

HITACHI
Inspire the Next

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

S
E
P
T
E
M
B
E
R
2
0
2
0

Vol. 63 No. 2

5553

«コラム

低真空SEMの可能性—SEMの基礎研究—

関口 隆史

5556

«研究報文

全固体リチウムイオン2次電池**—硫化物系固体電解質のナノスケール構造解析—**

森 茂生, 塚崎 裕文

5564

病院内での薬物血中濃度分析のための実用的なHPLCシステムの開発

森川 剛

5572

«技術解説

SEM-SPM-白色干渉顕微鏡によるコリレーション解析

相蘇 亨

5580

LA8080高速アミノ酸分析計用 分析支援ソフトウェアAminoARTS

伊藤 正人, 源 法雅, 渡辺 義市, 宝泉 雄介, 成松 郁子, 豊崎 耕作, 山田 宜昭

5585

ショットキー FE-SEM SU7000を用いた金属材料の*in-situ*引張観察

橋本 陽一朗, 板橋 洋憲, 斎藤 勉

低真空SEMの可能性—SEMの基礎研究—

The Potential of Low-Vacuum SEM—Basic research on SEM



筑波大学 数理物質系

教授

関口 隆史 (理学博士)

新型コロナウイルスのために、我々の大学でも学部生は全てオンライン授業となり、キャンパスは閑散としている。この状況で、授業の質を落とさず、授業についていけない学生を出さないようにするために、大学教員も大いに努力している。しかし、講義はまだ良いとしても、実験をオンラインで行うのは大分無理があるよう感じている。特に、自分の手で装置を動かし、失敗しながら創意工夫を凝らして実験を行う経験は何物にも代えがたいものであろう。実験ではないのだが、計測実験学という授業でSEMの講義を行い、低真空卓上顕微鏡(TM4000Plus)で観察したいいろいろな塩の観察結果を公開し、それについてレポート課題を出したところ、学生から大きな反響を得た。図1は、その資料(抜粋)である。

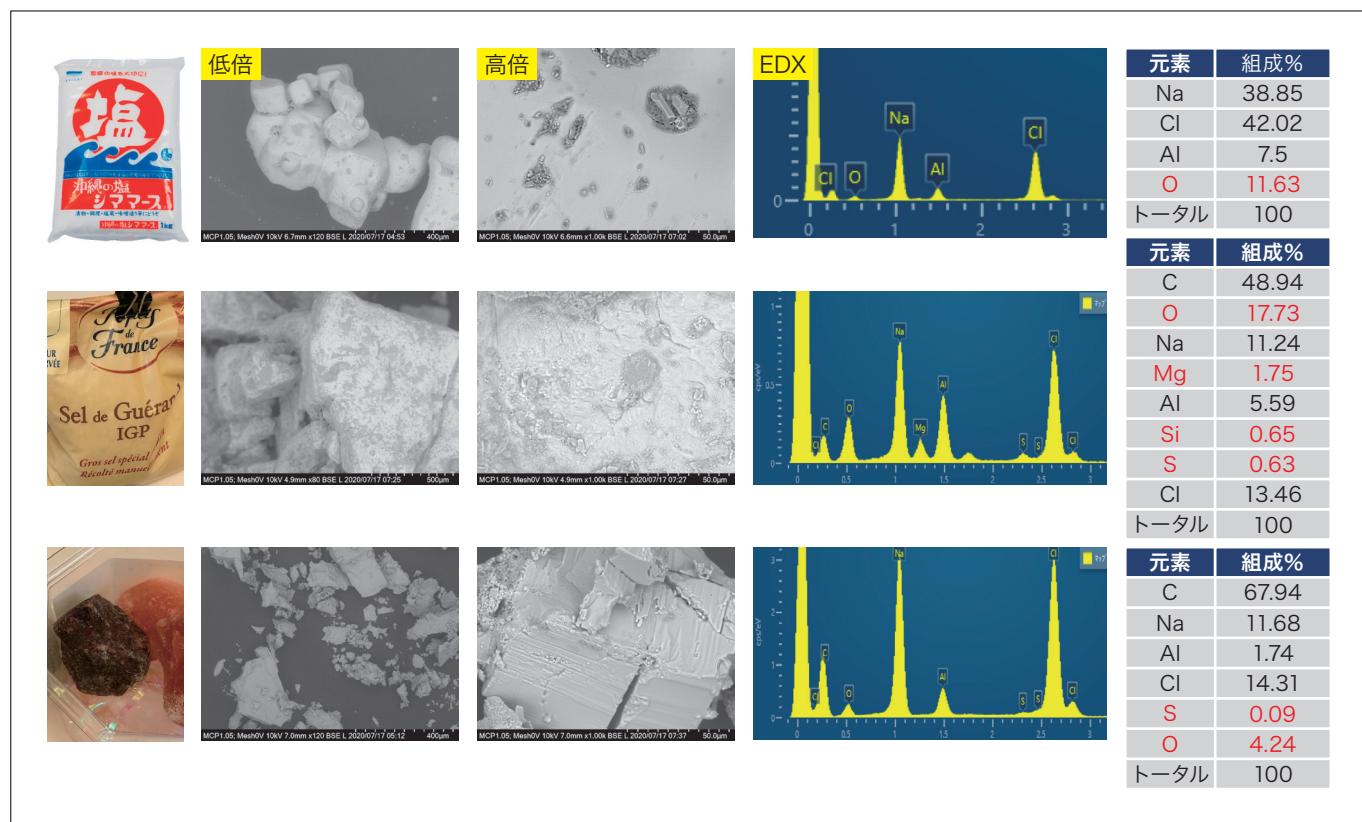


図1 いろいろな塩のSEM像(反射電子)とEDX分析結果
(加速電圧 10 kV)

食卓塩、ゲランデ塩田の塩、ピンクと黒のヒマラヤ岩塩（おろし器で削ったもの）の4種の形状（反射電子像）と組成（EDXスペクトル）を見せて、味との関連を議論してもらった。同じ塩でも形状や大きさには大きな違いがあり、また純度も違い、不純物もまちまちである。塩の結晶ができたときの環境を議論しているだけで、数ページのレポートができてしまう。バックグラウンドのAIを食卓塩の主成分であると回答したり、EDXスペクトルに現れたCを過大評価して、ゲランデの塩の中には有機物が多量に含まれているなどの珍答もあって面白い。学生と議論することができないので、生の実験結果をどのように踏みして考えるかを教えることの難しさを実感している。

さて、最近の卓上顕微鏡は、低真空を利点として、導電性コーティングなしで試料を観察できる。これは、SEMにとつてはまさに革命的な出来事で、一挙に観察対象が広がった。筑波大では卓上顕微鏡を共用に供しているが、強磁性体の微粒子以外、観察する固体には制限をかけていない。ただ、このことはまだ周知の事実とはなっていないようである。現に、40代以上の研究者の多くは、SEMで絶縁体を観察するときはコーティングが必須であると考えている。ましてや、装置を痛める湿った試料などの観察は避けるべきであると考えている。一方、低真空SEMが普及してからSEMを使いだした若い世代は、SEM観察に大きなハードルを持っていない。注意していないと、液体まで入れてしまいそうな学生もいるくらいである。

低真空卓上顕微鏡の良いところは、思いついたらすぐ実験ができるところである。コーティングが不要であれば、試料の前処理に時間はかかるない。朝のTVでは、新型コロナウイルスの感染予防にマスクが有効かどうかの議論をしていた。不織布マスクではウイルスを防御できないと言われても、ちゃんと納得するのは難しい。そこで、出勤早々、マスクに μm サイズのナイロン粒子を含んだ空気を透過させ、それをTM4000で観察した。図2に示すように不織布の使い捨てマスクは3層構造になっている。目の粗い不織布で、目の細かい不織布を挟んだ形である。なるほど、目の細かい不織布は $1\mu\text{m}$ の粒子を取り込んでいる。もっと大きな粒子は外側の不織布の接着部分にへばりついている。静電気の影響なのかもしれない。あいにくサブ μm の粒子が手元になかったので、ウイルスの挙動についてはまだ答えが出ていないが、マスクの役割についてかなり納得できた。いずれにせよ、繰り返し使用時には、表と裏を区別しておかないといけない。

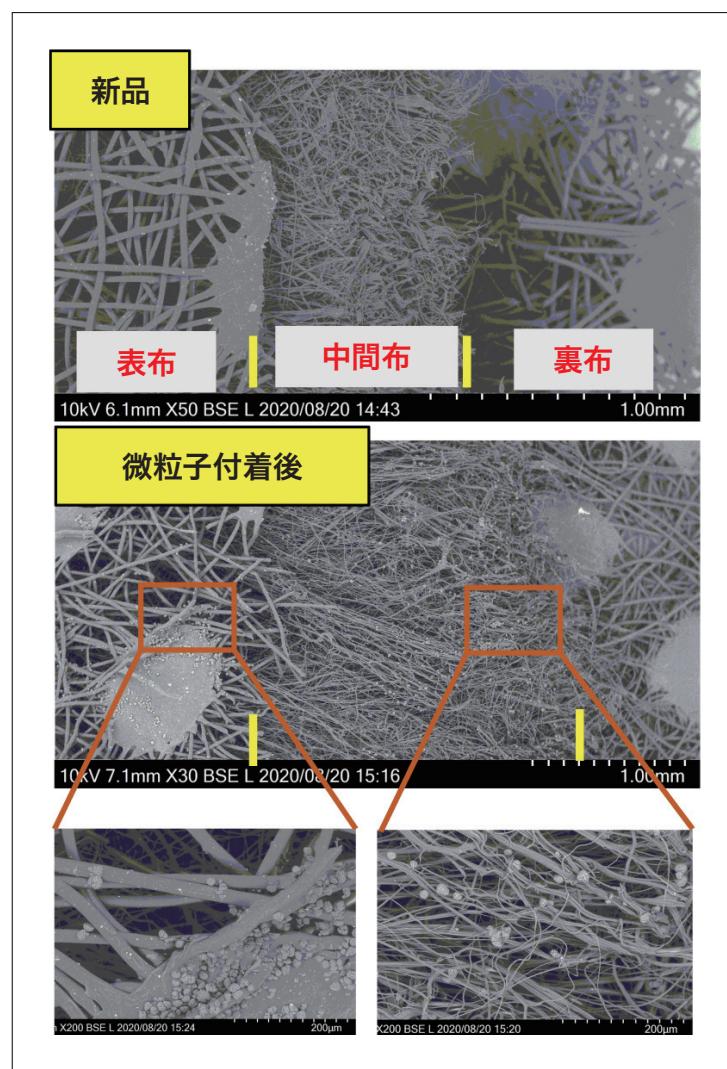


図2 不織布マスクのSEM像（反射電子）。新品と微粒子付着後
(加速電圧 10 kV)

最後の例は、塩の結晶と蜘蛛である。2年前は大きな台風が何個も日本に上陸し、めったに被害を受けない千葉や茨城でも大きな災害があった年である。つくばを大きな風台風が通過した翌日は、台風一過の晴天であったが、車のボンネットがべたべたしていて、台風がいろいろなものを落としていたのだということが分かった。ちょうど、大学の建物の脇に蜘蛛が巣を張っていたので、蜘蛛の巣をTMで観てみよう、一部を採集してみた。それが図3である。図鑑によると蜘蛛の巣は、縦糸は撲った糸であり、横糸は一本の糸に粘球がついた構造をしている。どうやら無分別に採集したために両者が絡み合ってしまったようである。このときは、SEM(反射電子)像に白い斑点が付いていたので、EDXの元素マッピングを撮ってみた。それが右のカラー像である。白い斑点は、NaとClのマップで明るくなっていること、塩の結晶ができることが分かった。海から100km離れたつくばにも海水を運んだ台風もさることながら、それが結晶化して、蜘蛛の巣についているとは想像だにしなかった。この結晶ができるまで、雨粒には塩が凝縮されて、さぞかししおいしい水滴が蜘蛛の巣についていたのだろう。あの蜘蛛が塩水を飲んで高血圧にならなければ良いがなあと思った次第である。

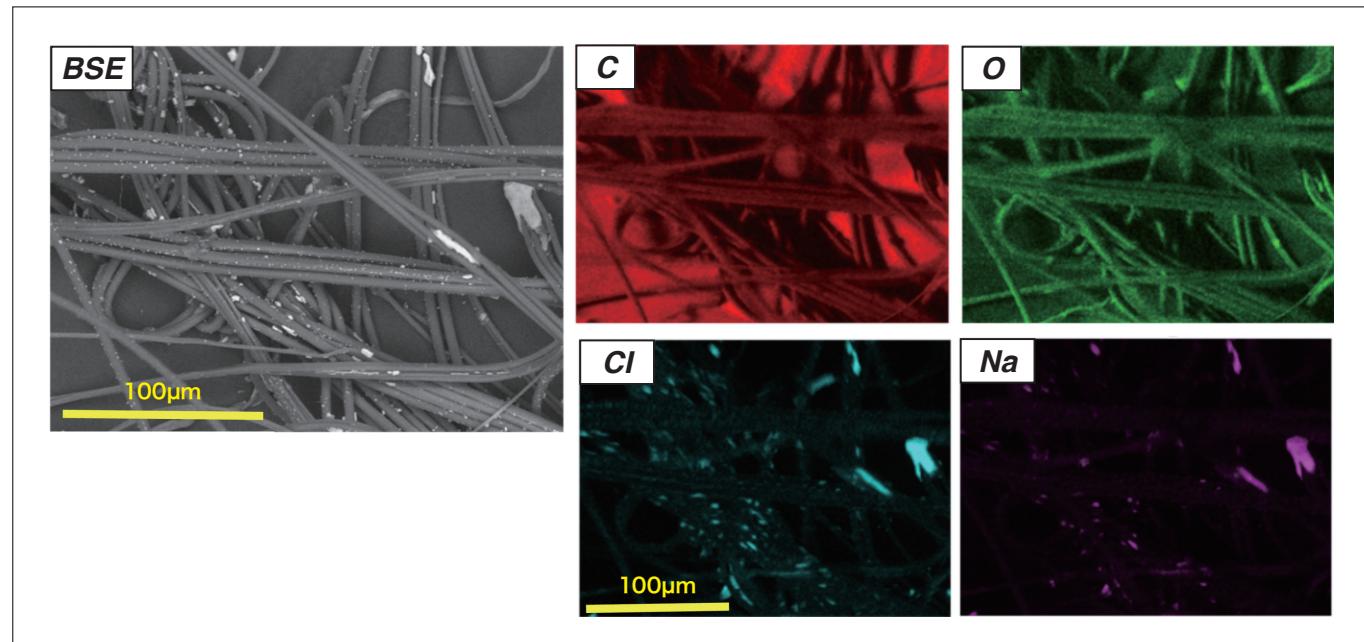


図3 台風翌日に採取した蜘蛛の糸。SEM像(反射電子)とX線元素マッピング
(加速電圧 10 kV)

閑話休題。これまで低真空SEMは、高真空排気系を持たない簡易型のSEMに取り入れられてユーザーを増やしてきた。低真空SEMは、材料のコーティングなどの試料準備に時間をかけなくとも済む。これからは、光学顕微鏡のように、実験室にあたりまえに置いてある実験器具としての地位を築いていくであろう。一つ付け加えると、TMの試料室の扉の裏には、ブランク蓋がついており、工夫すれば、電流導入や試料加熱、マニュピレーションなど、いろいろな環境を実現することができる。この装置のような使い勝手の良い簡易型低真空SEMがさらに普及して、SEM観察の裾野が広がることを願っている。

脚注

- (*)1 本稿では紹介できなかったが、筑波大学では、特別共同研究事業として、SEMの研究室を運営している(<https://advsem.bk.tsukuba.ac.jp/>)。この事業では、測長SEMやSEMの基礎技術の研究と、電子顕微鏡にかかる人材の育成、教科書作りなどのNPO事業に取り組んでいる。
- (*)2 また、これまでの低真空SEMには、二次電子像が得られないという欠点があったが、二次電子が雰囲気ガスに衝突して生じる発光を検出するUV検出器は、二次電子検出器の代替として十分な力を発揮しており、低真空二次電子検出器としての地位を確保するものと思われる。試料を選ぶが、このUV検出器を使えば、カソードルミネッセンス像(パンクロマテックCL像)も観察できる。更には試料ホルダーを工夫するとSTEM像も得られる。

全固体リチウムイオン2次電池 —硫化物系固体電解質のナノスケール構造解析—

All-solid-state Lithium-ion Secondary Battery
—Nanostructure Analysis of Sulfide-based Solid Electrolytes—



大阪府立大学 大学院工学研究科
物質・化学系専攻
マテリアル工学分野
材料構造物性研究グループ
教授

森 茂生 博士(工学)



大阪府立大学 大学院工学研究科
物質・化学系専攻
マテリアル工学分野
材料構造物性研究グループ
特認助教

塚崎 裕文 博士(工学)

概要

従来のリチウムイオン電池は優れた充放電サイクル特性と高いエネルギー密度を示すものの、電解液に可燃性の有機溶媒を用いているため、安全性に大きな課題がある。そこで、電解液の替わりに、不燃性の無機固体電解質を用いた全固体電池の開発が盛んに行われている。無機固体電解質として硫化物系 $\text{Li}_2\text{S} \cdot \text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質は、熱処理により結晶化が生じ、析出する結晶相の種類によってイオン伝導度が大きく変化する特長がある。一般にガラスを結晶化させたものをガラスセラミックスと呼んでいるが、その構造については不明な点が多く、結晶を含んだ非結晶状態の実態は未だに解明されていない。ここでは、高分解能電子顕微鏡法、電子回折法、および暗視野法を用いて、 $\text{Li}_2\text{S} \cdot \text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質のナノスケールでの微細構造について調べ、イオン伝導度との関係について検討を行った結果について報告する。また、全固体電池用 $\text{LiNi}_{1/3}\text{Mn}_{1/3}\text{Co}_{1/3}\text{O}_2$ (NMC) 正極複合体に対して加熱その場 TEM 觀察を行い、加熱によって生じた構造変化から NMC 正極複合体が示す発熱反応の起源について検討した。

1. はじめに

「エネルギー資源」と「環境」問題の解決に向けた研究開発が全世界で進められている。中でも重要な再生可能電力や環境にやさしい電動自動車の大規模導入には、電気エネルギーを貯蔵する高容量で長寿命・安全性の高い蓄電池の開発が不可欠とされている。リチウムイオン二次電池は優れた充放電サイクル特性と高いエネルギー密度を示すことから、現在携帯電話やノートパソコンなどのポータブル機器用電源として利用されている。また、大型化や高エネルギー密度化によって、電気自動車や家庭用大型蓄電池としての応用も期待されている。しかしながら、現在のリチウムイオン二次電池では、可燃性有機電解液を用いているため発火性などの安全性に欠けるという問題がある。このような安全性の問題を解決するため、近年電解液を不燃性の無機固体電解質に置き換えた全固体電池の開発が盛んに行われている。最近、電解液に匹敵するイオン伝導率を示す硫化物系固体電解質が見いだされ、広い電位域において電気化学的に安定であることから、全固体電池への応用が期待されている。

図 1 はバルク型全固体電池の模式図を示している。バルク型全固体電池は、微粒子を積層することによって作製されている。電極層に電極活物質を多量に導入することが可能なため、電池容量を大きく向上できる利点がある。例えば正極層に着目すると、正極層はリチウムイオンの伝導パスを担う固体電解質と正極活物質によって構成されている。したがって、全固体電池を実用化するためには、高いイオン導伝性を示す固体電解質や高容量を有す電極材料の開発、ならびに乱れのない電極・電解質固体界面の構築が重要となる。

