

1 原子間力顕微鏡によるナノ粒子のサイズ及び形態解析法 (G1-9-182)

原子間力顕微鏡法(AFM : Atomic Force Microscopy)は、カンチレバーに装着されたナノメートルオーダーの曲率半径を持つ微小な探針(図1)と試料表面の原子間に働く力を検出することでナノ粒子の画像を取得し、そのサイズや形態、表面形状を解析する分析手法である。大気中及び液中で実施することが可能である。また、ナノ粒子の剛性などの力学的特性を測定することも可能である。AFMはナノテクノロジーを応用した医薬品の特性解析に利用されている。

1. 装置及び動作原理

1.1. AFM装置

AFMは、半導体レーザー、AFMヘッド(カンチレバーが装着される機器の構成部分)、探針の付いたカンチレバー、試料ステージ、分割フォトダイオード受光部などから構成され、カンチレバーに照射するレーザーのアラインメントを適切に実施できるよう、光学顕微鏡及び荷電結合素子(Charge Coupled Dedice : CCD)カメラを搭載したものをを用いる(図1)。このAFMシステムは除振台上に設置し、測定に影響を及ぼす振動を防止する。

1.2. AFM動作原理

AFMの動作原理の一般的な概要は以下のとおりである(図1)。

- 1) 半導体レーザーがカンチレバーの背面に照射され、反射されたレーザー光は分割フォトダイオード受光部で常にモニターされている。
- 2) カンチレバーが試料の表面近傍に近づくと、表面間力(引力又は斥力)により生じる曲げモーメントに応じてカンチレバーがたわむ。このたわみは分割フォトダイオード受光部におけるレーザー検出位置の上下変位として計測される。
- 3) カンチレバーのたわみが一定となるように、試料ステージ又はAFMヘッドに付随しているピエゾ駆動装置によってカンチレバー-試料表面間のz軸方向での距離を制御しながら、試料のx, y方向に対してカンチレバーが走査される。

以上の1) ~ 3)の動作原理に基づき、ピクセルごとに高さ情報が保存されたAFM画像が得られる。実際の画像取得では、測定対象のナノ粒子は平らな固体基板上に固定されており、粒子の高さは基板表面から測定された値になる。ナノ粒子のサイズ測定において、対象粒子が球状であると仮定すると、AFMで測定される高さは、粒子の直径に相当することになる。さらに校正用標準試料を利用することにより、AFM画像におけるz軸方向の高さ情報は高い真度と精度を有する。一方、AFM画像の側方次元(x, y)情報は、校正の困難さや探針の形状による影響を考慮する必要がある。

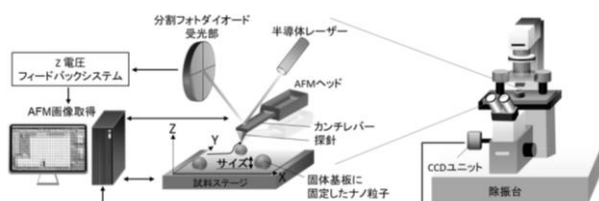


図1 代表的な原子間力顕微鏡システムと画像取得用PCの概略図¹⁾

1.3. その他の装置

防音ボックス：外部音による振動の影響を避けるために、原子間力顕微鏡システムを収容する防音ボックスを利用する場合がある。

UV照射洗浄装置：カンチレバーを洗浄する場合に利用できる。

温度制御装置：温度を一定に保つ必要がある試料測定に利用できる。

2. 測定

AFMによるナノ粒子のサイズ測定は、一般に以下の手順で実施される。

2.1. 測定試料の調製

測定対象のナノ粒子を適当な溶媒に適切な濃度となるように分散させた試料を調製する。溶媒・濃度はナノ粒子が安定に分散状態を保持するよう設定する。

2.2. ナノ粒子を固定するための基板の準備

AFMにより画像を取得する上で、観察対象試料の固体基板への固定は必須である。観察対象試料の物理的・化学的特性により適切な基板を選択することは、観測粒子数や形態など、最適な条件を検討する際の重要な要素である。

高さ測定において安定したベースラインを確保するために、基板の表面粗さは測定対象の粒子に比較して十分に平らでなければならない。測定対象の粒子サイズの5%以下の表面粗さ(表面の凹凸について、中心線からの偏差の絶対値平均である算術平均粗さ)であることが望ましい。また、ナノ粒子を容易に固定するために基板表面の物性が比較的均一であることが重要である。

