

『走査電子顕微鏡(SEM)による
ナノ粒子の粒子径分布計測プロトコル』



一般社団法人 ナノテクノロジービジネス推進協議会

【目次】

【はじめに】	1
1.背景	1
2.目的	2
3.SEM によるナノ粒子の粒子径分布計測フロー	2
3-1.試料調製フロー	3
3-2.SEM 観察フロー	3
3-3.画像解析フロー	3
4.プロトコルの検討	3
4-1. シリカナノ粒子	4
4-1-1.試料調製	4
4-1-2.SEM 観察	8
4-1-3.画像解析	12
4-1-4.粒子径分布測定結果	12
4-2. チタニアナノ粒子	13
4-2-1.試料調製	13
4-2-2.SEM 観察	15
4-2-3.画像解析	15
4-2-4.粒子径分布測定結果	15
4-3. 凝集、分散状態の異なる画像の粒子径分布計測結果比較と画像解析改善	15
4-3-1.シリカ検討画像	15
4-3-2.画像解析比較結果	16
4-3-3.画像解析の再検討とその結果	20
4-3-4.まとめ	21
5.プロトコル	24
【おわりに】	27
付録（事例集）	28
A. シリカの場合の試料調製法、観察条件、画像処理法	28
B. チタニアの場合の試料調製法、観察条件、画像処理法	30
C. シリカの場合の粒子径分布測定結果	32
D. チタニアの場合の粒子径分布測定結果	33
E. 画像解析詳細例	34-46

【はじめに】

本文書は、1nm から 100nm 以下のナノ粒子を対象にした SEM による粒子径分布測定のためのプロトコルである。SEM に着眼したのはナノ材料の観察・計測技術の一つに挙げられ、簡便・迅速に観察できることから産業界で広く普及している手法であることがその理由である。試料調製、観察条件、画像解析について、複数の機関による検討を通して、現状、良いと考えられる方法、条件をのせている。前半に、重要なポイントを整理し、できるだけ多くの事例をのせて、その方法、条件にした根拠がわかるようにした。さらに、参考にしてもらえるよう、より詳細な条件を付録に載せた。これまでの検討結果を基に、推奨すべきプロコをまとめた。用いたナノ粒子は、シリカ、チタニアであるが、これに特化したものでなく、他のナノ粒子にも適用可能と考えている。

なお試料調整法に関してはナノ粒子が適度に分散された試料を用いることを前提としており、試料を観察用基板にセットする際に粒子が再凝集しないような調整法をプロトコルの対象とした。従って分散状態の良い試料調整法には別途、十分な注意が必要である。

1.背景

ナノスケールオーダーで構造や特性を制御したナノ材料や、物質・材料の機能を飛躍的に向上させるナノ製造技術の研究開発等が次世代産業の中核を担う基盤材料・技術として期待されているが、物質としての安全性等については十分に確認されていない。ナノ材料安全管理の必要性から、EU ではナノ粒子のサイズ分布に基づき「ナノ材料」が定義され、この定義に該当する製品について規制が開始されている。2011 年 10 月に欧州委員会によりナノ材料の定義が以下のように勧告された。

「ナノマテリアルとは、非結合状態、または強凝集体(アグリゲート)または弱凝集体(アグロメレート)であり、個数濃度のサイズ分布で 50%以上の粒子について1つ以上の外径が 1nm から 100nm のサイズ範囲である粒子を含む、自然の、または偶然にてできた、または製造された材料を意味する。」

この定義は工業製品がナノ材料であるかどうかの該非判定に用いられることから、いかに粒子の粒子径分布を計測するかが課題となっている。

また、ISO TS80004-1 及び JIS TSZ0030-1 (用語規格)では、ナノスケールは、

「およそ 1nm~100nm の範囲、注記:より大きなサイズの外挿からは予測されない特性が主に、この長さの範囲に現れる。」

と定義されている。

フランス等でナノ材料の登録制度や表示の義務化(ナノラベリング)が開始され、OECD においては安全性試験のテストガイドライン策定の動きが始まっている。その一方で、工業粉体製品の粒子サイズ分布の統一された測定法がない。

ナノ材料の観察・計測技術の一つに挙げられる SEM 法は、簡便・迅速にナノ材料の観察ができることから産業界で広く普及している手法である。そこで、平成 27 年~平成 29 年の3年間、産業技術総合研究所(産総研)とナノテクノロジービジネス推進協議会(以下、NBCI)が、経済産業省委託事業である政府戦略分野に係る国際標準開発活動の一環でナノ材料のサイズ分布測定法に関する国際標準化を実施した。NBCIと産総研でSEMを用いたナノ粒子の粒子径分布

測定法の開発を行い、産総研が中心となって ISO/TC229 への規格提案を行った。(IS 19749, 規格名 Nanotechnology --Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy, 出版予定)

NBCI は、測定法の開発を社会受容標準化委員会/ナノ材料の実用的計測評価 WG の下で進め、産総研と複数の企業が参加するラウンドロビン試験(以下、RRT)を通じて、SEM は有効な方法であることを確認した。その後、粒子径分布計測プロトコルWGにて、プロトコル作成を実施した。

2.目的

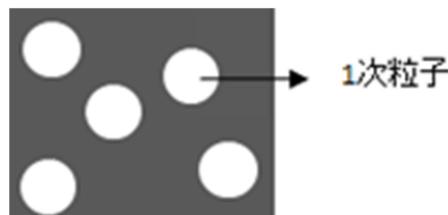
企業が活用できるプロトコルを作成する。ただし、標準作業手順書ではなく、推奨プロトコルと事例をのせ、活用、展開できるようにまとめる。

3. SEM によるナノ粒子の粒子径分布計測フロー

SEM を用いてナノ粒子の粒子径分布を計測するためには画像解析ソフトウェアの利用が必須である。画像解析ソフトウェアは画像の明暗により粒子と背景を区別して、個々の粒子の形状やサイズなどを解析して分布を導出する。そのためには、粒子の部分と背景との明るさが明確に分かれているコントラストが確保された画像が必要となる。また、明るさの差だけで粒子と背景を区別するアルゴリズムでは粒子同士が重なったり、接したりしている場合には、それらの粒子を一つの粒子と誤認識してしまうことになる。

画像のコントラストや粒子の重なりの問題については画像解析ソフトである程度は補正することができるが、完全な補正はできないので、できるだけ試料調整や SEM 観察の条件を工夫して理想に近い SEM の画像に近づける必要がある。理想的な画像とは、粒子とその背景との明るさの差(コントラスト)が明確で、粒子部分の明るさ(輝度)がそろっていて、個々の粒子がお互いに接することがない(凝集のない、分散された)画像である(図1)。

ただ、粒子の形状や表面の性状により、また、SEM の二次電子検出器のノイズなどによって輝度を完全に一様に保つことは不可能である。また、個々の粒子がお互いに完全に離れるように試料を調整することもできない。そのために、画像解析ソフトウェアには平滑化処理などの前処理や重なった粒子を画像上で分離するセグメンテーションなどの補正は必要である。



- ・試料調製により、上記 1次粒子が凝集なく、分散されている状態にする。
- ・SEM 画像は、粒子とバックグラウンドの差が大きく、粒子内は一律な明コントラストになるよう観察条件を決める。

図 1. 理想的な粒子分散状態

SEM による粒子径分布計測のフローは図2のように三段階に分類される。

3-1. 試料調製フロー

当 WG では計測の対象となるナノ粒子は既に分散と濃度調整がされた試料が準備されていることを前提とした。ナノ粒子を固定する基板は、濡れ性を良くするため、予め前処理を施してから使用する。分散液を基板に滴下し、乾燥させる。滴下後から乾燥過程で粒子が再凝集しないよう調整することがポイントになる。分散の良い状態を保ったまま、分散液溶媒を乾燥させる乾燥条件も影響する。目標とする観察試料は、粒子の種類に依らず、図 1 に示すように一次粒子が凝集なく、分散している状態をつくることである。

3-2. SEM 観察フロー

次に基板を SEM の試料台に固定し、観察する。観察にあたり、著しい粒子の局在がない視野を選定する。また、画像は、バックグランド(基板)と粒子のコントラスト差が大きく、しかも粒子の部分が一様な明コントラストになるよう、観察条件を決める。

3-3. 画像解析フロー

画像を取得後、使用画像を選択する。画像処理、解析に用いるソフトは特定しない。バックグランド処理後、画像の2値化、輪郭抽出を行い、粒子径と粒子径分布を算出する。

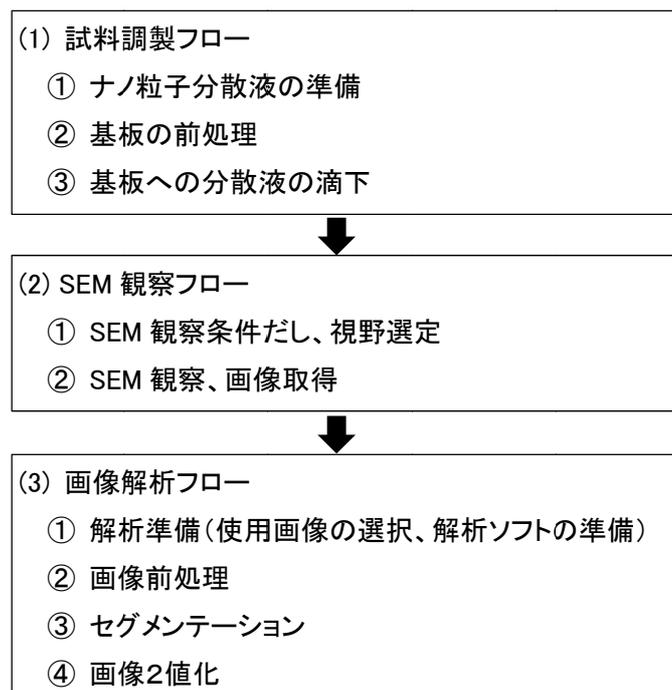


図 2. 粒子径分布計測フロー図

4. プロトコルの検討

ナノ粒子粒子径分布計測のプロトコルの検討にあたって、WG 内でラウンドロビテスト(RRT)を行うことにした。RRT の試料にはチタニア(d50 約 40nm)とシリカ(d50 約 60nm)を使用した。

シリカナノ粒子は、形状が球状に近く、分散性が比較的良い。ただし、シリカの試料液を基板に滴下して乾燥させようとするときシリカ粒子が基板に固定されないため分散媒の蒸発に伴い粒子が凝集してしまう。一方、チタニアは、形状が複雑で、凝集性が強い扱いにくい試料である。

RRT は2回実施した。第一回の RRT の結果を WG 内で検討した結果、参加機関の間で計測の技術に関する知識やノウハウの保有について各社のレベルがそろっていないことが判明したので、重要となるポイントを議論し、以下の様に整理した。

(1) 試料調製 → ポイントは、凝集の低減と粒子数確保

- ① ナノ粒子分散液(水系)の濃度及び分散助剤
- ② 基板の親水化処理
- ③ 粒子の凝集抑制や基板への固着を強化するための添加剤の追加
- ④ 粒子の凝集抑制のために基板に分散液を滴下した後の処理

(2) SEM 観察

- ① 加速電圧 → 画像のコントラストの最適化
- ② 画像のピクセルサイズ(倍率と画素数で決まる) → 粒子径計測の精度確保
- ③ 視野選択(著しい局在がなく、ランダムに配置されている領域を選択)

(3) 画像解析

- ① ノイズや異物除去のためのフィルタ条件(面積、周囲長など)
- ② 連結粒子、画像端粒子を計測に加えていないかを目視などで確認する
- ③ 凝集(重なり)が多い場合は、粒子が誤分割されたり、輪郭が内側になったりすることにより粒子径が小さく算出されることがある
- ④ 解析に求められる総粒子数(粒子径分布の精度向上)

これらのポイントについて、RRT の実施においてどのような方法や条件が良いかをシリカナノ粒子とチタニアナノ粒子について検討したので、以下4-1 節と 4-2 節で述べる。試料調整での凝集対策や SEM の加速電圧の選定などについては、他の試料の応用への参考となるように、より具体的な検討内容を示した。(事例 1～事例 4 参照)

ただし、4-1、4-2 の RRT の実施においては画像解析のソフトウェアや解析方法の選択は参画機関の判断に委ねられ報告だけが求められた。平均粒子径の各機関間のバラつきは試料調整、SEM 観察条件などの議論を通じて大きく改善された。そこで、凝集に対する課題を明確にするために、凝集、分散状態の異なる 3 種類の画像群を参画機関に配布して画像解析だけの比較を行うことにした。その結果を 4-3 で述べる。

4-1. シリカナノ粒子

シリカナノ粒子で検討した結果を示す。

4-1-1. 試料調製

① 水系分散液の使用と濃度

観察試料を調製するために、ナノ粒子分散液を用いて作製した。ここでは、ナノ粒子粉体から、分散液を作製する方法については述べない。水系分散液であり、市販のものを用いている。基板上に1次粒子が凝集なく、分散された試料を得るために、分散液の濃度が重要である。高濃度の分散液を用いると、凝集が起こりやすい。また、希薄すぎると、撮影にかかる時間が増大する。厳密に最適な濃度を検討したわけではないが、今回は濃度を 0.1wt%とし、これ以降の試料調製法を検討することにした。

②分散液に添加する添加剤

シリカナノ粒子は、分散状態が良い粒子であるが、滴下後、基板上で凝集を抑制するために、HEC(ヒドロキシエチルセルロース)を候補として選び、効果を調べた。以下に、シリコンとTEMグリッドを用いた場合に見られた効果を示す。(事例1及び事例2参照)

事例1: シリコン基板を用いた場合の HEC 添加効果

[試料処理法]

試料 : 微粒子分散水溶液 シリカ(SiO_2 , 日産化学製)

SiO_2 は HEC(和光純薬工業製 和光一級)1%水溶液を、0.4%添加

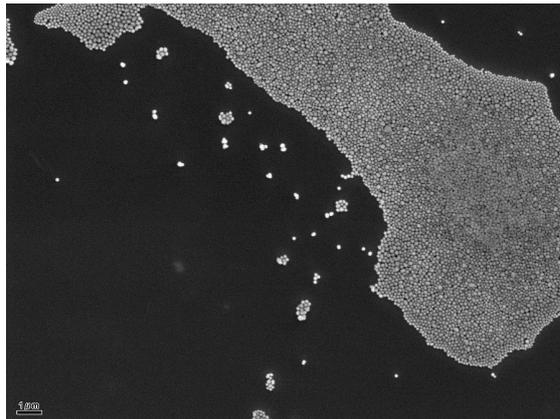
基板 : Si 基板

前処理 : 基板表面をプラズマエッチング装置(日本電子製 HDT-400)を使用し、2分間 DC プラズマ処理により親水化

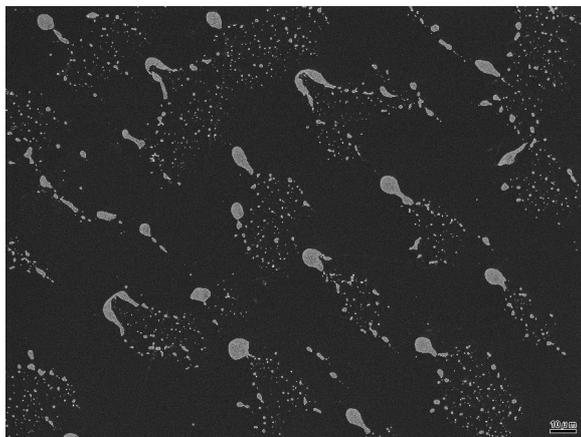
試料固定: ガラス毛细管ピペットで約 $1\mu\text{L}$ 滴下。滴下 10 秒後に濾紙で分散液を除去

[SEM 像]

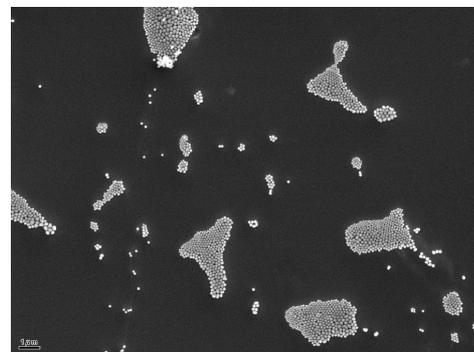
(1) HEC 添加無しで試料処理した場合のシリカ(SiO_2)の SEM 観察例



(a) ナノ粒子の密度の高い部分 ($\times 10\text{k}$)



(b) ナノ粒子の比較的密度の低い部分 ($\times 1\text{k}$)



(c) (b)の拡大 ($\times 10\text{k}$)