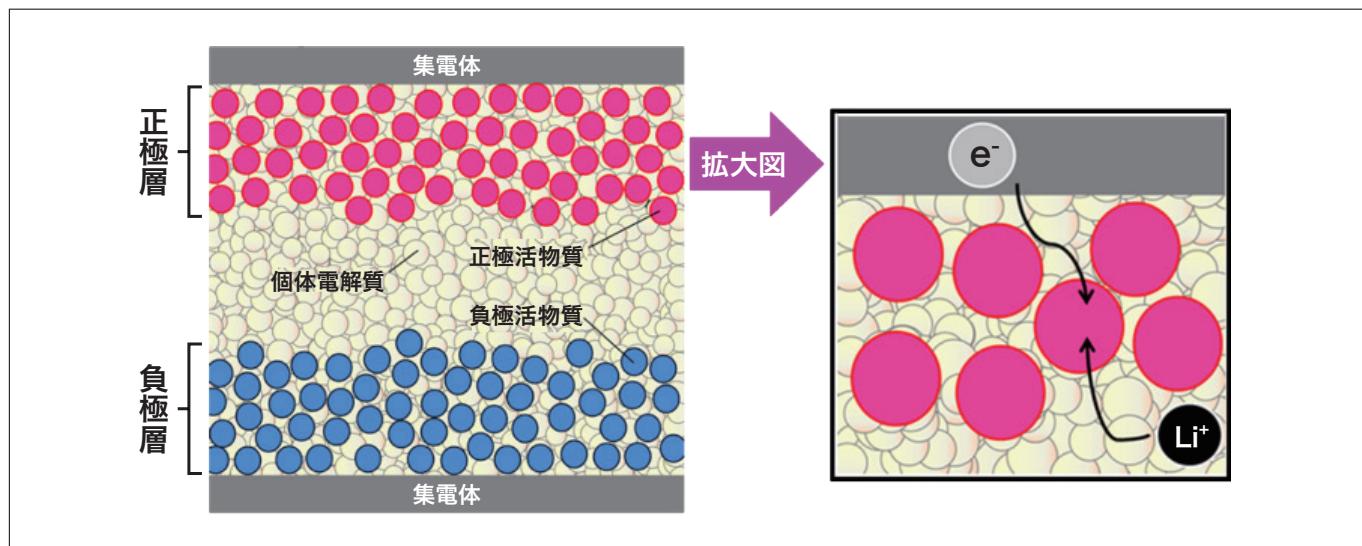


図1 バルク型全固体電池の模式図

硫化物系固体電解質は、酸化物系よりも高いイオン伝導度を有し、広い電位域において電気化学的に安定である。その中でも $\text{Li}_2\text{S}-\text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質は、図2に示すように、熱処理によって結晶化させるとイオン伝導性が向上する性質がある¹⁾。このため高イオン伝導度を実現するためには、非晶質状態や非晶質マトリックス中の析出した結晶の形態・繋がり方を解明することが重要となる。これまで我々は、透過型電子顕微鏡(以下TEM)を用いて、硫化物系ガラス電解質の高いイオン伝導度のメカニズムを明らかにするために、非晶質状態の高分解能TEM観察やガラスの結晶化挙動の加熱その場TEM観察を行ってきた²⁻⁴⁾。

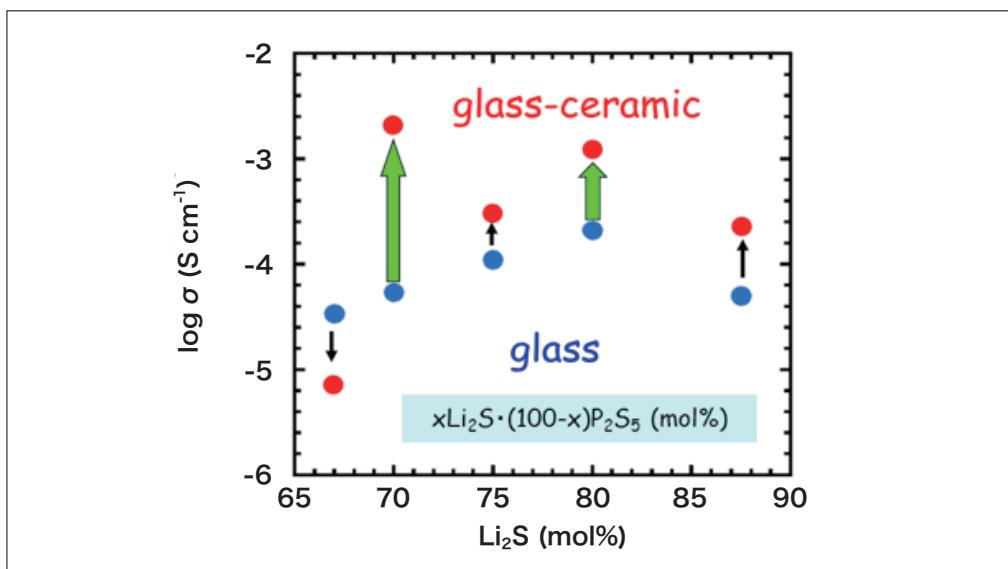


図2 70Li₂S · 30P₂S₅ガラス電解質のイオン伝導度の組成依存性¹⁾

硫化物系固体電解質は空気や水分に対する不安定性のため、不活性ガス雰囲気下でTEM観察するための実験環境を整える必要がある。TEM観察用試料の作製は図3に示す不活性ガス雰囲気のグローブボックス内で行い、TEM観察時には不活性ガス雰囲気対応の真空TEMホルダーと加熱用TEMホルダーを用いた。さらに、非晶質・結晶質領域の空間分布を可視化するため、暗視野法を用いた^{5,6)}。暗視野法は、結晶化により出現した回折スポットを用いて実空間像(暗視野像)を得ることができる。暗視野像の撮影には、輝度を稼ぐため電子線を絞る必要がなく、試料へのダメージを最小限に抑えて観察できる有効な手法である。またこの観察手法を用いれば、ガラス電解質をTEM内で加熱することで、結晶化プロセスを直接観察することも可能になる。



図3 硫化物系電解質を空気にさらさずにTEM観察するための実験環境
左：グローブボックス 右：真空TEMホルダー(上)と加熱用TEMホルダー(下)

2. 硫化物系Li₂S・P₂S₅ガラス電解質の高分解能TEM観察

硫化物系 Li₂S・P₂S₅ガラス電解質での非晶質状態、および結晶を含んだ非晶質状態(結晶化ガラス状態)について TEM を用いたその場観察により調べた。観察試料として、80Li₂S・20P₂S₅ガラスセラミックスを用い、結晶化ガラス状態の微細構造を調べた。室温で測定した X 線回折データには高イオン伝導結晶相 Li_{3.25}P_{0.95}S₄の回折ピークが観察された。そこで、Li_{3.25}P_{0.95}S₄結晶の形態を明らかにするため TEM を用いてナノスケールでその場観察を行った。

図4は80Li₂S・20P₂S₅ガラスセラミックスの高分解能電子顕微鏡像である。大きさ約5 nm の Li_{3.25}P_{0.95}S₄ナノ結晶が非晶質領域中に存在し、互いに連結している様子が観察される。この結果から、超イオン伝導ナノ結晶の析出、および連結が高いイオン伝導度に寄与していることが示唆される。

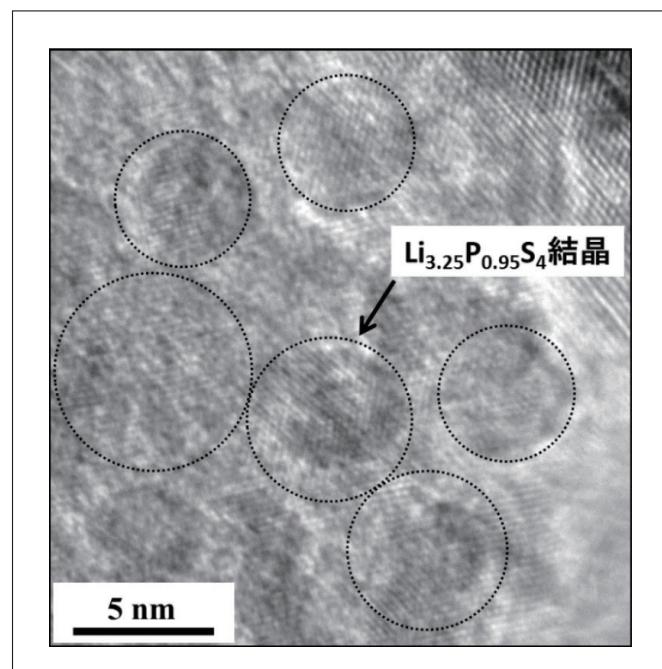


図4 80Li₂S・20P₂S₅ガラスセラミックスの高分解能電子顕微鏡像²⁾

次に $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質の微細構造を調べた。図5は $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質の暗視野像と高分解能電子顕微鏡像である。まず、図5に示す結晶粒から得られた電子回折図形にはハローパターンが観察される(図5左図の挿入図)。これは、平均構造として非晶質状態であることを示唆している。一方、暗視野像中には、図5左内の矢印で示すように、結晶領域を示す明るいコントラストが所々に点在している。さらに高分解能電子顕微鏡像中には、図5右内の点線で示すように、大きさ数nmのナノ結晶が非晶質領域中にランダムに分布している様子が観察された。これらの観察から、ガラス状態は均質な非晶質状態ではなく、数nmのナノ結晶を含んだ不均一な状態であることが明らかになった。

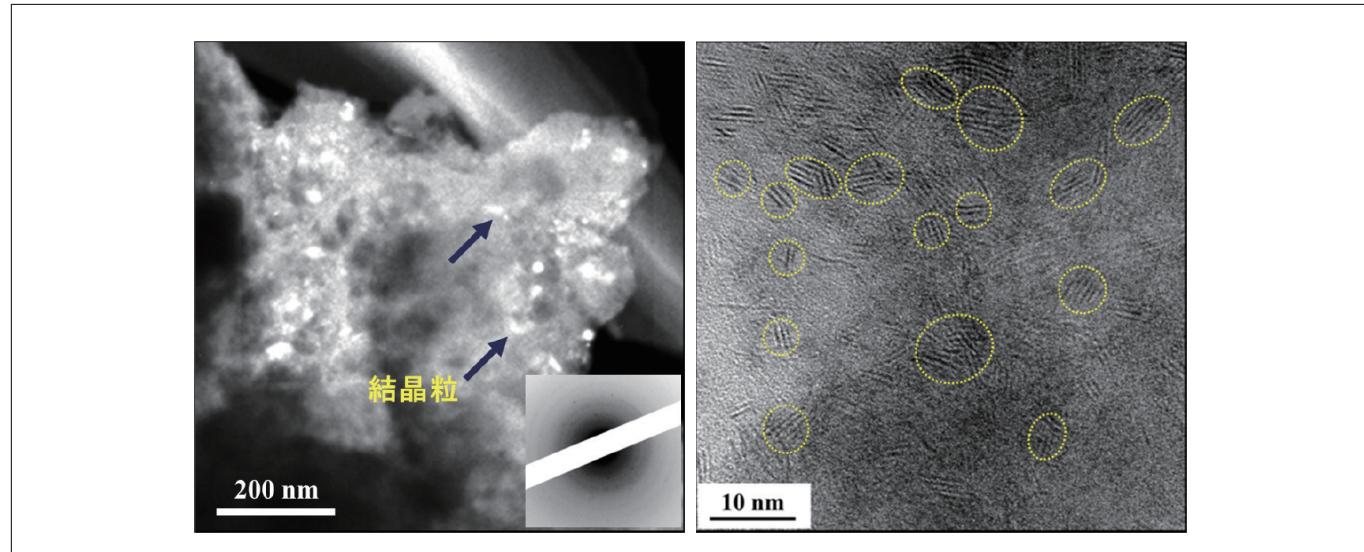


図5 $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質の暗視野像と高分解能電子顕微鏡像²⁾

次に、加熱によるその場TEM観察によりガラス電解質の結晶化挙動について調べた。図6は $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質から取得した各温度での電子回折図形である。室温では非晶質状態を示すハローパターンが観察される。この状態から加熱すると、約180°C付近で結晶化が始まり、その後は温度上昇とともに結晶化が進行する。280°Cの電子回折図形を解析した結果、析出した結晶相は仕込み組成に対応する $\beta\text{-Li}_3\text{PS}_4$ であることが分かった。さらに、 $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラスセラミックスの微細構造を明らかにするため、210°Cでその場TEM観察を行った。図7は $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラスセラミックスの暗視野像と高分解能電子顕微鏡像である。電子回折図形中には多数の回折スポットから成るデバイリング、暗視野像中には大きさ約10 nmの $\beta\text{-Li}_3\text{PS}_4$ 結晶粒が観察される。高分解能電子顕微鏡像中には、点線で示すように、 $\beta\text{-Li}_3\text{PS}_4$ 結晶が互いに隣接している様子が観察される。このように、暗視野法と高分解能TEM法を組み合わせることにより、これまで解明されていなかったガラスセラミックスの描像、すなわち結晶を含んだ非晶質状態の実態と、ナノ結晶の析出と連結が高いイオン伝導性に寄与していることが明らかになった。

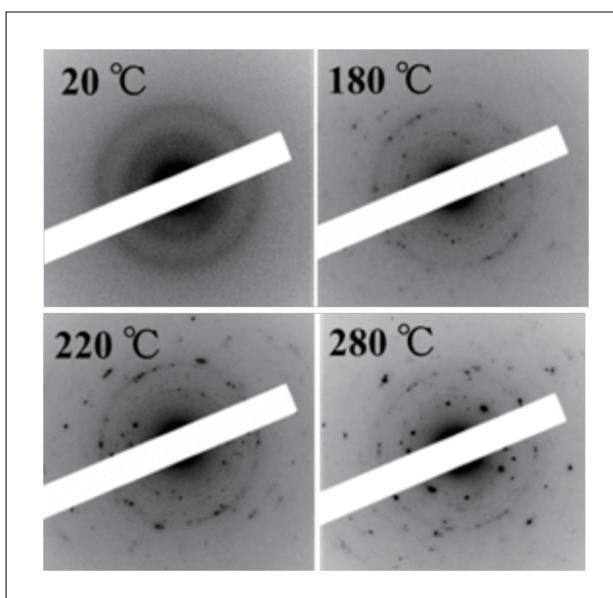


図6 $75\text{Li}_2\text{S} \cdot 25\text{P}_2\text{S}_5$ ガラス電解質における電子回折図形の温度変化²⁾

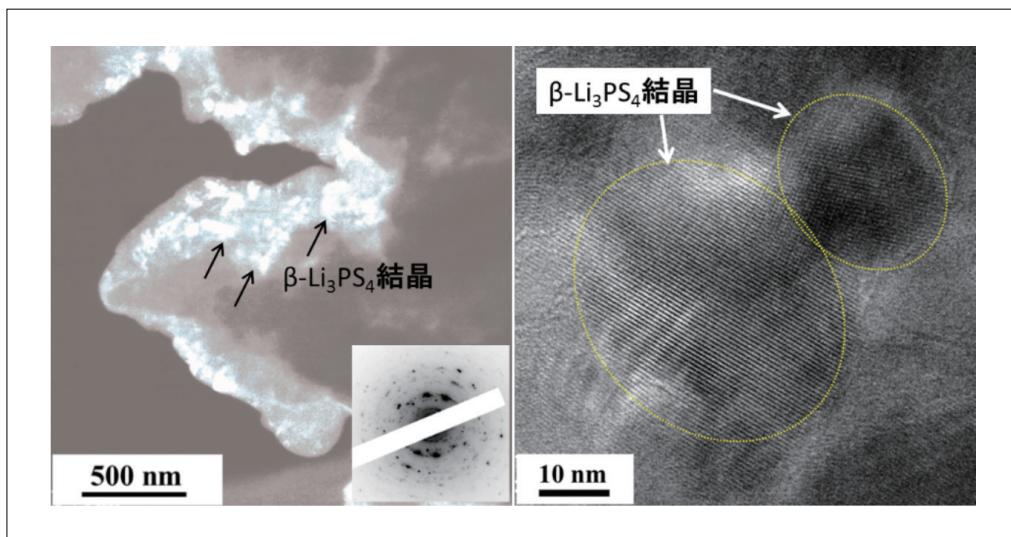


図7 75Li₂S · 25P₂S₅ガラスセラミックスの暗視野像と高分解能電子顕微鏡像²⁾

3. 全固体リチウムイオン2次電池用LiNi_{1/3}Mn_{1/3}Co_{1/3}O₂正極複合体の加熱その場TEM観察

全固体リチウムイオン2次電池の実用化には、電池の発熱や発火等を抑え、安全性を確保することが必須であり、使用環境の温度に耐えうる電池材料を開発する必要がある。また、発熱は電池の寿命を劣化させる要因にもなりうる。このため、電池材料の発熱挙動の評価や電池材料が示す発熱反応の要因を解明することが非常に重要である。本研究では、硫化物系固体電解質に対して行ってきたTEM観察手法を電極複合体に応用し、電極複合体の熱的安定性について評価を行った。本研究では、良好な長期サイクル特性を示す Li₂S-P₂S₅ (以下 LPS) ガラス電解質と正極活性物質 LiNi_{1/3}Mn_{1/3}Co_{1/3}O₂ (以下 NMC) から正極複合体を調べた^{7,8)}。図8は充電後 NMC-LPS 正極複合体の熱的挙動を示差走査熱量測定で調べた結果を示している。一定速度で温度を上昇させていくと、300 ~ 400°Cの温度範囲に2つの発熱反応が生じていることがわかる。本研究では、これらの発熱反応の要因を明らかにするため、加熱用TEMホルダーを用いて正極複合体をTEM内で加熱し、加熱に伴う構造変化をその場観察した。さらに、得られたTEM観察結果と第一原理計算をもとに、起こりうる化学反応過程、ならびにこの正極複合体が示す発熱反応の要因について検討した。

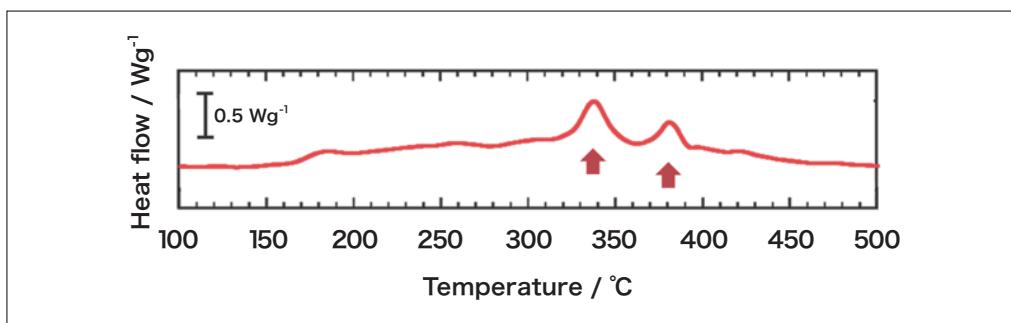


図8 充電後NMC-LPS正極複合体の示差走査熱量測定結果⁸⁾

充電後 NMC-LPS 正極複合体の加熱時における構造変化を調べた結果、活性物質 NMC には構造変化なく、電解質 LPS では結晶化が生じることが分かった。本研究では NMC との界面接触がある LPS 領域と界面接触がない LPS 領域にて、結晶化挙動の相違について検討を行った⁷⁾。図9は、充電後 NMC-LPS 正極複合体の明視野像と、NMC/LPS 界面近傍の LPS 領域における電子回折図形の温度変化を示している。まず室温(20°C)では、非晶質状態を示すハローパターンが観察される。この状態から加熱していくと、250°C付近で結晶化が始まり、350°C付近までは緩やかに結晶化が進行する。さらに温度を上昇させると、400°C以上で強度が強く明瞭なデバイリングが出現し、結晶化が進行している様子が分かる。各温度の電子回折図形から析出結晶相の同定を行った結果、200 ~ 350°Cでは Li₃PS₄、400°C以上では Li₄P₂S₆ や Li₂S が析出することが分かった。一方図10は、NMC-LPS 正極複合体において NMC との界面接触がない LPS 領域の明視野像と、電子回折図形の温度変化を示している。温度上昇とともに250°C付近で結晶化が始まるものの、図9で観察されるような強度の強いデバイリングは出現しない。析出結晶相の同定を行った結果、NMC と界面接触を持たない LPS 領域では、仕込み組成に対応する Li₃PS₄のみが析出することが分かった。このように、LPS の結晶化挙動は、活性物質 NMC との界面接触の有無によって大きく異なることが明らかとなった。