一般に、安定に分散しているナノ粒子の表面は正又は負に帯電しており、それら粒子の固体基板への固定は、静電的相互作用によることが多い。例えば、負荷電のポリスチレン標準ナノ粒子は、正に帯電した固体基板表面へ容易に固定できる。粒子と基板間の表面間力がファンデルワールス相互作用や疎水性相互作用に依存する、固定する対象粒子が柔らかく基板との相互作用により変形・崩壊が生じるなど、特に相互作用が複雑になる場合には、固体基板の選択に多くの検討が必要になる。代表的な基板として、市販されているAFM測定用の高品質マイカ(muscovite mica)、金(111)蒸着マイカ、単結晶性シリコンなどが挙げられる。これらの基板は原子レベルで平坦であり、基板表面の荷電状態を制御するための表面処理が可能である。例えば、負に帯電したナノ粒子を固定する場合には、0.3 vol%の3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)水溶液で正に帯電するように表面処理を行うことが可能である。その他、表面粗さが約5 nm以下の比較的平坦なカバーガラスが市販されており、測定対象の粒子サイズが約100 nm以上の場合には基板として用いることができる。使用する基板の表面粗さを把握するために、あらかじめAFMにより画像を取得しておくことが望ましい。

2.3. ナノ粒子の固体基板への固定

適切な基板にナノ粒子の液体試料を滴下し、粒子が基板に固定されるのに十分な時間、インキュベーションを行う。空气中で画像の取得を行う場合には、インキュベーション後に基板を超純水でリンスして塩などの余分な成分を除き乾燥させる。

100 2.4. AFM画像の取得

101 2.4.1. 測定モードの選択

102 ナノ粒子は、静電的相互作用やファンデルワールス相互作用
103 などの弱い分子間相互作用により基板に固定されている。その
104 ため、AFMの測定モードによって側方次元にかかる力を最小
105 限に抑えることが重要である。この要件に適した測定モードの
106 一つに、インターミitttentコンタクトモード(ダイナミック
107 モード、タッピングモード、ダイナミックフォースモード、振
108 幅変調モードとも呼ばれる)が挙げられ、市販されているほと
109 んどのAFMで利用可能である。一方、近年、カンチレバーを
110 加振しない非共振の測定モード(フォースカーブマッピング)が、
111 特に柔らかい試料の観察や力学的特性(硬さなど)の測定に用い
112 られることもある。

113 インターミitttentコンタクトモードでは、カンチレバーホル
114 ダーに取り付けられた小さなピエゾ素子によってカンチレバー
115 を共振周波数付近の振動数で上下に振動させる。振動振幅は、
116 探針-試料間距離に極めて敏感であり、探針が試料表面に接触
117 すると、カンチレバーの運動エネルギーは試料側に散逸し、急
118 激に振動振幅が小さくなる。この振動振幅が一定になるように
119 探針-試料間距離をフィードバック制御しながら絶えず上下振
120 動させて試料中の粒子表面を走査するために、側方次元にかか
121 る力がほとんど生じないという利点がある。そのため、動きや
122 すい試料、凹凸のある試料、柔らかな試料、表面への吸着があ
123 る試料などにも有効な測定モードである。ナノ粒子のサイズ測
124 定は、空気中及び液中のいずれの環境でもインターミitttent
125 コンタクトモードによって可能である。以降は、インターミッ
126 tentコンタクトモードによる画像取得方法を述べる。

127 2.4.2. カンチレバーの選択

128 カンチレバー及びその先端に取り付けられている探針の特性
129 及び形状は、AFMの感度と解像度を決定する重要な因子であ
130 る。留意すべき点を以下に挙げる。

131 AFMで得られる画像には、探針形状と試料粒子形状の両者
132 に由来する要因が含まれる。つまり、探針の形状は高さ測定に
133 影響を与えないが、 x 、 y 方向での形状表示に影響を与えるため、
134 ナノ粒子の x 、 y 方向でのサイズ情報の扱いには注意が必要であ
135 り、探針形状によるアーチファクトを最小化するために、10
136 nm以下の先端半径をもった探針の使用が推奨される。