図 3. HEC 添加無しで試料処理した場合のシリカ(SiO_2)/Si 基板の SEM 像

(2) HEC 添加有りて試料処理した場合のシリカ(SiO_2)の SEM 観察例

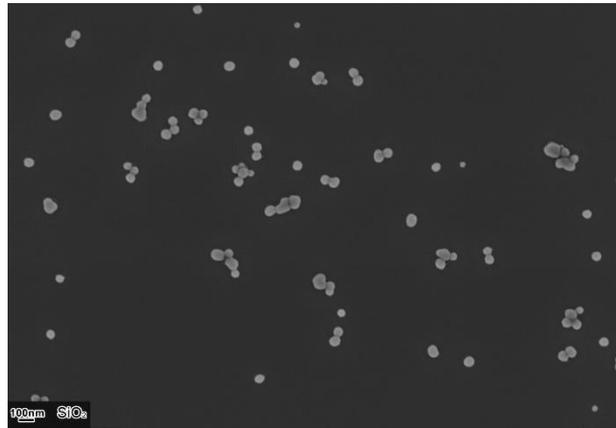


図 4. HEC 添加有りて試料処理した場合のシリカ(SiO_2)/Si 基板の SEM 像 ($\times 30k$)

事例 1 から、HEC 添加ない場合(図 3)は、ナノ粒子が高密度で凝集する部分、比較的低密度で凝集する部分が見られる一方、HEC 添加をした場合は、粒子密度が高い部分は、集合体の存在する確率が高いものの、図 3(a),(b)のような状態はほとんど存在せず、ほぼ全域にわたり高い確率で、1 次粒子が分離して存在していた。(図 4)

TEM グリッドを基板に用いた場合の HEC 添加効果について、事例 2 に示す。

事例 2 : TEM グリッドを基板に用いた場合の HEC 添加効果

ここでは、HEC を添加することによる凝集抑制効果、またその HEC 添加量依存性を検討した。HEC の 1%水溶性を調整し、0.1wt%のシリカナノ粒子分散液 1mL に対し、2, 4.5, 10, 30 μL ずつ添加した。フォルムパール支持膜つきの TEM グリッドの支持膜を上に向け濾紙の上に置き、支持膜側から HEC を添加したシリカ分散液をそれぞれ 30 μL 滴下した。この時余剰な分散液は TEM グリッドから溢れ、敷かれた濾紙により吸い取られる。TEM グリッドを 30 分以上自然乾燥させ、SEM 観察を行った。

図 5 に HEC 添加試料の SEM 像(低倍率像:左、高倍率像:右)を示す。TEM グリッド上のシリカナノ粒子が明コントラストで観察され、粒子数は HEC の添加量とともに増加する傾向がみられた。10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の HEC 添加でグリッドほぼ全体がシリカナノ粒子に覆われていた。30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ の添加ではグリッド外縁部から開口部中央へ向かう明コントラストの模様が観察されるが、このような箇所では粒子の積層が見られた。

以上より、HEC の添加により、TEM グリッド上にシリカナノ粒子を配置する効果があることが示された。また、その添加量により、TEM グリッド上の粒子密度をコントロールできることがわかった。0.1wt%のシリカナノ粒子の粒径計測を行うためには 4.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 程度の HEC 添加をすることで適した密度の粒子が得られる。

本手法は、凝集を抑制しつつ、シリカナノ粒子を TEM グリッド上に配置できる方法である。凝集抑制メカニズムの詳細は今後の議論であるが、簡便な操作で試料調製を実現できること

から、実用的な手法であるといえる。

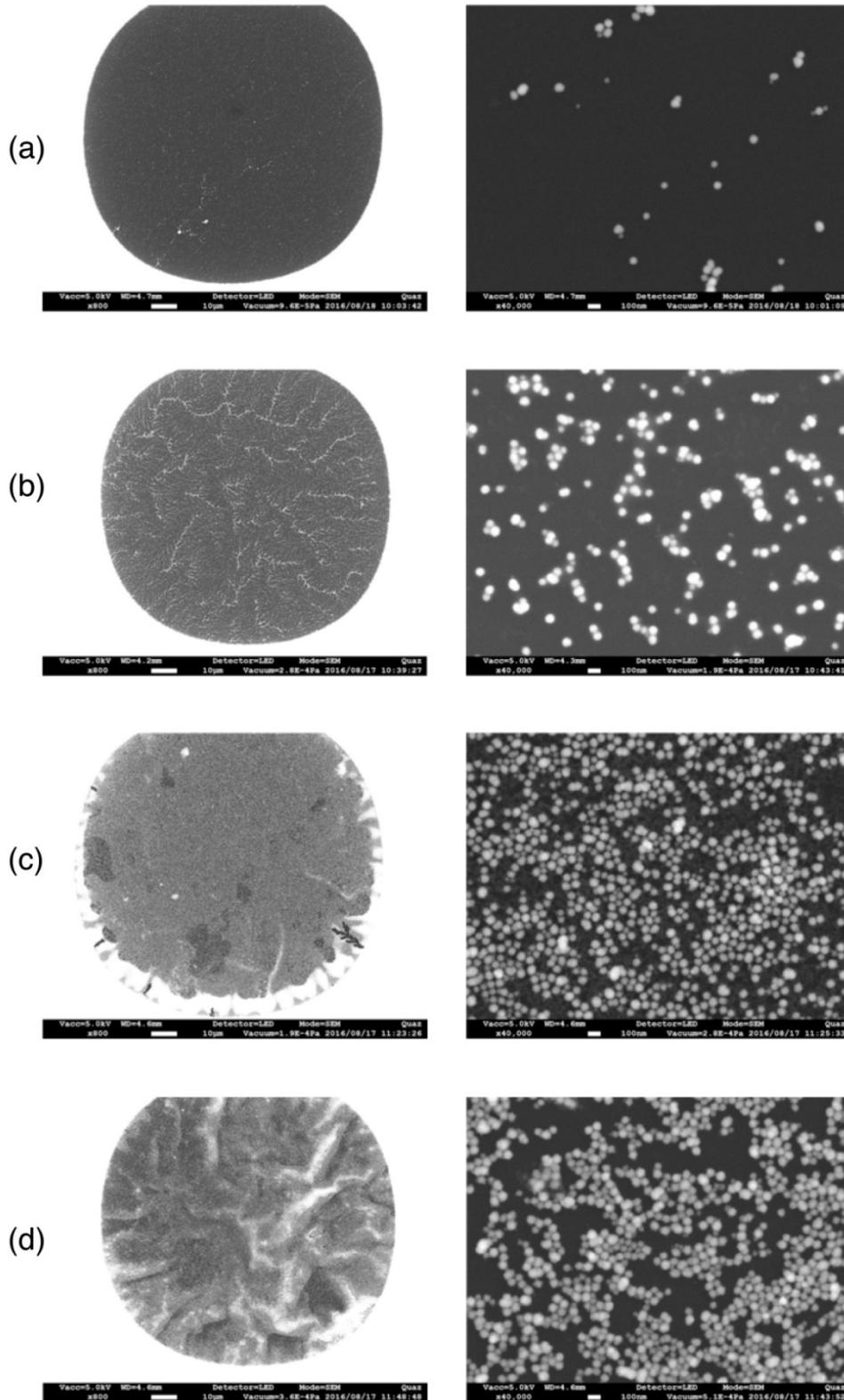


図 5. HEC 添加法により調製したシリカの粒子試料の SEM 像
HEC 水溶液添加量 : (a) $2 \mu\text{L/mL}$, (b) $4.5 \mu\text{L/mL}$, (c) $10 \mu\text{L/mL}$, (d) $30 \mu\text{L/mL}$

HEC は、シリカ粒子以外の粒子や TEM グリッド、シリコン以外の基板の場合にも適応できる可能性があり、今後の発展が期待される。また、HEC は、水溶性の高分子化合物であり、その水溶液は、増粘、懸濁、分散、保護コロイドなどの優れた機能を有していることが知られており、上記事例で述べた効果を裏づけていると考えられる。

③基板について

SEM 観察試料に用いる基板には、シリコンウェハ、TEM グリッド(銅あるいはモリブデン製メッシュ上にカーボン支持膜、コロジオン支持膜が付いている)、アルミ箔などがある。RRT では特に指定はしていないが、一般的によく用いられているシリコンウェハまたは TEM グリッドが使用された。

④親水化処理

分散液を基板に滴下後、基板表面にナノ粒子を凝集なく、均一に分散させるために基板の親水化処理は必要である。水系分散液を使用する場合、濡れ性を良くすることにより、凝集を抑制する効果がある。

親水化処理法は、プラズマ処理、UV オゾン処理がある。プラズマ処理装置などがない場合は、エタノールによる洗浄や、シリコン基板に限ってはガラス容器中で適度に加温したピラニア溶液(例えば濃硫酸 : 30%過酸化水素水=3:1(ただし調製や廃棄には十分に注意のこと)に浸す等の方法がある。

⑤滴下後処理、乾燥法について

分散液を基板に滴下後、試料を乾燥する方法は、自然乾燥(室温乾燥)、真空乾燥、加熱乾燥がある。主に、室温にて、30分以上乾燥させている場合が多い。

4-1-2. SEM 観察

①SEM 観察条件

SEM の加速電圧は、一つの粒子の表面上のコントラストに影響を与える。ここでは、参考に PS(ポリスチレン)ナノ粒子(平均粒径 50 nm)を用いた場合の粒子内コントラストの加速電圧依存性について事例(事例 3 参照)を示す。加速電圧他、観察条件は、事例を参考に最適な条件を決めていただきたい。

シリカの RRT での加速電圧その他の観察条件の事例を付録の表 A.2 に載せた。

②画像のピクセルサイズ

RRT では 100nm 以下の粒子径の測定精度を確保するために、画像のピクセルサイズは、1.5nm/px より小さくすることとした。

事例 3: PS(ポリスチレン)ナノ粒子(平均粒径 50 nm)を用いた場合の粒子内コントラストの加速電圧依存性

ポリカチオンレイヤーを有する鏡面研磨 Si 基板上に PS 粒子を配置し、SEM 観察用の試料とした。SEM 装置は電界放出型電子銃を搭載したアウトレンズ型の SEM 装置を用い、一次電子エネルギーを変化させながら像観察を行った。15keV から 1keV での条件では二次電子は試料チャンバー内壁面に取り付けられた Everhart-Thornley 型検出器で検出した[図 6.(a)-(l)]。

0.5keV から 0.1keV までの一次電子エネルギー条件では粒子像観察のために必要な分解能を確保するため、試料に負電圧(-2kV)を印加するリターディング条件で観察を行い、二次電子は試料直上の鏡筒内に設置された TTL 検出器で検出した[図 6.(m)-(p)]。

一次電子エネルギー15keV での二次電子像で PS 粒子は明コントラストの縁取りをもった粒子として現れる。粒子のエッジの内側の明るさは Si 基板のそれとほぼ同レベルであることから、エッジ効果の大きな寄与によって PS 粒子の情報がもたらされていることがわかる。15 keV から 5 keV にかけて一次電子エネルギーの低下とともに、縁取り内部のコントラストが増加し、3keV では粒子全体が均一な明コントラストとして現れる。一次電子エネルギー1keV でも類似した像が得られるが、電子線の収束が難しくなるため、今回用いた SEM 装置では像分解能が大幅に低下する。0.5 keV 以下のリターディング条件では、PS ナノ粒子は再び縁取りを伴った粒子として観察されるが、高エネルギー条件とは反対に、PS ナノ粒子中心部は Si 基板に対して明らかな暗コントラストである。また、スキャン方向に平行に線を引いたようなアーティファクトが観察され、この条件では、試料帯電が発生していることが示唆される。

以上から、粒径 50nm 程度の PS ナノ粒子の計測を行う際には、粒径計測に十分な像分解能が得られる場合は 3kV の加速電圧条件が適しているといえる。この条件下では、エッジ効果による縁取りの形成を抑制し、一様なコントラストで PS 粒子を観察することが可能である。このようなコントラストの粒子像はソフトウェアにより容易に自動粒子解析を行うことが可能であろう。このような条件で十分な像分解能が得られない SEM 装置では、10-15kV 程度の加速電圧を用いるが、PS 粒子のコントラストが十分得られる動作距離(W.D.)、スキャンスピードや照射電流を検討するのが望ましい。(次頁に続く)

加速電圧

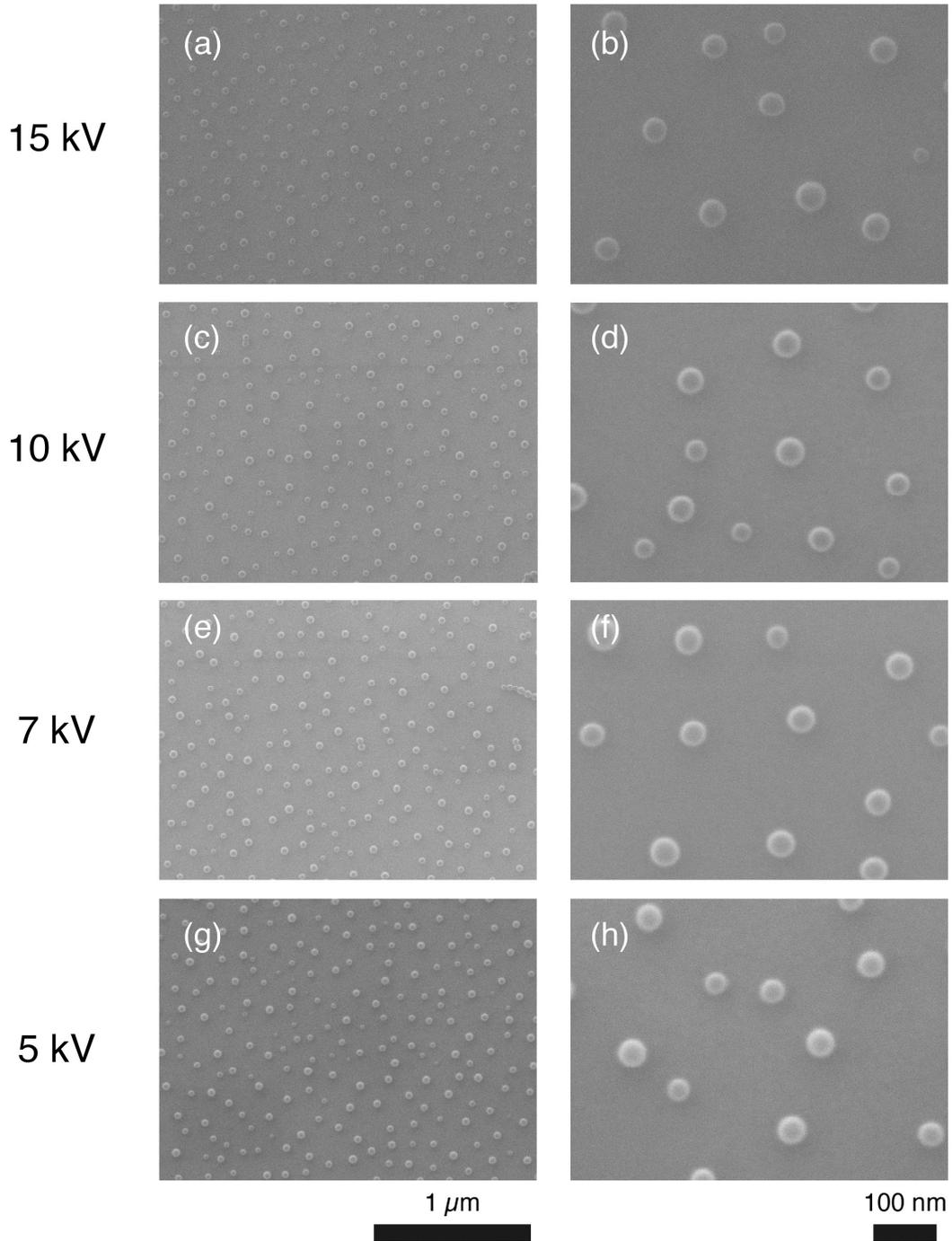


図 6. (a)-(h) PSL ナノ粒子の二次電子像コントラストの加速電圧依存性

(図 6 の続き)