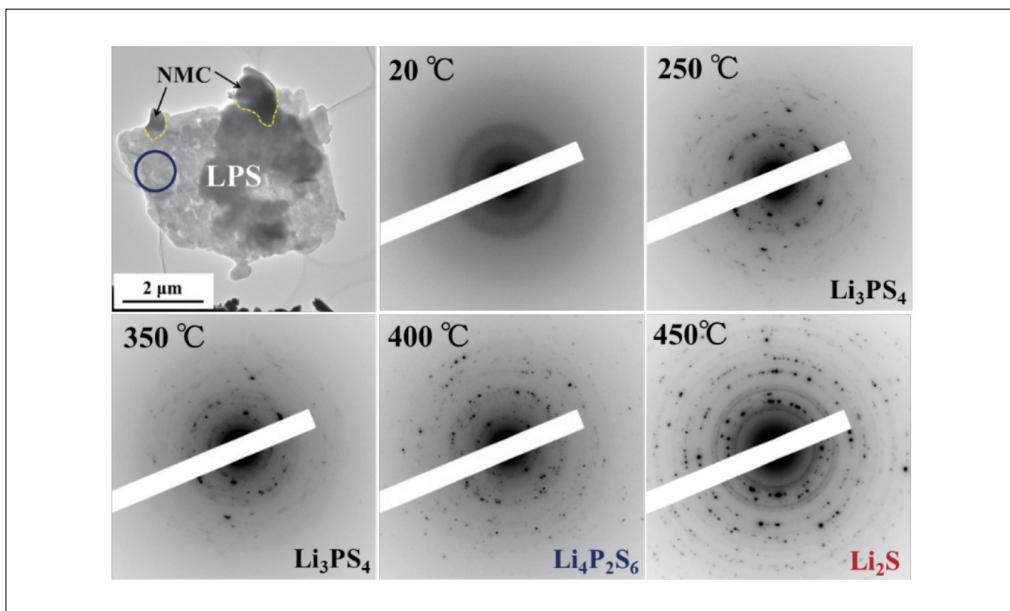


図9 充電後NMC-LPS正極複合体の明視野像とLPS領域における電子回折图形の温度変化。
電子回折图形は明視野像中の青丸で示したLPS領域から取得⁸⁾

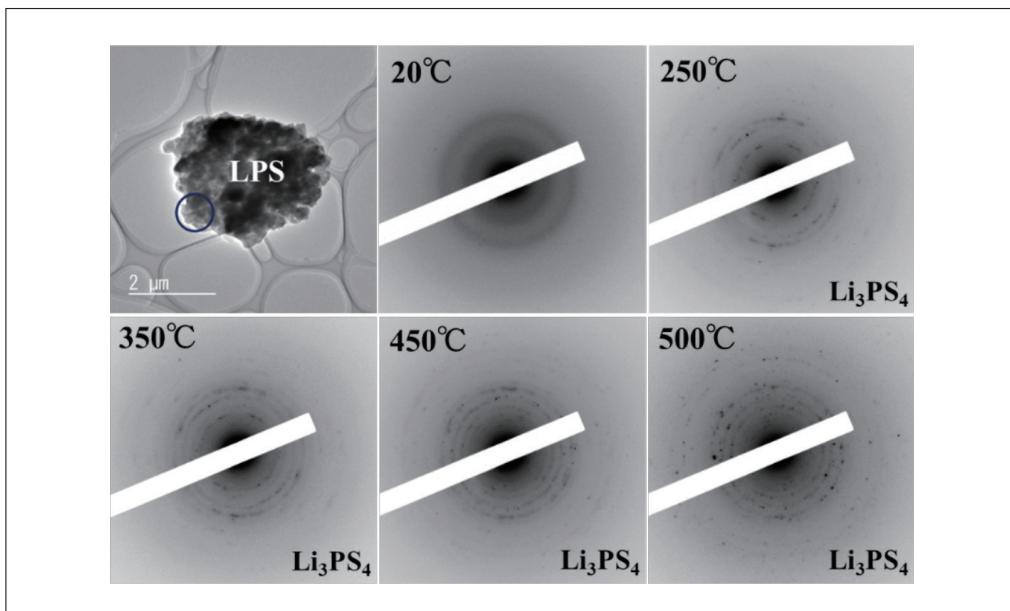


図10 NMCと界面接触がないLPS領域の明視野像と電子回折图形の温度変化。
電子回折图形は明視野像中の青丸で示したLPS領域から取得⁸⁾

図11は、図9に示す一連の電子回折图形に対応する実像の温度変化である。これらの像は、結晶化によって出現した回折スポットを用いて結像した暗視野像の重ね合せである。実像の温度変化からも400°Cを境に結晶化領域が増加している様子が分かる。このように、NMC-LPS正極複合体中のLPS電解質では、発熱反応が存在する高温域において、 $\text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6$ や Li_2S の析出に伴い、結晶化が大きく進行する。

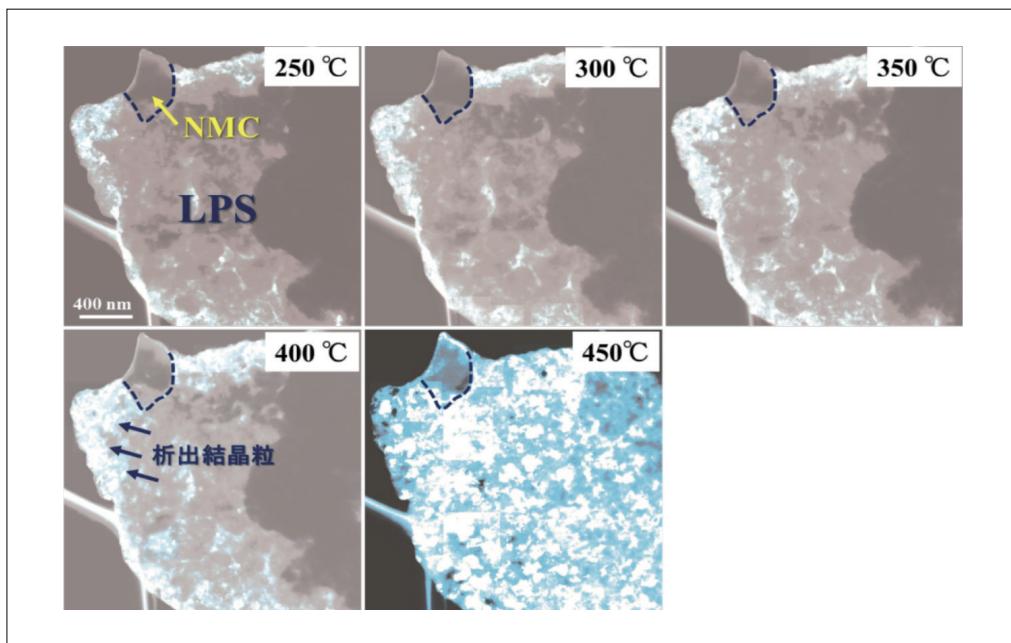


図11 NMC-LPS正極複合体中の電解質LPSの結晶化過程を示す一連の暗視野像⁸⁾

以上のTEM観察結果をふまえ、第一原理計算による計算シミュレーションを元に各結晶相の生成エネルギーや化学反応について検討した。その結果、2つの化学反応がエネルギー的に生じ易い可能性が見出された。

- (1) $\text{Li}_3\text{PS}_4 - \text{Li}$ (in NMC) \rightarrow (1/2) $\text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6 + \text{S} + 1.8 \text{ eV} (\text{/f.u.})$.
- (2) $2 \text{Li}_3\text{PS}_4 \rightarrow \text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6 + \text{Li}_2\text{S} + \text{S} - 0.2 \text{ eV} (\text{/f.u.})$.

まず(1)は、充放電により脱Li状態になったNMCによって Li_3PS_4 からLiイオンが引き抜かれ、 $\text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6$ に分解する反応である。一方(2)は、 Li_3PS_4 自身が $\text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6$ と Li_2S に分解する反応である。反応生成物の $\text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6$ や Li_2S が結晶化すると、その結晶化エネルギーが発熱として観測される。以上のTEM観察結果と計算シミュレーションから、充電後NMC-LPS正極複合体の発熱反応には、図12に示すように Li_3PS_4 の分解によって生成される $\text{Li}_4\text{P}_2\text{S}_6$ や Li_2S の結晶化に伴う発熱が関与している可能性が示唆された。このような加熱その場TEM観察と第一原理計算を組み合わせた発熱挙動の解析手法は、他の電池材料にも展開できる。

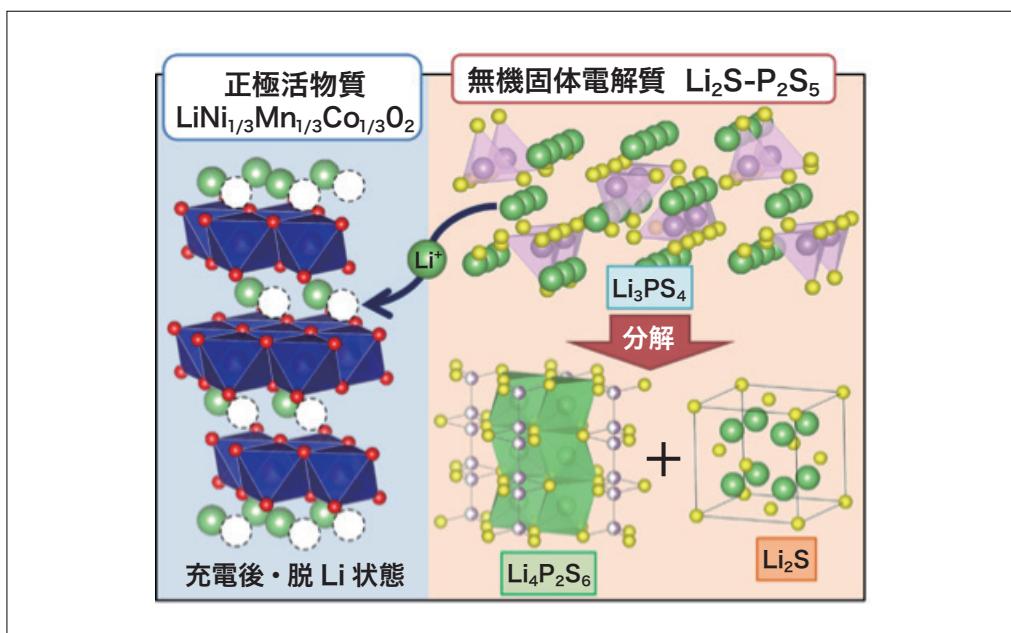


図12 充電後NMC-LPS正極複合体中で生じるLPS電解質の分解反応⁸⁾

4. おわりに

今後は、結晶化エネルギーの計算も進め、発熱反応の要因をさらに明確化していきたいと考えている。また、LPSの結晶化挙動がNMCとの界面接触によって大きく異なる要因として、結晶化する前の非晶質状態、すなわち、局所領域における原子やクラスターの結合状態も影響していることが予想される。そこで今後は、X線吸収分光法、ナノビーム電子回折法、2体相関分布関数法等を用いた非晶質状態の解析も取り入れる予定である。このように、電池材料の発熱挙動とその要因について多角的に評価し、全固体リチウムイオン2次電池の実用化に貢献していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、JST戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発・特別重点技術領域「次世代蓄電池」(ALCA-SPRING)の一環として実施されたものである。研究に際し多くのご協力ならびにご助言をいただいた大阪府立大学大学院工学研究科の辰巳砂昌弘教授、林晃敏教授、作田敦准教授、に深く感謝する。また、第一原理計算による研究は、国立研究開発法人物質・材料研究機構の大野隆央博士との共同研究によるものである。

参考文献

- 1) F. Mizuno, A. Hayashi, K. Tadanaga, M. Tatsumisago, New, highly ion-conductive crystals precipitated from $\text{Li}_2\text{S}-\text{P}_2\text{S}_5$ glasses, *Adv. Mater.*, **17**, 918–921 (2005).
- 2) H. Tsukasaki, S. Mori, H. Morimoto, A. Hayashi, M. Tatsumisago, Direct observation of a non-crystalline state of $\text{Li}_2\text{S}-\text{P}_2\text{S}_5$ solid electrolytes, *Sci. Rep.*, **7**, 4142 (2017).
- 3) 化学工業日報:「電池向け固体電解質 非結晶状態を直接観察」(2017年7月3日)。
- 4) 科学新聞:「ガラス固体電解質の非結晶状態解明」(2017年7月21日)。
- 5) H. Tsukasaki, S. Mori, S. Shiotani, H. Yamamura, H. Iba, Direct observation of a non-isothermal crystallization process in precursor $\text{Li}_{10}\text{GeP}_2\text{S}_{12}$ glass electrolyte, *J. Power Sources*, **369**, 57–64 (2017).
- 6) H. Tsukasaki, S. Mori, S. Shiotani, H. Yamamura, Ionic conductivity and crystallization process in the $\text{Li}_2\text{S}-\text{P}_2\text{S}_5$ glass electrolyte, *Solid State Ionics*, **317**, 122–126 (2018).
- 7) H. Tsukasaki, M. Otoyama, Y. Mori, S. Mori, H. Morimoto, A. Hayashi, M. Tatsumisago, Analysis of structural and thermal stability in the positive electrode for sulfide-based all-solid-state lithium batteries, *J. Power Sources*, **367**, 42–48 (2017).
- 8) H. Tsukasaki, Y. Mori, M. Otoyama, S. Yubuchi, T. Asano, Y. Tanaka, T. Ohno, S. Mori, A. Hayashi, M. Tatsumisago, Crystallization behavior of the $\text{Li}_2\text{S}-\text{P}_2\text{S}_5$ glass electrolyte in the $\text{LiNi}_{1/3}\text{Mn}_{1/3}\text{Co}_{1/3}\text{O}_2$ positive electrode layer, *Sci. Rep.*, **8**, 6214 (2018).

病院内での薬物血中濃度分析のための実用的なHPLCシステムの開発

Development of a Practical HPLC System for In-hospital Analysis of Blood Concentration of Various Medicines (and Related Compounds)



JA長野厚生連北信総合病院薬剤部
主任
森川 剛

1. はじめに

著者は2012年4月に薬剤師として働き始めてから、治療薬物モニタリング(therapeutic drug monitoring, TDM)を行う必要のある薬剤のうち、病院内で血中濃度が定量できる薬剤は一部であり、多くの薬剤の分析が外注委託されている状況に気がついた。例えば、当院では生化学・免疫分析装置 cobas[®]6000(ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いているが、院内における薬物血中濃度測定は汎用される7薬剤に限っており、他の約40薬剤は外注委託している。外注委託は便利である反面、分析結果を得るのに数日～1週間程度かかり、委託費用も安くはない。一方で、それらの項目を院内で測定するために必要な検査装置の導入コストやランニングコストは市中病院には負担が大きすぎる。また、分析担当者の不在、人件費の削減などの問題もあるため、院内での血中濃度測定業務は全国的に縮小傾向にあった。

このような状況は、TDMを行うことの臨床的な有用性が十分に認識されていないことの現れでもある。著者には、「医療現場で誰もが使えるHPLC法や装置」の開発が上記問題を解決する喫緊の課題であるように思われた。そこで、東京薬科大学の出身研究室(生体分析化学教室:柳田顕郎教授)の指導のもと、2012年9月から共同研究を開始した。

本稿では、まず、薬物血中濃度測定とHPLCの現状と課題について概説した後、(株)日立ハイテクサイエンスが共同開発した医療現場向けのHPLCシステムであるLM1010の開発経緯と今後の展望について述べる。

2. 医療現場における薬物血中濃度測定の必要性と課題

現在、薬物治療には、患者個人毎に最適な治療方法を分析・選択・施行するプレシジョン・メディシン(precision medicine, 精密医療)が求められている。プレシジョン・メディシンを支援する有効なツールとして、遺伝子情報に基づいた最適な薬物の選択や投与量設定を行うファーマコゲノミクス(pharmacogenomics, PGx)や、薬物血中濃度測定と解析を行い最適な投与量・投与方法の設定を行うTDMが挙げられる。

TDMにおいては、薬物血中濃度が治療効果と副作用発現に密接に関連するとき、薬物血中濃度の把握が投与設計の指標となる。もちろんすべての薬剤でTDMが必要という訳ではないが、TDMが必須もしくは有用な薬剤は多数存在する。TDMの実施が有用な薬剤服用者の薬物治療が無効で、その血中濃度が有効治療域下限未満であれば投与量を増量する。一方で薬物治療は有効だがその血中濃度が副作用発現域であれば、投与量の減量を考慮する。他にも薬物血中濃度の測定は、患者の服薬アドヒアランスの判断を可能とするし、多剤併用患者で薬物間相互作用の影響を検討する上などで役立つ。

また、中毒診療においても薬毒物の血中濃度測定が行われることがある。ただし、定量分析結果が診断・治療に有用なケースに限られており、日本中毒学会では15品目を「分析が有用な薬毒物」として提言している。

このように、薬物血中濃度を測定し、薬物動態学を用いて正しく解析することは、TDMや中毒診療において重要なファクターとなっていることは自明である。

しかしながら、薬物血中濃度測定は多くの病院で外部委託分析に依存している現状がある^{1,2)}。血中薬物濃度は、刻一刻と変化する臨床所見や検査結果と併せて、リアルタイムで考察するからこそ意味があり、迅速に分析結果を提供できなければ、血中濃度の測定意義もまた薄れてしまう。逆説的に、それが臨床現場において薬物血中濃度測定が軽視されている要因の一つとも考えられる。

3. 医療現場におけるHPLC法の現状と課題

日本では、保険診療(特定薬剤管理料)の対象薬として、1980年に炭酸リチウムが、翌年に抗てんかん剤とジギタリス製剤が認可された。それ以降、TDMの有用性が確認された薬剤は漸次拡大され、保険点数も引き上げられてきた。その薬物血中濃度分析において、1980年代～90年代にHPLC法が果たした意義は大きかったが、リガンド結合法(Ligand-Binding Assay, LBA法)を搭載した簡易な自動分析装置の普及と臨床検査項目の外部委託の推進によって、HPLCを保有する医療機関は減少の一途を辿ることとなった。

臨床薬毒物分析においても、1998年厚生省の補助によって救急救命センターに精密分析機器が配備されたが、多くは質量分析計を検出器とする高性能HPLCやGCシステムであり、汎用的で安価な紫外可視(UV)検出器を備えたHPLCを主力な装置として活用している施設はあまりない。

このように臨床現場において汎用型のHPLC装置が普及しているとは言い難い状況ではあるが、果たしてLBA法や質量分析計を用いた定量分析法だけで十分であるかというとそうではない。LBA法は簡易である反面、抗体等の試薬や消耗品のランニングコストが高いため、院内での測定項目を限定したり、外注分析される事例が増えている。また、質量分析計を備えたLC-MS/MSやGC-MSは、導入コストの問題や高性能装置ゆえの特殊な機器操作や維持管理などの理由により、運用できる医療施設は限定される。

そのため、LBA法やLC-MS/MSやGC-MS法の欠点を補完し、汎用性や簡便性、迅速性、検査項目の拡張性のあるシステムであれば、HPLC法は医療現場において再び活躍できるのではないか、と著者らは考えた。

4. 病院内での血中濃度測定に向けた基礎検討³⁾

4-1. 目的

これから医療現場に必要なHPLC法には、上記背景を加味すると以下の条件が求められるだろう。1)分析初心者でも扱える簡便なシステムであること、2)(質量分析計のような)高額な装置や(抗体等の)特殊な試薬は用いないこと、3)前処理と分析条件はほぼ同一で、かつ多品目を測定できること、4)迅速性に優れたシステムであること、である。

4-2. 測定

HPLCによる薬物濃度定量に先立つ前処理手段として、固相抽出(solid-phase extraction, SPE)法を検討した。HPLC装置は、逆相カラム、オートサンプラー、多波長UV(ダイオードアレイ)検出器を備えたChromaster[®]を使用した。被検薬物の血中濃度定量は以下の手順で行った。1)薬物標準液をHPLC分析して、一点検量線を作成した。2)薬物を含む血清を遠心スピンカラムでSPE処理してから、溶出液をHPLC分析して、前出の検量線から血中濃度を算出した。

使用機種

Chromaster[®] 液体クロマトグラフ(日立ハイテクサイエンス)

himac CT15E 小型遠心機(工機ホールディングス)



図1 測定に使用した機器(Chromaster[®])

4-3. 結果・考察

病院内で血中濃度測定を行う実用性を重視して、SPEによる前処理と逆相HPLC/UV検出システムを組み合わせた血中薬物濃度の迅速定量法を構築した(図2)。1薬剤ごとに迅速性を重視した分析法のため、分離分析の必要があれば別途検討する必要があるが、初期検討としては行わなかった。本法の検出感度はUV検出のため、ppmオーダーであるが、(現在論文で報告している)TDM対象薬物14品目を含む15品目の薬物に対して、ほぼ同一の前処理手順で単一のHPLC装置を用いた測定が可能であることを示した。

また、本法は(内標準法ではなく)絶対検量線法を用いており、しかも検量線は各薬剤の有効治療域内の最大濃度の1点検量線を用いた(図3)。これに関しては、3点検量線と1点検量線についてそれぞれ定量バリデーションを実施し、1点検量線による絶対検量線法は、定量値の真度や繰り返し精度の両面で、十分実用的な性能を有していると判断した。医薬品開発段階の薬物動態研究における生体試料中薬物濃度分析法(バイオアナリシス)のバリデーションのガイドラインから本法は逸脱しているという指摘を受けたことがあるが、このようなガイドラインは新薬開発時の臨床試験等を想定した指針であり、本法が目指している病院内でのTDM等に活用できるレベルの分析精度を想定していない。さらに、本法のコンセプトからすべての薬剤の安定同位体標識体を内標準物質として用意するのは現実的ではなく、また、将来的にメーカー保証の1点検量線用の標準液が製作される可能性も考慮した。

