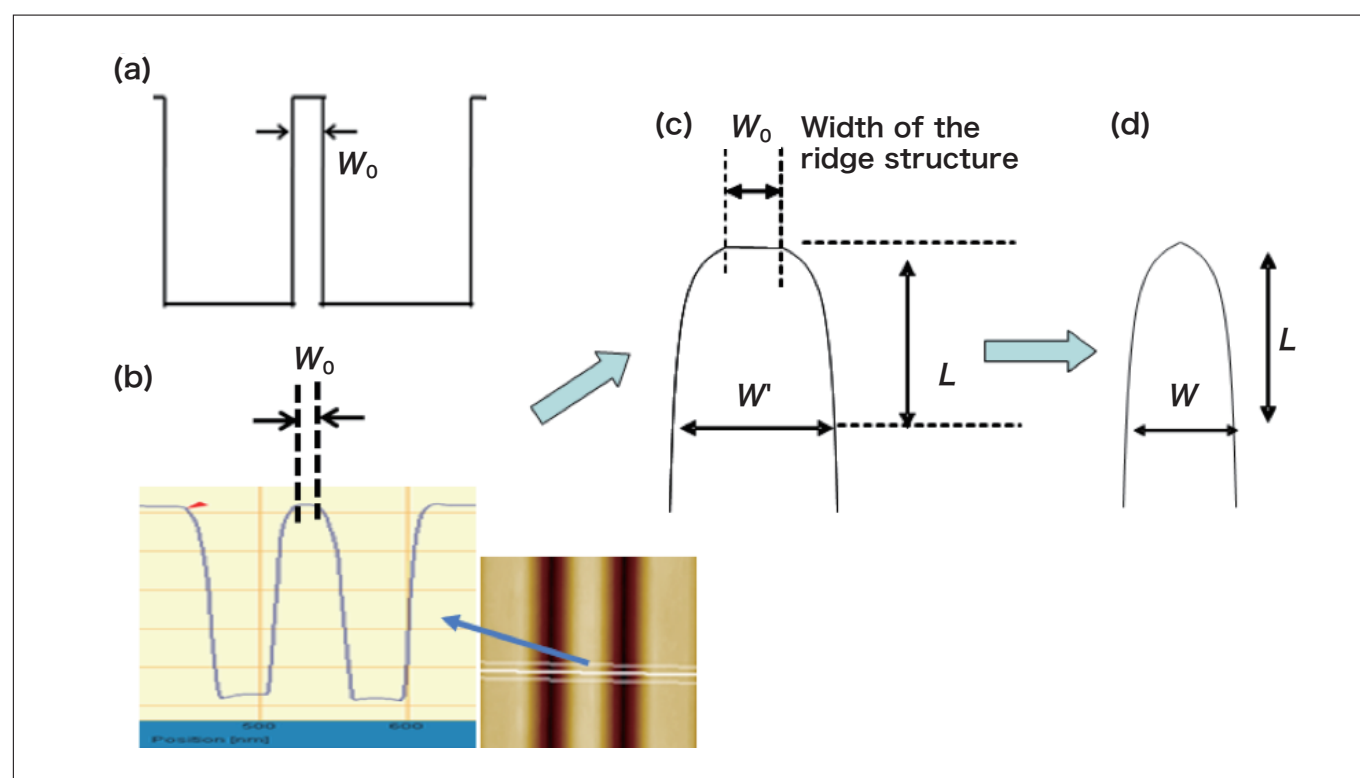


図5 ナイフエッジ法による探針形状の測定方法

## 2-5. ドリフトレートの測定 ISO 11039:2012

### Measurement of drift rate

この規格は、AFM のドリフトレートを計測する方法が記載されている。連続する画像の相関をとる方法、画像上の目印になる対象物を追跡する方法、特殊なパターン付標準試料の相関をとり精度よく測定する方法が記載されている。機器のドリフトを補正する場合などに有用な規格書ではあるが、この規格は、ドリフト速度が一定であることを前提としているため、AFM で問題となる1画面中でドリフト速度が変化する場合、上記の中で、目印になる対象物を追跡する方法以外は適用が難しい。ユーザー側の立場では、ドリフト測定は、計測の目的ではないため、機器側が実装していて、ドリフトが収まったことを確認できる機能があればありがたいと感じている。

### 3. まとめ

SPM を利用する場合に、多くの人が適切な解析方法、再現性を得たいと思っている。計測分野の規格は、その手助けになるよう作られている。現在、柔軟材料の弾性率 (ISO/DIS 21222) や半導体のキャリア濃度測定のガイドライン (ISO/AWI 23683) が作成されつつある (DIS や AWI の記号は、現在の審議ステージを表し、規格書が完成した場合には、ISO 21222 のような形で表示される)。アプリケーション上で重要な規格づくりは、近年始まったばかりであり、今後、ナノ粒子やナノラフネス等に関連する規格作成が計画されている。今後、規格が充実するにつれて、多くの分野で、SPM がナノ物性測定で使用されていくことが期待される。

#### 参考文献 (主な SPM に関連する規格書)

- 1) ISO 18115-2:2013 Terms used in scanning-probe microscopy
- 2) ISO 28600:2011 Data transfer format for scanning-probe microscopy
- 3) ISO 27911:2011 Definition and calibration of the lateral resolution of a near-field optical microscope
- 4) ISO 11039:2012 Measurement of drift rate
- 5) ISO 11952:201 Determination of geometric quantities using SPM: Calibration of measuring systems
- 6) ISO 13095:2019 Procedure for in situ characterization of AFM probe shank profile used for nanostructure measurement
- 7) ISO 13083 Standards on the definition and calibration of spatial resolution of electrical scanning probe microscopes (ESPMs) such as SSRM and SCM for 2D-dopant imaging and other purposes
- 8) ISO 11775 Determination of cantilever normal spring constants
- 9) JIS K-0147-2 走査型プローブ顕微鏡で用いられる用語

#### 規格に関連する主な団体

- (1) ISO <https://www.iso.org/technical-committees.html>
- (2) VAMAS <http://www.vamas.org/> <https://www.nims.go.jp/vamas/>
- (3) ASTM E42 <https://www.astm.org/COMMITTEE/E42.htm>
- (4) 日本規格協会 <http://www.jsa.org/>
- (5) IEC <https://www.iec.ch/>



# MirrorCLEM: シームレスな光-電子相関顕微鏡システム

MirrorCLEM: Seamless System for Correlative Light and Electron Microscopy



国立研究開発法人 理化学研究所  
環境資源科学研究センター(CSRs)  
技術基盤部門 質量分析・顕微鏡解析ユニット

豊岡 公徳 博士(理学)

## 1. はじめに：なぜ光-電子相関顕微鏡観察が必要なのか？

生体内のタンパク質等の機能分子の働きを正確に知るためには、それらの細胞内局在パターンを明らかにする必要がある。例えば、特定のタンパク質の細胞内局在やその動態は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 等を用いた蛍光イメージングの発展により、近年は容易に観察できるようになった。しかし、光学顕微鏡 (光顕) の解像度以上の微細な細胞内構造情報が必要なケースでは、電子顕微鏡 (電顕) を用いた観察が必要となるが、電顕では蛍光イメージングで用いる可視光領域を検出することができない。そのため筆者らはこれまで、電顕レベルで蛍光標識タンパク質の細胞内局在を解析する場合、蛍光タグに対する抗体を用いた免疫電顕法による局在推定を行ってきた<sup>1)</sup>。しかし免疫電顕法は、抗体・抗原の性質によっては使用できない場合も多く、高度な技術と経験を必要とする手順を含む。さらに金粒子が局在する構造体が、本当に蛍光を発する構造体と同一であると断定することは難しく、同一であると“推定”することしかできないのが実状である。この“推定”から“特定”にステップアップするためには、GFP などの蛍光を観察したのと全く同じ試料を電顕観察する必要がある。それを可能とする技術が、光-電子相関顕微鏡法 (Correlative light and electron microscopy: CLEM) 法である。

CLEM 法は、同一箇所を光顕と電顕を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像を重ね合わせることで相関を得る解析法である。光顕では、蛍光試薬や色素による組織染色など分子の局在・分布を広範囲で可視化できる。一方、電顕では、光顕では見えない超微形態を可視化できる。光顕と電顕を組み合わせた CLEM 法では、特定視野の分子局在と超微形態情報の両面で説得力のある実証性の高いデータを提示できる。生物試料では、蛍光免疫染色法や組織化学染色法などと透過電子顕微鏡 (TEM) や走査電子顕微鏡 (SEM) と組み合わせた CLEM、材料系試料では、反射顕微鏡像と SEM を組み合わせた CLEM がある。これまで多くの CLEM 法が報告され、顕微鏡メーカーから発表されている。筆者の理想的な CLEM は、メーカー問わず全ての光学顕微鏡像と電顕像が相関可能な、迅速で正確な CLEM システムである。本稿では、(株)日立ハイテクと開発した SEM と TEM に対応した CLEM システム MirrorCLEM とその応用について報告する。

## 2. 光-電子相関顕微鏡システム MirrorCLEM の開発

筆者が初めて CLEM 法にチャレンジした時は、電顕観察には電界放出形走査電顕 (Field emission SEM: FE-SEM) を用いたが、光顕で得られている特定視野の蛍光像と同一箇所を FE-SEM で探すことは非常に難しかった。その際は、切片試料の形やカバーガラスに印刷された英数字付きグリッドを参照して同一箇所を探し出し、画像処理ソフトを用いて蛍光像と FE-SEM 像を重ね合わせて辛うじて相関像を得たが、撮像後も同じ倍率・同じ傾きで重ね合わせるのに時間を要した<sup>2)</sup>。そこで筆者は、(株)日立ハイテクと共同研究開発を行い、迅速で簡便な CLEM システム “MirrorCLEM” を開発した<sup>3)</sup>。本システムは、図 1 に示すように、①光学顕微鏡を用いて樹脂切片などの試料を低倍率からターゲット構造が明瞭に観察される高倍率まで撮像した後、② MirrorCLEM ソフトウェアによって 1 枚の光顕マップを作成、③観察位置情報を FE-SEM または TEM のステージ位置情報と同期させたうえで、④ MirrorCLEM ソフトウェアからステージの外部制御を行うことで、電顕による同一箇所の観察・撮像・重ね合わせができる。また、光学顕微鏡と FE-SEM のオーバーレイ画像のリアルタイム表示や追従も可能である。MirrorCLEM を使えば、撮影した光顕と電顕のステージが鏡を見ているかのようにシームレスに観察・撮像することができ、効率よく相関像を得ることができる。次に、SEM と組み合わせた MirrorCLEM の応用と、その後に、TEM と組み合わせた MirrorCLEM の応用について紹介する。