加速電圧

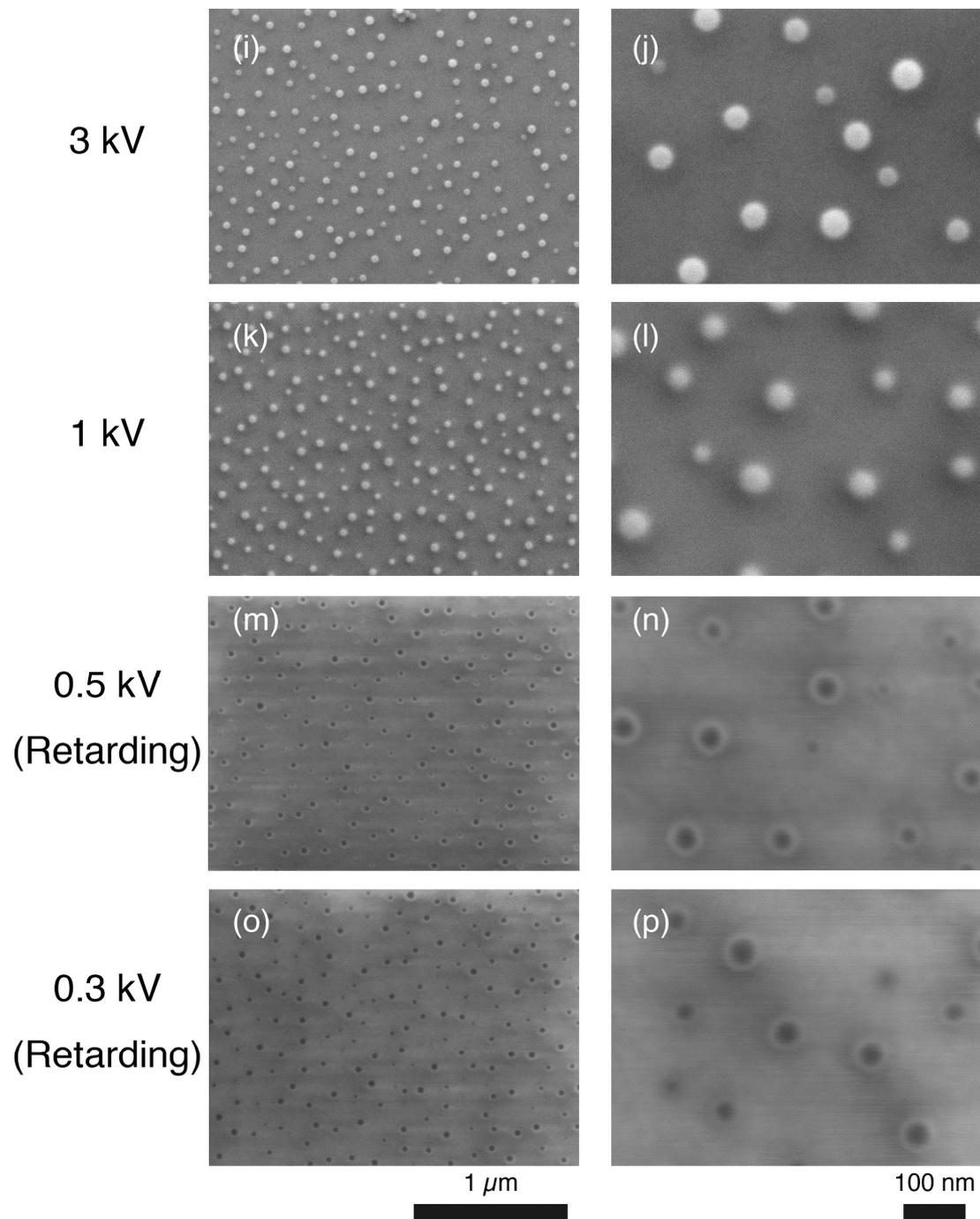


図 6. (i)-(p) PSL ナノ粒子の二次電子像コントラストの加速電圧依存性

4-1-3. 画像解析

シリカは、比較的、粒子形状が球形に近い。しかし、ナノ粒子は、材料によって必ずしも球のような理想の形状でない場合が多い。従って、粒子径をどう測定するかが重要である。そこで、粒子を2次元に投影した時の、長径である最大feret径、短径である最小feret径及び投影面の面積から求めた円相当径を粒子径として測定した。

RRTでは画像解析ソフトの種類、解析方法は各参画機関が選択した。その内容は付録の表 A.3 に示した。

解析に要する粒子数の数は、500個以上とした。粒子径分布が広い試料の場合は、より多くの粒子を解析することが望ましい。

4-1-4. 粒子径分布測定結果

ここでは、プロトコルの検討により得られた粒子径分布の実力値をRRT結果を用いて示す。試験は、2回行った。1回目の試験結果を基に2回目の試験条件を決定した。2回目の試験条件を下記①～③に示す。4-1-1～4-1-3で検討した結果が反映される前の1回目の結果に比べて2回目の方がばらつきの少ない結果となった。ここでは、2回目の結果を示した。

①試料調整方法

各機関の試料調整方法を付録の表 A.1 に示した。

②SEM 観察方法

各機関のSEM観察方法は、付録の表 A.2 と同じである。

③画像解析方法

各機関の画像解析方法は、付録の表 A.3 と同じである。

④SEM 像

各機関で測定されたSEM像の一部を付録の図 C.1 に示した。

⑤粒子径分布

2回目 RRT の円相当径分布を付録の図 C.2 に示した。円相当径の平均値は、

$$62.4 \pm 3.0 (1\sigma) \text{ (nm)}$$

であった。1回目のRRTによる円相当径の平均値は、

$$65.0 \pm 5.5 (1\sigma) \text{ (nm)}$$

であった。従って、ばらつきが改善したと言える。

4-2. チタニアナノ粒子

シリカナノ粒子と同様に検討した結果を示す。特にチタニアナノ粒子は凝集しやすいため、如何に分散させるかがポイントとなるため、その詳細を「⑤滴下後処理、乾燥法について」の項目に示した。

4-2-1. 試料調製

①水系分散液の使用と濃度

シリカナノ粒子と同様に濃度は約 0.1wt%とした。

②分散液に添加する添加剤

チタニアの場合は、添加剤は使用しなかった。⑤に示す滴下後処理、乾燥法の効果が確認できたためである。HEC 添加検討は、未実施である。

③基板について

シリカナノ粒子と同様である。

④親水化処理

シリカナノ粒子と同様である。

⑤滴下後処理、乾燥法について

チタニアは、分散液を基板に滴下後、10 秒ほど経過したら、濾紙で吸い取ることがポイントである。滴下後、すぐに分散液を吸い取らないと凝集が顕著になる。(事例 4 参照)

事例 4: 滴下後の濾紙の吸い取り効果について

試料調製手順は、以下の通りである。

- ・シリコン基板を使用し、DC プラズマ処理を 2min(使用装置 日本電子製: HDT-400) 行った。
- ・毛細管ピペット等を使用し、1 μ L 程度の極力少量を滴下した。
- ・10 秒後、濾紙を使用し、液滴を横から吸い取る。
(粒子濃度が高い場合には上から濾紙をかぶせる形で、液滴の大部分を吸い取る。)
- ・自然乾燥。

この試料の SEM 観察画像を、図 7 に示す。

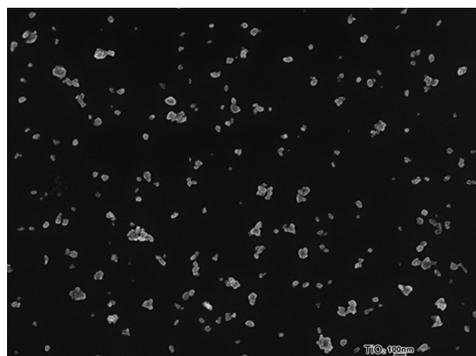
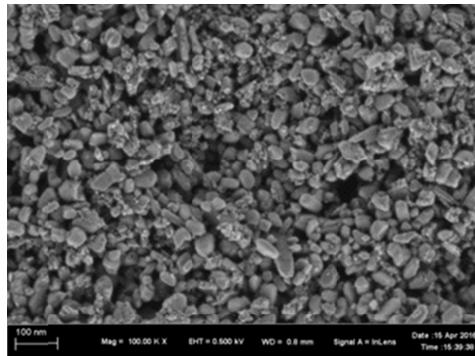
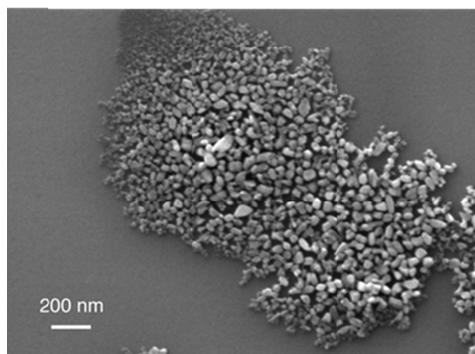


図 7. 濾紙で滴下 10 秒後に濾紙で吸い取った場合の SEM 画像 (X30k, 2kV)

次に、滴下後、すぐに吸い取らない場合の例を図 8 に示す。図 7 に比べ、凝集が多くなる傾向になることがわかる。



(a)



(b)

図 8. 滴下後、吸い取らない例

- (a) シリコン基板 10 分 プラズマ処理。分散液 約 10 μ L 滴下後、自然乾燥
($\times 100k$, 0.5kV)
- (b) 基板の上に分散液滴下後、乾燥
($\times 300k$, 3kV)
- (c) 親水処理した鏡面 Si 基板に分散液を 0.2 μ L 滴下し、室温で乾燥 ($\times 50k$, 5kV)
- (d) ポリビニルブチラール支持膜付き Cu メッシュに分散液 7 μ L 滴下し、105 $^{\circ}$ C の乾燥機で水分を蒸発 ($\times 100k$, 3kV)

4-2-2. SEM 観察

基本的には、シリカナノ粒子と同様である。事例を付録の表 B.2 に示す。

4-2-3. 画像解析

基本的には、シリカナノ粒子と同様である。事例を付録の表 B.3 に示す。

4-2-4. 粒子径分布測定結果

プロトコルの検討により得られた粒子径分布測定の RRT 結果を示す。試験は、2 回行った。

2 回目の試験条件を下記①～③に示す。4-2-1 から 4-2-3 で検討した結果が反映される前の 1 回目の結果に比べて 2 回目の方がばらつきの少ない結果となった。

①試料調整方法

各機関の試料調整方法を付録の表 B.1 に示した。

②SEM 観察方法

各機関の SEM 観察方法は、付録の表 B.2 と同じである。

③画像解析方法

各機関の画像解析方法は、付録の表 B.3 と同じである。

④SEM 像

各機関で測定された SEM 像の一部を付録の図 D.1 に示した。

⑤粒子径分布

2 回目の RRT の円相当径分布を付録の図 D.2 に示した。円相当径の平均値は、
 $36.8 \pm 6.3 (1\sigma)$ (nm)であった。

1 回目円相当径の平均値は、

$36.1 \pm 10.6 (1\sigma)$ (nm)

であり、ばらつきが改善された。

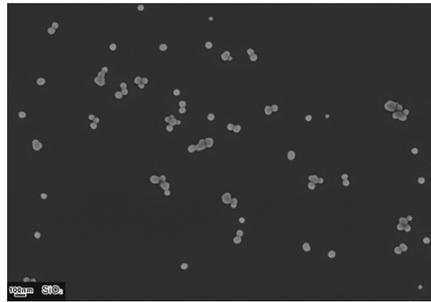
4-3. 凝集、分散状態の異なる画像の粒子径分布計測結果比較と画像解析改善

4-1 および 4-2 の RRT では計測結果は試料調整法の影響を受けるが、画像解析の方法に大きく依存しないとの想定で行った。

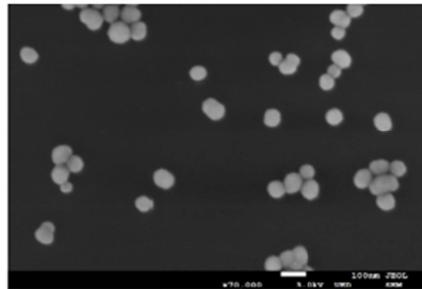
本項目では、画像解析が粒子径分布に与える影響を調査することを目的に、同一画像を用いた複数機関による画像解析の RRT 試験を行った。具体的には、シリカナノ粒子の凝集の異なる画像を検討した。その結果、凝集性の違いにより画像解析の影響が異なることが確認されたが、凝集の多い画像においても解析方法を工夫することにより粒子径分布が改善されることが確認された。

4-3-1. シリカ検討画像

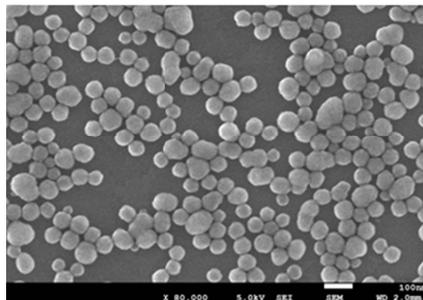
検討した代表的な画像を図 9 に示す。図 9.(A) は凝集が非常に少ない画像、図 9.(C) は凝集が多い画像、図 9.(B) はその中間的な凝集を示している。



A



B



C

図 9. 解析対象としたシリカの3種類の代表 SEM 画像

4-3-2. 画像解析比較結果

①画像解析方法

各機関の画像解析方法を表 1 に示した。各画像セットは、図 9 の画像を含め 12 枚を用い、粒子数 500 個以上を解析した結果である。

②粒子径分布

各機関で画像解析して得られた最大 feret 径、最小 feret 径及び円相当径を図 10～図 12 に示す。

表 1. 画像解析法

機関	解析ソフト	処理内容	輪郭抽出の方式	フィルタ条件
a	Fiji ver2	1.median 2大津で2値化 3 Watershedで分離	watershed	円形度が0.8以上の粒子を抽出
b	Photoshop7.0 粒子解析 Ver3.5	1.画像前処理: photoshopによる自動輪郭抽出 2.Photoshopによる接触粒子の切り離し 3.粒子解析ソフトによる2値化 4.粒子解析ソフトにより自動計測	粒子解析ソフト 自動計測処理	写真端部で切れた粒子は計測対象外
c	ImageJ 1.50e Image Jプラグイン	1.ノイズ除去: バイラテラルフィルタ ・モード: Fiji, Spatial: 3, Range: 50 (画像A 90) 2.2値化処理 大津の2値化 3.粒子分離処理 ・二値化画像に対してエロージョン演算を繰り返し行い粒子を分離 (画像A) 18回、(画像B) 12回、(画像C) 9回 エロージョン演算結果に対してポロノイ図作成。 ポロノイ図と二値化画像をOR演算し、粒子を分離	・自作プログラム OpenCV3.1ライブラリ使用 ・二値化により、背景と前景(粒子)に分離した画像を読み込む ・前景をラベリングし、背景とラベリングした領域の境界を輪郭として取得 輪郭の内側を粒子として計算。	面積 1200nm ² 以下の粒子を排除 不規則度(最大内接円/最大フェレ径) 0.5以下の粒子を排除
d	Image-Pro Premier v9.3.2 (日本ローバー製)	① 画像前処理: メディアンフィルター(3×3) ② バンドパスフィルター (ローサイズ1、ハイサイズ10、強さ10、回数1) ③ 大津の自動2値化(閾値110~255) ④ 凹凸部による自動分割	-	面積400nm ² 以下を除外
e	Win ROOF ver.3.5	1.前処理: γ補正(γ値0.5、画像C 0.3)、 平均化処理(フィルタサイズ5×5) 2.二値化: モード法 3.円形分離 4.計測(1回目) 5.二値化条件により小粒子数え落としあるため、 再度閾値を変更して二値化(画像B) 6.面積フィルタで大粒子排除(画像B) 7.計測(2回目)(画像B)	・絶対最大長→最大 Feret径 ・対角幅→最小Feret径 相当とて報告	・ピクセル=1x1排除(6の時) ・面積>400の粒子を排除 ・得られた輪郭が実際の画像と一致しない箇所を手動で排除
f	SPIP Ver.6.7.2	形状直径範囲: 20nm~300nm 勾配閾値: 0.6 (画像B 1.2)Arbitrary ノイズフィルタ: 4ピクセル(画像B,C 10ピクセル) 許容される重複: 20% 感度: -5	円検出(Circle Detection)法粒子検出	イメージの端を含む面積300nm ² 以下の粒子を排除
g	(画像A) ImageJ 1.51n	ノイズ低減 Process/Filters/Gaussian Blur - 5 pixel 2値化 Image/Adjust/Threshold - (ほぼ)default セグメンテーション Process/Binary/watershed	OpenCV findcontour	・30nm以下のサイズで異常形 ・顕著な凹形(ヒョウタン形等) 上記を目視により削除 ・画像の端(エッジ)に接触する粒子は削除
	(画像B) EDSION-v1.1 セグメンテーション OpenCV v2.4.8 輪郭検出、粒径算出 ImageJ 1.51n	EDISIONによるセグメンテーション MeanShiftパラメータ kernel - uniform, space window- 20pixel, color window- 15pixel, Min region - 200pixel Weight Mapパラメータ Gradiation window - 5pixel 粒径算出 OpenCV minAreaRect		
	(画像C) OpenCV v2.4.8	ノイズ低減 1: Gaussian Blur - 3pixel 2値化: Threshold(80近傍) ノイズ低減 2: Opening/Dilation - 3pixel セグメンテーション: dist_transform、watershed (maskの 閾値 0.3近傍) 粒径算出: minAreaRect		
h	Image-Pro Premier Ver.9.2	背景と粒子の平均輝度の中間点を閾値とし、 IPPカウント機能により粒形抽出(画像輝度のヒストグラムをガウスフィッティングすることによりそれぞれの平均輝度を算出)	IPPでのカウントの測定オプション 連結: 8連結、境界上を除外: 全て 穴埋め 自動2値化のバイアス: 0、自動2値化: 最小分散法 平滑化: 10、拡大: 0、自動分割: 無し 面積: 78nm ² (直径10nm) 以下を除外 円周(面積から算出) / 輪郭<0.95 を凝集粒子と見なして除外 (画像C) 自動分割のオプション: カウント時に測定図形を分割、分割方法: Watershed、凹凸サイズ: 40	面積: 78nm ² (直径10nm) 以下を除外 円周(面積から算出) / 輪郭<0.95 を凝集粒子と見なして除外 (画像C) 自動分割のオプション: カウント時に測定図形を分割、分割方法: Watershed、凹凸サイズ: 40
i	ImageJ Ver.1.50i	1. 画像を 8bitグレイスケールに変換 2. 解析領域の指定(スケールバーや文字などの削除) 3. 二値化 4. メディアンフィルタ(2 px)によるノイズ除去 5. Watershed 6. 輪郭抽出	ImageJ Particle Analysis	・面積<50nm ² の粒子を排除
j	Fiji 1.0 (ImageJ 1.51n) ParticleSizer 1.09	Single particle mode, Watershed for irregular structures, threshold convexity =0.95 Area >500px ² (画像B,C 75 px ²), solidity > 0.5 (画像C minimum solidity=0.5) Min Feret > 16 px(画像B,C なし) 他のパラメータは as Default	-	異常分割された輪郭を目視で除外(画像B,Cはこの処理なし)