本法を用いた臨床研究は、当院の臨床検査技師と薬剤師が、(カルバマゼピン、フェニトイン、ラモトリギン、ポリコナゾールの服用患者の)患者血清を用いた薬物血中濃度の院内測定が可能かどうか当院の倫理委員会の承認を経て実施したが、その成果は報告予定であることを付記しておく。

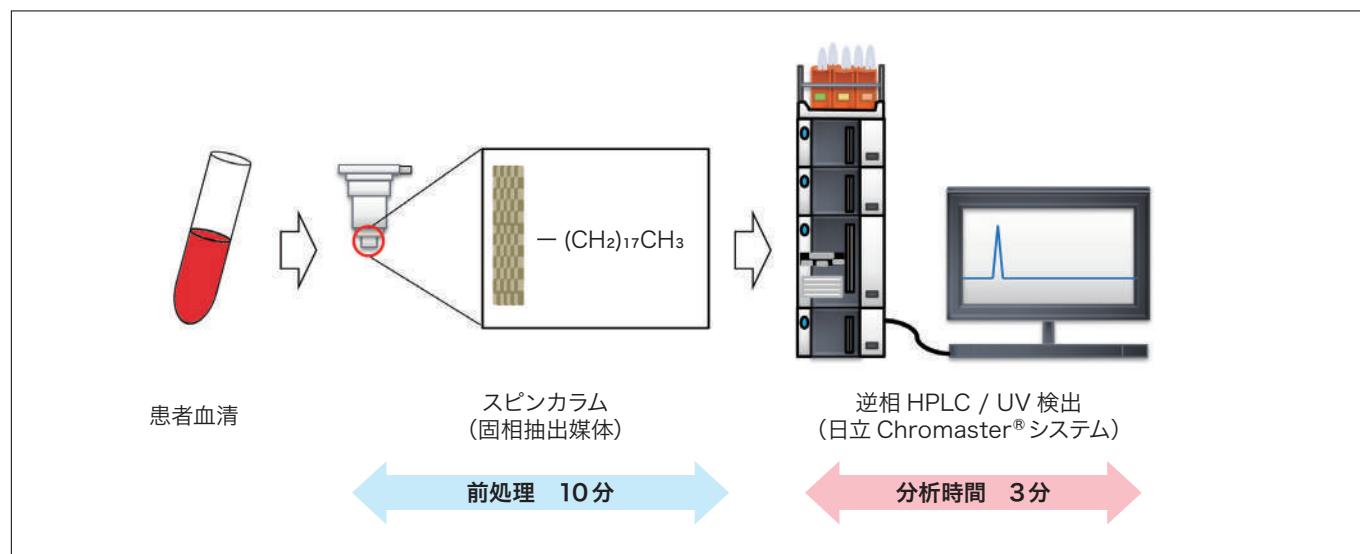


図2 本法の手順概要

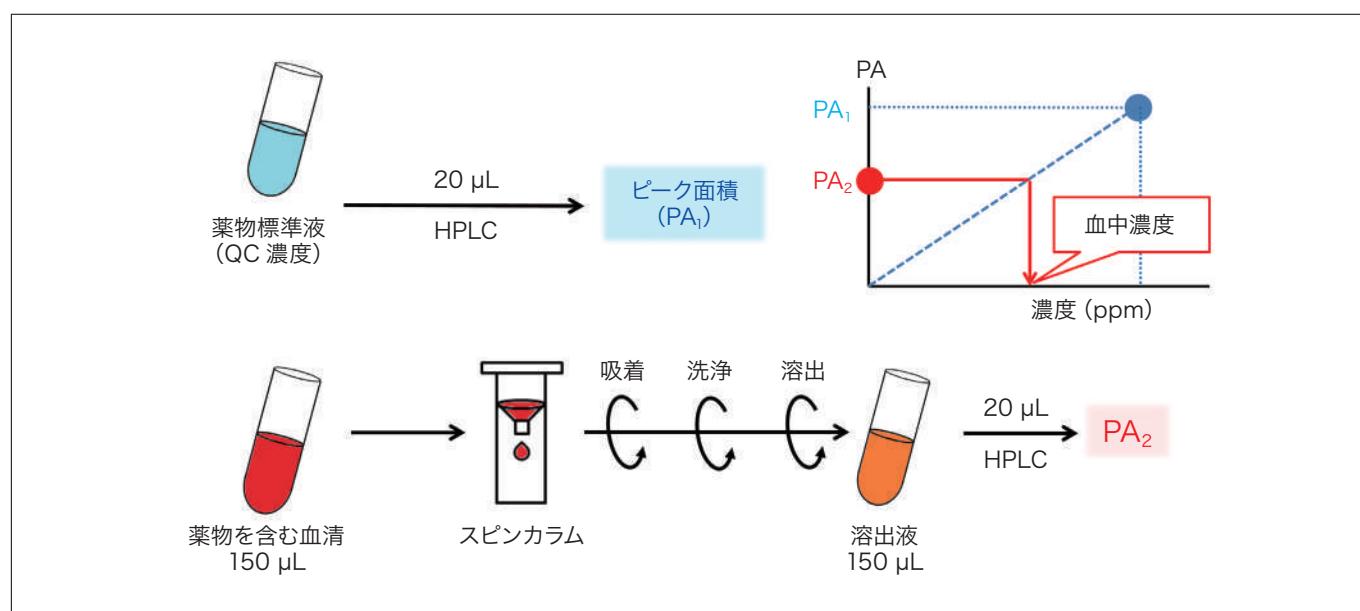


図3 本法の前処理手順と1点検量線による血中薬物濃度の算出手順

5. 医療機器LM1010システムの共同開発

5-1. 目的

上記 HPLC 分析システムは、汎用 HPLC を用いており、日々の業務で使い慣れている分析担当者であれば問題ないかもしれないが、医療現場で使用する観点からみると、臨床検査で汎用されている自動分析装置と比較して操作性の面で使いにくさがあった。また、日常の精度管理をどう運用していくかも課題であった。本検討は、上記 HPLCシステムを基に、血中薬物測定に関するアプリケーション、製品開発を目的として行った。

5-2. 測定

(株)日立ハイテクサイエンスが開発したLM1010システム(評価機、図4)、前処理キット、移動相、標準試料を使用した。当院の倫理委員会の承認を経て、臨床検査技師と薬剤師が本システムを用いて測定し、使用感を評価した。本システムの性能については、標準添加血清を用いて、カルバマゼピン、フェニトイン、ラモトリギン、ポリコナゾールの血中濃度既知の試料を定量し、カルバマゼピン、フェニトインはラテックス免疫比濁法(外注委託)、ラモトリギンとポリコナゾールは LC-MS/MS(外注委託)で得られる結果も併せて比較評価した。また、定量可能な直線性についても評価した。



図4 測定に使用した機器(LM1010システム)

販売名：LM1010 高速液体クロマトグラフ

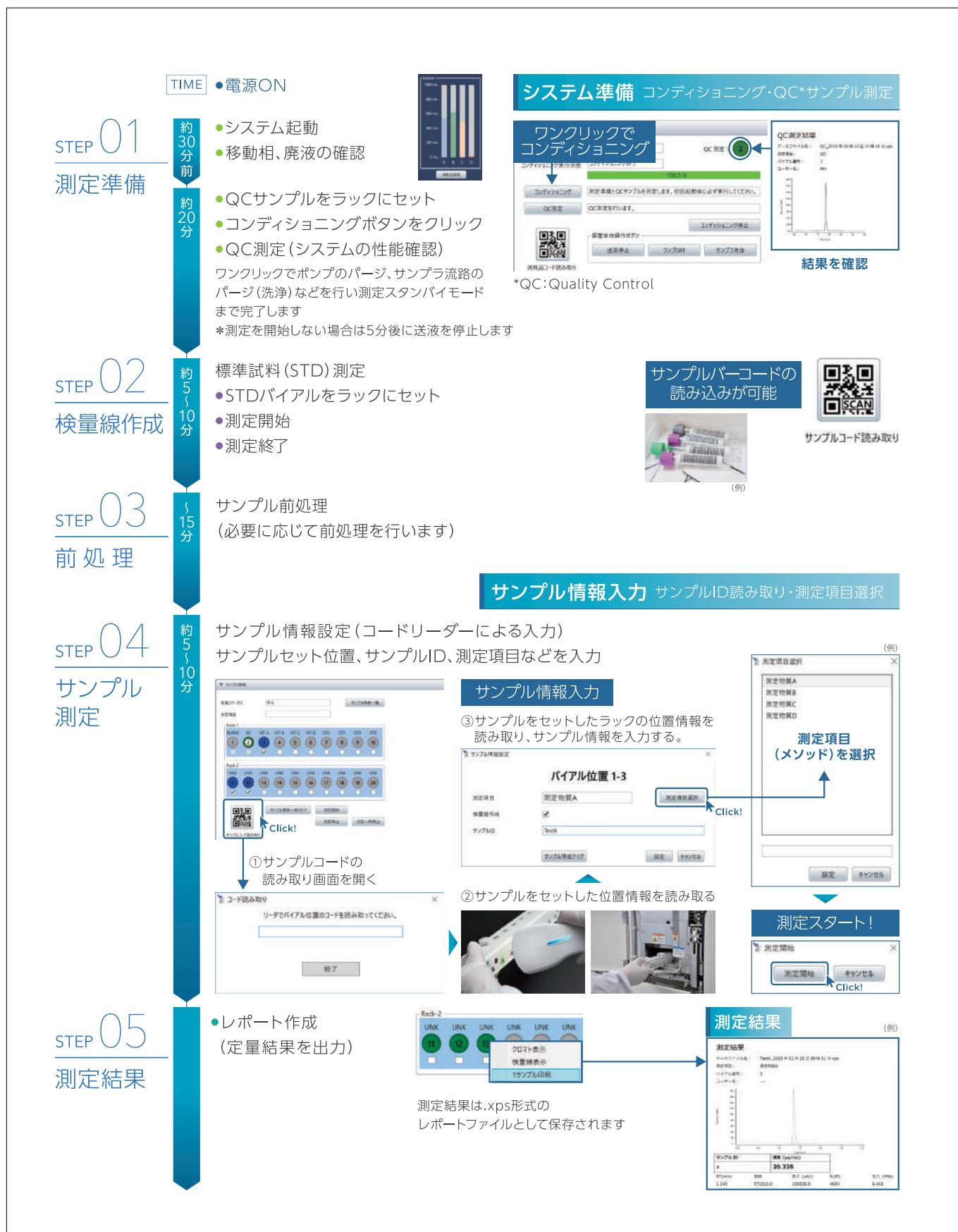
一般的名称：高速液体クロマトグラフィ分析装置

製造販売届出番号：22B3X10009000003

一般医療機器(特定保守管理医療機器)

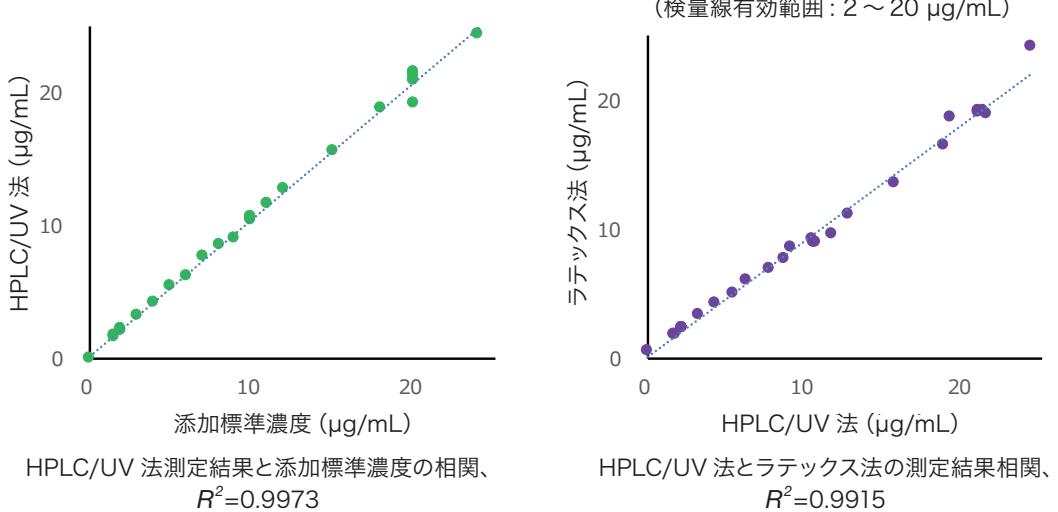
5-3. 結果・考察

LM1010システムは、分析前のコンディショニング、分析条件の設定、日常的な装置の性能確認などを自動で実施するソフトウェアが搭載されており、臨床検査技師が日常業務と並行して操作した結果、アプリケーション(制御部)は Chromaster®と比較して操作しやすいものと評価した(図5)。システムは自動コンディショニング機能と QC (Quality Control) サンプル測定による日常のシステム最適化機能が搭載されており、日常の精度管理を行うのに十分であった。薬物血中濃度測定の1日あたりの検体数や導入コスト等を考慮した結果、前処理に一部手作業を残したが、分析担当者の知識や経験に左右されずに安定した結果が得られた。標準添加血清を用いたカルバマゼピン、フェニトイン、ラモトリギン、ポリコナゾールの血中濃度既知の試料を測定した結果、良好な相関性があった(図6)。また、定量可能な直線性に関するデータを表1に示す。吸光度検出では、一般に、Beer の法則が成り立つのは低濃度領域で、高濃度になると分子間相互作用によって吸光度は濃度に比例しなくなることが知られている。本検討により、高濃度側で吸光度レンジ(2AU)に達してピークの飽和が確認されたが、上記薬剤の血中濃度が中毒域であっても広範囲に直線性が保たれており、一般に臨床で想定される血中濃度範囲では、希釈等の作業の必要はないことが示唆された。



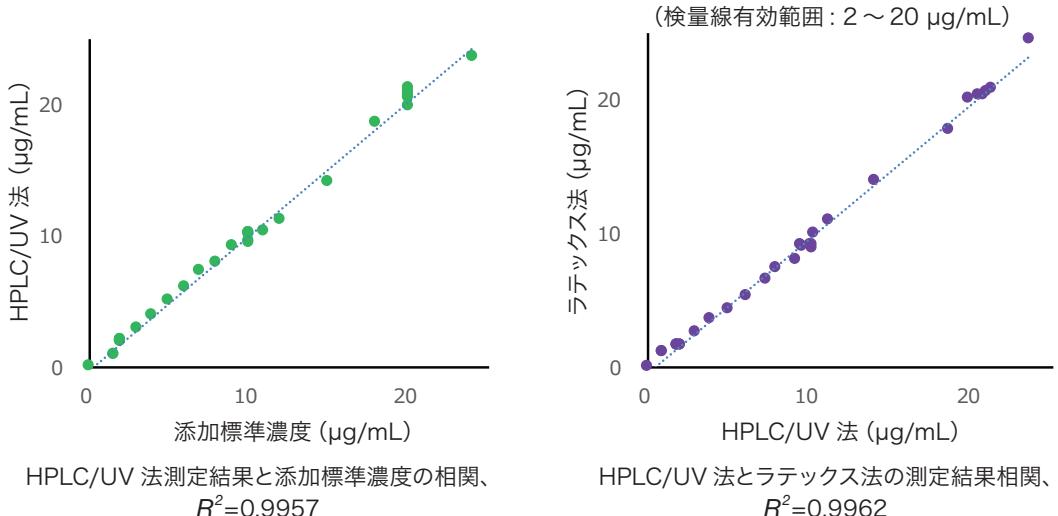
測定結果の比較 (vs. ラテックス免疫比濁法①)

カルバマゼピン標準添加血清の濃度測定 (0 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



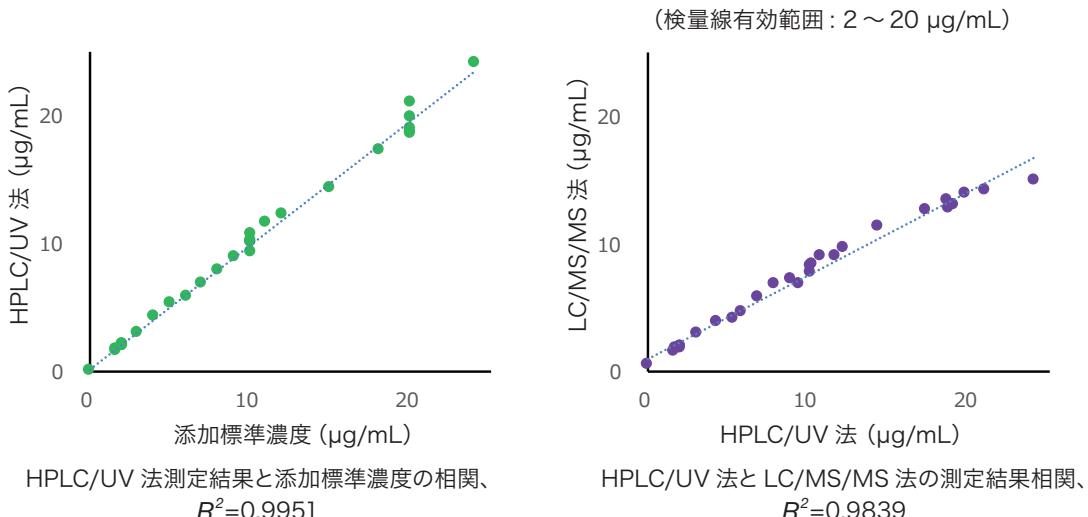
測定結果の比較 (vs. ラテックス免疫比濁法②)

フェニトイン標準添加血清の濃度測定 (0 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



測定結果の結果比較 (vs. LC/MS/MS ①)

ラモトリギン標準添加血清の濃度測定 (0 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



測定結果の結果比較 (vs. LC/MS/MS ②)

ボリコナゾール標準添加血清の濃度測定 (0 ~ 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(検量線有効範囲: 1 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

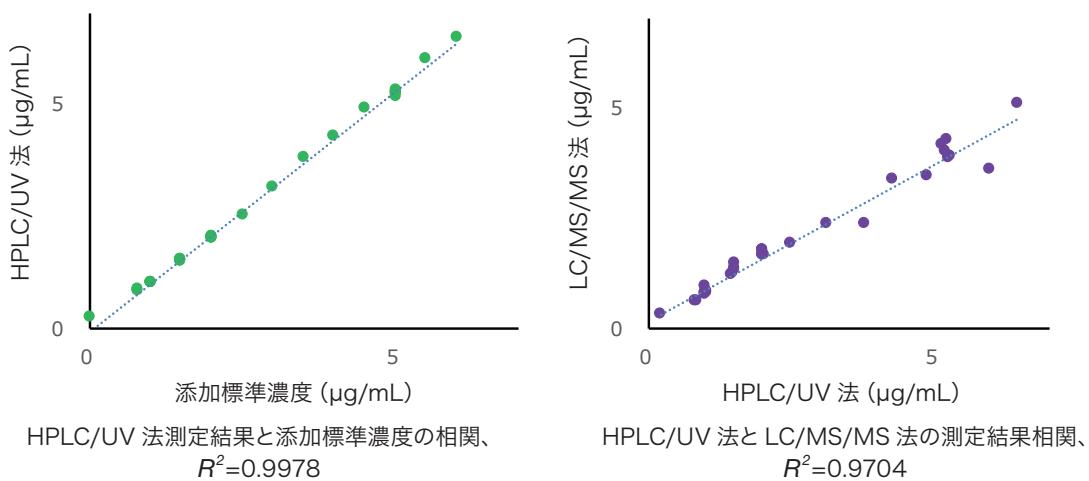


図6 各薬剤の標準添加血清を用いたLM1010システムの性能評価

表1 LM1010システムの直線性に関するデータ

成分	濃度範囲 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	傾き a	傾き a の変動 % (vs. LM1010アプリ)	r^2	直線性 $r^2 > 0.999$
CBZ	0.2 ~ 2	28379	101.5	1.000	○
	2 ~ 20	27962	100.0	1.000	○
	20 ~ 200	27810	99.5	1.000	○
PHT	0.2 ~ 20	23647	102.5	0.999	○
	2 ~ 20	23061	100.0	1.000	○
	20 ~ 200	22129	96.0	1.000	○
LTG	0.2 ~ 20	63391	102.0	0.999	○
	2 ~ 20	62141	100.0	1.000	○
	20 ~ 200	61350	98.7	1.000	○
VRCZ	0.2 ~ 1	13327	105.3	0.999	○
	1 ~ 5	12656	100.0	0.999	○
	5 ~ 50	12626	99.8	1.000	○
	50 ~ 500	12548	99.1	1.000	○