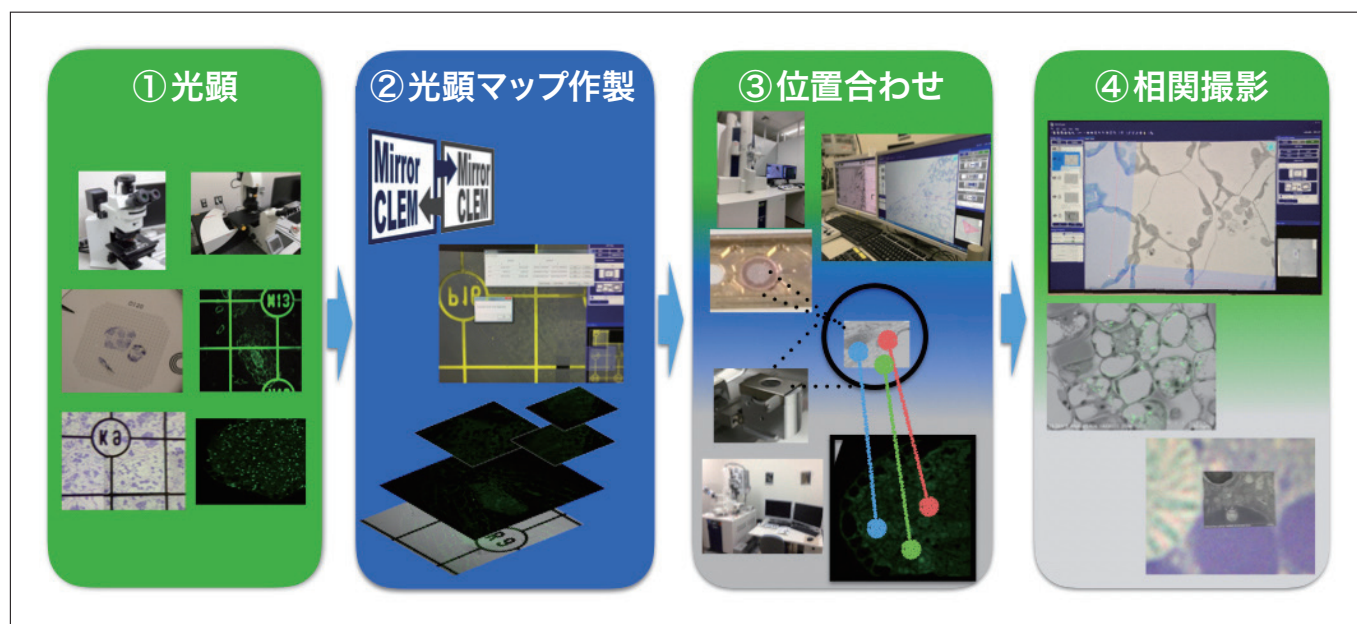


図1 光-電子相関顕微鏡システム「MirrorCLEM」のワークフロー図

### 3. 電界放出形走査電顕と光顕の相関解析：SEM-MirrorCLEM

近年の SEM は電子銃や検出器など性能が上がり、生物試料を含む樹脂包埋切片をスライドガラスやウェーハーなど平板上に載せ、低加速電圧ビームと反射電子検出器を用いて観察する“切片 SEM 法”により、TEM と遜色ない細胞・細胞内小器官の切片電顕像を撮影できるようになった<sup>4,5)</sup>。これにより、TEM で用いる超薄切片でなく 200 nm 以上の厚い樹脂切片を用いて、広域に渡り容易に撮像することができる。FE-SEM は、電界放出形電子銃を用いることにより、高分解能で数十万倍の倍率での観察が可能であり、筆者が使っている Hitachi SU8220 は、20-30 kV の高加速電圧で高分解能像を得られるだけでなく、0.1-1 kV といった極低加速電圧条件下でも大きなプローブ電流が得られ、明るく S/N に優れた画像観察が可能な反射電子検出器、YAG 結晶を用いた高感度の反射電子検出器 (YAG-BSE)<sup>6)</sup> など搭載されている。1  $\mu\text{m}$  以上の厚い切片でもスライドガラスに載せ、電子染色後、オスミウム蒸着し、YAG-BSE 検出器を用いることで、帯電なくスムーズな観察が可能である<sup>7)</sup>。

SEM-MirrorCLEM (図2A) は、光顕で一般的に使われるスライドガラスまたはカバーガラス専用の試料台 (図2B) と、MirrorCLEM ソフトウェアからなり、FE-SEM ステージ上の切片と蛍光写真など光顕像の位置を 3 点アライメント法により容易に同期することができ、同一箇所の微細構造を撮影できる。さらに、MirrorCLEM から光顕の X-Y 自動ステージを制御し、低倍率から高倍率の光顕像を取り込むことで、光顕マップと FE-SEM のステージとの位置合わせを簡便に行うことも可能である (図2C)。

FE-SEM を用いた MirrorCLEM 観察は、先に切片などの試料を光顕で色情報や低倍率像を取得したのち、同一試料、同一箇所を FE-SEM で撮像して、光顕像と重ね合わせ、相関像を得る。紙や基盤などの材料系であれば、先に光顕で撮影して、金属コーティング後に FE-SEM に入れ、アライメントを取るだけで簡単に相関像が得られる。生物試料の場合は、固定・樹脂包埋してウルトラマイクローム等で作製した樹脂包埋切片をスライドガラスに載せ、色素染色または蛍光を光顕で検出したのちに、電子染色およびオスミウム蒸着し、FE-SEM の反射検出器で撮影することで観察することで、同一切片を SEM 観察できる。ここでは生物試料の種類・目的に応じて使い分けている [1] ~ [3] の 3 つの方法を紹介する。

#### [1] トルイジンブルー O (TB) 染色切片との CLEM 解析

オスミウム固定試料を用いた形態観察用樹脂ブロックから 500 nm-1  $\mu\text{m}$  の準超薄切片を作製し、スライドガラスに貼り付ける。TB 染色し、正立顕微鏡等で低倍像と興味ある場所 (Focus of view: FOV) の高倍像を撮像する。その後、酢酸ウラニル溶液とクエン酸鉛溶液で電子染色し、オスミウムコーティングを行う。MirrorCLEM に低倍～高倍率の光顕像を読み込み、光顕マップを作成する。スライドガラス用 SEM 試料台にスライドガラスをセットし、MirrorCLEM で切片と光顕マップの 3 点アライメントを行う。これにより、光顕マップを移動するとステージも同じ場所に移動し、光顕マップを拡大すると SEM も同様に同じ倍率に拡大され、撮像すると自動に光顕マップ上に SEM 像を重ねて保存される。例えば、アズキの発芽子葉の TB 染色切片とその FE-SEM 像を撮像することで、光顕で観察位置を把握しながら光顕では見えない細胞内小器官を撮像することができた (図2-[1])。

## [2] 接着培養細胞などの包埋前蛍光検出 CLEM

動物の接着細胞はグリッド付カバーガラス(プリント面)に貼り付け、グルタルホルムアルデヒド固定後、共焦点レーザー顕微鏡等で蛍光と走査像のグリッドの英数字を含む低倍率像と FOV を含む高倍率像を撮影する。その後、オスミウムで固定、脱水、エポン樹脂に倒立包埋する。カバーガラスを樹脂から剥がすと、英数字と枠の凹凸が残るため、その凹凸を指標に光顕で撮像した箇所を残してトリミングし、超薄切を行う。その切片をスライドガラスに載せ、電子染色とオスミウムコーティング後、[1]と同様に MirrorCLEM で細胞やグリッド枠を指標にアライメントを行い、相関像を得る(図2-[2])。この方法を用いて、マウス皮膚初代培養細胞を用いて赤色蛍光タンパク質でラベルしたケラチンの CLEM 解析に成功した<sup>8)</sup>。

## [3] 組織や浮遊細胞の包埋切片蛍光検出 CLEM

スライドガラスに接着できない組織や浮遊細胞の GFP など蛍光タンパク質の局在を観察する場合は、その蛍光を残して樹脂包埋と超薄切を行う。その切片をグリッド付カバーガラスに載せて蛍光観察し、その同一箇所を MirrorCLEM 搭載 FE-SEM で観察する(図2-[3])。例えば GFP ラベルした ER ボディ(小胞体由来の顆粒)またはペルオキシソームを含む形質転換体シロイヌナズナを用いて CLEM を試みた。芽生えをアルデヒド固定し、脱水後にアクリル系樹脂である LR White 樹脂に包埋し、準超薄切片(厚さ1 μm)を作製し、グリッド付カバーガラスに切片を載せ、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像を撮影した。電子染色後、同じ切片の GFP 蛍光が検出された箇所を MirrorCLEM 搭載 FE-SEM で撮影した。その結果、蛍光ドットは、紡錘形の ER ボディまたは丸いペルオキシソームと一致する相関像を得た<sup>9)</sup>。