137 安定したカンチレバーの励起振動は、インターミitttentコン
138 タクトモードによる試料表面の画像化に重要な要素であり、
139 探針-試料粒子間の付着力(例えば、毛管力、ファンデルワール
140 ス力、静電力)を克服することができる大きな剛性(高いバネ
141 定数)をもつカンチレバーの使用が望ましい。一方で、カンチ
142 レバーの接触による力で粒子が変形する可能性があるため、測
143 定対象粒子の剛性に比較して小さい剛性(低いバネ定数)のカ
144 ンチレバーを用いることが望ましい。共振周波数の高いカンチレ
145 バーを使用すると、走査の感度が良くなり測定時間を短縮でき
146 るが、通常その剛性(バネ定数)は大きいために測定対象粒子へ
147 のダメージに留意が必要である。また、大気中観察及び液中観
148 察で、カンチレバー剛性の使い分けが必要ながある。これ
149 らの点を考慮して、カンチレバーの選択を行い、必要に応じて
150 カンチレバーの最適化を行う。

151 2.4.3. AFM画像の取得

152 調製した試料をAFMの試料ステージにセットし、AFM画像
153 を取得する。AFM画像は x 、 y 平面座標と垂直 z 座標の情報を持

154 つ。画像の取得及び解析の際には、 x 、 y 平面のデータポイント
155 数、すなわちピクセル数を考慮する必要がある。例えば、一辺
156 200ピクセルの $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 画像を得た場合、1ピクセルあ
157 たりりのサイズは $50\ \text{nm} \times 50\ \text{nm}$ となる。この設定条件では、
158 $50\ \text{nm}$ 以下の粒子を識別することができない。したがって、測
159 定対象の物質のサイズを考慮してスキャンサイズを設定する。
160 測定の際、一般的には1粒子あたり10ピクセル以上となるよう
161 にスキャンサイズを設定することが望ましい。AFMによる粒
162 子の平均サイズと粒度分布の解析では、代表的な粒子を無作為
163 に抽出していることを保証することが重要になる。一般的に、
164 少なくとも100個程度のナノ粒子のサイズを測定することや、
165 また、単一の視野での測定の作為性を避けるために、視野を変
166 えて画像を取得することが推奨される。画像取得中に画像の質
167 が突然悪くなった場合には、カンチレバーが汚染されたり磨耗
168 したりしていることが原因であることが多いので、カンチレバ
169 ーを洗浄又は交換することを検討する。

170 ナノ粒子を固定していない基板を用意し、同じ条件でAFM
171 画像の取得を行う。これにより、測定対象とするナノ粒子と誤
172 って判断してしまう可能性のあるアーチファクト又は異物が、
173 計測作業や基板そのものから混入していないことを保証するこ
174 とができる。

175 3. 画像解析とナノ粒子のサイズ(高さ)計測

176 取得したAFM画像は、AFM機器メーカーにより提供されて
177 いるソフトウェアを用いて、試料の設置や装置の熱ドリフトな
178 どに由来する画像上の高さの傾きを補正した後、解析を行う
179 (他の開発者によるAFM画像解析ソフトウェアも利用可能であ
180 る)。ナノ粒子のサイズ測定において、必須となるデータ解析
181 の操作について述べる。

182 3.1. 断面形状解析によるサイズ測定

183 ソフトウェアの断面形状解析ツールを用いると、画像中の任
184 意の部分に引いた線に沿った垂直方向の断面形状プロファイル
185 を取得することができ、水平・垂直方向の距離の測定が可能で
186 ある。断面形状プロファイルを取得すれば、ナノ粒子の高さだ
187 けでなく、ナノ粒子の凝集性も知ることができる。また、ナノ
188 粒子周辺の基板部分における傾き補正の適切性に関する情報を
189 得ることができる。画像中の各ナノ粒子について断面形状解
190 析を行い、粒子の高さを測定する。高さ測定の基準点は、全デー
191 タの最下点を基準に取る方法、走査方向に対して粒子形状の立
192 ち上がりの際を基準点とする方法、測定者が任意に基準を設定
193 する方法などがある。いずれを採用する場合でも同じ条件で一
194 連の測定を行う。試料調製に伴うアーチファクトの影響を避け
195 るために、明らかな異物粒子や粒子どうしを区別できない大き
196 な凝集物は粒子サイズの平均値を算出する際に除外する。

197 3.2. 自動粒子解析によるサイズ測定

198 ソフトウェアを用いて粒子を自動で認識し、粒子サイズ測定
199 を一括して短時間で行うことが可能である。粒子の認識は、ユ
200 ーザーが設定する高さの閾値に基づき行われる。すなわち、設
201 定値以上の高さを持つ粒子は解析に含まれ、設定値以下の高さ
202 の粒子は解析から除外される。また、明らかな異物の粒子や粒
203 子同士を区別できない大きな凝集物はソフトウェア上で選択し
204 解析対象から除外できる。以上の操作後、基板の高さを基準と
205 した個々の粒子における最大高さが自動的に測定される。自動
206 粒子解析を行う際には、解析対象となる画像の傾き補正が適切
207 に行われた状態でなければ、結果に人為的な影響が出てしまう