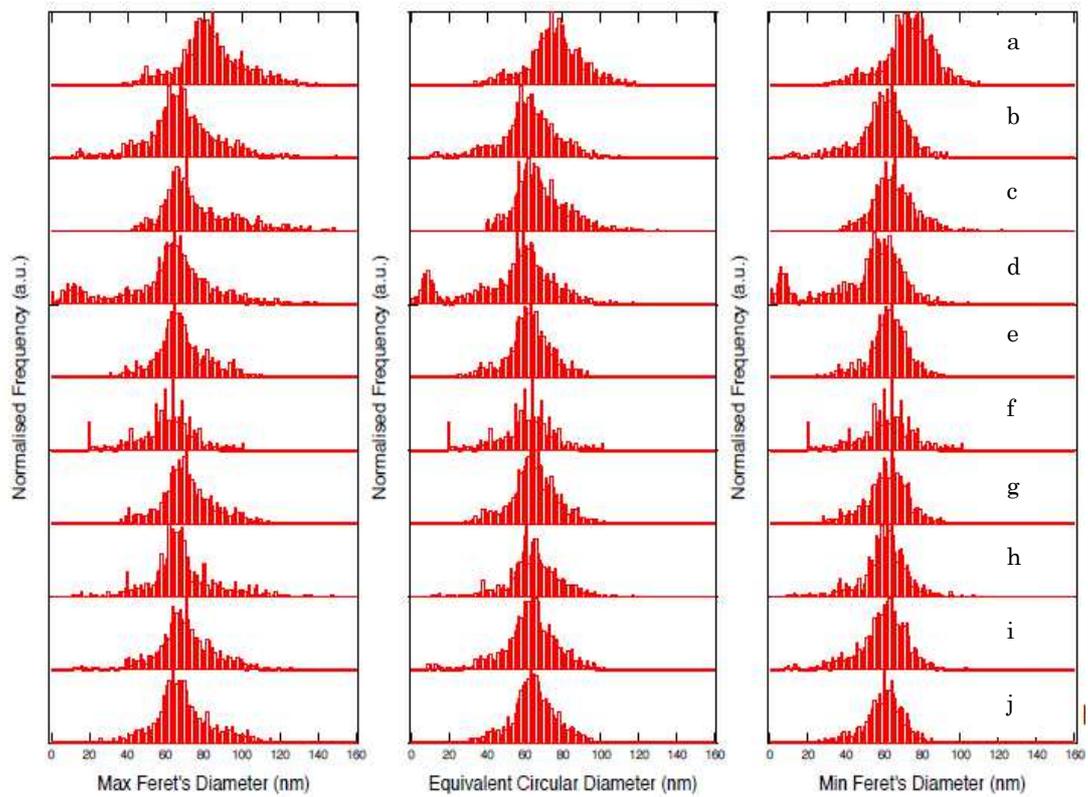


図 10. 画像 A の各解析方法に対する最大 Feret 径、円相当径、最少 Feret 径
 図中の記号 a~j は、表 1 の機関に対応。以下の図 11, 図 12 も同様。

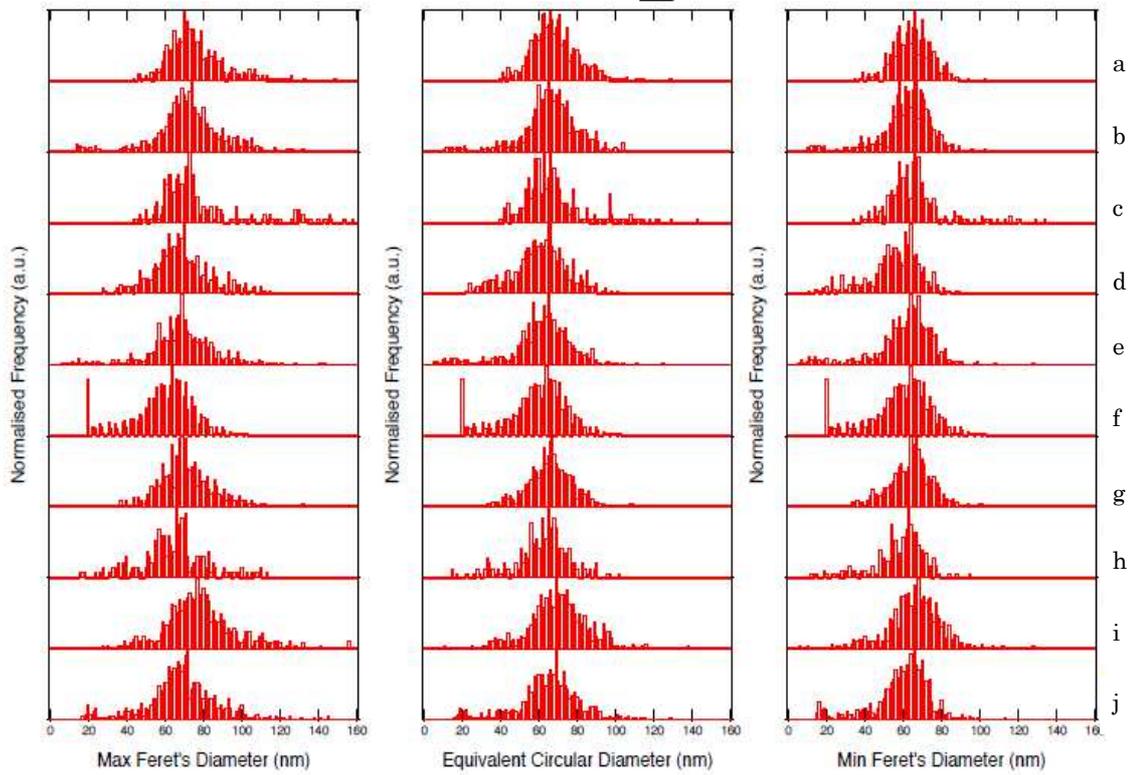


図 11. 画像 B の各解析方法に対する最大 Feret 径、円相当径、最少 Feret 径

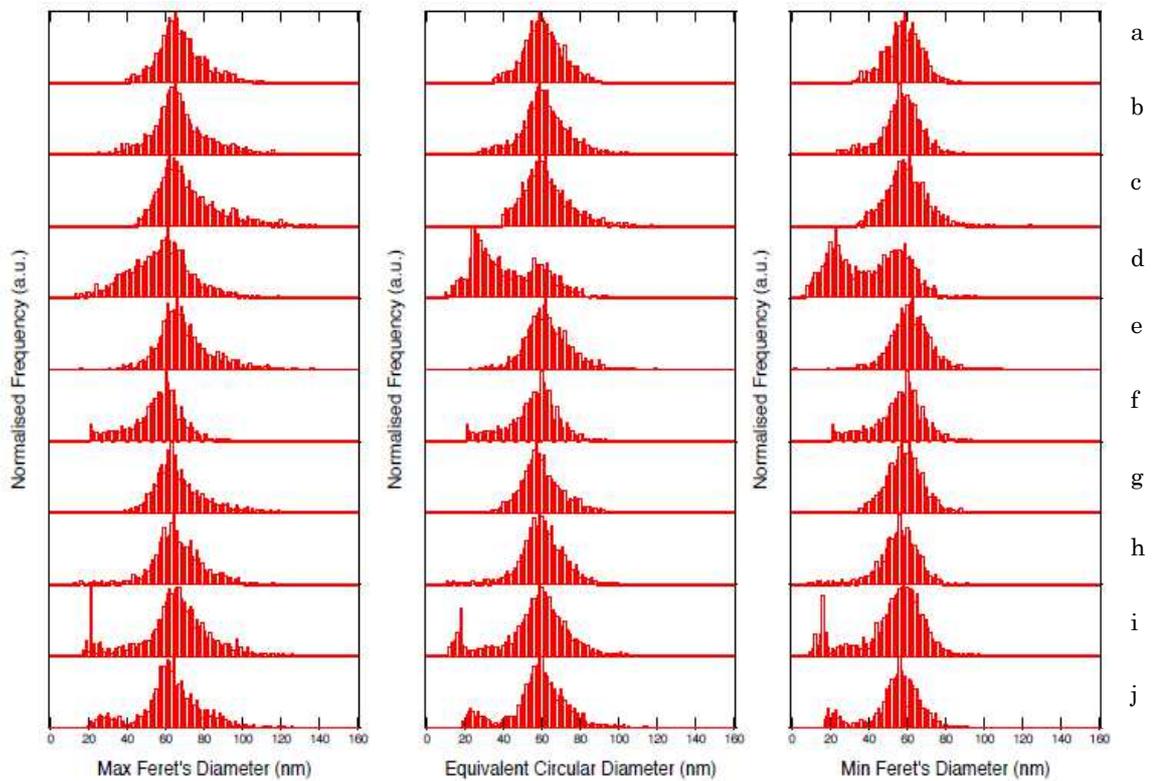


図 12. 画像 C の各解析方法に対する最大 Feret 径、円相当径、最少 Feret 径

各画像セットの上記の円相当径の全体の平均値とばらつきは、

画像 A $62.7 \pm 1.8 (1\sigma)$ (nm)

画像 B $63.4 \pm 2.7 (1\sigma)$ (nm)

画像 C $58.3 \pm 5.2 (1\sigma)$ (nm)

となった。画像 A,B は、ほぼ同じ値になり、ばらつきも1ピクセル相当になっている。一方、画像 C は、平均値が A,B より小さく、ばらつきが数倍大きい結果となった。

画像 C の粒子径が小さくなる理由としては、図 13 に示すように、粒子の重なり部のコントラストが暗くなる影響で、輪郭が内側にとられ、空隙ができたように見える。そのため、みかけの粒子が小さく算出されてしまう。さらに、粒子内コントラストの影響で、複数の粒子を分割してしまう誤分割や一つの粒子自体をより小さく見積もってしまう誤検出が原因である。その他、重なり粒子を一つの粒子として検出してしまう場合もある。これらにより、平均粒子径が小さくなり、また粒子径分布ばらつきが大きくなると考えられる。

一方、平均粒子径が良く一致している画像 A、B においても、図 10. や図 11. の粒子径分布の形状は大きく異なっているものが見られる。特に粒子径の小さい方へ分布が引きずられたものが目立つので、粒子の面積や形状などのフィルタでノイズや異物を排除することも必要であると考えられる。

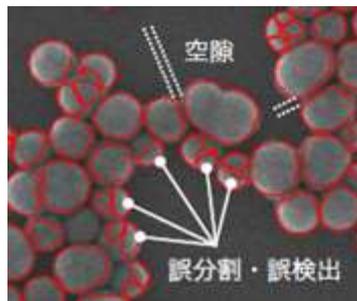


図 13. 凝集が多い場合の誤分割、誤検出の事例

4-3-3. 画像解析の再検討とその結果

図 9. の画像 C において、他の画像 A,B よりも平均粒径とそのばらつきが大きくなったことから、再試験を実施した。

①画像解析方法

凝集が画像全体に多くなると、粒子重なり部及び粒子内部のコントラストにより、誤検出、誤分割を生じる。輪郭を内側にとらないこと、誤分割、誤検出を減らすことによる改善が可能なかを調べた。各機関の画像解析方法を表 2 に示した(機関数は 2 機関減少)。表 1 に対して変更された点を記載した。表 1 と比較すると、輪郭抽出を 2 段階処理したり(機関 g,h)、機械学習による輪郭抽出を新たな画像解析ソフトの導入により行なう方法(機関 j)、形状フィルタの条件を見直したり(機関 a,c,g,i)、誤検出を避けるために目視で手動による排除をする(機関 b,g,i)などの方法を取り入れていることなど高度化していることがわかる。

表 1,表 2 には記載されていない画像解析手順の詳細については、付録 E にいくつかの事例

を載せた。

②粒子径分布

各機関で画像解析して得られた最大feret径、最小feret径及び円相当径の粒径分布結果を図14に示す。円相当径の平均値は、

$$62.0 \pm 2.1 (1\sigma) \text{ (nm)}$$

であり、画像A,Bと同程度にできることがわかった。

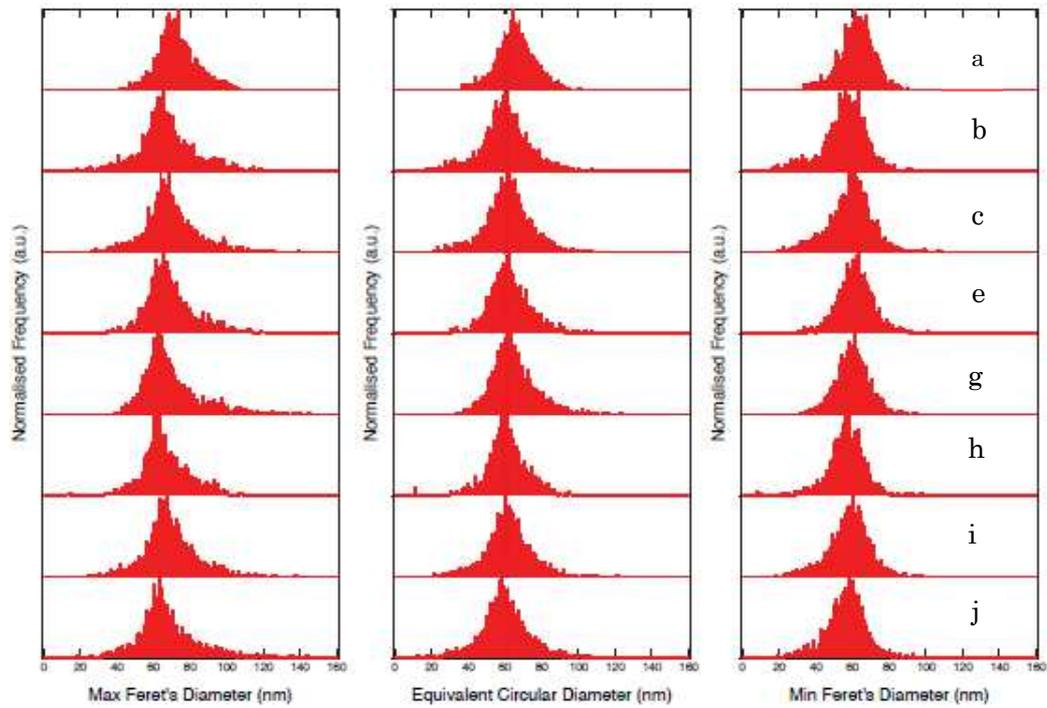
4-3-4.まとめ

精度の高い粒子径分布を得るためには、ある程度凝集の少ない画像が必要であることが確認された。凝集が多い画像解析では、粒子のセグメンテーションが不十分であったり、微小コントラストを粒子と誤認しまったり、凝集粒子の分割がうまくいかず、見かけ上小さな値が得られたと考えられる。これら箇所を手動で取り除く、フィルタ条件を変更することなどにバラツキを減少することができた。