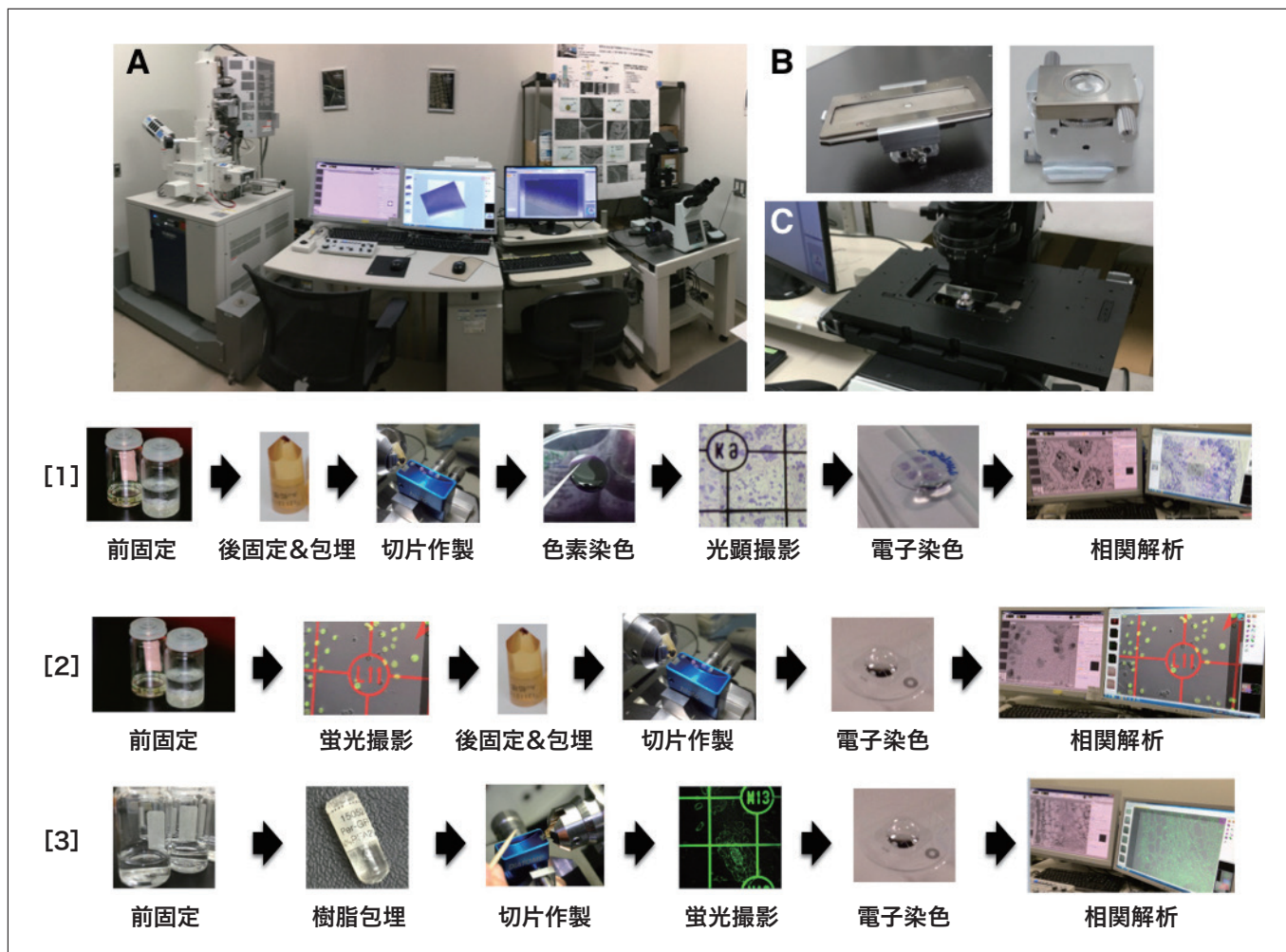


図2 SEM-MirrorCLEMおよびその試料調製法

(A)当施設のMirrorCLEMシステム。MirrorCLEM搭載SU 8220および自動ステージを搭載した倒立顕微鏡。

(B)スライドガラスおよびカバーガラス用FE-SEM試料台。

(C)MirrorCLEMによる光顕自動ステージ。

[1]-[3] 生物試料の試料・目的による相関解析法のワークフロー。



## 4. 透過電顕と光顕の相関解析：TEM-MirrorCLEM

透過電顕 HT7800 など最新の TEM を制御できる MirrorCLEM (図3A) は、光顕で撮影した像を読み込み、3 点アライメントを取る (図3B) ことで光顕像上の興味ある場所を TEM で探す、あるいは電顕で光顕像のどこを覗いているか確認しながら、光顕像に同一箇所を撮像し、保存することができる。相関像を得られるだけでなく、光顕と電顕像をリンクさせて保存できるので非常に便利である。ここでは、[1] 準超薄切片と超薄切片との CLEM, [2] TEMグリッド上の蛍光微粒子の CLEM, [3] TEMグリッド上に載せた超薄切片蛍光タンパク質蛍光像との CLEM, の 3 つの具体例を紹介する。

### [1] TB 染色準超薄切片像と超薄切片の相関

連続した切片同士を用いて相関を取る TEM-CLEM 法、つまりスライドガラス上の準超薄切片像とその直後の TEM グリッドに載せた超薄切片を用いて相関像を得る方法である。例えば、高圧凍結 / 凍結置換したシロイヌナズナ鞘の細胞内小器官を観察する場合、まず包埋した樹脂ブロックの準超薄切片を作製し、最後の1枚を TB 染色し、正立顕微鏡で低倍率と FOV の高倍率写真を撮影する。その後、FOV を含む部分を残してカミソリでトリミングし、80-100 nm 厚の超薄切片を数枚作製する。そして TEM グリッドに載せる。電子染色を行い、MirrorCLEM 搭載 HT7800 にセットし、アライメントを行うことで容易に同じ場所を撮影する (図3-[1])。TB 像に TEM 像を重ね合わせて表示することで、鞘のどの箇所を拡大し撮影したゴルジ体やミトコンドリアか特定することができた (図3C)。

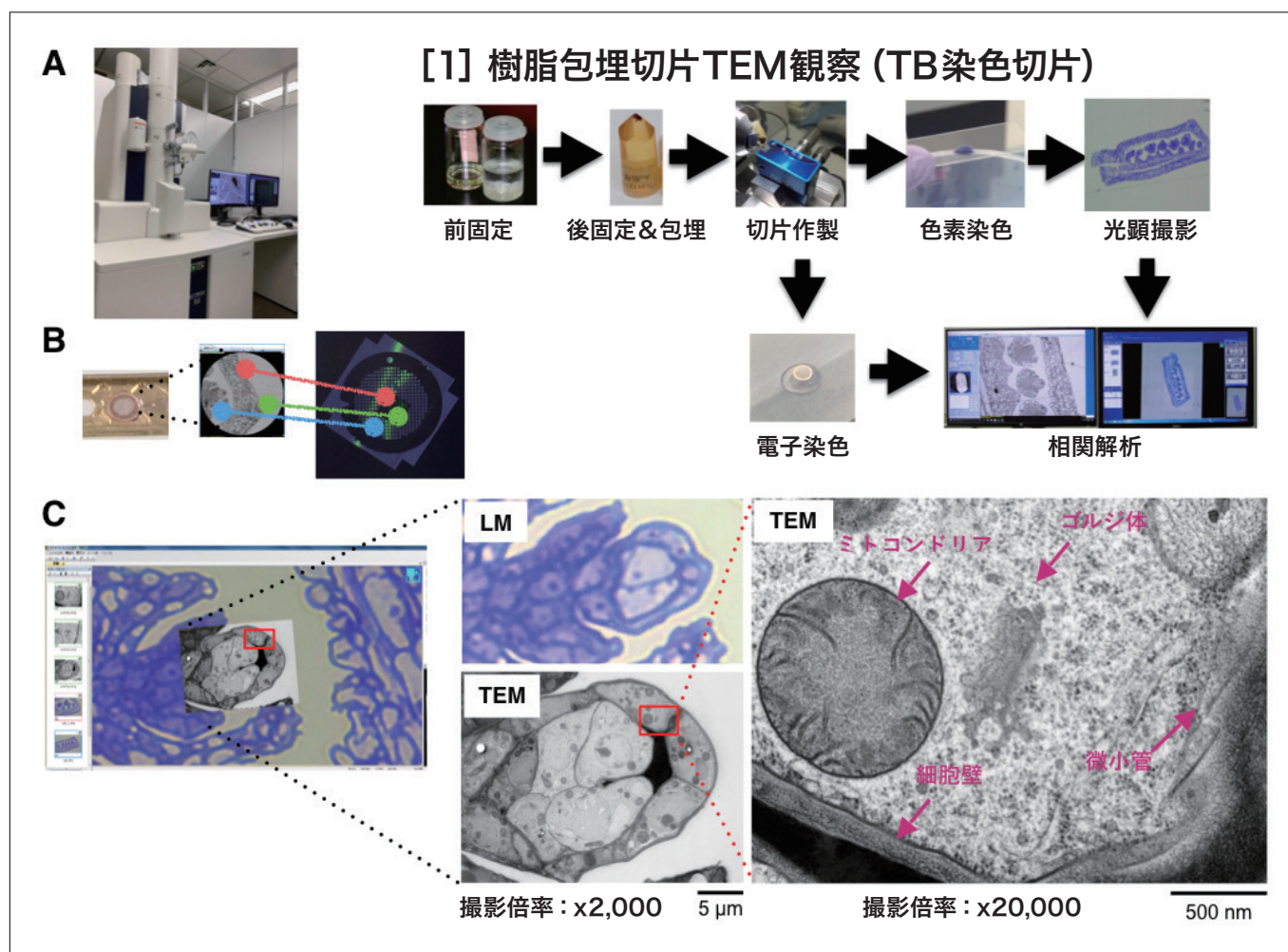


図3 TEM-MirrorCLEMおよびその試料調製法  
(A) MirrorCLEMを搭載したHT7800。  
(B) グリッドと光顕像との3点アライメントのイメージ図。  
(C) 高圧凍結/凍結置換したシロイヌナズナ鞘のTB染色像とMirrorCLEM像。  
[1] 樹脂包埋切片TEM観察 (染色切片) のワークフロー。

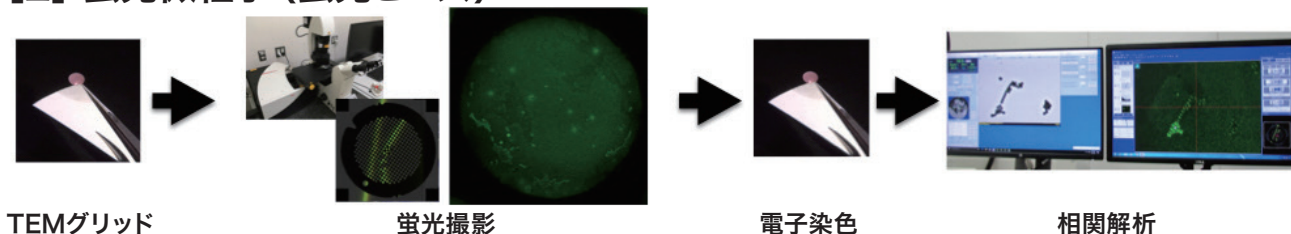
## [2] 蛍光微粒子の相関像撮影

蛍光を放つ微粒子などは TEMグリッドに載せ、蛍光撮影したのちにネガティブ染色を行い TEM-MirrorCLEM で観察を行う。例えば、蛍光ビーズの場合、浸水処理した膜張 TEMグリッドに蛍光ビーズを載せ、乾燥させる。そのグリッドをスライドガラスとカバーガラスに挟み、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光および走査像を撮像する。酢酸ウラニル水溶液液でネガティブ染色後、TEM-MirrorCLEM を用いてアライメント後、CLEM 撮影する(図4-[2])。緑色蛍光を放つビーズとそうでないものを TEM で識別することができた。

## [3] 超薄切片中の蛍光タンパク質蛍光との CLEM 解析

GFP 蛍光を残すようにマイルドに固定包埋した樹脂ブロックを作製<sup>9)</sup>し、100-200 nm の超薄切片を作製し英数字グリット付 TEMグリッドに載せる。蛍光を復帰させるために退色防止剤で満たしたカバーガラスボトム 35 mmディッシュとカバーガラスに挟み、高感度検出器を搭載した共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像と走査像を撮像する<sup>9)</sup>。その後、電子染色し、TEM-MirrorCLEM で CLEM 撮影を行う(図4-[3])。例えば、高感度共焦点レーザー顕微鏡像で英数字グリット付 TEMグリッドに載せたシロイヌナズナ発芽子葉中の GFPラベルしたペルオキシソーム樹脂包埋超薄切片の同一切片・箇所を MirrorCLEM で探し(図4A)、TEM 像を撮像し蛍光像と重ねる(図4B)。どの構造がペルオキシソームか区別することができた。