208 ので注意する。自動粒子解析を行う際、結果が正しく出力され
209 ているかを断面形状解析による結果と照らし合わせて妥当性を
210 確認しておくようにする。自動解析ソフトによるナノ粒子の平
211 均高さは、断面形状解析による平均高さよりも大きくなる傾向
212 にある。なお、ソフトウェアには、画像中における粒子個々の
213 占有面積から粒子サイズを解析するものもある。この場合、粒
214 子サイズは面積相当直径として解析される。

215 3.3. 真球以外の形状を有するナノ粒子の解析

216 粒子サイズを評価するにあたり、粒子が基板に固定された時
217 に変形が起きる場合や、対象となる粒子の形状が球形でない場
218 合には、高さとは別に、粒子解析ソフトを利用しながら他のパ
219 ラメータの追加解析を検討することも重要であろう。例えば、
220 粒子が基板に固定された時に変形が起きる場合には、基板への
221 固定前後で体積が一定であると仮定し、体積相当直径がサイズ
222 評価パラメータとして利用できるであろう(図2A)。加えて、面
223 積相当直径や、高さ/面積相当直径によって対象粒子の変形
224 した形状についての情報を得ることもできる(図2A)。また、対
225 象粒子が楕円形状である場合には、粒子が楕円に相当すると仮
226 定した場合の長径及び短径を測定することが可能であり、更に
227 短径/長径比を用いることで粒子の扁平率から形状について評
228 価することもできる(図2B)。側方(x,y)次元の情報が入り込む粒
229 子が球形でない場合の解析においては、カンチレバーの先端曲
230 率の影響を大きく受けるため、校正用格子を用いたカンチレバ
231 ー先端形状の評価などを行い、十分注意する。

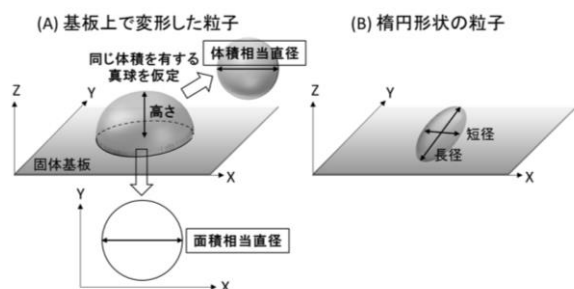
252 測定された平均値が保証された値と大きく異なる場合、製造
253 業者などによるピエゾ駆動装置のz変位の再校正について検討
254 する必要がある。

255 一方、近年のAFMでピエゾ素子に測長センサを付随させた
256 装置では、ピエゾ素子がどれだけ伸縮したかを精密に測ること
257 ができるため、高さzは常に測定されている。つまり、常に高
258 さ補正・変位補正を続けている制御方法を有する装置も存在す
259 る。

260 参考資料

- 261 1) 加藤くみ子ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,
262 50, 634~640 (2019) .
- 263 2) ASTM E2859-11 : 2017, Standard Guide for Size
264 Measurement of Nanoparticles using Atomic Force
265 microscopy.

266
267
268
269



232

233 図2 基板上で変形した粒子(A)及び(B)における形状評価¹⁾

234 3.4. サイズデータの報告

235 測定されたナノ粒子のサイズ(高さ)分布と、その平均値及び
236 標準偏差を報告する。測定に関わる因子はナノ粒子のサイズ測
237 定結果に影響を与えるため、ナノ粒子の固定化方法、カンチレ
238 ー、測定モード、測定環境が空気中か液中か、測定したナノ
239 粒子の個数及びサイズの解析方法に関する情報を記載すべきで
240 ある。

241 4. AFMの性能確認

242 AFMでは、カンチレバーのz位置を、ピエゾ素子の伸縮によ
243 って距離制御している。その伸縮は印加した電圧に対して非線
244 形性やヒステリシスなどの性質を有している。従来のAFMで
245 は、ピエゾ素子に印加した電圧から高さzを求めている。しか
246 し、上記の性質のために、高さが保証された実際の試料を測っ
247 て検量線などを作成し「高さ補正」をする必要がある。例えば、
248 測定するナノ粒子の高さに近いステップ高さの校正用格子を選
249 択し、鋭い探針を使って少なくとも三つの異なる場所で測定し
250 たステップ高さの平均値を、校正用格子で保証されている高さ
251 の値と比較する。