表 2. 画像 C の再解析方法（表 1 の方法との変更点を記載）

機関	解析ソフト	処理内容	輪郭抽出の方式	フィルタ条件
a	変更なし	OpenCVを使ってWatershedで分離 さらに、境界をFijiでWatershedで分離	変更なし	円形度が0.85以上の粒子を抽出
b	変更なし	1.粒子解析ソフトにより粒子領域自動選択 2.粒子解析ソフトにより接触粒子の切り離し (手動)	手動2値化処理	写真端部で切れた粒子とノイズと考えられるコントラストは計測対象外
c	ImageJ 1.51s	1.Waka segmentation v3.2.20 Gui上で前景と背景を画像に上書きする要領で指定し、処理する事で分離。 粒子分離処理 Image JのWatershed	変更なし	面積 215nm ² 以下の粒子を排除
e	変更なし			
g	・R version 3.3.1 ・EBImage v4.16.0 - Image processing and analysis for R	・ノイズ低減: Opening - 5pixel ・セグメンテーション distsmap - 距離マップからseed作成 閾値 0.3近傍 propagate - 距離と輝度勾配のtrade-off 0.001 粒径算出: computeFeatures	EBImage paintObjects	・サイズfilter 面積500pixel以下の粒子 ・顕著な凹形(ヒョウタン形等)を目視により削除 ・画像の端(エッジ)に接触する粒子は削除
h	Image-Pro Premier Ver.9.2 Photoshop CS	画像前処理、輪郭抽出、1次粒子以外の除去 ①バンドパスフィルターローサイズ:5、ハイサイズ:5、強さ:100、回数:1(IPP) ②二値化①の画像を2値化(Photoshop) ③画像修正元画像×②の画像(Photoshop) → 8bitグレー (粒子間の分割を容易にするための画像処理)	変更なし	一次粒子以外の除去
i		変更なし		面積 <300nm ² の粒子を排除 ・形状フィルタリング: 周長 > K*2*√(π* 面積) の粒子を排除 同面積の円周のK倍よりも大きな周長の粒子を排除 K=1.15
j	Fiji 1.0 (ImageJ 1.51n) Waka segmentation (v3.2.21)	・画像前処理 BG除去 (Rolling ball radius 80 px) Bilateral filter (spatial radius 3px, range radius 50 px) ・セグメンテーション SiO2_007を用いてclassifierをトレーニング(粒子,BG共に40,000 px程度)、これを全ての画像に適用し解析 ・画像二値化 Probability mapをStatistical region merging (Q=4) で多値化、その後二値化	ImageJ Particle Analysis	誤検出粒子の手動除去

※ 機関 d,f は、再解析未実施



(a) 各機関の最大フェレ径 (b) 各機関の円相当径 (c) 各機関の最小フェレ径

図 14. 画像 C の再解析後の粒子径分布

5. プロトコル

4章で検討した結果から、推奨されるプロトコルを以下に示す。

5.1. 試料調製

- ① ナノ粒子分散液を準備する。(濃度の目安は 0.1wt%)
- ② 基板(シリコン、TEM グリッド)を用意する。
- ③ 滴下時の下敷きとして、および、滴下後の分散液を吸い取るための濾紙を用意する。
- ④ 基板の親水化処理を行う。
- ⑤ ピペットなどで分散液を④の処理を施した基板に約 1 μ L 滴下する。

シリカなど基板への付着力が弱い粉体の場合、⑤を実施する前に、以下の添加剤を含む溶液を準備し、分散液に添加する。この添加剤は分散剤が乾燥する間に粒子が凝集するのを防ぐとともに、粒子が基板に付着するのを助けると考えられる。

- ・HEC(ヒドロキシエチルセルロース) 1wt%水溶液を作製する。(溶けにくい場合は超音波振盪や湯煎すると良い。)

基板に TEM グリッドを使用する場合は、2-5 μ L/mL の量を目安にするのが良い。

- ・基板が TEM グリッドの場合、滴下時に、下に敷く濾紙は定量濾紙の目の粗いもの(7-8 μ m)が良い。

- ⑥ 滴下後、濾紙を用いて分散液を吸い取る。

チタニアなど凝集性が高い場合は、分散液が乾燥中する間に粒子が凝集するのを防ぐためにこの操作を入れる。以下の条件が良い。

 - ・滴下後、すぐに吸い取る。10秒程度の時間が目安である。
 - ・濃度が高い場合は、上から被せるように吸い取り、濃度が希薄な場合は、横から吸い取るのが良い。
- ⑦ 室温で乾燥させる。30分以上、自然乾燥するのが良い。
- ⑧ 導電コートは必要があれば施す。
- ⑨ 上記、試料調整条件、方法と実施日を記録しておくことが好ましい。

5.2. SEM 観察

- ① 調製した試料を治具に固定し、試料台にセットする。SEM 操作方法は、使用する装置のマニュアルに従う。
- ② 予備観察を行い、粒子が著しい局在がなく分散されていることを確認する。それと同時に大まかな粒子径分布を把握する。
- ③ 微小粒子も十分なコントラストが得られるよう加速電圧他、条件を調製する。
- ④ 計測用画像を撮影する。
 - ・撮影する SEM 画像のピクセルサイズは 1.5 nm/px 以下とする。
 - ・できるだけ粒子がランダムに存在する視野を選択し、撮影する。
 - ・後の画像解析のため、必要な対象粒子数を考慮し、必要な画像数とする。

必要な粒子数の目安は、粒子径分布が比較的シャープな場合で 500 個程度であるがそれより多い粒子が好ましい。

⑤参考まで、以下の項目を記録しておくことが好ましい。

- ・使用装置
- ・検出器名
- ・加速電圧(試料入射時) /kV
- ・リターディング電圧 /kV
- ・照射電流 /pA
- ・観察倍率
- ・倍率校正法(校正試料)、校正実施日
- ・観察実施日
- ・SEM 画像サイズ (pixel)
- ・ピクセルサイズ (nm/pixel)

5-3. 画像解析(粒子解析)

解析手順の詳細例は、表 1,表2及び付録を参照いただき、ここではポイントとなる内容を示す。

①解析準備

使用画像の選択、解析ソフトウェアの準備をする。
使用するソフトウェアやアルゴリズムは任意とする

②画像前処理

バックグラウンド処理の実施。

③セグメンテーション

接触粒子の輪郭線が内側に後退するのを避けるよう閾値などを設定する。
含まれる場合には、画像前処理、フィルタ処理や目視判定などでこれを除く。

④画像2値化

⑤輪郭抽出

輪郭トレースは、自動 あるいは手動で行う。
輪郭抽出は自動画像処理で行う。画像分割などの前処理は手動でも構わない。
得られた粒子輪郭に明らかな誤分割や誤検出が含まれないことを確認する。

⑥自動計測の場合にはサイズフィルタや二値化条件に起因する粒子の検出漏れがないか確認する。数落としがある場合には二段階処理等の対策を行い、数落としを最小限に抑える。

⑦粒子径分布算出

粒子数の目安は、500 個以上とする。粒子径分布が広い粒子の場合は、より多くの粒子数による解析が望ましい。

⑧解析について、以下の項目を参考に、記録しておくことが好ましい。

- ・解析ソフト
- ・輪郭抽出の方式
- ・自動処理内容
- ・計測粒子数
- ・撮影視野数
- ・個々の粒子データとして最大・最小 Feret 径、面積、円相当径を求める。(表 3 参照)

表 3. データ表(例)

画像 No.	粒子 ID	粒子 X 座標	粒子 Y 座標	Max..Feret 径 (nm)	Min. Feret 径 (nm)	Area (nm ²)	Perimeter (nm)
1	1						
1	2						
⋮							
n	500						
⋮							

【おわりに】

シリカ、チタニアナノ粒子を用いて、試料調製法から画像解析の検討を行った。試料調製は検討の余地はあるものの、目標とすべき状態に近づけることはできた。画像解析法の検討から凝集の多い試料においても分布を改善することができた。この結果から、精度の良い粒子径分布計測が SEM によっても可能であることを示すことができたと言える。

推奨プロトコル及び事例を参考にすることで、他材料のナノ粒子の計測に展開することが可能であると考えられ、本文書を役立てていただければ幸いである。

付録（事例集）

A.シリカの場合の試料調製法、観察条件、画像処理法

表 A.1

	基板	分散液に添加	基板前処理	分散液滴下と後処理	乾燥法	その他処理
1	エラスチックカーボンメッシュ(ELS-C10)	分散液2ml中にHEC1%水溶液を5 μ l添加(超音波分散10分間)	DCプラズマ	分散液を接触	一昼夜真空乾燥	分散液(0.1wt)を超音波分散処理(10分間)
2	TEMメッシュ	HECを添加		基板に滴下	自然乾燥	蒸着処理
3	シリコンウェハー	1%HEC水溶液を添加		分散液を数 μ L滴下	自然乾燥	
4	シリコンウェハー	HEC1%水溶液を約0.4%添加	親水化処理 2min (JEOL DATUM: HDT-400)	ガラス毛细管ピペットで約1 μ L滴下、滴下10秒後濾紙で分散液を除去	自然乾燥	
5	シリコン	分散液 40mlに1%HEC水溶液を数滴添加、超音波分散	親水化処理	Si基板上に滴下、ブローで表面の溶液を除去	自然乾燥	濃度高で粒子が固まったため、分散液(HEC添加)に蒸留水を入れ、10倍希釈し、再度同じ処理
6	シリコンウェハー(鏡面)	1%HEC水溶液を添加: 3 μ L/mL	UVオゾン処理 15分	1 μ L滴下、10秒後 濾紙で吸い取る	室温乾燥	
7	シリコン	1% HEC水溶液をシリカ分散液に添加	親水化処理	滴下後、余剰分散液を濾紙で吸い取り	自然乾燥	
8	TEMグリッド(フォルムパール支持膜)	1%HEC水溶液を添加(3 μ L/mL)		ろ紙の上に基板を乗せ、滴下	室温乾燥	

表.A.2

	使用SEM装置(メーカー)	検出器名	加速電圧 (kV)	照射電流 (pA)	観察倍率	倍率校正法	画像サイズ (pixel)	ピクセルサイズ (nm/pixel)
1	JSM-7800F (JEOL)	UED検出器	3	193	x70,000	メーカーにて実施	1280 x 960	1.3
3	Merlin(Zeiss)	InLens	3	60	x25,000	標準マイクロスケール HJ-1000	4096 x 2820	1.1
4	日立 SU-8230	UPPER(レンズ内 2次電子検出器)	2	9	x30,000	Cristal Dimennsion	5120 x 3840	0.8
5	SU8200 (日立ハイテクノロジーズ)	Upper検出器(SE)	5	40	x35,000	マイクロスケール	2560 x 1920	1.4
6	JSM-7610F	SEI,上方検出器	5	8	x80,000	社内基準のスケールを 使用	1280 x 1024	1.2
7	日立S5500	ET検出器	3	8	x50,000	Standard Microscale Type 595-4706(日立)	2560 x 1920	1.0
8	GeminiSEM 500 (ZEISS)	InLens-SE	3	30	x50,000	ZEISS社標準の方法	2048 x 1536	1.1

表 A.3

解析ソフト(ver.)	輪郭抽出の方式	処理の内容 (自動の場合)	計測粒子数	撮影視野数	粒子数/視野
1 Adobe社製 Photoshop(Ver7.0) 住友金属テクノロジー社製 粒子解析(Ver3.5)	自動、手動(一部)	Photoshop自動選択ツールより粒子抽出 (一部手動により粒子の切り離し)後、粒子 解析により二値化→自動計測	1262	98	13
2 LUZEX AP	二値化画像処理	手動(自動は輪郭がぼやけて抽出不可)	572	9	64
3 Fiji (ImageJ 1.49m)	自動	二値化 > remove outlines > watershed	1042	16	65
4 Image-Pro Premier Ver.9.2	自動	Min Variance	767	23	33
5 Image-Pro Premier 3D (9.2.1)	自動 (多角形自動トレース)	エッジ部を指定するとそこからエッジ部に 沿って粒子を自動にトレースする	750	10	75
6 VLFeat v0.9.20	自動	Quick Shift法によりセグメンテーションを 実施した後、2次の形状モーメント値でフィル タリングを行い、極端な凹図形、突起を もつ図形、ほぼ矩形・台形の図形を削除 した	1430	12	119
7 ImageJ (1.50i)	自動	二値化, watershed, 輪郭抽出	508	11	46
8 SPIP version 6.6.3	自動	Threshold (注)閾値は自動設定(主たる平面と最大 値との高さの差の20%),単独の粒子と思 われる箇所AOI(Area Of Interest)を設定	847	31	27
9 ImageJ (1.50g)	自動	二値化(手動でTH決定), despeckle, watershed, 輪郭抽出	3470 9923	86 100	40 99

B チタニアの場合の試料調製法、観察条件、画像処理法

表.B.1 試料調製法

	基板	基板前処理	分散液滴下と後処理	乾燥法	その他処理
1	シリコンウエハー	プラズマ処理 2分	パスツールピペットで約1 μ L滴下、滴下10秒後、ろ紙で分散液を除去	室温乾燥	
2	シリコン	基板をエタノールに24時間浸漬	パスツールピペットでSi基板上に約1 μ L滴下、滴下10秒後にろ紙で分散液を除去	室温乾燥	導電コート (10mA, 20秒)
3	シリコン	濃硫酸と過酸化水素水(30%)の混合溶液(容積比 4:1)に浸漬し、100°C・10分間の加熱	分散液をピペットで1 μ L滴下し、10秒後に濾紙で除去	室温乾燥	Pdの導電コート (サンヨー電子 SC-MC)
4	シリコン	親水化処理 2min (JEOL DATUM: HDT-400)	ガラス毛细管ピペットで約1 μ L滴下 滴下10秒後濾紙で分散液を除去	室温乾燥	
5	シリコン	アルコール洗浄	滴下 10秒後、濾紙で吸い取る	室温乾燥	
6	シリコンウエハー (鏡面)	UVオゾン処理 15分	Si基板に試料を1 μ L滴下、10秒後 濾紙で分散液除去	実験室雰囲気 で室温乾燥	
7	シリコン	親水化処理	分散液を滴下 余剰分散液を濾紙で吸い取り	自然乾燥	
8	シリコン	親水化処理	1 μ L滴下後、ブローで表面の溶液を除去	自然乾燥	チタニア分散液(濃度0.1%) を超音波分散(5min)
9	シリコンウエハー (鏡面)	プラズマ処理	分散液を1 μ L滴下. 数秒後余剰分散液をろ紙で吸い取る	室温乾燥	

表 B.2 SEM 観察条件

	使用装置/メーカー	検出器名	加速電圧 /kV	照射電流 /pA	観察倍率	倍率校正	画像サイズ (pixel)	ピクセルサイズ (nm/pixel)
1	S-4800/ 日立ハイテクノロジーズ	Upper検出器 (SE)	3	100000	x100,000	装置メーカー方法 (*)	1280 x 960	0.99
2	S-5500/日立	SE検出器	2	15000	x100,000	銅メッシュ/目開き25μm	1280 x 960	1
3	JSM-6320F/JEOL	SE検出器	5	20	x150,000	ゲラー社 S2009ST	1024 x 768	0.83
4	SU-8230/日立	UPPER (レンズ内2次電子 検出器)	2	9	x30,000	Cristal Dimennsion	5120 x 3840	0.82
5	S-4800/日立	SE(U)	2.5		x100,000	グレーチング試料観察	2560 x 1920	0.5
6	JSM-7610F/JEOL	SEI, 上方検出器	5	8	x300,000	社内基準のスケールを使用	1280 x1024	0.31
7	日立S5500	ET検出器	3	8	x50,000	Standard Microscale Type 595-4706(日立)	2560 x 1920	1.01
8	GeminiSEM 500 (ZEISS)	InLens-SE	2.5	30	x50,000	ZEISS社 標準の方法	2048 x 1536	1.1
9	SU8200 / 日立ハイテクノロジーズ	Upper検出器 (SE)	5	40	x35,000	マイクロスケール	2560 x 1920	1.42
10	JSM-7100F/JEOL	LED検出器	7	74	x70,000	ISO16700準拠 (MRS-6)	2560 x 1920	0.67