### [2] 蛍光微粒子 (蛍光ビーズ)



### [3] 樹脂包埋切片TEM観察 (蛍光タンパク質)

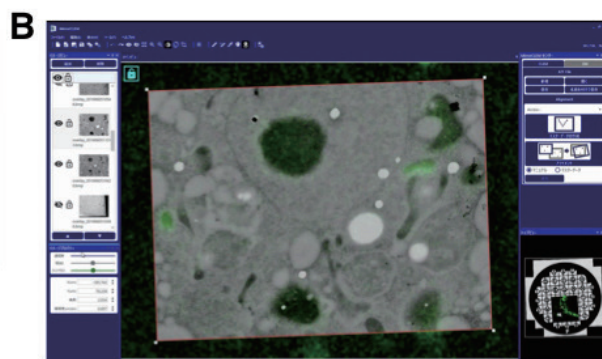
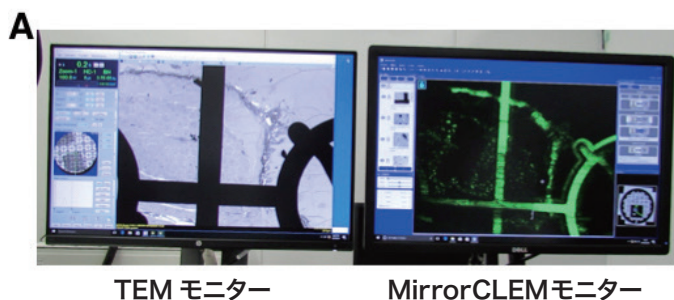
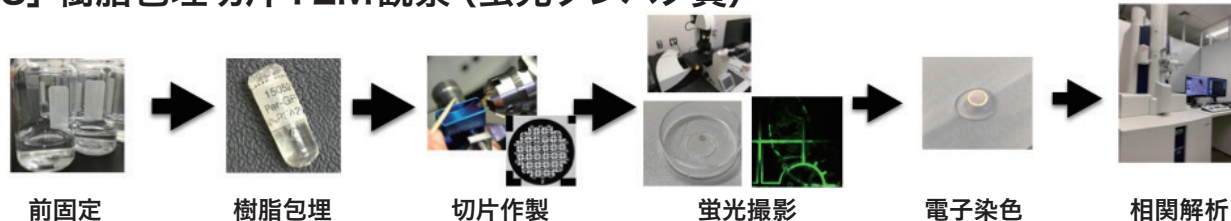


図4 TEM-MirrorCLEMの試料調製法

[2] TEMグリッド上の蛍光微粒子の相関像撮影のワークフロー。

[3] 蛍光タンパク質GFPの蛍光とTEMでCLEMする場合のワークフロー。

(A)同一箇所を観察中のTEMモニター画面とMirrorCLEMモニター画面。

(B)GFPラベルしたペルオキシソームの共焦点レーザー顕微鏡像と同一箇所を撮像したTEM像の重ね合わせたMirrorCLEM画面。

## 5. おわりに

MirrorCLEM は、蛍光タンパク質や色素が局在する微細構造を簡便に特定でき、多種多様な像と相関が得られるシームレスな電顕システムである。近年では電顕と光顕で同じ範囲、近い解像度で観察できるようになり、共焦点レーザー顕微鏡や FE-SEM の検出器の向上により、今まで得られなかったシグナルを高感度で検出できるようになった。今後は、共焦点レーザー顕微鏡および連続切片 SEM 法による 3 次元解析法と MirrorCLEM を組み合わせて解析することで、標的タンパク質の 3 次元的な局在様式が超微形態レベルで明らかにできると期待される。さらに MirrorCLEM と高圧凍結・クライオ電顕など他の様々な新技術を組み合わせて多角的な視点からの超微形態観察を行うことで、生体分子の分布や動態が極めて緻密に明らかになり、生命現象の理解に大きく貢献できると期待される。

### 参考文献

- 1) 佐藤繭子, 後藤友美, 豊岡公德, 顕微鏡, **52**, 98-103 (2017).
- 2) 豊岡公德, *Plant Morph.*, **28**, 15-21 (2016).
- 3) 製品プレス <https://www.hitachi-hightech.com/jp/about/news/2016/nr20160721.html>
- 4) D. Koga, S. Kusumi, R. Shodo, Y. Dan, and T. Ushiki, *Microscopy*, **64**, 387-394 (2015).
- 5) N. W. Rizzo, K. E. Duncan, T. M. Bourett, and R. J. Howard, *J. Microsc.* **263**, 142-147 (2016).
- 6) P. Walther, R. Ausrata, Y. Chen, and J. B. Pawley, *Scanning Microsc.* **5**, 301-9 (1991).
- 7) 豊岡公德, 若崎真由美, 宮彩子, 佐藤繭子, 顕微鏡, **55** (印刷中).
- 8) K. Usui, N. Kadono, Y. Furuichi, K. Shiraga, T. Saitou, H. Kawasaki, K. Toyooka, H. Tamura, A. Kubo, M. Amagai, T. Matsui, *J. Dermatol. Sci.* **94**, 346-349 (2019).
- 9) K. Toyooka, N. Shinozaki-Narikawa, *Microscopy*, **68**, 417-421 (2019).

### 謝辞

本システムの開発にあたり、(株)日立ハイテクの皆様、(株)アストロンの皆様、理研 CSRS の成川苗子氏、浜村有希博士、若崎真由美氏、佐藤繭子博士に多大なるご協力を頂きました。また、基礎生物学研究所の真野昌二博士に GFP 発現シロイヌナズナを分与頂きました。理研 IMS の松井毅博士、臼井景子博士、井関八郎氏に GFP 発現マウス皮膚初代培養細胞を提供頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。本研究は科学研究費 新学術領域研究 (17H06475) および基盤 C (17K07477) のサポートにより行われました。



# 異物検知自動化システム「EM-AI」

坂上 万里<sup>\*1</sup>, 陳 偉健<sup>\*2</sup>

## 1. はじめに

近年のナノテクノロジーの発展により、半導体分野、先端材料分野、電子部品分野など様々な分野において微細化や精密化が進んでいる。そのため、従来では問題視されていなかった微小異物の混入が精密化した部品の機能障害につながる大きな原因となってきた。

従来では、部品の異物検査は光学顕微鏡で行われていたが、微細化と高品質化に伴い、光学顕微鏡の空間分解能が不足するようになったため、より高い空間分解能と深い焦点深度をもつ SEM を用いた異物検査のニーズが増えている。異物検査作業は、検体数や目的に応じて検査者が大量の画像を取得し、各画像上の異物を検知する必要がある。SEM を用いた異物検査では、連続撮像機能により大量に取得した画像に対して、画像処理を用いた異物の判別が行われる。

一般的な画像処理による異物検出手法には、画像データの輝度値による異物の識別が用いられるが、図1に示す異物 A のように異物と背景の輝度差が小さい場合、画像処理ソフトの自動機能では識別ができない場合が多い。このような検体に対しては、作業者自身が画像上で異物の有無や個数を目視で確認する作業が不可欠であり、大きな作業負担となっている。そこで SEM 画像から異物を検知するための新しいアプローチとして、AIエンジンを搭載したソフトウェアを開発し、活用を試みた。従来手法では検知できなかった異物 A が図2に示すように AI の活用により、正確に検知され、異物検査の自動化が可能となった。

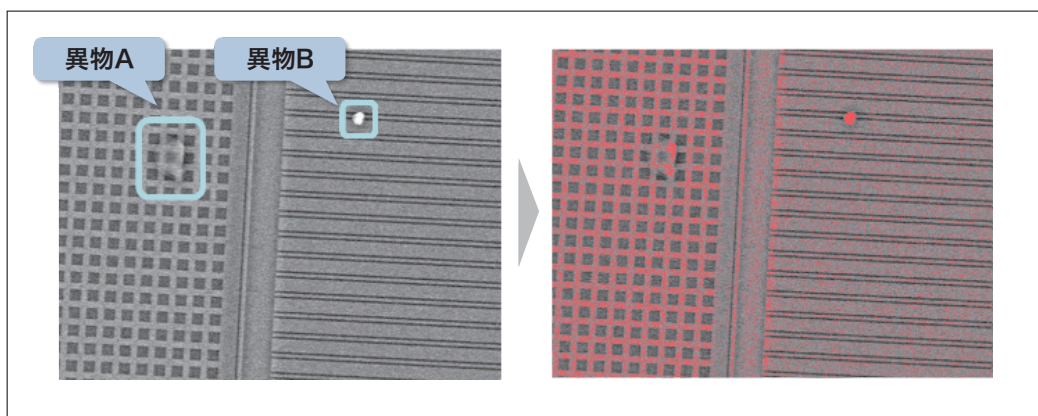


図1 従来の画像処理方法で処理した結果(異物A は未検知)

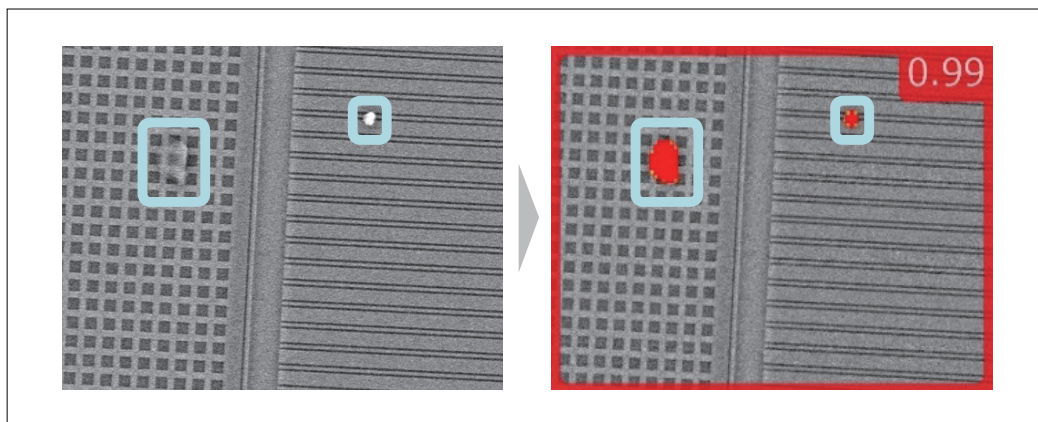


図2 AI画像認識技術で異物を検出した結果(異物A も検知)

本稿では、異物検知自動化システムを SEM のオプションとして搭載可能な「EM-AI」として製品化したので、以下に紹介する。



## 2. 装置構成

EM-AIシステムを初めに搭載する SEM として、コンパクト SEM である FlexSEM1000 II を選んだ。FlexSEM1000 は「工業材料」2017 年 4 月号で紹介した装置であるが、改良版である FlexSEM1000 II (図3) ではステージの耐震性能を向上させるとともに、多領域自動画像取得を可能とする Multi Zigzag 機能をオプション設定した。顧客ごとの様々な設置シーンに対応するため、高分解能を維持しながら小型化を図り、真空排気システムは低真空モードと高真空モードを目的に応じて選択可能としている。



図3 FlexSEM1000 II の外観写真

EM-AIシステムは、この FlexSEM II とステージをリンクし、SEM による複数検体の自動連続撮像機能と AI 画像認識技術を組み合わせ、異物を自動検知するシステムである。異物を検知し、その異物の場所にステージを移動させ、詳細な観察や分析を実施することも可能である。

## 3. SEMによる多領域連続画像撮影機能

FlexSEM1000 II には、視野探しの手間を大幅に減らし、直感的な視野探しを実現する「SEM MAP」機能を標準装備している。この機能では、SEM 観察開始前に視野探し用の光学画像を取込み、試料室内部を模したマップに貼付け、ナビゲーション用マップを作成する。マップ上の光学画像は座標情報や倍率情報を保持しており、このマップ画像上でマウスをドラッグ操作することで、観察視野への移動や、測定領域を指定できる。