LM1010 アプリケーションの濃度範囲

CBZ: カルバマゼピン

PHT: フェニトイン

LTG: ラモトリギン

VRCZ: ボリコナゾール

6. 今後の展望

通常の HPLC 分析はマニュアル操作が多く、それは HPLC 分析の汎用性を生みだしている一因ではあるが、「医療現場で使用する」という観点でみると、敬遠されやすい分析法であった。しかし、本システムのように、医療分野向けに特化した分析法を作る上で HPLC 法は有用であると考えられる。

以前から質量分析計を備えた HPLC-MS/MS は TDM の分野においてハイスループット技術として発展する可能性が注目されてきたが、高度な専門知識とノウハウが必要であり、その応用ができる医療機関は限定される⁴⁾。また、質量分析計を備えた高額な装置導入費用とランニングコスト、現在の病院経営状況等も考慮すると、やはり現時点で多くの病院に広めることは現実的ではない。

一方で近年、国際的にも HPLC-UV を見直す報告が散見される。特に抗菌薬領域は ppm オーダーで測定できる薬剤が多く、その応用が報告されている⁵⁾。本邦の抗菌薬 TDM ガイドライン⁶⁾や海外の集中治療室における抗菌薬の TDM に関するポジションペーパー⁷⁾等で推奨される薬剤の TDM に HPLC が活用されていくと推察する。LM1010 もこのような臨床現場の需要を踏まえた適応拡大が望まれる。

また、近年急性中毒症例が増えているカフェインなどの中毒起因物質においても本 HPLC システムが適応可能であることをすでに日本中毒学会で報告しており、これらの適応拡大も検討している。

すでに病院内で使用している LBA 法と HPLC 法を組み合わせることで、院内での定量分析可能な薬剤が拡張し、HPLC はプレシジョン・メディシンや中毒診療を支援する手段の一つになるだろう。本 HPLC システムが広く臨床現場において有用に活用されることを期待する。

謝辞

今回紹介した汎用 HPLC 法の開発は、東京薬科大学薬学部生体分析化学教室（柳田顕郎教授）との共同研究として遂行しました。また、株式会社日立ハイテクサイエンスのスタッフの皆様方には HPLC 装置の貸与のご支援や分析システムの開発において多くのご協力を頂きました。この場を借りて心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 辻 大樹ら, 医療薬学, **46**, 66-76 (2020).
- 2) 日本病院薬剤師会総務部, 日本病院薬剤師会雑誌, **55**, 1390 (2019).
- 3) 森川 剛ら, 分析化学, **68**, 473-481 (2019).
- 4) Michael Vogeser *et al*, *Clin Biochem*, **41**, 649-62 (2008).
- 5) Milla P *et al*, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **1148**, 122151 (2020).
- 6) 日本化学療法学会／日本 TDM 学会, 抗菌薬 TDM ガイドライン作成委員会編, “抗菌薬 TDM ガイドライン改訂版”, 公益社団法人日本化学療法学会 (2016).
- 7) Abdul-Aziz MH *et al*, *Intensive Care Med*, **46**, 1127-1153 (2020).

SEM-SPM-白色干渉顕微鏡によるコリレーション解析

相蘇 亨

1. はじめに

近年、走査電子顕微鏡(SEM)は低加速電圧による試料最表面の観察や、複数検出器によるさまざまな情報の同時取得が可能となった。一方で、加速電圧や検出器によって像質が変わり、入射電子の侵入深さや各検出器の検出エネルギー帯を考慮して像解釈することがある。走査型プローブ顕微鏡(SPM)は形状計測モードだけでなく、電磁気特性や機械特性などの物性測定モードも多様化しており、各物性データの解釈が高度化している。白色干渉顕微鏡(CSI)は、mmオーダーの広域において非接触かつ高スループットでサブnmオーダーの高さ計測が可能なことから、工場の検査用途にも広く用いられている。一方で、空間分解能が光の波長に制限される。このように、各装置単独で顧客の課題解決が困難な場合、SEM、SPM、CSIの3つを複合的に用い、同一箇所の観察により、それぞれの長所を活かしながら、お互いのデータを補完して解釈を深めるコリレーション解析が有効である。当社では、2016年9月からSEMとSPMの同一箇所測定技術をSÆMic.(セーミック)と称したソリューションを提供してきた。現在はSÆMic.としてCSIも取り込んだ活動を行っている。本稿では、実例を挙げながらSEM-SPM-CSIによるコリレーション解析事例を紹介する。

2. システム構成

2-1. 各装置の概要

(1) 走査電子顕微鏡(SEM)

SEMは、真空中で磁場や静電場によって電子ビームを絞り、試料表面に照射し走査することで発生する2次電子や反射電子を検出する顕微鏡である。また、同時に発生する特性X線のスペクトルから元素分析を行うEDX(エネルギー分散型X線分光)や、電子線回折パターンから結晶方位や相分布を計測するEBSD(後方散乱電子回折)などと組み合わせて用いられることが多い。

図1に示すように、ほとんどのSEMは複数の検出器を有し、2次電子起因の最表面の凹凸情報や反射電子起因の組成情報などを同時に取得し、像解釈することが一般的である。近年は観察や分析が主目的であったSEMでも、対物レンズ直下に配置した分割型反射電子検出器を用いた3D計測も可能となり(図2)、SPMやCSIとの相関解析の重要性が高まっている。

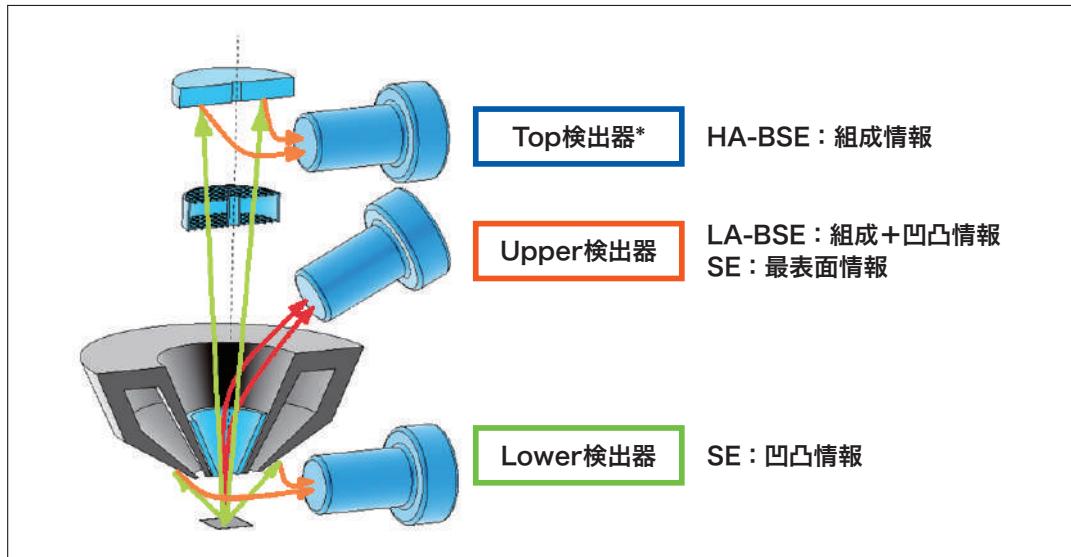


図1 FE-SEM(Regulus8200シリーズ)の検出器レイアウト

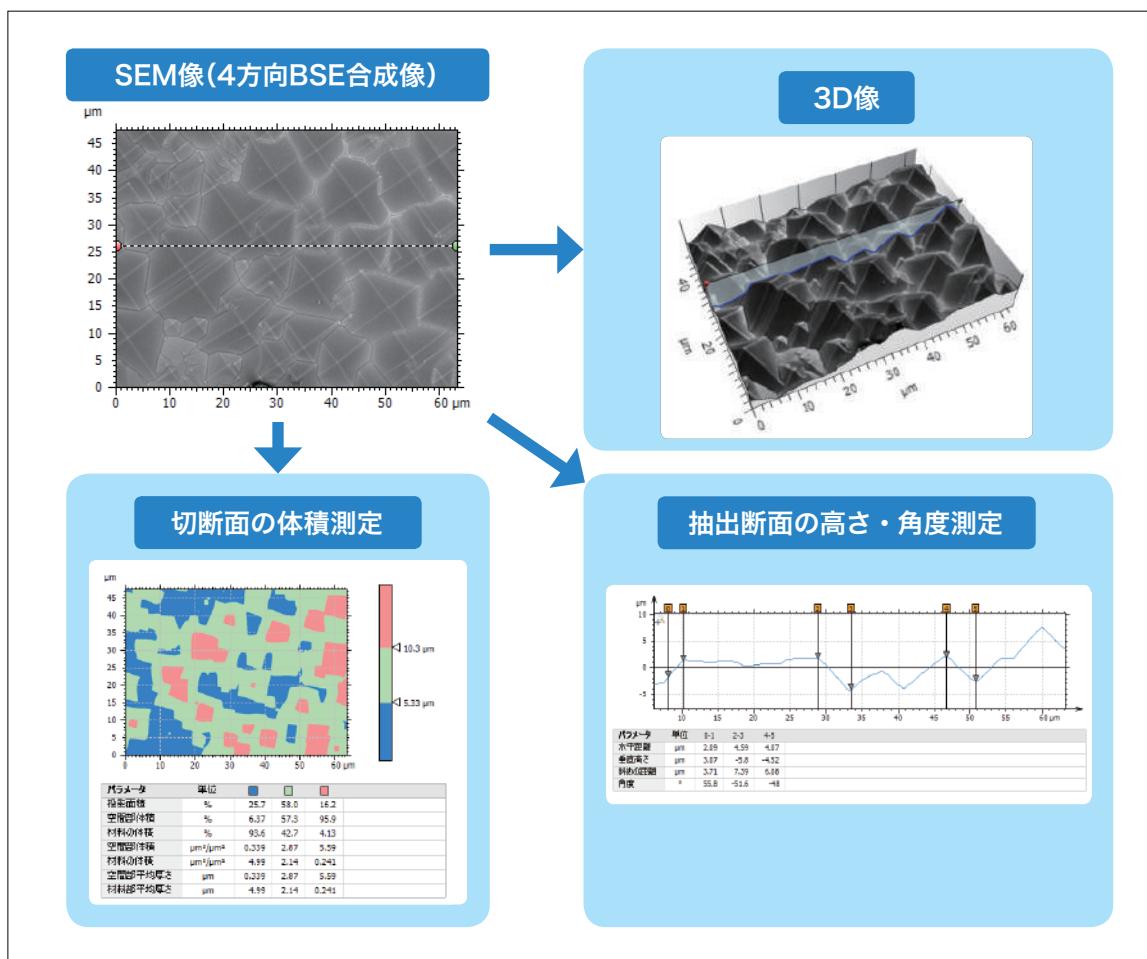


図2 頂上SEMによる太陽電池表面の3D計測

(2) 走査型プローブ顕微鏡(SPM)

SPMは、先端が数nm程度に尖った探針を有するカンチレバーを用い、ピエゾセイナを用いて試料表面を走査し、サブnmから数100μmの領域における試料表面の形状計測が可能な顕微鏡である。図3に示すように、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捉え、探針-試料表面の相互作用によって生じる微小な力を検出し、表面形状を捉える。また、探針-試料間に働く摩擦力や粘弾性、磁気力や静電気力の検出や、探針をナノプローバーとして用いた導電性や誘電特性の測定など、さまざまな物性計測にも用いられている。

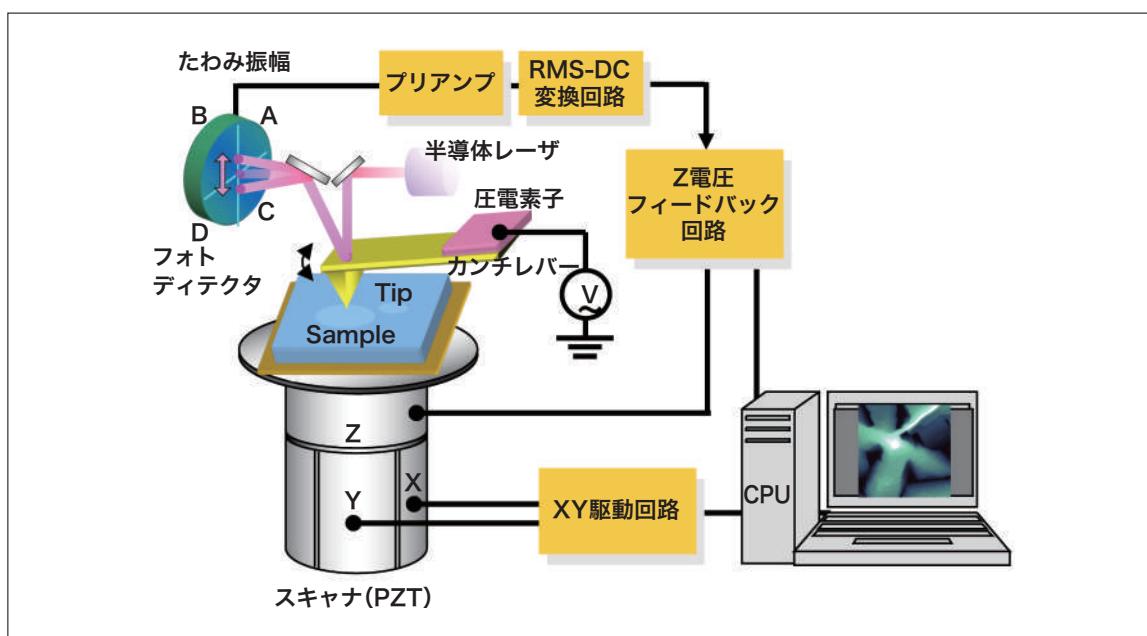


図3 SPMの原理図

(3) 白色干渉顕微鏡(CSI)

CSIは、図4に示すように、白色光源から照射された光をビームスプリッターで2つに分け、一方を参照面、もう一方を試料表面に照射し、試料表面の凹凸によって生じる光路差で得られる干渉縞の情報を高さ情報を変換して3D形状を計測する顕微鏡である。また図5のように、透明多層構造の各界面から得られる反射光を用い、断面を作製する手間をかけずに、非破壊で断面の情報を得ることも可能である。

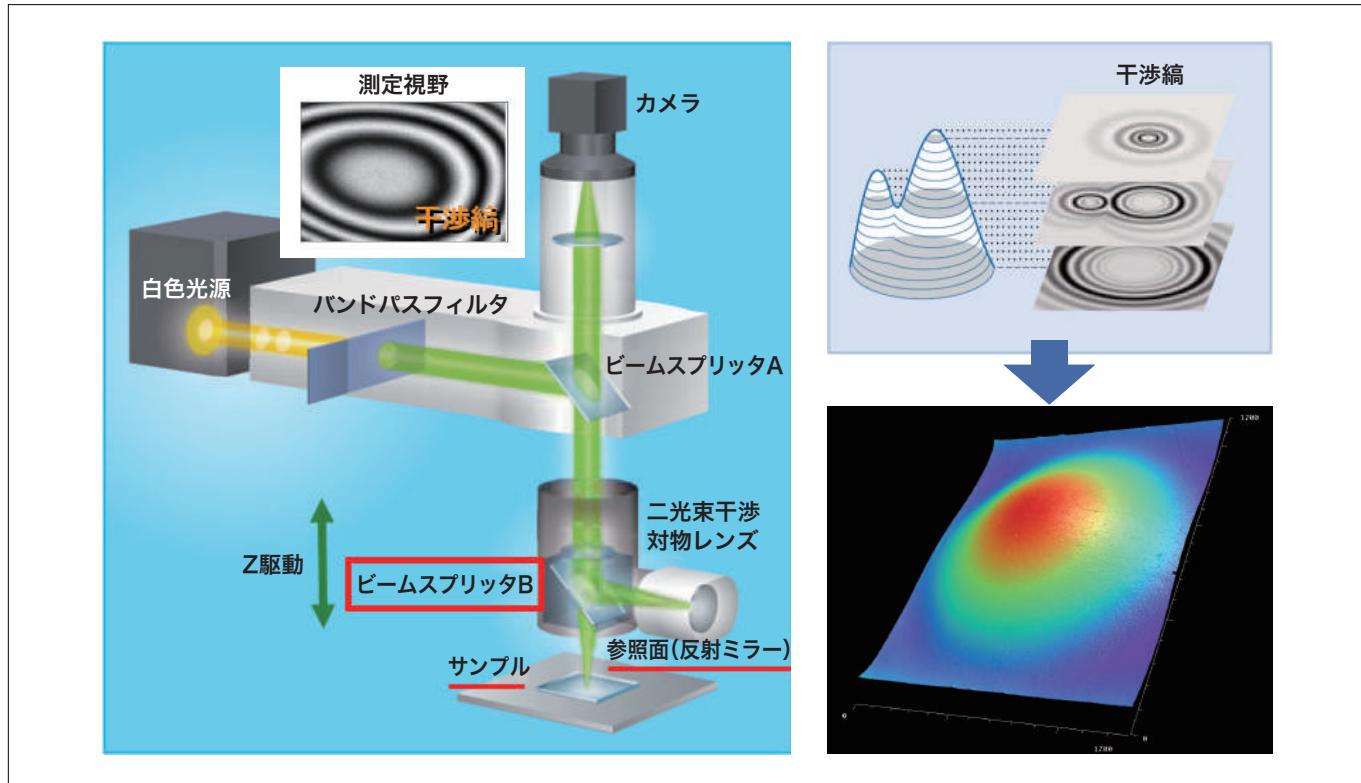


図4 CSIの原理図

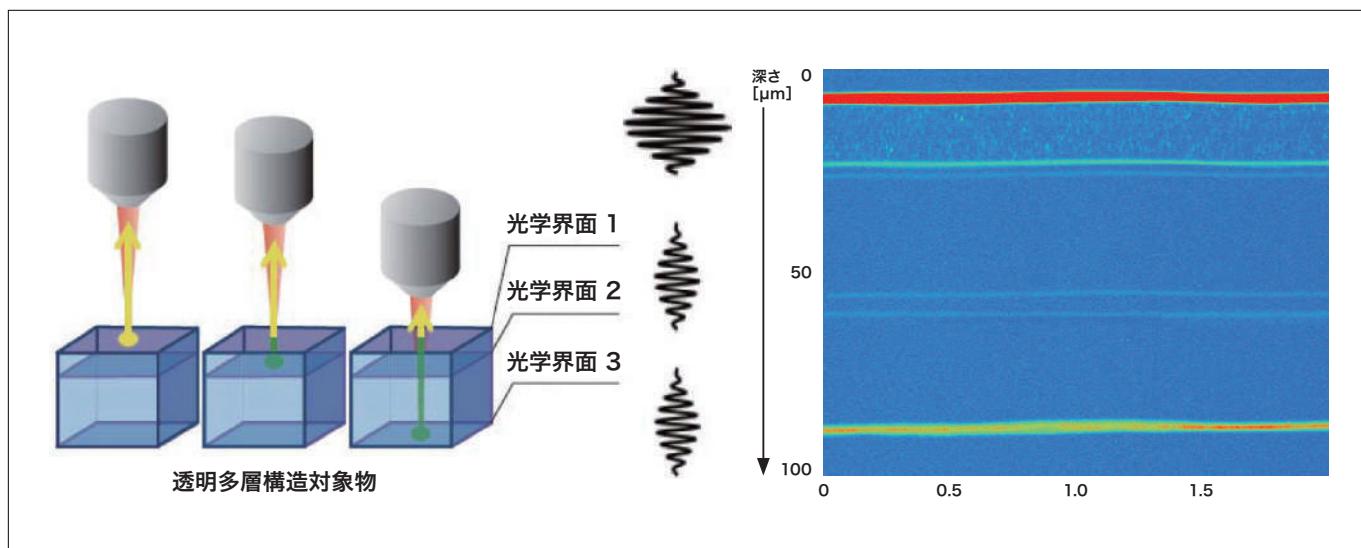


図5 層断面解析の概略図と多層バリアフィルム測定例

2-2. リンケージシステム概要

コリレーション解析には、各装置で同一箇所の観察が求められる。当社では、SEM、SPM、CSI共に座標情報の取得が可能な高精度電動ステージ搭載モデルを有しているため、容易に同一箇所を観察できる(図6)。特に、高分解能が求められるSEM-SPM間のコリレーション解析では、共有可能なアライメントマーク付き専用ホルダに試料を固定し、ソフトウェアによるステージアライメントで高精度座標リンクを実現している。この方式の優位性は、SEMチャンバー内にSPMを配置する複合機方式と比べて、各装置の性能や機能が制限されない点にある。