*)25.4μmのCuメッシュを用いて1,000倍率で観察、装置の測長機能を使用して校正

表 B.3 画像解析

	解析ソフト (ver.)	輪郭抽出の方式	処理の内容(自動の場合)	計測粒子数	撮影視野数	粒子数/視野
1	MAC-View (ver.4)	手動		586	25	23
2	Mac-View Ver.3	手動		517	10	52
3	Adobe Photoshop (トレースから 二値化まで) ImageJ (1.50i)	手動		777	15	52
4	Image-Pro Premier Ver.9.2	自動	Min Variance	1121	12	93
5	LUZEX AP	手動		587	30	20
6	EDSION v1.1 (セグメンテーション) OpenCV v2.4.8 (輪郭抽出、粒径算出)	自動	Mean Shift法でセグメンテーションを実施した後、目視確認により明らかな分割ミスの図形を削除	324	12	27
7	ImageJ (1.50i)	自動	二値化, watershed, 輪郭抽出	503	4	126
8	SPIP version 6.6.3	自動	Threshold (注)閾値は自動設定(主たる平面と最大値との高さの差の20%),単独の粒子と思われる箇所AOI(Area Of Interest)を設定	1199	30	40
9	Image-Pro Premier 3D (9.2.1)	自動 (多角形自動 トレース)	エッジ部を指定するとそこからエッジ部に沿って粒子を自動にトレースする	564	11	51
10	ImageJ (1.50g)	手動		772	34	23

C. シリカの場合の粒子径分布測定結果 - SEM 像と粒子径分布 -

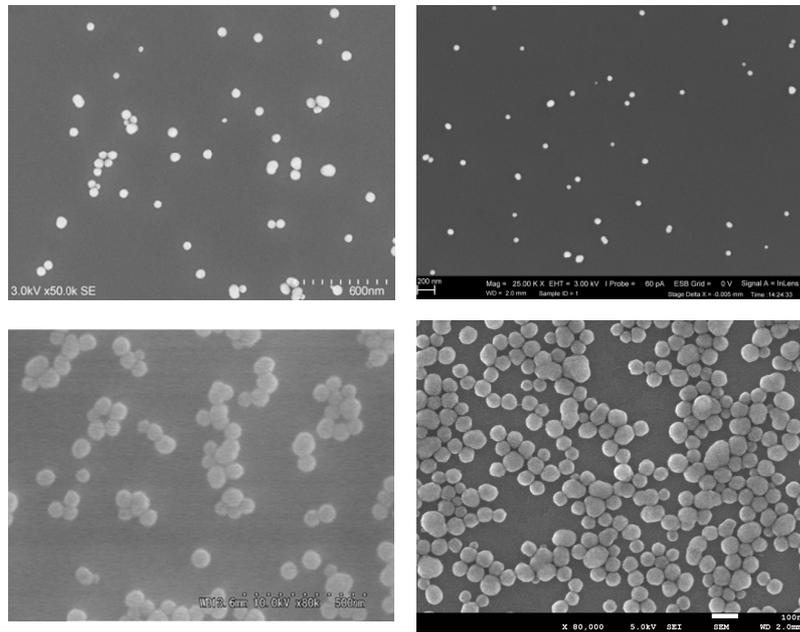


図 C.1 粒径分布測定に使用したシリカの SEM 画像事例

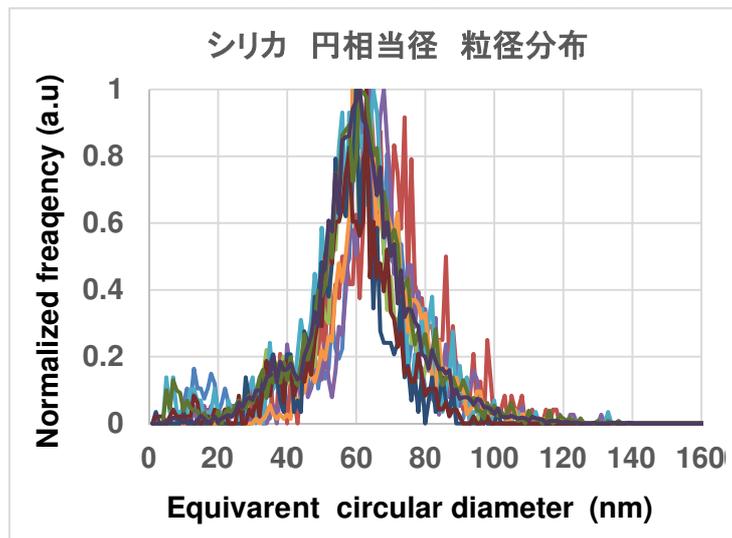


図 C.2 シリカの円相当径の粒径分布
表 A.3 の各解析事例に対応した結果を示している。

D.チタニアの場合の粒子径分布測定結果 - SEM 像と粒子径分布 -

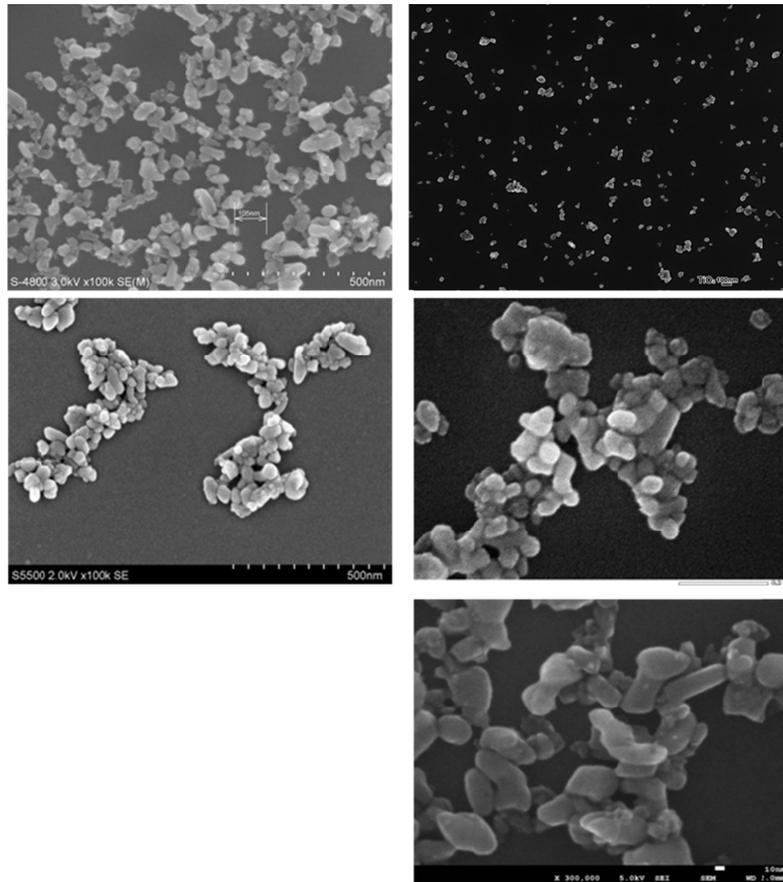


図 D.1 粒径分布測定に使用したチタニアの SEM 画像事例

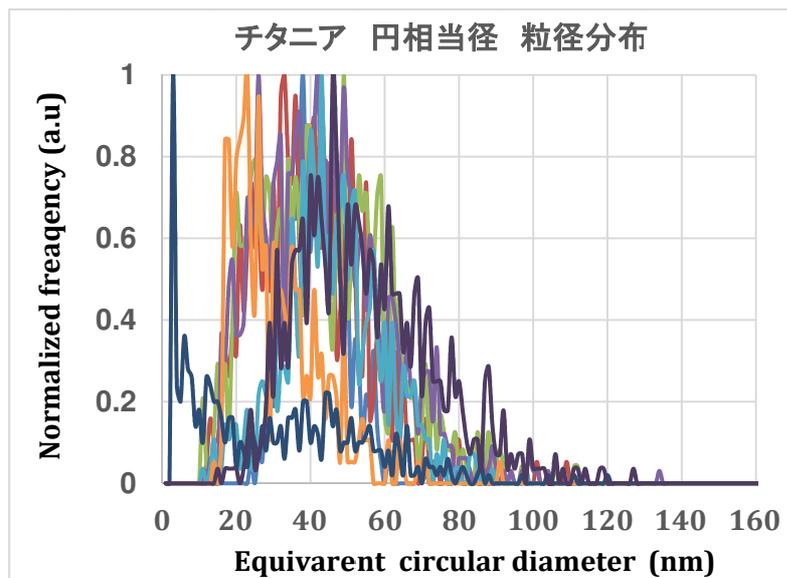
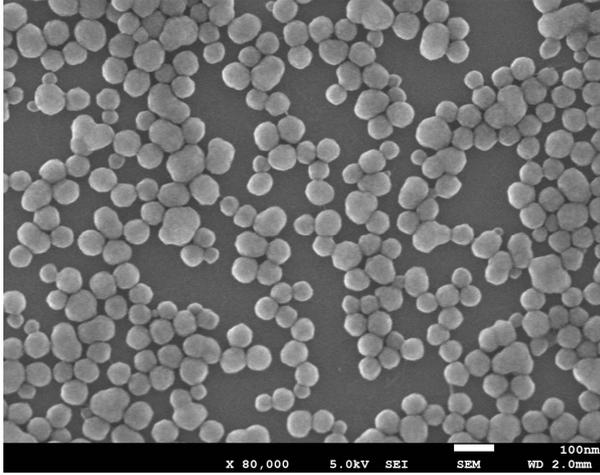
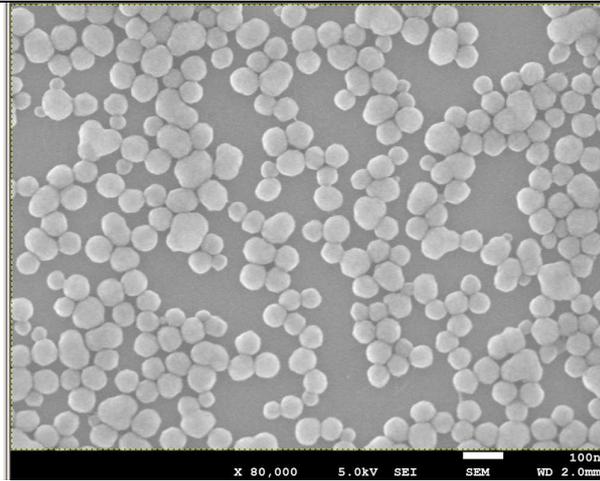
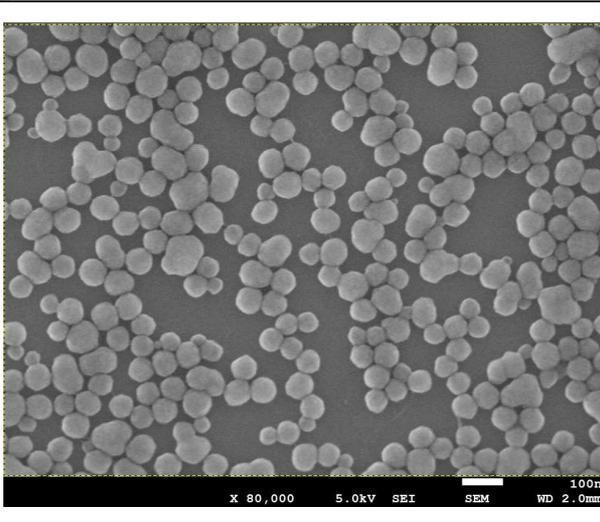


図 D.2 チタニアの円相当径の粒径分布
表 B.3 の各解析事例に対応した結果を示している。

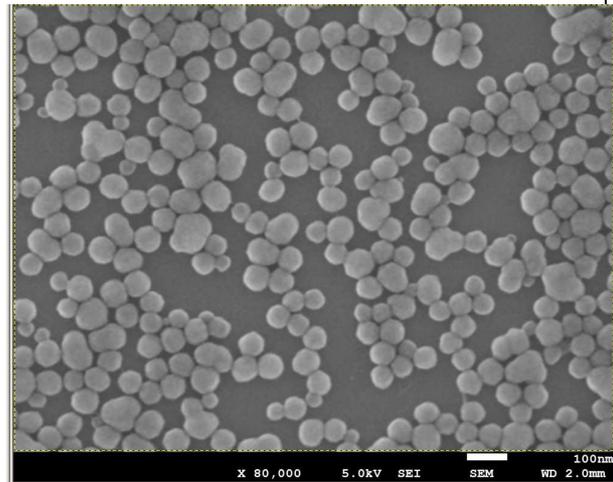
E.画像解析詳細手順例

E.1 (本文 表1 機関eの詳細)

<p>1.1 計測視野に ROI をかける 元画像をロード。長方形 ROI ツールで計測視野 (SEM 像下のデータバーを除いた、観察視野部分) に ROI をかける。</p>	
<p>1.2 γ 値補正 上部メニューバー>前処理>強調>ロックアップテーブル変換>ガンマ補正を選択し、ガンマ値を入力。 この機関の場合は 0.5 入力。各機関によって 0.3~0.5 を選択。</p>	
<p>1.3 明るさ、コントラスト調整 上部メニューバー>前処理>強調>>明るさ・コントラスト>明るさ、コントラストを調整。 この機関の画像では明るさ -20,コントラスト 10。各機関によって明るさ-20~5,コントラスト 10~50 を選択。</p>	

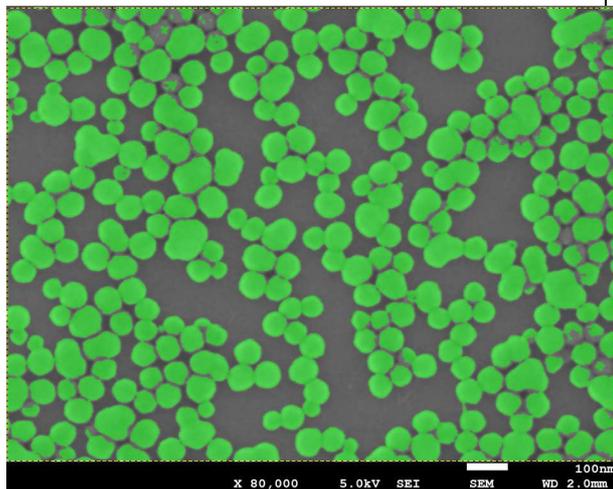
1.4 平均化フィルタ

上部メニューバー>前処理>フィルタ
>平均化でフィルタサイズ 5*5 を選
択。



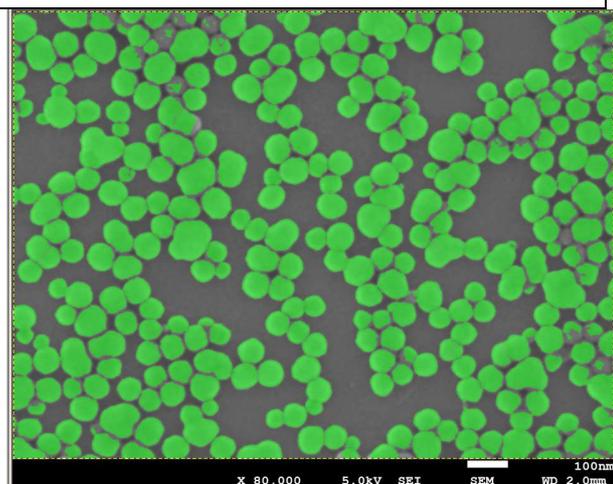
1.5 自動二値化

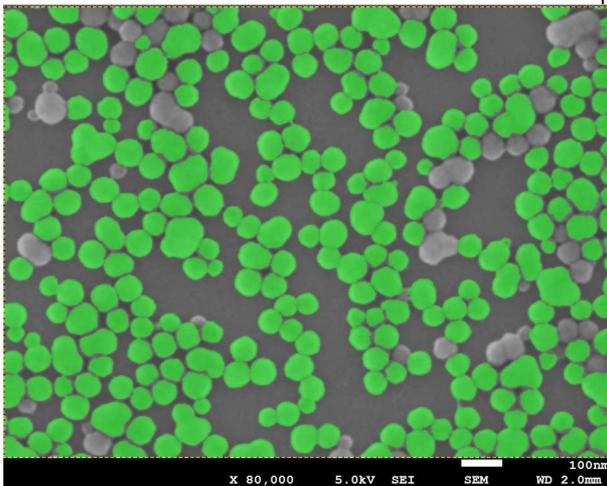
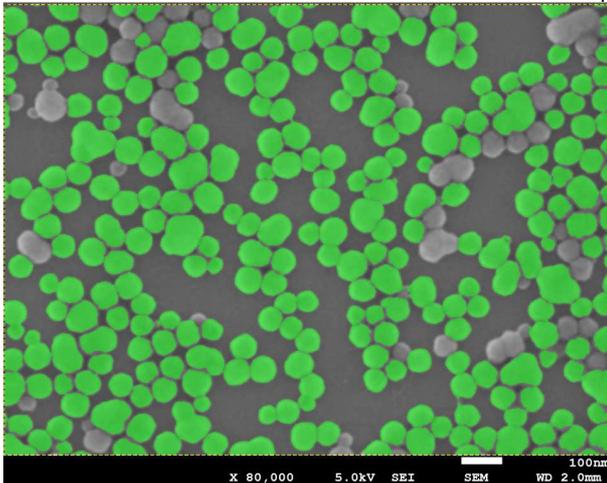
上部メニューバー>前処理>抽出>自
動2値処理>自動2値化>しきい値決定
方法をモード法に設定。粒子部分だけが
選択される程度に閾値を調整。