この SEM MAP を用いて、複数の領域を一括指定することで、多領域連続 SEM 画像取込みを可能とする「Multi Zigzag」機能を設定した。Multi Zigzag 機能による複数領域指定画面を図4に示す。この機能は撮像領域の複製機能も有しており、領域枠を固定し、複数試料での連続撮影も可能であるため、自動異物解析用に大量の画像を取得する際の操作の負担軽減も図っている。EM-AI による自動異物検知システムでは、これらの機能による複数試料の連続画像取得したデータも処理可能である。



図4 Multi Zigzag機能による多領域指定

## 4. 異物検知

EM-AI を用いることで、ユーザーは SEM 観察から粒子解析までを、専門知識を必要とせずに自動化することが可能である。異物検知のためには初めに、AIエンジンに対して異物を深層学習させる必要がある。異物の学習方法は2種類ある。一方は、事前に良品の形状を登録し、異物があつた際に検知するという方法で、異物が少ない場合などに用いる。他方は、異物の形状やテクスチャーを学習させるという方法で、異物が多い、あるいは特徴的である場合に用いる。良品を学習させた例を図5に示す。Cuメッシュ上に異物のない画像を良品画像として20枚以上準備し、学習させた後、EM-AIで異物検知を行ったところ、Cuメッシュ上の異物を検知できたことを示す結果である。

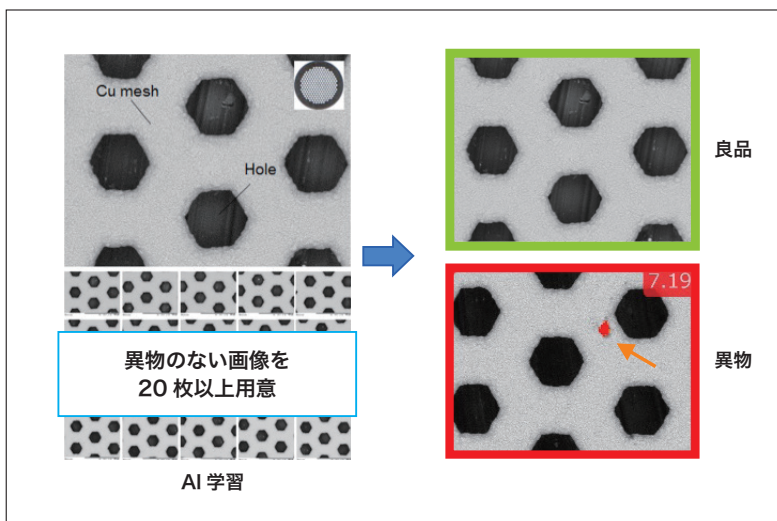


図5 AIに良品を学習させ、異物検知させた例

次に、異物の形状やテクスチャーを学習させた例を図6に示す。試料はフィルター上に捕集されたアスベスト繊維である。この画像のアスベスト繊維の径はばらつきが多く、また細い繊維は、従来の画像処理ベースの異物解析システムでは背景画像(フィルター)と異物(アスベスト)を輝度判別できずに検出が困難となる。AIでは特定の異物を「ペンツール」を用いて手動でラベル付けをして学習させる。異物の無いフィルターのみの良品画像、フィルター上にアスベストが捕集されている NG 画像をそれぞれ20枚以上学習させた後の検査結果を図7に示す。

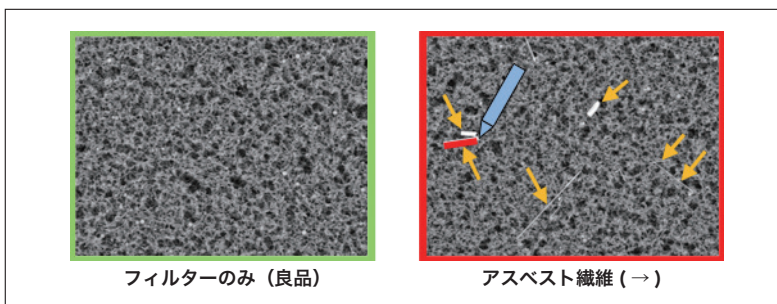


図6 捕集されたアスベストのAI学習例

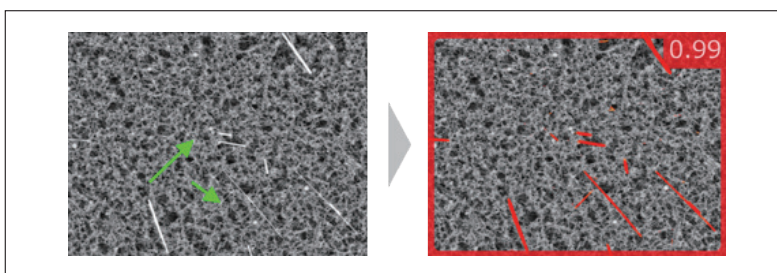


図7 AIによるアスベストの自動検出

学習後の結果では、フィルターとのコントラスト差が小さい、細いアスベスト繊維 (→) も自動で検出することが可能であった。このように、異物を検知させるための学習を適宜実施することで、従来の異物解析システムでは検出できなかった異物でも、検知精度が向上できている。

## 5. EM-AIシステム

EM-AIシステムによる検査ワークフローを図8に示す。前述のSEMによる多領域連続画像撮影機能と、AIによる異物検知を組み合わせ、SEM観察から粒子解析までを自動で行うことができる。粒子解析に関しては、粒子解析用のエンジンを積むことで、粒形に対する各閾値の設定、粒子サイズの分布、粒子数などのより詳細な自動解析を、異物の検知と同時に実施することが可能である。

EM-AIでは、複数の領域やサンプルを連続で自動解析できることから、作業者を拘束する時間を大幅に減らすことが可能となり、作業効率を高めることができる。

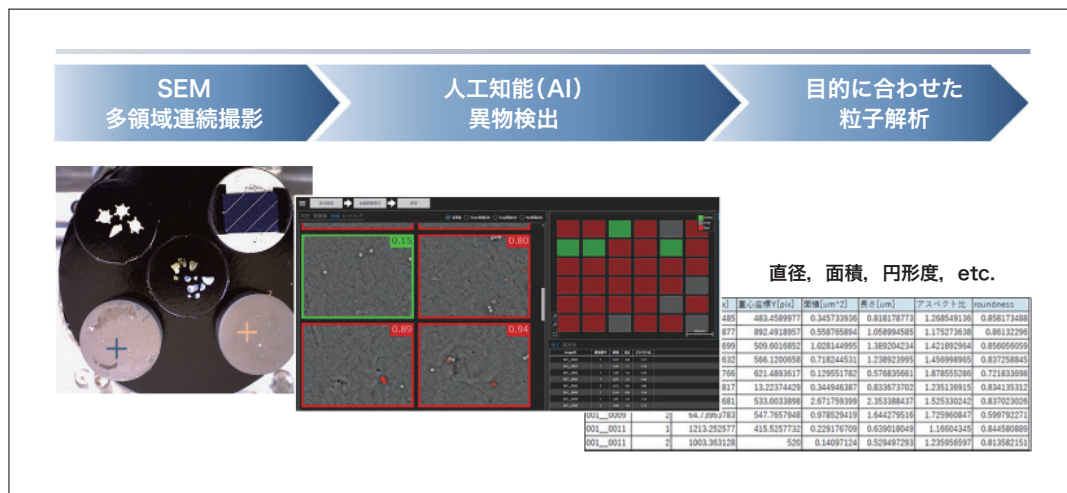


図8 EM-AIシステムのワークフロー

EM-AIの自動粒子解析システムを用いて、特定粒子の検出を行った事例を示す。試料にはほぼ同じ粒径で組成も近いラテックス粒子とダイヤモンド砥粒を混在させたものを使用し、その中からダイヤモンド砥粒のみを異物として検知させるを試みた。まずAIの深層学習により、ラテックス(円形粒子)は無視し、ダイヤモンド粒子のみを検知するよう、40枚の画像を使用して学習させた結果を図9に示す。ここで作成した教師ファイルを用い、EM-AIにより、100視野の自動粒子解析を実施した結果を図10に示す。SEMにより指定した領域①、その領域内の広域自動撮像データ②、および検出状況③を一覧で表示できる他、検出粒子の直径の自動測長④など、指定した粒子解析結果の表示や一括したレポート作成も可能である。

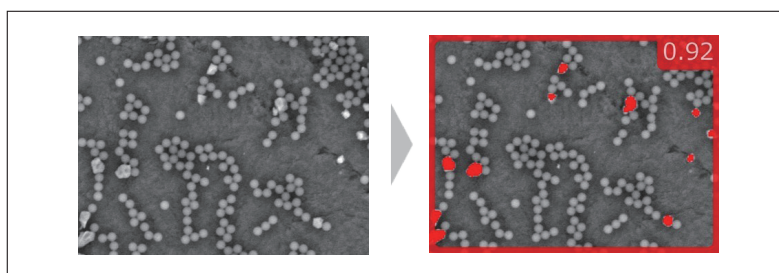


図9 AI学習による特定粒子の検出(ダイヤモンド粒子のみ検出)

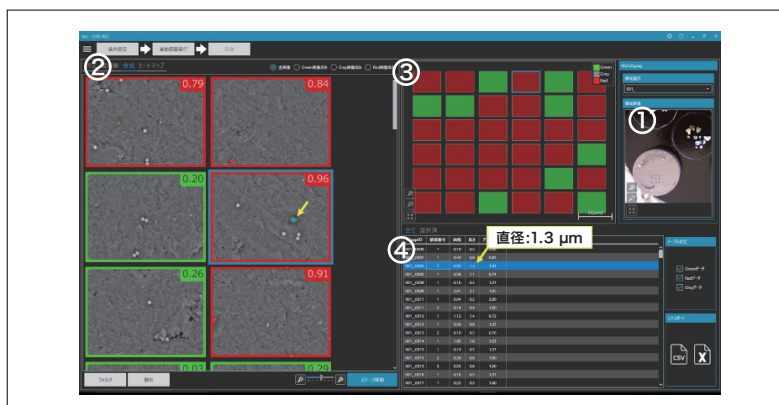


図10 広域自動撮像データと粒子の検出状況の一覧表示

## 6. まとめ

本稿では、異物検知手法において、EM-AIシステムを用いることで、従来の画像処理手法では検出困難だった異物でも、AI技術により深層学習させれば、検出可能になることを紹介した。EM-AIシステムは用途ごとのデータをAIに学習させることで、特定用途に特化させることなく、柔軟性の高い解析システムの実現・構築が可能となった。今後は他の電子顕微鏡へのEM-AIシステムの展開や、最先端技術を搭載した装置を最先端の場に提供し、材料解析や品質管理に貢献していきたい。