図6 SEM-SPM-CSIリンクエージの概略図

3. コリレーション解析事例

3-1. セパレータの形状観察

Liイオン電池(LIB)などに用いられるセパレータは電子線照射によってダメージを受けやすく、SEM観察の際に加速電圧や照射電流の最適化が必要である。SPMでは試料へのダメージなく形状計測が可能であるが、視野範囲や観察のスループットが限られるため、SEMによる広域ダメージレス観察の要求が高い。

そこで、SPM形状像をリファレンスとして、SEMの観察条件検討を行った例を図7に示す¹⁾。SEM観察の前処理には、帯電を抑制し細部まで明瞭に観察するため、帯電軽減に効果のあるイオン液体IL1000を塗布した²⁾。0.5 kVや1 kVの加速電圧でのSEM像ではSPM像に比べて大きな穴が開いており、電子線によってセパレータがダメージを受けていると考えられる。加速電圧を0.06 kVまで下げるとき、SPM像と同等の形状が得られ、電子線ダメージのないSEM観察条件が明らかとなった。本事例は同一箇所観察ではないが、SPMがSEMのクロスチェックをするという点で、相関解析の典型的な事例といえる。

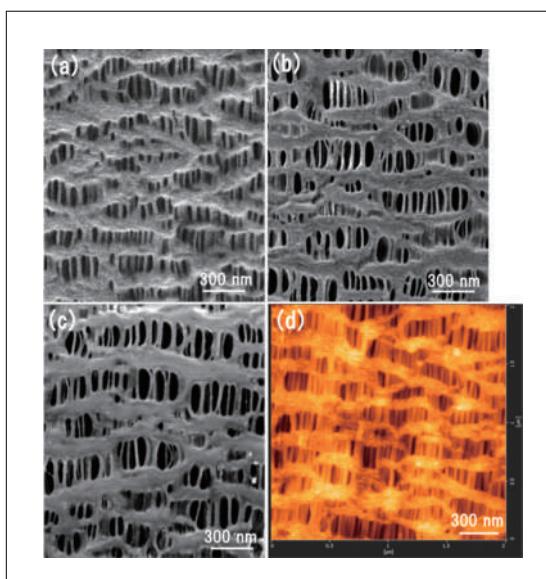


図7 IL1000を塗布したセパレータのSEM像(x50k)
(a)-(c)と無処理のセパレータのAFM像(d)
(a) 0.06 kV, (b) 0.5 kV, (c) 1.0 kV

3-2. LIB 負極の劣化メカニズム解析

LIB の高性能化、長寿命化には充放電サイクル試験による劣化要因の分析などが欠かせない。ここでは SiO_x を混合した黒鉛系の負極について、SPM 電気特性評価モードの1つである走査型拡がり抵抗顕微鏡(SSRM)と SEM-EDX による、サイクル試験前および、常温サイクル後、高温サイクル後の構造、元素分布、電気抵抗分布の相関分析を行った結果を図8に示す³⁾。イオンミリング-SEM-SPM 間で共用可能な雰囲気遮断ミリングホルダにより、試料作製から装置間の搬送を大気非暴露の状態で実施した。充放電サイクル前の SSRM 像は、黒鉛系活物質の境界付近が比較的低抵抗であるのに対し、常温サイクル後および高温サイクル後 SSRM 像では、活物質の境界が明るく観察されており、この領域が高抵抗化していることがわかる。サイクル試験後に黒鉛系活物質と、特に Si 系活物質の境界に濃化しているフッ素の存在から、この領域は SEI (Solid Electrolyte Interface) と考えられ、その領域で電気抵抗が大きくなったものと推測される。SSRM は $10^4 \sim 10^1 \Omega$ の広い範囲の抵抗分布を一度のスキャンで確認できる特長を有する。このように、LIB の内部抵抗増大の一因を、SEM-EDX と SSRM とのコリレーション解析によって調べることができる。

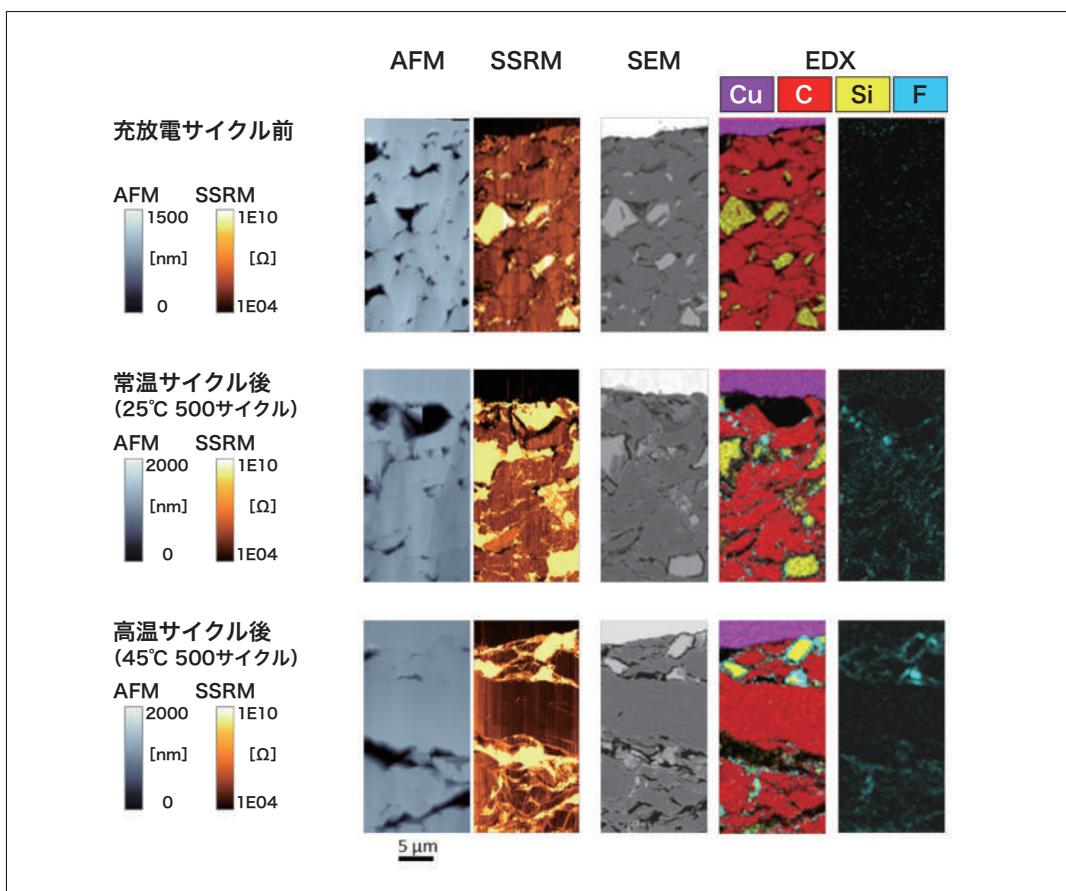


図8 充放電サイクル前後のリチウムイオン電池負極のミリング断面SSRM/SEM/EDX測定結果

3-3. 透明積層膜の断面構造解析

試料の断面構造解析には、機械研磨やイオンミリングなどを用いて断面出した試料を SEM 観察する手法が広く用いられている。広い範囲にわたって断面構造を高分解能で観察できる反面、断面作製に数時間要する場合も多い。例として、飲料缶の溶接部断面のコーティング厚を、CSI の層断面解析機能と断面 SEM 観察でコリレーション解析した事例を図9に示す⁴⁾。SEM 像では明瞭な断面構造が得られているが、断面作製には2時間程度を要した。一方、CSI では非破壊で任意の箇所の断面構造が得られ、約20秒で一視野を観察できる。CSI で得られたコーティング厚は断面 SEM の結果と同程度であり、測定スループットを重視するのであれば、CSI の方が適していると言える。

次に透明積層フィルムの異物解析事例を図10に示す⁵⁾。CSI 層断面解析では表面から 109 μm の深さに異物があることがわかるが、その異物の構成元素まではわからない。そこで SEM に取り付けた μXRF (微小部蛍光 X 線分析) から、50 kV の X 線を試料の同一箇所に照射し、異物の構成元素を EDX 検出器で特定した。このように、断面構造解析のスクリーニングに CSI を用い、詳細な分析には SEM を用いるようなコリレーション解析も、測定時間を効率化する上で有用である。

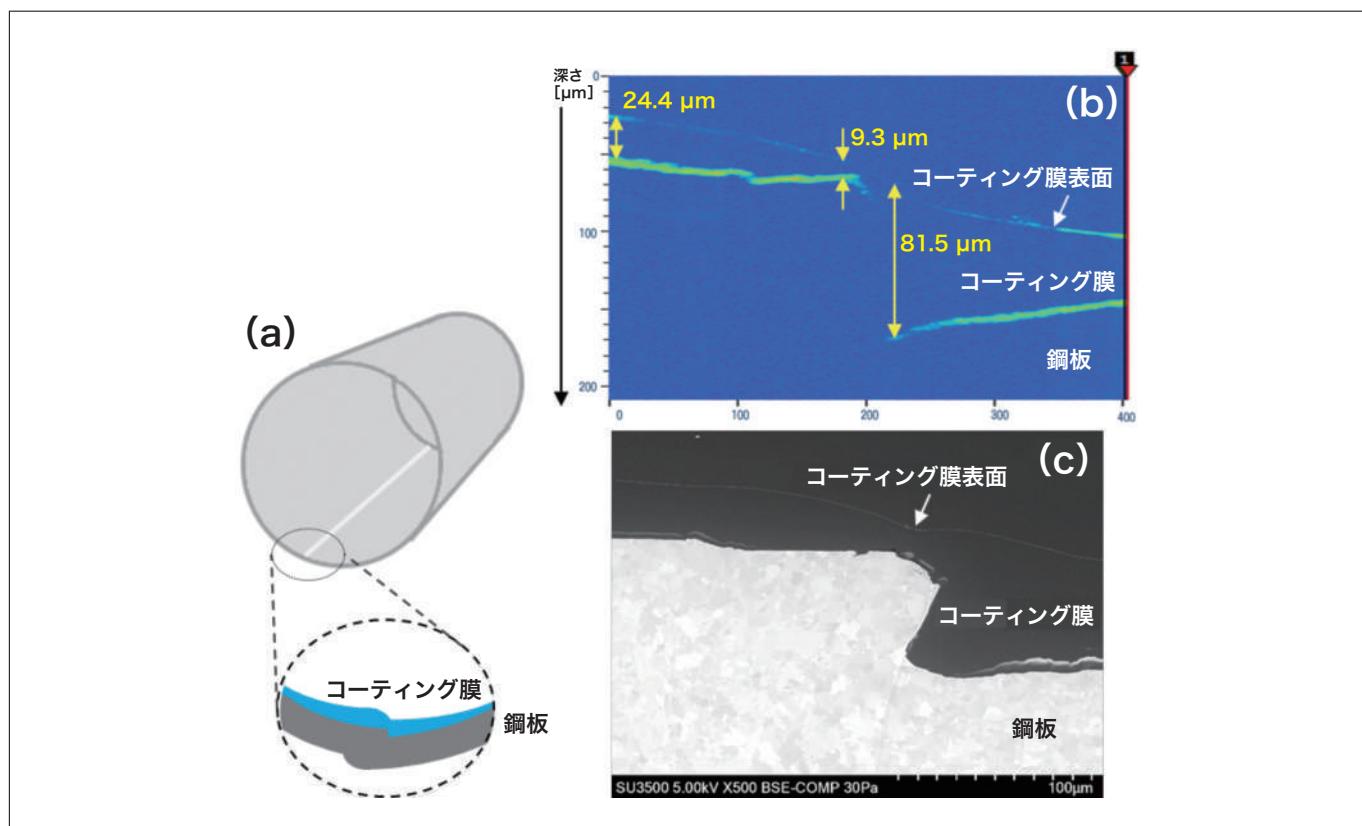


図9 飲料缶の溶接部の概略図(a)とCSI層断面解析像(b)および断面SEM像(5 kV, ×500, イオンミリング処理)(c)

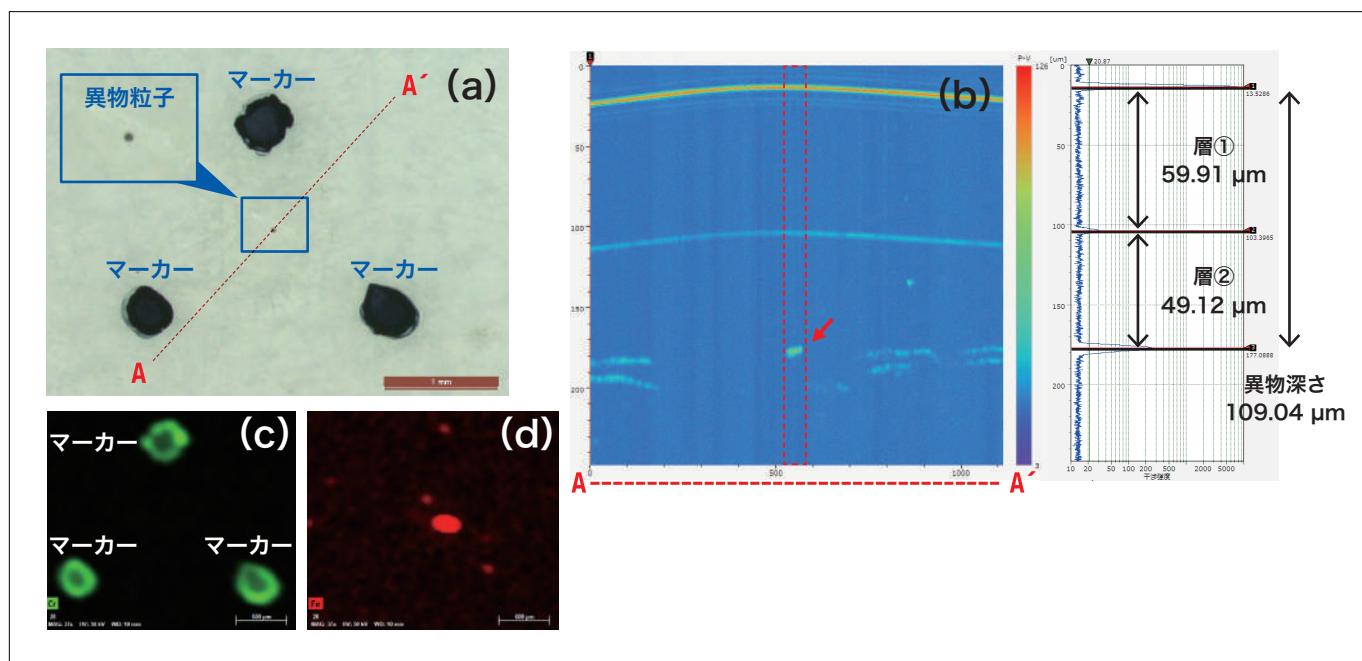


図10 積層フィルムの光学顕微鏡像(a)とCSI層断面解析像(b)およびμXRF-SEM-EDX像(c) (d)
(c) Crマップ, (d) Feマップ

3-4. アルミ合金の腐食解析

SPM で得られた最表面の物性情報について、深さ方向の影響範囲を可視化したいとの要望がある。1% NaCl 水溶液で30分間腐食させたアルミ合金について、表面電位分布が可能な SPM の電気特性評価モードの1つである KPFM (ケルビンプローブフォース顕微鏡) と FIB (収束イオンビーム)-SEM による 3D-SEM/EDX 像とのコリレーション解析事例を図11に示す⁶⁾。

本測定では、座標リンク機能を用いて、KPFM 測定箇所と同一箇所において、加工と観察を繰り返す Cut&See 機能により 3D-SEM/EDX 像を取得し、KPFM 像と重ね合わせを行った。SEM-EDX 像から、Al 合金表面に Fe 系介在物が存在しており、周囲が酸化していることがわかる。KPFM 像から、周囲に比べて Fe 介在物が最も電位が低く、酸化している領域も電位が低い。この電位差が腐食を進行させる要因の1つと考えられ、KPFM は腐食の進みやすい部位を特定するのに役立つ。一方で、試料内部への腐食の進行は KPFM だけではわからない。そこで図12に示すように、FIB-SEM を用いて試料内部の元素分布観察を試みたところ、腐食を示す酸素は Fe 系介在物に沿って内部まで侵食し始めている様子 [図12 (b) ↑1] がわかった。一方、表面に近い内部に存在する Fe 系介在物 [図12 (b) ←2] が、表面電位には影響しておらず、腐食にもまだ関与していないと考えられる。このように、AFM で捉える“表面物性”的起源を、FIB-SEM で捉える内部の構造からも検証していくことができる。

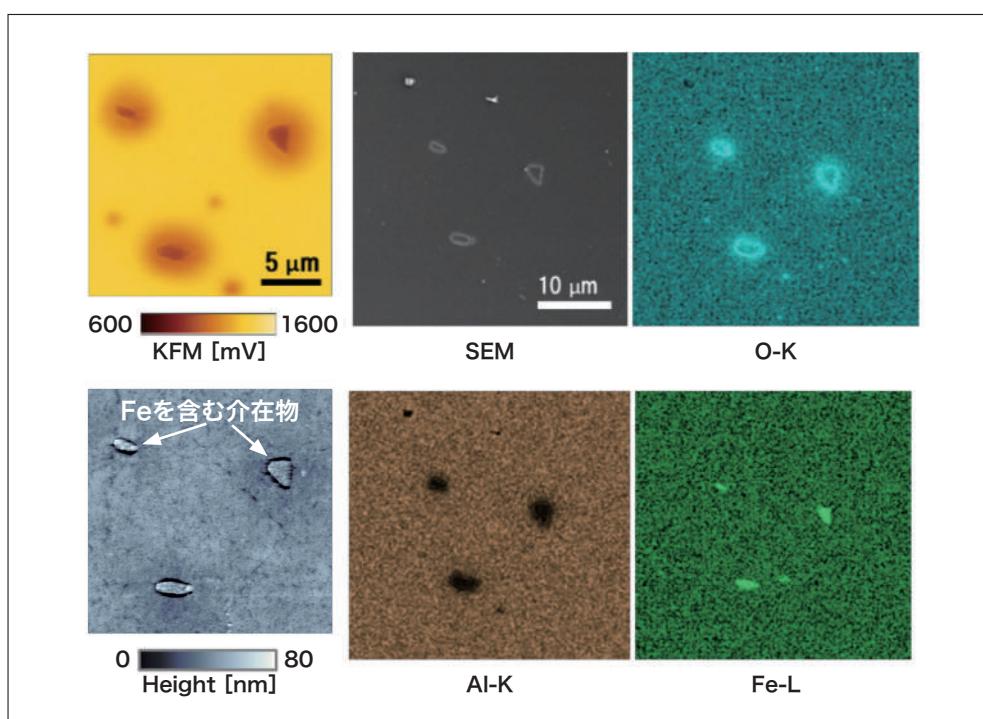


図11 腐食させたAl合金のKFM/SEM/EDX測定結果

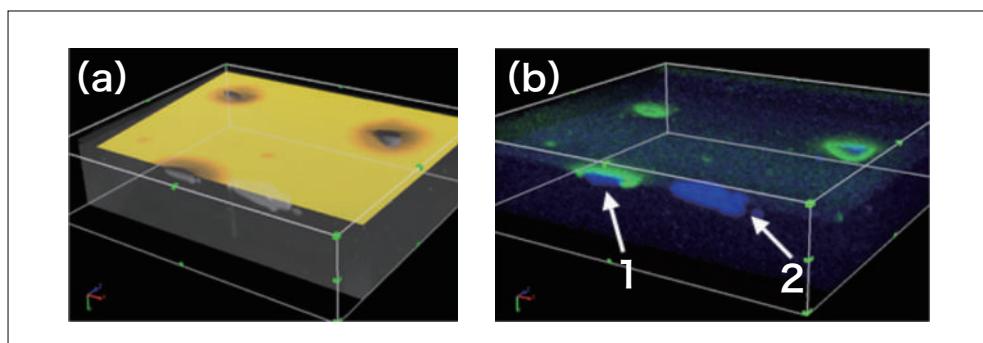


図12 腐食させたAl合金のKFM/3D-SEM像の重ね合わせ(a) 3D-EDX像(青: Fe-L, 緑: O-K)(b)
(1) 最表面に露出しているFe系介在物, (2) 表面近傍に埋まっているFe系介在物

4. まとめ

本稿で紹介した事例から、複数の装置を用いて同一試料の同一箇所を解析することにより、データの信頼性確認やデータ解釈の深化、スクリーニングとしての利用など、さまざまなメリットが得られることがわかった。

今後は、課題解決の手段としてコリレーション解析を積極的に運用しながら、リンクエージ手順の簡略化やリンクエージ精度の向上を目指し、誰もが簡単にコリレーション解析できるシステムを構築していきたい。

参考文献

- 1) 竹内 秀一 他, 日本顕微鏡学会 第73回学術講演会 発表要旨集, Vol.52 p149 (2017).
- 2) 二村 和孝 他, 日立評論, Vol.95 No.09 p598-599 (2013).
- 3) 日立ハイテク会員制サイト S.I.navi, アプリケーションデータシート HTD-AFM-035
- 4) 日立ハイテク会員制サイト S.I.navi, アプリケーションデータシート HTD-CSI-010
- 5) 日立ハイテク会員制サイト S.I.navi, アプリケーションデータシート HTD-SEM-093
- 6) 森川 晃成 他, 日本顕微鏡学会 第75回学術講演会 発表要旨集, Vol.54 p184 (2019).