1.6 円形分離

上部メニューバー>前処理>モフォロ
ジー>円形分離を選択。
分離境界は直線状に分けられる。

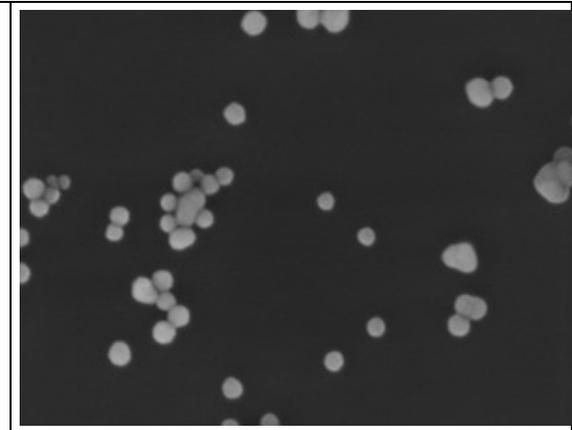


<p>1.7 誤検出粒子を手動で除去 上部バーの消しゴムツールで自動抽出の輪郭が不一致の箇所、円形分離が正しくできていない粒子を目視で判断し手動で除去</p>	 <p>X 80,000 5.0kV SEI SEM WD 2.0mm 100nm</p>
<p>1.8 単粒子除去 上部メニューバー>2値処理>モフォロジー>孤立点除去(除去対象:明るい点)を選択</p>	 <p>X 80,000 5.0kV SEI SEM WD 2.0mm 100nm</p>
<p>1.9 キャリブレーション 上部メニューバー>編集>計測環境>キャリブレーションで 1pixel の数値を入力してキャリブレーション</p>	
<p>1.10 視野の端の粒子を計測から除く 上部メニューバー>編集>計測環境>ボックスモード>境界線上の物体を上下左右の境界ごとに区別して処理する >上下左右すべて処理しないを選択</p>	
<p>1.11 計測 上部メニューバー>計測>形状特徴>面積、絶対最大長、対角幅、周長、始点を出力</p>	

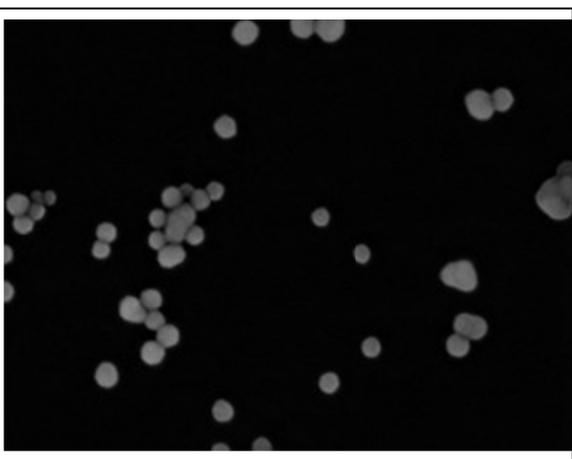
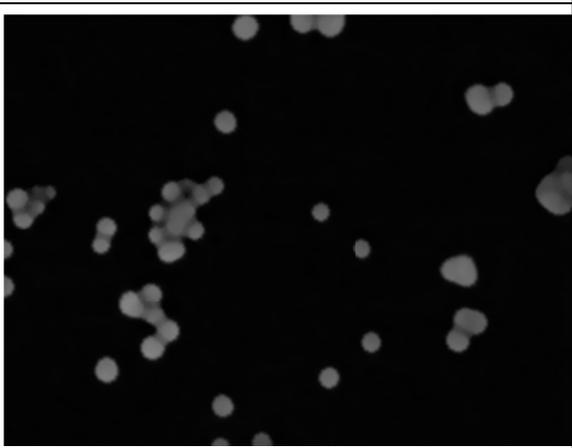
E.2 (本文 表 1 機関 a の詳細)

解析の準備

使用する解析ソフト：imageJ (Fiji)

<p>解析対象画像： 粒状物</p>	
--------------------	--

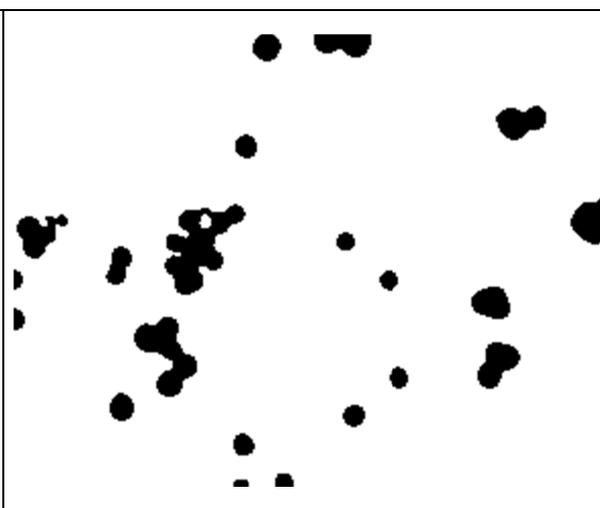
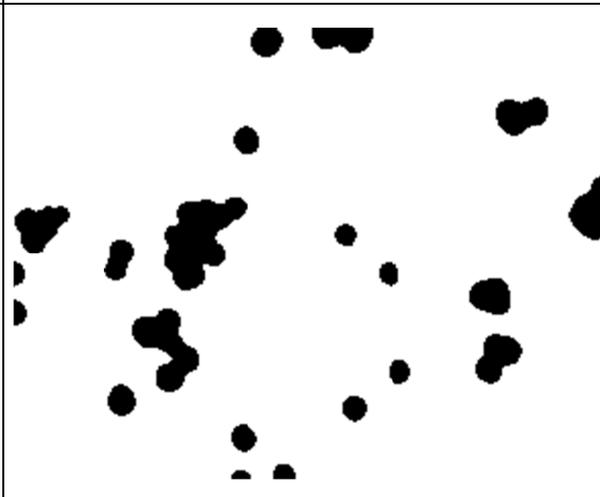
1. 画像前処理

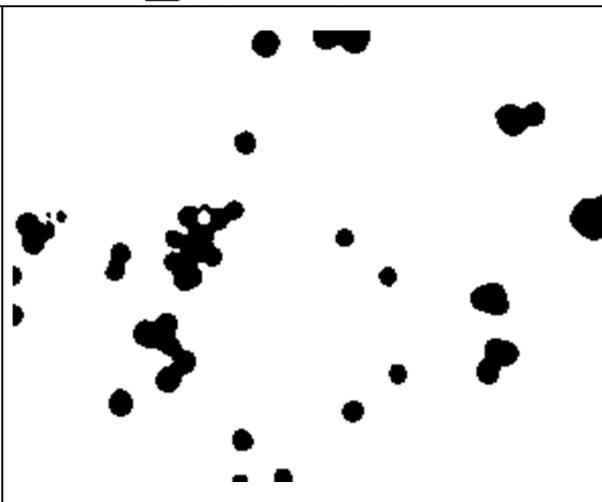
<p>1. 必要な領域を切り出し。 makeRectangle(0, 0, 1280, 960);</p> <p>2. 画像の平坦化。 run("Subtract Background...", "rolling=100 sliding");</p>	
<p>3. ごま塩ノイズ等を減らす。 run("Median...", "radius=2"); or run("Despeckle");</p>	

2. セグメンテーション

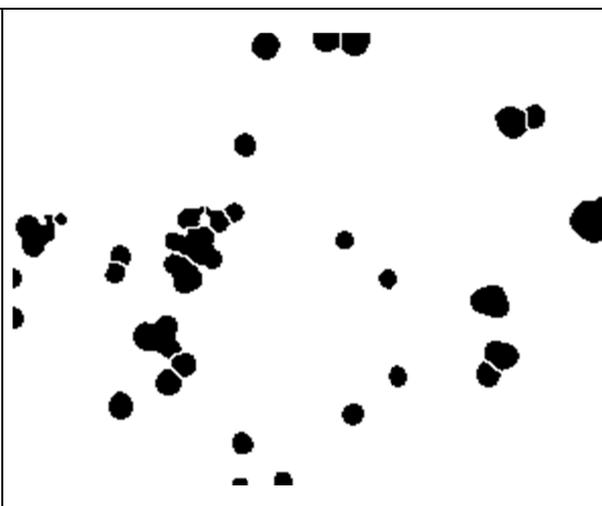
<p>1. 必要なら、opencv や機械学習等を試してみる。</p> <p>2. もしくは手動。</p>	
---	--

3. 画像二値化

<p>1. 大津法で閾値を決め、二値化。 <code>setAutoThreshold("Otsu dark");</code></p>	
<p>2. 上手く行かない場合は他の方法で閾値を決め、二値化。 <code>setAutoThreshold("RenyiEntropy dark");</code></p>	

<p>3. 以上で上手くいかない場合は手動で閾値を決め、二値化。</p> <pre>setThreshold(46, 255);</pre>	
--	--

4. 粒子輪郭抽出

<p>1. 上記の二値化で不十分な場合は watershed で境界を抽出。</p> <pre>run("Watershed");</pre>	
<p>2. もしくは opencv や機械学習で検討。</p>	
<p>3. 上手くいかない場合は手動で抽出。</p>	

E.3 (本文 表 2 機関 j の詳細)

解析の準備

使用する解析ソフト: Fiji (ImageJ)

- ・基本的な操作については下を参照

ImageJ.net

<http://imagej.net/Welcome>

ImageJ 日本語情報

<http://seesaawiki.jp/w/imagej/>

- ・使用する Fiji プラグイン

Bilateral filter

Trainable Weka Segmentation

http://imagej.net/Trainable_Weka_Segmentation

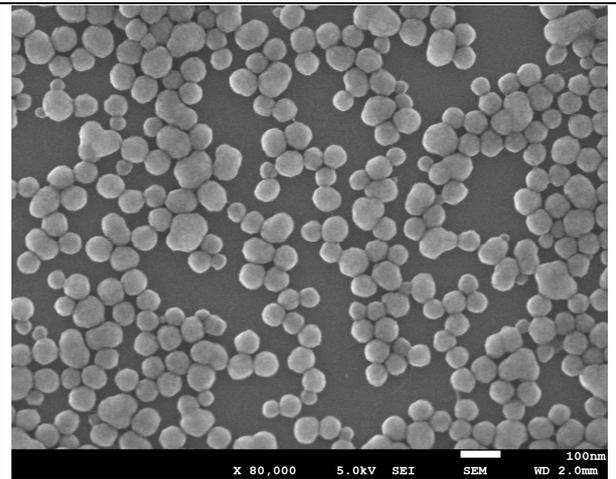
Statistical Region Merging

http://imagej.net/Statistical_Region_Merging

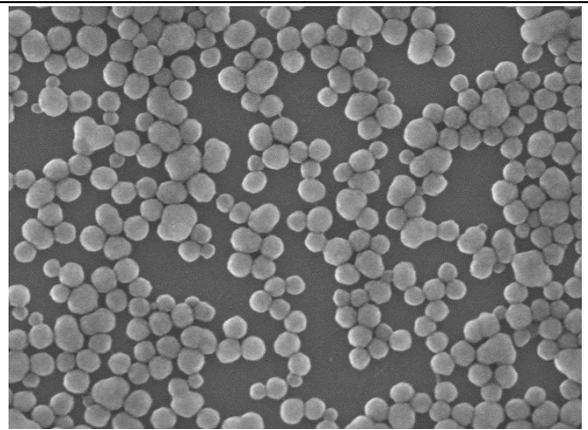
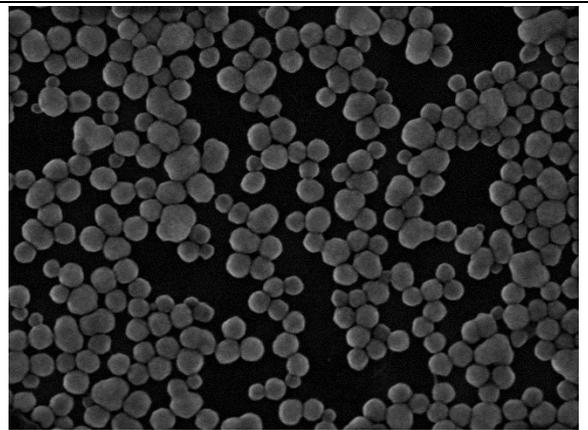
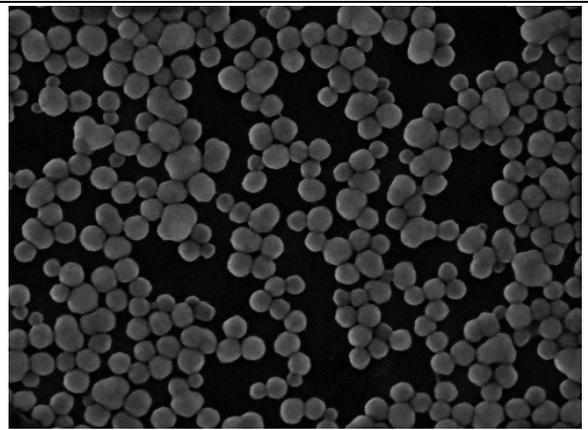
解析対象

本文書は右の様な比較的凝集度の高い SiO₂ 粒子画像からなる画像セット(画像解析 RRT データセット f)を想定して、Fiji を用いた粒径分布解析手順を各段階での画像を示しながら説明する。

なお、画像は Fiji macOS 版 ver. 2.0.0/1.51s を使用した例である。



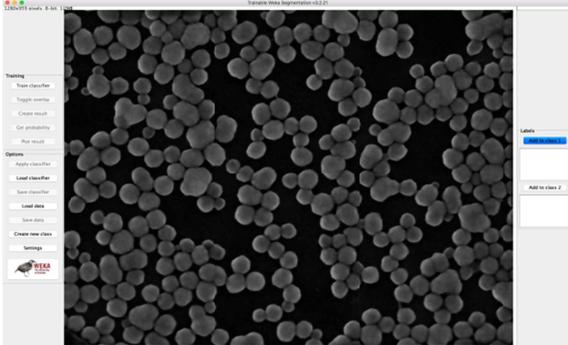
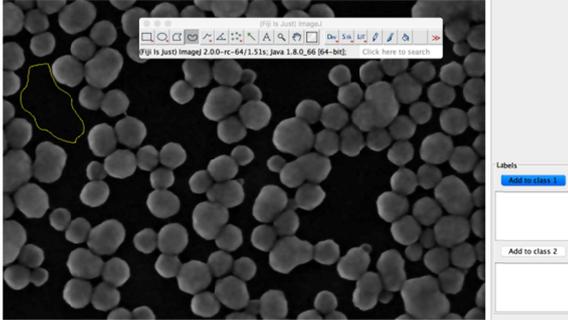
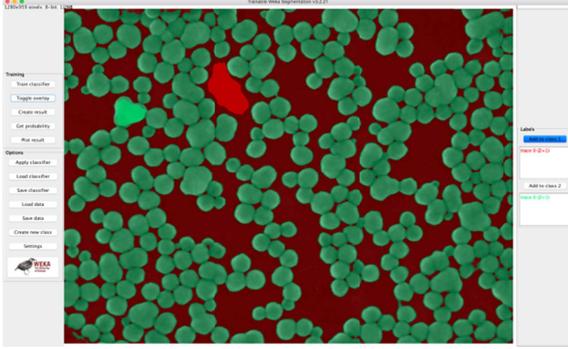
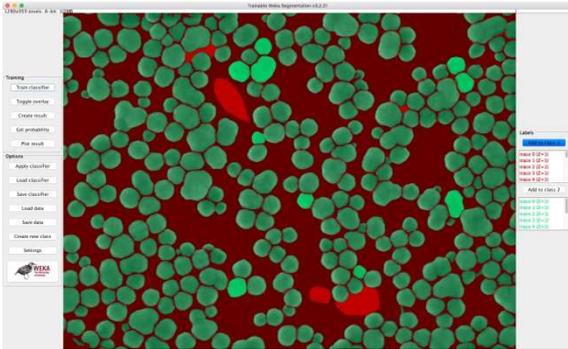
1. 画像前処理