### 出典

月刊誌「工業材料」2019年11月号掲載

### 著者紹介

\*<sup>1</sup> 坂上万里

(株) 日立ハイテク ナノテクノロジーソリューション事業統括本部 評価解析システム製品本部 解析ソリューション開発部

\*<sup>2</sup> 陳偉健

(株) 日立ハイテク ナノテクノロジーソリューション事業統括本部 評価解析システム製品本部 解析ソフトウェア設計部



# 高機能熱分析装置NEXTA<sup>®</sup> STAシリーズ

高橋 秀裕<sup>\*1</sup>, 柴田 健一<sup>\*2</sup>

## 1. はじめに

材料の耐熱性評価, 寿命予測, 成分定量などに有効な手段である熱重量測定 TG (Thermogravimetry) は熱分析手法の一つである。温度制御された加熱炉の中に試料を入れ温度を一定速度で変化または保持させる過程で起こる試料の分解反応や昇華, 蒸発, 酸化反応などに伴う試料の質量変化を温度または時間の関数として捉える技法である。

しかし, TG から得た情報だけでは質量変化の原因を推察するのは困難なことも多い。そのため, TG と示差熱分析 DTA (Differential Thermal Analysis) や示差走査熱量測定 DSC (Differential Scanning Calorimetry) を組み合わせた TG/DTA, TG/DSC が普及している。近年では, さらに多くの情報を得るため, デジタルカメラを装備させて, 測定中の試料を観察する技法も注目されている。

当社では1970年代以降, 水平差動方式の TG/DTA を自社開発し, 世界中に販売してきた。2013年には水平差動型の TG 装置として世界初の試料観察型 TG/DTA (Real View<sup>®</sup>) を発売した。第7世代となる新シリーズは, シリーズ名を NEXTA<sup>®</sup> とし, DSC 測定機能を搭載した TG/DSC 3機種をリリースした (装置名: STA200, STA200RV, STA300)。図1左は, 試料観察ユニットを付属させた STA200RV の外観である。

TG の解析は, 質量減少が発生する前後の質量差を読み取るが, TG のベースラインにドリフトが発生している場合, この読み取り値に装置由来の質量変化が加わってしまう。測定精度を高めるためにはベースラインの性能が重要である。本シリーズではベースライン性能を向上させるため, 新しく設計した天秤安定技術を搭載した。

ここでは, 本シリーズで取り入れた新技術を説明するとともに, この装置によって得られた特徴的なデータを紹介する。

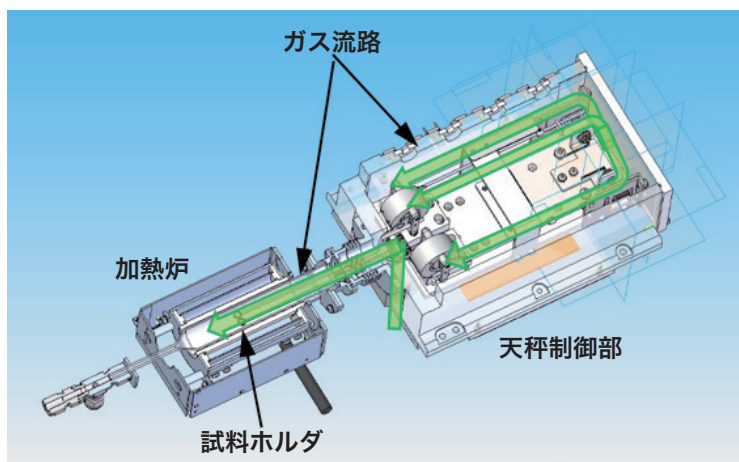
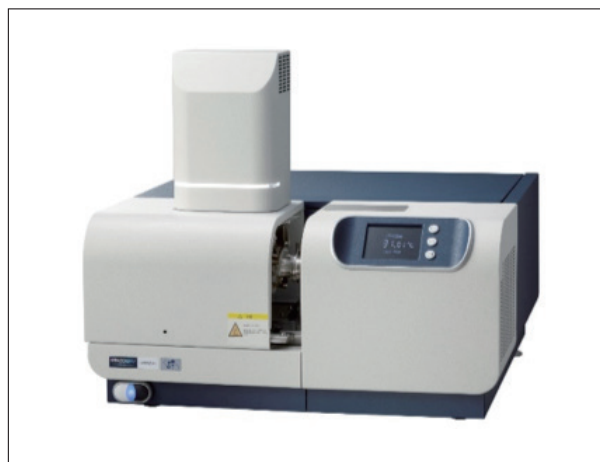


図1 NEXTA<sup>®</sup> STA外観(左)と天秤機構概略図(右)

## 2. ベースライン安定性

NEXTA<sup>®</sup> STA では, 天秤制御部の温度をつねに均一に保つことにより, 表1に示すように, 安定したベースラインを実現した。

図2は, 従来機と NEXTA<sup>®</sup> STA にて同条件で得られた TG のベースラインデータの重ね書きである。従来機と比較してドリフトが減少していることが確認できる。

ベースラインドリフトが低減した結果, 図3に示すような1%程度の微量の質量減少も高精度にとらえることができるようになった。

表1 NEXTA<sup>®</sup> STAの主な仕様

	STA200	STA200RV	STA300
天秤方式	デジタル水平差動型		
温度範囲	室温～1,100℃	室温～1,000℃	室温～1,500℃
TGベースライン性能	<10μg (室温～1,000℃昇温過程) <10μg (1,000℃等温保持時)		
DSC 機能	標準搭載		
比熱容量測定	可能 (オプション)		
試料観察オプション	非対応	オプション	非対応
ガスコントロール	マスフローコントローラー標準搭載		

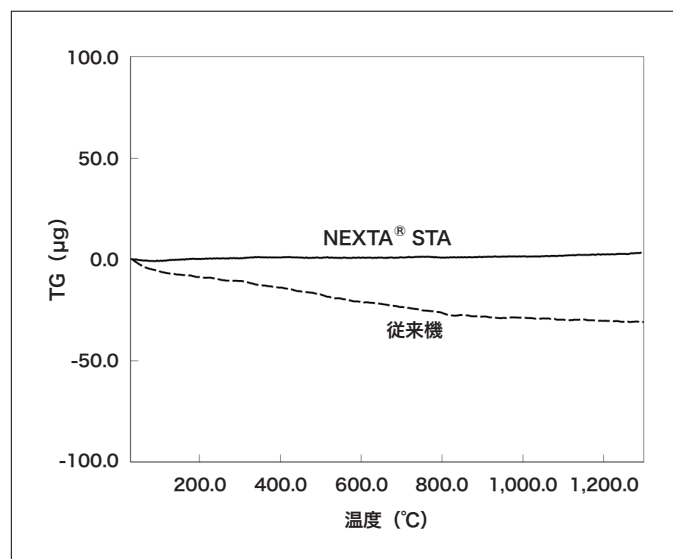


図2 ベースライン安定性

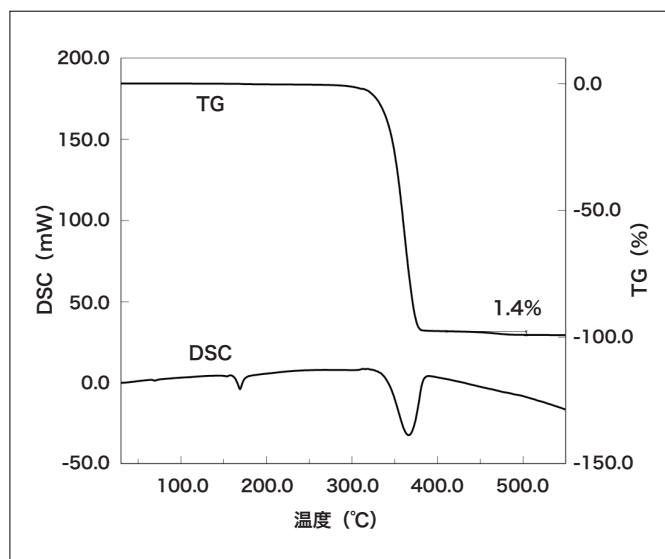


図3 微小混入量の定量例

### 3. ガス置換性の向上

TG 測定は一般的にガスを流しながら測定する技法であり、流すガスの種類によって試料で発生する反応が変わる。窒素をフローしながら測定する場合、多くの場合は酸化による反応を抑制しながら測定することを目的としている。金属試料の場合、測定系に酸素が混入すると測定中に試料が酸化し、試料本来の反応が発生しない可能性がある。また、高分子試料においては、分解開始温度が酸素濃度の影響を受けるケースも見受けられる。

当社の TG はガス置換性に優れた水平型の天秤機構を採用しており、他の天秤機構よりもガスフローを多くすることが可能であった。さらに、NEXTA<sup>®</sup> STA ではガス流路の最適化も行っており、従来よりもさらに置換性能を向上し、残留酸素濃度を 5 ppm まで低減することが可能となった。

図4は鉄粉を窒素雰囲気中で、1,400℃まで昇温測定した結果である。従来機と比較して TG の質量変化がほとんど確認できないことから、測定雰囲気中の残留酸素濃度が充分低いことがわかる。また、DSCチャートに現れた各転移のピーク温度が、純鉄の転移ピークであることも、試料が酸化していないことを示唆する結果となっている。



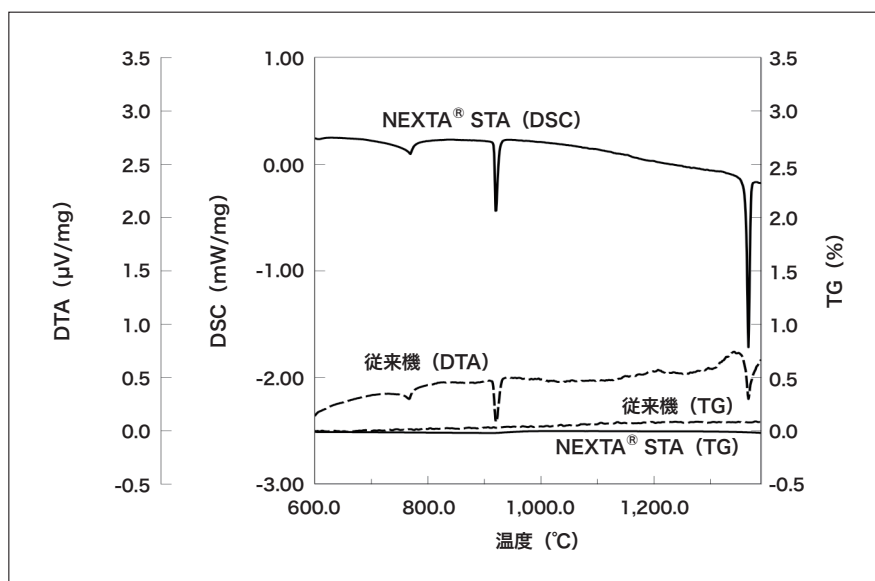


図4 鉄粉のSTA測定結果

## 4. 温度変調DSC機能による比熱測定

NEXTA® STAでは、温度変調DSC (TM-DSC) 測定が可能である。本機能は一定速度昇温に小さなサイン波状の温度変調を重ねた温度制御をする測定手法である。このデータを専用ソフトウェアで処理することにより、試料の比熱容量を算出できる。

図5は、モリブデンを測定した処理前のデータである。図6および表2は、比熱容量を算出した結果をNIST 認証値<sup>1)</sup>と併せて示している。認証値とTM-DSCによる測定結果がよく一致していることが確認できる。