出典

月刊誌「工業材料」2020年5月号掲載

著者紹介

相蘇 亨

(株)日立ハイテク 解析ソリューション開発部

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/

LA8080高速アミノ酸分析計用 分析支援ソフトウェア AminoARTS

Analysis Support Software of AminoARTS for LA8080 High-Speed Amino Acid Analyzer

伊藤 正人^{*1}, 源 法雅^{*1}, 渡辺 義市^{*1}, 宝泉 雄介^{*2}, 成松 郁子^{*3}, 豊崎 耕作^{*1}, 山田 宣昭^{*1}

1. はじめに

2017年に発表されたLA8080高速アミノ酸分析計 AminoSAAYA は、バイオ医薬品などの製薬分野をはじめ、食品・動物飼料・健康サプリメントの研究・品質管理、あるいは呈味の研究など広く利用されている^{1,2)}。測定の原理としては、イオン交換クロマトグラフィーによりアミノ酸各成分を分離したのち、ニンヒドリン反応により検出する伝統的な手法を採用した³⁾。この分析法が今なお利用されている理由は、アミノ酸に対して比較的選択性が高く、高速かつ高精度に定量分析できることにある。

発売当初からデータ処理装置には、OpenLab CDSバージョン2(以降、OpenLab CDSと略す)、および日立LA8080コントロールオプションを使用する。OpenLab CDSは、汎用HPLC用のCDS(Chromatography Data System)であり、様々なユーザーに適応するため多様な機能を有している。反面、ルーチンワーク的な日々の分析操作をするユーザーにとっては、OpenLab CDSはむしろ機能が多過ぎる印象さえあった。この課題を解消する目的で分析支援ソフトウェアAminoARTSを開発した。すなわち初心者でも迷うことなく簡単に分析開始できることが狙いであり、接尾辞のARTSは最先端を意味するState of the ARTから発想された。AminoARTSではサンプル情報と呼ぶファイルが重要である。例えば、溶離液の切替時間などのメソッドを指定する場合、サンプル情報の要素の一つとしてメソッドを指定する構造である。一方、ついでながら、装置システム全般を表すAminoSAAYAは、Sustainable, Amino, Acid, Your, and Analyzerのそれぞれの頭文字から構成された愛称である。

2. AminoARTSの操作フロー概要

簡単とはいえる分析開始までにユーザーは何を最低限しなければならないだろうか(図1)。デスクトップ上のアイコンをクリックして、本ソフトウェアを起動する(Step 1)。起動すると最初にメニューが表示され、前述のサンプル情報として新規にファイルを作成するか、あるいは既存ファイルを再利用するかをまず選択する(Step 2)。Step 3で2つの操作フローに分岐し、まず新規(経路1)の場合はメソッドを設定することにより基本的なサンプル情報ファイルを生成する。一方、既存(経路2)の場合、生成されたことのあるサンプル情報群からファイルを選び出し、これからどんなサンプルをどのように分析したいか改めて編集することができる。既存にしても新規ファイルにしても、Step 4をサンプル情報の確認/編集工程と呼ぶ。

このままコンディショニング、分析工程へと駒を進めてもいいのだけれども、AminoARTSはもう少し賢い。この段階でこれから分析する総サンプル数が決定されたので、分析終了時点での消耗部品チェック(Step 5)、および各液量を予測計算することができる(Step 6)。通知しなければならないときだけだが、消耗部品または液量表示の専用画面がそれぞれ表示される。これらを通過すると、いよいよカラム平衡化までのコンディショニング工程へと移行する(Step 7)。引き続き一定時間が経過したのち、自動的に分析工程を開始し、分析画面を表示する(Step 8)。以上が基本的な操作フローである。

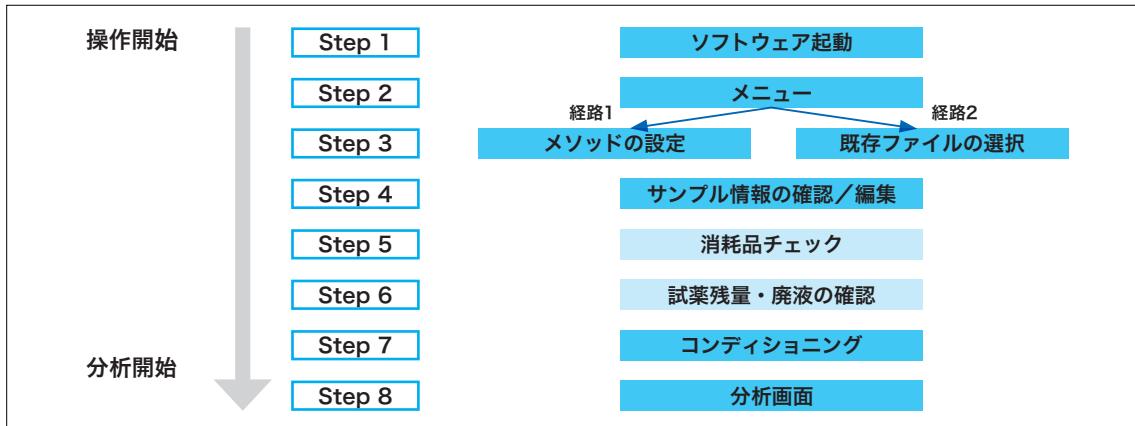


図1 AminoARTSの操作フロー

3. 操作画面の例

実際、AminoARTS では、どのような画面が表示されるのであろうか。

Step 3 (経路 1) メソッドの設定

サンプル情報ファイルを新規作成する経路1を選択した場合、図2(a)の画面が表示される。まず、これから利用するメソッドを設定する。メソッドはグラジエント溶離用のタイムプログラムのほか、クロマトグラムを解析する条件や、自動的にカラムを再生する RG (ReGenerating) メソッドなどがワンセットになっている。このひとまとまりのメソッド群を特にルーチンメソッドとも呼ぶ。またサンプル情報としては、基本的な総サンプル数や、ブランク補正の有無もこの Step 3 の段階で入力することができる。

Step 3 (経路 2) 既存ファイルの選択

もうひとつの経路は既存ファイルの再利用である。つまり、以前に作成したサンプル情報ファイルを借用することができる。図2(b)の例の場合、いくつか表示されたサンプル情報ファイル群から "TEST3x.csv" という名前のファイルを選択している。さらに、今回の分析を実行するため、次の Step 4 でファイルの内容を修正することが可能である。

Step 4 サンプル情報の確認／編集

経路1を経由しても、経路2を経由しても、この確認／編集画面にたどり着く。図2(c)に示す通り、一行一行修正することができる。バイアル瓶の番号、注入回数、注入量 (μL)、何倍で希釈されたものかを示す希釈倍率、標準試料 (STD) か未知試料 (UNK) かなどサンプルの種別、トマトかポテトかなどのサンプル名、そして、ここでもルーチンメソッドを設定し直せる。

Step 5 消耗部品チェック

サンプル情報が確定したあと、消耗部品の使用量が交換目安に達する場合は、図2(d)の例の画面を表示する。この画面の例では、ポンプ1のポンプシールが予め設定された交換目安を超過することが表示されている。同様にオートサンプラーのシリンジバルブシールが36,000回を超えることが予測されている。本画面が表示されてしまった場合、サンプル情報編集画面に戻り、サンプル数を減らすか、または消耗部品を交換するために一旦 AminoARTS を終了することになる。

Step 6 試薬残量・廃液確認

Step 5 の画面表示の有無にかかわらず、Step 6 の段階に移行すると必ず入力画面が表示され、緩衝液、反応液、および廃液の現在液量をそれぞれ入力する必要がある^(*)。その入力後、Step 7 へ画面が遷移できた場合、過不足がなかったことを示している。一方、Step 7 へ画面が遷移できなかった場合は、図2(e)の画面が表示される。分析終了時の液量が予測計算され、例えば試薬が不足する場合、朱色で表示される。または、廃液があふれ出すと予測される場合にも、朱色で表示される。いずれにしても図2(e)が表示された場合は、サンプル情報編集画面に戻りサンプル数を減らすか、あるいは液廃棄・追加ボタンを押して、次の案内に従うことになる。

(*) フルスペック版の場合、液量センサーが装備されているため現在量の入力が省略できる。さらに、過不足のない場合は Step 7 まで自動的に遷移する。

Step 7 コンディショニング

Step 5 と Step 6 を通過して、図2(f)のコンディショニング画面に到着する。本画面では各工程の標準的な所要時間が予め表示され、一連の工程を順に実行していく。例えば、N₂ガスバーピング工程は反応試薬中の酸素分子を窒素分子に置換するアミノ酸分析特有の動作である。今まで示してきたように、AminoARTS は慣れていないユーザーにもやさしく案内することにより、各工程を確実に実行できる特長がある。「次へ」ボタンをクリックして、Step 8 の分析工程が実行する。

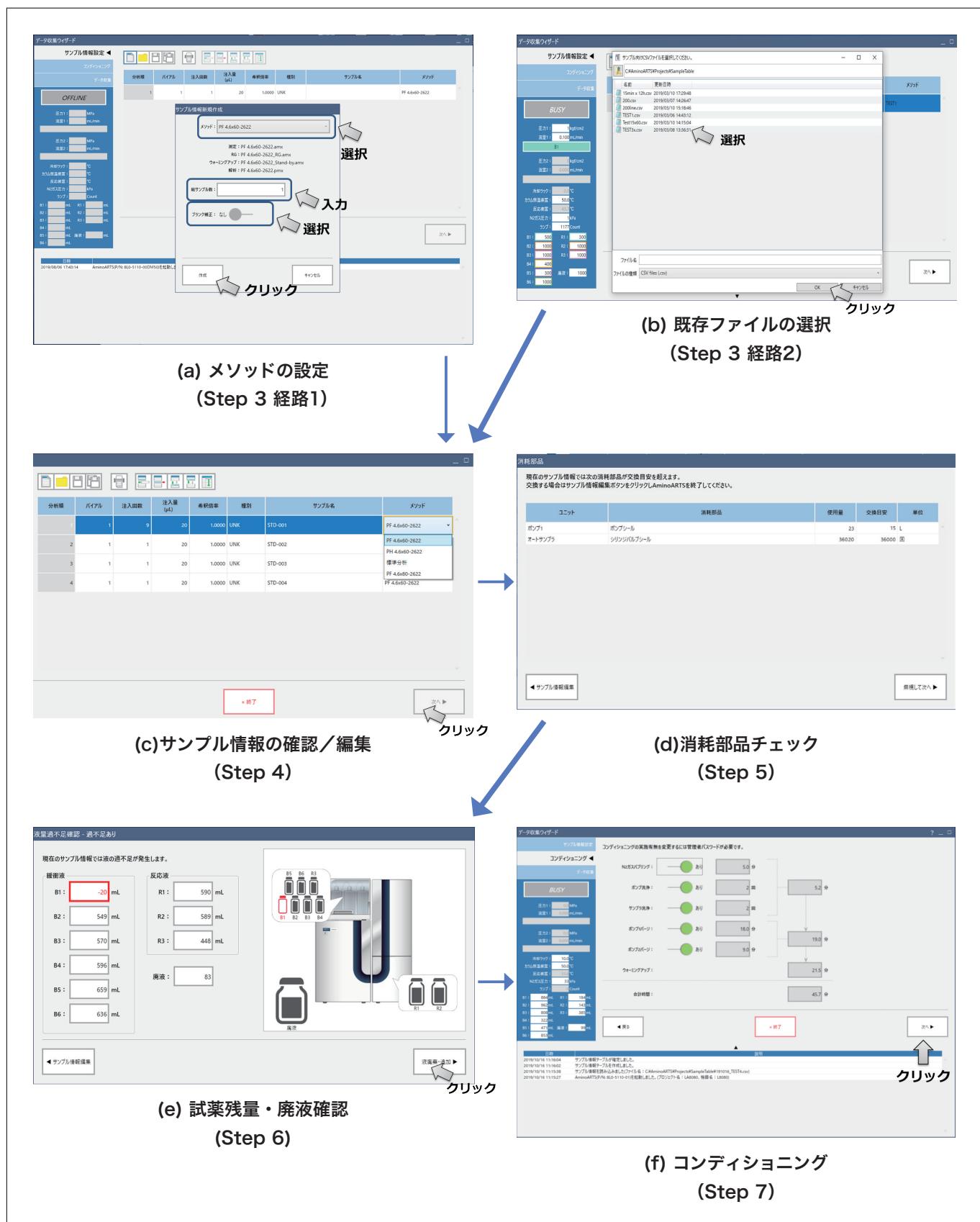


図2 AminoARTSの画面遷移例

4. 分析例

分析支援ソフトウェアAminoARTSを用いても用いなくとも、高速アミノ酸分析計AminoSAAYAからは精度の高い分析結果が得られる。ここでいくつかのデータを紹介する。図3に約40成分のアミノ酸標準サンプルを注入した基本的な生体液分析法のクロマトグラムを示す。この分析法は長さ60 mmのカラムを用いて、クエン酸リチウム系の緩衝液(溶離液)を5種類送液し、クロマトグラムが測定し終わるまでに約110分間を要する。分離が難しいイソロイシン(Ile)とロイシン(Leu)の分離度で1.2以上が得られた。時間をかけて多くの成分を分離するためにはナトリウム系よりリチウム系の緩衝液が適しており、図3にも見られる通りタウリン(Tau), GABAと略す γ -アミノ酪酸(g-ABA), およびオルニチン(Orn)など健康サプリメントの成分も分析可能である。生体液分析法は、動物の血清や尿を分析することから元々その名称で呼ばれているが、たんぱく質構成アミノ酸20成分以外のアミノ酸類縁物質も分離できるため食品分析全般に利用されている。

例えば、GABAのみを分析したい場合、分析時間の短縮が望まれるわけだが、その場合にも定量値が影響を受けないように夾雑物質はきちんと分離しなければならない。まず一斎分析法によりトマトピューレ中のGABAを分析したクロマトグラムを図4(a)に示す。次にGABAの前後のピーク群をきちんと分離した短縮分析法を図4(b)に示す。得られた濃度は、前者の分析法が0.208 mmol/Lで、後者が0.211 mmol/Lであった。このため、短縮分析法は一斎分析法と比べ数%以内の乖離で利用可能であることがわかった。

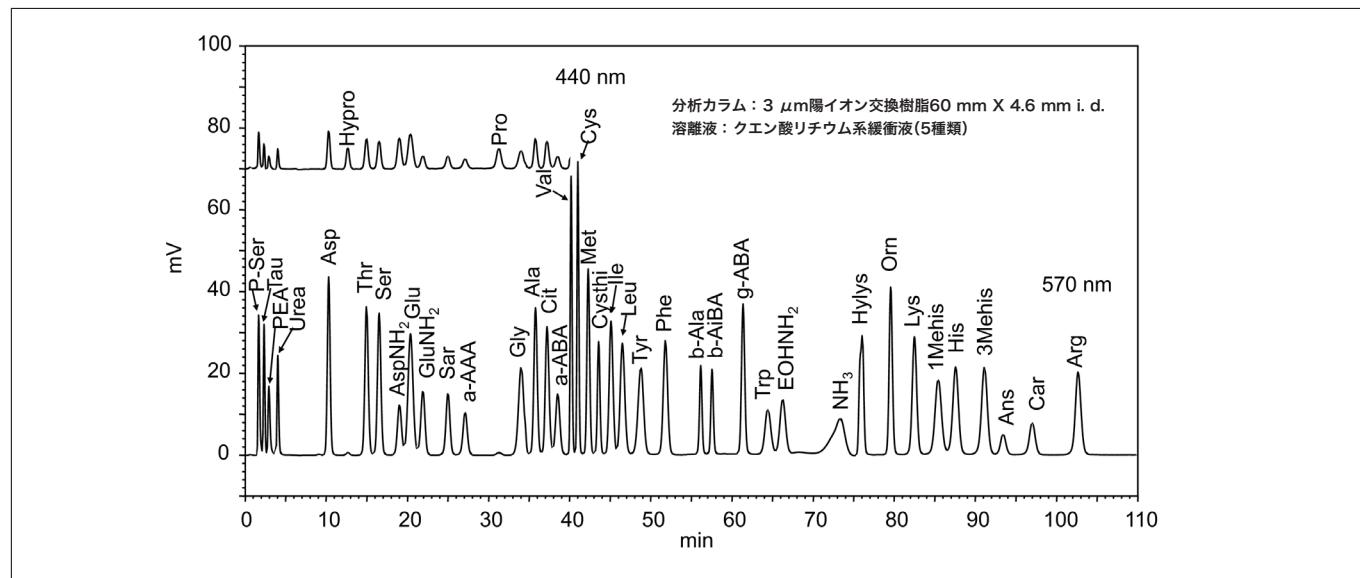


図3 生体液分析法のクロマトグラム

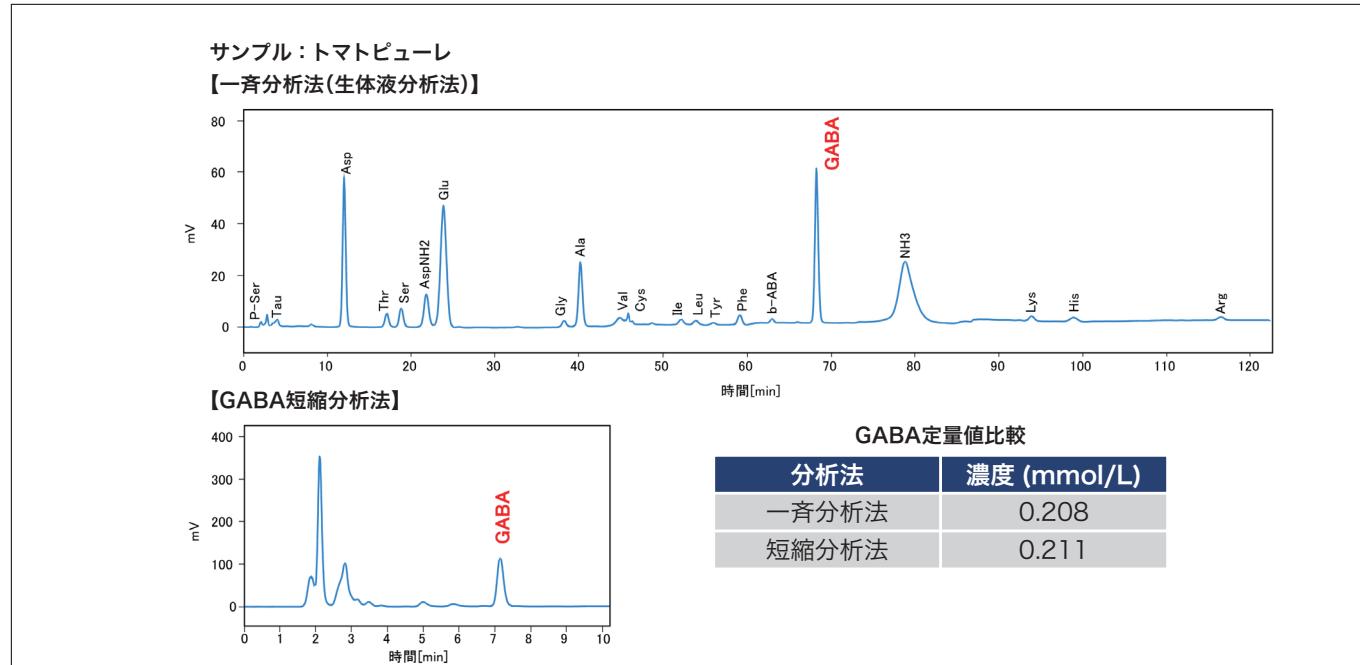


図4 トマトピューレのGABA短縮分析法

5. まとめ

AminoARTS の開発により、ユーザーに簡便な操作環境を提供することができるようになった。また、多彩な機能を必要とするユーザーには引き続き OpenLab CDS も利用可能なので、選択肢が拡がったとみることができる。いずれの操作環境を利用しても、ニンヒドリン法イオン交換クロマトグラフィーによる信頼性の高いアミノ酸分析データが入手可能である。最後に、本開発に限らず長きに亘りユーザー視点から多大なる御助言を頂いた、味の素株式会社の小澤真一主任研究員に心より感謝申し上げる次第である⁴⁾。

参考文献

- 1) 伊藤正人, 成松郁子, 裴敏伶, 森崎敦己, 鈴木裕志, 福田真人, 八木隆, 大月繁夫, 関一也, 豊崎耕作, *S. I. NEWS*, Vol. 61 No. 1, 5360-5364 (2018).
- 2) <https://www.nature.com/articles/d42473-019-00269-3>
- 3) 伊藤正人, 和光純薬時報, Vol. 86 No. 3, 15-17 (2018).
- 4) 小澤真一, 宮野博, 伊藤正人, *S. I. NEWS*, Vol. 58 No. 1, 4968-4977 (2015).