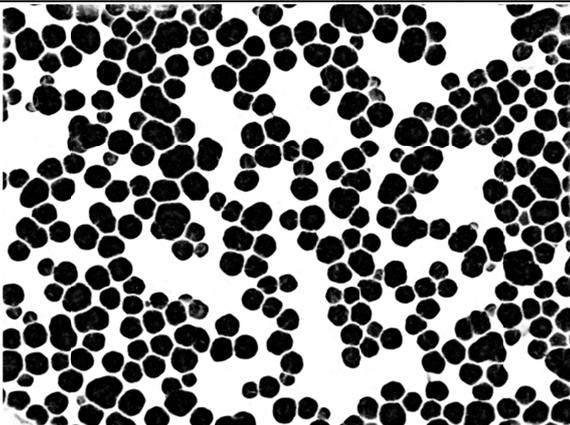
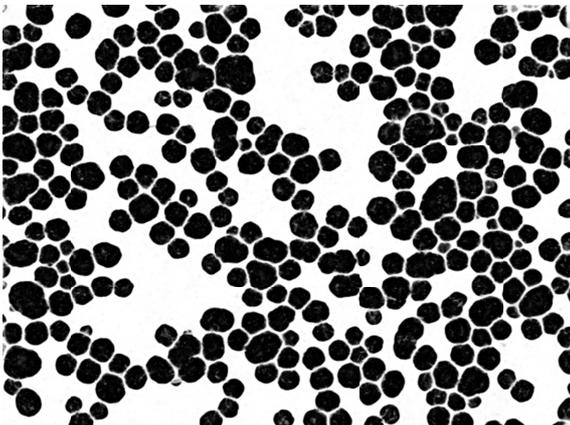
<p>1.1 画像のトリミング</p> <p>Fiji(ImageJ)で元画像をロード。Rectangle ツールで解析範囲を選択し、</p> <p>Image > Crop</p> <p>で字幕部を除去する。</p>	
<p>1.2 Background 除去</p> <p>上部メニューより</p> <p>Process > Subtract background</p> <p>Rolling ball radius: 80 px</p> <p>を実行し、バックグラウンドを除去する。</p>	
<p>1.3 Bilateral filter</p> <p>フィルタ処理により画像の平滑化を行う。上部メニューの</p> <p>Plug-ins > Process ></p> <p>Bilateral filter</p> <p>を実行。パラメータは以下を入力。</p> <p>spatial radius: 3px</p> <p>range radius: 50 px</p> <p>得られた画像を Tiff 形式で保存する。</p>	

上記 1.の作業を全ての画像に対して実施する。

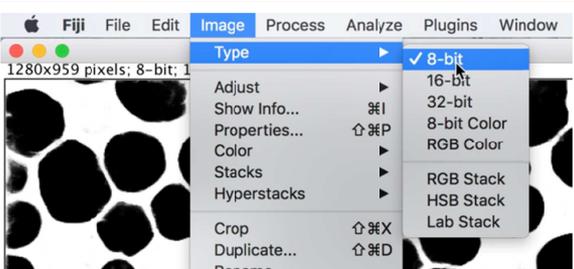
2. セグメンテーション

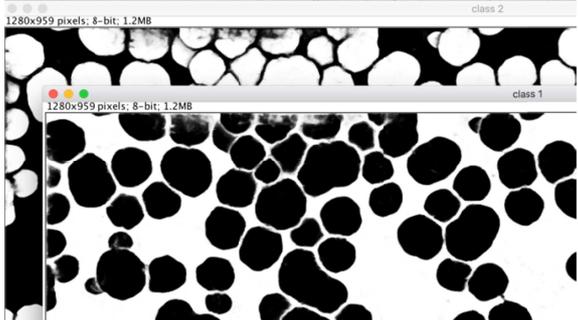
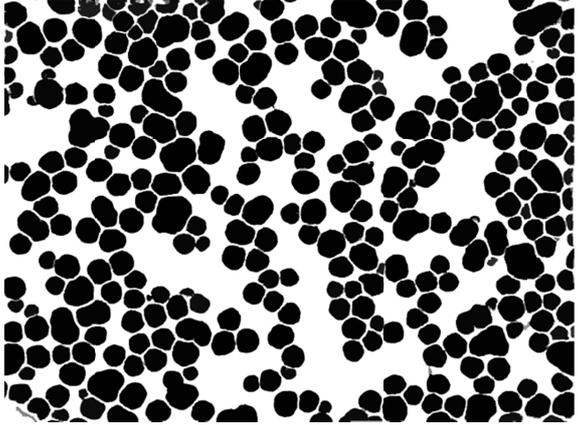
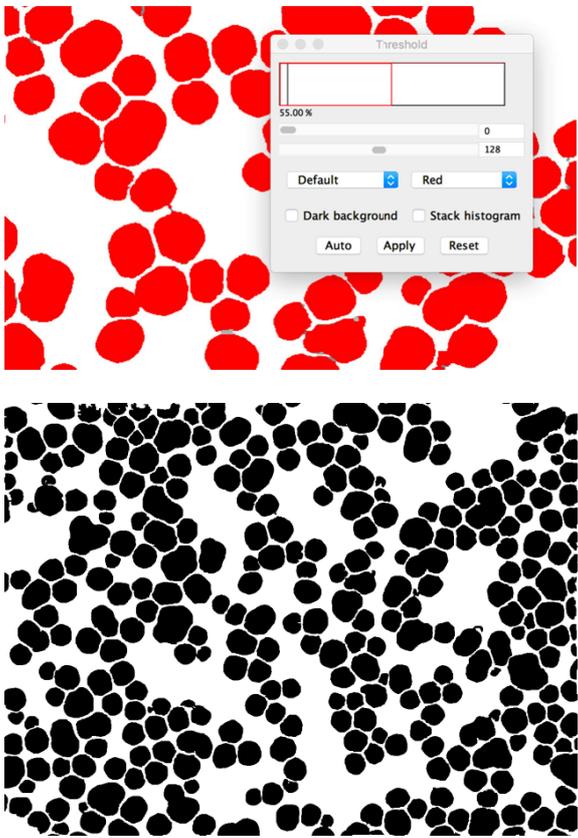
画像二値化 1.3 で保存した画像を1枚選択し、この画像を教示データとして用い trainable classifier をトレーニング・画像解析を行い、背景から粒子を分離した probability map を得る。

<p>2.1 セグメンテーションプログラムを起動</p> <p>1.3 で保存した画像を 1 枚開いた状態で、上部メニューの Plug-ins > Segmentation > Trainable Weka Segmentation を実行。</p>	
<p>2.2 Classifier のトレーニング(1)</p> <p>教示データ作成</p> <p>“ Polygon selection ” や “ Freehand selection ”、“Freehand Line” ツールで背景/粒子に対応する範囲を選択し、“Add to class”ボタンで対応する class に登録。これにより学習に使われる教示データが作成される。この例では背景が class 1 (赤) 粒子が class 2 (緑)。</p>	
<p>2.3 Classifier のトレーニング(2)</p> <p>“Train classifier”ボタンでセグメンテーションを実行。学習に基づくClassifierの判断により画像全体が薄い赤、緑に色分けされる。</p>	
<p>2.4 Classifier のトレーニング(3)</p> <p>粒子を選択・分離ができるようになるまで、教示データとなる領域を増やしながら 2.2, 2.3 を繰り返す。各クラスのデータ数(ピクセル数)は同じくらいとするのが良い。各クラスのデータ数は log ウィンドウに “# of pixels selected as class 1: xxxx” として表示される。RRT では各クラス約 40,000 px を教示データとして使用した。</p>	

<p>2.5 Probability map の作成</p> <p>“Get probability”ボタンから Probability map を作成する。2 枚の画像がスタックした 32 bit のグレースケール画像が出力されるので、これを tiff 形式で保存。</p> <p>Probability map はそのピクセルが Class 1 (Class 2)である確率をグレースケールで表示している。</p>	
<p>2.6 他の画像の解析</p> <p>トレーニングした classifier を他の画像にも適用し Probability map を得る。“Apply classifier” ボタンより、1.3 で保存した画像を選択、“Create probability maps instead of segmentation?”に対しては「Yes」で進む。</p> <p>選択した画像の Probability map が出力されるのでこれを tiff で保存する。</p> <p>この操作を繰り返し、全ての画像について Probability map を得る。</p> <p>解析対象となる画像の特徴が、トレーニングに用いた画像と大きく異なると、解析が上手くいかない場合がある。このような場合には特徴の似た画像ごとにトレーニング・解析を行うなどの処理が必要となる。</p>	

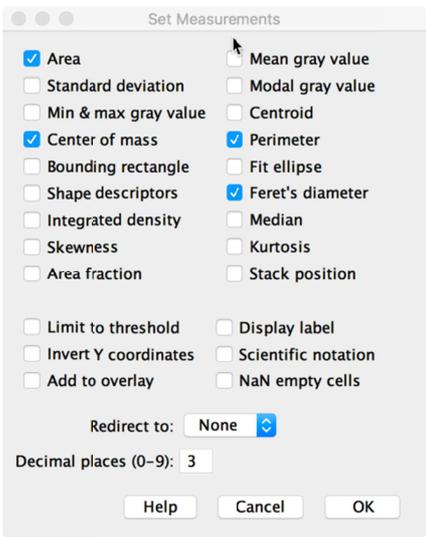
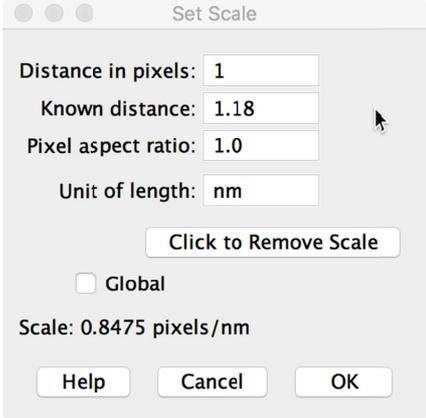
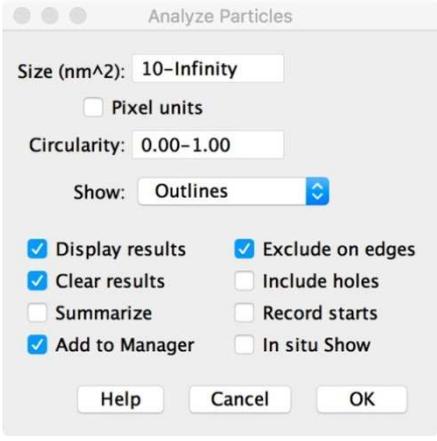
3. 画像二値化セグメンテーションで得られた Probability map を Statistical region merging で一旦多値化してから二値化し、粒子輪郭抽出の為の準備を行う。

<p>3.1 Probability map の 8 bit 化</p> <p>2.で得た probability map を開いた状態で上部メニューの</p> <p>Image > Type > 8-bit</p> <p>を選択し、画像を 8bit 化する。</p>	
--	--

<p>3.2 Stack の分割</p> <p>上部メニューの Image > Stacks > Stack to image を実行し、class 1 および class 2 の独立した probability map に分割する。 粒子が黒く表示される方の画像(class 1)を tiff 形式で保存する。</p>	
<p>3.3 画像多値化</p> <p>3.2 で保存した画像に対して上部メニューから Plug-ins > Segmentation > Statistical Region Merging Q:4 として実行。数段階にグレースケールで色分けされた画像が 32 bit で出力される。これを 3.1 同様に Image > Type > 8-bit より 8 bit 化する。</p>	
<p>3.4 画像二値化</p> <p>閾値を選択し、上で得られた画像を二値化する。</p> <p>Image > Adjust > Threshold より、右の閾値設定ウィンドウを表示する。粒子は黒であるので、“Dark background”のチェックを外し、下側のスライダーで適切に上限を調節し”Apply”ボタンを押し画像を二値化する。二値化した画像を tiff 形式で保存する。</p>	

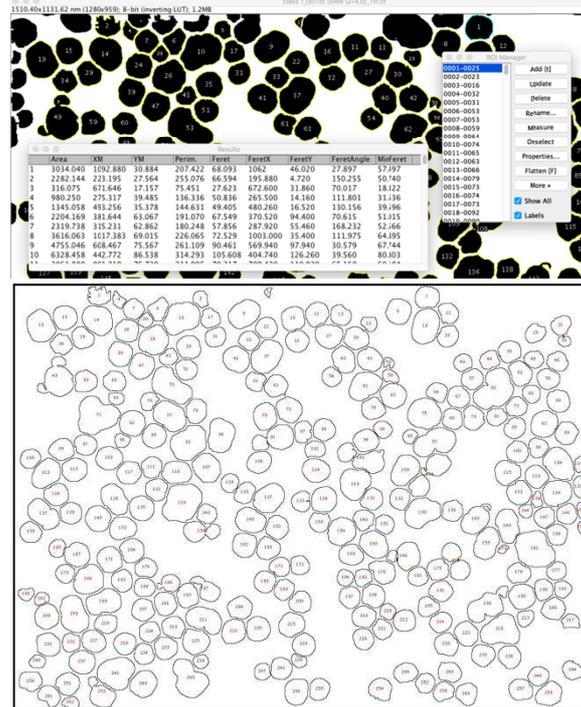
4. 粒子輪郭抽出

ImageJ のビルトイン機能を用いて粒子の輪郭抽出、粒径計測を行う。

<p>4.1 測定項目の設定</p> <p>上部メニューの Analyze > Set Measurements より、出力される測定量を設定する。右の 画像は RRT の時の例。</p>	
<p>4.2 ピクセルサイズの設定</p> <p>上部メニューの Analyze > Set Scale よりピクセルサイズを設定する。右の画像 は RRT の時の例。 場合によっては”Click to Remove Scale”で ピクセルサイズ情報を除去して、単純に px で出力させることもできる。この場合、最終 的な報告値の単位に注意する。</p>	
<p>4.2 粒子解析</p> <p>上部メニューの Analyze > Particles より粒子解析を実行する。 Size, Circularity はそれぞれサイズフィル タ、真円度フィルタであり、指定した範囲内 の粒子のみを検出する。サイズフィルタを 利用する場合には単位に注意する。</p>	

4.3 粒子解析結果の表示

解析処理が完了すると、粒子輪郭像、解析結果表(Results)、ROI manger が表示されるので、必要に応じてこれらを保存する。



4 誤検出粒子の手動除去

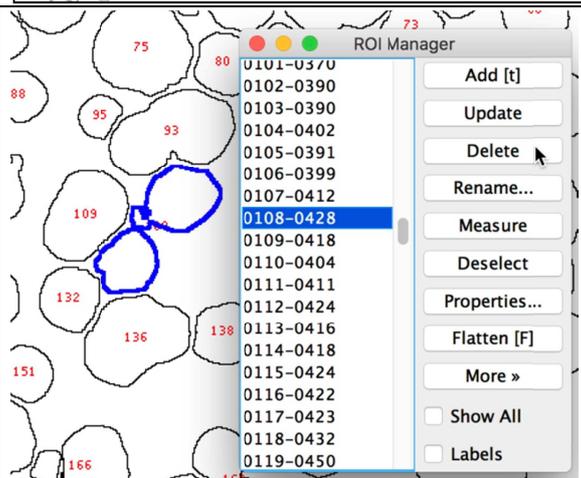
粒子輪郭像を見ながら明らかな誤分割・誤検出を除去する。

[表計算ソフト]

4.3 で得られた解析結果表を Excel などの表計算ソフトで開き、輪郭像を見ながら誤分割・誤検出された粒子を選別する。

[ROI Manager]

4.3 で出力された輪郭像をアクティブにした状態で、ROI Manager のリストを選択すると対応する粒子輪郭が強調表示される。誤分割・誤検出粒子は、ROI Manager の”Delete”ボタンでこれを除く。誤検出粒子を除去後、ROI Manager 上の全ての粒子を選択し、”Measure”ボタンで、これらの粒子についての解析結果が出力される。この結果は 4.3 の Results の表に追記されるので注意。事前に表を選択し上部メニューの Results > Clear Results で表の内容を消去しておくなどすると良い。



2019年4月

一般社団法人 ナノテクノロジービジネス推進協議会
社会受容・標準化委員会
ナノ材料の実用的計測評価WG / 粒径分布計測プロトコルWG

無断配布、本書の改編、改ざん及び転売を禁じます。
引用する場合は、必ず出展を明記願います。

〒101-0062
東京都千代田区神田駿河台 1-8-11
東京 YWCA 会館 3 階
03-3518-9811(代表)
<http://www.nbcj.jp/>