熱分析装置で比熱測定を行う場合、汎用DSCを用いて、実試料、基準物質、空容器の3回の測定により比熱容量を求める方法が一般的であるが、その方法と比較して、NEXTA® STAを用いたTM-DSCによる比熱容量測定には以下のメリットがある。

- 都度の基準物質測定が不要。
- 高温までの広い温度域の一括測定が可能。
- 残留酸素が少ない雰囲気中で測定可能であるので、比熱測定中に試料が酸化するリスクが低い。

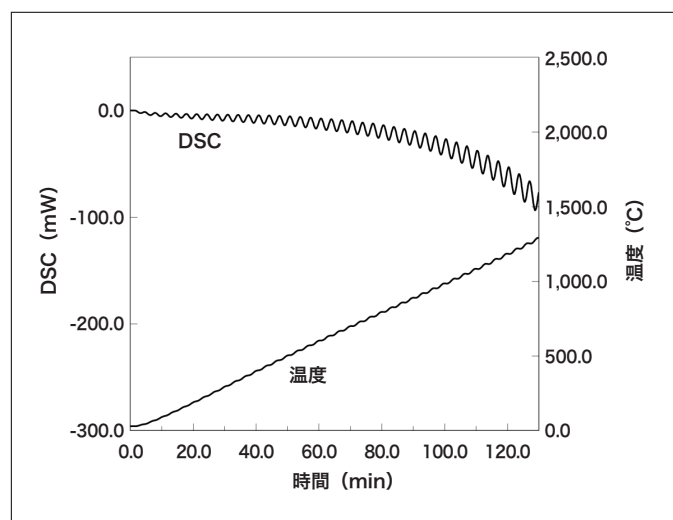


図5 TM-DSC測定データ

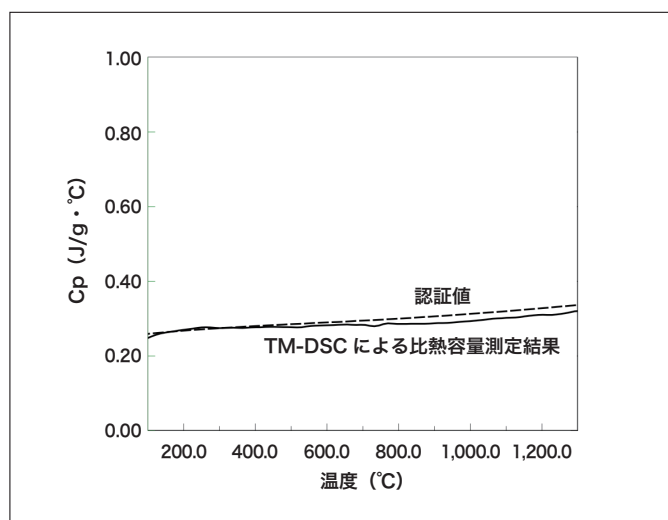


図6 モリブデンの比熱容量

表2 モリブデンの比熱容量読み取り値

	226.85℃	426.85℃	626.85℃	826.85℃	1026.85℃	1226.85℃
実測値 (J/g・℃)	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.31
認証値 (J/g・℃)	0.27	0.28	0.29	0.30	0.31	0.33

## 5. 試料観察熱分析の強化(色解析機能)

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

これまで観察だけではなく、デジタルズームに対応、長さ測定機能などの機能強化を続けてきた。NEXTA<sup>®</sup>シリーズでは新たに画像の色解析機能が付加された。色解析機能は収集した試料観察画像における任意のエリアの色相について、例えば赤(R)、緑(G)、青(B)の3種の数値で表現する手法である。本シリーズでは、RGB 以外に、CMYK、Lab の解析が可能である。

これまでの、測定中に色の変化があった場合は人の目による判定をしていたが、色解析を取り入れることで色の変化を定量的に評価することができるようになった。

図7は、硫酸銅5水和物の測定結果である。この試料は昇温により多段階に脱水による質量減少が起きることはよく知られている。脱水過程の試料観察画像を見ると、室温で鮮やかな青色であった試料が、次第に鮮やかさが消えながら、青色から白色へ変化している。この画像について、色解析(RGB)を実施して得られたR、G、B各信号を同じチャート上に表示した。

全ての色は、R、G、B各数値の組み合わせで表現できるが、室温近傍のR、G、B値と一段目の質量減少後(10～20分近傍)のR、G、B値は大きく変わっている。水和物がすべて脱水したと考えられる温度の画像も一見、グレーにみえるが、若干B(青色)成分を含んでいることがわかる。

ここでは、無機物の脱水過程における色変化を数値化した。高分子のSTA測定では、熱分解を測定することが多い。この場合、白色もしくは透明な高分子が黄変し、さらに昇温すると炭化していくが、この過程の評価にも適応が期待できる機能といえる。

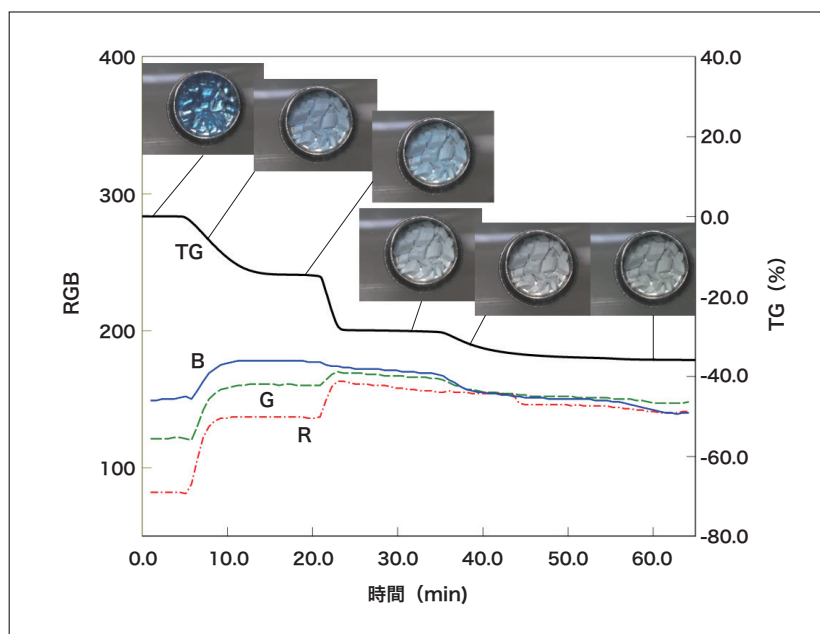


図7 試料観察TGの色解析例

## 6. まとめ

NEXTA<sup>®</sup> STAはベースライン性能、ガス置換性能の向上、DSC機能、試料観察機能を搭載した製品である。測定精度に課題を抱えている方、測定中に残留酸素で酸化反応が起きてしまっている方に最適なシステムになっている。色解析を新しく搭載したReal View<sup>®</sup>では、サンプルの色の変化をソフト上で定量的に評価できるようになり、より幅広い用途への応用が期待される。

## 参考文献

1) NIST SRM 781D2

1. “NEXTA<sup>®</sup>” および “Real View<sup>®</sup>” は株式会社日立ハイテクサイエンスの日本およびその他の国における登録商標です。

## 出典

月刊誌「工業材料」2019 年 10 月号掲載

## 著者紹介

\*<sup>1</sup> 高橋秀裕

(株) 日立ハイテクサイエンス アプリケーション開発センタ

\*<sup>2</sup> 柴田健一

(株) 日立ハイテクサイエンス マーケティング部

# 日立ハンドヘルド型・モバイル型元素分析装置のご紹介

Hitachi Handheld and Mobile Elemental Analyzer

鍋島 貴之

## 1. はじめに

ハンドヘルド型蛍光X線分析装置をはじめとする可搬型分析装置は、サンプルをラボに持ち込むことなくその場でオンサイト分析を行うことができ、分析対象に対する判断の効率化を可能にした。また、これらの分析装置の利点はオンサイト分析だけにとどまらず、従来のラボの分析装置内に設置することが困難な大型のサンプルを直接分析できることも、特長のひとつとしてあげられる。

可搬型分析装置は、近年その性能の向上により、使いやすさに加え、正確な分析能力、導入の簡便さ、携帯性などを併せ持つことで、従来のラボ用分析装置と比較して、より多くの分野で利用されるようになってきた。

今回紹介する日立ハイテクサイエンスの可搬型分析装置は、元素を対象として分析を行うためのハンドヘルド型及びモバイル型の元素分析装置である。ここではそれぞれの装置の特長、特性とそれらが貢献する代表的な対象分野について紹介する。

## 2. ハンドヘルド型・モバイル型元素分析装置のラインアップとその原理

日立ハイテクサイエンスは、さまざまな分析ニーズに応じていくつかのハンドヘルド型および、モバイル型元素分析装置のラインアップを提供している(図1)。

ハンドヘルド蛍光X線分析装置 X-MET8000シリーズ	ハンドヘルドLIBS分析装置 VULCAN+シリーズ	モバイル発光分光分析装置 PMI Masterシリーズ
		

図1 日立ハイテクサイエンスの可搬型元素分析装置のラインアップ

それぞれのラインアップで用いる分析手法は異なる。以下にその分析原理と、それを利用した製品の特長を示す。

### 2-1. 蛍光X線分析

蛍光X線分析では、試料中の原子を励起するためにX線が使用される。測定対象にX線が照射されることにより測定対象の内殻電子が励起され空孔が生じる。この空孔に外殻の電子が遷移し、電子軌道が正常な状態に戻るときに特性X線を放出する。照射されるX線を一次X線、放出される特性X線を二次X線と呼ぶ。この特性X線の波長やエネルギーは元素ごとに異なる。特性X線の放出された量を検出器によって検出することにより、試料中に存在する各元素の量を判断することができる(図2)。

蛍光X線分析の最大の特長のひとつは非破壊分析であり、分析対象の表面に痕跡を残さないことである。

蛍光X線分析はエネルギー分散型蛍光X線分析装置と波長分散型蛍光X線分析装置に分類される。日立ハイテクサイエンスのハンドヘルド蛍光X線分析装置はエネルギー分散型である。エネルギー分散型は特性X線のエネルギー毎にその量を検出できる検出器を用いており、装置の小型化に適している。X-MET8000シリーズはX線の発生にはX線管球が用いられ、検出器にはSDD(Silicon Drift Detector)という小型で高分解能な検出器が搭載されている。