1. “AminoSAAYA®” は日立ハイテクサイエンスの日本国内における登録商標です。
2. “AminoARTS®” は日立ハイテクサイエンスの日本国内における商標です。
3. “OpenLab” は米国 Agilent Technologies, Inc. の米国およびその他の国における登録商標または商標です。

著者紹介

- *¹ 伊藤 正人, 源 法雅, 渡辺 義市, 豊崎 耕作, 山田 宜昭
(株) 日立ハイテクサイエンス 光学設計部
*² 宝泉 雄介
(株) 日立ハイテクサイエンス マーケティング部
*³ 成松 郁子
(株) 日立ハイテクサイエンス サイエンスソリューションラボ東京

ショットキー FE-SEM SU7000を用いた 金属材料の*in-situ*引張観察

橋本 陽一朗^{*1}, 板橋 洋憲^{*2}, 斎藤 勉^{*3}

1. はじめに

近年、自動車や航空機部材に採用する金属材料には、さらなる軽量化と高強度化が求められている。引張応力などに対する材料の強度は、金属の結晶粒サイズ、歪み、介在物・析出物、転位といったミクロな組織構造の影響を大きく受けるといわれる。従って金属材料開発においては、マクロな機械的特性と組織構造の評価を関連付けて理解することが重要となる。

このようなミクロスケールの金属組織構造の観察には SEM の反射電子 (BSE) 像の特長である組成コントラストやチャネリングコントラストを用いた観察が有効である。また、SEM チャンバー内に応力試験用サブステージを組み込むことで応力を印加しながら、ミクロ組織構造の変化のその場 (*in-situ*) 観察が可能となる。本稿では、金属材料に対して引張応力を加えた際のミクロ組織構造の動的変化を *in-situ* 観察した事例を紹介する。

2. 実験装置の概要

2-1. SU7000 形 FE-SEM

観察には SU7000 形 FE-SEM を用いた。SU7000 はショットキーエミッターと静電界磁界重畠型対物レンズを搭載しており、低加速高分解能観察から大電流 EDX 分析、高速 EBSD 測定など幅広い用途に適用することができる。図1に SU7000 の外観と、信号検出系の模式図を示す。SU7000 は、図1 (b) に示すように複数の信号検出器を搭載しており、それぞれの検出器の特性に応じた異なる情報を取得することができる。また、それらすべての検出器の信号取得が同一の作動距離 (WD) (=6 mm) で行えるよう設計されており、測定条件を検出器ごとに変更する必要はなく、多信号の同時観察が可能である。

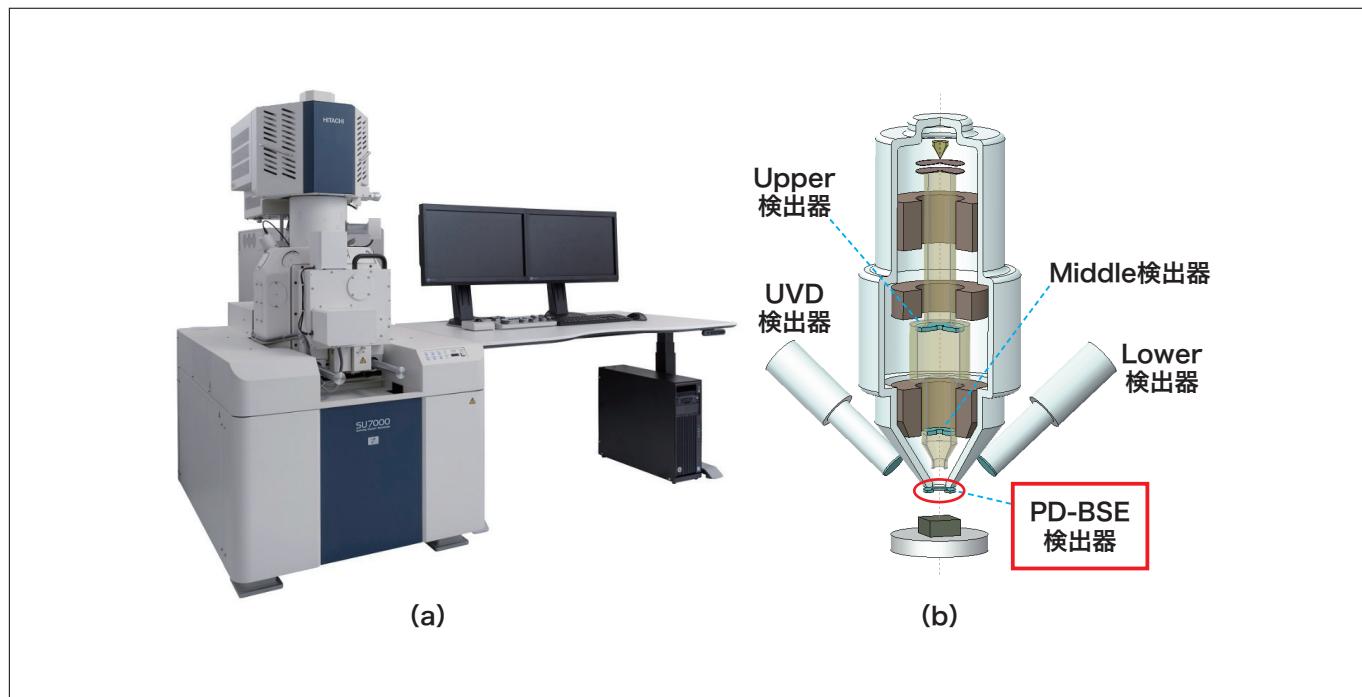


図1 ショットキー FE-SEM SU7000の(a)外観と(b)信号検出系の模式図

2-2. 引張サブステージ Microtest300

引張応力の印加には Deben 社製 Microtest300 を用いた。図2は、SU7000 のステージに Microtest300 を組み込んだ際の写真である。SU7000 の試料室は、ドローアウト方式を標準としており、このような特殊ステージの組み込みを容易に行うことができる。また、ステージドアにフィードスルー用のポートを用意しており、配線などの取り扱いも容易である。

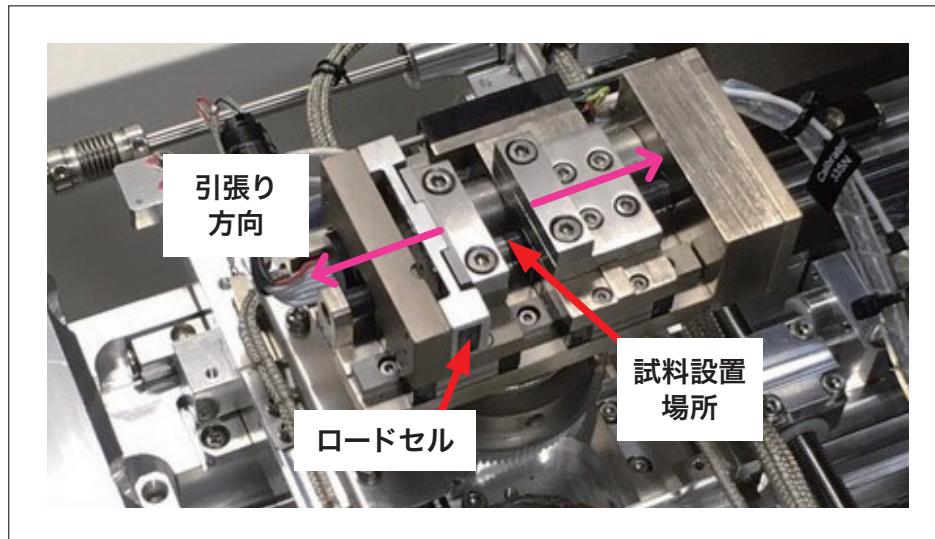


図2 SU7000のステージにMicrotest300を組み込んだ際の写真

2-3. リアルタイム観察に適した BSE 検出器

半導体型反射電子検出器 (Photo Diode BSE Detector : PD-BSED) は、組成コントラストやチャネリングコントラストを良好に捉えることができ、ミクロ組織構造の観察に適した検出器である。in-situ 観察では、作用に対する動的変化をリアルタイムで捉えるために高速スキャン条件での撮影が必要となる。

SU7000 では新規開発した PD-BSED により、従来の検出器と比較して応答特性を向上させ、高速スキャン条件での像質向上を図っている。改良点の一つとして、検出素子への逆バイアス電圧印加が挙げられる。図3は、逆バイアス電圧印加による効果を示す模式図である。PD-BSED の検出素子は半導体 PN 接合となっており、BSE などが素子に入射する際に発生する電子正孔対が空乏層の内部電界によって P 層、N 層に移動するときに発生する電流を入力信号としている。PN 接合に逆バイアス電圧を印加すると空乏層幅 W が拡大し、以下の式(1)で表される寄生容量 C が低下するため周波数帯域が向上する。

$$C = \varepsilon \frac{S}{W} \quad (1)$$

(ε : 誘電率, S : 素子面積)

また、空乏層幅 W が広がることによって、信号に寄与する電子正孔対の発生確率が増加するため、信号量が増加するという効果も期待できる。これらの総合的な効果によって、応答特性を向上させている。

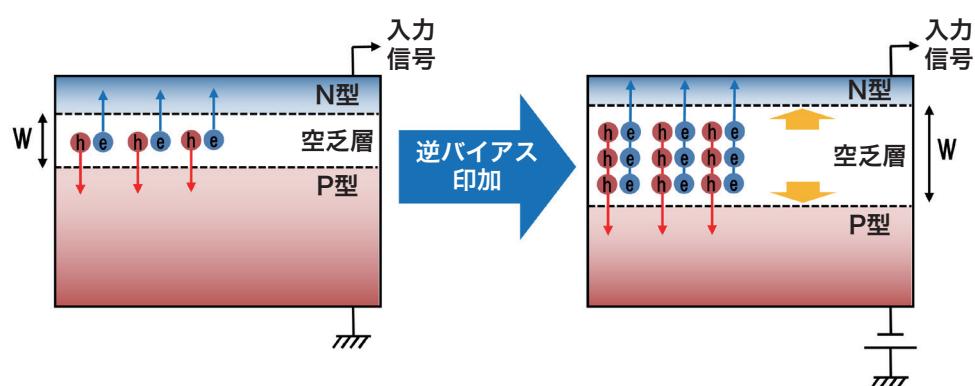


図3 PD-BSED素子への逆バイアス電圧印加による効果の模式図

3. *in-situ*観察条件の検討

機械研磨したアルミ板に対して、PD-BSED を用いて *in-situ* 観察するための観察条件の最適化を検討した。1フレームあたりの取得時間は 80 ms とし、加速電圧は、チャネリングコントラストが良好に観察された 3 kV を最適値とした。図4に、最適条件における従来検出器と SU7000 の PD-BSED で取得した BSE 像の比較を示す。従来検出器では像流れによって結晶組織が不鮮明なのに対して、SU7000 の PD-BSED ではチャネリングコントラストによって結晶粒を、組成コントラストによって介在物を鮮明に捉えることができた。

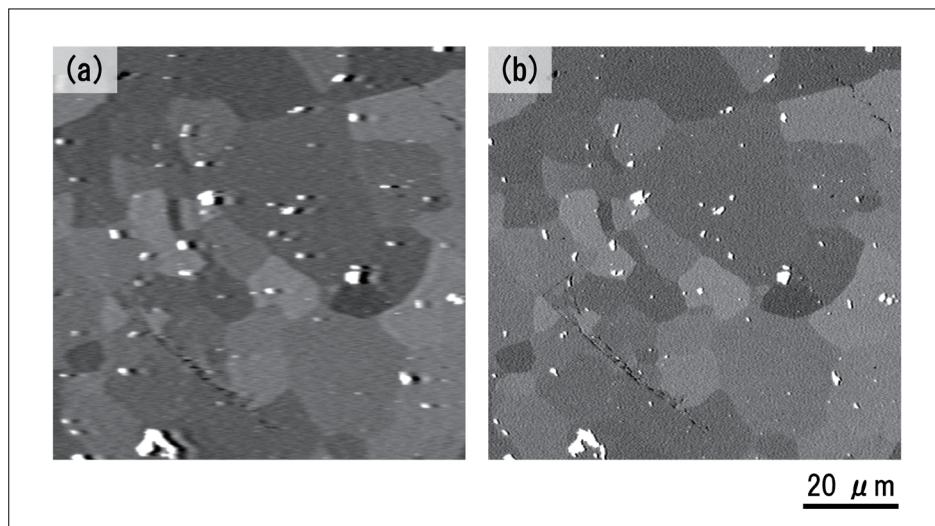


図4 *in-situ*観察条件における(a)従来検出器と(b)SU7000 PD-BSEDで取得したBSE像の比較

4. 金属組織の動的挙動観察

Microtest300 を用いてアルミ板に 0.1 mm/min の速さで引張応力を印加し、アルミ板が破断していく過程を観察した。図5に破断前後のアルミ板の BSE 像を示す。図5 (a) の破断前の BSE 像では、結晶由来のチャネリングコントラストを明瞭に捉えることができた。特に視野の中央付近では、一つの結晶粒内(破線)でチャネリングコントラストが著しく変化しており、引張応力の印加により結晶歪みが激しく生じている様子が観察された。図5 (b) の破断後の BSE 像では、破断面付近で結晶歪みがさらに進行し、結晶粒が微細化している様子が観察された。

図6 (b) ~ (j) に、破断過程を撮影した動画から一部拡大して抽出したスナップショットを示す。図6 (a) は応力印加前に予め広領域を撮影しておいた画像から同一視野を抽出した画像である。引張応力を印加したことにより結晶粒界近傍 [図6 (a)(b) 破線] で結晶粒が徐々に微細化していく様子を捉えられた。また、結晶粒の微細化が進行した領域 [図6 (g) 点線] に沿ってクラック [図6 (h) (i) 矢印] が生じ、最終的に破断するまでの過程を *in-situ* 観察できた。

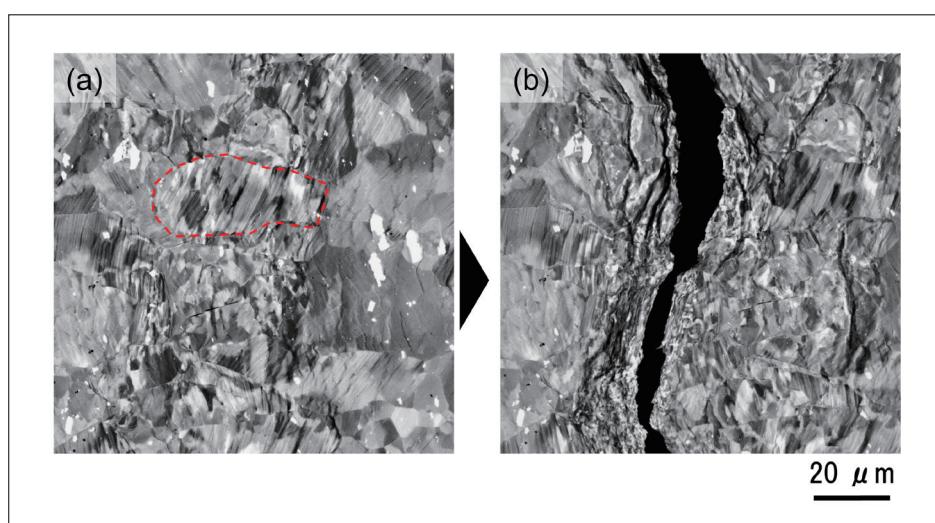


図5 アルミ板の*in-situ*引張観察例 [(a)破断前および(b)破断後のSEM像]

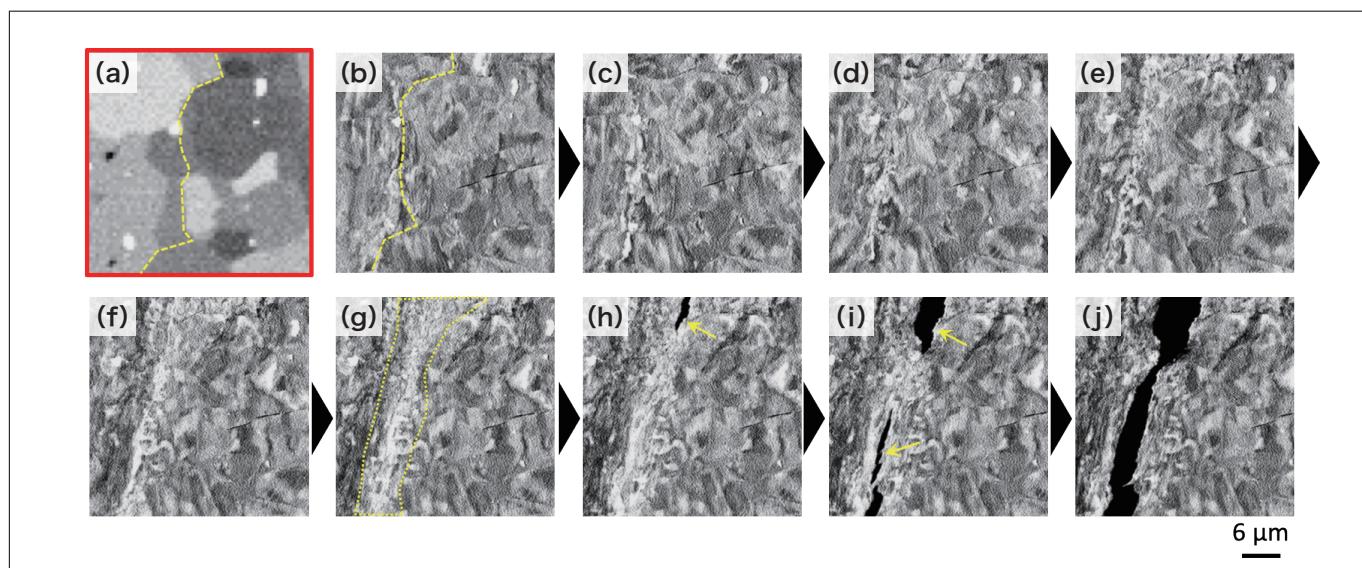


図6 アルミ板の *in-situ*引張SEM観察例(引張開始から破断するまでの過程を撮影した動画のスナップショット) (加速電圧: 3 kV) [(a)応力印加前, (b)~(j)破断過程]

5. まとめ

本稿では、ショットキー FE-SEM SU7000 と引張サブステージ Microtest300 を用いて、引張応力を印加した際の金属組織構造を *in-situ* 観察した事例を紹介した。応答特性を向上した半導体型反射電子検出器を用いて、応力印加に対する組織構造の変化を動的に捉えるための最適条件の検討を行った。その結果、結晶粒界近傍で結晶粒が微細化していく様子や微細化が進行した領域に沿ってクラックが生じて破断していく過程を観察できた。

本手法が金属の材料特性とミクロ組織構造についての新たな知見につながり、金属材料の開発に寄与することを期待する。

出典

月刊誌「工業材料」2020年4月号掲載

著者紹介

*¹ 橋本 陽一朗

(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

*² 板橋 洋憲

(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 制御システム設計部

*³ 斎藤 勉

(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 解析システム第一設計部

◎ 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 September 2020 VOL. 63 No. 2

発行日 2020年10月30日

発行 株式会社日立ハイテク

編集人 許斐麻美

〒105-6409

発行人 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/