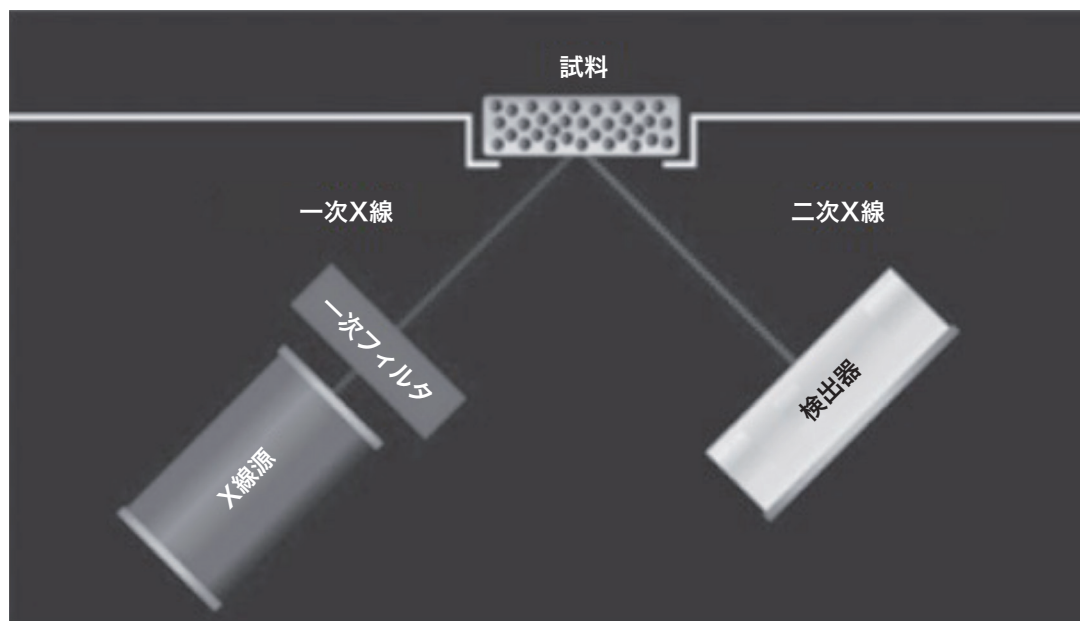


図2 蛍光X線分析の原理

## 2-2. レーザー誘起ブレイクダウン分光分析

レーザー誘起ブレイクダウン分光分析は、LIBS (Laser-induced Breakdown Spectroscopy) と呼ばれることが多く、励起源としてレーザーを使用している。測定対象をレーザーによってスパッタリングすることにより、測定対象の照射された部位の内殻電子が励起され空孔が生じる。この空孔に外殻の電子が遷移し、電子軌道が正常な状態に戻るときに各元素に対応した特長的な波長の光が放出される。放出された光は分光器によって波長ごとに分散され、その量が検出器によって検出される(図3)。

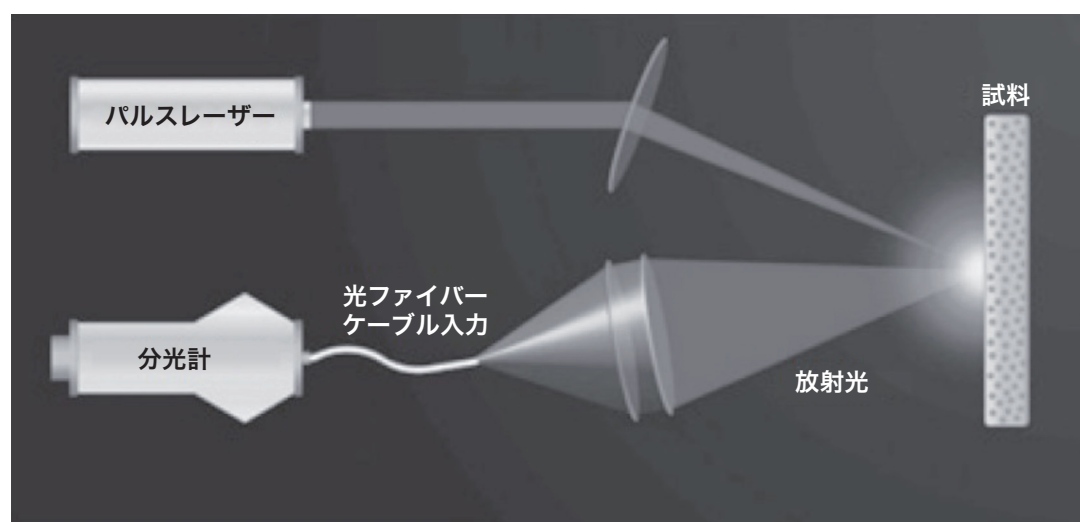


図3 レーザー誘起ブレイクダウン分光分析(LIBS)の原理

LIBS は試料表面をスパッタリングし分光分析することから、破壊検査となる。ただし、LIBS において試料に照射するレーザーは非常に小さく絞られるため、試料の痕跡は最小限に抑えられる。また LIBS は、蛍光 X 線分析と比べて軽元素の検出感度が高いのが特長である。

日立ハイテクサイエンスのハンドヘルド型 LIBS 装置である VULCAN + シリーズは、用いられるレーザーの特性、出力より測定対象が金属に限定される。パルスレーザーによる短時間の照射で分析を行うことにより、約1秒で分析結果が出ることも特長のひとつである。



## 2-3. OES (Optical Emission Spectrometry : 発光分光分析)

OESはLIBSと同じ分光分析技術を用いた分析手法である。LIBSが励起源としてレーザーを使用しているのに対し、OESはアーク放電またはスパーク放電のいずれかで測定対象をスパッタリングしている。スパッタリングにより測定対象を励起した後の原理はLIBSと同様である。

OESもLIBSと同様に試料表面をスパッタリングし分光分析することから、破壊検査となる。LIBSと比較し、照射エネルギーが大きいことから、試料の痕跡は残るが、感度が高く、測定対象元素が多いことがその特長である。

日立ハイテクサイエンスのモバイル発光分光分析装置 PMI Master シリーズは、測定対象が金属に限定されるが、特に PMI Master Smart は、測定が困難な条件の厳しい場所でも高精度の分析を行うことが可能な、世界最小・最軽量クラスの発光分光分析装置である。

## 3. 対象分野とその重要性

以上のように、それぞれのラインアップで用いられる原理が異なるため、測定対象や必要とする情報によって最適な装置を使用し、分析を行うことが重要である。ここでは、代表的な対象分野とその重要性についていくつかピックアップする。

### 3-1. 金属加工分野と品質管理の重要性

今日の金属加工産業では、納入業者の材料証明書だけを頼りにするのではなく、正しい材料が使用されていることを確認するために、合金分析装置を使用することが重要になってきている。間違った材料を使用することで事故や製品トラブルが引き起こされる事例が報告されているためである。

航空宇宙、自動車、石油化学をはじめとする多くの産業において、原材料を分析し、証明書の記載と実際の仕様が合致しているかの検査は、その企業に安全性と信頼の確保をもたらす。

製造業でのニーズは多様であるが、納入した材料を検査するために倉庫内で分析が行われる場合が多い。また、材料の受領印や証明書を紛失したような場合には、材料の取り違えを防ぐため工場のフロアでも分析が行われる。その場で結果を得ることが重要なため、外部委託をはじめ、分析室に持ち込んでの分析では要求に十分には応えられない。

日立ハイテクサイエンスの合金分析装置のラインアップには、超高速のハンドヘルドLIBS分析装置、非破壊式のハンドヘルド蛍光 X 線分析装置、高精度の OES 分析装置など、顧客の要件に応じた分析ソリューションがそろっている。

例えば全数検査をはじめ、検体数が多い場合には分析速度が重要となるためハンドヘルドLIBS分析装置が求められ、完成品の検査を行う場合には非破壊であることが重要となるためハンドヘルド蛍光 X 線分析装置が求められる。

### 3-2. 金属生産分野と精度の重要性

金属生産においては、メーカーの仕様を満たす高品質な製品を提供するため、最高水準の精度が必要になる。したがって、納入した材料の検査から製品の品質管理に至るまでの全工程にわたって分析が行われる。納入した金属くずの選別にはハンドヘルドLIBS分析装置 VULCAN + シリーズを用いることもできるが、さらに高精度の分析を要する場合は OES 発光分析装置を用いることが望ましい。

OES 発光分析装置は金属生産の工程において、すべての重要元素に対し、最高水準の精度と非常に低い検出限界によって監視を行うことができる。また OES は、鋼材の最も重要な合金元素である炭素を高精度に分析することが可能な重要な技術である。測定の難しい低レベルのホウ素や窒素でさえも、OES 分析装置あれば ppm レベルまで正確に測定することができる。

日立ハイテクサイエンスのモバイル発光分光分析装置 PMI-Master シリーズは高い信頼性から、金属メーカーで重要な役割を果たすことが可能である。

また据え置き型の OES 発光分光分析装置である Foundry-Master シリーズもラインアップしている。



### 3-3. 金属リサイクル分野における成分分析と混合物特定的重要性

金属は何度も溶解させて原材料として使用できることから、理想的なリサイクル資源である。また、金属リサイクルは環境負荷が少なくエネルギー効率がよい。例えば、金属くずからアルミニウムを製造した場合、ボーキサイト鉱石を原材料として使用するのに比べて最大95%のエネルギーを節約できる。また金属リサイクルにおいては、通常、保証された最小限の組成に基づいて評価されるスクラップ合金の塊を購入し、ハンドヘルド型の分析装置を使用して金属を仕分けした後、価値の高い部分を販売することで利益が得られる。

その他、金属の再利用における課題のひとつは、再利用を繰り返すために汚染が蓄積されることである。汚染された材料は金属生産において重大な問題を引き起こす可能性があるため、低レベルの混合物を調査・特定することがますます重要になりつつある。金属くずを炉に入れる前に、そうした金属に含まれる銅、スズなどの元素を特定しなければならない。

日立ハイテクサイエンスのハンドヘルドLIBS 分析装置 VULCAN +シリーズは、SUS やアルミ合金の等級をわずか1秒で特定でき、大量のスクラップであっても素早く効率的に仕分けすることが可能である。一方、ハンドヘルド蛍光 X 線分析装置は、特に混合物などの分析で威力を発揮する。

### 3-4. その他のアプリケーション

LIBS, OES の技術は金属を対象としたものであるが、蛍光 X 線はプラスチックや鉱石、土壌なども測定対象となる。樹脂中の RoHS 分析をはじめ、木材、塗料、自動車触媒などさまざまな元素を対象とする分析需要があり、オンサイトでの分析、大型サンプルの分析に貢献している。

## 4. おわりに

現時点では、迅速な仕分けから高精度の元素分析まで、すべての用途に対応した単一の装置は存在しない。日立ハイテクサイエンスは、金属産業にとどまらず、さまざまな元素分析ニーズに応えるべく、多様な製品ラインアップで多くのソリューションを提供していく所存である。

#### 著者紹介

鍋島 貴之

(株) 日立ハイテクサイエンス XR 営業部

## 株式会社 日立ハイテク

本社(サポートセンタ)	東 京	(03)3504-7211	中 部 支 店	名古屋	(080)8420-6408
北 海 道 支 店	札 幌	(080)8021-5427	関 西 支 店	大 阪	(080)8020-3544
東 北 支 店	仙 台	(080)8438-0969	九 州 支 店	福 岡	(080)9564-0285

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

本ニュースに関するお問い合わせは、下記へご連絡ください。

**HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS**    March 2020    VOL. 63    No. 1

発行日	2020年3月31日	発 行	株式会社日立ハイテク
編集人	許斐麻美		〒105-6409
発行人	内田憲孝		東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
			電話 (03) 3504-7211

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